รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

นภา โล่ห์ทอง . 2535 . ลูกแป้ง . กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต. กรุงเทพมหานคร: ฟันนี่พับบลิชชิ่ง.

เยาวภา ไหวพริบ . 2534 . การผลิตไคตินและไคโตแซนจากเปลือกกุ้ง . วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ส่งศรี กุลปรีชา . 2521 . อิทธิพลของอาหารสูตรต่าง ๆ ที่มีผลต่อการสร้างสปอร์ของรา *Rhizopus* sp.ในลูกแป้ง.วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาพฤกษศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Araki, Y. and Ito, E. 1975. A Pathway of Chitosan Formulation in *Mucor rouxii*. Eur.J.Biochem. 55:71-78.

Austin, P.R. and Zikakis, J.P. 1981. Chitin : New Facets of Research. Science. 212 : 749-753.

Bemiller, J.N. and Whistler, R.L. 1962. Alkaline Degradation of Amino Sugars. J. Org.chem. 27:1761-1764.

Bartnicki - Garcia, S. and Nickerson, W.J. 1962 . Nutrition, Growth and Morphogenesis of *Mucor rouxii* . J. Bacteriol. 84:841-858.

Bartnicki - Garcia, S. 1968. Cell Wall Chemistry, Morphogenesis and Taxonomy of Fungi. Annu. Rev. Microbiol. 22. 87-108.

Bough, W.A., Salter, W.L., Wu, A.C.M. and Perkins, B.E. 1978 . Influence of Manufacturing Variables on the Characteristics and Effectiveness of

Chitosan Products . Biotechnology and Bioengineering. 20 :1931-1943.

Budavari, S. 1978 . The Merck Index : An Enclyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. New York : Merck.

Cahn, R.W., Haasen, P. and Kramer, E.J. 1993. Materials Science and Technology. Vol. 12, p.641. Weinheim: VCH verlagsgesellschaft mbH.

Carrod, P.A., and Tom, P.A. 1978. Bioconversion of Shellfish Chitin Waste: Process Conception and Selection of Microorganisms. J. of Food. Sci. 43: 1158-1161.

Christodoulidou, A., Martinou, A., Kafetzopoulos, D., Isgigos, I., Thireos, G. and Bouriotis, V. 1996. Chitin Deacetylase : Function and Biological Implications, Cloning and Characterization of Two New Chitin Deacetylase from *Saccharomyces cerevisiae.* Chitin Enzymology. 2:405-414.

Datema, R., Wessels, J.G.H. and Van Den Ende, H. 1977 . The Hyphal Wall of *Mucor mucedo.* Eur.J.Biochem. 80:621-626.

Davis, B.J. 1964 . Disc Electrophoresis . Method and Application to Human Serum Protiens. Ann. N.Y. Acad. Sci. 121:404-427.

Davis, L.L. and Bartinicki-Garcia. S.1984. The Co-ordination of Chitosan and Chitin Synthesis in *Mucor rouxii.* J.Gen. Micro. 130:2095-2102.

Davoust, N. and Persson, A. 1992 . Effect of Growth Morphology and Time of Harvesting on the Yield of *Absidia repens* . Applied. Microbial. Biotech : 572- 575.

Goa, X.D. Katsumoto, T. and Onodera, L. 1995 . Purification and Characterization of Chitin Deacetylase from *Absidia coerulea.* J.Biochem. 117:257-263.

Hang , Y.D. 1989 . Chitosan Production from *Rhizopus oryzae* Mycellia. Biotechnology Letters. 12 : 911-913.

Horton, D. and Lineeback, D.R. 1965 . Method in Carbohydrate Chemistry . Vol 5.

New York: Academic Press.

Inui, T. and Takeda, Y. 1965. Taxonomical Studies on Genus *Rhizopus* . J. Gen. Appl. Micro. 2 :121.

Jennings, D.H.1991. The Physiology of Fungal Nutrition. Cambridge University Press.

Kafetzopoulos, D., Martinou, A., Bourinou, A. and Bouriotis V. 1993. Bioconversion of Chitin to chitosan : Purification and Characterization of Chitin Deacetylase from *Mucor rouxii* . Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90:2564-2568.

Kauss, H. and Baush, B. 1988 . Chitin Deacetylase from *Collectotrichum lindemuthianum* . Method in enzymology. Vol.161. Academic Press.

Knorr , D. 1984 . Use of Chitinous Polymers in Food . Food. Tech. 38 : 85.

Knorr , D. 1991 . Recovery and Utilization of Shellfish Chitin Waste : Process Conception and Selection of Microorganism. J. Food. Sci. 43 : 1158-1161.

Laemmli, U.K.1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T-4 . Nature . 227: 680-685.

Lowry, O.H. , Rosebrough , N.J. , Farr , A.L. and Randell , R.J. 1951 . Protein Measurement with Folin Phenol Reagent . J. Biol. Chem. 193 : 265-275.

Madhavan , P. , Ramachandra , N.K.G. and Gopakumar , K. 1986 . Novel Use of Chitinous Waste from Crustacean Processing plants. Infofish Margeting Digest.4 : 20.

Mima, S., Miya, R.I. and Yoshikawa, S. 1983 . Highly Deacetylated Chitosan and Its Properties J.Appl. Pol. Sci. 28 : 1909-1917.

Miyoshi, H. , Shimura, K. , Watanabe, K. and Onodera, K. 1992 . Characterization of Some Fungal Chitosans. Biosci. Biotech. biochem. 56 : 1901-1905.

Muzzarelli , R.A.A. 1977. Chitin . Oxford : Pengamon Press.

Muzzarelli , R.A.A. 1985. The Polysaccharide , Vol 3. New York : Academic Press.

Ohishi, K., Yamagishi, M., Ohta, T., Motosugi, M., Izumida, H., Sano, H., Adachi, K., and Miwa, T. 1997. Purification and Properties of Two Deacetylases Produced by *Vibrio alginolyticus* H-8 . Biosci. Biotech. Biochem. 61 : 1113-1117.

Prakasam , V.R. and Azariah, J. 1975. An Optimum pH for the Demonstration of Chitin in *Periplaneta americana* Using Lugol's Iodine . Acta. Histoch. 53 : 238-240.

Rane , K.D. and Hoover , D.G. 1993. An Evaluation of Aldali and Acid Treatments for Chitosan Extraction from Fungi. Proc. Biochem. 28 : 115-118.

Ride , J.P. and Drysdale, R.B. 1972. Determination of the Degree of Acetylation of Chitin and Chitosan . Physiol. Plant. Pathol. 2 : 7.

Robert , C. 1970. Medical Microbiology : The English Language Book Society and E. & S. Livingstone.

Siegrist , J. and Kauss , H. 1990 . Chitin Deacetylase in Cucumber Leaves Infected by *Collectotrichum lagenarium*. Physiological and Molecula Plant Pathology. 36 : 267-275.

Skaugrud , O. 1989 . Chitosan Make the Grade. Manuf. Chem . 60 : 31-35.

Tokuyasu , K. , Kameyama , M.O. and Hayashi , K. 1996 . Purification and Characterization of Extracellular Chitin Deacetylase from *Collectotrichum lindemuthianum* . Biosci. Biotech. Biochem . 60 : 1598-1603.

White , S.A., Farina , P.R. and Fulton , I. 1979. Production and Isolation of Chitosan from *Mucor rouxii* . Appl. Eviron. Microbiol . 38 : 323-328.

Williams and Reisfeld. 1964. Disc Electrophoresis in Polyacrylamide Gels: Extension to New Condition of pH and Buffer . N.Y. Acad. Annuals. 121 : 373-375.

Wolfrom , M.L., Maher , G.G. and Chaney , A. 1958 . Chitosan Nitrate. J.Org. Chem. 23 : 1990-1991.

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ พีดีเอ (Potato Dextrose Agar)

มันฝรั่ง 200.0 กรัม

กลูโคส 20.0 กรัม

วุ้นผง 20.0 กรัม

นำมันฝรั่งปอกเปลือก หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ต้มในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร นาน 10 นาที กรองเอาส่วนน้ำใสมาเติมส่วนผสมอื่นดังข้างต้น แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 ลิตร และอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อวายพีจี ตามสูตรของ Bartinicki-Garcia และ Nickerson (1962)

กลูโคส	2	เปอร์เซ็นต์
แบคโตเปปโตน	1	เปอร์เซ็นต์
สารสกัดจากยีสต์	0.3	เปอร์เซ็นต์

สารละลายในน้ำกลั่นและปรับ pH ที่ 4.5 นำไปอบฆ่าเชื้อ ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สารละลายที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายสำหรับตรวจวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไคติน-ดีอะเซทิลเลส (Ride และ Drysdale, 1972)

5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) สารละลายโซเดียมไนไตรท์

โดยชั่งโซเดียมไนไตรท์ 50 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร

5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) สารละลายโปแตสเซียมซัลเฟต

โดยชั่งโปแตสเซียมซัลเฟต 50 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร

12.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) สารละลายแอมโมเนียซัลฟาเมต

โดยชั่งแอมโมเนียมซัลฟาเมต 62.5 กรัมในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) สารละลาย 3-เมทิล-2-เบนไซไทอะโซลิโนน ไฮดราซีน

โดยชั่ง 3-เมทิล-2-เบนไซไทอะโซลิโนน ไฮดราซีน 25 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร

0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก / ปริมาตร) สารละลายเฟอริกคลอไรด์

โดยชั่งเฟอริกคลอไรด์ 1 กรัม ในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร

2. สารละลายสำหรับวัดปริมาณโปรตีน (Lowry และคณะ, 1951)

สารละลายลอรี เอ (Lowry A)

โซเดียมคาร์บอเนต	60	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์	12	กรัม
โซเดียมโปตัสเซียมทาร์เทรต	0.6	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	3000	กรัม

สารละลายลอรี บี (Lowry B)

คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4 . 5 H_2 O$)	50	กรัม
สารละลายในน้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

สารละลายลอรี ซี (Lowry C)

สารละลายลอรี 10 ส่วน ผสมกับสารละลายลอรี บี 1 ส่วน

สารละลายฟีนอลรีเอเจนต์

สารละลายโฟลินฟีนอลรีเอเจนต์ 1 ส่วน ต่อน้ำกลั่น 1 ส่วน

3. สารละลายสำหรับการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิส (Davis, 1964)

สารละลาย เอ (Solution A)

กรดเกลือเข้มข้น 1 นอร์มอล	48	มิลลิลิตร
ทริส (Tris (hydroxymelthyl) aminomethane)	36.3	กรัม
TEMED (N, N N', N'-Tetramethy ethylenediamine)	0.23	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	100	มิลลิลิตร
pH 8.8-9.0		

สารละลาย บี (Solution B)

กรดเกลือเข้มข้น 1 นอร์มอล	48	มิลลิลิตร
ทริส	5.98	กรัม
TEMED	0.46	มิลลิลิตร
เติมน้ำให้ครบ	100	มิลลิลิตร

สารละลาย ซี (Solution C) เก็บในขวดสีชาที่ 4 องศาเซลเซียส

อะคริลาไมด์	30	กรัม
BIS (N, N-Methylene bis acrylamide)	0.8	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารละลาย ดี (Solution D) เก็บในขวดสีชาที่ 4 องศาเซลเซียส

อะคริลาไมด์	10	กรัม
BIS	2.5	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

สารละลาย อี (Solution E)

ไรโบเฟลวิน	4.0	มิลลิกรัม
ละลายในน้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

สารละลาย เอฟ (Solution F)

ทริส	1.0	กรัม
ไกลซีน	2.88	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

สารละลาย จี (SolutionG)

ซูโครส	40	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

สารละลายผสมของเซพาเรติงเจล (separating gel solution)

สารละลาย เอ	1.0	มิลลิลิตร
สารละลาย ซี	2.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	5.0	มิลลิลิตร
แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	11.2	มิลลิลิตร

สารละลายผสมของสแตกกิงเจล (stacking gel solution)

สารละลาย บี	0.25	มิลลิลิตร
สารละลาย ดี	0.5	มิลลิลิตร
สารละลาย จี	1.0	มิลลิลิตร
สารละลาย อี	0.25	มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารละลายสีตามรอย

โบรโมฟีนอลบลู	5	กรัม
ละลายในสารละลาย จี	10	มิลลิลิตร

สารละลายสำหรับย้อมสีโปรตีน

โคแมสซีบริลเลียนท์บลู จี 250	0.28	กรัม
กรดเปอร์คลอริก	24.5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	675.5	มิลลิลตร

สารละลายล้างสีย้อมโปรตีน

กรดอะซิติก	35	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	500	มิลลิตร

4. สารละลายที่ใช้ในการทำเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิส

สารละลายทริสไกลซีนอิเลคโทรดบัฟเฟอร์

ทริส	3.03	กรัม
ไกลซีน	14.4	กรัม
โซเดียมไดเดซิลซัลเฟต	1	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร	1,000	มิลลิลิตร
pH 8.3		

สารละลายทริส-โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต

ทริส	39.4	กรัม
โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	2	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร	1,000	มิลลิลิตร
pH 6.8		

สารละลายทริส-โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต

ทริส	118.2	กรัม

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	2	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร	1,000	มิลลิลิตร
pH 8.8		

บัฟเฟอร์ที่ใช้กับโปรตีนที่จะวิเคราะห์ (sample buffer)

สารละลายทริส-โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต PH 6.8	50	มิลลิลิตร
โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	4	กรัม
กลีเซอรอล	30	มิลลิลิตร
สารละลายบรอมฟีนอลบลู 1 %	1	มิลลิลิตร
เบต้า-เมอร์แคบโทเอธานอล (B-merceptoethanol)	10	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น	100	มิลลิลิตร

สารละลายอะคริลาไมด์ (acrylamide stock) เก็บในขวดสีชาที่ 4 องศาเซลเซียส

อะคริลาไมด์	30	กรัม
BIS	0.8	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น	100	มิลลิลิตร

สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	1	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น	10	มิลลิลิตร

สารละลายนี้ต้องเตรียมใหม่ก่อนใช้

สารละลายผสมของเซพาเรติงเจล

สารละลายอะคริลาไมด์	20.8	มิลลิลิตร
สารละลายทริส-โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต PH 8.8	7.5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	31.6	มิลลิลิตร
TEMED	16	ไมโครลิตร
สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 %	0.4	มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารละลายผสมของสแตกกิงเจล

สารละลายอะคริลาไมด์	3.4 มิลลิลิตร
สารละลายทริส-โซเดียมโดเดซัลเฟต PH 6.8	10 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	6.6 มิลลิลิตร
TEMED	10 ไมโครลิตร
สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10%	0.16 มิลลิลิตร

สารละลายสำหรับย้อมสี (staining Solution)

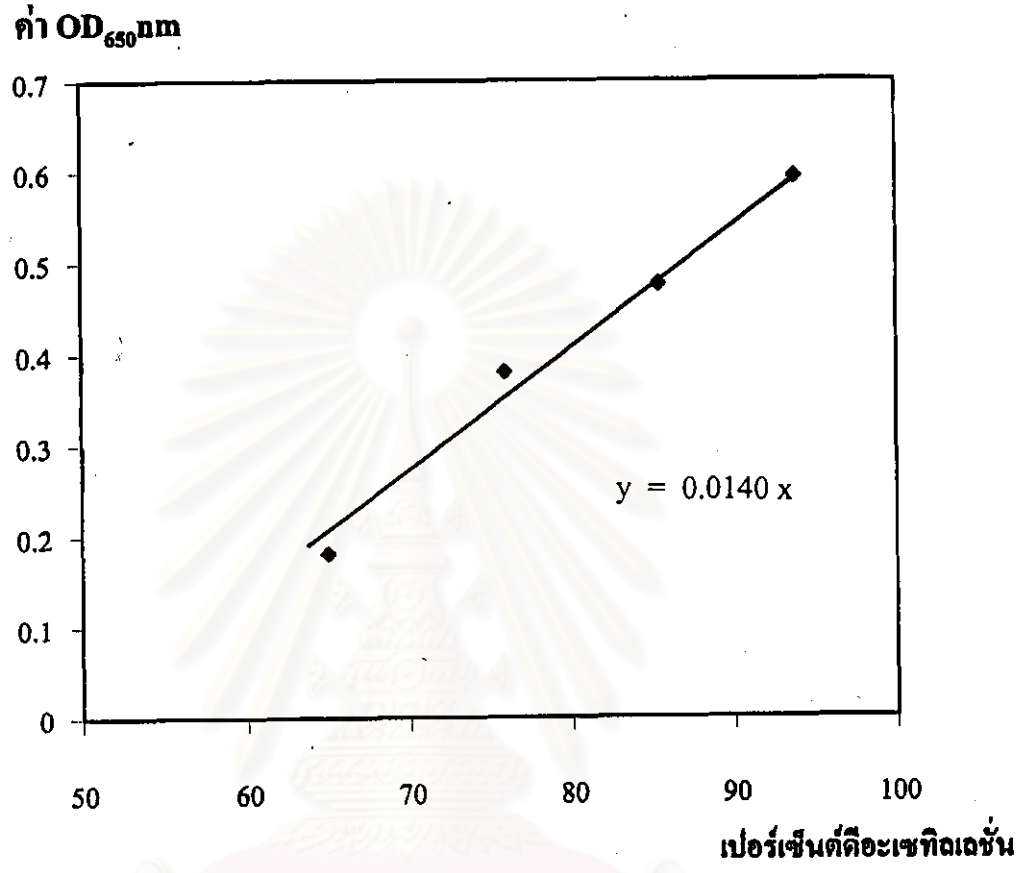
โคแมสซี บริลเลียนท์ บลู จี-250	0.12 %
กรดอะซิติก	8 %
เมธานอล	48 %

สารละลายสำหรับล้างสี (destaining Solution)

กรดอะซิติก	7 %
เมทานอล	5 %

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค



กราฟมาตรฐานของสารละลายไคโตแซน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการคำนวณเปอร์เซ็นต์ degree of decetylation

จากกราฟมาตรฐาน $y = 0.0140x$ ดังในรูปที่ 32

โดย y = ค่า OD_{650} ที่วัดค่าได้

x = เปอร์เซ็นต์การดีอะเซทิลเลชั่น (% DD) ของไคโตแซน

ยกตัวอย่าง เมื่อบ่มไคโตแซน 75.9 %DD ด้วยเอนไซม์ไคติน-ดีอะเซทิลเลส แล้วอ่านค่า OD_{650} ได้ 0.412

แทนค่า $0.412 = 0.0140x$

$x = 29.43$ % DD

สับสเตรทที่ใช้ คือ ไคโตแซน 75.9 % DD หมายความว่า ไคโตแซนมีหมู่อะมิโนอยู่ 75.9% และมีหมู่อะเซทิลอยู่ 100-75.9 = 24.1% ดังนั้นการเกิด 29.43% DD ของไคโตแซน เป็นการดีอะเซทิลเลท เอาหมู่อะเซทิลออกจากส่วนของ 24.1%ของไคโตแซน

ดังนั้น เมื่อไคโตแซน 100% acetylation จะมีการเกิด deacetylation 29.43 %

ถ้า ไคโตแซน 24.1% จะมีการเกิด deacetylation $\frac{29.43 \times 24.1}{100}$

$= 7.09\%$

แสดงว่ามีการเพิ่มขึ้นของ % deacetylation จากการทำงานของเอนไซม์ต่อสับสเตรทที่ใช้ (75.9% DD) เท่ากับ 7.09%

แสดงว่า % DD ของสับสเตรท ก่อนบ่มด้วยเอนไซม์ = 75.9 % DD

% DD ที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ = 7.09 % DD

ดังนั้น % DD ของสับสเตรทหลังบ่มด้วยเอนไซม์ = 75.9+7.09 = 82.99% DD

การคำนวณ unit ของเอนไซม์

1 unit ของเอนไซม์ คือปริมาณของเอนไซม์ที่ทำให้เกิดกรดอะซิติก 1 ไมโครโมล ต่อ 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ทดสอบแอคติวิตี ตามรายละเอียดบทที่ 2 ข้อที่ 2.2

โดยส่วนใหญ่ใช้โคโตแซนที่มี 75.9 % DD เป็นสับสเตรท โดยใช้ผงไคโตแซนดังกล่าว มา 0.2 กรัม ละลายใน 0.5% อะซิติกแอซิด ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วนำมาเจือจาง 100 เท่า แล้วนำมา 0.75 มิลลิลิตร และบ่มกับสารละลายเอนไซม์

ดังนั้น สับสเตรทที่ใช้จะมีไคโตแซน 15 ไมโครกรัม

จากข้อที่ 2 ได้ % DD ที่เพิ่มขึ้น = 7.09 % DD

แสดงว่า ใน 100 ไมโครกรัม ของไคโตแซนมี % DD เกิดขึ้น 7.09

ถ้าใน 15 ไมโครกรัม ของไคโตแซนมี % DD เกิดขึ้น $\frac{7.09 \times 15}{100}$

= 1.064 ไมโครกรัม

น้ำหนักโมเลกุลของ N- acetylglucosamine เท่ากับ 221

น้ำหนักโมเลกุลของไคโตแซน 1 หน่วย เท่ากับ 221 กรัม ซึ่งมีอะซิติกแอซิด 60 กรัม

ปริมาณไคโตแซน 1 หน่วย เท่ากับ 1.064 กรัม จะมีอะซิติกแอซิด

$= \frac{60 \times 1.064}{221}$

= 0.2888 ไมโครกรัม

น้ำหนักโมเลกุลของ กรดอะซิติก เท่ากับ 60

ถ้ากรดอะซิติก 0.2888 μg เท่ากับ $\frac{0.2888}{60}$ = 0.00481 μmole

ดังนั้น ยูนิตของเอนไซม์ = $\frac{0.00481 \times \text{dilution}}{(\text{ปริมาตรเอนไซม์ที่ใช้})\ (\text{เวลาที่ใช้บ่มเอนไซม์})}$

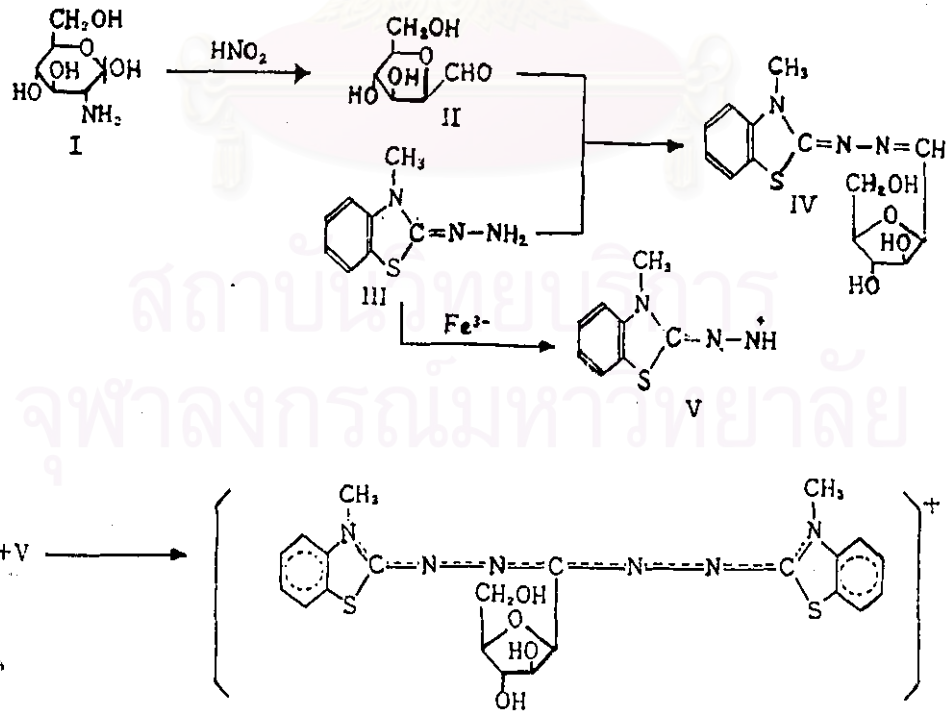
$= \frac{0.00481 \times 2}{0.5 \times 60} = 0.00032$ μ mole กรดอะซิติก / ml / min

ยูนิตของเอนไซม์ = 0.00032 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

ในการทดลองเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มิลลิลิตร ดังนั้นได้เอนไซม์ทั้งหมด

$= 0.00032 \times 50 = 0.016$ ยูนิต

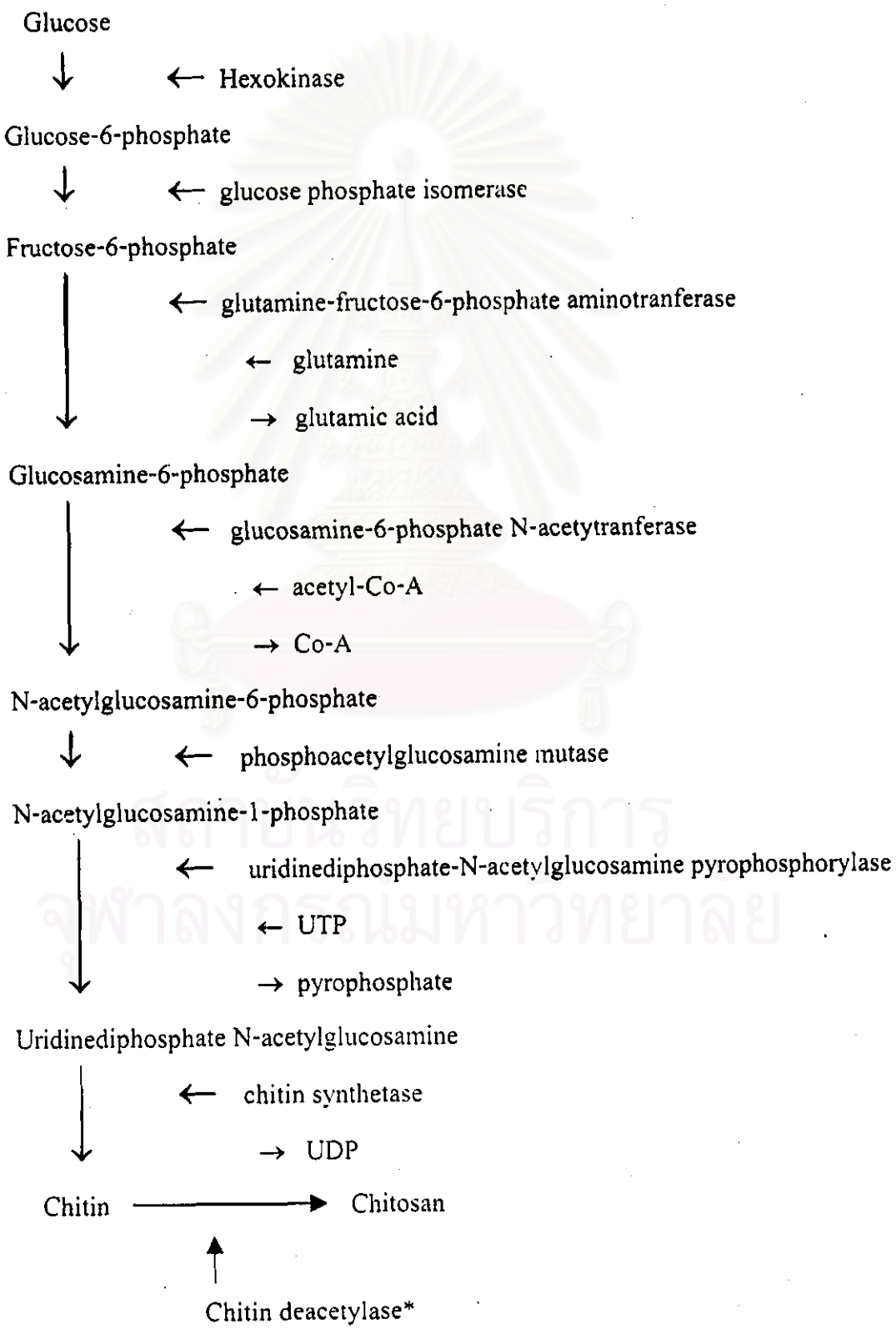
ปฏิกิริยาการเกิดสี ในการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไคติน-ดีอะเซทิลเลส โดยวิธีเปรียบเทียบสีของ Ride และDrysdale (1972) มีดังนี้



ภาคผนวก ง

การสังเคราะห์ไคติน ไคโตแซน

กระบวนการสังเคราะห์ไคติน ไคโตแซน ในสิ่งมีชีวิต จะมีกระบวนการต่างๆ สรุปดังนี้ (Muzzarelli,1977)



การใช้สารประกอบไนโตรเจนในรา

เชื้อราบางชนิดต้องการใช้แหล่งไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียและอินทรีย์ไนโตรเจน แต่ไม่ใช้ในรูปไนเตรต ดังแสดงในตาราง

Absidia coerulea	*M. putillus*
A. cylindrospora	*M. ramealis*
A. dubia	*M. rotula*
A. glauca	*M. scorodonius*
A. orchidis	*Monilinia fructicola*
Basidiobolus ranarum	*Mortierella rhizogena*
Ceratostomella fimbriata	*Mucor flavus*
C. ulmi	*M. hiemalis*
Choanephora cucurbitarum	*M. nodosus*
Cyathus striatus	*M. pyriformis*
Endothia parasitica	*M. saturninus*
Lenzites trabea	*M. stolonifer*
Marasmius alliaceus	*M. strictus*
M. androsaceus	*Phycomyces blakesleeanus*
M. chordalis	*Pleurotus ostreatus*
M. epiphyllus	*Rhizophylyctis rosea*
M. foetidis	*Rhizopus nigricans*
M. graminum	*R. oryzae*
M. performis	*Sporodina grandis*
M. personatus	*Zygorrhynchus moelleri*

Jenning (1995)

ภาคผนวก ฉ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 ผลการแปรผันอายุเชื้อและจำนวนสปอร์ของเชื้อตั้งต้น ต่อแอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลส ที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *Rhizopus oligosporus* NS_1

จำนวนสปอร์ (สปอร์ต่อมิลลิตร)	อายุ 2 วัน	อายุ 3 วัน	อายุ 4 วัน
10^5	0.334	0.302	0.252
10^6	0.456	0.380	0.304
10^7	0.434	0.364	0.330
10^8	0.382	0.354	0.324

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งและแอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลส โดยเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4 วัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ของเชื้อ *Rhizopus oligosporus* NS_1

ชนิดของแหล่งคาร์บอน	แอคติวิตี	น้ำหนักเซลล์แห้ง (มก./มล.)
กลูโคส	0.466	7.562
ซูโครส	0.174	3.412
แป้งมันสำปะหลัง	0.312	7.013
แป้งข้าวเหนียว	0.334	7.191
แป้งข้าวเจ้า	0.286	6.71

ตารางที่ 3 ผลการแปรผันความเข้มข้นของกลูโคส ในช่วง 1.0-3.0 เปอร์เซ็นต์ ของอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อเปรียบเทียบแอคติวิตีของ ไคติน-ดีอะเซทิลเลส

ความเข้มข้นของกลูโคส (เปอร์เซ็นต์)	แอคติวิตี (มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร)
1	0.522
1.5	0.588
2	0.478
2.5	0.402
3	0.358

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบแอคติวิตีของไคติน-ดีอะซิทิลเลสที่แปรผันแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนต่างๆ ที่ความเข้มข้นในช่วง 0.5-3.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที

%ไนโตรเจน	แอคติวิตี (มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร)		
	แบคโตเปปโตน	โพลีเปปโตน	กรดคาซามิโน
0.5	0.368	0.290	0.162
1	0.576	0.434	0.282
1.5	0.640	0.512	0.304
2	0.762	0.688	0.316
2.5	0.878	0.722	0.342
3	0.822	0.596	0.334

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบแอคติวิตีของไคติน-ดีอะซิทิลเลสที่แปรผันแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนต่างๆ ที่ความเข้มข้นในช่วง 0.5-3.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที

%ไนโตรเจน	แอคติวิตี (มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร)		
	$(NH_4)_2SO_4$	NH_4NO_3	$NaNO_3$
0.5	0.254	0.176	0.134
1	0.384	0.354	0.302
1.5	0.498	0.462	0.346
2	0.606	0.412	0.320
2.5	0.464	0.402	0.310
3	0.382	0.362	0.284

ตารางที่ 6 การแปรผันความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ตั้งแต่ 0.1-0.5 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบแอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลส โดยเลี้ยงเชื้อ เป็นเวลา 4 วัน บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที

ความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์(เปอร์เซ็นต์)	แอคติวิตี (มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร)
0.1	0.834
0.2	0.848
0.3	0.876
0.4	0.902
0.5	0.882

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบแอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลส เมื่อปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับปรุงในช่วง pH 3 - 8 และบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน

pHของอาหารเลี้ยงเชื้อ	แอคติวิตี (มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร)
3	0.722
3.5	0.794
4	0.850
4.5	0.906
5	0.928
5.5	0.884
6	0.814
6.5	0.754
7	0.668
8	0.572

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบแอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลส เมื่อแปรผันอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ ตั้งแต่ 25 - 50 องศาเซลเซียส และบ่มบนเครื่องเขย่า ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	แอคติวิตี (มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร)
25	0.878
28	0.916
30	0.942
31	0.938
35	0.862
40	0.732
45	0.378
50	0.164

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบแอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลส เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรปรับปรุง ที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 150 2 และ 250 รอบต่อนาที

ความเร็วรอบ(รอบต่อนาที)	แอคติวิตี (มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร)
100	0.874
150	0.936
200	0.890
250	0.814

ตารางที่ 10 แสดงผลการเติมสารบางชนิดเพื่อกระตุ้นการผลิตไคติน-ดีอะเซทิลเลส ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับปรุง

ชนิดของสารกระตุ้น	แอคติวิตี (มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร)
ผงไคติน	0.924
ผงไคโตแซน (65%DD)	0.920
ผงไคโตแซน (75.9%DD)	0.934
ผงไคโตแซน (85.4%DD)	0.936
ไม่เติมสาร	0.922

ตารางที่ 11 น้ำหนักเซลล์แห้งและแอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ (extracellular enzyme) จากส่วนสกัดจากเซลล์ (intracellular enzyme) และจากส่วนบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane bound enzyme) โดยการเลี้ยงเชื้อ *Rhizopus oligosporus* NS_1 เป็นเวลา 8 วัน ในอาหารสูตรปรับปรุง และเลี้ยงเชื้อในภาวะที่เหมาะสม

เวลา (วัน)	น้ำหนักแห้ง (มก./มล.)	Extracellular enzyme (ยูนิต/	Intracellular enzyme (ยูนิต)	Membrane bound enzyme (ยูนิต)
1	7.372	0.0261	0.0118	0.1472
2	8.858	0.0398	0.0162	0.2674
3	9.456	0.0451	0.0168	0.2949
4	10.012	0.0474	0.0174	0.3010
5	9.816	0.0459	0.0214	0.3040
6	9.708	0.0444	0.0217	0.3023
7	9.622	0.0337	0.0210	0.2874
8	9.203	0.0282	0.0199	0.2418

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 12 แสดงความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของไกลิน-ดีอะเซทิลเลส โดยตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที โดยแปรผันความเป็นกรดด่างตั้งแต่ 4-10 ในการบ่มปฏิกิริยา

pH	แอคติวิตี (มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร)		
4	0.132		
4.5	0.17		
5	0.196		
5.5	0.237		
6	0.274		
6.5	0.296	0.262	
7		0.243	
7.5		0.208	
8		0.167	0.196
8.5			0.173
9			0.15
9.5			0.11
10			0.067

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 13 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสม ต่อการทำงานของไคติน-ดีอะเซทิลเลส จากเชื้อ *Rhizopus oligosporus* NS_1

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	แอคติวิตี
30	0.171
35	0.204
40	0.247
45	0.262
50	0.280
55	0.290
60	0.253
65	0.176
70	0.103

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 14 ความสเถียรของไคติน-ดีอะเซทิลเลส ต่อ ความเป็นกรดด่าง โดยบ่มเอนไซม์ที่ pH ในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์

pH	แอคติวิตีสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)		
3	14.2		
3.5	40.8		
4	70.6		
4.5	85.8		
5	96.5		
5.5	98.2		
6	99.3		
6.5	98.6	95.2	
7		94.5	
7.5		88	
8		83.1	86.8
8.5			83.7
9			81.6
9.5			66.1
10			48.1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 15 ความสเถียรของไคติน-ดีอะเซทิลเลส ต่ออุณหภูมิ โดยบ่มเอนไซม์ใน 0.05 โมลาร์ อะเซเตทบัฟเฟอร์ ที่อุณหภูมิ 20-70 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	แอคติวิตีสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
20	98.0
25	99.7
30	99.0
35	97.6
40	95.9
45	97.6
50	94.2
55	70.7
60	37.1
65	5.80
70	0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 16 ผลการใช้ไคติน-ดีอะเซทิลเลส ไฮโดรไลส์ผลไคโตแซนที่มีเปอร์เซ็นต์การดีอะเซทิลเลชั่น 75.9 85.4 และ 93.8 โดยเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การดีอะเซทิลเลชั่นที่เพิ่มขึ้น

เวลา(นาที)	เปอร์เซ็นต์การดีอะเซทิลเลชั่นของผงไคโตแซน		
	75.9	85.4	93.8
30	0	0	0
60	0	0	0
90	0.04	0	0
120	0.08	0.01	0.02
150	0.1	0.08	0.07
180	0.18	0.11	0.08
210	0.24	0.12	0.1
240	0.28	0.15	0.11
270	0.29	0.16	0.11
300	0.31	0.18	0.13
360	0.36	0.21	0.15

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 17 เวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลส์ ให้สมบูรณ์ของไคติน-ดีอะเซทิลเลส ต่อสารละลายไคโตแซนที่มีเปอร์เซ็นต์การดีอะเซทิลเลชั่น เท่ากับ 75.9 85.4 93.8 โดยเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การดีอะเซทิลเลชั่นของสับสเตรทหลังบ่ม

เวลา (นาที)	เปอร์เซ็นต์การดีอะเซทิลเลชั่นของสารละลายไคโตแซน		
	75.9	85.4	93.8
5			97.4
10	85.5	92.7	98.1
15			99.2
20	87.8	96.3	100.3
25			100.7
30	90	98.3	100.7
35			100.8
40	93.1	99.8	100.7
45			
50	96.2	100.8	
55			
60	97.7	100.8	
65			
70	98.4	100.8	
75			
80	99.8	100.9	
85			
90	99.6	100.9	
95			
100	99.7		
105			
110	99.4		

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน

นางสาว นันทนา นิ่มเจริญนิยม เกิดวันที่ 23 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2517 ที่จังหวัดนครราชสีมา สำเร็จการศึกษา ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2538 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตร วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อ พ.ศ. 2539

ได้นำงานวิจัยเรื่องนี้ไปแสดงผลงานในการประชุมวิชาการ

Proceeding of Asia-Pacific Mycological Conference on Biodiversity and Biotechnology, 6-9 July 1998 ที่โรงแรมเมเลีย อ. หัวหิน จ. ประจวบคีรีขันธ์

Biotechnology for A Self Sufficient Economy , 25-27 Nov 1998 ที่โรมแรมโซฟิเทวิน กรุงเทพฯ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย