บทที่ 1
บทนำ

เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) เป็นองค์ประกอบที่สำคัญอย่างหนึ่งในผนังเซลล์พืช มีลักษณะเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลเพนโตสเป็นส่วนใหญ่ และยังมีน้ำตาลชนิดอื่นอีกหลายชนิดมาเชื่อมต่อเป็นอนุพันธ์ ไซแลนเป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลส ไซแลนยึดเกาะกับส่วนเซลลูโลสด้วยพันธะไฮโดรเจน ปริมาณไซแลนและโครงสร้างจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับแหล่งที่มา ในไม้เนื้อแข็งเช่นใน birch wood พบว่ามีปริมาณไซแลนมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ส่วนในไม้เนื้ออ่อนมีปริมาณไซแลนประมาณ 7-12 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง นอกจากนั้นในไม้ล้มลุกและวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น ฝ้าย รำข้าว ฟางข้าว ซังข้าวโพด และในเปลือกเมล็ดธัญพืชต่าง ๆ พบว่ามีไซแลนอยู่ประมาณ 20-40 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (Gome *et al.*, 1992)

ลักษณะโครงสร้างของไซแลน

ไซแลนประกอบด้วยน้ำตาล ดี - ไซโลส (D-xylose) หลาย ๆ โมแลกุลเชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีต้า - 1,4 ไซโลซิดิก (β - 1,4 xylosidic) เป็นสายหลักและมีน้ำตาลโมเลกุลอื่นหรือโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้น ๆ มาเชื่อมต่อเป็นสายโซ่กิ่ง ซึ่งสายโซ่กิ่งอาจประกอบด้วยหมู่อะราบิโนซิล (arabinosyl) กลูโคนิล (gluconyl) หรือหมู่อะซิทิล (acetyl) ไซแลนที่พบในไม้เนื้ออ่อนส่วนใหญ่เป็นอะราบิโนกลูคูโรโนไซแลน (arabinoglucuronoxylan) โดยที่สายหลักประกอบด้วยน้ำตาลบีต้า - ดี -ไซโลไพแรนโนสมีหมู่ 4-โอ -เมทธิล -แอลฟา - ดี- กลูคูโรนิคแอซิด (4-O-methy-α-D-glucuronic acid) มาเชื่อมต่อกับสายหลักที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 2 ทุก ๆ 2 หน่วยต่อไซโลส 10 หน่วยและแอลฟา - แอล - อะราบิโนฟิวราโนส (α-L-arabinofuranose) เชื่อมต่อที่คาร์บอนอะตอมที่ 3 จำนวนไซโลสที่มาเชื่อมต่อกัน (degree of polymerization) ประมาณ 200 หน่วย ไซแลนที่พบในไม้เนื้อแข็งส่วนใหญ่เป็น 4 -โอ - เมทธิล - กลูคูโรโน - บีตา - ดี - ไซแลน (4- O - methyl - glucurono - β - D - xylan) หรือเรียกว่ากลูคูโรโนไซแลน สายหลักประกอบด้วยบีต้า - ดี - ไซโลไพแรนโนส เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ 1,4 ไซโลซิดิกมีหมู่อะซิทิลเชื่อม

ต่อที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 2 หรือ 3 ทุก ๆ 7-10 หน่วยของน้ำตาลไซโลส และ 4-โอ-เมทิล - แอลฟา - ดี - กลูคูโรนิคแอซิค เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ 1,2 ทุก ๆ 10 หน่วยของน้ำตาลไซโลส

การย่อยสลายไซแลน

การย่อยสลายไซแลนให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวสามารถย่อยสลายโดยการใช้สารเคมี (chemical hydrolysis) และการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (enzyme hydrolysis) หรือการใช้ทั้งสองวิธีร่วมกัน (Taso and Chiang , 1983)

1. **การย่อยสลายไซแลนด้วยกรด** (acid hydrolysis) เป็นการย่อยสลายไซแลนเพื่อผลิตน้ำตาลไซโลส กรดที่ใช้เป็นกรดแก่ เช่น กรดไฮโดรคลอริคหรือกรดซัลฟูริก การย่อยสลายด้วยกรดเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว แต่ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะรุนแรงและไม่จำเพาะเจาะจง ทำให้ผลผลิตที่ได้ไม่บริสุทธิ์ เกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารพิษ เช่น เฟอฟูรัล (fufural) และจำเป็นต้องใช้วัสดุอุปกรณ์ที่ทนต่อความเป็นกรดและอุณหภูมิสูงได้ดี

2. **การย่อยสลายไซแลนด้วยด่าง** (alkaline hydrolysis) มักนำไปใช้ในอุตสาหกรรมกระดาษในขั้นตอนการทำเยื่อกระดาษ โดยนำชิ้นไม้มาต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นเพื่อให้ไม้ยุ่ยและกำจัดลิกนินออกบางส่วน หลังจากนั้นนำไปผ่านกระบวนการฟอกสีเยื่อกระดาษโดยใช้สารเคมีที่มีคลอไรด์เป็นองค์ประกอบ เช่น คลอรีนไดออกไซด์ (ClO_2) ก๊าซคลอรีน (Cl_2) เป็นต้น แต่สารเคมีเหล่านี้ทำให้เกิดสารประกอบพวกไดออกซิน และสารประกอบคลอไรด์ที่เป็นพิษอื่น ๆ

3. **การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์** (enzyme hydrolysis) เป็นปฏิกิริยาที่จำเพาะเจาะจงต่อสับสเตรทกว่าการใช้สารเคมีในการย่อยสลาย ผลิตภัณฑ์ที่ได้จึงมีความบริสุทธิ์สูงและปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นปฏิกิริยาที่ไม่รุนแรง นอกจากนี้ยังไม่ก่อให้เกิดสารประกอบที่เป็นพิษและสารเคมีตกค้างในสิ่งแวดล้อม เอนไซม์กลุ่มที่ย่อยสลายไซแลนนี้เรียกว่า ไซลาเนส (xylanase)

การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์ให้สมบูรณ์นั้นต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์หลายชนิด เนื่องจากโครงสร้างที่มีความแตกต่างกันของไซแลนรวมทั้งสายโซ่ตรงมักจะมีสายโซ่กิ่งหลายประเภท แต่เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายพันธะ β - 1,4 ของสายหลักของไซแลน มีอยู่ 2 ชนิดใหญ่ ๆ คือ

1. เอนโดไซลาเนส (endoxylanase) หรือ 1,4 - บีตา - ดี - ไซแลน - ไซลาโนไฮโดรเลส (1,4 - β - D - xylan - xylanohydrolase ; EC. 3.2.1.8) จะย่อยสลายพันธะ 1,4 - บีตา - ดี - ไซโลซิดิก แบบสุ่ม เป็นกลไกการย่อยสลายแบบภายใน (endo - mechanism) ได้ผลิตภัณฑ์คือ ไซโลสและน้ำตาลโอลิโกเมอร์สายสั้น ๆ (Gilbert *et al.* ,1993) กล่าวโดยทั่วไปเอนโดไซลาเนส คือ ไซลาเนส

2. บีตา - ไซโลซิเดส (β - xylosidase) หรือ 1,4 - บีตา - ดี - ไซแลน - ไซโลไฮโดรเลส (1,4 - β - D - xylan - xylohydrolase ; EC. 3.2.1.37) จะย่อยสลายพันธะ 1,4 - บีตา – ไซโลไพราโนไซด์ของ xylo - oligomers ทีละหนึ่งหน่วยจากปลายด้านนันรีดิวซ์ (non - reducing end) เป็นกลไกการย่อยสลายแบบภายนอก (exo - mechanism) ได้ผลิตภัณฑ์คือ ไซโลส (Dekker and Richard , 1976)

นอกจากนี้การย่อยสลายสายโซ่กิ่งของไซแลนให้สมบูรณ์ จำเป็นต้องอาศัยเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ ร่วมด้วย เช่น

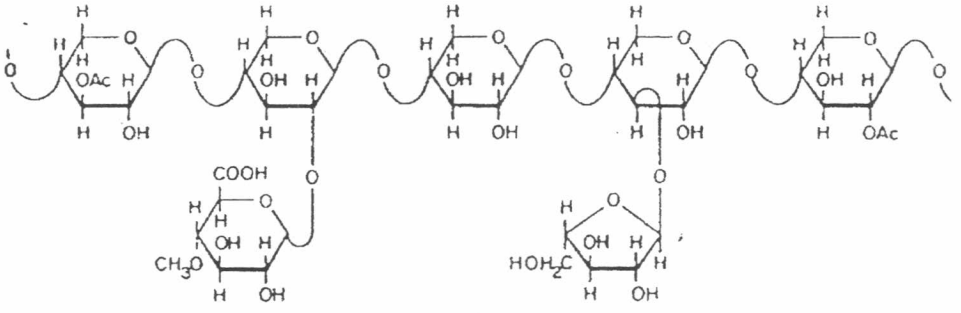
แอลฟา - แอล - อะราบิโนซิเดส (α- L- arabinosidase ; EC. 3.2.1.55) จะย่อยสลายพันธะแอลฟา – 1,3 ของหมู่นันรีดิวซ์ - แอลฟา - แอล - อะราบิโนฟิวราโนซิลได้น้ำตาลอะราบิโนสเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Eriksson *et al.*,1990)

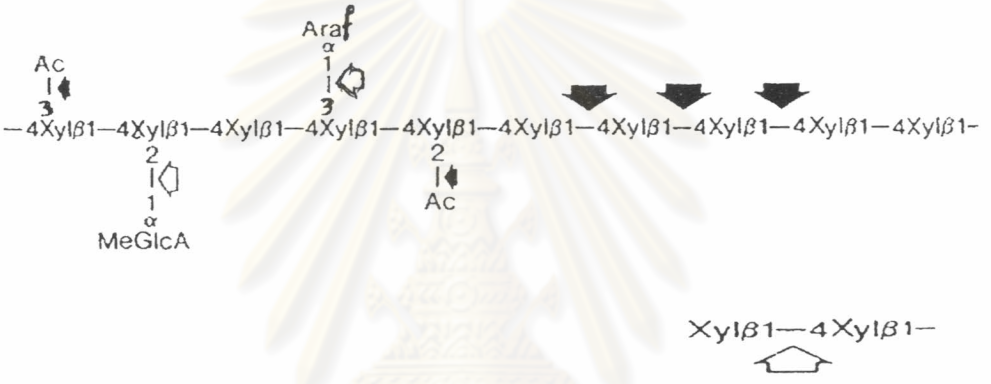
แอลฟา - ดี - กลูคูโรโนสิเดส (α- D- glucuronosidase ; EC. 3.2.1.1) จะย่อยสลายพันธะแอลฟา - 1,2 ใน 4 - โอ - เมทธิล - ดี - กลูคูโรนิคเอซิคจะได้น้ำตาลกลูคูโรนิกแอซิคเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Whistler , 1970)

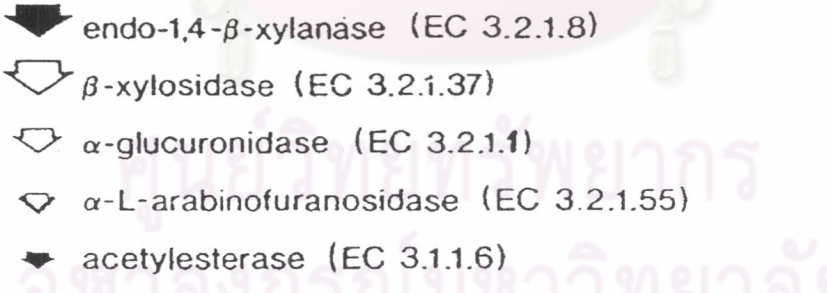
อะซิติล เอสเทอเรส (acetyl esterase ; EC. 3.2.1.6) จะย่อยสลายพันธะ บีตา - 1,2 และ บีตา-1,3 ที่เชื่อมหมู่อะซิติลกับสายหลักให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรดอะซิติก(Dekker and Richard , 1976)

เอนไซม์ทั้งหมดนี้จะจะทำงานร่วมกันในการย่อยสลายไซแลนได้อย่างสมบูรณ์ดังรูปที่ 1.1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย







รูปที่ 1.1 ลักษณะโมเลกุลของไซแลนและการย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายไซแลน (Biely , 1985)

ไซลาเนส

ไซลาเนสเป็นเอนไซม์ที่พบในจุลินทรีย์หลายชนิดเช่น แบคทีเรีย รา แอคติโนมัยสิท และยีสต์ ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างไซลาเนสได้แสดงในตารางที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 ตัวอย่างสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างไซลาเนส

สายพันธุ์จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus kawachii	Ito *et al.*, 1992
Aspergillus nidulans	Femandez-Espinar *et al.*, 1994
Aspergillus niger	Frederick *et al.*, 1985
Aspergillus sojae	Kimura *et al.*, 1995
Bacillus sp. strain 41M-1	Nakamura *et al.*, 1993
Bacillus sp. strain BP-23	Blanco *et al.*, 1995
Bacillus sp. strain K-1	Ratanakhanokchai *et al.*, 1999
Bacillus sp. Stearothermophilus T-6	Khasin *et al.*, 1993
Cellulomonas sp.	Gokhale and Deobagkar , 1989
Cellulomonas sp. N.C.I.M.2353	Chaudhary and Deobagkar , 1997
Clostridium thermocellum	Morag *et al.*, 1990
Fibrobacter succinogenes S85	Matte and Forsberg ; 1992
Fusarium oxysporum F3	Christakopoulos *et al.*,1996
Nocardiopsis dassonvillei	Tsujibo *et al.*, 1990
Schizophyllum commune	Paice *et al.*, 1978
Streptomyces sp. PC22	Pinphanichakarn and Wateewuthajarn ,2000
Streptomyces chattanoogensis	Lopez *et al.*, 1995
Streptomyces halstedii JM8	Ruiz-Arribas *et al.*, 1995
Streptomyces lividans	Dupont *et al.*, 1998
Streptomyces roseiscleroticus	Grabski and Jeffries ,1991
Thermotoga maritime	Bronnenmeier *et al.*, 1995

ตารางที่ 1.1 (ต่อ)

สายพันธุ์จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Trichoderma harzianum	De Paula Silveira ; 1999
Trichoderma longibranchitum	Royer and Nakas ; 1990
Trichoderma reesei PC-3-7	Xu *et al.*, 1998
Trichoderma viride	Beldman *et al.*, 1988

นอกจากการศึกษาไซลาเนสที่ได้จากจุลินทรีย์แล้วก็ยังมีการศึกษาถึงไซลาเนสในพืชบางชนิดอีกด้วยดังแสดงในตารางที่ 1.2

ตารางที่ 1. 2 ตัวอย่างพืชที่สามารถสร้างไซลาเนสได้

สายพันธุ์พืช	เอกสารอ้างอิง
Persea americana M.	Ronen *et al.*, 1991
Carca papaya L.	Ronen *et al.*, 1991
Musa sapientum L.	Bhagyalakshmi and Prabha ,1998
Capsicum annuum	Prabha *et al.*, 1998
Panax notoginseng	Lam and Ng , 2002

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทำไซลาเนสให้บริสุทธิ์

มีรายงานหลายฉบับได้ศึกษาการทำไซลาเนสโดยมีขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์แตกต่างกัน เช่น Tsujibo *et al.*, (1990) ทำไซลาเนสจาก *Norcardiopsis dassonvillei* ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยอะซิโตนที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส จากนั้นทำโครมาโทกราฟีบนดีอีเออี เซลลูโลไฟน์ เอ-800 (DEAE-cellulofine A-800) และชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยการทำเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0-1.0 โมลาร์ และตามด้วยการทำโครมาโทกราฟีบนเซฟาเด็กซ์ จี-75 (Sephadex G-75) ได้ไซลาเนส 3 ชนิดคือ X-I , X-II และ X-III ซึ่งมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 8.01 , 7.51 และ 6.02 เท่าและเหลือแอคติวิตีอยู่ 3.6 , 6.3 และ 3.3 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

Grabski *et al.*, (1991) ทำไซลาเนสจาก *Streptomyces roseiscleroticus* ให้บริสุทธิ์โดยการกรองผ่านเยื่อเลือกผ่าน ซึ่งจะกักโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 5,000 ดาลตัน จากนั้นตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตแบบลำดับส่วนที่ความเข้มข้น 30-50 เปอร์เซ็นต์ แล้วทำฟาสท์เพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (FPLC) โดยใช้ตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุบวก (CM-Bio-Gel A) ชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยการทำเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0-0.4 โมลาร์แล้วทำโครมาโทกราฟีบนตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุบวกชนิด โมโน-เอส (Mono-S) ได้ไซลาเนส 1 ชนิดมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 45.1 เท่า และเหลือแอคติวิตีอยู่ 19.4 เปอร์เซ็นต์

Viet *et al.*, (1991) ทำไซลาเนสจาก *Aeromonas caviae* W-61 ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 0-60 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำโครมาโทกราฟีบนดีอีเออี เซฟาเด็กซ์ เอ-50 (DEAE-Sephadex A-50) ตามด้วยการทำซีเอ็มเซฟาเด็กซ์ ซี-50 (CM-Sephadex C-50) ชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยการทำเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 5-50 มิลลิโมลาร์ แล้วทำเซฟาเด็กซ์จี – 100 (Sephadex G-10) ได้ไซลาเนส 1 ชนิดมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 23.33 เท่า และเหลือแอคติวิตีอยู่ 6.2 เปอร์เซ็นต์

Ito *et al.*, (1991) ทำไซลาเนสจาก *Aspergilus kawachii* ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 0-60 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วยการทำไฮเฟอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) บนดีอีเออี-5 พีดับเบิลยู (DEAE-5PW) และชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยการทำเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0-1.5 โมลาร์ แล้วทำโครมาโทกราฟี

บนจี 3000-เอสดับเบิลยู (G3000-5PW) ได้ไซลาเนส 3 ชนิดคือ XylA , XylB และ XylC ซึ่งมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 5.90 , 6.17 และ 2.93 เท่าและเหลือแอคติวิตีอยู่ 15 , 21 และ 6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Ishihara *et al.*, (1997) ทำไซลาเนสจาก Thermophilic Fungus สายพันธุ์ HG-1 ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 20-80 เปอร์เซ็นต์ แล้วทำโครมาโทกราฟีบนดีอีเออี เซฟาเด็กซ์ เอ-50 (DEAE-Sephadex A-50) และโครมาโทกราฟีบนคาร์บอกซีเมทธิล-เซฟาเด็กซ์ ซี-50 (CM-Sephadex C-50) และชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยการทำเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0-2.0 โมลาร์ จากนั้นทำโครมาโทกราฟีบนเซฟาเด็กซ์ จี-150 (Sephadex G-150) ได้ไซลาเนส 1 ชนิดมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 2.79 เท่าและเหลือแอคติวิตีอยู่ 0.7 เปอร์เซ็นต์

Lopez-Fernandez *et al.*,(1998) ทำไซลาเนสจาก *Streptomyces chattanoogensis* ให้บริสุทธิ์โดยการทำโครมาโทกราฟีบนคาร์บอกซีเมทธิลไบโอเจล (CM-Biogel) ตามด้วยการทำโครมาโทกราฟีที่ใช้ไซแลนเป็นตัวกลางเพื่อจับกับไซลาเนส ได้ไซลาเนส 1 ชนิดมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 291.8 เท่าและเหลือแอคติวิตีอยู่ 17.7 เปอร์เซ็นต์

Xu *et al.*,(1998) ทำไซลาเนสจาก *Trichoderma reesei* PC-3-7 ให้บริสุทธิ์โดยการทำโครมาโทกราฟีบนเซฟาคริล เอส-100 (Sephacryl S-100) และตามด้วยโครมาโทกราฟีบนคาร์บอกซีเมทธิล-เซฟาโรส เอฟเอฟ(CM-Sepharose FF) ได้ไซลาเนส 1 ชนิดมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 9.3 เท่าและเหลือแอคติวิตีอยู่ 7.9 เปอร์เซ็นต์

Lin *et al.*,(1999) ทำไซลาเนสจาก *Thermomyces lanuginosus*-SSBP ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 80 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วยการทำโครมาโทกราฟีบนดีอีเออี เซฟาเด็กซ์ เอ-25 (DEAE-Sephadex A-25) ชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยการทำเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0-1.0 โมลาร์และตามด้วยการทำโครมาโทกราฟีบนคิวเออี เซฟาเด็กซ์ เอ-25 (QAE-Sephadex A-25) ชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยการทำเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0-0.5 โมลาร์ ได้ไซลาเนส 1 ชนิดมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 4.64 เท่าและเหลือแอคติวิตีอยู่ 78.2 เปอร์เซ็นต์

Pinphanichakarn and Wateewuthajarn (2000) ทำไซลาเนสจาก *Streptomyces sp.*PC22 ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 40-70 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วยการทำโครมาโทกราฟีบนดีอีเออีไบโอเจล เอ (DEAE Bio-Gel A) ชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยการทำเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0-0.7 โมลาร์ จากนั้นทำโครมาโทกราฟีบนไบโอเจล พี-60 (Bio-Gel P-60) ได้ไซลาเนส 2 ชนิดคือ Xylanase I และ Xylanase II ซึ่งมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 13.6 และ 17.3 เท่าและเหลือแอคติวิตีอยู่ 1.3 และ 13.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ไซลาเนสที่ได้จากแต่ละแหล่งจะมีคุณสมบัติทางชีวเคมีที่แตกต่างกัน บางชนิดสามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่ค่อนข้างเป็นกรด บางชนิดสามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง บางชนิดสามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดี ในขณะที่บางชนิดไม่สามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิสูง ๆ เป็นต้น

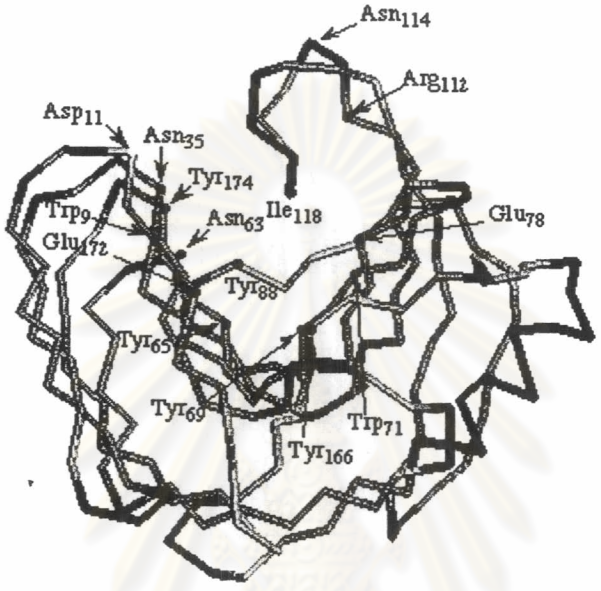
การศึกษาไซลาเนสที่ได้จากพืชส่วนใหญ่จะยังไม่มีรายงานการทำให้บริสุทธิ์และการศึกษาทางลักษณะทางชีวเคมี ในปี 1998 Bhagyalakshmi ได้ศึกษาถึงเอนไซม์หลายชนิดที่มีผลต่อการสุกของผลกล้วยน้ำว้า (*Musa sapientum*) พบว่าในระหว่างการสุกของผลกล้วยน้ำว้าจะตรวจพบแอคติวิตีของไซลาเนสในปริมาณที่สูงกว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ชนิดอื่นในการทดลองเดียวกันเช่น อะมัยเลส เพคติเนส บีต้า – กาแลคโตซิเดส เซลลูเลส เป็นต้น และเนื่องจากยังไม่มีการรายงานการทำให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของไซลาเนสจากผลกล้วยน้ำว้า จุดมุ่งหมายของงานวิจัยนี้จึงต้องการที่จะสกัดแยกไซลาเนสจากผลกล้วยน้ำว้าและทำให้บริสุทธิ์พร้อมกับศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของเอนไซม์ซึ่งอาจจะมีคุณสมบัติที่แตกต่างไปจากไซลาเนสจากแหล่งอื่นๆ ที่เคยมีการศึกษามาแล้ว ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้อาจนำไปใช้ในการพิจารณาถึงความเป็นไปได้ในการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการทำเยื่อกระดาษได้ในอนาคต

ประโยชน์ของไซลาเนส

ไซลาเนสที่มีแอคติวิตีสูงและมีความเสถียรต่อความเป็นด่างและที่อุณหภูมิสูงสามารถนำมาใช้ในการสกัดลิกนินและสารที่มีสีออกจากเยื่อกระดาษได้เนื่องจากไซลาเนสสามารถช่วยเพิ่มการสกัดลิกนินและสารที่มีสีออกจากเยื่อกระดาษได้ดี และสามารถใช้ทดแทนสารฟอกสีที่มีคลอไรด์เป็นองค์ประกอบซึ่งเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม และพบว่า cellulase - free xylanase ช่วยทำให้ความแข็งแรงของ cellulose fibre ไม่ถูกทำลาย ไซลาเนสยังสามารถใช้ในกระบวนการ bioconversion ของสารประเภทลิกโนเซลลูโลสให้เป็นสารเคมีและสารเชื้อเพลิง (fuel) บางชนิดได้อีกด้วย ไซลาเนสที่มีความเสถียรต่อความเป็นกรดสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำผลไม้ได้ดี (Horikoshi,1990)

กลุ่มของไซลาเนส (Family of xylanase)

ไซลาเนสสามารถแบ่งเป็น 2 แฟมิลีใหญ่ ๆ คือ แฟมิลี 10 (F) และแฟมิลี 11 (G) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ไกลโคซิลไฮโดรเลส เอนไซม์ในแฟมมิลี 10 จะมีขนาดใหญ่และซับซ้อนมากกว่าเอนไซม์ในแฟมีลี 11 บริเวณแอคทีฟของไซลาเนสจะมีโครงรูปเป็นสามมิติมีการจัดเรียงตัวของหมู่อะมิโนให้เหมาะสมกับสับสเตรท (binding site) และการจัดเรียงตัวของหมู่อะมิโนที่เหมาะสมในการย่อยสลายสับสเตรทให้เป็นผลิตภัณฑ์ (catalytic site) ไซลาเนสในแฟมิลี 10 (F) จะมีโครงสร้างสามมิติของ catalytic domain ที่มีลักษณะเป็น cylindrical [[alpha]] / [[beta]] barrel ส่วนไซลาเนสในแฟมิลี 11 (G) จะมีส่วนของ domain ที่มีลักษณะส่วนใหญ่เป็น [[beta]] pleated sheets อยู่ล้อมรอบ catalytic site ไซลาเนสในแฟมิลี 11 จะจับกับไซแลนได้อย่างจำเพาะเจาะจงมากกว่าไซลาเนสในแฟมิลี 10 (Jeffries, 2004) ตัวอย่างโครงสร้างสามมิติของไซลาเนสในแฟมิลี 11 จาก *Bacillus circulans* แสดงดังรูปที่ 1.2



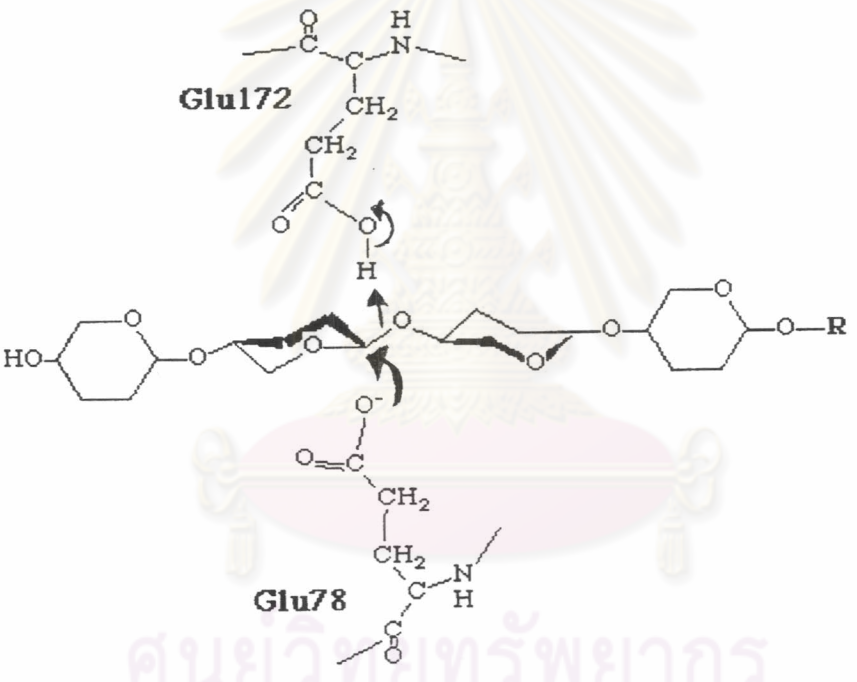
รูปที่ 1.2 โครงสร้างสามมิติของไซลาเนสจาก *Bacillus circulans* (Jeffries,2000)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กลไกการทำงานของไซลาเนส (mode of action)

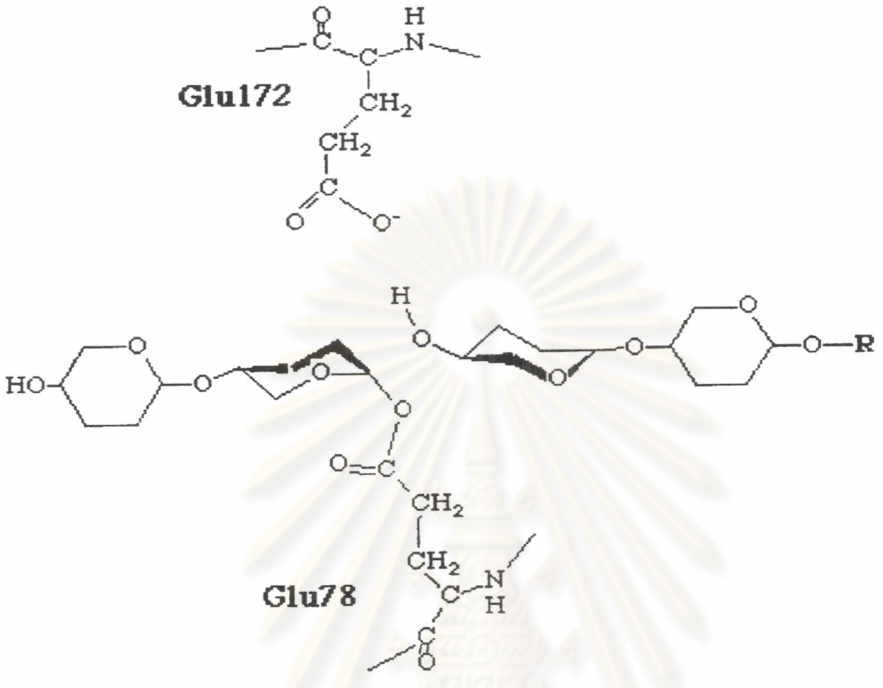
กลไกการทำงานของไซลาเนสจาก *Bacillus circulans* (family 11) ในการสลายไซแลนด้วยน้ำแบบ random endo – mechanism ซึ่งประกอบด้วย 4 ขั้นตอนดังนี้

1. ในขั้นตอนแรกจะเกิดการจับกันอย่างจำเพาะระหว่าง binding site ของไซลาเนสกับสายโซ่เกลียวของไซแลน โดยไซแลนจะมาอยู่ตำแหน่งช่องว่างระหว่าง Tyr 65 และ Tyr 69 โดยมี Glu 172 ทำหน้าที่เป็น acid / base catalyst และ Glu 78 ทำหน้าที่เป็น neucleophile

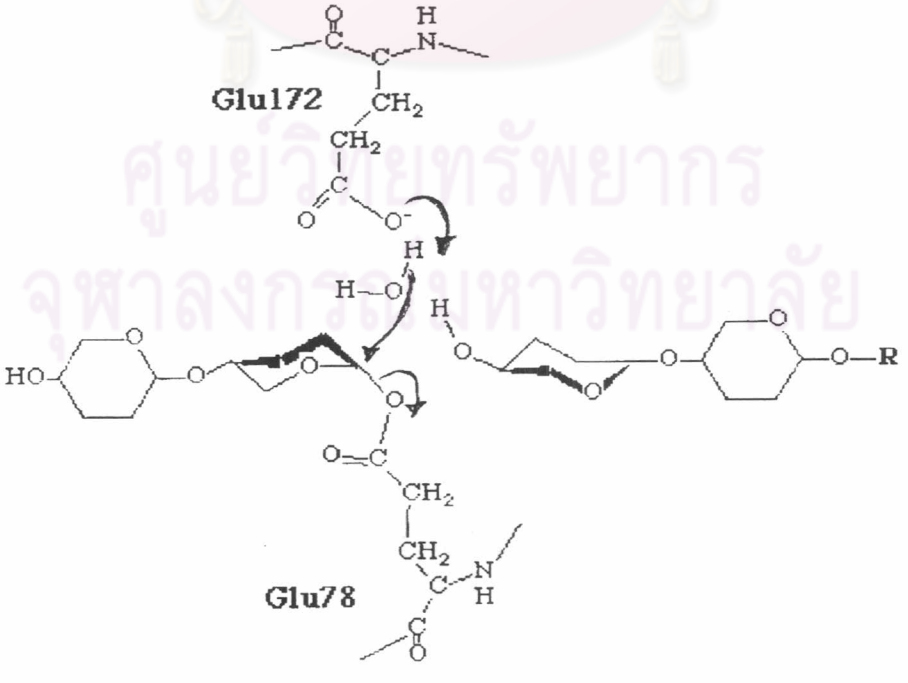


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. พันธะไกลโคซิดิกจะถูกสลายออกได้ aglycone ออกมา ส่วน glycone จะเกิดพันธะโควาเลนท์กับ Glu78 ของเอนไซม์

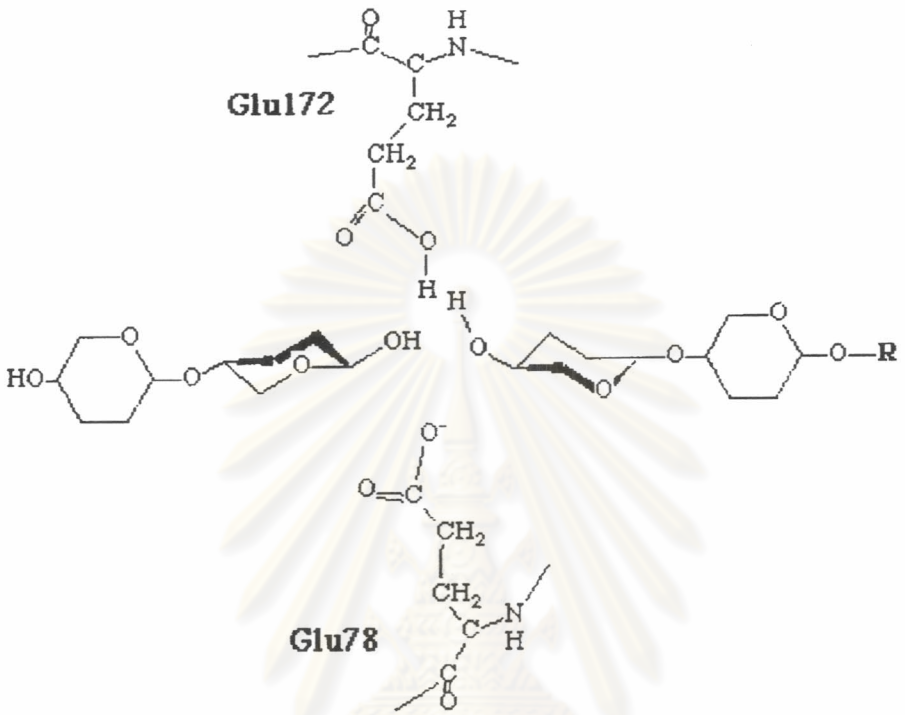


3. ต่อจากนั้นน้ำจะเข้ามามีส่วนร่วมในปฏิกิริยาโดยทำหน้าที่เป็น neucleophile



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. glycone (xylobiose) จะหลุดออกมาจากเอนไซม์ และเอนไซม์พร้อมที่จะเร่งปฏิกิริยาต่อไปกับไซแลนส่วนที่เหลือ



ไซลาเนสส่วนใหญ่จะมีกลไกการทำงานแบบ random endo – mechanism อย่างไรก็ตามพบว่าโครงสร้างสามมิติและชนิดกรดอะมิโนในบริเวณเร่งของไซลาเนสจากแหล่งต่าง ๆ อาจแตกต่างกันได้ เช่น ไซลาเนส จาก *Thermomyces lanuginosus* - SSBP (Lin *et al.*, 1999) พบว่ามีทริปโตฟานอยู่ในบริเวณเร่งของเอนไซม์ เป็นต้น

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาการสกัดแยกไซลาเนสในผลกล้วยน้ำว้า *Musa sapientum*
2. เพื่อศึกษาถึงขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ของไซลาเนสที่สกัดแยกได้
3. เพื่อศึกษาลักษณะสมบัติทางชีวเคมีบางประการของไซลาเนสที่สกัดแยกได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย