

การคัดกรองและลักษณะสมบัติของไลเพสจากแบคทีเรียชอบเค็มปานกลาง



นายศุภฤกษ์ เยี่ยมสมบัติ

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2560

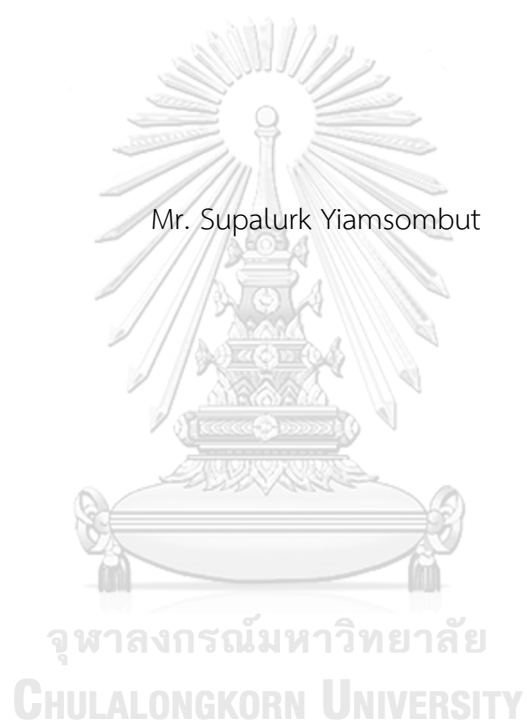
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

SCREENING AND CHARACTERIZATION OF LIPASE FROM
MODERATELY HALOPHILIC BACTERIA

Mr. Supaluk Yiamsombut



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

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2017

Copyright of Chulalongkorn University



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดกรองและลักษณะสมบัติของไลเปสจากแบคทีเรีย ชอบเค็มปานกลาง
โดย	นายศุภฤกษ์ เขี่ยมสมบัติ
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ ดร.อัญชริตา อัครจรัสญา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์ ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิช)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์ ดร.อัญชริตา อัครจรัสญา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ศาสตราจารย์ ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป นภทร)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.เพลินพิศ ลักษณะนิล)

ศุภฤกษ์ เยี่ยมสมบัติ : การคัดกรองและลักษณะสมบัติของไลเปสจากแบคทีเรียชอบเค็มปานกลาง (SCREENING AND CHARACTERIZATION OF LIPASE FROM MODERATELY HALOPHILIC BACTERIA) อ.ที่ปรึกษา วิทยาลัยนานาชาติ : ศ. ดร.อัญชรีดา อัครจรลัญญา, อ.ที่ปรึกษาวิทยาลัยนานาชาติร่วม: ศ. ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์, หน้า.

ในการคัดแยกแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางจำนวนทั้งหมด 77 สายพันธุ์ จากตัวอย่างกะปิทั้งหมด 8 ตัวอย่าง ที่เก็บจากตลาดสดมหาชัย จังหวัดสมุทรสาคร จากการคัดกรองสร้างเอนไซม์ไลเปสบนอาหารแข็งที่มีสับเสตรทเป็น Tween 20, 40, 60, 80 และ tributyrin พบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 61 สายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ และมีแบคทีเรียจำนวน 23 สายพันธุ์ สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้เมื่อนำมาคัดกรองการผลิตเอนไซม์ไลเปสในอาหารเหลวที่มีสับเสตรทเป็น *p*-Nitrophenyl butyrate (*p*-NPB) จึงได้คัดเลือกตัวแทนแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางที่มีเอกลักษณ์การผลิตเอนไซม์ไลเปสจำนวน 12 ไอโซเลท และไอโซเลทที่ไม่มีเอกลักษณ์จำนวน 26 ไอโซเลท ในอาหารเหลวมาศึกษาลักษณะทางฟิโนไทป์และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบว่าสามารถจัดกลุ่มแบคทีเรียตัวแทนที่ย้อมติดสีแกรมบวกทั้งหมด 38 ไอโซเลทได้เป็นทั้งหมด 9 สกุล ได้แก่ สกุล *Oceanobacillus* (2 สายพันธุ์), *Virgibacillus* (2 สายพันธุ์), *Halobacillus* (2 สายพันธุ์), *Thalassobacillus* (2 สายพันธุ์), *Bacillus* (5 สายพันธุ์), *Staphylococcus* (9 สายพันธุ์), *Salinicoccus* (12 สายพันธุ์), *Nesterenkonia* (2 สายพันธุ์) และ *Allobacillus* (2 สายพันธุ์) จากการศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานแบบโพลีฟาสติกของ *Allobacillus* sp. 2 สายพันธุ์ ได้แก่ SKP4-8 และ SKP8-2 จัดเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ ซึ่งมีผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA ของสายพันธุ์ SKP4-8 และ SKP8-2 ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *Allobacillus halotolerans* B3A^T เป็น 99.14 และ 98.80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และทั้ง 2 สายพันธุ์ มีความคล้ายคลึงของ DNA เป็น 46.6 ถึง 56.8 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับ *Allobacillus halotolerans* B3A^T ตามลำดับ จึงสามารถเสนอทั้ง 2 สายพันธุ์ เป็นแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางสปีชีส์ใหม่ชื่อว่า *Allobacillus saliphilus*

จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสของสายพันธุ์ SKP5-4 ซึ่งพิสูจน์เอกลักษณ์ได้เป็น *Virgibacillus halodenitrificans* และพบที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดในระยะ stationary phase เมื่อเลี้ยงในอาหารตัดแปลงสูตร JCM no. 377 ที่ความเข้มข้นเกลือ 5 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 8.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมง แล้วทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค acetone precipitation, anion exchange chromatography พบว่าไลเปสที่ได้มีความบริสุทธิ์ขึ้นถึง 11.6 เท่า มีขนาดมวลโมเลกุล 50, 43, 30 และ 12 กิโลดาลตันและลักษณะสมบัติของเอนไซม์ไลเปสสามารถทำงานได้ดีที่สุดในสภาวะที่พีเอช 7.0 ความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นอกจากนี้เอนไซม์ยังมีความจำเพาะเจาะจงต่อสับเสตรท *p*-nitrophenyl butyrate (C4:0)

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2560

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5872065823 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS: LIPASE-PRODUCING BACTERIA / MODERATELY HALOPHILIC BACTERIA / 16S RDNA

SUPALURK YIAMSOMBUT: SCREENING AND CHARACTERIZATION OF LIPASE FROM MODERATELY HALOPHILIC BACTERIA. ADVISOR: PROF. ANCHARIDA AKARACHARANYA, Ph.D., CO-ADVISOR: PROF. SOMBOON TANASUPAWAT, Ph.D., pp.

Seventy-seven of lipase-producing halophilic bacteria from fermented shrimp pastes collected from Mahachai market, Samut Sakhon province were isolated. The strains were screened for their lipolytic activity using agar plates supplemented with Tween 20, 40, 60, 80 or tributyrin as substrates. Sixty-one strains showed lipase activity on agar plates while twenty-three strains showed lipase activity in broth when determined using *p*-Nitrophenyl butyrate (*p*-NPB) as substrate. Twelve strains that have activity and twenty-six strains that have no activity were selected as representatives for the identification. On the basis of phenotypic characteristics and 16S rRNA gene sequences, thirty-two strains were belonged to 9 genera including *Oceanobacillus* (2 strains), *Virgibacillus* (2 strains), *Halobacillus* (2 strains), *Thalassobacillus* (2 strains), *Bacillus* (5 strains), *Staphylococcus* (9 strains), *Salinicoccus* (12 strains), *Nesterenkonia* (2 strains) and *Allobacillus* (2 strains). The 16S rRNA gene sequences analysis indicated that strains SKP4-8 and SKP8-2 were closely related to *Allobacillus halotolerans* B3A^T 99.14 and 98.80%, respectively, and they exhibited 46.6 and 56.8 % DNA-DNA relatedness, respectively with *Allobacillus halotolerans* B3A^T. Based on polyphasic taxonomic study, *Allobacillus* sp., strains SKP4-8 and SKP8-2 were belonged to the novel species. They will be proposed as a new moderately halophilic species, namely *Allobacillus saliphilus*.

Strain SKP5-4 identified as *Virgibacillus halodenitrificans* was selected for lipase production and it could produce the maximum lipase at stationary phase in modified JCM no. 377 at 5% concentration, pH 8.0, 37 °C and 30 hours. The lipase of SKP5-4 was purified by cold acetone precipitation and anion exchange chromatography with 11.6-fold purification. The purified lipase was the protein with molecular mass of about 50, 43, 30 and 12 kDa. The enzyme had a maximal activity in the present pH 7.0, 2% of NaCl and at 40 °C. The enzyme exhibited specific activity especially with *p*-nitrophenyl butyrate (C4:0).

Field of Study: Biotechnology

Academic Year: 2017

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลือของ ศาสตราจารย์ ดร.อัญชริดา สวารุช อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์และ ศาสตราจารย์ ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ ที่ปรึกษาร่วม ที่คอยดูแลให้ความรู้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนตรวจแก้ต้นฉบับวิทยานิพนธ์ ซึ่งผู้วิจัยมีความซาบซึ้งและขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ. ที่นี้ด้วย

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิช และรองศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป นภทร ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการและกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ตลอดจนช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณ ดร.เพลินพิศ ลักษณะนิล จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่กรุณาเป็นกรรมการ (ผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอก) ในการสอบวิทยานิพนธ์และคอยแนะนำให้มีความรู้และคำแนะนำต่างๆ ตลอดจนช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณ ดร.วรรณพ วิเศษสงวน และศูนย์นวัตกรรมอาหารและอาหารสัตว์ (Food and Feed Innovation Center) ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการทำวิจัยตลอดจนให้ความรู้และคำแนะนำแก่ผู้วิจัยตลอดมา

เนื่องจากงานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก Research Pyramid, Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund (GCURP_58_01_33_01), จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบพระคุณ ดร.รังสิมา ดรุณพันธ์ และเพื่อนพี่น้อง คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่คอยดูแล ให้ความช่วยเหลือ ความรู้และคำแนะนำ รวมทั้งกำลังใจที่ดีแก่ผู้วิจัยตลอดมา

สุดท้ายขอกราบพระคุณบิดา มารดาและน้องชาย ที่เป็นกำลังใจให้คำปรึกษาและคอยสนับสนุนแก่ผู้ทำวิจัยตลอดมาจนประสบความสำเร็จในการศึกษาต่อระดับปริญญาโท

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 แบคทีเรียชอบเค็ม (halophilic bacteria)	3
2.2 แหล่งที่พบแบคทีเรียชอบเค็ม.....	4
2.3 เอนไซม์ไลเปส.....	6
2.4 แหล่งของเอนไซม์ไลเปส	8
2.4.1 เอนไซม์ไลเปสจากสัตว์	8
2.4.2 เอนไซม์ไลเปสจากพืช	8
2.4.3 เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์.....	8
2.5 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปส	10
2.6 การทำเอนไซม์ไลเปสให้บริสุทธิ์.....	13
2.6.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulphate precipitate).....	14
2.6.2 การตกตะกอนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์.....	15
2.6.3 วิธีโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ions-exchange chromatography).....	15
2.6.4 วิธีโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิวเตรชัน (gel filtration chromatography).....	16
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	18

3.1	วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี	18
3.1.1	วัสดุอุปกรณ์.....	18
3.1.2	อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	19
3.1.3	สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	20
3.2	ขั้นตอนและวิธีดำเนินการวิจัย	22
3.2.1	เก็บตัวอย่าง.....	22
3.2.2	คัดแยกแบคทีเรียชอบเค็มปานกลาง	22
3.2.3	คัดกรองแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส	23
3.2.3.1	คัดกรองแบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสบนอาหารแข็ง.....	23
3.2.3.2	คัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสในอาหารเหลว	23
3.2.4	พิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียชอบเค็มปานกลาง	24
3.2.4.1	การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์.....	24
3.2.4.2	การศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์	25
3.2.4.3	ศึกษาอนุกรมวิธานเคมี (chemotaxonomy characterization)	27
3.2.5	ภาวะที่เหมาะสมของการผลิตในระดับขวดเขย่าและสมบัติของเอนไซม์ไลเปสจาก สายพันธุ์ที่คัดเลือก	27
3.2.5.1	ผลของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส.....	27
3.2.5.2	ผลของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส.....	27
3.2.5.3	ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไล เปส.....	28
3.2.5.4	ผลของความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส.....	28
3.2.5.5	ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส	28
3.2.5.6	ผลของระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส	28
3.2.6	ศึกษาการทำเอนไซม์ไลเปสให้บริสุทธิ์ (lipase purification)	29

3.2.6.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยอะซิโตน (acetone precipitation)	29
3.2.6.2 การแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange chromatography).....	29
3.2.7 ศึกษาสมบัติของเอนไซม์ไลเปส	30
3.2.8 ตรวจสอบรูปแบบโปรตีนด้วยเทคนิค Native-PAGE และ Zymogram	30
3.2.9 วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน	30
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผล	31
4.1 ผลการเก็บตัวอย่างและคัดแยกแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางจากอาหารหมัก.....	31
4.2 ผลการคัดกรองแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส	32
4.2.1 ผลการคัดกรองแบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสบนอาหารแข็ง	32
4.2.2 ผลการคัดกรองแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสในอาหารเหลว.....	34
4.3 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียชอบเค็มปานกลาง.....	37
4.4 ผลการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในระดับขวดเขย่าของการผลิตและสมบัติของเอนไซม์ไลเปสจากสายพันธุ์ที่คัดเลือก	61
4.4.1 ผลการศึกษาปัจจัยที่แปรผันแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส	61
4.4.2 ผลการศึกษาปัจจัยที่แปรผันแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส	62
4.4.3 ผลการศึกษาปัจจัยความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส	63
4.4.4 ผลการศึกษาปัจจัยของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส	64
4.4.5 ผลการศึกษาปัจจัยของอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส.....	65
4.4.6 ผลการศึกษาปัจจัยของเวลาที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส.....	66
4.5 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์	67
4.5.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยอะซิโตน	67

4.5.2 ผลการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ.....	67
4.6 ผลการตรวจสอบรูปแบบโปรตีนด้วยเทคนิค Native-PAGE และ Zymogram	68
4.7 ผลการทดสอบคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส.....	70
4.7.1 ผลการทดสอบพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส	70
4.7.2 ผลการทดสอบความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการทำงานของ เอนไซม์ไลเปส	71
4.7.3 ผลการทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส	72
4.7.4 ผลการทดสอบสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส	73
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	74
.....	78
รายการอ้างอิง	78
ภาคผนวก ก.....	87
ภาคผนวก ข.....	93
ภาคผนวก ค.....	97
ภาคผนวก ง.....	102
ภาคผนวก จ.....	106
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	130

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	กลุ่มแบคทีเรียชอบเค็มตามระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการเจริญ	4
ตารางที่ 2	แหล่งที่พบและสปีชีส์ของแบคทีเรียชอบเค็มปานกลาง.....	5
ตารางที่ 3	จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ใช้ในทางการค้า	9
ตารางที่ 4	ผลิตภัณฑ์ ปฏิบัติการและการประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสในอุตสาหกรรม.....	11
ตารางที่ 5	การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากจุลินทรีย์	12
ตารางที่ 6	เทคนิคการทำเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางให้บริสุทธิ์.....	13
ตารางที่ 7	Functional group ของ ion-exchange	16
ตารางที่ 8	วิธีการแยกสารตามคุณสมบัติ.....	17
ตารางที่ 9	ชนิดตัวอย่าง แหล่งสถานที่เก็บ รหัสตัวอย่าง รหัสไอโซเลทและจำนวน	31
ตารางที่ 10	ชนิดตัวอย่าง แหล่งสถานที่เก็บ รหัสตัวอย่าง รหัสไอโซเลทและจำนวน (ต่อ).....	32
ตารางที่ 11	แอกทิวิตีของเอนไซม์ไลเปสในอาหารแข็งที่มีสับสเตรทที่แตกต่างกัน	33
ตารางที่ 12	ผลแอกทิวิตีของเอนไซม์ไลเปสในอาหารเหลวและไอโซเลทที่นำไปวิเคราะห์ 16S rRNA gene	35
ตารางที่ 13	ผลแอกทิวิตีของเอนไซม์ไลเปสในอาหารเหลวและไอโซเลทที่นำไปวิเคราะห์ 16S rRNA gene (ต่อ).....	36
ตารางที่ 14	ลักษณะทางฟีโนไทป์ที่แตกต่างของสายพันธุ์กลุ่ม <i>Oceanobacillus</i> , <i>Virgibacillus</i> , <i>Halobacillus</i> และ <i>Thalassobacillus</i>	42
ตารางที่ 15	ลักษณะทางฟีโนไทป์ที่แตกต่างของสายพันธุ์กลุ่ม <i>Bacillus</i>	44
ตารางที่ 16	ลักษณะทางฟีโนไทป์ที่แตกต่างของสายพันธุ์กลุ่ม <i>Staphylococcus</i>	47
ตารางที่ 17	ลักษณะทางฟีโนไทป์ที่แตกต่างของสายพันธุ์กลุ่ม <i>Salinicoccus</i> และ <i>Nesterenkonia</i>	51
ตารางที่ 18	ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ SKP4-8 และ SKP8-2 เทียบกับสายพันธุ์ <i>Allobacillus halotolerans</i> B3A ^T	56

ตารางที่ 19 องค์ประกอบหลักของกรดไขมันระหว่างสายพันธุ์ SKP4-8, SKP8-2 และ <i>Allobacillus halotolerans</i> B3A ^T	58
ตารางที่ 20 สรุปการทำเอนไซม์ไลเปสให้บริสุทธิ์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ SKP5-4	67



สารบัญรูปภาพ

ภาพที่ 1 แสดงปฏิกิริยาเร่งสลายของเอนไซม์ไลเปส	6
ภาพที่ 2 การชะตัวอย่างโปรตีนออกจากคอลัมน์ด้วย 1 M NaCl แบบ segments gradient	30
ภาพที่ 3 แอททิวิตีเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียชอบเค็มปานกลาง 23 ไอโซเลทในอาหารเหลว สูตรดัดแปลง JCM no. 377 ที่เติมสับสเตรท Tween 20 และ Tween 80.....	37
ภาพที่ 4 แผนภูมิวิวัฒนาการของสายพันธุ์ <i>Oceanobacillus</i> บนพื้นฐานของการเปรียบเทียบ บริเวณยีน 16S rRNA ด้วยวิธี Neighbor-joining	38
ภาพที่ 5 แผนภูมิวิวัฒนาการของสายพันธุ์ <i>Virgibacillus</i> บนพื้นฐานของการเปรียบเทียบบริเวณ ยีน 16S rRNA ด้วยวิธี Neighbor-joining	39
ภาพที่ 6 แผนภูมิวิวัฒนาการของสายพันธุ์ <i>Thalassobacillus</i> บนพื้นฐานของการเปรียบเทียบ บริเวณยีน 16S rRNA ด้วยวิธี Neighbor-joining	40
ภาพที่ 7 แผนภูมิวิวัฒนาการของสายพันธุ์ <i>Halobacillus</i> บนพื้นฐานของการเปรียบเทียบบริเวณ ยีน 16S rRNA ด้วยวิธี Neighbor-joining	41
ภาพที่ 8 แผนภูมิวิวัฒนาการของสายพันธุ์ <i>Bacillus</i> บนพื้นฐานของการเปรียบเทียบบริเวณ 16S rRNA ด้วยวิธี Neighbor-joining	45
ภาพที่ 9 แผนภูมิวิวัฒนาการของสายพันธุ์ <i>Staphylococcus</i> บนพื้นฐานของการเปรียบเทียบยีน บริเวณ 16S rRNA ด้วยวิธี Neighbor-joining	48
ภาพที่ 10 แผนภูมิวิวัฒนาการของสายพันธุ์ <i>Salinicoccus</i> บนพื้นฐานของการเปรียบเทียบยีน บริเวณ 16S rRNA ด้วยวิธี Neighbor-joining	52
ภาพที่ 11 แผนภูมิวิวัฒนาการของสายพันธุ์ <i>Nesterenkonia</i> บนพื้นฐานของการเปรียบเทียบยีน บริเวณ 16S rRNA ด้วยวิธี Neighbor-joining	53
ภาพที่ 12 เซลล์ย้อมติดสีแกรมบวกของสายพันธุ์ SKP4-8 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์บนอาหารสูตร ดัดแปลง JCM no. 377 บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง	55
ภาพที่ 13 เซลล์ย้อมติดสีแกรมบวกของสายพันธุ์ SKP8-2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์บนอาหารสูตร ดัดแปลง JCM no. 377 บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง	55

ภาพที่ 14 เซลล์ของสายพันธุ์ SKP4-8 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดบน อาหารสูตรดัดแปลง JCM no. 377 ที่เติม 10% (w/v) KCl และ 1.2% (w/v) MgSO ₄ ·7H ₂ O บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง	55
ภาพที่ 15 แผนภูมิวิวัฒนาการของสายพันธุ์ SKP4-8, SKP8-2 และ <i>Allobacillus</i> <i>halotolerans</i> B3A ^T บนพื้นฐานของการเปรียบเทียบยีนบริเวณ 16S rRNA ด้วยวิธี Neighbor-joining	57
ภาพที่ 16 องค์ประกอบหลักชั้นมีซัวของสายพันธุ์ SKP4-8.....	59
ภาพที่ 17 องค์ประกอบหลักของชั้นมีซัวของสายพันธุ์ SKP8-2.....	60
ภาพที่ 18 แอทวิตีเอนไซม์ไลเปสจากการแปรผันแหล่งคาร์บอนของสายพันธุ์ SKP5-4	62
ภาพที่ 19 แอทวิตีเอนไซม์ไลเปสจากการแปรผันแหล่งไนโตรเจนของสายพันธุ์ SKP5-4	62
ภาพที่ 20 แอทวิตีเอนไซม์ไลเปสจากการแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ของสายพันธุ์ SKP5-4	63
ภาพที่ 21 แอทวิตีเอนไซม์ไลเปสจากการแปรผันพีเอชของสายพันธุ์ SKP5-4.....	64
ภาพที่ 22 แอทวิตีเอนไซม์ไลเปสจากการแปรผันอุณหภูมิของสายพันธุ์ SKP5-4.....	65
ภาพที่ 23 แอทวิตีเอนไซม์ไลเปสจากการแปรผันเวลาของสายพันธุ์ SKP5-4.....	66
ภาพที่ 24 รูปแบบการทำเอนไซม์ไลเปสให้บริสุทธิ์จากสายพันธุ์ SKP5-4 ด้วยคอลัมน์ Hitrap DEAE FF.....	68
ภาพที่ 25 Partial purification of protein; Standard protein markers (Lane 1), Crude enzyme (Lane 2), Acetone precipitation (Lane 3), Hitrap DEAE FF (Lane 4) โดยเทคนิค Native-PAGE และ Hitrap DEAE FF (Lane 5), Positive control: wheat germ (Lane 6) โดยเทคนิค Zymogram	69
ภาพที่ 26 การทำงานของเอนไซม์ไลเปสในช่วงพีเอชที่เหมาะสม.....	70
ภาพที่ 27 การทำงานของเอนไซม์ไลเปสในความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสม	71
ภาพที่ 28 การทำงานของเอนไซม์ไลเปสในอุณหภูมิที่เหมาะสม	72
ภาพที่ 29 การทำงานของเอนไซม์ไลเปสในสับสเตรทจำเพาะ	73

บทที่ 1 บทนำ

เอนไซม์ไลเปส (Lipases/triacylglycerol acylhydrolase; EC 3.1.1.3) เป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มไฮโดรเลส มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ได้เป็นกลีเซอรอล (glycerol) และกรดไขมัน (fatty acid) เอนไซม์ไลเปสพบได้ทั่วไปทั้งในพืช สัตว์และจุลินทรีย์ โดยปัจจุบันเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ได้รับความสนใจอย่างแพร่หลาย และมีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมสารชะล้าง อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมบำบัดน้ำเสีย การผลิตกระดาษ การฟอกเครื่องหนัง การสังเคราะห์สารเคมีและยา เป็นต้น เนื่องจากจุลินทรีย์มีอัตราการเจริญเติบโตเร็ว มีความคงทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์และมีต้นทุนต่ำในการผลิต ดังนั้นจุลินทรีย์จึงเป็นทางเลือกที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ ซึ่งกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่มีสภาวะที่รุนแรงและการเลือกใช้เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์จึงต้องมีคุณสมบัติทำงานได้ดีภายใต้สภาวะต่างๆ เช่น อุณหภูมิ pH ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์และตัวทำละลายอินทรีย์ ดังนั้นเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางจึงเป็นทางเลือกใหม่ที่น่าสนใจสำหรับกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรม เนื่องจากแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางเจริญได้ในสภาวะแวดล้อมที่มีเกลือตั้งแต่ 5 ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ และเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางสามารถทำงานได้ในช่วงของ pH อุณหภูมิและความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์หลายระดับ แบคทีเรียชอบเค็มปานกลางที่พบมีความหลากหลาย โดยเฉพาะที่ย้อมติดสีแกรมบวก ได้แก่ *Halobacillus halophilus* จากดินเค็ม, *Thalassobacillus devorans* จากตะกอนดินทะเล, *Oceanobacillus rezensis* จากดินเค็ม, และ *Virgibacillus alimentarius* จากน้ำบูดู แบคทีเรียชอบเค็มปานกลางแกรมลบ ได้แก่ *Chromohalobacter salexigens* จากนาเกลือ, *Idiomarina loihiensis* จากดินเค็ม และ *Marinobacter lipolyticus* จากดินเค็ม นอกจากนี้ในประเทศไทยยังมีการค้นพบแบคทีเรียชอบเค็มปานกลาง ได้แก่ *Halobacillus thailandensis* จากน้ำปลา, *Piscibacillus salipiscarius* จากปลาร้า, *Salinicoccus siamensis* จากกะปิ และ *Gracilibacillus thailandensis* จากปลาร้า เป็นต้น

จากการศึกษาลักษณะสมบัติของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางพบว่า มีลักษณะแตกต่างกันเช่นเอนไซม์ไลเปสของ *Virgibacillus alimentarius* LBU20907 พบว่ามีขนาด มวลโมเลกุล 100 กิโลดาลตัน ทำงานได้ดีที่สุดใน pH 7.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสและที่ความ เข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 20 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์ไลเปสของสายพันธุ์ *Salinivibrio* sp. SA-2 แสดง แอกทิวิตีเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่สุดในความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซ็นต์ pH 7.5 ถึง 8.0 และ อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส โดยมีค่าความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสอยู่ที่ 90 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที และเอนไซม์ไลเปสของสายพันธุ์ *Idiomarina* sp. W33 พบว่ามีมวลโมเลกุลขนาด 67 กิโลดาล ตัน สามารถทำงานได้ดีในช่วงของ pH 7.0 ถึง 9.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสและความเข้มข้น โซเดียมคลอไรด์ที่ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยมีการตรึงเอนไซม์ไลเปสนำไปประยุกต์ใช้ในการกระบวนการ ผลิตพลังงานทดแทน จากลักษณะสมบัติของเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางที่สามารถ ทำงานได้ในพีเอชที่กว้างและในอุณหภูมิสูงนี้ ทำให้เหมาะสมที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม ต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร ผงซักฟอก การผลิตกระดาษ การผลิตเครื่องสำอางและการบำบัดของ เสียมี่ไขมัน เป็นต้น

วัตถุประสงค์

1. คัดแยก คัดกรองและพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส
2. ศึกษาภาวะเหมาะสมของการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางสายพันธุ์ที่ คัดเลือกได้
3. ศึกษาลักษณะสมบัติของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แบคทีเรียชอบเค็ม (halophilic bacteria)

แบคทีเรียชอบเค็ม (Halophile; *Halo* = Salt, *Phile* = Love) คือ แบคทีเรียที่ต้องการเกลือ (sodium chloride: NaCl) ในการเจริญเติบโต ดังนั้นแบคทีเรียชอบเค็มจึงต้องอาศัยในสภาวะแวดล้อมที่มีโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญ ตั้งแต่ 1 ถึง 30 เปอร์เซ็นต์ (Ventosa & Nieto, 1995) แบคทีเรียชอบเค็มนอกจากอยู่รอดในสภาพแวดล้อมที่มีความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์แล้ว เซลล์ยังรักษาสมดุลโดยอาศัยสารอินทรีย์ที่เรียกว่า compatible solutes เช่น กรดอะมิโน น้ำตาล betaine ectoine และ glycine และการปรับสมดุลไอออนของโซเดียมคลอไรด์ที่อยู่ภายนอกเซลล์กับปริมาณไอออนของโพแทสเซียมคลอไรด์ภายในเซลล์ (Galinski, 1995; Schlesner, 2008)

การจัดกลุ่มของแบคทีเรียชอบเค็ม (Kushner, 1985) โดยแบ่งตามระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ดังตารางที่ 1 แบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 กลุ่มเป็นแบคทีเรียชอบเค็มน้อย (slight halophile) ส่วนใหญ่จัดเป็นแบคทีเรียจากทะเล ได้แก่ *Marinobacter* และ *Oceanobacillus* เจริญเติบโตได้ในช่วงของความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ ตั้งแต่ 1 ถึง 5 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มแบคทีเรียชอบเค็มปานกลาง (moderate halophile) ที่เจริญเติบโตได้ในช่วงความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ตั้งแต่ 5 ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ *Halobacillus*, *Lentibacillus*, *Gracilibacillus*, *Salinicoccus*, *Thalassobacillus* และ *Virgibacillus* และกลุ่มสุดท้ายแบคทีเรียชอบเค็มสูง (extreme halophile) ที่เจริญเติบโตได้ในช่วงความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ตั้งแต่ 20 ถึง 30 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ *Haloarcula*, *Halobacterium*, *Halococcus*, *Natronobacterium*, *Natronococcus* และ *Natrinema* เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในสภาวะแวดล้อมที่มีโซเดียมคลอไรด์และสภาวะแวดล้อมที่ไม่มีโซเดียมคลอไรด์ โดยเรียกแบคทีเรียกลุ่มนี้ว่า halotolerant ได้แก่ *Bacillus*, *Staphylococcus* และ *Micrococcus* เป็นต้น

ในการจัดกลุ่มแบคทีเรียชอบเค็มได้มีการแบ่งกลุ่ม โดยพิจารณาจากระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการเจริญ และตัวอย่างที่พบแบคทีเรียชอบเค็มปานกลาง ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 1 กลุ่มแบคทีเรียชอบเค็มตามระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการเจริญ

กลุ่มแบคทีเรีย	ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ โมลาร์ (เปอร์เซ็นต์)
แบคทีเรียชอบเค็มน้อย (slight halophile)	0.2 - 0.5 (1.16 - 2.9)
แบคทีเรียชอบเค็มปานกลาง (moderate halophile)	0.5 - 2.5 (2.9 - 14.6)
แบคทีเรียชอบเค็มสูง (extreme halophile)	2.5 - 5.2 (14.6 - 30.3)
แบคทีเรียทนเค็ม (halotolerant)	< 0.2 (< 1.16)

ที่มา: ดัดแปลงจาก (Imhoff, 1993)

2.2 แหล่งที่พบแบคทีเรียชอบเค็ม

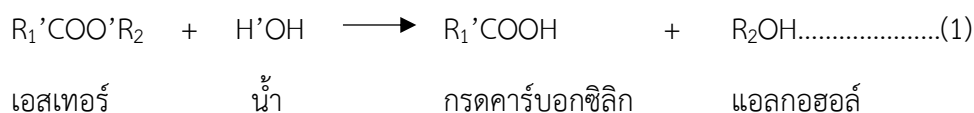
แบคทีเรียชอบเค็มปานกลางสามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อมที่มีเกลือทั่วไป เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้ต้องมีการปรับสภาพเพื่อให้สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในสิ่งแวดล้อมดังกล่าว ทำให้พบแบคทีเรียชอบเค็มปานกลาง ได้แก่ *Alkalibacillus haloalkaliphilus*, *Aquibacillus halophilus*, *Halomonas maura*, *Thalassobacillus devorans*, *Lentibacillus salaries*, *Marinobacter salexigens*, *Marinobacter aquaticus*, *Virgibacillus halophilus* และ *Virgibacillus salaries* จากดินเค็ม เกลือจากทะเลสาบและตะกอนดิน เป็นต้น และในสิ่งแวดล้อมที่มีเกลือที่มนุษย์สร้างขึ้น เช่น อาหารหมักซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์เป็นองค์ประกอบ พบแบคทีเรียชอบเค็มปานกลาง ได้แก่ *Oceanobacillus kapialis* และ *Virgibacillus kapii* จากกะปิ *Piscibacillus salipiscarius*, *Halobacillus thailandensis*, *Gracilibacillus thailandensis* จากปลาร้า *Salinicoccus siamensis*, *Salinivibrio siamensis*, *Lentibacillus kapialis*, *Lentibacillus halophilus*, *Lentibacillus salicampi*, *Lentibacillus juripiscarius* และจากน้ำปลา ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แหล่งที่พบและสปีชีส์ของแบคทีเรียชอบเค็มปานกลาง

แหล่งที่พบ	สปีชีส์	อ้างอิง
เกลือจากทะเลสาบ	<i>Virgibacillus salaries</i>	(Hua et al., 2008)
	<i>Aquibacillus halophilus</i>	(Amoozegar et al., 2014)
	<i>Alkalibacillus haloalkaliphilus</i>	(León et al., 2017)
	<i>Marinobacter aquaticus</i>	(Leon et al., 2017)
ดินเค็ม	<i>Halobacillus halophilus</i>	(Claus et al., 1983)
	<i>Halomonas maura</i>	(Bouchotroch et al., 2001)
	<i>Thalassobacillus devorans</i>	(Garcia et al., 2005)
	<i>Lentibacillus salaries</i>	(Jeon et al., 2005)
	<i>Virgibacillus halophilus</i>	(An et al., 2007)
	<i>Marinobacter salexigens</i>	(Han et al., 2017)
	กะปิ	<i>Lentibacillus kapialis</i>
<i>Salinicoccus siamensis</i>		(Pakdeeto et al., 2007b)
<i>Oceanobacillus kapialis</i>		(Namwong et al., 2009)
<i>Gracilibacillus thailandensis</i>		(Chamroensaksri et al., 2010)
<i>Virgibacillus kapii</i>		(Daroonpunt et al., 2016)
ปลาร้า	<i>Lentibacillus halophilus</i>	(Tanasupawat et al., 2006)
	<i>Piscibacillus salipiscarius</i>	(Tanasupawat et al., 2007)
	<i>Salinivibrio siamensis</i>	(Chamroensaksri et al., 2009)
น้ำปลา	<i>Halobacillus thailandensis</i>	(Chaiyanan et al., 1999)
	<i>Lentibacillus salicampi</i>	(Namwong et al., 2005)
	<i>Lentibacillus juripiscarius</i>	(Namwong et al., 2005)

การทำงานของเอนไซม์ไลเปสสามารถเร่งปฏิกิริยาหลักได้ 2 ชนิด

1. ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis)



เอนไซม์ไลเปสจะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสลายเอสเทอร์ด้วยน้ำ ได้กรดคาร์บอกซิลิกและแอลกอฮอล์เป็นผลิตภัณฑ์

2. ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ (synthesis)

- ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน (esterification)



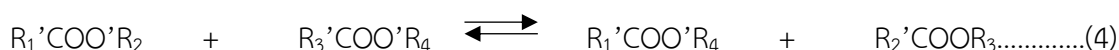
เอนไซม์ไลเปสจะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์ โดยการแทนที่หมู่ไฮดรอกซิล (OH group) ของกรดคาร์บอกซิลิกด้วยหมู่แอลคอกซิล (OR group) จากแอลกอฮอล์

- ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (transesterification)



เอนไซม์ไลเปสจะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการแทนที่ของหมู่แอลคอกซิล (OR₂ group) จากเอสเทอร์ A ด้วยหมู่แอลคอกซิล (OR₃ group) อีกตัวจากแอลกอฮอล์ A ได้เอสเทอร์และแอลกอฮอล์ชนิดใหม่เกิดขึ้นเป็นผลิตภัณฑ์

- ปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเทอริฟิเคชัน (interesterification)



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

2.4 แหล่งของเอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปสสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตทั่วไปได้ทั้งในพืช สัตว์และจุลินทรีย์ เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสมีความสำคัญต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมในการเจริญของสิ่งมีชีวิต (Sztajer et al., 1988) (ตารางที่ 3)

2.4.1 เอนไซม์ไลเปสจากสัตว์

พบได้ทั่วไปในเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ ของสัตว์ เช่น หัวใจ กล้ามเนื้อ สมอง ซีรัม ไตและตับอ่อน (pancreatic lipase) โดยตับอ่อนมีหน้าที่ย่อยสลายโมเลกุลในระบบย่อยอาหารของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น ตับอ่อนจากสุกร มีรายงานว่าตับอ่อนจากโค กระบือและหนู มีเอนไซม์ไลเปสจากน้ำนมแต่การทำให้บริสุทธิ์ไม่ค่อยเสถียรมากนัก เนื่องจากคุณสมบัติของเอนไซม์ไม่คงตัว (Steiner & Williams, 2002)

2.4.2 เอนไซม์ไลเปสจากพืช

เอนไซม์ไลเปสจากพืชมีความจำเพาะต่อสับสเตรทสูง ซึ่งจะไม่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและจุลินทรีย์ สามารถพบได้ในพืชจำพวกถั่วฝักยาว ดอกคาโนนา สบู่ดำ (Barbados nut) ถั่วลูปิน เมล็ดทานตะวัน เมล็ดอัลมอนด์ เมล็ดฝ้าย มะพร้าว ข้าวสาลี ข้าวโอ๊ต ธัญพืชและน้ำมันงา เป็นต้น (Barros et al., 2010) มีรายงานว่าเมล็ดข้าวโพด เมล็ดถั่วเหลือง มะกอก ข้าวสาลีและข้าวเจ้าเป็นแหล่งสำคัญของไลเปส โดยธรรมชาติของเมล็ดพืชสะสมไขมันไว้ใน lipid-bodies และ glyoxysomes ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่สามารถพบเอนไซม์ไลเปส (Huang, 1984)

2.4.3 เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์

เอนไซม์ไลเปสจากพืชถูกพบในเนื้อเยื่อที่ให้พลังงาน ส่วนเอนไซม์ไลเปสจากสัตว์ส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของไขมัน ได้แก่ กระบวนการย่อยสลายไขมัน การดูดซึมไขมันและกระบวนการเมตาบอลิซึมของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไขมันและโปรตีน ทำให้เกิดความซับซ้อนในการสกัดและเป็นข้อจำกัดในการนำมาใช้เป็นแหล่งเอนไซม์ ด้วยเหตุนี้แหล่งเอนไซม์ไลเปสจากพืชและสัตว์จึงไม่ค่อยนิยมใช้อย่างแพร่หลาย ต่างกับจุลินทรีย์โดยเฉพาะรา ยีสต์และแบคทีเรีย ซึ่งเป็นแหล่งของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกนำไปใช้อย่างมากมายในระดับอุตสาหกรรมทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ (Jaeger & Reetz, 1998) จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสสามารถพบได้ในแหล่งต่างๆ ในธรรมชาติ เช่น บริเวณน้ำเสียหรือดินที่ปนเปื้อนน้ำมันหรือไขมัน (Lee et al., 2015) (Costa & Peralta, 1999; Heravi et al., 2008) เมล็ดพืชไขมัน (Neal, 1946; Olney et al., 1968; Anzai et al., 1990; Sagiroglu & Arabaci, 2005; Yesiloglu & Baskurt, 2008)

ตารางที่ 3 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ใช้ในทางการค้า

แบคทีเรีย	รา	ยีสต์
<i>Achromobacter</i> sp.	<i>Aspergillus carneu</i>	<i>Pichia miso</i>
<i>A. lipolyticum</i>	<i>A. awamori</i>	<i>Proteus</i> sp.
<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>A. niger</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
<i>A. calcoaceticus</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>A. radioresistens</i>	<i>Geotrichum candidum</i>	<i>S. fragilis</i>
<i>Bacillus</i> sp.	<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	<i>S. lipolytica</i>
<i>B. alcalophilus</i>	<i>P. camemberti</i>	<i>S. fibuligera</i>
<i>B. megaterium</i>	<i>P. cyclopium</i>	<i>Torula thermophila</i>
<i>B. stearothermophilus</i>	<i>P. candidum</i>	
<i>B. subtilis</i>	<i>P. citrinum</i>	
<i>Chromobacterium violaceum</i>	<i>P. simplicissimum</i>	
<i>C. viscosum</i>	<i>P. solitum</i>	
<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>P. urticae</i>	
<i>L. plantarum</i>	<i>Rhizopus oligosporus</i>	
<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	<i>R. niveu</i>	
<i>P. fluorescens</i>	<i>R. oryzea</i>	
<i>P. fragi</i>	<i>R. chinensis</i>	
<i>P. mendocina</i>	<i>R. delemar</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>R. japonicus</i>	
<i>S. epidermidis</i>		
<i>S. haemolyticus</i>		
<i>S. warneri</i>		
<i>S. xylosum</i>		
<i>Serratia marcescens</i>		
<i>Vibrio cholerae</i>		

ที่มา (Gupta et al., 2004) และ (Singh & Mukhopadhyay, 2012)

2.5 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปส

ปัจจุบันอุตสาหกรรมเอนไซม์เติบโตและมีความสำคัญอย่างมาก เห็นได้ชัดตลอด 3 ทศวรรษที่ผ่านมา เอนไซม์ที่พบในธรรมชาติมีการใช้งานมาตั้งแต่สมัยโบราณจนถึงปัจจุบันมีการผลิตผลิตภัณฑ์มากมาย ส่วนใหญ่กระบวนการเหล่านี้อาศัยเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ ทำให้มีวิวัฒนาการของเครื่องมือและเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่และยังมีแนวโน้มอย่างยิ่งในระดับอุตสาหกรรมที่จะพบเอนไซม์ไลเปสชนิดใหม่ ซึ่งในการพัฒนานี้เองได้นำเอนไซม์เข้ามาประยุกต์ใช้ในโรงงานอุตสาหกรรม เช่น สารชะล้าง สารทำความสะอาด ฟอกเครื่องหนัง ผลิตภัณฑ์อาหารและยา (Aravindan et al., 2007) (ตารางที่ 5)

กรดไขมันที่เกิดขึ้นจากผลิตภัณฑ์แต่ละชนิด โดยเฉพาะพวกที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำและระเหยได้ เช่น acetic acid, propionic acid, butyric acid, valeric acid และ caproic acid จะมีกลิ่นเฉพาะตัวและทำให้เกิดกลิ่นที่ตึขึ้นในผลิตภัณฑ์อาหารชนิดต่างๆ ดังนั้นเอนไซม์ไลเปสจึงถูกนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงกลิ่นในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ เช่น โยเกิร์ต เนยแข็งและไส้กรอก เป็นต้น (Jaeger et al., 1994)

จากการศึกษาในปี 1994 ของบริษัท Nova Nordisk มีการเริ่มทำ recombinant เป็นครั้งแรก จากราสายพันธุ์ *Thermomyces lanuginosus* โดยให้เอนไซม์ไลเปสในสายพันธุ์ *Aspergillus oryzae* ได้ผลิตออกมาเป็นผลิตภัณฑ์ยี่ห้อ Lipolase® และในปีถัดมาบริษัท Genencor ได้ออกผลิตภัณฑ์ Lumafast® จากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Pseudomonas mendocina* และผลิตภัณฑ์ Lipomax® จากแบคทีเรียสายพันธุ์ *P. alcaligenes* เป็นต้น การนำเอนไซม์เข้าร่วมกับปฏิกิริยาต่างๆ ของเอนไซม์ไลเปสมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม (ตารางที่ 4)

จากการศึกษาเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย *Staphylococcus lipolyticus* สายพันธุ์ SS-33 ที่คัดแยกได้จากตะกอนทะเล พบว่าเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์ มีขนาดมวลโมเลกุล 67 กิโลดาลตัน เอนไซม์ไลเปสมีแอกทิวิตี้ได้ดีที่สุดในอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสและ pH 7.0 (Arora, 2013)

จากการศึกษาการประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียชอบเค็ม *Haloarcula* sp. สายพันธุ์ G41 ที่คัดแยกได้จากดินเค็ม ในประเทศจีน พบว่าเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์ มีขนาดมวลโมเลกุล 45 กิโลดาลตัน ทำงานได้ดีที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ที่ 20 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมซัลเฟตที่ 15 เปอร์เซ็นต์ pH 8.0 เอนไซม์ไลเปสนี้ถูกยับยั้งด้วย metalloenzyme ด้วยหมู่ Serine และ Cysteine ซึ่งจะทำหน้าที่รีดิวซ์ลดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ นอกจากนี้เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียชอบเค็ม *Haloarcula* sp. สายพันธุ์ G41 มีความคงตัวสูงจากสารอินทรีย์และจากการตรึงเอนไซม์ไลเปสในปฏิกิริยาพลังงานทดแทนไปโอดีเซล พบว่ามีเปอร์เซ็นต์เหลือรอดสูงถึง 80.5% และ 89.2% (Li & Yu, 2014)

นอกจากนี้จากการศึกษาเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางสายพันธุ์ *Salinivibrio* sp. พบว่าเอนไซม์ไลเปสทำงานได้ดีที่สุดในโซเดียมคลอไรด์ที่ 6 เปอร์เซ็นต์ pH 8.0 และ อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส โดยมีความเสถียรของเอนไซม์อยู่ที่ 90 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 นาที จากลักษณะสมบัติของเอนไซม์ไลเปสที่แยกได้จากแบคทีเรียชอบเค็มปานกลาง ซึ่งเหมาะสมที่จะนำเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางสายพันธุ์ *Salinivibrio* sp. มาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร สารชะล้าง ผงซักฟอก การสังเคราะห์สารเคมีและยา การผลิตกระดาษ เครื่องสำอางและการบำบัดน้ำเสียที่มีไขมัน เป็นต้น (Amoozegar et al., 2008)

ตารางที่ 4 ผลผลิตภัณฑ์ ปฏิกริยาและการประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสในอุตสาหกรรม

ผลิตภัณฑ์	ปฏิกริยา	การประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม
Lipopan [®]	hydrolysis และ oxygen uptake	อุตสาหกรรมขนมอบ
Lipozyme [®]	interesterification	อุตสาหกรรมน้ำมันและไขมัน
Novazyme [®] 27007	hydrolysis	อุตสาหกรรมแป้ง
Palatase	hydrolysis	อุตสาหกรรมนม
Novozyme [®] 871	emulsification	อุตสาหกรรมอาหารสัตว์

ที่มา (Aravindan et al., 2007)

ตารางที่ 5 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากจุลินทรีย์

อุตสาหกรรม	การนำมาใช้	การใช้ประโยชน์
ผงซักฟอก	ปฏิกิริยา hydrolysis of fats	ขจัดไขมันออกจากเสื้อผ้า
ผลิตภัณฑ์นม	ปฏิกิริยา hydrolysis of milk fat, cheese, butter	พัฒนากลิ่นรสของนม เนย
ผลิตภัณฑ์เบเกอรี่	ปรับปรุงกลิ่นรส	ยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์
เครื่องดื่ม	ปรับปรุงกลิ่น	เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เช่น ไวน์
Food dressing	ปรับปรุงคุณภาพ	มายองเนส น้ำสลัดและวิปครีม
อาหารเพื่อสุขภาพ	ปฏิกิริยา transesterification	อาหารเพื่อสุขภาพ
เนื้อและปลา	ปรับปรุงกลิ่นรส	ผลิตภัณฑ์เนื้อและปลาปราศจากไขมัน
ไขมันและน้ำมัน	ปฏิกิริยา transesterification และ hydrolysis	เนยโกโก้ มาการีน กรดไขมัน และกลีเซอรอล
เคมี	การสังเคราะห์ enantioselectivity	chiral building block
เภสัชกรรม	ปฏิกิริยา transesterification และ hydrolysis	ไขมันชนิดพิเศษ ยาย่อยอาหาร
เครื่องสำอาง	การสังเคราะห์เอสเทอร์	ผลิตภัณฑ์ที่เป็นอิมัลชันและสารให้ความชุ่มชื้น ครีมบำรุงผิวและครีมกันแดด
อุตสาหกรรมเชื้อเพลิง	ปฏิกิริยา transesterification	การผลิตไบโอดีเซล
กระดาษ	ปฏิกิริยา hydrolysis	ปรับปรุงคุณภาพกระดาษ
เครื่องหนัง	ปฏิกิริยา hydrolysis	ปรับปรุงผลิตภัณฑ์เครื่องหนัง
การทำความสะอาด	ปฏิกิริยา hydrolysis	กำจัดคราบไขมัน

ที่มา: (Sharma et al., 2001)

2.6 การทำเอนไซม์ไลเปสให้บริสุทธิ์

ปัจจุบันมีเทคนิคทั่วไปที่ใช้ทำเอนไซม์ไลเปสให้บริสุทธิ์ ได้แก่ การตกตะกอนโปรตีน (precipitation) เทคนิคเจลฟิวเตรชันโครมาโทกราฟี (gel filtration chromatography) เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ions exchange chromatography) เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพ (affinity chromatography) เป็นต้น (ตารางที่ 8) เทคนิคโครมาโทกราฟีเป็นเทคนิคที่ถูกใช้ในบางกรณีเพื่อลดขั้นตอนการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ โดยลำดับขั้นการใช้เทคนิคทั่วไปอาจไม่ได้มีแบบแผนหรือขั้นตอนที่ชัดเจน ซึ่งมีรายงานการค้นคว้าไว้ในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 เทคนิคการทำเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางให้บริสุทธิ์

แบคทีเรีย	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	มวลโมเลกุล kDa	อ้างอิง
<i>Oceanobacillus rekensis</i> Strain PT-11	1. Q-Sepharose FF 2. SP-Sepharose FF	23.5	(Jiewei et al., 2014)
<i>Virgibacillus alimentarius</i> LBU20907	1. ammonium sulfate precipitation 2. ion exchange (DEAE Toyopearl-650 M) 3. hydrophobic (butyl Toyopearl-650 M) 4. gel filtration (Toyopearl- HW-55F)	100	(Dueramae et al., 2017)
<i>Halobacillus</i> sp. LY5	1. 80% (NH ₄) ₂ SO ₄ 2. DEAE-cellulose Sephacryl S-100	96	(Li et al., 2012)
<i>Halobacillus</i> sp. AP-MSU8	1. (NH ₄) ₂ SO ₄ 2. DEAE-Sepharose FF 3. Sephadex G-75	25	(Esakkiraj et al., 2014)
<i>Chromohalobacter</i> sp. LY7-8	1. (NH ₄) ₂ SO ₄ 2. Sephacryl S-100	44	(Li & Yu, 2012)

2.6.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulphate precipitate)

การตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นเกลือที่นิยมใช้กันมากที่สุด เนื่องจากมีค่าการละลายน้ำสูงและมีค่าสัมประสิทธิ์อุณหภูมิต่ำ (temperature coefficient of solubility) ในช่วง 0-30 องศาเซลเซียส ทำให้สามารถใช้ในการตกตะกอนโปรตีนที่อุณหภูมิต่ำได้ เพราะถ้าหากใช้ในอุณหภูมิที่สูงอาจทำให้เกิดการสลายตัวของโครงสร้างโปรตีนหรือเอนไซม์ที่สลายตัวได้ง่ายที่อุณหภูมิสูง นอกจากนี้ยังนิยมใช้เกลือชนิดอื่น เช่น โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl) โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) เป็นต้น

การตกตะกอนโปรตีน โดยใช้เกลือที่มีความเข้มข้นสูง เรียกว่า “salting out” เป็นการเติมเกลือลงไปในการละลายโปรตีน เพื่อเพิ่มความแรงของไอออน (ionic strength) ของสารละลายสูงขึ้นจนไอออนของเกลือไปแย่งจับกับโมเลกุลของน้ำที่ล้อมรอบโมเลกุลของโปรตีน ทำให้โมเลกุลของน้ำออกมาล้อมรอบโมเลกุลของเกลือแทน เป็นการแย่งกันเกิดปฏิกิริยาไฟฟ้ากับโมเลกุลของน้ำระหว่างโมเลกุลของโปรตีนและโมเลกุลของเกลือ ซึ่งแรงที่จับระหว่างโมเลกุลของโปรตีนกับน้ำมีค่าน้อยกว่าแรงกระทำระหว่างโมเลกุลโปรตีนกับโปรตีน โปรตีนก็จะจับตัวเป็นตะกอนลงมา โดยเกิดจากการรวมตัวของส่วนที่ไม่ชอบน้ำบนโมเลกุลของโปรตีนแต่ละตัวเคลื่อนที่เข้าใกล้กันจากแรงดึงดูดระหว่างส่วนที่ไม่ชอบน้ำด้วยกัน เมื่อเกิดเป็นกลุ่มก้อนโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ขึ้น น้ำหนักสะสมเพิ่มขึ้นและตกตะกอนลงมาในที่สุด ซึ่งเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า “salting out effect”

การตกตะกอนโปรตีนที่จุดไอโซอิเล็กทริก โปรตีนแต่ละชนิดมีค่า pH ที่ทำให้สมดุลของประจุสุทธิบนโมเลกุลเป็นศูนย์ เรียกว่า จุดไอโซอิเล็กทริก (isoelectric point; pI) เป็นค่าเฉพาะตัวของโปรตีนแต่ละชนิด เมื่อปรับค่าพีเอชของสารละลายโปรตีนจนมีค่าเท่ากับค่า pI ของโปรตีนที่ต้องการแยกโปรตีนนั้น จะเกิดการรวมตัวกันแล้วตกตะกอนลงมา เนื่องจากบนโมเลกุลของโปรตีนนั้นมีประจุสุทธิเป็นศูนย์ จึงไม่มีแรงผลักดันไฟฟ้าสถิตระหว่างโมเลกุลของโปรตีนเอง โปรตีนจึงเข้ามาใกล้กันมากพอที่จะเกิดการรวมตัวกัน แล้วตกตะกอนลงมาได้เรียกว่า isoelectric precipitation

2.6.2 การตกตะกอนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

ตัวทำละลายอินทรีย์ที่นิยมใช้ ได้แก่ แอลกอฮอล์ อะซิโตน เอทานอลและกรดไฮโดรคลอริก โดยตัวทำละลายอินทรีย์จะไปลดค่าแอกทิวิตีของน้ำมีผลต่อค่าคงที่ไดอิเล็กตริก (dielectric constant) ทำให้สารละลายไอออนหรือโปรตีนมีความสามารถในการเป็นตัวทำละลายลดลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึงจุดที่แรงกระทำระหว่างโมเลกุลของโปรตีนในส่วนของพลังงานไฟฟ้าสถิต มีแรงกระทำที่สูงกว่าแรงกระทำระหว่างโปรตีนกับน้ำ เกิดการเข้ามารวมตัวกันของโมเลกุลโปรตีนตกตะกอนลงมา ซึ่งตัวทำละลายอินทรีย์ต้องทำในที่อุณหภูมิต่ำเพื่อป้องกันการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนหรือเอนไซม์

2.6.3 วิธีโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ions-exchange chromatography)

กระบวนการแลกเปลี่ยนประจุระหว่างวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่เป็นของเหลวกับวัฏภาคคงที่ (stationary phase) โดยที่วัฏภาคคงที่บรรจุของแข็งไม่ละลายน้ำ เรียกว่า เมทริกซ์ (matrix) เป็นพอลิเมอร์ที่เหนียวน้ำให้มีประจุ หรือเรียกว่าตัวแลกเปลี่ยนประจุ (ion exchanger) เมทริกซ์นี้อาจเรียกเป็น ตัวแลกเปลี่ยนประจุหรือเรซิน (resin) เมื่อตัวแลกเปลี่ยนประจุถูกทำให้อิ่มตัวด้วยสารละลายบัฟเฟอร์หรือสารละลายเกลือ พบว่ามีส่วนของสารที่มีประจุที่เป็นองค์ประกอบในบัฟเฟอร์หรือสารละลายเกลือ เข้ามาล้อมรอบตัวแลกเปลี่ยนประจุเพื่อรักษาสภาพสมดุลไฟฟ้า เรียก ประจุเหล่านี้ว่า counter ion เป็นไอออนที่มีประจุตรงข้ามกับเมทริกซ์ สารตัวอย่างแต่ละชนิดย่อมมีประจุต่างกันสามารถเกิดแรงกระทำทางไฟฟ้ากับประจุในส่วน counter ion ได้ต่างกัน เมื่อสารที่มีประจุตรงข้ามกับเมทริกซ์และมีความแรงประจุสูงก็จะไปแทนที่ counter ion แล้วเข้าไปยึดจับกับส่วนเมทริกซ์ ส่วนสารใดที่มีประจุชนิดเดียวกันกับตัวแลกเปลี่ยนประจุก็จะหลุดออกจากคอลัมน์ก่อนโดยแรงผลักทางไฟฟ้าทำให้สามารถแยกออกจากกันได้

ชนิดของเมทริกซ์ (ตารางที่ 7)

- Anion exchange แลกเปลี่ยนประจุลบ: Diethylaminoethyl (DEAE), Aminoethyl (AE), Quaternary aminoethyl (QAE)
- Cation exchange แลกเปลี่ยนประจุบวก: Carboxymethyl (CM), Sulphopropyl (SP), Phospho (P)

ตารางที่ 7 Functional group ของ ion-exchange

Charge group	โครงสร้าง	รูปแบบ	พีเอช
Anion exchangers			
Diethylaminoethyl (DEAE)	$\text{H-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}^+\text{(CH}_2\text{-CH}_3)_2\text{-H}$	weak	2-9
Quaternary aminoethyl (QAE)	$\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{-CH}_2\text{-CHOH-CH}_3$	strong	1-14
Cation exchangers			
Sulphopropyl (SP)	$\text{-CH}_2\text{.CH}_2\text{.CH}_2\text{.SO}_3^-$	strong	2-14
Phospho (P)	$\text{-PO}_4\text{H}_2^-$	strong	2-10
Carboxymethyl (CM)	$\text{-OCH}_2\text{COO}^-$	weak	5-10

ที่มา: (Bjellqvist et al., 1994)

2.6.4 วิธีโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิวเตรชัน (gel filtration chromatography)

เทคนิคเจลฟิวเตรชันโครมาโทกราฟีเป็นเทคนิคการแยกสารโดยอาศัยคุณสมบัติความแตกต่างกันของขนาด โมลโมเลกุลและรูปร่างของโปรตีน ซึ่งอาศัยคุณสมบัติของเม็ดเจลที่มีลักษณะช่องว่างภายในพอลิเมอร์ โดยภายในเม็ดเจลมีขนาดช่องว่างที่จำเพาะยอมให้สารที่มีโมเลกุลหนึ่งผ่านเข้าไปในเม็ดเจลได้ ส่วนสารที่มีขนาดใหญ่กว่าไม่สามารถผ่านเข้าไปในเม็ดเจลจึงถูกชะออกมากับสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ชะสารละลายหลุดออกจากคอลัมน์ก่อน จากหลักการข้างต้นเห็นได้ว่าสามารถแยกสารที่มีขนาดเล็กและใหญ่ออกจากกันได้ สารที่ใช้ทำเจล ได้แก่ เดกซ์แทรน (dextran) พอลิอะครีลาไมด์ (polyacrylamide) และอะกาโรส (agarose)

ตารางที่ 8 วิธีการแยกสารตามคุณสมบัติ

คุณสมบัติของสาร	วิธีการแยก
ประจุ	โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ions exchange chromatography) อิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis)
สภาพขี้ ขนาด รูปร่าง	โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (thin-layer chromatography) ไดอะไลซิส (dialysis) เจลฟิวเตรชันโครมาโทกราฟี (gel filtration chromatography) เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis) การปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
ความจำเพาะทางชีวภาพ	โครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพ (affinity chromatography)



บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 วัสดุอุปกรณ์

อุปกรณ์	รุ่น	บริษัท	ประเทศที่ผลิต
เครื่องชั่งแบบละเอียด (Electronic balance)	AB204-S	Mettler toledo	Switzerland
เครื่องชั่งแบบหยาบ (Electronic balance)	PB3002-S	Mettler toledo	Switzerland
เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter)	S20	Mettler toledo	Switzerland
เครื่องปั่นเหวี่ยง (High speed Refrigerated)	MX-301	Tomy	Japan
เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (High speed centrifuge)	5804R, Blend	Helago	Japan
เครื่องวัดการดูดกลืนคลื่นแสง (Spectrophotometer)	UV-Vis Helios alpha	Thermo fisher™	USA
เครื่องอ่านแถบไมโครเพลท (Microplate reader)	Wallac 1420	Perkinelmer	USA
เครื่อง PCR (Polymerase Chain reaction)	Mastecycler gradient 5331	Eppendorf	Germany
เครื่องแยกสารชีวโมเลกุล โปรตีนในโพรตีนไหล (Fast protein liquid chromatography)	ÄKTA™ FPCL with Frac-900	Amersham pharmacia	Sweden
เครื่องควบคุมอุณหภูมิ	Thermomixer C	Eppendorf	USA
เครื่องเขย่า (Shaker)	รุ่น Innova 4300	New brunswick Scientific	USA
เครื่องเขย่าผสม (Vortex)	Genie 2	Scientific industries	USA
เครื่องต้ม (Boiling sterilizer)	BS-8L	-	Thailand

เครื่องตีปั่น (Stomacher)	The Stomacher® 400 circulator	Seward	England
เครื่องกวนสารละลาย (Magnetic stirrer)	C-MAG MS7	Ika	Germany
ตู้เย็นอุณหภูมิตั้ง 4 องศา เซลเซียส	Hybrid cooling system	Sharp	Japan
ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)	Model: BE600	Memmert	Germany
ตู้เขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker)	Certomat® BS-1	Sartorius	Germany
ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow)	NU-440-400E	บี.เค.เทค แอสโซซิเอท จำกัด	USA
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (Autoclave)	SX-700	Tomy	Japan
ออโต้ปิเปต รุ่น P10	PIPETMAN® Classic	Gibson	France
ออโต้ปิเปต รุ่น P20	PIPETMAN® Classic	Gibson	France
ออโต้ปิเปต รุ่น P200	PIPETMAN® Classic	Gibson	France
ออโต้ปิเปต รุ่น P1000	PIPETMAN® Classic	Gibson	France
เครื่องรันเจล (Mini-slab size electrophoresis system)	AE-6530	Atto	Japan
หม้อแปลงไฟฟ้า (Powerpac™ Basic power supply)	-	BIO-RAD	USA
ChemiDoc™ MP Imaging system	-	BIO-RAD	USA
อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)	Precision	Thelco	USA

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ยี่ห้อ	ประเทศที่ผลิต
Peptone	Difco	USA
Casamino acids	Difco	USA
Yeast extract	Difco	USA
Beef extract	Difco	USA
Agar		

3.1.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมี	ยี่ห้อ	ประเทศที่ผลิต
Acetone for analysis	Merck	Germany
Ammonium persulfate ((NH ₄) ₂ S ₂ O ₈)	Sigma-aldrich	USA
BCA Protein Assay kit	Thermo scientific™	USA
<i>p</i> -Nitrophenyl-butyrate	Sigma-aldrich	USA
4-Methylumbelliferyl butyrate (MUF-butyrate)	Sigma-aldrich	USA
Sodium chloride (NaCl)	Merck	Germany
Sodium hydroxide (NaOH)	Merck	Germany
Monosodium glutamate		
Ethanol absolute for analysis	Merck	Germany
Ethanol gradient grade for liquid chromatography	Merck	Germany
Trizma® base	Sigma-aldrich	USA
Potassium chloride (KCl)	Merck	Germany
Magnesium sulfate heptahydrate (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	Merck	Germany
Manganese (II) chloride tetrahydrate (MnCl ₂ ·4H ₂ O)		
Trisodium citrate dihydrate (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ ·2H ₂ O)	Sigma-aldrich	USA
Triton®X-100	Sigma-aldrich	USA
Aesculin dihydrate	Sigma-aldrich	USA
Soluble starch	Merck	Germany
Skim milk	Difco	USA
Glycerol	Merck	Germany
Acetic acid	Merck	Germany
ชุด kit GenepHlow Gel/PCR purification	Geneaid	Taiwan
Boric acid	Sigma-aldrich	USA
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	BIO-RAD	USA
Tween® 20	Sigma-aldrich	USA
Tween® 40	Sigma-aldrich	USA
Tween® 60	Sigma-aldrich	USA
Tween® 80	Sigma-aldrich	USA

Tributylin	Sigma-aldrich	USA
Calcium chloride dihydrate (CaCl ₂ ·2H ₂ O)		
Potassium nitrate (KNO ₃)	Merck	Germany
Arabinose	Sigma-aldrich	USA
Cellobiose	Fluka	USA
Fructose	Fluka	USA
Galactose	Difco	USA
Glucose	Merck	Germany
Lactose	Merck	Germany
Mannose	Fluka	USA
Maltose	Fluka	USA
Mannitol	Fluka	USA
Mannitol	Fluka	USA
Melibiose	Fluka	USA
Raffinose	Fluka	USA
Rhamnose	Fluka	USA
Ribose	Fluka	USA
Salicin	Trademark	Japan
Sorbitol	Sigma-aldrich	USA
Sucrose	Merck	Germany
Trehalose	Fluka	USA
Xylose	Merck	Germany
Urea	Merck	Germany

3.2 ขั้นตอนและวิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 เก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่าง อาหารหมักเค็มกะปิที่มีส่วนผสมในการทำกะปิที่แตกต่างกัน ในกะปิมีผลต่อการแยกเชื้อแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางเนื่องจากในกะปิมีโซเดียมคลอไรด์อยู่ 5 เปอร์เซ็นต์ และมีคุณสมบัติของกลิ่นที่หอมเฉพาะตัวเป็นเอกลักษณ์ของกะปิซึ่งมาจากการย่อยสสารประกอบภายในตัวกุ้งและเคย โดยเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซ็นต์ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียกลุ่มชอบเค็มปานกลาง ดังนั้นผู้ทำวิจัยจึงสนใจทำการแยกเชื้อแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางจากกะปิ จากตลาดมหาชัย ในจังหวัดสมุทรสาคร ซึ่งเป็นแหล่งที่มีการทำกะปิเป็นจำนวนมาก และเป็นกะปิที่มีชื่อเสียง รวมทั้งหมด 8 ตัวอย่าง ได้แก่ 1. กะปิที่มีส่วนผสมของเคยเพียงอย่างเดียว 2. กะปิที่มีส่วนผสมของกุ้งและเคย 3. กะปิสำหรับทำแกง 4. กะปิสำหรับทำพริกแกง 5. กะปิสำหรับทำน้ำพริก 6. กะปิเมืองนคร 7. กะปิที่มีส่วนผสมของกุ้งอย่างเดียวและ 8. กะปิที่มีส่วนผสมของกุ้งตาโต

3.2.2 คัดแยกแบคทีเรียชอบเค็มปานกลาง

การคัดแยกแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางจากอาหารหมัก ทำโดยนำตัวอย่างกะปಿನ้ำหนัก 25 กรัม ใส่ถุงพลาสติกด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ เติมน้ำทะเลละลายเปปโตเนอ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 225 มิลลิลิตร (Barrow & Feltham, 1993) นำไปตีปั่นด้วยเครื่องตีปั่น (stomacher) เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเจือจางแบบลำดับส่วน ตั้งแต่ความเข้มข้น 10^{-1} ถึง 10^{-6} กรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตตัวอย่างอาหารหมักแต่ละระดับความเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Japan collection of microorganism no. 377 (JCM no. 377) (Namwong et al., 2005) เป็นอาหารที่มืองค์ประกอบของโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชอบเค็มปานกลาง ประกอบด้วย 0.5% yeast extract, 0.5% casamino acids, 0.1% monosodium glutamate, 0.3% trisodium citrate, 2% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.36% $FeCl_2 \cdot 4H_2O$, 0.036% $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 10% NaCl, 2% agar pH 7.0 - 7.2 จากนั้นเกลี่ยด้วยแท่งแก้วให้ทั่วผิวน้ำอาหารด้วยเทคนิค spread plate จนผิวน้ำอาหารแห้งสนิททำทั้งหมดจำนวน 2 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน คัดเลือกแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางทางลักษณะที่แตกต่างกันด้านสัณฐานวิทยาที่มีลักษณะต่างกัน มาซัดซ้ำ (restreak) บนอาหาร JCM no. 377 เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์และเก็บรักษาสายพันธุ์บริสุทธิ์ลงในอาหารดัดแปลงสูตร JCM no. 377 (5% ของ โซเดียมคลอไรด์) ที่เติมกลีเซอรอล 15 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสและเก็บแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางที่บริสุทธิ์แล้วลงในอาหารแข็งสูตรดัดแปลง JCM no.377 เพื่อใช้ศึกษาขั้นต่อไป

3.2.3 คัดกรองแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

3.2.3.1 คัดกรองแบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสบนอาหารแข็ง

แบคทีเรียชอบเค็มปานกลางที่คัดแยกแล้วนำมาซิด (streak) ลงบนอาหารที่เติมสับสเตรทแตกต่างกันดังนี้ Tributyrin, Tween 20, Tween 40, Tween 60 และ Tween 80 โดยเติมสารดังกล่าวความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ลงในอาหารแข็งสูตรดัดแปลง lipolytic medium (JCM no. 377 ที่เติม 0.01 เปอร์เซ็นต์ของ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ เพื่อให้เกิดการตกตะกอนรอบโคโลนี) (Barrow & Feltham, 1993) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อตรวจสอบหาการเกิดแอกทิวิตีของเอนไซม์ไลเปสเบื้องต้นจากการเกิดตะกอนบริเวณรอบโคโลนี (opaque zone) โดยจะคัดกรองสายพันธุ์ของแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางที่เกิดแอกทิวิตีเอนไซม์ไลเปสรอบโคโลนีในขั้นต้นนี้นำไปคัดกรองในขั้นต่อไป

3.2.3.2 คัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสในอาหารเหลว

นำสายพันธุ์แบคทีเรียที่ผ่านการคัดกรองในอาหารแข็งเบื้องต้นในข้อ 3.2.3.1 มาคัดเลือกความสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสเชิงคุณภาพตามวิธีของ (Cardenas et al., 2001) ทำโดยเลี้ยงสายพันธุ์แบคทีเรียชอบเค็มปานกลางที่บริสุทธิ์ลงในอาหาร JCM no. 377 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อทำเป็นกล้าเชื้อ (inoculate) จากนั้นปรับความขุ่นของกล้าเชื้อในค่าการดูดกลืนคลื่นแสง 600 นาโนเมตรที่ความขุ่น 0.2 และถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลวสูตรดัดแปลงที่เติมสับสเตรท Tween 20 ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และ Tween 80 ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ให้สับสเตรท Tween 20 เป็นตัวแทนของกรดไขมันสายสั้นและ Tween 80 เป็นตัวแทนกรดไขมันสายยาว) บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำวិเคราะห์แอกทิวิตีของเอนไซม์ไลเปสนำสารละลายสับสเตรท (*p*-nitrophenyl butyrate) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ (ภาคผนวก ง.1) ละลายในบัฟเฟอร์ universal พีเอช 8.0 (ภาคผนวก ค.1) ปริมาตร 180 ไมโครลิตร มาบ่ม (pre-incubate) ในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (thermomixer C) เป็นเวลา 5 นาที ปิเปตส่วนใส(crude enzyme) ลงใน 96 well plate ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในที่มีด จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader และคำนวณค่าการเกิดแอกทิวิตีของเอนไซม์ไลเปสที่เกิดขึ้น การคัดกรองแบคทีเรียที่เกิดแอกทิวิตีของเอนไซม์ไลเปสในขั้น 3.2.3.2 นำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ในขั้นต่อไป

การคำนวณค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ (ภาคผนวก ง.3) โดยกำหนดให้เอนไซม์ 1 ยูนิต (Unit) คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาให้เกิดการปลดปล่อย *p*-nitrophenol ออกมา 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

3.2.4 พิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียขอบเค็มปานกลาง

3.2.4.1 การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์

นำสายพันธุ์แบคทีเรียขอบเค็มปานกลางที่ผ่านการทดลองขั้นที่ 3.2.3.2 มาพิสูจน์เอกลักษณ์ โดยศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ต่างๆ (Barrow & Feltham, 1993) ดังต่อไปนี้

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristics)

ศึกษารูปร่างของเซลล์ การจัดเรียงตัว การติดสีแกรมและลักษณะการเจริญของโคโลนี ได้แก่ รูปร่าง การแผ่ สีของโคโลนี บนอาหารแข็งสูตรดัดแปลง JCM no. 377 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ลักษณะทางสรีรวิทยา (physiological characteristics)

ศึกษาความสามารถในการเจริญที่ระดับอุณหภูมิ 30, 37, 40 และ 45 องศาเซลเซียส, ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ตั้งแต่ร้อยละ 0, 1, 5, 10, 15, 20 และ 25 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และความเป็นกรดต่างที่ 5, 7 และ 9 โดยปรับกล้าเชื้อเริ่มต้นให้เท่ากันด้วย McFarland เบอร์ 0.5 ลงใน normal saline จากนั้นถ่ายเชื้อแบคทีเรียขอบเค็มปานกลางปริมาตร 60 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเหลวสูตรดัดแปลง JCM no. 377 ปริมาตร 6 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลวสูตรดัดแปลง JCM no. 377 บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ลักษณะทางชีวเคมี (biochemical characteristics)

ศึกษาการสร้างเอนไซม์คะตาเลส (catalase), ออกซิเดส (oxidase), การย่อยอาร์จินีน (arginine hydrolysis), การย่อยเอสคูริน (aesculin hydrolysis), การย่อยเจลาติน (gelatin hydrolysis), การรีดิวซ์ไนเตรท (nitrate reduction), การย่อยนม (skim milk hydrolysis), การย่อยแป้ง (starch hydrolysis), การย่อยไขมัน (Tween 80) และการย่อยยูเรีย (urea hydrolysis) (Barrow & Feltham, 1993) และทดสอบความสามารถในการสร้างกรดจากการหมักคาร์โบไฮเดรตตามวิธีของ (Leifson, 1963) ลงในอาหารสูตรดัดแปลง JCM no. 377 บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.2.4.2 การศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์

การแยกดีเอ็นเอและทำให้บริสุทธิ์ (extraction and purify DNA)

เลี้ยงแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางในอาหารเหลวตัดแปลงสูตร JCM no.377 นำมาสกัดและทำให้บริสุทธิ์ ตามวิธีของ (Saito & Miura, 1963) นำแบคทีเรียที่คัดเลือกแล้วมาล้างแยกเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 รอบ ถ่ายเชื้อแบคทีเรียลงหลอดพลาสติก จากนั้นเติม Buffer A (0.1M EDTA + 0.1 NaCl pH 8.0) ปริมาตร 3 มิลลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสม และเติม lysozyme 10 มิลลิกรัม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบ 1 ชั่วโมงนำมาเติม Buffer B (0.1M Tris + NaCl pH 9.0) ปริมาตร 3 มิลลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสม และเติม phenol : chloroform อัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 1 ใน 4 เขย่าให้เนื้อสารละลายเป็นสีขาวขุ่นๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดส่วนใส ลงในบีกเกอร์ที่สะอาด และเติม absolute ethanol ประมาณ 10 มิลลิตร จากนั้นใช้แท่งแก้วสะอาดพันดีเอ็นเอขึ้นมาและล้างด้วย 70% ethanol ตามด้วย 95% ethanol จากนั้นนำไปตากให้แห้ง และนำไปใส่หลอดที่มี 0.1 SSC (saline-sodium citrate buffer) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เมื่อได้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ นำมาเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ด้วยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) โดยใช้ forward primer คือ 20F (5'-AGTTTGATCCTGGCTC -3') และ reverse primer คือ 1530R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC -3') (Namwong et al., 2005) นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR product) มาตรวจสอบความบริสุทธิ์ของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis) จากนั้นทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปของ GenepHlow Gel/PCR purification Kit (100) จะได้สารละลายดีเอ็นเอบริสุทธิ์และนำส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macrogen® ประเทศเกาหลีใต้ นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ที่ได้มาเปรียบเทียบกับข้อมูลของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่มีอยู่ในฐานข้อมูลทางชีวภาพของ EzTaxon (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>) (Kim et al., 2012) โดยใช้โปรแกรม Bioedit เลือกโปรแกรม clustalW multiple alignment ตามวิธีของ (Thompson et al., 1997) แล้วระบุชนิดของแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางสายวิวัฒนาการกับสายพันธุ์ที่คัดเลือก

การวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis)

นำผลที่ได้มาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วงบริเวณของยีน 16S rRNA ด้วยโปรแกรม MEGA เวอร์ชัน 6.0 สร้างแผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ (phylogenetic tree) โดยใช้วิธี Neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987) และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่าความเชื่อมั่น โดยทำซ้ำถึง 1,000 ครั้ง (Felsenstein, 1985)

การวิเคราะห์การเข้าคู่กันของดีเอ็นเอ (genomic DNA-DNA hybridization)

การวิเคราะห์การเข้าคู่กันของจีโนมของดีเอ็นเอตามวิธีของ (Ezaki et al., 1989) มีทั้งหมด 3 ขั้นตอน ได้แก่ ขั้นตอนแรกต้มดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เพื่อให้ดีเอ็นเอคลายเกลียว เติม 2xPBS (phosphate buffered saline) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรและ $MgCl_2$ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เพื่อป้องกันไม่ให้ดีเอ็นเอกลับมาเข้าคู่กัน จากนั้นดีเอ็นเอเข้ากับ 96-well plate ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง นำดีเอ็นเอความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ติดฉลากด้วย photobiotin ต่อดีเอ็นเอ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและฉายแสงด้วยหลอดไฟ sunlamp เป็นเวลา 30 นาที บนน้ำแข็งจากนั้นล้าง photobiotin ออกด้วย 0.1 M Tris-HCl buffer pH 9.0 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตรและ 2-butanol ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 วินาที จากนั้นดูดเฉพาะส่วนบนออกลงในหลอด eppendorf ใหม่ นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และ sonicate 5 วินาที ปิดดีเอ็นเอลงใน hybridization solution ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จะมีส่วนที่เรียกว่า probe จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ติดอยู่ใน 96-well plate ออกมาล้างด้วย 0.2 SSC ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร และนำ hybridization solution ที่มีส่วนผสมของดีเอ็นเอ (probe) ปิดเตลง ใน 96-well plate ที่ติดด้วยดีเอ็นเอก่อนหน้านี้นี้แล้ว ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร นำไปบ่มตามค่าการคำนวณของปริมาณ G+C content เป็นเวลา 15 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย 0.2xSSC ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลาย solution 1 (ภาคผนวก ข.1) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาทีและสะบัดทิ้ง เติมสารละลาย solution 2 (ภาคผนวก ข.1) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นสะบัดทิ้งและล้างออกด้วย 0.1xPBS ปริมาตร 0.3 - 0.4 มิลลิลิตรและเติมซับสเตรท tetramethylbenzidine- H_2O_2 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ขั้นตอนสุดท้ายเติม stop reaction ด้วย 2M H_2SO_4 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 450 นาโนเมตรและ

คำนวณผลการเข้าคู่กันของจีโนมดีเอ็นเอ โดยให้จีโนมดีเอ็นเอของ type strain มีค่าเป็น 100 เปอร์เซ็นต์และเทียบกับ novel species เพื่อหาค่าความแตกต่างของการเข้าคู่กันของจีโนม

3.2.4.3 ศึกษาอนุกรมวิธานเคมี (chemotaxonomy characterization)

ศึกษาอนุกรมวิธานเคมีของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คาดว่าจะเป็นสปีชีส์ใหม่ ได้แก่ วิเคราะห์กรดไขมัน (fatty acid) ศึกษากรดไขมัน ด้วยเทคนิค gas chromatography (Sasser, 1990) วิเคราะห์องค์ประกอบ polar lipid ด้วยเทคนิค 2-dimension thin-layer chromatography (TLC) (Minnikin et al., 1977) วิเคราะห์องค์ประกอบ quinone ด้วยเทคนิค silica gel TLC (Collins et al., 1977) วิเคราะห์ diaminopimelic acid (DAP) ด้วยเทคนิค cellulose TLC (Staneck & Roberts, 1974)

3.2.5 ภาวะที่เหมาะสมของการผลิตในระดับขวดเขย่าและสมบัติของเอนไซม์ไลเปสจากสายพันธุ์ที่คัดเลือก

3.2.5.1 ผลของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส

นำสายพันธุ์แบคทีเรียชอบเค็มปานกลางที่คัดเลือกแล้ว เลี้ยงในอาหารเหลว สูตรดัดแปลง JCM no. 377 ที่แปรผันแหล่งคาร์บอน ได้แก่ casamino acids น้ำมันมะพร้าว น้ำมันมะกอก น้ำมันปาล์มและน้ำมันงาดำ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาที และบันทึกผลการผลิตเอนไซม์ไลเปส

3.2.5.2 ผลของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส

นำสายพันธุ์แบคทีเรียชอบเค็มปานกลางที่คัดเลือกแล้ว เลี้ยงในอาหารเหลว สูตรดัดแปลง JCM no. 377 จากข้อ 3.2.5.1 และแปรผันแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ yeast extract, beef extract, peptone, tryptone, ammonium chloride, potassium chloride และ urea บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส pH 7.0 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาที และบันทึกผลการผลิตเอนไซม์ไลเปส

3.2.5.3 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการผลิต เอนไซม์ไลเปส

นำสายพันธุ์แบคทีเรียชอบเค็มปานกลางที่คัดเลือกแล้ว เลี้ยงในอาหารเหลว สูตรดัดแปลง JCM no. 377 จากข้อ 3.2.5.2 และแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1, 3, 5, 7, 9, 12, 15 และ 17 (น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส pH 7.0 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาทีและบันทึกผลการผลิตเอนไซม์ไลเปส

3.2.5.4 ผลของความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส

นำสายพันธุ์แบคทีเรียชอบเค็มปานกลางที่คัดเลือกแล้ว เลี้ยงในอาหารเหลว สูตรดัดแปลง JCM no. 377 จากข้อ 3.2.5.3 และแปรผัน pH ของอาหารเหลวเป็น 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 และ 10.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาทีและบันทึกผลการผลิตเอนไซม์ที่ความเป็นกรดต่างๆ

3.2.5.5 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส

นำสายพันธุ์แบคทีเรียชอบเค็มปานกลางที่คัดเลือกแล้ว เลี้ยงในอาหารเหลว สูตรดัดแปลง JCM no. 377 จากข้อ 3.2.5.4 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30, 37, 40, 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาทีและบันทึกผลการผลิตเอนไซม์ไลเปส

3.2.5.6 ผลของระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส

นำสายพันธุ์แบคทีเรียชอบเค็มปานกลางที่คัดเลือกแล้ว เลี้ยงในอาหารเหลว สูตรดัดแปลง JCM no. 377 จากข้อ 3.2.5.5 จากนั้นเก็บผลและบันทึกผลทุก 6 ชั่วโมง โดยหาแอกทีวิตีการผลิตเอนไซม์ไลเปสและการเจริญของแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางที่คัดเลือก

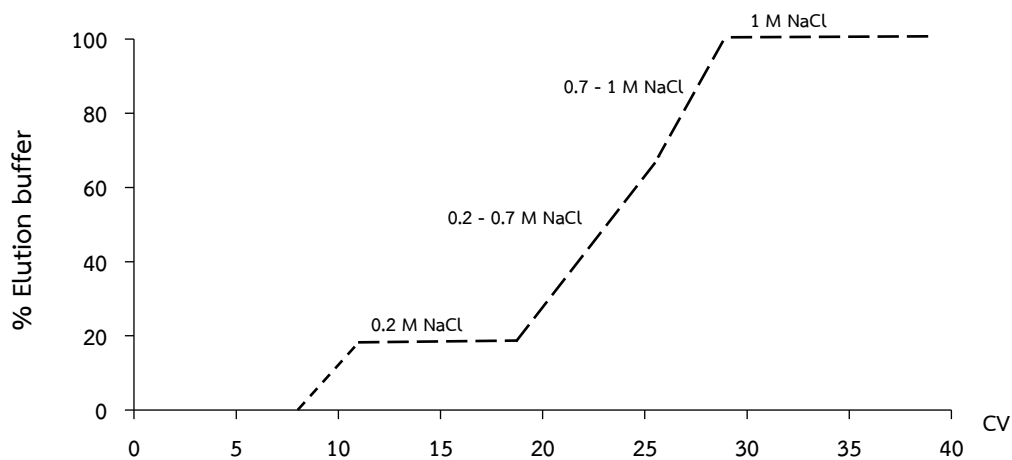
3.2.6 ศึกษาการทำเอนไซม์ไลเปสให้บริสุทธิ์ (lipase purification)

3.2.6.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยอะซิโตน (acetone precipitation)

เพาะเลี้ยงสายพันธุ์แบคทีเรียชอบเค็มปานกลางในอาหารสูตรดัดแปลง JCM no. 377 โดยใช้ภาวะจากข้อ 3.2.5 จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้มาตกตะกอนโปรตีนด้วยอะซิโตนที่แช่ -20 องศาเซลเซียส โดยเติมปริมาณอะซิโตนในรูปแบบของความเข้มข้นเปอร์เซ็นต์อิ่มตัว (% saturation) ที่ 1 ถึง 40 เปอร์เซ็นต์อิ่มตัว ในการเติมอะซิโตนจะค่อยๆ เติมและกวนผสมกันอย่างช้าๆ บนเครื่องกวนสารที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นกวนต่อเนื่องอีก 5 นาที นำสารละลายทั้งหมดตั้งทิ้งไว้ให้โปรตีนตกตะกอนเป็นเวลา 15 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 15 ชั่วโมงนำสารละลายทั้งหมดมาปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกตะกอนโปรตีนทิ้งไปและเก็บส่วนใสมาเติมปริมาณอะซิโตนในรูปแบบของความเข้มข้นเปอร์เซ็นต์อิ่มตัวที่ 40-60 เปอร์เซ็นต์อิ่มตัว ค่อยๆเติมอะซิโตนและกวนผสมกันอย่างช้าๆ บนเครื่องกวนสารที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นกวนต่อเนื่องอีก 5 นาที นำสารละลายทั้งหมดตั้งทิ้งไว้ให้โปรตีนตกตะกอนเป็นเวลา 15 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 15 ชั่วโมง นำสารละลายทั้งหมดมาปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสทิ้งและเก็บตะกอนมาทำให้อะซิโตนระเหยด้วยเครื่อง concentrator จากนั้นเก็บรักษาตะกอนโปรตีนไว้ที่ตู้ -20 องศาเซลเซียส

3.2.6.2 การแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange chromatography)

การแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์จะใช้วิธี ion-exchange chromatography ด้วยเครื่อง fast protein liquid chromatography (ÄKTA™ Explorer 100 FPLC with Frac-900; GE Health care) นำตะกอนโปรตีนที่ระเหยอะซิโตนด้วยเครื่อง concentrator แล้วนำมาละลายโปรตีนด้วยบัฟเฟอร์ 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำตัวอย่างโปรตีนปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ฉีดเข้าเครื่อง FPLC ตัวอย่างจะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์แบบแลกเปลี่ยนประจุ Hitrap™ DEAE fast flow (anion exchange) ขนาด 0.7 x 2.5 เซนติเมตร ปรับสมดุลคอลัมน์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 และชะสารตัวอย่างแบบ segments gradient ด้วย 1M NaCl (ภาพที่ 2) ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บปริมาตรทั้งหมด 40 fractions ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส วัดปริมาณโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรและหาแอกทิวิตีเอนไซม์ไลเปส จากนั้นทดสอบคุณสมบัติของเอนไซม์



ภาพที่ 2 การชะตัวอย่างโปรตีนออกจากคอลัมน์ด้วย 1 M NaCl แบบ segments gradient

3.2.7 ศึกษาสมบัติของเอนไซม์ไลเปส

ภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ไลเปส ได้แก่ อุณหภูมิ pH ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์และความจำเพาะต่อสับสเตรทจากสายพันธุ์แบคทีเรียชอบเค็มปานกลางที่คัดเลือก

3.2.8 ตรวจสอบรูปแบบโปรตีนด้วยเทคนิค Native-PAGE และ Zymogram

โหลดตัวอย่างโปรตีนที่ได้เทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (tricolor broad protein ladder, biotech rabbit, Germany) ที่มีขนาดอยู่ในช่วง 5.0 ถึง 245.0 กิโลดาลตัน ลงในเจล จากนั้นต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับชุดหม้อแปลงไฟฟ้าปรับกระแสไฟฟ้าให้มีปริมาณ 20 มิลลิแอมป์ต่อเจล ปล่อยให้โปรตีนเคลื่อนที่จนเกือบถึงขอบล่างของเจล จากนั้นปิดกระแสไฟฟ้าและนำเจลออกจากชุดทดสอบ นำเจลที่ได้ไปล้างด้วย 2.5% Triton-X เป็นเวลา 30 นาทีและล้างด้วย 50 mM phosphate buffer pH 7.0 จากนั้นเททับด้วย 4-Methylumbelliferyl butyrate (Moreno et al., 2009) ทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปส่องแสง UV ภายใต้เครื่องถ่ายภาพ เพื่อตรวจหารูปแบบการแสดงออกของเอนไซม์ไลเปส และนำแผ่นเจลออกมา fixing โปรตีนให้ติดกับแผ่นเจลและย้อมด้วยชุดสีย้อม silver stain เพื่อตรวจหารูปแบบขนาดของโปรตีนและคำนวณหาขนาดมวลโมเลกุลโปรตีนที่ต้องการศึกษาจากการเทียบกับขนาดมวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน (Laemmli, 1970)

3.2.9 วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป Pierce™ (Thermo Scientific™, USA) เทียบกับโปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

4.1 ผลการเก็บตัวอย่างและคัดแยกแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางจากอาหารหมัก

จากการนำตัวอย่างอาหารหมักที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ กะปิ ที่แตกต่างกันรวมทั้งหมด 8 ตัวอย่าง ในจังหวัดสมุทรสาคร ได้แก่ กะปิ ชนิดใช้เคียวทำอย่างเดี่ยว กะปิชนิดใช้กึ่งผสมเคียว กะปิสำหรับทำน้ำแกง กะปิสำหรับทำพริกแกง กะปิสำหรับทำน้ำพริก กะปิเมืองนคร กะปิชนิดใช้กึ่งทำอย่างเดี่ยวและกะปิชนิดใช้กึ่งตาโต (ตารางที่ 9-10) มาแยกเชื้อโดยใช้อาหาร JCM no. 377 พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางได้ทั้งหมด จำนวน 77 สายพันธุ์

ตารางที่ 9 ชนิดตัวอย่าง แหล่งสถานที่เก็บ รหัสตัวอย่าง รหัสไอโซเลทและจำนวน

ชนิดตัวอย่าง	แหล่ง สถานที่เก็บ	รหัส ตัวอย่าง	รหัสไอโซเลท	จำนวน
กะปิชนิดใช้เคียวทำ อย่างเดี่ยว	สมุทรสาคร	SKP1	SKP1-1, SKP1-2, SKP1-3, SKP1-4, SKP1-5, SKP1-6, SKP1-7	7
กะปิชนิดใช้กึ่งผสม เคียว	สมุทรสาคร	SKP2	SKP2-1, SKP2-2, SKP2-3, SKP2-4, SKP2-5, SKP2-6, SKP2-7, SKP2-9, SKP2-10, SKP2-11, SKP2-12, SKP2-13	12
กะปิสำหรับทำน้ำ แกง	สมุทรสาคร	SKP3	SKP3-1, SKP3-2, SKP3-3, SKP3-4	4
กะปิสำหรับทำพริก แกง	สมุทรสาคร	SKP4	SKP4-1, SKP4-2, SKP4-3, SKP4-4, SKP4-5, SKP4-6, SKP4-7, SKP4-8, SKP4-9	9
กะปิสำหรับทำ น้ำพริก	สมุทรสาคร	SKP5	SKP5-1, SKP5-2, SKP5-3, SKP5-4, SKP5-5, SKP5-6, SKP5-7, SKP5-8	8

ตารางที่ 10 ชนิดตัวอย่าง แหล่งสถานที่เก็บ รหัสตัวอย่าง รหัสไอโซเลขและจำนวน (ต่อ)

ชนิดตัวอย่าง	แหล่ง สถานที่เก็บ	รหัส ตัวอย่าง	รหัสไอโซเลข	จำนวน
กะปิเมืองนคร	สมุทรสาคร	SKP6	SKP6-1, SKP6-2, SKP6-3, SKP6-4, SKP6-5, SKP6-6, SKP6-7, SKP6-8, SKP6-9, SKP6-10, SKP6-11, SKP6- 12, SKP6-13, SKP6-14	14
กะปิชนิดใช้กุ้งทำ อย่างเดียว	สมุทรสาคร	SKP7	SKP7-1, SKP7-2, SKP7-3, SKP7-4, SKP7-5, SKP7-6, SKP7-7, SKP7-8, SKP7-9, SKP7-10, SKP7-11, SKP7-12	12
กะปิชนิดใช้กุ้งตาโต	สมุทรสาคร	SKP8	SKP8-1, SKP8-2, SKP8-3, SKP8-4, SKP8-5, SKP8-6, SKP8-7, SKP8-8, SKP8-9, SKP8-10, SKP8-11	11
รวม				77

4.2 ผลการคัดกรองแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส

4.2.1 ผลการคัดกรองแบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสบนอาหารแข็ง

เมื่อนำแบคทีเรียที่แยกได้ 77 สายพันธุ์มาซัดบนอาหารแข็งที่เติมสับสเตรทแตกต่างกันด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ Tween 20, Tween 40, Tween 60 Tween 80 และ Tributyrin พบว่ามีจำนวนทั้งหมด 61 ไอโซเลข ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสบนอาหารแข็ง คือ เกิดการตกตะกอนชั้นรอบโคโลนีของแบคทีเรีย โดยแต่ละไอโซเลขจะเกิดแอกทิวิตีการผลิตเอนไซม์ไลเปสแตกต่างกันไป พบว่า 4 ไอโซเลขเกิดแอกทิวิตีบนอาหารที่เติม Tween 20 Tween 40 Tween 60 Tween 80 และ Tributyrin จำนวน 12 ไอโซเลขเกิดแอกทิวิตีบนอาหารที่เติม Tween 20 Tween 40 Tween 60 และ Tween 80 จำนวน 2 ไอโซเลขเกิดแอกทิวิตีบนอาหารที่เติม Tween 20 Tween 40 และ Tween 60 จำนวน 11 ไอโซเลขเกิดแอกทิวิตีบนอาหารที่เติม Tween 40 Tween 60 และ Tween 80 จำนวน 11 ไอโซเลขเกิดแอกทิวิตีบนอาหารที่เติม Tween 40 และ Tween 80 จำนวน 6 ไอโซเลขเกิดแอกทิวิตีบนอาหารที่เติม Tween 60 และ Tween 80 จำนวน 1 ไอโซเลขเกิดแอกทิวิตีบนอาหารที่เติม Tween 20 และ Tween 60 จำนวน 1 ไอโซเลขเกิดแอกทิวิตีบนอาหารที่เติม Tween 40 และ Tween 80 จำนวน 10 ไอโซเลขเกิดแอกทิวิตีบนอาหารที่เติม

Tween 60 จำนวน 2 ไอโซเลทเกิดแอกทิวิตีบนอาหารที่เติม Tween 80 และ 1 ไอโซเลทเกิดแอกทิวิตีบนอาหารที่เติม Tween 40 (ตารางที่ 11) ดังนั้นไอโซเลทที่มีแอกทิวิตีการผลิตเอนไซม์ไลเปสบนอาหารแข็งที่เติมสับสเตรท โดยที่เอนไซม์ไลเปสจะเข้าไปย่อยโมเลกุลของ Tween และปลดปล่อยกรดไขมันอิสระออกมาทำปฏิกิริยากับแคลเซียมในอาหารทำให้เกิดการตกตะกอนเป็นการคัดกรองเบื้องต้น จึงจำเป็นต้องนำแบคทีเรียจำนวนทั้งหมด 61 ไอโซเลทไปคัดกรองในอาหารเหลวต่อไป

ตารางที่ 11 แอกทิวิตีของเอนไซม์ไลเปสในอาหารแข็งที่มีสับสเตรทที่แตกต่างกัน

รหัสไอโซเลท	Tween				Tributyryn	จำนวนไอโซเลท
	20	40	60	80		
SKP1-1, SKP6-2, SKP6-6, SKP7-2	+	+	+	+	+	4
SKP2-1, SKP2-3, SKP2-8, SKP2-10, SKP2-11, SKP2-12, SKP4-5, SKP4-8, SKP6-8, SKP7-3, SKP8-8, SKP8-11	+	+	+	+	-	12
SKP5-4, SKP8-2	+	+	+	-	-	2
SKP1-3, SKP1-4, SKP1-5, SKP1-6, SKP1-7, SKP3-3, SKP4-1, SKP4-2, SKP4-7, SKP5-6, SKP6-12	-	+	+	+	-	11
SKP2-2, SKP4-9, SKP5-2, SKP5-5, SKP6-4, SKP6-5, SKP7-4, SKP7-5, SKP7-7, SKP7-11, SKP8-1	-	+	+	-	-	11
SKP2-4, SKP2-5, SKP2-6, SKP2-9, SKP6-14	-	-	+	+	-	6
SKP6-10	+	-	+	-	-	1
SKP4-4	-	+	-	+	-	1
SKP2-13, SKP5-8, SKP6-3, SKP6-9, SKP6-13, SKP8-3, SKP8-4, SKP8-5, SKP8-6, SKP8-10	-	-	+	-	-	10
SKP5-3, SKP6-1	-	-	-	+	-	2
SKP8-9	-	+	-	-	-	1
รวม						61

+, เกิดการตกตะกอนรอบโคโลนี; -, ไม่เกิดการตกตะกอนรอบโคโลนี

4.2.2 ผลการคัดกรองแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส ในอาหารเหลว

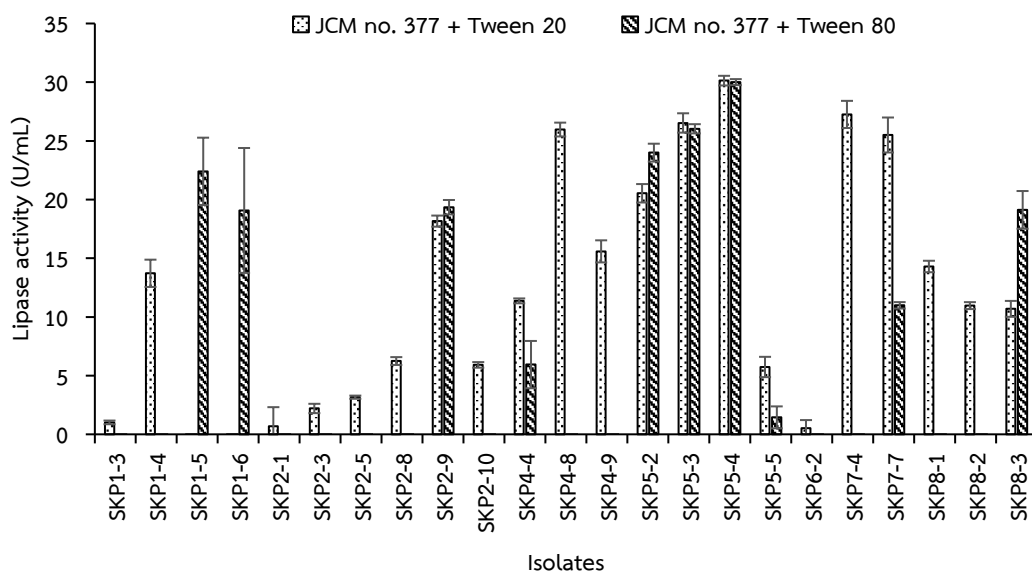
ผลการคัดกรองแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสในอาหารเหลว โดยใช้สับสเตรท *p*-Nitrophenyl butyrate (*p*-NPB) เป็นสารตั้งต้นด้วยวิธี colorimetric assay ซึ่งแสดงค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ไลเปสในหน่วยของยูนิต์ต่อมิลลิลิตร (U/mL) ค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากการคำนวณกราฟมาตรฐานและสูตรการคำนวณแสดงในภาคผนวกที่ 3 จากจำนวนทั้งหมด 61 ไอโซเลทมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสลงบนอาหารแข็ง เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรดัดแปลง JCM no. 377 ที่เติมสับสเตรท 1 เปอร์เซ็นต์ของ Tween 20 และ Tween 80 พบว่าค่าแอกทิวิตีเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสนั้น ในอาหารที่เติมสับสเตรท 1 เปอร์เซ็นต์ของ Tween 20 อยู่ในช่วง 0.00 ถึง 30.13 ± 0.41 U/mL และในอาหารที่เติมสับสเตรท 1 เปอร์เซ็นต์ของ Tween 80 อยู่ในช่วง 0.00 ถึง 30.00 ± 0.25 U/mL (ตารางที่ 12-13) จากการคัดกรองแบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสบนอาหารแข็งทั้งหมด 61 ไอโซเลทและได้แบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสในอาหารเหลวทั้งหมด 12 ไอโซเลท (ภาพที่ 3) จึงได้เลือกเป็นตัวแทนมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA เพื่อหาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการ

ตารางที่ 12 ผลแอกทีวิตีของเอนไซม์ไลเปสในอาหารเหลวและไอโซเลทที่นำไปวิเคราะห์ 16S rRNA gene

รหัสไอโซเลท	Lipase activity (U/mL)		ไอโซเลทที่วิเคราะห์ 16S rRNA gene
	Tween 20	Tween 80	
SKP1-3	1.015±0.15	0.0	SKP1-3
SKP1-4	13.71±1.16	0.0	SKP1-4
SKP1-5	0.0	22.24±2.86	SKP1-5
SKP1-6	0.0	19.07±5.32	SKP1-6
SKP2-1	0.68±1.62	0.0	SKP2-1
SKP2-3	2.02±0.39	0.0	SKP2-3
SKP2-5	3.16±0.13	0.0	
SKP2-8	6.24±0.33	0.0	
SKP2-9	28.16±0.47	29.34±0.61	
SKP2-10	5.81±0.23	0.0	
SKP4-4	11.36±0.21	5.93±2.01	
SKP4-8	25.96±0.59	0.0	SKP4-8
SKP4-9	15.58±0.94	0.0	
SKP5-2	20.53±0.78	23.99±0.76	
SKP5-3	29.52±0.82	30.0±0.39	
SKP5-4	30.13±0.41	30.0±0.25	SKP5-4
SKP5-5	5.73±0.86	1.44±0.93	SKP5-5
SKP6-2	0.53±0.67	0.0	SKP6-2
SKP7-4	27.25±1.15	0.0	SKP7-4
SKP7-7	25.5±1.49	10.98±0.27	
SKP8-1	14.29±0.48	0.0	
SKP8-2	10.96±0.29	0.0	SKP8-2
SKP8-3	10.68±0.67	19.12±1.60	
รวม			12

ตารางที่ 13 ผลแอกทีวิตีของเอนไซม์ไลเปสในอาหารเหลวและไอโซเลทที่นำไปวิเคราะห์ 16S rRNA gene (ต่อ)

รหัสไอโซเลท	Lipase activity (U/mL)		ไอโซเลทที่ วิเคราะห์ 16S rRNA gene
	Tween 20	Tween 80	
SKP1-1, SKP1-7, SKP2-2, SKP2-4, SKP2-6, SKP2-7, SKP2-11, SKP2-13, SKP3-2, SKP3-4, SKP4-1, SKP4-2, SKP4-3, SKP4-5, SKP4-7, SKP5-6, SKP5-7, SKP5-8, SKP6-1, SKP6-3, SKP6-4, SKP6-5, SKP6-6, SKP6-7, SKP6-8, SKP6-9, SKP6-10, SKP6-12, SKP6-13, SKP6-14, SKP7-2, SKP7-3, SKP7-8, SKP7-9, SKP7-10, SKP7-11, SKP8-4, SKP8-5, SKP8-6, SKP8-8, SKP8-9, SKP8-10, SKP8-11	0.0	0.0	SKP1-1, SKP1-7, SKP2-2, SKP2-4, SKP2-7, SKP2-13, SKP4-1, SKP5-6, SKP5-8, SKP6-1, SKP6-3, SKP6-4, SKP6-4, SKP6-7, SKP6-9, SKP6-10, SKP6-12, SKP6-13, SKP6-14, SKP7-3, SKP7-10, SKP7-11, SKP8-5, SKP8-6, SKP8-9, SKP8-11
รวม			26



ภาพที่ 3 แอกทิวิตีเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียชอบเค็มปานกลาง 23 ไอโซเลทในอาหารเหลว สูตรตัดแปลง JCM no. 377 ที่เติมสับสเตรท Tween 20 และ Tween 80

4.3 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียชอบเค็มปานกลาง

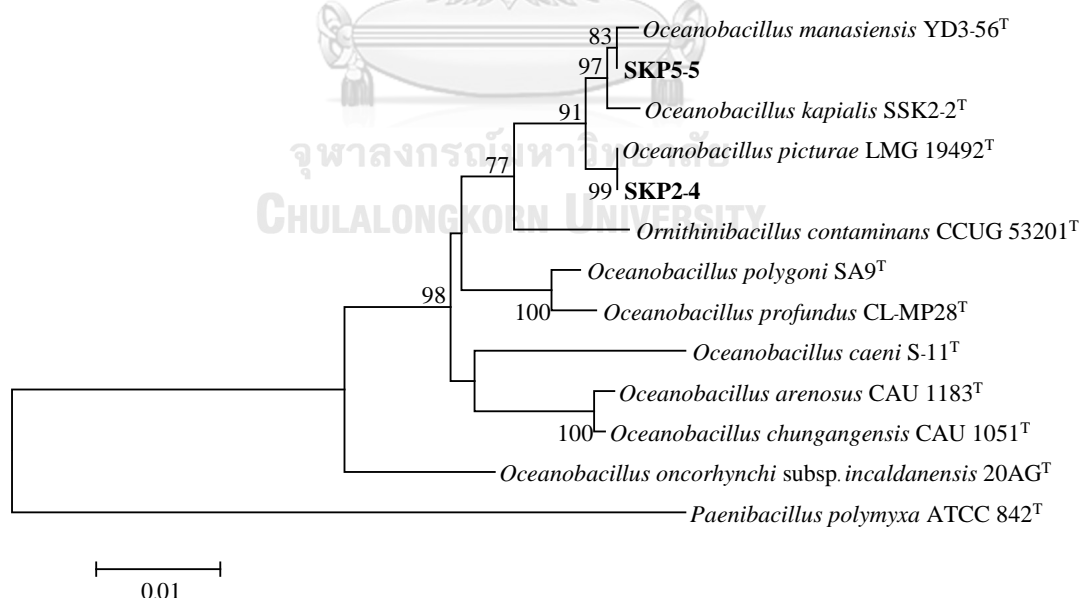
จากการคัดกรองขั้นที่ 4.2.1 และ 4.2.2 ได้คัดเลือกตัวแทนแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางที่มีแอกทิวิตีการผลิตเอนไซม์ไลเปสจำนวน 12 ไอโซเลทและ 26 (ตารางที่ 14-15) ไอโซเลทที่ไม่มีแอกทิวิตีในอาหารเหลวมาศึกษาลักษณะทางฟิโนไทป์และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

ผลจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี สรีรวิทยาและลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบว่าแบคทีเรียตัวแทนที่ย้อมติดสีแกรมบวกทั้งหมด 38 ไอโซเลท ทั้งที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสและตัวแทนของแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางสายพันธุ์อื่น สามารถจัดกลุ่มได้เป็นทั้งหมด 9 สกุล ดังผลในตารางที่ 16 ถึง 21 และภาพที่ 4 ถึง 16

1. สกุล *Oceanobacillus* เป็นแบคทีเรียรูปร่างท่อน มีลักษณะโคโลนีกลมมน ขอบเรียบ ไม่แผ่สร้างเอนไซม์คะตาเลสและออกซิเดส เจริญได้ในความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ที่ 1 ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ พบการย่อยแอสคูลิน หางนมและยูเรีย เกิดการสร้างกรดจากน้ำตาลอะราบิโนส ฟรุกโตส กลูโคส แมนนิทอล มอลโตส แมนโนส ไรโบส ซาลิซินและไซโลส ประกอบด้วย 2 สายพันธุ์ ได้แก่ SKP2-4 และ SKP5-5

สายพันธุ์ SKP2-4 มีโคโลนีสีส้มเหลืองอ่อน เจริญเติบโตในอาหารเหลวสูตรดัดแปลง JCM no. 377 ได้ในช่วงความเป็นกรดต่างตั้งแต่ 6 ถึง 9 อุณหภูมิ 30 ถึง 45 องศาเซลเซียส เกิดการย่อยแป้ง พบการใช้ไนเตรท สร้างกรดจากน้ำตาลแลคโตส เมลิไบโอส (ตารางที่ 14) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA สายพันธุ์ SKP2-4 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *Oceanobacillus piture* LMG19492^T (Lee, J. S. et al., 2006) 100 เปอร์เซ็นต์และมีความยาวเบส 1,349 นิวคลีโอไทด์ จึงพิสูจน์เอกลักษณ์ได้เป็น *Oceanobacillus piture* (ภาพที่ 4)

สายพันธุ์ SKP5-5 มีโคโลนีสีครีม เจริญเติบโตในอาหารเหลวสูตรดัดแปลง JCM no. 377 ได้ในช่วงความเป็นกรดต่างตั้งแต่ 6 ถึง 8 อุณหภูมิ 30 ถึง 40 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 14) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA สายพันธุ์ SKP5-5 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *Oceanobacillus manasiensis* YD3-56^T (Wang et al., 2010) 99.78 เปอร์เซ็นต์และมีความยาวเบส 1,372 นิวคลีโอไทด์ จึงพิสูจน์เอกลักษณ์ได้เป็น *Oceanobacillus manasiensis* (ภาพที่ 4)

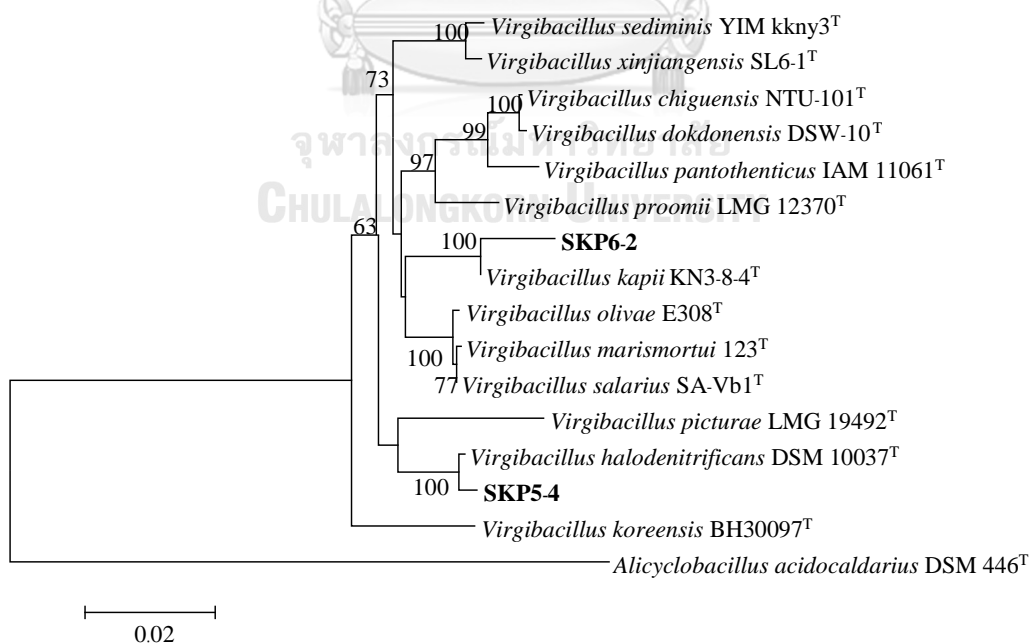


ภาพที่ 4 แผนภูมิวิวัฒนาการของสายพันธุ์ *Oceanobacillus* บนพื้นฐานของการเปรียบเทียบบริเวณยีน 16S rRNA ด้วยวิธี Neighbor-joining

2. สกุล *Virgibacillus* เป็นแบคทีเรียรูปร่างท่อน มีลักษณะโคโลนีกลมมน ขอบเรียบ สร้างเอนไซม์ คอะตาเลสและออกซิเดส เจริญได้ในอุณหภูมิ 30 ถึง 45 องศาเซลเซียสและความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ที่ 1 ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ เกิดการย่อยหางนมและยูเรีย พบการใช้ในเตรท เกิดการสร้างกรดจาก น้ำตาลฟรุกโตส กลูโคส แมนนิทอล มอลโตส ประกอบด้วย 2 สายพันธุ์ ได้แก่ SKP5-4 และ SKP6-2

สายพันธุ์ SKP5-4 มีสีโคโลนีครีมเหลือง ไม่แผ่ เจริญเติบโตในอาหารเหลวสูตรดัดแปลง JCM no. 377 ได้ในช่วงความเป็นกรดต่างตั้งแต่ 6 ถึง 9 สร้างกรดจากน้ำตาลกาแลคโตส ไรโบสและทรีฮาโลส (ตารางที่ 14) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA สายพันธุ์ SKP5-4 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *Virgibacillus halodenitrificans* DSM10037^T (Yoon et al., 2004) 99.57 เปอร์เซ็นต์และมีความยาวเบส 1,390 นิวคลีโอไทด์ จึงพิสูจน์เอกลักษณ์ได้เป็น *Virgibacillus halodenitrificans* (ภาพที่ 5)

สายพันธุ์ SKP6-2 มีสีโคโลนีครีมขาว แผ่ เจริญเติบโตในอาหารเหลวสูตรดัดแปลง JCM no. 377 ได้ในช่วงความเป็นกรดต่างตั้งแต่ 5 ถึง 9 เกิดการย่อยแอสคูลิน Tween 80 สร้างกรดจาก น้ำตาลเซลลูโลส ไบโอส แมนโนส แรมโนสและไซโลส (ตารางที่ 14) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA สายพันธุ์ SKP6-2 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *Virgibacillus kapii* KN3-8-4^T (Daroonpant et al., 2016) 99.58 เปอร์เซ็นต์และมีความยาวเบส 1,463 นิวคลีโอไทด์ จึงพิสูจน์เอกลักษณ์ได้เป็น *Virgibacillus kapii* (ภาพที่ 5)

