

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ	ง
บทคัดย่อภาษาไทย	จ
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ช
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญภาพ	ต
อักษรย่อและสัญลักษณ์	ด
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ประวัติความเป็นมา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
บทที่ 2 ทบทวนเอกสาร	
2.1 ไคติน	3
2.2 ไคตินเนส	4
2.3 แอคติโนมัยซีท	8

	หน้า
2.4 การสร้างเอนไซม์โคติเนสในแอคติโนมัยซีท	11
2.5 การตรวจวัดค่าการทำงานของเอนไซม์โคติเนส	16
2.6 การนำเอนไซม์โคติเนสไปใช้ประโยชน์	17
2.7 การออกแบบการทดลองทางสถิติ (Statistic experimental design)	18
บทที่ 3 วิธีการวิจัย	
3.1 การเพาะเลี้ยงและการเก็บรักษาแอคติโนมัยซีท	23
3.2 การคัดเลือกแอคติโนมัยซีทที่สามารถสร้างเอนไซม์โคติเนส	23
3.3 การบ่งชี้สายพันธุ์ของแอคติโนมัยซีทไอโซเลท CMU-NKS-5	25
3.4 การศึกษาปัจจัยพื้นฐานที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โคติเนส	30
3.5 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์โคติเนส	39
บทที่ 4 ผลการทดลอง	
4.1 ผลการคัดเลือกแอคติโนมัยซีทที่สามารถผลิตเอนไซม์โคติเนส	41
4.2 ผลการบ่งชี้สายพันธุ์ของแอคติโนมัยซีทไอโซเลท CMU-NKS-5	43
4.3 ผลการศึกษาปัจจัยพื้นฐานที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โคติเนส	61
4.4 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์โคติเนส	82
บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลอง	88
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง	98
เอกสารอ้างอิง	100

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก	สูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม	109
ภาคผนวก ข	การเตรียมสับสเตรท	117
ภาคผนวก ค	การเตรียมน้ำยาทดสอบและบัฟเฟอร์	119
ภาคผนวก ง	การทำการกราฟมาตรฐานของสารละลาย <i>N</i> -acetylglucosamine กราฟปริมาณของโปรตีน	121
ภาคผนวก จ	การหาค่า chitinase activity, ปริมาณ protein และ specific activity	126
ภาคผนวก ฉ	ลำดับเบสของแอกติโนมัยซีทไอโซเลท CMU-NKS 5	128
ภาคผนวก ช	ชุดทดสอบ API	129
ประวัติผู้เขียน		134

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 2.1	ตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนส
ตาราง 2.2	เงื่อนไขการทดลองโดยการออกแบบการทดลองแบบ Plackett and Burman
ตาราง 3.1	การเตรียม reaction mixture
ตาราง 3.2	ปฏิกิริยาที่ใช้ทดสอบของชุดทดสอบ API Coryne
ตาราง 3.3	สารตั้งต้นที่ใช้ทดสอบการทำงานของเอนไซม์ของชุดทดสอบ API ZYM®
ตาราง 3.4	ปฏิกิริยาหรือเอนไซม์ที่ใช้ทดสอบของชุดทดสอบ API 20E
ตาราง 3.5	ปัจจัยและระดับของส่วนประกอบของอาหารที่ใช้ในการคัดเลือกปัจจัยด้วยการทดลองแบบ Plackett and Burman design
ตาราง 3.6	แผนการออกแบบการทดลองแบบ Plackett and Burman design ที่มี N = 11
ตาราง 3.7	ปัจจัยและระดับของส่วนประกอบของอาหารที่ใช้ในการทดลองแบบ Central Composite Design ครั้งที่ 1
ตาราง 3.8	แผนการออกแบบการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) ที่มี N = 2 ครั้งที่ 1
ตาราง 3.9	ปัจจัยและระดับของส่วนประกอบของอาหารที่ใช้ในการทดลองแบบ Central Composite Design ครั้งที่ 2
ตาราง 3.10	แผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) ที่มี N = 2 ครั้งที่ 2
ตาราง 3.11	สูตรอาหารที่เหมาะสมกับการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส
ตาราง 3.12	ตารางเปรียบเทียบระหว่างสูตรอาหารเดิมและสูตรอาหารที่เหมาะสม
ตาราง 4.1	ค่า H/C value ratio ที่ได้จากการคำนวณระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสและโคโลนีของเชื้อแอคทีโนมัยซีท 25 ไอโซเลท
ตาราง 4.2	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคทีโนมัยซีท ไอโซเลท CMU-NKS-5

ตาราง 4.3	ผลการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์และการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายน้ำตาลของชุดทดสอบ API Coryne ที่บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน	49
ตาราง 4.4	ผลการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ของชุดทดสอบ API ZYM [®] ที่บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน	50
ตาราง 4.5	ผลการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์และการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายน้ำตาลของชุดทดสอบ API 20E ที่บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน	51
ตาราง 4.6	ผลของการวิเคราะห์ลำดับเบส 16S rRNA ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลท CMU-NKS-5 เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI	53
ตาราง 4.7	การเปรียบเทียบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน (carbon utilization) ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลท CMU-NKS-5 กับ <i>Streptomyces bungoensis</i> สายพันธุ์ MS16-10G, MS16-10W, NBRC15711 และ MJM2077	56
ตาราง 4.8	การเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>Streptomyces</i> sp. CMU-NKS-5 กับ <i>S. bungoensis</i> สายพันธุ์ MS16-10G, MS16-10W, MJM2077 และ NBRC15711	57
ตาราง 4.9	ผลของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอส ในแผนการทดลองแบบ Plackett and Burman design	71
ตาราง 4.10	การวิเคราะห์ข้อมูลของแผนการทดลองแบบ Plackett and Burman design จากโปรแกรม Design-Expert 7.0.0	72
ตาราง 4.11	การวิเคราะห์ข้อมูลของแผนการทดลองแบบ Plackett and Burman design ด้วยวิธี ANOVA จากโปรแกรม Design-Expert 7.0.0	73
ตาราง 4.12	ผลของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอส ในแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) ครั้งที่ 1	74
ตาราง 4.13	ผลของการวิเคราะห์ข้อมูลของแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) จากโปรแกรม Design-Expert 7.0.0 ครั้งที่ 1	75

ตาราง 4.14	การวิเคราะห์ข้อมูลของแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) ด้วยวิธี ANOVA จากโปรแกรม Design-Expert 7.0.0 ครั้งที่ 1	76
ตาราง 4.15	ผลของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนส ในแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) ครั้งที่ 2	78
ตาราง 4.16	ผลของการวิเคราะห์ข้อมูลของแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) จากโปรแกรม Design-Expert 7.0.0 ครั้งที่ 2	79
ตาราง 4.17	การวิเคราะห์ข้อมูลของแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) ด้วยวิธี ANOVA จากโปรแกรม Design-Expert 7.0.0 ครั้งที่ 2	80

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพ 2.1	ลักษณะการเจริญของโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัม	8
ภาพ 2.2	กราฟโครงร่าง (contour plot) (a) และ กราฟพื้นผิวตอบสนอง (surface plot) (b)	22
ภาพ 4.1	การคัดเลือกเชื้อที่สร้างไคตินเนสในอาหารแข็ง (a) โดยสังเกตวงใส (b) บนอาหาร colloidal chitin agar ที่มี 4 % (w/v) colloidal chitin เป็นแหล่งคาร์บอน	42
ภาพ 4.2	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนส (chitinase activity) ของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว EPM เขย่าที่ 150 rpm บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน	43
ภาพ 4.3	ลักษณะของโคโลนีเดี่ยวของแอสเพอร์จิลลินัมไอโซเลต 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 และการสร้างสปอร์ของแอสเพอร์จิลลินัมไอโซเลต 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	46
ภาพ 4.4	ลักษณะผิวของสปอร์ และการจัดเรียงตัวของสปอร์ใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) (a) ที่กำลังขยาย 10000x บาร์ = 1 μm และ (b) ที่กำลังขยาย 12000x บาร์ = 1 μm ของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไอโซเลต CMU-NKS-5	47

ภาพ 4.5	แผ่น TLC ของการวิเคราะห์ประเภทของ Diaminopimelic acid (DAP) ที่สกัดจากผนังเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลท CMU-NKS-5	48
ภาพ 4.6	ผลการทดสอบของชุดทดสอบ API ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลท CMU-NKS-5 โดยการใช้ชุดทดสอบ API coryne (a), API ZYM® (b) และ API 20E (c)	52
ภาพ 4.7	แผนผังแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อ <i>Streptomyces</i> sp. ไอโซเลท CMU-NKS-5 โดยกลุ่ม I คือ <i>Streptomyces</i> sp. กลุ่ม II คือ กลุ่ม <i>Micromonospora</i> sp. กลุ่ม III คือ กลุ่ม <i>Nocardia</i> sp. กลุ่ม IV คือ <i>Amycolatopsis</i> sp. และ out-group คือ <i>Thermopolyspora flexuosa</i> DSM 43186	51
ภาพ 4.8	ผลของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสของเชื้อ <i>Streptomyces</i> sp. ไอโซเลท CMU-NKS-5 ที่เลี้ยงในแหล่งคาร์บอนแตกต่างกันในอาหาร basal medium เมื่อเขย่าที่ความเร็ว 130 rpm บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน	63
ภาพ 4.9	ผลของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสของเชื้อ <i>Streptomyces</i> sp. ไอโซเลท CMU-NKS-5 ที่เลี้ยงในความเข้มข้นของคาร์บอนที่แตกต่างกันในอาหาร basal medium เมื่อเขย่าที่ความเร็ว 130 rpm บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน	64
ภาพ 4.10	ผลของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสของเชื้อ <i>Streptomyces</i> sp. ไอโซเลท CMU-NKS-5 ที่เลี้ยงในแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน 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 เมื่อเขย่าที่ความเร็ว 130 rpm บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน	65
ภาพ 4.11	ผลของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสของเชื้อ <i>Streptomyces</i> sp. ไอโซเลท CMU-NKS-5 ที่เลี้ยงในแหล่งไนโตรเจนประเภทอินทรีย์ที่แตกต่างกัน เมื่อเขย่าที่ความเร็ว 130 rpm บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน	66

ภาพ 4.12	ผลของกราฟเส้นโครงร่างและกราฟโครงร่าง (3D) ของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสของเชื้อ <i>Streptomyces</i> sp. ไอโซเลต CMU-NKS-5 ระหว่าง chitin powder และ casein ครั้งที่ 1	77
ภาพ 4.13	ผลของกราฟเส้นโครงร่าง และ กราฟโครงร่าง (3D) ของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสของเชื้อ <i>Streptomyces</i> sp. ไอโซเลต CMU-NKS-5 ระหว่าง chitin powder และ casein ครั้งที่ 2	81
ภาพ 4.14	ผล validation จากแผนการทดลองแบบ CCD ของการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสของเชื้อ <i>Streptomyces</i> sp. ไอโซเลต CMU-NKS-5 เมื่อเมื่อเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน	84
ภาพ 4.15	ผลของค่า pH เริ่มต้นที่เหมาะสมในอาหาร basal medium เมื่อเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน	85
ภาพ 4.16	ผลของความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้น ในอาหาร modified medium เมื่อเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน	86
ภาพ 4.17	ผลเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ระหว่างสูตรอาหารเดิมกับสูตรอาหารที่เหมาะสม เมื่อเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน โดยสัญลักษณ์ (◆) คืออาหารเดิม และสัญลักษณ์ (■) คืออาหารที่เหมาะสม	87

อักษรย่อและสัญลักษณ์

% = เปอร์เซนต์

v/v = ปริมาตร/ปริมาตร

w/v = น้ำหนัก/ปริมาตร

α = แอลฟา

β = เบต้า

λ = แกมมา

g = กรัม

mg = มิลลิกรัม

L = ลิตร

ml = มิลลิลิตร

μ l = ไมโครลิตร

$^{\circ}\text{C}$ = องศาเซลเซียส

rpm = รอบต่อนาที

m = เมตร

cm = เซนติเมตร

mm = มิลลิเมตร

μm = ไมโครเมตร