บทที่ 4

การอภิปรายและสรุปผลการวิจัย

การสร้างเอนไซม์ไซแลนเนสของจุลินทรีย์ส่วนมากจะถูกชักนำโดยไซแลน (4,6, 10,13,37) จากการตรวจหาเอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตโดยสเตรพโตมัยซีสซึ่งแยกได้จากดินตัวอย่างในแหล่งต่าง ๆ ของประเทศไทย พบว่า สเตรพโตมัยซีสหลายสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์นี้ได้ โดยใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน ในบรรดาสเตรพโตมัยซีสเหล่านี้ สเตรพโตมัยซีสสายพันธุ์ 42-9 สามารถสร้างไซแลนเนสได้สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่น ๆ ที่แยกได้ในสภาวะการตรวจสอบเดียวกัน

จากการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอน พบว่า สเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 นี้ สามารถสร้างไซแลนเนสได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน ไม่สามารถใช้น้ำตาลโมโนแซคคาไรด์และไดแซคคาไรด์ ซึ่งได้แก่ ฟรักโทส ไซโลส แรมโนส แรฟฟิโนส อราบิโนส อินโนซิทอล แมนนิทอล และซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตไซแลนเนส เช่นเดียวกับ Streptomyces xylophagus (29) นอกจากนี้ จุลินทรีย์นี้ยังสามารถใช้กากรำข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตไซแลนเนสได้ ทั้งนี้เพราะกากรำข้าวมีองค์ประกอบของไซแลนสูง (3) ได้มีรายงานหลายฉบับกล่าวว่า มีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถใช้กากรำข้าวในการผลิตไซแลนเนสได้ เช่น Aspergillus niger NCIM 1207 (40) Bacillus sp. (41) Streptomyces fradiae SCF-5 (3) และ Streptomyces exfoliatus MC_1 (30) เป็นต้น และในการทดลองใช้เปลือกเมล็ดฝ้ายเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส โดยสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 นี้ พบว่า จุลินทรีย์สามารถใช้เปลือกเมล็ดฝ้ายในการชักนำการสร้างไซแลนเนสได้บ้าง เนื่องจากเปลือกเมล็ดฝ้ายมีไซแลนเป็นองค์ประกอบอยู่มากและไซแลนของเปลือกเมล็ดฝ้ายจะประกอบด้วยไซโลสเท่านั้น (6,7) จากรายงานของ ศิริลักษณ์ ธีระดากร (53) ในการวิเคราะห์ส่วนประกอบต่าง ๆ ของสารละลายของเปลือกเมล็ดฝ้ายที่ถูกย่อยด้วยกรดกำมะถัน พบว่า ประกอบด้วยน้ำตาลรีดิวส์ 240 มก. ต่อ มล. กลูโคส 3 มก.ต่อ มล. ไซโลส 160 มก.ต่อ มล. โปรตีน 30 มก.ต่อ มล.

และปริมาณของแข็ง 24% ของน้ำหนักต่อปริมาตร แต่อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้เมื่อเปรียบเทียบการใช้เปลือกเมล็ดฝ้ายกับกากรำข้าว พบว่า กากรำข้าวจะเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีกว่า เพราะให้การผลิตไซแลนเนสสูงกว่า

ในการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสของสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 นี้ พบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซแลนและเปลือกเมล็ดฝ้ายเป็นแหล่งคาร์บอน สารสกัดจากยีสต์มีความสำคัญต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสนี้ เช่นเดียวกับ สเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ KT-23 (13) โดยที่การเพิ่มปริมาณสารสกัดจากยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซแลน 3% เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งเป็นปริมาณที่เหมาะสม ปริมาณเอนไซม์ไซแลนเนสจะเพิ่มขึ้นประมาณ 4.5 เท่า และในการศึกษาผลของสารสกัดจากยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปลือกเมล็ดฝ้ายเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า สารสกัดจากยีสต์จะมีผลในการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ได้บ้างแต่ไม่มากนัก แต่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากรำข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า สารสกัดจากยีสต์และสารที่เป็นแหล่งไนโตรเจนอื่น ๆ ไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ แสดงว่ากากรำข้าว 5% ที่ใช้เพียงพอที่จะเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนสำหรับการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสของจุลินทรีย์นี้ ดังรายงานของ พิเชษฐ อิฐกอ (54) ซึ่งได้วิเคราะห์ปริมาณคาร์บอนและไนโตรเจนในกากรำข้าว พบว่า มีปริมาณคาร์บอนอยู่ 25.54% และปริมาณไนโตรเจน 3.71% โดยน้ำหนัก และพบว่า การเสริมไซแลนลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากรำข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น ก็ไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ไซแลนเนสเช่นกัน แต่เมื่อเสริมไซแลนในรูปของเปลือกเมล็ดฝ้ายลงไป พบว่า การผลิตไซแลนเนสจะลดลงตามความเข้มข้นของเปลือกเมล็ดฝ้ายที่เสริมลงไป แสดงว่า ในเปลือกเมล็ดฝ้ายมีสารที่เป็นองค์ประกอบที่กดดันการสร้างไซแลนเนส เช่น กลูโคสอยู่ เพราะจากการทดลองพบว่า ไซแลนเนสของสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 นี้ จะถูกกดดันการสร้างโดยกลูโคส ซึ่งผลที่ได้นี้เช่นเดียวกับรายงานของ Nakanishi และคณะ (37) ที่พบว่า กลูโคสจะกดดันการสร้างเอนไซม์ไซแลนเนสในสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 3137 และกล่าวว่า การควบคุมการสร้างไซแลนเนสในสเตรพโตมัยซีสนี้ มีระบบการควบคุมเหมือนกับการสร้างเอนไซม์ บีต้า-กาแลคโตสิเดส (β-galactosidase) นอกจากนี้เปลือกเมล็ดฝ้ายยังประกอบด้วยลิกนิน (55) ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างซับซ้อนและเป็นโพลีเมอร์ของอะโรมาติคที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble aromatic polymer) ลิกนินทำให้ผนังเซลของพืชแข็ง อาจทำให้การย่อยสลายเปลือกเมล็ดฝ้ายโดย

สเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 เป็นไปได้ยากและเกิดได้ช้าเนื่องจากลิกนินเป็นตัวขวางกั้นการทำงานของเอนไซม์ไซแลนเนสและการย่อยสลายลิกนินยังต้องการกลไกที่ซับซ้อนอีกด้วย (56)

จากการศึกษาผลของเกลือแร่ต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสของสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 พบว่า ไดโปตัสเซี่ยม — ไฮโดรเจน—ฟอสเฟต ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการผลิตไซแลนเนสมาก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากไดโปตัสเซี่ยม—ไฮโดรเจน—ฟอสเฟต ช่วยรักษาความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อไม่ให้เปลี่ยนแปลงมาก ในขณะที่เฟอรัสซัลเฟต และโปตัสเซี่ยมคลอไรด์ มีผลต่อการเพิ่มผลผลิตของเอนไซม์เพียงเล็กน้อย แต่แมกนีเซี่ยมซัลเฟต และแมงกานีสซัลเฟต ไม่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์นี้ ส่วนโคบอลท์คลอไรด์ ที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 0.01% ในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ แต่ที่ความเข้มข้นมากกว่านี้จะมีผลยับยั้งการผลิตเอนไซม์เล็กน้อย และแคลเซี่ยมคลอไรด์มีผลยับยั้งการผลิตไซแลนเนสตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น Kawaminami และ Iizuka (29) ได้ศึกษาการผลิตไซแลนเนสโดย Streptomyces xylophagus พบว่า Mg^{2+} ที่ความเข้มข้น $4x10^{-3}$ โมลาร์ มีผลต่อการเพิ่มผลผลิตของไซแลนเนสเล็กน้อย Ca^{2+} มีผลต่อการเพิ่มการเจริญของเชื้อแต่มีผลยับยั้งการผลิตไซแลนเนสที่ความเข้มข้นมากกว่า $4x10^{-2}$ โมลาร์ Ba^{2+}, Mn^{2+} และ Fe^{2+} ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อและการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส การที่เกลือแร่ไม่แสดงผลเด่นชัดต่อการผลิตไซแลนเนสโดยสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 อาจเนื่องมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ ประกอบด้วยกากรำข้าว ซึ่งอาจมีเกลือแร่บางชนิดเจือปนอยู่ ดังนั้นจึงยากที่จะสรุปได้ว่าเกลือแร่ชนิดใดมีความจำเป็นต่อการสร้างไซแลนเนสโดยสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9

จากการศึกษาสภาวะต่าง ๆ ในการเลี้ยงเชื้อสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 เพื่อผลิตไซแลนเนส พบว่า ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ 6-7.5 และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไซแลนเนสคือ 30-35 องศาเซลเซียส และจากผลการศึกษาระยะเวลาต่อการเจริญของเชื้อและการผลิตไซแลนเนส พบว่า จุลินทรีย์นี้จะผลิตไซแลนเนสได้สูงสุดในวันที่ 2-3 ของการเจริญ ซึ่งเป็นระยะที่เชื้อเจริญได้มาก แสดงว่าการผลิตไซแลนเนสของสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 นี้ สัมพันธ์กับการเจริญของเชื้อ (growth associated)

จากการศึกษาสภาวะและปัจจัยในการทำงานของเอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตโดยสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 นี้ สามารถสรุปได้ ดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 แสดงสภาวะและปัจจัยต่าง ๆ ต่อการทำงานของเอนไซม์ไซแลนเนสจากสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9

สมบัติของเอนไซม์	
อุณหภูมิที่เหมาะสม	55-60 องศาเซลเซียส
ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม	6.0
ชนิดของบัฟเฟอร์	อะซีเตท บัฟเฟอร์
ความเป็นกรดด่างที่เอนไซม์เสถียร	5-9
อุณหภูมิที่เอนไซม์เสถียร	น้อยกว่า 60 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิที่เอนไซม์สูญเสียแอคติวิตีทั้งหมด	65 องศาเซลเซียส 30 นาที
Km	0.61 มก. ของไซแลนต่อ มล.

จากผลการทดลองที่ได้ พบว่า สภาวะและปัจจัยต่าง ๆ ต่อการทำงานของไซแลนเนสจาก สเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 นี้ ใกล้เคียงกับสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์อื่น ๆ ดังแสดงไว้ในบทที่ 1 ตารางที่ 3 และจากการศึกษาสารที่มีผลยับยั้งต่อการทำงานของไซแลนเนส พบว่า เมอคิวริค คลอไรด์ และ เฟอรัสซัลเฟต เป็นสารที่ยับยั้งการทำงานของไซแลนเนสจากสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 ได้อย่างรุนแรง แต่แมกนีเซียมซัลเฟต โคบอลท์คลอไรด์ แมงกานีสซัลเฟต และแคลเซียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 1 มิลลิโมลาร์ ไม่มีผลต่อการทำงานของไซแลนเนสจากจุลินทรีย์นี้

จากการปรับปรุงส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะต่าง ๆ ในการเลี้ยงเชื้อจะได้แอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสสูงสุดประมาณ 1.6-1.8 หน่วยต่อ มล.ของน้ำเลี้ยงเชื้อ และได้เปรียบเทียบความสามารถในการผลิตไซแลนเนสกับจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่น ๆ ที่มีรายงานไว้ ดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอ็นไซม์ไซแลนเนสจากสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 กับจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่สามารถผลิตไซแลนเนสได้

ชนิดของจุลินทรีย์	แอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนส		เอกสารอ้างอิง
	หน่วยต่อ มล.ของน้ำเลี้ยงเชื้อ	หน่วยต่อ มก.ของโปรตีนหลังตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต	
สเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9	1.6-1.8	6.0-6.5	(งานวิจัยนี้)
Streptomyces fradiae SCF-5			
parental strain	0.05-0.06	-	
mutant strain	0.19-0.20	-	(32)
Streptomyces exfoliatus MC_1	3.60	-	(30)
Streptomyces lividans	50.0	-	(31)
Streptomyces KT-23	4.4	-	(13)
Bacillus sp. No.C-125	0.83	5.1	(18)
Bacillus sp.	29.5	1.05	(57)
Aspergillus niger	5.7	4.3	(15)
Cryptococcus flavus	1.7-1.8	-	(39)
Melanocarpus albomyces	12.0	-	(58)
Trichoderma reesei QM 9194	1.2-1.6	-	(35)
Trichosporon cutaneum	0.82	-	(12)

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่มีรายงานไว้

จากตารางที่ 12 พบว่าปริมาณเอนไซม์ไซแลนเนสที่สเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 ผลิตได้ไม่ต่ำกว่าสายพันธุ์ของต่างประเทศบางสายพันธุ์มากนัก นอกจากนั้นยังได้ตรวจสอบความสามารถของสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 ในการผลิต บีต้า-ไซโลสิเดส ทั้งนี้เพราะมีรายงานหลายฉบับ พบว่า จุลินทรีย์ที่ผลิตไซแลนเนสได้ สามารถผลิต บีต้า-ไซโลสิเดสได้เช่นกัน เช่น Streptomyces sp.(14) Aspergillus niger (15) Cellulomonas uda (11) และ Streptomyces lividans (31) เป็นต้น จากการตรวจสอบเอนไซม์บีต้า-ไซโลสิเดสที่ผลิตโดย สเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 พบว่า การผลิต บีต้า-ไซโลสิเดส จะสัมพันธ์กับการผลิตไซแลนเนส แต่ปริมาณที่ตรวจพบยังจัดอยู่ในเกณฑ์ต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 เปรียบเทียบการผลิต บีต้า-ไซโลสิเดสจาก สเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 กับจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซแลน 1% เป็นแหล่งคาร์บอน

