การสลายเดกซ์แทรนบนแบบจำลองพื้นเรียบด้วยเดกซ์แทรนเนสจากจุลินทรีย์

นางสาวณฤดี อัศวเสรีเลิศ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEGRADATION OF DEXTRAN ON SMOOTH SURFACE MODEL BY MICROBIAL DEXTRANASES

Miss Naruedee Assawasereelert

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การสลายเดกซ์แทรนบนแบบจำลองพื้นเรียบด้วยเดกซ์แทรนเนสจากจุลินทรีย์
โดย	นางสาวณฤดี อัศวเสรีเลิศ
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา จันทร์ประทีป)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. ปาหนัน เริงสำราญ)

ณฤดี อัศวเสรีเลิศ : การสลายเดกซ์แทรนบนแบบจำลองพื้นเรียบด้วยเดกซ์แทรนเนสจากจุลินทรีย์. (DEGRADATION OF DEXTRAN ON SMOOTH SURFACE MODEL BY MICROBIAL DEXTRANASES) อ.ที่ปรึกษา : รศ. ดร. สุเทพ ธนียวัน, 99 หน้า.

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาความสามารถในการลดการยึดติดของ *Streptococcus sobrinus* 6715 บนแบบจำลองพื้นเรียบโดยใช้เดกซ์แทรนเนสที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ ทั้งในระบบการจำลองเพื่อนำเดกซ์แทรนเนสไปใช้เพื่อป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ในช่องปาก และการสลายคราบจุลินทรีย์นอกช่องปาก เช่น อุปกรณ์ที่ใช้กับช่องปาก อุปกรณ์ทางทันตกรรม เป็นต้น เดกซ์แทรนเนสที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้มาจากแบคทีเรีย *Arthrobacter* sp. AG-2 และรา *Penicillium pinophilum* SMCU 3-14 ที่ถูกชักนำด้วยเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรมที่มีพันธะ α-1,6 ในปริมาณมาก และเดกซ์แทรนที่ได้จาก *S. sobrinus* 6715 ที่ผลิตขึ้นเองในงานวิจัยนี้ ซึ่งมีพันธะ α-1,3 ในสัดส่วนที่มากกว่าพันธะ α-1,6 ผลจากการศึกษา พบว่า เดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. AG-2 ที่ถูกชักนำการผลิตด้วยเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 นั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดใหม่ของคราบจุลินทรีย์บนแบบจำลองพื้นเรียบได้ดีที่สุด โดยไม่พบคราบจุลินทรีย์เกิดขึ้นเลย และสามารถทำงานได้ดีในช่วงของค่าความเป็นกรด-ด่างที่กว้าง คือ 4.0-8.0 ถึงแม้เวลาจะผ่านไปนานจนถึง 7 ชั่วโมงประสิทธิภาพของการทำงานยังคงสม่ำเสมอ

สำหรับการสลายคราบจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นแล้วบนแบบจำลองพื้นเรียบนั้น เดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. AG-2 ที่ถูกชักนำการผลิตด้วยเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรมให้ประสิทธิภาพในการสลายที่ดีที่สุด รองลงมาเป็นเดกซ์แทรนเนสจาก *P. pinophilum* SMCU 3-14 ที่ถูกชักนำการผลิตด้วยเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม และเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ซึ่งสามารถสลายคราบจุลินทรีย์ได้ใกล้เคียงกัน โดยเดกซ์แทรนเนสทั้งสามนั้นทำงานได้ดีในทุกค่าความเป็นกรด-ด่างที่ทดสอบ คือ 4.0-8.0 ทั้งที่อุณหภูมิ 37 °ซ และที่อุณหภูมิห้อง

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต.....ณฤดี อัศวเสรีเลิศ.....

สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2550.....

4772288023 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: DEXTRAN / DEXTRANASE / DENTAL PLAQUE / DENTAL CARIES / *Streptococcus sobrinus* 6715 / *Arthrobacter* sp. / *Penicillium* sp.

NARUEDEE ASSAWASEREELERT : DEGRADATION OF DEXTRAN ON SMOOTH SURFACEMODEL BY MICROBIAL DEXTRANASES. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SUTHEP THANEEYAWARN, Ph.D., 99 pp.

The present study was conducted in order to study the ability of dextranase in reducing adherence of *Streptococcus sobrinus* onto smooth surface via the prevention as well as degradation of dextran based microbial plaques. Dextranase was produced by *Arthrobacter* sp. AG-2 and *Penicillium pinophilum* SMCU 3-14 via the induction of α-1,6 rich industrial grade dextran and α-1,3 rich dextran of *S. sobrinus* and vice versa. Dextranase from *Arthrobacter* sp. AG-2 via the induction of *S. sobrinus* 6715 dextran provided highest efficiency of plaque prevention on smooth surface with no trace of plaque was observed. This enzyme worked considerably well at broad pH range of 4.0-8.0.

In case of preformed plaque, bacterial dextranase induced by industrial grade dextran was of better degradation than fungal dextranases while bacterial dextranase induced by bacterial dextran did not showed significant degrading activity. It is therefore concluded that bacterial dextranase induced by α-1,3 rich dextran is the best agent for plaque prevention but not to the degradation of preformed plaque while fungal dextranase either induced by bacterial or fungal dextran performed rather well in the latter case.

Department.....Microbiology.....Student's signature Naruedee Assawasereelert

Field of study.....Industrial Microbiology....Advisor's signature

Academic year.....2007.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของ รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนการอบรมสั่งสอนด้วยดีเสมอมา ผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณในความเมตตาของท่านอาจารย์ฯ เป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณท่านผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ขอกราบขอบพระคุณท่านผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา จันทร์ประทีป และอาจารย์ ดร. ปาหนัน เริงสำราญ ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้ และคำแนะนำต่างๆ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. รัชชพิน ศรีสัจจะลักษณ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่มอบจุลินทรีย์สำหรับใช้ในงานวิจัย และสอนให้ผู้วิจัยรู้จักเทคนิคต่างๆ กราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ ที่ให้ความสะดวกในการใช้อุปกรณ์สำหรับงานวิจัย และขอขอบคุณคุณสุทธิรักษ์ นิยมฤทธิ์ ที่ช่วยผู้วิจัยเก็บรักษาดูแลจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้อย่างดีตลอดมา

กราบขอบพระคุณคณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ตลอดจนเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ที่น่ารัก และสมาชิกห้องวิจัย 448 ทุกคนที่คอยเป็นห่วง ดูแลเอาใจใส่ ให้กำลังใจ และช่วยเหลือผู้วิจัยด้วยดีเสมอมา ทำให้ผู้วิจัยรู้สึกประทับใจ และมีช่วงเวลาที่ดีตลอดเวลาที่ศึกษาอยู่ ณ ภาควิชาจุลชีววิทยาแห่งนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ญาติพี่น้อง และเพื่อนที่น่ารักทุกคนที่คอยสนับสนุน ช่วยเหลือ และเป็นที่ปรึกษา ตลอดจนให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยในการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญรูป..... ญ

สัญลักษณ์และคำย่อ..... ฏ

บทที่

1. บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 4

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 4

2. ปริทัศน์วรรณกรรม

2.1 ช่องปาก..... 5

2.2 จุลินทรีย์ในช่องปาก..... 6

2.3 โรคฟันผุ..... 10

2.4 คราบจุลินทรีย์..... 13

2.5 แนวทางแก้ไข และการป้องกันฟันผุ..... 16

2.6 เดกซ์แทรน..... 18

2.7 เดกซ์แทรนเนส..... 22

3. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการทดลอง

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง..... 30

3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง..... 32

3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.3.1 การเลี้ยงและการเก็บจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย..... 34

3.3.2 การเตรียมเดกซ์แทรนจาก *Streptococcus sobrinus* 6715..... 35

3.3.3 การเตรียมเดกซ์แทรนเนสจากจุลินทรีย์..... 36

3.3.4 การตรวจสอบแอกทิวิตีเฉพาะของเดกซ์แทรนเนส..... 39

บทที่ หน้า

3.3.5 เวลาในการก่อคราบจุลินทรีย์บนไมโครไตเตอร์เพลตที่ใช้เป็นแบบจำลองพื้นเรียบ โดย *S. sobrinus* 6715..... 40
3.3.6 ภาวะที่เหมาะสมในการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์บนไมโครไตเตอร์เพลต..... 41
3.3.7 ภาวะที่เหมาะสมในการสลายคราบจุลินทรีย์บนไมโครไตเตอร์เพลต..... 43
3.3.8 การตรวจสอบคราบจุลินทรีย์..... 46
4. ผลการทดลอง
4.1 เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715..... 48
4.2 เดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. AG-2 และ *Penicillium pinophilum* SMCU 3-14 ที่ชักนำด้วยเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม และเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715..... 48
4.3 เวลาการก่อคราบจุลินทรีย์บนไมโครไตเตอร์เพลตที่ใช้เป็นแบบจำลองพื้นเรียบ..... 49
4.4 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์..... 51
4.5 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการสลายคราบจุลินทรีย์..... 60
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 72
รายการอ้างอิง..... 79
ภาคผนวก..... 88
ภาคผนวก ก..... 89
ภาคผนวก ข..... 93
ภาคผนวก ค..... 97
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 99

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
2.1	แบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่พบได้ในช่องปาก.....	7
2.2	การจัดแบ่งชนิดของแบคทีเรียออกเป็นพวกที่เจริญเติบโตได้ทั้งในภาวะที่มีออกซิเจนกับในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน กับพวกที่เจริญเติบโตได้เฉพาะในภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเท่านั้น พร้อมกับจัดแบ่งแบคทีเรียออกเป็นพวกแบคทีเรียรูปกลม แบคทีเรียรูปแท่ง สไปโรขีต และจุลินทรีย์อื่นๆ.....	8
4.1	เปรียบเทียบแอกทิวิตี ปริมาณโปรตีน และแอกทิวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนส.....	49
4.2	ค่าความเสถียรต่อค่าความเป็นกรด-ด่างของเดกซ์แทรนเนสจากจุลินทรีย์.....	55
4.3	ประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์โดยเดกซ์แทรนเนสจากจุลินทรีย์.	60
4.4	ประสิทธิภาพในการสลายคราบจุลินทรีย์โดยเดกซ์แทรนเนสจากจุลินทรีย์.....	71
5.1	ประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ และการสลายคราบจุลินทรีย์ด้วยเดกซ์แทรนเนสจากจุลินทรีย์บนแบบจำลองพื้นเรียบ.....	78

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	ลักษณะของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ร่วมกันในช่องปากภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน.....	6
2.2	ลักษณะของ *S. mutans* และ *S. sanguis* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน.....	10
2.3	ระยะความรุนแรงของการเกิดโรคฟันผุ.....	11
2.4	ความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในคราบจุลินทรีย์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน.....	14
2.5	โครงสร้างของเดกซ์แทรน.....	19
4.1	ลักษณะของเดกซ์แทรนที่ผลิตได้จาก *S. sobrinus* 6715.....	48
4.2	ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดคราบจุลินทรีย์บนไมโครไตเตอร์เพลตของ *S. sobrinus* 6715 กับเวลา.....	50
4.3	ลักษณะคราบจุลินทรีย์ของ *S. sobrinus* 6715 ที่เวลาต่างๆ บนไมโครไตเตอร์เพลต เมื่อย้อมด้วยคริสตัลไวโอเลต 0.02% โดยน้ำหนัก.....	50
4.4	การป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ในช่องปากที่เวลาต่างๆ ด้วยเดกซ์แทรนเนสจากจุลินทรีย์.....	52
4.5	การป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์โดยเดกซ์แทรนเนส BI.....	53
4.6	การป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์โดยเดกซ์แทรนเนส FI.....	54
4.7	การป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ในช่องปากโดยเดกซ์แทรนเนสจากจุลินทรีย์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่างๆ ที่ 5 ชั่วโมง และ 7 ชั่วโมง.....	56
4.8	การป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ในช่องปากโดยเดกซ์แทรนเนสจากจุลินทรีย์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ที่เวลา 0-300 นาที.....	57
4.9	การป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ในช่องปากโดยเดกซ์แทรนเนส BI และ FI ที่ความเข้มข้น 1 2 3 4 และ 5 หน่วยต่อมล.ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง.....	59
4.10	การสลายคราบจุลินทรีย์โดยเดกซ์แทรนเนส BI และ BB ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI และในบัฟเฟอร์ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 0-30 นาที.....	62
4.11	การสลายคราบจุลินทรีย์โดยเดกซ์แทรนเนส FI และ FB ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI และในบัฟเฟอร์ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 0-30 นาที.....	63

รูปที่ หน้า

4.12 การสลายคราบจุลินทรีย์โดยเดกซ์แทรนเนส FI และ FB ในระบบบัฟเฟอร์ ที่อุณหภูมิ 37 °ซ และอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 0-30 นาที..... 64

4.13 การสลายคราบจุลินทรีย์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่างๆ โดยเดกซ์แทรนเนสจากจุลินทรีย์ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที..... 66

4.14 การสลายคราบจุลิทรีย์ในระบบบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ที่อุณหภูมิห้อง..... 67

4.15 การสลายคราบจุลินทรีย์โดยเดกซ์แทรนเนส BI และ FI ที่ความเข้มข้น 1 2 3 4 และ 5 หน่วยต่อมล. ในระบบบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 เป็นเวลา 15 นาที..... 68

4.16 การทำงานของเดกซ์แทรนเนส BB ร่วมกับเดกซ์แทรนเนส FI ในระบบบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 0-120 นาที..... 70

สัญลักษณ์และคำย่อ

มล.	=	มิลลิลิตร
มก.	=	มิลลิกรัม
°ซ	=	องศาเซลเซียส
%	=	เปอร์เซ็นต์

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ช่องปาก เป็นบริเวณเดียวของร่างกายที่จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่อย่างปกติมีความสัมพันธ์กับการก่อให้เกิดโรคได้ โดยโรคที่เกิดขึ้นและสัมพันธ์กับจุลินทรีย์นั้นมีอยู่ด้วยกัน 2 โรค คือ โรคฟันผุและโรคปริทันต์ โรคฟันผุ เป็นโรคที่เกิดกับผิวส่วนที่แข็งที่สุดของฟันถูกกัดกร่อนโดยกรดที่เกิดจากจุลินทรีย์ที่ใช้แป้งเป็นอาหาร (Bratthall, 1991; Carlsson, 1988) ส่วนโรคปริทันต์ เป็นโรคที่เกี่ยวกับเนื้อเยื่อปริทันต์ (Marsh และ Martin, 1984) โดยทั้งโรคฟันผุและโรคปริทันต์นี้ เป็นโรคที่เกิดจากผลของปฏิกิริยาที่ซับซ้อนระหว่างอาหารกับเชื้อจุลินทรีย์ที่พบปกติในช่องปากของสิ่งมีชีวิต

ในช่องปากมีจุลินทรีย์จำนวนมากทั้งชนิดที่ต้องการออกซิเจนและไม่ต้องการออกซิเจน ทั้งแกรมบวก และแกรมลบ โดยเฉพาะ lactobacilli และ streptococci ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการก่อฟันผุ (Burnett และ Scherp, 1962; Melville และ Russell, 1981) โดยทั่วไป จุลินทรีย์ต่างๆที่อยู่ในช่องปากจะมีบทบาทเสริม หรือต้านซึ่งกันและกัน ทำให้ช่องปากคงสภาพปกติ ไม่เกิดโรค แต่หากมีภาวะที่ทำให้จุลินทรีย์ในช่องปากเกิดความไม่สมดุลก็อาจทำให้เกิดโรคได้ โดยพบว่าแบคทีเรียในกลุ่มของ Mutan Streptococci ซึ่งได้แก่ *Streptococcus mutans* และ *S. sobrinus* มีบทบาทในการก่อให้เกิดโรคฟันผุได้มากที่สุด (Mukasa และคณะ, 1989) เนื่องจากแบคทีเรียดังกล่าวเมื่อมีน้ำตาลซูโครสอยู่จะสามารถยึดติดกับผิวของเคลือบฟัน โดยการสร้างพอลิเมอร์ทั้งชนิดที่ละลายน้ำและไม่ละลายน้ำออกมานอกเซลล์ เมื่อเจริญสามารถปลดปล่อยกรดอินทรีย์ออกมาทำลายเนื้อฟันก่อให้เกิดโรคฟันผุขึ้น จากการศึกษาพบว่า มีอัตราการก่อฟันผุในผู้ใหญ่ราว 90% โดย *S. mutans* ในขณะที่บางรายงานได้กล่าวว่า 8-40% เกิดจาก *S. sobrinus* และมักพบว่า อาการจะรุนแรงถ้ามี *S. sobrinus* ร่วมด้วย (Russel และ Gilpin, 1987) *Streptococcus* ที่พบมากในช่องปากมีหลายชนิด ได้แก่ *S. mutans S. sanguis S.mitior* หรือ *S. mitis S. milleri* และ *S. salivarius* เป็นต้น จากการทดสอบกับสัตว์ทดลองที่ปราศจากเชื้อ (germ free animal) ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส พบว่า *S. mutans* สามารถทำให้เกิดโรคฟันผุได้มากที่สุด (Jensen และ Bratthall, 1989; Songpaisan และคณะ, 1994) และเป็นสาเหตุของโรคฟันผุในคน เนื่องจากความสามารถในการผลิตเดกซ์แทรนที่มีลักษณะเหนียวหนืดติดอยู่ที่ผิวฟันทำให้เป็นที่สะสมของจุลินทรีย์จนเกิดเป็นคราบจุลินทรีย์

คราบจุลินทรีย์ เป็นแผ่นคราบบนผิวฟันที่มีจุลินทรีย์เป็นส่วนประกอบสำคัญ ที่เหลือเป็นพวกสารอินทรีย์ และอนินทรีย์ มีลักษณะนุ่ม หนืด ยึดติดกับผิวเคลือบฟัน (Noltel, 1973; Wolinsky, 1988) คราบจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นนี้พบว่าประกอบด้วยจุลินทรีย์ต่างชนิดกันออกไป และมีแบคทีเรียเป็นส่วนใหญ่ บางครั้งอาจเรียกว่า คราบแบคทีเรีย หรือคราบฟัน (dental plaque) และคราบจุลินทรีย์นี้เองเป็นสิ่งสะสมบนฟันที่เป็นจุดเริ่มต้นของกระบวนการเกิดฟันผุทั้งหมด (Wolinsky, 1988)

การป้องกันฟันผุสามารถทำได้หลายวิธี ทั้งวิธีทางกายภาพ เคมี และชีวภาพ ซึ่งวิธีที่ได้ผลดีที่สุด คือ การควบคุมทางกายภาพโดยเริ่มจากลักษณะนิสัยในการทำความสะอาดช่องปากส่วนบุคคล และโดยทั่วไปอุปกรณ์ทำความสะอาดช่องปากมักจะประกอบไปด้วยสารต่างๆ ที่ป้องกันฟันผุ หรือสารต่อต้านจุลินทรีย์ ซึ่งจะช่วยในการเคลือบฟัน และร่องฟัน รวมทั้งสามารถช่วยในการควบคุมปริมาณจุลินทรีย์ได้อีกด้วย (Kurihara และคณะ, 1999; Katsura และคณะ, 2001) จากการที่ซูโครสเป็นสับสเตรตของการผลิตเดกซ์แทรนจึงมีการใช้สารให้ความหวานอื่นๆ ซึ่งไม่ก่อให้เกิดการสร้างเดกซ์แทรนแทนซูโครส (sugar substitute) ได้แก่ ไซลิทอล แมนนิทอล และซอร์บิทอล เป็นต้น หรืออาจใช้สารปฏิชีวนะ หรือวัคซีนในการยับยั้งจุลินทรีย์ในช่องปาก (Kurihara และคณะ,1999; Katsura และคณะ, 2001) แต่วิธีนี้ไม่นิยมใช้กันมากนักเนื่องจากความสามารถในการฆ่าเชื้อของยามีวงกว้างเกินไป อาจมีผลทำลายจุลินทรีย์ชนิดอื่นด้วย และอาจก่อให้เกิดปัญหาในการดื้อยาตามมา จากที่ได้กล่าวไปข้างต้นแล้วว่า เดกซ์แทรนเป็นสาเหตุสำคัญในการยึดเกาะของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่บริเวณผิวฟันจนกลายเป็นคราบจุลินทรีย์ ปัจจุบันจึงมีการใช้เดกซ์แทรนเนสในการควบคุมปริมาณเดกซ์แทรนที่เกิดขึ้น (Marotta และคณะ, 2002) ซึ่งการใช้เดกซ์แทรนเนสนับว่าเป็นวิธีทางชีวภาพ มีความปลอดภัยกว่าการใช้สารเคมี มีความจำเพาะต่อการสลายเดกซ์แทรน และนอกจากนี้ยังมีการวิจัยที่นำเดกซ์แทรนเนสมาทดลองใช้ผสมลงในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดช่องปาก และมีแนวโน้มสามารถลดปริมาณของเดกซ์แทรนได้เป็นอย่างดี

เดกซ์แทรนเนสเป็นเอนไซม์ที่ต้องอาศัยสารชักนำ ดังนั้นในการผลิตเดกซ์แทรนเนสจากจุลินทรีย์ใดๆ จึงต้องเสริมเดกซ์แทรนลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อทำหน้าที่เป็นสารชักนำการผลิตเดกซ์แทรนเนสด้วย (Igarashi และคณะ, 1998) หากชักนำการสร้างด้วยเดกซ์แทรนที่มีพันธะ α-1,6 เดกซ์แทรนเนสที่ผลิตขึ้นมาจะจำเพาะต่อพันธะ α-1,6 บนสายเดกซ์แทรน ซึ่งในปี 1978 Margaret และคณะ รายงานว่า เดกซ์แทรนเนสที่จำเพาะต่อพันธะ α-1,6 จะไม่สามารถสลายเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ในการชักนำเดกซ์แทรนเนสที่จำเพาะต่อพันธะ α-1,6 ในกรณีนี้มักใช้เดกซ์แทรนที่ผลิตได้จาก *Leuconostoc mesenteroides* B-512F ที่มีพันธะ α-1,6 มากถึง 95 % (Marguerite และคณะ, 1997) ซึ่งเป็นเดกซ์แทรนที่มีจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ในชื่อของเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม ส่วนเดกซ์แทรนเนสที่จำเพาะต่อพันธะ α-1,3 บนสายเดกซ์แทรนนั้น จะต้อง

เสริมด้วยเดกซ์แทรนที่มีพันธะ α-1,3 ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อเป็นสารชักนำด้วยเช่นกัน แต่ในปัจจุบันยังไม่พบว่ามีเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 จำหน่ายในท้องตลาดในเกรดที่จะใช้เป็นสารชักนำในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่มีอยู่เฉพาะที่ใช้เป็นสารระดับวิเคราะห์เท่านั้นซึ่งมีราคาสูงมาก ในงานวิจัยทั่วไปจึงผลิตเดกซ์แทรนเองจากเชื้อในกลุ่ม Mutans Streptococci โดยมุ่งเน้นไปที่เดกซ์แทรนที่ไม่สามารถละลายน้ำได้ที่เชื้อผลิตขึ้น เนื่องจากมีพันธะ α-1,3 ในปริมาณสูง Margaret และคณะ (1978) รายงานถึงการชักนำการสร้างเดกซ์แทรนเนสด้วยเดกซ์แทรนที่มีพันธะ α-1,3 ใน *Cladosporium resinae* พบว่า เดกซ์แทรนเนสที่เกิดขึ้นจะจำเพาะต่อพันธะ α-1,3 บนสายเดกซ์แทรน และสลายเดกซ์แทรน โดยปลดปล่อยน้ำตาลกลูโคสออกมา Huge และคณะ (1986) รายงานถึงเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *Streptococcus sobrinus* 6715 ซึ่งเป็นเชื้อในกลุ่ม Mutans Streptococci ว่าสามารถผลิตเดกซ์แทรนที่มีพันธะ α-1,3 ได้ในปริมาณมากถึง 67 % แบคทีเรียชนิดนี้จึงเหมาะที่จะนำมาใช้ในการผลิตเดกซ์แทรนเพื่อเป็นสารชักนำการผลิตเดกซ์แทรนเนสที่จำเพาะต่อพันธะ α-1,3 ดังที่กล่าวข้างต้น

ในการทดลองนี้จะศึกษาถึงความสามารถในการผลิตเดกซ์แทรนเนสของรา และแบคทีเรีย ทั้งนี้เป็นที่ทราบกันว่าราส่วนมากนั้นมักจะมีส่วนของผนังเซลล์ที่ก่อให้เกิดอาการแพ้ได้ และราบางชนิดยังสร้างแอฟลาทอกซิน (aflatoxin) ออกมาในภาวะเดียวกันกับภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ จึงได้นำเดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียมาใช้แทน (Leach, 1969) แต่ในแบคทีเรียที่แยกได้จากธรรมชาตินั้น จะมีความสามารถในการผลิตค่อนข้างต่ำ การนำเดกซ์แทรนเนสจากทั้ง 2 แหล่งนั้นไปใช้จึงต้องคำนึงถึงแหล่งที่มาของเดกซ์เทรนเนสด้วย เช่น เดกซ์แทรนเนสจากรา อาจนำไปใช้ในการขจัดคราบฟันที่เกิดขึ้นบนฟันปลอม หรืออุปกรณ์ทางทันตกรรมอื่นๆ แต่เดกซ์แทรนเนสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียอาจจะนำไปผสมในน้ำยาป้วนปาก หรือยาสีฟันได้ แต่ต้องใช้ในความเข้มข้นที่สูง (Caldwell และคณะ, 1971; Keyes และคณะ, 1971; Murayama และคณะ, 1973)

แม้จะมีจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้หลายชนิดก็ตาม แต่เอนไซม์ที่เหมาะสมในการนำมาใช้ขจัดคราบจุลินทรีย์ และป้องกันฟันผุนั้น ควรทำงานได้ดีที่ภาวะภายในช่องปากของมนุษย์ เช่น เดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ CB-8 ซึ่งมีความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมกับการทำงานที่ 5.5-7.5 และเสถียรที่ 37 °ซ (Okushima และคณะ, 1991)

สำหรับในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการนำเดกซ์แทรนเนสไปใช้ในการสลายคราบจุลินทรีย์บนแบบจำลองพื้นเรียบที่ใช้แทนผิวฟัน โดยเดกซ์แทรนเนสที่จำเพาะต่อพันธะ α-1,3 และพันธะ α-1,6 จากแบคทีเรีย *Arthrobacter* sp. AG-2 และรา *Penicillium pinophilum* SMCU 3-14 เพื่อเป็นประโยชน์ในการนำเดกซ์แทรนเนสจากจุลินทรีย์ไปใช้ในการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ในช่องปาก และการสลายคราบจุลินทรีย์บนอุปกรณ์ที่ใช้กับช่องปาก หรืออุปกรณ์ทางทันตกรรมอื่นๆ

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ศึกษาการสลายเดกซ์แทรนบนแบบจำลองพื้นเรียบโดยใช้ไมโครไตเตอร์เพลตพอลิสไทรีน ชนิด 96 หลุม แทนผิวฟัน (Froeliger และ Five-Taylor, 2001) ด้วยเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตได้จาก *P. pinophilum* SMCU 3-14 และ *Arthrobacter* sp. AG-2

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบภาวะที่เหมาะสมในการนำเดกซ์แทรนเนสจาก *P. pinophilum* SMCU 3-14 และ *Arthrobacter* sp. AG-2 ไปใช้ในการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ และการสลายคราบจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นบนแบบจำลองฟัน

บทที่ 2

ปริทัศน์วรรณกรรม

สุขภาพช่องปากมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อร่างกาย เนื่องจากช่องปากเป็นแหล่งที่พบการติดเชื้อบ่อยที่สุดแห่งหนึ่ง ถึงแม้ช่องปากจะมีพื้นที่เล็กเมื่อเทียบกับพื้นที่ของร่างกาย แต่มีหน้าที่สำคัญ คือ เป็นทางนำอาหารเข้าสู่ร่างกาย และทำหน้าที่บดเคี้ยวอาหารเพื่อให้ย่อยง่ายขึ้นก่อนการย่อยต่อที่กระเพาะ และลำไส้ เนื่องจากช่องปากเป็นที่กักเก็บแบคทีเรียไว้เป็นจำนวนมาก จึงสามารถติดเชื้อ และก่อโรคได้หลายชนิด เช่น แผลชนิดต่างๆ มะเร็ง โรคฟันผุ และโรคปริทันต์ ปัจจุบัน พบว่า มีผลิตภัณฑ์ที่ใช้ทำความสะอาดฟันเพิ่มมากขึ้นเป็นจำนวนมาก ซึ่งผลิตภัณฑ์ทั้งหมดมีจุดมุ่งหมายเดียวกัน คือ เพื่อกำจัดสิ่งสกปรก ให้มีฟันที่ขาวสะอาด ไม่มีกลิ่นปาก มีเหงือกที่แข็งแรง ไม่มีโรคปริทันต์ และไม่เกิดโรคฟันผุ

2.1 ช่องปาก

ช่องปาก เป็นส่วนของร่างกายที่มีจุลินทรีย์อาศัยอยู่อย่างมากมาย ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ในช่องปากขึ้นอยู่กับอาหาร และลักษณะนิสัยการบริโภค รวมทั้งสุขนิสัยในการรักษาความสะอาดของแต่ละบุคคล หลายๆ ปัจจัยเหล่านี้เป็นส่วนก่อให้เกิดปัญหาสุขอนามัยในช่องปาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคที่เกี่ยวกับเหงือกและฟัน

ช่องปาก เป็นเพียงบริเวณเดียวของร่างกายที่มีพื้นที่ที่ไม่มีการลอกหลุด ทำให้เชื้อจุลินทรีย์เข้ามาตั้งถิ่นฐานได้ ซึ่งเนื้อเยื่อพิเศษนี้ทำให้มีการสะสมของเชื้อจุลินทรีย์ และผลิตผลของเชื้อจุลินทรีย์ จุลินทรีย์ที่พบมากส่วนใหญ่จะเป็นพวกแบคทีเรีย สิ่งสะสมที่เกิดขึ้นนี้ เรียกว่า คราบจุลินทรีย์ (dental plaque) ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องกันโรคฟันผุและโรคปริทันต์

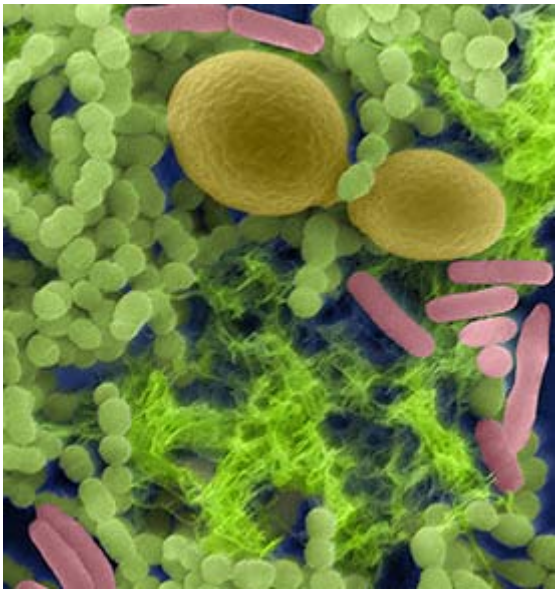
น้ำลาย ประกอบด้วยแร่ธาตุหลายชนิด เช่น โซเดียม โปแตสเซียม แคลเซียม คลอไรด์ ไบคาร์บอเนต และฟอสเฟต แร่ธาตุเหล่านี้บางตัวมีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ สามารถไปลดผลในการก่อให้เกิดฟันผุของกรดที่เกิดขึ้นจากการผลิตของแบคทีเรียได้ องค์ประกอบที่เป็นสารอินทรีย์ของน้ำลายส่วนใหญ่ คือ โปรตีน และมิวซิน (mucin) มิวซินจะมีความสัมพันธ์กับพอลิแซ็กคาไรด์ในการรวมตัวกันเป็นไกลโคโปรตีน (glycoprotein) และไกลโคโปรตีนเหล่านี้จะมีอิทธิพลต่อการเกาะกลุ่มรวมตัวกันของแบคทีเรียต่อพื้นผิวภายในช่องปาก

ความเป็นอยู่ของประชากรจุลินทรีย์ภายในชุมชนของเชื้อจุลินทรีย์ ขึ้นกับอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (Skinner และ Carr, 1974) อาหารที่แบคทีเรียในปากนำไปใช้

ได้มาจากน้ำลายและน้ำเหลืองเหงือก ในน้ำลายประกอบด้วยสารพวกไนโตรเจน เช่น กรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ส่วนในน้ำเหลืองเหงือกจะประกอบด้วยปัจจัยที่ช่วยในการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่สำคัญๆ หลายชนิด นอกจากนี้ในน้ำลายยังประกอบด้วยวิตามิน คาร์บอนไดออกไซด์ที่ละลายน้ำได้ ซึ่งสามารถไปกระตุ้นการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่มีอยู่ในปากได้หลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง คือ พวก Streptococci

2.2 **จุลินทรีย์ในช่องปาก**

จุลินทรีย์ในช่องปากจะมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา ซึ่งโดยปกตินิเวศวิทยาในช่องปากจะทำหน้าที่ควบคุมสัดส่วนของเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์และเป็นโทษให้มีความสมดุลย์กันทั้งชนิดและปริมาณ แม้ว่าจุลินทรีย์ที่พบภายในปากจะประกอบไปด้วยทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ สไปโรชีต ไมโครพลาสมา ไวรัส และโปรโตซัว ดังแสดงในรูปที่ 2.1 แต่จุลินทรีย์ที่มีการศึกษากันมาก และพบว่าเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดฟันผุ คือ แบคทีเรีย แบคทีเรียในช่องปากมีทั้งแบคมีเรียรูปกลม (cocci) แบคทีเรียรูปแท่ง (bacilli) แบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนและไม่ต้องการออกซิเจน (aerobes and anaerobes) แบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ (Gram-positive และ Gram-negative bacteria) แสดงในตารางที่ 2.1 และ 2.2



รูปที่ 2.1 ลักษณะของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ร่วมกันในช่องปากภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Kunkel, 2007)

ตารางที่ 2.1 แบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่พบได้ในช่องปาก (Schuster, 1990)

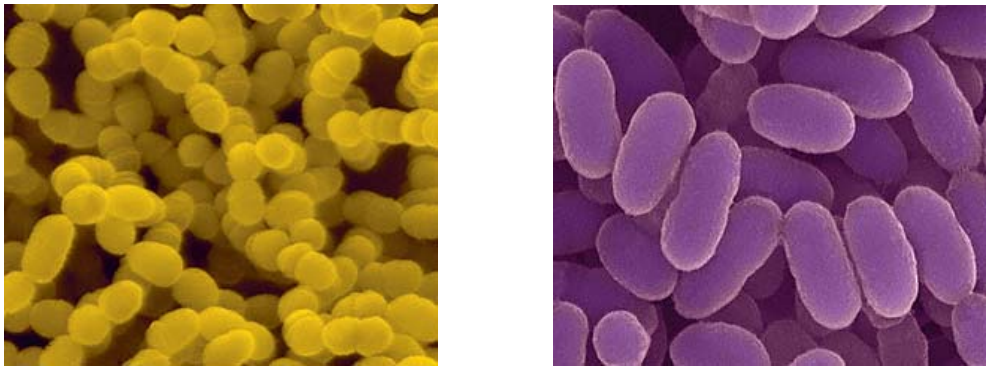
Gram-Positive Genera	Gram-Negative Genera
Streptococcus sp.	*Neisseria* sp.
Micrococcus sp.	*Moraxsella* sp.
Peptostreptococcus sp.	*Veillonella* sp.
Actinomyces sp.	*Haemophilus* sp.
Lactobacillus sp.	*Actinobacillus* sp.
Arachnia sp.	*Capnocytophaga* sp.
Propionibacterium sp.	*Eikenella* sp.
Bifidobacterium sp.	*Campylobacter* sp.
Eubacterium sp.	*Selenomonas* sp.
Rothia sp.	*Centipeda* sp.
Bacterionema sp.	*Treponema* sp.
	Bacteroides sp.
	Fusobacterium sp.
	Leptotrichia sp.
	Wolinella sp.

ตารางที่ 2.2 การจัดแบ่งชนิดของแบคทีเรียออกเป็นพวกที่เจริญเติบโตได้ทั้งในภาวะที่มีออกซิเจนกับในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน กับพวกที่เจริญเติบโตได้เฉพาะในภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเท่านั้น พร้อมกับจัดแบ่งแบคทีเรียออกเป็นพวกแบคทีเรียรูปกลม แบคทีเรียรูปแท่ง สไปโรชีต และจุลินทรีย์อื่นๆ (จินตกร คูวัฒนสุชาติ, 2542)

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

Streptococci เป็นจุลินทรีย์ที่พบได้ตามปกติในช่องปากเป็นส่วนใหญ่ (Skinner และ Quesnel, 1978; McCarthy และคณะ, 1965) กล่าวคือ จะพบ Streptococci โดยเฉลี่ยประมาณ 28% จากจุลินทรีย์ทั้งหมดที่เพาะเลี้ยงได้จากคราบจุลินทรีย์ และพบประมาณ 29% จากตัวอย่างจุลินทรีย์ที่นำมาจากบริเวณร่องเหงือก ส่วนตัวอย่างจุลินทรีย์ที่นำมาจากบริเวณลิ้น และน้ำลายจะพบ Streptococci ประมาณ 45% และ 46% ตามลำดับ ส่วนใหญ่ของ Streptococci ที่พบนี้จะเป็นชนิด α-hemolytic ผลิตผลพวกพอลิแซ็กคาไรด์ภายในปากที่เกิดจากการผลิตของจุลินทรีย์กับน้ำตาลซูโครสมีความสำคัญต่อสมบัติทางนิเวศวิทยา สารพอลิเมอร์ที่ไม่ละลายน้ำที่จุลินทรีย์ผลิตออกมา (insoluble extracellular polymer) มีบทบาทสำคัญต่อการอาศัยของ *Streptococcus* sp. ในช่องปากบางชนิดต่อผิวฟันที่ไม่มีอะไรปกคลุม ผลิตผลพวกพอลิเมอร์ยังเป็นตัวหลักที่ใช้ในการทดสอบเพื่อแยกชนิดของจุลินทรีย์เหล่านี้ด้วย

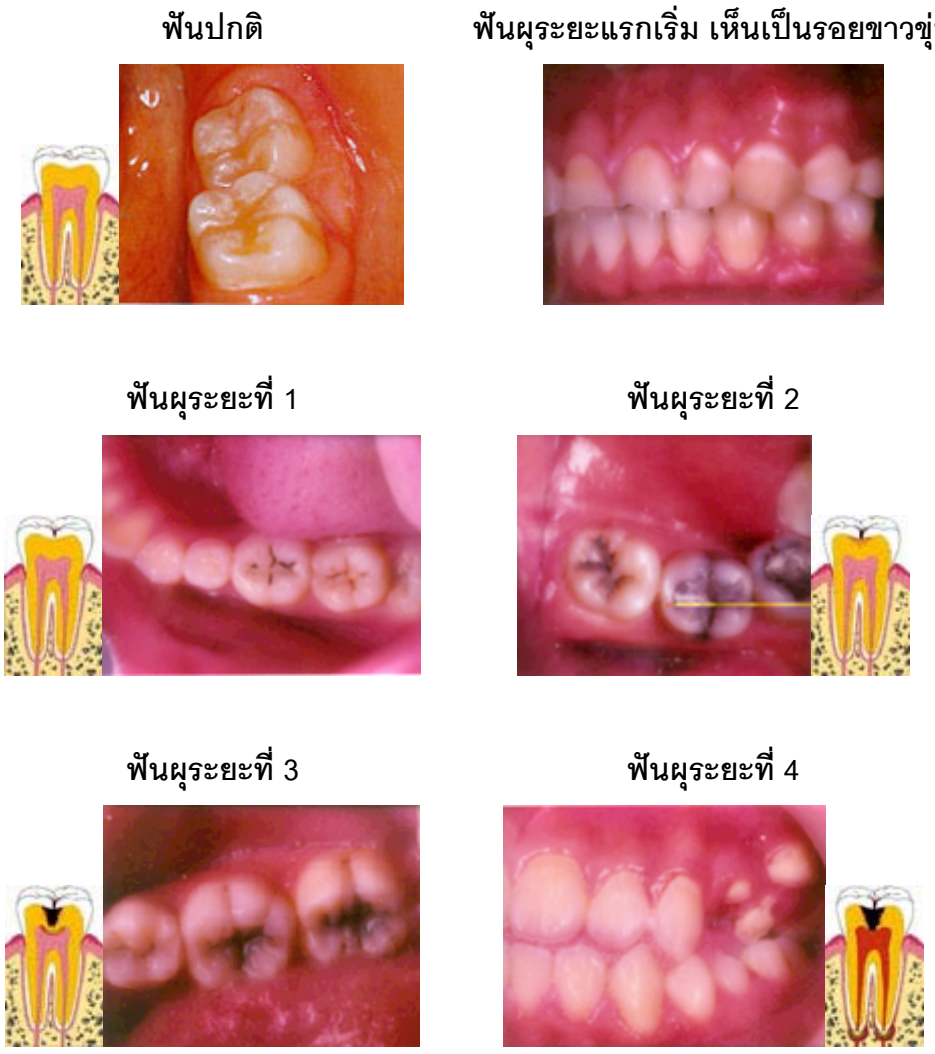
Streptococcus sp. ที่พบได้อย่างเด่นชัดในช่องปากมีหลายชนิด เช่น *S. mutans S. sanguis S. mitior หรือ S. mitis S. milleri* และ *S. salivarius* เป็นต้น (รูปที่ 2.2) แต่ที่สำคัญที่สุดคือ *S. mutans* โดยมีวารสารเป็นจำนวนมากที่ตีพิมพ์เกี่ยวกับแบคทีเรียตัวนี้มากกว่าจุลินทรีย์ตัวอื่นที่พบได้ในปาก ที่เป็นเช่นนี้เพราะเชื่อว่าแบคทีเรียตัวนี้มีบทบาทต่อการเริ่มก่อให้เกิดฟันผุ (Hamada และ Slade, 1980; Loesche, 1986) กล่าวคือ เมื่อนำแบคทีเรียนี้ไปทดสอบกับสัตว์ทดลองที่ปราศจากเชื้อ (germ free animal) ที่เลี้ยงดูด้วยอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส พบว่าสามารถทำให้เกิดโรคฟันผุได้มากที่สุด และจากการสำรวจการระบาดของโรค พบว่า เชื้อ *S. mutans* เป็นสาเหตุของโรคฟันผุในคน เนื่องจาก *S. mutans* สามารถผลิตเดกซ์แทรน (dextran) ที่เป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสได้ ซึ่งเดกซ์แทรนนี้จะมีลักษณะเหนียวหนืดติดอยู่ที่ผิวฟันทำให้เป็นที่สะสมของจุลินทรีย์ นอกจากแบคทีเรียในกลุ่ม *Streptococcus* sp. จะมีส่วนเกี่ยวข้องในการก่อให้เกิดโรคฟันผุแล้ว บางชนิดยังสามารถทำให้เกิดโรคขึ้นได้เมื่อมีโอกาส (opportunistic pathogen) (Jensen และ Bratthall, 1989; Songpaisan และคณะ,1994)



รูปที่ 2.2 ลักษณะของ *S. mutans* (ซ้าย) และ *S. sanguis* (ขวา) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Kunkel, 2007)

2.3 **โรคฟันผุ**

ฟันผุ เกิดเนื่องจากมีกรดกัดทำลายผิวเคลือบฟัน ซึ่งกรดนี้เกิดขึ้นเนื่องจากการที่แบคทีเรียในช่องปากของเราที่มีอยู่แล้วตามปกติมีการเจริญ และเกิดกระบวนการเมแทบอลิซึมสุดท้ายปล่อยกรดออกมาทำลายเนื้อฟัน ประกอบกับในช่องปากมีคราบจุลินทรีย์ซึ่งมีสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียเหล่านี้ทำให้เจริญได้ดีขึ้น เพราะในคราบจุลินทรีย์จะปริมาณออกซิเจนที่ต่ำ มีอาหารอุดมสมบูรณ์ อีกทั้งยังเป็นที่อาศัยที่ปลอดภัยทำให้รอดพ้นจากการทำลาย คราบแบคทีเรียเหล่านี้จะติดค้างอยู่ตามซอกฟันและบนผิวฟัน ไม่สามารถขจัดออกไปให้หมดด้วยการแปรงฟัน คนที่มีคราบอาหารตกค้างหลงเหลืออยู่มากโอกาสที่จะเกิดฟันผุย่อมมีมากขึ้น โรคฟันผุในระยะเริ่มต้นจะยังไม่ก่อให้เกิดอาการเสียวหรือเจ็บปวด แต่จะพบการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นที่บริเวณผิวฟันให้เห็นเป็นจุดหรือฝ้าขาวขุ่นคล้ายชอล์ก ถ้าสังเกตเห็นหรือตรวจพบแต่เนิ่นๆ แล้วจะสามารถรักษาให้ไม่เกิดเป็นรูผุได้ แต่ถ้าไม่ได้รับการรักษาจะเกิดการทำลายของเนื้อฟันต่อไปตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 ระยะความรุนแรงของการเกิดโรคฟันผุ (กองทันตสาธารณสุข กรมอนามัย, 2551)

ฟันผุระยะที่ 1 เริ่มเห็นเป็นรูผุที่ผิวฟันอาจมีสีเทาหรือดำ มีสีขาวขุ่นรอบๆ ระยะนี้ยังไม่พบว่ามีอาการใดๆ

ฟันผุระยะที่ 2 รูฟันที่ผุลุกลามกว้าง และลึกขึ้นเข้าสู่ชั้นเนื้อฟันใกล้โพรงประสาท ทำให้เกิดอาการเสียวฟัน โดยเฉพาะเมื่อกินอาหารหวาน หรือน้ำเย็นๆ

ฟันผุระยะที่ 3 รูฟันที่ผุลุกลามลึกลงไปถึงโพรงประสาทฟัน ซึ่งเป็นที่อยู่ของประสาทรับความรู้สึก ทำให้ปวด เคี้ยวไม่ได้

ฟันผุระยะที่ 4 การอักเสบลุกลามออกไป รอบตัวฟัน ถึงอวัยวะรอบตัวฟัน อาจเกิดฝีหนอง ฟันโยก ปวด เคี้ยวไม่ได้

2.3.1 บทบาทของ *S. mutans* ต่อการเกิดโรคฟันผุ

บทบาทของ *S. mutans* ที่มีความสัมพันธ์ต่อการทำให้เกิดฟันผุสามารถอธิบายได้ดังนี้ คราบจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นตามปกติในปากคนเราอาจก่อให้เกิดฟันผุขึ้นได้ โดยปกติแล้วรอยผุระยะเริ่มจะมีขนาดเล็กและจะค่อยๆ ขยายกว้างออกไปอย่างช้าๆ บางครั้งร่างกายจะสามารถจัดการกับรอยผุเล็กๆ ที่เริ่มเกิดขึ้นพวกนี้ด้วยวิธีการทางกระบวนการสร้างสารประกอบพวกแร่ธาตุขึ้นมาใหม่ (remineralization) ชุมชนจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในคราบจุลินทรีย์จะมีความสัมพันธ์กับสิ่งมีชีวิตที่เป็นแหล่งอาศัยของจุลินทรีย์นั้นๆ เป็นอย่างดีพอๆ กับความสัมพันธ์ที่มีต่อจุลินทรีย์ที่พบได้เป็นปกติในช่องปาก แต่ถ้าเมื่อใดระดับของ *S. mutans* ที่เจริญเติบโตทับอยู่บนคราบจุลินทรีย์มีระดับสูง ซึ่งอาจเกิดขึ้นจากความกดดันในเรื่องของอาหาร หรือเป็นผลมาจากนิเวศวิทยาที่เกิดขึ้นภายในบางอย่างช่วยเสริมให้เชื้อดังกล่าวเจริญได้ดีขึ้น รอยโรคของการผุของฟันเล็กๆ เหล่านี้ก็จะเกิดขึ้น

2.3.2 ปัจจัยในการก่อโรคฟันผุของ Mutans Streptococci

2.3.2.1 ความสามารถในการสร้างสารยึดติดกับผิวของเคลือบฟันจากน้ำตาลซูโครส

ซูโครส หรือน้ำตาลทราย เป็นสารให้ความหวานที่มีรสชาติดี หาง่าย ราคาถูก จึงเป็นที่นิยมในการบริโภค และใช้มากในอุตสาหกรรมอาหาร แต่ซูโครสนี้เองกลับเป็นสารตั้งต้นสำคัญที่แบคทีเรียในช่องปากใช้ในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีความเหนียวหนืดหรือที่เรียกว่าเดกซ์แทรน (dextran) โดยเดกซ์แทรนนี้จะทำหน้าที่คล้ายกาว ยึดให้จุลินทรีย์ติดอยู่บนผิวฟันกลายเป็นคราบจุลินทรีย์ ซึ่งจะเป็นที่เกาะของแบคทีเรียชนิดอื่นตามมา ในจำนวนเชื้อแบคทีเรียในช่องปากทั้งหมด พบว่า Mutans Streptococci เป็นจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคฟันผุในสัตว์ทดลอง (Hamada,1980)

Gibbon และคณะ (1966) และ McCabe และคณะ (1967) รายงานว่า เมื่อมีซูโครส Mutans Streptococci จะสร้างโคโลนีที่สามารถยึดติดกับวัตถุที่มีพื้นผิวแข็งในจานเพาะเชื้อได้ ซึ่งการสร้างโคโลนีนี้จะไม่เกิดถ้าเปลี่ยนซูโครสเป็นกลูโคส หรือเปลี่ยนเป็นจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่ทำให้เกิดโรคฟันผุ การศึกษานี้แสดงถึงความสัมพันธ์ของความสามารถในการใช้ซูโครสกับการเกิดโรคฟันผุ

2.3.2.2 ความสามารถในการสร้างกรดและการทนต่อกรด

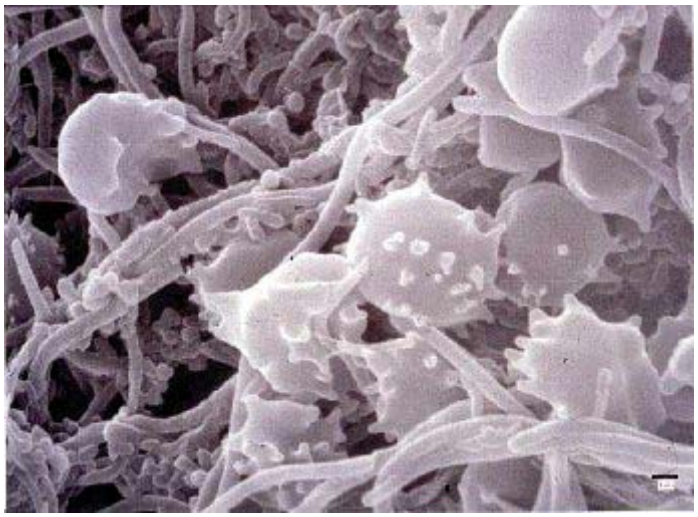
ปัจจัยที่สำคัญที่สุดที่ทำให้เกิดโรคฟันผุ คือ ความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ในช่องปากที่สามารถสร้างกรดได้จากอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต ซึ่งกรดที่จุลินทรีย์สร้างนี้สามารถสลายแร่ธาตุบนผิวฟัน (demineralization) ทำให้ฟันเกิดการผุกร่อน พบว่ามีจุลินทรีย์ในช่องปากที่สามารถผลิตกรดได้หลายชนิด เช่น Streptococci Lactobacilli Actinomyces และ Yeast แต่เมื่อพิจารณาถึงอัตราการสร้างกรดของ Mutans Streptococci เปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น พบว่า Mutans Streptococci สามารถสร้างกรดได้มากกว่า (Harper และ Loesche, 1983 และ 1984) กรดสำคัญที่ Mutans Streptococci สร้างเป็นปริมาณมาก คือ กรดแลกติก ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากเมแทบอลิซึมของไพรูเวทที่เป็นผลิตผลสุดท้ายจากปฏิกิริยาไกลโคลิซิส (glycolysis) และกรดแลกติกยังเป็นกรดที่แก่กว่ากรดชนิดอื่นด้วย นอกจากนี้ในระหว่างวันยังพบว่าชนิดของกรดที่พบในคราบจุลินทรีย์มีความแตกต่างไป โดยสามารถตรวจพบ กรดอะซิติก กรดซักซินิก กรดโพรพิโอนิก และกรดบิวไทริก กรดเหล่านี้เกิดจากแบคทีเรียชนิดต่างๆ ในคราบจุลินทรีย์ช่วยกันผลิตขึ้น Mutans Streptococci สามารถสร้างกรดอินทรีย์ได้จากน้ำตาลหลายชนิด แต่ซูโครสเป็นแหล่งสำคัญที่สุด เนื่องจากซูโครสมีความสำคัญมาตั้งแต่กระบวนการเกาะติดและเริ่มต้นในการเกิดคราบจุลินทรีย์

2.4 คราบจุลินทรีย์

คราบจุลินทรีย์ เป็นแผ่นคราบบนผิวฟันที่มีจุลินทรีย์เป็นส่วนประกอบสำคัญ ที่เหลือเป็นพวกสารอินทรีย์ และสารอนินทรีย์ มีลักษณะนุ่ม หนืด ยึดติดกับผิวเคลือบฟัน (Noltel, 1973; Wolinsky, 1988) คราบจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นนี้จะพบว่า ประกอบด้วยจุลินทรีย์ต่างชนิดกันออกไป และมีแบคทีเรียเป็นส่วนใหญ่ บางครั้งอาจเรียกว่า คราบแบคทีเรีย หรือคราบจุลินทรีย์ (dental plaque) ดังแสดงในรูปที่ 2.4 ซึ่งจะประกอบด้วยแบคทีเรีย ประมาณ 70-80% ที่สำคัญ ได้แก่ พวก *Streptococcus Actinomyces* และ *Neisseria* นอกจากนี้ก็จะมีรา โปรโตซัว และไวรัสเล็กน้อย ในระยะเริ่มของคราบจุลินทรีย์ แบคทีเรียที่พบมากที่สุด คือ กลุ่มของ *Streptococcus* ซึ่งสามารถผลิตกรดอินทรีย์ได้ และเป็นสาเหตุให้เกิดฟันผุ

คราบจุลินทรีย์ เป็นสิ่งสะสมบนตัวฟันที่เป็นจุดเริ่มต้นของกระบวนการเกิดฟันผุทั้งหมด (Wolinsky, 1988) และถือได้ว่าเป็นที่อยู่อาศัยของจุลินทรีย์ (macrohabitat) ซึ่งภายในคราบจุลินทรีย์นี้ ประกอบด้วยสิ่งแวดล้อมเล็กๆ เป็นจำนวนมาก สิ่งแวดล้อมเล็กๆ นี้ค่อยๆ เกิดขึ้นจากปัจจัยที่สำคัญทางนิเวศวิทยา โครงสร้างและการเกิดขึ้นของคราบจุลินทรีย์เป็นไปตามรูปแบบการ

ตั้งถิ่นฐานของแบคทีเรีย การยึดเกาะของ pioneer species เช่น *Neisseria* และ *S. sanguis* จะเกิดขึ้นก่อนแล้วตามมาด้วยการค่อยๆ เพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่ซับซ้อนมากขึ้น จนกระทั่งเกิดชุมชนจุลินทรีย์ที่มีหลากหลายสปีชีส์ รวมไปถึงมีแบคทีเรียพวกฟิลาเมนต์ พวกที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตเป็นจำนวนมาก การเปลี่ยนแปลงและการรวมตัวกันขึ้นมาใหม่ของจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมเล็กๆ (micro-environment) นี้ สามารถเกิดขึ้นได้ตลอดเวลาซึ่งอาจเป็นผลมาจากปัจจัยของสิ่งมีชีวิตที่เป็นที่อาศัยของจุลินทรีย์ (host factors) หรืออาจเป็นผลมาจากสิ่งต่างๆ ที่เกิดขึ้นภายในชุมชนของจุลินทรีย์ (activity of community) และจุลินทรีย์ชนิดแรกๆ ที่เกิดขึ้นบนคราบจุลินทรีย์นี้จะมีการใช้น้ำตาลที่เหลือจากการย่อยอาหารเป็นสารตั้งต้นในการสร้างเดกซ์แทรน และจากการรวมตัวกันของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ทำให้มีการสร้างกรดอินทรีย์ออกมาทำลายเนื้อฟันจึงเป็นสาเหตุให้เกิดฟันผุนั่นเอง (dental caries หรือ tooth decay)



รูปที่ 2.4 ความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในคราบจุลินทรีย์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Todar, 2007)

2.4.1 กลไกที่เกี่ยวข้องกับการเกิดคราบจุลินทรีย์

การเริ่มมีการยึดเกาะของจุลินทรีย์เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างจุลินทรีย์กับพื้นผิวที่จุลินทรีย์ไปเกาะ โดยมีพวกพอลิเมอร์ที่อยู่นอกตัวเซลล์เข้ามาเกี่ยวข้อง และมีอิทธิพลต่อการเริ่มยึดเกาะของจุลินทรีย์ การเกิดคราบจุลินทรีย์นั้น (Lyndhe, 1984) สามารถแบ่งเป็นขั้นตอนอย่างง่ายๆ ได้เป็น 4 ขั้นตอน ดังนี้ (จินตกร คูวัฒนสุชาติ, 2542)

1. ระยะแผ่นฟิล์มที่เกิดขึ้นที่ไม่คงตัว เป็นระยะที่สามารถเปลี่ยนกลับไปกลับมาได้ โดยจะเริ่มมีการยึดเกาะหรือมีการดูดซับของจุลินทรีย์ต่อพื้นผิวที่ถูกยึดเกาะ

2. ระยะแผ่นฟิล์มที่เกิดขึ้นมีความคงตัวไม่กลับไปกลับมา โดยที่ในระยะนี้จะมีพวกพอลิเมอร์เข้ามาทำหน้าที่ในการเชื่อมต่อระหว่างจุลินทรีย์กับพื้นผิวที่ถูกยึดเกาะ ซึ่งระยะนี้มีบทบาทสำคัญต่อการยึดเกาะของจุลินทรีย์ตัวต่อไป

3. ระยะที่มีการเกิดซ้ำซากของระยะที่ 1 และระยะที่ 2 ซึ่งการยึดเกาะแบบติดแน่นของจุลินทรีย์ที่เพิ่งเริ่มมีการยึดเกาะนี้จะเป็นการยึดเกาะติดกันของจุลินทรีย์ตัวอื่น

4. ระยะสุดท้ายเป็นระยะที่จุลินทรีย์ที่เกาะติดบนพื้นผิวที่ถูกยึดเกาะจะมีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนขึ้น จนเกิดเป็นแผ่นฟิล์มบางๆ ขึ้นในที่สุด

อย่างไรก็ตาม การเกิดคราบจุลินทรีย์เป็นกระบวนการที่ดำเนินต่อกันไปตลอดเวลาไม่มีการหยุดนิ่ง เริ่มจากการยึดเกาะของจุลินทรีย์ การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ การหลุดออกจากการยึดเกาะ และการกลับเข้ามายึดเกาะใหม่ของจุลินทรีย์ ดังนั้นการเกิดคราบจุลินทรีย์จึงสามารถเกิดขึ้นได้ซ้ำแล้วซ้ำอีก

2.4.2 คราบจุลินทรีย์กับการเกิดฟันผุ

เคลือบฟัน เป็นส่วนที่มีแร่ธาตุมากที่สุดของร่างกาย ซึ่งประกอบด้วย แคลเซียม (calcium) และฟอสเฟต (phosphate) อยู่ในรูปของเกลือไฮดรอกซีอะพาไทท์ (hydroxyapatite) ที่ผิวของเคลือบฟันจะมีรูเล็กๆ มากมาย ซึ่งยอมให้พวกไอออนที่มีขนาดเล็ก เช่น ไอออนของโซเดียม แคลเซียม และฟลูออไรด์เข้าไปได้ ไฮดรอกซีอะพาไทท์สามารถละลายได้ง่ายในกรด โดยการละลายจะขึ้นกับค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ และไอออนที่อยู่โดยรอบ โรคฟันผุเป็นโรคที่เกิดกับเนื้อเยื่อแข็งของฟันซึ่งได้แก่ ส่วนของฟันที่โผล่ขึ้นมาในช่องปาก โดยจะมีการทำลายของเนื้อฟัน ทำให้เกิดการสลายตัว เปื่อยยุ่ย หรือเป็นโพรง หรือรูขึ้น การทำลายนี้จะเป็นการทำลายอย่าง

ถาวร โดยร่างกายจะไม่สามารถซ่อมแซมส่วนที่ถูกทำลายไปให้ปกติเหมือนเดิมได้ นอกจากจะใช้วัสดุสังเคราะห์อื่นๆมาทดแทนเนื้อฟันส่วนที่เสียไปให้ทำหน้าที่ได้เหมือนเดิมเท่านั้น อาหารฟันผุเริ่มต้นจากแบคทีเรียในช่องปากดำรงชีวิตโดยใช้อาหารที่มีในคราบจุลินทรีย์ในภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ ทำให้เกิดผลผลิตเป็นกรดอินทรีย์ เช่น กรดแลคติก (lactic acid) กรดอินทรีย์ดังกล่าว เมื่อสัมผัสกับฟันในระยะเวลาหนึ่ง จะทำให้แร่ธาตุในเนื้อฟันละลายหายไป (demineralization) กลายเป็นโพรง หรือรูขึ้น

2.5 แนวทางแก้ไข และการป้องกันฟันผุ

ในปัจจุบันมีหลากหลายวิธีที่นิยมใช้ในการป้องกันฟันผุ ได้แก่

1. การใช้วิธีทางกายภาพในการทำความสะอาดช่องปาก โดยใช้อุปกรณ์ทำความสะอาดฟันที่มีส่วนประกอบของสารต่างๆ ที่ป้องกันฟันผุ เช่น สารฟลูออไรด์ (fluoride) คลอรีนไดออกไซด์ (chlorine dioxide) หรือสารต่อต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial agent) เป็นต้น แต่วิธีนี้ต้องขึ้นอยู่กับลักษณะนิสัยส่วนบุคคลของแต่ละคนด้วย

2. การใช้สารประกอบเรซิน (resin composite, RC) และสารเซรามิก (ceramic filling, CF) ซึ่งเป็นสารอนินทรีย์ ในการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์และการเกิดโรคเหงือกอักเสบ (gingival inflammation) (Konradsson และ Dijken, 2002)

3. การใช้สารให้ความหวานอื่นแทน (sugar substitutes) เช่น น้ำตาลไซลิทอล (xylitol) หรือใช้สารป้องกัน เช่น acarbose ซึ่งได้มีการรายงานไว้ว่า acarbose ซึ่งเป็นออรัลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (oral oligosaccharide) ชนิดหนึ่ง และเป็นสารป้องกันโรคเบาหวาน (anti-diabetic agent) มีความสามารถในการยับยั้งการสร้างเดกซ์แทรนได้ โดยมีความเกี่ยวข้องกับกลไกของคาร์โบไฮเดรตซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวรับน้ำตาล D-glucose ที่ปลดปล่อยออกมา (Kim และคณะ, 1998) หรือใช้เอสเทอร์ของคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate fatty acid ester) ได้แก่ 6-*O*-lauroylsucrose, 6′-*O*-lauroylmaltose และ 6″-*O*-lauroylmaltotriose โดย Devulapalle และคณะ (2004) ได้มีการรายงานไว้ว่า เอสเทอร์เหล่านี้มีความปลอดภัย และมีความสามารถในการป้องกันฟันผุได้ โดยเกิดการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส ซึ่งสามารถนำสารต่างๆ ข้างต้น ไปประยุกต์ใช้ผสมลงในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดช่องปากได้ นอกจากนี้ ยังมีการใช้กรดอะมิโนที่ให้ความหวานแทนการใช้น้ำตาลทราย เช่น monellin และ aspartame (Keyes, 1968) แต่มีข้อจำกัดอยู่ที่ไม่สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงมากๆได้ เนื่องจากความร้อนจะทำลายโปรตีนซึ่งจะทำให้สูญเสียความหวานไปในที่สุด

4. การใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม ในการปรับปรุงสายพันธุ์ของ *S. mutans* ไม่ให้เกิดการสร้างกรดแลคติคออกมา โดยสายพันธุ์ที่ใช้มีความสามารถเข้าไปแทนที่แบคทีเรียอื่นๆ ที่อาศัยอยู่ภายในช่องปาก

5. การใช้ passive immunization โดยการต่อต้าน *S. mutans* ด้วย anti-*S. mutans* monoclonal antibody

6. การใช้วัคซีน (vaccine) ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่ง Monchois และคณะ (1999) ได้มีการศึกษาถึงกลไกการทำงาน และความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและหน้าที่ของเอนไซม์กลูแคนซูเครส (glucansucrase) เพื่อนำไปพัฒนาผลิตเป็นวัคซีนสำหรับป้องกันฟันผุต่อไปได้ การทดลองผลิตวัคซีนเริ่มแรกจะใช้ *S. mutans* ที่ถูกทำให้ตายโดยฟอร์มาลีน หรือใช้ความร้อนในการฆ่าให้ตายก่อนฉีดเข้าไปในบริเวณต่อมน้ำลายของลิง เพื่อให้ลิงสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อนี้ขึ้น พบว่า ภูมิคุ้มกันที่ลิงสร้างขึ้นสามารถต่อต้าน *S. mutans* และลดการเกิดฟันผุได้ (Taubman และ Smith, 1974) แต่การใช้วัคซีนกรณีนี้มักมีปัญหา เนื่องจากวัคซีนสามารถก่อให้เกิด antigen-antibody complex ต่อเนื้อเยื่อหัวใจ และเนื้อเยื่อของอวัยวะอื่นได้ (Van de Rijn และคณะ,1976) และยังก่อให้เกิดการทำลายอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับการไหลเวียนของเลือดไปทั่วร่างกาย เช่น ไต ด้วย

7. การใช้สารเคลือบฟันไม่ให้เกิดการจับเกาะเบื้องต้น เช่น สเปอร์มีน (spermine) และสารพวกแลคติน (Hamada และ Slade, 1980) ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถจับเกาะได้ แต่วิธีนี้ยังไม่ได้ผลที่ดีนัก

8. การใช้เดกซ์แทรนเนสในการควบคุมปริมาณเดกซ์แทรนที่เกิดขึ้น ซึ่ง Marotta และคณะ (2002) ได้ทำการทดลองใช้เอนไซม์ระดับคุณภาพอาหาร (food grade) 2 ชนิด คือ เดกซ์แทรนเนส 50 L (Dextranase 50 L) และเดกซ์โทรไซม์ (Dextrozyme) ในระดับห้องปฏิบัติการ ซึ่งเดกซ์แทรนเนส 50 L จะมีความจำเพาะต่อพันธะ α-1,3 มากกว่าพันธะ α-1,6 ส่วนเดกซ์โทรไซม์จะจำเพาะต่อพันธะ α-1,6 มากกว่า โดยได้ทดลองผสมเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดลงในผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากเพื่อใช้เป็นตัวควบคุมการเกิดคราบจุลินทรีย์ พบว่าเดกซ์แทรนเนส 50 L มีความสามารถในการป้องกันการสร้างกลูแคนที่สร้างขึ้นจากเชื้อ *S. sobrinus* ได้ และกลูแคนที่สร้างออกมาจะไม่มีคุณสมบัติในการยึดเกาะอีกทั้งเดกซ์แทรนเนส 50 L ยังสามารถสลายกลูแคนก่อนการสังเคราะห์ (pre-synthesis) ได้บางส่วน (ประมาณ 20%) ด้วย แต่เดกซ์โทรไซม์จะไม่สามารถป้องกันและสลายกลูแคนได้ แต่จะทำให้กลูแคนนั้นไม่มีคุณสมบัติในการยึดเกาะเช่นเดียวกัน และเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดจะมีความอยู่ตัวดีในผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากที่ค่าความเป็นกรด-ด่างประมาณ 5.0 ดังนั้นจึงเป็นแนวทางที่สำคัญในการประยุกต์ใช้เดกซ์แทรนเนสผสมลงในผลิตภัณฑ์ประเภทยาสีฟัน หรือน้ำยา

บ้วนปาก ในการป้องกันฟันผุต่อไป ข้อดีของการนำเดกซ์แทรนเนสมาใช้ (Barrett และคณะ, 1986) คือ

- สามารถย่อยสลายเดกซ์แทรนที่ละลาย และไม่ละลายน้ำได้
- ยับยั้งการสร้างเดกซ์แทรนที่ไม่ละลายน้ำได้
- มีผลต่อการทำงาน และผลิตภัณฑ์ของเอนไซม์กลูโคซิลทรานเฟอเรส
- สามารถลดการรวมตัวกันของเซลล์ *S. mutans* ในหลอดทดลอง

จากแนวทางการแก้ปัญหาที่ได้เสนอไป การใช้เดกซ์แทรนเนสนับว่าเป็นวิธีทางชีวภาพที่มีความปลอดภัยกว่าการใช้สารเคมี และนอกจากนี้ยังมีการรายงานการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการนำเดกซ์แทรนเนสมาทดลองใช้มากมาย และมีแนวโน้มที่สามารถลดปริมาณของเดกซ์แทรนได้เป็นอย่างดี

2.6 เดกซ์แทรน

เดกซ์แทรน เป็นโฮโมพอลิแซ็กคาไรด์ (homopolysaccharide) ของกลูโคสชนิดที่ผลิตแล้วปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ (exopolysaccharide) (Jeanes และคณะ, 1954; Robyt, 1986; Sutherland, 1996; Broadbent และคณะ, 2003) ที่ประกอบขึ้นจากหน่วยย่อยของน้ำตาลดี-กลูโคส (D-glucose) จับกันด้วยพันธะไกลโคไซด์ชนิด α-1,6 เป็นส่วนใหญ่ และมีพันธะไกลโคไซด์ชนิด α-1,2 α-1,3 และ α-1,4 เป็นส่วนของกิ่งสาขา (Wynter และคณะ, 1996; Sutherland, 1996) ดังแสดงในรูปที่ 2.5 ซึ่งขนาดโมเลกุลและชนิดของพันธะจะเป็นตัวกำหนดความสามารถในการละลายน้ำของเดกซ์แทรน โดยยิ่งขนาดโมเลกุลใหญ่และสัดส่วนของพันธะ α-1,3 มากจะยิ่งละลายน้ำได้ยาก

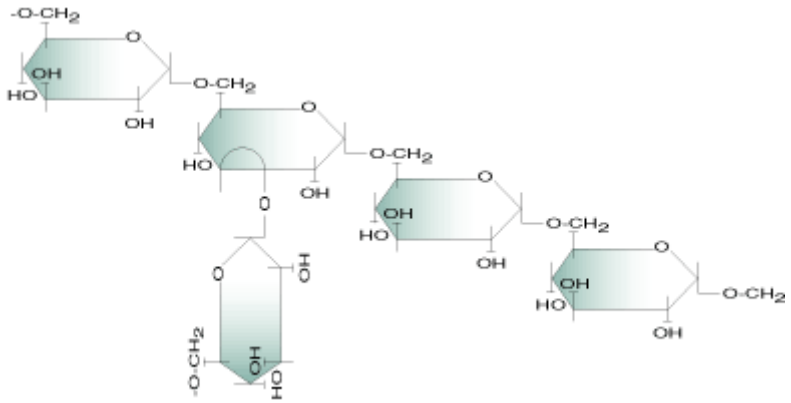
เดกซ์แทรน จะมีลักษณะเหนียวหนืด เป็นเมือก (slimy) หรือเป็นแผ่นเมือก (mucous mass) คล้ายกาว ประกอบกับมีน้ำหนักโมเลกุลที่สูงจึงสามารถละลายน้ำได้ยาก และมีลักษณะเหนียวหนืดสามารถจับกับผิวฟันได้ ลักษณะเหนียวหนืดนี้ยังทำหน้าที่เป็นกาวยึดคราบจุลินทรีย์ให้ติดกับฟันด้วย นอกจากนั้นเดกซ์แทรนเหล่านี้ยังจับกับไกลโคโปรตีนในน้ำลายและเศษอาหารต่างๆ เข้าไว้ด้วย ทำให้เกิดคราบจุลินทรีย์ส่งผลให้จุลินทรีย์ต่างๆ จับเกาะบนผิวฟันได้เพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งอาหารและแหล่งพลังงานที่สำคัญของแบคทีเรีย นอกเหนือจากอาหารที่ได้จากภายนอก (Guggenheim, 1970)

เดกซ์แทรน เกิดจากการทำงานของเอนไซม์เดกซ์แทรนซูเครส (dextransucrase) หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า กลูโคซิลทรานสเฟอร์เรส (glucosyltransferase, GTF) (1,6-α-glucan:D-glucose-2-glucosyltransferase; E.C. 2.4.1.5) ของแบคทีเรีย ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้เป็นเอนไซม์ที่

สร้างออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) และเป็นเอนไซม์ที่ต้องการการชักนำ (inducible enzyme) โดยสารชักนำการสร้างเดกซ์แทรน ได้แก่ ซูโครส

$$\text{n-Sucrose} \xrightarrow[\text{หรือ glucosyltransferase}]{\text{dextransucrase}} [\text{D-Glucose}]_n + \text{n[Fructose]}$$

จากปฏิกิริยาข้างบนนี้ เอนไซม์กลูโคซิลทรานเฟอร์เรส หรือเดกซ์แทรนซูเครส จะเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนซูโครส เป็นพอลิเมอร์ของกลูโคส หรืออีกชื่อหนึ่ง คือ เดกซ์แทรน (dextran) พร้อมกับปลดปล่อยฟรักโทสอิสระออกมาด้วย (Cole, 1977; Van Houte และ Russo, 1986)



รูปที่ 2.5 โครงสร้างของเดกซ์แทรน (Polydex Pharmaceuticals Ltd., 2007)

เดกซ์แทรนที่จุลินทรีย์แต่ละชนิดสร้างขึ้นจะมีความยาว ขนาดโมเลกุล และจำนวนแขนงย่อยแตกต่างกัน โดยจะมีขนาดโมเลกุลตั้งแต่หลายพันไปจนถึงหลายล้านดาลตัน ซึ่งตามที่ได้กล่าวไปข้างต้นแล้วว่า น้ำหนักโมเลกุลที่มากและการแตกแขนงของพันธะไกลโคไซด์ จะทำให้ความสามารถในการละลายน้ำของเดกซ์แทรนลดลง จุลินทรีย์ที่พบว่าสามารถสร้างเดกซ์แทรนซูเครสได้ดี คือ กลุ่มของ *Leuconostoc* sp. *Streptococcus* sp. *Acetobacter* sp. และ *Betabacterium* sp.

2.6.1 ชนิดของเดกซ์แทรน

2.6.1.1 เดกซ์แทรนที่สามารถละลายน้ำได้ (water soluble dextran)

เป็นเดกซ์แทรนที่มีพันธะ α-1,6 ในปริมาณมาก ถูกสังเคราะห์โดยการทำงานของกลูโคซิลทรานเฟอเรสที่สังเคราะห์เดกซ์แทรนพันธะ α-1,6 ได้ในปริมาณมาก (Lewicki และคณะ ,1971)

2.6.1.2 เดกซ์แทรนที่ไม่สามารถละลายน้ำได้ (water insoluble dextran หรือ less soluble dextran)

เป็นเดกซ์แทรนที่มีพันธะ α-1,3 ในปริมาณมาก ถูกสังเคราะห์โดยการทำงานของกลูโคซิลทรานเฟอเรสที่สังเคราะห์เดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ได้ในปริมาณมาก (Guggenheim และ Newbrun, 1969)

ในปัจจุบันมีการผลิตเดกซ์แทรนในทางการค้ามากมาย โดยมีให้เลือกตามขนาดของโมเลกุลและการใช้งาน เช่น เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรมที่ให้เป็นสารปรุงแต่งในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น เติมในไอศกรีม เบเกอรี่ หรือลูกอม ช่วยให้เกิดความนุ่มของเนื้อสัมผัส เดกซ์แทรนที่ใช้ในทางการแพทย์ ซึ่งใช้ในการเพิ่มปริมาณของโลหิตในผู้ป่วยที่สูญเสียน้ำจากการถูกไฟคลอก โดยไม่รบกวนระบบของแอนติเจน-แอนติบอดีที่ก่อให้เกิดการตกตะกอนของเลือด เดกซ์แทรน T-2000 (น้ำหนักโมเลกุล 2,000,000 ดาลตัน) เดกซ์แทรน T-40 (น้ำหนักโมเลกุล 40,000 ดาลตัน) และเดกซ์แทรน T-20 (น้ำหนักโมเลกุล 20,000 ดาลตัน) เป็นต้น โดยเดกซ์แทรนที่ผลิตทางการค้าทั้งหมดสังเคราะห์ได้จาก *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F ซึ่งประกอบด้วยพันธะ α-1,6 ถึง 95% โดยอีก 5% เป็นพันธะ α-1,3 (Wilham และคณะ,1955; Santos และคณะ, 2000) และจากคุณสมบัติที่เหนียวหนืดของเดกซ์แทรนนี้เองทำให้เดกซ์แทรนได้รับความสนใจและศึกษากันมาก

2.6.2 ปัญหาที่เกิดจากการสะสมของเดกซ์แทรน

2.6.2.1 อุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลทราย (sugar cane industry)

น้ำตาลทราย เป็นสินค้าทางเกษตรกรรมที่สามารถนำรายได้เข้าสู่ประเทศมากกว่าปีละสองหมื่นล้านบาท ซึ่งถือว่าเป็นอุตสาหกรรมที่ทำรายได้ให้แก่ประเทศเป็นจำนวนมากในแต่ละปี โดยมีพืชเศรษฐกิจที่สำคัญเป็นวัตถุดิบ คือ อ้อย ซึ่งสามารถเพาะปลูกได้ทั่วไปในเขตร้อนชื้น แต่พบว่า ได้ประสบปัญหาในระหว่างกระบวนการเก็บเกี่ยว และกระบวนการผลิตน้ำตาล เนื่องจากมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในกลุ่มของ *Leuconostoc* sp. ที่มีความสามารถในการผลิตเดกซ์แทรนจากซูโครสที่มีอยู่ในน้ำอ้อย โดยเดกซ์แทรนที่เกิดขึ้นเมื่อจับกับผิวของท่อส่งน้ำอ้อยจะทำให้เกิดการอุดตันส่งผลให้อัตราการผลิตต่ำลง นอกจากนี้ความหนืดของเดกซ์แทรนยังทำให้แบคทีเรียที่ปนเปื้อนชนิดอื่นมาเกาะติด และเจริญสามารถปล่อยกรดอินทรีย์ออกมาได้ เป็นสาเหตุทำให้เกิดการบูดเปรี้ยวของน้ำตาล เมื่อมีเดกซ์แทรนมากขึ้นจะส่งผลให้น้ำอ้อยมีความหนืดมากขึ้น ทำให้น้ำอ้อยเดือดช้าลง ใสได้ยากขึ้น อัตราการตกผลึกของซูโครสช้าลง และผลึกของซูโครสจะยาวผิดปกติ (บุญส่ง แสงอ่อน, 2527) น้ำตาลฟรักโทสที่เหลืออยู่ยังอาจสลายตัวให้เป็นกรดอินทรีย์และสารประกอบที่มีสี (สันติ์ ฉายตระกูล, 2525) นอกจากนี้การที่น้ำอ้อยมีเดกซ์แทรนปนเปื้อนมานั้น จะทำให้เกิดปัญหาเกี่ยวกับการตรวจวัดคุณภาพของน้ำอ้อยเป็นอย่างมาก ทั้งนี้เนื่องจากสมบัติทางชีวเคมีของเดกซ์แทรนที่สามารถเบี่ยงเบนแสง (Polarized light) ได้ และยังทำให้ค่าการเบี่ยงเบนแสง (Polarization) สูงกว่าค่าของน้ำตาลซูโครสถึง 3 เท่า ทำให้การวัดค่าการเบี่ยงเบนแสงมีความผิดพลาด (Singleton, 2006) ด้วยเหตุนี้เองทำให้เกิดการสูญเสียน้ำตาลไปถึงร้อยละ 9.2 ของผลผลิตน้ำตาลทรายที่ได้ต่อปี

Antti และคณะ (1999) รายงานว่า มีการปนเปื้อนของ *Leuconostoc mesenteroides* ในกระบวนการผลิตน้ำตาลจากหัวบีท (sugar beet) โดยซูโครสส่วนหนึ่งจะสูญหายไป พร้อมทั้งมีการสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีลักษณะคล้ายเมือก ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาต่อกระบวนการและคุณภาพของผลิตภัณฑ์

Egglestona และ Monge (2005) พบการปนเปื้อนของ *Leuconostoc* sp. ในกระบวนการผลิตน้ำตาลทรายที่หลุยส์เซียน่า สหรัฐอเมริกา ส่งผลให้สูญเสียปริมาณน้ำตาลทรายเป็นจำนวนมาก เนื่องมาจาก *Leuconostoc* sp. สามารถผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนซูเครสออกมาและเปลี่ยนซูโครสที่มีอยู่ในน้ำอ้อยให้เป็นเดกซ์แทรนได้

2.6.2.2 การเกิดคราบจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคฟันผุ

ปัจจัยการก่อโรคฟันผุเกิดจากการที่จุลินทรีย์ในช่องปากชนิด oral streptococci สามารถสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนซูเครส หรือกลูโคซิลทรานเฟอเรส ซึ่งจะเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนซูโครสที่เป็นสับสเตรตของเอนไซม์ให้กลายเป็นเดกซ์แทรนที่ละลายน้ำได้ยาก สามารถจับกับผิวฟันได้เกิดเป็นคราบจุลินทรีย์ ส่งผลให้เกิดการสะสมของจุลินทรีย์บนผิวฟันมากขึ้น จุลินทรีย์บนคราบจุลินทรีย์นั้นจะหมักอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตแล้วปลดปล่อยกรดอินทรีย์ออกมา ทำให้เกิดการละลายของสารประกอบจำพวกแร่ธาตุบริเวณผิวเคลือบฟัน หรือเนื้อฟันกลายเป็นภาวะฟันผุขึ้น

Ebisu และคณะ (1974) ได้ศึกษาคุณสมบัติของเดกซ์แทรนที่ไม่สามารถละลายน้ำได้จาก *Streptococcus mutans* OM7 176 พบว่า 70% เป็นเดกซ์แทรนที่ประกอบด้วยพันธะ α-1,3 และอีก 30% เป็นเดกซ์แทรนที่ประกอบด้วยพันธะ α-1,6 สรุปได้ว่าเดกซ์แทรนที่ประกอบด้วยพันธะ α-1,3 อยู่มากจะยิ่งละลายน้ำได้ยากเพราะมีโครงสร้างที่แตกแขนงมาก

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

Walker และคณะ (1984) ได้ศึกษาการเกิดโรคฟันผุในคน พบว่า เดกซ์แทรนที่ไม่สามารถละลายน้ำได้ ซึ่งมีพันธะ α-1,3 ปริมาณสูง จะช่วยให้จุลินทรีย์ยึดเกาะกับผิวฟัน ในขณะที่เดกซ์แทรนที่สามารถละลายน้ำได้ซึ่งมีพันธะ α-1,6 ปริมาณสูงจะช่วยในการยึดเกาะกันเองของแบคทีเรีย

Yu และคณะ (2006) กล่าวไว้ว่า แบคทีเรีย *S. mutans* ที่มีอยู่ในช่องปากจะเริ่มสร้างคราบจุลินทรีย์โดยการสังเคราะห์กลูแคนขึ้นจากน้ำตาลซูโครสที่ได้รับมาจากอาหาร จากนั้นจะปลดปล่อยกรดอินทรีย์ออกมาทำลายผิวเคลือบฟันเป็นผลให้เกิดอาการฟันผุ

2.7 **เดกซ์แทรนเนส**

เดกซ์แทรนเนส จัดเป็นเอนไซม์ที่ต้องการการชักนำ (inducible enzyme) โดยเดกซ์แทรนจะเป็นตัวที่ชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีน *dex*A ในระดับ mRNA ให้เกิดการสร้างเดกซ์แทรนเนส (Fukumoto และคณะ, 1971; Simonson และ Liberta, 1975; Madhu และ Prabhu, 1984) เอนไซม์นี้มีความจำเพาะต่อการย่อยสลายพันธะ α-1,6 และพันธะ α-1,3 ที่เชื่อมหน่วยย่อยของกลูโคสในสายเดกซ์แทรน โดยเอนไซม์นี้จะย่อยสลายพันธะที่เชื่อมหน่วยของกลูโคสจากปลาย

ด้านหนึ่งแล้วตัดเข้าไปทีละโมเลกุล ซึ่งเป็นปฏิกิริยาแบบ exo-dextranase หรืออาจย่อยที่จุดใดจุดหนึ่งบนสายเดกซ์แทรน ซึ่งเป็นปฏิกิริยาแบบ endo-dextranase ทำให้ได้สายเดกซ์แทรนที่สั้นลง ซึ่งปฏิกิริยาทั้ง 2 แบบนี้จะมีความจำเพาะต่อการสลายพันธะแตกต่างกันด้วย (Sutherland, 1996) โดยรูปแบบการย่อยสลายของเอนไซม์นี้ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ ส่วนผลิตภัณฑ์ที่ได้อาจเป็นโอลิโกเมอร์ (oligomer) ไดเมอร์ (dimer) หรือโมโนเมอร์ (monomer) ของน้ำตาลกลูโคส

2.7.1 ชนิดของเดกซ์แทรนเนสเมื่อแบ่งตามความจำเพาะในการสลายพันธะ

2.7.1.1 เดกซ์แทรนเนส (α-1,6-D-glucan-6-glucanohydrolase, E.C. 3.2.1.11) ซึ่งจำเพาะต่อพันธะ α-1,6 บนสายเดกซ์แทรน

2.7.1.2 เดกซ์แทรนเนส (α-1,3-D-glucan-3-glucanohydrolase, E.C. 3.2.1.59) ซึ่งจำเพาะต่อพันธะ α-1,3 บนสายเดกซ์แทรน

2.7.2 ลักษณะการทำงานของเดกซ์แทรนเนสในการสลายพันธะของเดกซ์แทรน (Walker, 1978)

2.7.2.1 exo-dextranase

เป็นเดกซ์แทรนเนสที่ย่อยสลายพันธะที่เชื่อมโมเลกุลของกลูโคสจากปลายรีดิวซ์ของสายเดกซ์แทรน เป็นการตัดทีละโมเลกุลของกลูโคส ผลิตภัณฑ์ที่ได้ส่วนใหญ่ คือกลูโคส และไอโซมอลโทส จุลินทรีย์ที่สร้าง exo-dextranase ได้แก่ *S. mutans*, *Achromobacter* spp. และ *Arthrobacter globiformis* T6 เป็นต้น (Wynter, 1997; Sutherland, 1996)

2.7.2.2 endo-dextranase

เป็นเดกซ์แทรนเนสที่ย่อยสลายพันธะไกลโคไซด์ ที่จุดใดจุดหนึ่งในสายของเดกซ์แทรน ทำให้ได้พอลิเมอร์ของน้ำตาลสายสั้นๆ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายอาจเป็นโอลิโกเมอร์ (oligomer) ไดเมอร์ (dimer) หรือโมโนเมอร์ (monomer) ของกลูโคส เช่น ไอโซมอลโทส ไอโซมอลโทเททราโอส (isomaltetraose) และไอโซมอลโทเพนทะโอส (isomaltopentaose)

เป็นต้น ซึ่งจะเกิดการย่อยอย่างช้าๆ ด้วย exo-dextranase ต่อไปจนได้ผลิตภัณฑ์เป็นโมเลกุลที่เล็กลง จุลินทรีย์ที่สร้าง endo-dextranase ได้แก่ *Chaetomium gracile, S. mutans, Cladosporium resinae, Flavobacterium* spp. และ *Pseudomonas* spp. เป็นต้น ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละชนิดก็จะสร้าง endo-dextranase ที่จำเพาะต่อพันธะแตกต่างกันไปอีกด้วย (Wynter, 1997; Sutherland, 1996)

เดกซ์แทรนเนสสามารถพบได้ในแหล่งต่างๆ เช่น ในลำไส้ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมบางชนิด (Sidebotham, 1974) และจากจุลินทรีย์ต่างๆ ทั้งรา (Fukumoto และคณะ, 1971, Simonson และ Liberta, 1975; Madhu และ Prabhu, 1984) ยีสต์ (Koenig และ Day, 1988) แอคติโนมัยซิส (Actinomyces) และแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบหลายชนิด (Lawman และ Bleiweis, 1991; Okushima และคณะ, 1991) ตามที่สุหัทยา จิระนันทิพร (2543) ได้สรุปไว้ เช่น *Arthrobacter globiformis, Bacillus megaterium, Streptomyces cinemonensis, Lipomyces starkeyi, Chaetomium gracile, Penicillium minioluteum* เป็นต้น

จากที่ผ่านมาได้มีการศึกษาเกี่ยวกับเดกซ์แทรนเนสมาตั้งแต่ปี 1952 หลังจากที่มีการค้นพบว่า คราบจุลินทรีย์ประกอบด้วยเดกซ์แทรน ต่อมาจึงมีการนำเดกซ์แทรนเนสมาเป็นสารป้องกันฟันผุ (anticaries agent) (Leach, 1969; Barrett และคณะ, 1986) การนำเดกซ์แทรนเนสไปใช้ก่อนที่จะมีพอลิแซ็กคาไรด์เกิดขึ้น จะง่ายต่อการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ แต่ถ้าปล่อยให้คราบจุลินทรีย์โตเต็มที่แล้ว จึงมาใช้เดกซ์แทรนเนสจะพบว่า การขจัดคราบจุลินทรีย์จะทำได้ยากกว่า (Wiater และคณะ, 2004)

Fitzgerald และคณะ (1968) ได้ศึกษาผลของเดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium funiculosum* ต่อการยับยั้งการเกิดฟันผุในหนูแฮมสเตอร์ โดยเติมเดกซ์แทรนเนสลงในอาหารและน้ำดื่มของหนู อาหารที่ใช้เลี้ยงจะมีซูโครสอยู่มาก พบว่า การเติมเดกซ์แทรนเนสลงไปในน้ำดื่มเพียงอย่างเดียว จะลดการเกิดฟันผุได้น้อยกว่าการเติมเดกซ์แทรนเนสลงไปทั้งในน้ำ และอาหาร

Block และคณะ (1969) ได้ศึกษาผลการป้องกัน และรักษาการเกิดคราบจุลินทรีย์ และฟันผุในหนูแฮมสเตอร์ของเดกซ์แทรนเนส พบว่า การป้องกันนั้นสัตว์ทดลองที่ได้รับเอนไซม์ จะมีคราบจุลินทรีย์ลดลง และไม่มีฟันผุเลย ในขณะที่สัตว์ทดลองชุดควบคุมที่ไม่ได้รับเอนไซม์ จะมีคราบจุลินทรีย์มาก และเกิดฟันผุมาก ในด้านการรักษา เมื่อเลี้ยงสัตว์ทดลองด้วยอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสสูง เป็นเวลา 21 วัน จากนั้นเติมเอนไซม์ลงในน้ำให้สัตว์ทดลองดื่ม พบว่า ภายในเวลา 2 วัน คราบจุลินทรีย์จะถูกขจัดไปหมด และอัตราการเกิดคราบจุลินทรีย์ก็จะลดลงด้วย

ต่อมาในปี ค.ศ. 1969 Leach พบว่า ราส่วนมากสร้างอะฟลาทอกซิน (aflatoxin) ออกมาในสภาวะที่มีการสร้างเดกซ์แทรนเนสด้วย ซึ่งจะส่งผลให้เกิดอาการแพ้ จึงได้เริ่มมีการนำเดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียมาใช้แทน

Schachtele และคณะ (1975) ได้ศึกษาความสามารถในการช่วยลดการยึดเกาะของ *Streptococcus mutans* บนแท่งแก้ว โดยเดกซ์แทรนเนสที่ได้จาก *Actinomyces isrelii* และ *Bacteroides ochraceus*

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

Khalikova และคณะ (2003) ได้กล่าวไว้ว่าแบคทีเรียในกลุ่ม Streptococci จะผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ออกมาภายนอกเซลล์ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นเดกซ์แทรน โดยเฉพาะ *S. mutans* และ *S. sobrinus* จะก่อให้เกิดคราบจุลินทรีย์หรือคราบหินปูนบนผิวฟัน แต่จะสามารถกำจัดออกไปได้ด้วยการใช้เดกซ์แทรนเนส

Wiater และคณะ (2004) ศึกษาความสามารถของมิวทาเนส และเดกซ์แทรนเนสจากราแบบ in vitro ทั้งในแง่ของการทำงานร่วมกัน และการทำงานแบบเดี่ยว พบว่า เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดมีประสิทธิภาพที่ดีในการป้องกัน และย่อยสลายกลูแคนที่เกิดขึ้น โดยเฉพาะเมื่อใช้เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดร่วมกัน

นอกจากนี้ในทางการค้ามีบริษัทในประเทศญี่ปุ่น ได้เติมเดกซ์แทรนเนสลงในยาสีฟันเพื่อใช้ลดคราบจุลินทรีย์ และป้องกันฟันผุออกจำหน่ายแล้ว

ถึงแม้ว่า จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้จะมีหลายชนิดก็ตาม แต่เอนไซม์ที่เหมาะสมในการใช้ขจัดคราบจุลินทรีย์ รวมถึงป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ และฟันผุในช่องปากนั้น ควรจะมีคุณสมบัติที่เหมาะสมกับสภาวะในช่องปากของคนด้วย เช่น สามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างที่เกิดขึ้นได้ และทนต่อความเข้มข้นของเกลือได้สูง เนื่องจากอาหารที่ได้รับประทานเข้าไปนั้นมีความแตกต่างกัน ดังนั้นจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์นี้ที่นำมาใช้น่าจะเป็นจุลินทรีย์ที่ทนเค็มได้ด้วย

การศึกษาเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านมาในประเทศไทยนั้น ได้มีการศึกษามาอย่างต่อเนื่องที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยในปี 2531 เอก แสงวิเชียร ได้เก็บตัวอย่างดินจากแหล่งต่างๆ ภายในประเทศ เพื่อคัดเลือกหาราที่สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้ จากตัวอย่างทั้งหมด พบว่า มีรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 สามารถผลิตเอนไซม์ได้ 42 หน่วยต่อมล. เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารของ Fukumoto ที่ผ่านการปรับปรุง ภายใต้การบ่มเขย่าที่

อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 วัน ต่อมามีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องเพื่อให้เชื้อสามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้มากขึ้น ปี 2538 สุวรรณา นพพรพันธ์ ได้กลายพันธุ์เชื้อด้วยแสงอัลตราไวโอเลต และ NTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) จนได้ *Penicillium* sp. SMCU 3-14 ที่มีความสามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้ในปริมาณที่สูงถึง 330 หน่วยต่อมล. จากนั้นมีการปรับปรุงสูตรอาหารโดยมีการเติมกากน้ำตาลลงไป ทำให้เชื้อสามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้สูงถึงประมาณ 600 หน่วยต่อมล. (ศิโรจน์ ศรีสรากรณ์, 2547) ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมสำหรับเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตได้จาก *Penicillium* sp. SMCU 3-14 เท่ากับ 4.5 และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเดกซ์แทรเนส คือ 55 °ซ (พัชราวดี บุตรทา, 2548) ต่อมาในปี 2549 พิมลรัตน์ เต็มจิตต์ภักดี ได้หาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS region ของ *Penicillium* sp. SMCU 3-14 พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณนี้ของ *Penicillium* sp. SMCU 3-14 มีความเหมือนกับ *Penicillium pinophilum* 100% ที่ความเชื่อมั่น 100% จึงได้จัดจำแนก *Penicillium* sp. SMCU 3-14 เป็น *Penicillium pinophilum* SMCU 3-14

ในปี 2540 ณฐินี สุวรรณสิงห์ ได้คัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์ AG-2 ที่สามารถสร้างเดกซ์แทรนเนสจากดินในจังหวัดนนทบุรี เมื่อศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ พบว่า สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสที่มีแอกทิวิตี 4.08 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรที่ปรับปรุงแล้วโดยณฐินี สุวรรณสิงห์ (2540) โดยค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนส คือ 6.5 และ 40 °ซ ตามลำดับ และมีความเสถียรที่ความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิ 4.0–7.0 และ 30-37 °ซ ตามลำดับ จากนั้น Chareonpornwattana และคณะ (2001) ได้ศึกษาสมบัติทางชีวเคมี และวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์ของ 16S ribosomal RNA และได้จัดจำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ AG-2 เป็น *Arthrobacter* sp. AG-2 ซึ่งจากคุณสมบัติทางกายภาพของเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตจาก *Arthrobacter* sp. AG-2 นั้น พบว่า มีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้กับช่องปากของมนุษย์

เป็นที่ทราบกันว่าเดกซ์แทรนเนสเป็นเอนไซม์ชนิดที่สามารถชักนำได้ (inducible enzyme) ผลที่ตามมาคือ ความจำเพาะต่อการย่อยเดกซ์แทรนจะขึ้นกับชนิดของพันธะที่ใช้เชื่อมหน่วยโมเลกุลกลูโคสเข้าด้วยกัน เช่น พันธะ α-1,6 จะถูกย่อยได้หากสารชักนำนั้นเป็นเดกซ์แทรนที่เชื่อมหน่วยกลูโคสด้วยพันธะ α-1,6 แต่จะไม่ตัดกลูโคสที่เชื่อมกันด้วยพันธะ α-1,3 และเช่นเดียวกันกับพวกที่ชักนำด้วยเดกซ์แทรน α-1,3 จะตัดเฉพาะกลูโคสที่เชื่อมกันด้วยพันธะ α-1,3 ไม่ตัดพวกที่เชื่อมกันด้วยพันธะ α-1,6 สืบเนื่องจากการที่เดกซ์แทรนมีการเชื่อมด้วยพันธะที่ต่างกันภายในเดกซ์แทรน เช่น ส่วนแกนกลางส่วนใหญ่เป็น α-1,6 ส่วนแขนงจะเป็น α-1,3 α-1,4 และ α-1,2 บ้าง ดังนั้น ผลการสลายของเดกซ์แทรนหนึ่งๆ ย่อมขึ้นกับ 2 ปัจจัย คือ

1. ชนิดของพันธะที่มีอยู่ในเดกซ์แทรนนั้นๆ ตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้นว่า เดกซ์แทรนที่ผลิตโดย *L. mesenteroides* NRRL B512F จะมีพันธะส่วนใหญ่เป็น α-1,6 และรองลงมาคือ α-1,3 และ α-1,4 กับ α-1,2 บ้าง (Wilham และคณะ,1955; Santos และคณะ, 2000) ส่วนเดกซ์แทรนที่ผลิตโดย *S. sobrinus* 6715 แม้ว่าจะมีพันธะ α-1,6 อยู่ด้วยแต่ปริมาณของ α-1,3 จะสูงกว่าของ *L. mesenteroides* NRRL B512F มาก โดยมีสัดส่วนของพันธะ α-1,6 ต่อพันธะ α-1,3 เท่ากับ 33 ต่อ 67 (Huge และคณะ, 1986) ดังนั้นการจะย่อยเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ให้ได้ดีย่อมต้องการการเสริมด้วยเดกซ์แทรนเนสที่มีความจำเพาะต่อ α-1,3 เพิ่มมากกว่าการย่อยเดกซ์แทรนจาก *L. mesenteroides* NRRL B512F

2. ชนิดของเดกซ์แทรนเนส โดยความจำเพาะนั้นเกิดจากการชักนำโดยเดกซ์แทรน หากเดกซ์แทรนที่ใช้ชักนำมีพันธะที่เชื่อมหน่วยกลูโคสใดความจำเพาะของเดกซ์แทรนเนสที่ได้ก็จะเป็นอย่างนั้น เดกซ์แทรนที่มีจำหน่ายในทางการค้าส่วนใหญ่จะผลิตโดย *L. mesenteroides* NRRL B512F ดังนั้นจะมีพันธะ α-1,6 มาก α-1,3 น้อย ซึ่งจะใช้ได้ดีในการขจัดเดกซ์แทรนที่ปนเปื้อนในน้ำอ้อยที่มีสาเหตุจาก *Leuconostoc* sp. แต่หากนำมาใช้กับเดกซ์แทรนจาก *Streptococcus* sp. อาจให้ผลไม่ดีเท่าที่ควรเนื่องจากมีความจำเพาะต่อ α-1,3 ต่ำ

ดังนั้นในการศึกษานี้เพื่อพิสูจน์แนวคิดดังกล่าว จึงได้ทดลองผลิตเดกซ์แทรนเนสโดยใช้เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรมซึ่งผลิตจาก *L. mesenteroides* NRRL B512F เป็นตัวแทนพวกที่มีพันธะ α-1,6 สูง และใช้เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ซึ่งผลิตขึ้นเองในการทดลองนี้เป็นตัวแทนของพวกที่มีพันธะ α-1,3 สูง

นันทิดา วานิชวงศ์วรรณ (2545) ศึกษาการผลิตเดกซ์แทรนโดย *S. sobrinus* 6715 เพื่อใช้เป็นสารชักนำในการผลิตเดกซ์แทรนเนสใน *Arthrobacter sp.* AG-2 พบว่า เดกซ์แทรนเป็นสารที่ถูกสร้างควบคู่ไปกับการเจริญ โดยจะสามารถผลิตได้ดีที่สุดในอาหาร Basal medium ที่เสริมด้วยน้ำตาลซูโครส 1.5% โดยน้ำหนัก และเมื่อนำเดกซ์แทรนที่ได้จาก *S. sobrinus* 6715 และเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรมไปชักนำการผลิตเดกซ์แทรนเนสใน *Arthrobacter sp.* AG-2 พบว่า เดกซ์แทรนเนสที่ถูกชักนำด้วยเดกซ์แทรนที่ได้จาก *S. sobrinus* 6715 จะสามารถย่อยสลายเดกซ์แทรน ที-2000 และเดกซ์แทรนที่ได้จาก *S. sobrinus* 6715 ได้ โดยจะปลดปล่อยเฉพาะกลูโคสออกมาเท่านั้น ส่วนเดกซ์แทรนเนสที่ได้จากการชักนำด้วยเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรมนั้น เมื่อย่อยสลายเดกซ์แทรน ที-2000 จะปลดปล่อยกลูโคส ไอโซมอลโทส และไอโซมอลโทเททราโอสออกมา แต่เมื่อนำไปย่อยเดกซ์แทรนที่ได้จาก *S. sobrinus* 6715 จะปลดปล่อยออกมาเพียงกลูโคส และไอโซมอลโทเททราโอส

ในการทดลองนี้ได้ศึกษาเดกซ์แทรนเนสจากจุลินทรีย์ทั้งในแบคทีเรีย *Arthrobacter* sp. AG-2 และรา *P. pinophilum* SMCU 3-14 ที่ชักนำการผลิตเดกซ์แทรนเนสด้วยเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม และเดกซ์แทรนที่ได้จาก *S. sobrinus* 6715 เพื่อศึกษาถึงความสามารถในการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ และการสลายคราบจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้น ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นเดกซ์แทรนชนิดที่ไม่ละลายน้ำ และเกิดขึ้นจาก *S. sobrinus* 6715 โดยในการศึกษาที่ผ่านมาส่วนใหญ่จะเป็นการศึกษาการทำงานของเดกซ์แทรนเนสที่ได้จากรา และยังไม่มีงานวิจัยใดที่ทำการชักนำการผลิตเดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียและราด้วยเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 และการศึกษาการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ และการสลายคราบจุลินทรีย์นั้นจำเป็นต้องทำในแบบจำลอง ที่ผ่านมาเคยมีการศึกษาบนแบบจำลองไว้พอสรุปได้ ดังนี้

Simonson และ Jackola (1979) ศึกษาผลของเดกซ์แทรนเนสจาก *Fusarium* และ *Penicillium* ที่ช่วยลดการยึดติดของ *S. mutans* บนเม็ดไฮดรอกซีอะพาไทท์ (hydroxyapatite beads)

Larrimore และคณะ (1983) ใช้ไมโครไตเตอร์เพลตเป็นแบบจำลองฟันในการศึกษาความสามารถในการยึดติดของ *S. mutans* สายพันธุ์กลายที่มีข้อบกพร่องในการยึดติด

Murchison และคณะ (1985) ศึกษาการยับยั้งการยึดติดของ *S. mutans* โดย *S. mutans* 6715 สายพันธุ์กลายซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไม่ยึดติด โดยใช้ไมโครไตเตอร์เพลท และหลอดแก้วเป็นแบบจำลองฟัน

Froeliger และ Five-Taylor (2001) ศึกษาความสามารถในการเกิดคราบจุลินทรีย์ของ *S. parasanguis* FW213 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดคราบจุลินทรีย์บนผิวฟัน โดยใช้ไมโครไตเตอร์เพลตเป็นแบบจำลองในการศึกษา

Igarashi (2004) ศึกษาการยึดติดบนพื้นเรียบของ *S. mutans* สายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์กลาย โดยใช้ไมโครไตเตอร์เพลตเป็นแบบจำลอง

Wiater และคณะ (2004) ใช้แผ่นแก้ว (glass plate) ในการศึกษาการย่อยสลายมิวแทน (โฮโมพอลิเมอร์ของกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคไซด์ α-1,3 เป็นส่วนใหญ่) และการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นจากแบคทีเรียในกลุ่ม Streptococci โดยใช้เอนไซม์ในกลุ่มของกลูคาเนสที่ผลิตได้จากรา

Yu และคณะ (2006) ได้ศึกษาถึงความสามารถของสารสกัดจาก *Asarum sieboldii* ในการลดความสามารถในการยึดติดของ *S. mutans* บนเม็ดไฮดรอกซีอะพาไทท์

โดยในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้ไมโครไตเตอร์เพลตชนิดพื้นเรียบ 96 หลุม (96-wells microtiter plate flat bottom) มาเป็นแบบจำลองพื้นเรียบในการทดสอบ เนื่องจากสามารถทำการทดสอบได้ง่าย รวดเร็ว การนำมาใช้งานไม่ยุ่งยาก มีค่าใช้จ่ายที่ไม่สูงมากนัก สามารถทำได้หลายชุดทดสอบในเพลตเดียว

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีทดลอง

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดทำความเย็น รุ่น 6500 บริษัท Kubota, Japan และรุ่น Avanti J-30I บริษัท Beckman Coulter, Germany
2. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (Digital pH meter) รุ่น SevenEasy บริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
3. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys บริษัท Spectronic Unicam, USA, รุ่น Gensys 20 บริษัท Thermo Spectronic, USA
4. เครื่องชั่งรุ่น PG 2002-S, รุ่น PB 3002 และรุ่น AG285 บริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
5. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น SS-325 และรุ่น ES-315 บริษัท Tomy Seiko, Ltd., Japan, รุ่น MLS 3020 บริษัท Sanyo Co., Ltd., Japan และรุ่น HV-25, บริษัท Hirayama, Co., Ltd., Japan
6. ตู้เขี่ยเชื้อ ISSCO รุ่น BV-124, บริษัท International Scientific Supply Co., Ltd., Thailand, รุ่น Clean, รุ่น V 3-4 บริษัท Triwork 2000 Co., Ltd., Thailand และ Bosstech รุ่น HVB 120S บริษัท Boss Scientific Associate L.P., Thailand
7. เครื่องเขย่า รุ่น Innova 2300 บริษัท New Brunwick Scientific Co., Inc., Edison, N.J., USA
8. ตู้แช่แข็งชนิดจุดเยือกแข็งต่ำ -20 °ซ บริษัท Sanyo Electric, Japan
9. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ -70 °ซ บริษัท Forma Scientific, USA
10. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น W 200 และรุ่น WB 22 บริษัท Memmert, Germany
11. เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ รุ่น N-100 บริษัท Eyela, Japan
12. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ รุ่น WB14 รุ่น W760 บริษัท Memmert Co., Ltd., Germany และชนิดที่ประกอบเข้ากับเครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ รุ่น digital water bath SB-1000 บริษัท Eyela, Japan
13. เครื่องทำความเย็น รุ่น CCA-110 บริษัท Eyela, Japan

14. เครื่องดูดอากาศ รุ่น A-3S บริษัท Eyela, Japan
15. ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) บริษัท Memmert, Germany
16. เครื่องผสมสาร (Vortex-Genie2) รุ่น G-560E บริษัท Scientific Industries Inc., USA
17. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงสำหรับไมโครไตเตอร์เพลต (Microplate reader) รุ่น EL_X 800 บริษัท Bio-Tek Instruments Inc., USA และรุ่น Multiskan MMC/340 บริษัท Titertek Instruments Inc., USA
18. เครื่องเขย่าสำหรับไมโครไตเตอร์เพลต (Microplate shaker) รุ่น PSU-2T บริษัท Biosan Ltd., Latvia
19. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง ชนิดอ่าง รุ่น Soronex RK 100 บริษัท Bandelin Electronic, Germany
20. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CH30RF200 บริษัท Olympus, Japan
21. ตู้อบความร้อน รุ่น UE 600 และรุ่น UL 80 บริษัท Memmert Co., Ltd., Germany
22. ไมโครปิเปตต์ ขนาด 200, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร บริษัท Gilson, France
23. ไมโครปิเปตต์ชนิด 8 หัวจ่าย ขนาด 200 ไมโครลิตร รุ่น BPE-200 บริษัท Labnet International Inc., USA
24. ไมโครไตเตอร์เพลตชนิด 96 หลุม พื้นเรียบ มีฝา (96-wells microtiter plate flat bottom with lid) Costar 3599 บริษัท Corning Inc., USA
25. ฮีมาไซโทมิเตอร์ บริษัท Schott Duran, Germany
26. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 บริษัท Whatman International Ltd., England

3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม (Dextran industrial grade) บริษัท Sigma Chemical Co., USA
2. เดกซ์แทรน ที-2000 (Dextran T-2000) บริษัท Amersham Biosciences, Sweden
3. เบรนฮาร์ทอินฟิวชัน (Brain Heart Infusion) บริษัท Difco Laboratories, USA
4. สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) บริษัท Labscan Asia, Co., Ltd., Ireland
5. พอลิเพบโตน (Polypeptone) บริษัท Difco Laboratories, USA
6. โบวีนซีรัมอัลบูมิน บริษัท Sigma Chemical Co., USA
7. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) บริษัท Merck, Germany
8. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) บริษัท Merck, Germany
9. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) บริษัท Merck, Germany
10. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) บริษัท Merck, Germany
11. เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) บริษัท Merck, Germany
12. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Carlo Erba Reagenti, Italy
13. โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) บริษัท Merck, Germany
14. โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$) บริษัท Carlo Erba Reagenti, Italy
15. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Merck, Germany
16. โซเดียมอะซิเตต (CH_3COONa) บริษัท Merck, Germany
17. โซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) บริษัท Merck, Germany
18. โซเดียมอาร์ซีเนต ($NaHAsO_4$) บริษัท Ajax Chemicals, Australia
19. โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4) บริษัท Merck, Germany
20. โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรตเตตระไฮเดรต ($C_4H_4KNaO_6.4H_2O$) บริษัท Merck, Germany
21. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตโดเดกขะไฮเดรต ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) บริษัท Merck, Germany
22. คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) บริษัท Merck, Germany
23. แอมโมเนียมโมลิบเดตเตตระไฮเดรต ($(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$) บริษัท Merck, Germany
24. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) บริษัท Merck, Germany
25. กรดอะซิติก (CH_3COOH) บริษัท Merck, Germany
26. สารละลายโฟลิน ฟีนอล รีเอเจนต์ (Folin phenol reagent) บริษัท Merck, Germany

27. คริสตัลไวโอเลต (Crystal violet) บริษัท Fluka, Japan
28. คลอเฮกซิดีน (Chlohexidine) C-20 บริษัท Osoth Laboratories Co., Ltd., Thailand
29. Tween-80 บริษัท Merck, Germany
30. กลีเซอรอล (Glycerol) บริษัท Merck, Germany

3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.3.1 การเลี้ยง และการเก็บจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.3.1.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.3.1.1.1 แบคทีเรีย *Streptococcus sobrinus* 6715 ได้รับจากรองศาสตราจารย์ ดร. รัชชพิน ศรีสัจจะลักษณ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากช่องปาก และมีความสามารถในการผลิตเดกซ์แทรน

3.3.1.1.2 แบคทีเรีย *Arthrobacter* sp. AG-2 คัดแยกมาจากดินในจังหวัดนนทบุรี โดยณฐินี สุวรรณสิงห์ (2540) เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเดกซ์แทรนเนส

3.3.1.1.3 รา *Penicillium pinophilum* SMCU 3-14 เป็นเชื้อที่สุวรรณา นพพรพันธ์ (2538) ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต และ N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) จาก *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 ที่คัดแยกได้จากดินโดยเอก แสงวิเชียร (2531) ซึ่งมีความสามารถในการผลิตเดกซ์แทรนเนส

3.3.1.2 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.3.1.2.1 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ในระยะสั้น

เขี่ยเชื้อ *S. sobrinus* 6715 ลงบนอาหารแข็งเอียง Brain Heart Infusion (BHI) (ภาคผนวก ก หมายเลข 1.3) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ ในภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบไม่เขย่า เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่แล้วให้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ จนกว่าจะนำมาใช้

เขี่ยเชื้อ *Arthrobacter* sp. AG-2 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียง Yamaguchi (ภาคผนวก ก หมายเลข 2.2) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง หรือจนกว่าเชื้อจะเจริญเต็มที่ เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่แล้วให้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ จนกว่าจะนำมาใช้

เขี่ยสปอร์ของรา *P. pinophilum* SMCU 3-14 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียงของ Fukumoto และคณะ (1971) ที่ปรับปรุงโดย เอก แสงวิเชียร (2531) (ภาคผนวก ก

หมายเลข 3.1) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จนสังเกตเห็นสปอร์ของราเจริญเต็มหน้าอาหาร จึงนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ จนกว่าจะนำมาใช้

3.3.1.2.2 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ในระยะยาว

เขี่ยเชื้อ *S. sobrinus* 6715 ลงในอาหารเหลว BHI (ภาคผนวก ก หมายเลข 1.1) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ ในภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบไม่เขย่า เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำมาละลายเซลล์กลับในอาหารเหลว BHI ที่มีกลีเซอรอลอยู่ 15% และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 °ซ

เขี่ยเชื้อ *Arthrobacter* sp. AG-2 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yamaguchi (ภาคผนวก ก หมายเลข 2.1) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำมาละลายเซลล์กลับในอาหารเหลว BHI ที่มีกลีเซอรอลอยู่ 15% และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 °ซ

เขี่ยสปอร์ของรา *P. pinophilum* SMCU 3-14 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียงของ Fukumoto และคณะ (1971) ที่ปรับปรุงโดย เอก แสงวิเชียร (2531) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่แล้วขูดสปอร์ของราให้แขวนลอยอยู่ในกลีเซอรอล 15% และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 °ซ

3.3.2 การเตรียมเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 (นันทิดา วานิชวงศ์วรรณ, 2545)

3.3.2.1 การเตรียมหัวเชื้อเพื่อการผลิตเดกซ์แทรน

ถ่ายเชื้อ *S. sobrinus* 6715 จากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียง BHI ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI ปริมาตร 50 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ ในภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบไม่เขย่า เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อ 10%โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ ในภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบไม่เขย่า จนวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรได้เท่ากับ 0.5-0.6 แล้วจึงนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อในการทดลองต่อไป

3.3.2.2 การผลิตเดกซ์แทรน

ถ่ายเชื้อจากข้อ 3.3.2.1 ปริมาณ 10%โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI ที่เสริมด้วยซูโครสความเข้มข้น 2% (ภาคผนวก ก หมายเลข 1.2) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ ในภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบไม่เขย่า เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้เดกซ์แทรนในน้ำเลี้ยงเชื้อของ *S. sobrinus* 6715

3.3.2.3 การทำบริสุทธิ์เดกซ์แทรนบางส่วน

นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากข้อ 3.3.2.2 มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำตะกอนเดกซ์แทรนที่ได้ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 เท่าโดยใช้เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (sonicator) เป็นเวลา 3 นาที เพื่อช่วยในการละลายและทำลายเซลล์แบคทีเรียที่ปนเปื้อนมากับเดกซ์แทรน นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำซ้ำทุกขั้นตอนอีก 2 ครั้ง แล้วนำตะกอนที่ได้มารวมกันแล้วนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งโดยใช้อุณหภูมิต่ำ (lyophilizer) จะได้ตะกอนเดกซ์แทรนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.3.3 การเตรียมเดกซ์แทรนเนสจากจุลินทรีย์

3.3.3.1 การเตรียมเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. AG-2 โดยใช้เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม และเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 เป็นสารชักนำ (นันทิดา วานิชวงศ์วรรณ, 2545)

3.3.3.1.1 การเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น

ถ่ายเชื้อ *Arthrobacter* sp. AG-2 จากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียง BHI (ภาคผนวก ก หมายเลข 1.3) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yamaguchi ปริมาตร 50 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. บ่มที่อุณหภูมิห้อง ให้อากาศโดยการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ซึ่งเชื้อจะเจริญอยู่ในระยะกึ่งกลางทวีคูณ (mid-log phase) ปั่นเหวี่ยงอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เก็บเกี่ยวและทำความสะอาดเซลล์โดยการล้างด้วยน้ำ

กลั่น 2 ครั้ง จากนั้นปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร ให้เท่ากับ 0.6-0.7 นำมาเป็นกล้าเชื้อในการทดลองต่อไป (สุหัทยา จิระนันทิพร, 2543)

3.3.3.1.2 การผลิตเดกซ์แทรนเนส α-1,6 จาก *Arthrobacter* sp. AG-2

นำเชื้อที่ได้จากข้อ 3.3.3.1.1 10 % โดยปริมาตร ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yamaguchi ซึ่งมีเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรมเป็นสารชักนำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง พร้อมให้อากาศโดยการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที และเก็บตัวอย่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เวลา 36-48 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเวลาที่มีการผลิตเดกซ์แทรนเนสสูงสุด นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสนำมาวิเคราะห์หาแอกทิวิตีและปริมาณโปรตีน คำนวณหาแอกทิวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนส

3.3.3.1.3 การผลิตเดกซ์แทรนเนส α-1,3 และ α-1,6 จาก *Arthrobacter* sp. AG-2

ดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 3.3.3.1.2 แต่ใช้เดกซ์แทรนที่ผลิตขึ้นจาก *S. sobrinus* 6715 ในข้อ 3.3.2.3 เป็นสารชักนำในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yamaguchi แทนเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม

3.3.3.2 การเตรียมเดกซ์แทรนเนสจาก *P. pinophilum* SMCU 3-14 โดยใช้เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม และเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 เป็นสารชักนำ

3.3.3.2.1 การเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น

เขี่ยสปอร์ของรา *P. pinophilum* SMCU 3-14 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียงของ Fukumoto และคณะ (1971) ที่ปรับปรุงโดย เอก แสงวิเชียร (2531) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เมื่อสปอร์เจริญเต็มที่แล้วเติมทวีน-80 ความเข้มข้น 0.1% ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อลงบนหน้าอาหาร แล้วใช้ลูปเขี่ยสปอร์ให้หลุดออกมาแขวนลอยในทวีน-80 นับสปอร์ให้อยู่ในช่วง $2x10^7$ สปอร์ต่อมล. โดยใช้ฮีมาไซโทมิเตอร์

3.3.3.2.2 การผลิตเดกซ์แทรนเนส α-1,6 จาก *P. pinophilum* SMCU 3-14 (อนันตพงษ์ สุขเกษ, 2543)

ถ่ายสปอร์แขวนลอยที่ได้จากข้อ 3.3.3.2.1 ปริมาตร 1 มล. ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวของ Fukumoto และคณะ (1971) ที่ปรับปรุงโดยศิโรจน์ ศรีสรากรณ์ (2547) (ภาคผนวก ก หมายเลข 3.2) ซึ่งมีเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรมเป็นสารชักนำ ปริมาตร 50 มล. ที่บรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. บ่มด้วยเครื่องเขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน จากนั้นนำมาแยกสปอร์และเส้นใยออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แล้วนำส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์หาแอกทิวิตีและปริมาณโปรตีนคำนวณหาแอกทิวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนส

3.3.3.2.3 การผลิตเดกซ์แทรนเนส α-1,3 และ α-1,6 จาก *P. pinophilum* SMCU 3-14

ดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 3.3.3.2.2 แต่ใช้เดกซ์แทรนที่ผลิตขึ้นจาก *S. sobrinus* 6715 ในข้อ 3.3.2.3 เป็นสารชักนำในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวของ Fukumoto และคณะ (1971) ที่ปรับปรุงโดยศิโรจน์ ศรีสรากรณ์ (2547) แทนเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม

ต่อไปเพื่อความสะดวกในการเรียกชื่อเอนไซม์จึงขอเรียก

เดกซ์แทรนเนส BI แทน เดกซ์แทรนเนส α-1,6 จาก *Arthrobacter* sp. AG-2 ที่ถูกชักนำด้วยเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม (dextran industrial grade)

เดกซ์แทรนเนส BB แทน เดกซ์แทรนเนส α-1,3 และ α-1,6 จาก *Arthrobacter* sp. AG-2 ที่ถูกชักนำด้วยเดกซ์แทรนจากแบคทีเรีย *S. sobrinus* 6715

เดกซ์แทรนเนส FI แทน เดกซ์แทรนเนส α-1,6 จาก *P. pinophilum* SMCU 3-14 ที่ถูกชักนำด้วยเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม

เดกซ์แทรนเนส FB แทน เดกซ์แทรนเนส α-1,3 และ α-1,6 จาก *P. pinophilum* SMCU 3-14 ที่ถูกชักนำด้วยเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715

3.3.4 การตรวจสอบแอกทิวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนส

3.3.4.1 การตรวจสอบแอกทิวิตีของเดกซ์แทรนเนส

แอกทิวิตีของเดกซ์แทรนเนสในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสามารถตรวจสอบได้ตามวิธีของ Fukumoto และคณะ (1971)

สารผสมของปฏิกิริยาในการวิเคราะห์แอกทิวิตีของเดกซ์แทรนเนส BI และ BB ประกอบด้วย

สารละลายเดกซ์แทรน ที-2000 ความเข้มข้น 0.625% โดยน้ำหนัก ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.0 ปริมาตร 0.4 มล.

โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.0 ปริมาตร 0.5 มล.

เดกซ์แทรนเนสที่ความเจือจางที่เหมาะสม 0.1 มล.

ส่วนสารผสมของปฏิกิริยาในการวิเคราะห์แอกทิวิตีของเดกซ์แทรนเนส FI และ FB ประกอบด้วย

สารละลายเดกซ์แทรน ที-2000 ความเข้มข้น 0.625% โดยน้ำหนัก ในโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.5 ปริมาตร 0.4 มล.

โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.5 ปริมาตร 0.5 มล.

เดกซ์แทรนเนสที่ความเจือจางที่เหมาะสม 0.1 มล.

นำสารผสมของปฏิกิริยาไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 °ซ เก็บตัวอย่างที่ 0 และ 15 นาที นำตัวอย่างที่ได้ไปหยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แล้วทำให้เย็นลง จากนั้นนำไปวิเคราห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกปลดปล่อยออกมาด้วยวิธีของ Somogyi-Nelson (Somogyi, 1952)

1 หน่วยของเดกซ์แทรนเนส คือ ปริมาณเอนไซม์ที่สลายเดกซ์แทรน ที-2000 แล้วปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่ากับน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้ภาวะที่ทดสอบ

3.3.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีของ Somogyi-Nelson (Somogyi, 1952)

นำสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 1 มล. มาเติมสารละลายแอลคาไลน์คอปเปอร์ (Alkaline copper reagent) (ภาคผนวก ข หมายเลข 1.1) ปริมาตร 1 มล. ผสมให้เข้ากันนำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที แล้วทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว จากนั้นเติมสารละลายเนลสัน (Nelson's reagent) (ภาคผนวก ข หมายเลข 1.2) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เติมน้ำกลั่น 5 มล. ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร เพื่อดูปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

เปรียบเทียบค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ได้จากกราฟมาตรฐานของกลูโคสที่ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมล. (ภาคผนวก ค หมายเลข 1)

3.3.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry (Lowry, 1951)

นำสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ในความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 1 มล.มาเติมสารละลายผสม Lowry C (ภาคผนวก ข หมายเลข 2.3) ปริมาณ 5 มล. ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จึงเติมสารละลาย Lowry D (ภาคผนวก ข หมายเลข 2.4) ปริมาตร 0.5 มล. ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

เปรียบเทียบค่าปริมาณโปรตีนได้จากกราฟมาตรฐานของโบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin) ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 2)

3.3.5 เวลาในการก่อคราบจุลินทรีย์บนไมโครไตเตอร์เพลตที่ใช้เป็นแบบจำลองพื้นเรียบ โดย *S. sobrinus* 6715

3.3.5.1 การเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น

ถ่ายเชื้อจากข้อ 3.3.2.1 ปริมาณ 10% โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ ในภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบไม่เขย่า เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลาแล้วให้เทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งเพื่อเก็บเกี่ยวเซลล์ที่ก้นฟลาสก์ และนำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

BHI ที่เสริมด้วยน้ำตาลซูโครส 2% โดยน้ำหนัก มาละลายเซลล์กลับให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรเท่ากับ 0.1

3.3.5.2 เวลาที่เหมาะสมในการก่อคราบจุลินทรีย์บนไมโครไตเตอร์เพลต โดย *S. sobrinus* 6715

นำเชื้อที่ได้จากข้อ 3.3.5.1 เติมลงในไมโครไตเตอร์เพลต (96-well polystyrene microtiter plate) หลุมละ 160 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 40 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ ในภาวะที่มีออกซิเจนต่ำที่เวลาต่างๆ เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเกิดคราบจุลินทรีย์ จากนั้นนำไปตรวจสอบการเกิดคราบจุลินทรีย์ตามวิธีในข้อ 3.3.8

3.3.6 ภาวะที่เหมาะสมในการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์บนไมโครไตเตอร์เพลต

3.3.6.1 ศึกษาเวลาที่ใช้ในการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์

แบ่งชุดการทดลองออกเป็น 6 ชุด แต่ละชุดจะเติมเชื้อที่ได้จากข้อ 3.3.5.1 160 ไมโครลิตร และสารทดสอบอีก 40 ไมโครลิตร โดยแต่ละชุดจะใช้สารทดสอบที่แตกต่างกันไปดังนี้

ชุดที่ 1 เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อเพื่อเป็นชุดควบคุม

ชุดที่ 2 เติมคลอเฮ็กซิดีน (Chlorhexidine) เพื่อเป็นชุดควบคุมผลบวก

ชุดที่ 3 เติมเดกซ์แทรนเนส BI จากข้อ 3.3.3.1.2 ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของเดกซ์แทรนเนสเป็น 1 หน่วยต่อมล.

ชุดที่ 4 เติมเดกซ์แทรนเนส BB จากข้อ 3.3.3.1.3 ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของเดกซ์แทรนเนสเป็น 1 หน่วยต่อมล.

ชุดที่ 5 เติมเดกซ์แทรนเนส FI จากข้อ 3.3.3.2.2 ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของเดกซ์แทรนเนสเป็น 1 หน่วยต่อมล.

ชุดที่ 6 เติมเดกซ์แทรนเนส FB จากข้อ 3.3.3.2.3 ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของเดกซ์แทรนเนสเป็น 1 หน่วยต่อมล.

ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และมีชุดควบคุมของแต่ละชุดการทดลองโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI ที่เสริมด้วยน้ำตาลซูโครส 2% โดยน้ำหนัก เช่นเดียวกับที่ใช้ในการ

เตรียมเชื้อข้อ 3.3.5.1 แทนเชื้อที่ได้จากข้อ 3.3.5.1 โดยทำ 3 ซ้ำเช่นกัน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ ในภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ แปรผันเวลาที่ใช้ในการบ่มตั้งแต่ 3 4 5 6 และ 7 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจสอบการเกิดคราบจุลินทรีย์ตามวิธีในข้อ 3.3.8

3.3.6.2 ศึกษาการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์โดยเดกซ์แทรนเนส BI และ FI

3.3.6.2.1 การป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์โดยเดกซ์แทรนเนส BI

เติมเชื้อที่ได้จากข้อ 3.3.5.1 160 ไมโครลิตร และสารทดสอบอีก 40 ไมโครลิตร โดยจะแบ่งออกเป็น

ชุดที่ 1 เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อเพื่อเป็นชุดควบคุม

ชุดที่ 2 เติมคลอเฮ็กซิดีนเพื่อเป็นชุดควบคุมผลบวก

ชุดที่ 3 เติมเดกซ์แทรนเนส BI ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของเดกซ์แทรนเนสเป็น 1 หน่วยต่อมล.

ชุดที่ 4 ทำเช่นเดียวกับชุดที่ 3 แต่ให้เติมเดกซ์แทรนเนส BI เพิ่มเข้าไปอีก 0.5 หน่วยต่อมล.

ชุดที่ 5 ทำเช่นเดียวกับชุดที่ 3 และเมื่อบ่มครบ 5 ชั่วโมงแล้วให้เติมเดกซ์แทรนเนส BI เพิ่มเข้าไปอีก 0.5 หน่วยต่อมล.

ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และมีชุดควบคุมของแต่ละชุดการทดลองโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI ที่เสริมด้วยน้ำตาลซูโครส 2% โดยน้ำหนัก เช่นเดียวกับที่ใช้ในการเตรียมเชื้อข้อ 3.3.5.1 แทนเชื้อที่ได้จากข้อ 3.3.5.1 โดยทำ 3 ซ้ำเช่นกัน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ ในภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ แปรผันเวลาที่ใช้ในการบ่มตั้งแต่ 3 4 5 6 และ 7 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจสอบการเกิดคราบจุลินทรีย์ตามวิธีในข้อ 3.3.8

3.3.6.2.2 การป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์โดยเดกซ์แทรนเนส FI

ทำเช่นเดียวกับข้อ 3.3.6.2.1 แต่เปลี่ยนเดกซ์แทรนเนสที่ใช้ทดสอบจากเดกซ์แทรนเนส BI เป็นเดกซ์แทรนเนส FI

3.3.6.3 ศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างที่ใช้ในการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.3.6.1 แต่แปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI ที่เสริมด้วยน้ำตาลซูโครส 2% โดยน้ำหนัก ที่ 4.0 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 7.0 7.5 และ 8.0 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ ในภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ บ่มเป็นเวลา 5 และ 7 ชั่วโมง จึงนำไปตรวจสอบการเกิดคราบจุลินทรีย์ตามวิธีในข้อ 3.3.8

3.3.6.4 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่คัดเลือกแล้ว

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.3.6.1 แต่นำผลของค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI ที่เสริมด้วยน้ำตาลซูโครส 2% โดยน้ำหนัก ที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.6.3 มาใช้ในการทดสอบ โดยแปรผันเวลาที่ใช้ในการบ่มที่ 0 15 30 60 120 180 240 และ 300 นาที

3.3.6.5 ศึกษาปริมาณความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนส BI และ FI ที่เหมาะสมในการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.3.6.1 โดยทำเฉพาะชุดการทดลองที่ 1 2 3 และ 5 เท่านั้น แต่จะทำการแปรผันปริมาณความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนสที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 2 3 4 และ 5 หน่วยต่อมล.

3.3.7 ภาวะที่เหมาะสมในการสลายคราบจุลินทรีย์บนไมโครไตเตอร์เพลต

3.3.7.1 เปรียบเทียบการสลายคราบจุลินทรีย์โดยเดกซ์แทรนเนสในระบบของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI ที่เสริมด้วยน้ำตาลซูโครส 2% โดยน้ำหนัก และในระบบบัฟเฟอร์ที่เวลาต่างๆ

เลี้ยงเชื้อ *S. sobrinus* 6715 เพื่อให้เกิดคราบจุลินทรีย์บนไมโครไตเตอร์เพลต ตามวิธีในข้อ 3.3.5.2 โดยเลือกใช้เวลาในการเกิดคราบจุลินทรีย์ที่เหมาะสม จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI ที่เสริมด้วยน้ำตาลซูโครส 2% โดยน้ำหนัก หรือบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของ

เดกซ์แทรนเนส160 ไมโครลิตร และสารทดสอบ 40 ไมโครลิตร โดยจะใช้สารทดสอบที่แตกต่างกันไป ดังนี้

ชุดที่ 1 เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อเพื่อเป็นชุดควบคุม

ชุดที่ 2 เติมคลอเฮ็กซิดีนเพื่อเป็นชุดควบคุมผลบวก

ชุดที่ 3 เติมเดกซ์แทรนเนส BI ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของเดกซ์แทรนเนสเป็น 1 หน่วยต่อมล.

ชุดที่ 4 เติมเดกซ์แทรนเนส BB ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของเดกซ์แทรนเนสเป็น 1 หน่วยต่อมล.

ชุดที่ 5 เติมเดกซ์แทรนเนส FI ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของเดกซ์แทรนเนสเป็น 1 หน่วยต่อมล.

ชุดที่ 6 เติมเดกซ์แทรนเนส FB ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของเดกซ์แทรนเนสเป็น 1 หน่วยต่อมล.

สำหรับในระบบบัฟเฟอร์ เดกซ์แทรนเนส BI และ BB ใช้โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ส่วนเดกซ์แทรนเนส FI และ FB ใช้โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.5

ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และมีชุดควบคุมของแต่ละชุดการทดลองโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI ที่เสริมด้วยน้ำตาลซูโครส 2% โดยน้ำหนัก เช่นเดียวกับที่ใช้ในการเตรียมเชื้อข้อ 3.3.5.1 หรือบัฟเฟอร์แทนเชื้อที่ได้จากข้อ 3.3.5.1 โดยทำ 3 ซ้ำเช่นกัน จากนั้นนำไปวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง แปรผันเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาตั้งแต่ 0 5 10 15 20 25 30 นาที จากนั้นนำไปตรวจสอบการเกิดคราบจุลินทรีย์ตามวิธีในข้อ 3.3.8

3.3.7.2 เปรียบเทียบการสลายคราบจุลินทรีย์โดยเดกซ์แทรนเนส FI และ FB ที่อุณหภูมิ 37 °ซ และอุณหภูมิห้อง

เลือกระบบที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนสจากข้อ 3.3.7.1 แล้วนำมาทดสอบการทำงานของเดกซ์แทรนเนสที่อุณหภูมิ 37 °ซ และอุณหภูมิห้อง โดยเลือกทดสอบกับเดกซ์แทรนเนส FI และ FB

3.3.7.3 ศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างที่ใช้ในการสลายคราบจุลินทรีย์

คัดเลือกระบบการทำงานและอุณหภูมิในการทำงานของเดกซ์แทรนเนสที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.7.1 และ 3.3.7.2 ตามลำดับ แล้วนำมาศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างที่ใช้ในการสลายคราบจุลินทรีย์ โดยแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 4.0 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 7.0 7.5 และ 8.0 โดยใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสม

ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 4.0-6.0 ใช้โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์

ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.0-8.0 ใช้โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์

3.3.7.4 ศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการสลายคราบจุลินทรีย์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.3.7.3 โดยเลือกใช้ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมมาทำการทดสอบ โดยแปรผันเวลาที่ใช้ในการสลายคราบจุลินทรีย์ที่ 0 15 30 60 120 และ 180 นาที

3.3.7.5 ศึกษาปริมาณความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนส BI และ FI ที่เหมาะสมในการสลายคราบจุลินทรีย์

เลือกใช้ผลของการทำปฏิกิริยาที่ดีที่สุดจากข้อ 3.3.7.4 และทำการทดสอบปริมาณความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนส BI และ FI ที่เหมาะสม โดยแปรผันปริมาณความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนส BI และ FI ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 2 3 4 และ 5 หน่วยต่อมล.

3.3.7.6 ศึกษาประสิทธิภาพในการสลายคราบจุลินทรีย์ โดยเดกซ์แทรนเนส BB ร่วมกับเดกซ์แทรนเนส FI

เลี้ยงเชื้อ *S. sobrinus* 6715 เพื่อให้เกิดคราบจุลินทรีย์บนไมโครไตเตอร์เพลตตามวิธีในข้อ 3.3.5.2 โดยเลือกใช้เวลาในการเกิดคราบจุลินทรีย์ที่เหมาะสม จากนั้นให้เทอาหาร

เลี้ยงเชื้อทิ้งแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วจึงเติมโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ลงไป 160 ไมโครลิตร และสารทดสอบ 40 ไมโครลิตร โดยสารทดสอบในแต่ละชุดจะแตกต่างกันไป ดังนี้

ชุดที่ 1 เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อเพื่อเป็นชุดควบคุม

ชุดที่ 2 เติมคลอเฮ็กซิดีนเพื่อเป็นชุดควบคุมผลบวก

ชุดที่ 3 เติมเดกซ์แทรนเนส BB ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของเดกซ์แทรนเนสเป็น 1 หน่วยต่อมล.

ชุดที่ 4 เติมเดกซ์แทรนเนส FI ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของเดกซ์แทรนเนสเป็น 1 หน่วยต่อมล.

ชุดที่ 5 เติมเดกซ์แทรนเนส BB ร่วมกับเดกซ์แทรนเนส FI ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของเดกซ์แทรนเนสแต่ละชนิดเป็น 1 หน่วยต่อมล.

ชุดที่ 6 เติมเดกซ์แทรนเนส FI ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของเดกซ์แทรนเนสเป็น 1 หน่วยต่อมล. จากนั้นเมื่อทิ้งให้ทำปฏิกิริยาครบ 60 นาทีแล้วให้เติมเดกซ์แทรนเนส BB เข้าไปอีก 1 หน่วยต่อมล.

ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และมีชุดควบคุมของแต่ละชุดการทดลองโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI ที่เสริมด้วยน้ำตาลซูโครส 2% โดยน้ำหนัก เช่นเดียวกับที่ใช้ในการเตรียมเชื้อข้อ 3.3.5.1 แทนเชื้อที่ได้จากข้อ 3.3.5.1 โดยทำ 3 ซ้ำเช่นกัน นำไปวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 120 นาที จากนั้นนำไปตรวจสอบการเกิดคราบจุลินทรีย์ตามวิธีในข้อ 3.3.8

3.3.8 การตรวจสอบคราบจุลินทรีย์ (ดัดแปลงจาก Froeliger และ Five-Taylor, 2001; O'Toole และ Kolter, 1998)

นำไมโครไตเตอร์เพลตที่ต้องการตรวจสอบมาเทอาหารเลี้ยงเชื้อหรือบัฟเฟอร์ทิ้ง นำไมโครไตเตอร์เพลตไปล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ทิ้งไว้ให้แห้ง เติมสารละลายคริสตัลไวโอเลต 0.02% โดยน้ำหนัก 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้นาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นเติมกรดอะซิติก 30% โดยปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปวางบนเครื่องเขย่าสำหรับไมโครไตเตอร์เพลต (Microplate shaker) นาน 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540

นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงสำหรับไมโครไตเตอร์เพลต (Microplate reader) โดยค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้นั้นจะแปรผันตรงกับปริมาณเดกซ์แทรน

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 เดกซ์แทรนจาก *Streptococcus sobrinus* 6715

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *S. sobrinus* 6715 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI ที่เสริมด้วยน้ำตาลซูโครส 2% โดยน้ำหนักเพื่อเป็นสารชักนำในการผลิตเดกซ์แทรน หลังการบ่ม 24 ชั่วโมง พบว่า ที่ก้นฟลาสก์มีเดกซ์แทรน และเซลล์ของ *S. sobrinus* 6715 ติดอยู่ มีลักษณะเป็นแผ่นฟิล์มสีขาวเคลือบติดแน่นอยู่ที่ก้นฟลาสก์ หลังการเก็บเกี่ยวและทำบริสุทธิ์ตามวิธีในข้อ 3.3.2.3 แล้วจะได้เดกซ์แทรนที่มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีขาว ดังแสดงในรูปที่ 4.1

รูปที่ 4.1 ลักษณะของเดกซ์แทรนที่ผลิตได้จาก *S. sobrinus* 6715

4.2 เดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. AG-2 และ *Penicillium pinophilum* SMCU 3-14 ที่ชักนำด้วยเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม และเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715

เดกซ์แทรนเนสจากจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองนี้ได้มาจากแบคทีเรีย *Arthrobacter* sp. AG-2 และรา *P. pinophilum* SMCU 3-14 ที่ถูกชักนำด้วยเดกซ์แทรน 2 ชนิด คือ เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรมซึ่งมีพันธะ α-1,6 ในปริมาณสูง ทำให้ได้เดกซ์แทรนเนสที่มีความจำเพาะต่อพันธะ α-1,6 หรือเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ซึ่งมีพันธะ α-1,3 และ α-1,6 ทำให้ได้เดกซ์แทรนเนสที่มีความจำเพาะต่อพันธะ α-1,3 และ α-1,6 เปรียบเทียบแอกทิวิตีของเดกซ์แทรนเนสจากทั้ง 2 แหล่งที่ใช้เดกซ์แทรนที่ต่างกันเป็นสารชักนำตามวิธีในข้อ 3.3.4.1 และวิเคราะห์หาปริมาณ

โปรตีน เพื่อคำนวณหาแอกทิวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนส จากผลการวิเคราะห์แอกทิวิตีของเดกซ์แทรนเนส พบว่า เดกซ์แทรนเนสที่ผลิตจาก *P. pinophilum* SMCU 3-14 จะมีแอกทิวิตีมากกว่าเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตจาก *Arthrobacter* sp. AG-2 ไม่ว่าจะถูกชักนำด้วยเดกซ์แทรนชนิดใดก็ตาม ในอีกแง่หนึ่ง พบว่า เดกซ์แทรนเนสที่ถูกชักนำด้วยเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรมจะมีแอกทิวิตีมากกว่าเดกซ์แทรนเนสที่ถูกชักนำด้วยเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ไม่ว่าเดกซ์แทรนเนสนั้นจะผลิตขึ้นจากเชื้อใดเช่นกัน ผลการวิเคราะห์แอกทิวิตี ปริมาณโปรตีน และแอกทิวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนสแสดงในตารางที่ 4.1

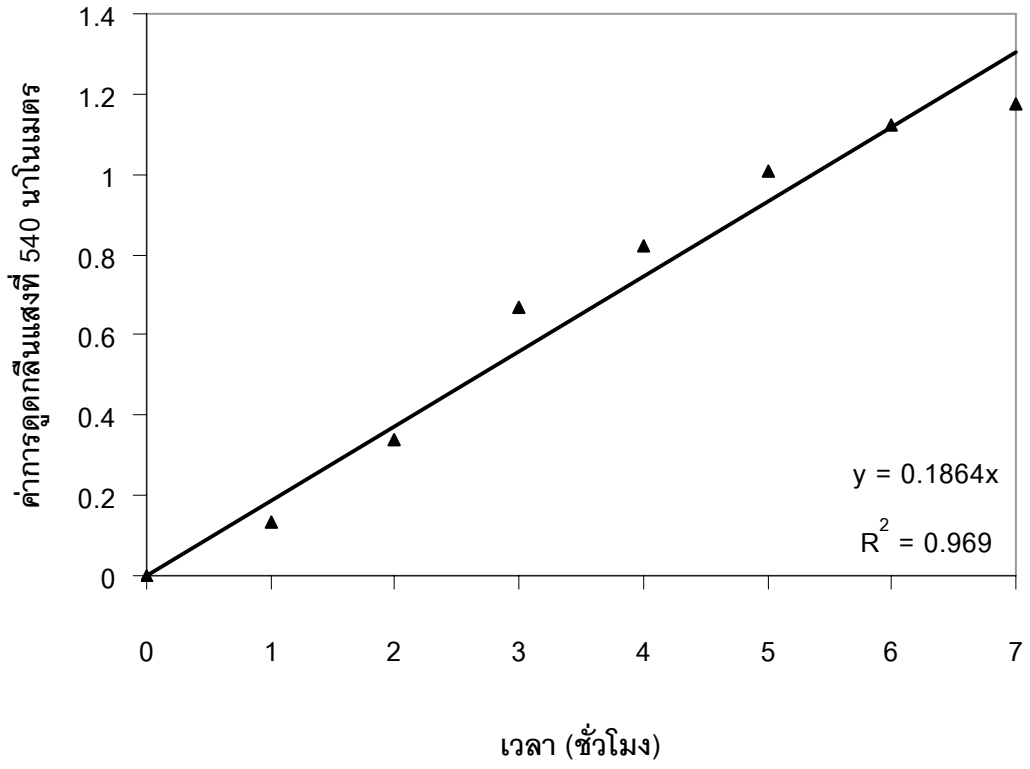
ตารางที่ 4.1 เปรียบเทียบแอกทิวิตี ปริมาณโปรตีน และแอกทิวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนส

แหล่งของเดกซ์แทรนเนส และชนิดของสารชักนำ	**แอกทิวิตี (หน่วยต่อมล.)**	**ปริมาณโปรตีน (มก.ต่อมล.)**	**แอกทิวิตีจำเพาะ (หน่วยต่อมก.โปรตีน)**
Arthrobacter sp. AG-2			
เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม	4.42	2.69	1.64
เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715	0.40	1.54	0.26
P. pinophilum SMCU 3-14			
เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม	1,105.30	5.01	220.71
เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715	779.96	4.85	160.88

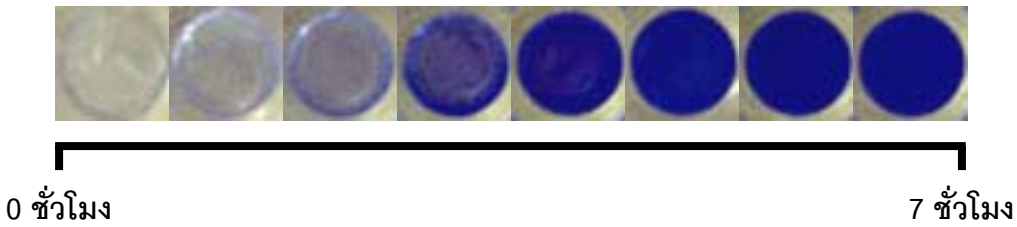
หมายเหตุ ในการวัดแอกทิวิตีของเดกซ์แทรนเนสนั้นจะใช้เดกซ์แทรน ที-2000 เป็นสับสเตรตซึ่งมีพันธะ α-1,6 สูง

4.3 เวลาการก่อคราบจุลินทรีย์บนไมโครไตเตอร์เพลตที่ใช้เป็นแบบจำลองพื้นเรียบ

การเกิดคราบจุลินทรีย์ของ *S. sobrinus* 6715 บนไมโครไตเตอร์เพลตที่ใช้เป็นแบบจำลองพื้นเรียบต่อเวลาการบ่ม โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI ที่เสริมด้วยน้ำตาลซูโครส 2% โดยน้ำหนัก แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ ในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน เชื้อเริ่มต้นมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรเท่ากับ 0.1 หรือเท่ากับ 3.02×10^8 เซลล์ต่อมล. พบว่า *S. sobrinus* 6715 จะก่อให้เกิดคราบจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นตามเวลาที่เพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.2 และรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดคราบจุลินทรีย์บนไมโครไตเตอร์เพลตของ *S. sobrinus* 6715 กับเวลา



รูปที่ 4.3 ลักษณะคราบจุลินทรีย์ของ *S. sobrinus* 6715 ที่เวลาต่างๆ บนไมโครไตเตอร์เพลต เมื่อย้อมด้วยคริสตัลไวโอเลต 0.02% โดยน้ำหนัก

นอกจากนี้ยังพบว่า หากเกิดคราบจุลินทรีย์มากเกินไปบนผิวของหลุมไมโครไตเตอร์เพลตแล้วจะเกิดการหลุดลอก ส่งผลให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่แปรผันไป และไม่น่าเชื่อถือได้ ดังนั้นในการทดลองต่อไปเวลาที่ใช้ในการบ่มให้เกิดคราบจุลินทรีย์บนไมโครไตเตอร์เพลตจะใช้ไม่เกิน 7 ชั่วโมง เนื่องจากช่วงเวลาที่ 0-7 ชั่วโมงเป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมที่สุดที่ไม่มีการหลุดออกของคราบจุลินทรีย์

ในการศึกษาต่อไปจะศึกษาการนำเดกซ์แทรนเนสไปใช้ใน 2 ลักษณะ คือ การป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ เพื่อเป็นประโยชน์ในการนำเดกซ์แทรนเนสไปใช้ในช่องปาก และการสลายคราบจุลินทรีย์ เพื่อเป็นประโยชน์ระบบจำลองการใช้เดกซ์แทรนเนสนอกช่องปาก เช่น นำไปใช้กับอุปกรณ์ที่ใช้กับช่องปาก หรืออุปกรณ์ทางทันตกรรม เป็นต้น โดยแต่ละระบบนั้น จะศึกษาบนพื้นฐานความเป็นไปได้ในการนำไปใช้ในภาวะจริง

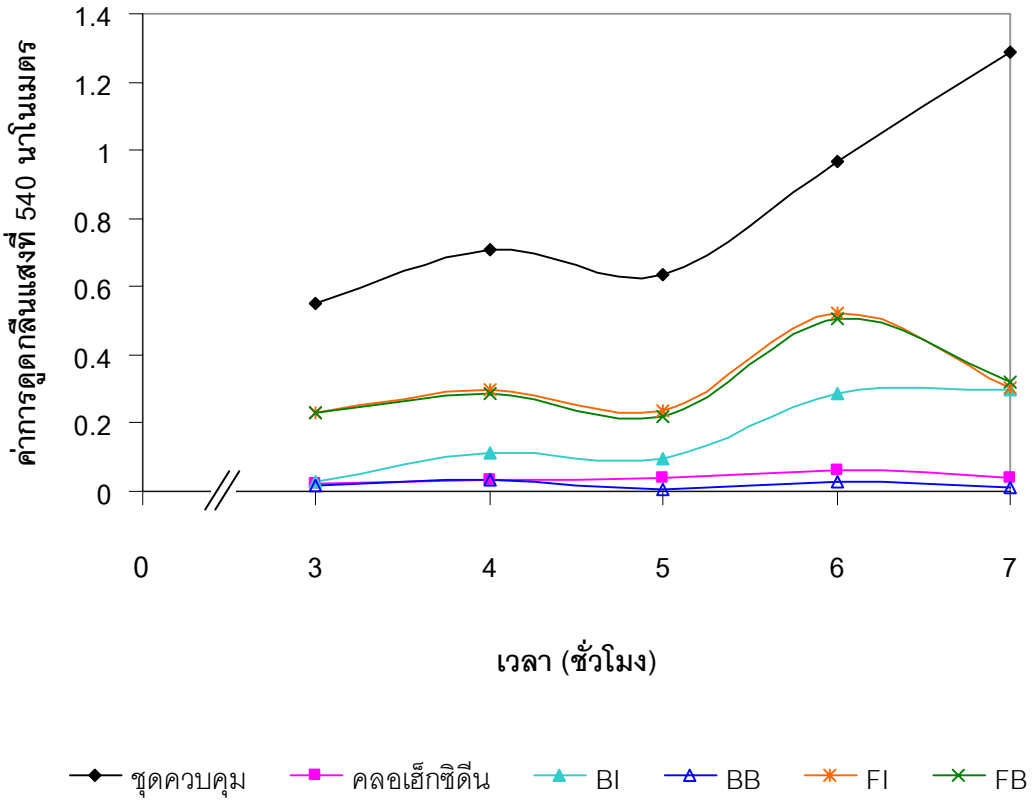
4.4 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์

ศึกษาภาวะในการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ โดยการเติมเดกซ์แทรนเนสจากจุลินทรีย์ลงในชุดการทดลองเปรียบเทียบกับชุดควบคุมผลบวกที่ใช้คลอเฮ็กซิดีน (chlorhexidine) เป็นสารทดสอบ มีรายงานไว้ว่า คลอเฮ็กซิดีนเป็นยาต้านแบคทีเรียที่ให้ผลดีที่สุดซึ่งสามารถต้านการเกิดคราบจุลินทรีย์ หรือโรคเหงือกอักเสบได้ (Wolinsky และ Hume,1985; Featherstone, 2000) และสามารถต้านแบคทีเรียในกลุ่ม mutan streptococci ได้ด้วย (Emilson, 1994) โดยในการศึกษานี้จะทำขึ้นบนพื้นฐานความเป็นจริงที่จะนำไปประยุกต์ใช้ได้ในช่องปาก

4.4.1 เวลาที่เหมาะสมในการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์

จากการแปรผันเวลาที่ใช้ในการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ โดยเลี้ยงเชื้อ *S. sobrinus* 6715 ร่วมกับเดกซ์แทรนเนส BI BB FI และ FB ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 หน่วยต่อมล. บ่มที่ 37 °ซ ในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน เป็นเวลา 3 4 5 6 และ 7 ชั่วโมง

เมื่อพิจารณาจากรูปที่ 4.4 พบว่า เดกซ์แทรนเนส BB มีประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์สูงที่สุด โดยสามารถลดปริมาณการเกิดคราบจุลินทรีย์ลงได้ถึง 96.92% ที่ชั่วโมงที่ 3 และ 99.14% ที่ชั่วโมงที่ 7 เมื่อเทียบการเกิดคราบจุลินทรีย์ในชุดควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็น 100% และให้ผลดีเทียบเท่ากับคลอเฮ็กซิดีน รองลงมาคือ เดกซ์แทรนเนส BI ส่วนเดกซ์แทรนเนส FI และ FB นั้นมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน



รูปที่ 4.4 การป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ในช่องปากที่เวลาต่างๆ ด้วยเดกซ์แทรนเนสจากจุลินทรีย์

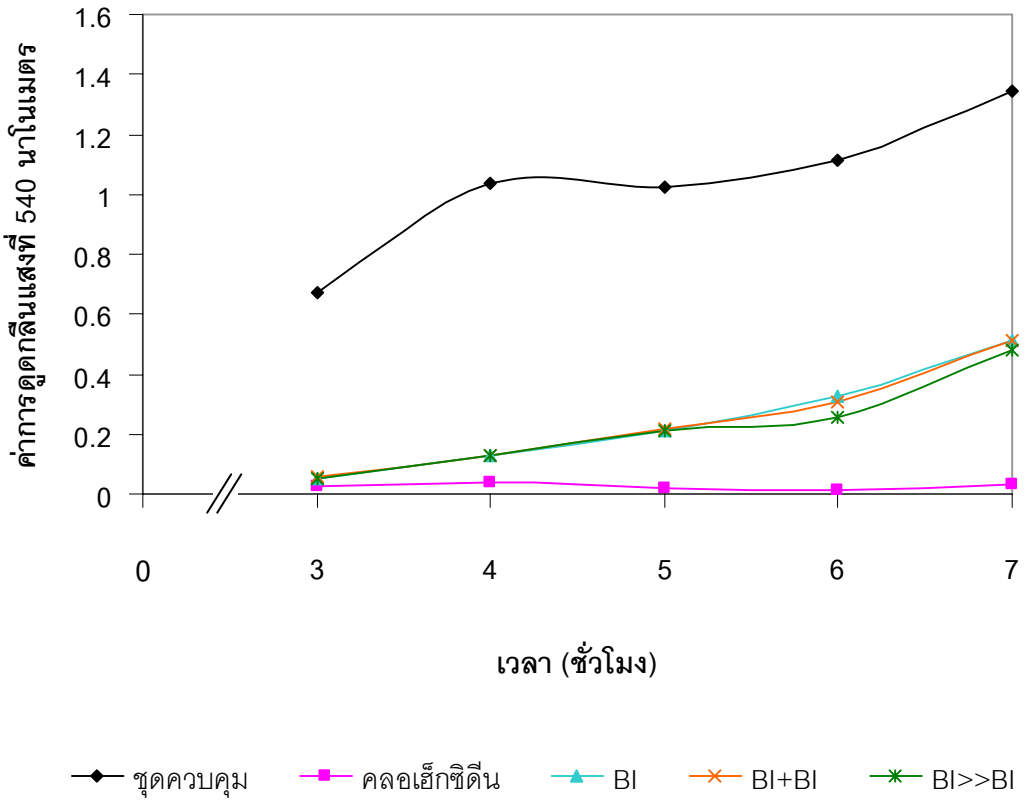
4.4.2 การป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์โดยเดกซ์แทรนเนส BI และ FI

จากผลการศึกษาถึงเวลาที่เหมาะสมในการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ในข้อ 4.4.1 นั้นจะเห็นได้ว่าเดกซ์แทรนเนสยังคงมีประสิทธิภาพเมื่อเวลาผ่านไปถึง 7 ชั่วโมง แต่ประสิทธิภาพในการทำงานอาจจะคงที่หรือลดลงเล็กน้อย จากเหตุผลดังกล่าวทำให้สนใจที่จะศึกษารูปแบบการสลายของคราบจุลินทรีย์ โดยเลือกเดกซ์แทรนเนส BI และ FI เป็นตัวแทนในการศึกษา เนื่องจากเดกซ์แทรนเนส BB และ FB มีต้นทุนในการผลิตที่สูง ทำการทดลองเช่นเดียวกัน แต่เมื่อเวลาผ่านไป 5 ชั่วโมง จะเติมเดกซ์แทรนเนสเพิ่มเข้าไปอีก 0.5 หน่วยต่อมล. แล้วบ่มต่อจนครบ 7 ชั่วโมง

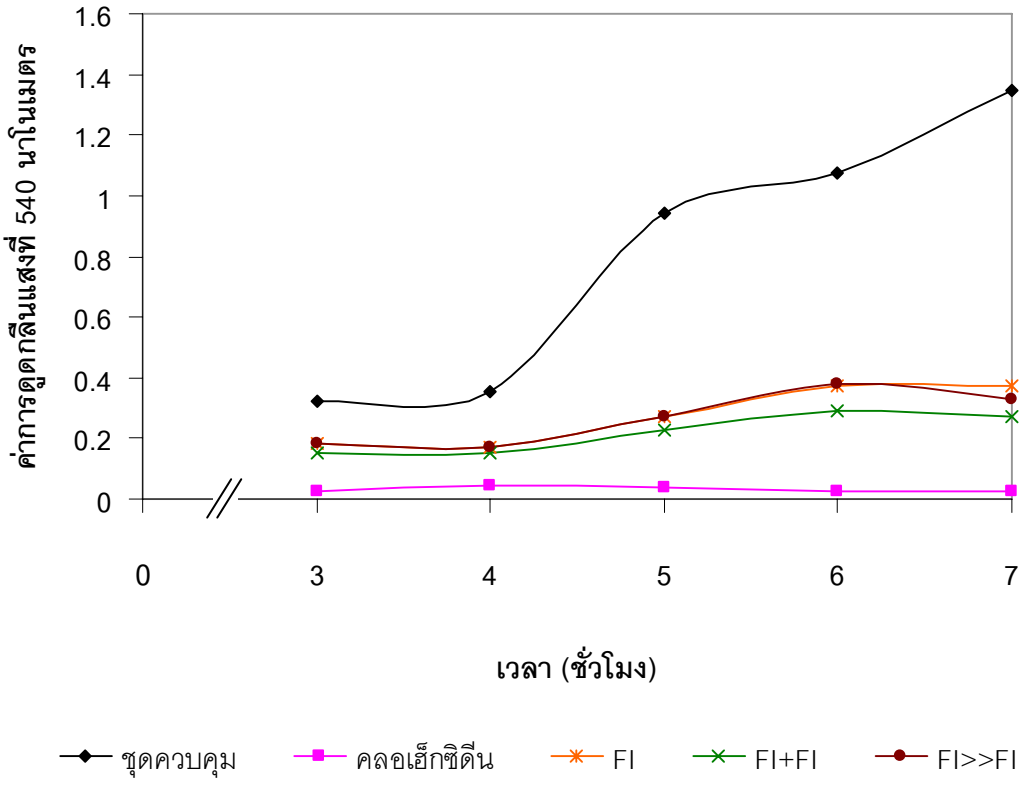
รูปที่ 4.5 แสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ของเดกซ์แทรนเนส BI แม้เวลาผ่านไปถึง 7 ชั่วโมงก็ยังคงสามารถป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ได้ดีที่ปริมาณความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมล. เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนส BI ขึ้นอีก 0.5 หน่วยต่อมล. (BI+BI) ความสามารถในการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์จะเพิ่มขึ้นเล็กน้อย และเมื่อ

การสลายเริ่มคงที่จึงทดลองเพิ่มความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนส BI เข้าไปที่ชั่วโมงที่ 5 (BI>>BI) เพื่อดูการทำงานของเดกซ์แทรนเนสว่าดีขึ้นหรือไม่ พบว่า ความสามารถในการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์จะเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเช่นกัน แสดงให้เห็นว่า เดกซ์แทรนเนส BI ยังคงมีประสิทธิภาพที่ดีในการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์บนแบบจำลองพื้นเรียบแม้ว่าเวลาจะผ่านไปนานถึง 7 ชั่วโมง

รูปที่ 4.6 แสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ของเดกซ์แทรนเนส FI กับเดกซ์แทรนเนส BI นั้นไม่แตกต่างกัน ถึงจะมีการเพิ่มความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนส FI ขึ้นอีก 0.5 หน่วยต่อมล. (FI+FI) หรือเติมเดกซ์แทรนเนส FI เพิ่มเข้าไปหลังจากบ่มไปแล้ว 5 ชั่วโมง (FI>>FI) ความสามารถในการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์นั้นจะดีขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น



รูปที่ 4.5 การป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์โดยเดกซ์แทรนเนส BI



รูปที่ 4.6 การป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์โดยเดกซ์แทรนเนส FI

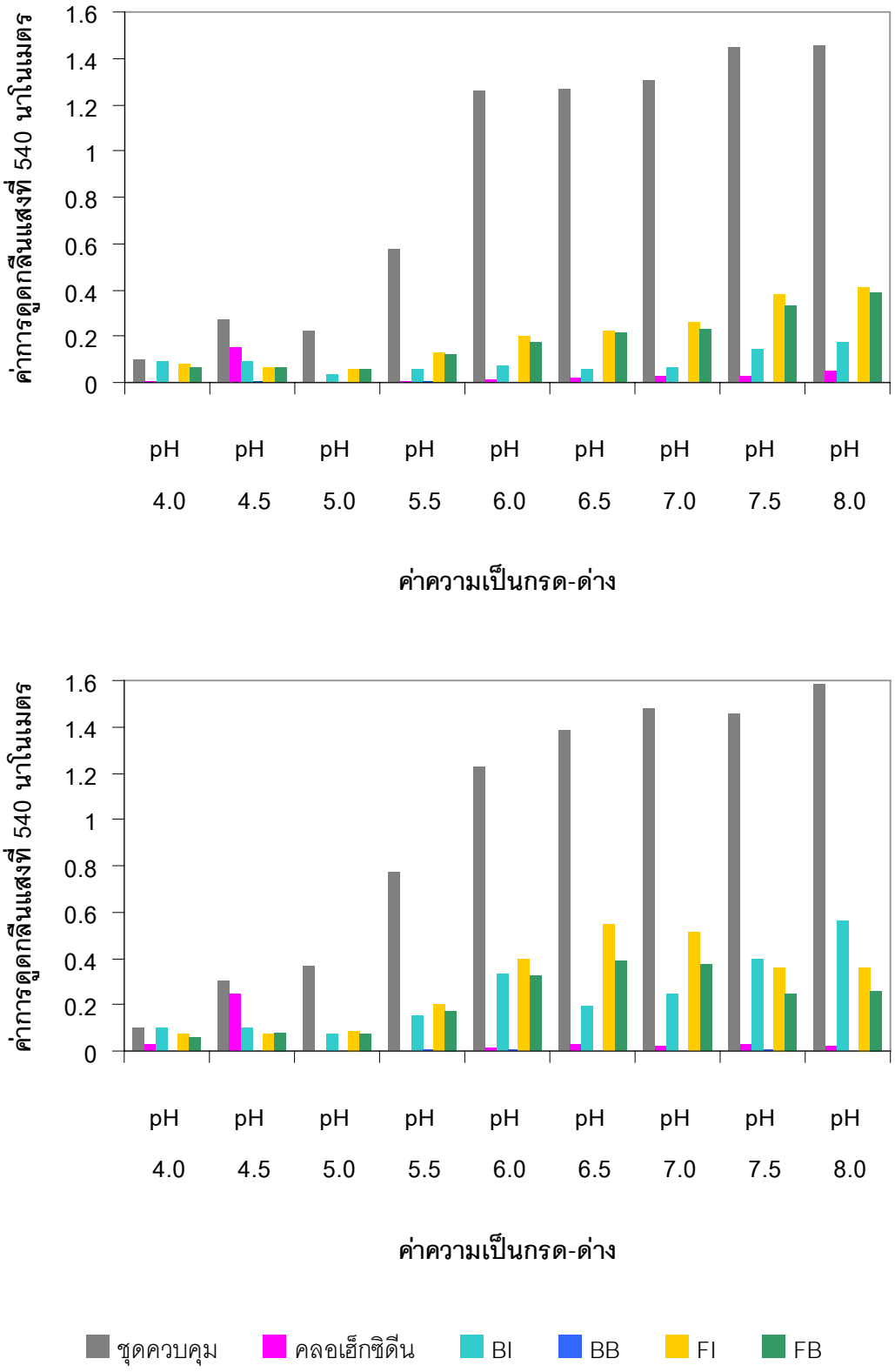
4.4.3 ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนสเพื่อป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์

ศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ด้วยเดกซ์แทรนเนสจากจุลินทรีย์ โดยแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI ที่เสริมด้วยน้ำตาลซูโครส 2% โดยน้ำหนัก ที่ 4.0 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 7.0 7.5 และ 8.0 และใช้เวลาในการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ที่ 5 และ 7 ชั่วโมง ผลการทดลองที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 4.7

จากรูปที่ 4.7 แสดงให้เห็นว่าไม่ว่าที่ค่าความเป็นกรด-ด่างนั้นจะมากหรือน้อยเดกซ์แทรนเนสจากจุลินทรีย์ไม่ว่าจะเป็นเดกซ์แทรนเนส BI BB FI หรือ FB ก็ยังคงมีประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ที่ดี แต่ประสิทธิภาพในการป้องกันที่ชั่วโมงที่ 5 นั้นจะดีกว่าที่ชั่วโมงที่ 7 ดังนั้นในการคัดเลือกค่าความเป็นกรด-ด่างที่จะนำไปใช้ในการทดลองต่อๆ ไปนั้น จะเลือกที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 เพราะเป็นค่าความเป็นกรด-ด่างที่ใกล้เคียงกับค่าความเป็นกรด-ด่างในช่องปาก โดยค่าเฉลี่ยความเป็นกรด-ด่างของน้ำลายในภาวะปกติจะมีค่าเท่ากับ 6.75 (จินตกร คูวัฒนสุชาติ, 2544) นอกจากนี้ ยังได้มีการศึกษาแล้วว่าเดกซ์แทรนเนสจากจุลินทรีย์ทั้ง 2 แหล่งนี้ มีความเสถียรที่ค่าความเป็นกรด-ด่างดังกล่าว แสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ค่าความเสถียรต่อค่าความเป็นกรด-ด่างของเดกซ์แทรนเนสจากจุลินทรีย์

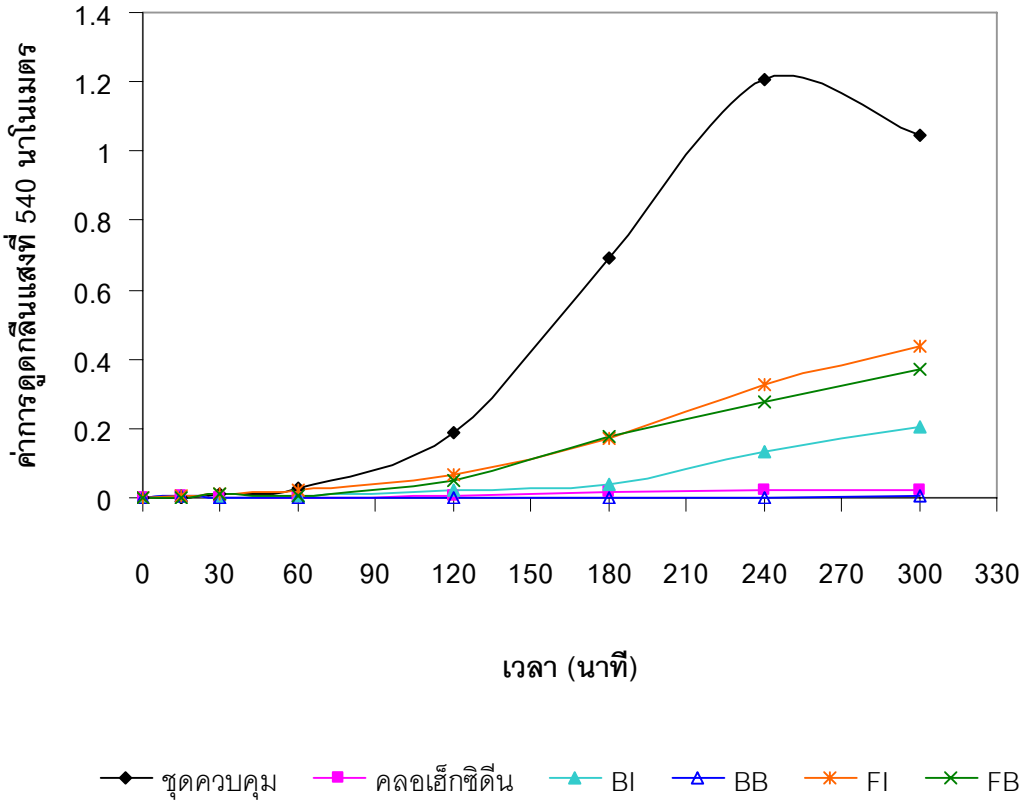
จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเดกซ์แทรนเนส	ค่าความเสถียรต่อความเป็นกรด-ด่าง
Arthrobacter sp. AG-2	5.5-7.0 (สุหัทยา จิระนันทิพร,2543)
P. pinophilum SMCU 3-14	4.5-7.0 (พัชราวดี บุตรทา, 2548)



รูปที่ 4.7 การป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ในช่องปากโดยเดกซ์แทรนเนสจากจุลินทรีย์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่างๆ ที่ 5 ชั่วโมง (บน) และ 7 ชั่วโมง (ล่าง)

4.4.4 เวลาที่เหมาะสมในการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0

จากผลการทดลองในข้อ 4.4.3 จึงได้ศึกษาเวลาที่ใช้ในการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 เพื่อหาเวลาที่เหมาะสมในการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ด้วยเดกซ์แทรนเนสจากจุลินทรีย์ โดยศึกษาที่เวลา 0 15 30 60 120 180 240 และ 300 นาที พบว่า เดกซ์แทรนเนสที่ได้จากจุลินทรีย์ทั้งเดกซ์แทรนเนส BI BB FI และ FB นั้น สามารถป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ได้ตั้งแต่เริ่มต้น โดยเดกซ์แทรนเนส BB มีประสิทธิภาพดีที่สุด และดีกว่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อด้วยคลอเฮ็กซิดีน รองลงมาเป็นเดกซ์แทรนเนสจาก BI ส่วนเดกซ์แทรนเนสจาก FI และ FB นั้นมีประสิทธิภาพที่ใกล้เคียงกัน ดังแสดงในรูปที่ 4.8



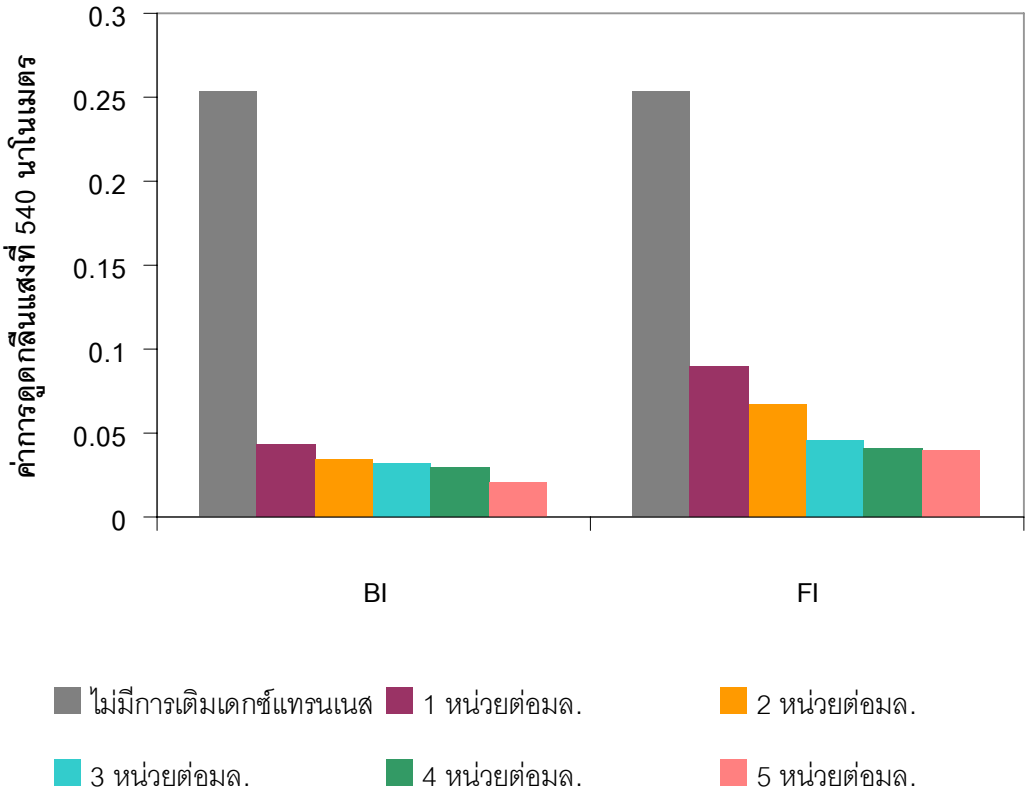
รูปที่ 4.8 การป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ในช่องปากโดยเดกซ์แทรนเนสจากจุลินทรีย์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ที่เวลา 0-300 นาที

จากรูปที่ 4.8 จะเห็นได้ว่าเดกซ์แทรนเนสจากจุลินทรีย์ยังคงสามารถป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ได้ในขณะที่มีการเกิดคราบจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วตั้งแต่ชั่วโมงที่ 2 ดังนั้นการศึกษาความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนสในขั้นต่อไปจึงเลือกเวลาที่ใช้ในการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ที่ 3 ชั่วโมง

4.4.5 ความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนส BI และ FI ต่อการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ที่เวลา 3 ชั่วโมง และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0

จากการศึกษาที่ผ่านมาได้ใช้ความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนสที่ 1 หน่วยต่อมล. ซึ่งมีประสิทธิภาพที่ดี ในการทดลองนี้จึงได้เพิ่มปริมาณความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนสขึ้นอีกเพื่อดูว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนสขึ้นแล้วจะสามารถป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ได้ดีขึ้นหรือไม่ โดย ทำการศึกษาที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และใช้ความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนสที่ 1 2 3 4 และ 5 หน่วยต่อมล. สาเหตุที่เลือกศึกษาในเดกซ์แทรนเนส BI และ FI นั้นเป็นเพราะว่าเดกซ์แทรนเนส BB มีประสิทธิภาพที่ดีมากอยู่แล้วที่ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมล. ส่วนเดกซ์แทรนเนส FB นั้นมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับเดกซ์แทรนเนส FI แต่มีต้นทุนในการผลิตที่สูงกว่าจึงไม่นำมาทดสอบ

จากรูปที่ 4.9 แสดงให้เห็นว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนส BI และ FI ความสามารถในการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์จะค่อนข้างคงที่ ดังนั้นในการนำไปใช้จึงเลือกใช้ที่ความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนสเท่ากับ 2-3 หน่วยต่อมล.



รูปที่ 4.9 การป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ในช่องปากโดยเดกซ์แทรนเนส BI และ FI ที่ความเข้มข้น 1 2 3 4 และ 5 หน่วยต่อมล.ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ผลจากการศึกษาที่ผ่านมาเมื่อนำมาเปรียบเทียบความสามารถในการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์โดยเดกซ์แทรนเนสที่ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI ที่เสริมด้วยน้ำตาลซูโครส 2% โดยน้ำหนัก ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 เป็นเวลา 3 ชั่วโมงเทียบกับชุดควบคุม แสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์โดยเดกซ์แทรนเนสจากจุลินทรีย์

แหล่งของเดกซ์แทรนเนส และชนิดของสารชักนำ	**การป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ (%)**
คลอเฮ็กซิดีน	97.74
Arthrobacter sp. AG-2	
เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม (BI)	94.61
เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 (BB)	100
P. pinophilum SMCU 3-14	
เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม (FI)	75.61
เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 (FB)	74.51

จากตารางที่ 4.3 เปรียบเทียบให้เห็นว่า เดกซ์แทรนเนส BB สามารถป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ได้ถึง 100% ในขณะที่คลอเฮ็กซิดีนป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ได้ 97.74% เดกซ์แทรนเนส BI ป้องกันได้ประมาณ 95% ส่วนเดกซ์แทรนเนส FI และ FB สามารถป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ได้ใกล้เคียงกัน คือ สามารถป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ได้มากกว่า 70%

4.5 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการสลายคราบจุลินทรีย์

ศึกษาถึงภาวะที่ใช้ในการสลายคราบจุลินทรีย์ภายนอกช่องปากด้วยเดกซ์แทรนเนสจากจุลินทรีย์ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมผลบวกที่ใช้คลอเฮ็กซิดีน (chlorhexidine) เป็นสารทดสอบ โดยการศึกษานี้จะทำขึ้นบนพื้นฐานความเป็นจริงที่จะนำไปประยุกต์ใช้ได้กับอุปกรณ์ที่ใช้กับช่องปาก

4.5.1 การสลายคราบจุลินทรีย์โดยเดกซ์แทรนเนสจากจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI และในบัฟเฟอร์ที่เวลาต่างๆ

หลังจากเลี้ยง *S. sobrinus* 6715 ให้เกิดคราบจุลินทรีย์บนไมโครไตเตอร์เพลตที่ 3 ชั่วโมงแล้ว นำมาทำปฏิกิริยากับเดกซ์แทรนเนสจากจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 หน่วยต่อมล. ทั้งในระบบที่เติมด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI ที่เสริมด้วยน้ำตาลซูโครส 2% โดยน้ำหนัก

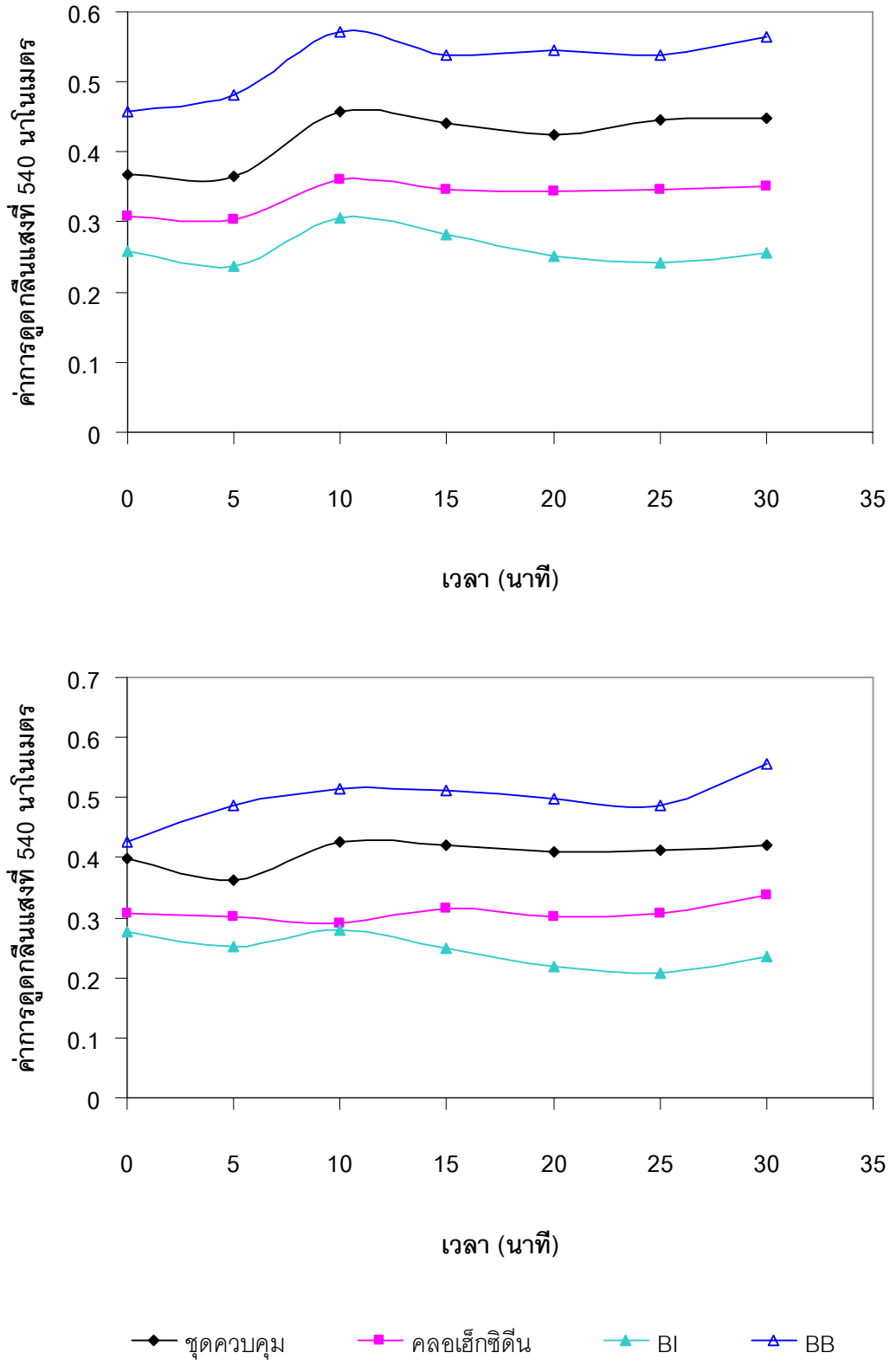
และระบบที่เติมด้วยบัฟเฟอร์ แปรผันเวลาที่ใช้ในการสลายตั้งแต่ 0 5 10 15 20 25 30 นาที และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง

จากรูปที่ 4.10 และ 4.11 พบว่า เดกซ์แทรนเนส BI FI และ FB สามารถสลายคราบจุลินทรีย์ได้ตั้งแต่เริ่มมีการเติมเดกซ์แทรนเนสลงไปในทั้ง 2 ระบบ และให้ผลที่ดีกว่าคลอเฮ็กซิดีน แต่ในทางตรงกันข้ามไม่ว่าเวลาที่ใช้ในการสลายจะนานแค่ไหนก็ตามเดกซ์แทรนเนส BB ยังคงไม่สามารถสลายคราบจุลินทรีย์ได้ในทั้ง 2 ระบบเช่นกัน

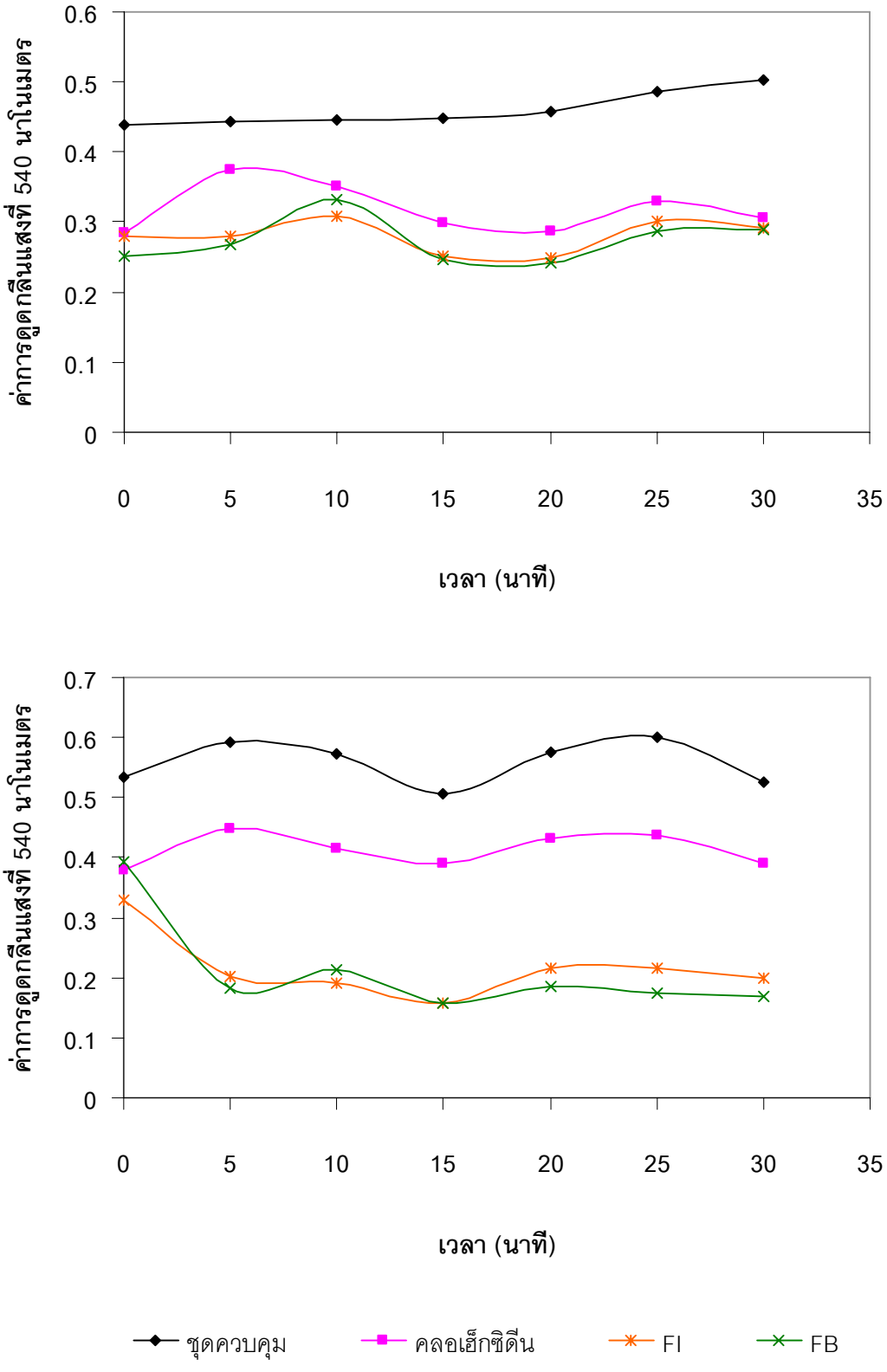
4.5.2 การสลายคราบจุลินทรีย์โดยเดกซ์แทรนเนส FI และ FB ที่อุณหภูมิ 37 °ซ และอุณหภูมิห้อง

จากข้อ 4.5.1 เห็นได้ว่าการสลายคราบจุลินทรีย์ของเดกซ์แทรนเนสในทั้ง 2 ระบบนั้นมีความแตกต่างกันไม่มากจึงเลือกการทำงานในระบบบัฟเฟอร์มาศึกษาเรื่องอุณหภูมิต่อ โดยเลือกศึกษาที่อุณหภูมิ 37 °ซ และอุณหภูมิห้อง ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่สามารถนำไปใช้ได้จริงกับอุปกรณ์ที่ใช้กับช่องปาก เลือกศึกษาโดยใช้เดกซ์แทรนเนส FI และ FB และใช้เวลาในการสลายที่ 0 5 10 15 20 25 และ 30 นาที

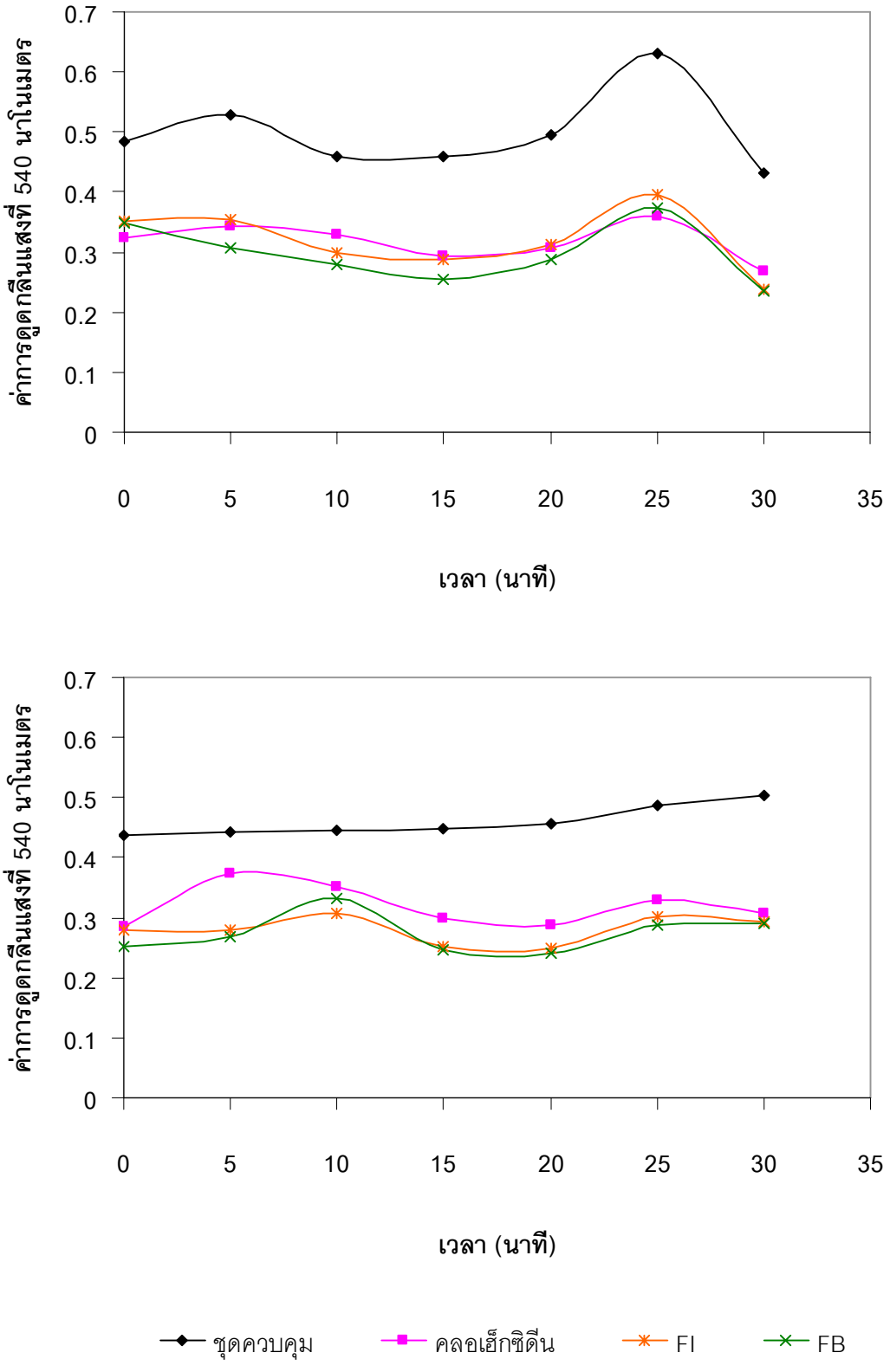
จากรูปที่ 4.12 เปรียบเทียบความสามารถในการสลายคราบจุลินทรีย์ของเดกซ์แทรนเนส FI และ FB ในระบบบัฟเฟอร์ ที่อุณหภูมิ 37 °ซ และอุณหภูมิห้อง พบว่า เดกซ์แทรนเนส FI และ FB สามารถทำงานได้ดีทั้งที่อุณหภูมิ 37 °ซ และอุณหภูมิห้อง ดังนั้นจึงเลือกอุณหภูมิห้องสำหรับการทดลองต่อไป เพราะง่ายต่อการนำไปใช้ในชีวิตจริงมากกว่า



รูปที่ 4.10 การสลายคราบจุลินทรีย์โดยเดกซ์แทรนเนส BI และ BB ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI (บน) และในบัฟเฟอร์ (ล่าง) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 0-30 นาที



รูปที่ 4.11 การสลายคราบจุลินทรีย์โดยเดกซ์แทรนเนส FI และ FB ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI (บน) และในบัฟเฟอร์ (ล่าง) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 0-30 นาที

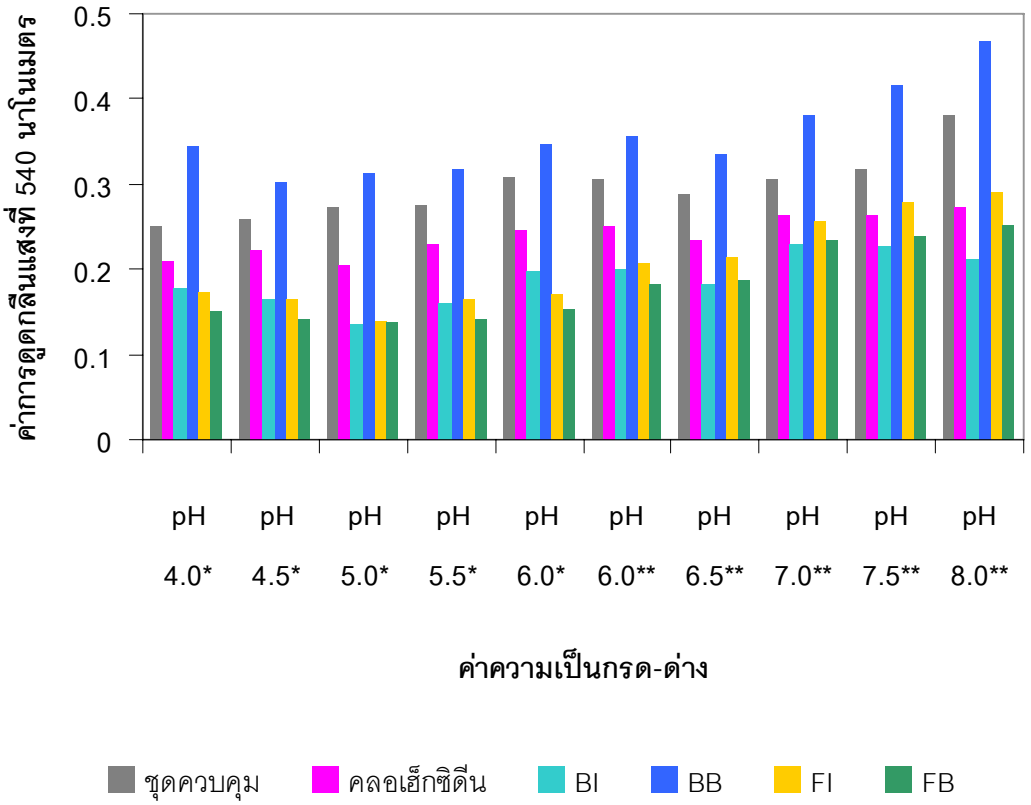


รูปที่ 4.12 การสลายคราบจุลินทรีย์โดยเดกซ์แทรนเนส FI และ FB ในระบบบัฟเฟอร์ ที่อุณหภูมิ 37 °ซ (บน) และอุณหภูมิห้อง (ล่าง) เป็นเวลา 0-30 นาที

4.5.3 ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการสลายคราบจุลินทรีย์นอกช่องปากโดยเดกซ์แทรนเนส

ศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการสลายคราบจุลินทรีย์ด้วยเดกซ์แทรนเนสจากจุลินทรีย์ โดยแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างของบัฟเฟอร์ที่ 4.0 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 7.0 7.5 และ 8.0 และใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาที่ 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

จากรูปที่ 4.13 พบว่า เดกซ์แทรนเนส BI FI และ FB สามารถสลายคราบจุลินทรีย์ได้ในทุกค่าความเป็นกรด-ด่าง แต่สำหรับเดกซ์แทรนเนส BB นั้นไม่สามารถสลายคราบจุลินทรีย์ได้ในทุกค่าความเป็นกรด-ด่าง ดังนั้นสำหรับในการทดลองต่อไปจะเลือกทดลองที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 เนื่องจากที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 นี้ในความเป็นจริงสามารถนำไปใช้ได้ง่ายกว่า และเดกซ์แทรนเนสจะมีความเสถียรที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 เช่นเดียวกับที่กล่าวไว้ในข้อ 4.4.3



รูปที่ 4.13 การสลายคราบจุลินทรีย์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่างๆ โดยเดกซ์แทรนเนสจากจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที

* ทดสอบในโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์

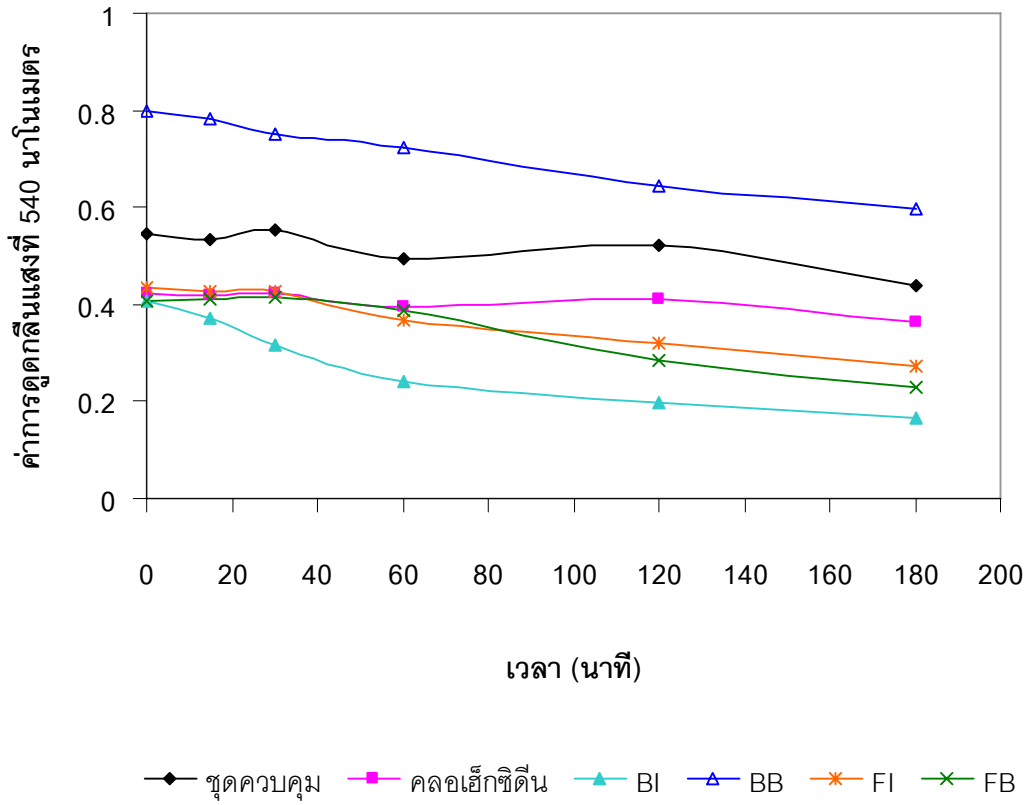
** ทดสอบในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์

4.5.4 เวลาที่เหมาะสมในการสลายคราบจุลินทรีย์นอกช่องปากโดยเดกซ์แทรนเนสในระบบบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0

ตามที่ได้กล่าวไว้ในข้อที่ 4.5.3 จึงเลือกทำการศึกษาความสามารถในการสลายคราบจุลินทรีย์ในระบบบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ในอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 0 15 30 60 120 และ 180 นาที เพื่อหาเวลาในการสลายคราบจุลินทรีย์ที่ดีที่สุดที่จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้จริง

จากรูปที่ 4.14 แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการสลายคราบจุลินทรีย์ของเดกซ์แทรนเนส BI FI และ FB ว่าสามารถสลายคราบจุลินทรีย์ให้เห็นได้อย่างชัดเจนตั้งแต่ 15 นาทีแรกที่มีการ

เติมเดกซ์แทรนเนส ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้เวลาในการสลายคราบจุลินทรีย์ที่ 15 นาที ส่วนเดกซ์แทรนเนส BB นั้นยังคงไม่สามารถสลายคราบจุลินทรีย์ได้เช่นเดิม



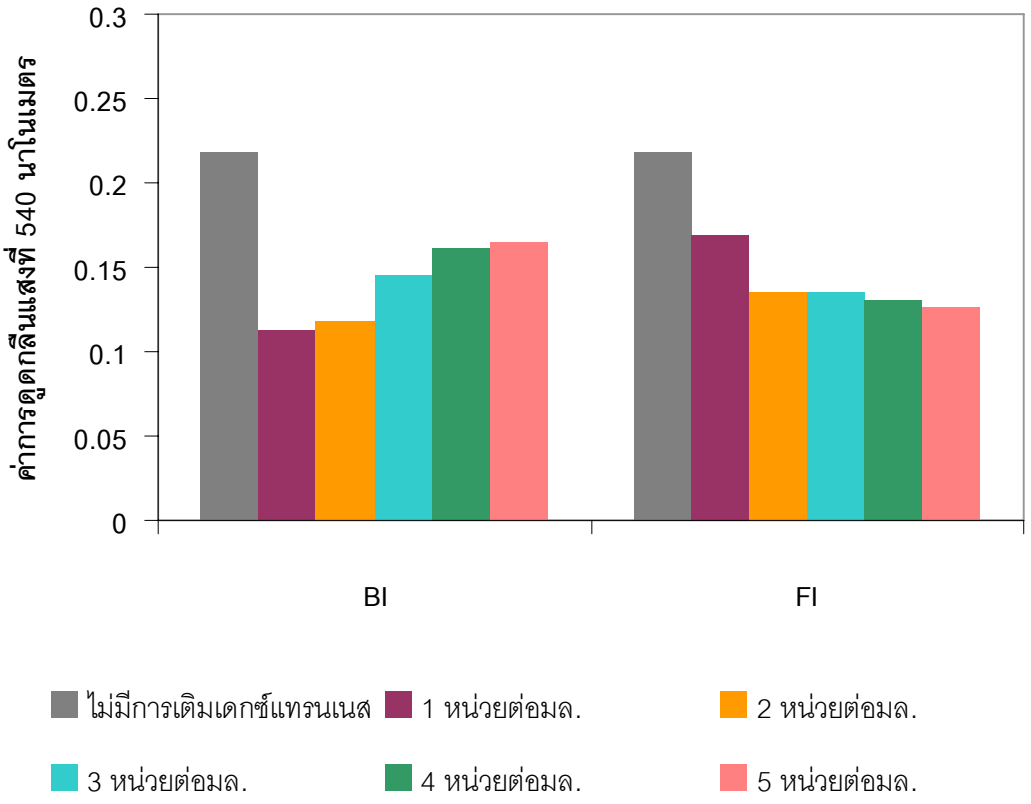
รูปที่ 4.14 การสลายคราบจุลิทรีย์ในระบบบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ที่อุณหภูมิห้อง

4.5.5 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของเดกซ์แทรนเนส BI และ FI ในการสลายคราบจุลินทรีย์ ในระบบบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 เป็นเวลา 15 นาที

ตลอดการศึกษาผลของการสลายคราบจุลินทรีย์นอกช่องปากโดยเดกซ์แทรนเนสจากจุลินทรีย์นั้น จะใช้เดกซ์แทรนเนสที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 หน่วยต่อมล. และเห็นแล้วว่าเดกซ์แทรนเนส BI FI และ FB มีประสิทธิภาพที่ดี แต่ในการทดลองนี้ได้เพิ่มความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนสขึ้นอีกเพื่อดูว่าเมื่อความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนสเพิ่มขึ้นจะมีประสิทธิภาพในการสลายเพิ่มขึ้นหรือไม่ โดยทำการศึกษากับเดกซ์แทรนเนส BI และ FI เนื่องจากเดกซ์แทรนเนส BB นั้น

ให้ผลการสลายไม่ดี ส่วนเดกซ์แทรนเนส FB ให้ผลการสลายคราบจุลินทรีย์ที่ใกล้เคียงกับเดกซ์แทรนเนส FI แต่มีต้นทุนในการผลิตที่สูงกว่าจึงไม่นำมาทดสอบ

จากรูปที่ 4.15 แสดงให้เห็นว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนส FI ความสามารถในการสลายคราบจุลินทรีย์จะค่อนข้างคงที่ แต่สำหรับเดกซ์แทรนเนส BI นั้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนสจะไม่ส่งผลที่ดีขึ้น ดังนั้นความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนสที่ 2 หน่วยต่อมล. ก็เป็นปริมาณที่เพียงพอแล้วสำหรับเดกซ์แทรนเนสทั้ง 2 ชนิด

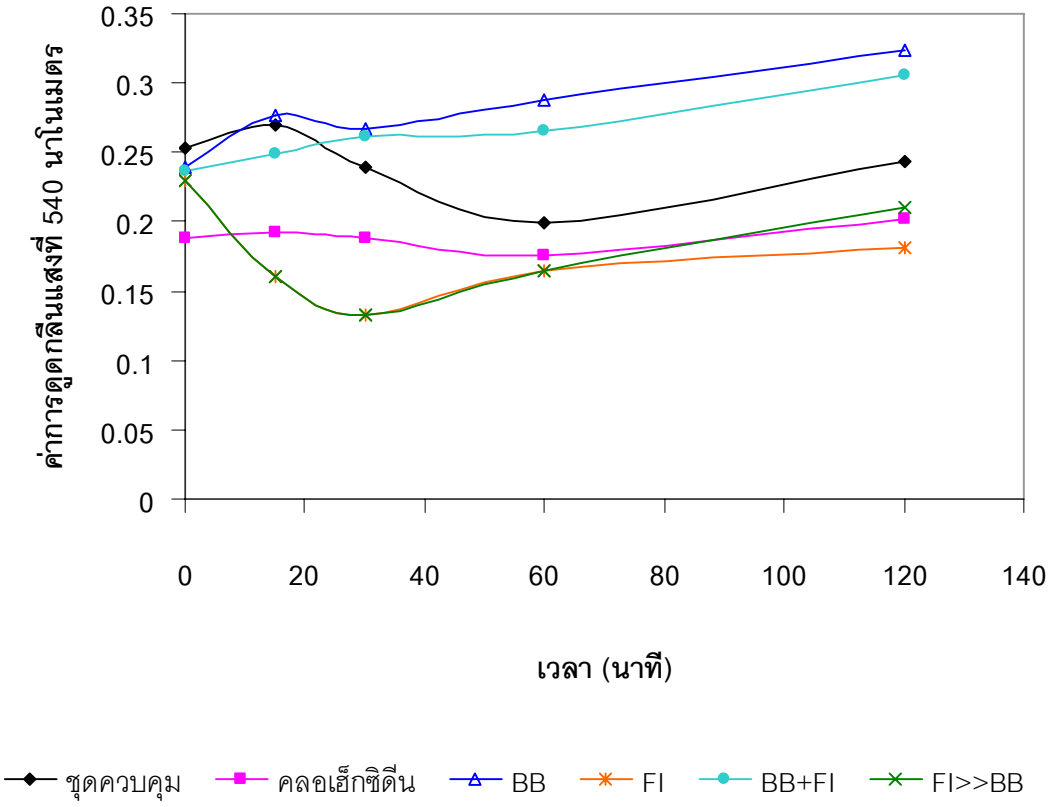


รูปที่ 4.15 การสลายคราบจุลินทรีย์โดยเดกซ์แทรนเนส BI และ FI ที่ความเข้มข้น 1 2 3 4 และ 5 หน่วยต่อมล. ในระบบบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 เป็นเวลา 15 นาที

4.5.6 ประสิทธิภาพการทำงานของเดกซ์แทรนเนส BB ร่วมกับเดกซ์แทรนเนส FI ในการสลายคราบจุลินทรีย์

จากการศึกษาที่ผ่านมาในการสลายคราบจุลินทรีย์จะเห็นได้ว่าเดกซ์แทรนเนส BB นั้นไม่สามารถสลายคราบจุลินทรีย์ได้ แต่เดกซ์แทรนเนส FI สามารถสลายคราบจุลินทรีย์ได้ดี ดังนั้นจึงได้นำเดกซ์แทรนเนสทั้ง 2 ชนิดนี้มาทดลองทำงานร่วมกันว่าเดกซ์แทรนเนส FI นั้นจะสามารถเสริมการทำงานของเดกซ์แทรนเนส BB ได้หรือไม่

ผลการทำงานร่วมกันของเดกซ์แทรนเนส BB และ FI ในรูปที่ 4.16 พบว่า เมื่อมีการเติมเดกซ์แทรนเนส FI เพิ่มอีก 1 หน่วยต่อมล. จากเดกซ์แทรนเนส BB ที่มีอยู่เดิม 1 หน่วยต่อมล. (BB+FI) ไม่มีผลในการเพิ่มความสามารถในการสลายคราบจุลินทรีย์ เช่นเดียวกับเมื่อปล่อยให้เดกซ์แทรนเนส FI สลายคราบจุลินทรีย์ไปก่อนเป็นเวลา 60 นาที แล้วจึงเติมเดกซ์แทรนเนส BB เข้าไป 1 หน่วยต่อมล. (FI>>BB) เดกซ์แทรนเนส BB ที่เติมเข้าไปนั้นไม่ทำให้การสลายคราบจุลินทรีย์ของเดกซ์แทรนเนส FI ดีขึ้นเลย



รูปที่ 4.16 การทำงานของเดกซ์แทรนเนส BB ร่วมกับเดกซ์แทรนเนส FI ในระบบบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 0-120 นาที

ผลจากการศึกษาที่ผ่านมาเมื่อนำมาเปรียบเทียบความสามารถในการสลายคราบจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นที่ 3 ชั่วโมง โดยเดกซ์แทรนเนสที่ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมล. ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง ในระบบบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ที่เวลา 15 นาที เทียบกับชุดควบคุม แสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ประสิทธิภาพในการสลายคราบจุลินทรีย์โดยเดกซ์แทรนเนสจากจุลินทรีย์

แหล่งของเดกซ์แทรนเนส และชนิดของสารชักนำ	**การสลายคราบจุลินทรีย์ (%)**
คลอเฮ็กซิดีน	21.30
Arthrobacter sp. AG-2	
เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม (BI)	30.26
เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 (BB)	0
P. pinophilum SMCU 3-14	
เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม (FI)	19.92
เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 (FB)	22.74

จากตารางที่ 4.4 แสดงให้เห็นว่าเดกซ์แทรนเนส BI นั้นมีประสิทธิภาพในการสลายคราบจุลินทรีย์ที่ดีกว่าคลอเฮ็กซิดีน โดยเดกซ์แทรนเนส BI สามารถสลายคราบจุลินทรีย์ได้ 30.26% ในขณะที่คลอเฮ็กซิดีนสลายคราบจุลินทรีย์ได้ประมาณ 20% ซึ่งใกล้เคียงกลับประสิทธิภาพในการสลายคราบจุลินทรีย์ของเดกซ์แทรนเนส FI และ FB ส่วนเดกซ์แทรนเนส BB ไม่สามารถสลายคราบจุลินทรีย์ได้

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้สนใจศึกษาการนำเดกซ์แทรนเนสไปใช้ในการป้องกันฟันผุ เพราะการใช้เดกซ์แทรนเนสนับว่าเป็นวิธีทางชีวภาพ มีความปลอดภัยกว่าการใช้สารเคมี มีความจำเพาะต่อการสลายเดกซ์แทรน เนื่องจากเดกซ์แทรนเนสเป็นเอนไซม์ที่ต้องอาศัยสารชักนำคือ เดกซ์แทรน นั่นคือพันธะที่เชื่อมต่อโมเลกุลของกลูโคสให้ต่อกันเป็นเดกซ์แทรนนั้นจะเป็นตัวบ่งบอกถึงความจำเพาะของเดกซ์แทรนเนส คือ ถ้าเดกซ์แทรนเนสถูกชักนำให้มีการผลิตด้วยเดกซ์แทรนพันธะ α-1,6 ก็จะได้เดกซ์แทรนเนสที่มีความจำเพาะต่อพันธะ α-1,6 ในขณะที่ถ้าชักนำการผลิตเดกซ์แทรนเนสด้วยเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 เดกซ์แทรนเนสที่ได้ก็จะจำเพาะต่อพันธะ α-1,3 ด้วยเช่นกัน (Walker และคณะ, 1984) และจากวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ที่จะต้องการศึกษาการสลายเดกซ์แทรนบนแบบจำลองพื้นเรียบนั้นจึงจำเป็นต้องใช้เดกซ์แทรนเนสที่จำเพาะต่อพันธะ α-1,3 ด้วย เพราะเดกซ์แทรนที่เกิดจากแบคทีเรียที่อาศัยในช่องปาก เช่น *S. sobrinus* 6715 นั้น เป็นเดกซ์แทรนที่มีพันธะ α-1,3 ในสัดส่วนที่มากกว่าพันธะ α-1,6 คือ มีพันธะ α-1,3 มากถึง 67 % และที่เหลือจะเป็นพันธะ α-1,6 (Huge และคณะ, 1986) จึงทำการผลิตเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 แล้วนำไปใช้ในการชักนำการผลิตเดกซ์แทรนเนส

เดกซ์แทรนเนสที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้มาจากแบคทีเรีย *Arthrobacter* sp. AG-2 และรา *Penicillium pinophilum* SMCU 3-14 ที่ถูกชักนำด้วยเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรมที่มีพันธะ α-1,6 ในปริมาณมากกว่า 95% (Marguerite และคณะ, 1997) และเดกซ์แทรนที่ได้จาก *Streptococcus sobrinus* 6715 ที่มีพันธะ α-1,3 สัดส่วนที่มากกว่าพันธะ α-1,6 (Huge และคณะ, 1986) ดังนั้นจะได้เดกซ์แทรนเนส 4 ชนิดด้วยกันคือ เดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. AG-2 ที่ถูกชักนำด้วยเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม (เดกซ์แทรนเนส BI) และที่ถูกชักนำด้วยเดกซ์แทรน *S. sobrinus* 6715 (เดกซ์แทรนเนส BB) เดกซ์แทรนเนสจาก *P. pinophilum* SMCU 3-14 ที่ถูกชักนำด้วยเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม (เดกซ์แทรนเนส FI) และที่ถูกชักนำด้วยเดกซ์แทรน *S. sobrinus* 6715 (เดกซ์แทรนเนส FB) แอกทิวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนสแต่ละตัวแสดงในตารางที่ 4.1 โดยเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตได้จาก *P. pinophilum* SMCU 3-14 จะมีแอกทิวิตีที่ดีกว่าเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตจาก *Arthrobacter* sp. AG-2 ไม่ว่าจะถูกชักนำด้วยเดกซ์แทรนชนิดใดก็ตาม ในขณะเดียวกันเดกซ์แทรนเนสที่ถูกชักนำด้วยเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม ก็จะมีแอกทิวิตีที่สูงกว่า

เดกซ์แทรนเนสที่ถูกชักนำด้วยเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ไม่ว่าจะเป็นเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตจาก *Arthrobacter* sp. AG-2 หรือ *P. pinophilum* SMCU 3-14 ทั้งนี้เป็นเพราะว่าเดกซ์แทรนที่-2000 ที่ใช้เป็นสับสเตรตนั้นมีสัดส่วนของพันธะ α-1,6 สูงมากถึง 95% (บริษัท Sigma และ Pharmacia) ดังนั้นเมื่อวัดแอกทิวิตีของเดกซ์แทรนเนสที่ชักนำด้วยเดกซ์แทรนเนสเกรดอุตสาหกรรมซึ่งจำเพาะต่อพันธะ α-1,6 แอกทิวิตีจึงสูงกว่าเดกซ์แทรนเนสที่ถูกชักนำด้วยเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ที่จำเพาะต่อ α-1,6 น้อยกว่า

การทดสอบการเกิดคราบจุลินทรีย์ของ *S. sobrinus* 6715 บนผิวฟันที่ทำในห้องปฏิบัติการนั้นสามารถทดสอบได้กับวัสดุหลากหลายชนิดที่นำมาเป็นแบบจำลอง เช่น แผ่นโลหะ ลวด แผ่นแก้ว เม็ดไฮดรอกซีอะพาไทท์ ผงเคลือบฟันหรือฟันที่นำมาตัดแบ่ง ไมโครไตเตอร์เพลต เป็นต้น แต่ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้ไมโครไตเตอร์เพลตชนิดพื้นเรียบ 96 หลุม (96-wells microtiter plate flat bottom) มาเป็นแบบจำลองพื้นเรียบในการทดสอบ เนื่องจากสามารถทำการทดสอบได้ง่าย รวดเร็ว การนำมาใช้งานไม่ยุ่งยาก มีค่าใช้จ่ายที่ไม่สูงมากนัก สามารถทำได้หลายชุดทดสอบในเพลตเดียว

การยึดติดของ *S. sobrinus* 6715 บนแบบจำลองพื้นเรียบเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI ที่เสริมด้วยน้ำตาลซูโครส 2% โดยน้ำหนัก ที่ 37 °ซ ในภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบไม่มีออกซิเจนนั้น จะเพิ่มขึ้นตามเวลาที่เพิ่มขึ้น เพราะเมื่อมีการเจริญของเชื้อจะมีการผลิตเดกซ์แทรนออกมาพร้อมกับการเจริญ (นันทิดา วานิชวงศ์วรรณ, 2545) ทำให้เซลล์ของเชื้อนั้นถูกยึดติดไว้บนแบบจำลองพื้นเรียบด้วยเดกซ์แทรนไม่ละลายน้ำซึ่งมีพันธะ α-1,3 ปริมาณสูง ในขณะที่เดกซ์แทรนที่สามารถละลายน้ำได้ซึ่งมีพันธะ α-1,6 ปริมาณสูงจะช่วยในการยึดเกาะกันเองของแบคทีเรีย (Walker และคณะ, 1984) เมื่อเวลาผ่านไปปริมาณของเดกซ์แทรนจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนไม่สามารถยึดติดบนพื้นผิวของแบบจำลองได้ทั้งหมด ทำให้เกิดคราบจุลินทรีย์ที่หนาขึ้นและเมื่อนำมาตรวจสอบคราบจุลินทรีย์จะมีคราบจุลินทรีย์บางส่วนที่ไม่ได้ยึดติดอยู่กับพื้นผิวของแบบจำลองหลุดลอกออกไป ค่าที่วัดได้จึงเกิดการแปรผันมาก ดังนั้นเวลาที่ใช้ในการทำให้เกิดคราบจุลินทรีย์บนแบบจำลองพื้นเรียบนั้นควรที่จะไม่เกิน 7 ชั่วโมง ซึ่งที่ 7 ชั่วโมงนี้จะสังเกตเห็นคราบจุลินทรีย์ที่ยึดติดอยู่ที่พื้นผิวของแบบจำลองเต็มพอดี (รูปที่ 4.3)

การทดสอบการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์บนแบบจำลองพื้นเรียบในงานวิจัยนี้ได้ทำการทดสอบกับเดกซ์แทรนเนสทั้ง 4 ชนิด คือ เดกซ์แทรนเนส BI BB FI และ FB ที่ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมล. ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI ที่เสริมด้วยน้ำตาลซูโครส 2% โดยน้ำหนัก บ่มที่

อุณหภูมิ 37 °ซ ในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน พบว่า ผลของการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์โดยเดกซ์แทรนเนสที่เวลา 3 4 5 6 และ 7 ชั่วโมงนั้น เดกซ์แทรนเนส BB จะให้ผลที่ดีมาก รองลงมาเป็นเดกซ์แทรนเนส BI ส่วนเดกซ์แทรนเนส FI และ FB นั้นให้ผลที่ใกล้เคียงกัน (รูปที่ 4.4) ถึงแม้ว่าทั้งเดกซ์แทรนเนส BB และ FB จะเป็นเดกซ์แทรนเนสที่จำเพาะต่อพันธะ α-1,3 เหมือนกันแต่ให้ผลที่ต่างกัน ทั้งนี้เป็นผลเนื่องจากเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่โดยเฉพาะราจะมีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ชนิดเอนโดเดกซ์แทรนเนสมากกว่า ซึ่งจะสามารถสลายได้เฉพาะภายในสายเดกซ์แทรนแบบสุ่มเท่านั้น โดยจะแตกต่างจากเอกโซเดกซ์แทรนเนสที่ทำการตัดทีละโมเลกุลของกลูโคสที่ปลายสายของเดกซ์แทรน (Sutherland, 1996; Wynter, 1997) ซึ่งเมื่อเดกซ์แทรนถูกสลายเป็น โอลิโกแซ็กคาไรด์สายสั้นๆ แล้ว เอนโดเดกซ์แทรนเนสจะไม่สามารถสลายโอลิโกแซ็กคาไรด์สายสั้นๆ นั้นได้อีก แต่จากการรายงานของ นันทิดา วานิชวงศ์วรรณ (2545) ได้ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากการสลายเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 โดยเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. AG-2 ที่ถูกชักนำด้วยเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 พบว่า ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีเพียงกลูโคสชนิดเดียว แสดงว่าเดกซ์แทรนเนส BB นั้นจะสามารถตัดโมเลกุลของเดกซ์แทรนให้เป็นเพียงโมเลกุลเดี่ยวของกลูโคสได้ ซึ่งเมื่อเหลือเพียงกลูโคสก็จะสามารถละลายน้ำได้ ลักษณะเหนียวหนืดของเดกซ์แทรนก็จะหมดไปทำให้ไม่ยึดติดกับพื้นผิวของแบบจำลอง ส่วนเดกซ์แทรนเนส BI และ FI นั้นเป็นเดกซ์แทรนเนสที่มีความจำเพาะต่อพันธะ α-1,6 แต่เดกซ์แทรนที่ *S. sobrinus* 6715 ผลิตขึ้นนั้นเป็นเดกซ์แทรนที่มีพันธะ α-1,3 ในปริมาณสูง ดังนั้นในการสลายเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 นั้นจำเป็นต้องเป็นเดกซ์แทรนเนสที่มีความจำเพาะต่อพันธะ α-1,3 ด้วยถึงจะให้ประสิทธิภาพที่ดี

ในการศึกษาการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์โดยเดกซ์แทรนเนส BI และ FI พบว่า เดกซ์แทรนเนสทั้งสองสามารถทำงานได้ดีถึง 7 ชั่วโมง จากการทดลองแม้ว่าหลังจาก 5 ชั่วโมงจะมีการเติมเดกซ์แทรนเนสเพิ่มขึ้นแต่ผลที่ได้ในการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์นั้นยังคงไม่แตกต่างไปจากเดิมมาก (รูปที่ 4.5 และ 4.6) อาจเป็นเพราะว่าเดกซ์แทรนเนส BI และ FI นั้นมีความจำเพาะต่อพันธะ α-1,6 และเดกซ์แทรนเนสที่เติมไปตั้งแต่แรกนั้นสลายเดกซ์แทรนพันธะ α-1,6 ไปหมดแล้ว เมื่อเติมเดกซ์แทรนเนสที่จำเพาะต่อ α-1,6 ลงไปเพิ่มอีกจึงไม่เห็นความแตกต่างในการสลายคราบจุลินทรีย์ เพราะเดกซ์แทรนที่เหลืออยู่นั้นน่าจะเป็นเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 เป็นส่วนใหญ่

ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนสทั้ง 4 ชนิดในการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์บนแบบจำลองพื้นเรียบ พบว่า เมื่อแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI ที่เสริมด้วยน้ำตาลซูโครส 2% โดยน้ำหนัก ตั้งแต่ 4.0 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 7.0 7.5 และ 8.0 เดกซ์แทรนเนสทั้ง 4 ชนิดนั้นยังคงทำงานได้ดีในทุกค่าความเป็นกรดด่างที่ 5 ชั่วโมง แต่เมื่อถึง 7 ชั่วโมงประสิทธิภาพของเดกซ์แทรนเนส BI FI และ FB จะลดลง การเลือกค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7.0 มาใช้ในการศึกษาเรื่องเวลาในการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ต่อเนื่องจากที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7.0 นี้เดกซ์แทรนเนสทั้ง 4 ชนิดมีความเสถียรต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง (ตารางที่ 4.2) เมื่อศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการนำไปใช้ในการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนสเท่ากับ 1 หน่วยต่อมล. ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 37 °ซ โดยใช้เวลาในการทดสอบตั้งแต่ 0 15 30 60 120 180 240 และ 300 นาที (รูปที่ 4.8) พบว่า เดกซ์แทรนเนสทั้ง 4 ชนิดสามารถป้องกันไม่ให้เกิดคราบจุลินทรีย์ได้ตั้งแต่เริ่มเติมเดกซ์แทรนเนสลงไป โดยเดกซ์แทรนเนส BB ให้ผลดีที่สุดโดยสามารถยับยั้งการเกิดคราบจุลินทรีย์ได้ 100% ตลอดระยะเวลาที่ทดสอบ ส่วนเดกซ์แทรนเนส BI FI และ FB สามารถยับยั้งการเกิดคราบจุลินทรีย์ได้ดีที่สุดที่ 180 นาที โดยสามารถยับยั้งการเกิดคราบจุลินทรีย์ได้ถึง 94.61 75.61 และ 74.51% ตามลำดับ เมื่อทดลองเพิ่มความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนส BI และ FI เป็น 2 3 4 และ 5 หน่วยต่อมล. และทดสอบที่ภาวะเดิม พบว่า ถ้าความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนสเพิ่มขึ้นความสามารถในการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ก็จะมากขึ้นตามไปด้วย

การนำเดกซ์แทรนเนสจากจุลินทรีย์ไปใช้ในช่องปากนั้น เดกซ์แทรนเนสที่ดีควรทำงานได้ดีที่ภาวะภายในช่องปาก ซึ่งเดกซ์แทรนเนสที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีคุณสมบัติครบทุกตัว คือ สามารถทำงานได้ในช่วงของความเป็นกรด-ด่างที่กว้าง และเสถียรที่อุณหภูมิ 37 °ซ แต่เดกซ์แทรนเนสที่ดีที่สุด คือ เดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. AG-2 ที่ถูกชักนำด้วยเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเกิดคราบจุลินทรีย์ไม่ว่าจะในภาวะใดก็ตาม เพราะในช่องปากนั้นจะมีค่าความเป็นกรด-ด่างเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลาขึ้นอยู่กับน้ำลาย และชนิดของอาหารที่รับประทาน เมื่อมีของหวานอยู่ในปากค่าความเป็นกรด-ด่างจะลดลงอย่างรวดเร็วเหลือเพียง 5.0 เป็นผลมาจากการเผาผลาญอาหารของแบคทีเรียและให้กรดแลคติกออกมา (จินตกร คูวัฒนสุชาติ, 2544) ซึ่งที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 5.0 นั้นเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. AG-2 ที่ถูกชักนำด้วยเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ก็ยังคงประสิทธิภาพที่ดี โดยสามารถยับยั้งการเกิดคราบจุลินทรีย์ได้ถึง 100%

ในงานวิจัยนี้นอกจากจะสนใจในการนำเดกซ์แทรนเนสจากจุลินทรีย์ไปใช้ในการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์แล้ว ยังสนใจถึงการสลายคราบจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นแล้วบนพื้นผิวแบบจำลอง ในการทดสอบนั้นได้ทำการสร้างคราบจุลินทรีย์ให้เกิดขึ้นบนพื้นผิวแบบจำลองก่อนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI ที่เสริมด้วยน้ำตาลซูโครส 2% โดยน้ำหนัก และบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ ในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เนื่องจากที่เวลา 3 ชั่วโมงนี้การเกิดคราบจุลินทรีย์นั้นจะเกิดขึ้นในปริมาณที่เหมาะสม และอยู่ในช่วงกึ่งกลางของการเพิ่มขึ้นของคราบจุลินทรีย์ (รูปที่ 4.2) ลักษณะของคราบจุลินทรีย์ที่ได้ก็ไม่มากหรือน้อยจนเกินไป (รูปที่ 4.3) เมื่อนำมาทดสอบกับสารทดสอบต่างๆ แล้วสามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงได้ดี เมื่อนำแบบจำลองที่มีคราบจุลินทรีย์ยึดติดอยู่นั้นมาเติมด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI ที่เสริมด้วยน้ำตาลซูโครส 2% โดยน้ำหนัก เปรียบเทียบกับการเติมด้วยบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนสชนิดนั้นๆ พบว่า ในระบบที่ใช้บัฟเฟอร์ในการทำงานจะให้ผลที่ดีกว่าการใช้อาหารเลี้ยงเหลว BHI ที่เสริมด้วยน้ำตาลซูโครส 2% โดยน้ำหนัก ที่ไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง แต่จะสังเกตเห็นได้ว่าเดกซ์แทรนเนส BB จะไม่สามารถสลายคราบจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นแล้วได้เลย (รูปที่ 4.10 และ 4.11) อาจเนื่องจาก *S. sobrinus* 6715 เมื่อก่อให้เกิดคราบจุลินทรีย์บนพื้นผิวของแบบจำลองนั้นจะใช้เดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ในการยึดติดกับพื้นผิวของแบบจำลอง แต่จะใช้พันธะ α-1,6 ในการยึดติดกันเองของแบคทีเรียตามที่ได้กล่าวมาแล้ว ทำให้เดกซ์แทรนเนส BB ซึ่งจำเพาะต่อพันธะ α-1,3 นั้นไม่สามารถเข้าไปสลายได้ ส่วนเดกซ์แทรนเนส FI และ FB นั้นมีประสิทธิภาพที่ใกล้เคียงกัน แต่เดกซ์แทรนเนส FB จะมีต้นทุนในการผลิตที่สูงกว่า ดังนั้นจึงเลือกเดกซ์แทรนเนส BI และ FB เป็นตัวแทนในการศึกษาประสิทธิภาพในการสลายคราบจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 37 °ซ และอุณหภูมิห้องนั้น พบว่า เดกซ์แทรนเนส BI และ FI สามารถทำงานได้ในทั้ง 2 อุณหภูมิที่ทำการทดสอบ (รูปที่ 4.12) ดังนั้นในการทดสอบต่อไปจะเลือกทดสอบที่อุณหภูมิห้อง เพราะวัตถุประสงค์หลักที่จะนำเดกซ์แทรนเนสไปใช้ในการสลายคราบจุลินทรีย์นั้นต้องการที่จะนำไปใช้กับอุปกรณ์ที่ใช้ในช่องปาก ดังนั้นการทำงานของเดกซ์แทรนเนสนั้นไม่ควรที่จะยุ่งยากเกินไป การทำทดสอบที่อุณหภูมิห้องจึงสำคัญที่สุดเพราะไม่ต้องยุ่งยากในการควบคุมอุณหภูมิ โดยที่อุณหภูมิห้องนี้เดกซ์แทรนเนสสามารถทำงานได้ดีตั้งแต่เริ่มมีการเติมเดกซ์แทรนเนสเข้าไปในระบบทดสอบจนครบเวลาทดสอบที่ 30 นาที

ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนสในการสลายคราบจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นแล้วได้ทดสอบขึ้นในระบบบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.0 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 7.0 7.5 และ 8.0 และใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาที่ 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าเดกซ์แทรนเนส BI FI และ FB นั้น สามารถสลายคราบจุลินทรีย์ได้ดีในช่วงที่ทำการทดสอบ

สำหรับเดกซ์แทรนเนส BB นั้นให้ผลการทดสอบเหมือนเช่นเคยคือ ไม่สามารถสลายคราบจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นก่อนแล้วได้เลย (รูปที่ 4.13) ในการทดสอบต่อไปจะเลือกทดสอบที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ด้วยเหตุผลเดียวกับเรื่องของอุณหภูมิ และอย่างที่ได้กล่าวมาแล้วว่าเดกซ์แทรนเนสทั้งสองมีความเสถียรต่อค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 (ตารางที่ 4.2) เมื่อทดสอบการสลายคราบจุลินทรีย์บนพื้นผิวของแบบจำลองเพื่อหาเวลาที่เหมาะสมในการนำไปใช้ที่ความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนสเท่ากับ 1 หน่วยต่อมล. ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 อุณหภูมิห้อง โดยใช้เวลาในการทดสอบตั้งแต่ 0 15 30 60 120 และ 180 นาที พบว่า เดกซ์แทรนเนส BI FI และ FB สามารถทำงานได้ตั้งแต่มีการเริ่มเติมเดกซ์แทรนเนสเข้าไปในระบบ และจะทำงานได้ดีขึ้นเรื่อยๆ เมื่อเวลาผ่านไป (รูปที่ 4.14) จากนั้นได้ทดสอบประสิทธิภาพของเดกซ์แทรนเนส BI และ FI เมื่อมีความเข้มข้นมากขึ้นที่ 2 3 4 และ 5 หน่วยต่อมล. ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที (รูปที่ 4.15) พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนส FI ให้เท่ากับ 2 หน่วยต่อมล. เดกซ์แทรนเนสจะทำงานได้ดีแต่ถ้ามีการเพิ่มความเข้มข้นอีกการทำงานจะเริ่มคงที่ ส่วนเดกซ์แทรนเนส BI นั้นความเข้มข้นที่มากกว่า 1 หน่วยต่อมล. ไม่ส่งผลให้การสลายดีขึ้นเลย

จากการทดสอบที่ผ่านมาเห็นได้ว่า เดกซ์แทรนเนส BB นั้นจะไม่สามารถสลายคราบจุลินทรีย์ได้จึงได้ทดสอบการทำงานของเดกซ์แทรนเนส BB ร่วมกับเดกซ์แทรนเนส FI (รูปที่ 4.16) พบว่า ถึงแม้จะมีการเติมเดกซ์แทรนเนส FI เข้าไปเพิ่มก็ไม่ส่งผลให้การทำงานของเดกซ์แทรนเนส BB ดีขึ้นเลย ไม่ว่าจะให้เดกซ์แทรนเนส FI ทำงานไปก่อน หรือว่าเติมลงไปพร้อมกันเดกซ์แทรนเนส BB ก็ยังคงไม่สามารถสลายคราบจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นแล้วบนแบบจำลองได้

การทดสอบที่ผ่านมาในการสลายคราบจุลินทรีย์ทั้งหมด เดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. AG-2 ที่ถูกชักนำด้วยเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรมนั้นให้ผลดีที่สุดในการสลายคราบจุลินทรีย์บนแบบจำลองพื้นเรียบ โดยสามารถสลายคราบจุลินทรีย์ได้ที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้ความเข้มข้นต่ำ เวลาน้อย และทำงานได้ดีในช่วงของค่าความเป็นกรด-ด่างที่กว้าง

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเดกซ์แทรนเนสในการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์บนแบบจำลองพื้นเรียบกับปริมาณคราบจุลินทรีย์ในชุดควบคุม ทดสอบที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 และใช้ความเข้มข้นสุดท้ายของเดกซ์แทรนเนสเท่ากับ 1 หน่วยต่อมล. และการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสลายคราบจุลินทรีย์บนแบบจำลองพื้นเรียบกับปริมาณคราบจุลินทรีย์ในชุดควบคุม ทดสอบที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 และใช้เดกซ์แทรนเนสที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1 หน่วยต่อมล.

โดยทดสอบกับคราบจุลินทรีย์ที่มีอายุ 3 ชั่วโมง จะพบว่า การป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์นั้นมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าการสลายคราบจุลินทรีย์ ดังแสดงในตารางที่ 5.1

ตารางที่ 5.1 ประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ และการสลายคราบจุลินทรีย์ด้วยเดกซ์แทรนเนสจากจุลินทรีย์บนแบบจำลองพื้นเรียบ

แหล่งของเดกซ์แทรนเนส และชนิดของสารชักนำ	**การป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ (%)**	**การสลายคราบจุลินทรีย์ (%)**
คลอเฮ็กซิดีน	97.74	21.30
Arthrobacter sp. AG-2		
เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม	94.61	30.26
เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715	100	0
P. pinophilum SMCU 3-14		
เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม	75.61	19.92
เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715	74.51	22.74

จากตารางที่ 5.1 แสดงให้เห็นว่า เดกซ์แทรนเนส BB นั้นมีประสิทธิภาพที่ดีในการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นใหม่ได้ โดยไม่มีคราบจุลินทรีย์หลงเหลืออยู่เลย ในขณะที่เดกซ์แทรนเนส BI FI และ FB นั้นก็สามารถป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ได้เช่นกันแต่ในปริมาณที่น้อยกว่า ส่วนการสลายคราบจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นแล้วนั้นเดกซ์แทรนเนส BI มีประสิทธิภาพที่ดีที่สุดแต่ยังไม่สามารถสลายคราบจุลินทรีย์ไปได้ทั้งหมดเช่นเดียวกับเดกซ์แทรนเนส FI และ FB แต่เดกซ์แทรนเนส BB นั้นไม่สามารถสลายคราบจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นแล้วได้เลย ดังนั้นการนำเดกซ์แทรนเนสจากจุลินทรีย์ไปใช้ให้เกิดประสิทธิภาพที่ดีที่สุดนั้น ควรนำเดกซ์แทรนเนสไปใช้ก่อนที่จะมีการเกิดใหม่ของคราบจุลินทรีย์เพราะเดกซ์แทรนเนสจากจุลินทรีย์จะสามารถลดการเกิดใหม่ของคราบจุลินทรีย์ได้ดีกว่าการสลายคราบจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นก่อนแล้ว

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กองทันตสาธารณสุข กรมอนามัย. 2551. โรคฟันผุเป็นอย่างไร. [Online]. http://www.anamai.moph.go.th/happysmile/book1/fam103.html. 8 เม.ย. 2551.

จินตกร คูวัฒนสุชาติ. 2542. จุลชีววิทยาช่องปาก และที่มาของโรคฟันผุ โรคปริทันต์ และโรคในช่องปาก. 2nd ed. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ณฐินี สุวรรณสิงห์. 2540. การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส และการศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์. รายงานการวิจัย. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

นันทิดา วานิชวงศ์วรรณ. 2545. การผลิตเดกซ์แทรนโดย *Streptococcus sobrinus* 6715 เพื่อชักนำการสร้างเดกซ์แทรนเนสใน *Arthrobacter* sp. AG-2. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

บุญส่ง แสงอ่อน. 2527. บทบาทของแบคทีเรียในน้ำอ้อย. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พัชราวดี บุตรทา. 2548. ภาวะการเก็บเดกซ์แทรนเนสให้เสถียร. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พิมลรัตน์ เต็มจิตต์ภักดี. 2549. การโคลนและการหาลำดับของจีโนมิกดีเอ็นเอซึ่งประมวลรหัสเดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium* sp. SMCU 3-14. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศิโรจน์ ศรีสรากรณ์. 2547. ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเดกซ์แทรนเนสโดย *Penicillium* sp. SMCU 3-14 ในถังหมัก. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สันติ์ ฉายตระกูล. 2510. กระบวนการผลิตน้ำตาลทราย และปัญหาทางเทคนิคในกระบวนการผลิตน้ำตาลทราย. กองวิทยาศาสตร์น้ำตาล. ศูนย์ส่งเสริมน้ำตาลทราย.

สุวรรณา นพพรพันธ์. 2538. การปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อการผลิตเดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium* sp. SMCU 3-14. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

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

อนันตพงษ์ สุขเกษ. 2543. การตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสบนผิวของทราย. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เอก แสงวิเชียร. 2531. เดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Antti, H.T., Ulla, A., Robert, V.W., Heikki, O., Juhani, K., and Matti, L. 1999. Exopolysaccharide-producing bacteria from sugar beets. Applied Environ. Microbiol. 65(2): 862-864.

Barrett, J.F., Barrett, T.A. and Curtiss III, R. 1986. Molecular Microbiology and Immunology of *Streptococcus mutans*. (Hamada, S., Michalek, S.M., Kiyono, H., Menaker, L. and MaGhee, J.R., eds.), pp. 205-215. Elsevier Science Publisher B.V., Netherland.

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

Bratthall, D. 1991. Dental caries : markers of high and low risk groups and individuals. pp. 287-312. Cambridge: Cambridge University Press.

Broadbent, J.R., McMahon, D.J., Welker, D.L., Oberg, C.J., and Moineau, S. 2003. Biochemistry, genetics and applications of exopolysacchatide production in *Streptococcus thermophilus*: A review. J. Dairy Sci. 86: 407-423.

Burnette, G.W., and Scherp, K.W. 1962. Oral Microbiology and Infectious Disease. pp. 386-401. Baltimore: The Williams and Wilkins Company.

Caldwell, R.C., Snadham, H.J., Mann, W.V., Jr., Finn, B., and Formicola, A.J. 1971. The effect of a dextranase mouthwash on dental plaque young adults and children. JADA. 82: 124-134.

Carlsson, P. 1988. On the epidemiology of *Streptococcus mutans* (dissertation). Malmo: University of Lunds.

Charoenpornwattana, S., Jiranuntipon, S., Tangjitpinitkarn, S., Thaniyavarn, J., and Thaniyavarn, S. 2001. Dextranase from *Arthrobacter* sp. AG-2 and characterization thereof. Biotechnology for Sustainable Utilization of Biological Resources in the Tropics. 15: 405-410.

Cole, J.A. 1977. A biochemical approach to the control of dental caries. Biochem. Society. Transact. 5(4): 1232-1239.

Devulapalle, K.S., Segura, A.G., Ferrer, M., Alcalde, M., Mooser, G., and Plou, F.J. 2004. Effect of carbohydrate fatty acid esters on *Streptococcus sobrinus* and glucosyltransferase activity. Carbohydr. Res. 339: 1029-1034.

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

Eggleston, G., and Monge, A. 2005. Optimization of sugarcane factory application of commercial dextranases. Proc. Biochem. 40:1881-1894.

Emilson, C.G. 1994. Potential efficacy of chlorhexidine against mutans streptococci and human dental caries. J. Dent. Res. 73: 682-691.

Featherstone, J.D.B. 2000. The science and practice of caries prevention. J. Am. Dent. Assoc. 131: 887-899.

Fitzgerald, R.J., Keyes, P.H., Stoudt, T.H., and Spinell, D.M. 1968. The effect of a dextranase preparation on plaque and caries in hamster, a preliminary report. JADA. 76: 301-304.

Froeliger, E.H.M., and Five-Taylor, P. 2001. *Streptococcus parasanguis* fimbria-associated adhesion FapI is required for biofilm formation. Infect. Immun. 69: 2512-2519.

Fukumoto, J., Tsuji, H., and Tsuru, D. 1971. *Penicillium luteum* dextranase: its production and some enzymatic properties. J. Biochem. 69: 1113-1121.

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

Guggenheim, B. 1970. Extracellular polysaccharides and microbial plaque. Int. Dent. J. 20(4): 657-678.

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

Hamada, S., and Slade, H.D. 1980. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol. Rev. 44: 331-84.

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

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

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

Igarashi, T., Asaga, E., and Goto, N. 2004. Roles of *Streptococcus mutans* dextranase anchored to the cell wall by sortase. Oral Microbiol. Immunol. 19:102-105.

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

Jeanes, A.W., Haynes, A.W., Williams, C.A., Rankin, J.C., Melvin,E.H., Austin, M.J., Cluskey, J.E., Fisher, B.E., Tsuchiya, H.M. and Rist, C.E. 1954. Characterisation and classification of dextrans from ninety six strains of bacteria. J. Am. Chem. Soc. 76: 5041-5052.

Jensen, B., and Bratthall, D. 1989. A new method for the estimation of mutans Streptococci in human saliva. J. Dent. Res. 68: 468-471.

Johnson, I.H. 1974. Glucanase-producing organisms in human dental plaques. Microbios. 61: 89-98.

Katsura, H., Tsukiyama, R.I., Suzuki, A., and Kobayashi, M. 2001. In vitro antimicrobial activities of bakuchiol against oral microorganisms. AAC. 45: 3009-3013.

Keyes,P.H. 1968. Research in dental caries. JADA. 76: 1357-1373.

Keyes, P.H., Hichs, M.A., Goldman, B.M., McCabe, R.M., and Fitzgerald, R. J. 1971. Dispersion of dextranase bacterial plaques on human teeth with dextranase. JADA. 82: 136-141.

Khalikova, E., Susi, P., Usanov, N., and Korpela, T. 2003. Purification and properties of extracellular dextranase from a *Bacillus* sp. J. Chromatogr. 769: 315-326.

Kim, D., Park, K.H., and Robyt, J.F. 1998. Acarbose effect for dextran synthesis, acceptor and disproportionation reactions of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMCM dextransucrase. J. Microbiol. Biotechnol. 8(3): 287-290.

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

Koenig, D.W., and Day, D.F. 1988. Production of dextranase by *Lipomyces starkeyi*. Biotechnol. Lett. 10: 117-122.

Konradsson, K., and Van Dijken, J.W. 2002. Effect of a novel ceramic filling material on plaque formation and marginal gingiva. Acta. Odontol. Scand. 60(6): 370-374.

Kunkel, D. 2007. Electron microscopy science stock photography. Dennis Kunkel microscopy, Inc. [Online]. http://www.denniskunkel.com. Accessed 8 April 2008.

Kurihara, H., Goto, Y., Aida, M., Hosokawa, M., and Takahashi, K. 1999. Antibacterial activity against cariogenic bacteria and inhibition of insoluble glucan production by free fatty acids obtained from dried *Gloiopeltis furcata*. Fish Sci. 65: 129-132.

Larrimore, S., Murchison, H., Shiota, T., Michalek, S.M., and Curtiss III, R. 1983. In vitro and in vivo complementation of *Streptococcus mutans* mutants defective in adherence. Infect. Immun. 42: 558-566.

Lawman, P., and Bleiweis, A. 1991. Molecular cloning of the extracellular endodextranase of *Streptococcus salivarius*. J. Bacteriol. 173: 7423-7428.

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

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

Loesche, W.J. 1986. Role of *Streptococcus mutans* in dental decay. Micro. Rev. 50: 353-80.

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

Lyndhe, J. editor. 1984. Text book of clinical periodontology. pp. 125-153. Copenhagen: Munksgaard.

Madhu, K., and Prabhu, K. 1984. Studies on dextranase from *Penicillium aculeatum*. Enzyme Microbiol. Technol. 6: 217-220.

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

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

Marotta, M., Martino, A., Rosa, A., Farina, E., Carteni, M., and Rosa, M. 2002. Degradation of dental plaque glucans and prevention of glucan formation using commercial enzymes. Proc. Biochem. 38: 101-108.

Marsh, P.D., Martin, M.V. 1984. Oral microbiology. 2nd ed. pp.1-10. Washington D.C.: American Society for Microbiology.

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

McCarthy, C., Snyder, M.L., and Parker, R.B. 1965. The indigenous oral flora of man I The newborn to the 1- year old infant. Arch. Oral Biol. 10: 61-70.

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

Monchois, V., Willemot, R.M., and Monsan, P. 1999. Glucansucrases: mechanism of action and structure-function relationships. FEMS Microbiol. Rev. 23: 131-151.

Murayama, Y.H., Wada, H., Hayashi, T., Uchida, I., Yokomizo, I., and Hamada, S. 1973. Effect of dextranase from *Spicaria violacea* (IFO 6120) on the polysaccharides produced by oral streptococci and human dental plaque. J. Dent. Res. 52: 658-667.

Murchison, H., Larrimore, S., and Curtiss III, R. 1985. In vitro inhibition of adherence of *Streptococcus mutans* strains by nonadherent mutants of *S. mutans* 6715. Infect. Immun. 50: 826-832

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

Noltel, W.A. 1973. Oral Microbiology. pp. 251-270. Saint Louis: The C.V. Mosby Company.

Okushima, M., Sugino, D., Kouno, Y., Nakano, S., Miyahara, J., Toda, H., Kubo, S., and Matsushiro, A. 1991. Molecular cloning and nucleotide sequencing of the *Arthrobacter* dextranase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Streptococcus sanguis*. Jpn. J. Genet. 66: 173-187.

O'Toole G.A., and Kolter, R. 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways : a genetic analysis. Molecular Microbiol. 28: 449-461.

Polydex Pharmaceuticals Ltd. 2008. Dextran Defined. [Online]. http://www.polydex.com/v2/research/dextran_defined.html. Accessed 8 April 2008.

Robyt, J.F. 1986. Encyclopedia of polymer sciences and technology. pp. 752-767. Fourth edition. John Wiley and Sons Inc., New York, USA.

Russel, R.R.B., and Gilpin, M.L. 1987. Identification of vilulence components of mutans streptococci. In Ferretti, J.J., and Curtiss III, R. (eds.) *Streptococcal* genetics pp. 201-204. Washington DC: American Society for Microbiology.

Santos, M., Teixeira, J., and Rodrigues, A. 2000. Production of dextransucrase, dextran and fructose from sucrose using *Leuconostoc mesenteriodes* NRRL B512(f). Biochem. Eng. J. 4: 177-188.

Schachtele, C.F., Staat, R.H., and Harlander, S.K. 1975. Dextranase from oral bacteria: Inhibition of water-insoluble glucan production and adherence to smooth surface by *Streptococcus mutans*. Infect. Immun. 12(2): 309-317.

Schuster, S. 1990. Oral microbiology and infectious disease. 3rd ed. pp. 441-569. Philadelphia: B.C.Decker.

Sidebotham, R.L. 1974. Dextrans. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 30: 371-444.

Simonson, L.G., and Jackola, D. 1979. Effects of dextranases on attachment of *Streptococcus mutans* to hydroxyapatite. Antimicrob. Agents Chemother. 16: 9-12.

Simonson, L.G., and Liberta, A.E. 1975. A new source of fungal dextranases. Mycology. 67: 845-851.

Singleton, V. 2006. The dextran story. [Online]. http://www.opticalactivity.com/dextran/story.htm. Accessed 10 January 2006.

Skinner, F.A., and Carr, J.G. editors. 1974. In the normal microbial flora of man. pp. 85-100. London: Academic Press.

Skinner, F. A., and Quesnel, L. 1978. Streptococci. pp. 157-205. London: Academic Press.

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

Songpaisan, Y., Serinirach, R., Kuvatanasuchati, J., and Bratthall, D. 1994. Mutans Streptococci in a Thai population:Relationship to caries and changes in prevalence after application of fissure sealants. Caries. Res. 28: 261-268.

Sutherland, I.W. 1996. Extracellular Polysaccharides. Biotechnology. edited by H.J., Rehm, G., Reed, A., Puhler, and P., Stadler, vol. 6, 2nd edition. Primary Metabolism, New York.

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

Todar, K. 2007. The microbial wolrd: microbe and dental disease (under construction). University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology. [Online]. http://www.bact.wisc.edu/themicrobialwolrd/dental.html. Accessed 8 April 2008.

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

Van Houte, J., and Russo, J. 1986. In Hamada,S., Michalek, S.M., Kiyono H., Menaker L., and McGhee, J.R. (eds.). Molecular Microbiology and Immunology of *Streptococcus mutans*. pp. 157-167. Netherland: Elsevier Science Publishers.

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

Wiater, A., Szczodrak, J., and Rogalski J. 2004. Hydrolysis of mutan and prevention of Its formation in streptococcal films by fungal α-d-glucanases. Proc. Biochem. 39: 1481–1489

Wilham, C.A., Alexander, B.H., and Jeanes, A. 1955. Heterogeneity in dextran preparations. Arch. Biochem. Biophys. 59: 61-75.

Wolinsky, L.E. 1988. Caries and Cariology. In Newman, M.G. and Nisingarrd, R. (eds.). Oral Microbiol Immunol. pp. 389-409. Jonanovich: W.B. Saunder Company.

Wolinsky, L. E., and Hume, W. R. 1985. Effects of extracellular plaque components on the chlorhexidine sensitivity of strains of *Streptococcus mutans* and human dental plaque. J. Dent. Res. 64(8): 1051-1054.

Wynter, C. 1997. Screening method for dextranases and amylodextranases from anaerobic thermophiles. J. Gen. Appl. Microobiol. 42: 213-223.

Wynter, C., Patel, B.K.C., Peter Bain, de Jersey, J., Hamilton, S., and Inkerman, P.A. 1996. A novel thermostable dextranase from a *Thermoanaerobacter* species cultured from the geothermal waters of the Great Artesian Basin of Australia. FEMS Microbiol. Lett. 140: 271-276.

Yu, H., Seo, S., Hur, J., Lee, H., Lee, Y., and You, Y. 2006. *Asarum sieboldii* extracts attenuate growth, acid production, adhesion, and water-insoluble glucan synthesis of *Streptococcus mutans*. J. Med. Food. 9(4): 505-509.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตร และวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. สูตร และวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ *Streptococcus sobrinus* 6715

1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Brain Heart Infusion (BHI)

BHI (Difco Laboratories)	37	กรัม

ละลายอาหารในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐานที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Brain Heart Infusion (BHI) ที่เสริมด้วยซูโครส 2%

BHI (Difco Laboratories)	37	กรัม
ซูโครส (Sucrose)	20	กรัม

ละลายสารทั้งหมดรวมกันในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 °ซ เป็นเวลา 10 นาที

1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Brain Heart Infusion (BHI)

เตรียมอาหารด้วยวิธีเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI แต่ละลายวุ้นผง 15 กรัมต่ออาหาร 1,000 มล. เพิ่มลงไป จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐานที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

2. สูตร และวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ *Arthrobacter* sp. AG-2

2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yamaguchi (Yamaguchi และ Gocho, 1973)

เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม (Dextran industrial grade)	5.0	กรัม
พอลิเปปโตน (Polypeptone)	10.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.0	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H2O$)	0.1	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	0.1	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	30.0	กรัม

ละลายสารทั้งหมดยกเว้นเดกซ์แทรนในน้ำกลั่นปริมาตรประมาณ 500 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 7.0 จากนั้นเติมเดกซ์แทรนแล้วนำไปละลายโดยการอุ่นด้วยความร้อน และปรับปริมาตรสารละลายให้เป็น 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐานที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Yamaguchi

เตรียมอาหารด้วยวิธีเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yamaguchi แต่ละลายวุ้นผง 15 กรัมต่ออาหาร 1,000 มล. เพิ่มลงไป จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐานที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

3. สูตร และวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ *Penicillium pinophilum* SMCU 3-14

3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งของ Fukumoto และคณะ (1971) ที่ปรับปรุงโดย เอก แสงวิเชียร (2531)

เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม (Dextran industrial grade)	10.0	กรัม
โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$)	2.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.0	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.5	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4$)	0.005	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	2.0	กรัม
วุ้นผง	15.0	กรัม

ละลายสารทั้งหมดยกเว้นเดกซ์แทรนและวุ้นผงในน้ำกลั่นปริมาตรประมาณ 500 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 4.5 จากนั้นเติมเดกซ์แทรนและวุ้นผงแล้วนำไปละลายโดยการอุ่นด้วยความร้อนและปรับปริมาตรสารละลายให้เป็น 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐานที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวของ Fukumoto และคณะ (1971) ที่ปรับปรุงโดยศิโรจน์ ศรีสรากรณ์ (2547)

เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม (Dextran industrial grade)	10.0	กรัม
กากน้ำตาล (Molass)	15.0	มล.
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	3.9	กรัม
โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$)	0.9	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.5	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.0	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.5	กรัม

ละลายสารทั้งหมดยกเว้นเดกซ์แทรนในน้ำกลั่นปริมาตรประมาณ 500 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 4.0 จากนั้นเติมเดกซ์แทรนแล้วนำไปละลายโดยการอุ่นด้วยความร้อน และปรับปริมาตรสารละลายให้เป็น 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐานที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมี

1. สารละลายสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีของ Somogyi-Nelson (Somogyi, 1952)

1.1 สารละลายอัลคาไลน์ คอปเปอร์ (Alkaline copper reagent)

สารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตโดเดกขะไฮเดรต ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) 71 กรัม และเกลือของโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรตเตตระไฮเดรต ($C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$) 40 กรัม ในน้ำกลั่น 700 มล. เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 นอร์มอล 100 มล. แล้วเติมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) ความเข้มข้น 10% 80 มล. ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมโซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) ปริมาณ 180 กรัม ละลายให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร เก็บในขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24-48 ชั่วโมง ถ้ามีตะกอนให้กรองออกก่อนนำไปใช้

1.2 สารละลายเนลสัน (Nelson's reagent)

ละลายแอมโมเนียมโมลิบเดตเตตระไฮเดรต ($(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$) 53.2 กรัม ในน้ำกลั่น 900 มล. กรดซัลฟูริกเข้มข้น 21 มล. ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมสารละลายโซเดียมอาร์ซีเนต ($NaHAsO_4$) ความเข้มข้น 12% 50 มล. ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร เก็บในขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24-48 ชั่วโมง ถ้ามีตะกอนให้กรองออกก่อนนำไปใช้

2. สารละลายสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry (Lowry, 1951)

2.1 สารละลาย Lowry A

โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	60.0	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	12.0	กรัม
โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต ($C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$)	0.6	กรัม
น้ำกลั่น	3,000	มล.

2.2 สารละลาย Lowry B

คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มล.

2.3 สารละลาย Lowry C

สารละลาย Lowry A	50	ส่วน
สารละลาย Lowry B	1	ส่วน

2.4 สารละลาย Lowry D

สารละลายโฟลินฟีนอลรีเอเจนท์ (Folin phenol reagent)	1	ส่วน
น้ำกลั่น	1	ส่วน

3. สารละลายเดกซ์แทรน ที-2000 ความเข้มข้น 0.625% (โดยน้ำหนัก)

ละลายเดกซ์แทรน ที-2000 0.625 กรัม ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 สำหรับเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. AG-2 ส่วนเดกซ์แทรนเนสจาก *P. pinophilum* SMCU 3-14 ให้ละลายในโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.5 จากนั้นนำไปละลายโดยใช้เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (sonicator) จนกว่าจะละลายหมด และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มล.

4. สารละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่างต่างๆ

เตรียมสารละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่างๆ ได้แก่ 4.0 4.5 5.0 5.5 และ 6.0 โดยละลายโซเดียมอะซิเตต 1.21 2.91 5.07 6.94 และ 7.76 กรัม ตามลำดับ ในน้ำกลั่น 80 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างตามต้องการด้วยกรดอะซิติก และปรับปริมาตรด้วยขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มล. จากนั้นเจือจางสารละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ แต่ละค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 0.05 โมลาร์ ด้วยน้ำกลั่น

5. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่างต่างๆ

เตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.0 6.5 7.0 7.5 และ 8.0 โดยละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.87 4.60 8.55 11.74 และ 13.34 กรัม และโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 10.42 8.11 4.77 2.46 และ 0.85 กรัม ตามลำดับ ในน้ำกลั่น 80 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างตามต้องการด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ และปรับปริมาตรด้วยขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มล. จากนั้นเจือจางสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ แต่ละค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 0.05 โมลาร์ ด้วยน้ำกลั่น

6. สารละลายคริสตัลไวโอเลต 0.02% (โดยน้ำหนัก)

ละลายคริสตัลไวโอเลต (Crystal violet) 0.02 กรัม ในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 มล. เก็บในขวดสีชา

7. กรดอะซิติกความเข้มข้น 30% (โดยปริมาตร)

เติมกรดอะซิติกเข้มข้น 30 มล. ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 70 มล. เก็บในขวดสีชา

8. สารละลาย Tween-80 0.1% โดยปริมาตร

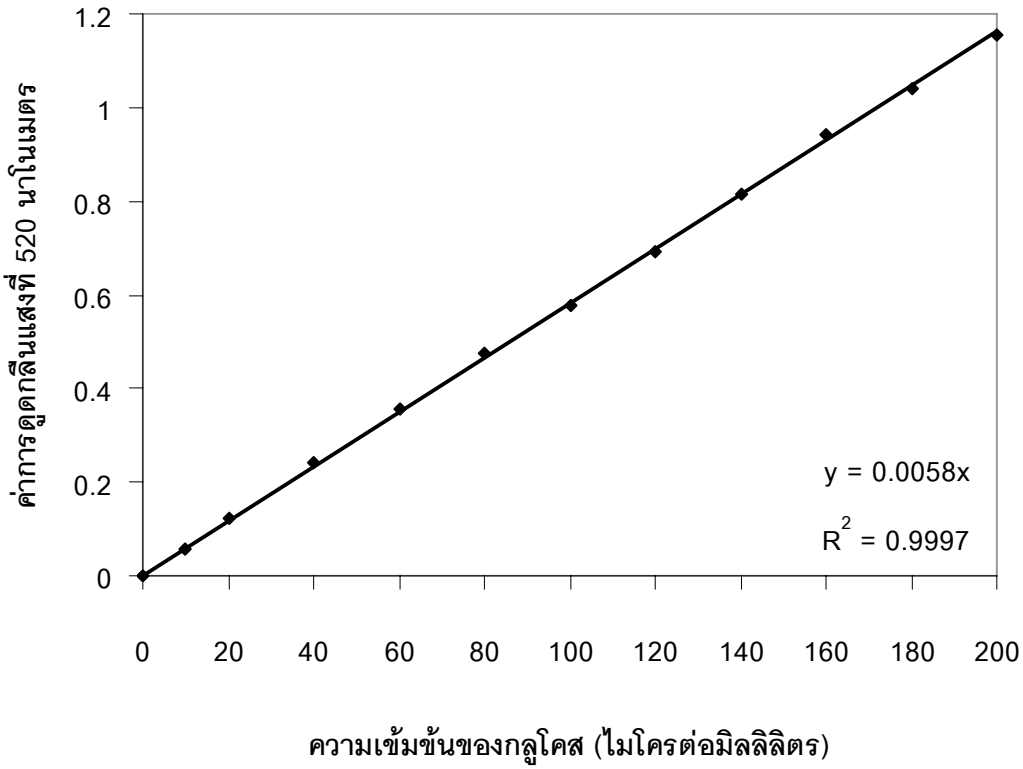
ผสม Tween-80 ปริมาตร 0.1 มล. ในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มล. จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐานที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐาน

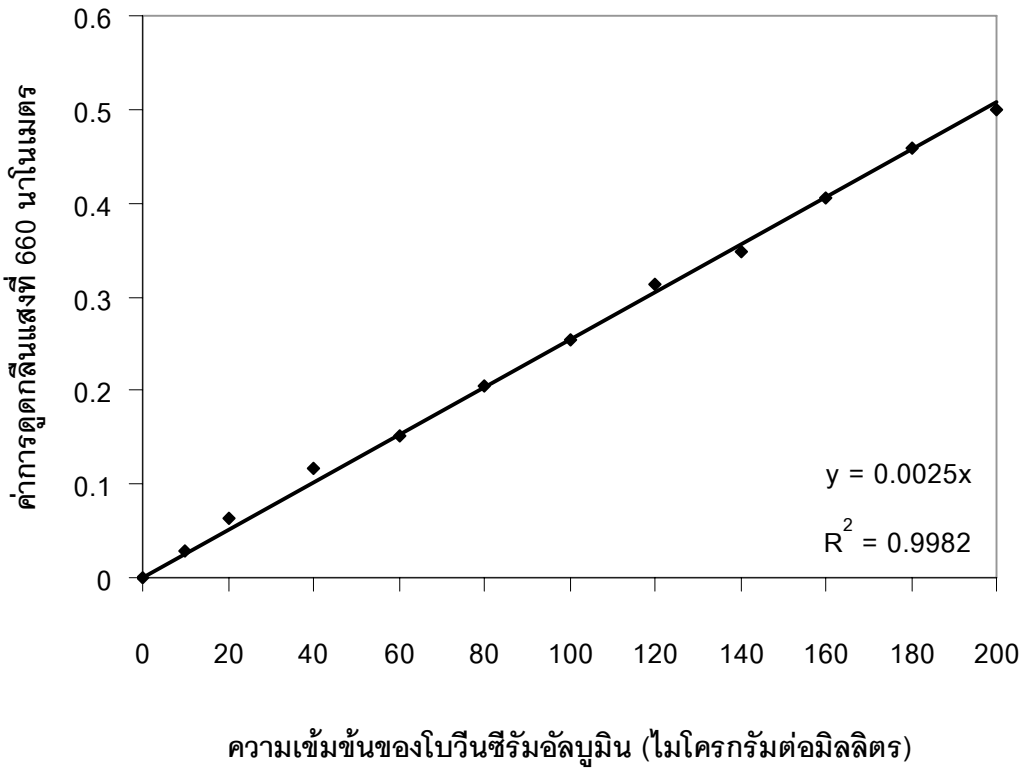
1. กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีของ Somogyi-Nelson (Somogyi,1952)

กราฟมาตรฐานกลูโคส ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



2. กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธีของ Lowry (Lowry,1951)

กราฟมาตรฐานของโบวีนซีรัมอัลบูมิน ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวณฤดี อัศวเสรีเลิศ เกิดเมื่อวันที่ 19 มีนาคม พ.ศ. 2525 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต จากภาควิชาชีววิทยา วิชาเอกจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ในปีการศึกษา 2546 และเข้ารับการศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2547 ที่อยู่ปัจจุบัน 2469/12 ถนนเพชรบุรีตัดใหม่ แขวงบางกะปิ เขตห้วยขวาง กรุงเทพมหานคร 10310