การผลิตไคตินดีอะเซทิเลสจากยีสต์และการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

นางสาว มนทรา จองจินดาสกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2543

ISBN 974-346-495-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I20616200

PRODUCTION AND PARTIAL PURIFICATION OF YEAST CHITIN DEACETYLASE

Miss Montra Jongjindasakun

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2000

ISBN 974-346-495-6

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตไคตินดีอะเซทิเลสจากยีสต์และการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน
โดย	นางสาว มนทรา จองจินดาสกุล
ภาควิชา	จุลชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. สุมาลี พิชญางกูร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย โพธิ์พิจิตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุมาลี พิชญางกูร)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์. สุวลี จันทร์กระจ่าง)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

นางสาว มนทรา จองจินดาสกุล : การผลิตไคตินดีอะเซทิเลสจากยีสต์และการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน (PRODUCTION AND PARTIAL PURIFICATION OF YEAST CHITIN DEACETYLASE) อ.ที่ปรึกษา รศ.ดร. สุมาลี พิชญางกูร 108 หน้า.
ISBN 974-346-495-6

ผลการคัดเลือกยีสต์ 54 สายพันธุ์ จากตัวอย่างผลไม้ และดิน พบยีสต์ 8 สายพันธุ์ ที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ไคตินดีอะเซทิเลส ยีสต์ 2 สายพันธุ์ คือ *Candida krusei* MS_1 และ *Rhodotorular rubra* MS_8 สามารถผลิตไคตินดีอะเซทิเลสสูง เมื่อเลี้ยง *C. krusei* MS_1ในอาหารเหลวที่มีกลูโคส 1 %น้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน, 1%น้ำหนักต่อปริมาตร แบคโตเปปโตน เป็นแหล่งไนโตรเจน และ 0.2% น้ำหนักต่อปริมาตร สารสกัดจากยีสต์ เป็นแหล่งวิตามินรวม โดยอาหารมีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 เลี้ยงที่ภาวะที่เหมาะสม คือ ที่อุณหภูมิห้อง (30±2°ซ) ด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชม. ส่วนยีสต์ *R. rubra* MS_8 เลี้ยงในอาหารเหลวที่มีองค์ประกอบเดียวกับที่เลี้ยงยีสต์ *C. krusei* MS_1 และเติม 0.05 %น้ำหนักต่อปริมาตร KCl เพื่อเป็นแหล่งเกลือแร่ เลี้ยงที่ภาวะเหมาะสม คือ อาหารมีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น เท่ากับ 4.5 บ่มที่อุณหภูมิ 25 °ซ ด้วยอัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชม. จากการเลี้ยงยีสต์ในอาหารที่มีองค์ประกอบและภาวะดังกล่าว พบว่า *C. krusei* MS_1 ผลิตเอนไซม์ได้เท่ากับ 0.4478 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร และ *R. rubra* MS_8 สามารถผลิตเอนไซม์ได้ 0.4755 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร

ทำการสกัดเอนไซม์ไคตินดีอะเซทิเลสที่ขับออกนอกเซลล์จากน้ำเลี้ยงยีสต์ *R. rubra* MS_8 ให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยการตกตะกอนด้วย แอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ความเข้มข้น 50 - 90 % แล้วผ่านคอลัมน์ ดีอีเออี-เซลลูโลส โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนอิออน และคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-75 จากผลการทดลองพบว่า เอนไซม์มีความบริสุทธิ์ขึ้น 43.21 เท่า และได้ปริมาณเอนไซม์ 1.36 % จากเอนไซม์เริ่มต้น จากการศึกษาสมบัติของเอนไซม์พบว่า ภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ ที่อุณหภูมิ 40 °ซ ความเป็นกรดด่างในช่วง 4.5 – 5.0 และเอนไซม์มีความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างในช่วง 4.0 – 8.5 และเสถียรต่ออุณหภูมิในช่วง 30 - 70 °ซ เอนไซม์ที่สกัดได้นี้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 15,500 ดาลตัน โดยวิธีเจลฟิลเตรชั่น และ 19,000 ดาลตัน โดยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์ เจลอิเล็กโตรโฟริซิส

ภาควิชา จุลชีววิทยา
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา 2543

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

MONTRA JONGJINDASAKUN : PRODUCTION AND PARTIAL PURIFICATION OF YEAST CHITIN DEACETYLASE.

THESIS ADVISOR : ASSO.PROF. SUMALEE PICHYANGKURA , Ph.D. 108 pp.

