

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) (อ้างโดยมุกดา, 2524)

คาร์โบไฮเดรต เป็นสารชีวโมเลกุลที่เป็นสารประกอบอินทรีย์ ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญสำหรับสิ่งมีชีวิต ประกอบด้วยธาตุ 3 ชนิด คือ C H และ O และมีคุณสมบัติทางเคมีเป็นอนุพันธ์ (derivative) ของ aldehyde หรือ ketone ของ alcohol ที่มีหมู่ -OH (hydroxy group) มากกว่า 1 หมู่ เรียกว่า polyhydroxy aldehyde หรือ polyhydroxy ketone โดยมีสูตรโครงสร้างหลักคือ $(CH_2O)_n$

ชนิดของคาร์โบไฮเดรต คาร์โบไฮเดรตแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ

- Simple carbohydrate หมายถึง คาร์โบไฮเดรตที่ไม่มีสารชนิดอื่นประกอบอยู่ในโมเลกุล สามารถแบ่งออกได้เป็น

1. Monosaccharides
2. Disaccharides
3. Oligosaccharides
4. Polysaccharides

- Complex carbohydrate หมายถึง คาร์โบไฮเดรตที่มีสารชนิดอื่น ซึ่งอาจจะเป็นโปรตีน ไขมัน หรือกรดนิวคลีอิก ประกอบอยู่ในโมเลกุล

รายละเอียดที่จะกล่าวถึงในส่วนที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยในครั้งนี้ มีดังนี้

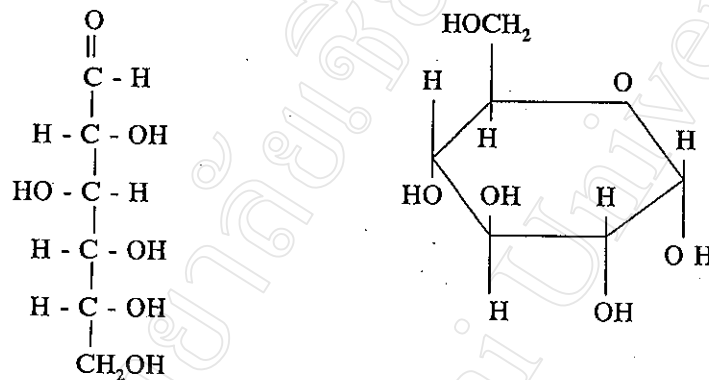
Monosaccharides

monosaccharides คือ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เป็นหน่วยเล็กที่สุดของคาร์โบไฮเดรต และมีสูตรโครงสร้างพื้นฐาน (empirical formula) คือ $(CH_2O)_n$ ($n=3$ ขึ้นไป) ทำให้แบ่ง monosaccharides ออกได้ตามจำนวนของคาร์บอนอะตอม (C) ในโมเลกุล ซึ่งตามธรรมชาติจะพบตั้งแต่ 3-7 C นอกจากนี้ยังแยกชนิดของ monosaccharides ตาม functional group ของน้ำตาล ถ้าเป็น aldehyde เรียก aldoses ถ้าเป็น ketone เรียก ketoses ดังตัวอย่าง

	Aldose	ketose
Hexose ($C_6H_{12}O_6$)	Glucose	Fructose
Pentose ($C_5H_{10}O_5$)	Ribose	Ribulose

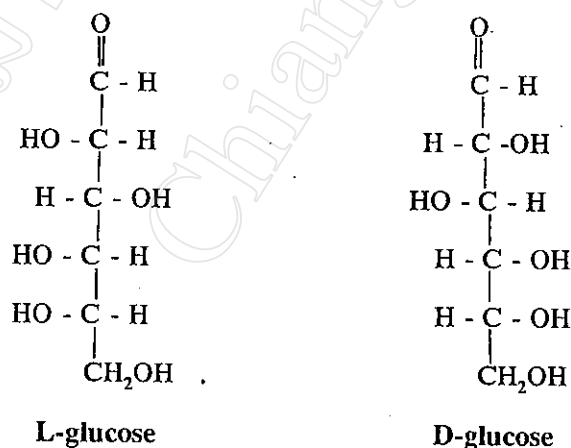
คุณสมบัติที่สำคัญของ monosaccharides

1. โครงสร้าง monosaccharides ที่มี 3 และ 4 คาร์บอนอะตอมจะมีโครงสร้างเป็นเส้นตรง (straight chain) ส่วนพวกที่มี 5 และ 6 คาร์บอนอะตอมพบว่ามีโครงสร้าง 2 แบบ คือ แบบเส้นตรงและแบบวงแหวน (cyclic structure) ลักษณะโครงสร้างของโมเลกุลมีความสำคัญต่อการแสดงคุณสมบัติทางเคมีและความเสถียร ดังภาพ 1



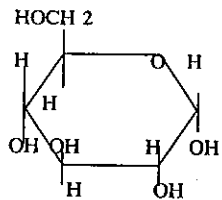
ภาพ 1 โครงสร้างของ glucose แบบเส้นตรงและแบบวงแหวน

2. D และ L isomer เกิดจากการจัดเรียงตัวของ -H และ -OH ที่คาร์บอนอะตอม ซึ่งติดกับคาร์บอนอะตอมตัวสุดท้ายที่มี primary alcohol (terminal primary alcohol carbon) ถ้าหมู่ -OH อยู่ทางขวามือ เรียกว่าเป็น D-isomer แต่ถ้าอยู่ทางซ้ายมือ เรียกว่าเป็น L-isomer ดังภาพ 2

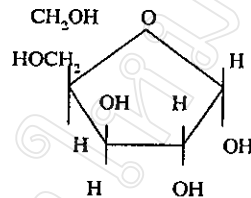


ภาพ 2 โครงสร้าง D และ L-isomer ของ glucose

3. Pyranose และ Furanose ring structure เกิดจากการจัดตัวของโมเลกุลเป็นรูป 6 เหลี่ยม (pyranose) หรือ 5 เหลี่ยม (furanose) เช่น glucose ในสารละลายพบว่า อยู่ในรูปของ pyranose มากกว่า 99 % ที่เหลือจึงเป็น furanose ดังภาพ 3



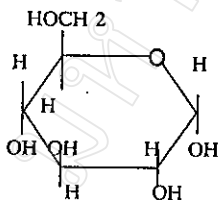
D-glucopyranose



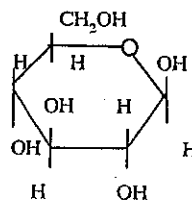
D-glucofuranose

ภาพ 3 โครงสร้าง pyranose และ furanose form ของ glucose

4. α และ β anomers เนื่องจากโครงสร้างวงแหวนของน้ำตาล aldose หรือ ketose เกิดจากการรวมตัวของหมู่ aldehyde หรือ ketone กับหมู่ -OH ทำให้เกิด isomerism ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ซึ่งเรียกว่า carbonyl โดยเกิดจากการจัดตัวของ -H และ -OH ถ้าหมู่ -OH อยู่ด้านล่างของระนาบของวงแหวน เรียกว่าเป็น α -anomer ถ้าอยู่ด้านบนเรียกว่าเป็น β -anomer ดังภาพ 4



α -D-glucopyranose



β -D-glucopyranose

ภาพ 4 โครงสร้าง α และ β anomer ของ glucose

Oligosaccharides

Oligosaccharides ประกอบด้วย monosaccharides ตั้งแต่ 2-6 โมเลกุลขึ้นไปต่อกันด้วย glycosidic linkage ถ้า monosaccharides เป็นชนิดเดียวกันทั้งหมด จะทำให้ได้ homooligosaccharides แต่ถ้ามีมากกว่า 1 ชนิด จะทำให้ได้ heterooligosaccharides

Polysaccharides

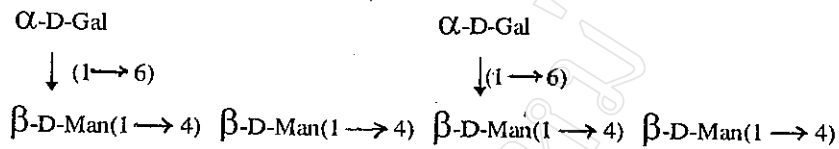
Polysaccharides ประกอบด้วย monosaccharides มากกว่า 6 โมเลกุลขึ้นไปต่อกันด้วย glycosidic linkage ซึ่ง monosaccharides เหล่านี้อาจต่อกันเป็นเส้นตรง (linear) หรือมีกิ่งก้านสาขาออกไป (branched) และถ้า monosaccharides เป็นชนิดเดียวกันทั้งหมดจะทำให้ได้ homopolysaccharides แต่ถ้ามีมากกว่า 1 ชนิด จะทำให้ได้ heteropolysaccharides

2. mannans (Roehrig, 1984)

mannans เป็น polysaccharides ที่ประกอบด้วย mannose จำนวนมากกว่า 6 โมเลกุล ในธรรมชาติ mannans ที่ไม่มีสารชนิดอื่นประกอบอยู่ในโมเลกุลหาได้ยากมาก ส่วนมากจะอยู่รวมกับสารประกอบอื่น เช่น galactomannans และ glucomannans เป็นต้น ลักษณะโครงสร้างของ mannans จะประกอบด้วย mannose ที่มีการจัดเรียงตัวของ -H และ -OH ที่คาร์บอนอะตอมที่อยู่ติดกับคาร์บอนอะตอมตัวสุดท้ายที่มี primary alcohol โดยหมู่ -OH อยู่ทางขวามือ เรียกเป็น D-mannose mannans ซึ่งเป็น polysaccharides ส่วนมากจะพบว่า มีการจัดตัวของโมเลกุลเป็นรูป 6 เหลี่ยม ซึ่งพบว่าเป็นชนิด α -D-manopyranose หรือ β -D-mannopyranose ก็ได้ ตัวอย่างเช่น *Rhodotorula glutinis* ซึ่งผลิต exocellular mannan มีโครงสร้างของ mannans ที่จัดตัวแบบ β -D-Man p-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Man p-(1 $\rightarrow$ 4) - อธิบายได้ว่า β -D-manopyranosyl จะเกิด glycosidic bond ที่ตำแหน่ง 1 กับ 3 และ ตำแหน่ง 1 กับ 4 ของ β -D-mannopyranosyl

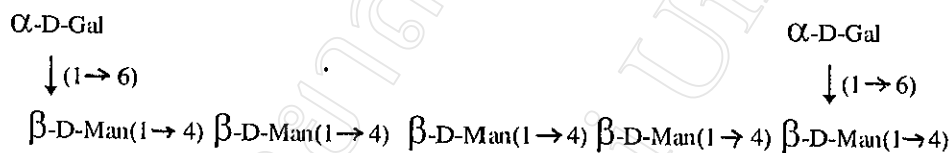
galactomannans เป็น heteropolysaccharides ที่ประกอบด้วย galactose และ mannose ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับแหล่งผลิตของ galactomannans ยกตัวอย่างเช่น guar มีอัตราส่วนของ Gal และ Man เป็น 1 : 2 ในขณะที่ locust bean gum จาก carob มีอัตราส่วนของ Gal และ Man เป็น 1 : 3 ถึง 1 : 6 เป็นต้น โครงสร้างของ galactomannans จาก guar gum ประกอบด้วยการจัดเรียงตัวเป็นเส้นตรงของ β -D-mannopyranosyl ต่อกันตรงตำแหน่ง 1 กับ 4 และมี side chain คือ α -D-galactopyranosyl ตำแหน่งที่ 6 ต่อกันตรงตำแหน่งที่ 1

ของ β -D-mannopyranosyl ดังภาพ 5



ภาพ 5 โครงสร้างของ guar gum (Roehrig, 1984)

การศึกษาในครั้งนี้ได้ใช้ locust bean gum เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งเป็น galactomannan โดยมีลักษณะโครงสร้างประกอบด้วย mannose เป็น back bone และ galactose เป็น side chain ดังภาพ 6



ภาพ 6 โครงสร้างของ locust bean gum (Roehrig, 1984)

แหล่งของ mannans

แหล่งของ mannans ที่พบอยู่ทั่วไปจัดแบ่งออกได้ตามแหล่งที่พบ คือ จากยีสต์ และจากพืช ซึ่งแสดงตัวอย่างที่สำรวจพบดังนี้

1. ยีสต์ที่ผลิต mannans ได้แก่

ชนิดของยีสต์	ชนิดของยีสต์
<i>Brettanomyces anomalus</i>	<i>Pichia farinosa</i>
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	<i>Pichia ohmeri</i>
<i>Brettanomyces dublinensis</i>	<i>Pichia pastoris</i>

ชนิดของยีสต์	ชนิดของยีสต์
<i>Brettanomyces lambicus</i>	<i>Pichia toletana</i>
<i>Candida lusitaniae</i>	<i>Pichia vanriji</i>
<i>Candida obtusa</i>	<i>Saccharomyces lodderi</i>
<i>Citeromyces matritensis</i>	<i>Saccharomyces microelliposdes</i>
<i>Debaryomyces castellii</i>	<i>Saccharomyces pretoriensis</i>
<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Saccharomyces rosei</i>
<i>Debaryomyces kloeckeri</i>	<i>Saccharomyces vafer</i>
<i>Debaryomyces phaffii</i>	<i>Schwanniomyces alluvius</i>
<i>Debaryomyces subglobosus</i>	<i>Schwanniomyces castellii</i>
<i>Hanseniaspora osmophila</i>	<i>Torulopsis colliculosa</i>
<i>Kloeckera africana</i>	<i>Trichosporon aculeatum</i>
<i>Kloeckera magna</i>	

2 พืชที่สร้าง mannans ได้ แยกตามส่วนประกอบของ mannans ที่พบในพืช คือ

2.1 Galactomannans พบมากใน *Ceratonia siliqua* (carob), เมล็ดกาแฟ (coffee bean)

ได้แก่ *Ceratonia siliqua* (carob), *Cyamopsis tetragonolobus* (guar), *Genista scoparia*, *Gleditschia ferox*, *Leucaena glauca*, *Medicago sativa* (lucerne), *Sesbania grandiflora* และถั่วเหลือง, ถั่วลันเตา (soybean) เช่น *Trifolium pratense* (red clover), *Trigonella foenum-graecum*

2.2 Glucomannans พบมากในบุก (konjac) เช่น *Amorphophallus konjac* รากพืชตระกูลหอม (arum root) ได้แก่ หน่อไม้ฝรั่ง (*Asparagus officinalis*), *Eremurus fuscus*, *E. regelii*, *E. spectabilis*, *Phaseolus aureus*, *Picea abies* (Norwegian spruce), สน เช่น *Pinus banksiana* (jack pine) และ *P. strobus*, *Tubera salep* (salep orchid)

2.3 (1→4) β -D-Mannans พบใน corozo เช่น *Orchis maculata*, *Phoenix canariensis*, *Phytelephas macrocarpa* (ivory nut) และ *Tubera salep*

3. เอนไซม์ที่สลาย mannans

Jokoby & Loening (1972) ได้กำหนดชื่อเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลาย mannans ได้ 2 ชนิด คือ endo-1, 4- β -mannanase (EC 3.2.1.78) และ exo-1,2-1,3- α -mannosidase (EC 3.2.1.77) จากการศึกษาใช้สับสเตรท เป็น locust bean gum ซึ่งมี galactose (α -D-Gal) และ mannose (β -D-Man-(1 $\rightarrow$ 4) เป็นองค์ประกอบ ดังนั้นเอนไซม์ที่สามารถใช้ locust bean gum เป็นสับสเตรทได้ คือ endo-1, 4- β -mannanase (EC 3.2.1.78) ซึ่งเป็นปฏิกิริยา hydrolysis ตรงตำแหน่ง 1,4- β -mannosidic linkages ของสับสเตรท

Endo-1,4- β - mannanase (EC 3.2.1.78)

การเรียกชื่อเอนไซม์ตามหลักของ International Union of Biochemistry (IUB) มี 2 ชื่อ ได้แก่ recommended name เรียก endo-1,4- β -mannanase (EC 3.2.1.78) และชื่อ systematic name เรียก 1,4, β -D-Mannan-mannohydrolase (EC 3.2.1.78) โดยแต่เดิมซึ่งยังไม่มีชื่อ การใช้ IUB-system (1956) เอนไซม์ที่ศึกษาตัวนี้ มีชื่อ trival name เรียก β -mannanase ซึ่งอธิบายถึงสับสเตรท ได้แก่ mannans และชนิดของปฏิกิริยา คือ hydrolysis

Endo-1, 4- β -mannanase (EC 3.2.1.78) สามารถอธิบายความหมายของเอนไซม์โดยจำแนกตาม IUB-system ได้ดังนี้

หมายเลข 3 หมายถึง ชนิดของปฏิกิริยา คือ hydrolysis เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการตัดพันธะระหว่างคาร์บอนกับอะตอมของสารอื่นโดยใช้น้ำ

หมายเลข 2 หมายถึง หมู่ที่เกิดการเปลี่ยนแปลง ได้แก่ glycosyl compound

หมายเลข 1 หมายถึง ชนิดของหมู่ไกลโคซิด ได้แก่ O-glycosyl

หมายเลข 78 หมายถึง Endo-1, 4- β -mannanase

4. แหล่งผลิต endo-1, 4- β - D-mannanase (EC 3.2.1.78)

สามารถพบเอนไซม์ชนิดนี้ได้จากแหล่งต่าง ๆ ดังนี้ จากพืช เช่น เมล็ดถั่ว (legume) และ guar (McCleary, 1979;1983) จากแบคทีเรีย เช่น *Bacillus subtilis* (Ratto & Poutanen, 1988) และจากเชื้อรา เช่น *Penicillium purpurogenum* (Park, et al., 1987) และ *Sporotrichum cellulophilum* (Araujo & Ward, 1991) เป็นต้น

ได้จำแนกแหล่งผลิต β -D-mannanase (EC 3.2.1.78) ได้เป็น 3 แหล่ง คือ

1. แหล่งผลิตเอนไซม์จากแบคทีเรีย ได้แก่

Aerobacter mannanolyticus, *Bacillus aroideae*, *B. mesentericus*, *B. subtilis*, *B. subtilis* var. *amylosacchariticus* และจาก rumen bacteria ได้แก่ *Streptococcus* sp.

2. แหล่งผลิตเอนไซม์จากเชื้อรา ได้แก่

2.1 ราทั่วไป *Aspergillus awamori*, *A. fumigatus*, *A. giganteus*, *A. luchuensis*, *A. nidulans*, *A. niger* van Tieghem, *A. oryzae*, *A. phoenicis*, *A. wentii*, *Botryosphaeria ribis*, *Botrytis cinerea*, *Chaetomium globosum*, *Cephalosporium* sp., *Chrysosporium lignorum*, *Cladosarum olivaceum*, *Collybia velutipes*, *Coniophora cerebella*, *Epicoccum yuccae*, *Fomes annosus*, *F. igniarius*, *F. marginatus*, *Fusarium culmorum*, *F. oxysporum*, *Fusicoccum* sp., *Gelatinosporium* sp., *Gloeophyllum sepiarium*, *Lenzites saepiaria*, *Memnoniella echinata*, *Merulius silvester*, *Myrothecium roridum*, *M. verrucaria*, *Paecilomyces varioti*, *Penicillium chrysogenum*, *P. expansum*, *P. funiculosum*, *P. isariiiforme*, *P. notatum*, *P. ochro-chloron*, *P. paxillus*, *P. piscarii*, *P. verrucosum*, *P. wortmanni*, *Phellinus igniarius*, *Polyporus betulinus*, *P. schweinitzii*, *Puccinia graminis* var. *tritici*, *Rhizopus niveus*, *R. tritici*, *Schizophyllum commune*, *Sclerotium rolfsii*, *Sporotrichum pruinosum*, *Stereum sanguinolentum*, *Trametes versicolor*, *Trichoderma viride*, *Trichurus spiralis*

2.2 Mycorrhiza fungi เช่น *Amanita muscaria*, *Leccinum scabrum*, *Suillus bovinus*, *S. luteus* และ *Xerocomus badius*

3. แหล่งผลิตเอนไซม์จากพืช

3.1 พืชบนบก พวกหัว เช่น บุก *Amorphophallus konjac*, *Asparagus officinalis*, และเมล็ดต่างๆ (barley seed) ได้แก่ *Cyamopsis tetragonolobus*, *Leucacna glauca*, *Medicago sativa*, *Phoenix dactylifera*, *Trigonella foenum-graecum* และ *Vicia sativa*

3.2 พืชในทะเล ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสาหร่าย (marine algae) เช่น *Cladophora rupestris*, *Laminaria digitata*, *Rhodomenia palmata* และ *Ulva lactuca*

4. แหล่งผลิตเอนไซม์จากสัตว์

ส่วนใหญ่จะพบในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (animals invertebrates) ได้แก่ *Astacus fluviatilis* Fabr., *Helix pomatia*, *Homarus vulgaris* M-E, *Gypsoma ceriana*,

Melasoma populi, *Melolontha vulgaris* (Hanneton), *Polyphylla fullo*, *Rhagium inquisitor*, และ *Sciapteron tabaniformis*

5. การศึกษาเกี่ยวกับ mannanase

ได้มีผู้ศึกษาคุณลักษณะบางประการของ mannanase จากแหล่งผลิตเอนไซม์ที่แตกต่างกัน ดังนี้

5.1 Mannanase ที่ผลิตจากเชื้อรา มีผู้ทำการศึกษาดังต่อไปนี้

Civas et al. (1984) ได้ศึกษาการผลิต glycosidases ใน *Aspergillus tamarii* พบว่า เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ 2 ชนิด ได้แก่ α -D-galactosidase (EC 3.2.1.22) และ β -D-mannanase (EC 3.2.1.78) โดย β -D-mannanase มีคุณสมบัติเป็น glycoprotein ที่ประกอบด้วย N-acetylglucosamine, mannose และ galactose ในอัตราส่วน 1 : 13 : 18 ตามลำดับ

Park et al. (1987) ได้ศึกษาคุณสมบัติบางประการของ β -mannanase จาก *Penicillium purpurogenum* พบว่า มวลโมเลกุลของเอนไซม์เท่ากับ 57,000 และองค์ประกอบทางเคมีของเอนไซม์ ได้แก่ glycine > serine > glutamic acid > alanine > aspartic acid ตามลำดับ pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ เท่ากับ 5.0 และ 70 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

Araujo & Ward (1989) ได้ศึกษาคุณสมบัติของ mannanase จาก *Thielavia terrestris* สายพันธุ์ NRRL 8162 อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง จะประกอบด้วย (g/l) ; KH_2PO_4 2, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3, trace metal solution 1 ml, locust bean gum 5, NaNO_3 2, corn steep solid 1 และ Potato extract 10 % (v/v) ผลการทดลองพบว่า มีการผลิต mannanase จำนวน 4 ตัว และ β -mannanase โดย mannanase มีประสิทธิภาพการทำงานเป็น 28.2, 38.7, 52.8 และ 4.17 (U/mg) ตามลำดับ ค่า pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 4.5-5.5 β -mannosidase มีค่าน้ำหนักแห้ง ซึ่งวัดจาก SDS-PAGE เท่ากับ 72,000 ส่วน mannanase มีค่าน้ำหนักแห้งเท่ากับ 52,000, 30,000, 55,000 และ 89,000 ตามลำดับ ปริมาณเปอร์เซ็นต์ของคาร์โบไฮเดรตในเอนไซม์อยู่ในช่วง 6-36 %

Araujo & Ward (1990) ได้ศึกษา mannanase จาก *Aspergillus niger* NRRL 337, *Thielavia terrestris* NRRL 8126 และ ATCC 26917, *Thermoascus aurantiacus* ATCC 26904 และ ATCC 28082, *Sporotrichum cellulophilum* ATCC 20493, *Talaromyces byssochlamydoides* NRRL 3658, *Talaromyces emersonii* NRRL 3221 และ NRRL 18080 จากผลการทดลองพบว่า

pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของ mannanase อยู่ในช่วง 5.0-6.6 *Talaromyces* sp. สามารถผลิต mannanase ได้มากเมื่อใช้เปปโตน เป็นแหล่งไนโตรเจน และเชื้อราทุกตัวใช้ locust bean gum เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด

Araujo & Ward (1991) ได้ศึกษาคุณสมบัติของ mannanase จากเชื้อรา *Sporotrichum cellulophilum* สายพันธุ์ ATCC 20493 เมื่อนำเอนไซม์มาทำให้บริสุทธิ์แล้ว ศึกษาพบว่า M_1 และ M_2 มีค่าน้ำหนักแห้งเท่ากับ 108,000 ถึง 112,000 และ 322,000 ถึง 360,000 ตามลำดับ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ M_1 และ M_2 คือ 5.5 และ 6 ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส M_1 , M_2 มีความเสถียรของเอนไซม์เป็น 30 และ 9 นาที ตามลำดับ

Stalbrand et al. (1993) ได้ศึกษาคุณสมบัติของ β -mannanase 2 ชนิด ที่ผลิตจาก *Trichoderma reesei* พบว่า เอนไซม์ 2 ชนิด สามารถย่อย ivorynut mannan ได้เป็น mannotriose และ mannobiose มีค่า specific activity เท่ากับ 1,860 และ 1,430 nkat mg^{-1} ตามลำดับ ค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองชนิดเท่ากับ 3.5 ถึง 4.0

Zeilinger et al. (1993) ได้ศึกษาคุณสมบัติของ β -galactosidase ที่ผลิตโดย *Trichoderma reesei* พบว่าเมื่อใช้ locust bean gum เป็นสับสเตรท เชื้อราสามารถผลิต α -galactosidase โดยมีการทำงานของเอนไซม์สูงสุดที่ pH 4.0 และอุณหภูมิ 66 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อราสามารถผลิต β -mannanase ได้ด้วย

Christgau et al. (1994) ได้ศึกษาคุณสมบัติของ β -1, 4-mannanase ที่ได้จาก การทำ recombinant ยีนของเชื้อรา *Aspergillus aculeatus* พบว่า recombinant ยีน ของ *A. aculeatus* มีการผลิต recombinant enzyme ได้ค่ามวลโมเลกุลเท่ากับ 45 kDa. การทำงานของเอนไซม์สูงสุดที่ pH 5.0 และอุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส

Stalbrand et al. (1995) ได้นำ recombinant ยีนที่ผลิต β -mannanase จาก *Trichoderma reesei* ผ่านสู่ host คือ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่า β -mannanase ที่ผลิตได้จาก recombinant ยีน โดยมี host เป็น *Saccharomyces cerevisiae* ประกอบด้วย amino acid จำนวน 40 ตัว และพบว่า ยีน Man 1 มีการผลิต β -mannanase ได้ 2 ตัวที่มีค่า isoelectric point ต่างกันเท่ากับ 4.6 และ 5.4 ตามลำดับ

Maijala et al. (1995) ได้ศึกษาการผลิต Hemicellulolytic จากเชื้อก่อโรค *Heterobasidion annosum* สายพันธุ์ P และ S พบว่า เชื้อราทั้งสองพันธุ์สามารถใช้เซลลูโลสและ xylan เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต xylanases, mannanase, endoglucanases และ α -galactosidases

การใช้ glucose เป็นแหล่งคาร์บอนจะทำให้การทำงานของเอนไซม์ลดลง

คุณสมบัติของเอนไซม์ที่ผลิตได้โดยเชื้อรา สรุปได้ดังนี้ β -D-mannanase ที่ผลิตได้จากเชื้อราจะย่อยสลาย D-mannans ได้เป็น manno-oligosaccharides และ mixed-D-mannose oligosaccharides จะพบ D-galactose รวมได้ถ้าแหล่งคาร์บอนเป็น galactomannan หรือ D-glucose ถ้าใช้ glucomannan เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นต้น สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ จะมีค่า pH ก่อนไปทางกรด และอุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส เอนไซม์ที่บริสุทธิ์มีองค์ประกอบทางเคมี ประกอบด้วย amino acid หลายชนิด เช่น glycine, serine, glutamic acid และ alanine ในอัตราส่วนแตกต่างกัน

5.2 Mannanase ที่ผลิตจากแบคทีเรีย ได้มีผู้ทำการศึกษาดังต่อไปนี้

Tian et al (1993) ได้ศึกษาคุณสมบัติของ β -mannanases จาก *Bacillus* N16-5 ที่เจริญในอาหารที่เป็นด่าง (alkalophilic) จากการศึกษาพบว่า เชื้อแบคทีเรียสามารถผลิต β -mannanase ได้ M_1 , M_2 และ M_3 มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 51,000, 38,000 และ 34,700 ตามลำดับ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของ M_1 , M_2 เท่ากับ 9.0 ส่วน M_3 มี pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 10.0 β -mannanase M_1 สามารถย่อยสลาย นูก ได้เป็น mono-, di-, tri- และ tetra-saccharides

Oda et al. (1993) ได้ศึกษาการผลิต β -mannanase และ β -mannosidase โดย *Enterococcus casseliflavus* FL 2121 จากกากนูก (konjac) การศึกษาพบว่า สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียจาก กากของ นูก ที่ทับถมกันนาน ที่สามารถผลิต mannanase และ β mannosidase ได้ โดยใช้ mannan และ manno oligosaccharides เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ ตามลำดับแบคทีเรียสามารถผลิต β -mannanase ได้ดี ในช่วงเวลาการเพาะเลี้ยงตั้งแต่ 24 ชั่วโมงจนถึง 72 ชั่วโมง ส่วนการผลิต β -mannosidase สามารถผลิตได้ดีในช่วงเวลาการเพาะเลี้ยง 8 ชั่วโมง เมื่อนำเอนไซม์มาทำให้บริสุทธิ์พบว่า β -mannanase มีสภาวะเหมาะสมต่อการทำงานที่ pH และอุณหภูมิเท่ากับ 6.0 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ การเติม AgNO_3 , HgCl_2 , EDTA และ N-bromosuccinimide จะมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ส่วน CoCl_2 และ MnCl_2 ให้ผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เล็กน้อย β -mannanase จัดเป็น endo-type β -mannanase

Araki et al. (1992) ได้ศึกษาการผลิต β -1, 4-mannanases จากแบคทีเรียที่อาศัยในน้ำทะเล *Vibrio* spp. MA-129 และ MA-138 จากการศึกษาพบว่า สามารถแยกเชื้อ

แบคทีเรียที่ผลิต β -1, 4-mannanases ได้จากน้ำทะเล แบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีเมื่อใช้ Konjac powder เป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับสายพันธุ์ MA-138 สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดี เมื่อใช้ mannose เป็นแหล่งคาร์บอน สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์นี้คือ เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง ค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์มีเท่ากับ 7.0 - 7.5

Mendozy et al. (1994) ได้ศึกษาการแยกเชื้อแบคทีเรียและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต mannanase จากการศึกษพบว่า *Bacillus subtilis* NM-39 เป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถใช้แมนแนนจากแหล่งคาร์บอนที่เป็น กากมะพร้าว และ locust bean gum ได้ อาหารเหลวเพื่อผลิต mannanase ได้สูงสุด ประกอบด้วย (w/v) ของกากมะพร้าว 1 กรัม เป็นแหล่งคาร์บอน และ ถั่วเหลืองป่น 1 กรัม เป็นแหล่งไนโตรเจนต่อปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร ปรับ pH 7.0 เลี้ยงในสภาวะที่มีออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 ชั่วโมง

Mendoza et al. (1994) ได้ศึกษาคุณสมบัติของ mannanase ที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* จากการศึกษพบว่า แบคทีเรียที่แยกได้จากดินของประเทศฟิลิปปินส์สามารถผลิต mannanase ได้ โดยสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ pH 5.0 และอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส มีความเสถียรของเอนไซม์ที่ pH 4-9 และอุณหภูมิต่ำกว่า 55 องศาเซลเซียส มี amino acid เป็นส่วนประกอบของเอนไซม์คือ Gly > Glx > Ser > Asx > Ala

Abe et al. (1994) ได้ศึกษาการแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต β -mannanase จากการศึกษพบว่า แบคทีเรียที่สร้าง β -mannanase ซึ่งแยกได้จากดิน ใช้ copra meal เป็นแหล่งของคาร์บอน ให้ผลิตภัณฑ์ที่เป็น manobiose, mannotriose และ mannotetrose

Tamaru et al. (1995) ได้ศึกษาคุณสมบัติของ extracellular β -1, 4-mannanase จากแบคทีเรียในน้ำทะเล *Vibrio* sp. strain 014-138 จากการศึกษพบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ ได้แก่ pH 6.5 และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

คุณสมบัติของเอนไซม์ที่ผลิตได้โดยแบคทีเรีย สรุปได้ดังนี้ แบคทีเรียที่สามารถผลิต mannanase ได้ส่วนมาก ให้เอนไซม์ที่เป็นชนิด endo-enzyme มีความสามารถในการย่อย D-galacto- และ D-gluco- D-mannans ให้กลายเป็น D-mannose, D-manno-oligosaccharides และ mixed-oligosaccharides ได้ สภาวะเหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ มีค่า pH เป็นกลาง อาจค่อนข้างไปทางกรดเล็กน้อย และอุณหภูมิอยู่ในช่วง 40 ถึง 57 องศาเซลเซียส

5.3 Mannanase ที่ผลิตจากพืช มีผู้ทำการศึกษาดังนี้

McCleary & Matheson (1974) ได้ทำการศึกษา โครงสร้างของ galactomannan และ การทำงานของ β -mannanase และ β -mannosidase ในเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว (legume) จากการศึกษาพบว่า การทำงานของ β -mannanase จะลดลง เมื่อ galactomannan ขาด กลไก β -mannanase จะทำงานลดลงเมื่อมี galactose เพิ่มมากขึ้น แหล่งที่พบ β -mannanase พบมากใน ส่วน endosperm และ cotyledon ของ เอ็มบริโอ

McCleary (1983) ได้ทำการศึกษาการย่อยสลาย galactomannan จาก guar โดย exo- β -mannanase จากการศึกษาพบว่า มีเอนไซม์ 3 ชนิด ที่ย่อยสลาย galactomannan จาก เมล็ดอ่อนของ guar คือ α -galactosidase, β -mannanase และ exo- β -mannanase การเติม cycloheximide จะมีผลยับยั้งการทำงานของ α -galactosidase และ β -mannanase

Wozniowski et al. (1993) ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติของ endo- β -mannanase จากบริเวณเหง้าของ *Lilium testaceum* พบว่า ขณะที่เมล็ด *L. testaceum* เจริญจะมีการ สะสมของ glucomannan ซึ่งเมื่อเอนไซม์ทำงาน จะย่อยสลาย glucomannan ได้เป็น glucose และ mannose ในอัตราส่วน 7 : 3 นอกจากนั้นยังพบว่ามีการทำงานของเอนไซม์ตัวอื่นร่วมด้วย ได้แก่ α -amylase, α -glucosidase β -mannosidase β -glucosidase และ endo- β -mannanase โดยสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของ β -mannanase คือที่ pH และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

คุณสมบัติของเอนไซม์ที่ผลิตได้จากพืช สรุปได้ดังนี้ พืชสามารถผลิต mannanase จากส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น จากเมล็ด (seed) หรือจาก endosperm เป็นต้น ซึ่งทำให้ การผลิตเอนไซม์ได้แตกต่างกันในส่วนต่าง ๆ ของพืชดังกล่าว

6. ประโยชน์ของ mannanase

Mannanase เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการย่อยสลายพวก hemicellulose ซึ่งมีมาก ในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร และอุตสาหกรรมการเกษตร เช่น อุตสาหกรรมแปรรูปไม้ อุตสาหกรรม สีข้าว และอุตสาหกรรมกระดาษ เป็นต้น ซึ่งนอกจากจะมี cellulose แล้วยังพบว่ามี mannans และ galactomannans ซึ่งเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญรวมอยู่ด้วย การนำเอนไซม์ เหลือทิ้งทางการเกษตร และอุตสาหกรรมการเกษตรมาใช้ เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิต

mannanase ในระดับอุตสาหกรรมได้ นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาของ mannanase ยังนำไปใช้ประโยชน์ในการสังเคราะห์ Oligosaccharides เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยา อุตสาหกรรมการผลิตกระดาษ เป็นต้น ซึ่งในที่นี้จะขอกล่าวถึงการสังเคราะห์ Oligosaccharides และประโยชน์ที่มีต่อมนุษย์ ดังนี้

การสังเคราะห์ Oligosaccharides

การสังเคราะห์ Oligosaccharides โดยเอนไซม์มี 2 วิธี คือ การสังเคราะห์โดยปฏิกิริยาย้อนกลับการสลายน้ำ และการสังเคราะห์โดยปฏิกิริยาโยกย้ายหมู่ ไกลโคซิล ซึ่งอธิบายได้ดังต่อไปนี้

1. การสังเคราะห์โดยปฏิกิริยาย้อนกลับการสลายน้ำ (Equilibrium controlled synthesis)

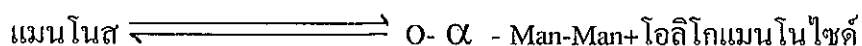
ในกรณีทั่วไป ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสจะเกิดจาก glycosidase เร่งปฏิกิริยาการสลายโอลิโกแซคคาไรด์เป็นโมโนแซคคาไรด์ อย่างไรก็ตาม การควบคุมสมดุลของปฏิกิริยาให้เกิดปฏิกิริยาย้อนกลับการสลายน้ำ สามารถทำได้โดยใช้ สับสเตรทที่มีความเข้มข้นสูง ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ ตัวอย่างการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ โดยใช้ α -mannosidase เร่งปฏิกิริยาย้อนกลับการสลายน้ำจากแมนโนส

ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส



ปฏิกิริยาการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ เมื่อมีสับสเตรทความเข้มข้นสูง

α - manosidase



2. การสังเคราะห์โดยปฏิกิริยาโยกย้ายหมู่ไกลโคซิล (Kinetically controlled synthesis)

การสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ โดยปฏิกิริยาโยกย้ายหมู่ไกลโคซิลโดย glycosidase ซึ่งมี mannanase รวมอยู่ในเอนไซม์กลุ่มนี้ด้วย จะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเคลื่อนย้ายหมู่ไกลโคซิลจากตัวให้ไปยังตัวรับ ปฏิกิริยาทั่วไปของการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ สามารถแสดงได้ดังนี้



เมื่อ DOR' หมายถึง ตัวให้หมู่ไกลโคซิล

D หมายถึง โมโนแซคคาไรด์

R หมายถึง หมู่สารอินทรีย์

ROH หมายถึง ตัวรับหมู่ไกลโคซิล

การสังเคราะห์ในลักษณะนี้ เอนไซม์สามารถจับกับตัวให้ได้ดี ดังนั้นจึงใช้เอนไซม์น้อย แต่ให้ผลผลิตที่เป็นโอลิโกแซคคาไรด์จำนวนมาก แต่โอลิโกแซคคาไรด์ที่เกิดขึ้นนี้สามารถเป็นตัวให้ได้เช่นเดียวกัน ดังนั้นในการผลิตต้องพยายามแยกผลิตภัณฑ์ที่ได้ออกมาตลอดเพื่อไม่ให้เกิดปฏิกิริยาย้อนกลับ ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้ จึงขึ้นกับ ปริมาณสับสเตรทที่เป็นตัวให้และตัวรับไกลโคซิล ถ้ามีตัวให้น้อย และมีตัวรับเหลืออยู่มาก ผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้อาจทำหน้าที่เป็นตัวให้ หมู่ไกลโคซิลได้ด้วย ทำให้ผลิตภัณฑ์ลดลง นอกจากนี้ปริมาณผลิตภัณฑ์ยังขึ้นกับอุณหภูมิที่ใช้ในการสังเคราะห์ การลดอุณหภูมิจาก 50 องศาเซลเซียส เป็น 4 องศาเซลเซียส ได้ปริมาณไดแซคคาไรด์เพิ่มขึ้นจาก 33 เปอร์เซ็นต์ เป็น 47 เปอร์เซ็นต์ (Nilsson, 1988)

ความสำคัญของ Oligosaccharides

Oligosaccharides มีประโยชน์ต่อมนุษย์เราโดยเฉพาะทางด้านการแพทย์ดังนี้ คือ

การที่ Oligosaccharides มีความสามารถจับตัวกับสารอื่นเกิดเป็น glycoconjugated oligosaccharides ขึ้น เช่น จับกับโปรตีน หรือ ไขมัน ได้เป็น glycoprotein และ glycolipid ตามลำดับ glycoconjugated oligosaccharides พบเป็นตำแหน่งย่อยบน antigen ที่กระตุ้นระบบ

ภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดย antigen เหล่านี้ได้แก่ ไวรัส แบคทีเรีย สารพิษจากแบคทีเรียและเนื้องอก เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่า ในหมู่เลือด A B O ต่างกัน มี oligosaccharides ซึ่งเป็น องค์ประกอบของ glycolipid ในเนื้อเยื่อเซลล์ต่างกัน ทำให้สามารถแบ่งแยกหมู่เลือด A B O ออกจากกันได้เป็น หมู่เลือด A, B, AB, และ O เป็นต้น ในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายที่สร้างขึ้นมา (Antibody) เป็น glycoprotein ที่มี mannose เป็นองค์ประกอบ มีความสำคัญในการตรวจวินิจฉัยเนื้อร้าย (carcinoma) โดยมีส่วนสัมพันธ์กับการตรวจพบ antibody ที่ร่างกายสร้างต่อต้าน

จากการศึกษาของ Nielsen *et al.* (1995) โดยการตรวจระดับ opsonin ในซีรัมของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV-1 โดย mannan-binding protein (MBP) จากการทดลองพบว่า ระดับ MBP ในซีรัมของผู้ป่วยติดเชื้อ HIV จำนวน 80 ราย แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ ระดับสูง ระดับกลาง และระดับต่ำ โดยพบว่า อัตราตายของผู้ป่วยในแต่ละกลุ่มเป็น 14, 12 และ 6 คน ตามลำดับ

การนำไปใช้ในอุตสาหกรรม

เอนไซม์ส่วนใหญ่ที่ได้จากกระบวนการหมักเป็นชนิดที่ชักนำให้เกิดได้ (inducible) เอนไซม์จะถูกสร้างขึ้นก็ต่อเมื่อมีสารที่เป็นตัวชักนำ (inducer) อยู่ด้วย inducer ส่วนใหญ่ ก็คือ สับสเตรทของเอนไซมนั้นเอง หรือสารที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับสับสเตรท ดังนั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์จะต้องมี inducer เป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย เช่น การใช้ mannan เป็น inducer เพื่อเพิ่มผลผลิตของ streptomycin โดยที่ในช่วงการหมักจะมีการสร้าง streptomycin และ mannosidostreptomycin โดยที่สารตัวหลังนี้มีประสิทธิภาพเพียง 20 % ของ streptomycin ในการผลิต จึงหาวิธีเปลี่ยน mannosidostreptomycin ให้เป็น streptomycin โดยการใส่ mannans จากยีสต์ ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ แมนแนนจะชักนำเชื้อที่ใช้ในการผลิตคือ *Streptomyces griseus* ให้สร้าง α -mannosidases ซึ่งจะเปลี่ยน mannosidostreptomycin ให้เป็น streptomycin (อ้างโดย กำเนิด, 2534)

ความสำคัญทางด้านอุตสาหกรรม พบว่า มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมต่าง ๆ หลายประเภท ได้แก่ อุตสาหกรรมกระดาษ มีการนำเอา gum arabic มาใช้เป็นตัวช่วยยึด (adhesive) ในการทำ wall paper หรือ gum tape เป็นต้น อุตสาหกรรมสิ่งทอมีการนำเอา gum karaya และ biogum มาใช้ในการย้อมสี (dyeing) และอุตสาหกรรมทางการเกษตร เช่น นำเอา xanthan gum, CMC มาผสมร่วมกับสารเคมีเพื่อให้มีความหนืด ในสารฆ่าแมลง เป็นต้น อุตสาหกรรมอาหาร มีการนำเอา pectin, agar จาก xanthan gum ร่วมกับ locust bean gum และ carrageenan มาเตรียม

ทำเป็น gel เพื่อเติมลงในผลิตภัณฑ์สำหรับการบริโภคให้มีความนุ่ม เหนียว และคงตัวอยู่เสมอ เป็นต้น

จากการศึกษาของ Arcand et al. (1993) ได้ศึกษาการผลิต β -mannanase จาก *Streptomyces lividans* 66 โดยวิธีการนำเอาชิ้นที่มีการสร้าง β -mannanase (manA) มาทำ recombinant ยีน ได้เป็น *Streptomyces lividans* IAF 36 นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว ที่มี galactomannan เป็นแหล่งคาร์บอน เอนไซม์มีการทำงานสูงสุดที่ pH และอุณหภูมิเท่ากับ 6.8 และ 58 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ได้ค่า specific activity เท่ากับ 876 i.u./mg. ของโปรตีน การศึกษาด้านพันธุวิศวกรรมดังกล่าว เป็นการปรับปรุงสายพันธุ์ให้ได้สายพันธุ์ที่มีการผลิตเอนไซม์และการทำงานของเอนไซม์อย่างมีประสิทธิภาพสูงเพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในงานอุตสาหกรรมการผลิตยาปฏิชีวนะต่อไปในอนาคต

7. การศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับเชื้อราที่สามารถผลิต mannanases

การศึกษาเกี่ยวกับเชื้อราที่สามารถผลิต mannanases ได้มีผู้สนใจทำการ ศึกษาเรื่องดังกล่าว ซึ่งเกี่ยวกับงานวิจัยในครั้งนี้ ดังต่อไปนี้

ดวงเนตร (2533) ได้ทำการแยกและคัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิต mannanases จากดิน และเชื้อราจากห้องปฏิบัติการชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ทำการเพิ่มปริมาณเชื้อราจากตัวอย่างดิน 2 ครั้ง โดยใช้อาหารเหลวเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณ (enrichment media : EM) เหย้าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นเพาะเชื้อลงในอาหารเพื่อผลิต mannanase (cultivation media : CM) โดยใช้ locust bean gum เป็นสับสเตรท เหย้าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน นำไปเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที เก็บส่วนใสที่เป็น crude enzyme มาวัดการทำงานของ mannanase โดยใช้ locust bean gum เป็นสับสเตรท บ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที พบว่าเชื้อราที่แยกได้จากดิน บริเวณผาลาด จ.เชียงใหม่ ซึ่งเป็นไอโซเลต PL มีการทำงานของเอนไซม์และ specific activity สูงสุดเท่ากับ 0.778 U และ 4.3161 U/mg ตามลำดับ จากการหาระยะเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิต mannanase ของเชื้อราไอโซเลต PL พบว่า เวลาและอุณหภูมิเหมาะสมต่อการเพาะ

เลี้ยงของไอโซเลต PL คือ 3 วันและ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยมีการทำงานของเอนไซม์ และ specific activity เท่ากับ 1.5850 U และ 6.48118 U/mg ตามลำดับ

Civas *et al.* (1984) ได้ศึกษาการสร้าง glycosidase จาก *Aspergillus tamaris* เติบโตอาหารเหลว CM ดังนี้ ชั่ง white-clover galactomannan น้ำหนัก 1 กรัม ต่อปริมาณอาหาร 1000 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวด Roux ปริมาณ 125 มิลลิลิตร นำหัวเชื้อที่เป็น suspension ของเชื้อราปริมาณ 1 มิลลิลิตร เติมนลงในอาหารเหลว CM เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน นำน้ำเลี้ยงเชื้อรากรองด้วยผ้าขาวบางแยกส่วนที่เป็นเส้นใยของเชื้อราออก ได้เป็น crude enzyme วิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ โดยวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Somogyi-Nelson โดยเตรียม reaction mixture ที่ประกอบด้วย crude enzyme 100 ไมโครลิตร (μ l) กลูโคสแมนแนน (0.1% (w/v) 100 ไมโครลิตร และบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที วัดค่าโปรตีนของเอนไซม์ Sedmak & Grossberg ซึ่งใช้ coomassie brilliant blue G-250 (CBB) เปรียบเทียบค่ากับกราฟโปรตีนมาตรฐานของ bovine albumin จากการทดลองพบว่าเชื้อราสามารถสร้าง β -D-mannanase ได้ การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ พบว่าที่ pH 4.5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ สับสเตรทคือ galactomannan จาก trifolium repens ให้ค่าการทำงานของเอนไซม์สูงสุด โลหะไอออน Co^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ag^+ และ Hg^{2+} ไม่มีผลยับยั้งการทำงานของ β -D-mannanase.

Ratto & Poutanen (1988) ได้ศึกษาการสร้าง mannanase จาก *Aspergillus awamori* VTT-D-75028 และ *Trichoderma reesei* GM 9414 เติบโตอาหารเหลว CM ประกอบด้วย (g/l) ของ KH_2PO_4 15 ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 ; distillers' spent grain 20 ; wheatbran 30 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi & Nelson เตรียม reaction mixture ประกอบด้วย crude enzyme 0.5 มิลลิลิตร, 0.05 M sodium citrate buffer pH 5.5 0.5 มิลลิลิตร และ 0.5% ของ locust bean gum 0.5 มิลลิลิตร บ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ผลการทดลองพบว่า เชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถผลิต β -mannanase, β -mannosidase และ α -galactosidase ได้

Park *et al.* (1987) ได้ศึกษาคุณสมบัติบางประการของ β -mannanase จาก *Penicillium*

purpurogenum No.618 เตรียม brown copra meal (BCM) ซึ่งประกอบด้วย mannose, galactose, glucose, arabinose และ xylose เป็นแหล่งคาร์บอนในอัตรา 66, 5.8, 22.5, 4.0 และ 17% ตามลำดับ ทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ โดยผ่าน DEAE-cellulose column chromatography 2 ครั้งและ Gel filtration บน Ultro-gel AcA 44 ผลการศึกษาโดยวิธี SDS polyacrylamide gel Electrophoresis พบว่า β -mannanase มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 5700 มีค่า isoelectric point เท่ากับ 4.1 β -mannanase ประกอบด้วย glycine > serine > glutamic acid เอนไซม์มีความเสถียรที่ pH และอุณหภูมิเท่ากับ 4.5 ถึง 8.0 และ 65 องศาเซลเซียส ตามลำดับ การเติมโลหะไอออนไม่มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ mannanase สามารถย่อย copra galactomannan (Gal : Man เท่ากับ 1 : 14) ได้เป็น mannose, manno-oligosaccharides และ mixed oligosaccharides (galactomanno-oligosaccharide) ที่ประกอบด้วย galactose และ mannose การที่ mannanase สามารถย่อย manno-oligosaccharides ที่เป็น mannotriose และ mannotetraose ได้เป็น mannose และ mannobiose จึงมีชื่อเรียกเอนไซม์ว่า endo- β -D-mannanase (EC 3.2.1.78)

Araujo & Ward (1989) ได้ศึกษาคูณสมบัติของ mannanase จาก *Thielavia terrestris* NRRL 8162 เตรียมอาหารเหลว CM ประกอบด้วย (g/l) ของ KH_2PO_4 2, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3, trace solution 1 มิลลิลิตร, locust bean gum 5, NaNO_3 2, corn steep solids 1 และ (v/v) ของ 10% potato extract pH 5.0 เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว CM เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส 2 ครั้ง คือ 36 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ นำน้ำเลี้ยงเชื้อมาเหวี่ยงที่ 10,000 xg เป็นเวลา 10 นาที ได้เป็น crude enzyme วัดการทำงานของเอนไซม์จากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี dinitrosalicylic acid ของ Miller เตรียม reaction mixture ประกอบด้วย 1% ของ galactomannan 0.5 มิลลิลิตร ใน 0.1 M Na-acetate buffer pH 5.6 และ crude enzyme 0.5 มิลลิลิตร บ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ประกอบด้วย mannanase 4 ชนิด และ β -mannosidase มวลโมเลกุลของ β -mannosidase ซึ่งวัดจาก SDS-PAGE มีค่าเท่ากับ 52,000, 30,000, 55,000 และ 89,000 ตามลำดับ พบปริมาณของคาร์โบไฮเดรตในเอนไซม์อยู่ในช่วง 6-36%

Araujo & Ward (1990) ได้คัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิต mannanase และ galactanase จำนวน 8 สายพันธุ์ ได้แก่ *Aspergillus niger* NRRL 337, *Thielavia terrestris* NRRL 8126 และ

ATCC 26917, *Thermoascus aurantiacus* ATCC 26904 และ ATCC 28082 และ *Sporotrichum cellulophilum* ATCC 20493 นำเชื้อ *A.niger* และ *T.terrestris* เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง *T.aurantiacus*, *S.cellulophilum* และ *Talaromyces spp.* เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมงเตรียมอาหารเหลว EM ประกอบด้วย (g/l) ของ locust bean gum, 5 ; NaNO_3 , 2 ; corn steep solids, 1 ; potato extract, 20% (w/v) ; KH_2PO_4 , 2 ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.3 ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.3 ; และ trace metal solution 1 ml (v/v) สำหรับอาหารเหลว CM จะใช้ (g/l) ของ locust bean gum , 10 เป็นแหล่งคาร์บอน pH 5.5 ใส่อาหารเหลว EM และ CM ประมาณ 50 มิลลิลิตรแบ่งแยกกลงใส่ขวดรูปชมพู่ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

การเตรียมหัวเชื้อทำได้โดยใช้ cork borer เจาะบริเวณ mycelial ของเชื้อที่เจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ขนาด 1 cm² เติมลงในอาหารเหลว EM เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมง นำหัวเชื้อที่ได้ปริมาณ 2 มิลลิลิตร เติมลงในอาหารเหลว CM เพาะเลี้ยงต่อเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ทำการเก็บเอนไซม์โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อรามาเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง 10,000 xg เป็นเวลา 10 นาที เก็บ crude enzyme เพื่อทดสอบการทำงานของเอนไซม์วัดหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี dinitrosalicylic acid ของ Miller ผลการศึกษา พบว่า *T.byssochlamydoides* NRRL 3658 และ *T. emersonii* NRRL 3221 เป็นเชื้อราที่มีการทำงานของ mannanase สูงสุด คือ 52.4 และ 43.1 U ตามลำดับ

นำเชื้อรา 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *T.byssochlamydoides* NRRL 3658 และ *T. emersonii* NRRL 3221 *Thielavia terrestris* NRRL 8126, *Thermoascus aurantiacus* ATCC 26904, *S. cellulophilum* ATCC 20493 และ *A.niger* NRRL 337 ทำการทดสอบดังต่อไปนี้ การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิต mannanase และ β -mannanase พบว่า แมนโนส และ locust bean gum เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมของ *T.aurantiacus* และ เชื้อราอีก 5 สายพันธุ์ ตามลำดับ เปปโตन เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมของ *T.emersonii*, *T.byssochlamydoides* และ *A.niger* ส่วน *T. terrestris* และ *T.aurantiacus* มีแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ โซเดียมไนเตรท pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของ mannanase อยู่ในช่วง 5.0-6.0 ยกเว้น *A.niger* จะมีค่า pH เท่ากับ 3-2 mannanase จาก *T.emersonii* และ *A.niger* มีความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง

Araujo & Ward (1991) ศึกษาการสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลาย galactomannan จาก

Sporotrichum cellulophilum เตรียมอาหารเหลว EM ประกอบด้วย (g/l) ของ NaNO_3 , 2 ; KH_2PO_4 , 2 ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.3 ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.3 ; trace metal solution 1 ml (v/v) locust bean gum, 5 ; potato extract, 5 ml (v/v) ; corn steep solids, 0.1 ; และ yeast extract, 1 pH 5.5 นำสปอร์ของเชื้อรา มาเพาะเลี้ยงลงบนอาหารเหลว EM ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเอาหัวเชื้อปริมาณ 5 มิลลิลิตร เติมลงในอาหารเหลว CM เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บเอนไซม์โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อรามาเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง 1000 xg เป็นเวลา 10 นาที ทำการวัดน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี dinitrosalicylic acid ของ Miller และวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry ใช้สับสเตรทคือ locust bean gum เพื่อทดสอบการทำงานของ mannanase การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ทำให้ได้ mannanase 2 ตัวคือ M_1 และ M_2 โดยค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของ M_1 และ M_2 เท่ากับ 5.5 และ 6.0 ตามลำดับ โดยมีความเสถียรของ M_1 และ M_2 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่ามีการสร้างเอนไซม์ β -mannosidase และ α -galactosidase ร่วมด้วย