

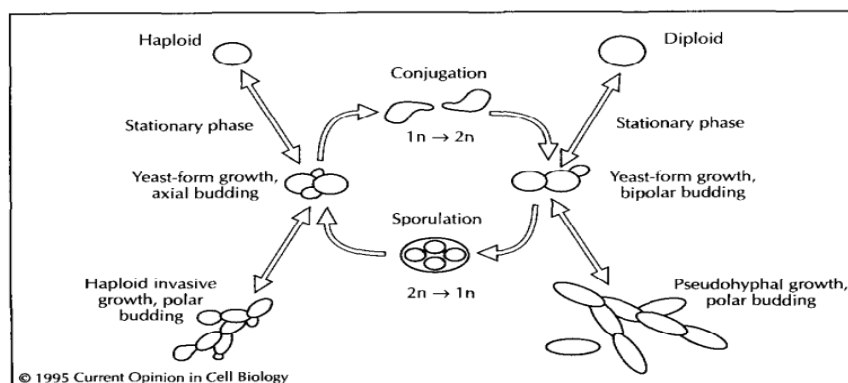
บทที่ 2

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

1. ลักษณะทั่วไปของยีสต์

ยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว สืบพันธุ์โดยอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ สามารถเพิ่มจำนวนได้โดยการแตกหน่อ จีโนมของยีสต์มีขนาดประมาณ 1.4×10^7 คู่เบส ประกอบด้วยโครโมโซม 16 โครโมโซม สามารถหาลำดับเบสได้ทุกโครโมโซม มีวงชีวิตทั้งแฮพลอยด์ (haploid) และดิพลอยด์ (diploid) แต่ช่วงแฮพลอยด์นานกว่า (ศิริลักษณ์ เอี่ยมธรรม, 2552) ทำให้ง่ายต่อการศึกษากระบวนการต่างๆ ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ยีสต์ (ภาพที่ 1) เซลล์ยีสต์มีกระบวนการพื้นฐานทั่วไปที่คล้ายกับยูแคริโอตชั้นสูง แต่สารพันธุกรรมมีความแตกต่างจากพวกลูกเซลล์ชั้นอื่นๆ โดยมีการศึกษาอินตรอน (intron) ในยีสต์มานานแล้วและมีความชัดเจนมากในภายหลังว่ายีสต์มีอินตรอนในยีนเพียง 4-5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งถ้ายีนใดมีอินตรอนจะพบบริเวณใกล้ๆ ปลาย 5' ก่อนตำแหน่งเริ่มต้น (start codon, ATG) ของยีน (Dujon, 1996; Spingola et al., 1999; Davis et al., 2000; Feldmann, 2010) ดังนั้นในการศึกษาการโคลนยีนจากยีสต์ส่วนใหญ่จึงใช้ดีเอ็นเอเป็นแม่แบบ (template) และเนื่องจากทราบข้อมูลทางพันธุกรรมพื้นฐานของยีสต์จึงสะดวกในการดัดแปลงเป็นเซลล์เจ้าบ้าน และพาหะที่ใช้มักเป็น โมเลกุลลูกผสมระหว่างพลาสมิดของ *E. coli* และบางส่วนของยีสต์ แบ่งเป็นพาหะที่ไม่สามารถจำลองตัวเองได้ที่สอดแทรกเข้าไปในโครโมโซม (integrative vector) ซึ่งแบ่งตัวพร้อมกับเซลล์เจ้าบ้าน และพาหะที่สามารถจำลองตัวเองได้ (autonomous explicative vector) ที่สามารถจำลองตัวได้อย่างอิสระ (ศิริลักษณ์ เอี่ยมธรรม, 2552)

ในปัจจุบันนิยมนำเซลล์ยีสต์ทั้งในกลุ่มของ *Saccharomyces* เช่น *S. cerevisiae* และ Non-*Saccharomyces* เช่น *Candida* sp., *Pichia* sp. และ *Hanseniaspora* sp. มาใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ทางเทคโนโลยีชีวภาพหลายชนิด ได้แก่ เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เอทานอล สารปรุงแต่งกลิ่นและรสชาติ ขนมปัง สีสผสมอาหาร เอนไซม์ ยา สอร์โบน วักซีน และสารเคมีต่างๆ (Walker, 1998) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีประโยชน์อย่างยิ่งในการดำรงชีวิตของมนุษย์ แต่บางครั้งเซลล์ยีสต์บางชนิดผลิตผลิตภัณฑ์ได้ในปริมาณน้อย จึงมีการดัดแปลงพันธุกรรมของเซลล์ยีสต์เพื่อให้สามารถเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ต้องการได้ในปริมาณมากขึ้น เพื่อตอบสนองต่อความต้องการของผู้บริโภคในปัจจุบัน



ภาพที่ 1 วงชีวิตของยีสต์ (Kron, Gow, 1995)

1.1 ยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์บีตากลูโคซิเดส

ในอดีตมีการใช้ประโยชน์จากยีสต์ในกลุ่ม *Saccharomyces* ในกระบวนการหมัก แอลกอฮอล์กันอย่างกว้างขวาง แต่จากผลการวิจัยพบว่ายีสต์ *S. cerevisiae* สามารถผลิตเอนไซม์บีตากลูโคซิเดสได้แต่มีประสิทธิภาพในการทำงานค่อนข้างต่ำและสามารถถูกยับยั้งการทำงานได้ภายใต้สภาวะของกระบวนการผลิตไวน์ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส (glucose) ฟรุคโตส (fructose) ซูโครส (sucrose) และแอลกอฮอล์ที่มีปริมาณสูง แต่ปัจจุบันได้มีการใช้ประโยชน์จากยีสต์กลุ่ม Non-*Saccharomyces* เช่น *Candida* sp., *Pichia* sp., *Hanseniaspora* sp., *Hansenula* sp., *Rhodotorula* sp., *Zygosaccharomyces* sp., *Debaromyces* sp., *Cryptococcus* sp., *Torulaspora* sp., *Kloeckera* sp., *Issatchenkia* sp. และ *Metschnikowia* sp. ซึ่งบางชนิดมีศักยภาพในกระบวนการหมักเพื่อให้เกิดคุณสมบัติต่างๆ ในไวน์ (Ganga, Martinez, 2004) ในที่นี้จะขอยกตัวอย่างยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์บีตากลูโคซิเดสเพื่อเพิ่มกลิ่นหอมในไวน์ ได้แก่ *Hanseniaspora* sp., *Pichia* sp., *Candida* sp., *Metschnikowia* sp. และ *Brettanomyces* sp. เป็นต้น ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่ม Non-*Saccharomyces* เช่นผลการวิจัยของ Swangkeaw et al. (2009b) สามารถคัดแยกยีสต์ *P. anomala* MDD24 ได้จากองุ่น ซึ่งเป็นยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์บีตากลูโคซิเดสที่มีคุณสมบัติในการเพิ่มกลิ่นหอมในไวน์และยังพบว่าในสภาวะที่มีเอทานอลเข้มข้น 4-20 เปอร์เซ็นต์ สามารถกระตุ้นการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้ ดังนั้นยีสต์ *P. anomala* MDD24 จึงเป็นยีสต์ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์บีตากลูโคซิเดสเพื่อเพิ่มกลิ่นหอมในไวน์

1.2 ยีสต์ *Pichia anomala*

Pichia anomala มีชื่อเรียกอีกอย่างว่า *Hansenula anomala* หรือ *Wickerhamomyces anomalus* (Passoth et al., 2011) เป็นยีสต์ที่สามารถคัดแยกได้จากหลายแหล่ง ได้แก่ ดอกไม้ เปลือกผลไม้ ลำไส้ของแมลง เนื้อเยื่อของมนุษย์ ผลิตภัณฑ์อาหารและนม น้ำเสีย และ น้ำทะเล เป็นต้น

(Walker, 2011) ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ของ *P. anomala* มีลักษณะเป็นยีสต์เซลล์เดี่ยวรูปร่างกลมรี สืบพันธุ์แบบไม้อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ (budding yeast cell) และยังพบเซลล์ที่มีลักษณะที่เป็นเส้นสายที่เป็นเส้นสายแตกแขนง (branching) ได้ แต่เป็นเส้นสายเทียม (pseudomycelium) เป็นส่วนใหญ่ (ภาพที่ 2) ในขณะที่เส้นสายแท้จริง (true mycelium) อาจจะมีการสร้างแต่น้อยมาก สามารถพบได้เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง และอาหารเหลว การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้างแอสโคสปอร์ (ascospore) รูปร่างของสปอร์มีลักษณะกลม (spherical) รูปหมวก (hat-shaped) หรือรูปดาวเสาร์ (saturn-shaped) (Kurtzman, 1998) เป็นยีสต์ที่สามารถเจริญได้ในสภาวะกดดัน (stress tolerance) เช่น พืชเค็ม แรงดันออสโมติกสูง บริเวณที่มีออกซิเจนต่ำ และบริเวณที่มีปริมาณน้ำน้อย (low a_w) เป็นต้น (Walker, 2011)



ภาพที่ 2 ลักษณะเซลล์ยีสต์ *P. anomala* (ก) ยีสต์เซลล์เดี่ยวที่สามารถแตกหน่อได้ (budding yeast cell) เซลล์ยีสต์ที่มีลักษณะเป็นเส้นสายเทียม (pseudohyphae) (Kurtzman, 2000)

1.3 ประโยชน์ของยีสต์ *P. anomala*

P. anomala เป็นยีสต์ที่มีประโยชน์ในหลายๆ ด้าน (ตารางที่ 1) ตัวอย่างเช่น ด้านอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ ซึ่ง Vohra, Satyanarayana (2001) กล่าวว่า *P. anomala* สามารถผลิตเอนไซม์ไฟเตส (phytase) ที่มีกิจกรรมสูง 68 ยูนิตต่อกรัมเซลล์แห้ง เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส pH 4.0 ซึ่งปัจจุบันเอนไซม์ชนิดนี้มีประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ เนื่องจากโดยปกติแล้วในวัตถุดิบอาหารสัตว์จะมีฟอสเฟตอยู่ในรูปของกรดไฟติก (phytic acid) แต่ในกระเพาะสัตว์ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ไฟเตสที่ย่อยให้ฟอสเฟต (phosphate) หลุดออกมาเป็นอิสระได้ จึงไม่สามารถดูดซึมฟอสเฟตไปใช้ประโยชน์ได้ ดังนั้นจึงมีการเติมเอนไซม์ไฟเตสเพื่อช่วยย่อยกรดไฟติกให้เป็นฟอสเฟตอิสระ (available phosphate) แล้วสัตว์สามารถดูดซึมเอาฟอสเฟตอิสระนี้ไปใช้ต่อไปได้อีกทั้งยังมีประโยชน์ในการถนอมอาหาร (preservation) ตามรายงานการวิจัยของ Olstorpe, Passoth (2011) พบว่า *P. anomala* สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อรา และแบคทีเรีย

กลุ่ม *Enterobacteriaceae* บนเมล็ดธัญพืชแห้งได้ ช่วยเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ และลดความเข้มข้นของสารยับยั้งสารอาหาร (antinutritional) ได้ และยังพบว่า *P. anomala* สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิว (surfactant) ที่ใช้เป็นส่วนผสมในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์หลายชนิดในอุตสาหกรรม จากรายงานวิจัยของ Thaniyavarn et al. (2008) พบว่า *P. anomala* PY1 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) ประเภทไกลโคลิปิดชนิดโซโฟโรลิพิด (sophorolipid) ที่โมเลกุลประกอบด้วยโซโฟโรส (sophorose) กับกรดไขมัน (fatty acid) และมีรายงานวิจัยของ Swangkeaw et al. (2009b, 2011) กล่าวว่า *P. anomala* MDD24 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ปัสตาคูโคซิเดสที่มีคุณสมบัติในการเพิ่มปริมาณสารประกอบอินทรีย์ที่ระเหยได้ เช่น ลิโมนีน (limonene), ลิโนลูล ออกไซด์ (linalool oxide), เอทิลคาโปรเอท (ethyl caproate) และ เอทิลเดคาโปรเอท (ethyl decaproate) จึงทำให้เพิ่มกลิ่นหอมในไวน์ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์นี้ยังทนต่อการยับยั้งของเอทานอลได้สูงถึง 20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้ทำให้สามารถนำไปใช้ในการเพิ่มกลิ่นหอมในอุตสาหกรรมการผลิตไวน์ (winemaking) ได้

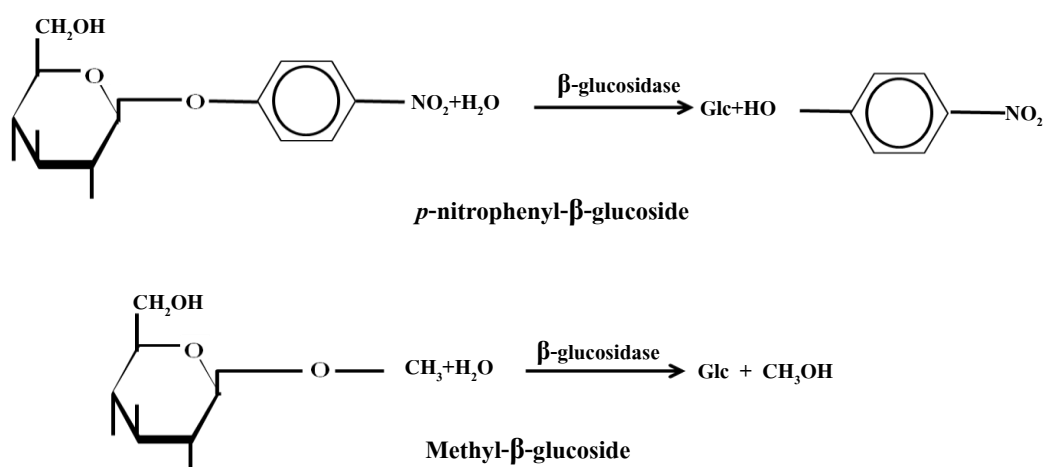
ตารางที่ 1 บทบาทของ *P. anomala* ในอาหาร อาหารสัตว์ และเครื่องดื่ม

การประยุกต์ใช้	ตัวอย่าง
การเพิ่มกลิ่นรส (flavor enhancement)	สารให้กลิ่นในอาหาร เช่น ฟีนิลเอทิล แอลกอฮอล์ (phenylethyl alcohol) และสารปรุงแต่งรสอาหาร เช่น ไดโซเดียมไรโบนิวคลีโอไทด์ (disodium 5'-ribonucleotide)
การถนอมอาหาร (Food biopreservation)	การควบคุมการเจริญของเชื้อราในผลไม้และอาหารแห้ง เช่น ซีเรียล (cereals)
ผลิตภัณฑ์นมหมัก (dairy fermentation)	เป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติก (probiotic)
การทำขนมปัง (baking)	ทำให้แป้งทำขนมปังฟู เรียกว่า โด (dough)
การผลิตไวน์ (winemaking)	เพิ่มกลิ่นหอมในไวน์, ได้ไวน์ที่มีปริมาณแอลกอฮอล์ต่ำ
ผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ (feed)	ผลิตเอนไซม์ไฟเตส (phytase) อะไมเลส (amylase) และเปปติเดส (peptidase)

(Walker, 2011)

2. เอนไซม์บีตากลูโคซิเดส

เอนไซม์บีตากลูโคซิเดส (β -glucosidase) หรือ β -glucoside glycosyl hydrolase (EC.3.2.1.21) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic linkage) ของสารประกอบในกลุ่มไกลโคไซด์ (glycoside) (ภาพที่ 3) ด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) โดยการย่อยหมู่อัลคิลกลูโคไซด์ (alkylglucoside) อาริลกลูโคไซด์ (arylglucoside) ของบีตากลูโคไซด์ รวมทั้งไดกลูโคไซด์ (diglucoside) และ โอลิโกกลูโคไซด์ (oligoglucoside) เป็นต้น เพื่อปลดปล่อยสารไกลโคน (glycone) คือ กลุ่มของน้ำตาล และสารอะไกลโคน (aglycone) คือกลุ่มที่ไม่ใช่น้ำตาล เช่น ไนโตรฟีนอล (nitrophenol) และ อัมเบลลิเฟอรอน (umbelliferone) (Leclerc et al., 1987) เป็นเอนไซม์ที่พบได้ในสิ่งมีชีวิตทั่วไปทั้งพวกโปรแคริโอต (prokaryotes) และยูแคริโอต (eukaryotes) ได้แก่ แบคทีเรีย เชื้อรา พืช และสัตว์ เป็นต้น ถึงแม้ว่าจะมาจากแหล่งที่แตกต่างกันแต่ก็มีความจำเพาะกับซับสเตรตที่เหมือนกัน แต่อาจมีคุณสมบัติ ความเสถียร และการทำงานที่สภาวะแวดล้อมที่ต่างกัน (Esen, 1993)



ภาพที่ 3 การทำงานของเอนไซม์บีตากลูโคซิเดสในการย่อยสารประกอบในกลุ่มไกลโคไซด์ (glycoside) (ดัดแปลงจาก Leclerc et al., 1987)

2.1 แหล่งที่มาของเอนไซม์บีตากลูโคซิเดส

เอนไซม์บีตากลูโคซิเดสเป็นเอนไซม์ที่พบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิต ทั้งโปรแคริโอตและยูแคริโอต แต่จะมีหน้าที่ในแต่ละสิ่งมีชีวิตแตกต่างกันออกไป

2.1.1 เอนไซม์บีตากลูโคซิเดสจากพืช

เอนไซม์บีตากลูโคซิเดสในพืชได้มีการศึกษามาเป็นเวลานานมาแล้ว ซึ่งเอนไซม์บีตากลูโคซิเดสทางการค้าส่วนใหญ่ผลิตมาจากพืช เช่น มันสำปะหลัง ข้าวโพด เมล็ดพวง ใบบละ

ผลของมะเขือพวง และอัลมอนด์ เช่น ในปี ค.ศ. 1873 Liebig และ Wohler ได้ศึกษาเอนไซม์บีตา กลูโคซิเดสจากอัลมอนด์ (almonds β -glucosidase) โดยอธิบายการทำงานของอัลมอนด์บีตา กลูโคซิเดส (almonds β -glucosidase) ในการย่อยอะไมดาลิน (amygdalin) ซึ่งการทำงานของเอนไซม์ ชนิดนี้ในพืชมักจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมและการตอบสนองต่อการเจริญของเซลล์ รวมทั้งในกระบวนการป้องกันการเกิดโรคโดยการปลดปล่อยสารพวกโคยูมาริน (coumarins) ไธโอไซยาเนต (thiocyanates) เทอร์พีน (terpenes) และ ไซยานิน (cyanine) เป็นต้น (Esen, 1993)

2.1.2 เอนไซม์บีตา กลูโคซิเดสจากสัตว์

เอนไซม์บีตา กลูโคซิเดสจากสัตว์ส่วนใหญ่จะพบที่เนื้อเยื่ออวัยวะภายใน โดยเฉพาะในระบบทางเดินอาหารและในน้ำย่อย ซึ่งมีการศึกษาเอนไซม์บีตา กลูโคซิเดสที่สกัดและ ทำให้บริสุทธิ์จากหอยทาก (*Achatina fulica*) พบว่าเอนไซม์ชนิดนี้สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ในช่วง พีเอชกว้าง (pH 4-10) ทนต่ออุณหภูมิได้สูงถึง 50 องศาเซลเซียส และมีความจำเพาะกับซับสเตรต หลายชนิด (Hu et al., 2007)

ตารางที่ 2 แหล่งที่มาของเอนไซม์บีตา กลูโคซิเดสจากจุลินทรีย์

ชนิดของจุลินทรีย์	ชื่อจุลินทรีย์	อ้างอิง
แบคทีเรีย	1. <i>Clostridium thermocellum</i>	Romaniec et al., 1993
เชื้อรา	1. <i>Thermoascus aurantiacus</i> 2. <i>Aspergillus aculeatus</i> 3. <i>Tricoderma reesei</i>	Parry et al., 2001 Kawaguchi et al., 1996 Barnett et al., 1991
ยีสต์	1. <i>Pichia anomala</i> 2. <i>Candida pelliculosa</i> 3. <i>C. albican</i> 4. <i>C. molischiana</i>	Swangkeaw et al., 2006 Kohchi, Toh-e., 1985 Polacheck et al., 1987 Janbon et al., 1995

2.1.3 เอนไซม์บีตา กลูโคซิเดสจากจุลินทรีย์

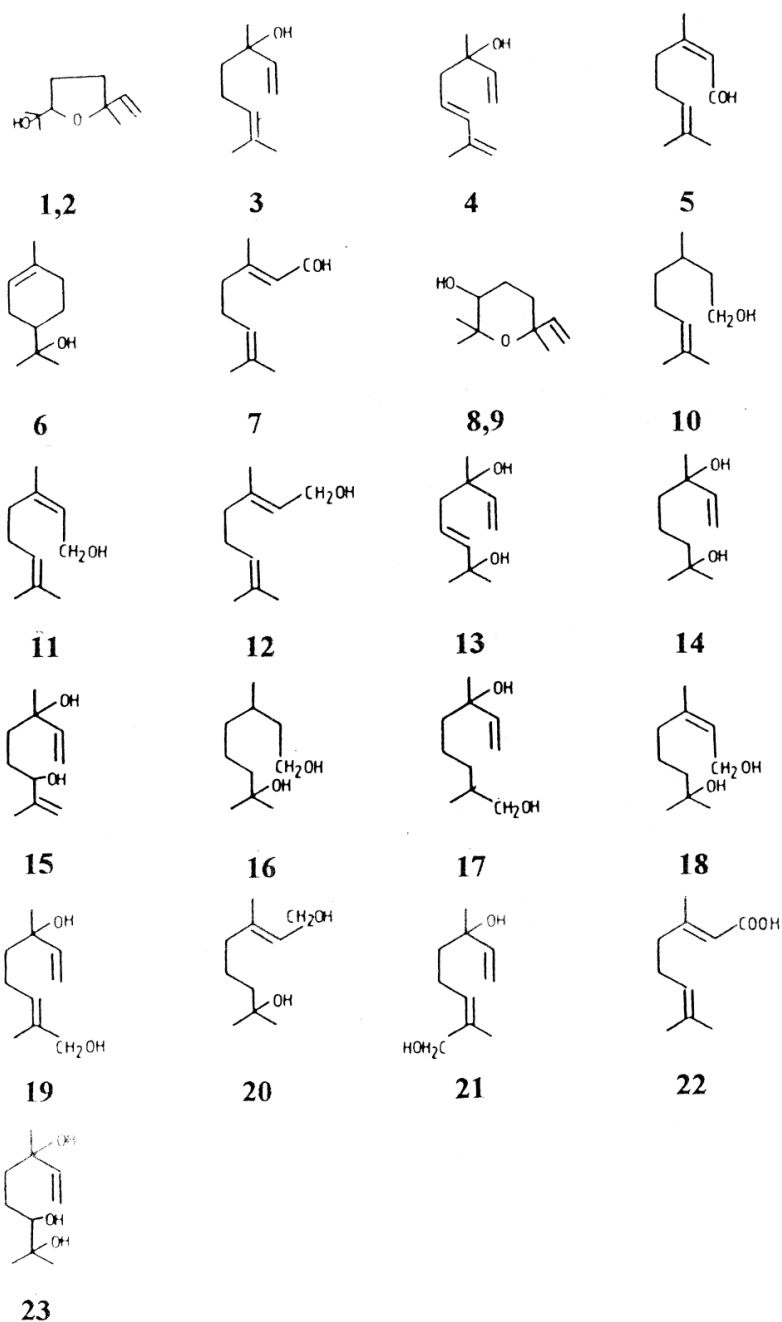
เอนไซม์บีตา กลูโคซิเดสพบในจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา และยีสต์ (ตารางที่ 2) ซึ่งจะมีหน้าที่หรือกลไกในการทำงานที่แตกต่างกันไป เช่น แบคทีเรีย และเชื้อรา เช่น *Tricoderma* sp. สามารถผลิตเอนไซม์ดังกล่าวในการย่อยโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) และ เซลโลไบโอส (cellulose) ให้เป็นกลูโคส เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมต่างๆ และใช้ใน กระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ ส่วนยีสต์นั้นพบว่า *P. anomala* MDD24 (Swangkeaw et al.,

2011) *Debaryomyces hansenii* (Rosi et al., 1994) มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ในการย่อยสารประกอบสารประกอบเชิงซ้อนที่ไม่ระเหยในกลุ่มของไกลโคไซด์ (glycosides) ได้ สารประกอบที่ระเหยได้ ซึ่งมีประโยชน์เป็นอย่างมากในการเพิ่มกลิ่นหอมที่มีลักษณะเฉพาะตัวของไวน์

2.2 บทบาทของเอนไซม์บีตาไกลูโคซิเดสต่ออุตสาหกรรม

เนื่องจากเอนไซม์ชนิดนี้มีความสามารถในการย่อยสลายพันธะบีตา-1,4-ไกลโคซิดิก (β -1,4-glycosidic linkage) ของสารประกอบประเภทคาร์โบไฮเดรต เช่น น้ำตาลโมเลกุลคู่ (disaccharide) โอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) เพื่อให้ได้น้ำตาลกลูโคสที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Wallecha, Mishra, 2003) และยังมีรายงานการวิจัยพบว่า เอนไซม์ชนิดนี้ยังสามารถเกิดปฏิกิริยาทรานสไกลโคซิเลชัน (transglycosylation) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการย้ายหมู่ น้ำตาลจากโมเลกุลของไกลโคไซด์ที่เป็นสารตั้งต้นไปเติมในโมเลกุลของแอลกอฮอล์ที่มีสายคาร์บอนสายยาว เพื่อสังเคราะห์สารอัลคิลไกลโคไซด์ และเอสเตอร์ของเอทอกซิเลท ไกลโคไซด์ (ethoxylated glycosides) ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาดังกล่าวจึงมีการนำไปใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ยา (pharmaceutical) เครื่องสำอาง (cosmetic) เครื่องดื่ม (beverage) และสารลดแรงตึงผิว (surfactant) เป็นต้น (Hong et al., 2007) นอกจากนี้เอนไซม์สามารถย่อยสารประกอบเชิงซ้อนในกลุ่มไกลโคไซด์ที่เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ก่อให้เกิดกลิ่นหอมในไวน์ (Quatrini et al., 2008) เพื่อให้ได้สารประกอบอินทรีย์ที่อยู่ในรูปที่ระเหยได้ ทำให้ผู้ดื่มสัมผัสถึงกลิ่นหอมจากสารที่ระเหยได้ตัวอย่างบทบาทของเอนไซม์บีตาไกลูโคซิเดสในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น

2.2.1 การเพิ่มกลิ่นหอมในไวน์ กลิ่นหอมเป็นคุณลักษณะที่สำคัญของไวน์คุณภาพดีเกิดจากสารประกอบไกลโคไซด์ที่มีในผลไม้ที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไวน์ รวมถึงกระบวนการหมักและการบ่ม โดยกลิ่นหอมในไวน์ส่วนใหญ่เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ระเหยได้ ส่วนใหญ่เป็นสารในกลุ่มของโมโนเทอร์พีน (monoterpenes) เช่น ลินาลูล (linalool), แอลฟา-เทอร์พีนอล (α -terpineol), ซิโตรเนลลูล (citronellol), นีโรล (nerol) และ จีราโนอล (geraniol) เป็นต้น (ภาพที่ 4) (Mateo, Jimenez, 2000; Quatrini et al., 2008) ซึ่งเกิดจากการย่อยสารประกอบไกลโคไซด์ที่เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ไม่ระเหย เพื่อให้ได้สารประกอบอินทรีย์ที่อยู่ในรูปที่ระเหยได้ โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์บีตาไกลูโคซิเดสทำให้ผู้ดื่มสัมผัสถึงกลิ่นหอมจากสารที่ระเหยได้นี้ เช่น งานวิจัยของ Rodriguez et al. (2004) พบว่า ยีสต์กลุ่ม Non-Saccharomyces ประกอบด้วย *Candida guilliermondii*, *C. pulcherrima* และ *Kloeckera apiculata* สามารถผลิตเอนไซม์บีตาไกลูโคซิเดสได้ ซึ่งสามารถใช้เอนไซม์จากยีสต์ดังกล่าวในรูปแบบของเชื้อผสมเริ่มต้น (mixed starter) หรือเชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) ในขั้นตอนสุดท้ายของกระบวนการหมักเพื่อเพิ่มกลิ่นหอมในไวน์แดง และมี



ภาพที่ 4 ตัวอย่างสารที่ทำให้เกิดกลิ่นหอมในไวน์ในกลุ่มโมโนเทอร์พีน (1. *trans*-Furan linalool oxide, 2. *cis*--Furan linalool oxide, 3. Linalool, 4. Ho trienol, 5. Neral, 6. α -Terpineol, 7. Geranial, 8. *trans*-Pyran linalool oxide, 9. *cis*-Pyran linalool oxide, 10. Cotronellol, 11. Nerol, 12. Geraniol, 13. Diol I, 14. Endiol, 15. Diol I, 16. Hydroxy-cityronellol, 17. 8-Hydroxydihydrolinalool, 18. Hydroxynerol, 19. *trans*-8-hydroxylinalool, 20. Hydroxygeraniol, 21. Cis-8-Hydroxylinalool, 22. Geranic acid และ 23. Triol) (Mateo, Jimenez, 2000)

รายงานการวิจัยการผลิตเอนไซม์บีตากลูโคซิเดสจากยีสต์กลุ่ม *Non-Saccharomyces* อีกหลายชนิด เช่น รายงานการวิจัยของ Rosi et al. (1994) พบว่า *D. hansenii* เป็นยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์นี้ได้ ในปริมาณสูง เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่พีเอช 4-5 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และยังทนต่อสภาวะที่มี ปริมาณน้ำตาลและเอทานอลสูงได้ และงานวิจัยของ Swangkeaw et al. (2011) พบว่า เอนไซม์บีตากลูโคซิเดสที่ผลิตจากยีสต์ *P. anomala* MDD24 มีความเหมาะสมในการใช้เพิ่มกลิ่นหอมในไวน์ ซึ่งสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่พีเอช 4.5 และที่ปริมาณเอทานอลเข้มข้น 4-20 เปอร์เซ็นต์ สามารถ กระตุ้นการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้

2.2.2 การผลิตเอทานอล ปัจจุบันได้มีการนำเอทานอลมาใช้เป็นพลังงานทดแทนกัน อย่างแพร่หลาย ซึ่งเอทานอลสามารถผลิตได้จากวัตถุดิบเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ชานข้าวฟ่าง หวาน ฟางข้าว แกลบ ชานอ้อย ชังข้าวโพด เป็นต้น เนื่องจากวัตถุดิบเหลือทิ้งทางการเกษตร เหล่านั้น ส่วนใหญ่เซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลัก ดังนั้นต้องย่อยวัตถุดิบเหล่านั้นให้เป็นน้ำตาล โมเลกุลเดี่ยว โดยในขั้นตอนแรกใช้เอนไซม์ในกลุ่มของเซลลูโลไลติก (cellulolytic enzyme) เช่น เอนไซม์เซลโลไบโอไฮโดรเลส (cellobiohydrolase) จะย่อยเซลลูโลส แล้วได้ผลิตภัณฑ์เป็น เซลโลไบโอส (cellobiose) จากนั้นจึงใช้เอนไซม์บีตากลูโคซิเดสในการย่อยเซลโลไบโอส เพื่อให้ เกิดเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอลต่อไป (Gurgu et al., 2011)

2.2.3 การผลิตสารลดแรงตึงผิว สารลดแรงตึงผิวมีคุณสมบัติช่วยให้เกิดฟอง สามารถดึง สิ่งสกปรกออกจากพื้นผิวให้กระจายอยู่ในน้ำ ด้วยเหตุนี้สารลดแรงตึงผิวจึงเป็นส่วนประกอบสำคัญ อย่างหนึ่งในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดและสารซักล้าง เนื่องจากเป็นสิ่งที่ทำให้คราบสกปรกหลุด ออกจากเนื้อผ้าได้สามารถนำมาใช้เป็นส่วนผสมในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์หลายชนิดใน อุตสาหกรรม โดยเฉพาะสารลดแรงตึงผิวในกลุ่มอัลคิลไกลโคไซด์ (alkyl glycoside) ซึ่งสามารถ สังเคราะห์ได้ทั้งทางเคมีและทางชีวภาพ ในส่วนของการผลิตอัลคิลไกลโคไซด์ทางชีวภาพนั้นจะใช้ เอนไซม์ไกลโคซิเดส (glycosidase) เร่งการเกิดปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชัน ซึ่งอัลคิลไกลโคไซด์ จัดเป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีประสิทธิภาพชนิดหนึ่ง เนื่องจากโมเลกุลละลายน้ำได้ดี อ่อนโยนต่อ ผิวหนังไม่ทำให้ระคายเคือง และไม่กระทบต่อสิ่งแวดล้อม จึงเหมาะที่นำไปใช้เป็นสารประกอบใน อุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอาง (Rantwijk et al., 1999; ภัทรภา พิมพ์พันธ์ และคณะ, 2555)

2.3 การจัดกลุ่มเอนไซม์บีตากลูโคซิเดส

บีตากลูโคซิเดส (E.C.3.2.1.21) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะบีตา ไกลโคซิดิก (β -glycosidic linkage) ที่เชื่อมระหว่างโมเลกุลของน้ำตาล และส่วนที่ไม่ใช่น้ำตาล ของ สารประกอบในกลุ่มไกลโคไซด์ เอนไซม์ชนิดนี้ถูกจัดอยู่ใน glycosyl hydrolase family 1 (GH1)

และ glycosyl hydrolase family 3 (GH3) (Bhatia et al. 2002) ซึ่ง GH1 ประกอบด้วยเอนไซม์ทั้งหมด 62 ชนิด ที่ผลิตจากแบคทีเรียโบราณ (archaeobacteria) พืช สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ส่วน GH3 ประกอบด้วยเอนไซม์ทั้งหมด 44 ชนิด ที่ผลิตจากแบคทีเรีย รา และยีสต์ เชื่อว่าเอนไซม์กลุ่มนี้จะมีกรดแอสพาทิก (aspartic acid, Asp) และกรดกลูตามิก (glutamic acid, Glu) เป็นกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยทั่วไปสามารถจัดจำแนกซึ่งแบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ จำแนกตามความจำเพาะกับซับสเตรต (substrate specificity) และ จำแนกตามความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence identity, NSI) (Henrissat, Bairoch, 1996)

1. การจำแนกตามความจำเพาะกับซับสเตรต (substrate specificity) การจำแนกเอนไซม์ในลักษณะนี้จะจำแนกออกตามความจำเพาะกับซับสเตรต 3 ชนิดคือ

1.1 aryl β -glucosidases เอนไซม์ชนิดนี้มีความจำเพาะกับซับสเตรตที่เรียกว่า อัลลิล-กลูโคไซด์ (aryl-glucosidase)

1.2 เซลโลไบเอส (cellobiase) เอนไซม์ชนิดนี้มีความจำเพาะกับซับสเตรตที่เรียกว่า เซลโลไบโอส (cellobiose) การทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้จะอาศัยน้ำเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (hydrolyze) เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลกลูโคส

1.3 เอนไซม์ที่มีความจำเพาะกับซับสเตรตหลายชนิด เอนไซม์กลุ่มนี้จะมี ความจำเพาะกับซับสเตรตได้มากกว่า 1 ชนิด

2. การจำแนกตามความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence identity, NSI) ในตอนแรกเอนไซม์บีตาไกลูโคซิเดสถูกจัดจำแนกออกเป็น 2 ชนิด คือ Type I และ Type II (Beguin, 1990) แต่ Rojas et al. (1995) กล่าวว่า เอนไซม์บีตาไกลูโคซิเดสแบ่งออกเป็น 2 subfamilies คือ subfamily A (BGA) และ subfamily B (BGB) แต่วิธีที่ได้รับการยอมรับมากที่สุดในปัจจุบัน คือการจัดจำแนกโดยอาศัยความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยการศึกษาของ Henrissat, Bairoch (1996) ได้จัดจำแนกโดยอาศัยความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์และการรวมตัว (folding) ของส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic cluster analysis, HCA) ของเอนไซม์นี้ ซึ่งเป็นส่วนที่แสดงให้เห็นถึงความเหมือนกันในโครงสร้างของเอนไซม์ นอกจากนั้นยังรวมถึงกรดอะมิโนบริเวณตำแหน่งอนุรักษ์ (conserved amino acid) ที่อยู่ใกล้บริเวณเร่งปฏิกิริยา (active site) ของเอนไซม์ด้วย

2.4 คุณลักษณะของเอนไซม์กลูคอสเปปตาไกลูโคซิเดส (recombinant β -glucosidase) จากสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ

เอนไซม์บีตาไกลูโคซิเดสจากสิ่งมีชีวิตหลายๆ ชนิด เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ รา พืช และสัตว์ มักจะถูกโคลนและแสดงออกทั้งในโปรแคริโอต เช่น แบคทีเรีย *E. coli* และยูแคริโอต เช่น ยีสต์

S. cerevisiae และ *Pichia pastoris* และราเส้นใย (filamentous fungi) ซึ่งการโคลนยีนสามารถโคลนได้โดยการทำห้องสมุดจีโนม (genomic DNA library) และคัดเลือกโคลนที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมด้วยการคัดเลือกเบื้องต้น เช่น

1) การคัดเลือกโดยใช้ 5-โบรโม-4-คลอโร-3-อินโดลิล-β-D-กาแลคโตไพราโนไซด์ (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-glucopyranoside, X-gal) ซึ่งเป็นซับสเตรตสังเคราะห์ (artificial substrate) ซึ่งเมื่อเกิดการแสดงออกของยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ β-D-กาแลคโตซิเดส (β-galactosidase) หรือเรียกว่า *lac Z* gene ที่มีตำแหน่งบนเวกเตอร์ ทำให้เกิดการ ทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวในการย่อย X-gal ทำให้เกิดเป็นสีฟ้าของ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl (X) ในโคโลนีที่ได้รับพลาสมิดเปล่า ส่วนโคโลนีที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมจะเกิดเป็นโคโลนีสีขาว เนื่องจากเกิดการแทรกของยีนที่สนใจบริเวณ *lac Z* gene ทำให้ไม่เกิดการแสดงออกของยีนดังกล่าว และไม่เกิดการย่อย X-gal โคโลนีจึงมีสีขาว

2) การคัดเลือกโดยใช้ 4-เมทิล อัมเบลลิเฟอริล β-D-กลูโคไพราโนไซด์ (4-methyl umbelliferyl β-D-glucopyranoside, MUG) ซึ่งเมื่อเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ของเอนไซม์ β-D-กลูโคซิเดสจะปลดปล่อย 4-methyl umbelliferone เมื่อตรวจสอบภายใต้แสงยูวี (UV) จะเกิดการเรืองแสงของผลิตภัณฑ์ที่ถูกปลดปล่อย

3) การคัดเลือกโดยใช้ พารา-ไนโตรฟีนิล β-D-กลูโคไพราโนไซด์ (p-nitrophenyl β-D-glucopyranoside, pNPG) ซึ่งเป็นซับสเตรตสังเคราะห์ เมื่อเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส จะเกิดการปลดปล่อยสารพาราไนโตรฟีโนล (p-nitrophenol, pNP) ซึ่งเป็นสารที่มีสีเหลืองรอบๆ โคโลนี

ตัวอย่างคุณสมบัติต่างๆ ของเอนไซม์ลูกผสม β-D-กลูโคซิเดสจาก แบคทีเรีย รา ยีสต์ ฟังไจ และความจำเพาะต่อซับสเตรตที่แตกต่างกันแสดงดังตารางที่ 3 จะเห็นว่าคุณสมบัติของเอนไซม์ลูกผสมจากสิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกันจะมีความแตกต่างกันมาก รวมทั้งยังมีความแตกต่างกับเอนไซม์ที่พบในสิ่งมีชีวิตปกติอีกด้วย เช่น เอนไซม์ β-D-กลูโคซิเดสลูกผสมที่พบในแบคทีเรียส่วนใหญ่มีโปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุลค่อนข้างต่ำ (low-molecular-weight proteins) พบที่บริเวณของเหลวภายในเซลล์แบคทีเรีย (cytosol) เรียกว่า เอนไซม์ภายในเซลล์ (intracellular enzyme) อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ลูกผสมจาก *Ruminococcus* sp. (Takano et al., 1992) พบว่าเป็นเอนไซม์ที่พบภายนอกเซลล์ เรียกว่า extracellular enzyme แต่โปรตีนลูกผสมจาก *Pyrococcus horikoshii* (Bgl) ที่แสดงออกใน *E. coli* พบโปรตีนชนิดนี้ที่บริเวณเยื่อหุ้มเมมเบรน (membrane bound) ของเซลล์ (ตารางที่ 3ก)

ปัจจุบันเป็นที่ทราบกันดีว่าเชื้อราเป็นเชื้อเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ β-D-กลูโคซิเดสได้ดี แต่รายงานการวิจัยเกี่ยวกับการโคลนยีนชนิดนี้ยังมีอยู่น้อย เนื่องจากมี

ความซับซ้อนของการเกิดกระบวนการไกลโคซิเลชัน (glycosylation) ของโปรตีน และยังพบส่วนของอินตรอน (intron) ในยีนโครงสร้าง (structural gene) ของเชื้อราด้วย การศึกษาการโคลนยีนชนิดนี้จากเชื้อราใน *E. coli* และแสดงออกในระบบของพวกยูแคริโอต เช่น *Trichoderma reesei* (Barnett et al., 1991) *Aspergillus* sp. (Takashima et al., 1999) *S. cerevisiae* (Dan et al., 2000) *P. pastoris* (Dan et al., 2000; Hong et al., 2007) ซึ่งส่วนใหญ่ระบบการแสดงออกในยูแคริโอตจะได้โปรตีนลูกผสม (recombinant protein) ออกมาภายนอกเซลล์ แต่มีบางกรณี เช่น การแสดงออกของโปรตีน BglA จาก *A. kawachii* จะพบโปรตีนลูกผสมบริเวณช่องว่างระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ (periplasmic space) ของ *S. cerevisiae* (Iwashita et al., 1999) (ตารางที่ 3ข)

เอนไซม์บีตากูโลซิเดสจากยีสต์มักจะศึกษาการแสดงออกในระบบของสิ่งมีชีวิตพวกยูแคริโอต เช่น *S. cerevisiae* *P. pastoris* หรือ *Candida* sp. ยกเว้น *bglu* จาก *C. wickerhamii* และ *P. etchellsii* ที่ศึกษาการแสดงออกใน *E. coli* ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตพวกโปรแคริโอต (Skory, Freer, 1995; Pandey, Mishra, 1995; Sethi et al., 2002) โดยทั่วไปการแสดงออกของเอนไซม์ใน *E. coli* จะพบโปรตีนลูกผสมภายในเซลล์ เช่น BglI จาก *P. etchellsii* (Pandey, Mishra, 1995) หรือบริเวณช่องว่างระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ เช่น BglII จาก *P. etchellsii* (Sethi et al., 2002) อย่างไรก็ตาม โปรตีนลูกผสม BGL1 และ BGL2 จาก *Saccharomycopsis fibuligera* ที่โคลนใน *S. cerevisiae* สร้างโปรตีนลูกผสมทั้ง 2 ชนิดอยู่ภายนอกเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Machida et al., 1988) (ตารางที่ 3ค)

เอนไซม์บีตากูโลซิเดสที่พบในพืชมี 2 ชนิด คือ β -D-glucosidases และ β -S-glucosidases (Myrosinase) แต่การโคลนยีนที่สร้างเอนไซม์ชนิดนี้ในพืชยังมีไม่มากนัก ดังแสดงในตารางที่ 3ง

ตารางที่ 3 คุณสมบัติของเอนไซม์ลูกลูกผสมบีตาไกลูโคซิเดสจากสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ

ก. แบคทีเรีย

แหล่งของยีน <i>bglu</i> ^a	เซลล์เจ้าบ้าน	ตำแหน่งที่พบเอนไซม์	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)/จำนวน subunit	พีเอชที่เหมาะสม	อุณหภูมิที่เหมาะสม	ความจำเพาะกับซับสเตรต	จลนพลศาสตร์	การจัดหมวดหมู่	อ้างอิง
<i>Agrobacterium tumefaciens cbg 1</i>	<i>E. coli</i>	Intracellular	88 (1)	-	-	Coniferin	-	Family 3	Castle et al., 1992
<i>Bacillus</i> sp. <i>bglA</i> , <i>bglB</i>	<i>E. coli</i>	Intracellular	Bgl A-50/(1) Bgl B-82/(1)	Bgl A-6.0 Bgl B-8.0	Bgl A-45 Bgl B-40	Bgl A- <i>p</i> NPG, cellobiose, gellan, trisaccharide Bgl B- <i>p</i> NPG	-	Bgl A-Family 1 Bgl B-Family 3	Hashimoto et al., 1998
<i>Bacillus circulans</i> sub sp. <i>alkalophilus bglA</i>	<i>E. coli</i>	Intracellular	51.3/(3)	-	55 on <i>p</i> NPG, 50 on cellobiose	Cellobiose, <i>p</i> NPG, lactose	-	Family 1	Paavilainen et al., 1993
<i>Bacillus polymyxa bglA</i> <i>bglB</i>	<i>E. coli</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>E. coli</i>	Intracellular	50/(1) 51.5/(1)	- -	- -	<i>p</i> NPG, cellobiose	<i>Km p</i> NPG- 0.6 mM, cellobiose- 13 mM -	Family 1 Family 1	Painbeni et al., 1992 Gonzalez-Candelas et al., 1990

^a หมายถึงสัญลักษณ์แทนยีนบีตาไกลูโคซิเดสในการศึกษาครั้งนี้

ตารางที่ 3 คุณสมบัติของเอนไซม์ลูกลูผสมปีตากลูโคซิเดสจากสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ (ต่อ)

ก. แบคทีเรีย

แหล่งของยีน <i>bglu</i> ^a	เซลล์เจ้าบ้าน	ตำแหน่งที่พบเอนไซม์	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)/ จำนวน subunit	pI ที่เหมาะสม	อุณหภูมิที่เหมาะสม	ความจำเพาะกับซับสเตรต	จลนพลศาสตร์	การจัดหมวดหมู่	อ้างอิง
<i>Closteridium thermocellum</i> - <i>bglA</i>	<i>E. coli</i>	-	51.4/(1)	-	-	<i>p</i> NPG, <i>p</i> NPX, cellobiose	-	Family 1	Graebnitz et al., 1991
<i>Microspora biospora</i> - <i>bglB</i>	<i>E. coli</i>	Intracellular	52/(1)	6.5	60	Cellobiose, aryl-glucoside	-	-	Wright et al., 1992
<i>Pyrococcus horikoshii</i>	<i>E. coli</i>	Membrane bound	35/(4)	6.0	100	Laminaribiose, cellobiose, gentiobiose, alkyl-glucosides	<i>Km p</i> NPG-0.35 mM; octyl-glucoside-0.2 mM; dodecyl-glucoside-0.03 mM	Family 1	Matsui et al., 2000
<i>Ruminococcus albus</i> <i>bgl</i>	<i>E. coli</i>	Extracellular	114	6.5	30	Cellobiose, <i>p</i> NPG, cellodextrins	<i>Km p</i> NPG- 2.4 mM, on cellobiose- 96 mM	Family 3	Takano et al., 1992

^a หมายถึงสัญลักษณ์แทนยีนปีตากลูโคซิเดสในการศึกษาครั้งนี้

ตารางที่ 3 คุณสมบัติของเอนไซม์ลูกผสมบีตากลูโคซิเดสจากสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ (ต่อ)

ข. รา

แหล่งของยีน <i>bglu</i> ^a	เซลล์เจ้าบ้าน	ตำแหน่งที่พบเอนไซม์	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)/ จำนวน subunit	pH ที่เหมาะสม	อุณหภูมิที่เหมาะสม	ความจำเพาะกับซับสเตรต	จลนพลศาสตร์	การจัดหมวดหมู่	อ้างอิง
<i>Aspergillus niger</i>	<i>P. pastoris</i>	Extracellular	90	5.0	50	cellobiose	-	-	Mekoo et al., 2010
<i>Aspergillus niger bglI</i>	<i>S. cerevisiae</i> <i>P. pastoris</i>	Extracellular	92	- pH stable 2-9	-	Monoterpenyl glucosides	-	Family 1	Dan et al., 2000
<i>Aspergillus kawachii bglA</i>	<i>S. cerevisiae</i> <i>A. kawachii</i>	Periplasmic space in recombinant <i>S. cerevisiae</i>	120	-	<30	-	-	Family 3	Iwashita et al., 1999
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	<i>P. pastoris</i>	Extracellular	-	5	70	<i>p</i> NP-Glc, <i>p</i> NP-cellobiose, Cellobiose, Cello-oligosaccharides	-	Family 3	Hong et al., 2007
<i>Trichoderma reesei bglI</i>	<i>T. reesei</i>	Extracellular	75.3	-	-	-	-	Family 3	Barnett et al., 1991

^a หมายถึงสัญลักษณ์แทนยีนบีตากลูโคซิเดสในการศึกษาครั้งนี้

ตารางที่ 3 คุณสมบัติของเอนไซม์ลูกผสมปีตากูโคซิเดสจากสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ (ต่อ)

ก. ยีสต์

แหล่งของยีน <i>bglu</i> ^a	เซลล์เจ้าบ้าน	ตำแหน่งที่พบเอนไซม์	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)/ จำนวน subunit	พีเอชที่เหมาะสม	อุณหภูมิที่เหมาะสม	ความจำเพาะกับซับสเตรต	จลนพลศาสตร์	การจัดหมวดหมู่	อ้างอิง
<i>Candida molischiana</i>	<i>Candida</i> sp.	-	83.3/(3)	-	-	-	-	Family 3	Janbon et al., 1995
<i>C. pelliculosa</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Periplasmic space	90/(4)	6.5	50	<i>p</i> NPG, cellobiose	Km <i>p</i> NPG-0.5 mM, cellobiose- 37 mM	-	Kohchi, Toe-h, 1985
<i>C. wickerhamii</i> <i>bglA</i> และ <i>bglB</i>	<i>E. coli</i>	-	-	BglA-4.5	50	<i>p</i> NPG cellodextrin	-	Family 3	Skory, Freer 1995
<i>Kluyveromyces fragilis</i> <i>bglI</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Intracellular	90/(4)	6.0	55	Cellobiose, <i>p</i> NPG, arbutin, salicin, methylglucoside	Km <i>p</i> NPG-0.52 mM, salicin-2.9 mM, cellobiose-79.0 mM	Family 3	Leclerc et al., 1987
<i>Pichia etchellsii</i>	<i>E. coli</i>	Intracellular	50/(4)	6.5-7.0	50 on <i>p</i> NPG, 37 cellobiose	Cellobiose, <i>p</i> NPG, sorpharose, lactose, sucrose	Km on <i>p</i> NPG-0.88 mM, cellobiose- 200 mM	-	Pandey, Mishra, 1997
<i>Saccharomycopsis fibuligera</i> <i>bgl1</i> , <i>bgl2</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Extracellular	BGL1-96.2/(2) BGL2-96.7/(2)	5-6	40-50	<i>p</i> NPG, cellobiose, gentiobiose, methylglucoside	-	BGL1- Family 3 BGL2- Family 3	Machida et al., 1988

^a หมายถึงสัญลักษณ์แทนยีนปีตากูโคซิเดสในการศึกษาครั้งนี้

ตารางที่ 3 คุณสมบัติของเอนไซม์ลูกผสมบีตากลูโคซิเดสจากสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ (ต่อ)

ง. พืช

แหล่งของยีน <i>bglu</i> ^a	เซลล์เจ้าบ้าน	ตำแหน่งที่พบเอนไซม์	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)/ จำนวน subunit	พีเอชที่เหมาะสม	อุณหภูมิที่เหมาะสม	ความจำเพาะกับซับสเตรต	จลนพลศาสตร์	การจัดหมวดหมู่	อ้างอิง
Barley <i>bglu60</i>	<i>E. coli</i>	-	60	4.25-6.5	60	Cellobiose, <i>p</i> NPG, laminaribiose, cellodextrins	<i>K_m</i> for cellobiose-4.5 mM	Family 1	Leah et al., 1995
<i>Catharanthus roseus</i> Strictosidine <i>bgl</i>	<i>S. cerevisiae</i>	-	63	-	-	-	-	Family 1	Geerlings et al., 2000
<i>Costus</i> sp. <i>bgl</i>	<i>E. coli</i>	Intracellular	61.8	-	-	Furastanol	-	Family 1	Inoue et al., 1996
Maize isozyme <i>glu1</i> <i>glu2</i>	<i>E. coli</i>	Intracellular	60/(2)	-	-	<i>p</i> NPG hydroxamic acid glucoside	<i>K_m</i> <i>p</i> NPG Glu1-0.41 mM Glu2-0.84 mM	Glu1-Family1 Glu2-Family1	Cicek, Esen, 1999

^a หมายถึงสัญลักษณ์แทนยีนบีตากลูโคซิเดสในการศึกษาครั้งนี้

3. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

3.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์บีตากลูโคซิเดสและการใช้เพิ่มกลิ่นหอมในไวน์

Janbon et al. (1994) ได้คัดเลือกยีสต์ *Candida molischiana* 35M5N สายพันธุ์กลายที่ผลิตเอนไซม์บีตากลูโคซิเดสได้ในปริมาณมาก โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อทดสอบคุณสมบัติของเอนไซม์พบว่าสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ที่พีเอช 3.5 และเอทานอลสามารถกระตุ้นให้กิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้น จากนั้น Gueguen et al. (1997) ได้ศึกษาการเพิ่มกลิ่นหอมของไวน์ที่หมักจากองุ่นสายพันธุ์มัสแคท (Muscat) ด้วยเอนไซม์บีตากลูโคซิเดสจาก *C. molischiana* 35M5N พบปริมาณของนิโรล จิราโนอล เบนซิลแอลกอฮอล์ (benzylalcohol) 2-ฟีนีลเอทานอล (2-phenylethanol), เทอร์พีน และ ไกลนาลูล เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับไวน์ที่ไม่ได้เติมเอนไซม์ดังกล่าว ซึ่งเอนไซม์ที่ผลิตจากยีสต์บางสายพันธุ์มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการนำไปใช้ในการเพิ่มกลิ่นในไวน์และไวน์ผลไม้ได้

Hernandez et al. (2003) ได้ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์บีตากลูโคซิเดสที่แสดงออกใน *S. cerevisiae* โดยวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ในอาหารหลายชนิด และหลายสภาวะการทดลองพบว่า เอนไซม์บีตากลูโคซิเดสมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ในอาหาร Yeast Extract Peptone แต่ถ้าเพาะเลี้ยงยีสต์ในน้ำองุ่นในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง 25 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์บีตากลูโคซิเดส คือ pH 4.0 และที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์บีตากลูโคซิเดสสามารถทำงานได้ในกระบวนการผลิตไวน์ ถึงแม้ว่าสภาวะที่เหมาะสมจะมีความแตกต่างกัน

Spagna et al. (2002) ได้ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์บีตากลูโคซิเดส จากยีสต์ *P. anomala* ที่คัดแยกได้จาก Sicilian musts และไวน์ ซึ่งพบว่า *P. anomala* ไม่เพียงผลิตเอนไซม์บีตากลูโคซิเดสในปริมาณสูงได้เท่านั้น ยังสามารถผลิตเอนไซม์อะราบินโนซิเดส (arabinosidase) ได้อีกด้วย ซึ่งเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด สามารถนำมาใช้ในการเพิ่มกลิ่นหอมของไวน์ และสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และยังทนต่อการยับยั้งของเอทานอลประมาณ 12-14 เปอร์เซ็นต์ คณะผู้วิจัยสรุปว่าเอนไซม์บีตากลูโคซิเดสนี้เป็นเอนไซม์ที่มีความเหมาะสมในการผลิตไวน์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้ามีเอนไซม์อะราบินโนซิเดสร่วมด้วยจะทำให้มีการปลดปล่อยสารเทอร์พีนอล (terpenols) ได้อย่างมีประสิทธิภาพทำให้กลิ่นหอมในไวน์เพิ่มขึ้น

Rodriguez et al. (2004) ได้คัดเลือกยีสต์จาก Comahue region (Argentinean North Patagonia) ที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ไกลโคซิเดส เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตไวน์แดง (Patagonian red wines) พบว่ายีสต์ที่มีศักยภาพในการเพิ่มกลิ่นหอมในไวน์แดงเป็นยีสต์ในกลุ่ม

Saccharomyces และ Non-*Saccharomyces* และยีสต์ทั้ง 12 ไอโซเลตที่คัดแยกได้มีคุณสมบัติของเอนไซม์ไกลโคซิเดสที่ผลิตได้ต่างกัน และพบยีสต์ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Candida guilliermondii*, *C. pulcherrima*, *Kloeckera apiculata* ที่พบกิจกรรมของเอนไซม์บีตากลูโคซิเดสได้ในปริมาณสูง

Swangkeaw et al. (2006, 2008, 2009b) ได้คัดแยกยีสต์จำนวน 762 ไอโซเลต จากองุ่นและผลไม้ชนิดต่างๆ ที่ปลูกในประเทศไทยและมีศักยภาพในการผลิตไวน์ จำนวน 40 ตัวอย่าง ได้ยีสต์จำนวน 39 ไอโซเลต ที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตเอนไซม์บีตากลูโคซิเดสเมื่อเลี้ยงยีสต์ในอาหารเหลว จากนั้นศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์บีตากลูโคซิเดสจากยีสต์สายพันธุ์ *P. anomala* MDD24 ซึ่งเป็นยีสต์ที่คัดแยกได้จากองุ่น พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์นี้ได้ดีในสภาวะที่มีเซลโลไบโอส 1.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และเมื่อทดสอบคุณสมบัติของเอนไซม์ พบว่าในสภาวะที่มีเอทานอลเข้มข้น 4 ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาตร สามารถกระตุ้นให้กิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้น และทนต่อการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โดยฟรุกโตสและซูโครส ซึ่งคณะผู้วิจัยสรุปว่าเอนไซม์ดังกล่าวมีศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้เพิ่มกลิ่นหอมของไวน์

Swangkeaw et al. (2011) ได้ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์บีตากลูโคซิเดสจากยีสต์ 2 สายพันธุ์ คือ *Hanseniaspora* sp. BC9 และ *P. anomala* MDD24 ที่มีศักยภาพในการเพิ่มกลิ่นหอมในน้ำผลไม้และไวน์ พบว่าน้ำตาลไม่มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บีตากลูโคซิเดสที่ผลิตจาก *Hanseniaspora* sp. BC9 แต่เอทานอลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ในกรณีของ *P. anomala* MDD24 พบว่าเอทานอลสามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์บีตากลูโคซิเดส แต่จะถูกยับยั้งโดยน้ำตาลกลูโคส โดยเอนไซม์บีตากลูโคซิเดสที่ผลิตจากยีสต์ 2 สายพันธุ์ดังกล่าวสามารถเพิ่มความเข้มข้นสารประกอบอินทรีย์ที่ระเหยได้ทั้งในน้ำผลไม้และไวน์ จากผลการวิจัยนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดในกระบวนการหมักไวน์ โดยเอนไซม์จาก *Hanseniaspora* sp. BC9 เหมาะที่จะนำไปใช้ในขั้นตอนก่อนกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ ส่วนเอนไซม์จาก *P. anomala* MDD24 เหมาะที่จะนำไปใช้ในขั้นตอนหลังกระบวนการหมักแอลกอฮอล์

González-Pombo et al. (2011) ได้ศึกษาและทำเอนไซม์บีตากลูโคซิเดสจากยีสต์ *Issatchenkia terricola* ให้บริสุทธิ์ซึ่งถูกผลิตแล้วส่งออกมานอกเซลล์และสามารถทนต่อสภาวะในกระบวนการผลิตไวน์ (พีเอชต่ำ ความเข้มข้นของน้ำตาลและเอทานอลสูง) ซึ่งพบว่าเอนไซม์สามารถทนต่อความเข้มข้นของน้ำตาล 100 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของเอทานอล 18 เปอร์เซ็นต์ เมทาไบซัลไฟต์ (metabisulfite) ความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีความคงตัวที่พีเอชมากกว่า 3 และยังพบว่าการตรึงเอนไซม์บน Eupergit C จะช่วยเพิ่มความคงตัวของเอนไซม์ในกระบวนการผลิตไวน์ขาวได้มากกว่า 16 วัน จากการวิเคราะห์สารประกอบที่ระเหยได้ด้วยวิธี GC-MS พบว่า

สามารถเพิ่มปริมาณโมโนเทอร์พีน และ โนริโซพรีนอยด์ (norisoprenoids) ได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า เอนไซม์ตรีงสามารถเพิ่มกลิ่นหอมในไวน์ได้

Wanapu et al. (2012) ได้ศึกษายีสต์ที่มีคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์บีตาไกลูโคซิเดสเพื่อใช้ในการเพิ่มกลิ่นหอมในไวน์ทั้งหมด 17 สายพันธุ์ พบว่า ยีสต์สายพันธุ์ 71B-1122 มีกิจกรรมของเอนไซม์บีตาไกลูโคซิเดสสูงสุด และนำเอนไซม์บริสุทธิ์ไปใช้ก่อนกระบวนการผลิตไวน์ จากนั้นวิเคราะห์สารประกอบที่ระเหย (aroma compounds) ด้วยวิธี headspace-SPME/GC-MS พบปริมาณเฮกซิลอะซิเตต (hexyl acetate) ไลนาลูล ฟีนเอทิล (phenethyl) นิโรล และสารประกอบจีราโนอล (geraniol compound) เพิ่มขึ้นหลังจากใช้เอนไซม์ดังกล่าว เมื่อทดสอบประสาทสัมผัสพบว่าเมื่อใช้เอนไซม์บริสุทธิ์เติมน้ำองุ่นที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไวน์ทำให้เกิดกลิ่นหอมของไวน์มากขึ้น

3.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการโคลนยีนบีตาไกลูโคซิเดสจากยีสต์

Kohchi, Toh-e (1985) ได้โคลนยีนบีตาไกลูโคซิเดสจากยีสต์ *C. pelliculosa* แล้วส่งถ่ายเข้าสู่ *S. cerevisiae* DC5 พบว่าได้ยีนมีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ 5327 คู่เบส สามารถแปลเป็นกรดอะมิโนได้ 3 เฟรม (frame) ที่มีความยาวของกรดอะมิโน 65, 825 และ 412 กรดอะมิโนตามลำดับ แต่พบว่าเฟรมที่ 2 ที่มีกรดอะมิโน 825 กรดอะมิโนเท่านั้นที่สามารถแปลเป็นเอนไซม์บีตาไกลูโคซิเดสที่มีน้ำหนักโมเลกุล 90 กิโลดาลตัน

Raynal et al. (1987) ได้โคลนยีนบีตาไกลูโคซิเดสจาก *Kluyveromyces fragilis* พบว่าได้ยีนที่มีความยาว 2535 คู่เบส แปลเป็นกรดอะมิโนได้ 845 กรดอะมิโน จากนั้นศึกษาการแสดงออกของยีนใน *S. cerevisiae* ได้โปรตีนลูกผสมที่มีขนาด 90 กิโลดาลตัน เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนพบว่ามีความเหมือนกับบีตาไกลูโคซิเดส จาก *Aspergillus wentii* มากที่สุด และมีกลไกการทำงานของเอนไซม์ที่เหมือนกับเอนไซม์ในกลุ่มไกลโคไลติก (glycolytic enzyme)

Machida et al. (1988) ได้โคลนยีนบีตาไกลูโคซิเดสจาก *Saccharomycopsis fibuligera* โดยใช้ดีเอ็นเอเป็นแม่แบบ (template) พบว่าได้ยีนที่สามารถผลิตเอนไซม์ดังกล่าวได้ 2 ยีน คือ *BGL1* และ *BGL2* และแปลเป็นกรดอะมิโนได้ 876 และ 880 กรดอะมิโน ตามลำดับ จากนั้นส่งผ่านเข้าสู่เซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* แล้วนำผลผลิตจากยีนดังกล่าวมาทำให้บริสุทธิ์ พบว่า ได้โปรตีน BGLI และ BGLII ที่มีขนาด 220 และ 200 กิโลดาลตัน ตามลำดับ แต่เมื่อนำมาศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์บีตาไกลูโคซิเดส พบว่า เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดมีคุณสมบัติใกล้เคียงกัน ยกเว้นความจำเพาะในการย่อยซับสเตรต (substrate specificity) พบว่าโปรตีน BGLI เท่านั้นที่สามารถใช้เซลโลไบโอสเป็นซับสเตรตได้

Janbon et al. (1995) ได้โคลนยีนบีตาไกลูโคซิเดส (*bglA*) จาก cosmid library ของยีสต์ *C. molischiana* 35M5N แล้วส่งผ่านเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ NM 554 ได้ *bglA* ที่มี

ความยาว 2289 คู่เบส ซึ่งแปลเป็นกรดอะมิโนได้ 763 กรดอะมิโน มีขนาดรีคอมบิแนนท์โปรตีน 83.3 กิโลดาลตัน เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับโปรตีนชนิดอื่นๆ ในฐานข้อมูล พบว่า เป็นโปรตีนที่อยู่ใน glycosyl hydrolase family 3 (GH3)

Pandey, Mishra (1995, 1997) ได้โคลนยีนบีตาไกลูโคซิเดสจากยีสต์ทนร้อน (thermophilic yeast) *Pichia etchellsii* พบว่า สามารถโคลนยีนบีตาไกลูโคซิเดส (β glu) ในพลาสมิด pUC19 ได้ยีนที่มีขนาด 4.8 กิโลเบส จากนั้นย้ายโคลนเข้าสู่พลาสมิด pBG55 แล้วส่งเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* เพื่อศึกษาการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม จากนั้นศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนลูกผสม โดยการทำให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์ด้วย PAGE-Zymogram พบว่า โปรตีนที่ได้มีขนาด 200 กิโลดาลตัน ประกอบไปด้วย 4 หน่วยย่อย (subunit) มีขนาดหน่วยละ 50 กิโลดาลตัน เรียกว่า เตตระเมอร์ (Tetramer) เมื่อนำโปรตีนลูกผสมดังกล่าวมาทดสอบความจำเพาะกับซับสเตรต (substrate specificity) พบว่า เอนไซม์ลูกผสมนี้มีความจำเพาะกับซับสเตรตสังเคราะห์ *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (*p*NPG) ซึ่งพบกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ 62 U/l และสามารถทนอุณหภูมิได้ถึง 50 องศาเซลเซียส

Quatrini et al. (2008) ได้หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่กำหนดการสร้างเอนไซม์บีตาไกลูโคซิเดสจาก *P. anomala* ALL12, *Hanseniaspora uvarum* Y8 และ *S. cerevisiae* AL41 โดยการออกแบบไพรเมอร์จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนจากยีสต์ 4 ชนิด จากนั้นเพิ่มปริมาณยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) ซึ่งขนาดผลิตภัณฑ์ (PCR product) ที่คาดหวังมีขนาด 200 คู่เบส แต่จากการศึกษาพบความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์จาก ALL12, Y8 และ AL41 คือ 179, 178 และ 216 คู่เบส ตามลำดับ และเป็นครั้งแรกที่พบความคล้ายคลึง (homology) ของยีนดังกล่าวจาก *Hanseniaspora uvarum* Y8 และ *S. cerevisiae* AL41