การผลิตเดกซ์แทรนโดย *Streptococcus sobrinus* 6715 เพื่อชักนำการสร้างเดกซ์แทรนเนสใน *Arthrobacter* sp. AG-2

นางสาวนันทิดา วานิชวงศ์วรรณ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-2848-4

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION OF DEXTRAN BY *Streptococcus sobrinus* 6715 FOR USE AS INDUCER FOR DEXTRANASE PRODUCTION IN *Arthrobacter* sp. AG-2

Miss Nantida Vanichwongwan

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A thesis Submited in Partial Fulfilment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Industrial Microbiology
Department of Microbiology
Faculty of science
Chulalongkorn University
Academic Year 2002

ISBN 974-17-2848-4

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตเดกซ์แทรนโดย *Streptococcus sobrinus* 6715 เพื่อชักนำการสร้างเดกซ์แทรนเนสใน *Arthrobacter* sp. AG-2
โดย	นางสาวนันทิดา วานิชวงศ์วรรณ
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์ ดร.สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.กาญจณา จันทองจีน)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นันทิดา วานิชวงศ์วรรณ : การผลิตเดกซ์แทรนโดย *Streptococcus sobrinus* 6715 เพื่อชักนำการสร้างเดกซ์แทรนเนสใน *Arthrobacter* sp. AG-2. (PRODUCTION OF DEXTRAN BY *Streptococcus sobrinus* 6715 FOR USE AS INDUCER FOR DEXTRANASE PRODUCTION IN *Arthrobacter* sp. AG-2) อ.ที่ปรึกษา: ผศ.ดร. สุเทพ ธนียวัน, อ.ที่ปรึกษาร่วม: อ.ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา, 104 หน้า. ISBN 974-17-2848-4

การเปรียบเทียบการผลิตเดกซ์แทรนจาก *Streptococcus sobrinus* 6715 ในอาหาร Tryptic soy broth, Brain heart infusion และ Basal medium พบว่าอาหาร Basal medium ให้ปริมาณเดกซ์แทรนสูงสุดในอาหารทั้ง 3 ชนิด และปริมาณซูโครสที่เหมาะสมในการผลิตเดกซ์แทรนในอาหาร Basal medium คือ 1.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เมื่อเปรียบเทียบการเจริญพร้อมการผลิตเดกซ์แทรนของ *S. sobrinus* 6715 พบว่าเดกซ์แทรนเป็นสารที่ถูกสร้างควบคู่ไปกับการเจริญ สำหรับการผลิตเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 จากเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ทำได้โดยการกำจัดพันธะ α-1,6 ออกโดยใช้เดกซ์แทรนเนสที่จำเพาะต่อพันธะ α-1,6 จาก *Penicilliun* sp. SMCU 3-14 และเมื่อนำเดกซ์แทรน T-2000 [α-1,6], เดกซ์แทรน จาก *S.sobrinus* 6715 [α-1,6 และ α-1,3], และเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 มาชักนำการสร้างเดกซ์แทรนเนสใน *Arthrobacter sp.* AG-2 และตรวจสอบความสามารถในการย่อยเดกซ์แทรนโดยดูการปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi-Nelson และ โครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง พบว่าเดกซ์แทรนเนส [α- 1,6] สามารถย่อยเดกซ์แทรน T-2000 โดยปลดปล่อยน้ำตาลกลูโคส,ไอโซมอลโทส และไอโซมอลโทเททราโอสออกมา และย่อยเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ได้ โดยปลดปล่อยกลูโคส, ไอโซมอลโทเททราโอส และสารที่มี retention time เท่ากับ 13.00 นาที แต่เดกซ์แทรนเนส [α-1,6] ไม่สามารถย่อยเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ได้ ในขณะที่เดกซ์แทรนเนสที่ถูกชักนำด้วยเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 [α-1,6 และ α-1,3] และ เดกซ์แทรนเนส [α-1,3] สามารถย่อยเดกซ์แทรนทั้ง 3 ชนิดโดยปลดปล่อยเฉพาะกลูโคสเท่านั้น

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2545 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4372306323: MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: *Arthrobacter* sp. AG-2 / DEXTRAN / DEXTRANASE / *Streptococcus sobrinus* 6715

NANTIDA VANICHWONGWAN: PRODUCTION OF DEXTRAN BY *Streptococcus sobrinus* 6715 FOR USE AS INDUCER FOR DEXTRANASE PRODUCTION IN *Arthrobacter* sp. AG-2. THESIS ADVISOR: ASSIST. PROF. SUTHEP THANIYAVARN, Ph.D., THESIS COADVISOR: SUPAT CHAREON PORNWATTANA, Ph.D., 104 pp. ISBN 974-17-2848-4

Growth and dextran production of *Streptococcus sobrinus* 6715 in Tryptic soy broth, Brain heart infusion and Basal Medium were compared. Result obtained indicated Basal Medium as better medium among the 3 media tested. The optimum amount of sucrose as inducer for dextran production is 1.5% w/v, with this it was found that dextran was produced as primary metabolite. The preparation of dextran with α-1,3 linkage from *S.sobrinus* 6715 dextran was carried out by the hydrolysis of α-1,6 linkages via dextranase of *Penicillium* sp. SMCU 3-14, an α-1,6 specific dextranase. The use of dextran T-2000 [α-1,6 dextran], dextran from *S. sobrinus* 6715 [α-1,6 and α-1,3 dextran] and the above [α-1,3] dextran as inducer for dextranase production by *Arthrobacter* sp. AG-2 gave rise of different dextranases. Judging from products liberated by the respective enzyme via Somogyi-Nelson and HPLC analysis revealed that: dextranase [α-1,6] hydrolysed dextran T-2000 with the release of glucose, isomaltose and isomaltotetraose while glucose, isomaltotetraose and an unknown fraction with the retention time of 13 minute were liberated when dextran from *S. sobrinus* 6715 was employed as substrate. The same enzyme failed to hydrolyse the [α-1,3] dextran whereas dextranase from *Arthrobacter* sp. AG-2 induced by either dextran from *S. sobrinus* 6715 [α-1,6 and α-1,3] or dextran [α-1,3] was able to digest all 3 dextrans with the released of glucose as sole product.

Department Microbiology	Student's signature……..…
Field of study Industrial Microbiology	Advisor's signature ……..……..
Academic year 2002	Co-advisor's signature……

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ ดร.สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ ความเป็นกันเอง ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนตรวจแก้ต้นฉบับวิทยานิพนธ์ ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการในการสอบ

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และรองศาสตราจารย์ ดร. กาญจณา จันทองจีน ที่กรุณารับเป็นกรรมการ และให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆตลอดจนช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณอาจารย์ในภาควิชาจุลชีววิทยา ขอบพระคุณ คุณสุหัทยา จิระนันทิพร และคุณ ณัฐพันธุ์ ศุภกา ที่คอยดูแล เอาใจใส่ ว่ากล่าวตักเตือน และสอนให้ผู้เขียนมีความเข้าใจทั้งในเรื่องงานวิจัยและสิ่งรอบๆตัว ผู้เขียนมีความประทับใจในน้ำใจของคุณสุหัทยาและคุณณัฐพันธุ์เป็นอย่างยิ่ง ขอขอบคุณ คุณศิโรจน์ ศรีสรากรณ์ คุณสุพินดา ศิริวราศิลป์ คุณศิริวัตน์ ปุณฑริกพันธ์ คุณธัญญรัตน์ ชำนาญกิจ และคุณอรสุภาว์ สายเพชร ที่คอยห่วงใย ถามไถ่ทุกข์สุขและคอยเสนอความช่วยเหลือให้เสมอมา คุณสีหนาถ ประสงค์สุข คุณกิติพงศ์ ปวรางกูร คุณกรินทร์ คุ้มไข่ และคุณวิชญพันธุ์ ศิลปสุวรรณ ที่คอยเป็นที่ปรึกษา ช่วยแก้ไขปัญหาทั้งเรื่องงานและเรื่องส่วนตัวตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆทุกคนที่ทำให้ช่วงเวลาแห่งการทำงานวิจัยเป็นช่วงเวลาที่สนุกสนานและสดใส

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และคุณป้า ที่ให้การสนับสนุนและความช่วยเหลือตลอดจนกำลังใจให้แก่ผู้วิจัยเสมอมา

ขอกราบขอบพระคุณ

นันทิดา วานิชวงศ์วรรณ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญตาราง.....ซ
สารบัญรูป.....ฌ
สัญลักษณ์และคำย่อ.....ฑ
บทที่
1. บทนำ..... 1
2. อุปกรณ์และวิธีการวิจัย.....24
3. ผลการทดลอง.....36
4. สรุปและอภิปรายผลการทดลอง.....79
5. ข้อเสนอแนะในการวิจัย.....85
รายการอ้างอิง.....86
ภาคผนวก
ภาคผนวก ก.....92
ภาคผนวก ข.....95
ภาคผนวก ค.....98
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....104

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แบคทีเรียชนิดต่างๆที่พบได้ในช่องปาก.....	2
2	แสดงเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้.....	18
3	แสดงปริมาณเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ก่อนและหลังการย่อยด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Penicillium* sp. SMCU 3-14 จนกระทั่งปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงที่.....	44
4	แสดงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายเดกซ์แทรนชนิดต่างๆ ด้วยเดกซ์แทรน-เนส [α-1,6] จาก *Penicillium* sp. SMCU 3-14.....	51
5	แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วิเคราะห์ได้จากการย่อยสลายเดกซ์แทรนT-2000, เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม, เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 และเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ด้วยกรดซัลฟูริก.....	52
6	แสดงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายเดกซ์แทรนชนิดต่างๆ ด้วยเดกซ์แทรน-เนส [α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2	60
7	แสดงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายเดกซ์แทรนชนิดต่างๆ ด้วยเดกซ์แทรน-เนส [α-1,3 และ α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2.....	68
8	แสดงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายเดกซ์แทรนชนิดต่างๆ ด้วยเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 จาก *Arthrobacter* sp. AG-2.....	75
9	แสดงผลิตภัณฑ์ทั้งหมดที่ได้จากการย่อยสลายเดกซ์แทรน T-2000, เดกซ์-แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 และเดกซ์แทรนพันธะ α–1,3 ด้วยเดกซ์แทรน-เนสจาก *Penicillium* sp. SMCU 3-14 และ *Arthrobacter* sp. AG-2 ที่ถูกชักนำด้วยเดกซ์แทรนพันธะต่างๆ.....	76

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	แสดงพันธะเคมีชนิดต่างๆ ที่ก่อให้เกิดการเกาะติดของแบคทีเรียบนผิวฟัน.....	6
2	ภาพจำลองแสดงการเกิดคราบฟัน.....	7
3	ก. แสดงโครงสร้างของเดกซ์แทรนพันธะ α-1,6 ปริมาณสูง	9
	ข. แสดงโครงสร้างของเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ปริมาณสูง.....	9
4	แสดงการเมแทบอลิซึมของอาหารพวกคาร์โบไฮเดรตโดยแบคทีเรียในคราบจุลินทรีย์.....	12
5	แสดงปริมาณเดกซ์แทรนที่ผลิตโดย *S. sobrinus* 6715 ที่เวลาต่างๆ ในอาหาร Basal medium, Brain heart infusion และ Tryptic soy broth ที่อุณหภูมิ 37^{O}ซ ในภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบไม่มีการเขย่า.....	37
6	แสดงลักษณะของเดกซ์แทรนที่ผลิตโดย *S. sobrinus* 6715 เมื่อเลี้ยงในอาหาร Brain heart infusion (BHI), Tryptic soy broth (TSB) และ Basal medium ที่เสริมด้วยซูโครส 2% ที่อุณหภูมิ 37^{O}ซ ในภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบไม่มีการเขย่า เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	38
7	แสดงลักษณะของเดกซ์แทรนที่ผลิตโดย *S. sobrinus* 6715 เมื่อเลี้ยงในอาหาร Brain heart infusion (BHI), Tryptic soy broth (TSB) และ Basal medium ที่เสริมด้วยซูโครส 2% ที่อุณหภูมิ 37^{O}ซ ในภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบไม่มีการเขย่า หลังจากผ่านการระเหยแห้ง.....	39
8	แสดงปริมาณเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *S. sobrinus* 6715 ในอาหาร Basal medium โดยมีการแปรผันปริมาณซูโครสตั้งแต่ 0-5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ 37^{O}ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบไม่มีการเขย่า.....	40
9	แสดงการเจริญของ *S. sobrinus* 6715 โดยการวัดปริมาณโปรตีนจากเซลล์ในอาหาร Basal medium ที่มีการเติมกลูโคส และซูโครสที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร).....	41
10	แสดงการผลิตเดกซ์แทรนโดย *S. sobrinus* 6715 ในอาหาร Basal medium ที่มีความเข้มข้นของซูโครส 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 0-48 ชั่วโมง อุณหภูมิ 37^{O}ซ ในภาวะการเลี้ยงแบบไม่มีการเขย่า.....	42
11	แสดงผลการย่อยสลายเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *S. sobrinus* 6715 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Penicillium sp*. SMCU 3-14.....	43

รูปที่ (ต่อ) **หน้า**

12 แสดงลักษณะของเดกซ์แทรนที่ผลิตโดย *S. sobrinus* 6715 ในอาหาร Basal medium และสารที่เหลือจากการย่อยด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Penicillium* sp. SMCU 3-14 4 ครั้ง และผ่านการทำแห้งแล้ว..... 44

13 โครมาโทแกรมแสดงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายเดกซ์แทรน T-2000 เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 และเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ด้วยกรดซัลฟูริก..... 46

14 โครมาโทแกรมแสดงชนิดของน้ำตาลก่อนและหลังการย่อยสลายเดกซ์แทรน T-2000 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Penicillium* sp. SMCU 3-14..... 49

15 แสดงปริมาณน้ำตาลชนิดต่างๆที่ได้จากการย่อยสลายเดกซ์แทรน T-2000 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Penicillium* sp. SMCU 3-14..... 49

16 โครมาโทแกรมแสดงชนิดของน้ำตาลก่อนและหลังการย่อยสลายเดกซ์แทรน จาก *S. sobrinus* 6715 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Penicillium* sp. SMCU 3-14..... 50

17 แสดงปริมาณกลูโคส และไอโซมอลโทสที่ถูกปลดปล่อยจากการย่อยสลายเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Penicillium* sp. SMCU 3-14..... 51

18 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยเดกซ์แทรน T-2000, เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 และเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Arthrobacter sp*. AG-2..... 54

19 โครมาโทแกรมแสดงชนิดของน้ำตาลก่อนและหลังการย่อยสลายเดกซ์แทรน T-2000 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2..... 55

20 แสดงปริมาณกลูโคส และ ไอโซมอลโทเททราโอสที่ถูกปลดปล่อยจากการย่อยสลาย เดกซ์แทรน T-2000 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2..... 56

21 โครมาโทแกรมแสดงชนิดของน้ำตาลก่อนและหลังการย่อยสลายเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2..... 57

รูปที่ (ต่อ) **หน้า**

22 แสดงปริมาณกลูโคสและไอโซมอลโทเททราโอสที่ถูกปลดปล่อยจากการย่อยสลายเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2..... 58

23 โครมาโทแกรมแสดงชนิดของน้ำตาลก่อนและหลังการย่อยสลายเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2..... 59

24 แสดงการปริมาณกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2..... 60

25 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยเดกซ์แทรน T-2000, เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 และเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และ α-1,6] จาก *Arthrobacter sp*. AG-2..... 62

26 โครมาโทแกรมแสดงชนิดของน้ำตาลก่อนและหลังการย่อยสลายเดกซ์แทรน T-2000 ด้วย เดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และ α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2..... 63

27 แสดงการปริมาณกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายเดกซ์แทรน T-2000 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และ α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2..... 64

28 โครมาโทแกรมแสดงชนิดของน้ำตาลก่อนและหลังการย่อยสลายเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และ α-1,6]] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2..... 65

29 แสดงการปริมาณกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และ α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2. 66

30 โครมาโทแกรมแสดงชนิดของน้ำตาลก่อนและหลังการย่อยสลายเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และ α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2..... 67

31 ปริมาณกลูโคสได้จากการย่อยสลายเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และ α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2..... 68

32 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยเดกซ์แทรน T-2000, เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 และเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] จาก *Arthrobacter sp*. AG-2..... 69

รูปที่	(ต่อ)	หน้า
33	โครมาโทแกรมแสดงชนิดของน้ำตาลก่อนและหลังการย่อยสลายเดกซ์แทรน T-2000 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2.....	70
34	แสดงปริมาณกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายเดกซ์แทรน T-2000 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2.....	71
35	โครมาโทแกรมแสดงชนิดของน้ำตาลก่อนและหลังการย่อยสลายเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2.....	72
36	แสดงปริมาณกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2.....	73
37	โครมาโทแกรมแสดงชนิดของน้ำตาลก่อนและหลังการย่อยสลายเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2.....	74
38	แสดงปริมาณกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ด้วยเดกซ์แทนเนส [α-1,3] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2.....	75
39	แสดงระดับน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยสลายเซลลูโลส และไนจีแรน ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2.....	77
40	แสดงระดับน้ำตาลรีดิวซ์จกการย่อยสลายเซลลูโลส และไนจีแรน ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2.....	78
41	กราฟมาตรฐานแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร กับน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....	98
42	กราฟมาตรฐานแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร กับโปรตีนมาตรฐานโบวีนซีรั่มอัลบูมิน ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....	99
43	กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณกลูโคสกับอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของกลูโคสต่อเมธิลแอลฟาดีกลูโคไพราโนไซด์ ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง.....	100
44	กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณไอโซมอลโทสกับอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของไอโซมอลโทสและเมธิลแอลฟาดีกลูโคไพราโนไซด์ ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง	101

รูปที่ (ต่อ) **หน้า**

45 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณไอโซมอลโทไทรโอสกับอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของไอโซมอลโทไทรโอสและเมธิลแอลฟาดีกลูโคไพราโนไซด์ ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง..... 102

46 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณไอโซมอลโทเททราโอสกับอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของไอโซมอลโทเททราโอสและเมธิลแอลฟาดีกลูโคไพราโนไซด์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง..... 103

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สัญลักษณ์และคำย่อ

^{O}ซ = องศาเซลเซียส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ปัญหาสุขภาพในช่องปากโดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคเกี่ยวกับเหงือกและฟันนับเป็นปัญหาทางด้านทันตสาธารณสุขที่สำคัญและมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นในปัจจุบัน โรคฟันผุเกิดได้กับประชาชนทุกเพศทุกวัย แม้ว่าจะมีการให้ความรู้และรณรงค์ให้ประชาชนเอาใจใส่ดูแลตนเอง แต่ยังพบว่าประชาชนยังคงเป็นโรคเหงือกและโรคฟันผุอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งก่อให้เกิดความเจ็บปวด บั่นทอนสุขภาพร่างกาย สูญเสียบุคลิกภาพที่ดี และสิ้นเปลืองในการรักษา การต่อสู้กับโรคฟันผุเป็นที่ทราบกันดีว่าเป็นเรื่องที่ควบคุมได้ยาก เนื่องจากปัจจัยหลายประการ เช่น ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ในช่องปาก อาหารและลักษณะนิสัยการบริโภค รวมถึงสุขนิสัยในการรักษาความสะอาดของแต่ละบุคคล และเมื่อเกิดอาการฟันผุขั้นรุนแรงขึ้นแล้ว ร่างกายไม่สามารถซ่อมแซมตัวเองด้วยวิธีการทางธรรมชาติได้ นอกจากต้องใช้วัสดุหรือสิ่งแปลกปลอมต่างๆเข้ามาทดแทนให้ฟันสามารถใช้การได้เหมือนเดิม ดังนั้นการป้องกันและควบคุมโรคอย่างมีประสิทธิภาพจึงมีความสำคัญมากกว่าการรักษา จึงมีการคิดค้นวิธีการและผลิตภัณฑ์ต่างๆ สำหรับช่องปากเพื่อการป้องกันฟันผุโดยต่างมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกัน

จุลินทรีย์ในช่องปาก

ช่องปากเป็นส่วนของร่างกายที่มีจุลินทรีย์อาศัยอยู่มากมาย โดยอาจมีจุลินทรีย์มากถึง 350 ชนิด และในน้ำลาย 1 มิลลิลิตรอาจมีจุลินทรีย์ถึง 100 ตัว (Antonie van Leeuwenhook, 1964) จุลินทรีย์ในช่องปากจะมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา ซึ่งโดยปกตินิเวศวิทยาในช่องปากจะทำหน้าที่ควบคุมสัดส่วนของเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์และที่เป็นโทษให้มีความสมดุลย์กันทั้งชนิดและปริมาณ แม้ว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่พบภายในปากจะประกอบไปด้วยทั้งแบคทีเรีย (bacteria), ยีสต์ (yeast), สไปโรคีต (spirochete), ไมโครพลาสมา (mycoplasma), ไวรัส (virus) และโปรโตซัว (protozoa) แต่จุลินทรีย์ที่มีการศึกษากันมากและพบว่าเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดฟันผุคือแบคทีเรีย แบคทีเรียในช่องปากมีทั้งแบคทีเรียรูปกลม (cocci) แบคทีเรียรูปแท่ง (bacilli), แบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจน (aerobe), แบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจน (anaerobe), แบคทีเรียแกรมบวก (gram- positive bacteria) และแบคทีเรียแกรมลบ (gram- negative bacteria) ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แบคทีเรียชนิดต่างๆที่พบได้ในช่องปาก (จินตกร, 2542)

	แบคทีเรียแกรมบวก		**แบคทีเรียแกรมลบ**	
	กึ่งต้องการออกซิเจน	**ไม่ต้องการออกซิเจน**	**กึ่งต้องการออกซิเจน**	**ไม่ต้องการออกซิเจน**
แบคทีเรียรูปกลม	*Streptococcus* *- S. mutans* *- S. sanguis* *- S. salivarius* *- S. milleri* *- S. mitis* *Micrococcus*	*Peptostreptococcus* *Peptococcus* *Streptococcus*	*Neisseria* *Branhamella*	*Veillonella* *- V. alcalescens* *- V. atypica* *- V. parvula*
แบคทีเรียรูปแท่ง	*Actinomyces* *- A. naeslundii* *- A. viscosus* *Bacterionema* *Rothia* *Nocardia* *Lactobacillus* *- L. acidophilus* *- L. casei* *- L. fermentum*	*Actinomyces* *- A. israelii* *- A. odontolyticus* *Arachnia* *Eubacterium* *Propionibacterium* *Bifidobacterium*	*Actinobacillus* *- A. actinomyce temcomitans* *Capnocytophaga* *- C. gingivalis* *- C. ochracea* *- C. sputigena* *Eikenella* *- E. corrodens* *Haemophilus* *- H. segnis*	*Bacteroides* *- B. gingivalis* *- B. intermedius* *- B. forsythus* *- B. melaninogenicus* *- B. loescheii* *- B. dentocola* *- B. corporis* *Fesobacterium* *Leptotrichia* *Campylobacter* *Selenomonas* *Wolinella*
สไปโรคีตและจุลินทรีย์อื่น ๆ	*Treponema* *-T. vincentii* *-T. denticola* *-T. socranskii*	*Mycoplasma*	*Candida* *- C. albicans*	*Entamoeba* *Trichomonas*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในปัจจุบันพบว่าแบคทีเรียในกลุ่มของ Mutans Streptococci ซึ่งได้แก่ *Streptococcus mutans* และ *Streptococcus sobrinus* (Mukasa และคณะ, 1989) มีบทบาทในการก่อให้เกิดโรคฟันผุได้มากที่สุด เนื่องจากเชื้อดังกล่าวสามารถยึดติดกับผิวของเคลือบฟันโดยการสร้างพอลีเมอร์ทั้งชนิดที่ละลายน้ำและไม่ละลายน้ำออกมานอกเซลล์ มีความสามารถในการสร้างกรดอินทรีย์หลายชนิด และมีความทนทานต่อกรด จากการศึกษาพบว่าการเกิดฟันผุในผู้ใหญ่ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ เกิดจาก *Streptococcus mutans* ในขณะที่บางกลุ่มได้กล่าวว่า 8-40 เปอร์เซ็นต์ เกิดจาก *Streptococcus sobrinus* และมักพบว่าอาการจะรุนแรงถ้ามี *Streptococcus sobrinus* ร่วมด้วย (Roy และคณะ, 1987)

ปัจจัยในการก่อโรคฟันผุของ Mutans Streptococci

1. ความสามารถในการสร้างสารยึดติดกับผิวของเคลือบฟันจากน้ำตาลซูโครส

ซูโครสหรือน้ำตาลทรายเป็นสารให้ความหวานที่มีรสชาติดี หาง่าย ราคาถูก จึงเป็นที่นิยมในการบริโภค และใช้มากในอุตสาหกรรมอาหาร โดยปริมาณการบริโภคซูโครสโดยเฉลี่ยอยู่ที่ 50 กิโลกรัมต่อคนต่อปี (March และ Martin, 1999) แต่ซูโครสที่เป็นที่นิยมบริโภคนี้กลับเป็นสารตั้งต้นสำคัญที่แบคทีเรียในช่องปากใช้ในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์มีความเหนียวหนืดที่เรียกว่า เดกซ์แทรน (dextran) เดกซ์แทรนจะทำหน้าที่คล้ายกาว ยึดให้จุลินทรีย์ติดอยู่บนผิวฟันกลายเป็นคราบจุลินทรีย์ ซึ่งจะเป็นที่เกาะของแบคทีเรียชนิดอื่นต่อมาด้วย ในจำนวนเชื้อแบคทีเรียในช่องปากทั้งหมด Mutans Streptococci เป็นจุลินทรีย์ที่พบว่ามีความสามารถในการสร้างแผ่นคราบจุลินทรีย์ โดยพบว่าทำให้เกิดโรคฟันผุได้ในสัตว์ทดลอง (Hamada และคณะ, 1980)

Gibbon และคณะ (1966) และ McCabe และคณะ (1967) รายงานว่าเมื่อมีซูโครส Mutans Streptococci จะสร้างโคโลนีที่สามารถยึดติดกับวัตถุที่มีพื้นผิวแข็งในจานเพาะเชื้อได้ ซึ่งการสร้างโคโลนีนี้จะไม่เกิดถ้าเปลี่ยนจากซูโครสเป็นกลูโคส หรือเปลี่ยนเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ทำให้เกิดโรคฟันผุชนิดอื่น การศึกษานี้แสดงถึงความสัมพันธ์ของความสามารถในการใช้ซูโครสกับการเกิดโรคฟันผุ

2. ความสามารถในการสร้างกรดและการทนต่อกรด

ปัจจัยที่สำคัญที่สุดที่ทำให้เกิดโรคฟันผุ คือความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ในช่องปากที่สามารถสร้างกรดได้จากอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต ซึ่งกรดที่จุลินทรีย์สร้างนี้สามารถสลายแร่ธาตุบนผิวฟัน (demineralization) ทำให้ฟันเกิดการผุกร่อน พบว่ามีจุลินทรีย์ในช่องปากที่สามารถผลิตกรดได้หลายชนิด เช่น Streptococci, Lactobacilli, Actinomyces และ Yeast แต่เมื่อ

พิจารณาถึงอัตราการสร้างกรดของ Mutans Streptococci เปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นพบว่า Mutans Streptococci สามารถสร้างกรดได้มากกว่า (Harper และ Loesche, 1983 และ 1984) กรดสำคัญที่ Mutans Streptococci สร้างเป็นปริมาณมาก คือ กรดแลคติก ซึ่งเป็นผลิตผลสุดท้ายจากปฏิกิริยาไกลโคลิซิส (glycolysis) และกรดแลกติกยังเป็นกรดที่แก่กว่ากรดชนิดอื่นด้วย นอกจากนี้ในระหว่างวันยังพบว่าชนิดของกรดที่พบในคราบฟันมีความแตกต่างไป โดยสามารถตรวจพบกรดอะซิติก, กรดซักซินิก, กรดโพรพิโอนิก และ กรดบิวไทริก (butyric acid) กรดเหล่านี้เกิดจากแบคทีเรียชนิดต่างๆ ในคราบฟันช่วยกันผลิตขึ้น (Marsh และ Martin, 1999) Mutans Streptococci สามารถสร้างกรดอินทรีย์ได้จากน้ำตาลหลายชนิด แต่ซูโครสเป็นแหล่งที่สำคัญที่สุด เนื่องจากซูโครสมีความสำคัญมาตั้งแต่กระบวนการเกาะติดและเริ่มต้นในการเกิดคราบฟัน (Horton และคณะ, 1985)

ในปี 1989 DeSoet และคณะ ได้เปรียบเทียบการสร้างกรดระหว่าง Mutans Streptococci และ Streptococci ชนิดอื่น เช่น *Streptococcus sanquis* ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่าง 5.0 - 7.0 พบว่า *Streptococcus sobrinus* สามารถสร้างกรดได้มากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญ และสามารถที่จะสร้างกรดได้แม้ค่าความเป็นกรด-ด่างจะต่ำกว่า 6.0 ในขณะที่เชื้อจุลินทรีย์ตัวอื่นหยุดการสร้างกรดแล้ว

นอกจากนี้ Mutans Streptococci มีความสามารถในการทนต่อกรด ทำให้สามารถเจริญเติบโต หมักน้ำตาล (ferment sugar) และยังสามารถมีชีวิตอยู่ได้เมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างลดต่ำลงเป็นเวลานาน

Harper และ Loesche, 1983 รายงานว่า Mutans Streptococci สามารถที่จะเติบโตได้ในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำมากกว่า streptococci อื่นๆ ที่ตั้งถิ่นฐานบนฟัน

ในปี ค.ศ. 1980 Svanberg รายงานว่าเมื่อบ้วนปากด้วยสารละลายที่เป็นกรดจะเพิ่มสัดส่วนของ Mutans Streptococci ต่อเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดที่อยู่ในฟัน

คราบจุลินทรีย์ (plaques)

คราบจุลินทรีย์เป็นสิ่งสะสมบนตัวฟันที่เป็นจุดเริ่มต้นของกระบวนการเกิดฟันผุทั้งหมด (Wolinsky, 1988) คราบจุลินทรีย์ประกอบด้วยเชื้อจุลินทรีย์มากมายรวมกับไกลโคโปรตีนในน้ำลาย เศษอาหารและสารยึดจำพวกพอลิแซ็กคาไรด์ โดยจุลินทรีย์ที่สะสมอยู่ในคราบจุลินทรีย์นี้จะมีการสร้างสารต่างๆ รวมทั้งกรด สารพิษ ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน ซึ่งล้วนแต่เป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อที่อยู่บริเวณข้างเคียง เช่น ทำให้เกิดการอักเสบของเหงือก อีกทั้งฤทธิ์ของกรดยังกัดกร่อนทำลายเนื้อฟัน ในช่วงแรกคราบจุลินทรีย์จะมีลักษณะเป็นแผ่นบางใส ไม่มีสี ทำให้มองด้วยตาเปล่าไม่เห็น เมื่อมีการสะสมอยู่เป็นเวลานานจึงจะพอเห็นเป็นคราบสีขาว หรือสีเทาติดอยู่บริเวณคอ

ฟันหรือซอกฟัน ปกติจะพบคราบจุลินทรีย์ได้ทุกบริเวณที่มีการไหลอาบของน้ำลาย แต่บริเวณที่คราบจุลินทรีย์มักตกค้างและสะสมอยู่เป็นปริมาณมาก คือบริเวณที่รอดพ้นจากการขัดสีของอาหาร ลิ้น ริมฝีปาก กระพุ้งแก้ม ตลอดจนบริเวณที่ไม่สามารถเข้าทำความสะอาดได้ถึง

ขั้นตอนการเกิดแผ่นคราบจุลินทรีย์ (รูปที่ 1 และ 2)

แผ่นคราบจุลินทรีย์เกิดขึ้นได้ตลอดเวลาและสามารถเกิดได้ทันทีหลังการแปรงฟัน การเกิดแผ่นคราบจุลินทรีย์เริ่มจากขั้นตอนของการเกาะติดของแบคทีเรียบนผิวฟันด้วยพันธะทางเคมี ซึ่งเป็นกลไกที่มีความซับซ้อนและมีปัจจัยเข้าร่วมหลายประการ ซึ่งสรุปได้เป็น 4 ขั้นตอน ดังนี้ (ยุพิน และคณะ , 2525)

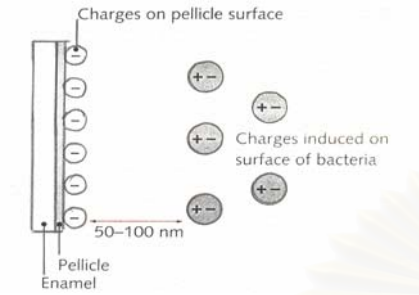
ขั้นตอนการที่ 1 แบคทีเรียเคลื่อนที่เข้าใกล้ผิวฟันโดยอาศัยแรงดันของน้ำลาย การแพร่หรือการเคลื่อนที่ของตัวแบคทีเรียเอง

ขั้นตอนการที่ 2 เมื่อแบคทีเรียเข้าใกล้ผิวฟันมากกว่า 100 นาโนเมตร จะมีการเกาะติดกับอนุภาคต่างๆที่อยู่บนผิวฟันเช่นเมือกน้ำลาย โปรตีนหรือเศษอาหาร ด้วยพันธะทางเคมีชนิดอ่อน ซึ่งได้แก่ แรงแวนเดอร์วาล์ว แรงทางไฟฟ้าสถิต ซึ่งเป็นพันธะที่ไม่แข็งแรง สามารถหลุดออกได้ง่าย แต่เมื่อแบคทีเรียเข้าใกล้ผิวฟันมากกว่า 2 นาโนเมตร จะมีการสร้างพันธะที่มีความแข็งแรงมากขึ้น คือ พันธะไฮโดรเจน ระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลของอนุภาคบนผิวฟัน กับหมู่ฟอสเฟตบนผนังเซลล์ของแบคทีเรีย

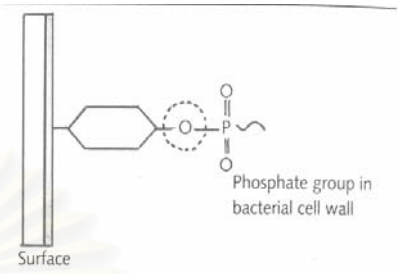
ขั้นตอนที่ 3 เป็นระยะที่มีการเกาะติดที่แท้จริงด้วยพันธะที่มีความแข็งแรง ได้แก่ พันธะโคเวเลนต์และพันธะไอออนิคระหว่างลิแกนด์บนผิวฟันและโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบบนผนังเซลล์ของแบคทีเรียทำให้เกิดเป็นคราบฟันขึ้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

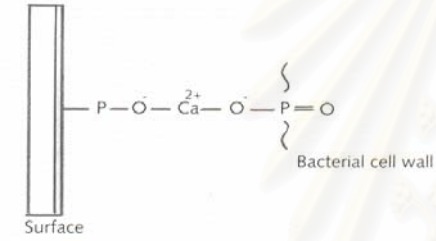
แรงวานเดอร์วาล์ว (van der Waal's force)



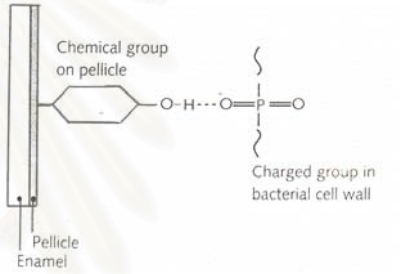
พันธะโคเวเลนต์ (covalent bonding)



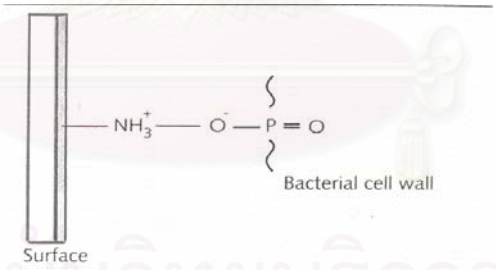
แรงทางไฟฟ้า (electrostatic interaction)



พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bonding)



พันธะไอออนิค (ionic bonding)



รูปที่ 1 แสดงพันธะเคมีชนิดต่างๆ ที่ก่อให้เกิดการเกาะติดของแบคทีเรียบนผิวฟัน (Jeremy และคณะ, 1999)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

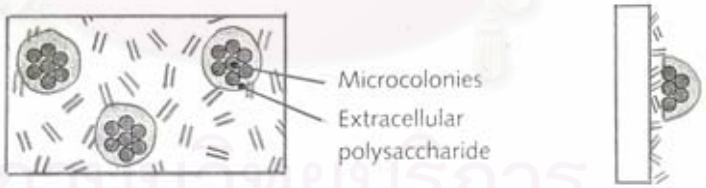
กลไกการเกิดแผ่นคราบจุลินทรีย์สามารถอธิบายได้ดังแผนภาพด้านล่าง

1. ผิวฟันสะอาดถูกไหลอาบด้วยน้ำลาย

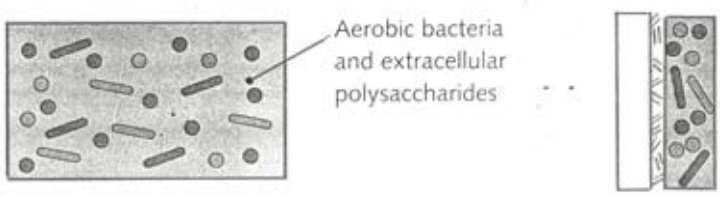
2. ไกลโคโปรตีนจากน้ำลายจะถูกผิวฟันดูดซับเอาไว้กลายเป็นฟิล์มบางๆ เรียกว่าเมือกน้ำลาย

3. เมือกน้ำลายจะทำหน้าที่คล้ายกาว ยึดจับจุลินทรีย์จากน้ำลายไว้บนผิวฟัน

4. เชื้อจุลินทรีย์มีการแบ่งตัวเพิ่มขึ้นจากเดิม พร้อมผลิตสารยึดจำพวกพอลิแซ็กคาไรด์เพื่อยึดซึ่งกันและกันไว้พร้อมกับทำให้มีจุลินทรีย์ใหม่เข้ามาสะสมเพิ่ม



5. โครงสร้างเปลี่ยนแปลงจนได้คราบฟันที่สมบูรณ์ ปกติใช้เวลาประมาณ 2 ถึง 5 วัน ประกอบด้วยจุลินทรีย์จำนวนมากมายแทรกอยู่ระหว่างสารยึดจำพวกพอลีแซ็กคาไรด์ ที่เป็นผลิตผลของเชื้อเอง



รูปที่ 2 ภาพจำลองแสดงการเกิดคราบฟัน (Jeremy และคณะ, 1999)

เดกซ์แทรน (dextran)

เดกซ์แทรนเป็นชื่อโดยทั่วไปของพอลีแซ็กคาไรด์ที่ประกอบขึ้นจากหน่วยย่อยได้แก่ ดี-กลูโคส (D-glucose) มีลักษณะเหนียวหนืด ละลายน้ำได้ยาก เกิดจากการทำงานของเดกซ์แทรนซูเครส (dextransucrase) หรือ กลูโคซิลทรานสเฟอร์เรส (glucosyltransferase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ต้องการการชักนำ (inducible enzyme) โดยสารชักนำการสร้างเดกซ์แทรนได้แก่ ซูโครส ในภาวะที่มีซูโครส แบคทีเรียจะผลิตกลูโคซิลทรานสเฟอร์เรสมาทำการเปลี่ยนซูโครส ให้เป็นเดกซ์แทรน แล้วขับออกมานอกเซลล์ พร้อมทั้งปล่อยฟรักโทสอิสระออกมาดังปฏิกิริยาต่อไปนี้ (Schachtete, 1982)

$$\text{n-sucrose} \xrightarrow[\text{หรือ glucosyltransferase}]{\text{dextransucrase}} [\text{D- glucose}]_n + n[\text{fructose}]$$

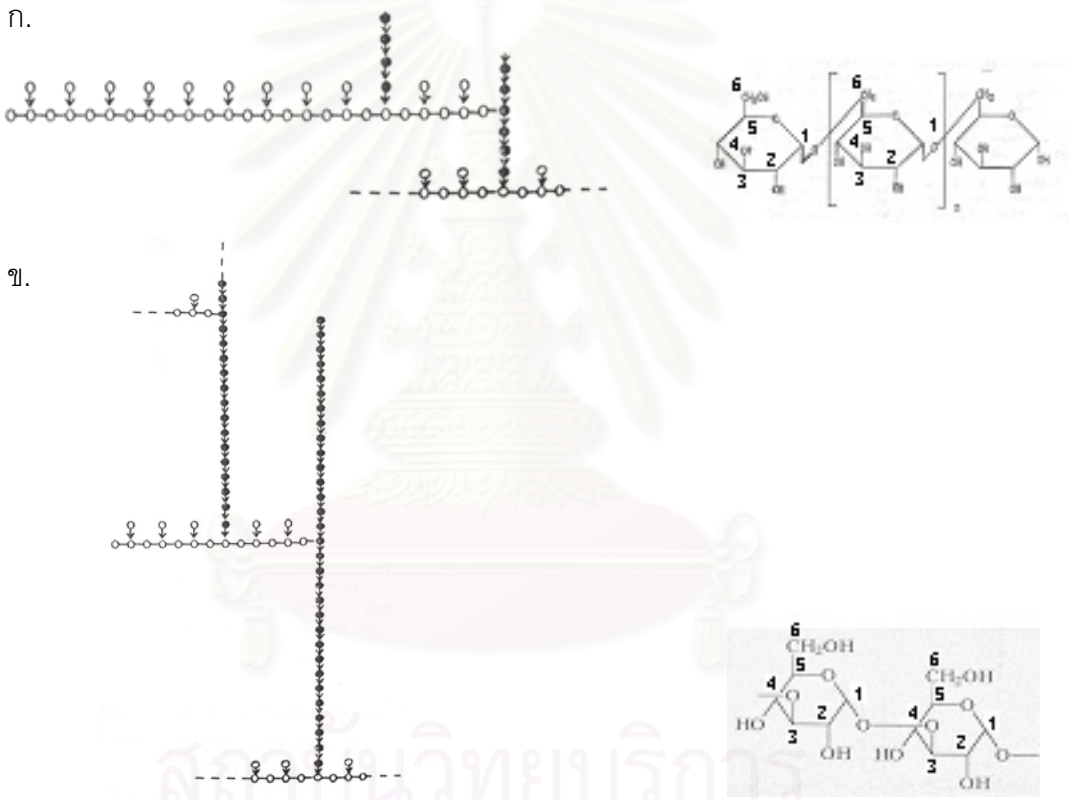
เดกซ์แทรนที่ผลิตจากจุลินทรีย์ต่างชนิดกันจะมีสมบัติทางเคมี และทางกายภาพแตกต่างกัน เช่น ความเหนียวหนืด, ความสามารถในการละลายน้ำ และสัดส่วนของพันธะไกลโคไซด์ (glycosidic linkage) ที่เป็นองค์ประกอบ ซึ่งโดยปกติเดกซ์แทรนจะประกอบด้วยพันธะไกลโคไซด์แบบ α-1,6 และ α-1,3 เป็นส่วนใหญ่ พันธะ α-1,4 และ α-1,2 เป็นส่วนน้อย (Jeanes และคณะ, 1950) ขนาดโมเลกุลและชนิดของพันธะจะเป็นตัวกำหนดความสามารถในการละลายน้ำของเดกซ์แทรน โดยยิ่งขนาดโมเลกุลใหญ่และสัดส่วนของพันธะไกลโคไซด์แบบ α-1,3 มากจะยิ่งละลายน้ำได้ยาก โดยเดกซ์แทรนสามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่

1. เดกซ์แทรนที่สามารถละลายน้ำได้ (water soluble dextran) ซึ่งมีพันธะ α-1,6 ในปริมาณมาก ถูกสังเคราะห์โดยการทำงานของกลูโคซิลทรานสเฟอร์เรส (sucrose:1,6-α-D-glucan 3-α- and 6-α-glucosyltransferase) ที่สังเคราะห์เดกซ์แทรนพันธะ α-1,6 ปริมาณมาก (Lewicki และคณะ, 1971)

2. เดกซ์แทรนที่ไม่สามารถละลายน้ำได้ (water insoluble dextran) ซึ่งมีพันธะ α-1,3 ในปริมาณมาก ถูกสังเคราะห์โดยการทำงานของกลูโคซิลทรานสเฟอร์เรส (sucrose:1,3-α-D-glucan 3-α-glucosyltransferase) ที่สังเคราะห์เดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ปริมาณมาก (Guggenheim และ Newbrun, 1969)

ในปัจจุบันมีการผลิตเดกซ์แทรนในทางการค้ามากมาย โดยมีให้เลือกตามขนาดของโมเลกุลและการใช้งาน เช่น เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรมที่ใช้เป็นสารปรุงแต่งในอุตสาหกรรม

อาหาร เช่นเติมในไอศกรีม เบเกอรี่ หรือลูกอม ช่วยให้เกิดความนุ่มของเนื้อสัมผัส เดกซ์แทรนที่ใช้ในทางการแพทย์ ซึ่งใช้ในการเพิ่มปริมาตรของโลหิตในผู้ป่วยที่สูญเสียน้ำจากการถูกไฟคลอกโดยไม่รบกวนระบบของแอนติเจน-แอนติบอดีที่ก่อให้เกิดการตกตะกอนของเลือด, เดกซ์แทรน T-2000 (น้ำหนักโมเลกุล 2,000,000), เดกซ์แทรน T-40 (น้ำหนักโมเลกุล 40,000) และเดกซ์แทรน T-20 (น้ำหนักโมเลกุล 20,000) เป็นต้น โดยเดกซ์แทรนที่ผลิตในทางการค้าทั้งหมด สังเคราะห์จากเชื้อแบคทีเรีย *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F ซึ่งโครงสร้างของเดกซ์แทรนที่เชื้อดังกล่าวผลิตขึ้นประกอบด้วยพันธะ α-1,6 ถึง 95 เปอร์เซ็นต์ โดยอีก 5 เปอร์เซ็นต์เป็นพันธะ α-1,3 (Lindberg และ Svensson, 1968 และ Wilham และคณะ, 1955)



รูปที่ 3 ก. แสดงโครงสร้างของเดกซ์แทรนพันธะ α-1,6 ปริมาณสูง

ข. แสดงโครงสร้างของเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ปริมาณสูง

(O แทนหน่วยกลูโคสในสาย α-1,6 กลูแคน, — พันธะ α-1,6 ไกลโคไซด์ , ● หน่วยกลูโคสในสาย α-1,3 กลูแคน, ↓ พันธะ α-1,3 ไกลโคไซด์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เนื่องจากกลูโคซิลทรานสเฟอร์เรสเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะในการเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนซูโครสเป็นเดกซ์แทรน โดยจะไม่เร่งปฏิกิริยาการต่อสายยาวของกลูโคสอิสระหรือกลูโคสจากน้ำตาลโมเลกุลคู่ชนิดอื่น (Jordan และ Keyes, 1966) และด้วยความเหนียวหนืดของเดกซ์-แทรนนี้เองทำให้เดกซ์แทรนได้รับความสนใจและศึกษาใน 2 แง่มุมดังนี้

1. **อุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลทราย** (sugar cane industry)

อุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลจากอ้อยถือเป็นอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ของประเทศ ในขั้นตอนของการหีบอ้อยจะมีการปนเปื้อนเชื้อกลุ่ม *Leuconostoc* spp. เช่น *Leuconostoc dextranicum* และ *Leuconostoc mesenteroides* ที่สามารถผลิตเดกซ์แทรนที่มีพันธะ α-1,6 เป็นส่วนใหญ่จากซูโครสที่มีอยู่ในน้ำอ้อยได้ เดกซ์แทรนที่ผลิตจากแบคทีเรียเหล่านี้ เมื่อจับกับพื้นผิวท่อส่งน้ำอ้อยในโรงงาน จะทำให้เกิดการอุดตัน ทำให้อัตราการไหลและการกรองต่ำลงหรือหยุดชะงัก (McCalip และคณะ,1939) อาจทำให้การเกิดผลึกของน้ำตาลช้าหรือไม่สมบูรณ์ (Imrie และ Tilbury, 1972) นอกจากนี้ความหนืดของเดกซ์แทรนยังทำให้แบคทีเรียชนิดอื่นที่ปนมาในน้ำอ้อยถูกยึดไว้ และเจริญโดยใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งอาหารแล้วปลดปล่อยกรดอินทรีย์ที่เกิดจากการเมตาบอลิซึมออกมา ทำให้ความเป็นกรดของน้ำอ้อยเพิ่มขึ้น ทำให้น้ำอ้อยบูดเปรี้ยว มีกลิ่น ทำให้คุณภาพของน้ำตาลต่ำลง

Antti และคณะ (1998) รายงานว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ในกระบวนการผลิตน้ำตาลจากหัวบีท (sugar beet) โดยซูโครสส่วนหนึ่งจะสูญหายไป พร้อมทั้งมีการสร้างพอลีแซ็กคาไรด์ที่มีลักษณะคล้ายเมือก ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาต่อกระบวนการและคุณภาพของผลิตภัณฑ์

2. **การเกิดคราบจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของฟันผุ**

แบคทีเรียในช่องปากกลุ่ม Mutans Streptococci สามารถสังเคราะห์เดกซ์แทรนจากซูโครสได้ โดยเดกซ์แทรนที่ Mutans Streptococci สังเคราะห์จะประกอบด้วยทั้งเดกซ์แทรนที่ละลายน้ำได้ (ซึ่งมีพันธะ α-1,6 ปริมาณสูง) และเดกซ์แทรนที่ไม่สามารถละลายน้ำได้ (ซึ่งมีพันธะ α-1,3 ปริมาณสูง) โดยเดกซ์แทรนที่ไม่สามารถละลายน้ำได้นี้เองเป็นสาเหตุสำคัญในการทำให้เกิดการรวมกลุ่มและเกาะติดบนผิวฟันของแบคทีเรีย

Ebisu และคณะ (1974) ได้ศึกษาคุณสมบัติของเดกซ์แทรนที่ไม่สามารถละลายน้ำได้จาก *Streptococcus mutans* OM7 176 พบว่า 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 และ 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นพันธะ α-1,6 สรุปได้ว่าเดกซ์แทรนที่มีพันธะ α-1,3 อยู่มากจะยิ่งละลายน้ำยากเพราะมีโครงสร้างที่แตกแขนงมาก

Johnson และคณะ (1974) รายงานว่าแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์เดกซ์แทรนได้ แต่ไม่ก่อให้เกิดการเกาะติดบนผิวฟัน และไม่ทำให้เกิดฟันผุ จะสังเคราะห์เฉพาะเดกซ์แทรนที่ประกอบด้วยพันธะ α-1,6

Usui และคณะ, 1975 ศึกษาเดกซ์แทรนที่สร้างจาก *Streptococcus mutans* JC-2 โดยวิธี ^{13}C-NMR พบว่าเดกซ์แทรนที่สามารถละลายน้ำได้จะมีพันธะ α-1,6 ในปริมาณมาก คือ ประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ และมีพันธะ α-1,3 ประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเดกซ์แทรนที่ไม่สามารถละลายน้ำได้จะมีพันธะ α-1,6 ประมาณ 48 เปอร์เซ็นต์ และมีพันธะ α-1,3 ประมาณ 52 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Nisizawa และคณะ (1977) ซึ่งใช้วิธี methylation analysis

Pearce (1976) พบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของเดกซ์แทรนกับคุณสมบัติในการเกาะติดบนผิวไฮดรอกซีอะพาไทท์ (hydroxyapatite) ซึ่งคล้ายกับองค์ประกอบบนผิวฟัน พบว่าพันธะ α-1,3 บนสายเดกซ์แทรนจะมีผลทำให้การเกาะติดบนผิวฟันเกิดได้ดีขึ้น

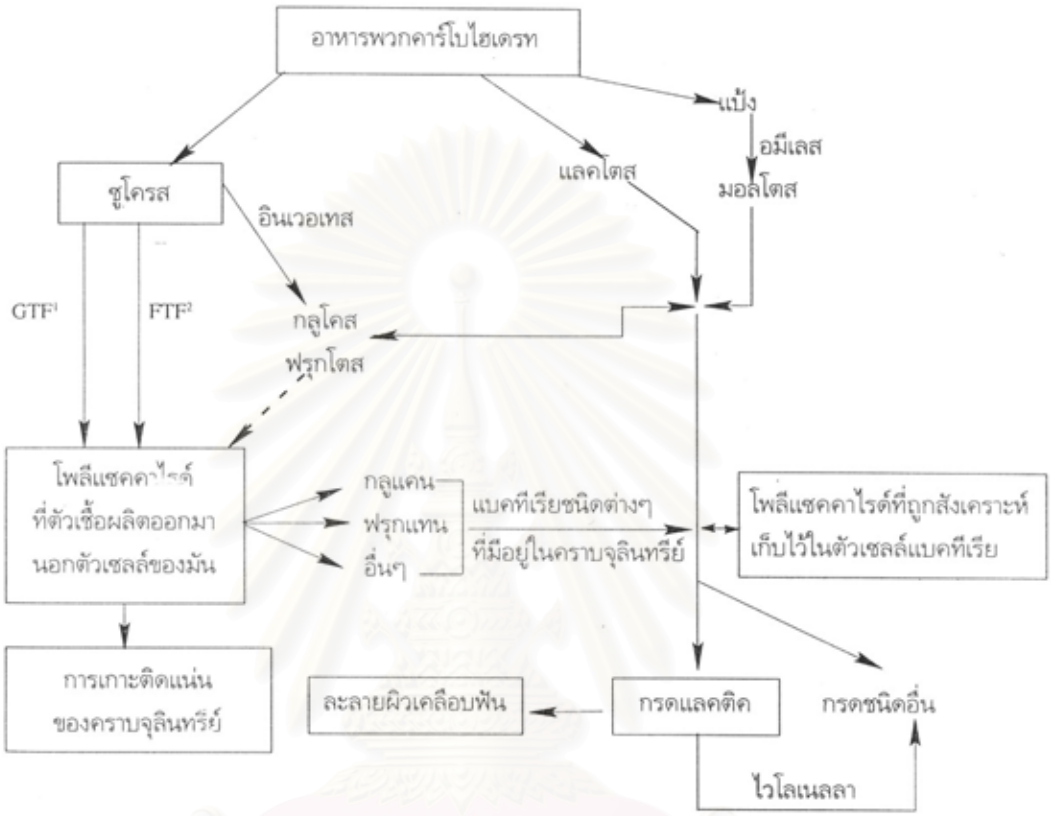
Walker และคณะ (1984) ได้ทำการศึกษาถึงการเกิดโรคฟันผุในคน พบว่าเดกซ์แทรนที่ไม่สามารถละลายน้ำได้ ซึ่งมีพันธะ α-1,3 ปริมาณสูง จะช่วยให้จุลินทรีย์ยึดเกาะกับผิวฟัน ในขณะที่เดกซ์แทรนที่สามารถละลายน้ำได้ซึ่งมีพันธะ α-1,6 ปริมาณสูงจะช่วยในการยึดเกาะกันเองของแบคทีเรีย

คราบจุลินทรีย์กับการเกิดฟันผุ

เคลือบฟันเป็นส่วนที่มีแร่ธาตุมากที่สุดของร่างกาย ซึ่งประกอบด้วยแคลเซียม (calcium) และ ฟอสเฟต (phosphate) อยู่ในรูปของเกลือไฮดรอกซีอะพาไทท์ (hydroxyapatite) ที่ผิวของเคลือบฟันจะมีรูเล็กๆมากมาย ซึ่งยอมให้พวกไอออนที่มีขนาดเล็กๆเช่น ไอออนของโซเดียม แคลเซียม และ ฟลูออไรด์เข้าไปได้ ไฮดรอกซีอะพาไทท์ละลายได้ง่ายในกรด โดยการละลายขึ้นกับค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ และไอออนที่อยู่โดยรอบ โรคฟันผุคือ โรคที่เกิดกับเนื้อเยื่อแข็งของฟัน ซึ่งได้แก่ ส่วนของฟันที่โผล่ขึ้นมาในช่องปาก โดยจะมีการทำลายของเนื้อฟันทำให้เกิดการสลายตัว เปื่อยยุ่ย หรือเป็นโพรงหรือรูขึ้น การทำลายนี้จะเป็นการทำลายอย่างถาวร โดยร่างกายจะไม่สามารถซ่อมแซมส่วนที่ถูกทำลายไปให้ปกติเหมือนเดิมได้ นอกจากจะใช้วัสดุสังเคราะห์อื่นๆมาทดแทนเนื้อฟันส่วนที่เสียไปให้ทำหน้าที่ได้เหมือนเดิมเท่านั้น อาการฟันผุเริ่มต้นจากแบคทีเรียในช่องปากดำรงชีวิตโดยใช้อาหารที่มีในคราบฟันในภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ ทำให้เกิดผลผลิตเป็นกรดอินทรีย์ เช่นกรด แลคติก ดังปฏิกิริยา

$$\underset{\text{(ซูโครส)}}{C_6H_{12}O_6} \longrightarrow \underset{\text{(กรดแลคติก)}}{2(C_3H_6O_3)} + 2ATP$$

กรดอินทรีย์ดังกล่าวเมื่อสัมผัสกับฟันในระยะเวลาหนึ่งจะทำให้แร่ธาตุในเนื้อฟันละลายหายไป (demineralization) กลายเป็นโพรงหรือรูขึ้น



รูปที่ 4 แสดงการเมตาบอลิสมของอาหารพวกคาร์โบไฮเดรตโดยแบคทีเรียในคราบจุลินทรีย์ (จินตกร, 2542) GTF หมายถึง เอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอร์เรส

FTF หมายถึง เอนไซม์ฟรักโตซิลทรานสเฟอร์เรส

การป้องกันฟันผุ

การป้องกันฟันผุสามารถทำได้หลายวิธี เช่นวิธีทางกายภาพ เช่น การบ้วนปากด้วยน้ำ การแปรงฟัน การฉีดล้างคราบฟัน และวิธีทางเคมี โดยสารเคมีที่ดีจะต้องกำจัดเฉพาะจุลชีพก่อโรค จุลชีพจะต้องไม่ดื้อต่อยาหรือสารดังกล่าว สารนั้นออกฤทธิ์ได้นานในช่องปาก ไม่ทำอันตรายต่อเนื้อเยื่อในช่องปากในระดับความเข้มข้นที่ใช้ สารจะต้องลดคราบจุลินทรีย์และลดการอักเสบ ไม่ก่อให้เกิดสีบนตัวฟันและเนื้อเยื่อช่องปาก ไม่เปลี่ยนความรู้สึกรับรส ก่อให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์

น้อย ใช้ง่ายและราคาถูก แต่ในปัจจุบันยังไม่มีสารบำบัดเฉพาะที่ชนิดหนึ่งชนิดใดที่มีคุณสมบัติครบถ้วนดังกล่าว (Mandel, 1988; Goodson, 1989 และ Howell, 1991) วิธีทางเคมีที่ใช้ป้องกันฟันผุในปัจจุบัน ได้แก่

1. การเคลือบร่องฟัน

ตำแหน่งที่เกิดการผุง่ายที่สุดในช่องปากของคน คือบริเวณหลุมร่องฟัน ที่อยู่บนด้านบดเคี้ยว เพราะบริเวณดังกล่าวนี้จะป้องกันสิ่งที่จะมาเกาะติดได้ยาก และทำความสะอาดได้ยากอีกด้วย วัสดุที่จะนำมาใช้เคลือบบริเวณนี้อาจเป็นพลาสติกที่แข็งตัวได้เอง หรือบางชนิดอาจต้องถูกกระตุ้นด้วยแสงอัลตราไวโอเลตก่อนจึงจะแข็งตัว การเคลือบร่องฟันก็เพื่อผลในการป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์เข้ามาอาศัยอยู่ในร่องฟันได้ ปัญหาของการเคลือบหลุมร่องฟัน ได้แก่ วัสดุที่ใช้ในการเคลือบมักเคลือบติดร่องฟันได้ไม่นาน และกรณีของการเคลือบร่องฟันที่มีรอยผุของโรคอยู่ก่อนแล้ว อาจทำให้เกิดฟันผุตามมาภายหลังได้ (Hamada และ Slade, 1980)

2. การใช้ฟลูออไรด์ (Wolinsy, 1988; Burnett และ Schuster, 1978)

ฟลูออไรด์มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเกิดฟันผุ เนื่องจาก ฟลูออไรด์สามารถเข้ารวมตัวกับผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทท์ (hydroxyapatite) บนผิวฟันให้กลายเป็นฟลูออโรอะพาไทท์ (fluoroapatite) ที่มีความคงทน สลายตัวได้ยากและทนต่อการละลายจากกรดได้ดีกว่าไฮดรอกซีอะพาไทท์ ฟลูออไรด์สามารถลดการเกิดปฏิกิริยาไกลโคลิซิส (glycolysis) โดยจะไปขัดขวางการทำงานของอีโนเลส (enolase) และไปขัดขวางระบบฟอสฟออีนอลไพรูเวท ทำให้ระบบการขนส่งน้ำตาลของแบคทีเรียเสียไป นอกจากนี้ฟลูออไรด์จะไปเปลี่ยนแปลงสภาพภายในเซลล์ของแบคทีเรียให้กลายเป็นกรด ทำให้เอนไซม์หลักที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิสมไม่สามารถทำงานได้ อย่างไรก็ตามการใช้ฟลูออไรด์ในปริมาณมากเกินไปอาจก่อให้เกิดความเป็นพิษได้ทั้งความเป็นพิษแบบเรื้อรัง เช่นทำให้เกิดความผิดปกติที่เคลือบฟัน เกิดเป็นอาการฟันตกกระขึ้น (dental fluorosis) ความผิดปกติของกระดูก ทำให้กระดูกหยาบ งองุ้ม หรือความเป็นพิษชนิดเฉียบพลัน โดยมีผลต่อระบบทางเดินโลหิต กดการทำงานของศูนย์ควบคุมการหายใจ จนทำให้ถึงแก่ชีวิตในที่สุด

3. สารต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์

สารที่ทำหน้าที่ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์มีหลายชนิด ที่ใช้กันมาก ได้แก่ คลอเฮกซิดีน (chlohexidine) มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อรา (Stanley และคณะ 1989) และเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบในช่องปากหลายชนิด คลอเฮกซิดีนในขนาดความเข้มข้นสูงตั้งแต่ 18-32

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถฆ่าจุลินทรีย์ได้โดยทำหน้าที่คล้ายผงซักฟอก คือ ประจุบวกของคลอเฮกซิดีนจะทำปฏิกิริยากับประจุลบบนผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ถูกทำลายและเกิดการรั่วซึมของสารภายในเซลล์ออกมาภายนอกเซลล์ (Rolla และคณะ, 1986) แต่ขนาดความเข้มข้นของคลอเฮกซิดีนต่ำๆ ทำได้เพียงยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เท่านั้น ข้อเสียของคลอเฮกซิดีนคือ มีรสขมมาก อาจทำให้ตุ่มรับรสผิดปกติหลังใช้อมบ้วนปาก และอาจทำให้เกิดคราบสีบนฟัน ลิ้น และฟันปลอมได้ และถึงแม้คลอเฮกซิดีน จะมีผลในการลดระดับเชื้อจุลินทรีย์ในช่องปาก อย่างไรก็ตามเชื้อจุลินทรีย์จะกลับมาในช่องปากได้ใหม่หลังจากช่วงระยะเวลาหนึ่ง (Bowden, 1996)

4. การใช้น้ำตาลเทียม

การบริโภคน้ำตาลที่แบคทีเรียไม่สามารถใช้ในกระบวนการเมตาบอลิสมได้ ทำให้สามารถลดการสร้างกรดและลดการเกิดฟันผุได้ โดยน้ำตาลเทียมสามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิดใหญ่ๆ ได้แก่ น้ำตาลเทียมที่มีรสหวานจัด ได้แก่ ซัยคลาเมท (cyclamate) และขัณฑสกร (saccharine) แต่จากการทดลองในหนูทดลองพบว่า น้ำตาลเหล่านี้ในปริมาณสูงสามารถทำให้เกิดเป็นมะเร็ง ปัจจุบันจึงไม่นิยมใช้ ส่วนแมนนิทอล (manitol) ไซลิทอล (xylitol) และซอร์บิทอล (sorbitol) เป็นน้ำตาลเทียมที่มีรสหวานน้อยกว่าซูโครส ส่วนใหญ่ไม่นิยมใช้เพราะมีราคาแพง นอกจากนี้ยังมีการใช้กรดอะมิโนที่ให้ความหวานเช่น แอสพาเทม (aspatame) ซึ่งมีข้อจำกัดอยู่ที่ไม่สามารถทนต่ออุณหภูมิที่สูงมากๆได้ (ณฐินี สุวรรณสิงห์, 2540)

5. ยาปฏิชีวนะ

มีการทดลองนำยาปฏิชีวนะพวกที่มีผลต่อแบคทีเรียแกรมบวก เช่น พวกเพนิซิลลิน กานามัยซิน และแวนโคมัยซิน เมื่อนำไปใส่ในอาหารหรือน้ำดื่มของสัตว์ทดลองพบว่าสามารถป้องกันการเกิดฟันผุได้ ทำนองเดียวกันกับผู้ป่วยบางรายที่ได้รับการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะเป็นเวลานาน การเกิดฟันผุจะลดลง ในปัจจุบันนี้การใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อควบคุมคราบจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคฟันผุเป็นวิธีที่ไม่เหมาะสม เพราะความสามารถในการฆ่าเชื้อของยาปฏิชีวนะอาจกว้างมากเกินไป จนไม่สามารถที่จะจำกัดให้ฆ่าเฉพาะเชื้อที่ทำให้เกิดโรคฟันผุเท่านั้น การใช้ยาปฏิชีวนะโดยที่ไม่ได้คัดเลือกในลักษณะนี้ จะทำให้เชื้อจุลินทรีย์มีการปรับตัวและเกิดการดื้อยาขึ้นได้ (Burnett และ Schuster, 1978)

6. การใช้วัคซีนป้องกันฟันผุ

การทดลองผลิตวัคซีนเริ่มแรกจะใช้เชื้อ *S. mutans* ที่ถูกทำให้ตายโดยฟอร์มาลีน หรือใช้ความร้อนในการฆ่าให้ตายก่อนฉีดเข้าไปในบริเวณต่อมน้ำลายของลิง เพื่อให้ลิงสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อนี้ขึ้น พบว่าภูมิคุ้มกันที่ลิงสร้างขึ้นสามารถต่อต้าน *S. mutans* และลดการเกิดฟันผุได้ (Taubman และ Smith, 1974) แต่การใช้วัคซีนกรณีนี้มักมีปัญหา เนื่องจากวัคซีนสามารถก่อให้เกิดแอนติเจน-แอนติบอดีคอมเพล็กซ์ (antigen-antibody complex) ต่อเนื้อเยื่อหัวใจ และเนื้อเยื่อของอวัยวะอื่นได้ (Van de Rijn และคณะ, 1976) และยังก่อให้เกิดการทำลายอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับการไหลเวียนของเลือดไปทั่วร่างกาย เช่น ไต ด้วย

7. การใช้เอนไซม์เพื่อลดการเกาะติดของแบคทีเรียในปาก

การนำเอากลูแคนไฮโดรเลส (glucanohydrolase) ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่จำเพาะต่อเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 และเดกซ์แทรนเนสที่จำเพาะต่อเดกซ์แทรนพันธะ α-1,6 ไปขัดขวางการเกิดคราบจุลินทรีย์บนผิวฟัน เคยมีการทดลองในหนูทดลองพบว่าเดกซ์แทรนเนสสามารถลดการเกิดคราบจุลินทรีย์ได้จริง และการศึกษาโดยใช้เดกซ์แทรนเนสที่จำเพาะต่อเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ซึ่งแยกได้จากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ผสมในหมากฝรั่ง แล้วทดลองให้คนเคี้ยว พบว่าลดการเกิดคราบจุลินทรีย์และลดการอักเสบของเหงือกลงได้

Blook และคณะ (1969) ได้ศึกษาถึงผลของการป้องกันฟันผุของเดกซ์แทรนเนสในหนูแฮมสเตอร์ พบว่าสัตว์ทดลองที่ได้รับเอนไซม์จะมีคราบฟันลดลงและไม่มีฟันผุเลย ในขณะที่สัตว์ทดลองชุดควบคุมที่ไม่ได้รับเอนไซม์จะมีคราบฟันและเกิดฟันผุมากกว่า ในด้านการรักษาเมื่อเลี้ยงสัตว์ทดลองด้วยอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสสูงเป็นเวลา 21 วัน จากนั้นเติมเดกซ์แทรนเนสลงในน้ำให้สัตว์ทดลองกิน พบว่าภายใน 2 วัน คราบฟันจะถูกขจัดไปหมดและอัตราการเกิดคราบฟันใหม่จะลดลงด้วย

Schachtele และคณะ, 1975 ได้รายงานว่าเดกซ์แทรนเนสจาก *Actinomyces isrelii* และ *Bacteroides ochraceus* สามารถช่วยลดการยึดเกาะของ *S. mutans* บนแท่งแก้วลงได้ถึง 80 เปอร์เซ็นต์

Guggenheim และ Haller, 1972 รายงานว่ามีการลดลงของ *S. mutans* ในคราบฟันเมื่อบ้วนปากด้วยเดกซ์แทรนเนสที่จำเพาะต่อเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 จาก *Aspergillus nidulans*

เดกซ์แทรนเนส

เดกซ์แทรนเนสเป็นเอนไซม์ที่สามารถสลายพันธะบนสายของเดกซ์แทรนได้ เดกซ์แทรนเนสเป็นเอนไซม์ที่ต้องการการชักนำ (inducible enzyme) และมีความจำเพาะต่อพันธะเป็นอย่างมาก สามารถแบ่งเดกซ์แทรนเนสออกเป็น 2 ชนิดตามความจำเพาะในการสลายพันธะ ได้แก่

1. เดกซ์แทรนเนส (α-1,6-glucanase, EC 3.2.1.11) ซึ่งจำเพาะต่อพันธะ α-1,6 บนสายเดกซ์แทรน
2. เดกซ์แทรนเนส (α-1,3-glucanase, EC 3.2.1.59) ซึ่งจำเพาะต่อพันธะ α-1,3 บนสายเดกซ์แทรน

ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองมีประโยชน์มากในการใช้กำจัดคราบฟันซึ่งเกิดจากแบคทีเรียในช่องปาก (Tsuchiya และคณะ, 1998) โดยการทำงานของเดกซ์แทรนเนสในการสลายพันธะของเดกซ์แทรนสามารถทำได้ 2 แบบ คือ

1. Exo-dextranase เป็นเดกซ์แทรนเนสที่ย่อยสลายพันธะที่เชื่อมโมเลกุลของกลูโคสจากปลายรีดิวซ์ของสายของเดกซ์แทรน เป็นการตัดทีละโมเลกุลของกลูโคส ผลิตภัณฑ์ที่ได้ส่วนใหญ่คือกลูโคส

2. Endo-dextranase เป็นเดกซ์แทรนเนสที่ย่อยสลายพันธะที่จุดใดจุดหนึ่งในสายของเดกซ์แทรน ทำให้ได้พอลิเมอร์ของน้ำตาลสายสั้นๆ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายอาจเป็นโอลิโกเมอร์ (oligomer) ไดเมอร์ (dimer) หรือโมโนเมอร์ (monomer) ของกลูโคส

Sery และ Hehre (1956) รายงานถึงเดกซ์แทรนเนสจาก *Bacteroides* ซึ่งจะปลดปล่อยเฉพาะกลูโคสออกมาจากการย่อยสลายเดกซ์แทรน ซึ่งการทำงานดังกล่าวทำให้จัดเดกซ์แทรนจาก *Bacteroides* เป็น exo-hydrolase

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนส

เดกซ์แทรนเนสสามารถพบได้ในแหล่งต่างๆ เช่น เนื่อเยื่อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมบางชนิด และจากจุลินทรีย์ต่างๆ ทั้งรา ยีสต์ แอคติโนมัยซิส และแบคทีเรีย แบคทีเรียในช่องปากจำนวนมากสามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้ (Johnson, 1990) โดยใช้ในการสลายพันธะของเดกซ์แทรนในคราบฟันเพื่อนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์สำหรับเมแทบอลิซึม (Russell และคณะ, 1992 และ Tao และคณะ, 1993)

เชื้อราเป็นจุลินทรีย์สำคัญที่สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้ในปริมาณที่สูงมากกว่าแบคทีเรีย (Sun และคณะ, 1988) แต่ไม่สามารถนำมาใช้ในการป้องกันฟันผุกับคนได้ เนื่องจากเดกซ์แทรนที่ราผลิตได้นั้นมักปนเปื้อนด้วยสารแอฟลาทอกซิน และมีส่วนประกอบของผนังเซลล์

เช่น กลูแคน ซึ่งอาจก่อให้เกิดการแพ้ได้ (Leach, 1969) ดังนั้นการคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อผลิตเดกซ์แทรนเนสสำหรับใช้ในการป้องกันฟันผุ จึงนิยมใช้แบคทีเรียเพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าว

Kim และคณะ (1999) รายงานถึงการใช้เดกซ์แทรนเนสที่ผลิตจาก *Lipomyces starkeyi* ในการย่อยสลายพันธะ α-1,3 และพันธะ α-1,6 ในสายเดกซ์แทรน เพื่อประโยชน์ในการป้องกันฟันผุ แม้เอนไซม์ที่ได้จะมีประสิทธิภาพดี แต่ไม่สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับมนุษย์ได้ เนื่องจาก *Lipomyces starkeyi* เป็นเชื้อก่อโรค

ณฐิณี สุวรรณสิงห์ (2540) ทำการคัดแยกเชื้อจากดินในจังหวัดนนทบุรี ที่มีความสามารถในการผลิตเดกซ์แทรนเนสได้ในปริมาณสูง เมื่อทำการแยกทางอนุกรมวิธานพบว่าเชื้อนี้จัดอยู่ในกลุ่มของ *Arthrobacter sp.* (สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา, 2543)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 แสดงเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้ (สุหัทยา จิระนันทิพร, 2543)

เชื้อจุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
แบคทีเรีย	
Acromobacter sp.	Sawei และคณะ, 1974
*Arthrobacte*r sp.	Kubo และคณะ, 1993
Arthrobacter globiformis	Iwai และคณะ, 1996
Bacillus circulan	Okami และคณะ, 1980; Okami, 1986
Bacillus megaterium	Zevenhuizen, 1968
Bacillus subtilis	Zevenhuizen, 1968
Bacteroides sp.	Staat และคณะ, 1973; Staat และ Schachtele, 1976
Bacteroides melaninogenicus	Holbrook และ Mcmillan, 1977
Bacteroides ochraceus	Schachtele, 1975;Holbrook และ Mcmillan, 1977
Bacteroides oralis	Takahashi, 1982; Wynter และคณะ, 1995
Bacteroides ovatus	Holbrook และ Mcmillan, 1977
Bacteroides thetaiotaomicron	Holbrook และ Mcmillan, 1977
Bifidobacterium sp.	Kaster และ Brown, 1983
Brevibacterium sp.	Yamaguchi และ Gocho, 1983
Brevibacterium fuscum	Sugiura และ Ito, 1975
Brevibacterium fuscum var dextranlyticum	Mizuno และคณะ, 1999
Capnocytophaga ochracea	Igarashi และคณะ, 1998
Capnocytophaga sputigena	Igarashi และคณะ, 1998
Cellovibrio fulva	Forgarty และ Kelly, 1984
Cellovibrio mixtus	Wynter และคณะ, 1995
Cytophagus johnsonii	Forgarty และคณะ, 1984
Flavobacterium sp.	Koboyashi และคณะ, 1983
Fusobacterium fusiforme	Costa และคณะ, 1974
Lactobacillus sp.	Staat และคณะ, 1973; Wynter และคณะ,1995
Prevotella oralis	Igarashi และคณะ, 1998
Prevotella melaninogenica	Igarashi และคณะ, 1998
Prevotella loescheii	Igarashi และคณะ, 1998
Pseudomonas sp.	Galvez-Mariscal และ Lopez-Munguia, 1991

ตารางที่ 2 แสดงเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้ (สุหัทยา จิระนันทิพร, 2543) (ต่อ)

เชื้อจุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Pseudomonas mixta	Wynter และคณะ, 1995
Streptococcus mitis	Forgarty และคณะ, 1984
Lactobacillus sp.	Staat และคณะ, 1973; Wynter และคณะ,1995
Prevotella oralis	Igarashi และคณะ, 1998
Prevotella melaninogenica	Igarashi และคณะ, 1998
Prevotella loescheii	Igarashi และคณะ, 1998
Pseudomonas sp.	Galvez-Mariscal และ Lopez-Munguia, 1991
Pseudomonas mixta	Wynter และคณะ, 1995
Streptococcus mitis	Forgarty และคณะ, 1984
Streptococcus mutans	Igarashi และคณะ, 1992
แอคติโนมัยซีส	
Actinomyces cinemonensis	Schachtele และคณะ, 1975
Strepromyces cinemonensis	Hattori และ Ishibashi, 1981
ยีสต์	
Lipomyces starkei	Webb และ Spencer, 1983; Koenig, 1989
รา	
Aspergillus sp.	Forgarty และ Kelly, 1984
Aspergillus carneus	Fukumoto และคณะ, 1971
Aspergillus luchvasis	Hattori และ Ishibashi, 1981
Aspergillusfumigatus	Hattori และ Ishibashi, 1981
Chetomium gracile	Mizuno และคณะ, 1999
Chetomium indicum	Wynter และคณะ, 1995
Chetomium luteum	Wynter และคณะ, 1995
Chetomium thermophilum var coprophilum	Wynter และคณะ, 1995
Chetomium thermophilum var thermophilum	Wynter และคณะ, 1995
Chetomium virescens	Wynter และคณะ, 1995
Fusarium moniliforme	Simonson และ Liberta, 1975
Gibberella fukuroi	Hattori และ Ishibashi, 1981
Hamicola grisea	Hattori และ Ishibashi, 1981
Paecilomyces lilacinus	Charles และ Farrell, 1957

ตารางที่ 2 แสดงเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้ (สุหัทยา จิระนันทิพร, 2543) (ต่อ)

เชื้อจุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Penicillium aculeatum	Madhu และ Prabhu ,1985
Penicillium funiculosum	Chaiet และ คณะ,1970;Kosaricและคณะ,1973
Penicillium lilacinum	Galvez-Mariscal และ Lopez-Munguia,1991
Penicillium luteum	Fukumoto,1971
Penicillium minioluteum	Mizuno และ คณะ,1999
Penicillium purpurogenum	Galvez-Mariscal และ Lopez-Munguia,1991
Penicillium roguefortii	Hattori และ Ishibashi,1981
Penicillium verruculosum	Whetley และ Moo-Yong,1977
Spicaria sp.	Yamaguchi และ Gocho,1973
Spirotichum asteroides	Hottari และ Ishibashi ,1981
Verticellium sp.	Tchuchiya และ คณะ, 1952

การชักนำการสร้างเดกซ์แทรนเนส

เดกซ์แทรนเนสเป็นเอนไซม์ที่ต้องอาศัยการชักนำ (inducible enzyme) ดังนั้นในการผลิตเดกซ์แทรนเนสจากจุลินทรีย์ใดๆ จึงต้องเสริมเดกซ์แทรนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทำหน้าที่เป็นสารชักนำด้วย (Igarashi และคณะ, 1998) หากชักนำการสร้างด้วยเดกซ์แทรนที่มีพันธะ α-1,6 เดกซ์แทรนเนสที่เกิดขึ้นจะจำเพาะต่อพันธะ α-1,6 บนสายเดกซ์แทรน (α-1,6-glucanase, EC 3.2.1.11) (Coral และคณะ, 1996) ซึ่งในปี 1978 Hare และคณะ รายงานว่าเดกซ์แทรนเนสที่จำเพาะต่อพันธะ α-1,6 ไม่สามารถย่อยสลายเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ได้ ซึ่งการชักนำเดกซ์แทรนเนสที่จำเพาะต่อพันธะ α-1,6 ในกรณีนี้มักใช้เดกซ์แทรนที่ผลิตได้จาก *Leuconostoc mesenteroides* B-512 ซึ่งมีพันธะ α-1,6 มากถึง 95 เปอร์เซ็นต์ (Marguerite และคณะ, 1997)

Margaret และคณะ, 1978 รายงานถึงการชักนำการสร้างเดกซ์แทรนเนสด้วยเดกซ์แทรนที่มีพันธะ α-1,3 ใน *Cladosporiun resinae* พบว่าเดกซ์แทรนเนสที่เกิดขึ้นจะจำเพาะต่อพันธะ α-1,3 บนสายเดกซ์แทรน (α-1,3-glucanase, EC 3.2.1.59) และย่อยสลายเดกซ์แทรนโดยปลดปล่อยน้ำตาลกลูโคสออกมา

แต่ปัจจุบันยังไม่พบว่ามีเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 จำหน่ายในท้องตลาด หรืออาจมีแต่ราคาสูงมาก ในงานวิจัยทั่วไปจึงมักผลิตเดกซ์แทรนเองจากเชื้อในกลุ่ม Mutans Streptococci

โดยมุ่งเน้นไปที่เดกซ์แทรนที่ไม่สามารถละลายน้ำได้ที่เชื้อผลิตขึ้น เนื่องจากมีพันธะ α-1,3 ปริมาณสูง

Claus และคณะ (1999) ทำการผลิตเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ปริมาณสูง จาก *S. mutans* เพื่อใช้เป็นสับสเตรทในการชักนำการสร้างเดกซ์แทรนเนส ทำได้โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารและปั่นแยกเอาเซลล์ออกโดยการเซนตริฟิวส์ที่ 4,000 g และเติมซูโครสความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ลงไป บ่มที่ 35°ซ 20 ชั่วโมง จากนั้นกรองเอาเดกซ์แทรนที่ไม่ละลายน้ำออกจากอาหารเลี้ยงมาใช้ต่อไป

Margaret และคณะ (1978) ผลิตเดกซ์แทรนที่มีพันธะ α-1,3 ปริมาณสูงจาก Streptococci ในช่องปากโดยบ่มน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยซูโครส 4 เปอร์เซ็นต์จากนั้นเติมเอทานอลและปั่นแยกเอาเดกซ์แทรนที่ไม่ละลายน้ำออกมาซึ่งเดกซ์แทรนดังกล่าวมีพันธะ α-1,3 ปริมาณสูง

Huge และคณะ (1986) รายงานถึงเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *Streptococcus sobrinus* 6715 ซึ่งเป็นเชื้อในกลุ่ม Mutans Streptococci ว่าสามารถผลิตเดกซ์แทรนที่มีพันธะ α-1,3 ได้ในปริมาณมากถึง 67 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียชนิดนี้จึงเหมาะที่จะนำมาใช้ในการผลิตเดกซ์แทรนเพื่อเป็นสารชักนำการสร้างเดกซ์แทรนเนสที่จำเพาะต่อพันธะ α-1,3 ดังที่กล่าวข้างต้น

การผลิตและทำบริสุทธิ์เดกซ์แทรนบางส่วน

โดยปกติการเลี้ยง Streptococci เพื่อการผลิตเดกซ์แทรนมักเลี้ยงในอาหารเพียงไม่กี่ชนิด ซึ่งได้แก่ Brain heart infusion, Tryptic soy broth และ Todd hewitt ซึ่งมีราคาแพง และสีของอาหารเลี้ยงปนกับเดกซ์แทรนที่ผลิตได้ ทำให้ทำความสะอาดได้ยาก ได้เดกซ์แทรนที่มีสีน้ำตาลเข้ม Gibbons และคณะ (1968) ได้เลี้ยง Human Streptococcus strains GS5 และ LM7 ในอาหาร Basal medium ที่มีองค์ประกอบง่าย ราคาถูก สามารถเตรียมได้เองในห้องปฏิบัติการ ซึ่งให้เดกซ์แทรนปริมาณมากและมีสีขาว จากนั้นนำไปผ่านการทำบริสุทธิ์โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเดกซ์แทรนไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 rpm นำตะกอนที่ได้ล้างด้วยน้ำกลั่น, โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.05 นอร์มัล และ 0.2 นอร์มัล กำจัดเซลล์แบคทีเรียด้วยการใช้เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง 3 นาที โดยการใช้ด่างที่มีความเข้มข้นมากขึ้น เพื่อกำจัดสารที่ไม่ต้องการออก จากนั้นตกตะกอนด้วยเอทานอล ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นและนำไปทำแห้งโดยใช้เครื่องระเหิดแห้งโดยใช้ความเย็น จากวิธีการดังกล่าวพบว่าตะกอนเดกซ์แทรนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้วจะประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรตอย่างน้อย 90 เปอร์เซ็นต์

การศึกษาองค์ประกอบของเดกซ์แทรน

Antti และคณะ (1998) พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์พร้อมทั้งมีการสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ในกระบวนการผลิตน้ำตาลจากหัวบีท (sugar beet) ทำให้เกิดปัญหาต่อกระบวนการและคุณภาพของผลิตภัณฑ์ จึงมีการศึกษาถึงชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบในพอลิแซ็กคาไรด์ที่จุลินทรีย์ดังกล่าวผลิตขึ้น โดยการนำพอลิแซคคาไรด์มาไฮโดรไลซ์ด้วยกรดซัลฟูริก 1 นอร์มัล ที่ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำให้เป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์ แล้วนำไปวิเคราะห์น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เกิดขึ้น โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง พบว่า น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่พบมากที่สุดคือ กลูโคส

Greg และคณะ, 1974 ทำการตรวจสอบองค์ประกอบของเดกซ์แทรนโดยการย่อยสลายเดกซ์แทรน 50 มิลลิกรัมด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.3 นอร์มัล 1 มิลลิลิตร 45 นาที ทำให้เย็นและปรับให้สารละลายเป็นกลาง จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปตรวจสอบชนิดของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบกระดาษ พบว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นคือ กลูโคส ไอโซมอลโทส (isomaltose) ไอโซมอลโทไทรโอส (isomaltotriose) ไอโซมอลโทเพนตะโอส (isomaltopentaose) และไอโซมอลโทเฮกซะโอส (isomaltohexaose)

Kazuhiro และคณะ, 1982 ทำการตรวจสอบองค์ประกอบของเดกซ์แทรนที่ไม่ละลายน้ำจาก *Streptococcus mutans* 6715-15 โดยใช้เดกซ์แทรน 10 มิลลิกรัม อุ่นให้ร้อน เติมกรดฟอร์มิกความเข้มข้น 98 เปอร์เซ็นต์ 0.15 มิลลิลิตร ในหลอดแก้วปิดผนึก (ampoule) เติมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.4 นอร์มัล 1.5 มิลลิลิตร ต้มที่ 100°ซ 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการทำให้เย็นทันที เติม Dowex-1 ($HCOO^{-}$) แล้วนำไประเหยแห้ง จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบกระดาษ พบว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นคือ ไอโซมอลโทสและไนจีโรส ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเดกซ์แทรนดังกล่าวประกอบด้วนพันธะ α-1,6 และ α-1,3

การศึกษาการเจริญของ Mutans Streptococci

คุณสมบัติทางสรีรวิทยาของ Mutans Streptococci, กระบวนการสังเคราะห์เดกซ์แทรนหรือการสร้างกรดของเชื้อ ต่างมีความสัมพันธ์กับการเจริญของเชื้อทั้งสิ้น ดังนั้นจึงมีผู้การศึกษาการเจริญของเชื้อในกลุ่ม Mutans Streptococci โดยในภาวะที่ไม่มีการสังเคราะห์เดกซ์แทรน โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ไม่มีการเติมซูโครส การเจริญของ Mutans Streptococci สามารถตรวจสอบได้ง่าย ด้วยวิธีการนับจำนวนเซลล์ (viable cell count) การชั่งน้ำหนักเซลล์แห้ง (dry weight) และการวัดความขุ่น (Turbidity)

Lewson (1971) ตรวจสอบการเจริญของ Mutans Streptococci ที่สามารถผลิตเดกซ์-แทรนได้ ในอาหารสังเคราะห์ด้วยวิธีการวัดค่าความขุ่น (Klett units) พบว่าทุกสายพันธุ์ที่ทำการศึกษามีอัตราการเจริญสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยง

Terleekyi และคณะ (1975) ศึกษาการเจริญของ Mutans Streptococci 14 สายพันธุ์ในอาหารสังเคราะห์ทางเคมีชนิดต่างๆ ในภาวะที่ไม่มีการสังเคราะห์เดกซ์แทรน โดยวิธีการวัดความขุ่น (Turbidity) พบว่าสามารถศึกษาการเจริญของเชื้อได้เป็นอย่างดี

ในภาวะที่มีการสังเคราะห์เดกซ์แทรน โดยการเลี้ยง Mutans Streptococci ในอาหารที่มีการเติมซูโครส พบว่า เดกซ์แทรนที่แบคทีเรียสังเคราะห์ขึ้นตกตะกอนแยกจากส่วนที่เป็นของเหลวของอาหารเลี้ยงเชื้อพร้อมกับเซลล์ของแบคทีเรีย ดังนั้นการศึกษาการเจริญของเซลล์โดยวิธีการต่างๆข้างต้นจึงไม่สามารถทำได้

Rajaguru และคณะ (2000) ได้แสดงว่าสามารถตรวจสอบการเจริญของเซลล์แบคทีเรียด้วยการวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry (Lowry และคณะ, 1951) โดยการทำให้เซลล์แตกก่อนด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 โมลาร์ 20 นาที (akaline hydrolysis) จากนั้นจึงนำสารละลายไปตรวจสอบปริมาณโปรตีน

ในงานวิจัยนี้มุ่งเน้นการผลิตเดกซ์แทรนที่มีพันธะ α-1,3 ปริมาณสูงจาก *Streptococcus sobrinus* 6715 สำหรับใช้เป็นสารชักนำการผลิตเดกซ์แทรนเนสใน *Arthrobacter sp.* AG-2 พร้อมทั้งศึกษาความสามารถของเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตได้ ในการย่อยสลายเดกซ์แทรนชนิดต่างๆ และตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา เพื่อเป็นความรู้พื้นฐานให้เข้าใจถึงลักษณะการทำงานในแง่ของความจำเพาะต่อพันธะในการย่อยสลายเดกซ์แทรน เพื่อผลในการประยุกต์ใช้เพื่อป้องกันฟันผุต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ วิธีและขั้นตอนดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น G-10 บริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc., U.S.A. และรุ่น innova 2100 บริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc., U.S.A.
2. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 401 บริษัท Milton Roy, U.S.A. และ รุ่น Spectronic 21 บริษัท Bausch & Lomb, U.S.A.
3. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น Cyberscan 2000 บริษัท Eutech Cybernetics, Singapore.
4. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น SS-325 บริษัท Tomy Seico Co, Ltd., Japan และรุ่น HA-3D บริษัท Hirayama Manufacturing Corperation, Japan
5. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ Larminar flow รุ่น BV-124 บริษัท ISSCO, U.S.A.
6. เครื่องผสมสาร (mixer) รุ่น vortex-genies 2 G560E บริษัท Scientific Industries Inc., U.S.A.
7. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น Temppet บริษัท T-80 Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Japan และ รุ่น W 760 Memmert, Germany
8. เครื่องชั่ง รุ่น PB3002 และ รุ่น L200P บริษัท Sartorius, U.S.A
9. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น KS-3000P บริษัท Kubota, Japan
10. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (benchtop centrifuge) รุ่น H-103N บริษัท Kubota, Japan
11. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดทำความเย็น (refrigirate centrifuge) รุ่น 1920 บริษัท Kubota, Japan
12. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดทำความเย็น (refrigirate centrifuge) รุ่น J-30I บริษัท Beckman, Germany
13. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (controlled environment incubator shaker) รุ่น G-27 บริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc, U.S.A
14. เครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) รุ่น 502P-2 บริษัท PMC, U.S.A
15. หลอดแสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet lamp) ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร G30T8 30w บริษัท Sankyo Denki, Japan
16. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น Hereaus type B 5050 E บริษัท Hereaus, Germany

17. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (ultrasonicator) ชนิดอ่าง รุ่น FS 4000 บริษัท Decan Ultrasonic, England.
18. ไมโครปิเปตต์ (micropipette) ขนาด 100, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร ของบริษัท Gilson, France
19. หลอดกรองชนิดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (centrifuge tube filter) แผ่นกรองชนิดเซลลูโลสอะซิเตท (cellulose acetate filter) ขนาดความกว้างของรู 0.45 ไมโครเมตร ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ของบริษัท Castar, U.S.A.
20. ชุดเครื่องมือโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, HPLC) สำหรับตรวจสอบปริมาณและชนิดของน้ำตาล
    - เครื่องโครมาโทกราฟีแบบของเหลว (liquid chromatography) รุ่น 515 ของบริษัท Waters, Australia
    - คอลัมน์ (column) คาร์โบไฮเดรตคอลัมน์ (carbohydrate column) ขนาด 4.6 x 250 mm ของบริษัท Waters, Australia
    - เครื่องตรวจสอบ (UV-visible detector)รุ่น 410 ของบริษัท Waters, Australia
    - เครื่องบันทึก (recorder) รุ่น 746 ของบริษัท Waters, Australia
    - กระบอกฉีดยา (microsyrings) ขนาด 100 ไมโครลิตร รุ่น EXMSR 100 ของบริษัท ITO Corporation, Japan
21. เครื่องระเหยแห้งอุณหภูมิต่ำ (Lyophilizer) รุ่น FD-1 ของบริษัท Eyela, Japan

เคมีภัณฑ์

1. เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม (industrial grade dextran) บริษัท, Sigma, U.S.A.
2. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) บริษัท Merck, Germany
3. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck, Germany
4. แมกเนเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$ $7H_2O$) บริษัท Carlo Erba Regenti, Italy
5. แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$) บริษัท Carlo Erba Regenti, Italy
6. ทริปติกซอยบรอท (Tryptic soy broth) บริษัท Difco Laboratories, U.S.A.
7. เบรนฮาร์ทอินฟิวชั่น (Brain heart infusion) บริษัท Difco Laboratories, U.S.A.
8. โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) บริษัท Merck, Germany
9. ทริปโตน (Tryptone) บริษัท Difco Laboratories, U.S.A.
10. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) บริษัท AJEX Chemicals, Australia

11. โพแทสเซียมคาร์บอเนต (K_2CO_3) บริษัท Carlo Erba Regenti, Italy
12. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) บริษัท Carlo Erba Regenti, Italy
13. ซูโครส (sucrose) บริษัท Sigma, U.S.A.
14. กลูโคส (glucose) บริษัท Sigma, U.S.A.
15. ไอโซมอลโทส (isomaltose) บริษัท Sigma, U.S.A.
16. ไอโซมอลโทไทรโอส (isomaltotriose) บริษัท Fluka, Germany
17. ไอโซมอลโทเททราโอส (isomaltotetraose) บริษัท Fluka, Germany
18. เมธิลแอลฟาดีแมนโนไพราโนไซด์ (methyl alpha-D-manopyranoside) บริษัท Sigma, U.S.A.
19. เซลลูโลส (cellulose) บริษัท Sigma, U.S.A.
20. ไนจีแรน (nigeran) บริษัท Sigma, U.S.A.
21. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Merck, Germany
22. โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$) บริษัท Fluka, Germany
23. เฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4$) บริษัท Unilab, U.S.A.
24. เอทานอล (C_2H_5OH) บริษัท Labscan, Ireland
25. สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) บริษัท Difco Laboratories, U.S.A.
26. อะซิโตไนไทรล์เกรด HPLC (HPLC grade acetonitrile) บริษัท Labscan, Ireland
27. น้ำปลอดประจุ (deionized distilled water)
28. กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) บริษัท Merck, Germany
29. เดกซ์แทรน T-2000 (Dextrans T-2000) บริษัท, Phamacia, Sweden
30. อัลบูมินจากซีรั่มวัว (bovine serum albumin) บริษัท Sigma, U.S.A.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินงานทดลอง

1 การเก็บและการเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

1.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

ได้แก่ *Streptococcus sobrinus* 6715 (Dr. R. J. Doyle, University of Louisville, Louisville, Kentucky, U.S.A) , *Arthrobacte*r sp. AG-2 (ณฐินี สุวรรณสิงห์, 2540) และ *Penicillium* sp. สายพันธ์SMCU 3-14 (สุวรรณา นพพรพันธุ์, 2538)

1.2 การเก็บรักษาจุลินทรีย์

ขีดเชื้อ *S. sobrinus* 6715 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียง Brain heart infusion (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ จนเชื้อเจริญเต็มที่แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ จนกว่าจะนำมาใช้

ขีดเชื้อ *Arthrobacter* sp. AG-2 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียง Yamaguchi (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ จนเชื้อเจริญเต็มที่แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ จนกว่าจะนำมาใช้

เขี่ยสปอร์ของเชื้อรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 ลงบนอาหารแข็งเอียง Fukumoto (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28-32°ซ) เป็นเวลา 7 วัน จนสปอร์เจริญเต็มที่แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ จนกว่าจะนำมาใช้

2. เตรียมหัวเชื้อเพื่อการผลิตเดกซ์แทรน

เตรียมหัวเชื้อตั้งต้น โดยถ่ายเชื้อ *S. sobrinus* 6715 จากหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียง Brain heart infusion ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Brain heart infusion ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ ในภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบไม่มีการเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Brain Heart Infusion บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ จนวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโน-เมตร ได้เท่ากับ 0.5 – 0.6 ใช้เป็นกล้าเชื้อในการทดลองต่อไป

3. การผลิตเดกซ์แทรน, การเก็บเกี่ยว และทำบริสุทธิ์เดกซ์แทรนบางส่วน (partial purification) จากน้ำเลี้ยงของ *S. sobrinus* 6715 (Gibbons และคณะ, 1968)

3.1 การผลิตเดกซ์แทรน

ทำการถ่ายเชื้อจากข้อ 2 ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Tryptic Soy Broth ที่เสริมซูโครสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ ในภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบไม่มีการเขย่า เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจะได้เดกซ์แทรนในน้ำเลี้ยงเชื้อของ *S. sobrinus* 6715

3.2 การเก็บเกี่ยวและทำบริสุทธิ์เดกซ์แทรนบางส่วน

นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตเดกซ์แทรนมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำตะกอนเดกซ์แทรนที่ได้ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 เท่าโดยใช้เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (sonicator) เพื่อช่วยในการละลายและทำลายเซลล์แบคทีเรียที่ปนเปื้อนมากับเดกซ์แทรน เป็นเวลา 3 นาที นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที 10 นาที จากนั้นทำซ้ำทุกขั้นตอนอีก 2 ครั้งโดยละลายเดกซ์แทรนในโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.05 นอร์มัล

และ 0.2 นอร์มัล จากนั้นล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้งแล้วนำตะกอนที่ได้ไปทำแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งโดยใช้อุณหภูมิต่ำ (Lyophilizer) จะได้ตะกอนเดกซ์แทรนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนแล้วเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

4. การคัดเลือกสูตรอาหารและความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสมต่อการผลิตเดกซ์แทรนโดย *S. sobrinus* 6715

4.1 การคัดเลือกสูตรอาหารเพื่อการผลิตเดกซ์แทรนโดย *S. sobrinus* 6715

ทำการถ่ายเชื้อจากข้อ 2 ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการเติมซูโครสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยอาหารที่เลือกใช้คือ Brain Heart Infusion, Tryptic Soy Broth (ภาคผนวก ก) และ Basal medium (Gibbon และคณะ, 1968, ภาคผนวก ก) ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เก็บตัวอย่างของอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 3 ชั่วโมง ตั้งแต่ 0-48 ชั่วโมง ทำการเก็บเกี่ยวและทำบริสุทธิ์เดกซ์แทรนบางส่วนตามขั้นตอนในข้อที่ 3.2 จากนั้นนำตะกอนเดกซ์แทรนที่ได้ใส่กระทงอะลูมินัมฟอยล์ อบที่อุณหภูมิ 80°ซ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หรือจนน้ำหนักคงที่ แล้วนำไปชั่งน้ำหนักแห้ง คำนวนเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของ เดกซ์แทรนที่ได้จากอาหารเลี้ยงทั้ง 3 ชนิด

4.2 การหาปริมาณซูโครสที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเดกซ์แทรนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตเดกซ์แทรนที่คัดเลือกได้ในข้อ 4.1

โดยการถ่ายเชื้อจากข้อ 2 ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อการผลิตเดกซ์แทรนที่คัดเลือกได้ในข้อ 4.1 ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่มีการแปรผันปริมาณซูโครสตั้งแต่ 0-5 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ ในภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบไม่มีการเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเก็บเกี่ยวและทำบริสุทธิ์เดกซ์แทรนตามขั้นตอนในข้อ 3.2 และหาน้ำหนักแห้งของเดกซ์แทรนตามวิธีในข้อ 4.1

5. การศึกษารูปแบบการเจริญและการผลิตเดกซ์แทรนของ *S. sobrinus* 6715 ในอาหารและปริมาณซูโครสที่คัดเลือกได้ในข้อ 4.1 (อาหาร Basal medium ที่มีซูโครส 1.5 เปอร์เซ็นต์)

5.1 การศึกษารูปแบบการเจริญของ *S. sobrinus* 6715 ในอาหาร Basal medium ที่มีซูโครส 1.5 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับรูปแบบการเจริญในอาหาร Basal medium ที่มีกลูโคส 1.5 เปอร์เซ็นต์

โดยการถ่ายเชื้อจากข้อ 2 ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Basal medium ที่มีการเติมซูโครส 1.5 เปอร์เซ็นต์ และในอาหาร Basal medium ที่มีการเติมกลูโคส 1.5 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ ในภาวะการเลี้ยงแบบไม่มีการเขย่า เก็บตัวอย่างของอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 3 ชั่วโมง ตั้งแต่ 0 – 48 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ตะกอนที่ได้นำมาเติม โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มัล จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือด 20 นาที นำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนใสไปตรวจสอบปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry (Lowry และคณะ, 1951)

5.2 การศึกษารูปแบบการผลิตเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ในอาหาร Basal medium ที่มีซูโครส 1.5 เปอร์เซ็นต์

โดยการถ่ายเชื้อจากข้อ 2 ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Basal medium ที่มีซูโครส 1.5 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ ในภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบไม่มีการเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเก็บเกี่ยวและทำบริสุทธิ์เดกซ์แทรนตามขั้นตอนในข้อ 3.2 และหาน้ำหนักแห้งของเดกซ์แทรนตามวิธีในข้อ 4.1

6. การผลิตเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ในปริมาณสูง เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

เลี้ยง *S. sobrinus* 6715 เพื่อการผลิตเดกซ์แทรนในอาหาร Basal medium ที่มีน้ำตาลซูโครส 1.5 เปอร์เซ็นต์และนำมาผ่านการทำบริสุทธิ์ตามวิธีการในข้อ 2 นำเดกซ์แทรนที่ผลิตได้ไปบดให้ละเอียด เก็บในขวดปิดฝาที่แห้งสนิทเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

7. การเตรียมเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ให้มีพันธะ α-1,3 ปริมาณสูง

7.1 การเลี้ยงเชื้อ *Pennicillium* sp. SMCU 3-14 เพื่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส [α-1,6]

เติมทวีน-80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วลงในหลอดเก็บเชื้อรา (stock culture) จากข้อ 1.2 ใช้ลูปเขี่ยสปอร์ให้หลุดออกมาแขวนลอยในทวีน-80 นับสปอร์ให้อยู่ในช่วง $2x10^7$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้ฮีมาไซโทมิเตอร์ (haemacytometer) ถ่ายสปอร์แขวนลอย 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Fukumoto (ภาคผนวก ก) 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าแบบ rotary shaker ที่อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน แยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เก็บส่วนน้ำใสที่ 4°ซ เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

7.2 การสลายเดกซ์แทรนที่มีพันธะ α-1,6 ออกจากเดกซ์แทรนที่ผลิตโดย *S. sobrinus* 6715

นำเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *S. sobrinus* 6715 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ (จากข้อ 6) มาย่อยสลายด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] ที่ผลิตจาก *Pennicillium* sp. SMCU 3-14 โดยใช้ สับสเตรท 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตรของเอนไซม์) ในการทำปฏิกริยา บ่มพร้อมให้การเขย่าที่ 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 55°ซ เพื่อให้เอนไซม์ทำปฏิกริยากับสับสเตรท ทำการเก็บตัวอย่างทุก 1.5 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนน้ำใสมาวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Somogyi-Nelson (Somogyi, 1952) นำส่วนตะกอนที่เหลือจากการย่อย (เดกซ์แทรน) เมื่อมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้คงที่ มาล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นเติมเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] ลงไปใหม่และเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ทำการเก็บตัวอย่างและเติมเอนไซม์ลงไปใหม่ ณ เวลาที่น้ำตาลรีดิวซ์คงที่ด้วยวิธีการเช่นเดิม จนกระทั่งปริมาณน้ำตาลที่คงที่ในครั้งสุดท้ายเท่ากับปริมาณน้ำตาลของปฏิกิริยาเริ่มต้น (คือเดกซ์-แทรนที่เหลืออยู่ที่ไม่สามารถถูกย่อยด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] ได้อีก) ล้างตะกอนเดกซ์แทรนด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง นำไปทำให้แห้งด้วยการใช้เครื่องระเหยแห้งที่อุณหภูมิต่ำ (lyophilizer) และนำ เดกซ์แทรนที่ได้มาบดให้ละเอียดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

8. การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ด้วยเดกซ์แทรน-เนส [α-1,6] จาก *Pennicillium* sp. SMCU 3-14

นำเดกซ์แทรนจากข้อ 7.2 ที่ผ่านการระเหยแห้ง 10 มิลลิกรัม มาย่อยด้วยกรดซัลฟูริก 1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยนำไปนึ่งในเครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 120°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการปรับสารละลายที่ได้ให้มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 แล้วนำไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน ทำการทดลองแบบนี้เช่นเดียวกันกับเดกซ์แทรน T-2000 และเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 (ที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Pennicillium* sp. SMCU 3-14) ในการเปรียบเทียบ จากนั้นนำไปหาปริมาณและชนิดของน้ำตาลโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography) โดยใช้สารละลายกลูโคสและมอลโทสเป็นสารละลายมาตรฐาน

9. การเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลระหว่างเดกซ์แทรนชนิดต่างๆ

ทำโดยนำเดกซ์แทรนทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ เดกซ์แทรน T-2000, เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม, เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 และเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ปริมาณ 10 มิลลิกรัม มาย่อยด้วยด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งในเครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ

120°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมงจากนั้นปรับสารละลายที่ได้ให้มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 ทำการตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi-Nelson (Somogyi, 1952)

หมายเหตุ จากผลการทดลองข้อ 9 พบว่า

เดกซ์แทรน T-2000 1 กรัม มีปริมาณน้ำตาลเทียบเท่ากับ

เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม 1.01 กรัม

เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 1.27 กรัม

และเท่ากับเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 2.058 กรัม

จึงยึดถือเอาปริมาณเทียบเท่าดังกล่าวในการทดลองทุกขั้นตอนต่อจากนี้

10. การผลิตเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. AG-2 โดยการชักนำด้วยเดกซ์แทรนชนิดต่างๆ

10.1 การเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น

ปลูกเชื้อ *Arthrobacter* sp. AG-2 จากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียง BHI (slant agar) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yamaguchi (ภาคผนวก ก) 50 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 มล. บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28-32°ซ) ให้อากาศโดยการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ซึ่งเชื้อจะเจริญอยู่ในระยะกึ่งกลางทวีคูณ (mid-log phase) ทำการปั่นเหวี่ยงอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เก็บเกี่ยวและทำความสะอาดเซลล์โดยการล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นทำการปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร เท่ากับ 0.6–0.7 นำมาเป็นกล้าเชื้อในการทดลองต่อไป (สุหัทยา, 2543)

10.2 การผลิตเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2

เลี้ยงเชื้อจากข้อ 10.1 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yamaguchi (ภาคผนวก ก) 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร โดยใช้เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรมเป็นสารชักนำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (28-32°ซ) พร้อมให้อากาศโดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และเก็บตัวอย่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เวลา 36-48 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเวลาที่มีการผลิตเดกซ์แทรนเนสสูงสุด (สุหัทยา, 2543)

10.3 การผลิตเดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และα-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2

ทำการเลี้ยง Arthrobacter sp. AG-2 เพื่อผลิตเดกซ์แทรนโดยใช้ภาวะเดียวกันกับข้อ 10.2 แต่ใช้เดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *S. sobrinus* 6715 เป็นสารชักนำแทนเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม

10.4 การผลิตเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2

ดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 10.3 แต่ใช้เดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ที่ผลิตขึ้นจากข้อ 7.2 เป็นสารชักนำแทน

11. การตรวจสอบปริมาณและชนิดของน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายเดกซ์แทรน T-2000 และเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *S. sobrinus* 6715 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Pennicillium* sp. SMCU 3-14

โดยการนำเดกซ์แทรน T-2000 และเดกซ์แทรนที่ผลิตได้จาก *S. sobrinus* 6715 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ตามวิธีการในข้อ 2 แล้วมาย่อยสลายด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] ที่ผลิตจาก *Pennicillium* sp. SMCU 3-14 โดยใช้สับสเตรท 2 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตรในการทำปฏิกริยา บ่มพร้อมให้การเขย่าที่อุณหภูมิ 55°ซ เพื่อให้เอนไซม์ทำปฏิกริยา เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ นำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นกรองส่วนน้ำใสผ่านแผ่นกรองที่มีขนาด 0.45 ไมครอน เติมสารละลายมาตรฐานภายใน (internal standard) เมธิล แอลฟา-ดี-แมนโนไพแรนโนไซด์ (methyl alpha–D–mannopyrannoside) ความเข้มข้น 12.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของน้ำตาลด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, HPLC) ซึ่งประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้

เครื่องโครมาโทกราฟีแบบของเหลว เลือกใช้คอลัมน์คาร์โบไฮเดรต (aminopropyl) ขนาด 4.6 x 250 mm ตั้งอุณหภูมิสารละลายตัวพา 30°ซ ตั้งอุณหภูมิคอลัมน์ที่อุณหภูมิห้อง (28-32°ซ) โดยใช้สารละลายอะซิโตไนไทรล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข) เป็นสารละลายตัวพา และใช้อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที

ฉีดสารละลายตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณและชนิดของน้ำตาลปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ในแต่ละตัวอย่าง ไปเทียบหาปริมาณของสารจากกราฟมาตรฐาน และเวลาที่สารถูกชะออกจากคอลัมน์นำไปเทียบชนิดของน้ำตาลจากสารมาตรฐานเช่นกัน

12. การตรวจสอบความสามารถของเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. AG-2 ที่ผลิตได้ในข้อ 10 ในการย่อยสลายเดกซ์แทรนชนิดต่างๆ

12.1 การตรวจสอบความสามารถของเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2 ที่ชักนำด้วยเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรมตามวิธีการในข้อ 10.2 ในการย่อยสลายเดกซ์แทรนชนิด

ต่างๆ คือ เดกซ์แทรน T-2000, เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 และ เดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 (ที่ผลิตได้จากข้อ 7.2) โดยตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi-Nelson และตรวจสอบชนิดและปริมาณน้ำตาลที่ได้หลังจากการย่อย ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง

12.1.1 การตรวจสอบความสามารถของเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2 ที่ผลิตตามวิธีในข้อ 10.2

โดยการนำเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] มาทำปฏิกริยากับเดกซ์แทรนทั้ง 3 ชนิดโดยใช้สับสเตรท 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในการทำปฏิกริยา บ่มพร้อมให้การเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45°ซ เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ นำตัวอย่างที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสไปตรวจหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีของ Somogyi-Nelson (Somogyi, 1952)

12.1.2 ตรวจสอบชนิดและปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการย่อยเดกซ์แทรนชนิดต่างๆด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] ที่ผลิตจาก *Arthrobacter* sp. AG-2 ตามวิธีในข้อ 10.2

โดยนำเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] มาทำปฏิกริยากับเดกซ์แทรนทั้ง 3 ชนิดโดยใช้สับสเตรท 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในการทำปฏิกริยา บ่มพร้อมให้การเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45°ซ เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ จากนั้นกรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาด 0.45 ไมครอน นำไปวัดปริมาณและชนิดของน้ำตาลด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง ซึ่งประกอบ ด้วยส่วนต่างๆ ดังข้อ 11 ที่อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที

12.2 การตรวจสอบความสามารถของเดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และ α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2 ที่ชักนำด้วยเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ตามวิธีการในข้อ 10.3 ในการย่อยสลายเดกซ์แทรนชนิดต่างๆ คือ เดกซ์แทรน T-2000, เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 และเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 (ที่ผลิตได้จากข้อ 7.2) โดยตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi-Nelson และตรวจสอบชนิดและปริมาณน้ำตาลที่ได้หลังจากการย่อยด้วยวิธีโครมา-โทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง

12.2.1 การตรวจสอบความสามารถของเดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และ α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2 ที่ผลิตตามวิธีข้อ 10.3

ทำการทดลองตามข้อ 12.1.1 โดยใช้เดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และ α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2 ที่ผลิตตามวิธีข้อ 10.3 มาทำปฏิกริยากับเดกซ์แทรนทั้ง 3 ชนิด

12.2.2 ตรวจสอบชนิดและปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการย่อยเดกซ์แทรนชนิดต่างๆด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และ α-1,6] ที่ผลิตจาก *Arthrobacter* sp. AG-2 ตามวิธีในข้อ 10.3

ทำการทดลองตามข้อ 12.1.2 โดยใช้เดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และ α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2 ที่ผลิตตามวิธีข้อ 10.3 มาทำปฏิกริยากับเดกซ์แทรนทั้ง 3 ชนิด

12.3 การตรวจสอบความสามารถของเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2 ที่ชักนำด้วยเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ตามวิธีการในข้อ 10.4 ในการย่อยสลายเดกซ์แทรนชนิดต่างๆ คือ เดกซ์แทรน T-2000, เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 และเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 (ที่ผลิตได้จากข้อ 7.2) โดยตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi-Nelson และตรวจสอบชนิดและปริมาณน้ำตาลที่ได้หลังจากการย่อย ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง

12.3.1 การตรวจสอบความสามารถของเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2 ที่ผลิตตามวิธีข้อ 10.4

ทำการทดลองตามข้อ 12.1.1 โดยใช้เดกซ์แทรนเนส [α-1,3] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2 ที่ผลิตตามวิธีข้อ 10.4 มาทำปฏิกริยากับเดกซ์แทรนทั้ง 3 ชนิด

12.3.2 ตรวจสอบชนิดและปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการย่อยเดกซ์แทรนชนิดต่างๆด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] ที่ผลิตจาก *Arthrobacter* sp. AG-2 ตามวิธีในข้อ 10.4

ทำการทดลองตามข้อ 12.1.2 โดยใช้เดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และ α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2 ที่ผลิตตามวิธีข้อ 10.4 มาทำปฏิกริยากับเดกซ์แทรนทั้ง 3 ชนิด

13. การตรวจสอบความสามารถของเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] และเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2 ในการย่อยสลายเซลลูโลสและไนจีแรน

13.1 การตรวจสอบความสามารถของเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2 ที่ผลิตตามวิธีในข้อ 10.2 ในการย่อยสลายเซลลูโลสและไนจีแรน

โดยการนำเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] มาทำปฏิกริยากับเซลลูโลสและไนจีแรนโดยใช้สับสเตรท 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในการทำปฏิกริยา บ่มพร้อมให้การเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45°ซ เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ นำตัวอย่างที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสไปตรวจหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีของ Somogyi-Nelson (Somogyi, 1952)

13.2 การตรวจสอบความสามารถของเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2 ที่ผลิตตามวิธีในข้อ 10.4 ในการย่อยสลายเซลลูโลสและไนจีแรน

โดยการนำเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] มาทำปฏิกริยากับเซลลูโลสและไนจีแรนโดยใช้สับสเตรท 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในการทำปฏิกริยา บ่มพร้อมให้การเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45°ซ เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ นำตัวอย่างที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสไปตรวจหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีของ Somogyi-Nelson (Somogyi, 1952)

14. วิธีการวิเคราะห์

14.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) โดยวิธีของ Somogyi-Nelson (Somogyi, 1952)

นำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร มาเติมสารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ (ภาคผนวก ข) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที แล้วทำให้เย็นทันที หลังจากนั้นเติมสารละลายเนลสัน (ภาคผนวก ข) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งเอาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร และทำการหาปริมาณ น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคส

14.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยวิธีของ Lowry (Lowry, 1951)

นำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเติมสารละลายผสม Lowry C (ภาคผนวก ข) 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จึงเติมสารละลาย Lowry D (ภาคผนวก ข) 0.5 ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าปริมาณโปรตีนที่ได้โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ใช้โบรไวน์ซีรั่มอัลบูมิน (Bovine serum albumin, BSA) ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

บทที่ 3

ผลการทดลอง

สัญลักษณ์และคำย่อในงานวิจัย

เดกซ์แทรน T-2000 และเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม คือ เดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *Leuconostoc mesenteroides* B-512F ซึ่งมีรายงานว่ามีพันธะ α-1,6 มากถึง 95 เปอร์เซ็นต์ (จากบริษัท Sigma และ Pharmacia)

เดกซ์แทรนจาก *Streptococcus sobrinus* 6715 เป็นเดกซ์แทรนที่มีรายงานว่าประกอบด้วยพันธะ α-1,3 ปริมาณมากถึง 67 เปอร์เซ็นต์ ที่เหลือเป็นพันธะ α-1,2, α-1,4 และ α-1,6 (Huge และคณะ,1986)

เดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 คือเดกซ์แทรนที่ได้จากการนำเดกซ์แทรนจาก *Streptococcus sobrinus* 6715 มาทำการย่อยด้วยเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Penicillium* sp. SMCU 3-14 ที่ชักนำโดยเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรมข้างต้น และสามารถย่อยเดกซ์แทรน T-2000 ได้อย่างดี ดังนั้นเดกซ์แทรนที่ผ่านกระบวนการย่อยนี้แล้วจึงจัดว่าเป็นเดกซ์แทรนที่มีพันธะ α-1,3 ปริมาณสูง (ดังวิธีการทดลองข้อ 7.2)

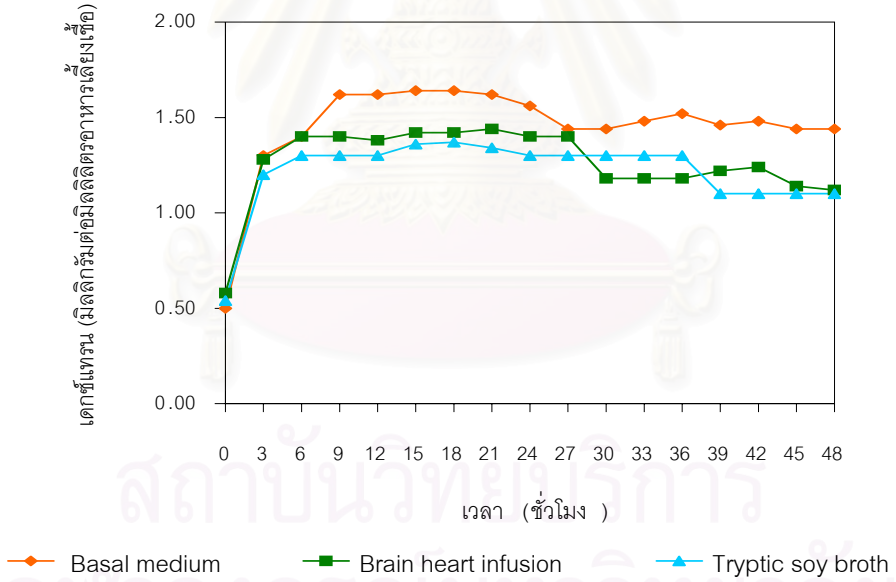
เดกซ์แทรนเนส [α-1,6] คือเดกซ์แทรนเนสที่จำเพาะในการตัดสายเดกซ์แทรนพันธะ [α-1,6] โดยการผลิตเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] นี้จะชักนำโดยเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม (Pharmacia)

เดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และ α-1,6] คือเดกซ์แทรนเนสที่จำเพาะในการตัดสายเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 และ พันธะ α-1,6 โดยการผลิตเดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และ α-1,6] นี้จะชักนำโดยเดกซ์แทรนที่สร้างจาก *Streptococcus sobrinus* 6715

เดกซ์แทรนเนส [α-1,3] คือเดกซ์แทรนเนสที่จำเพาะในการตัดสายเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 โดยการผลิตเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] นี้จะชักนำโดยเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ที่ผลิตได้จากการทดลองข้อ 7.2

3.1 การคัดเลือกสูตรอาหารเพื่อการผลิตเดกซ์แทรน โดย *S. sobrinus* 6715

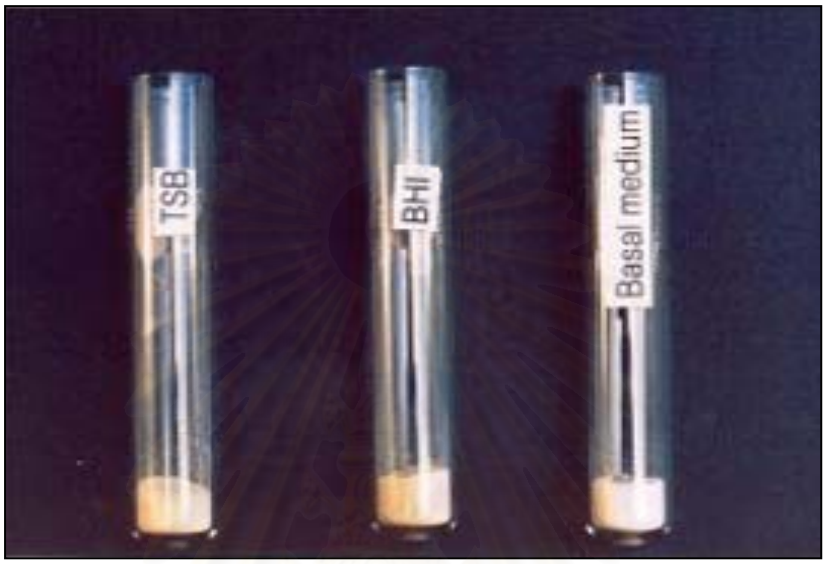
ทำการเปรียบเทียบปริมาณเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *S. sobrinus* 6715 ในอาหาร 3 ชนิดที่เลือกมาศึกษาในการผลิตเดกซ์แทรน ได้แก่ Brain heart infusion, Tryptic soy broth และ Basal medium ตามวิธีในข้อ 4.1 พบว่าการเลี้ยง *S. sobrinus* 6715 ในอาหาร Basal medium จะให้ปริมาณเดกซ์แทรนสูงที่สุด โดยชั่วโมงที่ 15 ของการเลี้ยงจะให้ปริมาณเดกซ์แทรน 1.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังรูปที่ 5 ในขณะที่ Brain heart infusion ให้ปริมาณเดกซ์แทรนสูงสุดที่ 1.44 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในชั่วโมงที่ 21 และอาหาร Tryptic soy broth ให้ปริมาณเดกซ์แทรนสูงสุด 1.37 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในชั่วโมงที่ 18 (รูปที่ 5) และยังพบว่าลักษณะเดกซ์แทรนที่ได้จากการเลี้ยง *S. sobrinus* 6715 ในอาหาร Basal medium จะมีลักษณะขาวสะอาดกว่าเดกซ์แทรนที่ได้จากอาหารชนิดอื่น (รูปที่ 6 และ 7) จึงเลือกใช้อาหาร Basal medium ในการผลิตเดกซ์แทรนเพื่อการทดลองต่อไป



รูปที่ 5 แสดงปริมาณเดกซ์แทรนที่ผลิตโดย *S. sobrinus* 6715 ที่เวลาต่างๆ ในอาหาร Basal medium, Brain heart infusion และ Tryptic soy broth ที่อุณหภูมิ 37°ซ ในภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบไม่มีการเขย่า

รูปที่ 6 แสดงลักษณะของเดกซ์แทรนที่ผลิตโดย *S. sobrinus* 6715 เมื่อเลี้ยงในอาหาร Brain heart infusion (BHI), Tryptic soy broth (TSB) และ Basal medium ที่เสริมด้วยซูโครส 2% ที่อุณหภูมิ 37^{O}ซ ในภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบไม่มีการเขย่า เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

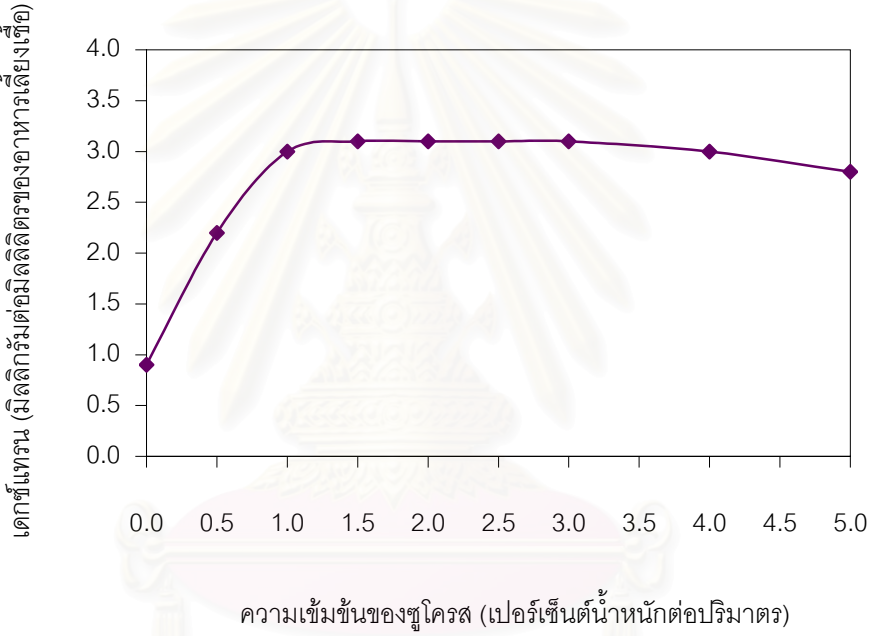


รูปที่ 7 แสดงลักษณะของเดกซ์แทรนที่ผลิตโดย *S. sobrinus* 6715 เมื่อเลี้ยงในอาหาร Brain heart infusion (BHI), Tryptic soy broth (TSB) และ Basal medium ที่เสริมด้วยซูโครส 2% ที่อุณหภูมิ 37^{O}ซ ในภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบไม่มีการเขย่า หลังจากผ่านการระเหยแห้ง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 ปริมาณซูโครสที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเดกซ์แทรนในอาหารเลี้ยงเชื้อ Basal medium

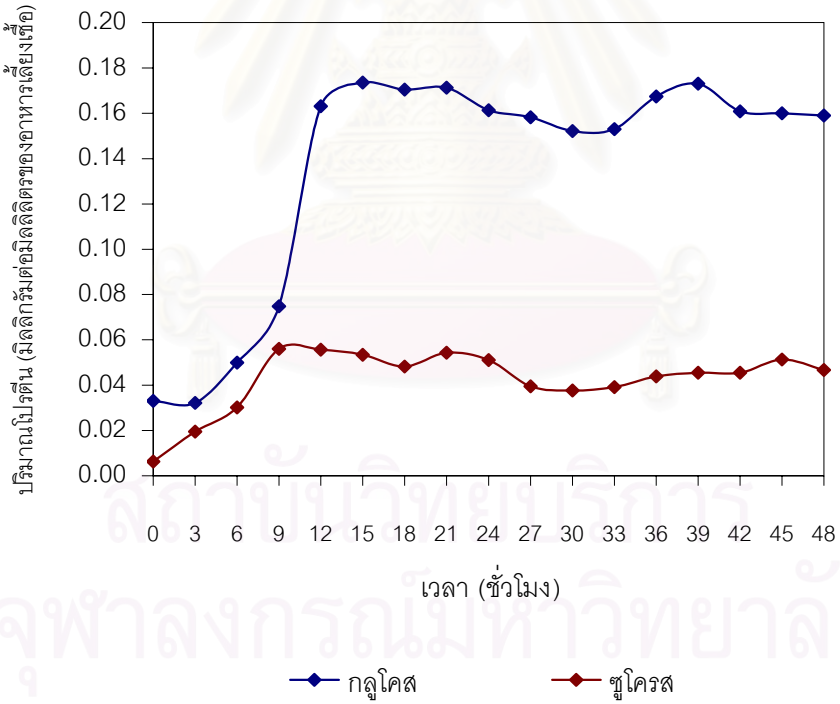
ทำการแปรผันปริมาณซูโครสเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการผลิตเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ในอาหาร Basal medium โดยมีการแปรผันความเข้มข้นของซูโครสตั้งแต่ 0 ถึง 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 8 พบว่าความเข้มข้นของซูโครสที่ให้ปริมาณเดกซ์แทรนสูงสุดคือ จาก 1.0 เปอร์เซ็นต์เป็นต้นไป จึงเลือก 1.5 เปอร์เซ็นต์สำหรับผลิตเดกซ์แทรนเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป



รูปที่ 8 แสดงปริมาณเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *S. sobrinus* 6715 ในอาหาร Basal medium โดยมีการแปรผันปริมาณซูโครสตั้งแต่ 0-5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ 37°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบไม่มีการเขย่า

3.3.ลักษณะการเจริญของ *S. sobrinus* 6715 ในอาหาร Basal medium ที่มีซูโครส 1.5 เปอร์เซ็นต์

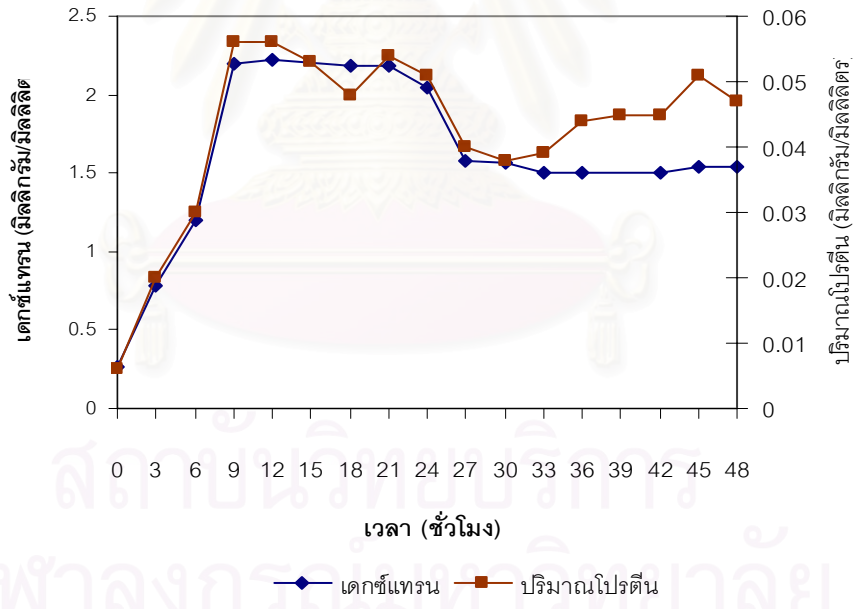
เมื่อทำการศึกษาลักษณะเจริญของ *S. sobrinus* 6715 ในภาวะที่มีการสังเคราะห์เดกซ์แทรน โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร Basal medium ที่มีการเติมซูโครส 1.5 เปอร์เซ็นต์ ทำการวิเคราะห์การเจริญของเชื้อตามวิธี 5.1 โดยวัดอัตราการเจริญของเซลล์ด้วยการหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry (Lowry และคณะ, 1951) เปรียบเทียบผลการทดลองนี้กับปริมาณโปรตีนจากเซลล์แบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร Basal medium ที่มีการเติมกลูโคส 1.5 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองดังรูปที่ 9 พบว่าแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารทั้ง 2 ชนิดมีอัตราการเจริญแตกต่างกัน ในอาหาร Basal medium ที่มีการเติมกลูโคส 1.5 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการเจริญสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 15 ให้ปริมาณโปรตีน 0.173 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่อาหาร Basal medium ที่มีการเติมซูโครส 1.5 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการเจริญสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 9 เช่นกันแต่ให้ปริมาณโปรตีนเพียง 0.056 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งต่ำกว่าการเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมกลูโคส



รูปที่ 9 แสดงการเจริญของ *S. sobrinus* 6715 โดยการวัดปริมาณโปรตีนจากเซลล์ ในอาหาร Basal medium ที่มีการเติมกลูโคส และซูโครสที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

3.4 การผลิตเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ในอาหารเหลว Basal medium ที่มีซูโครส 1.5 เปอร์เซ็นต์

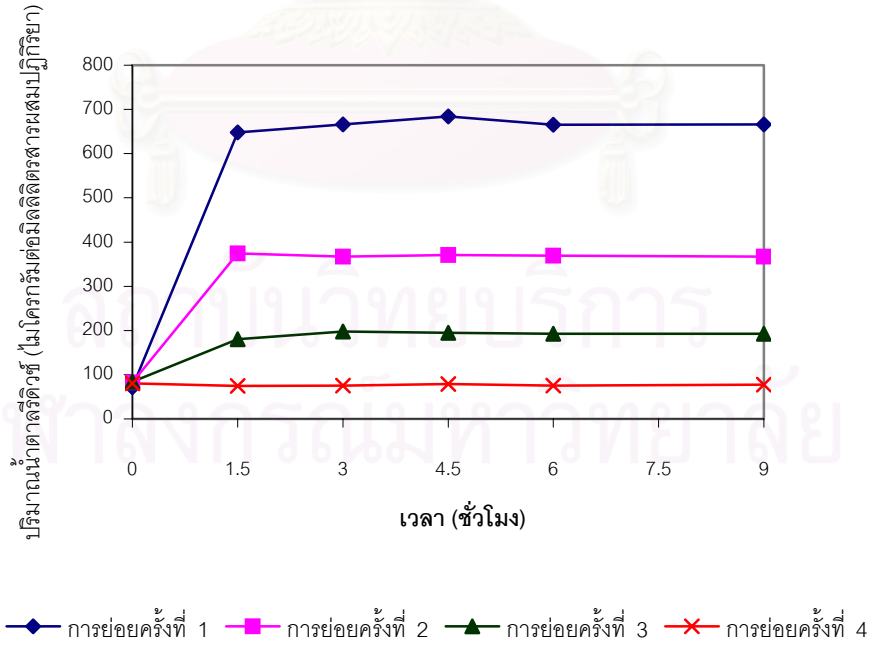
ทำการเลี้ยง *S. sobrinus* 6715 ในอาหารเหลว Basal medium ที่มีความเข้มข้นของซูโครส 1.5 เปอร์เซ็นต์ เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆกัน ตั้งแต่ 0 ถึง 48 ชั่วโมงเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเดกซ์แทรน นำเดกซ์แทรนที่ได้ไปผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนตามวิธีการในข้อ 3.2 เพื่อกำจัดเซลล์แบคทีเรียและสารปนเปื้อนจากอาหาร จากนั้นทำการตรวจสอบน้ำหนักแห้งของเดกซ์แทรนตามวิธีการในข้อ 5.2 ได้ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 10 พบว่า *S. sobrinus* 6715 ผลิตเดกซ์แทรนได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยง โดยให้ปริมาณเดกซ์แทรน 2.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณเดกซ์แทรนจะคงที่จนกระทั่งชั่วโมงที่ 24 จึงเริ่มลดลง ดังนั้นระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการเก็บเกี่ยวเดกซ์แทรนคือชั่วโมงที่ 9 ถึงชั่วโมงที่ 21 ของการเลี้ยง เมื่อเปรียบเทียบลักษณะการผลิตเดกซ์แทรนกับการเจริญของเชื้อพบว่าเดกซ์แทรนเป็นสารที่ถูกผลิตควบคู่ไปกับการเจริญ



รูปที่ 10 แสดงการผลิตเดกซ์แทรนโดย *S. sobrinus* 6715 ในอาหาร Basal medium ที่มีความเข้มข้นของซูโครส 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 0-48 ชั่วโมง อุณหภูมิ 37°ซ ในภาวะการเลี้ยงแบบไม่มีการเขย่า

3.5 การย่อยเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Penicillium* sp. SMCU 3-14 ในขั้นตอนการผลิตเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3

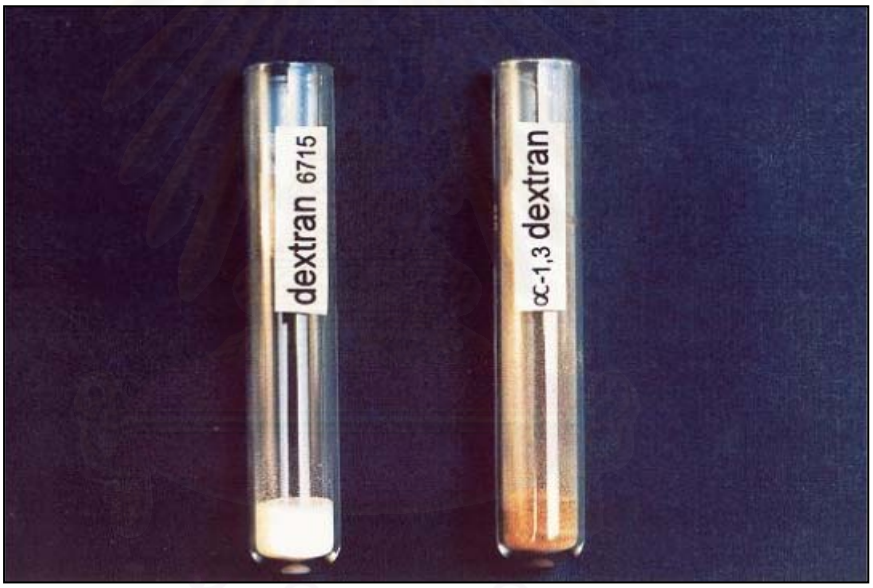
เมื่อนำเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *S. sobrinus* 6715 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้วมาย่อยสลายด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Penicillium* sp. SMCU 3-14 โดยบ่มพร้อมให้การเขย่าที่อุณหภูมิ 55°ซ เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ จากนั้นนำสารละลายไปวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยจากเดกซ์แทรน โดยวิธีของ Somogyi-Nelson (Somogyi, 1952) ได้ผลการทดลองดังแสดงรูปที่ 11 พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีอยู่ในปฏิกิริยาเริ่มต้น (0 ชั่วโมง) เท่ากับ 80.62 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการย่อยเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] ในครั้งที่ 1 พบว่าเมื่อให้เวลาในการทำปฏิกิริยามากขึ้น ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะเพิ่มขึ้นจากปริมาณเริ่มต้นที่มีอยู่ และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะเพิ่มสูงสุดเมื่อให้เวลาในการทำปฏิกิริยา 4.5 ชั่วโมง จากนั้นจะคงที่ และเมื่อทำการล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นและเติมเดกซ์แทรนเนสใหม่อีกครั้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ยังคงเพิ่มขึ้นจึงดำเนินการย่อยซ้ำต่อจนถึงครั้งที่ 4 ซึ่งพบว่าไม่มีการเพิ่มขึ้นของน้ำตาลรีดิวซ์อีก โดยปริมาณน้ำตาลที่ตรวจสอบได้หลังทำปฏิกิริยาเท่ากับปริมาณน้ำตาลที่มีอยู่เดิมในเอนไซม์ และเมื่อตรวจสอบปริมาณของสารที่เหลือจากการย่อยสลายเทียบกับปริมาณเดกซ์แทรนเริ่มต้นเท่ากับ 44.67 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3) ลักษณะของสารที่ผ่านการย่อย และผ่านการทำแห้งแล้ว แสดงดังรูปที่ 12



รูปที่ 11 แสดงผลการย่อยสลายเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *S. sobrinus* 6715 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Penicillium sp.* SMCU 3-14

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ก่อนและหลังการย่อยด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Penicillium* sp. SMCU 3-14 จนกระทั่งปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงที่

ปริมาณเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ก่อนการย่อยด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Penicillium* sp. SMCU 3-14 (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณสารที่เหลือหลังการย่อยเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Penicillium* sp. SMCU 3-14 (เปอร์เซ็นต์)
100	44.67



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 12 แสดงลักษณะของเดกซ์แทรนที่ผลิตโดย *S. sobrinus* 6715 ในอาหาร Basal medium และสารที่เหลือจากการย่อยด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Penicillium* sp. SMCU 3-14 4 ครั้ง และผ่านการทำแห้งแล้ว

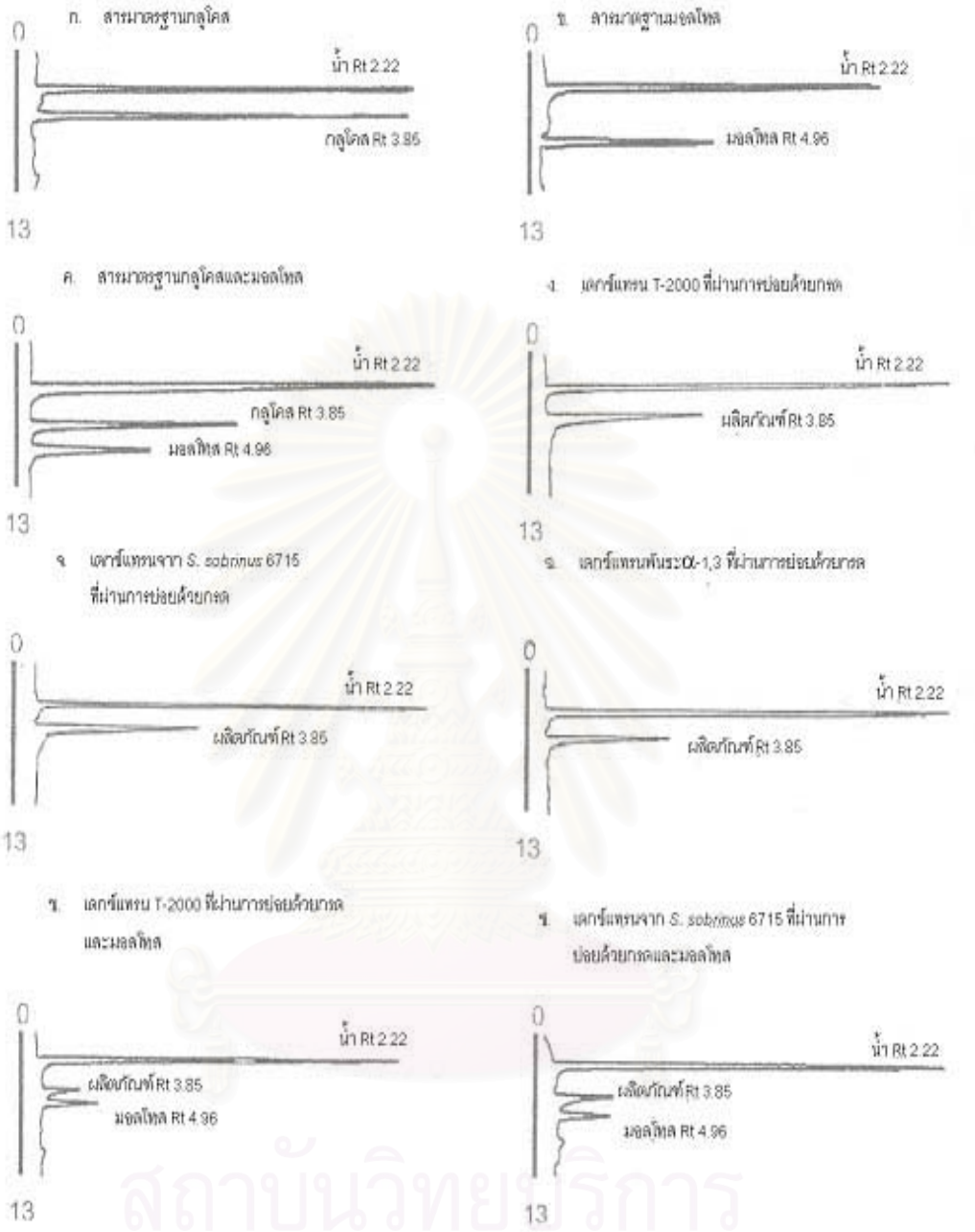
ก. เดกซ์แทรนที่ผลิตโดย *S. sobrinus* 6715

ข. สารที่เหลือจากการย่อยเดกซ์แทรนที่ผลิตโดย *S. sobrinus* 6715 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Penicillium* sp. SMCU 3-14

3.6 การตรวจสอบว่าสารที่เหลือจากการย่อยเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Penicillium* sp. SMCU 3-14 เป็นเดกซ์แทรนจริง

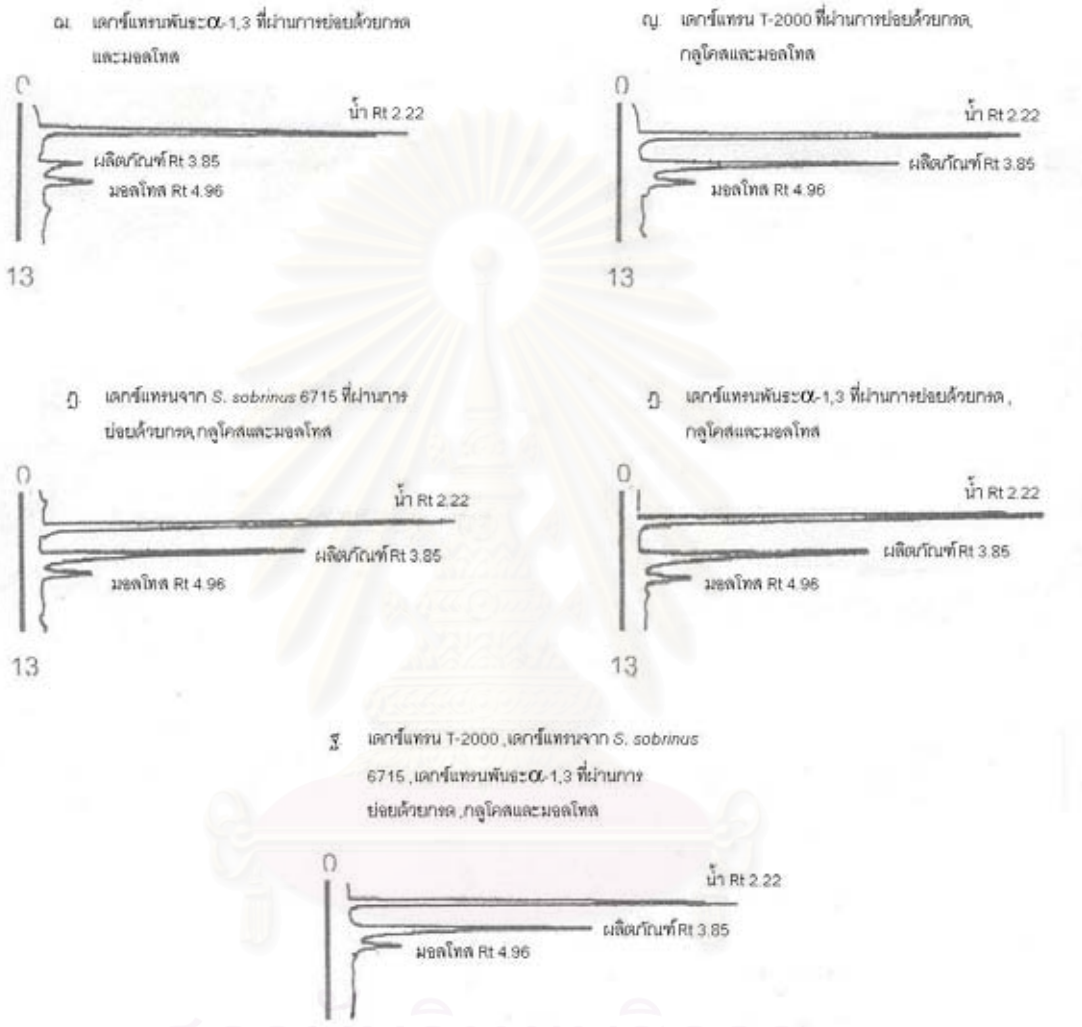
เมื่อนำสารที่เหลือจากการย่อยสลายที่ได้จากวิธีการทดลองข้อ 7.2 10 มิลลิกรัม มาย่อยด้วยกรดซัลฟูริก 1 นอร์มัล 1 มิลลิลิตร ที่ 120°ซ 1 ชั่วโมง แล้วนำไปปรับความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 จากนั้นนำไปตรวจหาชนิดของสารที่ได้ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง โดยเปรียบเทียบกับเดกซ์แทรน T-2000 และเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 (ที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยเดกซ์แทรนเนส [α–1,6] จาก *Penicillium* sp. SMCU 3-14) ซึ่งผ่านการสลายด้วยกรดเช่นกัน โดยมีกลูโคสและมอลโทสเป็นสารละลายมาตรฐาน พบว่าที่เวลา 3.60 นาที สารที่ได้จากการย่อยสลายเดกซ์แทรน T-2000 (รูป 13ง, 13ช และ 13ญ) เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 (รูป 9จ, 9ซ และ 9ฎ) และเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 (รูป 13ฉ, 13ฌ และ 13ฏ) ด้วยกรดซัลฟูริก 1 นอร์มัล ต่างมีเวลารีเทนชัน (retention time) เดียวกันกับกลูโคส เมื่อทำการตรวจสอบยืนยันอีกครั้งด้วยการผสมสารที่ได้จากการย่อยเดกซ์แทรนทั้ง 3 ชนิด พร้อมกับสารมาตรฐานกลูโคสและมอลโทส (รูปที่ 13ฐ) พบว่าสารที่ได้จากการย่อยเดกซ์แทรนทั้ง 3 ชนิดยังคงเคลื่อนที่ออกมาที่เวลาเดียวกันและเป็นเวลาเดียวกับกลูโคส จึงกล่าวได้ว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายเดกซ์แทรนพันธะ α–1,3 ด้วยกรดซัลฟูริก เป็นผลิตภัณฑ์ชนิดเดียวกันกับผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายเดกซ์-แทรน T-2000 และเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 โดยผลิตภัณฑ์ดังกล่าวคือกลูโคส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 13 โครมาโทแกรมแสดงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายเดกซ์แทรน T-2000 เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 และเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ด้วยกรดซัลฟูริก (โดยใช้อัตราการไหลของสารละลายตัวพา 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 13 โครมาโทแกรมแสดงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายเดกซ์แทรน T-2000 เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 และเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ด้วยกรดซัลฟูริก (โดยใช้อัตราการไหลของสารละลายตัวพา 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที) (ต่อ)

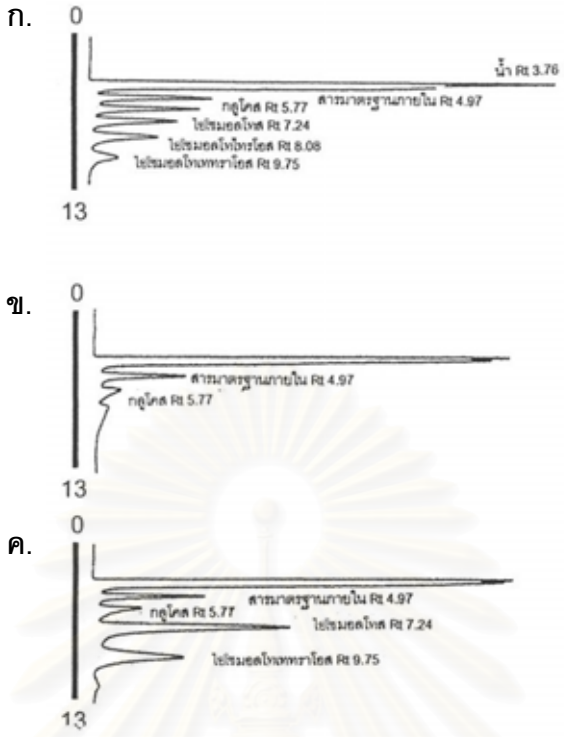
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.7 **ผลิตภัณฑ์จากการย่อยเดกซ์แทรน** T-2000 **และเดกซ์แทรนจาก** *S. sobrinus* 6715 **ด้วยเดกซ์แทรนเนส [**α-1,6**] จาก** *Penicillium* sp. SMCU 3-14

3.7.1 การย่อยเดกซ์แทรน T-2000 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Penicillium* sp. SMCU 3-14

เพื่อศึกษาถึงผลของการย่อยสลายและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาระหว่างเดกซ์แทนเนส [α-1,6] (ที่ถูกชักนำด้วยเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรมที่มีพันธะ α-1,6 โดย *Penicillium* sp. SMCU 3-14) กับเดกซ์แทรน T-2000 โดยทำการตรวจสอบปริมาณและชนิดของน้ำตาลของเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] ก่อนการทำปฏิกิริยากับเดกซ์แทรน T-2000 ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูงเพื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นหลังทำปฏิกิริยา พบว่ามีผลิตภัณฑ์เพียงชนิดเดียวถูกชะผ่านคอลัมน์ออกมาที่เวลา 5.77 นาที เมื่อตรวจสอบโดยการเทียบกับสารมาตรฐาน (รูปที่ 14 ก.) พบว่าสารดังกล่าวเป็นกลูโคส (รูปที่ 14 ข.) โดยมีความเข้มข้นเท่ากับ 7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 15) ในขณะที่เมื่อให้เดกซ์แทรนเนสทำปฏิกิริยากับเดกซ์แทรน T-2000 พบว่ามีผลิตภัณฑ์ทั้งหมด 3 ชนิดถูกชะออกมา (รูปที่ 14 ค.) เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานพบว่าเป็นกลูโคส, ไอโซมอลโทส และไอโซมอลโทเททราโอส โดยถูกชะผ่านคอลัมน์ออกมาที่เวลา 5.77 นาที, 7.24 นาที และ 9.75 นาทีตามลำดับ โดยกลูโคส, ไอโซมอลโทส และ ไอโซมอลโทเททราโอสที่ได้มีความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 23, 102 และ 123 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ (รูปที่ 15)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

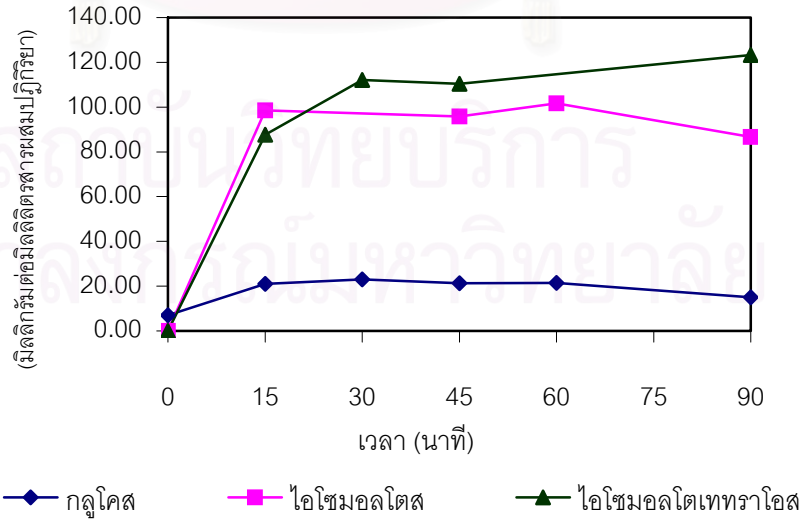


รูปที่ 14 โครมาโทแกรมแสดงชนิดของน้ำตาลก่อนและหลังการย่อยเดกซ์แทรน T-2000 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Penicillium* sp. SMCU 3-14 (โดยใช้อัตราการไหลของสารละลายตัวพา 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที)

ก. สารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส, ไอโซมอลโทส, ไอโซมอลโทไทรโอสและไอโซมอลโทเททราโอส

ข. ชนิดของน้ำตาลที่มีในเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] ก่อนการทำปฏิกิริยา

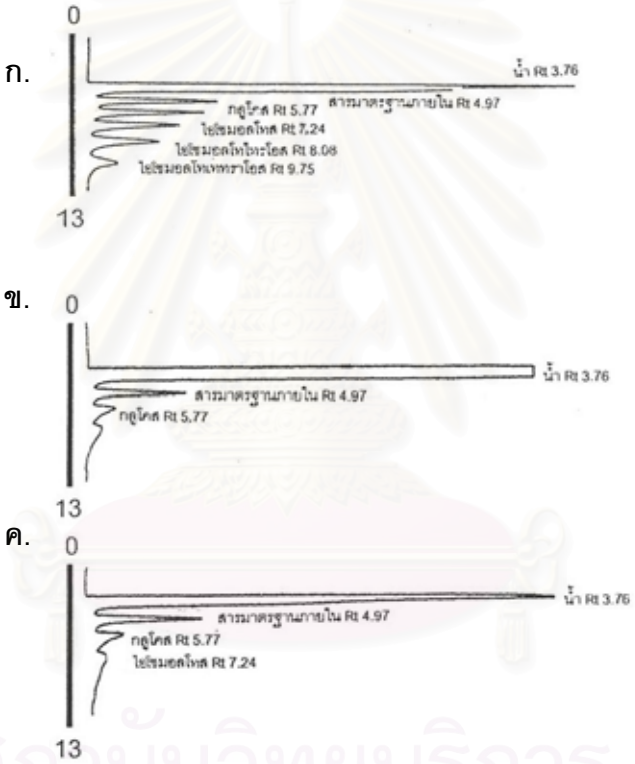
ค. ชนิดของน้ำตาลที่ตรวจพบหลังจากการทำปฏิกิริยา



รูปที่ 15 แสดงปริมาณน้ำตาลชนิดต่างๆที่ได้จากการย่อยเดกซ์แทรน T-2000 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Penicillium* sp. SMCU 3-14

3.7.2 การย่อยเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Penicillium* sp. SMCU 3-14

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของน้ำตาลในเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] ก่อนการย่อยเดกซ์-แทรน T-2000 (รูปที่ 16ข) เทียบกับสารมาตรฐาน (รูป 16ก) ตรวจพบกลูโคสความเข้มข้นเท่ากับ 11 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 17) และหลังจากการย่อย (รูปที่ 16ค) พบว่ากลูโคสเพิ่มขึ้นและเพิ่มสูงสุดเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังพบไอโซมอลโทสเกิดขึ้นและมีความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 23.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 17) ดังนั้นสรุปได้ว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยเดกซ์แทรน T-2000 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] ได้แก่กลูโคสและไอโซมอลโทส

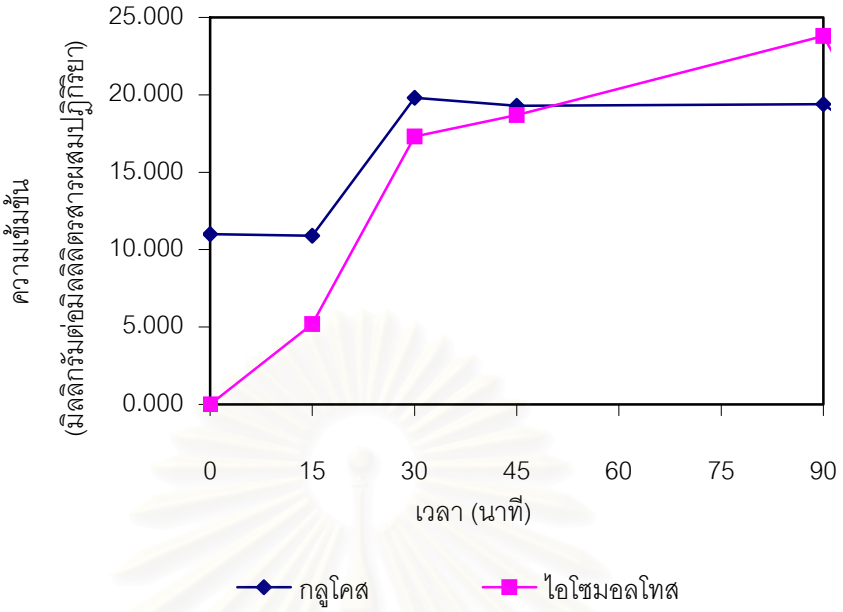


รูปที่ 16 โครมาโทแกรมแสดงชนิดของน้ำตาลก่อนและหลังการย่อยเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Penicillium* sp. SMCU 3-14 (โดยใช้อัตราการไหลของสารละลายตัวพา 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที)

ก. สารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส, ไอโซมอลโทส, ไอโซมอลโทไทรโอสและไอโซมอลโทเททราโอส

ข. ชนิดของน้ำตาลที่มีในเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] ก่อนการทำปฏิกิริยา

ค. ชนิดของน้ำตาลที่ตรวจพบหลังจากการทำปฏิกิริยา



รูปที่ 17 แสดงปริมาณกลูโคส และไอโซมอลโทสที่ถูกปลดปล่อยจากการย่อยเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Penicillium* sp. SMCU 3-14

จากการทดลองในข้อ 3.7.1 จะเห็นได้ว่าเมื่อชักนำการสร้างเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] ใน *Penicillium* sp. SMCU 3-14 ด้วยเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม และนำเดกซ์แทรนเนสดังกล่าวมาทำปฏิกิริยากับเดกซ์แทรน T–2000 พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ กลูโคส ไอโซมอลโทส และไอโซมอลโทเททราโอส และเมื่อนำเดกซ์แทรนเนสดังกล่าวมาทำปฏิกิริยากับเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ดังผลการทดลองที่ 3.7.2 พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ กลูโคส และไอโซมอลโทส ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยเดกซ์แทรนชนิดต่างๆ ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Penicillium* sp. SMCU 3-14

สารชักนำการสร้างเดกซ์แทรนเนส	สับสเตรท	ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยา
เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม [พันธะ α-1,6 สูง]	เดกซ์แทรน T-2000 [พันธะ α-1,6 สูง]	กลูโคส ไอโซมอลโทส และไอโซมอลโทเททราโอส
	เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus 6715* [พันธะ α-1,3 และ α-1,6 สูง]	กลูโคส และ ไอโซมอลโทส

3.8 การเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลระหว่างเดกซ์แทรน T-2000, เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม, เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 และเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ที่ผลิตขึ้น

เนื่องจากในขั้นตอนการเก็บเกี่ยวเดกซ์แทรนเนสจาก *S. sobrinus* 6715 อาจมีส่วนของผนังเซลล์แบคทีเรียหรือส่วนประกอบของอาหารปนเปื้อนด้วย ทำให้ปริมาณของเดกซ์แทรนที่ได้ไม่ใช่เดกซ์แทรนที่แท้จริงเพียงอย่างเดียว จึงทำการตรวจสอบปริมาณน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในเดกซ์แทรนแต่ละชนิดโดยย่อยด้วยกรดซัลฟูริกตามวิธีการในข้อ 9 และนำสารละลายที่ได้ไปตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi-Nelson พบว่า เดกซ์แทรน T-2000 มีความบริสุทธิ์สูงที่สุดโดยมีความบริสุทธิ์เท่ากับ 66 เปอร์เซ็นต์, เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรมมีความบริสุทธิ์ 65 เปอร์เซ็นต์, เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 มีความบริสุทธิ์ 52 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 มีความบริสุทธิ์ต่ำที่สุดเท่ากับ 32 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากเดกซ์แทรนทั้ง 4 ชนิดพบว่า เดกซ์แทรน T-2000 1.00 กรัม มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่ากับเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม 1.01 กรัม, เท่ากับเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 1.27 กรัม และเท่ากับเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 2.09 กรัม (ตารางที่ 5) ดังนั้นจึงใช้ปริมาณเทียบเท่าของเดกซ์แทรนทั้ง 4 ชนิดดังกล่าวในการทดลองขั้นต่อไป

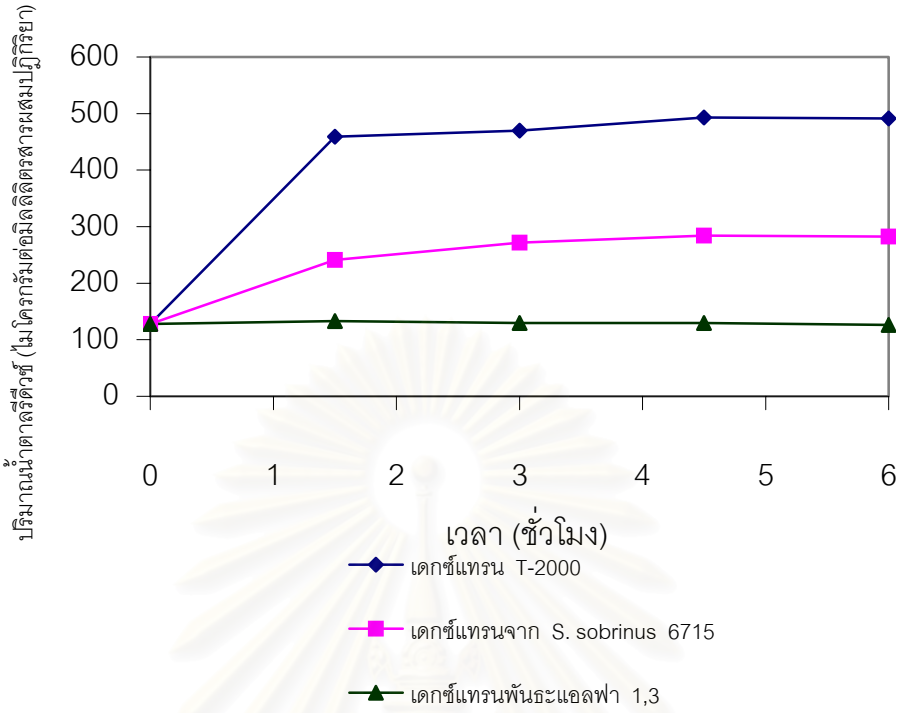
ตารางที่ 5 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วิเคราะห์ได้จากการย่อยเดกซ์แทรน T-2000, เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม, เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 และเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ด้วยกรดซัลฟูริก

เดกซ์แทรน	ความบริสุทธิ์ของเดกซ์แทรน (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณน้ำตาลเปรียบเทียบกับเดกซ์แทรน T-2000 (กรัมต่อกรัม)
เดกซ์แทรน T-2000	66	1
เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม	65	1.01
เดกซ์แทรนจาก*S. sobrinus* 6715	52	1.27
เดกซ์แทรนพันธะ α 1,3	32	2.058

3.9 ผลการย่อยเดกซ์แทรน T-2000, เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 และเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2 โดยการตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิด

เพื่อศึกษาถึงความจำเพาะต่อการย่อยพันธะ α-1,6 ในสายเดกซ์แทรนของเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] (ซึ่งถูกชักนำด้วยเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรมซึ่งมีพันธะ α-1,6 ปริมาณสูงจาก *Arthrobacter* sp. AG-2) โดยนำเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2 (จากการทดลองข้อ 12.1.1) มาย่อยเดกซ์แทรน T-2000, เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 และเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 แล้วตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi-Nelson ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 18 พบว่าเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2 สามารถย่อยเดกซ์แทรน T-2000 , เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 และเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ได้ โดยในการย่อยเดกซ์แทรน T-2000 ซึ่งมีพันธะ α-1,6 ปริมาณสูง ให้อัตราเร็วในการปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด โดยมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่ 4.5 ชั่วโมง เท่ากับ 493.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, การย่อยเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ซึ่งประกอบด้วยทั้งพันธะ α-1,3 และ α-1,6 ให้อัตราเร็วในการปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำกว่า โดยให้น้ำตาลรีดิวซ์สุดที่ 4.5 ชั่วโมงเช่นกันเท่ากับ 282.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และไม่พบน้ำตาลรีดิวซ์ในการย่อยเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 18 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยเดกซ์แทรน T-2000, เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 และเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Arthrobacter sp*. AG-2

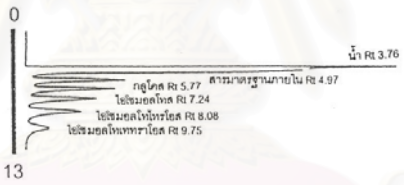
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.10 ผลการย่อยเดกซ์แทรน T-2000, เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 และเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2 โดยตรวจสอบด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง

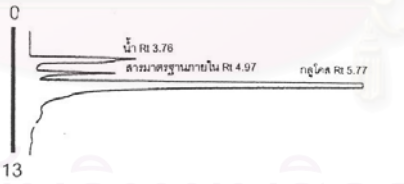
3.10.1 ผลการย่อยเดกซ์แทรน T-2000 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของน้ำตาลในเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] ก่อนการย่อยเดกซ์-แทรน T-2000 (รูปที่ 19ข) เทียบกับสารมาตรฐาน (รูปที่ 19ก) ตรวจพบกลูโคสความเข้มข้นเท่ากับ 44 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 20) และหลังจากการย่อย (รูปที่ 19ค และ 20) พบว่ากลูโคสเพิ่มขึ้นและเพิ่มสูงสุดเท่ากับ 530 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังพบผลิตภัณฑ์อีกสองชนิดคือ ไอโซมอลโทเททราโอสโดยมีความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 61 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนผลิตภัณฑ์อีกชนิดที่มีเวลารีเทนชันเท่ากับ 13 นาที ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยเดกซ์แทรน T-2000 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] ได้แก่กลูโคส, ไอโซมอลโทเททราโอส และสารที่มีเวลรีเทนชันเท่ากับ 13.00 นาที

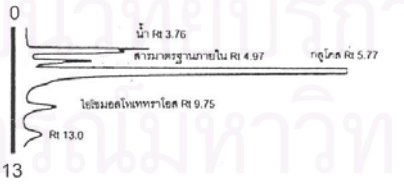
ก.



ข.



ค.

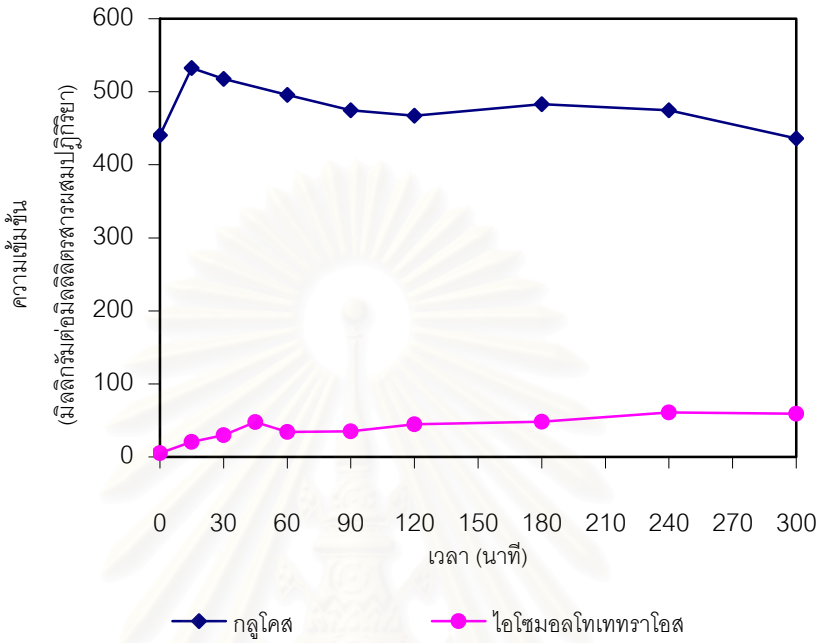


รูปที่ 19 โครมาโทแกรมแสดงชนิดของน้ำตาลก่อนและหลังการย่อยเดกซ์แทรน T-2000 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2 (โดยใช้อัตราการไหลของสารละลายตัวพา 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที)

ก. สารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส, ไอโซมอลโทส, ไอโซมอลโทไทรโอสและไอโซมอลโทเททราโอส

ข. ชนิดของน้ำตาลที่มีในเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] ก่อนการทำปฏิกิริยา

ค. ชนิดของน้ำตาลที่ตรวจพบหลังจากการทำปฏิกิริยา

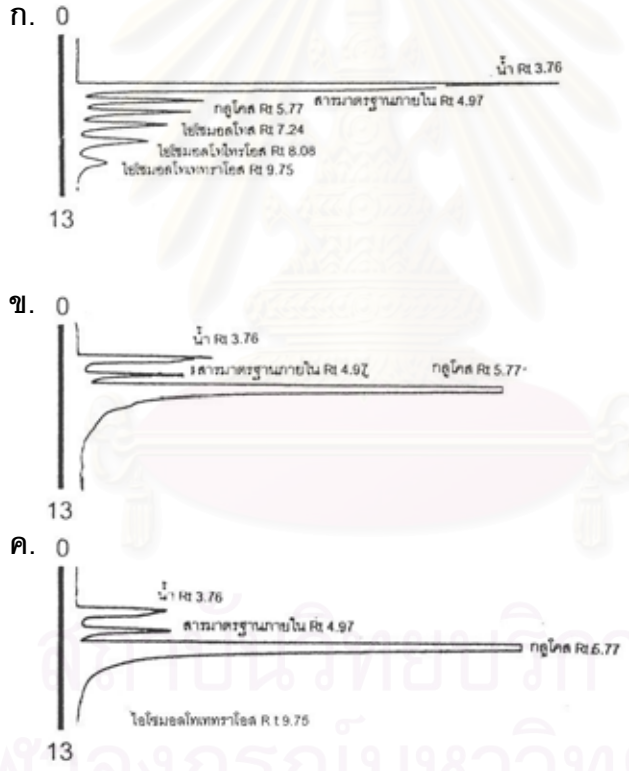


รูปที่ 20 แสดงปริมาณกลูโคส และ ไอโซมอลโทเททราโอสที่ถูกปลดปล่อยจากการย่อยเดกซ์แทรน T-2000 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.10.2 ผลการย่อยเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของน้ำตาลในเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] ก่อนการย่อยเดกซ์-แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 (รูปที่ 21ข) เทียบกับสารมาตรฐาน (รูป 21ก) ตรวจพบกลูโคสความเข้มข้นเท่ากับ 441 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 22) และหลังจากการย่อย (รูปที่ 21ค และ 22) พบว่ากลูโคสเพิ่มขึ้นและเพิ่มสูงสุดเท่ากับ 599 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังพบไอโซมอลโท-เททราโอสเกิดขึ้นและมีความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นสรุปได้ว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] ได้แก่กลูโคสและไอโซมอลโทเททราโอส

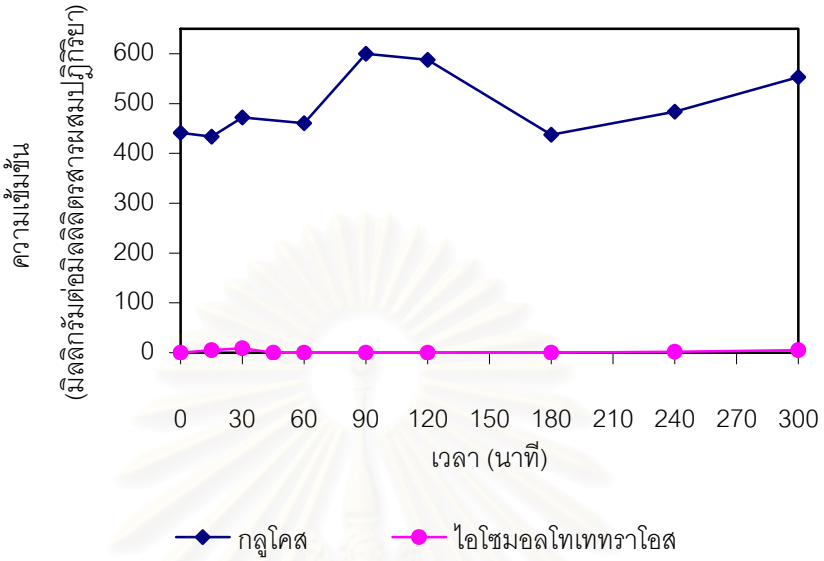


รูปที่ 21 โครมาโทแกรมแสดงชนิดของน้ำตาลก่อนและหลังการย่อยเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2 (โดยใช้อัตราการไหลของสารละลายตัวพา 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที)

ก. สารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส, ไอโซมอลโทส, ไอโซมอลโทไทรโอสและไอโซมอลโทเททราโอส

ข. ชนิดของน้ำตาลที่มีในเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] ก่อนการทำปฏิกิริยา

ค. ชนิดของน้ำตาลที่ตรวจพบหลังจากการทำปฏิกิริยา

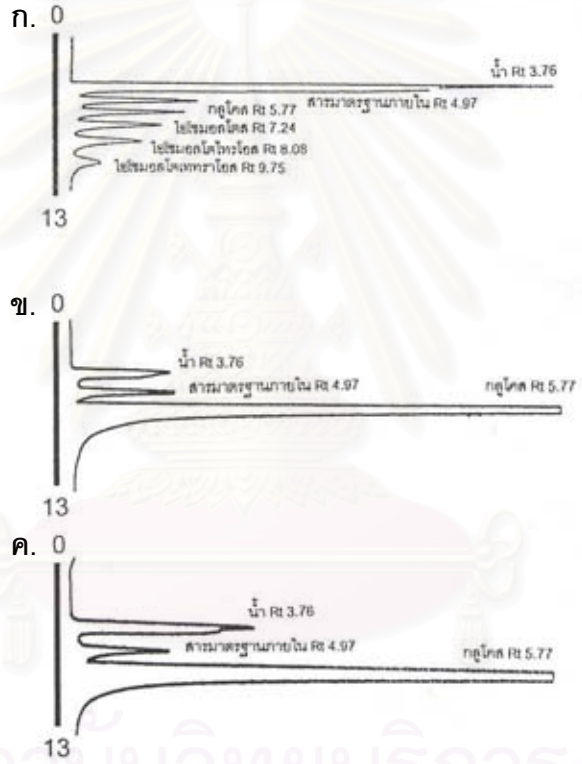


รูปที่ 22 แสดงปริมาณกลูโคส และไอโซมอลโทเททราโอสที่ถูกปลดปล่อยจากการย่อยเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.10.3 ผลการย่อยเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของน้ำตาลในเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] ก่อนการย่อยเดกซ์-แทรนพันธะ α-1,3 (รูปที่ 23ข) เทียบกับสารมาตรฐาน (รูป 23ก) พบว่าก่อนย่อยตรวจพบกลูโคสความเข้มข้นเท่ากับ 420 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร(รูปที่ 24) และหลังจากการย่อยไม่พบว่ามีผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น (รูปที่ 23ค และ 24) ดังนั้นสรุปได้ว่าเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] มีความจำเพาะต่อพันธะ [α-1,6] บนสายเดกซ์แทรน จึงไม่สามารถย่อยเดกซ์แทรนพันธะ [α-1,3] ได้

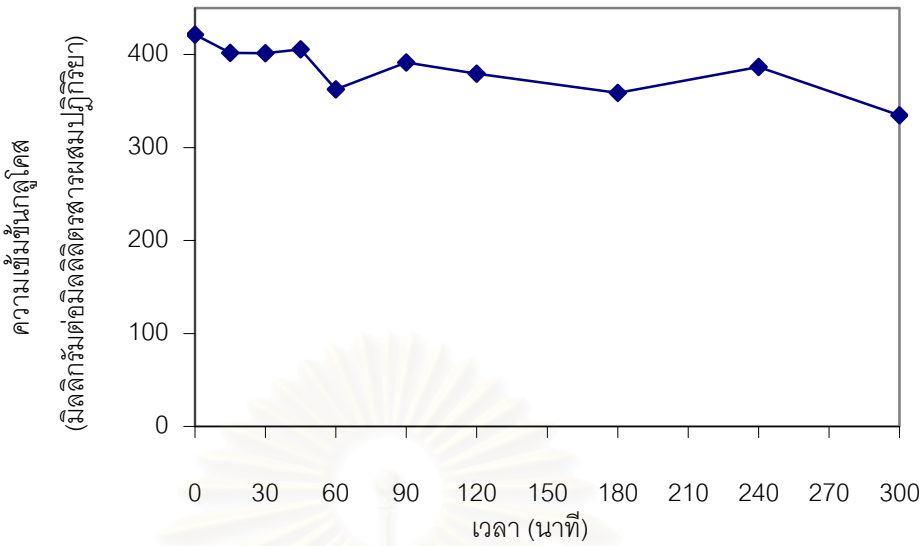


รูปที่ 23 โครมาโทแกรมแสดงชนิดของน้ำตาลก่อนและหลังการย่อยเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2 (โดยใช้อัตราการไหลของสารละลายตัวพา 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที)

ก. สารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส, ไอโซมอลโทส, ไอโซมอลโทไทรโอสและไอโซมอลโทเททราโอส

ข. ชนิดของน้ำตาลที่มีในเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] ก่อนการทำปฏิกิริยา

ค. ชนิดของน้ำตาลที่ตรวจพบหลังการทำปฏิกิริยา



รูปที่ 24 แสดงการปริมาณกลูโคสที่ได้จากการย่อยเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2

จากการทดลองในข้อ 3.10 จะเห็นได้ว่า เดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จะย่อยเดกซ์แทรนที่มีส่วนประกอบของกลูโคสที่เชื่อมโดยพันธะ α-1,6 (เดกซ์แทรน T-2000 และ เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus*) ได้ โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ กลูโคส และมอลโทเททราโอส แต่ไม่สามารถย่อยเดกซ์-แทรนพันธะ α-1,3 ได้ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยแสดงดังตารางที่ 6

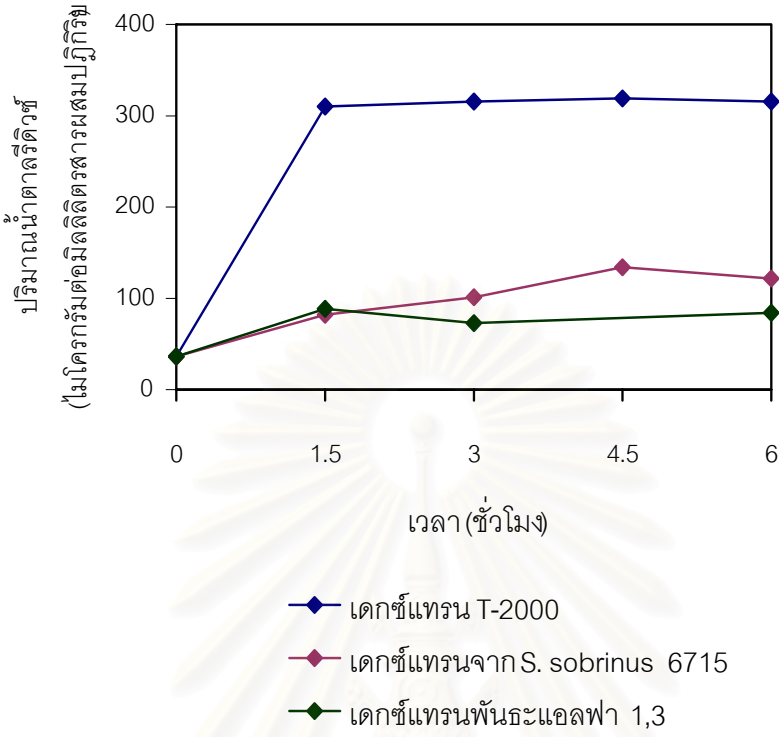
ตารางที่ 6 แสดงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยเดกซ์แทรนชนิดต่างๆ ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2

สารชักนำการสร้างเดกซ์แทรนเนส	สับสเตรท	ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยา
เดกซ์แทรน เกรดอุตสาหกรรม [พันธะ α-1,6 สูง]	เดกซ์แทรน T-2000 [พันธะ α-1,6 สูง]	กลูโคส และไอโซมอลโทเททราโอส
	เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus 6715* [พันธะ α-1,3 และ α-1,6 สูง]	กลูโคส และไอโซมอลโทเททราโอส
	เดกซ์แทรนพันธะ [α-1,3]	ไม่เกิดผลิตภัณฑ์

3.11 ผลการย่อยเดกซ์แทรน T-2000, เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 และเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และ α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2 ด้วยการตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น

เมื่อใช้เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ซึ่งประกอบด้วยทั้งพันธะ α-1,3 และ α-1,6 เพื่อชักนำการสร้างเดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และ α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2 และศึกษาถึงความสามารถของเดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และ α-1,6] ในการย่อยเดกซ์แทรนพันธะต่างๆ โดยการนำเดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และ α-1,6] มาย่อยเดกซ์แทรน T-2000, เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 และเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 (ที่ได้จากการทดลองข้อ 7.2) ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 25 พบว่าเดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และ α-1,6] สามารถย่อยเดกซ์แทรน T-2000 โดยให้น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 4.5 เท่ากับ 318.86 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, สามารถย่อยเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 โดยปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ออกมาสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 4.5 เท่ากับ 133.86 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและยังสามารถย่อยเดกซ์แทรน α-1,3 ได้โดยปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ออกมาสูงสุดในชั่วโมงที่ 1.5 เท่ากับ 88.65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จึงกล่าวได้ว่าเดกซ์แทรนเนสที่มีสารชักนำเป็นเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 และ α-1,6 สามารถย่อยเดกซ์แทรนทั้งพันธะ α-1,3 และพันธะ α-1,6 ได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



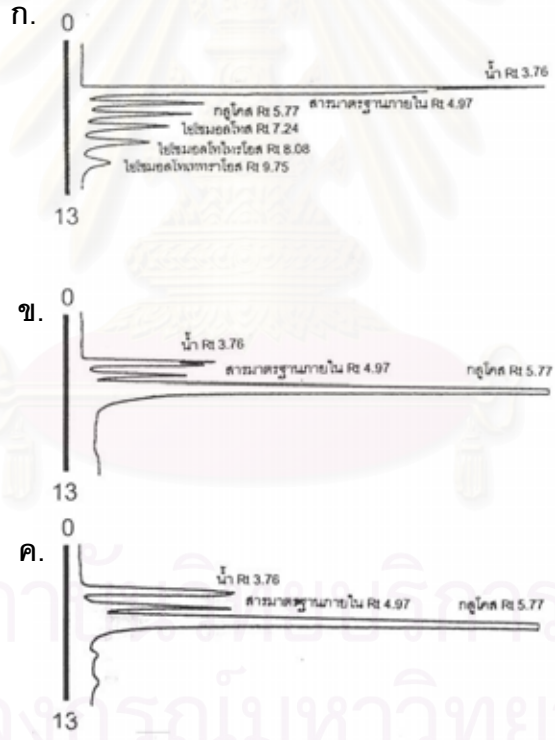
รูปที่ 25 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยเดกซ์แทรน T-2000, เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 และเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และ α-1,6] จาก *Arthrobacter sp.* AG-2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.12 ผลการย่อยเดกซ์แทรน T-2000, เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 และเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และ α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2 โดยตรวจสอบด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง

3.12.1 ผลการย่อยเดกซ์แทรน T-2000 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และ α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของน้ำตาลในเดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และ α-1,6] ก่อนการย่อยเดกซ์แทรน T-2000 (รูปที่ 26ข) เทียบกับสารมาตรฐาน (รูป 26ก) พบว่าก่อนย่อยตรวจพบกลูโคสความเข้มข้นเท่ากับ 250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 27) และหลังจากการย่อย (รูปที่ 26ค) พบเฉพาะกลูโคส โดยมีปริมาณเพิ่มสูงสุดเป็น 400 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 27) ดังนั้นสรุปได้ว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยเดกซ์แทรน T-2000 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และ α-1,6] คือกลูโคส

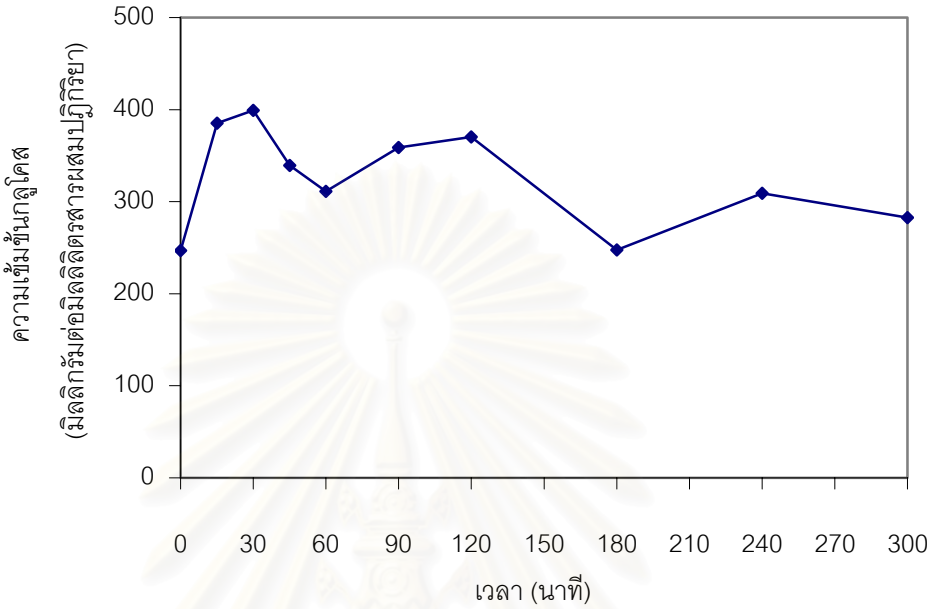


รูปที่ 26 โครมาโทแกรมแสดงชนิดของน้ำตาลก่อนและหลังการย่อยเดกซ์แทรน T-2000 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และ α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2 (โดยใช้อัตราการไหลของสารละลายตัวพา 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที)

ก. สารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส, ไอโซมอลโทส, ไอโซมอลโทไทรโอสและไอโซมอลโทเททราโอส

ข. ชนิดของน้ำตาลที่มีในเดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และ α-1,6] ก่อนการทำปฏิกิริยา

ค. ชนิดของน้ำตาลที่ตรวจพบหลังจากการทำปฏิกิริยา

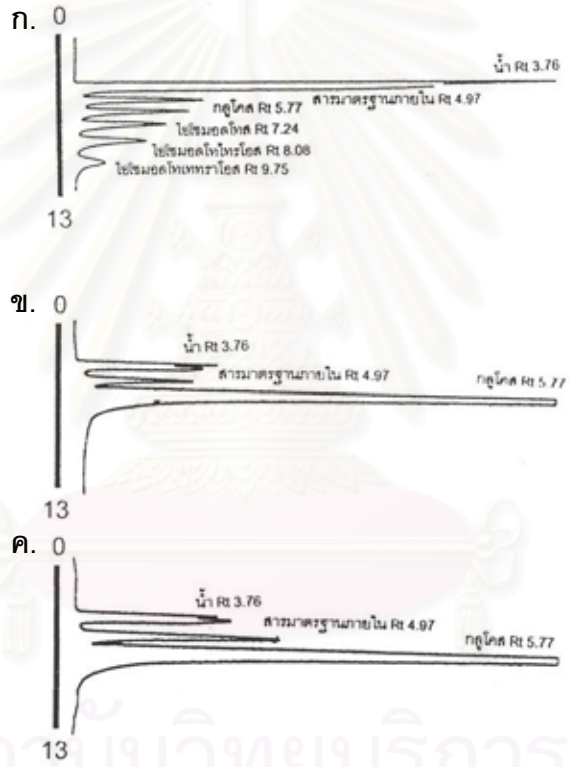


รูปที่ 27 แสดงการปริมาณกลูโคสที่ได้จากการย่อยเดกซ์แทรน T-2000 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และ α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.12.2 ผลการย่อยเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และ α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณ และชนิดของน้ำตาลในเดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และ α-1,6] ก่อนการย่อยเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 (รูปที่ 28ข) เทียบกับสารมาตรฐาน (รูป 28ก) พบว่าก่อนย่อยตรวจพบกลูโคสความเข้มข้นเท่ากับ 239 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 29) และหลังจากการย่อย (รูปที่ 28ค) พบเฉพาะกลูโคส โดยมีปริมาณเพิ่มสูงสุดเป็น 475 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 29) ดังนั้นสรุปได้ว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และ α-1,6] คือ กลูโคส

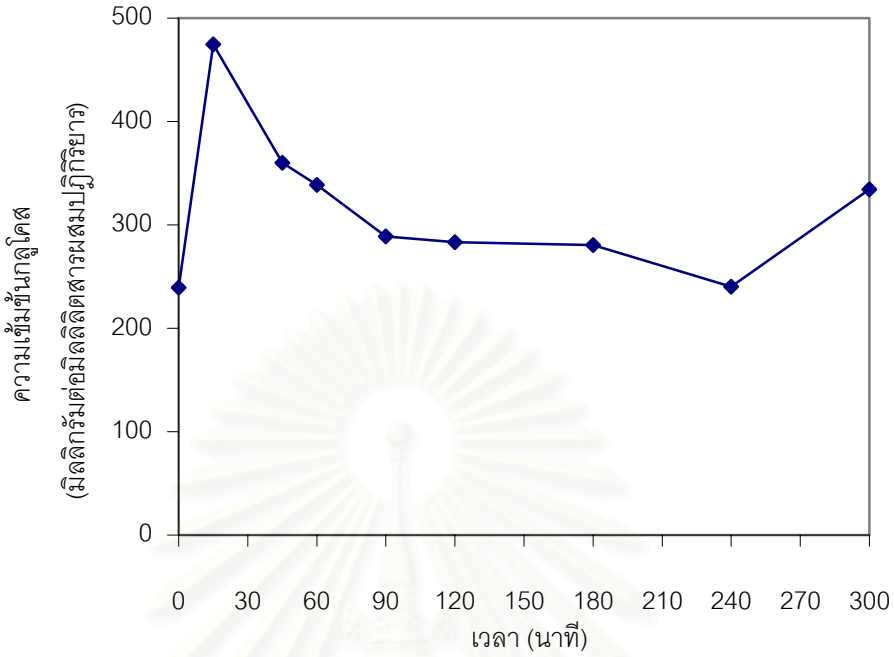


รูปที่ 28 โครมาโทแกรมแสดงชนิดของน้ำตาลก่อนและหลังการย่อยเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และ α-1,6]] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2 (โดยใช้อัตราการไหลของสารละลายตัวพา 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที)

ก. สารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส, ไอโซมอลโทส, ไอโซมอลโทไทรโอสและไอโซมอลโทเททราโอส

ข. ชนิดของน้ำตาลที่มีในเดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และ α-1,6] ก่อนการทำปฏิกิริยา

ค. ชนิดของน้ำตาลที่ตรวจพบหลังจากการทำปฏิกิริยา

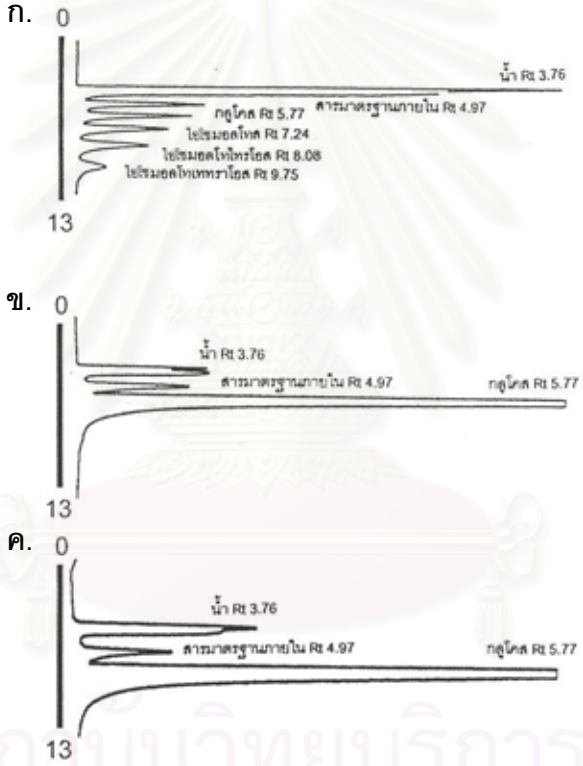


รูปที่ 29 แสดงการปริมาณกลูโคสที่ได้จากการย่อยเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และ α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.12.3 ผลการย่อยเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และ α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณ และชนิดของน้ำตาลในเดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และ α-1,6] ก่อนการย่อยเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 (รูปที่ 30ข) เทียบกับสารมาตรฐาน (รูป 30ก) พบว่าก่อนย่อยตรวจพบกลูโคสความเข้มข้นเท่ากับ 211 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 31) และหลังจากการย่อย (รูปที่ 30ค) พบเฉพาะกลูโคส โดยมีปริมาณเพิ่มสูงสุดเป็น 406 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 31) ดังนั้นสรุปได้ว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และ α-1,6] คือ กลูโคส

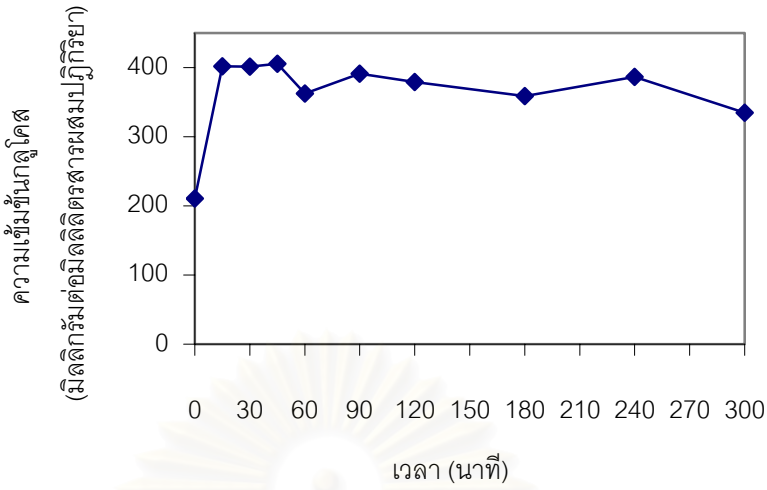


รูปที่ 30 โครมาโทแกรมแสดงชนิดของน้ำตาลก่อนและหลังการย่อยเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และ α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2 (โดยใช้อัตราการไหลของสารละลายตัวพา 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที)

ก. สารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส, ไอโซมอลโทส, ไอโซมอลโทไทรโอสและไอโซมอลโทเททราโอส

ข. ชนิดของน้ำตาลที่มีในเดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และ α-1,6] ก่อนการทำปฏิกิริยา

ค. ชนิดของน้ำตาลที่ตรวจพบหลังจากการทำปฏิกิริยา



รูปที่ 31 ปริมาณกลูโคสได้จากการย่อยเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และ α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2

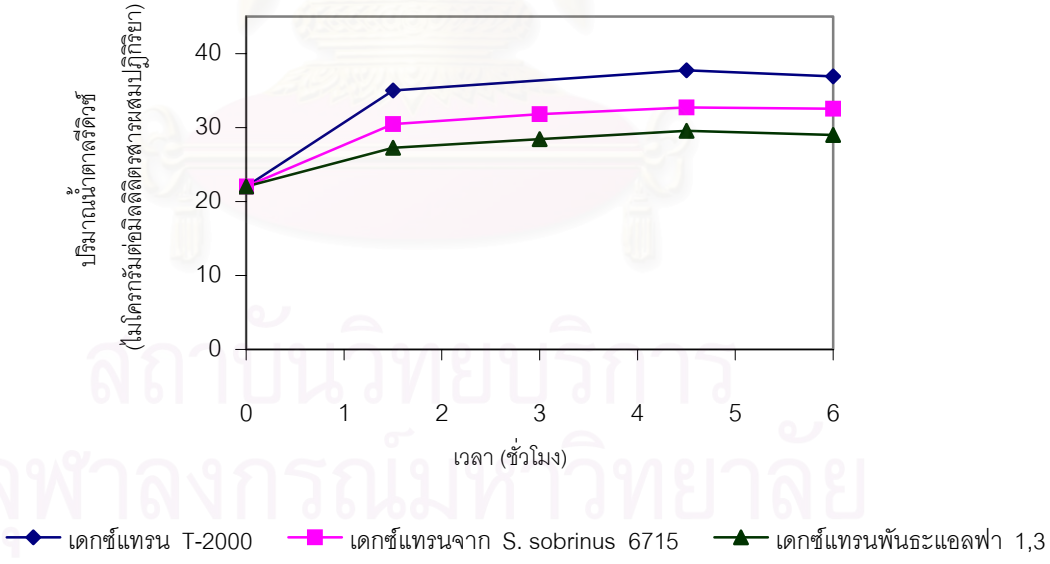
จากการทดลองในข้อ 3.12 เมื่อชักนำการสร้างเดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และ α-1,6] ใน *Arthrobacter* sp. AG-2 ด้วยเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 และเมื่อนำเดกซ์แทรนเนสดังกล่าวมาทำปฏิกิริยากับเดกซ์แทรนทั้ง 3 ชนิดได้แก่ เดกซ์แทรน T–2000 (ซึ่งมีพันธะ α-1,6 ปริมาณสูง), เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 และเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 พบว่า เดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และ α-1,6] สามารถย่อยเดกซ์แทรนทั้ง 3 ชนิดได้โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยเดกซ์แทรนทุกชนิดคือกลูโคสเพียงอย่างเดียว ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยเดกซ์แทรนชนิดต่างๆ ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และ α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2

สารชักนำการสร้างเดกซ์แทรนเนส	สับสเตรท	ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยา
เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus 6715* [พันธะα-1,3 และ α-1,6 สูง]	เดกซ์แทรน T-2000 [พันธะ α-1,6 สูง]	กลูโคส
	เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus 6715* [พันธะα-1,3 และ α-1,6 สูง]	กลูโคส
	เดกซ์แทรนพันธะ [α-1,3]	กลูโคส

3.13 ผลย่อยเดกซ์แทรน T-2000, เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 และเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2 โดยตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น

เพื่อทดสอบความสามารถของเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] (ซึ่งถูกชักนำด้วยเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรมซึ่งมีพันธะ α-1,6 ปริมาณสูงจาก *Arthrobacter* sp. AG-2) ในการย่อยเดกซ์แทรนพันธะต่างๆ โดยการนำเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] ดังกล่าวมาย่อยสลายเดกซ์แทรน T-2000, เดกซ์-แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 และเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 แล้วตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi-Nelson ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 32 พบว่าเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] สามารถย่อยเดกซ์แทรน T-2000 ได้ โดยปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ออกมาสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 4.5 เท่ากับ 37.73 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, สามารถย่อยเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 โดยปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ออกมาสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 4.5 เท่ากับ 32.72 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและย่อยเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ได้ โดยปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ออกมาสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 4.5 เท่ากับ 29.55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จึงกล่าวได้ว่าเดกซ์แทรนเนสที่ถูกชักนำโดยเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 สามารถย่อยเดกซ์-แทรนทั้งพันธะ α-1,3 และ α-1,6 ได้

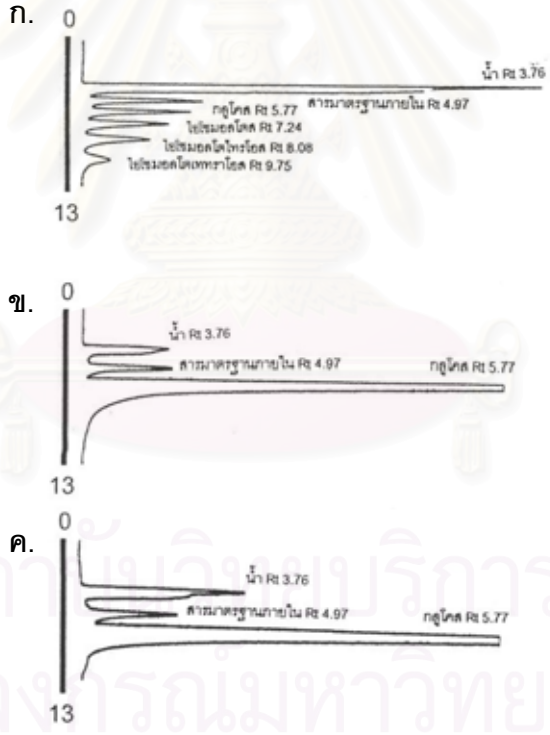


รูปที่ 32 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยเดกซ์แทรน T-2000, เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 และเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] จาก *Arthrobacter sp*. AG-2

3.14 ผลการย่อยเดกซ์แทรน T-2000, เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 และ เดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] จาก *Arthrobacter* sp.AG-2 โดยตรวจสอบด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง

3.14.1 ผลการย่อยเดกซ์แทรน T-2000 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณ และชนิดของน้ำตาลในเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] ก่อนการย่อยเดกซ์-แทรน T-2000 (รูปที่ 33ข) เทียบกับสารมาตรฐาน (รูป 33ก) ตรวจพบกลูโคสความเข้มข้นเท่ากับ 262 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 34) และหลังจากการย่อย (รูปที่ 33ค) พบเฉพาะกลูโคส โดยมีปริมาณเพิ่มสูงสุดเป็น 478 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 34) ดังนั้นสรุปได้ว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยเดกซ์แทรน T-2000 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] คือ กลูโคส

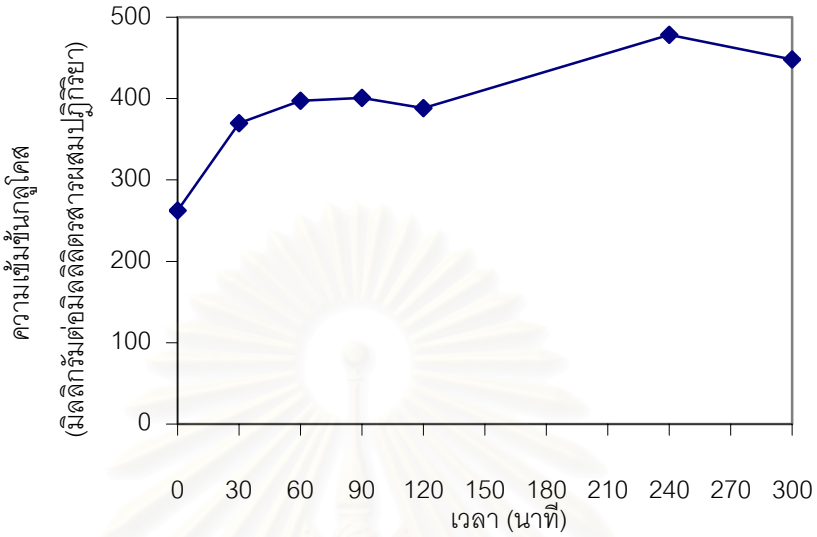


รูปที่ 33 โครมาโทแกรมแสดงชนิดของน้ำตาลก่อนและหลังการย่อยเดกซ์แทรน T-2000 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2 (โดยใช้อัตราการไหลของสารละลายตัวพา 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที)

ก. สารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส, ไอโซมอลโทส, ไอโซมอลโทไทรโอสและไอโซมอลโทเททราโอส

ข. ชนิดของน้ำตาลในเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] ก่อนการทำปฏิกิริยา

ค. ชนิดของน้ำตาลที่ตรวจพบหลังการทำปฏิกิริยา

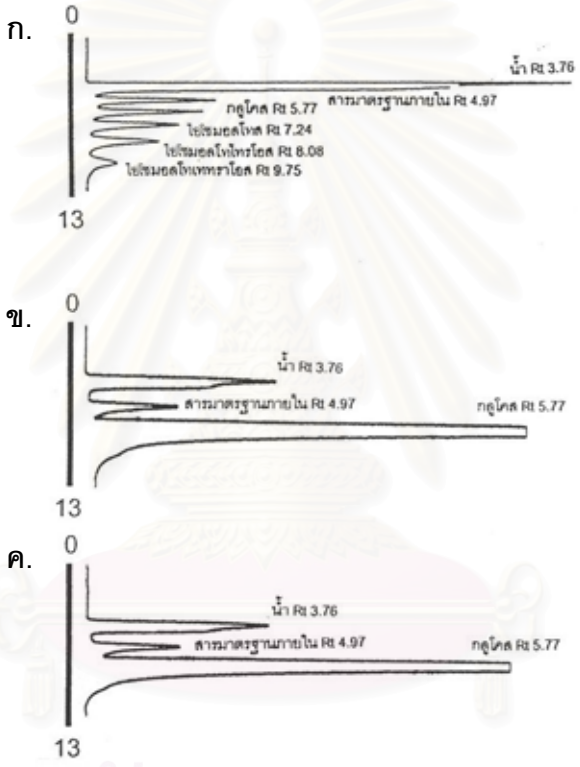


รูปที่ 34 แสดงปริมาณกลูโคสที่ได้จากการย่อยเดกซ์แทรน T-2000 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.14.2 ผลจากการย่อยเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณและชนิดน้ำตาลของเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] ก่อนการย่อยเดกซ์-แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 (รูปที่ 35ข) เทียบกับสารมาตรฐาน (รูป 35ก) ตรวจพบกลูโคสความเข้มข้นเท่ากับ 259 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 36) และหลังจากการย่อย (รูปที่ 35ค และ 36) พบเฉพาะกลูโคส โดยมีปริมาณเพิ่มสูงสุดเป็น 487 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นสรุปได้ว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] คือ กลูโคส

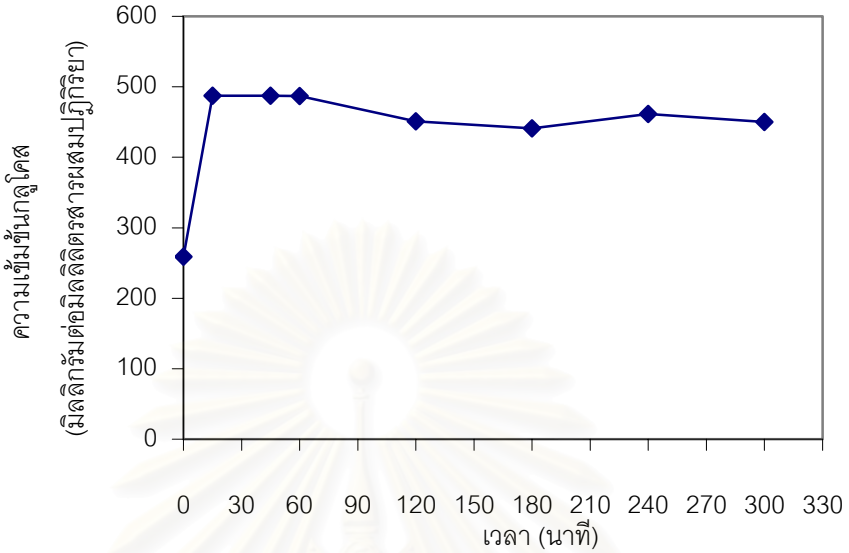


รูปที่ 35 โครมาโทแกรมแสดงชนิดของน้ำตาลก่อนและหลังการย่อยเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2 (โดยใช้อัตราการไหลของสารละลายตัวพา 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที)

ก. สารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส, ไอโซมอลโทส, ไอโซมอลโทไทรโอสและไอโซมอลโทเททราโอส

ข. ชนิดของน้ำตาลที่มีในเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] ก่อนการทำปฏิกิริยา

ค. ชนิดของน้ำตาลที่ตรวจพบหลังจากทำปฏิกิริยา

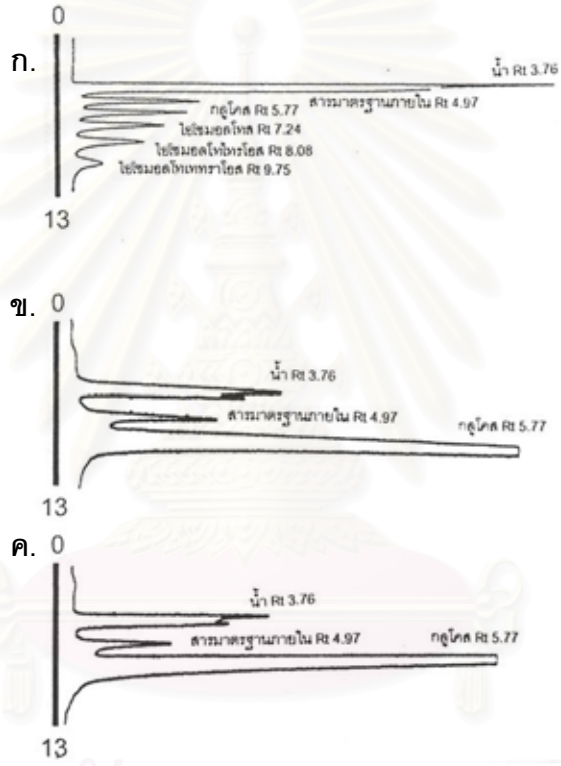


รูปที่ 36 แสดงปริมาณกลูโคสที่ได้จากการย่อยเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.14.3 ผลการย่อยเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณ และชนิดของน้ำตาลในเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] ก่อนการย่อยเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 (รูปที่ 37ข) เทียบกับสารมาตรฐาน (รูป 37ก) ตรวจพบกลูโคสความเข้มข้นเท่ากับ 321 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 38) และหลังจากการย่อย (รูปที่ 37ค และ 38) พบเฉพาะกลูโคส โดยมีปริมาณเพิ่มสูงสุดเป็น 493 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นสรุปได้ว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] คือ กลูโคส

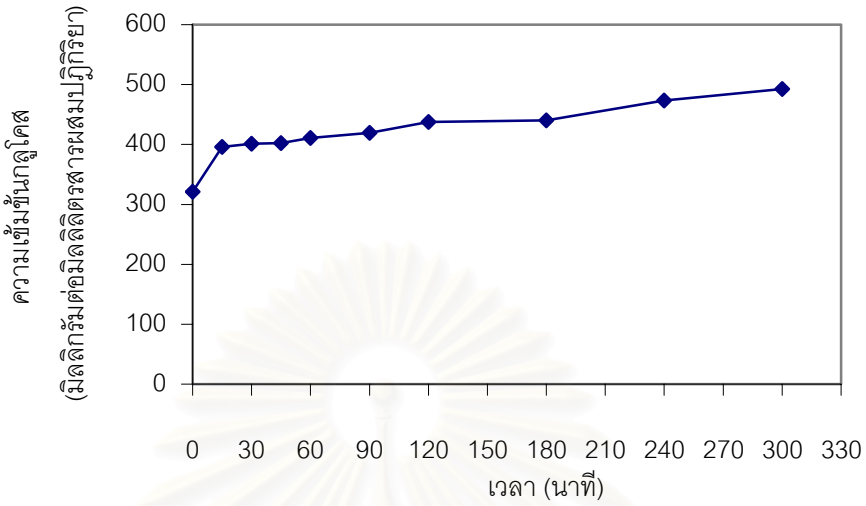


รูปที่ 37 โครมาโทแกรมแสดงชนิดของน้ำตาลก่อนและหลังการย่อยเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2 (โดยใช้อัตราการไหลของสารละลายตัวพา 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที)

ก. สารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส, ไอโซมอลโทส, ไอโซมอลโทไทรโอสและไอโซมอลโทเททราโอส

ข. ชนิดของน้ำตาลที่มีในเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] ก่อนการทำปฏิกิริยา

ค. ชนิดของน้ำตาลหลังจากการทำปฏิกิริยา



รูปที่ 38 แสดงปริมาณกลูโคสที่ได้จากการย่อยเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2

จากการทดลองในข้อ 3.14 เมื่อชักนำการสร้างเดกซ์แทรนเนสใน *Arthrobacter* sp. AG-2 ด้วยเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 และเมื่อนำเดกซ์แทรนเนสดังกล่าวมาทำปฏิกิริยากับเดกซ์แทรนทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ เดกซ์แทรน T–2000, เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 และเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยเดกซ์แทรนทุกชนิดคือ กลูโคส เพียงชนิดเดียว (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 แสดงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยเดกซ์แทรนชนิดต่างๆ ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2

สารชักนำการสร้างเดกซ์แทรนเนส	สับสเตรท	ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยา
เดกซ์แทรนพันธะ α-1,3	เดกซ์แทรน T-2000 [พันธะ α-1,6 สูง]	กลูโคส
	เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus 6715* [พันธะα-1,3 และ α-1,6 สูง]	กลูโคส
	เดกซ์แทรนพันธะ [α-1,3]	กลูโคส

ตารางที่ 9 แสดงผลิตภัณฑ์ทั้งหมดที่ได้จากการย่อยเดกซ์แทรน T-2000, เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 และเดกซ์แทรนพันธะ α–1,3 ด้วยเดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium* sp. SMCU 3-14 และ *Arthrobacter* sp. AG-2 ที่ถูกชักนำด้วยเดกซ์แทรนพันธะต่างๆ

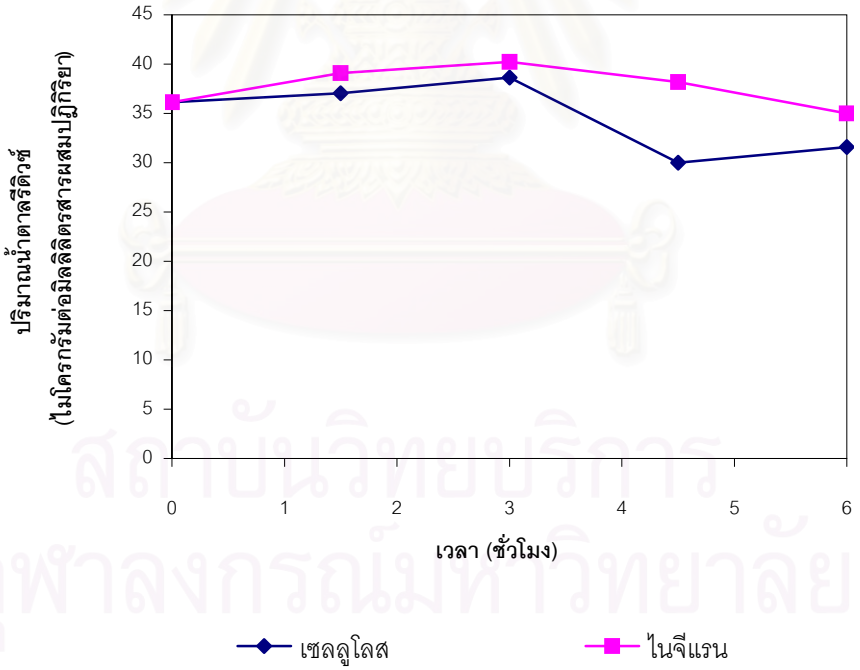
สารชักนำ	แหล่งเดกซ์แทรนเนส	สับสเตรท		
		เดกซ์แทรน T-2000	เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715	เดกซ์แทรนพันธะ α-1,3
		ผลิตภัณฑ์ที่ได้	ผลิตภัณฑ์ที่ได้	ผลิตภัณฑ์ที่ได้
เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม	*Penicillium* sp. SMCU 3-14	กลูโคส, ไอโซมอลโทส และไอโซมอลโทเททราโอส	กลูโคส และไอโซมอลโทเททราโอส	ไม่มี
	Arthrobacter sp. AG-2	กลูโคส ไอโซมอลโท-เททราโอส และสารที่มี เวลารีเทนชั่นเท่ากับ 13.00 นาที	กลูโคส และไอโซมอลโทเททราโอส	กลูโคส
เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715	*Arthrobacter* sp. AG-2	กลูโคส	กลูโคส	กลูโคส
เดกซ์แทรนพันธะ α-1,3	*Arthrobacter* sp. AG-2	กลูโคส	กลูโคส	กลูโคส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.15 การตรวจสอบความสามารถในการย่อยเซลลูโลส และไนจีแรนของเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2

3.15.1 ความสามารถในการย่อยเซลลูโลส และไนจีแรนของเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2

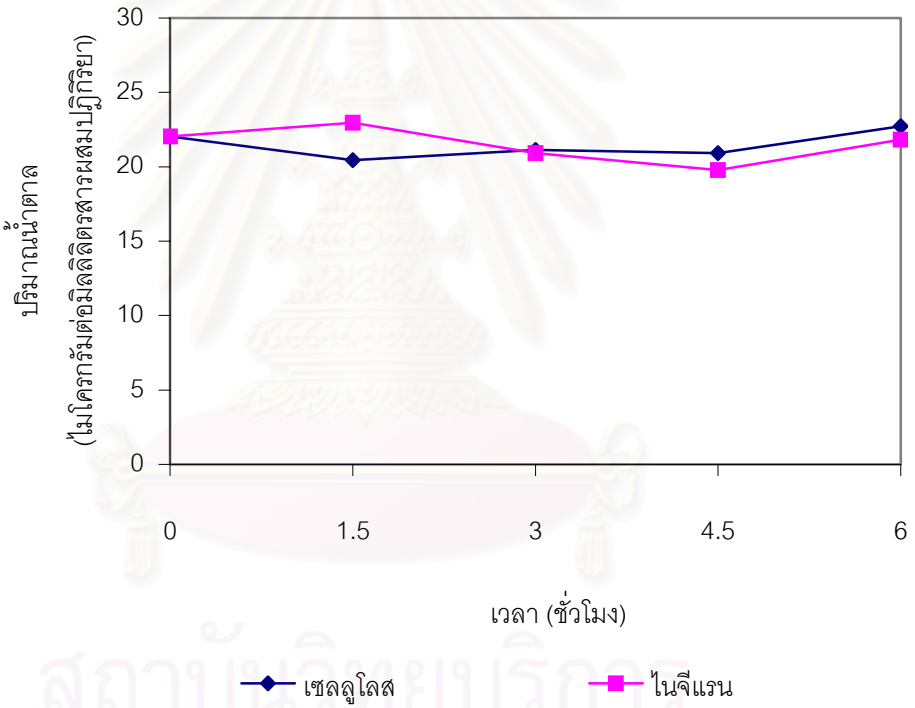
เพื่อทดสอบความสามารถในการย่อยเซลลูโลสซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคสต่อกันด้วยพันธะ [β-1,4] และไนจีแรนซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคสต่อกันด้วยพันธะ [α-1,3 สลับกับพันธะ α-1,4] ของเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2 แล้วตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Somogyi-Nelson พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ค่อนข้างคงที่จากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในเอนไซม์เริ่มต้น แสดงว่าเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2 ไม่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสและไนจีแรนได้ (รูปที่ 39)



รูปที่ 39 แสดงระดับน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยเซลลูโลส และไนจีแรน ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2

3.15.2 ความสามารถในการย่อยเซลลูโลสและไนจีแรนด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2

เพื่อทดสอบความสามารถในการย่อยเซลลูโลสซึ่งมีเป็นพอลิเมอร์กลูโคสต่อกันด้วยพันธะ [β-1,4] และไนจีแรนซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคสต่อกันด้วยพันธะ [α-1,3 และ พันธะ α-1,4] ของเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2 แล้วตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Somogyi-Nelson พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ค่อนข้างคงที่จากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในเอนไซม์เริ่มต้นแสดงว่าเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2 ไม่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสและไนจีแรนได้ (รูปที่ 40)



รูปที่ 40 แสดงระดับน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยสลายเซลลูโลส และไนจีแรน ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2

บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การผลิตเดกซ์แทรนจาก *Streptococcus sobrinus* 6715 เพื่อใช้ในการศึกษาได้มีรายงานการผลิตในอาหาร Brain heart infusion และ Tryptic soy Broth แต่เนื่องจากอาหารทั้งสองชนิดมีราคาสูงและให้เดกซ์แทรนที่มีลักษณะเหนียว ทำความสะอาดยาก เมื่อผ่านการทำแห้งแล้วยังคงมีสีน้ำตาลเข้มเนื่องจากองค์ประกอบของอาหารติดมากับเดกซ์แทรนที่ผลิตได้ จึงไม่เหมาะที่จะนำอาหารทั้งสองชนิดดังกล่าวมาใช้ในการผลิตเดกซ์แทรนปริมาณมาก Gibbon และคณะ, 1968 เสนอสูตรอาหาร Basal medium เพื่อการผลิตเดกซ์แทรน เมื่อพิจารณาถึงองค์ประกอบของอาหารพบว่ามีส่วนประกอบง่าย มีราคาถูก และเมื่อทดลองเปรียบเทียบปริมาณเดกซ์แทรนที่ผลิตได้จากอาหารทั้ง 3 ชนิดพบว่า Basal medium ให้ปริมาณเดกซ์แทรนสูงสุด (รูปที่ 5) อีกทั้งเดกซ์แทรนที่ผลิตได้ยังมีลักษณะขาวสะอาด (รูปที่ 6 และ 7) ดังนั้นอาหาร Basal medium จึงมีความเหมาะสมเพื่อใช้ในการผลิตเดกซ์แทรนปริมาณมากเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

จากการที่สารตั้งต้นในการสังเคราะห์เดกซ์แทรนคือ น้ำตาลซูโครส จึงทำการศึกษาถึงความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ในอาหาร Basal medium พบว่าความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสมต่อการผลิตเดกซ์แทรนในอาหาร Basal medium คือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของซูโครสสูงขึ้น จะไม่มีผลทำให้การผลิตเดกซ์แทรนเพิ่มขึ้น (รูปที่ 8)

ในภาวะที่มีการสังเคราะห์เดกซ์แทรน เซลล์ของแบคทีเรียและเดกซ์แทรนที่เชื้อผลิตขึ้นจะตกตะกอนแยกจากอาหารเลี้ยง ทำให้การศึกษาการเจริญของแบคทีเรียโดยใช้วิธีการวัดความขุ่น (turbidity) หรือการนับจำนวนเซลล์บนจานเพาะเชื้อ (plate count) หรือการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (dry weight) ไม่สามารถทำได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงต้องวิเคราะห์อัตราการเจริญของเซลล์ด้วยการวัดปริมาณโปรตีนภายในเซลล์ตามวิธีการของ Rajaguru และคณะ ในปี 2000 เปรียบเทียบระหว่างภาวะที่มีการสังเคราะห์เดกซ์แทรนโดยเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมซูโครส และในภาวะที่ไม่มีการสังเคราะห์เดกซ์แทรนโดยเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมกลูโคส (รูปที่ 9) พบว่าในภาวะที่มีการสังเคราะห์เดกซ์แทรนแบคทีเรียจะมีการเจริญต่ำกว่าซึ่งน่าจะเป็นผลเนื่องจาก พลังงานส่วนหนึ่งที่ใช้ในการเจริญถูกใช้ไปในการสังเคราะห์เดกซ์แทรน และในภาวะที่มีการผลิตเดกซ์แทรน อัตราการเจริญจะลดลงในชั่วโมงที่ 24 ถึงชั่วโมงที่ 33 และเพิ่มขึ้นอีกครั้งในชั่วโมงที่ 36 ซึ่งโดยปกติการตรวจสอบการเจริญโดยการวัดปริมาณโปรตีนนั้น ปริมาณโปรตีนควรจะคงที่เมื่อการเจริญหยุดลงหรือเพิ่มขึ้นเมื่อการเจริญเพิ่มขึ้น หากแต่ในขณะการวัดปริมาณโปรตีนดังกล่าวจะต้องทำการเก็บ

เกี่ยวเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อก่อน ด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยง ดังนั้นในภาวะที่การเจริญคงที่หรือเซลล์มีการสลายตัว ปริมาณโปรตีนอาจสูญหายไปในขั้นตอนการเก็บเกี่ยวทำให้ปริมาณโปรตีนที่ตรวจสอบได้อาจน้อยกว่าที่มีอยู่จริง

เมื่อศึกษาลักษณะการผลิตเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ในอาหาร Basal medium ที่มีความเข้มข้นของซูโครส 1.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าปริมาณเดกซ์แทรนเพิ่มสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 9 และค่อนข้างคงที่จนกระทั่งชั่วโมงที่ 24 จึงเริ่มลดลง (รูปที่ 10) เนื่องจากเดกซ์แทรนเป็นพอลิเมอร์ที่แบคทีเรียสังเคราะห์ขึ้น เพื่อใช้เป็นอาหารสำรอง ดังนั้นในภาวะขาดแคลนอาหาร แบคทีเรียจะสร้างเดกซ์แทรนเนสออกมาย่อยสลายเดกซ์แทรนเพื่อใช้เป็นอาหารแทนที่อาหารที่หมดไป ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญโดยในขณะที่เดกซ์แทรนมีปริมาณลดลงจะเห็นได้ว่าการเจริญมีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อย อย่างไรก็ตามเพื่อความแน่ใจที่ว่าการลดลงของเดกซ์แทรนเป็นผลจากการทำงานของเดกซ์แทรนเนส จะต้องมีการตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสในแต่ละช่วงเวลาต่อไป และระยะเวลาที่เหมาะสมในการเก็บเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 คือที่ระหว่างเวลา 9 ถึง 21 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อก่อนที่แบคทีเรียจะสลายมันไปใช้ในการเจริญและเมื่อเปรียบเทียบลักษณะการเจริญควบคู่กับลักษณะของการผลิตเดกซ์แทรนจากในอาหาร Basal medium ที่มีซูโครส 1.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเดกซ์แทรนมีการสร้างไปพร้อมๆกับการเจริญ

เนื่องจากเดกซ์แทรนเนสเป็นเอนไซม์ชนิดที่ต้องการการชักนำ (inducible enzyme) ด้วยเดกซ์แทรน และจากการที่พันธะที่เชื่อมโมเลกุลของกลูโคสจะเป็นตัวบ่งบอกถึงความจำเพาะของเอนไซม์ นั่นคือเดกซ์แทรนพันธะ α-1,6 ที่ใช้เป็นสารชักนำจะชักนำเดกซ์แทรนเนสที่มีความจำเพาะต่อพันธะ α-1,6 (Coral และคณะ, 1996) ในขณะที่เดกซ์แทรนชนิด α-1,3 ที่ใช้ชักนำจะให้เอนไซม์ที่จำเพาะต่อพันธะ α-1,3 (Walker และคณะ, 1984) จากวัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ต้องการขจัดเดกซ์แทรนในช่องปากเพื่อการป้องกันการเกิดฟันผุ ซึ่งเดกซ์แทรนในช่องปากเป็นพวกที่สร้างโดยจุลินทรีย์จำพวก cariogenic cocci ซึ่งมีพันธะ α-1,3 ปริมาณสูง จึงจำเป็นต้องใช้เดกซ์แทรนชนิดที่มีพันธะ α-1,3 สำหรับชักนำการสร้างเอนไซม์ อย่างไรก็ตามเดกซ์แทรนที่มีจำหน่ายนั้นจะเป็นเดกซ์แทรนที่ผลิตโดย *Leuconostoc mesenteroides* ที่มีส่วนประกอบเป็นพันธะ α-1,6 มากกว่า 95% (Sigma, USA) และยังไม่สามารถหาชนิดที่มีพันธะ α-1,3 เพื่อใช้เป็นสารชักนำได้ ในการศึกษานี้จึงจำเป็นต้องผลิตเดกซ์แทรนชนิดที่มีพันธะ α-1,3 ปริมาณสูงเพื่อใช้เป็นสารชักนำขึ้นเอง จากการที่มีรายงานว่า *S.sobrinus* 6715 สามารถผลิตเดกซ์แทรนที่มีส่วนประกอบชนิด α-1,3 ปริมาณสูงถึง 67% และที่เหลือเป็น α-1,6 เป็นส่วนใหญ่ (Lindberg และ Svensson, 1968) จึงทำการผลิตเดกซ์แทรนจากจุลินทรีย์นี้แล้วนำเดกซ์แทรนที่ได้ไปใช้เป็นสารชักนำการผลิตเดกซ์แทรนเนสโดย *Arthrobacter* sp. AG-2 โดยวิธีนี้จะทำให้ได้

เอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อชนิด α-1,6 และ α-1,3 สำหรับกรณีที่ต้องการผลิตเฉพาะชนิด α-1,3 จะทำได้โดยการทำลายเดกซ์แทรนที่มีพันธะ α-1,6 ออกจากเดกซ์แทรนที่ได้จาก *S.sobrinus* 6715 อย่างเต็มที่ด้วยเดกซ์แทรนเนสที่มีความจำเพาะต่อพันธะ α-1,6 ที่ผลิตจาก *Penicillium* sp. SMCU 3-14 (อนันตพงศ์ สุขเกษ, 2543) แล้วจึงนำไปใช้เลี้ยง *Arthrobacter* sp. AG-2 ให้ผลิตเดกซ์- แทรนเนสที่มีความจำเพาะต่อ α-1,3 อีกทีหนึ่ง

ในการเตรียมเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 นั้นพบว่าเมื่อทำการย่อยเดกซ์แทรนจาก *S.sobrinus* 6715 ด้วยเดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium* sp. SMCU 3-14 (รูปที่ 11) จะมีการปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ออกในระดับหนึ่งจากนั้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะคงระดับ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการคงระดับของน้ำตาลรีดิวซ์อาจเนื่องมาจากพันธะ α-1,6 หมดแล้วหรือเอนไซม์หมดฤทธิ์ในการย่อยต่อไป เพื่อให้มั่นใจว่าจะย่อยพันธะ α-1,6 ออกให้มากที่สุดจึงทำซ้ำขั้นตอนข้างต้นอีกจนไม่มีการปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าในการย่อยครั้งที่ 4 ไม่พบการปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ออกมาจึงถือว่าเดกซ์แทรนนี้ปลอดจากหรือมีเดกซ์แทรนพันธะ α-1,6 น้อยมาก โดยปริมาณเดกซ์แทรนที่เหลือหลังจากผ่านขั้นตอนการกำจัดพันธะ α-1,6 แล้ว เหลืออยู่ 44.67 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งตามรายงานของ Lindberg และ Svensson ในปี 1968 กล่าวว่า *S.sobrinus* 6715 ผลิตเดกซ์แทรนที่มีพันธะ α-1,3 มากถึง 67 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นหลังการกำจัด ควรมีเดกซ์แทรนเหลืออยู่เท่ากับ หรือใกล้เคียง 67 เปอร์เซ็นต์ แต่จากขั้นตอนการย่อยสลายพันธะ α-1,6 จะต้องผ่านการล้างตะกอนและปั่นเหวี่ยงหลายครั้งจึงอาจทำให้เดกซ์แทรนบางส่วนสูญหายไป

เพื่อพิสูจน์ว่าส่วนที่เหลือจากการสลายด้วยเดกซ์แทรนเนสที่จำเพาะต่อ [α-1,6] จาก *Penicillium* sp. SMCU 3-14 เป็นเดกซ์แทรนจริงจึงทำการย่อยส่วนนี้ด้วยกรดซัลฟูริค (acid hydrolysis) แล้ววิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ได้โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูงเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเดกซ์แทรน T-2000 และเดกซ์แทรนจาก *S.sobrinus* 6715 ปรากฏว่าเดกซ์แทรนทั้งสามให้ผลิตภัณฑ์ที่มีเวลารีเทนชันเท่ากับ 3.85 นาที ซึ่งตรงกับกลูโคส แสดงว่าต่างเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคส และเมื่อทดลองย่อยเดกซ์แทรน T-2000 และ เดกซ์แทรนที่ได้จาก *S. sobrinus* 6715 ด้วยเดกซ์แทรนเนสที่จำเพาะต่อ [α-1,6] จาก *Penicillium* sp. SMCU 3-14 และวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง พบว่าผลิตภัณฑ์จากเดกซ์แทรน T-2000 ที่ได้จาก *Leuconostoc* นั้นให้ กลูโคส ไอโซมอลโทส และ ไอโซมอลโทเททราโอส ในขณะที่เดกซ์แทรนที่ได้จาก *S .sobrinus* 6715 ให้เพียงกลูโคสและไอโซมอลโทสซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Polokonik และ Walker, 1977 และ Walker และคณะ 1951 ที่รายงานว่าเดกซ์แทรนเนสที่มีความจำเพาะต่อ α-1,6 จะตัดเดกซ์แทรนแบบสุ่มเป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์สายสั้น ๆ ที่มีกลูโคส 3-4 โมเลกุลหรือตัดเดกซ์แทรนเป็นโมโนเมอร์ของกลูโคสเพียง

อย่างเดียว (Fisher และ Stein, 1960) อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยเดกซ์แทรนชนิดต่าง ๆ มีรายงานว่าจะให้ผลิตภัณฑ์ที่มีความแตกต่างกันแล้วแต่ชนิดของจุลินทรีย์และชนิดของเดกซ์แทรน-นสที่ใช้ อาทิเช่นมีรายงานถึงการทำงานของเดกซ์แทรนเนสจากราในการย่อยสลายเดกซ์แทรน จาก *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้ เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่และ โอลิโกแซ็กคาไรด์ ซึ่งมีหน่วยย่อยเป็นกลูโคส (Jeanes และ Wilham,1950)

ในปี 1952 Jeanes และคณะ ใช้วิธีการโครมาโทกราฟีแบบกระดาษ (paper chromatography) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกริยาระหว่างเดกซ์แทรนจาก *Leuconostoc* sp.และเดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium* sp. พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นน้ำตาลไอโซ-มอลโทส (isomaltose)

เนื่องจากของเดกซ์แทรน T-2000, เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม, เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 และเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 มีความบริสุทธิ์แตกต่างกัน ดังนั้นเพื่อความเที่ยงตรงในการเปรียบเทียบที่จะเกิดขึ้นในผลการทดลองต่อๆไปจึงทำการวัดปริมาณน้ำตาลที่มีอยู่ในเดกซ์แทรนทั้ง 4 ชนิดด้วยวิธีการไฮโดรไลซ์ด้วยกรดและวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นพบว่าเดกซ์แทรน T-2000 ให้ปริมาณน้ำตาลสูงสุดต่อกรัมเดกซ์แทรนเนื่องจากเป็นเดกซ์แทรนที่มีความบริสุทธิ์สูง, เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรมมีปริมาณน้ำตาลต่ำกว่าแต่ใกล้เคียงกับเดกซ์แทรน T-2000 เนื่องจากมีความบริสุทธิ์น้อยกว่า, เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 มีปริมาณน้ำตาลต่ำกว่าเดกซ์แทรน T-2000 และเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม เนื่องจากในขั้นตอนการเก็บเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 อาจมีส่วนของผนังเซลล์หรือสารปนเปื้อนจากอาหารที่ถูกกำจัดไม่หมดในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ ทำให้มีปริมาณน้ำตาลในสัดส่วนกรัมต่อกรัมเดกซ์แทรนน้อยกว่าเดกซ์แทรนที่มีความบริสุทธิ์มากกว่า ส่วนเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 มีปริมาณน้ำตาลต่ำที่สุดเนื่องจากในขั้นตอนของการกำจัดพันธะ α-1,6 ออกจากสายของเดกซ์แทรนทำให้มีปริมาณน้ำตาลลดลง ในขณะที่ผนังเซลล์และสารปนเปื้อนจากอาหารยังคงมีอยู่เท่าเดิม

เมื่อนำเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2 ที่ชักนำด้วยเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรมไปย่อยเดกซ์แทรนชนิดต่าง ๆ พบว่าเอนไซม์นี้สามารถย่อยเดกซ์แทรน T-2000 และเดกซ์แทรนจาก *S.sobrinus* 6715 ซึ่งต่างมีส่วนประกอบของเดกซ์แทรนชนิด α-1,6 อยู่ด้วย และอัตราการย่อยโดยพิจารณาจากค่าความขันของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อย การย่อยเดกซ์แทรน T-2000 ซึ่งมีปริมาณ α-1,6 มากเกิดขึ้นในอัตราที่เร็วกว่าเดกซ์แทรนของ *S.sobrinus* 6715 ที่มีสัดส่วนต่ำกว่า (รูปที่ 18) แต่ไม่สามารถย่อยเดกซ์แทรน α-1,3 ที่เตรียมขึ้นได้เป็นการยืนยันว่าเดกซ์แทรนเนสที่ชักนำขึ้นเป็นเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] โดยที่ผลิตภัณฑ์ที่ได้เมื่อตรวจสอบโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง พบว่าเดกซ์แทรน T-2000 ให้ผลิตภัณฑ์คือกลูโคส ไอ

โซมอลโทเททราโอส และอีกพีคหนึ่งที่มีเวลารีเทนชันเท่ากับ 13 นาที ส่วนเดกซ์แทรนจาก *S.sobrinus* 6715 ให้กลูโคสและไอโซมอลโทเททราโอส ส่วนเดกซ์แทรน α-1,3 นั้นไม่ให้ผลิตภัณฑ์ใดๆ

สำหรับเดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และ α-1,6] ที่ได้จาก *Arthrobacter* sp. AG-2 ที่ชักนำด้วยเดกซ์แทรนจาก *S.sobrinus* 6715 นั้นสามารถย่อยเดกซ์แทรน T-2000 ได้ในอัตราที่เร็วกว่าเดกซ์แทรนจาก *S.sobrinus* 6715 แม้ว่าในกรณีนี้เอนไซม์มีทั้งสองแอคติวิตีก็ตาม เหตุผลนี้อาจเป็นไปได้ว่าการเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส [α-1,6] ต่อเดกซ์แทรน T-2000 นั้นทำได้สะดวกเนื่องจากพันธะส่วนใหญ่บนสายของเดกซ์แทรน T-2000 เป็นพันธะ α-1,6 เท่านั้น ในขณะที่ของ *S.sobrinus* 6715 นั้นแม้ว่าเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จะย่อยเดกซ์แทรนพันธะ α-1,6 และ เดกซ์แทรนเนส [α-1,3] จะย่อยเดกซ์แทรนพันธะ α- 1,3 ก็ตาม แต่บางส่วนของ α-1,3 นั้นเป็นส่วนแตกแขนง (branching) จำเป็นต้องย่อยด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] ก่อนแล้วเดกซ์- แทรนเนส [α-1,6] และ เดกซ์แทรนเนส [α-1,3] จึงจะเข้าทำการย่อยได้ อีกสาเหตุหนึ่งที่เป็นไปได้คือ เดกซ์แทรนพันธะ α- 1,6 นั้นละลายน้ำได้ดีจึงทำให้เอนไซม์เข้ากระทำได้ง่ายกว่าเดกซ์- แทรนพันธะ α- 1,3 ที่ละลายน้ำได้ยากกว่า

เมื่อตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากการย่อยสลายด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูงพบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายเดกซ์แทรนทั้ง 3 ชนิดด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และ α-1,6] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2 คือ กลูโคสเพียงชนิดเดียว

จากการทดสอบความสามารถของเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2 ที่ถูกชักนำจากเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ที่ผลิตขึ้นในการย่อยสลายเดกซ์แทรน T-2000, เดกซ์-แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 และเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 พบว่าเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] สามารถย่อยสลายเดกซ์แทรน T-2000, เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 และเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ได้ (รูปที่ 32) จึงเป็นการยืนยันว่าเมื่อชักนำการสร้างเดกซ์แทรนเนสด้วยเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 เดกซ์แทรนเนสดังกล่าวสามารถแสดงแอคติวิตีในการย่อยสลายเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ได้จริง แต่อย่างไรก็ตามการชักนำด้วยเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ดังกล่าว เดกซ์แทรนเนสที่ได้กลับมีแอคติวิตีในการย่อยสลายเดกซ์แทรนพันธะ α-1,6 ด้วย ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นในเบื้องต้นว่าเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] มีความสามารถในการย่อยสลายพันธะ α-1,6 ได้

เมื่อตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากการย่อยสลายด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูงพบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายเดกซ์แทรนทั้ง 3 ชนิดด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2 คือ กลูโคสเพียงชนิดเดียว

จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้น ผลิตภัณฑ์ที่ตรวจพบจากการย่อยสลายเป็นเพียงโอลิโกแซ็กคาไรด์สายสั้นๆ ซึ่งโดยความจริงอาจมีพอลิแซ็กคาไรด์ขนาดใหญ่เกิดขึ้นจากการย่อยสลาย หากแต่ความสามารถของคอลัมน์จะตรวจสอบได้เฉพาะโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีขนาดโมเลกุลต่ำๆ เท่านั้น และพบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายเดกซ์แทรน ด้วยเดกซ์แทรนเนสชนิดต่างๆ แม้จะให้ผลิตภัณฑ์ที่ต่างกัน แต่ผลิตภัณฑ์ที่ได้ต่างเป็นหน่วยย่อยซึ่งมีกลูโคสเป็นองค์ประกอบทั้งสิ้น สอดคล้องกับรายงานของ Russel และคณะ ในปี 1990 กล่าวว่าเดกซ์แทรนเนสจาก *S. mutans* Ingbritt เมื่อทำปฏิกริยากับเดกซ์แทรนจะให้อนุพันธ์ที่มีกลูโคสเป็นองค์ประกอบจำพวกไอโซมอลโทโอลิโกแซ็กคาไรด์เช่นเดียวกับรายงานของ Teruo และคณะ ในปี 1974 กล่าวว่าเดกซ์แทรนเนสจาก *Acromobacter* sp. เมื่อทำปฏิกริยากับเดกซ์แทรนพบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตรวจสอบโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบกระดาษ คือ ไอโซมอลโทส

Bo และ Jengen (1996) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากการย่อยสลายเดกซ์แทรนด้วยเดกซ์-แทรนเนสจาก *Thermomyces lanuginosus* ด้วยวิธี thin layer chromatography พบว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเป็นน้ำตาลกลูโคสเพียงอย่างเดียว และพบผลิตภัณฑ์เดียวกันจากการทำงานของเดกซ์แทรนเนสจาก *Lipomyces lopofer*

นอกจากนี้ยังพบว่ามีแบคทีเรียอีกหลายชนิดที่ผลิตเดกซ์แทรนเนสที่เมื่อทำการย่อยสลายเดกซ์แทรนแล้วได้ผลิตภัณฑ์เป็นไอโซมอลโทส

เมื่อทำการตรวจสอบความสามารถของเดกซ์แทรนเนสในการย่อยสลายไนจีแรน(nigeran) ที่ประกอบด้วยหน่วยของกลูโคสต่อกันด้วยพันธะ [α-1,3 สลับกับพันธะ α-1,4] พบว่าทั้งเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] และเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] จาก *Arthrobacter* sp. AG-2 ไม่สามารถย่อยสลายไนจีแรนได้ แสดงให้เห็นว่าแม้เดกซ์แทรนเนส [α-1,3] จะมีความสามารถในการย่อยสลายพันธะ α-1,3 บนสายของเดกซ์แทรนแต่ไม่มีความจำเพาะในการสลายพันธะ α-1,3 ที่ปนอยู่กับพันธะ α-1,4 บนสายของไนจีแรน ดังรูปที่ 39 และ 40

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

ข้อเสนอแนะงานวิจัย

การศึกษานี้ เดกซ์แทรนเนสที่เตรียมได้อาจมีการปนเปื้อนด้วยเดกซ์แทรนเนสที่เป็นชนิด α-1,4 และ α-1,2 ได้ ทั้งนี้เนื่องจากเดกซ์แทรนจาก *Streptococcus sobrinus* ที่ใช้เป็นสารชักนำนั้นมีเดกซ์แทรนที่เป็นพันธะ α-1,4 และ α-1,2 ปนอยู่ การกำจัดแอคติวิตีของทั้งสองพันธะนี้ ยังไม่สามารถทำได้ประกอบกับเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อพันธะทั้ง 2 ชนิดนั้นน่าจะมีปริมาณน้อย เนื่องจากองค์ประกอบของเดกซ์แทรนที่มีพันธะทั้งสองนี้มีปริมาณซึ่งน้อยกว่าทั้ง α-1,6 และ α-1,3 มาก

การศึกษานี้เป็นการดำเนินการโดยอาศัยหลักการว่าการที่เอนไซม์จะมีความจำเพาะต่อพันธะใดจะขึ้นกับเดกซ์แทรนที่ใช้ชักนำซึ่งการศึกษานี้ให้ผลตามหลักการ แต่อย่างไรก็ตามสำหรับการยืนยันผลโดยตรงนั้นสามารถทำได้โดยการศึกษาผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยโดยการวิเคราะห์พันธะ (linkage analysis) ต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ณฐิณี สุวรรณสิงห์. 2540. การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสและการศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์. รายงานการวิจัย. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

สุวรรณา นพพรพันธ์. 2538. การปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, ภาควิชาจุลชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุหัทยา จิระนันทิพร. 2543. การกลายพันธุ์ *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ AG-2 เพื่อเพิ่มการสร้างเดกซ์แทรนเนส. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

จินตกร คูวัฒนสุชาติ, จุลชีววิทยาช่องปาก. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2542.

Barrett, J.F. and Curtiss, R. 1986. Renaturation of dextranase activity from culture supernatant fluids of *Streptococcus sobrinus* after sodium dodecylsulfate polyacrylamind gel electrophoresis. Anal. Biochem.158: 365-370.

Blook, P.L., Dooney, C.L., and Howe, E.E. 1969. The retardation of spontaneous periodental disease and the prevention of caries in hamsters with dextranase. J. Periodent. 40: 105-110.

Burnette, G.W. and Schuster,G.S. 1978. Oral Microbiology and Infectious Disease. The Williams and Wilkins Company. Baltimore. pp. 204-209.

Chareonpornwattana, S., Jiranuntipon, S., Tangjitpinitkarn, S., Thaniyavarn, J., and Thaniyavarn, S. 2001. Dextranase from *Arthrobacter* sp. AG-2 and characterization thereof. Biotechnology for sustainable utilization of biological resources in the tropics. 2001: 405.

Cole, J.A. 1977. A biochemical approach to the control of dental caries. Biochem. Soc. Trans. 5:1232-1239.

Dewar, M., and Walker, G. 1975. Metabolism of the polysaccharide of human dental plaque. Caries Research. 9: 21-35.

De Soet, J.J., Toors, F.A., and De Graaff, J. 1989. Acidogenesis by oral streptococci at different pH values. Caries. Res. 23: 14-17.

Ebiso, S., and Misaki, A.,Kato,K.and Kotani,S. 1974. The structure of water-insoluble glucans of cariogenic *Streptococcus mutans* fromed in the absence and presence of dextranase. Carbohydr. Res. 38: 374-381.

Emilson, C.G., and Krasse, B. 1985. Support for implication of the specific plaque hypothesis. Scand. J. Dent. Res. 93: 96-104.

Fischer, E.H., and Stein, E.A. 1960. The Enzymes vol. 4. Edited by P.D. Boyer, H. Lardy, and K. Myrback. Academic Press Inc., New York. p.304.

Fukui, K., Moriyama, T., Miyake, Y., Mizutani, K. and Tanaka, O. 1982. Purification and properties of glucosyltransferase responsible for water-insoluble glucan synthesis from *Streptococcus mutans*. Infect. Immune. 37: 1-9.

Germaine, G.R., Chludzinski, A.K., and Schachtele, C.F. 1974. *Streptococcus mutans* dextransucrase: requirement for primer dextran. J. Bacteriol. 120: 287-294.

Goodson, S. 1989. Pharmacokinetic principles controlling efficacy of oral therapy. J. Dent. Res. 68: 1625-1632.

Gibbons, R.J., Berman, K.S., Knoettner, P., and Kapsimalis, B. 1966. Dental caries and alveolar bone loss in gnotobiotic rats infected with capsule-forming streptococci of human origin. Arch. Oral. Biol. 11: 549-560.

Gibbons, R. J., and Nygaard, M. 1968. Synthesis of insoluble dextran and its significance in the formation of gelatinous deposits by plaque-forming Streptococci. Archs. Oral. Biol. 13:1249-1262.

Guggenheim, B., and Haller,R. 1972. Purification and properties of an α—(1,3)-gluco-hydrolase from *Trichoderma harzianum*. J. Dent Res. 51: 394-402.

Guggenheim, B. and Newbrun,E. 1969. Extracellular glucosyltransferase activity of an HS strain of *Streptococcus mutans*. Helvetica. odontologica. acta. 13: 84-97.

Hamada, S., and Slade, H.M., 1980. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol. Rev. 44: 331-384.

Hare, M.D. 1977.The enzymic synthesis and degradation of extracellular and intracellular polysaccharide by oral Streptococci. M.Sc. Thesis, University of Sydney, Australia.

Harper, S., and Loesche, W.J. 1983. Effect of pH upon sucrose and glucose catabolism by the various genogroups of *Streptococcus mutans*. J. Dent. Res. 62: 526-531.

Harper, S., and Loesche, W.J. 1984. Growth and acid tolerance of human dental plaque bacteria. Arch. Oral. Biol. 29: 843-848.

Horton, W.A., Jacob, A.E., Green, R.M., Hillier, V.F., and Drucker, D.B. 1985. The cario-genicity of sucrose, glucose and maize starch in gnotobiotic rats mono-infected with strains of the bacteria *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius* and *Streptococcus milleri.* Arch. Oral. Biol. 30: 777-780.

Howell, T.H. 1991 Chemotherapeutic agents as *Streptococcus mutans* adjuncts in the treatment of periodental disease. Curr. Opinn. Dent. 1: 81-86.

Huge, M.D., Harry, B.H., and John, R.E. 1986. Structural elucidation of a water-insoluble glucan produce by a cariogenic oral *Streptococcus.* Carbohydr. Res. 156:69-77.

Hultin, E., and Hordstrom, L. 1949. Investigations on dextranase I on the occorrence and the assay of dextranase. Acta Chem. Scand. 3: 1405-1417.

Igarashi, T., Yamamoto, A., and Goto, N. 1992. Characterization of the dextranase purified from *Streptococcus mutans* Ingbritt. Microbiol. Immunol. 36(9): 969-976.

Igarashi, T., Yamamoto, A., and Goto, N. 1998. Detection of dextranase-producing gram-negative oral bacteria. Oral. Microbiol. Immunol. 13: 382-386.

Imrie, F.K.E. and Tibury, R.H. 1972. Polysaccharides in Sugar Cane and its Products. Williams, J.C. and Kelsell, D.F. (editors). Sugar Tech Rev. Elsevier Publishing Company. The Netherlands. 5(1):291-361.

Jeanes, A., and Wilham, C.A. 1950. Periodate oxidation of dextran. J. Am. Chem. Soc. 72: 2655-2657.

Johnson, I.H. 1990. Glucanase-producing organisms in human dental plaques. Microbios. 61: 89-98.

Jordan, H.V., and Keyes, P.H. 1966. In vitro methods for the study of plaque formation and carious lesion. Arch. Oral. Biol. 11: 793-801.

Kim, D., Su-jin, R., Soo-jin, H., Do-won, K., and Ho-sang, K.J. 1999. Characterisation of a novel carbohydrase from *Lipomyces starkeyi* KSM22 for dental Application. Microbiol. Biotechnol. 9(3): 260-264.

Lawson, J.W. 1971. Growth of cariogenic Streptococci in chemically defined medium. Arch. Oral Biol. 16: 339-342.

Leach, S.A. 1969. Dextranase and dental caries. British. Dental. J. 20: 325-330.

Lewicwi, W.J., Lang, L.W., and Edwards, J.R. 1971. Determination of the structure of a broth dextran produced by a cariogenic Streptococcus. Carbohydr. Res. 17: 175-182.

Loesche, W.J. 1986. Role of *Streptococcus mutans* in dental decay. Microbiol. Rev. 50: 353-380.

Mandel, I.D. 1988. Chemotherapeutic agents for controlling plaque and gingivitis. J. Clin. Periodental. 15: 488-498.

Margaret, D.H., Svensson, S., and Walker, G.J. 1978. Characterization of the extra-cellular, water-insoluble α—D-glucans of oral Streptococci by methylation analysis, and by enzymatic synthesis and degradation. Carbohydr. Res. 66: 245-264.

Marguerite, D., Magali, R.S., and Pierre, F.M. 1997. Dextransucrase production by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 comparison with *L. mesenteroides* NRRL B-512F. Enz. Microbial Tech. 20: 523-530.

McCabe, M.M., Keyes, P.H., and Howell, A. 1967. An in vitro method for assessing the plaque forming ability of oral bacteria. Arch. Oral. Biol. 12: 1653-1656.

Melville, T.H., and Russell, C. 1981. Microbiology for Dental Students. 3rd ed., William Medical Book Ltd.,London. pp. 323-338.

Mountzouris, K.C., Gilmour, S.G., Jay, A.J., and Rastall, R.A. 1999. A study of dextran production from maltodextrin by cell suspensions of *Gluconobacter oxydans* NCIB 4943. J. Appl. Microbiol. 87: 546-556.

Musaka, H., Shimamura, A., and Tsumori, H. 1989. Purification and characterization of cell-associated glucosyltransferase synthesizing insoluble glucans from *Streptococcus mutans* serotype C. J. Gen. Microbiol. 135: 2055-2063.

Nishizawa, T., Imai, S., Akada, H., Hixoide, M., and Araya, S. 1976. Extracellular glucans produced by oral Streptococci. J. Gen. Microbiol. 21: 207-213.

Pulkownik, A. and Walker, G.J. 1977. Purification and substrate specificity of an endo-dextranase of *Streptococcus mutans* Ki-R. Carbohydr. Res. 54: 237-251.

Rajaguru, P., Kalaiselvi, K., Palanivel, M. and Subburam. 2000. Biodegradation of azo dyes in a sequential anaerobic-aerobic system. Appl. Microbiol. Biotechnol. 54 : 268-273.

Rolla, G. 1986. Other chemical and antimicrobial agents and dental caries. Textbook of cariology. Edited by Thylstrup A, Fejerskov O. Copenhagen, Munksgaard, p.336.

Roy, R.B.R., and Martyn, L.G. 1987. Identification of virulence components of Mutans streptococci. Streptococcal genetics. Edited by Joseph J.F,, and Curtiss, R., III. Washington D.C., pp. 201-204.

Sawai, T., Toriyama, K., and Yano, K. 1974. A bacterial dextranase releasing only isomaltose from dextran. J. Biochem. 75: 105-112.

Schuster, S. 1990. Oral microbiology and Infectious Disease. 3rd Edition. B.C.Decker, Inc. Philadelphia, Toronto.

Stanley, A., Wilson, M., and Newman., H.N. 1989. The in vitro effects of chlorhexidine on subgingival plaque bacteria. J. Clin. Periodentol. 16: 259: 259-264.

Sun, J., Cheng, X., Zhang, Y., Yan., Z., and Zhang., S. 1988. A strain of *Paecilomyces lilacinus* producing high quality dextranase. Am. N.Y. Acad Sci. 542: 192-194.

Tao, L., Sutelisse, I.C., Russel, R.R.B., and Ferretti, J.J. 1993. Transport of sugars, including sucrose, by the msm transport system of *Streptococcus mutans*. J. Dent Res. 72: 1386-1390.

Taubman, M.A., and Smith, D.J. 1974. Effects of local immunization with *Streptococcus mutans* on induction of salvary immunoglobulin A antibody experimental dental caries in rats. Infect. Immune. 9: 1079-1091.

Van de Rijn, I., Bleiweis, A.S., and Zabriskie, J.B. 1976. Antigens in *Streptococcus mutans* cross reactive with human heart muscle. J. Dent. Res. 55: 59-64.

Walker, G.L., Brown, R.A. and Taylor, C. 1984. Activity of *Streptococcus mutans* α-D-Glucosyltransferases released under various growth conditions. J. Dent. Res. 63: 397-400.

Walker, G,L., Pulkownik, A. and Morrey-Johes, J.G. 1981. Metabolism of the polysaccharides of human dental plaque: release of dextranase in batch cultures of *Streptococcus mutans*. J. Gen. Micro. 127: 201-208.

Wynter, C. 1996. Screening method for dextranases and amylodextranases from anaerobic thermophiles. J. Gen. Appl. Microbiol. 42: 213-223.

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. สูตรอาหารสำหรับการเลี้ยงเชื้อ

1.1 สูตรอาหาร Basal medium

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

ทริปโตน (Tryptone)	20 .0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	2.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	3.0	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	2.0	กรัม
โพแทสเซียมคาร์บอเนต (K_2CO_3)	1.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \bullet 7H_2O$)	0.12	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$)	0.015	กรัม
ซูโครส (Sucrose)	15.0	กรัม

นึ่งฆ่าเชื้อที่ภาวะมาตรฐาน 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ: ซูโครสทำการอบฆ่าเชื้อที่110° ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

1.2 สูตรอาหาร Tryptic soy broth

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Bacto tryptone (Pancreatic Digest of Casein)	17.0	กรัม
Bacto soy tone (Papaic Digest of Soybean Meal)	3.0	กรัม
Bacto dextose	2.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.5	กรัม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชั่ง Tryptic soy Broth 30 กรัม ละลายในน้ำกลั่น (Distill water) 1 ลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นึ่งฆ่าเชื้อที่ภาวะมาตรฐาน 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.3 สูตรอาหาร Brain heart infusion

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Calf Brains, Infusion form	200.0	กรัม
Beef Heart, Infusion form	250.0	กรัม
โปรติโอสเปปโตน (Bacto Proteose Peptone)	10.0	กรัม
เดกซ์โตรส (Bacto Dextose)	2.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
ไดโซเดียมฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	2.5	กรัม

ชั่ง Brain heart infusion 37 กรัม ละลายในน้ำกลั่น (Distilled water) 1 ลิตร จากนั้นนึ่งฆ่าเชื้อที่ภาวะมาตรฐาน 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.4 สูตรอาหารของ Yamaguchi

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม	5.0	กรัม
พอลิเปปโตน	10.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.0	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$ $7H_2O$)	0.1	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	0.1	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	30.0	กรัม

ปรับความเป็นกรด - ด่างเริ่มต้นที่ 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่ภาวะมาตรฐาน 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.5 สูตรอาหารของ Fukumoto

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม	10.0	กรัม
โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$)	2.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.0	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.5	กรัม
แมกเนเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$ $7H_2O$)	0.5	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4$)	0.005	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	2.0	กรัม

ปรับความเป็นกรด - ด่างเริ่มต้นที่ 4.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่ภาวะมาตรฐาน 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. การเตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi-Nelson (Somogyi, 1952)

1.1 สารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ (Alkaline Copper reagent)

ละลายโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 71 กรัม และโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต 40.0 กรัม ในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 1.0 นอร์มัล ลงไป 100 มิลลิลิตรและเติมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตที่มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักลงไป 80 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและทำให้ร้อน จากนั้นเติมโซเดียมซัลเฟต 180 กรัม ละลายให้เข้ากันและปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บในขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง

1.2 สารละลายเนลสัน (Nelson reagent)

ละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต 53.2 กรัม ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นลงไป 21 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมสารละลายโซเดียมอาร์ซิเนตที่มีความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักลงไป 50 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บในขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง ถ้ามีตะกอนให้กรองออกก่อนนำไปใช้

2. สารละลายสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Lowry's reagent)

2.1 สารละลาย Lowry A ประกอบด้วย

โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	60.0 กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	12.0 กรัม
โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต	0.6 กรัม
น้ำกลั่น	3000 มิลลิลิตร

2.2 สารละลาย Lowry B ประกอบด้วย

คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$)	50.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

2.3 สารละลาย Lowry C ประกอบด้วย

Lowry A	50	ส่วน
Lowry B	1	ส่วน

2.4 สารละลาย Lowry D (phenol reagent) ประกอบด้วย

สารละลายโฟลิน ฟีนอล รีเอเจนต์ (Folin phenol reagent)	1	ส่วน
น้ำกลั่น	1	ส่วน

3. การละลายสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของน้ำตาลด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง

3.1 สารละลายมาตรฐานภายใน (internal standard)

เมธิลแอลฟาดีแมนโนไพราโนไซด์	12.5	กรัม
เติมน้ำกลั่นปลอดประจุจนปริมาตรสุดท้ายเป็น	100	มิลลิลิตร

ปั่นด้วยเครื่องปั่นผสมจนละลายหมด กรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดรูกว้าง 0.45 ไมโครเมตร เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อเป็นสารมาตรฐานภายในสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของน้ำตาลโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูงโดยเติมในอัตราส่วนตัวอย่าง 200 ไมโครลิตรต่อสารละลายมาตรฐาน 5 ไมโครลิตร

3.2 สารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส, ไอโซมอลโทส และ ไอโซมอลโทเททราโอส

ชั่งสารดังนี้ กลูโคส, ไอโซมอลโทส และ ไอโซมอลโทเททราโอส ชนิดละ 1 กรัม เติมน้ำกลั่นปลอดประจุลงในน้ำตาลแต่ละชนิดให้มีปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ปั่นด้วยเครื่องปั่นผสมจนละลายหมดกรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดรูกว้าง 0.45 ไมโครเมตร เก็บที่ 4 องศาเซลเซียสเพื่อใช้เป็นสารมาตรฐาน

3.3 สารละลายอะซิโตไนไตร์ทเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร)ในน้ำ

อะซิโตไนไตร์ท	70	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นปลอดประจุ	30	มิลลิลิตร

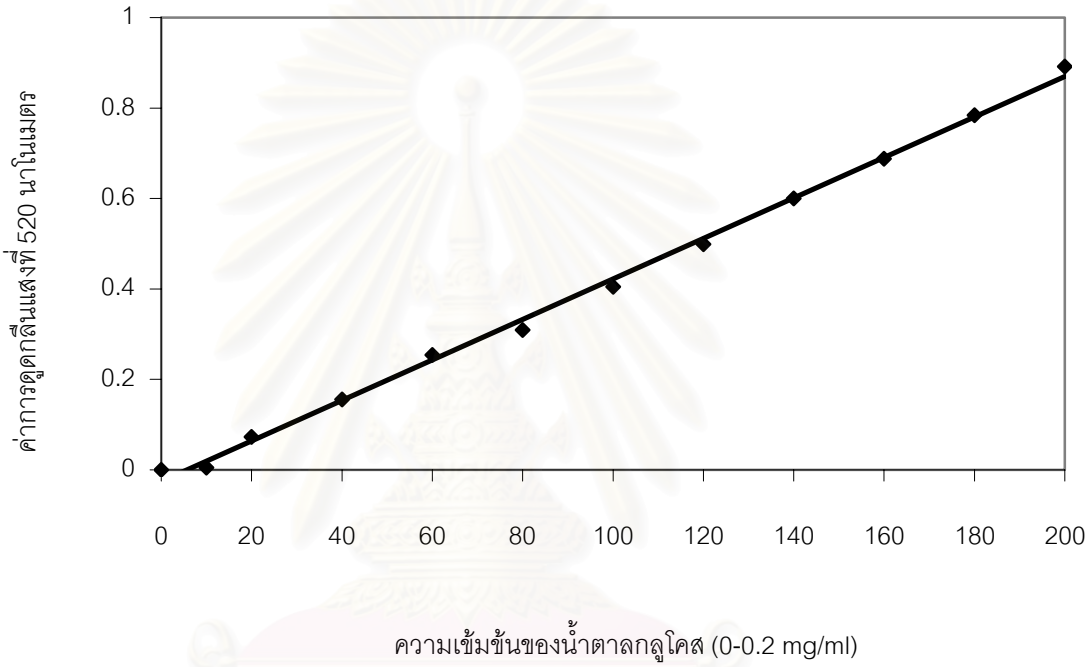
กรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร กำจัดอากาศออกด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูงจนกระทั่งไม่เหลือฟองอากาศ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐาน

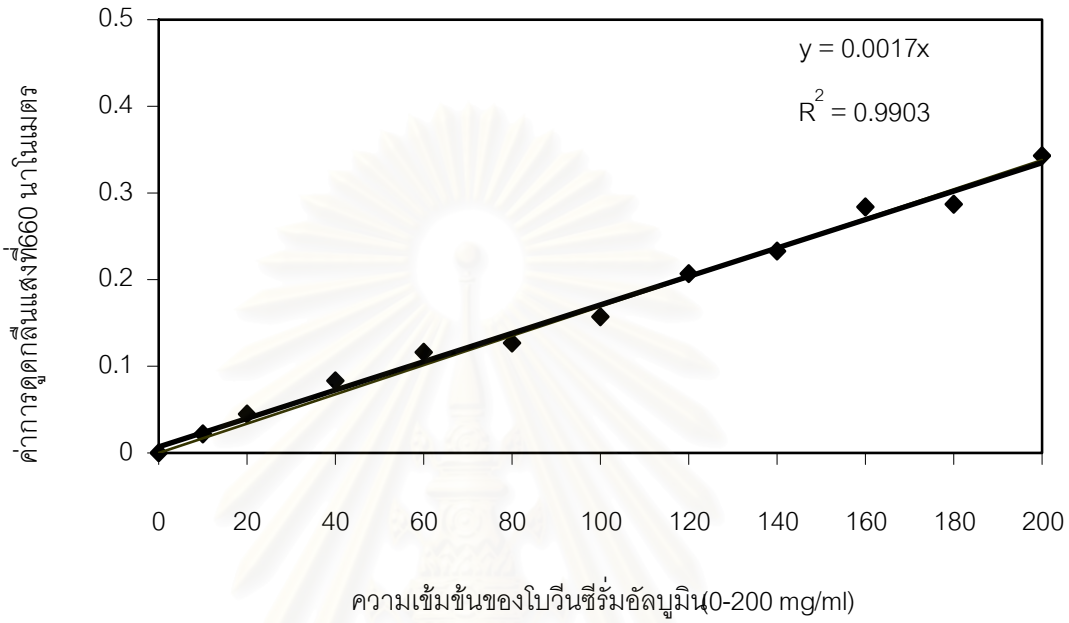
1. กราฟมาตรฐานน้ำตาลรีดิวซ์เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Samogi-Nelson



รูปที่ 41 กราฟมาตรฐานแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร กับน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

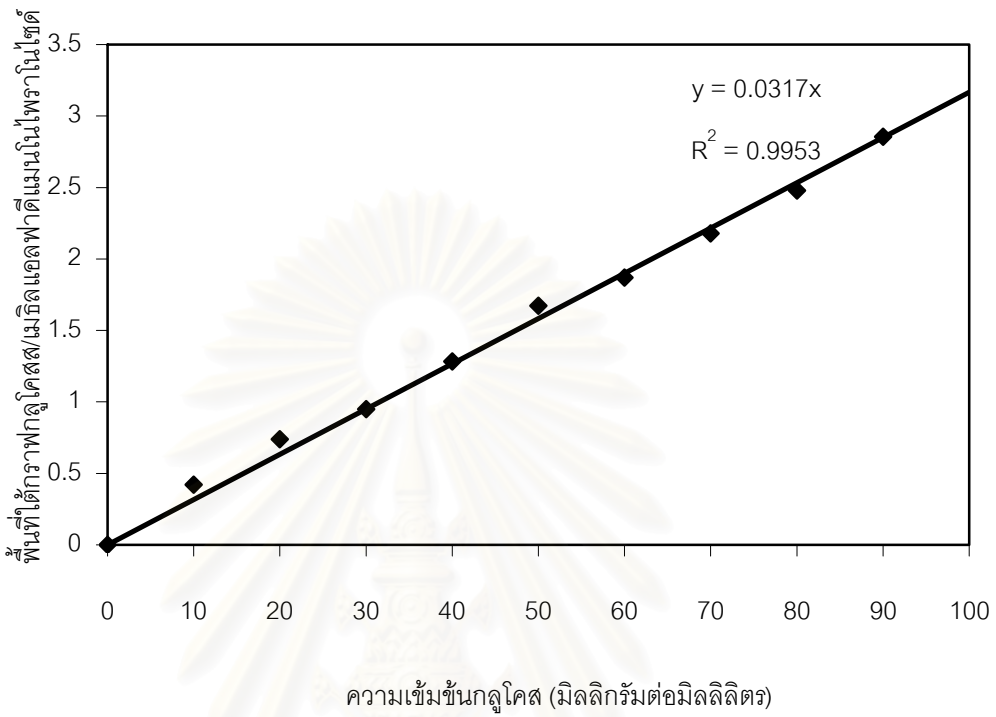
2. กราฟมาตรฐานโปรตีนเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Lowry



รูปที่ 42 กราฟมาตรฐานแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร กับโปรตีนมาตรฐาน โบวีนซีรั่มอัลบูมิน ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง



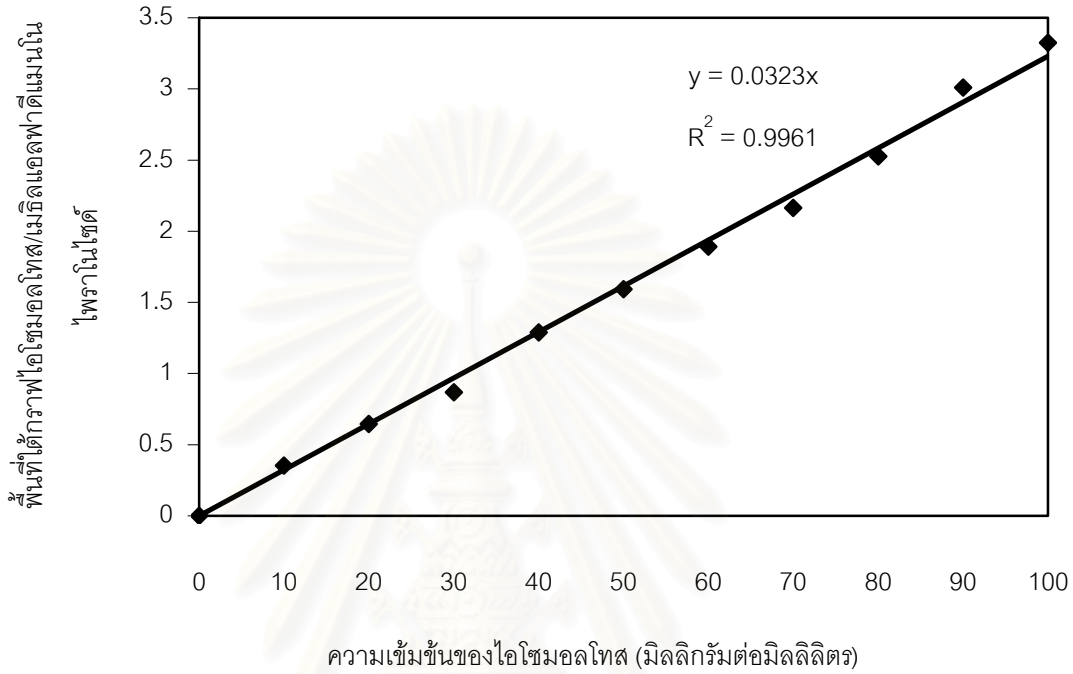
รูปที่ 43 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณกลูโคสกับอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของกลูโคสต่อเมธิลแอลฟาดีกลูโคไพราโนไซด์ ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง

หาความเข้มข้นของกลูโคสได้จากการนำอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของกลูโคสและเมธิลแอลฟาดีกลูโคไพแรนโนไซด์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูงมาแทนค่าในสมการเส้นตรง ดังนี้

พื้นที่ใต้กราฟ = ความชันของกราฟมาตรฐาน x ปริมาณกลูโคส

โดยที่ ความชันของกราฟมาตรฐาน = 0.0317

2. กราฟมาตรฐานน้ำตาลไอโซมอลโทสเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง



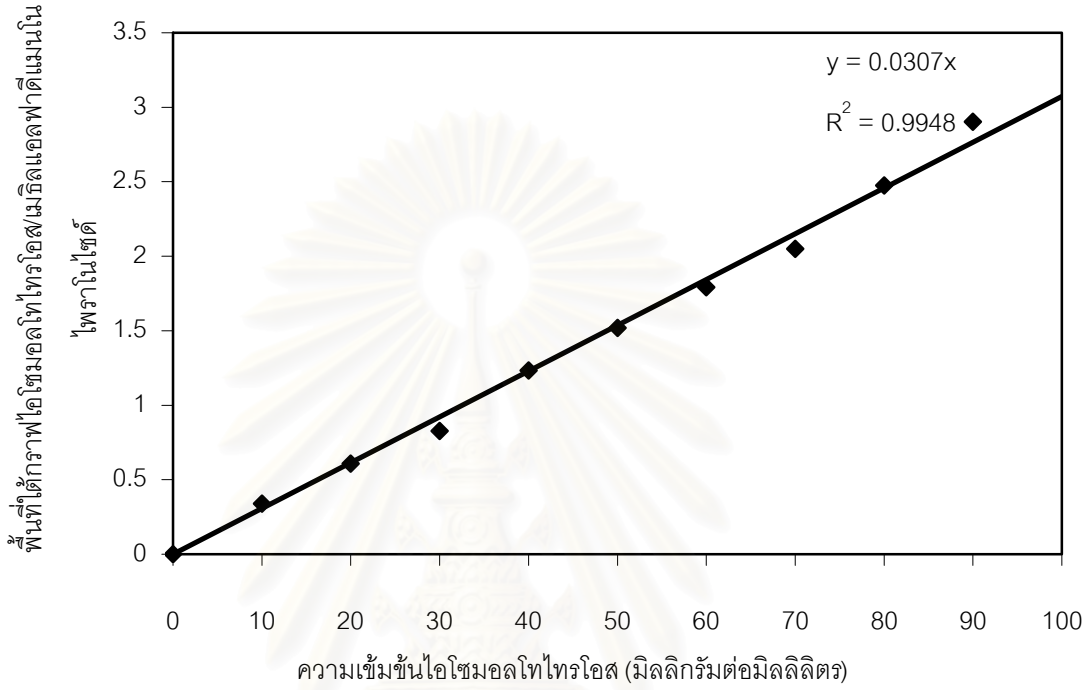
รูปที่ 44 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณไอโซมอลโทสกับอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของไอโซมอลโทสและเมธิลแอลฟาดีกลูโคไพราโนไซด์ ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโท-กราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง

หาความเข้มข้นของไอโซมอลโทสได้จากการนำอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของไอโซมอลโทสและเมธิลแอลฟาดีกลูโคไพราโนไซด์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูงมาแทนค่าในสมการเส้นตรง ดังนี้

พื้นที่ใต้กราฟ = ความชันของกราฟมาตรฐาน x ปริมาณไอโซมอลโทส

โดยที่ ความชันของกราฟมาตรฐาน = 0.0323

5.กราฟมาตรฐานไอโซมอลโทไทรโอสเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง



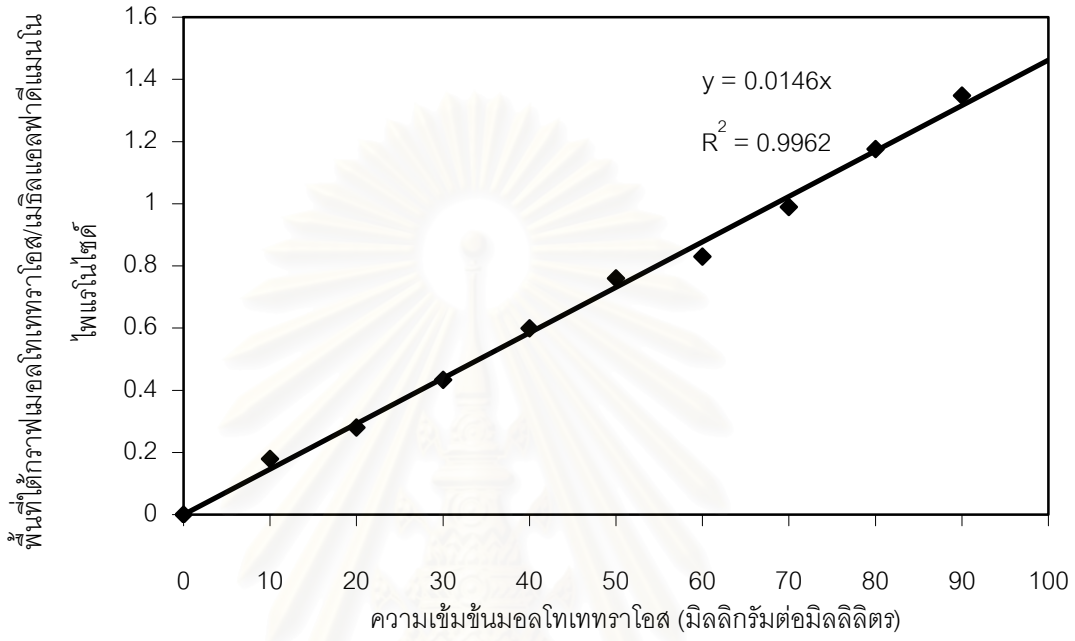
รูปที่ 45 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณไอโซมอลโทไทรโอสกับอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของไอโซมอลโทไทรโอสและเมธิลแอลฟาดีกลูโคไพราโนไซด์ ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง

หาความเข้มข้นของไอโซมอลโทไทรโอสได้จากการนำอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของมอลโทไทรโอสและเมธิลแอลฟาดีกลูโคไพราโนไซด์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูงมาแทนค่าในสมการเส้นตรง ดังนี้

พื้นที่ใต้กราฟ = ความชันของกราฟมาตรฐาน x ปริมาณไอโซมอลโทไทรโอส

โดยที่ ความชันของกราฟมาตรฐาน = 0.0307

6.กราฟมาตรฐานไอโซมอลโทเททราโอสเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง



รูปที่ 46 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณไอโซมอลโทเททราโอสกับอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของไอโซมอลโทเททราโอสและเมธิลแอลฟาดีกลูโคไพราโนไซด์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง

หาความเข้มข้นของไอโซมอลโทเททราโอสได้จากการนำอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของไอโซมอลโทเททราโอสและเมธิลแอลฟาดีกลูโคไพราโนไซด์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง มาแทนค่าในสมการเส้นตรง ดังนี้

พื้นที่ใต้กราฟ = ความชันของกราฟมาตรฐาน x ปริมาณไอโซมอลโทเททราโอส

โดยที่ ความชันของกราฟมาตรฐาน = 0.0146

ประวัติผู้เขียน

นางสาว นันทิดา วานิชวงศ์วรรณ เกิดวันที่ 3 ตุลาคม พ.ศ. 2521 ที่จังหวัดกรุงเทพฯ ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ในปีการศึกษา 2542 เข้ารับการศึกษาต่อในขั้น ปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2543 ที่อยู่ปัจจุบัน 14/1 ซอยกรุงเทพฯ-นนท์ 5 ถนนกรุงเทพฯ-นนท์ เขต บางซื่อ กรุงเทพฯ 10800

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย