รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ฉัตรฤดี สุวรรณชาติ. 2541. ไคตินและไคโตแซนจาก *Aspergillus niger* ที่เลี้ยงในแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อย. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิยาลัย.

ชัญญา พุทธิขันธ์. 2533. การผลิตลินามาเรสจากยีสต์. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิยาลัย.

นันทนา นิ่มเจริญนิยม. 2542. การผลิตและการทำไคติน-ดีอะเซทิเลสจาก *Rhizopus oligosporus*NS$_1$ให้บริสุทธิ์. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิยาลัย.

เยาวภา ไหวพริบ. 2534. การผลิตไคตินและไคโตแซนจากเปลือกกุ้ง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อังคณา โทการกุล. 2540. การแยกเชื้อยีสต์ที่มีเอนไซม์ไคติน ดีอะเซทิเลส. โครงการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Alfonso, C., Oscar, M., Francisco, S., and Fuensanta, R. 1995. Purification of a heat-stable chitin deacetylase from *Aspergillus nidulans* and its role in cell wall degradation. Current Microbiol. 30 : 49 – 54.

Araki, Y. and Ito, E. 1974. A pathway of chitosan formation in *Mucor rouxii* : Enzymatic deacetylase of chitin. Biochem and Biophy research communications. 56(3) : 669 – 675.

Arcidiacono, S. and Kaplan, D.L. 1992. Molecular weight distribution of chitosan isolated from *Mucor rouxii* under different culture and processing conditions. Biotech. and Bioeng. 39(3) : 281 – 286.

Bartinicki-Garcia, S. 1968. Cell wall chemistry , morphogenesis and taxonomy of fungi. Annu. Rev. Microbiol. 22 : 87 – 108.

Bartinicki-Garcia, S. and Nickerson, W.T. 1962. Nutrition , growth and morphogenesis of *Mucor rouxii*. J.Bacteriol. 84 : 841 – 858.

Beneke, ES. and Rogers, A.L. Medical mycology manual. 3rd ed. (Minneapolis : Burgess Pu Co, 1970) pp.165 – 168.

Bough, W.A., Salter, W.L., and Perkins, B.E. 1978. Influence of manufacturing variables on the characteristics and effectiveness of chitosan products. Biotech. and Bioeng. 20 : 1931 – 1943.

Collumbel, C., Damour, O., Gagnieu, C., Poinsignon, F., Echinard, C., and Marichy, J. 1988. Biomaterials for artificial skin and implants containing acetylated chitosan , collagens and glycosaminoglycans. Eur. Pat. Appl. EP : 296,078.

Christodoulidou, A., Bouriotis, V. and Thireos., G. 1996. Two sporulation-specific chitin deacetylase-encoding genes are required for the ascospore wall rigidity of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 271(49) : 31420 – 31425.

Datema, R., Wessel, J.G.H. and Van Den Eude, 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 protein. 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 Parsson, A. 1992. Effects of growth morphology and time of harvesting on the chitosan yield of *Absidia repens*. Appl. Microbiol.Biotechnol. 37 : 572-575.

Deising., H. and Siegrist., J. 1995. Chitin deacetylase activity of the rust uromyces-viciae-fabae is controlled. FEMS. Microbiol. Lett. 127(3) : 207-211.

Goa, X.D., Katsumoto, T. and Onodera, L. 1995. Purification and characterization of chitin deacetylase from *Absidia coerulea*. J. Biochem. 117 : 257 – 263.

Hadwiger, L.A., Fristensky, R. and Riggleman, R.C. Chitosan, a natural regulator in plant-fungal pathogen interactions , increases crop yields in chitin , chitosan , and related enzyme , J.P. Zikakis, ed., (Orlando : Academic Press, 1984), p. 291.

Hang, Y.D. 1989. Chitosan production from *Rhizopus oryzae* mycellia. Biotechnology Letter. 12 : 911 – 913.

Hirano, S. 1989. Some commercial products made of chitin and chitosan. MOL. pp. 27 - 31

Hirano, H. 1996. Chitin biotechnology applications. Biotechnol. Annu. Review. 2 : 237 – 258.

Horton, D. and Lineback, D.R. Method in carbohydrate chemistry. Vol 5 (New York : Academic Press, 1965).

Kafetzopoulos, D., Martinou, 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., Jeblick, W. and Young, D. 1982. Chitin deacetylase from the plant pathogen *Collectotrichum lindemuthianum*. Plant Science Letters. 28 : 231 – 236.

Knorr, D. 1984. Use of chitinous polymers in food. Food. Tech. 38 : 85.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4. Nature. 277 : 680 – 685.

Lodder, J. and Kreger-Van Rij, N.J.W. The yeast : A taxonomic study. (North-Holland Publishing Co, 1970), pp. 1216 – 1221.

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.

Markey, M.L., Bowman, L.M. and Bergamini, M.V.W. Chitin and chitosan. Skjak-Braek, G., Anthonsen, T. and Sandford, P. ed., (New York : Elsevier Applied Science, 1989), pp. 713 – 717.

Mattheus, H. Applications of chitin and chitosan. (Technomic Publishing Company Inc, 1997), pp. 3 – 54.

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.

Nowosielski, O., Struszczyk, H., Skwarski, T., Kotlinski, S., Krajewski, K. and Dziennik, W. 1988. Liquid hydroponic fertilizer containing chitosan and trace elements. Pol.PL 141.381.

Ohishi, Kazuo., Yamagishi, M., Ohta, T., Mouosugi, M., Izumida, H., Sano, H., Adachi, K. and Miwa, T. 1997. Purification and properties of two deacetylase produced by *Vibrio alginolyticus*H-8. Biosci. Biotech. Biochem. 61 (7) : 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.

Pospieszny, H. and Atabekov, I.G. 1989. Plant Sci. 62(1) : 29 – 31.

Ride, J.P. and Drysdale, R.B. 1972. A rapid method for the chemical estimation of filamentous fungi in plant tissue. Physiol. Plant. Pathol. 2 : 7 – 15.

Siegrist, J. and Kauss, H. 1990. Chitin deacetylase in cucumber leaves infected by *Collectotrichum lagenarium.* Physiological and Molecular Plant Pathology. 36 : 267 – 275.

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

Tokuyasu, K., Ohnishi-Kameyama, M. and Hayashi, K. 1996. Purification and characterization of extracellular chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum.* Biosci. Biotech. Biochem. 60(10) : 1598 – 1603.

Trudel, J. and Asselin, A. 1990. Detection of chitin deacetylase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. Anal. Biochem. 189(2) : 249 – 253.

White, S.A., Farina, P.R. and Fulton, I. 1979. Production and isolation of chitosan from *Mucor rouxii.* Appl. Environ. Microbiol. 38 : 323 – 328.

Wolfrom, M.L., Maher, G.C. and Chaney, A. 1958. Chitosan nitrate. J. Org. Chem. 23 : 1990 – 1991.

Yamano, N., Fujishima, S., Miwatani, R., Yaku, F., Tanaka, R. and Arita, M. 1994. Production of *N*-Acetylglucosamine deacetylase by *Vibrio cholerae* Non-01. Biosci. Biotech. Biochem. 58 : 193 – 195.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

1. **อาหารแข็งวายเอ็ม** (YM agar)

สารสกัดจากยีสต์	3.0	กรัม
สารสกัดมอลท์	3.0	กรัม
แบคโตเปปโตน	5.0	กรัม
กลูโคส	10.0	กรัม
วุ้นผง	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. **อาหารเหลววายพีจี** (YPG liquid medium) (Bartinicki – Garcia และ Nikerson , 1962)

สารสกัดจากยีสต์	0.3	เปอร์เซ็นต์
แบคโตเปปโตน	1.0	เปอร์เซ็นต์
กลูโคส	2.0	เปอร์เซ็นต์

ละลายน้ำกลั่น ปรับค่าความเป็นกรดด่างที่ 4.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

3. **อาหารที่ใช้จำแนกยีสต์** (Lodder, 1970)

3.1 <u>อาหารแข็งวุ้นเอียงโปตัสเซียมอะซิเตท</u> (Potassium acetate slant)

โปตัสเซียมคลอไรด์	0.82	กรัม
โซเดียมอะซิเตท	0.18	กรัม
กลูโคส	0.05	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	0.1	กรัม
วุ้น	1.5	กรัม

ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดละ 7 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน แล้วนำมาเอียง

3.2 อาหารแข็งวุ้นเอียงโครอดกาวา (Gorodkowa slant)

กลูโคส	0.1	กรัม
แบคโตเปปโตน	1.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	0.5	กรัม
วุ้น	2.0	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดละ 7 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน แล้วนำมาเอียง

3.3 อาหารสำหรับทดสอบการหมักน้ำตาล (Fermentation medium)

สารสกัดจากยีสต์	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลายให้เข้ากันแล้วแบ่งใส่หลอดเกลียว ที่มีหลอดดูแรห์ม หลอดละ 4.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติม 0.5 มิลลิลิตรของ 20 เปอร์เซ็นต์น้ำตาล ที่ผ่านการกรองเพื่อทำให้ปราศจากเชื้อ ลงในแต่ละหลอด (ยกเว้น น้ำตาลราฟฟิโนสจะเติม 0.1 มิลลิลิตร) น้ำตาลที่ใช้ในการทดสอบการหมัก ได้แก่

กลูโคส , กาแลคโตส , ซูโครส , มอลโตส , แลคโตส , เทฮาโลส , ราฟฟิโนส และ ไซโลส

3.4 อาหารสำหรับตรวจดูความสามารถในการใช้น้ำตาลเพื่อการเจริญ (Carbon assimilation)

ยีสต์ไนโตรเจนเบส	6.7	กรัม
แหล่งน้ำตาล	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรอง จากนั้นดูดมา 1 มิลลิลิตร เติมลงในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 9 มิลลิลิตร ปิดจุกด้วยสำลีเพื่อให้อากาศผ่านได้ แหล่งน้ำตาลที่ใช้ ได้แก่

กลูโคส , กาแลคโตส , ซูโครส , มอลโตส , แลคโตส , เทฮาโลส , ราฟฟิโนส และ ไซโลส

3.5 <u>อาหารสำหรับทดสอบการใช้แหล่งไนโตรเจน เพื่อการเจริญ</u> (Nitrogen assimilation medium)

ยีสต์คาร์บอนเนส	11.7	กรัม
โปตัสเซียมไนเตรท	0.78	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วนำไปกรองเพื่อทำให้ปราศจากเชื้อ ดูดมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 9 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลี

ภาคผนวก ข

1. **สารละลายสำหรับตรวจวัดแอคติวิตีของไคตินดีอะเซทิเลส** (Ride และ Drysdale , 1972)

- สับสเตรท 80 % DD ไคโตซาน
  ชั่ง ไคโตซานที่มีระดับการกำจัดหมู่อะเซทิลเท่ากับ 80 มา 0.2 กรัม ละลายใน 0.5 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติก จากนั้นทำให้เจือจาง 100 เท่า ด้วย 0.05 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0
- 5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) สารละลายโซเดียมไนไตรท์ ($NaNO_2$)
  ชั่งโซเดียมไนไตรท์ 5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร
- 5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) สารละลายโปตัสเซียมไฮโดรเจนซัลเฟต ($KHSO_4$)
  ชั่งโปตัสเซียมไฮโดรเจนซัลเฟต 5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น100 มิลลิลิตร
- 12.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) สารละลายแอมโมเนียมซัลฟาเมต ($H_6N_2O_3S$)
  ชั่งแอมโมเนียมซัลฟาเมต 12.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร
- 0.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) สารละลาย 3-เมทิล-2-เบนโซไทอะโซลิโนน ไฮดราโซน ($C_8H_9N_3S.HCl$)
  ชั่ง 3-เมทิล-2-เบนโซไทอะโซลิโนน ไฮดราโซน 0.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร (สารละลายต้องเตรียมใหม่ก่อนใช้)
- 0.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) สารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ ($FeCl_2$) ชั่งเฟอร์ริกคลอไรด์ 0.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร
  (สารละลายต้องเตรียมใหม่ก่อนใช้)

2. **สารละลายสำหรับวัดปริมาณโปรตีน** (Lowry และคณะ, 1951)

<u>สารละลายลอรี เอ</u> (Lowry A)

โซเดียมคาร์บอเนต	20	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์	4	กรัม
โซเดียมโปตัสเซียมทาร์เทรต	0.2	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร

สารละลายลอรี บี (Lowry B)

คอบเบ่อร์ซัลเฟต	5.0	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร

สารละลายลอรี ซี (Lowry C)

สารละลายลอรี เอ ต่อ สารละลายลอรี บี ในอัตราส่วน 50 ต่อ 1

สารละลายลอรี ดี (Lowry D)

สารละลายโฟลินฟีนอลรีเอเจนต์ 1 ส่วน ต่อ น้ำกลั่น 1 ส่วน

3. **สารละลายสำหรับทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟริซิส** (Davis, 1964)

สารละลายอะคริลาไมด์ (acrylamide solution)

อะคริลาไมด์	29.2	กรัม
BIS (N,N'-methylene-bis-acrylamide)	0.8	กรัม

ละลายน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

เก็บในขวดสีชา ที่ 4 องศาเซลเซียส

1.5 โมลาร์ สารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์ pH 8.8

ทริสเบส	18.15	กรัม
น้ำกลั่น	50.0	มิลลิลิตร
ปรับ pH เป็น 8.8 ด้วย 6N HCl แล้วปรับปริมาตรเป็น	100	มิลลิลิตร

เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

0.5 โมลาร์ สารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์ pH 6.8

ทริสเบส	6.0	กรัม
น้ำกลั่น	60.0	มิลลิลิตร
ปรับ pH เป็น 6.8 ด้วย 6N HCl แล้วปรับปริมาตรเป็น	100	มิลลิลิตร

เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

10 เปอร์เซ็นต์ สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	10.0	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

สารละลายต้องเตรียมใหม่ก่อนใช้

บัฟเฟอร์ที่ใช้ละลายตัวอย่างโปรตีนที่ต้องการวิเคราะห์ (sample buffer)

น้ำกลั่น	3.8	มิลลิลิตร
0.5 โมลาร์ สารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์ pH 6.8	1.0	มิลลิลิตร
กลีเซอรอล	0.8	มิลลิลิตร
2-เมอร์แคปโตเอธานอล	0.4	มิลลิลิตร
1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) บรอมฟีนอลบลู	0.4	มิลลิลิตร

สารละลายอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ (electrode buffer)

ทริสเบส	15.0	กรัม
ไกลซีน	72.0	กรัม

ละลายน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ก่อนใช้ต้องทำให้เจือจาง 5 เท่าด้วยน้ำกลั่น

สารละลายเซพาเรติงเจล ความเข้มข้นเจล 12 เปอร์เซ็นต์ (separating gel solution)

น้ำกลั่น	3.35	มิลลิลิตร
1.5 โมลาร์ สารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์ pH 8.8	2.5	มิลลิลิตร
สารละลายอะคริลาไมด์	4.0	มิลลิลิตร
10 เปอร์เซ็นต์ สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	50.0	ไมโครลิตร
TEMED	5.0	ไมโครลิตร

สารละลายสแตกกิงเจล ความเข้มข้นเจล 5 เปอร์เซ็นต์ (stacking gel solution)

น้ำกลั่น	2.4	มิลลิลิตร
0.5 โมลาร์ สารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์ pH 6.8	0.625	มิลลิลิตร
สารละลายอะคริลาไมด์	0.85	มิลลิลิตร
10 เปอร์เซ็นต์ สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	50.0	ไมโครลิตร
TEMED	5.0	ไมโครลิตร

สารละลายสีย้อม (staining solution)

โคแมสซี บริลเลียน บลู จี-250	0.1	เปอร์เซ็นต์
เมธานอล	40	เปอร์เซ็นต์
กรดอะซิติก	10	เปอร์เซ็นต์

ปรับปริมาตร เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

4. สารละลายสำหรับทำเอสดีเอส พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟริซิส (Laemmli , 1970)

สารละลายอะคริลาไมด์ (acrylamide solution)

อะคริลาไมด์	29.2	กรัม
BIS (N,N'-methylene-bis-acrylamide)	0.8	กรัม
ละลายน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร		
เก็บในขวดสีชา ที่ 4 องศาเซลเซียส		

10 เปอร์เซ็นต์ สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	10	กรัม
ละลายน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร		

1.5 โมลาร์ สารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์ pH 8.8

ทริสเบส	18.15	กรัม
น้ำกลั่น	50.0	มิลลิลิตร
ปรับ pH เป็น 8.8 ด้วย 6N HCl แล้วปรับปริมาตรเป็น	100	มิลลิลิตร
เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส		

0.5 โมลาร์ สารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์ pH 6.8

ทริสเบส	6.0	กรัม
น้ำกลั่น	60.0	มิลลิลิตร
ปรับ pH เป็น 6.8 ด้วย 6N HCl แล้วปรับปริมาตรเป็น	100	มิลลิลิตร
เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส		

10 เปอร์เซ็นต์ สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	10.0	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร		
สารละลายต้องเตรียมใหม่ก่อนใช้		

บัฟเฟอร์ที่ใช้ละลายตัวอย่างโปรตีนที่ต้องการวิเคราะห์ (sample buffer)

น้ำกลั่น	3.8	มิลลิลิตร
0.5 โมลาร์ สารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์ pH 6.8	1.0	มิลลิลิตร
กลีเซอรอล	0.8	มิลลิลิตร
10 เปอร์เซ็นต์ สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	1.6	มิลลิลิตร
2-เมอร์แคปโตเอธานอล	0.4	มิลลิลิตร

1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) บรอมฟีนอลบลู	0.4	มิลลิลิตร

สารละลายอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ (electrode buffer)

ทริสเบส	15.0	กรัม
ไกลซีน	72.0	กรัม
โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	5.0	กรัม

ละลายน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ก่อนใช้ต้องทำให้เจือจาง 5 เท่าด้วยน้ำกลั่น

สารละลายเซพาเรติงเจล ความเข้มข้นเจล 12 เปอร์เซ็นต์ (separating gel solution)

น้ำกลั่น	3.35	มิลลิลิตร
1.5 โมลาร์สารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์ pH 8.8	2.5	มิลลิลิตร
10 เปอร์เซ็นต์ สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	10.0	ไมโครลิตร
สารละลายอะคริลาไมด์	4.0	มิลลิลิตร
10 เปอร์เซ็นต์ สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	50.0	ไมโครลิตร
TEMED	5.0	ไมโครลิตร

สารละลายสแตกกิงเจล ความเข้มข้นเจล 5 เปอร์เซ็นต์ (stacking gel solution)

น้ำกลั่น	2.4	มิลลิลิตร
0.5 โมลาร์ สารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์ pH 6.8	0.625	มิลลิลิตร
10 เปอร์เซ็นต์ สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	50.0	ไมโครลิตร
สารละลายอะคริลาไมด์	0.85	มิลลิลิตร
10 เปอร์เซ็นต์ สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	50.0	ไมโครลิตร
TEMED	5.0	ไมโครลิตร

สารละลายสีย้อม (staining solution)

โคแมสซี บริลเลียน บลู จี-250	0.1	เปอร์เซ็นต์
เมธานอล	40	เปอร์เซ็นต์
กรดอะซิติก	10	เปอร์เซ็นต์

ปรับปริมาตร เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

สารละลายล้างสีย้อมโปรตีน (destaining solution)

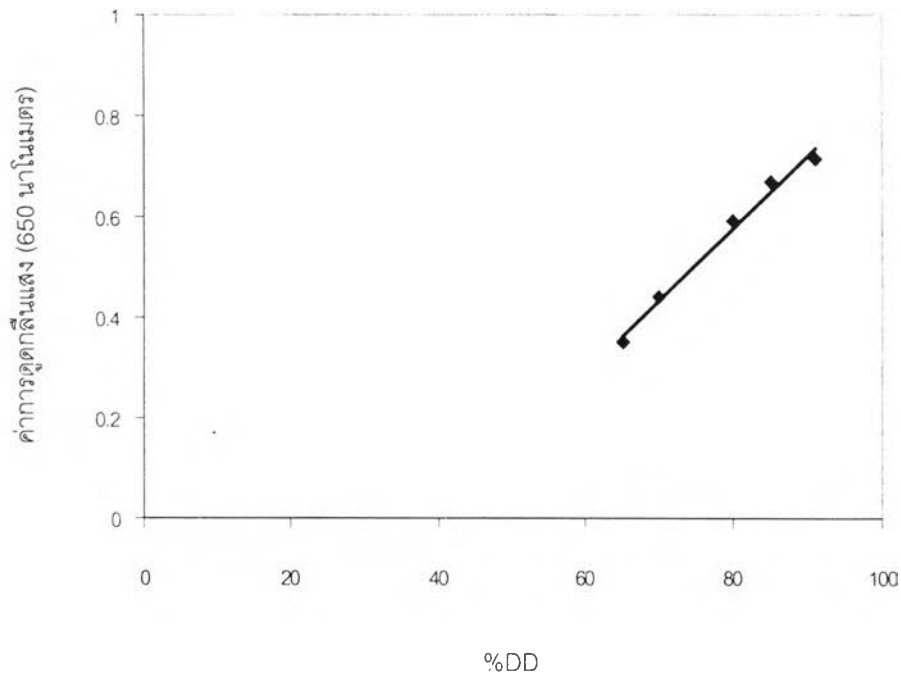
กรดอะซิติก	10	มิลลิลิตร
เมธานอล	40	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	50	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

การทำกราฟมาตรฐานสารละลายไคโตซานและการคำนวณหา %DD

การทำกราฟมาตรฐานสารละลายไคโตซาน

นำไคโตซานที่มีเปอร์เซ็นต์การกำจัดหมู่อะเซทิล (%DD) ต่างๆ คือ 65 , 70 , 80 , 85 และ 91 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณชนิดละ 0.2 กรัม ละลายในสารละลาย 0.5 เปอร์เซ็นต์กรดอะซิติก แล้วนำสารละลายที่ได้มา 1 มิลลิลิตร ทำให้เจือจาง 100 เท่าด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำสารละลายที่เจือจางแล้ว มาทำปฏิกิริยาตามวิธีของ Ride และ Drysdale ดังรายละเอียดในวิธีการทดลอง แล้วนำค่าที่ได้มาเขียนกราฟความสัมพันธ์ ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และ เปอร์เซ็นต์ของการกำจัดหมู่อะเซทิล



การคำนวณหา %DD

จากกราฟมาตรฐานสารละลายไคโตซาน $Y = 0.0156 X$

โดย Y = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร

X = %DD ของไคโตซาน

เมื่อบ่มสับสเตรท (ไคโตซาน 80%DD) ด้วยเอนไซม์ไคตินดีอะเซทิเลส อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร ได้ 0.427

แทนค่าในสมการ จะได้ $0.427 = 0.0156 X$

$X = 27.37$ %DD

สับสเตรทที่ใช้คือ ไคโตซาน 80 %DD หมายความว่า ไคโตซานมีหมู่อะมิโนอยู่ 80 % และมีหมู่อะเซทิลอยู่ 20 % ดังนั้นการเกิด 27.37 %DD ของสับสเตรท เป็นการดีอะเซทิเลท เอาหมู่อะเซทิลออกจากส่วน 20 % ของสับสเตรท

ดังนั้นเมื่อสับสเตรท100 % อะเซทิเลชั่น จะเกิดการดีอะเซทิเลชั่น 27.37 %

ถ้าสับสเตรท 20 % จะมีการเกิดดีอะเซทิเลชั่น เท่ากับ $\frac{27.37 \times 20}{100} = 5.47$ %

(5.47 % เป็นค่าที่ใช้ในการคำนวณยูนิตของเอนไซม์)

แสดงว่ามีการเพิ่มขึ้นของระดับการกำจัดหมู่อะเซทิล จากการทำงานของเอนไซม์ต่อสับสเตรทที่ใช้ (80 %DD) เท่ากับ 5.47 %

%DD ของสับสเตรท ก่อนบ่มด้วยเอนไซม์ เท่ากับ 80 %DD

%DD ที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ เท่ากับ 5.47 % DD

ดังนั้น %DD ของสับสเตรทหลังบ่มด้วยเอนไซม์ เท่ากับ $80 + 5.47$

$= 93.98$ %DD

ในการทดลองนี้ใช้ไคโตซาน 80 %DD เป็นสับสเตรท โดยผงไคโตซาน 0.2 กรัม ละลายใน 0.5 เบ่อร์เซ็นต์กรดอะซิติก ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วนำมาทำให้เจือจาง 100 เท่า จากนั้นนำมา 0.75 มิลลิลิตร

ดังนั้นในกรดอะซิติก 100 มิลลิลิตร มีไคโตซาน 0.2 กรัม
นำมาเจือจาง 100 เท่า จะมีไคโตซาน = X กรัม

นั่นคือ $\frac{100}{0.2} = \frac{1}{X}$

$X = 0.002$ กรัม

จากนั้นนำที่ทำให้เจือจางแล้ว มา 0.75 มิลลิลิตร จะมีไคโตซาน = Y กรัม

นั่นคือ 100 มิลลิลิตร ของที่เจือจาง จะมีไคโตซาน 0.002 กรัม
ถ้านำมา 0.75 มิลลิลิตร จะมีไคโตซาน $= \frac{0.002 \times 0.75}{100}$

$= 0.000015$ กรัม

$= 15$ ไมโครกรัม

ดังนั้นสับสเตรทที่ใช้มีไคโตซาน 15 ไมโครกรัม

ภาคผนวก ง

การคำนวณยูนิตของเอนไซม์

ในการทดลองนี้กำหนดให้

1 ยูนิตของเอนไซม์ คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่ทำให้เกิด กรดอะซิติก 1 ไมโครโมล ต่อ 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ทดสอบแอคติวิตี

ใช้ไคโตซาน 80 %DD เป็นสับสเตรท มีไคโตซาน 15 ไมโครกรัม

ได้ %DD เพิ่มขึ้น = 5.47 %

แสดงว่าใน 100 ไมโครกรัม ของไคโตซานมี %DD เกิดขึ้น 5.47

ถ้าใน 15 ไมโครกรัม ของไคโตซานจะมี %DD เท่ากับ $\frac{5.47 \times 15}{100}$

$= 0.821$ ไมโครกรัม

น้ำหนักโมเลกุลของ N-Acetylglucosamine = 221

น้ำหนักโมเลกุลไคโตซาน 1 หน่วย = 221 กรัม ซึ่งมีกรดอะซิติก 60 กรัม

ปริมาณไคโตซาน 1 หน่วย = 0.821 ไมโครกรัม จะมีกรดอะซิติกเท่ากับ $\frac{60 \times 0.821}{221}$

$= 0.2229$ ไมโครกรัม

น้ำหนักโมเลกุลของกรดอะซิติก = 60

กรดอะซิติก 0.2229 ไมโครกรัม $= \frac{0.2229}{60} = 0.00372$ ไมโครโมล

ดังนั้น ยูนิตของเอนไซม์ $= \frac{0.00372 \times \text{dilution}}{(\text{ปริมาตรเอนไซม์ที่ใช้})(\text{เวลาที่ใช้บ่มเอนไซม์})}$

$= \frac{0.00372 \times 2}{0.5 \times 60}$

$= 0.000248$ ไมโครโมลกรดอะซิติก/มิลลิลิตร/นาที

ยูนิตของเอนไซม์ = 0.000248 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

ในการทดลองเลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ดังนั้นเอนไซม์ทั้งหมด

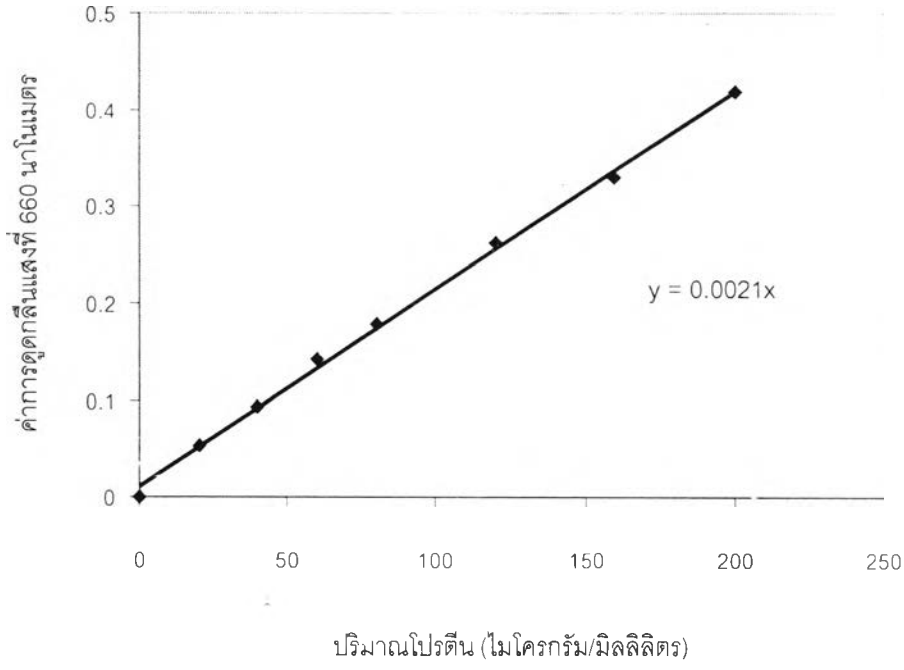
$= 0.0124$ ยูนิต

ภาคผนวก จ

การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry

นำตัวอย่างสารละลายเอนไซม์ที่ต้องการทดสอบปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเติม 5 มิลลิลิตรของสารละลายลอรีซี ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมสารละลายลอรีดี 0.5 มิลลิลิตร บ่มต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

เทียบค่าปริมาณโปรตีน จากกราฟมาตรฐานของโบวีน ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin) ความเข้มข้น 0 – 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาคผนวก ฉ

ตารางที่ 1 แอคติวิตีของไคตินดีอะเซทิเลส และน้ำหนักเซลล์แห้ง ของยีสต์ *C.krusei* MS_1 เมื่อแปรผันความเข้มข้นกลูโคส ในช่วง 0.5 – 8.0 เปอร์เซ็นต์ ของอาหารเหลว บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของกลูโคส (เปอร์เซ็นต์)	แอคติวิตีของเอนไซม์ (มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0.5	0.4588	3.6
1.0	0.4686	5.0
1.5	0.4188	5.0
2.0	0.3944	5.2
2.5	0.3683	5.4
3.0	0.3880	5.4
4.0	0.3596	5.6
5.0	0.3254	5.2
6.0	0.3132	5.2
7.0	0.3416	5.2
8.0	0.3115	5.4

ตารางที่ 2 แอคติวิตีของไคตินดีอะเซทิเลส และน้ำหนักเซลล์แห้ง ของยีสต์ *R. rubra* MS_8 เมื่อแปรผันความเข้มข้นกลูโคส ในช่วง 0.5 – 8.0 เปอร์เซ็นต์ ของอาหารเหลว บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของกลูโคส (เปอร์เซ็นต์)	แอคติวิตีของเอนไซม์ (มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0.5	0.4307	5.2
1.0	0.4559	7.7
1.5	0.4469	8.7
2.0	0.4547	9.0
2.5	0.4425	8.5
3.0	0.4150	8.4
4.0	0.4220	8.5
5.0	0.3753	8.4
6.0	0.3524	8.3
7.0	0.3077	8.0
8.0	0.2833	7.8

ตารางที่ 3 แอคติวิตีของไคตินดีอะเซทิเลส และน้ำหนักเซลล์แห้ง ของยีสต์ *R. rubra* MS_8 เมื่อแปรผันความเข้มข้นราฟฟิโนส ในช่วง 0.5 - 8.0 เปอร์เซ็นต์ ของอาหารเหลว บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของราฟฟิโนส (เปอร์เซ็นต์)	แอคติวิตีของเอนไซม์ (มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0.5	0.3033	3.14
1.0	0.3106	3.86
1.5	0.3028	4.45
2.0	0.3031	5.73
2.5	0.3068	6.62
3.0	0.3058	7.60
4.0	0.3670	7.76
5.0	0.3690	7.75
6.0	0.3986	7.63
7.0	0.4070	7.58
8.0	0.4273	7.54

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญ และ การผลิต ไคตินดีอะเซทิเลสของยีสต์ *C.krusei* MS_1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว ที่มีแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ชนิดของแหล่งไนโตรเจน	แอคติวิตีของเอนไซม์ (มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
แอมโมเนียมไนเตรท	0.3512	4.80
แอมโมเนียมคลอไรด์	0.3152	4.52
แอมโมเนียมซัลเฟต	0.3576	4.85
โซเดียมไนเตรท	0.2517	4.01
แอมโมเนียมซิเตรท	0.3129	4.49
แบคโตเปปโตน	0.4011	5.20
พอลิเปปโตน	0.3932	5.14

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญ และ การผลิต ไคตินดีอะเซทิเลสของยีสต์ *R. rubra* MS_8 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว ที่มีแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ชนิดของแหล่งไนโตรเจน	แอคติวิตีของเอนไซม์ (มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
แอมโมเนียมไนเตรท	0.2558	8.02
แอมโมเนียมคลอไรด์	0.2607	8.28
แอมโมเนียมซัลเฟต	0.2915	8.10
โซเดียมไนเตรท	0.2535	8.23
แอมโมเนียมซิเตรท	0.2743	8.24
แบคโตเปปโตน	0.4434	8.53
พอลิเปปโตน	0.4037	8.47

ตารางที่ 6 ผลการแปรผันความเข้มข้นของแบคโตเปปโตน และแอมโมเนียมไนเตรท ในช่วง 0.5 – 3.0 เปอร์เซ็นต์ ต่อการเจริญและ การผลิต ไคตินดีอะเซทิเลสของยีสต์ *C. krusei* MS_1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ความเข้มข้นแบคโตเปปโตน (เปอร์เซ็นต์)	แอคติวิตี (มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นแอมโมเนียมไนเตรท (เปอร์เซ็นต์)	แอคติวิตี (มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0.5	0.3323	4.6	0.5	0.2026	3.0
1.0	0.3587	5.0	1.0	0.2211	2.68
1.5	0.3582	5.2	1.5	0.200[illegible]	2.66
2.0	0.3413	5.2	2.0	0.2007	2.65
2.5	0.3468	5.4	2.5	0.1683	2.50
3.0	0.3413	5.8	3.0	0.1627	2.50

ตารางที่ 7 ผลการแปรผันความเข้มข้นของแบคโตเปปโตน ในช่วง 0.5 – 3.0 เปอร์เซ็นต์ ต่อการเจริญและการผลิตไคตินดีอะเซทิเลสของยีสต์ *R. rubra* MS_8 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ความเข้มข้นแบคโตเปปโตน (เปอร์เซ็นต์)	แอคติวิตี (มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0.5	0.3857	8.0
1.0	0.4570	8.4
1.5	0.4431	8.6
2.0	0.4324	8.8
2.5	0.4080	8.8
3.0	0.3932	9.0

ตารางที่ 8 แอคติวิตีของไคตินดีอะเซทิเลส และน้ำหนักเซลล์แห้ง ของ ยีสต์ *C. krusei* MS_1 และ *R. rubra* MS_8 เมื่อแปรผันความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ในช่วง 0.1– 0.5 เปอร์เซ็นต์ของอาหารเหลว บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ความเข้มข้นสารสกัดจากยีสต์ (เปอร์เซ็นต์)	*C. krusei* MS_1		*R. rubra* MS_8	
	แอคติวิตี (มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	แอคติวิตี (มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0.1	0.3283	4.6	0.3622	8.2
0.2	0.3663	5.4	0.4315	8.2
0.3	0.3532	5.2	0.4199	8.2
0.4	0.3408	5.2	0.4066	8.4
0.5	0.3553	5.2	0.4077	8.8

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบชนิดและความเข้มข้นของแหล่งเกลือแร่ที่เติมลงในอาหารสูตรปรับปรุง ที่มีผลต่อการผลิตไคตินดีอะเซทิเลส ของยีสต์ *C. krusei* MS_1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

การทดลอง	แอคติวิตี (มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร)
ชุดควบคุม (ไม่มีการเติมเกลือแร่)	0.3340
0.001 เปอร์เซ็นต์ $FeSO_4$	0.3435
0.005 เปอร์เซ็นต์ $FeSO_4$	0.3267
0.05 เปอร์เซ็นต์ $MgSO_4$	0.3277
0.1 เปอร์เซ็นต์ $MgSO_4$	0.3376
0.1 เปอร์เซ็นต์ K_2HPO_4	0.2986
0.5 เปอร์เซ็นต์ K_2HPO_4	0.1570
0.05 เปอร์เซ็นต์ KCl	0.3460
0.1 เปอร์เซ็นต์ KCl	0.3110

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบชนิดและความเข้มข้นของแหล่งเกลือแร่ที่เติมลงในอาหารสูตรปรับปรุง ที่มีผลต่อการผลิตไคตินดีอะเซทิเลส ของยีสต์ *R. rubra* MS_8 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

การทดลอง	แอคติวิตี (มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร)
ชุดควบคุม (ไม่มีการเติมเกลือแร่)	0.3025
0.001 เปอร์เซ็นต์ $FeSO_4$	0.2935
0.005 เปอร์เซ็นต์ $FeSO_4$	0.3180
0.05 เปอร์เซ็นต์ $MgSO_4$	0.3323
0.1 เปอร์เซ็นต์ $MgSO_4$	0.2643
0.1 เปอร์เซ็นต์ K_2HPO_4	0.3026
0.5 เปอร์เซ็นต์ K_2HPO_4	0.2353
0.05 เปอร์เซ็นต์ KCl	0.3400
0.1 เปอร์เซ็นต์ KCl	0.2888

ตารางที่ 11 ผลของความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ต่อการผลิต ไคตินดีอะเซทิเลส ของยีสต์ *C. krusei* MS_1 และ *R. rubra* MS_8 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นในช่วง 4.5 – 7.5 บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงยีสต์	แอคติวิตี (มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร)	
	C. krusei MS_1	*R. rubra* MS_8
4.5	0.4692	0.4878
5.0	0.4930	0.4715
5.5	0.5104	0.4750
6.0	0.5168	0.4773
6.5	0.4875	0.4739
7.0	0.4884	0.4637
7.5	0.4765	0.4550

ตารางที่ 12 ผลของอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงยีสต์ ต่อการเจริญและ การผลิตไคตินดีอะเซทิเลส ของยีสต์ *C. krusei* MS_1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ปรับปรุงสูตรแล้ว บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 , 30 , อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) , 35 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	แอคติวิตี (มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
25	0.4895	3.2
30	0.4950	3.2
35	0.2906	2.8
40	0	0.4

ตารางที่ 13 ผลของอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงเชื้อ ต่อการเจริญ และ การผลิต ไคตินดีอะเซทิเลส ของยีสต์ *R. rubra* MS_8 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ปรับปรุงสูตรแล้ว บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 , 30 , อุณหภูมิห้อง (30 ± 2) , 35 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	แอคติวิตี (มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
25	0.4738	5.0
30	0.4640	4.8
35	0.3031	4.5
40	0	0.2

ตารางที่ 14 ผลของความเร็วรอบของเครื่องเขย่า ต่อการผลิต ไคตินดีอะเซทิเลส ของยีสต์ *C. krusei* MS_1 และ *R. rubra* MS_8 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ปรับปรุงสูตรแล้ว บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 50 , 100 , 150 และ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ความเร็วรอบของเครื่องเขย่า (รอบต่อนาที)	แอคติวิตี (มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร)	
	C krusei MS_1	*R. rubra* MS_8
50	0	0
100	0.4011	0.4762
150	0.4994	0.4921
200	0.5020	0.4855

ตารางที่ 15 ผลของความเป็นกรดด่างต่อการทำงานของไคตินดีอะเซทิเลส เมื่อตรวจสอบแอคติวิตีใน บัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

pH	แอคติวิตีสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)		
4	93.7		
4.5	96.8		
5	100		
5.5	95.6		
6	95.5	87	
6.5	93.8	82	
7		73.7	
7.5		66.8	
8		63.6	58.9
8.5		59.6	56
9			47.7
9.5			45
10			39.2

ตารางที่ 16 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของไคตินดีอะเซทิเลส เมื่อตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ ที่ช่วงอุณหภูมิ 30 – 80 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	แอคติวิตีสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
30	97.7
40	100
50	96
60	91
70	85.6
80	78.2

ตารางที่ 17 ความเสถียรของไคตินดีอะเซทิเลส ต่อความเป็นกรดด่าง โดยบ่มเอนไซม์ที่ความเป็นกรดด่าง 4 – 10 ในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์

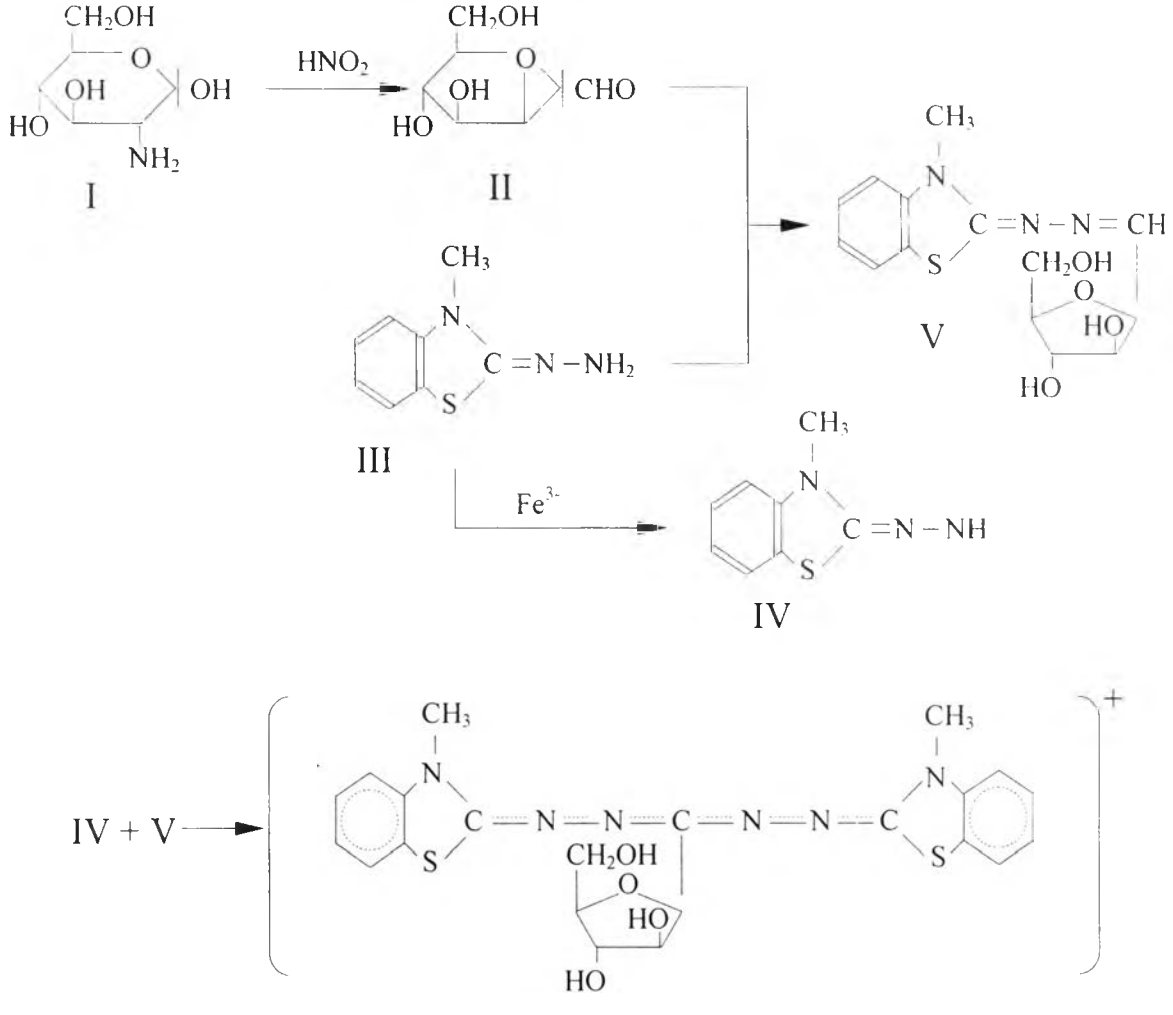
pH	แอคติวิตีสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)		
4	87.9		
4.5	91.3		
5	100		
5.5	98.4		
6	97.8	96.1	
6.5	98	95.4	
7		96.4	
7.5		98.5	
8		97	92
8.5		96.9	90
9			75.3
9.5			71.2
10			61.1

ตารางที่ 18 ความเสถียรของไคตินดีอะเซทิเลสต่ออุณหภูมิ โดยนำสารละลายเอนไซม์ใน 0.05 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.0 ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 30 – 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วตรวจหาแอคติวิตี

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	แอคติวิตีสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
30	97
40	100
50	97
60	95
70	90
80	20

ภาคผนวก ช

แสดงปฏิกิริยาการเกิดสี ในการวัดแอคติวิตีของไคตินดีอะเซทิเลส
โดยวิธีการเทียบสีของ Ride และ Drysdale (1972)



I = Hoxosamine

II = 2,5 – anhydrohexoses

III = 3-Methyl-2benzo-thaizolinone hydrazone

ประวัติผู้เขียน

นางสาว มนทรา จองจินดาสกุล เกิดวันที่ 26 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2518 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ในปีการศึกษา 2539 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตร วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2540
ได้นำผลงานวิจัย ไปเผยแพร่ในการประชุมวิชาการ

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

การประชุม "ความร่วมมือของภาครัฐและเอกชนในการพัฒนาการผลิต และการใช้สารไคติน-ไคโตซานแบบครบวงจร" , 2 – 3 เมษายน 2542 ที่โรงแรมไอเฟล อ.เมือง จ.ระนอง