บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

Streptomyces sp. PC22 เป็นจุลินทรีย์ที่แยกได้จากแหล่งดินในประเทศไทยโดยสุมาลี อึ้งใจธรรม (2539) ซึ่งพบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายไซแลน (xylanolytic enzymes) คือ ไซแลเนส บีตา-ไซโลสิเดส แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส และอะซีทิลเอสเทอเรส ซึ่งงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการทำอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22 ให้บริสุทธิ์ โดยพบว่าเชื้อนี้สามารถผลิตอะซีทิลเอสเทอเรสได้สูงประมาณ 0.28 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 0.75 เปอร์เซ็นต์ ไซแลนจากไม้เบิร์ชเป็นแหล่งคาร์บอน

งานวิจัยนี้ได้ทำอะซีทิลเอสเทอเรสจากจุลินทรีย์ดังกล่าวให้บริสุทธิ์ และศึกษาสมบัติของเอนไซม์บริสุทธิ์ที่เตรียมได้ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการนำเอนไซม์ไปใช้งาน โดยในขั้นตอนแรกได้ทดลองตกตะกอนลำดับส่วนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าเอนไซม์ตกตะกอนได้ดีในช่วงความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟต 40-80 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่อะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Bacillus pumilus* และ *Termitomyces clypeatus* ตกตะกอนที่ความเข้มข้น 30-70 เปอร์เซ็นต์ (Degrassi และคณะ, 1998 และ Mukhopadhyay และคณะ, 2003) แต่สำหรับงานวิจัยนี้เพื่อให้ได้ปริมาณเอนไซม์มากที่สุดสำหรับการทำให้บริสุทธิ์ต่อไปจึงเลือกความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 30-90 เปอร์เซ็นต์

งานวิจัยนี้ยังได้วิเคราะห์แอคติวิตีของไซแลเนสและเซลลูเลสควบคู่ไปกับอะซีทิลเอสเทอเรส ซึ่งมีรายงานว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่สามารถผลิตอะซีทิลเอสเทอเรสได้ก็สามารถผลิตไซแลเนสและเซลลูเลสได้ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้ถูกปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ เช่น *Trichoderma reesei* QM9414 สามารถผลิตอะซีทิลเอสเทอเรส ไซแลเนสและเซลลูเลสได้เท่ากับ 0.252 1.47 และ 8.5 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Beily และคณะ, 1988) และ *Thermomonospora fusca* ผลิตอะซีทิลเอสเทอเรส ไซแลเนส และเอนโดกลูแคเนสได้เท่ากับ 0.1 20.0 และ 1.5 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Bachmann และ McCarthy, 1991) และยังมีรายงานว่าการที่จุลินทรีย์จะผลิตไซแลเนสได้มากหรือน้อยขึ้นกับชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ เช่น Mukhopadhyay และคณะ (1997) พบว่าเมื่อเลี้ยง *Termitomyces clypeatus* ที่มี 1 เปอร์เซ็นต์ ไซแลนจากไม้เบิร์ช สามารถผลิตไซแลเนสได้สูงถึง 20 หน่วยต่อมิลลิลิตร และอะซีทิลเอสเทอเรสได้เท่ากับ 1.14 หน่วยต่อ

มิลลิลิตร แต่เชื้อนี้ไม่สามารถผลิตไซแลเนสได้เมื่อเลี้ยงในอาหาร ที่มี 1 เปอร์เซ็นต์ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน แต่ยังสามารถผลิตอะซีทิลเอสเทอเรสได้เท่ากับ 0.28 หน่วยต่อมิลลิลิตร สำหรับงานวิจัยนี้เมื่อเลี้ยง *Streptomyces* sp. PC22 ในอาหารเพื่อผลิตอะซีทิลเอสเทอเรสทีมี 0.75 เปอร์เซ็นต์ ไซแลนจากไม้เบิร์ชเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อนี้ผลิตไซแลเนสและเซลลูเลสได้เพียง คือ 0.7-0.8 และ 0.03 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าเมื่อเลี้ยงโดยใช้ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตร่วมกับ 2.5 เปอร์เซ็นต์กากเมล็ดฝ้ายประมาณ 10 เท่า (Wateewuthajarn และ Pinphanichakarn, 2000) ดังนั้นการเลือกแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจึงมีบทบาทสำคัญในการผลิตเอนไซม์ที่ต้องการให้ได้ปริมาณมากและยังช่วยลดการปนเปื้อนจากเอนไซม์อื่น ๆ ด้วย

ในขั้นตอนการทำอะซีทิลเอสเทอเรสให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีบนตัวกลางแลกเปลี่ยนอิออนลบ พบว่าเอนไซม์จับกับตัวกลางในคอลัมน์ซึ่งถูกชะออกจากตัวกลางโดยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.36-0.48 โมลาร์ และพบแอคติวิตีของไซแลเนส 2 ชนิด คือ ไซแลเนส I ซึ่งไม่จับกับตัวกลาง และไซแลเนส II ถูกชะออกจากตัวกลางโดยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นในช่วง 0.38-0.65 โมลาร์ ซึ่งตรงกับรายงานของ Wateewuthajarn และ Pinphanichakarn (2000) อะซีทิลเอสเทอเรสที่ได้จากขั้นตอนนี้ไม่มีไซแลเนส I ปนเปื้อนแต่ยังมีไซแลเนส II บางส่วนปนเปื้อนอยู่ มีรายงานถึงความเข้มข้นที่แตกต่างกันของโซเดียมคลอไรด์ที่ใช้ชะอะซีทิลเอสเทอเรสจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ ออกจากคอลัมน์แลกเปลี่ยนอิออนลบ เช่น อะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Fibrobacter succinogenes* S85 ถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วยโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นต่ำ และสามารถกำจัดไซแลเนสได้บางส่วน (McDermid และคณะ, 1990) อะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Trichoderma reesei* ถูกชะออกมาที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0-75 มิลลิโมลาร์ โดยเอนไซม์ที่ได้ไม่มีไซแลเนสปนเปื้อน (Sundberg และ Poutanen, 1991) สำหรับอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Schizophyllum commune* ถูกชะออกมาที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 0.13 โมลาร์ (Halgasova และคณะ, 1994) ขั้นตอนต่อไปของการทำให้บริสุทธิ์คือนำเอนไซม์มาผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟีบนบิวทิล ไฮโดรโฟบิค อินเตอร์แอคชัน โดยอะซีทิลเอสเทอเรสจับกับตัวกลางในคอลัมน์และถูกชะด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 1.4-0.4 โมลาร์ ซึ่งมีรายงานหลายฉบับพบว่าอะซิทิลเอสเทอเรสจะจับกับตัวกลางในคอลัมน์ที่มีสมบัติเป็นไฮโดรโฟบิค เช่น อะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Fibrobacter succinogenes* S85, *Schizophyllum commune*, *Bacillus pumilus*, *Aspergillus niger* และ *Termitomyces clypeatus* (McDermid และคณะ, 1990, Halgasova และคณะ, 1994, Altaner และคณะ, 2003 และ Mukhopadhyay และคณะ, 2003) และในขั้นตอนสุดท้ายของการทำให้บริสุทธิ์ คือ นำอะซีทิลเอสเทอเรสที่ได้มาผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟีบนไฮดรอกซี

อะปาไทต์ พบว่าเอนไซม์ไม่จับกับตัวกลางซึ่งสอดคล้องกับรายงานของอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Fibrobacter succinogenes* S85 ที่เมื่อนำมาผ่านคอลัมน์ไอดรอกซีอะปาไทต์พบว่าไม่จับตัวกลางเช่นกัน (McDermid และคณะ, 1990) ในขั้นตอนนี้สามารถแยกไซแลเนส II ซึ่งจับกับตัวกลางออกจากอะซีทิลเอสเทอเรสได้ หลังจากการทำอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22 ให้บริสุทธิ์ตามขั้นตอนดังกล่าวแล้ว พบว่ามีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 51.42 เท่า เหลือแอคติวิตีอยู่ 7.33 เปอร์เซ็นต์ และยังคงมีไซแลเนสปนเปื้อนอยู่บ้างแต่น้อยมากคือต่ำกว่า 0.05 เปอร์เซ็นต์ การกำจัดไซแลเนสอย่างสมบูรณ์สามารถทำได้โดยการผ่านคอลัมน์ของไฮดรอกซีอะปาไทต์ซ้ำ แต่ในงานวิจัยนี้ไม่ได้ทำการทดลองขั้นตอนนี้เนื่องจากปริมาณของอะซีทิลเอสเทอเรสที่เตรียมได้ค่อนข้างน้อย จากการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของอะซีทิลเอสเทอเรสโดยวิธีพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิสพบว่าเอนไซม์ที่เตรียมได้ยังไม่บริสุทธิ์ถึงระดับ homogeneity มีรายงานหลายฉบับเกี่ยวกับขั้นตอนการทำอะซีทิลเอสเทอเรสจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ ให้บริสุทธิ์จนถึงระดับ homogeneity โดยไม่มีโปรตีนชนิดอื่นปนเปื้อนรวมทั้งไซแลเนสนั้นจำเป็นต้องผ่านการทำให้บริสุทธิ์หลายขั้นตอน เช่น ion exchange, gel filtration และ hydrophobic chromatography รวมถึงการทำซ้ำบางขั้นตอน

ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์โดยเมื่อรวมแอคติวิตีทั้งหมดของเอนไซม์ในขั้นตอนต่าง ๆ ซึ่งเท่ากับ 131.23 หน่วย พบว่ามีค่าสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับแอคติวิตีทั้งหมดของเอนไซม์ที่วิเคราะห์ได้ในขั้นต้นจากน้ำเลี้ยงเชื้อซึ่งเท่ากับ 102.38 หน่วย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในน้ำเลี้ยงเชื้อมีสารประกอบหรือโลหะบางชนิดปนเปื้อนอยู่ซึ่งมีผลไปยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ แต่เมื่อผ่านการทำให้บริสุทธิ์สารยับยั้งเหล่านี้จะถูกกำจัดออกซึ่งมีผลให้เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีขึ้น ส่งผลให้แอคติวิตีมีค่าสูงขึ้น

การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของอะซีทิลเอสเทอเรสโดยการทำโครมาโทกราฟีบนเซฟาคริล เอส-200 เอชอาร์ เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานพบว่าเป็นเอนไซม์ที่มีขนาดค่อนข้างใหญ่ มีน้ำหนักโมเลกุลสูงประมาณ 155,000 ดาลตัน และจากการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยการทำอีเลคโทรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล พบว่าอะซีทิลเอสเทอเรสประกอบด้วยหน่วยย่อย 4 หน่วยย่อย ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันคือ 38,000 ดาลตัน มีรายงานถึงอะซีทิลเอสเทอเรสที่มีขนาดใหญ่ เช่น อะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Bacillus pumilus* มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 190,000 ดาลตัน ประกอบด้วยหน่วยย่อย 4 หรือ 5 หน่วยย่อย ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันคือ 40,000 ดาลตัน (Degrassi และคณะ, 1998) และ *Thermoanaerobacterium* sp.

JW/SL-YS485 ผลิตอะซีทิลเอสเทอเรสได้ 2 ชนิด โดย AXE I มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 195,000 ดาลตัน ประกอบด้วย 6 หน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันคือ 32,000 ดาลตัน และ AXE II มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 106,000 ดาลตัน ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อยขนาดเท่ากัน คือ 26,000 ดาลตัน (Shao และ Wiegel, 1995) อย่างไรก็ตามพบว่าอะซีทิลเอสเทอเรสจากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 34,000 – 50,000 ดาลตัน (Poutanen และ Sundberg, 1988 และ Kormelink และคณะ, 1993) เช่น อะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Aspergillus niger*, *Streptomyces lividans* และ *Aspergillus awamori* มีน้ำหนักโมเลกุล 30,480, 34,000 และ 50,000 ดาลตัน ตามลำดับ (Kormelink และคณะ, 1993, Dupont และคณะ, 1996 และ Sundberg และคณะ,1990)

จากข้อมูลข้างต้น *Streptomyces* sp. PC22 สามารถผลิตอะซีทิลเอสเทอเรสได้ 1 ชนิด ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับหลายรายงานที่พบว่าจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตอะซีทิลเอสเทอเรสได้ 1 ชนิด เช่น *Schizophyllum commune* (Halgosava และคณะ, 1994) *Streptomyces lividans* (Dupont และคณะ, 1996) และ *Candida guilliermondii* (Basaran และ Hang, 2000) แต่ก็มีผู้รายงานว่าจุลินทรีย์บางชนิดสามาถผลิตอะซีทิลเอสเทอเรสได้ 2 ชนิด เช่น *Trichoderma reesei* (Sundberg และ Poutanen, 1991) และ *Penicillium purpurogenum* (Egana และคณะ, 1996)

สำหรับจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตอะซีทิลเอสเทอเรสได้หลายชนิดนั้น ขึ้นกับความจำเพาะต่อสับสเตรท Sundberg และ Poutanen (1991) รายงานว่า *Trichoderma reesei* สามารถผลิตอะซีทิลเอสเทอเรสได้หลายชนิด โดยชนิดหนึ่งสามารถย่อยได้เฉพาะหมู่อะซีทิลของพอลิเมอร์ไซแลนสายยาว โดยทำงานร่วมกับไซแลเนสทำให้ได้โมโนเมอร์และโอลิโกเมอร์สายสั้นที่ยังมีหมู่อะซีทิล บางส่วนอยู่ จากนั้นจุลินทรีย์จะผลิตอะซีทิลเอสเทอเรสอีกชนิดหนึ่งที่มีความจำเพาะกับโอลิโกเมอร์สายสั้นเพื่อย่อยหมู่อะซีทิล ทำให้ไซแลเนสสามารถเข้าไปย่อยสายหลักได้ดีขึ้น และจะถูกย่อยต่อด้วยบีตา-ไซโลสิเดสทำให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวคือไซโลส ความแตกต่างของอะซีทิลเอสเทอเรสนี้จึงมีความจำเป็นต่อการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสในธรรมชาติที่มีความหลากหลายของขนาดโมเลกุล

การศึกษาสมบัติของอะซีทิลเอสเทอเรสบริสุทธิ์จาก *Streptomyces* sp. PC22 ในขั้นแรกศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส พบว่าเอนไซม์ทำงานได้ดีในช่วง 45-

60 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์ให้แอคติวิตีสูงสุด อย่างไรก็ตามที่อุณหภูมิสูง 65 องศาเซลเซียส เอนไซม์ก็ยังสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงจัดได้ว่าเป็นข้อดีของเอนไซม์นี้ที่สามารถทำงานได้ในช่วงกว้างกว่าอะซีทิลเอสเทอเรสจากจุลินทรีย์อื่น ๆ หลายชนิด เช่น *Candida guilliermondii* ที่ทำงานได้ดีในช่วง 50-60 องศาเซลเซียส (Basaran และ Hang, 2000) จาก *Schizophyllum commune* ที่มีอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 30-45 องศาเซลเซียส (Halgasova และคณะ, 1994) และทำงานได้ที่อุณหภูมิสูงกว่าอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Orpinomyces* sp. strain PC-2 (Blum และคณะ, 1999) และจาก *Aspergillus aculeatus* (Leeuwen และคณะ, 1992) ที่มีอุณหภูมิเหมาะสมคือ 30 และ 40 องศาเซลเซียส และอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Fibrobacter succinogenes* (McDermid และคณะ, 1990) และจาก *Termitomyces clypeatus* (Mukhopadhyay และคณะ, 2003) ที่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 45 องศาเซลเซียส

ผลของความเป็นกรดด่างต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรสบริสุทธิ์จาก *Streptomyces* sp. PC22 พบว่าเอนไซม์ทำงานได้ในช่วงแคบคือที่ความเป็นกรดด่าง 6.0-6.5 โดยที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.5 เป็นค่าที่เหมาะสมที่สุดในการทำงานของเอนไซม์นี้ ซึ่งเท่ากันกับความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรสบริสุทธิ์จาก *Fusarium oxysporum* (Christakopoulos และคณะ, 1999) และจาก *Termitomyces clypeatus* (Mukhopadhyay และคณะ, 2003) จากรายงานเกี่ยวกับความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรสจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดพบว่าจะแตกต่างกันโดยอยู่ในช่วง 5.0-10.0 ดังแสดงในตารางที่ 2.3

ความเสถียรของอะซีทิลเอสเทอเรสต่ออุณหภูมิ พบว่าอะซีทิลเอสเทอเรสบริสุทธิ์มีความเสถียรต่ออุณหภูมิได้สูงถึง 55 องศาเซลเซียส แต่อย่างไรก็ตามเมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 30 นาที เอนไซม์ยังคงมีแอคติวิตีเหลืออยู่สูงถึงประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความเสถียรที่อุณหภูมิสูงกว่าอะซีทิลเอสเทอเรสจากจุลินทรีย์อื่นๆเช่น อะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Schizophyllum commune* มีความเสถียรต่ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และจะสูญเสียแอคติวิตีอย่างสมบูรณ์ที่ 60 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มเป็นเวลา 30 นาที (Halgasova และคณะ, 1994) อะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Termitomyces clypeatus* มีความเสถียรต่ออุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยจะสูญเสียแอคติวิตีอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 30 นาที (Mukhopadhyay และคณะ, 2003) AXE I จาก *Penicillium purpurogenum* ที่มีความเสถียรต่ออุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 1

ชั่วโมง (Egana และคณะ, 1996) อะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Bacillus pumilus* และจาก *Aspergillus awamori* ที่มีความเสถียรต่ออุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง (Degrassi และคณะ, 1998 และ Koseki และคณะ, 2005)

อะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22 มีความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างในช่วง 5.0-9.0 ซึ่งจัดว่าเป็นช่วงที่ค่อนข้างกว้างเมื่อเทียบกับอะซีทิลเอสเทอเรสจากจุลินทรีย์หลายชนิดที่รายงานไว้ เช่น จาก *Candida guilliermondii* (Basaran และ Hang, 2000) มีความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างในช่วง 5.8-8.0 จาก *Aspergillus awamori* (Koseki และคณะ, 2005) มีความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างในช่วง 7.0-9.0 จาก *Thermoanaerobacterium* sp. SW/SLYS 485 (Shao และ Wiegel, 1995) ซึ่งมีความเสถียรในช่วง 6.0-8.0 และ จาก *Schizophyllum commune* (Basaran และ Hang, 2000) ที่มีความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างในช่วง 6.2-8.5

การศึกษาความจำเพาะของอะซีทิลเอสเทอเรสต่อสับสเตรทสังเคราะห์ *p*-nitrophenyl acetate พบว่าเอนไซม์มีค่า K_m ต่อ *p*-nitrophenyl acetate เท่ากับ 0.43 มิลลิโมลาร์ ซึ่งต่ำกว่าค่า K_m ของอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Orpinomyces* sp. PC-2 (Blum และคณะ, 1999) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.9 มิลลิโมลาร์ ส่วน K_m ของอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Fusarium oxysporum* (Christakopoulos และคณะ, 1999) และ *Termitomyces clypeatus* (Mukhopadhyay และคณะ, 2003) มีค่าเท่ากับ 0.36 และ 0.25 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

จากการศึกษาเกี่ยวกับผลของสารดัดแปลงหมู่อะมิโนต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส พบว่า phenylmethylsulfonylfluoride ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ 40 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22 น่าจะมีกรดอะมิโนเซรีนเกี่ยวข้องกับบริเวณ active site ซึ่งมีรายงานว่าอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Trichoderma reesei* (Margolles-Clark และคณะ, 1996) และ จาก *Aspergillus awamori* (Koseki และคณะ, 2005) มีกรดอะมิโนเซรีนอยู่ใน active site ของเอนไซม์ โดยถูกยับยั้งการทำงานด้วย phenylmethylsulfonyl fluoride

การศึกษาอิออนโลหะชนิดต่าง ๆ ที่มีผลยับยั้งการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส พบว่า Hg^{2+} มีผลยับยั้งรุนแรงที่สุดที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ รองลงมาคือ Cu^{2+},Zn^{2+} และ Co^{2+} แต่ไม่ถูกยับยั้งด้วย Ca^{2+}, Mg^{2+}และ Mn^{2+} ซึ่งจัดว่าเอนไซม์นี้มีคุณสมบัติที่ดีเมื่อเทียบกับอะซีทิลเอส

เทอเรสจากจุลินทรีย์อื่น ๆ ซึ่งถูกยับยั้งได้ด้วยอิออนโลหะชนิดต่าง ๆ หลากหลายชนิดกว่า เช่น อะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Schizophyllum commune* ถูกยับยั้งได้ด้วยอิออนของ Cu^{2+}, Fe^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}, Ca^{2+} และ Co^{2+} (Halgasova และคณะ, 1994) อะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Bacillus pumilus* ถูกยับยั้งด้วย Fe^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+},Ca^{2+} และ Ag^{2+} (Degrassi และคณะ, 1998) และอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Candida guilliermondii* ถูกยับยั้งการทำงานด้วย 10 มิลลิโมลาร์ของ Cu^{2+} และ Ag^{2+} (Basaran และ Hang, 2000)

จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนปลายเอ็นของอะซีทิลเอสเทอเรสได้ลำดับกรดอะมิโนบางส่วน คือ M-A-S-x-N-x-N และเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนปลายเอ็นของอะซีทิลเอสเทอเรสของจุลินทรีย์อื่น ๆ พบว่าไม่มีความอนุรักษ์และมีความหลากหลายสูงมาก ดังแสดงในตารางที่ 5.1 ซึ่งต่างจากเอนไซม์อื่น ๆ เช่น กลูโคสไอโซเมอเรส และบีตา-ไซโลสิเดสที่พบว่ากรดอะมิโนที่ปลายเอ็นมีความอนุรักษ์สูงมาก โดยเฉพาะในกลุ่ม *Streptomyces* spp. ด้วยกัน ดังแสดงในตารางที่ 5.2 และ 5.3 ตามลำดับ ดังนั้นจากความไม่คล้ายคลึงกันเลยของลำดับกรดอะมิโนปลายเอ็น อะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22 จึงอาจจัดเป็นชนิดใหม่

ตารางที่ 5.1 ลำดับกรดอะมิโนปลายเอ็นของอะซีทิลเอสเทอเรสจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ

อะซีทิลเอสเทอเรสจากจุลินทรีย์	ลำดับกรดอะมิโนปลายเอ็น	รายการอ้างอิง
Aspergillus niger	M S G S L Q G T D F	DeGraaff และคณะ, 1992
A. awamori	M L L S T H L L F V	Koseki และคณะ, 1997
A. ficuum	M L S T H L L F L A	Chung และคณะ, 2002
A. oryzae	M I L L S Y L L T Y	Koseki และคณะ, 2004
A. fumigatus AF293	M A K Y V L N T Y S	Nierman และคณะ, 2005
Streptomyces lividans	M R T S T G P R A S	Shareck และคณะ, 1991
S. thermoviolaceus	M R I P S R R P L R	Tsujibo และคณะ, 1992
S. coelicolor A3	M V S R R T V L G G	Bentley และคณะ, 2002
S. avermililis	M A L F D L P L D Q	Ikeda และคณะ, 2003
Streptomyces sp. PC22	M A S x N x N	งานวิจัยนี้

x คือ ไม่ทราบลำดับกรดอะมิโน

ตารางที่ 5.2 ลำดับกรดอะมิโนปลายเอ็นของกลูโคสไอโซเมอเรสจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ

กลูโคสไอโซเมอเรสจากจุลินทรีย์	ลำดับกรดอะมิโนปลายเอ็น	รายการอ้างอิง
Streptomyces murinus	M S F Q P T P E D R	Luiten และคณะ, 1990
Streptomyces sp. 190-1	M S F Q P T P E D R	Pinphanichakarn, 1991
S. phaeochromogenes	M S Y Q P T P E D R	Basuki และคณะ, 1992
S. diastaticus	M S Y Q P T P E D K	Wang และคณะ, 1994
S. lividans	M N Y Q P T S E D R	Heo และคณะ, 1999
S. thermocyaneoviolaceus	M N Y Q P T P E D R	Kwak และคณะ, 2000
S. olivaceoviridis	M S Y Q P T P E D R	Kaneko และคณะ, 2001
Streptomyces sp. SK	M S F Q P T P E D R	Belghith-Srih, 2003

ตารางที่ 5.3 ลำดับกรดอะมิโนปลายเอ็นของบีตา-ไซโลสิเดสจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ

บีตา-ไซโลสิเดสจากจุลินทรีย์	ลำดับกรดอะมิโนปลายเอ็น	รายการอ้างอิง
Bacillus sp. KK-1	M K I I N P V L K	Chun และคณะ, 1998
B. pumilus	M K I I N P V L K	Xu และคณะ, 2002
B. subtilis	M K I I N P V L K	Kunst และคณะ, 2003
Streptomyces coelicolor A3	M N A D V T V D H	Bentley และคณะ, 2002
Streptomyces sp. CH7	M N A D A A A E S	Pinphanichakarn และคณะ, 2003

จากการศึกษาเพื่อนำอะซีทิลเอสเทอเรสมาใช้ประโยชน์โดยศึกษาในแง่การทำงานร่วมกับเอนไซม์ย่อยสายหลักของไซแลนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยไซแลนจากไม้เบิร์ช พบว่าอะซีทิลเอสเทอเรสช่วยเพิ่มประสิทธิภาพไซแลเนส II ในการย่อยสลายไซแลนทำให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น 10.42 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อมีการทำงานร่วมกันระหว่างอะซีทิลเอสเทอเรสกับไซแลเนส II และบีตา-ไซโลสิเดสสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายไซแลนได้ดียิ่งขึ้น โดยให้น้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นเป็น 46.30 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับ Dupont และคณะ (1996) ที่รายงานว่าอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Streptomyces lividans* ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของไซแลเนส A และไซแลเนส B ที่ผลิตจาก *Streptomyces lividans* ในการย่อยไซแลนจากไม้เบิร์ชที่มีการเติมหมู่อะซีทิลเพิ่มขึ้นโดยการสังเคราะห์ และอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Aspergillus niger* ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของไซแลเนสจาก *Aspergillus awamori* ในการย่อยสลายไซแลนจากไม้เบิร์ชได้ โดยเมื่อบ่มปฏิกิริยาเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ได้ผลิตภัณฑ์คือ ไซโลโอลิโกเมอร์เพิ่มขึ้น 5 เท่า และยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดสได้น้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น 1.7 เท่า (Kormelink และคณะ , 1993) และในทางกลับกันยังมีรายงานถึงไซแลเนสช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรสเช่นกัน เช่น ไซแลเนสจาก *Orpinomyces* sp. strain PC-2 ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรสในการย่อยหมู่อะซีทิลของไซแลนจากไม้เบิร์ช โดยให้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดอะซีติกเพิ่มขึ้น 3 เท่า โดยไซแลเนสจะเข้าไปย่อยสายไซแลนให้เป็นโอลิโกเมอร์สายสั้นมีผลให้อะซีทิลเอสเทอเรสเข้าไปสลายหมู่อะซีทิลได้ง่ายและรวดเร็วขึ้น (Blum และคณะ, 1999)

เมื่อเปรียบเทียบสมบัติเอนไซม์บริสุทธิ์นี้กับที่ยังไม่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ซึ่งรายงานโดยเวฟุรีย์ ทองคำ (2547) พบว่าเอนไซม์ที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่าคือ 60 ^{o}C และเสถียรต่อความเป็นกรดด่างในช่วงค่อนข้างกว้างกว่าคือ 4.0-9.0 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากโปรตีนอื่น ๆ ที่ปนเปื้อนอยู่นั้นมีส่วนช่วยป้องกันหรือลดการสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์จากความร้อนและความเป็นกรดด่าง อย่างไรก็ตามจากข้อมูลสมบัติของเอนไซม์บริสุทธิ์พบว่าอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22 จัดว่ามีสมบัติในเกณฑ์ดีเมื่อเทียบกับเอนไซม์ที่รายงานไว้จากจุลินทรีย์อื่นๆ ดังนั้นจึงเป็นเอนไซม์ที่มีประโยชน์และมีศักยภาพสูงที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมฟอกสีเยื่อกระดาษร่วมกับไซแลเนสเพื่อลดการใช้สารเคมีและสารพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อม รวมทั้งใช้ในการผลิตน้ำตาลไซโลสเพื่อใช้ในกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ หรือผลิตไซลิทอล การปรับปรุงอาหารสัตว์ และอุตสาหกรรมอาหาร เป็นต้น

ตารางที่ 5.4 สมบัติของอะซีทิลเอสเทอเรสบริสุทธิ์ จาก *Streptomyces* sp. PC22 เปรียบเทียบกับจากจุลินทรีย์อื่น ๆ

สายพันธุ์ของจุลินทรีย์	อุณหภูมิที่เหมาะสม (^{o}C)	ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม	ความเสถียรต่ออุณหภูมิ	ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง	เอกสารอ้างอิง
Streptomyces sp. PC22	50	6.5	55 ^{o}C, 30 นาที	5.0-9.0	งานวิจัยนี้
Aspergillus awamori	60-75	5.5-6.0	50 ^{o}C ,60 นาที	7.0-9.0	Sundberg และคณะ1990 และ Koseki และคณะ, 2005
Aspergillus niger	50	5.5-6.0	50-55 ^{o}C, 2 ชั่วโมง	3.0-8.0	Kormelink และคณะ, 1993
Bacillus pumilus PS213	55	8.0	50^{o}C, 60 นาที	8.0-9.5	Degrassi และคณะ, 1998
Candida guilliermondii	50-60	7.5	60 ^{o}C	5.8-8.0	Basaran และ Hang, 2000
Clostridium cellulovorans	50	6.0	30 ^{o}C, 12 ชั่วโมง	3.0-7.0	Kosugi และคณะ, 2002
Fibrobacter succinogenes	45	7.0	-	-	McDermid และคณะ, 1990
Penicillium purpurogenum AXE I	50	5.3	42 ^{o}C, 60 นาที	4.0-8.0	Egana และคณะ, 1996
AXE II	55-60	5.5-6.0	65^{o}C, 60 นาที	4.0-8.0	

ตารางที่ 5.4 (ต่อ)

สายพันธุ์ของจุลินทรีย์	อุณหภูมิที่เหมาะสม (^{o}C)	ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม	ความเสถียรต่ออุณหภูมิ	ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง	เอกสารอ้างอิง
Schizophyllum commune	30-45	7.7	30 ^{o}C, 30 นาที	6.2-8.5	Halgasova และคณะ, 1994
Streptomyces flavogriseus	50	6.0	-	-	Linden และคณะ, 1994
Streptomyces lividans IAF-43	70	7.5	72 ^{o}C, 15 นาที	-	Dupont และคณะ, 1996
Streptomyces olivochromigenes	50	6.0	-	-	Linden และคณะ, 1994
Termitomyces clypeatus	45	6.5	35 ^{o}C	-	Mukhopadhyay และคณะ, 2003
Thermoanaerobacterium sp. SW/SL-YS485 AXE I	80	7.0	70 ^{o}C	7.0	Shao และ Wiegel, 1995
AXE II	84	7.5	70 ^{o}C	6.0-8.0	
Trichoderma reesei AXE I	60-65	5.0-6.0	75 ^{o}C, 60 นาที	3.0-7.0	Sundberg และ Poutanen, 1991
AXE II	60-65	5.0-6.0	60 ^{o}C, 24 ชั่วโมง	3.0-7.0	

หมายเหตุ : - คือ ไม่ระบุ