หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

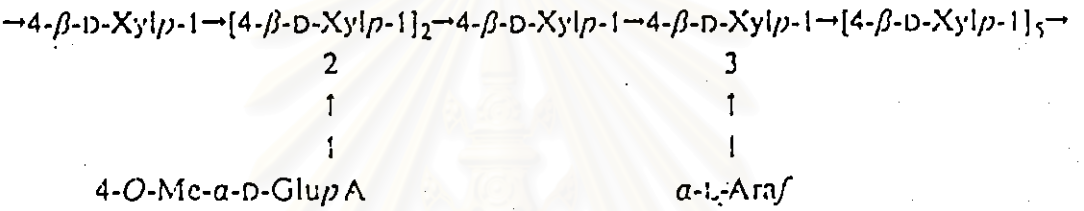
บทนำ

ปัจจุบันมีผู้สนใจนำเอนไซม์มาใช้ในกระบวนการผลิตทางอุตสาหกรรมหลายชนิด กลุ่มเอนไซม์ที่ย่อยสลายไซแลนเป็นเอนไซม์กลุ่มหนึ่งที่ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวาง เช่น ใช้ในกระบวนการย่อยสลายไซแลนเพื่อให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น ไซโลส เนื่องจากองค์ประกอบหลักของไซแลนคือ น้ำตาลดี-ไซโลส (D-xylose) เป็นสารให้รสหวาน สามารถเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า wood sugar น้ำตาลชนิดนี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายประการเช่น ผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว (single cell protein), single cell oil ผลิตเชื้อเพลิง เช่น เอธานอล บิวทานอล และผลิตไซลิทอล เป็นต้น (Biely,1985 ; Magee and Kosaric, 1985 ; Deshpande *et al.*; 1985 and Gilbert and Hazlewood, 1993), ใช้ในกระบวนการฟอกเยื่อกระดาษ โดยเอนไซม์จะย่อยสลายไซแลนที่อยู่บนเส้นใย ทำให้ขั้นตอนการฟอกสีเพื่อขจัดลิกนินมีประสิทธิภาพสูงขึ้น (Kantelinen *et al.*, 1993), ลดความหนืดของอาหารสัตว์ และอุตสาหกรรมอาหาร (Wong and Saddler, 1992 ; Gilbert and Hazlewood, 1993 and Onysko, 1993)

ไซแลนเป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลสพบในเซลล์พืช โดยยึดเกาะด้วยพันธะไฮโดรเจนกับส่วนของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสพบตามธรรมชาติทั้งในไม้เนื้ออ่อน, ไม้เนื้อแข็ง พืชล้มลุก, ในผนังเซลล์ชั้นแรกของพืชใบเลี้ยงเดี่ยว รวมทั้งในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร โดยปริมาณและโครงสร้างจะแตกต่างกันไปตามแหล่งที่มา ในไม้เนื้อแข็งพบว่ามีปริมาณไซแลนมากกว่า 30% ของน้ำหนักแห้ง (Weinstein and Albersheim, 1979) ในไม้เนื้ออ่อนจะมีไซแลนประมาณ 8% ของน้ำหนักแห้ง ในไม้ล้มลุกและวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น กากเมล็ดฝ้าย, รำข้าว, ฟางข้าว, ซังข้าวโพด, เปลือกเมล็ดทานตะวัน (Magee and Kosaric, 1985) และเปลือกเมล็ดธัญพืชต่างๆ (Parisi, 1989 ; Ericksson *et al.*, 1990) จะมีไซแลนอยู่ประมาณ 20-40% ของน้ำหนักแห้ง (Saddler *et al.*, 1983) นอกจากนั้นยังสามารถพบได้ในวัสดุเหลือทิ้งจากกระบวนการลอกเนื้อไม้ เพื่อทำเยื่อกระดาษ (pulping)

ไซแลนเป็นพอลิแซคคาไรด์ของน้ำตาลดี-ไซโลส (D-xylose) ที่เชื่อมกันด้วยพันธะบีตา-1,4-ไซโลสิดิก (β-1,4-xylosidic) เป็นสายหลัก (backbone) และมีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวชนิดอื่นหรือโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆมาเชื่อมเป็นสายโซ่กิ่ง ยกเว้นไซแลนในพืชบางชนิดเช่น หญ้าเอสพาโต (esparto grass) (Chanda, *et al.*, 1950) หรือลำต้นใบยาสูบ (tobacco stalk) (Eda *et al.*, 1976) จะมีโครงสร้างเป็นไซแลนชนิดที่ไม่มีสายโซ่กิ่ง สายโซ่กิ่งของไซแลนอาจ

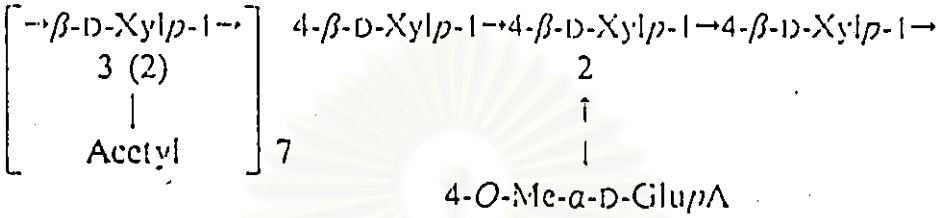
ประกอบด้วย หมู่อะราบิโนซิล (arabinosyl), กลูคูโรนิล (glucuronyl) หรืออะซิทิล (acetyl) ไซแลนที่พบในส่วนเฮมิเซลลูโลสของไม้เนื้ออ่อนส่วนใหญ่จะเป็นอะราบิโนกลูคูโรโนไซแลน (arabinoglucuronoxylan) ซึ่งมีสายหลักเป็นบีตา-1,4-ดี-ไซโลไพราโนซิล (β-1,4-D-xylopyranosyl) ที่มี 4-โอ-เมทธิล-แอลฟา-ดี-กลูคูโรนิคแอซิด (4-O-metyl-α-D-glucuronic) เชื่อมต่อที่ตำแหน่ง โอ-2 และ มีแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนส (α-L-arabinofuranose) เชื่อมต่อที่ตำแหน่ง โอ-3 ดังแสดงในรูปที่ 1.1 จำนวนหน่วยไซโลสที่มาเชื่อมต่อกัน (degree of polymerization) อยู่ในช่วง 70-130 หน่วย (Ericksson *et al.*, 1990)



รูปที่ 1.1 ลักษณะโครงสร้างของไซแลนในไม้เนื้ออ่อน (Ericksson *et al.*, 1990)

β-1,4-D-Xyl*p*	แทน	บีตา-1,4-ดี-ไซโลไพราโนซิล
4-O-Me-α-D-Glu*p*A	แทน	4-โอ-เมทธิล-แอลฟา-ดี-กลูคูโรนิคแอซิด
α-L-Ara*f*	แทน	แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนส

ไซแลนที่พบในส่วนเฮมิเซลลูโลสของไม้เนื้อแข็ง ส่วนใหญ่มักเป็นกลูคูโรโนไซแลน (glucuroxylan) มีสายหลักที่ประกอบด้วย บีตา-ดี-ไซโลไพราโนส (β-D-xylopyranose) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีตา-1,4-ไซโลสิดิกและจะมีหมู่อะเซติล (acetyl) เป็นสายโซ่กิ่งทุกๆ 7-10 หน่วยของสายหลักที่ตำแหน่ง โอ-2 หรือ โอ-3 ส่วน 4-โอ-เมทธิล-แอลฟา-ดี-กลูคูโรนิคแอซิด (4-O-metyl-α-D-glucuronic) เชื่อมต่อด้วยพันธะบีตา-1,2 ประมาณทุกๆ 10 หน่วยของไซแลน (Timell, 1967) ดังแสดงในรูปที่ 1.2 จำนวนหน่วยที่มาเชื่อมต่อกันอยู่ในช่วง 150-200 หน่วย (Ericksson *et al.*, 1990)



รูปที่ 1.2 ลักษณะโครงสร้างของไซแลนในไม้เนื้อแข็ง (Ericksson *et al.*, 1990)

β-1,4-D-Xyl*p* แทน บีตา-1,4-ดี-ไซโลไพราโนซิล

4-O-Me-α-D-Glu*p*A แทน 4-โอ-เมทธิล-แอลฟ่า-ดี-กลูคูโรนิคแอซิด

ไซแลเนสเป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งในกลุ่มเอนไซม์ที่ย่อยสลายไซแลน (xylan degradaing enzyme) ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการผลิตของอุตสาหกรรม (Dekker and Richards, 1976) มีชื่อตามระบบว่า 1,4-บีตา-ดี-ไซแลน-ไซลาโนไฮโดรเลส (1,4-β-D-xylan-xylanohydrolase ; EC 3.2.1.8) หรือเอนโดไซแลเนส (endo-xylanase) เอนไซม์ชนิดนี้จะย่อยสลายพันธะ 1,4-บีตา-ดี-ไซโลซิดิกแบบสุ่ม เรียกกระบวนการที่เกิดขึ้นว่ากลไกแบบเอนโด (endo-mechanism) ได้ไซโลสและโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆ เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Gilbert and Hazlewod, 1993) โดยทั่วไปพบว่าไซแลนเป็นสารชักนำการสร้างไซแลเนส (Nakanishi *et al.*, 1976; Mondou *et al.*, 1986; Bhalerao *et al.*, 1990; and Li and Ljungdahl, 1994) และเอนไซม์จะถูกสร้างขึ้นภายในเซลล์ก่อนแล้วจึงปล่อยออกนอกเซลล์ (extracellular enzyme) (Kusakabe *et al.*, 1977 ; Biely, 1985; and Nakanishi *et al.*, 1987)

เอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะบีตา-1,4 สายหลักของไซแลนให้ได้น้ำตาลไซโลสอีกชนิดหนึ่ง คือ ไซโลซิเดส เอนไซม์นี้มีชื่อตามระบบว่า 1,4-บีตา-ดี-ไซแลน-ไซโลไฮโดรเลส (1,4-β-D-xylan-xylohydrolase, EC 3.2.1.3.7) เอนไซม์ชนิดนี้จะย่อยสลายพันธะ 1,4-บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ ทีละ 1 หน่วยจากปลายสองด้าน non-reducing end เรียกกระบวนการที่เกิดขึ้นนี้ว่า กลไกแบบเอคโซ (exo-mechanism) ได้ไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Dekker and Richards, 1976)

นอกจากนี้การย่อยไซแลนให้สมบูรณ์จะต้องอาศัยเอนไซม์ชนิดอื่นๆ ด้วย เช่น

- แอลฟา-แอล-อะราบิโนสิเดส (α-L-arabinosidase ; EC 3.2.1.55) จะย่อยสลายหมู่นอน-รีดิวซ์-แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนซิล ของแอลฟา-แอล-อะราโนบิฟิวราโนไซด์, อะราบิแนน และอะราบิโนกาแลคแทน ได้น้ำตาลไซโลสและน้ำตาลที่เป็นพันธะกิ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (International Union Biochemistry, 1984)

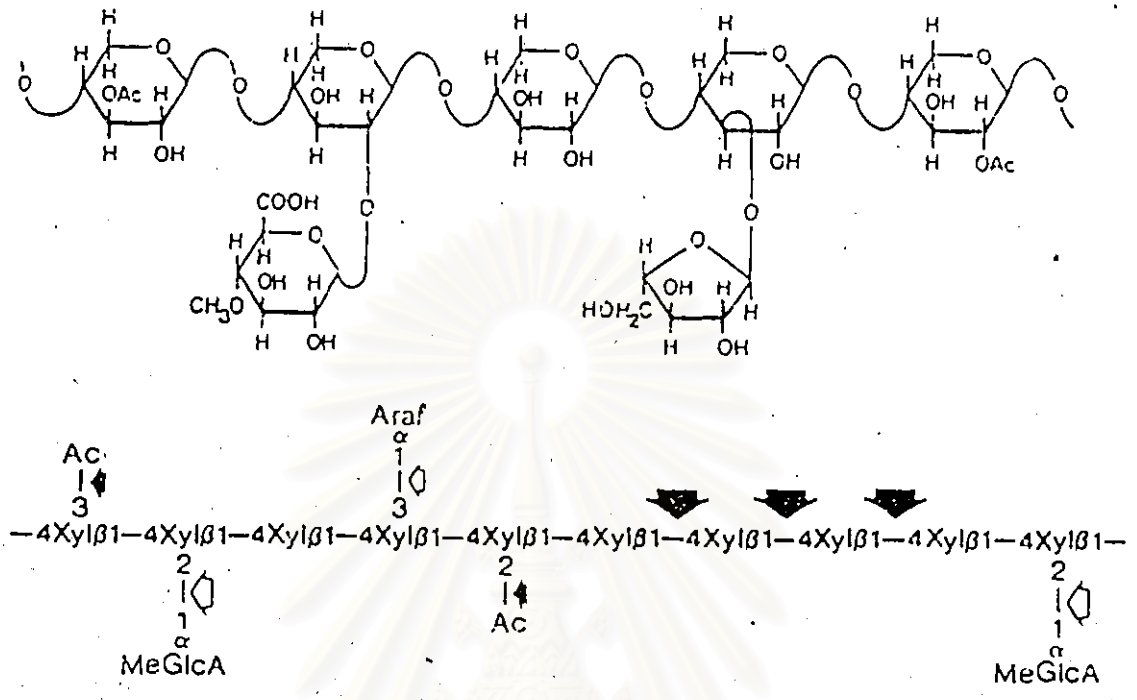
- แอลฟา-ดี-กลูคูโรโนสิเดส (α-D-glucuronosidase) จะย่อยสลายพันธะแอลฟา-1,2 ใน 4-โอ-เมทธิล-ดี-กลูคูโรนิคแอซิด (Whistler and Richards, 1970)

- อะเซติล(ไซแลน)เอสเทอเรส (acetyl(xylan)esterase ; EC 3.1.1.6) จะย่อยสลายพันธะบีตา-1,2 และ บีตา-1,3 ที่เชื่อมหมู่อะเซติลกับสายหลัก ให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรดอะซิติก (Reese *et al.*, 1969)

จากเอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายไซแลนทั้งหมดที่กล่าวมาแล้ว สามารถแสดงแผนภาพรวมการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ในการย่อยสลายโครงสร้างของไซแลนได้ ดังรูปที่ 1.3

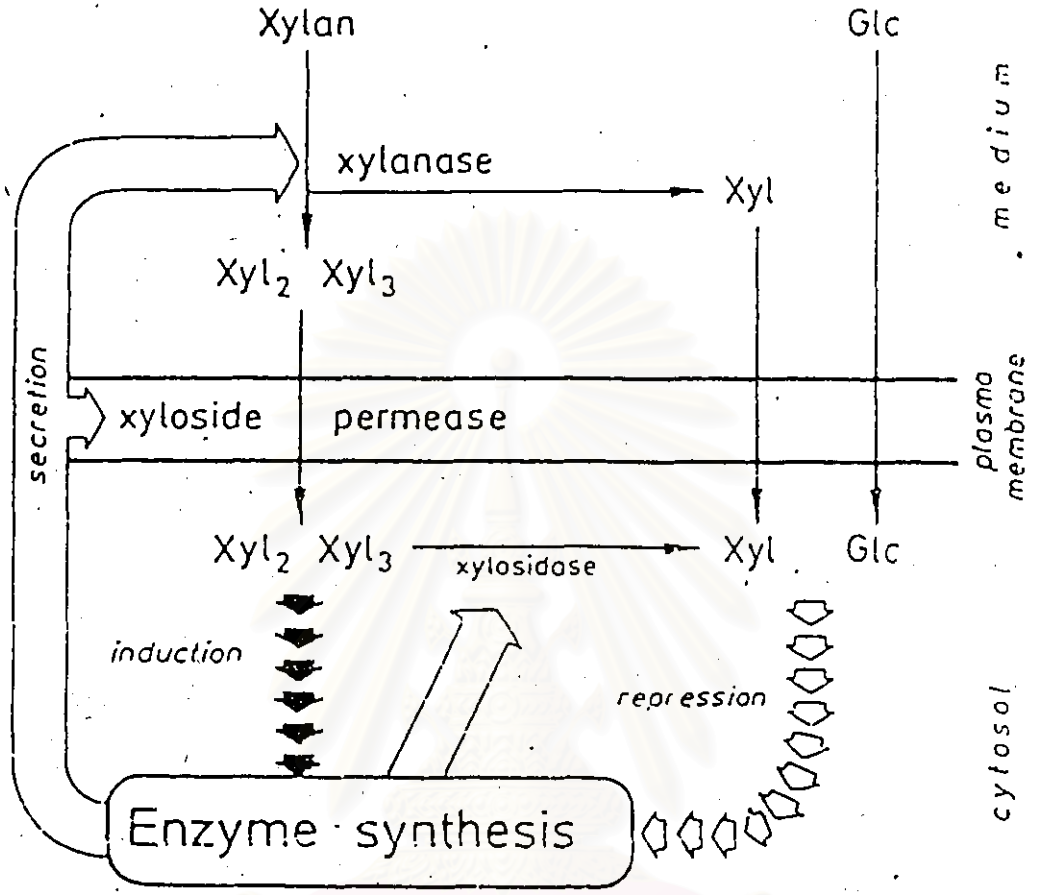
Biely และ Petrakova (1985) ศึกษารูปแบบการย่อยสลายไซแลนด้วยไซแลเนสและบีตา-ไซโลสิเดสของยีสต์ *Cryptococcus albidus* พบว่าเชื้อจะปลดปล่อยไซแลเนสออกมานอกเซลล์ เพื่อย่อยไซแลนให้เป็นไซโลโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆ ก่อนจะนำเอาไซโลโอลิโกแซคคาไรด์กลับเข้าสู่เซลล์ด้วยระบบ แอคทีฟทรานสปอร์ต (active transport) ต่อจากนั้นบีตาไซโลสิเดสภายในเซลล์จึงทำงานต่อเพื่อย่อยให้เกิดน้ำตาลไซโลส ซึ่งจุลินทรีย์จะนำไปใช้ในการเจริญเติบโตต่อไป ดังแสดงในรูปที่ 1.4

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1.3 **การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายไซแลน** (Biely, 1985)

Ac	แทน	หมู่อะเซติล
Araf	แทน	แอล-อะราบิโนฟิวราโนส
MeGlcA	แทน	4-โอ-เมธิล-ดี-กลูเคียวโรนิคแอซิด
Xyl	แทน	ดี-ไซโลส



รูปที่ 1.4 **ลักษณะการย่อยสลายไซแลนของ** *Cryptococcus albidus* (Biely and Petrakova, 1985)

Glc	แทน	ดี-กลูโคส
Xyl	แทน	ดี-ไซโลส
Xyl_2	แทน	ไซโลไบโอส
Xyl_3	แทน	ไซโลไตรโอส

สิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น แบคทีเรีย, รา, ยีสต์, แอคติโนมัยสีท, โปรโตซัว, พืช, แมลง และสัตว์ทะเลบางชนิด เช่น หอยกาบคู่ (charonoa lampas) สร้างเอนไซม์ไซแลเนสได้ (Fukada *et al.* , 1969 ; Dekker and Richards, 1976 ; Pou-Llinas and Driguez, 1987 ; Ball and McCarthy, 1989 ; O'neill *et al.*, 1989 ; Ronen *et al.*, 1991 and Shao and Wiegel, 1992) เอนไซม์นี้ที่นิยมศึกษามักมาจากจุลินทรีย์ เนื่องจากเจริญได้รวดเร็วเพาะเลี้ยงได้ง่าย จุลินทรีย์ที่สร้างไซแลเนส ส่วนใหญ่จะสร้างและปล่อยเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme)

ตัวอย่างสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างไซแลเนส

<u>แบคทีเรีย</u>

สายพันธุ์แบคทีเรีย	เอกสารอ้างอิง
Aeromonas caviae ME-1	Kubata *et al.*, 1997.
Bacillus circulans	Yang *et al.*, 1989
Bacillus pumilus	Panbangred *et al.*, 1983.
Bacillus stearothermophilus 21	Baba *et al.*, 1994.
Bacillus subtilis	Berniet *et al.*, 1983.
Bacteroides ovatus	Whitehead and Hespell, 1990.
Becteroides succinogenes	Sipat *et al.*, 1987.
Bacteroides xylanoticus	Schyns and Stams, 1992.
Butyrivibrio fibrisolvens H17c	Lin and Thomson, 1991.
Caldocellum saccharolyticum	Luthi *et al.*, 1990.
Cellulomonas sp.	Bhalerao *et al.*, 1990.
Clostridium acetobutylicum P262	Zappe *et al.*, 1987.
Clostridium stercorarium strain F-9	Sakka *et al.*, 1990.
Clostridium thermocellum	Grepinet *et al.*, 1988.
Pseudomonas fluorescens	Gilbert *et al.*, 1988.
Ruminococcus flavefaciens	Flint *et al.*, 1989.

รา

สายพันธุ์รา	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus niger NCIM 1207	Gokhale *et al.*, 1986.
Aspergillus ochraceus	Biswas *et al.*, 1987.
Aurobasidium pullulans	Tenkanen *et al.*, 1993.
Cochliobolus carbonum	Apel *et al.*, 1996.
Magnaporthe grisea	Wu *et al.*,1994.
Neocallimastix patriciarum	Lee , 1993.
Thermoascus aurantiacus	Tan *et al.*, 1987.
Trichoderma reesei	Tenkanen *et al.*, 1993.

แอคติโนมัยสีท

สายพันธุ์แอคติโนมายซิส	เอกสารอ้างอิง
Actinomadura sp. Strain FC7	Ethier *et al.*, 1994.
Streptomyces halstedii JM8	Ruiz-arribas *et al.*, 1997.
Streptomyces roseiscleroticus	Grabski and Jeffries, 1991.
Streptomyces sp. PC22	สุมาลี อึ้งใจธรรม , 2539

ยีสต์

สายพันธุ์ยีสต์	เอกสารอ้างอิง
Cryptococcus albidus	Morosoli *et al.*, 1992.
Dictyoglomus thermophilum Rt46B.1	Gibbs *et al.*, 1995.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Streptomyces sp. PC22 เป็นจุลินทรีย์ที่แยกได้จากแหล่งดินในประเทศไทย โดย สุมาลี อึ้งใจธรรม (2539) พบว่าสามารถสร้างไซแลเนสได้ดี โดยเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบตามรายงานของ กรรณิการ์ ดวงมาลย์ (2538) ซึ่งมี 1%ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนในภาวะ pH 9.0 สามารถสร้างไซแลเนสได้สูงสุดคือ 5.87 หน่วยต่อมิลลิลิตรของน้ำเลี้ยงเชื้อ และจากการศึกษาองค์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างไซแลเนส (สุมาลี อึ้งใจธรรม, 2539) พบว่าเชื้อนี้สามารถสร้างไซแลเนสได้ 14.68 หน่วยต่อมิลลิลิตร ผลการศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ และสมบัติเบื้องต้นของไซแลเนสที่ผลิตโดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ PC22 เมื่อเปรียบเทียบกับ *Streptomyces* อื่น สามารถสรุปผลได้ดังตารางที่ 1.1

มีรายงานเกี่ยวกับการโคลนยีนไซแลเนสจากจุลินทรีย์ต่างๆหลายชนิด ซึ่งพบว่ายีนที่เป็นรหัสของไซแลเนสมีขนาดแตกต่างกัน ดังมีรายละเอียด ดังต่อไปนี้

Iwasaki และคณะ (1986) ทำการโคลนยีนไซแลเนสจาก *Streptomyces* sp. No. 36a เข้าสู่ *Streptomyces lividans* TK21 โดยใช้พลาสมิดพาหะ pIJ702 จากนั้นทำการโคลนย่อย (subcloning) และพบว่าขนาดของดีเอ็นเอที่เป็นรหัสของไซแลเนสมีความยาวประมาณ 1.04 กิโลเบส ภายหลังจากการโคลนย่อย พบว่าสามารถเพิ่มการผลิตเอนไซม์ได้ถึง 73 เท่า

Mondou และคณะ (1986) ได้ทำการโคลนยีนไซแลเนสของ *Streptomyces lividans* 1326 เข้าสายพันธุ์เดิมที่ผ่านการกลายพันธุ์ทำให้ไม่สามารถผลิตไซแลเนสได้ พบว่าขนาดของไซแลเนสยีนที่รวมเอายีนควบคุมไว้ด้วย มีความยาวประมาณ 2 กิโลเบส และให้ประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้น 60 เท่าของสายพันธุ์กลาย เมื่อมีไซแลนเป็นตัวเหนี่ยวนำ

Ghangas และคณะ (1989) โคลนยีนไซแลเนสจาก *Thermomonospora fusca* เข้าสู่ *E. coli* โดยตัดดีเอ็นเอแบบกึ่งสมบูรณ์ด้วย *Eco*RI ให้มีขนาด 4-14 กิโลเบส เชื่อมชิ้นดีเอ็นเอกับ lambda gtWES คัดเลือกโคลนโดยตรวจสอบการแสดงออกของยีนต้องการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์หลังจากเกิดการย่อยสลายของเจ้าบ้าน พบชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 2.1 กิโลเบส ที่มีการแสดงออกของไซแลเนส หลังจากนั้นทำการโคลนย่อย โดยนำชิ้นยีนเข้าสู่ pBR322 และอนุพันธุ์ของ pBR322 ที่สามารถเพิ่มจำนวนได้ใน *Streptomyces lividans* ซึ่งทำให้สามารถเพิ่มการผลิตไซแลเนสได้สูงขึ้น 10-20 เท่าของเมื่ออยู่ใน *E. coli*

ตารางที่ 1.1 ภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อและสมบัติเบื้องต้นของไซแลเนสที่ผลิตโดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ PC22 เมื่อเปรียบเทียบกับ *Streptomyces* อื่น

สายพันธุ์จุลินทรีย์	แอคติวิตี (หน่วยต่อ มล.)	pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ	อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ	ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (วัน)	pH ที่เหมาะสม	ความเสถียรต่อ pH	อุณหภูมิที่เหมาะสม (^{o}C)	อุณหภูมิที่เสียแอคติวิตีอย่างสมบูรณ์	เอกสารอ้างอิง
Streptomyces sp. สายพันธุ์ PC22	14.68	9.0	45	2	5.5-7.0	4.0 ถึงมากกว่า 9.0	55-70	> 80 ^{o}C 30นาที	สุมาลี อึ้งใจธรรม, 2539
Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4	9.4	7.0	30	4	6.0	4.5-9.0	60-65	> 70 ^{o}C 30นาที	กรรณิการ์ ดวงมาลย์, 2538
Streptomyces sp.	12.0	10.0	15-37	5	7 และ 6.5	-	50	60 ^{o}C, 2 ชม.	Vyas *et al*, 1990
Streptomyces lividans 1326	18.0	7.0	31	2	6.5-7.5	-	55	60 ^{o}C, 10 ชม.	Kluepfel *et al*, 1986

ตารางที่ 1.1 (ต่อ)

สายพันธุ์จุลินทรีย์	แอคติวิตี (หน่วยต่อ มล.)	pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ	อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ	ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (วัน)	pH ที่เหมาะสม	ความเสถียรต่อ pH	อุณหภูมิที่เหมาะสม (°C)	อุณหภูมิที่เสียแอคติวิตีอย่างสมบูรณ์	เอกสารอ้างอิง
Streptomyces sp. สายพันธุ์ KT 23	4.44	7.0	30	2	5.5	4.0-10.0	55	-	Kusakabe *et al*, 1977
Streptomyces sp. No. 3137	80	5.0	30	5	5.0-6.0	4.0-8.0	50-60	-	Nakanishi *et al*, 1976
Streptomyces sp. HM 15	-	7.0	50	2	5.0-7.0	5.7	50-60	60 °C มากกว่า 5 ชม.	Patel and Ray, 1994

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต (2533) ปรับปรุงสายพันธุ์ *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 190-1 ซึ่งผลิตไซแลเนสได้ต่ำประมาณ 0.26 หน่วยต่อมิลลิลิตร โดยวิธีทางพันธุวิศวกรรม โดยการโคลนยีนไซแลเนสจาก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 42-9 เข้าสู่ *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 190-1 โดยใช้ pIJ702 และ pIJ699 เป็นพลาสมิดพาหะ ได้ *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ใหม่ที่สร้างไซแลเนสในปริมาณที่สูงขึ้นถึง 10 เท่า คือ 2-3 หน่วยต่อมิลลิลิตร

Bhalerao และคณะ (1990) โคลนยีนไซแลเนสจาก *Cellulomonas* sp. สายพันธุ์ NCIM 2353 โดยใช้ pUC18 เป็นพลาสมิดพาหะ คัดเลือกโคลนจากการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว โดยตรวจสอบวงใสรอบโคโลนี (clear zone) หลังการย้อมด้วยสี Congo red พบยีนไซแลเนสขนาด 1.42 กิโลเบส หาแผนที่ยีนโดยการทำ restriction map ไซแลเนสที่ผลิตมีน้ำหนักขนาด 45 กิโลดาลตัน และการสร้างไซแลเนสถูกชักนำโดยไซแลน

Vats-Mehta และคณะ (1990) โคลนยีนไซแลเนสจาก *Streptomyces lividans* 66 เข้าสายพันธุ์เดิมซึ่งทำให้เกิดการกลายพันธุ์แล้วไม่สามารถผลิตไซแลเนสได้ โดยใช้พลาสมิดพาหะ pIJ702 พบ 3 โคลน ประกอบด้วยชิ้นดีเอ็นเอขนาด 3.1 กิโลเบส ซึ่งผลิตไซแลเนสขนาด 35 กิโลดาลตัน โดยมี 4 กิโลดาลตัน เป็น signal peptide การผลิตเอนไซม์สามารถผลิตได้ 80% ของโปรตีนทั้งหมด และการสร้างไซแลเนสสามารถถูกยับยั้งได้โดยกลูโคส

Srivastava (1991) ทำการโคลนยีนไซแลเนสจาก *Streptomyces flavogriscus* เข้าสู่ *E. coli* ซึ่งเป็น lysogen ของ lambda cI857 เมื่อชักนำ lambda ให้ย่อยสลายเซลล์เจ้าบ้านด้วยการบ่มที่ 42 องศาเซลเซียส สามารถคัดเลือกโคลนที่มีชิ้นยีนขนาด 0.8 กิโลเบส ที่ผลิตไซแลเนสน้ำหนักโมเลกุล 18 กิโลดาลตัน

Ethier และคณะ (1994) แยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไซแลเนสได้ ที่อุณหภูมิสูงและในช่วงค่าความเป็นกรดด่างที่แตกต่างกันได้ *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ FC 7 ซึ่งผลิตไซแลเนสได้ จากนั้นทำการโคลนยีนไซแลเนสโดยใช้ shuttle vector Pfd666 โดยนำเข้าสู่ *Streptomyces lividans* ที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์จนไม่สามารถสร้างไซแลเนสได้ พบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีไซแลเนสยีน 2 ชนิดคือ pJF1 และ pJF6 ไซแลเนสที่ได้จากพลาสมิดทั้ง 2 จัดอยู่ในกลุ่มไซแลเนสชนิดที่มีค่า isoelectric point ต่ำ

Mannarelli และคณะ (1990) ทำการโคลนไซแลเนสยีนจาก *Butyrivibrio fibrisolvens* สายพันธุ์ 49 เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ JM83 โดยใช้ pUC19 เป็นพลาสมิดพาหะ ยีนไซแลเนสที่ได้มีขนาด 2.3 กิโลเบส เมื่อตัดด้วย *Eco*RI ได้ดีเอ็นเอ 2 ชิ้นขนาด 1.65 และ 0.65 กิโลเบส การแสดงออกของไซแลเนสต้องอาศัยชิ้นดีเอ็นเอทั้ง 2 ชิ้น ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ไม่มีการแสดงออกของ arabinosidase, cellulase, α-glucosidase หรือ xylosidase ไซแลเนสที่ได้มีค่า isoelectric point เท่ากับ 9.8 ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมเท่ากับ 5.4 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 411 ตัว และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 96 กิโลดาลตัน

Lin และ Thomson (1991) ศึกษาการโคลนไซแลเนสยีนจาก *Butyrivibrio fibrisolvens* สายพันธุ์ H17c โดยใช้ shuttle vector pEB1 เป็นพาหะเข้าสู่ *E. coli* ได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิด ซึ่งเรียก pLS206 ประกอบด้วยชิ้นดีเอ็นเอขนาด 3 กิโลเบส ที่มี open-reading frame ขนาด 1905 เบส สร้างกรดอะมิโน 635 ตัว ที่มีการแสดงออกของแอคติวิตีของไซแลเนส ไซแลเนสที่สร้างขึ้นนี้พบว่าอยู่ในส่วนไซโทปลาซึมของ *E. coli* ค่าความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมในทำงานคือ 5.4-6.0 และ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ไซแลเนสที่ได้มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับ cellobiohydrolase/endoglucanase ของ *Caldocellum saccharolyticum* และจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่นๆ เช่น *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C-125, *B. fibrisolvens* สายพันธุ์ 49 และ *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa*

Lee (1993) โคลนยีนไซแลเนสจาก *Neocallimastix patriciarum* สายพันธุ์ 27 เข้าสู่ *E. coli* โดยใช้ bacteriophage vector λgt WESλB เป็นพาหะ และทำการโคลนย่อยชิ้นดีเอ็นเอที่โคลนได้ โดยใช้ pUC18 และ pUC19 เป็นพลาสมิดพาหะ พบการแสดงออกของไซแลเนสทั้งสองทิศทางแสดงว่ายีนที่โคลนได้มีโพรโมเตอร์ของตัวเอง ไซแลเนสที่ได้สะสมอยู่ที่ periplasmid space ค่าความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 6.2 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ มีค่า Km สำหรับไซแลน เท่ากับ 0.89 มิลลิกรัม/มล.

Lee และคณะ (1993) ศึกษายีนการโคลนไซแลเนสจาก *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* สายพันธุ์ B6A-RI โดยใช้ cosmid vector pHC79 เป็นพาหะเข้าสู่ *.E. coli* พบยีนไซแลเนสมี open reading frame 3 กิโลเบส ซึ่งถอดรหัสการสร้างกรดอะมิโน 1,157 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุล 130 กิโลดาลตัน และมีส่วนที่เป็น signal peptide 33 กรดอะมิโน อุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 70 องศาเซลเซียส และ 5.5 ตามลำดับ ไซแลเนสที่สร้างขึ้นมีความเสถียรต่ออุณหภูมิถึง 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

Baba และคณะ (1994) แยก *Bacillus stearothermophilus* สายพันธุ์ 21 จากดิน ที่สามารถผลิตไซแลเนสและบีตาไซโลซิเดสได้ โดยใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียวในการเจริญเติบโต จากนั้นทำการโคลนไซแลเนสยีน โดยใช้ pUC19 เป็นพลาสมิดพาหะเข้าสู่ *E. coli* พบชิ้นดีเอ็นเอขนาด 4.2 กิโลเบส สามารถถอดรหัสให้ไซแลเนสและบีตาไซโลซิเดส เมื่อวิเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอพบว่าขนาดของยีนที่ถอดรหัสให้เอนไซม์ทั้งสองชนิดมีขนาด 3.4 กิโลเบส โดยส่วนของบีตาไซโลซิเดสยีน (xylA), โปรโมเตอร์และ Shine-Dalgarno Sequence จะอยู่ที่ตำแหน่ง upstream ของไซแลเนสยีนทางปลาย 3' ไซแลเนสและบีตาไซโลซิเดสมีน้ำหนักโมเลกุล 40 และ 75 กิโลดาลตัน ตามลำดับ

Li และ Ljungdahl (1994) โคลนยีนไซแลเนสจาก *Aureobasidium pullulans* สายพันธุ์ Y-2311-1 โดยการติดตาม cDNA ที่สร้างจาก RNA ของ *A. pullulans* และเชื่อมอยู่กับ λZAPII ด้วยการไฮบริไดซ์เข้ากับดีเอ็นเอขนาด 83 เบส ติดฉลากด้วย biotin พบว่า cDNA ของไซแลเนสยีนมีขนาด 895 เบส ถอดรหัสให้กรดอะมิโน 221 เรซิดิวส์ มีน้ำหนักโมเลกุล 23 กิโลดาลตัน และประกอบด้วย signal peptide 34 กรดอะมิโน ไซแลเนสยีนที่ได้เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ พบว่ามีส่วนที่คล้ายกันมาก สารที่ชักนำการสร้างไซแลเนสคือ ดี-ไซโลส (D-xylose) และไซแลน (xylan) ส่วนสารที่ยับยั้งคือ กลูโคส

Gibbs และคณะ (1995) โคลนยีนไซแลเนสจาก *Dictyglomus* thermophilum สายพันธุ์ Rt46B-1 เข้าสู่ *E. coli* โดยใช้ phage vector λZapII เป็นพาหะ คัดเลือกพลาค (plaque) ที่มีการ แสดงออกของไซแลเนส ได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดชื่อ B6-97 ที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 5.3 กิโลเบส หลังทำการโคลนย่อยแล้ว การศึกษาลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1,507 เบส ที่ได้หลังตัดด้วย *Pst*I และ *Hind*III พบว่าลำดับเบสนั้นเป็นส่วนของยีนไซแลเนสที่มีกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบ 352 รีซิดิวซ์ เอนไซม์นี้สามารถทำงานได้สูงที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.5 และอุณหภูมิสูงถึง 85 องศาเซลเซียส สามารถทนต่อค่าความเป็นกรดด่างที่กว้างคือ 5.5 และ 9.5 ได้มากกว่า 50% และเป็น endoxylanase

Tabernero และคณะ (1995) ทำการโคลนไซแลเนสยีนจากแบคทีเรียทนด่าง *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N137 เข้าสู่ *E. coli* พบชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1.6 กิโลเบส ที่มี open-reading frame ขนาด 993 เบส ที่ถอดรหัสให้ไซแลเนสที่มีน้ำหนักโมเลกุล 39 กิโลดาลตัน แต่โปรตีนที่ได้ขาด signal peptide ซึ่งแตกต่างกับโปรตีนของ *Bacillus* sp. และไซแลเนสนี้ส่วนใหญ่จะสะสมอยู่ใน periplasmic space ของ *E. coli* สามารถผลิตไซแลเนสได้ปริมาณมากที่ค่าความเป็นกรดด่าง 8.0 และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นอกจากนี้เอนไซม์ดังกล่าวมีความเสถียรต่อค่าความเป็นกรดด่างในช่วง 6-11 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เอนไซม์จะลดลงไป 45%

Dwivedi และคณะ (1996) โคลนยีนไซแลเนสจาก Thermophilic Bacterium Rt8B.4 genus *Caldicellulosiruptor* โดยใช้ phagemid λZapII เป็นพาหะเข้าสู่ *E. coli* คัดเลือกโคลนโดยการย้อมวงใสของพลาค (plauqe) ด้วยสี Congo red บน oat spelt xylan ได้รีคอมบิแนนท์พลามิด คือ pNZ2011 มีขีนดีเอ็นเอขนาด 6.7 กิโลเบส สร้างไซแลเนสชนิด multidomain protein ขนาด 36 กิโลดาลตัน มีความเสถียรต่ออุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่างที่ 7.0 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

Kubata และคณะ (1997) โคลนไซแลเนส I (xynA) ของ *Aeromonas, caviae* สายพันธุ์ ME-1 เข้าสู่ *E. coli* โดยใช้ pBR322 เป็นพลาสมิดพาหะ พบไซแลเนสยีนที่มี open-reading frame 633 เบส ที่ถอดรหัสให้กรดอะมิโน 211 ตัว และประกอบด้วย signal peptide 28 ตัว โคลนที่ได้ผลิตไซแลเนส 0.7 หน่วย/มล. โดยเป็น 80% ของโปรตีนทั้งหมดที่ปลดปล่อยออกมาในน้ำเลี้ยงเชื้อ

Jeong และคณะ (1998) โคลนยีนไซแลเนสจาก *Bacillus* sp เข้าสู่ *E. coli* โดยใช้ pUC19 เป็นพลาสมิดพาหะ พบยีนไซแลเนสมีขนาด 639 เบส ซึ่งถอดรหัสให้กรดอะมิโน 213 ตัว โดยมีความคล้ายกับกรดอะมิโนของไซแลเนสอื่นถึง 96% เมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนที่ปลาย N พบว่ามีลำดับของกรดอะมิโนเป็น Ala-Gly-Thr-Asp-Tyr-Trp-Gln-Asn-Trp-Thr-Asp-Gly-Gly-Gly-Thr ไซแลเนสที่ผลิตได้มีน้ำหนักโมเลกุล 20 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นขนาดที่เท่ากับไซแลเนสที่ผลิตได้จาก *Bacillus* sp. ทั่วไป

สุมาลี อึ้งใจธรรม (2539) รายงานการคัดเลือกเชื้อและศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสร้างไซแลเนส พบว่า *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ PC22 สามารถสร้างไซแลเนสอยู่ในเกณฑ์ที่สูงคือ 14.68 หน่วย/มล. และมีสมบัติอยู่ในเกณฑ์ดี โดยมีความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างในช่วงกว้างตั้งแต่ 4.0 ถึง 9.0 และมีความเสถียรต่ออุณหภูมิถึง 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จึงเป็นเอนไซม์ที่มีศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรม จากความสำคัญของเอนไซม์ไซแลเนส และรายงานความสำเร็จในการโคลนยีนไซแลเนสจากจุลินทรีย์ต่างๆ ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว ในงานวิจัยนี้จึงทำการโคลนยีนไซแลเนสจาก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ PC22 โดยวิธีการโคลนยีนนั้นจะใช้ทั้ง *E. coli* และ *Streptomyces* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน ทั้งนี้เนื่องจาก *E. coli* เจริญเร็วกว่า *Streptomyces* มาก ระยะเวลาที่ใช้ในการศึกษาจึงสั้นกว่า แต่ประสิทธิภาพของ *E. coli* ในการปลดปล่อยเอนไซม์ออกมาภายนอกเซลล์ต่ำกว่า *Streptomyces* ซึ่งอาจทำให้การตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ต่ำหรือการแสดงออกของยีนจาก *Streptomyces* ใน *E. coli* ไม่ดีนัก ดังนั้นเพื่อให้การโคลนยีนนี้ประสบความสำเร็จในระยะเวลาที่จำกัด จึงใช้เซลล์เจ้าบ้านทั้ง 2 ระบบควบคู่กันไป นอกจากนี้จะศึกษาลักษณะและการแสดงออกของยีนไซแลเนสที่ได้ เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการนำเอนไซม์นี้ไปใช้ประโยชน์ต่อไป