การผลิตเดกซ์แทรนโดย *Leuconostoc mesenteroides* 473 เพื่อใช้เป็นสารชักนำการสร้างเดกซ์แทรนเนสโดย *Penicillium* sp. SMCU 3-14

นางสาววิมลิน ศิริพัฒนานนท์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION OF DEXTRAN BY *Leuconostoc mesenteroides* 473 AS AN INDUCER FOR DEXTRANASE PRODUCTION BY *Penicillium* sp. SMCU 3-14

Miss Wimalin Siripattananont

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 2006

Copyright of Chulalongkorn University

491605

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตเดกซ์แทรนโดย *Leuconostoc mesenteroides* 473 เพื่อใช้เป็นสารชักนำการสร้างเดกซ์แทรนเนสโดย *Penicillium* sp. SMCU 3-14
โดย	นางสาววิมลิน ศิริพัฒนานนท์
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร. ปาหนัน เริงสำราญ)

วิมลิน ศิริพัฒนานนท์ : การผลิตเดกซ์แทรนโดย *Leuconostoc mesenteroides* 473 เพื่อใช้เป็นสารชักนำการสร้างเดกซ์แทรนเนสโดย *Penicillium* sp. SMCU 3-14. (PRODUCTION OF DEXTRAN BY *Leuconostoc mesenteroides* 473 AS AN INDUCER FOR DEXTRANASE PRODUCTION BY *Penicillium* sp. SMCU 3-14) อาจารย์ที่ปรึกษา: ผศ.ดร. สุเทพ ธนียวัน, 147 หน้า.

จากการศึกษาการเจริญและการผลิตเดกซ์แทรนจาก *L. mesenteroides* 473 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่างๆ และแปรผันพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญ ได้แก่ ความเป็นกรดเบส อุณหภูมิ และความเร็วรอบในการให้อากาศ พบว่าอาหารปรับปรุงสูตรประกอบด้วยซูโครสความเข้มข้น 7.0% กากถั่วลิสง 1.0% โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ พร้อมทั้งเสริมด้วยยีสต์สกัด 0.8% โดยน้ำหนักเป็นแหล่งวิตามิน ภายใต้ภาวะที่ปรับค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นที่ 5.5 อุณหภูมิ 30°ซ และอัตราการเขย่า 200 รอบ/นาที สามารถผลิตเดกซ์แทรนได้ปริมาณสูงสุด 4.52 มก./มล.ของน้ำเลี้ยงเชื้อ การเปรียบเทียบความสามารถของเดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์ (Sigma®) และเดกซ์แทรนจาก *L. mesenteroides* 473 ที่ปริมาณ 1.0% โดยน้ำหนักในการชักนำการสร้างเดกซ์แทรนเนสโดย *Penicillium* sp. SMCU 3-14 พบว่าเดกซ์แทรนเนสมีแอคติวิตีเป็น 480.18 และ 483.43 หน่วยเดกซ์แทรนเนส/มล.ของน้ำเลี้ยงเชื้อตามลำดับ จากการศึกษาสมบัติพบว่าภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนสทั้งสอง คือ ค่าความเป็นกรดเบส 4.5 อุณหภูมิ 55°ซ โดยพบว่าค่าคงที่ของมิเคลลิส (K_m) ของเดกซ์แทรนเนสทั้งสองชนิดต่อซับสเตรตเดกซ์แทรนที-2000 มีค่าเท่ากับ 1.04 และ 1.10 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ ซึ่งเห็นได้ว่าเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *L. mesenteroides* 473 สามารถใช้เป็นสารชักนำการสร้างเดกซ์แทรนเนสโดย *Penicillium* sp. SMCU 3-14 ได้ทัดเทียมกับเดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์

การตรวจสอบชนิดของผลิตภัณฑ์จากการย่อยสลายเดกซ์แทรน โดยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสลายด้วยเดกซ์แทรนเนสจะประกอบไปด้วยกลูโคส มอลโทส และโอลิโกแซ็กคาไรด์ แต่จากการย่อยสลายด้วยกรดจะเหลือแต่เพียงหน่วยย่อยที่เป็นกลูโคสเท่านั้น

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2549

4672409623: MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: *Leuconostoc mesenteroides* 473 / DEXTRAN PRODUCTION / *Penicillium* sp. SMCU 3-14 / DEXTRANASE

WIMALIN SIRIPATTANANONT: PRODUCTION OF DEXTRAN BY *Leuconostoc mesenteroides* 473 AS AN INDUCER FOR DEXTRANASE PRODUCTION BY *Penicillium* sp. SMCU 3-14. THESIS ADVISOR: ASST.PROF. SUTHEP THANIYAVARN, Ph.D., 147 pp.

Growth and dextran production of *L. mesenteroides* 473 were optimized. Parameters of concern were carbon and nitrogen sources, initial pH, temperature, agitation rate and aeration. The formulated medium consisted of 7.0% (w/v) sucrose, 1.0% (w/v) peanut meal as carbon source and nitrogen source, respectively and addition of 0.8% (w/v) yeast extract as vitamin source while optimal condition for dextran production were initial pH of 5.5 at 30°C, agitation rate of 200 rpm. Under such condition, the organism was able to produce dextran at 4.52 mg/ml of culture medium. Comparison for inducing ability of commercial dextran (Sigma®) and dextran from *L. mesenteroides* 473 at 1.0% (w/v) for dextranase production by *Penicillium* sp. SMCU 3-14 ware carried out, it was found that under such induction gave view to dextranase yielded 480.18 and 483.43 units dextranase/ml, respectively. Both dextranases showed optimum pH of 4.5 and optimum temperature of 55°C. The respective Michaelis constant (K_m) toward their substrate dextran T-2000 were 1.04 and 1.10 μmolar. Thus, the dextran produced by *L. mesenteroides* 473 has the ability in inducing dextrananse production by *Penicillium* sp. SMCU 3-14 as good as that of commercial dextran.

Product analysis of hydrolyzed dextran by high performance liquid chromatography revealed mixture of glucose, maltose and oligosaccharides when hydrolysed by dextranase and only glucose if acid hydrolysis was employed.

Department Microbiology Student's signature

Field of study Industrial Microbiology Advisor's signature

Academic year 2006

กิตติกรรมประกาศ

กราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็น ตลอดจนการอบรมสั่งสอนด้วยดีเสมอมา ผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณในความเมตตาของท่านอาจารย์ฯ เป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณท่านรองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ขอกราบขอบพระคุณท่านผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา และอาจารย์ ดร. ปาหนัน เริงสำราญ ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และให้ความรู้และคำแนะนำต่างๆ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณครอบครัว คุณบิดรมารดา ของผู้วิจัย ที่คอยสนับสนุนและช่วยเหลือและขอขอบคุณคุณนฤพล ไทยบำรุงวิวัฒน์ ที่คอยเป็นกำลังใจและคอยเป็นที่ปรึกษาเสมอมา

กราบขอบพระคุณอาจารย์ และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำและกำลังใจที่ดีเสมอมา และที่ขาดไม่ได้ ขอขอบคุณคุณชัชวาล อุดมโชคมงคล คุณปาริฉัตร ราวีศรี คุณอภิชญา เตชะวสัญญู และผองเพื่อน คุณกิตติภัทร ลิ้มประเสริฐ คุณไปรมา แก้วสามศรี คุณโสรจยา แวงศักดิ์ คุณปิ่นปัญญา เรียงรุ่งโรจน์ คุณปิยะวรรณ เพชราภา และผองเพื่อน ที่คอยดูแล เอาใจใส่ ช่วยเหลือผู้วิจัย รวมทั้งให้คำปรึกษาและทำให้มีช่วงเวลาที่น่าประทับใจตลอดการทำงานวิจัย ณ ภาควิชาจุลชีววิทยาแห่งนี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ
กิตติกรรมประกาศ..... ฉ
สารบัญ..... ช
สารบัญตาราง..... ฎ
สารบัญภาพ..... ฐ
สัญลักษณ์และคำย่อ..... ถ
บทที่
1. บทนำ..... 1
2. วารสารปริทรรศน์..... 3
3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง..... 39
3.1 การเก็บและการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย..... 42
3.1.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย..... 42
3.1.1.1 แบคทีเรีย *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473..... 42
3.1.1.2 รา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14..... 43
3.1.2 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย..... 43
3.1.2.1 การเก็บเชื้อ *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473..... 43
3.1.2.2 การเก็บเชื้อ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14..... 43
3.2 การเตรียมหัวเชื้อเพื่อการผลิตเดกซ์แทรนจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473..... 43
3.3 การศึกษารูปแบบการเจริญของ *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473..... 44
3.4 การคัดเลือกปริมาณกล้าเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเดกซ์แทรนโดย *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473..... 44
3.5 การคัดเลือกสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ และปริมาณส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเดกซ์แทรนโดย *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473..... 45
3.5.1 ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม..... 45
3.5.2 ปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม..... 45

หน้า

3.5.3 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม....46
3.5.4 ปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม....46
3.6 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเดกซ์แทรนโดย *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473....47
3.6.1 ค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสม....47
3.6.2 อุณหภูมิที่เหมาะสม....47
3.6.3 ความเร็วรอบที่เหมาะสม....48
3.7 ปริมาณแหล่งวิตามินที่เหมาะสม....48
3.8 การวิเคราะห์การเจริญของ *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ด้วยการนับเซลล์มีชีวิตที่เจริญบนจานเพาะเชื้อ....49
3.9 การเตรียมและแยกเดกซ์แทรนจากน้ำเลี้ยงของ *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 โดยวิธีการตกตะกอนด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ....49
3.10 การผลิตเดกซ์แทรนจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ในปริมาณสูงเพื่อใช้เป็นสารชักนำการผลิตเดกซ์แทรนเนส....50
3.11 การเลี้ยงเชื้อเพื่อเตรียมเดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 โดยเปรียบเทียบระหว่างการใช้เดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์ และเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 เป็นสารชักนำ....50
3.12 การตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว....51
3.13 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Somogyi....51
3.14 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry....51
3.15 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากซูโครสของแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิด โดยการย่อยสลายด้วยอินเวอร์เทส เพื่อทำการปรับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นจากซูโครสของแต่ละแหล่งคาร์บอนให้เท่ากัน....52
3.16 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนจากแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์แต่ละชนิดโดยวิธี Kjeldahl ตามวิธีของ A.O.A.C. เพื่อทำการปรับปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้นของแต่ละแหล่งไนโตรเจนให้เท่ากัน....52
3.17 การสกัดไขมันในส่วนของกากถั่วเหลืองและกากถั่วลิสง ด้วยตัวทำละลายนอร์มัลเฮกเซน....53

หน้า

3.18 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายเดกซ์แทรนจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ด้วยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี.....53
3.18.1 ตรวจสอบจากการย่อยสลายเดกซ์แทรนด้วยกรดซัลฟูริก.....53
3.18.2 ตรวจสอบจากการย่อยสลายเดกซ์แทรนด้วยเดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14.....54
3.19 การศึกษาสมบัติของเดกซ์แทรนเนส 2 ชนิด จากการใช้เดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์ และเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 เป็นสารชักนำ.....55
3.19.1 ความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนส 2 ชนิด ที่ใช้เดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์ และเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 เป็นสารชักนำ..... 55
3.19.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรเนส 2 ชนิด ที่ใช้เดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์ และเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 เป็นสารชักนำ.....55
3.19.3 ความเสถียรต่อความเป็นกรดเบสของเดกซ์แทรนเนส 2 ชนิด ที่ใช้เดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์ และเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 เป็นสารชักนำ.....56
3.19.4 ความเสถียรต่ออุณหภูมิของเดกซ์แทรนเนส 2 ชนิด ที่ใช้เดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์ และเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 เป็นสารชักนำ..... 56
3.19.5 การหาค่าคงที่มิเคลลิส (K_m) ของเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตโดยการชักนำด้วยเดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์ และเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ต่อเดกซ์แทรนที-2000..... 56
3.19.6 การเปรียบเทียบความสามารถของเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตโดยการชักนำด้วยเดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์ และเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ในการย่อยสลายซับสเตรตเดกซ์แทรนชนิดต่างๆ.....57
4. ผลการทดลอง..... 58
4.1 การศึกษารูปแบบการเจริญของ *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473.....58

หน้า

4.2 การคัดเลือกปริมาณกล้าเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเดกซ์แทรนโดย *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 59
4.3 การคัดเลือกสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ และปริมาณส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเดกซ์แทรนโดย *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 63
4.3.1 ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม 63
4.3.2 ปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม 66
4.3.3 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม 70
4.3.4 ปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม 73
4.4 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเดกซ์แทรนโดย *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 77
4.4.1 ค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสม 77
4.4.2 อุณหภูมิที่เหมาะสม 80
4.4.3 ความเร็วรอบที่เหมาะสม 83
4.5 ปริมาณแหล่งวิตามินที่เหมาะสม 86
4.6 การเลี้ยงเชื้อเพื่อเตรียมเดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 โดยเปรียบเทียบระหว่างการใช้เดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์ และเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 เป็นสารชักนำ 89
4.7 การศึกษาสมบัติของเดกซ์แทรนเนส 2 ชนิด จากการใช้ใช้เดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์ และเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 เป็นสารชักนำ 90
4.7.1 ความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนส 2 ชนิด ที่ใช้เดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์และเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 เป็นสารชักนำ 90
4.7.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรเนส 2 ชนิด ที่ใช้เดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์และเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 เป็นสารชักนำ 91

หน้า

4.7.3 ความเสถียรต่อความเป็นกรดเบสของเดกซ์แทรนเนส 2 ชนิด ที่ใช้เดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์ และเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 เป็นสารชักนำ....92

4.7.4 ความเสถียรต่ออุณหภูมิของเดกซ์แทรนเนส 2 ชนิด ที่ใช้เดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์และเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 เป็นสารชักนำ....93

4.7.5 การหาค่าคงที่มิเคลลิส (K_m) ของเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตโดยการชักนำด้วยเดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์ และเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ต่อเดกซ์แทรนที-2000....94

4.7.6 การเปรียบเทียบความสามารถของเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตโดยการชักนำด้วยเดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์และเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ในการย่อยสลายซับสเตรตเดกซ์แทรนชนิดต่างๆ....95

4.8 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายเดกซ์แทรนจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ด้วยกรดซัลฟูริก และเดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 โดยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี....96

5. สรุปและอภิปรายผล....99

รายการอ้างอิง....109

ภาคผนวก....135

ภาคผนวก ก....136

ภาคผนวก ข....139

ภาคผนวก ค....145

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์....147

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

2.1 ยีนที่ผลิตจากเดกซ์แทรนซูเครสและลักษณะของเดกซ์แทรนจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ต่างๆ 14
2.2 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนโดเดกซ์แทรนเนส (3.2.1.11)..... 23
2.3 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอกโซเดกซ์แทรนเนส..... 25
2.4 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนโด-1,3-แอลฟา-กลูแคนเนส..... 26
4.1 สูตรอาหารและภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเดกซ์แทรนโดย *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473..... 89
4.2 การเปรียบเทียบแอคติวิตี และแอคติวิตีจำเพาะระหว่างเดกซ์แทรนเนสที่ใช้เดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์ และเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 เป็นสารชักนำ..... 90
4.3 การเปรียบเทียบการย่อยสลายซับสเตรตเดกซ์แทรนชนิดต่างๆ โดยเดกซ์แทรนเนสที่ผลิตโดยการชักนำด้วยเดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์ และเดกซ์แทรนที่ผลิตจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473..... 96
5.1 การเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเดกซ์แทรนของ *L. mesenteroides* สายพันธุ์ต่างๆ..... 105
5.2 การเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเดกซ์แทรนของ *L. mesenteroides* สายพันธุ์ต่างๆ ณ ชั่วโมงที่ 8-12..... 106

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ **หน้า**

2.1 โครงสร้างของเดกซ์แทรน....3
2.2 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์เดกซ์แทรนจากเดกซ์แทรนซูเครส....6
2.3 ลักษณะของ *L. mesenteroides* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน....7
2.4 กระบวนการผลิตน้ำตาล....8
2.5 ลักษณะของ *S. mutans* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน....9
2.6 การเกาะยึดของจุลินทรีย์บนผิวฟันที่ก่อคราบจุลินทรีย์.... 10
2.7 การเกิดฟันผุจากกรดของจุลินทรีย์ในคราบฟัน.... 10
2.8 กลไกการทำงานของเดกซ์แทรนซูเครสต่อการสร้างสายเดกซ์แทรนของ *L. mesenteroides* 2 สายพันธุ์ ในภาวะที่มีเมทิล-แอลฟา-ดี-กลูโคไพราโนไซด์และซูโครส.... 15
4.1 รูปแบบการเจริญและการผลิตเดกซ์แทรนของ *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 จากอาหารเหลวทริปโตนที่เสริมด้วยซูโครสความเข้มข้น 10% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ 30°ซ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.... 59
4.2 การเจริญของ *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ที่แปรผันปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่ 5 10 และ 15% โดยปริมาตร ด้วยวิธีการนับเซลล์มีชีวิตทั้งหมดที่เจริญบนจานเพาะเชื้อจากอาหารทริปโตนเสริมด้วยซูโครสความเข้มข้น 10% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ 30°ซ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 ชั่วโมง.... 60
4.3 ปริมาณโปรตีนในส่วนใสของน้ำเลี้ยง *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ที่เวลาต่างๆ จากอาหารทริปโตนเสริมด้วยซูโครสความเข้มข้น 10% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่แปรผันปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่ 5 10 และ 15% โดยปริมาตร ที่ 30°ซ 200 รอบต่อนาที....61
4.4 ผลผลิตเดกซ์แทรนโดย *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ที่แปรผันปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่ 5 10 และ 15% โดยปริมาตร จากอาหารทริปโตนเสริมด้วยซูโครส 10% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ 30°ซ 200 รอบต่อนาที 10ชั่วโมง....62
4.5 การเปรียบเทียบปริมาณเดกซ์แทรนในชั่วโมงที่ 10 ของการเลี้ยงเชื้อ เมื่อแปรผันปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่ 5 10 และ 15% โดยปริมาตร.... 62

ภาพประกอบ **หน้า**

4.6 การเจริญของ *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ด้วยวิธีการนับเซลล์มีชีวิตทั้งหมดที่เจริญบนจานเพาะเชื้อ จากอาหารทริปโตนที่ใช้แหล่งคาร์บอนต่างกัน 3 ชนิด คือ ซูโครส น้ำอ้อย และกากน้ำตาล โดยปรับน้ำตาลรีดิวซ์ให้เท่ากันภายหลังการย่อยสลายแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดด้วยอินเวอร์เทส ที่ 30°ซ 200 รอบต่อนาที 10 ชั่วโมง..... 63

4.7 ปริมาณโปรตีนในส่วนใสของน้ำเลี้ยง *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ที่เวลาต่างๆ จากอาหารทริปโตนที่ใช้แหล่งคาร์บอนต่างกัน 3 ชนิด คือ ซูโครส น้ำอ้อย และกากน้ำตาล โดยปรับน้ำตาลรีดิวซ์ให้เท่ากัน ภายหลังการย่อยสลายแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดด้วยอินเวอร์เทส ที่ 30°ซ 200 รอบต่อนาที..... 64

4.8 ผลผลิตเดกซ์แทรนโดย *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 จากอาหารทริปโตนที่ใช้แหล่งคาร์บอนต่างกัน 3 ชนิด คือ ซูโครส น้ำอ้อย และกากน้ำตาล โดยปรับน้ำตาลรีดิวซ์ให้เท่ากัน ภายหลังการย่อยสลายแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดด้วยอินเวอร์เทส ที่ 30°ซ 200 รอบต่อนาที 10 ชั่วโมง..... 65

4.9 การเปรียบเทียบปริมาณเดกซ์แทรนในชั่วโมงที่ 10 ของการเลี้ยงเชื้อ จากอาหารทริปโตนเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนต่างกัน 3 ชนิด คือ ซูโครส น้ำอ้อย และกากน้ำตาล..... 65

4.10 ลักษณะของเดกซ์แทรนที่ผลิตโดย *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 เมื่อเลี้ยงในอาหารทริปโตนที่ใช้แหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน..... 66

4.11 การเจริญของ *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ด้วยวิธีการนับเซลล์มีชีวิตทั้งหมดที่เจริญบนจานเพาะเชื้อ จากอาหารซูโครสทริปโตนโดยแปรผันความเข้มข้นของซูโครสตั้งแต่ 0-10% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ 30°ซ 200 รอบต่อนาที 10 ชั่วโมง..... 67

4.12 ปริมาณโปรตีนในส่วนใสของน้ำเลี้ยง *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ที่เวลาต่างๆ จากอาหารซูโครสทริปโตนโดยแปรผันความเข้มข้นของซูโครสตั้งแต่ 0-10% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ 30°ซ 200 รอบต่อนาที..... 68

4.13 ผลผลิตเดกซ์แทรนโดย *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 จากอาหารซูโครสทริปโตนโดยแปรผันความเข้มข้นของซูโครสตั้งแต่ 0-10% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ 30°ซ 200 รอบต่อนาที 10 ชั่วโมง..... 69

ภาพประกอบ **หน้า**

4.14 การเปรียบเทียบปริมาณเดกซ์แทรนในชั่วโมงที่ 10 ของการเลี้ยงเชื้อ จากอาหารซูโครสทริปโตนเมื่อแปรผันความเข้มข้นของซูโครสตั้งแต่ 0-10% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร 69

4.15 การเจริญของ *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ด้วยวิธีการนับเซลล์มีชีวิตทั้งหมดที่เจริญบนจานเพาะเชื้อ จากอาหารซูโครสทริปโตนที่ใช้แหล่งไนโตรเจนต่างกัน คือ ไนโตรเจนอินทรีย์ (ยีสต์สกัด กากถั่วเหลือง และกากถั่วลิสง) และไนโตรเจนอนินทรีย์ (NH_4Cl, NH_4NO_3, $(NH_4)_2SO_4$ และ $(NH_4)_2HPO_4$) โดยปรับปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้นเท่ากัน ที่ 30°ซ 200 รอบต่อนาที 10 ชั่วโมง 70

4.16 ปริมาณโปรตีนในส่วนใสของน้ำเลี้ยง *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ที่เวลาต่างๆ จากอาหารซูโครสทริปโตนที่ใช้แหล่งไนโตรเจนต่างกัน คือ ไนโตรเจนอินทรีย์ (ยีสต์สกัด กากถั่วเหลือง และกากถั่วลิสง) และไนโตรเจนอนินทรีย์ (NH_4Cl, NH_4NO_3, $(NH_4)_2SO_4$ และ $(NH_4)_2HPO_4$) โดยปรับปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้นเท่ากัน ที่ 30°ซ 200 รอบต่อนาที 71

4.17 ผลผลิตเดกซ์แทรนโดย *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 จากอาหารซูโครสทริปโตนที่ใช้แหล่งไนโตรเจนต่างกัน คือ ไนโตรเจนอินทรีย์ (ยีสต์สกัด กากถั่วเหลือง และกากถั่วลิสง) และไนโตรเจนอนินทรีย์ (NH_4Cl, NH_4NO_3, $(NH_4)_2SO_4$ และ $(NH_4)_2HPO_4$) ที่ 30°ซ 200 รอบต่อนาที 10 ชั่วโมง 72

4.18 การเปรียบเทียบปริมาณเดกซ์แทรนในชั่วโมงที่ 10 ของการเลี้ยงเชื้อ จากอาหารซูโครสทริปโตนเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนต่างกัน คือ ไนโตรเจนอินทรีย์ (ยีสต์สกัด กากถั่วเหลือง และกากถั่วลิสง) และไนโตรเจนอนินทรีย์ (NH_4Cl, NH_4NO_3, $(NH_4)_2SO_4$ และ $(NH_4)_2HPO_4$) 73

4.19 การเจริญของ *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ด้วยวิธีการนับเซลล์มีชีวิตทั้งหมดที่เจริญบนจานเพาะเชื้อ จากอาหารซูโครสทริปโตนโดยแปรผันความเข้มข้นของยีสต์สกัดตั้งแต่ 0.0-1.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ 30°ซ 200 รอบต่อนาที10 ชั่วโมง 74

4.20 ปริมาณโปรตีนในส่วนใสของน้ำเลี้ยง *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ที่เวลาต่างๆ จากอาหารซูโครสทริปโตนโดยแปรผันความเข้มข้นของยีสต์สกัดตั้งแต่ 0.0-1.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ 30°ซ 200 รอบต่อนาที 75

ภาพประกอบ **หน้า**

4.21 ผลผลิตเดกซ์แทรนโดย *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 จากอาหารซูโครสทริปโตน โดยแปรผันความเข้มข้นของยีสต์สกัดตั้งแต่ 0.0-1.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ 30°ซ 200 รอบต่อนาที 10 ชั่วโมง..... 76

4.22 ผลผลิตเดกซ์แทรนในชั่วโมงที่ 10 ของการเลี้ยงเชื้อ จากอาหารซูโครสทริปโตนเมื่อแปรผันความเข้มข้นของยีสต์สกัดตั้งแต่ 0.0-1.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร.....76

4.23 การเจริญของ *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ด้วยวิธีการนับเซลล์มีชีวิตทั้งหมดที่เจริญบนจานเพาะเชื้อ จากอาหารซูโครสทริปโตนโดยแปรผันค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นที่ 4.0-8.0 ที่ 30°ซ 200 รอบต่อนาที 10 ชั่วโมง..... 77

4.24 ปริมาณโปรตีนในส่วนใสของน้ำเลี้ยง *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ที่เวลาต่างๆ จากอาหารซูโครสทริปโตนโดยแปรผันค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นที่ 4.0-8.0 ที่ 30°ซ 200 รอบต่อนาที.....78

4.25 ผลผลิตเดกซ์แทรนโดย *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 จากอาหารซูโครสทริปโตนโดยแปรผันค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นที่ 4.0-8.0 ที่ 30°ซ 200 รอบต่อนาที 10 ชั่วโมง.....79

4.26 การเปรียบเทียบปริมาณเดกซ์แทรนในชั่วโมงที่ 10 ของการเลี้ยงเชื้อ จากอาหารซูโครสทริปโตนเมื่อแปรผันค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นที่ 4.0-8.0.....79

4.27 การเจริญของ *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ด้วยวิธีการนับเซลล์มีชีวิตทั้งหมดที่เจริญบนจานเพาะเชื้อ จากอาหารซูโครสทริปโตนค่าความเป็นกรดเบส 5.5 200 รอบต่อนาที 10 ชั่วโมง โดยแปรผันอุณหภูมิในการบ่มเชื้อตั้งแต่ 25-50°ซ..... 80

4.28 ปริมาณโปรตีนในส่วนใสของน้ำเลี้ยง *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ที่เวลาต่างๆ จากอาหารซูโครสทริปโตน ค่าความเป็นกรดเบส 5.5 200 รอบต่อนาที โดยแปรผันอุณหภูมิในการบ่มเชื้อตั้งแต่ 25-50°ซ..... 81

4.29 ผลผลิตเดกซ์แทรนโดย *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 จากอาหารซูโครสทริปโตน ค่าความเป็นกรดเบส 5.5 200 รอบต่อนาที 10 ชั่วโมง โดยแปรผันอุณหภูมิในการบ่มเชื้อตั้งแต่ 25-50°ซ..... 82

4.30 การเปรียบเทียบปริมาณเดกซ์แทรนในชั่วโมงที่ 10 ของการเลี้ยงเชื้อ จากอาหารซูโครสทริปโตนเมื่อแปรผันอุณหภูมิในการบ่มเชื้อตั้งแต่ 25-50°ซ.....82

ภาพประกอบ **หน้า**

4.31 การเจริญของ *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ด้วยวิธีการนับเซลล์มีชีวิตทั้งหมดที่เจริญบนจานเพาะเชื้อ จากอาหารซูโครสทริปโตนค่าความเป็นกรดเบส 5.5 ที่ 30°ซ 10 ชั่วโมง โดยแปรผันความเร็วรอบในการให้อากาศตั้งแต่ 100-250 รอบต่อนาที.....83

4.32 ปริมาณโปรตีนในส่วนใสของน้ำเลี้ยง *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ที่เวลาต่างๆ จากอาหารซูโครสทริปโตนค่าความเป็นกรดเบส 5.5 ที่ 30°ซ โดยแปรผันความเร็วรอบในการให้อากาศตั้งแต่ 100-250 รอบต่อนาที..... 84

4.33 ผลผลิตเดกซ์แทรนโดย *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 จากอาหารซูโครสทริปโตนค่าความเป็นกรดเบส 5.5 ที่ 30°ซ 10 ชั่วโมง โดยแปรผันความเร็วรอบในการให้อากาศตั้งแต่ 100-250 รอบต่อนาที.....85

4.34 การเปรียบเทียบปริมาณเดกซ์แทรนในชั่วโมงที่ 10 ของการเลี้ยงเชื้อ จากอาหารซูโครสทริปโตนเมื่อแปรผันความเร็วรอบในการให้อากาศตั้งแต่ 100-250 รอบต่อนาที.....85

4.35 การเจริญของ *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ด้วยวิธีการนับเซลล์มีชีวิตทั้งหมดที่เจริญบนจานเพาะเชื้อ จากอาหารซูโครสทริปโตนที่ใช้กากถั่วลิสงความเข้มข้น 1.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และแปรผันปริมาณของยีสต์สกัดตั้งแต่ 0.0-1.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งวิตามิน ที่ 30°ซ 200 รอบต่อนาที10 ชั่วโมง..... 86

4.36 ปริมาณโปรตีนในส่วนใสของน้ำเลี้ยง *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ที่เวลาต่างๆ จากอาหารซูโครสทริปโตนที่ใช้กากถั่วลิสงความเข้มข้น 1.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และแปรผันปริมาณของยีสต์สกัดตั้งแต่ 0.0-1.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ 30°ซ 200 รอบต่อนาที.....87

4.37 ผลผลิตเดกซ์แทรนโดย *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 จากอาหารซูโครสทริปโตนที่ใช้กากถั่วลิสงความเข้มข้น 1.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และแปรผันปริมาณของยีสต์สกัดตั้งแต่ 0.0-1.0% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ 30°ซ 200 รอบต่อนาที 10 ชั่วโมง.....88

4.38 การเปรียบเทียบปริมาณเดกซ์แทรนในชั่วโมงที่ 10 ของการเลี้ยงเชื้อ จากอาหารซูโครสทริปโตนเมื่อแปรผันปริมาณของยีสต์สกัดซึ่งเป็นแหล่งวิตามินให้แก่แบคทีเรีย..... 88

4.39 ความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนส 2 ชนิด ที่ชักนำโดยเดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์ และเดกซ์แทรนจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473.....91

ภาพประกอบ **หน้า**

4.40 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนส 2 ชนิด ที่ชักนำโดยเดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์ และเดกซ์แทรนจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 92

4.41 ความเสถียรต่อความเป็นกรดเบสในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ของเดกซ์แทรนเนส 2 ชนิด ที่ชักนำโดยเดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์ และเดกซ์แทรนจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 93

4.42 ความเสถียรต่ออุณหภูมิของเดกซ์แทรนเนส 2 ชนิด ที่ชักนำโดยเดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์ และเดกซ์แทรนจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 94

4.43 การประมาณค่าคงที่มิเคลลิส (K_m) โดยวิธีของไลน์วีเวอร์-เบิร์กของเดกซ์แทรนเนส 2 ชนิด ที่ผลิตโดยการชักนำด้วยเดกซ์แทรนเชิงพาณิชย์ และเดกซ์แทรนจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 เมื่อใช้เดกซ์แทรนที-2000 เป็นซับสเตรต 95

4.44 โครมาโทแกรมแสดงชนิดของผลิตภัณฑ์ภายหลังจากการย่อยเดกซ์แทรนจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ด้วยกรดซัลฟูริก เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน โดยใช้อะซิโทไนไทรล์ความเข้มข้น 70% โดยปริมาตรเป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที 97

4.45 โครมาโทแกรมแสดงชนิดของผลิตภัณฑ์ภายหลังจากการย่อยเดกซ์แทรนจาก *L. mesenteroides* สายพันธุ์ 473 ด้วยเดกซ์แทรนเนส เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน โดยใช้อะซิโทไนไทรล์ความเข้มข้น 70% โดยปริมาตรเป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที 98

สัญลักษณ์และคำย่อ

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