



รายงานการวิจัย
เรื่อง

การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียชอบเกลือที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอส
จากดินตะกอนป่าชายเลนในเขตจังหวัดจันทบุรี
Isolation and screening of protease producing halophilic
bacteria from mangrove forest sediments
in Chanthaburi province

ดร. ฐิตา พุฒเฝ้า
ดร.จันทรพีญ ตั้งจิตรเจริญกุล

มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต
2557
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต



รายงานการวิจัย
เรื่อง

การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียชอบเกลือที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอส
จากดินตะกอนป่าชายเลนในเขตจังหวัดจันทบุรี
Isolation and screening of protease producing halophilic
bacteria from mangrove forest sediments
in Chanthaburi province

ดร. จิตา พุฒ่า
(โรงเรียนการเรือน)
ดร.จันทรพีญ ตั้งจิตรเจริญกุล
(คณะทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม)

มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต
2557

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต
(งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณแผ่นดินด้านการวิจัย ปีงบประมาณ 2556)

หัวข้อวิจัย	การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียชอบเกลือที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจากดิน ตะกอนป่าชายเลนในเขตจังหวัดจันทบุรี
ผู้ดำเนินการวิจัย ที่ปรึกษา	ดร.ฐิตา พุฒ่า และ ดร.จันทรพีญ ตั้งจิตรเจริญกุล -
หน่วยงาน	หลักสูตรเทคโนโลยีการแปรรูปอาหาร โรงเรียนการเรือน มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต คณะทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตศรีราชา
ปี พ.ศ.	2557

เอนไซม์โปรตีเอสที่ได้จากจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการเกิดกิจกรรมได้สูง ในสถานะที่มีเกลือและต่าง เป็นเอนไซม์ที่กำลังเป็นที่น่าสนใจ เนื่องจากเอนไซม์เหล่านี้มีบทบาทที่สำคัญในอุตสาหกรรมหลายชนิด เช่น อุตสาหกรรมอาหาร สารซักล้าง ฟอกหนัง ยา และการบำบัดน้ำเสีย เป็นต้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อแยกและคัดเลือกแบคทีเรียชอบเกลือที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจากดินตะกอนป่าชายเลน จำแนกชนิดของแบคทีเรีย รวมทั้งศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของโปรตีเอสที่ได้ ผลการศึกษาพบว่า เชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างโปรตีเอสที่แยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลนในเขตจังหวัดจันทบุรี 3 แหล่ง มีทั้งหมด 46 ไอโซเลต ซึ่งถูกคัดเลือกจากความสามารถในการย่อย skim milk ในอาหารแข็งที่มีโซเดียมคลอไรด์ 3% (w/v) เป็นส่วนประกอบ โดยดินตะกอนของสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 (ท่าสนั่น จันทบุรี) มีความหลากหลายของเชื้อที่แยกได้มากที่สุด เมื่อทำการตรวจสอบทางสัณฐานวิทยา พบว่า เชื้อที่แยกได้เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ที่มีรูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์ที่หลากหลาย และเมื่อจำแนกคุณสมบัติทางชีวเคมีด้วยเทคนิค 16s rRNA พบว่า เชื้อที่แยกได้ส่วนใหญ่มีความเหมือนและความใกล้เคียงกับแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp. โดยเชื้อรหัส KB111 ซึ่งเป็นเชื้อที่เกิดกิจกรรมของโปรตีเอสได้สูงสุด มีความเหมือนและความใกล้เคียงกับ *Bacillus aquimaris* strain TF-12 และมีอุณหภูมิและค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมอยู่ที่ 40 องศาเซลเซียส และ pH 7.0 งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าดินตะกอนป่าชายเลนเป็นแหล่งที่มีความหลากหลายของแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์โปรตีเอส ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้มีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมได้

Research Title	Isolation and screening of protease producing halophilic bacteria from mangrove forest sediments in Chanthaburi province
Researcher	Dr. Tita Foophow and Dr.Janpen Tangjitjaroenkun
Research Consultants	-
Organization	Department of Food Processing Technology, School of Culinary Arts, Suan Dusit Rajabhat University Department of Basic Science and Physical Education, Faculty of Science at Siacha, Kasetsart University
Year	2014

Proteases from microorganisms with highly specific activities in high resistance to salt and alkali have been an increasing interest because they have potential uses in various industrial fields mainly in food, detergent, leather, medicine, and wastewater treatment. The objective of the present study was isolation, screening, and identification of bacteria with high protease activity from mangrove forest sediments. Forty-six isolates were recovered using skimmed milk agar containing 3% (w/v) NaCl from 3 mangrove forests in Chanthaburi, Thailand. High microbial diversity was found in sediments at Mangrove Forest Resources Development Station 2, Thason, Chanthaburi. For morphological characteristic, all isolated bacteria were gram-positive bacteria with a wide diversity in shapes and conformations of cells. The results of 16S rRNA sequence analysis showed that most isolates were related to *Bacillus* sp. Among the isolates, KB111 showed the highest enzymatic activity. This strain was further characterized and identified as a high degree of homology with *Bacillus aquimaris* strain TF-12. The optimum temperature and pH for the activity of crude enzyme was 40°C and 7.0, respectively. This research showed that the high microbial diversity of protease-producing bacteria was found in mangrove forest sediments in Chanthaburi, which this bacteria had the appropriate characteristics for possible application in industrial fields.

กิตติกรรมประกาศ

รายงานการวิจัยเรื่องการแยกและคัดเลือกแบคทีเรียชอบเกลือที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจากดินตะกอนป่าชายเลนในเขตจังหวัดจันทบุรีสำเร็จลุล่วงได้ เนื่องจากบุคคลหลายท่านได้กรุณาให้ความช่วยเหลือทั้งในด้านการให้ข้อมูล ข้อเสนอแนะ คำปรึกษาแนะนำ และความคิดเห็น ผู้เขียนขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทัศนีย์ พาณิชย์กุล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุบล ชื่นสำราญ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้ห้องปฏิบัติการขั้นสูง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต ในการทำการทดลองในระดับโมเลกุล รวมทั้งคำปรึกษาและคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยในทุกด้าน และขอขอบพระคุณที่มคณะผู้วิจัยทุกท่านที่ร่วมกันทำงานวิจัยจนสำเร็จสมบูรณ์ ท้ายสุดนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิสำหรับการประเมินงานวิจัยนี้ รวมทั้งสำนักงานวิจัยแห่งชาติร่วมกับมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต (งบประมาณแผ่นดิน) ที่ช่วยส่งเสริมสนับสนุน กระตุ้นและให้ทุนอุดหนุนในการจัดทำงานวิจัยฉบับนี้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

2557

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญ	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	1
ขอบเขตการวิจัย	2
คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
ป่าชายเลน	3
แบคทีเรีย	4
เอนไซม์	7
โปรตีนเอส	9
การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรตีนเอส	14
การจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยใช้ 16S rRNA	15
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	18
กรอบแนวคิดในการวิจัย	20
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	21
วัตถุดิบ	21
วัสดุอุปกรณ์	21
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	21
วิธีการทดลอง	22
สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล	25

บทที่ 4 ผลการวิจัย	26
การเก็บตัวอย่างดินตะกอน	26
การแยกและคัดกรองแบคทีเรียชอบเกลือที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอส	28
การตรวจสอบลักษณะและจำแนกชนิดของแบคทีเรียชอบเกลือที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอส	33
การคัดเลือกและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส	74
 บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	 77
สรุปผลการวิจัย	77
อภิปรายผลการวิจัย	78
ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้	81
ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป	81
 บรรณานุกรม	 82
บรรณานุกรมภาษาไทย	82
บรรณานุกรมภาษาต่างประเทศ	82
 ประวัติผู้วิจัย	 85

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	การใช้ประโยชน์ของเอนไซม์ในอุตสาหกรรมอาหาร	8
2.2	อุตสาหกรรมอาหารที่มีการใช้เอนไซม์โปรตีเอส	14
4.1	แสดงสถานที่เก็บตัวอย่างดินตะกอนป่าชายเลนและจำนวนไอโซเลตที่แยกได้ใน เขตจังหวัดจันทบุรี	28
4.2	แสดงเส้นผ่านศูนย์กลางวงในหลายๆ โคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดิน ตะกอนป่าชายเลน บริเวณศูนย์การศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบนอัน เนื่องมาจากพระราชดำริ	29
4.3	แสดงเส้นผ่านศูนย์กลางวงในหลายๆ โคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดิน ตะกอนป่าชายเลน บริเวณสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 (ท่าสอน จันทบุรี)	30
4.4	แสดงเส้นผ่านศูนย์กลางวงในหลายๆ โคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดิน ตะกอนป่าชายเลน บริเวณสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 3 (ขลุ้ง จันทบุรี)	31
4.5	แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลน บริเวณศูนย์การศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบนอันเนื่องมาจากพระราชดำริ	34
4.6	แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลน บริเวณสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 (ท่าสอน จันทบุรี)	38
4.7	แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลน บริเวณสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 3 (ขลุ้ง จันทบุรี)	43
4.8	แสดงชนิดของแบคทีเรียที่มีค่าความเหมือนหรือความใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรียที่ แยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลน บริเวณศูนย์การศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน อันเนื่องมาจากพระราชดำริ	47
4.9	แสดงชนิดของแบคทีเรียที่มีค่าความเหมือนหรือความใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรียที่ แยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลน บริเวณสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 (ท่าสอน จันทบุรี)	48
4.10	แสดงชนิดของแบคทีเรียที่มีค่าความเหมือนหรือความใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรียที่ แยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลน บริเวณสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 3 (ขลุ้ง จันทบุรี)	50
4.11	แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการคัดกรอง	74

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	รูปร่างของแบคทีเรีย	4
2.2	ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญของจุลินทรีย์	5
2.3	ความสัมพันธ์ระหว่าง pH กับการเจริญของจุลินทรีย์	7
2.4	แบบจำลองการย่อยโปรตีนโดยโปรตีเอส	9
2.5	กลไกการทำงานของ Serine proteases	10
2.6	กลไกการทำงานของ Cystein proteases	11
2.7	กลไกการทำงานของ Aspartic proteases	11
2.8	กลไกการทำงานของ Metalloproteases	12
2.9	ความสัมพันธ์ของการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตกับเทคนิคทางโมเลกุล	15
2.10	ขั้นตอนการจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยวิธีการตรวจสอบระดับโมเลกุล	16
2.11	ขั้นตอนการทำงานของ PCR	17
3.1	แสดงการเก็บตัวอย่างตะกอนดินป่าชายเลน	22
4.1	แสดงจุดเก็บตัวอย่างและพิกัดบริเวณศูนย์ศึกษาธรรมชาติ โครงการพระราชดำริฯ อ่าวคุ้งกระเบน ต.คลองขุด อ.ท่าใหม่ จ.จันทบุรี	26
4.2	แสดงจุดเก็บตัวอย่างและพิกัด บริเวณสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 (ท่าสอน จันทบุรี) บ้านท่าสอน ต.บ่อ อ.ขลุง จ.จันทบุรี	27
4.3	แสดงจุดเก็บตัวอย่างและพิกัด บริเวณสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 3 (ขลุง จันทบุรี) ต.เกวียนหัก อ.ขลุง จ.จันทบุรี	27
4.4	แสดงการสร้างเอนไซม์โปรตีเอสย่อยอาหาร SKA จากวงใสรอบโคโลนีของเชื้อ แบคทีเรียที่แยกจากศูนย์การศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบนอันเนื่องมาจาก พระราชดำริ	32
4.5	แสดงการสร้างเอนไซม์โปรตีเอสย่อยอาหาร SKA จากวงใสรอบโคโลนีของเชื้อ แบคทีเรียที่แยกจากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 (ท่าสอน จันทบุรี)	32
4.6	แสดงการสร้างเอนไซม์โปรตีเอสย่อยอาหาร SKA จากวงใสรอบโคโลนีของเชื้อ แบคทีเรียที่แยกจากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 3 (ขลุง จันทบุรี)	33
4.7	แสดงการตรวจ band ของ DNA จากแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ที่มีวงใสรอบ โคโลนีมากกว่า 10 มิลลิเมตร	45
4.8	แสดงการตรวจ band ของ DNA จากแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ที่มีวงใสรอบ โคโลนีน้อยกว่า 10 มิลลิเมตร ที่แยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลน บริเวณสถานี พัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 (ท่าสอน จันทบุรี)	45
4.9	แสดงการตรวจ band ของ DNA จากแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ที่มีวงใสรอบ โคโลนีน้อยกว่า 10 มิลลิเมตร	46

ภาพที่		หน้า
4.10	แสดงผล sequence alignment ของ 16S rRNA ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ จำนวนทั้งหมด 46 ไอโซเลต	52
4.11	การจัดกลุ่มแบบ Phylogram Tree ของสาย DNA ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ 46 ไอโซเลต	73
4.12	อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์	75
4.13	ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์	76

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญ

โปรตีเอส (Protease) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ (peptide bond) ของโปรตีน ได้เป็นเปปไทด์สายสั้น ๆ หรือกรดอะมิโน โดยมีการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเป็น 2 ประเภท คือ การย่อยสลายพันธะภายในโมเลกุลของโปรตีน (endopeptidase) และการย่อยสลายพันธะจากปลายด้าน N หรือ C ของโปรตีน (exopeptidase) โปรตีเอสสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตแทบทุกชนิด ได้แก่ ในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทที่สำคัญต่อการย่อยสลายอาหารประเภทโปรตีน โปรตีเอสที่มีความสำคัญมากในอุตสาหกรรม คือ โปรตีเอสที่มีความสามารถในการทนต่อสภาวะที่มีเกลือและด่างสูง โดยอุตสาหกรรมที่มีการใช้เอนไซม์โปรตีเอส ได้แก่ อุตสาหกรรมอาหาร สารซักล้าง ฟอกหนัง การผลิตยา และการบำบัดน้ำเสีย เป็นต้น จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้สูงและนำมาใช้ในอุตสาหกรรมโดยส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียพวก *bacilli* และเชื้อรา เช่น *Rhizopus* spp. และ *Aspergillus* spp. ซึ่งไม่ก่อให้เกิดโรคกับมนุษย์ โดยในปัจจุบันอุตสาหกรรมต่าง ๆ ในประเทศไทยที่นำเอนไซม์โปรตีเอสมาใช้ประโยชน์จะต้องนำเข้าเอนไซม์มาจากต่างประเทศทั้งหมด ซึ่งหากเราสามารถแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์โปรตีเอสได้เองภายในประเทศ รวมทั้งมีการพัฒนาหรือปรับปรุงสายพันธุ์จนสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้ ก็จะเป็นอีกทางหนึ่งในการลดปริมาณการนำเข้าเอนไซม์จากต่างประเทศ และยังเป็นการพัฒนาศักยภาพในด้านความรู้และเทคนิคทางวิทยาศาสตร์เพิ่มมากขึ้น ในงานวิจัยนี้ทางคณะผู้วิจัยได้เลือกเก็บตัวอย่างดินตะกอนจากบริเวณป่าชายเลน เนื่องจากสภาพของดินตะกอนบริเวณป่าชายเลนจะมีความอุดมสมบูรณ์จากธาตุอาหารที่ไหลมาจากแหล่งต่าง ๆ ได้แก่ จากการกัดเซาะตามชายฝั่งและแหล่งน้ำลำธาร ชากพืชซากสัตว์บริเวณป่าชายเลน เป็นต้น ทำให้มีสิ่งมีชีวิตรวมถึงจุลินทรีย์อาศัยอยู่เป็นจำนวนมาก และน้ำที่ท่วมขังเหนือนดินเป็นน้ำกร่อยซึ่งมีความเค็มจากน้ำทะเลปน ระดับความเค็มของน้ำยังเปลี่ยนแปลงได้ตามระดับน้ำที่ขึ้นลง ทำให้สิ่งมีชีวิตในดินตะกอนบริเวณป่าชายเลนต้องมีความสามารถในการปรับตัวเพื่อความอยู่รอดในการดำรงชีวิต ดังนั้นดินตะกอนป่าชายเลนจึงเป็นตัวอย่างที่เหมาะสมในการแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถดำรงชีวิตในสภาวะที่เป็นด่าง และมีความสามารถในการทนต่อความเค็ม รวมทั้งสามารถย่อยสลายโปรตีนได้นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่แสดงถึงความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ในดินตะกอนป่าชายเลน และเป็นการใช้ประโยชน์จากความหลากหลายทางชีวภาพอีกทางหนึ่งด้วย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อการแยกและคัดกรองแบคทีเรียชอบเกลือที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจากดินตะกอนป่าชายเลน
2. เพื่อตรวจสอบลักษณะและจำแนกชนิดของแบคทีเรียชอบเกลือที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอส
3. เพื่อคัดเลือกและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส

ขอบเขตการวิจัย

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากระบบนิเวศทางทะเล โดยเฉพาะดินตะกอนป่าชายเลนซึ่งเป็นดินที่มีความอุดมสมบูรณ์จากธาตุอาหารสูง ทำให้ได้ความหลากหลายชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสเพิ่มมากขึ้น ซึ่งจะมีการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากดินตะกอนบริเวณป่าชายเลน ในจังหวัดจันทบุรี ที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอส และคัดกรองเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้สูงในอาหารแข็ง รวมทั้งจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกกว่ามีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้สูงโดยใช้คุณสมบัติทางฟิโนไทป์ และจีโนไทป์ เช่น คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ small subunit ribosomal DNA หรือ 16S rRNA เป็นต้น และคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์

ตัวแปรที่ศึกษา

1. ตามวัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยข้อที่ 1 และ 2
 - ตัวแปรอิสระ คือ ดินตะกอนจากบริเวณต่าง ๆ ของป่าชายเลนในเขตจังหวัดจันทบุรี 3 แหล่ง
 - ตัวแปรตาม คือ จำนวนและชนิดแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้
2. ตามวัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยข้อที่ 3
 - ตัวแปรอิสระ คือ สภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส ได้แก่ อุณหภูมิ และพีเอช
 - ตัวแปรตาม คือ การเกิดกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส (หน่วยของเอนไซม์, Unit) ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย 12 เดือน

คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย

1. โปรตีเอส (Protease) คือ ชื่อกลุ่มของเอนไซม์ซึ่งทำหน้าที่ย่อยโปรตีน (proteolytic enzyme) ให้แตกตัวลงจนเป็นเปปไทด์สายสั้น ๆ หรือมาเป็นหน่วยที่เล็กที่สุดหรือเชิงเดี่ยวเรียกว่า กรดอะมิโน
2. แบคทีเรียชอบเกลือ (Halophilic bacteria) คือ แบคทีเรียที่สามารถอาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีความเข้มข้นของเกลือ (NaCl) อยู่ในช่วง 3-30 เปอร์เซ็นต์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถคัดแยกและคัดกรองแบคทีเรียชอบเกลือที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจากดินตะกอนป่าชายเลน
2. สามารถจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส โดยใช้วิธีการระดับโมเลกุล
3. ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส

บทที่ 2

แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ป่าชายเลน (Mangrove forest)

ป่าชายเลนเป็นระบบนิเวศที่เชื่อมระหว่างบนบกและทางทะเล ซึ่งเป็นบริเวณที่เหมาะสมสำหรับการขยายพันธุ์ เพาะพันธุ์ และพักตัวของสัตว์หลายชนิด เนื่องด้วยเป็นแหล่งที่มีสารอาหารที่อุดมสมบูรณ์ ป่าชายเลนสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทตามลักษณะสภาพแวดล้อม โดยหากพบบริเวณริมแม่น้ำ ปากแม่น้ำ ซึ่งได้รับอิทธิพลมาจากแหล่งน้ำจืดเป็นส่วนใหญ่ จะเรียกว่า ป่าชายเลนที่อยู่บริเวณปากแม่น้ำ แต่หากพบตามชายฝั่ง เกาะต่าง ๆ หรือปากแม่น้ำสายเล็ก ซึ่งได้รับอิทธิพลจากน้ำจืดน้อย จะเรียกว่า ป่าชายเลนที่อยู่ริมทะเล สภาพแวดล้อมของป่าชายเลนมีความแตกต่างจากระบบนิเวศอื่น ๆ ส่งผลให้มีการกระจายและการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตที่หลากหลายอันเนื่องมาจากอิทธิพลของสิ่งแวดล้อม ดังนี้

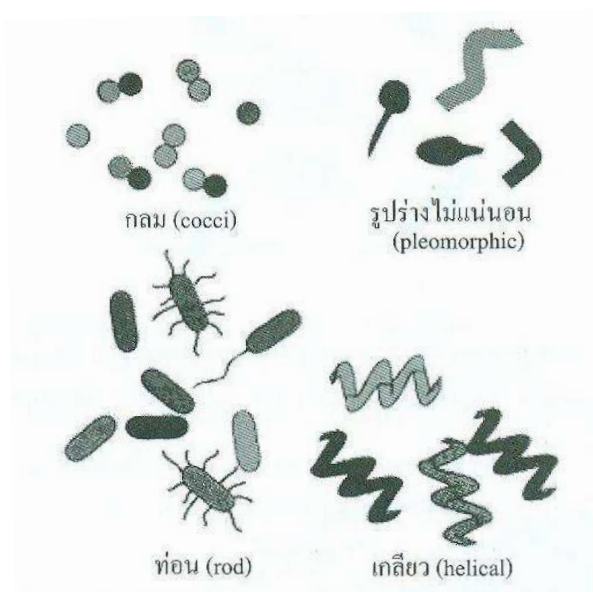
1. การขึ้นลงของน้ำทะเลในบริเวณชายฝั่งทะเล ซึ่งปริมาณความเค็มของน้ำในป่าชายเลนจะเปลี่ยนแปลงขึ้นกับช่วงเวลาของน้ำขึ้นและน้ำลง โดยในขณะนี้น้ำทะเลหนุนสูงขึ้น ค่าปริมาณความเค็มของน้ำชายฝั่งจะสูงขึ้น และเมื่อน้ำทะเลลดลงค่าปริมาณความเค็มของน้ำชายฝั่งจะลดลง
2. คลื่นและกระแสน้ำ การพัดพาของคลื่นและกระแสน้ำเป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เกิดการตกตะกอนบริเวณชายฝั่ง จนมีลักษณะเป็นสันทรายบริเวณปากแม่น้ำ รวมถึงการพัดพาเอาธาตุอาหารต่าง ๆ เข้าและออกระหว่างบริเวณป่าชายเลนกับบริเวณชายฝั่งทะเล
3. ระดับความเค็มของน้ำและน้ำในดิน เป็นปัจจัยที่สำคัญในการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต โดยปกติปริมาณความเค็มของน้ำ และน้ำในดินจะอยู่ระหว่าง 10-30‰ ดังนั้นสิ่งมีชีวิตที่อาศัยในบริเวณป่าชายเลนได้ ต้องสามารถทนหรือปรับตัวให้ทนต่อระดับความเค็มของน้ำและน้ำในดินได้
4. ดิน ในป่าชายเลนเป็นดินที่เกิดจากการทับถมของตะกอนซึ่งน้ำพัดพามาจากแหล่งต่าง ๆ และการตกตะกอนของสารแขวนลอย รวมถึงสารอินทรีย์ที่ทับถมกันมาเป็นเวลานาน ดังนั้นลักษณะหรือสมบัติของดินทั้งทางกายภาพและเคมีในป่าชายเลนแต่ละแหล่งจะแตกต่างกัน
5. ธาตุอาหาร การมีธาตุอาหารที่เพียงพอในป่าชายเลนจำเป็นอย่างยิ่งสำหรับการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิต ซึ่งธาตุอาหารในด้านอินทรีย์สารที่ได้มาจากดินตะกอน น้ำที่ไหลผ่านแผ่นดิน จากน้ำทะเล และจากการผุพังของอินทรีย์วัตถุในป่าชายเลน โดยอินทรีย์สารที่พบมากในป่าชายเลน ได้แก่ โปแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม และโซเดียม และอินทรีย์สารที่พบน้อย ได้แก่ ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส สำหรับธาตุอาหารในด้านอินทรีย์สารซึ่งเกิดจากสิ่งมีชีวิต โดยผ่านขั้นตอนการย่อยสลายจากจุลินทรีย์ได้มาจากสองแหล่ง คือ แหล่งแรกมาจากภายในป่าชายเลนเอง ได้แก่ แพลงตอนพืช แบคทีเรีย สาหร่าย พืช ซากสัตว์ และสิ่งปฏิกูลของสัตว์ในป่าชายเลน ส่วนแหล่งที่สองมาจากภายนอกป่าชายเลน ได้แก่ สารแขวนลอยในน้ำที่ไหลมาจากแม่น้ำ ตะกอนดินชายฝั่ง และซากพืชและสัตว์ทั้งตามฝั่งและในทะเล

เนื่องด้วยลักษณะและสภาพของดินตะกอนบริเวณป่าชายเลนมีความอุดมสมบูรณ์จากธาตุอาหารที่ไหลมาจากแหล่งต่าง ๆ ได้แก่ จากการกัดเซาะตามชายฝั่งและแหล่งน้ำลำธาร ซากพืชซากสัตว์บริเวณป่าชายเลน เป็นต้น ทำให้มีสิ่งมีชีวิตรวมถึงจุลินทรีย์อาศัยอยู่เป็นจำนวนมาก และน้ำที่

ท่วมขังเหนือดินเป็นน้ำกร่อยซึ่งมีความเค็มจากน้ำทะเลปะปน ระดับความเค็มของน้ำยังเปลี่ยนแปลงได้ตามระดับน้ำที่ขึ้นลง ทำให้สิ่งมีชีวิตในดินตะกอนบริเวณป่าชายเลนต้องมีความสามารถในการปรับตัวเพื่อความอยู่รอดในการดำรงชีวิต ป่าชายเลนจึงเป็นบริเวณที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งในการศึกษาถึงความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ

แบคทีเรีย (Bacteria)

แบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่มองด้วยตาเปล่าไม่เห็น มีขนาดกว้างประมาณ 0.5 ถึง 1 ไมโครเมตร และยาวประมาณ 1 ถึง 2 ไมโครเมตร แบคทีเรียจัดเป็นสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในกลุ่มโปรคาริโอตที่ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส ซึ่งพบได้มากและมีความหลากหลายมากที่สุดในโลก เนื่องจากความสามารถในการทนต่อสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้ดี และการเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วในระยะเวลาอันสั้น นอกจากนั้นแบคทีเรียยังมีความหลากหลายในด้านรูปร่าง โดยมีรูปร่างหลายรูปแบบ ได้แก่ รูปกลม รูปท่อน รูปเกลียว และรูปร่างที่ไม่แน่นอน ดังแสดงในภาพที่ 2.1 รวมทั้งแบคทีเรียบางชนิดจะมีแฟลกเจลลา ซึ่งมีผลต่อการเคลื่อนที่และกิจกรรมของเซลล์ในสิ่งแวดล้อม



ภาพที่ 2.1 รูปร่างของแบคทีเรีย

ที่มา: วีรานูช หลาง (2551)

แบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการดำรงชีวิตในสิ่งแวดล้อมที่ต่างกัน เนื่องด้วยความต้องการในปัจจัยทั้งภายในและภายนอก ได้แก่ ปริมาณน้ำ อากาศ ความเป็นกรด-ด่างในอาหาร อุณหภูมิ สารอาหาร แหล่งพลังงาน ธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญและเมแทบอลิซึมที่แตกต่างกัน หน้าที่หลักของแบคทีเรียต่อระบบนิเวศในธรรมชาติ คือเป็นผู้ย่อยสลาย ซึ่งจะทำหน้าที่ย่อยสลายซากของสิ่งมีชีวิต และวัสดุเหลือใช้ต่าง ๆ โดยเป็นการปล่อยน้ำย่อยหรือเอนไซม์ออกมาย่อยสารโมเลกุลใหญ่ให้กลายเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กลงภายนอกเซลล์ (extracellular digestion)

เนื่องจากแบคทีเรียไม่สามารถนำสารอาหารขนาดใหญ่เข้าสู่เซลล์ได้ ซึ่งเอนไซม์ที่แบคทีเรียปล่อยออกมาจะมีความจำเพาะเจาะจงกับสารแต่ละชนิดที่มันต้องการ

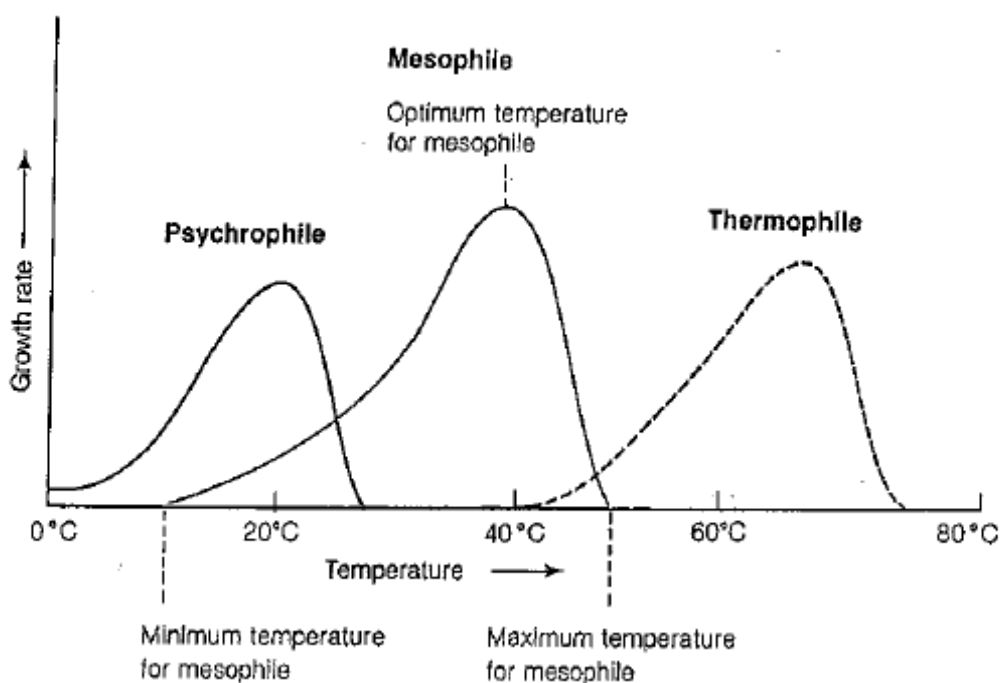
ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ได้แก่

1. อุณหภูมิ แบคทีเรียแต่ละชนิดมีความต้องการอุณหภูมิที่แตกต่างกัน ดังนั้นแบคทีเรียจะมีอุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum temperature) สำหรับการเจริญที่ต่างกัน ทำให้สามารถแบ่งแบคทีเรียออกได้เป็น 3 ประเภท ตามความชอบของอุณหภูมิ (ภาพที่ 2.2) ดังนี้

1.1 Psychrophiles เป็นแบคทีเรียที่ชอบความเย็น เจริญได้ดีในอุณหภูมิ 0 °C หรือต่ำกว่า ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้จะไม่ทนต่อความร้อน ตัวอย่างของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Pseudomonas*, *Psychrobacter* sp. และ *Listeria monocytogenes* เป็นต้น

1.2 Mesophiles เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีในอุณหภูมิปานกลาง ประมาณ 25-40 °C โดยมีอุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 37 °C ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่มีการนำมาใช้ประโยชน์ในอาหารและก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ตัวอย่างของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ ได้แก่ *E. coli*, *Salmonella* และ *Staphylococcus aureus* เป็นต้น

1.3 Thermophiles เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่า 45 °C แบคทีเรียกลุ่มนี้จะทนความร้อนได้ดี อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 50-55 °C ตัวอย่างของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Bacillus*, *Clostridium* และ *Lactobacillus thermophilus* เป็นต้น



ภาพที่ 2.2 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญของจุลินทรีย์

ที่มา: นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ (2550)

2. ความต้องการออกซิเจน ก๊าซออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์เป็นก๊าซที่จำเป็นต่อการเจริญของแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียแต่ละชนิดมีความต้องการปริมาณของก๊าซในการเจริญที่ต่างกัน ทำให้สามารถแบ่งประเภทของแบคทีเรียตามความต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตออกได้เป็น 4 ประเภท ดังนี้

2.1 Aerobic bacteria คือแบคทีเรียที่เจริญได้ในบรรยากาศที่มีออกซิเจน โดยออกซิเจนเป็นก๊าซที่จำเป็นต่อการสร้างพลังงาน ไม่ได้ใช้การหมักในการสร้างพลังงาน ตัวอย่างของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Pseudomonas*, *Bacillus cereus* และ *Acetobacter* เป็นต้น

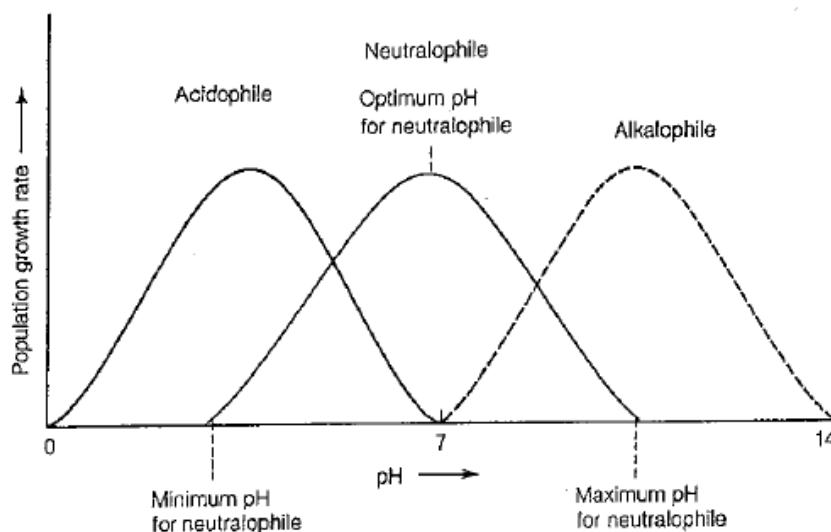
2.2 Anaerobic bacteria คือแบคทีเรียที่เจริญได้ในบรรยากาศที่ไม่มีออกซิเจน เพราะหากมีออกซิเจนจะเกิดการรวมตัวกับน้ำกลายเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งเป็นพิษต่อแบคทีเรีย ตัวอย่างของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Clostridium botulinum*, *Clostridium Perfringens* และ *Methanobacterium* เป็นต้น

2.3 Facultative anaerobic bacteria คือแบคทีเรียที่เจริญได้ทั้งในบรรยากาศที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถใช้การหายใจหรือการหมักในการสร้างพลังงาน และไม่จำเป็นต้องใช้ออกซิเจนในการสังเคราะห์ในกระบวนการต่าง ๆ ตัวอย่างของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ ได้แก่ *E. coli*, *Aeromonas* และ *Vibrio* เป็นต้น

2.4 Microaerophilic bacteria คือแบคทีเรียที่เจริญในบรรยากาศที่มีออกซิเจนเล็กน้อย โดยต้องการออกซิเจนน้อยกว่า 0.2 บรรยากาศ ตัวอย่างของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Campylobacter jejuni*, *Lactobacillus* และ *Neisseria* เป็นต้น

3. สภาพความเป็นกรด-ด่าง แบคทีเรียส่วนมากเจริญได้ดีในช่วงของ pH 6-8 แต่ก็ยังมีแบคทีเรียบางชนิดที่สามารถทนต่อสิ่งแวดล้อมที่เป็นกรด (acid-tolerant bacteria) โดยสามารถเจริญได้ดีที่ pH ต่ำกว่า 7 ตัวอย่างของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Lactobacillus* และ *Leuconostoc* เป็นต้น และบางชนิดที่สามารถทนต่อสิ่งแวดล้อมที่เป็นด่าง (alkaline-tolerant bacteria) โดยสามารถเจริญได้ดีที่ pH สูงกว่าหรือเท่ากับ 7 ตัวอย่างของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Vibrio* และ *Bacillus subtilis* เป็นต้น (ภาพที่ 2.3)

แต่อย่างไรก็ตามเมื่อทำการเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อไประยะเวลาหนึ่ง ค่าความเป็นกรด-เบสในอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถเปลี่ยนแปลงได้ เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียเองได้ปล่อยสารบางชนิดออกมาตามธรรมชาติ ส่งผลให้ค่า pH ในอาหารเปลี่ยนไป โดยจะเป็นกรดหรือด่างขึ้นกับชนิดของแบคทีเรีย และมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใส่สารประเภทบัฟเฟอร์ เช่น KH_2PO_4 , K_2HPO_4 เป็นต้น เพื่อรักษาสมดุลค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ



ภาพที่ 2.3 ความสัมพันธ์ระหว่าง pH กับการเจริญของจุลินทรีย์

ที่มา: นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ (2550)

เอนไซม์ (Enzyme)

เอนไซม์ คือ กลุ่มโมเลกุลของโปรตีนขนาดใหญ่ในสิ่งมีชีวิตที่เกิดจากกรดอะมิโน (amino acid) หลายชนิดมาเรียงต่อเข้าด้วยกัน เราสามารถพบเอนไซม์ได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ เอนไซม์มีความสำคัญและจำเป็นสำหรับสิ่งมีชีวิตอย่างมาก เนื่องจากทำหน้าที่เป็นตัวช่วยและเร่งปฏิกิริยาเคมีในระบบการทำงานของส่วนต่าง ๆ ให้สามารถทำงานได้รวดเร็วขึ้น กลุ่มของเอนไซม์ที่พบโดยส่วนใหญ่จะทำหน้าที่ช่วยในการย่อยอาหารและเผาผลาญพลังงาน จากบทบาทหน้าที่ของเอนไซม์ที่มีประโยชน์ต่อสิ่งมีชีวิต ทำให้มีการประยุกต์ใช้เอนไซม์ในอุตสาหกรรมด้านต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร การฟอกหนัง สารซักล้าง การผลิตยา และการบำบัดของเสีย เป็นต้น

เอนไซม์มีลักษณะเป็นทรงกลม มีบริเวณที่สำคัญที่ใช้ในการจับกับสับสเตรทเรียกว่าบริเวณเร่ง (active site) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการเร่งปฏิกิริยาเกิดขึ้น บริเวณเร่งจะมีลักษณะเป็นโพรงหรือร่อง ภายในจะมีกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเกิดปฏิกิริยา แต่เอนไซม์บางชนิดจำเป็นต้องมีส่วนประกอบอื่นที่เรียกว่า โคแฟกเตอร์ (cofactor) เข้ามาจับที่บริเวณใดบริเวณหนึ่งของเอนไซม์ก่อน เอนไซม์จึงจะสามารถทำงานได้ ซึ่งโคแฟกเตอร์มักจะเป็นไอออนของโลหะ เช่น Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} และ Zn^{2+} เป็นต้น เอนไซม์แต่ละชนิดจะมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้น (substrate) และประเภทของปฏิกิริยาสูง ซึ่งความจำเพาะจะสูงหรือต่ำขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์

เอนไซม์แต่ละชนิดจะมีลักษณะและคุณสมบัติที่แตกต่างกันจึงมีความต้องการสภาวะแวดล้อม ในขณะที่ทำปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน เพื่อให้การทำงานของเอนไซม์เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพและเกิดประโยชน์สูงสุด จึงควรต้องพิจารณาถึงปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ดังนี้

1. อุณหภูมิที่เหมาะสม

อุณหภูมิมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยการเพิ่มอุณหภูมิจะส่งผลต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุลทั้งในเอนไซม์และสารตั้งต้น ทำให้เอนไซม์และสารตั้งต้นเคลื่อนที่ได้เร็วและมีโอกาสเจอกันมากขึ้น ดังนั้นการเกิดปฏิกิริยาก็จะเร็วขึ้นตามไปด้วย แต่อย่างไรก็ตามอุณหภูมิที่สูงขึ้นอาจส่งผลต่อโครงสร้างของเอนไซม์

2. ค่า pH ที่เหมาะสม

ค่า pH มีผลต่อหมู่ไอออนิกของกรดอะมิโนซึ่งเป็นองค์ประกอบภายในโครงสร้างของเอนไซม์ โดยเฉพาะบริเวณแรงของเอนไซม์ ทำให้กรดอะมิโนมีประจุที่เปลี่ยนไป การเปลี่ยนประจุอาจส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงได้ แต่ถ้ามีค่า pH ที่สูงหรือต่ำเกินไปอาจทำให้เอนไซม์เสียสภาพได้เช่นกัน เอนไซม์แต่ละชนิดสามารถทำงานได้สูงที่สุด ณ ค่า pH ที่แตกต่างกัน

ในปัจจุบันอุตสาหกรรมอาหารได้มีการใช้เอนไซม์กันเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากเราสามารถใส่เอนไซม์ในปริมาณเพียงเล็กน้อยในการทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นในปริมาณมาก ๆ ได้ โดยที่เอนไซม์ยังไม่เสียสภาพและยังสามารถทำงานได้อย่างปกติ ดังนั้นการใช้เอนไซม์จึงเป็นการลดต้นทุนการใช้พลังงานและสารเคมีสังเคราะห์ที่มีราคาสูง ซึ่งสารเคมีสังเคราะห์บางชนิดนั้นเป็นอันตรายแก่ผู้บริโภค และส่งผลในการทำลายสิ่งแวดล้อมในทางอ้อมได้ ดังแสดงในตารางที่ 2.1 มีเอนไซม์หลายชนิดที่ได้มีการนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีเอส

ตารางที่ 2.1 การใช้ประโยชน์ของเอนไซม์ในอุตสาหกรรมอาหาร

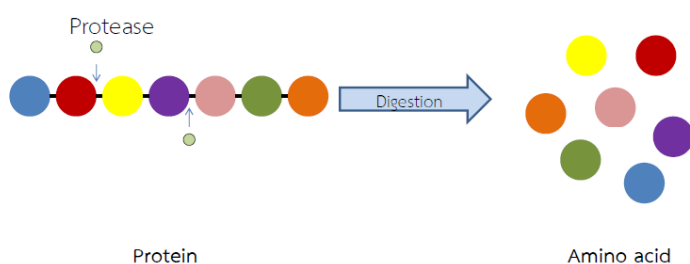
การใช้ประโยชน์	เอนไซม์ที่ใช้	การใช้
อุตสาหกรรมขนมปัง	แอลฟา-อะไมเลส โปรตีเอส	เร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของแป้งไปเป็นน้ำตาล -ผู้ผลิตขนมปังกรอบใช้ในการลดระดับโปรตีนในแป้ง -ย่อยสลายกลูเตนให้สั้นลงทำให้โดมีความยืดหยุ่นน้อยลง ทำให้ cracker และ biscuit มีลักษณะกรอบและร่วน
	ลิโพซีเจนเนส	จะทำให้ได้สีของขนมปังเป็นสีน้ำตาลนวล (light brown)
อาหารเด็ก	ทริปซิน	ช่วยย่อยอาหารก่อนเด็กรับประทาน
อุตสาหกรรมสุรา	อะไมเลส, กลูคาเนส, โปรตีเอส	แยกสลายพอลิแซคคาไรด์และโปรตีนในมอลท์
	ปีต้ากลูโคซิเดส	ปรับปรุงคุณลักษณะการกรอง
	อะไมโลกลูโคซิเดส	เปียร์ แคลอรีต่ำ
	โปรตีเอส	กำจัดความขุ่นระหว่างการเก็บเปียร์
การทำน้ำผลไม้	เซลลูเลส และ เพกติเนส	ทำให้น้ำผลไม้ใส

ตารางที่ 2.1 การใช้ประโยชน์ของเอนไซม์ในอุตสาหกรรมอาหาร (ต่อ)

การใช้ประโยชน์	เอนไซม์ที่ใช้	การใช้
อุตสาหกรรมชีสและนม	เรนเนต	การแยกโปรตีนออกจากนม
	โปรตีเอส และ โลเปส	ใช้ในการบ่มเพื่อให้ได้กลิ่นและรสชาติเฉพาะตัวของชีส
อุตสาหกรรมแป้งและน้ำเชื่อม	แลคเตส	แยกสลายแลคโตส เป็นกลูโคสและกาแลคโตส
	อะไมเลส, อะไมโลกลูโคซิเดส และ กลูโคอะไมเลส	เปลี่ยนแป้งไปเป็น กลูโคส และ หลายรูปแบบของ น้ำเชื่อม (inverted sugar syrup)
	กลูโคสไอโซเมอเรส	เปลี่ยนน้ำตาล กลูโคส ในฟรุคโตส (fructose) (น้ำเชื่อมที่มีฟรุคโตสสูงได้จากวัสดุคล้ายแป้งมีความหวานสูงแต่แคลอรีต่ำ)

โปรตีเอส (Protease)

โปรตีเอส คือ ชื่อกลุ่มของเอนไซม์ซึ่งทำหน้าที่ย่อยโปรตีน (proteolytic enzyme) ให้แตกตัวลงจนเป็นเปปไทด์สายสั้น ๆ หรือมาเป็นหน่วยที่เล็กที่สุดหรือเชิงเดี่ยวเรียกว่า กรดอะมิโน ดังแสดงในภาพที่ 2.4 โปรตีเอสถูกนำมาใช้มากในอุตสาหกรรม โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมสารซักล้างและอุตสาหกรรมอาหาร โดยเป็นเอนไซม์ที่มีการซื้อมากถึง 75% ของตลาดการซื้อขายเอนไซม์ทั่วโลก (Schäfer et al., 2007)



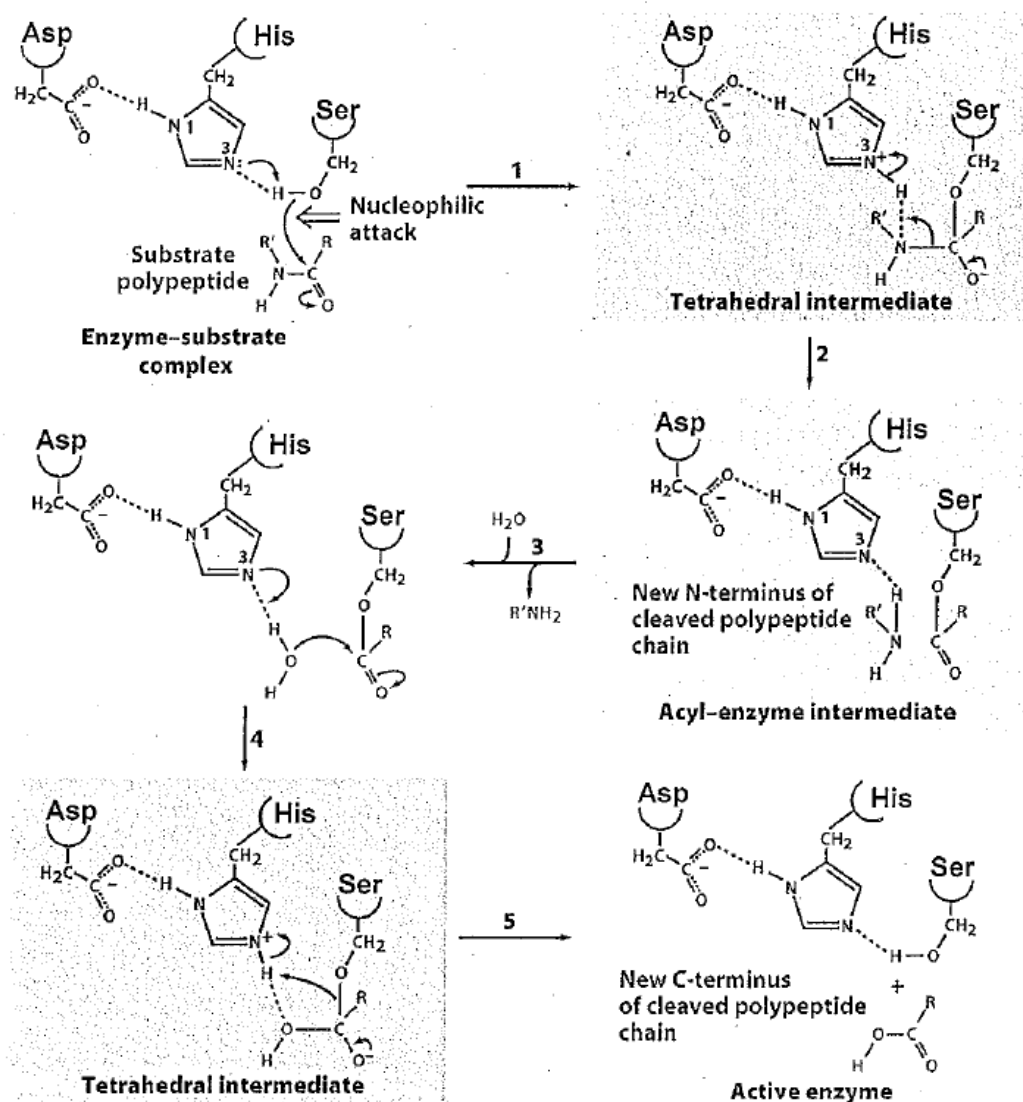
ภาพที่ 2.4 แบบจำลองการย่อยโปรตีนโดยโปรตีเอส

โปรตีเอสสามารถจัดแบ่งเป็นประเภทต่าง ๆ ได้ ดังนี้

1. จัดแบ่งประเภทตาม proteolytic mechanism ได้เป็น 4 ประเภท (Jeremy et al., 2007)

1.1 Serine proteases เป็นเอนไซม์โปรตีเอสที่มีหมู่เซรีนอยู่ที่บริเวณเร่ง โดยเซรีนทำหน้าที่เป็น nucleophilic amino acid พบได้ในสิ่งมีชีวิตทั้ง eukaryotes และ prokaryotes สามารถแบ่งเอนไซม์ออกเป็นกลุ่มได้ 2 กลุ่มลักษณะของโครงสร้าง คือกลุ่มของ trypsin และ subtilisin โดยทั้ง 2 กลุ่มจะมีการจัดเรียงตัวของ catalytic triad ที่คล้ายกัน ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 3 ชนิด คือ His, Asp และ Ser โดยอยู่ในโครงสร้างที่เป็น β/β สำหรับ trypsin และ α/β สำหรับ subtilisin เอนไซม์

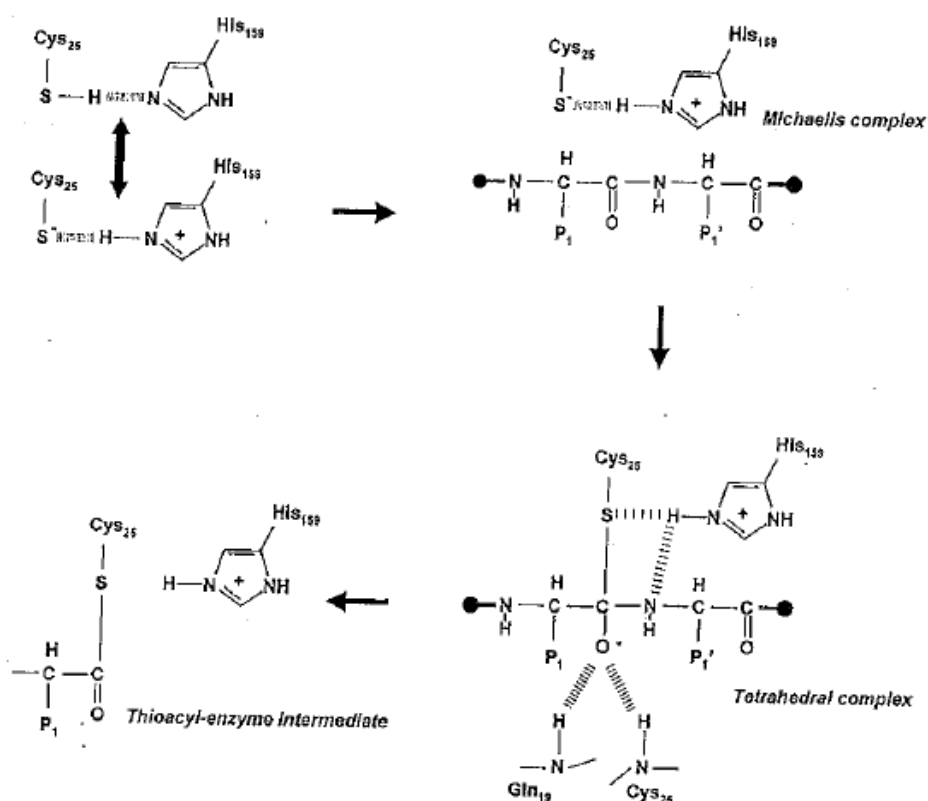
ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง ที่ pH 7-11 ตัวอย่างของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ chymotrypsin, trypsin และ subtilisin เป็นต้น กลไกการทำงานของเอนไซม์ดังแสดงในภาพที่ 2.5



ภาพที่ 2.5 กลไกการทำงานของ Serine proteases

ที่มา: Voet et al. (2006)

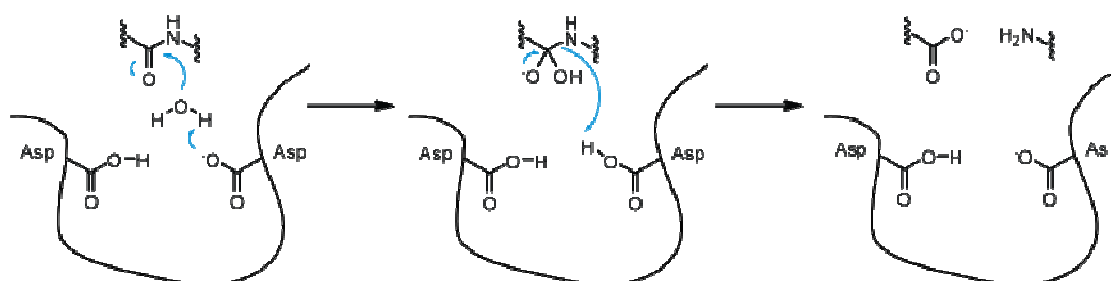
1.2 Cysteine proteases หรือเรียกว่า thiol proteases เป็นเอนไซม์ที่มีหมู่ซัลไฟดริล (sulfhydryl group; -SH) ที่บริเวณเร่ง เป็นเอนไซม์ที่พบส่วนใหญ่ในกลุ่มผลไม้ ได้แก่ มะละกอ สับปะรด และมะเดื่อ เป็นต้น ซึ่งจะพบได้สูงในผลไม้ดิบ เอนไซม์กลุ่มนี้มักนำมาใช้ประโยชน์ในการ ย่อยเนื้อให้นุ่มลง เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สภาวะเป็นกลาง ที่ pH 6-7.5 ตัวอย่างของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ papain, bromelain และ actinidain เป็นต้น กลไกการทำงานของเอนไซม์ดังแสดงในภาพที่ 2.6



ภาพที่ 2.6 กลไกการทำงานของ Cysteine proteases

ที่มา: Beynon & Bond (2001)

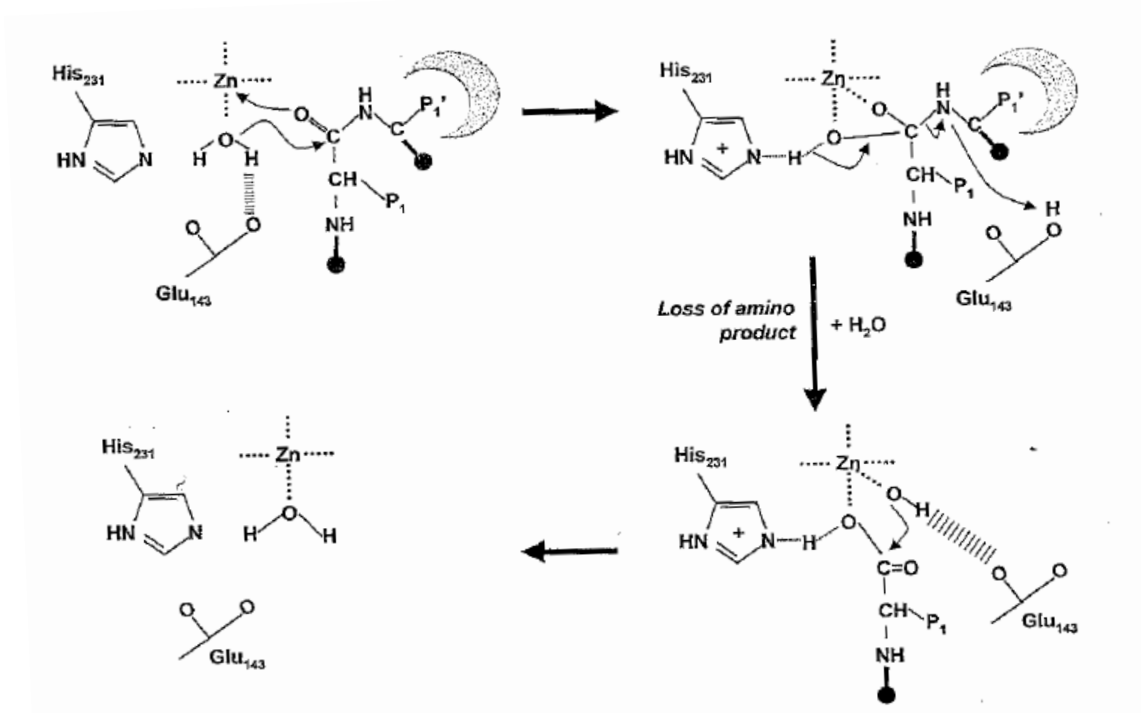
1.3 Aspartic proteases เป็นเอนไซม์ที่มีหมู่คาร์บอกซิลอย่างน้อย 2 หมู่ของกรดแอสปาทิกที่บริเวณเร่ง และทำงานได้ดีที่สภาวะเป็นกรด ค่า pH อยู่ระหว่าง 2-4 เป็นเอนไซม์ที่พบได้ส่วนใหญ่ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง สาหร่าย และ retrovirus ตัวอย่างของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ pepsin, cathepsin และ renin เป็นต้น กลไกการทำงานของเอนไซม์ดังแสดงในภาพที่ 2.7



ภาพที่ 2.7 กลไกการทำงานของ Aspartic proteases

ที่มา: Suguna et al. (1987)

1.4 Metalloproteases เป็นเอนไซม์ที่มีกลไกการเกิดกิจกรรมโดยมีไอออนของโลหะเข้ามาเกี่ยวข้องที่บริเวณเร่ง โดยส่วนใหญ่ต้องการ Zn^{2+} แต่เอนไซม์บางชนิดต้องการ Co^{2+} หรือ Mn^{2+} กรดอะมิโน ที่มักจะรวมตัวกับไอออนของโลหะ ได้แก่ ฮิสทิดีน กลูตาเมต แอสพาเตด ไลซีน และอาร์จินีน เอนไซม์ในกลุ่มนี้ทำงานได้ดีที่สภาวะเป็นกลาง ค่า pH 6.5-7.5 และสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้เมื่อเติมสารจับไอออนของโลหะ เช่น EDTA ตัวอย่างของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ carboxypeptidases A, carnosinase และ prolidase เป็นต้น กลไกการทำงานของเอนไซม์ดังแสดงในภาพที่ 2.8



ภาพที่ 2.8 กลไกการทำงานของ Metalloproteases

ที่มา: Beynon & Bond (2001)

2. จัดแบ่งประเภทตาม active pH range ได้เป็น 3 ประเภท (Rao et al., 1998 & Aguilar et al., 2008)

2.1 Acid proteases เป็นเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด ที่ pH 2-6 ตัวอย่างของเอนไซม์ในกลุ่มนี้โดยส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม aspartic protease ซึ่งอยู่ใน pepsin family รวมถึงเอนไซม์ในกลุ่ม metalloprotease และ cysteine proteases ในกลุ่มที่ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด

2.2 Neutral proteases เป็นเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกลาง เอนไซม์ส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มของ cysteine proteases และ metalloprotease และบางส่วนอยู่ในกลุ่มของ serine protease

2.3 Alkaline proteases เป็นเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง ที่ pH 8-13 ซึ่งสามารถเกิดกิจกรรมได้ดีในช่วง pH ที่เป็นกลาง โดยจุลินทรีย์ที่พบในกลุ่มนี้จะทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกลางและเป็นด่าง เช่น *Bacillus* และ *Streptomyces* โดยส่วนใหญ่ที่บริเวณนี้จะประกอบด้วย เซรีน แต่อย่างไรก็ตามอัลคาไลน์โปรตีเอสบางชนิดอาจมีกรดอะมิโนชนิดอื่นอยู่ที่บริเวณนี้ได้

ประเภทของโปรตีเอสที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมมากที่สุด คือ อัลคาไลน์โปรตีเอส (Alkaline proteases) เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่สามารถมีกิจกรรมและความคงตัวในสิ่งแวดล้อมที่มี pH เป็นด่างได้ (Kumar and Takagi, 1999) จึงเหมาะต่อการใช้ในอุตสาหกรรมที่มีสภาพ pH ของกระบวนการผลิตหรือการใช้งานที่เป็นด่างประเภทต่าง ๆ ได้แก่

1. อุตสาหกรรมสารซักล้าง โดยเอนไซม์ซับติไลซิน (subtilisin) หรืออัลคาไลน์โปรตีเอสจะถูกเติมลงในผงซักฟอกเพื่อกำจัดโปรตีน เอนไซม์ที่เติมลงไปต้องสามารถเกิดกิจกรรมและมีความเสถียรสูงในช่วงอุณหภูมิ และ pH ที่กว้าง
2. อุตสาหกรรมฟอกหนัง นิยมใช้อัลคาไลน์โปรตีเอส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพอย่างมากในกระบวนการฟอกหนัง โดยเฉพาะการกำจัดขนในสภาวะที่เป็นด่าง โดยเอนไซม์จะเข้าไปย่อยโปรตีน ทำให้ขนหลุดออกได้ง่าย
3. อุตสาหกรรมอาหาร มีการใช้โปรตีเอสอย่างมาดั่งแสดงในตารางที่ 2.2
4. การบำบัดน้ำเสีย อัลคาไลน์โปรตีเอสสามารถใช้ในการกำจัดของเสีย โดยเฉพาะจากโรงงานฆ่าสัตว์ ซึ่งมักมีของเสียที่เกิดจากหนังและขนเป็นจำนวนมาก

แหล่งผลิตเอนไซม์ที่สำคัญในอุตสาหกรรม คือ จุลินทรีย์ที่อยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียและเชื้อรา โดยเฉพาะแบคทีเรียจีส *Bacillus* เป็นจุลินทรีย์กลุ่มสำคัญที่ใช้เป็นแหล่งสร้างอัลคาไลน์โปรตีเอสสำหรับนำมาใช้ในวงการอุตสาหกรรม (Singh et al., 2004) จุลินทรีย์ถูกนำมาใช้ในการสร้างเอนไซม์เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถสร้างเอนไซม์ปริมาณมาก ๆ ได้ในระยะเวลาสั้น เพราะจุลินทรีย์เพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว มีขนาดเล็ก ใช้พื้นที่น้อย นอกจากนั้นยังสามารถเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราคาถูกและผลิตได้ตลอดเวลาโดยไม่ขึ้นกับฤดูกาล ทำให้ผลิตได้ปริมาณมากเพียงพอต่อความต้องการของตลาด รวมทั้งการเพิ่มผลผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์ด้วยวิธีปรับปรุงพันธุกรรมหรือเปลี่ยนแปลงสภาพการเลี้ยง สามารถทำได้ง่ายกว่าสิ่งมีชีวิตอื่น

ตารางที่ 2.2 อุตสาหกรรมอาหารที่มีการใช้เอนไซม์โปรตีเอส

เอนไซม์	ผลิตภัณฑ์/ ชนิดอุตสาหกรรม	วัตถุประสงค์หรือลักษณะปฏิกิริยา การใช้เอนไซม์
โปรตีเอส	ผลิตภัณฑ์ขนมอบ	เพิ่มความนุ่มในแป้งนวด ลดเวลานวด เพื่อการยืดของแป้งนวด ทำให้ลักษณะเนื้อสัมผัสของขนมปังมีความเป็นรูพรุนสม่ำเสมอ ขนาดก้อนโต
	เครื่องดื่มมีแอลกอฮอล์	พัฒนาให้มีเนื้อ กลิ่นรส และคุณค่าทางอาหารในระหว่างการหมัก และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการกรอง การทำให้ใส และลดการตกตะกอนในระหว่างการแช่เย็น
	ธัญชาติ	1. เพื่อตัดแปรโปรตีนในธัญชาติ จึงจะช่วยเพิ่มอัตราการทำให้แห้ง ตลอดจนจะช่วยปรับปรุงลักษณะของผลิตภัณฑ์ 2. ในอุตสาหกรรมการผลิตมิโซและเต้าหู้
	เนยแข็ง	1. เกิดการตกตะกอนโปรตีนนม 2. เกิดกลิ่นรสระหว่างการบ่มเนยแข็ง
	ไข่และผลิตภัณฑ์จากไข่	ปรับปรุงสมบัติด้านการทำให้แห้ง
	อาหารสัตว์	การย่อยสลายโปรตีนจากของเหลือทิ้งให้เป็นกรดอะมิโนหรือสารเปปไทด์สายสั้นสำหรับผสมในอาหารสัตว์
	ไฮโดรไลเสตของโปรตีน	กระบวนการผลิตน้ำซอสปรุงรส น้ำปลา และน้ำซุพ จากวัตถุดิบที่มีโปรตีน ทั้งจากพืช สัตว์
	ไวน์ เบียร์	กระบวนการแยกตะกอนโปรตีน ทำให้ผลิตภัณฑ์ใส อาจเพิ่มฟองในเบียร์ได้ ทำให้ผลิตภัณฑ์มีสัดส่วนของโปรตีนละลายน้ำได้มากขึ้น เพิ่มเนื้อให้ผลิตภัณฑ์ด้วย
	เนื้อสัตว์	กระบวนการทำให้เนื้อนุ่ม

ที่มา: ปราณี อานเป็รื่อง (2547)

การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียชอบเกลือที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอส

ในธรรมชาติจะมีจุลินทรีย์หลายประเภทอาศัยอยู่ด้วยกัน ดังนั้นการแยกเชื้อจึงเป็นเทคนิคที่ต้องนำมาใช้ในการทำให้ได้จุลินทรีย์เพียงชนิดเดียวที่ต้องการ วิธีการในการแยกเชื้อจะต้องมีการเตรียมอาหารและสภาวะในการเพาะเลี้ยงให้เหมาะสมกับเชื้อที่ต้องการและมีการยับยั้งเชื้อที่ไม่ต้องการ สำหรับในการแยก halophilic microorganism สามารถทำได้โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเกลือ ตัวอย่างที่จะนำมาคัดเลือกก็จะมาจากแหล่งที่มีความเค็มหรือไม่ก็ได้ แต่ในสภาพธรรมชาติที่มีความเค็มจะพบจุลินทรีย์ที่ชอบเกลือได้มากกว่า ในการปรับสภาวะของอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีการเติมเกลือ โดยนิยมใช้โซเดียมคลอไรด์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พร้อมทั้งมีการใส่สารตั้งต้นที่เป็นโปรตีน เช่น skim milk, casein และ gelatin เป็นต้น ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แบคทีเรียที่สามารถย่อยโปรตีนได้จะ

เกิดวงใสรอบโคโลนี (clear zone) หลังจากนั้นจะทำการคัดเลือกเฉพาะเชื้อที่สร้างวงใสรอบโคโลนีมาตรวจสอบความสามารถในการย่อยโปรตีน โดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีและวงใสที่เกิดรอบโคโลนีของเชื้อ

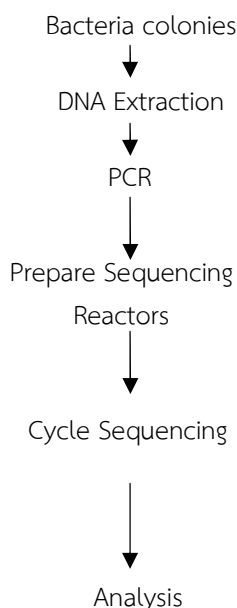
การจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยใช้ 16S rRNA

วิธีในการตรวจสอบและจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกมาจากสิ่งแวดล้อมที่นิยมมีหลายวิธี โดยมากจะเริ่มด้วยการตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย โดยการย้อมแกรมและส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100X เพื่อจำแนกและจัดกลุ่มแบคทีเรียตามรูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์ และลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นจะเป็นการตรวจสอบด้วยวิธีทางชีวเคมี เพื่อศึกษาคุณสมบัติในการใช้น้ำตาล หรือการสร้างเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ทำให้สามารถจัดจำแนกได้ละเอียดมากขึ้น ในปัจจุบันวิธีทางพันธุกรรม (genotypic method) เป็นอีกวิธีหนึ่งที่เป็นที่นิยมและมีประสิทธิภาพสูง เนื่องจากสามารถทราบถึงลำดับเบสของ gene ในสิ่งมีชีวิต ทำให้สามารถจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตได้ถึงในระดับสปีชีส์ วิธีในการจัดจำแนกแบคทีเรียทางพันธุกรรมมีหลายวิธี และแต่ละเทคนิคสามารถจำแนกกลุ่มของสิ่งมีชีวิตจากกลุ่มใหญ่ไปหากลุ่มย่อยที่แตกต่างกัน ดังแสดงในภาพที่ 2.9

Family	Genus	Species	Subspecies	Strain
Genome sequencing				
16S rDNA sequencing				
Mol% G+C				
DNA-DNA hybridization				
Multilocus sequence typing				
Whole cell protein profiling				
Genomic fingerprinting				

ภาพที่ 2.9 ความสัมพันธ์ของการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตกับเทคนิคทางโมเลกุล
ที่มา: Willey et al. (2009)

การจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยใช้ 16S rDNA sequencing เป็นเทคนิคที่วิเคราะห์ลำดับเบสของ gene โดยการวิเคราะห์จะมีการสกัด DNA โดยตรงจากตัวอย่าง สำหรับการจำแนกชนิดของแบคทีเรียมักตรวจสอบที่ยีน 16S rRNA ซึ่งเป็น mRNA ที่มีเพียงชุดเดียวใน genome ของแบคทีเรียพบในแบคทีเรียทุกชนิด ขนาดประมาณ 1500 เบสหรือมากกว่า โดยแบคทีเรียทุกชนิดจะมีช่วงของสาย DNA ที่มีลำดับเบสในช่วงนี้เหมือนกัน แต่ 16S rRNA gene ก็ยังมีช่วงของสาย DNA ที่แตกต่างกันในแบคทีเรียแต่ละชนิด ดังนั้นสายของ DNA ช่วงนี้จึงสามารถนำมาออกแบบ primer และศึกษาความหลากหลายในแบคทีเรียได้ ขั้นตอนสำหรับการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย ดังแสดงในภาพที่ 2.10

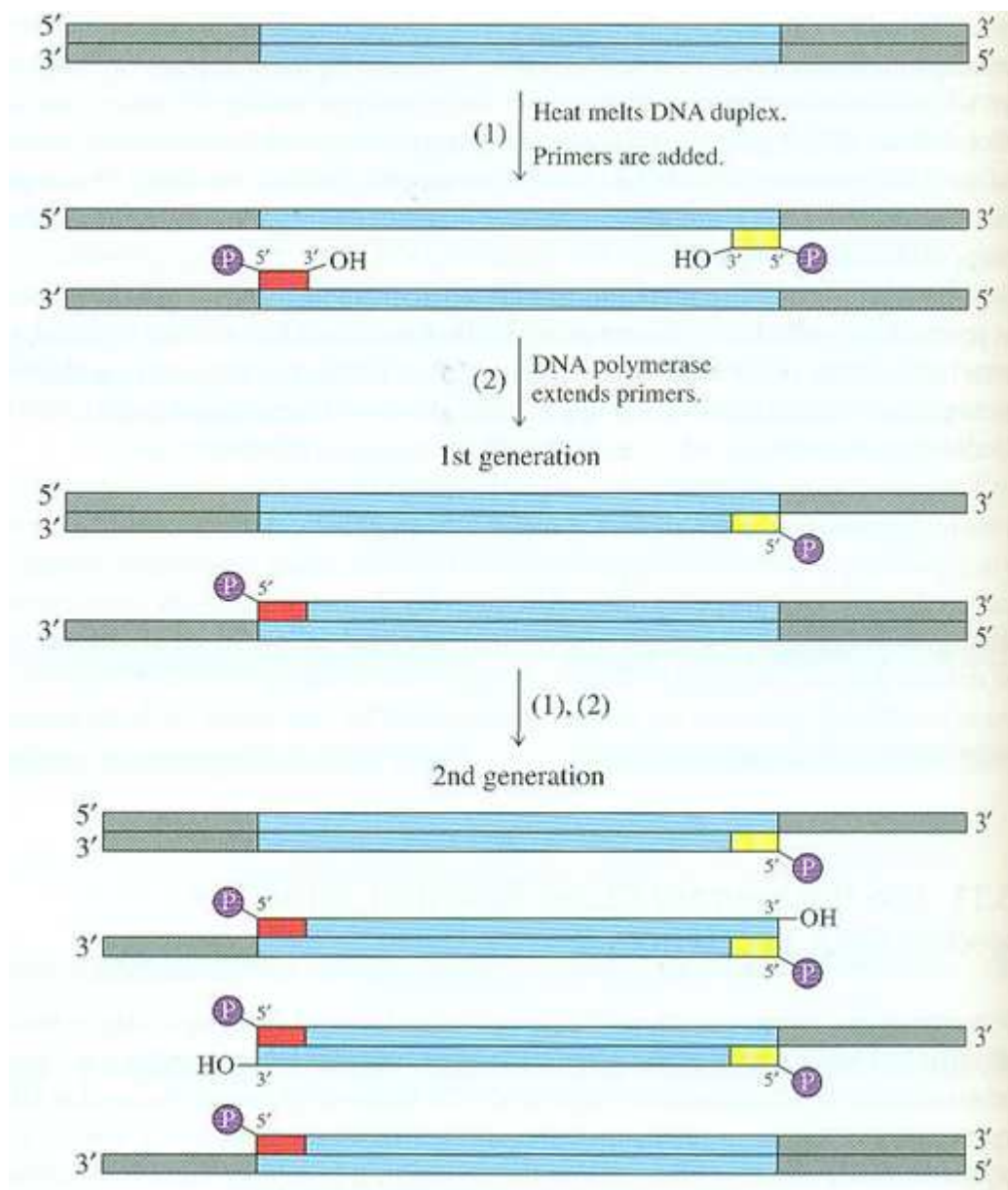


ภาพที่ 2.10 ขั้นตอนการจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยวิธีการตรวจสอบระดับโมเลกุล

1. การเตรียมเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์ โดยนำแบคทีเรียที่ต้องการตรวจสอบมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค streak plate จนได้โคโลนีเดี่ยว หลังจากนั้นนำโคโลนีที่บริสุทธิ์แล้วไปเพิ่มจำนวนต่อไป

2. การสกัด DNA ของแบคทีเรีย ทำได้โดยการทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรีย เพื่อให้พลาสมิด DNA หลุดออกมา และหลังจากนั้นต้องแยกพลาสมิด DNA ให้บริสุทธิ์ โดยแยกออกจากส่วนประกอบอื่น ๆ ของเซลล์ โดยทั่วไปมักจะใช้ความร้อนและเอนไซม์ หรือสารละลายต่างทำลายผนังเซลล์ หรืออาจใช้ชุดสำเร็จรูป DNA Preparation Kits ได้ ซึ่งชุด Kits เป็นที่นิยมเนื่องจากทำได้ง่ายและได้พลาสมิดที่มีความบริสุทธิ์สูง

3. การเพิ่มปริมาณ 16S rRNA ด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) ซึ่งต้องมีการออกแบบ primer 1 คู่ ซึ่งเป็น Universal primers ที่มีเหมือนกันในแบคทีเรียทุกชนิด หลังจากนั้นทำการเพิ่มปริมาณของ DNA ซึ่งเป็นการจำลอง DNA สายใหม่ จาก DNA ต้นแบบด้วย DNA polymerase ซึ่งจะทำหน้าที่ในการคัดลอกโมเลกุลของ DNA ต้นแบบ การทำงานของ PCR cycle จะมีขั้นตอนดังต่อไปนี้ 1. ขั้น denaturation จะเป็นการใช้ความร้อนทำให้ DNA ต้นแบบที่เป็นสายคู่เปลี่ยนแปลงสภาพ แยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยว 2. ขั้น annealing จะเป็นการใช้ความเย็นเพื่อให้เกิดการ annealing ระหว่าง primer ซึ่งเป็น DNA สายสั้น ๆ สามารถจับกับ DNA ต้นแบบได้ 3. ขั้น extension ซึ่งเป็นขั้นการสร้าง DNA สายใหม่ โดยมีการขยายส่วนปลายของ primer ให้เหมือนกับ DNA ต้นแบบ ด้วยการช่วยของ DNA polymerase และผลผลิตที่ได้จะทำหน้าที่เป็นต้นแบบสำหรับ primer ใน cycle ต่อไป ดังแสดงในภาพที่ 2.11 เมื่อทำการเพิ่มจำนวนด้วย PCR แล้ว จะมีการตรวจสอบผลของ DNA ด้วยการทำ Electrophoresis เพื่อดูขนาดของ 16S rRNA gene ซึ่งควรมีขนาดประมาณ 1500-1600 เบส



ภาพที่ 2.11 ขั้นตอนการทำงานของ PCR

ที่มา: Horton et al. (2002)

4. การหาลำดับเบสของ 16S rRNA gene โดยนำผลผลิตที่ได้จาก PCR (PCR product) ไปหาลำดับเบสด้วยเครื่อง DNA Sequencer ซึ่งเป็นเครื่องอัตโนมัติที่ทำหน้าที่แยกขนาดของ DNA ที่แตกต่างกันเพียง 1 เบสได้ ทำให้ได้ผลที่แม่นยำและสะดวกต่อการใช้งาน เหมาะสำหรับงานด้านพันธุศาสตร์และงานด้านชีวโมเลกุล

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการศึกษาค้นคว้าข้อมูล พบว่า มีงานวิจัยที่รายงานถึงการใช้ประโยชน์ของ โปรตีเอสในอุตสาหกรรม และวิธีการแยกและคัดเลือกรูปแบบที่เรียที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจากดินในบริเวณต่าง ๆ รวมถึงการจำแนกชนิดของแบคทีเรียตามลักษณะสัณฐานวิทยาและทางชีวเคมี นอกจากนี้ยังมีการศึกษาคุณสมบัติและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส พร้อมศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ในสภาวะต่าง ๆ

Kumar & Takagi (1999) ได้รายงานถึงจุลินทรีย์ที่สร้างอัลคาไลน์โปรตีเอสในมุมมองของอุตสาหกรรมเชิงชีวภาพว่า อัลคาไลน์โปรตีเอสเป็นเอนไซม์ที่น่าสนใจเนื่องจากสามารถเกิดกิจกรรมและมีความเสถียรที่สภาวะเป็นด่าง โปรตีเอสชนิดนี้จะพบมากในจุลินทรีย์ที่ชอบด่าง วิธีการต่าง ๆ ในการแยกเชื้อก็เป็นส่วนสำคัญในการคัดเลือกรูปแบบที่มีชีวิตที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่อไป นอกจากนี้การพัฒนาสายพันธุ์โดย Mutagenesis และ/หรือ recombinant DNA technology ก็เป็นอีกทางหนึ่งที่ทำให้ได้เชื้อที่มีประสิทธิภาพทางการค้าด้วยเช่นกัน

Gupta et al. (2002) ได้รายงานถึงแบคทีเรียที่สร้างอัลคาไลน์โปรตีเอสในด้านแนวทางโมเลกุลและการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยโปรตีน (proteolytic enzyme) สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ โปรตีเอสเป็นเอนไซม์ทางการค้าเพราะมีการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท ถึงจะมีสิ่งมีชีวิตหลายชนิดที่สามารถผลิตโปรตีเอสได้ แต่ที่สามารถนำไปใช้ทางการค้าได้มีเพียงไม่กี่ชนิด เช่น *Subtilisin Carlsberg*, *Subtilisin BPN'* และ *Savinase* ซึ่งใช้ในสารซักล้างเป็นส่วนใหญ่ ในปัจจุบันมีการพัฒนาประสิทธิภาพของการเกิดกิจกรรมและความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ, oxidizing agent และสภาวะในการซักล้าง ให้ดีขึ้นด้วยการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) แต่อย่างไรก็ตามก็ยังมีการแยกและคัดเลือกรูปแบบใหม่ตามแหล่งต่าง ๆ ซึ่งเป็นการใช้ประโยชน์จากความหลากหลายทางธรรมชาติอีกทางหนึ่งด้วย

Patel et al. (2005) ได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจีส *Bacillus* ชนิดใหม่ที่สามารถสร้างอัลคาไลน์โปรตีเอสได้ โดยเรียกเชื้อนี้ว่า Ve1 โดยได้ทำการแยกเชื้อจากดินที่มีความเป็นด่างสูงบริเวณแอ่ง Veraval ประเทศอินเดีย พบว่า Ve1 สามารถเกิดกิจกรรมได้สูงถึง 410 U/ml โดยใช้ gelatin เป็นสารตั้งต้น สามารถเจริญเติบโตและผลิตโปรตีเอสได้ในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 7.0-9.0

Moradian et al. (2006) ได้ทำการศึกษาแบคทีเรียจีส *Bacillus* ที่สร้าง serine alkaline protease โดยทำการแยกจากดินที่ภาคตะวันตกและภาคเหนือของประเทศ Iran พบว่าแบคทีเรียจีส *Bacillus* 2 ชนิด (HR-08 และ KR-8102) สามารถย่อยสลาย gelatin บนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ เอนไซม์สามารถเกิดกิจกรรมได้ในช่วงพีเอชค่อนข้างกว้าง (6.0-11.0) และมีความเสถียรที่พีเอช 7.0-12.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมของ HR-08 และ KR-8102 คือ 65 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

Shivanand & Jayaraman (2009) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจากแบคทีเรียทนเกลือ *Bacillus aquimaris* สายพันธุ์ VITP4 ที่แยกได้จากชายฝั่งทะเล Kumta เชื้อชนิดนี้เป็นเชื้อชนิดใหม่ เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วย 16S rRNA พบว่าเป็นเชื้อ *Bacillus aquimaris* สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้ถึง 630 U/ml ในเวลา 48 ชั่วโมง โปรตีเอสที่ผลิตได้มีความสามารถในการทนต่อ

ความเข้มข้นของเกลือได้ 0-4 M ค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์อยู่ที่ pH 7.5 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

Das et al. (2011) ได้ทำการศึกษาจุลินทรีย์ที่ทนความเค็มในดินของป่าชายเลน Sundarban ประเทศอินเดีย พบว่าระบบนิเวศของป่าชายเลน Sundarban มีจุลินทรีย์ที่ชอบความเค็มอยู่ค่อนข้างสูง จำนวนจุลินทรีย์ที่ชอบความเค็มในบริเวณหน้าดินจะน้อยกว่าบริเวณตรงกลางและด้านล่างของดิน จุลินทรีย์ที่อยู่ด้านล่างของดินจะมีการเจริญเติบโตแบบไม่ใช้ออกซิเจน และจำนวนของจุลินทรีย์จะลดลงตามลำดับความลึกของดิน

Suganthi et al. (2013) ได้ทำการศึกษาการคัดเลือกและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจากแบคทีเรียทนต่อความเค็ม *Bacillus licheniformis* ที่แยกได้จากดินตะกอนในบ่อเกลือ พบว่าเชื้อที่คัดเลือกสามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้สูงถึง 141.46 U/mg โดยบ่มในสภาวะที่มีเกลือ 1 M เวลา 24 ชั่วโมง ที่ pH 8 ภายใต้ความเร็วรอบ 250 rpm

Zhou et al. (2009) ได้ทำการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียที่สร้างโปรตีเอสในดินตะกอนของทะเลจีนใต้ พบว่าในตัวอย่างดินตะกอนมีแบคทีเรียที่ผลิตโปรตีเอสได้ถึง 10^6 cells/g และเมื่อทำการวิเคราะห์ทางชีวเคมีด้วย 16S rRNA gene sequences พบเป็นแบคทีเรียจีโนส *Pseudoalteromonas* (28.2%), *Alteromonas* (34.6%), *Marinobacter*, *Idiomarina*, *Halomonas*, *Vibrio*, *Shewanella*, *Pseudomonas* และ *Rheinheimera*

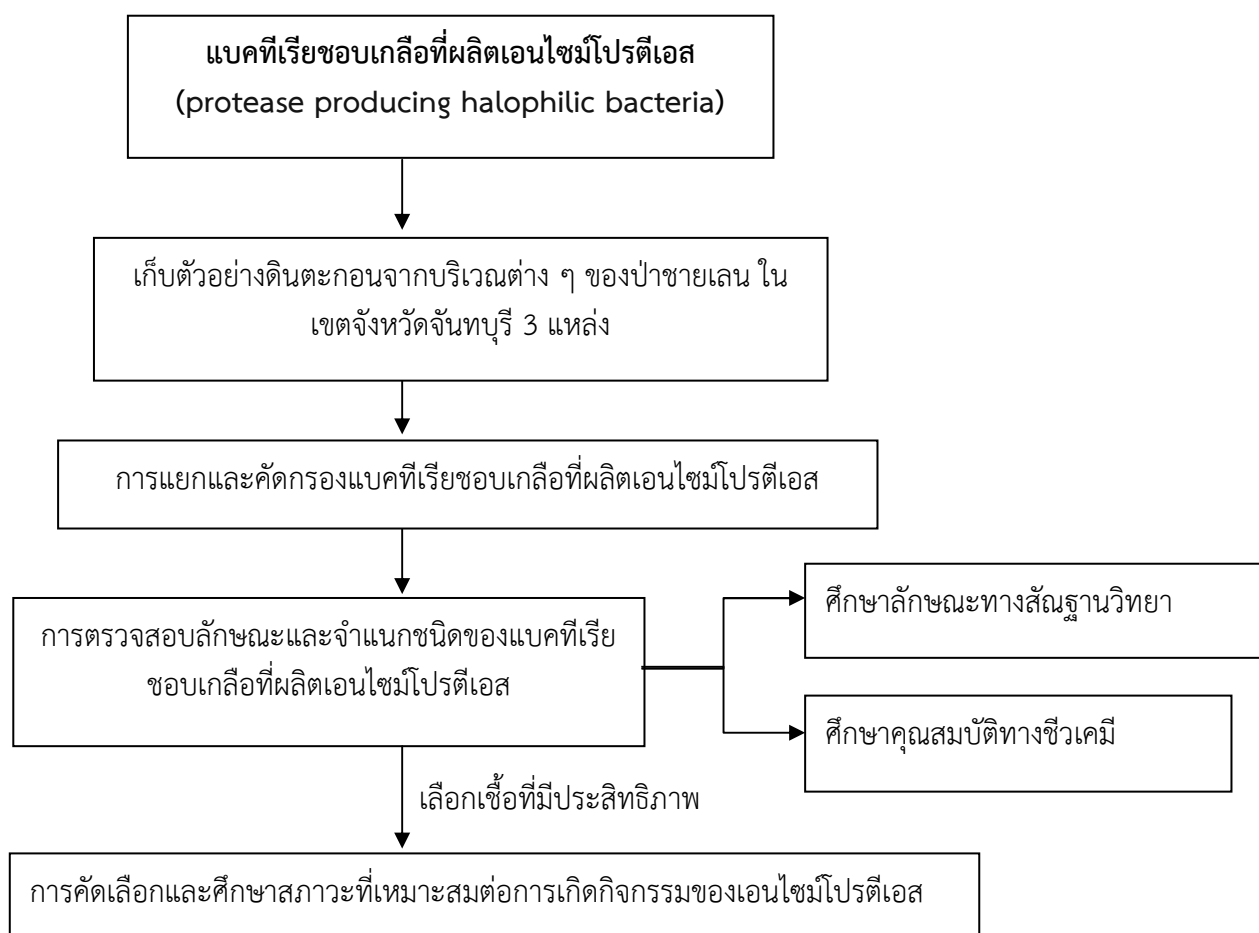
Saurabh et al. (2007) ได้ทำการศึกษาการเพิ่มผลผลิตของ serine alkaline protease ของเชื้อ *Bacillus* sp. โดยใช้ถั่วเหลืองเป็นสารตั้งต้น ทางคณะผู้วิจัยได้เชื้อที่สามารถสร้างโปรตีเอสจีโนส *Bacillus* sp. (SBP-29) มาจากโรงงานสัตว์ปีก พบว่าเอนไซม์สามารถเกิดกิจกรรมได้สูงสุด 3028 U/ml โดยใช้ถั่วเหลือง 1.5% (w/v) เป็นสารตั้งต้น สภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์คือ 60 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 9.5 เอนไซม์มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 20-90 องศาเซลเซียส และพีเอช 6.0-12.0

Venugopal & Saramma (2006) ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติของอัลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Vibrio fluvialis* strain VM10 ที่แยกได้จากตัวอย่างดินตะกอนป่าชายเลน ปากแม่น้ำ Cochin และประยุกต์ใช้เป็นสารเติมแต่งในผงซักฟอก พบว่าโปรตีเอสที่ได้มีขนาด 33.5 kDa สภาวะที่เหมาะสมในการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ คือ พีเอช 8.0 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และเสถียรต่อพีเอชในช่วงที่เป็นด่าง นาน 1 ชั่วโมง ไอออนของโลหะ Co^{2+} , Ca^{2+} และ Fe^{3+} ช่วยให้เกิดกิจกรรมได้เพิ่มมากขึ้น นอกจากนั้นโปรตีเอสที่ยังเสถียรต่อ H_2O_2 , SDS และ Triton X-100 ซึ่งเป็นส่วนประกอบในผงซักฟอกโดยทั่วไป

Foophow et al. (2010) ได้ทำการศึกษา subtilisin-like serine protease (Tk-SP) จาก hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* ซึ่งคัดแยกมาจากบ่อน้ำพุร้อนในประเทศญี่ปุ่น พบว่า Tk-SP มีคุณสมบัติในการทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นได้หลายชนิดและทนความร้อนได้สูง อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดกิจกรรมประมาณ 100 องศาเซลเซียส มีความเสถียรต่อ 5% SDS, 8M Urea และ 10% Triton X-100 นอกจากนั้น Tk-SP ไม่ต้องการ Ca^{2+} และ propeptide ในการจัดเรียงตัวของโปรตีน แสดงว่า Tk-SP สามารถทำงานได้ในสภาวะที่มีสารที่จับไอออนของ

โลหะ (EDTA) อยู่ ดังนั้น Tk-SP จึงเป็นโปรตีนเอส ที่มีประสิทธิภาพสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานทางเทคโนโลยีชีวภาพได้

กรอบแนวคิดในการวิจัย



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัตถุดิบ

ตัวอย่างดินตะกอนจากบริเวณต่างๆ ของป่าชายเลนในเขตจังหวัดจันทบุรี 3 แหล่ง ได้แก่

- ศูนย์การศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน อันเนื่องมาจากพระราชดำริ ต.คลองขุด อ.ท่าใหม่ จ.จันทบุรี
- สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 (ท่าสอย จันทบุรี) ต. บ่อ อ.ขลุง จ.จันทบุรี
- สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 3 (ขลุง จันทบุรี) ต.เกวียนหัก อ.ขลุง จ.จันทบุรี

วัสดุอุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่างดิน (Grab)
2. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-Vis Spectrophotometer) ยี่ห้อ Shimadzu/Japan
3. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) ยี่ห้อ Labnet/USA
4. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ยี่ห้อ Memmert/USA
5. ตู้ปลอดเชื้อ
6. หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ยี่ห้อ Hirayama/Japan
7. กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)
7. เครื่องเขย่าหลอดทดลอง
8. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical balance) ยี่ห้อ Precisa/Switzerland
9. เครื่องวัดความเป็นกรด ด่าง (pH meter) ยี่ห้อ Cyber Scan 510/Singapore
10. เครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า (Magnetic Stirrer Plate) ยี่ห้อ Harmony/Japan
11. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (Water bath shaker) ยี่ห้อ PolyScience/USA
12. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR) ยี่ห้อ Bioer/Japan
13. เครื่องแยกสารพันธุกรรมในเจล (Gel Electrophoresis) ยี่ห้อ Major Science/USA
14. เครื่องให้ความร้อนแก่หลอดทดลอง (Heating block) ยี่ห้อ Bioer/Japan

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

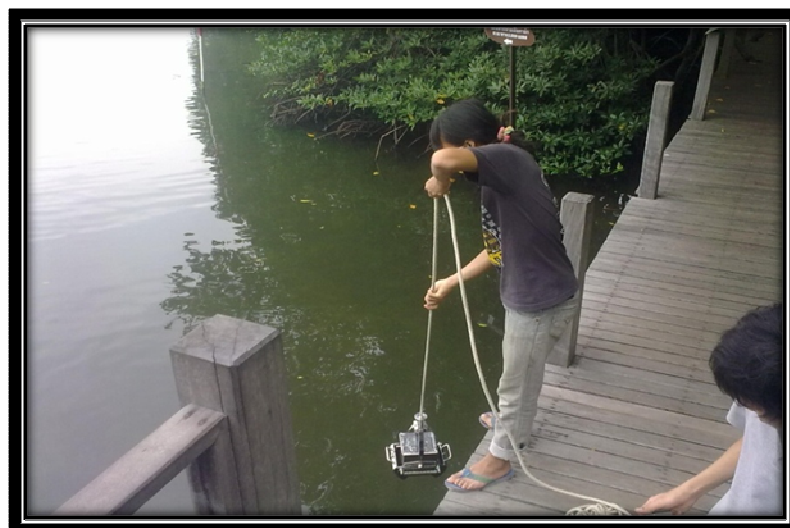
1. Skimmed milk agar (SKA)
2. Nutrient agar (NA)
3. Nutrient broth (NB)
4. Sodium chloride
5. Azocasein
6. Tris
7. Hydrochloric acid
8. Trichloroacetic acid
9. Sodium hydroxide

10. Taq polymerase
11. dNTP
12. Isopropanol
13. Genomic DNA Purification Kit (Purelink)
14. PCR Purification Kit (Purelink)
15. Agarose
16. Glycine
17. Sodium acetate
18. Disodium Phosphate (Na_2HPO_4)
19. Sodium Phosphate (NaH_2PO_4)
20. Ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA)

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างดินตะกอนป่าชายเลน

การเก็บตัวอย่างดินตะกอนป่าชายเลนในเขตจังหวัดจันทบุรี ทำโดยผู้เก็บตัวอย่างดินที่ลึกจากพื้นดินลงไปประมาณ 10-15 เซนติเมตร ด้วยอุปกรณ์เก็บตัวอย่างดิน (Grab) ลักษณะการเก็บดังแสดงในภาพที่ 3.1 หลังจากนั้นนำตัวอย่างดิน เก็บไว้ที่ 4-10 องศาเซลเซียส และทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียต่อไป



ภาพที่ 3.1 แสดงการเก็บตัวอย่างตะกอนดินป่าชายเลน

2. การแยกและคัดกรองแบคทีเรียชอบเกลือที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอส

2.1 คัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากตัวอย่างดิน

นำตัวอย่างดินตะกอนมาทำการเจือจางที่ระดับ 10^{-1} – 10^{-4} ด้วยน้ำเกลือ NaCl 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปลอดเชื้อ และเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารแข็ง skimmed milk agar (SKA) ที่เติมเกลือ NaCl 3 เปอร์เซ็นต์ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ถึง 48 ชั่วโมง ทำการตรวจผลการสร้างเอนไซม์โปรติเอส โดยสังเกตบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีเชื้อ ถ้ามีบริเวณใส แสดงว่าแบคทีเรานั้นสามารถสร้างเอนไซม์ได้ และแยกเชื้อแบคทีเรียที่สร้างวงใสรอบโคโลนี โดยใช้หัวถ่ายเชื้อเขี่ยเขี่ยนำมาลากซ้ำบนจานอาหาร nutrient agar (NA plate) ที่เติมเกลือ NaCl 3 เปอร์เซ็นต์ (cross streak plate method) จนได้เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ เก็บเชื้อบริสุทธิ์โดยเลี้ยงเชื้อบนหลอดอาหารวุ้นเอียง nutrient agar (NA slant) ที่เติมเกลือ 3 เปอร์เซ็นต์ เก็บเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สำหรับใช้ในการศึกษาต่อไป

2.2 คัดกรองเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสบนอาหารแข็ง

คัดกรองเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ด้วยวิธี point inoculation โดยนำเชื้อที่แยกได้ในข้อ 2.2 ถ่ายลงบนอาหารอาหารแข็ง SKA ที่เติมเกลือ NaCl 3 เปอร์เซ็นต์ โดยจุดตรงกึ่งกลางของจานอาหาร และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจสอบโดยพิจารณาบริเวณวงใสรอบๆ โคโลนีที่เกิดขึ้นจากการย่อยโปรตีนในอาหาร เลี้ยงเชื้อโดยเชื้อแบคทีเรียที่จุดตรงกึ่งกลางจานอาหาร ทำการคัดเลือกเฉพาะเชื้อที่มีความสามารถในการเกิดวงใสมากกว่า 10 มิลลิเมตร สำหรับทำการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในอาหารเหลวต่อไป

3. การตรวจสอบลักษณะและจำแนกชนิดของแบคทีเรียชอบเกลือที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอส

3.1 การตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่คัดเลือก

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยใช้ loop และกระจายซัสเพนชันของเชื้อบนแผ่นสไลด์ รอสโลต์แห้ง พิกซ์เชื้อโดยผ่านเปลวไฟ และทำการย้อมสีแบบแกรม (Gram's staining) และตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาและการติดสีย้อมแบบแกรมของเชื้อแบคทีเรียโดยการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

3.2 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอส

จำแนกชนิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยทำการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีด้วยวิธี 16S rDNA sequence analysis โดยนำเชื้อแบคทีเรียมาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ Genomic DNA Purification Kits เพื่อทำการแยกพลาสมิดดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ หลังจากนั้นนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ไปทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene โดยใช้เทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) ซึ่งมีการใช้ Universal primers ที่มีลำดับเบส ดังนี้

Primer 27F (forward) : 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'

Primer 1492R (reverse): 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'

และทำการเพิ่มปริมาณของยีนเป้าหมายโดยใช้ cycle-sequencing technique หลังจากเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR แล้ว นำดีเอ็นเอที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ PCR Purification Kit และมีการตรวจสอบขนาดด้วยเทคนิค Gel electrophoresis เพื่อดูขนาดของ 16S rRNA gene ที่ได้ แล้วจึงนำยีนที่ได้จากการเพิ่มปริมาณไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA โดยใช้ Genetic Analyzer และทำการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของแบคทีเรียด้วยลำดับเบส โดยใช้ blast homology search ใน DNA DataBank พร้อมทั้งสร้าง Phylogenetic tree

4. การคัดเลือกและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส

4.1 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสในอาหารเหลว

นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดกรองในข้อ 2.2 มาทำการคัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้สูง โดยนำเชื้อที่คัดกรองในข้อ 2.2 มาถ่ายเชื้อด้วย loop ลงอาหารเหลว nutrient broth (NB) ที่เติมเกลือ NaCl 3 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วบรรจุในหลอดทดลองที่มีปริมาตรอาหาร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตรถ่ายลงในหลอดเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ทำการแยกส่วนน้ำใสออกจากตัวเซลล์ น้ำใสที่แยกได้ (crude enzyme) จะนำไปทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ต่อไป

การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส (crude enzyme) ทำโดยวัดปริมาณไทโรซีนที่เกิดขึ้นหลังจากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ โดยใช้สารละลาย 2% (w/v) azocasein ที่ละลายใน 50 mM Tris-HCl พีเอช 8.0 เป็นสารตั้งต้น นำสารตั้งต้นมา 270 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับ crude enzyme ที่มีความเจือจางเหมาะสมปริมาตร 30 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และหยุดปฏิกิริยากับสารละลาย 15% (v/v) trichloroacetic acid ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 15,000 g เวลา 15 นาที หลังจากนั้นแยกส่วนใสปริมาตร 160 ไมโครลิตร ออก และเติม 2M NaOH ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ลงในส่วนใส นำสารละลายที่ได้ไปวัดปริมาณไทโรซีนด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-Vis Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ (unit) เท่ากับ ปริมาณอัลคาไลน์โปรตีเอสที่ทำให้ความยาวคลื่นที่ 440 นาโนเมตรของสารละลายเพิ่มขึ้น 0.1 ใน 1 นาที

4.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส

คัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสสูงสุดมา 1 เชื้อ มาทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกในอาหารเหลว ทำการแยกส่วนน้ำใสออกจากตัวเซลล์ นำส่วนใสที่แยกได้ไปศึกษา 2 ปัจจัย คือ อุณหภูมิ (30-80 องศาเซลเซียส) และพีเอช (4.0-10.0) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ (การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ดังแสดงตาม 4.1)

สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

1. ดินตะกอนจากบริเวณต่างๆ ของป่าชายเลนในเขตจังหวัดจันทบุรี 3 แหล่ง ได้แก่
 - ศูนย์การศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน อันเนื่องมาจากพระราชดำริ ต.คลองขุด อ.ท่าใหม่ จ.จันทบุรี
 - สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 (ท่าสอน จันทบุรี) ต.บ่อ อ.ขลุง จ.จันทบุรี
 - สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 3 (ขลุง จันทบุรี) ต.เกวียนหัก อ.ขลุง จ.จันทบุรี
2. ศูนย์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต
3. คณะทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตศรีราชา

บทที่ 4

ผลการวิจัย

การเก็บตัวอย่างดินตะกอนป่าชายเลน

ทำการเก็บตัวอย่างดินตะกอนป่าชายเลนแบบสุ่ม โดยใช้เครื่องเก็บตัวอย่างตะกอนดิน (Grab Sampler) พื้นที่ป่าชายเลนในเขตจังหวัดจันทบุรี 3 แหล่ง ได้แก่ (1) ศูนย์การศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน อันเนื่องมาจากพระราชดำริ ต.คลองขุด อ.ท่าใหม่ (2) สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 (ท่าสอน จันทบุรี) ต.ป้อ อ.ขลุง (3) สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 3 (ขลุง จันทบุรี) ต.เกวียนหัก อ.ขลุง แสดงจุดเก็บตัวอย่างและพิกัดดังภาพที่ 4.1-4.3



ภาพที่ 4.1 แสดงจุดเก็บตัวอย่างและพิกัด บริเวณศูนย์ศึกษาธรรมชาติ โครงการพระราชดำริฯ

อ่าวคุ้งกระเบน ต.คลองขุด อ.ท่าใหม่ จ.จันทบุรี

จุดเก็บตัวอย่างที่ 1	พิกัด : 12°34'24.77"	101°54'1.17"
จุดเก็บตัวอย่างที่ 2	พิกัด : 12°34'24.31"	101°54'5.87"
จุดเก็บตัวอย่างที่ 3	พิกัด : 12°34'24.37"	101°54'3.41"
จุดเก็บตัวอย่างที่ 4	พิกัด : 12°34'25.38"	101°54'0.66"
จุดเก็บตัวอย่างที่ 5	พิกัด : 12°34'25.79"	101°54'57.83"
จุดเก็บตัวอย่างที่ 6	พิกัด : 12°34'24.69"	101°54'53.50"



ภาพที่ 4.2 แสดงจุดเก็บตัวอย่างและพิกัด บริเวณสถานีพัฒนาศึกษาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2
(ท่าสอน จันทบุรี) บ้านท่าสอน ต.บ่อ อ.ขลุง จ.จันทบุรี

จุดเก็บตัวอย่างที่ 1	พิกัด : 12°23'27.76"	102°21'40.04"
จุดเก็บตัวอย่างที่ 2	พิกัด : 12°23'25.80"	102°21'40.80"
จุดเก็บตัวอย่างที่ 3	พิกัด : 12°23'26.92"	102°21'37.51"
จุดเก็บตัวอย่างที่ 4	พิกัด : 12°23'24.81"	102°21'38.08"



ภาพที่ 4.3 แสดงจุดเก็บตัวอย่างและพิกัด บริเวณสถานีพัฒนาศึกษาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 3
(ขลุง จันทบุรี) ต.เกวียนหัก อ.ขลุง จ.จันทบุรี

จุดเก็บตัวอย่างที่ 1	พิกัด : 12°26'23.86"	102°13'6.89"
จุดเก็บตัวอย่างที่ 2	พิกัด : 12°26'23.68"	102°13'7.54"
จุดเก็บตัวอย่างที่ 3	พิกัด : 12°26'23.24"	102°13'6.47"
จุดเก็บตัวอย่างที่ 4	พิกัด : 12°26'23.25"	102°13'7.15"

การแยกและคัดกรองแบคทีเรียชอบเกลือที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอส

1. คัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจากตัวอย่างดิน

ตัวอย่างดินตะกอนป่าชายเลนจากแหล่งต่างๆ มาทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสบนอาหาร Skimmed milk agar (SKA) ที่เติมเกลือ NaCl 3 เปอร์เซ็นต์ โดยพิจารณาจากบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย พบว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรตีเอสจากตัวอย่างดินตะกอนป่าชายเลนจากแหล่งต่างๆ ในเขตจังหวัดจันทบุรีได้ 46 ไอโซเลต ดังนี้ (แสดงดังตารางที่ 4.1)

- ศูนย์การศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบนอันเนื่องมาจากพระราชดำริ ต.คลองขุด อ.ท่าใหม่ จ.จันทบุรี สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้ 16 ไอโซเลต ได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย รหัส KB11, KB12, KB13, KB14, KB15, KB16, KB17, KB18, KB100, KB111, KB112, KB113, KB114, KB115, KB41 และ KB42

- สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 (ท่าสอน จันทบุรี) ต. บ่อ อ.ขลุง จ.จันทบุรี สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้ 23 ไอโซเลต ได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย รหัส TS11, TS12, TS13, TS14, TS21, TS22, TS23, TS24, TS25, TS26, TS31, TS32, TS33, TS34, TS35, TS36, TS41, TS42, TS43, TS44, TS45, TS46 และ TS47

- สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 3 (ขลุง จันทบุรี) ต.เกวียนหัก อ.ขลุง จ.จันทบุรี สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้ 7 ไอโซเลต ได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย รหัส WY11, WY21, WY22, WY41, WY42, WY43 และ WY44

ตารางที่ 4.1 แสดงสถานที่เก็บตัวอย่างดินตะกอนป่าชายเลนและจำนวนไอโซเลตที่แยกได้ในเขตจังหวัดจันทบุรี

สถานที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลตของเชื้อที่แยกได้	รหัสเชื้อแบคทีเรีย
ศูนย์การศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบนอันเนื่องมาจากพระราชดำริ	16	KB11, KB12, KB13, KB14, KB15, KB16, KB17, KB18, KB110, KB111, KB112, KB113, KB114, KB115, KB41, KB42
สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 (ท่าสอน จันทบุรี)	23	TS11, TS12, TS13, TS14, TS21, TS22, TS23, TS24, TS25, TS26, TS31, TS32, TS33, TS34, TS35, TS36, TS41, TS42, TS43, TS44, TS45, TS46, TS47
สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 3 (ขลุง จันทบุรี)	7	WY11, WY21, WY22, WY41, WY42, WY43, WY44

2. คัดกรองเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสบนอาหารแข็ง

นำเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสที่แยกบนอาหาร SKA ที่เติมเกลือ NaCl 3 เปอร์เซ็นต์ จากดินตะกอนป่าชายเลนในแหล่งต่างๆ มาคัดกรองความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสบนอาหาร SKA ที่เติมเกลือ NaCl 3 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธี point inoculation โดยพิจารณาความสามารถในการย่อยโปรตีนจากบริเวณวงใสรอบๆ โคโลนีของแบคทีเรีย แสดงผลความยาวของเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส ดังตารางที่ 4.2-4.5

ตารางที่ 4.2 แสดงเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสรอบๆ โคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลน บริเวณศูนย์การศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบนอันเนื่องมาจากพระราชดำริ

รหัสเชื้อ	เส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (mm)
KB11	8.61 ± 0.46
KB12	8.52 ± 0.34
KB13	7.51 ± 0.23
KB14	11.73 ± 1.11
KB15	8.13 ± 0.44
KB16	6.12 ± 0.14
KB17	7.35 ± 0.21
KB18	8.69 ± 0.48
KB100	12.42 ± 2.18
KB111	13.80 ± 0.36
KB112	10.18 ± 0.15
KB113	10.42 ± 0.46
KB114	8.25 ± 0.27
KB115	7.48 ± 0.37
KB41	9.62 ± 0.23
KB42	16.20 ± 0.30

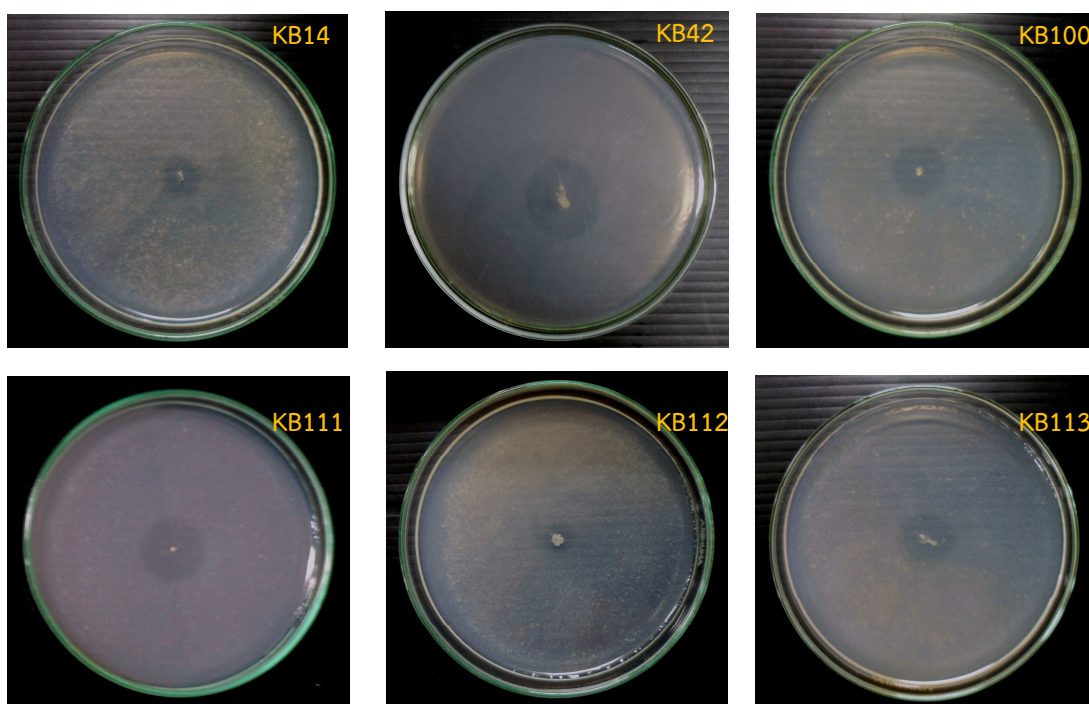
ตารางที่ 4.3 แสดงเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสรอบๆ โคลนินของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลน บริเวณสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 (ท่าสอน จันทบุรี)

รหัสเชื้อ	เส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (mm)
TS11	6.21 ± 0.14
TS12	6.53 ± 0.22
TS13	11.47 ± 0.56
TS14	6.82 ± 0.31
TS21	7.58 ± 0.42
TS22	6.45 ± 0.16
TS23	6.92 ± 0.34
TS24	7.37 ± 0.38
TS25	6.69 ± 0.29
TS26	10.73 ± 0.21
TS31	8.41 ± 0.25
TS32	6.71 ± 0.32
TS33	10.77 ± 0.21
TS34	8.58 ± 0.16
TS35	11.80 ± 0.20
TS36	7.49 ± 0.37
TS41	9.69 ± 0.43
TS42	12.50 ± 0.52
TS43	7.41 ± 0.23
TS44	8.72 ± 0.51
TS45	6.48 ± 0.19
TS46	7.86 ± 0.48
TS47	8.48 ± 0.12

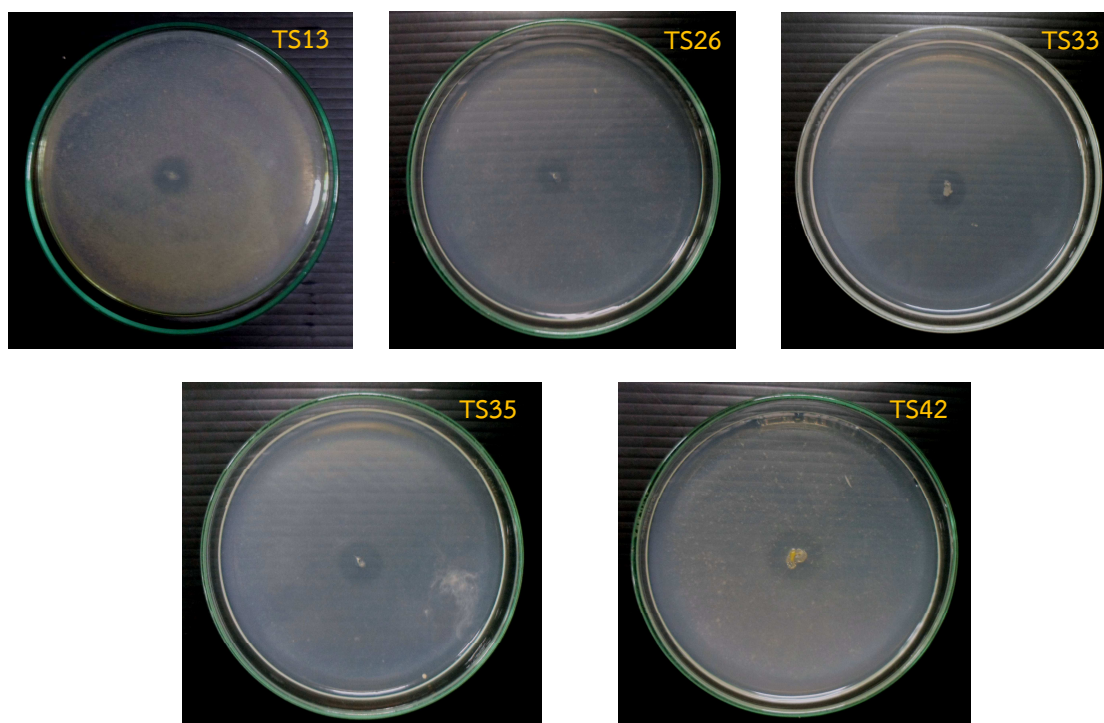
ตารางที่ 4.4 แสดงเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสรอบๆ โคลนินของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลน บริเวณสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 3 (ขลุง จันทบุรี)

รหัสเชื้อ	เส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (mm)
WY11	7.40 ± 0.32
WY21	10.88 ± 0.56
WY22	8.42 ± 0.45
WY41	6.94 ± 0.13
WY42	7.01 ± 0.22
WY43	11.91 ± 0.52
WY44	9.97 ± 0.89

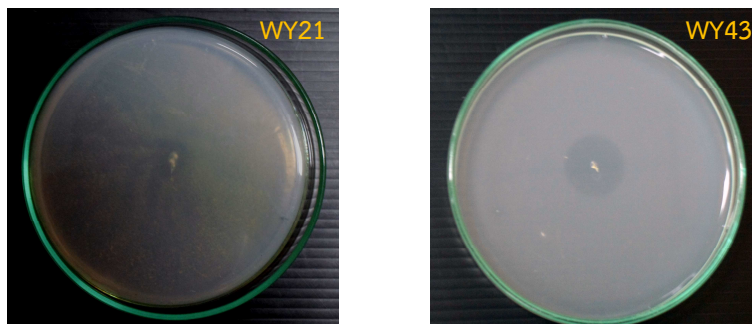
จากผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.2-4.4 พบว่าเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยอาหาร SKA ได้ดี โดยพิจารณาจากวงใสรอบๆ โคลนินที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 10 มิลลิเมตร มีจำนวน 13 ไอโซเลต โดยพบจากเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากดินตะกอนจากศูนย์การศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบนอันเนื่องมาจากพระราชดำริ จำนวน 6 ไอโซเลต ได้แก่ เชื้อรหัส KB14, KB42, KB100, KB 111, KB 112 และ KB113 (ภาพที่ 4.4), จากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 (ท่าสอน จันทบุรี) จำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ เชื้อรหัส TS13, TS 26, TS 33, TS 35 และ TS 42 (ภาพที่ 4.5) และเชื้อที่แยกจากบริเวณสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 3 (ขลุง จันทบุรี) จำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ เชื้อรหัส WY21 และ WY 43 (ภาพที่ 4.6)



ภาพที่ 4.4 แสดงการสร้างเอนไซม์โปรตีเอสย่อยอาหาร SKA จากวงใสรอบโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากศูนย์การศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบนอันเนื่องมาจากพระราชดำริ



ภาพที่ 4.5 แสดงการสร้างเอนไซม์โปรตีเอสย่อยอาหาร SKA จากวงใสรอบโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากสถานีวิจัยนันทวิทยาการป่าชายเลนที่ 2 (ท่าสนอน จันทบุรี)



ภาพที่ 4.6 แสดงการสร้างเอนไซม์โปรตีเอสย่อยอาหาร SKA จากวงใสรอบโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากบริเวณสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 3 (ขลุง จันทบุรี)

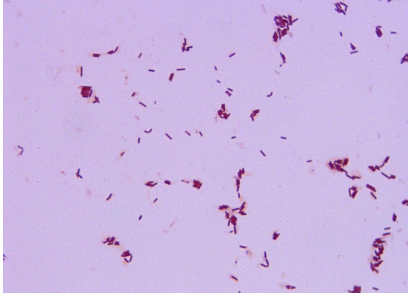
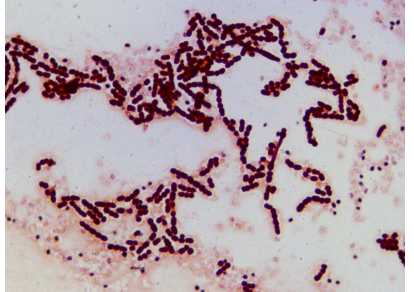
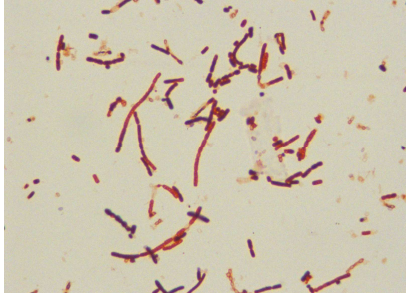
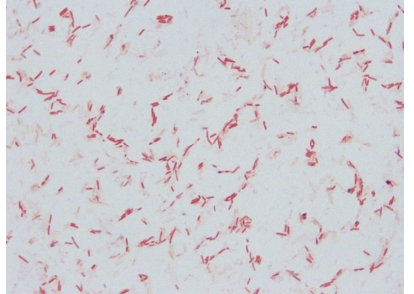
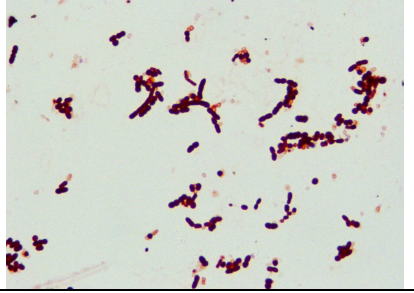
จากผลการทดลองเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากศูนย์การศึกษาพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบนอันเนื่องมาจากพระราชดำริ พบจำนวนเชื้อที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรตีเอสมากที่สุด รองลงมาจะเป็นเชื้อที่แยกได้จากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 ดังนั้นในการศึกษาขั้นต่อไปจะนำเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ที่ผ่านการคัดกรองความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรตีเอสไปตรวจสอบลักษณะและจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอส

การตรวจสอบลักษณะและจำแนกชนิดของแบคทีเรียชอบเกลือที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอส

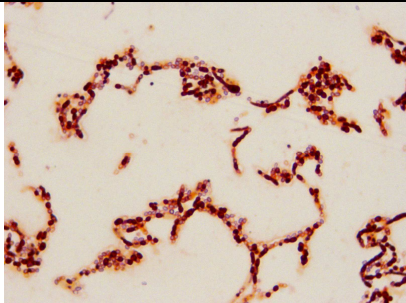
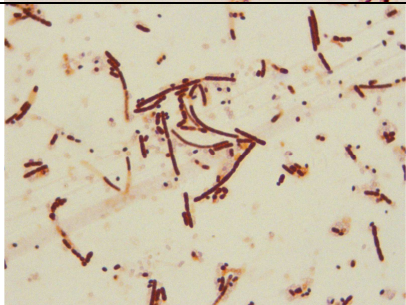
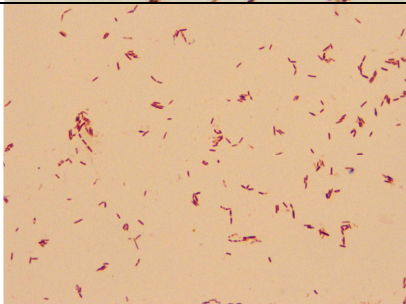
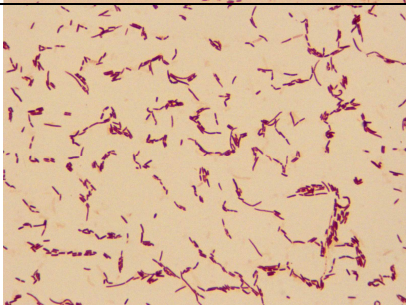
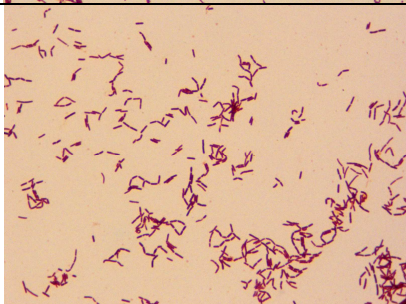
1. การตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่คัดเลือก

นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ จำนวนทั้งหมด 46 ไอโซเลต มาศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาโดยการย้อมสีแบบแกรม และส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.5-4.7

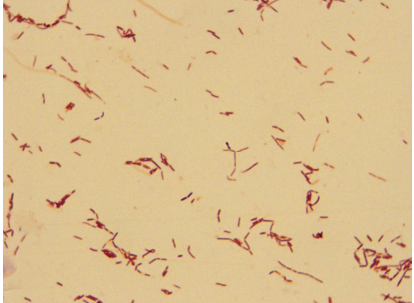
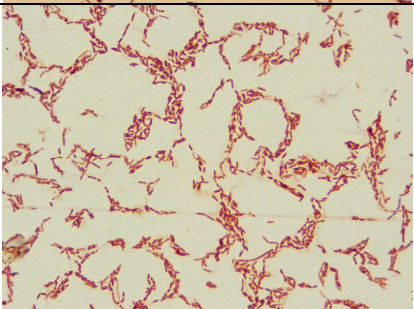
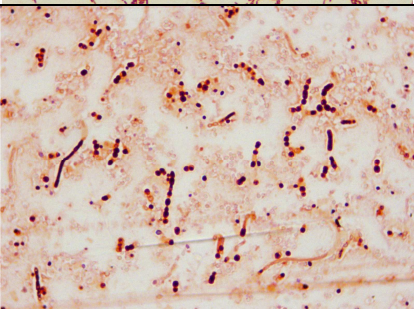
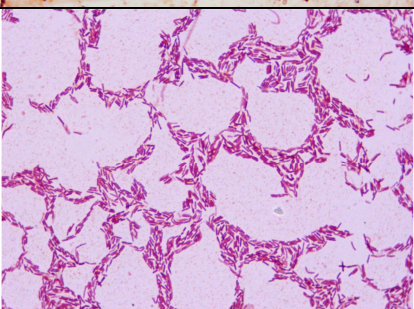
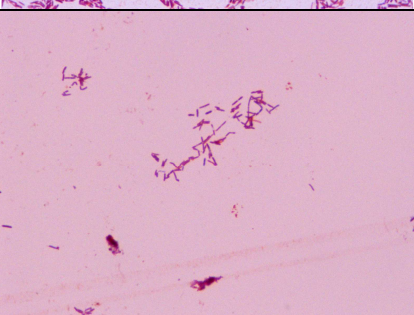
ตารางที่ 4.5 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลน บริเวณศูนย์การศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบนอันเนื่องมาจากพระราชดำริ

รหัสเชื้อ	การติดสีแกรม	รูปร่าง	ลักษณะเซลล์ที่กำลังขยาย 1,000x
KB11	แกรมบวก	รูปท่อน	
KB12	แกรมบวก	รูปไข่เรียงต่อกันเป็นสาย	
KB13	แกรมบวก	รูปท่อนเรียงต่อกันเป็นสาย	
KB14	แกรมบวก	รูปท่อน	
KB15	แกรมบวก	รูปไข่	

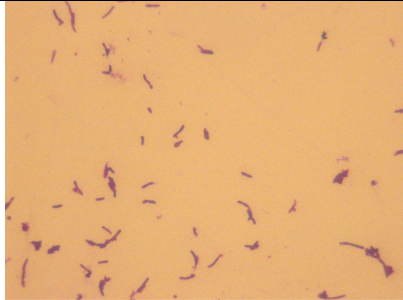
ตารางที่ 4.5 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	การติดสีแกรม	รูปร่าง	ลักษณะเซลล์ที่กำลังขยาย 1,000x
KB16	แกรมบวก	รูปไข่เรียงต่อกันเป็นสาย	
KB17	แกรมบวก	รูปท่อนเรียงต่อกันเป็นสาย	
KB18	แกรมบวก	รูปท่อน	
KB100	แกรมบวก	รูปท่อน	
KB111	แกรมบวก	รูปท่อน	

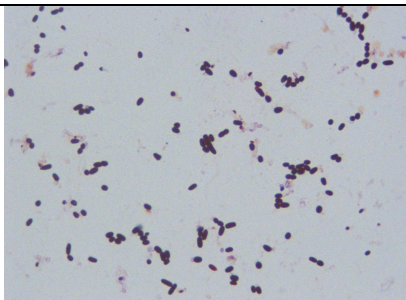
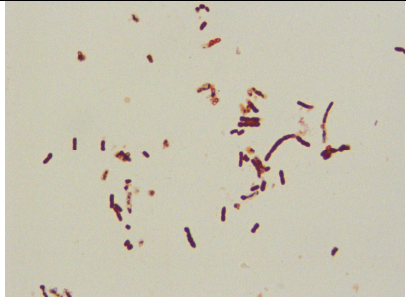
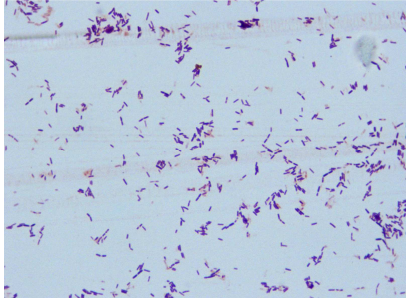
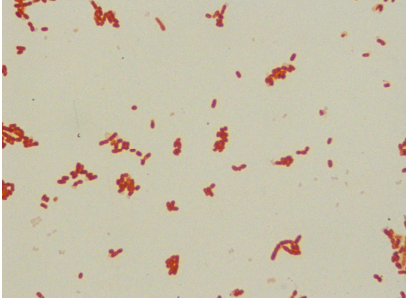
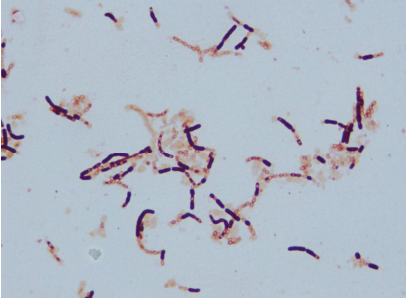
ตารางที่ 4.5 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	การติดสีแกรม	รูปร่าง	ลักษณะเซลล์ที่กำลังขยาย 1,000x
KB112	แกรมบวก	รูปท่อน	
KB113	แกรมบวก	รูปท่อน	
KB114	แกรมบวก	รูปไข่	
KB115	แกรมบวก	รูปท่อน	
KB41	แกรมบวก	รูปท่อน	

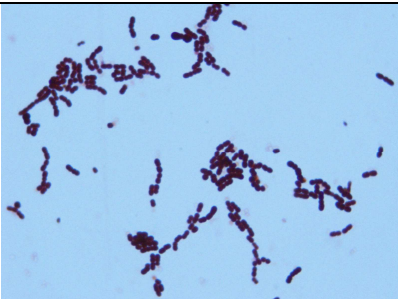
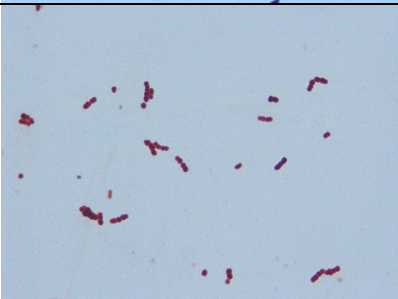
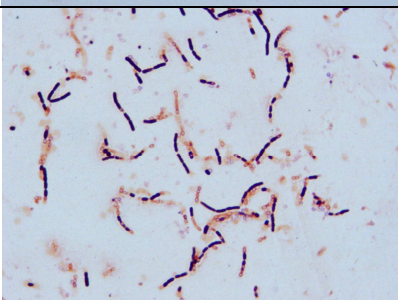
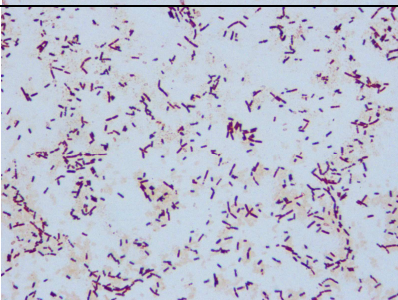
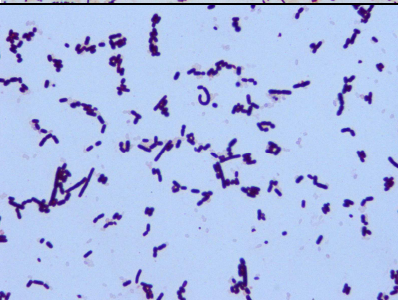
ตารางที่ 4.5 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	การติดสีแกรม	รูปร่าง	ลักษณะเซลล์ที่กำลังขยาย 1,000x
KB42	แกรมบวก	รูปท่อน	

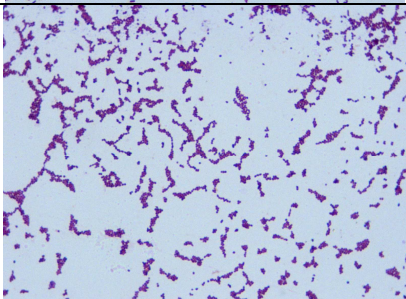
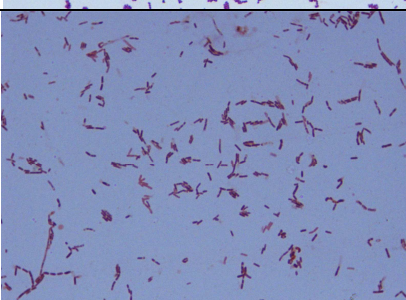
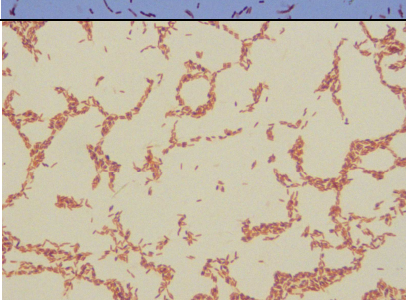
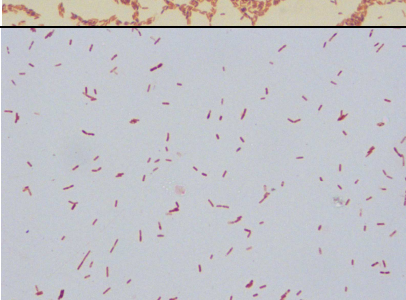
ตารางที่ 4.6 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลน บริเวณสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 (ท่าสอน จังหวัดบุรีรัมย์)

รหัสเชื้อ	การติดสีแกรม	รูปร่าง	ลักษณะเซลล์ที่กำลังขยาย 1,000x
TS11	แกรมบวก	รูปไข่	
TS12	แกรมบวก	รูปไข่	
TS13	แกรมบวก	รูปท่อน	
TS14	แกรมบวก	รูปไข่	
TS21	แกรมบวก	รูปท่อน	

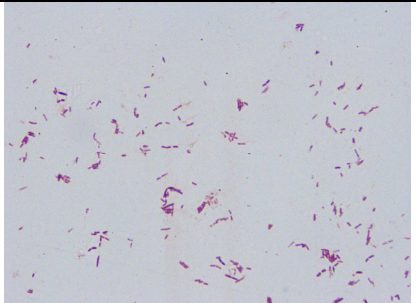
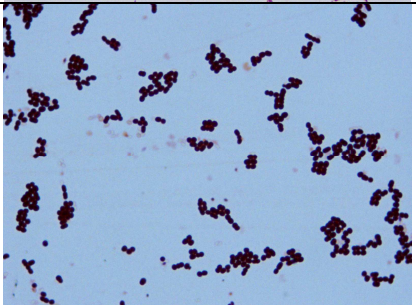
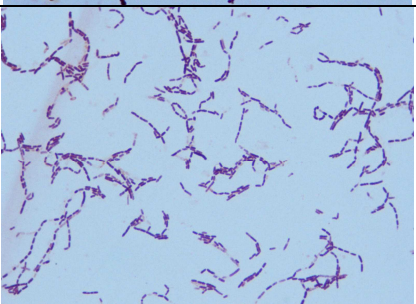
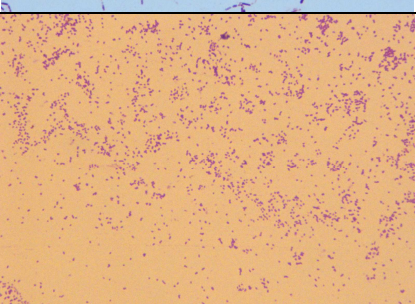
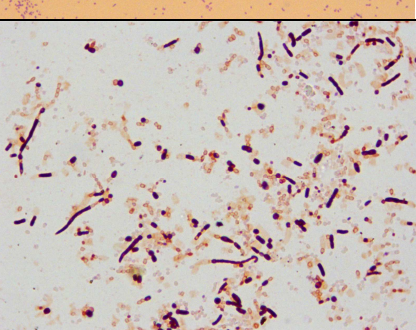
ตารางที่ 4.6 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	การติดสีแกรม	รูปร่าง	ลักษณะเซลล์ที่กำลังขยาย 1,000x
TS22	แกรมบวก	รูปไข่	
TS23	แกรมบวก	รูปไข่	
TS24	แกรมบวก	รูปท่อน	
TS25	แกรมบวก	รูปท่อน	
TS26	แกรมบวก	รูปท่อน	

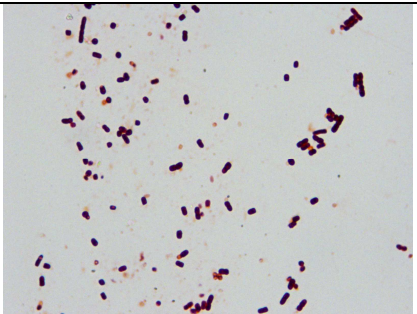
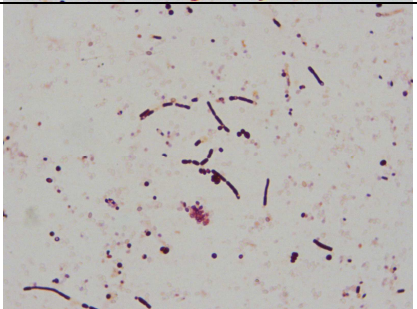
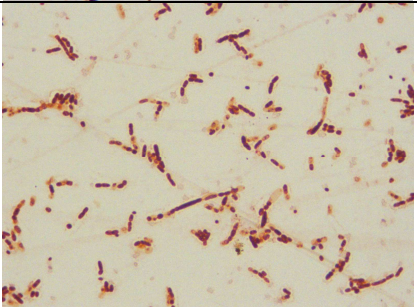
ตารางที่ 4.6 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	การติดสีแกรม	รูปร่าง	ลักษณะเซลล์ที่กำลังขยาย 1,000x
TS31	แกรมบวก	รูปท่อน	
TS32	แกรมบวก	รูปกลม	
TS33	แกรมบวก	รูปท่อน	
TS34	แกรมบวก	รูปท่อน	
TS35	แกรมบวก	รูปท่อน	

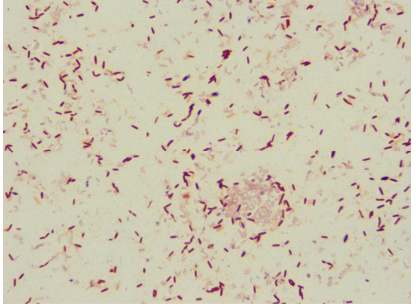
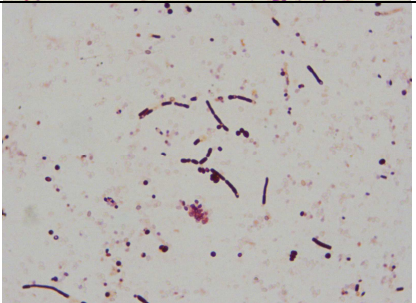
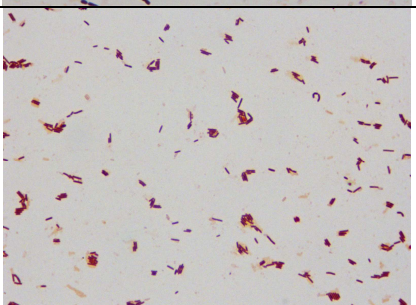
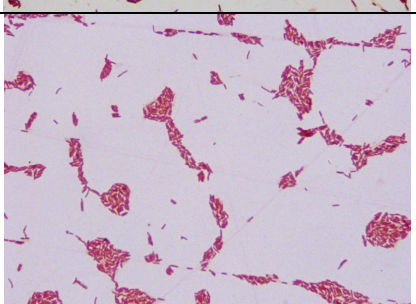
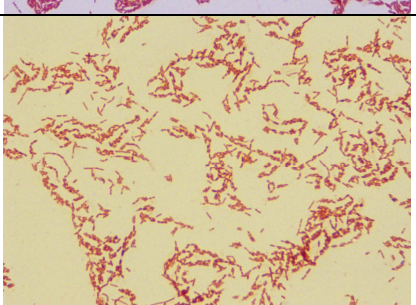
ตารางที่ 4.6 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	การติดสีแกรม	รูปร่าง	ลักษณะเซลล์ที่กำลังขยาย 1,000x
TS36	แกรมบวก	รูปท่อน	
TS41	แกรมบวก	รูปไข่	
TS42	แกรมบวก	รูปท่อน	
TS43	แกรมบวก	ท่อนสั้น	
TS44	แกรมบวก	รูปท่อน	

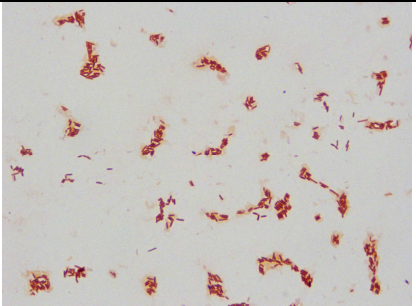
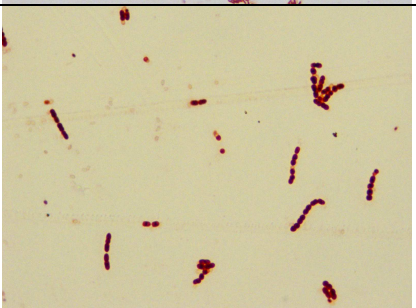
ตารางที่ 4.6 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	การติดสีแกรม	รูปร่าง	ลักษณะเซลล์ที่กำลังขยาย 1,000x
TS45	แกรมบวก	รูปไข่	
TS46	แกรมบวก	รูปท่อน	
TS47	แกรมบวก	รูปท่อน	

ตารางที่ 4.7 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลน บริเวณสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 3 (ขลุง จันทบุรี)

รหัสเชื้อ	การติดสีแกรม	รูปร่าง	ลักษณะเซลล์ที่กำลังขยาย 1,000x
WY11	แกรมบวก	รูปท่อน	
WY21	แกรมบวก	รูปท่อน	
WY22	แกรมบวก	รูปท่อน	
WY41	แกรมบวก	รูปท่อน	
WY42	แกรมบวก	รูปท่อน	

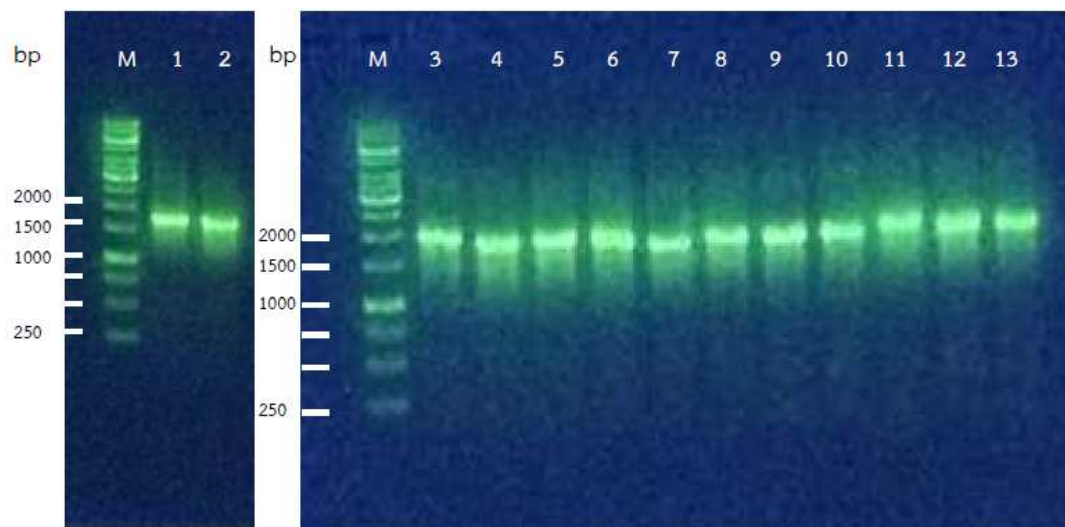
ตารางที่ 4.7 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	การติดสีแกรม	รูปร่าง	ลักษณะเซลล์ที่กำลังขยาย 1,000x
WY43	แกรมบวก	รูปไข่	
WY44	แกรมบวก	รูปไข่เรียงต่อกันเป็นสาย	

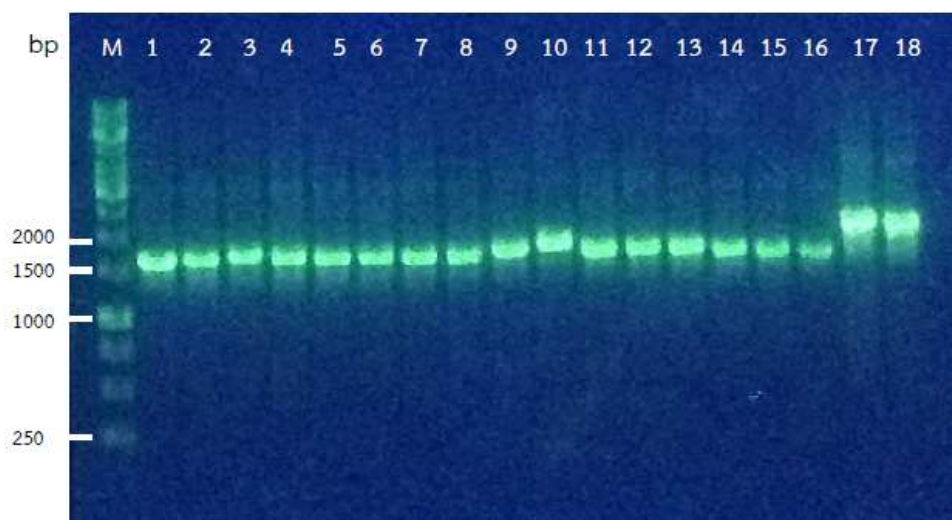
จากผลการทดลองในตารางที่ 4.5-4.7 จะเห็นว่าเชื้อที่แยกได้เป็นแบคทีเรียแกรมบวกทั้งหมด และมีลักษณะรูปร่างส่วนใหญ่เป็นรูปท่อน และรูปไข่ บางชนิดสามารถสร้างเอนโดสปอร์ได้

2. การจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์โปรตีเอส

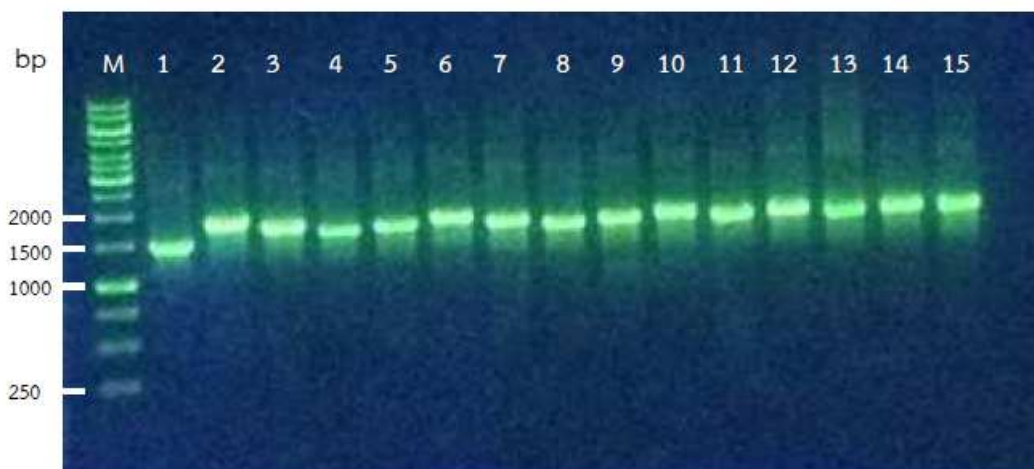
นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ จำนวนทั้งหมด 46 ไอโซเลต มาจำแนกชนิดของแบคทีเรีย โดยทำการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีด้วยวิธี 16S rDNA sequence analysis หลังจากทำการเพิ่มปริมาณ 16S rRNA gene ด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) แล้วได้ทำการการตรวจสอบผลของ DNA ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis เพื่อดูขนาดของ 16S rRNA gene ได้ผลดังภาพที่ 4.7-4.9 ซึ่งมีขนาดประมาณ 1500-1600 bp



ภาพที่ 4.7 แสดงการตรวจ band ของ DNA จากแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ที่มีวงไฮดรอกซีโลนีนมากกว่า 10 มิลลิเมตร โดย lane M คือ 1 kb DNA ladder และ lanes 1-13 คือ เชื้อรหัส KB100, KB112, KB14, KB111, KB113, KB42, TS13, TS26, TS33, TS35, TS42, WY21 และ WY43 ตามลำดับ



ภาพที่ 4.8 แสดงการตรวจ band ของ DNA จากแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ที่มีวงไฮดรอกซีโลนีนน้อยกว่า 10 มิลลิเมตร โดย lane M คือ 1 kb DNA ladder และ lanes 1-18 คือ เชื้อรหัส TS11, TS12, TS14, TS21, TS22, TS23, TS24, TS25, TS31, TS32, TS34, TS36, TS41, TS43, TS44, TS45, TS46 และ TS47ตามลำดับ ที่แยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลน บริเวณสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 (ท่าสอน จันทบุรี)



ภาพที่ 4.9 แสดงการตรวจ band ของ DNA จากแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ที่มีวงไฮดรอกซิลน้อยกว่า 10 มิลลิเมตร โดย lane M คือ 1 kb DNA ladder และ lanes 1-5 คือ เชื้อรหัส WY11, WY22, WY41, WY42 และ WY44 ตามลำดับ ที่แยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลน บริเวณสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 3 (ขลุ้ง จันทบุรี) และ lanes 6-15 คือ เชื้อรหัส KB11, KB12, KB13, KB15, KB16, KB17, KB18, KB41, KB114 และ KB115 ตามลำดับ ที่แยกได้จากบริเวณศูนย์การศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบนอันเนื่องมาจากพระราชดำริ

หลังจากนั้นนำยีนที่ได้จากการเพิ่มปริมาณไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ด้วยวิธี DNA sequencing โดยใช้ Primer 27F และ 1492R ตามที่กล่าวไว้ในบทที่ 3 และใช้เครื่อง Genetic Analyzer หลังจากทราบผล DNA sequences แล้วได้นำผลที่ได้ของ 16S rRNA ทั้ง 46 ไอโซเลต มาทำการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของแบคทีเรีย โดยวิเคราะห์ความเหมือนและความใกล้เคียง (identity) ด้วยลำดับเบสกับ 16S rRNA ที่มีอยู่ DNA DataBank โดยใช้ blast homology search ผ่านเว็บไซต์ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> ได้ผลดังตารางที่ 4.8-4.10

ตารางที่ 4.8 แสดงชนิดของแบคทีเรียที่มีค่าความเหมือนหรือความใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลน บริเวณศูนย์การศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบนอันเนื่องมาจากพระราชดำริ

รหัสเชื้อ	ชนิดของแบคทีเรีย ที่เหมือนและใกล้เคียง	ค่าความเหมือนและใกล้เคียง (Identity) (%)
KB11	Bacillus aquimaris strain TF-12	99.50% (1390/1397)
	Bacillus marisflavi strain TF-11	98.35% (1374/1397)
KB12	Bacillus aryabhattai strain B8W22	100% (1275/1275)
KB13	Bacillus aryabhattai strain B8W22	100% (1273/1273)
KB14	Bacillus aquimaris strain TF-12	99.56% (1123/1128)
	Bacillus marisflavi strain TF-11	98.67% (1111/1126)
KB15	Bacillus aryabhattai strain B8W22	100% (1286/1286)
KB16	Bacillus aryabhattai strain B8W22	100% (1321/1321)
KB17	Bacillus aryabhattai strain B8W22	100% (1284/1284)
KB18	Bacillus aquimaris strain TF-12	99.50% (981/986)
	Bacillus marisflavi strain TF-11	98.68% (974/987)
KB100	Bacillus aquimaris strain TF-12	99.13% (1373/1385)
	Bacillus marisflavi strain TF-11	98.56% (1365/1385)
KB111	Bacillus aquimaris strain TF-12	99.28% (1381/1391)
	Bacillus marisflavi strain TF-11	98.42% (1369/1391)
KB112	Bacillus aquimaris strain TF-12	99.47% (1134/1140)
	Bacillus marisflavi strain TF-11	98.60% (1125/1141)
KB113	Bacillus aryabhattai strain B8W22	99.93% (1383/1384)
	Bacillus megaterium strain NBRC 15308	99.78% (1381/1384)
	Bacillus megaterium strain ATCC 14581	99.71% (1380/1384)
	Bacillus megaterium QM B1551 strain	99.71% (1380/1384)
KB114	Bacillus aquimaris strain TF-12	99.51% (1014/1019)
	Bacillus marisflavi strain TF-11	98.72% (1006/1019)
KB115	Bacillus aryabhattai strain B8W22	99.85% (1369/1371)
	Bacillus megaterium strain NBRC 15308	99.71% (1367/1371)
	Bacillus megaterium strain ATCC 14581	99.64% (1366/1371)
	Bacillus megaterium QM B1551 strain	99.64% (1366/1371)
	Bacillus megaterium strain IAM 13418	99.64% (1366/1371)
KB41	Bacillus aquimaris strain TF-12	99.34% (910/916)
	Bacillus marisflavi strain TF-11	98.47% (903/917)

ตารางที่ 4.8 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ชนิดของแบคทีเรีย ที่เหมือนและใกล้เคียง	ค่าความเหมือนและใกล้เคียง (Identity) (%)
KB42	Bacillus aquimaris strain TF-12	99.50% (1390/1397)
	Bacillus marisflavi strain TF-11	98.35% (1374/1397)

ตารางที่ 4.9 แสดงชนิดของแบคทีเรียที่มีค่าความเหมือนหรือความใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลน บริเวณสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 (ท่าสนอน จังหวัดบุรีรัมย์)

รหัสเชื้อ	ชนิดของแบคทีเรีย ที่เหมือนและใกล้เคียง	ค่าความเหมือนและใกล้เคียง (Identity) (%)
TS11	Bacillus aryabhattai strain B8W22	100% (1276/1276)
TS12	Bacillus aryabhattai strain B8W22	100% (1292/1292)
TS13	Bacillus aquimaris strain TF-12	99.06% (1366/1379)
	Bacillus marisflavi strain TF-11	98.40% (1356/1378)
TS14	Bacillus megaterium strain NBRC 15308	100% (1276/1276)
TS21	Bacillus megaterium strain NBRC 15308	100% (1375/1375)
TS22	Bacillus aryabhattai strain B8W22	99.85% (1373/1375)
	Bacillus megaterium strain NBRC 15308	99.71% (1371/1375)
	Bacillus megaterium strain ATCC 14581	99.63% (1370/1375)
	Bacillus megaterium QM B1551 strain	99.63% (1370/1375)
	Bacillus megaterium strain IAM 13418	99.63% (1370/1375)
TS23	Bacillus aryabhattai strain B8W22	100% (1376/1376)
TS24	Bacillus aryabhattai strain B8W22	99.78% (1372/1375)
	Bacillus megaterium strain NBRC 15308	99.78% (1372/1375)
	Bacillus megaterium strain ATCC 14581	99.71% (1371/1375)
	Bacillus megaterium strain IAM 13418	99.71% (1371/1375)
	Bacillus megaterium QM B1551 strain	99.56% (1369/1375)
TS25	Bacillus amyloliquefaciens subsp. Plantarum strain FZB42	99.93% (1362/1363)
	Bacillus methylotrophicus strain CBMB205	99.85% (1362/1364)
	Bacillus amyloliquefaciens strain MPA1034	99.78% (1360/1363)
	Bacillus amyloliquefaciens strain NBRC 15535	99.78% (1360/1363)

ตารางที่ 4.9 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ชนิดของแบคทีเรีย ที่เหมือนและใกล้เคียง	ค่าความเหมือนและใกล้เคียง (Identity) (%)
TS26	Bacillus aryabhattai strain B8W22	100% (1380/1380)
TS31	Bacillus aquimaris strain TF-12 Bacillus vietnamensis strain 15-1 Bacillus marisflavi strain TF-11	99.48% (1335/1342) 98.79% (1304/1320) 98.40% (1356/1378)
TS32	Rhodococcus equi strain ATCC 6939 Rhodococcus equi strain DSM 20307 Rhodococcus kummingensis strain YIM 45607	99.92% (1314/1315) 99.92% (1314/1315) 98.25% (1292/1315)
TS33	Bacillus aquimaris strain TF-12 Bacillus vietnamensis strain 15-1 Bacillus marisflavi strain TF-11	99.48% (1362/1369) 98.80% (1328/1344) 98.39% (1347/1369)
TS34	Bacillus aquimaris strain TF-12 Bacillus vietnamensis strain 15-1 Bacillus marisflavi strain TF-11	99.47% (1325/1332) 98.78% (1300/1316) 98.42% (1311/1332)
TS35	Bacillus aquimaris strain TF-12 Bacillus marisflavi strain TF-11	99.47% (1117/1123) 98.66% (1108/1123)
TS36	Bacillus aquimaris strain TF-12 Bacillus marisflavi strain TF-11	99.46% (1096/1102) 98.55% (1091/1107)
TS41	Bacillus megaterium strain NBRC 15308 Bacillus megaterium strain ATCC 14581 Bacillus megaterium strain IAM 13418 Bacillus megaterium QM B1551 strain	99.85% (1360/1362) 99.78% (1359/1362) 99.78% (1359/1362) 99.71% (1358/1362)
TS42	Bacillus aquimaris strain TF-12 Bacillus vietnamensis strain 15-1 Bacillus marisflavi strain TF-11	99.42% (1376/1384) 98.90% (1347/1362) 98.41% (1362/1384)
TS43	Bacillus aryabhattai strain B8W22	100% (1273/1273)
TS44	Bacillus aryabhattai strain B8W22 Bacillus megaterium strain NBRC 15308 Bacillus megaterium strain ATCC 14581 Bacillus megaterium strain IAM 13418 Bacillus megaterium QM B1551 strain	99.93% (1385/1386) 99.93% (1385/1386) 99.86% (1384/1386) 99.78% (1383/1386) 99.71% (1382/1386)

ตารางที่ 4.9 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ชนิดของแบคทีเรีย ที่เหมือนและใกล้เคียง	ค่าความเหมือนและใกล้เคียง (Identity) (%)
TS45	Bacillus aryabhattai strain B8W22	99.85% (1374/1376)
	Bacillus megaterium strain NBRC 15308	99.71% (1372/1376)
	Bacillus megaterium strain ATCC 14581	99.64% (1371/1376)
	Bacillus megaterium QM B1551 strain	99.64% (1371/1376)
	Bacillus megaterium strain IAM 13418	99.64% (1371/1376)
TS46	Bacillus aryabhattai strain B8W22	100% (1371/1371)
TS47	Bacillus aryabhattai strain B8W22	100% (1289/1289)
TS26	Bacillus aryabhattai strain B8W22	100% (1380/1380)
TS26	Bacillus aryabhattai strain B8W22	100% (1380/1380)

ตารางที่ 4.10 แสดงชนิดของแบคทีเรียที่มีค่าความเหมือนหรือความใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลน บริเวณสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 3 (ขลุ้ง จันทบุรี)

รหัสเชื้อ	ชนิดของแบคทีเรีย ที่เหมือนและใกล้เคียง	ค่าความเหมือนและใกล้เคียง (Identity) (%)
WY11	Bacillus gibsonii strain DSM 8722	99.85% (1344/1346)
	Bacillus plakortidis strain P203	99.26% (1337/1347)
	Bacillus murimartini strain LMG 21005	99.03% (1334/1347)
WY21	Bacillus aquimaris strain TF-12	99.50% (1382/1389)
	Bacillus marisflavi strain TF-11	98.34% (1366/1389)
WY22	Bacillus aquimaris strain TF-12	99.40% (1336/1344)
	Bacillus vietnamensis strain 15-1	98.72% (1315/1332)
	Bacillus marisflavi strain TF-11	98.51% (1321/1341)
WY41	Bacillus aquimaris strain TF-12	99.44% (1060/1066)
	Bacillus marisflavi strain TF-11	98.59% (1052/1067)
WY42	Bacillus aquimaris strain TF-12	99.44% (1058/1064)
	Bacillus marisflavi strain TF-11	98.59% (1049/1064)
WY43	Bacillus gibsonii strain DSM 8722	99.85% (1349/1351)
	Bacillus plakortidis strain P203	99.26% (1342/1352)
	Bacillus murimartini strain LMG 21005	99.04% (1339/1352)

ตารางที่ 4.10 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ชนิดของแบคทีเรีย ที่เหมือนและใกล้เคียง	ค่าความเหมือนและใกล้เคียง (Identity) (%)
WY44	Bacillus aryabhattai strain B8W22	99.20% (1359/1370)
	Bacillus megaterium strain NBRC 15308	99.05% (1357/1370)
	Bacillus megaterium strain ATCC 14581	98.98% (1356/1370)
	Bacillus megaterium QM B1551 strain	98.98% (1356/1370)
	Bacillus megaterium strain IAM 13418	98.98% (1356/1370)

จากผลการวิเคราะห์ค่าความเหมือนและใกล้เคียงกันของ DNA sequences พบว่า เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ทั้ง 46 ไอโซเลต อาจมีทั้งที่เป็นเชื้อชนิดเดียวกันและเชื้อต่างชนิดกัน จึงได้มีการนำ DNA sequences ของเชื้อมาวิเคราะห์เปรียบเทียบโดยการนำ Alignment เพื่อศึกษาความเหมือนและความใกล้เคียงกันของ sequence โดยใช้โปรแกรม CLUSTALW2 และ gene doc ได้ผลดังรูปที่ 4.10

KB11	: GTCGAGCGGATTGATGGGAGC	TTGCT	-CCCTGATATCAGCGGCGGACGGGTGAG	TAACACGTGGGT	: 65
KB12	:				: -
KB13	:				: -
KB14	: GTCGAGCGGATTGATGGGAGC	TTGCT	-CCCTGATATCAGCGGCGGACGGGTGAG	TAACACGTGGGT	: 65
KB15	:				: -
KB16	: -----ATTAGAAGC	TTGCTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAG	TAACACGTGGGC		: 54
KB17	:				: -
KB18	:			GGGTGAGTAACACGTGGGT	: 19
KB41	:			TAACACGTGGGT	: 12
KB42	: GTCGAGCGGATTGATGGGAGC	TTGCT	-CCCTGATATCAGCGGCGGACGGGTGAG	TAACACGTGGGT	: 65
KB100	: -----TGGGAGC	TTGCT	-CCCTGATATCAGCGGCGGACGGGTGAG	TAACACGTGGGT	: 51
KB111	: -TCGAGCGGATTGATGGGAGC	TTGCT	-CCCTGATATCAGCGGCGGACGGGTGAG	TAACACGTGGGT	: 64
KB112	: -TCGAGCGGATTGATGGGAGC	TTGCT	-CCCTGATATCAGCGGCGGACGGGTGAG	TAACACGTGGGT	: 64
KB113	: -----CTGATTAGAAGC	TTGCTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAG	TAACACGTGGGC		: 57
KB114	:			GGACGGGTGAGTAACACGTGGGT	: 23
KB115	: -----TTGCTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAG	TAACACGTGGGC			: 45
TS11	:				: -
TS12	:				: -
TS13	: -----GGGAGC	TTGCT	-CCCTGATATCAGCGGCGGACGGGTGAG	TAACACGTGGGT	: 50
TS14	:				: -
TS21	: -----TTGCTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAG	TAACACGTGGGC			: 45
TS22	: -----TTGCTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAG	TAACACGTGGGC			: 45
TS23	: -----AACTGATTAGAAGC	TTGCTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAG	TAACACGTGGGC		: 59
TS24	: -----TTGCTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAG	TAACACGTGGGC			: 45
TS25	: -----GGGAGC	TTGCT	-CCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAG	TAACACGTGGGT	: 50
TS26	: -----TTAGAAGC	TTGCTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAG	TAACACGTGGGC		: 53
TS31	:			GGACGGGTGAGTAACACGTGGGT	: 23
TS32	:			GGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGT	: 26
TS33	: -----AGC	TTGCT	-CCCTGATATCAGCGGCGGACGGGTGAG	TAACACGTGGGT	: 47
TS34	:			GGGTGAGTAACACGTGGGT	: 19
TS35	: -----TGGGAGC	TTGCT	-CCCTGATATCAGCGGCGGACGGGTGAG	TAACACGTGGGT	: 51
TS36	: -----TTGCT	-CCCTGATATCAGCGGCGGACGGGTGAG	TAACACGTGGGT		: 44
TS41	: -----TTGCTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAG	TAACACGTGGGC			: 45
TS42	: GTCGAGCGGATTGATGGGAGC	TTGCT	-CCCTGATATCAGCGGCGGACGGGTGAG	TAACACGTGGGT	: 65
TS43	:				: -
TS44	: -----TGATTAGAAGC	TTGCTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAG	TAACACGTGGGC		: 56
TS45	: -----CTTGCTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAG	TAACACGTGGGC			: 46
TS46	: -----CTTGCTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAG	TAACACGTGGGC			: 46
TS47	:				: -
WY11	: -----TTAGCGGCGGACGGGTGAG	TAACACGTGGGC			: 31
WY21	: ---GAGCGGATTGATGGGAGC	TTGCT	-CCCTGATATCAGCGGCGGACGGGTGAG	TAACACGTGGGT	: 62
WY22	: -----GATATCAGCGGCGGACGGGTGAG	TAACACGTGGGT			: 35
WY41	: -----CTTGCT	-CCCTGATATCAGCGGCGGACGGGTGAG	TAACACGTGGGT		: 45
WY42	: -----TTGCT	-CCCTGATATCAGCGGCGGACGGGTGAG	TAACACGTGGGT		: 44
WY43	: -----CGTTAGCGGCGGACGGGTGAG	TAACACGTGGGC			: 33
WY44	: -----GCTTGCTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAG	TAACACGTGGGC			: 47

ภาพที่ 4.10 แสดงผล sequence alignment ของ 16S rRNA ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ จำนวนทั้งหมด 46 ไอโซเลต

```

KB11 : AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATAACTCAATTTCTCTCG : 131
KB12 : -----AATACCGGATAGGATCTTCTCCTT : 24
KB13 : -----AATACCGGATAGGATCTTCTCCTT : 24
KB14 : AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATAACTCAATTTCTCTCG : 131
KB15 : -----TAATACCGGATAGGATCTTCTCCTT : 25
KB16 : AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTT : 120
KB17 : -----AATACCGGATAGGATCTTCTCCTT : 24
KB18 : AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATAACTCAATTTCTCTCG : 85
KB41 : AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATAACTCAATTTCTCTCG : 78
KB42 : AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATAACTCAATTTCTCTCG : 131
KB100 : AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATAACTCAATATCTCTCG : 117
KB111 : AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATAACTCAATTTCTCTCG : 130
KB112 : AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATAACTCAATTTCTCTCG : 130
KB113 : AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGAACTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTT : 123
KB114 : AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATAACTCAATTTCTCTCG : 89
KB115 : AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGATACTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTT : 111
TS11 : -----TAATACCGGATAGGATCTTCTCCTT : 25
TS12 : -----TACCGGATAGGATCTTCTCCTT : 22
TS13 : AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATAACTCAATTTCTCTCG : 116
TS14 : -----TAATACCGGATAGGATCTTCTCCTT : 25
TS21 : AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTT : 111
TS22 : AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGATACTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTT : 111
TS23 : AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTT : 125
TS24 : AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGATACTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTT : 111
TS25 : AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCG : 116
TS26 : AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTT : 119
TS31 : AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATAACTCAATTTCTCTCG : 89
TS32 : GATCTGCCCTGCACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGAGCTCCTGTCTG : 92
TS33 : AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATAACTCAATTTCTCTCG : 113
TS34 : AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATAACTCAATTTCTCTCG : 85
TS35 : AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATAACTCAATTTCTCTCG : 117
TS36 : AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATAACTCAATTTCTCTCG : 110
TS41 : AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGATACTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTT : 111
TS42 : AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATAACTCAATTTCTCTCG : 131
TS43 : -----TAATACCGGATAGGATCTTCTCCTT : 25
TS44 : AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTT : 122
TS45 : AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGATACTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTT : 112
TS46 : AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTT : 112
TS47 : -----TAATACCGGATAGGATCTTCTCCTT : 25
WY11 : AACCTACCTTATCGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATAACATCTAGCACCT : 97
WY21 : AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATAACTCAATTTCTCTCG : 128
WY22 : AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATAACTCAATTTCTCTCG : 101
WY41 : AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATAACTCAATTTCTCTCG : 111
WY42 : AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATAACTCAATTTCTCTCG : 110
WY43 : AACCTACCTTATCGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATAACATCTAGCACCT : 99
WY44 : AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGATACTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTT : 113

```

ภาพที่ 4.10 (ต่อ)

```

KB11 : CATGAGGAAATGTTGAAAGGTGGCTTTTAGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTA : 197
KB12 : CATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGG-CTATCACTTACAGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTA : 89
KB13 : CATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGG-CTATCACTTACAGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTA : 89
KB14 : CATGAGGAAATGTTGAAAGGTGGCTTT----- : 157
KB15 : CATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGG-CTATCACTTACAGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTA : 90
KB16 : CATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGG-CTATCACTTACAGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTA : 185
KB17 : CATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGG-CTATCACTTACAGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTA : 89
KB18 : CATGAGGAAATGTTGAAAGGTGG----- : 108
KB41 : CATGAGGAAATGTTGAAAGGTGGCTTT----- : 104
KB42 : CATGAGGAAATGTTGAAAGGTGGCTTTTAGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTA : 197
KB100 : CATGAGGAAATGTTGAAAGATGGCTTCTTGCTATCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTA : 183
KB111 : CATGAGGAAATGTTGAAAGATGGCTTCTAGCTATCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTA : 196
KB112 : CATGAGGAAATGTTGAAAGGTGGCTTCCG----- : 159
KB113 : CATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGG-CTATCACTTACAGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTA : 188
KB114 : CATGAGGAAATGTTGAAA----- : 107
KB115 : CATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGG-CTATCACTTACAGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTA : 176
TS11 : CATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGG-CTATCACTTACAGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTA : 90
TS12 : CATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGG-CTATCACTTACAGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTA : 87
TS13 : CATGAGGAAATGTTGAAAGGTGGCTTCGG-CTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTA : 181
TS14 : CATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGG-CTATCACTTACAGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTA : 90
TS21 : CATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGG-CTATCACTTACAGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTA : 176
TS22 : CATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGG-CTATCACTTACAGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTA : 176
TS23 : CATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGG-CTATCACTTACAGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTA : 190
TS24 : CATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGG-CTATCACTTACAGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTA : 176
TS25 : CATGGTTCAGACATGAAAGGTGGCTTCGG-CTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTA : 181
TS26 : CATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGG-CTATCACTTACAGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTA : 184
TS31 : CATGAGGAAATGTTGAAAGGTGGCTTTTAGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTA : 155
TS32 : CATGGCGGGGGTTGGAAAGGTTTACTGGTGAG-----GATGGGACCCGCGGCCTATCAGCTT : 149
TS33 : CATGAGGAAATGTTGAAAGGTGGCTTTTAGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTA : 179
TS34 : CATGAGGAAATGTTGAAAGGTGGCTTTTAGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTA : 151
TS35 : CATGAGGAAATGTTGAAAGGTGGCTTG----- : 144
TS36 : CATGAGGAAATGTTGAAAGGTGGTTCG----- : 137
TS41 : CATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGG-CTATCACTTACAGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTA : 176
TS42 : CATGAGGAAATGTTGAAAGGTGGCTTCTAGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTA : 197
TS43 : CATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGG-CTATCACTTACAGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTA : 90
TS44 : CATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGG-CTATCACTTACAGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTA : 187
TS45 : CATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGG-CTATCACTTACAGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTA : 177
TS46 : CATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGG-CTATCACTTACAGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTA : 177
TS47 : CATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGG-CTATCACTTACAGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTA : 90
WY11 : CCTGGTGCCGGATTAAAAGAGGCCTTCTTGCTCTCAGATGAGATGGGACCCGCGGCGCATTAGCTA : 163
WY21 : CATGAGGAAATGTTGAAAGGTGGCTTTTAGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTA : 194
WY22 : CATGAGGAAATGTTGAAAGGTGGCTTTTAGCTATCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTA : 167
WY41 : CATGAGGAAATGTTGAAAGGTGGCT----- : 136
WY42 : CATGAGGAAATGTTGAAA----- : 128
WY43 : CCTGGTGCCGGATTAAAAGAGGCCTTCTTGCTCTCAGATGAGATGGGACCCGCGGCGCATTAGCTA : 165
WY44 : CATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGG-CTATCACTTACAGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTA : 178

```

ภาพที่ 4.10 (ต่อ)

KB11	: GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC	: 263
KB12	: GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC	: 155
KB13	: GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC	: 155
KB14	: -----	: -
KB15	: GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC	: 156
KB16	: GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC	: 251
KB17	: GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC	: 155
KB18	: -----	: -
KB41	: -----	: -
KB42	: GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC	: 263
KB100	: GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC	: 249
KB111	: GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC	: 262
KB112	: -----	: -
KB113	: GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC	: 254
KB114	: -----	: -
KB115	: GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC	: 242
TS11	: GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC	: 156
TS12	: GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC	: 153
TS13	: GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC	: 247
TS14	: GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC	: 156
TS21	: GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC	: 242
TS22	: GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC	: 242
TS23	: GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC	: 256
TS24	: GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC	: 242
TS25	: GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC	: 247
TS26	: GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC	: 250
TS31	: GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC	: 221
TS32	: GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC	: 215
TS33	: GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC	: 245
TS34	: GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC	: 217
TS35	: -----	: -
TS36	: -----	: -
TS41	: GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC	: 242
TS42	: GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC	: 263
TS43	: GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC	: 156
TS44	: GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC	: 253
TS45	: GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC	: 243
TS46	: GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC	: 243
TS47	: GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC	: 156
WY11	: GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC	: 229
WY21	: GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC	: 260
WY22	: GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC	: 233
WY41	: -----	: -
WY42	: -----	: -
WY43	: GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC	: 231
WY44	: GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC	: 244

ภาพที่ 4.10 (ต่อ)

KB11	:	TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA	:	329
KB12	:	TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA	:	221
KB13	:	TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA	:	221
KB14	:	-----	:	-
KB15	:	TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA	:	222
KB16	:	TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA	:	317
KB17	:	TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA	:	221
KB18	:	-----	:	-
KB41	:	-----	:	-
KB42	:	TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA	:	329
KB100	:	TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA	:	315
KB111	:	TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA	:	328
KB112	:	-----	:	-
KB113	:	TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA	:	320
KB114	:	-----	:	-
KB115	:	TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA	:	308
TS11	:	TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA	:	222
TS12	:	TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA	:	219
TS13	:	TGGGACTGAAACACGGCCCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA	:	313
TS14	:	TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA	:	222
TS21	:	TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA	:	308
TS22	:	TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA	:	308
TS23	:	TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA	:	322
TS24	:	TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA	:	308
TS25	:	TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA	:	313
TS26	:	TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA	:	316
TS31	:	TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA	:	287
TS32	:	TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA	:	281
TS33	:	TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA	:	311
TS34	:	TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA	:	283
TS35	:	-----	:	-
TS36	:	-----	:	-
TS41	:	TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA	:	308
TS42	:	TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA	:	329
TS43	:	TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA	:	222
TS44	:	TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA	:	319
TS45	:	TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA	:	309
TS46	:	TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA	:	309
TS47	:	TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA	:	222
WY11	:	TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA	:	295
WY21	:	TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA	:	326
WY22	:	TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA	:	299
WY41	:	-----	:	-
WY42	:	-----	:	-
WY43	:	TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA	:	297
WY44	:	TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA	:	310

ภาพที่ 4.10 (ต่อ)

KB11	: AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA	: 395
KB12	: AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA	: 287
KB13	: AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA	: 287
KB14	: -----	: -
KB15	: AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA	: 288
KB16	: AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA	: 383
KB17	: AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA	: 287
KB18	: -----	: -
KB41	: -----	: -
KB42	: AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA	: 395
KB100	: AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA	: 381
KB111	: AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA	: 394
KB112	: -----	: -
KB113	: AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA	: 386
KB114	: -----	: -
KB115	: AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA	: 374
TS11	: AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA	: 288
TS12	: AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA	: 285
TS13	: AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA	: 379
TS14	: AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA	: 288
TS21	: AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA	: 374
TS22	: AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA	: 374
TS23	: AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA	: 388
TS24	: AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA	: 374
TS25	: AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA	: 379
TS26	: AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA	: 382
TS31	: AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA	: 353
TS32	: AGCCTGATGACAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTTCGGGTTGTAAACCTCTTTACAGCAGGGA	: 347
TS33	: AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA	: 377
TS34	: AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA	: 349
TS35	: -----	: -
TS36	: -----	: -
TS41	: AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA	: 374
TS42	: AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA	: 395
TS43	: AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA	: 288
TS44	: AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA	: 385
TS45	: AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA	: 375
TS46	: AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA	: 375
TS47	: AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA	: 288
WY11	: AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGGTTTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTATGAGGGA	: 361
WY21	: AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA	: 392
WY22	: AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA	: 365
WY41	: -----	: -
WY42	: -----	: -
WY43	: AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGGTTTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTATGAGGGA	: 363
WY44	: AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA	: 376

ภาพที่ 4.10 (ต่อ)

```

KB11 : AGAACAAGTGCCGTTCTGAATAAGGCGGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA : 461
KB12 : AGAACAAGTACGAGAGTAAGTCTCG-TACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA : 352
KB13 : AGAACAAGTACGAGAGTAAGTCTCG-TACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA : 352
KB14 : -----TTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA : 192
KB15 : AGAACAAGTACGAGAGTAAGTCTCG-TACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA : 353
KB16 : AGAACAAGTACGAGAGTAAGTCTCG-TACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA : 448
KB17 : AGAACAAGTACGAGAGTAAGTCTCG-TACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA : 352
KB18 : -----CTT : 111
KB41 : ----- : -
KB42 : AGAACAAGTGCCGTTCTGAATAAGGCGGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA : 461
KB100 : AGAACAAGTGCCGTTCTGAATAAGGCGGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA : 447
KB111 : AGAACAAGTGCCGTTCTGAATAAGGCGGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA : 460
KB112 : -----TTCTGAATAAGGCGGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA : 212
KB113 : AGAACAAGTACGAGAGTAAGTCTCG-TACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA : 451
KB114 : ----- : -
KB115 : AGAACAAGTACGAGAGTAAGTCTCG-TACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA : 439
TS11 : AGAACAAGTACGAGAGTAAGTCTCG-TACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA : 353
TS12 : AGAACAAGTACGAGAGTAAGTCTCG-TACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA : 350
TS13 : AGAACAAGTGCCGTTCTGAATAAGGCGGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA : 445
TS14 : AGAACAAGTACAAGAGTAAGTCTTG-TACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA : 353
TS21 : AGAACAAGTACAAGAGTAAGTCTTG-TACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA : 439
TS22 : AGAACAAGTACGAGAGTAAGTCTCG-TACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA : 439
TS23 : AGAACAAGTACGAGAGTAAGTCTCG-TACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA : 453
TS24 : AGAACAAGTACAAGAGTAAGTCTCG-TACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA : 439
TS25 : AGAACAAGTGCCGTTCTGAATAAGGCGGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA : 445
TS26 : AGAACAAGTACGAGAGTAAGTCTCG-TACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA : 447
TS31 : AGAACAAGTGCCGTTCTGAATAAGGCGGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA : 419
TS32 : CG-----AAGCGAGAG-----TGACGGTACCTGCAGAGAGCACGGCTAACTA : 392
TS33 : AGAACAAGTGCCGTTCTGAATAAGGCGGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA : 443
TS34 : AGAACAAGTGCCGTTCTGAATAAGGCGGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA : 415
TS35 : -----AATAAGGCGGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA : 193
TS36 : -----AATAAGGCGGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA : 186
TS41 : AGAACAAGTACAAGAGTAAGTCTTG-TACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA : 439
TS42 : AGAACAAGTGCCGTTCTGAATAAGGCGGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA : 461
TS43 : AGAACAAGTACGAGAGTAAGTCTCG-TACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA : 353
TS44 : AGAACAAGTACAAGAGTAAGTCTCG-TACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA : 450
TS45 : AGAACAAGTACGAGAGTAAGTCTCG-TACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA : 440
TS46 : AGAACAAGTACGAGAGTAAGTCTCG-TACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA : 440
TS47 : AGAACAAGTACGAGAGTAAGTCTCG-TACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA : 353
WY11 : AGAACACGTACCGTTCTGAATAAGGCGGGCACCTTGACGGTACCTCATCAGAAAGCCACGGCTAACTA : 427
WY21 : AGAACAAGTGCCGTTCTGAATAAGGCGGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA : 458
WY22 : AGAACAAGTGCCGTTCTGAATAAGGCGGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA : 431
WY41 : -----TCACTA : 142
WY42 : -----ACGGCTAACTA : 139
WY43 : AGAACACGTACCGTTCTGAATAAGGCGGGCACCTTGACGGTACCTCATCAGAAAGCCACGGCTAACTA : 429
WY44 : AGAACAAGTACGAGAGTAAGTCTCG-TACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA : 441

```

ภาพที่ 4.10 (ต่อ)

```

KB11 : CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGAATTATTGGGCGTAAAG---- : 523
KB12 : CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAG---- : 414
KB13 : CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAG---- : 414
KB14 : CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGAATTATTGGGCGTAAAG---- : 254
KB15 : CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAG---- : 415
KB16 : CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAG---- : 510
KB17 : CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAG---- : 414
KB18 : C-----AATTATTGGGCGTAAAG----- : 129
KB41 : ----- : -
KB42 : CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGAATTATTGGGCGTAAAG---- : 523
KB100 : CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGAATTATTGGGCGTAAAG---- : 509
KB111 : CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGAATTATTGGGCGTAAAG---- : 522
KB112 : CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGAATTATTGGGCGTAAAG---- : 274
KB113 : CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAG---- : 513
KB114 : -----CCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGAATTATTGGGCGTAAAG---- : 158
KB115 : CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAG---- : 501
TS11 : CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAG---- : 415
TS12 : CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAG---- : 412
TS13 : CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGAATTATTGGGCGTAAAG---- : 507
TS14 : CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAG---- : 415
TS21 : CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAG---- : 501
TS22 : CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAG---- : 501
TS23 : CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAG---- : 515
TS24 : CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAG---- : 501
TS25 : CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGAATTATTGGGCGTAAAG---- : 507
TS26 : CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAG---- : 509
TS31 : CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGAATTATTGGGCGTAAAG---- : 481
TS32 : CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGAATTATTGGGCGTAAAG---- : 454
TS33 : CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGAATTATTGGGCGTAAAG---- : 505
TS34 : CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGAATTATTGGGCGTAAAG---- : 477
TS35 : CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGAATTATTGGGCGTAAAG---- : 255
TS36 : CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGAATTATTGGGCGTAAAG---- : 248
TS41 : CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAG---- : 501
TS42 : CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGAATTATTGGGCGTAAAG---- : 523
TS43 : CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAG---- : 415
TS44 : CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAG---- : 512
TS45 : CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAG---- : 502
TS46 : CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAG---- : 502
TS47 : CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAG---- : 415
WY11 : CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGAATTATTGGGCGTAAAG---- : 489
WY21 : CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGAATTATTGGGCGTAAAG---- : 520
WY22 : CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGAATTATTGGGCGTAAAG---- : 493
WY41 : CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGAATTATTGGGCGTAAAG---- : 204
WY42 : CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGAATTATTGGGCGTAAAG---- : 201
WY43 : CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGAATTATTGGGCGTAAAG---- : 491
WY44 : CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCG : 507

```

ภาพที่ 4.10 (ต่อ)

```

KB11 : -----CGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT : 584
KB12 : -----CGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT : 475
KB13 : -----CGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT : 475
KB14 : -----CGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT : 315
KB15 : -----CGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT : 476
KB16 : -----CGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT : 571
KB17 : -----CGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT : 475
KB18 : -----CGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT : 190
KB41 : -----CAACCGTGGAGGGTCAT : 121
KB42 : -----CGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT : 584
KB100 : -----CGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT : 570
KB111 : -----CGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT : 583
KB112 : -----CGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT : 335
KB113 : -----CGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT : 574
KB114 : -----CGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT : 219
KB115 : -----CGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT : 562
TS11 : -----CGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT : 476
TS12 : -----CGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT : 473
TS13 : -----CGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT : 568
TS14 : -----CGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT : 476
TS21 : -----CGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT : 562
TS22 : -----CGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT : 562
TS23 : -----CGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT : 576
TS24 : -----CGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT : 562
TS25 : -----GgcTTCGcAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCcCGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT : 568
TS26 : -----CGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT : 570
TS31 : -----CGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT : 542
TS32 : -----AGcTTCGTAGGCGGTTTGTTCGCGTGTCCGTGAAAAcTTGGGGCTCAACCGCAAGCTTGCGG : 515
TS33 : -----CGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT : 566
TS34 : -----CGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT : 538
TS35 : -----CGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT : 316
TS36 : -----CGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT : 309
TS41 : -----CGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT : 562
TS42 : -----CGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT : 584
TS43 : -----CGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT : 476
TS44 : -----CGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT : 573
TS45 : -----CGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT : 563
TS46 : -----CGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT : 563
TS47 : -----CGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT : 476
WY11 : -----CGCGCGCAGGCGGcCTTTTAAGTCTGATGTGAAATcTTGCGGCTCAACCGCAAGCGGcCAT : 550
WY21 : -----CGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT : 581
WY22 : -----CGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT : 554
WY41 : -----CGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT : 265
WY42 : -----CGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT : 262
WY43 : -----CGCGCGCAGGCGGcCTTTTAAGTCTGATGTGAAATcTTGCGGCTCAACCGCAAGCGGcCAT : 552
WY44 : TAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT : 573

```

ภาพที่ 4.10 (ต่อ)

```

KB11 : TGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGTGGAAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA : 650
KB12 : TGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA : 541
KB13 : TGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA : 541
KB14 : TGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGTGGAAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA : 381
KB15 : TGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA : 542
KB16 : TGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA : 637
KB17 : TGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA : 541
KB18 : TGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGTGGAAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA : 256
KB41 : TGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGTGGAAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA : 187
KB42 : TGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGTGGAAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA : 650
KB100 : TGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGTGGAAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA : 636
KB111 : TGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGTGGAAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA : 649
KB112 : TGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGTGGAAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA : 401
KB113 : TGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA : 640
KB114 : TGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGTGGAAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA : 285
KB115 : TGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA : 628
TS11 : TGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA : 542
TS12 : TGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA : 539
TS13 : TGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGTGGAAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA : 634
TS14 : TGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA : 542
TS21 : TGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA : 628
TS22 : TGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA : 628
TS23 : TGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA : 642
TS24 : TGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA : 628
TS25 : TGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA : 634
TS26 : TGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA : 636
TS31 : TGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGTGGAAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA : 608
TS32 : GCGATACGGGCACTTGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCA : 581
TS33 : TGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGTGGAAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA : 632
TS34 : TGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGTGGAAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA : 604
TS35 : TGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGTGGAAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA : 382
TS36 : TGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGTGGAAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA : 375
TS41 : TGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA : 628
TS42 : TGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGTGGAAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA : 650
TS43 : TGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA : 542
TS44 : TGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA : 639
TS45 : TGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA : 629
TS46 : TGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA : 629
TS47 : TGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA : 542
WY11 : TGGAAACTGGGAGGCTTGAGTACAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA : 616
WY21 : TGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGTGGAAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA : 647
WY22 : TGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGTGGAAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA : 620
WY41 : TGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGTGGAAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA : 331
WY42 : TGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGTGGAAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA : 328
WY43 : TGGAAACTGGGAGGCTTGAGTACAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA : 618
WY44 : TGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA : 639

```

ภาพที่ 4.10 (ต่อ)

```

KB11 : GATATTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAA : 716
KB12 : GAGATGTTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCCGCTTTTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAA : 607
KB13 : GAGATGTTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCCGCTTTTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAA : 607
KB14 : GATATTTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAA : 447
KB15 : GAGATGTTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCCGCTTTTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAA : 608
KB16 : GAGATGTTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCCGCTTTTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAA : 703
KB17 : GAGATGTTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCCGCTTTTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAA : 607
KB18 : GATATTTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAA : 322
KB41 : GATATTTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAA : 253
KB42 : GATATTTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAA : 716
KB100 : GATATTTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAA : 702
KB111 : GATATTTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAA : 715
KB112 : GATATTTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAA : 467
KB113 : GAGATGTTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCCGCTTTTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAA : 706
KB114 : GAGATGTTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCCGCTTTTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAA : 351
KB115 : GAGATGTTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCCGCTTTTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAA : 694
TS11 : GAGATGTTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCCGCTTTTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAA : 608
TS12 : GAGATGTTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCCGCTTTTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAA : 605
TS13 : GATATTTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAA : 700
TS14 : GAGATGTTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCCGCTTTTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAA : 608
TS21 : GAGATGTTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCCGCTTTTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAA : 694
TS22 : GAGATGTTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCCGCTTTTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAA : 694
TS23 : GAGATGTTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCCGCTTTTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAA : 708
TS24 : GAGATGTTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCCGCTTTTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAA : 694
TS25 : GAGATGTTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAA : 700
TS26 : GAGATGTTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCCGCTTTTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAA : 702
TS31 : GATATTTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAA : 674
TS32 : GATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCCGGTCTCTGGGCACTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAA : 647
TS33 : GATATTTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAA : 698
TS34 : GATATTTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAA : 670
TS35 : GATATTTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAA : 448
TS36 : GATATTTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAA : 441
TS41 : GAGATGTTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCCGCTTTTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAA : 694
TS42 : GATATTTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAA : 716
TS43 : GAGATGTTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCCGCTTTTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAA : 608
TS44 : GAGATGTTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCCGCTTTTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAA : 705
TS45 : GAGATGTTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCCGCTTTTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAA : 695
TS46 : GAGATGTTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCCGCTTTTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAA : 695
TS47 : GAGATGTTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAA : 608
WY11 : GATATGTTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAA : 682
WY21 : GATATTTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAA : 713
WY22 : GATATTTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAA : 686
WY41 : GATATTTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAA : 397
WY42 : GATATTTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAA : 394
WY43 : GATATGTTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAA : 684
WY44 : GAGATGTTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCCGCTTTTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAA : 705

```

ภาพที่ 4.10 (ต่อ)

```

KB11 : GCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTT : 782
KB12 : GCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTT : 673
KB13 : GCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTT : 673
KB14 : GCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTT : 513
KB15 : GCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTT : 674
KB16 : GCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTT : 769
KB17 : GCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTT : 673
KB18 : GCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTT : 388
KB41 : GCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTT : 319
KB42 : GCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTT : 782
KB100 : GCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTT : 768
KB111 : GCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTT : 781
KB112 : GCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTT : 533
KB113 : GCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTT : 772
KB114 : GCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTT : 417
KB115 : GCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTT : 760
TS11 : GCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTT : 674
TS12 : GCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTT : 671
TS13 : GCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTT : 766
TS14 : GCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTT : 674
TS21 : GCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTT : 760
TS22 : GCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTT : 760
TS23 : GCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTT : 774
TS24 : GCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTT : 760
TS25 : GCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTT : 766
TS26 : GCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTT : 768
TS31 : GCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTT : 740
TS32 : GCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTT : 712
TS33 : GCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTT : 764
TS34 : GCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTT : 736
TS35 : GCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTT : 514
TS36 : GCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTT : 507
TS41 : GCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTT : 760
TS42 : GCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTT : 782
TS43 : GCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTT : 674
TS44 : GCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTT : 771
TS45 : GCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTT : 761
TS46 : GCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTT : 761
TS47 : GCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTT : 674
WY11 : GCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTT : 748
WY21 : GCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTT : 779
WY22 : GCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTT : 752
WY41 : GCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTT : 463
WY42 : GCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTT : 460
WY43 : GCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTT : 750
WY44 : GCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTT : 771

```

ภาพที่ 4.10 (ต่อ)

```

KB11 : AGGGGGTTTCCGCCCT----TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG : 844
KB12 : AGAGGGTTTCCGCCCT----TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG : 735
KB13 : AGAGGGTTTCCGCCCT----TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG : 735
KB14 : AGGGGGTTTCCGCCCT----TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG : 575
KB15 : AGAGGGTTTCCGCCCT----TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG : 736
KB16 : AGAGGGTTTCCGCCCT----TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG : 831
KB17 : AGAGGGTTTCCGCCCT----TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG : 735
KB18 : AGGGGGTTTCCGCCCT----TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG : 450
KB41 : AGGGGGTTTCCGCCCT----TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG : 381
KB42 : AGGGGGTTTCCGCCCT----TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG : 844
KB100 : AGGGGGTTTCCGCCCT----TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG : 830
KB111 : AGGGGGTTTCCGCCCT----TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG : 843
KB112 : AGGGGGTTTCCGCCCT----TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG : 595
KB113 : AGAGGGTTTCCGCCCT----TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG : 834
KB114 : AGAGGGTTTCCGCCCT----TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG : 479
KB115 : AGAGGGTTTCCGCCCT----TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG : 822
TS11 : AGAGGGTTTCCGCCCT----TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG : 736
TS12 : AGAGGGTTTCCGCCCT----TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG : 733
TS13 : AGGGGGTTTCCGCCCT----TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG : 828
TS14 : AGAGGGTTTCCGCCCT----TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG : 736
TS21 : AGAGGGTTTCCGCCCT----TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG : 822
TS22 : AGAGGGTTTCCGCCCT----TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG : 822
TS23 : AGAGGGTTTCCGCCCT----TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG : 836
TS24 : AGAGGGTTTCCGCCCT----TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG : 822
TS25 : AGGGGGTTTCCGCCCT----TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG : 828
TS26 : AGAGGGTTTCCGCCCT----TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG : 830
TS31 : AGGGGGTTTCCGCCCT----TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG : 802
TS32 : --GGGTTTCTTCCACGGGATCCGTGCGGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCGGCCTGGGGAGTACGG : 776
TS33 : AGGGGGTTTCCGCCCT----TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG : 826
TS34 : AGGGGGTTTCCGCCCT----TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG : 798
TS35 : AGGGGGTTTCCGCCCT----TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG : 576
TS36 : AGGGGGTTTCCGCCCT----TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG : 569
TS41 : AGAGGGTTTCCGCCCT----TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG : 822
TS42 : AGGGGGTTTCCGCCCT----TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG : 844
TS43 : AGAGGGTTTCCGCCCT----TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG : 736
TS44 : AGAGGGTTTCCGCCCT----TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG : 833
TS45 : AGAGGGTTTCCGCCCT----TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG : 823
TS46 : AGAGGGTTTCCGCCCT----TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG : 823
TS47 : AGAGGGTTTCCGCCCT----TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG : 736
WY11 : AGGGGGTTTCGATGCC---GTAGTGCTCGAAGTTAACACATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG : 810
WY21 : AGGGGGTTTCCGCCCT----TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG : 841
WY22 : AGGGGGTTTCCGCCCT----TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG : 814
WY41 : AGGGGGTTTCCGCCCT----TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG : 525
WY42 : AGGGGGTTTCCGCCCT----TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG : 522
WY43 : AGGGGGTTTCGATGCC---GTAGTGCTCGAAGTTAACACATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG : 812
WY44 : AGAGGGTTTCCGCCCT----TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG : 833

```

ภาพที่ 4.10 (ต่อ)

KB11 : CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG-ACAACCTAGAGATAGGGCTTTC : 975
 KB12 : CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG-ACAACCTAGAGATAGAGCGTTC : 866
 KB13 : CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG-ACAACCTAGAGATAGAGCGTTC : 866
 KB14 : CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG-ACAACCTAGAGATAGGGCTTTC : 706
 KB15 : CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG-ACAACCTAGAGATAGAGCGTTC : 867
 KB16 : CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG-ACAACCTAGAGATAGAGCGTTC : 962
 KB17 : CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG-ACAACCTAGAGATAGAGCGTTC : 866
 KB18 : CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG-ACAACCTAGAGATAGGGCTTTC : 581
 KB41 : CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG-ACAACCTAGAGATAGGGCTTTC : 512
 KB42 : CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG-ACAACCTAGAGATAGGGCTTTC : 975
 KB100 : CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG-ACAACCTAGAGATAGGGCTTTC : 961
 KB111 : CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG-ACAACCTAGAGATAGGGCTTTC : 974
 KB112 : CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG-ACAACCTAGAGATAGGGCTTTC : 726
 KB113 : CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG-ACAACCTAGAGATAGAGCGTTC : 965
 KB114 : CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG-ACAACCTAGAGATAGGGCTTTC : 610
 KB115 : CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG-ACAACCTAGAGATAGAGCGTTC : 953
 TS11 : CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG-ACAACCTAGAGATAGAGCGTTC : 867
 TS12 : CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG-ACAACCTAGAGATAGAGCGTTC : 864
 TS13 : CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG-ACAACCTAGAGATAGGGCTTTC : 959
 TS14 : CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG-ACAACCTAGAGATAGAGCGTTC : 867
 TS21 : CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG-ACAACCTAGAGATAGAGCGTTC : 953
 TS22 : CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG-ACAACCTAGAGATAGAGCGTTC : 953
 TS23 : CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG-ACAACCTAGAGATAGAGCGTTC : 967
 TS24 : CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG-ACAACCTAGAGATAGAGCGTTC : 953
 TS25 : CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG-ACAACCTAGAGATAGAGCGTTC : 958
 TS26 : CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG-ACAACCTAGAGATAGAGCGTTC : 961
 TS31 : CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG-ACAACCTAGAGATAGGGCTTTC : 933
 TS32 : CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG-ACAACCTAGAGATAGGGCTTTC : 906
 TS33 : CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG-ACAACCTAGAGATAGGGCTTTC : 957
 TS34 : CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG-ACAACCTAGAGATAGGGCTTTC : 929
 TS35 : CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG-ACAACCTAGAGATAGGGCTTTC : 707
 TS36 : CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG-ACAACCTAGAGATAGGGCTTTC : 700
 TS41 : CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG-ACAACCTAGAGATAGAGCGTTC : 953
 TS42 : CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG-ACAACCTAGAGATAGGGCTTTC : 975
 TS43 : CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG-ACAACCTAGAGATAGAGCGTTC : 867
 TS44 : CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG-ACAACCTAGAGATAGAGCGTTC : 964
 TS45 : CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG-ACAACCTAGAGATAGAGCGTTC : 954
 TS46 : CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG-ACAACCTAGAGATAGAGCGTTC : 954
 TS47 : CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG-ACAACCTAGAGATAGAGCGTTC : 867
 WY11 : CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG-ACAACCTAGAGATAGGGCTTTC : 940
 WY21 : CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG-ACAACCTAGAGATAGGGCTTTC : 972
 WY22 : CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG-ACAACCTAGAGATAGGGCTTTC : 945
 WY41 : CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG-ACAACCTAGAGATAGGGCTTTC : 656
 WY42 : CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG-ACAACCTAGAGATAGGGCTTTC : 653
 WY43 : CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG-ACAACCTAGAGATAGGGCTTTC : 942
 WY44 : CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG-ACAACCTAGAGATAGAGCGTTC : 964

ภาพที่ 4.10 (ต่อ)

```

KB11 : CCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT : 1041
KB12 : CCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT : 932
KB13 : CCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT : 932
KB14 : CCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT : 772
KB15 : CCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT : 933
KB16 : CCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT : 1028
KB17 : CCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT : 932
KB18 : CCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT : 647
KB41 : CCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT : 578
KB42 : CCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT : 1041
KB100 : CCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT : 1027
KB111 : CCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT : 1040
KB112 : CCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT : 792
KB113 : CCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT : 1031
KB114 : CCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT : 676
KB115 : CCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT : 1019
TS11 : CCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT : 933
TS12 : CCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT : 930
TS13 : CCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT : 1025
TS14 : CCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT : 933
TS21 : CCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT : 1019
TS22 : CCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT : 1019
TS23 : CCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT : 1033
TS24 : CCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT : 1019
TS25 : CCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT : 1023
TS26 : CCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT : 1027
TS31 : CCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT : 999
TS32 : CCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT : 969
TS33 : CCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT : 1023
TS34 : CCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT : 995
TS35 : CCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT : 773
TS36 : CCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT : 766
TS41 : CCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT : 1019
TS42 : CCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT : 1041
TS43 : CCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT : 933
TS44 : CCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT : 1030
TS45 : CCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT : 1020
TS46 : CCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT : 1020
TS47 : CCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT : 933
WY11 : CCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT : 1005
WY21 : CCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT : 1038
WY22 : CCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT : 1011
WY41 : CCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT : 722
WY42 : CCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT : 719
WY43 : CCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT : 1007
WY44 : CCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT : 1030

```

ภาพที่ 4.10 (ต่อ)

```

KB11 : TAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGT--TGGGCACTCTAAGAT : 1105
KB12 : TAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGT--TGGGCACTCTAAGGT : 996
KB13 : TAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGT--TGGGCACTCTAAGGT : 996
KB14 : TAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGT--TGGGCACTCTAAGAT : 836
KB15 : TAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGT--TGGGCACTCTAAGGT : 997
KB16 : TAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGT--TGGGCACTCTAAGGT : 1092
KB17 : TAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGT--TGGGCACTCTAAGGT : 996
KB18 : TAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGT--TGGGCACTCTAAGAT : 711
KB41 : TAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGT--TGGGCACTCTAAGAT : 642
KB42 : TAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGT--TGGGCACTCTAAGAT : 1105
KB100 : TAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGT--TGGGCACTCTAAGAT : 1091
KB111 : TAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGT--TGGGCACTCTAAGAT : 1104
KB112 : TAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGT--TGGGCACTCTAAGAT : 856
KB113 : TAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGT--TGGGCACTCTAAGGT : 1095
KB114 : TAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGT--TGGGCACTCTAAGAT : 740
KB115 : TAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGT--TGGGCACTCTAAGGT : 1083
TS11 : TAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGT--TGGGCACTCTAAGGT : 997
TS12 : TAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGT--TGGGCACTCTAAGGT : 994
TS13 : TAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGT--TGGGCACTCTAAGAT : 1089
TS14 : TAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGT--TGGGCACTCTAAGGT : 997
TS21 : TAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGT--TGGGCACTCTAAGGT : 1083
TS22 : TAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGT--TGGGCACTCTAAGGT : 1083
TS23 : TAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGT--TGGGCACTCTAAGGT : 1097
TS24 : TAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGT--TGGGCACTCTAAGGT : 1083
TS25 : TAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGT--TGGGCACTCTAAGGT : 1087
TS26 : TAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGT--TGGGCACTCTAAGGT : 1091
TS31 : TAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGT--TGGGCACTCTAAGAT : 1063
TS32 : TAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGT--TGGGCACTCTAAGAT : 1035
TS33 : TAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGT--TGGGCACTCTAAGAT : 1087
TS34 : TAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGT--TGGGCACTCTAAGAT : 1059
TS35 : TAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGT--TGGGCACTCTAAGAT : 837
TS36 : TAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGT--TGGGCACTCTAAGAT : 830
TS41 : TAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGT--TGGGCACTCTAAGGT : 1083
TS42 : TAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGT--TGGGCACTCTAAGAT : 1105
TS43 : TAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGT--TGGGCACTCTAAGGT : 997
TS44 : TAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGT--TGGGCACTCTAAGGT : 1094
TS45 : TAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGT--TGGGCACTCTAAGGT : 1084
TS46 : TAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGT--TGGGCACTCTAAGGT : 1084
TS47 : TAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGT--TGGGCACTCTAAGGT : 997
WY11 : TAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGT--TGGGCACTCTAAGGT : 1069
WY21 : TAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGT--TGGGCACTCTAAGAT : 1102
WY22 : TAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGT--TGGGCACTCTAAGAT : 1075
WY41 : TAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGT--TGGGCACTCTAAGAT : 786
WY42 : TAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGT--TGGGCACTCTAAGAT : 783
WY43 : TAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGT--TGGGCACTCTAAGGT : 1071
WY44 : TAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGT--TGGGCACTCTAAGGT : 1094

```

ภาพที่ 4.10 (ต่อ)

```

KB11 : GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGG : 1171
KB12 : GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGG : 1062
KB13 : GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGG : 1062
KB14 : GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGG : 902
KB15 : GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGG : 1063
KB16 : GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGG : 1158
KB17 : GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGG : 1062
KB18 : GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGG : 777
KB41 : GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGG : 708
KB42 : GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGG : 1171
KB100 : GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGG : 1157
KB111 : GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGG : 1170
KB112 : GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGG : 922
KB113 : GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGG : 1161
KB114 : GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGG : 806
KB115 : GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGG : 1149
TS11 : GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGG : 1063
TS12 : GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGG : 1060
TS13 : GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGG : 1155
TS14 : GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGG : 1063
TS21 : GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGG : 1149
TS22 : GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGG : 1149
TS23 : GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGG : 1163
TS24 : GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGG : 1149
TS25 : GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGG : 1153
TS26 : GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGG : 1157
TS31 : GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGG : 1129
TS32 : GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGG : 1101
TS33 : GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGG : 1153
TS34 : GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGG : 1125
TS35 : GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGG : 903
TS36 : GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGG : 896
TS41 : GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGG : 1149
TS42 : GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGG : 1171
TS43 : GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGG : 1063
TS44 : GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGG : 1160
TS45 : GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGG : 1150
TS46 : GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGG : 1150
TS47 : GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGG : 1063
WY11 : GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGG : 1135
WY21 : GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGG : 1168
WY22 : GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGG : 1141
WY41 : GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGG : 852
WY42 : GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGG : 849
WY43 : GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGG : 1137
WY44 : GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGG : 1160

```

ภาพที่ 4.10 (ต่อ)

```

KB11 : GCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGGGCAGCAAGACCGCGAGGTTTAGCCAATCCCATA : 1237
KB12 : GCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCGAGGTCAAGCCAATCCCATA : 1128
KB13 : GCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCGAGGTCAAGCCAATCCCATA : 1128
KB14 : GCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGGGCAGCAAGACCGCGAGGTTTAGCCAATCCCATA : 968
KB15 : GCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCGAGGTCAAGCCAATCCCATA : 1129
KB16 : GCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCGAGGTCAAGCCAATCCCATA : 1224
KB17 : GCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCGAGGTCAAGCCAATCCCATA : 1128
KB18 : GCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGGGCAGCAAGACCGCGAGGTTTAGCCAATCCCATA : 843
KB41 : GCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGGGCAGCAAGACCGCGAGGTTTAGCCAATCCCATA : 774
KB42 : GCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGGGCAGCAAGACCGCGAGGTTTAGCCAATCCCATA : 1237
KB100 : GCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGGGCAGCAAGACCGCGAGGTTTAGCCAATCCCATA : 1223
KB111 : GCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGGGCAGCAAGACCGCGAGGTTTAGCCAATCCCATA : 1236
KB112 : GCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGGGCAGCAAGACCGCGAGGTTTAGCCAATCCCATA : 988
KB113 : GCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCGAGGTCAAGCCAATCCCATA : 1227
KB114 : GCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGGGCAGCAAGACCGCGAGGTTTAGCCAATCCCATA : 872
KB115 : GCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCGAGGTCAAGCCAATCCCATA : 1215
TS11 : GCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCGAGGTCAAGCCAATCCCATA : 1129
TS12 : GCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCGAGGTCAAGCCAATCCCATA : 1126
TS13 : GCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGGGCAGCAAGACCGCGAGGTTTAGCCAATCCCATA : 1221
TS14 : GCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCGAGGTCAAGCCAATCCCATA : 1129
TS21 : GCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCGAGGTCAAGCCAATCCCATA : 1215
TS22 : GCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCGAGGTCAAGCCAATCCCATA : 1215
TS23 : GCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCGAGGTCAAGCCAATCCCATA : 1229
TS24 : GCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCGAGGTCAAGCCAATCCCATA : 1215
TS25 : GCTACACACGTGCTACAATGGACAGTACAAAGGGCAGCGAAGACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCATA : 1219
TS26 : GCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCGAGGTCAAGCCAATCCCATA : 1223
TS31 : GCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGGGCAGCAAGACCGCGAGGTTTAGCCAATCCCATA : 1195
TS32 : GCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAGAGGGCTGCGATTACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTA : 1167
TS33 : GCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGGGCAGCAAGACCGCGAGGTTTAGCCAATCCCATA : 1219
TS34 : GCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGGGCAGCAAGACCGCGAGGTTTAGCCAATCCCATA : 1191
TS35 : GCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGGGCAGCAAGACCGCGAGGTTTAGCCAATCCCATA : 969
TS36 : GCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGGGCAGCAAGACCGCGAGGTTTAGCCAATCCCATA : 962
TS41 : GCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCGAGGTCAAGCCAATCCCATA : 1215
TS42 : GCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGGGCAGCAAGACCGCGAGGTTTAGCCAATCCCATA : 1237
TS43 : GCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCGAGGTCAAGCCAATCCCATA : 1129
TS44 : GCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCGAGGTCAAGCCAATCCCATA : 1226
TS45 : GCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCGAGGTCAAGCCAATCCCATA : 1216
TS46 : GCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCGAGGTCAAGCCAATCCCATA : 1216
TS47 : GCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCGAGGTCAAGCCAATCCCATA : 1129
WY11 : GCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGTTGCGAAGCCGCGAGGTGAAGCCAATCCCATA : 1201
WY21 : GCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGGGCAGCAAGACCGCGAGGTTTAGCCAATCCCATA : 1234
WY22 : GCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGGGCAGCAAGACCGCGAGGTTTAGCCAATCCCATA : 1207
WY41 : GCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGGGCAGCAAGACCGCGAGGTTTAGCCAATCCCATA : 918
WY42 : GCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGGGCAGCAAGACCGCGAGGTTTAGCCAATCCCATA : 915
WY43 : GCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGTTGCGAAGCCGCGAGGTGAAGCCAATCCCATA : 1203
WY44 : GCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCGAGGTCAAGCCAATCCCATA : 1226

```

ภาพที่ 4.10 (ต่อ)

```

KB11 : AAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG : 1303
KB12 : AAACCATTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG : 1194
KB13 : AAACCATTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG : 1194
KB14 : AAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG : 1034
KB15 : AAACCATTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG : 1195
KB16 : AAACCATTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG : 1290
KB17 : AAACCATTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG : 1194
KB18 : AAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG : 909
KB41 : AAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG : 840
KB42 : AAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG : 1303
KB100 : AAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG : 1289
KB111 : AAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG : 1302
KB112 : AAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG : 1054
KB113 : AAACCATTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG : 1293
KB114 : AAACCATTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG : 938
KB115 : AAACCATTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG : 1281
TS11 : AAACCATTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG : 1195
TS12 : AAACCATTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG : 1192
TS13 : AAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG : 1287
TS14 : AAACCATTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG : 1195
TS21 : AAACCATTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG : 1281
TS22 : AAACCATTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG : 1281
TS23 : AAACCATTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG : 1295
TS24 : AAACCATTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG : 1281
TS25 : AATCTGTTCTCAGTTCGGATTGTCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG : 1285
TS26 : AAACCATTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG : 1289
TS31 : AAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG : 1261
TS32 : AAGCCGGTTCTCAGTTCGGATTGCGGGTCTGCAACTCGACCCGTTGAAGCTGGAGTTCGCTAGTAATCG : 1233
TS33 : AAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG : 1285
TS34 : AAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG : 1257
TS35 : AAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG : 1035
TS36 : AAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG : 1028
TS41 : AAACCATTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG : 1281
TS42 : AAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG : 1303
TS43 : AAACCATTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG : 1195
TS44 : AAACCATTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG : 1292
TS45 : AAACCATTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG : 1282
TS46 : AAACCATTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG : 1282
TS47 : AAACCATTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG : 1195
WY11 : AAGCCATTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCTGGAATTCGCTAGTAATCG : 1267
WY21 : AAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG : 1300
WY22 : AAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG : 1273
WY41 : AAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG : 984
WY42 : AAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG : 981
WY43 : AAGCCATTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCTGGAATTCGCTAGTAATCG : 1269
WY44 : AAACCATTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG : 1292

```

ภาพที่ 4.10 (ต่อ)

```

KB11 : CGGATCAGCATG-CGGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGA : 1368
KB12 : CGGATCAGCATG-CGGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGA : 1259
KB13 : CGGATCAGCATG-CGGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGA : 1259
KB14 : CGGATCAGCATG-CGGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGA : 1099
KB15 : CGGATCAGCATG-CGGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGA : 1260
KB16 : CGGATCAGCATG-CGGCGGTGAATACGTTCCG----- : 1321
KB17 : CGGATCAGCATG-CGGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGA : 1259
KB18 : CGGATCAGCATG-CGGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGA : 974
KB41 : CGGATCAGCATG-CGGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGA : 905
KB42 : CGGATCAGCATG-CGGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGA : 1368
KB100 : CGGATCAGCATG-CGGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGA : 1354
KB111 : CGGATCAGCATG-CGGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGA : 1367
KB112 : CGGATCAGCATG-CGGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGA : 1119
KB113 : CGGATCAGCATG-CGGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGA : 1358
KB114 : CGGATCAGCATG-CGGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGA : 1003
KB115 : CGGATCAGCATG-CGGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGA : 1346
TS11 : CGGATCAGCATG-CGGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGA : 1260
TS12 : CGGATCAGCATG-CGGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGA : 1257
TS13 : CGGATCAGCATG-CGGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGA : 1352
TS14 : CGGATCAGCATG-CGGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGA : 1260
TS21 : CGGATCAGCATG-CGGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGA : 1346
TS22 : CGGATCAGCATG-CGGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGA : 1346
TS23 : CGGATCAGCATG-CGGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGA : 1360
TS24 : CGGATCAGCATG-CGGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGA : 1346
TS25 : CGGATCAGCATG-CGGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGA : 1350
TS26 : CGGATCAGCATG-CGGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGA : 1354
TS31 : CGGATCAGCATG-CGGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGA : 1326
TS32 : CAGATCAGCAACGCTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAA : 1299
TS33 : CGGATCAGCATG-CGGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGA : 1350
TS34 : CGGATCAGCATG-CGGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGA : 1322
TS35 : CGGATCAGCATG-CGGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGA : 1100
TS36 : CGGATCAGCATG-CGGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGA : 1093
TS41 : CGGATCAGCATG-CGGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGA : 1346
TS42 : CGGATCAGCATG-CGGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGA : 1368
TS43 : CGGATCAGCATG-CGGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGA : 1260
TS44 : CGGATCAGCATG-CGGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGA : 1357
TS45 : CGGATCAGCATG-CGGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGA : 1347
TS46 : CGGATCAGCATG-CGGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGA : 1347
TS47 : CGGATCAGCATG-CGGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGA : 1260
WY11 : CGGATCAGCATG-CGGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGA : 1332
WY21 : CGGATCAGCATG-CGGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGA : 1365
WY22 : CGGATCAGCATG-CGGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGA : 1338
WY41 : CGGATCAGCATG-CGGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGA : 1049
WY42 : CGGATCAGCATG-CGGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGA : 1046
WY43 : CGGATCAGCATG-CGGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGA : 1334
WY44 : CGGATCAGCATG-CGGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGA : 1357

```

ภาพที่ 4.10 (ต่อ)

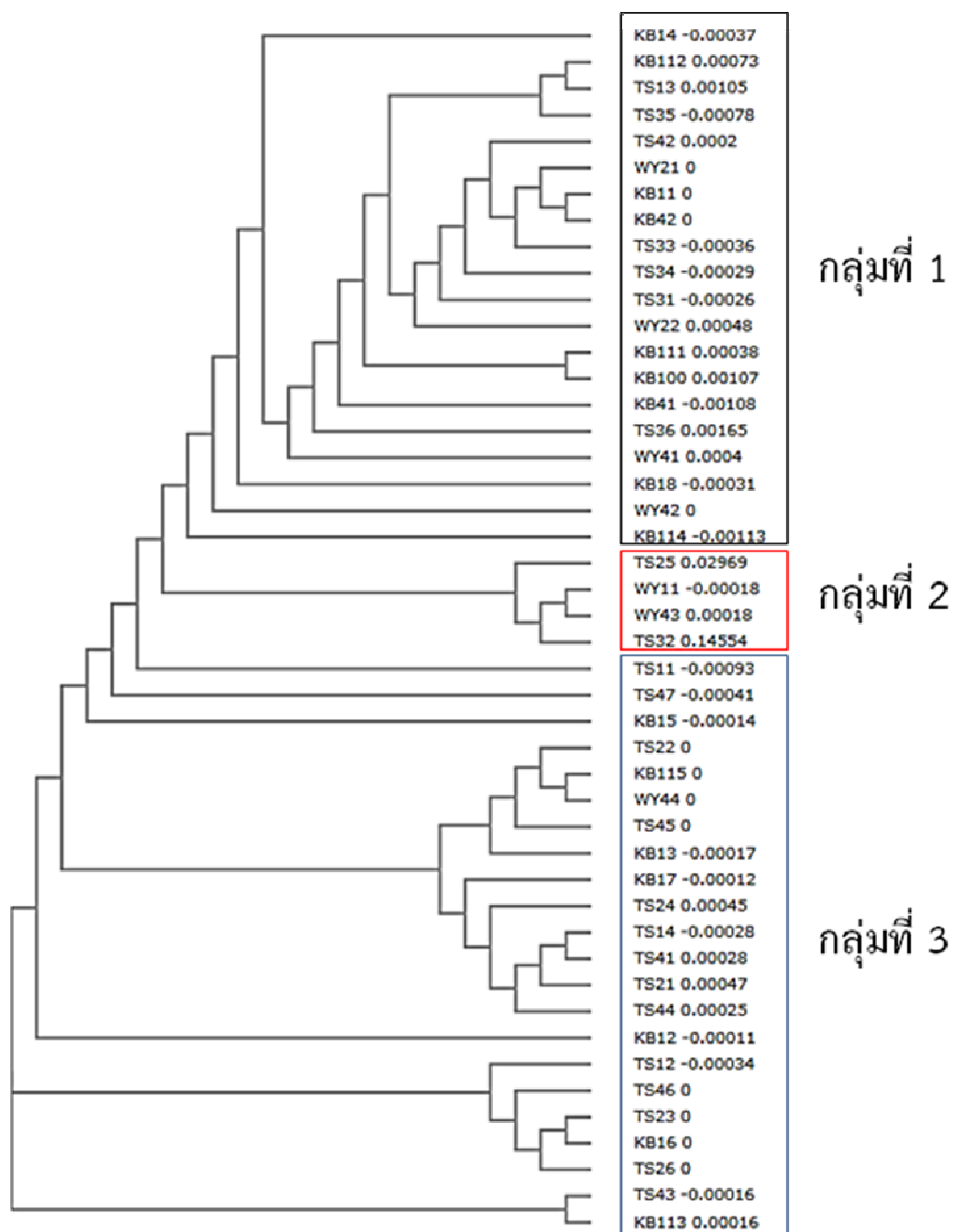
```

KB11 : GTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAA----- : 1397
KB12 : GTTTGTAAACACCCGAA----- : 1275
KB13 : GTTTGTAAACACCCG----- : 1273
KB14 : GTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAGGT----- : 1126
KB15 : GTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGGAG----- : 1286
KB16 : ----- : -
KB17 : GTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGGA----- : 1284
KB18 : GTTTGTAAACACCC----- : 987
KB41 : GTTTGT----- : 911
KB42 : GTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAA----- : 1397
KB100 : GTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAAACC---- : 1385
KB111 : GTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGA----- : 1391
KB112 : GTTTGTAAACACCCGAAGTCGG----- : 1140
KB113 : GTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGGAG----- : 1384
KB114 : GTTTGTAAACACCCGAA----- : 1019
KB115 : GTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGGA----- : 1371
TS11 : GTTTGTAAACACCCGAA----- : 1276
TS12 : GTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGGAGTAACCGTAA : 1292
TS13 : GTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAGG----- : 1378
TS14 : GTTTGTAAACACCCGAA----- : 1276
TS21 : GTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGGAGTAA----- : 1375
TS22 : GTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGGAGTAA----- : 1375
TS23 : GTTTGTAAACACCCGAA----- : 1376
TS24 : GTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGGAGTAA----- : 1375
TS25 : GTTTGTAAACACCC----- : 1363
TS26 : GTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGGAG----- : 1380
TS31 : GTTTGTAAACACCCGAA----- : 1342
TS32 : GTCGGTAAACACCCGAA----- : 1315
TS33 : GTTTGTAAACACCCGAAGTC----- : 1369
TS34 : GTTTGTAAACA----- : 1332
TS35 : GTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTG----- : 1123
TS36 : GTTTGTAA----- : 1101
TS41 : GTTTGTAAACACCCGAA----- : 1362
TS42 : GTTTGTAAACACCCGAA----- : 1384
TS43 : GTTTGTAAACACCC----- : 1273
TS44 : GTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGGAGTAA----- : 1386
TS45 : GTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGGAGTAA----- : 1376
TS46 : GTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGG----- : 1371
TS47 : GTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGGAGTAA----- : 1289
WY11 : GTTTGTAAACACCCG----- : 1346
WY21 : GTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGA----- : 1389
WY22 : GTTTGT----- : 1344
WY41 : GTTTGTAAACACCCGAAGT----- : 1067
WY42 : GTTTGTAAACACCCGAAGT----- : 1064
WY43 : GTTTGTAAACACCCGAAG----- : 1351
WY44 : GTTTGTAAACACCC----- : 1370

```

ภาพที่ 4.10 (ต่อ)

จากผลของการ Alignment เชื้อของแบคทีเรียทั้ง 46 ไอโซเลต พบว่า การเรียงตัวของสายนิวคลีโอไทด์มีความเหมือนและใกล้เคียงกันในบางช่วงของ DNA หลังจากนั้นได้มีการนำมาจัดกลุ่มแบบ Phylogram Tree โดยใช้โปรแกรม CLUSTALW2 ได้ผลดังรูปที่ 4.11



ภาพที่ 4.11 การจัดกลุ่มแบบ Phylogram Tree ของสาย DNA ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ 46 ไอโซเลต จัดกลุ่มเรียงตามความเหมือนและใกล้เคียงกันตามนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA โดยใช้โปรแกรม ClustalW2

จากผลของ Alignment (ภาพที่ 4.10) และ Phylogram Tree (ภาพที่ 4.11) ทำให้สามารถแบ่งเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 คือ รหัสเชื้อ KB11 KB14 KB18 KB 41 KB42 KB100 KB111 KB112 KB114 TS13 TS31 TS33 TS34 TS35 TS36 TS42 WY21 WY22 WY41 และ WY42 ซึ่งมีความเหมือนและความใกล้เคียงกับ *Bacillus aquimaris* strain TF-12

กลุ่มที่ 2 คือ รหัสเชื้อ TS25 TS32 WY11 และ WY43 ซึ่งเป็นกลุ่มที่ค่อนข้างจะมีความหลากหลาย โดยจะมีความเหมือนและความใกล้เคียงกับ *Bacillus amyloliquefaciens*, *Rhodococcus equi* strain และ *Bacillus gibsonii* strain DSM 8722

กลุ่มที่ 3 คือ รหัสเชื้อ KB12 KB13 KB15 KB16 KB17 KB113 KB115 TS11 TS12 TS14 TS21 TS22 TS23 TS24 TS26 TS41 TS43 TS44 TS45 TS46 TS47 และ WY44 ซึ่งมีความเหมือนและความใกล้เคียงกับ *Bacillus aryabhattai* strain B8W22

อย่างไรก็ตามในกลุ่มใหญ่แต่ละกลุ่มยังสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยได้อีก ทำให้เห็นถึงความหลากหลายของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้ ในดินตะกอนบริเวณป่าชายเลน ในเขตจังหวัดจันทบุรี

การคัดเลือกและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส

1. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสในอาหารเหลว

นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดกรองในอาหารแข็ง โดยมีวงใสรอบๆ โคโลนีที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 10 มิลลิเมตร โดยเลือกเชื้อที่เกิดวงใสขนาดใหญ่ 5 อันดับแรก ได้แก่ เชื้อรหัส KB42, KB111, TS42, KB100 และ WY43 มาทำการคัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสในอาหารเหลว โดยถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว nutrient broth (NB) ที่เติมเกลือ NaCl 3 เปอร์เซ็นต์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการแยกส่วนน้ำใสออกจากตัวเซลล์ น้ำใสที่แยกได้ (crude enzyme) จะนำไปทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์โดยใช้ azocasein เป็นสารตั้งต้น ได้ผลดังตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการคัดกรอง

รหัสเชื้อ	กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส (Unit /ml)
KB42	10.74±1.96
KB100	10.73±0.70
KB111	23.93±0.29
TS42	16.12±1.99
WY43	18.65±0.73

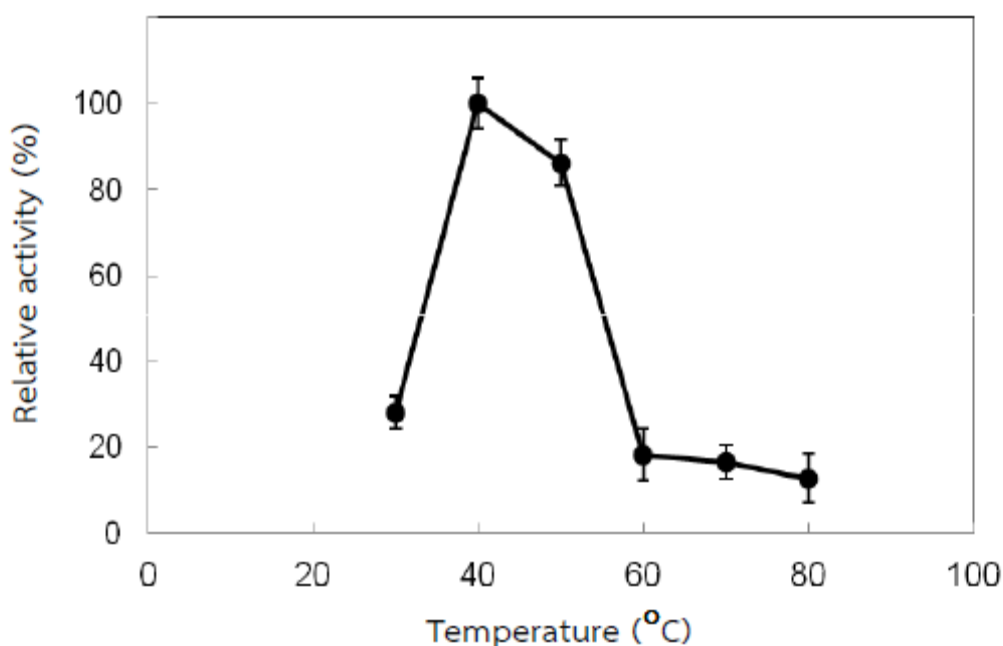
จากผลการทดลอง พบว่าเชื้อรหัส KB111 เกิดกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสได้สูงสุดที่ 23.93 Unit/ml รองลงมาคือ WY43 และ TS42 โดยเกิดกิจกรรมได้ 18.65 และ 16.12 Unit/ml ตามลำดับ เมื่อใช้ azocasein เป็นสารตั้งต้นได้

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส

ทำการคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสมา 1 เชื้อ โดยพบว่าเชื้อ KB111 เป็นเชื้อที่สามารถเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งในอาหารแข็ง ที่ใช้ skim milk เป็นสารตั้งต้น และอาหารเหลวที่ใช้ azocasein เป็นสารตั้งต้นได้มีประสิทธิภาพดีที่สุด มาทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์

2.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์

ทำการเลี้ยงเชื้อ KB111 ในอาหารเหลว และแยกส่วนน้ำใสออกจากตัวเซลล์ หลังจากนั้นนำส่วนใสที่แยกได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 30-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และวัดการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ โดยใช้ azocasein เป็นสารตั้งต้น นำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ (relative activity) ได้ผลดังภาพที่ 4.12

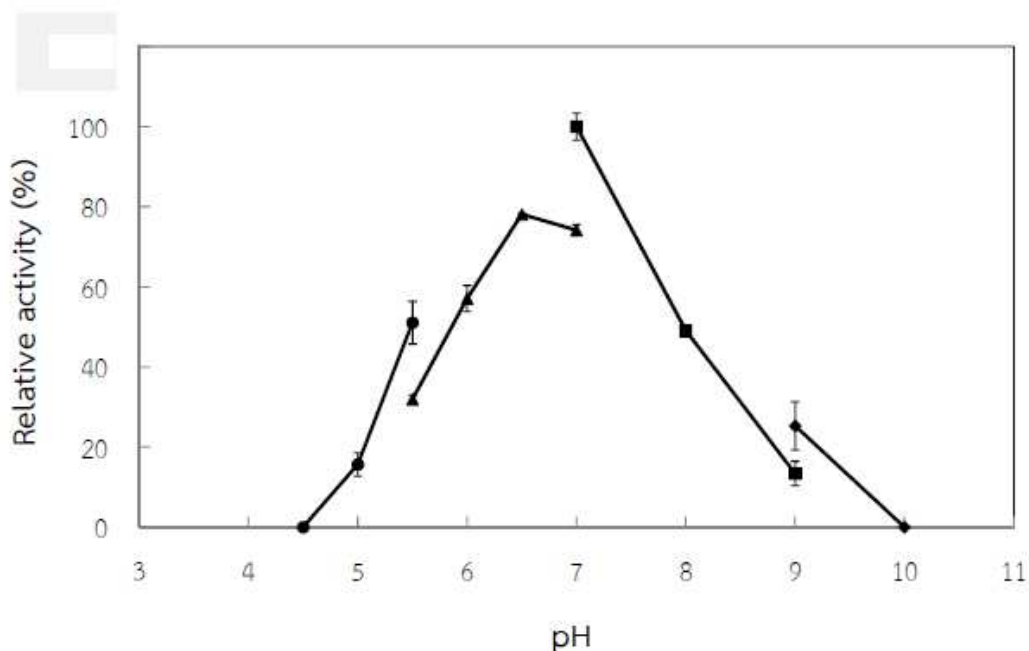


ภาพที่ 4.12 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์

เชื้อ KB111 สามารถเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยเกิดกิจกรรมที่ 23.93 Unit/ml และที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์ยังคงเสถียรอยู่ลดลงเพียง 15 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นถึง 60 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็ว โดยลดลงถึง 80 เปอร์เซ็นต์

2.2 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์

ทำการเลี้ยงเชื้อ KB111 ในอาหารเหลว และแยกส่วนน้ำใสออกจากตัวเซลล์ หลังจากนั้นนำส่วนใสที่แยกได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และวัดการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ โดยใช้สารละลาย 2% (w/v) azocasein ที่ละลายในบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอช 4.5-10.0 เป็นสารตั้งต้น และนำมาค่าที่ได้มาคำนวณหาค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ (relative activity) ได้ผลดังภาพที่ 4.13



ภาพที่ 4.13 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทดลองมีความเข้มข้นที่ 50 mM โดยสัญลักษณ์ ● คือ Sodium Acetate ▲ คือ Sodium phosphate ■ คือ Tris-HCl และ ◆ คือ glycine-NaOH

เชื้อ KB111 สามารถเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ได้สูงสุดที่ค่า pH ประมาณ 7 ในสารละลาย 50 mM Tris-HCl โดยเกิดกิจกรรมได้สูงสุดถึง 47 ± 1.03 Unit/ml และเมื่อทำการเปลี่ยนเป็น ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยมีค่า pH ที่เท่ากัน จะพบว่า กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นแสดงว่านอกจากค่าความเป็นกรด-ด่างจะมีผลต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์แล้ว ชนิดของบัฟเฟอร์ก็มีผลต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์เช่นเดียวกัน

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

เชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสที่แยกได้จากตัวอย่างดินตะกอนในบริเวณต่าง ๆ ของป่าชายเลนในเขตจังหวัดจันทบุรี 3 แหล่ง มีทั้งหมดจำนวน 46 ไอโซเลต โดยพบที่สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 (ท่าสอย จันทบุรี) มากที่สุดถึง 23 ไอโซเลต รองลงมาพบที่ศูนย์การศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบนอันเนื่องมาจากพระราชดำริ จำนวน 16 ไอโซเลต และสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 3 (ขลุง จันทบุรี) จำนวน 7 ไอโซเลต และเมื่อทำการคัดกรองบนอาหารแข็ง พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียที่มีวงใสรอบ ๆ โคโลนีที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 10 มิลลิเมตร จำนวน 13 ไอโซเลต โดยพบจากศูนย์การศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบนอันเนื่องมาจากพระราชดำริ จำนวน 6 ไอโซเลต ได้แก่ เชื้อรหัส KB14, KB42, KB100, KB 111, KB 112 และ KB113 จากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 (ท่าสอย จันทบุรี) จำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ เชื้อรหัส TS13, TS26, TS33, TS35 และ TS42 และเชื้อที่แยกจากบริเวณสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 3 (ขลุง จันทบุรี) จำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ เชื้อรหัส WY21 และ WY 43

การตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่แยกได้ทั้ง 46 ไอโซเลต โดยการย้อมแกรมและส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่า เชื้อที่แยกได้ทั้งหมดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ส่วนใหญ่มีรูปร่างเป็นท่อน และรูปไข่ มีบางเชื้อที่มีรูปร่างที่เรียงต่อกันเป็นสาย และเมื่อนำเชื้อทั้ง 46 ไอโซเลตมาจำแนกคุณสมบัติทางชีวเคมีด้วย 16S rRNA พบว่า เชื้อที่พบแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 จะมีความเหมือนและความใกล้เคียงกับ *Bacillus aquimaris* strain TF-12 กลุ่มที่ 2 ค่อนข้างจะมีความหลากหลาย โดยจะมีความเหมือนและความใกล้เคียงกับ *Bacillus amyloliquefaciens*, *Rhodococcus equi* strain และ *Bacillus gibsonii* strain DSM 8722 และกลุ่มที่ 3 จะมีความเหมือนและความใกล้เคียงกับ *Bacillus aryabhattai* strain B8W22

เชื้อ KB111 ที่แยกได้จากดินตะกอนของศูนย์การศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบนอันเนื่องมาจากพระราชดำริ เป็นเชื้อที่มีความสามารถในการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสทั้งในอาหารแข็ง ที่ใช้ skim milk เป็นสารตั้งต้น และอาหารเหลวที่ใช้ azocasein เป็นสารตั้งต้น ได้มีประสิทธิภาพดีที่สุด โดยเชื้อ KB111 จัดเป็นเชื้อในกลุ่มที่ 1 ซึ่งมีความเหมือนและความใกล้เคียงกับ *Bacillus aquimaris* strain TF-12 เมื่อทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเชื้อ KB111 ต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส พบว่า สภาวะที่เหมาะสมของเชื้อ KB111 คือ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในสารละลาย 50 mM Tris-HCl pH 7.0 โดยเกิดกิจกรรมได้สูงสุดถึง 47 ± 1.03 Unit/ml

อภิปรายผล

การแยกและคัดกรองแบคทีเรียชอบเกลือที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอส

ในการศึกษาได้ทำการเก็บตัวอย่างดินตะกอนจากบริเวณต่างๆ ของป่าชายเลนในเขตจังหวัด จันทบุรี 3 แหล่ง ได้แก่ 1) ศูนย์การศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน อันเนื่องมาจากพระราชดำริ ต.คลองขุด อ.ท่าใหม่ จ.จันทบุรี 2) สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 (ท่าสอน จันทบุรี) ต.บ่อ อ.ขลุง จ.จันทบุรี และ 3) สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 3 (ขลุง จันทบุรี) ต.เกวียนหัก อ.ขลุง จ.จันทบุรี โดยเลือกจากความเป็นธรรมชาติและความอุดมสมบูรณ์ของป่าชายเลน รวมทั้งห่างไกลจาก แหล่งชุมชน แหล่งที่ 1 เป็นโครงการอันเนื่องมาจากพระราชดำริ ซึ่งเป็นโครงการอนุรักษ์ธรรมชาติ ทำให้ป่าชายเลนยังมีความอุดมสมบูรณ์อยู่สูง สำหรับแหล่งที่ 2 และ 3 เป็นสถานีพัฒนาทรัพยากร ป่าชายเลน ซึ่งเป็นเขตอนุรักษ์ รวมถึงอยู่ห่างไกลจากชุมชนและบริเวณที่ทำนาเกลือ เนื่องจากลักษณะ และสภาพของดินตะกอนบริเวณป่าชายเลนที่มีความอุดมสมบูรณ์สูง ซึ่งได้จากธาตุอาหารที่ไหลมาจาก แหล่งต่าง ๆ ได้แก่ จากการกัดเซาะตามชายฝั่งและแหล่งน้ำลำธาร ชากพืชซากสัตว์บริเวณป่าชายเลน เป็นต้น ทำให้มีสิ่งมีชีวิตรวมถึงจุลินทรีย์อาศัยอยู่เป็นจำนวนมาก และเมื่อทำการแยกเชื้อแบคทีเรียที่ ผลิตโปรตีเอสจากดินตะกอนที่ได้ พบว่าที่สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 (ท่าสอน จันทบุรี) มีความหลากหลายของเชื้อมากที่สุด รองลงมาคือศูนย์การศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบนอัน เนื่องมาจากพระราชดำริ แสดงให้เห็นว่าป่าชายเลนจากแหล่งทั้ง 2 ยังมีความอุดมสมบูรณ์สูง รวมทั้ง เมื่อทำการคัดกรองบนอาหารแข็ง พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่มีวงใสรอบ ๆ โคโลนีที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง มากกว่า 10 มิลลิเมตร ส่วนใหญ่มาจากศูนย์การศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน และสถานีพัฒนา ทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 (ท่าสอน จันทบุรี) แต่สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 3 (ขลุง จันทบุรี) พบความหลากหลายของเชื่อน้อยที่สุดเพียง 7 ไอโซเลต ซึ่งแสดงถึงความอุดมสมบูรณ์ของป่าชายเลน ที่ลดลง และเมื่อทำการคัดกรองบนอาหารแข็ง พบเชื้อที่มีวงใสรอบ ๆ โคโลนีที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง มากกว่า 10 มิลลิเมตร เพียง 2 ไอโซเลต ความหลากหลายที่น้อยอาจเนื่องจากสถานีพัฒนาทรัพยากร ป่าชายเลนที่ 3 มีพื้นที่ขนาดเล็ก แหล่งของดินตะกอนมีความอุดมสมบูรณ์น้อย รวมทั้งในการเก็บ ตัวอย่าง ได้ทำการเก็บตัวอย่างของดินที่อยู่บริเวณชายฝั่งเท่านั้น แต่ศูนย์การศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้ง กระเบนได้มีการเก็บตัวอย่างดินตะกอนหลายจุดทั้งบริเวณที่ไกลและใกล้ทะเล

การตรวจสอบลักษณะและจำแนกชนิดของแบคทีเรียชอบเกลือที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอส

เมื่อทำการตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่แยกได้ทั้ง 46 ไอโซเลต โดยการ พิจารณาจากลักษณะโคโลนี การย้อมแกรมและส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่า เชื้อที่แยกมีความ หลากหลายในด้านลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมถึงรูปแบบของเซลล์ โดยมีรูปร่าง ที่เป็นรูปท่อน รูปไข่ รูปกลม รวมถึงบางเชื้อเป็นรูปท่อนหรือรูปไข่ที่เรียงต่อกันเป็นสาย ซึ่งแสดงให้ เห็นถึงความหลากหลายของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ และเมื่อมาจำแนกคุณสมบัติทางชีวเคมีด้วยวิธี 16S rRNA พบว่า เชื้อที่พบในแหล่งที่ 1 ศูนย์การศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน สามารถแบ่งกลุ่ม เชื้อได้เป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 จะมีความเหมือนและความใกล้เคียงกับเชื้อ *Bacillus aquimaris* strain TF-12 ซึ่งมีจำนวน 9 ไอโซเลต ได้แก่ รหัสเชื้อ KB11, KB14, KB18, KB100, KB111, KB112,

KB114, KB41 และ KB42 ซึ่งเชื้อในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่เป็นเชื้อที่เกิดวงใสรอบ ๆ โคลนินที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 10 มิลลิเมตร กลุ่มที่ 2 จะมีความเหมือนและความใกล้เคียงกับเชื้อ *Bacillus aryabhattai* strain B8W22 ซึ่งมีจำนวน 7 ไอโซเลต ได้แก่ รหัสเชื้อ KB12, KB13, KB15, KB16, KB17, KB113 และ KB115 เชื้อที่พบในแหล่งที่ 2 สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 (ท่าสนอน จันทบุรี) มีความหลากหลายค่อนข้างสูง โดยสามารถแบ่งกลุ่มเชื้อได้เป็น 5 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 จะมีความเหมือนและความใกล้เคียงกับเชื้อ *Bacillus aquimaris* strain TF-12 ซึ่งมีจำนวน 7 ไอโซเลต ได้แก่ รหัสเชื้อ TS13, TS31, TS33, TS34, TS35, TS36 และ TS42 กลุ่มที่ 2 จะมีความเหมือนและความใกล้เคียงกับเชื้อ *Bacillus aryabhattai* strain B8W22 ซึ่งมีจำนวน 10 ไอโซเลต ได้แก่ รหัสเชื้อ TS11, TS12, TS22, TS23, TS24, TS26, TS43, TS44, TS45, TS46 และ TS47 กลุ่มที่ 3 จะมีความเหมือนและความใกล้เคียงกับเชื้อ *Bacillus megaterium* strain NBRC 15308 ซึ่งมีจำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ รหัสเชื้อ TS14, TS21 และ TS41 กลุ่มที่ 4 จะมีความเหมือนและความใกล้เคียงกับเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* ซึ่งมีจำนวน 1 ไอโซเลต ได้แก่ รหัสเชื้อ TS25 กลุ่มที่ 5 จะมีความเหมือนและความใกล้เคียงกับเชื้อ *Rhodococcus equi* strain ซึ่งมีจำนวน 1 ไอโซเลต ได้แก่ รหัสเชื้อ TS32 เชื้อที่พบในแหล่งที่ 3 สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 3 (ขลุง จันทบุรี) สามารถแบ่งกลุ่มเชื้อได้เป็น 3 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 จะมีความเหมือนและความใกล้เคียงกับเชื้อ *Bacillus aquimaris* strain TF-12 ซึ่งมีจำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ รหัสเชื้อ WY21, WY22, WY41 และ WY42 กลุ่มที่ 2 จะมีความเหมือนและความใกล้เคียงกับเชื้อ *Bacillus aryabhattai* strain B8W22 ซึ่งมีจำนวน 1 ไอโซเลต ได้แก่ รหัสเชื้อ WY44 และกลุ่มที่ 3 จะมีความเหมือนและความใกล้เคียงกับเชื้อ *Bacillus gibsonii* strain DSM 8722 ซึ่งมีจำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ รหัสเชื้อ WY11 และ WY43 จากข้อมูลการจำแนกคุณสมบัติทางชีวเคมีด้วยวิธี 16S rRNA จะพบว่าดินตะกอนในบริเวณป่าชายเลนทั้ง 3 แหล่ง จะพบเชื้อที่มีความเหมือนและความใกล้เคียงกับเชื้อ *Bacillus aquimaris* strain TF-12 และ *Bacillus aryabhattai* strain B8W22 ซึ่งเชื้อ *Bacillus aquimaris* strain TF-12 เป็นเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้มาจากน้ำทะเลบริเวณชายหาดของทะเลเหลืองในประเทศเกาหลี ซึ่งลักษณะของโคลนที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อจะออกเป็นสีเหลือง-สีส้มอ่อน รูปร่างของเชื้อเป็นรูปท่อน ขนาดประมาณ $0.5-0.7 \times 1.2-3.5 \mu\text{m}$ มีแฟลกเจลลาเป็นแบบ Peritrichous และสร้างสปอร์ได้บริเวณตรงกลางของเซลล์ เชื้อมีคุณสมบัติในการทนเกลือได้สูงถึง 17% (w/v) ค่า pH ที่เหมาะสมในการเจริญ คือ 6.0-7.0 และไม่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสได้ มีความสามารถในการย่อย tween 80 และ starch ได้ (Yoon et al., 2003) สำหรับเชื้อ *Bacillus aryabhattai* strain B8W22 เป็นเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้มาจากหลอดแก้ว cryotube ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างอากาศจากบริเวณชั้นบรรยากาศส่วนบน ที่ประเทศอินเดีย ซึ่งลักษณะของโคลนที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อจะออกเป็นสีส้มอมชมพู รูปร่างของเชื้อเป็นรูปท่อน เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคลนประมาณ 5-8 mm มี endospore รูปร่างกลมรี ตรงกลางเซลล์ เชื้อมีคุณสมบัติในการทนเกลือได้ที่มีความเข้มข้น 2 M อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ คือ 28 องศาเซลเซียส และเจริญได้สูงสุดที่ 37 องศาเซลเซียส มีความสามารถในการย่อย aesculin, starch และ casein ได้ (Shivaji et al., 2009)

การคัดเลือกและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส

ในการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่เกิดกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด ได้ทำการคัดเลือกโดยใช้อาหารเหลว เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จะมีการสร้างเอนไซม์ขึ้นภายในเซลล์แล้วจะมีการปล่อยเอนไซม์ออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) และสามารถเกิดกิจกรรมกับสารตั้งต้น (substrate) ได้ สำหรับการคัดเลือกได้เลือกจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดกรองในอาหารแข็ง โดยมีวงใสรอบๆ โคลนินที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 10 มิลลิเมตร ที่มีขนาดของวงใสใหญ่ 5 อันดับแรก ได้แก่ เชื้อรหัส KB42, KB111, TS42, KB100 และ WY43 มาทำการคัดเลือกเชื้อ เมื่อพิจารณารหัสเชื้อกับการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย พบว่า เชื้อรหัส KB42, KB111, TS42 และ KB100 มีความเหมือนและความใกล้เคียงกับเชื้อ *Bacillus aquimaris* strain TF-12 และเชื้อรหัส WY43 มีความเหมือนและความใกล้เคียงกับเชื้อ *Bacillus aryabhatai* strain B8W22 เมื่อทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์โดยใช้ azocasein เป็นสารตั้งต้น พบว่า เชื้อรหัส KB111 เกิดกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสได้สูงสุด ซึ่งสูงกว่าเชื้อรหัส KB42 ทั้งที่ในอาหารแข็งเชื้อรหัส KB42 เป็นเชื้อที่เกิดวงวงใสรอบๆ โคลนินที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางสูงสุด และมากกว่าเชื้อรหัส KB111 ซึ่งการคัดกรองในอาหารแข็งเป็นการพิจารณาเบื้องต้นถึงความสามารถในการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ แต่ยังไม่ทราบถึงปริมาณเอนไซม์ที่ถูกผลิตออกมาได้ จึงไม่สามารถเปรียบเทียบถึงความสามารถของเอนไซม์ของเชื้อแต่ละชนิดได้ เมื่อทำการถ่ายเชื้อที่คัดกรองลงในอาหารเหลวจะพบว่าเชื้อแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการเจริญที่แตกต่างกัน อาจเนื่องจากสภาวะในการบ่ม และความเร็วรอบในการเลี้ยง ซึ่งการเจริญที่แตกต่างกันส่งผลต่อปริมาณเอนไซม์ที่ขับออกมาภายนอกเซลล์ โดยเชื้อรหัส KB111, WY43 และ TS42 เจริญในอาหารเหลวได้สูง แต่ KB42 และ KB100 เจริญในอาหารเหลวได้ไม่ดี การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อมีความสำคัญต่อการผลิตเอนไซม์ เพื่อให้ได้เอนไซม์ที่มีปริมาณมากและมีประสิทธิภาพในการเกิดกิจกรรมกับสารตั้งต้น

สำหรับการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ ได้ทำการคัดเลือกเชื้อรหัส KB111 ซึ่งเป็นเชื้อที่สามารถเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งในอาหารแข็งที่ใช้ skim milk เป็นสารตั้งต้น และอาหารเหลวที่ใช้ azocasein เป็นสารตั้งต้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ มาทำการศึกษา พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์ในการเกิดกิจกรรมของเชื้อ KB111 คือประมาณ 40 องศาเซลเซียส และกิจกรรมของเอนไซม์จะลดต่ำลงอย่างชัดเจน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิสูงประมาณ 60-80 องศาเซลเซียส ซึ่งเมื่ออุณหภูมิต่ำเกินไป จะส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์ช้าลงหรือหยุด แต่ถ้าอุณหภูมิสูงเกินไป จะส่งผลให้โครงสร้างของเอนไซม์เสียสภาพ (denature) ได้ อุณหภูมิมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยการเพิ่มอุณหภูมิจะส่งผลต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุลทั้งในเอนไซม์และสารตั้งต้น ทำให้เอนไซม์และสารตั้งต้นเคลื่อนที่ได้เร็วและมีโอกาสเจอกันมากขึ้น ดังนั้นการเกิดกิจกรรมก็จะเร็วขึ้นตามไปด้วย แต่อย่างไรก็ตามอุณหภูมิที่สูงขึ้นอาจส่งผลต่อโครงสร้างของเอนไซม์ซึ่งเป็นโปรตีน อาจทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติได้ และโครงสร้างบริเวณเร่งก็จะเปลี่ยนไป ทำให้ไม่สามารถจับกับสารตั้งต้นได้อีกต่อไป นอกจากนั้นจากผลอุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์ในการเกิดกิจกรรมแสดงให้เห็นว่าเชื้อ KB111 เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มของ Mesophile คือเจริญได้ดีในอุณหภูมิปานกลาง สำหรับค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ คือ pH 7 ในสารละลาย 50 mM Tris-HCl ซึ่ง pH ที่เหมาะสมจะแตกต่างกันไปตามสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด โดยทั่วไป

มักพบค่า pH ที่เหมาะสมประมาณ 7 และกิจกรรมของเอนไซม์จะลดต่ำลง ที่ค่า pH ต่ำ ประมาณ 4.5-6 และที่ค่า pH สูง ประมาณ 8-10 ซึ่งค่า pH มีผลต่อหมู่ไฮดรอกซิลของกรดอะมิโนซึ่งเป็นองค์ประกอบภายในโครงสร้างของเอนไซม์ โดยเฉพาะบริเวณเร่งของเอนไซม์ ทำให้กรดอะมิโนมีประจุที่เปลี่ยนไป การเปลี่ยนประจุอาจส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงได้ แต่ถ้ามีค่า pH ที่สูงหรือต่ำเกินไปอาจทำให้เอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติได้เช่นกัน

ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้

1. ผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัยเป็นข้อมูลพื้นฐานที่มีประโยชน์ต่อนักวิจัย และนักวิชาการ เพื่อทราบถึงความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์โปรตีเอส ในบริเวณดินตะกอนป่าชายเลน ในเขตจังหวัดจันทบุรี รวมถึงการนำความหลากหลายทางชีวภาพไปใช้ประโยชน์ในอนาคตได้
2. ข้อมูลทางด้านการเกิดกิจกรรมและสภาวะที่เหมาะสมของเชื้อแบคทีเรีย เป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ สำหรับการนำเชื้อที่แยกได้ ไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมที่ต้องการใช้โปรตีเอสในกระบวนการผลิต

ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป

1. ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อที่แยกได้ ที่สร้างวงใสรอบๆ โคโลนีที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 10 มิลลิเมตรทั้งหมด เพื่อทราบถึงความสามารถในการเกิดกิจกรรมในช่วงของอุณหภูมิ และค่า pH ที่กว้างที่สุด และยังมีกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ในระดับสูง เพื่อคัดเลือกมาประยุกต์ในอุตสาหกรรมได้อย่างเหมาะสมต่อไป
2. นำเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงที่แยกได้ไปทดสอบความสามารถในการทนต่อเกลือ สารเคมีชนิดต่าง ๆ และ EDTA เพื่อศึกษาถึงความเสถียร (stability) ของเชื้อ และเปรียบเทียบกับเชื้อที่มีการใช้ในอุตสาหกรรมในปัจจุบัน
3. ทำการตรวจสอบตำแหน่งของ amino acid sequence ของสายพันธุ์เชื้อที่มีความใกล้เคียงกับเชื้อ KB111 เพื่อหา sequence ตำแหน่งที่เป็นโปรตีเอส และทำการศึกษาทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ โดยทำ plasmid construction, overproduction และ purification โปรตีน รวมถึงทดสอบประสิทธิภาพในการเกิดกิจกรรมของโปรตีน

บรรณานุกรม

บรรณานุกรมภาษาไทย

- ปราณี อ่านเปรื่อง. (2547). *เอนไซม์ทางอาหาร*. (พิมพ์ครั้งที่ 4). กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. (2550). *จุลชีววิทยาทั่วไป*. (พิมพ์ครั้งที่ 6). กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วีรานุช หลาง. (2551). *จุลชีววิทยาสังแวดล้อม*. (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

บรรณานุกรมภาษาต่างประเทศ

- Aguilar, C.N., Gutierrez-Sanchez, Rado-Barragan, P.A., Rodriguez-Herrera, R., Martinez Hernandez, J.L. & Contreras-Esquivel, J.C. (2008). Perspective of solid state fermentation for production of food enzymes. *Am. J. Biochem. & Biotech.*, 4, 354-366.
- Beynon, R. & Bond, J.S. (2001). *Proteolytic Enzymes: A Practical Approach*. (2nd ed.). Oxford: Oxford University Press.
- Das, S., De, M., Ray, R., Ganguly, D., Jana, T.K. & De, T.K. (2011). Salt tolerant culturable microbes accessible in the soil of the Sundarban Mangrove forest, India. *Open Journal of Ecology*, 1, 35-40.
- Foophow, T., Tanaka, S., Koga, Y., Takano, K. & Kanaya, S. (2010). Subtilisin-like serine protease from hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* with N- and C-terminal propeptides. *Protein Eng. Des. Sel.*, 23, 347-355.
- Gupta, R., Beg, Q.K. & Lorenz, P. (2002). Bacterial alkaline proteases: Molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59, 15-32.
- Horton, H.R., Moran, L.A., Ochs, R.S., Rawn, J.D. & Scrimgeour, K.G. (2002). *Principles of Biochemistry*. (3rd ed.). New Jersey: Prentice-Hall.
- Berg, J., T, J.L. & Stryer, L. (2007). *Biochemistry*, (6th ed.). New York: W. H. Freeman and Company.
- Kumar, C.G. & Takagi, H. (1999). Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnol Adv.*, 17, 561-594.
- Moradian, F., Khajeh, K., Naderi-Manesh, H., Ahmadvand, R., Sajedi, R.H. & Sadeghizadeh, M. (2006). Thiol-dependent serine alkaline proteases from *Bacillus* sp. HR-08 and KR-8102. *Appl. Biochem. Biotech.*, 134, 77-85.

- Patel, R., Dodia, M. & Singh, S.P. (2005). Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp.: Production and optimization. *Process Biochem.*, 40, 3569-3575.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S. & Deshpande, V.V. (1988). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. and Molecular Biol. Rev.*, 62, 597-635.
- Schäfer, T., Borchert, T.W., Nielsen, V.S., Skagerlind, P., Gibson, K., Wenger, K., Hatzack, F., Nilsson, L.D., Salmon, S., Pedersen, S., Heldt-Hansen, H.P., Poulsen, P.B., Lund, H., Oxenboll, K.M., Wu, G.F., Pedersen, H.H., & Xu, H. (2007). Industrial enzymes. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 105, 59-131.
- Shivanand, P. & Jayaraman, G. (2009). Production of extracellular protease from halotolerant bacterium, *Bacillus aquimaris* strain VITP4 isolated from Kumta coast. *Process Biochem.*, 44, 1088-1094.
- Shivaji, S., Chaturvedi, P., Begum, Z., Pindi, P.K., Manorama, R., Padmanaban, D.A., Shouche, Y.S., Pawar, S., Vaishampayan, P., Dutt, C.B., Datta, G.N., Manchanda, R.K., Rao, U.R., Bhargava, P.M. & Narlikar, J.V. (2009). *Janibacter hoylei* sp. nov., *Bacillus isronensis* sp. nov. and *Bacillus aryabhatai* sp. nov., isolated from cryotubes used for collecting air from the upper atmosphere. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 59, 2977-2986.
- Singh, J., Vohra, R.M. & Sahoo, D.K. (2004). Enhanced production of alkaline protease by *Bacillus sphaericus* using fed-batch culture. *Process Biochem.*, 39, 1093-1101.
- Suganthi, C., Mageswari, A., Karthikeyan, S., Anbalagan, M., Sivakumar, A. & Gothandam, K.M. (2013). Screening and optimization of protease production from a halotolerant *Bacillus licheniformis* isolated from saltern sediments. *J. Genetic Eng. And Biotech.*, 11, 47-52.
- Suguna, K., Padlan, E.A., Smith, C.W., Carlson, W.D. & Davies, D.R. (1987). Binding of a reduced peptide inhibitor to the aspartic proteinase from *Rhizopus chinensis*: implications for a mechanism of action. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84, 7009-7013.
- Venugopal, M. & Saramma, A.V. (2006). Characterization of alkaline protease from *Vibrio fluvialis* strain VM10 isolated from a mangrove sediment sample and its application as a laundry detergent additive. *Process Biochem.*, 41, 1239-1243.
- Voet, D., Voet, J.G. & Pratt, C. (2006). *Fundamentals of biochemistry: Life at the Molecular level*. (2rd ed.). New Jersey: John Wiley & Sons Inc.

- Willey, J.M., Sherwood, L.M. & Woolverton, C.J. (2009). *Prescott's principles of microbiology*. New York: McGraw-Hill.
- Yoon, J.H., Kim, I.G., Kang, K.H., Oh, T.K. & Park, Y.H. (2003). *Bacillus marisflavi* sp. nov. and *Bacillus aquimaris* sp. nov., isolated from sea water of a tidal flat of the Yellow Sea in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53, 1297-1303.
- Zhou, M.Y., Chen, X.L., Zhao, H.L., Dang, H.Y., Luan, X.W., Zhang, X.Y., He, H.L., Zhou, B.C. & Zhang, Y.Z. (2009). Diversity of both the cultivable protease-producing bacteria and their extracellular proteases in the sediments of the South China sea. *Microb. Ecol.*, 58, 582-590.

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-นามสกุล	นางสาว ฐิตา พู่เฒ่า
ตำแหน่งปัจจุบัน	พนักงานมหาวิทยาลัย ตำแหน่งอาจารย์
หน่วยงานและสถานที่ติดต่อ	หลักสูตรเทคโนโลยีการแปรรูปอาหาร โรงเรียนการเรือน มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต 228-228/1-3 ถนนสิรินธร เขตบางพลัด กรุงเทพมหานคร 10700 เบอร์โทรศัพท์ 02-4239435 มือถือ 080-6172529 E-mail: tita_foo@dusit.ac.th

ประวัติการศึกษา

Ph.D. Eng (Biotechnology)	Osaka University, Osaka, Japan
M. Eng. (Biotechnology)	Osaka University, Osaka, Japan
วท.ม. (วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม)	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
วท.บ. (เทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร)	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ (เกียรตินิยมอันดับที่ 2)

ผลงานวิจัย

1. Sinsereekul, N*, **Foophow, T***, Yamanouchi, M., Koga, Y., Takano, K., and Kanaya, S. (2011) An alternative mature form of subtilisin homologue, Tk-SP, from *Thermococcus kodakaraensis* identified in the presence of Ca^{2+} . FEBS J. 278(11): 1901-1911.

* These authors contributed equally to this work

2. **Foophow, T.**, Tanaka, S., Angkawidjaja, C., Koga, Y., Takano, K., and Kanaya, S. (2010) Crystal structure of a subtilisin homologue, Tk-SP, from *Thermococcus kodakaraensis*: requirement of a C-terminal β -jelly roll domain for hyperstability. *J. Mol. Biol.* 400(4): 865-877.

3. **Foophow, T.**, Tanaka, S., Koga, Y., Takano, K., and Kanaya, S. (2010) Subtilisin-like serine protease from hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* with N- and C-terminal propeptides. *Protein Eng. Des. Sel.*, 23(5), 347-355.

4. Noitang, S., Sooksai, S.A., **Foophow, T.**, and Petsom, A. (2009) Proximate Analysis and Physico-Chemical Properties of Flour from the Seeds of the China Chestnut, *Sterculia monosperma* Ventenat. *PJBS.*, 12(19), 1314-1319.

ชื่อ-นามสกุล นางสาว จันทร์เพ็ญ ตั้งจิตรเจริญกุล
 ตำแหน่งปัจจุบัน พนักงานมหาวิทยาลัย ตำแหน่งอาจารย์
 หน่วยงานและสถานที่ติดต่อ คณะวิทยาศาสตร์ ศรีราชา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
 วิทยาเขตศรีราชา 199 ม.6 ถนนสุขุมวิท
 ต.ทุ่งสุขลา อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี 20230
 เบอร์โทรศัพท์ 038-354589 มือถือ 089-7627704
 E-mail: frenvijpt@src.ku.ac.th

ประวัติการศึกษา

วท.บ. (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร
 วท.ม. (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
 วท.ด. (เทคโนโลยีชีวภาพ) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลงานวิจัย

1. Janpen Tangjitjaroenkun, Vichien Kitprechavanit, Surang Suthirawut, Pratumpon Chimanake, Wanna Praprirong, Warawut Krusong, Busaba Yongsmith. 2004. Improvement of high vitamin B12 Thua nao by mixed cultures of soybean oligosaccharide and the use of bacteria and yeast. Kasetart Journal (Natural Science). 38: 123-130.
2. Janpen Tangjitjaroenkun, Roongtawan Supabphol, Warinthorn Chavasiri. 2012. Antioxidant effect of *Zanthoxylum limonella* Alston. Journal of Medicinal Plants Research. 6(8): 1407-1414.
3. Janpen Tangjitjaroenkun, Oraphin Chantarasriwong, Warinthorn Chavasiri. 2012. Chemical Constituents of the Stems of *Zanthoxylum limonella* Alston. Journal of Phytochemistry Letters. 5: 443-445.
4. Janpen Tangjitjaroenkun, Warinthorn Chavasiri, Sudaluck Thunyaharn, Chulee Yompakdee. 2012. Bactericidal effects and time-kill studies of the essential oil from the fruits of *Zanthoxylum limonella* on multi-drug resistant bacteria. Journal of Essential oil Research. 24(4): 363-370.

