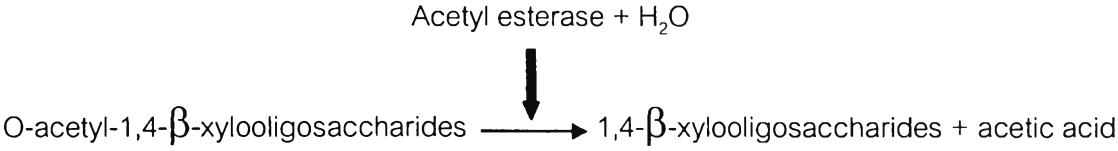
สำนักงานวิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

ปริทัศน์วรรณกรรม

2.1 อะซีทิลเอสเทอเรส (EC 3.1.1.6)

อะซีทิลเอสเทอเรสจัดเป็นเอนไซม์ที่สำคัญชนิดหนึ่งในกลุ่มย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส ทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะบีตา-1,2 และบีตา-1,3 ของหมู่อะซีทิลที่เชื่อมอยู่กับสายหลักของไซแลน ส่งผลให้เอนไซม์ย่อยสลายสายหลักเข้าย่อยสลายไซแลนได้ดีขึ้น โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายคือ ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ น้ำตาลไซโลส และกรดอะซีติก (Johnson และคณะ, 1988) ซึ่งการทำงานของอะซีทิลแสดงดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 การทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส (Johnson และคณะ, 1988)

ไซแลนจากพืชแต่ละชนิดมีหมู่ข้างเคียงชนิดต่าง ๆ ในปริมาณที่แตกต่างกัน ซึ่งพบหมู่อะซีทิลมากในไม้เนื้อแข็ง เช่น ไซแลนจากไม้เบิร์ช และจากไม้บีช ประกอบด้วยหมู่อะซีทิลประมาณ 11 และ 9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Biely และคณะ, 1986) และยังพบในบางส่วนของธัญพืช เช่น ฟางข้าวสาลี มีประมาณ 6.4 เปอร์เซ็นต์ (Egana และคณะ, 1996) มีรายงานว่าหมู่อะซีทิลเหล่านี้ทำหน้าที่กีดขวางการทำงานของเอนไซม์ย่อยสลายสายหลัก และป้องกันไม่ให้ผนังเซลล์พืชถูกทำลาย โดยเมื่อมีปริมาณหมู่อะซีทิลมากการย่อยสลายไซแลนจะเกิดขึ้นในระดับต่ำ ซึ่งการย่อยสลายไซแลนที่มีหมู่อะซีทิลมากให้สมบูรณ์นั้นต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ย่อยสลายสายหลัก และอะซีทิลเอสเทอเรสให้มากขึ้น (Mcdermid และคณะ, 1990)

ได้มีรายงานว่าอะซีทิลเอสเทอเรสมีบทบาทสำคัญต่อการเพิ่มประสิทธิภาพเอนไซม์ย่อยสลายไซแลนสายหลักจากไม้เนื้อแข็งซึ่งมีหมู่อะซีทิลเป็นองค์ประกอบปริมาณมาก เช่น Biely และคณะ (1986) รายงานว่าการย่อยสลายไซแลนเกิดขึ้นรวดเร็วเมื่อบ่มปฏิกิริยาในอะซีทิลเอสเทอเรสและไซแลเนสที่ผลิตจาก *Schizophyllum commune* ให้ผลิตภัณฑ์คือ ไซโลส ไซโลโอลิโกเมอร์ และ กรดอะซีติก

Poutanen และคณะ (1990) ศึกษาถึงการทำงานของไซแลเนสร่วมกับอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Trichoderma reesei* พบว่าทั้งสองเอนไซม์ส่งเสริมซึ่งกันและกันในการย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิก โดยอะซีทิลเอสเทอเรสทำหน้าที่ดึงหมู่อะซีทิลออกจากไซโลโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นก่อน ทำให้ไซแลเนสสามารถเข้าย่อยสลายไซแลนได้อย่างสมบูรณ์

Puls และคณะ (1991) ศึกษาลำดับการย่อย อะซีทิล-4-โอ-เมธิลกลูคูโรโนไซแลนจากไม้บีชด้วยเอนไซม์ต่าง ๆ โดยเมื่อนำมาย่อยด้วยอะซีทิลเอสเทอเรสร่วมกับไซแลเนส พบว่าได้ผลิตภัณฑ์เป็น กรดอะซีติก ไซโลไบโอส และไซโลไตรโอส เป็นส่วนใหญ่ และเมื่อบ่มด้วยอะซีทิลเอสเทอเรสก่อนแล้วตามด้วยไซแลเนส ได้ไซโลไบโอสเป็นส่วนใหญ่ และได้ 4-โอ-เมธิลกลูคูโรโนไซโลไตรโอส และไซโลสเพิ่มขึ้น แต่เมื่อนำไซแลนมาบ่มด้วยไซแลเนสก่อนก็สามารถช่วยให้อะซีทิลเอสเทอเรสทำงานได้ดีเช่นกัน แต่ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีขนาดใหญ่ คือ ไซโลไตรโอส และไซโลโอลิโกเมอร์สายยาวที่ยังคงมีหมู่ข้างเคียงบางส่วนอยู่

Kormelink และคณะ (1993) รายงานว่าเมื่อนำไซแลนจากไม้เบิร์ชมาบ่มปฏิกิริยากับอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Aspergillus niger* เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์มีความสามารถสูงในการย่อยหมู่อะซีทิล ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดอะซิติก 62 เปอร์เซ็นต์ (กำหนดให้ปริมาณหมู่อะซีทิลทั้งหมดในสับสเตรทเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์) จากนั้นบ่มต่อด้วยเอนโดไซแลเนส I จาก *Aspergillus awamori* นาน 1 ชั่วโมง พบว่าให้ผลิตภัณฑ์ คือ ไซโลโอลิโกเมอร์ต่าง ๆ เพิ่มขึ้น 5 เท่า และเมื่อบ่มต่อเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง พบว่าให้ไซโลโอลิโกเมอร์และไซโลสเพิ่มขึ้นเป็น 66 เท่า และ 4 เท่า ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบกับบ่มปฏิกิริยาในเอนโดไซแลเนส I เพียงชนิดเดียวนาน 1 ชั่วโมง และเมื่อนำไซแลนจากไม้เบิร์ชที่ถูกดึงหมู่อะซีทิลออกแล้วโดยอะซีทิลเอสเทอเรส มาบ่มกับบีตา-ไซโลสิเดสนาน 24 ชั่วโมง ได้น้ำตาลไซโลสเพิ่มขึ้น 1.7 เท่า

Dupont และคณะ (1996) ศึกษาการทำงานร่วมกันของอะซีทิลเอสเทอเรสกับไซแลเนส A และไซแลเนส B จาก *Streptomyces lividans* ต่อการย่อยสลายไซแลนจากไม้เบิร์ชที่มีการเติมหมู่อะซีทิล พบว่าเมื่อนำไซแลนไปย่อยด้วยอะซีทิลเอสเทอเรสก่อนเพื่อดึงหมู่อะซีทิลออก แล้วตามด้วยไซแลเนสทำให้ไซแลนถูกย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ อะซีทิลเอสเทอเรสมีความจำเพาะกับ O-acetylated polysaccharide ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการย่อยเฮมิเซลลูโลส โดยเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายนี้มีความสำคัญต่อการเจริญและการอยู่รอดในธรรมชาติของจุลินทรีย์

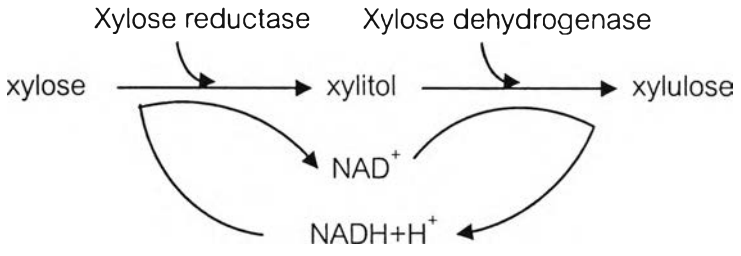
2.2 ประโยชน์ของเอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายไซแลน

เอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายไซแลนมีบทบาทสำคัญต่ออุตสาหกรรมหลายชนิด และเป็นที่สนใจกันมากเพราะสามารถนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์ได้จริง เช่น การแปรสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาเป็นเชื้อเพลิงและสารเคมี อุตสาหกรรมการผลิตเยื่อกระดาษ การทำน้ำผลไม้ให้ใสขึ้น (Polizeli และคณะ, 2005) การปรับปรุงคุณภาพขนมปัง (Camacho และ Aguilar, 2003) และใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์เพื่อลดความหนืดของอาหารสัตว์ลงทำให้ย่อยง่ายขึ้นและเพิ่มการดูดซึม (Twomey และคณะ, 2003) เป็นต้น

เฮมิเซลลูโลสในพืชมักมีหมู่อะซีทิลเป็นองค์ประกอบปริมาณมาก โดยอะซีทิลของไซแลนสามารถขัดขวางการย่อยสลายของเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ และเป็นปัจจัยสำคัญต่อการย่อยลิกโนเซลลูโลสในลำไส้ของสัตว์ ดังนั้นการย่อยสลายหมู่อะซีทิลออกจากสายไซแลนด้วยอะซีทิลเอสเทอเรสจึงเป็นการเพิ่มความสามารถในการย่อยอาหารของสัตว์ได้ (Puls และคณะ, 1991)

อะซีทิลเอสเทอเรสสามารถทำงานร่วมกับไซแลเนสในการฟอกสีเยื่อกระดาษ เนื่องจากการย่อยสลายไซแลนในเยื่อกระดาษจะทำให้ลิกนินซึ่งเกาะกับไซแลนหลุดออกไปบางส่วน และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างบนเส้นใยที่ทำให้ง่ายต่อการกำจัดลิกนินโดยสารฟอกขาว จึงช่วยลดปริมาณการใช้สารเคมีได้ เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ และคลอรีน ส่งผลให้กระดาษมีความขาวและสว่างมากขึ้น (Paice และคณะ, 1992)

การทำงานร่วมกันของอะซีทิลเอสเทอเรสกับเอนไซม์ย่อยสายหลักจะช่วยให้เกิดการย่อยสลายไซแลนได้อย่างสมบูรณ์ จะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว คือ ไซโลส ซึ่งสามารถนำไปใช้ผลิตสารหรือผลิตภัณฑ์ที่มีประโยชน์และมีคุณค่าทางเศรษฐกิจสูงได้มากมาย เช่น ไซโลสเป็นสารชักนำในการสร้างเอนไซม์ไซโลสไอโซเมอเรส (D-xylose isomerase; EC 5.3.1.5) ซึ่งจะเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสไปเป็นน้ำตาลฟรุกโตสซึ่งใช้ในการผลิตน้ำเชื่อมฟรุกโตส (high fructose syrup) และถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตขนมหวานและลูกกวาด (Chen และคณะ, 1980) ไซโลสเป็นสารอาหารให้กับจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักเพื่อผลิตโปรตีนเซลล์เดียว (single cell protein) ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตไซลิทอล ซึ่งเป็นสารที่ใช้ทางการแพทย์ทดแทนน้ำตาลให้กับผู้ป่วยโรคเบาหวาน หรือใช้เพื่อให้ความหวานในลูกอม ยาสีฟัน หมากฝรั่ง โดยไม่ทำให้ฟันผุ (Parajo และคณะ, 1998) โดยมีกระบวนการเปลี่ยนรูปดังรูปที่ 2.2 นอกจากนั้นยังใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอลและบิวทานอล (Neale และคณะ, 1988)



รูปที่ 2.2 การเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสเป็นไซลิทอล (Walker, 1998)

น้ำตาลไซโลสสามารถนำไปเป็นสารตั้งต้นในการผลิต Furfural หรือที่รู้จักกันในชื่อ furfurol, furol และ furfuraldehyde เมื่อกลั่นได้ใหม่ ๆ จะเป็นของเหลวไม่มีสี จุดติดไฟง่ายระเหยได้ และเมื่อสัมผัสกับอากาศหรือแสงสว่างจะมีกลิ่น ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมเคมี เช่น นำมาทำเป็นตัวทำละลายในการทำให้บริสุทธิ์ของน้ำมันหล่อลื่นคุณภาพสูง ยางสน และน้ำมันพืช และยังใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตไนลอน เรซิน น้ำมันเคลือบเงา การเปลี่ยนแปลงไซโลสเป็น furfural แสดงดังรูปที่ 2.3

$$\underset{\text{xylose}}{C_5H_{10}O_5} \longrightarrow \underset{\text{furfural}}{C_5H_4O_2} + 3H_2O$$

รูปที่ 2.3 การเปลี่ยนไซโลสเป็น furfural (การใช้ประโยชน์จากอ้อย, 2541)

ในปัจจุบันนี้ การผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นที่สนใจอย่างมาก เนื่องจากมีประสิทธิภาพ และช่วยเพิ่มคุณค่าของวัสดุเหลือทิ้ง ในปี 2002 เอทานอลกว่า 2 ล้านแกลลอนถูกผลิตขึ้นจากการหมักแป้งเป็นหลัก และแนวโน้มการใช้เอทานอลในอนาคตประเมินกันว่าจะมีอัตราเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องจากเป็นสารที่มีความปลอดภัยกับสิ่งแวดล้อมมากกว่าการใช้ methyl tertiary butyl ether (MTBE) ซึ่งเป็นสารผสมในน้ำมันเพื่อการเผาไหม้ที่สะอาด และใช้กันอย่างแพร่หลายที่สุด นอกจากนี้พบว่า MTBE มีการปนเปื้อนในแหล่งน้ำธรรมชาติ (Saha, 2003)

วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่ยังไม่ได้ใช้ประโยชน์ สามารถใช้เป็นวัตถุดิบราคาถูกในการผลิตเอทานอลได้ การย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสด้วยเอนไซม์จะได้น้ำตาลต่างๆ ขึ้นกับแหล่งที่มา เช่น

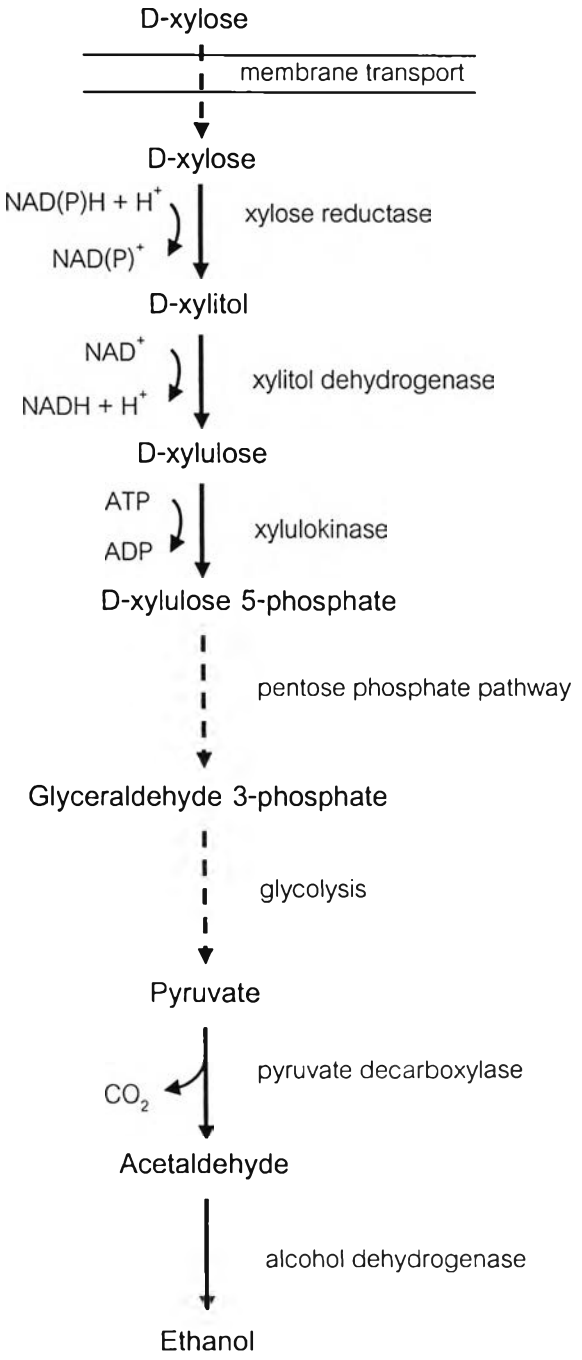
ไซโลส กาแลคโตส แมนโนส ฟรุกโตส แรมโนส กลูโคส และอะราบิโนส แม้ว่า *Saccharomyces cerevisiae* ทั่ว ๆ ไป จะเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นเอทานอลได้อย่างรวดเร็ว แต่ก็ไม่สามารถเปลี่ยนน้ำตาลชนิดอื่น ๆ เช่น ไซโลสไปเป็นเอทานอลได้ (Saha, 2003)

Pachysolen tannophilus, *Pichia stipitis* และ *Candida shehate* เป็นยีสต์ที่สามารถเปลี่ยนไซโลสไปเป็นเอทานอลได้ (Walker, 1998) ดังรูปที่ 2.4 แต่ในเชิงพาณิชย์การใช้ยีสต์เหล่านี้ในการหมักเอทานอลมีอยู่ไม่มากเพราะมีความทนต่อเอทานอลได้ต่ำ กระบวนการหมักเป็นไปอย่างเชื่องช้า และการควบคุมออกซิเจนเพื่อให้ได้ภาวะที่เหมาะสมทำได้ยาก (Du Preez, 1994) แต่อย่างไรก็ตามไซโลสสามารถถูกเปลี่ยนเป็นไซลูโลส (xylulose) โดยใช้ไซโลสไอโซเมอเรส (xylose isomerase) และยีสต์ทั่ว ๆ ไปสามารถหมักไซลูโลสเป็นเอทานอลได้ (Gong และคณะ, 1981) จึงมีการใช้เทคโนโลยีรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอโดยทรานสฟอร์มยีนประมวลรหัสไซโลสไอโซเมอเรสจากยีสต์เข้าสู่ *Saccharomyces cerevisiae* ทำให้สามารถหมักไซโลสเป็นเอทานอลได้ (Walker, 1998) ดังรูปที่ 2.5

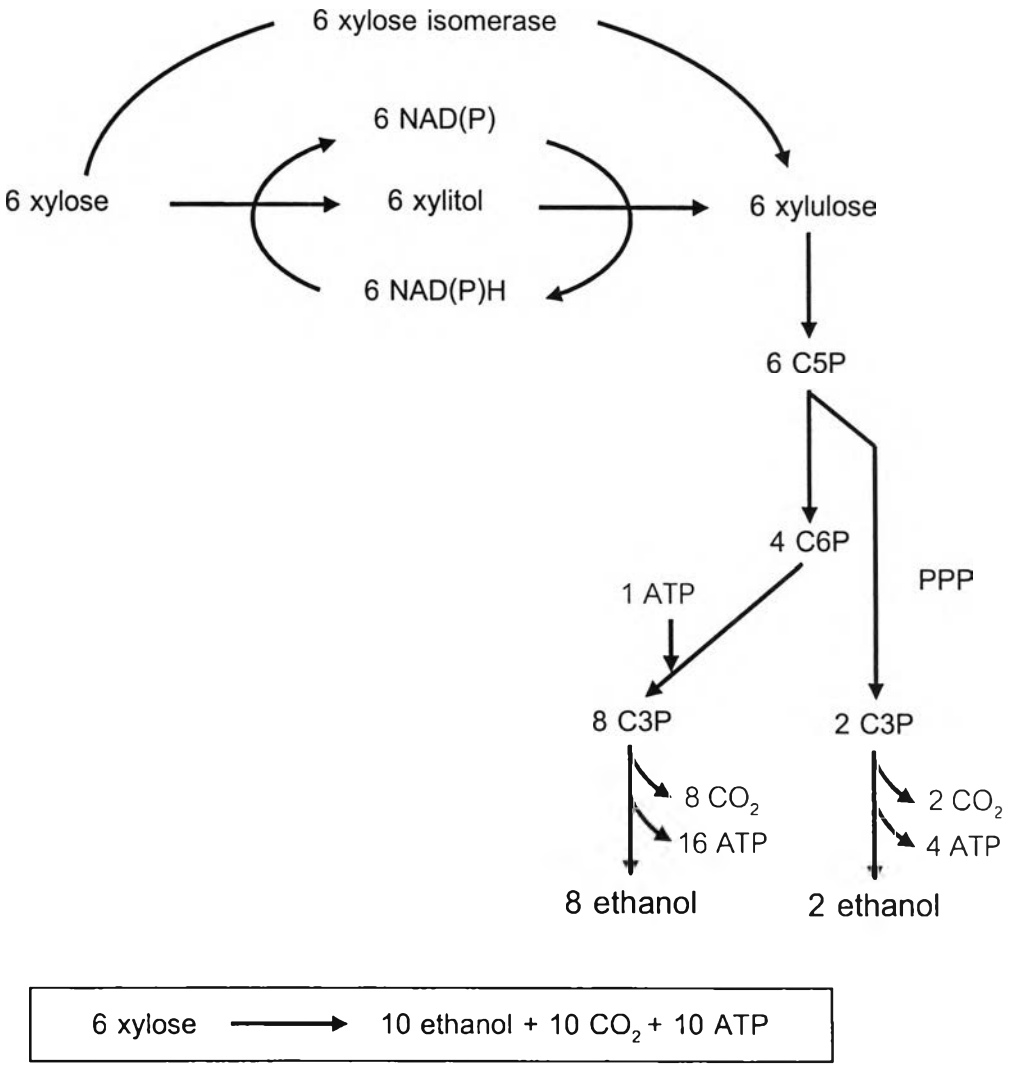
ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ได้นำอะซีทิลเอสเทอเรสไปใช้ในด้านอื่น ๆ นอกเหนือจากการทำงานร่วมกับไซแลเนส เช่น นำไปใช้ในการย่อยสลายหมู่อะซีทิลในคาร์โบไฮเดรตชนิดอื่น ๆ รวมถึงน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวอีกด้วย มีรายงานจาก Biely และคณะ (2003) พบว่าอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Schizophyllum commune* สามารถเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่อะซีทิลจาก vinyl acetate, triacetin และ ethyl acetate ให้กับคาร์โบไฮเดรตในสภาวะที่มีน้ำน้อยได้ ผลการทดลองพบว่าได้ผลดีมาก ซึ่งเป็นการทดลองเริ่มต้นเพื่อเป็นทางเลือกในการดัดแปลงโอลิโกแซคคาร์ไรด์ และพอลิแซคคาไรด์ต่าง ๆ ในอนาคต

2.3 แอคติวิตีของไซแลเนส

ไซแลเนสเป็นเอนไซม์หลักที่ย่อยสลายพันธะ1,4-บีตา-ดี-ไซโลสิดิกของไซแลน จุลินทรีย์ที่ผลิตอะซีทิลเอสเทอเรสได้ส่วนใหญ่สามารถผลิตไซแลเนสได้เช่นกัน โดยเอนไซม์ทั้งสองนี้จะทำงานร่วมกันในการย่อยสลายไซแลนให้สมบูรณ์ จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตทั้งอะซีทิลเอสเทอเรสและไซแลเนสได้ เช่น *Bacillus pumilus* (Panbangred และคณะ, 1983) *Schizophyllum commune* (Halgasova และคณะ, 1994) *Penicillium purpurogenum* (Belancic และคณะ, 1995) *Melanocarpus albomyses* IIS 68 (Saraswat และ Bisaria, 1997) *Thermomonospora fusca* (Bachmann และ McCarthy, 1991) และ *Aspergillus awamori* (Koseki และคณะ, 2005)



รูปที่ 2.4 การหมักไซโลสเป็นเอทานอลโดย *Candida shehate* (Walker, 1998)



รูปที่ 2.5 การหมักไซโลสเป็นเอทานอล โดย *Saccharomyces cerevisiae* ที่ปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีไซโลสไอโซเมอเรส (xylose isomerase) (Kuyper และคณะ, 2004)

C3P คือ triose-3-phosephate

C5P คือ pentose-5-phosphate

C6P คือ hexose-6-phosphate

PPP คือ pentose phosphate pathway

2.4 แหล่งของอะซีทิลเอสเทอเรส

อะซีทิลเอสเทอเรสพบได้ในจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น แบคทีเรีย รา ยีสต์ และแอคติโนมัยสีท จุลินทรีย์ส่วนใหญ่มักสร้างและปลดปล่อยเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) แต่มีจุลินทรีย์บางสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์เก็บไว้ภายในเซลล์ (intracellular enzyme) ตัวอย่างสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างอะซีทิลเอสเทอเรสดังแสดงดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างอะซีทิลเอสเทอเรส

สายพันธุ์จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus aculeatus	Leeuwen และคณะ, 1992
Aspergillus awamori	Koseki และคณะ, 2005
Aspergillus carneus	Biley และคณะ, 2004
Aspergillus japonicus	Christov และ Prior, 1993
Aspergillus nidulans	Linden และคณะ, 1994
Aspergillus niger	Altaner และคณะ, 2003
Aspergillus oryzae	Tenkanen และคณะ, 1998
Bacillus pumilus	Degrassi และคณะ, 1998
Butyrivibrio fibrisolvens	Hespell และ O'Bryan-Shah, 1988
Caldocellum saccharolyticum	Luthi และคณะ, 1990
Candida guilliermondii	Basaran และ Hang, 2000
Clostridium cellulovorans	Kosugi และคณะ, 2002
Cryptococcus albidus	Lee และคณะ, 1987
Fibrobacter succinogenes S85	McDermid และคณะ, 1990
Fusarium oxysporum	Christakopoulos และคณะ, 1999
Melanocarpus albomyces IIS 68	Saraswat และ Bisaria, 1997

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

สายพันธุ์จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Neocallimastix patriciarum	Dalrymple และคณะ, 1997
Orpinomyces sp. สายพันธุ์ PC-2	Blum และคณะ, 1999
Penicillium purpurogenum	Egana และคณะ, 1996
Phanerochaete chrysosporium	Biely และคณะ, 2004
Pichia abadieae	Lee และคณะ, 1987
Pichia lindnerii	Lee และคณะ, 1987
Pseudomonas fluorescens	Ferreira และคณะ, 1993
Rhodosporidium toruloides	Lee และคณะ, 1987
Rhodotorula mucilaginosa	Lee และคณะ, 1987
Schizophyllum commune	Halgasova และคณะ, 1994
Streptomyces flavogriseus	Linden และคณะ, 1994
Streptomyces lividans	Dupont และคณะ, 1996
Streptomyces olivochromogenes	Linden และคณะ, 1994
Streptomyces thermoviolaceus OPC-520	Tsujibo และคณะ, 1997
Termitomyces clypeatus	Mukhopadhyay และคณะ, 2003
Thermoanaerobacterium sp. JW/SL YS485	Shao และ Wiegel, 1995
Thermomonospora fusca	Bachman และ McCarthy, 1991
Trichoderma reesei	Margolles-Clark และ คณะ, 1996
Trichoderma cutaneum	Lee และคณะ, 1987
Trichoderma pullulan	Lee และคณะ, 1987

2.5 การทำอะซีทิลเอสเทอเรสให้บริสุทธิ์

อะซีทิลเอสเทอเรสมีบทบาทสำคัญช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายไซแลนของเอนไซม์ย่อยสายหลัก ได้มีรายงานหลายฉบับศึกษาการทำอะซีทิลเอสเทอเรสให้บริสุทธิ์ โดยมีขั้นตอนต่าง ๆ กัน เช่น

Potanen และ Sundberg (1988) ได้ทำอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Trichoderma reesei* ให้บริสุทธิ์โดยการทำโครมาโทกราฟีบนคาร์บอกซีเมธิล-เซฟาโรส เอฟเอฟ (CM-Sepharose FF) และชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-0.4 โมลาร์ จากนั้นทำโครมาโทกราฟีบนดีอีเออี-เซฟาโรส เอฟเอฟ (DEAE-Sepharose FF) ได้โปรตีนที่มีแอคติวิตีของอะซิทิลเอสเทอเรสซึ่งไม่จับกับคอลัมน์ โดยมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 230 เท่า และเหลือแอคติวิตีอยู่ 29 เปอร์เซ็นต์

McDermid และคณะ (1990) ได้ทำอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Fibrobacter succinogenes* S85 ให้บริสุทธิ์โดยการทำโครมาโทกราฟีบนดีอีเออี-เซฟาโรส ซีเอล-6บี (DEAE-Sepharose CL-6B) และชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-1.0 โมลาร์ ตามด้วยการทำโครมาโทกราฟีบนฟีนิล-เซฟาโรส ซีเอล-6บี (Phenyl-Sepharose CL-6B) และชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์ของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นจาก 2.0-0 โมลาร์ พบว่าได้โปรตีน 2 ชนิด ที่มีแอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรส คือ AXE A และ AXE B แต่เมื่อนำ AXE B มาทำให้บริสุทธิ์ในขั้นต่อไป โดยนำมาทำโครมาโทกราฟีบนไฮดรอกซีอะปาไทต์ (Hydroxyapatite) และชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโปแทสเซียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.02-0.4 โมลาร์ จากนั้นทำโครมาโทกราฟีบนคิว-เซฟาโรส (Q-Sepharose) และชะโปรตีนด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-0.2 โมลาร์ ได้โปรตีนที่มีแอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรสชนิด AXE B ซึ่งมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 438 เท่า และเหลือแอคติวิตีอยู่ 0.45 เปอร์เซ็นต์ แต่สูญเสียแอคติวิตีของ AXE A

Sundberg และ Poutanen (1991) ได้ทำอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Trichoderma reesei* ให้บริสุทธิ์โดยการทำโครมาโทกราฟีบนคาร์บอกซีเมธิล-เซฟาโรส เอฟเอฟ (CM-Sepharose FF) และชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์ของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-0.15 โมลาร์ จากนั้นทำโครมาโทกราฟีบนคิว-เซฟาโรส เอฟเอฟ (Q-Sepharose FF) และชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-75 มิลลิโมลาร์ สามารถแยกอะ

ซีทิลเอสเทอเรสออกจากเอนโดไซแลเนสและโปรตีนอื่นได้ ตามด้วยการทำโครมาโทกราฟีบนเซฟาคริล เอส-100เอชอาร์ (Sephacryl S-100HR) และทำโครมาโทโฟกัสซิ่ง (Chromatofocusing) ได้โปรตีน 2 ชนิด ที่มีแอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรส คือ AXE I และ AXE II โดยมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 53 และ 54 เท่า ตามลำดับ และเหลือแอคติวิตีอยู่ 4.7 และ 4.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Kormelink และคณะ (1993) ได้ทำอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Aspergillus niger* ให้บริสุทธิ์โดยการทำโครมาโทกราฟีบนดีอีเออี-ทริสอะคริล (DEAE-trisacryl) และชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-1.0 โมลาร์ ตามด้วยการทำไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) บนดีอีเออี-5พีดับเบิลยู (DEAE-5PW) และชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-1.0 โมลาร์ ได้อะซีทิลเอสเทอเรส 1 ชนิด มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 17.2 เท่า

Halgasova และคณะ (1994) ได้ทำอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Schizophyllum commune* ให้บริสุทธิ์โดยตกตะกอนโปรตีนด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิ –18 องศาเซลเซียส แล้วทำโครมาโทกราฟีบนเซฟาเด็กซ์ จี-25 (Sephadex G-25) และโครมาโทกราฟีบนดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 (DEAE-Sephadex A-50) และชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-1.0 โมลาร์ พบว่าสามารถแยกอะซีทิลเอสเทอเรสออกจากไซแลเนสได้ จากนั้นทำโครมาโทกราฟีบน คิว เซฟาโรส ฟาสท์ โฟล์ (Q Sepharose Fast Flow) และชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-1.0 โมลาร์ พบว่าอะซีทิลเอสเทอเรสถูกชะออกมาที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 0.05 โมลาร์ แล้วทำฟาสท์เพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (FPLC) บนฟีนิล-ซุปเปอร์โรส เอชอาร์ 5/5 (Phenyl-Superose HR 5/5) จากนั้นชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 1.7-0 โมลาร์ ได้อะซีทิลเอสเทอเรสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 59.2 เท่า และเหลือแอคติวิตีอยู่ 11.1 เปอร์เซ็นต์

Egana และคณะ (1996) ทำอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Penicillium purpurogenum* ให้บริสุทธิ์โดยการกรองผ่านเยื่อเลือกผ่าน (Pillicon PTGC membrane) โดยกักโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 10,000 ดาลตัน ตามด้วยการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 40-90 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำโครมาโทกราฟีบนไบโอ-เจล พี300 (Bio-gel P300) พบโปรตีน 2 ชนิด ที่มีแอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรส คือ AXE I และ AXE II โดยนำโปรตีนที่ได้ทั้ง 2 ชนิดนี้มาทำให้บริสุทธิ์อีกโดยการทำโครมาโทกราฟีบนคาร์บอกซีเมธิล-เซฟาเด็กซ์ ซี-50 (CM-

Sephadex C-50) และชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-0.5 โมลาร์ แล้วตามด้วยโครมาโทโฟกัสซิ่ง (Chromatofocusing) ได้อะซีทิลเอสเทอเรส 2 ชนิด คือ AXE I และ AXE II

Dupont และคณะ (1996) ทำอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Streptomyces lividans* IAF43 ให้บริสุทธิ์โดยตกตะกอนโปรตีนด้วย 95 เปอร์เซ็นต์ของเอทานอล ล้างตะกอนด้วยอะซีโตน และทำให้แห้งในระบบสุญญากาศ จากนั้นนำมาละลายและไดอะไลส์ใน 10 mM Tris-buffer pH 8.5 หลังจากนั้นนำมาแช่กับเรซินที่เป็นตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุลบเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และกรองเรซินออกโดย Buchner funnel นำส่วนใสที่กรองได้มาไดอะไลส์ใน 20 mM Mes/NaOH buffer pH 6.0 ตามด้วยการทำไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) บนเอชอาร์ 15 ซีเอ็ม – โปรตีน (HR 15 CM-Protein) ซึ่งเป็นตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุบวก และชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-1.0 โมลาร์ ได้โปรตีนที่มีแอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรส 1 ชนิด

Degrassi และคณะ (1998) ได้ทำอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Bacillus pumilus* ให้บริสุทธิ์โดยตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 30-70 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วยการทำโครมาโทกราฟีบนฟีนิลเซฟาโรส (phenyl sepharose HP 16/10) จากนั้นทำโครมาโทกราฟีบนเซฟาคริล เอชอาร์ 200 ได้อะซีทิลเอสเทอเรส 1 ชนิด มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 179.2 เท่า และมีแอคติวิตีเหลืออยู่ 11.2 เปอร์เซ็นต์

Blum และคณะ (1999) ศึกษาการทำอะซีทิลเอสเอทเรสให้บริสุทธิ์โดยเอนไซม์นี้ได้จากการโคลนยีนของราที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายไซแลนได้หลายชนิด *Orpinomyces* sp. strain PC-2 ซึ่งแสดงออกใน *Escherichia coli* นำเซลล์มาทำให้แตกด้วยการบด แล้วนำส่วนน้ำใสมาผ่านคอลัมน์ SP Sepharose high-Performance ชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-1 โมลาร์ ทำให้เข้มข้นขึ้นโดยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน แล้วผ่านลงในคอลัมน์ TSK 3000SW และคอลัมน์ Mono Q HR5/5 ชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์

Basaran และ Hang (2000) ได้ทำอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Candida guilliermondii* สายพันธุ์ NRRL Y-17257 ให้บริสุทธิ์โดยตกตะกอนโปรตีนด้วยอะซิโตนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำโปรตีนไปไดอะไลส์ใน 20 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.0 ตามด้วยการทำโครมาโท

กราฟีบน คิวเออี-เซฟาโรส ฟาสท์ โฟล์ (QAE-Sepharose fast flow) และชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-0.5 โมลาร์ ตามด้วยการกรองผ่านเยื่อเลือกผ่าน (Polysulfane membrane) โดยกักโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 30,000 ดาลตัน พบว่าอะซีทิลเอสเทอเรสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 8.6 เท่า และเหลือแอคติวิตีของเอนไซม์อยู่ 31.2 เปอร์เซ็นต์

Altaner และคณะ (2003) ได้ทำอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Aspergillus niger* ให้บริสุทธิ์ โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วยการทำโครมาโทกราฟีบนคอลัมน์แลกเปลี่ยนอิออนลบ Uno Q ชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-1.0 โมลาร์ และตามด้วยคอลัมน์ Phenyl-superose HR5/5 ชะโปรตีนด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 1.7-0 โมลาร์ ได้โปรตีนที่มีความบริสุทธิ์จนถึงระดับ homogeneity โดยมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 27 เท่า

Mukhopadhyay และคณะ (2003) ได้ทำอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Termitomyces clypeatus* ให้บริสุทธิ์โดยตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 30-70 เปอร์เซ็นต์ นำโปรตีนที่ได้มาผ่านคอลัมน์ Bio-Gel P-200 พบโปรตีนที่มีแอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรส 2 ช่วง คือ โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงให้ชื่อว่า HMM (high molecular mass) และโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำให้ชื่อว่า LMM (Low molecular mass) จากนั้นนำโปรตีนทั้งสองมาทำให้บริสุทธิ์ต่อไป โดยทำอะซีทิลเอสเทอเรสในส่วน LMM ให้บริสุทธิ์โดยนำมาผ่าน CM-Sepharose (CL-4B) ชะโปรตีนด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0-0.2 โมลาร์ จากนั้นทำ HPLC โดยใช้คอลัมน์ Ultrapac TSKG 2000 SW ซึ่งเป็นเจลฟิลเตรชัน ได้อะซีทิลเอสเทอเรสที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 60.1 เท่า และคงเหลือแอคติวิตีอยู่ 6 เปอร์เซ็นต์ สำหรับอะซีทิลเอสเทอเรสในส่วน HWW ทำให้บริสุทธิ์ โดย HPLC โดยใช้คอลัมน์ Protein Pak 300 SW ตามด้วยการทำโครมาโทกราฟีบนคอลัมน์แลกเปลี่ยนอิออนลบ DEAE-sephadex ชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์ของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1-0.2 โมลาร์ และ 1 โมลาร์ แล้วตามด้วย phenyl sepharose CL-4B ชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ออกด้วยเกรเดียนท์ของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-2 โมลาร์ จากนั้นทำ affinity chromatography บน Con A-sepharose ชะโปรตีนออกด้วยเกรเดียนท์ของแอลฟา-เมธิลแมนโนไซด์ (α-methyl mannoside) ความเข้มข้น 0-1 โมลาร์ เพื่อแยกอะซีทิลเอสเทอเรสออกจากเซลโลไบเอส (cellobiase) ได้อะซีทิลเอสเทอเรสที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 5.37 เท่า และเหลือแอคติวิตีอยู่ 10.13 เปอร์เซ็นต์

2.6 น้ำหนักโมเลกุลของอะซีทิลเอสเทอเรส

ได้มีรายงานการหาน้ำหนักโมเลกุลของอะซีทิลเอสเทอเรสจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ ที่ ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว พบว่ามีขนาดแตกต่างกัน และยังประกอบด้วยจำนวนหน่วยย่อยต่าง ๆ กัน ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 น้ำหนักโมเลกุลของอะซีทิลเอสเทอเรสจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่าง ๆ

สายพันธุ์จุลินทรีย์	น้ำหนักโมเลกุล (ดาลตัน) (เจลฟิลเตรชัน)	จำนวนหน่วยย่อยและน้ำหนักโมเลกุล (ดาลตัน)	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus awamori	-	50,000	Sundberg และคณะ, 1990
Aspergillus niger	-	30,480	Kormelink และคณะ, 1993
Aspergillus oryzae	-	30,000	Tenkanen และคณะ, 1991
Bacillus pumilus PS213	190,000	4 หรือ 5 หน่วยย่อย 40,000	Degrassi และคณะ, 1998
Butyrivibrio fibrisolvens	-	66,000	Lanz และ Williams, 1973
Candida guilliermondii	65,000	67,000	Basaran และ Hang, 2000
Fibrobacter succinogenes S85	-	55,000	McDermid และคณะ, 1990
Orpinomyces sp. strain PC-2	39,000	40,000	Blum และคณะ, 1999
Penicillium purpurogenum			
AXE I	-	48,000	Egana และคณะ, 1996
AXE II	-	23,000	
Schizophyllum commune	18,000	31,000	Halgasova และคณะ, 1994
Streptomyces lividans IAF43	-	34,000	Dupont และคณะ, 1996

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

สายพันธุ์จุลินทรีย์	น้ำหนักโมเลกุล (ดาลตัน) (เจลฟิลเตรชัน)	จำนวนหน่วยย่อยและน้ำหนักโมเลกุล (ดาลตัน)	เอกสารอ้างอิง
Thermoanaerobacterium sp. JW/SL-YS485			
AXE I	195,000	6 หน่วยย่อย 32,000	Shao และ Wiegel, 1995
AXE II	106,000	4 หน่วยย่อย 26,000	
Thermomonospora fusca	-	2 หน่วยย่อย 40,000	Bachmann และ McCarthy, 1991
Trichoderma reesei			
AXE I	20,000	34,000	Sundberg และ Poutanen, 1991
AXE II	20,000	34,000	
Trichoderma reesei	67,000	2 หน่วยย่อย 45,000	Poutanen และ Sundberg, 1988

2.7 สมบัติของอะซีทิลเอสเทอเรส

2.7.1 อุณหภูมิและความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส

อะซีทิลเอสเทอเรสจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ มีสมบัติในแง่ของอุณหภูมิและความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 อุณหภูมิและความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรสจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ

สายพันธุ์จุลินทรีย์	อะซีทิลเอสเทอเรส	ภาวะที่เหมาะสม		เอกสารอ้างอิง
		อุณหภูมิ (^{o} ซ)	ความเป็นกรดด่าง	
Aspergillus aculeatus		40	5.5	Leeuwen และคณะ, 1992
Aspergillus awamori		60-75	5.5-6.0	Sundberg และคณะ,1990
Aspergillus niger		50	5.5-6.0	Kormelink และคณะ, 1993
Bacillus pumilus PS213		55	8.0	Degrassi และคณะ, 1998
Caldocellum saccharolyticum		70-75	6.0	Luthi และคณะ, 1990
Candida guilliermondii		50-60	7.5	Basaran และ Hang, 2000
Clostridium cellulovorans		50	6.0	Kosugi และคณะ, 2002
Fibrobacter succinogenes		45	7.0	McDermid และคณะ, 1990
Fusarium oxysporum		55	6.5	Christakopoulos และคณะ ,1999
Orpinomyces sp. strain PC-2		30	9.0	Blum และคณะ, 1999
Penicillium purpurogenum	AXE I AXE II	50 55-60	5.3 5.5-6.0	Egana และคณะ, 1996
Rhodotorula mucilaginosa		-	8.0-10.0	Lee และคณะ, 1987
Schizophyllum commune		30-45	7.7	Halgasova และคณะ, 1994

หอสมุดกลาง สำนักงานวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.3 (ต่อ)

สายพันธุ์จุลินทรีย์	อะซีทิลเอสเทอเรส	ภาวะที่เหมาะสม		เอกสารอ้างอิง
		อุณหภูมิ (°ซ)	ความเป็นกรดด่าง	
Streptomyces flavogriseus		50	6.0	Linden และคณะ, 1994
Streptomyces lividans IAF-43		70	7.5	Dupont และคณะ, 1996
Streptomyces olivochromigenes		50	6.0	Linden และคณะ, 1994
Termitomyces clypeatus		45	6.5	Mukhopadhyay และคณะ, 2003
Thermoanaerobacterium sp. SW/SL-YS485	AXE I AXE II	80 84	7.0 7.5	Shao และ Wiegel, 1995
Trichoderma reesei		50	5.5	Poutanen และ Sundberg, 1988
Trichoderma reesei	AXE I AXE II	60-65 60-65	5.0-6.0 5.0-6.0	Sundberg และ Poutanen, 1991

2.7.2 ความเสถียรต่ออุณหภูมิและความเป็นกรดด่างของอะซีทิลเอสเทอเรส

อะซีทิลเอสเทอเรสจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ มีความเสถียรต่ออุณหภูมิและความเป็นกรดด่างแตกต่างกัน ดังแสดงตัวอย่างในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ความเสถียรของอะซีทิลเอสเทอเรสจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ ต่ออุณหภูมิและความเป็นกรดด่าง

สายพันธุ์จุลินทรีย์	อะซีทิลเอสเทอเรส	ความเสถียรต่อ		เอกสารอ้างอิง
		อุณหภูมิสูงถึง (°ซ)	ความเป็นกรดด่าง	
Aspergillus awamori		50 (1 hr)	7.0-9.0	Koseki และคณะ, 2005
Aspergillus niger		50-55 (2 hr)	3.0-8.0	Kormelink และคณะ, 1993
Bacillus pumilus		50 (1 hr)	8.0-9.5	Degrassi และคณะ, 1998
Candida guilliermondii		60	5.8-8.0	Basaran และ Hang, 2000
Clostridium cellulovorans		30 (12 hr)	3.0-7.0	Kosugi และคณะ, 2002
Penicillium purpurogenum	AXE I	42 (1 hr)	4.0-8.0	Egana และคณะ, 1996
	AXE II	65 (1 hr)	4.0-8.0	
Schizophyllum commune		30 (30 min)	6.2-8.5	Halgasova และคณะ, 1994
Streptomyces lividans		72 (15 min)	-	Dupont และคณะ, 1996
Termitomyces clypeatus		35	-	Mukhopadhyay และคณะ, 2003
Thermoanaerobacterium	AXE I	70	7.0	Shao และ Wiegel, 1995
sp. JW/SL-YS485	AXE II	70	6.0-8.0	
Trichoderma reesei		50	4.0-5.0	Poutanen และ Sundberg, 1988
Trichoderma reesei	AXE I	75 (1 hr)	3.0-7.0	Sundberg และ Poutanen, 1991
	AXE II	60 (24 hr)	3.0-7.0	

2.7.3 ความจำเพาะต่อสับสเตรทของอะซีทิลเอสเทอเรส

โดยทั่วไปอะซีทิลเอสเทอเรสจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ มีสับสเตรทเป็นไซแลนและไซโลโอลิโกเมอร์ที่มีหมู่อะซีทิลเป็นหมู่ข้างเคียง แต่ไซแลนจากพืชต่างชนิดกันก็มีองค์ประกอบแตกต่างกัน โดยเฉพาะมีความแปรผันของหมู่อะซีทิลและตำแหน่งที่เกาะกับสายหลักด้วย รวมทั้งความยาวของสายสับสเตรทก็มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ดังนั้นอะซีทิลเอสเทอเรสจึงมีความจำเพาะต่อไซแลนและไซโลโอลิโกเมอร์แตกต่างกัน ยิ่งกว่านั้นแหล่งของอะซีทิลเอสเทอเรสก็อาจมีผลทำให้เกิดความหลากหลายของความจำเพาะต่อชนิดของสับสเตรทเช่นกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.5

Kormelink และคณะ (1993) รายงานว่าปริมาณหมู่อะซีทิลในไซแลนมีผลต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Trichoderma reesei* โดยเอนไซม์มีแอคติวิตีต่ำเมื่อไซแลนมีปริมาณหมู่อะซีทิลมากกว่า 1.4 เปอร์เซ็นต์

อะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Trichoderma reesei* มีความจำเพาะต่อ acetylated xylobiose สูงและสามารถสลายหมู่อะซีทิลออกจากสายหลักของไซโลโอลิโกเมอร์ได้บางส่วน แต่ไม่สามารถสลายหมู่อะซีทิลจากสับสเตรทที่เป็นพอลิเมอร์ขนาดใหญ่ได้ โดยอะซีทิลเอสเทอเรสต้องอาศัยการทำงานร่วมกันกับแอคติวิตีของไซแลเนสจึงจะสามารถย่อยได้ (Poutanen และ Sundberg, 1988) แต่อะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Schizophyllum commune* สามารถดึงหมู่อะซีทิลจาก acetylated xylan ได้อย่างรวดเร็วโดยไม่ต้องอาศัยการทำงานของไซแลเนส (Halgasova และคณะ, 1994)

อะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Penicillium purpurogenum* มีความจำเพาะต่อสับสเตรทหลายชนิด โดยมีความจำเพาะต่อ α-naphthyl acetate สูงมาก แต่มีความจำเพาะต่ำใน xylose tetra-acetate, acetylated xylan และ steam exploded hemicellulose ซึ่งความสามารถของเอนไซม์ในการย่อยนี้ขึ้นอยู่กับความยาวของสายหลัก โดยเมื่อความยาวของสายสับสเตรทเพิ่มขึ้นความสามารถในการย่อยหมู่อะซีทิลจะลดลง (Egana และคณะ, 1996)

นอกจากนี้ยังพบว่าอะซีทิลเอสเทอเรสจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ มีค่าความจำเพาะต่อสับสเตรทแตกต่างกันไปเมื่อใช้ *p*-nitrophenyl acetate และ α-naphthyl acetate เป็นสับสเตรทสังเคราะห์ ดังแสดงในตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.5 แอคติวิตีจำเพาะของอะซีทิลเอสเทอเรสต่อสับสเตรทต่าง ๆ

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ชนิดของสับสเตรท	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus niger	Birchwood xylan	32.3	Kormelink และคณะ, 1993
	p-nitrophenyl acetate	31.0	
Bacillus pumilus	Acetylated xylan	40.97	Degrassi และคณะ, 1998
	Xylose tetraacetate	37.16	
	p-nitrophenyl acetate	32.0	
	α-naphthyl acetate	118.8	
Fibrobacter succinogenes	Acetylated xylan	8.63	McDermid และคณะ, 1990
	Lachwood xylan	<0.01	
Penicillium purpurogenum			Egana และคณะ, 1996
AXE I	Acetylated oat spelts xylan	2.85	
	Birchwood hemicellulose	3.87	
	α-naphthyl acetate	24.2	
AXE II	Acetylated oat spelts xylan	0.67	
	Birchwood hemicellulose	0.824	
	α-naphthyl acetate	7.72	
Schizophyllum commune	Acetylated xylan	23	Halgasova และคณะ, 1994
	p-nitrophenyl acetate	59.2	
Streptomyces lividans	Acetylated birchwood xylans	715	Dupont และคณะ, 1996
	Acetylated oat spelt xylans	890	
Termitomyces clypeatus	Acetylated xylan	74	Mukhopadhyay และคณะ, 2003
	p-nitrophenyl acetate	80	
	α-naphthyl acetate	0.80	

ตารางที่ 2.6 ค่า K_m และ V_{max} ของอะซีทิลเอสเทอเรสต่อ *p*-nitrophenyl acetate (NPA) และ α-naphthyl acetate (NA)

สายพันธุ์จุลินทรีย์	สับสเตรทสังเคราะห์	K_m (มิลลิโมลาร์)	V_{max} (ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	เอกสารอ้างอิง
Orpinomyces sp. PC-2	NPA	0.90	785	Blum และคณะ, 1999
Fusarium oxysporum	NPA	0.25	0.65	Christakopoulos และคณะ, 1999
Termitomyces clypeatus	NPA	0.36	83.33	Mukhopadhyay และคณะ, 2003
Aspergillus awamori	NA	1.43	0.11	Koseki และคณะ, 2005
Bacillus pumilus	NA	1.54	360	Degrassi และคณะ, 1998
Candida guilliermondii	NA	2.63	213.3	Basaran และ Hang, 2000
Fibrobacter succinogenes S85	NA	2.70	-	McDermid และคณะ, 1990

2.7.4 สารยับยั้งการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส

อิออนของโลหะหลายชนิดมีผลในการยับยั้งการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรสจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ แตกต่างกัน โดยความสามารถในการยับยั้งขึ้นกับชนิดและปริมาณของอิออนโลหะนั้น เช่น ตะกั่ว (Pb^{2+}) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Aspergillus niger* ได้อย่างรุนแรง (Kormelink และคณะ, 1993) อะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Schizophyllum commune* ถูกยับยั้งการทำงานด้วยอิออนของทองแดง (Cu^{2+}) และเหล็ก (Fe^{2+}) ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ แมงกานีส (Mn^{2+}) และ สังกะสี (Zn^{2+}) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และที่ 10 มิลลิโมลาร์ ของแคลเซียม (Ca^{2+}) และ โคบอลต์ (Co^{2+}) (Halgasova และคณะ, 1994) อะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Bacillus pumilus* ถูกยับยั้งการทำงานด้วย 10 มิลลิโมลาร์ ของ Fe^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+},Ca^{2+} และ Ag^{2+} (Degrassi และคณะ, 1998) อะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Candida guilliermondii* NRRL Y-17257 ถูกยับยั้งการทำงานด้วย 10 มิลลิโมลาร์ ของ Cu^{2+} และ Ag^{2+} ซึ่งสูญเสียแอคติวิตี 50 และ 25 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และสูญเสียแอคติวิตี 70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมี 100 มิลลิโมลาร์ของ EDTA (Basaran และ Hang, 2000)

นอกจากนี้ยังพบว่าสารดัดแปลงกรดอะมิโนบางชนิดยับยั้งการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส เช่น phenylmethylsulfonyl fluoride สามารถยับยั้งการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Trichoderma reesei* (Margolles-Clark และคณะ, 1996)

ตามที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น พบว่ามีรายงานการศึกษาอะซีทิลเอสเทอเรสจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ แต่มีรายงานค่อนข้างน้อยมากจาก *Streptomyces* ในปี พ.ศ. 2539 *Streptomyces* sp. PC22 เป็นจุลินทรีย์ที่แยกได้จากแหล่งดินในประเทศไทย ซึ่งสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงถึง 45 องศาเซลเซียส ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 9.0 และมีประสิทธิภาพสูงในการผลิตไซแลเนสเมื่อเจริญโดยมีแหล่งคาร์บอนเป็นไซแลน หรือวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ เช่น กากเมล็ดฝ้าย (Ungchaithum และ Pinphanichakarn, 1998) และจากการศึกษาสมบัติของไซแลเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์พบว่าเชื้อนี้สร้างไซแลเนสได้ 2 ชนิด โดยทั้งคู่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานที่ 60 องศาเซลเซียส และทนค่าความเป็นกรดด่างได้ในช่วงกว้างตั้งแต่ 5.0-9.0 (Wateewuthajarn และ Pinphanichakarn, 2000, และ Raungtaep และคณะ, 2002) และมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายหมู่ข้างเคียง คือ แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส ศึกษาโดยวิชุตา เหล่าเรืองธนา (2547) และอะซีทิลเอสเทอเรส ศึกษาโดยเวฟุรีย์ ทองคำ (2547)

พบว่าเชื้อนี้สามารถผลิตอะซีทิลเอสเทอเรสได้สูงถึง 0.31 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงในภาวะที่เหมาะสม และยังได้ศึกษาสมบัติเบื้องต้นของอะซีทิลเอสเทอเรสนี้ที่ยังไม่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ พบว่ามีค่าความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงาน คือ 6.5 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เอนไซม์มีความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างในช่วงกว้าง คือ 4.0-9.0 ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะนำมาใช้ประโยชน์ทางอุตสาหกรรม

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะทำอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22 ให้บริสุทธิ์ และศึกษาสมบัติของเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้ รวมทั้งนำเอนไซม์บริสุทธิ์ไปศึกษาการทำงานร่วมกันกับไซแลเนสและบีตา-ไซโลสิเดส เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายไซแลนให้สูงยิ่งขึ้น