ISBN 974-346-495-6

A total of 54 yeast strains were isolated from various fruits and soil samples. Among them , 8 strains were found to show chitin deacetylase activity. Two strains of yeasts , *Candida krusei* MS_1 and *Rhodotorular rubra* MS_8 produced higher chitin deacetylase among the eight strains. Suitable liquid medium composition for cultivation of *C. krusei* MS_1 composed of 1%(w/v) glucose as a carbon source, 1%(w/v) bactopeptone as a nitrogen source, 0.2%(w/v) yeast extract as a vitamin source at a pH of 6.0. The optimum conditions were room temperature (30±2°C) and rotation of 200 rpm for 48 hours. On the other hand *R. rubra* MS_8 was cultivated in the same medium as *C. krusei* MS_1 but with 0.05% w/v KCl and at a pH of 4.5. The optimum conditions for *R. rubra* MS_8 were 25 °C and rotation of 150 rpm for 48 hours. Under such condition *C. krusei* MS_1 produced 0.4478 mU/ml chitin deacetylase and *R. rubra* MS_8 produced 0.4755 mU/ml chitin deacetylase .

Chitin deacetylase, an extracellular enzyme was obtained from the culture broth of *R. rubra* MS_8 purified by precipitation with 50 - 90 % saturation of ammonium sulfate and the separated protein was passed through DEAE-Cellulose and Sephadex G - 75 gel filtration. It was found that the enzyme was purified to 43.21 folds of purity with 1.36% recovery from that of the crude enzyme. The purified enzyme had optimal pH in the range of 4.5 – 5.0 and optimal temperature of 40 °C. The enzyme was stable to temperature up to 70 °C and to pH in the range of 4.0 to 8.5. The molecular weight of the enzyme was estimated to be 15,500 Da by gel filtration and 19,000 Da by SDS-PAGE.

Department Microbiology
Field of study Industrial Microbiology
Academic year 2000

Student's signature Montra Jongjindasakun
Advisor's signature Sumalee Pichyangkura
Co-advisor's signature .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลือ และความกรุณาอย่างยิ่งของท่าน รองศาสตราจารย์ ดร. สุมาลี พิชญางกูร อาจารย์ที่ปรึกษา ซึ่งท่านได้ให้คำแนะนำ กำลังใจ และข้อคิดเห็นต่าง ๆ ตลอดจนได้กรุณาช่วยปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์. สุวลี จันทร์กระจ่าง และ อาจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการ และกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา และขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ และ น้องๆ ที่มีส่วนในการช่วยเหลือให้การวิจัยดำเนินไปด้วยดี และให้กำลังใจตลอดมา

ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนบางส่วนในการทำวิจัยนี้ ตลอดจนเจ้าหน้าที่บัณฑิตวิทยาลัยทุกท่านที่ได้ให้ความสะดวกต่างๆ

ขอขอบคุณ ชมรมไคติน-ไคโตซาน ที่ให้สาระความรู้ ตลอดจนข้อมูลสำคัญที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งในงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยเทคโนโลยีแห่งเอเชีย (AIT) ที่กรุณาเอื้อเฟื้อไคโตซานเพื่อนำมาใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ ตลอดจน คุณไว ประทุมผาย และ คุณกาซี ซาร์วาร์ ฮาซาน ที่ได้ให้ความรู้ ข้อมูลที่มีประโยชน์ในการทำวิจัยนี้ รวมทั้งกำลังใจ และ ความช่วยเหลือ

ท้ายสุดผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ซึ่งท่านได้ให้ความรัก การดูแลเอาใจใส่ และสนับสนุนทุกด้านจนสำเร็จการศึกษา รวมทั้งญาติ และ พี่น้องที่ข้าพเจ้ารัก ที่ได้ให้กำลังใจตลอดมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ
กิตติกรรมประกาศ..... ฉ
สารบัญ..... ช
สารบัญตาราง..... ฯ
สารบัญรูป..... ฌ
คำย่อ..... ฑ
บทที่
1. บทนำ..... 1
2. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีการทดลอง..... 16
3. ผลการทดลอง และอภิปรายผล..... 30
4. สรุปผลการทดลอง..... 77
รายการอ้างอิง..... 80
ภาคผนวก..... 84
ภาคผนวก ก..... 85
ภาคผนวก ข..... 88
ภาคผนวก ค..... 93
ภาคผนวก ง..... 96
ภาคผนวก จ..... 97
ภาคผนวก ฉ..... 98
ภาคผนวก ช.....107
ประวัติผู้เขียน.....108

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. ตารางแสดงการศึกษาสมบัติของไคตินดีอะเซทิเลสจากจุลินทรีย์..... 14
2. เปรียบเทียบผลของการทดสอบแบบรวดเร็ว (rapid test) ตามวิธีของ Prakasam และ Azariah (1975)..... 32
3. แหล่งของไคตินดีอะเซทิเลสในยีสต์ 8 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลววายพีจี ทดสอบโดยวิธีเทียบสีที่เกิดจากปฏิกิริยาของ Ride และ Drysdale (1972)..... 36
4. ผลการศึกษาการจำแนกยีสต์ทางสัณฐานวิทยา..... 37
5. ผลการศึกษาการหมักและการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ..... 40
6. เปรียบเทียบแอคติวิตี เมื่อเติม 0.05 เปอร์เซ็นต์ $MgSO_4$ และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ KCl ลงในอาหารเลี้ยงยีสต์ *R. rubra* MS_8..... 56
7. สรุปขั้นตอนต่างๆ ในการแยกไคตินดีอะเซทิเลสจากยีสต์ *R. rubra* MS_8 ให้บริสุทธิ์..... 63

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1. โครงสร้างทางเคมีของไคติน ไคโตซาน และ เซลลูโลส..... 2
2. แสดงการย่อยสลายของไคตินและไคโตซานด้วยเอนไซม์..... 4
3. แสดงการสังเคราะห์ไคติน และไคโตซานในสิ่งมีชีวิต 6
4. สีที่เกิดจากปฏิกิริยาการทดสอบแบบรวดเร็ว (rapid test)..... 31
5. แสดงลักษณะยีสต์ที่คัดเลือกได้ 8 สายพันธุ์ เจริญบนอาหารวุ้นเอียงวายเอ็ม..... 33
6. สีปฏิกิริยาของการตรวจสอบเอนไซม์โดยวิธีการเทียบสี (colorimetric method) ของ Ride และ Drysdale (1972)..... 35
7. แสดงลักษณะของยีสต์ MS_1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์..... 38
8. แสดงลักษณะการเจริญแบบฝ้าของยีสต์ MS_1 บนผิวของอาหารเหลววายเอ็ม..... 38
9. แสดงลักษณะของยีสต์ MS_8 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์..... 39
10. แสดงสีของรงควัตถุสีส้มของยีสต์ MS_8 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลววายเอ็ม..... 39
11. แอคติวิตีของไคตินดีอะเซทิเลส และน้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ *C. krusei* MS_1 เมื่อแปรผันความเข้มข้นกลูโคส ในช่วง 0.5-8.0 เปอร์เซ็นต์ของอาหารเหลว บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30±2องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 42
12. แอคติวิตีของไคตินดีอะเซทิเลส และน้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ *R. rubra* MS_8 เมื่อแปรผันความเข้มข้นกลูโคส ในช่วง 0.5-8.0 เปอร์เซ็นต์ของอาหารเหลว บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30±2องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 43
13. แอคติวิตีของไคตินดีอะเซทิเลส และน้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ *R. rubra* MS_8 เมื่อแปรผันความเข้มข้นราฟฟิโนส ในช่วง 0.5-8.0 เปอร์เซ็นต์ของอาหารเหลว บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30±2องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 44

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

14. เปรียบเทียบชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลิตไคติน-ดีอะเซทิเลสของยีสต์ *C. krusei* MS_1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีแหล่งไนโตเจนแต่ละชนิดความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์เท่ากัน บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30±2องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง.....46

15. เปรียบเทียบชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลิตไคติน-ดีอะเซทิเลสของยีสต์ *R. rubra* MS_8 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีแหล่งไนโตเจนแต่ละชนิดความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์เท่ากัน บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30±2องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง.....47

16. ผลการแปรผันความเข้มข้นของแบคโตเปปโตน และแอมโมเนียมไนเตรทในช่วง 0.5-3.0 เปอร์เซ็นต์ ต่อการเจริญและการผลิตไคตินดีอะเซทิเลสของยีสต์ *C. krusei* MS_1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30±2องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 49

17. ผลการแปรผันความเข้มข้นของแบคโตเปปโตน ในช่วง 0.5-3.0 เปอร์เซ็นต์ตอการเจริญและการผลิตไคตินดีอะเซทิเลสของยีสต์ *R. rubra* MS_8 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30±2องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 50

18. แอคติวิตีของไคตินดีอะเซทิเลส และน้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ *C. krusei* MS_1 และ *R.rubra* MS_8 เมื่อแปรผันความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ ในช่วง 0.1-0.5 เปอร์เซ็นต์ของอาหารเหลว บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30±2องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 52

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

19. เปรียบเทียบชนิดและความเข้มข้นของเกลือแร่ที่เติมลงในอาหารสูตรปรับปรุงที่มีผลต่อการผลิตไคตินดีอะเซทิเลสของยีสต์ *C. krusei* MS_1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30±2องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 54

20. เปรียบเทียบชนิดและความเข้มข้นของเกลือแร่ที่เติมลงในอาหารสูตรปรับปรุงที่มีผลต่อการผลิตไคตินดีอะเซทิเลสของยีสต์ *R. rubra* MS_8 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30±2องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 55

21. ผลของความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ต่อการผลิตไคตินดีอะเซทิเลสของยีสต์ *C. krusei* MS_1 และ *R. rubra* MS_8 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นในช่วง 4.5-7.5 บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30±2องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 57

22. ผลของอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงยีสต์ ต่อการเจริญและการผลิตไคตินดีอะเซทิเลสของยีสต์ *C. krusei* MS_1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ปรับปรุงสูตรแล้ว บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 , อุณหภูมิห้อง (30±2องศาเซลเซียส) , 35 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 58

23. ผลของอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงยีสต์ ต่อการเจริญและการผลิตไคติน-ดีอะเซทิเลสของยีสต์ *R. rubra* MS_8 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ปรับปรุงสูตรแล้ว บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 , อุณหภูมิห้อง (30±2องศาเซลเซียส) , 35 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 59

24. ผลของความเร็วรอบของเครื่องเขย่า ต่อการผลิตไคตินดีอะเซทิเลสของยีสต์ *C. krusei* MS_1 และ *R. rubra* MS_8 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ปรับปรุงสูตรแล้ว บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 50 , 100 , 150 และ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30±2องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 60

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

25. โครมาโตกราฟีของไคตินดีอะเซทิเลสจากยีสต์ *R. rubra* MS_8 บนคอลัมน์ดีอีเออี-เซลลูโลส ขนาด 1.5 x 30 เซนติเมตร ชะคอลัมน์ด้วย 0.05 โมลาร์อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 ที่อัตราการไหล 15 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง แล้วทำเกรเดียนท์โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-1 โมลาร์..... 64
26. โครมาโตกราฟีของไคตินดีอะเซทิเลสจากยีสต์ *R. rubra* MS_8 ในคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-75 ขนาด 1 x 50 เซนติเมตร ชะคอลัมน์ด้วย 0.05 โมลาร์อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 ที่อัตราการไหล 9 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง..... 66
27. ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ด้วยพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟริซิส..... 67
28. โครมาโตกราฟีของโปรตีนมาตรฐาน บนคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ จี-75 ขนาด 1 x 50 เซนติเมตร เก็บสารละลายโปรตีนหลอดละ 0.5 มิลลิลิลิตร ที่อัตราการไหล 9 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง..... 69
29. การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไคตินดีอะเซทิเลส โดยการทำเจลฟิลเตรชั่นผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-75..... 68
30. เปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลของไคตินดีอะเซทิเลสกับโปรตีนมาตรฐานโดยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต พอลิอะคริลาไมด์เจล อิเล็กโตรโฟริซิสชนิดแผ่น.....70
31. การหาน้ำหนักโมเลกุลไคตินดีอะเซทิเลส โดยการทำอิเล็กโตรโฟริซิส บนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต พอลิอะคริลาไมด์เจล..... 71
32. ผลของความเป็นกรดด่างต่อการทำงานของไคตินดีอะเซทิเลส เมื่อตรวจสอบแอคติวิตีในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ที่ค่าความเป็นกรดด่างต่างกัน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส..... 73
33. ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของไคตินดีอะเซทิเลส เมื่อตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ช่วงอุณหภูมิ 30-80 องศาเซลเซียส..... 74

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

34. ความเสถียรของไคตินดีอะเซทิเลส ต่อความเป็นกรดด่าง โดยบ่มเอนไซม์ที่ความเป็นกรดด่าง 4-10 ในบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์..... 75

35. ความเสถียรของไคตินดีอะเซทิเลส ต่ออุณหภูมิ โดยนำสารละลายเอนไซม์ใน 0.05 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.0 ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 30-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วตรวจหาแอคติวิตี..... 76

คำย่อ

°ซ	=	องศาเซลเซียส
ซม.	=	เซนติเมตร
°C	=	องศาเซลเซียส
rpm	=	รอบต่อนาที
mU / ml	=	มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร
w / v	=	น้ำหนักต่อปริมาตร
%	=	เปอร์เซ็นต์