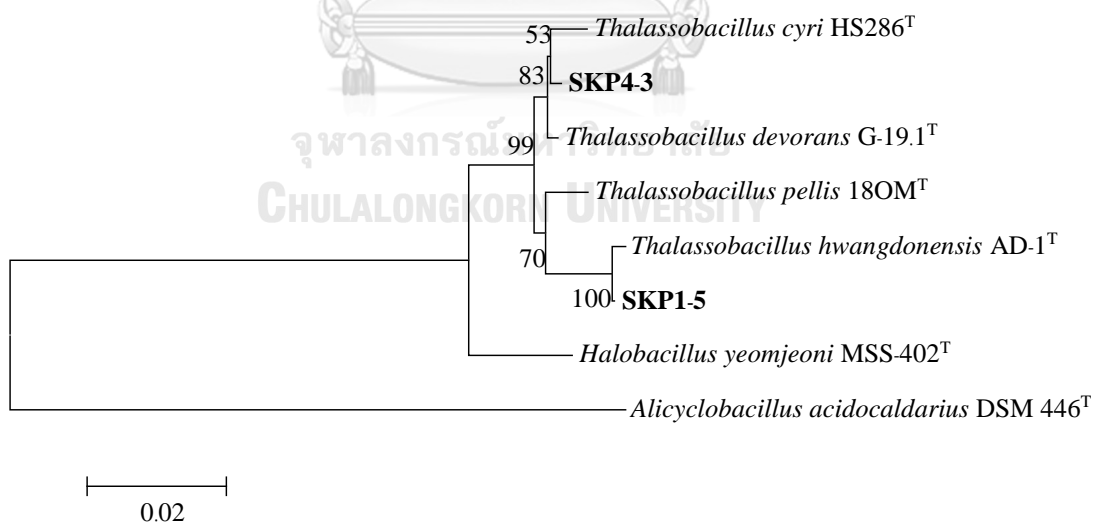


ภาพที่ 5 แผนภูมิวิวัฒนาการของสายพันธุ์ *Virgibacillus* บนพื้นฐานของการเปรียบเทียบบริเวณ ยีน 16S rRNA ด้วยวิธี Neighbor-joining

3. สกุล *Thalassobacillus* เป็นแบคทีเรียรูปร่างท่อน มีลักษณะโคโลนีกลมมน ขอบเรียบ ไม่แผ่ สร้างเอนไซม์อะซิเตสและออกซิเดส เจริญได้ในช่วงความเป็นกรดต่างตั้งแต่ 6 ถึง 8 ความเข้มข้น โซเดียมคลอไรด์ที่ 1 ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ พบการย่อยทวีน 80 พบการใช้ไนเตรท เกิดการสร้างกรดจาก น้ำตาลฟรุกโตส กลูโคสและมอลโตส ประกอบด้วย 2 สายพันธุ์ ได้แก่ SKP1-5 และ SKP4-3

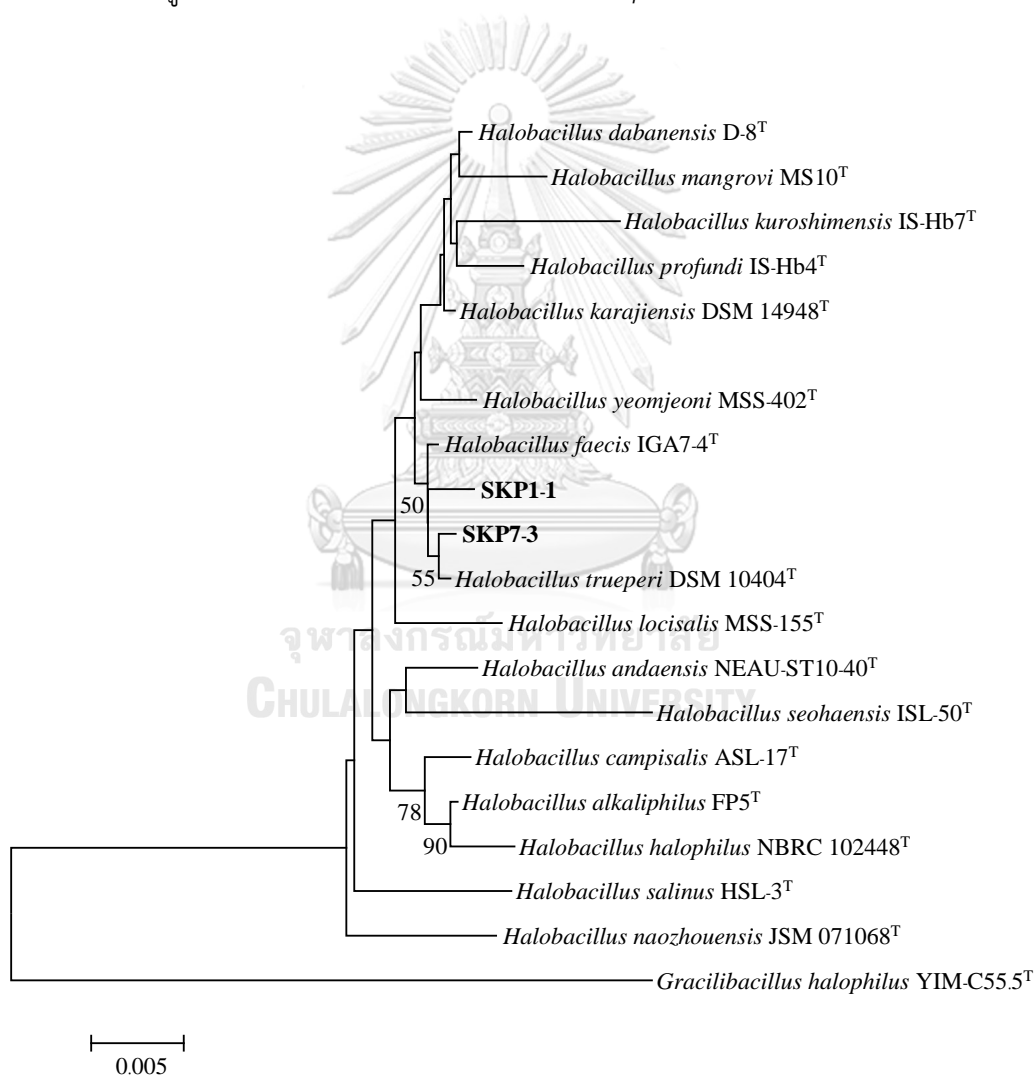
สายพันธุ์ SKP1-5 มีสีโคโลนีครีมเหลือง เจริญเติบโตในอาหารเหลวสูตรดัดแปลง JCM no. 377 ได้ในอุณหภูมิ 30 ถึง 50 องศาเซลเซียส พบการย่อยหางนมและยูเรีย (ตารางที่ 14) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA สายพันธุ์ SKP1-5 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *Thalassobacillus hwangdonensis* AD-1^T (Lee et al., 2010) 99.64 เปอร์เซ็นต์และมีความยาวเบส 1,381 นิวคลีโอไทด์ จึงพิสูจน์เอกลักษณ์ได้เป็น *Thalassobacillus hwangdonensis* (ภาพที่ 6)

สายพันธุ์ SKP4-3 มีสีโคโลนีสีครีมขาว เจริญเติบโตในอาหารเหลวสูตรดัดแปลง JCM no. 377 ได้ในอุณหภูมิ 30 ถึง 40 องศาเซลเซียส พบการย่อยอาร์จินีน สร้างกรดจากน้ำตาลเซลลูโลส ไบโอสแมนนิทอล และราฟิโนส (ตารางที่ 14) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA สายพันธุ์ SKP4-3 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *Thalassobacillus devorans* G-19.1^T (Garcia et al., 2005) 99.64 เปอร์เซ็นต์และมีความยาวเบส 1,388 นิวคลีโอไทด์ จึงพิสูจน์เอกลักษณ์ได้เป็น *Thalassobacillus devorans* (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 แผนภูมิวิวัฒนาการของสายพันธุ์ *Thalassobacillus* บนพื้นฐานของการเปรียบเทียบบริเวณยีน 16S rRNA ด้วยวิธี Neighbor-joining

4. สกุล *Halobacillus* เป็นแบคทีเรียรูปร่างท่อน มีลักษณะโคโลนีกลมมน ขอบเรียบ สีโคโลนีครีม เหลือง ไม่แผ่ ประกอบด้วย 2 สายพันธุ์ ได้แก่ SKP1-1 และ SKP7-3 สร้างเอนไซม์อะมิลเลสและออกซิเดส เจริญเติบโตในอาหารเหลวสูตรดัดแปลง JCM no. 377 ได้ช่วงความเป็นกรดต่างตั้งแต่ 6 ถึง 9 อุณหภูมิ 30 ถึง 45 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ที่ 1 ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ พบแอกทิวิตีการย่อยแป้ง ทางนมและยูเรีย สร้างกรดจากน้ำตาลกลูโคส โมลโตส เมลิไบโอส ราฟิโนส โรโบส และซาลิซิน (ตารางที่ 14) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA สายพันธุ์ SKP1-1 และ SKP7-3 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *Halobacillus trueperi* DSM10404^T (Spring et al., 1996) 99.55 และ 99.64 เปอร์เซ็นต์ และมีความยาวเบส 1,348 และ 1,390 นิวคลีโอไทด์ตามลำดับ จึงพิสูจน์เอกลักษณ์ได้เป็น *Halobacillus trueperi* (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 แผนภูมิวิวัฒนาการของสายพันธุ์ *Halobacillus* บนพื้นฐานของการเปรียบเทียบบริเวณยีน 16S rRNA ด้วยวิธี Neighbor-joining

ตารางที่ 14 ลักษณะทางฟีโนไทป์ที่แตกต่างของสายพันธุ์กลุ่ม *Oceanobacillus*, *Virgibacillus*, *Halobacillus* และ *Thalassobacillus*

Characteristics	<i>Oceanobacillus</i>		<i>Virgibacillus</i>		<i>Halobacillus</i>		<i>Thalassobacillus</i>	
	SKP2-4	SKP5-5	SKP5-4	SKP6-2	SKP1-1	SKP7-3	SKP1-5	SKP4-3
Pigmentation	OY	CW	CY	CW	CW	CW	CW	CY
Growth at pH 5	-	-	-	+	-	-	-	-
Growth at pH 9	+	-	+	+	+	+	-	-
Growth at 45°C	+	-	+	+	+	+	+	-
Growth at 50°C	-	-	-	-	-	-	+	-
Hydrolysis of								
Aesculin	+	+	-	+	-	-	-	-
L-Arginine	-	-	-	-	-	-	-	+
Gelatin	-	-	-	-	-	-	-	-
Skim milk	+	+	+	+	+	+	+	-
Starch	+	-	-	-	+	+	-	-
Tween 80	-	-	-	+	-	-	+	+
Urea	+	+	W	W	+	+	+	-
Nitrate reduction	+	-	+	+	-	-	+	-
Acid form:								
L(+)-Arabinose	+	+	-	-	-	-	-	-
D(+)-Cellobiose	+	-	-	+	+	+	-	+
D(-)-Fructose	+	-	-	-	W	+	+	+
D(+)-Galactose	+	-	+	-	+	+	-	-
Lactose	+	-	-	-	-	-	-	-
D-Manitol	+	+	+	+	+	+	-	+
D(+)-Mannose	+	+	-	+	+	+	-	-
D(+)-Melibiose	+	-	-	-	+	+	-	-
D(+)-Raffinose	-	-	-	-	+	W	-	+
L(+)-Rhamnose	-	+	-	W	-	-	-	-
D(-)-Ribose	+	+	+	-	-	-	-	-
D(-)-Salicin	+	+	-	-	+	W	-	-
D(+)-Trehalose	-	-	+	-	+	+	-	-
D(+)-Xylose	+	+	-	+	+	+	-	-

+, เจริญ; -, ไม่เจริญ; W, เจริญน้อย; OY, สีส้มเหลือง; CW, สีครีมขาว; CY, สีครีมเหลือง

5. สกุล *Bacillus* เป็นแบคทีเรียรูปร่างท่อน มีลักษณะโคโลนีกลมมน ขอบเรียบ ประกอบด้วย 5 สายพันธุ์ ได้แก่ SKP1-3, SKP1-4, SKP4-1, SKP5-8 และ SKP7-4

สายพันธุ์ SKP1-3 มีสีโคโลนีขาวขุ่น สร้างเอนไซม์อะไมเลสและ ออกซิเดส เจริญเติบโตในอาหารเหลวสูตรดัดแปลง JCM no. 377 ได้ในช่วงความเป็นกรดต่างตั้งแต่ 6 ถึง 9 อุณหภูมิ 30 ถึง 40 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ที่ 0 ถึง 15 เปอร์เซ็นต์ พบการย่อย Tween 80 พบการใช้ไนเตรท (ตารางที่ 15) สร้างกรดจากน้ำตาลฟรุกโตส มอลโตสและทรีฮาโลสจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA สายพันธุ์ SKP1-3 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *Bacillus seohaeanensis* BH724^T (Lee, J. C. et al., 2006) 99.64 เปอร์เซ็นต์และมีความยาวเบส 1,396 นิวคลีโอไทด์ จึงพิสูจน์เอกลักษณ์ได้เป็น *Bacillus seohaeanensis* ภาพที่ 8

สายพันธุ์ SKP1-4 มีสีโคโลนีขาว มีเมือกไหล มันวาว สร้างเอนไซม์อะไมเลส แต่ไม่สร้างเอนไซม์ออกซิเดส เจริญเติบโตในอาหารเหลวสูตรดัดแปลง JCM no. 377 ได้ในช่วงความเป็นกรดต่างตั้งแต่ 6 ถึง 9 อุณหภูมิ 30 ถึง 50 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ที่ 0 ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ พบการย่อยแป้ง ยูเรียและหางนม พบการใช้ไนเตรท (ตารางที่ 15) สร้างกรดจากน้ำตาลอะราบินอส ฟรุกโตส แลคโตส แมนนิทอล มอลโตส แมนโนสและไซโลส จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA สายพันธุ์ SKP1-4 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42^T (Borriss et al., 2011) 99.86 เปอร์เซ็นต์และมีความยาวเบส 1,393 นิวคลีโอไทด์ จึงพิสูจน์เอกลักษณ์ได้เป็น *Bacillus amyloliquefaciens* (ภาพที่ 8)

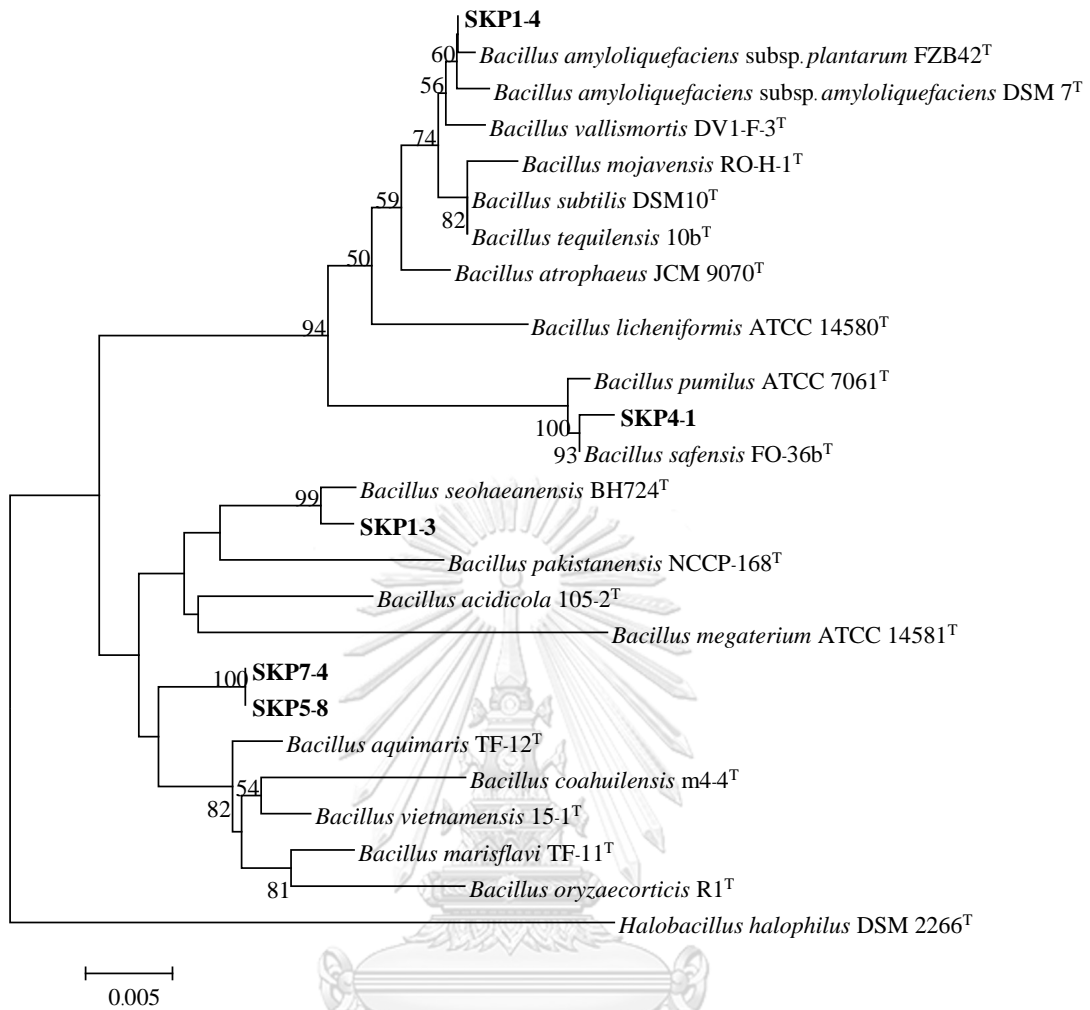
สายพันธุ์ SKP4-1 มีโคโลนีสีขาวขุ่น สร้างเอนไซม์อะไมเลส แต่ไม่สร้างเอนไซม์ออกซิเดส เจริญเติบโตในอาหารเหลวสูตรดัดแปลง JCM no. 377 ได้ในช่วงความเป็นกรดต่างตั้งแต่ 5 ถึง 8 อุณหภูมิ 30 ถึง 50 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ที่ 0 ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ พบการย่อย แอสคูลิน หางนมและยูเรีย พบการใช้ไนเตรท (ตารางที่ 15) สร้างกรดจากน้ำตาลอะราบินอส เซลลูโลส ฟรุกโตส มอลโตส แมนโนส ไรโบส ซาโลซินและทรีฮาโลส จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA สายพันธุ์ SKP4-1 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *Bacillus safensis* FO-36b^T (Satomi et al., 2006) 99.85 เปอร์เซ็นต์และมีความยาวเบส 1,376 นิวคลีโอไทด์ จึงพิสูจน์เอกลักษณ์ได้เป็น *Bacillus safensis* (ภาพที่ 8)

สายพันธุ์ SKP5-8 และ SKP7-4 มีสีโคโลนีครีมส้ม ไม่แผ่ สร้างเอนไซม์อะไมเลสและออกซิเดส เจริญเติบโตในอาหารเหลวสูตรดัดแปลง JCM no. 377 ได้ในช่วงความเป็นกรดต่างตั้งแต่ 6 ถึง 8 อุณหภูมิ 30 ถึง 45 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ที่ 1 ถึง 15 เปอร์เซ็นต์ พบการย่อยแป้ง หางนมและยูเรีย สร้างกรดจากน้ำตาลเซลลูโลส ไบโอส กลูโคส แมนนิทอล แมนโนส มอลโตส ซาลิซิน ทรีฮาโลสและไซโลส (ตารางที่ 15) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA สายพันธุ์ SKP5-8 และ SKP7-4 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *Bacillus vietnamensis* 15-1^T (Noguchi et al., 2004) 98.02 และ 97.94 เปอร์เซ็นต์และมีความยาวเบส 1,366 และ 1,479 นิวคลีโอไทด์ ตามลำดับ จึงพิสูจน์เอกลักษณ์ได้เป็น *Bacillus* sp. (ภาพที่ 8)

ตารางที่ 15 ลักษณะทางฟีโนไทป์ที่แตกต่างของสายพันธุ์กลุ่ม *Bacillus*

Characteristics	<i>Bacillus</i>				
	SKP1-3	SKP5-8	SKP7-4	SKP1-4	SKP4-1
Pigmentation	W	CO	CO	W	CW
Oxidase	+	+	+	-	-
Growth at pH 5	-	-	-	+	-
Growth at 45°C	-	+	+	+	+
Growth at 50°C	-	-	-	+	+
Growth in 15% NaCl	+	+	+	-	+
Growth in 20% NaCl	-	-	-	-	+
Hydrolysis					
Aesculin	-	-	-	-	+
Gelatin	-	-	-	+	-
Skim milk	-	+	+	+	+
Starch	-	-	-	-	-
Tween 80	+	-	-	-	-
Urea	-	W	W	W	W
Nitrate reduction	+	-	-	+	+
Acid form:					
L(+)-Arabinose	-	-	-	+	+
D-(+)-Cellobiose	-	+	+	-	+
D(-)-Fructose	+	-	-	+	+
Lactose	-	-	-	+	-
Maltose	+	+	+	+	W
D(+)-Mannose	-	+	+	+	+
D(-)-Ribose	-	-	-	-	+
D(-)-Salicin	-	+	+	-	+
D(+)-Trehalose	+	+	+	-	+
D(+)-Xylose	-	+	+	+	-

+, เจริญ; -, ไม่เจริญ; W, เจริญน้อย; CW, สีครีมขาว; CO, สีครีมส้ม;



ภาพที่ 8 แผนภูมิวิวัฒนาการของสายพันธุ์ *Bacillus* บนพื้นฐานของการเปรียบเทียบยีนบริเวณ 16S rRNA ด้วยวิธี Neighbor-joining

6. สกุล *Staphylococcus* เป็นแบคทีเรียรูปร่างกลม มีลักษณะโคโลนีกลมมน ขอบเรียบ ไม่แผ่สร้างเอนไซม์คะตาเลส ไม่สร้างเอนไซม์ออกซิเดส ประกอบด้วย 9 สายพันธุ์ ได้แก่ SKP2-1, SKP2-2, SKP2-3, SKP2-12, SKP6-3, SKP6-4, SKP6-14, SKP7-10 และ SKP8-11

สายพันธุ์ SKP2-1, SKP2-2, SKP2-3, SKP2-12, SKP6-3, SKP6-4 และ SKP6-14 มีสีโคโลนีเหลือง เจริญเติบโตในอาหารเหลวสูตรดัดแปลง JCM no. 377 ได้ในช่วงความเป็นกรดต่างตั้งแต่ 5 ถึง 8 อุณหภูมิ 30 ถึง 40 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ที่ 1 ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ เกิดการย่อยอาร์จินีน ทางนมและยูเรีย พบการใช้ในเตรท สร้างกรดจากน้ำตาลอะราบิโนส แลคโตส แมนโนส ไรโบสและไซโลส (ตารางที่ 16) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบว่าสายพันธุ์ SKP2-1, SKP2-2, SKP2-3, SKP2-12, SKP6-3, SKP6-4 และ SKP6-14 มีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *saprophyticus* ATCC 15305^T (Hajek et al., 1996) 99.64 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์และมีความยาวเบส ตั้งแต่ 1,376 ถึง 1,384 นิวคลีโอไทด์ จึงพิสูจน์เอกลักษณ์ได้เป็น *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *saprophyticus* (ภาพที่ 9)

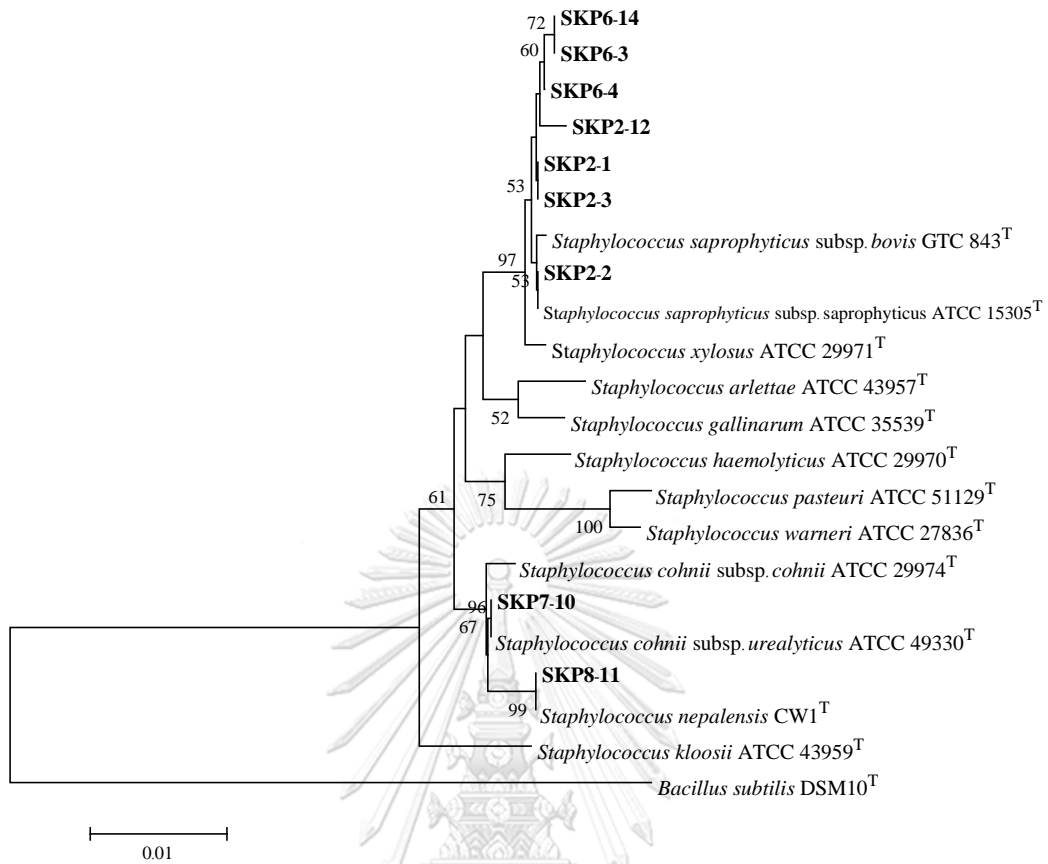
สายพันธุ์ SKP7-10 มีสีโคโลนีขาว เจริญเติบโตในอาหารเหลวสูตรดัดแปลง JCM no. 377 ได้ในช่วงความเป็นกรดต่างตั้งแต่ 6 ถึง 8 อุณหภูมิ 30 ถึง 40 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ที่ 1 ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ เกิดการย่อยอาร์จินีน ทางนม ทวีน 80 และยูเรีย พบการใช้ในเตรท สร้างกรดจากน้ำตาลฟรุกโตส กาแลคโตส กลูโคส แลคโตส แมนนิทอล มอลโตส แมนโนสและทรีฮาโลส (ตารางที่ 16) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบว่าสายพันธุ์ SKP7-10 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *Staphylococcus cohnii* subsp. *urealyticus* ATCC 49330^T (Kloos & Wolfshohl, 1991) 100 เปอร์เซ็นต์และมีความยาวเบส 1,401 นิวคลีโอไทด์ จึงพิสูจน์เอกลักษณ์ได้เป็น *Staphylococcus cohnii* (ภาพที่ 9)

สายพันธุ์ SKP8-11 มีสีโคโลนีครีมเหลือง เจริญเติบโตในอาหารเหลวสูตรดัดแปลง JCM no. 377 ได้ในช่วงความเป็นกรดต่างตั้งแต่ 6 ถึง 8 อุณหภูมิ 30 ถึง 45 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ที่ 1 ถึง 15 เปอร์เซ็นต์ เกิดการย่อยแอสคูลิน อาร์จินีน ทางนม ทวีน 80 และยูเรีย พบการใช้ในเตรท เกิดการสร้างกรดจากน้ำตาลอะราบิโนส ฟรุกโตส กาแลคโตส กลูโคส แลคโตส แมนนิทอล มอลโตส แมนโนส ไรโบส ซาลิซิน ทรีฮาโลสและไซโลส (ตารางที่ 16) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบว่าสายพันธุ์ SKP8-11 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *Staphylococcus nepalensis* CW1^T (Spergser et al., 2003) 100 เปอร์เซ็นต์และมีความยาวเบส 1,402 นิวคลีโอไทด์ จึงพิสูจน์เอกลักษณ์ได้เป็น *Staphylococcus nepalensis* (ภาพที่ 9)

ตารางที่ 16 ลักษณะทางฟิโนไทป์ที่แตกต่างของสายพันธุ์กลุ่ม *Staphylococcus*

Characteristics	<i>Staphylococcus</i>		
	SKP2-1, SKP2-2, SKP2-3, SKP2-12, SKP6-3, SKP6-4, SKP6-14	SKP7-10	SKP8-11
Pigmentation	Y	W	CY
Growth at pH 5	+(-1)	-	-
Growth at 45°C	-(+1)	-	+
Growth in 15% NaCl	+(-2)	+	+
Growth in 20% NaCl	+(-3)	+	-
Hydrolysis of			
Aesculin	-	-	+
L-Arginine	+(-1)	+	+
Skim milk	+(-3)	+	+
Tween 80	-	+	+
Nitrate reduction	+	+	+
Acid form:			
L(+)-Arabinose	+(1)	-	+
D-(+)-Cellobiose	-	-	+
D(+)-Galactose	-(-3)	+	+
Lactose	+(-3)	+	+
D(+)-Mannose	+(1)	+	+
D(-)-Ribose	+(-2)	-	+
D(-)-Salicin	-	-	+
D(+)-Xylose	+(-1)	-	+

+, เจริญ; -, ไม่เจริญ; W, สีขาว; CY, สีครีมเหลือง; Y, สีเหลือง



ภาพที่ 9 แผนภูมิวิวัฒนาการของสายพันธุ์ *Staphylococcus* บนพื้นฐานของการเปรียบเทียบยีนบริเวณ 16S rRNA ด้วยวิธี Neighbor-joining

7. สกุล *Salinicoccus* เป็นแบคทีเรียรูปร่างกลม มีลักษณะโคโลนีกลมมน ขอบเรียบ ไม่แผ่ มีโคโลนีสีชมพู ประกอบด้วย 12 สายพันธุ์ ได้แก่ SKP2-7, SKP5-6, SKP6-9, SKP6-13, SKP8-5, SKP8-8, SKP6-7, SKP6-10, SKP6-12, SKP6-1, SKP8-6 และ SKP8-9

สายพันธุ์ SKP2-7, SKP5-6, SKP6-9, SKP6-13, SKP8-5 และ SKP8-8 สร้างเอนไซม์อะซิเตสและออกซิเดส เจริญเติบโตในอาหารเหลวสูตรดัดแปลง JCM no. 377 ได้ในช่วงความเป็นกรดต่างตั้งแต่ 6 ถึง 9 อุณหภูมิ 30 ถึง 45 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ที่ 5 ถึง 20 เปอร์เซ็นต์เกิดการย่อยยูเรีย สร้างกรดจากน้ำตาลมอลโตส แมนโนสและทรีฮาโลส (ตารางที่ 17) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบว่าสายพันธุ์ SKP2-7, SKP5-6, SKP6-9, SKP6-13, SKP8-5 และ SKP8-8 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงสายพันธุ์ *Salinicoccus siamensis* PN1-2^T (Pakdeeto et al., 2007b) ตั้งแต่ 99.35 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์และมีความยาวเบสตั้งแต่ 1,385 ถึง 1,396 นิวคลีโอไทด์ ตามลำดับ จึงพิสูจน์เอกลักษณ์ได้เป็น *Salinicoccus siamensis* (ภาพที่ 10)

สายพันธุ์ SKP6-7 และ SKP6-10 สร้างเอนไซม์อะซิเตส แต่ไม่สร้างเอนไซม์ออกซิเดส เจริญเติบโตในอาหารเหลวสูตรดัดแปลง JCM no. 377 ได้ในช่วงความเป็นกรดต่างตั้งแต่ 6 ถึง 8 อุณหภูมิ 30 ถึง 45 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ที่ 5 ถึง 20 เปอร์เซ็นต์เกิดการย่อยอาร์จินิน หางนมและทวีน 80 พบการใช้ในเตรท สร้างกรดจากน้ำตาลฟรุกโตส กลูโคส มอลโตสและแมนโนส (ตารางที่ 17) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA สายพันธุ์ SKP6-7 และ SKP6-10 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสายพันธุ์ *Salinicoccus roseus* DSM5351^T (Ventosa et al., 1990) ตั้งแต่ 99.71 ถึง 99.79 เปอร์เซ็นต์และมีความยาวเบส 1,390 และ 1,420 นิวคลีโอไทด์ตามลำดับ จึงพิสูจน์เอกลักษณ์ได้เป็น *Salinicoccus roseus* (ภาพที่ 10)

สายพันธุ์ SKP6-1, SKP6-12 และ SKP8-6 เจริญเติบโตในอาหารเหลวสูตรดัดแปลง JCM no. 377 ได้ในช่วงความเป็นกรดต่างตั้งแต่ 6 ถึง 9 อุณหภูมิ 30 ถึง 40 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ที่ 5 ถึง 10 เปอร์เซ็นต์เกิดการย่อยยูเรีย เกิดการสร้างกรดจากน้ำตาลฟรุกโตส กลูโคส มอลโตส แมนโนส ไโรโบสและทรีฮาโลส (ตารางที่ 17) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA สายพันธุ์ SKP6-1, SKP6-12 และ SKP8-6 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *Salinicoccus salsiraiiae* RH-1^T (Franca et al., 2006) ตั้งแต่ 99.78 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์และมีความยาวเบส 1,350 ถึง 1,512 นิวคลีโอไทด์ ตามลำดับ จึงพิสูจน์เอกลักษณ์ได้เป็น *Salinicoccus salsiraiiae* (ภาพที่ 10)

สายพันธุ์ SKP8-9 สร้างเอนไซม์อะมิลเลสและออกซิเดส เจริญเติบโตในอาหารเหลวสูตรดัดแปลง JCM no. 377 ได้ในช่วงความเป็นกรดต่างตั้งแต่ 6 ถึง 9 อุณหภูมิ 30 ถึง 45 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ที่ 5 ถึง 15 เปอร์เซ็นต์ เกิดการย่อยยูเรีย เกิดการสร้างกรดจาก (ตารางที่ 17) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA สายพันธุ์ SKP8-9 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *Salinicoccus amylolyticus* JC304^T (Srinivas et al., 2016) 99.34 เปอร์เซ็นต์และมีความยาวเบส 1,368 นิวคลีโอไทด์ จึงพิสูจน์เอกลักษณ์ได้เป็น *Salinicoccus amylolyticus* (ภาพที่ 10)

8. สกุล *Nesterenkonia* ย้อมติดสีแกรมบวก รูปร่างกลม มีลักษณะโคโลนีกลมมน ขอบเรียบ มีโคโลนีสีเหลืองขุ่น ไม่แผ่ สร้างเอนไซม์อะมิลเลส แต่ไม่สร้างเอนไซม์ออกซิเดส ประกอบด้วย 2 สายพันธุ์ ได้แก่ SKP2-13 และ SKP7-11 เกิดการย่อยยูเรีย

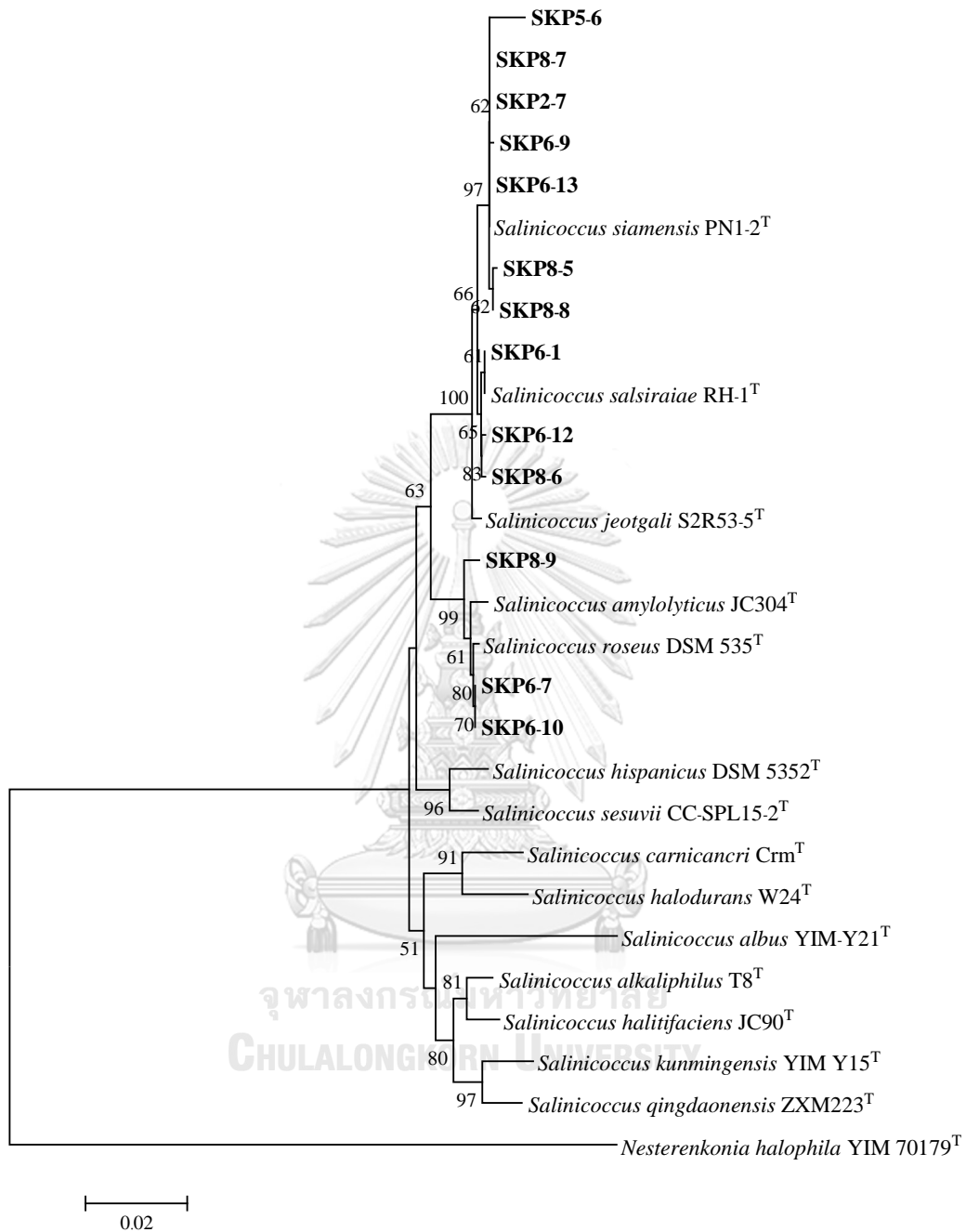
สายพันธุ์ SKP2-13 เจริญเติบโตในอาหารเหลวสูตรดัดแปลง JCM no. 377 ได้ในช่วงความเป็นกรดต่างตั้งแต่ 6 ถึง 9 อุณหภูมิ 30 ถึง 45 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ที่ 1 ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ เกิดการย่อยอาร์จินีน สร้างกรดจากน้ำตาลฟรุกโตส กาแลคโตส กลูโคส แมนนิทอล และทรีฮาโลส (ตารางที่ 17) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA สายพันธุ์ SKP2-13 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *Nesterenkonia lacusekhoensis* EL-30^T (Collins et al., 2002) 99.78 เปอร์เซ็นต์และมีความยาวเบส 1,390 นิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 11)

สายพันธุ์ SKP7-11 เจริญเติบโตในอาหารเหลวสูตรดัดแปลง JCM no. 377 ได้ในช่วงความเป็นกรดต่างตั้งแต่ 6 ถึง 8 อุณหภูมิ 30 ถึง 40 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ที่ 1 ถึง 15 เปอร์เซ็นต์ เกิดการย่อยแป้ง สร้างกรดจากน้ำตาลอะราบิโนส เซลลูโลส ฟรุกโตส กลูโคส แลคโตส มอลโตส ทรีฮาโลสและไซโลส (ตารางที่ 17) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน 16S rRNA สายพันธุ์ SKP7-11 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสายพันธุ์ *Nesterenkonia halophila* 70179^T (Li et al., 2008) 99.27 เปอร์เซ็นต์และมีความยาวเบส 1,375 นิวคลีโอไทด์และพบว่ามี ความแตกต่างกันทางพีโนไทป์ที่แตกต่างกัน ได้แก่ สีโคโลนี การย่อยแป้ง ทวิน 80 และการสร้างกรดจากน้ำตาลฟรุกโตส กลูโคสและแลคโตส จากสายพันธุ์มาตรฐาน *Nesterenkonia halophila* 70179^T จึงพิสูจน์เอกลักษณ์ได้เป็น *Nesterenkonia* sp. (ภาพที่ 11)

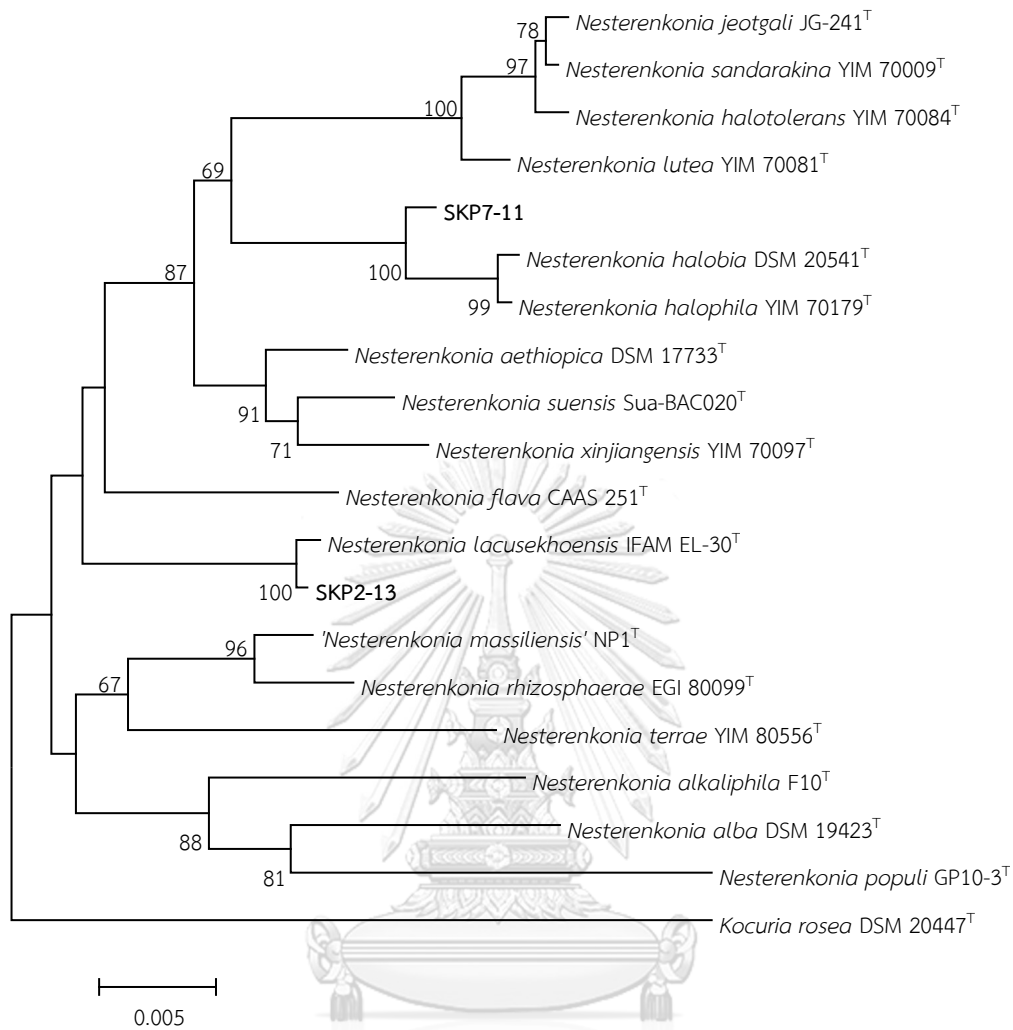
ตารางที่ 17 ลักษณะทางฟีโนไทป์ที่แตกต่างของสายพันธุ์กลุ่ม *Salinicoccus* และ *Nesterenkonia*

Characteristics	<i>Salinicoccus</i>					<i>Nesterenkonia</i>	
	SKP2-7, SKP5-6, SKP6-9, SKP6-13, SKP8-5,	SKP6-7, SKP6-10	SKP6-12, SKP6-1, SKP8-6	SKP8-9	SKP2-13	SKP7-11	
Pigmentation	P	P	P	P	Y	Y	
Oxidase	+	-	+	+	-	-	
Growth at pH 9	+(-2)	-	+	+	+	-	
Growth at 45°C	-(+2)	+	-	+	+	-	
Growth in 15% NaCl	+(-2)	+	-	+	+	+	
Growth in 20% NaCl	-(+2)	+	-	-	+	-	
Hydrolysis of							
L-Arginine	-(+1)	+	-	-	+	-	
Starch	-	-	-	-	-	+	
Skim milk	-	+(+1)	-	-	-	-	
Urea	W(+2)	-	W	+	W	W	
Nitrate reduction	-(+2)	+	-	-	-	-	
Acid form:							
D-Manitol	-	-	-	W	+	-	
Maltose	-(+2), 1W	+	W	+	-	+	
D(+)-Mannose	-2, +2, 1W	+(1W)	W	+	-	-	
D(-)-Ribose	+	-	+	+	-	-	
D(-)-Salicin	-	-	-	-	-	-	
D(+)-Trehalose	+(-1)	+(-1)	+	+	+	+	
D(+)-Xylose	-(1W)	-	-	-	-	+	

+, เจริญ; -, ไม่เจริญ; W, เจริญน้อย; P, สีชมพู; Y, สีเหลือง



ภาพที่ 10 แผนภูมิวิวัฒนาการของสายพันธุ์ *Salinococcus* บนพื้นฐานของการเปรียบเทียบยีนบริเวณ 16S rRNA ด้วยวิธี Neighbor-joining



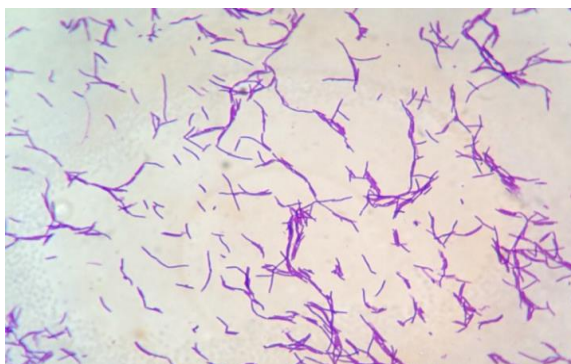
ภาพที่ 11 แผนภูมิวิวัฒนาการของสายพันธุ์ *Nesterenkonia* บนพื้นฐานของการเปรียบเทียบยีนบริเวณ 16S rRNA ด้วยวิธี Neighbor-joining

9. สกุล *Allobacillus* ประกอบด้วย 2 สายพันธุ์ ได้แก่ SKP4-8 และ SKP8-2 เป็นแบคทีเรียรูปร่างท่อนยาว (ภาพที่ 12 และ 13) ลักษณะโคโลนีกลมมน ขอบเรียบ ไม่แผ่ มีสีโคโลนีสีขาวครีม สร้างสปอร์บริเวณปลายเซลล์ (terminal endospores) (ภาพที่ 14) สร้างเอนไซม์อะไมเลสและออกซิเดส เจริญเติบโตในอาหารเหลวสูตรดัดแปลง JCM no. 377 ได้ช่วงความเป็นกรดต่างตั้งแต่ 5-9 อุณหภูมิ 30-45 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ที่ 1-20 เปอร์เซ็นต์ (เจริญเติบโตได้ดีในความเป็นกรดต่างที่ 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ที่ 8-10 เปอร์เซ็นต์) เกิดการสร้างกรดจากน้ำตาลแมนโนส, ไรโบสและฟรุกโตส สายพันธุ์ SKP4-8 และ SKP8-2 มีเปอร์เซ็นต์ของเบส G+C อยู่ที่ 40.5 และ 40.8 ตามลำดับ ในตารางที่ 20 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA พบว่าสายพันธุ์ SKP4-8 และ SKP8-2 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสายพันธุ์ *Allobacillus halotolerans* B3A^T (Sheu et al., 2011) ถึง 99.14 และ 98.80 เปอร์เซ็นต์และมีความยาวเบส 1,393 และ 1,434 นิวคลีโอไทด์ ตามลำดับ (ภาพที่ 15)

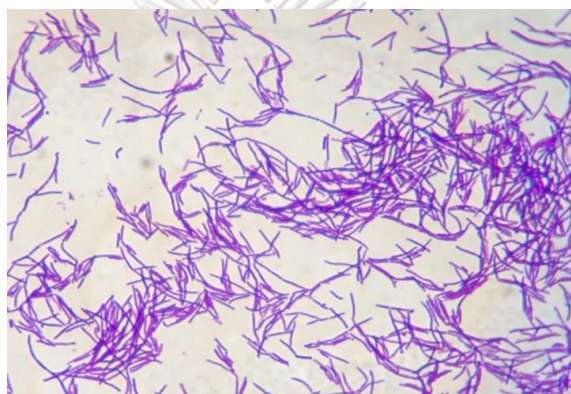
จากการศึกษาองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรีย พบว่าในชั้นของเพปติโดไกลแคน จะมี meso-diaminopimelic acid เป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ และมี menaquinone 7 isoprene เป็นองค์ประกอบหลักของ isoprenoid quinone และพบองค์ประกอบของ fatty acid พบว่าในสายพันธุ์ SKP4-8 ประกอบด้วย iso-C_{15:0} (45.8%), iso-C_{16:0} (3.4%), antesio-C_{15:0} (17.9%) และ antesio-C_{17:0} (6.6%) แต่ในสายพันธุ์ SKP8-2 ประกอบด้วย iso-C_{15:0} (20.5%), iso-C_{16:0} (7.5%), antesio-C_{15:0} (42.4%) และ antesio-C_{17:0} (14.3%) ซึ่งจะแสดงให้เห็นความแตกต่างกันกับสายพันธุ์ *Allobacillus halotolerans* B3A^T (ตารางที่ 18)

จากการศึกษาความมีขั้วของผนังเซลล์ (polar lipids) ของสายพันธุ์ SKP4-8 และ SKP8-2 ประกอบด้วย Phosphatidylglycerol, diphosphatidylglycerol, phospholipids 2 โมเลกุลและ glycolipid 1 โมเลกุล เป็นองค์ประกอบหลักของส่วนมีขั้วของผนังเซลล์ (ภาพที่ 16 และ 17)

จากการศึกษาการเข้าคู่กันของดีเอ็นเอ (genomic DNA-DNA hybridization) พบว่าสายพันธุ์ SKP4-8 และ SKP8-2 มีเปอร์เซ็นต์การเข้าคู่กันของดีเอ็นเอเป็น 84 เปอร์เซ็นต์ และสายพันธุ์ดั้งเดิม *Allobacillus halotolerans* B3A^T อยู่ที่ 46.6 และ 56.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีค่าน้อยกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ (Wayne et al., 1987) แสดงให้เห็นว่าค่าการเข้าคู่กันของดีเอ็นเอน้อยกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ให้จัดว่าเป็นเชื้อสปีชีส์ใหม่ แต่การเข้าคู่ระหว่างสายพันธุ์ SKP4-8 และ SKP8-2 มีค่าการเข้าคู่กันของดีเอ็นเอมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ จัดว่าเป็นเชื้อสปีชีส์เดียวกัน

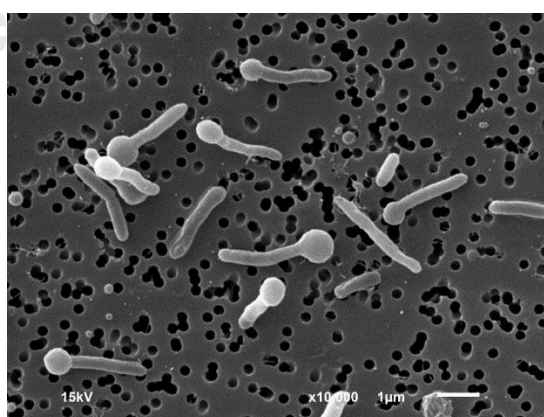


ภาพที่ 12 เซลล์ย้อมติดสีแกรมบวกของสายพันธุ์ SKP4-8 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์บนอาหารสูตรดัดแปลง JCM no. 377 บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง



ภาพที่ 13 เซลล์ย้อมติดสีแกรมบวกของสายพันธุ์ SKP8-2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์บนอาหารสูตรดัดแปลง JCM no. 377 บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



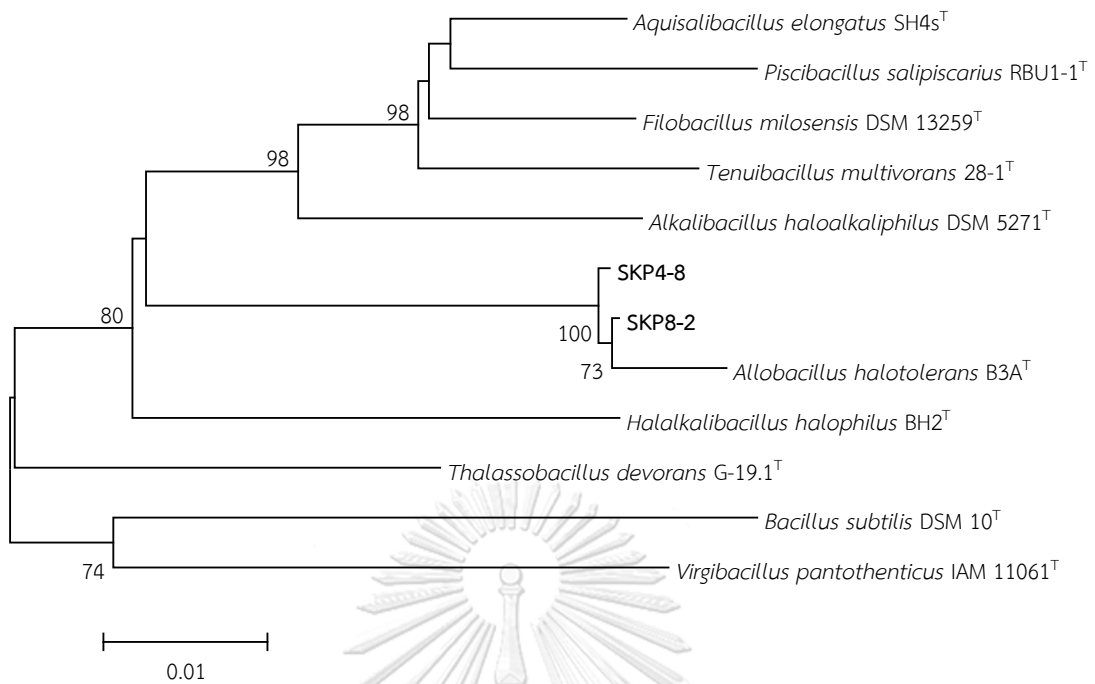
ภาพที่ 14 เซลล์ของสายพันธุ์ SKP4-8 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดบนอาหารสูตรดัดแปลง JCM no. 377 ที่เติม 10% (w/v) KCl และ 1.2% (w/v) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ตารางที่ 18 ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ SKP4-8 และ SKP8-2 เทียบกับสายพันธุ์

Allobacillus halotolerans B3A^T

Characteristics	1	2	3
Growth at pH 9	+	-	+
Temperature range for growth (optimum) (°C)	25-45 (37)	25-45 (37)	20-45 (37)
NaCl range for growth (optimum) (%w/v)	1-16 (8-10)	1-19 (5-13)	1-20 (1-11)
API ZYM tests			
Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	-	-	+
Acid production from:			
D-Fructose	-	+	-
D-Mannose	-	+	-
D-Ribose	-	+	+
DNA G+C content (mol%)	40.5	40.8	40.8

1, SKP4-8; 2, SKP8-2; 3, *Allobacillus halotolerans* B3A^T; +, เจริญ; -, ไม่เจริญ

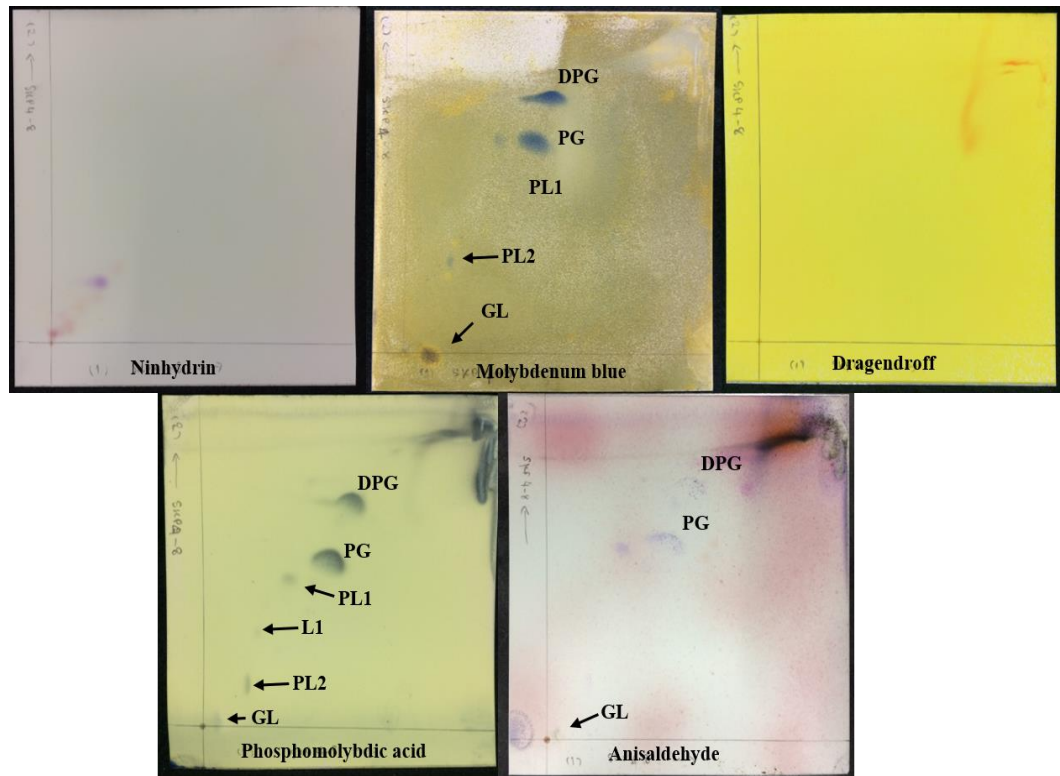


ภาพที่ 15 แผนภูมิวิวัฒนาการของสายพันธุ์ SKP4-8, SKP8-2 และ *Allobacillus halotolerans* B3A^T บนพื้นฐานของการเปรียบเทียบยีนบริเวณ 16S rRNA ด้วยวิธี Neighbor-joining

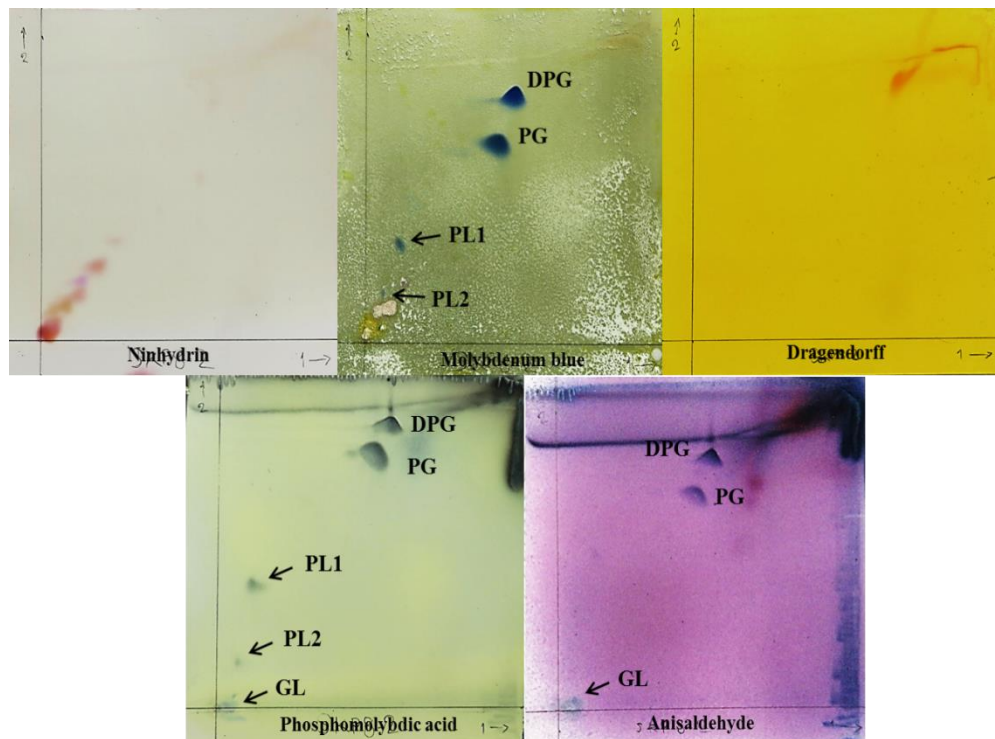
ตารางที่ 19 องค์ประกอบหลักของกรดไขมันระหว่างสายพันธุ์ SKP4-8, SKP8-2 และ *Allobacillus halotolerans* B3A^T

Fatty acids	Percentage of total		
	SKP4-8	SKP8-2	<i>Allobacillus halotolerans</i> B3A ^T
Saturated straight-chain			
C _{15:0}	-	-	6.5
C _{16:0}	0.5	0.7	-
Saturated branched-chain			
iso-C _{14:0}	2.2	3.2	11.5
iso-C _{15:0}	45.8	20.5	47.5
antesio-C _{15:0}	17.9	42.4	-
iso-C _{16:0}	3.4	7.5	20.0
iso-C _{17:0}	9.5	2.8	0.5
antesio-C _{17:0}	6.6	14.3	7.9
Unsaturated straight-chain			
C _{16:1} ω11c	0.7	0.5	-
C _{16:1} ω7c alcohol	8.4	5.7	3.6
Summed Feature 4	2.5	1.8	0.5

Summed feature 4 ประกอบด้วย iso-C_{17:1} หรือ/และ anteiso-C_{17:1}



ภาพที่ 16 องค์ประกอบหลักชั้นมีไข้วของสายพันธุ์ SKP4-8
(PG, Phosphatidylglycerol; DPG, diphosphatidylglycerol; PL1 และ PL2
phospholipids และ GL1, glycolipid)



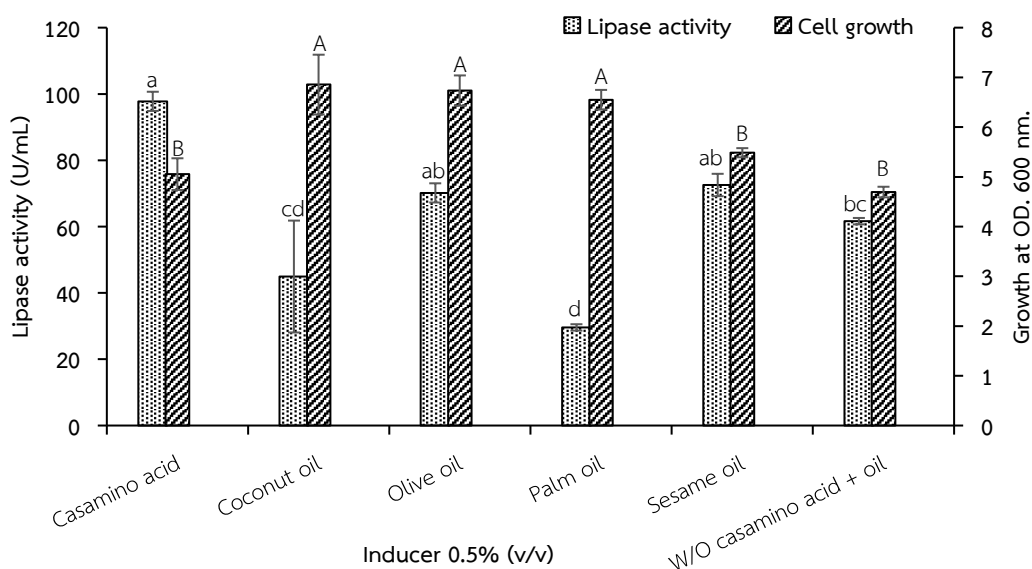
ภาพที่ 17 องค์ประกอบหลักของชั้นมีไข้วของสายพันธุ์ SKP8-2
(PG, Phosphatidylglycerol; DPG, diphosphatidylglycerol; PL1 และ PL2
phospholipids และ GL, glycolipid)

4.4 ผลการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในระดับขเวาของการผลิตและสมบัติของเอนไซม์ไลเปสจากสายพันธุ์ที่คัดเลือก

จากการนำสายพันธุ์ SKP5-4 ที่ให้ค่าแอกทิวิตีการผลิตเอนไซม์ไลเปสสูงสุด เพื่อใช้ในการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในระดับขเวาของการผลิตเอนไซม์ไลเปสให้ได้สูงสุด โดยศึกษาจากอาหารเหลวตัดแปลงสูตร JCM no. 377 ที่แปรผันปัจจัยแหล่งต่างๆ ที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสดังต่อไปนี้

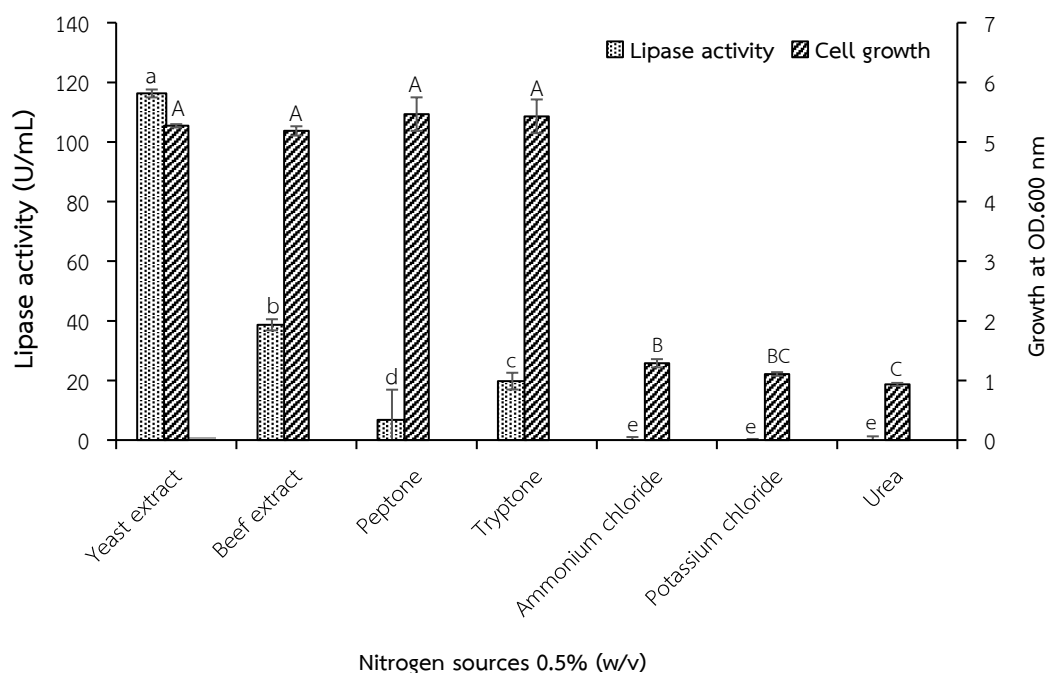
4.4.1 ผลการศึกษาปัจจัยที่แปรผันแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส

จากการศึกษาปัจจัยที่แปรผันแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยแปรผันแหล่งคาร์บอน ได้แก่ casamino acids, coconut oil, olive oil, palm oil และ sesame oil ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าแหล่งคาร์บอนที่ให้การผลิตเอนไซม์ไลเปสสูงสุด คือ casamino acids โดยค่าแอกทิวิตีเอนไซม์ไลเปสอยู่ที่ 97.78 ± 2.9 U/mL ตามด้วย sesame oil (72.54 ± 3.37 U/mL), olive oil (70.15 ± 2.9 U/mL), coconut oil (45.0 ± 16.7 U/mL) และ palm oil (30.0 ± 1.0 U/mL) (ภาพที่ 18) สอดคล้องกับรายงานของ Rashid และคณะ (Rashid et al., 2001) (Rashid et al., 2001) และ Gupta และคณะ (Gupta et al., 2004) ที่มีการใช้ casamino acids เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ไลเปสในสายพันธุ์ *Pseudomonas marginalis* stain KB700A ซึ่งต่างจากแหล่งคาร์บอนอื่นที่ให้การเจริญเติบโตของเซลล์สูงแต่แอกทิวิตีของเอนไซม์ไลเปสน้อยกว่า casamino acids เนื่องจากแหล่งคาร์บอน coconut oil, olive oil, palm oil และ sesame oil เป็นแหล่งคาร์บอนที่ได้จากพืชซึ่งเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากพืชมีคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสไม่คงตัว (Steiner & Williams, 2002)



ภาพที่ 18 แอกทิวิตีเอนไซม์ไลเปสจากการแปรผันแหล่งคาร์บอนของสายพันธุ์ SKP5-4
 4.4.2 ผลการศึกษาปัจจัยที่แปรผันแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส

จากการศึกษาปัจจัยที่แปรผันแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยแปรผันแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ yeast extract, beef extract, tryptone, peptone, ammonium chloride, potassium chloride และ urea พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสสูงสุดคือ yeast extract โดยค่าแอกทิวิตีเอนไซม์ไลเปสอยู่ที่ 116.26 ± 1.33 U/mL และตามด้วย beef extract (38.66 ± 1.87 U/mL), tryptone ($20.0 \pm 2.8 \pm 2.81$ U/mL), peptone (6.73 ± 10.16 U/mL), ammonium chloride (0.0 U/mL), potassium chloride (0.0 U/mL) และ urea (0.0 U/mL) (ภาพที่ 19) ซึ่งสอดคล้องการงานวิจัยของ Sharma และคณะ (Sharma et al., 2002) ที่มีการใช้ yeasts extract เป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตเอนไซม์ไลเปสในสายพันธุ์ *Bacillus* stain RSJI และแหล่งไนโตรเจน beef extract, tryptone และ peptone เป็นแหล่งที่ได้จากการสกัดทำให้เชื้อแบคทีเรียนำไปใช้เจริญได้ดีแต่ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีเหมือน yeasts extract ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ดีเนื่องจากใน yeasts extract มีกรดอะมิโนสูงเหมาะสำหรับการเจริญและผลิตเอนไซม์ไลเปส ammonium chloride, potassium chloride และ urea เป็นแหล่งที่ได้จากการสังเคราะห์ขึ้นมาทำให้แบคทีเรียนำไปใช้ในการเจริญได้น้อยและไม่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปส

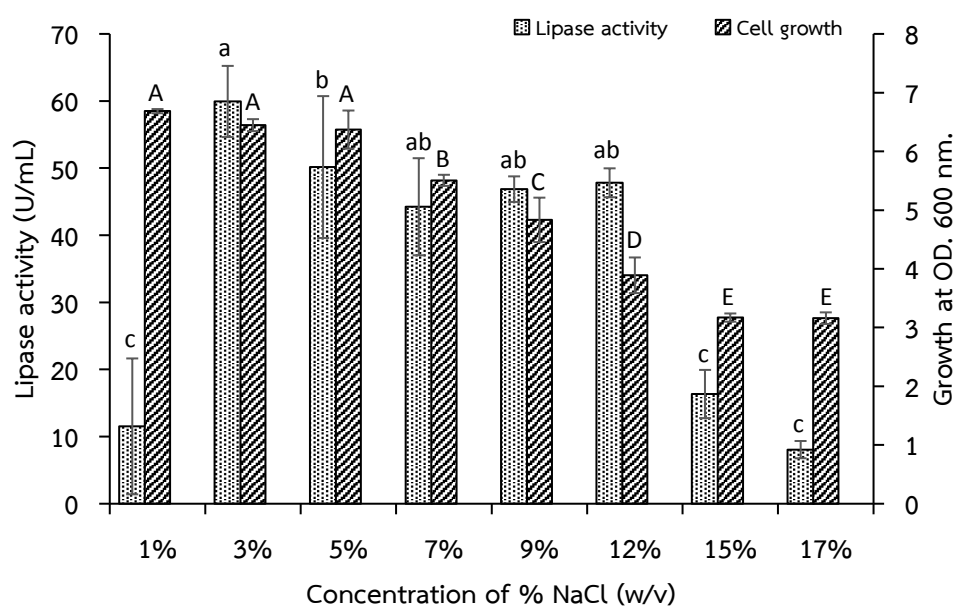


ภาพที่ 19 แอกทิวิตีเอนไซม์ไลเปสจากการแปรผันแหล่งไนโตรเจนของสายพันธุ์ SKP5-4

4.4.3 ผลการศึกษาปัจจัยความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส

เพส

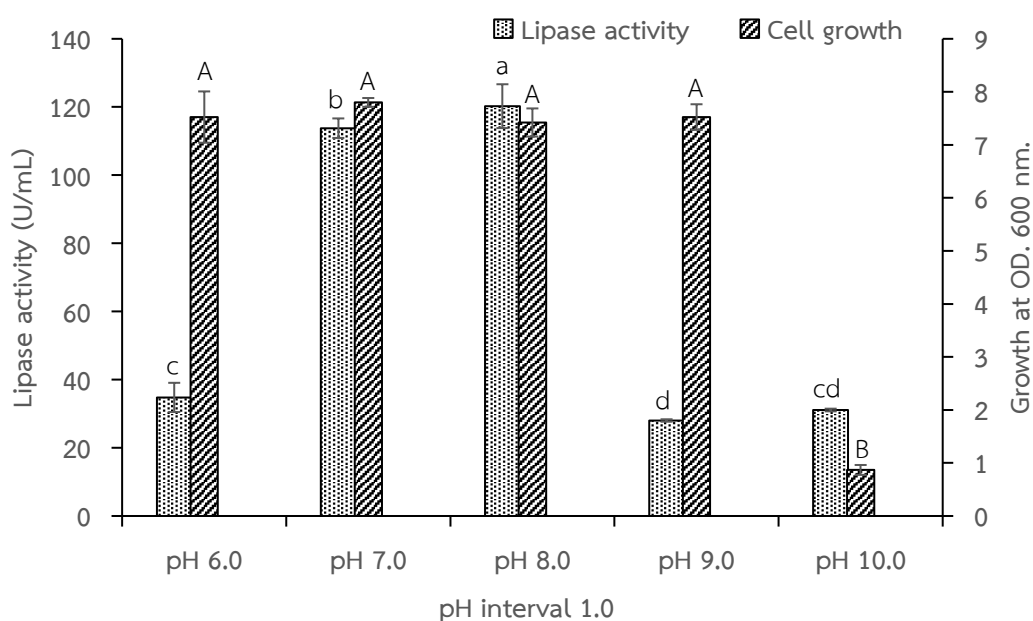
จากการศึกษาปัจจัยความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยแปรผันตามเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้น (1, 3, 5, 7, 9, 12, 15 และ 17 w/v) พบว่าสายพันธุ์ SKP5-4 ค่าแอกทิวิตีเอนไซม์ไลเปสตั้งแต่ 60 ± 5.3 ถึง 8.06 ± 1.28 Unit/mL และที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 3 เปอร์เซ็นต์ให้การผลิตเอนไซม์ไลเปสสูงสุดอยู่ที่ 60 ± 5.3 Unit/mL (ภาพที่ 20)



ภาพที่ 20 แอกทิวิตีเอนไซม์ไลเปสจากการแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ของสายพันธุ์ SKP5-4

4.4.4 ผลการศึกษาปัจจัยของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส

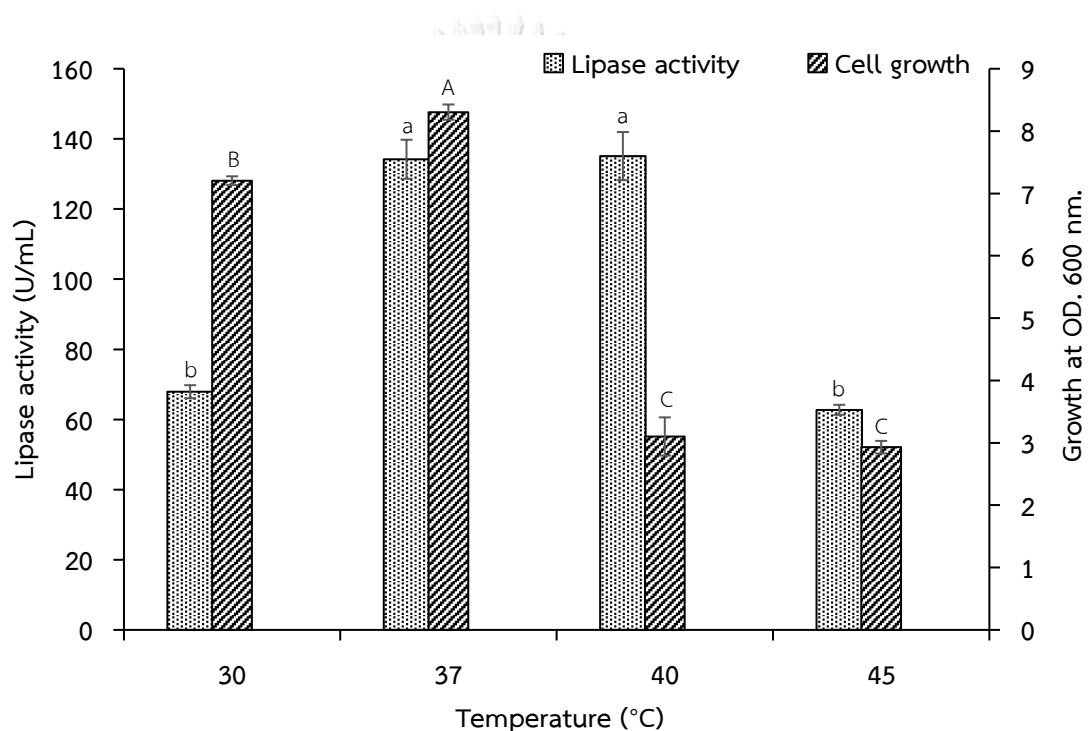
จากการศึกษาปัจจัยของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส แปรผันตามพีเอช ตั้งแต่ 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 และ 10.0 โดยเปลี่ยนความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์เป็น 3 เปอร์เซ็นต์ พบว่าพีเอชที่ให้การผลิตเอนไซม์ไลเปสสูงสุดอยู่ที่ 8.0 โดยค่าแอกทิวิตีเอนไซม์ไลเปสอยู่ที่ 120.24 ± 6.42 U/mL และตามด้วยพีเอช 7.0 (113.78 ± 2.86 U/mL), 6.0 (35 ± 4.28 U/mL), 10.0 (31.10 ± 0.4 U/mL) และ 9.0 (28.02 ± 0.35 U/mL) (ภาพที่ 21)



ภาพที่ 21 แอกทิวิตีเอนไซม์ไลเปสจากการแปรผันพีเอชของสายพันธุ์ SKP5-4

4.4.5 ผลการศึกษาปัจจัยของอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส

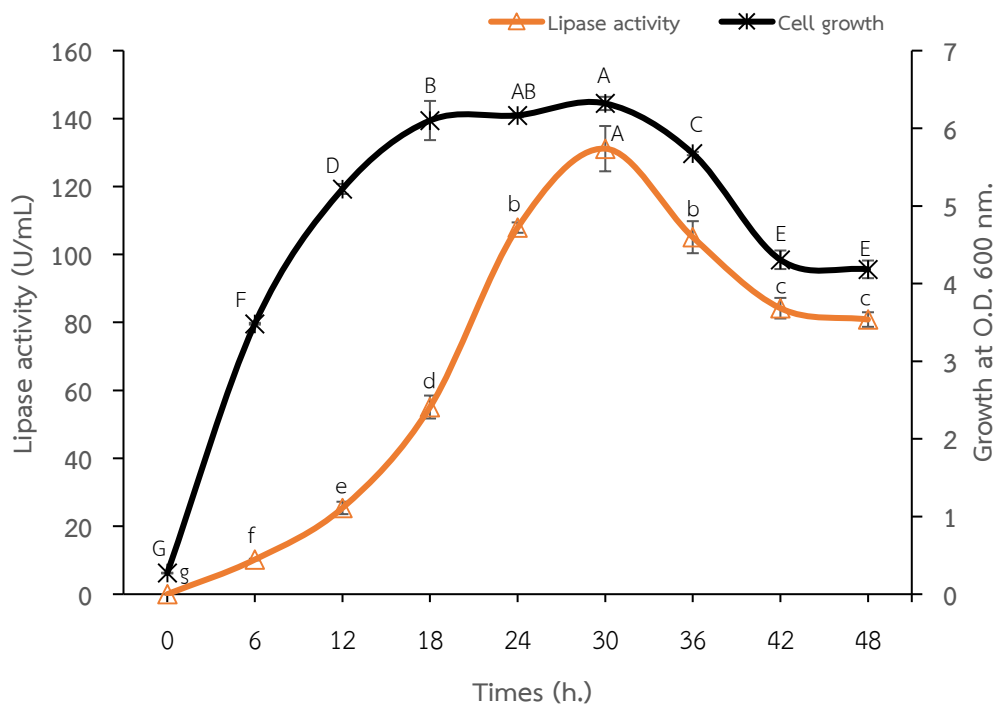
จากการศึกษาปัจจัยของอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยแปรผันตามอุณหภูมิที่ 30, 37, 40 และ 45 องศาเซลเซียส โดยปรับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์เป็น 3 เปอร์เซ็นต์และพีเอช 8.0 พบว่าอุณหภูมิที่ทำให้การผลิตเอนไซม์ไลเปสสูงสุดอยู่ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยค่าแอกทิวิตีเอนไซม์ไลเปสอยู่ที่ 134.2 ± 5.57 U/mL และตามด้วยที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (135.1 ± 6.85 U/mL), 30 องศาเซลเซียส (67.91 ± 1.85 U/mL) และ 45 องศาเซลเซียส (63.0 ± 1.43 U/mL) (ภาพที่ 22)



ภาพที่ 22 แอกทิวิตีเอนไซม์ไลเปสจากการแปรผันอุณหภูมิของสายพันธุ์ SKP5-4

4.4.6 ผลการศึกษาปัจจัยของเวลาที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส

จากการศึกษาการแปรผันของเวลา พบว่าแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางสายพันธุ์ SKP5-4 เข้าสู่ช่วงของ lag phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 และเริ่มเข้าสู่ช่วงของ stationary phase ในชั่วโมงที่ 18 โดยชั่วโมงที่แบคทีเรียมีการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดอยู่ในชั่วโมงที่ 30 (ภาพที่ 23) และเป็นชั่วโมงที่เลือกใช้ในการศึกษาในขั้นทำเอนไซม์ไลเปสให้บริสุทธิ์



ภาพที่ 23 แยกทีวิตีเอนไซม์ไลเปสจากการแปรผันเวลาของสายพันธุ์ SKP5-4

4.5 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์

4.5.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยอะซีโตน

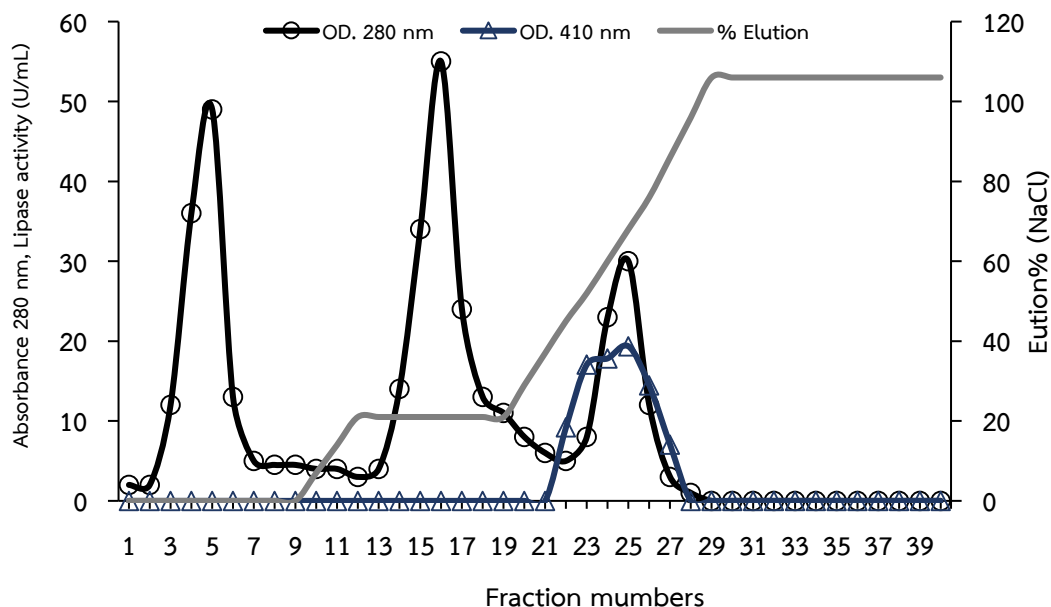
แบคทีเรียชอบเค็มปานกลางสายพันธุ์ SKP5-4 นำมาทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยสารละลายอะซีโตนแบบลำดับส่วนอิมิตัว พบว่าที่ความเข้มข้นของสารละลายอะซีโตน 40 ถึง 60 เปอร์เซ็นต์อิมิตัว ให้ค่าแอกทิวิตีไลเปสทั้งหมดอยู่ที่ 24,591 Units และโปรตีนมีค่าความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 5 เท่าจาก crude enzyme (ตารางที่ 22)

4.5.2 ผลการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ

ผลการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ โดยใช้คอลัมน์ anion exchange (Hitrap DEAE FF) อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที หลังจากการโหลดตัวอย่างเข้าคอลัมน์ พบว่าเอนไซม์ไลเปสเริ่มถูกชะด้วยความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ ใน fraction ที่ 24, 25, 26 และ 27 โดยใน fraction ที่ 25 แสดงค่าแอกทิวิตีเอนไซม์ไลเปสสูงสุดและสอดคล้องกับพีคสูงสุดในภาพ โดยให้ความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 12 เท่า ในตารางที่ 22 และในภาพที่ 24

ตารางที่ 20 สรุปการทำเอนไซม์ไลเปสให้บริสุทธิ์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ SKP5-4

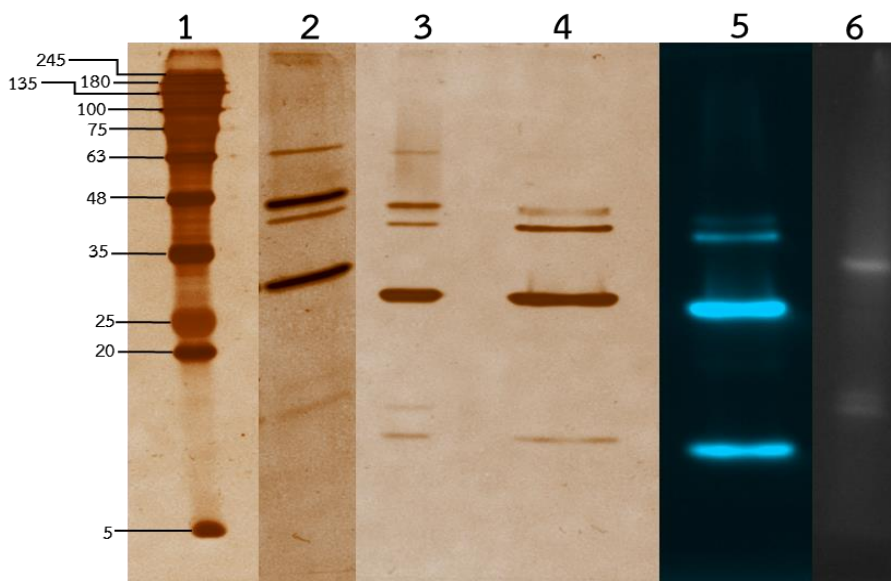
Purification steps	Total activity (Units)	Total protein (mg)	Specific activity (Units/mg)	Purification fold	% Yield
Crude enzyme	127527	733	174	1	100
Acetone precipitation	24591	30	862	5	20
Hitrap DEAE FF	4778	3	2016	12	4



ภาพที่ 24 รูปแบบการทำเอนไซม์ไลเปสให้บริสุทธิ์จากสายพันธุ์ SKP5-4 ด้วยคอลัมน์ Hitrap DEAE FF

4.6 ผลการตรวจสอบรูปแบบโปรตีนด้วยเทคนิค Native-PAGE และ Zymogram

ผลการตรวจสอบรูปแบบโปรตีนด้วยเทคนิค native-PAGE และ zymogram หลังจากการการทำให้โปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค anion exchange chromatography พบว่าใน fraction ที่ 25 มีค่าแอกทิวิตีเอนไซม์สูงสุดจึงนำมาวิเคราะห์มวลโมเลกุลของเอนไซม์ไลเปสเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน พบว่าการตรวจสอบรูปแบบโปรตีนแบบ zymogram โดยใช้สับสเตรท คือ 4-Methylumbelliferyl butyrate พบว่าเกิดแบนโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับสับสเตรทและเรืองแสงทั้งหมด 4 แบนและในตรวจสอบรูปแบบโปรตีนแบบ native-PAGE พบแบนโปรตีนทั้งหมด 4 แบน ซึ่งแต่ละแบนมีขนาดโมเลกุลประมาณ 50, 43, 30 และ 12 กิโลดาลตัน ในภาพที่ 25 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Parwata และคณะ (Parwata et al., 2014) เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Pseudomonas stutzeri* พบว่ามี 2 แบนที่เกิดแอกทิวิตีเอนไซม์ไลเปสและมีมวลโมเลกุลขนาด 124 และ 29 กิโลดาลตัน

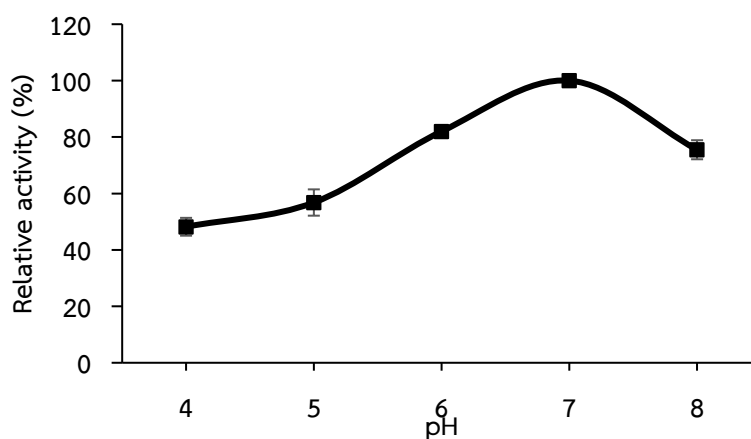


ภาพที่ 25 Partial purification of protein; Standard protein markers (Lane 1), Crude enzyme (Lane 2), Acetone precipitation (Lane 3), Hitrap DEAE FF (Lane 4) โดยเทคนิค Native-PAGE และ Hitrap DEAE FF (Lane 5), Positive control: wheat germ (Lane 6) โดยเทคนิค Zymogram

4.7 ผลการทดสอบคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส

4.7.1 ผลการทดสอบพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส

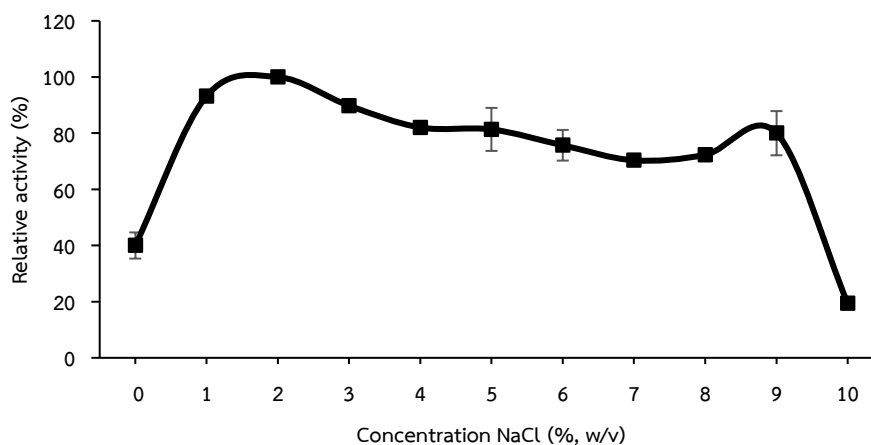
พบว่าเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางสายพันธุ์ SKP5-4 สามารถทำงานได้ในช่วงพีเอช 4.0 ถึง 8.0 และสามารถทำงานได้ดีที่สุดในพีเอช 7.0 (ภาพที่ 26) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Arora (Arora, 2013) ซึ่งพบว่าเอนไซม์ไลเปสจากสายพันธุ์ *Staphylococcus lipolyticus* ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเอนไซม์ด้วยสารละลายอะซีโตนสามารถทำงานได้ดีที่พีเอช 7.0



ภาพที่ 26 การทำงานของเอนไซม์ไลเปสในช่วงพีเอชที่เหมาะสม

4.7.2 ผลการทดสอบความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส

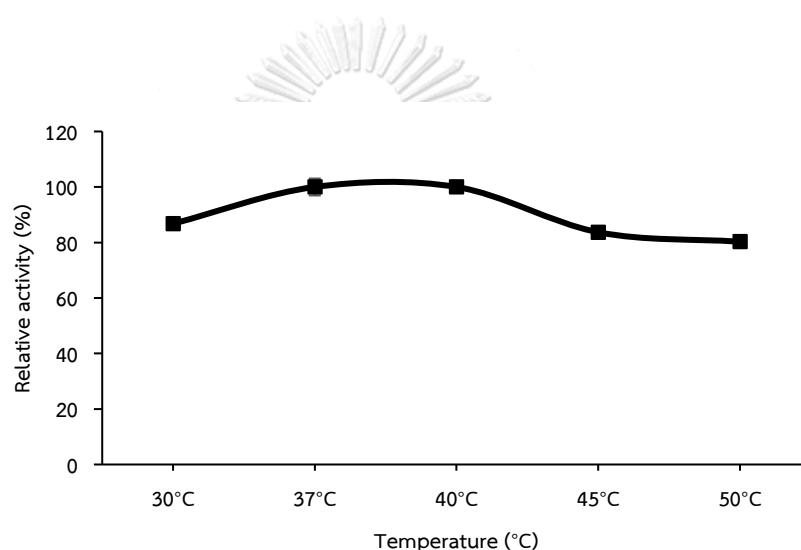
พบว่าเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางสายพันธุ์ SKP5-4 สามารถทำงานได้ในช่วงความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0 ถึง 9 และทำงานได้ดีที่สุดในความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 2 โดยที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1 ถึง 9 แต่ในความโซเดียมคลอไรด์ที่ 0 เปอร์เซ็นต์ ทำงานได้ไม่ดีเนื่องจากเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ต้องการโซเดียมคลอไรด์ในการทำงานและในความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ที่ 10 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์ไลเปสไม่สามารถทำงานได้ เนื่องจากความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์สูงและเป็นสภาพที่ไม่เหมาะสมให้เอนไซม์ไลเปสทำงานได้ (ภาพที่ 27) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lv และคณะ (Lv et al., 2010) *Thalassobacillus* sp. strain DF-E4 ซึ่งสามารถทำงานได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ 2 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 27 การทำงานของเอนไซม์ไลเปสในความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสม

4.7.3 ผลการทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส

พบว่าเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์จากแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางสายพันธุ์ SKP5-4 สามารถทำงานได้ในช่วงอุณหภูมิ 30 ถึง 50 องศาเซลเซียสและทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 28) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lv และคณะ (Lv et al., 2010) Esteban-Torres และคณะ (Esteban-Torres et al., 2015) และ Edupuganti และคณะ (Edupuganti et al., 2017) โดยเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Staphylococcus epidermidis* strain L2, *Lactobacillus plantarum* และ *Thalassobacillus* sp. strain DF-E4 เอนไซม์ไลเปสสามารถทำงานได้ดีที่สุดในอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

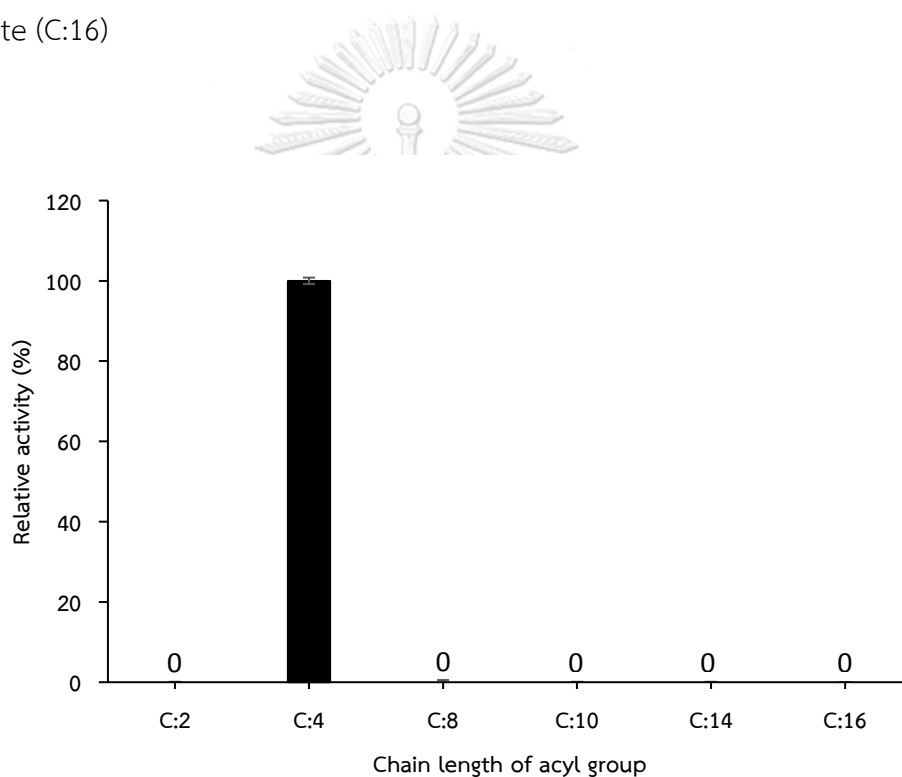


ภาพที่ 28 การทำงานของเอนไซม์ไลเปสในอุณหภูมิที่เหมาะสม

CHULALONGKORN UNIVERSITY

4.7.4 ผลการทดสอบสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส

พบว่าเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์จากแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางสายพันธุ์ SKP5-4 ให้ค่าแอกทิวิตีเอนไซม์ไลเปสสูงสุดในสับสเตรท *p*-nitrophenyl butyrate (C:4) (ภาพที่ 29) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Moreno และคณะ (Moreno et al., 2009) และ Lv และคณะ (Lv et al., 2010) ซึ่งแบคทีเรียสายพันธุ์ *Salicola* sp. strain IC10 และ *Thalassobacillus* sp. strain DF-E4 สามารถทำงานได้ดีที่สุดในสับสเตรท *p*-nitrophenyl butyrate (C:4) และเอนไซม์ไลเปสจากสายพันธุ์ SKP5-4 ไม่มีแอกทิวิตีในสับสเตรท *p*-nitrophenyl acetate (C:2), *p*-nitrophenyl octanoate (C:8), *p*-nitrophenyl decanoate (C:10), *p*-nitrophenyl myristate (C:14) และ *p*-nitrophenyl palmitate (C:16)



ภาพที่ 29 การทำงานของเอนไซม์ไลเปสในสับสเตรทจำเพาะ

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการคัดแยกสายพันธุ์แบคทีเรียชอบเค็มปานกลางจำนวนทั้งหมด 77 สายพันธุ์ จากตัวอย่างกะปิที่เก็บจากตลาดสดมหาชัย จังหวัดสมุทรสาคร ทั้งหมด 8 ตัวอย่าง ผลการคัดกรองการสร้างเอนไซม์ไลเปสบนอาหารแข็งที่มี Tween 20, 40, 60, 80 และ tributyrin เป็นสับสเตรท พบว่าแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้จำนวน 61 สายพันธุ์และพบว่าเมื่อนำมาคัดกรองสร้างเอนไซม์ไลเปสในอาหารเหลว ซึ่งในอาหารเหลวดัดแปลงสูตร JCM no. 377 ที่เติม Tween 20 และ Tween 80 โดยแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางจำนวน 23 สายพันธุ์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสในอาหารเหลว มีค่าการผลิตเอนไซม์ไลเปสอยู่ในช่วง 1.013 ± 0.15 ถึง 30.13 ± 13 Unit/mL และ 1.44 ± 0.94 ถึง 30.03 ± 0.39 Unit/mL ตามลำดับ ซึ่งพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ให้ค่าแอกทิวิตีการผลิตเอนไซม์ไลเปสสูงสุด คือ สายพันธุ์ SKP5-4 อยู่ที่ 30.14 ± 0.41 Unit/mL และ 30.03 ± 0.39 Unit/mL โดยคัดเลือกตัวแทนในการพิสูจน์เอกลักษณ์ โดยอาศัยลักษณะทางฟิโนไทป์และการวิเคราะห์ช่วงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA จากแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสในอาหารเหลวจำนวน 12 สายพันธุ์และแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางที่ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสบนอาหารแข็งและในอาหารเหลวจำนวน 26 สายพันธุ์ ซึ่งสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ออกได้เป็น 9 สกุล ดังต่อไปนี้ สกุล *Bacillus* มีทั้งหมด 5 สายพันธุ์ ได้แก่ 1 สายพันธุ์ มีความคล้ายคลึง 99.86 เปอร์เซ็นต์กับสายพันธุ์มาตรฐาน *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, 1 สายพันธุ์มีความคล้ายคลึง 99.64 เปอร์เซ็นต์กับสายพันธุ์มาตรฐาน *B. seohaeanensis*, 1 สายพันธุ์มีความคล้ายคลึง 99.85 เปอร์เซ็นต์กับสายพันธุ์มาตรฐาน *B. safensis* และ 2 สายพันธุ์มีความคล้ายคลึง 97.94 และ 98.02 เปอร์เซ็นต์กับสายพันธุ์มาตรฐาน *Bacillus vietnamensis*, สกุล *Halobacillus* มีทั้งหมด 2 สายพันธุ์ มีความคล้ายคลึง 99.55 และ 99.64 เปอร์เซ็นต์กับสายพันธุ์มาตรฐาน *Halobacillus trueperi*, สกุล *Oceanobacillus* มีทั้งหมด 2 สายพันธุ์ ได้แก่ 1 สายพันธุ์ มีความคล้ายคลึง 99.78 เปอร์เซ็นต์กับสายพันธุ์มาตรฐาน *Oceanobacillus manasiensis* และ 1 สายพันธุ์มีความคล้ายคลึง 100 เปอร์เซ็นต์กับสายพันธุ์มาตรฐาน *Oceanobacillus picturae*, สกุล *Thalassobacillus* มีทั้งหมด 2 สายพันธุ์ ได้แก่ 1 สายพันธุ์ มีความคล้ายคลึง 99.64 เปอร์เซ็นต์กับสายพันธุ์มาตรฐาน *Thalassobacillus devorans* และ 1 สายพันธุ์ มีความคล้ายคลึง 99.64 เปอร์เซ็นต์กับสายพันธุ์มาตรฐาน *Thalassobacillus hwangdonensis*, สกุล *Virgibacillus* มีทั้งหมด 2 สายพันธุ์ ได้แก่ 1 สายพันธุ์ มีความคล้ายคลึง 99.57 เปอร์เซ็นต์กับสายพันธุ์มาตรฐาน *Virgibacillus halodenitrificans* และ 1 สายพันธุ์ มีความคล้ายคลึง 99.58 เปอร์เซ็นต์กับสายพันธุ์มาตรฐาน *Virgibacillus kapii*, สกุล *Nesterenkonia* มี

ทั้งหมด 2 สายพันธุ์ ได้แก่ 1 สายพันธุ์ มีความคล้ายคลึง 99.27 เปอร์เซ็นต์กับสายพันธุ์มาตรฐาน *Nesterenkonia halophila* และ 1 สายพันธุ์ มีความคล้ายคลึง 99.78 เปอร์เซ็นต์กับสายพันธุ์มาตรฐาน *Nesterenkonia lacusekhoensis*, สกุล *Salinicoccus* มีทั้งหมด 11 สายพันธุ์ ได้แก่ 6 สายพันธุ์ มีความคล้ายคลึง 99.35 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์กับสายพันธุ์มาตรฐาน *Salinicoccus siamensis*, 2 สายพันธุ์ มีความคล้ายคลึง 99.71 และ 99.79 เปอร์เซ็นต์กับสายพันธุ์มาตรฐาน *Salinicoccus roseus*, 3 สายพันธุ์ มีความคล้ายคลึง 99.35 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์กับสายพันธุ์มาตรฐาน *Salinicoccus salsiraiiae*, สกุล *Staphylococcus* มีทั้งหมด 9 สายพันธุ์ ได้แก่ 7 สายพันธุ์ มีความคล้ายคลึงตั้งแต่ 99.64 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์กับสายพันธุ์มาตรฐาน *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *saprophyticus*, 1 สายพันธุ์ มีความคล้ายคลึง 100 เปอร์เซ็นต์กับสายพันธุ์มาตรฐาน *Staphylococcus cohnii* subsp. *urealyticus* และ 1 สายพันธุ์ มีความคล้ายคลึง 100 เปอร์เซ็นต์กับสายพันธุ์มาตรฐาน *Staphylococcus nepalensis* และสกุล *Allobacillus* มีทั้งหมด 2 สายพันธุ์ มีความคล้ายคลึง 99.14 และ 98.80 เปอร์เซ็นต์กับสายพันธุ์มาตรฐาน *Allobacillus halotolerans*

จากการศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานแบบพอลิฟาลิกของสายพันธุ์ *Allobacillus* sp. 2 สายพันธุ์ ได้แก่ SKP4-8 และ SKP8-2 พบว่าเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่จากตัวอย่างกะปิชนิดใช้กุ้งตาโตจากตลาดสดมหาชัย จังหวัดสมุทรสาคร โดยสายพันธุ์ SKP4-8 และ SKP8-2 มีกรดไขมันเป็นองค์ประกอบหลักประกอบด้วย iso-C_{15:0} (20.5-45.8%), iso-C_{16:0} (3.4-7.5%), antesio-C_{15:0} (17.9-42.4%) และ antesio-C_{17:0} (6.6-14.3%) และมี polar lipid ได้แก่ phosphatidylglycerol (PG), diphosphatidylglycerol (DPG), phospholipids (PG) และ glycolipid เป็นองค์ประกอบหลัก ในสายพันธุ์ SKP4-8 และ SKP8-2 มีปริมาณ DNA ของเบส G+C เป็น 40.5 และ 40.8 โมลเปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งผลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA ของสายพันธุ์ SKP4-8 และ SKP8-2 ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *Allobacillus halotolerans* B3A^T เป็น 99.14 และ 98.80 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และทั้ง 2 สายพันธุ์ มีความคล้ายคลึงของ DNA เป็น 46.6 ถึง 56.8 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับ *Allobacillus halotolerans* B3A^T ทั้งสายพันธุ์ SKP4-8 และ SKP8-2 มีความคล้ายคลึงกันของ DNA ระหว่างกันเป็น 99.0 เปอร์เซ็นต์ จึงจัดเป็นสปีชีส์เดียวกันและจะถูกเสนอเป็นแบคทีเรียขอบเค็มปานกลางสปีชีส์ใหม่ชื่อว่า *Allobacillus saliphilus*

จากแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางทั้งหมด 77 สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ SKP5-4 ให้ค่าแอกทิวิตีการผลิตเอนไซม์ไลเปสสูงสุดในช่วง stationary phase ในอาหารเหลวสูตรดัดแปลง JCM no. 377 ที่เพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 3 เปอร์เซ็นต์ pH 8.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและระยะเวลาในการบ่ม 30 ชั่วโมง สภาวะขูดเขย่า 200 รอบต่อนาที การทำเอนไซม์ไลเปสให้บริสุทธิ์เริ่มจากการตกตะกอนด้วยสารละลายอะซีโตนแบบลำดับส่วนอิ่มตัวที่ 40 ถึง 60 เปอร์เซ็นต์และทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ต่อด้วยเทคนิค anion exchange chromatography โดยใช้คอลัมน์ Hitrap DEAE Fast Flow) อัตราการไหลอยู่ที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาทีและชะตัวอย่างด้วยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ พบว่าเอนไซม์ไลเปสในหลอดที่ 25 มีแอกทิวิตีเอนไซม์ไลเปสสูงสุดซึ่งมีขนาดมวลโมเลกุล 50, 43, 30 และ 12 กิโลดาลตัน ซึ่งให้ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์มากกว่าส่วนใส 12 เท่าและเอนไซม์ไลเปสสามารถทำงานได้ในช่วงของ pH 5 ถึง 8 ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ 0 ถึง 9 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 ถึง 50 องศาเซลเซียสและทำงานได้ดีที่สุดในพีเอช 7 ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสและสับสเตรทจำเพาะเจาะจงใน *p*-nitrophenyl butyrate (C:4) เป็นเวลา 30 นาที โดยไม่เสียสภาพ ซึ่งเหมาะที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเนื่องจากมีช่วงการทำงานของ pH 7.0 ทำงานได้ในอุณหภูมิที่สูงถึง 50 องศาเซลเซียสและกรดไขมันที่เกิดขึ้นจากผลิตภัณฑ์จะเป็นพวกน้ำหนักรโมเลกุลต่ำ มีกลิ่นเฉพาะตัวและสามารถนำไปพัฒนาให้เกิดกลิ่นที่ดีขึ้นในผลิตภัณฑ์อาหารชนิดต่างๆ เช่น โยเกิร์ต เนยแข็งและไส้กรอก

จากผลการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์ ในการตรวจสอบรูปแบบโปรตีนบนแผ่น native-PAGE พบจำนวนแถบที่เกิดขึ้นทั้งหมด 4 แถบ ตรงกับตำแหน่งในแผ่น zymogram โดยมีการทำงานของเอนไซม์ไลเปสขนาดมวลโมเลกุล 50, 43, 30 และ 12 กิโลดาลตัน จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์ไลเปสมีจำนวนที่เกิดขึ้น 4 แถบ ซึ่งอาจจะเป็นเอนไซม์ไลเปส 4 ชนิด แต่ยังไม่พิสูจน์ด้วยการทำ amino acid sequence analysis เพื่อยืนยันว่าเป็นเอนไซม์ไลเปสชนิดใหม่

ข้อเสนอแนะ

1. ควรเพิ่มขั้นตอนการทำเอนไซม์ไลเปสให้บริสุทธิ์ในขั้นต่อไป เช่น การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคเจลฟิวเทรชัน เพื่อให้ได้เอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์และมีค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ไลเปสสูงขึ้น
2. ศึกษาเพิ่มเติมและเพิ่มขั้นตอนการทำ amino acids sequences เพื่อตรวจสอบหาชนิดของเอนไซม์ไลเปส
3. ศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสที่เหมาะสมต่อการทำงานและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร
4. ในงานวิจัยนี้สามารถคัดแยกแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางสายพันธุ์อื่นที่น่าสนใจและอาจจะเป็นสปีชีส์ใหม่



รายการอ้างอิง

- Amoozegar, M. A., Bagheri, M., Didari, M., Mehrshad, M., Schumann, P., Sproer, C. & Ventosa, A. (2014). *Aquibacillus halophilus* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic bacterium from a hypersaline lake, and reclassification of *Virgibacillus koreensis* as *Aquibacillus koreensis* comb. nov. and *Virgibacillus albus* as *Aquibacillus albus* comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 64(11): 3616-3623.
- Amoozegar, M. A., Salehghamari, E., Khajeh, K., Kabiri, M., Naddaf, S. (2008). Production of an extracellular thermohalophilic lipase from a moderately halophilic bacterium, *Salinivibrio* sp. strain SA-2. Journal of Basic Microbiology 48(3): 160-167.
- An, S. Y., Asahara, M., Goto, K., Kasai, H., Yokota, A. (2007). *Virgibacillus halophilus* sp. nov., spore-forming bacteria isolated from soil in Japan. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57(7): 1607-1611.
- Anzai, T., Kotake, I., Komine, S. (1990). Seed oils containing fatty acids with conjugated double bonds as substrates for lipase assay. Clinica Chimica Acta 190(1-2): 107-108.
- Aravindan, R., Anbumathi, P., Viruthagiri, T. (2007). Lipase applications in food industry Indian Journal of Biotechnology 6(141-158).
- Arora, P. K. (2013). *Staphylococcus lipolyticus* sp. nov., a new cold-adapted lipase producing marine species. Annals of Microbiology 63(913-922).
- Barros, M., Fleuri, L. F., Macedo, G. A. (2010). Seed lipases: sources, applications and properties-A review. Brazilian Journal of Chemical Engineering 27(1): 15-19.
- Barrow, G. I., Feltham, R. K. A. (1993). *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria* (3 ed.). Cambridge: Cambridge University Press.
- Bjellqvist, B., Basse, B., Olsen, E., Celis, J. E. (1994). Reference points for comparisons of two dimensional maps of proteins from different human cell types defined in a pH scale where isoelectric points correlate with polypeptide compositions. . Electrophoresis 15(529-539).
- Borriss, R., Chen, X. H., Rueckert, C., Blom, J., Becker, A., Baumgarth, B. & Klenk, H. P. (2011). Relationship of *Bacillus amyloliquefaciens* clades associated with strains DSM 7T and FZB42T: a proposal for *Bacillus amyloliquefaciens* subsp.

- amyloliquefaciens* subsp. nov. and *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* subsp. nov. based on complete genome sequence comparisons. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 61(8): 1786-1801.
- Bouchotroch, S., Quesada, E., del Moral, A., Llamas, I., Bejar, V. (2001). *Halomonas maura* sp. nov., a novel moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51(5): 1625-1632.
- Cardenas, F., Alvarez, E., 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 Enzymatic 14(111-123).
- Chaiyanan, S., Chaiyanan, S., Maugele, T., Huq, A., Robb, F. T., Colwell, R. R. (1999). Polyphasic taxonomy of a novel *Halobacillus*, *Halobacillus thailandensis* sp. nov. isolated from fish sauce. Systematic and Applied Microbiology 22(3): 360-365.
- Chamroensakri, N., Tanasupawat, S., Akaracharanya, A., Visessanguan, W., Kudo, T., Itoh, T. (2009). *Salinivibrio siamensis* sp. nov., from fermented fish (*pla-ra*) in Thailand. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 59(4): 880-885.
- (2010). *Gracilibacillus thailandensis* sp. nov., from fermented fish (*pla-ra*). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 60(4): 944-948.
- Claus, D., Fahmy, F., Rolf, H. J., Tosunoglu, N. (1983). *Sporosarcina halophila* sp. nov., an Obligate, Slightly Halophilic Bacterium from Salt Marsh Soils. Systematic and Applied Microbiology 4(4): 496-506.
- Collins, M. D., Lawson, P. A., Labrenz, M., Tindall, B. J., Weiss, N., Hirsch, P. (2002). *Nesterenkonia lacusekhoensis* sp. nov., isolated from hypersaline Ekho Lake, East Antarctica, and emended description of the genus *Nesterenkonia*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 52(4): 1145-1150.
- Collins, M. D., Pirouz, T., Goodfellow, M. (1977). Distribution of Menaquinones in Actinomycetes and Corynebacteria. Journal of General Microbiology 100(221-230).

- Costa, M. A., Peralta, R. M. (1999). Production of lipase by soil fungi and partial characterization of lipase from a selected strain (*Penicillium wortmanii*). Journal of Basic Microbiology 39(1): 11-15.
- Daroonpant, R., Tanasupawat, S., Kudo, T., Ohkuma, M., Itoh, T. (2016). *Virgibacillus kapii* sp. nov., isolated from Thai shrimp paste (*Ka-pi*). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 66(4): 1832-1837.
- Dueramae, S., Bovornreungroj, P., Enomoto, T., Kantachote, D. (2017). Purification and characterization of an extracellular lipolytic enzyme from the fermented fish-originated halotolerant bacterium, *Virgibacillus alimentarius* LBU20907. Chemical Papers 71(10): 1975-1984.
- Edupuganti, S., Parcha, L., Mangamoori, L. (2017). Purification and Characterization of Extracellular Lipase from *Staphylococcus epidermidis* (MTCC 10656). Journal of applied pharmaceutical science: 1057-1063.
- Esakkiraj, P., Prabakaran, G., Maruthiah, T., Immanuel, G., Palavesam, A. (2014). Purification and Characterization of Halophilic Alkaline Lipase from *Halobacillus* sp. Proceedings of the National Academy of Sciences 86(2): 309-314.
- Esteban-Torres, M., Mancheño, J. M., Rivas, B., Muñoz, R. (2015). Characterization of a halotolerant lipase from the lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* useful in food fermentations. LWT - Food Science and Technology 60(1): 246-252.
- Ezaki, T., Hashimoto, Y., Yabuuchi, E. (1989). Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. International Journal of Systematic Bacteriology 39(3): 224-229.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. Evolution 39(4): 783-791.
- Franca, L., Rainey, F. A., Nobre, M. F., da Costa, M. S. (2006). *Salinicoccus salsiraiiae* sp. nov.: a new moderately halophilic gram-positive bacterium isolated from salted skate. Extremophiles 10(6): 531-536.
- Galinski, E. A. (1995). Osmoadaptation in bacteria. Advances in Microbial Physiology 37(272-328).
- Garcia, M. T., Gallego, V., Ventosa, A., Mellado, E. (2005). *Thalassobacillus devorans* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic, phenol-degrading, Gram-positive

- bacterium. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 55(5): 1789-1795.
- 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.
- Hajek, V., Meugnier, H., Bes, M., Brun, Y., Fiedler, F., Chmela, Z. & Freney, J. (1996). *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *bovis* subsp. nov., isolated from bovine nostrils. International Journal of Systematic Bacteriology 46(3): 792-796.
- Han, J. R., Ling, S. K., Yu, W. N., Chen, G. J., Du, Z. J. (2017). *Marinobacter salexigens* sp. nov., isolated from marine sediment. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 67(11): 4595-4600.
- Heravi, K. M., Eftekhari, F., Yakhchali, B., Tabandeh, F. (2008). Isolation and identification of a lipase producing *Bacillus* sp. from soil. Pakistan Journal of Biological Sciences 11(5): 740-745.
- Hua, N. P., Hamza-Chaffai, A., Vreeland, R. H., Isoda, H., Naganuma, T. (2008). *Virgibacillus salarius* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a Saharan salt lake. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 58(10): 2409-2414.
- Huang, A. H. C. (1984). *Lipases*. Science Publishers, Amsterdam: In B. H. L. Brockman.
- Imhoff, J. F. (1993). *Osmotic adaptation in halophilic and halotolerant microorganisms* (Vol. 168). Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie. Bonn, Germany: Meckenheimer.
- Jaeger, K. E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., van Heuvel, M., Misset, O. (1994). Bacterial lipases. FEMS Microbiology reviews 15(1): 29-63.
- Jaeger, K. E., Reetz, M. T. (1998). Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. Trends in Biotechnology 16(9): 396-403.
- Jeon, C. O., Lim, J. M., Lee, J. C., Lee, G. S., Lee, J. M., Xu, L. H. & Kim, C. J. (2005). *Lentibacillus salarius* sp. nov., isolated from saline sediment in China, and emended description of the genus *Lentibacillus*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 55(3): 1339-1343.
- Jiewei, T., Zuchao, L., Peng, Q., Lei, W., Yongqiang, T. (2014). Purification and characterization of a cold-adapted lipase from *Oceanobacillus* strain PT-11. PLoS One 9(7): 1013-1043.
- Kim, O. S., Cho, Y. J., Lee, K., Yoon, S. H., Kim, M., Na, H. & Chun, J. (2012). Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes

- that represent uncultured species. International journal of systematic and evolutionary microbiology 62(3): 716-721.
- Kloos, W. E., Wolfshohl, J. F. (1991). *Staphylococcus cohnii* subspecies: *Staphylococcus cohnii* subsp. *cohnii* subsp. nov. and *Staphylococcus cohnii* subsp. *urealyticum* subsp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology 41(2): 284-289.
- Kushner, D. J. (1985). *The halobacteriaceae* (Vol. 8). C. R. Woese and R. S. Wolfe: Academic Press, London, U.K.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227(52-59): 680-685.
- Lee, J. C., Lim, J. M., Park, D. J., Jeon, C. O., Li, W. J., Kim, C. J. (2006). *Bacillus seohaeanensis* sp. nov., a halotolerant bacterium that contains L-lysine in its cell wall. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 56(8): 1893-1898.
- Lee, J. S., Lim, J. M., Lee, K. C., Lee, J. C., Park, Y. H., Kim, C. J. (2006). *Virgibacillus koreensis* sp. nov., a novel bacterium from a salt field, and transfer of *Virgibacillus picturae* to the genus *Oceanobacillus* as *Oceanobacillus picturae* comb. nov. with emended descriptions. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 56(1): 251-257.
- Lee, L. P., Karbul, H. M., Citartan, M., Gopinath, S. C., LakshmiPriya, T., Tang, T. H. (2015). Lipase-secreting *Bacillus* species in an oil-contaminated habitat: promising strains to alleviate oil pollution. BioMed Research International 2015(8205-8275).
- Lee, S. Y., Oh, T. K., Yoon, J. H. (2010). *Thalassobacillus hwangdonensis* sp. nov., isolated from a tidal flat sediment. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 60(9): 2108-2112.
- Leifson, E. (1963). Determination of Carbohydrate Metabolism of Marine Bacteria. Journal of Bacteriology 85(1183-1184).
- León, M. J., Cristina, S.-P., Ventosa, A. (2017). *Marinobacter aquaticus* sp. nov., a moderately halophilic bacterium from a solar saltern. Int J Syst Evol Microbiol 67(2622-2627).
- Leon, M. J., Sanchez-Porro, C., Ventosa, A. (2017). *Marinobacter aquaticus* sp. nov., a moderately halophilic bacterium from a solar saltern. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 67(8): 2622-2627.
- Li, W. J., Zhang, Y. Q., Schumann, P., Liu, H. Y., Yu, L. Y., Zhang, Y. Q. & Jiang, C. L. (2008). *Nesterenkonia halophila* sp. nov., a moderately halophilic,

- alkalitolerant actinobacterium isolated from a saline soil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 58(6): 1359-1363.
- Li, X., Yu, H.-Y., Lin, Y. F. (2012). Purification and characterization of an extracellular esterase from a moderately halophilic bacterium, *Halobacillus* sp. strain LY5. Journal of Biotechnology 11(23): 6327-6334.
- Li, X., Yu, H. Y. (2012). Characterization of a novel extracellular lipase from a halophilic isolate, *Chromohalobacter* sp. LY7-8. African Journal of Microbiology Research 6(14): 3516-3522.
- (2014). Characterization of an organic solvent-tolerant lipase from *Haloarcula* sp. G41 and its application for biodiesel production. Folia Microbiologica 59(6): 455-463.
- Lv, X.-Y., Guo, L.-Z., Song, L., Fu, Q., Zhao, K., Li, A.-X. & Lu, W.-D. (2010). Purification and characterization of a novel extracellular carboxylesterase from the moderately halophilic bacterium *Thalassobacillus* sp. strain DF-E4. Annals of Microbiology 61(2): 281-290.
- Minnikin, D. E., Patel, P. V., Alshamaony, L., Goodfellow, M. (1977). Polar Lipid Composition in the Classification of *Nocardia* and Related Bacteria. International Journal of Systematic Bacteriology 27(2): 104-117.
- Moreno, L., Garcia, M. T., Ventosa, A., Mellado, E. (2009). Characterization of *Salicola* sp. IC10, a lipase- and protease-producing extreme halophile. FEMS Microbiology Ecology 68(1): 59-71.
- Namwong, S., Tanasupawat, S., Lee, K. C., Lee, J. S. (2009). *Oceanobacillus kapiialis* sp. nov., from fermented shrimp paste in Thailand. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 59(9): 2254-2259.
- Namwong, S., Tanasupawat, S., Smitinont, T., Visessanguan, W., Kudo, T., Itoh, T. (2005). Isolation of *Lentibacillus salicampi* strains and *Lentibacillus juripiscarius* sp. nov. from fish sauce in Thailand. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 55(1): 315-320.
- Neal, M. P. (1946). Fat necrosis studies; the effect of feeding lipase-containing vegetable seed on the production of fat necrosis. Archives of Pathology 41(37-41).
- Noguchi, H., Uchino, M., Shida, O., Takano, K., Nakamura, L. K., Komagata, K. (2004). *Bacillus vietnamensis* sp. nov., a moderately halotolerant, aerobic, endospore-forming bacterium isolated from Vietnamese fish sauce. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54(6): 2117-2120.

- Olney, C. E., Jensen, R. G., Sampugna, J., Quinn, J. G. (1968). The purification and specificity of a lipase from *Vernonia anthelmintica* seed. Lipids 3(6): 498-502.
- Pakdeeto, A., Tanasupawat, S., Thawai, C., Moonmangmee, S., Kudo, T., Itoh, T. (2007a). *Lentibacillus kapialis* sp. nov., from fermented shrimp paste in Thailand. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57(2): 364-369.
- (2007b). *Salinicoccus siamensis* sp. nov., isolated from fermented shrimp paste in Thailand. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57(9): 2004-2008.
- Parwata, P., Asyari, M., Hertadi, R. (2014). Organic Solvent-Stable Lipase from Moderate Halophilic Bacteria *Pseudomonas stutzeri* Isolated from the Mud Crater of Bleduk Kuwu, Central Java, Indonesia. Journal of Pure and Applied Microbiology 8(1): 31-40.
- Rashid, N., Shimada, Y., Ezaki, S., Atomi, H., Imanaka, T. (2001). Low-temperature lipase from psychrotrophic *Pseudomonas* sp. strain KB700A. Applied and Environmental Microbiology 67(9): 4064-4069.
- Sagiroglu, A., Arabaci, N. (2005). Sunflower seed lipase: extraction, purification and characterization. Preparative Biochemistry & Biotechnology 35(1): 37-51.
- Saito, H., Miura, K. I. (1963). Preparation of Transforming Deoxyribonucleic Acid by Phenol Treatment. Biochimica et Biophysica acta 72(619-629).
- Saitou, N., Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4(4): 406-425.
- Sasser, M. (1990). *Identification of Bacteria by Gas Chromatography of Cellular Fatty Acids*.
- Satomi, M., La Duc, M. T., Venkateswaran, K. (2006). *Bacillus safensis* sp. nov., isolated from spacecraft and assembly-facility surfaces. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 56(8): 1735-1740.
- Schlesner, M. (2008). *The Halobacterium salinarum Taxis Signal Transduction Network: a Protein-Protein Interaction Study* (Vol. 3). der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U. C. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. Biotechnology Advances 19(8): 627-632.
- Sharma, R., Soni, S. K., Vohra, R. M., Jolly, R. S., Gupta, L. K. (2002). Production of extracellular alkaline lipase from a *Bacillus* sp. RSJ1 and its application in ester hydrolysis. Indian Journal of Microbiology 42(49-54).

- Sheu, S. Y., Arun, A. B., Jiang, S. R., Young, C. C., Chen, W. M. (2011). *Allobacillus halotolerans* gen. nov., sp. nov. isolated from shrimp paste. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 61(5): 1023-1027.
- Singh, A. K., Mukhopadhyay, M. (2012). Overview of fungal lipase: a review. Applied Biochemistry and Biotechnology 166(2): 486-520.
- Spargser, J., Wieser, M., Taubel, M., Rossello-Mora, R. A., Rosengarten, R., Busse, H. J. (2003). *Staphylococcus nepalensis* sp. nov., isolated from goats of the Himalayan region. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 53(6): 2007-2011.
- Spring, S., Ludwig, W., Marquez, M. C., Ventosa, A., Schleifer, K. H. (1996). *Halobacillus* gen. nov., with Descriptions of *Halobacillus litoralis* sp. nov. and *Halobacillus trueperi* sp. nov., and Transfer of *Sporosarcina halophila* to *Halobacillus halophilus* comb. nov. International Journal of Systematic Bacteriology 46(2): 492-496.
- Srinivas, A., Divyasree, B., Tushar, L., Suresh, G., Sasikala, C., Ramana, C. V. (2016). *Salinicoccus amylolyticus* sp. nov., isolated from a saltern. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 66(10): 3814-3820.
- Staneck, J. L., Roberts, G. D. (1974). Simplified Approach to Identification of Aerobic Actinomycetes by Thin-Layer Chromatography. Journal of Applied Microbiology 28(2): 226-231.
- Steiner, J. M., Williams, D. A. (2002). Purification of classical pancreatic lipase from dog pancreas. Biochimie 84(12): 1245-1253.
- Sztajer, H., Maliszewska, I., Wieczorek, J. (1988). Production of exogenous lipases by bacteria, fungi and actinomycetes. Enzyme and Microbial Technology 10(8): 492-497.
- Tanasupawat, S., Namwong, S., Kudo, T., Itoh, T. (2007). *Piscibacillus salipiscarius* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic bacterium from fermented fish (*pla-ra*) in Thailand. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57(7): 1413-1417.
- Tanasupawat, S., Pakdeeto, A., Namwong, S., Thawai, C., Kudo, T., Itoh, T. (2006). *Lentibacillus halophilus* sp. nov., from fish sauce in Thailand. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 56(8): 1859-1863.
- 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.

- Ventosa, A., Márquez, M. C., Ruiz-Berraquero, F., Kocur, M. (1990). *Salinicoccus roseus* gen. nov., sp. nov., a new moderately halophilic Gram-positive coccus. Systematic and Applied Microbiology 13(1): 29-33.
- Ventosa, A., Nieto, J. J. (1995). Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. World Journal of Microbiology and Biotechnology 11(85-94).
- Wang, L., Liu, W. Y., Gu, Z. J., Chen, S. F., Yang, S. S. (2010). *Oceanobacillus manasiensis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from the salt lakes of Xinjiang, China. Journal of Microbiology 48(3): 312-317.
- Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I. & Truper, H. G. (1987). International Committee on Systematic Bacteriology: announcement of the report of the ad hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. International Journal of Systematic Bacteriology 37(4): 463-464.
- Yesiloglu, Y., Baskurt, L. (2008). Partial purification and characterization of almond seed lipase. Preparative Biochemistry & Biotechnology 38(4): 397-410.
- Yoon, J. H., Oh, T. K., Park, Y. H. (2004). Transfer of *Bacillus halodenitrificans* Denariáz et al. 1989 to the genus *Virgibacillus* as *Virgibacillus halodenitrificans* comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54(6): 2163-2167.



ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมีและบัฟเฟอร์

เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิดนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ยกเว้นอาหารจากการสกัดจากแหล่งคาร์บอนซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

ก.1 อาหารแข็ง Japan collection of microorganisms (JCM) no. 377 (Namwong et al., 2005)

Casamino acids	5	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Sodium glutamate	1	กรัม
Trisodium citrate	3	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	20	กรัม
KCl	2	กรัม
NaCl	100	กรัม
FeCl ₂ ·4H ₂ O	0.362	กรัม
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.0362	กรัม
Agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอช อยู่ในช่วง 7.0 ถึง 7.2 ด้วย 1 N NaOH

ก.2 อาหารเหลว Modified JCM no. 377

Casamino acids	5	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Sodium glutamate	1	กรัม
Trisodium citrate	3	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	20	กรัม
KCl	2	กรัม
NaCl	50	กรัม
FeCl ₂ ·4H ₂ O	0.362	กรัม
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.0362	กรัม
Agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
ปรับพีเอช อยู่ในช่วง 7.0 ถึง 7.2 ด้วย 1 N NaOH		

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

Casamino acids	5	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Sodium glutamate	1	กรัม
Trisodium citrate	3	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	20	กรัม
KCl	2	กรัม
NaCl	100	กรัม
FeCl ₂ ·4H ₂ O	0.362	กรัม
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.0362	กรัม
Agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

โดยเติมสับสเตรทร้อยละ 1 (Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80 และ Tributyrin)

ปรับพีเอช อยู่ในช่วง 7.0 ถึง 7.2 ด้วย 1 N NaOH

ก.4 อาหารแข็ง L-arginine

Peptone	1	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.3	กรัม
NaCl	50	กรัม
L-(+) arginine hydrochloride	1	กรัม
Phenol red, 0.1% aq. Solution	1	กรัม
Agar	3	กรัม

ปรับพีเอช อยู่ในช่วง 7.0 ถึง 7.2 ด้วย 1 N NaOH

ก.5 อาหารแข็ง Starch

Modified JCM no. 377 agar	100	มิลลิลิตร
Starch	1%	(w/v)

ปรับพีเอช อยู่ในช่วง 7.0 ถึง 7.2 ด้วย 1 N NaOH

ก.6 Gelatin agar

Modified JCM no. 377 agar	100	มิลลิลิตร
Gelatin	1%	(w/v)

ปรับพีเอช อยู่ในช่วง 7.0 ถึง 7.2 ด้วย 1 N NaOH

ก.7 อาหารแข็ง Tween 80

Modified JCM no. 377 agar	100	มิลลิลิตร
Tween 80	1%	(w/v)

ปรับพีเอช อยู่ในช่วง 7.0 ถึง 7.2 ด้วย 1 N NaOH

ก.8 อาหารแข็ง Skim milk

Modified JCM no. 377 agar	100	มิลลิลิตร
Skim milk	1%	(w/v)

ปรับพีเอช อยู่ในช่วง 7.0 ถึง 7.2 ด้วย 1 N NaOH

ก.9 อาหารเหลว Nitrate

Beef extract	10	กรัม
Peptone	10	กรัม
KNO ₃	1	กรัม
NaCl	5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
ปรับพีเอช อยู่ในช่วง 7.0 ถึง 7.2 ด้วย 1 N NaOH		

ก.10 อาหารเหลว Aesculin

Modified JCM no. 377 agar	100	มิลลิลิตร
Aesculin	0.1	กรัม
Ferric citrate	0.05	กรัม
ปรับพีเอช อยู่ในช่วง 7.0 ถึง 7.2 ด้วย 1 N NaOH		

ก.11 อาหารเหลว Peptone

Peptone	10	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ก.12 อาหารเหลว Marine oxidation-fermentation (MOF) (Leifson, 1963)

Casitone (Difco)	1	กรัม
Yeast extract	0.1	กรัม
Ammonium sulfate	0.5	กรัม
Tris	0.5	กรัม
NaCl	50	กรัม
Phenol red	0.001%	
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
ปรับพีเอช เป็น 7.5		

ก.13 สารละลาย 1M Tris-HCl พีเอช 8.0

ชั่ง Tris hydroxymethyl aminomethane (Tris) 121.14 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับค่าพีเอชด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น จนมีค่าพีเอช 8.0 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นอีกครั้งจนมีปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร

ก.14 สารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl พีเอช 8.0

Tris (MW 121.14)	6.057	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ปรับค่าพีเอชเป็น 8.0 ด้วยกรด HCl เข้มข้น

ก.15 ไนเตรทรีเอเจนต์

สารละลาย A: 0.33% กรดซัลฟาลินิกที่ละลายในกรดอะซิติก

สารละลาย A: 0.6% dimethyl- α -naphthylamine ที่ละลายในกรดอะซิติก

ก.16 Lugol's iodine

KI	40	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ก.17 1X Tris-acetate (TAE) บัฟเฟอร์

50X Tris-acetate (TAE)	20	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	980	มิลลิลิตร

ก.18 PCR reaction mixture

Stock	1 Volume	(100 μ L)	
Forward Primer: 20F	10 pmol/ μ L	4	
Reverse Primer: 1492R	10 pmol/ μ L	4	
10 x Taq buffer (NH ₄ SO ₄ -MgCl ₂)	10 x	10	
dNTP	2.0 mM	2	
MgCl ₂	25 mM	8	
Taq DNA polymerase	5 Unit/ μ L	0.5	
Milli-Q water -		66.5	
Template	Undilute	5	

ก.19 0.8% Agarose gel

Agarose	0.8	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
ละลายผงวุ้นกับน้ำกลั่นในเครื่องไมโครเวฟ		

ภาคผนวก ข
สารละลายสำหรับการทดสอบทางอนุกรมวิธาน

ข.1 รีเอเจนต์และบัฟเฟอร์สำหรับการทดสอบ DNA-DNA hybridization

Pre-hybridization solution (10 mL)

20X SSC	1	มิลลิลิตร
10 mg/ml Salmon sperm DNA	1	มิลลิลิตร
Formamide	51	มิลลิลิตร
Sonicated salmon sperm DNA (10 mg/ml)	0.1	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

Hybridization solution (10 ml)

Prehybridization solution	100	มิลลิลิตร
Dextran sulfate	5	มิลลิลิตร
Solution 1	10	มิลลิลิตร
BSA (Bovine serum albumin)	0.05	กรัม
Triton X	10	ไมโครลิตร
20X PBS	0.5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	9.5	มิลลิลิตร

Solution 2

Streptavidin-POD conjugate	1	ไมโครลิตร
Solution 2	4	มิลลิลิตร

Solution 3

3,3',5,5' Tetramethylbenzidine (TMB)		
(10 mg/ml in DMFO)	100	มิลลิลิตร
0.3% H ₂ O ₂	100	มิลลิลิตร

0.1 M citric acid + 0.2 M Na₂HPO₄ buffer พีเอช 6.2 ใน 10% DMFO 5 มิลลิลิตร

20X Phosphate buffer saline (PBS)

Na ₂ HPO ₄	28.8	กรัม
NaCl	160	กรัม
KH ₂ PO ₄	4	กรัม
KCl	4	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
พีเอช 7.2 ถึง 7.4		

100 x Denhardt solution

Bovine serum albumin	2	กรัม
Polyvinylpyrrolidone	2	กรัม
Ficoll400	2	มิลลิลิตร

ละลายในน้ำนาโนเพียว 100 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

Salmon sperm DNA (10 mg/mL)

Salmon sperm DNA	10	มิลลิกรัม
TE buffer	1	มิลลิลิตร

ละลาย salmon sperm DNA ลงในบัฟเฟอร์ TE จากนั้นต้มจนเดือดเป็นเวลา 10 นาที นำออกมาแช่ด้วยเย็นบนน้ำแข็งทันทีและนำไป sonicate เป็นเวลา 3 นาที

20X Saline sodium citrate (SSC)

NaCl	175.3	กรัม
Sodium citrate	88.2	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
ปรับพีเอช 7.0		

1X Saline sodium citrate (SSC)

20X SSC	50	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	950	มิลลิลิตร

ข.2 Polar lipids

Ninhydrin solution

Ninhydrin	0.5	กรัม
1-Butanol saturated	100	มิลลิลิตร

Dittmer & Lester reagent

Reagent A

MoO ₃	4.011	กรัม
25 N H ₂ SO ₄	100	มิลลิลิตร

ละลาย MoO₃ 4.011 กรัม ใน 25 N H₂SO₄ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Reagent B

Molybdenum powder	0.178	กรัม
Solution A	59	มิลลิลิตร

ชั่ง Molybdenum powder 0.178 กรัม ละลายใน solution A ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นแช่เย็นทันที นำสารละลายออกจากตะกอนอย่างช้าๆ ผสมสารละลาย A และ B อย่างละ 50 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

Anisaldehyde reagent

Ethanol	90	มิลลิลิตร
<i>p</i> -Anisaldehyde	5.0	มิลลิลิตร
H ₂ SO ₄	5	มิลลิลิตร
Acetic acid	1	มิลลิลิตร

ข.3 Cellular fatty acid analysis

Reagent 1 (Saponification reagent)

Sodium hydroxide	15	กรัม
MeOH (HPLC grade)	50	มิลลิลิตร
Milli-Q water	50	มิลลิลิตร

ละลาย NaOH ใน Milli-Q water จากนั้นเติม MeOH

Reagent 2 (Methylation reagent)

6 N HCl	65	มิลลิลิตร
MeOH (HPLC grade)	55	มิลลิลิตร
pH must be below 1.5		

Reagent 3 (Extraction solvent)

n-Hexane (HPLC grade)	50	มิลลิลิตร
Methyl-tert-Butyl ether	50	มิลลิลิตร

Reagent 4 (base wash reagent)

Sodium hydroxide	1.2	กรัม
Milli-Q water	100	มิลลิลิตร

Reagent 5 (Saturated sodium chloride)

Sodium chloride saturated in Milli-Q water

RNase A solution

RNase A	20	นาโนกรัม
0.15 M NaCl, pH 5.0	10	มิลลิลิตร

ละลาย RNase A ใน 0.15 M NaCl, pH 5.0 จากนั้นต้มในน้ำเดือด 95°C เป็นเวลา 5-10 นาที
เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

RNase T solution

RNase T	800	ยูนิต
0.1 M Tris-HCl (pH 7.2)	1	มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย RNase T ใน 0.1M Tris-HCl (pH 7.2) จากนั้นต้มในน้ำเดือด 95°C
เป็นเวลา 5-10 นาที เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ค

รีเอเจนต์และบัฟเฟอร์สำหรับวิเคราะห์เอนไซม์ไลเปสและการทำให้บริสุทธิ์

ค.1 Universal buffer (Britton-Robinson, pH 2-12)

0.04 M Acetic acid	2.07	มิลลิลิตร
0.04 M H ₃ PO ₄	2.29	มิลลิลิตร
0.04 M Boric acid	2.47	กรัม

ปรับพีเอชด้วย 0.2 N NaOH และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

ค.2 Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) reagents

Monomer solution

Acrylamide	30%	(w/v)
Bisacrylamide	0.8%	(w/v)
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ค.3 4x Resolving gel buffer

Tris(Hydroxymethyl) aminomethane	18.15	กรัม
Milli-Q water	90	มิลลิลิตร

ละลายและปรับพีเอชให้เป็น 8.8 ด้วย 0.1 N HCl

ข้อควรระวัง: เก็บในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและไม่ควรเก็บนานเกิน 3 เดือน

ค.4 4x Stacking gel buffer

Tris(Hydroxymethyl) aminomethane	6	กรัม
น้ำกลั่น	90	มิลลิลิตร

ละลายและปรับพีเอชให้เป็น 6.8 ด้วย 0.1 N HCl

ข้อควรระวัง: เก็บในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและไม่ควรเก็บนานเกิน 3 เดือน

ค.5	10x Tank buffer สำหรับ SDS-PAGE		
	Tris(Hydroxymethyl) aminomethane	30.28	กรัม
	Glycine	144.13	กรัม
	Sodium dodecyl sulfate	10	กรัม
	น้ำกลั่น	90	มิลลิลิตร
ค.6	10% Sodium dodecyl sulfate (SDS)		
	Sodium dodecyl sulfate	10	กรัม
	Milli-Q water	90	มิลลิลิตร
ค.7	2x Sample buffer for SDS-PAGE		
	4x Stacking gel buffer	2.5	มิลลิลิตร
	Glycerol	2	มิลลิลิตร
	10% (w/v) SDS	4	มิลลิลิตร
	Bromophenol blue (2 mg/ml)	1	มิลลิลิตร
	β -mercaptoethanol	0.2	มิลลิลิตร
	เพิ่มเติม 4x Stacking gel buffer สำหรับ Native-PAGE สามารถเตรียมเหมือนกันได้ แต่ไม่เติม β -mercaptoethanol		
ค.8	12.5% Running gel for SDS-PAGE		
	Milli-Q water	4.1314	มิลลิลิตร
	4x Running gel buffer	3.25	มิลลิลิตร
	Monomer solution	5.4171	มิลลิลิตร
	10% (w/v) SDS	130	ไมโครลิตร
	10% (w/v) Ammonium persulfate	65	ไมโครลิตร
	TEMED	6.5	ไมโครลิตร
	เพิ่มเติม: 12.5% Running gel สำหรับ Native-PAGE สามารถเตรียมเหมือนกันได้แต่ไม่เติม 10% (w/v) SDS		

ค.9 4% Stacking gel for SDS-PAGE

Milli-Q water	3.053	มิลลิลิตร
4x Stacking gel buffer	1.25	มิลลิลิตร
Monomer solution	677	ไมโครลิตร
10% (w/v) SDS	50	ไมโครลิตร
10% (w/v) Ammonium persulfate	25	ไมโครลิตร
TEMED	5	ไมโครลิตร

เพิ่มเติม 4% Stacking gel สำหรับ Native-PAGE สามารถเตรียมเหมือนกันได้แต่ไม่
เติม 10% (w/v) SDS

ค.10 Silver staining kit reagent (GE Healthcare)

Fixing solution TCA		
Trichloroacetic acid	50	กรัม
Milli-Q water	250	มิลลิลิตร
Sensitizing solution		
Ethanol	75	มิลลิลิตร
Sodium thiosulphate (5% w/v)	10	มิลลิลิตร
Sodium acetate	17	กรัม
Milli-Q water	250	มิลลิลิตร

เพิ่มเติม ก่อนใช้ Sensitizing solution ควรเติม glutardialdehyde (25% w/v)
ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร

Silver solution

Silver nitrate solution (2.5% w/v)	25	มิลลิลิตร
Milli-Q water	250	มิลลิลิตร

Developing solution

Sodium carbonate	6.25	กรัม
Milli-Q water	250	มิลลิลิตร

เพิ่มเติม ก่อนใช้ Developing solution ควรเติม formaldehyde (37% w/v)
ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร

Stop solution

EDTA-Na ₂ ·2H ₂ O	3.65	กรัม
Milli-Q water	250	มิลลิลิตร

Washing solution

Milli-Q water

Preserving solution

Glycerol (87% w/w)	25	มิลลิลิตร
Milli-Q water	250	มิลลิลิตร

Staining procedure

- ขั้นตอน Fixation: 30 นาที
แช่เจลด้วย fixing solution เป็นเวลา 30 นาที
- ขั้นตอน Washing: 3 x 5 นาที
ล้างแผ่นเจลด้วยน้ำสะอาด 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
- ขั้นตอน Sensitizing: 30 นาที
เทสารละลาย sensitizing ทิ้งไว้ เป็นเวลา 30 นาที
- ขั้นตอน Washing: 3 x 10 นาที
ล้างแผ่นเจลด้วยน้ำสะอาด 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที
- ขั้นตอน Silver reaction: 20 นาที
เทสารละลาย silver ทิ้งไว้ เป็นเวลา 20 นาที
- ขั้นตอน Washing: 2 x 1 นาที
ล้างสารละลาย silver ด้วยน้ำสะอาด 2 ครั้ง ครั้งละ 1 นาที
- ขั้นตอน Developing: 2 to 5 นาที
เทสารละลาย developing ทิ้งไว้ เป็นเวลา 2 ถึง 10 นาที

8. ขั้นตอน Stopping: 10 นาที
 เทสารละลาย stopping ทิ้งไว้ เป็นเวลา 10 นาที
9. ขั้นตอน Washing: 3 x 5 นาที
 ล้างแผ่นเจลด้วยน้ำสะอาด 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
10. ขั้นตอน Preserving: 20 นาที
 เทสารละลาย preserving ทิ้งไว้ เป็นเวลา 20 นาที



ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์

ง.1 การวิเคราะห์แอกทิวิตีของเอนไซม์ไลเปส ด้วยวิธี colorimetric โดยมี *p*-nitrophenyl butyrate (*p*-NPB) เป็นสารตั้งต้น

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน *p*-nitrophenol ความเข้มข้น 1000 μ M (1 mM) จาก stock ของ *p*-nitrophenol ความเข้มข้น 0.1 M (100 mM)

เตรียม stock ของ *p*-nitrophenol (M.W. 139.11 g/mol) ที่มีความเข้มข้น 0.1 M ปริมาตร 1 ml

$$\begin{aligned}
 \text{จากสูตร mol} &= \text{g/M.W.} \\
 \text{g} &= (\text{mol})(\text{M.W.}) \\
 &= (0.1 \text{ M})(139.11) \\
 &= 13.911 \text{ g/L} \\
 1000 \text{ mL มี } p\text{-nitrophenol} &= 13.911 \text{ g} \\
 1 \text{ mL มี } p\text{-nitrophenol} &= (13.911 \text{ g})(1 \text{ mL})/1000 \text{ mL} \\
 &= 0.013911 \text{ g} \\
 &\text{หรือ } 13.911 \text{ mg}
 \end{aligned}$$

ดังนั้น ชั่ง *p*-nitrophenol ปริมาณ 0.013911 กรัม ปรับปริมาตรให้ได้ 1 มิลลิเมตรด้วย absolute ethanol จะได้ stock ของ *p*-nitrophenol ที่มีความเข้มข้น 0.1 M (100 mM)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เตรียม working ของ *p*-nitrophenol ที่มีความเข้มข้น 1 mM ปริมาตร 1 mL

Stock ของ *p*-nitrophenol ที่มีความเข้มข้น 0.1 M (100 mM)

ต้องการ working ของ *p*-nitrophenol ที่มีความเข้มข้น 1 mM

$$\begin{aligned}
 C1 V1 &= C2 V2 \\
 (100 \text{ mM}) * V1 &= (1 \text{ mM})(1 \text{ mL}) \\
 V1 &= (1 \text{ mM})(1 \text{ mL})/100 \text{ mM} \\
 V1 &= 0.01 \text{ mL} \\
 &\text{หรือ } 10 \mu\text{L}
 \end{aligned}$$

ดังนั้น ปิเปต Stock ของ *p*-nitrophenol ที่มีความเข้มข้น 0.1 M (100 mM) ปริมาตร 10 μ L แล้วปรับปริมาตรด้วย universal buffer 990 μ L จะได้ working ของ *p*-nitrophenol ที่มีความเข้มข้น 1 mM ปริมาตร 1 mL

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน *p*-nitrophenol ที่ความเข้มข้นต่างๆ จาก stock ของสารละลายมาตรฐาน *p*-nitrophenol ความเข้มข้น 100 mM เพื่อทำการหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน *p*-nitrophenol กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

ตารางที่ 1 สารละลายมาตรฐาน *p*-nitrophenol ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน <i>p</i> -nitrophenol	ปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน <i>p</i> -nitrophenol 100 mM (μ l)	ปริมาตรของ Universal buffer (μ l)
0	0	200
10	2	198
30	6	196
50	10	190
70	14	186
100	20	180
150	30	170
250	40	160
300	50	150

ง.2 การเตรียมสารละลาย stock solution ของ *p*-nitrophenol butyrate (*p*-NPB) ความเข้มข้น 0.01 M; M.W. of *p*-NPB = 209.02 g/mol

เตรียม stock ของ *p*-nitrophenol butyrate (M.W. 209.02 g/mol) ที่มีความเข้มข้น 0.01 M ปริมาตร 1 ml

$$\begin{aligned}
 \text{จากสูตร mol} &= \text{g/M.W.} \\
 \text{g} &= \text{mol} * \text{M.W.} \\
 &= 0.01 \text{ M} * 209.02 \\
 &= 2.0902 \text{ g/L} \\
 1000 \text{ mL มี } p\text{-nitrophenol butyrate} &= 2.0902 \text{ กรัม} \\
 1 \text{ mL มี } p\text{-nitrophenol butyrate} &= (2.0902 \text{ g})(1 \text{ mL})/1000 \text{ mL} \\
 &= 0.00209 \text{ g} \\
 &\text{หรือ } 2.1 \mu\text{L}
 \end{aligned}$$

ดังนั้น ชั่ง *p*-nitrophenol butyrate ปริมาณ 0.00209 กรัม ปรับปริมาตรให้ได้ 1 มิลลิลิตรด้วย absolute ethanol จะได้ stock ของ *p*-nitrophenol butyrate ที่มีความเข้มข้น 0.01 M (10 mM)

เตรียม working ของ *p*-nitrophenol butyrate ที่มีความเข้มข้น 0.1 mM ปริมาตร 10 mL

Stock ของ *p*-nitrophenol butyrate ที่มีความเข้มข้น 10 mM

ต้องการ working ของ *p*-nitrophenol butyrate ที่มีความเข้มข้น 0.1 mM

$$\begin{aligned}
 C1 * V1 &= C2 * V2 \\
 (10 \text{ mM}) * V1 &= (0.1 \text{ mM})(10 \text{ mL}) \\
 V1 &= (0.1 \text{ mM})(10 \text{ mL})/10 \text{ mM} \\
 V1 &= 0.1 \text{ mL} \\
 &= 100 \mu\text{L}
 \end{aligned}$$

ดังนั้น ปิเปต Stock ของ *p*-nitrophenol butyrate ที่มีความเข้มข้น 0.01 M (10 mM) ปริมาตร 100 μL แล้วปรับปริมาตรด้วย buffer ให้ได้ 1 mL จะได้ working ของ *p*-nitrophenol butyrate ที่มีความเข้มข้น 0.1 mM ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ง.3 การคำนวณแอกทิวิตีเอนไซม์

ยกตัวอย่าง

- หลังจากวัดการดูดกลืนคลื่นแสงที่ OD. 410 ได้ค่า 0.757
- นำค่า 0.757 ลบกับ 0.225 คือ ค่าของ Blank ที่เฉลี่ยแล้ว จะได้ค่าที่ลบกับ blank คือ 0.532
- นำค่า 0.532 มาหาค่า x จากสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐาน จากสูตร $x = (0.532 - 0.0976) / 0.0044$ ซึ่ง x เท่ากับ 98.727 $\mu\text{mole/mL}$ ทำให้ทราบว่าในปฏิกิริยามีการปลดปล่อยความเข้มข้นของ *p*-nitrophenol ไปที่ μmole เมื่อเทียบกับค่าความเข้มข้นของ *p*-nitrophenol มาตรฐาน
- จากนั้นนำค่าที่ได้มาคูณค่าการเจือจาง 5 เท่าของปฏิกิริยา $(98.727 \mu\text{mole/mL})(5) = 493.635 \mu\text{mole/mL}$

- ปริมาตรทั้งหมดที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา คือ 0.2 mL

ซึ่งในปริมาตร 1 mL มีแอกทิวิตีเอนไซม์อยู่ 493.635 μmole

ปริมาตรทั้งหมดที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา คือ 0.2 mL \therefore มีแอกทิวิตีเอนไซม์อยู่

$$(493.635 \mu\text{mole})(0.2 \text{ mL}) / 1 \text{ mL} = 98.727 \mu\text{mole}$$

- ปริมาตรเอนไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา คือ 0.02 mL

เอนไซม์ที่เติมลงไปในการปฏิกิริยาปริมาตร 0.02 mL มีแอกทิวิตีเอนไซม์อยู่ 98.727 μmole

และเอนไซม์ปริมาตร 1 mL มีแอกทิวิตีเอนไซม์อยู่ $(98.727 \mu\text{mole})(1 \text{ mL}) / 0.02 \text{ mL} = 4936.35 \mu\text{mole}$

- ระยะเวลาที่ใช้ในการบ่ม 30 นาที

\therefore แอกทิวิตีเอนไซม์เท่ากับ 4936.35 $\mu\text{mole/mL} \times 30 \text{ min}$ จะได้ค่า 164.545 Unit/mL

\therefore เอนไซม์ 1 ยูนิต (Unit) คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่ปลดปล่อย *p*-nitrophenol ความเข้มข้น 1 μM ต่อ 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

ภาคผนวก จ
ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

1. Strain SKP1-4 (1,394 นิวคลีโอไทด์)

CAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGG
 TAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACC
 GCATGGTTCAGACATAAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAG
 TTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACT
 GGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGAATGGACGAAA
 GTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAA
 GAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTAC
 GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTC
 GCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGAAACTGG
 GGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGA
 GGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAG
 CGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTTCC
 GCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAAC
 TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGAAGCAACGCGAAG
 AACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTG
 ACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC
 AACCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAG
 GAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCATTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGAC
 AGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCA
 GTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATA
 CGTTCGCCGGCCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAG
 GT

2. Strain SKP1-5 (1,381 นิวคลีโอไทด์)

GCAAGCGGATCCCCTTCGGGGGTGATGCTTGTGGAATGAGCGGGACGGGTGAGTAACACGTGGG
 CAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACCCCGGAAACCGGGGCTAATACCGGTAATACCTGACTCC
 GCATGGAGTCGGGTTGAAAGATGGCTTCTCGCTATCACTTACAGATGGGCCCGGGCGCATTAGCTA
 GTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC
 TGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA
 AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTCAGGGA
 AGAACAAAGTACCGTGCGAATAGAGCGGTACCTTGACGGTACCTGACCAGAAAGCCACGGCTAACTA
 CGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCG
 CGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTG
 GGGAACTTGAGTACAGAAGAGGAGAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGG
 AGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGG
 GCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGGGGCTT
 CCACCCCTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAA
 ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGAAGCAACGCGA
 AGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTCGGACCACCTGGAGACAGGGTTTTCCCTTCGGGGACCGAA
 TGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGC
 GCAACCCCTGACCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGG
 AGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATG
 GATGGTACAAAGGGCAGCAAAACCGCGAGGTCGAGCAAATCCCATAAAACCACTTCTCAGTTCGGATT
 GCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGA
 ATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTGGCAACACCC

3. Strain SKP2-1 (1,379 นิวคลีโอไทด์)

GCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCTATAAGACTGG
 GATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACATTTGGAACCGCATGGTTCTAAAGTGAAAGA
 TGGTTTTGCTATCACTTATAGATGGACCCGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCA
 AGGCAACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGAC
 TCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGT
 GAGTGATGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACAATGTGTAAGTAACTGTG

CACGTCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA
 GGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGTTTCTTAAAGTCTGATGTG
 AAAGCCCACGGCTCAACCGTGAGGGTCATTGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGT
 GGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTT
 CTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
 CACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATT
 AAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACA
 AGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTTTGA
 AAATCTAGAGATAGAGCCTTCCCTTCGGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAG
 CTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTAAGCTTAGTTGCCATCATT
 AAGTTGGGCACTTAGGTTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCAT
 CATGCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAATACAAAGGGCAGCTAAACCGCGA
 GGTCATGCAAATCCCATAAAGTTGTTCTCAGTTCCGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGCT
 GGAATCGTAGTAATCGTAGATCAGCATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCC
 CGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGCCGGTGGAGTAACCA

4. Strain SKP2-2 (1,384 นิวคลีโอไทด์)

AGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCTATAAGACTGG
 GATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACATTTGGAACCGCATGGTTCTAAAGTGAAAGA
 TGGTTTTGCTATCACTTATAGATGGACCCGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCA
 AGGCGACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGAC
 TCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGT
 GAGTGATGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACAATGTGTAAGTAACTGTG
 CACGTCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA
 GGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGTTTCTTAAAGTCTGATGTG
 AAAGCCCACGGCTCAACCGTGAGGGTCATTGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGT
 GGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTT
 CTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
 CACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATT
 AAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACA

AGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTTTGA
 AAACCTAGAGATAGAGCCTTCCCCTTCGGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAG
 CTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAAGCTTAGTTGCCATCATT
 AAGTTGGGCACTCTAGGTTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCAT
 CATGCCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAATACAAAGGGCAGCTAAACCGCGA
 GGTCATGCAAATCCCATAAAGTTGTTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGCT
 GGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGCATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGTCTTGTACACACCGCC
 CGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGCCGGTGGAGTAACCATTTA

5. Strain SKP2-3 (1,374 นิวคลีโอไทด์)

GCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCTATAAGACTGG
 GATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACATTTGGAACCGCATGGTTCTAAAGTGAAAGA
 TGGTTTTGCTATCACTTATAGATGGACCCGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCA
 AGGCAACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGAC
 TCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGT
 GAGTGATGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTATTAGGGAAGAACAATGTGTAAGTAACTGTG
 CACGTCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA
 GGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTG
 AAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGT
 GGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTT
 CTGGTCTGTAACCTGACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
 CACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATT
 AAGCACTCCGCTGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACA
 AGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTTTGA
 AAACCTAGAGATAGAGCCTTCCCCTTCGGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAG
 CTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAAGCTTAGTTGCCATCATT
 AAGTTGGGCACTCTAGGTTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCAT
 CATGCCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAATACAAAGGGCAGCTAAACCGCGA
 GGTCATGCAAATCCCATAAAGTTGTTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGCT

GGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGCATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGACACACCGCC
CGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGCCGGTGGAGT

6. Strain SKP2-4 (1,349 นิวคลีโอไทด์)

CGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACCCCGGGAAACCGGGGCT
AATACCGGATAATACTTTCTTTTGCATAAAGGAAAGTTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACCTACAGA
TGGGCCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGAC
CTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAG
GGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGTTTTTCGGAT
CGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTTGGGTAGTAAGTACCCAACTTACCGGTACCTAAC
CAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGA
ATTATTGGGCGTAAAGCGCTCGCAGGCGGTCCTTTAAGTCTGATGTGAAATCTCGCGGCTCAACCGC
GAACGGTCATTGGAACTGGAGGACTTGAGTACAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGT
GAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTG
AGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGT
GCTAGGTGTTAGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAG
TACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAAGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTT
TAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGTCTTGACATCCTCTGCTATTCTAGAGATAGGAAG
TTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGG
TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGA
CTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGC
TACACACGTGCTACAATGGATGGAACAAAGGGAAGCAAAACCGGAGGTCAAGCAAATCCCATAAAA
CCATTCTAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGA
TCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTGG
TAACACCCGAAGTCGGTGAGG

7. Strain SKP2-12 (1,349 นิวคลีโอไทด์)

GCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCTATAAGACTGG
GATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACATTTGAAACCGCATGGTTCTAAAGTGAAGA
TGGTTTTGCTATCACTTATAGATGGACCCGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCA

AGGCAACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGAC
 TCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGT
 GAGTGATGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACAATGTGTAAGTAACTGTG
 CCATTCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA
 GGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTG
 AAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGT
 GGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTT
 CTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
 CACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATT
 AAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACA
 AGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTTTGA
 AAAGTCTAGAGATAGAGCCTTCCCTTCGGGGGACCAAAGTACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCA
 GCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTAAGCTTAGTTGCCATCAT
 TAAGTTGGGCACTCTAGGTTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA
 TCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAATACAAAGGGCAGCTAAACCGCG
 AGGTCATGCAAATCCATAAAGTTGTTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGC
 TGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGCATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGACACACCGC
 CCGTCACACCACGAGAG

8. Strain SKP2-13 (1,401 นิวคลีโอไทด์)

TGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCGGTGCTTGC
 ACCGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTATCACGTGAGTAACCTGCCCTTGACTCTGGGATAAG
 CCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATACGACCAGTCAACCGCATGGTGTGCTGGTGGAAAGCTTTA
 GCGGTTTTGGATGGACTCGCGCCTATCAGCTAGACGGTGAGGTAATGGCTCACCGTGGCGATGAC
 GGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGA
 GGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGTGGGATGAC
 GGCTTCGGGTTGTAAACCACTTTCAGCAGGGAAGAAGCTTTTTGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGC
 GCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTATCCGGAATTATTGG
 GCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGCTCTGCTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTGTG
 CAGTGGGTACGGGCAGGCTAGAGTGCAGTAGGGGAGACTGGAATCCTGGTGTAGCGGTGAAATGC

GCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCTGTTACTGACGCTGAGGAGCG
 AAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGTTGGGCACTAGGT
 GTGGGGGACATTCCACGTTTTCCGCGCCGTAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGG
 CCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATT
 CGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGACCGCCCTAGAGATAGGGTTTTCCC
 TTCGGGGCTGGTGTACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTC
 CCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTATGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGGACTCATGGGAGACTGC
 CGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTTAC
 GCATGCTACAATGGCCGGTACAGTGGGTTGCGATACTGTGAGGTGGAGCTAATCCCTAAAAGCCGG
 TCTCAGTTCGGATCGAAGTCTGCAACTCGACTTCGTGAAGTTGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAG
 CAATGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCAAGTCACGAAAGTTGGTAAC
 ACCCGAAGC

9. Strain SKP4-3 (1,388 นิวคลีโอไทด์)

TCCCCTTCGGGGGTGACGCTTGTGGAACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCC
 TGTAAGACTGGGATAACCCCGGAAACCGGGCTAATACCGGATAACACCGGACTCCACATGGAGT
 CCTGTTGAAAGATGGCTTCTCGTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAG
 GTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACTGGGACTGA
 GACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACG
 GAGCAACGCCCGTGAACGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTCAGGGAAGAACAAGT
 GCCGTGCGAATAGAGCGGCACCTTGACGGTACCTGACGAGGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGC
 AGCCGCGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGG
 TTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGAAACTGGGGAACCTGA
 GTACAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCA
 GTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACGACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA
 TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGGGGCTTCCACCCCTTAG
 TGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAA
 TTGACGGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGCAAGCAACGCGAAGAACCTTACC
 AGGTCTTGACATCTTCGGACAACCCTGGAGACAGGGCGTTCCCTTCGGGGACCGAATGACAGGTGG
 TGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGA

CCTTAGTTGCCAGCATTCAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGCGG
 GGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAA
 GGGCAGCGAAGCCGCGAGGTGTAGCAAATCCATAAAACCATTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCA
 ACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCC
 GGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTGGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAA

10. Strain SKP4-8 (1,393 นิวคลีโอไทด์)

AAGCAGACAGCGTCCCTTCGGGGACAATGTCTGTGGAACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTG
 GGCAACCTGCCTGCAAGACTGGGATAACTCCGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGATGACATGAA
 TCGCATGATTCATGTTTTGAAAGATGGCCTTTGTGCTATCACTTGCAGATGGGCCCGGGCGCATTAG
 CTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCA
 CACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGAC
 GAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGTCTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAG
 GGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAA
 CTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGC
 GCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAA
 CTGGGGAACCTTGAGTACAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATG
 TGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGG
 GTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGGGTT
 CCAACCCTTAGTGCTGAGTTAACGCAATAAGCACTCCGCCTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAA
 ACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGACGCAACGCGA
 AGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCGCTGACCGGCCTAGAGATAGGCCTTCCCTTCGGGGCAGCG
 GTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAG
 CGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCG
 GAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAAT
 GGATGGTACAGAGGGCAGCGAGACCGTGAGGTTTAGCCAATCCCTTAAAGCCATTCTCAAGTTCGGA
 TTGCAGGCTGCAACTCGCCTGTATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGT
 GAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTGGCAACACCCGAAGTCG
 GT

11. Strain SKP5-4 (1,390 นิวคลีโอไทด์)

ATCCTCTTCGGAGGTGACGCTTGTGGAACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGC
 CTGTAAGACTGGGATAACCCCGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAATACTTTTCATCACCTGATGG
 AAAGTTGAAAGGTGGCTTCTTGCTACCACTTACAGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAG
 GTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCAACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGA
 GACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACG
 GAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGT
 GCCGTTCGAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGC
 AGCCGCGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGG
 TCCTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTTAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGAGGACTTGA
 GTACAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCA
 GTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGA
 TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTAAGGGGGTTCCGCCCTTA
 GTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGA
 ATTGACGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGACGCAACCGGAAGAACCTTAC
 CAGGTCTTGACATCCTCTGCAATCGGTAGAGATACCGAGTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTG
 GTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACGAGCGCAACCCCTTG
 ATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGG
 GGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGAACAAA
 GGAAGCAAACCGCGAGGTCAAGCAAATCCATAAACCATTTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAA
 CTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCG
 GGCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTGGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAA

12. Strain SKP5-5 (1,372 นิวคลีโอไทด์)

GCTGATCCCCTTCGGGGGTGACGCTTGTGGAATGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAAC
 CTGCCTGTAAGACTGGGATAACCCCGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAATACTTTTCTTTGCATA
 AAGGAAAGTTGAAAGGCGGTTTTTCGGCTGCCACTTACAGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGG
 TGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGA
 CTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCT
 GACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAAC

AAGTCGGGTAGTAACTGACCCGGCCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCC
 AGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCTCGCAGG
 CGGTCCTTTAAGTCTGATGTGAAATCTCGCGGCTCAACCGCGAACGGTCATTGGAAACTGGAGGACT
 TGAGTACAGAAGAGGAGAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACA
 CCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACA
 GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCT
 TAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAA
 GAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGAAGCAACGCGAAGAACCTT
 ACCAGGTCTTGACATCCTCTGCTATTCCTAGAGATAGGAAGTTCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGT
 GGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTT
 GATCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT
 GGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGAACA
 AAGGAAGCAAACCGCGAGGTCAAGCAAATCCATAAAACCATTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGC
 AACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCC
 CGGGCCTTGTACACACCCGCCGTCACACCACGAGAGTTGGTAACA

13. Strain SKP5-6 (1,385 นิวคลีโอไทด์)

CGCAGCCCCGAGCTTGCTCTGGGGTCTGCGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTA
 CCCATCAAAGTGGGATAACCGCGGAAACCGTGGCTAATACCGGATAACCCTGATCCCCGAGGGG
 GATGAGTTGAAAGGCGGTCTTTGACTGCCACTGATGGATGGGCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGT
 GGGGTAAGGGCCCACCAAGGCGACAATGCGTAGCCAACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGAC
 TGAAACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGCAAGTCTG
 ACGGAGCAACGCCCCGTGAGTGAAAAAGGGTTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTCAGGGAAAAACG
 CCGGTGGGAGTAACTGTCCATCGGGTGACGGTACCTGACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCA
 GCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGC
 GGTTCGTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGCGAACT
 TGAGTGCAGAAAAGGAGAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACA
 CCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACA
 GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTCCGCCCT
 TAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAG

GAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTT
 ACCAAATCTTGACATCCTCTGACCGCCATGGAGACATGGCTTCCCTTTTGGGCAGAGTGACAGGTGG
 TGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAT
 CATTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGG
 GGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGGTTACA
 AAGGGCAGCTACGCCGCGAGGCCAAGCGAATCCCATAAAACCTGTTCTCAGTTCGGATTGGAGTCTG
 CAACTCGACTCCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCC
 CGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGGAAGTCGGTAACACCTGAAGCCGGTGGG

14. Strain SKP6-3 (1,379 นิวคลีโอไทด์)

CGCAGCCCCGGAGCTTGCTCTGGGGTCTGCGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTA
 CCCATCAAACCTGGGATAACCGCGGGAAACCGTGGCTAATACCGGATAACCCTGATCCCCGAGGGG
 GATGAGTTGAAAGGCGGTCTTTGACTGCCACTGATGGATGGGCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGT
 GGGGTAAGGGCCACCAAGGCGACAATGCGTAGCCAACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGAC
 TGAAACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGCAAGTCTG
 ACGGAGCAACGCCCCGTGAGTGAAAAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTCAGGGAAAAACG
 CCGGTGGGAGTAACTGTCCATCGGGTGACGGTACCTGACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCA
 GCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGGTAGGC
 GGTTGTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGCGAACT
 TGAGTGCAGAAAAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACA
 CCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACA
 GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTCCGCCCT
 TAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAG
 GAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTT
 ACCAAATCTTGACATCCTCTGACCGCCATGGAGACATGGCTTCCCTTTTGGGCAGAGTGACAGGTGG
 TGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAT
 CATTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGG
 GGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGGTTACA
 AAGGGCAGCTACGCCGCGAGGCCAAGCGAATCCCATAAAACCTGTTCTCAGTTCGGATTGGAGTCTG

CAACTCGACTCCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCC
CGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGGAAGTCGGTAACACCTGAAGCCGGTGGG

15. Strain SKP6-4 (1,377 นิวคลีโอไทด์)

CTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCTATAAGACTGGGA
TAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACATTTGGAACCGCATGGTTCTAAAGTGAAAGATG
GTTTTGCTATCACTTATAGATGGACCCGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAG
GCAACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTC
CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGA
GTGATGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTATTAGGGAAGAACAAATGTGTAAGTAACTGTGCA
CATCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGG
TGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAA
AGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGAAAACCTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGG
AATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCT
GGTCTGTAAGTACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
CGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAA
GCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAG
CGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTTTGAAA
ACTCTAGAGATAGAGCCTTCCCCTTCGGGGGACAAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTC
GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACGAGCGCAACCCTTAAGCTTAGTTGCCATCATTAAAG
TTGGGCACTCTAGGTTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCAT
GCCCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAATACAAAGGGCAGCTAAACCGCGAGGT
CATGCAAATCCCATAAAGTTGTTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGCTGGA
ATCGCTAGTAATCGTAGATCAGCATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGT
CACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGCCGGTGGAGTAACC

16. Strain SKP6-7 (1,420 นิวคลีโอไทด์)

TGCAGTCGAACGCGCGGATCAGGAGCTTGCTCCTGTGACGCGAGTGCCGGACGGGTGAGTAACACG
TAGGCAACCTGCCATCAGACTGGGATAACCACGGGAAACCGTGGCTAATACCGGATAATCCTTTTC
CACACAGGTGGAAAAGTTGAAAGGCGGCCTTTTGGCTGTCACTGATGGATGGGCCTGCGGCGCATT

AGCTGGTTGGTGGGGTAACGGCCCCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGC
 CACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGG
 ACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTC
 AGGGAAGAACGCCGACGGGAGTAACTGCCCGTCGGGTGACGGTACCTGACCAGAAAGCCACGGCTA
 ACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAG
 CGCGCTAGGCGGTTTCGTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAA
 ACTGGCGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGAT
 ATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTG
 GGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGG
 GTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCCAAGGTT
 GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACG
 CGAAGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTCTGACCACCCTGGAGACAGGGTTCCCTTCGGGGCAGA
 GTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAG
 CGCAACCCTTATCATTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTTAATGAGACTGCCGGTGACAAACCG
 GAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATG
 GACAGGTTACAAAGGCGAGCTAAGCCGCGAGGCCAAGCGAATCCATAAACTGTTCTCAGTTCGG
 ATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGT
 GAATACGTTCCCGGGTCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAAAGTCGGTAACACCTGAAGCCG
 GTGGGCCAACCTCTTGAGGCGAGCCGTC

17. Strain SKP6-9 (1,385 นิวคลีโอไทด์)

GGAGCTTGCTCTGGGGTCTGCGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTACCCATCAGA
 CTGGGATAACCGCGGAAACCGTGGCTAATACCGGATAACCCTGATCCCCGAGGGGGATGAGTTG
 AAAGGCGGTCTTTGACTGCCACTGATGGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGG
 GCCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
 GCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGCAAGTCTGACGGAGCAA
 CGCCGCTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTCAGGGAAGAACCCGGTGGGA
 GTAAGTGTCCATCGGGTACGGTACCTGACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG
 GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGCGGTTTCGTTAA
 GTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGCGAACTTGAGTGCAGA

AGAGGAGAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGA
 AGGCGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATA
 CCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTCCGCCCTTAGTGCTGCA
 GCAAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGG
 GGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTG
 ACATCTCTGACCGCATGGAGACATGGCTTCCCTTTTGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGT
 CGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCATTAGTTGCC
 AGCATTGAGTTGGGCACTCTAATGAAAAGTCCCGGTGACAAACCGGAAGGAAGGTGGGGGATGACG
 TCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGGTTACAAAGGGCAG
 CTACGCCGCGAGGCCAAGCGAATCCCATAAAAGTCTCAGTTCGGATTGGAGTCTGCAACTCGAC
 TCCATGAAGCTGGAATCGTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTG
 TACACACCGCCCGTCACACCACGGAAGTCGGTAACACCTGAAGCCGGTGGGCCAAC

18. Strain SKP6-10 (1,390 นิวคลีโอไทด์)

CAGTCGAACGCGCGGATCAGGAGCTTGCTCCTGTGACGCGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTA
 GGCAACCTGCCATCAGACTGGGATAACCACGGGAAACCGTGGCTAATACCGGATAATCCTTTTCCA
 CACAGGTGAAAAGTTGAAAGGCGGCCTTTTGGCTGTCACTGATGGATGGGCCTGCGGCGCATTAG
 CTGGTTGGTGGGGTAACGGCCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCA
 CACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGAC
 GAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAAGAAAGGTTTCGGCTCGTAAAAGTCTGTTGTCAG
 GGAAGAACGCCGACGGGAGTAACTGCCCGTGGGTGACGGTACCTGACCAGAAAGCCACGGCTAAC
 TACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCG
 CGCGTAGGCGGTTTCGTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGAGGGTCATTGGAAAC
 TGGCGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATAT
 GGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGG
 GATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTT
 TCCGCCCTTAGTGCTGAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGA
 AACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCG
 AAGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTCTGACCACCCTGGAGACAGGGTTTCCCTTCGGGGCAGAGT
 GACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG

CAACCCTTATCATTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAACCGGA
 GGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGA
 CAGGTTACAAAGGGCAGCTAAGCCGCGAGGCCAAGCGAATCCCATAAAAAGTGTCTCAGTTCGGATT
 GGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAA
 TACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAAAGTCGGTAACACCTGAAGCCGGTG
 GGC

19. Strain SKP6-12 (1,350 นิวคลีโอไทด์)

GGGTCTGCGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTACCCATCAGACTGGGATAACCG
 CGGAAACCGTGGCTAATACCGGATGATCCTGATCCCCGAGGGGGATGAGTTGAAAGGCGGTCTT
 TGACTGCCACTGATGGATGGGCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGGGCCCACCAAGGC
 GACGATGCGTAGCCGACTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCT
 ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGCAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGT
 GAAGAAGGGTTTTCGGCTCGTAAAAGTCTGTTGTGAGGAAGAAGCCGGTGGGAGTAACTGTCCAT
 CGGGTGACGGTACCTGACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG
 TGGAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGGTAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAA
 AGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGCGAACTTGAGTGAGAAGAGGAGAGTGG
 AATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTAT
 GGTCTGCAACTGACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC
 ACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGACGAAACGCATTA
 AGCACTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAA
 GCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTCTGAC
 CGCCATGGAGACATGGCTTCCCTTCGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGT
 GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCATTAGTTGCCAGCATTAGTT
 GGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGC
 CCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGGTTACAAAGGGCAGCTACGCCGCGAGG
 CCAAGCGAATCCCATAAAAAGTGTCTCAGTTCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGCTGG
 AATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCG
 TCACACCACGGAAGTCGGTAACAC

20. Strain SKP6-13 (1,400 นิวคลีโอไทด์)

GGGTCTGCGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTACCCATCAGACTGGGATAACCG
 CGGAAACCGTGGCTAATACCGGATGATCCTGATCCCCGAGGGGGATGAGTTGAAAGGCGGTCTT
 TGA CTGCCACTGATGGATGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGGGCCCACCAAGGC
 GACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCT
 ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGCAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGT
 GAAGAAGGGTTTTCGGCTCGTAAA ACTCTGTTGT CAGGGAAGAACGCCGGTGGGAGTAACTGTCCAT
 CGGGTGACGGTACCTGACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG
 TGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAA
 AGCCCCGGCTCAACCGGGAGGGTCATTGGAACTGGCGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGG
 AATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTAT
 GGTCTGCAACTGACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCC
 ACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTA
 AGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAA
 GCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTCTGAC
 CGCCATGGAGACATGGCTTCCCTTCGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGT
 GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTATCATTAGTTGCCAGCATT CAGTT
 GGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGC
 CCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGGTTACAAAGGGCAGCTACGCCGCGAGG
 CCAAGCGAATCCCATAAA ACTGTTCTCAGTTCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGCTGG
 AATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGACACACCGCCCCG
 TCACACCACGGAAGTCGGTAACAC

21. Strain SKP6-14 (1,377 นิวคลีโอไทด์)

TTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCTATAAGACTGGGAT
 AACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACATTTGGAACCGCATGGTTCTAAAGTGAAAGATGG
 TTTTGCTATCACTTATAGATGGACCCGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGG
 CAACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGA ACTGAGACACGGTCCAGACTCC
 TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAG
 TGATGAAGGGTTTTCGGCTCGTAAA ACTCTGTTATTAGGGAAGAACAATGTGTAAGTAACTATGCAC

ATCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT
 GGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGGTAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAA
 GCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGA
 ATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTG
 GTCTGTAAGTACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
 GCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAG
 CACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGC
 GGTGGAGCATGTGGTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTTTGAAAA
 CTCTAGAGATAGAGCCTTCCCCTTCGGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTC
 GTGTCGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTAAGCTTAGTTGCCATCATTAG
 TTGGGCACTCTAGTTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCAT
 GCCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAATACAAAGGGCAGCTAAACCGCGAGGT
 CATGCAAATCCCATAAAGTTGTTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGCTGGA
 ATCGCTAGTAATCGTAGATCAGCATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGT
 CACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGCCGGTGGAGTAACCA

22. Strain SKP7-3 (1,447 นิวคลีโอไทด์)

ATGCAGTCGAGCGCGGGAAGCGAGTGGATCCCTTCGGGGTGAAGCTCGTGGAACGAGCGGCGGACG
 GGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGATCGGAATAACCCCGGGAAACCGGGGCTAATGCC
 GGGTAATACTTTCTTTCGCATGAAGGAAAGTTGAAAGATGGCTTCTTGCTATCACTTACAGATGGGC
 CCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAG
 AGGGTGATCGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT
 CTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTTCGGATCGTAA
 AGTTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTGCGAATAGAGCGGTACCTTGACGGTACCTAACGAGG
 AAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTA
 TTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTCCCTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGA
 GGGTCATTGGAACTGGGGAACCTTGAGGACAGAAGAGGAGAGTGAATTCACGTGTAGCGGTGAA
 ATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTTTCTGACGCTGAGGT
 GCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTA
 GGTGTTAGGGGGCTCCACCCCTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACG

GCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT
 TCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTGACATCCCTAGAGATAGGGCTTTCC
 CTTCCGGGACCAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGTTAA
 GTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTAATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGC
 CGGTGACAAACCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACA
 CACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCAGCGAAGCCGCGAGGTGTAGCAAATCCCATAAAACCA
 TTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCA
 GCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTGGCAA
 CACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCCGCAAGGTGATCCCC

23. Strain SKP7-4 (1,319 นิวคลีโอไทด์)

GGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACGGATGGGAGCTTGCTCCCTGA
 AGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAA
 ACCGGGGCTAATACCGGATAGTTCCTTTCCCTCACATGGGGAAGGGTGGAAAGGCGGCTTCGGCTGC
 CACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATG
 CGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAG
 GCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAG
 GTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAATAGGTCGGCACCTTGA
 CGGTACCTAACCGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAG
 CGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGCGGTCTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCAC
 GGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATTCCA
 CGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGT
 AACTGACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT
 AAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTC
 CGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGG
 AGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTA
 GAGATAGGGCGTTCCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCT
 GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGG
 CACTCTAAGATGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGGATGACGTCAAATCATCATGCC
 CTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGGGCAGCAAGACCGCGAGGTTTA

GCAAATCCCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCTGGAATC
 GCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGT
 CACACCACGAAGAGTTTGTAAACACCCGGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCTAAG
 GTGGGACAGATGATTGGGGG

24. Strain SKP7-10 (1,401 นิวคลีโอไทด์)

GCAGTCGAGCGAACAGATAAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGT
 GGGTAACCTACCTATAAGACTGGAATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATGCCGGATAACATTTAGAA
 CCGCATGGTTCTAAAGTGAAAGATGGTTTTGCTATCACTTATAGATGGACCCGCGCCGTATTAGCTA
 GTTGGAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC
 TGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAA
 AGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAACTCTGTTATTAGGGAA
 GAACAAATGTGTAAGTAAGTGTGCACGTCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGT
 GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGT
 AGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGA
 AACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGG
 AACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCA
 AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTCCGC
 CCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCA
 AAGGAATTGACGGGGACCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAAC
 CTTACCAAATCTTGACATCCTTTGACAACTCTAGAGATAGAGCCTTCCCCTTCGGGGACAAAGTGA
 CAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCA
 ACCCTTAAGCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGTTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGG
 AAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACA
 ATACAAAGGGCAGCTAAACCGCGAGGTCATGCAAATCCCATAAAGTTGTTCTCAGTTCGGATTGTAG
 TCTGCAACTCGACTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGCATGCTACGGTGAATACG
 TTCCCGGTCTTGATACACCCGCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGCCGGTGGAGTA
 ACC

25. Strain SKP7-11 (1,375 นิวคลีโอไทด์)

GCAGTCGAACGATGAAGCCTGGTGCTTGACCGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTATCACGT
 GAGTAACCTGCCCTTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATACGACCAGTCC
 TCGCATGGGGTGCTGGTGGAAAGATTTATCGGTCTTGATGGACTCGCGGCCTATCAGTTTGTGGT
 GAGGTAATGGCTCACCAAGGCGATGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGAC
 TGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTG
 ATGCAGCGACGCCGCTGCGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCGCTTTCAGCAGGGAAGAAGC
 TTTTTGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTA
 GGGCGGAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTGCCGCGTCTGCTGT
 GAAAGCCCGGGGCTTAACTCCGGGTGTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCAGTAGGGGAGAC
 TGAATTCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAAGAACCCGATGGCGAAGGCAGGTC
 TCTGGGCTGTTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
 TCCATGCCGTAAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGGACATTCCACGTTTTCCGCGCCGTAGCTAACGC
 ATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGC
 ACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAGGCTTGACATGGA
 CCGGATCGCTGCAGAGATGTAGTTTTCCCTTCGGGGCTGGTTCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAG
 CTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTATGTTGCCAGCAGC
 TGATGGTGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATC
 ATCATGCCCCTTATGTCTTGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAGTGGGTTGCGATACTGT
 GAGGTGGAGCTAATCCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGAAGTCTGCAACTCGACTTCGTGAAG
 TTGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAATGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACC
 GCCCGTCAAGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCTCACGGCCAA

26. Strain SKP8-2 (1,434 นิวคลีโอไทด์)

GGGGGGGGGGTGCCTATAATGCAGTCGAGCGCGGGAAGCAGACAGCGTCCCTTCGGGGACAATGT
 CTGTGGAACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGCAAGACTGGGATAACCC
 CGGGAAACCGGGCTAATACCGGATGATGACATGAATCGCATGATTCATGTTTGAAAGATGGCCTTT
 GTGCTATCACTTGAGATGGGCCCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGGGCCTACCAAGGC
 AACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGTGCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCT
 ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGT

GAAGAAGGTCTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGT
 ACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG
 TGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAA
 AGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAGTGGGGAAGTTGAGTACAGAAGAGGAGAGTGG
 AATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCT
 GGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC
 ACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGGGTTCCAACCCCTTAGTGCTGCAGTTAACGCAATAAG
 CACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGC
 GGTGGAGCATGTGGTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCGCTGACC
 GGCCTAGAGATAGGCCTTCCCTTCGGGGCAGCGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGTCTGT
 GTCGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTT
 GGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGC
 CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAGAGGGCAGCGAGACCGTGAGGTT
 TAGCCAATCCCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGTATGAAGCCGGAA
 TCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCCGTC
 ACACCACGAGAGTTGGCAACACCCGAAGTCGGTGGGGTAA

27. Strain SKP8-5 (1,390 นิวคลีโอไทด์)

GCGCAGCCCCGGAGCTTGCTCTGGGGTCTGCGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCT
 ACCCATCAGACTGGGATAACCGCGGGAAACCGTGGCTAATACCGGATAACCCTGATCCCCGAGGG
 GGATGAGTTGAAAGGCGGTCTTTGACTGCCGCTGATGGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGG
 TGGGGTAAGGGCCCCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGA
 CTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGCAAGTCT
 GACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTCAGGGAAGAAC
 GCCGGTGGGAGTAAGTGTCCATCGGGTACCGGTACCTGACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCC
 AGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCTAGG
 CGGTTGTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGAGGGTCATTGGAAGTGGCGAAC
 TTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAAC
 ACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAAC
 AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGGTTAAGGGGGTTTTCCGCC

CCTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCA
 AAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAAC
 CTTACCAAATCTTGACATCCTCTGACCGCCATGGAGACATGGCTTCCCTTTTGGGCAGAGTGACAGG
 TGGTGATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCT
 TATCATTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT
 GGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGGTTA
 CAAAGGGCAGCTACGCCGCGAGGCCAAGCGAATCCCATAAAACCTGTTCTCAGTTCGGATTGGAGTCT
 GCAACTCGACTCCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCC
 CCGGGTCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGGAAGTCGGTAACACCTGAAGCCGGTGGGCC

28. Strain SKP8-6 (1,512 นิวคลีโอไทด์)

CAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGCGCAGCCCCGGAGCTTGCTCCG
 GGTTCTGCGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTACCCATCAGACTGGGATAACCGC
 GGGAAACCGTGGCTAATACCGGATGATCCTGATCCCTGCAGGGGGATGAGTTGAAAGGCGGTCTTT
 GACTGCCACTGATGGATGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGGGCCACCAAGGCG
 ACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTA
 CGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGCAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTG
 AAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTGACGGGAAGAACGCCGGTGGGAGTAACTGTCCATC
 GGGTGACGGTACCTGACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT
 GGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGGTAGGCGGTTGTTAAGTCTGATGTGAAA
 GCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGCGAACCTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGA
 ATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTG
 GTCTGCAACTGACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
 GCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAG
 CACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGC
 GGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAATCTTGACATCCTCTGACCG
 CCATGGAGACATGGCTTCCCTTCGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGT
 CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTATCATTAGTTGCCAGCATTAGTTGG
 GCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCC
 CTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGGTTACAAAGGGCAGCTACGCCGCGAGGCC

AAGCGAATCCCATAAAACCTGTTCTCAGTTCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGCTGGAA
 TCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGACACACCGCCCGT
 ACACCACGGAAGTCGGTAACACCTGAAGCCGGTGGGCCAACCTTTATGGAGGCAGCCGTGGAAGGT
 GGGACCGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGC

29. Strain SKP8-8 (1,509 นิวคลีโอไทด์)

CTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGCGCAGCCCCGGAGCTTGCTC
 TGGGGTCTGCGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTACCCATCAGACTGGGATAACC
 GCGGGAAACCGTGGCTAATACCGGATAACCCTGATCCCCGAGGGGGATGAGTTGAAAGGCGGTCT
 TTGACTGCCGCTGATGGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGGGCCACCAAGG
 CGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCC
 TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGCAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAG
 TGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTGTTGTGACGGGAAGAACGCCGGTGGGAGTAACTGTCCAT
 CGGGTGACGGTACCTGACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG
 TGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGGTAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAA
 AGCCCCGGCTCAACCGGGAGGGTCATTGAAAACCTGGCGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGG
 AATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCT
 GGTCTGCAACTGACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCC
 ACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTA
 AGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAA
 GCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTCTGAC
 CGCCATGGAGACATGGCTTCCCTTTGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGT
 GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCATTAGTTGCCAGCATTAGTT
 GGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGC
 CCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGGTTACAAAGGGCAGCTACGCCGCGAGG
 CCAAGCGAATCCCATAAAACCTGTTCTCAGTTCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGCTGG
 AATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGACACACCGCCCG
 TCACACCACGGAAGTCGGTAACACCTGAAGCCGGTGGGCCAACCTTTATGGAGGCAGCCGTGGAAG
 GTGGGACCGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAG

30. Strain SKP8-11 (1,402 นิวคลีโอไทด์)

GTCGAGCGAACAGATAAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGG
TAACCTACCTATAAGACTGGAATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATGCCGGATAATATTTAGAACCG
CATGGTTCTAAAGTGAAAGATGGTTTTGCTATCACTTATAGATGGACCCGCGCCGTATTAGCTAGTT
GGTGGGGTAATGGCTTACCAAGGCAACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGG
AACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGC
CTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAACTCTGTTATTAGGGAAGAA
CAAATGTGTAAGTAACTGTGCACGTCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCC
AGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGG
CGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAAACT
TGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACA
CCAGTGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACA
GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAAGGGGGTTTCCGCCCC
TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAA
GGAATTGACGGGGACCCGCAAGCGGTGGAAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACC
TTACCAAATCTTGACATCCTTTGACAACTCTAGAGATAGAGTCTTCCCCTTCGGGGGACAAAGTGAC
AGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAA
CCCTTAAGCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGTTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGA
AGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAA
TACAAAGGGCAGCTAAACCGCGAGGTCATGCAAATCCCATAAAGTTGTTCTCAGTTCGGATTGTAGT
CTGCAACTCGACTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGCATGCTACGGTGAATACGT
TCCCGGGTCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTCTGTAACACCCGAAGCCGGTGGAGTA
ACCA

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายศุภฤกษ์ เขียมสมบัติ เกิดเมื่อวันที่ 21 มกราคม 2536 ที่จังหวัดกาฬสินธุ์ ประเทศไทย สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม เมื่อปีการศึกษา 2558 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ภาคต้น ปีการศึกษา 2558

การนำเสนอผลงานทางวิชาการ

1 . Supalurk Yiamsombut, Ancharida Akaracharanya, and Somboon Tanasupawat. 2016. Screening and Characterization of Lipase Producing Moderately Halophilic Bacteria. (TSB2016) The 28th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference. September 28-30, 2016 at The Empress Hotel, Chiang Mai, Thailand.



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY