

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

จากการทดสอบการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีท์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนส ที่แยกมาจากดินในพื้นที่ของประเทศไทย จากห้องปฏิบัติการวิจัยสู่ความเป็นเลิศทางวิชาการ ด้านพัฒนาแบบยั่งยืน ของทรัพยากรชีวภาพ สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ด้วยวิธีทดสอบ ในอาหารแข็งที่ใช้อาหาร colloidal chitin agar ที่มี 4% (w/v) colloidal chitin เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท์โดยรายงานผลเป็นค่า H/C ratio จากความสามารถในการสร้าง วงใส ได้จำนวน 25 ไอโซเลท จากทั้งหมด 104 ไอโซเลท (4.16%) ซึ่งการทดสอบในอาหารแข็งเป็น การคัดเลือกเบื้องต้น มีความสะดวก รวดเร็ว และสามารถดูผลได้ง่าย โดยดูวงใสรอบโคโลนีเชื้อ ในหลายงานวิจัยจึงนิยมใช้วิธีการเกิดวงใสในการคัดเลือกเชื้อ (Bansode and Bajekal, 2006; Mane and Deshmukh, 2009) ข้อเสีย คือ มีความไวต่ำ และ ไม่เสมอไปที่มีวงใสที่กว้างแล้ว ค่าของกิจกรรม ของเอนไซม์ไคตินเนส จะต้องสูงทุกครั้ง ในการทดลองจึงได้ทำการทดสอบ ในอาหารเหลวควบคู่กันไป โดยเลี้ยงในอาหารเหลว EPM ที่มี แหล่งคาร์บอน คือ glucose และ colloidal chitin และ แหล่งไนโตรเจน คือ yeast extract และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เพื่อหาค่า chitinase activity ด้วยวิธี DNS method ผลการทดลอง สามารถคัดเลือกเชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์ไคตินเนสได้มากกว่า 1 U/ml ได้ จำนวน 10 ไอโซเลท จากไอโซเลททั้งหมด การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว สามารถตรวจวัดค่าการทำงานของเอนไซม์ไคตินเนสได้ แต่มีข้อบกพร่อง คือ ถ้าเป็นเอนไซม์ที่ผลิตภายในเซลล์จะไม่สามารถใช้วิธีนี้วัด ได้ ทำการเปรียบเทียบวิธีการทั้งสองแบบ พบว่าแอคติโนมัยซีท์ ไอโซเลท CMU-NKS-5 มีค่า H/C ratio และค่า chitinase activity ที่สูงสุดทั้งสองวิธี

ในการระบุสายพันธุ์ของเชื้อแอคติโนมัยซีท์ ไอโซเลท CMU-NKS-5 ที่แยกมาจากดิน รอบรังปลวก ทำการศึกษาลักษณะของเส้นใยและรูปร่างของสปอร์ โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อทำการศึกษากายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และ กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด การใช้กล้องจุลทรรศน์จะทำให้ทราบถึงรายละเอียด ของเส้นใยและสปอร์ได้มากขึ้น จัดเป็นส่วนสำคัญสำหรับการจำแนกแอคติโนมัยซีท์ และ สามารถตรวจสอบรายละเอียดและโครงสร้างอื่นๆภายในเซลล์ได้อีกด้วย จากการจัดจำแนกของ Vobis ในปี ค.ศ. 1997 อ้างโดย พงศ์ระวี (2558) หากสังเกตเพียงตาเปล่า อาจเห็นเพียงลักษณะของโคโลนี และ

รูปแบบของเส้นใยเท่านั้น ทำการศึกษาบนอาหารแข็ง ISP 2 พบว่า เส้นใยจะเจริญเติบโต และ มีการอัดกันแน่น ทำให้ลักษณะของเส้นใยได้ผิวอาหารมีลักษณะแข็งคล้ายยาง ผึ่งลงบนผิวหน้าอาหาร จากนั้นมีการสร้างเส้นใยขึ้นมาอยู่บนผิวหน้าอากาศ มีลักษณะคล้ายผงแป้งละเอียด เรียกว่า เส้นใยเหนืออาหาร พบว่า มีสีขาว แต่เมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีเทา ถึง เทาเข้ม โคโลนิญขึ้นเหนือผิวอาหาร ผิวหน้าขรุขระ ลักษณะผิวของสปอร์ และการจัดเรียงตัวของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่า สปอร์เป็นแบบสาวยาว มีการจัดเรียงสปอร์แบบเรียงต่อกันเป็นสายโซ่ สปอร์มีผิวขรุขระลักษณะคล้ายหนาม ขึ้นมาจากผิวสปอร์ พบลักษณะนี้ได้มากในกลุ่มของ *Streptomyces* และในการเลี้ยงเชื้อลงในอาหาร ISP ทั้ง 9 ชนิด พบว่า เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ปานกลาง ในอาหารที่เป็น oatmeal agar และ carbon utilization agar และ ในอาหารที่เป็น peptone yeast extract iron agar นั้นเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น

จากนั้นอาศัยลักษณะทางชีวเคมี และ ชุดทดสอบ API มาช่วยในการบ่งบอกจำแนกเชื้อ เนื่องจากความแตกต่างทางองค์ประกอบเคมีของเซลล์ มีส่วนช่วยในการจำแนกแอกติมัยซีท์ได้อย่างถูกต้อง และ แม่นยำยิ่งขึ้น เพราะ แอกติมัยซีท์ที่มาจากต่างสกุลกันบางชนิดมีความเหมือนกันของลักษณะทางพื้นฐานวิทยาสถา กระบวนการที่ง่ายและรวดเร็วในการแบ่งแยกกลุ่มของแอกติมัยซีท์ได้ถึงระดับสกุล คือ การศึกษาการมีอยู่ และ ชนิดของกรด Diaminopimelic (DAP) และ องค์ประกอบของน้ำตาลในผนังเซลล์ (Happer and Davis, 1979; Lechevalier and Lechevalier, 1970) เมื่อทำการทดลองตรวจสอบกรดอะมิโน (DAP) ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์แอกติโนมัยซีท์พบว่าเป็น LL-DAP ในกลุ่มของ *Streptomyces* พบชนิดนี้บ่อยที่สุด และ ในส่วนของชุดทดสอบ API เป็นชุดทดสอบการผลิตเอนไซม์ และการทดสอบการย่อยสลายน้ำตาล หลักการทำงานของชุดทดสอบนี้ คือ ในแต่ละหลุมทดสอบจะมีสับสเตรทที่จำเพาะกับเอนไซม์แต่ละชนิดอยู่ภายใน เมื่อจุลินทรีย์ทดสอบทำการผลิตเอนไซม์ออกมา เอนไซม์นั้นจะเข้าทำงานอย่างจำเพาะกับสับสเตรทแต่ละชนิดที่อยู่ในหลุม สับสเตรทจะถูกย่อย และ แสดงผลออกมา โดยการเปลี่ยนสีในหลุมทดสอบ แล้วนำมาเปรียบเทียบกับแผ่นเทียบสีของผู้ผลิต ผลการทดลอง พบว่า สามารถสร้างเอนไซม์ได้หลายชนิด ตัวอย่างเช่น เอนไซม์กลุ่มย่อยไขมัน (lipolytic) คือ esterase และ esterase lipase และ มีเอนไซม์กลุ่มย่อยโปรตีน (proteolytic) คือ valine arylamidase และ cysteine arylamidase และ มีเอนไซม์กลุ่มย่อยไคตินได้ คือ N-acetyl- β -glucoseamidase และ สามารถย่อยสลายน้ำตาลได้ 3 ชนิด คือ glucose, amygdalin และ arabinose ชุดทดสอบ API เป็นชุดทดสอบเชิงคุณภาพทั้งปริมาณ เป็นชุดทดสอบที่ง่าย และ รวดเร็ว ตรวจสอบเอนไซม์หลายชนิดได้ในชุดเดียว และ ตรวจสอบตัวอย่างได้หลากหลาย ซึ่งใช้ปริมาณเชื้อเพียงเล็กน้อยเท่านั้น เพราะ substrate มีความจำเพาะเจาะจงกับปฏิกิริยา ในการทดลองนี้จะอ่านผลจากการ

เปลี่ยนสี และ ระดับการให้คะแนนความเข้มของสี อาจทำให้ผลที่ได้ อาจมีความผิดพลาดบ้าง เพราะให้คะแนนด้วยสายตา

การศึกษาชิ้นส่วน 16S rRNA เป็นการวิเคราะห์ลำดับเบสในส่วนหนึ่งของ ribosomal RNA ปรกติแล้วใช้ในการจัดจำแนกยีนส์ และ สปีชีส์ เนื่องจาก เป็นบริเวณที่ถูกอนุรักษ์ไว้ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ทั้ง ยูคาริโอต และ โปรคาริโอตที่มีการผันแปรทางพันธุกรรมสูง ทำให้สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ หรือ ภายในสายพันธุ์เดียวกันได้ และ ชิ้นส่วน rRNA สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด นำวิธีการนี้มาจัดจำแนกสปีชีส์ของแอคติโนมัยซีท โดยใช้ไพรเมอร์ (universal primers) สอง ชนิด คือ 1522R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') และ 27F (5'-AGAGTTTGA TCCTGGCTCAG-3') จากนั้น ทำการวิเคราะห์ข้อมูลของลำดับเบสของเชื้อ ด้วยฐานข้อมูล NCBI เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบความใกล้เคียงของเชื้อ พบว่า แอคติโนมัยซีท ไอโซเลท CMU-NKS-5 มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Streptomyces bungoensis* สายพันธุ์ NBRC 15711 ที่ 98% nucleotide sequence จากนั้น เลือกเชื้อที่มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท CMU-NKS-5 เพื่อหาความสัมพันธ์ และ ความแตกต่างของเชื้อ โดยทำแผนผังแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในงานวิจัยชิ้นนี้ เชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกมาจากดินรอบรังปลวกนั้น ให้ค่า chitinase activity สูงสุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Gomes (2000) โดยพบเอนไซม์ไคตินเนส จากเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากดิน และ ในปี 2007 Narayana และ คณะ รายงานว่าแอคติโนมัยซีทที่แยกจากตัวอย่างดิน มักจะเป็นยีนส์ *Streptomyces* sp. ต่อมาในปี ค.ศ. 2009 Mane และ Deshmukh พบว่า แอคติโนมัยซีทยีนส์ *Streptomyces* sp. ส่วนใหญ่สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนสได้

ในส่วนของการเปรียบเทียบความสามารถในการใช้น้ำตาลของแอคติโนมัยซีท ไอโซเลท CMU-NKS-5 กับเชื้อ *Streptomyces bungoensis* สายพันธุ์ต่างๆ จากผลการทดสอบ พบว่า ไอโซเลท CMU-NKS-5 สามารถใช้ได้เฉพาะน้ำตาลกลูโคสเท่านั้น แต่ในงานวิจัยของ Eguchi (1993) และ Cheng (2013) นั้นสามารถใช้น้ำตาลได้เกือบทุกชนิด มากน้อยแตกต่างกันไป จึงทำให้ผลที่ได้มีความแตกต่างกัน เนื่องจากงานวิจัยนี้ได้ใช้ชุดทดสอบ API และ เลี้ยงเชื้อทดสอบในอาหารเหลว แต่งานวิจัยที่นำมาอ้างอิงนั้นทำการทดสอบในอาหารแข็ง ISP 9 ที่ใส่น้ำตาลต่างๆกัน จึงนำมาเปรียบเทียบกันได้เพียงคร่าวๆเท่านั้น ไม่สามารถบอกได้ชัดเจน และในส่วนของการทนต่อเกลือ (NaCl tolerance) พบว่า เชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลท CMU-NKS-5 สามารถเจริญได้ในความเข้มข้นของเกลือตั้งแต่ 0% จนถึง 7% โดยที่ความเข้มข้นที่ 8% สามารถเจริญได้เพียงเล็กน้อย แต่ที่ความเข้มข้นที่ 9% ขึ้นไป ไม่สามารถเจริญได้ และ ในส่วนของการเปรียบเทียบ การเจริญของเชื้อ แอคติโนมัยซีท ไอโซเลท CMU-NKS-5 กับเชื้อ *Streptomyces bungoensis* สายพันธุ์ต่างๆบนอาหาร ISP 1-9 พบว่าสีของเส้นใย

เนื้ออาหารและสีของเส้นใยได้อาหารของอาหาร Oatmeal agar และ Tryptone agar นั้น ให้สีที่เหมือนกันกับสายพันธุ์ที่นำมาเปรียบเทียบ และในส่วนของ Yeast extract – malt extract agar นั้น เหมือนกันตรงสีของเส้นใยเนื้ออาหารและในอาหาร Inorganic salt starch agar เหมือนกันตรงสีของเส้นใยได้อาหาร

การทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส พบว่าปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส คือ แหล่งของคาร์บอน และ ไนโตรเจน (Singh *et al.*, 2009) เนื่องจากเพื่อนำไปใช้ในการเจริญเติบโต และ ผลิตสารเมตาโบไลต์ ในการทดลองนี้เลือกอาหาร basal medium ในเลี้ยงเชื้อแอสเพอร์จิลลัส เนื่องจากเป็นสูตรอาหารพื้นฐานที่มีแหล่งสารอาหารเท่าที่จำเป็น จากนั้นทำการศึกษาแหล่งแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสของเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท CMU-NKS-5 ทำการกำหนดความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ 0.5% (w/v) ทั้ง 9 ชนิด คือ arabinose, galactose, glucose, raffinose, xylose, colloidal chitin, chitin powder, soluble starch และ ชุดควบคุมที่ไม่ใส่แหล่งคาร์บอน ผลการทดลอง พบว่า chitin powder เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด และ ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์มีค่าสูงที่สุด เท่ากับ 172.0 mU/ml เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่แหล่งคาร์บอน จะเห็นได้ว่า chitin powder ให้ค่า chitinase activity สูงกว่าสารชนิดอื่นๆ เนื่องจากไคตินนั้นประกอบไปด้วย *N*-acetyl-D-glucosamine จึงทำให้เป็นได้ทั้งแหล่งคาร์บอน และ ไนโตรเจน ซึ่งแตกต่างจากน้ำตาลชนิดอื่นๆ และ แป้งที่ใช้ในการทดสอบ ที่ไม่ได้แค่แหล่งของคาร์บอนเพียงอย่างเดียว พบว่า มีการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส แต่ผลิตในปริมาณที่น้อยมาก คือน้อยกว่า 100 mU/ml เนื่องจาก ปกติแล้วเอนไซม์ไคตินเนสเป็นเอนไซม์ที่ต้องถูกเหนี่ยวนำหรือกระตุ้น (inducible enzyme) ด้วยไคติน ถึงจะมีการผลิตเอนไซม์ออกมา (Singh *et al.*, 2009) และ สัมพันธ์ระหว่างไคตินทั้งสองชนิด คือ chitin powder และ colloidal chitin พบว่า ปริมาตรที่ใช้เท่ากัน คือ 0.5% แต่หน่วยที่ใช้แตกต่างกัน เนื่องจาก เป็นของแข็ง กับ ของเหลว เมื่อทำการทดลอง ปริมาตรที่ใช้จริงของ colloidal chitin อาจจะน้อยกว่า chitin powder ทำให้ปริมาตรของสารตั้งต้นไม่เท่ากัน ทำให้ค่า activity ที่ได้ไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้ และในส่วนของ chitin powder นั้นมีความบริสุทธิ์มากกว่า เนื่องจากเป็นไคตินสำเร็จรูป แต่ในส่วนของ colloidal chitin จะมีความบริสุทธิ์น้อยกว่า มีการใช้สารเคมี และ อาจจะมีสารหลงเหลืออยู่ทำให้ปนเปื้อน ในระหว่างการเตรียมสาร เนื่องจาก สารที่ปนเปื้อนนั่นส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ ก่อนทำการทดลองจึงต้องหมั่นตรวจสอบค่า pH ของ colloidal chitin ให้มีค่า pH เป็นค่ากลาง ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ chitin powder เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส จากนั้นทำการหาความเข้มข้นของ chitin powder ที่เหมาะสม พบว่า ที่ความเข้มข้น 1.5% ให้ค่า chitinase activity สูงที่สุด ซึ่งผลการ

ทดลอง ที่ได้มีการศึกษาใกล้เคียงกับงานของ Narayana และ Vijayalakshmi (2009) ทำการหาความเข้มข้นที่เหมาะสม ผลการทดลอง พบว่า ความเข้มข้นที่ 0.5-2.0% เป็นความเข้มข้นที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 6,000-7,000 mU/ml แต่ที่ค่าความเข้มข้นที่ 1.0% ค่าของ chitinase activity มีค่าสูงสุดเท่ากับ 7,000 mU/ml และที่ 1.5% มีค่าเท่ากับ 6,100 mU/ml มี colloidal chitin เป็นแหล่งคาร์บอน จะเห็นได้ว่าค่าที่ได้นั้นห่างกันเพียงเล็กน้อย และในปี ค.ศ. 2009 Mane และ Deshmukh รายงานว่าเชื้อ *Streptomyces canus* KS10 ที่ความเข้มข้นที่ 1.2% ของ colloidal chitin ให้ค่า chitinase activity สูงสุดเท่ากับ 4,800 mU/ml และ ในงานวิจัยอื่นๆ ที่สามารถใช้ chitin powder ผลิตเอนไซม์ไคตินเอส พบว่ามีส่วนน้อย เนื่องจาก มีการรายงานว่า colloidal chitin เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด ตัวอย่างเช่น งานของ Kim และ Ji ในปีค.ศ. 2001 ทำการทดลองโดยใช้เชื้อ *Streptomyces griseus* HUT6037 โดยทำการเปรียบเทียบระหว่าง chitin powder และ colloidal chitin พบว่า chitin powder ให้ค่าของ chitinase activity สูงสุดเท่ากับ 8,600 mU/ml และค่า specific activity เท่ากับ 8.3 U/mg protein แต่ colloidal chitin ให้ค่า specific activity มากกว่า (12.6 U/mg protein) และในงานวิจัยของ El-Dein และ คณะ (2010) มีการรายงานว่า เชื้อ *Streptomyces champavatii* AZ-1 สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเอสได้ทั้ง exochitinase และ endochitinase โดยพบว่า chitin powder สามารถผลิตไคตินเอสได้แต่ให้ค่า chitinase activity น้อยกว่า 1,000 mU/ml และมี colloidal chitin เป็นแหล่งคาร์บอน และ ในโตรเจนที่เหมาะสม เพราะให้ค่า chitinase activity สูงสุดเท่ากับ 6,453 mU/ml เมื่อเทียบกับเชื้อ *Streptomyces* sp. เหมือนกัน พบว่าค่า chitinase activity เมื่อใช้ chitin powder ของงานวิจัยอื่นมีค่ามากกว่าในการทดลองนี้

ในการศึกษาแหล่งไนโตรเจนประเภทอนินทรีย์ที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไคตินเอส โดยทำการกำหนดความเข้มข้นของแหล่งของไนโตรเจนเท่ากับ 1% (w/v) ทั้ง 7 ชนิด คือ KNO_3 , NaNO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, NH_4NO_3 , และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นชุดควบคุม ผลการทดลอง พบว่า KNO_3 นั้น ให้ค่า chitinase activity ที่สูงสุด (315.3 mU/ml) และ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์นั้นมีค่าใกล้เคียงกับ KNO_3 จะเห็นได้ว่าค่า chitinase activity ของสาร KNO_3 นั้นมากกว่าสารชนิดอื่นๆ เนื่องจาก มีราคาถูกกว่า $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และ NaNO_3 อีกทั้งเมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงทำการเลือก KNO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจนประเภทอนินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไคตินเอส ซึ่งในงานของ Narayana และ vijayalashmi (2009) ทำการทดสอบโดยใช้ KNO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเอสได้ มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 6,630 mU/ml แต่แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมของเชื้อ *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 คือ yeast extract ที่ความเข้มข้น 0.4% (w/v) เพราะให้ค่า

chitinase activity เท่ากับ 8,890 mU/ml ซึ่งเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม 1.33 เท่า (6,980 mU/ml) และ ทำการศึกษาแหล่งไนโตรเจนประเภทสารอินทรีย์ที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไคตินเอส โดยทำการ กำหนดความเข้มข้นของแหล่งของไนโตรเจนเท่ากับ 0.05% (w/v) ทั้ง 7 ชนิด คือ beef extract, casein, malt extract, peptone, tryptone, urea และ yeast extract เป็นชุดควบคุม ผลการทดลองพบว่า casein ให้ค่า chitinase activity สูงสุดเท่ากับ 336.6 mU/ml และ เมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระหว่าง yeast extract, peptone และ casein ในการ ทดลองนี้เลือกใช้ casein เพราะ ราคาถูก และ หาง่าย เนื่องจาก ไม่มีงานวิจัยมาเปรียบเทียบ เชื้อ *Streptomyces* sp. ที่ใช้ KNO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจน มีแต่ที่สามารถใช้ yeast extract และ peptone ตัวอย่างเช่น การทดลองของ Narayana และ vijayalashmi (2009) ทำการทดสอบแหล่งไนโตรเจนของ เชื้อ *Streptomyces* sp. ANU 6277 พบว่า ค่าของ yeast extract 0.4% (w/v) (8,890 mU/ml) และ soy bean meal 0.6% (w/v) (8,050 mU/ml) สร้างเอนไซม์ได้สูงสุดเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (6,980 mU/ml) และ ในการรายงานผลของ Han และ คณะ (2008) ทำการทดสอบแหล่งไนโตรเจนประเภท สารอินทรีย์ 4 ชนิดของเชื้อ *Streptomyces* sp. Da11 พบว่า peptone สร้างเอนไซม์ได้สูงสุด (101.7 U/g)

เหตุผลที่ต้องทำการทดสอบแหล่งของไนโตรเจนแยกกันระหว่างอินทรีย์ และ อนินทรีย์ เนื่องจาก ถ้าเชื้อสามารถใช้แหล่งไนโตรเจนประเภทอนินทรีย์ได้ดีกว่าอินทรีย์จะมีประโยชน์มากกว่า ในการนำไปใช้ในทางอุตสาหกรรม เนื่องจากเตรียมง่ายกว่าเพราะรู้ส่วนประกอบของสาร และสามารถหาซื้อได้ง่าย ช่วยในการลดต้นทุน และ แหล่งไนโตรเจนประเภทอินทรีย์นั้นมีกระบวนการ เตรียมที่ยุ่งยากมากกว่า เนื่องจากทำมาจากของเสีย (waste) แต่ในทางการเจริญเติบโตนั้น แหล่งของ ไนโตรเจนประเภทอินทรีย์ดีกว่าเชื้อมากกว่าแหล่งไนโตรเจนประเภทอนินทรีย์ แต่ ในทาง อุตสาหกรรมนั้น ถือว่า แหล่งไนโตรเจนประเภทอนินทรีย์นั้น ดีกว่า แหล่งไนโตรเจนประเภทอินทรีย์

ในการศึกษาส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอนไซม์ ไคตินเอส พบว่า สารอาหารนั้นมีบทบาทที่สำคัญในการช่วยเพิ่มการผลิตเอนไซม์ (Singh *et al.*, 2009) วิธีที่ใช้ทดสอบนั้นสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การทดลองทีละปัจจัย (single factor) หรือ การ ออกแบบการทดลองทางสถิติ (statistic experimental design) โดยการทดลองทีละปัจจัย เป็นวิธีที่ง่าย แต่มีข้อเสียตรงที่ใช้เวลานาน มีราคาแพง หากมีหลายปัจจัยที่ต้องการศึกษา และ ไม่มีอิทธิพลร่วม ระหว่างปัจจัย (interaction) ทำให้ไม่สามารถอธิบายผลกระทบทั้งหมดของปัจจัยในการทดลองได้ ในส่วนของการออกแบบการทดลองทางสถิติ ทำการศึกษา ปัจจัยที่มีผลต่อการทดลองที่เกิดขึ้น พร้อมๆกัน เมื่อทำการทดลอง ควรทำการเปลี่ยนค่าของปัจจัยไปพร้อมๆกันมากกว่าทำการเปลี่ยนค่า

ของปัจจัยตัวใดตัวหนึ่ง เพราะทำให้ได้งานที่มีประสิทธิภาพมากกว่า และ สามารถอธิบายอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยได้ โดยอิทธิพลร่วมจะเกิดขึ้นเมื่อปัจจัยตัวหนึ่งมีผลต่อปัจจัยอีกตัวหนึ่งที่ระดับต่างๆ กันไป และมีความน่าเชื่อถือมากกว่า อีกทั้งช่วยในการประหยัดเวลา ประหยัดสารเคมี และ ต้นทุน

โดยในการทดลองนี้ทำการเลือกแผนการทดลองแบบ Plackett and Burman มาทำการคัดกรองส่วนประกอบของสูตรอาหารที่เป็นปัจจัยหลัก (main effect) ในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานเนื่องจากมีหลายปัจจัยที่มีแนวโน้มว่าจะมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ และการผลิตเอนไซม์ของเชื้อขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ซึ่งการคัดกรองเป็นการลดจำนวนปัจจัยให้มีจำนวนน้อยลง จากปัจจัยที่ต้องการศึกษาทั้งหมด 7 ปัจจัย มี dummy variable 4 ตัว มีค่ากลาง เพื่อลดความผิดพลาดของการทดลอง ทำการทดลองภายใต้เงื่อนไขของการทดลอง 15 การทดลอง (N=11) ซึ่งในการทดลองแบบ Plackett and Burman ส่วนมากมักจะไม่นสนใจในส่วนของการ interaction เพราะไม่ค่อยส่งผลต่อการทดลอง ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป ส่วนใหญ่นิยมใช้ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ผลการทดลอง ทำการพิจารณาค่าของแบบจำลอง (model) และ ค่าของ lack of fit ด้วยค่า P-value ($P \leq 0.05$) ในส่วนของแบบจำลองมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ ค่า lack of fit นั้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% แบบทดลองที่ได้จึงจะมีความเหมาะสม และ พบว่าปัจจัยทั้ง 3 ปัจจัย ได้แก่ K_2HPO_4 , chitin powder และ casein มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (significant) ($P \leq 0.05$) จึงมีผลต่อการผลิตเอนไซม์โคติเนสของเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท CMU-NKS-5 และ จากปัจจัยข้างต้น พบว่า chitin powder และ casein เป็นปัจจัยหลัก (main effect) ที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์โคติเนสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ส่วนปัจจัยที่เหลือ มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์โคติเนสน้อย (minor effect) เมื่อนำมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติ พบว่า ปัจจัยดังกล่าวส่วนใหญ่เป็นค่าที่ไม่สำคัญ และ มีระดับความเชื่อมั่นที่ค่อนข้างต่ำ ดังนั้น ในการศึกษาต่อไปจะทำการศึกษาเฉพาะปัจจัยหลัก (main effect) ที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์โคติเนสจริงๆ จึงทำการเลือก chitin powder และ casein มาทำการทดลองต่อ เนื่องจาก เมื่อพิจารณาค่าของ P-value พบว่าทั้งสองสาร มีค่าความแปรปรวนที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 99% ($P \leq 0.01$) ที่มีความสำคัญต่อการผลิตเอนไซม์โคติเนส

ศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของ chitin powder และ casein ที่เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) มีการวางแผนการทดลอง จำนวน 12 การทดลอง และมีการทำซ้ำที่จุดกลาง เพื่อหาค่าที่เหมาะสมที่สุด เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมทางสถิติ โดยพิจารณาค่า P-value ($P \leq 0.05$) พบว่า ในส่วนของแบบจำลองมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทาง

สถิติ และ ค่า lack of fit ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% แบบทดลองที่ได้จึงจะมีความเหมาะสม และ การทดลองที่ 12 ให้ค่า chitinase activity ที่สูงที่สุด โดยปริมาณของ chitin powder และ casein ที่ใช้ อยู่ในระดับกลางทั้งสองชนิด จากนั้นนำผลการทดลอง มาสร้างสมการลำดับที่สอง (quadratic equation) แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง chitin powder และ casein และนำสมการที่ได้มาสร้างกราฟ contour และ กราฟโครงร่าง 3D เพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมที่สุดของปัจจัยทั้งสองชนิด เมื่อพิจารณาจากกราฟเส้นโครงร่าง และ กราฟโครงร่าง (3D) จะเห็นได้ว่า กราฟของ casein มีลักษณะโค้งลง ค่าที่ระดับต่ำ และ ระดับสูงให้ค่าของ chitinase activity ที่ใกล้เคียงกัน เมื่อใช้ casein ในระดับกลางจะส่งผลให้ค่าของ chitinase activity มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ดังนั้น สามารถหาปริมาณที่เหมาะสมของ casein ได้ แต่กราฟของ chitin powder นั้นมีลักษณะเป็นเส้นตรง จึงไม่สามารถหาปริมาณสารที่ทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดได้ และ ค่าของ coefficient ของสารแต่ละตัว พบว่า มีผลเชิงลบทั้งคู่ ซึ่งไม่สอดคล้องกับการทดลองแบบ Plackett and Burman จึงทำการตรวจสอบแผนการทดลองแบบ PB เพื่อหาข้อผิดพลาด เมื่อทำการตรวจสอบพบว่า สารทั้งสองชนิดนี้ มีอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยในทางลบ พบว่า ข้อเสียของการทดลองแบบ PB คือ ถ้าอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยมีนัยสำคัญทางสถิติ จะทำให้เกิดความผิดพลาดในการแปลผลไปทำการทดลองต่อ เพราะโดยปกติแล้วในการทดลองแบบ PB นั้นจะไม่นำผลของอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยแต่ละชนิดมาคิดด้วย แต่สามารถตรวจสอบค่า interaction ระหว่างปัจจัยได้ จึงทำการออกแบบแผนการทดลองแบบ CCD ใหม่ โดยกำหนดให้ casein ในระดับสูง และ chitin powder ในระดับต่ำ เนื่องจาก อิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยสองชนิดมีนัยสำคัญทางสถิติ ทำการออกแบบการทดลองเพื่อวิเคราะห์อิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัย เพื่อหาปริมาณของสารที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส ทำการวางแผนการทดลอง จำนวน 12 การทดลอง และ มีการทำซ้ำที่จุดกลาง เพื่อหาค่าที่เหมาะสมที่สุด จากนั้นวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมทางสถิติ โดยพิจารณาค่า P-value ($P \leq 0.05$) พบว่า ในส่วนของแบบจำลองมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ ค่า lack of fit ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% แบบทดลองที่ได้จึงจะมีความเหมาะสม และการทดลองที่ 12 ให้ค่า chitinase activity ที่สูงที่สุด โดยปริมาณของ chitin powder และ casein ที่ใช้ อยู่ในระดับกลางทั้งสองชนิด จากนั้น นำผลการทดลอง มาสร้างสมการลำดับที่สอง (quadratic equation) และนำสมการที่ได้มาสร้างกราฟ contour และ กราฟโครงร่าง 3D จะเห็นได้ว่า เมื่อปริมาณของ casein เพิ่มขึ้น ค่า chitinase activity ที่ได้จะลดลง ตรงกับค่าของ coefficient ที่ต้องใส่ casein ในระดับที่ต่ำ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์จึงจะเพิ่มสูงขึ้น และ ในส่วนของ chitin powder ค่ากลางนั้นให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด จะต้องใส่ในระดับกลาง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์จึงจะเพิ่มสูงขึ้น

จากนั้นทำการตรวจสอบความถูกต้องของแผนการทดลอง (Validation) ว่ามีความถูกต้องแม่นยำ และ เชื่อถือได้ จากการทดลองแบบ PB และ การทดลองแบบ CCD โดยทำการทำนายค่าของ chitinase activity สูงสุด จากสมการของแผนการทดลองแบบ CCD กิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนส สูงสุด เท่ากับ 250 mU/ml เมื่อมีส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนี้ casein (0.88 g/L), K_2HPO_4 (0.7 g/L), KH_2PO_4 (0.03 g/L), KNO_3 (1.0 g/L), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.03 g/L), chitin powder (15 g/L) และ trace element (10 ml/L) ทำการเปรียบเทียบผลจากการทดลอง และ ค่าทำนายจากแบบจำลอง พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ระหว่างการทดลองเท่ากับ 241 mU/ml และ ค่าทำนายของค่ากิจกรรมของเอนไซม์นั้นเท่ากับ 250 mU/ml มี % varidate เท่ากับ 96.48% พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่ทำนายได้จากสมการ ดังนั้น แบบจำลองนี้สามารถทำนายค่าได้ถูกต้อง และ แม่นยำ สามารถนำไปใช้ในการผลิตเอนไซม์ต่อไปได้

ผลของพีเอชในอาหารเริ่มต้น พบว่า ที่ค่า pH เริ่มต้นที่ 5 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด และ ถ้าค่า pH มากกว่า 9 หรือมีความเป็นด่างมากเกินไป จะไปยับยั้งการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส ทำให้ค่า chitinase activity ลดน้อยลง ผลการทดลอง สอดคล้องกับงานของ El-Dein และ คณะ (2010) ที่ทำการศึกษาค่า pH ที่เหมาะสม ของเชื้อ *Streptomyces champavatii* AZ-1 พบว่าที่ pH 5 เป็นค่า pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ โดยรายงานเป็นค่า specific activity เท่ากับ 16.8 U/mg protein และ ในงานของ Narayana และ Vijayalakshmi (2009) พบว่าที่ pH 5.0 (chitinase activity 3,800 mU/ml) นั้นไปยับยั้งการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสของ *Streptomyces* sp. ANU 6277 โดย ค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับเชื้อนี้คือ pH 6 ให้ค่า chitinase activity สูงสุด (7,100 mU/ml) และ ในปี ค.ศ. 2009 Mane และ Deshmukh รายงานว่า ค่า pH ที่เหมาะสมของเชื้อ *Streptomyces canus* KS10 นั้นมีค่าเป็นด่าง คือ 8.0 ให้ค่า chitinase activity สูงสุดเท่ากับ 3,500 mU/ml

จากการศึกษาเวลาที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส โดยเลี้ยงใน modified medium ที่มี 1.5% (w/v) chitin powder เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท CMU-NKS-5 คือวันที่ 7 ได้เอนไซม์สูงสุด (145 mU/ml) ซึ่งสูงกว่าการทดลองของ Tang-um and Niamsup (2012) ที่ทำการทดลองหาระยะเวลาที่เหมาะสมของเชื้อ *Streptomyces* strain P4 พบว่า เริ่มสร้างวันที่ 1-2 และ วันที่ 5 ให้ค่า chitinase activity สูงสุดคือ 0.93 mU/ml และ ค่า specific activity เท่ากับ 0.050 U/mg protein หลังจากวันที่ 5 พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง ผลการทดลองสอดคล้องกับงานทดลองของ Mane และ Deshmukh ในปี ค.ศ. 2009 รายงานว่าเชื้อ *Streptomyces canus* KS10 สามารถสร้างเอนไซม์ได้สูงสุดที่วันที่ 6 ค่า chitinase

activity เท่ากับ 3,100 mU/ml และ ในงานของ Kumaran และ คณะ (2012)พบว่า เชื้อ *Streptomyces* sp. CDB20 สร้างเอนไซม์ได้สูงสุดในวันที่ 8 ค่า chitinase activity เท่ากับ 2,800 mU/ml และ ในงานวิจัยของ Narayana และ Vijayalakshmi (2009) *Streptomyces* sp. ANU 6277 สร้างเอนไซม์ได้สูงสุดที่ 72 ชั่วโมง หรือประมาณ สองวันครึ่ง ค่า chitinase activity เท่ากับ 6,800 mU/ml ซึ่งพบว่าสามารถสร้างเอนไซม์ได้เร็วกว่าเชื้ออื่นๆ

จากผลการทดลองทั้งหมด พบว่า สูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตเอนไซม์ไคตินเอส ประกอบด้วย Casein 0.88 g/L, K_2HPO_4 0.7 g/L, KH_2PO_4 0.03 g/L, KNO_3 1.0 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.03, Chitin powder 15.0 g/L, Trace element 10 ml/L และ มีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5 ใส่ปริมาณเชื้อตั้งต้นลงไปปริมาณ 2% เป็นเวลา 7 วัน ซึ่งสร้างเอนไซม์ไคตินเอสสูงสุดในวันที่ 7 เท่ากับ 145.0 mU/ml แต่ถ้าใช้สูตรเดิมจะได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอสเท่ากับ 100 mU/ml เมื่อทำการเปรียบเทียบค่าการทำงานของเอนไซม์ของสูตรอาหารเดิมพบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอสเพิ่มขึ้น 0.68 เท่าของสูตรอาหารเดิม และค่า specific activity เพิ่มขึ้น 1.44 เท่าของสูตรอาหารเดิม แต่เนื่องจากการผลิตเอนไซม์ไคตินเอสของเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลต CMU-NKS-5 นี้ไม่ค่อยเสถียร จากค่า chitinase activity เมื่อใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมทดสอบ พบว่าได้ค่า chitinase activity ต่ำกว่าการทดลองอื่นๆ น่าจะมีการศึกษาเปรียบเทียบหลายๆการทดลองต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

ในการทดลองสามารถคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถสร้างเอนไซม์ไคตินเนสได้ พบว่ามี 25 ไอโซเลท ที่สามารถย่อยสลายไคตินในอาหารแข็งทดสอบที่มี 4% (w/v) colloidal chitin เป็นสับเตรท และมีค่า H/C ratio มากกว่า 1 จากทั้งหมด 104 ไอโซเลท และ พบว่ามีแอคติโนมัยซีท 10 ไอโซเลท (4.16%) ที่สามารถผลิตค่ากิจกรรมของเอนไซม์มากกว่า 1 U/ml ในการทดสอบในอาหารเหลว EPM ที่มี 1% (w/v) colloidal chitin และ glucose เป็นสับเตรท จากผลการทดลอง พบว่า ไอโซเลท CMU-NKS-5 สามารถผลิตวงใสบนอาหารแข็งได้ และ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรพื้นฐาน ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด เท่ากับ 1,949 mU/ml เมื่อทดสอบด้วยวิธี DNS method จึงเลือกเชื้อนี้มาทำการระบุสายพันธุ์ โดยการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา จากการส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ แบบใช้แสง และ แบบส่องกราด การเจริญบนอาหาร ISP 1-9 การทนเกลือ ลักษณะทางชีวเคมีจากชนิดของกรดอะมิโนที่อยู่ในผนังเซลล์ การทดสอบการผลิตเอนไซม์ และการใช้น้ำตาลด้วยชุด API ผลการทดลอง พบว่า แอคติโนมัยซีท ไอโซเลท CMU-NKS-5 จัดอยู่ในสปีชีส์ *Streptomyces* sp. และ เมื่อนำไปศึกษาทางอนุชีววิทยาโดยใช้การศึกษาลำดับเบส 16S rRNA และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อ พบว่า ไอโซเลท CMU-NKS-5 นี้มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Streptomyces bungoensis* สายพันธุ์ NBRC 15711

จากนั้น ทำการศึกษาปัจจัยพื้นฐานที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท CMU-NKS-5 พบว่า แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมคือ chitin powder และ ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเท่ากับ 1.5% (w/v) แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม คือ KNO_3 และ casein เมื่อนำมาทดลองแบบ Plackett and Burman (PB) เพื่อหาสารอาหารที่มีผลต่อการสร้างเอนไซม์ไคตินเนส โดยพิจารณาจากค่า P-value ($P \leq 0.05$) พบว่า chitin powder, K_2HPO_4 และ casein มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส แต่ เฉพาะ chitin powder และ casein ที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ไปศึกษาด้วยแผนการทดลองแบบ CCD จากการวิเคราะห์ผลที่ได้พบว่า ปริมาณที่เหมาะสมของ chitin powder และ casein เท่ากับ 15 g/L และ 0.88 g/L ตามลำดับ

สูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส ประกอบด้วย Casein 0.88 g/L, K_2HPO_4 0.7 g/L, KH_2PO_4 0.03 g/L, KNO_3 1.0 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.03, Chitin powder 15.0 g/L, Trace element 10 ml/L และ สภาวะที่เหมาะสม พบว่า ผลิตภัณฑ์ไคตินเนสได้ สูงสุดในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง และ ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสม คือ 5.0 และ ปริมาณ ของเชื้อตั้งต้นที่ใส่ลงไปอาหารเท่ากับ 2% (v/v)



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved