รายการอ้างอิง

Abeles, F.B., Bosshart, R.T., Forrense, L.E., and Habig, W.H. 1970. Preparation and purification of glucanase and chitinase from bean leaves. Plant Physiol. 47: 129-134.

Andrews, A.T. 1981. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE).Homogeneous gel and buffer systems. In Electrophoresis: theory, techniques, and biochemical and clinical applications, pp. 5-49. New York: Clarendon Press.

Bhushan, B., and Hoondal, G.S. 1998. Isolation, purification and properties of a thermostable chitinase from an alkalophilic *Bacillus* sp. BG-11. Biotechnology Letters 20(2): 157-159.

Blackwell, J. 1988. Physical methods for the determination of chitin structure and conformation. In Methods in Enzymology Vol 161(51), pp. 435-442. New York: Academic Press.

Boller, T., and Muach, F. 1988. Colormetric assay for chitinase. In Methods in Enzymology Vol 161(50), pp. 430-435. New York: Academic Press.

Boller, T., Gehri, A., Mauch, F., and Vogeli, U. 1983. Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function. Planta. 157: 22-31.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.

Brameld, K.A., Shrader, W.D., Imperiali, B., and Goddard, W.A. 1998. Substrate assistance in the mechanism of family 18 chitinases: theoretical studies of potential intermediates and inhibitors. J. Mol. Biol. 280: 913-923.

Cabib, E. 1988a. Assay for chitinase using tritiated chitin. In Methods in Enzymology Vol 161(48), pp. 424-426. New York: Academic Press.

Chen, A.C., Mayer, R.T., and Deloach, J.R. 1982 Purification and characterization of chitinase from the stable fly, *Stomoxys calcitrans*. Arch. Biochem. Biophys. 216(1): 314-321.

Chernin, L.S., Winson, M.K., Thompson, J.M., Haran, S., Bycroft, B.W., Chet, I., Williams, P., and Stewart, G.S.A.B. 1998. Chitinolytic activity in *Chromobacterium violaceum*: substrate analysis and regulation by quorum sensing. J. Bacteriol. 180(17): 4435-4441.

Cody, R.M. 1989. Distribution of chitinase and chitobiase in Bacillus. Curr. Microbiol. 19: 201-205.

Davies, D.H., and Hayes, E.R. 1988. Determination of the degree of acetylation of chitin and chitosan. In Methods in Enzymology Vol 161(52), pp. 442-446. New York: Academic Press.

Davis, B.J. 1964. Disc electrophoresis-II method and application to human serum proteins. Ann. N.Y. Acad. Sci. 121: 404-427.

Flach, J., Pilet, P.-E., and Jolles, P. 1992. What's new in chitinase research?. Experientia 48: 701-716.

Fukamizo, T., Kramer, K.J., Mueller, D.D., Schaefer, J., Garbow, J., and Jacob, G.S. 1986. Analysis of chitin structure by nuclear magnetic resonance spectroscopy and chitinolytic enzyme digestion. Arch. Biochem. Biophys. 249(1): 15-26.

Gardner, K.H., and Blackwell, J. 1975. Refinement of the structure of β-chitin. Biopolymers 14: 1581-1595.

Hara, S., Yamamura, Y., Fujii, Y., Mega, T., and Ikenaka, T. 1989. Purification and characterization of chitinase produced by *Streptomyces erythraeus*. J. Biochem. 105: 484-489.

Hedrick, S.A., Bell, I.N., Boller, T., and Lamb, C.J. 1988. Chitinase cDNA cloning and mRNA induction by fungal elicitor, wounding and infection. Pl. Physiol. 86: 182-186.

Hirano, S. 1988. Water-soluble glycol chitin and carboxymethychitin. In **Methods in Enzymology** Vol 161(52), pp. 408-410. New York: Academic Press.

Imoto, T., and Yagishita, K. 1971. A simple activity measurement of lysozyme. **Agr. Biol. Chem.** 35(7): 1154-1156.

Inbar, J., and Chet, I. 1991. Evidence that chitinase produced by *Aeromonas caviae* is involved in the biological control of soil-borne plant pathogens by this bacterium. **Soil Biol. Biochem.** 23(10): 973-978.

Inglis, P.W., and Peberdy, J.F. 1997. Production and purification of a chitinase from *Ewingella americana*, a recently described pathogen of the mushroom, *Agaricus bisporus*. **FEMS. Microbiol. Lett.** 157: 189-194.

Jeuniaux, C. 1966. Chitinases. In **Methods in Enzymology** Vol 8, pp. 644-650. New York: Academic Press.

Kondo, K., Matsumoto, M., Maeda, R., and Kato, S. 1997. Purification and characteristics of chitinase from japanese radish seeds. **J. Chem. Eng. Japan.** 30(6): 1140-1143.

Kramerov, A.A., Metakovskii, E.V., and Gvozdev, V.A. 1985. Sulfated and chitinase-sensitive glycoproteins in cultured cells of *Drosophila melanogaster*. **Biochemistry USSR** 50: 811-822.

Leadbetter, E.R. 1963. A chitinase from the gut of the cockroach *Periplaneta americana*. **Nature** 200: 1128.

Maeda, H., and Ishida, N. 1967. Specificity of binding of hexopyranosyl polysaccharides with fluorescent brightener. **J. Biochem.** 62(2): 276-278.

Martin, M.N. 1991. The latex of *Hevea brasiliensis* contains high levels of both chitinases and chitinases / lysozymes. **Plant Physiol.** 95: 469-476.

