ปฏิสัมพันธ์ของยีสต์ปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Lasiodiplodia theobromae*

Interaction of Antagonistic Yeasts Against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Lasiodiplodia theobromae*

รัติยา พงศ์พิสุทธา[1,2]ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล[1,2]พัทยา จำปีเรือง[1,2]วาสนา ทองปิ่น[1,2] และ รณภพ บรรเจิดเชดชู[1,2]

Ratiya Pongpisutta[1,2],Chainarong Rattanakreetakul[1,2], Pattaya Jumpeeruang[1,2],Wassana Tongpin[1,2]andRonnapop Bunjoedcherdchoo[1,2]

Abstract

The interaction between two pairs of antagonistic yeasts and fungal pathogens causing fruit rot of papaya (*Pichia anomala*/*Colletotrichum gloeosporioides* and *Saccharomycopsis fibuligera*/*Lasiodiplodia theobromae*) were investigated on papaya fruit using scanning electron microscope (SEM). The result showed attachment of antagonistic yeast cells to hyphal and conidial surface of pathogens. Additionally, pitting on the point of attachment to the hyphal and conidial walls were detected. Enzyme activity was examined by culturing antagonistic yeast and fungal pathogen in modified Czapek's broth medium added with 5 gm of peptone and 3 gm of beef extract. Result showed that both antagonistic yeasts can produce chitinase enzyme which can degrade the fungal hyphae and spores. So, it is believed that both antagonistic yeasts can be used for biological control of papaya fruit rot disease.

Keywords: *Colletotrichum gloeosporioides*, *Lasiodiplodia theobromae*, Antagonistic yeasts

บทคัดย่อ

ทำการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีสต์ปฏิปักษ์กับเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่ามะละกอ 2 คู่ ระหว่าง *Pichia anomala* กับ *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Saccharomycopsis fibuligera* กับ *Lasiodiplodia theobromae* โดยการปลูกเชื้อลงบนผลมะละกอ เมื่อตรวจสอบโดยตรงโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าเซลล์ของยีสต์ปฏิปักษ์เกาะบนผิวของสปอร์และบนเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรค นอกจากนี้พบว่าบริเวณที่เซลล์ยีสต์เกาะมีลักษณะเป็นหลุม เมื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โดยเลี้ยงยีสต์ปฏิปักษ์ร่วมกับเชื้อราสาเหตุโรคในอาหารเหลวดัดแปลงสูตร Czapek ที่ผสม peptone 5 กรัม และ beef extract 3 กรัม พบว่ายีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสองชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนส ซึ่งมีคุณสมบัติในการย่อยสลายเส้นใยและสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรค จากผลงานนี้ทำให้เชื่อได้ว่ายีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสองชนิดน่าจะนำมาใช้ในการควบคุมโรคผลเน่าของมะละกอโดยชีววิธีได้

คำสำคัญ: *Colletotrichum gloeosporioides*, *Lasiodiplodia theobromae*, ยีสต์ปฏิปักษ์

คำนำ

มะละกอเป็นผลไม้ที่นิยมใช้รับประทานสุก หากการจัดการในแปลงไม่เหมาะสม มีผลกระทบต่อการเก็บรักษาซึ่งทำให้เกิดโรคขั้วผลเน่าและแอนแทรคโนส ยีสต์ปฏิปักษ์หลายชนิดได้ถูกนำมาควบคุมโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยวที่เกิดจากเชื้อรา เช่น *Saccharomyces*, *Candida, Hansenula*, *Pichia*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces* และ *Zygosaccharomyces* ทั้งนี้เพื่อลดการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา ซึ่งกระทบต่อผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม การประเมินประสิทธิภาพในการนำยีสต์มาใช้เป็นชีวภัณฑ์และการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีสต์ปฏิปักษ์และเชื้อสาเหตุโรคเป็นสิ่งที่น่าสนใจเพื่อทราบถึงกลไกในการควบคุม

อุปกรณ์และวิธีการ

ประสิทธิภาพของยีสต์ปฏิปักษ์ต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อ *C. gloeosporioides* และ *L. theobromae*ในอาหารเหลว

เลี้ยงเชื้อรา *C. gloeosporioides* (CG) และ *L. theobromae* (LT) บนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้แสงสลับความมืดเป็นเวลา 12 ชั่วโมง นาน 5 วัน ตัดบริเวณขอบโคโลนีด้วย cork borer ใส่ลงในขวดฝาเกลียวขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มี Nutrient Yeast Dextrose Agar (NYDB) ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ขวดละ 3 ชิ้นวุ้น จากนั้นใช้ปิเปตดูด cell suspension ของ

[1]ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

[1] Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at KPS, KasetsartUniversuty, Kamphaengsaen Campus, NakhonPathom 73140

[2]ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10400

[2]Postharvest Technology Innovation Center, Commission on Higher Education, Bangkok 10400

ยีสต์ปฏิปักษ์ที่ความเข้มข้น $1x10^8$ เซลล์/มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดอาหาร NYDB ยีสต์ที่ทดสอบกับเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้แก่ *Pichia anomala* (PA) ส่วน *L. theobromae* ทดสอบกับ *Saccharomycopsis fibuligera* (SF) นำไปเขย่าบน shaker ความเร็ว 160 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ เมื่อครบกำหนดจึงกรองเส้นใยที่ได้ในแต่ละกรรมวิธีมาทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง freeze drier แล้วจึงชั่งน้ำหนักแห้ง คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใย โดยใช้สูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใย} = \frac{\text{นน.เฉลี่ยของเชื้อราชุดควบคุม - นน.เฉลี่ยของเชื้อราในแต่ละกรรมวิธี}}{\text{นน.เฉลี่ยของเชื้อราชุดควบคุม}} \times 100$$

และตรวจสอบความเปลี่ยนแปลงของลักษณะโครงสร้างของเส้นใยเชื้อราใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound microscope

กลไกของยีสต์ในการยับยั้งการทำลายของเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *L. theobromae* บนผลมะละกอ

หยด cell suspension ของยีสต์ *P. anomala* และ *S. fibuligera* ที่มีอายุ 5 วัน เลี้ยงบนอาหาร PDA ความเข้มข้น $1x10^8$ เซลล์/มล. ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25°ซ นาน 12 ชั่วโมง หยด spore suspension ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *L. theobromae* ความเข้มข้น $1x10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25°ซ นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวางในตะกร้าพลาสติก คลุมด้วยถุงพลาสติก และให้ความชื้นด้วยการฉีดน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปิดปากถุงให้สนิท บ่มที่อุณหภูมิ 25°ซ เมื่อครบระยะเวลาใช้ใบมีดโกนตัดชิ้นพืชให้มีขนาด 5×5 มิลลิเมตร หนา 3 มิลลิเมตร นำไปแช่ในสารละลาย glutaraldehyde 2.5% ใน 0.1 M phosphate, buffer pH 7.2 ทิ้งข้ามคืน จากนั้นนำไปเตรียมตัวอย่างทางชีววิทยาเพื่อตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (scanning electron microscope; SEM; JEOL, model JSM-5410LV)

การผลิตเอนไซม์ไคติเนสโดยยีสต์ปฏิปักษ์

เตรียมเซลล์แขวนลอยของยีสต์ *P. anomala* และ *S. fibuligera* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA อายุ 5 วัน ให้ได้ความเข้มข้น $1×10^8$เซลล์/มิลลิลิตร ดูดปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเหลวดัดแปลง Czapek (modified Czapek's broth medium) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่ผสมด้วย peptone 5 กรัม และ beef extract 3 กรัม ใน flask ขนาด 500 มิลลิลิตร และเลี้ยงยีสต์ร่วมกับเชื้อราที่เลี้ยงบนอาหาร PDA อายุ 5 วัน (*P. anomala*/*C. gloeosporioides* และ *S. fibuligera*/*L. theobromae*) นำ mycelial disc จำนวน 2 ชิ้นวุ้น ใส่ในอาหารเหลวนำไปเขย่าบนเครื่อง shaker ความเร็ว 160 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 7 วัน เก็บตัวอย่างเพื่อตรวจสอบกิจกรรมที่เวลา 3, 5 และ 7 วัน โดยเก็บสารตัวอย่างกรรมวิธีละ 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที นำส่วนที่เป็นน้ำใส (เป็น crude enzyme) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°ซ เพื่อทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส (chitinase activity) โดยตรวจสอบหาปริมาณน้ำตาลเอ็น-อะ***ซิติลดีกลูโคซามีน*** (N-acetyl-D-glucosamine, NAGA) ที่เกิดขึ้น และเปรียบเทียบปริมาณไคติเนสมาตรฐานจากเชื้อ *Streptomyces griseus* ด้วยวิธีของ Nelson (1944) และ Somogyi (1952) ทำโดยนำ crude enzyme ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบที่มีสารละลาย colloidal chitin ความเข้มข้น 1% ละลายใน 0.1 โมล โซเดียมอะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร และสารละลาย D ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ต้มในน้ำ 20 นาที แล้วจึงหยุดปฏิกิริยาในน้ำเย็น 5 นาที เติมสารละลาย E ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้ววัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer (Boceo, S-22) ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าที่ได้เพื่อประเมินกิจกรรมของคติเนสในสารละลายตัวอย่างกับกราฟมาตรฐาน (standard curve) ที่ได้มาใช้ในการคำนวณหาปริมาณ NAGA (ดัดแปลงจากวิธีการของ Nelson, 1944)

หมายเหตุ: สารละลาย A:ละลาย 25 กรัม anhydrous sodium carbonate, 25 กรัม sodium potassium tartrateและ 200 กรัม sodium sulphate ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วกรองเก็บไว้ในขวดสีชา

สารละลาย B:30 กรัม coppersulphate pentahydrate ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร จากนั้นหยด sulphuric acid เข้มข้น จำนวน 4 หยด เก็บไว้ในขวดสีชา

สารละลาย C:50 กรัม ammonium molybdate ละลายในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร จากนั้นผสม sulphuric acid เข้มข้น จำนวน 42 มิลลิลิตร จากนั้นจึงผสม 6 กรัม sodium arsenate heptahydrate ที่ละลายในน้ำ 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

สารละลาย D:สารละลาย B ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมในสารละลาย A ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

สารละลาย E:เจือจางสารละลาย C ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:5 ก่อนใช้

ผล

ประสิทธิภาพของยีสต์ปฏิปักษ์ต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อ*C.* Gloeosporioides และ *L.theobromae*ในอาหารเหลว

ผลการทดลองปรากฏว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ *P. anomala* (CG+Pa) มีน้ำหนักแห้ง 0.09 กรัม ส่วนกรรมวิธีควบคุม (CG only) มีน้ำหนัก 2.66 กรัม และสามารถคิดค่าการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ 96.76% ส่วนเชื้อรา *L. theobromae* ที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ *S. fibuligera* (LT+SF) มีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 0.11 กรัม ขณะที่กรรมวิธีควบคุม (LT only) มีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 0.63 กรัม (Table 1) จากการศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าทั้ง *C. gloeosporioides* และ *L. theobromae* มีเซลล์ยีสต์จำนวนมากเกาะอยู่บริเวณโดยรอบเส้นใยผนังเซลล์มีการติดสีไม่สม่ำเสมอ เส้นใยมีลักษณะผิดปกติ ผนังเซลล์มีลักษณะคล้ายเป็นรู มีการสูญเสียของเหลวภายใน และเส้นใยมีการเจริญขยายออกไปทางปลายเส้นใย (proliferation) น้อย เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (Figure 1 and Figure 2)

Table 1 Efficiency of two antagonistic yeasts – *Pichia anomala* and *Saccharomycopsis fibuligera* on inhibition of mycelia growth of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Lasiodiplodia theobromae* causing papaya fruit rot disease

Treatment	Mycelial dry weight (gm)	Mycelial growth inhibition (%)
CG only (control)	2.66	0.00
CG + PA	0.09	96.76
LT only (control)	0.63	0.00
LT + SF	0.11	83.35

กลไกของยีสต์ในการยับยั้งการทำลายของเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *L. theobromae* บนผลมะละกอ

จากการตรวจสอบใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด พบว่าเซลล์ยีสต์ *P. anomala* และ *S. fibuligera* สามารถเจริญครอบคลุมพื้นผิวและบริเวณผลที่ทำแผลบนผลมะละกอได้ดี โดยสามารถยึดเกาะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *L. theobromae* ได้ ซึ่งบริเวณที่ถูกยึดเกาะด้วยเซลล์ยีสต์จะมีลักษณะเหี่ยวและผนังเซลล์ไม่สมบูรณ์ พบเซลล์ยีสต์ฝังตัวอยู่บริเวณเส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา (Figure 3)

การผลิตเอนไซม์ไคติเนสโดยยีสต์ปฏิปักษ์

พบว่ายีสต์ *P. anomala* ผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้ 1.65, 1.36 และ 0.91 unit/มิลลิลิตร ในวันที่ 3, 5 และ 7 ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงร่วมกับ *C. gloeosporioides* พบว่าผลิตเอนไซม์ได้ 1.21, 1.01 และ 0.90 unit/มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนยีสต์ *S. fibuligera* มีการผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้ 1.32, 1.15 และ 1.56 unit/มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *L. theobromae* พบการผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้นโดยมีค่าเท่ากับ 2.07, 3.73 และ 1.64 unit/มิลลิลิตร ตามลำดับ (Table 2)

Table 2 Chitinase production of antagonistic yeasts in modified Czapek medium at room temperature and detected by monitoring the UV absorbance at 550 nm

Treatment	Chitinase (unit/ml)		
	day3	day5	day7
PA	1.65	1.36	0.91
CG + PA	1.21	1.01	0.90
SF	1.32	1.15	1.56
LT + SF	2.07	3.73	1.64

วิจารณ์ผล

ยีสต์ปฏิปักษ์และเชื้อสาเหตุมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างกัน งานวิจัยนี้พบว่ายีสต์ *P. anomala* และ *S. fibuligera* สามารถเพิ่มปริมาณได้บนผลมะละกอ และสัมผัสส่วนของเส้นใยและสปอร์ของเชื้อราสาเหตุทั้ง *C. gloeosporioides* และ *L. theobromae* ซึ่งเป็นบทบาทสำคัญต่อการนำมาใช้ในการควบคุมโดยชีววิธี (Arras, 1996; Cook, 2002) บริเวณผนังเส้นใยของเชื้อราสาเหตุเห็นได้ชัดว่าเกิดการรั่วไหลทำให้สูญเสียของเหลวภายใน (cytoplasm) อาจมีผลต่อคุณสมบัติของโปรตีน (protein integrity) และไปยับยั้งกระบวนการหายใจระดับเซลล์ของเชื้อรา จากงานวิจัยของ Hashem and Alamri (2009) พบว่าเมื่อยีสต์ *P. anomala* Moh 93 เข้าไปสัมผัสยึดเกาะบริเวณปลายเส้นใยเชื้อรา ทำให้ผนังของเส้นใยเชื้อรา เกิดรอยเว้าเป็นรู เมื่อศึกษาการสร้างเอนไซม์ไคติเนส พบว่ายีสต์ทั้งสองชนิดสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ได้ และไปย่อยสลายผนังเซลล์ซึ่งเชื้อราสาเหตุกลุ่มนี้มีไคติน (chitin) เป็นองค์ประกอบโดยส่วนใหญ่ Nantawanit *et al.* (2010) รายงานว่าเชื้อยีสต์ *Pichia guilliermondii* R13 ผลิตสารบางชนิดออกมาได้แก่ phenylalanine ammonia-lyase (PAL) chitinase และ ß-1, 3–glucanase ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าสารเหล่านี้อาจส่งผลทำให้มีการเจริญของเส้นใยที่ผิดปกติ หรือ บวมโป่ง และสปอร์ และเส้นใยของเชื้อราเกิดความผิดปกติ อย่างไรก็ตาม Ízgü *et al.* (2006) รายงานว่ากิจกรรมของ ß-1, 3–glucanase มีผลต่อการปลดปล่อยสารพิษ(killer toxin)ของยีสต์ *P. anomala* NCYC 434 ซึ่งมีบทบาทต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคได้

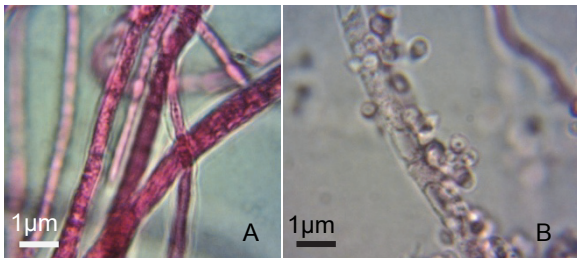

Figure 1 (A) Hyphae of *Colletotrihum gloeosporioides* (B) *Pichia anomala*TISTR5329 yeast cells showing superficial attachment on *C. gloeosporioides* hypha

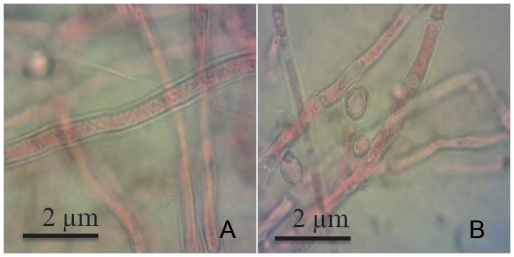

Figure 2 (A) Hyphae of *Lasiodiplodia theobromae* (B) yeast cells of *Saccharamycopsis fibuligera* affecting to cytoplasm leakage of *L. theobromae*

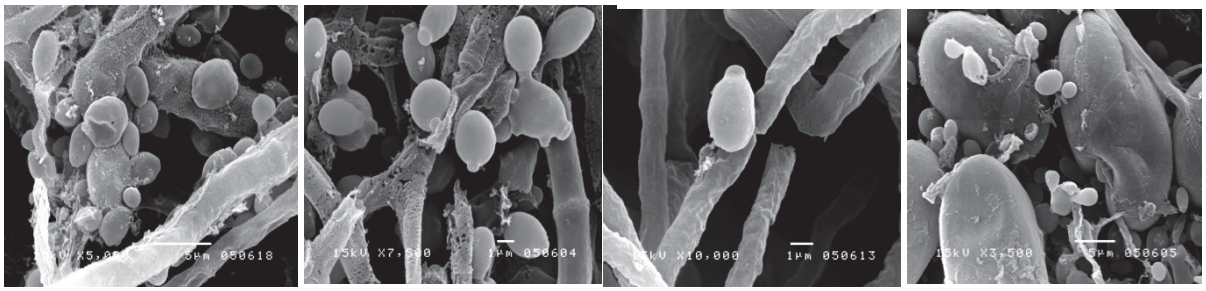

Figure 3 Scanning electron micrographs antagonistic yeasts (A) cells of *Pichia anomala* TISTR5329 colonized around hyphae of *Colletotrichum gloeosporioides* and pitting in the hyphal cell wall of the causal agent (B-D) yeast cells of *Saccharomycopsis fibuligera* budding and interacting hyphae and also conidia *of Lasiodiplodia theobromae*

สรุป

ยีสต์ปฏิปักษ์ *P. anomala* และ *S. fibuligera* เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว NYDB สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides*และ *L. theobromae* ได้ จากการตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์ยีสต์เกาะโดยรอบเส้นใยของเหลวภายในเส้นใยเกิดการรั่วไหล เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด พบว่าเซลล์ยีสต์เกาะฝังตัวส่วนของสปอร์และเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค ทำให้มีลักษณะเหี่ยวและผนังเซลล์ไม่สมบูรณ์ นอกจากนี้ยังพบว่ายีสต์ทั้งสองชนิดสามารถสร้างเอนไซม์ไคติเนสได้ โดยเฉพาะในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคร่วมกับยีสต์จะมีการผลิตเอนไซม์เพิ่มมากขึ้น

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ให้การสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Arras, G. 1996. Mode of action of an isolate of *Candida famata* in biological control of *Penicillium digitatum* in orange fruit. Postharvest Biology and Technology 8: 191-198.

Cook, D.W.M. 2002.A laboratory simulation for vectoring of *Trichosporon pullulans* by conidia of *Botrytis cinerea*. Phytopathology 92: 1293-1299.

Hashem M. and S. Alamri. 2009. The biocontol of postharvest disease (*Botryodiplodia theobromae*) of guava (*Psidium guajava* L.) by the application of yeast strains. Postharvest Biology and Technology 53: 123–130.

ÍzgÜ, F., D. Altinbay and T. Acun. 2006. Killer toxin of *Pichia anomala* NCYC432; purification, characterization and its exo-ß-1,3-glucanase activity. Enzyme and Microbial Technology 39: 669-676.

Nantawanit, N., A. Chanchaichaovivat, B. Panijpan and P. Ruenwongsa. 2010. Induction of defense response against *Colletotrichum capsici* in chili fruit by the yeast *Pichia guilliermondii* strain R13. Biological Control 52: 145-152.

Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. Journal of Biological Chemistry 153: 375-380.

Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. Journal of Biological Chemistry 195: 19-23.