บทที่ 5
วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

จากการแยกแอคติโนมัยซีสจากตัวอย่างรากพืช และตัวอย่างดิน ได้แอคติโนมัยซีสจำนวน 5 และ 102 ไอโซเลทตามลำดับ และแอคติโนมัยซีสบริสุทธิ์จากภาควิชาชีววิทยาจำนวน 142 ไอโซ-เลท ไปเพาะในอาหารเหลวที่มี locust bean gum 1% ซึ่งเป็น galactomannan แล้วนำไปทดสอบการผลิต mannanase โดยวิธี gel diffusion assay (Downie *et al.*, 1994) พบแอคติโนมัยซีสที่ผลิต mannanase ได้ 38 ไอโซเลท จากการคัดเลือกขั้นตอนแรกนี้พบว่ามีแอคติโนมัยซีสจำนวน 3 ไอโซ-เลทคือ M4, 4/37 และ E2/22 มีแนวโน้มจะผลิต mannanase ได้สูงคือสามารถให้วงใสขนาดใหญ่มากกว่า 10 มิลลิเมตร จึงศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ของทั้ง 3 เชื้อนี้พบว่าไอโซเลทที่ให้ mannanase activity สูงสุดคือ E2/22 เท่ากับ 12.27 U/ml จึงได้คัดเลือกแอคติโนมัยซีส E2/22 เพื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ต่อไป

การศึกษาลักษณะต่างๆของแอคติโนมัยซีส E2/22 พบว่าสามารถเจริญได้ดีบนอาหารแข็งหลายชนิดไม่ว่าจะเป็น semisynthetic medium หรือ synthetic medium ลักษณะเส้นใยที่เจริญขึ้นไปในอากาศจะมีสีเทา ด้านหลังโคโลนีจะเป็นสีน้ำตาลถึงน้ำตาลแดง เฉดสีจะแตกต่างกันเล็กน้อยในอาหารแต่ละชนิด พบการสร้างสปอร์ในวันที่ 3 หรือ 4 การสร้างรงควัตถุจะพบในอาหารบางชนิดคือพบใน HT agar, PDA, ISP medium No. 2 และ 3 pH ของอาหารแข็งที่เหมาะสำหรับการเจริญอยู่ในช่วงกว้างโดยจะค่อนไปทางด่างคือตั้งแต่ 5-10 เชื้อนี้เป็น mesophile เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30°C จากการศึกษาลักษณะจากกล้องจุลทรรศน์และการทดสอบทางชีวเคมีพบว่าเชื้อนี้อยู่ในจีนัส *Streptomyces* ซึ่งเคยมีรายงานเกี่ยวกับการศึกษาการผลิต mannanase จากแอคติโนมัยซีสชนิดนี้ (Arcand *et al.*, 1993 : Marga *et al.*, 1996)

สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ที่ศึกษาใน shake flask เริ่มจากศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสม พบว่าในสูตรอาหารสูตรที่ 3 ซึ่งประกอบด้วย locust bean gum 2.5%, peptone 0.5%, KH_2PO_4 0.05% และ $MgSO_4.7H_2O$ 0.05% (w/v) *Streptomyces* sp. E2/22 จะผลิต mannanase ได้สูงสุด (mannanase activity 148.39 U/ml, specific activity 263.99 U/mg) อาหารนี้มีส่วนประกอบที่สามารถเตรียมได้ง่ายและสามารถทำให้เชื้อผลิตเอนไซม์ได้สูงกว่าในอาหารสูตรอื่นๆจึงได้ใช้สูตรอาหารนี้ในการทดลองต่อไป ซึ่งแต่เดิมสูตรอาหารนี้เป็นสูตรอาหารเพื่อการผลิต mannanase สำหรับ *Bacillus* sp. W-2 มีค่าการทำงานของ crude enzyme เท่ากับ 9130 U/ml, specific activity 12.5 U/mg (Ooi and Kikuchi, 1995)

แหล่งของคาร์บอนที่เหมาะต่อการผลิต mannanase คือ locust bean gum (46.87 U/ml) เนื่องจากมีการใช้ locust bean gum ในการ enrich เชื้อตั้งแต่แรก ปริมาณเอนไซม์ที่ได้ตอนนี้อาจไม่สูงเท่ากับเมื่อทดสอบในเรื่องสูตรอาหารอาจเนื่องมาจากกล้าเชื้อมีการกระจายตัวไม่ดี การผลิตเอนไซม์ในแต่ละครั้งจึงไม่ค่อยคงที่ ซึ่งจะมีการแก้ไขในการทดลองต่อไป น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว น้ำตาลแอลกอฮอล์ และแป้ง ไม่ชักนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ และเมื่อใช้กากมะพร้าวป่นซึ่งเป็นแหล่งของแมนแนน *Streptomyces* sp. E2/22 จะไม่ผลิต mannanase อาจเป็นเพราะในกากมะพร้าวมีไขมันอยู่มาก ซึ่งตรงข้ามกับการทดลองของ Mendoza *et al.*, 1994b ที่สามารถผลิต mannanase จาก *Bacillus subtilis* MN-39 โดยใช้อาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น coconut residue coconut residue ที่ใช้นี้เป็นกากมะพร้าวที่ได้หลังจากการสกัดน้ำมันมะพร้าวออกแล้ว ส่วนแป้งบุก, mannose, mannan จาก *Acacia campanulatus* และ mannan จาก *Acacia variabilis* จะชักนำให้สร้าง mannanase ในปริมาณเพียงเล็กน้อย เนื่องจากในการคัดเลือกเชื้อในขั้นแรกมีการส่งเสริมการเจริญเริ่มต้นด้วยการใช้ locust bean gum ดังนั้นเชื้อจึงสามารถสร้าง mannanase จาก locust beam gum ได้ดี เมื่อศึกษาปริมาณของ locust bean gum ที่เหมาะสมในการผลิต mannanase พบว่าเมื่อใช้ locust bean gum 2.5%(w/v) *Streptomyces* sp. E2/22 จะผลิต mannanase ได้มากที่สุด (198.08 U/ml) แต่ปริมาณ locust bean gum 2.5% นี้จะทำให้อาหารมีความหนืดมากในตอนเริ่มต้น ในการเตรียมอาหารจึงต้องเตรียมสารละลายที่สามารถละลายน้ำได้ก่อนแล้วค่อยๆเติม locust bean gum ลงไปในสารละลายนั้นจะช่วยให้ locust bean gum ไม่จับตัวเป็นก้อน ถ้าเพิ่มปริมาณ locust bean gum เป็น 3.0% เชื้อจะผลิต mannanase ได้น้อยลง (124.49 U/ml) เนื่องจากอาหารมีความหนืดมากการให้อากาศจึงไม่ค่อยดี

แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิต mannanase คือ peptone 0.5% เพราะมีค่าการผลิตเอนไซม์สูง (177.65 U/ml, specific acitvity 640.63 U/mg) casein ถึงแม้จะให้ mannanase activity สูงกว่าคือ 226.50 U/ml แต่มีspecific activity ต่ำกว่าคือ 410.76 U/mg แสดงว่าการใช้ casein เป็นแหล่งไนโตรเจนจะให้โปรตีนอื่นปนมาอยู่มากกว่า ส่วนแหล่งไนโตรเจนอื่นๆซึ่งมีทั้ง organic และ inorganic nitrogen จะให้ค่า mannanase activity น้อยกว่าเมื่อใช้ peptone 0.5% เป็นแหล่งไนโตรเจน

pH เริ่มต้นของอาหารเพื่อการผลิตเอนไซม์ที่เหมาะสมเท่ากับ 5.0 เชื้อจะผลิต mannanase ได้สูงสุด (151.45 U/ml) รองลงมาได้แก่ที่ pH 4.0 (138.14 U/ml) จะเห็นได้ว่า *Streptomyces* sp. E2/22 สามารถผลิต mannanase ได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด ที่ pH 2.0 และ 3.0 เชื้อจะผลิต mannanase ได้น้อยมากเมื่อสังเกตดูปริมาณ pellet ของเชื้อจะพบว่ามีปริมาณน้อยกว่าที่ pH อื่นๆแสดงว่าที่ pH 2 และ 3 ไม่เหมาะกับการเจริญของเชื้อ ถ้า pH สูงกว่า 5 การผลิต mannanase จะลดลงเป็นลำดับไป

ในการทดลองตอนนี้ได้ใช้ขดลวดสปริงในอาหารกล้าเชื้อทำให้เชื้อมีการกระจายตัวดีเป็น pellet เล็กลงและมีขนาดสม่ำเสมอ

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิต mannanase คือที่อุณหภูมิ 30°C (222.34 U/ml) ถ้าเพิ่มอุณหภูมิสูงกว่านี้การผลิต mannanase จะลดลงเป็นลำดับ ส่วน galactanase จะสร้างได้ดีใกล้เคียงกันที่อุณหภูมิ 30-37°C (0.71-0.76 U/ml) แต่สร้างในปริมาณน้อยกว่า mannanase มากเนื่องจากการส่งเสริมการเจริญเริ่มต้นด้วย locust bean gum มีรายงานว่าการผลิต galactanase จะต้องมีการชักนำจาก galactose (Araujo and Ward, 1990b) ถ้าอาหารมี galactose ต่ำจะทำให้มีการสร้าง galactanase ต่ำด้วยขณะหมัก *Streptomyces* sp. E2/22 ในอาหารเหลวที่ 30°C จะพบว่าเชื้อมีสีแดงมากสีแดงจะค่อยๆลดลงเป็นสีน้ำตาลมากขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น และเชื้อมีการสร้างรงควัตถุสีน้ำตาลปนออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เอนไซม์ mannanase จาก *Streptomyces* sp. E2/22 จะสูงสุดในชั่วโมงที่ 96 (149.92 U/ml) ซึ่งจะใช้เวลามากกว่าใน *Bacillus subtilis* NM-39 (Mendoza *et al.*, 1994b) คือ 28 ชั่วโมง (8.8 U/ml) แต่ก็จะได้ปริมาณเอนไซม์ที่มากกว่ามาก mannanase จะสร้างได้สูงสุดหลังจากการเจริญสูงสุดของเชื้อโดยดูจากน้ำหนักแห้ง เช่นเดียวกับ β-mannosidase จะสร้างได้สูงสุดใกล้เคียงกันในชั่วโมงที่ 84-108 (0.76-0.79 U/ml) แต่ galactanase จะสร้างได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 24 (2.25 U/ml) ซึ่งอยู่ในช่วงที่เซลล์กำลังเริ่มเพิ่มปริมาณ

เอนไซม์ mannanase ที่ *Streptomyces* sp. E2/22 สร้างขึ้นมานี้มี pH ที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ในช่วงที่เป็นกรดเล็กน้อย (6.0-6.5) คล้าย thermophilic fungi (5.0-6.0) (Araujo and Ward, 1990a) อุณหภูมิ 60°C จะเร่งการทำงานของเอนไซม์ได้สูงสุดโดยจะใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 120 นาที แต่ถ้าใช้อุณหภูมิ 50°C จะใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาถึง 240 นาทีอุณหภูมิที่เหมาะกับการทำงานของเอนไซม์นี้คล้ายกับใน *Bacillus subtilis* NM-39 (Mendoza *et al.*,1994b) และ *Talaromyces* sp. (วรางคณา, 2539) สภาวะนี้จะสะดวกต่อการนำเอนไซม์ไปใช้ในอุตสาหกรรม การใช้อุณหภูมิสูงจะช่วยลดการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น และช่วยลดค่าใช้จ่ายที่จะใช้ในการควบคุมอุณหภูมิ

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสลาย locust bean gum และ gum arabic เมื่อตรวจสอบโดยวิธี Thin layer chromatography พบว่า crude enzyme นี้สามารถย่อยสลายสับสเตรทเหล่านี้ได้ แต่ยังไม่สามารถบ่งบอกชนิดของผลิตภัณฑ์นั้นได้เนื่องจากไม่มีสับสเตรทมาตรฐาน

เอนไซม์ mannanase จาก *Streptomyces* sp. E2/22 นี้มีปริมาณมากเมื่อเทียบกับแบคทีเรียหรือฟังไจอื่นๆที่เคยศึกษามาก่อน (ตาราง 19) คุณสมบัติของ mannanase จาก *Streptomyces* sp.

E2/22 จะต้องมีการศึกษาต่อไปจะหาเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์เพื่อพัฒนาในการนำไปใช้ประโยชน์ทางอุตสาหกรรมต่อไป

ตาราง 19 mannanase activity จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

Microorganism	mannanase activity (U/ml)	Reference
Talaromyces sp.	6	วรางคณา, 2539
Streptomyces sp. E2/22	521.68	นลิน, 2541
sterilia mycelium No. 120	8.2	อนุวัฒน์, 2541
sterilia mycelium No. 127	5.7	อนุวัฒน์, 2541
Bacillus subtilis NRRL 356	106.2	Araujo and Ward, 1990b
Bacillus subtilis	102	El-Helow *et al.*, 1997
Streptomyces lividans	115	Marga *et al.*, 1997

สรุปผลการทดลอง สามารถคัดเลือกแอคติโนมัยซีสที่ผลิต mannanase ได้สูงเมื่อตรวจสอบแล้วพบว่าอยู่ในจีนัส *Streptomyces* สูตรอาหารเพื่อการผลิต mannanase ที่เหมาะสมประกอบด้วย (%w/v) locust bean gum 2.5, peptone 0.5, KH_2PO_4 0.05 และ $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 pH 5.0 การผลิต mannanase จะสูงที่สุดเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาทีในชั่วโมงที่ 96 โดยมี mannanase activity 149.92 U/ml specific activity 675.62 U/mg ส่วนสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของ mannanase อยู่ที่อุณหภูมิ 60°C pH 6.5 เป็นเวลา 2 ชั่วโมงโดยให้ mannanase activity เพิ่มขึ้นเป็น 521.68 U/ml specific activity 2230.35 U/mg