

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

การแยกและความหลากหลายของ endophytic fungi จากไผ่

การทดสอบการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 5.25% โซเดียมไฮโปคลอไรด์ตัวอย่างกิ่งไผ่บงหนาม (*Bambusa burmanica*, BBU) พบว่าส่วนข้อและปล้องควรใช้เวลาแช่นาน 3-5 นาที เพราะหากไม่ได้ผ่านสารฆ่าเชื้อเลยหรือใช้เวลาแช่สารเพียง 1-2 นาที endophytic fungi ที่แยกได้มักมีการปนเปื้อนของแบคทีเรียเกือบ 100 % และมีเชื้อรากลุ่มที่พบปนเปื้อนในห้องปฏิบัติการทั่วไปเจริญคลุมโคนของเชื้อที่ต้องการ ทำให้ยากต่อการทำเชื้อให้บริสุทธิ์ สำหรับส่วนใบควรใช้เวลาในการแช่นาน 2 นาที

สามารถแยก endophytic fungi จากกิ่งไผ่ 13 ชนิด จำนวน 36 ดันในบริเวณมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ บริเวณต่างๆ ในอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย ได้แก่ น้ำตกมณฑาธาร จุดชมวิวกว๊านดอกม้า สวนสมุนไพรสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ และที่ทำการอุทยานดอยสุเทพ และจากหมู่บ้านหาดแพน จังหวัดพะเยา ได้เชื้อราทั้งสิ้น 636 ไอโซเลท ส่วนใหญ่แยกได้จากส่วนข้อ รองลงมาคือส่วนปล้อง สำหรับใบแยกเชื้อได้น้อยมาก เนื่องจากแผ่นใบไผ่มีลักษณะบางมาก ทำให้มีผิวสัมผัสต่อสารฆ่าเชื้อค่อนข้างมาก และอาจเป็นเพราะที่ส่วนใบมีจำนวน endophyte อาศัยอยู่น้อยกว่าส่วนข้อและปล้องอยู่แล้ว ซึ่งสอดคล้องกับคำกล่าวที่ว่า endophyte อยู่ในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของหญ้าคือ ใบใบมักพบในส่วนที่ต่ำกว่าแผ่นใบลงไป เช่น ก้านใบ นอกจากนี้ยังพบในส่วนลำต้น กิ่งก้าน รวมทั้งในเมล็ดด้วย (anonymous, 1999) ซึ่งบางส่วนคือ ก้านใบและเมล็ดไม่ได้ทำการทดลองในครั้งนี้ อย่างไรก็ตาม ใบไผ่ซึ่งจัดเป็นพืชตระกูลหญ้าแยกได้เชื้อจากส่วนใบได้น้อยกว่าในพืชใบเลี้ยงคู่และใบเลี้ยงเดี่ยวอื่นๆ ที่มีใบหนากว่า ซึ่งมักแยกได้เชื้อจากส่วนใบจำนวนมากเท่ากับส่วนอื่นๆ ของกิ่ง ดังที่ Fisher and Punithalingam (1993) ได้แยกจากเฟิร์น *Pteridium aquilinum* ซึ่งพบเชื้อ *Stagonospora pteridiicola* sp. nov. ทั่วไปในส่วนใบและก้านใบ แต่ไม่พบในส่วน rhizome เลย เป็นต้น นอกจากนี้จำนวนเชื้อที่แยกได้ยังอาจแปรผันไปตามฤดูกาลอีกด้วย ซึ่งเนื้อเยื่อส่วนใบหญ้ามักพบจำนวนมากในปลายฤดูร้อนและฤดูใบไม้ร่วง (anonymous, 1999) แต่ในการทดลองครั้งนี้ได้เก็บตัวอย่างกิ่งไผ่มาทำในฤดูฝนจึงทำให้แยกเชื้อจากส่วนใบได้น้อยดังกล่าวข้างต้น

เชื้อราที่พบในกิ่งไผ่บงหนาม (*Bambusa burmanica*, BBU) ที่ไม่ได้ฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์และที่แช่นานเพียง 1 นาทีมีจำนวนและชนิดมากกว่าเมื่อ treated นาน 2-20 นาที แต่น่าจะมีเชื้อปนเปื้อนซึ่งยังไม่ทราบแน่ชัดว่าเป็นชนิดใดรวมอยู่ด้วยจำนวนหนึ่ง หากแช่ไว้นานถึง

20 นาทีทำให้แยกเชื้อได้น้อยชนิดที่สุด ทั้งนี้เพราะเชื้อรา endophyte ชนิดที่ทนทานต่อสารฆ่าเชื้อ น่าจะมีเพียงน้อยชนิด และพบว่า *Phoma* spp. และ *Mycelia sterilia* (19 กลุ่ม) เป็นกลุ่มที่พบได้ในทุกชุดการทดลอง

เชื้อราในไผ่ในครั้งนี้พบว่า *Mycelia sterilia* มีความถี่และจำนวนสูงสุด (97 ไอโซเลต) พบได้ในไผ่ทุกชนิด รองลงมาคือ *Fusarium* spp. (72 ไอโซเลต) ซึ่งคาดว่าน่าจะมีหลายสปีชีส์ *Xylaria* spp. และ *Phoma* spp. พบจำนวนมากเป็นอันดับสาม (30-33 ไอโซเลต) ส่วนเชื้อที่ไม่สามารถระบุชื่อ No.1, No.2, และ *Colletotrichum* spp. พบจำนวนปานกลาง (16-18 ไอโซเลต) *Phomopsis* spp., *Cladosporium* sp., *Artrinium* sp. และ เชื้อที่ไม่สามารถระบุชื่อ No.3 พบในความถี่ค่อนข้างต่ำ (5-10 ไอโซเลต) และเชื้อที่พบเพียงเล็กน้อย (1-3 ไอโซเลต) ได้แก่ *Arthrographis* sp., *Aspergillus* sp., *Cephalosporium* sp., *Chaetabolisia* sp., *Curvularia* sp., *Drechslera* spp., *Harknessia* sp., *Helicoon* sp., *Nigrospora* sp., *Papularia* spp., *Penicillium* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Pithomyces* spp., *Syringospora* sp., *Xylariaceae* นอกจากนี้ยังพบเชื้อที่ไม่สามารถระบุชื่อได้ใน class *Hyphomycetes* จำนวน 3 กลุ่มย่อย *Coelomycetes* จำนวน 27 กลุ่มย่อย ซึ่งจะเห็นได้ว่าเชื้อที่พบเป็นส่วนใหญ่เคยมีรายงานว่าพบในพืชชนิดอื่นๆเช่นเดียวกัน โดยเฉพาะ *Mycelia sterilia*, *Xylaria* และ *Phomopsis* ที่อาจกล่าวได้ว่าเป็น endophytic fungi ที่พบได้ทั่วไปในพืชหลายชนิดด้วยความถี่ค่อนข้างสูง ตัวอย่างเช่น ต้น Norway spruce, *Salix fragilis* และ *Quercus ruber* (Sieber, 1989 ; 1991) *Euterpe oleracea* (Rodrigues, 1994) *Cassuarina equisetifolia* และ *Manikara bidentata* (Bayman, 1998) เป็นต้น สำหรับเชื้อรา *Mycelia sterilia* หากต้องการบ่งบอกชนิดก็ควรทำการกระตุ้นให้เชื้อสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์ อาจทำได้โดยกระตุ้นด้วยการเลี้ยงในอาหารสูตรเฉพาะที่เหมาะสม การฉาย UV ทุก 12 ชั่วโมงระยะเวลาหนึ่ง อย่างไรก็ตามจากประสบการณ์ที่เคยทำการทดลองมาพบว่าการกระตุ้นด้วยการฉาย UV ยังไม่สามารถทำให้เชื้อราสร้างสปอร์ได้

เมื่อเปรียบเทียบชนิดและจำนวนเชื้อที่พบในกิ่งไผ่รวก (*Thyrostachys siamensis*, TSI) ที่ได้จากต้นที่ขึ้นบนพื้นที่ที่มีความสูงจากระดับน้ำทะเลต่างกันพบว่า ต้นจากบริเวณมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (300 m) มีเชื้อราหลากหลายของมากที่สุด รองลงมาคือจากน้ำตกมณฑาธาร (<1000 m) แต่ในกิ่งไผ่จากต้นที่ขึ้นบริเวณที่ทำการอุทยานคอยสุเทพ (1000-1500 m) มีจำนวนและชนิดของเชื้อน้อยที่สุด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสภาพแวดล้อมและภูมิอากาศเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อชนิดและจำนวนของเชื้อราที่พบในพืชในพื้นที่ต่างๆ อย่างไรก็ตามพันธุกรรมของพืชแต่ละต้นและอายุของกิ่งที่นำมาทดลองอาจมีผลต่อชนิดและจำนวนของเชื้อได้ด้วยเช่นกัน หากจะให้ได้ผลการทดลองที่ถูกต้องยิ่งขึ้นในการศึกษาอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมนี้ อาจทำได้โดยการเพาะต้นกล้าจากเมล็ดพืชสายพันธุ์เดียวกันในพื้นที่ที่มีสภาพแวดล้อมแตกต่างกัน เลี้ยงให้โตแล้วเก็บตัวอย่างพืชมาแยกเชื้อเป็นระยะๆ

การคัดเลือก endophytic fungi ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโพลีแซคคาไรด์บางชนิดได้สูง

จากการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยโพลีแซคคาไรด์ 4 ชนิดคือ cellulase, inulinase, xylanase และ mannanase ของ endophytic fungi 12 ไอโซเลท โดยประยุกต์ใช้วิธี gel diffusion assay ของ Downie *et al.* (1994) ซึ่งเดิมใช้ในการตรวจวัดความสามารถในการผลิต mannanase จากแบคทีเรีย (ในปริมาณ 0.07 pkatal ถึง 14 nkatal) พบว่าวิธีนี้สามารถนำมาใช้ในการคัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิต mannanase ได้เช่นเดียวกัน เนื่องจากเมื่อนำเชื้อราไปเพาะในอาหารเหลวที่มี locust bean gum 1% แล้วนำไปทดสอบการผลิตเอนไซม์ด้วยวิธีดังกล่าวพบว่าให้วงใสชัดเจนบนหลุมในงาน phytagel ที่มี locust bean gum 1% (w/v) เป็น substrate และวงใสมีขนาดใหญ่มากกว่า 15 มิลลิเมตรเป็นส่วนใหญ่ (คิดเป็นจำนวน 58.33%) สำหรับ cellulase และ xylanase สามารถทดสอบด้วยวิธีนี้ได้เช่นเดียวกันแต่ควรใช้รุ่นแทน phytagel และเติม substrate นั้นๆลงไปด้วยในปริมาณ 1% (w/v) แต่วงใสที่ได้อาจไม่ชัดเจนเท่ากับการตรวจวัด mannanase ดังกล่าวข้างต้น และผลที่ได้อาจมีความผิดพลาดได้มากกว่าเนื่องจากสังเกตขอบเขตวงใสได้ยากกว่า แต่ inulinase เนื่องจากไม่พบวงใสเกิดขึ้นเลยทั้งนี้อาจเป็นเพราะเชื้อที่ใช้ทดสอบไม่สามารถผลิตเอนไซม์นี้ได้ หรือการตรวจวัดด้วยวิธีนี้ไม่เหมาะสม ดังนั้นหากต้องการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ควรวัดด้วยวิธีอื่น เช่น การเลี้ยงใน shake flask แล้ววัดค่าการทำงานของเอนไซม์ด้วยวิธี DNS method หรือวิธีอื่นๆที่เหมาะสมกว่า

เมื่อนำเชื้อรา endophyte จำนวน 226 ไอโซเลทมาตรวจการผลิต mannanase ด้วยวิธี gel diffusion method พบว่าเชื้อราส่วนใหญ่ให้วงใสขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 15 mm รองลงมาคือขนาด 1-14 และ 0 มิลลิเมตรตามลำดับ (คิดเป็นจำนวน 43.8%, 33.2%, และ 23% ตามลำดับ) จึงคัดเลือกตัวแทนจำนวน 5 ไอโซเลทที่ให้วงใสขนาด 22 mm ซึ่งคาดว่าจะผลิต mannanase ได้ดีไปหมักในอาหารเหลว cultivation medium บ่มไว้บนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง (28-30°C) เป็นเวลา 4 วัน พบว่าเชื้อราไอโซเลท GnCMU384 ผลิต mannanase ได้สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% (enzyme activity 4.27 U/ml, specific activity 22.16 U/mg) เชื้อราไอโซเลทนี้แยกได้จากส่วนข้อของกกไม้หกเครือ (*Gigantochloa nigro-ciliata* (Munro) Kurz) บริเวณน้ำตกมณฑลธารบนคอกยสุเทพ จังหวัดเชียงใหม่ เมื่อศึกษาคุณสมบัติต่างๆของเชื้อราไอโซเลทนี้พบว่าเจริญได้ดีบนอาหาร semisynthetic medium หลายชนิด ได้แก่ PDA, WA ที่ไรด้วยเมล็ดข้าวเหนียวลักษณะ, CMA และ LBA แต่บน CMA โคโลนีมีลักษณะบางมาก บนอาหาร MA with rose bengal เชื้อมีอัตราการเจริญต่ำสุดและโคโลนีมีลักษณะบางติดแน่นกับผิวหน้าอาหาร จากการศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์สามารถบ่งบอกได้ว่าเป็น *Fusarium*

การศึกษาสภาวะต่างๆที่เหมาะสมต่อการผลิต mannanase

จากการศึกษาสภาวะต่างๆที่เหมาะสมต่อการผลิต mannanase ใน shake flask พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมคือสูตรที่ 3 ซึ่งประกอบด้วย KH_2PO_4 0.2% (w/v), NaNO_3 0.2% (w/v), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03% (w/v), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.03% (w/v), trace metal solution 0.1% (v/v), corn steep solid 0.1% (w/v), locust bean gum 1.0% (w/v) pH 5.5 ทำให้ *Fusarium* sp. GnCMU384 ผลิต mannanase ได้สูงที่สุด (mannanase activity 4.88 U/ml, specific activity 12.60 U/mg) ซึ่งแต่เดิมสูตรนี้เป็นสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้ thermophilic fungi บางชนิดผลิต mannanase ได้ดีเช่นเดียวกัน (Araujo and Ward, 1990)

แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิต mannanase คือ locust bean gum ซึ่งเป็น galactomannan (enzyme activity 4.36 U/ml, specific activity 14.99 U/mg) ซึ่งเป็นสารที่เคยมีรายงานว่าเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อราอื่นเพื่อให้ผลิต mannanase ได้ปริมาณสูง เช่น *Talaromyces* sp. KM-1 (วรางคณา, 2539), *Mycelia sterile* No.120 (อนุวัฒน์, 2541), thermophilic fungi 7 ชนิด (Araujo and Ward, 1990) เป็นต้น สำหรับแป้งบุกซึ่งเป็น glucomannan แม้จะให้ค่าการทำงานของเอนไซม์เป็นอันดับรองลงมา (2.97 U/ml) แต่มีปริมาณโปรตีนมากกว่าถึงสองเท่า แหล่งคาร์บอนอื่นๆที่เป็น monosaccharide, disaccharide, และ polysaccharide คือ glucose, galactose, mannose, manitol, soluble starch, mannan จาก *Acacia variabilis*, mannan จาก *A. campanulatus*, แป้งข้าวเหนียว, แป้งข้าวเจ้า, ข้าวโพดป่น, และ Arabic gum สามารถชักนำให้เชื้อราผลิตเอนไซม์ได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น (enzyme activity 0.08-0.21 U/ml, specific activity 0.11-0.61 U/mg) ในทางตรงข้ามอาหารที่ไม่มีแหล่งคาร์บอนเลยก็ไม่สามารถชักนำให้เชื้อราผลิตเอนไซม์ได้

เมื่อศึกษาปริมาณ locust bean gum ที่เหมาะสมสำหรับเป็นแหล่งคาร์บอนคือ 3.0% (12.38 U/ml, specific activity 24.30 U/mg) แม้ว่าอาหารที่ปริมาณ locust bean gum 5.0% จะทำให้เชื้อราผลิต mannanase ได้สูงสุดแต่เอนไซม์ที่ได้มีปริมาณโปรตีนสูงเช่นกันจึงทำให้ specific activity ต่ำกว่า นอกจากนี้ยังพบว่าถ้าความเข้มข้นของ locust bean gum ยิ่งสูงเท่าไรอาหารยังมีความหนืดมากขึ้นเท่านั้น ดังนั้นในการเตรียมอาหารให้เป็นเนื้อเดียวกันต้องเตรียมสารละลายอื่นที่เป็นส่วนผสมก่อนแล้วจึงค่อยๆเติม locust bean gum ขณะคนอย่างสม่ำเสมอด้วย magnetic stirrer นอกจากนี้ยังอาจกล่าวได้ว่าอาหารที่มีความหนืดมากจะทำให้เชื้อได้รับอากาศลดลงซึ่งมีผลเสียต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของเชื้อราได้

แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิต mannanase ของเชื้อราคือ peptone (9.81 U/ml) รองลงมาคือ NaNO_3 ที่มี 0.1% corn steep solid และ beef extract ซึ่งทำให้เชื้อราผลิต

เอนไซม์ในปริมาณไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้น 95% แต่ NaNO_3 ที่มี corn steep solid 0.1% (w/v) ด้วยนั้นแม้ว่าจะทำให้เชื้อผลิตเอนไซม์ได้มากกว่าเมื่อมี NaNO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียวแต่เอนไซม์ที่ได้ก็มีปริมาณโปรตีนสูงมากด้วยเช่นเดียวกัน ส่วน organic nitrogen และ inorganic nitrogen อื่นๆคือ yeast extract, soy bean powder, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และ casein ทำให้เชื้อผลิตเอนไซม์ได้มากกว่าอาหารที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจนและอาหารที่มี urea เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงเล็กน้อยเท่านั้น และพบว่าเมื่อใช้ peptone 0.9% เป็นแหล่งไนโตรเจนทำให้เชื้อราผลิต mannanase ได้สูงสุด 12.05 U/ml

ระดับ pH เริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมที่ทำให้เชื้อราผลิต mannanase ได้สูงสุด (mannanase activity 12.67 U/ml, specific activity 16.08 U/mg) คือ pH ที่เป็นกลางเท่ากับ 7.0 ส่วนที่ pH 10 ซึ่งมีสภาพเป็นด่างมากกว่าแม้ว่าจะให้ค่าการทำงานของเอนไซม์สูงสุดแต่เอนไซม์ที่ได้มีปริมาณโปรตีนสูงด้วยทำให้ specific activity มีค่าต่ำกว่า จากการทดลองในครั้งนี้จะสังเกตเห็นว่าค่าการทำงานของเอนไซม์มีแนวโน้มสูงขึ้นในช่วง pH 3-10 ส่วนค่า specific activity จะค่อยๆลดลงเมื่ออาหารมี pH ประมาณ 8-10 แต่ที่ pH 2.0 ซึ่งมีสภาพเป็นกรดสูงเชื้อจะผลิตเอนไซม์ได้น้อยที่สุดอย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้น 95%

ระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับผลิต mannanase เชื้อราคือ ที่อุณหภูมิห้อง ($28-30^\circ\text{C}$) (enzyme activity 10.37 U/ml, specific activity 9.50 U/mg) เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 37°C และ 45°C ความสามารถในการผลิตเอนไซม์จะลดลงเป็นลำดับ ทั้งนี้เพราะที่อุณหภูมิสูงกว่า optimum temperature ทำให้เอนไซม์เสียสภาพ (denature) และโครงสร้างเปลี่ยนแปลงไป นอกจากนี้อาจเป็นผลจากอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราที่ลดลง สภาพความเป็นกรดเบสไม่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตเอนไซม์กล่าวคือที่อุณหภูมิ 37°C อาหารมีสภาพเป็นกลาง (pH 7.0) แต่ที่อุณหภูมิ 45°C อาหารมีสภาพเป็นด่าง (pH 9.1) ขณะที่อุณหภูมิห้องอาหารมีสภาพเป็นด่างอ่อนกว่าที่อุณหภูมิ 45°C (pH 8.1) ซึ่งน่าจะเป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและผลิตเอนไซม์ของเชื้อราไอโซเลทนี้ และยังพบว่าที่อุณหภูมิสูงๆเชื้อรานี้สร้างรงควัตถุสีม่วงในอาหารน้อยกว่าเมื่อบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง

การศึกษาไคเนติกพบว่าเชื้อราจะค่อยๆผลิต mannanase เพิ่มขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 84 จะผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดและให้ค่า specific activity สูงสุดที่ความเข้มข้น 95% โดยมีค่าเท่ากับ 15.08 U/ml และ 8.99 U/mg ตามลำดับ หลังจากนั้นค่าการทำงานของเอนไซม์จะค่อยๆลดลงในชั่วโมงที่ 96 และเริ่มคงที่ในช่วงชั่วโมงที่ 108-132 หลังการบ่มเชื้อนาน 84 ชั่วโมงอาหารมีความเป็นด่างเพิ่มขึ้น โดยมี pH ประมาณ 8.29 เชื้อมีน้ำหนักรวมสูงสุดในชั่วโมงที่ ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าการเก็บเกี่ยวผลิตผลเอนไซม์จากเชื้อนี้ควรทำในชั่วโมงที่ 84 ซึ่งจะทำให้ได้ปริมาณเอนไซม์สูงสุด

การศึกษาคุณสมบัติเฉพาะตัวของปฏิกิริยาของ crude enzyme

ในการตรวจวัด mannanase activity โดยใช้ buffer 2 ชนิดที่มีค่า pH ต่างกันในการเตรียม reaction mixture คือ sodium acetate buffer 0.1M และ phosphate buffer พบว่าเมื่อใช้ sodium acetate buffer pH ประมาณ 4.0-5.5 ทำให้ crude enzyme ค่อยๆทำงานดีขึ้น จนมีค่าการทำงานของเอนไซม์ที่สูงที่สุดในสถานะเป็นกรดอ่อนคือ pH 6.5 (mannanase activity 11.73 U/ml, specific activity 8.88 U/mg) แล้วจึงลดลงในช่วง pH ประมาณ 7.0-8.0 สำหรับ phosphate buffer ก็เช่นเดียวกันกล่าวคือ ค่าการทำงานของเอนไซม์ใกล้เคียงกันในช่วงเป็นกรดอ่อน pH 6.0-6.5 จนได้ค่าสูงสุดในช่วง pH 7.0 และมีแนวโน้มลดลงใน buffer ที่เป็นด่างเพิ่มขึ้นคือ pH ประมาณ 7.5-8.0 อย่างไรก็ตามจะสังเกตเห็นว่า sodium acetate buffer ทำให้ crude enzyme ทำงานได้ดีกว่า phosphate buffer ดังนั้นในการตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์ในครั้งต่อไปจึงใช้ sodium acetate buffer 0.1M pH 6.5

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการบ่ม reaction mixture คือ 60°C (mannanase activity 8.19 U/ml, specific activity 5.53 U/mg) โดยพบว่าที่อุณหภูมิ 40°C และ 50°C ค่าการทำงานของเอนไซม์จะค่อยๆสูงขึ้นเป็นลำดับแต่มีค่าต่ำกว่าที่อุณหภูมิ 70°C ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับที่ 60°C และมีแนวโน้มลดลงอย่างรวดเร็วที่เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 80°C

ระยะเวลาในการตรวจวัด mannanase activity ของ reaction mixture ที่ใช้ sodium acetate buffer 0.1M pH 6.5 บ่มที่ 60°C พบว่าเมื่อบ่ม reaction mixture ใช้นาน 60 และ 120 นาที ทำให้ crude enzyme ทำปฏิกิริยาได้ดีกว่าจากการทดลองที่ผ่านมาซึ่งบ่มใช้นาน 30 นาทีประมาณ 2 เท่าหรือมากกว่า และให้ค่าการทำงานของเอนไซม์สูงสุดในช่วง 4 ชั่วโมงแรกเมื่อบ่มใช้นาน 180 นาที (enzyme activity 23.08 U/ml, specific activity 15.56 U/mg) เมื่อทดสอบต่อไปอีกในช่วงเวลานาน 300-520 นาที แม้ว่าจะให้ค่าการทำงานของเอนไซม์สูงขึ้นอีกแต่ไม่มากนักเมื่อเปรียบเทียบกับที่ 180 นาที ซึ่งคาดว่าผลผลิตที่ได้ไม่คุ้มค่ากับเวลาในการบ่มที่นานเกินไปดังนั้นจึงไม่ได้ทำการทดลองต่อไป ในการทดลองครั้งนี้พบว่าที่เวลา 520 นาทีให้ค่าการทำงานของเอนไซม์และค่า specific activity สูงที่สุดเท่ากับ 33.74 U/ml และ 22.73 U/mg ตามลำดับ ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าเวลาที่เหมาะสมในการบ่ม reaction mixture ของ crude enzyme นี้คือนานประมาณ 3 ชั่วโมง ซึ่งจะทำได้เอนไซม์ปริมาณสูงในระดับหนึ่ง ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าเอนไซม์ที่ได้ในครั้งนี้น่าจะมีความเสถียรสูง ซึ่งจะเป็นผลดีในการเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ได้นาน

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อย locust bean gum ของ crude enzyme เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี TLC มี 2 ชนิดคือ galactose และสารอีกชนิดหนึ่งซึ่งยังไม่สามารถบ่งบอกชนิดได้ เนื่องจากไม่มีสารมาตรฐานที่มีค่า RF ที่เท่ากับสารดังกล่าวและจุดของสารมาตรฐานในครั้งนี้มีขนาดใหญ่เกินไปอาจ

ทำให้ค่า RF คาดเคลื่อนได้ อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้ว่าสารใดเป็นผลิตภัณฑ์หลักหรือรอง ทั้งนี้เพราะการหาผลิตภัณฑ์ที่ได้เชิงปริมาณต้องอาศัยการวิเคราะห์ทางเคมีเชิงปริมาณซึ่งไม่ได้ทำการทดลองในครั้งนี้

เอนไซม์ mannanase ที่ได้จาก *Fusarium* sp. GnCMU384 นี้มีปริมาณมากกว่าเมื่อเทียบกับเชื้อราอื่นๆและแบคทีเรียบางชนิด แต่มีปริมาณน้อยกว่าแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยบางชนิดที่เคยมีการศึกษา (ตาราง 31) อย่างไรก็ตามหากต้องการพัฒนาไปใช้เชิงอุตสาหกรรมอย่างคุ้มค่าและได้กำไรจะต้องมีการศึกษาอีกหลายด้าน ได้แก่ การหาความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ คุณสมบัติของเอนไซม์ เช่น มวลโมเลกุล สารที่ช่วยส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ เช่น ZnSO_4 , NaF, และ EDTA (อ้างโดยวรางคณา, 2539) สารที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เช่น Ag^+ , Hg^{2+} , Cu^{2+} , dithiothreitol และ *N*-bromosuccinimide (Yamaura and Matsumoto, 1993) แหล่งคาร์บอนแหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุต่างๆที่ได้จากวัตถุดิบที่มีราคาถูกกว่าสารเคมีที่ใช้ในการทดลองในครั้งนี้ ความเสถียรของเอนไซม์ การเก็บรักษาเอนไซม์ให้คงอยู่ได้นานและมีประสิทธิภาพสูง การเก็บรักษาเชื้อราและปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ได้สูงยิ่งขึ้นไป การค้นหาเชื้อราใหม่ๆที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์นี้ดีกว่า เป็นต้น

ตาราง 31 ค่า mannanase activity ของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

Microorganism	Mannanase activity (U/ml)	Reference
<i>Talaromyces</i> sp.	6	วรางคณา, 2539
<i>Sterilia mycelium</i> No.120	8.2	อนุวัฒน์, 2541
<i>Sterilia mycelium</i> No.127	5.7	อนุวัฒน์, 2541
<i>Fusarium</i> sp. GnCMU384	23.08	สุธีรา, 2542
<i>Polyporus vesicolor</i> NRCC5909	3.42	Johnson, 1990
<i>Streptomyces</i> sp. E2/22	521.68	นลิน, 2541
<i>Bacillus</i> sp.	1.6	Abe, Hossain, and Hizukuri, 1994
<i>Bacillus subtilis</i> NM-39	8.8	Mendoza et al, 1994

สรุปผลการทดลอง

สามารถแยก endophytic fungi จากกิ่งไม้ 13 ชนิด จำนวน 36 ต้นจากบริเวณมหาวิทยาลัย เชียงใหม่ บนอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย จังหวัดเชียงใหม่และหมู่บ้านหาดแพน จังหวัดพะเยา ได้เชื้อราทั้งสิ้น 636 ไอโซเลต ส่วนใหญ่แยกได้จากส่วนข้อ รองลงมาคือส่วนปล้อง สำหรับใบ แยกเชื้อได้น้อยมาก เมื่อตรวจสอบและบ่งชี้พบว่าในไม้ทุกชนิดพบ *Mycelia sterilia* และมีจำนวนมากที่สุด (97 ไอโซเลต) รองลงมาคือ *Fusarium* spp. เชื้อที่พบมากเป็นอันดับสาม ได้แก่ *Xylaria* spp. และ *Phoma* spp. (30-33 ไอโซเลต) เชื้อที่พบมากเป็นอันดับสี่ คือ เชื้อที่ไม่สามารถระบุชื่อ หมายเลข 1, 2 และ *Colletotrichum* spp. (16-18 ไอโซเลต) *Phomopsis* spp., *Cladosporium* sp., *Artrinium* sp. และ เชื้อที่ไม่สามารถระบุชื่อหมายเลข 3 พบในความถี่ค่อนข้างต่ำ เชื้อที่พบเพียงเล็กน้อย (1-3 ไอโซเลต) ได้แก่ *Arthrographis* sp., *Aspergillus* sp, *Cephalosporium* sp., *Chaetobolisia* sp., *Curvularia* sp., *Drechslera* spp, *Harknessia* sp., *Helicoon* sp., *Nigrospora* sp., *Papularia* spp., *Penicillium* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Pithomyces* spp., *Syringospora* sp., *Xylariaceae* นอกจากนี้ยังพบเชื้อที่ไม่สามารถระบุชื่อได้ใน class *Hyphomycetes* จำนวน 3 กลุ่มย่อยและ *Coelomycetes* จำนวน 26 กลุ่มย่อย

สามารถคัดเลือก endophytic fungi ที่ผลิต mannanase ได้สูงคือ *Fusarium* sp. GnCMU384 ซึ่งแยกได้จากส่วนข้อของกิ่งไม้หกกเครือ (*Gigantochloa nigro-ciliata* (Munro) Kurz) บริเวณน้ำตก มณฑลธารบนดอยสุเทพ จังหวัดเชียงใหม่ สูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ประกอบด้วย locust bean gum 3.0% (w/v), Peptone 0.9%, KH_2PO_4 0.2% (w/v), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03% (w/v), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.03% (w/v), trace metal solution 0.1% (v/v), pH 7.0 การผลิต mannanase จะมีค่าสูงสุดเมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง (28-30°C) เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาทีในชั่วโมงที่ 84 โดยมีค่า mannanase activity 15.08 U/ml และ specific activity 8.99 U/mg ส่วนสภาวะที่เหมาะสมต่อการ ทำงานของ mannanase จะเกิดขึ้นได้เมื่อเตรียม reaction mixture ที่ใช้ sodium acetate buffer 0.1M pH 6.5 บ่มที่ 60°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ซึ่งให้ค่า mannanase activity เพิ่มขึ้นเป็น 23.08 U/ml และ specific activity 15.56 U/mg