

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 การเพาะเลี้ยงและการเก็บรักษาแอคติโนมัยซีท

นำแอคติโนมัยซีทจำนวน 100 ไอโซเลท ที่แยกมาจากดินในพื้นที่ของประเทศไทย ได้รับมาจากห้องปฏิบัติการวิจัยสู่ความเป็นเลิศทางวิชาการ ด้านพัฒนาแบบยั่งยืนของทรัพยากรชีวภาพ สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Yeast - malt extract agar (ISP 2) (ภาคผนวก ก) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเก็บเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ลงใน 20% glycerol (v/v) ที่อุณหภูมิ -20 °C และ เก็บในขวดอาหารแข็งที่มี minimal medium agar (ภาคผนวก ก) ที่ 4 °C

3.2 การคัดเลือกแอคติโนมัยซีทที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคไคเนส

ทำการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทด้วยกัน 2 วิธี คือ ทดสอบในอาหารแข็ง (agar culture) และ ทดสอบในอาหารเหลว (liquid culture)

3.2.1 วิธีทดสอบในอาหารแข็ง

นำเชื้อแอคติโนมัยซีทจากข้อที่ 3.1 มาทดสอบโดยการเจาะชั้นวุ้นที่มีเชื้อด้วยปลายพลาสติกเจอปิเปต (pasteur pipette) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นใช้เข็มเย็บเชื้อวางเชื้อแอคติโนมัยซีทลงบนอาหารแข็ง colloidal chitin agar (Hsu and Lockwood, 1975) ที่มี 4% (w/v) colloidal chitin (ภาคผนวก ก) เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 10 - 14 วัน หลังจากนั้นทำการบันทึกเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดขึ้น และ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อแอคติโนมัยซีท โดยจะทำการคำนวณ อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (H) และ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อ (C) ดังสูตรด้านล่าง (Mane and Deskmukh, 2009)

สูตร $H/C \text{ value ratio} = \text{เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (mm)} / \text{ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อ (mm)}$

3.2.2 วิธีทดสอบในอาหารเหลว

- 1) นำเชื้อแอกติโนมัยซีตมาเลี้ยงในอาหารแข็ง ISP 2 บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นถ่ายเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยวของแต่ละไอโซเลท ลงใน test tube ขนาด 18 x 18 mm ที่มีอาหารเหลว enzyme production medium (EPM) (Ulhoa and Perberdy, 1991) ปริมาตร 10 ml ซึ่งมี 0.1% (w/v) colloidal chitin (ภาคผนวก ก) เป็นแหล่งคาร์บอน นำไปบ่มบนเครื่องเขย่า (Triple shaker NR-80 (TAITEC)) ที่ความเร็ว 150 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน
- 2) หลังจากครบ 7 วัน ทำการเก็บน้ำเลี้ยง (crude enzyme) ของแต่ละไอโซเลท โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge harrier 18/80) ความเร็ว 6000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที มาปั่นเพื่อแยกเซลล์ออก โดยเก็บส่วนใสในหลอด microcentrifuge เพื่อทดสอบหาการทำงานของเอนไซม์โดยการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วย DNS method (Miller, 1959) (ภาคผนวก ค)
- 3) วัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนส (chitinase activity)

3.2.3 การวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนส (chitinase activity)

วัดค่าการทำงานของเอนไซม์ไคตินเนส โดยวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วย dinitrosalicylic method (DNS method) (Miller, 1959) แสดงดังตารางที่ 3.1

ตาราง 3.1 การเตรียม reaction mixture

	Crude enzyme (ml)	0.2M Phosphate buffer pH 7.0 (ml)	Substrate (ml) (Colloidal chitin; buffer; 4 g: 1 ml)
Substrate control (SC)	-	1.0	0.5
Enzyme control (EC)	0.5	1.0	-
Enzyme substrate (ES)	0.5	-	1.0

- 1) บ่ม reaction mixture ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิมาตรฐานแม่เหล็ก (water bath) ปิดหลอดด้วยกระดาษอลูมิเนียม ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที
- 2) นำ reaction mixture มาเติมสาร dinitrosalicylic acid (DNS) reagent ปริมาตร 2 ml ปิดหลอดด้วยลูกแก้ว ต้มในน้ำเดือด 15 นาที จากนั้นทำให้เย็นลงทันทีโดยแช่ในอ่างน้ำแข็ง และเติมสารละลาย 40% (w/v) sodium-potassium tartrate ปริมาตร 1 ml (ภาคผนวก ค) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer

- 3) จากนั้นนำ substrate control (SC) และ enzyme substrate (ES) มาทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง ความเร็ว 10,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที เก็บเฉพาะส่วนใส
- 4) นำ reaction mixture ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer (Thermo Spectronic (GENESYS20)) ที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร โดยใช้อาหารเปล่าเป็น blank แทน crude enzyme ปริมาตร 1.5 ml
- 5) นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เทียบกับกราฟมาตรฐาน หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐาน *N*-acetylglucosamine (GluNAG) (ภาคผนวก ง)

1 หน่วยของเอนไซม์ (1 unit or U) หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไคติน ให้เป็น NAG 1 μ Mole ในเวลา 1 นาที ในสภาวะที่กำหนด ที่อุณหภูมิ 37 °C

3.3 การบ่งชี้สายพันธุ์ของแอคติโนมัยซีท ไอโซเลท CMU-NKS-5

3.3.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีท

นำแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนส (chitinase activity) สูงสุด มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง 9 ชนิด คือ ISP 1 ถึง ISP 9 บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7 วัน เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยบันทึกสีของเส้นใยเหนืออาหาร (aerial mycelium) สีเส้นใยใต้อาหาร (substrate mycelium) และ การสร้างสีบนอาหาร (soluble pigment) ในส่วนของลักษณะโคโลนี สีของโคโลนี ความเรียบเนียนของขอบ ทำการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (compound microscope) และ กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) ในอาหารแข็ง ISP 2 และ ศึกษาลักษณะผิวของสปอร์ และการจัดเรียงตัวของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope (SEM)) และ ทำการทดสอบการทนเกลือ (NaCl) ตั้งแต่ที่ความเข้มข้น 0% - 12% ในอาหารแข็ง ISP 2

3.3.2 การศึกษาลักษณะทางเคมีบางประการ ด้วยการตรวจสอบกรดอะมิโน Diaminopimelic acid (DAP) ในผนังเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยซีท

1) การเตรียม whole cell hydrolysis

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทลงในอาหารเหลว ISP 2 บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำการเก็บเซลล์แอคติโนมัยซีท โดยนำไปปั่นเพื่อแยกอาหารเลี้ยงเชื้อ และ เซลล์ออกจากเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง ที่ 6000 rpm เป็นเวลา 15 นาที และ ทำการล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อโดยเทสารละลายส่วนบนทิ้งแล้วเติมน้ำกลั่นลงไปผสมกับตะกอนเซลล์ จากนั้น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ทำการล้างเซลล์ทั้งหมด 3 รอบ และ นำเซลล์มาเติม 6N HCl ปริมาตร 0.1 ml จากนั้น นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

2) การวิเคราะห์กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบบาง (Thin layer chromatography (TLC))

เตรียมสารละลายตัวชะ โดยนำแผ่น TLC สำเร็จที่เคลือบด้วย cellulose ขนาด 20 x 20 cm มาทำเครื่องหมายให้ห่างจากขอบด้านข้าง 1.0 cm กำหนดจุดเริ่มต้นให้ห่างจากขอบด้านล่าง 1.5 cm และ กำหนดจุดสิ้นสุดห่างจากขอบด้านบน 0.5 cm โดยกำหนดระยะห่างระหว่างแต่ละสารเท่ากับ 1 cm และ ใช้หลอด capillary ดูดสารตัวอย่างมาแต่ละลงบนตำแหน่งที่ทำไว้บนแผ่น TLC ตัวอย่างละ 20 - 30 หยด (ประมาณ 0.2 μ l) พร้อมกับหยดสารมาตรฐาน (ใช้ชนิดของ DAP เป็นสารมาตรฐาน) ที่ด้านข้าง โดยการหยดตัวอย่าง และ สารมาตรฐานนี้จะต้องรอให้จุดที่หยดแห้งสนิทก่อนถึงจะทำการหยดซ้ำ เพื่อให้ได้ขนาดที่เล็ก หลังจากนั้นใส่ตัวทำละลาย (developing solvent) (ภาคผนวก จ) ลงใน TLC tank ปิดฝาให้ภายใน TLC tank อิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย แล้วนำแผ่น TLC จุ่มลงใน TLC tank โดยระดับของจุดสารตัวอย่างจะต้องอยู่สูงกว่าตัวทำละลาย จากนั้นปิดฝา รอประมาณ 4 - 6 ชั่วโมงให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่พาสารตัวอย่างขึ้นไปถึงจุดสิ้นสุด (solvent front) หลังจากนั้นนำแผ่น TLC ออกจาก TLC tank โดยเป่าด้วยเครื่องเป่าลมให้แห้งในตู้ดูดควัน (fume hood) จากนั้นพ่นด้วย 0.1% (v/v) ninhydrin reagent ให้ทั่วทั้งแผ่น และ เป่าด้วยเครื่องเป่าลมจนแห้งอีกครั้ง และ นำไปอบในตู้อบความร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 2 นาที จะเห็นจุดสีปรากฏบนแผ่น TLC โดยสามารถวิเคราะห์ชนิดของ Diaminopimelic acid (DAP) ที่ผนังเซลล์ของแอคติโนมัยซีทเทียบกับสารมาตรฐาน (Happer and Davis, 1979; Lechevalier and Lechevalier, 1970)

3.3.3 การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของเชื้อแอคติโนไมซีท โดยชุดทดสอบ สำเร็จรูป (API® stripes, Biomerieux)

ชุดทดสอบ API เป็น ระบบที่ได้มาตรฐานสำหรับการจัดจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ และสามารถนำมาใช้ในการตรวจคุณลักษณะของ Actinobacteria ได้ โดยอาศัยหลักการทดสอบทางด้านชีวเคมี นำผลที่ได้ไปเทียบกับฐานข้อมูลที่เหมาะสมกับสารทดสอบ

1) ชุดทดสอบ API Coryne

แผ่นทดสอบ Coryne จะประกอบไปด้วยหลอดขนาดเล็กที่มีสารตั้งต้นสำหรับการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ (enzymatic activity) และการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายน้ำตาล (fermentation of carbohydrate) โดยตารางที่ 3.2 แสดงรายละเอียดของชุดทดสอบ API Coryne

ตาราง 3.2 ปฏิกริยาที่ใช้ทดสอบของชุดทดสอบ API Coryne

หลุมทดสอบ (Test)	ปฏิกริยาที่ใช้ทดสอบ (Reaction)
Nit	Nitrate reduction
Pyz	Pyrazinamidase
PyrA	Pyrrolidonyl Arylamidase
Pal	Alkaline phosphatase
β Gur	β -Glucuronidase
β Gal	β -Galactosidase
α Glu	α -Glucosidase
β Nag	N-Acetyl- β -Glucosamidase
Esc	Esculin (β -Glucosidase)
Ure	Urease
Gel	Gelatine (hydrolysis)
Glu	Glucose fermentation
Rib	Ribose fermentation
Xyl	Xylose fermentation
Man	Mannitol fermentation
Lac	Lactose fermentation
Sac	Sucrose fermentation
Glyg	Glycogen fermentation

2) ชุดทดสอบ API ZYM[®]

แผ่นทดสอบ ZYM จะประกอบไปด้วยหลอดขนาดเล็กที่มีสารตั้งต้นสำหรับการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme assay) โดยตารางที่ 3.3 แสดงรายละเอียดของชุดทดสอบ API ZYM[®]

ตาราง 3.3 สารตั้งต้นที่ใช้ทดสอบการทำงานของเอนไซม์ของชุดทดสอบ API ZYM[®]

หลุมทดสอบ (No)	เอนไซม์ที่ใช้ทดสอบ (Enzyme assay for)	สารตั้งต้น (Substrate)
2	Phosphatase alkaline	2-naphthyl phosphate
3	Esterase (C 4)	2-naphthyl butyrate
4	Esterase Lipase (C 8)	2-naphthyl caprylate
5	Lipase (C 14)	2-naphthyl myristate
6	Leucine arylamidase	L-leucyl-2- naphthylamide
7	Valine arylamidase	L-valyl-2- naphthylamide
8	Cystine arylamidase	L-cystyl-2- naphthylamide
9	Trypsin	N-benzoyl-DL-arginine-2- naphthylamide
10	Chymotrypsin	N-glutaryl-phenylalanine-2- naphthylamide
11	Phosphatase acid	2-naphthyl phosphate
12	Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	Naphthol-AS-BI-phosphate
13	α galactosidase	6-Br-2-naphthyl- α -D-galactopyranoside
14	β -galactosidase	2-naphthyl- β -D-galactopyranoside
15	β -glucuronidase	Naphthol-AS-BI- β -D-glucuronide
16	α glucosidase	2-naphthyl- α -D-glucopyranoside
17	β -glucosidase	6-Br-2-naphthyl- β -D-glucopyranoside
18	N-acetyl- β -glucoseamidase	1-naphthyl-N-acetyl- β -D-glucoseaminide
19	α mannosidase	6-Br-2-naphthyl- α -D- mannopyranoside
20	α fucosidase	2-naphthyl- α -L-fucopyranoside

3) ชุดทดสอบ API 20 E

แผ่นทดสอบ 20 E จะประกอบไปด้วยหลอดขนาดเล็กที่มีสารตั้งต้นสำหรับการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ (enzymatic activity) และการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายน้ำตาล (fermentation of carbohydrate) โดยตารางที่ 3.4 แสดงรายละเอียดของชุดทดสอบ API 20 E

ตารางที่ 3.4 ปฏิกริยาหรือเอนไซม์ที่ใช้ทดสอบของชุดทดสอบ API 20E

หลุมทดสอบ (Test)	สารตั้งต้น (Substrate)	ปฏิกริยาหรือเอนไซม์ที่ใช้ ทดสอบ(reactions/enzymes)
Onp	Ortho-nitro-phenyl-galactoside	β -galactosidase
Arg	Arginine	Arginine dihydrolase
Lys	Lysine	Lysine decarboxylase
Ods	Ornithine	Ornithine decarboxylase
Cit	Sodium citrate	Citrate utilization
H ₂ S	Sodium thiosulfate	H ₂ S production
Ure	Urea	Urease
Trp	Tryptophane	Tryptophane desaminase
Ind	Tryptophane	Indole production
VP	Sodium pyruvate	Acetoin production
Gel	Kohn's gelatin	Gelatinase
Glu	Glucose	Fermentation
Man	Mannose	Fermentation
Ino	Inositol	Fermentation
Sor	Sorbitol	Fermentation
Rha	Rhamnose	Fermentation
Sac	Sucrose	Fermentation
Mel	Melibiose	Fermentation
Amy	Amygdalin	Fermentation
Ara	Arabinose	Fermentation

3.3.4 การบ่งชนิดของแอกติโนมัยซีทในระดับสปีชีส์ด้วยวิธีอณูชีววิทยา โดยใช้ยีน 16S rRNA ในการหาลำดับเบส

- 1) เลี้ยงแอกติโนมัยซีทลงในอาหารเหลว ISP 2 บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำการเตรียม whole cell hydrolysis เหมือนข้อ 3.3.2 จากนั้นนำเซลล์ที่ได้มาสกัด DNA โดยใช้ชุดสำเร็จในการวิเคราะห์คือ Wizard® Genomic DNA purification (Promega) และทำ PCR (Polymerase chain reaction) จากนั้นส่งไปวิเคราะห์หาลำดับเบสของ DNA ที่ 1st Base sequencing, Malaysia
- 2) นำลำดับเบสของเชื้อแอกติโนมัยซีทมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI และทำแผนผังแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อ (Phylogenetic tree) โดยใช้โปรแกรม Bioedit และ MEGA 5.0

3.4 การศึกษาปัจจัยพื้นฐานที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไคตินเอส

3.4.1 ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ไคตินเอส

ศึกษาแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์ไคตินเอสในอาหารเหลว basal medium (ภาคผนวก ก) โดยจะกำหนดความเข้มข้นที่ 0.5% (w/v) เท่ากันทั้ง 8 ชนิด ดังนี้ arabinose, galactose, glucose, raffinose, xylose, colloidal chitin, chitin powder, soluble starch และ ชุดควบคุมที่ไม่ได้แหล่งคาร์บอน โดยทำการทดลองดังนี้

- 1) เตรียมกล้าเชื้อ (seed medium) โดยเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท CMU-NKS-5 ลงในอาหารเหลว ISP 2 ปริมาตร 50 ml ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นทำการล้างเซลล์ ด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วโดยเทอาหารส่วนบนทิ้งให้เหลือแต่ตะกอนเซลล์ แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปผสมกับตะกอนเซลล์ ทำประมาณ 2-3 รอบ จะได้หัวเชื้อจุลินทรีย์มาทำการทดลองต่อไป
- 2) เตรียมอาหาร basal medium ปริมาตร 25 ml ที่มีแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml โดยทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ซ้ำ
- 3) ลงกล้าเชื้อในอาหาร โดยใช้ปิเปตทำการดูดเชื้อที่ความเข้มข้น 0.5% (v/v) จากข้อ 1) ลงในอาหาร basal medium ที่มีแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน ในขวดรูปชมพู่
- 4) บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 130 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นทำการเก็บน้ำเลี้ยง และ นำไปวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอส

3.4.2 การศึกษาปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

ทำการทดสอบปริมาณที่แตกต่างกันของแหล่งคาร์บอนที่ให้ค่าของกิจกรรมเอนไซม์ไคตินเนสที่เหมาะสมที่สุด โดยใช้ปริมาณของคาร์บอนระหว่าง 0.1 – 2.5% (w/v) ในอาหารเหลว basal medium

- 1) เตรียมอาหาร basal medium ที่มี chitin powder เป็นแหล่งคาร์บอน และ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ปริมาตร 50 ml ที่มีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน 6 ความเข้มข้นด้วยกันคือ 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5% (w/v) ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 ml โดยทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ซ้ำ
- 2) เลี้ยงเชื้อตั้งต้นตาม ข้อ 1) ใน 3.4.1 จากนั้นลงกล้าเชื้อในอาหารที่ต้องการทดสอบ โดยใช้ปิเปตทำการดูดเชื้อที่ความเข้มข้น 0.5% (v/v) ลงในขวดรูปชมพู่
- 3) บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็ว 130 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นทำการเก็บน้ำเลี้ยง และ นำไปวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนส

3.4.3 การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส

- 1) ศึกษาแหล่งไนโตรเจนประเภทสารอนินทรีย์ที่เติมร่วม (Inorganic nitrogen)

ทำการทดสอบแหล่งของไนโตรเจนประเภทสารอนินทรีย์ กำหนดความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่ 0.1% (w/v) เท่ากันทั้ง 7 ชนิด คือ KNO_3 , NaNO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, NH_4NO_3 , และ ชุดควบคุมที่ใส่ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน

- 1.1) เตรียมอาหาร basal medium ที่มี 1.5% chitin powder เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 50 ml ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml โดยทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ซ้ำ
- 1.2) เลี้ยงเชื้อตั้งต้นตาม ข้อ 1) ใน 3.4.1 จากนั้นลงกล้าเชื้อในอาหารที่ต้องการทดสอบ โดยใช้ปิเปตทำการดูดเชื้อที่ความเข้มข้น 0.5% (v/v) ลงในขวดรูปชมพู่
- 1.3) บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็ว 130 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นทำการเก็บน้ำเลี้ยง และ นำไปวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนส

2) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนสารอินทรีย์ (Organic nitrogen)

ทำการทดสอบแหล่งของไนโตรเจนประเภทสารอินทรีย์ กำหนดความเข้มข้นที่ 0.05% (w/v) เท่ากันทั้งหมด 7 ชนิด คือ beef extract, casein, malt extract, peptone, tryptone, urea และ ชุดควบคุมที่ได้ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน

2.1) เตรียมอาหาร basal medium ที่มี 1.5% chitin powder เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 50 ml ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml โดยทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ซ้ำ

2.2) เลี้ยงเชื้อตั้งต้นตาม ข้อ 1) ใน 3.4.1 จากนั้นลงกล้าเชื้อในอาหารที่ต้องการทดสอบ โดยใช้ปิเปตทำการดูดเชื้อที่ความเข้มข้น 0.5% (v/v) ลงในขวดรูปชมพู่

2.3) บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 130 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นทำการเก็บน้ำเลี้ยง และ นำไปวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนส

3.4.4 ศึกษาปัจจัยของอาหารพื้นฐานที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสด้วยแผนการทดลองแบบ Plackett and Burman design

ทำการทดลองเพื่อคัดเลือกส่วนประกอบต่างๆ ของอาหาร basal medium ซึ่งเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส จากการศึกษาที่ละปัจจัยทำให้ได้แหล่งคาร์บอน และ ไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ chitin powder และ casein ตามลำดับ จากนั้นวางแผนการทดลองแบบ Plackett and Burman design (PB) ในการทดลองแบบ PB มีปัจจัย (variables) ที่ต้องการกลั่นกรองทั้งหมด 7 ปัจจัย กำหนดให้ค่า N เท่ากับ 11 ค่า dummy เท่ากับ 4 และ ค่า center point เท่ากับ 3 เพื่อใช้ในการวางแผนการทดลอง และ มีจำนวนของสิ่งทดลองเท่ากับ 10 (N-1) ในการทดลองจะกำหนดค่าของแต่ละปัจจัย ในระดับสูง (+) ในระดับกลาง (0) และ ระดับต่ำ (-) และ ในส่วนของแผนการออกแบบการทดลองนั้น มีรายละเอียดของปัจจัยแสดงในตารางที่ 3.5 และ 3.6

ตาราง 3.5 ปัจจัยและระดับของส่วนประกอบของอาหารที่ใช้ในการคัดเลือกปัจจัย ด้วยการทดลองแบบ Plackett and Burman design

Variables	สูตรอาหาร	ระดับสูง (+)	ระดับต่ำ (-)	ระดับกลาง (0)
X1	KH_2PO_4 (g/L)	0.3	0.03	0.17
X2	K_2HPO_4 (g/L)	0.7	0.07	0.39
X3	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/L)	0.3	0.03	0.17
X4	Trace element (ml/L)	1.0	0.1	0.55
X5	Chitin powder (g/L)	15	1.5	8.25
X6	Casein (g/L)	0.5	0.05	0.28
X7	KNO_3 (g/L)	1.0	0.1	0.55

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3.6 แผนการออกแบบการทดลองแบบ Plackett and Burman design ที่มี N = 11

Std	Run	Block	KH ₂ PO ₄	K ₂ HPO ₄	MgSO ₄ .7H ₂ O	Trace element	Chitin powder	Casein	KNO ₃	h	i	j	k
1	15	Block 1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1
2	11	Block 1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1
3	6	Block 1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1
4	3	Block 1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1
5	2	Block 1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1
6	5	Block 1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1
7	13	Block 1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1
8	4	Block 1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1
9	9	Block 1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1
10	10	Block 1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1
11	1	Block 1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1
12	12	Block 1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
13	14	Block 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	7	Block 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	8	Block 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

สัญลักษณ์ “-1” แทนค่าของปัจจัยในระดับต่ำ สัญลักษณ์ “0” แทนค่าของปัจจัยในระดับกลาง และสัญลักษณ์ “1” แทนค่าของปัจจัยในระดับสูง ตามตารางที่ 3.4 และ
คอลัมน์ h-k แทนในส่วนของ dummy

- 1.1) เตรียมอาหาร basal medium ตามสูตรที่ได้จากในตารางที่ 3.6 ปริมาตร 50 ml ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml
- 1.2) เลี้ยงเชื้อตั้งต้นตาม ข้อ 1) ใน 3.4.1 จากนั้นลงกล้าเชื้อในอาหารที่ต้องการทดสอบ โดยใช้ปิเปตทำการดูดเชื้อที่ความเข้มข้น 0.5% (v/v) ลงในขวดรูปชมพู่
- 1.3) บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็ว 130 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นทำการเก็บน้ำเลี้ยง และ นำไปวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนส
- 1.4) ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยคอมพิวเตอร์ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ (Design-expert 7.0.0) และ ทำการคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส เพื่อนำไปศึกษาปริมาณที่เหมาะสมในการทดลองต่อไป

3.4.5 ศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส ด้วยแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD)

จากการวางแผนการทดลองแบบ Plackett and Burman design (PB) สามารถนำปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ คือ chitin powder และ casein มาทำการศึกษาปริมาณที่เหมาะสม และ ศึกษาถึงผลของการทำงานร่วมกัน (interaction) โดยใช้แผนการทดลองแบบ CCD ในการทดลองนี้ ทำการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่าง chitin powder และ casein กำหนดค่า $N = 2$ และ center point เท่ากับ 5 มีแผนการทดลองเท่ากับ 13 การทดลอง โดยแต่ละปัจจัยจะกำหนดค่าระดับสูง (+) ระดับกลาง (0) และ ระดับต่ำ (-) ดังตารางที่ 3.7 ถึง 3.10 ซึ่งในการทดลองนี้ทำการทดลองแบบ CCD 2 การทดลอง

ตาราง 3.7 ปัจจัยและระดับของส่วนประกอบของอาหารที่ใช้ในการทดลองแบบ Central Composite Design ครั้งที่ 1

Variables	สูตรอาหาร	ระดับสูง (+)	ระดับต่ำ (-)	ระดับกลาง (0)
X1	Chitin powder (g/L)	25	15	20
X2	Casein (g/L)	1.5	0.5	1.0

ตาราง 3.8 แผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) ที่มี N = 2 ครั้งที่ 1

Std	Run	Block	Chitin powder	Casein
1	2	Block 1	-1	-1
2	12	Block 1	1	-1
3	4	Block 1	-1	1
4	9	Block 1	1	1
5	1	Block 1	-1.41	0
6	7	Block 1	1.41	0
7	13	Block 1	0	-1.41
8	11	Block 1	0	1.41
9	10	Block 1	0	0
10	8	Block 1	0	0
11	3	Block 1	0	0
12	6	Block 1	0	0
13	5	Block 1	0	0

สัญลักษณ์ “-1” แทนค่าของปัจจัยในระดับต่ำ สัญลักษณ์ “0” แทนค่าของปัจจัยในระดับกลาง และสัญลักษณ์ “1” แทนค่าของปัจจัยในระดับสูง ตามตารางที่ 3.7

ตาราง 3.9 ปัจจัยและระดับของส่วนประกอบของอาหารที่ใช้ในการทดลองแบบ Central Composite Design ครั้งที่ 2

Variables	สูตรอาหาร	ระดับสูง (+)	ระดับต่ำ (-)	ระดับกลาง (0)
X1	Chitin powder (g/L)	15	5	10
X2	Casein (g/L)	1.5	0.5	1.0

ตาราง 3.10 แผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) ที่มี N = 2 ครั้งที่ 2

Std	Run	Block	Chitin powder	Casein
1	2	Block 1	-1	-1
2	12	Block 1	1	-1
3	4	Block 1	-1	1
4	9	Block 1	1	1
5	1	Block 1	-1.41	0
6	7	Block 1	1.41	0
7	13	Block 1	0	-1.41
8	11	Block 1	0	1.41
9	10	Block 1	0	0
10	8	Block 1	0	0
11	3	Block 1	0	0
12	6	Block 1	0	0
13	5	Block 1	0	0

สัญลักษณ์ “-1” แทนค่าของปัจจัยในระดับต่ำ สัญลักษณ์ “0” แทนค่าของปัจจัยในระดับกลาง และสัญลักษณ์ “1” แทนค่าของปัจจัยในระดับสูง ตามตารางที่ 3.9

1.1) เตรียมอาหาร basal medium ตามสูตรในตารางที่ 3.7 และ 3.9 ปริมาตร 50 ml ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml

1.2) เลี้ยงเชื้อตั้งต้นตาม ข้อ 1) ใน 3.4.1 จากนั้นลงกล้าเชื้อในอาหารที่ต้องการทดสอบ โดยใช้ปิเปตทำการดูดเชื้อที่ความเข้มข้น 0.5% (v/v) ลงในขวดรูปชมพู่

1.3) บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็ว 130 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นทำการเก็บน้ำเลี้ยง และ นำไปวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์

1.4) ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยคอมพิวเตอร์ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ (Design-expert 7.0.0) โดยใช้สมการลำดับที่สองที่มีระดับความเชื่อมั่นมากกว่า 95% นำมาสร้างกราฟ ของ chitin powder และ casein เพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมที่สุดของปัจจัยสองชนิดนี้

3.4.6 ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส

จากแผนการทดลองแบบ PB และ CCD ได้ปริมาณของสารอาหารที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์ไคตินเนส ดังตารางที่ 3.11 ในการทดลองนี้จะทำการทดลองเพื่อยืนยันผลว่าเป็นไปตามที่สมการลำดับที่สองของ CCD ทำนายไว้หรือไม่ (validation) โดยทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร optimized medium ที่มีสูตรอาหารที่เหมาะสมกับการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส

ตาราง 3.11 สูตรอาหารที่เหมาะสมกับการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส

สูตรอาหารที่เหมาะสม	ปริมาตร
Casein (g/L)	0.88
K ₂ HPO ₄ (g/L)	0.7
KH ₂ PO ₄ (g/L)	0.03
KNO ₃ (g/L)	1.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O (g/L)	0.03
Chitin powder (g/L)	15.0
Trace element (ml/L)	1.0

1.1) เตรียมอาหาร optimized medium ตามสูตรในตารางที่ 3.11 ปริมาตร 50 ml ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml โดยทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ซ้ำ

1.2) เลี้ยงเชื้อตั้งต้นตาม ข้อ 1) ใน 3.4.1 จากนั้นลงกล้าเชื้อในอาหาร โดยใช้ปิเปตทำการดูดเชื้อที่ความเข้มข้น 0.5% (v/v) ลงในขวดรูปชมพู่

1.3) บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็ว 130 rpm ที่อุณหภูมิห้อง

1.4) ทำการเก็บน้ำเลี้ยง และ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 575 นาโนเมตร เพื่อนำไปคำนวณหาค่า chitinase activity

3.5 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส

3.5.1 การศึกษาผลของค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมในอาหารสำหรับการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส (pH initial)

ในการทดลองนี้ ทำการศึกษาค่าของ pH เริ่มต้นที่เหมาะสมของอาหารที่ทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงขึ้น โดยจะทำการปรับ pH เริ่มต้นของอาหารตั้งแต่ 3-11

- 1.1) เตรียมอาหาร modified basal medium ปริมาตร 50 ml ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml โดยทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ซ้ำ ทำการปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 และ 11.0
- 1.2) เลี้ยงเชื้อตั้งต้นตาม ข้อ 1) ใน 3.4.1 จากนั้นลงกล้าเชื้อในอาหาร โดยใช้ปิเปตทำการดูดเชื้อที่ความเข้มข้น 2.0% (v/v) ลงในขวดรูปชมพู่
- 1.3) บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็ว 130 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นทำการเก็บน้ำเลี้ยง และ นำไปวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์

3.5.2 การศึกษาปริมาณของเชื้อตั้งต้น (percent inoculum) ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส

ในการทดลองนี้ ทำการศึกษาค่าความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้นที่ทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงขึ้น โดยกำหนดความเข้มข้นเริ่มต้นของเชื้อที่แตกต่างกันตั้งแต่ 0.5 - 2.5% (v/v) ตามลำดับ

- 1.1) เตรียมอาหาร modified medium ที่มี 1.5% (w/v) chitin powder เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 50 ml ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml โดยทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ซ้ำ กำหนดความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้นตั้งแต่ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5% (v/v) ตามลำดับ
- 1.2) เลี้ยงเชื้อตั้งต้นตาม ข้อ 1) ใน 3.4.1 จากนั้นลงกล้าเชื้อในอาหาร โดยใช้ปิเปตทำการดูดกล้าเชื้อที่ความเข้มข้นเริ่มต้นแตกต่างกัน ลงในขวดรูปชมพู่
- 1.3) บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็ว 130 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นทำการเก็บน้ำเลี้ยง และ นำไปวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนส

3.5.3 เปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสระหว่างสูตรอาหารเดิม และ สูตรอาหารที่เหมาะสม

ในการทดลองนี้ ทำการเปรียบเทียบระหว่างสูตรอาหาร 2 สูตร โดยแหล่งคาร์บอน เปลี่ยนจาก colloidal chitin เป็น chitin powder และ แหล่งไนโตรเจนเปลี่ยนจาก $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และ yeast extract เป็น KNO_3 และ casein ตามลำดับ โดยเพิ่มระยะเวลาที่เหมาะสม ค่าของ pH เริ่มต้นในอาหาร และ ค่าของความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้น ดังในตารางที่ 3.12

ตาราง 3.12 ตารางเปรียบเทียบระหว่างสูตรอาหารเดิม และ สูตรอาหารที่เหมาะสม

สูตรอาหารเดิม (basal medium)	ปริมาตร	สูตรอาหารที่เหมาะสม (modified medium)	ปริมาตร
Yeast extract (g/L)	0.5	Casein (g/L)	0.88
K_2HPO_4 (g/L)	0.7	K_2HPO_4 (g/L)	0.7
KH_2PO_4 (g/L)	0.3	KH_2PO_4 (g/L)	0.03
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L)	1.0	KNO_3 (g/L)	1.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/L)	0.3	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/L)	0.03
Collidal chitin (g/L)	15.0	Chitin powder (g/L)	15.0
Trace element (ml/L)	1.0	Trace element (ml/L)	1.0
Day (วัน)	7	Day (วัน)	7
%(v/v) inoculum (ml/L)	0.5	%(v/v) inoculum (ml/L)	2
pH initial	7.0	pH initial	5.0

- 1.1) เตรียมอาหาร basal medium และ modified medium ตามสูตรในตารางที่ 3.12 ปริมาตร 150 ml ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 ml โดยทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ซ้ำ
- 1.2) เลี้ยงเชื้อตั้งต้นตาม ข้อ 1) ใน 3.4.1 จากนั้นลงกล้าเชื้อในอาหาร โดยใช้ปิเปตทำการดูดเชื้อตามตารางที่ 3.12 ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml
- 1.3) บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็ว 130 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน
- 1.4) ทำการเก็บน้ำเลี้ยง และ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 575 และ 595 นาโนเมตร เพื่อนำไปคำนวณหาค่า chitinase activity และ ค่า specific activity (ภาคผนวก จ)