หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3
ผลการวิจัย

ผลการแยกเชื้อแบคทีเรียจากแหล่งต่างๆ

1. การเก็บรวบรวมเชื้อแบคทีเรียจากแหล่งต่างๆ

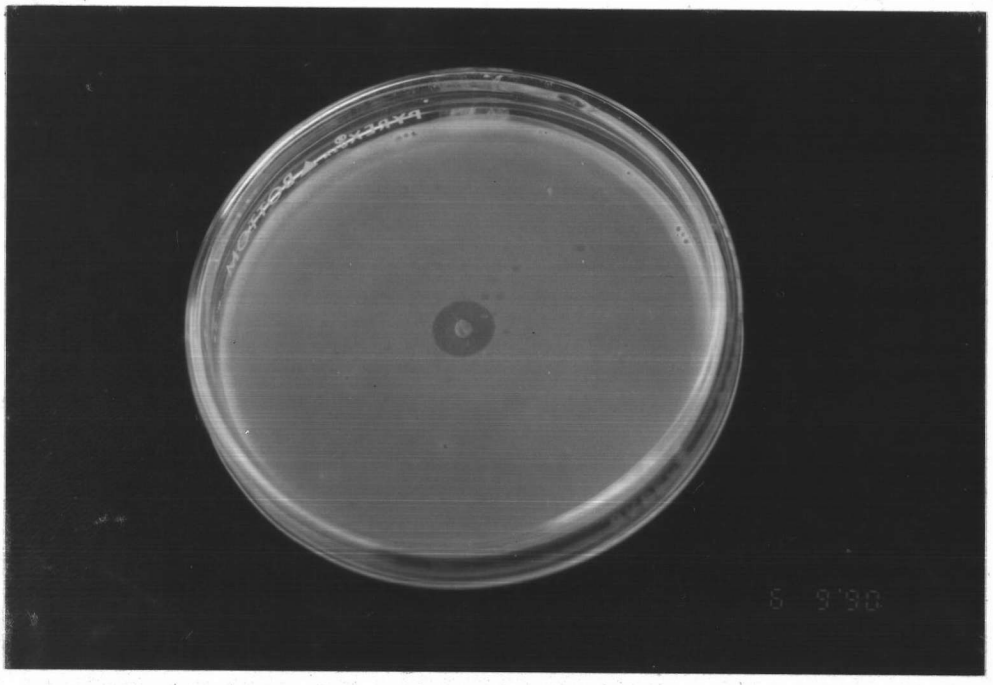
ในการแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดินเลนริมชายฝั่งทะเลและน้ำทะเลจากแหล่งต่างๆในประเทศไทย รวมทั้งจากคลังเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากทะเลของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จำนวนทั้งสิ้น 11 แหล่งสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียในอาหารวุ้นแข็งตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 1 ได้ทั้งหมด 1092 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 6.

2. การทดสอบเชื้อแบคทีเรียบนอาหารวุ้นแข็งที่มีเดกซ์แทรน

นำเชื้อแบคทีเรียที่เก็บรวบรวมได้จากข้อ 1 มาทำการทดสอบการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสบนอาหารวุ้นแข็งที่มีเดกซ์แทรนเป็นแหล่งคาร์บอน โดยการจุดเชื้อ (spot) ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จนเห็นว่าเชื้อเจริญดีแล้ว นำเอธานอล 95% เทราดลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น สังเกตดูบริเวณใสรอบๆโคโลนีที่เกิดขึ้นดังตัวอย่างในรูปที่ 3. พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียที่ให้ส่วนใสรอบโคโลนี ซึ่งแสดงว่า แบคทีเรียนั้นสามารถผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสได้จำนวน 19 สายพันธุ์

3. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆที่ให้บริเวณใสรอบๆโคโลนีจากข้อ 2 มาจุดเชื้อลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเดกซ์แทรนเป็นแหล่งคาร์บอนและมีปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ 30 มล. เท่ากันในทุกจานอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียเพียงสายพันธุ์เดียวที่ให้ขนาดของบริเวณใสรอบโคโลนีกว้างคือเชื้อสายพันธุ์ Z-10 โดยมีขนาดของส่วนใสรอบโคโลนีเท่ากับ 1.2 ซม. ส่วนเชื้อแบคทีเรียที่เหลือจะให้ขนาดของบริเวณใสรอบๆโคโลนีเล็กน้อย ดังแสดงในตารางที่ 7.



รูปที่ 3. แสดงตัวอย่างการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง เชื้อที่ผลิตเอนไซม์ออกมาจะให้บริเวณใสรอบๆ โคโลนีเมื่อราดด้วย 95%เอธานอล

ตารางที่ 6. แสดงจำนวนเชื้อแบคทีเรียและเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่แยกได้จากแหล่งต่างๆ

แหล่งตัวอย่าง	เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้	เชื้อที่มีเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส
ดินชายเลนบางปู สมุทรปราการ	20	1
ดินชายเลน สมุทรสงคราม	178	–
ดินทรายริมชายหาด เกาะพีพี กระบี่	16	–
ดินชายเลน ระนอง	94	2
ดินริมหาด จันทบุรี	75	3
ดินปากแม่น้ำจันทบุรี จันทบุรี	84	5
ดินจากก้นอ่าวไทย จันทบุรี	60	–
ดินทะเลลึกบริเวณอ่าวไทย จันทบุรี	36	–
ดินทะเลบริเวณที่มีน้ำลดลงไปต่ำสุด จันทบุรี	48	2
ดินทะเลบริเวณที่มีน้ำขึ้นสูงสุด จันทบุรี	72	2
ดินฟาร์มหอยนางรมบริเวณที่มีน้ำลดลงต่ำสุด จันทบุรี	48	–
ดินฟาร์มหอยนางรมบริเวณที่มีน้ำขึ้นสูงสุด จันทบุรี	48	–
ดินริมหาดทราย ระยอง	46	3
ดินห่างฟาร์มหอย(ห่างเล็กน้อย) ระยอง	48	–
ดินห่างฟาร์มหอย(ห่างมาก) ระยอง	48	–
หอยนางรม	24	–
น้ำทะเลจากชายหาดบางแสน ชลบุรี	16	–
คลังเชื้อแบคทีเรียจากทะเลของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	131	1
รวม (สายพันธุ์)	1092	19

ตารางที่ 7 แสดงขนาดของบริเวณใสรอบโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียซึ่งแสดงถึงความสามารถในการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสในอาหารเลี้ยงเชื้อของ Schroder ที่เสริมด้วยเดกซ์แทรน 1.0% ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน

เชื้อแบคทีเรีย	แหล่งที่เก็บตัวอย่าง	ความกว้างของบริเวณใสวัดจากขอบโคโลนี (ซม.)
เชื้อหมายเลข B-11	ดินชายเลนบางปู สมุทรปราการ	0.4
เชื้อหมายเลข Z-10	ดินชายเลน ระนอง	1.2
เชื้อหมายเลข Z-56		0.3
เชื้อหมายเลข J-23	ดินริมหาด จันทบุรี	0.8
เชื้อหมายเลข J-47		0.4
เชื้อหมายเลข J-68		0.6
เชื้อหมายเลข K-7	ดินปากแม่น้ำจันทบุรี จันทบุรี	1.0
เชื้อหมายเลข K-25		0.3
เชื้อหมายเลข K-27		0.8
เชื้อหมายเลข K-55		0.4
เชื้อหมายเลข K-61		0.6
เชื้อหมายเลข L-32	ดินทะเลบริเวณที่มีน้ำลงต่ำสุด จันทบุรี	0.7
เชื้อหมายเลข L-45		0.8
เชื้อหมายเลข M-48	ดินทะเลบริเวณที่มีน้ำขึ้นสูงสุด จันทบุรี	0.5
เชื้อหมายเลข M-52		0.4
เชื้อหมายเลข Y-22	ดินริมหาดทราย ระยอง	0.2
เชื้อหมายเลข Y-34		0.1
เชื้อหมายเลข Y-40		0.8
เชื้อหมายเลข A-94	คลังเชื้อแบคทีเรีย	0.5

4.ผลการคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

จากการทดลองเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 ในอาหารเหลวทั้ง 3 สูตร พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรอาหารดัดแปลงของ Okami และในสูตรอาหารของ Yamaguchi ดังแสดงในรูปที่ 4ข.แต่เชื้อที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรของ Yamaguchi สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงกว่า โดยเชื้อจะให้เอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 0.39 หน่วยต่อมล.แต่เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลงของ Okami เชื้อจะให้เอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 0.26 หน่วยต่อมล. ดังแสดงในรูปที่ 4ก. สำหรับในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลงของ Schroder นั้น เชื้อเจริญได้น้อยและให้เอนไซม์ออกมาน้อยด้วย คือ ให้เอนไซม์ 0.22 หน่วยต่อมล. เท่านั้น ดังนั้นจึงเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรของ Yamaguchi มาเป็นต้นแบบในการศึกษาต่อไป

5.ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

5.1 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสม

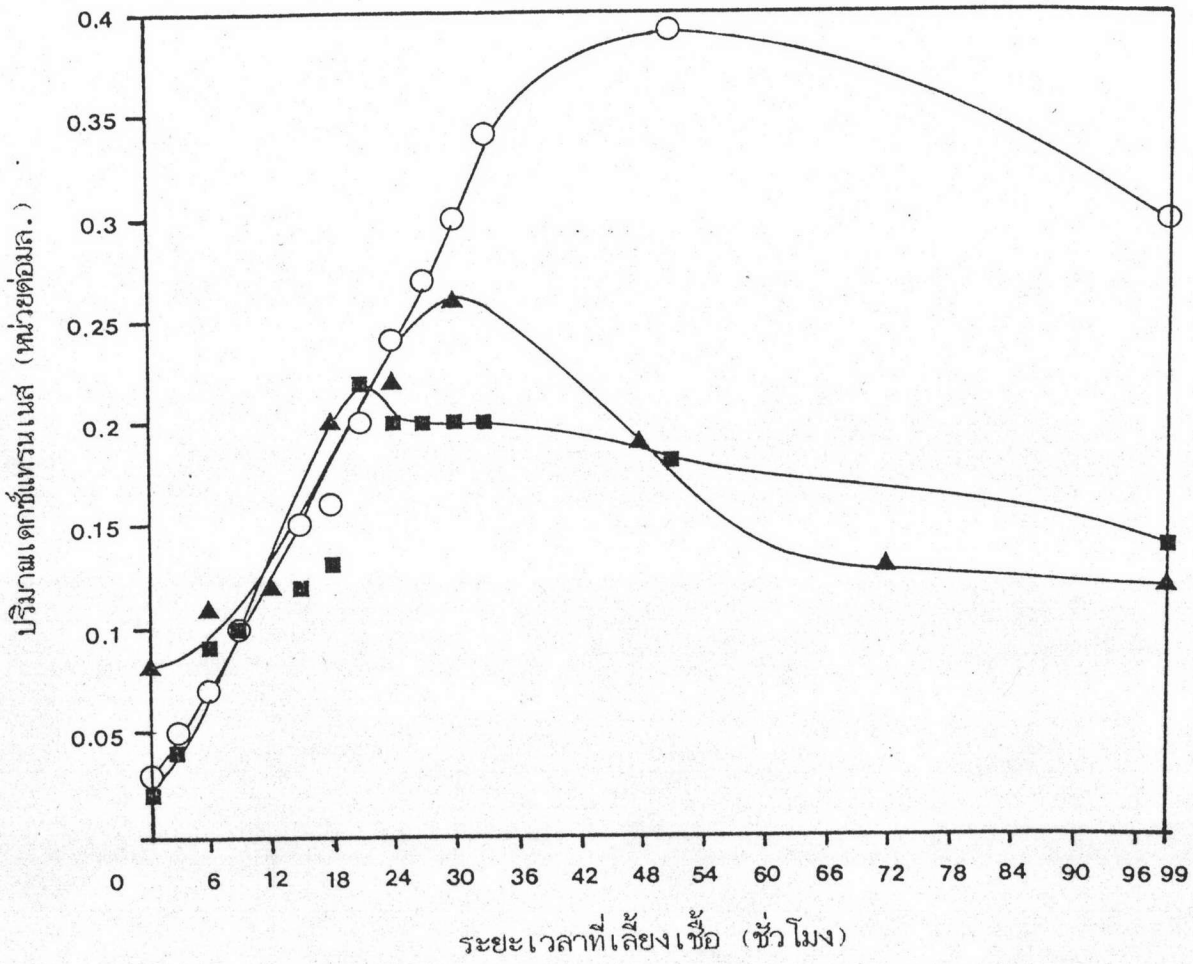
จากการทดลองเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 โดยแปรผันอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงตั้งแต่ 25-50 องศาเซลเซียส พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสอยู่ในช่วง 30-35 องศาเซลเซียส หรือในช่วงอุณหภูมิห้อง ซึ่งให้ปริมาณเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 0.71 หน่วยต่อมล.ที่ชั่วโมงที่ 30 ของการเลี้ยงเชื้อ (รูปที่ 5ก.) ในขณะที่อุณหภูมิ 25-35 องศาเซลเซียส และ 40 องศาเซลเซียส ให้ผลการเจริญใกล้เคียงกันแต่ปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตได้ต่ำกว่าอย่างเห็นได้ชัดและหากเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสแล้วจะไม่พบการเจริญของเชื้อนี้ ดังแสดงในรูปที่ 5ข.

5.2 ผลของความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการทดลองเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 โดยแปรผันความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วง 3-11 ที่อุณหภูมิห้อง พบว่า การเจริญของเชื้อในช่วงความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นตั้งแต่ 6-8 จะใกล้เคียงกัน คือ มีค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 7.5-8.0 (รูปที่ 6ข.)แต่เชื้อจะผลิตเอนไซม์ได้มากที่สุดในช่วงความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 9 โดยให้ปริมาณเอนไซม์สูงสุด 1.12 หน่วยต่อมล. ดังแสดงในรูปที่ 6ก.

5.3 ผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์

เนื่องจากแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 นี้คัดเลือกจากบริเวณชายฝั่งทะเลซึ่งมีความเค็ม จึงได้ทำการศึกษาผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์เดกซ์-แทรนเนส โดยทำการทดลองเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการแปรผันความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ตั้งแต่ 0-20 % ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นใน



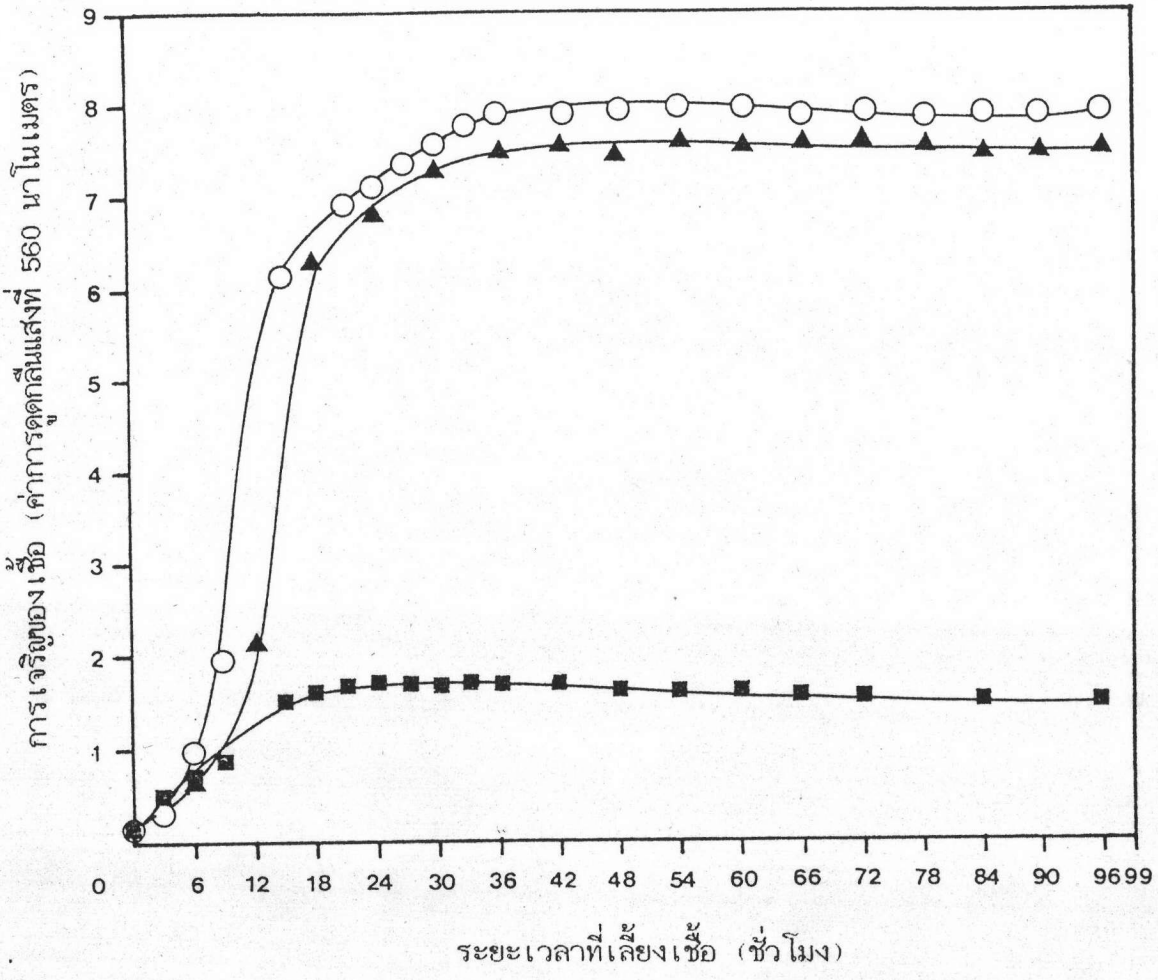
รูปที่ 4ก. ผลของสูตรอาหารชนิดต่างๆ ที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 ต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ดังภาคผนวก ก.

■ ■ สูตรอาหารดัดแปลงของ Schroder

○ ○ สูตรอาหารของ Yamaguchi

▲ ▲ สูตรอาหารดัดแปลงของ Okami

โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 99 ชั่วโมง ภายใต้การเขย่า 200 รอบต่อนาที



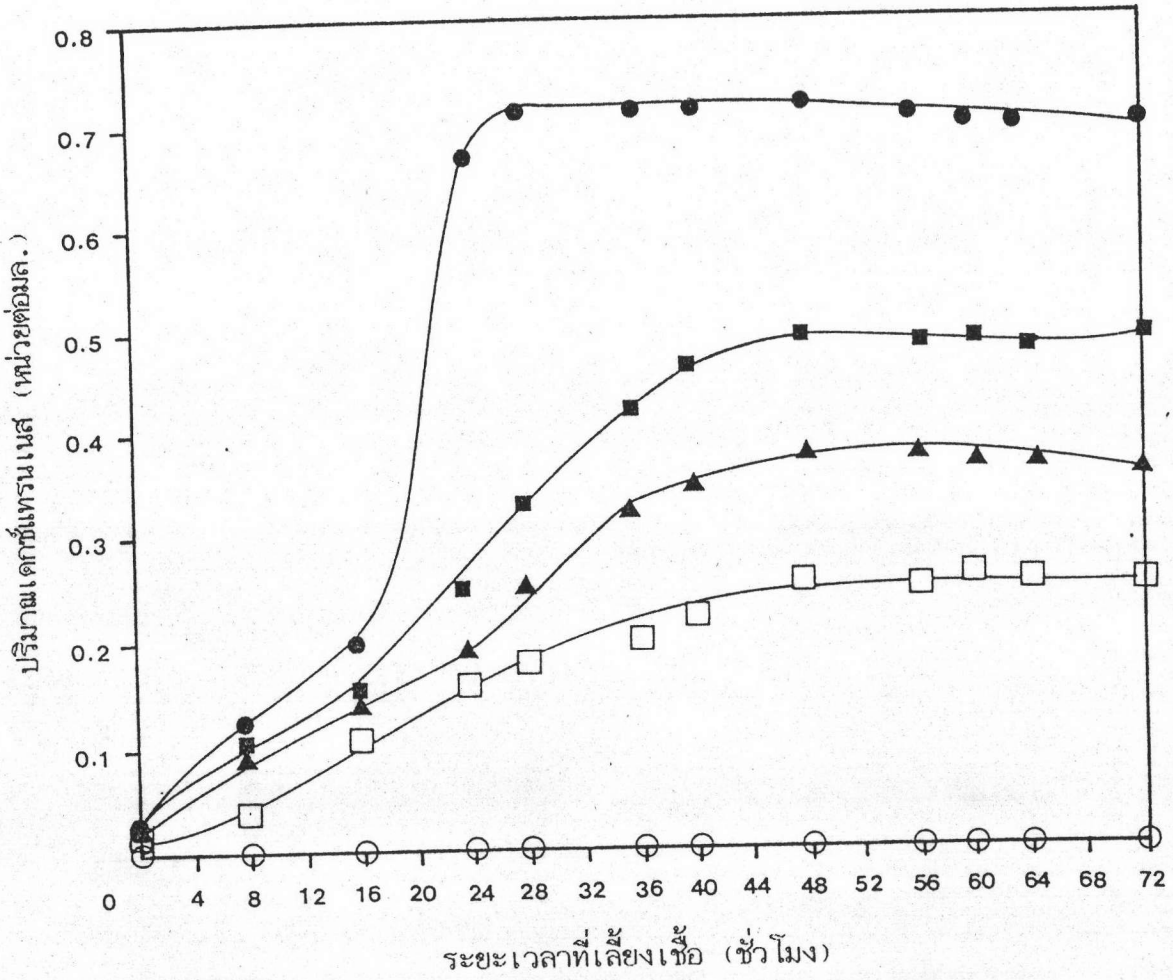
รูปที่ 4ข. ผลของสูตรอาหารชนิดต่างๆ ต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 ในการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ดังภาคผนวก ก.

■ ■ สูตรอาหารดัดแปลงของ Schroder

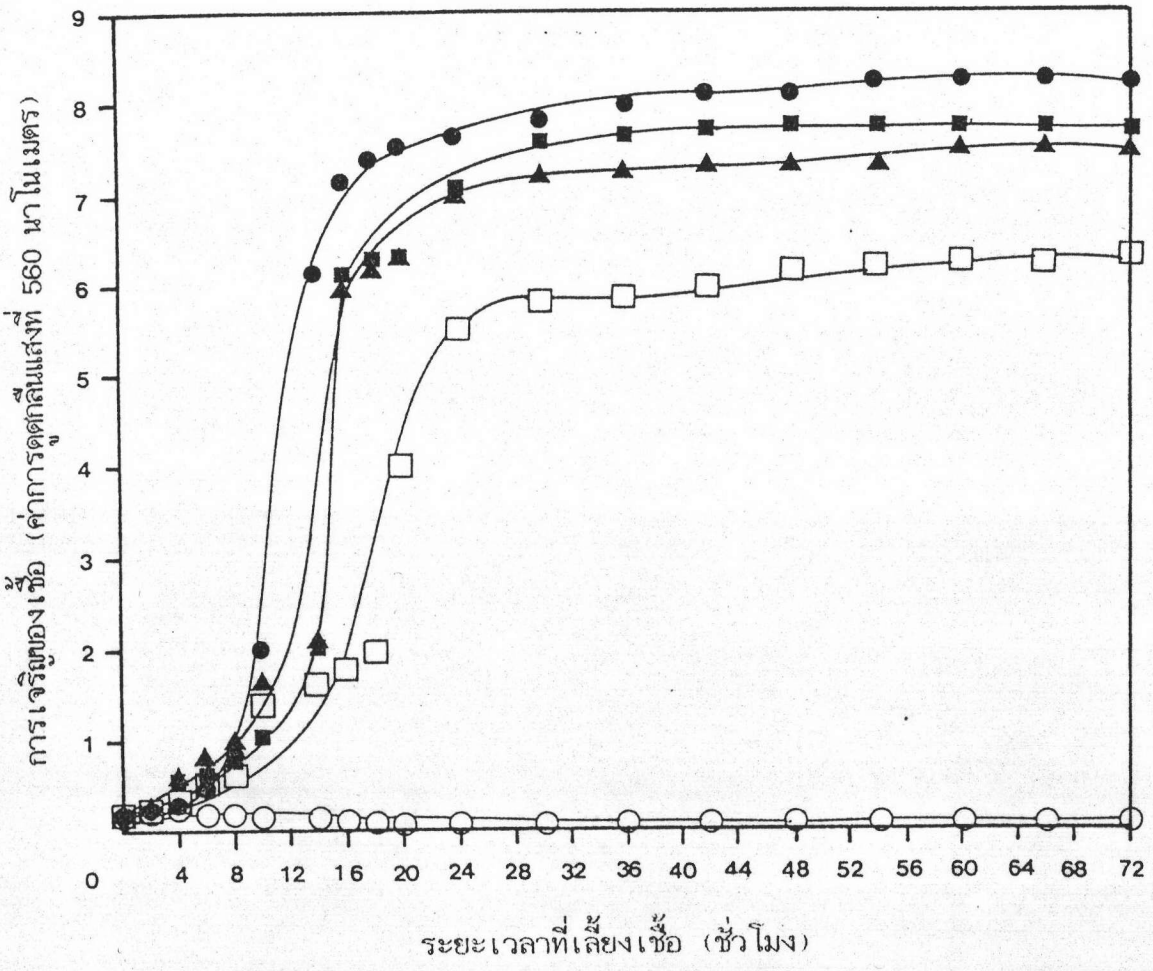
○ ○ สูตรอาหารของ Yamaguchi

▲ ▲ สูตรอาหารดัดแปลงของ Okami

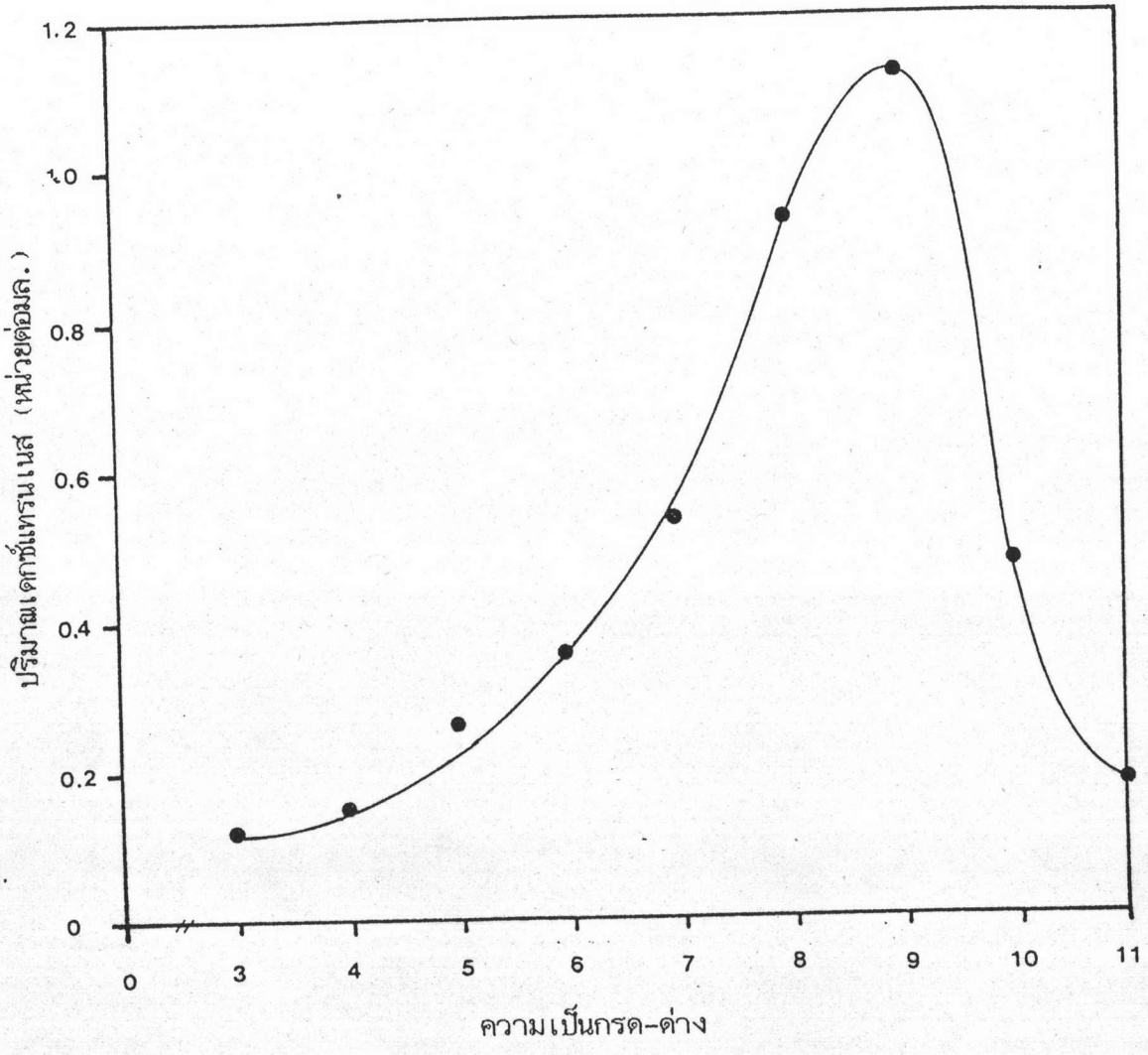
โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 99 ชั่วโมง ภายใต้การเขย่า 200 รอบต่อนาที



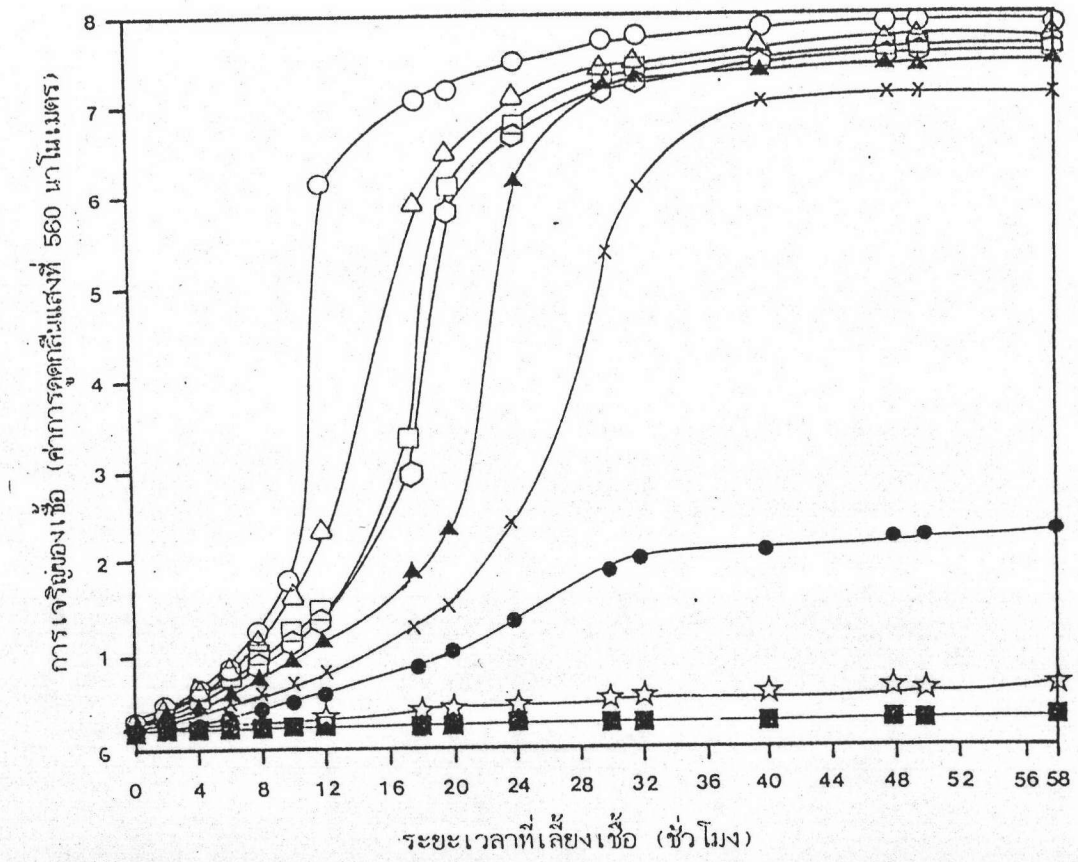
รูปที่ 5ก. ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 โดยแปรผันอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเชื้อในช่วง 25-55 องศาเซลเซียส ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรของ Yamaguchi ที่ประกอบด้วย 1.0% เดกซ์แทรน , 0.2% K_2HPO_4 , 0.1% KH_2PO_4 , 0.01% $MgSO_4$, 0.01% ผงสกัดจากยีสต์ และ 1.0% โพลีเปปโตน ภายใต้การเขย่า 200 รอบต่อนาที ดังในรูป โดย ■ ■ 28-30 °C ● ● 30-35 °C ▲▲40 °C □□45 °C○○50 °C



รูปที่ 5ข. ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 โดยแปรผันอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเชื้อในช่วง 25-55 องศาเซลเซียส ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรของ Yamaguchi ที่ประกอบด้วย 1.0% เดกซ์แทรน , 0.2% K_2HPO_4 , 0.1% KH_2PO_4 , 0.01% $MgSO_4$, 0.01% ผงสกัดจากยีสต์ และ 1.0% โพลีเปปโตน ภายใต้การเขย่า 200 รอบต่อนาที ดังในรูป โดย ■ ■ 28-30 °C ● ● 30-35 °C ▲ ▲ 40 °C □ □ 45 °C ○ ○ 50 °C



รูปที่ 6ก. ผลของความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรของ Yamaguchi เช่นเดียวกับรูปที่ 5. แต่ปรับสภาวะความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเป็น 3-11 ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้การเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



รูปที่ 6ข. ผลของความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรของ Yamaguchi เช่นเดียวกับในรูปที่ 5. แต่ปรับสภาวะความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเป็น 3.0-11.0 และเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้การเขย่า 200 รอบต่อนาที

pH 3 ■■ pH 4 ●● pH 5 ▲▲ pH 6 □□
pH 7 ○○ pH 8 △△ pH 9 ⬡⬡ pH 10 x x
pH 11 ☆☆

อาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 9 พบว่า เชื้อสามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดเมื่อมีเกลือโซเดียมคลอไรด์อยู่ 2.5 % โดยให้ปริมาณเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 1.23 หน่วยต่อมล.และเมื่อไม่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ลงไป เชื้อสามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ได้ดีเช่นกัน ดังแสดงในรูปที่ 7ก. และ 7ข.

6.ความจำเพาะของสารชักนำการสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

จากการทดลองเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการแปรผันชนิดของคาร์โบไฮเดรตที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งได้แก่ เดกซ์แทรนชนิดเกรดอุตสาหกรรม น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุคโตส น้ำตาลมอลโตส น้ำตาลเซลโลไบโอส น้ำตาลซูโครส แอลฟา-เซลลูโลส และแป้ง (soluble starch) พบว่า เชื้อสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีคาร์โบไฮเดรตทุกชนิดแต่ปริมาณเอนไซม์ที่เชื้อผลิตออกมาจะแตกต่างกันไป โดยพบว่า เมื่อใช้เดกซ์แทรนเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้เอนไซม์สูงสุด ในขณะที่ แอลฟา-เซลลูโลส สามารถชักนำให้มีการสร้างเอนไซม์นี้ได้ 52.8% ของเอนไซม์ที่ได้จากการชักนำด้วยเดกซ์แทรนและคาร์โบไฮเดรตชนิดอื่นสามารถชักนำได้บ้าง ดังแสดงในตารางที่ 8

<u>การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมเพื่อการเจริญและผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสของแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 จากสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อของ Yamaguchi</u>

7.ผลความเข้มข้นของเดกซ์แทรนต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

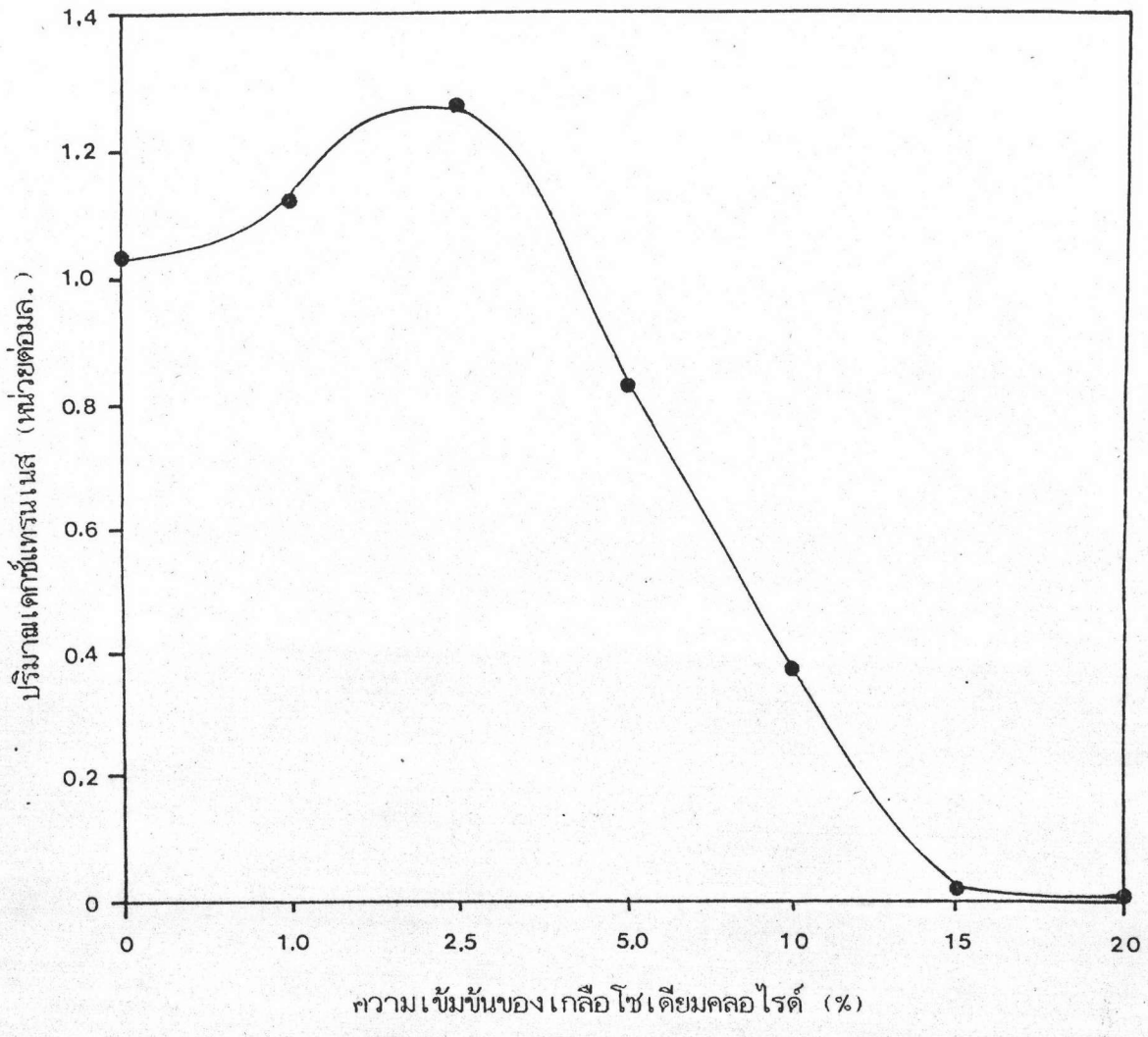
จากการทดลองเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 โดยแปรผันปริมาณของเดกซ์แทรนชนิดอุตสาหกรรมในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ 0-2.0% พบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเดกซ์แทรนลงไป 0.5% จะให้เอนไซม์สูงสุด 2.4 หน่วยต่อมล. ขณะที่ในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีเดกซ์แทรน(เติมกลูโคส 2.0% เป็นแหล่งคาร์บอนแทน) เชื้อสามารถเจริญได้ดีแต่ไม่มีเอนไซม์เกิดขึ้นเลย (รูปที่ 8ก. และ 8ข.) ดังนั้นจึงเลือกใช้เดกซ์แทรนชนิดอุตสาหกรรมซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 3-5x10 ที่ความเข้มข้น 0.5% เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับเลี้ยงเชื้อต่อไป

8.ผลของเกลือแร่ต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

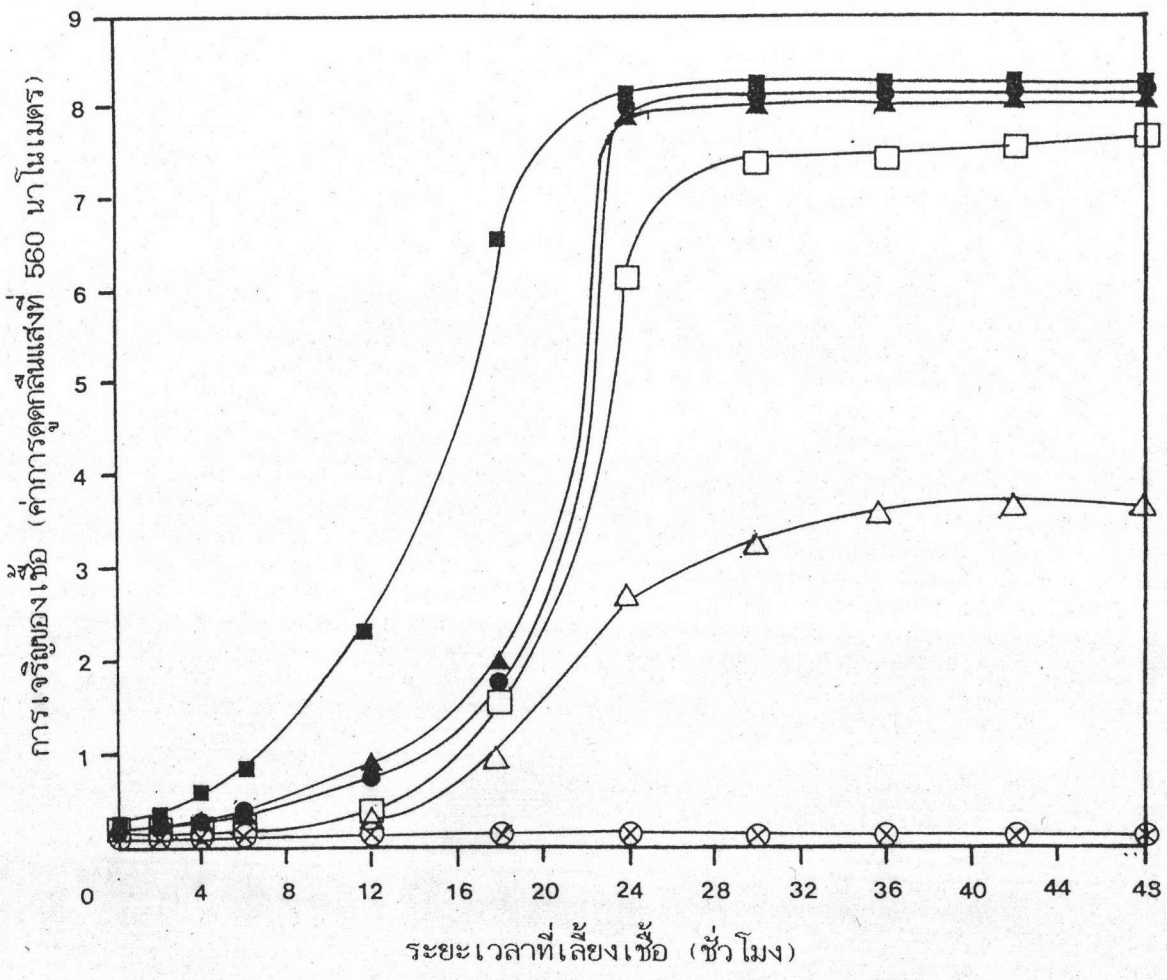
เกลือแร่ต่างๆมีความจำเป็นในการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองศึกษาผลของเกลือแร่ต่อการผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 โดยแปรผันชนิดและปริมาณของเกลือแร่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า

8.1 ผลของไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต

จากการทดลองเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการแปร-



รูปที่ 7ก. ผลของการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรของ Yamaguchi เช่นเดียวกับในรูปที่ 5. แต่แปรผันปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ปรับความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเป็น 9.0 เลี้ยงที่สภาวะเดียวกับการทดลองในรูปที่ 6.



รูปที่ 7ข. ผลของการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรของ Yamaguchi เช่นเดียวกับในรูปที่ 5. แต่แปรผันปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ปรับความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเป็น 9.0 เลี้ยงที่สภาวะเดียวกับการทดลองในรูปที่ 6.

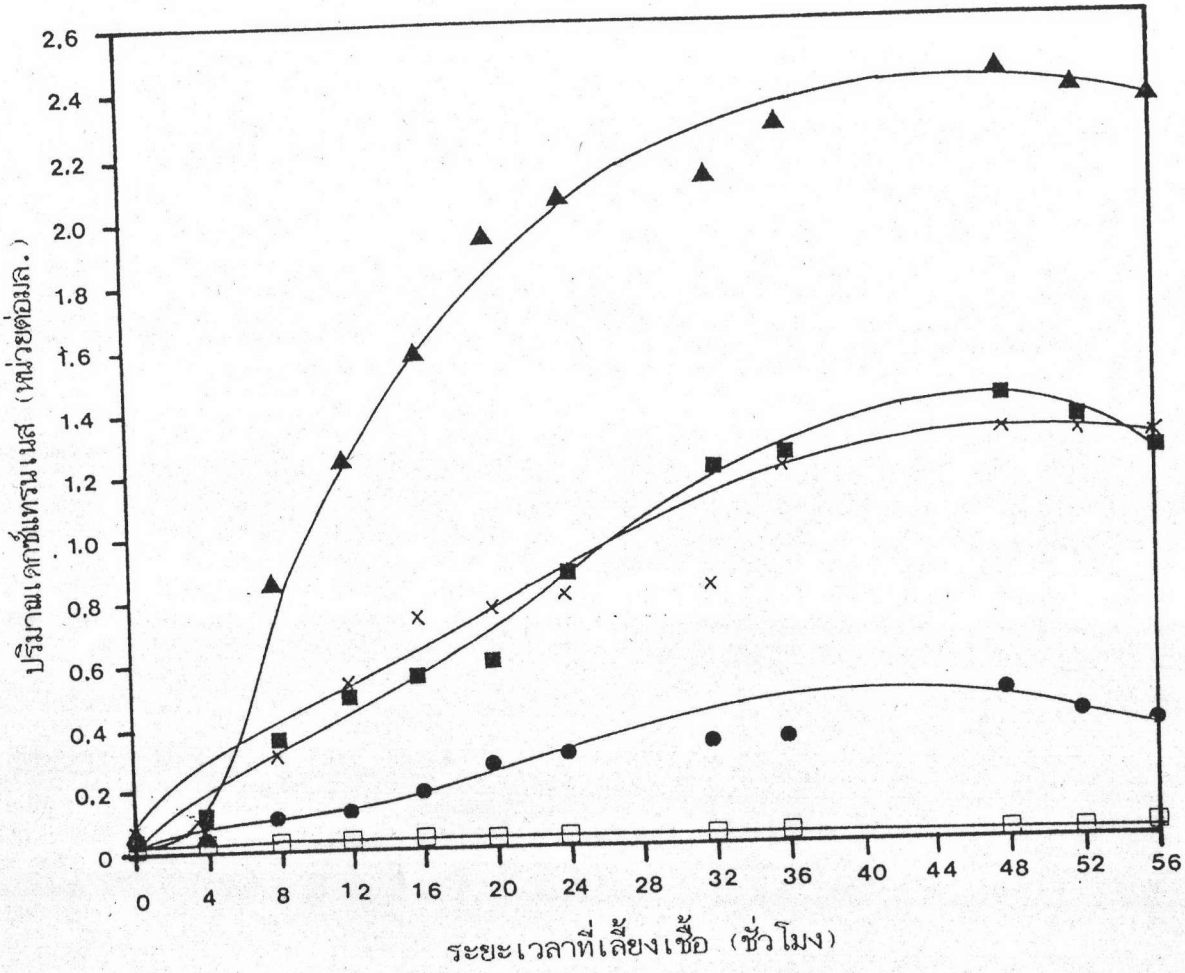
0% NaCl ■ ■ 1% NaCl ● ● 2.5% NaCl ▲ ▲

5% NaCl □ □ 10% NaCl △ △ 15% NaCl ○ ○

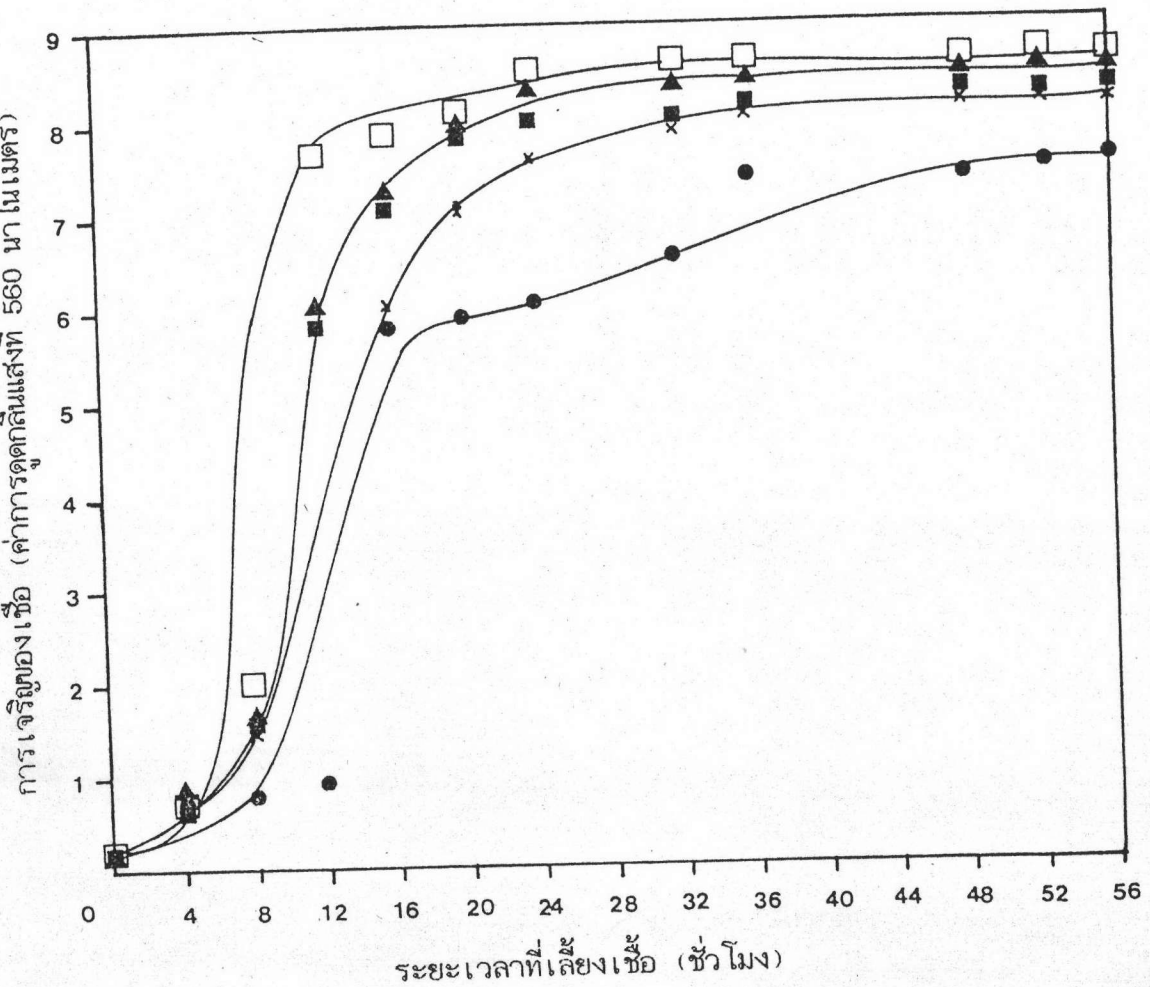
20% NaCl x x

ตารางที่ 8. ผลของคาร์โบไฮเดรตต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10

ชนิดของคาร์โบไฮเดรต	ความเข้มข้น (%)	แอคติวิตีสัมพัทธ์ (%)
น้ำตาลกลูโคส	1.0	12.6
น้ำตาลฟรุคโตส	1.0	18.7
น้ำตาลเซลโลไบโอส	1.0	24.9
น้ำตาลมอลโตส	1.0	26.4
น้ำตาลซูโครส	1.0	32.6
α -เซลลูโลส	1.0	52.8
soluble starch	1.0	27.8
เดกซ์แทรนชนิดเกรดอุตสาหกรรม	1.0	100



รูปที่ 8ก. ผลของปริมาณเดกซ์แทรนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส จากแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรของ Yamaguchi เช่นเดียวกับการทดลองในรูปที่ 5. แต่แปรผันความเข้มข้นของเดกซ์แทรนในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 0.5% ▲▲, 1.0% ■ ■, 1.5% xx , 2.0% ● ● และ กลูโคส 2.0% □ □ ที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 9.0 เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้การเขย่า 200 รอบต่อนาที



รูปที่ 8ข. ผลของปริมาณเดกซ์แทรนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรของ Yamaguchi เช่นเดียวกับการทดลองในรูปที่ 5. แต่แปรผันความเข้มข้นของเดกซ์แทรนในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น
0.5% ▲▲, 1.0% ■ ■, 1.5% ×× , 2.0% ● ● และ กลูโคส 2.0% □ □
ที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 9.0 เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้การเขย่า 200 รอบต่อนาที

ผันความเข้มข้นของไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตตั้งแต่ 0-2.0% พบว่า เมื่อเติมไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตลงไป 1.0% เชื้อจะผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด 3.34 หน่วยต่อมล. แต่ถ้าความเข้มข้นสูงหรือต่ำกว่านี้เชื้อจะผลิตเอนไซม์ได้ลดลง ดังแสดงในรูปที่ 9.

8.2 ผลของโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต

จากการทดลองเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการแปรผันความเข้มข้นของโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตตั้งแต่ 0-1.6% พบว่า เมื่อเติมโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตลงไป 0.4% เชื้อจะผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด 3.61 หน่วยต่อมล.แต่ถ้าเติมลงไปมากกว่านี้จะทำให้การผลิตเอนไซม์ลดลงมาก ดังแสดงในรูปที่ 10.

8.3 ผลของแมกนีเซียมซัลเฟต

จากการทดลองเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการแปรผันความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตตั้งแต่ 0-0.1% พบว่า เมื่อเติมแมกนีเซียมซัลเฟตลงไป 0.05% เชื้อจะผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด 4.05 หน่วยต่อมล.ดังแสดงในรูปที่ 11.

9.ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

จากการทดลองเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 โดยแปรผันชนิดและปริมาณของสารประกอบไนโตรเจนทั้งในรูปของสารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ ตลอดจนสารอินทรีย์ที่อยู่ในรูปสารประกอบที่ซับซ้อน พบว่า

9.1 สารประกอบอนินทรีย์ไนโตรเจนในรูปของเกลือไนเตรท

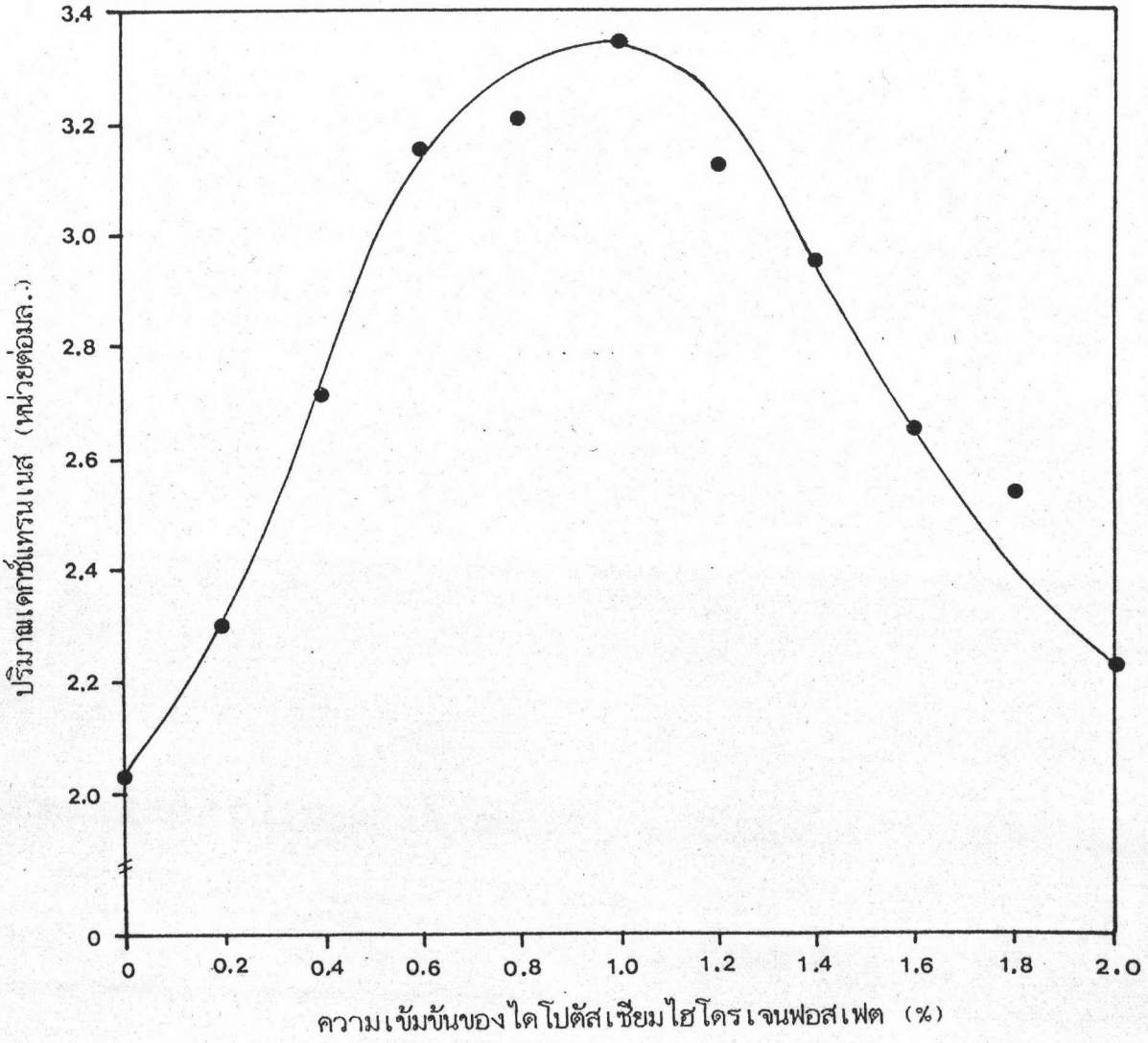
เมื่อทดลองใช้สารประกอบอนินทรีย์ไนโตรเจนในรูปของเกลือไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนแทนโพลีเปปโตน ได้แก่ โปตัสเซียมไนเตรท แอมโมเนียมไนเตรท และโซเดียมไนเตรท โดยแปรผันความเข้มข้นตั้งแต่ 0-1.0% พบว่า เชื้อผลิตเอนไซม์ได้ค่อนข้างต่ำ โดยให้ปริมาณเอนไซม์สูงสุดเพียง 1.66 หน่วยต่อมล. ดังแสดงในตารางที่ 9.

9.2 สารประกอบอนินทรีย์ไนโตรเจนในรูปของเกลือแอมโมเนียม

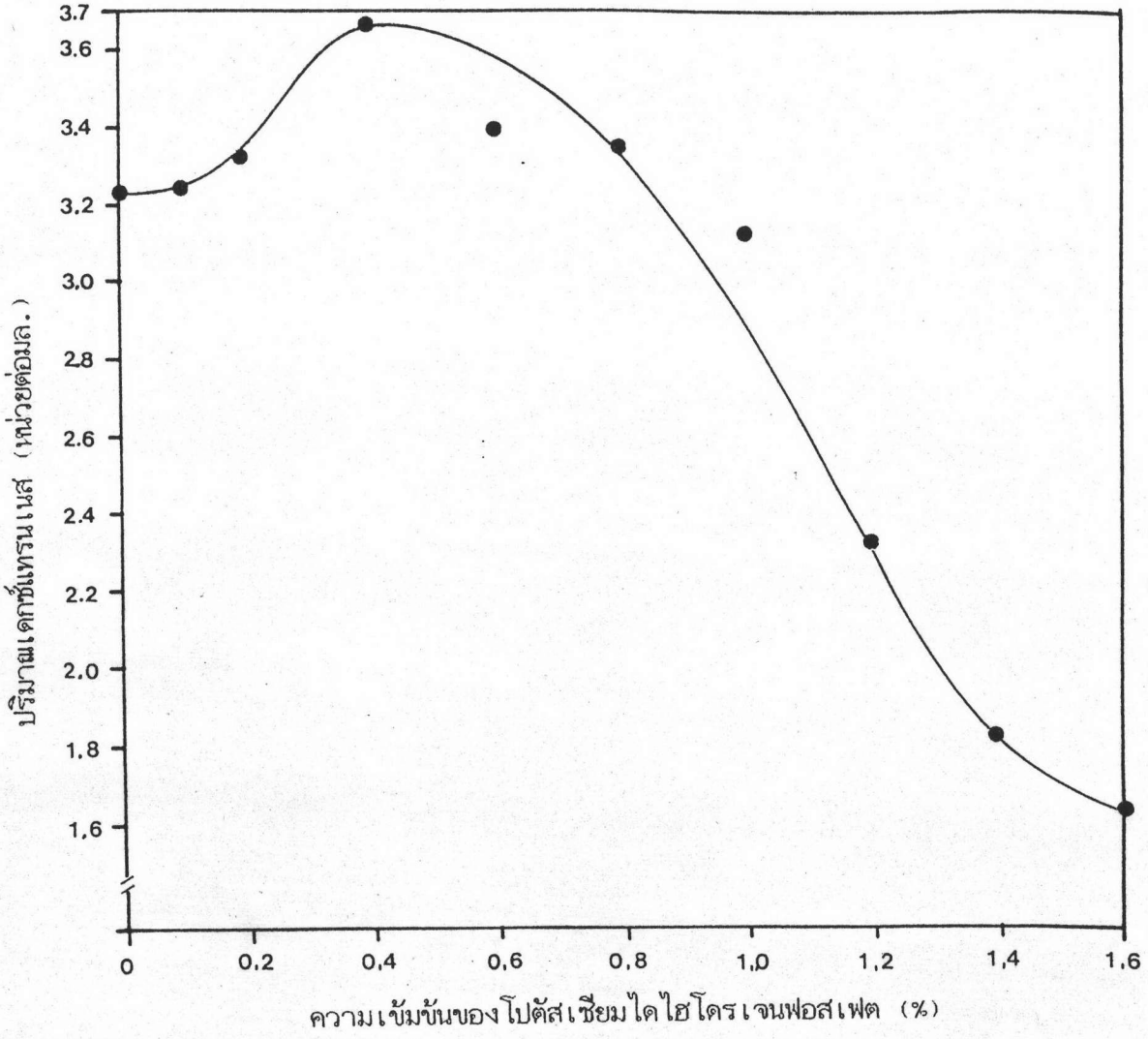
เมื่อทดลองใช้สารประกอบอนินทรีย์ไนโตรเจนในรูปของเกลือแอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจนแทนโพลีเปปโตน ได้แก่ แอมโมเนียมคลอไรด์ และแอมโมเนียมซัลเฟต โดยแปรผันความเข้มข้นตั้งแต่ 0-1.0% พบว่า เชื้อผลิตเอนไซม์ได้ค่อนข้างต่ำ โดยให้ปริมาณเอนไซม์สูงสุดเพียง 1.67 หน่วยต่อมล. ดังแสดงในตารางที่ 9.

9.3 สารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจน

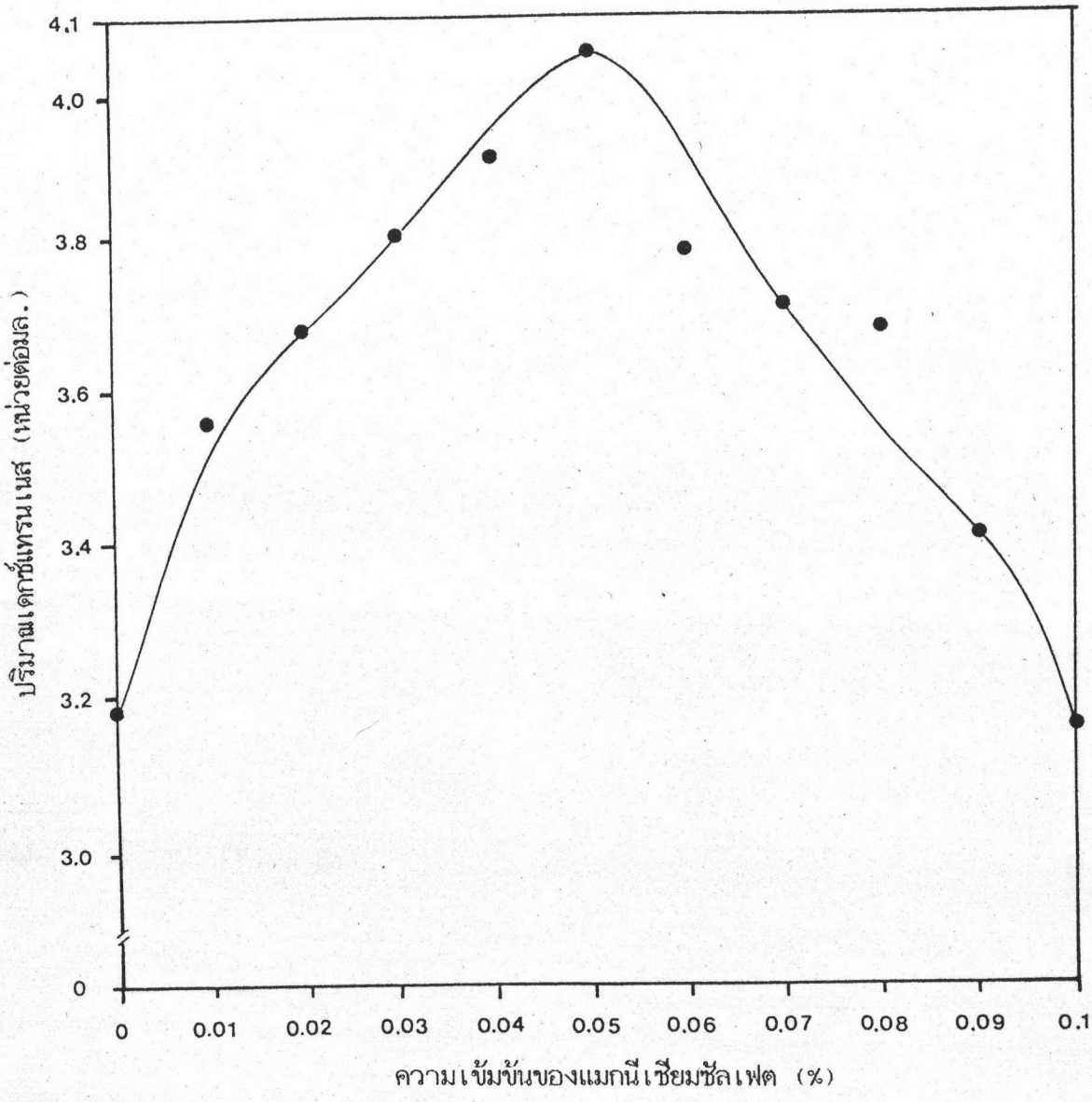
เมื่อทำการทดลองเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 โดยแปรผันความเข้มข้นของโพลีเปปโตนตั้งแต่ 0-1.0% พบว่า ที่ความเข้มข้น 1.0% จะให้ปริมาณเอนไซม์ค่อนข้างสูง คือ 4.05 หน่วยต่อมล. และเมื่อแปรผันแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ซับซ้อน แทนโพลีเปปโตน ซึ่งได้แก่ กรดคาซามิโน ผงสกัดจากยีสต์ และ corn steep liquor ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-2.0% พบว่า เมื่อใช้ผงสกัดจากยีสต์ และ corn steep



รูปที่ 9. ผลของการเติมไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ความเข้มข้นต่างๆ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรของ Yamaguchi ที่ปรับปรุงปริมาณเดกซ์แทรนแล้วจากการทดลองในรูปที่ 8. แต่แปรผันปริมาณของไดโปตัสเซียมไฮโดรเจน-ฟอสเฟต ปรับความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเป็น 9.0 เลี้ยงที่สภาวะเดียวกับการทดลองในรูปที่ 6.



รูปที่ 10. ผลของการเติมโปตัสไดเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ความเข้มข้นต่างๆ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับปรุงแล้วจากการทดลองในรูปที่ 9. แต่แปรผันปริมาณของโปตัสไดเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ปรับความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเป็น 9.0 เลี้ยงที่สภาวะเดียวกับการทดลองในรูปที่ 6.



รูปที่ 11. ผลของการเติมแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) ความเข้มข้นต่างๆเพื่อผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับปรุงแล้วจากการทดลองในรูปที่ 10. แต่แปรผันปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟต ปรับความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเป็น 9.0 เลี้ยงที่สภาวะเดียวกับการทดลองในรูปที่ 6.

ตารางที่ 9. การใช้สารประกอบไนโตรเจนชนิดต่างๆและความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

ชนิดของสารประกอบ	ปริมาณเดกซ์แทรนเนสที่ผลิต (หน่วยต่อมล.)						
	ความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจน						
	0.1%	0.2%	0.3%	0.5%	1.0%	1.5%	2.0%
สารอนินทรีย์ไนโตรเจน							
โปตัสเซียมไนเตรต	1.65	1.46	1.24	1.02	0.86	ND	ND
แอมโมเนียมไนเตรต	1.23	1.67	1.37	1.21	1.09	ND	ND
โซเดียมไนเตรต	0.76	1.24	1.63	1.49	1.32	ND	ND
แอมโมเนียมคลอไรด์	ND	1.70	ND	1.66	1.26	ND	ND
แอมโมเนียมซัลเฟต	ND	1.29	ND	1.47	1.07	ND	ND
สารอินทรีย์ไนโตรเจนที่ซับซ้อน							
โพลีเปปโตน	ND	1.09	ND	2.17	4.05	4.13	4.26
กรดคาซามิโน	ND	0.71	ND	1.26	2.94	4.02	5.05
ผงสกัดจากยีสต์	ND	0.82	ND	0.79	1.94	2.44	1.86
Corn steep liquor	ND	0.22	ND	1.51	2.27	1.86	1.63

ND = ไม่ได้ตรวจสอบที่ความเข้มข้นนั้น

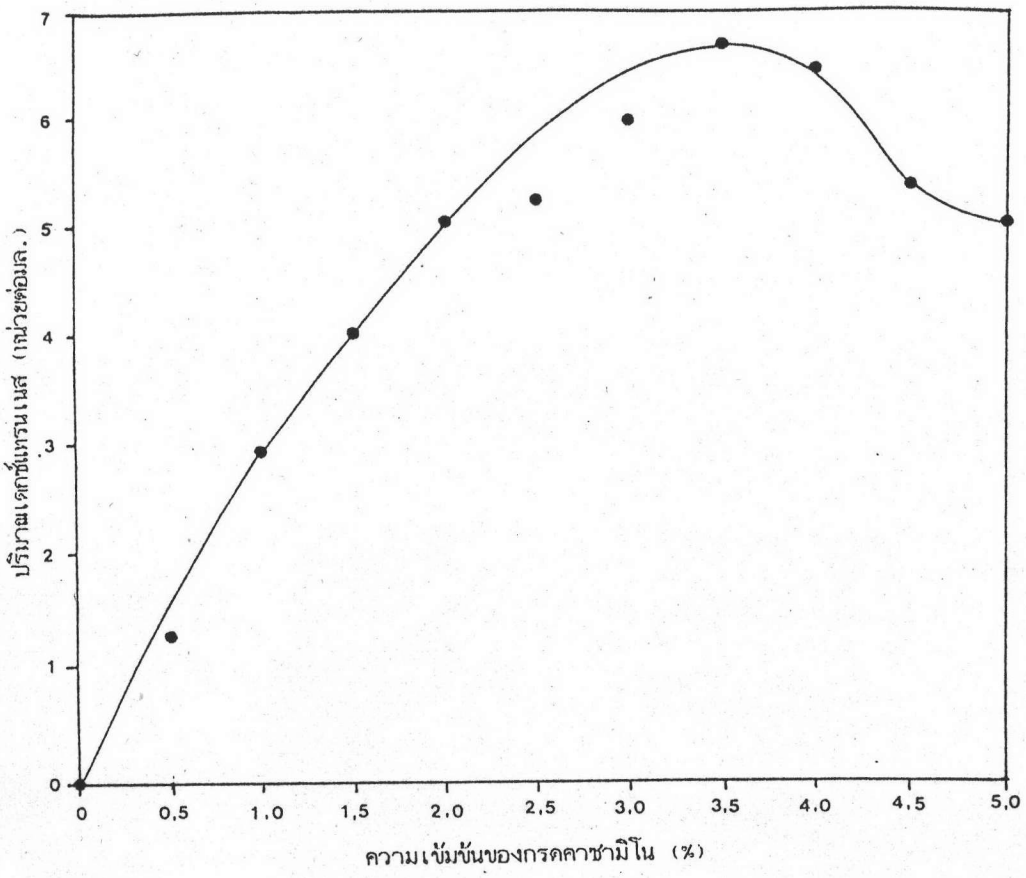
liquor ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-2.0% พบว่า เมื่อใช้ผงสกัดจากยีสต์ และ corn steep liquor เป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อจะผลิตเอนไซม์ได้ค่อนข้างต่ำ โดยให้ปริมาณเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 2.44 หน่วยต่อมล.และ 2.27 หน่วยต่อมล. เมื่อใช้ผงสกัดจากยีสต์ที่มีความเข้มข้น 1.5% และ corn steep liquor ที่มีความเข้มข้น 1.0% ตามลำดับ แต่เมื่อใช้กรดคาซามิโนเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า ที่ความเข้มข้น 2.0% เชื้อผลิตเอนไซม์ได้เท่ากับ 5.05 หน่วยต่อมล.ซึ่งสูงกว่าเมื่อเลี้ยงในโพลีเปปโตนความเข้มข้น 2.0% รวมทั้งเชื้อมีแนวโน้มที่จะผลิตเอนไซม์ได้สูงขึ้น ดังนั้นจึงทำการขยายช่วงความเข้มข้นของกรดคาซามิโนที่เป็น 0-5.0% พบว่า เชื้อจะผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดเมื่อเติมกรดคาซามิโนลงไป 3.5% โดยให้ปริมาณเอนไซม์ 6.7 หน่วยต่อมล. ดังแสดงในรูปที่ 12. ดังนั้นจึงเลือกใช้กรดคาซามิโนที่ความเข้มข้น 3.5% เป็นแหล่งไนโตรเจนของการเลี้ยงเชื้อต่อไป

10. ผลของผงสกัดจากยีสต์ต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

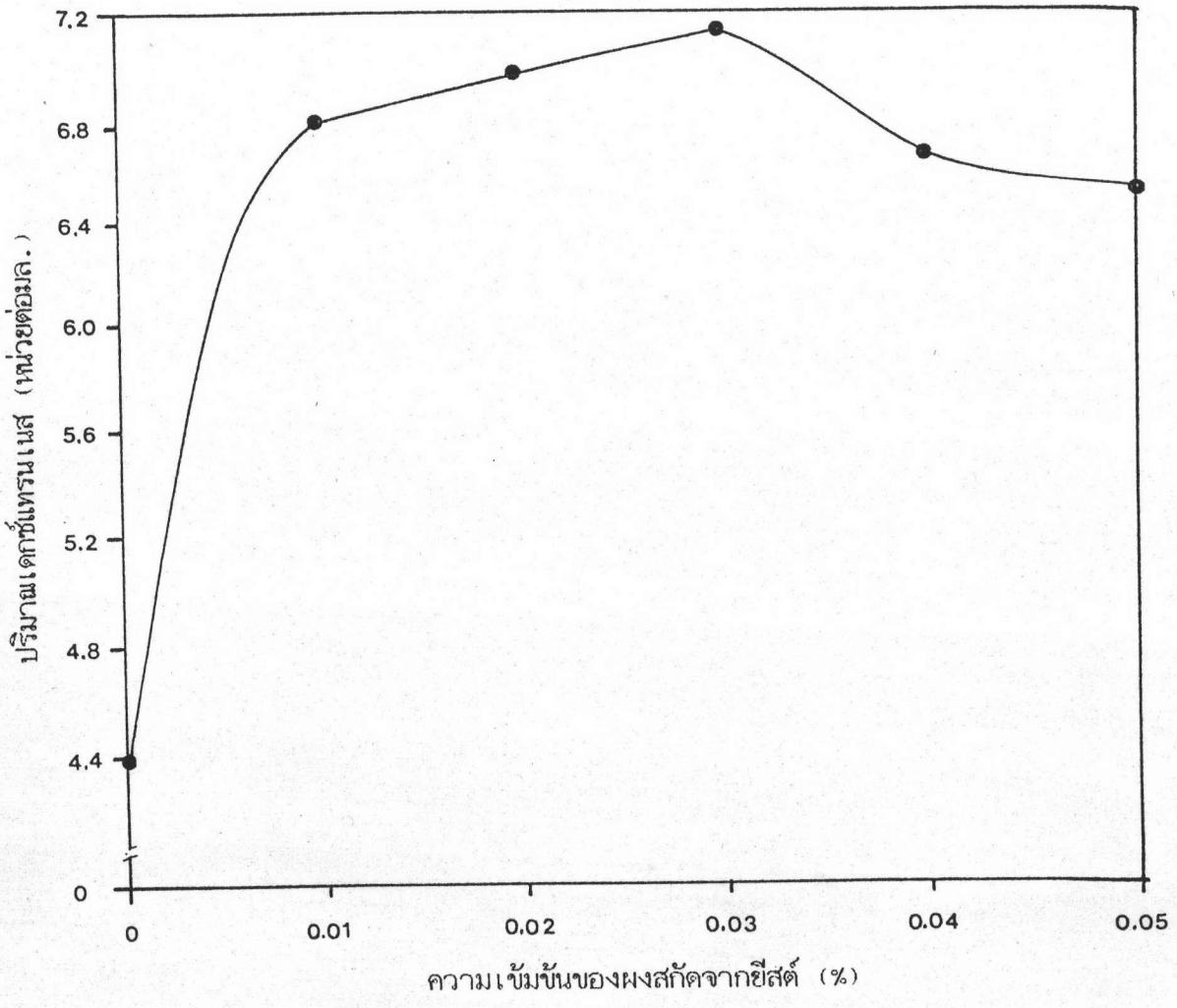
จากการทดลองเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการแปรผันความเข้มข้นของผงสกัดจากยีสต์ตั้งแต่ 0-.05% พบว่า เชื้อจะผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดเมื่อเติมผงสกัดจากยีสต์ลงไป 0.03% โดยได้เอนไซม์ 7.1 หน่วยต่อมล. ดังแสดงในรูปที่ 13.

11. ผลของแร่ธาตุต่างๆต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

จากการทดลองแปรผันปริมาณของแร่ธาตุต่างๆที่มีอยู่ในน้ำทะเลที่ใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเปรียบเทียบการเติมและไม่เติมแร่ธาตุนั้นๆ ผลการทดลองได้แสดงไว้ในตารางที่ 10. โดยปริมาณของเกลือแร่ต่างๆที่เติมลงไปในสารอาหาร มีดังนี้ คือ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ 6.0×10^{-3} โมลาร์ แอมโมเนียมซัลเฟต 8.0×10^{-3} โมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ 2.0×10^{-3} โมลาร์ กรดบอริค 3.0×10^{-5} โมลาร์ โซเดียมโมลิบเดต 2.0×10^{-6} โมลาร์ แมงกานีสคลอไรด์ 2.0×10^{-6} โมลาร์ ซิงค์ซัลเฟต 1.7×10^{-8} โมลาร์ คอปเปอร์ซัลเฟต 1.6×10^{-9} โมลาร์ โคบอลท์คลอไรด์ 4.2×10^{-9} โมลาร์



รูปที่ 12. ผลของกรดคาซามิโนต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 โดยเลี้ยงเชื้อในสภาวะเดียวกันกับการทดลองในรูปที่ 6 โดยแปรผันความเข้มข้นตั้งแต่ 0-5.0%



รูปที่ 13. ผลการเติมผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) ความเข้มข้นต่างๆเพื่อผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับปรุงแล้วจากการทดลองในรูปที่ 12. แต่แปรผันปริมาณผงสกัดจากยีสต์ในอาหาร ปรับความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเป็น 9.0 เลี้ยงที่สภาวะเดียวกับการทดลองในรูปที่ 6.

ตารางที่ 10. ผลของแร่ธาตุในน้ำทะเลเทียมที่มีต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

ชนิดของแร่ธาตุ	ปริมาณที่เติม (โมลาร์)	ปริมาณเอนไซม์ (หน่วยต่อมล.)	
		ในสภาวะปกติ	เมื่อไม่เติม
Tris-HCl	6.0×10^{-3}	8.16	2.29
$(NH_4)_2SO_4$	8.0×10^{-3}	8.25	6.98
$CaCl_2$	2.0×10^{-3}	8.19	3.05
H_3BO_3	3.0×10^{-5}	8.21	3.64
Na_2MoO_4	2.0×10^{-6}	7.53	5.61
$MnCl_2$	2.0×10^{-6}	7.50	7.31
$ZnSO_4$	1.7×10^{-8}	7.46	7.40
$CuSO_4$	1.6×10^{-9}	7.50	7.80
$CoCl_2$	4.2×10^{-9}	7.50	7.27

ดังนั้นในการเตรียมน้ำทะเลจะเติมแร่ธาตุต่างๆในปริมาณปกติ ยกเว้น $CuSO_4$

จากการศึกษาดังกล่าวทำให้ได้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 เพื่อผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส โดยสรุปไว้ในตารางที่ 11.

12. ผลของระยะเวลาต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

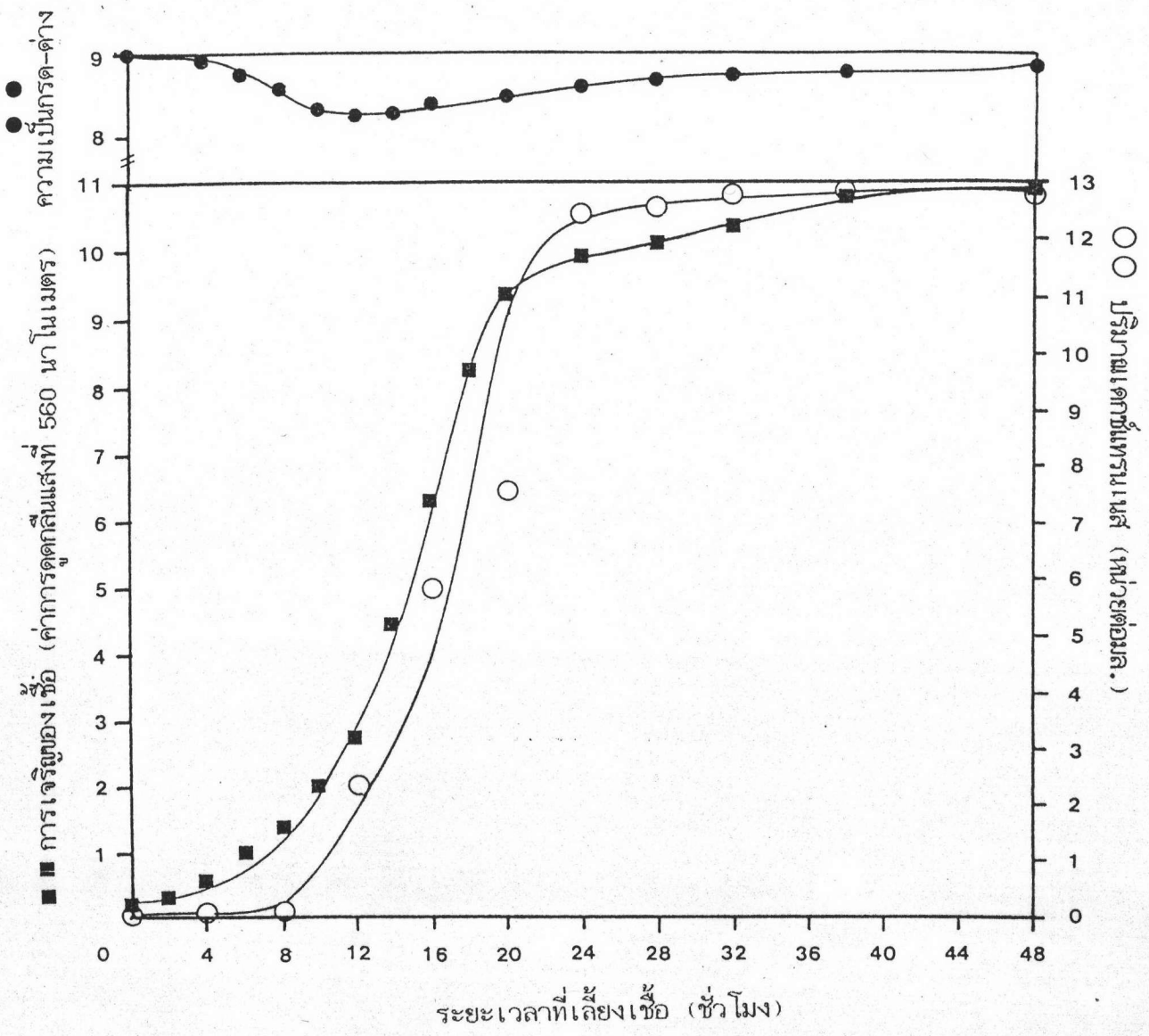
จากการศึกษาผลของการเจริญและการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสของแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ทำการปรับปรุงแล้ว พบว่า เชื้อ Z-10 จะเริ่มสร้างเอนไซม์หลังจากเลี้ยงเชื้อได้ 8 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะที่เชื้อมีการเจริญเข้าสู่ช่วง early log phase และเชื้อจะให้เอนไซม์สูงเมื่อเชื้อมีการเจริญอยู่ในช่วง late log phase จนถึงช่วง stationary phase โดยเชื้อจะให้เอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 12.8 หน่วยต่อมล.ซึ่งเพิ่มขึ้นประมาณ 33 เท่า เมื่อเทียบกับปริมาณเอนไซม์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในสภาวะและสูตรอาหารก่อนการปรับปรุง (0.38 หน่วยต่อมล.) และมีการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่างเพียงเล็กน้อยอยู่ในช่วง 8-9 ดังแสดงในรูปที่ 14.

ตารางที่ 11. แสดงสูตรอาหารเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 ที่ได้ทำการปรับปรุงแล้ว

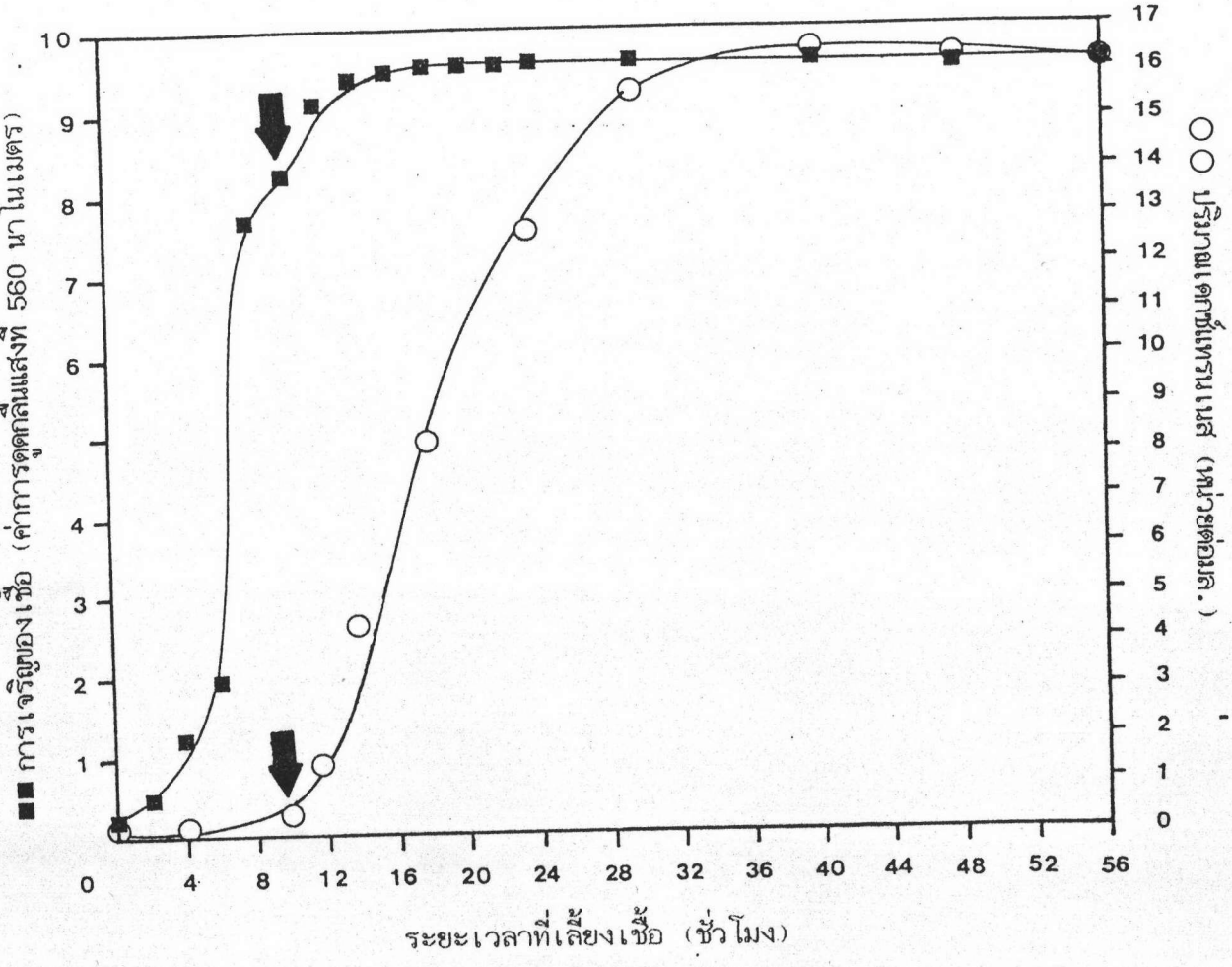
สารอาหาร	ความเข้มข้น (%)	
	สูตรเดิม	สูตรปรับปรุง
เดกซ์แทรน	1.0	0.5
กรดคาซามิโน★	-	3.5
ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.4	1.0
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.2	0.4
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.01	0.05
ผงสกัดจากยีสต์	0.01	0.03
NaCl	25 กรัม	25 กรัม
Tris-HCl	1 กรัม	1 กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	1 กรัม	1 กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	1 กรัม	1 กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.3 กรัม	0.3 กรัม
H_3BO_3	2 มิลลิกรัม	2 มิลลิกรัม
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.5 มิลลิกรัม	0.5 มิลลิกรัม
$MnCl_2.4H_2O$	0.4 มิลลิกรัม	0.4 มิลลิกรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	50 ไมโครกรัม	50 ไมโครกรัม
$CuSO_4.5H_2O$	0.4 ไมโครกรัม	- ไมโครกรัม
$CoCl_2.6H_2O$	1 ไมโครกรัม	1 ไมโครกรัม

★สูตรเดิมเป็นโพลีเปปโตน 1.0%

ปรับความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเป็น 9.0



รูปที่ 14. ผลความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 กับการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ทำการปรับปรุงแล้วซึ่งประกอบด้วย เดกซ์แทรน (industrial grade , น้ำหนักโมเลกุล 3-50 x 10^6) 0.5% ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 1.0% โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 0.4% แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) 0.05% ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) 0.03% และ กรดคาซามิโน (Casamino acid) 3.5% ในน้ำทะเลที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 2.5% ปรับความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเป็น 9.0 ภายใต้การเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง



รูปที่ 15. ผลของการชักนำของเดกซ์แทรนต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ทำการปรับปรุงแล้วซึ่งประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคส 0.5% ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 1.0% โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 0.4% แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) 0.05% ผงยีสต์สกัด (Yeast extract) 0.03% และกรดคาซามิโน (Casamino acid) 3.5% ในน้ำทะเลเทียมที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 2.5% ปรับความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเป็น 9.0 ภายใต้การเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 56 ชั่วโมง โดยเติมเดกซ์แทรน (industrial grade, น้ำหนักโมเลกุล $3-50 \times 10^6$) ที่ความเข้มข้น 0.25% ในชั่วโมงที่ 10 (ลูกศร)

13. ผลการชักนำให้แบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 ผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

จากการทดลองเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ปรับปรุงแล้วแต่เปลี่ยนแหล่งคาร์บอนจากเดกซ์แทรนเป็นน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้น 2% จนกระทั่งเชื้อเจริญอยู่ในช่วง late log phase คือประมาณชั่วโมงที่ 10 จากนั้นจึงเติมเดกซ์แทรนลงไปโดยให้ความเข้มข้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 0.25% พบว่า ในขณะที่เชื้อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเชื้อเจริญเติบโตดีแต่ไม่มีเอนไซม์เกิดขึ้น แต่หลังจากที่เติมเดกซ์แทรนลงไปในชั่วโมงที่ 12 เชื้อจึงเริ่มมีการผลิตเอนไซม์ขึ้นมา โดยเชื้อจะผลิตเอนไซม์ออกมาสูงถึง 16.3 หน่วยต่อมล. ในชั่วโมงที่ 40 ของการเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในรูปที่ 15.

การศึกษาสมบัติของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10

1. สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

1.1 ผลของความเป็นกรด-ด่างต่อการทำงานของเอนไซม์

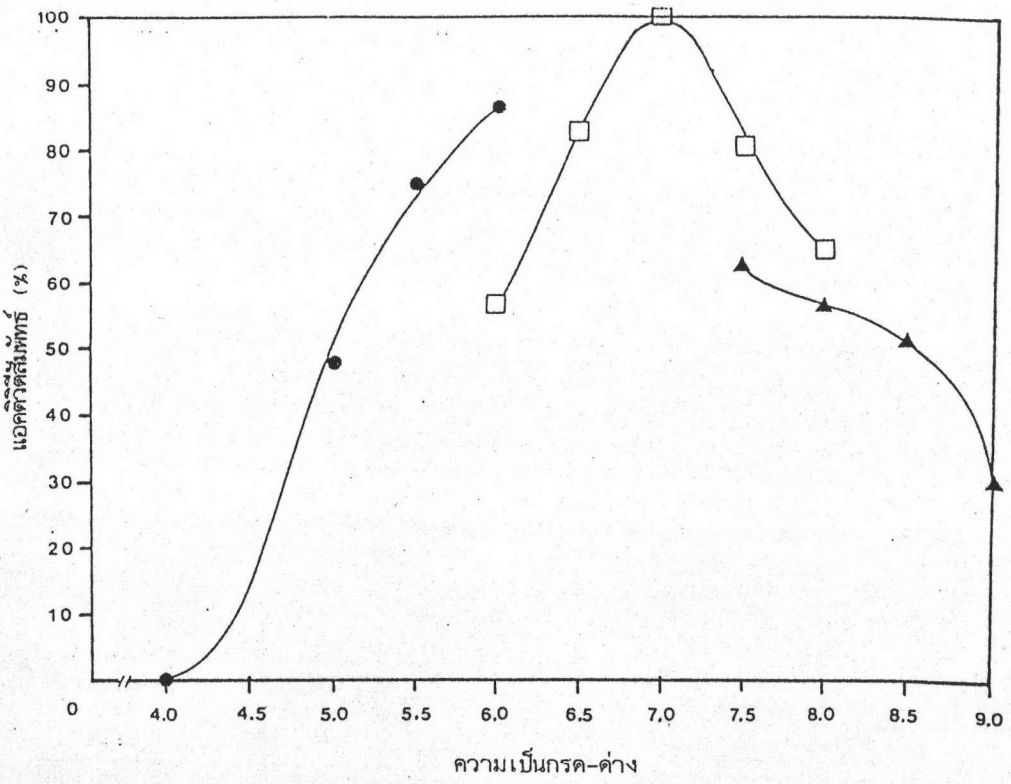
ในการทดลองนี้แปรผันบัฟเฟอร์ที่ใช้ในสารผสมของปฏิกิริยาเพื่อตรวจสอบเอนไซม์แอคติวิตี โดยใช้บัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์และมีช่วงความเป็นกรด-ด่างตั้งแต่ 4.0-9.0 จำนวน 3 ชนิด คือ

ซิเตรต-ฟอสเฟต บัฟเฟอร์	ในช่วงความเป็นกรด-ด่างตั้งแต่ 4.0-7.0
ฟอสเฟต บัฟเฟอร์	ในช่วงความเป็นกรด-ด่างตั้งแต่ 6.0-8.0
ทริส-(ไฮดรอกซีมีเทน) อะมิโนมีเทน บัฟเฟอร์	ในช่วงความเป็นกรด-ด่างตั้งแต่ 7.5-9.0

โดยบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในการตรวจสอบแอคติวิตี จากนั้นเทียบหาแอคติวิตีสัมพัทธที่สภาวะมาตรฐาน คือ ที่ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 พบว่าเอนไซม์จะมีแอคติวิตีสูงสุดในช่วงความเป็นกรด-ด่างตั้งแต่ 6.5-7.5 โดยเฉพาะที่ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 เอนไซม์จะมีแอคติวิตีสูงสุด ดังแสดงในรูปที่ 16.

1.2 ความเสถียรต่อความเป็นกรด-ด่าง

จากการศึกษาความเสถียรต่อความเป็นกรด-ด่างด้วย ซิเตรต-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์และทริส-(ไฮดรอกซีมีเทน)อะมิโนมีเทนบัฟเฟอร์ ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.05 โมลาร์ในช่วงความเป็นกรด-ด่างตั้งแต่ 4.0-9.0 โดยบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปตรวจสอบแอคติวิตี หลังจากนั้นจึงนำไปตรวจสอบแอคติวิตีและเทียบหาแอคติวิตีสัมพัทธที่สภาวะมาตรฐานเช่นเดียวกับข้อ 1.1 พบว่าเอนไซม์จะเสถียรต่อความเป็นกรด-ด่างได้ดี โดยมีแอคติวิตีสัมพัทธ 100% ในช่วงความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.5-8.0 และมีแอคติวิตีสัมพัทธลดลงเหลือ 90% ที่ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ



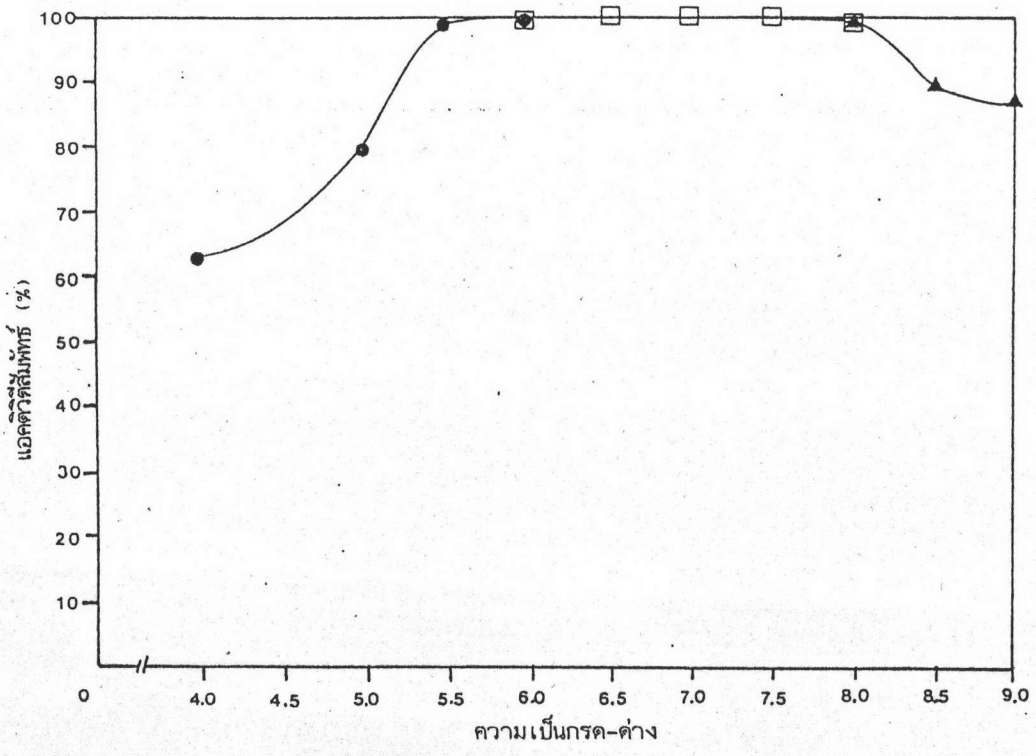
รูปที่ 16. ผลของความเป็นกรดด่างต่อการทำงานของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 โดยบ่มเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ดังนี้

●● ซิเตรต-ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (4.0-7.0)

□ □ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (6.0-8.0)

▲ ▲ ทริส(ไฮดรอกซีมีเทน) อะมิโนมีเทน บัฟเฟอร์ (7.5-9.0)

ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ และหาแอคติวิตีสัมพัทธเทียบกับสภาวะมาตรฐานซึ่งได้แก่ สภาวะที่มีฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ และมีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส



รูปที่ 17. ผลของความเสถียรของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 ต่อความเป็นกรดด่าง โดยบ่มเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆที่มีความเป็นกรด-ด่างในช่วง 4.0-9.0 ได้แก่

● ● ซิเตรต-ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (4.0-7.0)

□□ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (6.0-8.0)

▲ ▲ ทริส(ไฮดรอกซีมีเทน) อะมิโนมีเทน บัฟเฟอร์ (7.5-9.0)

ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงตรวจสอบแอคติวิตีและหาแอคติวิตีสัมพัทธเทียบกับที่ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0

9.0 ดังแสดงในรูปที่ 17.

1.3 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์

จากการแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มสารผสมของปฏิกิริยาตามวิธีในข้อ 5 ซึ่งใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์และความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 และบ่มเป็นเวลา 30 นาที ในการตรวจสอบแอคติวิตี จากนั้นเทียบหาแอคติวิตีสัมพัทธที่สภาวะมาตรฐาน คือ ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พบว่า เอนไซม์จะทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิแคบๆ และเอนไซม์จะมีแอคติวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส แอคติวิตีของเอนไซม์จะต่ำมากที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสโดยจะมีแอคติวิตีเหลืออยู่น้อยกว่า 5% ดังแสดงในรูปที่ 18.

1.4 ความเสถียรต่ออุณหภูมิ

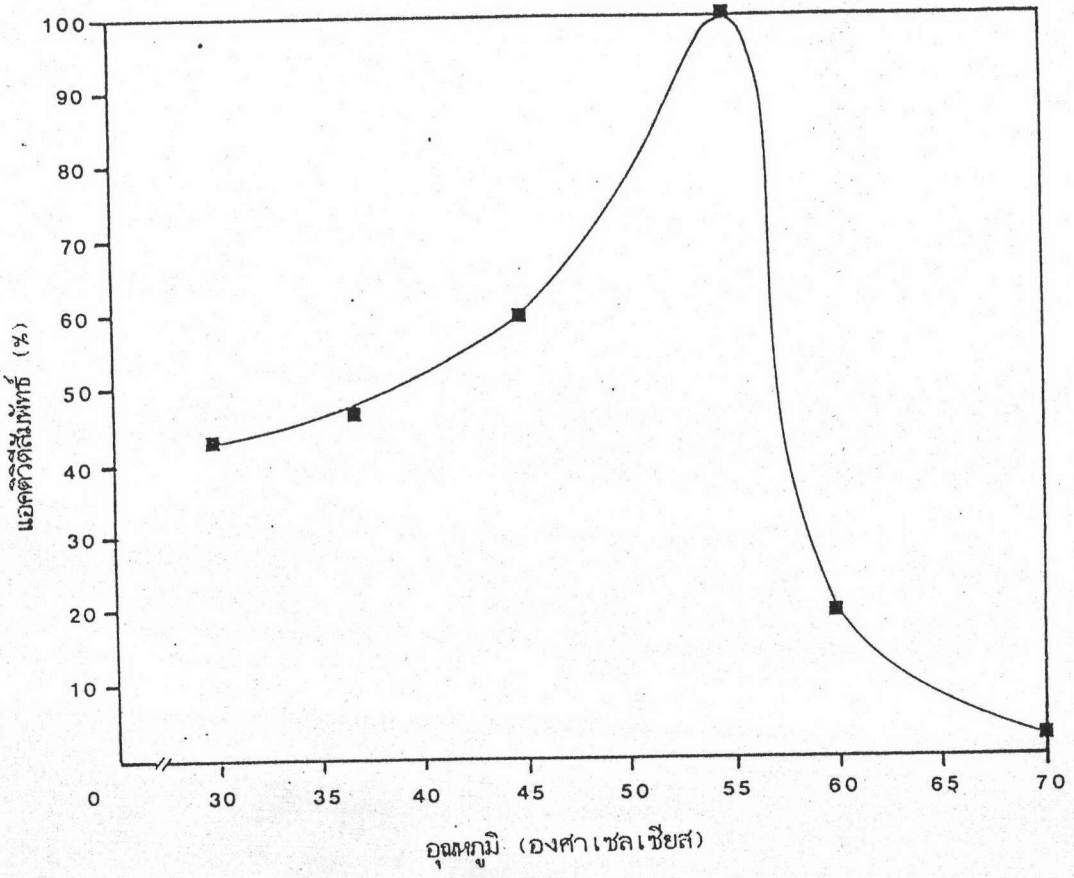
จากการศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ โดยการบ่มเอนไซม์ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์และความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที ก่อนไปมาตรวจสอบแอคติวิตี หลังจากนั้นจึงนำมาตรวจสอบแอคติวิตีและเทียบหาแอคติวิตีสัมพัทธที่สภาวะมาตรฐานเช่นเดียวกับข้อ 1.3 พบว่า เอนไซม์มีความเสถียรมากที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในขณะที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์นั้นจะมีแอคติวิตีเหลือประมาณ 72% และสูญเสียแอคติวิตีทั้งหมดไปเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ดังแสดงในรูปที่ 19.

1.5 ผลของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการทำงานของเอนไซม์

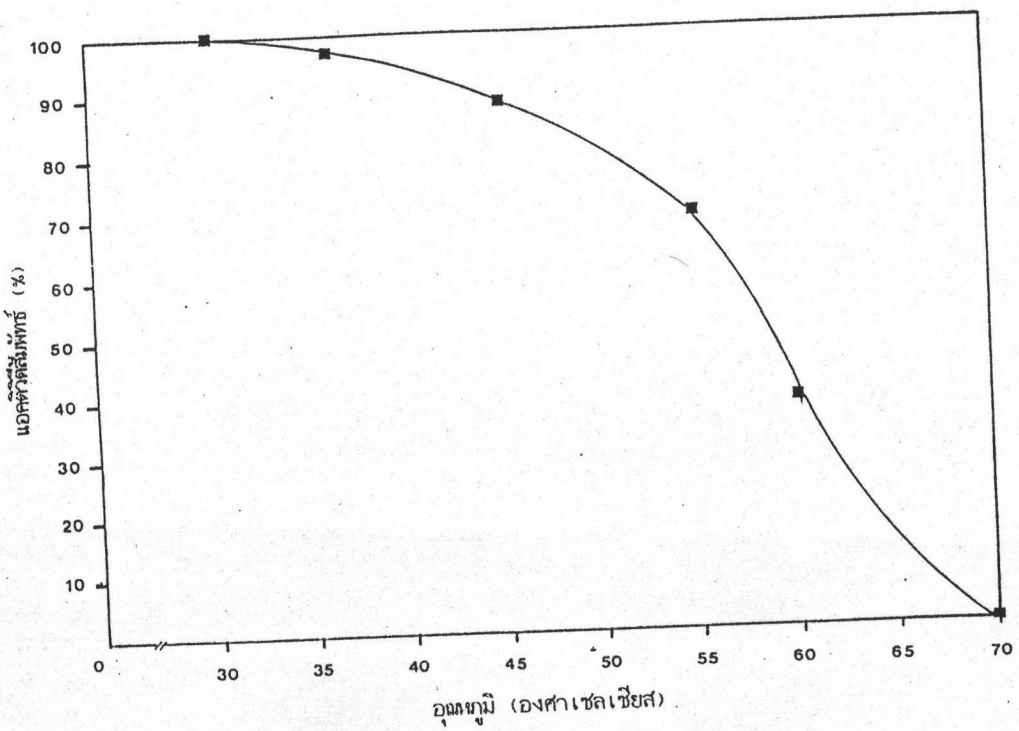
เมื่อทำการแปรผันความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในสารผสมของปฏิกิริยาตามวิธีในข้อ 6. ตั้งแต่ 0-20% บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในการตรวจสอบ จากนั้นเทียบหาแอคติวิตีสัมพัทธที่สภาวะมาตรฐาน คือ ที่ความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 0% พบว่า เอนไซม์จะทำงานได้ดีเมื่อมีเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 2.5-7.5% เทียบกับสภาวะมาตรฐาน แต่ถ้าบ่มในสภาวะที่มีเกลือโซเดียม-คลอไรด์มากกว่านั้นแล้วการทำงานของเอนไซม์จะลดลงโดยเอนไซม์จะมีแอคติวิตีสัมพัทธเหลือประมาณ 66% เมื่อมีเกลือโซเดียมคลอไรด์อยู่ 20% ดังแสดงในรูปที่ 20.

1.6 ความเสถียรต่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์

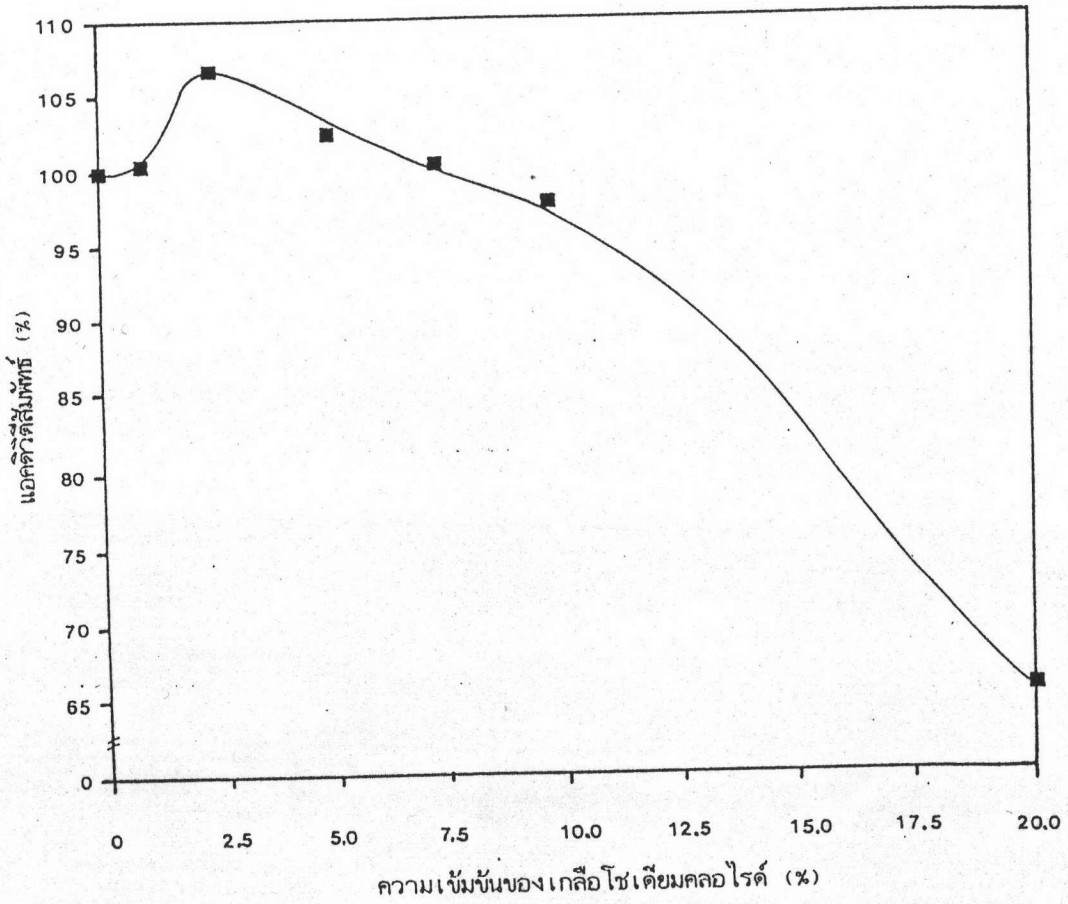
จากการศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ต่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์และความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 โดยบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำมาตรวจสอบแอคติวิตี หลังจาก



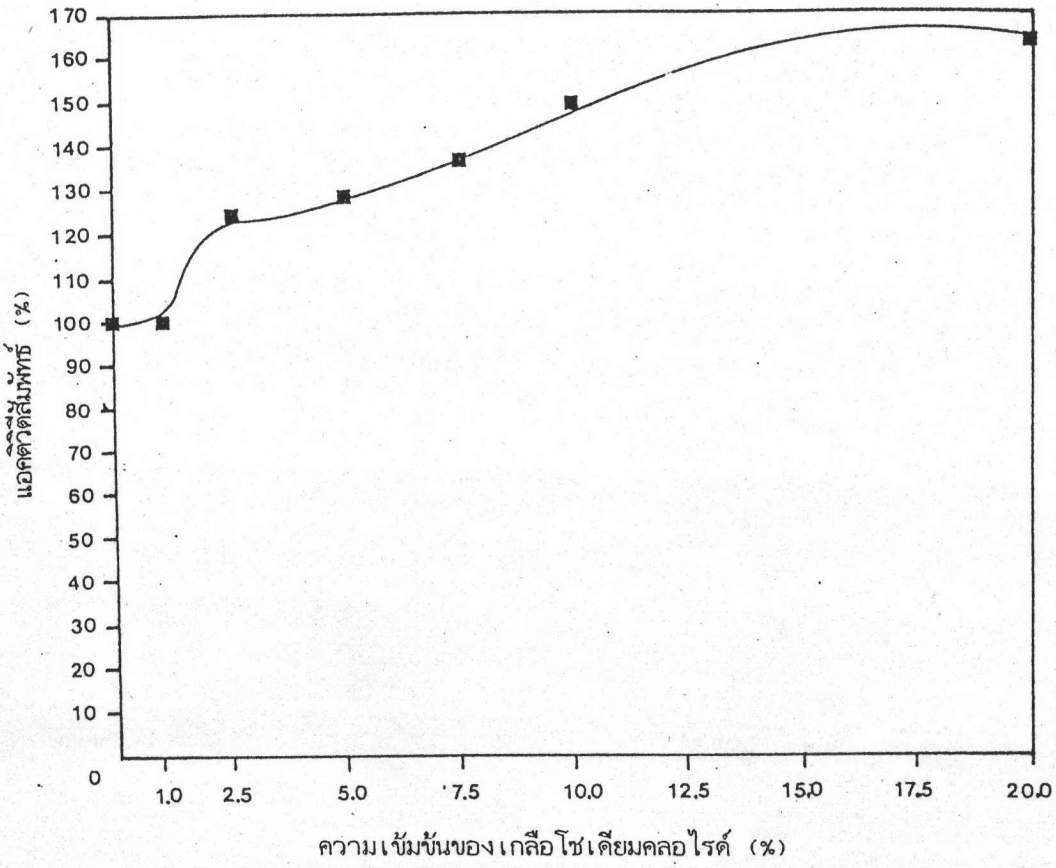
รูปที่ 18. ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 โดยบ่มเอนไซม์ในสารผสมของปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที ในการตรวจสอบหาแอคติวิตีของเอนไซม์และหาแอคติวิตีสัมพัทธเทียบกับสภาวะมาตรฐาน



รูปที่ 19. ผลของความเสถียรของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 ต่ออุณหภูมิ โดยบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงตรวจสอบแอคติวิตีและหาแอคติวิตีสัมพัทธเทียบกับที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



รูปที่ 20. ผลของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการทำงานของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 โดยบ่มเอนไซม์ในสารผสมของปฏิกิริยา แต่แปรผันความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ ตั้งแต่ 0-20 % เป็นเวลา 30 นาที ในการตรวจสอบหาแอคติวิตีของเอนไซม์และหาแอคติวิตีสัมพัทธเทียบกับสภาวะมาตรฐาน คือ ในสภาวะที่ไม่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์



รูปที่ 21. ผลของความเสถียรของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 ต่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ โดยบ่มเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงตรวจสอบแอคติวิตีและหาแอคติวิตีสัมพัทธเทียบกับสภาวะที่ไม่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์

นั้นนำสารละลายเอนไซม์มาเจือจางลง 20 เท่า แล้วจึงนำมาตรวจสอบแอคติวิตีและเทียบหาแอคติวิตีสัมพัทธที่สภาวะมาตรฐานเช่นเดียวกับข้อ 1.5 พบว่า เมื่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้นจะทำให้เอนไซม์มีความเสถียรเพิ่มมากขึ้นด้วยโดยจะเห็นได้จากการที่เอนไซม์จะมีแอคติวิตีสัมพัทธเพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 21.

1.7 ผลของความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ต่อการทำงานของเอนไซม์

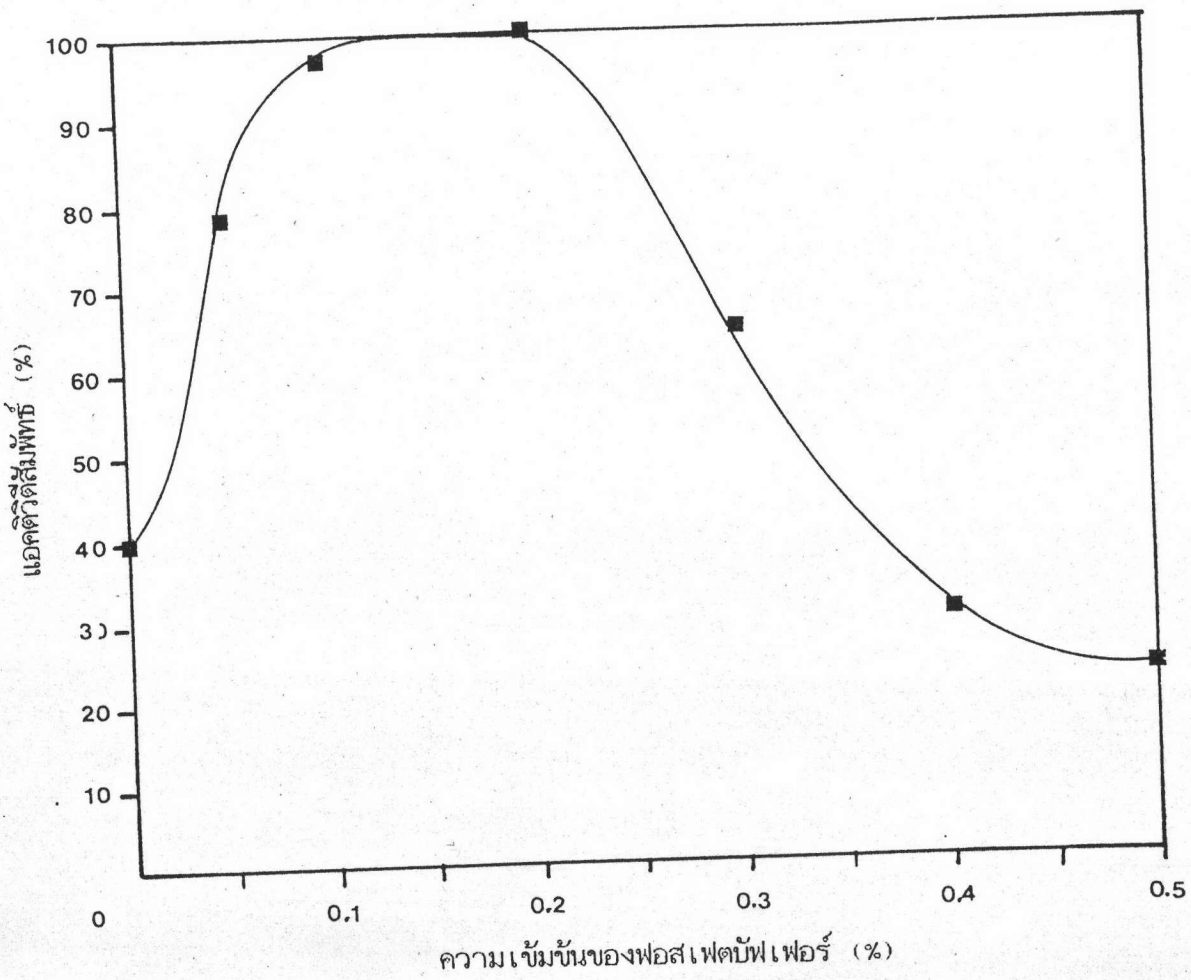
เมื่อทำการแปรผันความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในสารผสมปฏิกิริยาโดยใช้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-0.5 โมลาร์และมีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีในการตรวจสอบแอคติวิตี จากนั้นเทียบหาแอคติวิตีสัมพัทธที่สภาวะมาตรฐาน คือ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พบว่า เอนไซม์ทำงานได้ดีในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 0.01-0.02 โมลาร์ ดังแสดงในรูปที่ 22.

1.8 ความเสถียรต่อความเข้มข้นของบัฟเฟอร์

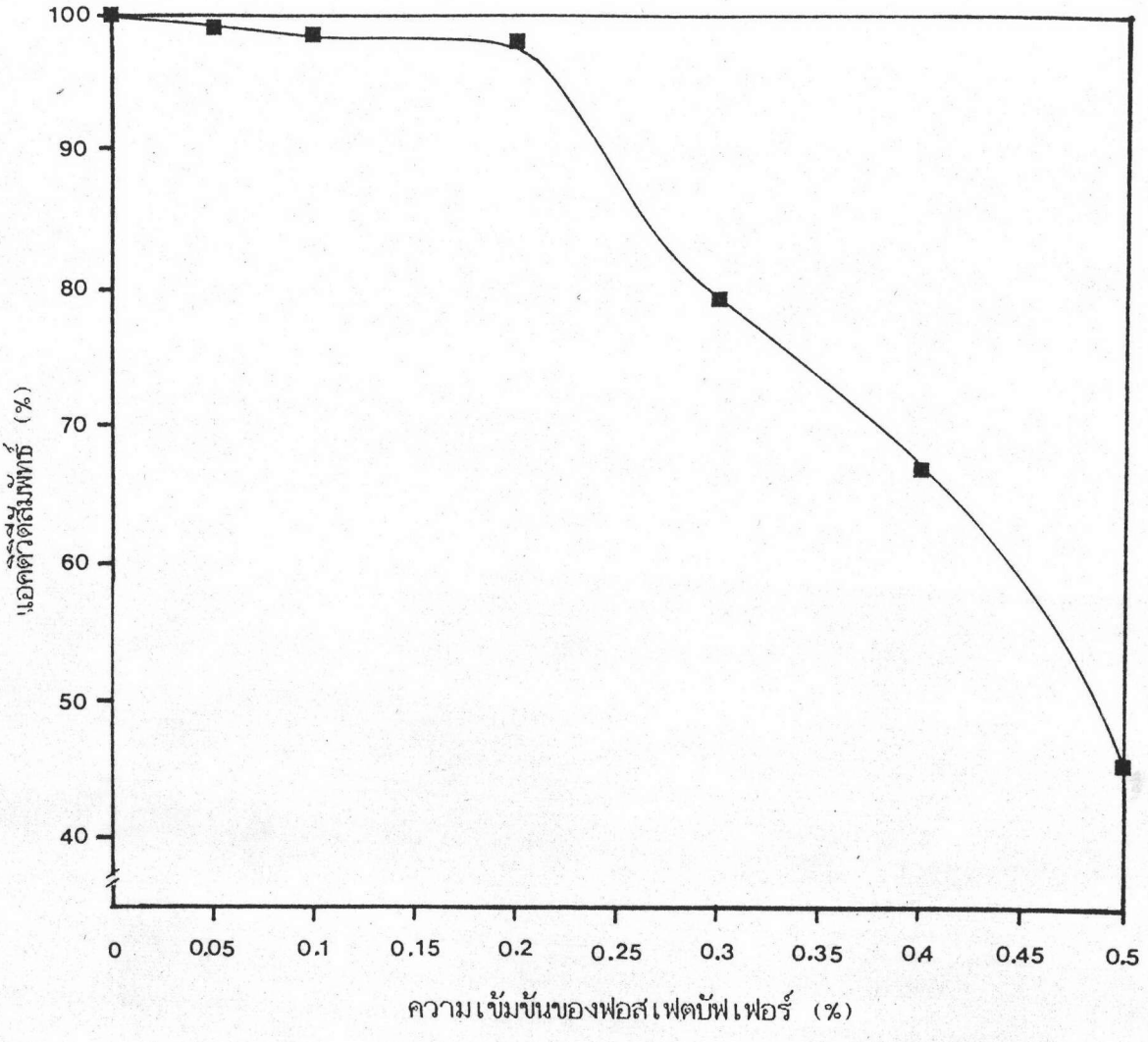
จากการศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ต่อความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ในช่วงความเข้มข้น 0-0.5 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำมาตรวจสอบแอคติวิตี หลังจากนั้นนำสารละลายเอนไซม์มา dialyse แล้วจึงนำมาตรวจสอบแอคติวิตีและเทียบหาแอคติวิตีสัมพัทธที่สภาวะมาตรฐานเช่นเดียวกับข้อ 1.7 พบว่า ที่ความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0-0.2 โมลาร์ เอนไซม์ยังคงมีแอคติวิตีเหลืออยู่มากกว่า 97% แต่ถ้าความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์มากขึ้น แอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลง ดังแสดงในรูปที่ 23.

1.9 ผลของชนิดและปริมาณของเกลือแร่และสารบางชนิดต่อการทำงานของเอนไซม์

จากผลการทดลองที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 12. แสดงว่า คอปเปอร์ซัลเฟต คอปเปอร์คลอไรด์ เมอคิวริคคลอไรด์ นิเกิลคลอไรด์ ซิงค์คลอไรด์ และเฟอริคคลอไรด์ เป็นสารที่มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้มาก แมงกานีสคลอไรด์ และเฟอรัสซัลเฟต จะมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ปานกลาง และซิสเตอีน-ไฮโดรคลอไรด์มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์เพียงเล็กน้อย สำหรับซิสเตอีน EDTA แคลเซียมไฮดรอกไซด์และโปตัสเซียมคลอไรด์เป็นสารและเกลือแร่ที่มีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เพียงเล็กน้อย ยกเว้นแมกนีเซียมซัลเฟตที่มีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์มาก



รูปที่ 22. ผลของความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ต่อการทำงานของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส จากแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 โดยบ่มเอนไซม์ในสารผสมของปฏิกิริยา แต่แปรผันความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ตั้งแต่ 0-0.5 โมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที ในการตรวจสอบหาแอคติวิตีของเอนไซม์และหาแอคติวิตีสัมพัทธเทียบกับสภาวะมาตรฐาน



รูปที่ 23. ผลของความเสถียรของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 ต่อความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยบ่มเอนไซม์ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงตรวจสอบแอคติวิตีและหาแอคติวิตีสัมพัทธเทียบกับที่ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์เป็น 0

ตารางที่ 12. ผลของชนิดและปริมาณเกลือแร่และสารบางชนิดต่อการทำงานของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 ในการหาแอคติวิตีสัมพัทธ์ ได้กำหนดให้แอคติวิตีของเอนไซม์ที่นำมาตรวจสอบโดยไม่เติมสารใดลงไปซึ่งเท่ากับ 7.10 หน่วยต่อมล.ของน้ำเลี้ยงเชื้อ เป็น 100 % การตรวจหาแอคติวิตีทำที่สภาวะมาตรฐานดังวิธีในบทที่ 2 ข้อ 5

ชนิดของสาร	แอคติวิตีสัมพัทธ์ (%)				
	15 mM	10 mM	5 mM	2.5 mM	1 mM
CYSTEINE	33.7	58.7	156.4	127.9	87.2
CYSTEINE-HCl	35.8	37.9	41.6	63.2	90.0
EDTA	87.7	110.8	123.2	121.2	116.8
DTT	94.7	108.0	66.4	62.8	57.5
$MgSO_4$	178.9	168.9	187.7	203.3	168.9
$MgCl_2$	220.0	222.4	217.7	183.5	158.8
$MnCl_2$	14.7	39.5	55.0	57.8	85.3
$Ca(OH)_2$	57.1	79.2	94.4	112.2	121.1
$CuSO_4$	0	0	0	0	0
$CuCl_2$	0	0	0	0	0
$CoCl_2$	0	1.45	16.2	53.3	84.5
$HgCl_2$	0	0	1.32	4.41	7.93
$NiCl_2$	0	5.0	7.0	23.5	36.0
ZnCl	0	2.56	2.93	5.49	13.2
$FeSO_4$	6.76	13.5	20.8	21.3	42.0
$FeCl_3$	0	0	0	2.39	4.78
KCl	80.73	110.4	112.5	102.6	100.0

หมายเหตุ DTT = dithiothretol

2.ความจำเพาะต่อสับสเตรตของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

จากการศึกษาการย่อยสารประกอบน้ำตาลชนิดต่างๆ ได้ผลแสดงในตารางที่ 13. พบว่า เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 มีความจำเพาะต่อเดกซ์แทรนและเซฟาเดกซ์ จี-100 ซึ่งเป็นสารประกอบของกลูโคสที่เชื่อมกันด้วยพันธะ แอลฟา-1,6 โดยที่เซฟาเดกซ์ จี-100 เป็นสารประกอบเดกซ์แทรนที่อยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ เอนไซม์นี้ไม่ย่อยสลายสารประกอบของกลูโคสที่เชื่อมกันด้วยพันธะอื่นเลย เช่น แป้ง เดกซ์ทรินและเซลลูโลส

3.การตรวจสอบชนิดของน้ำตาลที่เกิดขึ้นเนื่องจากการย่อยสลายเดกซ์แทรน

จากผลการทดลองที่ได้แสดงไว้ในรูปที่ 24. พบว่า เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 สามารถย่อยสลายเดกซ์แทรนให้ผลิตภัณฑ์ที่เป็น oligosaccharide ที่อยู่ใกล้กับจุดเริ่มต้นและให้น้ำตาลที่มีขนาดเล็กที่มี Rf ใกล้เคียงกับน้ำตาลไอโซมอลโตส โดยไม่สามารถตรวจพบน้ำตาลกลูโคส เนื่องจากอาจมีในปริมาณที่ต่ำมาก

4.การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วน

เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีเอนไซม์เดกซ์แทรนไปตกตะกอนลำดับส่วนด้วยแอมโมเนียม-ซัลเฟต พบว่า เอนไซม์จะตกตะกอนลงมามากเมื่อแอมโมเนียมซัลเฟตมีความเข้มข้น 70-80% จากนั้นนำตะกอนโปรตีนที่ได้มาละลายในบัฟเฟอร์แล้วนำไป dialyse จากนั้นจึงนำมาผ่านคอลัมน์ของเซฟาโรส 4บี พบว่า เอนไซม์จะถูกชะออกมาอยู่ในลำดับส่วนตั้งแต่ 86-94 โดยเอนไซม์จะออกมามากในลำดับส่วนที่ 90 ดังรูปที่ 25. จากนั้นนำลำดับส่วนที่มีเอนไซม์รวมกันแล้วทำให้เข้มข้นก่อนนำไปผ่านคอลัมน์ของดีอีเออี-เซลลูโลส พบว่า เอนไซม์ที่ถูกดูดซับจะถูกชะออกด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 75 มิลลิโมลาร์ โดยจะออกมาในลำดับส่วนที่ 31-35 และเอนไซม์จะออกมามากในลำดับส่วนที่ 33 ดังรูปที่ 26.

จากการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วนสามารถสรุปได้ตามตารางที่ 14. โดยจะพบว่า เมื่อเอนไซม์ผ่านขั้นตอนต่างๆจะให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นประมาณ 222.8 เท่า แต่มีปริมาณเอนไซม์เหลืออยู่น้อยมาก คือประมาณ 2.3%

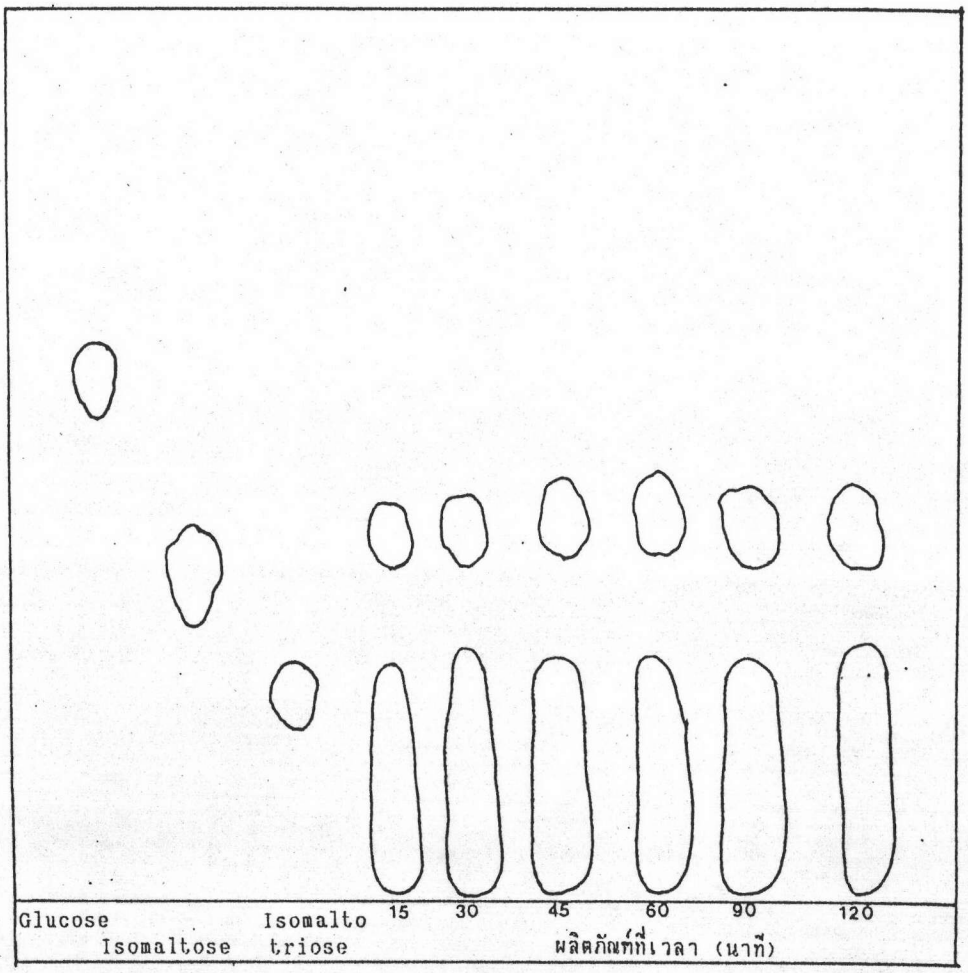
5.การเตรียมเอนไซม์เข้มข้น

เมื่อเปรียบเทียบผลของความเสถียรของเอนไซม์ต่อกรรมวิธีในการเตรียมเอนไซม์เข้มข้นโดยการระเหิดแห้ง พบว่า เอนไซม์จากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ เอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตแล้ว เอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ของเซฟาโรส 4บี และเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ของดีอีเออี-เซลลูโลส เมื่อนำมาระเหิดแห้ง เอนไซม์จะมีแอคติวิตีเหลืออยู่ 91.4%,73.7%,80.3% และ 91.5% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 15.

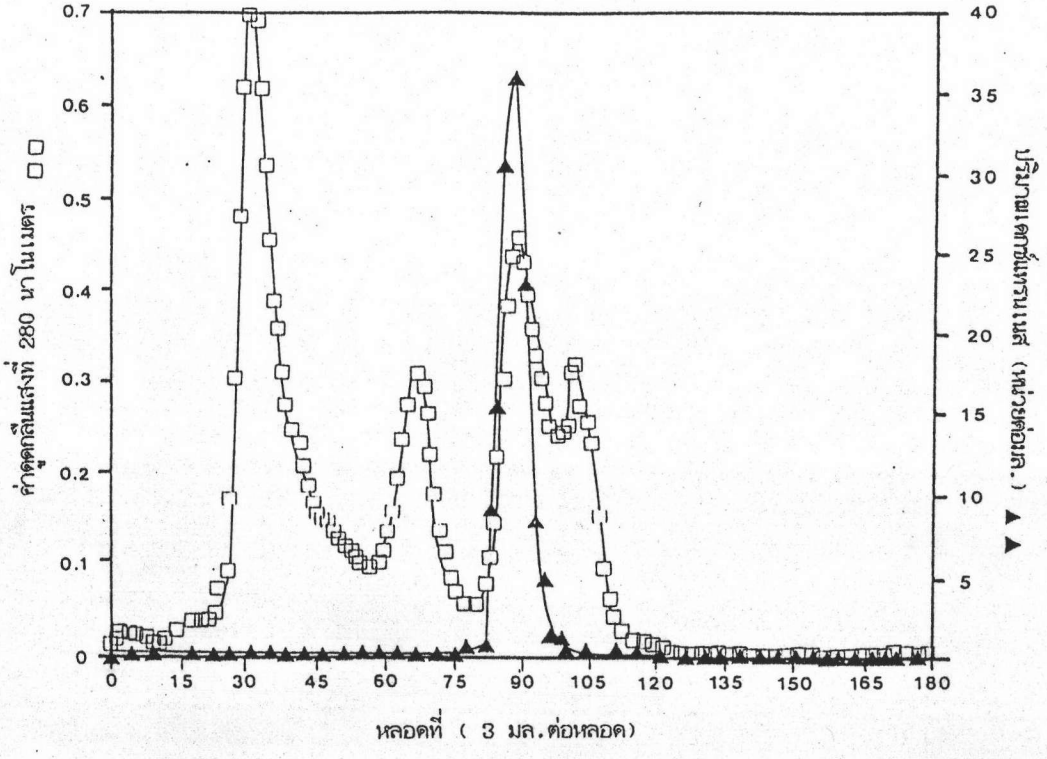
ตารางที่ 13. ความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบน้ำตาลของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส เมื่อบ่มในปฏิกิริยาในสภาวะมาตรฐานแล้วทำการตรวจสอบน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น

สารประกอบน้ำตาล	ชนิดของพันธะ	การย่อยสลาย
Dextran (mw. 17,200)	α -1,6	+
Dextran (mw. 153,000)	α -1,6	+
Dextran (mw. 487,000)	α -1,6	+
Dextran T-70	α -1,6	+
Dextran T-2000	α -1,6	+
Dextran (mw. 5-40x10^6)	α -1,6	+
Sephadex G-100	α -1,6	+
Nigeran	α -1,3	-
Dextrin	β -1,4	-
soluble starch	α -1,4	-
α-cellulose	β -1,4	-
Carboxyl Methyl Cellulose	β-1,4	-

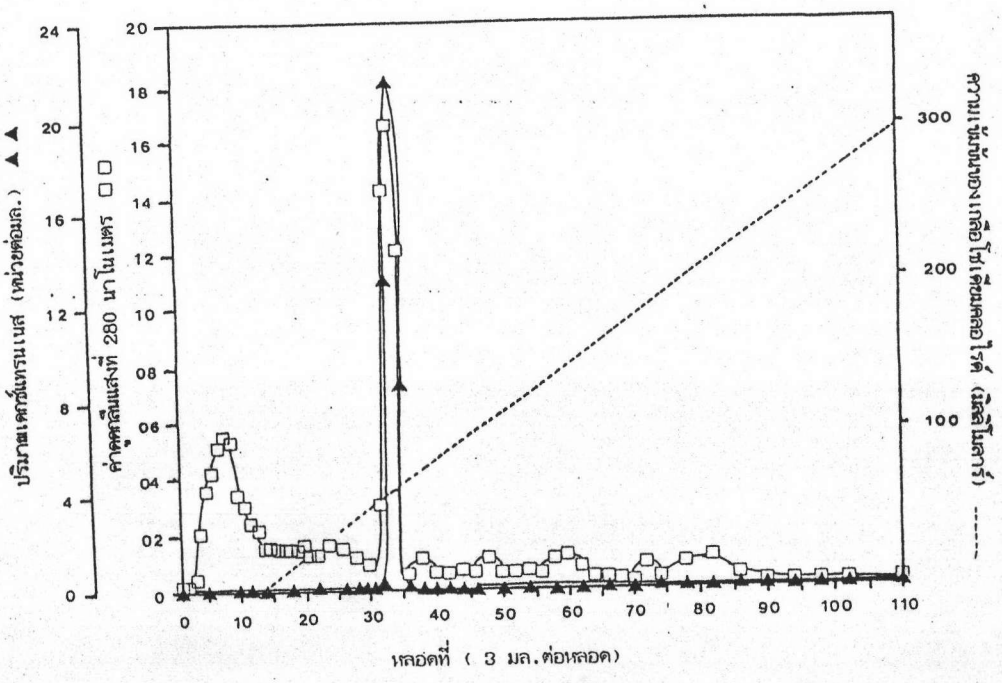
หมายเหตุ + หมายถึง เอนไซม์สามารถย่อยสลายสารประกอบน้ำตาลได้
- หมายถึง เอนไซม์ไม่สามารถย่อยสลายสารประกอบน้ำตาลได้



รูปที่ 24. โครมาโตแกรมแสดงชนิดของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายเดกซ์แทรน ที-2000 ด้วยเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะมาตรฐาน เป็นเวลา 0-120 นาที เทียบกับสารละลายมาตรฐานกลูโคส ไอโซมอลโตส และ ไอโซมอลโตไตรโอส บนกระดาษ Whatman no.1 โดยใช้วิธี ascending ในระบบของตัวทำละลาย น้ำต่อ n-propanol ในอัตราส่วน 30 ต่อ 70



รูปที่ 25. การทำโครมาโตกราฟฟีบนคอลัมน์ของเซฟาโรส 4บี รายละเอียดการทดลองนี้กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 9 และ 13.2



รูปที่ 26. การทำโครมาโตกราฟฟีบนคอลัมน์ของดีอีเออี-เซลลูโลส รายละเอียดการทดลองนี้กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 10 และ 13.2

ตารางที่ 14. สรุปขั้นตอนต่างๆในการทำให้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 ให้บริสุทธิ์บางส่วน

ขั้นตอนในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์	ปริมาณ (มล.)	โปรตีนทั้งหมด (มก.)	แอคติวิตีทั้งหมด (หน่วย)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วยต่อ มก. โปรตีน	ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ (เท่า)	ปริมาณเอนไซม์ (%)
สารสกัดของเอนไซม์	500	3702	5425	1.47	1.00	100.0
ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต เข้มข้น 70-80%	36	112	3119	27.8	18.9	57.5
โครมาโตกราฟฟีบนเซฟาเดกซ์ 4บี	27	2.8	538	193.7	131.8	9.92
โครมาโตกราฟฟีบนดีอีเออี-เซลลูโลส	9	0.38	124	327.6	222.8	2.28

ตารางที่ 15. แสดงผลการเปรียบเทียบวิธีการเตรียมเอนไซม์เข้มข้นด้วยการระเหิดแห้ง

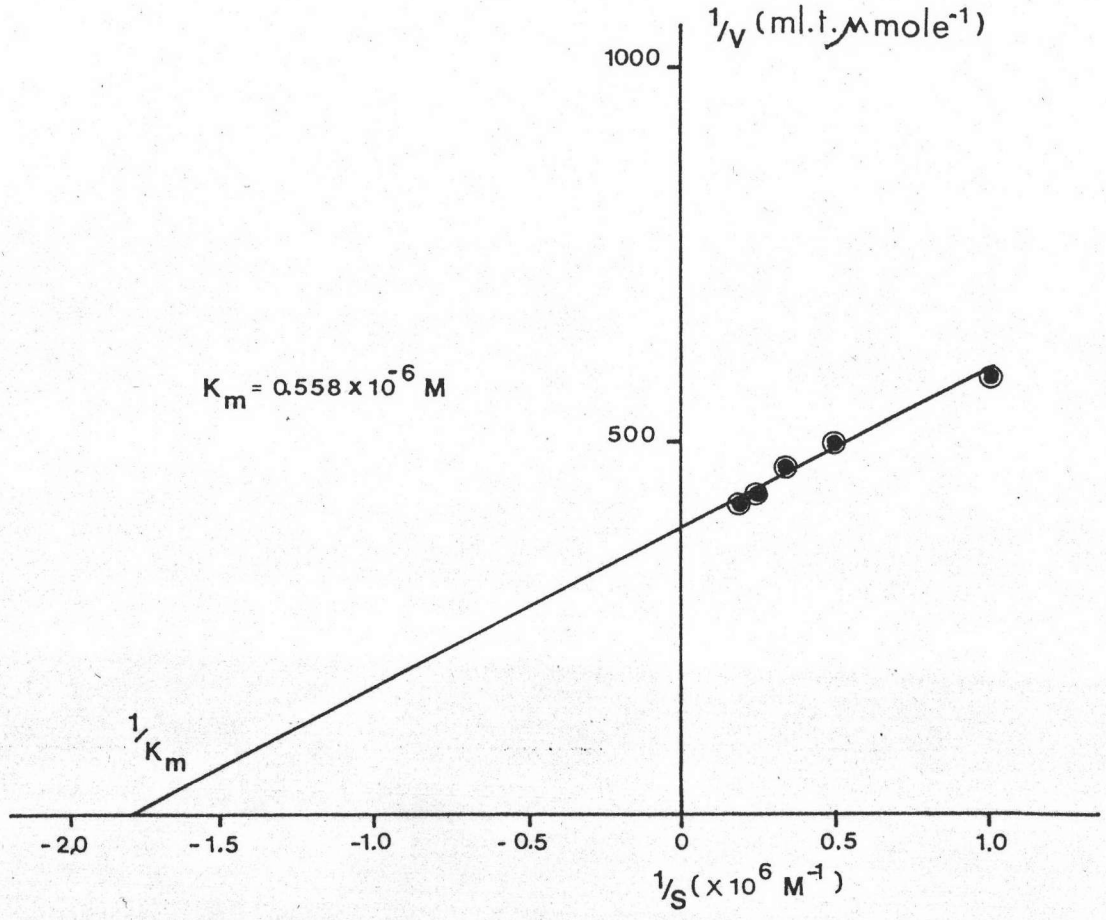
แหล่งของเอนไซม์	%แอคติวิตี	
	ก่อนระเหิดแห้ง	หลังระเหิดแห้ง
เอนไซม์จากน้ำเลี้ยงเชื้อ	100	96.1
เอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตแล้ว	100	73.7
เอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ของเซฟาโรส 4บี	100	80.3
เอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ของดีอีเออี-เซลลูโลส	100	91.5

6.การหาค่า Km ของเอนไซม์

เมื่อนำเอนไซม์ที่มีความเข้มข้น 16.7 หน่วยต่อมล.ซึ่งเป็นเอนไซม์ในรูปกึ่งบริสุทธิ์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนแล้ว มาบ่มปฏิกิริยากับเดกซ์แทรน ที-2000 ที่มีความเข้มข้น 0-5.0 โมลาร์ ในสภาวะการทดลองมาตรฐาน แล้วนำผลที่ได้มาเขียนให้อยู่ในรูปของไลน์วีเวอร์-เบิร์ก (Lineweaver-Burk plot) จะได้ค่า Kmเฉลี่ยเท่ากับ 0.558×10^{-6} โมล ดังแสดงในรูปที่ 27.

7.การตรวจสอบสกุลของแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10

แบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 เป็นเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีกลม ตรงกลางนูน ขอบโคโลนีเรียบ เซลล์มีรูปร่างกลม (coccus) อยู่กันเดี่ยวๆ เป็นคู่ หรือเป็นสายยาว ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ เมื่อย้อมสีแกรมจะติดสีม่วง จึงจัดอยู่ในกลุ่มแกรมบวก จากลักษณะทางการเจริญลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติอื่นๆทางชีวเคมีดังตารางที่ 16. และ 17. พบว่า ลักษณะดังกล่าวใกล้เคียงกับลักษณะของแบคทีเรียในสกุล Micrococcus ตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (81) ซึ่งอธิบายลักษณะของแบคทีเรียในสกุล Micrococcus เป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะรูปร่างกลม อยู่กันเดี่ยวๆ เป็นคู่ สี่เซลล์ ลูกบาศก์ หรือเป็นกลุ่ม ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ ติดสีแกรมบวก ไม่ผลิตอินโดล ผลิตคาตาเลส ต้องการออกซิเจน เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส และเจริญได้ในที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ถึง 5%



รูปที่ 27. แสดงผลของการหาค่า Km ของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 ต่อเดกซ์แทรน ที-2000 ในรูปของ Lineweaver-Burk Plot โดยทำการบ่มเอนไซม์ที่สภาวะมาตรฐานแล้วตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ เมื่อทำการแปรผันความเข้มข้นของเดกซ์แทรน ที-2000 ตั้งแต่ 0-5.0 โมลาร์

ตารางที่ 16. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10

คุณสมบัติที่ศึกษา	ลักษณะที่พบ
ลักษณะของเซลล์:	
รูปร่างของเซลล์	รูปร่างกลม (coccus)
การจัดเรียงตัวของเซลล์	เซลล์อยู่กันเป็นคู่
	เซลล์อยู่กันเป็นกลุ่ม 4 เซลล์
	เซลล์ต่อกันเป็นสายยาว
การเคลื่อนที่	ไม่เคลื่อนที่
การสร้างสปอร์	ไม่สร้างสปอร์
การติดสีแกรม	แกรมบวก
การติดสี acid-fast	ไม่ติดสี acid-fast
ลักษณะของโคโลนี:	
บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง	โคโลนีกลม นูนตรงกลาง และขอบโคโลนีเรียบ
สีของโคโลนี	โคโลนีมีสีเหลือง

ตารางที่ 17. คุณสมบัติทางสรีรวิทยาและทางชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10

คุณสมบัติที่ศึกษา	ลักษณะที่พบ
1.คุณสมบัติทางชีวเคมี:	
การสร้างเอนไซม์คาตาเลส	+
การสร้างเอนไซม์ยูริเอส	+
การสร้างเอนไซม์ออกซิเดส	+
การสร้างแอมโมเนีย	-
การรีดิวซ์ไนเตรต	+
การสร้างอินโดล	-
MR-VP	-/-
การใช้ซิเตรต	+
การผลิตกาซไฮโดรเจนซัลไฟด์	-
การย่อยแป้ง	-
TSI	a/a
2.การเกิดกรดจากการใช้น้ำตาล	
กลูโคส	+
ไซโลส	+
แมนโนส	+
แรมโนส	+
แลคโตส	+
ซูโครส	+
มอลโตส	+
แมนนิทอล	+