# บทที่ 4

## การอภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำทะเลและดินชายเลนแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย จำนวน 1092 สายพันธุ์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่เติมเดกซ์แทรนลงไป1% พบเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสทั้งสิ้น 16 สายพันธุ์ ในจำนวน 16 สายพันธุ์นี้ แบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดินชายเลนของชายฝั่งทะเลในจังหวัดระนอง ให้ส่วนใสรอบโคโลนีกว้างที่สุดจึงคัดเลือกสำหรับศึกษาต่อไป

จากการศึกษาเบื้องต้นถึงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสำหรับการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 นี้ โดยนำสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่ใช้ผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสชนิดต่างๆที่มีผู้รายงานไว้ (34,40,41) มาทดลองเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 พบว่า สูตรอาหารของ Yamaguchi (40) เป็นสูตรอาหารตั้งต้นที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ ดังนั้นจึงเลือกสูตรอาหารของ Yamaguchi นี้ไว้เป็นสูตรอาหารตั้งต้นสำหรับปรับปรุงให้เหมาะสมต่อไป

ในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสของแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 โดยเริ่มจากการศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ พบว่า ที่อุณหภูมิห้องหรือช่วงอุณหภูมิ 30-33 องศาเซลเซียส เป็นช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสของแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 นี้ หากอุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่านี้จะทำให้เชื้อผลิตเอนไซม์ได้ลดลง แต่หากอุณหภูมิสูงเกินกว่า 50 องศาเซลเซียส จะพบว่า เชื้อไม่สามารถเจริญได้ ทั้งนี้อาจเนื่องจากเชื้อนี้จัดเป็นเชื้อในกลุ่ม mesophile จึงไม่สามารถเจริญในที่ที่มีอุณหภูมิสูงได้ เช่นเดียวกับเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราชนิดอื่นๆที่ได้มีรายงานไว้คือเชื้อเหล่านี้จะสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสหรือใกล้เคียงดังแสดงในตารางที่ 18. สำหรับการศึกษาความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมนั้น พบว่า ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 9.0 เป็นค่าที่เหมาะสม ซึ่งแตกต่างไปจากเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราชนิดอื่นๆที่ได้มีผู้รายงานไว้ เช่น Cytophaga sp. (86) L. starkeyi (49) P. aculeatum (59) เป็นต้น ยกเว้น เชื้อ Brevibacterium sp. (40) และ Fusarium moniliforme (58) ที่เจริญและผลิตเอนไซม์นี้ได้ดีที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 8.0

สืบเนื่องมาจากแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 เป็นเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดินชายเลนริมฝั่งทะเล ดังนั้นปริมาณความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์จึงมีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสด้วย พบว่า ที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 2.5%

เชื้อจะให้เอนไซม์สูงสุด และเชื้อก็ยังสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือโซเดียม-คลอไรด์อยู่ 15% แต่ถ้ามีเกลือมากกว่า 20% เชื้อไม่สามารถเจริญได้ ทั้งนี้อาจเนื่องจากเชื้อนี้เป็นเชื้อที่ทนเค็มได้ดี

เนื่องจากการสร้างเอนไซม์นั้นแบ่งเอนไซม์ออกเป็น 2 ชนิด คือ เอนไซม์พวกที่มีอยู่แล้วในเซลล์ (constitutive enzyme) และ เอนไซม์พวกที่ต้องมีการชักนำให้มีการสร้างขึ้นมา (inducible enzyme) จากการวิจัยพบว่า เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่สร้างขึ้นโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 เป็นเอนไซม์ที่ถูกปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยกลุ่มอื่นๆ (39,49,58) รวมทั้งเป็นเอนไซม์ที่ต้องมีการชักนำจึงจะมีการสร้างเอนไซม์ขึ้นมา สารที่ใช้เป็นตัวชักนำในการสร้างเอนไซม์โดยทั่วไปคือเดกซ์แทรน (51) ในการศึกษาถึงความจำเพาะของการชักนำการสร้างเอนไซม์ของเชื้อนี้ พบว่า คาร์โบไฮเดรตที่ใช้ได้แก่ แอลฟา-เซลลูโลส ก็สามารถชักนำให้มีการสร้างเอนไซม์ได้ ส่วนคาร์โบไฮเดรตชนิดอื่นสามารถชักนำได้เล็กน้อย นอกจากคาร์โบไฮเดรตที่ได้ทำการวิจัยแล้วได้มีผู้รายงานไว้ว่า น้ำตาลไอโซมอลโตสก็สามารถชักนำให้มีการสร้างเอนไซม์นี้ได้เช่นกัน (44,51) ดังนั้นสารที่ชักนำให้มีการสร้างเอนไซม์นี้ได้ดีคือสับสเตรตตามธรรมชาติของเอนไซม์ อันได้แก่เดกซ์แทรน ปริมาณของเดกซ์แทรนที่ใช้ในการชักนำและการเจริญของเชื้อแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป สำหรับแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 นี้ พบว่า ปริมาณของเดกซ์แทรนที่เหมาะสมที่เติมลงไปในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 0.5% ในขณะที่รา Penicillium sp. สายพันธุ์ 61 ต้องเติมเดกซ์แทรนลงไป 1.0% (87)

การปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรของ Yamagichi (40) ได้ศึกษาถึงผลของเกลือแร่ชนิดต่างๆที่เป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ อันประกอบด้วย ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตและแมกนีเซียมซัลเฟต พบว่า หากไม่เติมเกลือแร่เหล่านี้ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้การผลิตเอนไซม์ลดลงต่ำกว่าปกติโดยเฉพาะโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่มีผลทำให้การผลิตเอนไซม์ลดลงมาก การเติมเกลือแร่เหล่านี้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อมากกว่าสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อของ Yamaguchi จะทำให้การผลิตเอนไซม์ดีขึ้นกว่าเดิม

ในการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสของแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 โดยใช้แหล่งไนโตรเจนที่อยู่ในรูปของสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ พบว่า กรดคาซามิโนและโพลีเปปโตนซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนที่อยู่ในรูปของสารอินทรีย์ให้ผลดี แต่กรดคาซามิโนให้ผลดีที่สุด ในขณะที่เกลือแอมโมเนียม เกลือไนเตรตและไนโตรเจนที่อยู่ในรูปของสารอินทรีย์ชนิดอื่น เช่น ผงสกัดยีสต์ และ corn steep liquor กลับลดผลผลิตของเอนไซม์ลงไป จากรายงานการวิจัยต่างๆจะเห็นว่าเชื้อแต่ละชนิดมีลักษณะที่ชอบแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกันไปในการสร้างเอนไซม์ เช่น Brevibacterium sp.

(40) จะให้เอนไซม์สูงสุดเมื่อใช้โพลีเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน หรือ P. luteum ATCC 9644 (88) ที่จะให้เอนไซม์สูงสุดเมื่อใช้ corn steep liquor เป็นแหล่งไนโตรเจน ในการทดลองนี้ถ้าเติมผงสกัดยีสต์ลงไป 0.03% จะทำให้การผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้น ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงเลือกกรดคาซามิโนและเสริมด้วยผงสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนต่อไป

เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อนี้มีส่วนผสมของน้ำทะเลเทียมตามสูตรของ Schroder (81) ซึ่งมีแร่ธาตุต่างๆมาก เมื่อศึกษาถึงผลของแร่ธาตุเหล่านี้พบว่า การเพิ่มแร่ธาตุบางชนิดก็มีผลเพิ่มปริมาณของเอนไซม์ แร่ธาตุหลายชนิดเมื่อเติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้การผลิตเอนไซม์ดีกว่าเมื่อไม่เติม และแร่ธาตุอีกหลายชนิดที่เมื่อเติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้การผลิตเอนไซม์ลดลง

ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญกับการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้มีการปรับปรุงแล้ว พบว่า การสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสของแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 มีความสัมพันธ์กับการเจริญของเชื้อโดยการสร้างเอนไซม์นี้เป็น growth-associated product ของเชื้อนี้ การสร้างเอนไซม์จะเริ่มเกิดขึ้นหลังจากที่เลี้ยงเชื้อได้ 8 ชม.และจะให้เอนไซม์สูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อได้ 24 ชม.ซึ่งเป็นช่วงเดียวกับที่เชื้อเจริญเข้าสู่ช่วง stationary phase สำหรับความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อตลอดระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นเล็กน้อยโดยความเป็นกรด-ด่างจะอยู่ในช่วง 8.0-9.0 ในการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารที่ได้ทำการปรับปรุงแล้ว พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 สามารถสร้างเอนไซม์ได้เพิ่มขึ้น 33 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเอนไซม์ที่ได้รับจากสภาวะที่ทดสอบและสูตรอาหารก่อนได้รับการปรับปรุง

เนื่องจากการสร้างเอนไซม์มีส่วนสัมพันธ์กับการเจริญของเซลล์และสารชักนำ รวมทั้งเดกซ์แทรนที่ใช้เป็นสารชักนำนั้นมีราคาค่อนข้างแพง ดังนั้นหากเราสามารถเลี้ยงเซลล์ให้เจริญในแหล่งคาร์บอนแหล่งอื่นที่มีราคาถูกกว่าเดกซ์แทรนก่อน เช่น น้ำตาลกลูโคส จนถึงระยะหนึ่งแล้วค่อยเติมเดกซ์แทรนซึ่งเป็นสารชักนำในการสร้างเอนไซม์ลงไป ถ้าหากได้ผลจะทำให้ปริมาณของเดกซ์แทรนที่ใช้ลดน้อยลงอันเป็นการลดต้นทุนการผลิตได้ จากการวิจัยนี้พบว่า การเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสจนกระทั่งเชื้อเริ่มเข้าสู่ช่วง stationary แล้วจึงเติมเดกซ์แทรนลงไป 0.25% พบว่าเชื้อสร้างเอนไซม์ได้สูงขึ้นเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเดกซ์แทรนตั้งแต่ต้น แต่ระยะเวลาเลี้ยงเชื้อเพื่อที่จะให้ได้เอนไซม์สูงสุดจะใช้เวลานานกว่า แต่ถ้าเปรียบเทียบถึงต้นทุนในการผลิตจะเห็นว่า การเลี้ยงเชื้อให้เจริญเต็มที่ก่อนแล้วจึงเติมสารชักนำการสร้างเอนไซม์ลงไปจะมีต้นทุนการผลิตต่ำกว่าแม้จะต้องใช้เวลาในการเลี้ยงเชื้อเพิ่มมากขึ้นอีกเล็กน้อยก็ตาม

ในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสนั้น ได้ทำการศึกษาถึงผลของความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ และความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ต่อการทำงานของเอนไซม์นี้ พบว่า แอคติวิตีของเอนไซม์จะสูงสุด

ที่ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ซึ่งใกล้เคียงกับเอนไซม์นี้จากแบคทีเรียชนิดอื่น (34,41, 45) แต่แตกต่างจากเอนไซม์นี้ที่ได้จากเชื้อรา ดังแสดงในตารางที่ 19. และเอนไซม์นี้เสถียรที่ความเป็นกรด-ด่างในช่วงกว้าง คือ ตั้งแต่ 5.5 ถึง 8.0 ได้นาน 30 นาที สำหรับผลของอุณหภูมินั้น พบว่า เอนไซม์ทำงานได้ดีในอุณหภูมิที่เหมาะสมในช่วงค่อนข้างแคบ คือ ตั้งแต่ 45 ถึง 55 องศาเซลเซียส โดยประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์จะดีที่สุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และเอนไซม์มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที สำหรับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการทำงานของเอนไซม์พบว่า หากบ่มเอนไซม์ในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์มากขึ้นแอคติวิตีของเอนไซม์จะเริ่มลดลง ส่วนความเสถียรของเอนไซม์จะเห็นว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์จะทำให้เอนไซม์มีความเสถียรเพิ่มมากขึ้น ซึ่งความเสถียรจะตรงข้ามกับการทำงานของเอนไซม์ โดยที่ความเสถียรจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้นแต่แอคติวิตีของเอนไซม์กลับลดลง ทั้งนี้อาจมีสาเหตุเนื่องมาจากสภาวะการทดสอบความเสถียรนั้นทำโดยการบ่มระบบของเอนไซม์-สับสเตรตที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ แต่การตรวจสอบแอคติวิตีจะนำมาตรวจสอบในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอ-ไรด์ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือที่ 2.5% เกลือโซเดียมคลอไรด์ดังนั้นแอคติวิตีของเอนไซม์เมื่อนำมาทดสอบความเสถียรจึงสูง สำหรับสาเหตุของการที่เอนไซม์มีความเสถียรเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้นนั้นยังไม่สามารถอธิบายได้ แต่เกลือโซเดียมคลอไรด์อาจจะช่วยรักษาโครงรูปของเอนไซม์นี้ซึ่งน่าจะถูกต้องตามธรรมชาติของแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 ที่เป็นแบคทีเรียที่ชอบเค็ม ทำให้เป็นลักษณะที่ดีของเอนไซม์นี้คือทำงานได้ดีและมีความเสถียรในระบบที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ อีกทั้งในทางปฏิบัติแล้วอาจใช้เกลือโซเดียมคลอไรด์เป็นสารป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อที่ไม่ชอบเค็มหรือเชื้อที่ไม่ทนเค็มได้ ส่วนผลของความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ต่อการทำงานของเอนไซม์ พบว่าฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ จะมีแอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุด และเอนไซม์มีความเสถียรที่ความเข้มข้นนี้ได้ดีหลังจากบ่มไว้ 30 นาที

ผลของเกลือแร่และสารบางชนิดต่อการทำงานของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 จะเห็นว่า สารประกอบโลหะหนักโดยเฉพาะ คอปเปอร์ซัลเฟต คอปเปอร์คลอไรด์ เมอคิวรีคลอไรด์ นิเกิลคลอไรด์ ซิงค์คลอไรด์ และเหล็กคลอไรด์จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เช่นเดียวกับงานวิจัยอื่นๆ (34,38,40,41,59,60) และคาดว่าสารประกอบโลหะหนักเหล่านี้น่าจะมีผลการยับยั้งแบบ non-competitive ส่วนสารอื่นๆ นั้นไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์มากนักยกเว้นสารประกอบของแมกนีเซียมทั้งในรูปของแมกนีเซียมซัลเฟตและแมกนีเซียมคลอไรด์ซึ่งต่างก็เสริมแอคติวิตีของเอนไซม์เช่นเดียวกับเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อ Bacillus circulan สายพันธุ์ MT-G2 ที่เกลือของแมกนีเซียมช่วยเสริมการทำงานของเอนไซม์ (34) การที่เกลือของแมกนีเซียมช่วยเสริม

การทำงานของเอนไซม์นี้อาจเนื่องจากแมกนีเซียมอาจจะเป็นโคแฟคเตอร์ของเอนไซม์ต่างๆ

ในการศึกษาความจำเพาะต่อการย่อยของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสโดยใช้สับสเตรตที่มีพันธะแอลฟาและพันธะเบต้าที่เชื่อมในตำแหน่งต่างๆกันรวมทั้งเดกซ์แทรนที่มีขนาดต่างๆกัน ปรากฏว่า เอนไซม์นี้มีความจำเพาะต่อโพลิเมอร์ของกลูโคสที่มีพันธะ แอลฟา-1,6-ไกลโคซิดิคเท่านั้น เอนไซม์นี้จะไม่ย่อยสลายพันธะ แอลฟา-1,6 ในสายแยก (branch) ของโพลิเมอร์ของกลูโคส เช่น แป้งและเดกซ์ทริน ทั้งแป้งและเดกซ์ทรินนี้เป็นโพลิเมอร์ที่มีพันธะ แอลฟา-1,4 เป็นแกนหลัก สำหรับผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยเดกซ์แทรน ที-2000 ซึ่งตรวจโดยการทำโครมาโตกราฟีบนกระดาษกรอง พบว่า ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะเป็นโอลิโกแซคคาร์ไรด์ที่อยู่ใกล้กับจุดเริ่มต้นและให้น้ำตาลที่มีขนาดเล็กที่มีค่า Rf เท่ากับค่า Rf ของน้ำตาลไอโซมอลโตสโดยไม่สามารถตรวจพบน้ำตาลกลูโคส (อาจมีในปริมาณที่ต่ำมาก) จึงพอสรุปได้ว่า การทำงานของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 เป็นแบบ endo- ให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายในรูปของน้ำตาลไอโซมอลโตส เช่นเดียวกับเชื้อ Achromobacter sp.(33) จากรายงานของบริษัท Novo และจากตารางที่ 19. แสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยสลายของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อราจะมีการย่อยสลายเป็นแบบ endo- ทำให้ได้น้ำตาลโอลิโกเมอร์หรือไดเมอร์ของกลูโคสออกมาเป็นหลัก (53, 59,60,88) แต่สำหรับของแบคทีเรียนั้นมีการย่อยสลายได้ทั้งชนิด endo- และ exo-

ในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วน พบว่า การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ขั้นแต่ละขั้นจะทำให้แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์สูงขึ้นและความบริสุทธิ์ของเอนไซม์หลังกรรมวิธีทั้งหมดจะเพิ่มมากขึ้นถึง 222.8 เท่าเมื่อเทียบกับเอนไซม์ก่อนที่จะนำมาทำให้บริสุทธิ์ โดยในขั้นตอนของการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตนั้นทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 18.9 เท่าโดยมีปริมาณของเอนไซม์เหลือ 57.5 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อผ่านคอลัมน์ของเซฟาโรส 4บี จะทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 131.8 เท่าโดยมีปริมาณของเอนไซม์เหลือ 9.9 เปอร์เซ็นต์ จากการนำเอนไซม์มาผ่านคอลัมน์ของดีอีเออี-เซลลูโลสซึ่งเป็น ion exchange จะเห็นว่าเอนไซม์จะเกาะติดกับดีอีเออี-เซลลูโลสได้ดีและต้องใช้เกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นสูงกว่ามาชะล้างจึงจะออกมาแสดงว่า เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่ได้นี้มีประจุเป็นลบและในขั้นตอนนี้ทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 222.8 เท่า แต่ปริมาณของเอนไซม์ที่เหลืออยู่เหลือเพียง 2.3 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นว่าเอนไซม์ที่เหลืออยู่เมื่อผ่านแต่ละขั้นตอนจะต่ำมาก ทั้งนี้อาจเนื่องจากสภาวะที่ใช้ในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ยังไม่เหมาะสม จะต้องทำการปรับปรุงวิธีการและสภาวะต่างๆในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์เพื่อให้ได้ปริมาณเอนไซม์สูงขึ้น

ในการเตรียมเอนไซม์เข้มข้นโดยการนำเอนไซม์ที่ผ่านขั้นตอนต่างๆในการทำให้บริสุทธิ์มาทำการระเหิดแห้ง พบว่า เอนไซม์จะสูญเสียแอคติวิตีไปประมาณ 20-25% ทั้งนี้อาจเนื่องจากการเปลี่ยนสถานะของเอนไซม์มีผลทำให้โครงรูปของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป

การหาค่าคงที่ทางจลนศาสตร์ (Km) ของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 ที่ได้ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนแล้วต่อเดกซ์แทรน ที-2000 ได้เท่ากับ 0.558x $10^{-6}$ โมลาร์ ซึ่งแสดงถึงความจำเพาะของเอนไซม์นี้ว่ามีความจำเพาะค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับค่า Km จากงานวิจัยอื่น ดังแสดงในตารางที่ 20. จากตารางดังกล่าวเมื่อเปรียบเทียบเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อรา Penicillium sp. สายพันธุ์ 61 กับแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 จะเห็นว่า เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 มีความจำเพาะต่อเดกซ์แทรน ที-2000ซึ่งเป็นสับสเตรตสูงกว่า

ในการตรวจสอบทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 พบว่า เชื้อนี้มีลักษณะกลม (coccus) อยู่กันเป็นคู่หรือเป็นสายยาว ติดสีแกรมบวก โคโลนี้มีลักษณะกลมนูนตรงกลางและมีขอบเรียบ และจากผลการทดสอบทางชีวเคมี ตาม Bergey's Manual of Systematics Bacteriology (85) ทำให้จำแนกเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 นี้เป็นแบคทีเรียในสกุล Micrococcus

ตารางที่ 18. แสดงสภาวะต่างๆในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

| ชนิด | ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น | อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | เวลาที่ใช้การเลี้ยงเชื้อ | เอกสารอ้างอิง |
|---|---|---|---|---|
| Achromobacter sp. | 6.8 | 30 | 24 ชม. | 33 |
| Brevibacterium sp. | 8.0 | 26 | 72 ชม. | 40 |
| Cytophaga sp. | 6.5 | 29-30 | 24 ชม. | 86 |
| แบคทีเรีย สายพันธุ์ Z-10 | 9.0 | 30 | 48 ชม. | ในการวิจัยนี้ |
| Lipomyces starkeyi | 2.5-4.0 | 25-30 | 70-100 ชม. | 49 |
| Aspergillus luchvansis | 6.0 | 28 | 4 วัน | 54 |
| Fusarium moniliforme | 8.0 | 30 | 14 วัน | 58 |
| Penicillium funiculosum | 6.0 | 25-28 | 5 วัน | 60 |
| P. aculeatum | 6.5 | 30 | 5-6 วัน | 59 |
| Penicillium sp.สายพันธุ์ 61 | 6.0 | 30 | 6 วัน | 87 |

ตารางที่ 19. แสดงสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากแหล่งต่างๆ

| ชนิด | ความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม | อุณหภูมิที่เหมาะสม (องศาเซลเซียส) | ลักษณะการย่อยสลายเดกซ์แทรน | เอกสารอ้างอิง |
|---|---|---|---|---|
| Achromobacter sp. | 4.2 | 37 | Exo | 33 |
| Bacillus circulans | 6.2-6.7 | 35 | - | 34 |
| Bacillus subtilis | 5.8-6.0 | - | Endo | 36 |
| Brevibacterium sp. | 8.0 | 53 | Endo | 40 |
| Brevibacterium fuscum | 7.0-7.5 | - | Exo | 41 |
| Cytophaga johnsonii | 5.0-6.5 | 50 | Endo | 43 |
| Fusobacterium fusiforme | 6.8 | - | Exo | 45 |
| Streptococcus mitis | 6.0 | - | Exo | 43 |
| แบคทีเรียสายพันธุ์ Z-10 | 7.0 | 55 | Endo | ในการวิจัยนี้ |
| Lipomyces starkeyi | 5.0 | 50 | Endo | 49 |
| Aspergillus carneus | 5.0-5.5 | 55 | Endo | 53 |
| Aspergillus luchvensis | 5.5 | - | Endo | 54 |
| Fusarium monoliforme | 5.5 | 55 | - | 58 |
| Penicillium luteum | 4.0-6.0 | - | Endo | 43 |
| Penicillium lilaccinum | 4.5-5.5 | - | Endo | 64 |
| Penicillium sp. สายพันธุ์ 61 | 5.5 | 55 | Endo | 87 |

ตารางที่ 20.แสดงค่า Km ของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

| ชนิด | ชนิดของสับสเตรต | Km | เอกสารอ้างอิง |
|---|---|---|---|
| Brevibacterium fuscum | เดกซ์แทรนขนาด $1.0 \times 10^6$ | 0.0435% | 42 |
| Lipomyces starkeyi | เดกซ์แทรน ที2000 | $3.0 \times 10^{-6}$ โมล | 49 |
| Fusarium moniliforme | เดกซ์แทรน ที10 | $1.1 \times 10^{-4}$ โมล | 58 |
| Penicillium funiculosum | | $0.952 \times 10^{-6}$ โมล | 60 |
| Penicillium sp.สายพันธุ์ 61 | เดกซ์แทรน ที2000 | $1.6 \times 10^{-6}$ โมล | 87 |
| แบคทีเรียสายพันธุ์ z-10 | เดกซ์แทรน ที2000 | $0.558 \times 10^{-6}$ โมล | ในการวิจัยนี้ |