บทที่ 4

การอภิปรายและสรุปผลการวิจัย

การปรับปรุงสายพันธุ์ของ *Streptomyces sp. 190-1* ซึ่งผลิตเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสได้สูง ให้มีความสามารถสร้างเอนไซม์ไซแลนเนสด้วย สามารถทำได้โดยวิธีการเชื่อมโปรโตพลาสท์กับ *Streptomyces sp. 42-9* ที่ผลิตไซแลนเนส ซึ่งข้อดีของการเชื่อมโปรโตพลาสท์นี้ คือ สามารถทำให้เกิดลูกผสมได้ แม้ในจุลินทรีย์ที่พบว่าไม่มีการถ่ายลักษณะทางพันธุกรรมตามธรรมชาติ และยังสามารถใช้ได้เมื่อต้องการเชื่อมสายพันธุ์พ่อแม่ที่มีจำนวนมากกว่า 2 สายพันธุ์ขึ้นไป เพื่อให้ได้ลักษณะที่ต้องการโดยไม่มีข้อจำกัด เพียงแต่ทำให้เชื้อนั้นเกิดเป็นโปรโตพลาสท์ได้เท่านั้น แต่อย่างไรก็ตาม การเชื่อมโปรโตพลาสท์ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ จะมีรายละเอียดของเทคนิคที่ใช้แตกต่างกันไป งานวิจัยนี้จึงศึกษาถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเกิดโปรโตพลาสท์,การรีเจนเนอเรชันตลอดจน การเชื่อมโปรโตพลาสท์ของ *Streptomyces sp. 190-1* กับ *Streptomyces sp. 42-9* เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพในการเชื่อมโปรโตพลาสท์สูงสุด

ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดและการริเจนเนอเรทโปรโตพลาสท์

จากการทดลองเลี้ยงเชื้อในภาชนะต่าง ๆ 3 ชนิด คือ ขวดทรงกรวยธรรมดา, ขวดทรงกรวยก้นบุบ และขวดทรงกรวยธรรมดาที่ใส่ขดลวด พบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อในขวดทรงกรวยธรรมดาที่ใส่ขดลวดเชื้อจะมีการเจริญดี ได้เซลล์มาก และลักษณะของไมซีเลียมที่ได้กระจายตัวดีที่สุด เหมาะสำหรับใช้ในการทำโปรโตพลาสท์ โดยเมื่อนำมาทำปฏิกิริยากับไลโซไซม์ จะทำให้ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ได้อย่างทั่วถึง เนื่องจาก *Streptomyces* เป็นเชื้อที่ต้องการอากาศสูง การเลี้ยงในภาชนะที่ทำให้มีการละลายของอากาศลงในอาหารหารเลี้ยงเชื้อสูงเช่น ในขวดทรงกรวยก้นบุบ และ ขวดทรงกรวยธรรมดาที่ใส่ขดลวด จึงทำให้เชื้อมีการเจริญได้ดี โดยเฉพาะในขวดทรงกรวยธรรมดาที่ใส่ขดลวด จะมีพื้นที่ผิวที่ปะทะกับอาหารเลี้ยงเชื้อและเซลล์มากที่สุด ทำให้ไมซีเลียมมีการกระจายตัวดี ไม่พันกันและจับตัวเป็นเม็ด เนื่องจากว่า โดยปกติแล้วเชื้อเหล่านี้มีแนวโน้มที่จะเจริญและเกาะกันเป็นกลุ่ม เพราะไมซีเลียมที่เจริญมาจากสปอร์นั้นจะ

ไม่มีการหัก หรือแยกเป็นท่อน (fragment) และกลุ่มของสปอร์เอง ก็มีแนวโน้มที่จะอยู่รวมกันเป็นกลุ่มอีกด้วย (32) นอกจากนี้ การเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีความหนืดสูง เช่น YEME ซึ่งมีซูโครสความเข้มข้นสูงถึง 34% ก็เป็นส่วนหนึ่ง ที่ช่วยให้ไมซีเลียมกระจายตัวดี และจะมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการเกิดโปรโตพลาสท์ดีขึ้น

นอกเหนือจาก ลักษณะของไมซีเลียมที่ใช้ต้องกระจายตัวดี คุณสมบัติของไมซีเลียมซึ่งมีความไวต่อการถูกย่อยสลายด้วยไลโซไซม์ ก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเกิดโปรโตพลาสท์ มีรายงานหลายฉบับดังที่ได้กล่าวในบทนำ (11, 18, 20, 22) รายงานว่า ความเข้มข้นของไกลซีนที่เหมาะสมจะช่วยให้เกิดโปรโตพลาสท์ได้ดี เนื่องจากทำให้องค์ประกอบผนังเซลล์ผิดปกติ จึงง่ายต่อการทำลายด้วยไลโซไซม์ (19) แต่จากผลการทดลองในงานวิจัยนี้พบว่า การเติมไกลซีนไม่ได้ช่วยให้เกิดโปรโตพลาสท์ดีขึ้น ทั้งใน *Streptomyces sp. 190-1* และ *Streptomyces sp. 42-9* ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับที่ Merdamadi - Tehrani และคณะ ได้รายงานไว้ (27) ว่าไกลซีนไม่มีผลต่อการเกิดโปรโตพลาสท์ของเชื้อ *S. canescens* และ *S. limosus* เช่นกัน ยิ่งกว่านั้น ไกลซีนยังมีผลไปยับยั้งการเจริญของเชื้ออีกด้วย ซึ่งแตกต่างไปจากที่รายงานหลายฉบับกล่าวไว้ ทั้งนี้อาจเพราะเป็นการศึกษาในเชื้อที่ต่างชนิดกัน และเชื้อแต่ละชนิดก็จะมีองค์ประกอบของผนังเซลล์แตกต่างกันไป สำหรับงานวิจัยนี้ การที่ไกลซีนเข้าไปแทนที่ อลานีนทำให้การสร้างผนังเซลล์ผิดปกติไป จึงยับยั้งการเจริญเชื้อ แต่ก็อาจเป็นการเข้าไปแทนที่ในตำแหน่งซึ่งไม่มีผลต่อ cross-link มากนัก เมื่อถูกย่อยด้วยไลโซไซม์จึงไม่ทำให้เกิดโปรโตพลาสท์มากกว่า เมื่อใช้ไมซีเลียมที่ไม่ได้เติมไกลซีน นอกจากนี้การใช้สูตรของอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างไปจากที่เคยมีผู้รายงานไว้ ก็น่าจะเป็นอีกปัจจัยหนึ่งเพราะสูตรของอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันไป จะมีไกลซีนปนอยู่ในปริมาณที่ต่างกัน ในสูตรอาหาร YEME ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ประกอบด้วย ยีสต์เอกซแทรก, เปปโตน, มอลท์เอกซแทรก ก็อาจเป็นแหล่งหนึ่งของไกลซีนด้วย และ Okanishi (20) ก็ได้รายงานว่าความเข้มข้นของสารตัวอื่นในอาหารเลี้ยงเชื้อ อาจมีผลต่อความไวของเปปติโดไกลแคนที่มีต่อไลโซไซม์ด้วยเช่นกัน ทำให้การเติมไกลซีนลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสูตรแตกต่างกันไม่ทำให้เกิดโปรโตพลาสท์ได้ดีเสมอไป

ผลของอายุเชื้อที่มีต่อการเกิดโปรโตพลาสท์ และการรีเจนเนอเรทนั้น จากการทดลองพบว่า เชื้อ *Streptomyces sp. 190-1* รีเจนเนอเรทได้ดีที่สุดในช่วงระหว่าง late log phase และ stationary phase ส่วน *Streptomyces sp. 42-9* นั้นรีเจนเนอเรทได้ดีในช่วง exponential phase ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานหลายฉบับ ที่กล่าวว่า การรีเจนเนอเรทจะเกิดได้ดีที่สุดเมื่อใช้โปรโตพลาสท์ที่เตรียมจากเชื้อที่มีอายุอยู่ในช่วง exponential phase ถึง late log phase (10, 14, 20) และยังเป็นการยืนยันอีกว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการรีเจนเนอเรทของเชื้อแต่ละชนิดนั้นเป็นสภาวะที่เฉพาะตัว (species specific)

ในการหาค่าความถี่ในการรีเจนเนอเรทนั้น จำเป็นต้องรู้สัดส่วนของโปรโตพลาสท์ที่เตรียมได้ กับชิ้นส่วนของไมซีเลียมที่ปะปนมาในขั้นตอนการทำโปรโตพลาสท์ และสามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการรีเจนเนอเรท การวิเคราะห์ชิ้นส่วนไมซีเลียมที่ปนมา ทำได้โดยการนำโปรโตพลาสท์ที่เตรียมได้มาทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงแรงดันออสโมติกอย่างฉับพลัน (osmotic shock) ซึ่งในงานวิจัยนี้ ทำโดยกระจายโปรโตพลาสท์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ L ซึ่งปราศจากสารประกอบที่ทำหน้าที่รักษาแรงดันออสโมติกที่เหมาะสมสำหรับโปรโตพลาสท์ จึงคาดว่า จะทำให้โปรโตพลาสท์แตกได้ คงเหลือแต่ชิ้นส่วนไมซีเลียมที่ยังเจริญได้ แต่ผลการทดลองนี้พบว่า ปริมาณโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ L และอาหารเลี้ยงเชื้อ R_2 ซึ่งเหมาะสมต่อการรีเจนเนอเรทโปรโตพลาสท์มีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก โดยเฉพาะใน *Streptomyces sp. 42-9* ดังผลการทดลองในตารางที่ 3 และรูปที่ 5 แสดงว่าโปรโตพลาสท์ของ *Streptomyces sp. 190-1* และ *Streptomyces sp. 42-9* นั้นสามารถทนต่อความผันแปรของแรงดันออสโมติกได้ในช่วงกว้าง ดังนั้น การหาจำนวนชิ้นส่วนไมซีเลียมที่ปะปนมากับการเตรียมโปรโตพลาสท์ จึงทำโดยการใช้ 0.01% SDS ซึ่งจะทำให้ได้ค่าที่ถูกต้องที่สุด เนื่องจาก SDS เป็น anionic detergent มีสมบัติทำลายผนังเมมเบรนอย่างรุนแรง และทำให้โปรโตพลาสท์แตกทันที

จากการทดสอบความสามารถต้านยาปฏิชีวนะของ *Streptomyces sp. 190-1* และ *Streptomyces sp. 42-9* พบว่า *Streptomyces sp. 190-1* มีความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะ เตตราซัยคลิน และ *Streptomyces sp. 42-9* มีความ

สามารถต้านยาแอมพิซิลิน ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *Streptomyces* ทั้ง 2 ชนิดนี้มียีนสำหรับต้านยา 2 ชนิด นี้อยู่ในจีโนม แต่เมื่อนำมาทำการคอนจูเกชัน และเชื่อมโปรโตพลาสท์ พบว่าเชื้อจะมีการเจริญต่ำบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เสริมด้วยแอมพิซิลิน ซึ่งสาเหตุดังกล่าวยังไม่สามารถหาเหตุผลมาอธิบายได้ ดังนั้น จึงได้เพิ่มความสามารถของ *Streptomyces sp. 42-9* ในการต้านยาปฏิชีวนะชนิดอื่น เพื่อใช้เป็น marker ในการคัดเลือกลูกผสมแทนการใช้แอมพิซิลิน ซึ่งทำได้โดยการทรานสฟอร์มพลาสมิด pIJ 4027 ซึ่งมียีนต้านยาอีริโทรมัยซิน เข้าไปใน *Streptomyces sp. 42-9* ทำให้เชื้อนี้มีคุณสมบัติต้านยาอีริโทรมัยซินเพิ่มขึ้น และเมื่อนำมาทำการคอนจูเกชัน และ เชื่อมโปรโตพลาสท์ เชื้อมีการเจริญได้ดี และจำนวนลูกผสมที่ได้มีจำนวนมาก

จากการเชื่อมโปรโตพลาสท์ของเชื้อมาตรฐาน *S. coelicolor M 124* กับ *S. coelicolor M130* พบว่าได้ความถี่ในการรีคอมบิเนชันเป็น 6.73×10^{-4} แม้ว่าค่าที่ได้นี้จะต่ำกว่าค่าที่ Hopwood (50) รายงานไว้ คือ 8.4×10^{-2} ทั้งนี้อาจเนื่องจากปัจจัยและสภาวะแวดล้อมที่ใช้ต่างกัน แต่อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองนี้เป็นการยืนยันได้ว่า สภาวะและปัจจัยต่าง ๆ ที่ใช้ในงานวิจัยนี้สามารถเกิดรีคอมบิเนชันของจุลินทรีย์จริง

สำหรับการศึกษาการคอนจูเกชัน และการเชื่อมโปรโตพลาสท์ระหว่าง *Streptomyces sp.190-1* และ *Streptomyces sp.42-9* ให้ค่าความถี่ในการการรีคอมบิเนชันเป็น 4.54×10^{-7} และ 1.46×10^{-3} ตามลำดับ ซึ่งการเชื่อมโปรโตพลาสท์ ให้ค่าความถี่ของรีคอมบิเนชัน สูงกว่าการคอนจูเกชัน 3125 เท่า ส่วนการรีคอมบิเนชันใน *Streptomyces sp.190-1* และ *Streptomyces sp. 42-9/pIJ4027* โดยวิธีคอนจูเกชันมีค่า 8.41×10^{-5} และวิธีเชื่อมโปรโตพลาสท์ มีค่า 4.15×10^{-2} ซึ่งการเชื่อมโปรโตพลาสท์ จะมีค่าสูงกว่าการคอนจูเกชัน 497 เท่า ดังนั้นจะเห็นว่า การเชื่อมโปรโตพลาสท์ น่าจะเป็นวิธีการที่ดี ในการใช้ปรับปรุงสายพันธุ์ เพราะให้ความถี่ในการรีคอมบิเนชันค่อนข้างสูง เมื่อเทียบกับการคอนจูเกชัน ซึ่งโดยปกติจะเกิดในความถี่เพียง 10^{-5} เท่านั้น ถ้าจะให้ประสิทธิภาพของการคอนจูเกชันสูงต้องอาศัย plasmid sex factor ในการนำชิ้นส่วน DNA เข้าไป (51)ส่วนการเชื่อมโปรโตพลาสท์นั้น เป็นการรวมเอาจีโนมของทั้งสายพันธุ์พ่อและแม่เข้าไว้ด้วยกัน กระบวน

การเชื่อมโปรโตพลาสท์นั้น เริ่มจากการมาอยู่รวมกันของโปรโตพลาสท์ เนื่องจากเกิดการ dehydration ด้วย PEG (52) จากนั้นโปรโตพลาสท์จะเกิดการหดตัวและมีรูปร่างผิดไป โปรโตพลาสท์ที่อยู่ใกล้กันจะมาแตะกัน แล้วจึงมีการรวมตัวของโปรตีน และไขมัน บริเวณผนังเมมเบรน โดยอาศัย PEG หรือ Ca^{2+} ซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งในบัฟเฟอร์ P เป็นตัวช่วย จะมีการจัดเรียงตัวของโมเลกุลไขมันใหม่เป็นผลให้เกิดการเชื่อมกันเป็นบริเวณเล็กๆ ตรงส่วนของเมมเบรนซึ่งแตะกันอยู่ จากนั้นจึงมีการเชื่อมกันของไซโตพลาสซม (52) ทำให้ลูกผสมที่ได้ใหม่นี้ อยู่ในสภาพคล้ายกับเป็นดิพพลอยด์ มีการตั้งสมมติฐานว่า หลังจากที่โปรโตพลาสท์เชื่อมรวมกันแล้ว จีโนมทั้งสองจะแยกเป็นท่อน (fragment) และหลังจากนั้นจะเกิดการ crossing over หลายครั้ง ระหว่างท่อนของจีโนม แล้วมีการแยกตัวไป ให้เป็นลูกผสมที่เป็นแฮพพลอยด์ ที่เสถียร (52)

จากงานวิจัยนี้เมื่อทำการตรวจสอบลูกผสมที่ได้ โดยให้เจริญซ้ำบนอาหารที่ใช้คัดเลือกเฉพาะลูกผสม พบว่า เชื้อทั้งหมดสามารถเจริญได้ แสดงให้เห็นว่า ลูกผสมนี้มีความเสถียรแล้ว ซึ่งสอดคล้องกับที่ Ochi และคณะ (17) ได้ รายงานไว้ว่า ลูกผสมที่ได้จากการเชื่อมโปรโตพลาสท์ของ *S. parvulus* เป็นลูกผสมที่แท้จริง และ Nakano และคณะ (53) ก็ได้ลูกผสมที่เสถียรจากการเชื่อมโปรโตพลาสท์ของ *S. lavendulae* โดยเมื่อถ่ายเชื้อลงไปบน minimal media อีกครั้งเชื้อก็ยังสามารถเจริญได้ทั้งหมด แต่อย่างไรก็ตาม จำนวนลูกผสมที่นำมาทดสอบนี้เป็นการสุ่มตัวอย่างมาเพียงบางส่วนเท่านั้น ซึ่งความจริงแล้ว คงมีบางโคโลนีที่ไม่ใช่ลูกผสมที่แท้จริง โดยมีรายงานหลายฉบับที่กล่าวถึงการเกิดเป็น heteroclone ที่สามารถเจริญได้บนอาหารที่ใช้คัดเลือกเฉพาะลูกผสมเช่นกัน แต่จะไม่เสถียร สามารถเกิดการแยกตัว(segregation) ได้ภายหลัง ทำให้บางลักษณะของเชื้อ เช่น ลักษณะพิเศษที่ใช้เป็น marker ซึ่งสามารถตรวจพบได้ในการคัดเลือกลูกผสมครั้งแรกนั้นหายไป (17, 54, 55) ในการถ่ายเชื้อครั้งต่อ ๆ ไป

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ในงานวิจัยนี้สังเกต พบว่า ลูกผสมที่ได้มีขนาดแตกต่างกัน คือ มีทั้งที่เป็นโคโลนีขนาดใหญ่สามารถเจริญได้ดี และโคโลนีที่มีขนาดเล็ก ทั้งนี้ อาจเนื่องจากมีบางโคโลนีที่เป็น heteroclone ซึ่ง Ochi (55) ก็ได้เคยรายงานว่า โคโลนีที่เจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้คัดเลือกลูกผสม และมี

ขนาดเล็กนั้นเป็น heteroclone เมื่อนำมาทดสอบลักษณะทางพันธุกรรม พบว่า เกือบทั้งหมดนั้นเป็น auxotroph และการที่โคโลนีหยุดเจริญไปนั้น ก็เนื่องจากได้เกิดการแยกตัวไปเป็นลักษณะของสายพันธุ์พ่อ แม่แล้ว ซึ่งตรงกันข้ามกับโคโลนีที่ไม่มีการแยกตัวนั้น จะเป็นโคโลนีที่มีขนาดใหญ่และสม่ำเสมอ นอกจากนี้ มีบางเชื้อซึ่งให้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างไปจากสายพันธุ์ พ่อ แม่ โดยสิ้นเชิง และเมื่อทำการถ่ายเชื้อไปเรื่อย ๆ ก็ยังคงแสดงลักษณะที่เสถียรเช่นเดิม แสดงว่า เชื้อที่ผ่านกระบวนการทำโปรโตพลาสท์ รีคอมบิเนชัน และรีเจนเนอเรชัน นั้น อาจทำให้ลักษณะของเซลล์ที่รีเจนเนอเรทได้ผิดปกติไป

นอกจากนี้ งานวิจัยนี้ยังได้ศึกษาการเชื่อมโปรโตพลาสท์ของตัวเอง (self fusion) ในจุลินทรีย์ที่ศึกษา เพื่อใช้เป็นตัวควบคุม พบว่า เชื้อที่รีเจนเนอเรทได้นั้น ไม่สามารถเจริญบนอาหารที่ใช้คัดเลือกลูกผสม แสดงให้เห็นว่าไม่มีการกลายพันธุ์เกิดขึ้นในระหว่างการทำโปรโตพลาสท์ และลูกผสมที่ได้นั้น ก็น่าจะมาจากการเชื่อมโปรโตพลาสท์ระหว่าง 2 สายพันธุ์ จริง ๆ ซึ่งต่างจากที่ Kohler และคณะ (31) รายงานว่า ในการทำ self fusion ของ *S. avermitilis* สายพันธุ์ MA 4680 พบว่า จะมีการกลายพันธุ์ของเชื้อ ทำให้ได้ลักษณะที่เหมือนลูกผสมถึง 11.9% ซึ่งเป็นปัญหาต่อการวิเคราะห์ลูกผสม นอกจากนี้เขายังได้รายงานอีกว่า การทำให้เกิดโปรโตพลาสท์แล้วนำไปรีเจนเนอเรทโดยไม่ได้เชื่อมโปรโตพลาสท์ ก็สามารถทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้เช่นกัน

การสร้างเอนไซม์ของลูกผสม

จากลูกผสมที่สุ่มมาทั้งหมด 60 โคโลนี พบว่า 20 โคโลนี ผลิตเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสอยู่ในเกณฑ์สูง แต่ก็ยังต่ำกว่า *Streptomyces sp.190-1* และเมื่อตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ไซแลนเนสของทั้ง 20 โคโลนี ที่คัดเลือกมา ก็พบว่าสามารถสร้างเอนไซม์ได้ในปริมาณที่มากน้อยต่างกัน สาเหตุที่ทำให้ลูกผสมเหล่านี้มีการสร้างเอนไซม์ทั้งสองในปริมาณที่ต่างกัน โดยบางเชื้อก็ให้ลักษณะการสร้างเอนไซม์ใกล้เคียงกับสายพันธุ์พ่อ หรือสายพันธุ์แม่อย่างใดอย่างหนึ่ง แต่บางเชื้อก็ให้ลักษณะการสร้างเอนไซม์ซึ่งแตกต่างไปจากสายพันธุ์พ่อ แม่ คือ เป็นลักษณะผสมอยู่ระหว่างกึ่ง

กลางของสายพันธุ์พ่อ แม่ นั้น อาจเนื่องจากในระหว่างที่จีโนมมีการหักเป็นท่อน หลังจากการเชื่อมโปรโตพลาสท์แล้วเกิด crossing - over เพื่อแยกไปเป็น haploid ที่เสถียร (52) อาจทำให้ได้ยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ไม่สมบูรณ์ จึงมีผลให้สร้างเอนไซม์ได้ในปริมาณที่ต่างกัน

เมื่อเลี้ยงเชื้อลูกผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากรำข้าวเป็นองค์ประกอบ เพื่อตรวจสอบแอคติวิตีของไซแลนเนสนั้น พบว่า จะให้แอคติวิตีต่ำกว่า เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ แสดงว่าการสร้างไซแลนเนสในลูกผสมยังเป็นลักษณะชักนำ เนื่องจากกากรำข้าวมีกลูโคสเป็นองค์ประกอบส่วนหนึ่ง นอกเหนือจากไซแลน จึงอาจมีผลยังยั้งการสร้างเอนไซม์นี้ อนึ่ง ในงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นถึงความสามารถของลูกผสมในการสร้างไซแลนเนสเท่านั้น จึงยังไม่ได้ศึกษาสภาวะ หรือองค์ประกอบที่เหมาะสม โดยเฉพาะปริมาณไซแลนในกากรำข้าว ว่ามีผลต่อการสร้างเอนไซม์อย่างไร นอกจากนั้นยังน่าจะมีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม ในการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสโดยลูกผสมเช่นกัน

อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้ก็ประสบผลสำเร็จในการเตรียมลูกผสมที่สามารถผลิตได้ทั้งไซแลนเนส และกลูโคสไอโซเมอเรส ซึ่งคาดว่าจะเป็นประโยชน์ในอนาคต