หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

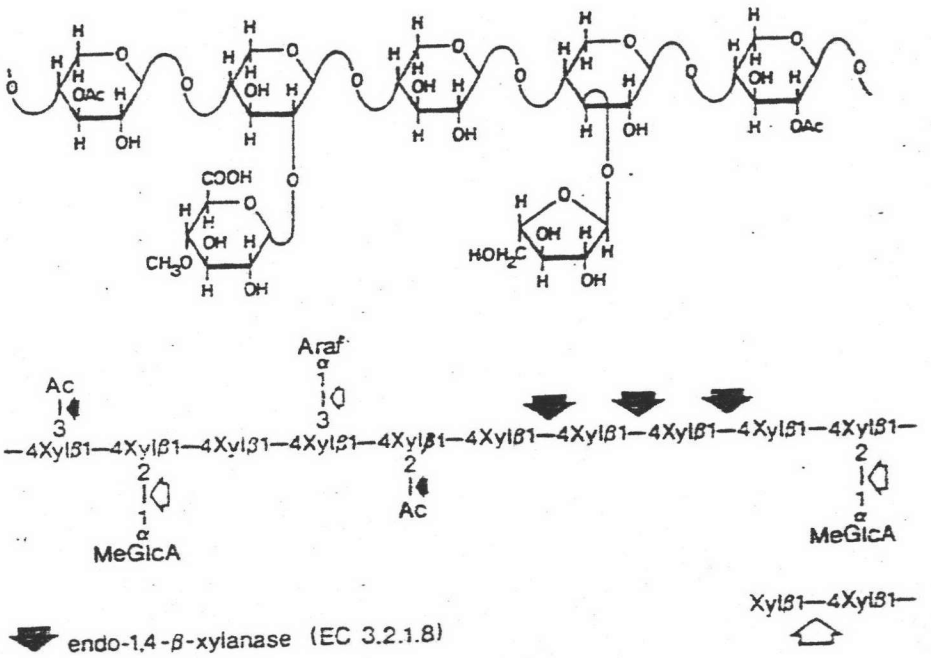
บทนำ

ไซแลนเป็นโพลิแซคคาไรด์ที่พบในผนังเซลล์พืช โดยเป็นองค์ประกอบหลักของเอมิเซลลูโลส ไซแลนจะมีองค์ประกอบโดยส่วนใหญ่ คือ น้ำตาล ดี-ไซโลส (D-xylose) ซึ่งเป็นน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 ตัว (1) (ดังรูปที่ 1)

ในกระบวนการผลิตกระดาษจากเยื่อไม้ซึ่งจะเกิดไซแลนเป็นผลิตภัณฑ์ร่วมด้วยนั้น เมื่อปลดปล่อยของเสียจากโรงงานกระดาษลงสู่แม่น้ำ จะทำให้มีการสะสมไซแลนในแม่น้ำลำธาร ทำให้เกิดปัญหามลภาวะ ดังนั้นจึงน่าจะมีการเปลี่ยนไซแลนในของเสียให้เกิดเป็นสารที่มีประโยชน์ขึ้นมา ในการย่อยสลายไซแลนทำได้โดยการย่อยสลายด้วยกรด(acid hydrolysis) และการย่อยสลายด้วยเอนไซม์จากจุลินทรีย์(enzyme hydrolysis)(2) ซึ่งการย่อยสลายด้วยกรดจะเป็นปฏิกิริยาที่รุนแรงและรวดเร็ว แต่จะเกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ เช่นเฟอฟิวรัล (furfural)(3) ส่วนการย่อยด้วยเอนไซม์ปฏิกิริยามีความจำเพาะและไม่มีสารพิษเกิดขึ้น ได้น้ำตาลไซโลสในปริมาณที่สูงกว่าการย่อยด้วยกรด เอนไซม์ที่ใช้คือไซแลเนส ซึ่งแบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ เอนโด-1,4-บีต้า-ดี-ไซแลเนส หรือ 1,4-β-D-xylan xylanohydrolase ; EC 3.2.1.8 เอกโซไซแลเนส และ บีต้า-ดี-ไซโลซิเดส หรือ 1,4-β-D-xyloside xylohydrolase ; EC 3.2.1.37 (4) ถึงแม้ว่าในอดีตจะมีการศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์ไซแลเนสกันบ้าง แต่ยังน้อยกว่าการศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์เซลลูเลส แต่ในปัจจุบันมีการศึกษาถึงบทบาทของเอนโดไซแลเนสต่อการย่อยสลายไซแลนกันมากขึ้น (5)

เอนไซม์ไซแลเนสพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด(6) เช่น รา แบคทีเรีย โปรโตซัว แมลงบางชนิด หอยทาก ครัสเตเชียน และพืช เช่น สาหร่ายทะเล เป็นต้น

ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่พบว่ามีความสามารถผลิตไซแลเนสได้เช่น Aspergillus niger (7), A. fumigatus (8), Bacillus subtilis (9), Clostridium acetobutylicum (10), Humicola lanuginosa (11), Streptomyces xylophagus (12), Streptomyces flavogriceus (13),Streptomyces lividans (14),Streptomyces sp. KT-23 (15) และ Trichoderma reesei(16) เป็นต้น



รูปที่ 1 ลักษณะโมเลกุลของไซแลนและตำแหน่งที่ไซแลโนไลติคเอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยา ด้านบนของรูปจะประกอบด้วยน้ำตาล ดี-ไซโลส 5 โมเลกุลต่อกันเป็นสายยาว

Ac แทน หมู่อะซิติล

Araf แทน น้ำตาล แอล-อะราบิโนฟิวราโนส

MeGle A แทน 4-O-เมธิล-ดี-กลูคูโรนิก แอซิด

Xyl แทน น้ำตาล ดี-ไซโลส

การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

ได้มีผู้ศึกษาเกี่ยวกับ การทำเอนไซม์ไซแลเนสให้บริสุทธิ์จากจุลินทรีย์บางชนิด พร้อมกับศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์ด้วย ดังรายละเอียดในตารางที่ 1

เอนไซม์ไซแลเนสจากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆเป็นเอนไซม์ที่ปล่อยออกมานอกเซล (extra-cellular enzyme) จึงเป็นการง่ายที่จะแยกเอนไซม์นั้นออกจากเซลโดยนำไปปั่นแยกที่ความเร็วที่เหมาะสม หรืออาจจะใช้วิธีการกรองผ่านเมมเบรนที่มีขนาดเหมาะกับเซลของจุลินทรีย์แต่ละชนิด

การทำเอนไซม์ไซแลเนสให้บริสุทธิ์นั้นมีขั้นตอนดังนี้คือ ขั้นแรกนำมาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต จากนั้นนำเอนไซม์มาทำให้บริสุทธิ์ต่อไป โดยนำไปผ่านคอลัมน์-โครมาโตกราฟีโดยอาศัยความแตกต่างของประจุในโมเลกุลของเอนไซม์(Ion exchange chromatography) ตัวอย่างเรซินโดยทั่วไปที่ใช้ในการทดลองเช่น ดีอีเออี-เซลลูโลส (DEAE-Cellulose) ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ (DEAE-Sephadex) เป็นต้น และความแตกต่างของขนาดโมเลกุล (gel filtration หรือ molecular sieve) ตัวอย่างเรซินเช่น เซฟาเด็กซ์ จี-100 (Sephadex G-100) หรือ เซฟาเด็กซ์ จี-150 (Sephadex G-150) เป็นต้น (17) ตัวอย่างการทำไซแลเนสจากจุลินทรีย์ต่างๆให้บริสุทธิ์ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1

Nakajima และคณะ (15) ได้ศึกษาการทำเอนไซม์ไซแลเนสให้บริสุทธิ์จาก Streptomyces sp. KT-23 ซึ่งแยกได้จากฟางข้าวที่เน่าเปื่อยแล้ว (rotten rice straw)โดยการทำโครมาโตกราฟีบนดีอีเอดี-เซลลูโลส จากนั้นนำไปผ่านคอลัมน์ไบโอเจลพี-100 (Biogel P-100) ผลปรากฏว่าสามารถทำเอนไซม์ได้บริสุทธิ์ขึ้นถึง 10 เท่าและได้ผลิตผล (yeild) เอนไซม์เป็น 20.5 เปอร์เซนต์

ตารางที่ 1 การศึกษาไซแลเนสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ให้บริสุทธิ์

แหล่งจุลินทรีย์	ขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์	เอกสารอ้างอิง
Streptomyces lividans	ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต โครมาโตกราฟีบน Accell QMA (แอนไอออน-เอกซ์เชนโครมาโตกราฟี) โครมาโตกราฟีของเหลวความดันสูง (High performance liquid chromatography)	18
Streptomyces sp. KT-23	ไดอะไลส์ผ่าน 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 โครมาโตกราฟีบนดีอีเออี-เซลลูโลส โครมาโตกราฟีบนไบโอเจล พี-10	15
Clostridium acetobutylicum ATCC 824	ทำให้เข้มข้นโดยอุลตราฟิลเตรชัน โครมาโตกราฟีบนซีเอ็ม-เซฟาโรส โครมาโตกราฟีบนไบโอเจล พี-150	19
Bacillus spp.	ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต โครมาโตกราฟีบนดีอีเออี-โตโยเพิร์ล 650 เอ็ม โครมาโตกราฟีบนโตโยเพิร์ลเอชดับบลิว 55 เอ (Toyopearl HW 55 S)	20

ตารางที่ 1 (ต่อ) การศึกษาไซแลเนสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ให้บริสุทธิ์

แหล่งจุลินทรีย์	ขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์	เอกสารอ้างอิง
Trichoderma harzianum	ทำปฏิกิริยากับโปตัสเซียมโอดรอกไซด์	21
	โครมาโตกราฟีบนฟีนิล-เซฟาโรส (Phenyl-Sepharose)	
	โครมาโตโฟกัสซิง	
	ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต	
Chaetomium thermophile var. coprophile	ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต	4
	โครมาโตกราฟีบนเซฟาเด็กซ์ จี-25	
	โครมาโตกราฟีบนดีอีเออี เซฟาเด็กซ์ เอ-50	
	โครมาโตกราฟีบน ไบโอเจล พี-30	
Humicola lanuginosa	ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต	11
	โครมาโตกราฟีบนเซฟาเด็กซ์ จี-100	
	โครมาโตกราฟีบนดีอีเออี-เซฟาโรส ซีแอล 6 บี (DEAE-Sepharose CL-6 B)	
Aspergillus niger	โครมาโตรกราฟีบนVitrogel Ac A54	5
	โครมาโตกราฟีบน เอลพีเซฟาเด็กซ์ ซี-25	
	โครมาโตกราฟีบน ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-25	
	โครมาโตกราฟีบน เซฟาเด็กซ จี-50	
	โครมาโตกราฟีบนเอลพีเซฟาเด็กซ์ซี-25	

ตารางที่ 1 (ต่อ) การศึกษาไซแลเนสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ให้บริสุทธิ์

แหล่งจุลินทรีย์	ขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์	เอกสารอ้างอิง
Trichosporon cutaneum	ไดอะไลส์ใน 10 มิลลิโมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่มี 0.02 เปอร์เซนต์ โซเดียมเอไซด์ (Sodium azide) โครมาโตกราฟีบน ดีอีเอ-เซลลูโลส โครมาโตกราฟีบน ไบโอเจล พี-100	22
Cryptococcus albidus	ไดอะไลส์ในน้ำกลั่นที่มี 0.01 เปอร์เซนต์ โซเดียมเอไซด์ (Sodium azide) โครมาโตกราฟีบน ดีอีเออี-เซลลูโลส โครมาโตกราฟีบนซีเอ็ม-เซฟาเด็กซ์ โครมาโตกราฟีบน ไบโอเจล เอ	23
Irpex lacteus (Polyporous tulipiferae	โครมาโตกราฟีบนดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต โครมาโตกราฟีบน ไบโอเจลพี-100 โครมาโตกราฟีบนซีเอ็ม เซฟาเด็กซ์ ซี-50	24

จากการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุล ของเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว โดยวิธี SDS-โพลิอะคริลาไมด์ เจลอิเลคโตรโฟริซีส (SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis) พบว่ามีค่าเป็น 44,000 ดาลตัน และโดยวิธีไบโอเจล พี-100 เจลฟิลเตรชันพบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 42,000 ดาลตัน

Morosoli และคณะ (14) ได้ศึกษาไซแลเนสจาก S. lividans โดยนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต จากนั้นนำไปทำโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบ (anion exchange chromatography) และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โดยใช้โครมาโตกราฟีแบบของเหลวความดันสูง(high performance liquid chromatography) พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นประมาณ 32 เท่า และเหลือปริมาณเอนไซม์ 18 เปอร์เซนต์

นอกจากนี้ Kitpreechavanich และคณะ (11) ได้ทำการศึกษาการทำให้บริสุทธิ์ของไซแลเนส จาก H. lanuginosa โดยใช้ เซฟาเด็กซ์ จี-100 (Sephadex G-100) และจากนั้นนำไปผ่านคอลัมน์ ดีอีเออี-เซฟาโรส ซีแอล-6บี (DEAE-Sepharose CL-6B Column) โดยใช้เกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0-0.35 โมลาร์ พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์ขึ้น 54 เท่า และมีเปอร์เซนต์เอนไซม์เหลือเป็น 68 เปอร์เซนต์

Lee และคณะ (19) ศึกษาการทำไซแลเนสจาก Cl. acetobutylicum ATCC 824 ให้บริสุทธิ์ โดยใช้คอลัมน์ ซีเอ็ม-เซฟาโรส (CM-Sepharose) ที่ชะด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-0.5 โมลาร์ แล้วนำไปผ่านคอลัมน์ไบโอเจล พี-150 (Biogel P-150) พบว่าได้ไซแลเนส 2 ชนิด คือไซแลเนส A มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 19 เท่า มีปริมาณเอนไซม์เหลือ 10 เปอร์เซนต์ ส่วนไซแลเนส B มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 23 เท่า และเหลือปริมาณเอนไซม์ 56 เปอร์เซนต์

นอกจากนี้ Okasaki และคณะ(19) ทำไซแลเนสที่สร้างจากจากแบคทีเรีย Bacillus spp. ให้บริสุทธิ์โดยใช้ ดีอีเออี-โตโยเพิร์ล 650 เอ็ม (DEAE-Toyopearl 650M) พบว่ามีไซแลเนส 2 ชนิด คือ W1 และ W2 และแต่ละชนิดมี 2 องค์ประกอบ (Component) คือ องค์ประกอบที่ I และ II (W1-I,W1-II,W2-I และ W2-II) นำไซแลเนสแต่ละชนิดไปผ่านคอลัมน์ โตโยเพิร์ล เอชดับบลิว 55 เอส (Toyopearl HW 55 S) พบว่า เอนไซม์ W1-I จะมีความบริสุทธิ์ขึ้น 100 เท่า เหลือปริมาณเอนไซม์ 25

เปอร์เซนต์ และ W1-II มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 96 เท่า เหลือปริมาณเอนไซม์ 3 เปอร์เซนต์ ส่วน W2-I มีความบริสุทธิ์เพิ่มถึง 333 เท่า เหลือเปอร์เซนต์เอนไซม์เท่ากับ 11 เปอร์เซนต์ และ W2-II มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 135 เท่า เหลือปริมาณเอนไซม์เพียง 4 เปอร์เซนต์

Biely และคณะ (23) ศึกษาไซแลเนสที่ได้จากยีสต์คือ Cryptococcus albidus โดยใช้คอลัมน์ ดีอีเออี-เซลลูโลส (DEAE-Cellulose) ซีเอ็ม-เซฟาเด็กซ์ (CM-Sephadex), ไบโอเจล-เอ(Biogel-A) และไบโอเจล พี-100(Biogel P-100) ซึ่งได้เอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์ขึ้น 69 เท่า และมีปริมาณเอนไซม์เหลือ 6.5 เปอร์เซนต์

น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์

น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ไซแลเนสโดยทั่วๆ ไป มีขนาดไม่ใหญ่มากนัก คือ ไม่เกิน 100,000 ดาลตัน เช่น ไซแลเนสจาก T. cutaneum (22) มีน้ำหนักโมเลกุล 45,000 ดาลตัน ซึ่งจะมีค่าใกล้เคียงกัน กับน้ำหนักโมเลกุลของไซแลเนสจากจุลินทรีย์พวก Streptomyces เช่น Streptomyces sp. KT-23 มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 43,000 ดาลตัน (15) ซึ่งมีขนาดเท่ากับเอนไซม์จาก S. lividans ที่ศึกษาโดย Morosoli และคณะ (18) และไม่พบว่ามีหน่วยย่อยเมื่อทำให้แตกออกเป็นหน่วยย่อยโดย โซเดียม - โดเดซิลซัลเฟต หรือ 6 โมลาร์ กวานิดินไฮโดรคลอไรด์

เอนไซม์ไซแลเนสจากแบคทีเรียบางชนิด มีมากกว่า 1 องค์ประกอบ เช่น Bacillus spp.สามารถผลิตเอนไซม์ชนิด W1-I, W1-II และ W2-I, W2-II ได้ซึ่งมีขนาดโมเลกุลเป็น 21,500, 49,500 และ 22,500, 50,000 ดาลตัน ตามลำดับ(20) แต่ละองค์ประกอบก็ไม่มีหน่วยย่อยเช่นกันเมื่อทำปฏิกิริยากับโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต

นอกจากนี้ไซแลเนสที่มีขนาดค่อนข้างเล็ก เช่นไซแลเนสที่ผลิตจาก H. lanuginose มีขนาดโมเลกุลเป็น 21,500 ดาลตัน (11)ในขณะที่ไซแลเนสจาก C. thermophile var. coprophile มีน้ำหนักโมเลกุล 2 ขนาด คือ 26,000 และ 7,000 ดาลตัน (4) ดังแสดงในตารางที่ 2 นอกจากนี้จุลินทรีย์บางชนิดสามารถสร้างไซแลเนสได้มากกว่า 1 ชนิด และมีขนาดแตกต่างกันมากพอสมควร เช่น Cl. acetobutylicum

ATCC 824 (19) สามารถสร้างไซแลเนสได้ 2 ชนิด โดยที่เอนไซม์ 2 ชนิดนั้น มีขนาดโมเลกุลเป็น 63,000 และ 29,000 ดาลตัน ตามลำดับ ซึ่งสมบัตินี้พบได้กับไซแลเนสในเห็ดบางชนิด เช่น I. lacteus ซึ่งผลิตไซแลเนสได้ 2 ชนิดเช่นกัน มีขนาดโมเลกุลเป็น 38,000 และ 62,000 ดาลตัน ตามลำดับ

สำหรับค่า isoelectric point (pI) ของไซแลเนสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ก็ได้มีผู้รายงานไว้ เช่น ไซแลเนสจาก S. lividans มีค่า pI เท่ากับ 5.2 (18) จาก Streptomyces sp. KT-23 มีค่า 6.9 (15) และจาก H. lanuginosa มีค่า pI เป็น 4.1 (11) เป็นต้น

สมบัติของเอนไซม์ไซแลเนส

ความจำเพาะต่อสับสเตรท

โดยทั่วไปไซแลเนสจากจุลินทรีย์จะมีความจำเพาะต่อไซแลน แต่ไม่สามารถย่อยคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสได้ เช่น Cryptococcus flavus (25) และ Streptomyces xylophagus (12) เป็นต้น แต่ Frederick และคณะ (5) ศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรทของไซแลเนสจากเชื้อรา A. niger พบว่า A. niger สามารถผลิตไซแลเนสได้ 2 ชนิด คือ ไซแลเนส I และ II โดยที่ทั้ง 2 ชนิดไม่สามารถย่อย อะราบิโนกาแลคแทน ,ไคทิน ,เด็กซ์แทรน ,เด็กซ์ทริน , กลูโคแมนแนน, อินูลิน, ลามินาริน , เพคติน และ โพลีกาแลคทูโรนิคได้ แต่จะสลายเซลลูโลสได้ (untreated cellulose, crystalline cellulose และ Carboxymethylcellulose) แต่เมื่อเทียบกับไซแลน พบว่าจะสลายไซแลนได้ดีกว่า เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดสามารถย่อย soluble larch wood ไซแลน ได้รวดเร็วกว่า insoluble larchwood ไซแลน แต่อย่างไรก็ตามสุดท้ายจะให้ปริมาณการย่อยสลายใกล้เคียงกัน

Ganju และคณะ (4) ได้ศึกษาสมบัติของไซแลเนสจาก C. thermophile var. coprophile พบว่ามีค่า K_m ต่อ larchwood xylan เป็น 0.55 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับเอนไซม์ไซแลเนส I และ II ตามลำดับ

ราบางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลส,กลูแคน,เซลโลไบโอส และไซโลไบโอสได้ เช่น T. harzianum ซึ่งทำการศึกษาโดย Wong และคณะ (21) ส่วนราบางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ที่ย่อยไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ได้ทุกชนิดยกเว้นไซโลไบโอสคือ H.lanuginosa (11)แต่จะถูกยับยั้งโดยไซโลไบโอส จะเห็นได้ว่าความจำเพาะต่อสับสเตรทของไซแลเนส จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ไม่เหมือนกัน และไม่ได้ขึ้นกับสกุลของจุลินทรีย์ด้วย

สำหรับแบคทีเรียบางชนิดเช่น Bacillus spp.(20)สามารถผลิตไซแลเนสได้ 2 ชนิด และแต่ละชนิดมี 2 องค์ประกอบ คือ W1-I, W1-II, W2-I และ W2-II มีค่า K_m ต่อ larchwood xylan เป็น 4.5,0.95,4.0 และ 0.57 ตามลำดับ

อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ไซแลเนส จากจุลินทรีย์ต่างชนิดจะแตกต่างกันไปดังตารางที่ 2 เช่น ไซแลเนสจากยีสต์ T. cutaneum (22) มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานเป็น 50 องศาเซลเซียส ส่วนของ S. lividans จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมเป็น 60 องศาเซลเซียส(18) แต่ของเชื้อ Streptomyces sp.KT-23 (15) มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานเป็น 55 องศาเซลเซียส จะเห็นว่าเป็นอุณหภูมิที่ไม่สูงเกินไปแต่จะอยู่ในระดับปานกลาง ส่วนไซแลเนสจากรา อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานจะค่อนข้างสูง ตัวอย่างเช่น ไซแลเนสจาก H. lanuginosa (11) มีอุณหภูมิเหมาะสมที่ 65 องศาเซลเซียส C. thermophile var.coprophile(4) มีอุณหภูมิที่เหมาะสมเป็น 70 และ 60 องศาเซลเซียส สำหรับไซแลเนส 2 ชนิด คือ ไซแลเนส I และ ไซแลเนส II ตามลำดับ จากการศึกษาในแบคทีเรียพบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานก็จะแตกต่างกันไป เช่น Cl. acetobutylicum ATCC 824 ซึ่งสามารถผลิตไซแลเนสได้ 2 ชนิด คือ ไซแลเนส A และ ไซแลเนส B โดยมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานเป็น 50 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (19) นอกจากนี้ ไซแลเนสจาก Bacillus spp. (20) มีอุณหภูมิเหมาะสมต่อการทำงานค่อนข้างสูงคือ 70 องศาเซลเซียส

สำหรับความเสถียรต่อความร้อนของเอนไซม์จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ จะมีช่วงค่อนข้างกว้าง ถึงแม้ว่าจะเป็นเอนไซม์จากเชื้อเดียวกันแต่ต่างชนิดกัน ก็มีความทนทานต่อความร้อนไม่เท่ากัน เช่น ไซแลเนสจาก Bacillus spp. ชนิด W1-I, W1-II, W2-I

และ W2-II มีความเสถียรต่อความร้อนเป็น 40, 60, 50 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (20) Cl. acetobutylicum ATCC 824 สามารถผลิตไซแลเนสได้ 2 ชนิด คือ ไซแลเนส A และ ไซแลเนส B มีความเสถียรต่อความร้อนเป็น 40 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (19) ไซแลเนสจาก Streptomyces sp. KT-28 มีความทนทานได้ถึง 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที แต่จะสูญเสียสภาพเมื่ออุณหภูมิเกิน 60 องศาเซลเซียส (15)

ความเป็นกรดด่าง (pH)

ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงาน ของไซแลเนสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ มีค่าแตกต่างกันไป ดังแสดงในตารางที่ 2 โดยจะอยู่ในช่วง 4.0-9.0 เช่น C. thermophile var. coprophile สามารถผลิตไซแลเนสได้ 2 ชนิด คือ ไซแลเนส A และไซแลเนส B มีความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานเป็น 5.4-6.0 และ 4.8-6.4 ตามลำดับ ในขณะที่ Bacillus spp. ที่ผลิตไซแลเนส W1 และ W2 มีช่วงความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการทำงานค่อนข้างสูงกว่า คือ W1-I และ W2-I อยู่ในช่วงความเป็นกรดด่าง 6.0 และ W1-II และ W2-II อยู่ในช่วง 7.0-9.0 (20) สำหรับไซแลเนสจาก Streptomyces จะมีค่าความเป็นกรดด่าง ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง ค่อนไปทางด้านกรดเล็กน้อย เช่น ไซแลเนสจาก S. lividans (18) และ Streptomyces sp. KT-28 (5) มีความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการทำงาน คือ 6.0 และ 5.5 ตามลำดับ นอกจากนี้ Stuttgen กับ Sahm(22)ได้ศึกษาไซแลเนสจากยีสต์ Trichosporon cutaneum พบว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการทำงานคือ 5.0

โดยทั่วไปแล้วเอนไซม์ไซแลเนสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆจะมีความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างค่อนข้างกว้าง คือ ตั้งแต่ 4.0 - 10.0 สำหรับไซแลเนสที่ผลิตโดย Streptomyces sp. KT-28 จะมีความคงทนต่อความเป็นกรดด่างในช่วงที่กว้างคือตั้งแต่ 4.0 ถึง 10.0 (15) แต่ ไซแลเนสจาก T. cutaneum มีความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างในช่วง 4.5-9.0 สำหรับ ไซแลเนส W1 และ W2 จาก Bacillus spp. เสถียรต่อความเป็นกรดด่างที่ 4.5-10.0 ทั้ง 2 ชนิด(7) ไซแลเนส A และ B จาก Cl. acetobutylicum ATCC 824 มีความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างในช่วง 5.5-7.0 และ

ตารางที่ 2 สรุปสมบัติของเอนไซม์ไซแลเนสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

จุลินทรีย์	ความจำเพาะต่อสับสเตรท	K_m	อุณหภูมิที่เหมาะสม (^oC)	pH ที่เหมาะสม	สารยับยั้ง	ความต้องการไอออนของโลหะ	ความคงทนต่ออุณหภูมิ (^oC)	ความคงทนต่อ pH	น้ำหนักโมเลกุล	จำนวนหน่วยย่อย	เอกสารอ้างอิง
Bacillus sp. (W_1)	larchwood xylan	4.5 0.95	65 70	6.0 7.0-9.0	Hg^{2+}	-	40 60	4.5-6.0	21,500 49,500	-	20
Bacillus sp. (W_2)	"	4.0 0.57	65 70	6.0 7.0-9.0	Hg^{2+},Cu^{2+}	-	50 60	4.5-10.0	22,500 50,000	-	20
Cl. acetobutilicum	"	6.0	50	5.0	Hg^{2+},Cu^{2+},Pb^{2+}	-	40	5.5-7.0	63,000	-	19
		6.7	60	5.5	Hg^{2+}	-	50	3.5-7.0	29,000		
H. lanuginosa	wood xylan	7.3	65	6.0	Hg^{2+},Cu^{2+},Co^{2+},Fe^{2+}	-	55	5.0-8.0	21,500	-	11
C. thermophile var.coprophile	larchwood xylan	0.55 0.1	70 60	5.4-6.0 4.8-6.4	-	-	50 50	- -	26,000 7,000	-	4
S. lividans	oatspelt xylan	0.78	60	6.0	-	-	37	6.0	43,000	-	18
Streptomyces sp.KT-23	rice-straw arabino-xylan	0.20	55	5.5	Hg^{2+},Mn^{2+}	-	4-55	4.0-10.0	43,000	-	15
I. lacteus	larchwood xylan	- -	60 70	6.0 6.0	Hg^{2+},Ag^{2+},Mn^{2+}	-	60 60	5.0-10.0 5.0-7.0	38,000 62,000	-	24
T. cutaneum	oathusk xylan, xylose, glucose, cellobiose	-	50	5.0	-	-	35	4.5-9.0	45,000	-	22

3.5-7.0 ตามลำดับ จากที่กล่าวมา การที่เอนไซม์มีช่วง pH ที่เหมาะสมในการทำงานได้กว้างมีประโยชน์ที่จะนำมาใช้ทำปฏิกิริยาในช่วงความเป็นกรดด่างต่ำๆ เพราะเนื่องจากในสภาวะที่เป็นกรดหรือกลางนั้น จะสามารถหลีกเลี่ยงสารที่ไม่ต้องการบางอย่างได้ (26)

สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

โลหะหนักหลายชนิดจะมีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซแลเนสเช่น ปรอท(Hg^{++}), เงิน(Ag^{++}), ทองแดง(Cu^{++}), ตะกั่ว(Pb^{++}), โคบอลท์(Co^{++}), เหล็ก(Fe^{+++}) และ แมงกานีส (Mn^{++}) เป็นต้น (11,15,19,24) นอกจากนี้ยังพบว่า EDTA ไม่มีผลในการยับยั้งเอนไซม์ไซแลเนสจากจุลินทรีย์บางชนิดได้ (15,19,27,28)

ตัวอย่างไซแลเนสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆที่ไอออนของโลหะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ เช่น Cl. acetobutylicum ATCC 824 (19) พบว่า Hg^{++},Cu^{++} และ Pb^{++} ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์ไซแลเนส A ได้ถึง 100,95 และ 60 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ส่วนไซแลเนส B จะถูกยับยั้งการทำงานโดย Hg^{++} อย่างสมบูรณ์ นอกจากนี้ไซแลเนสจาก Streptomyces sp. KT-23 (15) สามารถถูกยับยั้งโดย Hg^{++} และ Mn^{++} ได้ถึง 58 และ 51 เปอร์เซนต์ ตามลำดับที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์เช่นกัน แต่จะไม่ถูกยับยั้งโดย Mg^{++},Ca^{++},Cu^{++},Zn^{++}, Fe^{++}, Fe^{+++} และ Co^{++} ในขณะที่ SDS และ โมโนไอโอโดอะซิเตท 1 มิลลิโมลาร์ จะยับยั้งแอคติวิตีได้ 25 เปอร์เซนต์

Hashimoto และคณะ (27) ศึกษาผลของไอออนของโลหะต่างๆ ต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยทดสอบที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และรายงานในรูปแอคติวิตีสัมพัทธ์ (Relative activity) กับแอคติวิตีเมื่อไม่มีไอออนของโลหะเหล่านี้ พบว่า Hg^{++} สามารถยับยั้งแอคติวิตีได้อย่างสมบูรณ์ ส่วนไอออนชนิดอื่นๆไม่มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์คือ Na^{+}, Ca^{++}, Mg^{++}, Cu^{++}, Co^{++} และ Ni^{+} โดยให้ค่าแอคติวิตีสัมพัทธ์เป็น 100, 109, 105, 104, 109 และ 104 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ Horikoshi และคณะ (28) พบว่า Hg^{++}, Ag^{++} และ Cd^{++} ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ จะมีผลยับยั้งแอคติวิตีของไซแลเนสจากเชื้อ Bacillus No. C-52-2 โดยให้ค่าแอคติวิตีสัมพัทธ์เป็น 12, 55 และ 50 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ส่วน Fe^{++},Fe^{+++}, Mg^{++}, Co^{++}, Ca^{++} และ Na^{+} ไม่มีผลในการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์เลย ซึ่งค่าแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ได้คือ 115, 100, 102, 110, 112 และ 110 ตามลำดับ

มีรายงานการศึกษา ผลของไอออนต่อการทำงานของไซแลเนสจากเห็ดบางชนิด เช่น I. lacteus (Polyporous tulipiferae) (24) พบว่า Hg^{++} เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ มีผลในการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์มากที่สุด โดยจะเหลือแอคติวิตีเพียง 23.9 และ 1.0 เปอร์เซนต์ สำหรับไซแลเนส I และไซแลเนส II ตามลำดับ แต่ Ca^{++} และ Mg^{++} 2 มิลลิโมลาร์ ไม่มีผลในการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์เลย เนื่องจากไซแลเนส I ยังมีแอคติวิตีเหลือเป็น 104.2 และ 101.6 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ และไซแลเนส II ยังคงมีแอคติวิตีเหลือเป็น 105.6 และ 100.4 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ส่วนไอออนชนิดอื่น ๆ มีผลต่อการทำงานของเอ็นไซม์เพียงเล็กน้อย

Okasaki และคณะ (20) ได้ศึกษาผลของไอออนต่อการทำงานของเอนไซม์ไซแลเนส W1-I, W1-II, W2-I และ W2-II พบว่า Hg^{++} 5 มิลลิโมลาร์ จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ถึง 100 เปอร์เซนต์ Cu^{++} 5 มิลลิโมลาร์ มีผลในการยับยั้งแอคติวิตีเอนไซม์ค่อนข้างมากโดยจะเหลือปริมาณเอนไซม์ 44, 50, 89 และ 0 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ และ Ag^{+} 5 มิลลิโมลาร์ มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์บ้าง โดยจะมีแอคติวิตีเหลือเป็น 83, 78, 84 และ 79 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ส่วน Co^{++} 5 มิลลิโมลาร์ มีผลเล็กน้อยต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ โดยจะคงเหลือแอคติวิตีถึง 91, 85, 100 และ 93 เปอร์เซนต์ตามลำดับ

นอกจากนั้นยังมีผู้ศึกษาพบว่า แอลกอฮอล์บางชนิดสามารถยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ด้วยเช่น เมธานอล หรือ เอทธานอล ที่มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ จะทำให้แอคติวิตีของไซแลเนสจาก Streptomyces sp. KT-23 ลดลงถึง 92 และ 50 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ (15) แต่สำหรับโลหะหนักบางชนิดอาจจะไม่มีผลต่อการทำงานของไซแลเนสได้เช่นกัน เช่น แคดเมียม (Cd^{++}), นิเกิล (Ni^{++}), แมกนีเซียม (Mg^{++}), แคลเซียม (Ca^{++}), แบเรียม (Ba^{++}) และ สังกะสี (Zn^{++}) ไม่มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ได้จาก Bacillus spp.(20) และ H. lanuginosa (11) เป็นต้น

มีการศึกษากรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ไซแลเนส ที่ได้จากจุลินทรีย์บางชนิด เช่น Streptomyces sp. KT-23 พบว่า กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบคือ ซีรีน, ไกลซีน, กรดกลูตามิค และกรดแอล-ไดอะมิโนพิมิริค (15), จาก A. niger มีกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่คือ ไกลซีน, ซีรีน, กรดกลูตามิค, โปรลีน และ อะลานีน เป็นต้น (5), จาก C. thermophile var. coprophile (4) มีไกลซีน, ทรีโอนีน, กรดแอสพาติค-แอสพาราจีน และกรดกลูตามิค-กลูตามีน เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์โดยส่วนใหญ่ ส่วนไซแลเนสจากยีสต์เช่น T. cutaneum (22) มีลูซีน , ไลซีน และ ฮิสติดีน

เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ส่วนใหญ่ จาก H. lanuginosa (11) มีองค์ประกอบของกรดอะมิโน คือ ไกลซีน,กรดแอสพาติค,ทริโอนีน,กรดกลูตามิค และ อลานีน เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ สำหรับในเห็ด I. lacteus (Polyporous tulipiferae) กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ไซแลเนสจะเป็นไกลซีน, แอสพาราจีน, อะลานีน และซีรีนโดยส่วนใหญ่ (24) จากที่ยกตัวอย่างมาจะเห็นได้ว่า กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของไซแลเนสจากแหล่งต่างๆส่วนใหญ่จะเป็นไกลซีน

ในงานวิจัยนี้ มีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาการทำให้บริสุทธิ์ของเอนไซม์ไซแลเนสที่ได้จาก Streptomyces sp.42-9 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่แยกได้จากแหล่งดินในประเทศไทย และได้มีการศึกษาความสามารถในการผลิตไซแลเนสจากจุลินทรีย์นี้ (2) งานวิจัยนี้จะศึกษาขั้นตอนการทำไซแลเนสให้บริสุทธิ์ตลอดจนศึกษาสมบัติทางชีวเคมีและทางกายภาพของเอนไซม์ที่เตรียมได้ ซึ่งข้อมูลนี้จะสามารถนำไปศึกษาการผลิต และการนำเอนไซม์นี้ไปใช้ประโยชน์ต่อไป

017694