บทที่ 1

บทนำ

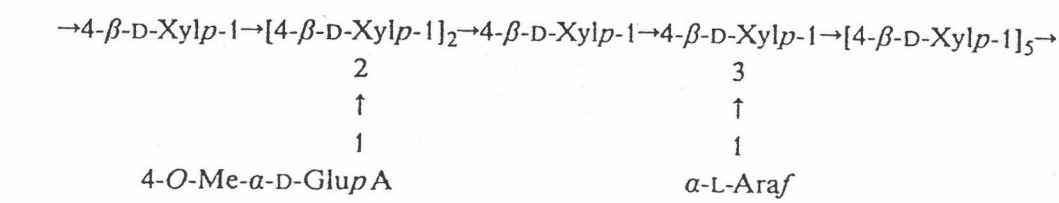
ประวัติความเป็นมา

เซลล์พืชเป็นแหล่งใหญ่ของอินทรีย์คาร์บอนในธรรมชาติ โดยประกอบด้วยพอลิเมอร์ของสารต่างๆ ยึดกันอยู่อย่างแน่นหนา สามารถแยกเป็นองค์ประกอบหลักได้ 3 ชนิด คือ เซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และลิกนิน (lignin) เซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ บีตา-1,4-ไกลโคซิดิก (β-1, 4-glycosidic) ที่เป็นสายตรง ไม่มีสาขาย่อย (unbranched polymer) มีสูตรทั่วไปคือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ ในปริมาณประมาณ 30-50 % ของน้ำหนักแห้ง เฮมิเซลลูโลสเป็นโพลิเมอร์ของน้ำตาลเพนโตส และ/หรือน้ำตาลเฮกโซส ที่สังเคราะห์จากส่วนกอลจิ แอพพาราตัส (golgi apparatus) ของเซลล์พืช (Robinson, 1977) ได้แก่ กลูแคน (glucan) แมนแนน (mannan) และไซแลน (xylan) เป็นต้น แต่จะมีไซแลนเป็นองค์ประกอบหลัก ส่วนลิกนินมีโครงสร้างเป็นสารประกอบเชิงซ้อนประเภท พอลิฟีโนลิก (polyphenolic) ที่สังเคราะห์จากหน่วยฟีนิลโพรพานอยด์ (phenyl propanoid) เกาะกันเป็นโมเลกุลใหญ่ ซึ่งมักห่อหุ้มชั้นเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสเอาไว้ (Wong et al., 1988a)

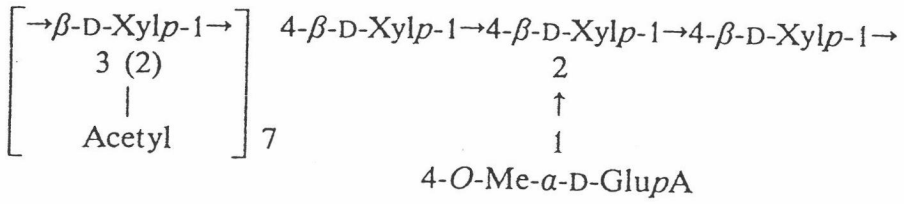
ไซแลนเป็นองค์ประกอบของเซลล์พืชในส่วนของเฮมิเซลลูโลส โดยยึดเกาะกับคาร์โบไฮเดรทชนิดอื่นด้วยพันธะนัน-โควาเลนท์ และยึดเกาะกับส่วนเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสด้วยพันธะไฮโดรเจน ไซแลนพบได้ทั้งในไม้เนื้ออ่อน ไม้เนื้อแข็ง พืชล้มลุก วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น เปลือกข้าวโพด กากเมล็ดฝ้าย รำข้าว ฟางข้าว ธัญพืช ต่างๆ เป็นต้น (Parisi, 1989; Ericksson et al., 1990) แต่ปริมาณและโครงสร้างจะแตกต่างกันไปตามแหล่งที่มาของไซแลนแต่ละชนิด ในไม้เนื้อแข็งพบว่ามีไซแลนประมาณ 20-25 % ของน้ำหนักแห้ง ในไม้เนื้ออ่อนจะมีไซแลนประมาณ 8 % ของน้ำหนักแห้ง ส่วนในไม้ล้มลุกหรือหญ้าโดยเฉพาะวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร พบว่ามีไซแลนประมาณ 15-30 % ของน้ำหนักแห้ง (Goodwin and Mercer, 1972)

ลักษณะโครงสร้างของไซแลน

ไซแลนเป็นพอลิแซคคาไรด์ของดี-ไซโลสที่เชื่อมกันด้วยพันธะบีตา-1,4-ไซโลซิดิกเป็นสายหลัก (backbone) และมีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวชนิดอื่น หรือโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้น ๆ มาเชื่อมต่อปนอยู่ด้วย ยกเว้นในพืชบางชนิดเช่น หญ้าเอสพาโต (esparto grass; Chanda et al., 1950) หรือลำต้นใบยาสูบ (tobacco stalk; Eda et al., 1976) จะมีโครงสร้างเป็นไซแลนชนิดที่ไม่มีสาขาย่อย ไซแลนที่พบในส่วนเอมิเซลลูโลสของไม้เนื้ออ่อนส่วนใหญ่จะเป็นอะราบิโนกลูคูโรโนไซแลน (arabinoglucuronoxylan) ซึ่งมีสายหลักเป็นบีตา-1,4-ดี-ไซโลไพราโนซิล ที่มี 4-โอ-เมทธิล-แอลฟา-ดี-กลูคูโรนิค แอซิด เชื่อมต่อที่ตำแหน่ง โอ-2 และมีแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนส เชื่อมต่อที่ตำแหน่ง โอ-3 ดังแสดงในรูปที่ 1 ส่วนไซแลนที่พบในไม้เนื้อแข็งมักเป็น โอ-อะเซติล-4-โอ-เมทธิล-กลูคูโรโน-บีตา-ดี-ไซแลน หรือเรียกอีกอย่างว่ากลูคูโรโนไซแลน (glucuronoxylan) มีสายหลักที่ประกอบด้วย บีตา-ดี-ไซโลไพราโนส เชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีตา-1-4 และทุก ๆ 7-10 หน่วยของสายหลักจะมีหมู่อะเซติล (acetyl) มาเชื่อมต่อที่ตำแหน่ง โอ-2 หรือ โอ-3 ส่วน 4-โอ-เมทธิล-แอลฟา-ดี-กลูคูโรนิคแอซิด จะเชื่อมกับสายหลักด้วยพันธะบีตา-1,2 ประมาณทุกๆ 10 หน่วยของไซแลน (Timell, 1967) ดังแสดงในรูปที่ 2 นอกจากนี้ไซแลนในไม้เนื้ออ่อนและไม้เนื้อแข็งยังแตกต่างกันที่จำนวนหน่วยที่มาต่อกัน (degree of polymerization) โดยไม้เนื้ออ่อนจะประกอบด้วย 70-130 หน่วย ในขณะที่ไม้เนื้อแข็งจะประกอบด้วย 150-200 หน่วย (Ericksson et al., 1990)



รูปที่ 1 ลักษณะโครงสร้างของไซแลนในไม้เนื้ออ่อน (Ericksson et al., 1990)



รูปที่ 2 ลักษณะโครงสร้างของไซแลนในไม้เนื้อแข็ง (Ericksson et al., 1990)

ประโยชน์ของไซแลน

เนื่องจากไซแลนเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลไซโลส ดังนั้นจึงมีน้ำตาลไซโลสเป็นองค์ประกอบหลัก น้ำตาลชนิดนี้สามารถเรียกอีกอย่างว่า wood sugar เป็นพวกอัลโดเพนโทส (aldopentose) ที่มีสูตรเคมี $C_5H_{10}O_5$ มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 150.13 โดยปกติจะไม่พบในรูปอิสระ เป็นสารที่ให้รสหวาน มีจุดหลอมเหลว 144-145 องศาเซลเซียส น้ำตาลชนิดนี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายประการเช่น ผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว ผลิตกรดอะซิติก ผลิตเอธานอล บิวธานอล ผลิตไซลิทอล (Screenath and Joseph, 1978; Slininger et al., 1987; Barbosa et al., 1988; Neale et al., 1988; Wong et al., 1988b; Kotter and Ciriary, 1993) เป็นต้น

การย่อยสลายไซแลน

การย่อยสลายไซแลนให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว สามารถทำได้ด้วยการย่อยสลายด้วยกรด (acid hydrolysis) การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (enzyme hydrolysis) หรือการใช้ทั้งสองวิธีร่วมกัน (Tsao and Chiang, 1983)

1. การย่อยสลายไซแลนด้วยกรด

การใช้กรดย่อยสลายไซแลนเพื่อผลิตน้ำตาลไซโลสเป็นวิธีที่ง่าย และรวดเร็ว แต่ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะรุนแรงและไม่เจาะจง ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่ได้จะไม่บริสุทธิ์ ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการเช่น เฟอฟูรัล ซึ่งเป็นพิษต่อการเลี้ยงเชื้อ (Paturau, 1989) นอกจากนี้ถ้าจะนำน้ำตาลที่ได้ไปใช้จะต้องแยกกรดที่ปนอยู่ด้วยออกเสียก่อน ส่วนอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ก็ต้องทนต่อสภาพกรดเข้มข้นหรืออุณหภูมิสูงได้ (Woodward, 1987; Parisi, 1989)

2. การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์

การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์ เป็นปฏิกิริยาที่จำเพาะกว่าการใช้กรดในการย่อยสลาย เนื่องจากภาวะที่ใช้ขณะทำงาน อุณหภูมิและความเป็นกรดด่างก็ไม่รุนแรง นอกจากนี้ยังไม่ทำให้เกิดสารประกอบที่เป็นพิษขึ้นด้วย ทำให้สามารถนำน้ำตาลที่เกิดขึ้นไปใช้ได้อย่างต่อเนื่อง เอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายไซแลน (xylan degrading enzymes) สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายประการเช่น ใช้ในกระบวนการฟอกขาวเพื่อผลิตเยื่อกระดาษ การลดความหนืดของอาหารสัตว์ และอุตสาหกรรมอาหาร รวมถึงการย่อยสลายไซแลนให้เป็นไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ และน้ำตาลไซโลสซึ่งมีประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมอาหารหลายชนิด (Wong and Saddler, 1992; Onysko, 1993) ซึ่งเอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะบีตา-1,4 ของสายหลักให้ได้น้ำตาลไซโลสมีอยู่ 2 ชนิดใหญ่ ๆ คือ

2.1 เอนโดไซแลเนส (endo-xylanase) หรือ 1,4-บีตา-ดี-ไซแลน-ไซลาโนไฮโดรเลส (1,4-β-D-xylan-xylanohydrolase, EC 3.2.1.8) เอนไซม์ชนิดนี้จะย่อยสลายพันธะ 1,4-บีตา-ดี-ไซโลไพราโนสของไซแลนแบบสุ่ม เรียกกระบวนการนี้ว่ากลไกแบบเอนโด (endo-mechanism) ได้ไซโลสและไซโลโอลิโกแซคคาไรด์เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของการย่อยสลาย

2.2 บีตาไซโลซิเดส (β-xylosidase) หรือ 1,4-บีตา-ดี-ไซแลน-ไซโลไฮโดรเลส (1,4-β-D-xylan-xylohydrolase, EC 3.2.1.37) เอนไซม์ชนิดนี้จะย่อย

สลายพันธะ 1,4-บีตา-ดี-ไซโลไพราโนส ตามลำดับทีละ 1 หน่วยจากปลายสายด้านนอนรีดิวซ์ (non-reducing end) เรียกกระบวนการนี้ว่า กลไกแบบเอคโซ (exo-mechanism) ได้ไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของการย่อยสลาย อาจเรียกเอนไซม์ชนิดนี้ได้อีกอย่างว่า เอกโซ-ไซแลเนส (exo-xylanase) (Dekker and Richards, 1976; Rapp and Wagner, 1986) ซึ่งเป็นเอนไซม์ชนิดสำคัญที่ใช้ในการผลิตน้ำตาลไซโลสให้เป็นไปอย่างสมบูรณ์ และมีประสิทธิภาพ (Aspinall, 1980) นอกจากนี้ยังสามารถใช้ผลิตไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ (Kizawa et al., 1991) และสังเคราะห์ไซโลไซด์ (xyloside) ซึ่งใช้เป็นไพรเมอร์ของคอนดรอยติน ซัลเฟต และการสังเคราะห์โปรตีโอไกลแคน (Shinoyama et al., 1991)

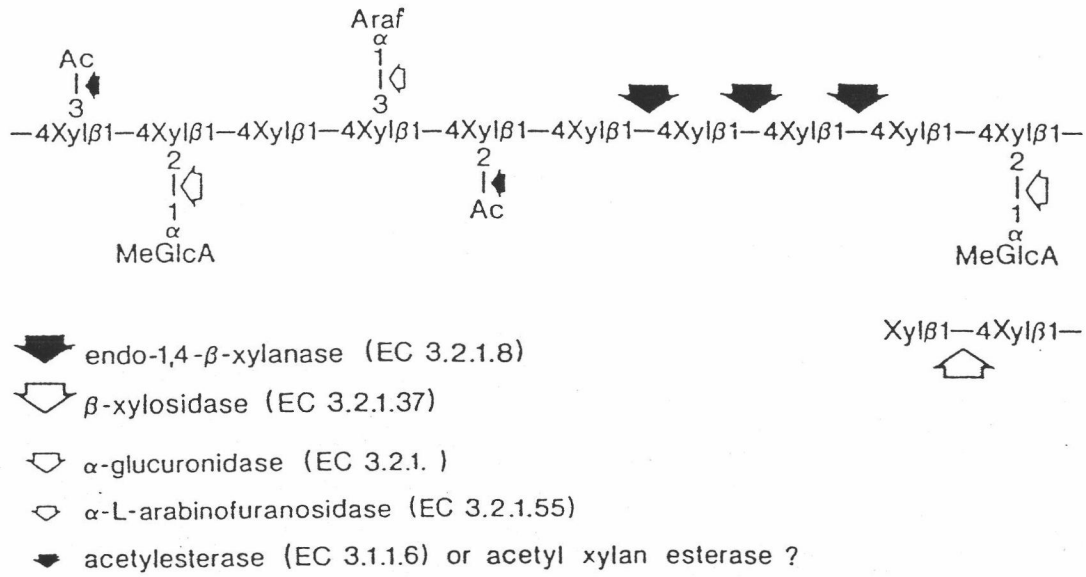
เนื่องจากไซแลนมีโครงสร้างที่ผันแปรไปตามพันธะสาขา ดังนั้นการย่อยสลายไซแลนจากเซลล์พืชให้เกิดได้อย่างสมบูรณ์จึงต้องใช้เอนไซม์ชนิดอื่นนอกเหนือไปจากไซแลเนส และบีตาไซโลซิเดส ดังต่อไปนี้ คือ

: แอลฟา-แอล-อะราบิโนซิเดส (α-L-arabinosidase, EC 3.2.1.55) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายหมู่นอน-รีดิวซ์-แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟูราโนซิล ของแอลฟา-แอล-อะราบิโนส อะราบิแนน อะราบิโนไซแลน และอะราบิโนกาแลคแทน ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายของการย่อยสลายเป็นแอล-อะราบิโนส (IUB, 1984) เป็นเอนไซม์ที่พบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด (Dekker and Richards, 1976)

