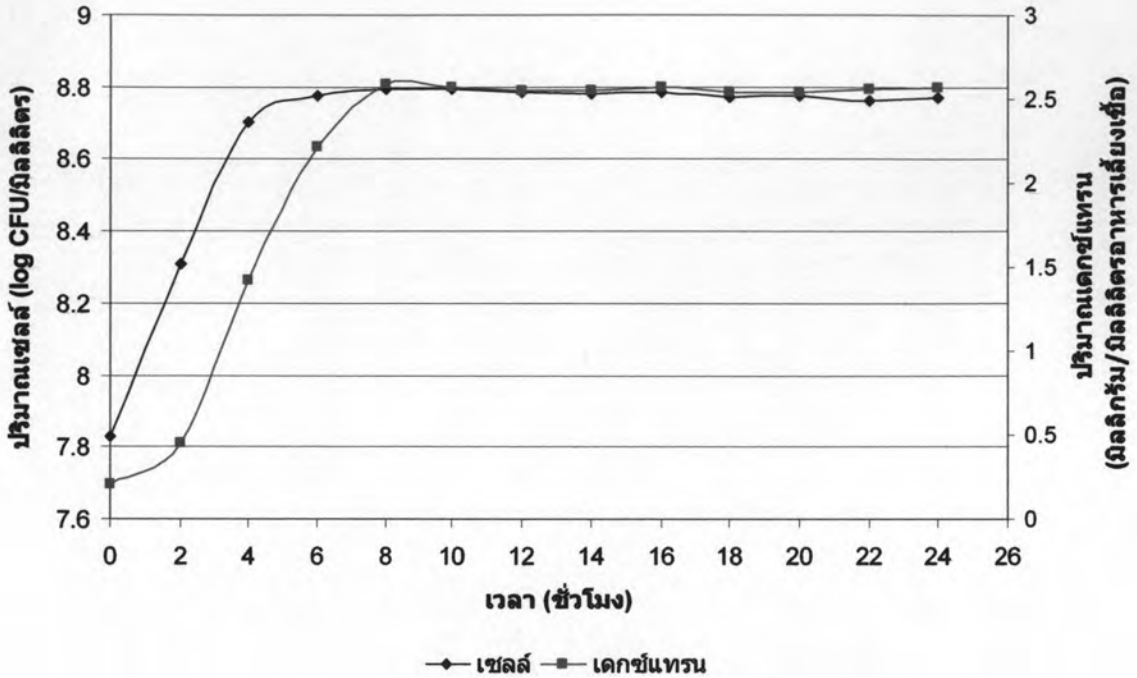
บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การศึกษารูปแบบการเจริญของ *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473

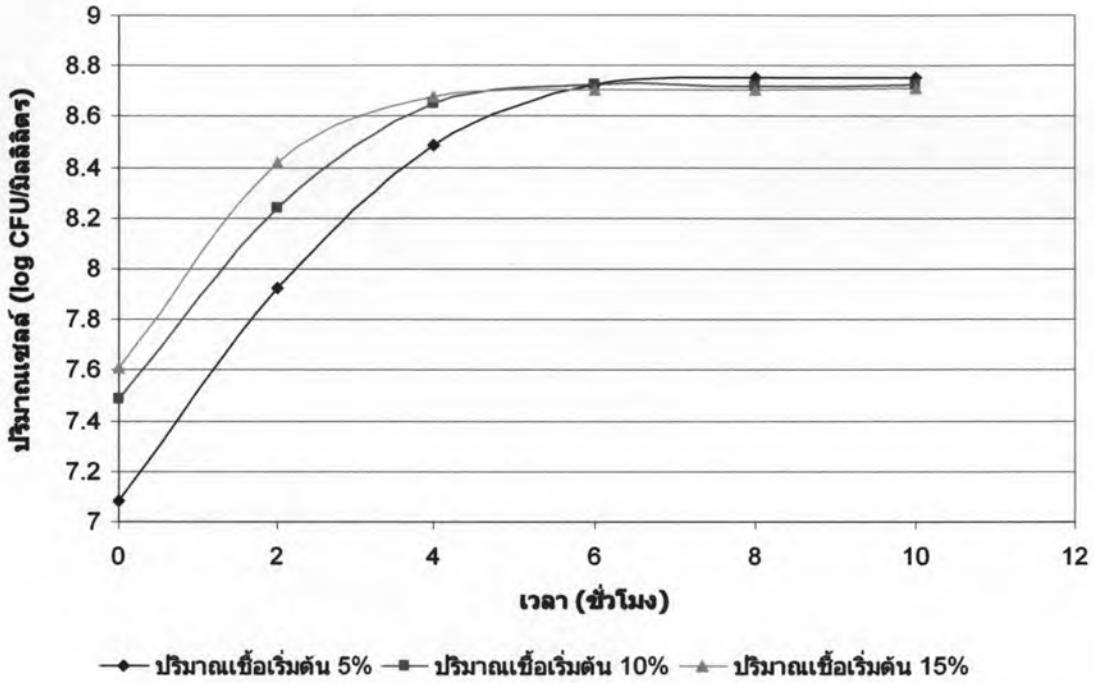
จากการเลี้ยง *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปโตนที่เสริมด้วยซูโครสความเข้มข้น 10% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อเป็นสารชักนำการสร้างเดกซ์แทรน ตามวิธีการเตรียมหัวเชื้อ และการศึกษารูปแบบการเจริญในข้อ 3.2 และ 3.3 ตามลำดับ จากนั้นติดตามการเจริญด้วยวิธีการนับเซลล์มีชีวิตทั้งหมดที่เจริญบนจานเพาะเชื้อในข้อ 3.8 พร้อมทั้งตรวจสอบปริมาณเดกซ์แทรนตามวิธีในข้อ 3.9 สามารถสร้างกราฟรูปแบบการเจริญและการสร้างเดกซ์แทรนของ *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.1 โดยพบว่ากล้าเชื้อมีค่าการเจริญเท่ากับกึ่งกลางการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ (mid-log phase) ที่ 3 ชม. จึงใช้กล้าเชื้อที่ช่วงเวลานี้สำหรับการทดลองต่อไป นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณการผลิตเดกซ์แทรนจะเริ่มเข้าสู่ภาวะคงที่ในชั่วโมงที่ 8 เป็นต้นไป ดังนั้นในการทดลองต่อๆ ไปจึงเก็บตัวอย่างตั้งแต่ 0-10 ชม. และเมื่อพิจารณาถึงรูปแบบการเจริญและการผลิตเดกซ์แทรนพบว่า เดกซ์แทรนเป็นสารที่ถูกสร้างขึ้นควบคู่ไปพร้อมกับการเจริญ



รูปที่ 4.1 การเจริญและการผลิตเดกซ์แทรนของ *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 จากอาหารเหลวทริปโตนเสริมด้วยซูโครสความเข้มข้น 10% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ 30°ซ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

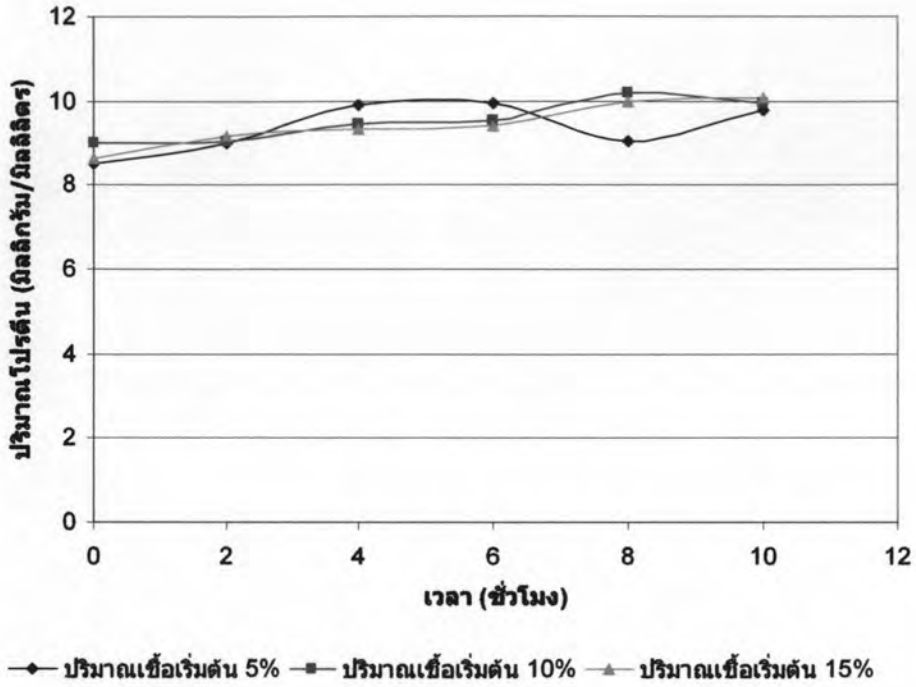
4.2 การคัดเลือกปริมาณกล้าเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเดกซ์แทรนโดย *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473

จากการแปรผันปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นในการผลิตเดกซ์แทรนโดย *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ตั้งแต่ 5-15% โดยปริมาตร ตามวิธีในข้อ 3.4 เมื่อวิเคราะห์การเจริญของเซลล์ด้วยวิธีการนับเซลล์มีชีวิตทั้งหมดที่เจริญบนจานเพาะเชื้อตามวิธีในข้อ 3.8 ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.2 พบว่าการใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่ 15% โดยปริมาตร ให้อัตราการเจริญสูงที่สุดและรูปแบบการเจริญสามารถเข้าสู่ภาวะคงที่ได้อย่างรวดเร็ว



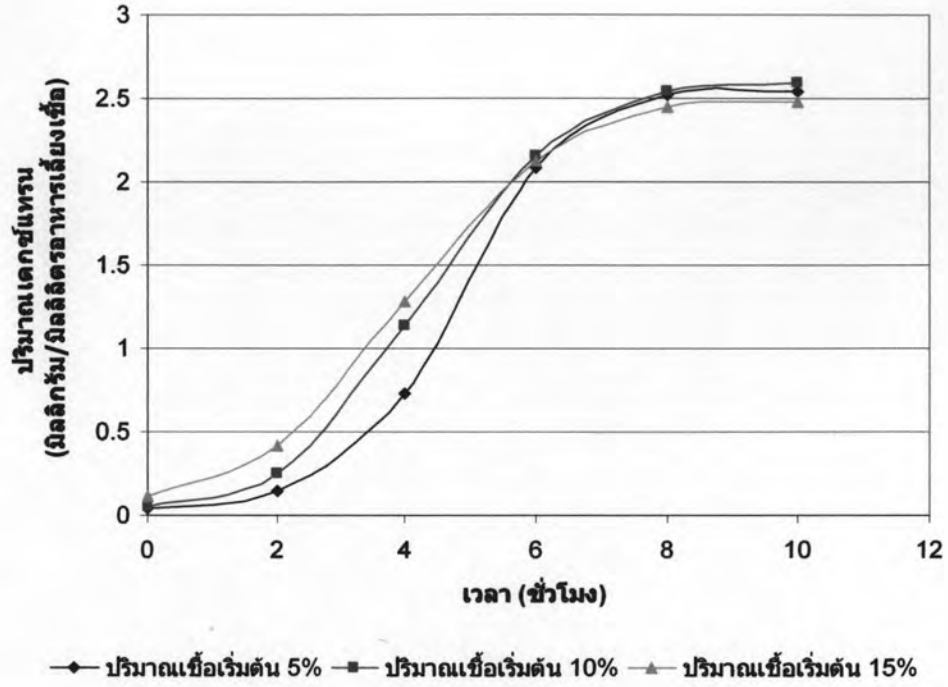
รูปที่ 4.2 การเจริญของ *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ที่แปรผันปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่ 5 10 และ 15% โดยปริมาตร ด้วยวิธีการนับเซลล์มีชีวิตทั้งหมดที่เจริญบนจานเพาะเชื้อ จากอาหารทริปโตนเสริมด้วยซูโครสความเข้มข้น 10% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ 30°ซ 200 รอบต่อนาที 10 ชั่วโมง

สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในส่วนใสของน้ำเลี้ยงด้วยวิธีของ Lowry (1951) ตามวิธีในข้อ 3.14 พบว่าปริมาณโปรตีนในส่วนใสของน้ำเลี้ยงจากอาหารทริปโตนที่ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่างๆ ที่ 5% 10% และ 15% โดยปริมาตร ในแต่ละระยะเวลาของการเก็บตัวอย่าง จะอยู่ในช่วงประมาณ 8.5-9.9 9.0-10.2 และ 8.6-10.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.3 เห็นได้ว่าในส่วนใสก่อนที่จะนำไปตกตะกอนเดกซ์แทรน มีโปรตีนเจือปนอยู่ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน

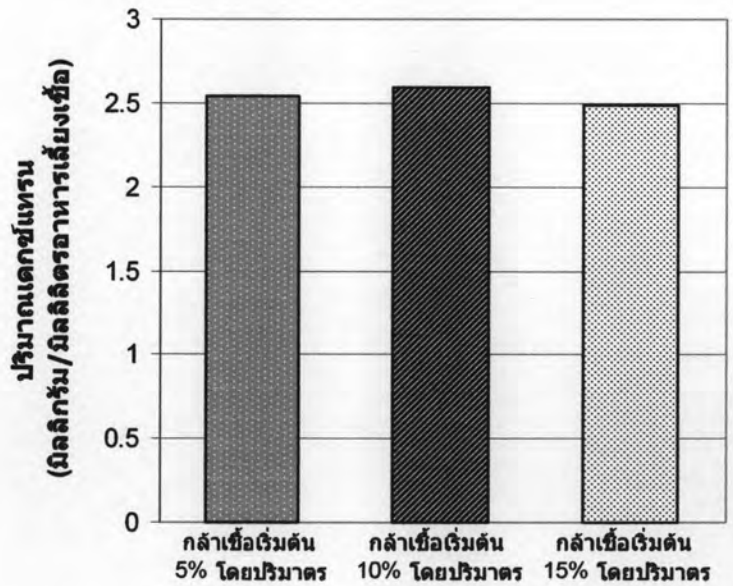


รูปที่ 4.3 ปริมาณโปรตีนในส่วนใสของน้ำเลี้ยง *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ที่เวลาต่างๆ จากอาหารทริปโตนเสริมด้วยซูโครสความเข้มข้น 10% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่แปรผันปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่ 5 10 และ 15% โดยปริมาตร ที่ 30°ซ 200 รอบต่อนาที

และจากการเปรียบเทียบการผลิตเดกซ์แทรนตามวิธีในข้อ 3.9 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นแตกต่างกัน ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.4 และ 4.5 พบว่าปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่ 5% และ 10% โดยปริมาตร ณ ชั่วโมงที่ 10 จะให้ปริมาณเดกซ์แทรนที่ใกล้เคียงกันเท่ากับ 2.54 และ 2.59 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อตามลำดับ แต่เนื่องจากปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่ 5% โดยปริมาตรนั้น จะให้รูปแบบการเจริญที่ระยะเริ่มต้นยาวนานกว่า ดังนั้นจึงคัดเลือกปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่ 10% โดยปริมาตร สำหรับผลิตเดกซ์แทรนเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป



รูปที่ 4.4 ผลผลิตเดกซ์แทรนโดย *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ที่แปรผันปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่ 5 10 และ 15% โดยปริมาตร จากอาหารทริปโตนเสริมด้วยซูโครส 10% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ 30°ซ 200 รอบต่อนาที 10 ชั่วโมง

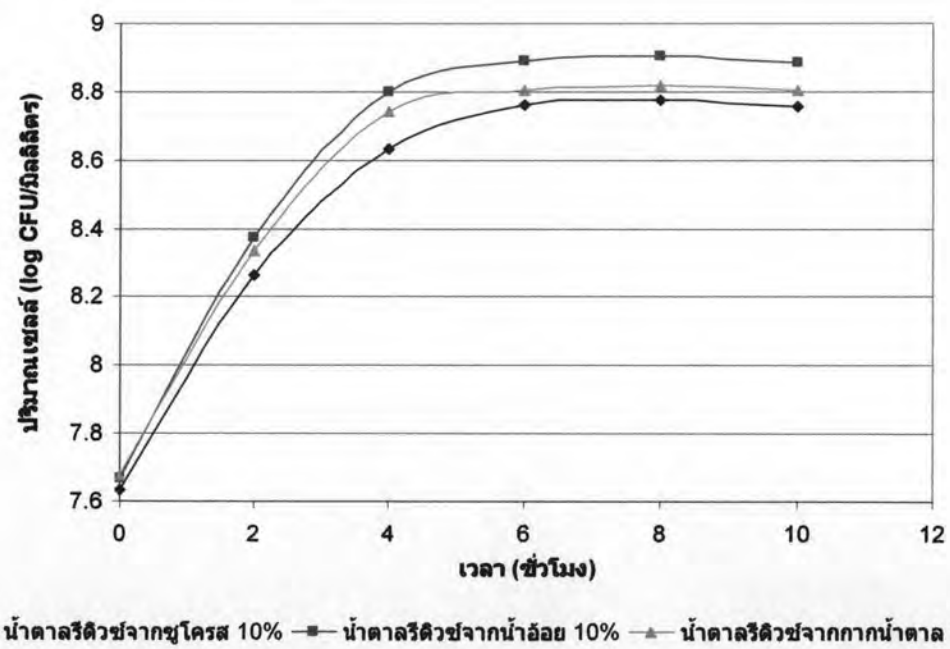


รูปที่ 4.5 การเปรียบเทียบปริมาณเดกซ์แทรนในชั่วโมงที่ 10 ของการเลี้ยงเชื้อ เมื่อแปรผันปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่ 5 10 และ 15% โดยปริมาตร

4.3 การคัดเลือกสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ และปริมาณส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเดกซ์แทรนโดย *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473

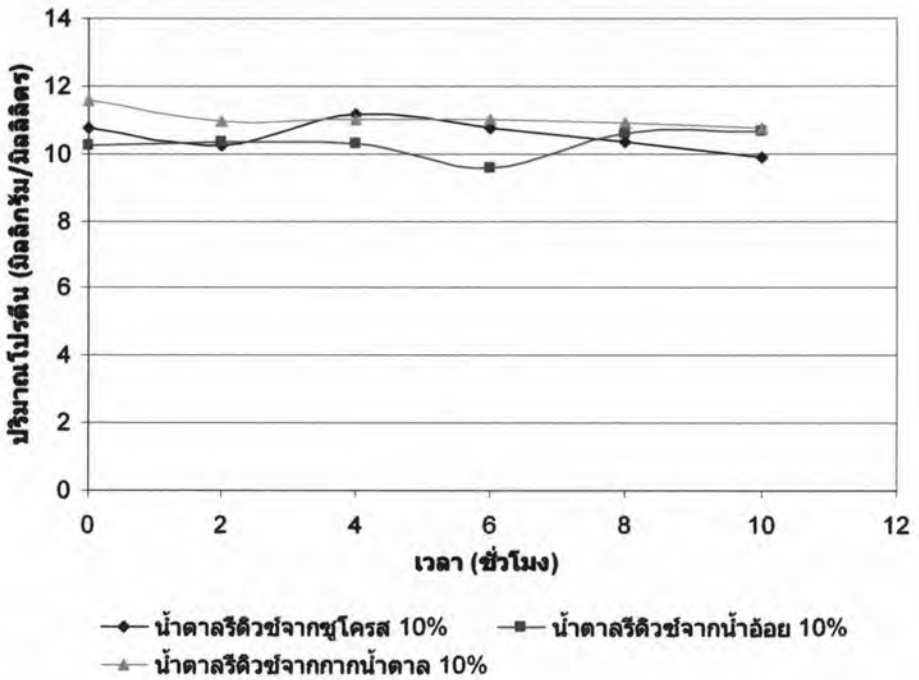
4.3.1 ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

จากการเลี้ยง *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นในการผลิตเดกซ์แทรนที่คัดเลือกได้คือ 10% โดยปริมาตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ ซูโครส น้ำอ้อย และกากน้ำตาล โดยปรับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นให้เท่ากัน จากการวิเคราะห์การย่อยสลายแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดด้วยอินเวอร์เทสตามวิธีในข้อ 3.5.1 และ 3.15 วิเคราะห์การเจริญของเซลล์ด้วยวิธีการนับเซลล์มีชีวิตทั้งหมดที่เจริญบนจานเพาะเชื้อตามวิธีในข้อ 3.8 ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.6 พบว่าการใช้น้ำอ้อยและกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน จะมีอัตราการเจริญสูงกว่าการใช้ซูโครส และจะเริ่มเข้าสู่ภาวะคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 เป็นต้นไป



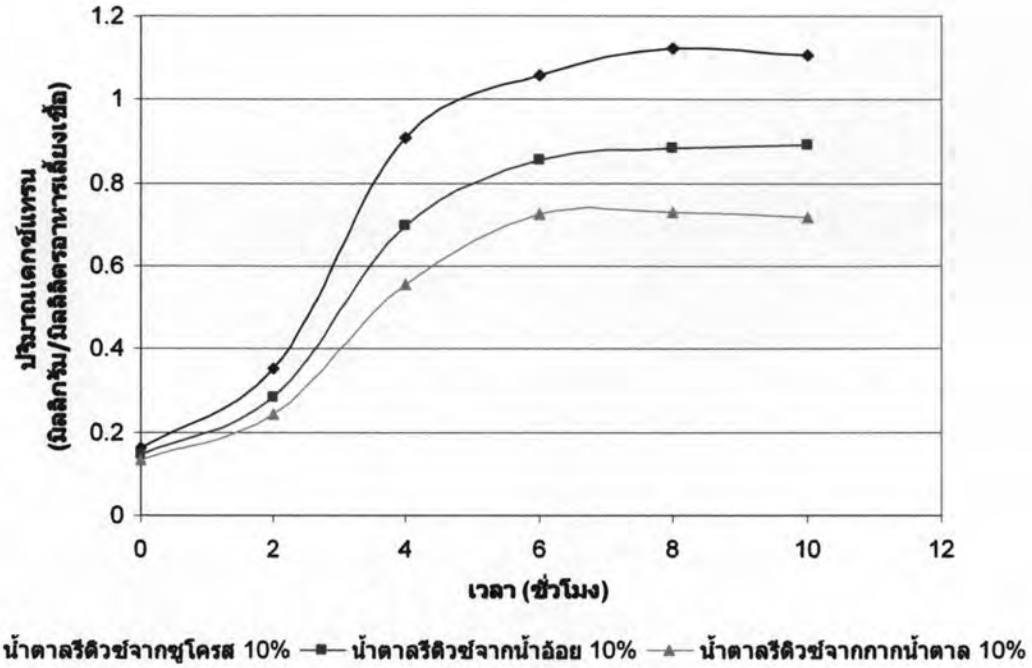
รูปที่ 4.6 การเจริญของ *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ด้วยวิธีการนับเซลล์มีชีวิตทั้งหมดที่เจริญบนจานเพาะเชื้อ จากอาหารทริปโตนที่ใช้แหล่งคาร์บอนต่างกัน 3 ชนิด คือ ซูโครส น้ำอ้อย และกากน้ำตาล โดยปรับน้ำตาลรีดิวซ์ให้เท่ากันภายหลังการย่อยสลายแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดด้วยอินเวอร์เทส ที่ 30°ซ 200 รอบต่อนาที 10 ชั่วโมง

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีของ Lowry (1951) ตามวิธีในข้อ 3.14 พบว่าปริมาณโปรตีนในส่วนใสของน้ำเลี้ยงซึ่งใช้ซูโครส น้ำอ้อย และกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน จากแต่ละระยะเวลาของการเก็บตัวอย่าง จะอยู่ในช่วงประมาณ 9.9-11.1 9.6-10.7 และ 10.8-11.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.7 เห็นได้ว่าในส่วนใสก่อนที่จะนำไปตกตะกอนเดกซ์แทรนมีโปรตีนเจือปนอยู่ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน

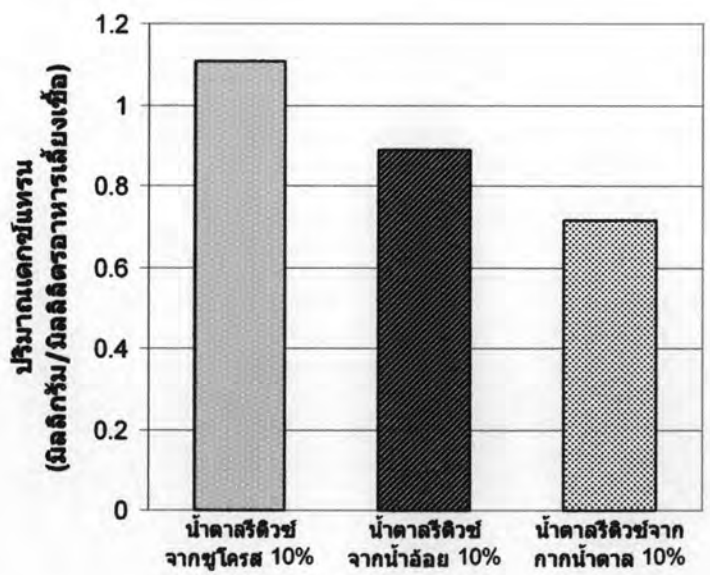


รูปที่ 4.7 ปริมาณโปรตีนในส่วนใสของน้ำเลี้ยง *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ที่เวลาต่างๆ จากอาหารทริปโตนที่ใช้แหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 3 ชนิด คือ ซูโครส น้ำอ้อย และกากน้ำตาล โดยปรับน้ำตาลรีดิวซ์ให้เท่ากัน ภายหลังการย่อยสลายแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดด้วยอินเวอร์เทส ที่ 30°ซ 200 รอบต่อนาที

จากการเปรียบเทียบการผลิตเดกซ์แทรนตามวิธีในข้อ 3.9 ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.8 และ 4.9 พบว่าการใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน จะให้ปริมาณเดกซ์แทรนที่สูงกว่า และลักษณะของตะกอนเดกซ์แทรนที่ได้จะมีสีขาวกว่าการใช้แหล่งคาร์บอนอีก 2 ชนิดด้วย ดังแสดงในรูปที่ 4.10 ดังนั้นจึงคัดเลือกซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับผลิตเดกซ์แทรนเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป



รูปที่ 4.8 ผลผลิตเดกซ์แทรนโดย *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 จากอาหารทริปโตนที่ใช้แหล่งคาร์บอนต่างกัน 3 ชนิด คือ ซูโครส น้ำอ้อย และกากน้ำตาล โดยปรับน้ำตาลรีดิวซ์ให้เท่ากันภายหลังการย่อยสลายแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดด้วยอินเวอร์เทส ที่ 30°ซ 200 รอบต่อนาที 10 ชั่วโมง

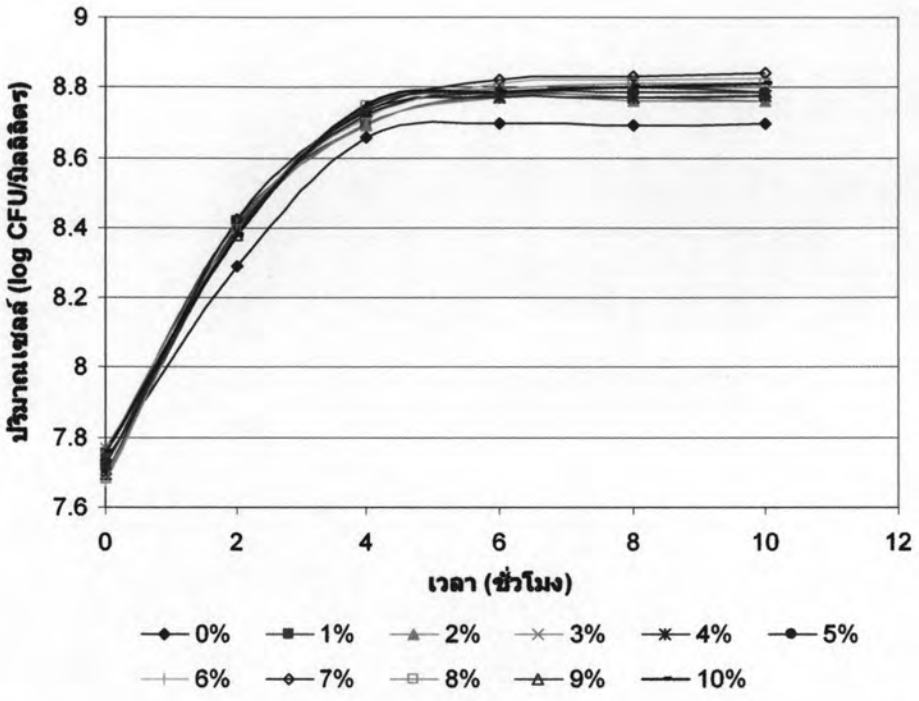


รูปที่ 4.9 การเปรียบเทียบปริมาณเดกซ์แทรนที่ชั่วโมงที่ 10 ของการเลี้ยงเชื้อ จากอาหารทริปโตนเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนต่างกัน 3 ชนิด คือ ซูโครส น้ำอ้อย และกากน้ำตาล

รูปที่ 4.10 ลักษณะของเดกซ์แทรนที่ผลิตโดย *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 เมื่อเลี้ยงในอาหารทริปโตนที่ใช้แหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 3 ชนิด ก) ซูโครส ข) น้ำอ้อย และ ค) กากน้ำตาล

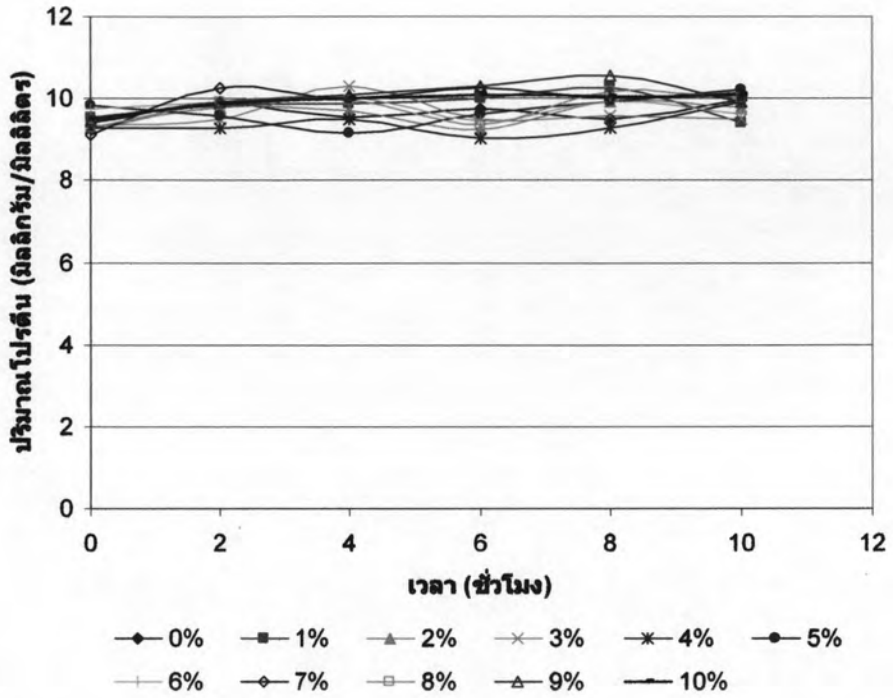
4.3.2 ปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

จากการเลี้ยง *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นในการผลิตเดกซ์แทรน 10% โดยปริมาตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันความเข้มข้นของซูโครสตั้งแต่ 0-10% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามวิธีในข้อ 3.5.2 และวิเคราะห์การเจริญของเซลล์ด้วยวิธีการนับเซลล์มีชีวิตทั้งหมดที่เจริญบนจานเพาะเชื้อ ตามวิธีในข้อ 3.8 ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.11 พบว่าอัตราการเจริญของการใช้ซูโครสในแต่ละความเข้มข้นมีความสอดคล้องกัน โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของซูโครสมากขึ้น จะมีการเจริญที่เพิ่มสูงขึ้นตามไปด้วย



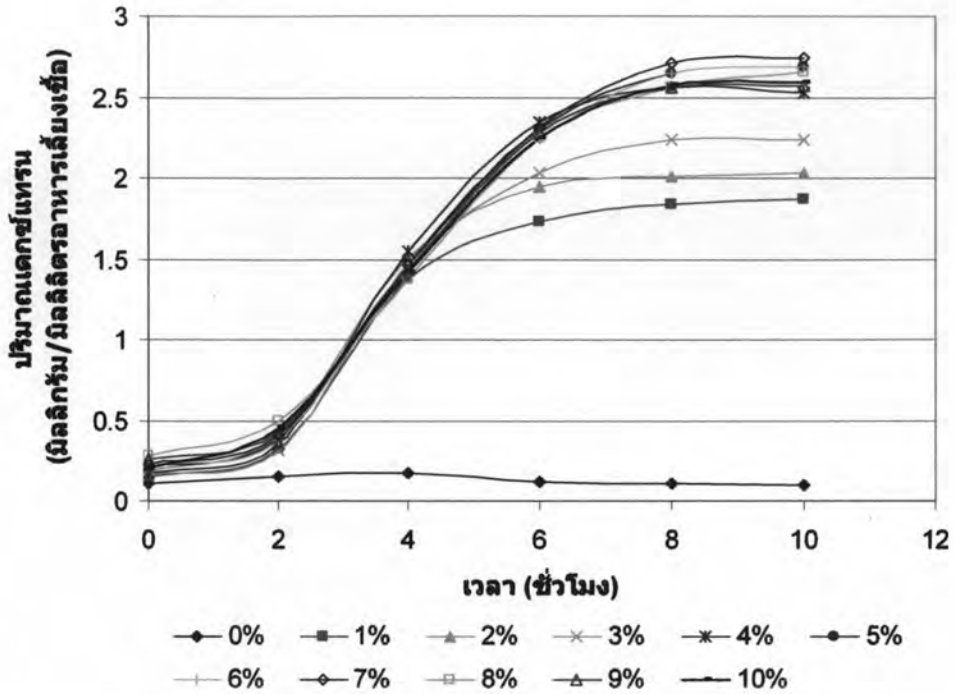
รูปที่ 4.11 การเจริญของ *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ด้วยวิธีการนับเซลล์มีชีวิตทั้งหมดที่เจริญบนจานเพาะเชื้อ จากอาหารซูโครสทริปโตนโดยแปรผันความเข้มข้นของซูโครสตั้งแต่ 0-10% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ 30°ซ 200 รอบต่อนาที 10 ชั่วโมง

สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีของ Lowry (1951) ตามวิธีในข้อ 3.14 พบว่าปริมาณโปรตีนในส่วนใสของน้ำเลี้ยงจากแต่ละความเข้มข้นของซูโครสและแต่ละระยะเวลาของการเก็บตัวอย่าง จะอยู่ในช่วงประมาณ 9.0-10.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.12 เห็นได้ว่าในส่วนใสก่อนที่จะนำไปตกตะกอนเดกซ์แทรนในแต่ละระยะเวลาของการเก็บตัวอย่าง มีปริมาณโปรตีนเจือปนอยู่ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน

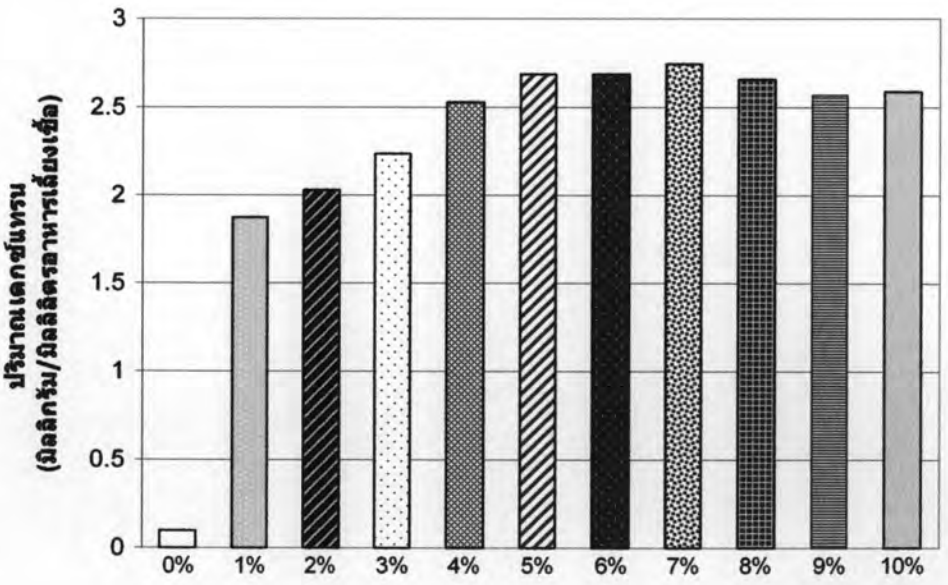


รูปที่ 4.12 ปริมาณโปรตีนในส่วนใสของน้ำเลี้ยง *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ที่เวลาต่างๆ จากอาหารซูโครสทริปโตนโดยแปรผันความเข้มข้นของซูโครสตั้งแต่ 0-10% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่ 30°ซ 200 รอบต่อนาที

และจากการเปรียบเทียบการผลิตเดกซ์แทรน ตามวิธีในข้อ 3.9 ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.13 และ 4.14 พบว่าการใช้ซูโครสที่ความเข้มข้น 7.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จะให้ปริมาณเดกซ์แทรนที่สูงที่สุด โดยสามารถผลิตเดกซ์แทรนสูงที่สุดเท่ากับ 2.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกซูโครสที่ความเข้มข้น 7.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อใช้สำหรับผลิตเดกซ์แทรนในการทดลองต่อไป



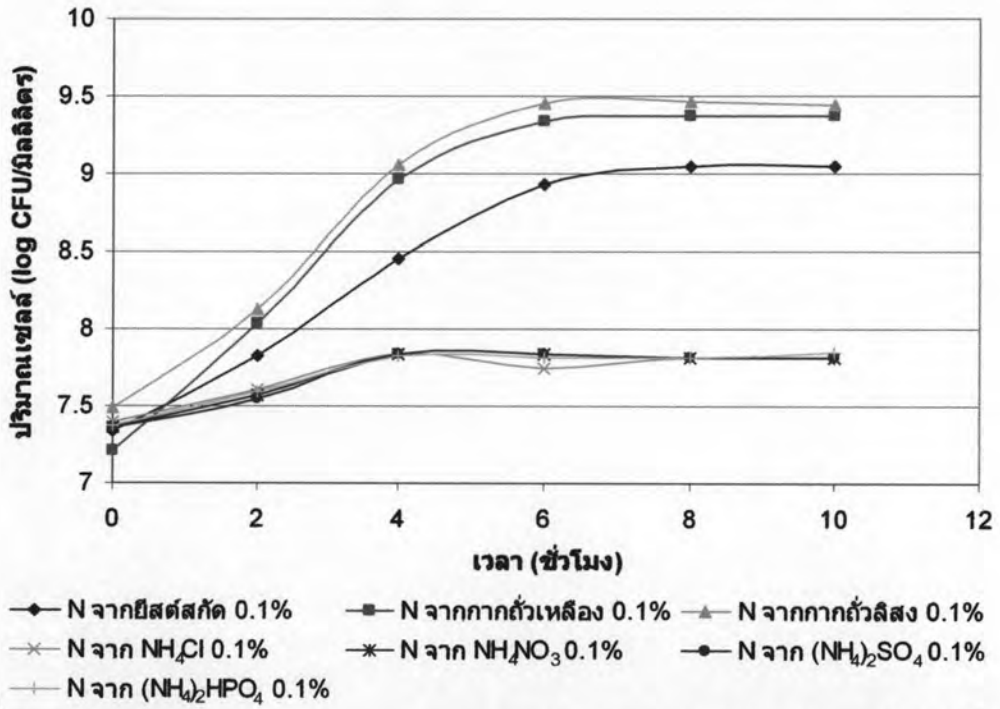
รูปที่ 4.13 ผลผลิตเดกซ์แทรนโดย *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 จากอาหารซูโครสทริปโตน โดยแปรผันความเข้มข้นของซูโครสตั้งแต่ 0-10% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ 30°ซ 200 รอบต่อนาที 10 ชั่วโมง



รูปที่ 4.14 การเปรียบเทียบปริมาณเดกซ์แทรนในชั่วโมงที่ 10 ของการเลี้ยงเชื้อ จากอาหารซูโครสทริปโตนเมื่อแปรผันความเข้มข้นของซูโครสตั้งแต่ 0-10% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

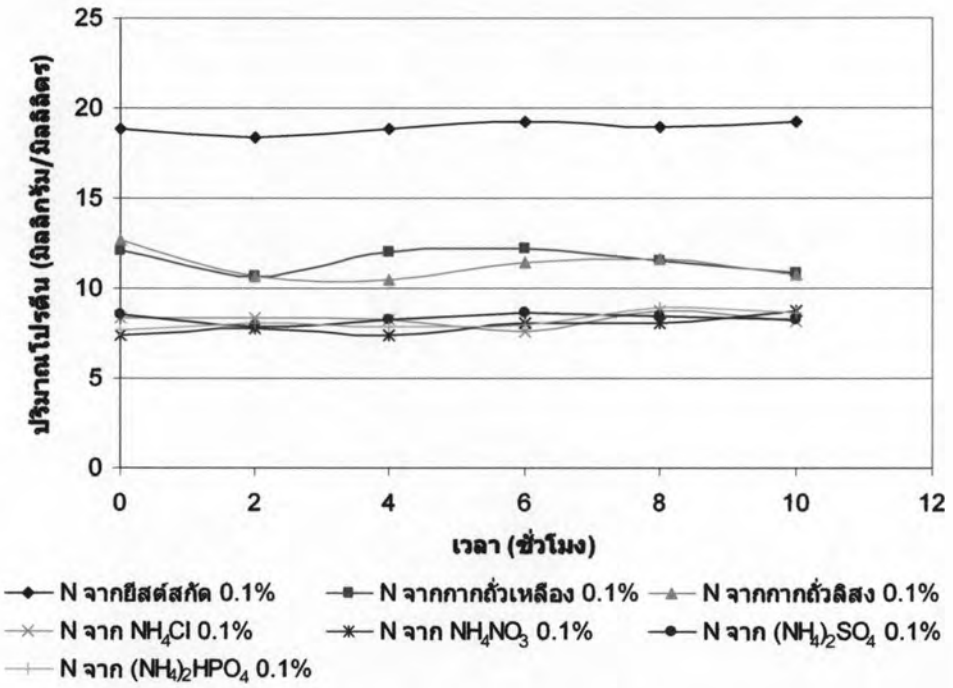
4.3.3 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

จากการเลี้ยง *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นในการผลิตเดกซ์แทรน 10% โดยปริมาตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อทริปโตนที่ใช้ซูโครส 7.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้แหล่งไนโตรเจนทั้งชนิดที่เป็นไนโตรเจนอินทรีย์และอนินทรีย์แตกต่างกัน ซึ่งปรับปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้นเป็น 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเท่ากัน ตามวิธีในข้อ 3.5.3 และวิเคราะห์การเจริญของเซลล์ด้วยวิธีการนับเซลล์มีชีวิตทั้งหมดที่เจริญบนจานเพาะเชื้อ ตามวิธีในข้อ 3.8 ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.15 พบว่าการใช้กากถั่วลิสงเป็นแหล่งไนโตรเจนจะมีอัตราการเจริญสูงที่สุด ส่วนการใช้กากถั่วเหลืองจะให้อัตราการเจริญที่สูงรองลงมา



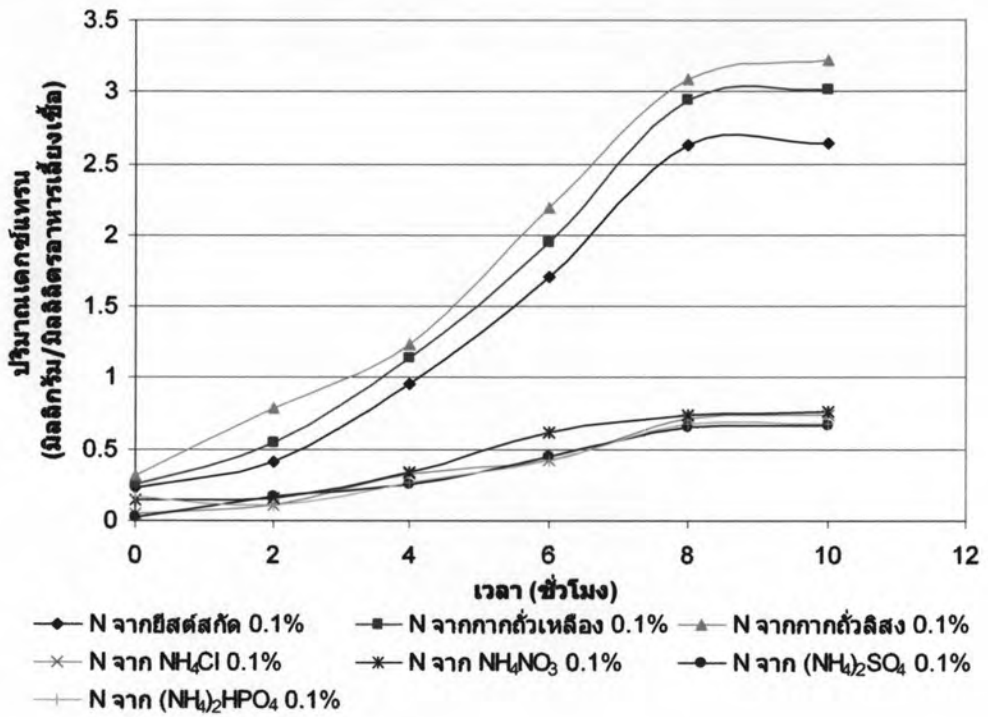
รูปที่ 4.15 การเจริญของ *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ด้วยวิธีการนับเซลล์มีชีวิตทั้งหมดที่เจริญบนจานเพาะเชื้อ จากอาหารซูโครสทริปโตนที่ใช้แหล่งไนโตรเจนต่างกัน คือ ไนโตรเจนอินทรีย์ (ยีสต์สกัด กากถั่วเหลือง และกากถั่วลิสง) และไนโตรเจนอนินทรีย์ (NH_4Cl, NH_4NO_3, $(NH_4)_2SO_4$ และ $(NH_4)_2HPO_4$) โดยปรับปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้นเท่ากัน ที่ 30°ซ 200 รอบต่อนาที 10 ชั่วโมง

สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในส่วนใสของน้ำเลี้ยงด้วยวิธีของ Lowry (1951) ตามวิธีในข้อ 3.14 พบว่าปริมาณโปรตีนในส่วนใสของน้ำเลี้ยงจากอาหารทริปโตนแต่ละชนิดของแหล่งไนโตรเจน (ยีสต์สกัด, กากถั่วเหลือง, กากถั่วลิสง, NH_4Cl, NH_4NO_3, $(NH_4)_2SO_4$ และ $(NH_4)_2HPO_4$) จะอยู่ในช่วง 18.4-19.2, 10.7-12.2, 10.4-12.7, 7.6-8.8, 7.4-8.7, 7.9-8.6 และ 7.7-9.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ เห็นได้ว่าในแต่ละระยะเวลาของการเก็บตัวอย่างจะมีปริมาณโปรตีนที่ใกล้เคียงกัน ดังแสดงในรูปที่ 4.16

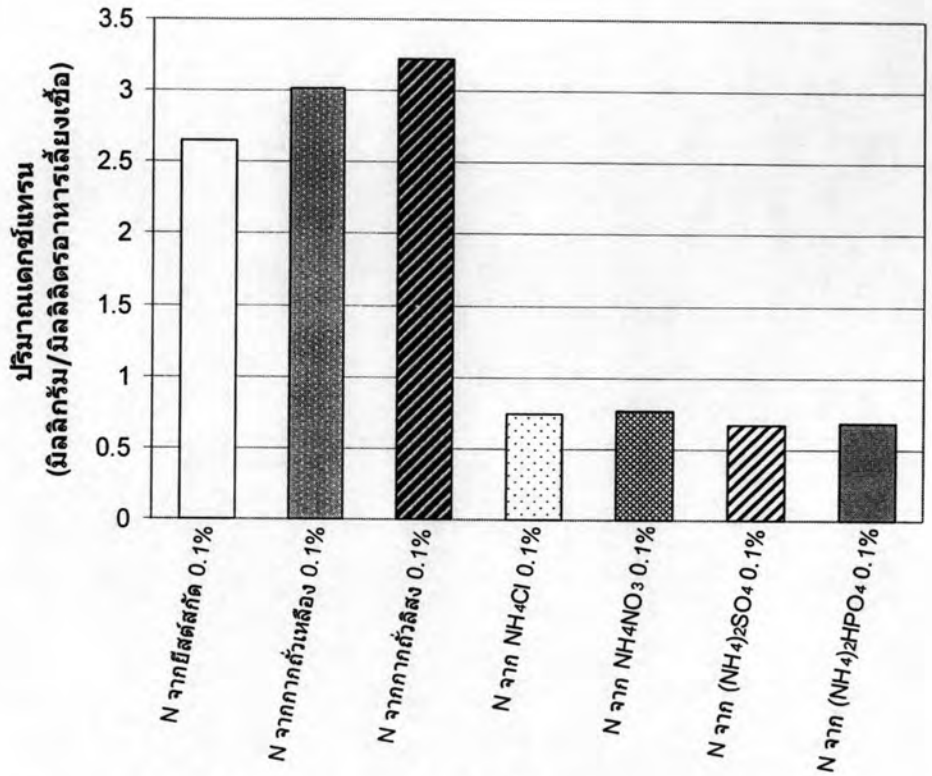


รูปที่ 4.16 ปริมาณโปรตีนในส่วนใสของน้ำเลี้ยง *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ที่เวลาต่างๆ จากอาหารซูโครสทริปโตนที่ใช้แหล่งไนโตรเจนต่างกัน คือ ไนโตรเจนอินทรีย์ (ยีสต์สกัด กากถั่วเหลือง และกากถั่วลิสง) และไนโตรเจนอนินทรีย์ (NH_4Cl, NH_4NO_3, $(NH_4)_2SO_4$ และ $(NH_4)_2HPO_4$) โดยปรับปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้นเท่ากัน ที่ 30°ซ 200 รอบต่อนาที

และจากการเปรียบเทียบการผลิตเดกซ์แทรนตามวิธีในข้อ 3.9 ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.17 และ 4.18 พบว่าการใช้กากถั่วลิสงจะให้ปริมาณเดกซ์แทรนที่สูงที่สุดซึ่งผลการทดลองที่ได้จะสอดคล้องกับรูปแบบการเจริญ โดยสามารถผลิตเดกซ์แทรนสูงที่สุดเท่ากับ 3.22 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นจึงคัดเลือกกากถั่วลิสงเป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อใช้สำหรับผลิตเดกซ์แทรนในการทดลองต่อไป



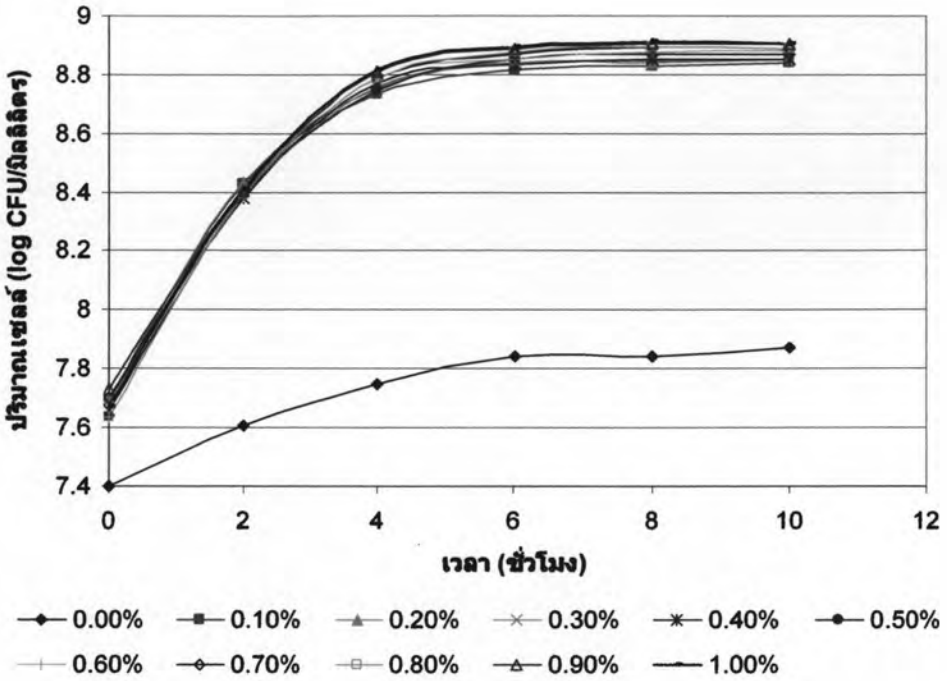
รูปที่ 4.17 ผลผลิตเดกซ์แทรนโดย *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 จากอาหารซูโครสทริปโตนที่ใช้แหล่งไนโตรเจนต่างกัน คือ ไนโตรเจนอินทรีย์ (ยีสต์สกัด กากถั่วเหลือง และกากถั่วลิสง) และไนโตรเจนอนินทรีย์ (NH_4Cl, NH_4NO_3, $(NH_4)_2SO_4$ และ $(NH_4)_2HPO_4$) ที่ 30°ซ 200 รอบต่อนาที 10 ชั่วโมง



รูปที่ 4.18 การเปรียบเทียบปริมาณเดกซ์แทรนในชั่วโมงที่ 10 ของการเลี้ยงเชื้อ จากอาหารซูโครสทริปโตนเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนต่างกัน คือ ไนโตรเจนอินทรีย์ (ยีสต์สกัด กากถั่วเหลือง และกากถั่วลิสง) และไนโตรเจนอนินทรีย์ (NH_4Cl, NH_4NO_3, $(NH_4)_2SO_4$ และ $(NH_4)_2HPO_4$)

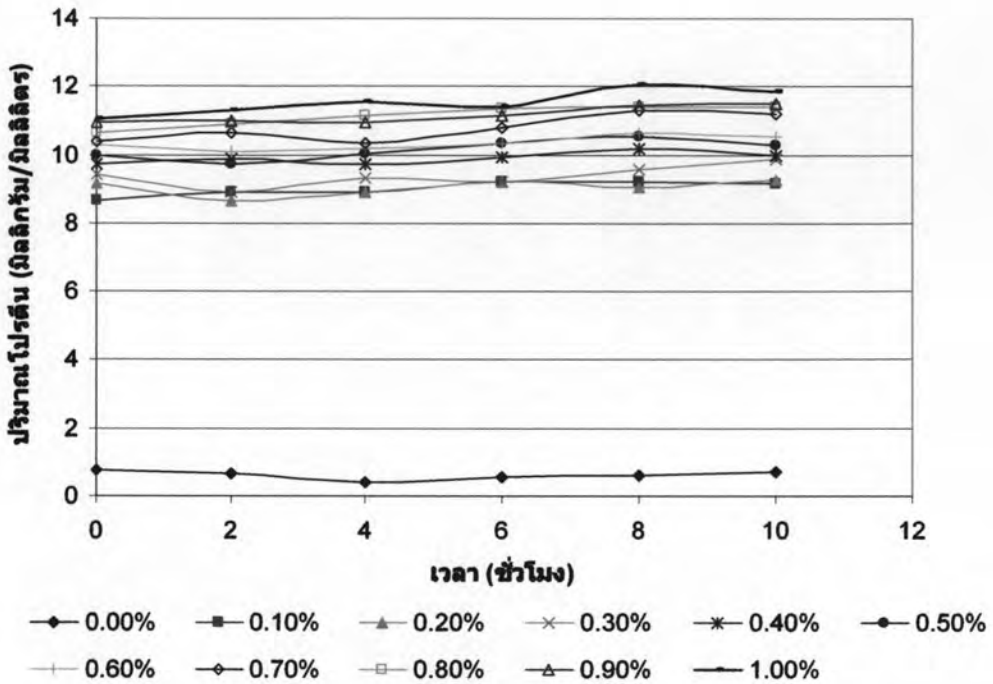
4.3.4 ปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

จากการเลี้ยง *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นในการผลิตเดกซ์แทรน 10% โดยปริมาตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ซูโครส 7.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งแปรผันความเข้มข้นของยีสต์สกัดตั้งแต่ 0.0-1.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามวิธีในข้อ 3.5.4 และวิเคราะห์การเจริญของเซลล์ด้วยวิธีการนับเซลล์มีชีวิตทั้งหมดที่เจริญบนจานเพาะเชื้อตามวิธีในข้อ 3.8 ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.19 พบว่าอัตราการเจริญของการใช้ยีสต์สกัดแต่ละความเข้มข้นมีรูปแบบที่ใกล้เคียงกัน โดยจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของยีสต์สกัด



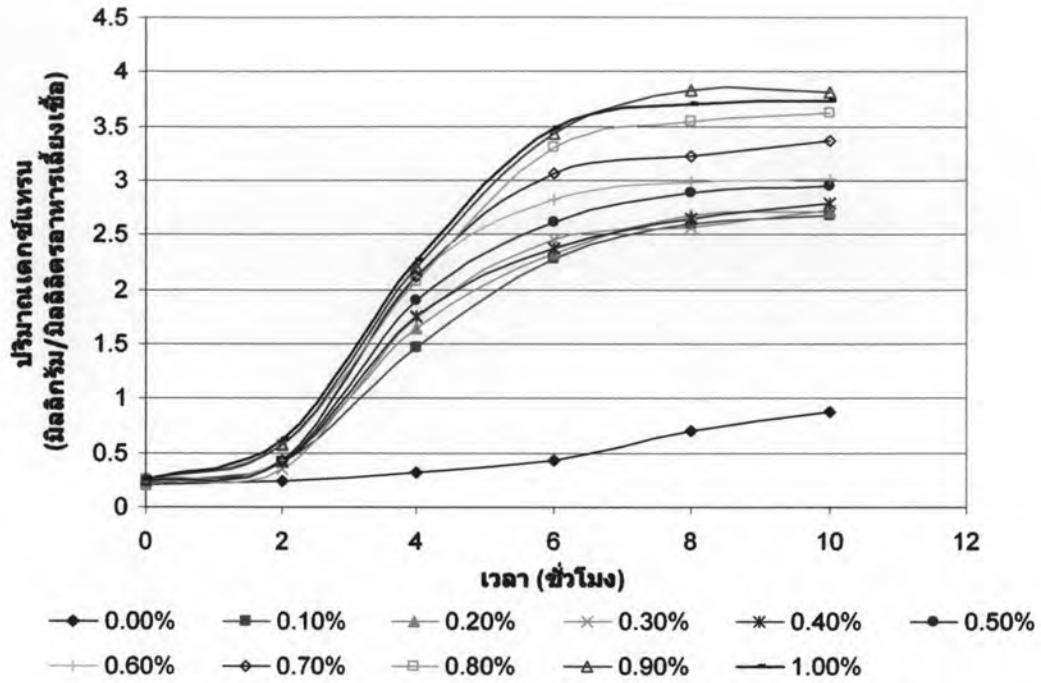
รูปที่ 4.19 การเจริญของ *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ด้วยวิธีการนับเซลล์มีชีวิตทั้งหมดที่เจริญบนจานเพาะเชื้อ จากอาหารซูโครสทริปโตนโดยแปรผันความเข้มข้นของยีสต์สกัดตั้งแต่ 0.0-1.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ 30°ซ 200 รอบต่อนาที10 ชั่วโมง

สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในส่วนใสของน้ำเลี้ยงด้วยวิธีของ Lowry (1951) ตามวิธีในข้อ 3.14 พบว่าปริมาณโปรตีนในส่วนใสของน้ำเลี้ยงจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของยีสต์สกัด ดังแสดงในรูปที่ 4.20 ซึ่งเห็นได้ว่าในส่วนใสก่อนที่จะนำไปตกตะกอนเดกซ์แทรน ในแต่ละระยะเวลาของการเก็บตัวอย่างและในแต่ละความเข้มข้นของยีสต์สกัดจะมีโปรตีนเจือปนอยู่ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน

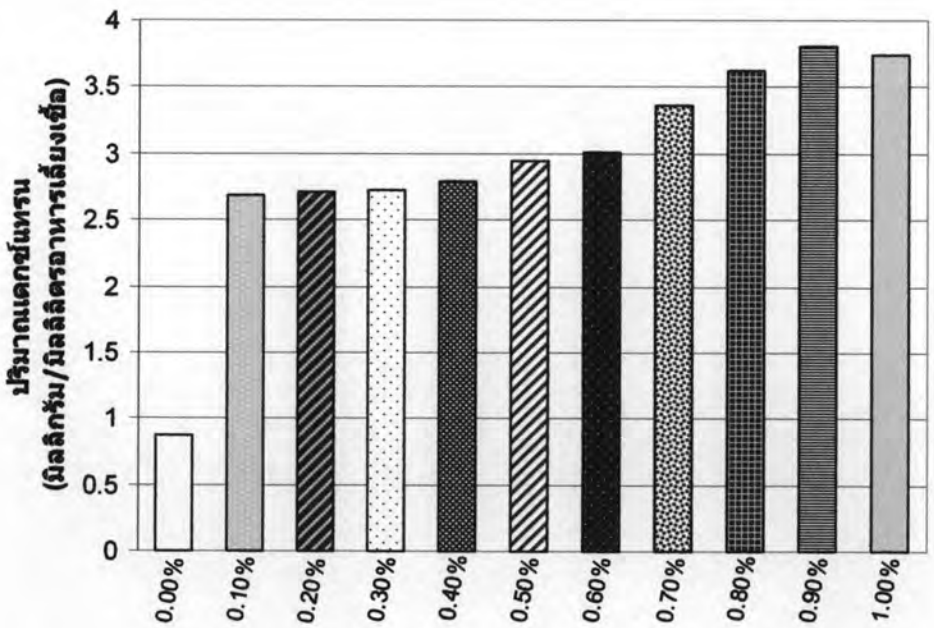


รูปที่ 4.20 ปริมาณโปรตีนในส่วนใสของน้ำเลี้ยง *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ที่เวลาต่างๆ จากอาหารซูโครสทริปโตนโดยแปรผันความเข้มข้นของยีสต์สกัดตั้งแต่ 0.0-1.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ 30°ซ 200 รอบต่อนาที

และจากการเปรียบเทียบการผลิตเดกซ์แทรนตามวิธีในข้อ 3.9 ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.21 และ 4.22 พบว่าผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกับการเจริญของแบคทีเรีย ซึ่งการใช้ยีสต์สกัดที่ความเข้มข้น 0.9% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรจะให้ปริมาณเดกซ์แทรนที่สูงที่สุด โดยสามารถผลิตเดกซ์แทรนสูงที่สุดเท่ากับ 3.82 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นจึงคัดเลือกยีสต์สกัดที่ความเข้มข้น 0.9% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับผลิตเดกซ์แทรนในการทดลองต่อไป



รูปที่ 4.21 ผลผลิตเดกซ์แทรนโดย *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 จากอาหารซูโครสทริปโตน โดยแปรผันความเข้มข้นของยีสต์สกัดตั้งแต่ 0.0-1.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ 30°ซ 200 รอบต่อนาที 10 ชั่วโมง

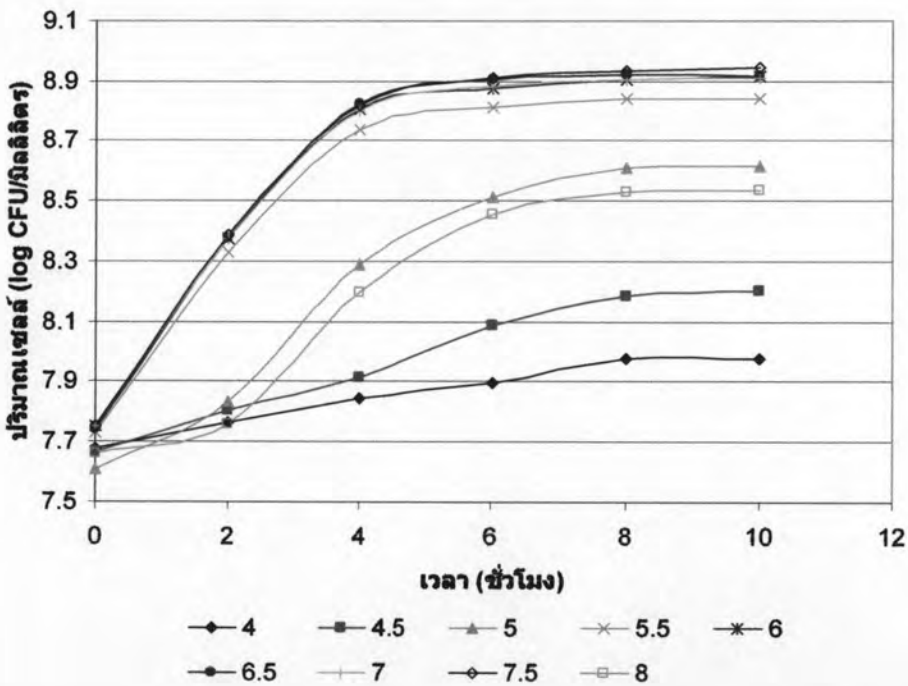


รูปที่ 4.22 การเปรียบเทียบปริมาณเดกซ์แทรนในชั่วโมงที่ 10 ของการเลี้ยงเชื้อ จากอาหารซูโครสทริปโตนเมื่อแปรผันความเข้มข้นของยีสต์สกัดตั้งแต่ 0.0-1.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

4.4 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเดกซ์แทรนโดย *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473

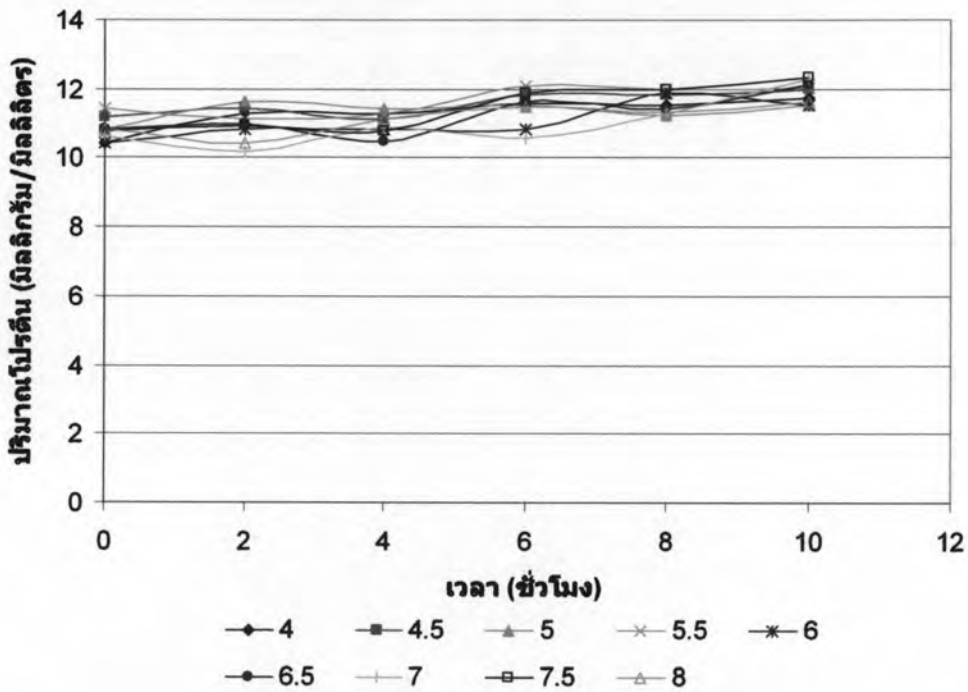
4.4.1 ค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสม

จากการเลี้ยง *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นในการผลิตเดกซ์แทรน 10% โดยปริมาตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ซูโครส 7.0% และยีสต์สกัด 0.9% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ โดยแปรผันค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ 4.0-8.0 ตามวิธีในข้อ 3.6.1 จากนั้นวิเคราะห์การเจริญของเซลล์ด้วยวิธีการนับเซลล์มีชีวิตทั้งหมดที่เจริญบนจานเพาะเชื้อ ตามวิธีในข้อ 3.8 ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.23 พบว่าแบคทีเรียสามารถเจริญได้ดีในช่วงความเป็นกรดเบสตั้งแต่ 5.5-7.5 และจะมีอัตราการเจริญที่สูงที่สุดในช่วงค่าความเป็นกรดเบสนี้ด้วย



รูปที่ 4.23 การเจริญของ *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ด้วยวิธีการนับเซลล์มีชีวิตทั้งหมดที่เจริญบนจานเพาะเชื้อ จากอาหารซูโครสทริปโตนโดยแปรผันค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นที่ 4.0-8.0 ที่ 30°ซ 200 รอบต่อนาที 10 ชั่วโมง

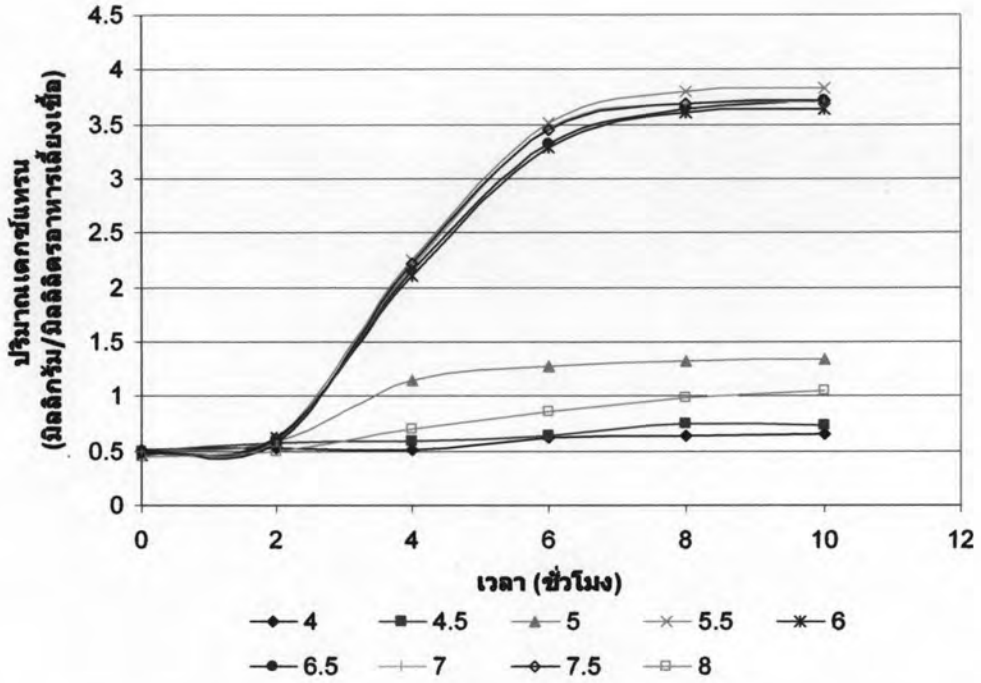
สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในส่วนใสของน้ำเลี้ยงด้วยวิธีของ Lowry (1951) ตามวิธีในข้อ 3.14 พบว่าปริมาณโปรตีนในส่วนใสของน้ำเลี้ยงทุกค่าความเป็นกรดเบสจะอยู่ในช่วง 10.2-12.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.24 เห็นได้ว่าในส่วนใสก่อนที่จะนำไปตกตะกอนเดกซ์แทรนในแต่ละค่าความเป็นกรดเบส และแต่ละระยะเวลาในการเก็บตัวอย่าง จะมีโปรตีนเจือปนอยู่ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน



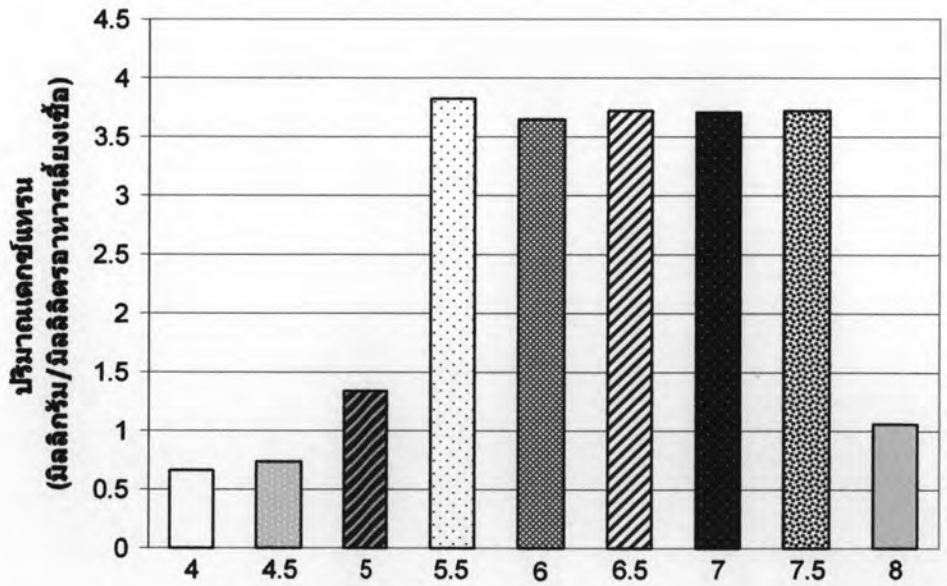
รูปที่ 4.24 ปริมาณโปรตีนในส่วนใสของน้ำเลี้ยง *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ที่เวลาต่างๆ จากอาหารซูโครสทริปโตนโดยแปรผันค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นที่ 4.0-8.0 ที่ 30°ซ 200 รอบต่อนาที

และจากการเปรียบเทียบการผลิตเดกซ์แทรน ตามวิธีในข้อ 3.9 ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.25 และ 4.26 พบว่าค่าความเป็นกรดเบสในช่วง 5.5-7.5 จะมีการผลิตเดกซ์แทรนในปริมาณสูง โดยที่ค่าความเป็นกรดเบสที่ 5.5 จะให้ปริมาณเดกซ์แทรนที่สูงที่สุด โดยสามารถผลิตเดกซ์แทรนสูงที่สุดเท่ากับ 3.83 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นจึงคัดเลือกค่าความเป็นกรดเบสที่ 5.5 สำหรับผลิตเดกซ์แทรนเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

หอสมุดกลาง ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



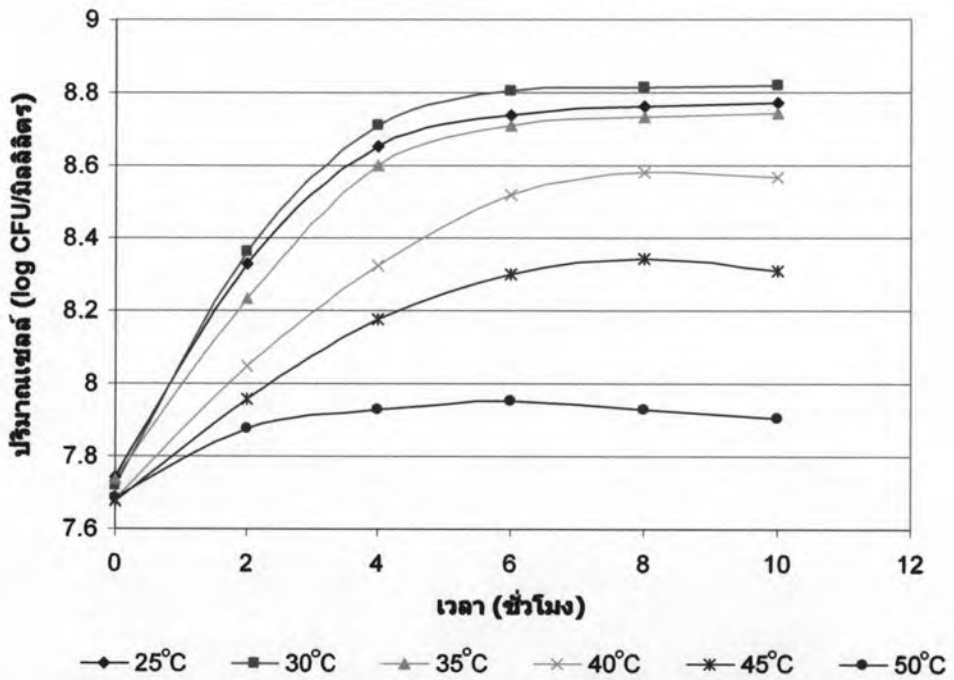
รูปที่ 4.25 ผลผลิตเดกซ์แทรนโดย *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 จากอาหารซูโครสทริปโตน โดยแปรผันค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นที่ 4.0-8.0 ที่ 30°ซ 200 รอบต่อนาที 10 ชั่วโมง



รูปที่ 4.26 การเปรียบเทียบปริมาณเดกซ์แทรนในชั่วโมงที่ 10 ของการเลี้ยงเชื้อ จากอาหารซูโครสทริปโตนเมื่อแปรผันค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นที่ 4.0-8.0

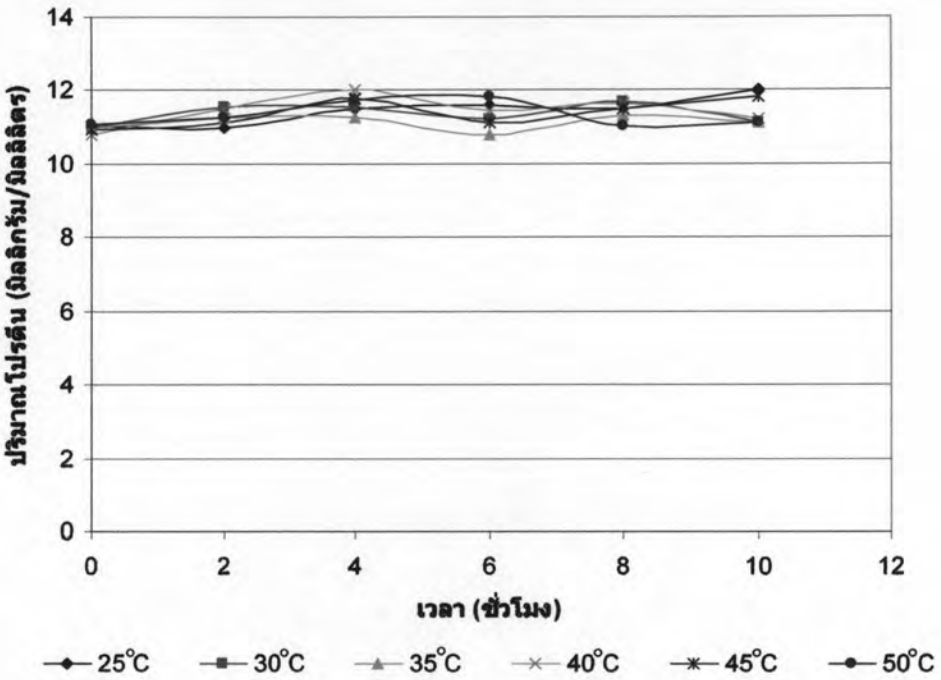
4.4.2 อุณหภูมิที่เหมาะสม

จากการเลี้ยงเชื้อ *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นในการผลิตเดกซ์แทรน 10% โดยปริมาตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ซูโครส 7.0% และยีสต์สกัด 0.9% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ และปรับค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 5.5 โดยแปรผันอุณหภูมิในการบ่มเชื้อตั้งแต่ 25-50°ซ ตามวิธีในข้อ 3.6.2 จากนั้นวิเคราะห์การเจริญของเซลล์ด้วยวิธีการนับเซลล์มีชีวิตทั้งหมดที่เจริญบนจานเพาะเชื้อตามวิธีในข้อ 3.8 ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.27 พบว่าในช่วงอุณหภูมิ 25-35°ซ มีอัตราการเจริญในรูปแบบที่ใกล้เคียงกัน โดยอุณหภูมิที่ 30°ซ จะมีอัตราการเจริญสูงที่สุด



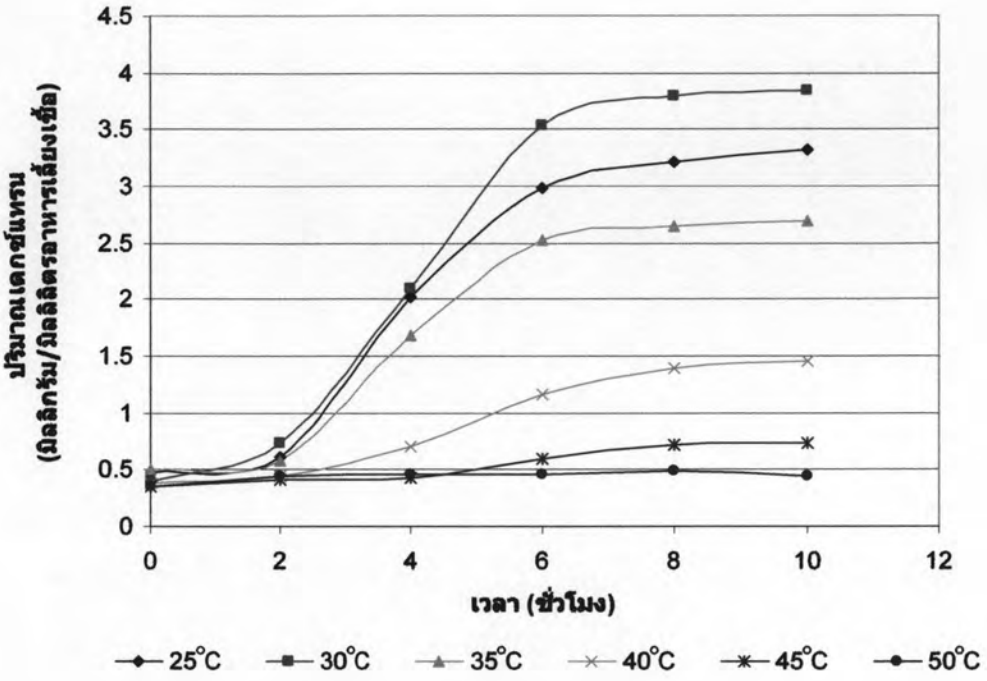
รูปที่ 4.27 การเจริญของ *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ด้วยวิธีการนับเซลล์มีชีวิตทั้งหมดที่เจริญบนจานเพาะเชื้อ จากอาหารซูโครสทริปโตนค่าความเป็นกรดเบส 5.5 200 รอบต่อนาที 10 ชั่วโมง โดยแปรผันอุณหภูมิในการบ่มเชื้อตั้งแต่ 25-50°ซ

สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในส่วนใสของน้ำเลี้ยงด้วยวิธีของ Lowry (1951) ตามวิธีในข้อ 3.14 พบว่าปริมาณโปรตีนในส่วนใสของน้ำเลี้ยงทุกอุณหภูมิจะอยู่ในช่วง 10.4-12.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.28 เห็นได้ว่าในส่วนใสก่อนที่จะนำไปตกตะกอนเดกซ์แทรนในแต่ละอุณหภูมิและในแต่ละระยะเวลาของการเก็บตัวอย่าง จะมีโปรตีนเจือปนอยู่ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน

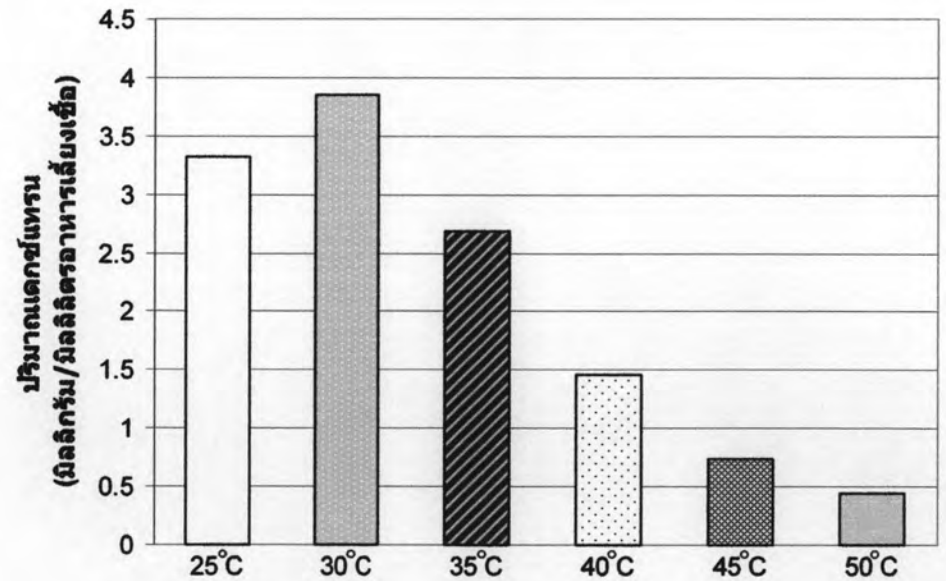


รูปที่ 4.28 ปริมาณโปรตีนในส่วนใสของน้ำเลี้ยง *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ที่เวลาต่างๆ จากอาหารซูโครสทริปโตน ค่าความเป็นกรดเบส 5.5 200 รอบต่อนาที โดยแปรผันอุณหภูมิในการบ่มเชื้อตั้งแต่ 25-50°ซ

และจากการเปรียบเทียบการผลิตเดกซ์แทรนตามวิธีในข้อ 3.9 ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.29 และ 4.30 พบว่าอุณหภูมิในช่วง 25-35°ซ จะมีการผลิตเดกซ์แทรนได้ในปริมาณสูง โดยที่อุณหภูมิ 30°ซ จะให้ปริมาณเดกซ์แทรนที่สูงที่สุด โดยสามารถผลิตเดกซ์แทรนสูงที่สุดที่ชั่วโมงที่ 10 เท่ากับ 3.85 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นจึงคัดเลือกอุณหภูมิในการบ่มเชื้อที่ 30°ซ สำหรับผลิตเดกซ์แทรนเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป



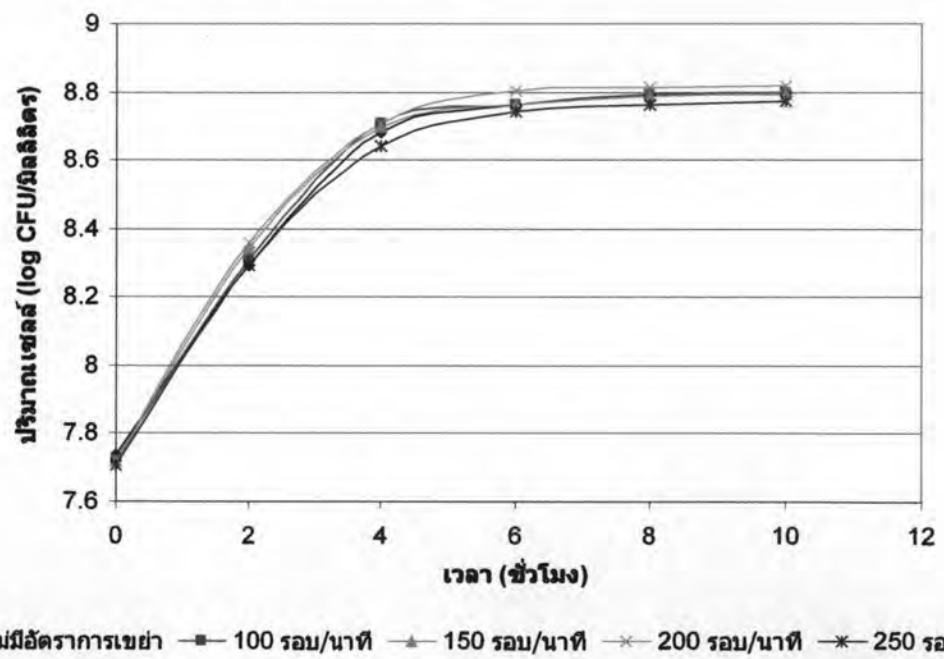
รูปที่ 4.29 ผลผลิตเดกซ์แทรนโดย *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 จากอาหารซูโครสทริปโตน ค่าความเป็นกรดเบส 5.5 200 รอบต่อนาที 10 ชั่วโมง โดยแปรผันอุณหภูมิในการบ่มเชื้อตั้งแต่ 25-50°ซ



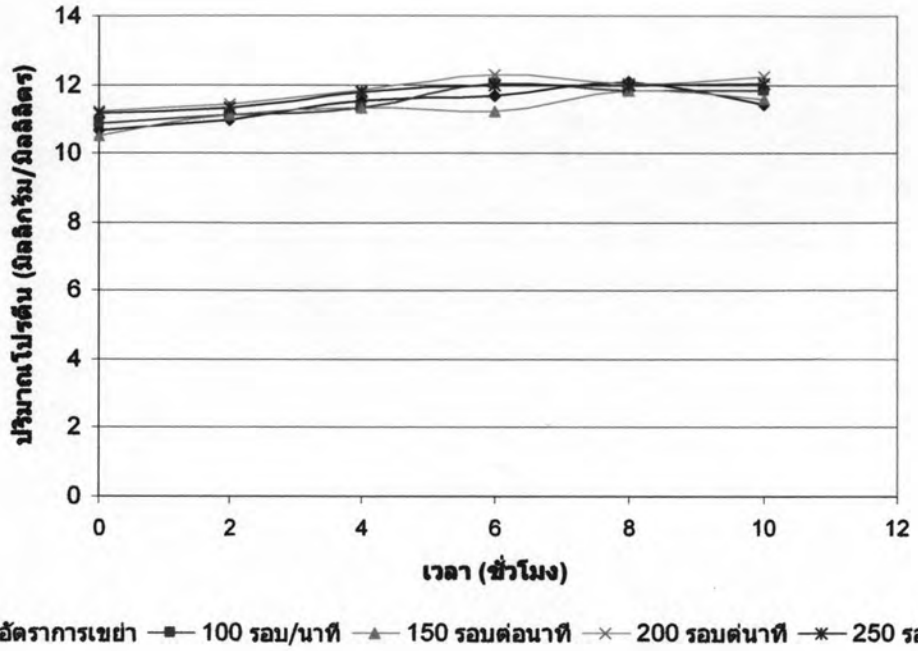
รูปที่ 4.30 การเปรียบเทียบปริมาณเดกซ์แทรนในชั่วโมงที่ 10 ของการเลี้ยงเชื้อ จากอาหารซูโครสทริปโตนเมื่อแปรผันอุณหภูมิในการบ่มเชื้อตั้งแต่ 25-50°ซ

4.4.3 ความเร็วรอบที่เหมาะสม

จากการเลี้ยง *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นในการผลิตเดกซ์แทรน 10% โดยปริมาตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ซูโครส 7.0% และยีสต์สกัด 0.9% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ ปรับค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ โดยแปรผันความเร็วรอบในการให้อากาศตั้งแต่ 0-250 รอบต่อนาที ตามวิธีในข้อ 3.6.3 จากนั้นวิเคราะห์การเจริญของเซลล์ด้วยวิธีการนับเซลล์มีชีวิตทั้งหมดที่เจริญบนจานเพาะเชื้อตามวิธีในข้อ 3.8 ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.31 และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนจากส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อโดยวิธีของ Lowry (1951) ตามวิธีในข้อ 3.14 ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.32 จากนั้นเปรียบเทียบการผลิตเดกซ์แทรน ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.33 และ 4.34 พบว่าในทุกความเร็วรอบจะมีอัตราการเจริญและการผลิตเดกซ์แทรนที่ใกล้เคียงกัน และมีปริมาณโปรตีนที่ใกล้เคียงกันด้วย โดยปริมาณโปรตีนในทุกความเร็วรอบจะอยู่ในช่วง 10.5-12.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

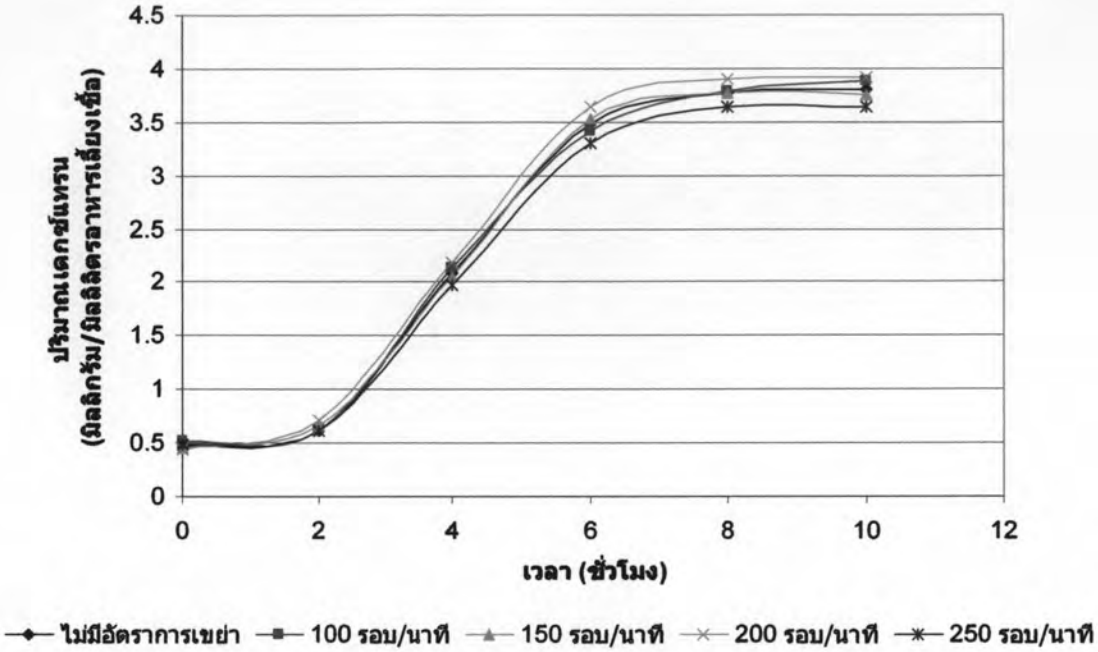


รูปที่ 4.31 การเจริญของ *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ด้วยวิธีการนับเซลล์มีชีวิตทั้งหมดที่เจริญบนจานเพาะเชื้อ จากอาหารซูโครสทริปโตนค่าความเป็นกรดเบส 5.5 ที่ 30°ซ 10 ชั่วโมง โดยแปรผันความเร็วรอบในการให้อากาศตั้งแต่ 0-250 รอบต่อนาที

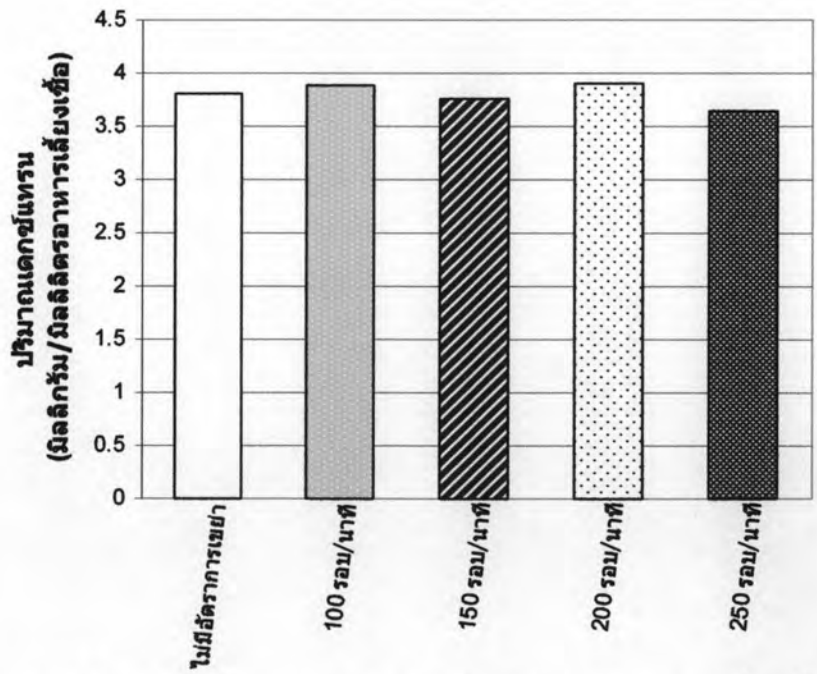


รูปที่ 4.32 ปริมาณโปรตีนในส่วนใสของน้ำเลี้ยง *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ที่เวลาต่างๆ จากอาหารซูโครสทริปโตนค่าความเป็นกรดเบส 5.5 ที่ 30°ซ โดยแปรผันความเร็วรอบในการให้อากาศตั้งแต่ 0-250 รอบต่อนาที

จากการผลิตเดกซ์แทรนตามวิธีในข้อ 3.9 พบว่าที่ความเร็วรอบที่ 200 รอบต่อนาที จะให้ปริมาณเดกซ์แทรนที่สูงที่สุด โดยสามารถผลิตเดกซ์แทรนสูงที่สุดเท่ากับ 3.91 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นจึงคัดเลือกความเร็วรอบในการให้อากาศเป็น 200 รอบต่อนาที สำหรับการผลิตเดกซ์แทรนปริมาณสูงต่อไป



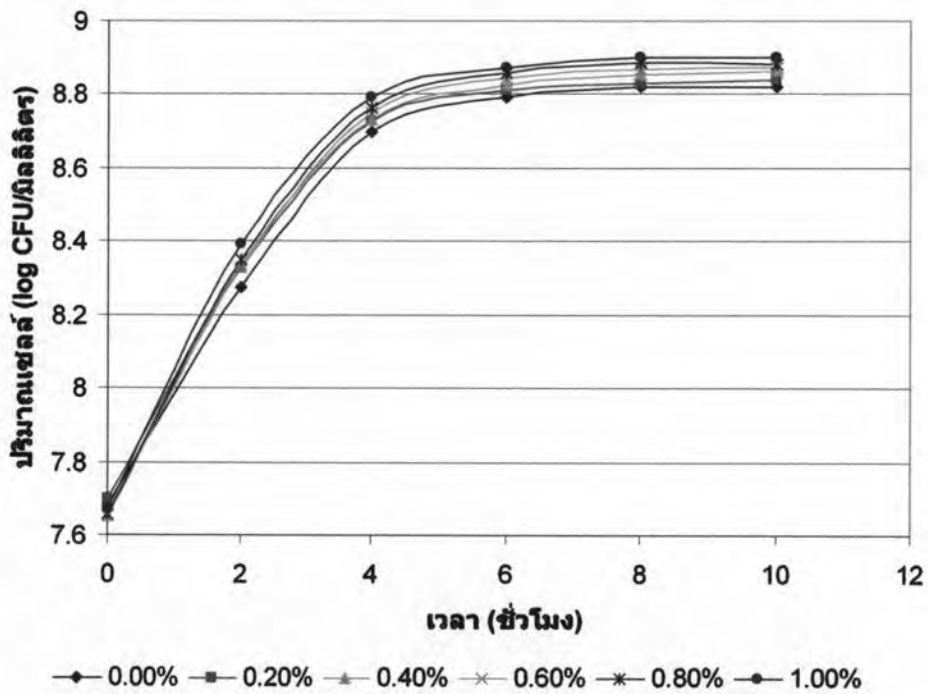
รูปที่ 4.33 ผลผลิตเดกซ์แทรนโดย *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 จากอาหารซูโครสทริปโตน ค่าความเป็นกรดเบส 5.5 ที่ 30°ซ 10 ชั่วโมง โดยแปรผันความเร็วรอบในการให้อากาศตั้งแต่ 0-250 รอบต่อนาที



รูปที่ 4.34 การเปรียบเทียบปริมาณเดกซ์แทรนในชั่วโมงที่ 10 ของการเลี้ยงเชื้อ จากอาหารซูโครสทริปโตนเมื่อแปรผันความเร็วรอบในการให้อากาศตั้งแต่ 0-250 รอบต่อนาที

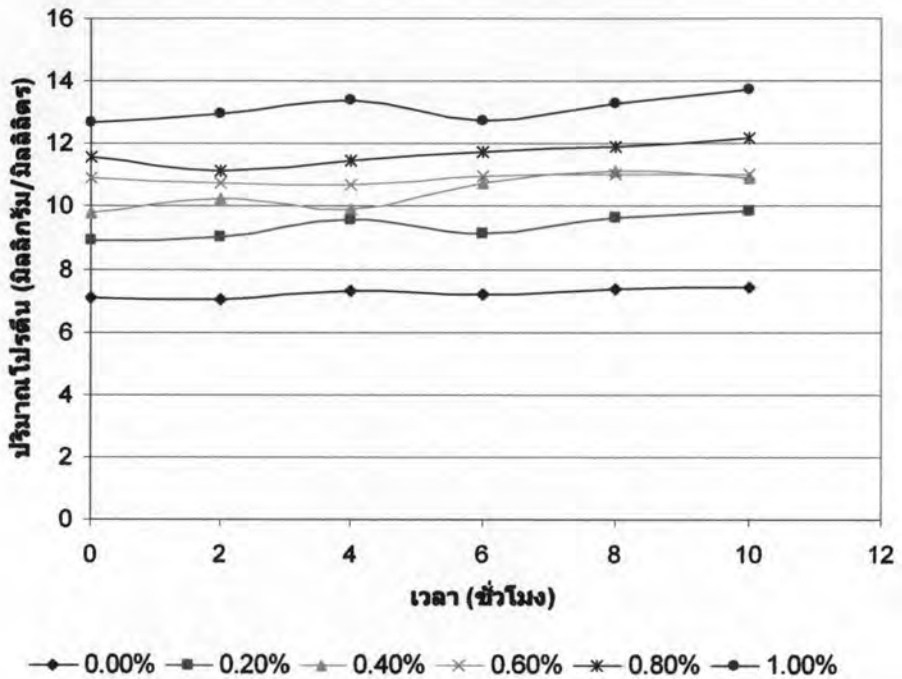
4.5 ปริมาณแหล่งวิตามินที่เหมาะสม

เมื่อเลี้ยง *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่ 10% โดยปริมาตรเพื่อการผลิตเดกซ์แทรน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ซูโครส 7.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอน และกากถั่วลิสงที่ผ่านการสกัดด้วยตัวทำละลายนอร์มัลเฮกเซนซ้ำ 4 ครั้ง ที่ความเข้มข้น 1.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งไนโตรเจน แล้วแปรผันปริมาณยีสต์สกัดในรูปแหล่งวิตามินที่ 0.0-1.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามวิธีในข้อ 3.5 และวิเคราะห์การเจริญของเซลล์ด้วยวิธีการนับเซลล์มีชีวิตทั้งหมดที่เจริญบนจานเพาะเชื้อ ตามวิธีในข้อ 3.8 ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.35 พบว่าอัตราการเจริญของ *L. mesenteroides* เมื่อใช้ยีสต์สกัดที่แต่ละความเข้มข้นเป็นไปในรูปแบบเดียวกัน โดยจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของยีสต์สกัด



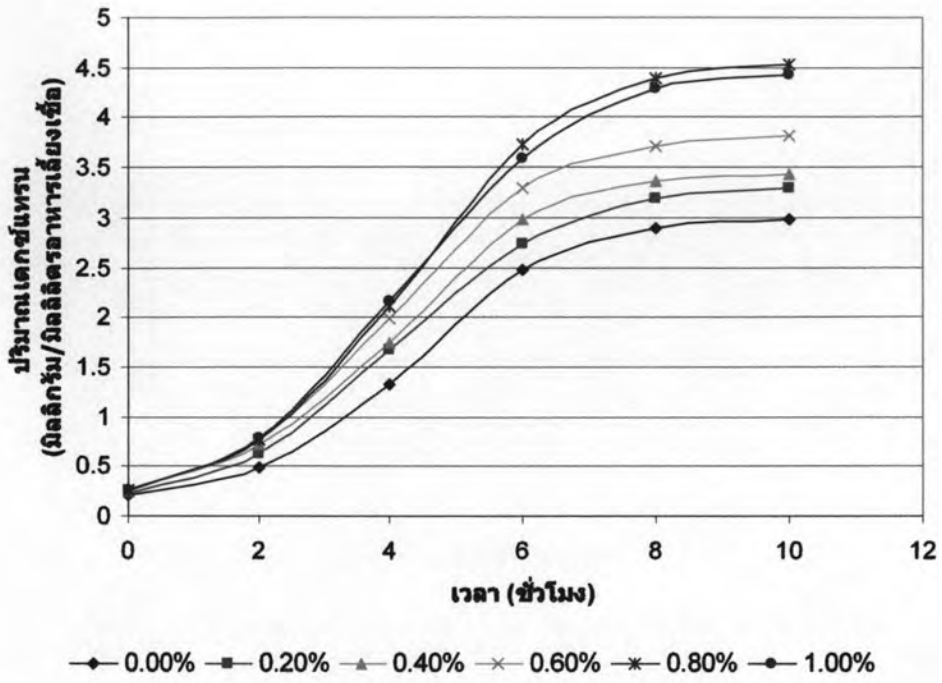
รูปที่ 4.35 การเจริญของ *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ด้วยวิธีการนับเซลล์มีชีวิตทั้งหมดที่เจริญบนจานเพาะเชื้อ จากอาหารซูโครสทริปโตนที่ใช้กากถั่วลิสงความเข้มข้น 1.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และแปรผันปริมาณของยีสต์สกัดตั้งแต่ 0.0-1.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งวิตามิน ที่ 30°ซ 200 รอบต่อนาที10 ชั่วโมง

สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในส่วนใสของน้ำเลี้ยงด้วยวิธีของ Lowry (1951) ตามวิธีในข้อ 3.14 พบว่าปริมาณโปรตีนในส่วนใสของน้ำเลี้ยงจากแต่ละความเข้มข้นของยีสต์สกัดและจากแต่ละระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างนั้น จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของยีสต์สกัด ดังแสดงในรูปที่ 4.36 เห็นได้ว่าในส่วนใสก่อนที่จะนำไปตกตะกอนเดกซ์แทรนในแต่ละความเข้มข้นของยีสต์สกัด จะมีโปรตีนเจือปนอยู่ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน

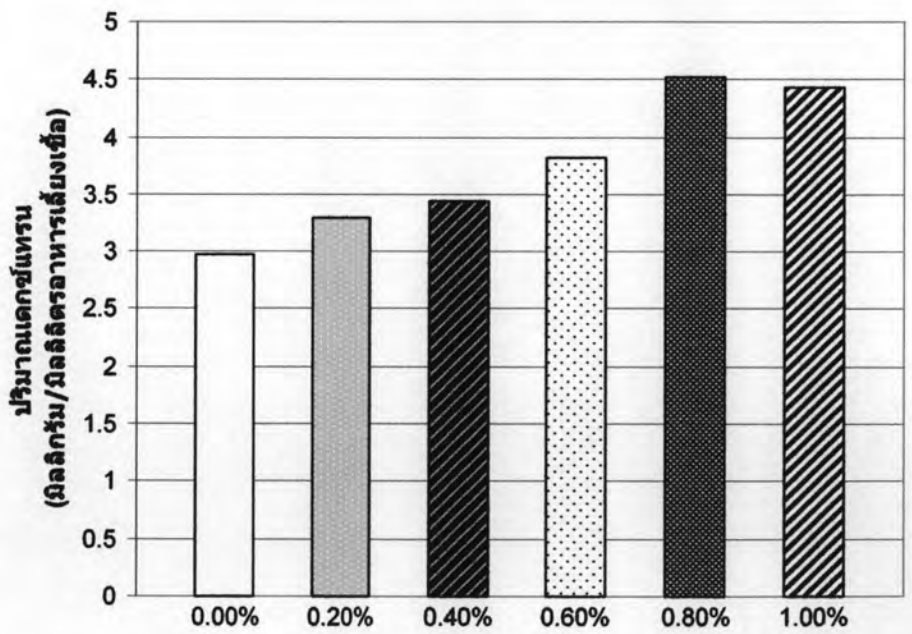


รูปที่ 4.36 ปริมาณโปรตีนในส่วนใสของน้ำเลี้ยง *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ที่เวลาต่างๆ จากอาหารซูโครสทริปโตนที่ใช้กากถั่วลิสงความเข้มข้น 1.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และแปรผันปริมาณของยีสต์สกัดตั้งแต่ 0.0-1.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ 30°ซ 200 รอบต่อนาที

และจากการเปรียบเทียบการผลิตเดกซ์แทรนตามวิธีในข้อ 3.9 ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.37 และ 4.38 พบว่าผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกับการเจริญของแบคทีเรีย ซึ่งการใช้ยีสต์สกัดที่ความเข้มข้น 0.8% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเพื่อเป็นแหล่งวิตามินให้แก่แบคทีเรียจะให้ปริมาณเดกซ์แทรนที่สูงที่สุด โดยสามารถผลิตเดกซ์แทรนสูงที่สุดเท่ากับ 4.52 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ เห็นได้ว่ายีสต์สกัดที่ความเข้มข้น 0.8% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เหมาะสำหรับใช้เป็นแหล่งวิตามินให้แก่แบคทีเรียในการผลิตเดกซ์แทรน



รูปที่ 4.37 ผลผลิตเดกซ์แทรนโดย *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 จากอาหารซูโครสทริปโตนที่ใช้กากถั่วลิสงความเข้มข้น 1.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และแปรผันปริมาณของยีสต์สกัดตั้งแต่ 0.0-1.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ 30°ซ 200 รอบต่อนาที10 ชั่วโมง



รูปที่ 4.38 การเปรียบเทียบปริมาณเดกซ์แทรนในชั่วโมงที่ 10 ของการเลี้ยงเชื้อ จากอาหารซูโครสทริปโตนเมื่อแปรผันปริมาณของยีสต์สกัดซึ่งเป็นแหล่งวิตามินให้แก่แบคทีเรีย

จากการคัดเลือกปริมาณกล้าเชื้อ สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเดกซ์แทรน จะเห็นได้ว่าการผลิตเดกซ์แทรนในอาหารเหลวทริปโตนที่ใช้ซูโครส 7.0% และกากถั่วลิสง 1.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ พร้อมทั้งเสริมด้วยยีสต์สกัด 0.8% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งวิตามิน ปรับค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 5.5 บ่มที่ 30°ซ และความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จะให้ปริมาณเดกซ์แทรนที่สูงเท่ากับ 4.52 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 4.2 ซึ่งการทดลองต่อไปจะนำเดกซ์แทรนจากการปรับปรุงมาใช้เป็นสารชักนำการสร้างเดกซ์แทรนเนสโดย *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14

ตารางที่ 4.1 สูตรอาหารและภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเดกซ์แทรนโดย *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นเป็น 10% โดยปริมาตร

ชนิดและปริมาณของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเดกซ์แทรน						ปริมาณเดกซ์แทรน (มก./มล. อาหารเลี้ยงเชื้อ)
แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน	แหล่งวิตามิน	pH	อุณหภูมิ	การให้อากาศ	
ซูโครส 7.0% โดยน้ำหนัก	กากถั่วลิสง 1.0% โดยน้ำหนัก	ยีสต์สกัด 0.8% โดยน้ำหนัก	5.5	30°ซ	200 รอบ/นาที	4.52

4.6 การเลี้ยงเชื้อเพื่อเตรียมเดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 โดยเปรียบเทียบระหว่างการใช้เดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์และเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 เป็นสารชักนำ

จากการผลิตเดกซ์แทรนเนสโดย *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 จากสารชักนำการสร้างเดกซ์แทรนเนสความเข้มข้น 1.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร 2 ชนิด คือ เดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์และเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 เปรียบเทียบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสที่ใช้สารชักนำแตกต่างกันตามวิธีในข้อ 3.12 และ 3.13 และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธีในข้อ 3.14 เพื่อคำนวณแอคติวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนส ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.2 โดยพบว่าแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสที่ใช้เดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์เป็นสารชักนำ มีค่ามากกว่าแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสที่ใช้เดกซ์แทรนจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 เพียงเล็กน้อย

โดยสามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้ประมาณ 483.43 หน่วยต่อมิลลิลิตรของน้ำเลี้ยงเชื้อ มีปริมาณโปรตีนประมาณ 4.48 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 480.18 หน่วยต่อมิลลิลิตรของน้ำเลี้ยงเชื้อ มีปริมาณโปรตีนประมาณ 7.36 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ซึ่งสามารถคำนวณออกมาในหน่วยของแอคติวิตีจำเพาะได้เป็น 107.91 และ 65.24 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ

ตารางที่ 4.2 การเปรียบเทียบแอคติวิตี และแอคติวิตีจำเพาะระหว่างเดกซ์แทรนเนสที่ใช้เดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์ และเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 เป็นสารชักนำ

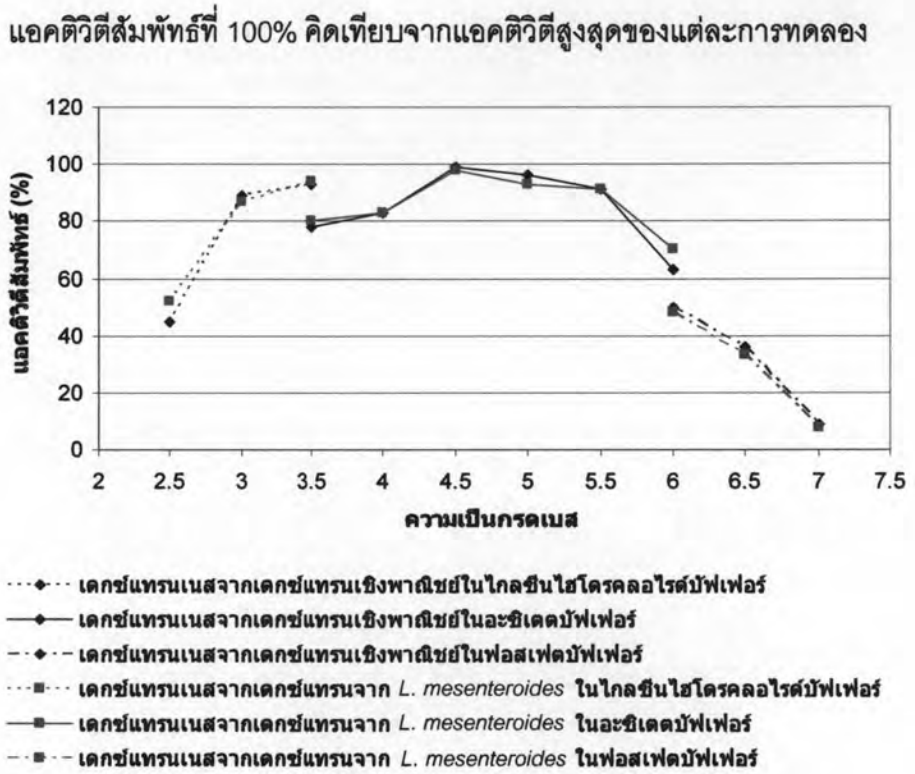
ชนิดของสารชักนำที่ใช้ผลิตเดกซ์แทรนเนส	**แอคติวิตี (หน่วย/มล.)**	**ปริมาณโปรตีน (มก./มล.)**	**แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.โปรตีน)**
เดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์	483.43	4.48	107.91
เดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473	480.18	7.36	65.24

4.7 การศึกษาสมบัติของเดกซ์แทรนเนส 2 ชนิด จากการใช้เดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์ และเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 เป็นสารชักนำ

4.7.1 ความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนส 2 ชนิด ที่ใช้เดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์ และเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 เป็นสารชักนำ

หลังจากแปรผันค่าความเป็นกรดเบส ในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์แต่ละชนิดที่ใช้สารชักนำแตกต่างกันตั้งแต่ 2.5-7.0 ตามวิธีในข้อ 3.19.1 และวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 3.12 และ 3.13 พบว่าไกลซีนไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ที่ความเป็นกรดเบส 2.5-3.5 และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ความเป็นกรดเบส 6.0-7.0 ไม่เหมาะสำหรับการทำปฏิกิริยาของเดกซ์แทรนเนสทั้ง 2 ชนิด เนื่องจากแอคติวิตีของเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ดังกล่าวมีค่าน้อยกว่าการใช้อะซิเตตบัฟเฟอร์ เมื่อความเป็นกรดเบสของอะซิเตตบัฟเฟอร์เพิ่มขึ้น จะมีผลทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้นด้วย จนกระทั่งถึงค่าความเป็นกรดเบส 4.5 จะทำให้เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดมีแอคติวิตีสูงที่สุด จากนั้นเมื่อ

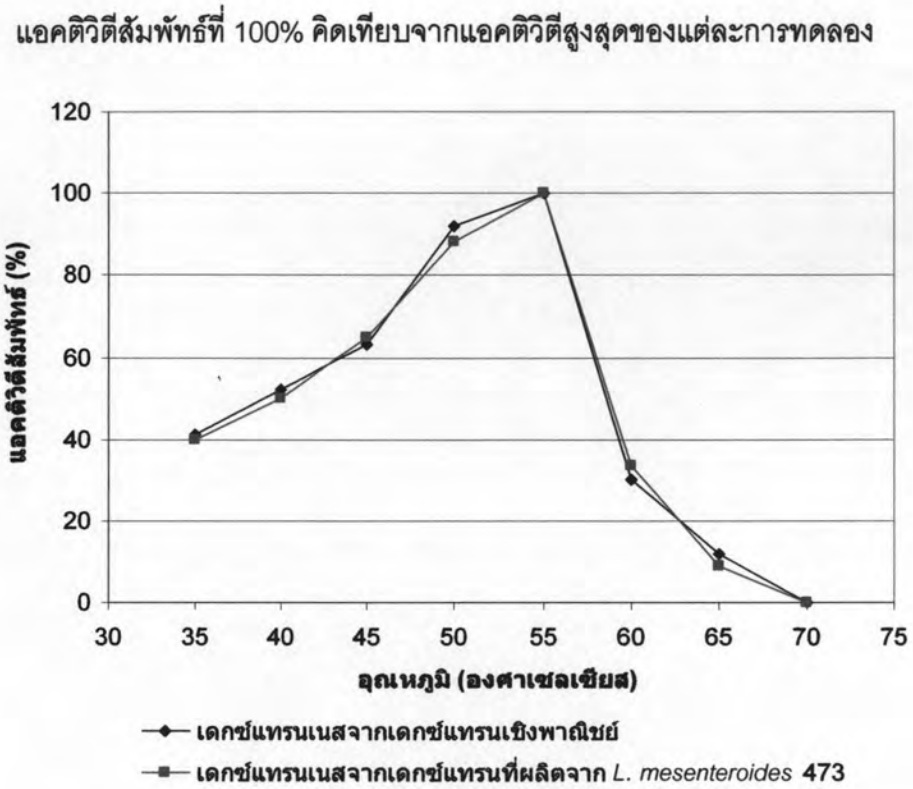
เพิ่มความเป็นกรดเบสของอะซิเตตบัฟเฟอร์สูงขึ้นอีก พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ลดลง ดังผลการทดลองแสดงในรูป 4.39



รูปที่ 4.39 ความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนส 2 ชนิด ที่ชักนำโดยเดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์ และเดกซ์แทรนจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473

4.7.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนส 2 ชนิด ที่ใช้เดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์ และเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 เป็นสารชักนำ

จากการแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ตั้งแต่ 35-70°ซ ตามวิธีในข้อ 3.19.2 และวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 3.12 และ 3.13 ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.40 พบว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจะมีผลให้แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสเพิ่มขึ้น โดยที่เดกซ์แทรนเนสทั้ง 2 ชนิด มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานเท่ากันคือที่ 55°ซ แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นจะพบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ลดลง แสดงให้เห็นว่าผลของอุณหภูมิที่มีต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนสทั้ง 2 ชนิดไม่แตกต่างกัน

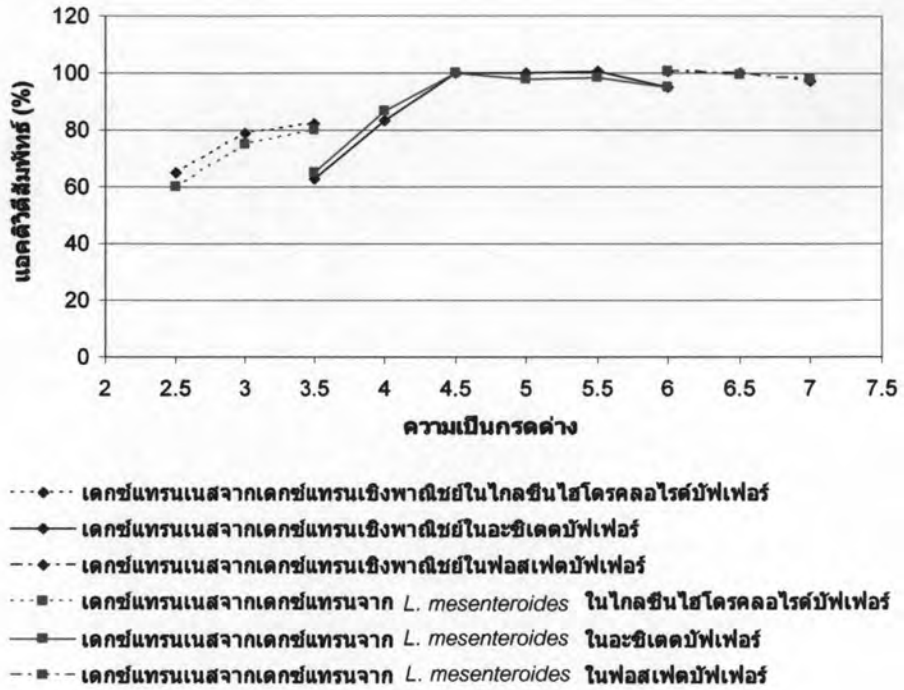


รูปที่ 4.40 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนส 2 ชนิด ที่ชักนำโดยเดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์ และเดกซ์แทรนจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473

4.7.3 ความเสถียรต่อความเป็นกรดเบสของเดกซ์แทรนเนส 2 ชนิด ที่ใช้เดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์ และเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 เป็นสารชักนำ

จากการบ่มเดกซ์แทรนเนสแต่ละชนิด ในบัฟเฟอร์ที่แปรผันความเป็นกรดเบสในช่วง 2.5-7.0 ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 30 นาที ตามวิธีในข้อ 3.19.3 จากนั้นนำไปวิเคราะห์แอคติวิตีที่เหลืออยู่ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมตามวิธีในข้อ 3.12 และ 3.13 ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.41 พบว่าเดกซ์แทรนเนสแต่ละชนิดมีความเสถียรต่อความเป็นกรดเบสใกล้เคียงกัน และมีความเสถียรอยู่ในช่วงกว้างตั้งแต่ 4.5-7.0 โดยมีแอคติวิตีคงเหลือประมาณ 90–100%

แอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100% คิดเทียบจากแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ไม่ได้บ่มของแต่ละการทดลอง

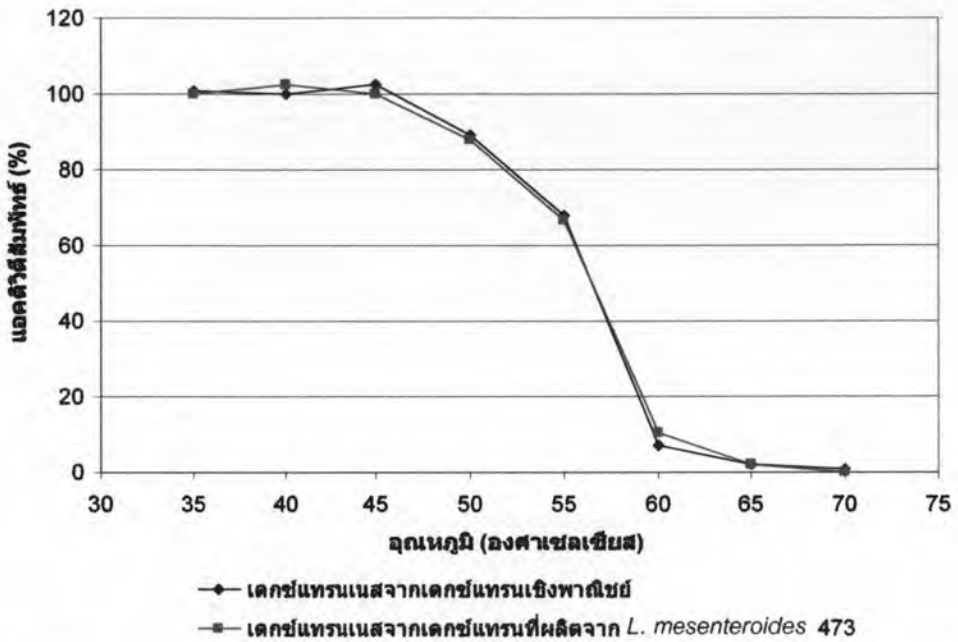


รูปที่ 4.41 ความเสถียรต่อความเป็นกรดเบสในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ของเดกซ์แทรนเนส 2 ชนิด ที่ชักนำโดยเดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์ และเดกซ์แทรนจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473

4.7.4 ความเสถียรต่ออุณหภูมิของเดกซ์แทรนเนส 2 ชนิด ที่ใช้เดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์ และเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 เป็นสารชักนำ

จากการนำเดกซ์แทรนเนสแต่ละชนิดมาบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ โดยแปรผันอุณหภูมิในช่วง 35-70°ซ เป็นเวลา 30 นาที ตามวิธีในข้อ 3.19.4 จากนั้นนำไปวิเคราะห์แอคติวิตีที่เหลืออยู่ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม ตามวิธีในข้อ 3.12 และ 3.13 ผลการทดลองดังแสดงในรูป 4.42 พบว่าความเสถียรของเดกซ์แทรนเนสแต่ละชนิดต่ออุณหภูมิมีค่าใกล้เคียงกัน โดยจะมีความเสถียรต่ออุณหภูมิในช่วง 35-45°ซ และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 50 และ 55°ซ เอนไซม์แต่ละชนิดจะมีแอคติวิตีคงเหลือประมาณ 90 และ 60% ตามลำดับ และเอนไซม์จะสูญเสียแอคติวิตีอย่างรวดเร็วเมื่อเพิ่มอุณหภูมิถึง 65°ซ

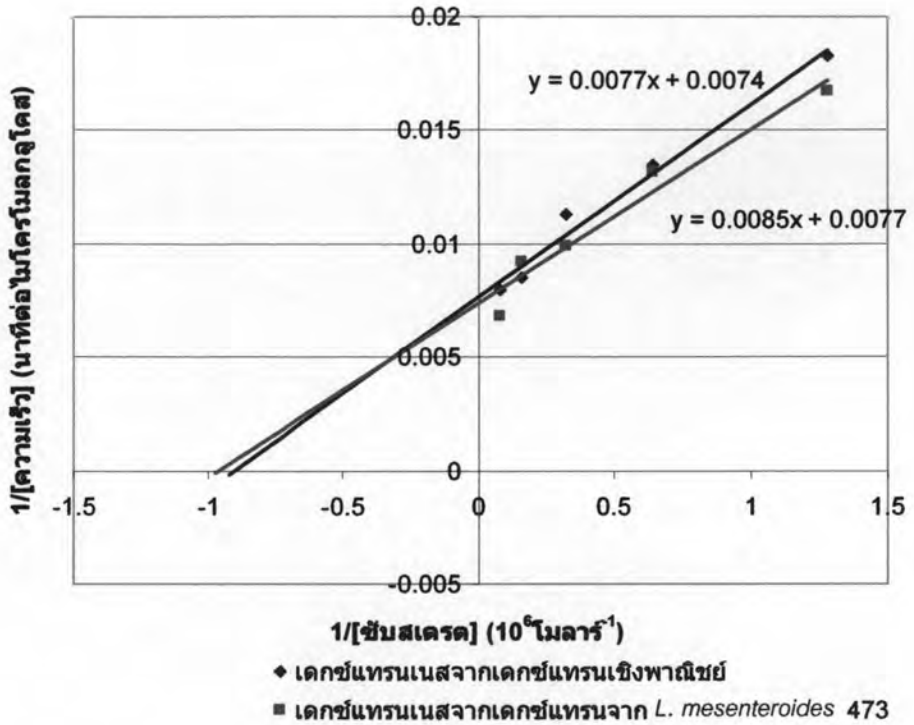
แอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100% คิดเทียบจากแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ไม่ได้บ่มของแต่ละการทดลอง



รูปที่ 4.42 ความเสถียรต่ออุณหภูมิของเดกซ์แทรนเนส 2 ชนิด ที่ชักนำโดยเดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์และเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473

4.7.5 การหาค่าคงที่มิเคลลิส (K_m) ของเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตโดยการชักนำด้วย เดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์และเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ต่อเดกซ์แทรนที-2000

การทดลองนี้ได้ศึกษาความจำเพาะของเดกซ์แทรนเนส ที่ผลิตจากการใช้เดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์ และเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 โดยแปรผันความเข้มข้นของซับสเตรตเดกซ์แทรนที-2000 ตามวิธีในข้อ 3.19.5 และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีในข้อ 3.13 จากนั้นนำค่าที่ได้มาเขียนกราฟตามวิธีของไลน์วีเวอร์-เบิร์ก (Lineweaver-Burk plot) ดังแสดงในรูปที่ 4.39 พบว่าค่า K_m ของเดกซ์แทรนเนสที่ใช้เดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์ และเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 เป็นสารชักนำ เปรียบเทียบกับซับสเตรตเดกซ์แทรนที-2000 มีค่าเท่ากับ 1.10 ไมโครโมลาร์ และ 1.04 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเดกซ์แทรนเนสแต่ละชนิด จะมีความจำเพาะต่อซับสเตรตเดกซ์แทรนที-2000ใกล้เคียงกัน



รูปที่ 4.43 การประมาณค่าคงที่มิเคลลิส (K_m) โดยวิธีของไลน์วีเวอร์-เบิร์ก (Linewever-Burk plot) ของเดกซ์แทรนเนส 2 ชนิด ที่ผลิตโดยการชักนำด้วยเดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์ และเดกซ์แทรนจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 เมื่อใช้เดกซ์แทรนที-2000 เป็นซับสเตรต

4.7.6 การเปรียบเทียบความสามารถของเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตโดยการชักนำด้วย เดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์และเดกซ์แทรนจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ในการย่อยสลายซับสเตรตเดกซ์แทรนชนิดต่างๆ

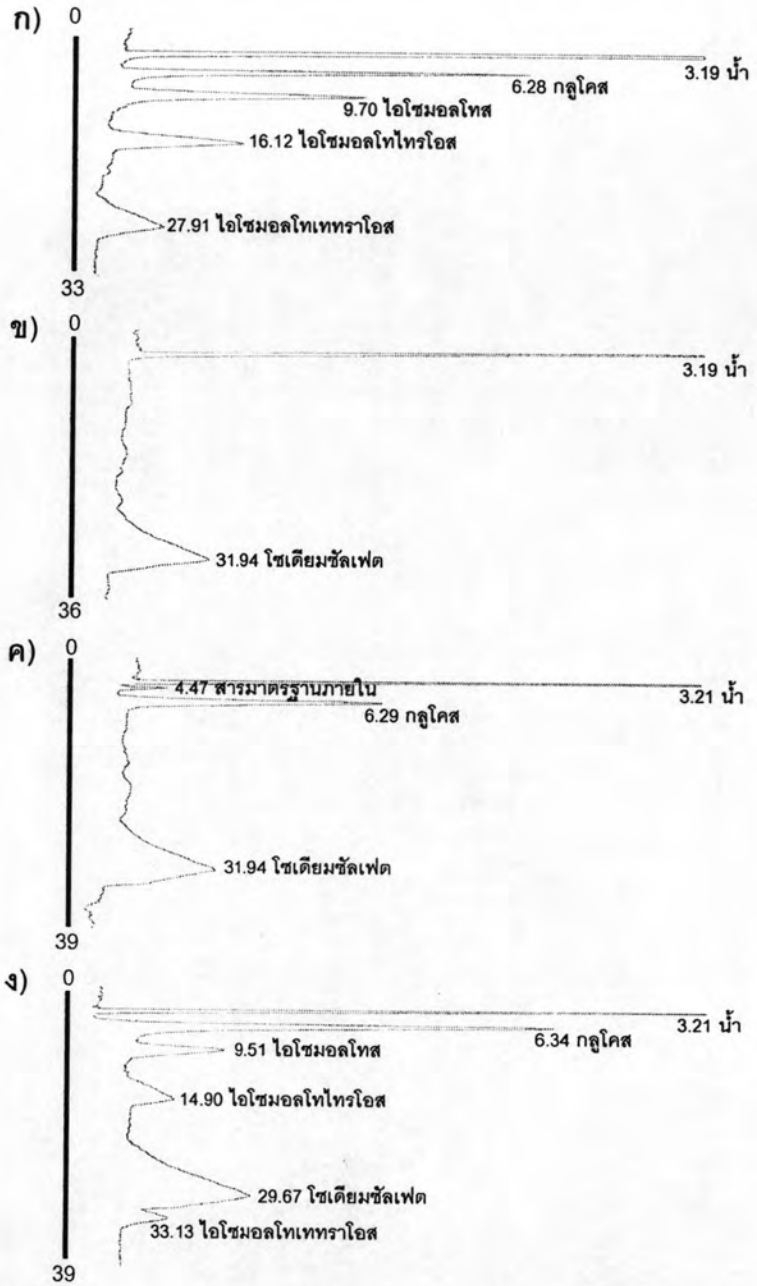
จากการบ่มปฏิกิริยาของเดกซ์แทรนเนสแต่ละชนิด ที่มีแอคติวิตีเริ่มต้นเท่ากับ 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร กับซับสเตรตเดกซ์แทรนชนิดต่างๆ ได้แก่ เดกซ์แทรนที-2000 เดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์ และเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ที่ความเข้มข้น 0.625% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเท่ากัน ในภาวะที่เหมาะสมเป็นเวลา 15 นาที ตามวิธีในข้อ 3.19.6 และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีในข้อ 3.13 พบว่าเดกซ์แทรนเนสทั้ง 2 ชนิด มีความสามารถในการย่อยสลายซับสเตรตแต่ละชนิดใกล้เคียงกัน โดยน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายมีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 การเปรียบเทียบการย่อยสลายซับสเตรตเดกซ์แทรนชนิดต่างๆ โดยเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตโดยการชักนำด้วยเดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์ และเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 (แอคติวิตีเริ่มต้น 1หน่วยต่อมิลลิลิตรเท่ากัน)

ชนิดของเดกซ์แทรนเนส	**น้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จากซับสเตรต**		
	เดกซ์แทรนจาก *L. mesenteroides*	**เดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์**	**เดกซ์แทรนที่-2000**
เดกซ์แทรนเนสที่ชักนำด้วยเดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์	1.01	0.94	1.22
เดกซ์แทรนเนสที่ชักนำด้วยเดกซ์แทรนจาก *L. mesenteroides* 473	0.91	0.86	1.12

4.8 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายเดกซ์แทรนจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ด้วยกรดซัลฟูริก และเดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 โดยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (high performance liquid chromatography, HPLC)

จากการย่อยสลายเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ด้วยกรดซัลฟูริกและเดกซ์แทรนเนส จากนั้นตรวจสอบชนิดของน้ำตาลโดยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี ตามวิธีในข้อ 3.18 พบว่าการย่อยสลายเดกซ์แทรนด้วยกรดซัลฟูริกจะพบผลิตภัณฑ์ที่เป็นน้ำตาลกลูโคสยู่เพียงชนิดเดียว ดังโครมาโทแกรมที่แสดงดังรูปที่ 4.44 ซึ่งแตกต่างจากการย่อยสลายด้วยเดกซ์แทรนเนส จะพบผลิตภัณฑ์ที่เป็นน้ำตาลกลูโคส ไอโซมอลโทไทรโอส และไอโซมอลโทเททราโอส ดังโครมาโทแกรมที่แสดงในรูปที่ 4.45



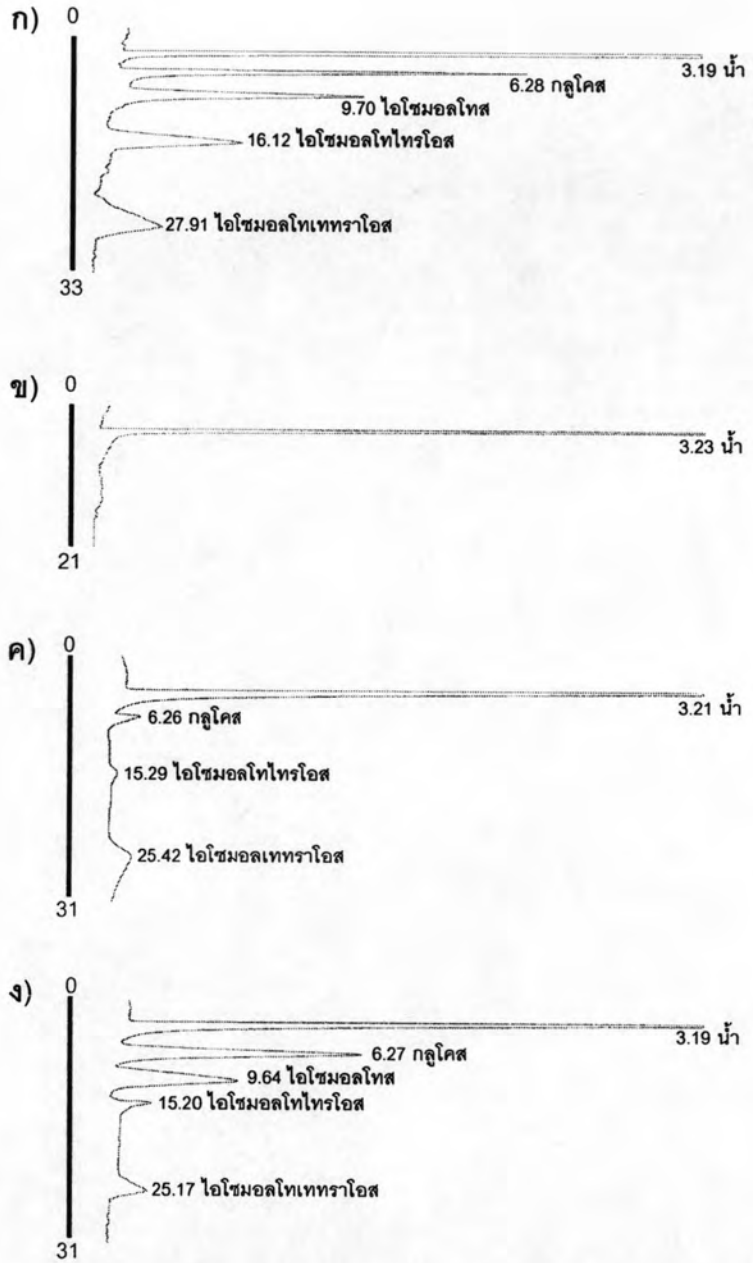
รูปที่ 4.44 โครมาโทแกรมแสดงชนิดของผลิตภัณฑ์ภายหลังการย่อยเดกซ์แทรนจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ด้วยกรดซัลฟูริก เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโดยใช้อะซิโทไนไทรล์ความเข้มข้น 70% โดยปริมาตรเป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

ก) สารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ไอโซมอลโทส ไอโซมอลโทไทรโอส และไอโซมอลโทเททราโอส

ข) โซเดียมซัลเฟตความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ค) ชนิดของน้ำตาลภายหลังจากการย่อยสลายเดกซ์แทรนด้วยกรดซัลฟูริก

ง) ชนิดของน้ำตาลภายหลังจากการย่อยสลายเดกซ์แทรนด้วยกรดซัลฟูริกรวมกับสารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิด



รูปที่ 4.45 โครมาโทแกรมแสดงชนิดของผลิตภัณฑ์ภายหลังการย่อยเดกซ์แทรนจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ด้วยเดกซ์แทรนเนส เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโดยใช้อะซิโทไนไทรล์ความเข้มข้น 70% โดยปริมาตร เป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

ก) สารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ไอโซมอลโทส ไอโซมอลโทไทรโอส และไอโซมอลโทเททราโอส

ข) โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ค) ชนิดของน้ำตาลภายหลังจากการย่อยสลายเดกซ์แทรนด้วยเดกซ์แทรนเนส

ง) ชนิดของน้ำตาลภายหลังจากการย่อยสลายเดกซ์แทรนด้วยเดกซ์แทรนเนส รวมกับสารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิด