การควบคุมกระบวนการสังเคราะห์พอลิ-เบต้า-ไฮดรอกซีอัลคาโนเอท ใน Alcaligenes eutrophus ATCC 17697

นางสาว วนิดา วัฒนการุณ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2536

ISBN 974-583-150-6

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

018824 I 14838357

REGULATION OF POLY-β-HYDROXYALKANOATE SYNTHESIS IN *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17697

Miss Wanida Wattanakaroon

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Programe of Biotechnology

Graduate School

Chulalongkorn University

1993

ISBN 974-583-150-6

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การควบคุมกระบวนการสังเคราะห์พอลิ-เบต้า-ไฮดรอกซีอัลคาโนเอท ใน Alcaligenes eutrophus ATCC 17697
โดย	นางสาววนิดา วัฒนการุณ
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล

เฉลิมพระเกียรติ สภาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน)

วนิดา วัฒนการุณ : การควบคุมกระบวนการสังเคราะห์พอลิ-เบต้า-ไฮดรอกซีอัลคาโนเอทใน Alcaligenes eutrophus ATCC 17697 (REGULATION OF POLY-β-HYDROXY ALKANOATE SYNTHESIS IN Alcaligenes eutrophus ATCC 17697) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.สัณห์ พณิชยกุล , 92 หน้า. ISBN 974-583-150-6

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ Alcaligenes eutrophus ATCC 17697 ในอาหารสูตรเกลือแร่ที่มีฟรุกโตสและแอมโมเนียมซัลเฟต เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนและไนโตรเจน เมื่อศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบการเจริญและการผลิตพอลิ-เบต้า-ไฮดรอกซีบิวทิเรท ในอาหารสูตรเกลือแร่และอาหารสูตรอุดม พบว่าในอาหารสูตรเกลือแร่ ให้ปริมาณพอลิ-เบต้า-ไฮดรอกซีบิวทิเรทสูงกว่าอย่างเห็นได้ชัด และขึ้นกับความเข้มข้นของฟรุกโตสและแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ ในขณะที่การเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรอุดมจะให้ปริมาณพอลิ-เบต้า-ไฮดรอกซีบิวทิเรทต่ำมาก

ในการศึกษาเอนไซม์ 3 ชนิด (เบต้า-คีโตไธโอเลส , อะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตส และไฮดรอกซีบิวทิเรทดีไฮโดรจีเนส) ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์พอลิ-เบต้า-ไฮดรอกซีบิวทิเรท ของ A. eutrophus ในสภาวะของการสะสมพอลิ-เบต้า-ไฮดรอกซีบิวทิเรท แตกต่างกัน พบว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเกลือแร่ที่มีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตต่ำ (0.1 กรัมต่อลิตร) จะให้แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์เบต้า-คีโตไธโอเลสและอะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตสสูงกว่า 4 และ 2 เท่า ตามลำดับ ของที่เลี้ยงในอาหารสูตรเดียวกันที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร ขณะที่มีการสะสมของพอลิ-เบต้า-ไฮดรอกซีบิวทิเรทเพิ่มขึ้นเพียง 2 เท่า เมื่อเติมอาหารสูตรอุดมลงในอาหารสูตรเกลือแร่ ทำให้ A. eutrophus เจริญเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่เป็นผลให้การสังเคราะห์พอลิ-เบต้า-ไฮดรอกซีบิวทิเรท ลดลงอย่างชัดเจน เช่นเดียวกับแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ ทั้งสามชนิดที่มีค่าต่ำ ส่วนการเปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์เบต้า-คีโตไธโอเลส และอะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตส เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรอุดมที่ระยะการเจริญคงที่จะต่ำกว่าในอาหารสูตรเกลือแร่ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร ขณะที่แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไฮดรอกซีบิวทิเรทดีไฮโดรจีเนสสูงกว่า 10 เท่า

การศึกษาโคพอลิเอสเทอร์ของ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรท และ 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรท ที่ A. eutrophus สังเคราะห์ พบว่าการเติมกรดบิวทิริคลงในอาหารสูตรเกลือแร่ ทำให้สัดส่วนของ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรท ต่อ 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรทสูงขึ้น เช่นเดียวกับการที่แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์เบต้า-คีโตไธโอเลสและอะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตส เพิ่มขึ้น 9-10 เท่า และ 3-4 เท่า ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตรเดียวกันที่ไม่เติมกรดบิวทิริค

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2535..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

C226161 : MAJOR MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD:
POLY-β-HYDROXYALKANOATE/POLY-β-HYDROXYBUTYRATE/
Alcaligenes eutrophus

WANIDA WATTANAKAROON : REGULATION OF POLY-β-HYDROXY AL KANOATE SYNTHESIS IN Alcaligenes eutrophus ATCC 17697.
THESIS ADVISOR : ASSO.PROF. SANHA PANICHAJAKUL, Ph.D.92 pp.
ISBN 974-583-150-6

Alcaligenes eutrophus ATCC 17697 was grown in mineral salts medium contained fructose and ammonium sulfate as a carbon and nitrogen source. The growth and poly-β-hydroxybutyrate synthetic pattern was compared to the cultivation in nutrient broth. In mineral salts medium the production of poly-β-hydroxybutyrate were significantly higher than the NB medium. The difference value highly depended on fructose and ammonium sulfate concentration. Very low concentration of poly-β-hydroxybutyrate was detected when the microorganism was grown in nutrient broth.

Three enzymes activities (β-ketothiolase , acetoacetyl-CoA reductase and D(-)-3-hydroxybutyrate dehydrogenase) involving poly-β-hydroxybutyrate synthesis from A. eutrophus have been studied at the various conditionsof the poly-β-hydroxybutyrate accumulation. The higher specific activity of β-ketothiolase , acetoacetyl-CoA reductase were obtained from cells growing in the mineral salts medium at low concentration of ammonium sulfate (0.1 g/l) which synthesized 4 and 2 fold higher in specific activity of the enzymes than the medium with contained 2 g/l ammonium sulfate , while only 2 fold higher in poly-β-hydroxybutyrate accumulation was observed. The addition of nutrient broth to the mineral salts medium caused a rapid increase in growth of A. eutrophus but strongly decreased the poly-β-hydroxybutyrate production , which were correlatively to the decreased of all three enzymes investigated significantly. Cells growing in nutrient broth culture produced very low specific activity of β-ketothiolase and acetoacetyl-CoA reductase at the stationary phase in comparison to the activities obtained from growing cells in 2 g/l ammonium sulfate. However , the specific activity of D(-)-3-hydroxybutyrate dehydrogenase in this rich medium was over 10 fold higher.

Copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvale rate were also identified in A. eutrophus . Addition of butyric acid can increase the proportion of 3-hydroxybutyrate to3-hydroxyvalerate with corresponding to highly induction of β-ketothiolase and acetoacetyl-CoA reductase specific activity of 9-10 and 3-4 fold when cells were grown in the same mineral salts media.

ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ปีการศึกษา 2535 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม -

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล อาจารย์ที่ปรึกษาที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำ ข้อคิดเห็นต่าง ๆ ในการวิจัย และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

กราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ที่ได้กรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณคณาจารย์ในหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ และภาควิชาชีวเคมี ที่ได้ให้ความรู้พื้นฐาน ความกรุณา ตลอดระยะเวลาของการศึกษา

ขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี ที่ให้ความสะดวกและช่วยเหลือทางด้านสารเคมี เครื่องมืออุปกรณ์การทดลองตลอดจนสถานที่ทำงานวิจัย

ขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาชีวเคมีทุกท่าน สำหรับความช่วยเหลือในระหว่างทำงานวิจัย

ขอขอบคุณฝน, น้องแมน, น้องหมี และน้องเจี๊ยบ สำหรับความช่วยเหลือในการทำกราฟและสไลด์ คุณนันทนา ชูฉัตร ที่ได้กรุณาช่วยวิเคราะห์ตัวอย่าง น้องหญิง และน้องติ่ง สำหรับความช่วยเหลือในระหว่างจัดทำวิทยานิพนธ์ พี่ เพื่อน และน้อง ๆ ในภาควิชาชีวเคมี และเทคโนโลยีชีวภาพ สำหรับมิตรภาพและการช่วยเหลือต่าง ๆ

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย สำหรับความอนุเคราะห์ด้านทุนวิจัย

ท้ายที่สุดกราบขอบพระคุณคุณพ่อ และขอบคุณพี่เจี๊ยบและน้องจุ้ยของผู้เขียนที่ให้การสนับสนุนทางการศึกษา กำลังใจ ความรักและความช่วยเหลือมาโดยตลอดระยะเวลาในการศึกษา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญตาราง..... ญ

สารบัญรูป..... ฏ

คำย่อ..... ฒ

บทที่

1 บทนำ..... 1

2 วิธีการทดลอง..... 15

2.1 ครุภัณฑ์..... 15

2.2 วัสดุและเคมีภัณฑ์..... 16

2.2.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง..... 16

2.2.2 เคมีภัณฑ์..... 17

2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์..... 18

2.4 การเตรียมสารละลาย..... 19

2.5 วิธีการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์..... 20

2.6 วิธีการเลี้ยงเชื้อและวัดการเจริญของเชื้อ..... 21

2.7 วิธีการศึกษาการสังเคราะห์พอลิ-เบต้า-ไฮดรอกซีบิวทิเรท และพอลิ-เบต้า-ไฮดรอกซีอัลคาโนเอท..... 22

2.8 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล..... 24

2.9 การวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจน (วิธีเนสเลอร์)..... 25

2.10 การเตรียมสารละลายเอนไซม์..... 25

2.11 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์..... 26

3 ผลการทดลอง..... 28

3.1 รูปแบบการเจริญและการผลิต PHB ของ *A.eutrophus* ATCC 17697 ในอาหารสูตรเกลือแร่..... 28

บทที่ หน้า

3.2 การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต PHB. 28
3.3 ผลของปริมาณแหล่งต้นตอคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิต PHB.. 31
3.4 รูปแบบการเจริญและการผลิต PHB ของ *A.eutrophus* ATCC 17697 ในอาหารสูตรเกลือแร่เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน..... 31
3.5 การศึกษาความต้องการอากาศของ *A.eutrophus* ATCC 17697 ในการเจริญและผลิต PHB..... 35
3.6 ผลของปริมาณแหล่งต้นตอไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลิต PHB 38
3.7 การเจริญและการผลิต PHB ของ *A.eutrophus* ATCC 17697 ในอาหารสูตรอุดม (NB)..... 38
3.8 รูปแบบการเจริญและการผลิต PHB ของ *A.eutrophus* ATCC 17697 ในอาหารสูตรเกลือแร่ที่เสริมด้วยอาหารสูตรอุดม (nutrient broth)..... 43
3.9 ความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของเอนไซม์เบต้า-คีโตไธโอเลส, อะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตส และไฮดรอกซีบิวทิเรทดีไฮโดรจีเนส กับปริมาณโปรตีนที่สกัดแยกจาก *A.eutrophus* ATCC 17697... 45
3.10 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดแยกเอนไซม์จากเซลล์ *A.eutrophus* ด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง..... 45
3.11 การศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์เบต้า-คีโตไธโอเลส, อะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตสและไฮดรอกซีบิวทิเรทดีไฮโดรจีเนส ในสภาวะที่มีการสังเคราะห์ PHB แตกต่างกันใน *A.eutrophus* ATCC 17697..... 45
3.12 การศึกษาการเจริญของ *A.eutrophus* ATCC 17697 ในอาหารสูตรเกลือแร่ซึ่งมีกรดคาร์บอกซิลิคเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน..... 56
3.13 ผลของกรดคาร์บอกซิลิคต่อการสังเคราะห์โคโพลีเมอร์ใน *A.eutrophus* ATCC 17697..... 58
4 วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง..... 60
เอกสารอ้างอิง..... 73

หน้า

ภาคผนวกที่..... 80

1 กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีลอรี..... 81

2 รูปแบบของการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตรของการวิเคราะห์พอลิ-เบต้า-ไฮดรอกซีบิวทิเรท..... 82

3 กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ PHB โดยวิธีสเปคโตรโฟโตเมตตรี..... 83

4 กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ PHB โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟฟี..... 84

5 กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณฟรุกโตส โดยวิธีของ Marshall และ Kooi ซึ่งดัดแปลงตามวิธีของ Dische และ Borenfreund..... 85

6 กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส..... 86

7 กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจน..... 87

8 กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณอะซิโตอะซิติลโคเอนไซม์เอ.... 88

9 กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ NADPH..... 89

10 กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ NADH..... 90

11 รูปแสดงโครมาโตแกรมของไฮดรอกซีบิวทิเรท, ไฮดรอกซีวาเลอเรท และกรดเบนโซอิค วิเคราะห์โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟฟี 91

ประวัติผู้เขียน..... 92

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงคุณสมบัติของ PHB เทียบกับพอลิโพรไพลีน.....	2
2	แสดงรายชื่อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสาร PHB ในธรรมชาติ.....	3
3	แสดงองค์ประกอบของ PHAs ที่ผลิตโดย *A.eutrophus* ATCC 17697 เมื่อเจริญในแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน.....	9
4	การเจริญและผลิต PHB ของ *A.eutrophus* ATCC 17697 ที่เวลา 50 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเกลือแร่ ที่ประกอบด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร โดยใช้แหล่งต้นตอคาร์บอนชนิดต่าง ๆ (ปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร).....	30
5	ค่าการเจริญของ *A.eutrophus* ATCC 17697 ที่เวลา 50 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเกลือแร่ และใช้กรดคาร์บอกซิลิคเป็นแหล่งคาร์บอนเทียบกับฟรุกโตสในสภาวะเดียวกันกับข้อ 3.1.....	58
6	รูปแบบและปริมาณการสังเคราะห์ 3HB และ 3HV ของ *A.eutrophus* ATCC 17697 ที่เวลา 50 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเกลือแร่ที่ประกอบด้วยฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร และเสริมด้วยกรดคาร์บอกซิลิค 1 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที.	59

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	แสดงสมมุติฐานของวิถีการสังเคราะห์ PHB จากตัวกลางของวัฏจักรเครปส์.....	6
2	แสดงสมมติฐานของวิธีการสังเคราะห์ poly (HB-CO-HV) จากโปรปิโอเนท [1-^{13}c] ใน *A.eutrophus*.....	12
3	แสดงสมมติฐานของวิถีการสังเคราะห์ PHB จากอะซิเตท [1-^{13}c] และบิวทิเรท [1-^{13}c] ใน *A.eutrophus*	13
4	แสดงรูปแบบการเจริญและการผลิต PHB ของ *A.eutrophus* ATCC 17697 สัมพันธ์กับปริมาณฟรุกโตสและแอมโมเนียมซัลเฟต ในอาหารเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเกลือแร่ ที่ประกอบด้วยฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที.....	29
5	แสดงรูปแบบการเจริญและการผลิต PHB ของ *A.eutrophus* ATCC 17697 ปริมาณฟรุกโตสและแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารเมื่อเจริญในอาหารสูตรเกลือแร่ที่ประกอบด้วยฟรุกโตส 20 กับ 40 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที.....	32
6	แสดงรูปแบบการเจริญและการผลิต PHB ของ *A.eutrophus* ATCC 17697 สัมพันธ์กับปริมาณกลูโคสและแอมโมเนียมซัลเฟต ในอาหารเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเกลือแร่ที่ประกอบด้วยกลูโคส 20 กรัมต่อลิตรและแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที.....	36
7	ผลการศึกษาปัจจัยของการให้อากาศโดยใช้ค่าปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรขวดต่อการเจริญและการผลิต PHB ของ *A.eutrophus* ATCC 17697 เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 50 ชั่วโมง ในอาหารสูตรเกลือแร่ ที่ประกอบด้วยฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตรที่อุณหภูมิ 30 °ซ เขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที ในเครื่องเขย่า	

รูปที่		หน้า
	ของบริษัท Heto model 02-PT-623.....	37
8	แสดงรูปแบบการเจริญและการผลิต PHB ของ *A.eutrophus* ATCC 17697 สัมพันธ์กับปริมาณฟรุกโตสและแอมโมเนียมซัลเฟต ในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเกลือแร่ ที่ประกอบด้วย ฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตรและแอมโมเนียมซัลเฟต 0 ถึง 1.0 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที....	39
9	ลักษณะการเจริญและการผลิต PHB ของ *A.eutrophus* ATCC 17697 เมื่อพาะเลี้ยงในอาหารสูตรอุดมที่ประกอบด้วย NB 0.8 เปอร์เซนต์ ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที.....	42
10	แสดงรูปแบบการเจริญและการผลิต PHB ของ *A.eutrophus* ATCC 17697 สัมพันธ์กับปริมาณฟรุกโตสและแอมโมเนียมซัลเฟต ในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเกลือแร่ที่ประกอบด้วย ฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตรและแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร เสริมด้วย nutrient broth 0.8 เปอร์เซนต์ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที.....	44
11	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของเอนไซม์เบต้า-คีโตไธโอเลส ของ *A.eutrophus* ATCC 17697 กับปริมาณโปรตีนวัดแอคติวิตี (วิธีข้อ 2.11.1) โดยใช้อะซิโตอะซิติลโคเอนไซม์เอ เป็นสับสเตรท.....	46
12	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของเอนไซม์อะซิโตอะซิติลโคเอ-รีดักเตส ของ *A.eutrophus* ATCC 17697 กับปริมาณโปรตีน วัดแอคติวิตี(วิธีข้อ 2.11.2)โดยใช้อะซิโตอะซิติลโคเอนไซม์เอ เป็นสับสเตรท.....	47
13	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของเอนไซม์ไฮดรอกซีบิวทิเรท-ดีไฮโดรจีเนส ของ *A.eutrophus* ATCC 17697 กับปริมาณ โปรตีนวัดแอคติวิตี (วิธีข้อ 2.11.3) โดยใช้ดีแอล-3-ไฮดรอกซีบิว ทิเรทเป็นสับสเตรท.....	48

รูปที่ หน้า

14 ผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูงเพื่อสกัดแยกเอนไซม์ไฮดรอกซีบิวทิเรทดีไฮโดรจีเนสออกจากเซลล์ *A.eutrophus* 49

15 รูปแบบการผลิตเอนไซม์เบต้า-คีโตไธโอเลส, อะซิโตอะซิติลโคเอ-รีดักเตส, ไฮดรอกซีบิวทิเรทดีไฮโดรจีเนส, ค่าความขุ่น, น้ำหนักแห้งของเซลล์, ปริมาณโปรตีนของสารละลายเอนไซม์และ PHB ที่ระยะต่าง ๆ ของการเจริญของ *A.eutrophus* ATCC 17697 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเกลือแร่ที่ประกอบด้วยฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตรและแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตรในสภาวะของการเพาะเลี้ยงข้อ 3.11.1..... 51

16 รูปแบบการผลิตเอนไซม์เบต้า-คีโตไธโอเลส, อะซิโตอะซิติลโคเอ-รีดักเตส, ไฮดรอกซีบิวทิเรทดีไฮโดรจีเนส, ค่าความขุ่น, น้ำหนักแห้งของเซลล์, ปริมาณโปรตีนของสารละลายเอนไซม์และ PHB ที่ระยะต่าง ๆ ของการเจริญของ *A.eutrophus* ATCC 17697 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเกลือแร่ที่ประกอบด้วยฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตรและแอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 กรัมต่อลิตรในสภาวะของการเพาะเลี้ยงข้อ 3.11.2..... 52

17 รูปแบบการผลิตเอนไซม์เบต้า-คีโตไธโอเลส, อะซิโตอะซิติลโคเอ-รีดักเตส, ไฮดรอกซีบิวทิเรทดีไฮโดรจีเนส, ค่าความขุ่น, น้ำหนักแห้งของเซลล์, ปริมาณโปรตีนของสารละลายเอนไซม์และ PHB ที่ระยะต่าง ๆ ของการเจริญของ *A.eutrophus* ATCC 17697 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเกลือแร่ที่ประกอบด้วยฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตรและแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร เสริมด้วย NB 8 กรัมต่อลิตรในสภาวะของการเพาะเลี้ยงข้อ 3.11.3..... 54

18 รูปแบบการผลิตเอนไซม์เบต้า-คีโตไธโอเลส, อะซิโตอะซิติลโคเอ-รีดักเตส, ไฮดรอกซีบิวทิเรทดีไฮโดรจีเนส, ค่าความขุ่น, น้ำหนักแห้งของเซลล์, ปริมาณโปรตีนของสารละลายเอนไซม์และ PHB ที่ระยะต่างๆ ของการเจริญของ *A.eutrophus* ATCC 17697 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรอุดมในสภาวะของการเพาะเลี้ยงข้อ 3.11.4.. 55

19 รูปแบบการผลิตเอนไซม์เบต้า-คีโตไธโอเลส, อะซิโตอะซิติลโคเอ-รีดักเตส, ไฮดรอกซีบิวทิเรทดีไฮโดรจีเนส, ค่าความขุ่น, น้ำหนักแห้งของเซลล์, ปริมาณโปรตีนของสารละลายเอนไซม์และ PHB ที่ระยะต่างๆ ของการเจริญของ *A.eutrophus* ATCC 17697 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเกลือแร่ที่ประกอบด้วยฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร เสริมด้วยกรดบิวทิริค 1 กรัมต่อลิตร ในสภาวะของการเพาะเลี้ยงข้อ 3.11.5..... 57

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

°ซ = องศาเซลเซียส

PHB = Poly-β-hydroxybutyrate

3HB = 3-hydroxybutyrate

3HV = 3-hydroxyvalerate

NAD^+ = Nicotinamide adenine dinucleotide, oxidized form

NADH = Nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form

NADPH = Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form

Concn = Concentration

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย