Tm
91-3-8

รายงานฉบับสมบูรณ์
ทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดินประจำปี

2532

เรื่อง

การคัดเลือกแบคทีเรียทนเค็มที่สามารถสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส และการศึกษาสมบัติของเอนไซม์ทางชีวเคมี

โดย
ผศ.ดร. สุเทพ ธนียวัน
ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์

เสนอต่อ
ฝ่ายวิจัยคณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
20 กรกฎาคม 2533

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียทนเค็มจากตัวอย่าง ดิน เลน และน้ำทะเล จากแหล่งบริเวณชายฝั่งทะเลของประเทศไทย จากแบคทีเรียทั้งหมดที่แยกได้ 1,092 สายพันธุ์ มีอยู่ 19 สายพันธุ์ที่สามารถสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสได้ จึงได้คัดเลือกสายพันธุ์ Z-10 ซึ่งภายหลังพบว่าเป็นเชื้อ Micrococcus ที่ให้ความกว้างของบริเวณใสมากที่สุดมาศึกษาต่อไป

การสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสโดยเชื้อ Z-10 นี้เกิดได้ดีในอาหารสูตร Yamaguchi เมื่อเทียบกับสูตรอื่น ๆ สภาวะการเลี้ยงเชื้อที่ให้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสคือเลี้ยงที่ 30°C ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 9 พบว่าระบบการควบคุมการสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสเป็นชนิด induction โดยมีสับสเตรทเดกซ์แทรนเป็น inducer สูตรอาหาร Yamaguchi ได้รับการปรับปรุงจนเชื้อ Z-10 สามารถสร้างเอนไซม์ในปริมาณ 13 หน่วยต่อมล.อาหารเลี้ยงเชื้อหรือเพิ่มขึ้นกว่าการใช้สูตรที่ยังไม่ได้รับการปรับปรุง 33 เท่า นอกจากนี้ยังได้ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์อีกด้วย สำหรับเอนไซม์นี้พบว่ามีความจำเพาะต่อการย่อยเดกซ์แทรนชนิด α-1,6 แต่ไม่พบแอคติวิตีชนิด α-1,3 หรืออื่น ๆ โดยเอนไซม์ที่ได้รับการทำให้อยู่ในรูปกึ่งบริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วย NH_4SO_4 โครมาโตกราฟบน Sepharose-4B และผ่านบน DEAE-cellulose จะมีค่า $K_m = 0.558 \times 10^{-6}$ M ต่อ เดกซ์แทรน T-2000

บทนำ

ฟันผุ (dental caries) เป็นอาการกร่อนของเนื้อฟันอันสืบเนื่องจากการกัดกร่อนโดยกรดอินทรีย์ที่ปล่อยออกมาโดยจุลชีพในช่องปาก (10) ปัญหาฟันผุนี้เป็นปัญหาใหญ่ทางด้านสาธารณสุขของทั่วโลก ในแต่ละปีประชากรโลกต้องสูญเสียเงินเป็นจำนวนมากเพื่อรักษาอาการฟันผุนี้ สาเหตุใหญ่ของอาการฟันผุนี้ได้แก่จุลชีพในช่องปากและการบริโภคน้ำตาล sucrose (2,22) หรือที่เรารู้จักกันดีในชื่อของน้ำตาลทราย (cane sugar)

ในแง่ของจุลชีพนั้น จุลินทรีย์ที่พบเป็นสาเหตุของอาการนี้มีอยู่หลายกลุ่มอันได้แก่ Actinomycetes, Lactobacilli และ Streptococci (10,16) ในจุลินทรีย์กลุ่มต่าง ๆ เหล่านี้พบว่า Streptococci โดยเฉพาะ Streptococcus mutans (4)

เป็นสาเหตุที่สำคัญของการทำให้เกิดฟันผุชนิดผิวเรียบ (smooth surface caries) และเนื่องจากฟันผุชนิดนี้พบได้มากกว่า 90% ของอาการฟันผุทั้งหมดการวิจัยหาวิธีป้องกันฟันผุจึงได้เน้นถึงระบบนี้

กลไกของการเกิดฟันผุ เริ่มโดยการจับเกาะ (adherance) ของเชื้อนี้กับผิวฟันซึ่งมีไกลโคโปรตีนจากน้ำลาย (salivary glycoprotein) และเศษอาหารจับกันอยู่ในรูปของ plaque (10,11,23) คุณสมบัติอย่างหนึ่งของเชื้อนี้คือความสามารถในการสร้างเอนไซม์ dextransucrase หรือ glucosyltransferase (GTF) เอนไซม์นี้ใช้ sucrose เป็น substrate ได้โดยจะ hydrolyse ซูโครสซึ่งเป็น disaccharide ของน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตสให้เป็น homopolymer ของ D-glucose ที่เรียกว่า dextran หรือ glucan (19) และปล่อย free fructose ออกมา ดังสมการ

$$n\ \text{Sucrose} \xrightarrow{\text{dextransucrase}} \text{D-glucose}_n + n(\text{fructose})$$

dextran หรือ glucan นี้เป็นหน่วยของ ดี-กลูโคสที่เชื่อมกันอยู่ด้วยพันธะชนิด α-1,6-glycosidic นอกจากนี้แล้วสาย glucan นี้ยังมีการแตกกิ่ง (branching) โดยพันธะชนิด α-1,3-glycosidic โดยการแตกกิ่งนี้จะทำให้ glucan นี้ละลายน้ำไม่ดีเป็นwater insoluble glucan ซึ่งมีลักษณะเหนียว (5) คุณสมบัติของ waterinsoluble glucan อันนี้เองที่ทำให้เกิดมีการจับเกาะชนิดที่ secondary attachment ในรูปของcolonization ขึ้น (9,11) โดยการจับเกาะชนิดหลังนี้จะมีปริมาณของเชื้อเพิ่มมากขึ้นกว่าเดิมมาก เมื่อเราบริโภคน้ำตาลเข้าไป จุลชีพจะใช้น้ำตาลพร้อมกับมีการปล่อยกรดอินทรีย์ เช่น lactic acid, propionic acid ออกมา (10) กรดเหล่านี้จะกัดกร่อนเคลือบฟันและเนื้อฟันทำให้เกิดฟันผุได้

ในแง่ของน้ำตาล เนื่องจากน้ำตาลทรายหรือ sucrose นี้เป็นน้ำตาลที่ใช้กันแพร่หลายทั่วโลกเนื่องจากราคาถูก หาง่ายและมีรสชาดถูกปากกว่าน้ำตาลชนิดอื่น ๆ อีก ทั้งต้นอ้อยซึ่งเป็นแหล่งที่มาของน้ำตาลทรายนี้จัดเป็นพืชเศรษฐกิจของหลาย ๆ ประเทศรวมทั้งประเทศไทยด้วย ถึงแม้เราจะทราบว่าน้ำตาลทรายนี้เป็นสาเหตุใหญ่ของการเกิดฟันผุก็ตาม (เนื่องจากเป็นสับสเตรทของเอนไซม์ GTF ซึ่งกล่าวมาแล้วข้างต้น) แต่เนื่องจาก

เหตุผลดังกล่าวจึงยังทำให้เราบริโภคน้ำตาลทรายกันอยู่ ดังนั้นปัญหาฟันผุจึงยังเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่ยังแก้ไม่ตกจนทุกวันนี้

ได้มีผู้ทำการวิจัยและเสนอวิธีการต่าง ๆ เพื่อป้องกันฟันผุโดยวิธีการต่าง ๆ ซึ่งพอจะสรุปได้ดังนี้

1. การใช้สาร fluoride เติมลงในยาสีฟันและน้ำดื่ม (12,13) วิธีการนี้ได้ใช้กันอย่างแพร่หลายทั่วโลก พบว่าการใช้ fluoride ในรูปของสองวิธีนี้สามารถลดปริมาณของการเกิดฟันผุได้ประมาณ 50% แต่ก็ยังมีคนไข้บางคนที่แปรงฟันวันละสองครั้งอย่างสม่ำเสมอและดื่มน้ำที่มี fluoride ก็ยังเกิดฟันผุได้

2. การใช้น้ำตาลอื่น ๆ ที่ไม่ใช่สับสเตรทของเอนไซม์ GTF เป็นแหล่งของความหวาน วิธีการนี้ได้มีการใช้กันมาบ้างแล้ว เช่น การใช้ saccharin, cyclamate หรือการใช้น้ำตาล sorbitol (18) ผสมลงในอาหารและหมากฝรั่งในกรณีหลัง แต่เนื่องจากรสชาดและปัญหาทางเศรษฐกิจจึงทำให้ไม่เป็นที่ยอมรับกัน ในระยะสองสามปีหลังนี้ได้มีการนำสารโปรตีนที่มีความหวานมาใช้แทนน้ำตาล เช่น monellin และที่รู้จักกันดีและผลิตออกมาในเชิงพาณิชย์แล้วคือ aspartame ในแง่ของการใช้โปรตีนหรือกรดอะมิโนนี้เป็นวิธีการที่ดีแต่มีข้อจำกัดที่ไม่สามารถใช้ในกรณีอุณหภูมิสูงเนื่องจากโปรตีนจะถูกทำลายทำให้สูญเสียรสหวานได้อีกทั้งในกรณีผู้ป่วย α-ketourea จะใช้ aspartame ไม่ได้

3. การใช้สารปฏิชีวนะ (antibiotics) เพื่อฆ่าเชื้อในช่องปาก (6,14) วิธีนี้ไม่เป็นที่นิยมเนื่องจากต้องใช้ยาอยู่ตลอดเวลาอาจมีปัญหาจากผลข้างเคียง การต้านยาของเชื้อและอาจเกิด suprainfection ได้

4. การใช้สารที่เป็นตัวยับยั้งของเอนไซม์ GTF เช่น น้ำตาล fructose, pyridoxal-5-phosphate เป็นต้น (2,26) แต่สารส่วนใหญ่ที่พบยังไม่มีประสิทธิภาพที่ดีพอต้องใช้ในปริมาณสูง

5. การใช้สารเคลือบฟันไม่ให้เกิด primary adherance เช่น spermine, สารพวก lectin (10) เพื่อเกาะจุดจับ (attachment site) ไม่ให้จุลชีพจับเกาะในช่วงแรก วิธีนี้ยังไม่ได้ผลในระดับที่พึงพอใจนัก

6. การใช้เอนไซม์ dextranase ซึ่งย่อยสลายพันธะ α -1,6 และ α-1,3-glycosidic linkage (7,15,19) วิธีนี้เป็นวิธีจำเพาะโดยเอนไซม์นี้จะย่อยสลายสาย dextran ให้เป็นหน่วยย่อยของกลูโคส และเมื่อบวกกับการย่อยกิ่ง 1,3

หอสมุดกลาง ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการดำเนินวิจัย

การคัดเลือก (screening) แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส จากตัวอย่างน้ำทะเลและดินเลนตามชายฝั่งทะเลในประเทศไทย

1.)การคัดแยกโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (solid medium)

1.1) ชั่งตัวอย่างน้ำทะเล 1 มล.หรือดินเลนตัวอย่าง 1 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำทะเลเทียมนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 9 มล. ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม(vortex mixer) นำไปเจือจางตามลำดับแล้วดูดสารแขวนลอยในแต่ละความเข้มข้นมา 0.1 มล. เกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตร Artificial Seawater ด้วยแท่งแก้วงอให้ทั่วผิวหน้าอาหาร บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส จนเห็นโคโลนีของแบคทีเรียขึ้นชัดเจน จากนั้นแยกโคโลนีเดี่ยวมาทำให้บริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียงชนิดเดิม บ่มไว้จนเห็นโคโลนีของแบคทีเรียเจริญเต็มที่

1.2) นำแบคทีเรียที่แยกได้บริสุทธิ์แล้วจากข้อ 1.2 มาจุด(spot)ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อวุ้นตามสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อในข้อ 1.1และเติมเดกซ์แทรนลงไป 1.0 % บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน แล้วนำมาตรวจสอบความสามารถในการย่อยสลายเดกซ์แทรนเนสของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ โดยการเทราดด้วยเอธานอล 95% ให้ท่วมบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง สังเกตผลบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น เนื่องจากการย่อยสลายเดกซ์แทรน (โดยปกติเดกซ์แทรนเนสจะมีหน่วยกลูโคสต่อกันมากกว่า 50 หน่วยขึ้นไป เมื่อทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์ เช่น เอธานอลจะตกตะกอนทำให้เห็นเป็นสีขาวขุ่น แต่หากเดกซ์แทรนถูกย่อยโดยเดกซ์แทรนเนสเป็นหน่วยย่อยเล็กลงแล้วจะไม่ถูกตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ ทำให้เห็นเป็นบริเวณใสได้)

3.)การคัดเลือกโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (solid medium)

นำแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆที่เก็บรักษาไว้ในข้อ 2 มาทำการทดสอบต่อ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตรเหมือนในข้อ 1.2 ในปริมาตร 30 มล.ต่อจานเลี้ยงเชื้อ ทำการ

จุดเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งนี้ และทำเหมือนในข้อ 1.2 จากนั้นวัดขนาดของบริเวณใสที่เกิดขึ้น

4.) การเลี้ยงแบคทีเรียในขวดแก้วทรงกรวย

4.1) การเตรียมเชื้อตั้งต้น

นำเชื้อที่เก็บไว้ตามที่ได้กล่าวในข้อที่ 2 มาใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่บรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าแบบ rotary shaker ใช้อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.2) การเลี้ยงเชื้อ

นำเชื้อตั้งต้นที่เตรียมไว้ในข้อ 4.1 มาใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่บรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวยเช่นเดียวกับในข้อ 4.1 โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.2 เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร จากนั้นนำไปเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที บนเครื่องเขย่าแบบ rotary shaker ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวออกมา 5 มล. ทำการแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวิธีปั่นด้วยเครื่องปั่นแยกด้วยความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อใสมาตรวจลอบแอคติวิตีของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสตามวิธีการในข้อ 5

5.) การตรวจลอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรีย

นำส่วนผสมของปฏิกิริยาจำนวน 1 มล. ประกอบด้วย 0.7 มล. ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 และ 0.2 มล. ของ 0.625% ลับสเตรต บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงเติม 0.1 มล. ของน้ำเลี้ยงเชื้อซึ่งผ่านการแยกเซลล์ออกไปแล้ว ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เก็บตัวอย่างของส่วนผสมที่เวลา 0 และ 30นาทีหยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในอ่างน้ำเดือด 5 นาที แล้วตรวจหาน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีการของ Somogyi-Nelson(20, 24)

1 หน่วย(Unit)ของเดกซ์แทรนเนส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อย

สลายเดกซ์แทรน T-2000 แสวงหาน้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่าน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ

6.) การตรวจวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ใช้วิธีการของLowryและคณะ(17) เปรียบเทียบหาค่าของโปรตีนจากกราฟมาตรฐานที่ใช้ โบวิน ซีรัม อัลบูมิน (Bovine Serum Albumin) ความเข้มข้น 0 ถึง 200 ไมโครกรัมต่อมล.

7.) การตรวจวิเคราะห์การเจริญของเซลล์

โดยการวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร

8.) การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

8.1) การหาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียตามวิธีในข้อ 4 ในสูตรอาหารต่างๆดังนี้

สูตรอาหารดัดแปลงของ Schroder(24)

สูตรอาหารของ Yamaguchi(27)

สูตรอาหาร 1/3 Strength BHI ที่ดัดแปลงของ Okami(21)

แล้วตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตามวิธีในข้อ 5 จากนั้นทดสอบผลของแฟคเตอร์ต่าง ๆ ต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกและปรับปรุงต่อเพื่อให้ได้สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์ของเชื้อ Z-10 ดังนี้

8.2) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนสโดยแปรผันอุณหภูมิที่เลี้ยงเชื้อเป็น 29,37,45 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

8.3) ความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนสโดยแปรผันความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นตั้งแต่ 3 ถึง 11

8.4) ผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนสโดยแปรผันความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์เป็น 0, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0 และ 20.0% ตามลำดับ

8.5) ปริมาณของเดกซ์แทรนที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสูตรของ Yamaguchi ที่เสริมด้วยเดกซ์แทรนชนิดอุตสาหกรรม (น้ำหนักโมเลกุล $3\text{-}50\times10^6$ ของบริษัท Sigma,D-5501) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันความเข้มข้นเป็น 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 %

8.6) การหาชนิดของแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันแหล่งไนโตรเจนต่างๆดังนี้

แหล่งอาหารอินทรีย์ไนโตรเจน

ผงยีสต์สกัดและ Corn Steep Liquor ความเข้มข้น 0.2, 0.5 และ 1.0% โดยน้ำหนัก

กรดคาซามิโนและโพลีเปปโตน ความเข้มข้น 0.2, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0% โดยน้ำหนัก

แหล่งอาหารอนินทรีย์ไนโตรเจน

โปตัสเซียมไนเตรตและแอมโมเนียมไนเตรต ความเข้มข้น 0.1,0.2 และ 0.3% โดยน้ำหนัก

โซเดียมไนเตรต ความเข้มข้น 0.1,0.3,0.5 และ 1.0% โดยน้ำหนัก

แอมโมเนียมคลอไรด์และแอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้น 0.2,0.5 และ 1.0% โดยน้ำหนัก

8.7) การหาปริมาณของสารที่เป็นแหล่งไนโตรเจน

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสูตรของ Yamaguchi ตามวิธีในข้อ4 โดยแปรผันปริมาณกรดคาซามิโนเป็น1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 และ 5.0% โดยน้ำหนัก

8.8) ผลของเกลือแร่ต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสูตรของ Yamaguchi ตามวิธีในข้อ 4 ที่มี 0.5% เดกซ์แทรนเป็นแหล่งคาร์บอนและ 3.5% กรดคาซามิโนเป็นแหล่งไนโตรเจนและได้มีการแปรผันชนิดและปริมาณของเกลือแร่ดังนี้ ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต แมกนีเซียมซัลเฟต ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ แคลเซียมคลอไรด์ กรดบอริค โซเดียมโมลิบเดต แมงกานีสคลอไรด์ ซิงค์ซัลเฟต คอปเปอร์ซัลเฟต โคบอลท์คลอไรด์ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตามวิธีในข้อ 5

8.9) ผลของผงสกัดจากยีสต์ต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส

ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสูตรข้างต้น โดยแปรผันความเข้มข้นของผงสกัดยีสต์เป็น 0 ถึง 0.05% โดยน้ำหนัก

8.10) ผลการชักนำให้เกิดเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสูตรข้างต้นที่ได้ปรับปรุงแล้ว แต่เปลี่ยนแหล่งคาร์บอนจากเดกซ์แทรนเป็นน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้น 2.0% จนเชื้อเข้าสู่ช่วง late log phase จากนั้นเติมเดกซ์แทรนลงไปให้มีความเข้มข้น 0.25% ตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตามวิธีในข้อ 5

9.) การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

9.1) ความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

บ่มเอนไซม์ในสารผสมของปฏิกิริยาที่ความเป็นกรด-ด่างในช่วงต่างๆ โดยการแปรผันความเป็นกรด-ด่างด้วยบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆที่ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์

ซิเตรต-ฟอสเฟต บัฟเฟอร์	ที่มีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ	4.0-7.0
ฟอสเฟต บัฟเฟอร์	ที่มีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ	6.0-8.0
ทริส-(ไฮดรอกซีมีเทน)	ที่มีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ	7.5-9.0

ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

9.2) ความเสถียรของเอนไซม์ต่อความเป็นกรดด่าง

บ่มเอนไซม์ที่เจือจางในบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่ความเป็นกรด-ด่างดังนี้ คือ

ซิเตรต-ฟอสเฟต บัฟเฟอร์	ที่มีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ	4.0-7.0
ฟอสเฟต บัฟเฟอร์	ที่มีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ	6.0-8.0
ทริส-(ไฮดรอกซีมีเทน) อะมิโนมีเทน บัฟเฟอร์	ที่มีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ	7.5-9.0

เป็นเวลา 30 นาที แล้วตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตามวิธีในข้อ 5 เปรียบเทียบกับระบบที่มีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0

9.3) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

บ่มเอนไซม์ในสารผสมของปฏิกิริยาในอ่างน้ำที่ปรับอุณหภูมิเป็น 30,37,45,55, 60 และ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา30 นาที ตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตามวิธีในข้อ 5

9.4) ความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ

บ่มเอนไซม์ที่เจือจางใน 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ที่อุณหภูมิ 30,37,45,55,60 และ 70องศาเซลเซียสเป็น

เวลา 30 นาที ตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตามวิธีในข้อ 5 โดยใช้เอนไซม์ที่บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเป็นตัวเปรียบเทียบ

9.5) ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

บ่มเอนไซม์ในสารผสมของปฏิกิริยาที่มีฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มี ความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.0 ที่มีบัฟเฟอร์ความเข้มข้นต่างๆกัน ตั้งแต่0ถึง 0.5 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตามวิธีในข้อ 5

9.6) ความเสถียรของเอนไซม์ต่อความเข้มข้นของบัฟเฟอร์

บ่มเอนไซม์ที่เจือจางในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 ถึง 0.5 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำเอนไซม์นี้มาตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตามวิธีในข้อ 5 เปรียบเทียบกับกรณีที่ใช้ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0

9.7) ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการทำงานของเอนไซม์

บ่มเอนไซม์ในสารผสมของปฏิกิริยาที่มี 0.05 โมลาร์ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 และเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0 และ 20.0% ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตามวิธีในข้อ 5

9.8) ความเสถียรของเอนไซม์ต่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์

บ่มเอนไซม์ที่เจือจางใน 0.05 โมลาร์ ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ซึ่งมีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0 และ 20.0% ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำเอนไซม์มาตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตามวิธีในข้อ 5 เทียบกับกรณีที่บ่มในบัฟเฟอร์ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 2.5%

9.9) ความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบน้ำตาลบางชนิดของเอนไซม์

บ่มเอนไซม์ที่เจือจางใน 0.05 โมลาร์ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 กับสับสเตรตชนิดต่างๆที่มีความเข้มข้น 0.625% ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีทำการตรวจสอบน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากการย่อยสลายตามวิธีในข้อ 5 สับสเตรตที่ใช้มีดังนี้ เดกซ์ทริน, แป้ง, แอลฟา-เซลลูโลส, ไซแลน, อะไมโลส, เซฟาเดกซ์ จี-100, คาร์บอกซีเมทิล-เซลลูโลส, เดกซ์แทรน T-70, เดกซ์แทรนคุณภาพอุตสาหกรรมน้ำหนักโมเลกุล 17,200 , 153,000, 487,000 และ 5-40 x 10^6

9.10) การตรวจสอบชนิดของน้ำตาลที่เกิดจากการย่อยสลายเดกซ์แทรน

บ่มเอนไซม์ที่เจือจางกับสับสเตรตที่สภาวะมาตรฐานเป็นเวลา 0 ถึง 120 นาทีเก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆกัน แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที แล้วนำไปวิเคราะห์น้ำตาลที่เกิดขึ้นด้วยโครมาโตกราฟีบนกระดาษกรอง Whatman No.1 แบบ ascending เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานของกลูโคส ไอโซมอลโตสและไอโซมอลโตไทรโอสที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมล. ตัวอย่างละ 5 ไมโครลิตร บรรจุในภาชนะที่อิ่มตัวด้วยสารละลายผสมของn-propanolต่อน้ำในอัตราส่วน70 ต่อ 30 เมื่อสารละลายชึมถึงตำแหน่งใกล้ขอบบนมากที่สุดแล้วนำกระดาษกรองนี้ออกมาทำให้แห้ง และทำให้เกิดสีโดยพ่นทับด้วยอัลคาไลซิลเวอร์ไนเตรต

9.11) การศึกษาชนิดและปริมาณของเกลือแร่รวมทั้งสารบางชนิดที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

บ่มเอนไซม์ที่เจือจางในสารผสมของปฏิกิริยาที่มีเกลือแร่และสารที่ใช้ทดสอบซึ่งมีความเข้มข้น 0 ถึง15 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตามวิธีการในข้อ 5 โดยทดสอบกับเกลือแร่และสารต่าง ๆ ดังนี้

ซิสเตอีน, ซิสเตอีน-ไฮโดรคลอไรด์, EDTA, dithiothreiol (DTT),

แมกนีเซียมซัลเฟต, แมกนีเซียมคลอไรด์, แมงกานีสคลอไรด์, แคลเซียมไฮดรอกไซด์, คอปเปอร์ซัลเฟต, คิวบ์รัสคลอไรด์, โคบอลท์คลอไรด์, เมอคิวริคคลอไรด์, นิเกิลคลอไรด์, ซิงค์คลอไรด์, เฟอริคคลอไรด์, เฟอรัส-ซัลเฟต, โปตัสเซียมคลอไรด์, ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต

9.12) การหาค่า Km ของเอนไซม์

บ่มเอนไซม์ที่อยู่ในรูปกึ่งบริสุทธิ์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต รวมทั้งผ่านคอลัมน์ของ เซฟาโรส 4บี (Sepharose 4B) และดีอีเออี-เซลลูโลส (DEAE-cellulose) แล้วความเข้มข้น 0.334 หน่วยต่อมล. บ่มกับเดกซ์แทรน T-2000 ที่ความเข้มข้น 0 ถึง 5.0 M. ในสภาวะมาตรฐาน ตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสที่เวลาต่างๆ แล้วนำผลที่ได้มาเขียนให้อยู่ในรูปไลน์วีเวอร์-เบิร์ก (Lineweaver-Burk Plot)

10) <u>การเตรียมเอนไซม์เข้มข้น</u>

10.1) การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ทดลองตกตะกอนเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ตรวจหาช่วงที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดแล้วนำมารวมเก็บไว้ใช้ต่อไป

10.2) เอนไซม์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตจะถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดยนำไปผ่าน Sepharose-4B และ Ion exchange chromatography เช่น DEAE-cellulose แล้วเช็คความบริสุทธิ์โดยการทำ PAGE

11) <u>การตรวจสอบสกุลของเชื้อแบคทีเรีย Z-10</u>

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและ ลักษณะการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆเพื่อเป็นแนวทางในการจัดจำแนกเชื้อตาม Bergey's Manual of Determinative Bacteriology

11.1 ลักษณะการเจริญของแบคทีเรีย นำแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar,nutrient agar slant และ nutrient broth มาศึกษารูปร่าง ขนาด สี ความโปร่งใสหรือความทึบแสงของโคโลนี ลักษณะของโคโลนีบนหรือในอาหารเลี้ยงเชื้อ

11.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยดูจากลักษณะต่าง ๆ ดังนี้ การติดสีแกรม การติดสี acid fast ลักษณะของเอนโดสปอร์(ถ้ามี) การเคลื่อนที่

11.3 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

นำแบคทีเรียที่เจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar จนกระทั่งมีอายุ 48 ชั่วโมง มาทำการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีหาความสามารถในการสร้างเอนไซม์คาตาเลส ออกซิเดส ยูริเอส ความสามารถของการรีดิวซ์ไนเตรท ความสามารถในการสร้างอินโดล ไฮโดรเจนซัลไฟด์ MR-VP test ความสามารถในการย่อยแป้ง การใช้ซิเตรท การผลิตแอมโมเนีย การใช้คาร์โบไฮเดรทชนิดต่าง ๆ การรีดิวซ์ Litmus milk

ผลการทดลองและการอภิปราย

1. การแยกเชื้อจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย

จากการคัดแยกเชื้อจากตัวอย่างดินเลนและน้ำทะเลจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทยและจากคลังเชื้อของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รวมทั้งสิ้น 11 แหล่ง สามารถแยกเชื้อได้ทั้งสิ้น 1092 สายพันธุ์ (ดังตารางที่ 1) เมื่นำเชื้อที่แยกได้นี้ไปทดสอบหาความสามารถในการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสบนอาหารแข็งที่ผสมเดกซ์แทรน พบว่ามีอยู่ 19 สายพันธุ์ที่ให้ส่วนใสรอบโคโลนีซึ่งเป็นข้อชี้บ่งถึงความสามารถในการผลิตเอนไซม์เดกซแทรนเนส (ตารางที่ 2)

สืบเนื่องจากสายพันธุ์ Z-10 ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างดินชายฝั่งทะเลจังหวัดระนองให้ส่วนใสรอบโคโลนีกว้างที่สุด คือ 1.2 ซ.ม. จึงเลือกสายพันธุ์ Z-10 ไว้ศึกษาต่อไป

2. การคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเดกซ์แทรนเนสโดยเชื้อ Z-10

ทดสอบความสามารถของการเจริญและการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสของเชื้อ Z-10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับใช้เลี้ยงแบคทีเรียจากน้ำทะเลอันประกอบด้วย สูตรของ Yamaguchi สูตรดัดแปลงของ Okami และสูตรของ Schroder เปรียบเทียบกันโดยใช้สภาวะการเลี้ยงดังบรรยายไว้ในรูปที่ 1A,B ผลปรากฏว่า ปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตโดยเชื้อ Z-10 ในอาหารทั้งสามได้เป็น 0.39 0.26 และ 0.22 หน่วยต่อม.ล.โดยลำดับ จึงเลือกสูตรอาหารของ Yamaguchi ไว้ใช้เลี้ยงเชื้อ Z-10 ต่อไป

3. แฟคเตอร์ที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเดกซ์แทรนเนสของเชื้อ Z-10

เลี้ยงเชื้อ Z-10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Yamaguchi แล้วแปรผันแฟคเตอร์ต่าง ๆ ดังนี้

3.1 อุณหภูมิที่เหมาะสม โดยใช้อุณหภูมิในช่วง 25-50°C พบว่าที่อุณหภูมิ 30-35°C (อุณหภูมิห้อง) ได้เอนไซม์สูงสุด คือ 0.71 หน่วยต่อม.ล. ที่ชั่วโมงที่ 30 ของการเลี้ยง (รูปที่ 2A และ 2B) ในขณะที่ที่อุณหภูมิ 28-35°C และ 40°C ซึ่งให้ผลการเจริญใกล้เคียงกันกลับสร้างเอนไซม์ในระดับที่ต่ำกว่าอย่างเห็นได้ชัดและหากเลี้ยงที่อุณหภูมิ 50°C แล้วจะไม่พบการเจริญของเชื้อนี้แต่อย่างใด

3.2 ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อปรับความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ pH ต่าง ๆ ตั้งแต่ 3-11 แล้วดูอัตราการเจริญร่วมกับการสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสของเชื้อ Z-10 พบว่าที่ pH 9 จะให้เอนไซม์ในปริมาณสูงสุด คือ 1.12 หน่วย/ม.ล.(รูปที่ 3) ในขณะที่อัตราการเจริญใกล้เคียงกันกับช่วง pH อื่น ๆ ที่อยู่ในช่วง 6-8 คือมีค่าดูดกลืนแสงในช่วง 7.45-7.96 (รูปที่ 4)

3.3 ผลของ NaCl เนื่องจากเชื้อที่คัดเลือกนี้คัดจากบริเวณใกล้ฝั่งหรือชายฝั่งซึ่งมีความเค็มไม่มากนักจึงเป็นที่น่าสนใจว่าNaCl จะมีผลอย่างไรบ้างกับการสร้างเอนไซม์และการเจริญของเชื้อ Z-10 และเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม NaCl ลงไปในช่วง 1-20% นั้น พบว่าที่ความเข้มข้น NaCl

2.5% เชื้อจะเจริญและผลิตเอนไซม์สูงสุด คือ 1.23 หน่วย/ม.ล. (รูปที่ 5 และ 6) อนึ่ง ที่ 0% NaCl นั้น เชื้อจะสามารถเจริญและสร้างเดกซ์แทรนเนสได้ค่อนข้างดี

3.4 ปริมาณของเดกซ์แทรน เนื่องจากการสร้างเอนไซม์นั้นมี 2 ชนิด คือ พวก constitutive และ induction ในการตรวจสอบชนิดของการควบคุมตลอดจนความเข้มข้นที่เหมาะสมของ substrate ที่ใช้ จึงทดลองเลี้ยงเชื้อ Z-10 ในอาหารที่เติมเดกซ์แทรน 0-2% แล้วดูอัตราการเจริญควบคู่กับการสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส พบว่าการเติมเดกซ์แทรนที่ความเข้มข้น 0.5% จะให้ปริมาณเอนไซม์สูงสุด ในขณะที่ 0% เดกซ์แทรน (เติม 2% กลูโคสให้เป็นแหล่งของคาร์บอนแทน) จะพบการเจริญแต่ตรวจไม่พบระดับของเอนไซม์แต่อย่างใด (รูปที่ 7 และ 8) ดังนั้น จึงสรุปได้ว่าระบบการสร้างเอนไซม์นี้เป็นแบบ induction โดยมีเดกซ์แทรนเป็น inducer และปริมาณที่เหมาะสมของเดกซ์แทรน คือ 0.5% สำหรับอัตราการเจริญนั้นไม่พบความแตกต่างกันมากนักในช่วงความเข้มข้นของเดกซ์แทรนที่ทดสอบ

4. ความจำเพาะของการชักนำการสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

จากการที่ทราบจากการทดลองในข้อ 3 ว่าการสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสถูกชักนำโดยสับสเตรทของมัน คือ เดกซ์แทรนนั้น เพื่อหาความจำเพาะของการชักนำนี้จึงทดลองเลี้ยงเชื้อ Z-10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรเปลี่ยนชนิดของคาร์โบไฮเดรทที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนแล้วตรวจหาปริมาณเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่ผลิตโดยเชื้อ Z-10 ผลการทดลองพบว่าเชื้อจะเจริญได้ในอาหารที่ทดสอบแต่ไม่พบการสร้างเอนไซม์หรือพบในระดับต่ำมากเมื่อเทียบกับการใช้เดกซ์แทรน (ตารางที่ 3) จึงสรุปได้ว่า inducer ของเอนไซม์นี้คือสับสเตรทธรรมชาติของมันอันได้แก่เดกซ์แทรนและการชักนำก็มีความจำเพาะต่อเดกซ์แทรนด้วย

การทดลองต่อไปนี้จะเป็นการหาสูตรอาหารที่เหมาะสมโดยยึดเอาสูตรอาหารของ Yamagushi เป็นแนวแล้วแปรเปลี่ยนชนิดตลอดจนปริมาณของธาตุอาหารต่าง ๆ เพื่อให้เชื้อ Z-10 เจริญและผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสได้สูงสุด

5. ผลของเกลือแร่ต่าง ๆ ต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

ทดสอบผลของเกลือแร่ชนิดต่าง ๆ ในปริมาณต่าง ๆ ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสของเชื้อ Z-10 อันประกอบด้วย K_2HPO_4 KH_2PO_4 $MgSO_4$ โดยแปรผันปริมาณที่ใช้ในช่วง 0-2% 0-1.6% และ 0-0.1% ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสได้แก่ 1.0% K_2HPO_4 0.4% KH_2PO_4 และ 0.05% $MgSO_4$ โดยให้ปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 3.34 3.61 และ 4.05 หน่วย/ม.ล. ตามลำดับดังแสดงในรูป 9 10 และ 11 ทั้งนี้ตั้งแต่การทดลองนี้เป็นต้นไปปริมาณที่เหมาะสมของสารที่ทดสอบจะถูกใช้ในสูตรอาหารสำหรับการทดสอบต่อ ๆ ไป

6. แหล่งของไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสโดยเชื้อ Z-10

ทดสอบผลการแปรผันชนิดและปริมาณของไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ในปริมาณต่าง ๆ ต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสโดยเชื้อ Z-10 โดยใช้ไนโตรเจนทั้งในรูปอินทรีย์ อนินทรีย์ ตลอดจนไนโตรเจนที่อยู่ในรูป complex ในช่วงความเข้มข้น 0.1-2.0% แล้วแต่ความเหมาะสมในแต่ละกรณี ผลการทดลอง (ตารางที่ 4) พบว่า เมื่อใช้สารประกอบไนโตรเจนในรูปเกลืออนินทรีย์ไนเตรทหรือแอมโมเนียมที่แปรผันความเข้มข้น 0-1% นั้นให้ปริมาณของเอนไซม์ค่อนข้างต่ำ โดยให้ปริมาณเอนไซม์สูงสุดเพียง 1.66 และ 1.67 หน่วย/มล. เท่านั้น (ตารางที่4) ส่วนในกรณีการใช้สารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนนั้น โพลีเปปโตนซึ่งเป็นสารที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนของสูตรอาหารนี้อยู่แล้วเมื่อแปรผันความเข้มข้นดูพบว่า ที่ความเข้มข้น 1% จะให้ปริมาณของเอนไซม์ค่อนข้างสูง คือ 4.05 หน่วย/มล. แต่ต่ำกว่าการใช้ 2% casamino acid (5.05 หน่วย/มล.) และหากดูระดับของเอนไซม์ที่ผลิตต่อความเข้มข้นของ casamino acid จะเห็นว่าหากเพิ่มความเข้มข้นของ casamino acid ให้สูงกว่านี้แล้วอาจได้ปริมาณเอนไซม์สูงกว่านี้ได้ จึงได้ขยายการทดลองเฉพาะส่วนของ casamino acid ออกไปโดยขยายช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบเป็น 0-5% (รูปที่ 12) ผลการทดลองนี้พบว่าระดับของเอนไซม์สูงสุดอยู่ที่การใช้ casamino acid 3.5% ซึ่งสูงกว่าแหล่งไนโตรเจนอื่น ๆ ในทุก ๆ ความเข้มข้นที่ทดสอบ ดังนั้น จึงเลือกใช้ 3.5% casamino acid เป็นแหล่งไนโตรเจนของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อไป

7. ผงสกัดยีสต์ต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

แปรผันปริมาณของผงสกัดยีสต์ในสูตรอาหารจาก 0 - 0.05% พบว่าเชื้อจะสร้างเอนไซม์สูงสุดเมื่อใช้ผงสกัดยีสต์ 0.03% โดยให้ปริมาณเอนไซม์ 7.1 หน่วยต่อมล. ดังแสดงในรูปที่ 13

8. ผลของแร่ธาตุต่าง ๆ ต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

ทดสอบผลของแร่ธาตุต่าง ๆ ในสูตรอาหารที่ใช้ต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสโดยเชื้อ Z-10 โดยเปรียบเทียบการเติมหรือไม่เติมเกลือแร่นั้น ๆ ต่อการผลิตเอนไซม์เพื่อใช้เป็นแนวทางสำหรับการปรับปรุงสูตรอาหาร ผลการทดลองโดยสรุปแสดงไว้ในตาราง 5

9. สูตรอาหาร Yamaguchi ปรับปรุงสำหรับเชื้อ Z-10

จากผลการทดลองข้างต้น เมื่อประมวลข้อมูลที่ได้รับทั้งหมดเข้าด้วยกันทำให้ได้สูตรอาหาร Yamaguchi ปรับปรุงให้เหมาะสมกับการเจริญและการสร้างเอนไซม์ของเชื้อ Z-10 ดังแสดงในตาราง 6 และเมื่อทดลองเลี้ยงเชื้อ Z-10 ในอาหารสูตรปรับปรุงภายใต้สภาวะการทดลองที่ได้รับการปรับปรุงใหม่นี้ พบว่าเชื้อ Z-10 สามารถสร้างเอนไซม์เพิ่มขึ้นโดยได้เอนไซม์ 12.8 หน่วยต่อมล. (รายละเอียดและผลการทดลองแสดงไว้ในรูปที่ 14) ซึ่งเพิ่มขึ้นประมาณ 33 เท่าเมื่อเทียบกับปริมาณของเอนไซม์ที่ได้รับจากสภาวะการทดสอบและสูตรอาหารก่อนได้รับการปรับปรุง (0.38 หน่วยต่อมล.)

10. การทดสอบการชักนำการสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสในอาหารที่เติมกลูโคสและเดกซ์แทรน

เนื่องจากการสร้างเอนไซม์มีส่วนสัมพันธ์กับการเจริญของเซลล์และสารชักนำและเนื่องจากเดกซ์แทรนซึ่งเป็นตัวชักนำนั้นมีราคาค่อนข้างแพง ดังนั้นหากเราสามารถเลี้ยงเซลล์เจริญโดยใช้แหล่งคาร์บอนอื่นที่มีราคาถูกกว่าเดกซ์แทรน เช่น กลูโคส จนถึงระยะหนึ่งแล้วค่อยเติมเดกซ์แทรนให้เป็นตัวชักนำการสร้างเอนไซม์แล้วถ้าหากได้ผลจะทำให้ปริมาณของเดกซ์แทรนที่ใช้ลดน้อยลงอันเป็นการลดต้นทุนการผลิตได้ ดังนั้นจึงทดลองเลี้ยงเชื้อ Z-10 ในสูตรอาหารปรับปรุงแต่ใช้กลูโคสในปริมาณ 0.5% และเลี้ยงจนปริมาณของกลูโคสลดน้อยลง (ประมาณช่วง late log) แล้วเติมเดกซ์แทรนในปริมาณ 0.25% ในอาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็นตัวชักนำการสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส จากผลการทดลอง (แสดงในรูปที่15) พบว่า การเจริญของเชื้อ Z-10 นั้นจะเข้าสู่ช่วง late log ในราวชั่วโมงที่ 10 ซึ่งที่เวลาดังกล่าวปริมาณของเอนไซม์จะต่ำมาก (น้อยกว่า 0.4 หน่วยต่อมล.) แต่หลังจากเติมเดกซ์แทรนลงไปในปริมาณ 0.25% ของปริมาตรทั้งหมด ระดับของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจะเพิ่มสูงขึ้นและมีค่าสูงสุด 16.4 หน่วย/มล. ที่ชั่วโมงที่ 40 ของการเลี้ยงเชื้อซึ่งให้ปริมาณของเอนไซม์ที่สูงกว่าเมื่อเลี้ยงด้วย 0.5% เดกซ์แทรนแต่ใช้เวลานานกว่า ถ้าเปรียบเทียบการทดลองในรูปที่ 14 และ 15 จะเห็นว่าในทางปฏิบัติหากคำนึงต้นทุนการผลิตแล้วอาจใช้กลูโคสและเดกซ์แทรนดังตัวอย่างนี้แต่อาจเก็บเอนไซม์ในชั่วโมงที่ 28 แทนโดยจะได้เอนไซม์ 15.7 หน่วยต่อมล.ซึ่งจะใช้เวลาใกล้เคียงกับการใช้เดกซ์แทรนเพียงอย่างเดียว (12.5 หน่วยต่อมล. ที่ชั่วโมงที่ 24) แต่ให้เอนไซม์มากกว่าและลดต้นทุนการผลิตลงเนื่องจากใช้เดกซ์แทรนน้อยลง 0.25% ถึงแม้จะใช้กลูโคสเพิ่ม 0.5% ก็ตาม

11. การศึกษาสมบัติของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

11.1 ผลของความเป็นกรดด่างต่อการทำงานและความเสถียรของเอนไซม์ การทดลองนี้ทดลองโดยเลือกใช้ระบบบัฟเฟอร์ต่าง ๆ ที่คลอบคลุมช่วงความเป็นกรดด่างจาก 4.0 - 9.0 อันได้แก่

ซิเตรท-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ซึ่งคลอบคลุมช่วงความเป็นกรดด่างระหว่าง 4.0-7.0

ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ซึ่งคลอบคลุมช่วงความเป็นกรดด่างระหว่าง 6.0-8.0 และ

ทริส-ไฮดรอกซีมีเทน-อมิโนมีเทน ซึ่งคลอบคลุมช่วงความเป็นกรดด่างระหว่าง 7.5-9.0

ผลการทดลองพบว่าเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อ Z-10 จะมีแอคติวิตีสูงในช่วง 6.5-7.5 แต่จะมีค่าสูงสุดที่ pH 7.0 ดังแสดงในรูปที่ 16

ในแง่ของความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างนั้น พบว่าเอนไซม์มีความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างอย่างดีโดยคงแอคติวิตี 100% ที่ pH 5.5 - 8.0 และเหลือ 90% แอคติวิตีที่ pH 9.0 (รูปที่ 17)

11.2 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานและความเสถียรของเอนไซม์ ทำการทดลองหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสโดยแปรผันอุณหภูมิตั้งแต่ 30 - 70°ซ พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วงค่อนข้างแคบคือ 45 - 55°ซ (รูปที่ 18) และอุณหภูมิที่เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุด คือ 55°ซ ในขณะที่ที่ 70°ซ เอนไซม์จะมีแอคติวิตีต่ำมาก (น้อยกว่า 5% ของแอคติวิตีที่ 55°ซ)

การทดสอบโดยบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30-70° ซ เป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำมาตรวจวัดแอคติวิตีที่สภาวะมาตรฐาน (55° ซ) เพื่อหาความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมินั้น (รูปที่ 19) พบว่าเอนไซม์มีความเสถียรที่สุดที่ 30° ซ ในขณะที่ ที่ 55° ซ ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์นั้น หากบ่มไว้ 30 นาทีจะมีแอคติวิตีเหลือ ประมาณ 72% ของแอคติวิตีที่ 30° ซ และสูญเสียแอคติวิตีหมดที่ 70° ซ

11.3 ผลของ NaCl ต่อการทำงานและความเสถียรของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

เมื่อเติม NaCl ลงในระบบการทำงานของเอนไซม์ในปริมาณ 2.5-20.0% โดยบ่มไว้เป็นเวลา 30 นาทีแล้วทดสอบการทำงานของเอนไซม์ต่อสับเสตรทเดกซ์แทรน พบว่า การเติม 2-7.5% NaCl ลงในระบบการทำงานของเอนไซม์จะทำให้การทำงานของเอนไซม์เกิดได้ดีขึ้นเมื่อเทียบกับระบบการทดลองมาตรฐาน แต่หากบ่มที่ % NaCl มากกว่านั้นแล้วแอคติวิตีจะเริ่มลดลง เช่น จะเหลือ 66% ของแอคติวิตีที่ 20% NaCl (รูปที่ 20) ส่วนความเสถียรของเอนไซม์ใน NaCl นั้น ผลการทดลองที่ได้รับบ่งว่าการใช้ NaCl ในช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบนั้น ทุก ๆ ความเข้มข้นต่างทำให้เอนไซม์เสถียรมากขึ้น แต่ลักษณะของความเสถียรนั้นมีลักษณะตรงข้ามกับการทำงานของเอนไซม์ (รูปที่ 21) โดยที่ความเสถียรจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จาก 2.5% NaCl จนถึง 20% NaCl แต่แอคติวิตีของเอนไซม์ถลับลดลงนั้นสามารถอธิบายได้ว่า สภาวะการทดสอบความเสถียรนั้นทำโดยการบ่มระบบของเอนไซม์-สับสเตรทที่ความเข้มข้นเกลือนั้น ๆ เช่นที่ 20% NaCl แต่การตรวจสอบแอคติวิตีจะนำมาตรวจสอบในสภาวะที่ความเข้มข้นของ NaCl ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (2.5% NaCl) ดังนั้น แอคติวิตีของเอนไซม์เมื่อทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ที่ความเข้มข้นของเกลือ 20% จึงสูง ในขณะที่การทำงานของเอนไซม์ที่ 20% NaCl นั้นมีเพียง 65% เท่านั้นแต่สำหรับสาเหตุของการที่เอนไซม์มีความเสถียรเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเกลือเพิ่มขึ้นนั้น ขณะนี้ยังไม่สามารถอธิบายได้แต่ NaCl อาจจะช่วย preserve conformation ของเอนไซม์นี้ซึ่งน่าจะถูกต้องตามธรรมชาติของเชื้อ Z-10 ที่เป็นแบคทีเรียชอบเค็ม ซึ่งเป็นลักษณะที่ดีของเอนไซม์นี้คือทำงานได้ดีและมีความเสถียรในระบบที่มี NaCl อีกทั้งในทางปฏิบัติแล้วอาจใช้ NaCl เป็นสารป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อไม่ชอบเค็มหรือไม่ทนเค็มได้

11.4 ความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ต่อการทำงานของเอนไซม์

เมื่อทดสอบหาความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส พบว่าฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 0.2% จะมีแอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดและพบว่าเอนไซม์มีความเสถียรที่ความเข้มข้นนี้โดยภายหลังการบ่ม 30 นาทีเอนไซม์ยังคงเหลือแอคติวิตีมากกว่า 97% (รูปที่ 22,23)

11.5 ผลของเกลือแร่ต่าง ๆ ต่อการทำงานของเอนไซม์

ทำการทดลองเติมเกลือแร่และสารต่าง ๆ ที่อาจเป็นตัว stabilize แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ บ่มไว้ 30 นาที จากนั้นนำไปทดสอบหาแอคติวิตีของเอนไซม์ต่อสับสเตรท ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 7 จะเห็นได้ว่าสารประกอบโลหะหนักโดยเฉพาะ $CuSO_4$ $CuCl_2$ $HgCl_2$ จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยสิ้นเชิงโดยคาดว่าเป็นการยับยั้งชนิด non-competitive สารอื่น ๆ ก็ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์มากนักยกเว้นสารประกอบของ Magnesium ทั้งในรูป $MgSO_4$ หรือ $MgCl_2$ ต่างก็เสริมแอคติวิตีของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสในทุก ๆ ความเข้มข้นที่ทดสอบซึ่งไม่เป็นที่แปลก

ใจนักทั้งนี้เนื่องจากโดยทั่วไปแล้วเกลือของ Magnesium มักจะเป็น cofactor ของเอนไซม์ต่าง ๆ ซึ่งเกิดในกรณีนี้เช่นกัน

11.6 ความจำเพาะของการทำงานของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

ทำการทดสอบความจำเพาะต่อการย่อยน้ำตาลโดยเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส โดยใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่มีพันธะทั้ง alpha และ beta ที่เชื่อมในตำแหน่งต่าง ๆ บนน้ำตาลรวมทั้ง เดกซ์แทรนที่มีขนาดต่างกัน ปรากฏว่าเอนไซม์นี้มีความจำเพาะต่อ polymer ของกลูโคสที่มีพันธะเฉพาะ alpha-1,6-glycosidic เท่านั้น ดังแสดงในตารางที่ 8 อนึ่ง hydrolysate ที่ได้จากการย่อยในเวลาที่จำกัดเมื่อนำไปทำ paper chromatography จะได้ product เป็น oligosaccharide ที่อยู่ใกล้กับ origin และให้น้ำตาลที่มีขนาดเล็กที่มีค่า Rf เท่ากับ isomaltose โดยไม่สามารถตรวจพบกลูโคส (อาจมีในปริมาณต่ำมาก) ดังรูปที่ 24 ดังนั้น พอจะสรุปได้ว่าการทำงานของเอนไซม์นี้เป็นแบบ endo- โดยตัดหน่วยกลูโคสทีละ 2 โมเลกุลในรูป isomaltose

11.7 การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วน

น้ำเลี้ยงเชื้อที่มีเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสเมื่อถูกนำไปตกตะกอนตามลำดับส่วนด้วย NH_4SO_4 พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์จะพบได้สูงสุดที่ 70-80% NH_4SO_4 ตะกอนของโปรตีนที่ได้นี้ถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์เบื้องต้นโดยการผ่านเข้าไปใน Sepharose 4B fraction ที่มีแอคติวิตีจะถูก pool แล้วทำให้เข้มข้นโดย ultrafiltration ผ่าน Amicon membrane แล้ว load บน DEAE-cellulose column เอนไซม์ที่ถูกดูดซับจะถูก elute ออกด้วย NaCl (profile ของเอนไซม์ที่ elute ผ่าน Sepharose-4B และ DEAE-cellulose แสดงไว้ในรูปที่ 25 และ 26)

11.8 การศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์

การหาค่า Km ของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่ได้จากข้อ 11.7 ต่อสับเสตรท dextran T-2000 (Pharmacia) โดยบ่มที่ความเข้มข้น 0-5.0 โมลาร์ แล้วเขียนผลการทดลองในรูปของไลน์-วีเวอร์-เบอร์ก จะได้ค่า Km ของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสต่อ Dextran T2000 เท่ากับ 0.558×10^{-6} โมลาร์ ดังแสดงในรูป 27

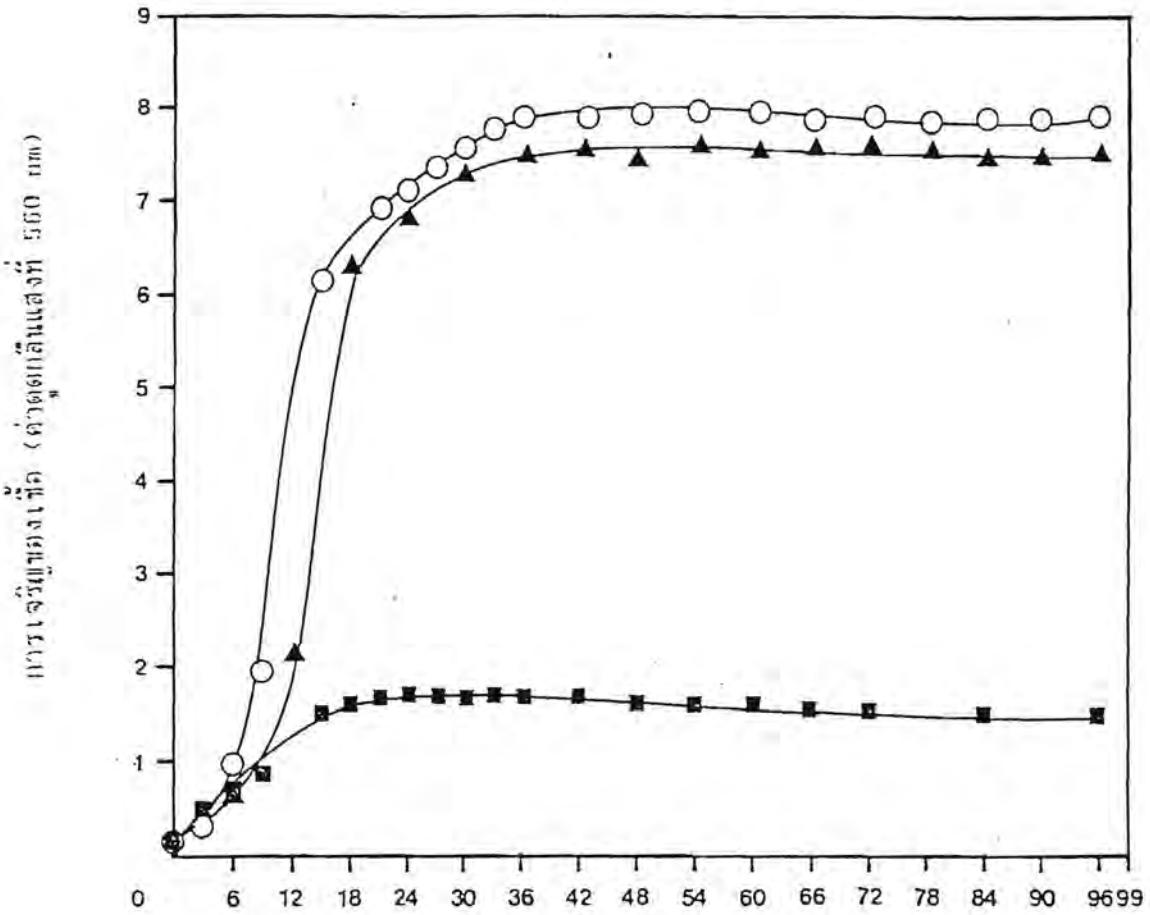
12. การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อ Z-10

จากการตรวจสอบทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ Z-10 พบว่าเชื้อนี้มีรูปร่างชนิด coccus อยู่เป็นคู่หรือเป็นสายยาว ติดสีแกรมบวก มีลักษณะโคโลนีกลมนูนตรงกลางและมีขอบเรียบ และเมื่อประเมินผลนี้ร่วมกับผลการทดสอบทางชีวเคมี (ตารางที่ 9 และ 10) ตาม Bergey's Manual of Systematics Bacteriology ทำให้จำแนกเชื้อนี้เป็น Micrococcus สายพันธุ์ Z-10

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดยสรุปงานวิจัยนี้ได้บรรลุผลสำเร็จโดยสามารถแยกแบคทีเรียทนเค็มที่สามารถสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่ทำงานได้ดีที่ 2.5% เกลือ (NaCl) และมีความเสถียรที่ความเข้มข้นของ NaCl สูง ๆ และยังได้ปรับปรุงสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสโดยสามารถเพิ่มผลผลิตของเอนไซม์จาก Micrococus sp. Z-10 ขึ้น 33 เท่าของผลผลิตก่อนการปรับปรุงสูตรอาหาร (16.4 หน่วยต่อมล.น้ำเลี้ยงเชื้อ) ซึ่งมีปริมาณปานกลางในกลุ่มจุลชีพที่สร้างเดกซ์แทรนเนสทั้งหมด คือน้อยกว่าราแต่สูงกว่าแบคทีเรียทั่ว ๆ ไปรวมทั้ง Bacillus circulans ซึ่งถูกรายงานว่าใช้สำหรับย่อยสลายเดกซ์แทรนจาก Streptococcus mutans โดยตรงและสูงกว่ายีสต์ Lipomyces starkeyi (ตารางที่ 11) อีกทั้งได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ตามที่บรรยายมาแล้วข้างต้น สำหรับเอนไซม์ที่ได้นี้เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อการย่อยเดกซ์แทรนชนิด alpha-1,6 สำหรับเอนไซม์ชนิด alpha-1,3 dextranase นั้นจากเชื้อและเอนไซม์ที่ได้มายังไม่พบเชื้อใดที่สร้างเอนไซม์ดังกล่าว เนื่องจากในทางปฏิบัติไม่สามารถจะใช้ dextran ชนิด alpha-1,3 เป็นตัวคัดแยก (ไม่มีการจำหน่ายทางพาณิชย์) จึงต้องใช้การแยกคัดด้วย dextran จาก Leuconostoc mesenteroides ซึ่งเป็นเดกซ์แทรนชนิด alpha-1,6 เป็นตัวช่วยคัดแยกแทนทำให้ไม่สามารถคัดเฉพาะพวกที่เป็น alpha-1,3 ได้จนกว่าจะนำเอนไซม์มาย่อยสลายสับสเตรทที่ต้องการจึงจะทราบได้ อย่างไรก็ตามการวิจัยนี้ทำให้ได้เอนไซม์ที่มีสมบัติทนเกลือที่มี alpha-1,6 specificity ซึ่งในทางปฏิบัติจะใช้ร่วมกันกับชนิด alpha-1,3 สำหรับแก้ปัญหาฟันผุตามเจตนารมย์เบื้องต้นได้ อีกทั้งได้พัฒนาวิธีการ optimization และสูตรอาหารซึ่งอาจใช้สำหรับเลี้ยงแบคทีเรียทนเค็มอื่น ๆ โดยเฉพาะพวกสร้าง dextranase ให้สร้างเอนไซม์ตามที่ต้องการได้

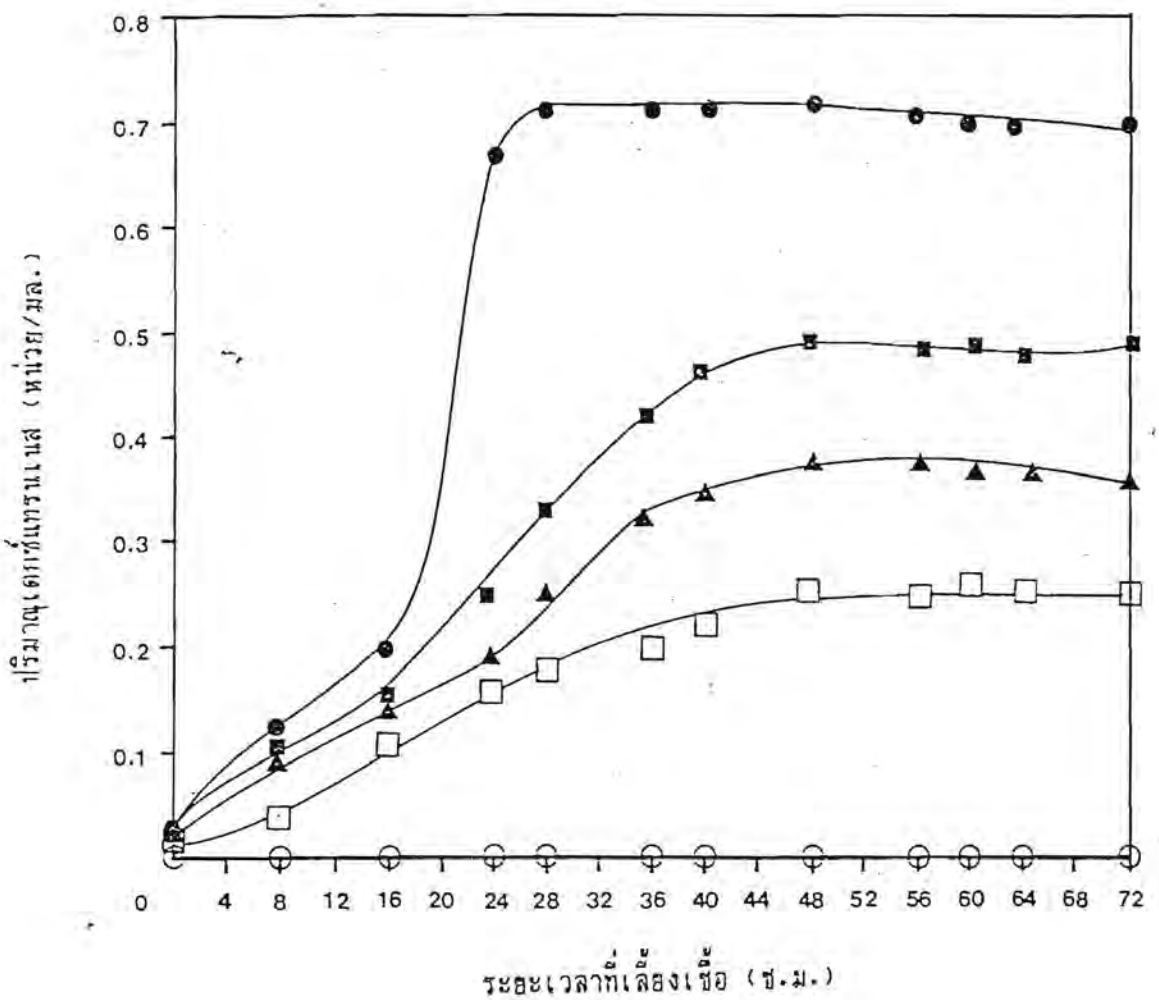
รูปที่ 18 กราฟแสดงการเจริญของเชื้อ Z-10 ที่เลี้ยงในอาหารสูตรต่าง ๆ เลี้ยงเชื้อ Z-10 ในอาหารสูตร Yamaguchi ○ สูตรดัดแปลงของ Okami ▲ และสูตรของ Schroder ■ ที่เสริมด้วยเดกซ์แทรน 1% ที่ 30°C และเขย่า 200 รอบต่อนาที



รูปที่ 2A ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสโดยเชื้อ Z-10

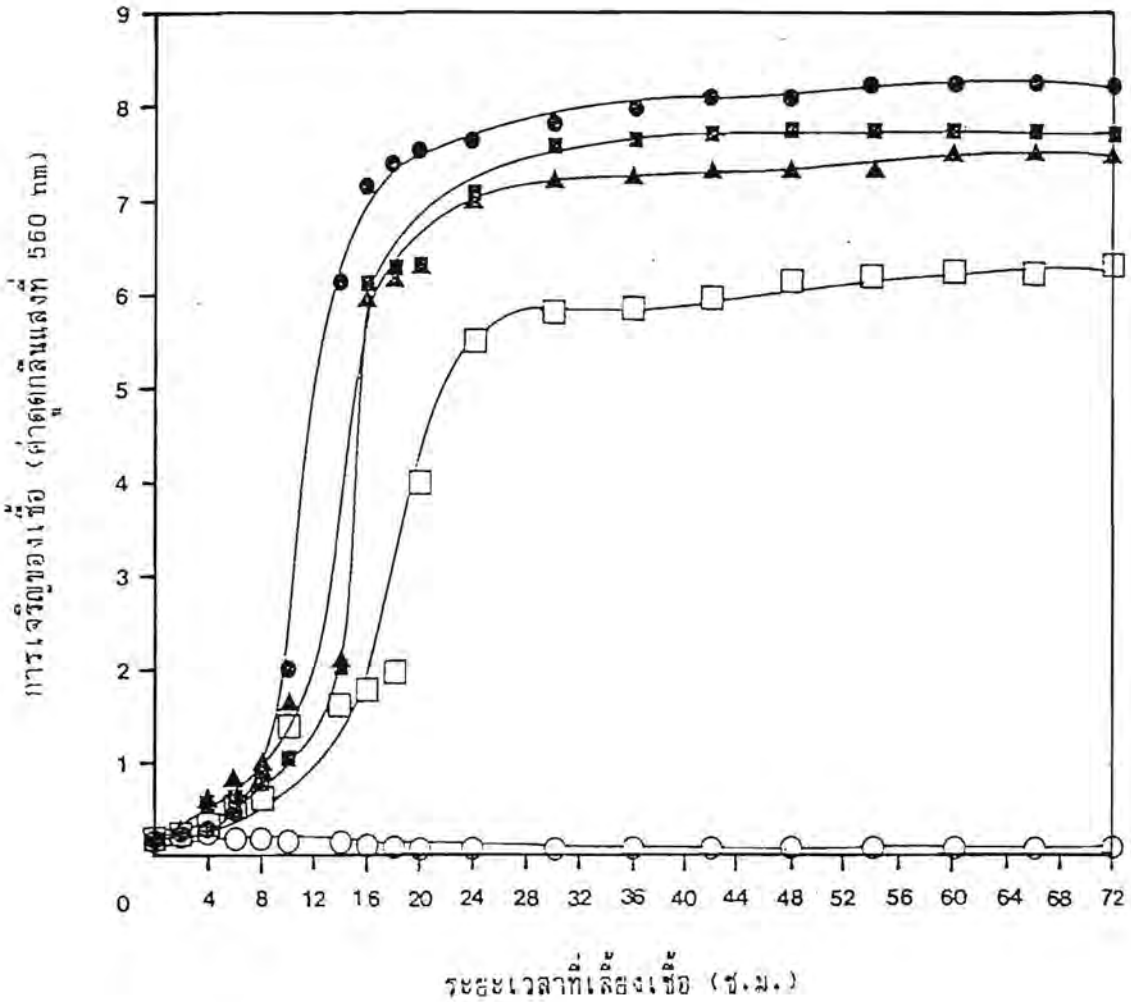
เลี้ยงเชื้อ Z-10 ในอาหารสูตร Yamaguchi ที่เสริมด้วยเดกซ์แทรน 1% ที่อุณหภูมิต่าง ๆ และเขย่า 200 รอบต่อนาที

■ = 28-30°C ● = 30-35°C ▲ = 40°C □ = 45°C ○ = 50°C

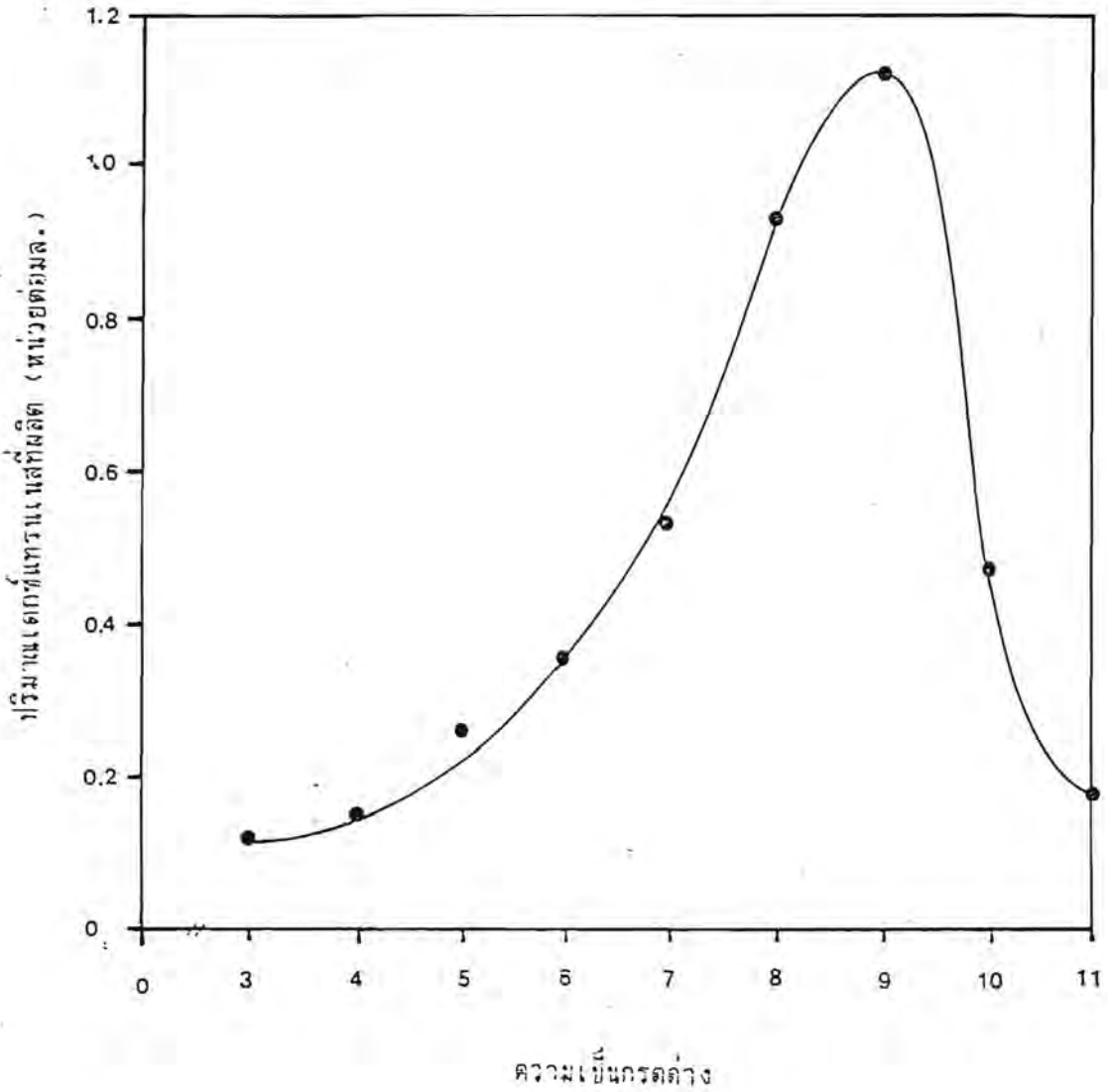


รูปที่ 28 การเจริญของเชื้อ Z-10 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ภายใต้สภาวะการเลี้ยงเช่นเดียวกับรูปที่ :

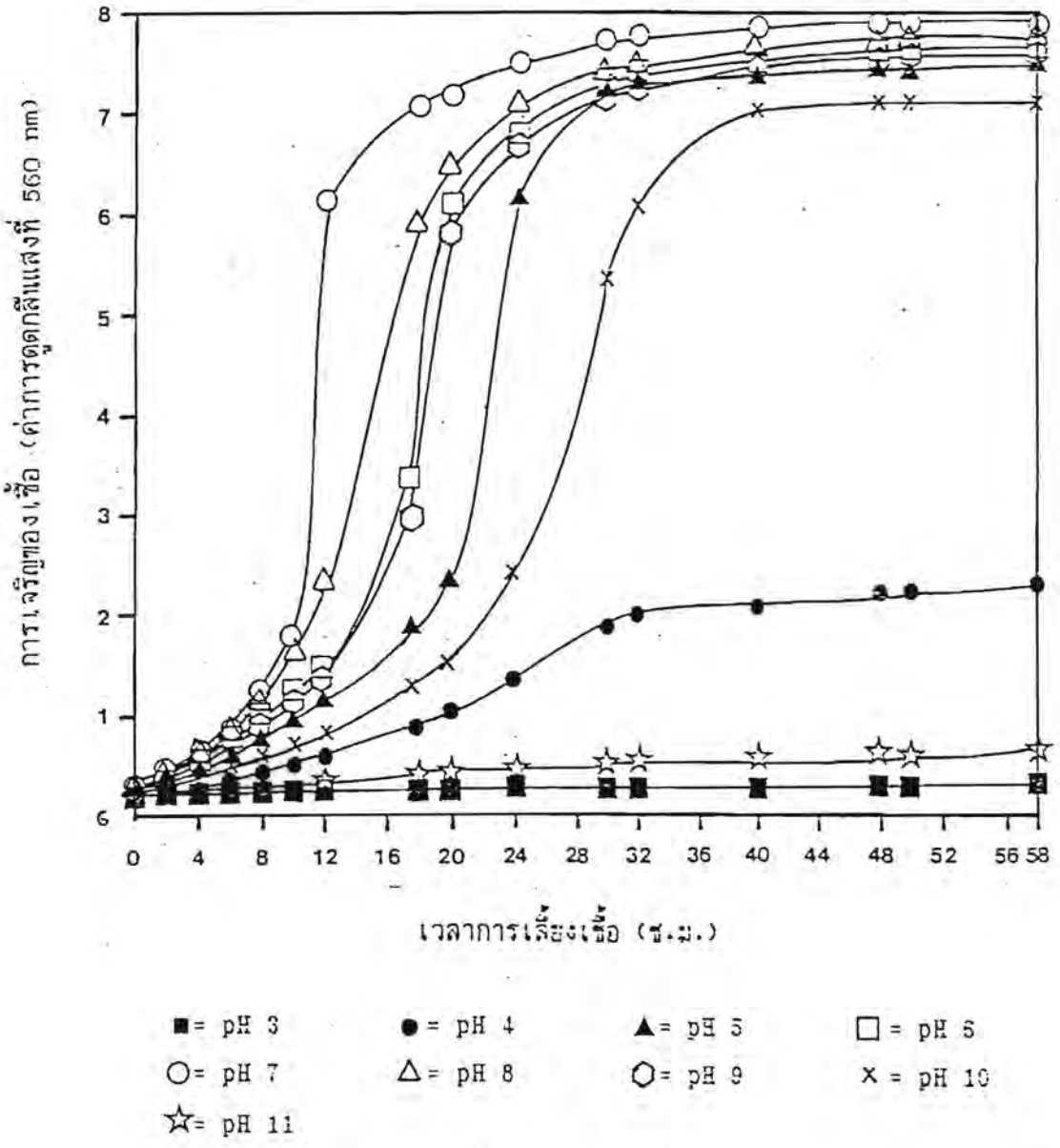
■ = 28-30°C ● = 30-35°C ▲ = 40°C □ = 45°C ○ = 50°C



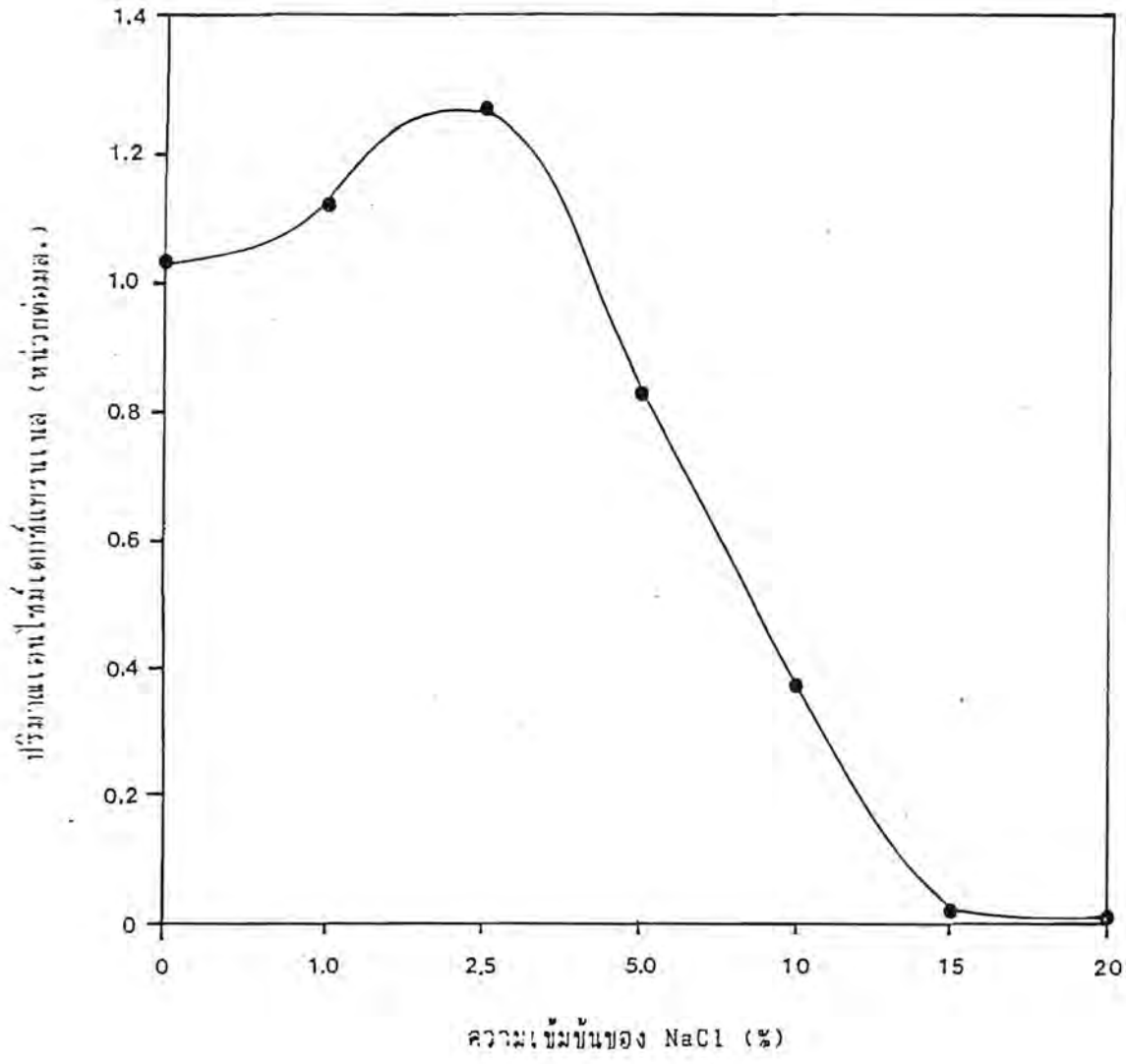
รูปที่ 3 ผลของความเป็นกรดด่างเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส เชื้อ Z-10 ถูกเลี้ยงในอาหาร Yamaguchi ที่อุณหภูมิห้องภายใต้การเขย่า 200 รอบ/นาที ที่ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นต่าง ๆ กัน



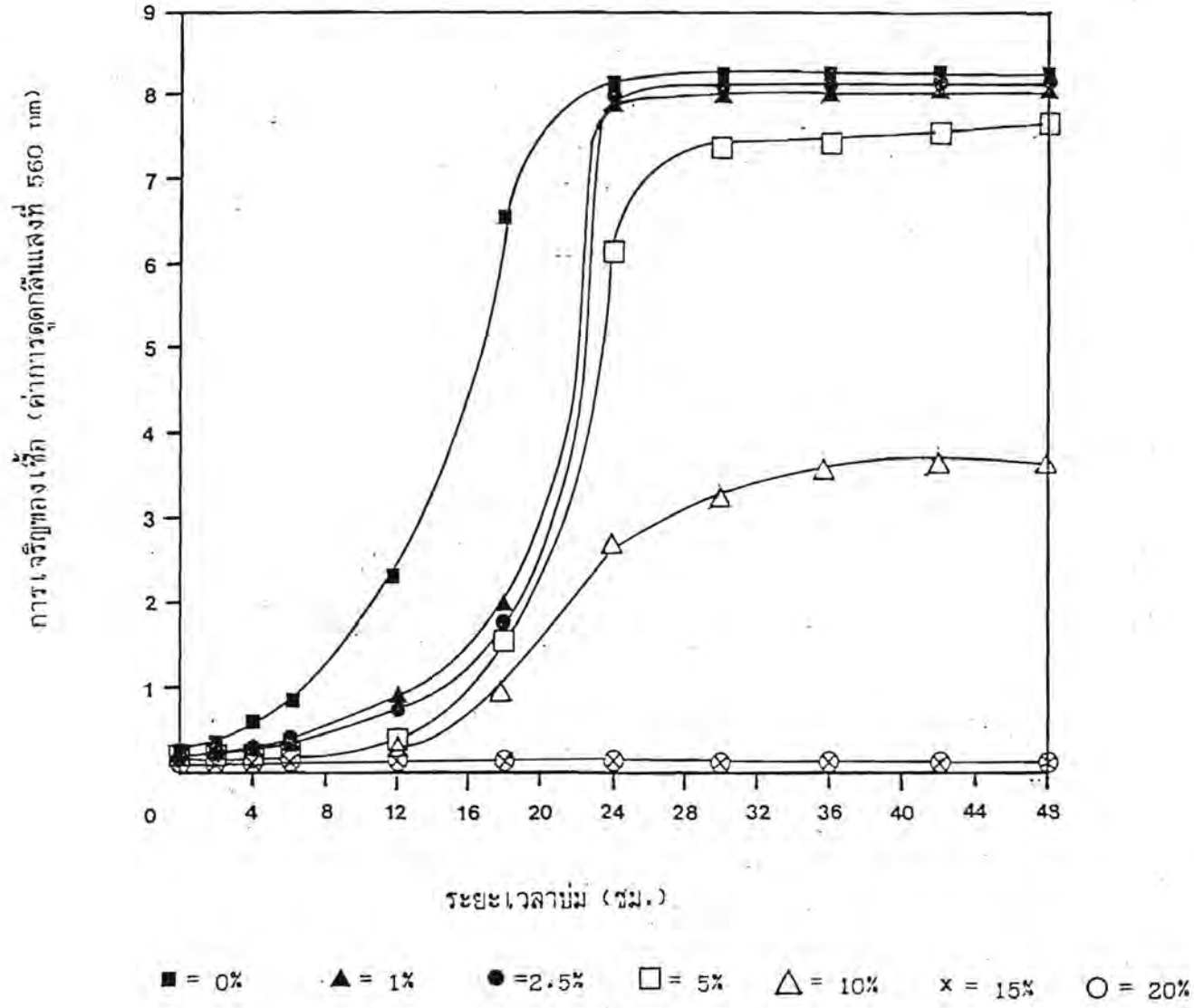
รูปที่ 4 การเจริญของเชื้อ Z-10 ในสูตรอาหาร Yamaguchi โดยแปรผันความเป็นกรดด่างเริ่มต้น ทั้งนี้เป็นข้อมูลจากการทดลองเดียวกันกับรูปที่ 3



รูปที่ 5 ผลของ NaCl ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส เลี้ยงเชื้อ Z-10 ภายใต้สภาวะเดียวกันกับรูปที่ 3 และเสริมด้วย NaCl ตามที่ระบุ



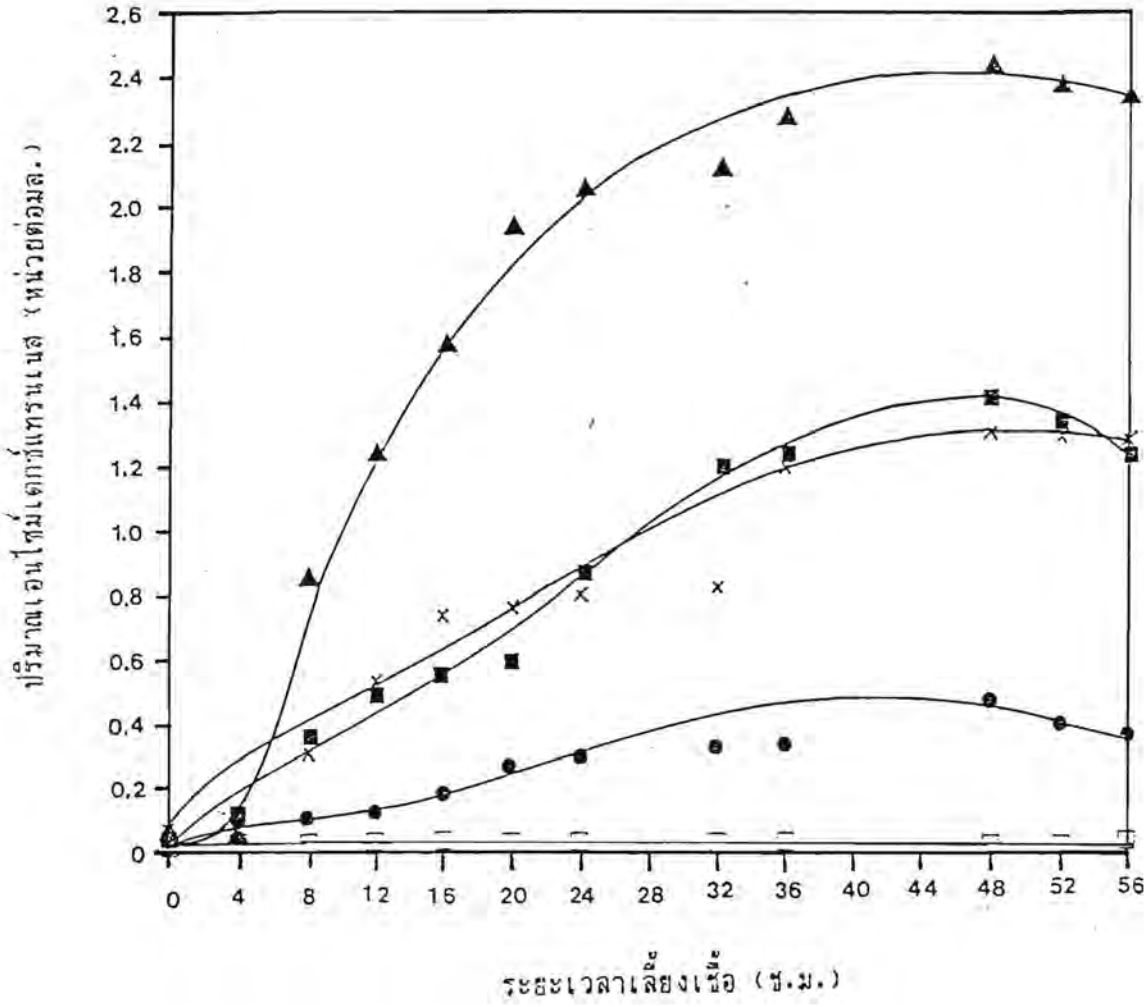
รูปที่ 6 การเจริญของเชื้อ Z-10 ในสูตรอาหาร Yamaguchi ที่เติม NaCl ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยเป็นชุดการทดลองเดียวกับรูปที่ 5



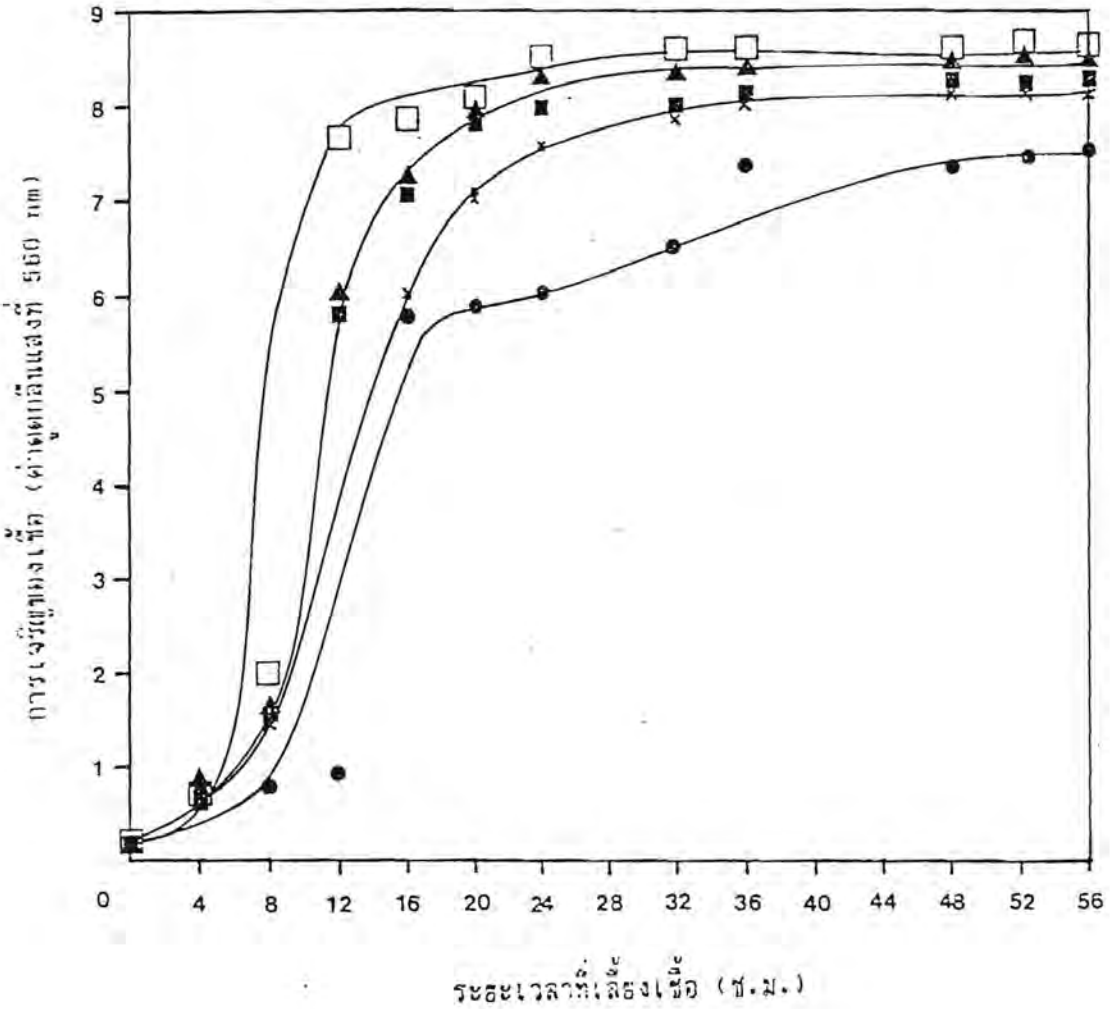
รูปที่ 7 ปริมาณของเดกซ์แทรนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส เลี้ยงเชื้อ 2-10 ในอาหาร Yamaguchi ที่เสริมด้วยเดกซ์แทรนในปริมาณต่าง ๆ หรือกลูโคส ที่ความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 9.0 อุณหภูมิห้องและเขย่า 200 rpm

□ = 2% กลูโคส ▲ = 0.5% เดกซ์แทรน ■ = 1.0% เดกซ์แทรน

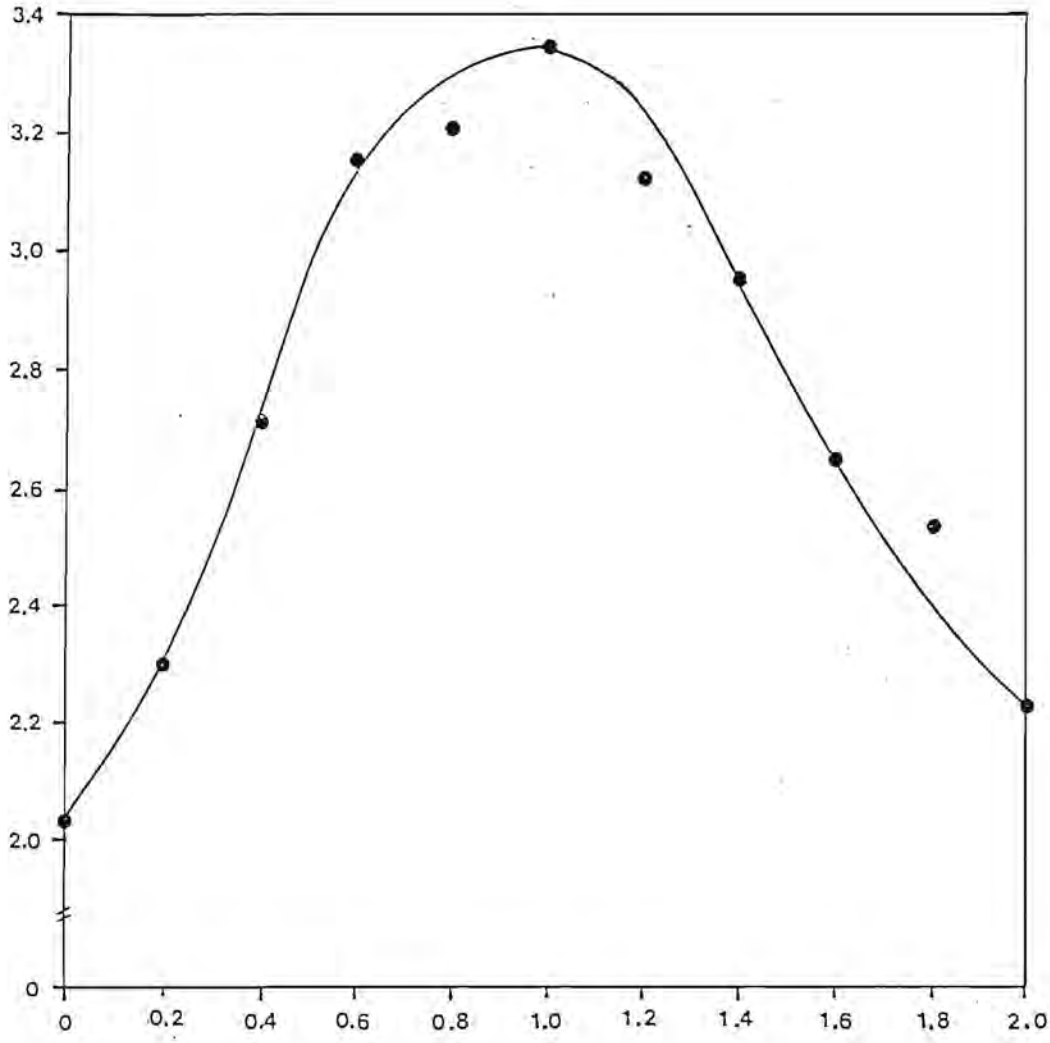
● = 2.0% เดกซ์แทรน x = 1.5% เดกซ์แทรน



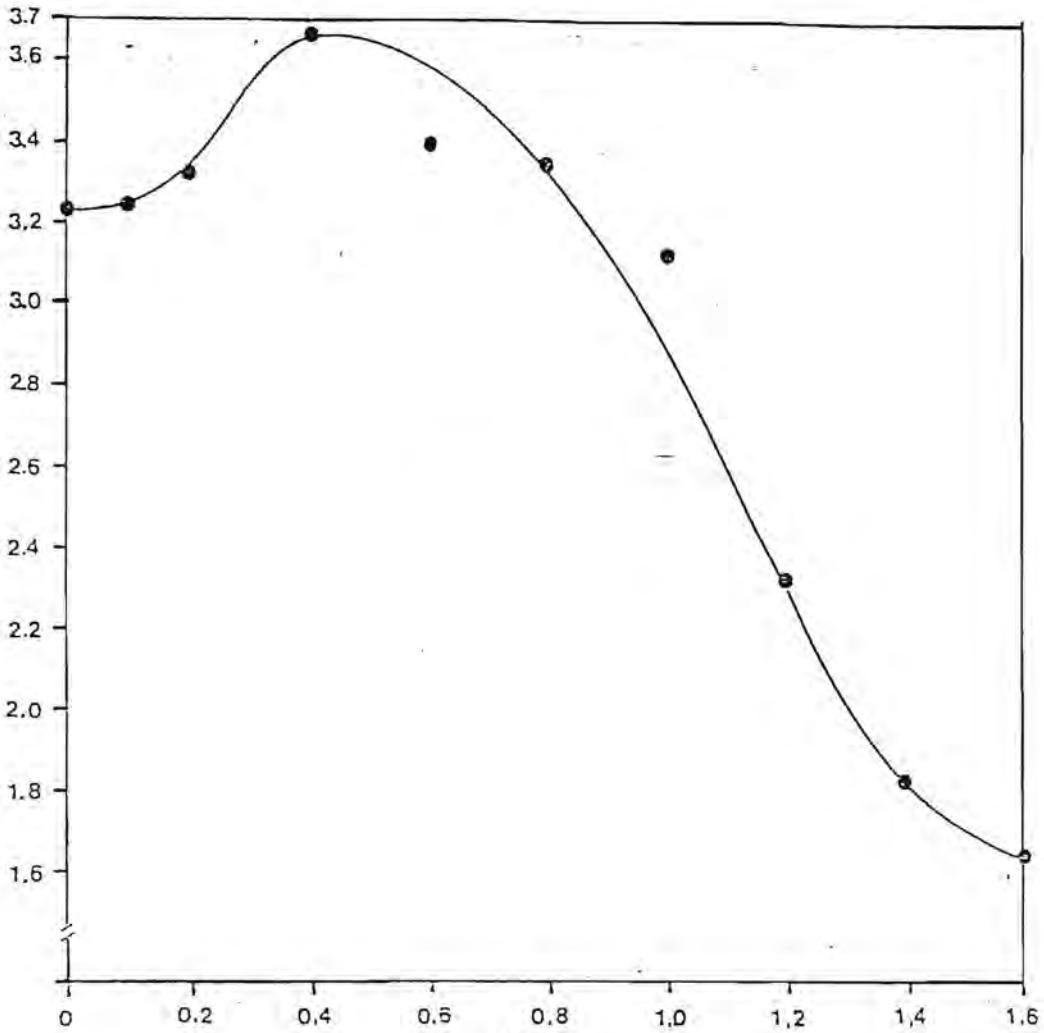
รูปที่ 8 การเจริญของเชื้อ Z-10 ในอาหาร Yamaguchi ที่เสริมด้วยเดกซ์แทรนในปริมาณต่าง ๆ ภายใต้สภาวะการเลี้ยงเช่นเดียวกันกับรูปที่ 7



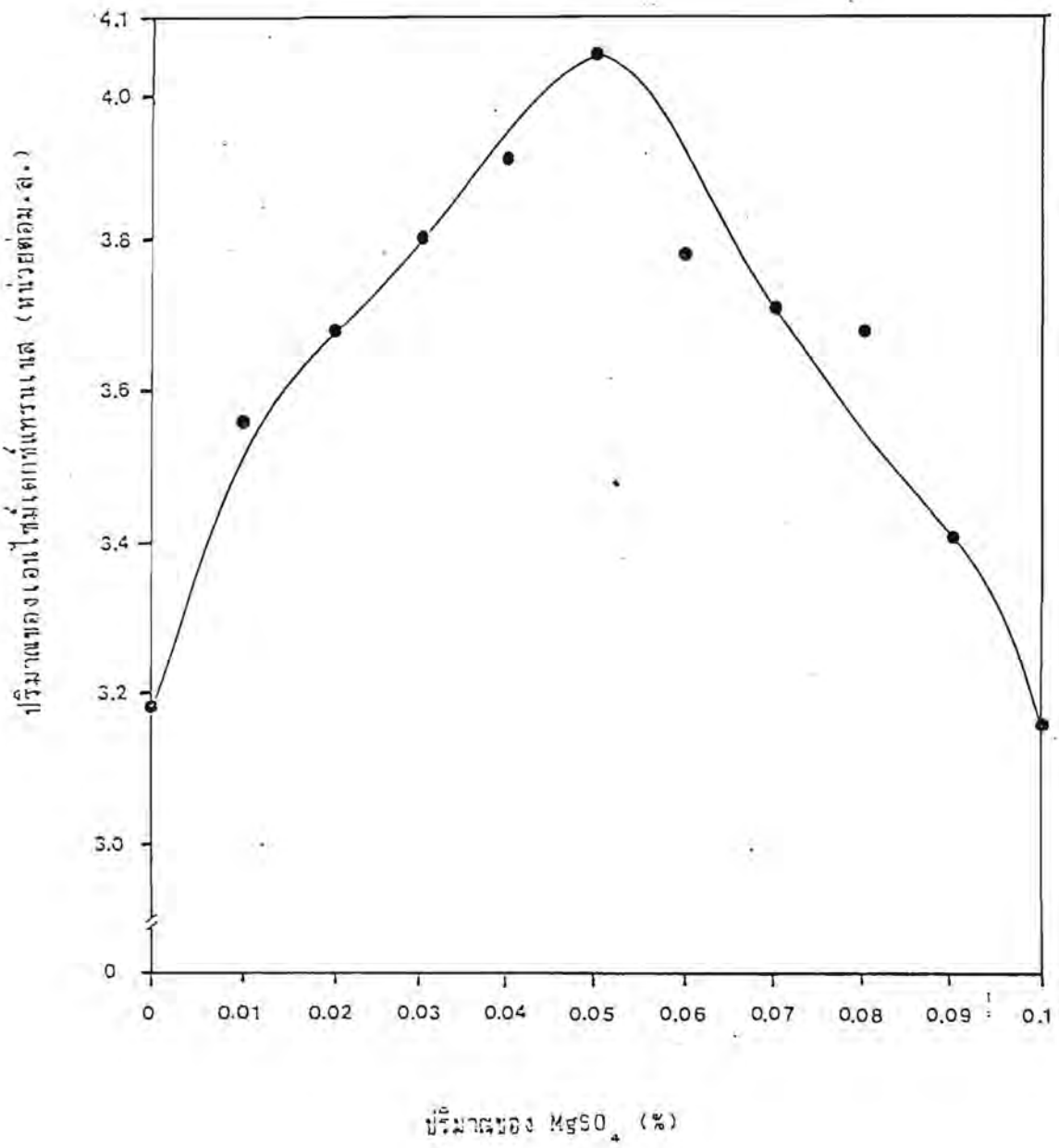
รูปที่ 9 ผลของ K_2HPO_4 ต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส เลี้ยงแบคทีเรีย Z-10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Yamaguchi ที่สภาวะเดียวกันกับรูปที่ 7 แต่เสริมด้วยเดกซ์แทรน 0.5% แล้วแปรผันปริมาณของ K_2HPO_4 ในช่วง 0-2.0%



รูปที่ 10 ผลของ K_2HPO_4 ต่อการสังเคราะห์เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสโดยเชื้อ Z-10 เลี้ยงแบคทีเรีย Z-10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Yamaguchi ที่สภาวะเดียวกันกับรูปที่ 7 แต่เสริมด้วยเดกซ์แทรน 0.5% แล้วแปรผันปริมาณของ KH_2PO_4 ในช่วง 0-2.0%

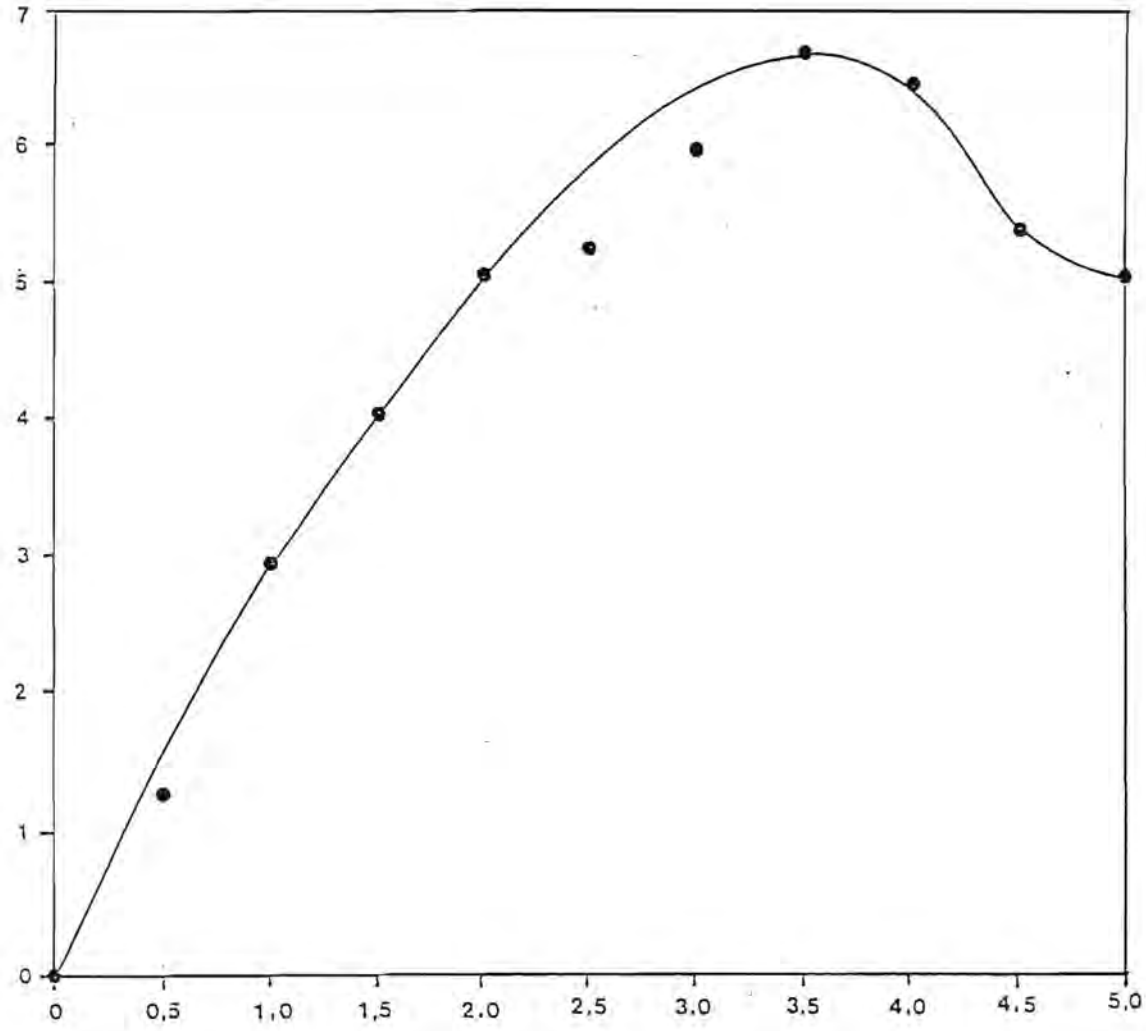


รูปที่ 11 ผลของ $MgSO_4$ การผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสโดยเชื้อ Z-10
เลี้ยงเชื้อ Z-10 ในอาหาร Yamaguchi ที่ได้รับการปรับปรุงเหมือนที่ใช้ในรูปที่ 8 แต่ใช้ KH_2PO_4 0.4% แล้วแปรผันปริมาณของ $MgSO_4$ ในช่วง 0-0.1%

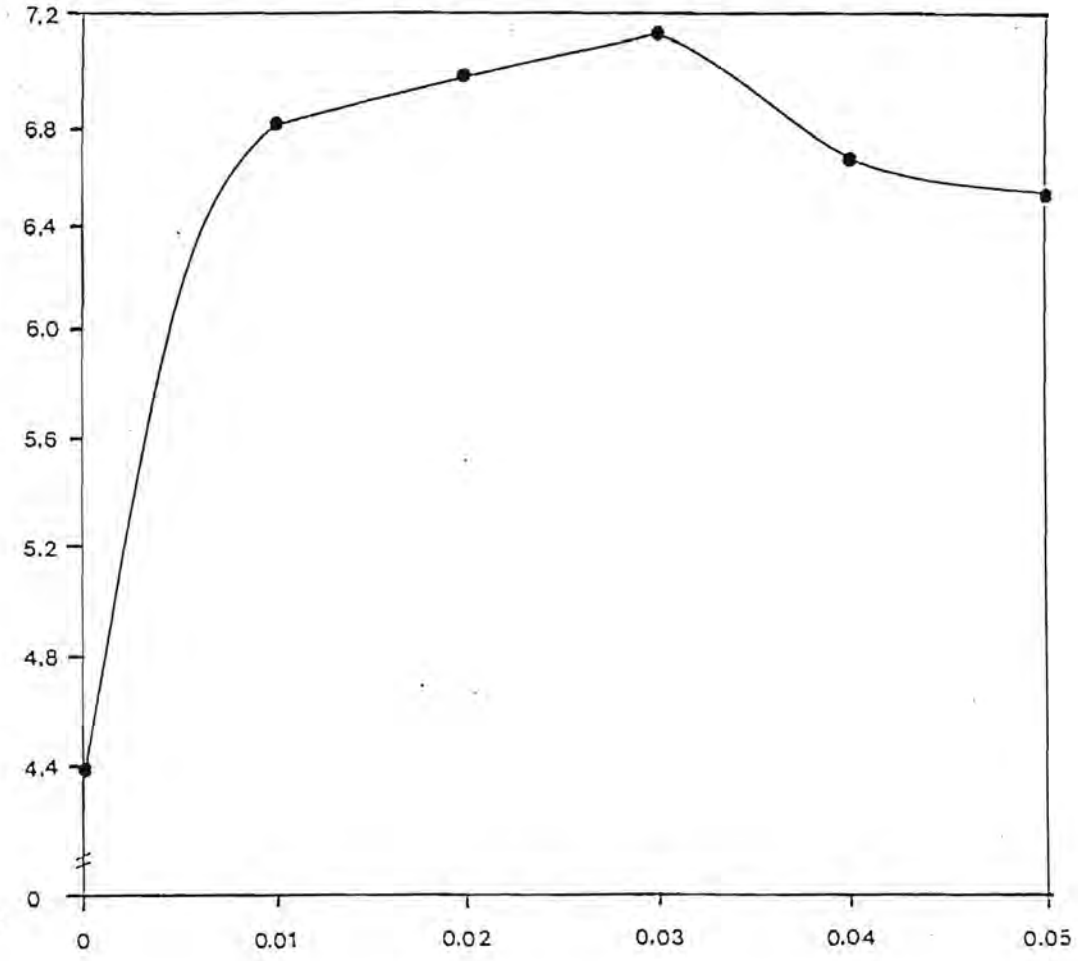


รูปที่ 12 การใช้ Casamino acid เป็นแหล่งของไนโตรเจน

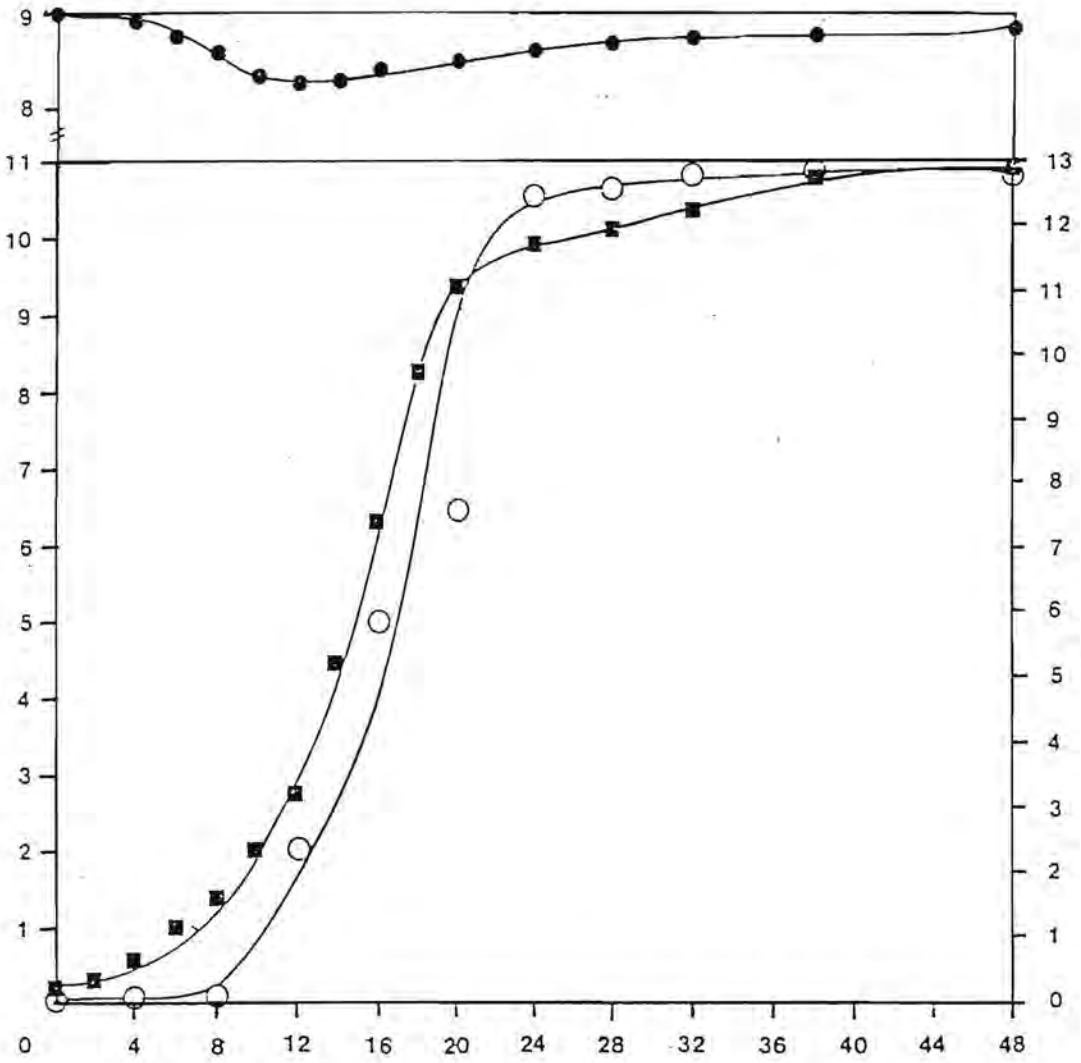
เชื้อ Z-10 ถูกเลี้ยงในอาหาร Yamaguchi สูตรปรับปรุงเช่นเดียวกับที่ใช้ในรูป 11 แต่ใช้ $MgSO_4$ ในปริมาณ .05% แล้วแปรผันปริมาณของ Casamino acid ในช่วง 0-5%



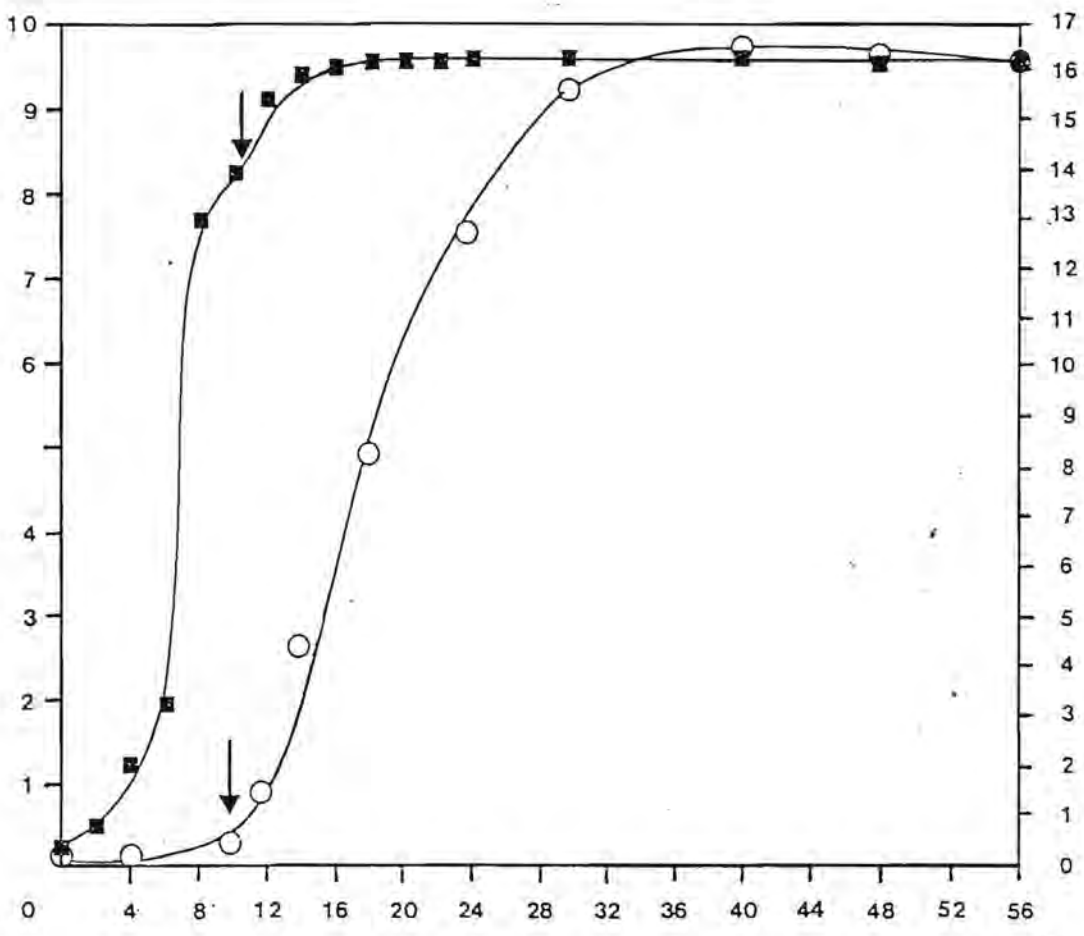
รูปที่ 13 ผลของผงยีสต์สกัดต่อการสร้างเอนซ์ไซม์เดกซ์แทรนเนส ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับรูปที่ 12 แล้วเติมผงยีสต์สกัดในปริมาณ 0 - 0.05% ลงไป



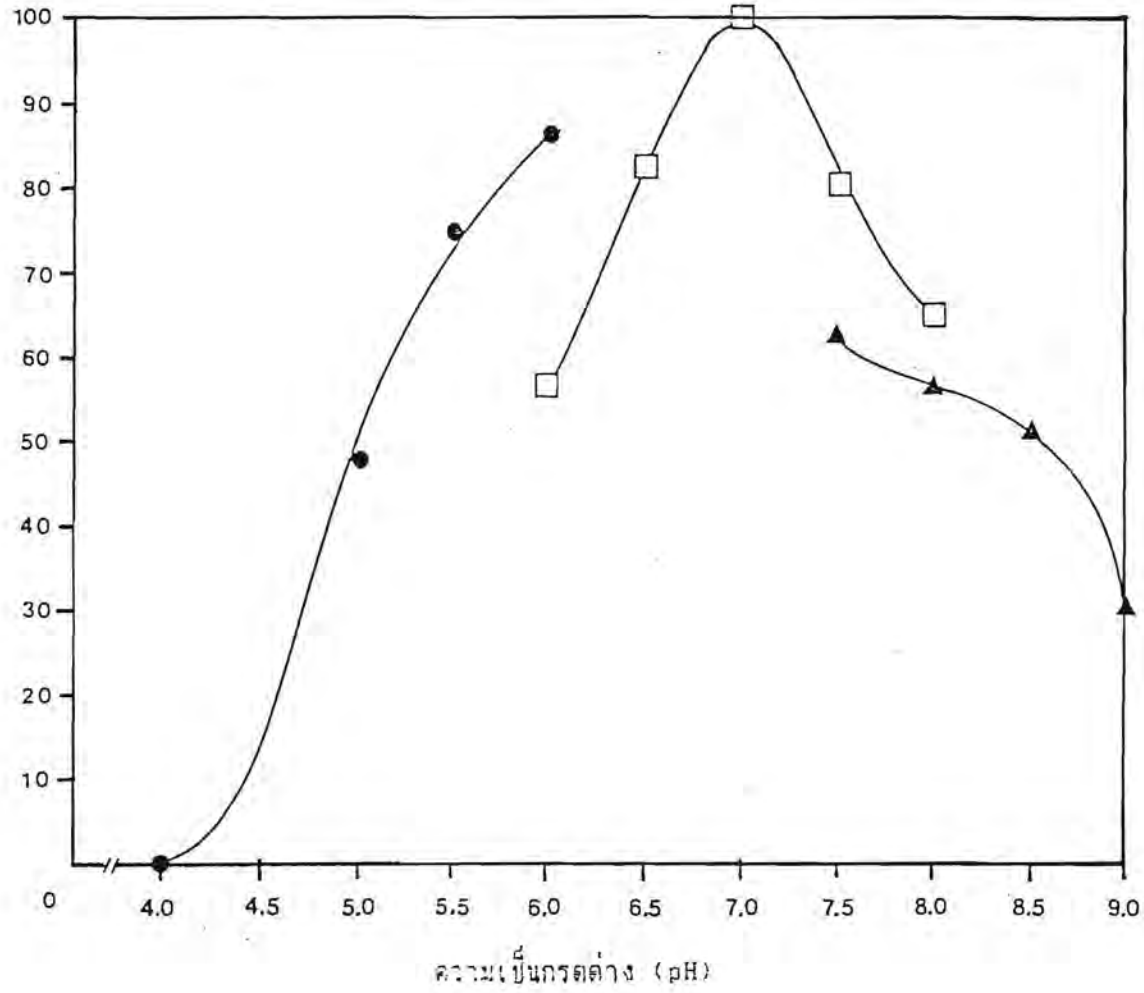
รูปที่ 14 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสโดยเชื้อ Z-10 เลี้ยงเชื้อ Z-10 ในอาหาร Yamaguchi สูตรปรับปรุง (ตารางที่ 6) ที่อุณหภูมิห้อง ความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 9.0 ภายใต้การเขย่า 200 รอบต่อนาที



รูปที่ 15 การใช้กลูโคสและเดกซ์แทรนเป็นแหล่งของคาร์บอนกับการใช้เดกซ์แทรนอย่างเดียว เลี้ยงเชื้อ Z-10 ในอาหาร Yamaguchi สูตรปรับปรุงภายใต้สภาวะมาตรฐาน โดยสภาวะแรกใช้ 0.5% กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนจนเชื้อเจริญถึงระยะ late log phase (หัวลูกศร) แล้วเติม 0.25% เดกซ์แทรนเสริมลงไปเทียบกับสภาวะมาตรฐานที่ใช้ 0.5% เดกซ์แทรนเป็นแหล่งของคาร์บอนเพียงอย่างเดียว



รูปที่ 16 อิทธิพลของความเป็นกรดด่างต่อการทำงานของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส บ่มเอนไซม์กับสับสเตรทในระบบบัฟเฟอร์ ดังนี้: ● ซิเตรท-ฟอสเฟต (pH 4-6) □ ฟอสเฟต (pH 6-8). ▲ ทริส(ไฮดรอกซีมิเทน)อะมิโนมิเทน (pH 7.5-9) โดยให้แอคติวิตี้ pH 7.0 ซึ่งสูงที่สุดเท่ากับ 100%

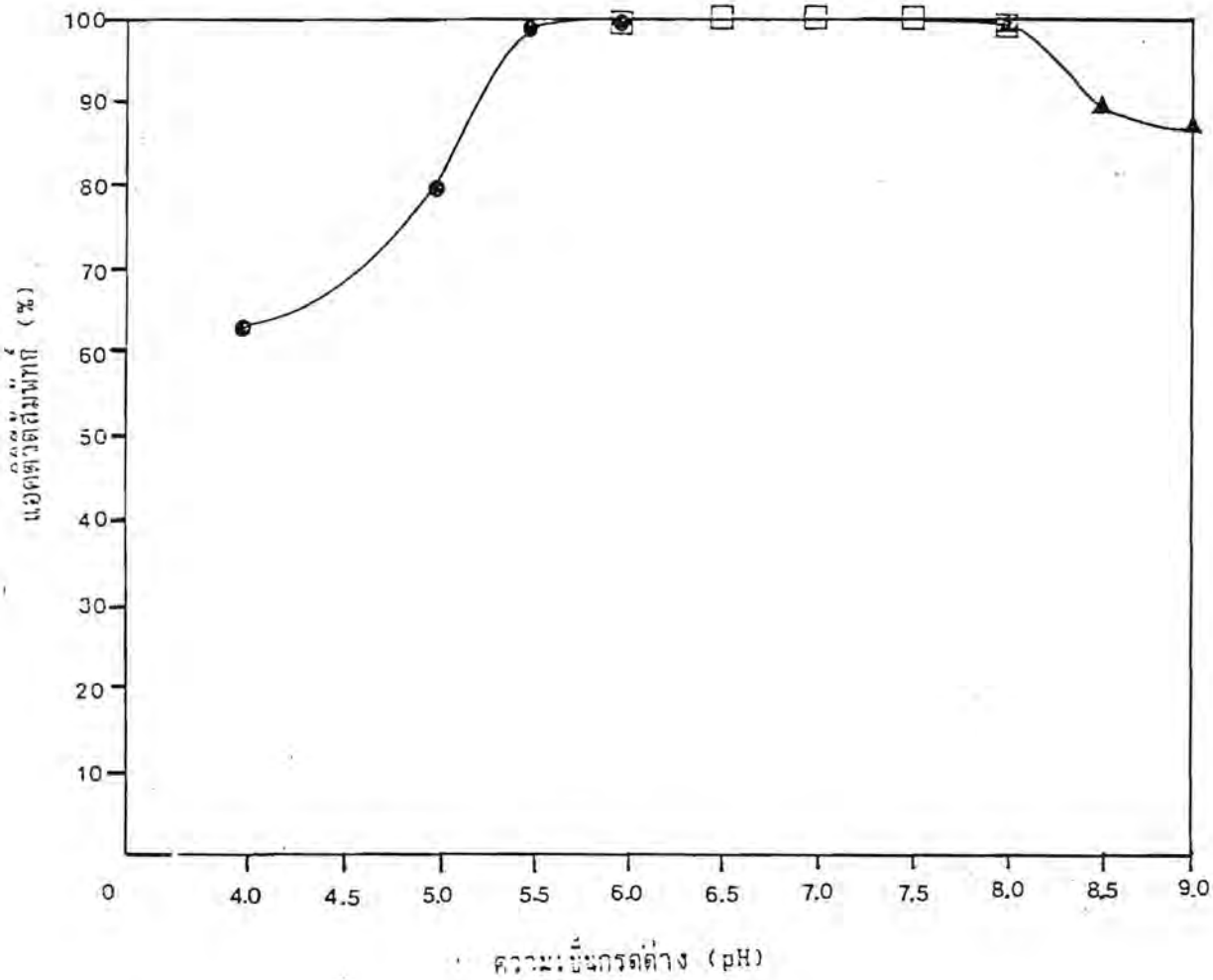


รูปที่ 17 ความเสถียรของเอนไซม์ต่อความเป็นกรดด่าง

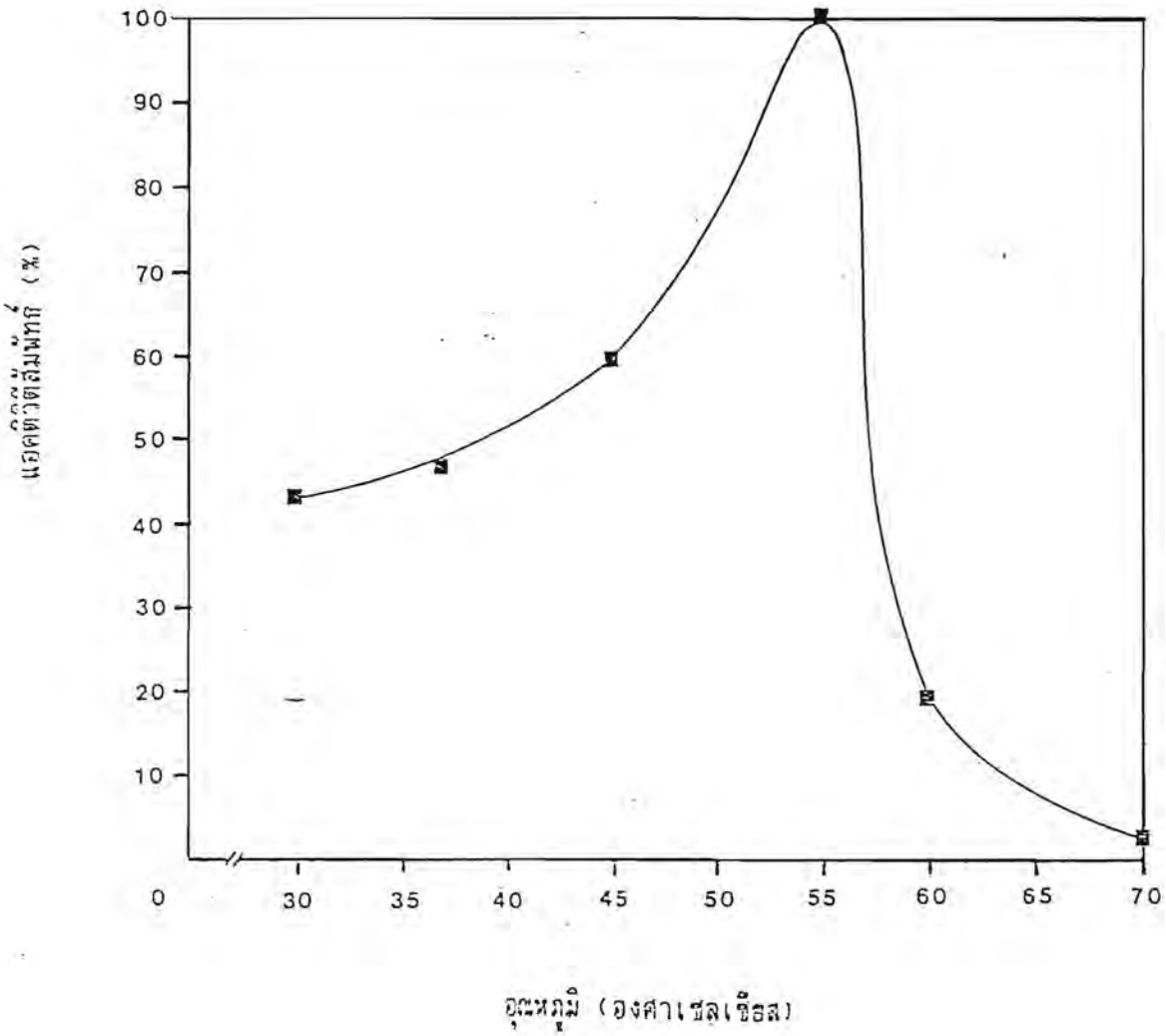
ของเอนไซม์ในระบบบัฟเฟอร์ต่าง ๆ ดังนี้ ● ซิเตรท-ฟอสเฟต (pH 4-5)

□ ฟอสเฟต (pH 6-8). ▲ ทริส(ไฮดรอกซีมีเทน)อะมิโนมีเทน (pH 7.5-9)

เป็นเวลา 30 นาทีแล้วนำมาหาแอคติวิตี้ที่ pH 7.0 โดยให้แอคติวิตี้ที่ pH 7.0 เป็น 100%

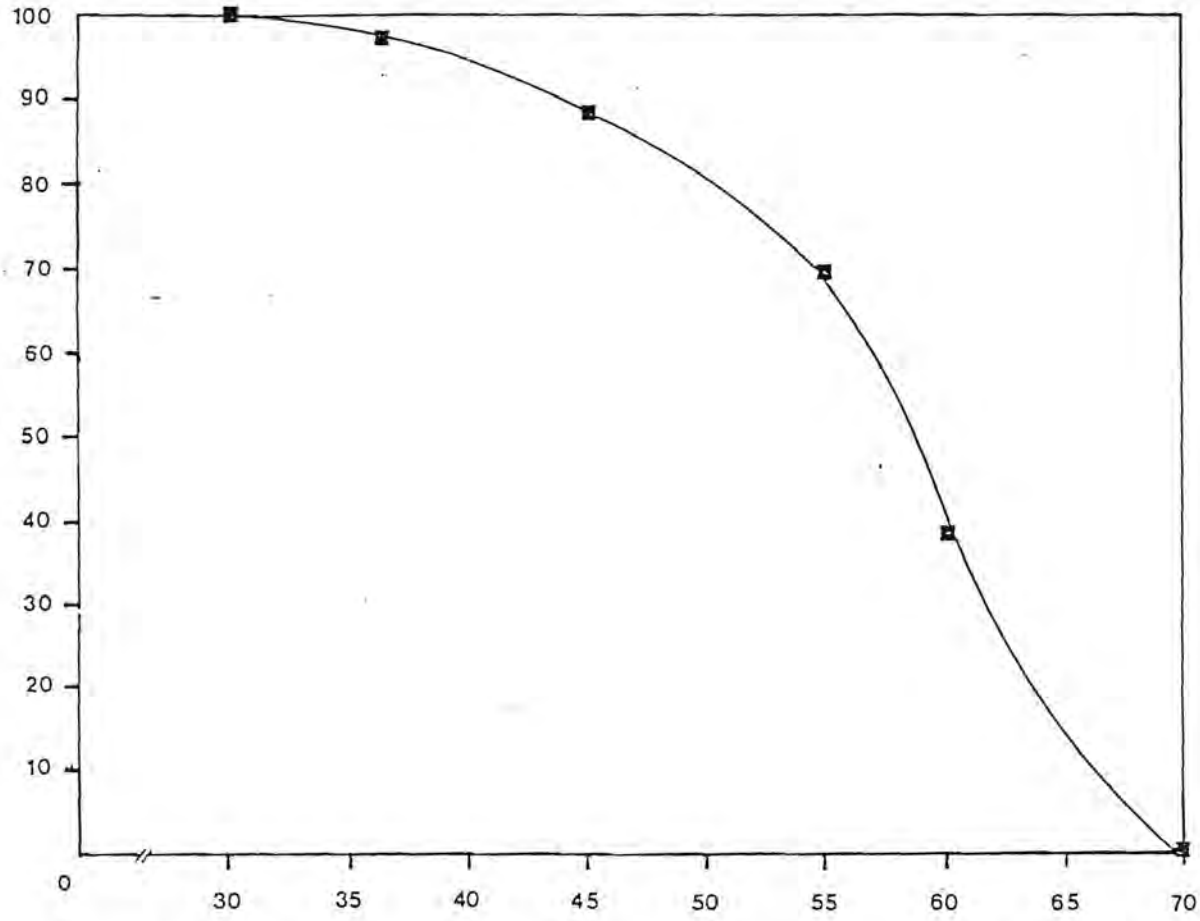


รูปที่ 18 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์
: เปรียบเทียบแอคติวิตีของระบบเอนไซม์สับสเตรทที่บ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ

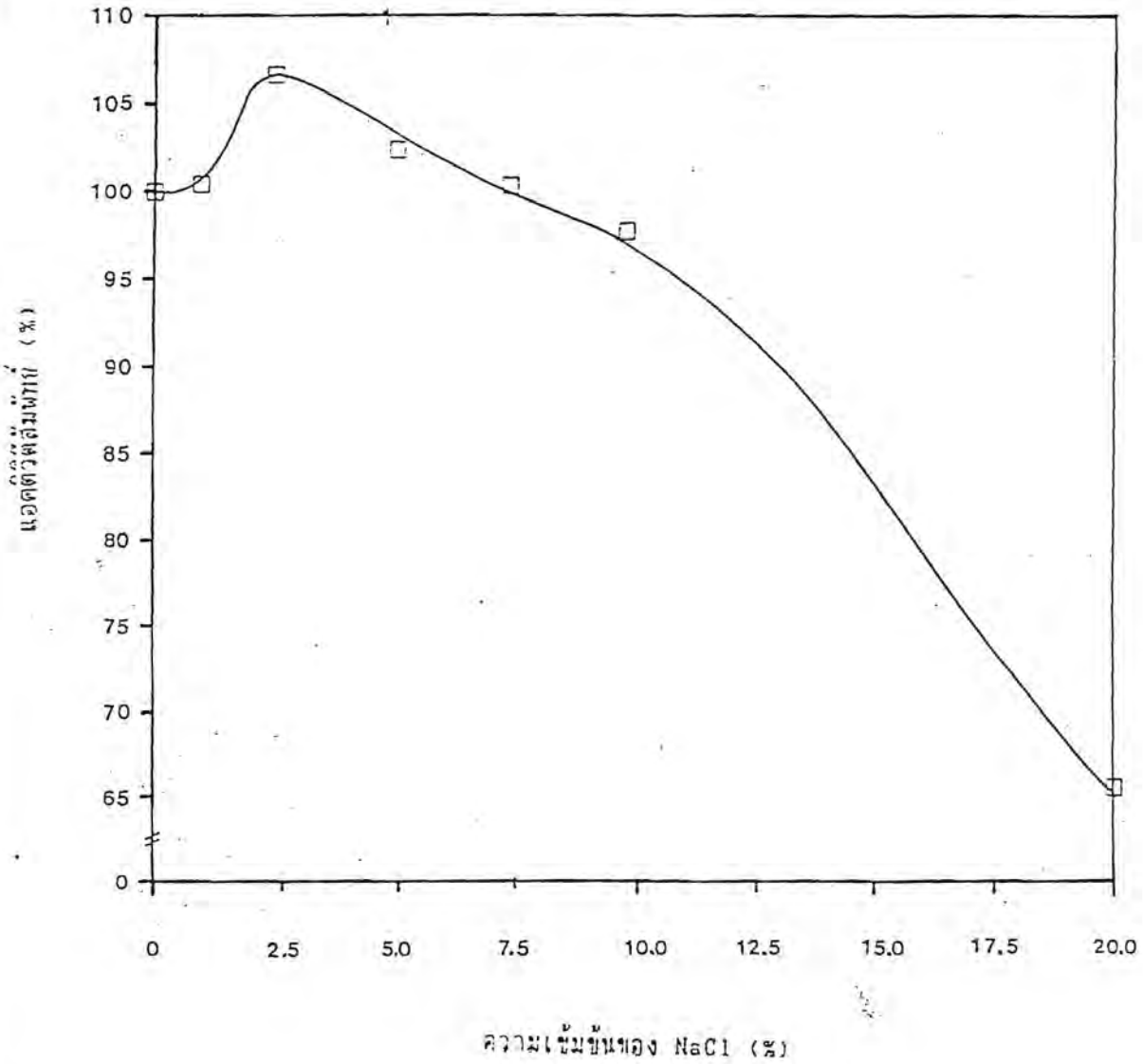


รูปที่ 19 ความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ

บ่มเอนไซม์กับ 0.05 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่อุณหภูมิที่กำหนดเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาทำปฏิกริยากับสับสเตรทที่อุณหภูมิ 55°C

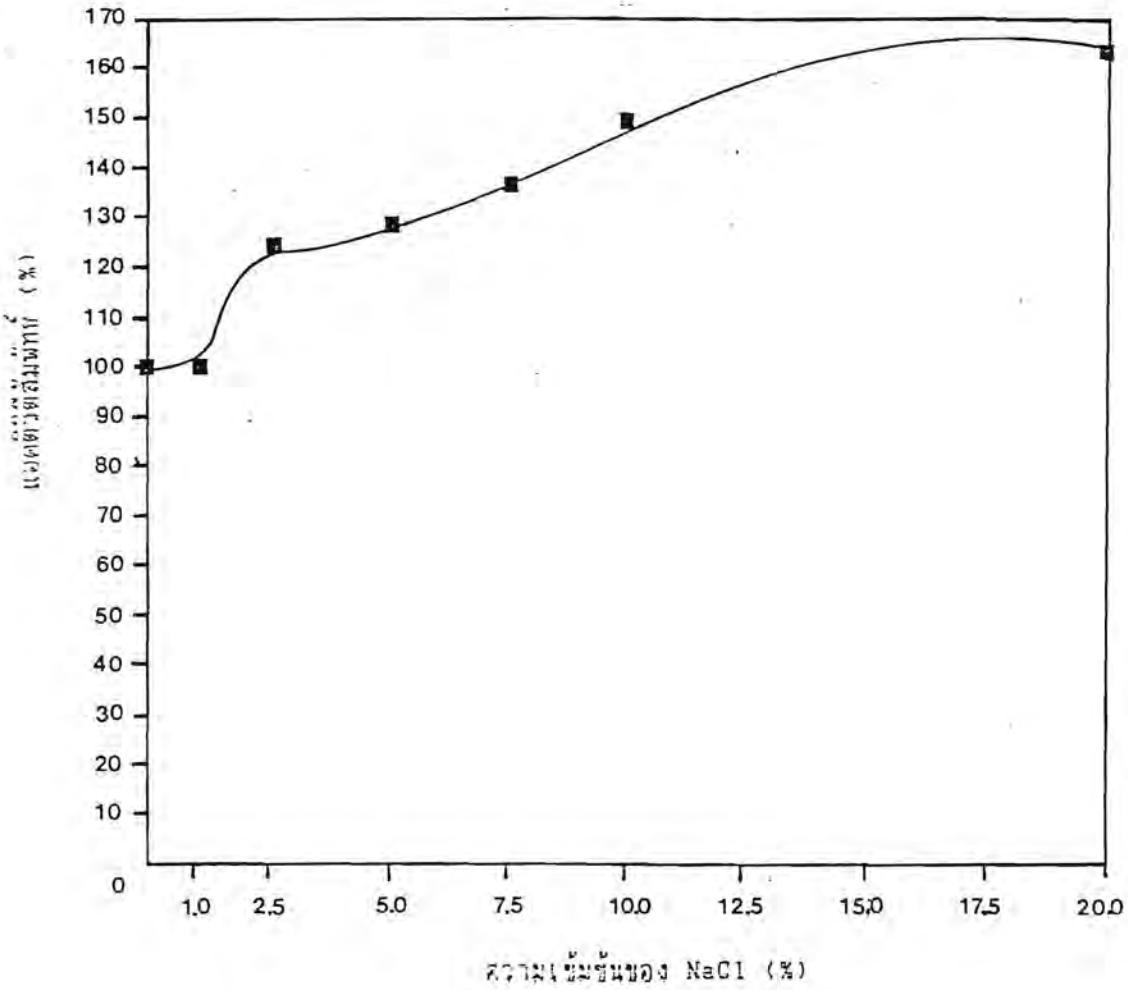


รูปที่ 20 ผลของ NaCl ต่อการทำงานของเอนไซม์
บ่มระบบเอนไซม์ลับสเตรทร่วมกับ NaCl ที่ความเข้มข้นตามที่ระบุในสภาวะ
ทดลองมาตรฐาน

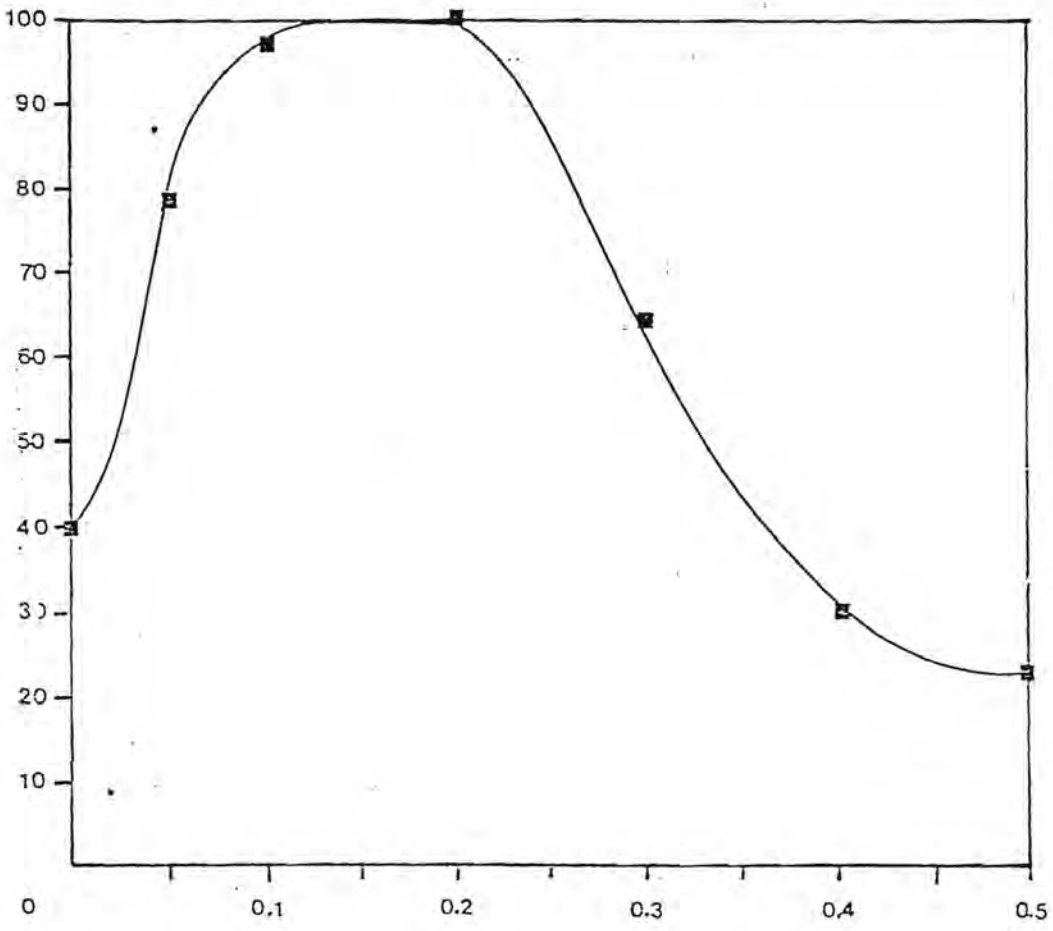


รูปที่ 21 ความเสถียรของเอนไซม์ต่อ NaCl

บ่มเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่มี NaCl ความเข้มข้นต่าง ๆ ตามที่ระบุเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาตรวจอคติวิติโดยทำให้เจือจางเป็น 2.5%

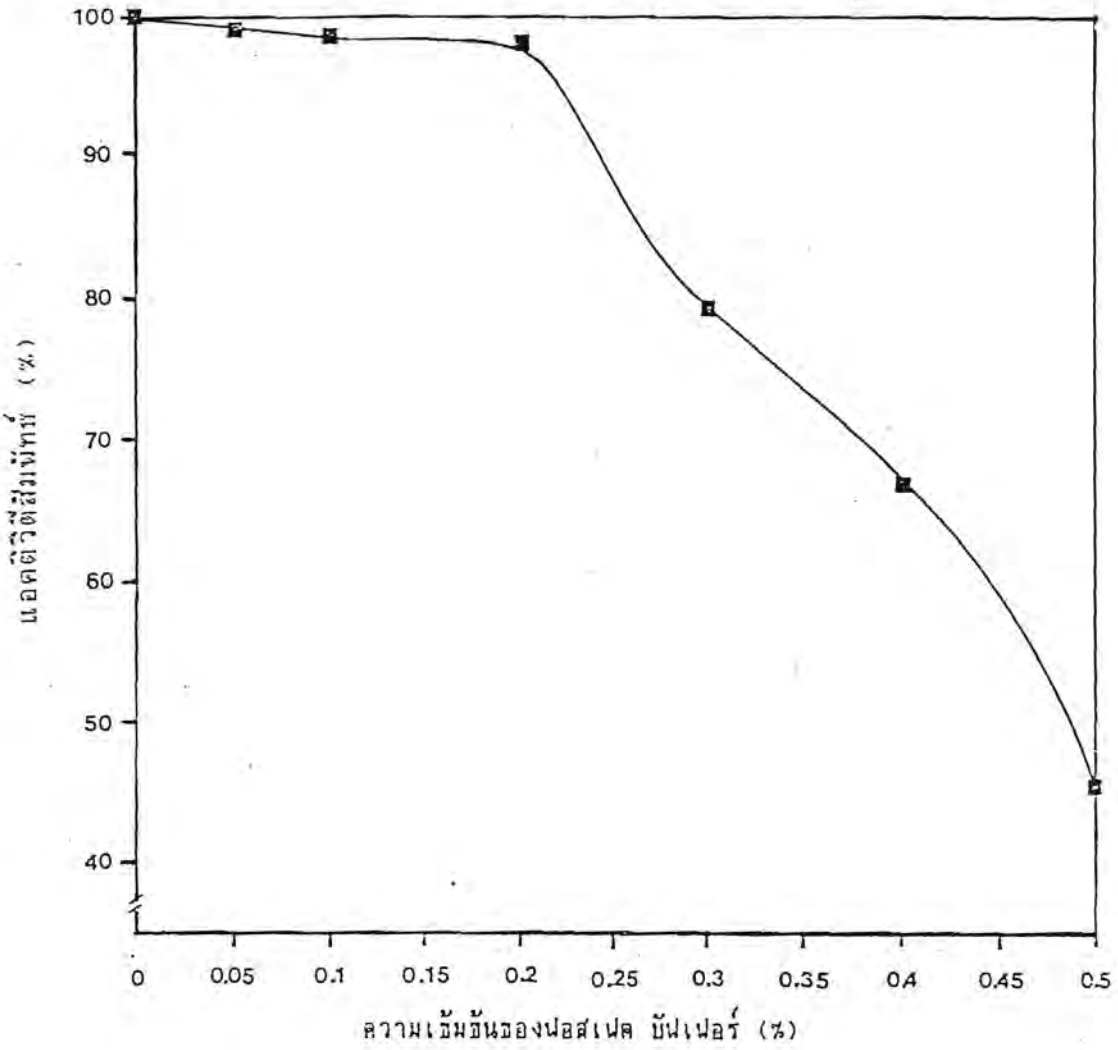


รูปที่ 22 ความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ต่อการทำงานของเอนไซม์ ย่อมเอนไซม์ในสารผสมของปฏิกิริยาโดยแปรผันความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในช่วง 0-0.5 M

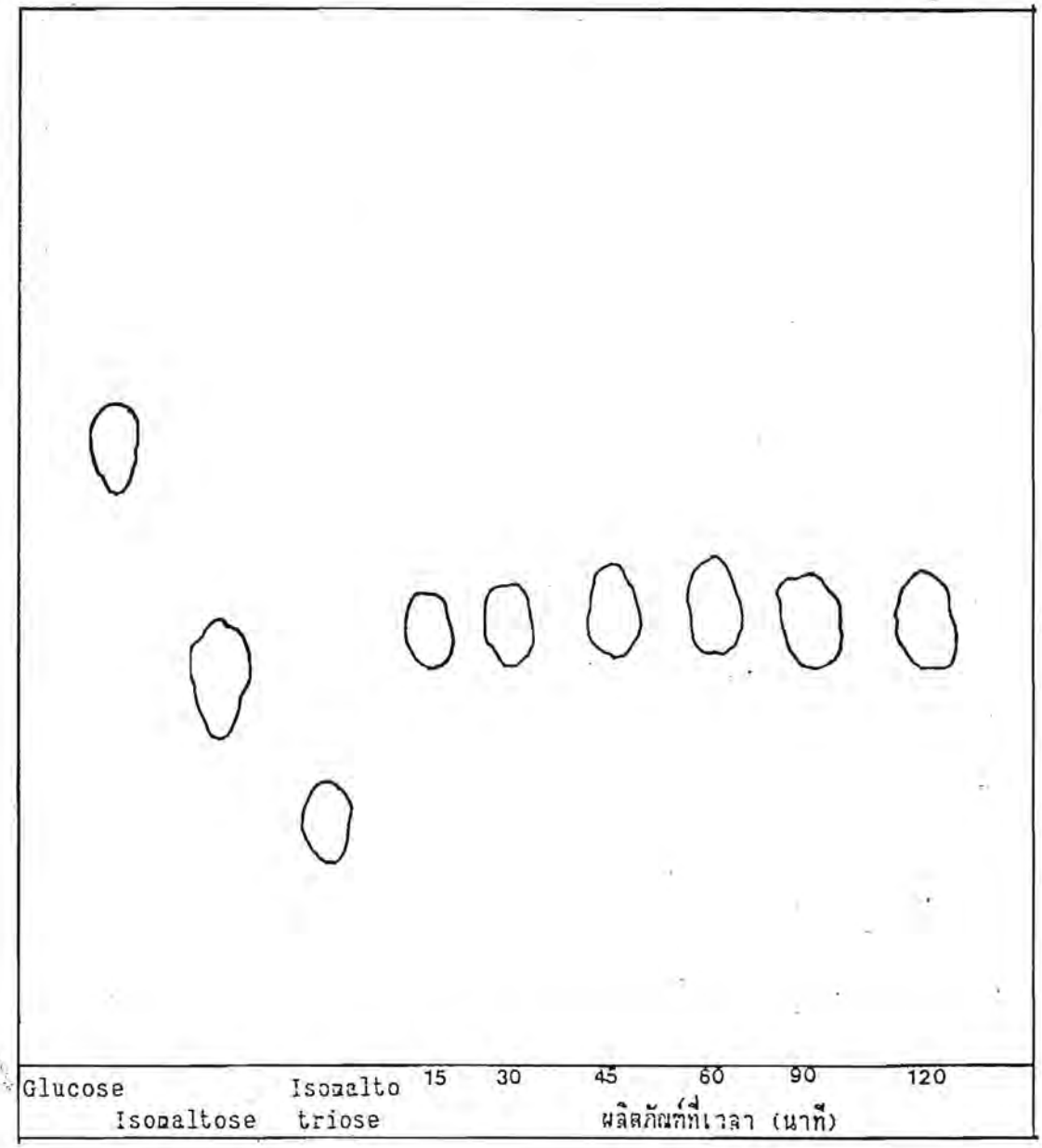


รูปที่ 23 ความเสถียรของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสในฟอสเฟตบัฟเฟอร์

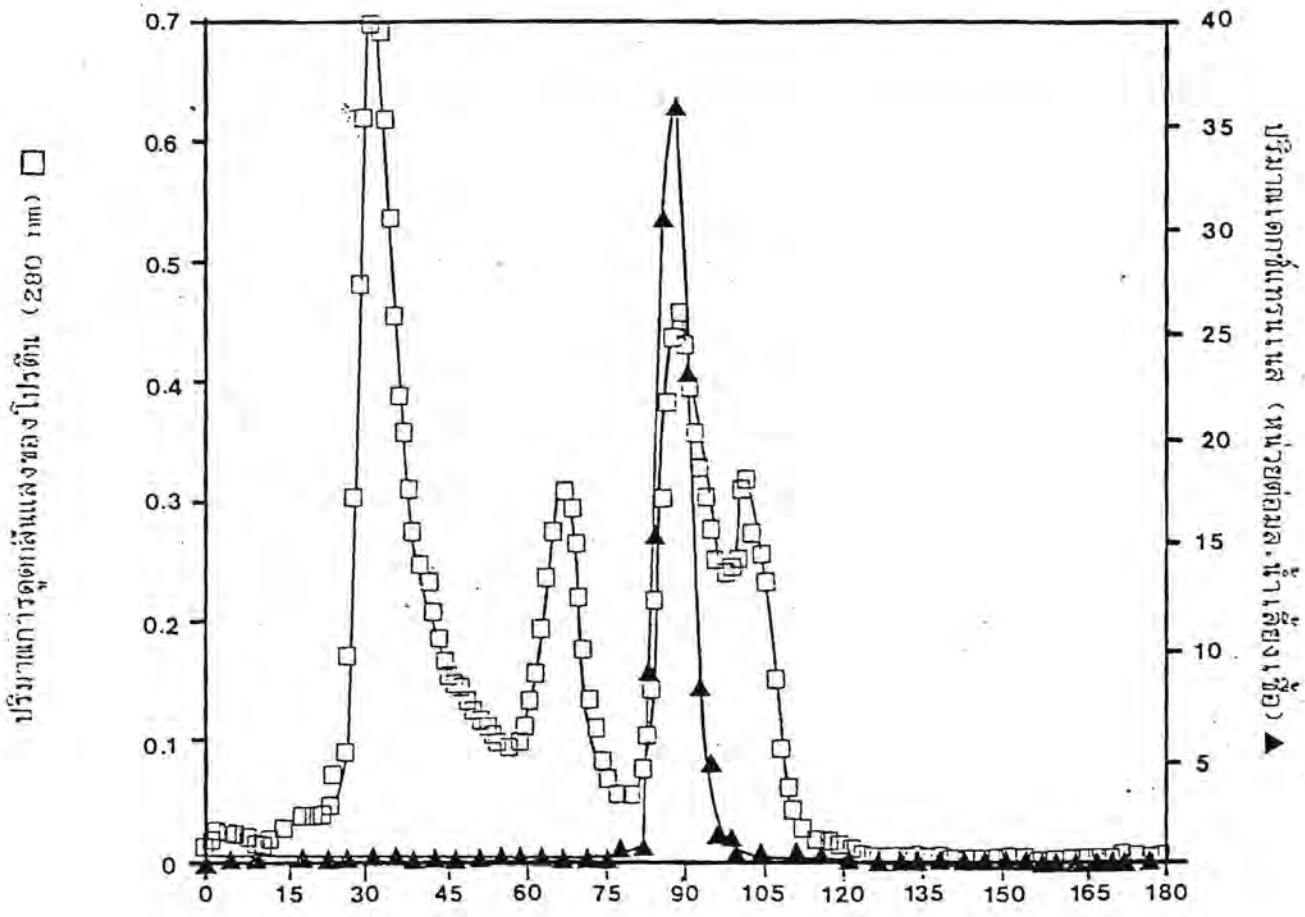
บ่มเอนไซม์ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้นต่าง ๆ 30 นาทีในสภาวะมาตร
ฐานจากนั้นนำมาตรวจสอบแอคติวิตีโดยให้แอคติวิตีที่สภาวะมาตรฐานเท่ากับ 100%



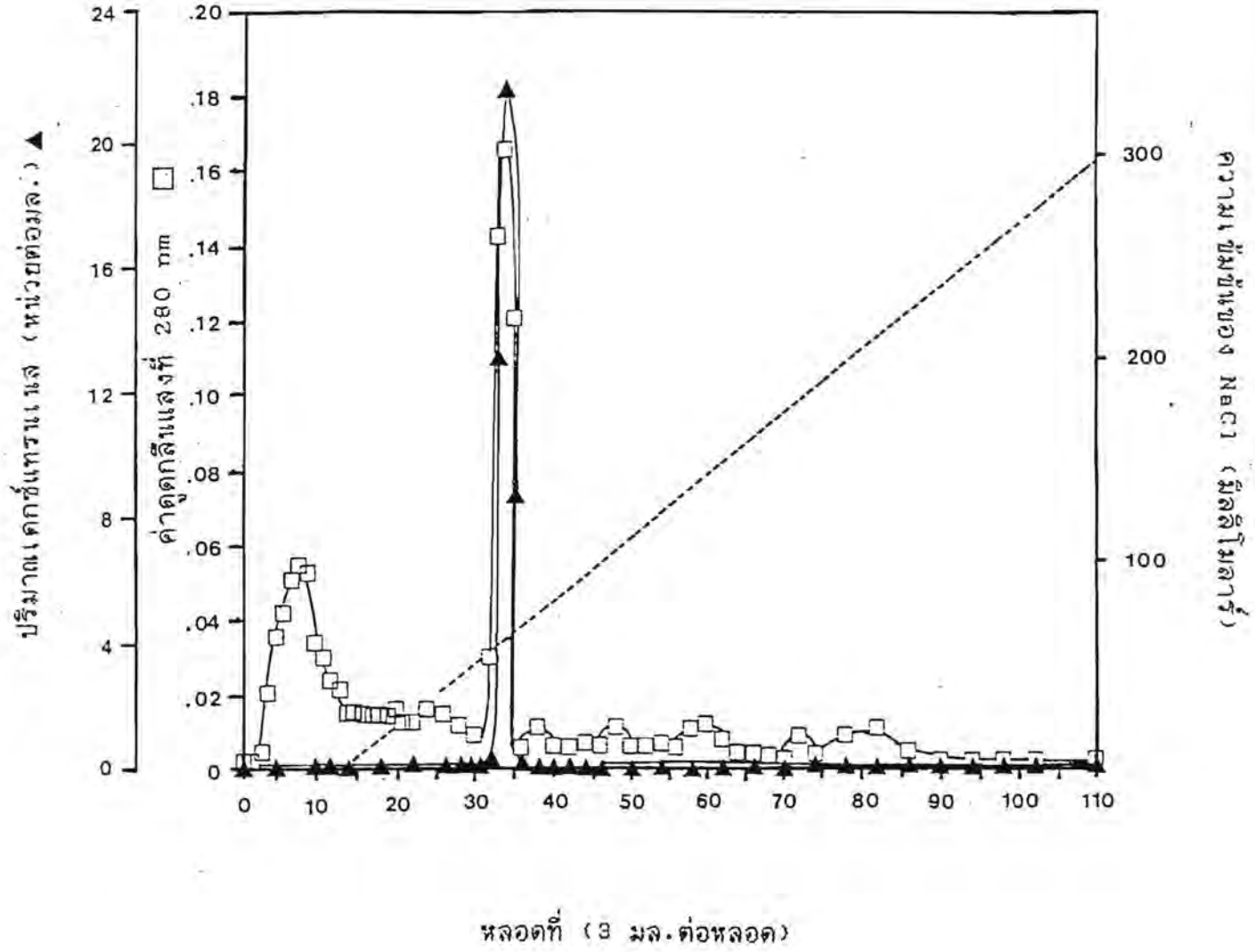
รูปที่ 24 . Paper chromatogram ของไฮโดรไลเสทเดกซ์แทรน T-2000 จากการย่อยสลายโดยเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจาก Micrococcus sp. Z-10 ที่เวลาต่าง ๆ กันเทียบกับ standard glucose, isomaltose isomaltotriose บนกระดาษ Whatman no. 1 โดยใช้วิธี ascending ในระบบโซลเวนท์ n-propanaol-น้ำ ในอัตราส่วน 70 : 30



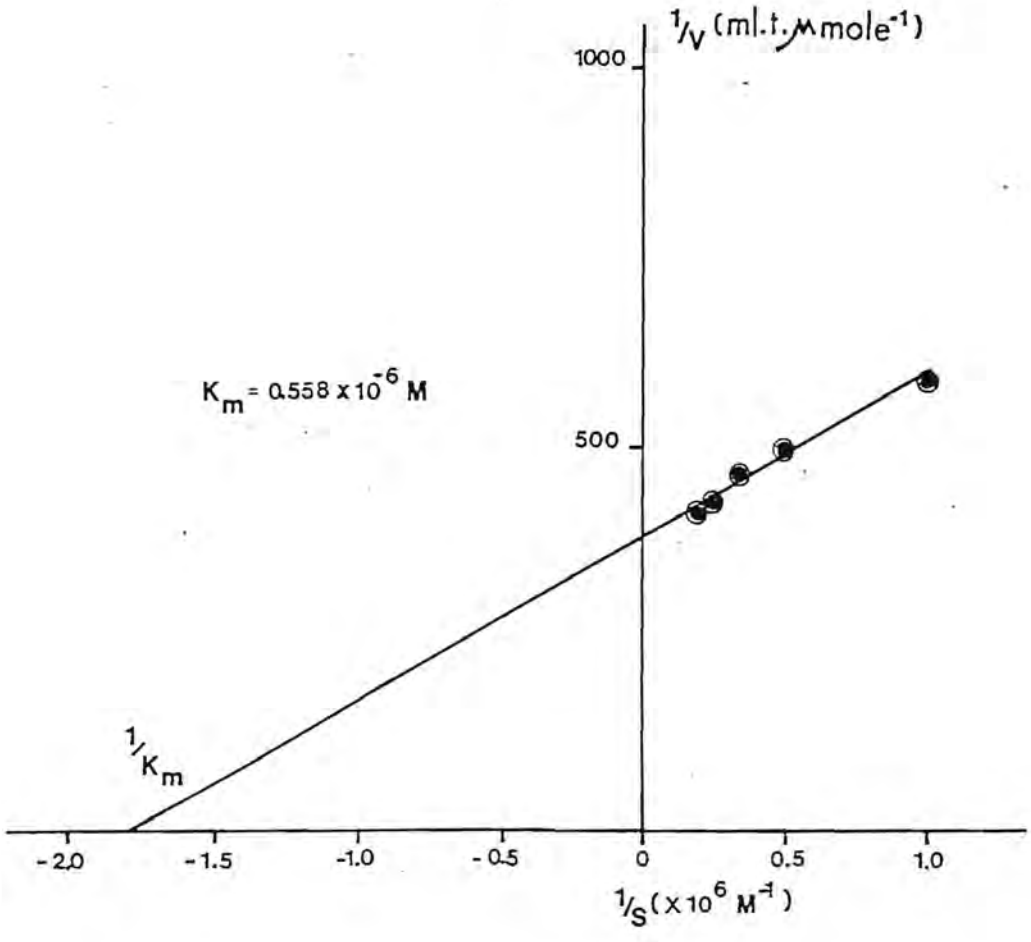
รูปที่ 25 Elution profile ของเดกซ์แทรนเนสจาก Micrococcus sp. Z-10 ที่ผ่าน Sepharose 4B โดยตัวอย่างละลายอยู่ใน .05 M sodium phosphate buffer pH 7.0 และใช้ความเร็วของการชะเท่ากับ 30 มล.ต่อชม.



รูปที่ 25 Elution profile ของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากคอลัมน์ DEAE-Cellulose เอนไซม์ละลายใน .01 M sodium phosphate buffer pH 7.0 แล้ว elute ด้วย gradient ของ 0 - 300 mM NaCl โดยใช้ flow rate 15 มล./ชม.



รูปที่ 27 การหาค่า Km ของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจาก Micrococcus sp. Z-10 ต่อ dextran-T2000 ในรูป Lineweaver-Berge plot



ตารางที่ 1 การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่แยกจากแหล่งต่างๆ

แหล่งที่เก็บตัวอย่าง	เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้	เชื้อที่มีเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส
ดินชายเลนบางปู สมุทรปราการ	20	1
ดินชายเลน สมุทรสงคราม	178	
ดินทรายริมชายหาด เกาะมีมี 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	48	
ดินฟาร์มหอยนางรมบริเวณที่มีน้ำขึ้นสูงสุด	48	
ดินริมหาดทราย ระยอง	46	3
ดินห่างฟาร์มหอย(ห่างเล็กน้อย) ระยอง	48	
ดินห่างฟาร์มหอย(ห่างมาก) ระยอง	48	
หอยนางรม	24	
น้ำทะเลจากชายหาดบางแสน ชลบุรี	16	
คลังเชื้อแบคทีเรียจากทะเล ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	131	1
รวม (สายพันธุ์)	1092	19

ตารางที่ 2 แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

เชื้อแบคทีเรีย	แหล่งที่เก็บตัวอย่าง	ความกว้างของบริเวณใส วัดจากขอบโคโลนี (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	0.7
เชื้อหมายเลข L-45		0.8
เชื้อหมายเลข M-48	ดินทะเลบริเวณที่มีน้ำขึ้นสูงสุด	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

ตารางที่ 3. ผลของคาร์โบไฮเดรตชนิดต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส จากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10

ชนิดของคาร์โบไฮเดรต	ความเข้มข้น	แอคติวิตีสัมพัทธ์ (%)
เดกซ์แทรน T-2000	0.5	100
กลูโคส	1.0	7.25
ฟรุคโตส	1.0	11.3
เซลโลไบโอส	1.0	14.3
มอลโตส	1.0	15.0
ซูโครส	1.0	18.7
เซลลูโลส	1.0	30.3
แป้ง	1.0	15.8

ตารางที่ 4 การใช้สารประกอบไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ เป็นแหล่งไนโตรเจน

ชนิดของสารประกอบ	ปริมาณเอนไซม์ที่ผลิต (หน่วยต่อมล. น้ำเลี้ยงเชื้อ)						
	0.1%	0.2%	0.3%	0.5%	1.0%	1.5%	2.0%
Inorganic nitrogen							
KNO_3	1.65	1.46	1.24	1.02	0.86	ND	ND
NH_4NO_3	1.23	1.67	1.37	1.21	1.09	ND	ND
$NaNO_3$	0.76	1.24	1.63	1.49	1.32	ND	ND
Organic nitrogen							
NH_4Cl	ND	1.70	ND	1.66	1.26	ND	ND
NH_4SO_4	ND	1.29	ND	1.47	1.07	ND	ND
Complex organic N							
Polypeptone	ND	1.09	ND	2.17	4.05	4.13	4.26
Casamino acid	ND	0.71	ND	1.26	2.94	4.02	5.05
Yeast extract	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

ตารางที่ 5 ผลของเกลือแร่ต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ Z-10

ชนิดของแร่ธาตุ	ปริมาณเอนไซม์ (หน่วยต่อมล.)	
	ในสภาวะปกติ	เมื่อไม่เติม
$CaCl_2$	8.19	3.05
H_3BO_3	8.21	3.64
Na_2MoO_4	7.83	5.61
$MnCl_2$	7.80	7.31
$ZnSO_4$	7.46	7.40
$CuSO_4$	7.50	7.80
$CoCl_2$	7.50	7.27

ตารางที่ 6 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ Micrococcus sp. Z-10 ที่ได้ทำการปรับปรุงแล้ว

สารอาหาร	ความเข้มข้น (%) หรือตามที่ระบุ	
	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 มก.	2 มก.
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.5 มก.	0.5 มก.
$MnCl_2.4H_2O$	0.4 มก.	0.4 มก.
$ZnSO_4.7H_2O$	50 ก	0 ก
$CuSO_4.5H_2O$	0.4 ก	0 ก
$CoCl_2.6H_2O$	1 ก	0 ก

*สูตรเดิมเป็นโพลีเปปโตน 1.0%
ปรับความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเป็น 8.0

ตารางที่ 7 ผลของเกลือแร่ชนิดต่าง ๆ ต่อการทำงานของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจาก Micrococcus sp. Z-10 โดยเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ของแอคติวิตีสัมพัทธ์กับสภาวะมาตรฐานซึ่งไม่มีการเติมเกลือแร่ใด ๆ

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	35.6	37.9	41.6	63.2	90.2
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	208.3	168.9
$MgCl_2$	220.0	232.4	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	3.0	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

แอคติวิตีของสภาวะมาตรฐานเท่ากับ 7.10 หน่วยต่อมล.น้ำเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 8 ความสามารถในการย่อยสลายน้ำตาลชนิดต่าง ๆ โดยเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส จาก Micrococcus sp. Z-10

ชนิดของน้ำตาล	ชนิดของพันธะ	ผลการย่อยสลาย
Dextran (MW. 17,200)	alpha-1,6	+
Dextran (MW. 153,000)	alpha-1,6	+
Dextran (MW. 487,000)	alpha-1,6	+
Dextran (MW. 70,000)	alpha-1,6	+
Dextran (MW. 2×10^6)	alpha-1,6	+
Dextran (MW. $5\text{-}40 \times 10^6$	alpha-1,6	+
Sephadex G-100	alpha-1,6	+
Nigeran	alpha-1,3	-
Dextrin	alpha-1,4	-
Soluble starch	alpha-1,4	-
Alpha-cellulose	beta-1,4	-
Carboxy methyl cellulose	beta-1,4	-

ตารางที่ 9 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ 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 10 สมบัติทางสรีรวิทยาและทางชีวเคมีบางประการของแบคทีเรีย สายพันธุ์ Z-10

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

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบปริมาณเดกซ์แทรนเนสที่สร้างจากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

ชนิดของจุลินทรีย์	ปริมาณเอนไซม์[1] (หน่วยต่อมล.อาหารเลี้ยงเชื้อ)	เอกสารอ้างอิง
Fungi		
Penicillium sp. strain 61	42	1
Penicillium luteum	22	8
Yeast		
Lipomyces starkeyi	14.5	15
Bacteria		
Micrococcus sp. strain Z-10	16.4	การวิจัยนี้
Bacillus circulans strain MT-G2	6	21
Flavobacterium sp. strain EK-14	2.3	7
Brevibacterium sp.	8.0[2]	27

หมายเหตุ

[1] = 1 หน่วยเอนไซม์คือปริมาณเอนไซม์ที่ปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่ากับ 1 ไมโครโมลกลูโคสต่อเวลา 1 นาทีภายใต้สภาวะที่ใช้ทดสอบ

[2] = 1 หน่วยเอนไซม์ในกรณีนี้คือปริมาณเอนไซม์ที่ปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่ากับ 1 ไมโครโมลมอลโตสต่อเวลา 1 นาทีภายใต้สภาวะที่ใช้ทดสอบ

เอกสารอ้างอิง

1. เอก แสงวิเชียร, เดกซ์แทรนเนสจาก Penicillium sp. สายพันธุ์ 61 วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2531

2. Bowen, W.H. 1978. Role of carbohydrate in dental caries. Proceeding Sweetener and Dental caries, Eds. Shaw, J.H. and G.C. Roussos. Sp. Supp. Feeding, Weight and Obesity Abstracts, 1978, pp 147-155

3. Buchanan, R.E. and others. 1974. Bergey's Manual of the determinative Bacteriology. 8th edi., The Williams and Wilkins Co., Baltimore, U.S.A.

4. Burnett, G.W., H.W. Scherp, and G.S. Schuster.1976. Oral Microbiology and Infectious Disease. (4th edi.) The William and Wilkins Co., Baltimore, M.D.,U.S.A.

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

6. Depaola,P.F., H.V. Jordan, and J. Berg. 1974. Temporary suppression of Streptococcus mutans through tropical application of vancomycin. J. Dent. Res. 53:108-114

7. Ebisu,S., K.Kato, S.Kotani, and A. Misaki.1975. Isolation and purification of Flavobacterium -1,3-glucanase-hydrolyzing; insoluble, sticky glucan of Streptococcus mutans. J. Bacteriol. 124:1489-1501

8. Fukumoto, J., H. Tsuji, and D. Tsuru. 1971. Studies on mold dextranases I, Penicillium luteum dextranase : its production and some enzymatic properties. J. Biochem. 69 1113-1121

9. Gibbons,R.J., and J. van Houte. 1980. Bacterial adherence and the formations of dental plaque in bacterial adherence. In E.H. Beachey (edi.), Receptor and Recognition, series B, vol. 6,pp.63-103, Chapman and Hall, London, U.K.

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

11. Hamada,S., and H.D. Slade. 1980. Mechanisms of adherence of Streptococcus mutans to smooth surfaces in vitro. In E.H. Beachey (edi.),pp. 107-135, Chapman and Hill, London, U.K.

12. Hoffman, S. 1978. Current research trends in preventive dentistry. In H.L. Ward, H. Miller, and A.F. Gardner (edi.), A preventive point of view, pp. 206-230, Charles C. Thomas Publisher, Springfield, IL., U.S.A.

13. Jenkins, G.N. 1978. The Physiology and Biochemistry of mouth. Blackwell Scientific Publications, London, U.K.

14. Jordan, H.V., and P.F. DePaola. 1974. Effect of a topically applied 3 per cent vancomycin gel on Streptococcus mutans on different tooth surfaces. J. Dent. Res. 53:115-120

15. Koenig, D.W., and D.F. Day. 1988. Production of dextranase by Lipomyces starkeyi. Biotech. Letts. 10: 117-122

16. Loesche, W.J. 1986. Role of Streptococcus mutans in human dental decays. Microbiol. Rev. 50:353-380

17. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagents. J. Biol. Chem. 193: 265-275

18. Makinen, K.K. 1978. The use of xylitol in nutritional and medical research with special reference in dental caries. Proceeding "Sweetener and Dental Caries", Eds. Shaw, J.H., and G.G. Roussos. Sp. Supp. Feeding, Weight and Obesity Abstracts, 1978, pp. 193-224

19. Montville, T.J., C.L. Cooney, and A.J. Sinskey. 1978. Streptococcus mutans dextransucrase: A Review. Adv. Appl. Microbiol. 24:55-84

20. Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. J. Biol. Chem. 153 375-380

21. Okami, Y., A. Kurasawa, and Y. Hirose. 1980. a newly glucanase produced by a marine Bacillus sp. Agric. Biol. Chem., 44(5): 1191-1192

22. Orland, F.J. 1959. A review of dental research using germ free animals. Ann. N.Y. Acad. Sci. 78:285-289

23. Orstavik,D., F.W. Kraus, and L.C. Henshaw. 1974. In vitro attachment of streptococci to the tooth surface. Infect. Immun. 9:794-800

24. Schroder, H.G.S., and F.B. Van Es. 1980. Distribution of bacteria in industrial sediment of the Ems-Dollard estuary. Neth. J. Sea Res. 14: 168-287

25. Somogyi, M. 1952. Noted on sugar determination. J. Biol. Chem. 195: 19-23

26. Thaniyavarn, S., K.G. Taylor, S. Singh, and R.J. Doyle. 1982. Pyridine analogues inhibit the glucosyltransferase of Streptococcus mutans. Infect. Immun. 37: 1101-1111

27. Yamaguchi, T., and S. Gocho. 1973. Production and properties of alkaline dextranase from a newly isolated Brevibacterium sp. Agric. Biol. Chem. 37 2527-2533