การใช้โปรตีเอสร่วมกับเดกซ์แทรนเนสในการสลายคราบจุลินทรีย์ในแบบจำลองภายนอกร่างกาย

นางสาวศันสณีย์ ศิริลักษณ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2555
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

APPLICATION OF PROTEASE ALONG WITH DEXTRANASE FOR MICROBIAL PLAQUE DEGRADATION IN AN *IN VITRO* MODEL

Miss Sansanee Sirilak

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 2012

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การใช้โปรตีเอสร่วมกับเดกซ์แทรนเนสในการสลายคราบจุลินทรีย์ในแบบจำลองภายนอกร่างกาย
โดย	นางสาวศันสณีย์ ศิริลักษณ์
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

……..ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.อัญชริดา อัครจรัลญา)

……..อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน)

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

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

……กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รศ.ดร.กาญจณา จันทองจีน)

ศันสณีย์ ศิริลักษณ์: การใช้โปรตีเอสร่วมกับเดกซ์แทรนเนสในการสลายคราบจุลินทรีย์ในแบบจำลองภายนอกร่างกาย. (APPLICATION OF PROTEASE ALONG WITH DEXTRANASE FOR MICROBIAL PLAQUE DEGRADATION IN AN *IN VITRO* MODEL) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.ดร.สุเทพ ธนียวัน, 113 หน้า.

งานวิจัยนี้ ศึกษาการสลายคราบจุลินทรีย์ในแบบจำลองภายนอกร่างกาย โดยเดกซ์แทรนเนสจากรา *Penicillium pinophilum* SMCU3-14 และแบคทีเรีย *Arthrobacter* sp. AG-2 ซึ่งไม่ว่าจะใช้เดกซ์แทรนชนิดใดเป็นสารชักนำการผลิตเดกซ์แทรนเนสก็ตาม เดกซ์แทรนเนสที่ผลิตจากรา *Penicillium pinophilum* SMCU3-14 ให้แอกทิวิตีสูงกว่าเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Arthrobacter* sp. AG-2 เสมอ และจากการผลิตเดกซ์แทรนเนสทั้งหมด เดกซ์แทรนเนส จากราที่มีเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรมเป็นสารชักนำจะให้แอกทิวิตีสูงที่สุด ปาเปนมีความสามารถย่อยโปรตีนดีกว่าเปปซิน เนื่องจากสามารถย่อยสลายคราบจุลินทรีย์ในช่วงความเป็นกรด-เบสที่กว้างกว่าเปปซิน เดกซ์แทรนเนสที่มีความจำเพาะต่อพันธะ α-1,6 สามารถผสมกับปาเปนได้และยังคงสลายคราบจุลินทรีย์ได้เช่นเดิม การใช้เดกซ์แทรนเนสร่วมกับปาเปนจึงย่อยสลายคราบจุลินทรีย์ได้ดีกว่าการใช้เดกซ์แทรนเนสหรือปาเปนเพียงอย่างใดอย่างหนึ่ง สารผสมเดกซ์แทรนเนสและปาเปนจะเตรียมเป็นสารทดสอบโดยการผสมพร้อมกันก่อนนำไปทดสอบการสลายคราบจุลินทรีย์ และส่วนผสมที่เหมาะสมที่สุดต่อการสลายคราบจุลินทรีย์ คือ เดกซ์แทรนเนสที่มีความจำเพาะต่อพันธะ α-1,6 ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 หน่วยต่อมิลลิลิตร และปาเปน ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.25 หน่วยต่อมิลลิลิตร โดยทำปฏิกิริยากับคราบจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที สามารถลดคราบจุลินทรีย์ ได้ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ โดยคราบจุลินทรีย์ที่ศึกษาผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดมีลักษณะคล้ายร่างแห เซลล์จุลินทรีย์ยึดติดกันน้อยลง ทำให้คราบจุลินทรีย์หลุดล่อนได้ง่ายขึ้น

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

ปีการศึกษา 2555 .....

5272558323 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
KEYWORDS : PROTEASE / DEXTRANASE / BIOFILM / *Streptococcus sobrinus* 6715 / *Arthrobacter* sp. AG-2 / *Pennicillium pinophilum* SMCU3-14

SANSANEE SIRILAK : APPLICATION OF PROTEASE ALONG WITH DEXTRANASE FOR MICROBIAL PLAQUE DEGRADATION IN AN *IN VITRO* MODEL. ADVISOR : ASSOC. PROF. SUTHEP THANIYAVARN, Ph.D., 113 pp.

The present study focus on microbial plaque degradation in an *in vitro* model by microbial dextranase of the fungus *Penicillium pinophilum* SMCU3-14 and bacteria *Arthrobacter* sp. AG-2. Regardless of inducer used, *P. pinophilum* SMCU3-14 produced higher dextranase activity than that of *Arthrobacter* sp. AG-2. Among all the systems employed, fungal dextranase with industrial grade dextran as inducer gave the highest dextranase activity. Papain showed better proteolytic activity than pepsin, the former showed better plaque degradation as well as wider pH range. Dextranase with α-1,6 specificity can withstand papain rather well. Papain along with dextranase could degrade plaque better than using dextranase or papain alone. Dextranase and papain mixture was blended together and use for plaque degradation. The best combination for plaque degradation is a mixture consisting of 10 unit/ml dextranase and 0.25 unit/ml papain. After 5 minutes incubation at room temperature, approximately 80% of plaque was reduced. A scanning electron microscope of the remaining plaque revealed a mesh-like structure with less bacterial adherence thus cause the detachment of plaque.

Department : Microbiology Student's Signature .....
Field of Study : Industrial Microbiology Advisor's Signature .....
Academic Year : 2012 .....

กิตติกรรมประกาศ

กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ในทุกขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย ตลอดจนตรวจแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.กาญจณา จันทองจีน ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็น รวมทั้งกรุณารับเป็นกรรมการจากภายนอกในการสอบวิทยานิพนธ์ กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.อัญชริดา อัครจรัลญา ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ กราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป นภาธร และอาจารย์ ดร.ปาหนัน เริงสำราญ ที่กรุณารับเป็นกรรมการภายในของการสอบวิทยานิพนธ์ ซึ่งให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัย ตลอดจนช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ ที่เอื้อเฟื้อเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงสำหรับไมโครไตเตอร์เพลต และกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา

กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.รัชชพิน ศรีสัจจะลักษณ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความอนุเคราะห์แบคทีเรียที่ใช้สร้างแบบจำลองคราบจุลินทรีย์ในงานวิจัยนี้สำหรับเป็นงานวิจัยนี้

ทั้งนี้ขอขอบคุณนางสาวณฤดี อัศวเสรีเลิศ และสมาชิกทุกคนในห้องปฏิบัติการห้อง 448 ตลอดจนเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน สำหรับทุกความห่วงใยและความช่วยเหลือที่มีให้ตลอดมา

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวของผู้วิจัยเป็นอย่างมากที่มีความห่วงใยและให้การสนับสนุนช่วยเหลือ รวมทั้งเป็นกำลังใจให้ผู้วิจัยตลอดมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ญ

สารบัญภาพ..... ฏ

สัญลักษณ์และคำย่อ..... ฒ

บทที่ 1 บทนำ..... 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 4

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 4

1.4 ขั้นตอนงานวิจัย..... 4

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 5

2.1 ช่องปาก..... 5

2.2 จุลินทรีย์ในช่องปาก..... 6

2.3 คราบจุลินทรีย์..... 8

2.4 ความสัมพันธ์ของการเกิดคราบจุลินทรีย์กับ Mutans Streptococci..... 9

2.5 คราบจุลินทรีย์และการเกิดโรคฟันผุ..... 10

2.6 โรคฟันผุ..... 11

2.7 การป้องกันฟันผุ..... 12

2.8 เดกซ์แทรน..... 16

2.9 เดกซ์แทรนเนส..... 17

2.10 โปรตีเอส..... 24

2.11 สารฟู่ หรือ เม็ดฟู่..... 29

หน้า

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 31
3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย..... 31
3.2 เคมีภัณฑ์..... 33
3.3 วิธีการดำเนินการวิจัย..... 35
3.3.1 จุลินทรีย์ในงานวิจัย..... 35
3.3.2 การเตรียมเดกซ์แทรนเพื่อใช้เป็นสารชักนำในการผลิตเดกซ์แทรนเนส..... 36
3.3.3 การเปรียบเทียบความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนสที่เหมาะสมในการผลิตเดกซ์แทรนที่มีพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,3 ในปริมาณสูง..... 37
3.3.4 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของการย่อยสลายเดกซ์แทรนที่มีพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,6 ออกจากเดกซ์แทรนที่ผลิตโดย *S. sobrinus* 6715 ด้วย เดกซ์แทรนเนส FI..... 37
3.3.5 การตรวจสอบว่าเดกซ์แทรนที่มีพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,3 ในปริมาณสูง เป็นเดกซ์แทรนที่เป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส..... 38
3.3.6 การผลิตเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. AG-2 และ *P. pinophilum* SMCU3-14 ด้วยสารชักนำคือ เดกซ์แทรนที่มีพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,6 เป็นส่วนใหญ่ (จากข้อ 3.3.2.1) เดกซ์แทรนที่มีพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,6 และ α-1,3 ที่ผลิตโดย *S. sobrinus* 6715 (จากข้อ 3.3.2.2) หรือ เดกซ์แทรนที่มีพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,3 ในปริมาณสูง (จากข้อ 3.3.2.3)..... 38
3.3.7 การตรวจสอบแอกทิวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนส..... 40
3.3.8 การสร้างคราบจุลินทรีย์ในไมโครไตเตอร์เพลตจากกล้าเชื้อ *S. sobrinus* 6715..... 41
3.3.9 การตรวจสอบปริมาณคราบจุลินทรีย์ที่ลดลง..... 42
3.3.10 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการสลายคราบจุลินทรีย์ด้วยเดกซ์แทรนเนส..... 43
3.3.11 การเพิ่มประสิทธิภาพในการลดคราบจุลินทรีย์ในแบบจำลองภายนอกร่างกาย..... 44

หน้า

บทที่ 4 ผลการทดลอง..... 51
4.1 การเตรียมเดกซ์แทรนเพื่อใช้เป็นสารชักนำในการผลิตเดกซ์แทรนเนส..... 51
4.2 แอกทิวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. AG-2 และ *P. pinophilum* SMCU3-14 ที่ชักนำด้วยเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 และเดกซ์แทรนที่มีพันธะ α-1,3 เป็นส่วนใหญ่ที่เหลือจากการย่อยเดกซ์แทนจาก *S.sobrinus* 6715 ด้วยเดกซ์แทรนเนส FI..... 63
4.3 การสร้างคราบจุลินทรีย์ในไมโครไตเตอร์เพลตจากกล้าเชื้อ *S. sobrinus* 6715 65
4.4 ภาวะที่เหมาะสมต่อการสลายคราบจุลินทรีย์ด้วยเดกซ์แทรนเนส..... 66
4.5 การเพิ่มประสิทธิภาพในการลดคราบจุลินทรีย์ในแบบจำลองภายนอกร่างกาย..... 72
4.6 การลดคราบจุลินทรีย์ในแบบจำลองภายนอกร่างกาย ภายในระยะเวลา 5 นาที..... 79
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ..... 90
รายการอ้างอิง..... 93
ภาคผนวก..... 101
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 113

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	การจัดแบ่งชนิดของแบคทีเรียในช่องปากออกเป็นพวกที่เจริญเติบโตได้ทั้งในภาวะที่มีออกซิเจนกับในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน กับพวกที่เจริญเติบโตได้เฉพาะในภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเท่านั้น พร้อมกับจัดแบ่งแบคทีเรียออกเป็นพวกแบคทีเรียรูปกลม แบคทีเรียรูปแท่ง สไปโรขีต และจุลินทรีย์อื่นๆ.....	7
2.2	จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้.....	19
4.1	แสดงการเปรียบเทียบแอกทิวิตี ปริมาณโปรตีน และแอกทิวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนส.....	64
4.2	แสดงแอกทิวิตีที่เหลือของเดกซ์แทรนเนส FI หลังจากผสมปาเปน เป็นเวลา 0-60 นาที และ เปอร์เซ็นต์คราบจุลินทรีย์ที่ลดลงจากการนำส่วนผสมไปทดสอบการสลายคราบจุลินทรีย์.....	79
4.3	แสดงเปอร์เซ็นต์คราบจุลินทรีย์ที่ลดลง จาการแปรผันความเข้มข้นของปาเปนและเดกซ์แทรนเนส FI.....	82
4.4	แสดงเปอร์เซ็นต์คราบจุลินทรีย์ที่ลดลงและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้น โดยเดกซ์แทรนเนส FI.....	85
4.5	แสดงเปอร์เซ็นต์คราบจุลินทรีย์ที่ลดลงและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นโดยสารผสมปาเปนและเดกซ์แทรนเนส FI.....	86

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	ภาพแสดงฟันและเนื้อเยื่อปริทันต์…….….....	5
2.2	ภาพแสดงรูปแบบของการเกาะกลุ่มกันของจุลินทรีย์ในช่องปากโดยแสดงบริเวณจดจำที่ใช้ในการเกาะติดกับ acquired pellicle กับ initial colonizers และแสดงการยึดเกาะระหว่าง initial colonizers กับ late colonizers โดยมี fusobacteria เชื่อมโยง.....	9
2.3	ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light micrographs) แสดงการยึดเกาะกันของ *S. mutans* บนผิวเคลือบฟันในแต่ละวันของการทดลองดังนี้ (a) วันที่ 1 (b) วันที่ 2 (c) วันที่ 4 และ (d) วันที่ 7……..……	11
2.4	ภาพบนแสดงการย้อมสีคราบจุลินทรีย์ของฟัน ภาพล่างแสดงฟันตัดที่ขูดคราบจุลินทรีย์ออก แสดงให้เห็นจุดขาวขุ่นบนฟัน (white spot) ในขณะที่ฟันซี่อื่นยังคงมีคราบจุลินทรีย์ ……..….	12
2.5	โครงสร้างของเดกซ์แทรน ……...……..	17
2.6	ปฏิกิริยาการเกิดเดกซ์แทรนโดยเอนไซม์เดกซ์แทรนซูเครส……..	16
2.7	กลไกการทำงานของเปปซิน……..	26
2.8	กลไกการทำงานของปาเปน…….	27
4.1	ลักษณะของเดกซ์แทรนที่มีพันธะ α-1,3 และ α-1,6 ที่ผลิตโดย *S. sobrinus* 6715	51
4.2	แสดงผลการย่อยเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *S. sobrinus* 6715 ด้วย เดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *P. pinophilum* SMCU3-14 หรือ เดกซ์แทรนเนส FI ที่มีความเข้มข้น (ก.) 20 หน่วยต่อมิลลิลิตร (ข.) 40 หน่วยต่อมิลลิลิตร (ค.) 60 หน่วยต่อมิลลิลิตร (ง.) 80 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ (จ.) 100 หน่วยต่อมิลลิลิตร โดยวัดจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นจากเวลาเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0)…….	51 53
4.3	ลักษณะเดกซ์แทรนที่มีพันธะ α-1,3 เป็นส่วนใหญ่ที่เหลือจากการย่อยเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *S. sobrinus* 6715 ด้วย เดกซ์แทรนเนส FI ที่มีความเข้มข้น (ก.) 20 หน่วยต่อมิลลิลิตร (ข.) 40 หน่วยต่อมิลลิลิตร (ค.) 60 หน่วยต่อมิลลิลิตร (ง.) 80 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ (จ.) 100 หน่วยต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาทำบริสุทธิ์เดกซ์แทรนบางส่วนแล้วทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งโดยใช้อุณหภูมิต่ำ.....	54 56

รูปที่		หน้า
4.4	โครมาโทรแกรมแสดง (ก) สารละลายมาตรฐาน และผลิตภัณฑ์ของการย่อยครั้งที่ 1 สำหรับการย่อยเดกซ์แทรนที่ผลิตโดย *S. sobrinus* 6715 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] แอกทิวิตีเท่ากับ 20 หน่วยต่อมิลลิลิตรที่เวลา (ข) 0.0 ชั่วโมง (ค) 0.5 ชั่วโมง (ง) 3.0 ชั่วโมง และ (จ) 9.0 ชั่วโมง.....	58
4.5	แสดงผลการย่อยครั้งที่ 1 ของการย่อยเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *S. sobrinus* 6715 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *P. pinophilum* SMCU3-14 แอกทิวิตี 20 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่มีการเติม/ไม่เติมเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] แอกทิวิตี 20 หน่วยต่อมิลลิลิตร เพิ่มที่เวลา 4.5 ชั่วโมง.....	59
4.6	แสดงผลการย่อยเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *S. sobrinus* 6715 ด้วย เดกซ์แทรนเนส FI ซึ่งมีแอกทิวิตี 20 หน่วยต่อมิลลิลิตร จำนวน 4 ครั้ง (ตามลูกศร) คือ ชั่วโมงที่ 0 ชั่วโมงที่ 8 ชั่วโมงที่ 16 และชั่วโมงที่ 24.....	60
4.7	โครมาโทรแกรมแสดง (ก) สารละลายมาตรฐาน และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายด้วยกรดซัลฟูริกของ (ข) เดกซ์แทรนที-2000 (ค) เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม (ง) เดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *S. sobrinus* 6715 และ (จ) เดกซ์แทรนที่มีพันธะ α-1,3 เป็นส่วนใหญ่ที่เหลือจากการย่อยเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *S. sobrinus* 6715 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6]…….……..	62
4.8	แสดงคราบจุลินทรีย์ที่เกิดจาก *S. sobrinus* 6715 ใน (ก) ไมโครไตเตอร์เพลต (ข) หลอดทดลอง.....	65
4.9	การสลายคราบจุลินทรีย์โดยเดกซ์แทรนเนส BI FI FB และ FB-1,3 ที่มีความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในระบบบัฟเฟอร์ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที….	66
4.10	การสลายคราบจุลินทรีย์โดย (ก) เดกซ์แทรนเนส FI (ข)เดกซ์แทรนเนส FB และ (ค) เดกซ์แทรนเนส FB-1,3 ที่มีความเข้มข้น 1 2 3 4 และ 5 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 5 และ 15 นาที ในระบบบัฟเฟอร์ อุณหภูมิห้อง.....	68
4.11	แสดงการย่อยสลายคราบจุลินทรีย์ของเดกซ์แทรนเนส (ก) FI และ (ข) FB ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 0-45 นาที แล้วเติมเดกซ์แทรนเนส (FI FB และ FB-1,3) ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 45 นาที แล้วย่อยสลายคราบต่ออีก 15 นาที.....	71

รูปที่ หน้า

4.12 แสดงผลการสลายคราบจุลินทรีย์ด้วยวิธีต่าง คือ วิธีที่ 1 คือ สารฟู่เพียงอย่างเดียว ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 5 นาที วิธีที่ 2 คือ สารฟู่ผสมกับเดกซ์แทรนเนส FI ทำปฏิกิริยาพร้อมกันเป็นเวลา 5 นาที และ วิธีที่ 3 คือ สารฟู่ ทำปฏิกิริยา 10 นาที แล้วเติมเดกซ์แทรนเนส FI ทำปฏิกิริยาต่อ 5 นาที รวมเวลาทำปฏิกิริยาเป็น 15 นาที..... 72

4.13 แสดงผลการสลายคราบจุลินทรีย์ด้วยเดกซ์แทรนเนส FI กับสารฟู่ที่มีอัตราส่วนผสมที่แตกต่างกัน..... 73

4.14 แสดงการสลายคราบจุลิทรีย์ด้วยปาเปน ที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส..... 74

4.15 แสดงการสลายคราบจุลิทรีย์ด้วยเปปซิน ที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส..... 75

4.16 แสดงคราบจุลินทรีย์ที่ลดลงโดยปาเปนและเปปซิน ที่บัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 2.0-8.0..... 76

4.17 แสดงคราบจุลินทรีย์ที่ลดลงโดยปาเปนและเปปซิน ที่บัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 2.5 และ 7.0..... 77

4.18 แสดงคราบจุลินทรีย์ที่ลดลงโดยปาเปนและเปปซิน ที่บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 2.5 และ 7.0 โดยทดสอบด้วยวิธีต่างๆ คือ วิธีที่ 1 คือ เดกซ์แทรนเนส FI FB หรือ FB-1,3 ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตรเท่านั้น ทำปฏิกิริยา 15 นาที วิธีที่ 2 คือ เดกซ์แทรนเนส FI FB หรือ FB-1,3 ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ผสมปาเปนความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาพร้อมกันเป็นเวลา 15 นาที และ วิธีที่ 3 คือ ปาเปนความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ทำปฏิกิริยา 10 นาที จากนั้นเทส่วนผสมทิ้งแล้วล้างน้ำ 3 ครั้ง จึงเติมเดกซ์แทรนเนส FI FB หรือ FB-1,3 ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาต่ออีก 15 นาที รวมเวลาทำปฏิกิริยาทั้งสิ้น 25 นาที..... 78

4.19 แสดงการสลายคราบจุลินทรีย์ของเดกซ์แทรนเนส FI ความเข้มข้น 1, 10, 20, 30, 40 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 0-5 นาที..... 80

รูปที่		หน้า
4.20	แสดงการสลายคราบจุลินทรีย์ของการผสมปาเปน ความเข้มข้น 1 3 หรือ 5 หน่วยต่อมิลลิลิตร กับเดกซ์แทรนเนส FI ความเข้มข้น 10 หน่วยต่อมิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาที่เวลา 0-5 นาที.....	81
4.21	แสดงเปอร์เซ็นต์คราบจุลินทรีย์ที่ลดลงจากการเติมสารทดสอบในภาวะต่างๆ.....	83
4.22	แสดงคราบจุลินทรีย์ที่ลดลงจากการแปรผันลำดับการเติมสารฟู ปาเปนและเดกซ์แทรนเนส.....	84
4.23	แสดงคราบจุลินทรีย์ที่ถูกสร้างบนแผ่นปิดสไลด์.....	87
4.24	(ก) แสดงลักษณะคราบจุลินทรีย์ที่เป็นชุดควบคุม เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยาย 2,000 เท่า (ซ้าย) และกำลังขยาย 7,500 เท่า (ขวา).....	88
	(ข) แสดงลักษณะคราบจุลินทรีย์ที่ย่อยด้วยปาเปน เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยาย 2,000 เท่า (ซ้าย) และกำลังขยาย 7,500 เท่า (ขวา)	88
	(ค) แสดงลักษณะคราบจุลินทรีย์ที่ย่อยด้วยเดกซ์แทรนเนส FI เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยาย 2,000 เท่า (ซ้าย) และกำลังขยาย 7,500 เท่า (ขวา)	89
	(ง) แสดงลักษณะคราบจุลินทรีย์ที่ย่อยด้วยสารละลายเดกซ์แทรนเนสและปาเปน เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยาย 2,000 เท่า (ซ้าย) และกำลังขยาย 7,500 เท่า (ขวา)	90

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

เดกซ์แทรนเนส BI = เดกซ์แทรนเนส [α-1,6] หรือ เดกซ์แทรนเนสที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Arthrobacter* sp. AG-2 โดยมีเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรมเป็นสารชักนำ จึงเป็นเอนไซม์ที่จำเพาะต่อพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,6

เดกซ์แทรนเนส BB = เดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และ α-1,6] หรือ เดกซ์แทรนเนสที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Arthrobacter* sp. AG-2 โดยมีเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *Streptococcus sobrinus* 6715 เป็นสารชักนำ จึงเป็นเอนไซม์ที่จำเพาะต่อพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,3 และชนิด α-1,6

เดกซ์แทรนเนส BB-1,3 = เดกซ์แทรนเนส [α-1,3] หรือ เดกซ์แทรนเนสที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Arthrobacter* sp.AG-2 โดยเดกซ์แทรนที่เป็นสารชักนำได้จากการย่อยพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,6 ออกจากเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *S. sobrinus* 6715 จึงเหลือพันธะชนิด α-1,3 เป็นส่วนใหญ่ จึงเป็นเอนไซม์ที่จำเพาะต่อพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,3

เดกซ์แทรนเนส FI = เดกซ์แทรนเนส [α-1,6] หรือ เดกซ์แทรนเนสที่ผลิตจากรา *Penicillium pinophilum* SMCU3-14 โดยมีเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรมเป็นสารชักนำ จึงเป็นเอนไซม์ที่จำเพาะต่อพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,6

เดกซ์แทรนเนส FB = เดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และ α-1,6] หรือ เดกซ์แทรนเนสที่ผลิตจากรา *P. pinophilum* SMCU3-14 โดยมีเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *S. sobrinus* 6715 เป็นสารชักนำ จึงเป็นเอนไซม์ที่จำเพาะต่อพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,3 และ α-1,6

เดกซ์แทรนเนส FB-1,3 = เดกซ์แทรนเนส [α-1,3] หรือ เดกซ์แทรนเนสที่ผลิตจากรา *P. pinophilum* SMCU3-14 โดยเดกซ์แทรนที่เป็นสารชักนำได้จากการย่อยพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,6 ออกจากเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *S. sobrinus* 6715 จึงเหลือพันธะชนิด α-1,3 เป็นส่วนใหญ่ จึงเป็นเอนไซม์ที่จำเพาะต่อพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,3

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สถานการณ์โรคฟันผุเป็นปัญหาในทุกกลุ่มอายุ โดยโรคฟันผุเกิดจากความไม่สมดุลของการอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์ในช่องปาก เนื่องจากกระบวนการเมแทบอไลต์ของจุลินทรีย์ในคราบจุลินทรีย์มีผลให้ค่าความเป็นกรด-เบสลดต่ำลงจนเกินจุดวิกฤติ (critical pH) ทำให้เกิดการสลายแร่ธาตุจากเคลือบฟัน แม้ว่าระบบบัฟเฟอร์ในช่องปากจะสามารถซ่อมแซมเพื่อการคืนกลับแร่ธาตุโดยปรับค่าความเป็นกรด-เบสกลับสู่ค่าปกติในเวลาต่อมาได้ก็ตาม (Tanzer, 1989; Edmondson, 1990 และ Van Houte, 1994)

คราบฟัน (dental plaque) เป็นแผ่นคราบบนผิวฟันที่ประกอบด้วยสารอินทรีย์ในกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์ โปรตีน ไขมัน อนุพันธ์ของไกลโคโปรตีนในน้ำลาย สารอนินทรีย์ และประชากรจุลินทรีย์ (Flemming และคณะ, 2000) ในรูปคราบจุลินทรีย์ที่เกิดจากการจับเกาะเป็นชั้นบางๆ ของจุลินทรีย์ร่วมกับโปรตีนจากน้ำลายที่เคลือบบนผิวฟัน จุลินทรีย์บางชนิดสร้างเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส (glucosyltransferases; GTFs) ที่หลั่งออกมานอกเซลล์สามารถไฮโดรไลซ์น้ำตาลซูโครสและก่อพอลิเมอร์ของน้ำตาลดี-กลูโคส (D-glucose) ที่เรียกกันว่า เดกซ์แทรน (dextran) และมิวแทน (mutan) ทั้งเดกซ์แทรนและมิวแทนนี้มีบทบาทสำคัญในการยึดเกาะกันของจุลินทรีย์กับผิวเคลือบฟัน (primary attachment หรือ colonization) เมื่อคราบฟันร่วมกับปัจจัยอื่นที่กล่าวมาข้างต้นจะเกิดเป็นพลาค (plaque) เกิดการสะสมของจุลินทรีย์อื่นๆ เกิดเมแทบอลิซึมปลดปล่อยกรดอินทรีย์ เช่น ไพรูวิค แลคติค ออกมาสลายเคลือบฟันและเนื้อฟัน (demineralization) จึงก่อโรคฟันผุได้ (Hayacibara และคณะ, 2004)

Streptococcus mutans และ *Streptococcus sobrinus* เป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มมิวแทนสเตร็บโตคอคไค (mutans streptococci) ที่พบมากในบริเวณคราบจุลินทรีย์ และรอยโรคฟันผุ (Musaka และคณะ, 1989) จึงเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญต่อการก่อโรคฟันผุในมนุษย์ ทั้งนี้ *S. mutans* และ *S. sobrinus* มีความสามารถในการสร้างกลูโคซิลทรานสเฟอเรสที่เกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์กลูแคนชนิดต่างๆจากน้ำตาลซูโครส คือ มิวแทนที่เป็นพอลิเมอร์ของกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,3 เป็นส่วนใหญ่ และเดกซ์แทรนที่เป็นพอลิเมอร์ของกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,6 เป็นส่วนใหญ่ (Hayacibara และคณะ, 2004) จึงทำให้เกิดคราบจุลินทรีย์บนผิวเคลือบฟัน ดังนั้น การป้องกันการสร้างหรือการสลายมิวแทนและเดกซ์แทรนจึงสามารถลดคราบจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคฟันผุได้

การป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ด้วยการลดการยึดเกาะของจุลินทรีย์ที่ผิวเคลือบฟันเป็นวิธีตรงในการป้องกันโรคฟันผุ โดยกดการทำงานของยีน *gtfB* และ *gtfC* เพื่อยับยั้งการสร้างกลูโคซิลทรานสเฟอเรส (Xiao และคณะ, 2007 และ Li และคณะ, 2009) หรือการใช้เดกซ์แทรนเนสยับยั้งการยึดเกาะของ *S. mutans* บริเวณผิวเรียบของฟันในหนูทดลอง (Hamada และคณะ, 1976) และบนแผ่นไฮดรอกซีอะปาไทต์ (hydroxyapatite disk) ทั้งระยะแรกของการเกาะติด และระยะที่มีการสะสมกลูแคนของคราบจุลินทรีย์ได้ (Simonson และ Jackola, 1979) ซึ่งการป้องกันการสร้างคราบจุลินทรีย์อย่างเดียวยังไม่เพียงพอในการป้องกันฟันผุ เนื่องจากคราบจุลินทรีย์ที่มีอยู่ยังสามารถทำให้เกิดโรคฟันผุได้เช่นเดิม ดังนั้น จึงต้องมีการสลายคราบจุลินทรีย์ควบคู่ไปกับการป้องกันการสร้างคราบจุลินทรีย์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการป้องกันฟันผุด้วย

มิวแทนและเดกซ์แทรนเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคสที่เกาะติดบนผิวเคลือบฟันอันเป็นต้นเหตุของการเกิดคราบจุลินทรีย์ ดังนั้น การสลายคราบจุลินทรีย์นี้สามารถทำได้โดยใช้เอนไซม์ที่มีความจำเพาะกับพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,3 และ/หรือ α-1,6 โดยงานวิจัยนี้เลือกใช้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่มีความจำเพาะกับพันธะไกลโคซิดิกและตัดพันธะไกลโคซิดิกที่เชื่อมระหว่างกลูโคสมอนอเมอร์ออกได้ การสร้างเอนไซม์นี้ต้องการสารชักนำ คือ เดกซ์แทรน (Igarashi และคณะ, 1998) และความจำเพาะของเดกซ์แทรนเนสต่อพันธะที่จะสลายขึ้นกับชนิดของพันธะของเดกซ์แทรนที่ใช้ในการชักนำนั้นๆ (Hare และคณะ, 1978) โดยเดกซ์แทรนที่สร้างจากจุลินทรีย์ต่างชนิดกันจะมีจำนวนของพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,6 และ α-1,3 แตกต่างกันไป และหากสารชักนำมีจำนวนของพันธะเป็นแบบใดมากก็จะสร้างเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อพันธะนั้นได้มากกว่า เช่น เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรมที่มีพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,6 ถึง 95 เปอร์เซ็นต์ จะชักนำให้จุลินทรีย์สร้างเดกซ์แทรนเนสชนิดที่มีความจำเพาะต่อพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,6 ได้มาก ส่วนเดกซ์แทรนที่มีพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,3 มากก็จะสร้างเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,3 (Dols และคณะ, 1997) แม้ว่าจุลินทรีย์กลุ่มสเตร็บโตคอคไคในช่องปากจะสร้างเดกซ์แทรนได้ทั้งสองชนิด แต่ชนิดที่มีพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,3 นั้น มีสมบัติทำให้เดกซ์แทรนละลายน้ำได้ยากและเป็นตัวก่อปัญหามากกว่าพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,6 จึงมีความต้องการเดกซ์แทรนเนสประเภทนี้มาก แต่เดกซ์แทรนที่มีพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,3 สูง (หรือที่เรียกอีกว่า มิวแทน) ที่มีขายในท้องตลาดนั้นมีราคาสูง จึงจำเป็นต้องผลิตจาก *S. sobrinus* 6715 เพื่อใช้เป็นสารชักนำขึ้นเอง และเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *S. sobrinus* 6715 ประกอบด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,3 มากถึง 67 เปอร์เซ็นต์ (Davis และคณะ, 1986)

จากการศึกษาของ ณฤดี อัศวเสรีเลิศ (2550) ในการเปรียบเทียบการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ระหว่างเดกซ์แทรนเนส และคลอเฮ็กซิดีนซึ่งเป็นยาฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในช่องปากที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย (Grenier, 1993) พบว่า เดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. AG-2 ที่ชักนำด้วยเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 และคลอเฮ็กซิดีนสามารถยับยั้งการเกิดคราบจุลินทรีย์ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และ 97.74 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนการสลายคราบจุลินทรีย์นั้น เดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. AG-2 ที่ชักนำด้วยเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม และคลอเฮ็กซิดีนสามารถสลายคราบจุลินทรีย์ได้เพียง 30.26 เปอร์เซ็นต์ และ 21.30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเดกซ์แทรนเนสและคลอเฮ็กซิดีนมีประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์มากกว่าการสลายคราบจุลินทรีย์

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า Krillase® ซึ่งเป็นโปรตีเอสจากระบบย่อยอาหารของกุ้ง (*Euphasia superba*) ที่มีสมบัติทั้งย่อยสลายพันธะเพปไทด์แบบสุ่มภายในสายโปรตีน (endopeptidase) และย่อยสลายพันธะเพปไทด์จากปลายสายโปรตีน (exopeptidase) สามารถสลายคราบจุลินทรีย์ได้เช่นกัน (Berg และคณะ, 2001) แต่ทั้งเดกซ์แทรนเนสและโปรตีเอสเพียงชนิดใดชนิดหนึ่งยังไม่สามารถสลายคราบจุลินทรีย์ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ แม้ว่าในระบบที่มีแต่โปรตีเอสและเดกซ์แทรนเนสเพียงชนิดใดชนิดหนึ่งนั้น เอนไซม์ทั้งสองจะทำงานได้ดีก็ตาม ทั้งนี้อาจเนื่องจากคราบจุลินทรีย์ประกอบด้วยสารอินทรีย์ที่เป็นพอลิแซ็กคาไรด์และโปรตีนเป็นส่วนใหญ่ ส่วนโปรตีนนั้นอาจบดบังการเข้าทำงานของเดกซ์แทรนเนสได้ ดังนั้น คาดว่าการย่อยสลายโปรตีนด้วยโปรตีเอสตามด้วยการย่อยสลายเดกซ์แทรนด้วยเดกซ์แทรนเนสจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการสลายคราบจุลินทรีย์ได้

โปรตีเอสจำแนกตามกลไกการทำงานได้เป็น กลุ่มเซรีนโปรตีเอส (serine protease) ซัลฟ์ไฮดริลโปรตีเอส (sulfhydryl protease) แอซิดโปรตีเอส (acid protease) และเมทัลโลโปรตีเอส (metalloprotease) ซึ่งสามารถย่อยสลายพันธะเพปไทด์แบบสุ่มภายในสายโปรตีนและจากปลายสายโปรตีนได้ (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2543 และ Arbige และ Pitcher, 1986) โดยการสลายคราบจุลินทรีย์นี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำความสะอาดอุปกรณ์ที่ใช้ภายในช่องปากโดยใช้โปรตีเอสร่วมกับเดกซ์แทรนเนส จึงต้องคัดเลือกชนิดของโปรตีเอสโดยคำนึงถึงความปลอดภัย ราคา ภาวะของการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมใกล้เคียงกับเดกซ์แทรนเนส สามารถสลายโปรตีนได้รวดเร็วและหลากหลาย ในที่นี้ จึงคัดเลือกโปรตีเอสที่ผลิตในเชิงพาณิชย์เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร คือ ปาเปนและเปปซิน สำหรับเดกซ์แทรนเนสที่ใช้ คือ เดกซ์แทรนเนสที่ผลิตจาก *Arthrobacter* sp. AG-2 ซึ่งคัดแยกจากดินในจังหวัดนนทบุรีโดยณฐินี สุวรรณสิงห์ (2540) และ

เดกซ์แทรนเนสที่ผลิตจาก *P. pinophilum* SMCU3-14 ซึ่งได้จากการกลายพันธุ์ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตและ NTG (สุวรรณา นพพรพันธ์, 2538) ในการสลายคราบจุลินทรีย์ในไมโครไตเตอร์เพลตที่ใช้เป็นแบบจำลองภายนอกร่างกาย

สำหรับการศึกษานี้จะเน้นการสลายคราบจุลินทรีย์ที่สร้างจาก *S. sobrinus* 6715 ในไมโครไตเตอร์เพลตหรือหลอดทดลองที่ใช้เป็นแบบจำลองภายนอกร่างกาย โดยใช้เวลาทำปฏิกิริยาที่น้อยที่สุด ซึ่งจะศึกษาภาวะที่เหมาะสม ของแต่ละส่วนผสม ส่วนผสมที่เหมาะสม อัตราส่วนที่เหมาะสม เป็นต้น ทั้งนี้ เพื่อจะสามารถนำผลการศึกษาที่ได้นี้ นำไปประยุกต์ใช้ทำความสะอาดอุปกรณ์ภายในช่องปาก ฟันปลอม ได้ต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

หาภาวะที่เหมาะสมในการใช้โปรตีเอสร่วมกับเดกซ์แทรนเนสเพื่อสลายคราบจุลินทรีย์ในแบบจำลองภายนอกร่างกาย

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบภาวะที่เหมาะสมของการนำโปรตีเอสไปใช้ร่วมกับเดกซ์แทรนเนสเพื่อสลายคราบจุลินทรีย์บนแบบจำลองภายนอกร่างกาย ซึ่งสามารถประยุกต์ใช้ทำความสะอาดอุปกรณ์ที่ใช้ภายในช่องปาก

1.4 ขั้นตอนงานวิจัย

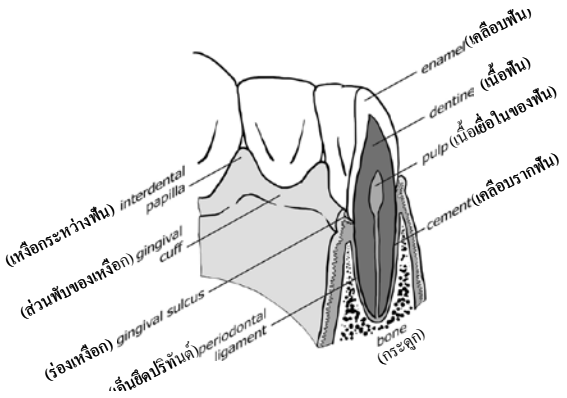
1) เตรียมเดกซ์แทรนเพื่อใช้เป็นสารชักนำในการผลิตเดกซ์แทรนเนส
2) ผลิตเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. AG-2 และ *P. pinophilum* SMCU3-14
3) คัดเลือกชนิดของโปรตีเอส
4) หาภาวะที่เหมาะสมในการสลายคราบจุลินทรีย์ในไมโครไตเตอร์เพลตโดยโปรตีเอสที่คัดเลือก และเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. AG-2 และ *P. pinophilum* SMCU 3-14

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในช่องปากมีพื้นที่ประมาณ 214.7 + 12.9 cm^2 (Collins และ Dawes,1987) ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของทางเดินอาหารที่มีฟันช่วยกัด ฉีก บด เคี้ยวอาหารที่รับประทานให้มีขนาดเล็กลงก่อนส่งผ่านสู่ระบบการย่อยอาหาร ทำให้ร่างกายได้รับพลังงานเพื่อการดำรงชีวิต อีกทั้งยังทำงานร่วมกับคอหอยและกล่องเสียงในการสร้างเสียงเพื่อใช้สื่อสาร รวมถึงช่วยรักษารูปหน้าและเสริมสร้างบุคลิกภาพ แต่จากผลการสำรวจสภาวะทันตสุขภาพแห่งชาติครั้งที่ 6 พ.ศ. 2549-2550 (กรมอนามัย, 2551) พบว่า ทุกวัยล้วนมีปัญหาสุขภาพช่องปาก เช่น โรคฟันผุ โรคปริทันต์ ดังนั้นการทำความสะอาดช่องปากและฟันถูกวิธีอย่างสม่ำเสมอหรือการใช้น้ำยาบ้วนปากร่วมกับการแปรงฟันในผู้สูงอายุที่มีปัญหาเรื่องกล้ามเนื้อมือ ช่วยลดสาเหตุของโรคฟันผุและโรคปริทันต์ได้

2.1 ช่องปาก

ฟันประกอบด้วยเนื้อเยื่อแข็งและเนื้อเยื่ออ่อน ดังรูปที่ 2.1 โดยมีเนื้อเยื่อแข็ง 3 ชนิด คือ เคลือบฟัน (enamel) เนื้อฟัน (dentine) และเคลือบรากฟัน (cementum) ซึ่งมีผลึกของไฮดรอกซีอะปาไทต์เป็นส่วนประกอบหลักในเปอร์เซ็นต์ที่แตกต่างกัน ที่เหลือคือ น้ำ คอลลาเจนและสารมิวโคพอลิแซ็กคาไรด์ ส่วนเนื่อเยื่ออ่อน 1 ชนิด คือเนื้อเยื่อในของฟัน (dental pulp) ประกอบด้วยหลอดเลือด หลอดน้ำเหลือง และเส้นประสาท ทำหน้าที่นำอาหารสู่ฟัน ส่งความรู้สึกจากฟันไปโพรงฟันแล้วนำไปสู่สมอง ถ้าเชื้อโรคลุกลามเข้ามาถึงชั้นนี้ จะทำให้เกิดอาการอักเสบ และการทำลายของเส้นเลือด เส้นประสาท เป็นเหตุให้ฟันตายได้ (ชัชรี สุชาติล้ำพงศ์ และ ณัฏยา อัศวรฤทธิ์, 2545 และ สิทธิชัย ขุนทองแก้ว, 2552)



รูปที่ 2.1 ภาพแสดงฟันและเนื้อเยื่อปริทันต์ (ดัดแปลงจาก Hillson, 2005)

น้ำลายมีหน้าที่เกี่ยวกับการย่อยอาหาร การพูด และป้องกันการเกิดโรคฟันผุ เนื่องจากมีการชะล้าง มีสารต้านจุลชีพ มีความเป็นบัฟเฟอร์ และโปรตีนในน้ำลายช่วยป้องกันการสลายแร่ธาตุ (deminernalizetion) และยังมีแร่ธาตุที่ช่วยในการคืนกลับแร่ธาตุ (remineralization) ของเคลือบฟันทำให้เกิดสมดุลระหว่างการละลายและการคืนกลับของแร่ธาตุ แต่ถ้าภายในช่องปากมีความเป็นกรด-เบสต่ำกว่าค่าความเป็นกรด-เบสวิกฤติ (critical pH) ที่มีค่าประมาณ 5.2-5.5 แล้วการละลายแร่ธาตุจะเกิดมากกว่าการคืนกลับของแร่ธาตุทำให้เกิดฟันผุได้ (Edmonson, 1990)

ในน้ำลายยังมีโปรตีนและมิวซินซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่จะรวมกับพอลิแซ็กคาไรด์เกิดเป็นไกลโคโปรตีนที่มีอิทธิพลต่อการเกาะกลุ่มกันของแบคทีเรียในช่องปาก โดยโปรตีนบางชนิดในน้ำลายที่มีสภาพเป็นกรดเกิดแรงดึงดูดกับแคลเซียมบริเวณผิวเคลือบฟันทำให้เกิดการยึดติดกับผิวเคลือบฟัน และโปรตีนในสภาพเป็นเบสยึดเหนี่ยวกับอนุมูลฟอสเฟตบนผิวเคลือบฟัน ทำให้เกิดเป็นโครงสร้างของฟิล์มบางๆ (acquired pellicle) ที่ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า และพัฒนาเป็นคราบจุลินทรีย์ต่อไป

2.2 จุลินทรีย์ในช่องปาก

ในช่องปากสามารถพบจุลินทรีย์ได้ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ สไปโรชีต ไมโครพลาสมา ไวรัสและโปรโตซัว แต่ที่พบมากที่สุดและเป็นสาเหตุของโรคฟันผุ คือแบคทีเรีย แบคทีเรียที่พบมีมากกว่า 500 ชนิด โดยชนิดและปริมาณที่พบในแต่ละบริเวณของช่องปากขึ้นกับปัจจัยทางกายภาพ เช่น ปริมาณออกซิเจน อาหาร ปัจจัยของเจ้าบ้าน เช่น น้ำลาย และปัจจัยของแบคทีเรีย เช่น ความสามารถในการยึดเกาะ (Robert, 2005)

แบคทีเรียในช่องปากสามารถแบ่งตามคุณสมบัติในการสร้างกรดได้ 3 กลุ่ม คือ แบคทีเรียที่สร้างกรด (acidogenic bacteria) แบคทีเรียที่ไม่มีการสร้างกรด (non-acidogenic bacteria) และแบคทีเรียที่สร้างเบส (base-producing bacteria) นอกจากนั้นยังมีการแบ่งตามรูปร่าง การย้อมติดสีแกรม ความต้องการ กึ่งต้องการหรือไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต ตามตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 การจัดแบ่งชนิดของแบคทีเรียในช่องปากออกเป็นพวกที่เจริญเติบโตได้ทั้งในภาวะที่มีออกซิเจนกับในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน 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. atypical* *-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.

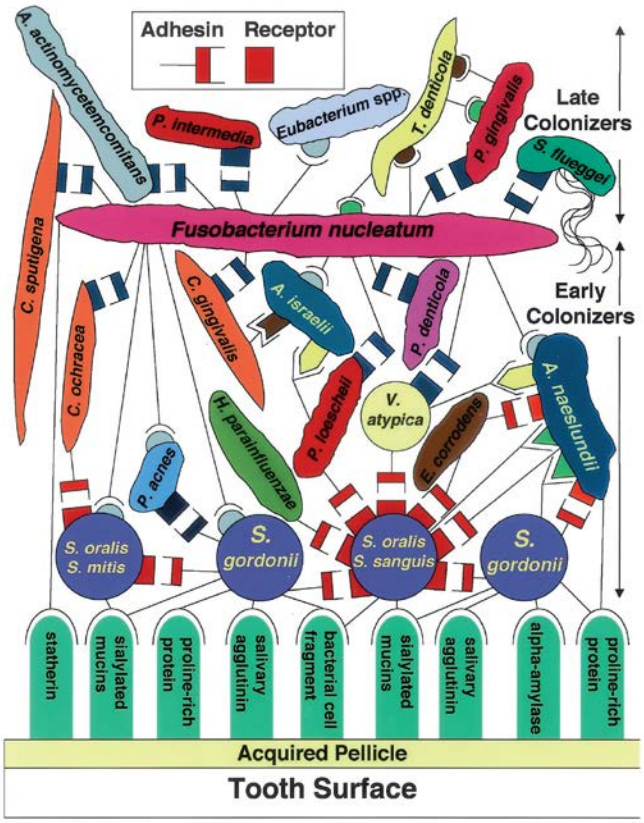
ปกติในช่องปากจุลินทรีย์จะอยู่ร่วมกันอย่างสมดุล แต่เมื่อเกิดปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ เช่น การรับประทานคาร์โบไฮเดรตโดยเฉพาะน้ำตาลซูโครส น้ำตาลจะถูกย่อยสลายเกิดภาวะกรดทำให้ยับยั้งแบคทีเรียส่วนใหญ่ แต่แบคทีเรียทนกรด เช่น *Streptococci* และ *Lactobacilli* สามารถเจริญเติบโตและสร้างกลูแคนในการยึดเกาะ เกิดเป็นคราบจุลินทรีย์และทำให้เกิดโรคฟันผุ

จุลินทรีย์ที่สำคัญที่พบได้บ่อยในรอยโรคฟันผุ คือ mutan streptococci ซึ่งประกอบด้วย *S. mutans S. sobrinus S. crecetus* และ *S. rattus* โดยจุลินทรีย์ที่พบมากที่สุดในคราบจุลินทรีย์ของมนุษย์คือ *S. mutans* รองลงมาคือ *S. sobrinus* จึงสรุปได้ว่าทั้งสองสายพันธุ์มีความสำคัญต่อการก่อโรคฟันผุในมนุษย์ ทั้งนี้ Yoo และคณะ (2005) พบว่า *S. downei* ที่อยู่ในคราบจุลินทรีย์ของลิง (*Macaca fascicuralis*) สามารถแยกได้จากคราบจุลินทรีย์ในช่องปากของคนเช่นเดียวกัน

2.3 คราบจุลินทรีย์

จากการศึกษาของ Ritz (1967) พบว่า *Streptococci* สามารถตรวจพบตลอดระยะเวลาการสร้างคราบจุลินทรีย์ แต่ *Neisseriae* และ *Nocardia* เป็นจุลินทรีย์ที่ใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโตกลับพบได้เพียงช่วงแรก ต่อมาพบ *Fusobactrium Corynebacterium* และ *Veillonella* ที่เป็นจุลินทรีย์ไม่ใช้หรือกึ่งใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโต แสดงว่าตลอดการสร้างคราบจุลินทรีย์มีการเปลี่ยนกลุ่มของจุลินทรีย์จากสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนไป และความหนาของคราบจุลินทรีย์ทำให้เกิดภาวะที่เหมาะสมกับจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้ออกซิเจน

การสร้างคราบจุลินทรีย์เริ่มจากแบคทีเรียกลุ่มแรก (initial colonizer) เข้ายึดเกาะกับ acquired pellicle และพบแบคทีเรียในกลุ่มที่สอง (late colonizer) เข้ายึดเกาะกับจุลินทรีย์กลุ่มแรก ส่วน *Fusobacterium nuclessum* พบในระยะเวลารอยต่อของทั้งสองกลุ่ม นอกจากนั้นแบคทีเรียในทั้งสองกลุ่ม เช่น *S. gordonii S. mutans* และ *S. sobrinus* ยังมีการสร้างพอลิแซ็กคาไรด์นอกเซลล์ เช่น กลูแคน (glucan) เพื่อช่วยในการยึดเกาะกันแน่นโดยไม่ผันกลับด้วย (Kolenbrader, 2002) ดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 ภาพแสดงรูปแบบของการเกาะกลุ่มกันของจุลินทรีย์ในช่องปาก โดยแสดงบริเวณจดจำที่ใช้ในการเกาะติดกับ acquired pellicle กับ initial colonizers และแสดงการยึดเกาะระหว่าง initial colonizers กับ late colonizers โดยมี fusobacteria เชื่อมโยง (Kolenbrader, 2002)

2.4 ความสัมพันธ์ของการเกิดคราบจุลินทรีย์กับ Mutans Streptococci

Mutans Streptococci มีเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส (glutosyltransferases: GTFs) ที่หลั่งออกมานอกเซลล์ทำให้เกิดการสังเคราะห์กลูแคนจากน้ำตาลซูโครส โดยเอนไซม์สามารถสร้างกลูแคนที่ไม่ละลายน้ำที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,3 เป็นส่วนใหญ่ หรือเรียกว่ามิวแทน (mutan) สร้างกลูแคนชนิดที่ละลายน้ำและไม่ละลายน้ำที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,3 และ 1,6 และสร้างกลูแคนชนิดที่ละลายน้ำที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,6 เป็นส่วนใหญ่ หรือเรียกว่าเดกซ์แทรน (dextran) (Mitsue และคณะ, 2004) กลูแคนที่มีความเหนียวหนืดนี้จะเป็นที่ยึดเกาะของจุลินทรีย์บนผิวเคลือบฟัน นอกจากนั้นยังมีเอนไซม์ฟรุคโตซิลทรานสเฟอเรส (fructosyltransferase: FTF) ที่สลายน้ำตาลซูโครสแล้วเปลี่ยนเป็นพอลิเมอร์ที่เรียกว่าฟรุคแตนส์ แต่การยึดเกาะของ *S. mutans* และ *S. sobrinus* ขึ้นกับกลูแคนมากกว่าฟรุคแตนส์ (Rozen, 2001) และเป็นการยึดเกาะแบบไม่ผันกลับที่ต้องอาศัยซูโครส โดยเดกซ์แทรนมีบทบาทในการยึดเกาะเช่นเดียวกับมิวแทน เนื่องจากเมื่อสลายเดกซ์แทรนด้วยเดกซ์แทรนเนสที่สามารถย่อยพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,6 ก่อน แล้วทำปฏิกิริยากับ *S. mutans* มีผลให้ *S. mutans* ยึดเกาะพื้นผิวลดลง

2.5 คราบจุลินทรีย์และการเกิดโรคฟันผุ

แบคทีเรียที่มีความสำคัญในการก่อโรคฟันผุในมนุษย์มีคุณสมบัติสำคัญดังนี้

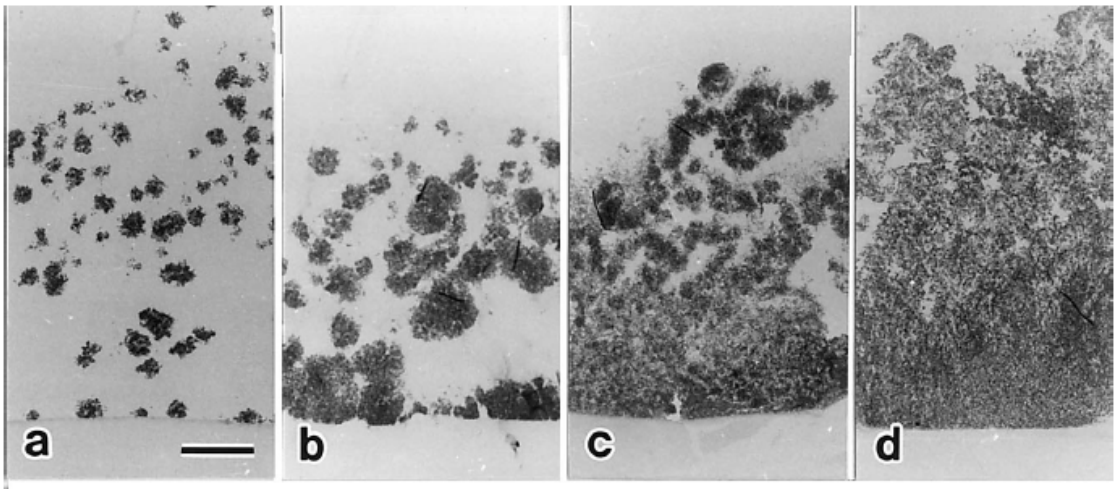
2.5.1 ความสามารถในการยึดเกาะกับผิวเคลือบฟัน

การยึดเกาะสามารถเกิดขึ้นได้ในสภาวะที่มีและไม่มีน้ำตาลซูโครส ซึ่งในสภาวะที่ไม่มีน้ำตาลซูโครสนั้น แบคทีเรียจะมีการยึดเหนี่ยวระหว่างผิวเคลือบฟันไม่แน่นหนาทำให้เกิดการผันกลับได้จึงหลุดจากผิวเคลือบฟันได้ง่าย อีกทั้งยังมีการสร้างกรดและพอลิแซ็กคาไรด์ภายในเซลล์ ที่เป็นสารอาหารสำรองยามที่เซลล์ขาดแคลนอาหารไม่มาก แต่ในสภาวะที่มีน้ำตาลซูโครสนั้นจะเกิดการย่อยสลายน้ำตาลซูโครสได้สารหลายชนิด เช่น พอลิแซ็กคาไรด์ภายในเซลล์ (intracellular polysaccharide) พอลิแซ็กคาไรด์ภายนอกเซลล์ (extracellular polysaccharide) กรดอินทรีย์ และพลังงาน โดยพอลิแซ็กคาไรด์ภายนอกเซลล์ เช่น เดกซ์แทรน มีลักษณะเหนียวหนืด จึงช่วยในการยึดเกาะกับผิวเคลือบฟันและช่วยส่งเสริมการเกาะติดกับแบคทีเรียชนิดอื่นที่ไม่สามารถสร้างพอลิเมอร์ภายนอกเซลล์ได้ เกิดเป็นคราบจุลินทรีย์ที่มีความแข็งแรงและห่อหุ้มแบคทีเรียที่หลากหลายไว้ด้วยกัน จนเกิดเป็นสังคมของจุลินทรีย์ (สิทธิชัย ขุนทองแก้ว, 2552)

2.5.2 ความสามารถในการสร้างกรดและการทนกรด

แบคทีเรียในช่องปากต้องมีการปรับตัวให้เหมาะสมกับการเปลี่ยนแปลงของระดับน้ำตาลรอบๆ ตัวจากการรับประทานอาหาร เครื่องดื่ม โดยผ่านกระบวนการนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์เพื่อความอยู่รอด ดังนั้นจึงมีความสามารถในการนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ได้ในภาวะที่มีปริมาณน้ำตาลต่ำหรือสูง จึงอยู่รอดและเจริญได้ดีกว่าแบคทีเรียอื่นๆ น้ำตาลจะถูกสลายได้พลังงานและกรด กรดนี้จะเข้าทำลายผิวเคลือบฟันโดยตรงและส่งผลให้บริเวณรอบเซลล์มีความเป็นกรดเพิ่มขึ้น ทำให้สภาพโดยรวมในช่องปากมีค่าความเป็นกรด-เบสที่ต่ำกว่าค่าความเป็น กรด-เบสวิกฤติ (critical pH) และส่งเสริมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทนกรด (สิทธิชัย ขุนทองแก้ว, 2552)

จากการศึกษาของ Hashizume และคณะ (2002) พบว่าการสร้างคราบจุลินทรีย์นอกร่างกาย (*in vitro*) ของ *S. mutans* ทำให้ความเป็นกรด-เบสลดลงจาก 7 เป็น 4 ตั้งแต่วันแรกและคงความเป็นกรดตลอด 7 วันของการทดลอง อีกทั้งยังเกิดการเกาะกลุ่ม เพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ตลอดระยะเวลาที่สัมผัสกับผิวเคลือบฟันจำลอง ดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light micrographs) แสดงการยึดเกาะกันของ *S. mutans* บนผิวเคลือบฟันในแต่ละวันของการทดลองดังนี้ (a) วันที่ 1 (b) วันที่ 2 (c) วันที่ 4 และ (d) วันที่ 7 (Hashizume และคณะ, 2002)

2.6 โรคฟันผุ

จากผลการสำรวจสภาวะทันตสุขภาพแห่งชาติครั้งที่ 6 พ.ศ. 2549-2550 (กรมอนามัย, 2551) พบว่า โรคฟันผุมีแนวโน้มที่ดีขึ้นหากเทียบกับการสำรวจในอดีต แต่ในเด็กก่อนวัยเรียน วัยเรียนและเยาวชนยังพบภาวะการเกิดโรคฟันผุอยู่ ในขณะที่วัยทำงานและผู้สูงอายุมีปัญหาการสูญเสียฟันจากโรคปริทันต์ ซึ่งทั้งโรคฟันผุและโรคปริทันต์ล้วนมีสาเหตุจากคราบจุลินทรีย์ทั้งสิ้น แต่ในที่นี้ขอกล่าวถึงเพียงโรคฟันผุเท่านั้น

การเกิดโรคฟันผุเกิดจากหลายปัจจัยรวมกัน อย่างเช่น แบคทีเรียที่ทำให้เกิดคราบจุลินทรีย์ คาร์โบไฮเดรตจากอาหาร และส่วนของความไวรับของฟัน (susceptible teeth) เนื่องจาก Mutans Streptococci เช่น *S. mutans S. sobrinus* สร้างกลูแคนที่มีลักษณะเหนียวหนืดยึดติดกับเคลือบฟันทำให้เกิดการยึดเกาะของจุลินทรีย์อื่นๆจนเป็นสังคมจุลินทรีย์ที่สามารถเมแทบอไลท์คาร์โบไฮเดรตจากอาหารแล้วเกิดกรด ส่งผลให้ค่าความเป็นกรด-เบสลดต่ำลงจนเกินจุดวิกฤติ ทำให้เกิดการสลายแร่ธาตุจากเคลือบฟัน แม้ว่าระบบบัฟเฟอร์จะทำงานให้ค่าความเป็นกรด-เบสกลับสู่ค่าปกติและร่างกายเกิดการซ่อมแซมโดยการคืนกลับแร่ธาตุในเวลาต่อมา (Tanzer, 1989 และ Houte, 1994) แต่ถ้าไม่รักษาสุขลักษณะช่องปาก มีการบริโภคคาร์โบไฮเดรตบ่อยครั้ง เกิดกรดทำลายผิวเคลือบฟัน เกิดภาวะที่เหมาะสมกับแบคทีเรียที่ก่อโรคฟันผุ มีคราบจุลินทรีย์คอยป้องกันจากภาวะที่ไม่เหมาะสมแล้ว โรคฟันผุย่อมเกิดขึ้นตามมาอย่างแน่นอน

โดยฟันผุในระยะแรกจะเห็นเป็นรอยโรคฟันผุสีขาว (white spot) (รูปที่ 2.4) หากมีการลุกลามของโรคจะเกิดอาการเสียวฟัน ปวดฟัน เกิดเป็นโพรงและสูญเสียฟันในที่สุด แต่ถ้าสามารถหยุดปัจจัยที่ทำให้เกิดฟันผุได้ตั้งแต่ระยะแรกก็จะไม่เกิดอาการลุกลามแต่จะทำให้เกิดเป็นรอยโรคสีน้ำตาล (brown spot) แทน (สิทธิชัย ขุนทองแก้ว, 2552)

รูปที่ 2.4 ภาพบนแสดงการย้อมสีคราบจุลินทรีย์ของฟัน ภาพล่างแสดงฟันตัดที่ขูดคราบจุลินทรีย์ออก แสดงให้เห็นจุดขาวขุ่นบนฟัน (white spot) ในขณะที่ฟันซี่อื่นยังคงมีคราบจุลินทรีย์ (Edwina, 2005)

2.7 การป้องกันฟันผุ

2.7.1 การใช้วิธีทางกายภาพ

การทำความสะอาดฟันโดยการแปรงฟันนั้นช่วยกำจัดคราบจุลินทรีย์ได้ แต่เนื่องจากพฤติกรรมในการทำความสะอาดฟันของคนแต่ละคนไม่เท่ากัน อาจยังมีคราบจุลินทรีย์ที่ซึ่งยากแก่การมองเห็นด้วยตาเปล่าหลงเหลืออยู่ ดังนั้นจึงอาจใช้สีย้อมคราบจุลินทรีย์ เช่น ปองโซ 4 อาร์ เป็นตัวบ่งชี้ความสะอาดหลังการแปรงฟันเพื่อเสริมประสิทธิภาพในการดูแลอนามัยช่องปาก (เกศสุดา เงินประเสริฐ, 2538)

2.7.2 การเคลือบฟันและร่องฟัน (Fissure sealant)

การใช้วัสดุที่สามารถยึดเกาะกับผิวฟันและแข็งตัวได้ เคลือบบริเวณหลุมหรือร่องฟันที่ยากแก่การทำความสะอาด เพื่อไม่ให้จุลินทรีย์เข้ามาอาศัยอยู่ในร่องฟันแล้วทำให้เกิดฟันผุได้ง่าย แต่ปัญหาที่ตามมาคือ การเกิดโรคฟันผุซ้ำจากบริเวณเคลือบที่มีรอยโรคอยู่แล้ว วัสดุเคลือบติดร่องฟันได้ไม่นาน วัสดุเคลือบฟันถูกทำลายด้วยกรดจากจุลินทรีย์ ทำให้จุลินทรีย์สามารถแทรกตัวเข้าไปทำลายเนื้อฟันได้เช่นเดิม (Silverstone, 1974)

2.7.3 การใช้สารประกอบเรซิน (resin composite)

Imazato (1995) ศึกษาการตรึงโมโนเมอร์ของ methacryloyloxydodecyl-pyridinium bromide (MDPB) ให้อยู่ในรูปพอลิเมอร์ที่ละลายน้ำได้และไม่ละลายน้ำในสารประกอบเรซิน หลังจากการทำให้เรซินแข็งตัว พบว่า กิจกรรม (activity) จะลดลงกว่าเดิม แต่ยังคงมีประสิทธิภาพในการควบคุมและยับยั้งกลุ่มเสต็บโตคอกคัสในช่องปาก (oral streptococcus) ได้มากกว่าโมโนเมอร์ที่ไม่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลังจากการทำให้เรซินแข็งตัว

Imazato และคณะ (2003) พบว่า เรซินผสม MDPB ที่ยังไม่แข็งตัวในสภาวะที่ไม่มีน้ำลายสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. mutans* ได้อย่างสมบูรณ์ และในภาวะที่มีน้ำลาย สามารถยับยั้งได้มากกว่าร้อยละ 99.9 และมีแบคทีเรียมายึดเกาะน้อยกว่าที่ผสม MDPB

2.7.4 การใช้ฟลูออไรด์ (Fluoride)

ฟลูออไรด์ช่วยป้องกันฟันผุ เพราะฟลูออไรด์มีขนาดเล็กกว่าไอออนไฮดรอกซิล แต่มีประจุลบเหมือนกันจึงแทนที่กันได้ในธรรมชาติ ทำให้ผลึกมีขนาดเล็กลงและมีความเสถียรมากขึ้น การละลายของผลึกลดลงจึงช่วยลดการทำลายเคลือบฟันได้ (Robinson และคณะ, 2000) หรือฟลูออไรด์รวมกับผลึกกลายเป็นฟลูออร์อะปาไทต์ที่ทนการละลายจากกรดกว่าเดิม และฟลูออไรด์ยังยับยั้งเมแทบอลึซึมของจุลินทรีย์ได้ทำให้ไม่เกิดกรด ดังนั้น การใช้ฟลูออไรด์จึงเป็นอีกทางหนึ่งในการป้องกันโรคฟันผุ

จากการศึกษาของขวัญชนก รัตนอุบล (2542) พบว่ายาสีฟันผสมฟลูออไรด์ 1,000 ส่วนในล้านส่วน มีผลต่อการเพิ่มความแข็งของผิวฟันน้ำนมมากกว่ายาสีฟันผสมฟลูออไรด์ 500 ส่วนในล้านส่วน แต่การได้รับฟลูออไรด์มากเกินอาจเกิดความผิดปกติของกระดูก เกิดโรคฟันตกกระ เกิดความผิดปกติของระบบทางเดินอาหาร

จากการศึกษาของกฤษณ์ชัย เบศรภิญโญวงศ์ (2544) พบว่า การทดลองในเซลล์โพรงฟัน ฟลูออไรด์จะยับยั้งการสร้างเส้นใยคอลลาเจน ลดระดับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และลดการเจริญของเซลล์ด้วย

2.7.5 การใช้น้ำตาลเทียม (Artificial sweetener)

การใช้สารให้ความหวานอื่น เช่น น้ำตาลไซลิทอล น้ำตาลแมนนิทอล น้ำตาลซอร์บิทอล แทนน้ำตาลโมโนแซคคาไรด์หรือไดแซคคาไรด์ ทำให้จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคฟันผุไม่สามารถเมแทบอไลท์น้ำตาลเทียม จึงไม่เกิดกรดทำลายเคลือบฟัน (Ly และคณะ, 2006)

2.7.6 การใช้ยาปฏิชีวนะและสารต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Antibiotic and anti-microbial agent)

ยาปฏิชีวนะมีผลยับยั้งจุลินทรีย์จึงใช้ผสมในผลิตภัณฑ์เพื่อป้องกันฟันผุ แต่เนื่องจากอำนาจของยาปฏิชีวนะไม่สามารถจำกัดการฆ่าเฉพาะจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคฟันผุ รวมถึงมีผลให้เชื้อเกิดการดื้อยา เชื้อประจำถิ่นลดลงทำให้เชื้อฉวยโอกาสเจริญเพิ่มมากขึ้น วิธีนี้จึงไม่นิยมใช้เท่าที่ควร (Berg และคณะ, 2001)

2.7.7 การใช้วัคซีนป้องกันโรคฟันผุ (Dental caries vaccine)

การผลิตวัคซีนเกิดจากมีส่วนประกอบที่ทำหน้าที่ตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน (components for immune response) จึงนำมาใช้เพื่อป้องกันฟันผุ จากการศึกษาของ Niu และคณะ (2009) ได้เพิ่มจำนวนชิ้นส่วน *cat* (*cat* fragment) จากจุลินทรีย์ *S. sobrinus* OMZ176 *gtf-1* โคลนในพลาสมิดแล้วนำไปกระตุ้นภูมิคุ้มกันเพื่อสร้างวัคซีน เมื่อทดลองในหนูทดลองสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดแอนติบอดีในน้ำลาย (salivary SIgA antibody) จึงยับยั้งการติดเชื้อจากจุลินทรีย์ *S. mutans* และ *S. sobrinus* ที่ก่อให้เกิดโรคฟันผุ และการให้วัคซีนทางผิวหนังมีประสิทธิภาพมากกว่าทางจมูก

2.7.8 การลดการเกาะติดของจุลินทรีย์กับผิวฟัน

การลดปัจจัยการเกาะติดของจุลินทรีย์ที่ผิวฟันจะลดโอกาสเกิดฟันผุได้ มีการศึกษาดังนี้

Xiao และคณะ (2007) พบว่า สารสกัดจากรวงผึ้ง (Nidus Vespae) สามารถยับยั้งการเกาะติดของ *S. mutans* ATCC 25175 บนแผ่นไฮดรอกซีอะปาไทต์ที่เคลือบน้ำลาย เนื่องจากมีการยับยั้งการสร้างเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสที่หลั่งออกมานอกเซลล์ (extracellular glucosyltransferase)

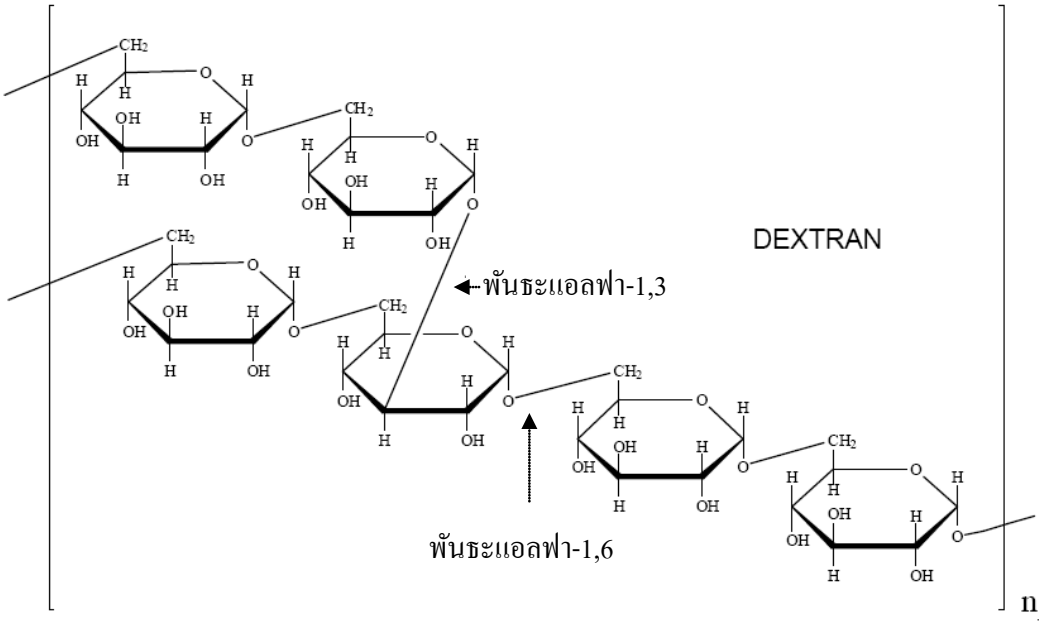
Li และคณะ (2009) พบว่า methacryloxylethylcetylmdimethyl-nammonium chloride (DMAE-CB) ซึ่งเป็นโมโนเมอร์ที่มีประจุลบในสารยึดติดฟัน ช่วยกดการทำงานของยีน *gtfB* และ *gtfC* ของ *S. mutans* ที่เกี่ยวกับการสร้างเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส และลดการสะสมคราบจุลินทรีย์บนพื้นผิว

Lang และคณะ (2010) พบว่า *L. paracasic* และ *L. rhamnosus* เป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มแลคโตบาซิลัสที่ทำหน้าที่เป็นโพรไบโอติก สามารถจับกลุ่มร่วมกันอย่างจำเพาะ (specifically co-aggregate) กับมิวแทนสเตร็บโตคอคไค (mutans streptococci) โดยไม่ทำอันตรกิริยากับจุลินทรีย์อื่นในช่องปาก ดังนั้น mutans streptococci ที่ล่องลอยในน้ำลายจะถูกจับโดยจุลินทรีย์ในกลุ่มแลคโตบาซิลัสและถูกกำจัดด้วยกระบวนการของร่างกาย เช่น การกลืนน้ำลาย ทำให้ลดแบคทีเรียที่สร้างคราบจุลินทรีย์ได้

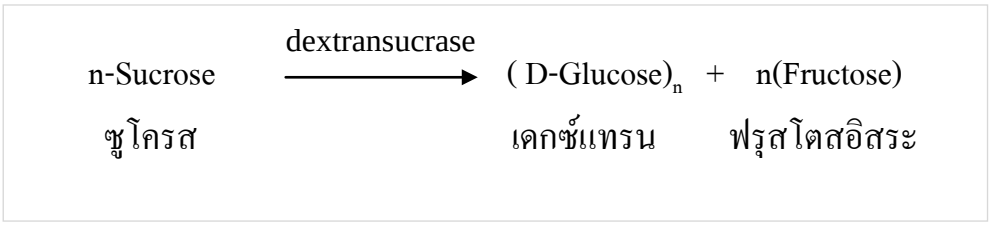
Hamada และคณะ (1976) ได้ทดลองผสมเดกซ์แทรนเนสความเข้มข้น 10 หน่วยต่อกรัมในน้ำให้หนูทดลองดื่ม พบว่า สามารถยับยั้งการพัฒนาของโรคฟันผุจาก *S. mutans* ได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยเดกซ์แทรนเนสช่วยยับยั้งการเกาะติดบริเวณผิวเรียบของฟันและทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในคราบจุลินทรีย์ อีกทั้งเอนไซม์นี้ไม่มีความเป็นพิษกับหนูด้วย และจากการศึกษาของ Simonson และ Jackola (1979) พบว่าเดกซ์แทรนเนสจากรา (Fusarium dextranase) สามารถรบกวนการเกาะติดของ *S. mutans* บนแผ่นไฮดรอกซีอะปาไทต์ (hydroxyapatite disk) ทั้งระยะแรกของการเกาะติดและระยะที่มีการสะสมกลูแคนของคราบจุลินทรีย์ จึงนับเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการใช้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสในการยับยั้งการเกาะติดของเชื้อก่อโรคฟันผุและยับยั้งการสร้างคราบจุลินทรีย์

2.8 **เดกซ์แทรน** (dextran)

เดกซ์แทรนที่ผลิตได้จาก *Leuconostoc mesenterooides* B-512FMCM มีมวลโมเลกุลมากกว่า 10^6 ดาลตัน (Kim และคณะ, 2003) ประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลดี-กลูโคส ซึ่งต่อกันเป็นพอลิเมอร์ด้วยพันธะไกลโคซิดิก α-1,6 เป็นสายหลักและมีกิ่งสาขาที่ต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก α-1,2 α-1,3 หรือ α-1,4 จึงจัดว่าเดกซ์แทรนเป็นโฮโมพอลิแซ็กคาไรด์ (รูปที่ 2.5) เดกซ์แทรนเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสชนิดดี (GTF-D) หรือเอนไซม์เดกซ์แทรนซูเครส (dextransucrase) ที่เร่งการไฮโดรไลซ์ซูโครสให้เป็นกลูโคสและฟรุคโตสอิสระ (รูปที่ 2.6) จากนั้นโมเลกุลกลูโคสเชื่อมต่อกันกลายเป็นพอลิเมอร์ที่มีลักษณะเหนียวหนืด ซึ่งเดกซ์แทรนเป็นกลูแคนที่สามารถละลายน้ำได้ (water soluble dextran) แต่ทั้งนี้ก็ขึ้นกับมวลโมเลกุล ปริมาณกิ่งสาขา ปริมาณของพันธะไกลโคซิดิก α-1,6 กับ α-1,3 ถ้ามีพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,3 มากขึ้น การละลายจะลดลงและเมื่อพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,3 มากกว่าร้อยละ 43 เดกซ์แทรนจะไม่ละลายน้ำ (water insoluble dextran) (Khalikova และคณะ, 2005)



รูปที่ 2.5 โครงสร้างของเดกซ์แทรน (ที่มา : ดัดแปลงจาก Sigma-Aldrich Co.)



รูปที่ 2.6 ปฏิกิริยาการเกิดเดกซ์แทรนโดยเอนไซม์เดกซ์แทรนซูเครส

จุลินทรีย์ที่มีความสามารถสร้างเดกซ์แทรนมีทั้งแบคทีเรียและรา เช่น *Leuconostoc* sp. *Streptococcus* sp. *Acetobacter capsulatus Lactobacillus* sp. และ *Rhizopus* sp. ซึ่ง *Leuconostoc mesenteroides* มีความสำคัญในการสร้างเดกซ์แทรนที่สุด สามารถนำไปพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น เป็นสารเพิ่มความหนืด (thickening agent) ในการผลิตไอศกรีม ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิต Sephadex สำหรับใช้ใน gel filtration technique ใช้ในเบียร์บางชนิดเพื่อให้ได้ลักษณะที่มีการรินไหลดี ใช้เป็นอาหารควบคุมน้ำหนักตัว เนื่องจากเดกซ์แทรนเป็นพวกพอลิแซ็กคาไรด์ที่เอนไซม์ในระบบย่อยอาหารไม่สามารถย่อยได้ (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2547)

เดกซ์แทรนมีประโยชน์ตามที่ได้กล่าวไปแล้ว แต่หากเกิดการสร้างเดกซ์แทรนในบริเวณที่ไม่ต้องการ ก็อาจเกิดปัญหาได้เช่นกัน เนื่องจากลักษณะความเหนียวหนืดของเดกซ์แทรนประกอบกับสามารถพบจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนซูเครสได้ทั่วไป ทั้งที่เป็นเชื้อประจำถิ่นหรือเป็นเชื้อปนเปื้อนในบริเวณที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นสับสเตรท (substrate) จึงทำให้เกิดปัญหาอย่างมากในอุตสาหกรรมน้ำตาล เช่น ทำให้น้ำอ้อยบูดเปรี้ยว เกิดการอุดตันในเครื่องจักรที่ผลิตน้ำตาล น้ำตาลเกิดเป็นผลึกรูปเข็มทำให้ผลผลิตของน้ำตาลลดลง อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มที่ใช้น้ำตาลเป็นสารให้ความหวานจะเกิดการเน่าเสียได้ เช่น ลูกอม ชอคโกแลต เกิดการตกตะกอนของเครื่องดื่ม (Aquino และ Franco, 2009 ; นิลเนตร อัศวศิริจินดา, 2551) เกิดปัญหากับทันตสาธารณสุขจากการที่เดกซ์แทรนถูกสร้างขึ้นเพื่อช่วยในการยึดเกาะพื้นผิวของฟันของจุลินทรีย์ทำให้เกิดคราบจุลินทรีย์ที่นำไปสู่โรคฟันผุได้

2.9 **เดกซ์แทรนเนส** (dextranase)

เดกซ์แทรนเนสเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะที่ต้องอาศัยการชักนำจากเดกซ์แทรน ที่สามารถย่อยสลายพันธะไกลโคไซด์แบบจำเพาะได้ 2 แบบ คือ จำเพาะต่อพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,6 บนสายของเดกซ์เทรน (α-1,6-D-glucan-6-glucanohydrolase : E.C. 3.2.1.11) และจำเพาะต่อพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,3 บนสายของเดกซ์เทรน (α-1,3-D-glucan-3-glucanohydrolase E.C. 3.2.1.59)

2.9.1 การทำงานของเอนไซม์ในการสลายพันธะได้ 2 แบบ (Khalikova และคณะ, 2005)

2.9.1.1 Exo-dextranase

เป็นเดกซ์แทรนเนสที่ย่อยสลายพันธะที่เชื่อมโมเลกุลของกลูโคสจากปลายรีดิวซ์ของสายเดกซ์แทรน เป็นการตัดทีละโมเลกุลของกลูโคส ผลิตภัณฑ์ที่ได้ คือ บีต้าดีกลูโคส (ß-D-glucose) ซึ่งเป็นการเปลี่ยนโครงร่าง (configurayion) จากแอลฟาเป็นบีต้า จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์นี้ได้ คือ *S. mutans Arthrobacter globiformis* T6 *Achromobacter* spp, *Bacteroides oralis* IG4a

2.9.1.2 Endo-dextranase

เป็นเดกซ์แทรนเนสที่ย่อยสลายพันธะไกลโคไซด์แบบสุ่มภายในสายของเดกซ์แทรน ทำให้ได้พอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสสายสั้นๆ ผลิตภัณฑ์ที่ได้ส่วนใหญ่เป็นโอลิโกเมอร์ โมโนเมอร์ของกลูโคส เช่น ไอโซมอลโทส ไอโซมอลโทไทรโอส ไอโซมอลโทเททราโอส และได้น้ำตาลดีกลูโคสเป็นส่วนน้อย ทั้งนี้ผลิตภัณฑ์ยังขึ้นกับชนิดของสับสเตรทและแหล่งที่มาของเอนไซม์ จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์นี้มีทั้งรา แบคทีเรียและยีสต์ได้ เช่น *Chaetomium gracile Chaetomium erraticum Penicillium lilacinum Lipomyces stakyi S. sobrinus* 6715

เดกซ์แทรนเนสที่ผลิตจาก *Chaetomium gracile* และ *Chaetomium erraticum* สามารถย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิกชนิด α -1,6 บนสายของเดกซ์เทรนแบบสุ่ม จึงนำมาผลิตทางการค้าเพื่อใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรม เช่น โรงงานน้ำตาล จากการศึกษาของ Eggleston และ Monge (2005) พบว่า ในโรงงานน้ำตาลของสหรัฐอเมริกา เอนไซม์สามารถทำงานและรักษากิจกรรม (activity) ได้ที่ความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 5.4-5.8 ทนอุณหภูมิสูงสุดเท่ากับ 50 องศาเซลเซียส แต่กิจกรรมลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำเชื่อมเท่ากับ 25-30 องศาบริกซ์

2.9.2 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจะย่อยสลายเดกซ์แทรนให้มีขนาดโมเลกุลที่เล็กลงก่อนนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงานภายในเซลล์ สามารถพบได้ทั้งรา แบคทีเรีย ยีสต์และแอคติโนมัยซิส ซึ่งสุหัทยา จิระนันทิพร (2543) ได้สรุปไว้ตามตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้

จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
แบคทีเรีย	
Acromobacter sp.	Sawei และคณะ, 1974; Foxgarty และ Kelly, 1984
Arthrobacter sp.	Kubo และคณะ, 1993
Arthrobacter globiformis	Lwai และคณะ, 1996
Bacillus circulan	Okami และคณะ, 1980; Okami, 1986
Bacillus megaterium	Zevenhuizen, 1968
Bacillus subtilis	Zevenhuizen, 1968
Bacteroides sp.	Staat และคณะ, 1973; Staat และ Schachtele, 1974
Bacteroides melaninogenicus	Holbrook และ Mcmillan, 1977
Bacteroides ochraceus	Schachtele, 1975;Holbrook และ Mcmillan, 1977
Bacteroides oralis	Takahashi, 1982; Wynter และคณะ, 1995
Bacteroides ovatus	Holbrook และ Mcmillan, 1977
Bacteroides thetaiotaomicron	Holbrook และ Mcmillan, 1977
Bifidobacterium sp.	Kaster และ Brown, 1983
Brevibacterium sp.	Yamaguchi และ Gocho, 1983
Brevibacterium fuscum	Sugiura และ Ito, 1975
Brevibacterium fuscum var dextranlyticum	Mizuno และคณะ, 1999
Capnocytophaga ochracea	Igarashi และคณะ, 1998
Capnocytophaga sputigena	Igarashi และคณะ, 1998
Cellovibrio fulva	Forgarty และ Kelly, 1984
Cellovibrio mixtus	Wynter และคณะ, 1995
Cytophagus johnsonii	Forgarty และคณะ, 1984
Flavobacterium sp.	Koboyashi และคณะ, 1983
Fusobacterium fusiforme	Costa และคณะ, 1974
Lactobacterium sp.	Staat และคณะ, 1973; Wynter และคณะ, 1995
Prevotella oralis	Igarashi และคณะ, 1998
Prevotella melaninogenica	Igarashi และคณะ, 1998
Prevotella loescheii	Igarashi และคณะ, 1998

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Pseudomonas sp.	Galvez-Mariscal และ Lopez-Munguia, 1991
Pseudomonas mixta	Wynter และคณะ,1995
Streptococcus mitis	Forgarty และคณะ,1984
Lactobacillus sp.	Staat และคณะ,1973; Wynter และคณะ,1995
Prevotella oralis	Lgarashi และคณะ, 1998
Prevotella melaninogenica	Lgarashi และคณะ, 1998
Prevotella loescheii	Lgarashi และคณะ, 1998
Pseudomonas sp.	Galvez-Mariscal และ Lopez-Munguia, 1991
Pseudomonas mixta	Wynter และคณะ,1995
Streptococcus mitis	Forgarty และคณะ,1984
Streptococcus mutans	Lgarashi และคณะ, 1992
Micrococcus sp. สายพันธ์ Z-10	ณฐินี สุวรรณสิงห์, 2533
แอคติโนมัยซีส	
Actinomyces cinemonensis	Schachtele และคณะ,1975
Streptomyces cinemonensis	Hattori และ Ishibashi,1981
ยีสต์	
Lipomyces starkei	Webb และ Spencer,1983; Koenig, 1989
รา	
Aspergillus sp.	Forgarty และ Kelly,1984
Aspergillus carneus	Fukumoto และคณะ,1971
Aspergillus luchvasis	Hattori และ Ishibashi,1981
Aspergillusfumigatus	Hattori และ Ishibashi,1981
Chetomium gracile	Mizuno และคณะ,1999
Chetomium indicum	Wynter และคณะ,1995
Chetomium luteum	Wynter และคณะ,1995
Chetomium thermophilum var coprophilum	Wynter และคณะ,1995
Chetomium thermophilum var thermophilum	Wynter และคณะ,1995
Chetomium virescens	Wynter และคณะ,1995
Fusarium moniliforme	

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Gibberella fukuroi	Simonson และ Liberta,1975 Hattori และ Ishibashi,1981
Hamicola grisea	Hattori และ Ishibashi, 1981
Paecilomyces lilacinus	Hattori และ Ishibashi, 1981 Charles และ Farrell, 1957
Penicillium aculeatum	Madhu และ Prabhu, 1985
Penicillium funiculosum	Chaiet และคณะ, 1970 ; Kosaric และคณะ, 1973
Penicillium lilacinum	Galvez-Mariscal และ Lopez-Munguia, 1991
Penicillium luteum	Fukumoto, 1971
Penicillium minioluteum	Mizuno และคณะ, 1999
Penicillium purpurogenum	Galvez-Mariscal และ Lopez-Munguia, 1991
Penicillium roguefortii	Hattori และ Ishibashi, 1981
Penicillium verruculosum	Whetley และ Moo-Yong, 1977
Spicaria sp.	Yamaguchi และ Gocho, 1973
Spirotichum asteroids	Hattori และ Ishibashi, 1981
Verticellium sp.	Tchuchiya และคณะ, 1952

ที่มา : สุหัทยา จิระนันทิพร, 2543

2.9.3 ประโยชน์ของเดกซ์แทรนเนส

2.9.3.1 ด้านการแพทย์

จากคุณสมบัติของเดกซ์แทรนที่มีความหนืด สามารถเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อ (biocompatibility) เกิดการย่อยสลายอย่างช้าๆ (slow biodegradability) และความสามารถรวมตัวกับโมเลกุลได้ในของเหลว (matrix) จึงนำเดกซ์แทรนเนสมาผลิตเดกซ์แทรนให้มีมวลโมเลกุลที่เหมาะสมที่ใช้ทางการแพทย์ได้ (Ko และคณะ, 1991)

2.9.3.1.1 ผลิตเดกซ์แทรนที่มีน้ำหนักโมเลกุลจำเพาะเพื่อรักษาระดับน้ำเลือดของผู้ป่วยที่เสียเลือดมาก หรือ ผู้ป่วยที่เกิดแผลไฟไหม้ แทนการใช้กรดและสารละลายอินทรีย์ (Khalikova และคณะ, 2005)

2.9.3.1.2 การใช้เดกซ์แทรนเนสและเดกซ์แทรนส่งยาไปออกฤทธิ์ที่อวัยวะเป้าหมาย เช่น การรักษามะเร็งโดยใช้เดกซ์แทรนเป็นตัวห่อหุ้มยาที่เชื่อมต่อกับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเอนติเจนของเซลล์มะเร็งและเดกซ์แทรนเนส แล้วฉีดแอนติบอดีเข้าไปจับที่เซลล์มะเร็ง จากนั้นฉีดเดกซ์แทรนเนสเข้าไปย่อยเดกซ์แทรนเพื่อปลดปล่อยยาออกมาที่เซลล์มะเร็งเป้าหมาย (Hansen, 1998)

2.9.3.1.3 รักษาเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ โดยใช้เดกซ์แทรนเนสย่อยไกลโคคาลิค (glycocalyx) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะ (Dall และคณะ, 1990)

2.9.3.1.4 ผลิตไอโซมอลโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ (IMOs) ที่เป็นพรีไบโอติก (prebiotic) ที่ร่างกายคนไม่สามารถย่อยได้ แต่จุลินทรีย์ในลำไส้สามารถย่อยได้ ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของ Bifidobacteria ในลำไส้ใหญ่ของมนุษย์และสัตว์ ทำให้เกิดสมดุลของเชื้อจุลินทรีย์ในลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ของคน ซึ่งอาจเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์โดยการทำพันธุวิศวกรรมหรือผลิตเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป (Erhard และ Jordening, 2007 และ Aslan และ Tanriseven, 2007)

2.9.3.2 อุตสาหกรรมน้ำตาลทราย

เดกซ์แทรนเนสช่วยลดปัญหาที่เกิดจากการสะสมของเดกซ์แทรนที่ปนเปื้อนในสายการผลิตที่มีผลให้ผลผลิตน้ำตาลลดลง ใช้เวลาและพลังงานในการผลิตมากกว่าเดิม ลดการเกิดผลึกผิดรูป ซึ่งการใช้เดกซ์แทรนเนสในอุตสาหกรรมยังไม่สามารถใช้ประโยชน์จากกิจกรรมได้เต็มที่ จึงต้องมีการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเดกซ์แทรนเนสที่ใช้ในเชิงพาณิชย์ในโรงงานน้ำตาล (Eggleston และ Monge, 2005)

2.9.3.3 ด้านทันตสาธารณสุข

โรคฟันผุมีสาเหตุจากการสะสมของคราบจุลินทรีย์บนผิวฟัน เนื่องจากจุลินทรีย์ในช่องปากบางสายพันธุ์มีเอนไซม์เดกซ์แทรนซูเครสเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสเป็นเดกซ์แทรนเพื่อยึดเกาะผิวเคลือบฟันกับจุลินทรีย์ในช่องปาก จึงนำเดกซ์แทรนเนสมาใช้ประโยชน์เพื่อกำจัดคราบจุลินทรีย์ หรือลดการยึดเกาะของเชื้อจุลินทรีย์

Murayama และคณะ (1973) พบว่า เดกซ์แทรนเนสจาก *Spicaria violaceae* (IFO 6120) มีคุณสมบัติย่อยสลายคราบจุลินทรีย์และป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ในคนได้ดีกว่าเดกซ์แทรนเนสจาก *P. funiculosum*

Hamada และคณะ (1976) พบว่า เดกซ์แทรนเนสสามารถยับยั้งการเกาะติด *S. mutans* บริเวณผิวเรียบของฟันหนูทดลองและทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในคราบจุลินทรีย์จึงเป็นการยับยั้งฟันผุได้

Simonson และ Jackola (1979) พบว่า เดกซ์แทรนเนสจากรา (Fusarium dextranase) รบกวนการเกาะติดของ *S. mutans* บนแผ่นไฮดรอกซีอะปาไทต์ (hydroxyapatite disk) ตลอดระยะการสร้างคราบจุลินทรีย์

สุวรรณา นพพรพันธุ์ (2538) ได้พัฒนาเชื้อกลายพันธุ์จากการคัดแยก *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 จากดินของ เอก แสงวิเชียร (2531) โดยใช้แสงอัตราไวโอแลตและ NTG (N-methyl-N'-nitro-N-Nitrosoguanidine) จนคัดเลือกได้เป็น *Penicillium* sp. SMCU-3-14 และปรับปรุงสูตรอาหารจนสามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้ 600 หน่วยต่อมิลลิลิตร ต่อมาพิมลรัตน์ เต็มจิตต์ภักดี (2549) พบว่า *Penicillium* sp. SMCU-3-14 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ *P. pinophilum* ร้อยละ 100 จึงจำแนกเป็น *P. pinophilum* SMCU 3-14

วิมลิน ศิริพัฒนานนท์ (2549) ศึกษาการใช้เดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *Leuconoctoc mesenteroides* 473 เป็นสารชักนำการสร้างเดกซ์แทรนเนสใน *P. pinophilum* SMCU3-14 เมื่อเปรียบเทียบการใช้เดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์ พบว่า เดกซ์แทรนเนสที่ผลิตได้มีคุณสมบัติไม่แตกต่างกัน

ณฐินี สุวรรณสิงห์ (2540) และ Chareonpornwattana และคณะ (2001) พบว่า แบคทีเรียที่แยกได้จากดินในจังหวัดนนทบุรีสามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสที่มีแอกทิวิตี 4.08 หน่วยต่อมิลลิลิตร คือ *Arthrobacter* sp. AG-2

นันทิดา วานิชวงศ์วรรณ (2545) พบว่า เดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. AG-2 ที่ได้จากการชักนำด้วยเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *S. sobrinus* 6715 สามารถย่อยสลายเดกซ์แทรนที-2000 และเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *S. sobrinus* 6715 ได้ผลผลิตเป็นกลูโคส ส่วนเดกซ์แทรนเนสที่ได้จากการชักนำด้วยเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรมสามารถย่อยสลายเดกซ์แทรนที-2000 ได้ผลผลิตเป็นกลูโคส ไอโซมอลโตส และไอโซมอลโทเททราโอส และย่อยสลายเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *S. sobrinus* 6715 ได้ผลผลิตเป็นกลูโคสและไอโซมอลโทเททราโอส

ณฤดี อัศวเสรีเลิศ (2550) ศึกษาความสามารถในการลดการยึดติดของ *S. sobrinus* 6715 บนแบบจำลองพื้นเรียบโดยใช้เดกซ์แทรนเนสที่ผลิตจากรา *P. pinophilum* SMCU3-14 และผลิตจากแบคทีเรีย *Arthrobacter* sp. AG-2 โดยใช้การชักนำจากเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรมที่มีพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,6 และเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *S. sobrinus* 6715 ที่มีพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,3 มากกว่าชนิด α-1,6 ผลการศึกษาพบว่า เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรีย *Arthrobacter* sp. AG-2 โดยใช้การชักนำจากเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *S. Sobrinus* 6715 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดใหม่ของคราบจุลินทรีย์บนแบบจำลองพื้นผิวเรียบได้ดีที่สุด ส่วนเดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรีย *Arthrobacter* sp. AG-2 โดยใช้การชักนำจากเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรมให้ประสิทธิภาพในการสลายคราบจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นแล้วบนแบบจำลองฟันได้ดีที่สุด

2.10 โปรตีเอส

โปรตีนเป็นส่วนประกอบหนึ่งของคราบจุลินทรีย์ ดังนั้น การใช้โปรตีเอสย่อยโปรตีนย่อมเป็นอีกหนึ่งวิธีในการลดคราบจุลินทรีย์ได้

โปรตีเอส (protease) มีชื่อสามัญหลายชื่อ ได้แก่ เปปติเดส (peptidase) โปรตีนเนส (proteinase) และโปรตีโอไลติกเอนไซม์ (proteolytic enzymes) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีน พบได้ทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ สามารถแบ่งโปรตีเอสได้ 4 กลุ่ม ตามลักษณะบริเวณเร่งของเอนไซม์ (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2543 และ Enzyme Nomenclature, 1992) คือ

ก. ซีรีน โปรตีเอส (Serine protease)

โปรตีเอสที่มีอนุมูลซีรีน และหมู่อิมิดาโซลอยู่ที่บริเวณเร่ง (active site) สามารถย่อยสลายพันธะเพปไทด์อย่างอิสระได้ภายในสายโพลีเพปไทด์ (endopepidase) สำหรับค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมในการทำงาน คือ 7-11 จึงเรียกได้ว่าเป็นอัลคาไลน์ โปรตีเอส (alkaline protease) และจะถูกยับยั้งโดย DPF (diisoprppyl-phospho-fluoridate) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิล (OH-) ของอนุมูลซีรีนในบริเวณเร่งของเอนไซม์ ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ ตระกูลไคโมทริปซิน (chymotrypsin family) ทริปซิน (trypsin) อิลาสเทส (elastase)

ข. เมทัลโล โปรตีเอส (Metallo-protease) หรือ โปรตีเอสมีโลหะ (Metal-containing protease)

โปรตีเอสที่มีอิออนของโลหะอยู่ในบริเวณเร่ง หรือร่วมในปฏิกิริยาการย่อยสลาย หรืออยู่ในลักษณะโคแฟคเตอร์ โปรตีเอสกลุ่มนี้เกือบทั้งหมดย่อยสลายพันธะเพปไทด์จากปลายสายของโปรตีน (exoopepidase) อาจเป็นด้านปลายอะมิโน (N-terminal) หรือด้านปลายคาร์บอกซิล (C-terminal) ทั้งนี้ขึ้นกับความจำเพาะของเอนไซม์ สำหรับค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมในการทำงาน คือ 6.5-7.5 จึงเรียกได้ว่าเป็นนิวทรัลโปรตีเอส (neutral protease) และจะถูกยับยั้งโดยสารจับอิออนของโลหะ (metal chelatying agents) ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ คาร์บอกซิเพปติเดส เอ (carboxypeptidase A) ที่มีอิออนของสังกะสี (Zn^{+}) อยู่บริเวณเร่ง อิมิโนไดเพปติเดส (iminodipeptidase) ต้องการอิออนแมงกานีส (Mn^{+}) ในปฏิกิริยาย่อยสลาย

ค. แอซิด โปรตีเอส (Acid protease) หรือ แอสปาร์ติคโปรตีเอส (aspartic protease) หรือ คาร์บอกซิล โปรตีเอส (carboxyl protease)

โปรตีเอสที่มีหมู่คาร์บอกซิลมากกว่า 1 หมู่ จากอนุมูลกรดแอสปาร์ติกอยู่ในบริเวณเร่ง สำหรับค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมในการทำงาน คือ 2-4 ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ เรนนิน (rennin) เปปซิน (pepsin)

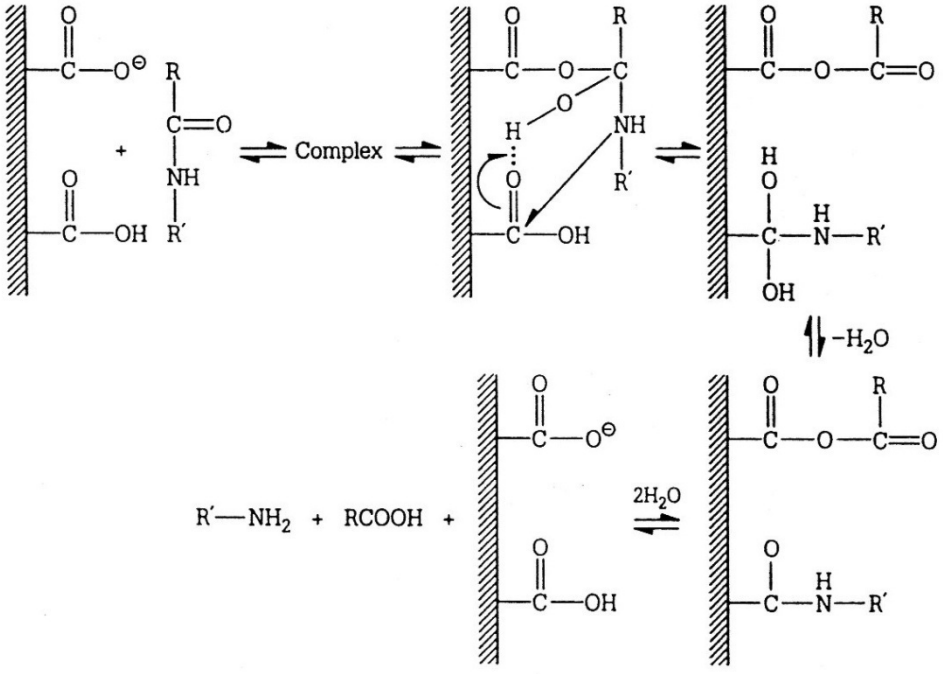
ง. ไทออล โปรตีเอส (Thiol protease) หรือ ซิสเตอีน โปรตีเอส (cysteine protease) หรือ ซัลฟ์ไฮดริลโปรตีเอส (sulfhydryl protease)

โปรตีเอสที่มีอนุมูลซัลฟ์ไฮดริลบริเวณเร่ง สามารถย่อยสลายพันธะเพปไทด์อย่างอิสระได้ภายในสายโพลีเพปไทด์ เป็นนิวทรัลโปรตีเอสทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 6.0-7.5 และจะถูกยับยั้งโดยสารจับหมู่ซัลฟ์ไฮดริล (sulfhydryl reagents) หรือ กลุ่มไทออล (-SH) ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ ไฟซิน (ficin) โบรมิเลน (Bromilian) ปาเปน (papain)

ในที่นี้ จะศึกษาโปรตีเอส 2 ชนิด คือ เปปซิน และปาเปน เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร จึงมีความปลอดภัยต่อการนำมาทดสอบสลายคราบจุลินทรีย์ และอาจนำมาใช้ประโยชน์กับอุปกรณ์ในช่องปากต่อไป

2.10.1 **เปปซิน** (pepsin)

เปปซินพบได้ทั่วไปในน้ำย่อยของสัตว์มีกระดูกสันหลัง มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 35,500 มีลักษณะเป็นพอลิเปปไทด์สายเดี่ยว ซึ่งมีกรดอะมิโนจำนวน 321 กรดอะมิโน สำหรับการทำปฏิกิริยานั้นค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมคือ 2.0 และมีความเสถียรของเอนไซม์ที่ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 2.5 กลไกการทำปฏิกิริยา คือ หมู่คาร์บอกซิล 2 หมู่ที่อยู่บริเวณเร่งของเปปซิน ทำหน้าที่ในรูปโปรตอนเนต (protonated form) และในรูปอิออนไนซ์ (ionized) กับสับสเตรท เกิดเป็นสารเชิงซ้อนของเอนไซม์และสับสเตรท (enzyme-substrate complex: ES complex) และสารเชิงซ้อนนี้ถูกหมู่คาร์บอนิลของเอนไซม์เข้าปะทะทำให้ได้อิเล็กตรอนคู่ จากนั้นคาร์บอนิลออกซิเจนของเอนไซม์จึงดึงไฮโดรเจนอิออนออก เกิดเป็นสารอะมิโน-เอซิล-เอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยากับน้ำได้ผลผลิต 2 หมู่ คือ หมู่อะมิโน ($R\text{-}NH_2$) และหมู่คาร์บอกซิล (R-COOH) (รูปที่ 2.7) (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2547)

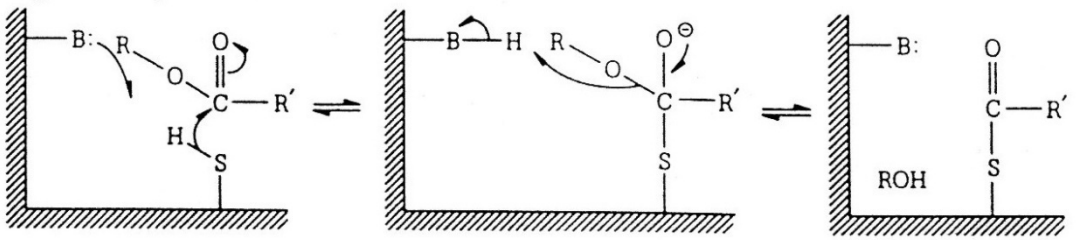


รูปที่ 2.7 กลไกการทำงานของเปปซิน

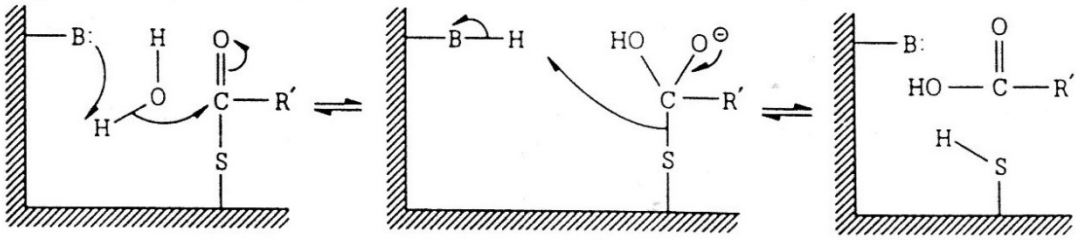
2.10.2 ปาเปน (papain)

ปาเปนเป็นเอนไซม์ที่พบในยางมะละกอ มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 23,406 มีลักษณะเป็นสายพอลิเปปไทด์สายเดี่ยวเรียงตัวกันของกรดอะมิโนจำนวน 212 ตัว มีพันธะไดซัลไฟด์ 3 พันธะที่เกิดจากการจับกันของกรดอะมิโนซิสเตอีน และยังพบกรดอะมิโนซิสเตอีนหนึ่งตัวที่บริเวณเร่งตำแหน่งที่ 25 ด้วย สำหรับการทำปฏิกิริยานั้นค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมคือช่วง 6.0 - 7.0 และอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 65 องศาเซลเซียส กลไกการทำปฏิกิริยาแบ่งเป็น 2 ขั้นตอนคือ ขั้นแรกเกิดปฏิกิริยาเติมหมู่เอซิล (acylation) คือที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ปาเปนนั้น หมู่อิมิดาโซลจะดึงไฮโดรเจนอิออนจากหมู่ซัลฟ์ไฮดริลทำให้เอนไซม์เข้าจับกับหมู่คาร์บอนิลของสับสเตรทได้ง่ายและรวดเร็ว เกิดเป็นสารเชิงซ้อนของเอนไซม์และสับสเตรท จากนั้นจึงเกิดการหลุดของอนุมูล R ทำให้เหลือส่วนที่เป็นเอซิลเอนไซม์ (acyl-enzyme) ในรูปของไทออลเอสเทอร์ (thiol ester) แล้วเกิดปฏิกิริยาขั้นที่สองคือปฏิกิริยาสลายหมู่เอซิล (deacylation) คือ หมู่อิมิดาโซลจะแยกไฮโดรเจนอิออนจากโมเลกุลของน้ำทำให้ไฮดรอกไซด์ของน้ำเข้าจับกับหมู่คาร์บอนิลของเอซิลเอนไซม์ทำให้หมู่เอซิลหลุดออก และเอนไซม์กลับสู่ภาวะปกติ (รูปที่ 2.8) (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2547 และ Arnon, 1970)

(ก) ปฏิกิริยาเติมหมู่เอซิล (acylation)



(ข) ปฏิกิริยาสลายหมู่เอซิล (deacylation)



รูปที่ 2.8 กลไกการทำงานของปาเปน

2.10.2.1 ประโยชน์ของปาเปน (ทวีศักดิ์ วุฒิเวียงธรรม, 2536 และสันศณี จงจิตสำราญ, 2538)

2.10.2.1.1 อุตสาหกรรมเบียร์ เติมปาเปนในกระบวนการย่อยสลายเพื่อย่อยโปรตีนจากวัตถุดิบในการผลิตเบียร์ เช่น ข้าวบาร์เลย์และมอลท์ และทำให้เบียร์ใสเมื่อเก็บที่อุณหภูมิต่ำหรือเก็บเป็นระยะเวลานาน โดยปาเปนช่วยย่อยโปรตีนในเบียร์ทำให้ไม่ให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโปรตีนและสารประกอบฟีนอล (polyphenolic compounds) ที่เป็นตะกอนจนทำให้เบียร์ขุ่น

2.10.2.1.2 อุตสาหกรรมเนื้อสัตว์และปลา ปาเปนช่วยย่อยโปรตีนในเนื้อสัตว์ที่มีลักษณะเป็นเส้นใยและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ทำให้เนื้อสัตว์นุ่มขึ้นเมื่อนำมาประกอบอาหาร ใช้ในการหมักน้ำปลาเพื่อลดระยะเวลาในการหมักและลดปริมาณปลาที่ใช้

2.10.2.1.3 อุตสาหกรรมเวชภัณฑ์ ยา และประโยชน์ทางการแพทย์ ใช้ปาเปนเป็นองค์ประกอบของยาที่ช่วยย่อยอาหาร รักษาแผลติดเชื้อ ทำให้เลือดแข็งตัว ฆ่าพยาธิในลำไส้ เป็นส่วนผสมในน้ำยาคอนเทคเลนส์ เป็นส่วนผสมของยาสีฟัน เป็นต้น

2.10.2.1.4 อุตสาหกรรมฟอกหนัง ปาเปนช่วยให้หนังเรียบและนุ่ม

2.10.2.1.5 อุตสาหกรรมทอผ้า ปาเปนไม่ส่งผลกระทบต่อโปรตีนในเส้นไหม จึงใช้ฟอกไหมให้หมดเมือก และยังทำให้ไหมไม่หดย่น

2.10.2.1.6 อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ ผสมปาเปนในอาหารสัตว์ เพื่อเป็นสารเสริมอาหาร

Pitts และคณะ (2003) พบว่า โปรตีเอสความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร สามารถลดคราบจุลินทรีย์ที่สร้างจาก *P. aeruginosa* ในไมโครไตเตอร์เพลต ได้ร้อยละ 60.70 $\pm$ 4.6

Leroy และคณะ (2008) พบว่า ปาเปนความเข้มข้น 184.8 $\pm$ 32.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดการเกาะติดของแบคทีเรีย *Pseudoalteromonas* sp. D41 ในไมโครไตเตอร์เพลต ภายใน 3 ชั่วโมง

Molobela และคณะ (2010) พบว่า โปรตีเอส 2 ชนิด คือ Savinase และ Everlase ที่ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สามารถสลายคราบจุลินทรีย์ที่ผลิตจาก *P. fluorescens* บนไมโครไตเตอร์เพลตได้มากกว่าร้อยละ 80

2.11 สารฟู่ หรือ เม็ดฟู่

สารฟู่ทำความสะอาดฟันปลอมจะมีตัวยาสำคัญ (โสภิต บุษยจารุ และคณะ, 2538 และ Andrew, 1984) คือ

1) bleaching agent เช่น โซเดียมเปอร์บอเรต (Sodium perborate)
2) สารให้ฟองฟู่ประกอบด้วยกรดซิตริก (Citric acid) และโซเดียมไบคาร์บอเนต (Sodium bicarbonate) ที่จะทำปฏิกิริยาเคมีกันเกิดฟองก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ที่ช่วยในการแตกตัวของเม็ดยา
3) สารลดแรงตึงผิว เช่น โซเดียมลอริวซัลเฟต (Sodium lauryl sulfate) เพื่อช่วยทำความสะอาด

จากการศึกษากับอาสาสมัครกลุ่มหนึ่ง ของโสภิต บุษยจารุ และ อภิรดา สุคนธ์พันธ์ (2538) ได้ทำการทดลองสูตรส่วนผสมต่างๆแล้วตอกเป็นเม็ดด้วยเครื่อง Hydraulic press พบว่าสารบางชนิดในสูตรตำรับก่อให้เกิดปัญหาขึ้น เช่น Sodium carbonate.10H_2O ทำให้เม็ดยาเยิ้มเหลว การเข้ากันไม่ได้ของกรดซิตริกและโซเดียมเปอร์บอเรต (Sodium perborate) ส่วนโซเดียมเมตาซิลิเกต (Sodium metasilicate) ทำให้สารละลายที่ได้มีลักษณะเป็นปุย ดังนั้นสรุปได้ว่าตำรับเม็ดสารฟู่ที่มีคุณสมบัติดี ประกอบด้วย 1) Sodium perborate 30% 2) Citric acid 24% 3) Sodium bicarbonate 32% 4) Sodium tripolyphosphate 3% 5) Sodium sulfate 5% 6) Polyvinylpyrolidone 2% 7) starch 2% 8) Sodium lauryl sulfate 0.3% 9) FD&C blue No.2 0.03% 10) Peppermint oil 0.67% 11) Magnesium stearate 0.5% และ 12) Disodium ethylenediaminetetraacetate 0.5%

สารฟู่ที่เหมาะสมต่อการทำความสะอาดมีส่วนผสมของโซเดียมไบคาร์บอเนตอยู่ระหว่าง 25-55 เปอร์เซนต์ และกรดซิตริกอยู่ระหว่าง 10-30 เปอร์เซนต์ของส่วนผสมทั้งหมด (Iain และคณะ, 1999) และความเข้มข้นที่นำมาทดสอบคือ โซเดียมไบคาร์บอเนตความเข้มข้น 0.75-1.2 เปอร์เซนต์ และกรดซิตริกความเข้มข้น 1.2 เปอร์เซนต์ (Ely และคณะ, 2007)

Gohel และ Sumitra (2002) พบว่า สารฟู่ที่มีส่วนผสมของโซเดียมไบคาร์บอเนตและกรดซิตริกในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ที่บรรจุกับส่วนผสมของยาภายในแคปซูลเจลาตินอย่างหนาที่มีจุกปิดแบบละลายน้ำได้ ภายหลังจากชั่วโมงที่ 4 ส่วนผสมของยาถูกปลดปล่อยออกจากแคปซูลอย่างรวดเร็ว เนื่องจากการทำปฏิกิริยาของสารฟู่ที่ก่อให้เกิดคาร์บอนไดออกไซด์ดันตัวยาออกจากแคปซูล และปริมาณของสารฟู่ที่เหมาะสมขึ้นกับน้ำหนักของจุกปิดด้วย

ในการทดสอบสลายคราบจุลินทรีย์ด้วยสารฟู่จึงเลือกที่จะแปรผันความเข้มข้นของสารฟู่และอัตราส่วนระหว่างโซเดียมไบคาร์บอเนตกับกรดซิตริก เพื่อได้อัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดในการสลายคราบจุลินทรีย์

ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงศึกษาการสลายคราบจุลินทรีย์หรือการลดคราบจุลินทรีย์จากแบบจำลองภายนอกร่างกาย โดยใช้ เดกซ์แทรนเนส โปรตีเอส สารฟู่ เพียงอย่างใดอย่างหนึ่ง หรือการใช้สารทั้ง 3 ชนิดร่วมกัน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการลดคราบจุลินทรีย์ และนำไปประยุกต์ใช้กับการทำความสะอาดอุปกรณ์ที่ใช้ภายในช่องปากได้ เช่น ฟันปลอม เครื่องมือแพทย์

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CH30RF200 บริษัท Olympus, Japan
2. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด JEOL รุ่น JSM-5410LV, Japan
3. ฮีมาไซโทมีเตอร์ (Haemacytometer) บริษัท Schott Duran, German
4. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูงชนิดอ่าง (Sonicator) รุ่น RK100 บริษัท Bandelin Electronic, Germany
5. เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (Digital pH meter) รุ่น SevenEasy บริษัท Mettler-Toledo, Switzerland
6. เครื่องชั่ง รุ่น AG285 รุ่น PG2002-S และ รุ่น PG6002-S บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
7. เครื่องผสมสาร (vortex mixer) รุ่น GenieII G-560E บริษัท Scientific Industries, USA
8. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys บริษัท Spectronic unicam, รุ่น Genesys 20 บริษัท Thermo Spectronic, USA
9. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงสำหรับไมโครไตเตอร์เพลต (Microplate reader) รุ่น Elx 800 บริษัท Bio-tek instrument, USA
10. เครื่องเขย่าสำหรับไมโครไตเตอร์เพลต (Microtiterplate shaker) รุ่น PSU-2T บริษัท Biosan, Latvia
11. เครื่องเขย่า รุ่น Innova 2300 บริษัท Brunwick Scientific, USA
12. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดทำความเย็น รุ่น 6500 บริษัท Kubota, Japan และ รุ่น Avanti J-301 บริษัท Beckman Coulter, German
13. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (waterbath) รุ่น WB 14 บริษัท Memmert, Germany
14. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิพร้อมเครื่องเขย่า (waterbath shaker) รุ่น 939XL บริษัท Amerex instrument, USA

15. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ประกอบเข้ากับเครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ รุ่น Digital water bath SB-1000 บริษัท Eyela, Thailand
16. เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ รุ่น N-100 บริษัท Eyela, Thailand
17. เครื่องดูดอากาศ รุ่น A-3S บริษัท Eyela, Thailand
18. เครื่องทำความเย็น รุ่น CCA-110 บริษัท Eyela, Thailand
19. ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส รุ่น SVC-100SAD บริษัท Sandenintercool, Thailand
20. ตู้แช่แข็งชนิดจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น FC20U บริษัท Sharp, Thailand
21. ตู้เขี่ยเชื้อ รุ่น BV-124 บริษัท International Scientific Supply, Thailand รุ่น Clean และ รุ่น V6-T บริษัท Labmicro, Thailand และ Bosstech รุ่น HVB 120S บริษัท Boss Scientific , Thailand
22. ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (incubator) บริษัท Memmert, Germany
23. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น MLS 3020 ของบริษัท SANYO, Japan รุ่น SS-325 และรุ่น ES-315 บริษัท Tomy Seiko, Japan และรุ่น HV-25 บริษัท Hirayama, Japan
24. ตู้อบความร้อน (hot air oven) รุ่น UE 600 ของบริษัท Memmert, Germany
25. เครื่องไมโครเวฟ (microwave oven) รุ่น Sharp, Thailand
26. โถดูดความชื้น (Desicator)
27. ไมโครปิเปตต์ (micropipette) รุ่น P200 P1000 และ P5000 ของบริษัท Gilson, France
28. ไมโครปิเปตต์ชนิด 8 หัวจ่าย รุ่น BPE-200 บริษัท Labnet International, USA
29. ไมโครไตเตอร์เพลตชนิดพอลิสไตรีน 96 หลุม พื้นเรียบ มีฝา (96-wells polystylene microtiter plate flat bottom with lid) Costar 3599 บริษัท Corning, USA
30. หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (micro centrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร บริษัท Axygen Scientific, USA
31. กระดาษกรอง (filter paper) Whatman เบอร์ 1 บริษัท Whatman International, England

3.2 เคมีภัณฑ์

1. เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม (Dextran industrial grade) บริษัท Sigma chemical, USA
2. เดกซ์แทรน ที-2000 (Dextran T-2000) บริษัท Amersham Biosciences, Sweden
3. ปาเปน (Sigma Chemical Co.,USA) บริษัท Sigma chemical, USA
4. เปปซิน (Pepsin from porcine gastric mucosa) บริษัท Sigma chemical, USA
5. เคซีน (Casein hydrolysate) บริษัท Merck, Germany
6. แอล-ไทโรซีน (L-Tyrosine) บริษัท Merck, Germany
7. เบรนฮาร์ทอินฟิวชัน (Brain Heart Infusion) บริษัท Difco Laboratory, USA
8. สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)บริษัท Bio Springer, France
9. พอลิเพบโตน (Polypeptone) บริษัท Difco Laboratory, USA
10. โบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine Serum Albumin) บริษัท Sigma Chemical, USA
11. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) บริษัท Merck, Germany
12. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) บริษัท Merck, Germany
13. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) บริษัท Merck, Germany
14. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$) บริษัท Merck, Germany
15. เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4.7H_2O$) บริษัท Merck, Germany
16. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck, Germany
17. โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) บริษัท Merck, Germany
18. โซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) บริษัท Merck, Germany
19. โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$) บริษัท Merck, Germany
20. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Merck, Germany
21. โซเดียมอะซิเตต (CH_3COONa) บริษัท Merck, Germany
22. โซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) บริษัท Merck, Germany
23. โซเดียมอาร์ซีเนต ($NaHAsO_4$) บริษัท Merck, Germany
24. โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4) บริษัท Merck, Germany

25. โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรตเตตระไฮเดรต ($C_4 H_4KNaO_6 .4H_2O$) บริษัท Merck, Germany

26. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตโดเดกขะไฮเดรต ($Na_2HPO_4.12H_2O$) บริษัท Merck, Germany

27. คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$) บริษัท Merck, Germany

28. แอมโมเนียมโมลิบเดตเตตระไฮเดรต ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$) บริษัท Merck, Germany

29. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) บริษัท Merck, Germany

30. กรดอะเซติก (CH_3COOH) บริษัท Merck, Germany

31. กรดซัลฟูริก (Sulfuric acid) บริษัท Merck, Germany

32. กรดไตรคลอโรอะเซติก (Trichloraacetic acid : TCA) บริษัท Merck, Germany

33. สารละลายโฟลีน ฟีนอล รีเอเจนต์ (Folin phenol reagent) บริษัท Merck, Germany

34. คริสตัลไวโอเลต (Crytal violet) บริษัท Fluka, Japan

35. คลอเฮกซิดีน (Chlohexidine) C-20 บริษัท Osoth Laboratories, Thailand

36. ทวีน 80 (Tween 80) บริษัท Merck, Germany

37. กลีเซอรอล (Glycerol) บริษัท Merck, Germany

38. กลูโคส

หมายเหตุ สารเคมีที่ใช้ในการทดลองทุกชนิดเป็นเกรดเพื่อการวิเคราะห์ (analytical grade)

3.3 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.3.1 จุลินทรีย์ในงานวิจัย

3.3.1.1 การเตรียมกล้าเชื้อ *S. sobrinus* 6715 (นันทิดา วานิชวงศ์วรรณ, 2545)

ถ่ายเชื้อ *S. sobrinus* 6715 ที่ได้รับจาก รศ.ดร.รัชชพิน ศรีสัจจะลักษณ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากช่องปาก และมีความสามารถในการผลิตเดกซ์แทรน ที่เก็บรักษาสายพันธุ์ไว้ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Brain Heart Infusion (BHI) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบไม่เขย่า เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบไม่เขย่า เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 0.5-0.6 แล้วจึงนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อต่อไป

3.3.1.2 การเตรียมกล้าเชื้อ *Arthrobacter* sp. AG-2 (สุหัทยา จิระนันทิพร, 2543)

ถ่ายเชื้อ *Arthrobacter* sp. AG-2 จากอาหารแข็งเอียงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yamaguchi ที่มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง ให้อากาศโดยการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 0.6-0.7 แล้วจึงนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อต่อไป (สุหัทยา จิระนันทิพร, 2543)

3.3.1.3 การเตรียมกล้าเชื้อ *P. pinophilum* SMCU3-14 (Fukumoto และคณะ, 1971 และ เอก แสงวิเชียร, 2531)

เขี่ยสปอร์ *P. pinophilum* SMCU3-14 ลงบนอาหารแข็งเอียง Fukumoto บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน แล้วเติมทวีน-80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่ปลอดเชื้อลงบนผิวหน้าอาหาร จากนั้นเขี่ยสปอร์ให้หลุดออกมาแขวนลอยแล้วนับสปอร์ด้วยฮีมาไซโทมีเตอร์ให้อยู่ในช่วง $2x10^7$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร แล้วนำมาใช้ต่อไป

3.3.2 การเตรียมเดกซ์แทรนเพื่อใช้เป็นสารชักนำในการผลิตเดกซ์แทรนเนส

3.3.2.1 เดกซ์แทรนที่มีพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,6 เป็นส่วนใหญ่

เดกซ์แทรนที่มีพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,6 เป็นส่วนใหญ่ คือ เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม (Sigma Co.; USA) ที่ผลิตจาก *Leuconostoc mesenteroides* B-512F ซึ่งพบว่ามีพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,6 ประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ และพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,3 ประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ (Peter, 1994)

3.3.2.2 เดกซ์แทรนที่มีพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,6 และชนิด α-1,3 ที่ผลิตโดย *S. sobrinus* 6715 (นันทิดา วานิชวงศ์วรรณ, 2545)

ถ่ายกล้าเชื้อ *S. sobrinus* 6715 จากข้อ 3.3.1.1 ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI ที่เสริมด้วยซูโครสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบไม่เขย่า เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำบริสุทธิ์เดกซ์แทรนบางส่วนในน้ำเลี้ยงเชื้อ โดยการปั่นเหวี่ยง 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนเดกซ์แทรนด้วยน้ำกลั่นโดยใช้เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูงเป็นเวลา 3 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง แล้วนำตะกอนที่ได้ไปทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งโดยใช้อุณหภูมิต่ำ

3.3.2.3 เดกซ์แทรนที่มีพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,3 ในปริมาณสูงจากการสลายเดกซ์แทรนพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,6 ออกจากเดกซ์แทรนที่ผลิตโดย *S. sobrinus* 6715 (นันทิดา วานิชวงศ์วรรณ, 2545)

เติมเดกซ์แทรนเนสจากราจาก *P. pinophilum* SMCU3-14 ที่มีสารชักนำเป็นเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม ซึ่งจะมีพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,6 เป็นส่วนใหญ่ (เดกซ์แทรนเนส FI) ตามวิธีข้อ 3.3.6.2 ผสมกับเดกซ์แทรนที่ผลิตโดย *S. sobrinus* 6715 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนจากข้อ 3.3.2.2 ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตรเอนไซม์) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 9 ชั่วโมง เพื่อย่อยพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,6 ของเดกซ์แทรนที่ผลิตโดย *S. sobrinus* 6715 จากนั้นล้างตะกอนโดยการปั่นเหวี่ยง 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จึงเก็บตะกอนแล้วเติมเดกซ์แทรนเนส FI ใหม่ ทำปฏิกิริยาซ้ำ 4 ครั้ง เมื่อครบการทำปฏิกิริยาให้ล้างตะกอนเดกซ์แทรน ทำแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งโดยใช้อุณหภูมิต่ำ จะได้สารชักนำเป็นเดกซ์แทรนที่มีพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,3 ในปริมาณสูง

3.3.3 การเปรียบเทียบความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนสที่เหมาะสมในการผลิตเดกซ์แทรนที่มีพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,3 ในปริมาณสูง

ทำตามวิธี ข้อ 3.3.2.3 โดยความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนส FI สำหรับการย่อยพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,6 ออกจากเดกซ์แทรนที่ผลิตโดย *S. sobrinus* 6715 เท่ากับ 20 40 60 80 และ 100 หน่วยต่อมิลลิลิตร และเก็บตัวอย่างเพื่อวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทุก 1.5 ชั่วโมง จนครบ 9 ชั่วโมง ทำปฏิกิริยาอีก 4 ครั้ง หรือจนกระทั่งเดกซ์แทรนเนส FI ไม่สามารถย่อยสลายเดกซ์แทรนได้อีก โดยวัดจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Somogyi, 1952) ของปฏิกิริยาเริ่มต้นเท่ากับหลังการทำปฏิกิริยา

3.3.4 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของการย่อยสลายเดกซ์แทรนที่มีพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,6 ออกจากเดกซ์แทรนที่ผลิตโดย *S. sobrinus* 6715 ด้วย เดกซ์แทรนเนส FI

ทำตามวิธี ข้อ 3.3.2.3 โดยความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนส FI เท่ากับ 20 หน่วยต่อมิลลิลิตร เก็บตัวอย่างที่เวลา 0 0.5 3.0 และ 9.0 ชั่วโมง มาปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที กรองน้ำส่วนใสผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน จากนั้นนำตัวอย่างวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของน้ำตาลโดยวิธีโครมาโทกราฟฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography; HPLC) มีสารละลายกลูโคส มอลโทส มอลโทไทรโอส มอลโทเททราโอสเป็นสารละลายมาตรฐาน

เครื่องโครมาโทกราฟฟีแบบของเหลว เลือกใช้คอลัมน์คาร์โบไฮเดรต (Prevail™ Carbohydrate ES Column) ขนาด 4.6x250 nm ตั้งอุณหภูมิสารละลายตัวพา 30 องศาเซลเซียส ตั้งอุณหภูมิคอลัมน์ที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้สารละลายอะซิโตไนไทรล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารละลายตัวพา และใช้อัตราการไหล 0.2 มิลลิลิตรต่อนาที โดยมี HPLC detector เป็น Evaporative Light Scattering Detector (ELSD)

3.3.5 การตรวจสอบว่าเดกซ์แทรนที่มีพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,3 ในปริมาณสูง เป็นเดกซ์แทรนที่เป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส (นันทิดา วานิชวงศ์วรรณ, 2545)

นำเดกซ์แทรนที่-2000, เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม เดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *S. sobrinus* 6715 และเดกซ์แทรนที่มีพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,3 ในปริมาณสูง ที่ผ่านการระเหยแห้งปริมาณ 10 มิลลิกรัม มาย่อยด้วยกรดซัลฟูริก 1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยนำไปนึ่งในเครื่องอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นปรับสารละลายที่ได้ให้มีค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 7.0 แล้วนำไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของน้ำตาลโดยวิธีโครมาโทกราฟฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง ที่มีสารละลายกลูโคส มอลโทส มอลโทไทรโอส มอลโทเททราโอสเป็นสารละลายมาตรฐาน

เครื่องโครมาโทกราฟฟีแบบของเหลว เลือกใช้คอลัมน์คาร์โบไฮเดรต (Prevail™ Carbohydrate ES Column) ขนาด 4.6x250 nm ตั้งอุณหภูมิสารละลายตัวพา 30 องศาเซลเซียส ตั้งอุณหภูมิคอลัมน์ที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้สารละลายอะซิโตไนไทรล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารละลายตัวพา และใช้อัตราการไหล 0.2 มิลลิลิตรต่อนาที โดยมี HPLC detector เป็น ELSD

3.3.6 การผลิตเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. AG-2 และ *P. pinophilum* SMCU3-14 ด้วยสารชักนำคือ เดกซ์แทรนที่มีพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,6 เป็นส่วนใหญ่ (จากข้อ 3.3.2.1) เดกซ์แทรนที่มีพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,6 และ α-1,3 ที่ผลิตโดย *S. sobrinus* 6715 (จากข้อ 3.3.2.2) หรือ เดกซ์แทรนที่มีพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,3 ในปริมาณสูง (จากข้อ 3.3.2.3) (นันทิดา วานิชวงศ์วรรณ, 2545 และ ณฤดี อัศวเสรีเลิศ, 2550)

3.3.6.1 การผลิตเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. AG-2

ถ่ายกล้าเชื้อ *Arthrobacter* sp.AG-2 จากข้อ 3.3.1.2 ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yamaguchi ซึ่งมีเดกซ์แทรนจากข้อ 3.3.2.1 3.3.2.2 หรือ 3.3.2.3 เป็นสารชักนำ บ่มที่อุณหภูมิห้อง ให้อากาศโดยการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที และเก็บตัวอย่างอาหารที่เวลา 36-48 ชั่วโมง แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บน้ำส่วนใสที่มีเดกซ์แทรนเนสเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

โดยเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Arthrobacter* sp. AG-2 ที่ได้นั้น ในที่นี้กำหนดให้เป็น

- เดกซ์แทรนเนส BI หรือ เดกซ์แทรนเนส [α-1,6] ที่ผลิตจากแบคทีเรีย ที่ได้จากการเติมเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรมเป็นสารชักนำ จึงเป็นเอนไซม์ที่จำเพาะต่อพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,6
- เดกซ์แทรนเนส BB หรือ เดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และ α-1,6] ที่ผลิตจากแบคทีเรีย ที่ได้จากการเติมเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *S. sobrinus* 6715 เป็นสารชักนำ จึงเป็นเอนไซม์ที่จำเพาะต่อพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,3 และชนิด α-1,6
- เดกซ์แทรนเนส BB-1,3 หรือ เดกซ์แทรนเนส [α-1,3] ที่ผลิตจากแบคทีเรีย ที่ได้จากการเติมเดกซ์แทรนที่เป็นสารชักนำได้จากการย่อยพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,6 ออกจากเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *S. sobrinus* 6715 จึงเหลือพันธะชนิด α-1,3 เป็นส่วนใหญ่ จึงเป็นเอนไซม์ที่จำเพาะต่อพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,3

3.3.6.2 การผลิตเดกซ์แทรนเนสจาก *P. pinophilum* SMCU3-14

ถ่ายสปอร์แขวนลอยของ *P. pinophilum* SMCU3-14 จากข้อ 3.3.1.3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Fukumoto ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (Fukumoto และคณะ, 1971 และ ศิโรจน์ ศรีสราภรณ์, 2547) ซึ่งมีเดกซ์แทรนจากข้อ 3.3.2.1 3.3.2.2 หรือ 3.3.2.3 เป็นสารชักนำ บ่มที่อุณหภูมิห้อง ให้อากาศโดยการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นกรองเก็บน้ำส่วนใสที่มีเดกซ์แทรนเนส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

โดยเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตจาก *P. pinophilum* SMCU3-14 ในที่นี้กำหนดให้เป็น

- เดกซ์แทรนเนส FI หรือ เดกซ์แทรนเนส [α-1,6] ที่ผลิตจากรา ที่ได้จากการเติมเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรมเป็นสารชักนำ จึงเป็นเอนไซม์ที่จำเพาะต่อพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,6
- เดกซ์แทรนเนส FB หรือ เดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และ α-1,6] ที่ผลิตจากรา ที่ได้จากการเติมเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *S. sobrinus* 6715 เป็นสารชักนำ จึงเป็นเอนไซม์ที่จำเพาะต่อพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,3 และชนิด α-1,6
- เดกซ์แทรนเนส FB-1,3 หรือ เดกซ์แทรนเนส [α-1,3] ที่ผลิตจากรา ที่ได้จากการเติมเดกซ์แทรนที่เป็นสารชักนำได้จากการย่อยพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,6 ออกจากเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *S. sobrinus* 6715 จึงเหลือพันธะชนิด α-1,3 เป็นส่วนใหญ่ จึงเป็นเอนไซม์ที่จำเพาะต่อพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,3

3.3.7 การตรวจสอบแอกทิวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนส (Fukumoto และคณะ, 1971)

เติมเดกซ์แทรนเนสจากข้อ 3.3.6 ที่มีความเจือจางที่เหมาะสม ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายเดกซ์แทรน ที่-2000 ความเข้มข้น 0.625 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร และบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร โดยบัฟเฟอร์สำหรับเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. AG-2 คือ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 7.0 (ณฐินี สุวรรณสิงห์, 2540) และบัฟเฟอร์สำหรับเดกซ์แทรนเนสจาก *P. pinophilum* SMCU3-14 คือ โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 4.5 (พัชราวดี บุตรทา, 2548) นำสารผสมทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 นาที และ 15 นาที แล้วต้มในน้ำเดือด 5 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีของ Somogyi (1952) และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry และคณะ (1951) เพื่อคำนวณแอกทิวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนสจากสารชักนำต่างกัน

1 หน่วย (Unit) ของเดกซ์แทรนเนส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายเดกซ์แทรนที่-2000 และปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่ากับน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้ภาวะที่ทดสอบ

3.3.7.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีของ Somogyi-Nelson (Somogyi, 1952)

นำสารตัวอย่างที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ (ภาคผนวก ข ข้อ 1.1) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลานำมาทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วโดยแช่ในอ่างน้ำเย็นที่มีน้ำแข็งเอาออกจากอ่างมาตั้งอุณหภูมิห้องแล้วเติมสารละลายเนลสัน (ภาคผนวก ข ข้อ 1.2) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร

คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานของกลูโคสที่ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค ข้อ 1)

3.3.7.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry (Lowry, 1951)

นำสารตัวอย่างที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย Lowry C (ภาคผนวก ข ข้อ 2.3) ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เติมสารละลาย Lowry D (ภาคผนวก ข ข้อ 2.4) ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร

คำนวณปริมาณโปรตีนโดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานของโบวีนซีรัมอัลบูมินที่ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค ข้อ 2)

3.3.8 การสร้างคราบจุลินทรีย์ในไมโครไตเตอร์เพลตจากกล้าเชื้อ *S. sobrinus* 6715 (ณฤดี อัศวเสรีเลิศ, 2550)

ถ่ายกล้าเชื้อ *S. sobrinus* 6715 จากข้อ 3.3.1.1 ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบไม่เขย่า เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งแล้วแขวนลอยเซลล์ที่ก้นฟลาสก์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI ที่เสริมด้วยซูโครสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ จนวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 0.1 แล้วเติมลงในไมโครไตเตอร์เพลตชนิดพอลิสไตรีนแบบพื้นเรียบ 96 หลุม (96-wells polystylene microtiter plate flat bottom) หลุมละ 160 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 40 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในกล่องสแตนเลสที่จุดเทียนแล้วปิดฝาเพื่อให้อยู่ในภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จะได้คราบจุลินทรีย์ในไมโครไตเตอร์เพลต จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง วางให้แห้งก่อนนำไปใช้เป็นแบบจำลองสำหรับการสลายคราบจุลินทรีย์ภายนอกร่างกาย

การสร้างคราบจุลินทรีย์ในหลอดทดลองขนาด 13 x 150 มิลลิเมตร ทำเช่นเดียวกัน แต่เติมเซลล์แขวนลอยที่มีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 0.1 ปริมาณหลอดละ 4 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1 มิลลิลิตร

3.3.9 การตรวจสอบปริมาณคราบจุลินทรีย์ที่ลดลง (ณฤดี อัศวเสรีเลิศ, 2550, Leroy และคณะ, 2008 และ Yano และคณะ, 2010)

ตรวจวัดปริมาณคราบจุลินทรีย์ที่เหลืออยู่หลังการทดสอบโดยเทบัฟเฟอร์ที่เหลือทิ้ง ล้างคราบจุลินทรีย์ด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ทิ้งไว้ให้แห้ง ย้อมสีด้วยสารละลายคริสตัลไวโอเลต 0.02 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก 50 ไมโครลิตร นาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ทิ้งไว้ให้แห้ง เติมกรดอะซิติก 30 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปวางบนเครื่องเขย่าสำหรับไมโครไตเตอร์เพลตนาน 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงสำหรับไมโครไตเตอร์เพลต (Microtiter plate reader)

การวัดปริมาณคราบจุลินทรีย์ที่เหลืออยู่ในหลอดทดลอง ล้างคราบจุลินทรีย์ด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ทิ้งไว้ให้แห้ง ย้อมสีด้วยสารละลายคริสตัลไวโอเลต 0.02 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก 1 มิลลิลิตร นาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ทิ้งไว้ให้แห้ง เติมกรดอะซิติก 30 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร 5 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

คำนวณเปอร์เซ็นต์คราบจุลินทรีย์ที่ลดลง (Percentage reduction) (Pitts และคณะ, 2003 และ Molobala และคณะ, 2010) ดังนี้

$$\frac{(C - B) - (T - B)}{(C - B)} \times 100\%$$

B= ค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ที่ไม่มีคราบจุลินทรีย์และไม่มีสารทดสอบ (Blank)
C = ค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ที่มีคราบจุลินทรีย์ แต่ไม่มีสารทดสอบ (Control)
T = ค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ที่มีคราบจุลินทรีย์ และมีสารทดสอบ (Treatment)

3.3.10 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการสลายคราบจุลินทรีย์ด้วยเดกซ์แทรนเนส

3.3.10.1 ชนิดของเดกซ์แทรนเนสต่อการสลายคราบจุลินทรีย์

สร้างคราบจุลินทรีย์ ตามวิธีข้อ 3.3.8 จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ปริมาตร 160 ไมโครลิตร ลงในไมโครไตเตอร์เพลต โดยบัฟเฟอร์สำหรับเดกซ์แทรนเนส BI คือ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 7.0 และบัฟเฟอร์สำหรับเดกซ์แทรนเนส FI FB หรือ FB-1,3 คือ โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 4.5 จากนั้นเติมเดกซ์แทรนเนส BI FI FB หรือ FB-1,3 ปริมาตร 40 ไมโครลิตร โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงตรวจสอบปริมาณคราบจุลินทรีย์ที่ลดลง ตามวิธีข้อ 3.3.9

3.3.10.2 ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการสลายคราบจุลินทรีย์ของเดกซ์แทรนเนส

สร้างคราบจุลินทรีย์ ตามวิธีข้อ 3.3.8 จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับเดกซ์แทรนเนส ปริมาตร 160 ไมโครลิตร ลงในไมโครไตเตอร์เพลต เติมสารทดสอบปริมาตร 40 ไมโครลิตร โดยสารทดสอบ คือ เดกซ์แทรนเนส BI FI FB หรือ FB-1,3 ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 2 3 4 และ 5 หน่วยต่อมิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 และ 15 นาที แล้วจึงตรวจสอบปริมาณคราบจุลินทรีย์ที่ลดลง ตามวิธีข้อ 3.3.9

3.3.10.3 ประสิทธิภาพการทำงานร่วมกันระหว่างเดกซ์แทรนเนส 2 ชนิด จากรา ต่อการสลายคราบจุลินทรีย์

สร้างคราบจุลินทรีย์ ตามวิธีข้อ 3.3.8 จากนั้นเติมโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 4.5 ปริมาตร 120 ไมโครลิตร ลงในไมโครไตเตอร์เพลต จากนั้นเติมเดกซ์แทรนเนส FI ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 45 นาที แล้วเติมเดกซ์แทรนเนส FI FB หรือ FB-1,3 ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาต่ออีก 15 นาที ตรวจสอบปริมาณคราบจุลินทรีย์ที่ลดลง ที่เวลา 0 5 10 15 20 30 45 และ 60 นาที ตามวิธีข้อ 3.3.9 จากนั้นทำการทดลองเช่นดิม แต่เติมเดกซ์แทรนเนส FB แทนเดกซ์แทรนเนส FI ในครั้งแรกของการทำปฏิกิริยา

3.3.11 การเพิ่มประสิทธิภาพในการลดคราบจุลินทรีย์ในแบบจำลองภายนอกร่างกาย

3.3.11.1 การใช้สารฟู่ร่วมกับเดกซ์แทรนเนส

สร้างคราบจุลินทรีย์ ตามวิธีข้อ 3.3.8 จากนั้นเติมโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 4.5 ปริมาตร 120 ไมโครลิตร ลงในไมโครไตเตอร์เพลต และสารทดสอบปริมาตร 80 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง โดยสารทดสอบคือ

ก. สารฟู่ มีเปอร์เซ็นต์ของส่วนผสมที่เป็นความเข้มข้นสุดท้าย ดังนี้

- 0.25% โซเดียมไบคาร์บอเนต + 0.25% กรดซิตริก
- 0.25% โซเดียมไบคาร์บอเนต + 0.50% กรดซิตริก
- 0.50% โซเดียมไบคาร์บอเนต + 0.50% กรดซิตริก

ข. เดกซ์แทรนเนส FI ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร

ซึ่งจะมีวิธีในการทดสอบดังนี้

วิธีที่ 1 คือ เติมสารฟู่ ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยา 5 นาที

วิธีที่ 2 คือ เติมสารฟู่ ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ผสมกับเดกซ์แทรนเนส FI ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาพร้อมกัน 5 นาที

วิธีที่ 3 คือ เติมสารฟู่ ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยา 10 นาที จากนั้นเติมเดกซ์แทรนเนส FI ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาต่ออีก 5 นาที รวมเวลาทำปฏิกิริยาเป็น 15 นาที

จากนั้นตรวจสอบปริมาณคราบจุลินทรีย์ที่ลดลง ตามวิธีข้อ 3.3.9 เมื่อได้วิธีที่เหมาะสมแล้วแปรผันเปอร์เซ็นต์ของส่วนผสมสารฟู่ ดังนี้

- 0.50% โซเดียมไบคาร์บอเนต + 1.00% กรดซิตริก
- 0.50% โซเดียมไบคาร์บอเนต + 1.50% กรดซิตริก
- 0.75% โซเดียมไบคาร์บอเนต + 1.00% กรดซิตริก
- 0.75% โซเดียมไบคาร์บอเนต + 1.50% กรดซิตริก
- 1.00% โซเดียมไบคาร์บอเนต + 1.00% กรดซิตริก
- 1.00% โซเดียมไบคาร์บอเนต + 1.50% กรดซิตริก

ทดสอบตามวิธีที่เหมาะสม และตรวจสอบปริมาณคราบจุลินทรีย์ที่ลดลง ตามวิธีข้อ 3.3.9

3.3.11.2 การใช้โปรตีเอส

3.3.11.2.1 ผลของอุณหภูมิและระยะเวลาที่มีผลต่อการลดคราบจุลินทรีย์ของโปรตีเอส

สร้างคราบจุลินทรีย์ ตามวิธีข้อ 3.3.8 เติมบัฟเฟอร์ตามค่าความเป็นกรด-เบส ที่ระบุข้างขวดของโปรตีเอส ปริมาตร 160 ไมโครลิตร เติมสารละลายเอนไซม์เปปซิน หรือ ปาเปน ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร โดยบัฟเฟอร์สำหรับเปปซิน คือ สารละลายกรดไฮโดรคลอริก/โพแทสเซียมคลอไรด์บัฟเฟอร์ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 2.5 และบัฟเฟอร์สำหรับปาเปนคือ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 7.0 ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง และที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 2 3 4 5 10 15 20 25 และ 30 นาที จากนั้นตรวจสอบปริมาณคราบจุลินทรีย์ที่ลดลง ตามวิธีข้อ 3.3.9

3.3.11.2.2 ผลของค่าความเป็นกรด-เบส ที่เหมาะสมต่อการลดคราบจุลินทรีย์ของโปรตีเอส

สร้างคราบจุลินทรีย์ ตามวิธีข้อ 3.3.8 เติมบัฟเฟอร์ ปริมาตร 160 ไมโครลิตร และเติมสารละลายเอนไซม์เปปซิน หรือ ปาเปน ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร โดยแปรผันค่าความเป็นกรด-เบส ของบัฟเฟอร์ที่ 2.0 2.5 3.0 3.5 4.0 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 7.0 7.5 และ 8.0

ค่าความเป็นกรด-เบส

- 2.0 และ 2.5 คือสารละลายกรดไฮโดรคลอริก/โพแทสเซียมคลอไรด์บัฟเฟอร์
- 3.0 คือสารละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต/กรดไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์
- 3.5 4.0 4.5 5.0 5.5 และ 6.0 คือสารละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์
- 6.5 7.0 7.5 และ 8.0 คือสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นตรวจสอบปริมาณคราบจุลินทรีย์ที่ลดลง ตามวิธีข้อ 3.3.9

3.3.11.2.3 ศึกษาการใช้โปรตีเอสร่วมกับเดกซ์แทรนเนส FI

สร้างคราบจุลินทรีย์ ตามวิธีข้อ 3.3.8 จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-เบส ที่เหมาะสมกับปาเปนและเดกซ์แทรนเนส จากข้อ 3.3.11.2.2 ปริมาตร 120 ไมโครลิตร ลงในไมโครไตเตอร์เพลต และสารทดสอบปริมาตร 80 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิที่เหมาะสม ตามข้อ 3.3.11.2.1 โดยสารทดสอบคือ

ก. โปรตีเอส ที่คัดเลือกจากข้อ 3.3.11.2.1 และ ข้อ 3.3.11.2.2

ข. เดกซ์แทรนเนส FI FB หรือ FB-1,3 ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะมีวิธีในการทดสอบดังนี้

วิธีที่ 1 คือ เติมเดกซ์แทรนเนส FI FB หรือ FB-1,3 ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ทำปฏิกิริยา 15 นาที

วิธีที่ 2 คือ เติมเดกซ์แทรนเนส FI FB หรือ FB-1,3 ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ผสมโปรตีเอสที่คัดเลือกความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาพร้อมกันเป็นเวลา 15 นาที

วิธีที่ 3 คือ เติมโปรตีเอสที่คัดเลือกความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 หน่วยต่อมิลลิลิตรทำปฏิกิริยา 10 นาที จากนั้นเทส่วนผสมทิ้งแล้วล้างน้ำ 3 ครั้ง จึงเติมเดกซ์แทรนเนส FI FB หรือ FB-1,3 ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาต่ออีก 15 นาที รวมเวลาทำปฏิกิริยาทั้งสิ้น 25 นาที

เมื่อครบเวลาทำปฏิกิริยา ตรวจสอบปริมาณคราบจุลินทรีย์ที่ลดลง ตามวิธีข้อ 3.3.9

3.3.11.2.4 ศึกษาระยะเวลาของการผสมโปรตีเอสกับเดกซ์แทรนเนส FI ที่มีผลต่อการลดคราบจุลินทรีย์

ผสมโปรตีเอสที่คัดเลือกกับเดกซ์แทรนเนส FI เป็นเวลา 0 15 30 45 และ 60 นาที จากนั้นทดสอบการสลายคราบจุลินทรีย์ที่ ภาวะทดสอบตามข้อ 3.3.11.2.3 เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบกำหนดเวลานำน้ำส่วนใสไปหาแอกทิวีตีของเดกซ์แทรนเนส FI ตามข้อ 3.3.7 และตรวจสอบปริมาณคราบจุลินทรีย์ที่ลดลง ตามวิธีข้อ 3.3.9

3.3.11.3 การลดคราบจุลินทรีย์ในแบบจำลองภายนอกร่างกาย ภายในระยะเวลา 5 นาที

3.3.11.3.1 การเพิ่มความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนส FI

สร้างคราบจุลินทรีย์ในหลอดทดลอง ตามวิธีข้อ 3.3.8 เติมบัฟเฟอร์ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร และเติมเดกซ์แทรนเนส FI ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยแปรผันความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 1 10 20 30 และ 40 หน่วยต่อมิลลิลิตร ทำปฏิกิริยา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบกำหนดเวลาต้มเดือด 5 นาที เพื่อทำลายเอนไซม์ และตรวจสอบปริมาณคราบจุลินทรีย์ที่ลดลง ตามวิธีข้อ 3.3.9

3.3.11.3.2 การเพิ่มความเข้มข้นโปรตีเอสที่คัดเลือกผสมกับเดกซ์แทรนเนส FI ความเข้มข้นที่คัดเลือกจากข้อ 3.3.11.3.1

สร้างคราบจุลินทรีย์ในหลอดทดลอง ตามวิธีข้อ 3.3.8 เติมบัฟเฟอร์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และเติมเดกซ์แทรนเนส FI ความเข้มข้นที่คัดเลือกจากข้อ 3.3.11.3.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับโปรตีเอสที่คัดเลือก ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่แปรผันความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 1 3 และ 5 หน่วยต่อมิลลิลิตร ทำปฏิกิริยา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบกำหนดเวลาต้มเดือด 5 นาที เพื่อทำลายเอนไซม์ และตรวจสอบปริมาณคราบจุลินทรีย์ที่ลดลง ตามวิธีข้อ 3.3.9

3.3.11.3.3 การแปรผันอัตราส่วนความเข้มข้นของโปรตีเอสที่คัดเลือกกับเดกซ์แทรนเนส FI สำหรับการสลายคราบจุลินทรีย์

สร้างคราบจุลินทรีย์ในหลอดทดลอง ตามวิธีข้อ 3.3.8 เติมบัฟเฟอร์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และเติมเดกซ์แทรนเนส FI ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยแปรผันความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0 1 5 10 50 และ 100 หน่วยต่อมิลลิลิตร ผสมกับโปรตีเอสที่คัดเลือก ที่แปรผันความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 0.00 0.10 0.25 0.50 0.75 และ 1.00 หน่วยต่อมิลลิลิตร ทำปฏิกิริยา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบกำหนดเวลาต้มเดือด 5 นาที เพื่อทำลายเอนไซม์ และตรวจสอบปริมาณคราบจุลินทรีย์ที่ลดลง ตามวิธีข้อ 3.3.9

3.3.11.3.4 การใช้สารฟู่ร่วมกับส่วนผสมของโปรตีเอสที่คัดเลือกและเดกซ์แทรนเนส สำหรับการสลายคราบจุลินทรีย์

สร้างคราบจุลินทรีย์ ตามวิธีข้อ 3.3.8 เติมบัฟเฟอร์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และเติมสารทดสอบปริมาตร 2 มิลลิลิตร โดยส่วนผสมของสารทดสอบ คือ

- สารฟู่ (0.75 % โซเดียมไบคาร์บอร์เนต + 1.00 % กรดซิตริก)
- เดกซ์แทรนเนส FI ความเข้มข้นสุดท้ายที่เหมาะสม จากข้อ 3.3.11.3.3
- โปรตีเอส ความเข้มข้นสุดท้ายที่เหมาะสม จากข้อ 3.3.11.3.3

ทดสอบโดยแปรผันลำดับและเวลาในการเติมสารทดสอบดังนี้

- เติมสารฟู่เพียงอย่างเดียว
- เติมส่วนผสมที่มีเดกซ์แทรนเนสและโปรตีเอส พร้อมกัน
- เติมส่วนผสมที่มีสารฟู่ เดกซ์แทรนเนส และโปรตีเอส พร้อมกัน
- เติมสารฟู่ทำปฏิกิริยาก่อนเป็นเวลา 1 นาที แล้วเติมส่วนผสมโปรตีเอสกับเดกซ์แทรนเนส FI
- เติมสารฟู่ทำปฏิกิริยาก่อนเป็นเวลา 4 นาที แล้วเติมส่วนผสมโปรตีเอสกับเดกซ์แทรนเนส FI
- เติมส่วนผสมโปรตีเอสกับเดกซ์แทรนเนส FI ทำปฏิกิริยาก่อนเป็นเวลา 1 นาที แล้วเติมสารฟู่
- เติมส่วนผสมโปรตีเอสกับเดกซ์แทรนเนส FI ทำปฏิกิริยาก่อนเป็นเวลา 4 นาที แล้วเติมสารฟู่

ทำปฏิกิริยาจนครบ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นต้มเดือด 5 นาที เพื่อทำลายเอนไซม์ และตรวจสอบปริมาณคราบจุลินทรีย์ที่ลดลง ตามวิธีข้อ 3.3.9

3.3.11.3.5 ลำดับการเติมสารฟู่ โปรตีเอสและเดกซ์แทรนเนส ที่เหมาะสมต่อการสลายคราบจุลินทรีย์

สร้างคราบจุลินทรีย์ ตามวิธีข้อ 3.3.8 เติมบัฟเฟอร์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และเติมสารทดสอบปริมาตร 2 มิลลิลิตร โดยส่วนผสมของสารทดสอบ ตามข้อ 3.3.11.3.4 ทดสอบโดยแปรผันลำดับในการเติมสารทดสอบดังนี้

- เติมสารฟู่ที่เวลา 0 นาที เติมเดกซ์แทรนเนสที่เวลา 2 นาที และเติมโปรตีเอสที่เวลา 4 นาที
- เติมสารฟู่ที่เวลา 0 นาที เติมโปรตีเอสที่เวลา 2 นาที และเติมเดกซ์แทรนเนสที่เวลา 4 นาที
- เติมโปรตีเอสที่เวลา 0 นาที เติมสารฟู่ที่เวลา 2 นาที และเติมเดกซ์แทรนเนสที่เวลา 4 นาที
- เติมโปรตีเอสที่เวลา 0 นาที เติมเดกซ์แทรนเนสที่เวลา 2 นาที และเติมสารฟู่ที่เวลา 4 นาที

- เติมเดกซ์แทรนเนสที่เวลา 0 นาที เติมสารฟู่ที่เวลา 2 นาที และเติมโปรตีเอสที่เวลา 4 นาที
- เติมเดกซ์แทรนเนสที่เวลา 0 นาที เติมโปรตีเอสที่เวลา 2 นาที และเติมสารฟู่ที่เวลา 4 นาที

ทำปฏิกิริยาจนครบ 6 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นต้มเดือด 5 นาที เพื่อทำลายเอนไซม์ และตรวจสอบปริมาณคราบจุลินทรีย์ที่ลดลง ตามวิธีข้อ 3.3.9

3.3.11.4 การตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หลังจากการย่อยสลายคราบจุลินทรีย์

หลังการทดสอบการย่อย นำน้ำส่วนใสมาตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หลังจากการย่อยสลายคราบจุลินทรีย์ ด้วยวิธีของ Somogyi-Nelson ตามวิธี ข้อ 3.3.7.1

3.3.11.5 การตรวจสอบลักษณะคราบจุลินทรีย์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

3.3.11.5.1 การสร้างคราบจุลินทรีย์บนแผ่นสไลด์

สร้างคราบจุลินทรีย์ตามวิธีข้อ 3.3.8 แต่ใช้จานเพาะเชื้อที่มีแผ่นปิดสไลด์ปราศจากเชื้อแทนไมโครไตเตอร์เพลตหรือหลอดทดลอง เมื่อครบกำหนดเวลานำสไลด์มาล้างและทดสอบการสลายคราบจุลินทรีย์ในจานเพาะเชื้อที่มีสารละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ ปริมาตร 16 มิลลิลิตร และเติมสารทดสอบปริมาตร 4 มิลลิลิตร ดังนี้

- เติมสารละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ (ชุดควบคุม)
- เติมเดกซ์แทรนเนส ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร
- เติมปาเปน ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 0.25 หน่วยต่อมิลลิลิตร
- เติมส่วนผสมที่มีเดกซ์แทรนเนสความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 1 หน่วยต่อมิลลิลิตรและโปรตีเอสความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 0.25 หน่วยต่อมิลลิลิตร พร้อมกัน

ทำปฏิกิริยาจนครบ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นล้างสไลด์ เพื่อตรวจสอบลักษณะคราบจุลินทรีย์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

3.3.11.5.2 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสำหรับศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

ตรวจสอบขนาดแผ่นสไลด์ที่มีคราบจุลินทรีย์ให้มีขนาดไม่เกิน 5 ตารางเซนติเมตร และหนาไม่เกิน 3 มิลลิเมตร หากเกินจากที่กำหนดต้องตัดให้เรียบร้อยก่อนแช่ตัวอย่างใน 2.5% กลูตารัลดีไฮด์ ใน 0.1 M สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 7.2 นาน 1-2 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2 ครั้ง น้ำกลั่น 1 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที แล้วจึงนำน้ำออก (dehydrate) ด้วยเอทานอล ความเข้มข้น 30% 50% 70% และ 95% ความเข้มข้นละ 1 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที ตามลำดับ แล้วจึงแช่ใน absolute ethanol จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที จึงนำตัวอย่างมาทำแห้ง ณ จุดวิกฤตด้วยเครื่อง Critical Point Dryer (ยี่ห้อ Balze, model CPD 020) แล้วจึงติดตัวอย่างบนแท่นวางตัวอย่าง (stub) ด้วยเทปกาวสองหน้าหรือกาว นำตัวอย่างไปฉาบทองด้วยเครื่อง Ion sputter (ยี่ห้อ Balze, model SCD 040) แล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (ยี่ห้อ JEOL, model JSM-5410LV) โดยส่งตรวจตัวอย่างที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 การเตรียมเดกซ์แทรนเพื่อใช้เป็นสารชักนำในการผลิตเดกซ์แทรนเนส

4.1.1 เดกซ์แทรนที่มีพันธะ α-1,6 สูง

เดกซ์แทรนที่มีพันธะ α-1,6 สูงที่ใช้คือ เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรมที่มีจำหน่ายทางการค้า (Sigma Co.; USA) ซึ่งผลิตจาก *Leuconostoc mesenteroides* B-512F มีพันธะ α-1,6 ประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ และพันธะ α-1,3 ประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ (Peter, 1994)

4.1.2 เดกซ์แทรนที่มีพันธะ α-1,3 และ α-1,6

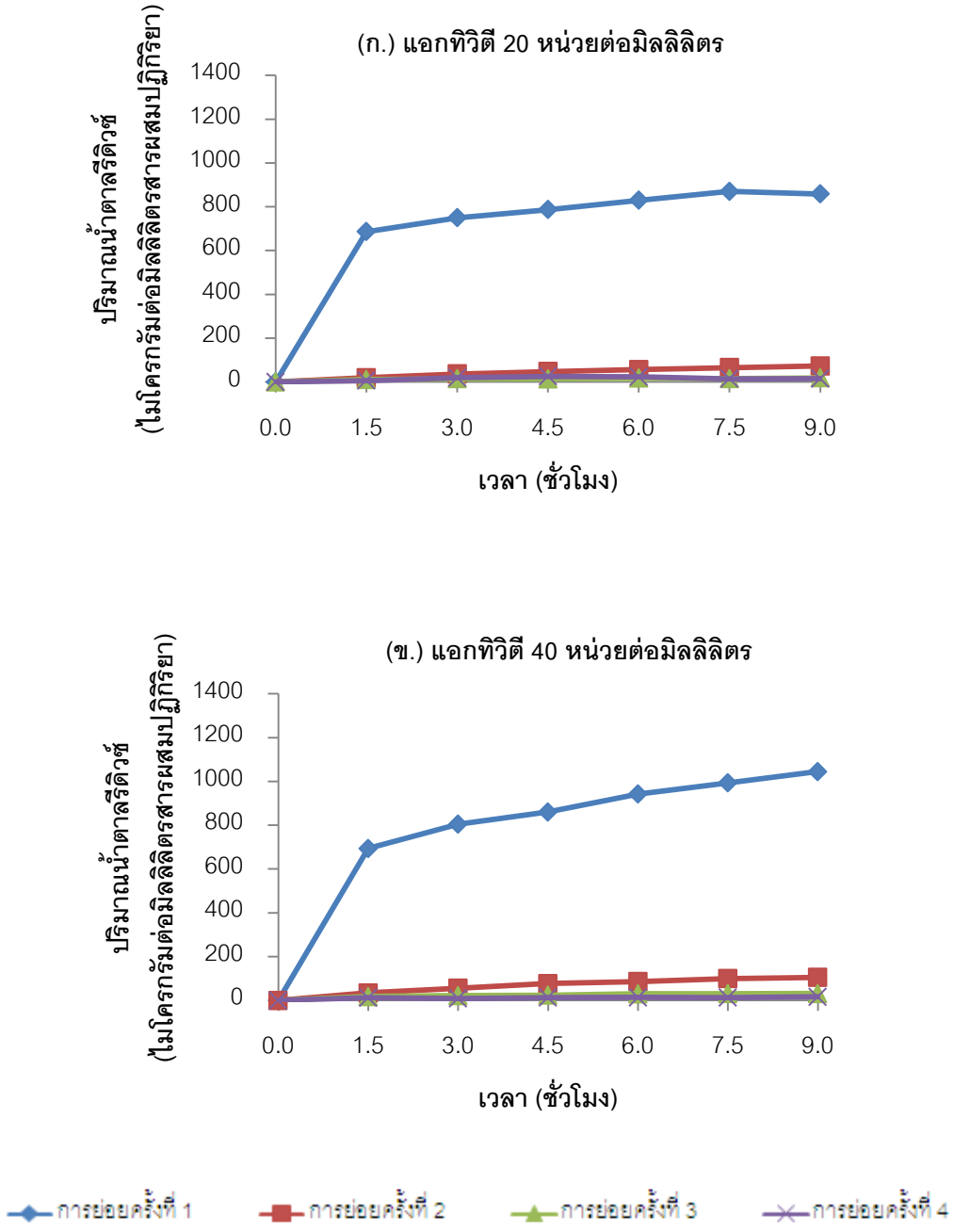
เดกซ์แทรนที่มีพันธะ α-1,3 และ α-1,6 เป็นเดกซ์แทรนที่เตรียมขึ้นใช้เองจาก *S. sobrinus* 6715 ภายใต้สภาวะการเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI ที่เสริมด้วยซูโครสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แบบไม่เขย่า เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีขาว ดังรูปที่ 4.1 มีพันธะ α-1,6 ประมาณ 33 เปอร์เซ็นต์ และพันธะ α-1,3 ประมาณ 67 เปอร์เซ็นต์ (Davis และคณะ, 1986) นำแผ่นฟิล์มสีขาวมาทำบริสุทธิ์บางส่วนและทำแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งโดยใช้อุณหภูมิต่ำ ตามวิธีในข้อ 3.3.2.2

รูปที่ 4.1 ลักษณะของเดกซ์แทรนที่มีพันธะ α-1,3 และ α-1,6 ที่ผลิตโดย *S. sobrinus* 6715

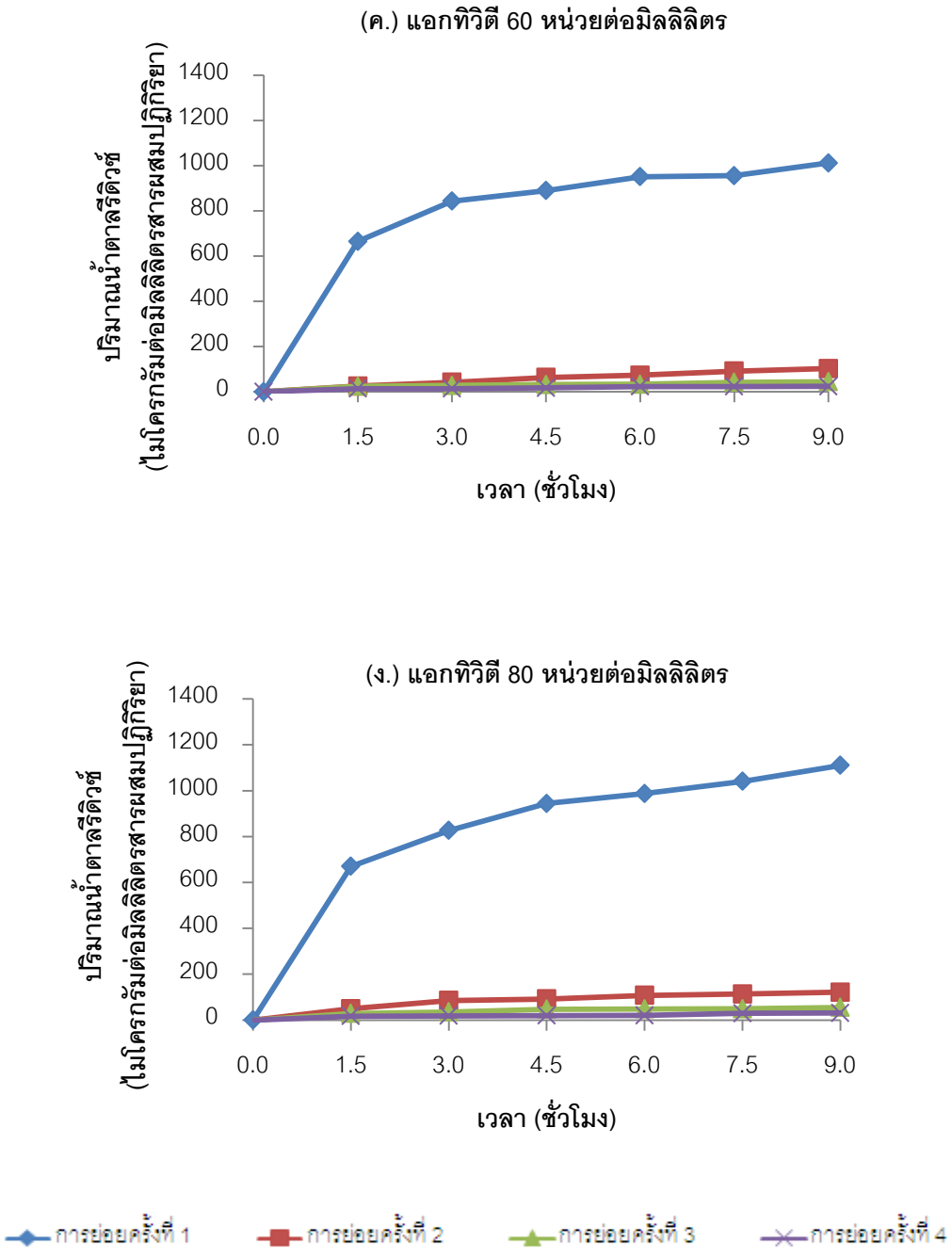
4.1.3 เดกซ์แทรนที่มีพันธะ α-1,3 เป็นส่วนใหญ่ จากการสลายพันธะ α-1,6 ออกจากเดกซ์แทรนที่ผลิตโดย *S. sobrinus* 6715

4.1.3.1 การเปรียบเทียบแอกทิวิตีของเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *P. pinophilum* SMCU3-14 หรือ เดกซ์แทรนเนส FI เพื่อผลิตเดกซ์แทรนพันธะ α-1,3 ด้วยการย่อยสลายพันธะ α-1,6 ออกจากเดกซ์แทรนที่ผลิตโดย *S. sobrinus* 6715 จากข้อ 4.1.2

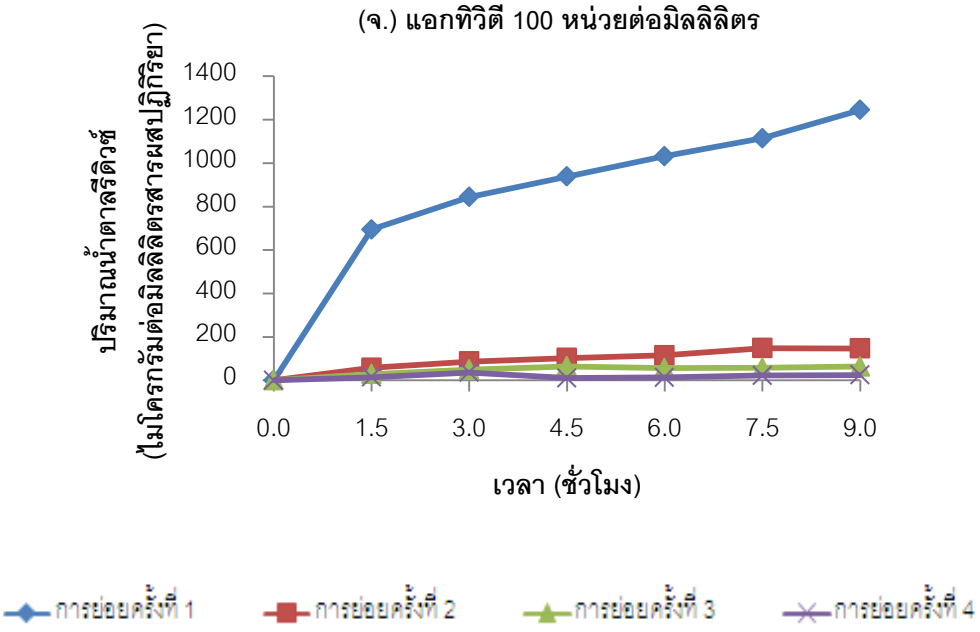
จากการย่อยแดกซ์แทรนที่ผลิตโดย *S. sobrinus* 6715 ด้วย เดกซ์แทรนเนส FI ที่มีแอกทิวิตีเท่ากับ 20 40 60 80 และ 100 หน่วยต่อมิลลิลิตร เก็บตัวอย่างเพื่อวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ทุก 1.5 ชั่วโมง จนครบ 9 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยง ล้างตะกอนแล้วเติมเดกซ์แทรนเนส FI แอกทิวิตีเท่าเดิมอีกครั้ง ทำปฏิกิริยาซ้ำ 4 ครั้ง จากรูปที่ 4.2 พบว่าจากการย่อยครั้งที่ 1 เดกซ์แทรนเนส FI ที่มีแอกทิวิตีเท่ากับ 20 40 60 80 และ 100 หน่วยต่อมิลลิลิตร ย่อยเดกซ์แทรนที่ผลิตโดย *S. sobrinus* 6715 ให้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาการย่อยเทียบจากเวลาเริ่มต้น (0 ชั่วโมง) โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นสูงสุดคือ 869.70 1,044.85 1012.12 1,110.31 และ 1,244.85 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นล้างตะกอนเดกซ์แทรนด้วยน้ำกลั่นและเติมเดกซ์แทรนเนส FI แอกทิวิตีเท่าเดิมใหม่อีก 3 ครั้ง พบว่าการย่อยครั้งที่ 2 และ 3 นั้น เดกซ์แทรนเนส FI ที่มีแอกทิวิตีเท่ากับ 20 40 60 80 และ 100 หน่วยต่อมิลลิลิตร ย่อยเดกซ์แทรนและให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นเล็กน้อยเช่นเดียวกัน และการย่อยครั้งที่ 4 พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นสูงสุดจากการย่อย คือ 15.03 16.25 24.49 30.54 และ 24.73 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งถือว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นน้อยมาก จึงกล่าวได้ว่าเดกซ์แทรนที่มีพันธะ α-1,6 และ α-1,3 ที่ผลิตโดย *S. sobrinus* 6715 ถูกย่อยด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] หรือ เดกซ์แทรนเนส FI จนเหลือเป็นเดกซ์แทรนที่มีพันธะ α-1,3 เป็นส่วนใหญ่



รูปที่ 4.2 แสดงผลการย่อยเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *S. sobrinus* 6715 ด้วย เดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *P. pinophilum* SMCU3-14 หรือ เดกซ์แทรนเนส FI ที่มีความเข้มข้น (ก.) 20 หน่วยต่อมิลลิลิตร (ข.) 40 หน่วยต่อมิลลิลิตร (ค.) 60 หน่วยต่อมิลลิลิตร (ง.) 80 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ (จ.) 100 หน่วยต่อมิลลิลิตร โดยวัดจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นจากเวลาเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0)



รูปที่ 4.2 (ต่อ) แสดงผลการย่อยเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *S. sobrinus* 6715 ด้วย เดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *P. pinophilum* SMCU3-14 หรือ เดกซ์แทรนเนส FI ที่มีความเข้มข้น (ก.) แอกทิวิตี 20 หน่วยต่อมิลลิลิตร (ข.) 40 หน่วยต่อมิลลิลิตร (ค.) 60 หน่วยต่อมิลลิลิตร (ง.) 80 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ (จ.) 100 หน่วยต่อมิลลิลิตร โดยวัดจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นจากเวลาเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0)



รูปที่ 4.2 (ต่อ) แสดงผลการย่อยเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *S. sobrinus* 6715 ด้วย เดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *P. pinophilum* SMCU3-14 หรือ เดกซ์แทรนเนส FI ที่มีความเข้มข้น (ก.) แอกทิวิตี 20 หน่วยต่อมิลลิลิตร (ข.) 40 หน่วยต่อมิลลิลิตร (ค.) 60 หน่วยต่อมิลลิลิตร (ง.) 80 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ (จ.) 100 หน่วยต่อมิลลิลิตร โดยวัดจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นจากเวลาเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0)

จากนั้นนำเดกซ์แทรนที่เหลือจากการย่อยมาทำบริสุทธิ์บางส่วนแล้วทำแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งโดยใช้อุณหภูมิต่ำพบว่าลักษณะของเดกซ์แทรนที่เหลืออยู่มีลักษณะคล้ายกันและสีของเดกซ์แทรนมีสีน้ำตาลเข้มขึ้นตามแอกทิวิตีที่เพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.3 เนื่องจากเดกซ์แทรนเนสเป็นเอนไซม์ที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ และในงานวิจัยนี้ใช้เดกซ์แทรนเนสแบบเอนไซม์หยาบ (Crude enzyme) ที่ผลิตจากเชื้อ *P. pinophilum* SMCU3-14 ที่มีกากน้ำตาลเป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งให้แอกทิวิตีสูงถึง 858.25 หน่วยต่อมิลลิลิตร จึงต้องเจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมก่อนการทดสอบ ทำให้สีของเดกซ์แทรนเนสแปรตามความเข้มข้นของแอกทิวิตีเดกซ์แทรนเนส

(ก)

(ข)

(ค)

(ง)

(จ)

รูปที่ 4.3 ลักษณะเดกซ์แทรนที่มีพันธะ α-1,3 เป็นส่วนใหญ่ที่เหลือจากการย่อยเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *S. sobrinus* 6715 ด้วย เดกซ์แทรนเนส FI ที่มีความเข้มข้น (ก.) 20 หน่วยต่อมิลลิลิตร (ข.) 40 หน่วยต่อมิลลิลิตร (ค.) 60 หน่วยต่อมิลลิลิตร (ง.) 80 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ (จ.) 100 หน่วยต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาทำบริสุทธิ์เดกซ์แทรน บางส่วนแล้วทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งโดยใช้อุณหภูมิต่ำ

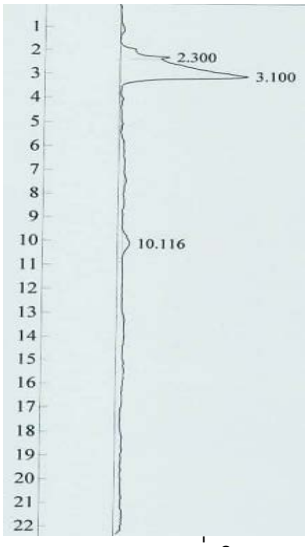
ดังนั้นในการผลิตเดกซ์แทรนที่มีพันธะ α-1,3 เป็นส่วนใหญ่เพื่อเป็นสารชักนำในการผลิตเดกซ์แทรนเนส [α-1,3] จึงเลือก เดกซ์แทรนเนส FI ที่มีแอกทิวิตีเท่ากับ 20 หน่วยต่อมิลลิลิตร เติมเอนไซม์ใหม่จำนวน 4 ครั้ง ทุก 9 ชั่วโมง เนื่องจากสามารถผลิตเดกซ์แทรนที่มีพันธะ α-1,3 เป็นส่วนใหญ่โดยใช้แอกทิวิตีน้อยที่สุดในการทดสอบ

4.1.3.2 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของการย่อยสลายเดกซ์แทรนที่มีพันธะ α-1,6 ออกจากเดกซ์แทรนที่ผลิตโดย *S. sobrinus* 6715 ด้วย เดกซ์แทรนเนส FI ที่มีแอกทิวิตีเท่ากับ 20 หน่วยต่อมิลลิลิตร

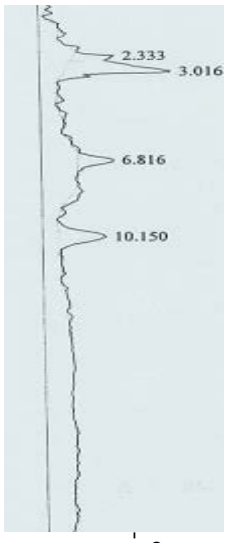
ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยเดกซ์แทรนที่ผลิตโดย *S. sobrinus* 6715 ด้วย เดกซ์แทรนเนส FI ที่มีแอกทิวิตีเท่ากับ 20 หน่วยต่อมิลลิลิตร โดยเก็บตัวอย่างจากการย่อยครั้งที่ 1 ที่เวลา 0.0 0.5 3.0 และ 9.0 ชั่วโมง มากรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน จากนั้นนำไปหาปริมาณและชนิดของน้ำตาลโดยวิธีโครมาโทกราฟฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้สารละลายกลูโคส มอลโทส มอลโทไทรโอส มอลโทเททราโอสเป็นสารละลายมาตรฐาน จากรูปที่ 4.4 พบว่า การย่อยเป็นเวลา 0.5 3.0 และ 9.0 ชั่วโมง ให้ผลิตภัณฑ์ที่เด่นชัดเมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐาน คือ กลูโคสและมอลโทส

จากรูปที่ 4.2 (ก) เมื่อพิจารณาการย่อยครั้งที่ 1 ของการสลายพันธะ α-1,6 ออกจากเดกซ์แทรนที่ผลิตโดย *S. sobrinus* 6715 ด้วย เดกซ์แทรนเนส FI นั้น พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เป็นผลิตภัณฑ์จากการย่อยเพิ่มขึ้นมากสุดในเวลา 0-1.5 ชั่วโมง และช่วงเวลา 1.5-9.0 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนค่อนข้างคงที่ เนื่องจากเมื่อผ่านการย่อยไป 9.0 ชั่วโมง เอนไซม์มีแอกทิวิตีลดลง 81.57 เปอร์เซ็นต์ จากการที่น้ำตาลรีดิวซ์คงที่นั้นอาจเกิดจากการย่อยโดยสมบูรณ์หรือเกิดจากการที่เอนไซม์หมดแอกทิวิตี จึงทดสอบโดยเติมเดกซ์แทรนเนส FI 20 หน่วยต่อมิลลิลิตรเพิ่มที่เวลา 4.5 ชั่วโมง จากรูปที่ 4.5 พบว่า การเติมเอนไซม์เพิ่มมีผลให้อัตราการเพิ่มของน้ำตาลรีดิวซ์สูงขึ้นกว่าการไม่เติมเอนไซม์ แต่น้อยกว่าช่วง 0-1.5 ชั่วโมง เนื่องจากช่วงเวลา 0-4.5 ชั่วโมง เดกซ์แทรนเนส FI ย่อยพันธะ α-1,6 ออกจากเดกซ์แทรนที่ผลิตโดย *S. sobrinus* 6715 ได้เป็นส่วนใหญ่ จึงเหลือพันธะ α-1,6 เป็นส่วนน้อย และพันธะอื่นๆ เช่น พันธะ α-1,3 ที่ไม่ถูกย่อย ดังนั้น การเติมเดกซ์แทรนเนส FI เพิ่มจึงเป็นการย่อยเดกซ์แทรนที่เหลือเพิ่มเติม

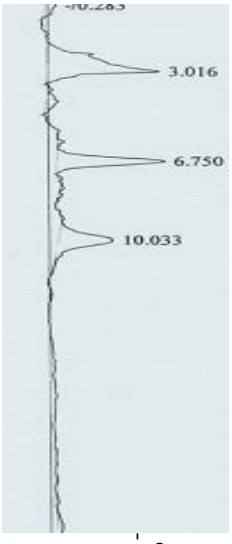
(ก) สารละลายมาตรฐาน



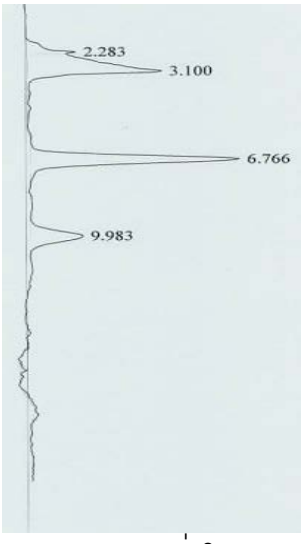
(ข) 0.0 ชั่วโมง



(ค) 0.5 ชั่วโมง

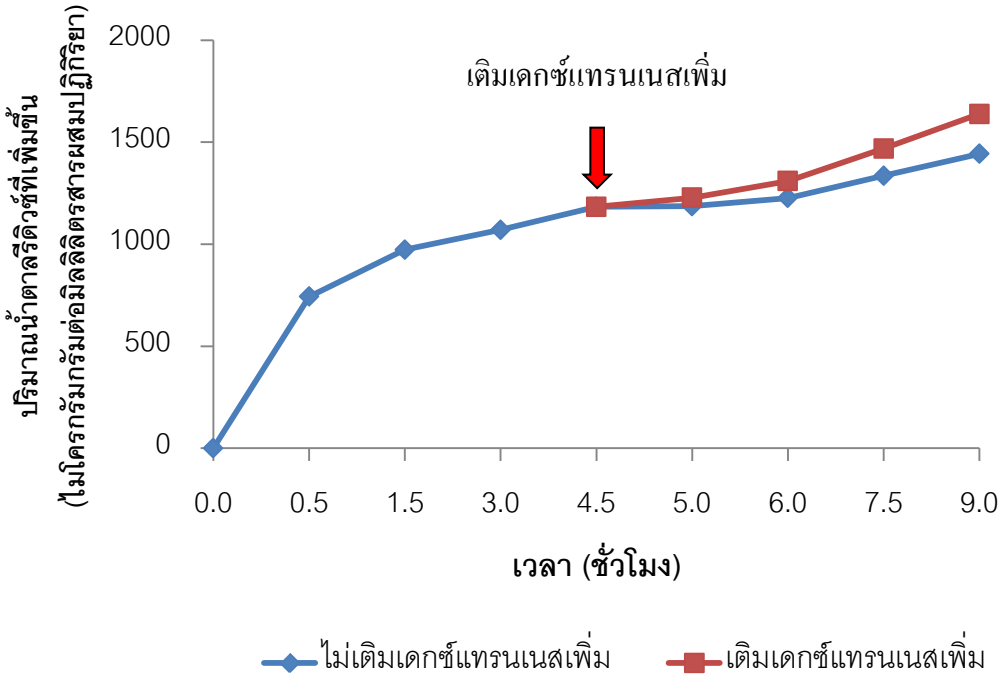


(ง) 3.0 ชั่วโมง



(จ) 9.0 ชั่วโมง

รูปที่ 4.4 โครมาโทรแกรมแสดง (ก) สารละลายมาตรฐาน และผลิตภัณฑ์ของการย่อยครั้งที่ 1 สำหรับการย่อยเดกซ์แทรนที่ผลิตโดย *S. sobrinus* 6715 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] แอกทิวิตีเท่ากับ 20 หน่วยต่อมิลลิลิตรที่เวลา (ข) 0.0 ชั่วโมง (ค) 0.5 ชั่วโมง (ง) 3.0 ชั่วโมง และ (จ) 9.0 ชั่วโมง

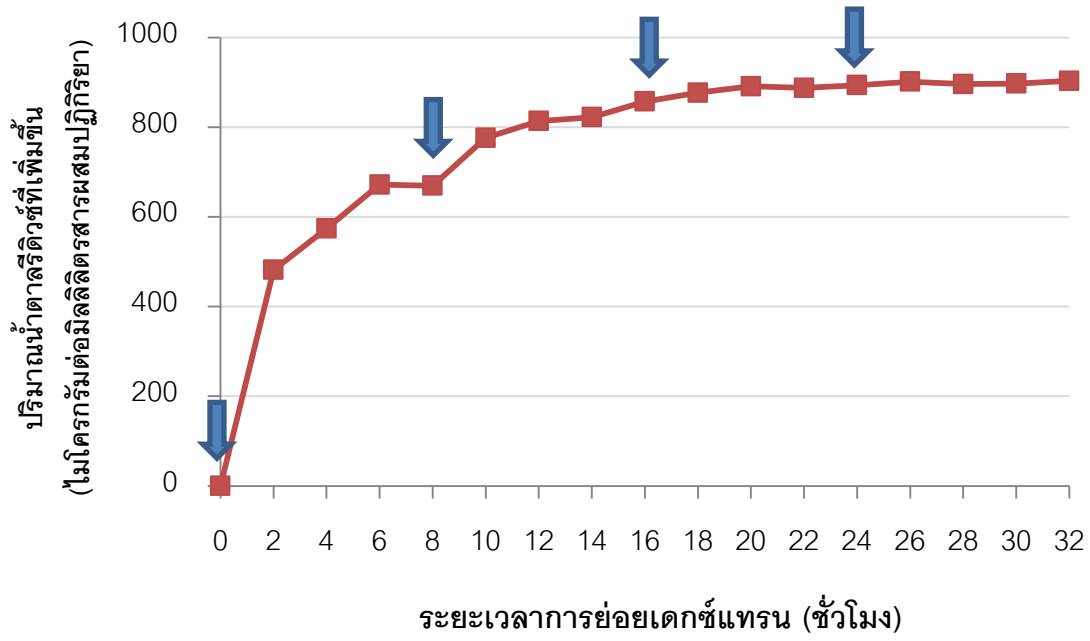


รูปที่ 4.5 แสดงผลการย่อยครั้งที่ 1 ของการย่อยเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *S. sobrinus* 6715 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] จาก *P. pinophilum* SMCU3-14 แอกทิวิตี 20 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่มีการเติม/ไม่เติมเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] แอกทิวิตี 20 หน่วยต่อมิลลิลิตร เพิ่มที่เวลา 4.5 ชั่วโมง

4.1.3.3 การผลิตเดกซ์แทรนที่มีพันธะ α-1,3 เป็นส่วนใหญ่โดยย่อยสลายพันธะ α-1,6 ออกจากเดกซ์แทรนที่ผลิตโดย *S. sobrinus* 6715 ด้วย เดกซ์แทรนเนส FI ที่มีแอกทิวิตีเท่ากับ 20 หน่วยต่อมิลลิลิตร โดยไม่ล้างตะกอนเดกซ์แทรนก่อนการเติมเอนไซม์ซ้ำแต่ละครั้ง

ย่อยสลายพันธะ α-1,6 ออกจากเดกซ์แทรนที่ผลิตโดย *S. sobrinus* 6715 โดยเติมเดกซ์แทรนเนส FI ที่มีแอกทิวิตีเท่ากับ 20 หน่วยต่อมิลลิลิตร ทุก 8 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที และเก็บตัวอย่างเพื่อวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทุก 2 ชั่วโมง จากรูปที่ 4.6 แสดงว่า การย่อยครั้งที่ 1 มีอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์จากการย่อยเดกซ์แทรน คือ น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด รองลงมาคือ การย่อยครั้งที่ 2 และ 3 ตามลำดับ และการย่อยครั้งที่ 4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นคงที่ นั่นคือ เดกซ์แทรนที่เหลือจากการย่อยครั้งที่สี่ควรจะเป็นเดกซ์แทรนที่มีพันธะ α-1,3 เป็นส่วนใหญ่

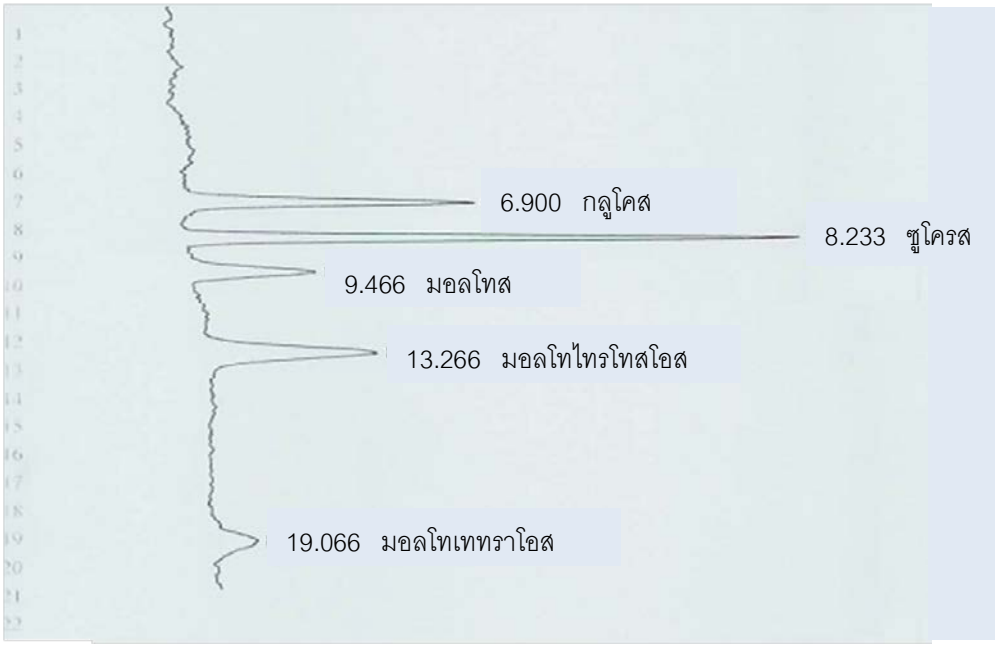
จากการทดสอบข้อ 4.1.3.1 และ 4.1.3.3. ที่มีการล้างหรือไม่ล้างตะกอนเดกซ์แทรนก่อนการเติมเอนไซม์ซ้ำแต่ละครั้ง ให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกัน คือ เดกซ์แทรนที่เหลือจากการย่อยครั้งที่ 4 เป็นเดกซ์แทรนที่มีพันธะ α-1,3 เป็นส่วนใหญ่ เนื่องจากเดิมเดกซ์แทรนที่ผลิตโดย *S. sobrinus* 6715 มีทั้งพันธะ α-1,6 และพันธะ α-1,3 ประมาณ 33 เปอร์เซ็นต์ และ 67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งในการย่อยครั้งที่ 4 ที่มีการเติม เดกซ์แทรนเนส FI กลับไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหมือนกับครั้งที่ 1-3 แสดงว่า เดกซ์แทรนพันธะ α-1,6 ถูกย่อยสลายจนหมดในการย่อยครั้งที่ 4 และคงเหลือเป็นเดกซ์แทรนที่มีพันธะ α-1,3 เป็นส่วนใหญ่



รูปที่ 4.6 แสดงผลการย่อยเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *S. sobrinus* 6715 ด้วย เดกซ์แทรนเนส FI ซึ่งมีแอกทิวิตี 20 หน่วยต่อมิลลิลิตร จำนวน 4 ครั้ง (ตามลูกศร) คือ ชั่วโมงที่ 0 ชั่วโมงที่ 8 ชั่วโมงที่ 16 และชั่วโมงที่ 24

4.1.3.3 การตรวจสอบว่าเดกซ์แทรนที่มีพันธะ α-1,3 เป็นส่วนใหญ่ที่เหลือจากการย่อยเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *S. sobrinus* 6715 ด้วยเดกซ์แทรนเนส FI เป็นเดกซ์แทรนที่เป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส

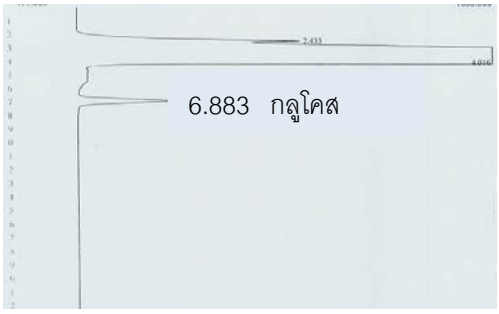
นำเดกซ์แทรนที่-2000 เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม เดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *S. sobrinus* 6715 และเดกซ์แทรนที่มีพันธะ α-1,3 เป็นส่วนใหญ่ที่เหลือจากการย่อยเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *S. sobrinus* 6715 ด้วยเดกซ์แทรนเนส FI และผ่านการระเหยแห้งแล้ว ชนิดละ 10 มิลลิกรัม มาย่อยด้วยกรดซัลฟูริก 1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยนำไปนึ่งในเครื่องอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นปรับสารละลายที่ได้ให้มีค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 7.0 แล้วนำไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน จากนั้นนำไปหาปริมาณและชนิดของน้ำตาลโดยวิธีโครมาโทกราฟฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้สารละลายกลูโคส มอลโทส มอลโทไทรโอส มอลโทเททราโอสเป็นสารละลายมาตรฐาน จากรูปที่ 4.7 พบว่า ที่เวลา 6.8 นาที สารที่ได้จากการย่อยสลายเดกซ์แทรน ที-2000 (รูป ข) เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม (รูป ค) เดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *S.sobrinus* 6715 (รูป ง) และเดกซ์แทรนที่มีพันธะ α-1,3 ในปริมาณสูงที่เหลือจากการย่อยเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *S.sobrinus* 6715 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] (รูป ง) มีเวลารีเทนชัน (Retension time) เดียวกันกับกลูโคส ซึ่งได้ผลิตภัณฑ์เพียงชนิดเดียว และให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยของนันทิดา วานิชวงศ์วรรณ (2545) จึงกล่าวได้ว่าเดกซ์แทรนทั้ง 4 ชนิดที่ผ่านการย่อยด้วยกรดซัลฟูริก ได้ผลิตภัณฑ์เพียงชนิดเดียว คือ กลูโคส ดังนั้น เดกซ์แทรนที่มีพันธะ α-1,3 เป็นส่วนใหญ่เป็นเดกซ์แทรนที่เป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส เช่นเดียวกับเดกซ์แทรน ที-2000 เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม และเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *S. sobrinus* 6715



(ก) สารละลายมาตรฐาน

(ข) เดกซ์แทรน ที-2000

(ค) เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม



(ง) เดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *S. sobrinus* 6715

(จ) เดกซ์แทรนที่มีพันธะ α-1,3 เป็นส่วนใหญ่

รูปที่ 4.7 โครมาโทรแกรมแสดง (ก) สารละลายมาตรฐาน และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายด้วยกรดซัลฟูริกของ (ข) เดกซ์แทรน ที-2000 (ค) เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม (ง) เดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *S. sobrinus* 6715 และ (จ) เดกซ์แทรนที่มีพันธะ α-1,3 เป็นส่วนใหญ่ที่เหลือจากการย่อยเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *S. sobrinus* 6715 ด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6]

4.2 แอกทิวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนสจาก *Arthrobacter* sp. AG-2 และ *P. pinophilum* SMCU3-14 ที่ชักนำด้วยเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 และเดกซ์แทรนที่มีพันธะ α-1,3 เป็นส่วนใหญ่ที่เหลือจากการย่อยเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ด้วยเดกซ์แทรนเนส FI

เดกซ์แทรนเนสที่ใช้ในการทดลองนี้จะผลิตจากจุลินทรีย์คือ แบคทีเรีย *Arthrobacter* sp. AG-2 และรา *P. pinophilum* SMCU3-14 โดยแต่ละชนิดจะชักนำด้วยสารชักนำ 3 ชนิด ได้แก่

1) เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม (Sigma Co.; USA) ที่มีพันธะ α-1,6 ปริมาณสูงจะให้เดกซ์แทรนเนสที่มีความจำเพาะต่อ α-1,6 หรือเรียกในที่นี้เป็น เดกซ์แทรนเนส [α-1,6] ชื่อย่อ BI (เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรีย) และชื่อย่อ FI (เดกซ์แทรนเนสจากรา)

2) เดกซ์แทรนที่มีพันธะ α-1,3 และ α-1,6 ที่ผลิตโดย *S. sobrinus* 6715 จะผลิตได้เดกซ์แทรนเนสที่มีความจำเพาะต่อ α-1,3 และ α-1,6 หรือเรียกในที่นี้เป็น เดกซ์แทรนเนส [α-1,3 และ α-1,6] ชื่อย่อ BB (เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรีย) และชื่อย่อ FB (เดกซ์แทรนเนสจากรา)

3) เดกซ์แทรนที่มีพันธะ α-1,3 เป็นส่วนใหญ่ที่เหลือจากการย่อยเดกซ์แทรนจาก *S.sobrinus* 6715 ด้วย เดกซ์แทรนเนส [α-1,6] อย่างเต็มที่ ได้เดกซ์แทรนเนสที่มีความจำเพาะต่อ α-1,3 หรือเรียกในที่นี้เป็น เดกซ์แทรนเนส [α-1,3] ชื่อย่อ BB-1,3 (เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรีย) และชื่อย่อ FB-1,3 (เดกซ์แทรนเนสจากรา)

เมื่อวิเคราะห์แอกทิวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนสทั้ง 6 ชนิดโดยสับสเตรทคือเดกซ์แทรนที-2000 ที่มีพันธะ α-1,6 สูง และวิเคราะห์ตามวิธีในข้อ 3.3.7 พบว่า เดกซ์แทรนเนสที่ผลิตจากรา *P. pinophilum* SMCU3-14 มีแอกทิวิตีสูงกว่าเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Arthrobacter* sp. AG-2 ไม่ว่าจะใช้เดกซ์แทรนชนิดใดเป็นสารชักนำก็ตาม และหากพิจารณาในแง่ของสารชักนำพบว่าเดกซ์แทรนเนสที่มีสารชักนำเป็นเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรมให้แอกทิวิตีมากที่สุด รองลงมาคือ เดกซ์แทรนที่มีพันธะ α-1,3 และ α-1,6 ที่ผลิตโดย *S. sobrinus* 6715 และเดกซ์แทรนที่มีพันธะ α-1,3 เป็นส่วนใหญ่ที่เหลือจากการย่อยเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ด้วย [α-1,6] เดกซ์แทรนเนส ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.1

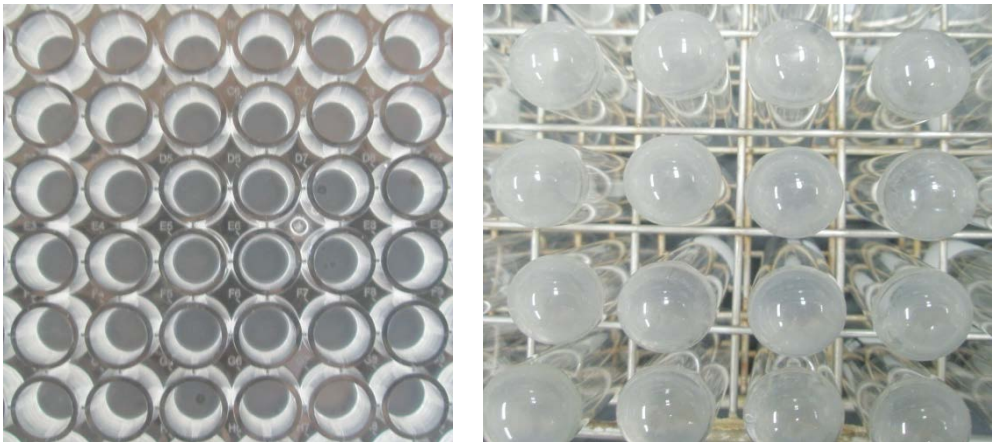
ตารางที่ 4.1 แสดงการเปรียบเทียบแอกทิวิตี ปริมาณโปรตีน และแอกทิวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนส

แหล่งของเดกซ์แทรนเนส และชนิดของสารชักนำ	ตัวย่อ	แอกทิวิตี* (หน่วยต่อมล.)	ปริมาณโปรตีน (มก.ต่อมล.)	แอกทิวิตีจำเพาะ (หน่วยต่อมก.โปรตีน)
แบคทีเรีย				
Arthrobacter sp.AG-2				
เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม	(BI)	24.18	2.15	11.25
เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715	(BB)	0.15	1.88	0.08
เดกซ์แทรนที่เหลือจากการย่อยเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ด้วย [α -1,6] เดกซ์แทรนเนส	(BB-1,3)	0	1.14	0
รา				
P. pinophilum SMCU 3-14				
เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม	(FI)	858.25	4.11	208.82
เดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715	(FB)	614.25	4.82	127.44
เดกซ์แทรนที่เหลือจากการย่อยเดกซ์แทรนจาก *S. sobrinus* 6715 ด้วย [α -1,6] เดกซ์แทรนเนส	(FB-1,3)	5.47	4.36	1.25

*ในการวัดแอกทิวิตีของเดกซ์แทรนเนสนั้นจะใช้เดกซ์แทรนที-2000 เป็นสับสเตรทซึ่งมีพันธะ α-1,6 สูง

4.3 การสร้างคราบจุลินทรีย์ในไมโครไตเตอร์เพลตจากกล้าเชื้อ *S. sobrinus* 6715

การสร้างคราบจุลินทรีย์ในไมโครไตเตอร์เพลตจาก *S. sobrinus* 6715 โดยเติมเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI ที่เสริมด้วยซูโครสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ จนมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 หรือเท่ากับ 2.46×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จึงเติมในไมโครไตเตอร์เพลตหรือหลอดทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในภาวะที่มีออกซิเจนต่ำเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จะได้คราบจุลินทรีย์ ดังรูปที่ 4.8



(ก) (ข)

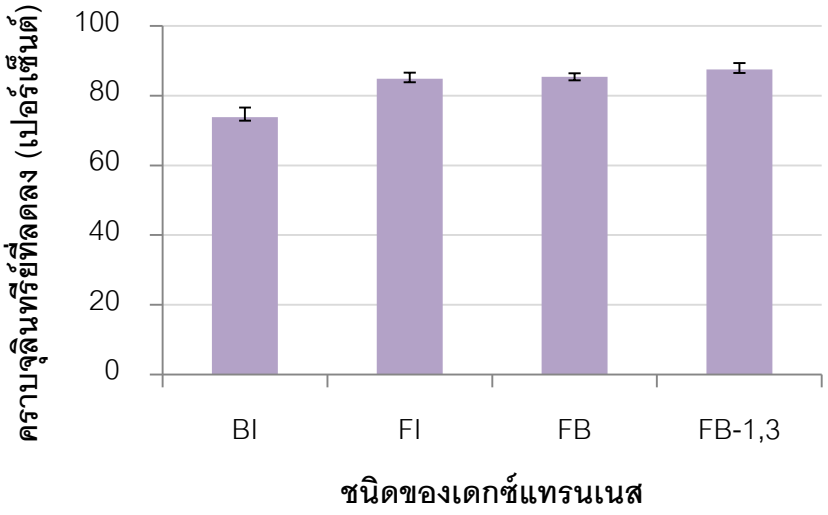
รูปที่ 4.8 แสดงคราบจุลินทรีย์ที่เกิดจาก *S. sobrinus* 6715 ใน (ก) ไมโครไตเตอร์เพลต (ข) หลอดทดลอง

4.4 ภาวะที่เหมาะสมต่อการสลายคราบจุลินทรีย์ด้วยเดกซ์แทรนเนส

ศึกษาภาวะการสลายคราบจุลินทรีย์บนไมโครไตเตอร์เพลต หรือหลอดทดลอง ที่ใช้เป็นแบบจำลองภายนอกร่างกาย โดยทดสอบที่อุณหภูมิห้อง และระบบบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมกับเอนไซม์ เพื่อสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการล้างทำความสะอาดอุปกรณ์ที่ใช้ภายในช่องปาก เช่น ฟันปลอม

4.4.1 ชนิดของเดกซ์แทรนเนสต่อการสลายคราบจุลินทรีย์

จากข้อ 4.2 ที่แอกทิวิตีของเดกซ์แทรนเนส BB และ BB-1,3 มีค่าน้อยมากไม่สามารถนำมาศึกษาต่อได้ ดังนั้นการศึกษาต่อไปจึงเปรียบเทียบเฉพาะความสามารถในการสลายคราบจุลินทรีย์ของเดกซ์แทรนเนส BI FI FB และ FB-1,3 ที่มีความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในเวลา 15 นาที เท่านั้น พบว่า เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรีย (BI) และเดกซ์แทรนเนสจากรา (FI FB และ FB-1,3) สามารถย่อยสลายคราบจุลินทรีย์ได้ใกล้เคียงกันโดยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังรูปที่ 4.9 แต่ในการผลิตเดกซ์แทรนเนสในปริมาตรที่เท่ากันราจะผลิตเดกซ์แทรนเนสที่มีแอกทิวิตีสูงกว่า จึงเหมาะสมต่อการผลิตในเชิงอุตสาหกรรมมากกว่า ดังนั้นจึงเลือกเดกซ์แทรนเนสจากราเพื่อการทดสอบต่อไป



รูปที่ 4.9 การสลายคราบจุลินทรีย์โดยเดกซ์แทรนเนส BI FI FB และ FB-1,3 ที่มีความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในระบบบัฟเฟอร์ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที

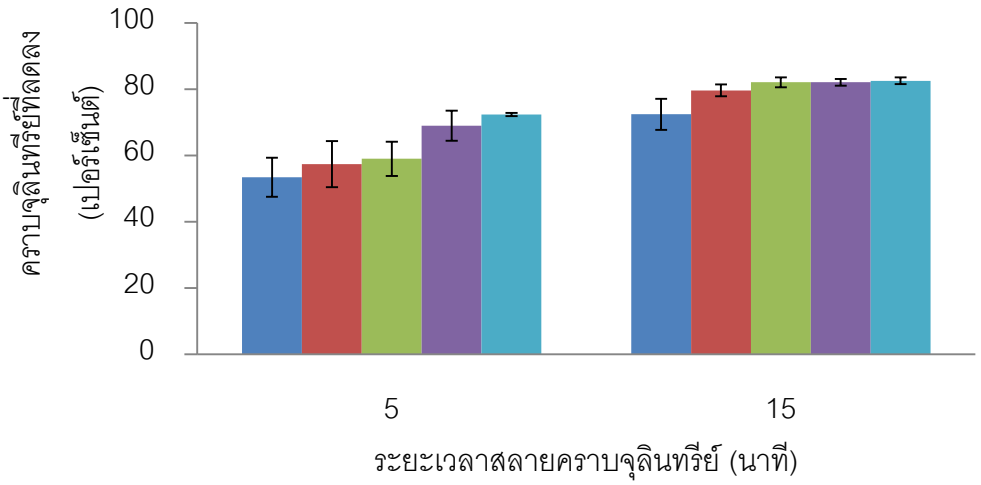
4.4.2 ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการสลายคราบจุลินทรีย์ของเดกซ์แทรนเนส FI FB และ FB-1,3 โดยมีระยะเวลาสลายคราบเป็นเวลา 5 และ 15 นาที

จากการสลายคราบจุลินทรีย์ด้วยเดกซ์แทรนเนส FI FB และ FB-1,3 ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 2 3 4 และ 5 หน่วยต่อมิลลิลิตร และระยะเวลาสลายคราบจุลินทรีย์เป็นเวลา 5 และ 15 นาที จากรูปที่ 4.10 พบว่า เดกซ์แทรนเนส FI และ FB สามารถสลายคราบจุลินทรีย์ได้เพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นและระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น แต่เดกซ์แทรนเนส FB-1,3 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นจาก 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็น 2 หน่วยต่อมิลลิลิตร จะสลายคราบจุลินทรีย์ได้สูงที่สุด และการสลายคราบจะลดลงเมื่อความเข้มข้นสูงกว่า 2 หน่วยต่อมิลลิลิตร เนื่องจากแอกทิวิตีเริ่มต้นจากเอนไซม์หยาบ (Crude enzyme) ของเดกซ์แทรนเนส FB-1,3 ต่ำกว่าเดกซ์แทรนเนส FI และ FB เท่ากับ 156.90 และ 112.29 เท่า ตามลำดับ จึงต้องปรับความเข้มข้นสุดท้ายของแต่ละเอนไซม์ให้เท่ากันเพื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการสลายคราบจุลินทรีย์ของเดกซ์แทรนเนสได้ จึงทำให้ต้องใช้เนื้อสารของเดกซ์แทรนเนส FB-1,3 มากกว่า ดังนั้น เนื้อสารดังกล่าวที่มีส่วนผสมของอาหารเลี้ยงเชื้ออาจเข้ายึดติดกับคราบจุลินทรีย์ทำให้บดบังการทำงานของเอนไซม์ได้

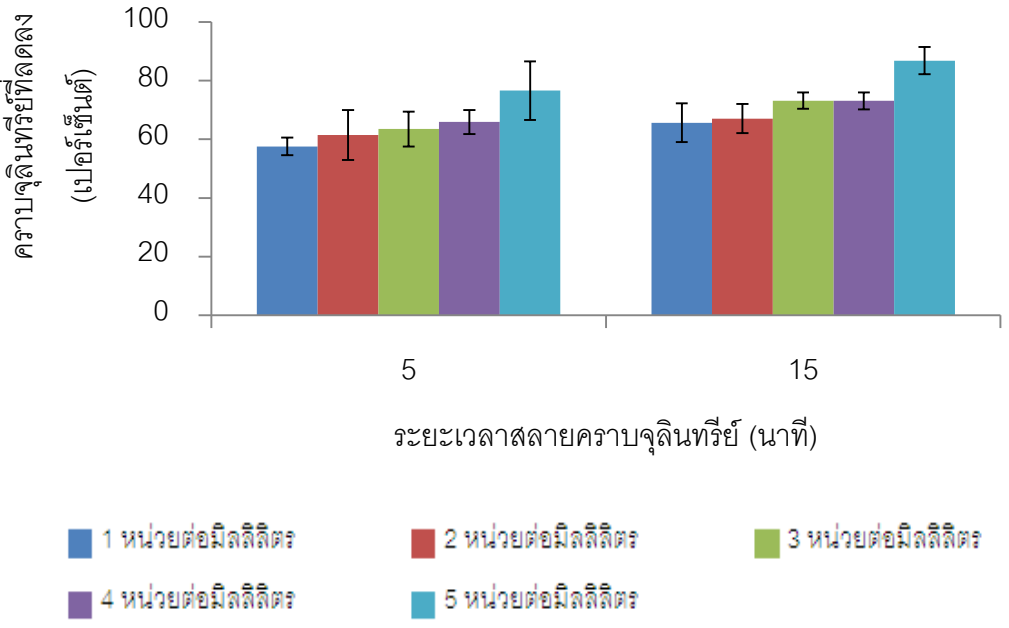
เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการสลายคราบจุลินทรีย์ พบว่า เดกซ์แทรนเนส FI และ FB สลายคราบจุลินทรีย์ได้ใกล้เคียงกันในทุกความเข้มข้น และเดกซ์แทรนเนส FI FB และ FB-1,3 ที่ความเข้มข้น 1-2 หน่วยต่อมิลลิลิตร มีระยะเวลาสลายคราบจุลินทรีย์ 15 นาที สามารถย่อยสลายคราบได้ใกล้เคียงกัน แต่เดกซ์แทรนเนส FI เป็นเอนไซม์ที่ใช้เดกซ์แทรนเนสเกรดอุตสาหกรรมเป็นสารชักนำ จึงผลิตง่ายกว่าและเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เชิงอุตสาหกรรมมากกว่าการเตรียมสารชักนำเองจากแบคทีเรีย *S. sobrinus* 6715 จึงใช้เดกซ์แทรนเนส FI ในการทดสอบต่อไป

สำหรับความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดต่อการสลายคราบจุลินทรีย์ด้วยเดกซ์แทรนเนส FI คือ ความเข้มข้น 5 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 5 นาที หรือ ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 15 นาที ทั้งนี้ขึ้นกับจุดประสงค์ของการทดสอบว่าต้องการประหยัดเวลา หรือประหยัดเอนไซม์

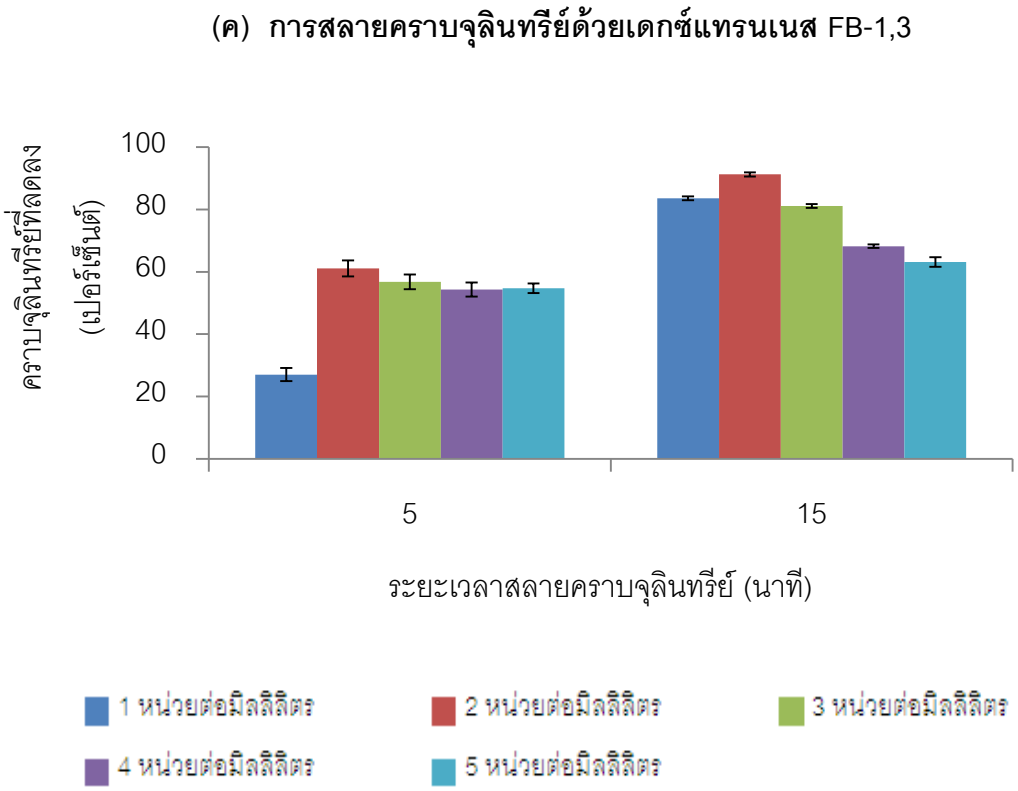
(ก) การสลายคราบจุลินทรีย์ด้วยเดกซ์แทรนเนส FI



(ข) การสลายคราบจุลินทรีย์ด้วยเดกซ์แทรนเนส FB



รูปที่ 4.10 การสลายคราบจุลินทรีย์โดย (ก) เดกซ์แทรนเนส FI (ข)เดกซ์แทรนเนส FB และ (ค) เดกซ์แทรนเนส FB-1,3 ที่มีความเข้มข้น 1 2 3 4 และ 5 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 5 และ 15 นาที ในระบบบัฟเฟอร์ อุณหภูมิห้อง



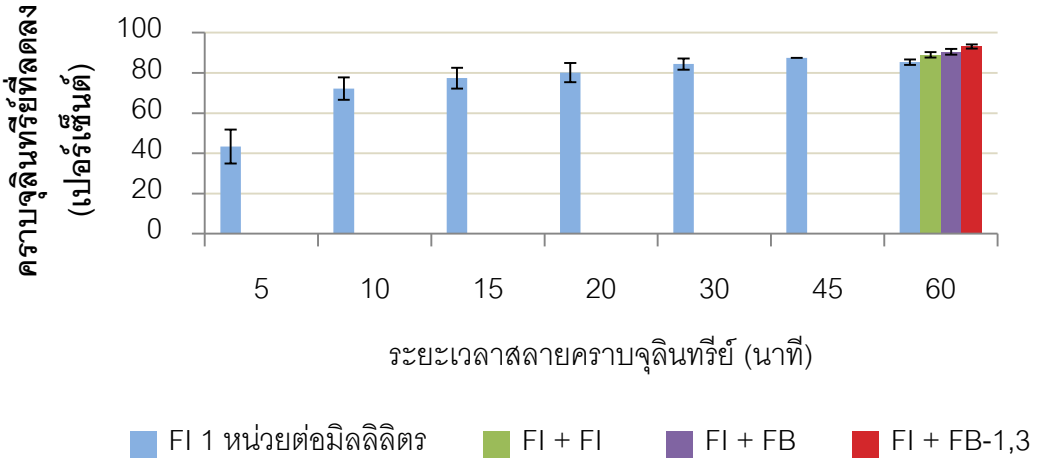
รูปที่ 4.10 (ต่อ) การสลายคราบจุลินทรีย์โดย (ก) เดกซ์แทรนเนส FI (ข)เดกซ์แทรนเนส FB และ (ค)เดกซ์แทรนเนส FB-1,3 ที่มีความเข้มข้น 1 2 3 4 และ 5 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 5 และ 15 นาที ในระบบบัฟเฟอร์ อุณหภูมิห้อง

4.4.3 ประสิทธิภาพของการทำงานร่วมกันระหว่างเดกซ์แทรนเนส 2 ชนิด ต่อการสลายคราบจุลินทรีย์

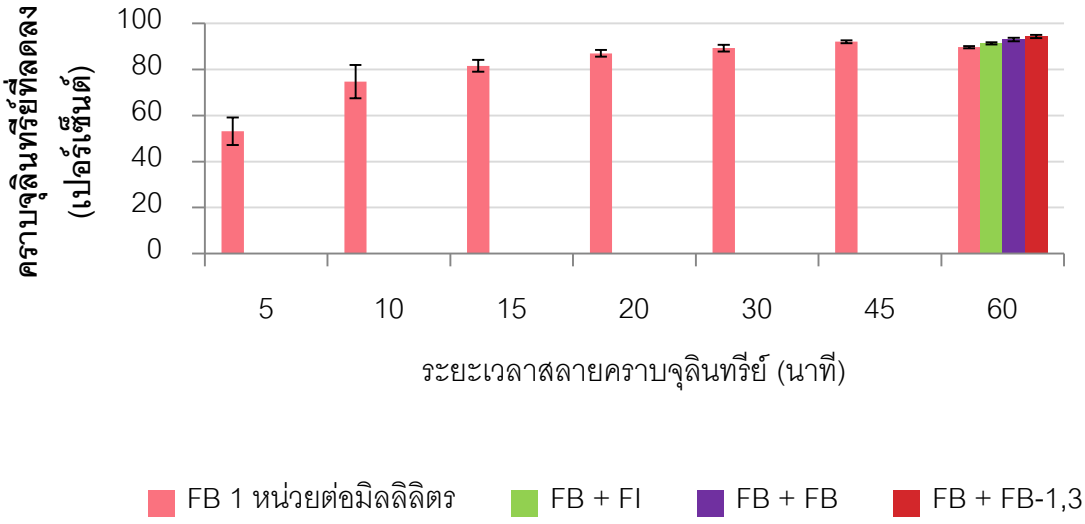
จากการศึกษาที่ผ่านมาโดยย่อยสลายคราบจุลินทรีย์ด้วยเดกซ์แทรนเนสชนิดใดชนิดหนึ่งเป็นเวลา 15 นาที ยังไม่สามารถย่อยสลายคราบจุลินทรีย์ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ จึงเพิ่มประสิทธิภาพของการย่อยสลายคราบจุลินทรีย์ด้วยการเติมเดกซ์แทรนเนส FI ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 0-45 นาที แล้วเติมเดกซ์แทรนเนส (FI FB หรือ FB-1,3) ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 45 นาที แล้วทำปฏิกิริยาต่ออีก 15 นาที พบว่า การเพิ่มระยะเวลาการสลายคราบของจุลินทรีย์เป็นเวลา 45 นาที ให้ผลไม่แตกต่างจากการย่อยสลายคราบจุลินทรีย์เพียง 15 นาที ซึ่งการย่อยสลายคราบจุลินทรีย์ค่อนข้างคงที่ อาจเนื่องมาจากเดกซ์แทรนเนส FI ย่อยสลายคราบจุลินทรีย์ที่มีพันธะ α-1,6 ได้หมดและเหลือพันธะอื่นๆ ที่เดกซ์แทรนเนส FI ไม่สามารถย่อยได้ หรือประสิทธิภาพการทำงานของเดกซ์แทรนเนสลดลงจากระยะเวลาการสลายคราบจุลินทรีย์ที่นานขึ้น จึงเติมเดกซ์แทรนเนส FI, FB หรือ FB-1,3 แล้วทำปฏิกิริยาต่อ พบว่า การย่อยสลายคราบจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และการเติมเดกซ์แทรนเนส FB-1,3 จะทำให้คราบจุลินทรีย์ลดลงมากที่สุด ดังรูปที่ 4.11 (ก)

เมื่อทำการทดลองเช่นเดิม แต่เติมเดกซ์แทรนเนส FB ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 0-45 นาที แทน เดกซ์แทรนเนส FI แล้วเติมเดกซ์แทรนเนส (FI FB หรือ FB-1,3) ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 45 นาที แล้วทำปฏิกิริยาต่ออีก 15 นาที พบว่า การย่อยสลายคราบจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และการเติมเดกซ์แทรนเนส FB-1,3 จะทำให้คราบจุลินทรีย์ลดลงมากที่สุด ดังรูป 4.11 (ข)

จากผลการทดลองสรุปได้ว่า การเพิ่มระยะเวลาการย่อยสลายคราบจุลินทรีย์ หรือการทำงานร่วมกันของเดกซ์แทรนเนส 2 ชนิด ไม่มีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพของการสลายคราบจุลินทรีย์อย่างมีนัยสำคัญ



รูปที่ 4.11 แสดงการย่อยสลายคราบจุลินทรีย์ของเดกซ์แทรนเนส (ก) FI และ (ข) FB ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 0-45 นาที แล้วเติมเดกซ์แทรนเนส (FI FB และ FB-1,3) ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 45 นาที แล้วย่อยสลายคราบต่ออีก 15 นาที



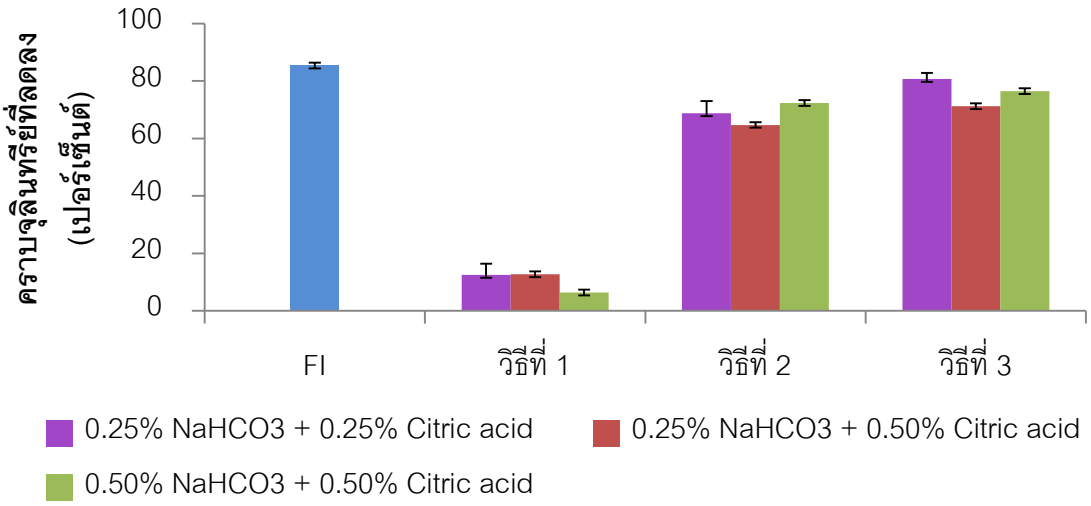
รูปที่ 4.11 แสดงการย่อยสลายคราบจุลินทรีย์ของเดกซ์แทรนเนส (ก) FI และ (ข) FB ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 0-45 นาที แล้วเติมเดกซ์แทรนเนส (FI FB และ FB-1,3) ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 45 นาที แล้วย่อยสลายคราบต่ออีก 15 นาที

4.5 การเพิ่มประสิทธิภาพในการลดคราบจุลินทรีย์ในแบบจำลองภายนอกร่างกาย

จากการทดลองที่ผ่านมา จะเห็นได้ว่า เดกซ์แทรนเนสสามารถสลายคราบจุลินทรีย์ได้เพียงส่วนหนึ่ง และใช้เวลาการย่อยสลายคราบจุลินทรีย์ที่นานถึง 15 นาที จึงต้องหาวิธีเพิ่มประสิทธิภาพของการลดคราบจุลินทรีย์บนแบบจำลองภายนอกร่างกายเพื่อลดเวลาที่ใช้ลงแต่ยังคงมีประสิทธิภาพ

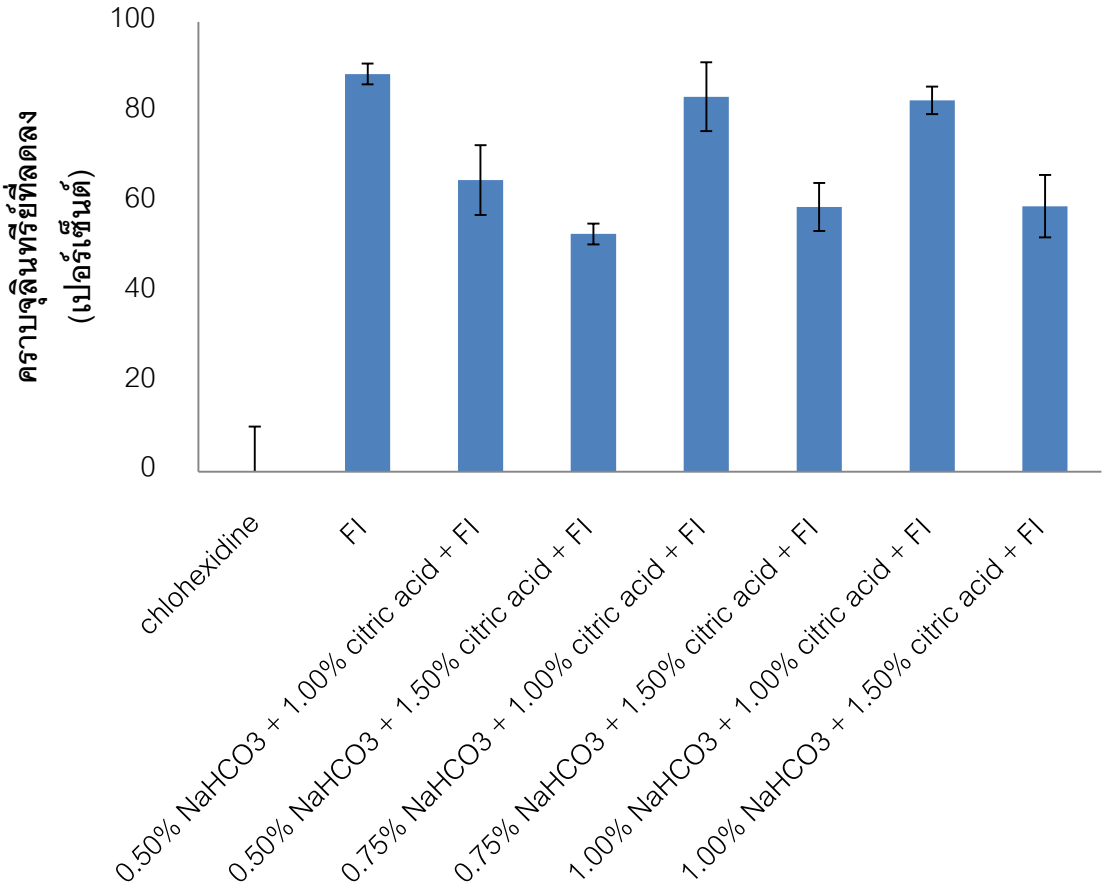
4.5.1 การใช้สารฟู่ร่วมกับเดกซ์แทรนเนส

เมื่อทดสอบการลดคราบจุลินทรีย์โดยใช้สารฟู่ร่วมกับเดกซ์แทรนเนส FI ความเข้มข้น 5 หน่วยต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธีต่างๆคือ วิธีที่ 1 คือ เติมสารฟู่เท่านั้น วิธีที่ 2 คือ เติมสารผสมของสารฟู่กับเดกซ์แทรนเนสทำปฏิกิริยาพร้อมกัน และวิธีที่ 3 คือ เติมสารฟู่ ทำปฏิกิริยาก่อน 10 นาที จากนั้นเติมเดกซ์แทรนเนส FI ทำปฏิกิริยาต่ออีก 5 นาที พบว่า การใช้สารฟู่ร่วมกับเดกซ์แทรนเนสไม่ว่าวิธีใดก็ตามลดปริมาณคราบจุลินทรีย์ได้น้อยกว่าการเติมเดกซ์แทรนเนส FI เพียงอย่างเดียว และเมื่อเปรียบเทียบแต่ละวิธีของการเติมสารฟู่ พบว่า วิธีที่ 2 มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับวิธีที่ 3 แต่ใช้เวลาน้อยกว่า และอัตราส่วนผสมของสารฟู่มีผลต่อการทำปฏิกิริยาของเดกซ์แทรนเนส FI (รูปที่ 4.12)



รูปที่ 4.12 แสดงผลการสลายคราบจุลินทรีย์ด้วยวิธีต่าง คือ วิธีที่ 1 คือ สารฟู่เพียงอย่างเดียว ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 5 นาที วิธีที่ 2 คือ สารฟู่ผสมกับเดกซ์แทรนเนส FI ทำปฏิกิริยาพร้อมกันเป็นเวลา 5 นาที และ วิธีที่ 3 คือ สารฟู่ ทำปฏิกิริยา 10 นาที แล้วเติมเดกซ์แทรนเนส FI ทำปฏิกิริยาต่อ 5 นาที รวมเวลาทำปฏิกิริยาเป็น 15 นาที

จากผลการทดลองข้างต้น จึงยืนยันผลการลดคราบจุลินทรีย์โดยใช้วิธีที่ 2 คือ ผสมเดกซ์แทรนเนส FI ความเข้มข้น 5 หน่วยต่อมิลลิลิตร กับสารฟู่ที่มีอัตราส่วนผสมต่างๆ โดยแปรผันความเข้มข้นละอัตราส่วนเพื่อหาส่วนผสมที่เหมาะสมในการสลายคราบจุลินทรีย์ ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 5 นาที ดังรูปที่ 4.13 พบว่า อัตราส่วนผสมของสารฟู่ที่มีค่าความเป็นกรด-เบสที่เป็นกลางมากกว่าจะลดคราบจุลินทรีย์ได้มากกว่าแต่น้อยกว่าการใช้เดกซ์แทรนเนสเพียงอย่างเดียว ดังนั้นสารฟู่ไม่มีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพของการลดคราบจุลินทรีย์ เนื่องจากสารฟู่จะทำให้เกิดฟองฟู่ที่ลอยขึ้นสู่ผิวหน้า จึงอาจมีโอกาสให้เดกซ์แทรนเนสเข้าทำปฏิกิริยาการย่อยสลายคราบที่ก้นเพลตหรือก้นหลอดทดลองน้อยลง



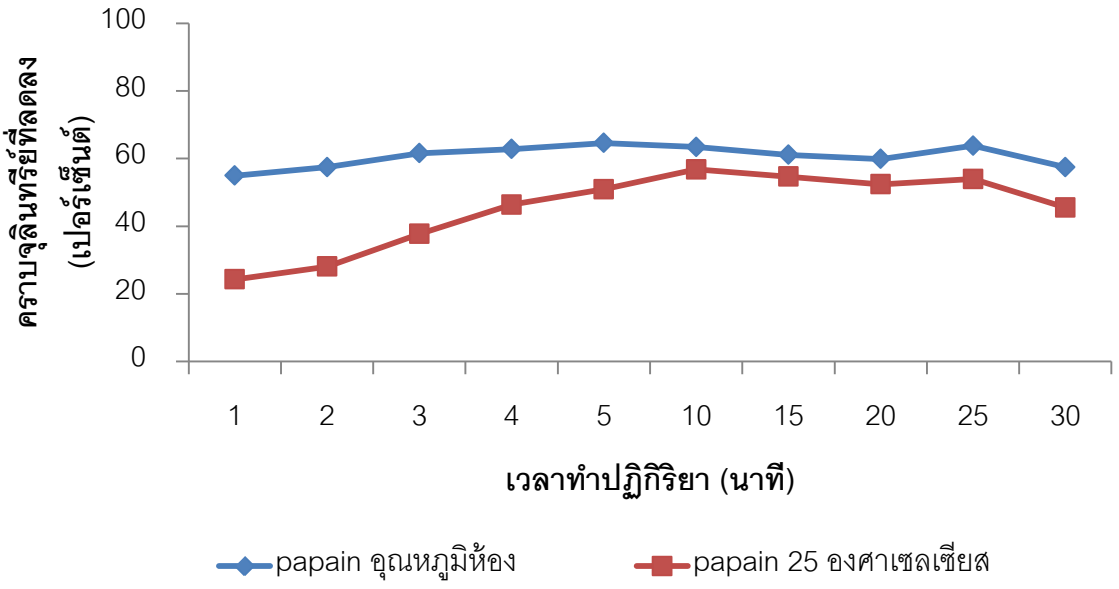
รูปที่ 4.13 แสดงผลการสลายคราบจุลินทรีย์ด้วยเดกซ์แทรนเนส FI กับสารฟู่ที่มีอัตราส่วนผสมที่แตกต่างกัน

4.5.2 การใช้โปรตีเอส

เนื่องจากโปรตีน เป็นหนึ่งในส่วนประกอบของคราบจุลินทรีย์ ดังนั้นการย่อยโปรตีนด้วยโปรตีเอส จึงน่าจะเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถลดปริมาณคราบจุลินทรีย์ได้ การทดลองนี้เลือกใช้โปรตีเอส 2 ชนิด คือ ปาเปน และเปปซิน เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่มีการย่อยโปรตีนแบบสุ่ม และมีค่าความเป็นกรด-เบส เหมาะสมกับการผสมเดกซ์แทรนเนสเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการลดคราบจุลินทรีย์

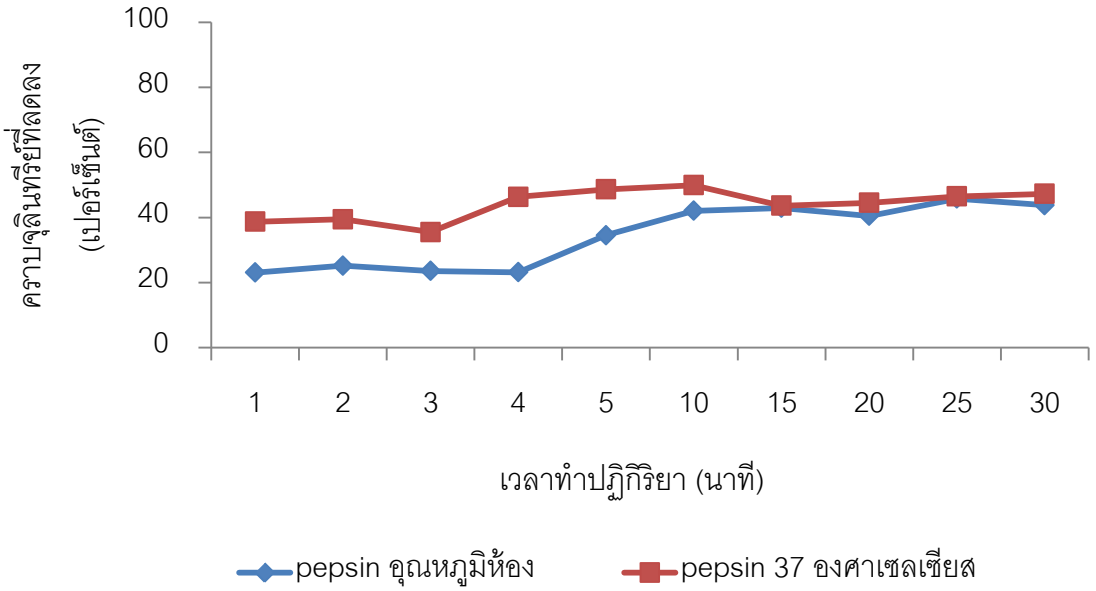
4.5.2.1 ผลของอุณหภูมิและระยะเวลาที่มีผลต่อการลดคราบจุลินทรีย์ของโปรตีเอส

จากรูปที่ 4.14 เปรียบเทียบความสามารถในการลดคราบจุลินทรีย์ด้วยปาเปนความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1 2 3 4 5 10 15 20 25 และ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) และที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิที่ระบุโดยผู้ผลิต) พบว่า ปาเปนสามารถลดคราบจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิห้องได้ดีกว่าที่ 25 องศาเซลเซียส และ คราบจุลินทรีย์ที่เหลืออยู่ลดลงตามระยะเวลาการทำปฏิกิริยาและค่อนข้างคงที่ตั้งแต่นาทีที่ 10 ดังนั้น ในการลดคราบจุลินทรีย์ด้วยปาเปนจึงเลือกใช้เวลาทำปฏิกิริยา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อการทดสอบต่อไป



รูปที่ 4.14 แสดงการสลายคราบจุลิทรีย์ด้วยปาเปน ที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

เมื่อทดสอบด้วยเปปซินความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตรแทนปาเปน ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องและ 37 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิที่ระบุข้างขวดสารเคมี) พบว่า เปปซินสามารถลดคราบจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสได้ดีกว่าแต่ตั้งแต่นาทีที่ 10 การลดคราบจุลินทรีย์ทั้งสองอุณหภูมิมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังรูปที่ 4.15 ดังนั้น ในการลดคราบจุลินทรีย์ด้วยเปปซินจึงเลือกใช้เวลาทำปฏิกิริยา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อประยุกต์ใช้ทำความสะอาดอุปกรณ์ในช่องปากโดยไม่ต้องควบคุมอุณหภูมิ



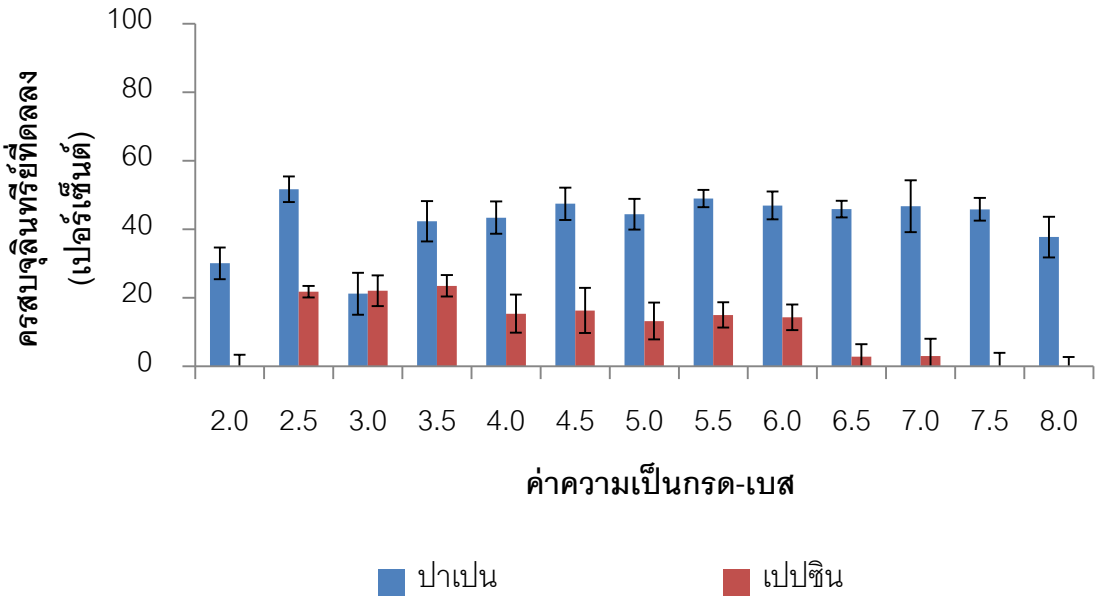
รูปที่ 4.15 แสดงการสลายคราบจุลิทรีย์ด้วยเปปซิน ที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

4.5.2.2 ผลของค่าความเป็นกรด-เบส ที่เหมาะสมต่อการลดคราบจุลินทรีย์ของโปรตีเอส

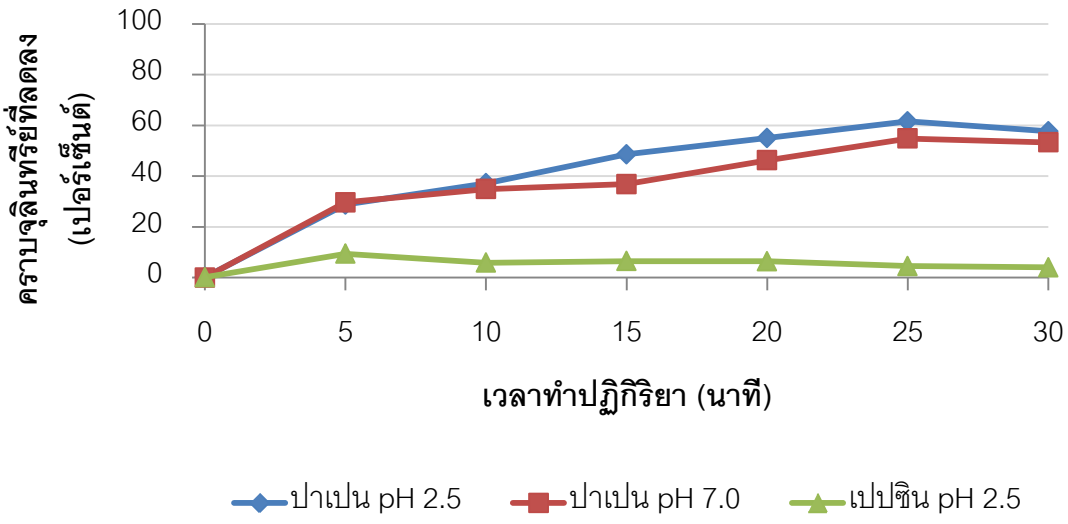
ศึกษาค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมต่อการลดคราบจุลินทรีย์ของปาเปนและเปปซินความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร โดยแปรผันค่าความเป็นกรด-เบสของบัฟเฟอร์ที่ 2.0 2.5 3.0 3.5 4.0 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 7.0 7.5 และ 8.0 (ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 2.0 และ 2.5 คือ สารละลายกรดไฮโดรคลอริก/โพแทสเซียมคลอไรด์บัฟเฟอร์, ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 3.0 คือ สารละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต/กรดไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 3.5 4.0 4.5 5.0 5.5 และ 6.0 คือสารละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์, ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 6.5 7.0 7.5 และ 8.0 คือสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์) และใช้เวลาทำปฏิกิริยา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากรูปที่ 4.16 พบว่า เปปซินลดคราบจุลินทรีย์ได้มากที่สุดที่ค่าความเป็น

กรด-เบส เท่ากับ 2.5–3.5 ส่วนปาเปนสามารถลดคราบจุลินทรีย์ได้มากกว่าเปปซิน ที่ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 2.0-8.0 และลดคราบจุลินทรีย์ได้สูงสุดที่ ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 2.5 สรุปได้ว่า ปาเปนมีค่าความเป็นกรด-เบสสำหรับการลดคราบจุลินทรีย์ที่กว้างกว่าเปปซิน

เพื่อยืนยันว่าปาเปนสามารถลดคราบจุลินทรีย์ได้ทั้งภาวะที่เป็นกรดและเป็นกลาง จึงแปรผันระยะเวลาทำปฏิกิริยาที่ เวลา 0 5 10 15 20 25 และ 30 นาที พบว่า ปาเปนลดคราบจุลินทรีย์ได้มากกว่าเปปซินที่ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 2.5 และ 7.0 เช่นเดิม ดังรูปที่ 4.17 ดังนั้น จึงเลือกปาเปน เพื่อทำการทดลองต่อไป



รูปที่ 4.16 แสดงคราบจุลินทรีย์ที่ลดลงโดยปาเปนและเปปซิน ที่บัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 2.0-8.0

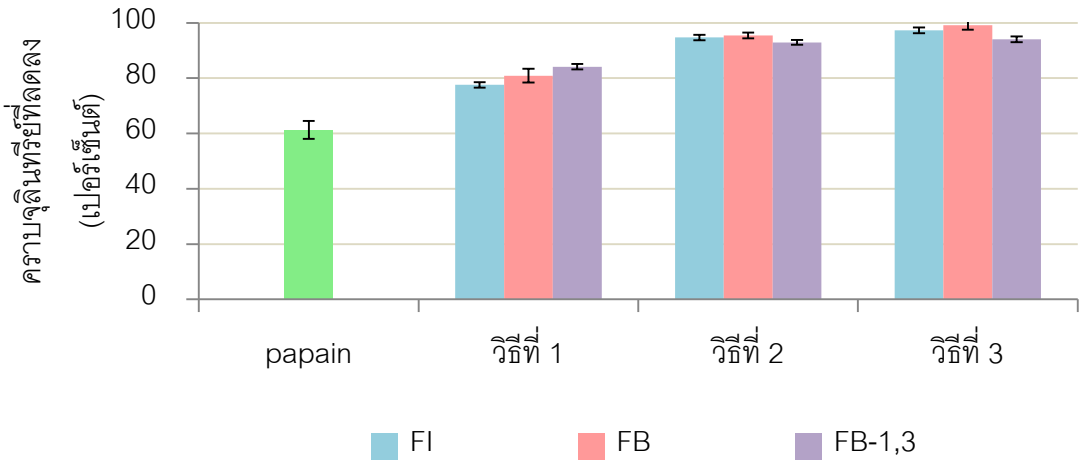


รูปที่ 4.17 แสดงคราบจุลินทรีย์ที่ลดลงโดยปาเปนและเปปซิน ที่บัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 2.5 และ 7.0

4.5.3 การใช้ปาเปนร่วมกับเดกซ์แทรนเนส FI

4.5.3.1 ` การใช้ปาเปนร่วมกับเดกซ์แทรนเนสในการลดคราบจุลินทรีย์

จากการทดลองที่ผ่านมาพบว่า ปาเปนสามารถลดคราบจุลินทรีย์ได้ที่ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 2.0-8.0 `ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที จึงนำปาเปนมาใช้ร่วมกับเดกซ์แทรนเนสตามวิธีต่างๆในระบบอะซิเตตบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 4.5 ซึ่งเป็นค่าความเป็นกรด-เบส ที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาของเดกซ์แทรนเนส FI เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการลดคราบจุลินทรีย์ โดยวิธีที่ 1 คือ เติมเดกซ์แทรนเนสเท่านั้น วิธีที่ 2 คือ เติมสารผสมของเดกซ์แทรนเนสกับโปรตีเอส ทำปฏิกิริยาพร้อมกัน และวิธีที่ 3 คือ เติมโปรตีเอสทำปฏิกิริยาก่อน 10 นาที จากนั้นเทส่วนผสมทิ้งแล้วล้างน้ำ 3 ครั้ง จึงเติมเดกซ์แทรนเนสทำปฏิกิริยาต่ออีก 15 นาที จากการเปรียบเทียบพบว่า การใช้ปาเปนร่วมกับเดกซ์แทรนเนส แบบวิธีที่ 2 และแบบวิธีที่ 3 จะลดคราบจุลินทรีย์ได้ใกล้เคียงกันและมากกว่าการใช้ปาเปนหรือเดกซ์แทรนเนสเพียงอย่างใดอย่างหนึ่ง (ปาเปน และวิธีที่ 1 ตามลำดับ) จึงเลือกวิธีที่ 2 คือ การผสมปาเปนกับเดกซ์แทรนเนสแล้วทำปฏิกิริยากับคราบจุลินทรีย์พร้อมกัน และเลือกเดกซ์แทรนเนส FI สำหรับการทดลองต่อไป เนื่องจากใช้เวลาในการลดคราบจุลินทรีย์น้อยกว่าวิธีที่ 3



รูปที่ 4.18 แสดงคราบจุลินทรีย์ที่ลดลงโดยปาเปนและเปปซิน ที่บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 2.5 และ 7.0 โดยทดสอบด้วยวิธีต่างๆ คือ วิธีที่ 1 คือ เดกซ์แทรนเนส FI FB หรือ FB-1,3 ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตรเท่านั้น ทำปฏิกิริยา 15 นาที วิธีที่ 2 คือ เดกซ์แทรนเนส FI FB หรือ FB-1,3 ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ผสมปาเปนความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาพร้อมกันเป็นเวลา 15 นาที และ วิธีที่ 3 คือ ปาเปนความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ทำปฏิกิริยา 10 นาที จากนั้นเทส่วนผสมทิ้งแล้วล้างน้ำ 3 ครั้ง จึงเติมเดกซ์แทรนเนส FI FB หรือ FB-1,3 ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาต่ออีก 15 นาที รวมเวลาทำปฏิกิริยาทั้งสิ้น 25 นาที

4.5.3.2 ผลของปาเปนต่อเดกซ์แทรนเนส FI และผลของการลดคราบจุลินทรีย์

เนื่องจากปาเปนเป็นเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนได้ และเดกซ์แทรนเนสเป็นเอนไซม์ที่เป็นโปรตีน จึงมีโอกาสถูกย่อยด้วยปาเปนเช่นกัน ดังนั้น จึงศึกษาผลของระยะเวลาผสมปาเปนกับเดกซ์แทรนเนส FI ต่อการลดคราบจุลินทรีย์ โดยการผสมปาเปนกับเดกซ์แทรนเนส FI ความเข้มข้นอย่างละ 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในระบบอะซิเตตบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 4.5 เป็นเวลา 0 15 30 45 และ 60 นาที แล้วจึงนำไปทดสอบการสลายคราบจุลินทรีย์เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง พบว่า ไม่ว่าจะผสม เดกซ์แทรนเนสกับปาเปนเป็นเวลา 0-60 นาที เดกซ์แทรนเนสยังคงมีแอกทิวิตีใกล้เคียงกับการไม่ผสมกับปาเปน และสามารถย่อยสลายคราบจุลินทรีย์ได้ใกล้เคียงกันเช่นเดิมดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงแอกทิวิตีที่เหลือของเดกซ์แทรนเนส FI หลังจากผสมปาเปน เป็นเวลา 0-60 นาที และ เปอร์เซ็นต์คราบจุลินทรีย์ที่ลดลงจากการนำส่วนผสมไปทดสอบการสลายคราบจุลินทรีย์

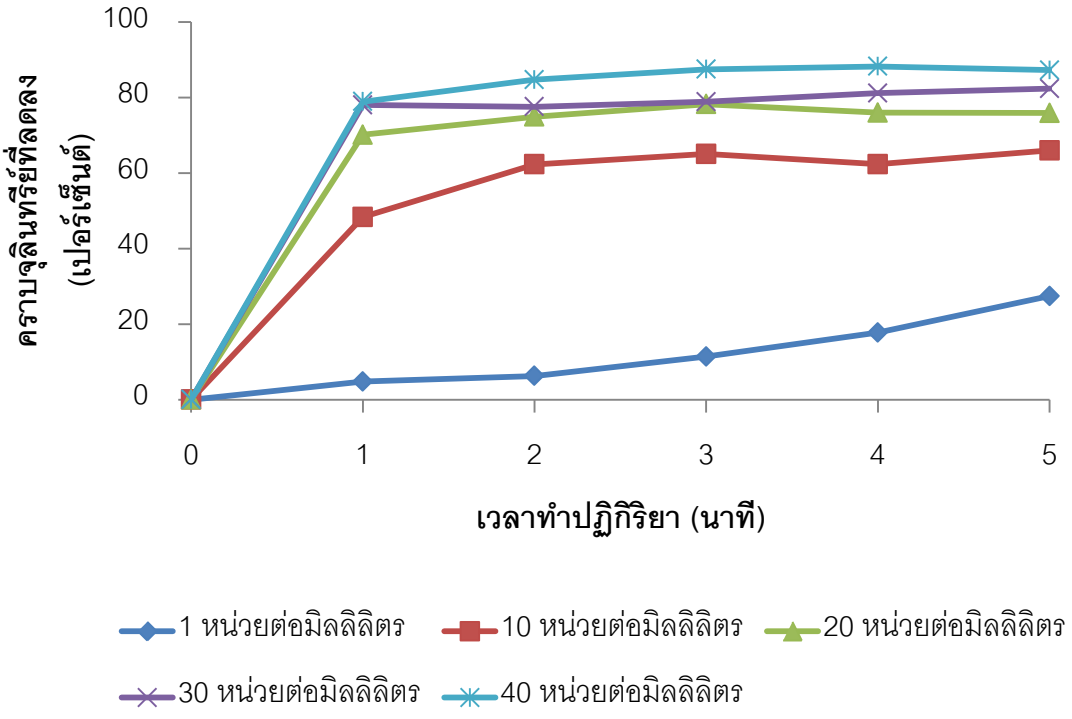
ระยะเวลาผสม (นาที)	แอกทิวิตีที่เหลือของเดกซ์แทรนเนส FI หลังจากผสมปาเปน (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	คราบจุลินทรีย์ที่ลดลง (เปอร์เซ็นต์)
0	0.88	96.79 $\pm$ 0.36
15	0.96	97.26 $\pm$ 0.90
30	0.98	97.54 $\pm$ 0.56
45	0.99	98.72 $\pm$ 0.62
60	0.98	99.05 $\pm$ 1.17

แสดงว่า สามารถผสมเดกซ์แทรนเนสกับปาเปนเพื่อใช้เป็นสารผสมในการสลายคราบจุลินทรีย์ได้ และเป็นการสลายคราบจุลินทรีย์ในขั้นตอนเดียว ประหยัดเวลา สะดวกต่อการปรับใช้หรือผลิตเพื่อจำหน่ายทางอุตสาหกรรม

4.6 การลดคราบจุลินทรีย์ในแบบจำลองภายนอกร่างกาย ภายในระยะเวลา 5 นาที

4.6.1 การเพิ่มความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนส FI

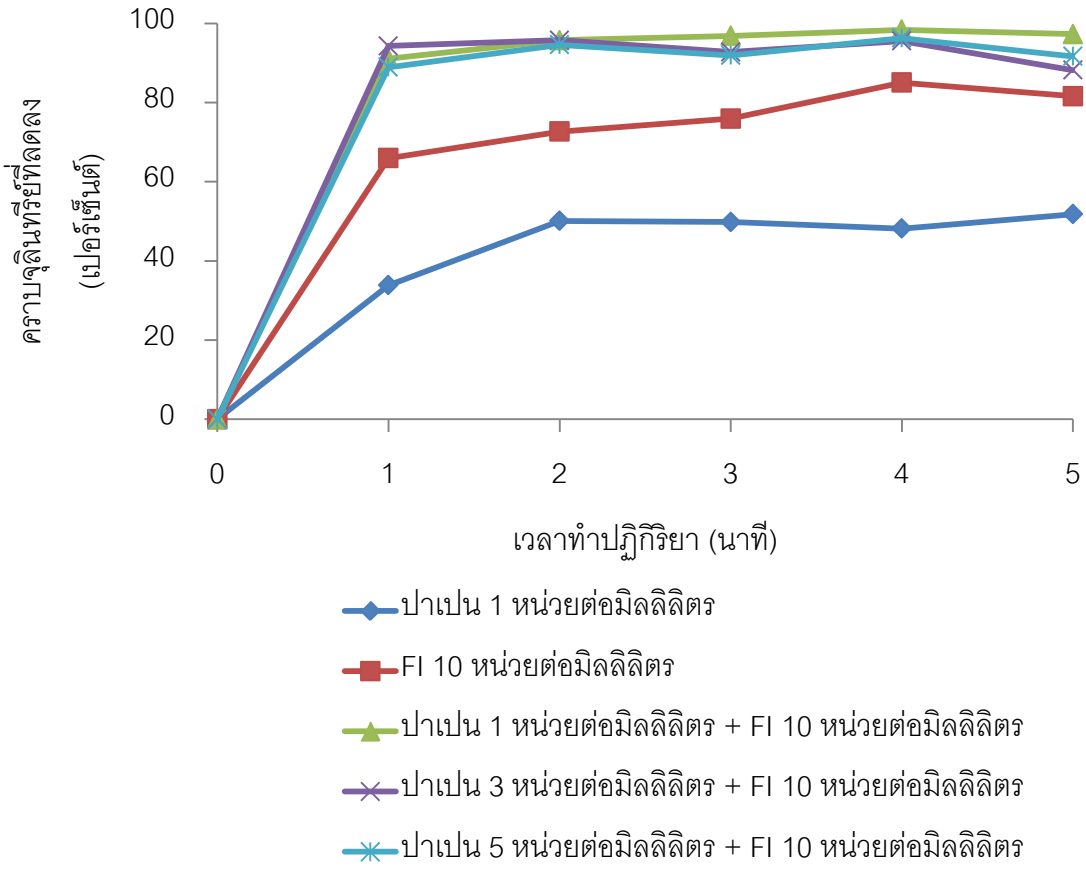
จากการสลายคราบจุลินทรีย์ของเดกซ์แทรนเนส FI ความเข้มข้น 1 10 20 30 และ 40 หน่วยต่อมิลิลิตร ในระบบอะซิเตตบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 4.5 เป็นเวลา 0-5 นาที จากรูป 4.19 พบว่า เดกซ์แทรนเนส FI สามารถลดคราบจุลินทรีย์ได้เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น และที่ความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนส เท่ากับ 20 30 และ 40 หน่วยต่อมิลลิลิตร จะลดคราบจุลินทรีย์ได้ใกล้เคียงกัน ดังนั้น จะเลือกเดกซ์แทรนเนสความเข้มข้น 20 หน่วยต่อมิลลิลิตร สำหรับการลดคราบจุลินทรีย์ ภายในระยะเวลา 5 นาที ด้วยเดกซ์แทรนเนสเพียงอย่างเดียว แต่หากต้องการเพิ่มประสิทธิภาพการลดคราบจุลินทรีย์โดยใช้ปาเปนร่วมกับเดกซ์แทรนเนส จะเลือกเดกซ์แทรนเนสความเข้มข้น 10 หน่วยต่อมิลลิลิตร สำหรับการทดสอบต่อไป เพื่อเป็นการประหยัดเดกซ์แทรนเนสและสามารถตรวจสอบประสิทธิภาพที่เพิ่มขึ้นได้ชัดเจนกว่า



รูปที่ 4.19 แสดงการสลายคราบจุลินทรีย์ของเดกซ์แทรนเนส FI ความเข้มข้น 1 10 20 30 และ 40 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 0-5 นาที

4.6.2 การเพิ่มความเข้มข้นปาเปนที่ผสมกับเดกซ์แทรนเนส FI ความเข้มข้น 10 หน่วยต่อมิลลิลิตร

การทดสอบการสลายคราบจุลินทรีย์โดยผสมปาเปน ความเข้มข้น 1 3 หรือ 5 หน่วยต่อมิลลิลิตร กับเดกซ์แทรนเนส FI ความเข้มข้น 10 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในระบบอะซิเตตบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 4.5 ทำปฏิกิริยาที่เวลา 0-5 นาที จากรูปที่ 4.20 พบว่า ปาเปนความเข้มข้น 1 3 หรือ 5 หน่วยต่อมิลลิลิตรที่ผสมกับเดกซ์แทรนเนส สามารถย่อยสลายคราบจุลินทรีย์ได้เท่ากัน และมากกว่าการใช้เดกซ์แทรนเนสหรือปาเปนเพียงอย่างใดอย่างหนึ่ง ดังนั้นภาวะที่เหมาะสม สำหรับการสลายคราบจุลินทรีย์ คือ ปาเปนความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตรผสมกับเดกซ์แทรนเนส ความเข้มข้น 10 หน่วยต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 4.20 แสดงการสลายคราบจุลินทรีย์ของการผสมปาเปน ความเข้มข้น 1 3 หรือ 5 หน่วยต่อมิลลิลิตร กับเดกซ์แทรนเนส FI ความเข้มข้น 10 หน่วยต่อมิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาที่เวลา 0-5 นาที

4.6.3 การแปรผันอัตราส่วนความเข้มข้นของปาเปนกับเดกซ์แทรนเนส สำหรับการสลายคราบจุลินทรีย์

จากการทดสอบการสลายคราบจุลินทรีย์ที่ผ่านมา ภาวะที่เหมาะสม สำหรับการสลายคราบจุลินทรีย์ คือ ปาเปนความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตรผสมกับเดกซ์แทรนเนส ความเข้มข้น 10 หน่วยต่อมิลลิลิตร แต่ถ้าสามารถหาอัตราส่วนของการผสมที่เหมาะสมระหว่างปาเปนและเดกซ์แทรนเนส FI ได้ จะสามารถลดปริมาณเอนไซม์และคงประสิทธิภาพในการลดคราบจุลินทรีย์ได จึงทดลองต่อโดยแปรผันความเข้มข้นของปาเปน คือ 0.00 0.10 0.25 0.50 0.75 และ 1.00 หน่วยต่อมิลลิลิตร และแปรผันความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนส คือ 0 1 5 10 50 และ 100 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง ในระบบอะซิเตตบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 4.5 เป็นเวลา 5 นาที

ตารางที่ 4.3 แสดงเปอร์เซ็นต์คราบจุลินทรีย์ที่ลดลง จากการแปรผันความเข้มข้นของปาเปนและเดกซ์แทรนเนส FI

เดกซ์แทรนเนส FI (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	**ปาเปน (หน่วยต่อมิลลิลิตร)**					
	0.00	0.10	0.25	0.50	0.75	1.00
0	0.00% (0.00)	6.07% (5.17)	15.05% (5.39)	17.15% (2.65)	19.58% (2.93)	16.79% (5.36)
1	11.04% (4.37)	20.39% (2.79)	17.90% (2.61)	26.54% (3.60)	37.01% (2.70)	31.80% (9.06)
5	14.89% (3.33)	50.00% (3.10)	53.03% (4.98)	65.49% (2.55)	71.24% (5.46)	78.44% (5.50)
10	13.47% (0.61)	61.33% (9.33)	80.62% (3.60)	67.23% (7.04)	71.12% (6.26)	83.90% (3.08)
50	15.23% (0.91)	83.68% (0.30)	80.10% (1.94)	82.73% (5.45)	89.16% (1.40)	85.32% (5.90)
100	14.14% (6.74)	85.50% (4.92)	93.99% (0.79)	84.83% (5.49)	90.94% (4.87)	87.10% (5.51)

จากตารางที่ 4.3 แสดงให้เห็นว่า การลดคราบจุลินทรีย์ได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราส่วนผสมระหว่างเดกซ์แทรนเนสและปาเปน คือ

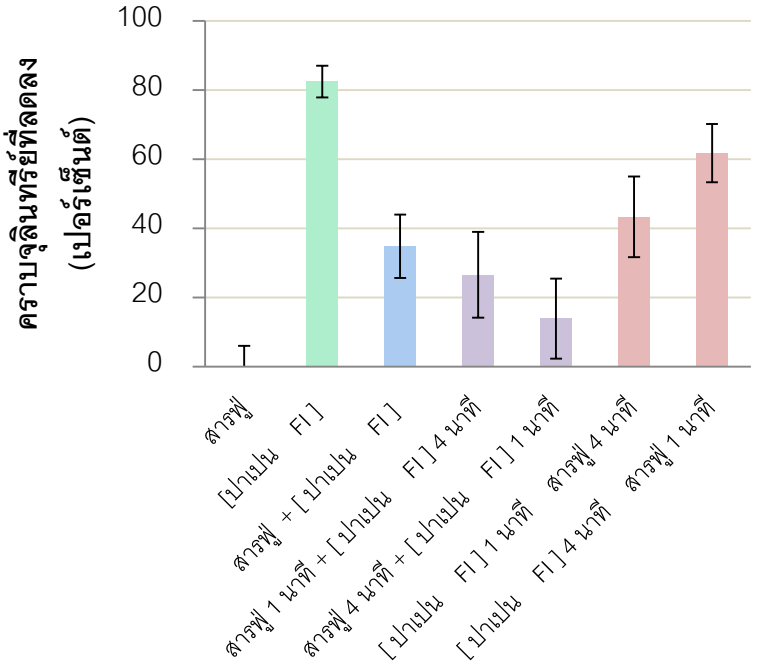
1) เดกซ์แทรนเนส FI ความเข้มข้น 10 หน่วยต่อมิลลิลิตร ผสมกับ ปาเปนความเข้มข้น 0.25 หรือ 1.00 หน่วยต่อมิลลิลิตร
2) เดกซ์แทรนเนส FI ความเข้มข้น 50 หน่วยต่อมิลลิลิตร ผสมกับ ปาเปนความเข้มข้น 0.10 0.25 0.50 0.75 และ 1.00 หน่วยต่อมิลลิลิตร
3) เดกซ์แทรนเนส FI ความเข้มข้น 100 หน่วยต่อมิลลิลิตร ผสมกับ ปาเปนความเข้มข้น 0.10 0.25 0.50 0.75 และ 1.00 หน่วยต่อมิลลิลิตร

ดังนั้น จึงเลือกอัตราส่วนที่น้อยที่สุด คือ เดกซ์แทรนเนส FI ความเข้มข้น 10 หน่วยต่อมิลลิลิตร ผสมกับปาเปนความเข้มข้น 0.25 หน่วยต่อมิลลิลิตร สำหรับการลดคราบจุลินทรีย์ในการทดลองต่อไป

4.6.4 การใช้สารฟู่ร่วมกับส่วนผสมของปาเปนและเดกซ์แทรนเนส สำหรับการสลายคราบจุลินทรีย์

สำหรับส่วนผสมเดกซ์แทรนเนส FI กับปาเปน สามารถลดคราบจุลินทรียได้เป็นอย่างดี จึงศึกษาต่อว่าการเติมสารฟู่ (0.75 % โซเดียมไบคาร์บอร์เนต + 1.00 % กรดซิตริก) จะเพิ่มประสิทธิภาพการลดคราบจุลินทรีย์ ภายใน 5 นาที ได้หรือไม่ โดยทดสอบในภาวะต่างๆ ตามรูปที่ 4.21 พบว่า

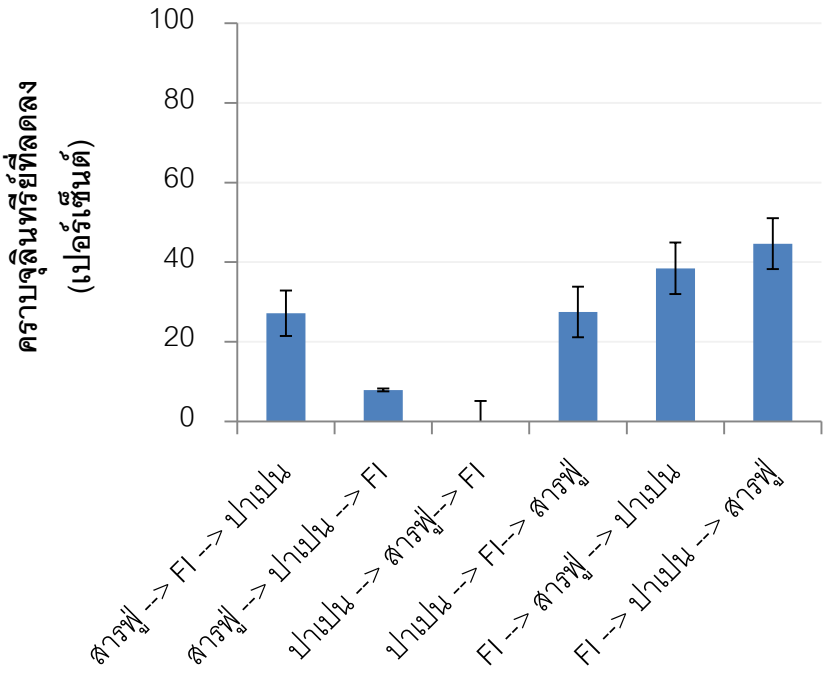
1) การลดคราบจุลินทรีย์ได้มากที่สุดคือ ใช้ส่วนผสมเดกซ์แทรนเนส FI กับปาเปน รองลงมาคือ การเติมส่วนผสมเดกซ์แทรนเนส FI กับปาเปนก่อนเติมสารฟู่ และ การเติมสารฟู่ก่อนเติมส่วนผสมเดกซ์แทรนเนส FI กับปาเปน
2) สารฟู่ที่เติมมีผลให้เกิดการสลายคราบจุลินทรีย์น้อยลง
3) การสลายคราบจุลินทรีย์ขึ้นกับเวลาการทำปฏิกิริยาของส่วนผสมเดกซ์แทรนเนส FI กับปาเปน



รูปที่ 4.21 แสดงเปอร์เซ็นต์คราบจุลินทรีย์ที่ลดลงจากการเติมสารทดสอบในภาวะต่างๆ

4.6.5 ลำดับการเติมสารฟู่ ปาเปนและเดกซ์แทรนเนส ที่เหมาะสมต่อการสลายคราบจุลินทรีย์

ศึกษาการสลายคราบจุลินทรีย์โดยการเติมสารทดสอบ 3 ชนิด โดยเติมสารทดสอบชนิดที่ 1 ที่เวลา 0 นาที และเติมสารทดสอบที่ 2 และ 3 ที่เวลา 2 และ 4 นาที ตามลำดับ ซึ่งสารทดสอบทั้ง 3 ชนิด คือ FI ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ปาเปน ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร และสารฟู่ ทดสอบโดยเปลี่ยนลำดับการเติมเพื่อลดคราบจุลินทรีย์ จากรูปที่ 4.22 พบว่า การเติมเดกซ์แทรนเนส FI เป็นลำดับที่ 1 จะลดคราบจุลินทรีย์ได้มากที่สุด รองลงมาคือ การเติมเดกซ์แทรนเนส FI เป็นลำดับที่ 2 และ 3 ตามลำดับ และการเติมเดกซ์แทรนเนสและปาเปนในลำดับที่ติดกันจะลดคราบจุลินทรีย์ได้ดีกว่าเติมสารฟู่แทรก สรุปได้ว่า ระยะเวลาการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์มีผลต่อการสลายคราบจุลินทรีย์ และเดกซ์แทรนเนส FI มีผลต่อการสลายคราบจุลินทรีย์มากกว่าปาเปนและสารฟู่ในระยะเวลาที่เท่ากัน



รูปที่ 4.22 แสดงคราบจุลินทรีย์ที่ลดลงจากการแปรผันลำดับการเติมสารฟู่ ปาเปนและเดกซ์แทรนเนส

4.6.6 การตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หลังจากการย่อยสลายคราบจุลินทรีย์

การวัดความสามารถของเอนไซม์สามารถวัดจากปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นได้ ซึ่งในที่นี้จะวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เป็นผลิตภัณฑ์ของการย่อยเดกซ์แทรนด้วยเดกซ์แทรนเนส แต่จากการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นหลังการทดสอบ พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นน้อยมาก เมื่อเทียบกับความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์คราบจุลินทรีย์ที่ลดลง ซึ่งอาจเกิดจากขั้นตอนการล้างคราบจุลินทรีย์ก่อนการทดสอบมีผลให้คราบจุลินทรีย์ส่วนเกินหลุดออกและเหลือเพียงคราบจุลินทรีย์ที่มีความเหนียวแน่นยึดเกาะบนแบบจำลองภายนอกร่างกาย

ดังนั้น เพื่อเป็นการยืนยันว่าเดกซ์แทรนเนสสามารถย่อยคราบจุลินทรีย์ได้จริง จึงศึกษาเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นหลังการย่อยคราบจุลินทรีย์ 2 แบบ คือ ล้างคราบจุลินทรีย์และไม่ล้างคราบจุลินทรีย์ ก่อนการทดสอบ จากนั้นทดสอบการสลายคราบจุลินทรีย์โดยเติมเดกซ์แทรนเนส FI ความเข้มข้น 1 5 10 15 และ 20 หน่วยต่อมิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลานำน้ำส่วนใสตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากตารางที่ 4.4 พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนสมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของเปอร์เซ็นต์คราบจุลินทรีย์ที่ลดลงเช่นเดียวกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นของการย่อยคราบจุลินทรีย์ที่ไม่ได้ล้างก่อนการทดสอบ แต่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นของการย่อยคราบจุลินทรีย์ที่ล้างก่อนการทดสอบกลับค่อนข้างคงที่ แสดงให้เห็นว่า เดกซ์แทรนเนสสามารถย่อยสลายคราบจุลินทรีย์ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลรีดิวซ์จริง แต่การล้างคราบจุลินทรีย์ก่อนการทดสอบมีผลให้คราบจุลินทรีย์ส่วนเกินหลุดออก ทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์แตกต่างกัน

ตารางที่ 4.4 แสดงเปอร์เซ็นต์คราบจุลินทรีย์ที่ลดลงและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้น โดยเดกซ์แทรนเนส FI

ความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	**เปอร์เซ็นต์คราบจุลินทรีย์ที่ลดลง (เปอร์เซ็นต์)**	**ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)**	
		ล้างคราบจุลินทรีย์ก่อนการทดสอบ	**ไม่ล้างคราบจุลินทรีย์ก่อนการทดสอบ**
1	0.13 $\pm$ 1.45	0.00	4.43
5	10.55 $\pm$ 4.95	1.09	6.79
10	18.79 $\pm$ 5.71	1.03	8.97
15	19.85 $\pm$ 1.64	1.15	11.88
20	24.64 $\pm$ 2.09	1.09	14.73

ศึกษาเพิ่มเติม โดยการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองข้างต้น แต่ใช้สารทดสอบเป็นปาเปนความเข้มข้น 0.25 หน่วยต่อมิลลิลิตร ผสมกับเดกซ์แทรนเนส FI ความเข้มข้น 1 5 10 15 และ 20 หน่วยต่อมิลลิลิตร จากตารางที่ 4.5 พบว่า สารผสมปาเปนและเดกซ์แทรนเนสสามารถสลายคราบจุลินทรีย์ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ โดยการล้างคราบจุลินทรีย์ก่อนการทดสอบนั้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นน้อยกว่าการไม่ล้างคราบจุลินทรีย์ก่อนการทดสอบ และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนส FI ที่ทดสอบเช่นเดียวกัน แสดงให้เห็นว่าเดกซ์แทรนเนสที่ผสมรวมกับปาเปนในการทดสอบ ยังคงสามารถย่อยสลายคราบจุลินทรีย์ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลรีดิวซ์จริง

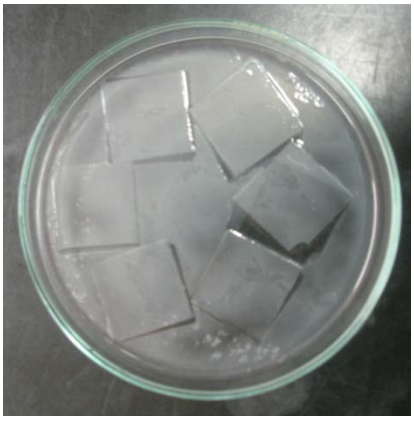
ตารางที่ 4.5 แสดงเปอร์เซ็นต์คราบจุลินทรีย์ที่ลดลงและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้น โดยสารผสมปาเปนและเดกซ์แทรนเนส FI

สารผสมปาเปนและเดกซ์แทรนเนสที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	**เปอร์เซ็นต์คราบจุลินทรีย์ที่ลดลง (เปอร์เซ็นต์)**	**ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)**	
		ล้างคราบจุลินทรีย์ก่อนการทดสอบ	**ไม่ล้างคราบจุลินทรีย์ก่อนการทดสอบ**
1	33.36 $\pm$ 4.61	3.76	6.24
5	44.01 $\pm$ 1.32	5.69	12.42
10	65.27 $\pm$ 2.17	3.76	12.73
15	70.14 $\pm$ 1.12	4.00	21.34
20	73.76 $\pm$ 3.26	5.33	21.88

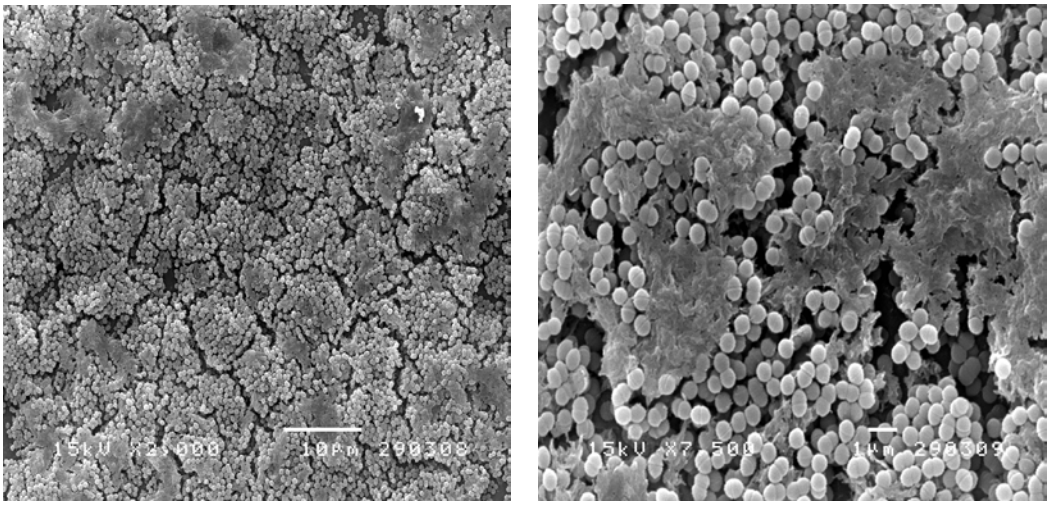
จากตารางที่ 4.4 และตารางที่ 4.5 แสดงให้เห็นว่า การเติมปาเปนเพิ่มในส่วนผสม มีผลต่อการเพิ่มเปอร์เซ็นต์คราบจุลินทรีย์ที่ลดลงประมาณ 3.5 เท่า และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นประมาณ 1.5 เท่า อาจเนื่องมาจากปาเปนมีผลต่อความสามารถของเดกซ์แทรนเนส FI ทำให้ย่อยคราบจุลินทรีย์ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มมากขึ้น จึงมีผลต่อการเกาะติดของคราบจุลินทรีย์ทำให้เกิดการหลุดล่อนได้ง่ายขึ้น

4.6.7 การตรวจสอบลักษณะคราบจุลินทรีย์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

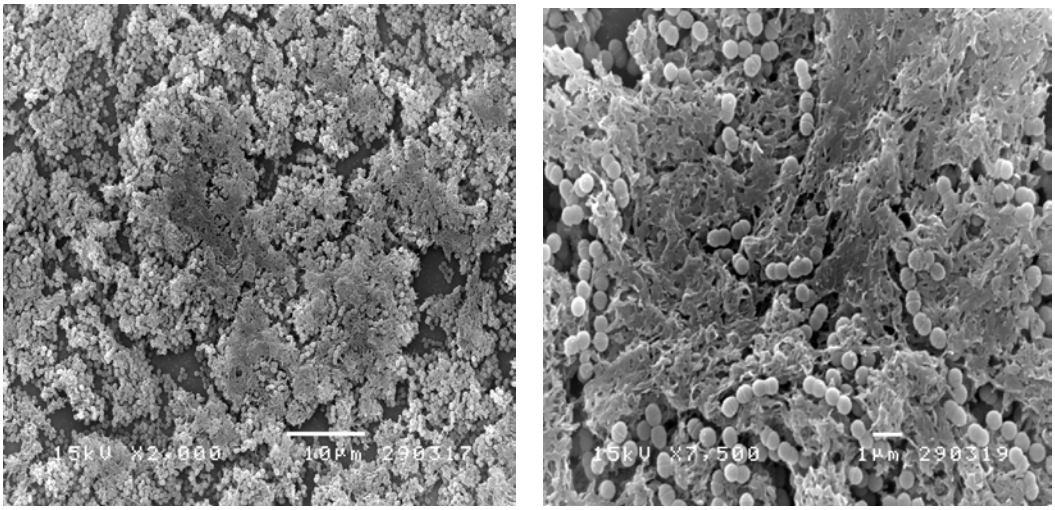
เมื่อสร้างคราบจุลินทรีย์บนแผ่นปิดสไลด์ ดังรูปที่ 4.23 แล้วจึงนำออกมาทดสอบการย่อยคราบจุลินทรีย์ด้วยเดกซ์แทรนเนส ความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 10 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ/หรือ ปาเปนความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 0.25 หน่วยต่อมิลลิลิตร ทดสอบเป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงเตรียมตัวอย่างเพื่อดูลักษณะคราบจุลินทรีย์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่า คราบจุลินทรีย์ของชุดควบคุมมีลักษณะเป็นแผ่นหนาเกาะติดกันแน่นและเซลล์แบคทีเรียเกาะกันเป็นกลุ่มอยู่กับคราบจุลินทรีย์ (รูปที่ 4.24 (ก)) คราบจุลินทรีย์ที่ถูกย่อยด้วยปาเปนมีลักษณะเป็นแผ่นหนามีร่องรอยของการย่อยเล็กน้อย และเซลล์แบคทีเรียยังคงเกาะกันแน่น (รูปที่ 4.24 (ข)) คราบจุลินทรีย์ที่ถูกย่อยด้วยเดกซ์แทรนเนสเกิดช่องว่างจากการย่อยเป็นจำนวนมากซึ่งมากกว่าการย่อยด้วยปาเปนแต่น้อยกว่าสารผสมของเดกซ์แทรนเนสและปาเปน เนื่องจากคราบจุลินทรีย์ประกอบด้วยพอลิเมอร์ของน้ำตาลดี-กลูโคสที่ต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,6 จึงถูกย่อยด้วยเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] และความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรียน้อยกว่าการใช้ปาเปนเพียงอย่างเดียว(รูปที่ 4.24 (ค)) และคราบจุลินทรีย์ที่ถูกย่อยด้วยสารผสมของเดกซ์แทรนเนสและปาเปน มีช่องว่างของคราบจุลินทรีย์มากที่สุด ทำให้เซลล์แบคทีเรียเกิดการยึดติดกันน้อยที่สุด จึงเป็นส่วนผสมที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการสลายคราบจุลินทรีย์ รองลงมาคือ เดกซ์แทรนเนส ปาเปน ตามลำดับ



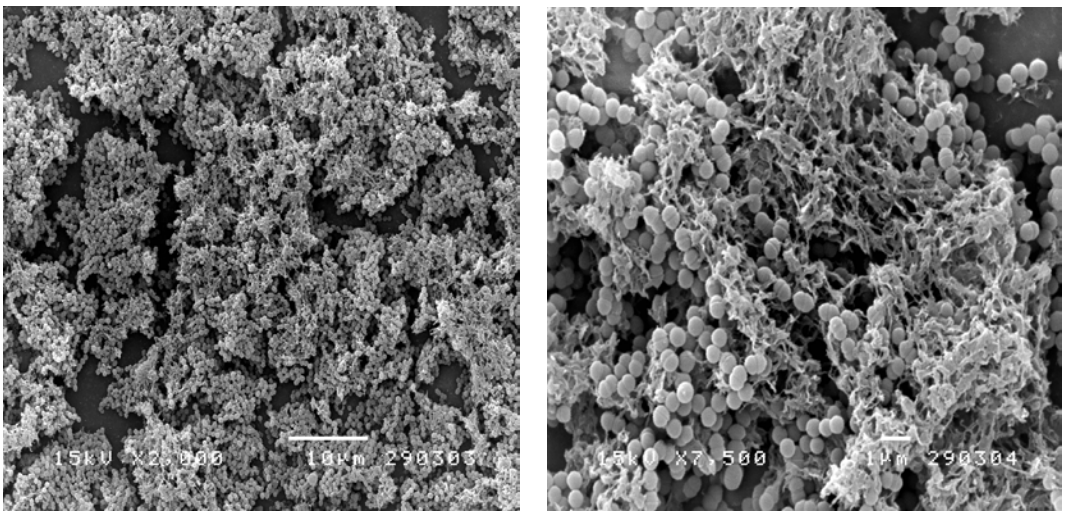
รูปที่ 4.23 แสดงคราบจุลินทรีย์ที่ถูกสร้างบนแผ่นปิดสไลด์



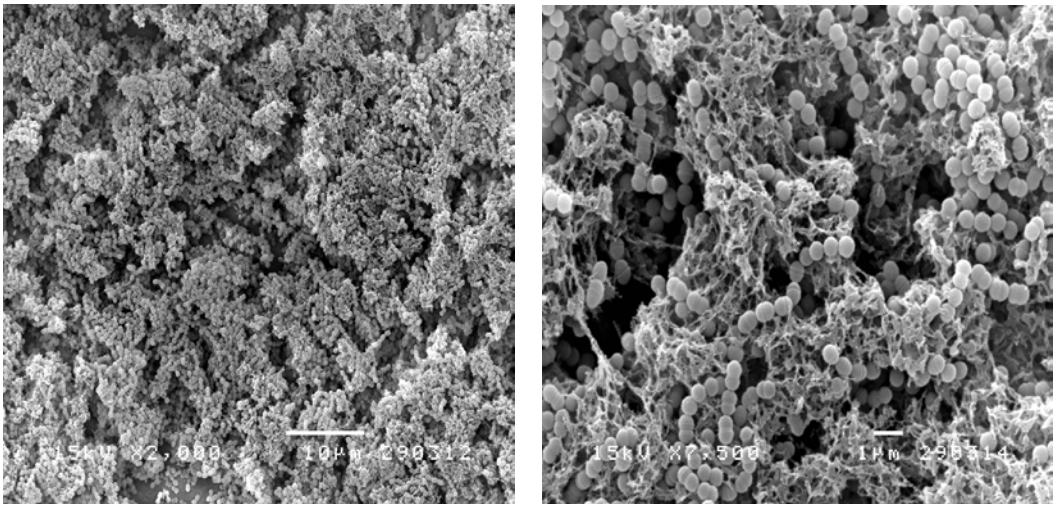
รูปที่ 4.24 **(ก)** แสดงลักษณะคราบจุลินทรีย์ที่เป็นชุดควบคุม เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยาย 2,000 เท่า (ซ้าย) และกำลังขยาย 7,500 เท่า (ขวา)



รูปที่ 4.24 **(ข)** แสดงลักษณะคราบจุลินทรีย์ที่ย่อยด้วยปาเปน เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยาย 2,000 เท่า (ซ้าย) และกำลังขยาย 7,500 เท่า (ขวา)



รูปที่ 4.24 **(ค)** แสดงลักษณะคราบจุลินทรีย์ที่ย่อยด้วยเดกซ์แทรนเนส FI เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยาย 2,000 เท่า (ซ้าย) และกำลังขยาย 7,500 เท่า (ขวา)



รูปที่ 4.24 **(ง)** แสดงลักษณะคราบจุลินทรีย์ที่ย่อยด้วยสารละลายเดกซ์แทรนเนสและปาเปน เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยาย 2,000 เท่า (ซ้าย) และกำลังขยาย 7,500 เท่า (ขวา)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย และอภิปรายผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ศึกษาการสลายคราบจุลินทรีย์โดยใช้โปรตีเอสร่วมกับเดกซ์แทรนเนสในไมโครไตเตอร์เพลตและหลอดทดลองที่ใช้เป็นแบบจำลองภายนอกร่างกาย

การสลายคราบจุลินทรีย์ด้วยเดกซ์แทรนเนสนั้นผลิตจากแบคทีเรีย *Arthrobacter* sp. AG-2 และรา *Penicillium pinophilum* SMCU3-14 ที่มีเดกซ์แทรนเป็นสารชักนำการผลิต โดยความจำเพาะของเดกซ์แทรนเนสต่อการสลายพันธะขึ้นกับพันธะของเดกซ์แทรนนั้นๆซึ่งคราบจุลินทรีย์ในงานวิจัยนี้เป็นเดกซ์แทรนที่มีทั้งพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,3 และ α-1,6 จึงต้องการผลิตเดกซ์แทรนเนสสำหรับการสลายคราบจุลินทรีย์ที่มีความจำเพาะต่อพันธะไกลโคซิดิกดังนี้

1) เดกซ์แทรนเนสที่มีความจำเพาะต่อพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,6 จึงใช้เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรมที่มีพันธะ α-1,6 ประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารชักนำ
2) เดกซ์แทรนเนสที่มีความจำเพาะต่อพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,3 และ α-1,6 จึงใช้เดกซ์แทรนที่ผลิตโดย *S. sobrinus* 6715 มีพันธะชนิด α-1,3 ประมาณ 67 เปอร์เซ็นต์ และชนิด α-1,6 ประมาณ 33 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารชักนำ
3) เดกซ์แทรนเนสที่มีความจำเพาะต่อพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,3 จึงใช้เดกซ์แทรนที่มีพันธะชนิด α-1,3 เป็นส่วนใหญ่ ที่ได้จากการย่อยพันธะชนิด α-1,6 ออกจากเดกซ์แทรนที่ผลิตโดย *S. sobrinus* 6715 เป็นสารชักนำ

ในการผลิตเดกซ์แทรนที่มีพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,3 เป็นส่วนใหญ่ มีการตรวจสอบว่าพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,6 ถูกย่อยไปจนหมดแล้วหรือไม่ โดยพิจารณาจากการไม่เกิดผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้นหลังการย่อย นั่นก็คือ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สะสมคงที่ จากรูปที่ 4.2 เห็นได้ว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สะสมเริ่มคงที่ อาจเนื่องจากพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,6 ถูกย่อยจนหมดหรือเกิดการสูญเสียสับสเตรทในขั้นตอนการล้างตะกอน หรือ เดกซ์แทรนเนสสูญเสียแอกทิวิตี จึงศึกษาต่อโดยการเติมเดกซ์แทรนเนส [α-1,6] ใหม่ ทุก 8 ชั่วโมงเพื่อชดเชยส่วนที่สูญเสียไป ดังกล่าว พบว่า ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 20 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สะสมคงที่ (รูปที่ 4.6) แสดงให้เห็นว่าพันธะชนิด α-1,6 ถูกย่อยไปเป็นส่วนใหญ่แล้ว และคงเหลือพันธะอื่นๆที่เดกซ์แทรนเนส [α-1,6] ไม่สามารถย่อยได้ เช่น พันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,3

การผลิตเดกซ์แทรนเนสจากสารชักนำข้างต้นจะได้เดกซ์แทรนเนสทั้งหมด 6 ชนิด (ตารางที่ 4.1) โดยเดกซ์แทรนเนสจากรามีแอกทิวิตีและแอกทิวิตีจำเพาะสูงกว่าแบคทีเรียไม่ว่าจะใช้เดกซ์แทรนชนิดใดเป็นสารชักนำก็ตาม ซึ่งเดกซ์แทรนที่มีพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,3 เป็นส่วนใหญ่ที่ใช้เป็นสารชักนำจะให้แอกทิวิตีน้อยมาก เนื่องจากสับสเตรทที่มีพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,3 มีราคาจำหน่ายสูงมาก จึงใช้เดกซ์แทรนที-2000 ที่มีพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,6 สูง เป็นสับสเตรทชนิดเดียวในการวัดแอกทิวิตี เมื่อปรับแอกทิวิตีของเดกซ์แทรนเนสให้เท่ากันแล้ว เดกซ์แทรนเนสจากรา FI FB และ FB-1,3 จะมีความจำเพาะต่อพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,6 เท่ากัน ในขณะที่ความจำเพาะต่อพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,3 จะเรียงลำดับจากน้อยไปหามาก ซึ่งเดกซ์แทรนเนสจากราจะสลายคราบจุลินทรีย์ได้ใกล้เคียงกัน เป็นผลจากการทำงานของเดกซ์แทรนเนสที่จำเพาะต่อพันธะ α-1,6 ที่ย่อยสลายสายหลักของเดกซ์แทรน และทำให้พันธะ α-1,3 ที่ต่อเป็นกิ่งสาขาของสายหลักหลุดออกด้วย เมื่อมวลโมเลกุลของเดกซ์แทรนลดลงและมีพันธะ α-1,3 น้อยกว่า 43 เปอร์เซ็นต์แล้ว เดกซ์แทรนนั้นจะละลายน้ำส่งผลให้คราบจุลินทรีย์ลดลงประกอบกับเดกซ์แทรนในคราบจุลินทรีย์ที่มีบทบาทต่อการยึดติดมีปริมาณน้อย ดังนั้นคราบจุลินทรีย์ที่เหลืออยู่จะมีสับเตรทของพันธะ α-1,3 เหลือน้อยมาก ถึงแม้ว่าจะมีการทำงานของเดกซ์แทรนเนสที่จำเพาะต่อพันธะ α-1,3 ก็อาจเห็นความแตกต่างของคราบจุลินทรีย์ที่ลดลงได้ไม่ชัดเจน อีกทั้งการผลิตสารชักนำสำหรับการผลิตเดกซ์แทรนเนส FB และ FB-1,3 มีหลายขั้นตอน มีระยะเวลาการผลิตมาก และได้ปริมาณน้อยจึงไม่เหมาะแก่การนำมาใช้ในทางอุตสาหกรรม จึงคัดเลือกเดกซ์แทรนเนส FI สำหรับการสลายคราบจุลินทรีย์ร่วมกับโปรตีเอส

โปรตีเอสที่เลือกใช้ คือ ปาเปน เนื่องจากปาเปนมีค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมต่อการสลายคราบจุลินทรีย์ที่กว้างกว่าเปปซิน คือ ช่วงความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 2.5-8.0 ที่อุณหภูมิห้อง (รูปที่ 4.14 4.15 4.16 และ 4.17)

การสลายคราบจุลินทรีย์โดยใช้สารผสมของเดกซ์แทรนเนสและปาเปนสามารถสลายคราบจุลินทรีย์ได้ดีกว่าการใช้เดกซ์แทรนเนสหรือปาเปนเพียงอย่างใดอย่างหนึ่ง และส่วนผสมที่เหมาะสมที่สุดคือ สารผสมของเดกซ์แทรนเนสความเข้มข้น 10 หน่วยต่อมิลลิลิตรกับปาเปนความเข้มข้น 0.25 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่สามารถลดคราบจุลินทรีย์ได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้อง ภายในเวลา 5 นาที โดยลักษณะคราบจุลินทรีย์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (รูปที่ 4.24) มีช่องว่างระหว่างเซลล์จำนวนมากและเพิ่มขึ้นจากเดิม ทำให้จุลินทรีย์ที่ยึดเกาะกับคราบจุลินทรีย์มีจำนวนลดน้อยลง เป็นผลจากการสลายคราบจุลินทรีย์ด้วยเดกซ์แทรนเนสและปาเปน อย่างที่ทราบว่าเดกซ์แทรนเนสเป็นเอนไซม์ซึ่งเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งย่อม

ถูกย่อยด้วยโปรตีเอสได้ แต่จากการทดลองเดกซ์แทรนเนสยังมีความสามารถในการสลายพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,6 ได้ เนื่องจากปาเปนย่อยพันธะเพปไทด์แบบสุ่มแต่ไม่ตัดส่วนที่เป็นบริเวณเร่งของเอนไซม์ จึงไม่ส่งผลกระทบต่อเดกซ์แทรนเนสในการสลายคราบจุลินทรีย์

ทั้งนี้ความสัมพันธ์ของน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นหลังการสลายคราบจุลินทรีย์ไม่มีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงกับปริมาณคราบจุลินทรีย์ที่ลดลง (ตารางที่ 4.4 และ 4.5) เนื่องจากคราบจุลินทรีย์ประกอบด้วยส่วนอื่นๆอีก เช่น มิวแทน ไขมัน สารอนินทรีย์ จุลินทรีย์ นอกเหนือจากเดกซ์แทรนที่ถูกย่อยสลายและเกิดผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ เมื่อเดกซ์แทรนที่มีบทบาทต่อการยึดติดของจุลินทรีย์ลดลง จุลินทรีย์เหล่านั้นก็จะหลุดออกไปพร้อมกับเดกซ์แทรนและส่วนหนึ่งจะหลุดล่อนออกจากคราบจุลินทรีย์ได้ง่ายขึ้น

ในงานวิจัยนี้ พบว่า สารฟู่ไม่เพิ่มประสิทธิภาพในการสลายคราบจุลินทรีย์ เมื่อใช้ร่วมกับเดกซ์แทรนเนส หรือเดกซ์แทรนเนสร่วมกับปาเปน เนื่องจากสารฟู่ที่ใช้เป็นสารละลายของกรดซิตริกและโซเดียมไบคาร์บอเนต ที่ทำปฏิกิริยากันแล้วเกิดฟองฟู่ของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ลอยขึ้นสู่ผิวหน้าของเหลว และนำพาเดกซ์แทรนเนสขึ้นสู่ผิวหน้าของเหลวด้วย ทำให้เดกซ์แทรนเนสเข้าทำปฏิกิริยากับคราบจุลินทรีย์ที่อยู่ด้านล่างของแบบจำลองจุลินทรีย์ได้ยากขึ้น ซึ่งแตกต่างจากการใช้เม็ดฟู่ที่มีน้ำหนักจึงอยู่บริเวณด้านล่างที่มีคราบจุลินทรีย์โดยตรงและอาจมีส่วนประกอบอื่นๆในเม็ดฟู่ที่มีผลต่อการสลายคราบจุลินทรีย์มากกว่าการมีแค่กรดซิตริกและโซเดียมไบคาร์บอเนต (โสภิต บุษยจารุ และ อภิรดา สุคนธ์พันธ์, 2538)

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ในงานวิจัยต่อไป อาจศึกษาเกี่ยวกับการทำงานของปาเปนร่วมกับเดกซ์แทรนเนสเพิ่มเติมว่าปาเปนมีผลต่อการเพิ่มแอกทิวิตีของเดกซ์แทรนเนสโดยตรงหรือไม่ นอกเหนือจากที่ปาเปนไม่ส่งผลกระทบต่อบริเวณเร่งของเดกซ์แทรนเนส และยังคงทำหน้าที่ในการสลายคราบจุลินทรีย์ของแต่ละเอนไซม์ได้เช่นเดิม

2. ศึกษาการใช้สารผสมเดกซ์แทรนเนสกับปาเปนที่มีผลต่อการใช้งานจริงกับอุปกรณ์ในช่องปาก เช่น ฟันปลอม อุปกรณ์ที่ใช้ในทางทันตกรรม

3. ศึกษาปริมาณเดกซ์แทรนที่มีอยู่ทั้งหมดในคราบจุลินทรีย์ ทั้งที่มีการล้างคราบจุลินทรีย์และไม่ล้างคราบจุลินทรีย์ ก่อนและหลังการทดสอบการสลายคราบจุลินทรีย์ เพื่อเป็นอีกหนึ่งแนวทางในการยืนยันผลการทดลอง

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กฤษณ์ชัย เบศรภิญโญวงศ์. 2544. ผลร่วมระหว่างฟลูออไรด์กับเบสิค-เอฟจีเอฟหรือพีดีจีเอฟ ที่มีต่อเซลล์สร้างเส้นใยจากโพรงฟันของมนุษย์. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. สาขาวิชาชีววิทยาช่องปาก ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เกศสุดา เงินประเสริฐ. 2538. การใช้ปองโซ 4 อาร์เป็นสารย้อมติดสีคราบจุลินทรีย์. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. สาขาวิชาปริทันตวิทยา ภาควิชาปริทันตวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ขวัญชนก รัตนอุบล. 2542. การเปรียบเทียบผลของยาสีฟันผสมฟลูออไรด์ความเข้มข้น 500 และ 1,000 ส่วนในล้านส่วนต่อความแข็งผิวฟันน้ำนมในห้องปฏิบัติการ. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. สาขาวิชาทันตกรรมสำหรับเด็ก ภาควิชาทันตกรรมสำหรับเด็ก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

จินตกร คูวัฒนสุชาติ. 2544. จุลชีววิทยาช่องปาก และที่มาของโรคฟันผุ โรคปริทันต์ และโรคในช่องปาก. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร:จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชัชรี สุชาติล้ำพงศ์ และ ณัฏยา อัศววรฤทธิ์. 2545. ตำราทันตกายวิภาคศาสตร์ประยุกต์ 1. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร:จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ณฤดี อัศวเสรีเลิศ. 2550. การสลายเดกซ์แทรนบนแบบจำลองพื้นเรียบด้วยเดกซ์แทรนเนสจากจุลินทรีย์. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ณฐินี สุวรรณสิงห์. 2540. การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เดกซ์แทนเนสและการศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์. รายงานการวิจัย. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

นิลเนตร อัศวศิริจินดา. 2551. การโคลนและการแสดงของเดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium pinophilum* SMCU3-14 ในแบคทีเรียและยีสต์. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

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

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2547. เอนไซม์ทางอาหาร. กรุงเทพมหานคร:จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ทวีศักดิ์ วุฒิเวียงธรรม. 2536. การทำให้บริสุทธิ์และตรวจสอบคุณสมบัติของเอนไซม์ปาเปนจากยางมะละกอพันธุ์แขกดำ (*Carica* papaya Linn.). วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

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

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

วิมลิน ศิริพัฒนานนท์. 2549. การผลิตเดกซ์เทรนโดย *Leuconostoc mesenteroides* 473 เพื่อใช้เป็นสารชักนำการสร้างเดกซ์แทรนเนสโดย *Penicillium* sp. SMCU 3-14. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศิโรจน์ ศรีสราภรณ์. 2547. ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเดกซ์แทรนเนสโดย *Penicillium* sp. SMCU3-14 ในถังหมัก. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สิทธิชัย ขุนทองแก้ว. 2552. วิทยาการโรคฟันผุ. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร:ไอกรุ๊ป เพรส

สันศณี จงจิตสำราญ. 2538. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติระหว่างปาเปนตรึงรูปบนเม็ดทรายกับปาเปนอิสระ. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. สหวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุวรรณา นพพรพันธุ์. 2538. การปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

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

โสภิต บุษยจารุ และอภิรดา สุคนธ์พันธ์. 2538. การพัฒนายาเม็ดทำความสะอาดฟันปลอม. โครงการพิเศษของนักศึกษาระดับปริญญาตรี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

กรมอนามัย. 2551. รายงานผลการสำรวจสภาวะสุขภาพช่องปากระดับประเทศ ครั้งที่ 6 [ออนไลน์]. กรุงเทพมหานคร : กรมอนามัย. แหล่งที่มา : http://dental.anamai.moph.go.th/oralhealth/PR/E-book/index.html [2553, ธันวาคม 21]

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

ภาษาอังกฤษ

Aquino, F.W.B. and Franco, D.W. 2009. Molecular mass distribution of dextran in Brazilian sugar and insoluble deposits of cachaça. Food Chem. 114:1391–1395.

Andrew, R.G. 1984. Effervescent denture cleaning composition comprising monoperphthalate. U.S. patent :4490269.

Arbige, M.V. and Pitcher, W.H. 1986. Industrial enzymology: a look forwards the future. Trends Biotech. 7:330-335.

Arnon, R. 1970. In Methods in Enzymology. Acadamic Press, New York.

Aslan, Y. and Tanriseven, A. 2007. Immobilization of *Penicillium lilacinum* dextranase to produce isomaltooligosaccharide from dextran. Biochem. Eng. J. 34:8-12.

Berg, I.C.H., Kalfas, S., Malmsten, M. and Arnebrant, T. 2001. Proteolytic degradation of oral biofilms *in vitro* and *in vivo*: potential of proteases originating from *Euphausia superba* for plaque control. Eur J Oral Sci. 109:316-324.

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

Collins, L.M.C. and Dawes, C. 1987. The surface area of tha adult human and thickness of salivary film covering the teeth and oral mucosa. J Dent Res. 66:1300-1302.

Dall, L., Keilhofner, M., Herndon, B., Barnes, W. and Lane, J. 1990. Clindamycin effect on glycocalyx production in experimental viridans streptococcal endocarditis. J Infect Dis. 161:1221–1224.

Davis, H.M., Hines, H.B. and Edwards, J.R. 1986. Structural elucidation of a water-insoluble glucan produce by a cariogenic oral Streptococcus. Carbohydr Res. 156:69-77.

Dols, M., Remaud-Simeon, M. and Monsan, P.F. 1997. Dextransucrase production by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 comparison with *L. mesenteroides* NRRL-512F. Enz Microb Tech. 20:523-530.

Edmondson, E.M.S. 1990. Food composition and food cariogenicity factors affecting the cariogenic potential of foods. Caries Res. 24(Suppl 1):60-71.

Edwina, K. 2005. Essentials of dental caries. 3rd. Oxford University press, New York.

Eggleson, G. and Monge, A. 2005. Optimization of sugarcane application of commercial dextranase. Process Biochem. 40:1881-1894.

Enzyme Nomenclature. 1992. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Academic press, San Diego, California.

Erhard, F.A. and Jordening, H-J. 2007. Immobilization of dextranase from *Chaetomium erraticum*. J Biotechnol. 131:440-447.

Flemming, H.C., Wingender, J. and Griegbe, M.C. 2000. Physico-chemical properties of biofilms, p.19–34. In: Evans LV, (ed), Biofilms: recent advances in their study and control. Harwood Academic Publishers., Amsterdam.

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

Grenier, D. 1993. Reduction of proteolytic degradation by chlorhexidine. J Dent Res. 72(3):630-633.

Gohel, M.C. and Sumitra, M.G. 2002. Modulation of active pharmaceutical material release from a novel 'tablet in capsule system' containing an effervescent blend. J Control Release. 79:157-164.

Hamada, S., Ooshima, T., Masuda, N., Mizuno, J. and Sobue, S. 1976. Inhibition of rat dental caries by dextranase from a strain of *Spicaria violacea*. Jpn J Microbiol. 20(4):321-330.

Hansen, H. J. 1998. Method for antibody targeting of therapeutic agents. U.S. patent. :5851527.

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

Hashizume, L.N., Shinada, K., Kawaghuchi, Y. and Yamashita Y. 2002. Seguence of ultrastructural change of enamel crystals and *Streptococcus mutans* biofilm in early caries *in vitro*. J Med Dent Sci. 49:67-75.

Hayacibara, M.F., Koo, H., Vacca-Smith, A.M., Kopec, L.K., Scott-Anne, K., Cury, J.A. and Bowen, W.H. 2004. The influence of mutanase and dextranase on the production and structure of glucans synthesized by Streptococcal glucosyltransferases. Carbohydr Res. 339:2127-2137.

Hillson, S. 2005. Teeth 2nd. Cambridge University press, New York.

Houte, J.H. 1994. Role of micro-organism in caries etiology. J Dent Res. 73(3):672-681.

Iain, A.H., Elizabeth, M.R. and Christopher, D.W. 1999. Cleansing composition. U.S.patent :6008171.

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

Imazato, S., Russell, R. R. B. and McCabet, J. F. 1995. Antibacterial activity of MDPB polymer incorporated in dental resin. J Dent. 23(3):177-181.

Imazato, S., Ebi, N., Takahashi, Y., Kaneko,T., Ebisu,S. and Russell, R.R.B. 2003. Antibacterial activity of bactericide-immobilized filler for resin-based restoratives. Biomaterials. 24:3605–3609.

Khalikova, E., Susi, P. and Korpela, T. 2005. Microbial dextran-hydrolyzing enzyme: Fundamental and applications. Microbiol Mol Biol Rev. 69(2):306-325.

Kim, D., Robyt, J.F., Lee, S-Y., Lee, J-H.and Kim, Y-M. 2003. Dextran molecular size and degree of branching as a function of sucrose concentration, pH, and temperature of reaction of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMCM dextransucrase. Carbohydr Res. 338:1183-1189.

Kim, J.S., Reuhs, B.L., Michon, F., Kaiser, R.E. and Arumugham, R.G. 2006. Addition of glycerol for improved methylation linkage analysis of polysaccharides. Carbohydr Res. 341:1061-1064.

Ko, W., Wong, C., Yeung, H., Yung, M., Shaw, P. and Tam, S. 1991. Increasing the plasma half-life of trichosanthin by coupling to dextran. Biochem Pharmacol. 42:1721–1728.

Kolenbrader, P.E., Andersen, R.N., Blehert, D.S., Egland, P.G., Foster, J.S. and Palmer, R.J. 2002. Communication among oral bacteria. Mol Microbiol Mol Biol Rev. 66:486-505.

Lang, C., Bottner, M., Holz, C., Veen, M., Ryser, M., Reindl, A., Pompejus, M. and Tanzer, J.M. 2010. Specific Lactobacillus/Mutan streptococcus co-aggregation. J Dent Res. 89(2):175-179.

Leroy, C., Delbarre, C., Ghillebaert, C., Compere, C and Combes, D. 2008. Effect of commercial enzymes on the adhesion of a marine biofilm forming bacterium. Biofouling. 24(1):11-22.

Li, F., Chai, Z.G., Sun, M.N., Wang, F., Ma, S., Zhang, L., Fang, M. and Chen, J.H. 2009. Anti-biofilm effect of dental adhesive with cationic monomer. J Dent Res. 88(4): 372-376.

Ely, L., Roa, W., Finlay, W.H. and LÖbenberg, R. 2007. Effervescent dry powder for respiration drug delivery. Eur J Pharm Biopharm. 65:346-353.

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.

Ly, K., Milgrom, P. and Rothem, M. 2006. Xylitol, sweeteners, and dental caries. Pediatr Dent. 28(2):154-163.

Mitsue, F.H., Hyun, K., Anne, M.V.S., Leslie, K.K., Kathleen, S-A., Jaime, A.C. and William, H.B. 2004. The influence of mutanase and dextranase on the production and structure of glucans synthesized by Streptococcal glucosyltransferases. Carbohydr Res. 339:2127-2137.

Molobela, I.P., Cloete,.T.E. and Beukes, M. 2010. Protease and amylase enzymes for biofilm removal and degradation of extracellular polymeric substances (EPS) produced by *Pseudomonas fluorescens* bacteria. Afr J Microbiol Res. 4(14): 1515-1524.

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

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.

Niu,Y., Sun, J., Fan, M., Xu, Q.-A., Guo, J., Jia, R. and Li, Y. 2009. Construction of a new fusion anti-caries DNA vaccine. J Dent Res. 88(5):454-460.

Peter, B., Gregory, L.C. and Anthony, B-C. 1994. Purification and properties of alternanase, a novel endo-a- 1,3-α- 1,6-D-glucanase. Eur J Biochem. 226:633-639.

Pitts, B., Hamilton, M.A., Zelver, N., and Stewart, P.S. 2003. Amicrotiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. J Microbiol Meth. 54:269-276.

Ritz, H.L. 1967. Microbial population shifts in deverloping human dental plaque. Arch Oral Biol. 12:1562-1568.

Robert, A. 2005. Bacetria in the mouth. Dent update. 32:134-142.

Robinson, C. Shore, R.C., Brookes, S.J. and Strafford, S. 2000. The chemistry of enamel caries. Crit Rev Oral Biol Med. 11(4):481-495.

Rozen, R., Bachrach, G., Bronshteyn, M. and Steeinberg, D. 2001. The role of fructans on dental formation by *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus gordonii* and *Actinomyces viscosus*. FEMS Microbiol Lett. 195:205-210.

Simonson, L.G. and Jackola, D. 1979. Effects of dextranases on attachment of *Streptococcus mutans* to hydroxyapatite. Antimicrob Agents Chemother. 16(1): 9-12.

Silverstone, L.M. 1974. Fissure Sealants. Caries Res. 8:2–26.

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

Tanzer, J.M. 1989. On changing the cariogenic chemistry of coronal plaque. J Dent Res. 68 (Spec iss):1576-1587.

Van Houte, J. 1994. Role of micro-organism in caries etiology. J Dent Res. 73(3):672-681.

Xiao, J., Zuo, Y.L., Liu, Y., Li, J.Y., Hao, Y.Q. and Zhou, X.D. 2007. Effect of Nidus Vespae extract and chemical fraction on glucosyltransferases, adherence and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol. 52:869-875.

Yano, A., Kikuchi, S., Yamashita, Y., Sakamoto, Y., Nakagawa, Y. and Yoshida, Y. 2010. The inhibitory effects of mushroom extracts on sucrose-dependent oral biofilm formation. Appl Microbiol Biotechnol. 86:615-623.

Yoo, S.Y., Kim, K-J. Lim, S-H., Kim, K-W., Hwang, H-K., Min, B-M., Choe, S-J.and Kook, J-K. 2005. First isolate of *Streptococcus downei* from human dental plaque. FEMS Microbiol Lett. 249:323-326.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์

1. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ *Streptococcus sobrinus* 6715

1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Brain Heart Infusion (BHI)

BHI	37 กรัม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเตรียมอาหารเช่นเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว แล้วเติมวุ้นผงเพิ่ม 15 กรัมต่ออาหารเหลว 1,000 มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Brain Heart Infusion (BHI) ที่เสริมด้วยซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์

BHI	37.0	กรัม
ซูโครส (Sucrose)	20.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ *Arthrobacter* sp.AG-2

2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yamaguchi (yamaguchi และ Gocho, 1973)

เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม (Dextran industrial grade)	5.0	กรัม
พอลิเพบโตน (Polypeptone)	10.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.0	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.1	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	0.1	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	30.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดยกเว้นเดกซ์แทรนในน้ำกลั่นปริมาตรประมาณ 500 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบสให้เป็น 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล หรือสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 นอร์มัล จากนั้นเติมเดกซ์แทรน นำไปละลายโดยอุ่นให้ความร้อนด้วยเครื่องไมโครเวฟและปรับปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเตรียมอาหารเช่นเดียวกับอารหารเลี้ยงเชื้อเหลวแล้วเติมวุ้นผงเพิ่ม 15 กรัมต่ออาหารเหลว 1,000 มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. **อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ *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 ($MgSO_4.7H_2O$)	0.5	กรัม
เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4.7H_2O$)	0.005	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	2.0	กรัม
วุ้นผง	15.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดยกเว้นเดกซ์แทรนในน้ำกลั่นปริมาตรประมาณ 500 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบสให้เป็น 4.8 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 นอร์มัล หรือ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล จากนั้นเติมเดกซ์แทรนและวุ้นผง นำไปละลายโดยอุ่นให้ความร้อนด้วยเครื่องไมโครเวฟและปรับปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งของ Fukumoto และคณะ (1971) ที่ปรับปรุงโดย ศิโรจน์ ศรีสรากรณ์ (2547)

เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม (Dextran industrial grade)	10.0	กรัม
กากน้ำตาล (Molass)	15.0	มล.
โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$)	0.9	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.0	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.5	กรัม
เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4.7H_2O$)	0.005	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	3.9	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดยกเว้นเดกซ์แทรนในน้ำกลั่นปริมาตรประมาณ 500 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบสให้เป็น 4.0 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 นอร์มัล หรือ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล จากนั้นเติมเดกซ์แทรน นำไปละลายโดยอุ่นให้ความร้อนด้วยเครื่องไมโครเวฟและปรับปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข
สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีของ Somogyi-Nelson (Somogyi, 1952)

1.1 สารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ (Alkaline copper reagent)

ละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตโดเดกขะไฮเดรต ($Na_2HPO_4.12H_2O$) 71 กรัม และโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรตเตตระไฮเดรต ($C_4H_4KNaO_6.4H_2O$) 40 กรัม ในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นค่อยๆเติมโซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) ปริมาณ 180 กรัม ในสารละลายที่ตั้งในอ่างควบคุมอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส เพื่อช่วยในการละลายแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1-2 วัน ถ้ามีตะกอนกรองก่อนใช้

1.2 สารละลายเนลสัน (Nelson's reagent)

ละลายแอมโมเนียมโมลิบเดตเตตระไฮเดรต ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$) 53.2 กรัม ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร แล้วเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น (Sulfuric acid) ปริมาตร 21 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมอาร์ซีเนต ($NaHAsO_4$) ความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1-2 วัน ถ้ามีตะกอนกรองก่อนใช้

2. สารละลายสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry (Lowry, 1951)

2.1 สารละลาย Lowry A

ละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 20 กรัม โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 4 กรัม และโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรตเตตระไฮเดรต ($C_4H_4KNaO_6.4H_2O$) 0.2 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเก็บในขวดสีชา

2.2 สารละลาย Lowry B

ละลายคอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$) 5.0 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเก็บในขวดสีชา

2.3 สารละลาย Lowry C

ผสมสารละลาย Lowry A 50 ส่วน กับสารละลาย Lowry B 1 ส่วน โดยในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนนี้ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้ง

2.4 สารละลาย Lowry D

ผสมสารละลายโฟลีนฟีนอลรีเอเจนท์ (Folin phenol reagent) 1 ส่วน กับน้ำกลั่น 1 ส่วน โดยในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนนี้ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้ง

3. **สารละลายเดกซ์แทรนที-2000 ความเข้มข้น 0.625 เปอร์เซ็นต์**

ละลายเดกซ์แทรนที-2000 ปริมาณ 0.625 กรัม ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 7.0 สำหรับเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตจาก *Arthrobacter* sp.AG-2 จากนั้นนำไปละลายโดยใช้เครื่องกำเนิดความถี่สูง (Sonicator) จนกว่าจะละลายหมด และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

ละลายเดกซ์แทรนที-2000 ปริมาณ 0.625 กรัม ในโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 4.5 สำหรับเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตจาก *Penicillium pinophilum* SMCU3-14 จากนั้นนำไปละลายโดยใช้เครื่องกำเนิดความถี่สูง (Sonicator) จนกว่าจะละลายหมด และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

4. **สารละลายกรดไฮโดรคลอริก/โพแทสเซียมคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดต่าง ๆ**

เตรียมสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 2.0 และ 2.5 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ จากนั้นเจือจางสารละลายไฮโดรคลอริก/โพแทสเซียมคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ที่ได้เป็นความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ด้วยน้ำกลั่น

5. **สารละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต/กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดต่าง ๆ**

เตรียมสารละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปรับค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 3.0 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จากนั้นเจือจางสารละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต/กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่ได้เป็นความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ด้วยน้ำกลั่น

6. **สารละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดต่าง ๆ**

เตรียมสารละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรด-เบสต่างๆได้แก่ 3.5 4.0 4.5 5.0 5.5 และ 6.0 โดยละลายโซเดียมอะซิเตต 0.42 1.21 2.91 5.07 6.94 และ 7.76 กรัม ตามลำดับ ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบสตามต้องการด้วยกรดอะซิติก (Acetic acid) และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ที่ได้เป็นความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ด้วยน้ำกลั่น

7. **สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดต่าง ๆ**

เตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรด-เบส ต่างๆได้แก่

ค่าความเป็นกรด-เบส	ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (กรัม)	โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (กรัม)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)
6.0	1.87	10.42	80
6.5	4.60	8.11	80
7.0	8.55	4.77	80
7.5	11.74	2.46	80
8.0	13.34	0.85	80

ปรับค่าความเป็นกรด-เบสตามต้องการด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ที่ได้เป็นความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ด้วยน้ำกลั่น

8. **สารละลายคริสตัลไวโอเลต 0.02 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนัก)**

ละลายคริสตัลไวโอเลต (Crytal violet) 0.02 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเก็บในขวดสีชา

9. **กรดอะเซติก (CH_3COOH) ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร)**

เติมกรดอะเซติกเข้มข้น 30 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 70 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเก็บในขวดสีชา

10. **สารละลายทวีน-80 (Tween-80) ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร)**

ผสมทวีน-80 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

11. **โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น** 0.1 **นอร์มัล** (0.1 N NaOH)

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.4 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

12. **สารละลายเคซีน ความเข้มข้น** 1.5 **เปอร์เซ็นต์**

ละลายเคซีนในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล คนและปรับค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 7 จึงเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

13. **สารละลายไตรคลอโรอะเซติกแอซิด ความเข้มข้น** 0.4 **โมลาร์**

ละลายกรดไตรคลอโรอะเซติก 6.53 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

14. **สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น** 0.4 **โมลาร์**

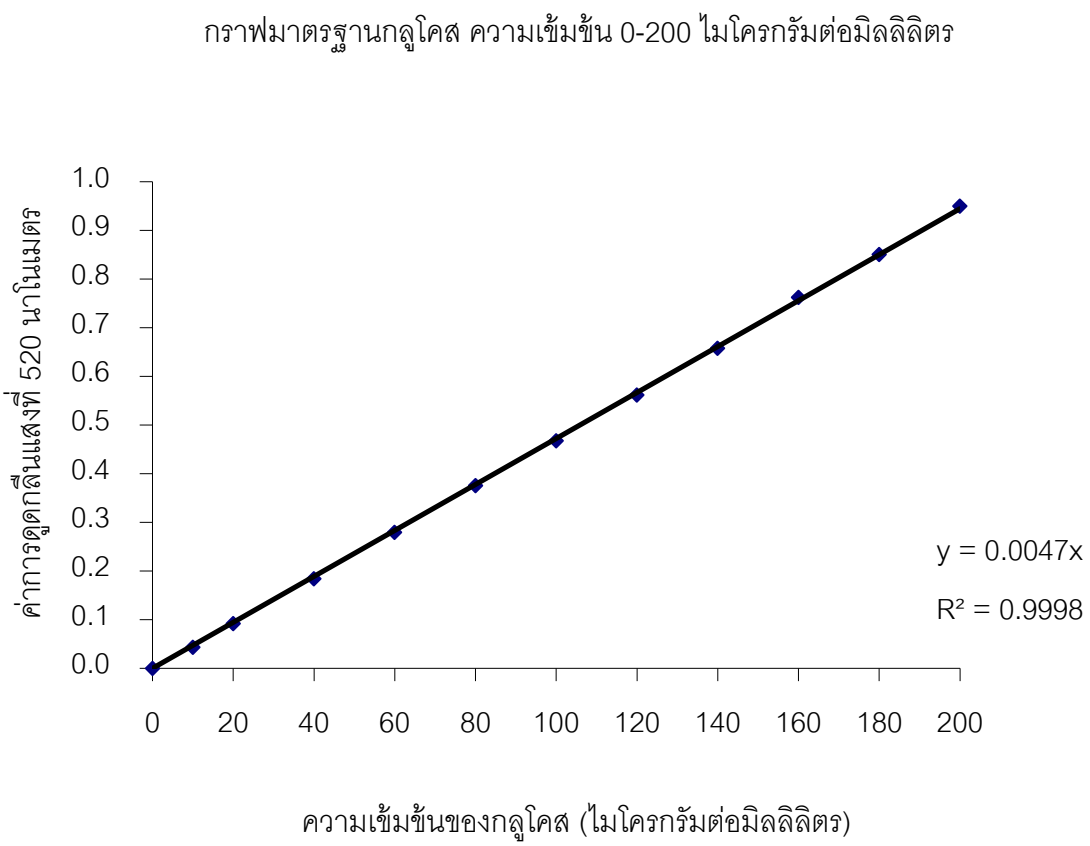
ละลายโซเดียมคาร์บอเนต 4.24 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

15. **สารละลายโฟลินรีเอเจนท์**

เตรียม Folin-ciocateus เจือจางกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 และต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

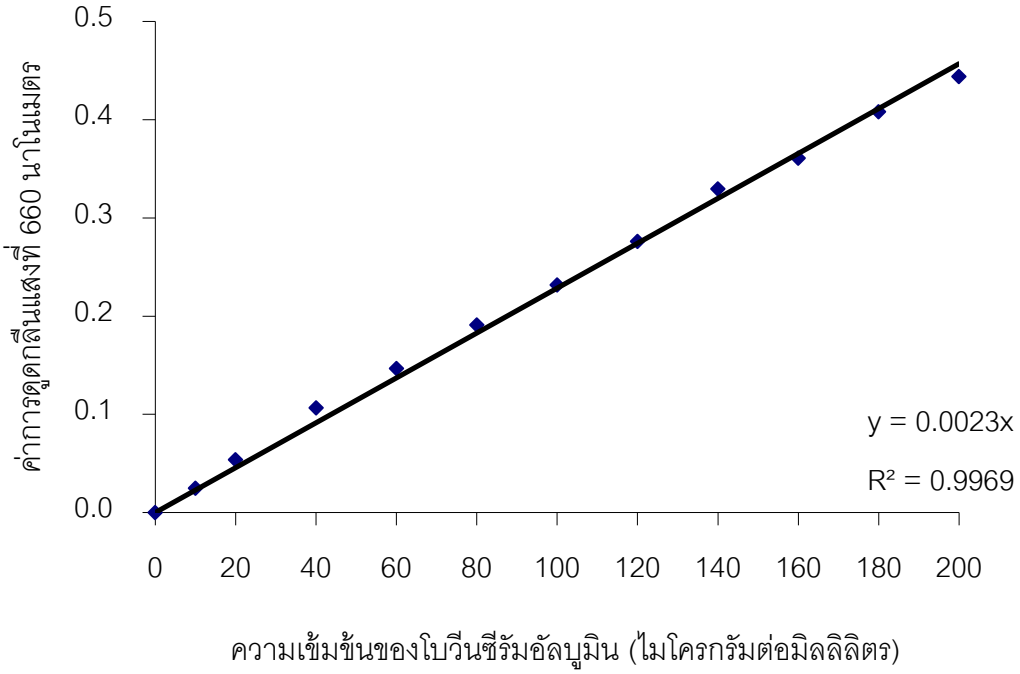
ภาคผนวก ค
กราฟมาตรฐาน

1. **กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีของ** Somogyi-Nelson (Somogyi, 1952)

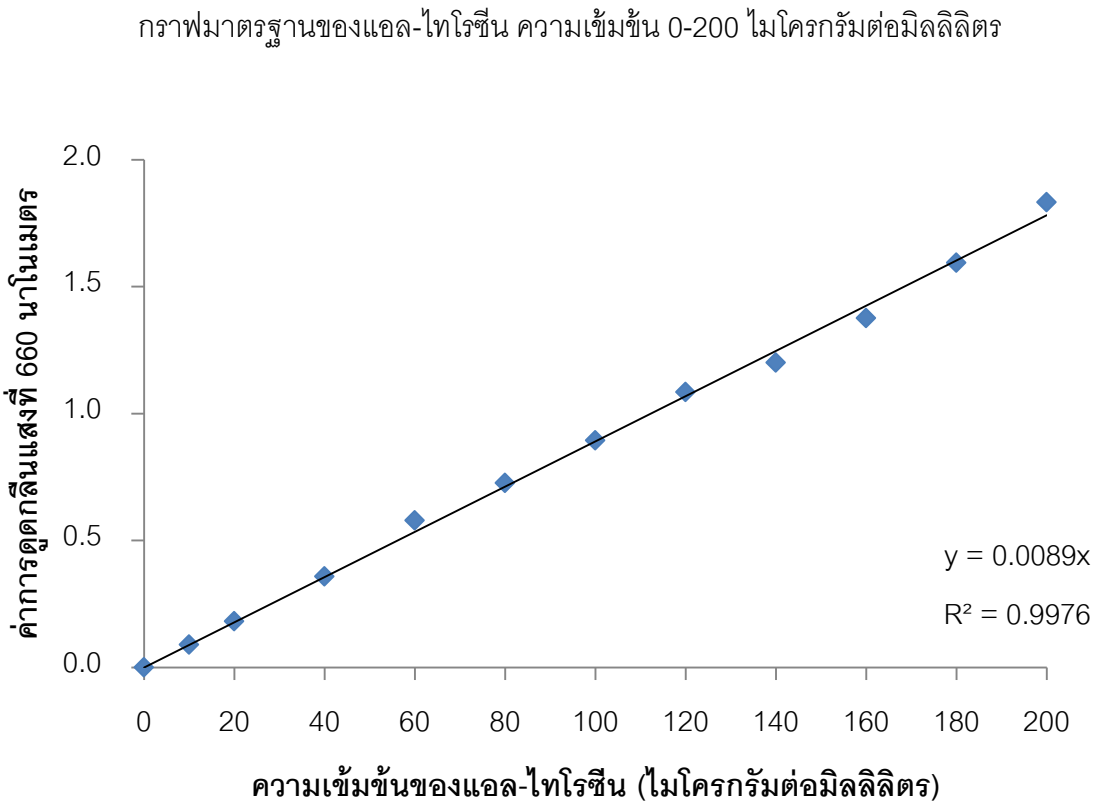


2. กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธีของ Lowry (Lowry,1951)

กราฟมาตรฐานของโบวีนซีรัมอัลบูมิน ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



3. **กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์แอกทิวิตีของโปรตีเอส**



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวศันสณีย์ ศิริลักษณ์ เกิดเมื่อวันที่ 28 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2525 สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการสัตวแพทย์) คณะเทคนิคการสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในปีการศึกษา 2547 และเข้ารับการศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2552

ผลงานทางวิชาการ

Sirilak. S., Assawasereelert. N., and Thaniyavarn. S. Dental biofilm degradation by combination of dextranase and papain. The First ASEAN Plus Three Graduate Research Congress (AGRC), 2012 March 1-2, The Empress Hotel, Chiang Mai, Thailand.