

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

จากการทดลอง ศึกษาการแยกและคัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิต mannanase จากธรรมชาติ จำนวน 50 ตัวอย่าง พบเชื้อราที่สามารถผลิต mannanase ได้ 27 ไอโซเลต โดยแบ่งเป็น ไอโซเลตที่สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จำนวน 10 ไอโซเลต ได้แก่ ตัวอย่างดินจากสวนลั่นทม อ.พริ้ว 2 ตัวอย่าง จากสวนรุกขชาติ 2 ตัวอย่าง จากสวนสัตว์เชียงใหม่ 2 ตัวอย่าง จากศาลาอ่างแก้ว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 1 ตัวอย่าง จากสวนสัก มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 2 ตัวอย่าง และจากอุทยานกล้วยไม้ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ 1 ตัวอย่าง โดยมีค่าการทำงานของเอนไซม์ตั้งแต่ 0.080 ถึง 0.781 U และ specific activity ตั้งแต่ 3.810 ถึง 27.214 U/mg ไอโซเลตที่สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ได้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จำนวน 17 ไอโซเลต ได้แก่ ตัวอย่างดินจากน้ำตกผาลาด คอยสุเทพ 1 ตัวอย่าง จากสวนรุกขชาติ 3 ตัวอย่าง จากศาลาอ่างแก้ว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 1 ตัวอย่าง จากน้ำตกห้วยแก้ว 2 ตัวอย่าง จากถ้ำฤๅษี คอยสุเทพ 3 ตัวอย่าง จากสวนสนคอยสุเทพ 2 ตัวอย่าง จากผาเงิบคอยสุเทพ 2 ตัวอย่าง และจากสวนสัตว์เชียงใหม่ 3 ตัวอย่าง โดยมีค่าการทำงานของเอนไซม์ตั้งแต่ 0.027 ถึง 3.311 U และ specific activity ตั้งแต่ 0.871 ถึง 97.382 U/mg

เชื้อราที่สามารถผลิต mannanase พบจากตัวอย่างดินซึ่งเป็นแหล่งที่มีจุลินทรีย์ปริมาณมาก เลือกศึกษาเชื้อราเพื่อผลิต mannanase ได้สูงซึ่งมีค่าการทำงานของเอนไซม์ เท่ากับ 3.311 U ที่แยกได้จากดินบริเวณน้ำตกผาลาด คอยสุเทพ ซึ่งเป็นไอโซเลต KM-1 เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถเจริญเติบโตเต็มจานอาหาร บนอาหาร PDA ภายใน 8 วัน ดังการศึกษาของ Hashimoto & Fukumoto, 1969 (อ้างโดย Araujo & Ward, 1990) พบว่า *Rhizopus niveus* เป็นเชื้อราประเภท mesophile สามารถผลิต mannanase และจากการศึกษาของ Gubitz et al., 1996 พบว่า *Sclerotium rolfsii* ซึ่งเป็น mesophilic fungi สามารถผลิต mannanase ได้เช่นกัน

เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา พบว่าเป็นเชื้อรา *Talaromyces* sp. ซึ่งจากรายงานพบว่า สามารถผลิต mannanase ได้ Araujo & Ward, 1990 ; 1991 ได้ศึกษาการผลิต mannanase จาก *Talaromyces byssochlamydoides* และ *Talaromyces emersonii* โดยพบว่า *Talaromyces* spp. ทั้งสองสายพันธุ์ สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งแตกต่างจาก

Talaromyces sp. ที่ได้คัดเลือกซึ่งมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 27 ถึง 37 องศาเซลเซียส และเชื้อราไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 ถึง 50 องศาเซลเซียส ดังนั้น *Talaromyces* sp. KM-1 จึงเป็นเชื้อราพวก Mesophilic fungi ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 25-35 องศาเซลเซียส (Deacon, 1984) เชื้อราสามารถเจริญได้ตั้งแต่ pH 4.0 ถึง 8.0 โดย pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 5.0 ถึง 6.0 ซึ่งเหมือนกับ *T. byssochlamydoides* และ *T. emersonii* ที่สามารถเจริญได้ดี ที่ pH 5.5 (Araujo & Ward, 1990)

จากผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต mannanase โดย *Talaromyces* sp. KM-1 โดยเปรียบเทียบกับผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต mannanase โดย *T. byssochlamydoides* และ *T. emersonii* (Araujo & Ward, 1990) พบว่าผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิต mannanase โดยมีแหล่งคาร์บอนที่เป็น โมโนแซคคาไรด์ โพลีแซคคาไรด์และอินทรีย์คาร์บอน พบว่า locust bean gum และ แป้งบุกญี่ปุ่น เหมาะสมที่จะนำมาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิต mannanase โดยเชื้อราสามารถใช้ locust bean gum เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด (Araujo & Ward, 1990) แหล่งคาร์บอนอื่น ที่เชื้อราสามารถผลิตและมีการทำงานของเอนไซม์ได้น้อย คือ แมนโนส สำหรับแหล่งคาร์บอนที่เชื้อราไม่สามารถผลิตเอนไซม์ได้เลย ได้แก่ แป้งละลายน้ำได้ แป้งข้าวเหนียว แป้งมันสำปะหลัง แป้งบุกเมืองกาญจน์ บุกจากเพชรบูรณ์ และกลูโคส สาเหตุที่ locust bean gum และ แป้งบุกญี่ปุ่น เชื้อราสามารถนำไปใช้ได้ดีเป็นเพราะมีลักษณะ โครงสร้างเป็นแบบ manno oligosaccharides ซึ่งเชื้อราที่ผลิต mannanase จะสามารถย่อยสลายและนำไปใช้ได้ง่ายกว่า เมื่อทำการกระจายความเข้มข้นของ locust bean gum ตั้งแต่ 0 ถึง 3 % พบว่า ที่ความเข้มข้นของ locust bean gum 3 % ไม่มีการผลิตและการทำงานของเอนไซม์เลย เนื่องจากความเข้มข้นมากเกินไปทำให้อาหารหนืด มีการกระจายของออกซิเจนได้น้อย จึงทำให้เชื้อราไม่สามารถเจริญได้ สำหรับที่ความเข้มข้น 0 ถึง 1.5 % ของ locust bean gum พบว่า locust bean gum 1.5 % เหมาะสมต่อการผลิตและการทำงานของเอนไซม์มากที่สุด การผลิตและการทำงานของเอนไซม์จะลดลงจาก 8.889 เป็น 2.844 U ที่ความเข้มข้นมากกว่า 1.5 ถึง 2.5 % จากการศึกษา pH ของอาหารเหลวเพื่อผลิตเอนไซม์ พบว่า ที่ pH 5.5, 6 และ 6.5 มีการผลิตและการทำงานของเอนไซม์สูง มีค่าเท่ากับ 6.505, 6.283 และ 5.100 U ตามลำดับ ดังการศึกษาผลของ pH ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิต mannanase ใน *Talaromyces byssochlamydoides* NRRL 3658 และ *T. emersonii* NRRL 3221 (Araujo & Ward, 1990) จากการศึกษาแหล่งของไนโตรเจนต่อการผลิต mannanase พบว่า การใช้ corn steep solids 0.1 % ร่วมกับ NaNO_3 0.2 % มีผลต่อการผลิตเอนไซม์มากที่สุด ทำให้มีการทำงานของเอนไซม์สูง

ถึง 3.811 U ของเอนไซม์ ส่วน 0.2 % yeast extract มีการทำงานของเอนไซม์รองลงมา เท่ากับ 1.722 U จากการศึกษาผลของ corn steep solids กับ NaNO_3 ต่อการผลิต mannanase พบว่า ไม่มีการผลิตและการทำงานของเอนไซม์ในแหล่งไนโตรเจนที่เป็น NaNO_3 และชุดควบคุมซึ่งไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน การเติม 0.1 % corn steep solids ร่วมกับ 0.2 % NaNO_3 ให้ผลการผลิตและการทำงานของเอนไซม์สูงสุด มีค่าเท่ากับ 6.950 U โดยแตกต่างจากการศึกษาของ Araujo & Ward, 1990 ซึ่งพบว่า *T. byssochlamydoides* และ *T. emersonii* สามารถใช้ เปปโตเนเป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด

จากการศึกษาผลของปริมาณหัวเชื้อต่อการผลิต mannanase พบว่า ที่ปริมาณหัวเชื้อ 2 มิลลิลิตร เหมาะสมต่อการผลิตและการทำงานของเอนไซม์มากที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 2.911 U หรือ 145.550 U/mg สำหรับที่ปริมาณหัวเชื้อ 3, 4 และ 5 มิลลิลิตร สามารถให้ผลการผลิตและการทำงานของเอนไซม์ได้ดีเช่นกัน เลือกใช้ปริมาณหัวเชื้อ 2 มิลลิลิตร ทำให้ค่าของการผลิตและการทำงานของเอนไซม์สูงสุด สามารถประหยัดต้นทุนในการผลิตโดยสามารถใช้ปริมาณหัวเชื้ออย่างเหมาะสม ผลการศึกษาคือความเป็นกรด ต่าง ต่อการทำงานของ mannanase พบว่าที่ acetate buffer ความเข้มข้น 0.1 M pH 5.5 ให้ผลการทำงานของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 6.572 U หรือ 312.952 U/mg ซึ่งเอนไซม์ส่วนมากจะมี optimum pH อยู่ในช่วงที่เป็นกลางหรือเป็นกรดเล็กน้อย และพบว่า pH activity curve เป็นรูปประฆังคว่ำดังการศึกษาอิทธิพลของ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของ mannanase ใน *Talaromyces emersonii* และ *T. byssochlamydoides* มีค่าเท่ากับ 6.0 และ 6.6 ตามลำดับ (Araujo & Ward, 1990) จากการศึกษาผลของระยะเวลาต่อการทำงานของเอนไซม์ พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์มากที่สุดเท่ากับ 15 นาที ให้ค่าการทำงานของเอนไซม์ 9.126 U หรือ 434.562 U/mg เลือกใช้ระยะเวลาทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่เร็วที่สุดคือ 15 นาที และให้ค่าการทำงานของเอนไซม์สูงสุด จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของ mannanase พบว่าเมื่อ อุณหภูมิเพิ่มจนถึงจุด ๆ หนึ่ง ซึ่งเรียกว่า transitional temperature หรือ optimum temperature เอนไซม์จะทำงานได้ดีที่สุด และถ้าอุณหภูมิสูงกว่านี้แล้วการทำงานของเอนไซม์จะลดลง เนื่องจากเอนไซม์ถูกทำให้เสียสภาพธรรมชาติ (denature) มีโครงสร้างเปลี่ยนไป (อ้างโดย วิบูลย์, 2535) ดังนั้นค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ 55 องศาเซลเซียส มีค่าการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 2.855 U หรือ 142.750 U/mg ดังการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการทำงานของ mannanase ใน *T. byssochlamydoides* และ *T. emersonii* (Araujo & Ward, 1990) พบว่า *T. byssochlamydoides* และ

T. emersonii มีความเสถียรของเอนไซม์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 55 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ จากการศึกษาผลของระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมแบ่งออกได้เป็น 4 ช่วง คือ ระยะ lag phase ซึ่งเป็นระยะเริ่มต้นการเจริญของเชื้อต่อมาเชื้อจะมีการเจริญและเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็วเรียก ระยะ exponential phase หรือ logarithmic growth และเมื่ออาหารเริ่มจำกัดการเจริญของเชื้อจะไม่เพิ่มปริมาณเรียก ระยะ deceleration และจะคงที่อยู่ที่ช่วงระยะ เรียกระยะ stationary phase เมื่ออาหารเริ่มขาดแคลนปริมาณออกซิเจนลดลงและมีการสร้างสารพิษขึ้นมา การเจริญของเชื้อราที่จะเข้าสู่ระยะ autolysis โดยจะพบว่าเชื้อจุลินทรีย์จะมีการสร้างผลิตภัณฑ์หรือ secondary metabolite ในระยะของ deceleration เข้าสู่ระยะ stationary phase จากผลการทดลองพบว่า ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์คือ 48 ชั่วโมง ซึ่งเหมือนกับระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์ ใน *T. byssochlamydoidea* และ *T. emersonii* (Araujo & Ward, 1990) โดยพบว่าเชื้อราที่มีการผลิตและการทำงานของเอนไซม์สูงสุด มีค่าเท่ากับ 6.015 U หรือ 261.522 U/mg พบการเจริญของเส้นใยสีขาวปนเหลืองในอาหารเหลวเพื่อผลิตเอนไซม์ น้ำหนักแห้งของเชื้อราที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเชื้อราแตกต่างกันมีดังนี้ คือ ตั้งแต่เริ่มต้น 0 จนถึง 48 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 0.422 ถึง 0.492 กรัม และตั้งแต่เวลา 60 จนถึง 96 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 0.489 ถึง 0.477 กรัม จะพบว่าที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง มีการเจริญของเชื้อราดีที่สุด โดยมีค่าน้ำหนักแห้ง เท่ากับ 0.492 กรัม แต่เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับระยะเวลาในแต่ละช่วงของการเพาะเลี้ยงพบว่ามีค่าน้ำหนักแห้งที่แตกต่างกันเพียงเล็กน้อยที่เป็นเช่นนี้เพราะว่า ขณะที่ทำการกรองเชื้อราด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ไม่ได้ทำการล้างเอาอาหารเลี้ยงเชื้อที่ติดมากับเส้นใยของเชื้อราออก จึงเป็นผลให้อาหารเลี้ยงเชื้อติดมากับเส้นใยของเชื้อราด้วย

เนื่องจากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตและการทำงานของเอนไซม์ เพื่อให้ได้การทำงานของเอนไซม์สูงสุด ควรมีการทดลองหาปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อการผลิตและการทำงานของเอนไซม์อย่างสม่ำเสมอ เพื่อให้การผลิตเอนไซม์มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ควรมีการทดสอบหาผลของสารประกอบต่าง ๆ ต่อการทำงานของเอนไซม์ เช่น ZnSO_4 , NaF และ EDTA เป็นต้น เพราะมีสารประกอบบางชนิดที่มีผลในการเป็นตัวเร่งการทำงานของเอนไซม์ ทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เพิ่มมากขึ้น และยังมีสารประกอบบางตัวที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ เช่น sulfonamide การศึกษาในด้านอื่นเช่น ศึกษา glycosidase ชนิดอื่นที่ปนอยู่ในเอนไซม์ที่สกัดได้นอกจากนี้ จาก mannanase ซึ่งตรวจสอบไปแล้ว เช่น α - galactosidase, α - mannosidase และ β - galactosidase เป็นต้น โดยการใช้สับสเตรตตัวอื่น เช่น gum arabic และ p - nitrophenol เป็นต้น

การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ (purification) จะช่วยให้สามารถแยกสกัดเอนไซม์ตัวอื่นที่มีอยู่ใน crude enzyme และสามารถศึกษาคุณสมบัติ ของเอนไซม์ดังกล่าวได้แก่ การศึกษาด้านมวลโมเลกุล การศึกษาผลของโลหะไอออนต่าง ๆ ต่อการทำงานของเอนไซม์ เป็นต้น การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ต่อปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ ความเป็นกรด ด่าง อุณหภูมิ และโลหะไอออน เป็นต้น ศึกษาการเก็บรักษาเอนไซม์ เพื่อสามารถเก็บเอนไซม์ได้นาน ๆ และยังคงประสิทธิภาพการทำงานสูง