บทที่ 1

บทนำ

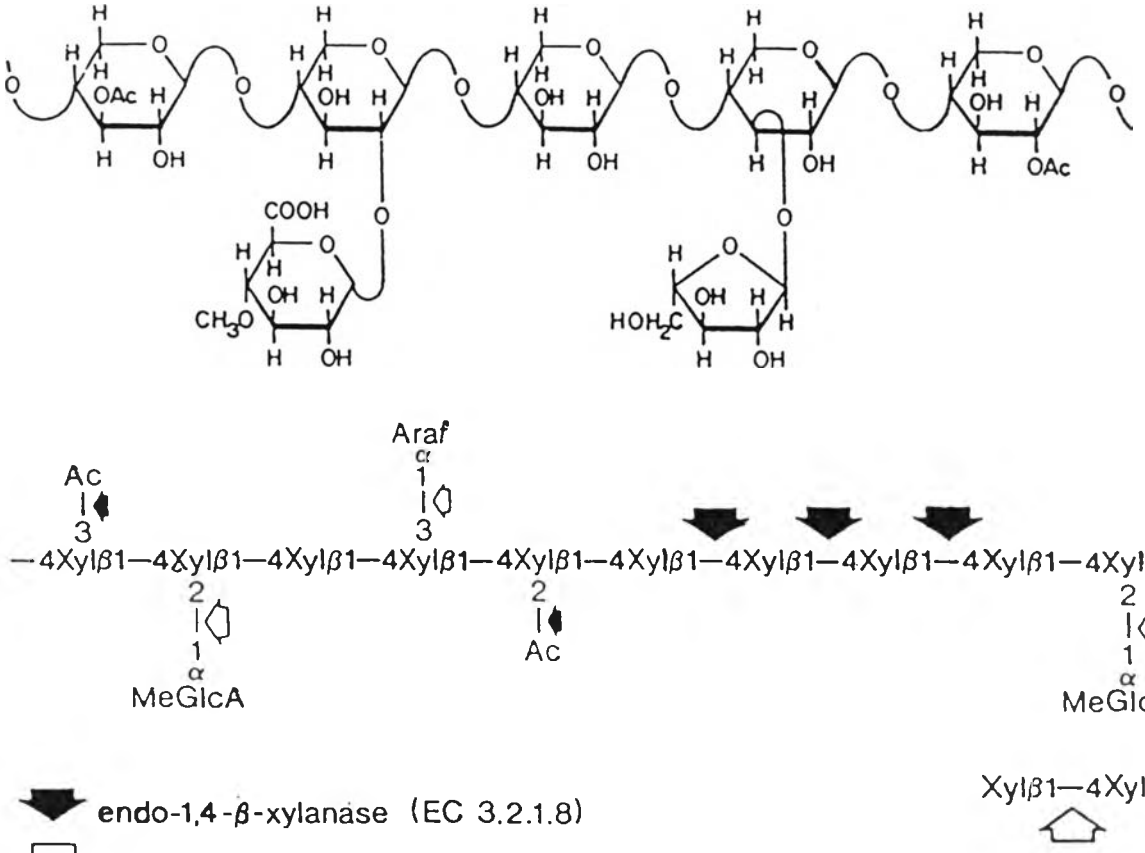
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.1 ประวัติความเป็นมา

เซลล์พืชเป็นแหล่งคาร์บอนหลักในธรรมชาติ ประกอบด้วยพอลิเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบหลัก 3 ชนิด ชนิดแรกคือ เซลลูโลส (cellulose) เป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ บีตา-1,4-ไกลโคซิดิก (β-1,4-glycosidic) ที่เป็นสายโซ่ตรง มีสูตรทั่วไปคือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ พบในปริมาณ 30-50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ชนิดที่สองคือ เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) เป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลเพนโตส และ/หรือน้ำตาลเฮกโซส ได้แก่ กลูแคน แมนแนน และไซแลน โดยมีไซแลนเป็นองค์ประกอบหลัก ชนิดสุดท้ายคือ ลิกนิน (lignin) เป็นสารประกอบเชิงซ้อนประเภทพอลิฟีโนลิก (polyphenolic) ซึ่งมักห่อหุ้มชั้นเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเอาไว้ (Wong และคณะ, 1988)

ไซแลนเป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลสในเซลล์พืชโดยยึดเกาะกับพอลิแซคคาร์ไรด์ชนิดอื่นด้วยพันธะนอนโควาเลนท์ (non covalent) และยึดเกาะกับเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสด้วยพันธะไฮโดรเจน พบตามธรรมชาติทั้งในไม้เนื้ออ่อน ไม้เนื้อแข็ง พืชล้มลุก ในผนังเซลล์ชั้นแรกของพืชใบเลี้ยงเดี่ยว รวมทั้งในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น กากเมล็ดฝ้าย รำข้าว ฟางข้าว ซังข้าวโพด เปลือกเมล็ดทานตะวัน (Magee และ Kosaric, 1985) และในเปลือกเมล็ดธัญพืชต่างๆ เป็นต้น (Ericksson และคณะ, 1990) นอกจากนั้นยังสามารถพบได้ในวัสดุเหลือทิ้งจากกระบวนการลอกเนื้อไม้เพื่อทำเยื่อกระดาษ (pulping) (Biely, 1985) ปริมาณและโครงสร้างจะแตกต่างกันไปตามแหล่งที่มา เช่น ในไม้เนื้อแข็งพบว่ามีปริมาณไซแลนมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (Ward และ Moo-Young, 1985) ในไม้เนื้ออ่อนจะมีไซแลนประมาณ 8 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ส่วนในไม้ล้มลุกจะมีไซแลนอยู่ประมาณ 20-40 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (Saddler และคณะ, 1983)

โครงสร้างของไซแลนเป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลไซโลสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีตา-1,4-ไซโลสิดิก (β-1,4-xylosidic) เป็นสายหลัก และมีสารประกอบอื่นๆมาเชื่อมต่อเป็นหมู่ข้างเคียงเช่น หมู่อะราบิโนสต่อกับตำแหน่ง *O*-3 ของไซโลส หมู่กลูคูโรนิลต่อกับตำแหน่ง *O*-2 ของไซโลส ส่วนหมู่อะซิติลต่อกับตำแหน่ง *O*-3 และ *O*-2 ของไซโลสได้ ดังแสดงในรูปที่ 1.1



รูปที่ 1.1 ลักษณะโมเลกุลของไซแลนและการย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์กลุ่มย่อยสลายไซแลน (Biely, 1985)

Ac	แทน	หมู่อะซิทิล
Araf	แทน	แอล-อะราบิโนฟิวราโนส
MeGlcA	แทน	4-โอ-เมธิล-ดี-กลูคูโรนิค แอซิด
Xyl	แทน	ดี-ไซโลส

1.2 การย่อยสลายไซแลน

การย่อยสลายไซแลนให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว สามารถย่อยสลายโดยการใช้สารเคมี (chemical hydrolysis) และการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (enzyme hydrolysis) หรือใช้ทั้งสองอย่างร่วมกัน (Tsao และ Chiang, 1983)

1.2.1 การย่อยสลายไซแลนด้วยด่าง

การย่อยสลายไซแลนด้วยด่าง มักนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการทำกระดาษ ซึ่งจะนำชิ้นของเปลือกไม้มาต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น เพื่อให้เปลือกไม้ยุ่ย และเป็นการกำจัดลิกนินที่อยู่ในชั้นลิกโนเซลลูโลสออกบางส่วน หลังจากนั้นจะนำไปผ่านกระบวนการฟอกสีเยื่อกระดาษโดยใช้สารเคมีที่มีคลอไรด์เป็นองค์ประกอบ เช่น คลอรีนไดออกไซด์ (chlorinedioxide) และก๊าซคลอรีน เป็นต้น ทำให้เกิดสารประกอบไดออกซิน (dioxin) และสารประกอบคลอไรด์ที่เป็นพิษชนิดอื่นๆด้วย (Visser และคณะ, 1992)

1.2.2 การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์

การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์เป็นปฏิกิริยาที่จำเพาะกว่าการใช้สารเคมี และยังไม่ทำให้เกิดสารประกอบที่เป็นพิษ เอนไซม์ในกลุ่มนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายประเภท เช่น กระบวนการฟอกสีเยื่อกระดาษ (Jurasek และ Paice, 1992) ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การทำน้ำผลไม้ให้ใสขึ้น และใช้ลดความหนืดของอาหารสัตว์ (Wong และ Saddler, 1992 และ Gilbert และ Hazlewood, 1993) ซึ่งเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายไซแลนประกอบด้วยเอนไซม์ 2 กลุ่มใหญ่คือ

1. เอนโดไซแลเนส (endo-xylanase) หรือ 1,4-บีตา-ดี-ไซแลน-ไซลาโนไฮโดรเลส (1,4-β-D-xylan-xylanohydrolase; EC 3.2.1.8) เอนไซม์นี้จะย่อยสลายพันธะ 1,4-บีตา-ดี-ไซโลสิดิกแบบสุ่ม เรียกกระบวนการที่เกิดขึ้นว่ากลไกแบบภายใน (endo-mechanism) ได้ไซโลสและโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆ เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Gilbert และคณะ, 1993)

2. บีตา-ไซโลสิเดส (β-xylosidase) หรือ 1,4-บีตา-ดี-ไซแลน-ไซโลไฮโดรเลส (1,4-β-D-xylan-xylohydrolase; EC 3.2.1.37) เอนไซม์ชนิดนี้จะย่อยสลายพันธะ 1,4-บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ ทีละ 1 หน่วยจากปลายด้านนอนรีดิวส์ (non-reducing end) เรียกกระบวนการที่เกิดขึ้นนี้

ว่า กลไกแบบภายนอก (exo-mechanism) ได้ไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Dekker และ Richards, 1976)

นอกจากนี้การย่อยสลายไซแลนให้สมบูรณ์ยังต้องอาศัยเอนไซม์ชนิดอื่นๆ ดังแสดงในรูปที่ 1.1 ได้แก่

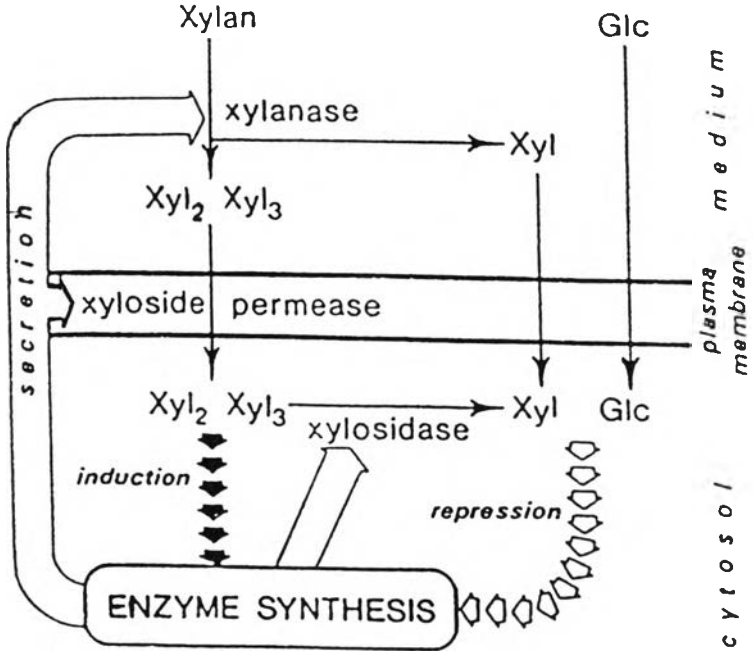
แอลฟา-ดี-กลูคูโรนิเดส (α-D-glucuronidase; EC 3.2.1.139) เป็นเอนไซม์ย่อยสลายพันธะแอลฟา-1,2 ใน 4-โอ-เมธิล-ดี-กลูคูโรนิค แอซิด

แอลฟา-แอล-อะราบิโนสิเดส (α-L-arabinosidase; EC 3.2.1.55) ย่อยสลายพันธะแอลฟา-1,3 ของหมู่นอนรีดิวส์ แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนซิล ได้น้ำตาลอะราบิโนส

อะซิทิลเอสเทอเรส (acetyl esterase; EC 3.1.1.6) ย่อยสลายพันธะบีตา-1,2 และ บีตา-1,3 ที่เชื่อมระหว่างหมู่อะซิทิลกับสายหลักให้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดอะซิติก

Biely และ Petrakova (1985) ศึกษาการย่อยสลายไซแลนด้วยไซแลเนสและบีตา-ไซโลสิเดส ในยีสต์ *Cryptococcus albidus* พบว่าเชื้อจะปลดปล่อยไซแลเนสออกมานอกเซลล์เพื่อย่อยไซแลนให้เป็นโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆ จากนั้นนำไซโลโอลิโกแซคคาไรด์นั้นเข้าสู่เซลล์ โดยกระบวนการขนส่งที่ต้องใช้พลังงาน (active transport) แล้วใช้บีตา-ไซโลสิเดสย่อยไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ต่อไป กระบวนการย่อยสลายไซแลนโดย *C. albidus* แสดงดังรูปที่ 1.2

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1.2 กระบวนการย่อยสลายไซแลนโดย *Cryptococcus albidus* (Biely และ Petrakova, 1985)

Glc แทน ดี-กลูโคส

Xyl, Xyl_2, Xyl_3 แทน ดี-ไซโลส, ไซโลไบโอส และไซโลไตรโอส ตามลำดับ

1.3 แหล่งของบีตา-ไซโลสิเดส

บีตา-ไซโลสิเดสพบได้ในจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น แบคทีเรีย แอคติโนมัยสีท ยีสต์ รา จุลินทรีย์ส่วนใหญ่มักสร้างและเก็บเอนไซม์ไว้ภายในเซลล์ (intracellular enzyme) แต่มีจุลินทรีย์บางสายพันธุ์ที่สร้างและปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) ตัวอย่างสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างบีตา-ไซโลสิเดส แสดงดังตารางที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 ตัวอย่างสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างบีตา-ไซโลสิเดส

สายพันธุ์จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Aeromonas caviae ME-1	Suzuki และคณะ, 2001
Arxula adeninivorans	Buttner และ Bode, 1992
Aspergillus awamori	Tenkanen และคณะ, 1993
A. awamori K4	Kurakake และคณะ, 1997
A. carbonarius	Kiss และ Kiss, 2000
A. flavus	de-Souza และคณะ, 1999
A. nidulans	Kumar และ Ramon, 1996
A. niger	Van-Peij และคณะ, 1997
A. oryzae	Tenkanen และคณะ, 1993
A. oryzae KBN616	Kitamoto และคณะ, 1999
A. phoenicis	Rizzatti และคณะ, 2001

ตารางที่ 1.1 (ต่อ)

สายพันธุ์จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
A. sydowii MG49	Ghosh และ Nanda, 1993
Aureobasidium pullulans	Christov และคณะ, 1999
Bacillus circulans	Ratto และคณะ, 1992
Bacillus sp. KK-1	Jung และคณะ, 1998
B. stearothermophilus	Cho และ Choi, 1998
B. stearothermophilus 21	Baba และคณะ, 1994
B. stearothermophilus T-6	Bravman และคณะ, 2001
B. subtilis	Lindner และคณะ. 1994
Butyrivibrio fibrisolvens	Utt และคณะ, 1991
Cellulomonas flavigena	Perez-Avalos และคณะ, 1996
Cochliobolus carbonum	Wegener และคณะ, 1999
Clostridium acetobutylicum ATCC 824	Lee และ Forsberg, 1987
Dictyogiomus sp.	Ratto และคณะ, 1994
Neocallimastix frontalis	Hebraud และ Fevre, 1990
Neocallimastix patriciarum 27	Zhu และคณะ, 1994
Neurospora crassa	Deshpande และคณะ, 1986
Penicillium funiculosum	Park และคณะ, 2001

ตารางที่ 1.1 (ต่อ)

สายพันธุ์จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Penicillium janthainellum	Hasmann และคณะ, 2000
Phaeosphaeria nodorum	Lalaoui และคณะ, 2000
Selenomonas ruminantium	Cotta และ Whitehead, 1998
Streptomyces olivochromogens	Tenkanen และคณะ, 1993
Streptomyces sp. CH-M-1035	Flores และคณะ, 1996
Streptomyces sp. EC 10	Belfaquih และ Penninckx, 2000
Termitomyces clypeatus	Bhattacharyya และคณะ, 1997
Thermomyces lanuginosus strain SSBP	Singh และคณะ, 2000
Thermoanaerobacter ethanolicus	Mai และคณะ, 2000
Thermoanaerobacterium saccharolyticum	Lee และ Zeikus, 1993
Thermotoga thermarum	Sunna และ Antranikian, 1996
Trichoderma harzianum	Ximenes และคณะ, 1996
Trichoderma koningii G-39	Li และคณะ, 2000
Trichoderma reesei	Herrmann และคณะ, 1997

1.4 การทำบีตา-ไซโลสิเดสให้บริสุทธิ์

มีรายงานหลายฉบับศึกษาการทำบีตา-ไซโลสิเดสให้บริสุทธิ์โดยมีขั้นตอนต่างๆกันเช่น Nanmori และคณะ (1990) ศึกษาการทำบีตา-ไซโลสิเดสที่ทนอุณหภูมิสูงจาก *Bacillus stearothermophilus* ให้บริสุทธิ์โดยตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 35 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำมาผ่านลงในคอลัมน์ Toyopearl HW-65 ชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 35-0 เปอร์เซ็นต์ แล้วผ่านลงในคอลัมน์ Sephacryl S-200 และคอลัมน์แลกเปลี่ยนอิออนลบโดยวิธี Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) โดยใช้คอลัมน์แลกเปลี่ยนอิออนลบ Mono Q HR 5/5 ชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์โดยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-500 มิลลิโมลาร์ พบว่าเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 72.50 เท่า เหลือแอคติวิตี 16.10 เปอร์เซ็นต์

Hudson และคณะ (1991) ศึกษาการทำบีตา-ไซโลสิเดสให้บริสุทธิ์โดยเอนไซม์นี้ได้จากการโคลนยีนของยีสต์ที่ทนอุณหภูมิสูงและเจริญได้โดยไม่ต้องการอากาศ *Caldocellum saccharolyticum* ซึ่งแสดงออกใน *Escherichia coli* นำเซลล์มาทำให้แตกด้วย Triton X-100 ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำส่วนใสมาผ่านคอลัมน์ DEAE-Sepharose ชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์โดยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-1,000 มิลลิโมลาร์ ทำให้เข้มข้นขึ้นโดยอัลตราฟิลเตรชัน แล้วผ่านลงในคอลัมน์ CM-Sepharose คอลัมน์ TSK Fractogel HW 55 และคอลัมน์ Bio-Gel HTP hydroxyapatite ชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์โดยเกรเดียนท์เส้นตรงของโพแทสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 20-500 มิลลิโมลาร์ พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 550 เท่า คงเหลือแอคติวิตี 4.30 เปอร์เซ็นต์

Dobberstein และ Emeis (1991) ทำบีตา-ไซโลสิเดสให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ Bio-Gel P6 หลังจากทำให้เข้มข้นแล้วนำมาผ่านคอลัมน์แลกเปลี่ยนอิออนลบ Q-Sepharose ทำเจลฟิลเตรชันโดยคอลัมน์ Sephacryl HR300 นำไปไลโอฟิลไลส์แล้วเอาเกลือออกโดยคอลัมน์ Sephadex G-25 พบว่า เอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์นี้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น 8.5 เท่า เหลือแอคติวิตีอยู่ 9.5 เปอร์เซ็นต์

Shao และ Wiegel (1992) ศึกษาการทำบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Thermoanaerobacter ethanolicus* ให้บริสุทธิ์โดยการทำโครมาโทกราฟีบนคอลัมน์ DEAE-cellulose ชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของ pH ในช่วง 6.6-3.0 จากนั้นทำไฮโดรโฟบิก โครมาโทกราฟี ด้วยคอลัมน์ Phenyl-Sepharose CL-4B ชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์โดยเกรเดียนท์เส้นตรงของแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 800-0 มิลลิโมลาร์ แล้วนำมาผ่านคอลัมน์ DEAE-Sephacel ชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของ pH ในช่วง 6.0-3.0 พบว่าเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์นี้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 72 เท่า คงเหลือแอคติวิตีอยู่ 14 เปอร์เซ็นต์

Lee และ Zeikus (1993) ทำบีตา-ไซโลสิเดสให้บริสุทธิ์จากรีคอมบิแนนท์ *E. coli* (pXPH3) ที่ได้จากการโคลนยีนของ *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* strain B6A-RI เลี้ยงเซลล์ปริมาตร 1 ลิตรในอาหารที่มีการเติมแอมพิซิลลิน ทำให้เซลล์แตกโดยวิธี French press นำส่วนใสมาเซนตริฟิวก์แล้วให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นผ่านลงในคอลัมน์แลกเปลี่ยนอิออนลบ Q-Sepharose ชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-1,000 มิลลิโมลาร์ ทำเจลฟิลเตรชัน โครมาโทกราฟีโดยใช้คอลัมน์ Superose-12 พบว่าเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วมีแอคติวิตีเหลืออยู่ถึง 50.3 เปอร์เซ็นต์ และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 13.1 เท่า

Zhu และคณะ (1994) ศึกษาการทำบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Neocallimastix patriciarum* 27 ให้บริสุทธิ์ โดยการทำโครมาโทกราฟีบนคอลัมน์ DEAE-Sepharose ชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-200 มิลลิโมลาร์ ทำแอฟฟินิตีโครมาโทกราฟีโดยใช้คอลัมน์ CH-Sepharose 4B ที่เชื่อมกับ *p*-aminophenyl-thio-β-D-xylopyranoside ชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของไซโลสความเข้มข้น 0-2,000 มิลลิโมลาร์ ได้โปรตีน 2 ชนิดที่แสดงแอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดส คือ xylosidase I และ xylosidase II โดยที่ xylosidase I มีแอคติวิตีจำเพาะสูงกว่า คือเท่ากับ 26.2 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนถูกชะออกมาที่ความเข้มข้นของไซโลสเท่ากับ 500 มิลลิโมลาร์ ขณะที่ xylosidase II มีแอคติวิตีจำเพาะเพียง 8.7 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ถูกชะออกมาที่ความเข้มข้นของไซโลสเท่ากับ 2,000 มิลลิโมลาร์ ดังนั้นจึงนำ xylosidase I มาทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วยการทำแอฟฟินิตีโครมาโทกราฟีบนคอลัมน์เดิมซ้ำอีก 3 ครั้ง แล้วตามด้วยคอลัมน์ Bio-Gel P100 พบว่า xylosidase I ที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ดังกล่าว มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 88 เท่า เหลือแอคติวิตีอยู่ 4 เปอร์เซ็นต์

Kumar และ Ramon (1996) ทำบีตา-ไซโลสิเดสให้บริสุทธิ์จากรา *Aspergillus nidulans* ที่เลี้ยงโดยมีไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตเป็นแหล่งคาร์บอน นำสายใยรามาสกัดซ้ำ 2 ครั้ง ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มี 0.05 เปอร์เซ็นต์ Triton X-100 ทำให้เข้มข้นด้วยอัลตราฟิลเตรชัน แล้วนำมาผ่านลงคอลัมน์ Q-Sepharose ชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-500 มิลลิโมลาร์ ตามด้วยคอลัมน์ Mono-Q ชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-500 มิลลิโมลาร์ สุดท้ายนำมาผ่านคอลัมน์ Superdex 200 HR 10/30 พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 89.2 เท่า เหลือแอคติวิตีอยู่ 27.2 เปอร์เซ็นต์

Ximenes และคณะ (1996) ศึกษาการทำบีตา-ไซโลสิเดสให้บริสุทธิ์จาก *Trichoderma harzianum* strain C ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งที่มีรำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ กำจัดตะกอนทิ้งไป นำส่วนใสมาทำให้เข้มข้นด้วยอัลตราฟิลเตรชัน แล้วผ่านลงคอลัมน์ Sephacryl S-100 ตามด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนอิออนลบ DEAE-Sepharose และ S-Sepharose ชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-1,000 มิลลิโมลาร์ พบว่าบีตา-ไซโลสิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 13.15 เท่า เหลือแอคติวิตีอยู่ 4.0 เปอร์เซ็นต์

Bhattacharyya และคณะ (1997) ศึกษาการทำบีตา-ไซโลสิเดส จาก *Termitomyces clypeatus* ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ แล้วผ่านลงในคอลัมน์ Bio-Gel P 200 ตามด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนอิออนลบ DEAE-Sephadex A-50 ชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-1,000 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 5.0 จากนั้นผ่านโปรตีนลงในคอลัมน์แลกเปลี่ยนอิออนลบชนิดเดิมอีกครั้ง ชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 6.0 แล้วจึงนำมาผ่านไฮโดรโฟบิก โครมาโทกราฟี โดยใช้คอลัมน์ Phenyl-Sepharose ชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 50-0 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 55.6 เท่า เหลือแอคติวิตีอยู่ 4.36 เปอร์เซ็นต์

Jung และคณะ (1998) ทำบีตา-ไซโลสิเดสให้บริสุทธิ์จากรีคอมบิแนนท์ *Escherichia coli* ที่มียีนจาก *Bacillus* sp. KK-1 โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 35-75 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำมาผ่านคอลัมน์ Phenyl-Sepharose 2 ครั้ง ครั้งแรกชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 1,000-0 มิลลิโมลาร์ ด้วยอัตราการไหลเท่ากับ 60 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ครั้งที่สองชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 400-0 มิลลิโมลาร์ ด้วยอัตราการไหลเท่ากับ 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ตามด้วยคอลัมน์ Resource-S ชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-400 มิลลิโมลาร์ แล้วนำมาทำเจลฟิลเตรชัน โครมาโทกราฟี บนคอลัมน์ Superose 12 HR 10/30 และคอลัมน์ Hydroxyapatite พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 22.1 เท่า เหลือแอคติวิตี 3.5 เปอร์เซ็นต์

Kitamoto และคณะ (1999) ทำบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Aspergillus oryzae* KBN616 ให้บริสุทธิ์ โดยการทำโครมาโทกราฟีบนคอลัมน์แลกเปลี่ยนอิออนลบ STREAMLINE DEAE และ HR 16/20 Fast Flow Q-Sepharose ตามด้วยคอลัมน์ Hydroxyapatite ชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์โดยเพิ่มความเข้มข้นของโพแทสเซียม ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ตั้งแต่ 0-300 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 6.8 สุดท้ายผ่านโปรตีนลงในคอลัมน์ HiLoad 26/60 Superdex 200-pg พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 65.6 เท่า เหลือแอคติวิตี 11 เปอร์เซ็นต์

Belfaquih และ Penninckx (2000) ศึกษาการทำบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. EC10 ให้บริสุทธิ์ โดยการทำโครมากราฟีแลกเปลี่ยนอิออนลบใช้คอลัมน์ DEAE-Sephacel ชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-1,000 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำมาทำเจลฟิลเตรชัน โครมาโทกราฟี บนคอลัมน์ Biogel A ด้วยอัตราการไหลเท่ากับ 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 10 เท่า เหลือแอคติวิตี 15.07 เปอร์เซ็นต์

Kiss และ Kiss (2000) ทำบีตา-ไซโลสิเดสให้บริสุทธิ์จาก *Aspergillus carbonarius* โดยผ่านไฮโดรโฟบิกโครมาโทกราฟี ใช้คอลัมน์ Phenyl-Sepharose CL-4B ชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 10-0 เปอร์เซ็นต์ แล้วทำโครมาโทรโฟคัสซิง โดยใช้คอลัมน์ PBE 94 สุดท้ายทำแอฟฟินิตี โครมาโทรกราฟี โดยใช้คอลัมน์ Sepharose 4B พบว่าบีตา-ไซโลสิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ตามขั้นตอนดังกล่าวมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 60.9 เท่า เหลือแอคติวิตีอยู่ถึง 48.5 เปอร์เซ็นต์

Rizzatti และคณะ (2001) ศึกษาการทำบีตา-ไซโลสิเดสให้บริสุทธิ์จากเชื้อราทนร้อน *Aspergillus phoenicis* โดยการทำโครมาโทกราฟีบนคอลัมน์ DEAE-Cellulose ตามด้วยคอลัมน์ Sephadex G-100 พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 17.7 เท่า เหลือแอคติวิตีอยู่ 9.8 เปอร์เซ็นต์

Bravman และคณะ (2001) ศึกษาการทำบีตา-ไซโลสิเดสให้บริสุทธิ์จากรีคอมบิแนนท์ *Esherichia coli* BL21(DE3) ที่มีพลาสมิด pET9d-*xynB2* โดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เซนตริฟิวก์แล้วนำมาทำเจลฟิลเตรชัน โครมาโทกราฟี โดยใช้คอลัมน์ Superdex 200 26/10 พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 3.3 เท่า เหลือแอคติวิตีอยู่ 58 เปอร์เซ็นต์

1.5 น้ำหนักโมเลกุลของบีตา-ไซโลสิเดส

รายงานการหาน้ำหนักโมเลกุลของบีตา-ไซโลสิเดสบริสุทธิ์จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ พบว่ามีขนาดแตกต่างกันไปอย่างมาก และยังประกอบด้วยจำนวนหน่วยย่อยต่างๆกัน ดังแสดงในตารางที่ 1.2

ตารางที่ 1.2 น้ำหนักโมเลกุลของบีตา-ไซโลสิเดสจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ

สายพันธุ์จุลินทรีย์	น้ำหนักโมเลกุล (ดาลตัน)	จำนวนหน่วยย่อยและน้ำหนักโมเลกุล (ดาลตัน)	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus carbonarius	100,000	-	Kiss และ Kiss, 2000
A. nidulans	180,000	2 หน่วยย่อย (85,000)	Kumar และ Ramon, 1996
A. niger	78,000	-	John และคณะ, 1979
A. niger 15	253,000	2 หน่วยย่อย (122,000)	Rodionova และคณะ, 1983
A. oryzae KBN616	110,000	-	Kitamoto และคณะ, 1999
A. phoenicis	132,000	-	Rizzatti และคณะ, 2001
Aureobasidium pullulans	350,000	2 หน่วยย่อย (224,000)	Dobberstein และ Emeis, 1991
Bacillus pumilus IPO	190,000	3 หน่วยย่อย (56,000)	Xu และคณะ, 1991
Bacillus sp. KK-1	140,000	2 หน่วยย่อย (62,000)	Jung และคณะ, 1998
B. stearothermophilus	150,000	2 หน่วยย่อย (75,000)	Nanmori และคณะ, 1990

ตารางที่ 1.2 (ต่อ)

สายพันธุ์จุลินทรีย์	น้ำหนักโมเลกุล (ดาลตัน)	จำนวนหน่วยย่อยและน้ำหนักโมเลกุล (ดาลตัน)	เอกสารอ้างอิง
Bacillus stearothermophilus 21	75,000	-	Baba และคณะ, 1994
B. stearothermophilus T-6	157,000	2 หน่วยย่อย (79,894)	Bravman และคณะ, 2001
B. subtilis	260,000		
Butyrivibrio fibrisolvens	60,000	4 หน่วยย่อย (65,000)	Bernier และคณะ, 1987
Caldocellum saccharolyticum	53,000	-	Utt และคณะ, 1991
Neocallimastix frontalis	180,000	-	Hudson และคณะ, 1991
Neocallimastix patriciarum 27	39,500	-	Hebraud และ Fevre, 1990
Neurospora crassa	83,000	-	Zhu และคณะ, 1994
Penicillum wortmanni	100,000	-	Deshpande และคณะ, 1986
Pichia stipitis	37,000	-	Deleyn และคณะ, 1978
Saccharum officinarum L.	62,000	-	Ozcan และคณะ, 1991
Streptomyces sp. EC 10	163,000	4 หน่วยย่อย (42,000)	Chinen และคณะ, 1982
Termitomyces clypeatus	190,000	2 หนวยย่อย (94,000)	Belfaquih และ Penninckx, 2000
Thermoanaerobacter ethanolicus	165,000	2 หน่วยย่อย (85,000)	Bhattacharyya และคณะ, 1997 Shao และ Wiegel, 1992
Thermoanaerobacterium saccharolyticum	55,000	-	Lee และ Zeikus, 1993
Thermomonospora fusca	168,000	3 หน่วยย่อย (56,000)	Bachmann และ McCarthy, 1989
Trichoderma harzianum	60,000	-	Ximenes และคณะ, 1996
Trichoderma reesei	100,000	-	Poutanen และ Puls, 1988
Trichoderma reesei	100,000	-	Herrmann และคณะ, 1997

1.6 สมบัติของบีตา-ไซโลสิเดส

1.6.1 อุณหภูมิและความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดส

บีตา-ไซโลสิเดสจากจุลินทรีย์ต่างๆมีสมบัติในแง่ของอุณหภูมิและความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 1.3

ตารางที่ 1.3 อุณหภูมิและความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดสจากจุลินทรีย์ต่างๆ

สายพันธุ์จุลินทรีย์	อุณหภูมิที่เหมาะสม (°ซ)	ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม	เอกสารอ้างอิง
Aeromonas caviae ME-1	50	6.0	Suzuki และคณะ, 2001
Arxula adeninivirans	60	5.0	Buttner และ Bode, 1992
Aspergillus awamori	70	6.5	Kormelink และคณะ, 1993
A. carborius	60	4.0	Kiss และ Kiss, 2000
A. nidulans	50	5.0	Kumar และ Ramon, 1996
A. niger	42	6.7-7.0	John และคณะ, 1979
A. niger 15	70	3.8-4.0	Rodionova และคณะ, 1983
A. oryzae KBN616	60	4.0	Kitamoto และคณะ, 1999
A.phoenicis	75	4.0-4.5	Rizzatti และคณะ, 2001
Aureobasidium pullulans	80	4.5	Dobberstein และ Emeis, 1991
Bacillus pumilus	45-50	6.6	La Grange และคณะ, 1997
B. pumilus IPO	40	7.0	Xu และคณะ, 1991
Bacillus sp. KK-1	40	6.5	Jung และคณะ, 1998
B. stearothermophilus T-6	65	5.6-6.3	Bravman และคณะ, 2001
B. subtilis	50	7.0	Bennier และคณะ, 1987
Caldocellum saccharolyticum	70	5.7	Hudson และคณะ, 1991
Clostridium acetobutylicum ATCC 824	45	6.0-6.5	Lee และ Forsberg, 1987
Neurospora crassa	55	4.5-5.0	Deshpande และคณะ, 1986

ตารางที่ 1.3 (ต่อ)

สายพันธุ์จุลินทรีย์	อุณหภูมิที่เหมาะสม (°ซ)	ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม	เอกสารอ้างอิง
Neocallimastix patriciarum 27			Zhu และคณะ, 1994
xylosidase I	50	6.0	
xylosidase II	40	6.0	
Saccharum officinarum L.	75	4.85	Chinen และคณะ, 1982
Streptomyces sp. EC10	45	7.5	Balfaquih และ Penninckx, 2000
Termitomyces clypeatus	60	5.0	Bhattacharyya และคณะ, 1997
Thermomonospora fusca	40-60	5.0-9.0	Bachmann และ McCarthy, 1989
Thermoanaerobacter ethanolicus	82	5.0	Shao และ Wiegel, 1992
Thermoanaerobacterium saccharolyticum	70	5.5	Lee และ Zeikus, 1993
Trichoderma koningii G-39	55-60	3.5-4.0	Li และคณะ, 2000
Trichoderma reesei	60	4.0	Herrmann และคณะ, 1997

1.6.2 ความเสถียรต่ออุณหภูมิและความเป็นกรดด่างของบีตา-ไซโลสิเดส

บีตา-ไซโลสิเดสจากจุลินทรีย์ต่างๆ มีความเสถียรต่ออุณหภูมิและความเป็นกรดด่างแตกต่างกันออกไป ดังแสดงในตารางที่ 1.4

ตารางที่ 1.4 ความเสถียรต่ออุณหภูมิและความเป็นกรดด่างของบีตา-ไซโลสิเดสจากจุลินทรีย์ต่างๆ

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ความเสถียรต่ออุณหภูมิ (°ซ)	ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง	เอกสารอ้างอิง
Aeromonas caviae ME-1	40, 1 ช.ม.	5.0-8.0	Suzuki และคณะ, 2001
Aspergillus carbonarius	50, 30 นาที	3.5-6.5	Kiss และ Kiss, 2000
A. nidulans	55, 30 นาที	4.0-6.0	Kumar และ Ramon, 1996
A. oryzae KBN616	45, 10 นาที	3.0-7.0	Kitamoto และคณะ, 1999
A. phoenicis	60, 4 ช.ม.	4.0-6.0	Rizzatti และคณะ, 2001
Aureobasidium pullulans	70, 1 ช.ม.	2.0-9.5	Dobberstein และ Emeis, 1991
Bacillus pumilus	45, 2 ช.ม.	-	La Grange และคณะ, 1997
Bacillus sp. KK-1	40, 1 ช.ม.	6.5-10.0	Jung และคณะ, 1998
B. stearothermophilus T-6	65, 2.05 ช.ม.	5.6-6.3	Bravman และคณะ, 2001
Caldocellum saccharolyticum	70, 40 นาที	7.5-9.0	Hudson และคณะ, 1991
Neocallimastix patriciarum 27			Zhu และคณะ, 1994
xylosidase I	-	5.0-8.0	
xylosidase II	-	5.5-6.5	
Pennicillium wortmanni	-	5.0-6.0	Deleyn และคณะ, 1978
Saccharum officinarum L.	70, 1 ช.ม.	-	Chinen และคณะ, 1982
Streptomyces sp. EC10	45, 2 ช.ม.	5.0-8.0	Belfaquih และ Penninckx, 2000
Termitomyces clypeatus	40, 30 นาที	4.0-7.0	Bhattacharyya และคณะ, 1998
Thermomonospora fusca	65, 8 ช.ม.	6.0-8.0	Bachmann และ McCarthy, 1989
Thermoanaerobacter ethanolicus	82, 3 ช.ม.	5.0-8.0	Shao และ Wiegel, 1993
Thermoanaerobacterium saccharolyticum	75, 55 นาที	5.0-7.0	Lee และ Zeikus, 1993
Trichoderma koningii G-39	-	2.5-7.4	Li และคณะ, 2000
Trichoderma reesei	50, 1 ช.ม.	3.0-6.0	Herrmann และคณะ, 1997

1.6.3 ความจำเพาะต่อสับสเตรทของบีตา-ไซโลสิเดส

โดยทั่วไปบีตา-ไซโลสิเดสจากจุลินทรีย์ต่างๆมีสับสเตรทเป็นไซโลโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆ ที่มีไซโลสเชื่อมต่อกัน 2-7 หน่วย และพบว่าความสามารถในการย่อยสลายจะลดลงตามความยาวของสายไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ที่เพิ่มขึ้น โดยพบว่าบีตา-ไซโลสิเดสสามารถย่อยสลายไซโลไบโอสได้ดีที่สุด (Hermann และคณะ, 1997) นอกจากนี้ยังพบว่าบีตา-ไซโลสิเดสจากจุลินทรีย์ต่างๆมีค่าความจำเพาะต่อสับสเตรทแตกต่างกันไป เมื่อใช้ พารา-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ ซึ่งเป็นสับสเตรทสังเคราะห์ทำหน้าที่แทนไซโลไบโอส ดังแสดงในตารางที่ 1.5

ตารางที่ 1.5 ค่าความจำเพาะ (K_m)และความเร็ว (V_{max}) ของบีตา-ไซโลสิเดสต่อพารา-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ จากจุลินทรีย์ต่างๆ

สายพันธุ์จุลินทรีย์	K_m (มิลลิโมลาร์)	V_{max} (ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	เอกสารอ้างอิง
Aeromonas caviae ME-1	0.34	33.00	Suzuki และคณะ, 2001
Aspergillus awamori	3.00	-	Kormelink และคณะ, 1993
A. carbonarius	0.20	3.64 U/mg	Kiss และ Kiss, 2000
A. nidulans	1.10	25.60	Kumar และ Ramon, 1996
A. niger	0.22	-	John และคณะ, 1979
A. niger 15	0.23	-	Rodionova และคณะ, 1983
A. phoenicis	2.36	920.75 U/ml	Rizzatti และคณะ, 2001
Aureobasidium pullulans	1.43	-	Christov และคณะ, 1999
Bacillus pumilus IPO	3.90	1.23 ukat/mg	Xu และคณะ, 1991
B. stearothermophilus	1.20	-	Nanmori และคณะ, 1990
B. stearothermophilus T-6	0.20	-	Bravman และคณะ, 2001
Caldocellum saccharolyticum	10.00	-	Hudson และคณะ, 1991
Neocallimastix frontalis	0.33	-	Hebraud และ Fevre, 1990
Neocallimastix patriciarum 27			Zhu และคณะ, 1994
xylosidase I	0.59	38.04 U/mg	
xylosidase II	0.13	8.90 U/mg	

ตารางที่ 1.5 (ต่อ)

สายพันธุ์จุลินทรีย์	K_m (มิลลิโมลาร์)	V_{max} (ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	เอกสารอ้างอิง
Neurospora crassa	0.05	-	Deshpande และคณะ, 1985
Penicillium wortmanni	0.12	-	Deleyn และคณะ, 1978
Saccharum officinarum L.	2.05	20.40	Chinen และคณะ, 1982
Streptomyces sp. EC10	13.50	-	Balfaquih และ Penninckx, 2000
Termitomyces clypeatus	0.40	13.00	Bhattacharyya และคณะ, 1997
Thermomonospora fusca	0.89	-	Bachmann และ McCarthy, 1989
Trichoderma koningii G-39	0.04	-	Li และคณะ, 2000
Trichoderma reesei	0.08	-	Poutanen และ Puls, 1988
Trichoderma reesei	0.42	-	Herrmann และคณะ, 1997

1.6.4 สารยับยั้งการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดส

ไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากการที่บีตา-ไซโลสิเดสย่อยสลายไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ มีรายงานว่าไซโลสเป็นสารยับยั้งการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดสแบบแข่งขัน (Competitive inhibitor) โดยมีค่าคงที่ในการยับยั้ง (K_i) แตกต่างกันไปในจุลินทรีย์ต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 1.6

ตารางที่ 1.6 ค่าคงที่ในการยับยั้งการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดส (K_i) ต่อไซโลสจากจุลินทรีย์ต่างๆ

สายพันธุ์จุลินทรีย์	K_i (มิลลิโมลาร์)	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus niger ; β-xylosidase I	9.80	Van Peij และคณะ, 1997
β-xylosidase II	13.20	
A. niger 15	2.90	Rodionova และคณะ, 1983
Arxula adeninivorans ; deglycosilated	2.10	Buttner และ Bode, 1992
glycosilated	5.80	
Caldocellum saccharolyticum	40.00	Hudson และคณะ, 1991
Neocallimastix frontalis	3.98	Garcia-Campayo และ Wood, 1993
Saccharum officinarum L.	7.98	Chinen และคณะ, 1982
Thermomonospora fusca	19.00	Bachmann และ McCarthy, 1989
Trichoderma koningii G-39	5.00	Li และคณะ, 2000
Trichoderma reesei	2.40	Herrmann และคณะ, 1997
Trichoderma reesei QM 9414	11.00	Dekker, 1983

นอกจากนั้นยังพบว่าอิออนโลหะหลายชนิดมีผลยับยั้งการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดส เช่น บีตา-ไซโลสิเดสจาก *Petnopecten* sp. ถูกยับยั้งการทำงานอย่างรุนแรงด้วยอิออนของเหล็ก ทองแดง เงินและปรอท (Takagaki และคณะ, 1990) บีตา-ไซโลสิเดสจาก *Caldocellum saccharolyticum* ถูกยับยั้งการทำงานอย่างรุนแรงด้วยอิออนของเงิน ปรอท และแคดเมียม (Hudson และคณะ, 1991) บีตา-ไซโลสิเดสจาก *Aureobasidium pullulans* ถูกยับยั้งการทำงานอย่างรุนแรงด้วย EDTA (Dobberstein และ Emeis, 1991) Xylosidase I และ Xylosidase II จาก *Neocallimastix patriciarum* ถูกยับยั้งการทำงานอย่างรุนแรงด้วยอิออนของทองแดง และปรอท (Zhu และคณะ, 1994) บีตา-ไซโลสิเดสจาก *Aspergillus nidulans* ถูกยับยั้งการทำงานอย่างรุนแรงด้วยอิออนของปรอท เงิน และทองแดง (Kumar และ Ramon, 1996)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บีตา-ไซโลสิเดสจาก *Termitomyces clypeatus* ถูกยับยั้งการทำงานอย่างรุนแรงด้วยอิออนของเงิน ทองแดง และเหล็ก (Bhattacharyya และคณะ, 1997) บีตา-ไซโลสิเดสจาก *Bacillus* sp. KK-1 และ *Aspergillus phoenicis* ถูกยับยั้งการทำงานอย่างรุนแรงด้วยอิออนของปรอท (Jung และคณะ, 1998 และ Rizzatti และคณะ, 2001)

นอกเหนือจากรายงานข้างต้นที่พบว่าอิออนของโลหะหลายชนิดมีผลยับยั้งการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดสจากจุลินทรีย์ต่างๆแล้วยังมีรายงานถึงอิออนบางชนิดมีผลในการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์นี้ดังเช่น อิออนของแคลเซียมและแมกนีเซียมช่วยเพิ่มแอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Neocallimastix frontalis* (Garcia-Campayo และ Wood, 1993) และอิออนของแมกนีเซียม แคลเซียม และแมงกานีส ช่วยเพิ่มแอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Aspergillus phoenicis* (Rizzatti และคณะ, 2001)

ตามที่ได้กล่าวมาข้างต้นพบว่ามีรายงานการศึกษาบีตา-ไซโลสิเดสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆมากมาย แต่มีรายงานค่อนข้างน้อยมากจาก *Streptomyces* ในปี พ.ศ. 2539 สุมาลี อึ้งใจธรรม ได้แยก *Streptomyces* sp. CH7 จากแหล่งดินในประเทศไทย และพบว่าเชื้อนี้สามารถผลิตบีตาไซโลสิเดสได้สูงถึงประมาณ 0.9 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อเลี้ยงในภาวะเหมาะสม นอกจากนั้นยังได้ศึกษาสมบัติเบื้องต้นของเอนไซม์นี้ที่ยังไม่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ พบว่ามีค่าความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานคือ 6.5 และ 55 องศาเซลเซียสตามลำดับ เอนไซม์มีความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างในช่วงกว้างคือ 4.5-9.5 และเสถียรต่ออุณหภูมิได้สูงถึง 55 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มเป็นเวลา 30 นาที จากสมบัติดังกล่าวเอนไซม์นี้จะมีประโยชน์ต่อการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมฟอกเยื่อกระดาษในขั้นตอนการกำจัดไขแลนซึ่งโดยทั่วไปขั้นตอนนี้จะใช้อุณหภูมิและภาวะความเป็นกรดด่างสูง และ ในปี พ.ศ. 2541 จิราวรรณ ธนะ โคลนยีนบีตาไซโลสิเดส จาก *Streptomyces* sp. CH7 โดยใช้ pUC18 เป็นพลาสมิดพาหะ และ *E. coli* DH5α เป็นเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) ได้ดีเอ็นเอขนาด 3.6 กิโลเบส ที่สามารถแสดงออกแอคติวิตีของเอนไซม์นี้ได้และสูงกว่าเซลล์เจ้าบ้าน 30 เท่า ซึ่งการโคลนยีนดังกล่าวได้ จะเป็นประโยชน์มากต่อการผลิตเอนไซม์นี้ในเชิงพาณิชย์ แต่อย่างไรก็ตาม การทำให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของบีตา-ไซโลสิเดสบริสุทธิ์จากเชื้อนี้ยังไม่มีการรายงานมาก่อน งานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะทำบีตา-ไซโลซิเดสจาก *Streptomyces* sp CH7 ให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์บริสุทธิ์ ซึ่งข้อมูลที่ได้จะมีประโยชน์ในการนำเอนไซม์นี้ไปใช้งานต่อไป