: แอลฟา-ดี-กลูคูโรโนซิเดส (α-D-glucuronosidase, EC 3.2.1.) จะย่อยสลายพันธะแอลฟา-1,2 ที่เชื่อม 4-โอ-เมทธิล-ดี-กลูคูโรนิคแอซิด กับสายหลักให้หลุดออกมา

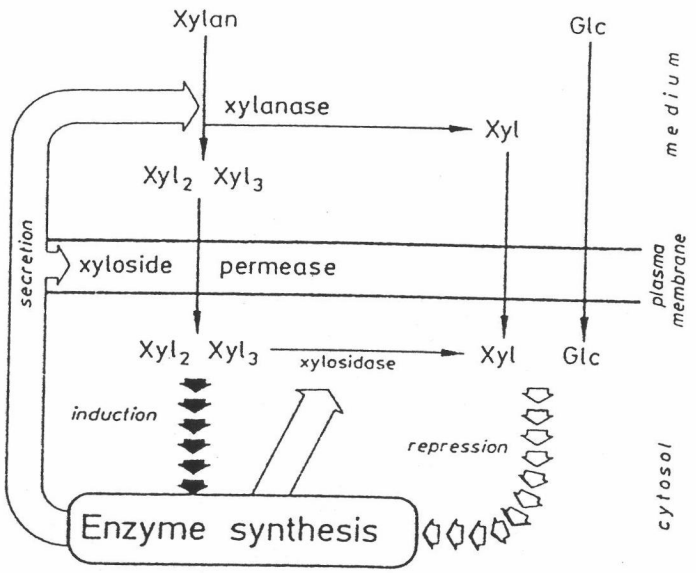
: อะเซติล(ไซแลน)เอสเทอเรส acetyl(xylan)esterase, EC 3.1.1.6 จะย่อยสลายพันธะบีตา-1,2 และ บีตา-1,3 ที่เชื่อมหมู่อะเซติลกับสายหลัก ให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรดอะซิติก (Reese et al., 1969)

จากเอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายไซแลนทั้งหมดที่กล่าวมาแล้ว สามารถแสดงแผนภาพรวมการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มนี้เพื่อย่อยสลายโครงสร้างของไซแลนได้ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายไซแลน (Biely, 1985)

Biely (1985) ได้ศึกษารูปแบบการย่อยสลายไซแลนด้วยไซแลเนส และบีตาไซโลซิเดสของยีสต์ *Cryptococcus albidus* ดังแสดงในรูปที่ 4 จะเห็นว่าเมื่อจุลินทรีย์ปล่อยไซแลเนสออกมานอกเซลล์เพื่อย่อยไซแลนให้เป็นไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ และไซโลสแล้ว จุลินทรีย์จะใช้ระบบแอคทีฟ ทรานสปอร์ต นำเอาไซโลโอลิโกแซคคาไรด์เข้าสู่เซลล์ จากนั้นบีตาไซโลซิเดสในเซลล์จึงทำงานต่อเพื่อย่อยให้เกิดน้ำตาลไซโลส แต่ในจุลินทรีย์บางชนิด เช่นแบคทีเรียในลำไส้ (ruminant bacteria) ซึ่งอยู่ในภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนสายสั้น ๆ ที่เกิดจากการทำงานของจุลินทรีย์ชนิดอื่นแล้ว พบว่าถึงแม้จะสร้างไซแลเนสได้ก็จะไม่ปล่อยออกมานอกเซลล์



รูปที่ 4 ลักษณะการย่อยสลายไซแลนของ *Cryptococcus albidus* (Biely, 1985)

Glc = D-Glucose Xyl_2 = xylobiose

Xyl = D-xylose Xyl_3 = xylotriose

Reese และคณะ (1973) ได้ศึกษาความสามารถในการสร้างบีตาไซโลซิเดสของ *Aspergillus niger* GM877 พบว่าเอนไซม์ชนิดนี้ถูกสร้างไว้ภายในเซลล์ ในระยะ early stage และปล่อยออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อผ่านระยะนี้ไป โดยเมื่อเพาะเลี้ยงเกิน 6 วัน จะตรวจพบเอนไซม์ในน้ำเลี้ยงเชื้อแทน ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกันกับ *Botryodiplodia* sp. QM7092 ส่วนในแบคทีเรีย และยีสต์บางชนิดพบว่าบีตาไซโลซิเดสเป็น cell-associated โดยสร้างขึ้นจากภายในไซโตซอล (cytosol)ในรูป soluble form (Biely, 1985) หรือใน *Cellulomonas uda* (Rapp and Wagner, 1986) พบว่าบีตาไซโลซิเดสถูกสร้างขึ้นระหว่างการเจริญ โดยอยู่ในส่วนช่องว่างของชั้นเพอริพลาสมิค (periplasmic space) และผนังเซลล์ ส่วนอายุของจุลินทรีย์ที่ให้บีตาไซโลซิเดสสูงสุดพบว่ามักอยู่ในช่วงปลายระยะ log phase เช่นใน *Bacteroides xylanolyticus* X5-1 (Schyns and Stams, 1992) *Thermomonospora fusca* (McCarthy and Bachmann, 1992) *Thermomonospora* (Ristroph and Humphreyt, 1985) หรือ *Thermoanaerobacter ethanolicus* (Shao and Wiegel, 1992) เป็นต้น ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ชนิดภายในเซลล์

Ball และ McCarthy (1989) ได้แยกเชื้อแอคติโนมัยสีทมากกว่า 200 สายพันธุ์ เพื่อศึกษาเอนไซม์ที่ย่อยสลาย ball-milled wheat straw เพื่อใช้ในการผลิตน้ำตาล พบว่าแอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่จะสร้างบีตาไซโลซิเดสไว้ภายในเซลล์ มีเพียง 2 สายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถปล่อยบีตาไซโลซิเดสออกมานอกเซลล์ แต่ก็มีปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ส่วนการสร้างบีตาไซโลซิเดสในเชื้อราเช่น *Aspergillus* spp. หรือ *Trichoderma* spp. พบว่าเป็นเอนไซม์ชนิดที่ปล่อยออกนอกเซลล์ (John et al., 1979) ซึ่งต่างจากแบคทีเรียซึ่งจะมีทั้งสร้างไว้ภายในเซลล์และปล่อยออกมานอกเซลล์

ในการทำงานของบีตาไซโลซิเดสเพื่อย่อยสลายไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ ให้ได้น้ำตาลไซโลส ได้มีผู้ศึกษาไว้เช่น

Kersters-Hilderson และคณะ (1976) พบว่าบีตาไซโลซิเดสจาก *Bacillus pumilis* ทำงานแบบ single displacement mechanism โดยไม่มีการสร้างสารตัวกลาง (intermediate, enzyme-xylosyl complex) ซึ่งเมื่อศึกษาการย่อยพันธะบีตา-1,4 พบว่าจะเริ่มย่อยพันธะบีตา-1,4 ของไซโลโอลิโกแซคคาไรด์จากปลายสายด้านนอน-รีดิวซ์ ทีละ 1 หน่วย โดยเปลี่ยนจากไซโลเตตระโอส (x_4) เป็นไซโลไตรโอส (x_3) ไซโลไบโอส (x_2) และไซโลส (x) ตามลำดับ

นอกจากนี้ Fukuda และคณะ (1969) พบว่าบีตาไซโลซิเดสจาก marine gastropod (*Charonia lampus*) สามารถย่อยสลายพันธะบีตา-ไซโลซิดิกและบีตากลูโคซิดิกได้ ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับบีตาไซโลซิเดส จาก *Chaetomium trilaterale* (Uziie et al., 1985) ซึ่งสรุปได้ว่า บีตาไซโลซิเดส และบีตา-กลูโคซิเดสมีอยู่ใน catalytic site เดียวกัน หรืออาจมี binding site ที่ต่างกัน แต่อยู่ใน active center ของเอนไซม์ชนิดเดียวกัน

แหล่งของบีตาไซโลซิเดส

บีตาไซโลซิเดสพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น รา แบคทีเรีย แอคติโนมัยสีท ยีสต์ โปรโตซัว พืช ผลไม้ และแมลง (Reese et al., 1973; Pou-Llinas and Driguez, 1987; Ball and McCarthy, 1989; O'Neill et al., 1989; Nanmori et al., 1990; Takagaki et al., 1990; Ronen et al., 1991; Smith et al., 1991) แต่แหล่งของเอนไซม์ที่มีผู้นิยมศึกษาเพื่อใช้ในการผลิตบีตาไซโลซิเดส มักเป็นจุลินทรีย์ ซึ่งจุลินทรีย์บางสายพันธุ์จะสร้างและปล่อยเอนไซม์ออกมานอกเซลล์(extracellular enzyme) แต่บางสายพันธุ์จะสร้างและเก็บไว้ภายในเซลล์ (intracellular enzyme) ตัวอย่างสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างบีตาไซโลซิเดสได้แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ชนิดจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างบีตาไซโลซิเดสได้

สายพันธุ์จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus awamori	Tenkanen และคณะ, 1993.
Aspergillus awamori AANTG 19	Smith และ Wood, 1991a.
Aspergillus foetidus	Biely และ Poutanen, 1989.
Aspergillus fumigatus	Lindner และคณะ, 1994.
Aspergillus fumigatus Fresenius	Kitpreechavanich และคณะ, 1992.
Aspergillus niger	John และคณะ, 1979.
Aspergillus niger NCIM1207	Gokhale และคณะ, 1986.
Aspergillus niger 15	Rodionova และคณะ, 1983.
Aspergillus ochraceus	Biswas และคณะ, 1987.
Aspergillus oryzae	Tenkanen และคณะ, 1993.
Aspergillus terreus	Biely และ Poutanen, 1989.
Aureobasidium pullulans	Tenkanen และคณะ, 1993.

ตารางที่ 1 (ต่อ)

สายพันธุ์จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Bacillus circulan	Ratto และคณะ, 1992.
Bacillus stearothermophilus	Nanmori และคณะ, 1990.
Bacillus subtilis	Lindner และคณะ, 1994.
Bacteroides xylanoticus	Schyns และ Stams, 1992.
Butyrivibrio fibrisolvens	Utt และคณะ, 1991.
Cellulomonas uda	Rapp และ Wagner, 1986.
Chaetomium trilaterale	Uziie และคณะ, 1985.
*Clostridium acetobutyricum*ATCC824	Lee และ Forsberg, 1987.
Clostridium stercorarium	Wolfgang และคณะ, 1990.
Cryptococcus albidus	Biely และคณะ, 1980.
Dictyoglomus sp.	Ratto และคณะ, 1994.
Emericella nidulans	Matsuo และ Yasui, 1984b.
Fibrobacter succinogenes	Smith และ Forsberg, 1991.
Humicola lanuginosa	Kitpreechavanich และคณะ, 1984.
Neocallimastix frontalis	Hebraud และ Fevre, 1990.
Neurospora crassa	Deshpande และคณะ, 1985.
Penicillium funiculosum	Mishra และคณะ, 1985.
Penicillium wortmanni	Win และคณะ, 1987.
Penicillium wortmanni IF07237	Matsuo และคณะ, 1987.
Phanerochaete chrysosporium	Copa-Patino และคณะ, 1993.
Pullularia pullulans	Pou-Llinas และ Driguez, 1987.
Rhodobacter marinus	Dahlberg และคณะ, 1993.
Sclerotinia sclerotiorum	Riou และคณะ, 1991.

ตารางที่ 1 (ต่อ)

สายพันธุ์จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Shizophyllum commune	Tenkanen และคณะ, 1993.
Streptomyces lividans 1326	Kluepfel และคณะ, 1986.
Streptomyces olivochromogenes	Tenkanen และคณะ, 1993.
Streptomyces sp.	Nakanishi และคณะ, 1987.
Streptomyces sp. EC1	Godden และคณะ, 1989
Thermoanaerobacter ethanolicus	Shao และ Wiegel, 1992.
Thermoanaerobacterium saccharolyticum	Lee และคณะ, 1993.
Thermoascus aurantiacus	Gomes และคณะ, 1994.
Thermomonospora fusca	McCarthy และ Bachmann, 1992.
Thermomonospora strain LL	Ristroph และ Humphreyt, 1985.
Thermomyces lanuginosa	Gomes และคณะ, 1993a.
Trichoderma lignorum	Defaye และคณะ, 1985.
Trichoderma reesei	Tenkanen และคณะ, 1993.
Trichoderma viride	Matsuo และ Yasui, 1964a.

การสร้างและปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการสร้างบีตาไซโลซิเดสโดยจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

1. การชักนำให้เกิดการสร้างบีตาไซโลซิเดสโดยสารชักนำที่เป็นแหล่งคาร์บอน

บีตาไซโลซิเดส เป็นเอนไซม์ที่มีรายงานหลายฉบับแสดงไว้ว่าเป็น inducible enzyme ที่ถูกชักนำการสร้างด้วยแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ และในรายงานบางฉบับได้กล่าวว่าบีตาไซโลซิเดสเป็นทั้ง inducible และ constitutive enzyme ซึ่ง Rapp และ

Wagner (1986) ได้ศึกษาการสร้างบีตาไซโลซิเดสภายในเซลล์ของ *Cellulomonas uda* พบว่า ตามปกติเมื่อจุลินทรีย์เจริญในแหล่งคาร์บอนที่เป็น กลูโคส กาแลคโตส แมนโนส อะราบิโนส ไซโลส เซลโลไบโอส มอลโตส หรือแป้ง จุลินทรีย์จะสร้างบีตาไซโลซิเดสได้ในช่วง 0.03-0.08 หน่วยต่อมล. แต่เมื่อมีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าจะทำให้ปริมาณเอนไซม์ที่สร้างขึ้นสูงกว่าเดิมเป็น 0.21 หน่วยต่อมล. ส่วนรายงานอื่นๆ ที่มีผู้ศึกษาเกี่ยวกับแหล่งคาร์บอนต่อการสร้างบีตาไซโลซิเดส เช่น

Nakanishi และคณะ (1987) ได้ศึกษาบีตาไซโลซิเดสใน *Streptomyces* sp. พบว่าเป็นเอนไซม์ภายในเซลล์ที่สามารถชักนำการสร้างเอนไซม์ได้ด้วย ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ ไซแลน และบีตา-ไซโลไซด์ โดยไซโลไบโอสจะให้ผลการชักนำได้ดีที่สุดและมากกว่าการใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งไซโลไบโอสให้แอคติวิตีของบีตาไซโลซิเดสเท่ากับ 0.14 หน่วยต่อมล. ในขณะที่ไซแลนให้แอคติวิตีของบีตาไซโลซิเดสเท่ากับ 0.13 หน่วยต่อมล. แต่ใน *Aspergillus terreus* (Iizuka et al., 1992) พบว่ากลูโคส กลีเซอรอล แลคโตส มอลโตส หรือ เซลโลไบโอส จะไม่สามารถชักนำการสร้างบีตาไซโลซิเดสได้เลย

Ratto และคณะ (1992) พบว่าการสร้างบีตาไซโลซิเดสของ *Bacillus circulans* สามารถชักนำได้ด้วยไซแลน ส่วนกลูโคสและไซโลสจะให้ผลกดการสร้างเอนไซม์อย่างมาก ซึ่งเมื่อใช้ไซโลสหรือกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนไซแลนจะทำให้แอคติวิตีลดลงจาก 6 หน่วยต่อมล. เหลือเพียง 0.144 และ 0.078 หน่วยต่อมล. ตามลำดับ ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับ *Butyrivibrio fibrisolvens* (Sewell et al., 1988) หรือ *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* (Lee et al., 1993) ซึ่งพบว่ากลูโคสจะมีผลทำให้เกิด catabolic repressed นอกจากนี้ Lindner และคณะ (1994) ได้ศึกษาการสร้างเอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายไซแลนใน *Bacillus subtilis* พบว่ายีนที่เป็นรหัสของบีตาไซโลซิเดสเป็นส่วนเดียวกับส่วนของ carbon catabolite repression regulation ทำให้กลูโคสมีผลกดการสร้างเอนไซม์

Schyns และ Stams (1992) ได้รายงานการสร้างบีตาไซโลซิเดสในกลุ่มย่อยสลายไซแลนของ *Bacteroides xylanolyticus* X5-1 พบว่าไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน

ที่สามารถชักนำการสร้างบีตาไซโลซิเดสได้เป็นอย่างดี โดยให้แอคติวิตีของบีตาไซโลซิเดสเท่ากับ 0.24 หน่วยต่อมก.โปรตีน ส่วนการใช้ ดี-ไซโลส และแอล-อะราบิโนส เป็นแหล่งคาร์บอนสามารถชักนำการสร้างเอนไซม์ได้บ้างถ้าใส่ในปริมาณที่เหมาะสม แต่ถ้าใส่มากเกินไปจะกดการสร้างเอนไซม์ ส่วนการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าจะทำให้แอคติวิตีลดลงเหลือเพียง 0.001 หน่วยต่อมก.โปรตีน นอกจากนี้ยังพบว่า เฮกโซส เซลโลไบโอส และ ไพรูเวท จะมีผลกดการสร้างเอนไซม์ด้วย

Lee และคณะ (1993) พบว่าไซแลนและไซโลสสามารถชักนำการสร้างเอนไซม์ภายในเซลล์ของ *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* B6A-RI ได้ โดยที่ไซแลน สามารถชักนำการสร้างเอนไซม์ได้ดีกว่าไซโลส ซึ่งแอคติวิตีของการใช้ไซแลนและไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน มีค่าเท่ากับ 0.272 และ 0.087 หน่วยต่อมล.ตามลำดับ แต่ในจุลินทรีย์บางชนิดเช่น *Aureobasidium pullulans* (Dobberstein and Emeis, 1991) พบว่าไซโลสสามารถชักนำการสร้างบีตาไซโลซิเดสได้ดีกว่าไซแลน โดยเมื่อมีไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้แอคติวิตีของบีตาไซโลซิเดสเท่ากับ 0.35 หน่วยต่อมล. ในขณะที่ไซแลนจะให้แอคติวิตีเพียง 0.2 หน่วยต่อมล. หรือใน *Bacillus subtilis* (Lindner et al., 1994) ซึ่งสร้างเอนไซม์ชนิดภายในเซลล์ พบว่าไซโลสสามารถชักนำการสร้างบีตาไซโลซิเดสได้ดีกว่าการใช้ไซแลนถึง 60 % และใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่สั้นกว่า

ส่วนการใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อใช้ชักนำการสร้างบีตาไซโลซิเดสที่มีผู้ศึกษาไว้ เช่น Ghosh และ Kunda (1980) พบว่า Tamarind (*Tamarindus indica*) Kernel Polysaccharide (TKP) สามารถชักนำการสร้างบีตาไซโลซิเดสของ *Aspergillus terreus* ได้เป็นอย่างดี โดยการใช้ TKP 2.5 % ซึ่งเป็นปริมาณที่เหมาะสมที่สุดจะให้แอคติวิตีของบีตาไซโลซิเดสเท่ากับ 2.65 หน่วยต่อมล. แต่ถ้าเพิ่มเป็น 3 % พบว่าจะทำให้แอคติวิตีลดลงเหลือ 2.32 หน่วยต่อมล. ในขณะที่เมื่อมีไซแลน 1 % เป็นแหล่งคาร์บอนให้แอคติวิตีเพียง 0.85 หน่วยต่อมล.

Gokhale และคณะ (1986) พบว่าการใช้รำข้าวสาลี 4 % เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger* NCIM1207 พบว่าให้แอคติวิตีของบีตาไซโลซิเดส

เท่ากับ 6.8 หน่วยต่อมล. ในขณะที่การใช้ไซแลน 4 % เป็นแหล่งคาร์บอนจะให้แอคติวิตีเท่ากับ 4.2 หน่วยต่อมล.

นอกจากนี้ยัง Smith และ Wood (1991a) พบว่าสามารถใช้ ball-milled oat straw เพื่อเลี้ยง *Asperillus awamori* AANTG43 ซึ่งให้แอคติวิตีของบีตาไซโลซิเดสได้เท่ากับ 3.0 หน่วยต่อมล. หรือการใช้เอมิเซลลูโลสจากชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อเลี้ยง *Trichoderma reesei* QM9414 (Dekker, 1983) พบว่าให้แอคติวิตีของบีตาไซโลซิเดสเท่ากับ 2.1 หน่วยต่อมล.

การนำเอาวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ ในบางครั้งจะต้องปรับสภาพวัสดุที่จะนำมาใช้เสียก่อน เช่น การใช้โพแทสเซียม อะซิเทต แช่รำข้าวสาลี เพื่อกำจัดแป้งและส่วนเอนโดสเปิร์มออกก่อนนำไปเลี้ยง *Streptomyces spp.* (Mackenzie et al., 1987) เพื่อให้สร้างไซแลเนส หรือการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์กำจัดส่วนของลิกนินออกจากวัสดุเหล่านั้นเสียก่อน โดย Manonmoni และ Sreekantiah (1987) ได้รายงานไว้ว่า สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์สามารถทำลายลิกนินได้สูง และทำให้เกิดการพองตัวของลิกโนเซลลูโลสด้วย แต่ในรายงานบางฉบับพบว่า การใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ กำจัดลิกนินออกจากฟางข้างสาลี เพื่อนำมาใช้เลี้ยง *Aspergillus ochraceus* เพื่อสร้างไซแลเนส และบีตาไซโลซิเดส (Biswas et al., 1987) จะทำให้บีตาไซโลซิเดสลดลงมากกว่าการใช้ฟางข้าวสาลีชนิดธรรมดาถึง 50 % ซึ่งเขาอธิบายไว้ว่าที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากสารละลายด่างทำให้ฟางข้าวสาลีเกิดการพองตัว และถูกย่อยสลายได้ง่าย ทำให้จุลินทรีย์ใช้อาหารอย่างรวดเร็วจนเกิด product inhibition ในขณะที่ฟางข้าวธรรมดาถูกย่อยได้ยากกว่า ดังนั้นจึงต้องสร้างเอนไซม์ในปริมาณที่มากกว่า

นอกจากแหล่งคาร์บอนทั่วไปที่ใช้ชักนำการสร้างเอนไซม์แล้ว ยังมีรายงานว่าบีตาไซโลซิเดสสามารถชักนำด้วยสาร non-metabolize เช่น Reese และคณะ (1973) พบว่าเมื่อเติม บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งเป็นแหล่งคาร์บอน ในการเลี้ยง *Aspergillus niger* QM877 หรือ *Botryodiplodia* sp. QM7092 พบว่าจะมีบีตาไซโลซิเดสเกิดขึ้น หรือการใช้ เมทธิล-บีตา-ดี-ไซโลไซด์ ชักนำการสร้างเอนไซม์ใน

ยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ เช่น *Cryptococcus albidus* (Biely and Petrakowa, 1984) *Cryptococcus flavus* (Yasui et al., 1984) หรือการใช้ไทโอไซโลไบโอสชักนำการสร้างบีตาไซโลซิเดสใน *Trichoderma lignorum* (Defaye et al., 1985) เป็นต้น

2. ผลของแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการสร้างบีตาไซโลซิเดส

ได้มีผู้ศึกษาเกี่ยวกับแหล่งไนโตรเจนที่ใช้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ เพื่อการสร้างบีตาไซโลซิเดส ไว้เช่น

Ghosh และ Kunda (1980) ได้ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจน ทั้งชนิดอินทรีย์และอนินทรียสารต่อการสร้างบีตาไซโลซิเดสใน *Aspergillus terreus* พบว่าการใช้ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.42 % เป็นแหล่งไนโตรเจนจะให้ผลดีที่สุด โดยมีค่าแอคติวิตีเท่ากับ 8.953 หน่วยต่อมล. ส่วนการใช้ยูเรีย 0.03 % จะให้ปริมาณเอนไซม์ต่ำกว่าเล็กน้อย (7.959 หน่วยต่อมล.) ในขณะที่การใช้แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมซัลเฟต หรือไนโตรเจนชนิดอินทรียสาร เช่น เพปโตน สารสกัดจากยีสต์ จะให้ปริมาณเอนไซม์ในระดับที่ต่ำกว่ามาก ซึ่งเหตุผลที่เป็นเช่นนี้พบว่าเนื่องมาจากความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยพบว่าการใช้ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตหรือยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน จะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความเป็นกรดด่างขณะเพาะเลี้ยงอยู่ในช่วง 6.2-6.3 ในขณะที่การใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดอื่นที่กล่าวมาแล้ว จะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความเป็นกรดด่างขณะเพาะเลี้ยงอยู่ในช่วง 3.0-3.5 ทำให้ได้ปริมาณเอนไซม์เกิดขึ้นในระดับต่ำ ดังนั้นจึงได้ทดลองควบคุมความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.24 % เป็นแหล่งไนโตรเจนให้มีค่าเท่ากับ 4.8 พบว่าจะทำให้แอคติวิตีลดลงจาก 7.1 หน่วยต่อมล. เหลือเพียง 1.92 หน่วยต่อมล.

Smith และ Wood (1991b) ได้ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเพาะเลี้ยง *Aspergillus awamori* CMI142717 พบว่าการใช้คอร์นสตีพ ลิเคอร์ ทดแทนการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดเดิม ซึ่งเป็นสารสกัดจากยีสต์ร่วมกับโปรตีโอส เพปโตน จะทำให้บีตาไซโลซิเดสเกิดขึ้นได้ดีที่สุด โดยเพิ่มจาก 0.0036 หน่วยต่อมก.โปรตีน เป็น 0.0283 หน่วยต่อมก.โปรตีน ในขณะที่การใช้สารสกัดจากยีสต์ หรือ

โปรตีโอส เพปโตน เพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง จะให้ปริมาณบีตาไซโลซิเดสที่เกิดขึ้นอยู่ในระดับต่ำ ส่วนแหล่งไนโตรเจนชนิดอนินทรียสารที่ศึกษาพบว่า แอมโมเนียมคลอไรด์ และโซเดียมไนเตรต ให้ผลการสร้างเอนไซม์ไม่ดีนัก ในขณะที่ยูเรียจะให้ผลที่ดีกว่ามากโดยมีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ 0.027 หน่วยต่อมก.โปรตีน แต่ปริมาณเอนไซม์ที่ได้ก็ยังคงน้อยกว่าการใช้คอร์นสตีพ ลิเคอร์ เป็นแหล่งไนโตรเจน

Kitpreechavanich และคณะ (1992) ได้ศึกษาผลของแอมโมเนียมไนเตรตต่อการสร้างบีตาไซโลซิเดสของ *Aspergillus fumigatus* Fresenius 4-45-IF ซึ่งมีฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการเพิ่มแอมโมเนียมไนเตรตจาก 0.025 กรัมต่อฟางข้าว 5 กรัม เป็น 0.2 กรัมต่อฟางข้าว 5 กรัม สามารถทำให้ปริมาณบีตาไซโลซิเดส เพิ่มขึ้นจาก 1.03 หน่วยต่อกรัมวัสดุหมักแห้งเป็น 2.46 หน่วยต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง แต่ถ้าใช้ปริมาณที่มากเกิน 0.3 กรัมต่อฟางข้าว 5 กรัม พบว่าจะทำให้ปริมาณบีตาไซโลซิเดสลดลงอย่างมาก ซึ่งแสดงว่าปริมาณไนโตรเจนที่มากเกินไปจะยับยั้งการสร้างเอนไซม์ได้เช่นกัน

Ratto และคณะ (1992) ได้ใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ เลี้ยง *Bacillus circulans* VTT-E-87305 โดยใช้คอร์นสตีพ ลิเคอร์ หรือ distiller's spent grain ทดแทนการใช้เพปโตนร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนเดิม พบว่าการใช้คอร์นสตีพ ลิเคอร์ เป็นแหล่งไนโตรเจน จะทำให้ปริมาณบีตาไซโลซิเดสเพิ่มขึ้นจาก 5.1 หน่วยต่อมล.เป็น 6.0 หน่วยต่อมล. ส่วนการใช้ distiller's spent grain เป็นแหล่งไนโตรเจน จะทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงเหลือ 3.6 หน่วยต่อมล.

3. <u>ผลของเกลือแร่ที่มีต่อการสร้างบีตาไซโลซิเดส</u>

เกลือแร่ชนิดต่างๆ ที่นิยมเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เลี้ยงจุลินทรีย์ เพื่อสร้างบีตาไซโลซิเดสได้แก่ โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต แมกนีเซียมซัลเฟต เฟอรัสซัลเฟต แมงกานีสซัลเฟต และแร่ธาตุปริมาณน้อยเป็นต้น (Nakanishi et al.,1987; Pou-Llinas and Driguez, 1987; Nanmori et al., 1990; Smith and Wood, 1991b; Gomes et al., 1994) เป็นต้น แต่ยังไม่มีรายละเอียดว่าเกลือแร่ชนิดใดมีผลในแง่กลไกต่อการสร้างบีตาไซโลซิเดสอย่างไร

4. ภาวะในการเลี้ยงเชื้อ

4.1 ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

จุลินทรีย์แต่ละกลุ่ม จะมีความสามารถในการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มีความเป็นกรดด่างที่แตกต่างกัน จุลินทรีย์จำพวกราจะเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเป็นกรดด่างเริ่มต้นต่ำ แบคทีเรียจะเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเป็นกรดด่างเริ่มต้นค่อนข้างสูง ส่วนแอคติโนมัยสีทจะเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็นกลาง ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้างบีตาไซโลซิเดส จึงแปรตามชนิดของจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์นี้ ดังตัวอย่างที่แสดงในตารางที่ 2

4.2 อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ

อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อสร้างบีตาไซโลซิเดส ส่วนใหญ่จะเป็นอุณหภูมิในช่วง 30 องศาเซลเซียส แต่ก็มีจุลินทรีย์บางชนิด เช่น รา หรือแบคทีเรีย ที่สามารถเจริญในอุณหภูมิสูงและสร้างบีตาไซโลซิเดสที่ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ (Dahlberg et al., 1993; Gomes et al.,1993b)

4.3 ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง

พบว่าการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อสร้างบีตาไซโลซิเดส โดยแบคทีเรียจะใช้เวลาที่สั้น คือประมาณ 2-3 วัน เนื่องจากแบคทีเรียส่วนใหญ่จะสร้างเอนไซม์ได้สูงสุดในช่วงปลายระยะ log phase (McCarthy and Bachmann, 1992; Schyns and Stams, 1992; Shao and Wiegel, 1992) ในขณะที่เชื้อราส่วนใหญ่ต้องใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงประมาณ 4-8 วัน จึงให้ปริมาณเอนไซม์ที่สูงที่สุด (Copa-Patino et al., 1993; Gomes et al., 1994)

ตัวอย่างอุณหภูมิที่เหมาะสม และระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เพื่อสร้างบีตาไซโลซิเดสแสดงไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ชนิดต่างๆเพื่อสร้างบีตาไซโลซิเดส

สายพันธุ์ของจุลินทรีย์	ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ	อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง (°C)	ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (วัน)	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus awamori	4.0	35	4-7	Smith และ Wood, 1991b.
Aspergillus AANG19	4.0	30	7	Smith และ Wood, 1991a.
Aspergillus foetidus	4.8	30	7	Biely และ Poutanen, 1989.
Aspergillus fumigatus	-	40	5	Kitpreechavanich และคณะ,1986.
Aspergillus niger	5.5	30	3	John และคณะ, 1979.
Aspergillus ochraceus	6.5	30	6-14	Biswas และคณะ, 1987.
Aspergillus terreus	4.8-4.9	30	7	Ghosh และ Kunda, 1980.
Bacillus circulan	8.0-8.5	30	2-3	Ratto และคณะ, 1992.
Butyrivibrio fibrisolven	6.8-7.0	37	2	Sewell และคณะ, 1988.
Cellulomonas uda	7.0	30	5	Rapp และ Wagner, 1986.
Chaetomium trilaterale	-	30	7	Uziie และคณะ, 1985.
Emericella nidulans	-	30	4	Matsuo และ Yasui, 1984b.
*Penicillium wortmanni*IF07237	5.4	30	5	Matsuo และคณะ, 1987.

ตารางที่ 2 (ต่อ)

สายพันธุ์ของจุลินทรีย์	ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ	อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง (°C)	ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (วัน)	เอกสารอ้างอิง
Phanerochaete chrysosporium	-	37	8	Copa-Patino และคณะ, 1993.
Pullularia pullulans	5.0	30	2	Pou-Llinas และ Driguez, 1987.
Rhodobacter marinus	7.1	65	2	Dahlberg และคณะ, 1993.
Streptomyces sp. EC1	7.5	37	2	Godden และคณะ, 1989.
Thermoascus aurantiacus	5.0-5.5	45	8	Gomes และคณะ, 1994.
Thermomonospora fusca	8.0	50	3	Bachmann และ McCarthy, 1989.
Thermomonospora strain LL	7.6	55	2	Ristroph และ Humphreyt,1985.
Thermomyces lanuginosa	-	50	5-6	Gomes และคณะ, 1993.
Trichoderma reesei	-	30	4	Poutanen และ Puls, 1988.
Trichoderma reesei QM9414	4.5	28	5	Dekker, 1983.
Trichoderma viride	–	30	4	Matsuo และ Yasui, 1984a.

หมายเหตุ

- หมายถึง ไม่มีรายงานไว้

สมบัติของบีตาไซโลซิเดสและไซแลเนส

1. ผลของอุณหภูมิต่อเอนไซม์

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของบีตาไซโลซิเดส พบว่าขึ้นอยู่กับแหล่งของเอนไซม์ โดยจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะสร้างบีตาไซโลซิเดสที่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ในช่วง 45-55 องศาเซลเซียส แต่ถ้าเป็นจุลินทรีย์ที่ชอบหรือทนอุณหภูมิสูงได้ก็จะสร้างเอนไซม์ชนิดที่ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูงและเสถียรต่ออุณหภูมิสูง เช่น บีตาไซโลซิเดสที่สร้างจาก *Bacillus stearothermophilus* (Nanmori et al., 1990)มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานถึง 70 องศาเซลเซียส และจะเสียแอคติวิตีเมื่อบ่มไว้ที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชม. หรือ บีตาไซโลซิเดสจาก *Thermoanaerobacter ethanolicus* (Shao and Wiegel, 1992) ซึ่งมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานในช่วง 65- 82 องศาเซลเซียส ส่วนไซแลเนสส่วนใหญ่จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานในช่วง 55-60 องศาเซลเซียส แต่จะมีราบางสายพันธุ์เช่น *Cerotocystis paradoxa* (Dekker and Richards, 1976) หรือ *Thermoascus aurantiacus* (Gomes et al., 1994) ที่สร้างไซแลเนสที่มีอุณหภูมิเหมาะสมต่อการทำงานสูงถึง 80 องศาเซลเซียส เป็นต้น

2. ผลของความเป็นกรดด่างต่อเอนไซม์

ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของบีตาไซโลซิเดส และไซแลเนสที่สร้างจากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะค่อนข้างเป็นกรดถึงกลาง ยกเว้นจุลินทรีย์บางสายพันธุ์ เช่น *Thermomonospora fusca* (Bachmann and McCarthy, 1989) มีบีตาไซโลซิเดสที่มีความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานในช่วง 5.0-9.0 ส่วนความเสถียรของบีตาไซโลซิเดสต่อค่าความเป็นกรดด่างพบว่าจุลินทรีย์บางสายพันธุ์ มีความเสถียรต่อค่าความเป็นกรดด่างในช่วงกว้าง เช่น บีตาไซโลซิเดสจากรา *Chaetomium trilaterale* (Uziie et al., 1985) ซึ่งเสถียรต่อค่าความเป็นกรดด่างในช่วง 4.0-11.0 แต่บางสายพันธุ์ เช่น *Trichoderma reesei* (Matsuo and Yasui, 1984a) มีบีตาไซโลซิเดส ที่เสถียรต่อความเป็นกรดด่างในช่วง 3.0-4.0 เท่านั้น ส่วนไซแลเนสส่วนใหญ่มักเสถียรต่อความเป็น

กรดด่างในช่วงกว้างเช่น ไซแลเนสจาก *Trichoderma reesei* (Dekker, 1983) เสถียรต่อความเป็นกรดด่างในช่วง 2.0-10.0 หรือ ไซแลเนสจาก Streptomyces sp. KT23 (Nakajima et al., 1984) เสถียรต่อความเป็นกรดด่างในช่วง 4.0-10.0 เป็นต้น

3. ความจำเพาะต่อซับสเทรต (Km)

รายงานหลายฉบับเช่น Rodionova และคณะ (1983); Matsuo และ Yasui (1984a); Van Doorslaer และคณะ (1985); Poutanen และ Puls (1988) เป็นต้น พบว่าบีตาไซโลซิเดสจะมีแอคติวิตีสูงสุดต่อไซโลไบโอส และจะไม่สามารถย่อยสลายไซแลนได้เลย หรือในจุลินทรีย์บางชนิดพบว่าจะมีแอคติวิตีต่อไซแลนเพียงเล็กน้อย เช่น บีตาไซโลซิเดสจาก *Clostridium acetobutyricum* ATCC824 (Lee and Forsberg, 1987) ส่วนความสามารถในการย่อยสลายไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ พบว่าแอคติวิตีจะลดลงตามความยาวของสายไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ที่เพิ่มขึ้นเช่น Matsuo และ Yasui (1984a)พบว่าบีตาไซโลซิเดสจาก *Trichoderma viride* จะสามารถย่อยสลาย ไซโลไบโอส ได้มากกว่าไซโลไตรโอส ไซโลเตรตะโอส และไซโลเพนตะโอส ตามลำดับ ส่วนบีตาไซโลซิเดสจาก *Emericella nidulans* (Matsuo and Yasui, 1984b) จะสามารถย่อยสลาย ไซโลไตรโอสได้มากกว่าไซโลไบโอส ไซโลเตรตะโอส และไซโลเพนตะโอส ตามลำดับ

ส่วนความจำเพาะต่อซับสเทรตของไซแลเนส พบว่าไซแลเนสส่วนใหญ่จะมีความจำเพาะต่อไซแลนค่อนข้างสูง และ สามารถย่อยสลาย ไซโลไตรโอส ไซโลเตรตะโอส และ ไซโลเพนตะโอสได้ (Nakanishi et al., 1984) ในจุลินทรีย์บางชนิด เช่น *Streptomyces xylophagus* หรือ *Trichoderma trichosporon* พบว่าสร้างไซแลเนสชนิดที่ไม่สามารถย่อยไซโลไบโอสได้เลย (Kawaminami and Iizuka, 1969; Shuttgen and Sahm, 1982) แต่ใน Streptomyces sp. KT-23 พบว่าสามารถย่อยสลายไซแลนให้น้ำตาลไซโลสปนกับไซโลไบโอสได้ (Nakajima et al., 1984)

สมบัติของบีตาไซโลซิเดส และไซแลเนสจากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ สามารถแสดงได้ดังตารางที่ 3 และตารางที่ 4

ตารางที่ 3 สมบัติของบีตาไซโลซิเดสจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ

สายพันธุ์ของจุลินทรีย์	ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม	ความเสถียรต่อกรดด่าง	อุณหภูมิที่เหมาะสม (°C)	อุณหภูมิที่เสียแอคติวิตี 50 %	อุณหภูมิที่เสียแอคติวิตี 100 %	Km (mM)	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus fumigatus	4.5	2.0-8.0	75	-	60°C,20นาที	0.08	Yasui และคณะ, 1989.
Aspergillus niger	6.7-7.0	-	42	-	-	0.22	John และคณะ, 1979.
Aspergillus niger 15	3.8-4.0	3.0-8.0	70	-	70°C, 1ชม.	0.23	Rodionova และคณะ, 1983.
Aureobasidium pullulans	4.5	2.0-9.5	80	-	75°C, 1ชม.	-	Dobberstein และ Emeis, 1991.
Bacillus stearothermophilus	6.0	6.0-8.0	70	-	80°C, 1ชม.	1.20	Nanmori และคณะ, 1990.
Cellulomonas uda	5.4-6.1	-	43-45	60°C,2นาที	-	-	Rapp และ Wagner, 1986.
Chaetomium trilaterale	4.0-5.0	4.0-11	45	-	-	-	Uziie และคณะ, 1985.
Clostridium acetobutyricum ATCC824	6.0-6.5	6.0-8.0	45	-	-	3.70	Lee และ Forsberg, 1987.
Emericella nidulans	4.5-5.0	4.0-6.0	55	-	65°C,30นาที	6.60	Matsuo และ Yasui, 1984b.
Neurospora crassa	4.5-5.0	-	55	-	-	0.047	Desphande และคณะ, 1985.
Rhodobacter marinus	7.1	-	65	90°C,45นาที	-	-	Dahlberg และคณะ, 1993.

ตารางที่ 3 (ต่อ)

สายพันธุ์ของจุลินทรีย์	ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม	ความเสถียรต่อกรดด่าง	อุณหภูมิที่เหมาะสม (°C)	อุณหภูมิที่เสียแอคติวิตี 50 %	อุณหภูมิที่เสียแอคติวิตี 100 %	Km (mM)	เอกสารอ้างอิง
Streptomyces sp.	6.5	6.0-9.0	45	-	55°C,30นาที	-	Nakanishi และคณะ, 1987.
Thermoanaerobacter ethanolicus	5.0-5.2	5.0-8.0	65-82	-	-	-	Shao และ Wiegel, 1992.
Thermoascus aurantiacus	5.0	4.0-6.0	75	70°C, 5วัน	-	-	Ratto และคณะ, 1994.
Thermomonospora fusca	5.0-9.0	-	40-60	65°C, 8ชม.	-	0.89	Bachmann และ McCarthy, 1989.
Thermomonospora strain LL	6.5	5.0-8.0	70	65°C, 5ชม.	-	0.82	Ristroph และ Humphreyt, 1985.
Trichoderma reesei	4.0	3.0-6.0	60	-	60°C, 1วัน	0.08	Poutanen และ Puls, 1988.
Trichoderma reesei QM9414	4.0-5.0	2.5-6.0	55-60	50°C, 1ชม.	-	1.02	Dekker, 1983.
Trichoderma viride	3.5	3.0-4.0	55	-	75°C,30นาที	5.80	Matsuo และ Yasui, 1984a.

หมายเหตุ

- หมายถึง ไม่มีรายงานไว้

ตารางที่ 4 สมบัติของไซแลเนสจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ

สายพันธุ์ของจุลินทรีย์	ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม	ความเสถียรต่อกรดด่าง	อุณหภูมิที่เหมาะสม (°C)	อุณหภูมิที่เสียแอคติวิตีอย่างสมบูรณ์	Km มก./นาที	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus niger	6.0	3.5-9.0	45	-	–	John และคณะ, 1979.
Bacillus subilis	6.0-6.2	5.0-7.0	37-45	70	–	Roncero, 1983.
Bacillus pumilis	6.5	-	45-50	60	–	Panbangred และคณะ, 1983.
Ceratocystis paradoxa	5.1	5.0-10.0	80	100	0.27	Dekker และ Richards , 1976.
Cryptococcus flavus	4.5	3.5-8.0	55	-	3.10	Yasui และคณะ, 1984.
Humicola lanuginosa	6.0	5.0-8.0	65	80	7.30	Kitpreechavanich และคณะ, 1984.
Phanerochate chrysosporium	5.0	4.0-9.0	50	-	0.62	Copa-Patino และคณะ, 1993.
Streptomyces lividans	6.0-6.7	-	60	70	-	Kluepfel และคณะ,1986.
Streptomyces sp.	5.5	-	60	-	-	Okeke และ Paterson, 1992.
Streptomyces sp. E-86	5.5-6.2	4.5-10.5	55-60	70	-	Kusakabe และคณะ, 1977.
Streptomyces sp. KT23	5.5	4.0-10.0	55	-	0.20	Nakajima และคณะ, 1984.
Streptomyces sp. No.3137	5.0-6.0	4.0-8.0	50-60	-	-	Nakanishi และคณะ, 1976.

ตารางที่ 4 (ต่อ)

สายพันธุ์ของจุลินทรีย์	ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม	ความเสถียรต่อกรดด่าง	อุณหภูมิที่เหมาะสม (°C)	อุณหภูมิที่เสียแอคติวิตีอย่างสมบูรณ์	Km มก./นาที	เอกสารอ้างอิง
Streptomyces xylophagus	6.2	5.3-7.3	55-60	70	-	Kawaminami และ Iizuka, 1969.
Termitomyces clypeatus	3.5	-	55	70	4.0	Mukherjee และ Sengupta, 1985.
Thermoascus aurantiscus	5.0	3.0-9.0	80	-	-	Gomes และคณะ, 1994.
Trichoderma reesei	4.0-5.0	2.0-10.0	55-60	61	-	Dekker, 1983.
Trichoderma viride	5.5-6.0	3.0-7.0	-	90	2.5	Shamala และ Sreekantish, 1986.

หมายเหตุ

- หมายถึง ไม่มีรายงานไว้

เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม ทำให้มีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรหลายชนิดที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบเช่น ฟางข้าว ชานอ้อย กากเมล็ดฝ้าย เปลือกข้าวโพด เหลือทิ้งอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อชักนำการสร้างเอนไซม์ได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ประเทศไทยยังเป็นแหล่งของจุลินทรีย์ในดินหลายชนิด *Streptomyces spp.* เป็นแอคติโนมัยสีทกลุ่มหนึ่งที่พบได้ทั่วไปในดิน ส่วนใหญ่จะเป็น saprophyte ที่มีความสามารถสูง ในการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส (Kluepfel et al., 1986) ดังนั้นจึงเป็นจุลินทรีย์ กลุ่มที่น่าสนใจเพื่อใช้ในการผลิตเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายไซแลนได้

ได้มีรายงานเกี่ยวกับไซแลเนสที่สร้างโดย *Streptomyces sp.* จากแหล่งดิน ในประเทศไทยโดย กาญจนา วรวิทย์วัฒนะ (2530) และ กมลวรรณ มั่นภักดี (2534) แต่ยังไม่มีรายงานถึงการศึกษาบีตาไซโลซิเดส จาก *Streptomyces sp.* จากแหล่งดินในประเทศไทย งานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะคัดเลือก *Streptomyces spp.* ที่สร้างบีตาไซโลซิเดสได้สูง ศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อในระดับขวดเขย่า ตลอดจนสมบัติของบีตาไซโลซิเดสรวมทั้งไซแลเนสที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น รวมทั้งจำแนกสายพันธุ์ของ *Streptomyces sp.* สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้