Metraux, J.P., and Boller, T. 1988. Local and systemic induction of chitinase in cucumber plants in response to viral, bacterial and fungal infections. **Physiol. molec. Pl. Path.** 28: 161-169.

Molano, J., Duran, A., and Cabib, E. 1977. A rapid and sensitive assay for chitinase using tritiated chitin. **Anal. Biochem.** 83: 648-656.

Molano, J., Polacheck, I., Duran, A., and Cabib, E. 1979. An endochitinase from wheat germ. J. Biol. Chem. 254(11): 4901-4907.

Muzzarelli, R.A.A. 1976. Chitin, pp. 1-44. Oxford: Pergamon.

O'Brien, M., and Colwell, R.R. 1987. A rapid test for chitinase activity that uses 4-methylumbelliferyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide. Appl. Environ. Microbiol. 53(7): 1718-1720.

Ohtakara, A., Mitsutomi, M., and Uchida, Y. 1979. Purification and some properties of chitinase from *Vibrio* sp. J. Ferment. Technol. 57(3): 169-177.

Ohtakara, A. 1988. Viscosimetric assay for chitinase. In Methods in Enzymology Vol 161(49), pp. 426-430. New York: Academic Press.

Ohtakara, A., and Mitsutomi, M. 1988. Analysis of chitooligosaccharides and reduced chitooligosaccharides by high-performance liquid chromatography. In Methods in Enzymology Vol 161, pp. 453-457. New York: Academic Press.

Park, J.K., Morita, K., Fukumoto, I., Yamasaki, Y., Nakagawa, T., Kawamukai, M., and Matsuda, H. 1997. Purification and characterization of the chitinase (Chi A) from *Enterobacter* sp.G-1. Biosci. Biotech. Biochem. 61(4): 684-689.

Pedraza-Reyes, M., and Lopez-Romero, E. 1989. Purification and some properties of two forms of chitinase from mycelial cells of *Mucor rouxii*. J. Gen. Microbiol. 135: 211-218.

Pegg, G.F. 1988. Chitinase from *Verticillium albo-atrum*. In Methods in Enzymology Vol 161(59), pp. 474-479. New York: Academic Press.

Pinto, A.de S., Barreto, C.C., Schrank, A., Ulhoa, C.J., and Vainstein, M.H. 1997. Purification and characterization of an extracellular chitinase from the entomopathogen *Metharhizium anisopliae*. Can. J. Microbiol. 43: 322-327.

Reissig, J.L., Strominger, J.L., and Leloir, L.F. 1955. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. J. Biol. Chem. 217: 959-966.

Roberts, W.K., and Selitrennikoff, C.P. 1988. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. J. Gen. Microbiol. 134: 169-176.

Rodriguez, J., Copa-Patino, J.L., and Pe'rez-Leblic, M.I. 1995. Purification and properties of a chitinase from *Penicillium oxalicum* autolysates. Letters in Appl. Microbiol. 20: 46-49.

Sahai, A.S., and Manocha, M.S. 1993. Chitinase of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. FEMS Microbiol. Rev. 11: 317-338.

Sakai, K., Narihara, M., Kasama, Y., Wakayama, M., and Moriguchi, M. 1994. Purification and charaterization of thermostable β-N-acetylhexosaminidase of *Bacillus stearothermophilus* CH-4 isolated from chitin-containing compost. Appl. Environ. Microbiol. 60(8): 2911-2915.

Sakai, K., Yokota, A., Kurokawa, H., Wakayama, M., and Moriguchi, M. 1998. Purification and characterization of three thermostable endochitinases of a Noble *Bacillus* Strain, MH-1, isolated from chitin-containing compost. Appl. Environ. Microbiol. 64(9): 3397-3402.

Sannan, T., Kurita, K., and Iwakura, Y. 1976. Effect of deacetylation on solubility. Makromol. Chem. 177: 3589-3600.

Schales, O., and Schales, S.S. 1945. A simple method for the determination of glucose in blood. Arc. Biochem. 8: 285-292.

Segrest, J.P., and Jackson, R.L. 1972. Molecular weight determination of glycoproteins by polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate. In Methods in Enzymology, pp. 54-63. New York: Academic Press

Shimahara, K., and Takiguchi, Y. 1988. Preparation of crustacean chitin. In Methods in Enzymology Vol 161, pp. 417-423. New York: Academic Press.

Skujins, J., Pukite, A., and Mclaren, A.D. 1970. Chitinase of *Streptomyces* sp. purification and properties. **Enzymologia** 39(6): 353-370.

Sugiyama, J., Boisset, C., Hashimoto, M., and Watanabe, T. 1999. Molecular directionality of β-chitin biosynthesis. **J. Mol. Biol.** 286: 247-255.

Svitil, A.L., Chadhain, S.M.N., Moore, J.A., and Kirchman, D.L. 1997. **Appl. Environ. Microbiol.** 63(2): 408-413.

Tronsmo, A., and Harman, G.E. 1992. Detection and quantification of N-acetyl-β-D-glucosaminidase, chitobiosidase, and endochitinase in solutions and on gels. **Anal. Biochem.** 208: 74-79.

Trudel, J., and Asselin, A. 1988. Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. **Anal. Biochem.** 178: 362-366.

Ulhoa, C.J., and Peberdy, J.F. 1992. Purification and some properties of the extracellular chitinase produced by *Trichoderma harzianum*. **Enzyme Microb.Technol.** 14: 236-240.

Vergauwen, R., Leuven, F.V., and Laere, A.V. 1998. Purification and characterization of strongly chitin-binding chitinases from salicylic acid-treated leek (*Allium porrum*). **Physiologia Platarum** 104: 175-182.

Wang, S.L., and Chang, W.T. 1997. Purification and characterization of two bifunctional chitinases / lysozymes extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab shell powder medium. **Appl. Environ. Microbiol.** 63(2): 380-386.

Watanabe, T., Oyanagi, W., Suzuki, K., and Tanaka, H. 1990. Chitinase system of *Bacillus circulans* WL-12 and importance of chitinase A1 in chitin degradation. **J. Bacteriol.** 172(7): 4017-4022.

Watanabe, T., Kimura, K., Sumiya, T., Nikaidou, N., Suzuki, K., Suzuki, M., Taiyoji, M., Ferrer, S., and Regue, M. 1997. Genetic analysis of the chitinase system of *Serratia marcescens* 2170. **J. Bacteriol.** 179(22): 7111-7117.

Yamagami, T., Mine, Y., Aso, Y., and Ishiguro, M. 1997. Purification and characterization of two chitinase isoforms from the bulbs of Gladiolus (*Gladiolus gandavensis*). **Biosci. Biotech. Biochem.** 61(12): 2140-2142.

Yamanaka, S., Tsuyoshi, N., Kikuchi, R., Takayama, S., and Sakuda, S., and Yamada. 1994. Effect of demethylallosamidin, a chitinase inhibitor, on morphology of fungus *Geotrichum candidum*. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 40:171-174.

Yanai, K., Takaya, N., Kojima, N., Horiuchi, H., Ohta, A., and Takagi, M. 1992. Purification of two chitinases from *Rhizopus oligosporus* and isolation and sequencing of the encoding genes. **J. Bacteriol.** 174(22): 7398-7406.

Young, M.E., Bell, R.L., and Carroad, P.A. 1984. Kinetics of chitinase production I chitin hydrolysis. **Biotechnol. Bioeng.** 22: 769-780.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ 1 ผลการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

Characteristics	Reaction
Gram reaction	+ ve
Fermentation production of acid from:	
- glycerol	+
- erythritol	-
- D-arabinose	-
- L-arabinoase	-
- ribose	+
- D-xylose	-
- L-xylose	-
- adonitol	-
- β-methyl-D-xyloside	-
- galactose	+
- glucose	+
- fructose	+
- mannose	-
- sorbose	-
- rhamnose	-
- dulcitol	-
- inositol	-
- mannitol	-
- sorbitol	-
- α-methyl-D-mannoside	-
- α-methyl-D-glucoside	-

Remark: +ve = Gram positive bacteria

\+ = Positive reaction

\- = Negative reaction

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(ต่อ)

Characteristics	Reaction
Fermentative production of acid from:	
- N-acetyl-glucosamine	+
- amygdalin	+
- arbutin	+
- esculin	+
- salicine	+
- cellobiose	+
- maltose	+
- lactose	-
- melibiose	-
- saccharose	+
- trehalose	+
- inulin	-
- melezitose	-
- D-raffinose	-
- starch	+
- glycogen	+
- xylitol	-
- β-gentiobiose	+
- D-turanose	-
- D-lyxose	-
- D-tagatose	-
- D-fucose	-
- L-fucose	-

Remark: +ve = Gram positive bacteria

\+ = Positive reaction

\- = Negative reaction

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(ต่อ)

Characteristics	Reaction
Fermentative production of acid from:	
- D-arabitol	-
- L-arabitol	-
- gluconate	+
- 2-keto-gluconate	-
- 5-keto-gluconate	-

Remark: +ve = Gram positive bacteria

\+ = Positive reaction

\- = Negative reaction

ผลการตรวจวิเคราะห์ในระบบเอพีไอ จากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย 196 ถ. พหลโยธิน เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ 2 การเตรียมคอลลอยดัลไคทิน (Colloidal chitin)

ทำตามวิธีของ Shimahara และ Takiguchi (1988)

นำไคทินจากเปลือกปูที่ผ่านการคัดขนาดที่ 42-mesh จำนวน 20 กรัม ค่อยๆ เติมลงในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ปริมาตร 800 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 5 องศาเซลเซียส พร้อมกับกวนอย่างแรงด้วยเครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก เมื่อผสมไคทินเป็นเนื้อเดียวกันแล้ว ค่อยๆ เพิ่มอุณหภูมิของสารผสมเป็น 37-40 องศาเซลเซียส พร้อมกับปรับเครื่องกวนแท่งแม่เหล็กให้มีความเร็วปานกลาง จะสังเกตเห็นว่าความหนืดของสารผสมจะเพิ่มขึ้น จากนั้นประมาณ 2-3 นาที ความหนืดจะเริ่มลดลงและใสขึ้น ทำการกรองสารผสมที่ได้ด้วยใยแก้ว (glass wool) เพื่อกำจัดเศษไคทินที่ไม่ถูกไฮโดรไลซ์ออกไป ผ่านส่วนที่กรองได้ลงในน้ำที่กำจัดไอออนแล้ว (deionized water) ปริมาตร 8 ลิตร ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 5 องศาเซลเซียส พร้อมกับกวนด้วยความเร็วปานกลาง ภายในเวลาประมาณ 10-15 นาที สารจะขุ่นขึ้นเนื่องจากไคทินเกิดการตกตะกอนอีกครั้ง หยุดกวนหลังจาก 30 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นจึงใช้วิธีกาลักน้ำค่อยๆ ดูดส่วนใสข้างบนทิ้งไป ล้างตะกอนที่ได้ด้วยน้ำที่กำจัดไอออนแล้ว โดยปั่นล้างที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที หลายๆ ครั้งจนกระทั่ง pH เข้าใกล้ 7 มากที่สุด จากนั้นนำตะกอนทั้งหมดมากระจาย (resuspend) ในน้ำที่กำจัดไอออนแล้วปริมาตร 400 มิลลิลิตร โดยการกวนด้วยความเร็วปานกลางอีกครั้ง เมื่อตะกอนกระจายทั่วแล้วดูดคอลลอยดัลไคทินออกมาปริมาตร 1-2 มิลลิลิตร ใส่ในถ้วยฟอยล์เพื่อหาน้ำหนักแห้ง (ผลผลิตที่ได้ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์) เก็บคอลลอยดัลไคทินที่เหลือในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บไว้ได้นานอย่างน้อย 6 เดือน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ 3 การเตรียมรีเจนเนอเรทเทดไคทิน (Regenerated chitin)

ดัดแปลงเล็กน้อยจากวิธีของ Hirano และคณะ (1976)

ค่อยๆ เติมกรดอะซิติก 10 เปอร์เซ็นต์ (V/V) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในไคโตแซน จำนวน 1 กรัม พร้อมกับบดด้วยโกร่ง เมื่อส่วนผสมเป็นเนื้อเดียวกันแล้วปิดโกร่งด้วย พาราฟิมล์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อให้การละลายของพอลิเมอร์เป็น ไปอย่างสมบูรณ์ จากนั้นเติมเมธานอลปริมาตร 90 มิลลิลิตร ลงไปช้าๆ พร้อมกับผสมให้เข้า กัน นำสารละลายข้นที่ได้มากรองด้วยใยแก้ว เก็บสารละลายที่กรองได้ในบีกเกอร์ จากนั้น เติมอะซิติกแอนไฮไดรด์ (acetic anhydride) 1.5 มิลลิลิตร ลงไปพร้อมกับกวนด้วยเครื่อง กวนแท่งแม่เหล็ก ประมาณ 2-3 นาที ส่วนผสมจะเกิดเป็นเจลแข็งทำให้แท่งแม่เหล็กหยุด หมุน ตั้งเจลทิ้งไว้ต่อไปอีกประมาณ 30 นาที จากนั้นจึงตัดเจลออกเป็นชิ้นเล็กๆ ด้วย spatula ทิ้งของเหลวที่ไหลออกจากชิ้นเจลให้หมด นำชิ้นเจลใส่ลงในโกร่ง เติมเมธานอลให้ ท่วมเจลแล้วบดด้วยโกร่งให้ละเอียด จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นโดยใช้ suction จนได้ pH เข้า ใกล้ 7 มากที่สุด นำเจลละเอียดมากระจายในน้ำกลั่นปริมาตรจำนวนหนึ่ง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ 4 การเตรียมไกลคอลไคทิน (Glycol chitin)

ทำตามวิธีของ Trudel และ Asselin (1988)

เติมไกลคอลไคโตแซน 5 กรัม ลงในกรดอะซิติก 10 เปอร์เซ็นต์ (V/V) บดด้วยโกร่งจนได้สารละลายหนืด ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ค่อยๆ เติมเมธานอลปริมาตร 45 มิลลิลิตร ลงในสารละลายอย่างช้าๆ พร้อมกับกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 โดยใช้ suction เก็บสารละลายที่กรองได้ในบีกเกอร์ เติมอะซิติกแอนไฮไดรด์ (acetic anhydride) ปริมาตร 7.5 มิลลิลิตร ลงไปพร้อมกับกวนให้เข้ากัน ตั้งเจลที่ได้ไว้ประมาณ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นตัดเจลออกเป็นชิ้นเล็กๆ ทิ้งของเหลวที่ไหลออกมาจากชิ้นเจลออกให้หมด นำชิ้นเจลใส่ลงใน waring blender เติมเมธานอลลงไปให้ท่วมเจลแล้วปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำ suspension ที่ได้ไปปั่นที่ความเร็ว 27,000 g เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำตะกอนที่ได้ที่มีลักษณะเป็นเจลมา resuspend ในเมธานอลปริมาตร 1 ปริมาตร ทำให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วนำไปปั่นเหมือนกับขั้นตอนที่แล้ว จากนั้นจึงนำตะกอนที่ได้จากการปั่นมา resuspend ในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ซึ่งมีโซเดียมเอไซด์ (NaN_3) อยู่ 0.02 เปอร์เซ็นต์ (W/V) ทำให้เป็นเนื้อเดียวกันจะได้สารละลายไกลคอลไคทินที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์ (W/V)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ 5 การเตรียมสารละลาย

1.สารละลายสำหรับหาแอคติวิตีของเอนไซม์ในสารละลาย

1.1 **สารละลายบัฟเฟอร์ McIlvaine 0.1 โมลาร์ pH 3.0**

ละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) 0.58 กรัม และกรดซิตริกโมโนไฮเดรท ($C_6H_8O_7.H_2O$) 1.67 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

1.2 **สารละลายบัฟเฟอร์ McIlvaine 0.1 โมลาร์ pH 4.0**

ละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) 1.09 กรัม และกรดซิตริกโมโนไฮเดรท ($C_6H_8O_7.H_2O$) 1.29 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

1.3 **สารละลายบัฟเฟอร์ McIlvaine 0.1 โมลาร์ pH 5.0**

ละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) 1.46 กรัม และกรดซิตริกโมโนไฮเดรท ($C_6H_8O_7.H_2O$) 1.02 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

1.4 **สารละลายโซเดียม-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 6.0**

ละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) 0.19 กรัม และ โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรท (NaH_2PO_4) 1.36 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

1.5 **สารละลายโซเดียม-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7.0**

ละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) 0.85 กรัม และ โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรท (NaH_2PO_4) 0.62 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

1.6 **สารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 8.0 และ pH 9.0**

ละลายทริส (ไฮดรอกซีเมทธิล)-อะมิโนมีเธน 1.21 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เป็น 8.0 และ 9.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 4 โมลาร์ เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

1.7 **สารละลายไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 10.0**

ละลายไกลซีน 0.19 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เป็น 10.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

1.8 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 11 และ pH 12

ละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) 0.36 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เป็น 11 และ 12 ด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

1.9 สารละลายเอ็น-อะซีทิลกลูโคซามีนมาตรฐาน

ละลายเอ็นอะซีทิลกลูโคซามีน 1 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร

1.10 สารละลายโพแทสเซียมเฟอริกไซยาไนด์

ละลายโพแทสเซียมเฟอริกไซยาไนด์ ($K_3Fe(CN)_6$) 5 กรัม ในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 1 ลิตร เก็บในขวดสีชา

1.11 สารละลาย p-nitrophenol มาตรฐาน

ละลาย p-nitrophenol 0.005 มิลลิกรัม ในสารละลายบัฟเฟอร์ McIlvaine 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

2. สารละลายสำหรับหาปริมาณโปรตีน

2.1 Bradford stock solution

ละลาย Serva Blue G 350 มิลลิกรัม ในกรดฟอสฟอริก 85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร และ เอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บได้นานที่อุณหภูมิห้อง

2.2 Bradford working solution

ผสม Bradford stock solution ปริมาตร 30 มิลลิลิตร กรดฟอสฟอริก 85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 15 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร กรองสารละลายผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 เก็บในขวดสีชา เก็บได้หลายสัปดาห์ในที่เย็น

2.3 สารละลาย BSA มาตรฐาน

ละลาย BSA 1 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร

3. สารละลายสำหรับการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยรีเจนเนอเรทเทดไคทิน

3.1 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 20 โมลาร์ pH 7.4

ละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรท ($Na_2HPO_4.2H_2O$) 2.28 กรัม และโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรท ($NaH_2PO_4.2H_2O$) 0.65 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตร 1 ลิตร

3.2 สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 5.5

ละลายโซเดียมอะซิเตทไตรไฮเดรท ($CH_3COONa.3H_2O$) 2.72 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับ pH ของสารละลายด้วยกรดอะซิติก 20 มิลลิโมลาร์ จนได้ pH 5.4 แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร

3.3 กรดอะซิติก 20 มิลลิโมลาร์

เติมกรดอะซิติก (CH_3COOH) เข้มข้น ปริมาตร 1.14 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น ปริมาตร 998.86 มิลลิลิตร

4.สารละลายสำหรับการทำดิสค์-พอรีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซีส (Disc- Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

4.1 สารละลายทริส-ไกลซีนอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ pH 8.3 (Tris-glycine electrode buffer)

ละลายทริส (ไฮดรอกซีเมทธิล)-อะมิโนมีเธน 3 กรัม และไกลซีน 14.14 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เป็น 8.3 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร

4.2 สารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.8 (Tris-chloride buffer stock solution, pH 8.8)

ละลายทริส(ไฮดรอกซีเมทธิล)-อะมิโนมีเธน 18.2 กรัม ในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 8.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

4.3 สารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 6.8 (Tris-chloride buffer stock solution, pH 6.8)

ละลายทริส(ไฮดรอกซีเมทธิล)-อะมิโนมีเธน 6 กรัม ในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 6.8 ด้วยกรดไฮโรคลอลิก 1 โมลาร์ เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

4.4 สารละลายอะคริลาไมด์ (Acrylamide stock solution)

ละลายอะคริลาไมด์ 30 กรัม และบิส-อะคริลาไมด์ 0.8 กรัม ในน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร กรองสารละลายผ่านกระดาษกรอง แล้วเก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.5 สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต

ละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

4.6 สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับตัวอย่าง (Sample buffer)

ละลายโบรโมฟีนอลบลู 10 มิลลิกรัม และซูโครส 15 กรัม ในสารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 6.7 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

4.7 น้ำยาย้อมสีโปรตีน (Staining solution)

ละลาย Coomassie brilliant blue R-250 1 กรัม ในเอธานอล 450 มิลลิลิตร เติมกรดอะซิติกเข้มข้น 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร

4.8 น้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน (Destaining solution)

ผสมเมธานอล 100 มิลลิลิตร และกรดอะซิติกเข้มข้น 100 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเป็น 1 ลิตร

5.สารละลายสำหรับการทำเอสดีเอส-พอลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิส (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

5.1 สารละลายทริส-เอสดีเอสอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ pH 8.3 (Tris-SDS electrode buffer, pH 8.3)

เตรียมเหมือนข้อ 3.4.1 แต่ให้เติม SDS 0.1 เปอร์เซ็นต์ (W/V)

5.2 **สารละลายทริส-เอสดีเอสบัฟเฟอร์** pH 8.8 (Tris-SDS buffer stock solution, pH 8.8)

เตรียมเหมือนข้อ 3.4.1 แต่ให้เติม SDS 0.4 เปอร์เซ็นต์ (W/V)

5.3 **สารละลายทริส-เอสดีเอสบัฟเฟอร์** pH 6.8 (Tris-SDS buffer stock solution, pH 6.8)

เตรียมเหมือนข้อ 3.4.3 แต่ให้เติม SDS 0.4 เปอร์เซ็นต์ (W/V)

5.4 **สารละลายอะคริลาไมด์** (Acrylamide stock solution)

เตรียมเหมือนข้อ 3.4.4

5.5 **สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต**

เตรียมเหมือนข้อ 3.4.5

5.6 **สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับสารตัวอย่าง** (Sample buffer)

ละลายโบรโมฟีนอลบลู 10 มิลลิกรัม ซูโครส 15 กรัม SDS 2.5 กรัมและ 2–mercaptoethanol 2 มิลลิลิตร ในสารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 6.7 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

5.7 **น้ำยาย้อมสีโปรตีน** (Staining solution)

เตรียมเหมือนข้อ 3.4.7

5.8 **น้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน** (Destaining solution)

เตรียมเหมือนข้อ 3.4.8

6.สารละลายสำหรับติดตามแอคติวิตีของเอนไซม์ในแผ่นพอลีอะคริลาไมด์เจล

6.1 **สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์** pH 5.0

ละลายโซเดียมอะซิเตทไตรไฮเดรท (CH3COONa.3H2O) 9.53 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับpH ของสารละลายด้วยกรดอะซิติก 0.1 โมลาร์ จนได้ pH 5.0 แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 ลิตร

6.2 **สารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ 0.5 โมลาร์** pH 8.9

ละลายทริส(ไฮดรอกซีเมทธิล)-อะมิโนมีเธน 30.29 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 8.9 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 4 โมลาร์ เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

6.3 **สารละลายฟลูออเรสเซนซ์ 0.01 เปอร์เซ็นต์** (Fluorescence brightener 28 solution)

ละลาย Fluorescence brightener 28 5 มิลลิกรัม ในสารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ 0.5 โมลาร์ pH 8.9 (ข้อ 6.2) ปริมาตร 50 ลิตร

7.สารละลายสำหรับติดตามแอคติวิตีของเอนไซม์ในแผ่นเอสดีเอส-พอลีอะคริลาไมด์เจล

7.1 สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 5.0

ทำเหมือนข้อ 6.1

7.2 สารละลาย Triton X-100 1.0 เปอร์เซ็นต์

เติม Triton X-100 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 5.0 (ข้อ 7.1) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

7.3 สารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ 0.5 โมลาร์ pH 8.9

ทำเหมือนข้อ 6.2

7.4 สารละลายฟลูออเรสเซนซ์ 0.01 เปอร์เซ็นต์

ทำเหมือนข้อ 6.3

8. สารละลายสำหรับตรวจสอบไกลโคโปรตีนด้วยการย้อม Periodic acid–Schiff (PAS) reagent

8.1 สารละลายฟิกเซทิฟ (Fixative solution)

สารละลายฟิกเซทิฟประกอบด้วย เอทธานอล 200 มิลลิลิตร และกรดอะซิติกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 500 มิลลิลิตร

8.2 **สารละลายกรดเปอร์ริโอดิก 0.7 เปอร์เซ็นต์** (Periodic acid solution)

ละลายกรดเปอร์ริโอดิก 1.4 กรัม ในกรดอะซิติกเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

8.3 สารละลายโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ (Sodium metabisulfite solution)

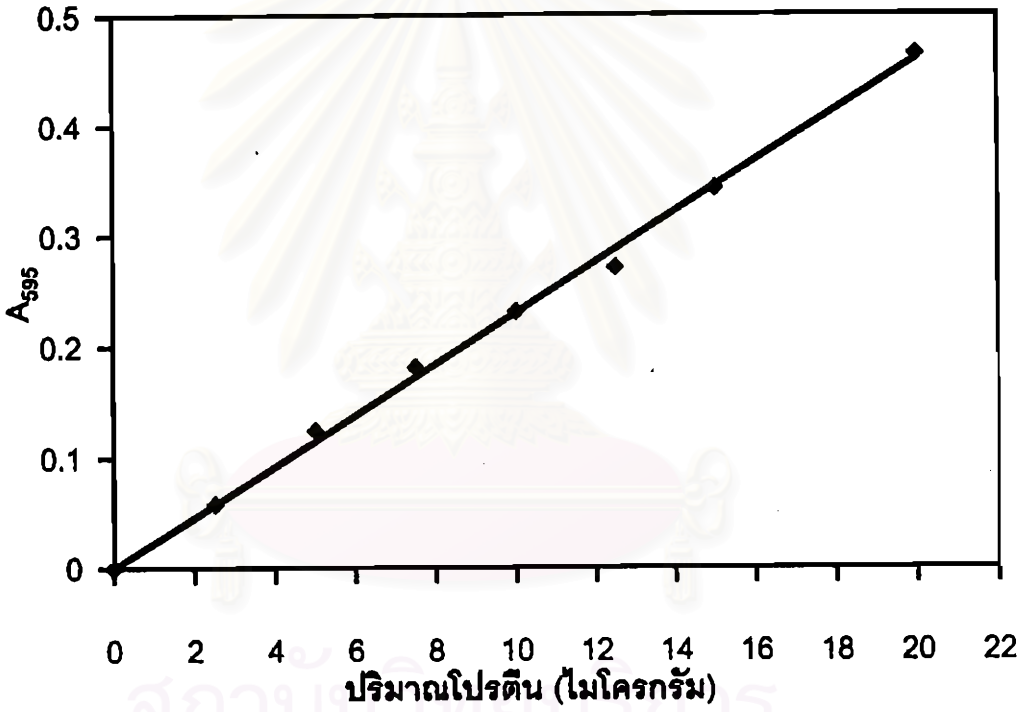
ละลายโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ 0.4 กรัม ลงในกรดอะซิติกเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

8.4 Schiff's reagent (Andrews,1981)

ละลาย basic fuchsin 2 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 400 มิลลิลิตร พร้อมทั้งอุ่น จากนั้นทำให้เย็นและกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เติมกรดไฮโดรคลอริก 2 นอร์มอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร กับโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ 4 กรัม ลงไป ผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เติม activated charcoal 1 กรัม ลงไป พร้อมทั้งคน จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2 นอร์มอล ลงไปจนกระทั่งเมื่อทดสอบด้วยการหยดสารละลายนี้ลงบนแผ่นสไลด์แล้วทำให้แห้งสารจะไม่เปลี่ยนเป็นสีแดง เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ควรทิ้งเมื่อสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู

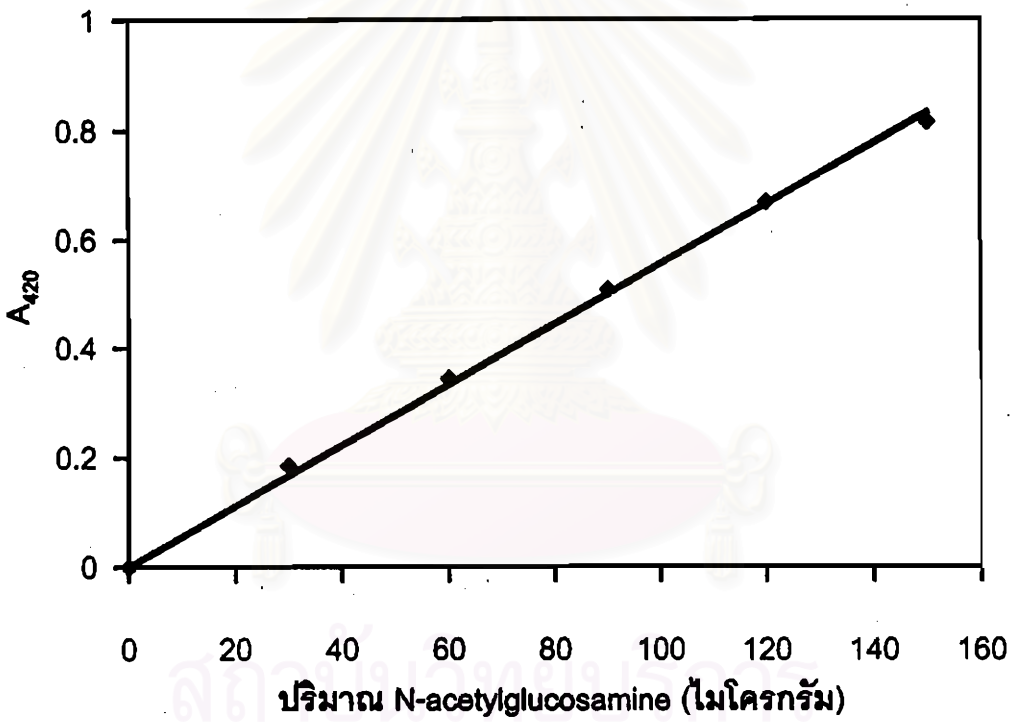
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ 6 กราฟมาตรฐานสำหรับการหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี micromethod ของ Bradford ใช้ความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน Bovine Serum Albumin (BSA) ปริมาณ 0 - 20 ไมโครกรัม วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (วิธีข้อ 3.3)

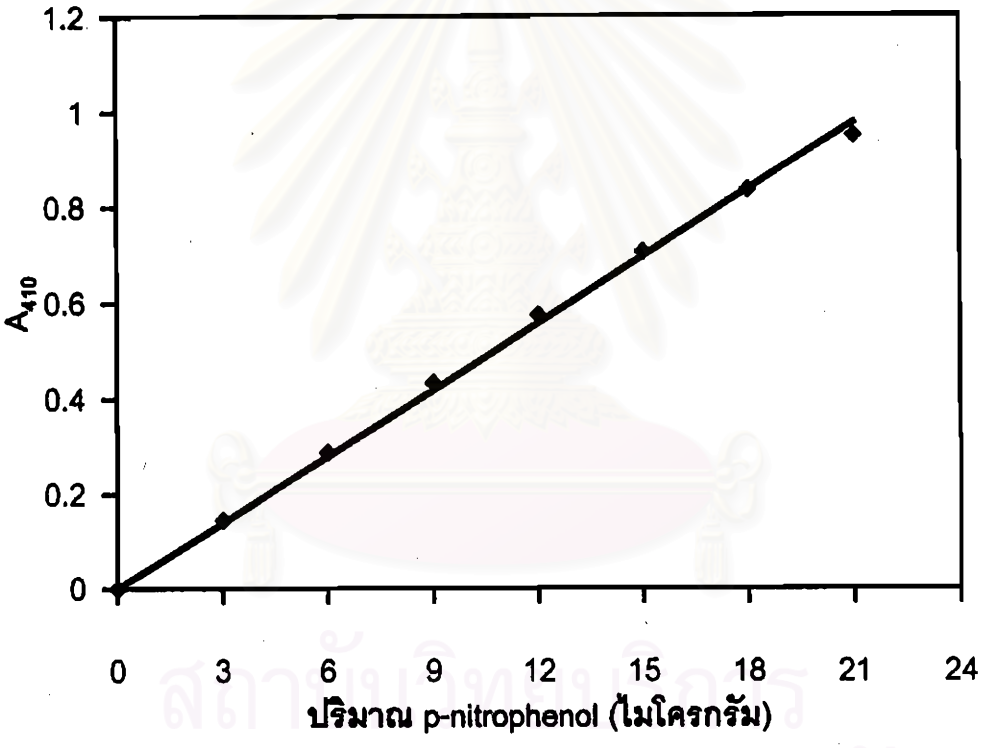


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

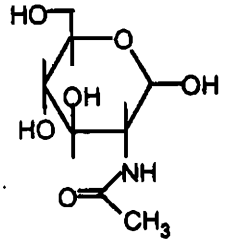
ภาคผนวกที่ 7 กราฟมาตรฐานสำหรับการหาปริมาณ reducing sugars โดยวิธีของ Imoto และ Yagishita ซึ่งดัดแปลงเล็กน้อยจาก Schales ใช้ความเข้มข้นของ N-acetylglucosamine (NAG) ปริมาณ 0 -150 ไมโครกรัม วัดค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร (วิธีข้อ 3.2)



ภาคผนวกที่ 8 กราฟมาตรฐานสำหรับการหาปริมาณ p-nitrophenol ซึ่งได้ดัดแปลงเล็กน้อยจากวิธีของ Roberts และ Selitrennikoff ใช้ความเข้มข้นของ p-nitrophenol ปริมาณ 0-21 ไมโครกรัม วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร (วิธีข้อ 3.6.6)

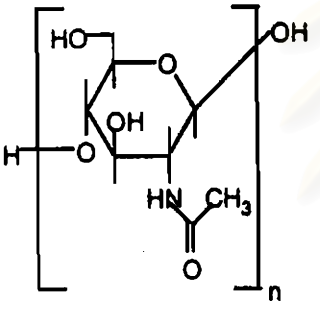


ภาคผนวกที่ 9 สูตรโครงสร้างของสารประกอบชนิดต่างๆ



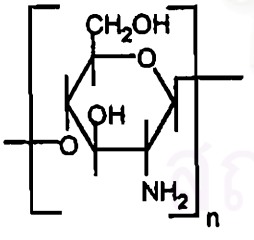
N-acetyl-D-glucosamine (D-GlcNAc)

$C_8H_{15}NO_6$ MW 221.21



chitin [poly (N-acetyl-1,4-β-D-glucopyranosamine)]

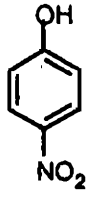
$(C_8H_{13}NO_5)_n$ MW~400,000



chitosan [2-amino-2-deoxy-(1-4)-β-D-glucopyranan]

or [poly (1,4-β-D-glucopyranosamine)]

MW~150,000-600,000

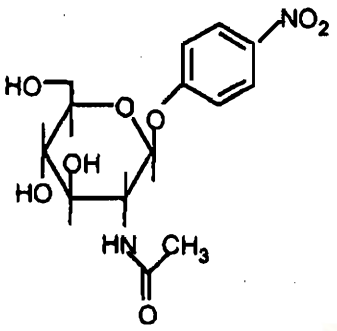


4-nitrophenol

$C_6H_5NO_3$ MW~139.11

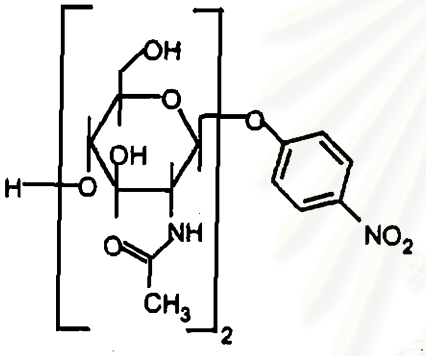
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(ต่อ)



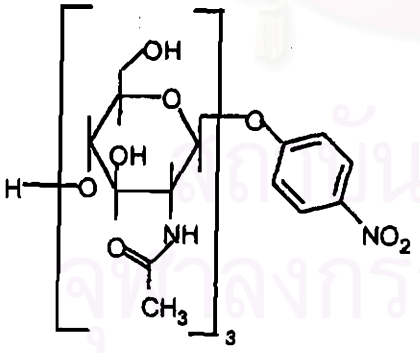
4-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide

$C_{14}H_{18}N_2O_8$ MW~342.30



4-nitrophenyl-N,N'-diacetyl-β-D-chitobioside

$C_{22}H_3N_3O_{13}$ MW~545.50



4-nitrophenyl-N,N',N''-triacetyl-β-D-chitotrioside

$C_{30}H_{44}N_4O_{18}$ MW~748.7

ประวัติผู้เขียน

นางสาว มณีรัตน์ มีพลอย เกิดวันที่ 13 มิถุนายน พ.ศ. 2517 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (สาขาเทคโนโลยีการเกษตร) จากมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ เมื่อปี พ.ศ. 2538

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย