

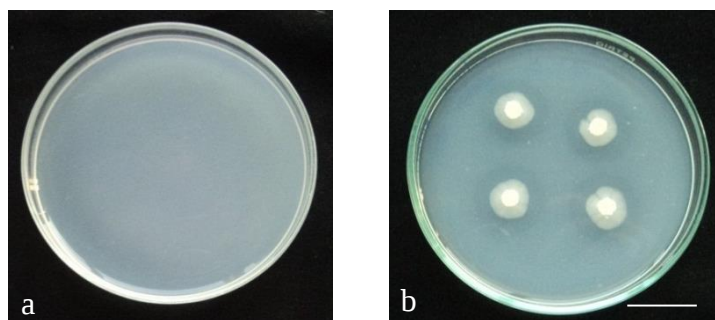
บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการคัดเลือกแอคติโนมัยซีที่สามารผลิตเอนไซม์ไคตินเอส

จากการทดสอบการผลิตเอนไซม์ไคตินเอสบนอาหารแข็ง colloidal chitin ที่มี 4% (w/v) colloidal chitin เป็นแหล่งคาร์บอน ของเชื้อแอคติโนมัยซีทั้งหมด 104 ไอโซเลท ที่ได้รับมาจากห้องปฏิบัติการวิจัย ด้านพัฒนาแบบยั่งยืนของทรัพยากรชีวภาพ สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 10-14 วัน โดยทำการบันทึกผล เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (clear zone) และ โคโลนี ดังภาพที่ 4.1 จากนั้นนำผลที่ได้ไปคำนวณค่าของอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส และ เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (H/C ratio) พบว่าทั้ง 25 ไอโซเลท แสดงค่าของ H/C ratio มากกว่า 1.0 ในตารางที่ 4.1

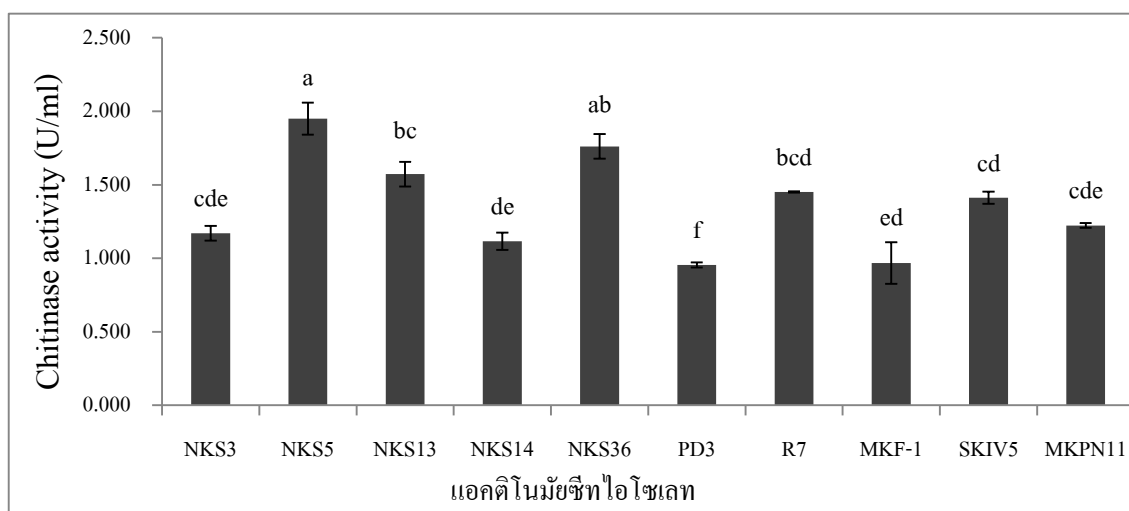
จากการทดสอบการผลิตเอนไซม์ไคตินเอสของเชื้อ 104 ไอโซเลทในอาหารเหลว enzyme production medium (EPM) ที่มี 1% (w/v) colloidal chitin เป็นแหล่งสับสเตรท นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ทำการวัดค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์โดย DNS method และ นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอส (chitinase activity) เทียบกับกราฟมาตรฐาน NAG (ภาคผนวก จ) ผลการทดลอง พบว่า แอคติโนมัยซี 10 ไอโซเลท แสดงค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไคตินเอสมากกว่า 1 U/ml คือ ไอโซเลท CMU-NKS-3, CMU-NKS-5, CMU-NKS-13, CMU-NKS-14, CMU-NKS-36, PD3, R7, MKF-1, SKIV5 และ MKPN11 ตามภาพที่ 4.2 จะเห็นได้ว่า ไอโซเลท CMU-NKS-5 นั้นให้ค่าของกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด ($1,949 \pm 0.108$ mU/ml) จึงเลือกมาทำการทดลองต่อไป



ภาพ 4.1 การคัดเลือกเชื้อที่สร้างไคตินในอาหารแข็ง (a) โดยสังเกตวงใส (b) บนอาหาร colloidal chitin agar ที่มี 4% (w/v) colloidal chitin เป็นแหล่งคาร์บอน

ตาราง 4.1 ค่า H/C ratio ที่ได้จากการคำนวณระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส และ โคโลนีของเชื้อ แอคติโนมัยซีท 25 ไอโซเลท

ไอโซเลท	ค่า H/C $\pm$ SD	ไอโซเลท	ค่า H/C $\pm$ SD
OTOP2-1	1.36 ± 0.08	CMU-NKS-10	1.80 ± 0.01
MKF-1	1.24 ± 0.14	CMU-NKS-13	2.00 ± 0.06
Hourse-1	1.19 ± 0.04	CMU-NKS-14	1.69 ± 0.11
MJ1	2.28 ± 0.07	CMU-NKS-15	1.70 ± 0.25
MK3-4	1.84 ± 0.14	CMU-NKS-17	1.73 ± 0.20
12001	2.24 ± 0.34	CMU-NKS-20	1.50 ± 0.18
SHS2	1.50 ± 0.13	CMU-NKS-23	1.80 ± 0.16
NNN-3	2.13 ± 0.02	CMU-NKS-24	1.89 ± 0.15
MK2-3	1.85 ± 0.04	CMU-NKS-34	1.82 ± 0.08
Home-2	1.60 ± 0.02	CMU-NKS-36	1.43 ± 0.14
Home-3	1.59 ± 0.10	CMU-NKS-38	1.67 ± 0.04
CMU-NKS-5	2.33 ± 0.02	CMU-NKS-39	1.67 ± 0.07
CMU-NKS-7	1.64 ± 0.04		



ภาพ 4.2 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอส (chitinase activity) ของเชื้อแอสเพอริลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว EPM เขย่าที่ 150 rpm บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

4.2 การบ่งชี้สายพันธุ์ของแอสเพอริลลัส CMU-NKS-5

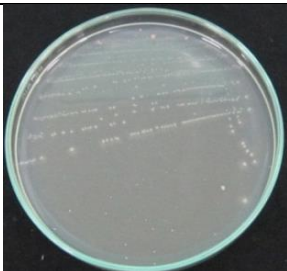
4.2.1 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการของแอสเพอริลลัส CMU-NKS-5

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอสเพอริลลัส CMU-NKS-5 ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเอสได้ โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง ISP 1 ถึง ISP 9 บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นบันทึกลักษณะต่างๆ ได้แก่ สีเส้นใยเหนืออาหาร (aerial mycelium) สีเส้นใยใต้อาหาร (substrate mycelium) และ การสร้างสีบนอาหาร (soluble pigment) ในส่วนของการเจริญเติบโต พบว่าในอาหาร ISP 1, ISP 2, ISP 4, ISP 5, ISP 7 และ ISP 8 เชื้อแอสเพอริลลัสสามารถเจริญเติบโตได้ดี ในอาหาร ISP 3 และ ISP 9 เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ปานกลาง และ ในอาหาร ISP 6 เชื้อเจริญเติบโตได้น้อย โคลอนีมีขนาดเล็ก พบว่า สีเส้นใยเหนืออาหารส่วนใหญ่มีสีเทา มีบางอาหารที่มีสีเหลือง แต่ในอาหาร ISP 9 ไม่มีการสร้างสีของ aerial mycelium และ ในส่วนของสีเส้นใยใต้อาหาร จะมีสีเหลือง มีบางอาหารที่มีสีเทา และ ในอาหาร ISP 1, ISP 5 และ ISP 8 นั้น สามารถสร้างสีออกมาในอาหารได้ ดังผลตามตารางที่ 4.2

ตาราง 4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท CMU-NKS-5

อาหาร	Aerial mycelium	Substrate mycelium	Soluble pigment	ลักษณะของเชื้อบนอาหารแข็ง ISP
Tryptone – Yeast extract agar (ISP 1)	264 light gray	82 vivid yellow	83 brilliant yellow	
Yeast – Malt extract agar (ISP 2)	264 light gray	90 grayish yellow	-	
Oatmeal agar (ISP 3)	266 dark gray	265 medium gray	-	
Inorganic salts starch agar (ISP 4)	89 pale yellow	264 light gray	-	
Glycerol - Asparagine agar (ISP 5)	86 light yellow	71 Moderate orange-yellow	86 light yellow	

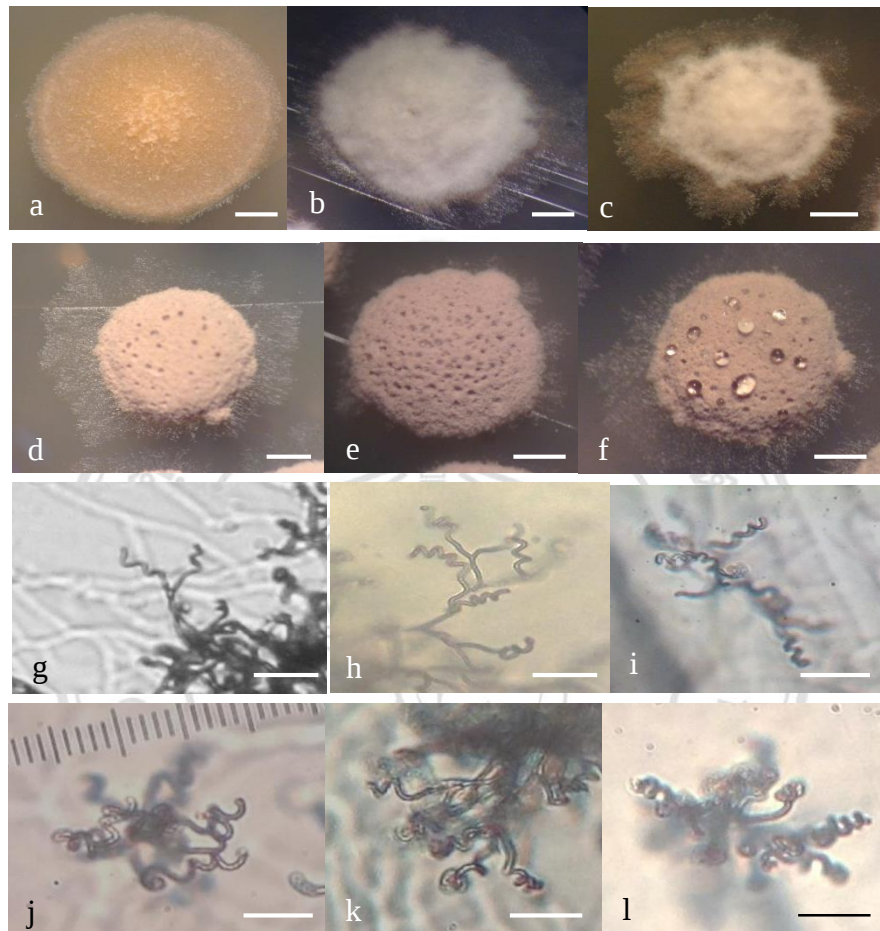
ตาราง 4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท CMU-NKS-5 (ต่อ)

อาหาร	Aerial mycelium	Substrate mycelium	Soluble pigment	ลักษณะของเชื้อบนอาหารแข็ง ISP
Peptone yeast extract iron agar (ISP 6)	264 light gray	264 light gray	-	
Tyrosine agar (ISP 7)	264 light gray	86 light yellow	-	
Nitrate agar (ISP 8)	265 medium gray	77 yellowish brown	89 pale yellow	
Carbon utilization agar (ISP 9)	no aerial mycelium	89 pale yellow	-	

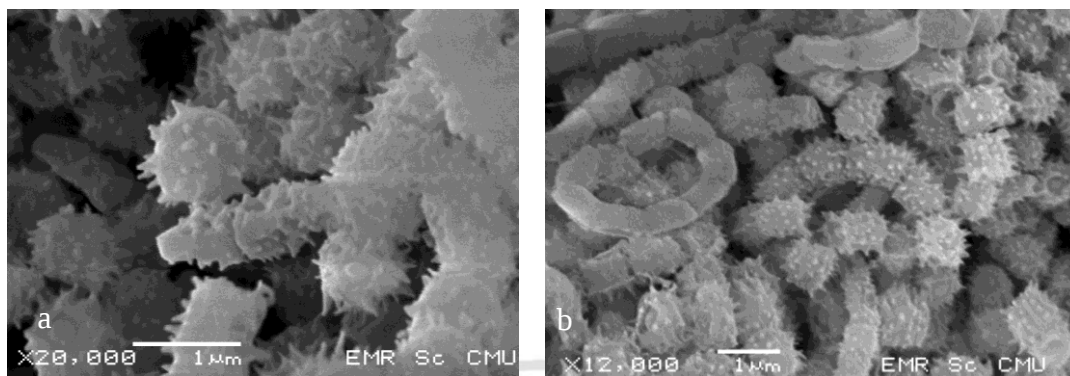
อ้างอิงตามสีเทียบมาตรฐาน ISCC-NBS color chart (Kenneth, 1958)

ศึกษาลักษณะของโคโลนี ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท CMU-NKS-5 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (compound microscope) บนอาหารแข็ง ISP 2 บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 14 วัน พบว่า เส้นใยเหนืออาหารมีสีขาวแต่เมื่อแก่จะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเทา ขอบโคโลนีไม่เรียบ โคโลนีขึ้นเหนือผิวหน้าอาหาร ผิวหน้าขรุขระ ดังภาพที่ 4.3 และ สปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) บนอาหารแข็ง ISP 2 บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 10 วัน พบว่าเส้นใยเหนืออาหารมีการสร้างสปอร์ต่อกันเป็นเส้นสายยาว ลักษณะของสปอร์เป็นแบบเกลียวคล้ายสปริง แบบขดเกลียวไม่อัดกันแน่น ดังภาพที่ 4.3 และ ทำการศึกษาผิวของสปอร์ด้วยกล้อง

จุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่า มีการจัดเรียงสปอร์เป็นสายยาวต่อกันเป็นลูกโซ่
 ผิวสปอร์เป็นแบบมีหนาม (spiral) ดังภาพที่ 4.4



ภาพ 4.3 ลักษณะของโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* CMU-NKS-5 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบที่เจริญบนอาหารแข็ง ISP 2 ที่ (a) วันที่ 3 บาร์ = 0.30 cm, (b) วันที่ 5 บาร์ = 0.3 cm, (c) วันที่ 7 บาร์ = 0.34 cm, (d) วันที่ 9 บาร์ = 0.34 cm, (e) วันที่ 11 บาร์ = 0.4 cm และ (f) วันที่ 14 บาร์ = 0.4 cm และ การสร้างสปอร์ของแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* CMU-NKS-5 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ที่ (g) วันที่ 5 บาร์ = 0.4 cm, (h) วันที่ 7 บาร์ = 0.4 cm, (i) วันที่ 9 บาร์ = 0.43 cm, (j) วันที่ 11 บาร์ = 0.43 cm, (k) วันที่ 12 บาร์ = 0.45 cm และ (l) วันที่ 14 บาร์ = 0.45 cm บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน บนอาหาร ISP 2

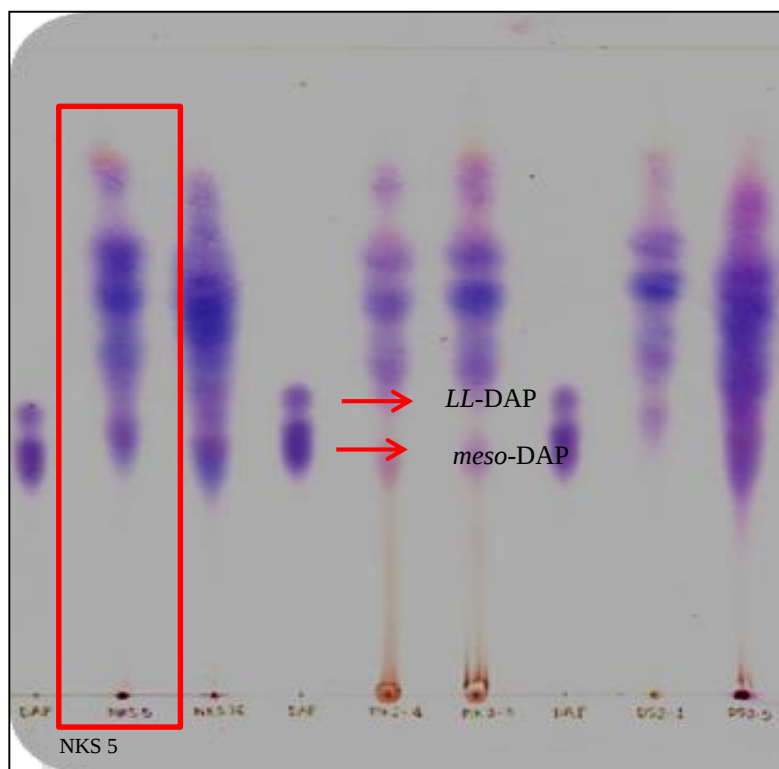


ภาพ 4.4 ลักษณะผิวของสปอร์ และ การจัดเรียงตัวของสปอร์ใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) (a) ที่กำลังขยาย 10000x บาร์ = 1 μm และ (b) ที่กำลังขยาย 12000x บาร์ = 1 μm ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท CMU-NKS-5

4.2.2 ผลการศึกษากรดอะมิโน (Diaminopimelic acid, DAP) บนผนังเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยซีท โดยวิธี Thin layer chromatography (TLC)

ในการทดลองทำการศึกษานิโคตินของกรดไดอะมิโนไพเมลิค ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ ที่ใช้ชนิดของผนังเซลล์เป็นตัวบ่งบอกของเชื้อแอคติโนมัยซีท โดยนำเซลล์ที่ได้มาจากข้อ 3.3.2 มา spot ลงบนแผ่น TLC รอจนสารขึ้นไปถึง solvent front จึงนำแผ่น TLC ออกมาพ่นด้วย 0.1% (v/v) ninhydrin reagent จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 2 นาที จะสังเกตเห็นจุดสีของเชื้อที่ปรากฏบนแผ่น TLC ทำให้สามารถวิเคราะห์กรดอะมิโนชนิด diaminopimelic acid (DAP) บนผนังเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ชนิดของ DAP มีสองแบบคือ *LL*-DAP และ *meso*-DAP เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน พบว่าแอคติโนมัยซีทไอโซเลท CMU-NKS-5 นั้นมีชนิดของ DAP เป็น *LL*-DAP เมื่อดูจากภาพที่ 4.5 จะเห็นได้ว่า จุดของสารนั้น อยู่ในจุดเดียวกับ *LL*-DAP

ลิขสิทธิ์ © by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 4.5 แผ่น TLC ของการวิเคราะห์ประเภทของ Diaminopimelic acid (DAP) ที่สกัดจากผนังเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท CMU-NKS-5

4.2.3 ผลการศึกษาลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท CMU-NKS-5 โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป (API® stripes)

จากการศึกษาลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท CMU-NKS-5 โดยทำการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ (enzymatic activity) และ การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายน้ำตาล (fermentation of carbohydrate) โดยใช้ชุดทดสอบ API 3 ชุด ผลการทดลองพบว่า เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท CMU-NKS-5 สามารถสร้างเอนไซม์ได้ 8, 13 และ 8 ชนิดในชุดทดสอบ API Coryne, API ZYM® และ API 20E ตามลำดับ ได้แก่ Pyrazinamidase, Alkaline phosphatase, α -Glucosidase, N-Acetyl- β -Glucosamidase, Esculin (β -Glucosidase), Phosphatase alkaline, Esterase, Esterase Lipase, Leucine arylamidase, Valine arylamidase, Cystine arylamidase, Trypsin, Phosphatase acid, Naphthol-AS-B-l-phosphohydrolase, α -glucosidase, β -glucosidase, α -mannosidase, β -galactosidase, Arginine dihydrolase, Tryptophane desaminase และ Acetoin production และสามารถย่อยสลายน้ำตาล Glucose, Amygdalin และ Arabinose ได้ และสามารถย่อยสลายเจลาตินได้ (Gelatin) และ สามารถสร้างเอนไซม์ N-acetyl- β -glucoseamidase ที่อยู่ในกลุ่มย่อย

โคตินได้ ซึ่งแสดงผลที่ได้ดังตาราง 4.3, 4.4 และ 4.5 และ ภาพที่ 4.6 แสดงผลการทดสอบการเปลี่ยนสีของชุดทดสอบ API 3 ชุด (ภาคผนวก ข)

ตาราง 4.3 ผลการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ และ การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายน้ำตาลของชุดทดสอบ API Coryne ที่บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3 วัน

หลุมทดสอบ	ปฏิกิริยาที่ใช้ทดสอบ	ผลของเชื้อแอคติโนไมซีไทโอโซเลท CMU-NKS-5
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	-
Cat		+
MAL		-

สัญลักษณ์ + หมายถึงในปฏิกิริยาที่มีการเปลี่ยนแปลงของสี, สัญลักษณ์ - หมายถึง ในปฏิกิริยาไม่มีสีเกิดขึ้น หรือ ไม่เปลี่ยนสี

ตาราง 4.4 ผลการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ของชุดทดสอบ API ZYM[®] ที่บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3 วัน

No	เอนไซม์ที่ใช้ทดสอบ	สารตั้งต้น	ผลของเชื้อแอคติโนไมซีท ไอโซเลท CMU-NKS-5
1		Control	
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	-

สัญลักษณ์ + หมายถึงในปฏิกิริยา มีการเปลี่ยนแปลงของสี โดยที่แบ่งระดับออกเป็น 5 ระดับตามความเข้มของสี, สัญลักษณ์ - หมายถึง ในปฏิกิริยาไม่มีสีเกิดขึ้น หรือ ไม่เปลี่ยนสี

ตาราง 4.5 ผลการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ และ การทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย
น้ำตาลของชุดทดสอบ API 20E ที่บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3 วัน

กลุ่มทดสอบ	สารตั้งต้น	ปฏิกิริยาหรือเอนไซม์ที่ใช้ทดสอบ	ผลของเชื้อแบคทีเรียในมัยซีท ไอโซเลท CMU-NKS-5
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	+
NO ₂		Reduction of nitrate to nitrites	-
N ₂		Reduction of N ₂ gas	-

สัญลักษณ์ + หมายถึงในปฏิกิริยามีการเปลี่ยนแปลงของสี, สัญลักษณ์ – หมายถึง ในปฏิกิริยาไม่มีสี
เกิดขึ้น หรือ ไม่เปลี่ยนสี



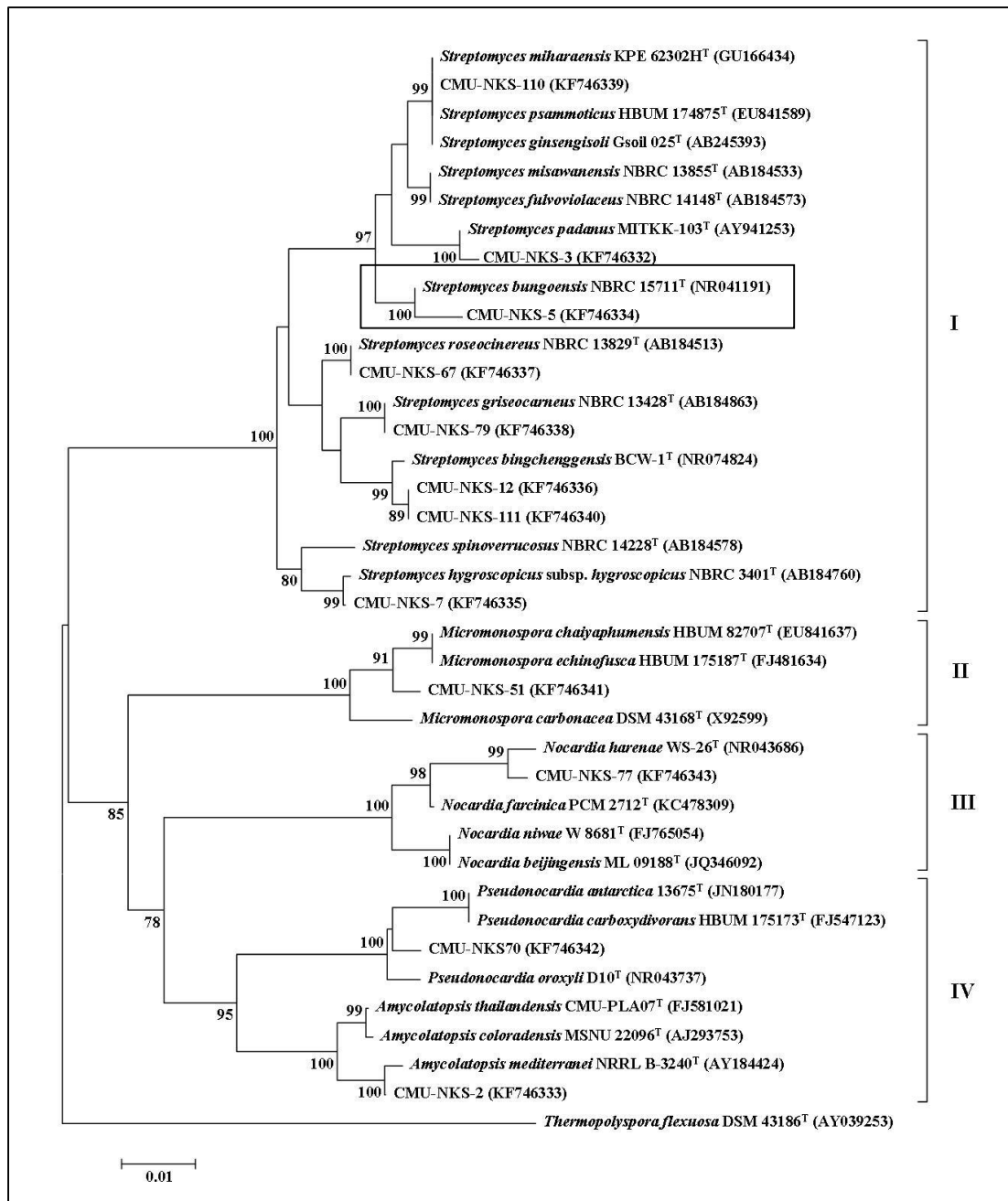
ภาพ 4.6 ผลการทดสอบของชุดทดสอบ API ของเชื้อแอคทีโนมัยซีทไอโซเลท CMU-NKS-5 โดยการ
ใช้ชุดทดสอบ API Coryne (a), API ZYM[®] (b) และ API 20E (c)

4.2.4 ผลการศึกษาขึ้น 16S rRNA ของแอคทีโนมัยซีทในระดับสปีชีส์ด้วยวิธีทาง อณูชีววิทยา

จากการทดลอง นำลำดับเบสของขึ้น 16S rRNA ของเชื้อแอคทีโนมัยซีทไอโซเลท CMU-NKS-5 มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI เพื่อบ่งบอกถึงจีโนส และ สปีชีส์ของเชื้อแอคทีโนมัยซีทไอโซเลท CMU-NKS-5 พบว่ามีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Streptomyces bungoensis* สายพันธุ์ NBRC 15711 ที่ 98% ดังตารางที่ 4.6 จากนั้นคัดเลือกแอคทีโนมัยซีทที่มีความใกล้เคียงกันมาวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความเหมือนกันของลำดับเบส เพื่อทำแผนผังแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อ (phylogenetic tree) ดังภาพที่ 4.7 โดย Phylogenetic tree จะใช้โปรแกรม bioedit และ โปรแกรม mega 5.0 ในส่วนของลำดับเบส 16S rRNA และทำการ aligned โดยใช้ CLUSTAL W เทียบกับลำดับเบส (nucleotide sequences) จากฐานข้อมูล GenBank ด้วยวิธี neighbor joining method และ ใช้เชื้อ *Thermopolyspora flexuosa* DSM 43186^T เป็น outgroup มีค่า Bootstrap values (>50%) และ ทำการวิเคราะห์ bootstrap ซ้ำจำนวน 1000 ครั้ง

ตาราง 4.6 ผลของการวิเคราะห์ลำดับเบส 16S rRNA ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท CMU-NKS-5 เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI

Description	Max score	Total score	Query cover	E-value	Ident	Acession
<i>Streptomyces bungoensis</i> strain HBUM174567 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1655	1655	100%	0.0	98%	FJ486371
<i>Streptomyces bungoensis</i> strain FoRh14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1639	1639	100%	0.0	98%	KM370028
<i>Streptomyces bungoensis</i> strain 173014 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1639	1639	100%	0.0	98%	EU593563
<i>Streptomyces bungoensis</i> strain NBRC 15711 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1639	1639	100%	0.0	98%	NR_041191



ภาพ 4.7 แผนผังแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท CMU-NKS-5 โดยกลุ่ม I คือ *Streptomyces* sp. กลุ่ม II คือ กลุ่ม *Micromonospora* sp. กลุ่ม III คือ กลุ่ม *Nocardia* sp. กลุ่ม IV คือ *Amycolatopsis* sp. และ out-group คือ *Thermopolyspora flexuosa* DSM 43186

นำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบความสามารถในการใช้น้ำตาลกับ *Streptomyces bungoensis* สายพันธุ์ MS16-10G, MS16-10W, NBRC15711 (Eguchi *et al.*, 1993) และ MJM2077 (Cheng *et al.*, 2013) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท CMU-NKS-5 ดังตารางที่ 4.7

จากนั้นทำการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท CMU-NKS-5 ในอาหาร ISP ทั้ง 9 ชนิด กับ *Streptomyces bungoensis* สายพันธุ์ MS16-10G, MS16-10W, NBRC15711 (Eguchi *et al.*, 1993) และ MJM2077 (Cheng *et al.*, 2013) ที่มีความคล้ายคลึงกับเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท CMU-NKS-5 ดังตารางที่ 4.8 ยกเว้นอาหาร ISP 1, ISP 8 และ ISP 9 เนื่องจากไม่มีรายงานการทดสอบดังกล่าวในงานวิจัยที่นำมาเปรียบเทียบ โดยสัญลักษณ์ (-) คือ ไม่มีการทดสอบในอาหาร และ no คือ มีการทดสอบแต่ไม่สร้างสี และในส่วนของ การทนต่อเกลือ (%NaCl) พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท CMU-NKS-5 นั้นสามารถเจริญได้ในความเข้มข้นที่ 7% ในความเข้มข้นที่ 8% นั้นเจริญได้เพียงเล็กน้อย และ ไม่สามารถเจริญได้ตั้งแต่ความเข้มข้นที่ 9% เป็นต้นไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 4.7 การเปรียบเทียบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน (carbon utilization) ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท CMU-NKS-5 กับ

Streptomyces bungoensis สายพันธุ์ MS16-10G, MS16-10W, NBRC15711 และ MJM2077

น้ำตาล	เชื้อไอโซเลท CMU-NKS-5	<i>S. bungoensis</i> สายพันธุ์ MS16-10G	<i>S. bungoensis</i> สายพันธุ์ MS16-10W	<i>S. bungoensis</i> สายพันธุ์ MJM 2077	<i>S. bungoensis</i> สายพันธุ์ NBRC15711
D-glucose	+	+	+	+	+
L-Rhamnose	-	-	-	+	-
D-Fructose	nd	+	+	+	+
D-galactose	nd	+	+	+	+
D-xylose	-	+	+	+	+
L-arabinose	-	+	+	+	+
Sucrose	-	±	±	+	±
Raffinose	nd	-	±	+	±
D-mannitol	-	+	+	+	+
i-Inositol	-	-	-	+	-

สัญลักษณ์ + คือสามารถใช้แหล่งน้ำตาลนั้นได้ สัญลักษณ์ - คือไม่สามารถใช้แหล่งน้ำตาลนั้นได้ และสัญลักษณ์ ± คือใช้แหล่งน้ำตาลได้เพียงเล็กน้อย และ nd คือ ไม่มีการทดสอบในชุดทดสอบ API

ตาราง 4.8 การเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลต CMU-NKS-5 กับ *S. bungoensis* สายพันธุ์ MS16-10G, MS16-10W, MJM2077 และ NBRC15711

อาหาร	ลักษณะทาง สัณฐานวิทยา (characteristic)	<i>Streptomyces</i> sp. ไอโซเลต CMU-NKS-5	<i>S. bungoensis</i> สายพันธุ์ MS16-10G and MS16- 10W	<i>S. bungoensis</i> สายพันธุ์ MJM 2077	<i>S. bungoensis</i> สายพันธุ์ NBRC15711
ISP1 agar	Gr	Abundant	Not determined	-	-
	AMC	Light gray	-	-	-
	RC	Vivid yellow	-	-	-
	SP	Yes (brilliant yellowish)	Yes (brownish black)	-	-
ISP2 agar	Gr	Abundant	Abundant	Medium	Abundant
	AMC	Light gray	Gray	Gray	Gray
	RC	Grayish yellow	Reddish brown	Reddish yellow	Reddish brown
	SP	No	Yes (brownish black)	No	Yes (brownish black)
ISP3 agar	Gr	Moderate	Abundant	Abundant	Abundant
	AMC	Dark gray	Gray	Gray	Gray
	RC	Medium gray	Gray	Gray	Gray
	SP	No	No	No	No

ตาราง 4.8 การเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลต CMU-NKS-5 กับ *S. bungoensis* สายพันธุ์ MS16-10G, MS16-10W, MJM2077 และ NBRC15711 (ต่อ)

อาหาร	ลักษณะทาง สัณฐานวิทยา (characteristic)	<i>Streptomyces</i> sp. ไอโซเลต CMU-NKS-5	<i>S. bungoensis</i> สายพันธุ์ MS16-10G and MS16- 10W	<i>S. bungoensis</i> สายพันธุ์ MJM 2077	<i>S. bungoensis</i> สายพันธุ์ NBRC15711
ISP4 agar	Gr	Abundant	Abundant	Abundant	Abundant
	AMC	Pale yellow	Gray	White	Gray
	RC	Light gray	Gray	Grayish yellow	Gray
	SP	No	No	No	No
ISP5 agar	Gr	Abundant	Abundant	Abundant	Abundant
	AMC	Light yellow	Grayish brown	Grayish brown	Grayish brown
	RC	Moderate orange yellow	Brownish yellow	Brownish yellow	Brownish yellow
	SP	Yes (light yellow)	No	No	No
ISP6 agar	Gr	A little	Abundant	Abundant	Abundant
	AMC	Light gray	White	No aerial mycelium	White
	RC	Light gray	Colorless	Dark gray	Colorless
	SP	No	Yes (brownish black)	Yes (brownish black)	yes (brownish black)

ตาราง 4.8 การเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลต CMU-NKS-5 กับ *S. bungoensis* สายพันธุ์ MS16-10G, MS16-10W, MJM2077 และ NBRC15711 (ต่อ)

อาหาร	ลักษณะทาง สัณฐานวิทยา (characteristic)	<i>Streptomyces</i> sp. ไอโซเลต CMU-NKS-5	<i>S. bungoensis</i> strains MS16-10G and MS16- 10W	<i>S. bungoensis</i> strains MJM 2077	<i>S. bungoensis</i> strains NBRC15711
ISP7 agar	Gr	Abundant	Abundant	Abundant	Abundant
	AMC	Light gray	Gray	Gray	Gray
	RC	Light yellow	Yellow	Gray	Yellow
	SP	No	Yes (pale brown)	Yes (black)	Yes (pale brown)
ISP8 agar	Gr	Abundant	-	-	-
	AMC	Medium gray	-	-	-
	RC	yellowish brown	-	-	-
	SP	Yes (pale yellow)	-	-	-
ISP9 agar	Gr	Moderate	-	-	-
	AMC	No aerial mycelium	-	-	-
	RC	Pale yellow	-	-	-
	SP	No	-	-	-

ตาราง 4.8 การเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท CMU-NKS-5 กับ *S. bungoensis* สายพันธุ์ MS16-10G, MS16-10W, MJM2077 และ NBRC15711 (ต่อ)

อาหาร	ลักษณะทาง สัณฐานวิทยา (characteristic)	<i>Streptomyces</i> sp. ไอโซเลท CMU-NKS-5	<i>S. bungoensis</i> strains MS16-10G and MS16- 10W	<i>S. bungoensis</i> strains MJM 2077	<i>S. bungoensis</i> strains NBRC15711
Nutrient	Gr	-	Moderate	Good	Moderate
agar (NA)	AMC	-	White	No	White
	RC	-	Colorless	Grayish yellow	Colorless
	SP	-	Yes (reddish brown)	No	Yes (reddish brown)
NaCl tolerance (0% - 12%)		≥ 7% แต่ < 9%	≥ 7% แต่ < 10%	-	-

๘ *Gr; การเจริญเติบโตของเชื้อ AMC; สีของเส้นใยเหนืออาหาร RC; สีของเส้นใยใต้อาหาร SP; การสร้างสปอร์อาหาร

4.3 ผลการศึกษาปัจจัยพื้นฐานที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส

4.3.1 ผลของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส

ในการทดลอง ทำการศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสของเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท CMU-NKS-5 โดยทำการกำหนดความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ 0.5% (w/v) ทั้ง 9 ชนิด คือ arabinose, galactose, glucose, raffinose, xylose, colloidal chitin, chitin powder, soluble starch และ ชุดควบคุมที่ไม่ใส่แหล่งคาร์บอน เลี้ยงในอาหาร basal medium เดิมเชื้อตั้งต้นลงไป 0.5% (w/v) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จากผลการทดลอง พบว่า chitin powder ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (chitinase activity) สูงที่สุดคือ 172.0 mU/ml รองลงมาคือน้ำตาลอะราบินอส และ แป้ง เมื่อเทียบกับตัวควบคุมที่ไม่ใส่แหล่งคาร์บอน พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$) ดังภาพที่ 4.8

4.3.2 ผลของปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส

ในการทดลอง ทำการศึกษาปริมาณของแหล่งคาร์บอน ที่ 0.1 – 2.5% (w/v) เลี้ยงในอาหาร basal medium เดิมเชื้อตั้งต้นลงไป 0.5% (w/v) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ผลการทดลองพบว่า ที่ความเข้มข้นที่ 1.5% นั้นให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ สูงสุดคือ 432.8 mU/ml รองลงมาคือที่ 2.0% (w/v) และ 2.5% (w/v) เมื่อเทียบกับค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของคาร์บอนเริ่มต้นที่ 0.5 % (w/v) พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$) ดังภาพที่ 4.9

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

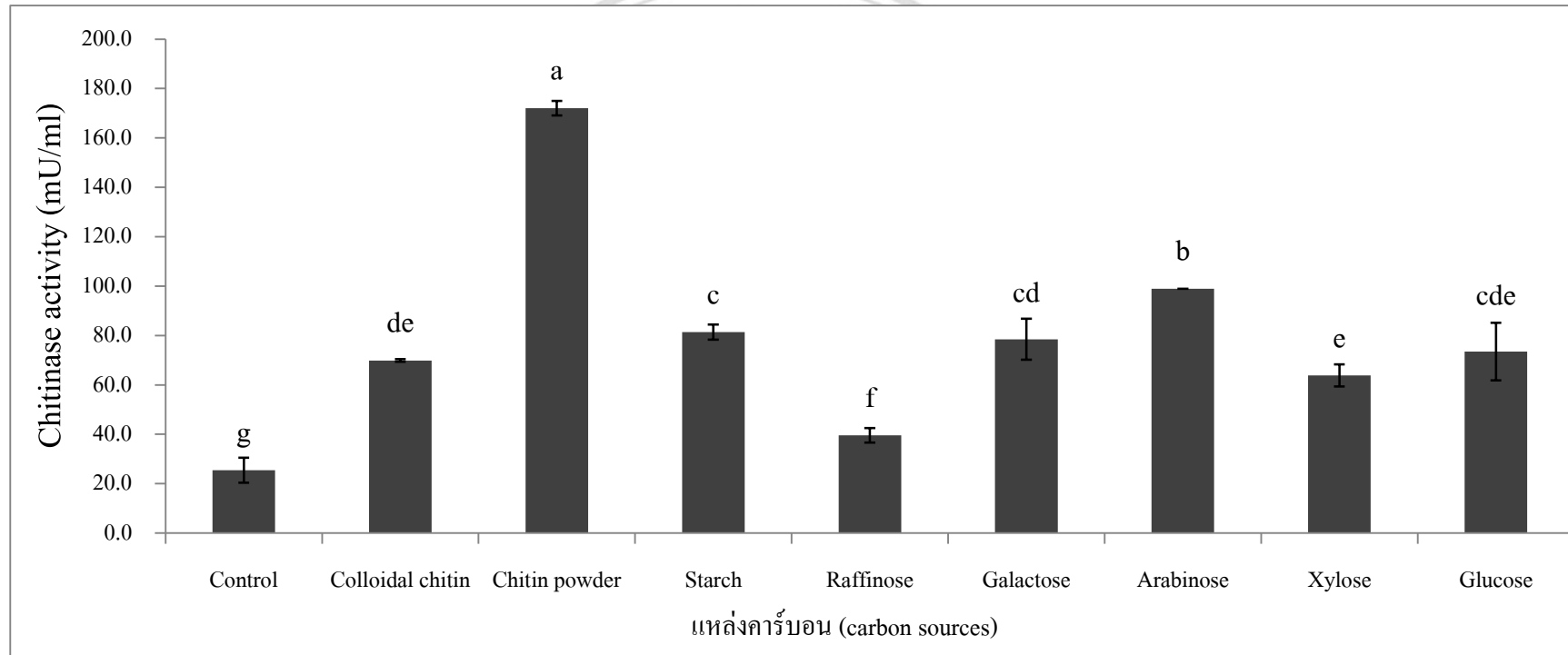
4.3.3 ผลของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ไคตินเอส

1) ผลของแหล่งไนโตรเจนประเภทอนินทรีย์ที่โดยรวม

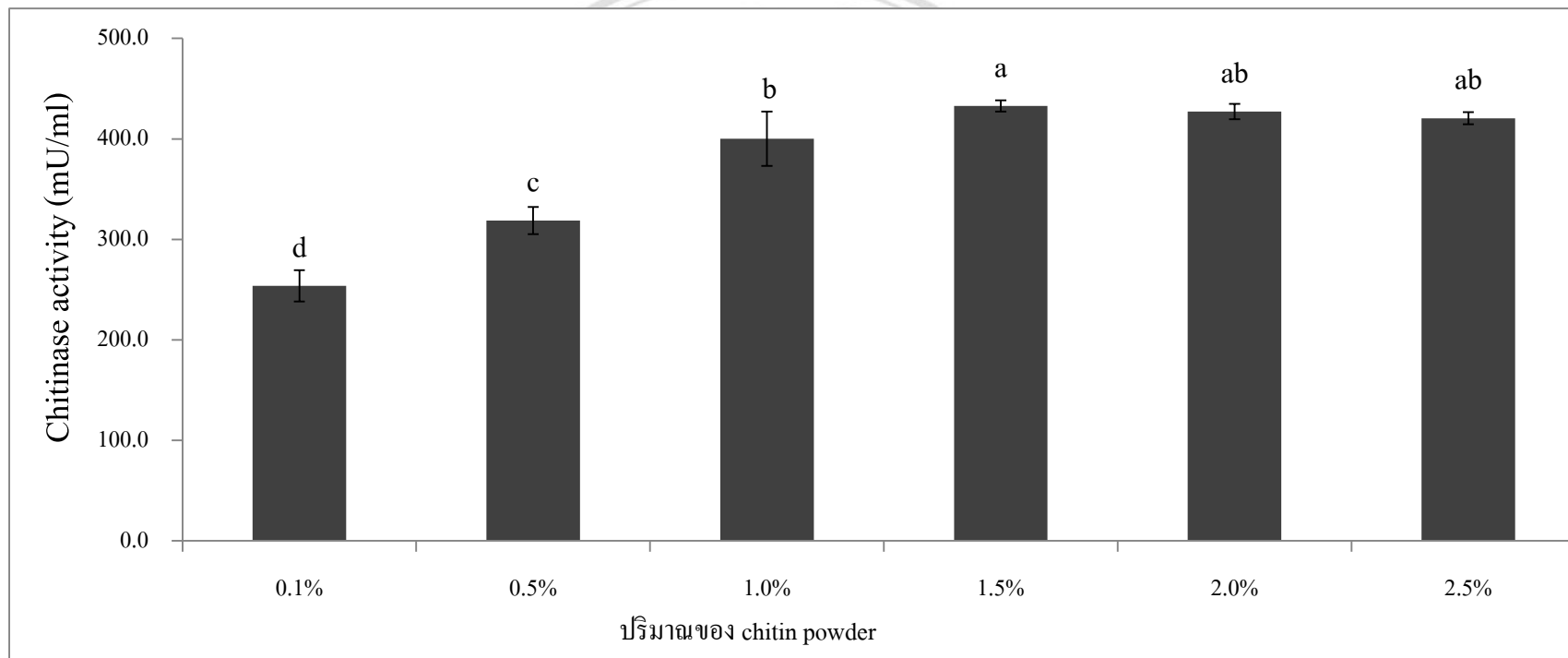
ในการทดลอง ทำการศึกษาแหล่งไนโตรเจนประเภทอนินทรีย์ที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไคตินเอสของเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท CMU-NKS-5 โดยทำการกำหนดความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 1.0% (w/v) ทั้ง 7 ชนิด คือ KNO_3 , NaNO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, NH_4NO_3 , และ ชุดควบคุมที่ได้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ในอาหาร basal medium ที่มี 1.5% (w/v) chitin powder เป็นแหล่งคาร์บอน เดิมเชื่อดังต้นลงไป 0.5% (w/v) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน พบว่าค่าของ KNO_3 นั้น ให้ค่า chitinase activity สูงที่สุด (315.3 mU/ml) รองลงมาคือ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และ NaNO_3 พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 4.10

2) ผลของแหล่งไนโตรเจนประเภทอินทรีย์

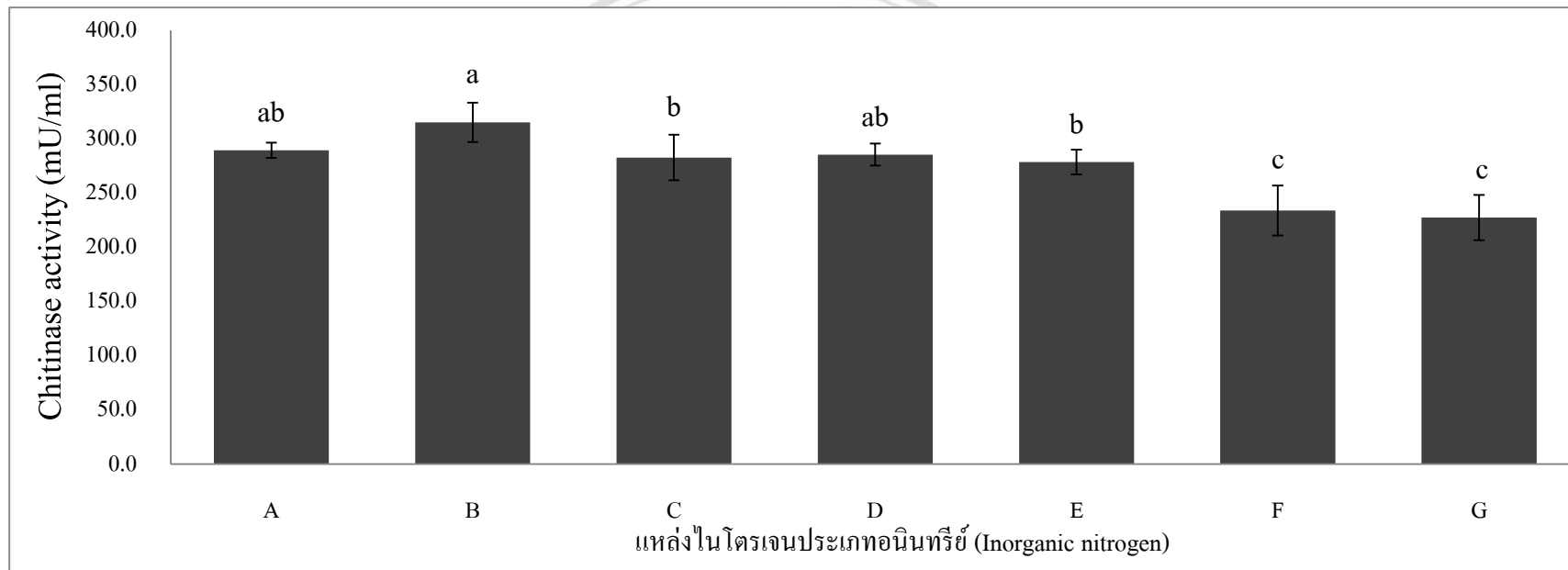
ในการทดลอง ทำการศึกษาแหล่งไนโตรเจนประเภทอินทรีย์ที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไคตินเอสของเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท CMU-NKS-5 โดยทำการกำหนดความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 0.05% (w/v) ทั้ง 7 ชนิด คือ beef extract, casein, malt extract, peptone, tryptone, urea และ ชุดควบคุมที่ได้ yeast extract ในอาหาร basal medium ที่มี 1.5% (w/v) chitin powder เป็นแหล่งคาร์บอน เดิมเชื่อดังต้นลงไป 0.5% (w/v) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน พบว่า casein, yeast extract และ peptone ให้ค่า chitinase activity เท่ากับ 336.6, 312.6 และ 322.9 mU/ml ตามลำดับ ดังภาพที่ 4.11 เมื่อทำการจัดกลุ่มทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$) จึงเลือกใช้ casein เป็นแหล่งของไนโตรเจนเพื่อทำการทดลองต่อไป



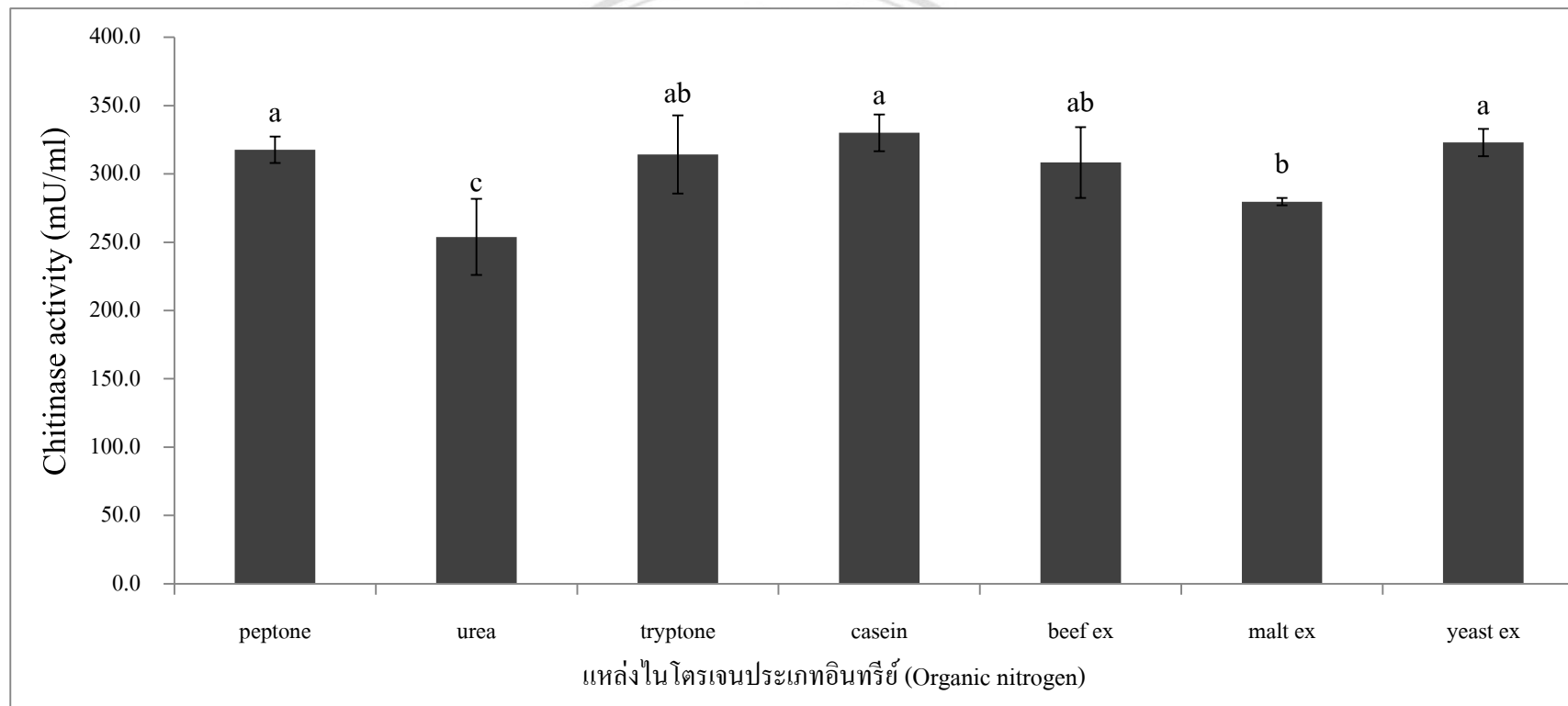
ภาพ 4.8 ผลของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสของเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท CMU-NKS-5 ที่เลี้ยงในแหล่งคาร์บอนแตกต่างกันในอาหาร basal medium เมื่อเขย่าที่ความเร็ว 130 rpm บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน



ภาพ 4.9 ผลของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสของเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท CMU-NKS-5 ที่เลี้ยงในความเข้มข้นของคาร์บอนที่แตกต่างกัน ในอาหาร basal medium เมื่อเขย่าที่ความเร็ว 130 rpm บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน



ภาพ 4.10 ผลของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสของเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท CMU-NKS-5 ที่เลี้ยงในแหล่งไนโตรเจนที่ต่างกัน โดยที่ A ; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, B ; KNO_3 , C ; NH_4NO_3 , D ; NaNO_3 , E ; $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, F ; NH_4Cl , G ; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ตามลำดับ ในอาหาร basal medium เมื่อเขย่า ที่ความเร็ว 130 rpm บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน



ภาพ 4.11 ผลของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสของเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลต CMU-NKS-5 ที่เลี้ยงในแหล่งไนโตรเจนประเภทอินทรีย์ที่แตกต่างกัน ในอาหาร basal medium เมื่อเขย่าที่ความเร็ว 130 rpm บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

4.3.4 ผลการศึกษาส่วนประกอบของอาหารที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส

ในการทดลองนี้ใช้แผนการทดลองแบบ Plackett and Burman design (PB) เพื่อคัดเลือกส่วนประกอบในอาหาร basal medium ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส โดย ในตารางที่ 4.9 แสดงปัจจัยทั้งหมดที่ทำการศึกษา จำนวน 7 ปัจจัย ได้แก่ casein, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , KNO_3 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, chitin powder และ trace element และ ค่าของ chitinase activity ของแต่ละการทดลองทั้งหมด 15 การทดลอง โดยพบว่า ที่การทดลองที่ 2 นั้นให้ค่า chitinase activity สูงสุดเท่ากับ 223.9 mU/ml และ ที่การทดลองที่ 10 นั้นให้ค่า chitinase activity น้อยที่สุดเท่ากับ 109.7 mU/ml นำข้อมูลที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติ ได้เป็นตารางที่ 4.10 ซึ่งจะแสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลของ Sum of Squares, df, Mean Square, F-Value และ P-value ในการวิเคราะห์ข้อมูลของผลการทดลอง จะทำการวิเคราะห์ค่าของความแปรปรวน (P-value) ที่ 0.05 เพื่อคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส โดยแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($P \leq 0.05$) โดยค่า P-value ของ model และ lack of fit นั้นจะต้องมีค่าน้อยกว่า 0.05 และมากกว่า 0.05 ตามลำดับ แบบจำลองที่ได้จึงจะมีความเหมาะสมต่อแผนการทดลองนั้น ผลการทดลองพบว่า ค่าความแปรปรวนของแบบจำลอง (model) นั้นมีความแตกต่างทางสถิติ และ ค่าของ lack of fit พบว่า ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ตามที่กำหนดไว้จึงทำการวิเคราะห์ค่าของ P-value ของแต่ละปัจจัย พบว่า ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส มีทั้งหมด 3 ปัจจัย ได้แก่ K_2HPO_4 , chitin powder และ casein สำหรับปัจจัย 4 ปัจจัยที่เหลือคือ KH_2PO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, KNO_3 และ trace element นั้นมีค่า P-value มากกว่า 0.05 แสดงว่าปัจจัยนี้ไม่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส และ ในตารางที่ 4.11 แสดงค่าของ Coefficient, df, Standard Error, 95% CI Low, 95% CI High และ VIF ตามลำดับ นอกจากนี้ค่า effect จะวิเคราะห์ผลได้ 2 แบบคือ ผลเชิงบวก (positive effect) และ ผลเชิงลบ (negative effect) ทำการอ่านผลโดยการสังเกตสัญลักษณ์ตรงคอลัมน์ coefficient ว่าเป็นค่าบวก (+) หรือ ลบ (-) ตัวอย่างเช่น K_2HPO_4 ค่า coefficient เท่ากับ 0.011268 ซึ่งให้ผลเป็นบวก แสดงว่า K_2HPO_4 มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส คือหากสูตรอาหารมี K_2HPO_4 เป็นส่วนประกอบอยู่ในปริมาณสูง จะช่วยเพิ่มค่ากิจกรรมของเอนไซม์ให้สูงขึ้น ดังนั้น ควรเลือกกระดับสูงที่ใช้ในการทดลองแบบ PB คือ 0.7 กรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับผลเชิงลบ คือ สารนั้นมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส ตัวอย่างเช่น KH_2PO_4 นั้นให้ผลเป็นลบ คือ -0.00477 แสดงว่า หากสูตรอาหารมี KH_2PO_4 เป็นส่วนประกอบอยู่ในปริมาณต่ำ จะช่วยเพิ่มค่ากิจกรรมของเอนไซม์ให้สูงขึ้น ดังนั้นควรเลือกกระดับต่ำ คือ 0.03 กรัมต่อลิตร และค่า Coefficient นั้นเอาไว้ดูว่าจะต้องใส่ปริมาณของสาร ไปทางระดับต่ำหรือระดับสูง

จากผลการทดลองนี้มีสารสามชนิดที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส แต่ทำการเลือก chitin powder และ casein ซึ่งยังต้องทำการศึกษาข้อมูลเพิ่มเติม โดยพิจารณาจากค่าของ P-value ถ้าค่า P-value มากแสดงว่ามีผลน้อยหรือไม่มีผล พบว่าค่า P-value ของสารทั้งสองชนิดนั้นเมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ พบว่า เท่ากับ 99.9% ของ chitin powder และ 99.0% ของ casein แต่ของ K_2HPO_4 นั้นคิดเป็น 97% เมื่อพิจารณาแล้วพบว่าสารทั้งสองชนิดให้ผลที่ค่า $P = 0.01$ ($P \leq 0.01$) และยังเป็นแหล่งคาร์บอน และ แหล่งไนโตรเจน ที่งานวิจัยส่วนมากมักนำไปศึกษาต่อ จึงนำไปศึกษาด้วยแผนการทดลองแบบ Central Composite Design ในลำดับต่อไป

4.3.5 ผลการศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของส่วนประกอบของอาหาร ในการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสด้วยแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD)

ในการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) ทำการเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสในแผนการทดลองแบบ PB ได้แก่ chitin powder และ casein มาศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยสำหรับการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส ในตารางที่ 4.12 แสดงปัจจัยที่ทำการศึกษา ได้แก่ casein และ chitin powder และ ค่าของ chitinase activity ของแต่ละการทดลอง รวมทั้งหมด 13 การทดลอง ผลการทดลอง พบว่า ที่การทดลองที่ 12 ให้ค่า chitinase activity สูงสุด เท่ากับ 256.5 mU/ml และ ที่การทดลองที่ 8 ให้ค่า chitinase activity ต่ำสุด เท่ากับ 173 mU/ml จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ ได้ผลตามตารางที่ 4.13 ซึ่งแสดงค่าของ Sum of Squares, df, Mean Square, F-Value และ P-value และ ทำการวิเคราะห์ข้อมูลของผลการทดลอง พิจารณาค่า P-value ที่ 0.05 เหมือนกับการทดลองแบบ PB โดยแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($P \leq 0.05$) ในส่วนของค่าความแปรปรวนของแบบจำลอง (model) นั้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและค่าของ lack of fit พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแสดงว่าแบบจำลองมีความเหมาะสมต่อการแผนทดลอง จากผลการทดลองครั้งที่ 1 พบว่า ไม่สามารถหาปริมาณที่เหมาะสมที่ให้ค่า chitinase activity สูงสุดของ chitin powder ได้ เนื่องจากกราฟโครงร่าง (3D) ที่ได้มีลักษณะเป็นเส้นตรง ดังภาพที่ 4.12 ส่วน casein นั้นสามารถหาปริมาณที่เหมาะสมที่ให้ค่า chitinase activity สูงสุดได้จากภาพที่ 4.12 กราฟที่ได้มีลักษณะโค้งลง และ ตารางที่ 4.14 จะแสดงค่าของ Coefficient, df, Standard Error, 95% CI Low, 95% CI High และ VIF ตามลำดับ เมื่อดูค่าของ coefficient ของ interaction (AB) ระหว่าง chitin powder (A) และ casein (B) พบว่ามีผลเชิงลบ และ ค่าของ coefficient ทั้ง chitin powder และ casein มีผลไปในเชิงลบทั้งคู่เช่นกัน ซึ่งให้ผลที่ตรงกันข้ามกับแผนการทดลอง PB

ในการทดลองนี้ไม่สามารถหาปริมาณที่เหมาะสมของทั้งสองค่าได้ โดยพิจารณาจากกราฟ contour และ กราฟ 3D จากภาพที่ 4.12 จะเห็นได้ว่า casein นั้นมีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์ไคตินเอส กราฟที่ได้เป็นแบบโค้งลง ค่ากลางนั้นให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด จะเห็นได้ว่า ไม่ว่าจะเพิ่มหรือลดค่ากิจกรรมที่ได้ ไม่แตกต่างกัน และ ในส่วนของ chitin powder จะเห็นได้ว่ากราฟที่ได้นั้นมีลักษณะเป็นเส้นตรง คือ ไม่ว่าจะเพิ่มหรือลดปริมาณของ chitin powder ค่า chitinase activity ก็ไม่มีการเพิ่มขึ้นหรือลดลง

ทำแผนการทดลองแบบ CCD ครั้งที่ 2 เพื่อหาปริมาณที่เหมาะสม โดยทำการลดปริมาณของ chitin powder ลง และ กำหนดค่าของ casein เท่าเดิม ในตารางที่ 4.15 แสดงปัจจัยที่ทำการศึกษา คือ casein และ chitin powder และ ค่าของ chitinase activity ของแต่ละการทดลองทั้งหมด 13 การทดลอง และ พบว่า ที่การทดลองที่ 12 ให้ค่าของ chitinase activity สูงสุดเท่ากับ 348.5 mU/ml และ ที่การทดลองที่ 5 ให้ค่าของ chitinase activity น้อยที่สุดเท่ากับ 150.5 mU/ml และ ในตารางที่ 4.16 จะแสดงค่าของ Sum of Squares, df, Mean Square, F-Value และ P-value ผลการทดลอง จะพิจารณาค่าของ P-value ของ model และ lack of fit พบว่าในส่วนของค่าความแปรปรวนของแบบจำลอง (model) นั้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ ค่าของ lack of fit พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแสดงว่าแบบจำลองมีความเหมาะสมต่อการแผนทดลอง และ ตารางที่ 4.17 จะแสดงค่าของ Coefficient, df, Standard Error, 95% CI Low, 95% CI High และ VIF ตามลำดับ โดยค่า coefficient ของ chitin powder มีผลเชิงบวก ส่วนค่าของ casein นั้นมีผลเชิงลบ และ ในการทดลองนี้สามารถหาปริมาณที่เหมาะสมของทั้งสองค่าได้ โดยพิจารณาจากกราฟ contour และกราฟ 3D จากภาพที่ 4.13 จะเห็นได้ว่า casein นั้นมีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์ไคตินเอส โดยเมื่อปริมาณของ casein เพิ่มขึ้น ค่า chitinase activity ที่ได้จะลดลง ตรงกับค่าของ coefficient ที่ต้องใส่ casein ในระดับที่ต่ำ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์จึงจะเพิ่มสูงขึ้น และในส่วนของ chitin powder ค่ากลางนั้นให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด จะเห็นได้ว่า ไม่ว่าจะเพิ่มหรือลดค่ากิจกรรมที่ได้ ไม่แตกต่างกัน

จากผลการทดลองที่ได้ นำข้อมูลมาสร้างกราฟพื้นผิวตอบสนองในรูปแบบ 3 มิติ (response surface) และ กราฟเส้นโครงร่างของพื้นผิวตอบสนอง (contour plot) ซึ่งแต่ละกราฟจะแสดงผลของการทดลอง 2 ตัวแปรคือ chitin powder และ casein โดยจะบอกได้ว่าในส่วนของส่วนโค้งในกราฟ 3D หรือ จุดศูนย์กลางของวงกลมในกราฟ contour เป็นค่าที่มีความเหมาะสมของแต่ละตัวแปร โดยความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยสองปัจจัยที่ทำการศึกษา ทำให้ได้สมการสุดท้ายในรูปแบบของ actual factor ออกมา โดยที่ค่า Y คือ ค่าของการตอบสนองต่อการผลิตเอนไซม์ไคตินเอส และ นำสมการ

ด้านล่าง มาทำนายค่าเอนไซม์ไคตินเนส เมื่อแทนค่าเหมาะสมลงในสมการ จะได้ค่าที่ดีที่สุดของเอนไซม์ไคตินเนส หรือค่า Y ในสมการที่ทำนาย และ ทำการทดลองเพื่อยืนยันผลว่าเป็นไปตามที่ทำนายไว้หรือไม่ (validation) ในการทดลองต่อไป

$$\text{Chitinase activity (Y)} = 0.1223 + 0.0312 * \text{chitin powder} + 0.0611 * \text{casein} + 0.0074 * \text{chitin powder} * \text{casein} - 0.0016 * \text{chitin powder}^2 - 0.1033 * \text{casein}^2$$



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 4.9 ผลของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนส ในแผนการทดลองแบบ Plackett and Burman design

STD	Run	Block	KH ₂ PO ₄	K ₂ HPO ₄	MgSO ₄ 7H ₂ O	Trace element	Chitin powder	Casein	KNO ₃	Chitinase activity(mU/ml)
1	1	Block 1	0.3	0.7	0.03	1	15	0.5	0.1	190.1
2	14	Block 1	0.03	0.7	0.3	0.1	15	0.5	1	223.9
3	13	Block 1	0.3	0.07	0.3	1	1.5	0.5	1	141.7
4	12	Block 1	0.03	0.7	0.03	1	15	0.05	1	197.6
5	2	Block 1	0.03	0.07	0.3	0.1	15	0.5	0.1	162.6
6	9	Block 1	0.03	0.07	0.03	1	1.5	0.5	1	133.6
7	5	Block 1	0.3	0.07	0.03	0.1	15	0.05	1	144.9
8	10	Block 1	0.3	0.7	0.03	0.1	1.5	0.5	0.1	140.3
9	7	Block 1	0.3	0.7	0.3	0.1	1.5	0.05	1	116.1
10	4	Block 1	0.03	0.7	0.3	1	1.5	0.05	0.1	109.7
11	6	Block 1	0.3	0.07	0.3	1	15	0.05	0.1	148.4
12	8	Block 1	0.03	0.07	0.03	0.1	1.5	0.05	0.1	111.3
13	15	Block 1	0.165	0.385	0.165	0.55	8.25	0.275	0.55	164.8
14	11	Block 1	0.165	0.385	0.165	0.55	8.25	0.275	0.55	184.7
15	3	Block 1	0.165	0.385	0.165	0.55	8.25	0.275	0.55	169.4

ตาราง 4.10 การวิเคราะห์ข้อมูลของแผนการทดลองแบบ Plackett and Burman design จากโปรแกรม Design-Expert 7.0.0

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value	Prob > F
Model	0.01312	7	0.001874	8.732122	0.0087	Significant
A-KH ₂ PO ₄	0.000273	1	0.000273	1.272813	0.3023	
B-K ₂ HPO ₄	0.001524	1	0.001524	7.098089	0.0373	
C-MgSO ₄ .7H ₂ O	1.96E-05	1	1.96E-05	0.09115	0.7729	
D-Trace element	3.95E-05	1	3.95E-05	0.184067	0.6829	
E-powder chitin	0.008257	1	0.008257	38.46974	0.0008	
F-casein	0.002248	1	0.002248	10.4734	0.0178	
G-KNO ₃	0.000759	1	0.000759	3.535592	0.1091	
Curvature	0.001085	1	0.001085	5.053216	0.0656	non-significant
Residual	0.001288	6	0.000215			
Lack of Fit	0.001071	4	0.000268	2.465775	0.3088	non-significant
Pure Error	0.000217	2	0.000109			
Cor Total	0.015493	14				

ตาราง 4.11 การวิเคราะห์ข้อมูลของแผนการทดลองแบบ Plackett and Burman design ด้วยวิธี ANOVA จากโปรแกรม Design-Expert 7.0.0

Factor	Coefficient Estimate	Df	Standard Error	95% CI Low	95% CI High	VIF
Intercept	0.15168	1	0.004229	0.141331	0.162029	
A-KH ₂ PO ₄	-0.00477	1	0.004229	-0.01512	0.005577	1
B-K ₂ HPO ₄	0.011268	1	0.004229	0.000919	0.021617	1
C-MgSO ₄ .7H ₂ O	-0.00128	1	0.004229	-0.01163	0.009072	1
D-Trace element	0.001815	1	0.004229	-0.00853	0.012163	1
E-powder chitin	0.026232	1	0.004229	0.015883	0.036581	1
F-casein	0.013687	1	0.004229	0.003338	0.024036	1
G-KNO ₃	0.007953	1	0.004229	-0.0024	0.018301	1
Center Point	0.021259	1	0.009457	-0.00188	0.0444	1

R-Squared = 0.9106, Adj R-Squared = 0.8063, Pred R-Squared = 0.3464, Adeq Precision = 10.197,

Std. Dev. = 0.015, Mean = 0.16, C.V. % = 9.40, PRESS = 0.010

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 4.12 ผลของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอส ในแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) ครั้งที่ 1

Std	Run	Block	Chitin powder	Casein	Chitinase activity (mU/ml)
1	2	Block 1	15	0.5	231.9
2	12	Block 1	25	0.5	233.4
3	4	Block 1	15	1.5	216.0
4	9	Block 1	25	1.5	200.8
5	1	Block 1	12.92893	1	253.5
6	7	Block 1	27.07107	1	242.6
7	13	Block 1	20	0.292893	225.5
8	11	Block 1	20	1.707107	173.4
9	10	Block 1	20	1	254.9
10	8	Block 1	20	1	232.2
11	3	Block 1	20	1	254.4
12	6	Block 1	20	1	256.5
13	5	Block 1	20	1	222.3

ตาราง 4.13 ผลของการวิเคราะห์ข้อมูลของแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) จากโปรแกรม Design-Expert 7.0.0 ครั้งที่ 1

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	0.0059	5	0.0012	7.53	0.0098	Significant
A-Chitin	0.0001	1	0.0001	0.68	0.4365	
B-Casein	0.0019	1	0.0019	11.95	0.0106	
AB	0.0001	1	0.0001	0.45	0.5241	
A ²	0.0000	1	0.0000	0.063	0.8092	
B ²	0.0037	1	0.0037	23.75	0.0018	
Residual	0.0011	7	0.0002			
Lack of Fit	0.0001	3	0.0000	0.14	0.9339	non significant
Pure Error	0.0010	4	0.0002			
Cor Total	0.0070	12				

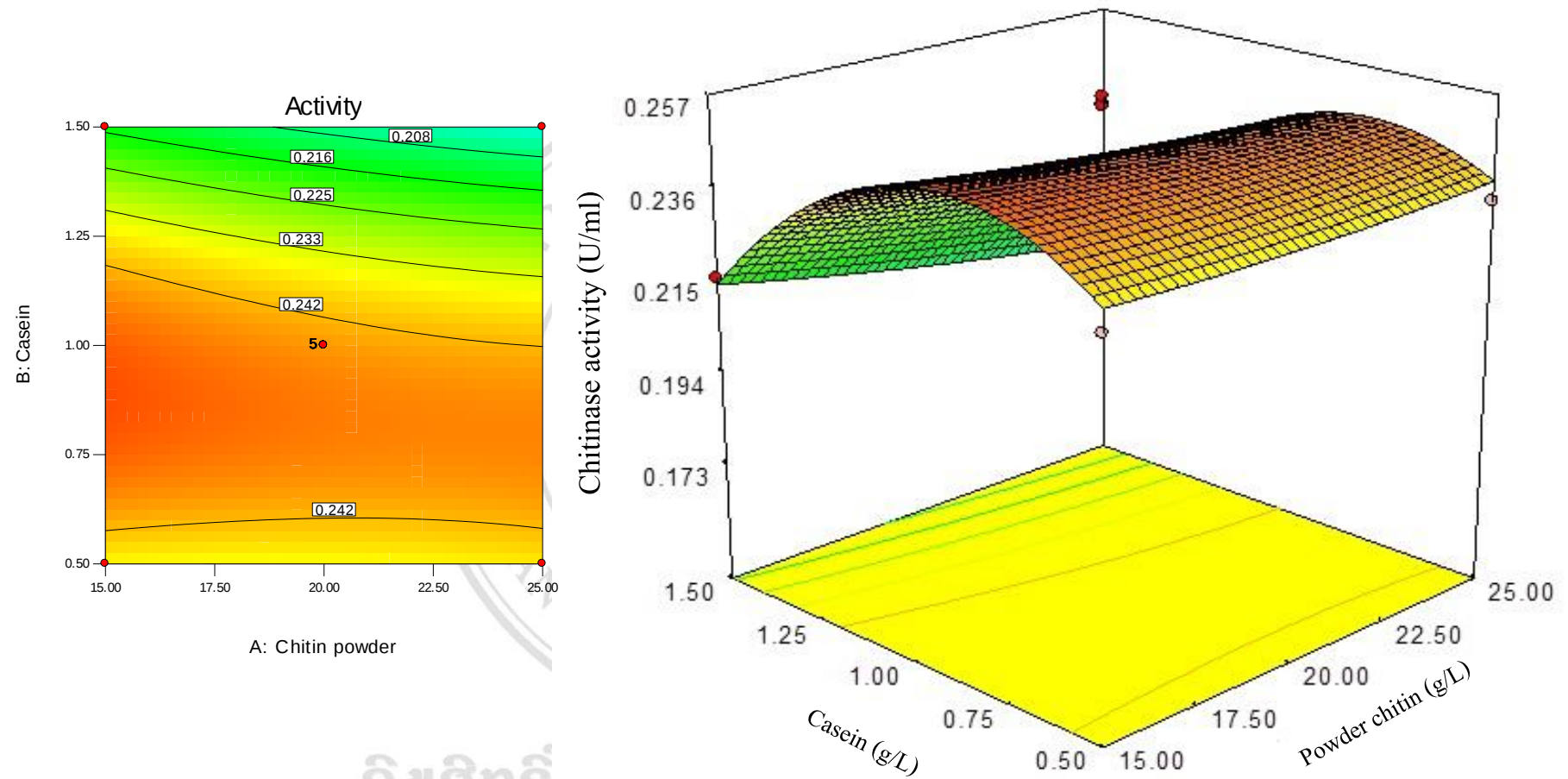
R-Squared = 0.8432, Adj R-Squared = 0.7311, Pred R-Squared = 0.6748, Adeq Precision = 8.871,

Std. Dev. = 0.012, Mean = 0.23, C.V. % = 5.42 และ PRESS = 0.023

ตาราง 4.14 การวิเคราะห์ข้อมูลของแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) ด้วยวิธี ANOVA

จากโปรแกรม Design-Expert 7.0.0 ครั้งที่ 1

Factor	Coefficient Estimate	df	Standard Error	95% CI Low	95% CI High	VIF
Intercept	0.2400	1	0.0056	0.23	0.26	
A-Chitin	-0.0036	1	0.0044	-0.014	0.0068	1
B-Casein	-0.0150	1	0.0044	-0.026	-0.0048	1
AB	-0.0042	1	0.0062	-0.019	0.011	1
A ²	0.0012	1	0.0047	-0.01	0.012	1.02
B ²	-0.0230	1	0.0047	-0.034	-0.012	1.02



ภาพ 4.12 ผลของกราฟเส้นโครงร่างและกราฟโครงร่าง (3D) ของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสของเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท CMU-NKS-5 ระหว่าง chitin powder และ casein ครั้งที่ 1

ตาราง 4.15 ผลของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนส ในแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) ครั้งที่ 2

Std	Run	Block	Chitin powder	Casein	Chitinase activity (mU/ml)
1	12	Block 1	5.00	0.50	269.1
2	1	Block 1	15.00	0.50	236.5
3	2	Block 1	5.00	1.50	180.1
4	3	Block 1	15.00	1.50	222.1
5	8	Block 1	2.93	1.00	150.5
6	9	Block 1	17.07	1.00	306.7
7	7	Block 1	10.00	0.29	323.3
8	11	Block 1	10.00	1.71	195.3
9	10	Block 1	10.00	1.00	290.1
10	5	Block 1	10.00	1.00	311.0
11	6	Block 1	10.00	1.00	291.5
12	4	Block 1	10.00	1.00	346.5
13	13	Block 1	10.00	1.00	273.4

ตาราง 4.16 ผลของการวิเคราะห์ข้อมูลของแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) จากโปรแกรม Design-Expert 7.0.0 ครั้งที่ 2

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	0.03292	5	0.006584	4.58	0.0356	Significant
A-Chitin	0.006634	1	0.006634	4.62	0.0687	
B-Casein	0.010118	1	0.010118	7.04	0.0327	
AB	0.001388	1	0.001388	0.97	0.3584	
A ²	0.011816	1	0.011816	8.23	0.0241	
B ²	0.004646	1	0.004646	3.23	0.1151	
Residual	0.010054	7	0.001436			
Lack of Fit	0.006926	3	0.002309	2.95	0.1614	non significant
Pure Error	0.003128	4	0.000782			
Cor Total	0.042975	12				

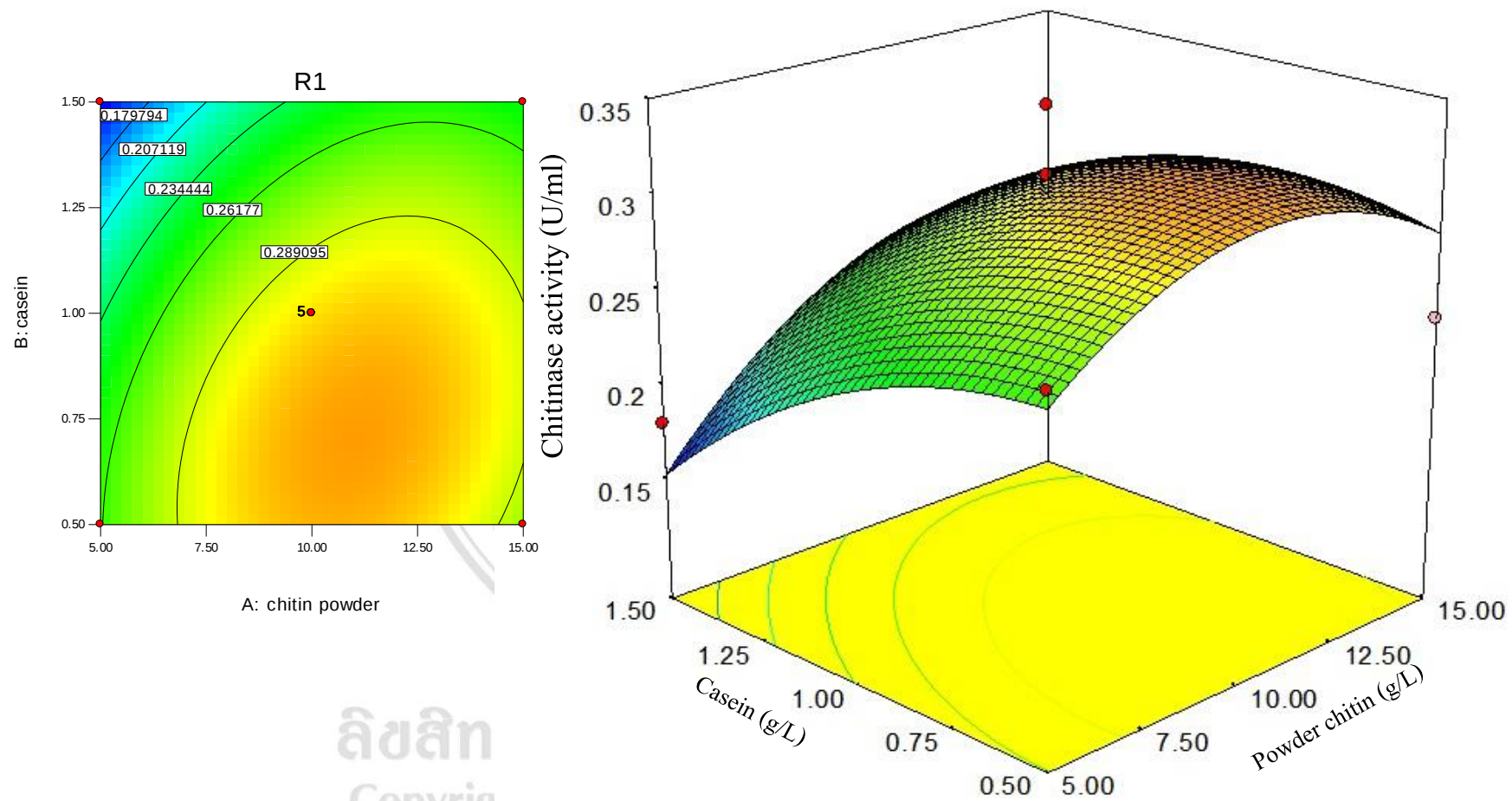
R-Squared = 0.7660, Adj R-Squared = 0.5989, Pred R-Squared = -0.2598, Adeq Precision = 5.827,

Std. Dev. = 0.038, Mean = 0.26, C.V. % = 14.51 และ PRESS = 0.054

ตาราง 4.17 การวิเคราะห์ข้อมูลของแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) ด้วยวิธี ANOVA

จากโปรแกรม Design-Expert 7.0.0 ครั้งที่ 2

Factor	Coefficient Estimate	df	Standard Error	95% CI Low	95% CI High	VIF
Intercept	0.30	1	0.017	0.262432	0.342588	
A-Chitin	0.029	1	0.013	-0.00289	0.060481	1.00
B-Casein	-0.036	1	0.013	-0.06725	-0.00388	1.00
AB	0.019	1	0.019	-0.02618	0.063435	1.00
A ²	-0.041	1	0.014	-0.07519	-0.00724	1.02
B ²	-0.026	1	0.014	-0.05982	0.008136	1.02



ภาพ 4.13 ผลของกราฟเส้นโครงร่างและกราฟโครงร่าง (3D) ของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลต CMU-NKS-5 ระหว่าง chitin powder และ casein ครั้งที่ 2

4.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส

4.4.1 ผลของระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส

จากแผนการทดลองแบบ CCD ได้ปริมาณที่เหมาะสมของ chitin powder กับ casein เท่ากับ 15 กับ 0.88 g/L ตามลำดับ จากสมการที่ได้ ทำการทดลองเพื่อยืนยันผลว่าเป็นไปตามการทำนายหรือไม่ (validation) โดยเปรียบเทียบระหว่างผลจากการทดลองกับผลลัพธ์ที่ทำนายได้จากแผนการทดลอง CCD (250 mU/ml) ในการทดลองทำการเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. CMU-NKS-5 ใน modified basal medium ที่เหมาะสมดังตารางที่ 3.9 เติมน้ำเชื้อตั้งต้นลงไป 2.0% (v/v) บ่มที่อุณหภูมิห้อง พบว่า เชื้อผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุดใน วันที่ 7 ค่า pH เปลี่ยนจาก 5.0 เป็น 8.5 โดยค่า chitinase activity เท่ากับ 241.2 mU/ml ตามภาพที่ 4.14 ผลการทดลองพบว่า ผลที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสม และ จากการทำนายผลมีค่าไม่แตกต่างกัน และ ค่า% validate เท่ากับ 96.48%

4.4.2 ผลของค่าพีเอชเริ่มต้น (pH initial) ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส

ทำการศึกษาผลของค่าพีเอชเริ่มต้น โดยเลี้ยงเชื้อลงในอาหาร modified basal medium ที่มี 1.5% (w/v) chitin powder เป็นแหล่งคาร์บอน ปรับค่า pH เริ่มต้นที่แตกต่างกันตั้งแต่ 3 - 11 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ผลการทดลองพบว่า ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของค่า pH เริ่มต้นที่ 7.0 เท่ากับ 244.6 mU/ml ที่ค่า pH เริ่มต้น 5.0 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด เท่ากับ 288.7 mU/ml และ ที่ค่า pH เท่ากับ 9-11 พบว่า เชื้อมีค่า chitinase activity ลดน้อยลง ตามภาพที่ 4.15

4.4.3 ผลของความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้น (% inoculum)

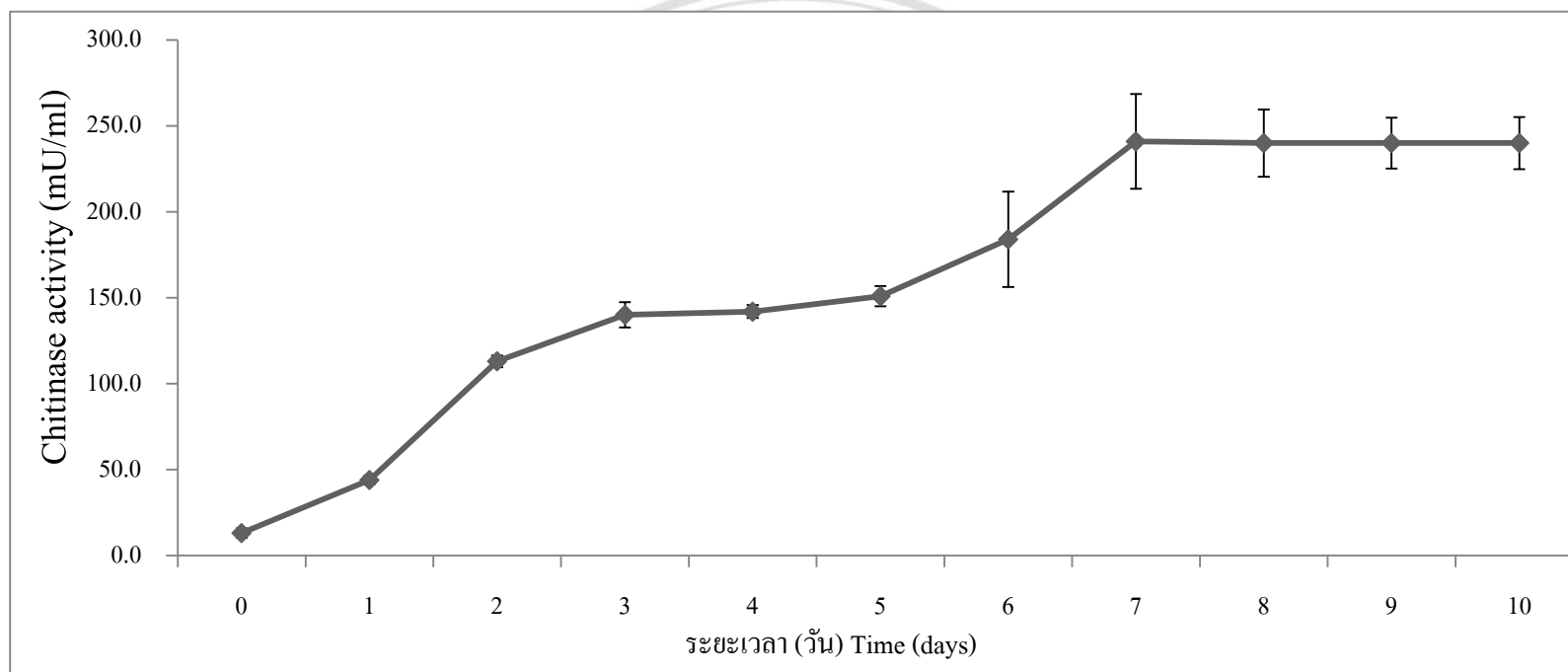
ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้น โดยเลี้ยงเชื้อลงในอาหาร modified basal medium ที่มี 1.5% (w/v) chitin powder เป็นแหล่งคาร์บอน ที่กำหนดค่าความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้นที่ต่างกัน ตั้งแต่ 0 - 2.5% (v/v) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ทำการเปรียบเทียบระหว่างค่า pH เริ่มต้นระหว่าง 5.0 กับ 7.0 ผลการทดลองพบว่า ที่ pH อาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 ค่าความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้นที่ 2.5% (v/v) ให้ค่า activity สูงสุด เท่ากับ 231.2 mU/ml และ ที่ pH ที่เหมาะสมเท่ากับ 5.0 ความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้นที่ 2.0% (v/v) ให้ค่า activity สูงสุด เท่ากับ 223.8 mU/ml ดังภาพที่ 4.16 ในการทดลองเลือกความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้นที่ 2.0% (v/v) เป็นปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อไป

4.4.4 เปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ระหว่างสูตรอาหารเดิมกับสูตรอาหารที่เหมาะสม

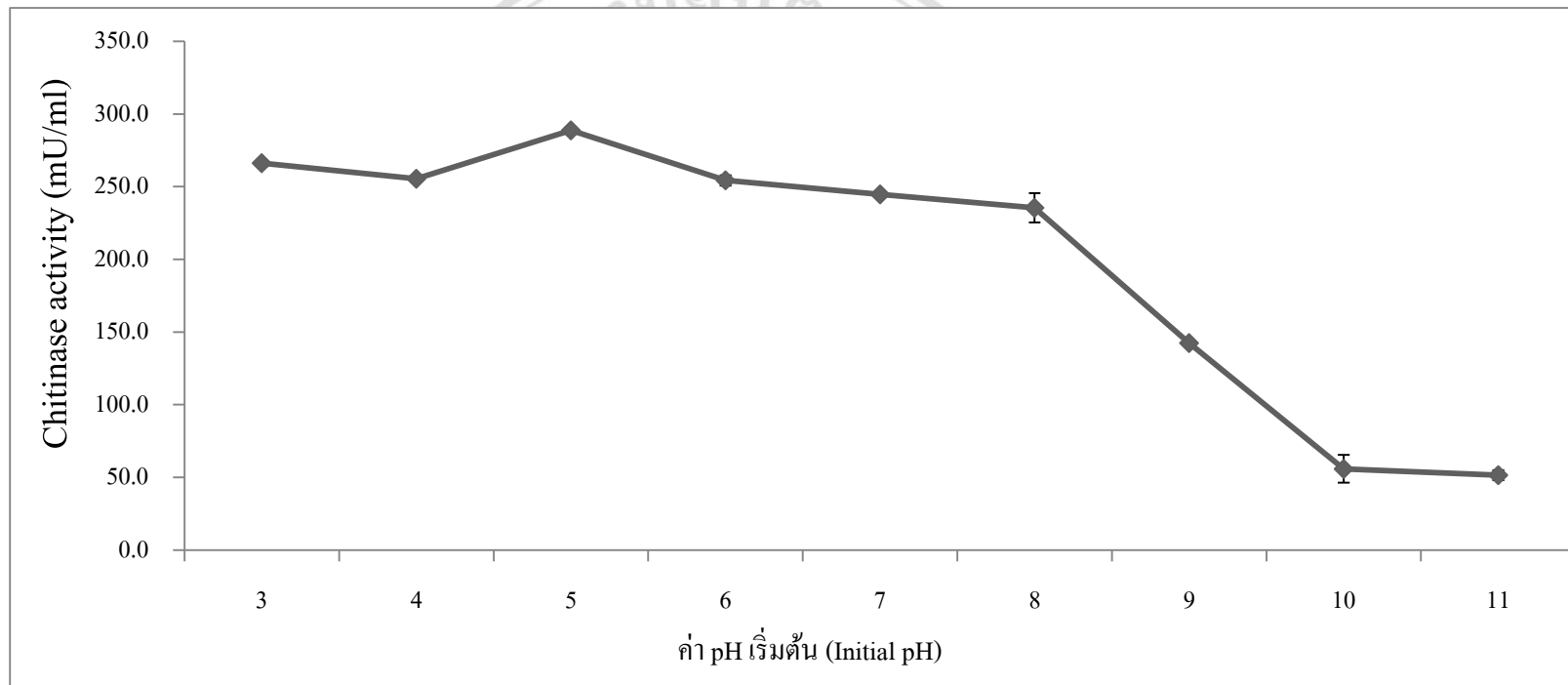
ทำการทดลอง เปรียบเทียบระหว่างสูตรอาหารเดิม และ สูตรอาหารที่เหมาะสม โดยเลี้ยงเชื้อลงในอาหาร basal medium และ optimized medium ตามสูตรในตารางที่ 9 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ผลการทดลองพบว่า ทั้งสองสูตรมีค่า chitinase activity ที่ใกล้เคียงกัน ใน 3 วันแรก หลังจากวันที่ 4 พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมนั้นให้ค่า chitinase activity เพิ่มขึ้นกว่าสูตรอาหารเดิม โดยทั้งสองสูตรสร้างเอนไซม์สูงสุดที่วันที่ 7 เท่ากับ 100 mU/ml และ 145.0 mU/ml ตามลำดับ ดังภาพที่ 4.17 และ ค่า chitinase activity ของสูตรอาหารใหม่เพิ่มขึ้นเป็น 0.68 เท่าของอาหารเดิม และ ค่า specific activity ของ basal medium และ ของ modified basal medium เท่ากับ 27.97 และ 40.37 mU/mg protein ตามลำดับ



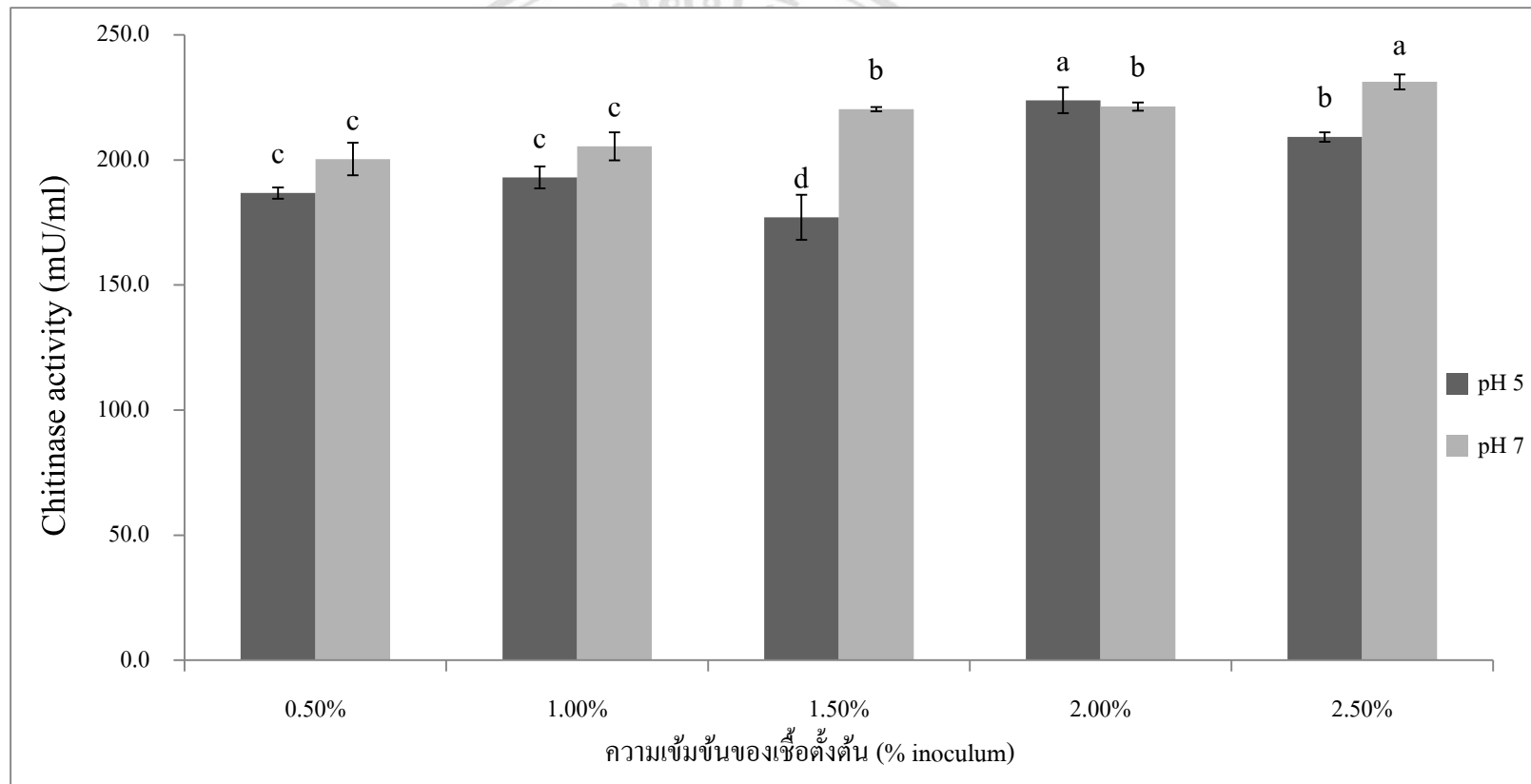
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



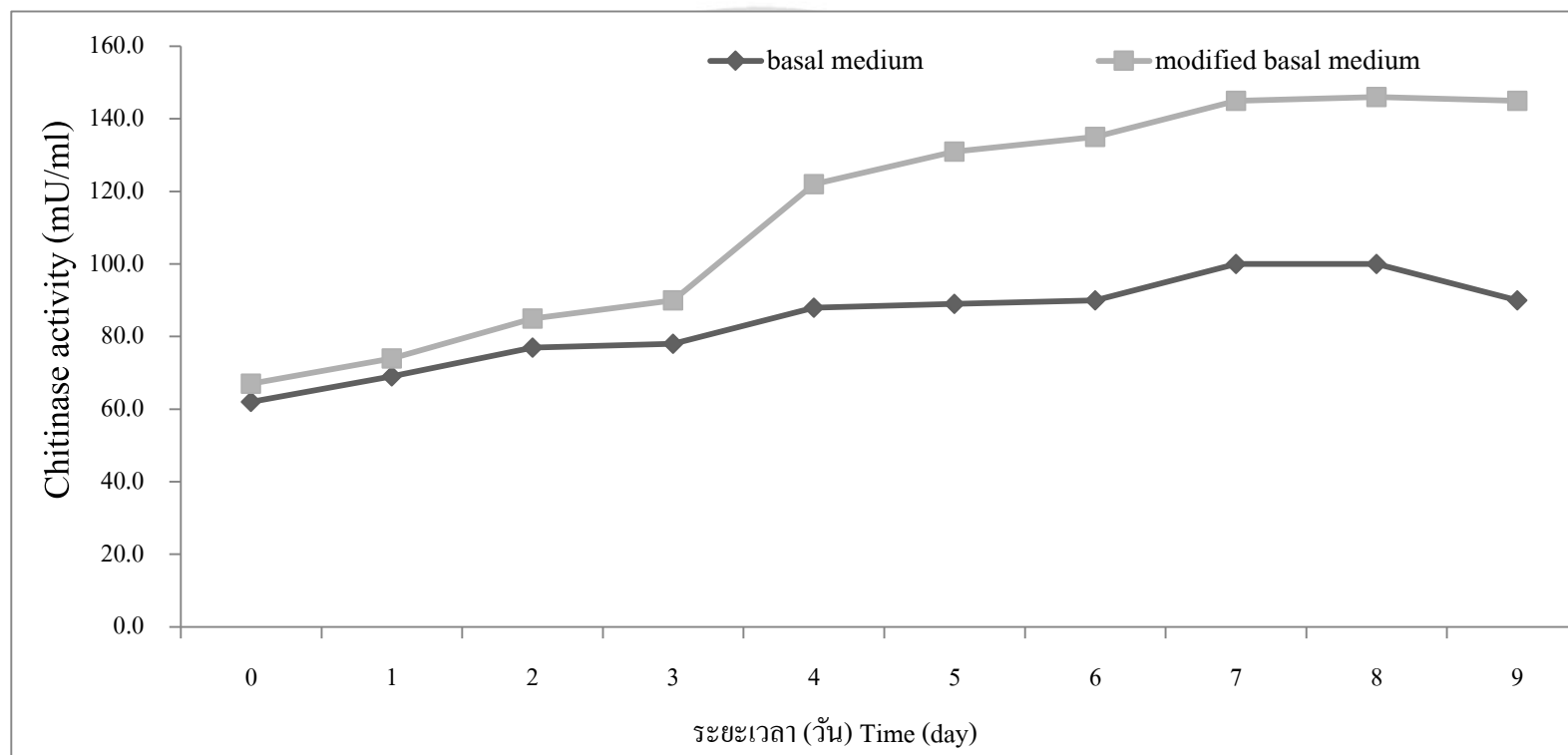
ภาพ 4.14 ผล validation จากแผนการทดลองแบบ CCD ของการผลิตเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลต CMU-NKS-5 เมื่อเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน



ภาพ 4.15 ผลของค่า pH เริ่มต้นที่เหมาะสมในอาหาร modified medium เมื่อเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน



ภาพ 4.16 ผลของความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้น ในอาหาร modified medium เมื่อเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน



ภาพ 4.17 ผลเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ระหว่างสูตรอาหารเดิมกับสูตรอาหารที่เหมาะสม เมื่อเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน โดยสัญลักษณ์ (◆) คืออาหารเดิม และสัญลักษณ์ (■) คืออาหารที่เหมาะสม