ชนิดของจุลินทรีย์	แอคติวิตีของเอนไซม์ (หน่วยของเอนไซม์ต่อ มล. ของสารละลายที่สกัดจากเซล)	เอกสารอ้างอิง
สเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9	0.07	(งานวิจัยนี้)
Streptomyces sp.	0.16	(14)
Streptomyces lividans	0.19	(31)
Aspergillus niger	0.20	(15)
Cellulomonas uda	0.21	(11)
Neurospora crassa	0.16	(24)

การที่แอคติวิตีของบีต้า-ไซโลสิเดสที่ตรวจหาได้ของสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 ยังต่ำอยู่ อาจเป็นเพราะว่ายังไม่ได้ปรับปรุงวิธีการสกัดเอนไซม์จากเซล การเก็บรักษาเอนไซม์ให้เสถียร และวิธีการที่เหมาะสมต่อการทำงานของบีต้า-ไซโลสิเดสจากจุลินทรีย์นี้ ซึ่งคาดว่าถ้าได้มีการปรับปรุงขั้นตอนเหล่านี้ในอนาคต อาจทำให้ได้แอคติวิตีของบีต้า-ไซโลสิเดสที่สูงขึ้น

ดังนั้น จึงสรุปได้ว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษานี้ สเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 สามารถผลิตไซแลนเนสได้ 1.6-1.8 หน่วยต่อ มล.ของน้ำเลี้ยงเชื้อหรือ 6.0-6.5 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และบีต้า-ไซโลสิเดส 0.07 หน่วยต่อ มล. ของสารละลายที่สกัดจากเซล แม้ว่าปริมาณไซแลนเนสและบีต้า-ไซโลสิเดสที่สเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 ผลิตได้นี้อาจจะยังต่ำอยู่ แต่ถ้าได้มีการนำสายพันธุ์ดังกล่าวนี้ไปปรับปรุงโดยขบวนการกลายพันธุ์หรือทางวิศวกรรมพันธุศาสตร์ ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้ปรับปรุงสายพันธุ์ที่ใช้ในอุตสาหกรรม ก็อาจมีโอกาสที่จะช่วยเพิ่มการผลิตเอนไซม์ในกลุ่มไซแลนเนสของสายพันธุ์ดังกล่าวนี้ได้อีกหลายเท่าตัว

อย่างไรก็ตาม เนื่องจากจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้นี้ สามารถผลิตไซแลนเนสได้ใกล้เคียงปริมาณสูงสุดในระยะเวลาค่อนข้างสั้น คือ 2 วัน ในขณะที่ จุลินทรีย์อีกหลายชนิดต้องใช้เวลาค่อนข้างนานในการที่จะให้ได้ปริมาณไซแลนเนสสูงสุด เช่น Streptomyces exfoliatus MC_1 (30) ให้เอนไซม์สูงสุด 3.60 หน่วยต่อ มล.ของน้ำเลี้ยงเชื้อในเวลา 3 วัน Penicillium funiculosum (25) ให้เอนไซม์สูงสุด 16 หน่วยต่อ มล.ของน้ำเลี้ยงเชื้อในเวลา 10 วัน Trichosporon cutaneum (12) ให้เอนไซม์สูงสุด 0.80 หน่วยต่อ มล.ของน้ำเลี้ยงเชื้อในเวลา 3 วัน และ Neurospora crassa (59) ให้เอนไซม์สูงสุด 14 หน่วยต่อ มล.ของน้ำเลี้ยงเชื้อในเวลา 4 วัน เป็นต้น ดังนั้นสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 จึงจัดว่าอาจมีประโยชน์ที่จะนำมาใช้ในการผลิตไซแลนเนสในอนาคต หรืออาจนำมาใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์อื่นที่มีความสำคัญเชิงพาณิชย์ เช่น กลูโคส ไอโซเมอเรส ซึ่งส่วนใหญ่ของการสร้างเอนไซม์นี้จำเป็นต้องใช้ไซโลสเป็นสารชักนำ ดังนั้นถ้าได้มีการนำเทคโนโลยีขั้นสูงมาใช้ เช่น การหลอมผสมโปรโตพลาสต์ (protoplast fusion) ของจุลินทรีย์ทั้งสองเข้าด้วยกัน ก็อาจผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อราคาถูก ซึ่งสามารถลดต้นทุนการผลิตเอนไซม์ดังกล่าวลงได้มาก