

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
สารบัญตาราง	ณ
สารบัญภาพ	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทบทวนเอกสาร	4
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	27
บทที่ 4 ผลการทดลอง	43
บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลอง	92
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง	102
บรรณานุกรม	104
ภาคผนวก	
ก อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม	110
ข การเตรียมสารเคมี บัฟเฟอร์ และ reagent	112
ค การเตรียมสับสเตรท	114
ง การทำกราฟมาตรฐาน	115
จ การคำนวณที่ใช้ในการทดลอง	119
ฉ การเตรียมเปลือกกุ้ง	121
ช การเตรียม Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis	122
ซ เปอร์เซ็นต์ความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต	124
ณ การเตรียม standard Mc Farland	125

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1 องค์ประกอบของเปลือกกุ้งและกระดองปู	5
2 ปริมาณไคตินที่ใช้ประโยชน์ได้	5
3 การใช้ประโยชน์จาก astaxanthin amino acid และ แหล่งไนโตรเจน	8
4 Production of bioactive compound in SSF	15
5 Production of organic acid in SSF	16
6 Other products by SSF	17
7 A brief summary of bacterial studies on production of microbial chitinases	20
8 หลักการแยกและการทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์	21
9 การทำไคตินจากแบคทีเรียให้บริสุทธิ์	26
10 ผลการแยกแบคทีเรียจากดินในนาข้าว	44
11 ผลการเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตไคตินเนสของแบคทีเรีย 12 ไอโซเลท	45
12 ผลเปรียบเทียบการผลิตไคตินเนสในอาหารเหลว Enzyme Production Medium และในอาหารแข็งเปลือกกุ้ง	47
13 ผลเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะภายใต้กล้องของแบคทีเรีย ไอโซเลท MC176 บนอาหาร chitin agar และ nutrient agar	50
14 ผลการทดสอบลักษณะทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลท MC176 เทียบกับ <i>Bacillus thuringiensis</i>	51
15 ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไคตินเนสของ <i>Bacillus thuringiensis</i> MC176	53
16 ปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไคตินเนสของ <i>Bacillus thuringiensis</i> MC176 (chitinase activity)	54
17 ปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไคตินเนสของ <i>Bacillus thuringiensis</i> MC176 (specific activity)	54

ญ

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
18 ผลของปริมาณ ball-milled chitin ต่อการสร้าง chitinase ที่ผลิตโดย <i>Bacillus thuringiensis</i> MC 176	56
19 ชนิดของสับสเตรทที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากับไคตินเอสที่ผลิตจาก <i>Bacillus thuringiensis</i> MC 176	57
20 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตไคตินเอส ของ <i>Bacillus thuringiensis</i> MC 176	59
21 ปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตไคตินเอส ของ <i>Bacillus thuringiensis</i> MC 176	61
22 ชนิดของสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการผลิตไคตินเอส ของ <i>Bacillus thuringiensis</i> MC 176	63
23 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไคตินเอสของ <i>Bacillus thuringiensis</i> MC 176	65
24 pH เริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไคตินเอส ของ <i>Bacillus thuringiensis</i> MC 176	66
25 Chitinase activity และ specific activity ของ <i>Bacillus thuringiensis</i> MC 176 เมื่อเลี้ยงในภาชนะต่างๆ ในการหมักสภาพแข็ง	67
26 Chitinase activity และ specific activity ของ <i>Bacillus thuringiensis</i> MC 176 เมื่อเติมสับสเตรทต่างๆ ในการหมักสภาพแข็ง	69
27 Chitinase activity และ specific activity ของ <i>Bacillus thuringiensis</i> MC 176 โดยใช้เปลือกกุ้งและฟางข้าวเป็นสับสเตรทในการหมักสภาพแข็ง	71
28 ผลของระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง <i>Bacillus thuringiensis</i> MC 176 ในอาหารเหลว EPM ต่อการผลิตไคตินเอส	73
29 ผลของระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง <i>Bacillus thuringiensis</i> MC 176 ในอาหารแข็งเปลือกกุ้งต่อการผลิตไคตินเอส	75
30 ค่า chitinase activity ของ <i>Bacillus thuringiensis</i> MC 176 หลังการให้รังสี อัลตราไวโอเล็ต ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน	77

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
31 เวลาที่ใช้บ่มเอนไซม์ไคตินเนส	79
32 อุณหภูมิที่ใช้บ่มเอนไซม์ไคตินเนส	80
33 ผลความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ	81
34 ผลของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์	82
35 ผลความเสถียรของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์	83
36 ชนิดของไคตินเนสที่ผลิตโดย <i>Bacillus thuringiensis</i> MC176	84
37 การทำ chitinase ให้บริสุทธิ์ขึ้นบางส่วนโดยการตกตะกอนด้วย ammonium sulfate	85
38 ผลการทดสอบค่า pH ของ Tris-HCl บัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่ทำให้เอนไซม์จับกับตัว แลกเปลี่ยนประจุ	87
39 ผลการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์	
40 ค่าการดูดกลืนแสงของ N-acetylglucosamine ความเข้มข้นต่างๆ ที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร	90 115
41 การเตรียมสารละลายมาตรฐานโปรตีน	
42 ค่าการดูดกลืนแสงของ Bovine serum albumin ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร	117 118

สารบัญภาพ

รูป	หน้า
1 โครงสร้างของไคติน	4
2 ขบวนการทางชีวภาพในการเปลี่ยนไคตินให้เป็น โปรตีนเซลล์เดี่ยว	6
3 การเก็บตัวอย่างโดยวิธี Gel-Electrophoresis	24
4 การใช้เทคนิคไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซึ่งในการแยกโปรตีนผสมออกจากกัน	25
5 เปลือกกุ้งขนาดอนุภาคต่างๆ ขนาดป่นละเอียด ขนาดกลาง ขนาดใหญ่	28
6 สับสเตรทเสริมที่ใช้ร่วมกับเปลือกกุ้งในการหมักสภาพแข็ง	35
7 ค่า chitinase activity ของแบคทีเรีย 12 ไอโซเลท ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง เปลือกกุ้งขนาดอนุภาคต่างๆ	45
8 ผลการผลิตไคตินเอสของแบคทีเรีย 12 ไอโซเลทที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว EPM	48
9 ผลการผลิตไคตินเอสของแบคทีเรีย 12 ไอโซเลท ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง เปลือกกุ้ง	49
10 การเจริญของ <i>Bacillus thuringiensis</i> MC176 บน nutrient agar และ chitin agar	50
11 ลักษณะภายใต้กล้องของ <i>Bacillus thuringiensis</i> MC176 หลังการย่อย สีแกรม	52
12 ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตไคตินเอสของ <i>Bacillus thuringiensis</i> MC176	53
13 ปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตไคตินเอสของ <i>Bacillus thuringiensis</i> MC176	55
14 ผลของปริมาณ ball-milled chitin ต่อการสร้าง chitinase ของ <i>Bacillus thuringiensis</i> MC176	56
15 ชนิดของสับสเตรทที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากับไคตินเอสที่ผลิตโดย <i>Bacillus thuringiensis</i> MC176	58

สารบัญตาราง

รูป	หน้า
16 ปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตไคตินเนส ของ <i>Bacillus thuringiensis</i> MC176	60
17 ปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตไคตินเนสของ <i>Bacillus thuringiensis</i> MC176	62
18 ชนิดของสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการผลิตไคตินเนส ของ <i>Bacillus thuringiensis</i> MC176	64
19 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไคตินเนสของ <i>Bacillus thuringiensis</i> MC176	65
20 pH เริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไคตินเนส ของ <i>Bacillus thuringiensis</i> MC176	66
21 ผลของชนิดและขนาดของภาชนะที่เหมาะสมในการผลิตไคตินเนส ของ <i>Bacillus thuringiensis</i> MC176	68
22 ชนิดของสับสเตรทเสริมที่มีผลต่อการผลิตไคตินเนส ของ <i>Bacillus thuringiensis</i> MC176	70
23 การผลิตไคตินเนสของ <i>Bacillus thuringiensis</i> MC176 เมื่อเลี้ยงในเปลือกกุ้ง ฟางข้าว และ เปลือกกุ้งผสมฟางข้าว	72
24 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยง <i>Bacillus thuringiensis</i> MC176 ในอาหารเหลว EPM ต่อการผลิตไคตินเนส	74
25 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยง <i>Bacillus thuringiensis</i> MC176 ในอาหารแข็งเปลือก กุ้งต่อการผลิตไคตินเนส	76
26 ผลการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของ <i>Bacillus thuringiensis</i> MC176 หลังการให้รังสี อัลตราไวโอเลตที่ระยะเวลาแตกต่างกัน	78
27 ผลของเวลาที่เหมาะสมต่อการทำงานของไคตินเนส	79
28 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไคตินเนส	80
29 ผลความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ	81

สารบัญตาราง

รูป	หน้า
30 ผลของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์	82
31 ผลของความเสถียรของการทำงานต่อเอนไซม์	83
32 ชนิดของโคติเนสที่ผลิตจาก <i>Bacillus thuringiensis</i> MC176	84
33 การแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดย Butyl-Toyopearl 650W	86
34 การแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดย DEAE-cellulofine	88
35 โครมาโตแกรมของการแยกโคติเนสโดยคอลัมน์ Toyopearl HF-40W	89
36 ผลการทำ SDA-PAGE	91
37 กราฟมาตรฐานโปรตีน	92