บทที่ 1

บทนำ

1.1 ประวัติความเป็นมา

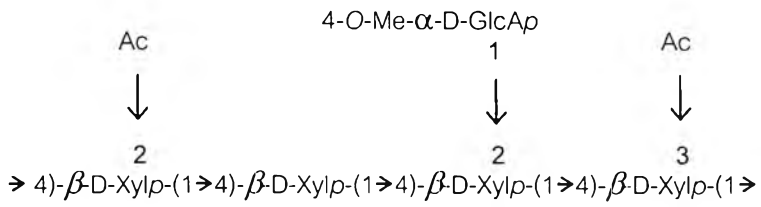
เซลล์พืชเป็นแหล่งคาร์บอนที่ใหญ่ที่สุดในธรรมชาติ ซึ่งประกอบด้วยพอลิเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบหลัก 3 ชนิด คือ เซลลูโลส (cellulose) ซึ่งมีมากที่สุดคือ 30-50 เปอร์เซ็นต์ เป็นพอลิเมอร์ของกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีตา-1,4-ไกลโคซิดิก (β-1,4-glycosidic) ที่เป็นสายตรง รองลงมาคือ เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) มี 20-35 เปอร์เซ็นต์ เป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลเพนโทสและ/หรือน้ำตาลเฮกโซส ได้แก่ ไซแลน (xylan), อะราบิแนน (arabinan), แมนแนน (mannan), กลูแคน (glucan) และกาแลคแทน (galactan) โดยไซแลนเป็นองค์ประกอบหลัก (Ebringerova และ Heinze, 2000) ชนิดสุดท้ายคือลิกนิน (lignin) มี 20-30 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารประกอบเชิงซ้อนประเภทพอลิฟีโนลิก (polyphenolic) เกาะกันเป็นกลุ่มใหญ่ซึ่งมักห่อหุ้มชั้นเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเอาไว้ (Wong และคณะ, 1988)

ไซแลนเป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลสในเซลล์พืชโดยยึดเกาะกับพอลิแซคคาไรด์ชนิดอื่นด้วยพันธะนอนโควาเลนท์ (non covalent) ยึดเกาะกับเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสด้วยพันธะไฮโดรเจน และยึดเกาะกับลิกนิกด้วยพันธะโควาเลนท์ ทำให้การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเซลลูเลสในธรรมชาติเป็นไปได้ยาก (Beg และคณะ, 2001) ไซแลนพบได้ในธรรมชาติทั้งใน หญ้า มอส เฟิร์น พืชล้มลุก ไม้เนื้ออ่อน ไม้เนื้อแข็ง ในผนังเซลล์ชั้นแรกของพืชใบเลี้ยงเดี่ยว รวมทั้งในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น กากเมล็ดฝ้าย รำข้าว ฟางข้าว ซังข้าวโพด เปลือกเมล็ดทานตะวัน (Magee และ Kosaric, 1985) และในเปลือกเมล็ดธัญพืชต่าง ๆ เป็นต้น (Ericksson และคณะ, 1990) นอกจากนั้นยังสามารถพบได้ในวัสดุเหลือทิ้งจากกระบวนการลอกเนื้อไม้เพื่อทำเยื่อกระดาษ (pulping) (Biely, 1985) พืชแต่ละชนิดจะมีไซแลนในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยพบมากในไม้เนื้อแข็งมีไซแลนปริมาณ 15-30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ในไม้เนื้ออ่อนมีประมาณ 7-12 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (Haltrich และ คณะ, 1996) ส่วนในไม้ล้มลุกและวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรจะมีไซแลนอยู่ประมาณ 20-40 เปอร์เซ็นต์ (Saddler และคณะ,1983)

1.2 โครงสร้างของไซแลน

โครงสร้างของไซแลนเป็นพอลิเมอร์ประกอบด้วยน้ำตาลไซโลสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีตา-1,4-ไซโลซิดิก (β-1,4-xylosidic) เป็นสายหลัก (Ebringerova และ Heinze, 2000) และมีสารประกอบอื่นมาเชื่อมต่อเป็นหมู่ข้างเคียง เช่น หมู่อะราบิโนสต่อที่ตำแหน่ง *O*-3 ของไซโลส หมู่กลูคูโรนิลต่อที่ตำแหน่ง *O*-2 ของไซโลส และหมู่อะซีทิลต่อที่ตำแหน่ง *O*-2 และ *O*-3 ของไซโลส โดยไซแลนจากพืชแต่ละชนิดมีหมู่ข้างเคียงชนิดต่าง ๆ ในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยไซแลนในไม้เนื้ออ่อน และพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เช่น พืชจำพวกหญ้า ได้แก่ ฟางข้าว ธัญพืช ได้แก่ เปลือกข้าวโอ๊ต รำข้าวสาลี จะมีอะราบิโนสเป็นหลัก (Schyns และคณะ, 1994) ส่วนไซแลนในไม้เนื้อแข็งจะมีหมู่อะซีทิลเป็นหลัก (Sunna และ Antranikian, 1997)

โครงสร้างของไซแลนในไม้เนื้อแข็ง คือ โอ-อะซีทิล-4-โอ-เมธิลกลูคูโรโนไซแลน (O-acetyl-4-O-methylglucuronoxylan) ซึ่งมีสายหลักเป็นไซโลส เชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีตา-1,4 ไซโลซิดิก และมี 4-โอ-เมธิลกลูคูโรนิคแอซิด (4-*O*-methylglucuronic acid) ต่อที่ตำแหน่ง *O*-2 ของไซโลส และมีอะซีทิล (acetyl) ต่อที่ตำแหน่ง *O*-3 และ *O*-2 ของไซโลส (Hon และ Shiraishi, 1990) ดังแสดงในรูปที่ 1.1



รูปที่ 1.1 ลักษณะโครงสร้างของโอ-อะซีทิล-4-โอ-เมธิลกลูคูโรโนไซแลน จากไม้เนื้อแข็ง (Hon และ Shiraishi, 1990)

ในไม้เนื้อแข็งจะพบหมู่อะซีทิลเป็นหมู่ข้างเคียงในปริมาณที่แตกต่างกันตามชนิดของพืช โดยมักมีอัตราส่วนของไซโลสและหมู่อะซีทิลเป็น 10 ต่อ 7 (Kantelinen และคณะ, 1993) ส่วนไซแลนในไม้เนื้ออ่อนบางชนิดพบว่ามีหมู่อะซีทิลเป็นหมู่ข้างเคียงประมาณ 1-2 เปอร์เซ็นต์ (Maijala, 2000) บางชนิดก็ไม่พบหมู่อะซีทิลเป็นหมู่ข้างเคียงเลย (Basaran และ Hang, 2000) โดยหมู่อะซีทิลเหล่านี้ช่วยให้ไซแลนละลายน้ำได้ดีขึ้น

1.3 การย่อยสลายไซแลน

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

1.3.1 การย่อยสลายไซแลนด้วยด่าง

การย่อยสลายไซแลนด้วยด่างมักนำไปใช้ในอุตสาหกรรมทำกระดาษ ซึ่งมักจะนำชิ้นของเปลือกไม้มาต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น เพื่อทำให้เปลือกไม้ยุ่ย และเป็นการกำจัดลิกนินออกจากชั้นลิกโนเซลลูโลสบางส่วนด้วย หลังจากนั้นนำไปผ่านกระบวนการฟอกสีเยื่อกระดาษโดยใช้สารเคมีที่มีคลอไรด์เป็นองค์ประกอบ เช่น คลอรีนไดออกไซด์ (chlorinedioxide) ก๊าซคลอรีน เป็นต้น ซึ่งทำให้เกิดสารประกอบไดออกซิน (dioxin) และสารประกอบอะโรมาติกคลอไรด์ที่เป็นพิษอื่น ๆ ด้วย เช่น คลอโรฟีนอล (chlorophenol) คลอโรไบฟีนิล (chloriobiphenyl) และอนุพันธ์คลอโรลิกนิน (chlorolignin) อื่น ๆ ซึ่งสารประกอบเหล่านี้เป็นสารพิษก่อมะเร็งไม่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพและมักจะสะสมในสิ่งแวดล้อมเป็นปริมาณมาก (Bajpai, 1999)

1.3.2 การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์

การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์เป็นปฏิกิริยาที่จำเพาะกว่าการใช้สารเคมี และยังไม่ทำให้เกิดสารประกอบที่เป็นพิษ ซึ่งเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายไซแลนประกอบด้วยเอนไซม์สองกลุ่มใหญ่ คือ

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) ได้ไซโลสและโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้น ๆ เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Li และคณะ, 2000)

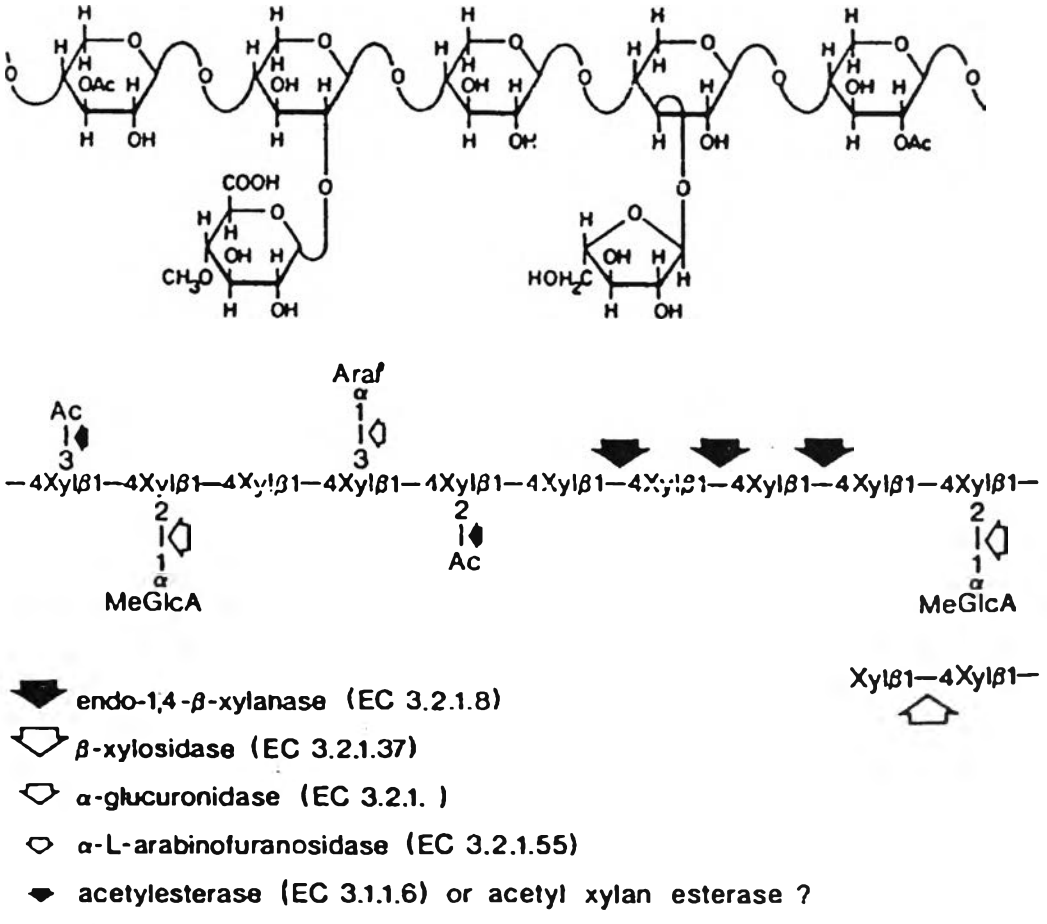
2. บีตา-ไซโลสิเดส (β-xylosidase) หรือ 1,4-บีตา-ดี-ไซแลน-ไซโลไฮโดรเลส (1,4-β-D-xylan-xylohydrolase; EC 3.2.1.37) เอนไซม์ชนิดนี้จะย่อยสลายพันธะ 1,4-บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ทีละ 1 หน่วยจากปลายด้านนอนรีดิวซ์ (non-reducing end) เรียกกระบวนการที่เกิดขึ้นนี้ว่ากลไกภายนอก (exo-mechanism) ได้ไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Biely , 1993)

นอกจากนี้การย่อยสลายไซแลนให้สมบูรณ์ยังต้องอาศัยเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ ดังแสดงในรูปที่ 1.2 ได้แก่ แอลฟา-ดี-กลูคูโรนิเดส (α-D-glucuronidase; EC 3.2.1.139) เป็นเอนไซม์ย่อยสลายพันธะแอลฟา-1,2 ใน 4-โอ-เมธิล-ดี-กลูคูโรนิค แอซิด แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส (α-L-arabinofuranosidase; EC 3.2.1.55) ย่อยสลายพันธะแอลฟา-1,3 ของหมู่นอนรีดิวซ์แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนซิล และอะซีทิล(ไซแลน) เอสเทอเรส (acetyl (xylan) esterase; EC 3.1.1.6) ย่อยสลายพันธะบีตา-1,2 และบีตา-1,3 ที่เชื่อมระหว่างหมู่อะซีทิลกับสายหลัก ซึ่งในงานวิจัยนี้จะกล่าวถึงอะซีทิลเอสเทอเรสอย่างละเอียด ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สนใจจะศึกษา

อะซีทิลเอสเทอเรสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายหมู่อะซีทิล ซึ่งเป็นหมู่ข้างเคียงในองค์ประกอบของไซแลน ซึ่งไซแลนเป็นพอลิแซคคาไรด์ในกลุ่มเฮมิเซลลูโลสที่พบในธรรมชาติมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส โดยอะซีทิลเอสเทอเรสมีบทบาทไปเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ย่อยสลายสายหลัก ทำให้เกิดการย่อยสลายไซแลนได้อย่างสมบูรณ์จนได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่สามารถนำไปใช้กระบวนการหมักเพื่อให้ได้สารที่มีประโยชน์ต่าง ๆ

อะซีทิลเอสเทอเรสพบได้ในจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น รา แบคทีเรีย ยีสต์ และแอคติโนมัยซีทิส รวมถึงมีการศึกษาการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์จากเชื้อต่าง ๆ เช่น *Trichoderma reesei* (Sundberg และ Poutanen, 1991) *Schizophyllum commune* (Halgasova และคณะ, 1994) *Bacillus pumilus* (Degrassi และคณะ, 1998) *Candida guilliermondii* (Basaran และ Hang, 2000) และ *Thermomonospora fusca* (Bachmann และ McCarthy, 1991)

สำหรับงานวิจัยที่ได้ดำเนินการอย่างต่อเนื่องในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย คือ สามารถแยก *Streptomyces* sp. PC22 ได้จากแหล่งดินในประเทศไทย และพบว่าเชื้อนี้เจริญดีในภาวะอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างสูง และยังผลิตไซแลเนสที่ทนต่อค่าความเป็นกรดด่างในช่วงกว้างปริมาณสูง รวมทั้งสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายหมู่ข้างเคียงได้แก่ อะซีทิลเอสเทอเรส สำหรับงานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์ที่จะทำอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22 นี้ให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์บริสุทธิ์ที่เตรียมได้ เพื่อเป็นข้อมูลในการนำมาใช้งานร่วมกับเอนไซม์ย่อยสลายสายหลักเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายไซแลนให้สูงขึ้น



รูปที่ 1.2 ลักษณะโมเลกุลของไซแลนและการย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์กลุ่มย่อยไซแลน (Biely, 1985)

Ac	แทน	หมู่อะซีทิล
Araf	แทน	แอล-อะราบิโนฟิวราโนส
MeGlcA	แทน	กรด 4-โอ-เมธิล-ดี-กลูคูโรนิค
Xyl	แทน	ดี-ไซโลส

หอสมุดกลาง สำนักงานวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย