บทที่ 1

บทนำ

1.1 ไซแลน

ผนังเซลล์พืชเป็นแหล่งคาร์บอนหลักที่พบในธรรมชาติ ประกอบด้วยโพลีเมอร์หลัก 3 ชนิดคือ เซลลูโลส (cellulose) เป็นสายใยของกลูแคน (glucan) ที่เชื่อมกันด้วยพันธะบีตา-1,4-(β-1,4 glucan) และไม่ละลายน้ำ เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) เป็นโพลีแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วย กลูแคน แมนแนน (mannan) และไซแลน (xylan) ลิกนิน (lignin) เป็นพวกโพลีฟีโนลิก (polyphenolic) ที่มีลักษณะโครงสร้างซับซ้อน (Wong et al., 1988) องค์ประกอบที่พบมากที่สุดในผนังเซลล์พืชคือ เซลลูโลส รองลงมาคือ เฮมิเซลลูโลส ซึ่งในเฮมิเซลลูโลสจะมีไซแลนเป็นองค์ประกอบหลัก (Biely, 1985)

ไซแลนประกอบด้วย ดี-ไซโลส (D-xylose) ซึ่งเป็นน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอมเชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีตา-1,4 (Biely, 1985) ทำให้ได้บีตา-1,4-ดี-ไซแลน (β-1,4-D-xylan) เป็นสายหลัก (Coughlan and Hazlewood, 1993) สายหลักของไซแลนมีลักษณะคล้ายกับสายหลักของเซลลูโลส แตกต่างกันที่สายหลักของไซแลนประกอบด้วย ดี-ไซโลส แต่สายหลักของเซลลูโลสประกอบด้วย ดี-กลูโคส (D-glucose) และพบว่าไซแลนเกือบทั้งหมดในธรรมชาติจะเป็นโพลีเมอร์ที่มีหมู่แทนที่หลายหมู่มาต่อกับสายหลักทำให้เกิดเป็นสายกิ่ง ซึ่งลักษณะเช่นนี้เรียกว่าเฮเทอโรโพลีแซคคาไรด์ (heteropolysaccharide) (Biely, 1985) หมู่แทนที่ที่มาต่อกับสายหลักของไซแลนได้แก่ อะเซทิล (acetyl) อะราบิโนซิล (arabinosyl) และกลูคูโรโนซิล (glucuronosyl) นอกจากนี้ยังมีไซแลนอีกประเภทหนึ่งที่มีหมู่แทนที่เป็นไซโลซิล (xylosyl) เพียงชนิดเดียวในสายหลัก ซึ่งจะพบไซแลนประเภทนี้ได้น้อยมากในธรรมชาติ และเรียกว่าโฮโมไซแลน (homoxylan) (Sunna and Antranikian, 1997)

ไซแลนสามารถพบได้ทั้งในไม้เนื้อแข็งและไม้เนื้ออ่อน โดยมีลักษณะต่างกันดังนี้ คือ

1.1.1 ไซแลนในไม้เนื้อแข็ง

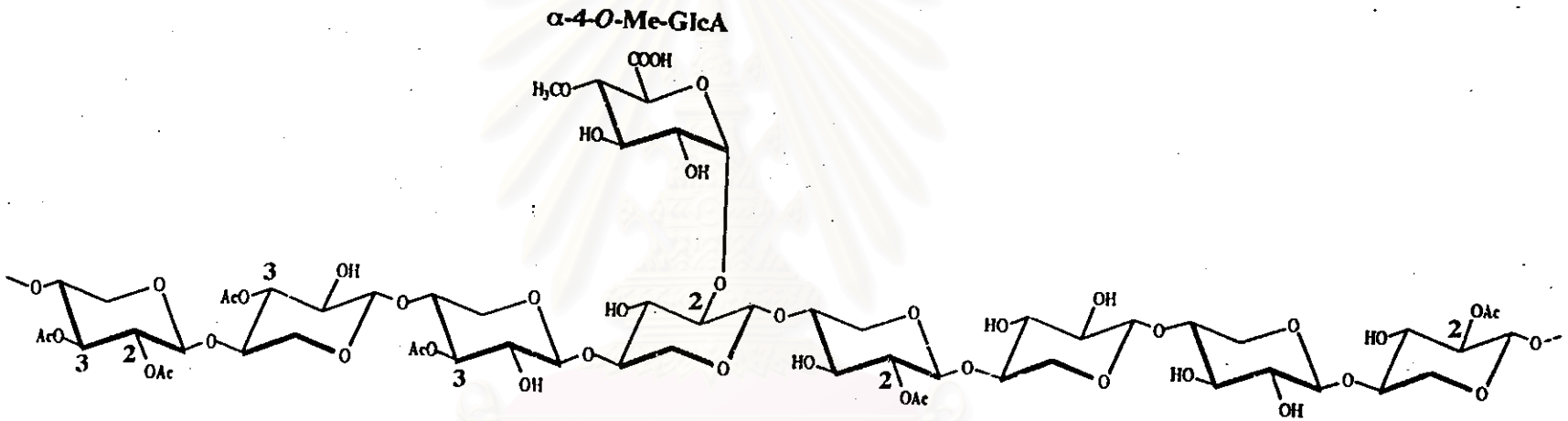
ไซแลนในไม้เนื้อแข็งเรียกว่า โอ-อะเซทิล-4-โอ-เมธิล กลูคูโรโนไซแลน (*O*-acetyl-4-*O*-methyl glucuronoxylan) ดังแสดงในรูปที่ 1.1 โดยเป็นโพลีแซคคาไรด์

ที่ประกอบด้วยบีตา-ไซโลไพราโนสอย่างน้อย 70 เรซิดิวซ์ (residues) มีความยาวเฉลี่ย 150-200 เรซิดิวซ์ (Sunna and Antranikian, 1997) และประมาณตำแหน่งที่สิบของบีตา-ไซโลไพราโนส ในสายหลักจะมีหมู่แทนที่ 4-โอ-เมธิล-แอลฟา-ดี-กลูคูโรนิค แอซิด เรซิดิวซ์ (4-*O*-methyl-α-D-glucuronic acid residue) มาเชื่อมที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 โดย 70 เปอร์เซ็นต์ จะมีการเติมหมู่อะเซทิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 หรือ 3 หรือทั้ง 2 ตำแหน่ง (Coughlan and Hazlewood, 1993) เช่น เบิร์ช ไซแลน (birch xylan) จะมีอัตราส่วนโมลของอะซิติค แอซิด ต่อไซโลส มากกว่า 1:2 (Dekker, 1989) และจะมีการเติมหมู่อะเซทิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 มากกว่า 2 ซึ่งการมีหมู่อะเซทิลมากจะช่วยให้บางส่วนละลายน้ำได้ (Sunna and Antranikian, 1997)

1.1.2 ไซแลนในไม้เนื้ออ่อน

ไซแลนในไม้เนื้ออ่อนเรียกว่า อะราบิโน-4-โอ-เมธิล กลูคูโรไนไซแลน (arabino-4-*O*-methyl glucuronoxylan) ดังแสดงในรูปที่ 1.2 มีหมู่ 4-โอ-เมธิล กลูคูโรนิค แอซิด (4-*O*-methyl glucuronic acid) มากกว่าในไม้เนื้อแข็ง โดยหมู่นี้จะเชื่อมที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ของไซโลไพราโนส ส่วนคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 จะมี แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนส เรซิดิวซ์ (α-L-arabinofuranose residue) มาเชื่อมด้วยพันธะไกลโคซิดิคแบบ แอลฟา-1,3 (α-1,3 -glycosidic) และไม่มีการเติมหมู่อะเซทิลในสายหลัก (Sunna and Antranikian, 1997) นอกจากนี้ยังพบหมู่อะราบิโนซิล 12 เปอร์เซนต์ของหมู่ไซโลซิล (Wong et al., 1988) อัตราส่วนของบีตา-ไซโลไพราโนส ต่อ 4-โอ-เมธิล-แอลฟา-ดี-กลูคูโรนิค แอซิด และแอล-อะราบิโนฟิวราโนส คือ 100:20:13 และสายโพลีแซคคาไรด์ของไซแลนในไม้เนื้ออ่อนจะสั้นกว่าในไม้เนื้อแข็ง โดยมีความยาวเฉลี่ย 70-130 เรซิดิวซ์ และมีสายกิ่งน้อย (Sunna and Antranikian, 1997)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



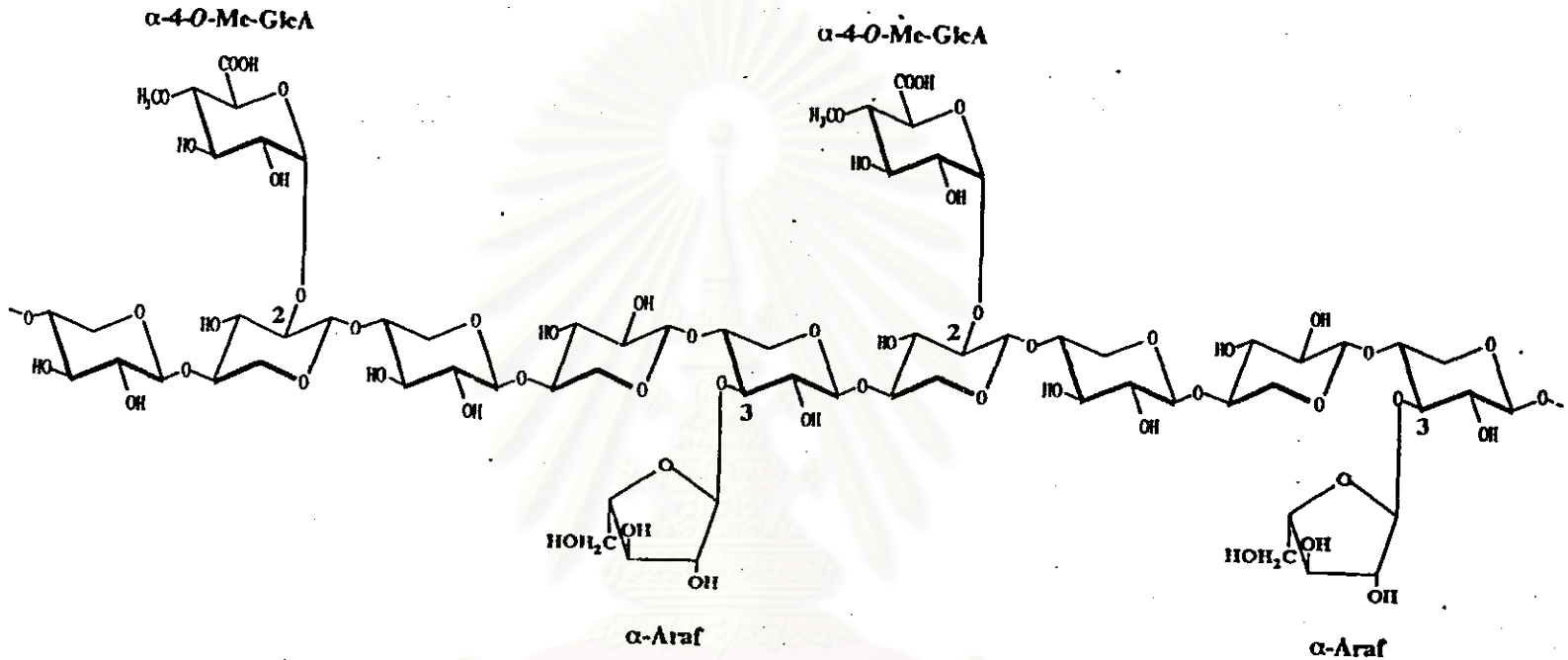
รูปที่ 1.1 โครงสร้างของไซแลนในไม้เนื้อแข็ง (Sunna and Antranikian, 1997)

ตัวเลข แสดงตำแหน่งที่หมู่แทนที่เข้ามาต่อ

Ac แทน หมู่อะเซทิล

α-4-*O*-Me-Glc แทน แอลฟา-4-โอ-เมธิล-กลูคูโรนิค แอซิด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1.2 โครงสร้างของไซแลนในไม้เนื้ออ่อน (Sunna and Antranikian, 1997)

ตัวเลข แสดงตำแหน่งที่หมู่แทนที่เข้ามาต่อ

α-Araf แทน แอลฟา-อะราบิโนฟิวราโนส

α-4-*O*-Me-GlcA แทน แอลฟา-4-โอ-เมธิลดี-กลูคูโรนิค แอซิด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2 การย่อยสลายไซแลน

การย่อยสลายไซแลนให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวสามารถทำได้โดยการย่อยสลายด้วยสารเคมี (chemical hydrolysis) ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (enzyme hydrolysis) หรือใช้ทั้ง 2 วิธีร่วมกัน (Tsao and Chiang, 1983)

1.2.1 การย่อยสลายไซแลนด้วยสารเคมี

สามารถทำได้ 2 วิธี คือ

1.2.1.1 การย่อยสลายไซแลนด้วยกรด

การย่อยสลายไซแลนด้วยกรดเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว แต่มีข้อเสียคือต้องใช้อุณหภูมิสูง ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นรุนแรงและไม่จำเพาะ ผลผลิตที่ได้ไม่บริสุทธิ์ เกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารพิษ เช่น เฟอฟูรัล ซึ่งมีผลต่อการนำไซโลสและน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวจากการย่อยสลายไซแลนไปเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อใช้ในกระบวนการหมัก (Paturan, 1989) และในขั้นตอนการย่อยสลายไซแลนด้วยกรดยังต้องใช้วัสดุอุปกรณ์ที่ทนต่อความเป็นกรดและอุณหภูมิสูงด้วย (Woodward, 1987; Parisi, 1989)

1.2.1.2 การย่อยสลายไซแลนด้วยด่าง

ในอุตสาหกรรมกระดาษมักใช้ด่างในการย่อยสลายไซแลน โดยนำชิ้นเปลือกไม้มาต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นเพื่อให้เปลือกไม้ยุ่ยและกำจัดลิกโนเซลลูโลสออกบางส่วน จากนั้นจึงนำไปฟอกสีเยื่อกระดาษด้วยสารเคมีที่มีคลอไรด์เป็นองค์ประกอบ เช่น คลอรีนไดออกไซด์ (chlorinedioxide) ก๊าซคลอรีน (Cl_2) เป็นต้น โดยใช้อุณหภูมิสูงไม่ต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียส และความเป็นกรดด่างไม่ต่ำกว่า 10 ซึ่งเมื่อผ่านกระบวนการเหล่านี้แล้วจะทำให้เกิดสารพิษพวกไดอ็อกซิน (dioxin) และสารประกอบคลอไรด์ที่เป็นพิษชนิดอื่นๆ (Visser et al., 1992)

1.2.2 การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์

การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์เป็นปฏิกิริยาที่ไม่รุนแรง มีความจำเพาะสูง ใช้ภาวะในการย่อยสลายที่เป็นกลาง ไม่ก่อให้เกิดสารพิษหรือสารเคมีตกค้าง ทำให้สามารถนำน้ำตาลที่เกิดขึ้นมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารอื่นๆ โดยกระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์

ต่อไป เช่น ผลิตเอธานอล (Biely, 1985) ผลิตสารให้เชื้อเพลิง (Dekker, 1983; Yu and Saddler, 1985) ผลิตตัวทำละลายและกรดอินทรีย์ (Singh et al., 1995) ผลิตสารให้ความหวานหรือสารแต่งรส (Coughlan and Hazlewood, 1993) เป็นต้น

1.3 เอนไซม์ย่อยสลายไซแลน

มีรายงานหลายฉบับที่กล่าวถึงการศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์ย่อยสลายไซแลน และพบว่าจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายไซแลนได้ ดังแสดงในตารางที่ 1.1

จากโครงสร้างที่ซับซ้อนของไซแลน พบว่าการย่อยสลายไซแลนให้สมบูรณ์จนได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวจะต้องใช้เอนไซม์หลายชนิดทำงานร่วมกัน ดังแสดงในรูปที่ 1.3 ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1.3.1 เอนไซม์ย่อยสายหลักของไซแลน

เอนไซม์ย่อยสายหลักของไซแลนที่สำคัญได้แก่ เอนโด-บีตา-1,4-ไซแลเนส (endo-β-1,4-xylanase) หรืออีกชื่อหนึ่งคือ บีตา-1,4-ดี-ไซแลน ไซแลโนไฮโดรเลส (β-1,4-D-xylan xylanohydrolase; EC 3.2.1.8) และบีตา-1,4-ไซโลสิเดส (β-1,4-xylosidase) หรืออีกชื่อหนึ่งคือ บีตา-1,4-ดี-ไซโลไซด์ ไซโลไฮโดรเลส (β-1,4-D-xyloside xylohydrolase; EC 3.2.1.37) และอาจเรียกได้ว่า เอกโซไซแลเนส (exoxylanase) หรือบีตา-1,4-ดี-ไซแลน ไซโลไฮโดรเลส (β-1,4-D-xylan xylohydrolase) (Coughlan and Hazlewood, 1993) โดย เอนโด-บีตา-1,4-ดี-ไซแลเนส จะย่อยแบบสุ่มที่พันธะไกลโคซิดิคภายในสายเฮเทอโรไซแลน ทำให้สายสั้นลงได้เป็นไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ (xylooligosaccharide) ไซโลไตรโอส (xylotriose) ไซโลไบโอส (xylobiose) และไซโลส (xylose) (Sunna and Antranikian, 1997) ส่วนบีตา-ดี-ไซโลสิเดส ซึ่งเป็นเอนไซม์ประเภท เอกโซไกลโคซิเดส (exoglycosidase) จะย่อยโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆ และไซโลไบโอสที่ปลายไม่รีดิวซ์ (non-reducing end) ทำให้ได้ไซโลส (Wong et al., 1988)

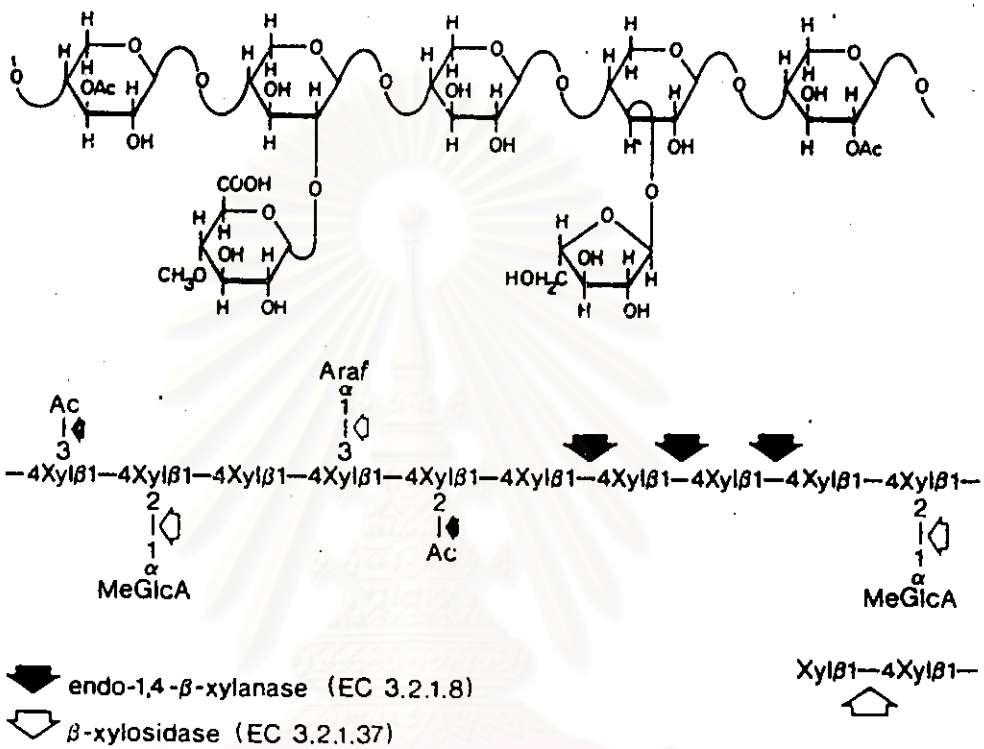
1.3.2 เอนไซม์ย่อยสายกิ่งของไซแลน

เอนไซม์ย่อยสายกิ่งของไซแลนได้แก่ แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส (α-L-arabinofuranosidase) แอลฟา-ดี-กลูคูโรนิเดส (α-D-glucuronidase) รวมทั้งเอนไซม์พวกเอสเทอเรส (esterase) ซึ่งจากการทำงานของเอนไซม์ชนิดหลังนี้จะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นหมู่อะเซทิล คูมาโรอิล (coumaloyl) และ เฟรูโรอิล (feruloyl) (Coughlan and Hazlewood, 1993) เอนไซม์ย่อยสายกิ่งเหล่านี้จะช่วยย่อยหมู่แทนที่ที่มาต่อกับสายหลักของไซแลน ซึ่งหมู่แทนที่เหล่านี้จะมีผลต่อการย่อยที่สายหลักของไซแลนโดยจะทำให้เกิดการขัดขวางการจับของเอนไซม์กับสายหลัก (enzyme-substrate complex formation) (Sunna and Antranikian, 1997) ดังรายงานของ Tenkanen และคณะ (1996) ที่กล่าวว่าหมู่ แอล-อะราบิโนซิลที่เชื่อมกับวงไซโลไพราโนซิลด้วยพันธะแบบแอลฟา-1,3- ป้องกันพันธะบีตา-1,4-ไกลโคซิดิค ไม่ให้ถูกย่อยโดยเอนไซม์บีตา-ไซโลสิเดส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1.1 ตัวอย่างจุลินทรีย์ต่างๆที่สามารถย่อยสลายไซแลนได้

จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus awamori K4	Kurakake และคณะ, 1997.
Aspergillus nidulans	Perez-Gonzalez และคณะ, 1998.
Aspergillus niger	Wong และคณะ, 1988.
Bacillus pumilus IPO	Xu และคณะ, 1991.
Bacillus stearothermophilus 21	Baba และคณะ, 1994.
Bacillus subtilis	Bachem และคณะ, 1997.
Bacteroides ovatus V975	Whitehead, 1995.
Butyrivibrio fibrisolvens	Utt และคณะ, 1991.
Cellulomonas flavigena	Perez-Avalos และคณะ, 1996.
Cellulomonas sp.	Bhalerao และคณะ, 1990.
Clostridium stercorarium	Sakka และคณะ, 1993.
Erwinia chrysanthemi	Vroemen และคณะ, 1995.
Fusarium oxysporum	Singh และคณะ, 1995.
Klebsiella pneumoniae	Yu และ Saddler, 1985.
Lactobacillus pentosus	Chaillou และคณะ, 1998.
Prevotella ruminicola	Avgustin และคณะ, 1992.
Rhodothermus marinus	Karlsson และคณะ, 1997.
Streptomyces halstedii JM8	Ruiz-Arribas และคณะ, 1995.
Streptomyces lividans	Kluepfel และคณะ, 1986.
Thermomonospora	Ristroph และ Humphreyt, 1985.
Trichoderma reesei	Poutanen และ Puls, 1988.



รูปที่ 1.3 การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายไซแลน (Biely, 1985)

Ac แทน หมู่อะเซทิล

Araf แทน แอล-อะราบิโนฟิวราโนส

MeGlcA แทน 4-โอ-เมธิล-ดี-กลูคูโรนิค แอซิด

Xyl แทน ดี-ไซโลส

เนื่องจากบีตา-ไซโลสิเดสเป็นหนึ่งในเอนไซม์ที่สำคัญที่ย่อยสายหลักของไซแลน โดยจะย่อยไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นไซโลส ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายด้านดังที่กล่าวมาแล้ว และยังช่วยลดการยับยั้งการทำงานของเอนโดไซแลเนสที่เกิดเนื่องจากผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่มากเกินพอ (Bachmann and McCarthy, 1991) ดังนั้นจึงมีผู้สนใจศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์นี้มากขึ้นทั้งในระดับชีวเคมีและชีวโมเลกุล

1.4 บีตา-ไซโลสิเดส

จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถสร้างบีตา-ไซโลสิเดสได้ ซึ่งโดยส่วนใหญ่จะสร้างและเก็บไว้ภายในเซลล์ (Biely, 1985; Bachmann and McCarthy, 1991) อย่างไรก็ตามมีจุลินทรีย์บางชนิดที่สร้างบีตา-ไซโลสิเดสแล้วปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ (Poutanen and Puls, 1988; Saraswat and Bisaria, 1997) ซึ่งมีรายงานมากมายที่ศึกษาเกี่ยวกับบีตา-ไซโลสิเดสจากจุลินทรีย์ต่างๆ เช่น *Trichoderma viride* (Matsuo and Yasui, 1984b) *Penicillium wortmanni* IFO7237 (Matsuo et al., 1987) *Clostridium stercorarium* (Wolfgang et al., 1990) *Aspergillus awamori* AANTG19 (Smith and Wood, 1991a) *Bacillus subtilis* (Lindner et al., 1994) *Streptomyces* sp. 43-4 (กรรณิการ์ ดวงมาลย์, 2538) และ *Streptomyces sp.* CH7 (สุมาลี อึ้งใจธรรม, 2539) เป็นต้น

1.4.1 การผลิตบีตา-ไซโลสิเดส

การผลิตบีตา-ไซโลสิเดสโดยจุลินทรีย์ต่างๆขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ดังนี้คือ

1.4.1.1 แหล่งคาร์บอน

จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ต้องใช้แหล่งคาร์บอนในการชักนำให้เกิดการสร้างบีตา-ไซโลสิเดส ดังมีผู้รายงาน เช่น Linder และคณะ (1994) พบว่า *Bacillus subtilis* สามารถใช้ไซโลสชักนำการสร้างเอนไซม์บีตา-ไซโลสิเดสได้ดีกว่าไซแลนถึง 60 เปอร์เซ็นต์ และใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงสั้นกว่า Rapp และ Wagner (1986) พบว่า *Cellulomonas uda* สามารถสร้างบีตา-ไซโลสิเดสภายในเซลล์ได้เมื่อเพาะเลี้ยงในแหล่งคาร์บอนที่เป็น กลูโคส แกแลคโตส แมนโนส ไซโลส เซลโลไบโอส มอลโตส หรือแป้ง และจะสร้างเอนไซม์ได้ในปริมาณมากกว่าเดิม 6-7 เท่า เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน Utt และคณะ (1991) รายงานว่าการชักนำบีตา-ไซโลสิเดสให้ย่อยไซโล-โอลิโกแซคคาไรด์เพื่อให้ได้

ผลิตภัณฑ์เป็นไซโลสขึ้นกับประสิทธิภาพการทำงานของไซแลเนสที่ย่อยสลายไซแลน ดังนั้น เมื่อเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ทำงานร่วมกันจึงถูกชักนำได้ด้วยไซแลน อย่างไรก็ตามได้มีงานวิจัยที่กล่าวถึงการกดการสร้างบีตา-ไซโลสิเดสโดยน้ำตาลต่างๆ ที่นำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเช่นกัน ดังรายงานของ Perez-Avalos และคณะ (1996) ที่พบว่า *Cellulomonas flavigena* CDBB-531 จะสร้างบีตา-ไซโลสิเดสได้น้อยลงเมื่อถูกเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนคือ กลูโคส เซลโลไบโอส อะราบิโนส หรือไซโลส ดังนั้นจากตัวอย่างรายงานที่กล่าวมานี้จึงแสดงให้เห็นว่าแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดมีผลในการชักนำหรือการกดการสร้างบีตา-ไซโลสิเดสในจุลินทรีย์ต่างๆ แตกต่างกัน

1.4.1.2 แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการสร้างบีตา-ไซโลสิเดสในจุลินทรีย์ต่างๆ ดังรายงาน เช่น Smith และ Wood (1991b) พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยง *Aspergillus awamori* CMI142712 โดยใช้คอร์นสตีพ ลิเคอร์ (cornsteep liquor) ทดแทนการใช้สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ร่วมกับไพรตีโอสเพปโตน (proteose peptone) จุลินทรีย์จะผลิตบีตา-ไซโลสิเดสได้สูงสุดจาก 0.004 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนเป็น 0.03 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน Ratto และคณะ (1992) เปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนที่นำมาทดแทนการใช้เพปโตนร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ในการเลี้ยง *Bacillus circulans* VTT-E-87305 พบว่าการใช้คอร์นสตีพ ลิเคอร์ สามารถเพิ่มปริมาณการสร้างบีตา-ไซโลสิเดสได้ แต่การใช้ distiller's spent grain จะทำให้การสร้างบีตา-ไซโลสิเดสลดลง

1.4.1.3 ภาวะในการเลี้ยงเชื้อ

ภาวะในการเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการสร้างบีตา-ไซโลสิเดส ได้แก่ ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ และระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ ตัวอย่างเช่น *Aspergillus awamori* AANTG19 และ *Thermoascus aurantiacus* เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเป็นกรดด่าง 4.0 (Smith and Wood, 1991a; Gomes et al., 1994) แต่ *Streptomyces* T7 เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเป็นกรดด่าง 7.0 (Ross et al., 1992) *Aspergillus niger* เจริญและผลิตบีตา-ไซโลสิเดสได้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (John et al., 1979) แต่ *Thermomonospora fusca* เจริญและผลิตบีตา-ไซโลสิเดสได้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (Bachmann and McCarthy, 1991) จุลินทรีย์พวกแบคทีเรียจะใช้เวลาในการเจริญและสร้างบีตา-ไซโลสิเดสได้สูงสุดที่ระยะเวลาประมาณ 2-3 วัน เช่น *Streptomyces* sp. 43-4 เจริญและสร้างบีตา-ไซโลสิเดสได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงจุลินทรีย์ 3 วัน (กรรณิการ์

ดวงมาลย์, 2538) แต่จุลินทรีย์จำพวกราต้องใช้เวลาในการเจริญและสร้างบีตา-ไซโลสิเดสสูงสุดประมาณ 4-10 วัน เช่น *Aspergillus terreus* สามารถสร้างบีตา-ไซโลสิเดสได้สูงสุดในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง หรือ *Aspergillus niger* ผลิตบีตา-ไซโลสิเดสได้สูงสุดเมื่อเลี้ยง 4 วัน (John et al., 1979; Ghosh and Kunda, 1980; Copa-Patino et al., 1993 and Gomes et al., 1994)

1.4.1.4 ชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์

บีตา-ไซโลสิเดสจากจุลินทรีย์ต่างชนิดและสายพันธุ์จะมีลักษณะที่แตกต่างกัน ดังรายงานของ Sunna และ Antranikian (1997) ที่กล่าวว่าในแบคทีเรียและราผลิตบีตา-ไซโลสิเดสที่มีขนาดใหญ่ และมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วงระหว่าง 60-360 กิโลดาลตัน ตัวอย่างบีตา-ไซโลสิเดสที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ต่างๆ แสดงดังตารางที่ 1.2

นอกจากบีตา-ไซโลสิเดสที่สร้างในจุลินทรีย์ต่างกันจะมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันแล้ว พบว่าจุลินทรีย์ต่างๆยังมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์นี้แตกต่างกันดังตารางที่ 1.3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1.2 น้ำหนักโมเลกุลของบีตา-ไซโลสิเดสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

แหล่งของเอนไซม์	น้ำหนักโมเลกุล (ดาลตัน)	จำนวนหน่วยย่อยและน้ำหนักโมเลกุล (ดาลตัน)	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus awamori	110,000	-	Kormelink และคณะ, 1993.
Aspergillus fumigatus	360,000	4 หน่วยย่อย 90,000 เท่ากัน	Kitpreechavanich และคณะ, 1986.
Aspergillus niger	78,000	-	John และคณะ, 1979.
Aspergillus niger	>200,000	-	Claeyssens และคณะ, 1970.
Aspergillus niger	253,000	2 หน่วยย่อย 122,000 เท่ากัน	Rodionova และคณะ, 1983.
Bacillus pumilus	130,000	2 หน่วยย่อย 70,000 เท่ากัน	Kersters-Hilderson และคณะ, 1969.
Bacillus Stearothermophilus	150,000	2 หน่วยย่อย 75,000 เท่ากัน	Nanmori และคณะ, 1990.
Chaetomium trilaterate	240,000	2 หน่วยย่อย 118,000 เท่ากัน	Uziie และคณะ, 1985.
Clostridium acetobutyricum ATCC 824	224,000	3 หน่วยย่อย คือ 85,000 1 หน่วยย่อย และ 63,000 2 หน่วยย่อย	Lee และ Forsberg, 1987.
Clostridium stercorarium	220,000	4 หน่วยย่อย 57,000 เท่ากัน	Sakka และคณะ, 1993.
Emericella nidulans	240,000	2 หน่วยย่อย	Matsuo และ Yasui, 1984a.
Patnopectin sp.	78,000	-	Takagaki และคณะ, 1990.
Penicillium wortmanii	100,000	-	Deleyn และคณะ, 1978.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1.2 (ต่อ)

สายพันธุ์จุลินทรีย์	น้ำหนักโมเลกุล (ดาลตัน)	จำนวนหน่วยย่อยและน้ำหนักโมเลกุล(ดาลตัน)	เอกสารอ้างอิง
Thermomonospora fusca 15	168,000	3 หน่วยย่อย 56,000 เท่ากัน	Bachmann และ McCarthy, 1989.
Trichoderma reesei	100,000	-	Poutanen และ Puls, 1988.
Trichoderma viride	101,000	-	Matsuo และ Yasui, 1984b.
Thermoanaerobacter ethanolicus	165,000	2 หน่วยย่อย 85,000 เท่ากัน	Shao และ Wiegel, 1992.

- หมายถึงไม่มีรายงานไว้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1.3 เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของบีตา-ไซโลซิเดสจากจุลินทรีย์ต่างๆ

สายพันธุ์จุลินทรีย์	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	เอกสารอ้างอิง
Streptomyces sp. 43-4	1.53	กรรณิการ์ ดวงมาลย์, 2538.
Streptomyces sp. CH7	0.90	สุมาลี อึ้งใจธรรม, 2539.
Aspergillus awamori	0.03	Smith และ Wood, 1991b.
Aspergillus awamori	2.88	Tenkanen และคณะ, 1993.
Aspergillus foetidus	4.40	Biely และ Poutanen, 1989.
Aspergillus fumigatus	0.30	Biely และ Poutanen, 1989.
Aspergillus fumigatus	0.50	Viikari และคณะ, 1991.
Aspergillus fumigatus	0.18	Kitpreechavanich และคณะ, 1986.
Aspergillus niger	0.10	John และคณะ, 1979.
Aspergillus niger 15	0.18	Rodionova และคณะ, 1983.
Aspergillus oryzae	2.63	Biely และ Poutanen, 1989.
Aspergillus oryzae	3.50	Viikari และคณะ, 1991.
Aspergillus terreus	0.43	Biely และ Poutanen, 1989.
Aureobasidium pullulans	0.30	Tenkanen และคณะ, 1993.
Aureobasidium pullulans	0.90	Dobberstein และ Emeis, 1991.
Bacillus circulans	2.74	Ratto และคณะ, 1992.

ตารางที่ 1.3 (ต่อ)

สายพันธุ์จุลินทรีย์	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	เอกสารอ้างอิง
Clostridium acetobutyricum ATCC 824	0.11	Lee และ Forsberg, 1987.
Cryptococcus albidus	0.02	Biely, Vrsanska และ Kratky, 1980.
Emericella nidulans	0.10	Matsuo และ Yasui, 1984a.
Fibrobacter succinogenes	0.06	Smith และ Forsberg, 1991.
Neurospora crassa	0.01	Desphande และคณะ, 1985.
Penicillium wortmanni IFO 7237	4.80	Matsuo และคณะ, 1987.
Shizophyllum commune	0.06	Tenkanen และคณะ, 1993.
Streptomyces lividans 1326	0.37	Kluepfel และคณะ, 1986.
Streptomyces olivochromogenes	0.06	Tenkanen และคณะ, 1993.
Thermomonospora fusca	0.56	Bachmann และ McCarthy, 1989.
Thermomyces langinosus	0.01	Gomes และคณะ, 1993.
Trichoderma reesei	0.66	Poutanen และ Puls, 1988.
Trichoderma reesei	0.64	Tenkanen และคณะ, 1993
Trichoderma viride	0.44	Matsuo และ Yasui, 1984b

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.4.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดส

ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดส มีดังนี้ คือ

1.4.2.1 อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีผลต่อการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดส โดยพบว่าบีตา-ไซโลสิเดสจากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ทำงานได้ดีในช่วง 45-55 องศาเซลเซียส เช่น บีตา-ไซโลสิเดส จาก *Streptomyces* sp. CH-M-1035 ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (Flores et al., 1997) แต่มีจุลินทรีย์บางชนิดที่สามารถผลิตบีตา-ไซโลสิเดสที่ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูง เช่น *Aspergillus awamori* K4 สร้างบีตา-ไซโลสิเดสที่ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส (Kurakake et al., 1997) นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับความเสถียรของเอนไซม์นี้ต่ออุณหภูมิ เช่น เอนไซม์บีตา-ไซโลสิเดสจาก *Bacillus stearothermophilus* จะสูญเสียแอคติวิตีเมื่อบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (Nanmori et al., 1990) เอนไซม์บีตา-ไซโลสิเดสจาก *Trichoderma reesei* RUT C-30 เสถียรต่ออุณหภูมิปานกลางคือยังคงมีแอคติวิตีเหลืออยู่ 70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที (Herrmann et al., 1997) *Streptomyces* sp. CH-7 สร้างบีตา-ไซโลสิเดสได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และเอนไซม์นี้เสถียรต่ออุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มเป็นเวลา 30 นาที (สุมาลี อึ้งใจธรรม, 2539)

1.4.2.2 ความเป็นกรด-ด่าง

ความเป็นกรดด่างมีผลต่อการทำงานและความเสถียรของบีตา-ไซโลสิเดสเช่นกัน ดังรายงานของ Shao และ Wiegel (1992) กล่าวว่า ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Thermoanaerobacter ethanolicus* อยู่ในช่วง 5.0-5.2 Dahlberg และคณะ (1993) พบว่า บีตา-ไซโลสิเดสจาก *Rhodothermus marinus* ทำงานได้ดีที่ความเป็นกรดด่าง 7.1 โดยมีจุลินทรีย์บางชนิดสร้างบีตา-ไซโลสิเดสที่ทำงานได้ดีที่ความเป็นกรดด่างอยู่ในช่วงกว้าง เช่น *Thermomonospora fusca* สร้างบีตา-ไซโลสิเดสทำงานได้ดีที่ความเป็นกรดด่าง 5.0-9.0 (Bachmann and McCarthy, 1989) ส่วนความเสถียรของบีตา-ไซโลสิเดสต่ออุณหภูมินั้น Shao และ Wiegel (1992) รายงานว่าบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Thermoanaerobacter ethanolicus* เสถียรต่อความเป็นกรดด่างในช่วง 3.0-4.0 Poutanen และ Puls (1988) พบว่า *Trichoderma reesei* สร้างบีตา-ไซโลสิเดสที่เสถียรต่อความเป็นกรดด่างช่วง 3.0-6.0 สุมาลี อึ้งใจธรรม (2539) รายงานว่า *Streptomyces* sp. CH7 สร้างบีตา-ไซโลสิเดสได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่างในช่วงกว้างคือ 4.0-9.5

1.4.3 การศึกษาระดับชีวโมเลกุลของเอนไซม์บีตา-ไซโลสิเดส

Panbangred และคณะ (1983) โคลนยีนที่เป็นรหัสสำหรับเอนไซม์ย่อยสลายไซแลนจาก *Bacillus pumilus* โดยใช้พลาสมิดพาหะ pBR322 และ *Escherichia coli* C600 เป็นเซลล์เจ้าบ้าน พบ 1 โคลนจาก 439 ทรานสฟอร์แมนท์ ที่มีแอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดส และไซแลเนส เรียกรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้จากโคลนว่า pOXN29 ซึ่งเมื่อตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bgl*II พบว่าได้ดีเอ็นเอ 2 ชิ้น ชิ้นที่หนึ่งมีขนาด 10.15 กิโลเบส ซึ่งประกอบด้วยชิ้นพลาสมิดพาหะ pBR322 และชิ้นดีเอ็นเอที่มียีนบีตา-ไซโลสิเดส ส่วนชิ้นที่สองมีขนาด 5.6 กิโลเบส ที่มียีนไซแลนส

Sakka และคณะ (1990) โคลนยีนที่เป็นรหัสสำหรับเอนไซม์ย่อยสลายไซแลนจาก *Clostridium stercorarium* สายพันธุ์ F-9 เข้าสู่ *Escherichia coli* JM109 โดยใช้พลาสมิดพาหะ pBR322 พบว่าจาก 2,500 ทรานสฟอร์แมนท์ มี 9 โคลน ที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลเนส 6 โคลน มีแอคติวิตีของเอนไซม์ไซโลสิเดส และ 1 โคลนมีแอคติวิตีของไซแลเนสและไซโลสิเดส จากการโคลนย่อยพบว่ายีนไซแลเนสมีขนาดประมาณ 2 กิโลเบส และชิ้นดีเอ็นเอที่มียีนบีตา-ไซโลสิเดสจากโคลนต่างๆ มีขนาดประมาณ 3-4 กิโลเบส จากการทดสอบผลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ พบว่าโคลนที่ได้ทั้งหมดแสดงแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ดีที่อุณหภูมิสูง โดยเอนไซม์ไซโลสิเดสทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ส่วนเอนไซม์ไซแลเนสทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส

Whitehead และ Hespell (1990) ได้โคลนยีนไซแลนส ไซโลสิเดส และอะราบิโนสิเดส จาก *Bacteroides ovatus* โดยใช้ pUC18 เป็นพลาสมิดพาหะ และใช้ *Escherichia coli* JM83 เป็นเซลล์เจ้าบ้าน พบว่าทั้ง 3 ยีน อยู่บนชิ้นดีเอ็นเอขนาด 3.8 กิโลเบส และจากการโคลนย่อยพบว่ายีนไซแลเนสมีขนาดประมาณ 2 กิโลเบส และแสดงออกอย่างเป็นอิสระจากยีนบีตา-ไซโลสิเดสและอะราบิโนสิเดส ซึ่งมีขนาดประมาณ 1.7 กิโลเบสและมีการแสดงออกร่วมกัน

Utt และคณะ (1991) ศึกษาชิ้นดีเอ็นเอขนาด 4.2 กิโลเบส ที่โคลนได้จากโครโมโซมของ *Butyrivibrio fibrisolvens* โดยใช้ *Escherichia coli* DH5α เป็นเซลล์เจ้าบ้านและ pUC18 เป็นพลาสมิดพาหะ พบยีน *xylB* ขนาด 1.551 กิโลเบส ซึ่งเป็นรหัสสำหรับโปรตีน

ที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ 2 ชนิด คือ แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส และบีตา-ไซโลสิเดส น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ได้นี้เท่ากับ 60 กิโลดาลตัน และแอคติวิตีจำเพาะของอะราบิโนสิเดสมากกว่าไซโลสิเดสประมาณ 1.6 เท่า

Flint และคณะ (1991) ศึกษาการแสดงออกของยีน *xynA* และ *xynB* ที่ได้จาก *Ruminococcus flavifaciens* 17 โดยโคลนย่อยยีนทั้ง 2 นี้เข้าพลาสมิดพาหะ pUC13 และใช้ *Escherichia coli* HB101 เป็นเซลล์เจ้าบ้าน พบว่าโคลนที่มียีน *xynA* มีแอคติวิตีของไซแลนเนส และมีแอคติวิตีของเซลโลไบโอสิเดส (cellobiosidase) และไซโลสิเดสเล็กน้อย ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายไซแลนโดยเอนไซม์นี้ ส่วนใหญ่เป็นไซโลไบโอส และไซโลส และไม่ย่อยสลายไซโลไบโอส ส่วนโคลนที่มียีน *xynB* มีแอคติวิตีของไซแลนเนสเพียงอย่างเดียว และไซแลนเนสที่สร้างจากยีน *xynB* นี้ จะย่อยสลายไซแลนได้ผลิตภัณฑ์เป็นไซโลไบโอส และไซโล-โอลิโกแซคคาไรด์ถึงส่วนใหญ่ และค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ได้จากทั้ง 2 ยีนนี้ เท่ากับ 5.5

Lee และ Zeikus (1993) โคลนยีนบีตา-ไซโลสิเดส (*xynB*) จาก *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* โดยทำการโคลนย่อยจากคอสมิดโคลน (pXDM1) ได้พลาสมิด pXPH3 ที่มียีน *xynB* ขนาด 1.5 กิโลเบส ซึ่งเป็นรหัสสำหรับโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 55 กิโลดาลตัน จากการศึกษาสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ที่เป็นผลิตภัณฑ์ของยีนนี้ พบว่าเป็นโมโนเมอร์ มีแอคติวิตีจำเพาะของบีตา-ไซโลสิเดส 5.53 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ค่าความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานคือ 5.5 และ 70 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และเสถียรต่อความร้อนถึง 65 องศาเซลเซียส

Baba และคณะ (1994) โคลนยีนที่เป็นรหัสสำหรับบีตา-ไซโลสิเดส (*xylA*) และไซแลนเนส (*xynA*) จาก *Bacillus stearothermophilus* 21 เข้าสู่ *Escherichia coli* JM109 โดยใช้พลาสมิดพาหะ pUC19 ได้โคลน 13E และ 2F ที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่โคลนได้ขนาด 4.2 และ 10.6 กิโลเบส ตามลำดับ เมื่อศึกษาแผนที่ยีน พบว่าชิ้นส่วนยีนที่โคลนได้จากโคลน 13E และ 2F มีแผนที่ยีนบางส่วนคล้ายกันและยีนมีทิศทางการถอดรหัสเช่นเดียวกับโพรโมเตอร์ของ *lacZ* ซึ่งจากแผนที่ยีนและลำดับเบส พบว่ายีนทั้ง 2 ชนิด ใช้โพรโมเตอร์ของตัวเอง และยีน *xylA* มีขนาด 2.1 กิโลเบส ส่วนยีน *xynA* มีขนาด 1.0 กิโลเบส

Whitehead (1995) ศึกษายีนไซแลนเนส (*xylI*) และยีนไซโลสิเดส (*xsa*) จาก *Bacteroides ovatus* V975 พบว่า ทั้ง 2 ยีน อยู่บนโอเปอรอนที่ถูกชักนำการถอดรหัสด้วยไซแลน โดย *xylI* มีขนาด 1.127 กิโลเบส และเป็นรหัสสำหรับไซแลเนสที่มีน้ำหนักโมเลกุล 42.979 กิโลดาลตัน และ *xsa* มีขนาด 0.974 กิโลเบส เป็นรหัสของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 37.245 กิโลดาลตัน ซึ่งยีน*xsa* นี้แสดงแอคติวิตีของทั้งไซโลสิเดสและอะราบิโนสิเดสร่วมกัน

Vroemen และคณะ (1995) โคลนและศึกษาสมบัติของยีนบีตา-กลูโคสิเดส และบีตา-ไซโลสิเดส จาก *Erwinia chrysanthemi* D1 ด้วยพลาสมิด pUC118 โดยใช้ *E. coli* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน พบ 5 โคลนจาก 4,000 ทรานสฟอร์แมนท์ ที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์บีตา-กลูโคสิเดส และบีตา-ไซโลสิเดส จากการศึกษาแผนที่ยีนพบว่าทั้ง 5 โคลนมีช่วงลำดับดีเอ็นเอในรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเหมือนกันจึงให้ชื่อยีนนี้ว่า *bgxA* ซึ่งมีขนาด 1.960 กิโลเบส โดยเป็นรหัสของโปรตีนขนาด 68.884 กิโลดาลตัน พบว่าโปรตีนนี้ให้แอคติวิตีทั้งบีตา-กลูโคสิเดสและบีตา-ไซโลสิเดสร่วมกัน และยังพบว่าทั้งโคลนที่ได้และ *Erwinia chrysanthemi* D1 สร้างเอนไซม์บีตา-กลูโคสิเดสและบีตา-ไซโลสิเดสสะสมไว้ที่ชั้น periplasmic space ของเซลล์

Fukumura และคณะ (1995) ศึกษายีน *xynB* จาก *Clostridium stercorarium* F-9 โดยโคลนย่อยดีเอ็นขนาด 2.4 กิโลเบส จากพลาสมิด pMF6 ที่มียีน *xynB* เข้าพลาสมิดพาหะ pBluescriptII KS$^+$ และ KS$^-$ ได้พลาสมิดลูกผสม pMF6-1 และ pMF6-2 ตามลำดับ โดยใช้ *Escherichia coli* XL1-Blue เป็นเซลล์เจ้าบ้าน พบว่า *xynB* ประกอบด้วยกรอบการอ่านรหัส 1 กรอบ (1 open reading frame) ที่มีขนาด 1.161 กิโลเบส เป็นรหัสสำหรับไซแลเนสที่มีน้ำหนักโมเลกุล 44.377 กิโลดาลตัน และมีแอคติวิตีของ ไซแลนส เซลลูเลส บีตา-ไซโลสิเดส และเซลโลไบเอส

Suh และคณะ (1996) โคลนยีน *xylB* ที่เป็นรหัสสำหรับเอนไซม์บีตา-ไซโลสิเดสจาก *Bacillus stearothermophilus* โดยใช้พลาสมิดพาหะ pBR322 และเซลล์เจ้าบ้าน *Escherichia coli* HB101 พบ 6 โคลนจาก 10,000 ทรานสฟอร์แมนท์ ที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์อะราบิโนฟิวราโนสิเดส โดย 1 โคลนมีชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกขนาด 5 กิโลเบส ซึ่งมียีนคล้ายคลึงกันกับยีน *arfI* ที่เป็นรหัสของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส (Eom et al.,

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1995) ส่วนอีก 5 โคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 3.5 กิโลเบส พบว่ามียีนที่ให้โปรตีนซึ่งแสดงแอคติวิตีของทั้งแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสและบีตา-ไซโลสิเดส

Lorenz และ Wiegel (1997) โคลนยีนจาก *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ JW/SL YS485 เข้าสู่ pUC18 โดยใช้ *Escherichia coli* TG-1 เป็นเซลล์เจ้าบ้าน ได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pXylo1 ที่มีชิ้นยีนบีตา-ไซโลสิเดส (*xylB*) และยีนสำหรับ อะเซทิล ไซเลน เอสเทอเรส (*axe*1) โดยยีน *axe*1 อยู่ทางด้าน 3' ของ *xylB* ขนาดของ *xylB* และ *axe*1 เท่ากับ 1.5 กิโลเบส และ 0.963 กิโลเบส ตามลำดับ เอนไซม์บีตา-ไซโลสิเดส ที่ได้จากยีน *xylB* มีน้ำหนักโมเลกุล 57 กิโลดาลตัน ซึ่งไม่เหมือนกับบีตา-ไซโลสิเดส 1 (86 กิโลดาลตัน) และบีตา-ไซโลสิเดส 2 (78 กิโลดาลตัน) ซึ่งเคยพบในแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกันที่ศึกษามาก่อนหน้านี้ (ไม่แสดงข้อมูล) ดังนั้น *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ JW/SL YS485 จึงมีบีตา-ไซโลสิเดสอย่างน้อย 3 ชนิด

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะโคลนและศึกษาการแสดงออกของยีนบีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากแหล่งดินในประเทศไทยโดย สุมาลี อึ้งใจธรรม (2539) และพบว่าสามารถผลิตบีตา-ไซโลสิเดสที่มีสมบัติทนต่อค่าความเป็นกรดด่างในช่วงกว้าง และทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูงปานกลาง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย