หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 1

# บทนำ

## 1. ประวัติความเป็นมา

เศษวัสดุพืชที่เหลือทิ้งทางการเกษตร มีองค์ประกอบอินทรีย์คาร์บอนใหญ่ ๆ 3 อย่างคือ

1) เซลลูโลส เป็นโพลีเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส ที่เชื่อมกันด้วยพันธะบีต้า-1, 4-ไกลโคสิดิค (β-1,4-glycosidic) มีประมาณ 30-50% ของน้ำหนักแห้ง

2) เฮมิเซลลูโลส เป็นสารพวกเพนโตแซน (pentosan) ซึ่งมีองค์ประกอบหลักคือไซแลน (xylan) ในเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรจะมีเฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบประมาณ 20-40% ของน้ำหนักแห้ง

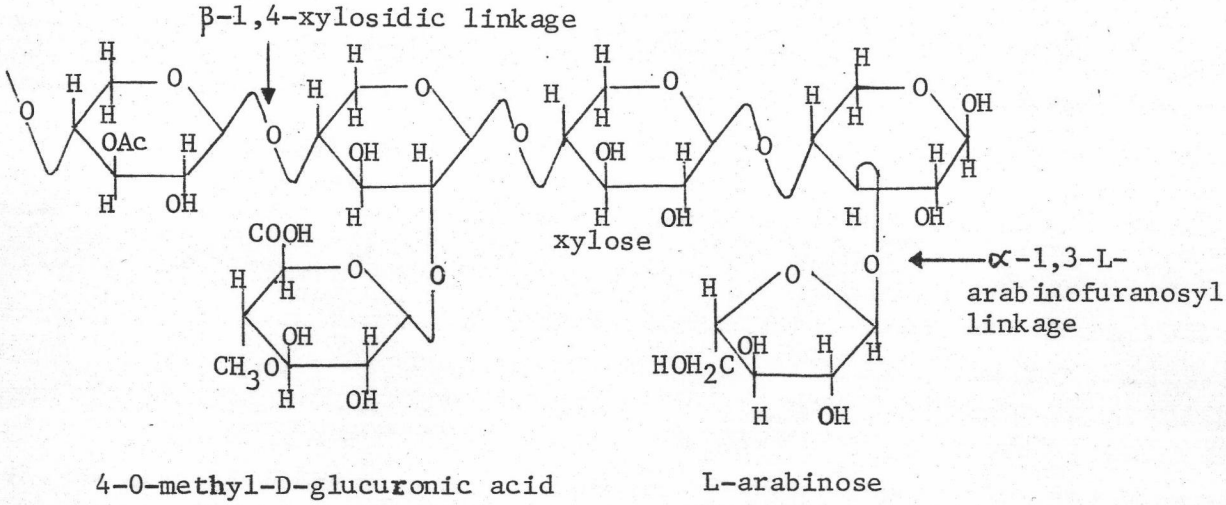
3) ลิกนิน เป็นโพลีเมอร์ของโพลีอะโรมาติค (polyaromatic) ที่ซับซ้อน (1,2)

ไซแลนพบทั่วไปในผนังเซลพืชในธรรมชาติ เช่น ไม้เนื้อแข็ง ไม้เนื้ออ่อน ซังข้าวโพด รำข้าว ฟางข้าว เปลือกเมล็ดฝ้ายและธัญพืชต่าง ๆ เป็นต้น (3,4,5) ปริมาณไซแลนจะแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด ไม้เนื้อแข็งจะมีประมาณ 20-30% ของน้ำหนักแห้ง ไม้เนื้ออ่อนจะมีประมาณ 8% ของน้ำหนักแห้ง ในพืชล้มลุกโดยเฉพาะวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรจะมีไซแลนอยู่มากถึง 15-30% (1)

## 2. ลักษณะโครงสร้างของไซแลน

โครงสร้างหลักของไซแลนเป็นโพลีเมอร์ของน้ำตาลไซโลส ซึ่งเชื่อมกันด้วยพันธะบีต้า-1,4-ไซโลสิดิค (β-1,4-xylosidic) อาจเป็นสายโซ่ตรงที่มีเฉพาะไซโลสหลายโมเลกุล หรือมีสาขาที่เป็นโพลีแซคคาไรด์ชนิดอื่น ๆ ปนอยู่ด้วย เช่น แอล-อราบิโนฟูราโนส (L-arabinofuranose) จะเชื่อมกับส่วนของดี-ไซโลส (D-xylose) ที่ตำแหน่ง 0-3 และดี-กลูคูโรนิค แอซิด (D-glucuronic acid) หรือ 4-O-เมทิล-กลูคูโรนิค แอซิด

ซึ่งจะเชื่อมกับไซโลสที่ตำแหน่ง 0-2 ไซแลนของพืชต่างชนิดกันมีโครงสร้างหลักเหมือนกัน จะแตกต่างกันก็เฉพาะชนิด จำนวน และตำแหน่งของหน่วยข้างเคียง (side chain unit) (6) เช่น ไซแลนของไม้เนื้อแข็งและเปลือกเมล็ดฝ้ายจะประกอบด้วยไซโลสอย่างเดียวเท่านั้น (7) สูตรทางเคมีของไซโลสคือ $C_5H_{10}O_5$ สำหรับไซแลนมีสูตรโครงสร้างดังนี้ (6)




หมายเหตุ : Ac คือหมู่อะซีทิล (Acetyl group)

3. ประโยชน์ของไซแลน

การที่จะนำเอาไซแลนไปใช้ประโยชน์นั้น ทำได้โดยการย่อยสลายไซแลนให้เป็นน้ำตาลไซโลสก่อนแล้วจึงเอาน้ำตาลไซโลสที่ได้ไปใช้ผลิตเป็นสารที่มีประโยชน์อื่น ๆ ต่อไป (3,4,6) ได้แก่

1) โปรตีนเซลเดี่ยว (Single cell protein)
2) เอทธานอล บิวทานอล
3) สารที่ให้พลังงานทางเคมี (Chemical fuels)
4) กรดอะซิติก
5) เป็นตัวชักนำการผลิตเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส

4. การย่อยสลายไซแลน

การย่อยสลายไซแลนเป็นโมโนแซคคาไรด์นั้น ทำได้โดย การย่อยสลายด้วยกรด (Acid hydrolysis) การย่อยสลายด้วยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ (Enzyme hydrolysis) หรือการใช้ร่วมกันทั้ง 2 วิธี (8)

4.1 การย่อยสลายไซแลนด้วยกรด

การย่อยสลายไซแลนด้วยกรด ต้องใช้อุณหภูมิสูง คือประมาณ 190-240 องศาเซลเซียส กรดที่นิยมใช้ในการย่อยสลายคือ กรดซัลฟูริค ($H_2SO_4$) ปฏิกิริยาการย่อยสลายจะเกิดได้เร็วแต่เป็นปฏิกิริยาที่รุนแรง แม้จะใช้เวลาสั้น และจะมีผลิตภัณฑ์ข้างเคียง (by product) ที่เป็นสารประกอบที่เป็นพิษต่อการเลี้ยงเชื้อเกิดขึ้น เช่น เฟอฟูรัล (furfural) (4,9)

4.2 การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์จากจุลินทรีย์

การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ เป็นปฏิกิริยาที่จำเพาะไม่มีสารพิษเกิดขึ้น และได้น้ำตาลไซโลสปริมาณสูงกว่าการย่อยสลายด้วยกรด เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายคือ ไซแลนเนส เอนไซม์นี้แบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด ตามลักษณะการย่อยสลายไซแลนคือ

4.2.1 เอนโด-ไซแลนเนส (endo-xylanase) หรือ 1,4-บีต้า-ดี-ไซแลน-ไซลาโนไฮโดรเลส (1,4-β-D-xylan xylanohydrolase, EC. 3.2.1.8) จะย่อยสลายพันธะ 1,4-บีต้า-ดี-ไซโลไพราโนสของไซแลนตามลำดับแบบสุ่ม เรียกกระบวนการนี้ว่า endo-mechanism ได้ไซโลสและไซโลโอลิโกแซคคาไรด์เป็นผลลัพท์สุดท้ายของการย่อยสลาย

4.2.2 บีต้า-ไซโลสิเดส (β-xylosidase) หรือ 1,4-บีต้า-ดี-ไซแลน-ไซโลไฮโดรเลส (1,4-β-D-xylan xylohydrolase, EC.3.2.1.37) ซึ่งย่อยสลายพันธะ 1,4-บีต้า-ดี-ไซโลไพราโนส ตามลำดับทีละ 1 หน่วยจากปลายสาย เรียกกระบวนการ exo-mechanism ได้ไซโลสเป็นผลลัพท์สุดท้ายของการย่อยสลายจากปฏิกิริยา เรียกว่า เอกโซ-ไซแลนเนส ( exo-xylanase) (10,11)

นอกจากนี้ เอนโด-ไซแลนเนสยังแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ตามความสามารถในการย่อยสลายพันธะ แอล-อราบิโนฟูราโนซิล (L-arabinofuranosyl) ซึ่งเป็นพันธะสาขาของอราบิโนไซแลน (arabinoxylan) และอราบิโนกลูคูโรโนไซแลน (arabinoglucuronoxylan) คือ

4.2.1.1 พวกที่สามารถย่อยสลายพันธะที่เป็นสาขาแล้วได้แอล-อราบิโนส (L-arabinose) เรียกว่า ไซแลนเนสที่ปลดปล่อยอราบิโนส (arabinose-liberating-xylanase) เช่น เอนโด-ไซแลนเนสของ Bacillus subtilis

4.2.1.2 พวกที่ย่อยสลายอราบิโนไซแลน แล้วไม่ได้แอล-อราบิโนส เรียกว่า ไซแลนเนสที่ไม่ปลดปล่อยอราบิโนส (non-arabinose-liberating-xylanase) เช่น เอนโด-ไซแลนเนสของ Streptomyces xylophagus (10)

การย่อยสลายไซแลนโดยเอนไซม์ไซแลนเนสจากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ มีลักษณะการย่อยดังนี้

Kusakabe และคณะ (7) รายงานว่า ขั้นตอนการย่อยสลายไซแลนโดยเอนไซม์ไซแลนเนสจากสเตรพโตมัยซีสเป็นแบบเอนโด-ไซแลนเนส มีขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงดังนี้ ไซแลนถูกย่อยสลายให้ไซโลไทรโอส (xylotriose) ไซโลเททราเอส (xylotetraose) ไซโลไบโอส (xylobiose) ไซโลเพนทาโอส (xylopentaose) และไซโลเฮกโซส (xylohexose) ในปริมาณที่น้อยลงตามลำดับ จากนั้นทั้งหมดจะถูกย่อยต่อเป็นไซโลไบโอส ไซโลไทรโอสและไซโลสซึ่งไซโลไทรโอสที่เหลือจะถูกย่อยต่ออีกจนกระทั่งได้ไซโลไบโอสในปริมาณเท่ากับไซโลส และขั้นตอนสุดท้ายจะได้ไซโลสในปริมาณมากกว่าไซโลไบโอส

Stuttgen และ Sahm (12) พบว่า ในระยะแรกของการย่อยสลายไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตด้วยไซแลนเนสจากเชื้อรา Trichosporon cutaneum จะได้ไซโลไบโอส ไซโลไทรโอส ไซโลเททราโอสและไซโลไอลิโกแซคคาไรด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่านี้ แต่เมื่อใช้เวลาบ่มนานขึ้นถึง 4 ชั่วโมง ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ของการย่อยสลายจะเป็น

ไซโลส ไซโลไบโอส และไซโลไทรโอส แสดงว่าเอนไซม์ของเชื้อนี้เป็นเอนไซม์ที่ย่อยภายในสายสับสเตรท (endo-spliting enzyme) และไม่พบอราบิโนสที่เกิดจากการย่อยสลายเอนไซม์ของเชื้อนี้จึงจัดเป็นพวกเอนไซม์ไซแลนเนสที่ย่อยภายในสายสับสเตรท แต่ไม่ปลดปล่อยอราบิโนสออกมา (non-arabinose-liberating-xylanase) เพราะไม่สามารถสลายพันธะ แอลฟา-1,3-แอล-อราบิโนฟูราโนซิล ($\alpha$-1,3-L-arabinofuranosyl) ที่ตำแหน่งสาขาของอราบิโนไซแลน

Nakajima และคณะ (13) รายงานว่า การย่อยสลายอราบิโนไซแลนของเอนไซม์ไซแลนเนสจาก Streptomyces sp. KT-23 ในระยะแรกจะได้ไซโลไบโอส ไซโลไทรโอสและไซโลเททราโอส โดยไม่มีการสะสมของสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่านี้ หลังจากบ่มต่อ 24 ชั่วโมง จะพบไซโลไบโอสและไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย แสดงว่าไซแลนเนสของเชื้อนี้มีแบบของปฏิกิริยาเป็นแบบการย่อยสลายภายใน (endo-type) และเนื่องจากไม่มีอราบิโนสที่เกิดจากการย่อยสลายไซแลน แสดงว่าเอนไซม์ของเชื้อนี้จัดอยู่ในกลุ่มไซแลนเนสที่ไม่ปลดปล่อยอราบิโนส ตามการจำแนกของ Dekker และ Richards (10)

จากรายงานหลายฉบับ (4,6,7,14) กล่าวว่า จุลินทรีย์ที่ผลิตไซแลนเนสได้สามารถผลิตเอนไซม์ บีต้า-ไซโลสิเดสได้ แต่สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ทั้งสองชนิดจะแตกต่างกันและเอนไซม์ไซแลนเนสของจุลินทรีย์ส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ที่ปล่อยออกมานอกเซล (extra-cellular enzyme) ในขณะที่ บีต้า-ไซโลสิเดสเป็นเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซล (intra-cellular enzyme) มักพบในไซโตซอลของเซลในรูปสารละลายในจุลินทรีย์พวกนี้ ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์จะต้องผ่านเข้าเซลก่อนเกิดการย่อยสลาย

5. <u>แหล่งของเอนไซม์ไซแลนเนส</u>

เอนไซม์ไซแลนเนสนี้ พบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด (10) ได้แก่

1) รา
2) แบคทีเรีย
3) แอคติโนมัยซีทีส
4) โปรโตซัว
5) แมลง

6) หอยทาก

7) ครัสเตเชียน

8) พืช เช่น สาหร่ายทะเล เมล็ดของพืชกำลังงอก

สำหรับชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไซแลนเนสได้ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1

6. การสร้างและปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการสร้างเอนไซม์ไซแลนเนสของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

จากการศึกษาพบว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสออกมานอกเซล (13) แต่ก็มีจุลินทรีย์บางชนิดที่ผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสแล้วไม่ปล่อยออกมานอกเซล อาทิเช่น แบคทีเรียในลำไส้ โปรโตซัว Sporocytophaga myxococcoides และ Aspergillus niger เป็นต้น (10) การผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสของจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะเริ่มผลิตในระยะหลังของการเจริญ (late growth phase) ตัวอย่างเช่น Streptomyces sp. no.3137 (34) Aspergillus niger (15) แต่ก็มีจุลินทรีย์บางชนิดที่ผลิตเอนไซม์ไปพร้อมกับการเจริญ เช่น Trichosporon cutaneum (12) Streptomyces sp. KT-23 (13) และ Cellulomonas uda (11)

6.1 การชักนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ไซแลนเนสโดยสารชักนำที่เป็นแหล่งคาร์บอน

มีรายงานหลายฉบับ กล่าวว่า ไซแลนเนสจะถูกชักนำให้เกิดการสร้างโดยสารที่เป็นแหล่งคาร์บอน ดังเช่น

Stuttgen และ Sahm (12) รายงานว่า ไซแลนเนสของราจะพบเฉพาะเมื่อเชื้อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซแลนหรืออนุพันธ์ของไซแลนเท่านั้น Trichosporon cutaneum จะผลิตเอนไซม์นี้เมื่อเจริญในที่มีไซแลนหรือไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน แต่จะไม่พบการผลิตเอนไซม์นี้เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส หรือเซลโลไบโอส เอนไซม์ไซแลนเนสของเชื้อนี้ถูกชักนำให้เกิดการสร้างโดยไซแลนและอนุพันธ์ที่เกิดจากการย่อยสลายของไซแลน

นอกจากนั้นยังมีรายงานว่า Stereum sanguinolentum และ Chrysosporium lignorum สร้างไซแลนเนสได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเซลลูโลสแต่ไม่มีไซแลน แต่แอคติวิตีของไซแลนเนสที่สร้างขึ้นนี้ อาจเนื่องจากปฏิกิริยาของเอนไซม์เซลลูเลส

ตารางที่ 1 แสดงชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสได้

| สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ | เอกสารอ้างอิง |
|---|---|
| Aspergillus niger | (15) |
| Aspergillus awamori | (4) |
| Aspergillus foetidus | (4) |
| Aspergillus nidulans | (4) |
| Aspergillus fhoenicis | (4) |
| Aspergillus fumigatus | (1) |
| Aureobasidium pullulans | (16) |
| Bacillus pumilus | (8) |
| Bacillus subtilis | (17) |
| Bacillus sp. No.C-125 | (18) |
| Botrytis cinerea | (4) |
| Clostridium thermocellum | (2) |
| Clostridium acetobutyricum | (19) |
| Chainia (NCL 82-5-1) | (9) |
| Chaetomium trilaterale | (4) |
| Cellulomonas uda | (11) |
| Cryptococcus flavus | (20) |
| Fusarium avenaceum | (4) |
| Fusarium culmarum | (4) |
| Fusarium oxysporum | (4) |
| Fusarium roseum | (21) |
| Gliocladium virens | (22) |
| Humicola lanuginosa | (23) |

ตารางที่ 1 (ต่อ)

| สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ | เอกสารอ้างอิง |
|---|---|
| Myrothecium roridum | (4) |
| Neurospora crassa | (24) |
| Paecilomyces sp. | (4) |
| Penicillium funiculosum | (25) |
| Sporotrichum thermophile | (26) |
| Schizophyllum commune | (27) |
| Saccharomonospora viridis | (28) |
| Streptomyces xylophagus | (29) |
| Streptomyces exfoliatus $MC_1$ | (30) |
| Streptomyces lividans | (31) |
| Streptomyces fradiae SCF-5 | (32) |
| Streptomyces flavogriseus | (33) |
| Streptomyces albogriseolus | (34) |
| Streptomyces vridochromogenes | (34) |
| Streptomyces olivochromogenes | (34) |
| Streptomyces mitakaensis | (34) |
| Streptomyces sp. No.3137 | (34) |
| Streptomyces sp. KT-23 | (13) |
| Thermomonospora sp. | (28) |
| Trichoderma reesei | (35) |
| Trichosporon cutaneum | (12) |
| Termitomyces clypeatus | (36) |

ที่มีต่อสับสเตรทหลายชนิด เป็นแอคติวิตี้ที่คล้ายคลึงกับไซแลนเนส (pseudo-xylanase activity) และ พบว่า เซลลูเลสนี้สามารถย่อยสลายไซแลนได้ เมื่อมีความบริสุทธิ์สูง ๆ เช่น เซลลูเลส F-2 จากเชื้อ Trichoderma viride และยังพบว่า เส้นใยของ Stereum sanguinolentum ประกอบด้วยไซแลน ดังนั้นการสร้างเอนไซม์ไซแลนเนสของเชื้อนี้ในที่มีเซลลูโลสอาจเกิดจากการชักนำเนื่องจากตัวเชื้อเอง (self-induced) โดยที่ไซแลนเนสถูกชักนำให้สร้างขึ้นโดยการสลายตัวของสารที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลเก่าของเชื้อ ซึ่งนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงาน การค้นพบนี้ แสดงให้เห็นว่า เอนไซม์ไซแลนเนสอาจเป็นเอนไซม์ที่สร้างขึ้นเนื่องจากการถูกชักนำ (inducible enzyme) (10)

Nakajima และคณะ (13) พบว่า Streptomyces sp. KT-23 จะสร้างไซแลนเนสได้มากที่สุด เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอราบิโนไซแลนจากฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน

Nakanishi และคณะ (37) รายงานว่า การสร้างเอนไซม์ไซแลนเนสของ Streptomyces สายพันธุ์ 3137 จะถูกชักนำโดยไซแลนและวัตถุดิบอื่นที่เกี่ยวข้องกับไซแลนเชื้อนี้จะไม่สร้างไซแลนเนสเมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน แต่ถ้าเติมไซแลนลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส จะสามารถกระตุ้นการผลิตไซแลนเนสได้ ขึ้นกับความเข้มข้นของไซแลนในอาหารเลี้ยงเชื้อ และในกรณีของเส้นใยที่ถูกชักนำการสร้างไซแลนเนส โดยการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซแลน เมื่อนำเส้นใยมาเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสหรือไซโลสจะสามารถเพิ่มผลผลิตของไซแลนเนสได้ในกรณีที่ไม่มีไซแลน และการเติมน้ำตาลกลูโคสและไซโลสร่วมกับไซแลน จะใช้ไซแลนเพียง 50% เท่านั้น ในการให้ผลผลิตของเอนไซม์ในปริมาณเท่าเดิม ตัวชักนำที่ดีที่สุดในการผลิตไซแลนเนสของ Streptomyces สายพันธุ์ 3137 นี้คือ ไซแลน ไซโลไบโอส บิวทีริล เอสเทอร์ (butyryl ester) และเมทิล-บีต้า-ดี-ไซโลไซด์ (methyl-β-D-xyloside)

Linko และคณะ (4) รายงานว่า จุลินทรีย์บางชนิด เช่น Streptomyces Chaetomium ต้องการไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนและชักนำการผลิตไซแลนเนส ขณะที่จุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ อาจไม่จำเป็น และไซแลนอาจไม่ใช่แหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด เช่น บางสายพันธุ์ของ

Trichoderma reesei สร้างไซแลนเนสได้มากในที่มีเซลลูโลส กลูโคสและแลคโตส แต่ Aspergillus awamori ไม่สามารถใช้สารเหล่านี้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตไซแลนเนสได้

Kawaminami และ Iizuka (29) รายงานว่า การผลิตไซแลนเนสของ Streptomyces xylophagus จะผลิตได้เฉพาะเมื่อมีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนเท่านั้น ไม่สามารถใช้ อราบิโนส ไรโบส ไซโลส ฟรักโทส กาแลคโตส กลูโคส เซลโลไบโอส แลคโตส มอลโตส ซูโครส และเดกซ์แทรน เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์นี้

นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่าจุลินทรีย์บางชนิดสามารถใช้สารที่จุลินทรีย์ไม่สามารถเมตาบอไลซ์ได้เป็นสารชักนำการสร้างเอนไซม์ไซแลนเนสได้ เช่น Streptomyces สายพันธุ์ 3137 (38) สามารถใช้สารพวก บีต้า-ไซโลไซด์ เช่น เมทิล- ไอโซโปรปิล- บิวทิล- และเอทธิลีนไซยาโนไฮดริน-บีต้า-ดี-ไซโลไซด์ (ethylene-cyanohydrin-β-D-xylosides) เป็นสารชักนำการสร้างไซแลนเนสได้ดีพอ ๆ กับไซแลน และสารที่เป็นอนุพันธ์ของไซแลน อัตราการสร้างไซแลนเนสขึ้นกับความเข้มข้นของบีต้า-ไซโลไซด์ที่เติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่พบว่าสารพวก แอลฟา-ไซโลไซด์ บางชนิด เช่น เมทิล- เอทธิล- และไอโซโปรปิล-แอลฟา-ดี-ไซโลไซด์ จะกดดันการสร้างไซแลนเนส และ Yasui และคณะ (39) ได้ทดลองใช้สารที่เป็นอนุพันธ์ของไซเลส ไซโลไบโอสและไซแลนในการชักนำการสร้างไซแลนเนสของ Cryptococcus flavus พบว่า บีต้า-เมทิล-ไซโลไซด์ เป็นตัวชักนำที่ดีที่สุด จากการเติม บีต้า-เมทิล-ไซโลไซด์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน จะเพิ่มแอคติวิตีของไซแลนเนสได้ประมาณ 15-20 เท่า จากที่ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซแลนหรือไซโลสเป็นตัวชักนำ

มีรายงานหลายฉบับ พบว่าสามารถนำวัตถุดิบต่าง ๆ ในธรรมชาติมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตไซแลนเนสได้ดังนี้

Gokhale และคณะ (40) รายงานว่า Aspergillus niger NCIM 1207 สามารถผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส คือ ไซแลนเนสและบีต้า-ไซโลสิเดส ได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีรำข้าวสาลี 4% เป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเปรียบเทียบกับอาหาร

เลี้ยงเชื้อที่มีไซแลนความเข้มข้น 3% เป็นแหล่งคาร์บอน รำข้าวจะให้ผลผลิตของเอนไซม์มากกว่า นอกจากนี้รำข้าวยังใช้ได้ดีกับการผลิตไซแลนเนสของ Bacillus หลายสายพันธุ์ (41) และ Streptomyces fradiae SCF-5 ซึ่งมีรายงานว่าสามารถใช้สับสเตรทจากธรรมชาติ เช่น ฟางข้าวและรำข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตไซแลนเนสได้ และพบว่ารำข้าวที่ถูกย่อยสลายแล้วบางส่วนจะใช้ได้ดีกว่าสับสเตรทที่ยังไม่ผ่านการย่อยสลาย (32) นอกจากรำข้าวแล้วยังมีสับสเตรทในธรรมชาติบางชนิดที่สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้เช่นกัน เช่น ชานอ้อย ซึ่งมีรายงานว่า Trichoderma reesei สามารถผลิตไซแลนเนสได้เมื่อใช้ชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน (35)

## 6.2 สารที่เป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตไซแลนเนส

สารแหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนโดยมากเป็นสารอินทรีย์คือ สารสกัดจากยีสต์ เนื่องจากสารอินทรีย์มีปัจจัยสำหรับการเจริญ (growth factor) และยังเป็นแหล่งวิตามินซึ่งจุลินทรีย์ต้องการสารเหล่านี้ในการเจริญ นอกจากนี้ยังมีสารอินทรีย์ชนิดอื่นที่นิยมใช้รวมกับสารสกัดจากยีสต์ เช่น เปปโตน (37) คอร์นสตีพลิเคอร์ ( Corn steep liquor) (37) โพลีเปปโตน (22) สารสกัดจากมอลท์ (30) และโปรติโอส เปปโตน (31) เป็นต้น แต่ก็มีจุลินทรีย์บางชนิดที่สามารถใช้สารอนินทรีย์ เช่น โซเดียมไนเตรท โซเดียมกลูตาเมท แอมโมเนียมซัลเฟตและยูเรีย (8,28,29,37,42) เป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตเอนไซม์นี้ได้

## 6.3 ผลของเกลือแร่ต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

Kawaminami และ Iizuka (29) พบว่า เกลือแร่บางชนิดมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสโดย Streptomyces xylophagus ดังนี้ $Mg^{2+}$ มีผลต่อการเพิ่มผลผลิตของไซแลนเนสเล็กน้อย แต่ $Ca^{2+}$ มีผลในการยับยั้งการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส ในขณะที่มีเกลือแร่บางชนิดไม่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส เช่น $Ba^{2+}$, $Mn^{2+}$และ $Fe^{2+}$

## 6.4 สภาวะในการเลี้ยงเชื้อ

### 6.4.1 ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

สำหรับจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะเจริญได้ดีที่ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อแตกต่างกันไป โดยที่จุลินทรีย์จำพวกราจะเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเป็นกรดด่างเริ่มต้นต่ำ แบคทีเรียจะเจริญได้ดีในสภาวะที่ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นค่อนข้างสูง และสเตรพโตมัยซีสจะเจริญได้ดีในสภาวะที่ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็นกลาง

### 6.4.2 อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่นิยมใช้ในการเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตไซแลนเนสส่วนมากใช้อุณหภูมิในช่วงอุณหภูมิห้อง คือ 25-30 องศาเซลเซียส แต่ก็มีจุลินทรีย์บางชนิดที่เจริญได้ดีในที่มีอุณหภูมิสูง เช่น ราบางชนิดซึ่งสามารถผลิตไซแลนเนสที่ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ (43)

### 6.4.3 ระยะเวลา

ระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสในจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างไป โดยพบว่าแบคทีเรียจะให้การสร้างเอนไซม์สูงสุด ภายใน 2-3 วัน ขณะที่ราส่วนใหญ่จะให้เอนไซม์สูงสุดเมื่อผ่านการเพาะเลี้ยงไปแล้ว 4-10 วัน

สำหรับสภาวะต่าง ๆ ในการเลี้ยงจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เพื่อผลิตไซแลนเนส ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 สภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เพื่อผลิตไซแลนเนส

| ชนิดของจุลินทรีย์ | ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ | อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | ระยะเวลาที่บ่ม (วัน) | เอกสารอ้างอิง |
|---|---|---|---|---|
| *Aspergillus niger* | 5.5 | 30 | 3 | (15) |
| *Bacillus pumilus* | 6.5 | 30 | 2 | (8) |
| *Bacillus* sp. No.C-125 | 10.3 | 37 | 3 | (18) |

| ชนิดของจุลินทรีย์ | ความเป็นกรดด่างเริ่ม-ต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ | อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | ระยะเวลาที่บ่ม (วัน) | เอกสารอ้างอิง |
|---|---|---|---|---|
| Fusarium roseum | 6.0 | 30 | 4 | (21) |
| Humicola lanuginosa | - | 45 | 4-5 | (23) |
| Neurospora crassa | 5.0 | 28 | 4 | (24) |
| Phanerachaete chrysosporium A387 | - | - | 7 | (43) |
| Streptomyces fradiae SCF-5 | 7.0 | อุณหภูมิห้อง | 2-3 | (32) |
| Streptomyces exfoliatus $MC_1$ | 7.0 | 25-30 | 3-4 | (3,30) |
| Streptomyces sp. KT-23 | 7.0 | 30 | 2 | (13) |
| Thermoascus aurantiacus C412 | - | - | 10 | (43) |
| Thermoascus aurantiacus C436 | - | - | 7 | (43) |

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่มีรายงานไว้

## 7. สมบัติของเอนไซม์ไซแลนเนส

### 7.1 ความจำเพาะต่อสับสเตรท ค่า Km

Nakanishi และคณะ (20) รายงานว่า เอนไซม์ไซแลนเนสของ Cryptococcus flavus จะมีความจำเพาะต่อการย่อยสลายไซแลน ไซโลไทรโอส ไซโลเททราโอส และไซโลเพนทาโอส แต่จะไม่สามารถย่อยสลายคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส เซลลูโลส อราบิแนนและน้ำตาลไดแซ็คคาไรด์อื่น ๆ นอกจากนี้ยังไม่สามารถย่อย บีต้า-ฟีนิล-ไซโลไซด์และบีต้า-เมทิล-ไซโลไซด์ ซึ่งมีพันธะไซโลสิดิคเช่นกัน

Kawaminami และ Iizuka (29) พบว่า ไซแลนเนสของ Streptomyces xylophagus จะมีความจำเพาะต่อไซแลนเท่านั้น ไม่สามารถย่อยน้ำตาลโมโนแซคคาไรด์ และไดแซคคาไรด์ได้ และ Stuttgen และ Sahm (12) รายงานว่าไซแลนเนสของ Trichosporon cutaneum จะมีความจำเพาะต่อไซแลนเช่นกันแต่ไม่สามารถย่อยไซโลไบโอส

Dekker และ Richards (10) รายงานว่า ค่า Km ของไซแลนเนสของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ อยู่ในช่วง 0.27-14.0 มก. ของเฮมิเซลลูโลสต่อ มล. และ Nakajima และคณะ (13) พบว่าค่า Km ของไซแลนเนสจาก Streptomyces sp. KT-23 มีค่าเท่ากับ 0.2 มก. ของไซแลนต่อ มล.

7.2 อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไซแลนเนสคือ ประมาณ 50 องศาเซลเซียส ค่อนข้างทนต่ออุณหภูมิสูง และหมดประสิทธิภาพในการทำงานที่อุณหภูมิมากกว่า 65 องศาเซลเซียส แต่ก็มีราบางชนิดที่สร้างไซแลนเนสที่เสถียรต่ออุณหภูมิสูง เช่น Ceratocystis paradoxa มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 80 องศาเซลเซียส และจะหมดประสิทธิภาพอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส หลังจากบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่ความเป็นกรดด่าง 5.5 แม้เมื่อมี EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid) เอนไซม์นี้ก็ยังคงมีความเสถียรต่ออุณหภูมิ

7.3 ความเป็นกรดด่าง

ไซแลนเนสจากราโดยทั่วไปจะมีความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 3.5-5.5 และเสถียรในช่วงความเป็นกรดด่างค่อนข้างกว้างคือ 3-10 แต่ไซแลนเนสจากแบคทีเรีย เช่น Bacillus subtilis และ Streptomyces xylophagus จะมีความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ในช่วงที่สูงกว่าไซแลนเนสที่ได้จากราคือประมาณ 5-7 (10)

สมบัติของเอนไซม์ไซแลนเนสจากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ได้แสดงไว้ในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 สมบัติของไซแลนเนสจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ

| แหล่งของเอนไซม์ | ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม | ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง | อุณหภูมิที่เหมาะสม | อุณหภูมิที่สูญเสียแอคติวิตี้อย่างสมบูรณ์ | Km | เอกสารอ้างอิง |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Aspergillus fumigatus | 5.0-6.0 | - | 65 | - | - | (1) |
| Aspergillus niger | 6.0 | 3.5-9.0 | 45 | - | - | (15) |
| Bacillus subtilis | 6.0-6.2 | 5.0-7.0 | 37-45 | 70 | - | (17) |
| Bacillus pumilus | 6.5 | - | 45-50 | 60 | - | (8) |
| Ceratocystis paradoxa | 5.1 | 5.0-10.0 | 80 | 100 | 0.27 | (10) |
| Cellulomonas uda | 5.8 | - | 58 | - | - | (11) |
| Cryptococcus flavus | 4.5 | 3.5-8.0 | 55 | - | 3.1 | (39) |
| Humicola lanuginosa | 6.0 | 5.0-8.0 | 65 | 80 | 7.3 | (23) |
| Streptomyces xylophagus | 6.2 | 5.3-7.3 | 55-60 | 70 | - | (29) |
| Streptomyces lividans | 6.0-7.0 | - | 60 | 70 | - | (31) |
| Streptomyces sp. KT-23 | 5.5 | 4.0-10.0 | 55 | - | 0.2 | (13) |
| Streptomyces sp. E-86 | 5.5-6.2 | 4.5-10.5 | 55-60 | 70 | - | (7) |
| Streptomyces sp. No.3137 | 5.0-6.0 | 4.0-8.0 | 50-55 | - | - | (34) |
| Trichosporon cutaneum | 5.0 | 4.5-9.0 | 50 | - | - | (12) |
| Termitomyces clypeatus | 3.5 | - | 55 | 70 | 4 | (36) |
| Trichoderma viride | 5.5-6.0 | 3.0-7.0 | - | 90 | 2.5 | (42,44) |
| Trichoderma reesei | 5.0 | 2.0-10.0 | 55-60 | 65 | 9.85 | (35) |

หมายเหตุ - หมายถึงไม่มีรายงานไว้

013042

## 7.4 สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซแลนเนส

จากรายงาน (10) กล่าวว่า ไซแลนเนสถูกยับยั้งโดย ซัลฟีดริล รีเอเจนท์ (Sulfhydryl reagent) เช่น พารา-คลอโรเมอคิวรีเบนโซเอต (p-chloro-mercuri-benzoate) ไอโอดีน กรดไอโอโดอะซีติค โลหะหนัก กลีเซอรอล 1,2-อีเธนไดอัล และน้ำตาลต่าง ๆ เช่น แอล-อราบิโนส ดี-ไซโลส ไซโลไทรโอส ไซโลเพนทาโอส เป็นต้น พบว่า กลีเซอรอล และ 1,2-อีเธนไดอัลที่ความเข้มข้นมากกว่า 60% (ปริมาตรต่อปริมาตร) จะยับยั้งปฏิกิริยาของไซแลนเนสจาก Aspergillus niger แบบรุนแรง และการยับยั้งปฏิกิริยาของไซแลนเนสโดย 1,2-อีเธนไดอัล เกิดย้อนกลับได้ ไอออนของปรอท เป็นสารยับยั้งที่รุนแรงที่สุด ผลของไอออนของปรอทต่อเอนไซม์ไซแลนเนส เนื่องจากหมู่ไทโอล (thiol) โดยที่ไอออนของปรอทจะทำปฏิกิริยากับพันธะเปปไทด์ และอาจมีความสามารถจับกับหมู่คาร์บอกซิลและหมู่อะมิโนได้ ไอออนของโลหะอื่นเป็นสารยับยั้งเพียงบางส่วน (partially inhibitor) ของปฏิกิริยาของไซแลนเนส สารยับยั้งและไซแลนเนสของจุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้งดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซแลนเนสจากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

| สารยับยั้ง | แหล่งของเอนไซม์ไซแลนเนส | เอกสารอ้างอิง |
|---|---|---|
| - Sulfhydryl reagent :<br>p-chloromercuribenzoate<br>iodine<br>iodoacetic acid | Bacillus subtilis | (10) |
| - glycerol, 1,2-ethanediol | Aspergillus niger | (10) |
| - p-chloromercuribenzoate<br>oxidized glutathione | Neurospora crassa | (24) |

ตารางที่ 4 (ต่อ)

| สารยับยั้ง | แหล่งของเอนไซม์ไซแลนเนส | เอกสารอ้างอิง |
|---|---|---|
| - monoiodoacetate | Streptomyces sp. KT-23 | (13) |
| Sodium dodecyl sulfate | | |
| 10% methanol | | |
| 10% ethanol | | |
| - N-Bromosuccinimide | Cryptococcus flavus | (20) |
| Sodium dodecyl sulfate | | |
| - โลหะหนัก | | |
| $Hg^{2+}$,$Ag^{+}$,$Cu^{2+}$,$Fe^{2+}$,$Fe^{3+}$ | Bacillus subtilis | (10) |
| $Mn^{2+}$,$Zn^{2+}$,$Mg^{2+}$ | Agaricus bisporus | (10) |
| $Hg^{2+}$,$Mn^{2+}$ | Streptomyces sp. KT-23 | (13) |
| $Cd^{2+}$,$Sn^{2+}$,$Pb^{2+}$,$Cu^{2+}$ | Streptomyces sp. E-86 | (7) |
| $Hg^{2+}$,$Cu^{2+}$,$Co^{2+}$,$Fe^{3+}$ | Humicola lanuginosa | (23) |
| $Hg^{2+}$,$Fe^{2+}$,$Ag^{+}$,$Cu^{2+}$,$Zn^{2+}$ | Termitomyces clypeatus | (35) |
| $Hg^{2+}$ | Trichoderma viride | (44) |
| - น้ำตาล | | |
| L-arabinose, D-xylose | Ceratocystis paradoxa | (10) |
| Xylotriose | | |
| Xylopentaose | Trichoderma viride | (44) |
| Xylose | Cellulomonas uda | (11) |

ในประเทศไทยนั้นมีวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรหลายชนิดที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ เช่น ฟางข้าว รำข้าว เปลือกข้าวโพด และซังข้าวโพดเป็นจำนวนมาก ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ประเทศไทยยังเป็นแหล่งของจุลินทรีย์ในดินมากมายหลายชนิด ดังนั้น จึงน่าที่จะมีการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสจากจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายไซแลนในวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรเหล่านี้ ซึ่งอาจนำจุลินทรีย์นี้มาใช้โดยตรงในการผลิตน้ำตาลไซโลสหรือโดยทางอ้อมในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์อื่นที่ปราศจากไซแลนเนส แต่ต้องการไซโลสเพื่อการเจริญหรือสร้างผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ

การวิจัยนี้จะกล่าวถึง การศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสจากสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างดินในประเทศไทย โดยศึกษาถึงส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ สภาวะต่าง ๆ ในการเลี้ยงเชื้อ สมบัติของเอนไซม์ไซแลนเนส และการศึกษาลักษณะและการจำแนกชนิดของสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 นี้