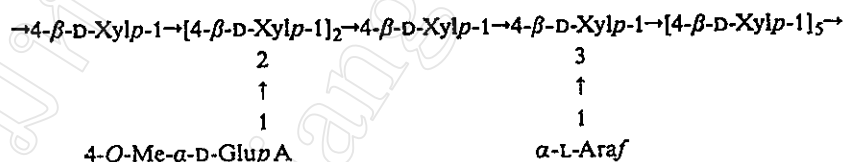


บทที่ 2

บททวนเอกสาร

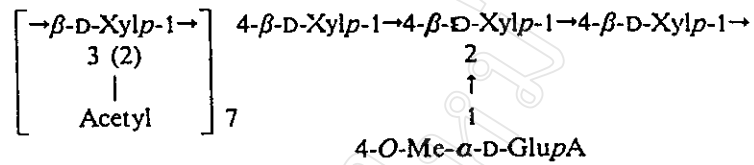
เอนไซม์ไซลานเนส

ไซลานเนสมีความเกี่ยวข้องในการย่อยสลาย xylan polymer ซึ่งประกอบไปด้วยหน่วยของน้ำตาลไซโลสเชื่อมต่อกัน ในธรรมชาติไซแลนเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์พืช และมีปริมาณมากกว่า 30% ของน้ำหนักเซลล์แห้งของพืช นอกจากนี้ยังมี heteropolysaccharide ที่แตกสาขาออกไปอีกมากมาย เช่นไซแลนที่เป็นองค์ประกอบในไม้เนื้ออ่อนและไม้เนื้อแข็งจะมีโครงสร้างความแตกต่างกัน โดยไซแลนในไม้เนื้ออ่อน คือ arabinoglucuronoxylan สายหลักจะประกอบไปด้วยหน่วยของ 1,4-linked- β -D-xylopyranose ภายในสายจะถูกแทนที่ในตำแหน่ง C₂ และ C₄ ด้วยหน่วยของ 4-O-methyl- α -D-glucuronic acid ประมาณ 2 หน่วยต่อ ไซโลส 10 หน่วย และมีหน่วยของ α -L-arabinopyranose ประมาณ 1.3 หน่วย ต่อ ไซโลส 10 หน่วย (รูป 1)



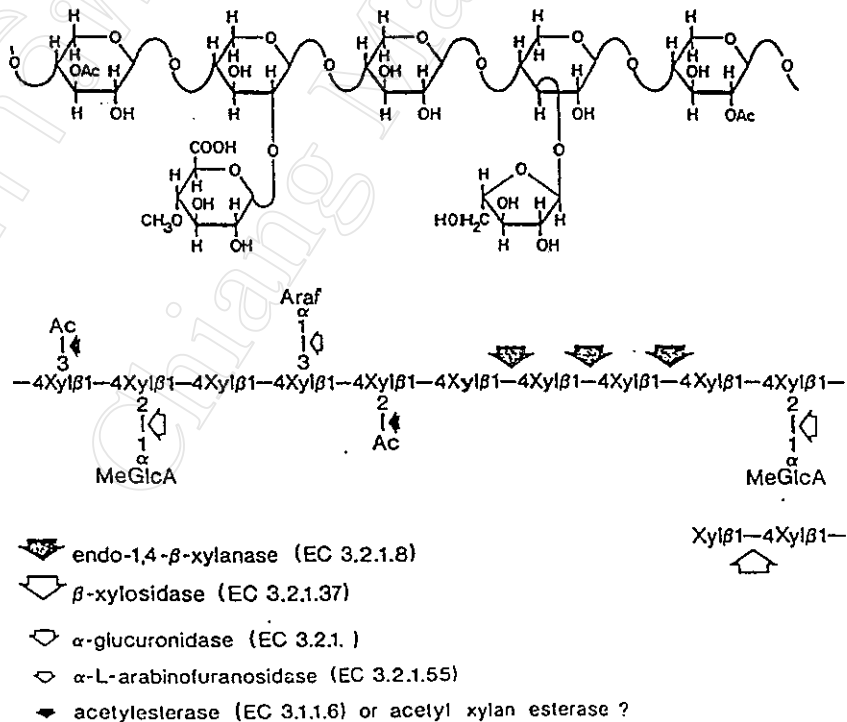
รูป 1 โครงสร้างของ arabinoglucuronoxylan

ไซแลนในไม้เนื้อแข็งคือ O-acetyl-4-O-methyl-glucurono- β -D-xylan หรืออาจเรียกสั้นๆ ว่า glucuronoxylan ในสายหลักจะประกอบไปด้วยหน่วยของ β -D-xylopyranose โดยไซโลส 7 หน่วย จาก 10 หน่วย จะมี acetyl group ที่ตำแหน่ง C₂ หรือ C₃ และจะมี 1 หน่วย ของ 4-O-methyl- α -D-glucuronic acid ต่อ 10 หน่วยของไซโลส (รูป 2)



รูป 2 โครงสร้างของ glucuronoxylan

เอนไซม์ไฮโดรไลสมี 11 families ของ endo-1,4- β -D-glucosidase และ ไฮโดรไลสที่ทำการตัดแบบสุ่มคือ 1,4-glycosidic bond โดยการทำงานของกลุ่เอนไซม์จะทำให้การย่อยสลายไซแลนสมบูรณ์มากขึ้น (รูป 3) เช่นการย่อยสลายแขนงของ acetyl xylan จำเป็นต้องใช้เอนไซม์ที่ต่างกันหลายชนิด คือ endo-1,4- β -xylanase(EC.3218.), β -xylosidase(EC.321.37), α -glucuronidase (EC.3.2.1), α -L-arabinofluranosidase(EC.3.2.1.55) และ acetyl esterase(EC.3.1.1.6)



รูป 3 การสลายพันธะต่างๆของไซเลน

ที่มา : Eriksson และคณะ 1990

endoxylanase เป็นเอนไซม์ที่มีการศึกษากันมาก โดยเอนไซม์ดังกล่าวจะเข้าทำปฏิกิริยากับสายหลักของไซแลน และทำให้เกิด substitute และ non-substitute oligomer, xylobiose, ไซโลส เป็นต้น หรือมีการเปลี่ยน oligomer หรือ dimer ให้เป็นไซโลส โดย β -xylosidase โดยปกติจะทำงานร่วมกับเอนไซม์ชนิดอื่น เช่น α -arabinosidase, α -D-glucuronosidase และ acetylsterase เป็นต้น ซึ่งจะทำหน้าที่ในการตัดหมู่แทนที่จากสายหลักของไซแลนทำให้การย่อยสลายสมบูรณ์มากขึ้น

ในธรรมชาติมีเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถสร้างเอนไซม์ในกลุ่มไซแลเนสได้และมีการศึกษากันอย่างกว้างขวางดังเช่น

Endo-1,4- β -D-xylanase

เชื้อราและแบคทีเรียหลายชนิดสามารถที่จะผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ได้ และได้มีการศึกษเกี่ยวกับคุณสมบัติของเอนไซม์ โดยเฉพาะจากเชื้อ *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*, *T. harzianum*, *T. koningii* และ *T. lignorum* เป็นต้น นอกจากนี้ยังมี brown rot fungi เช่น *Cinophora cerebella*, *Tyromyces palustris* และ *Ploria placenta* ในกลุ่มของแบคทีเรียเช่น *Bacillus*, *Streptomyces*, *Thermomonas* sp. และ *Cellulomonas uda* ในกลุ่ม anaerobic bacteria เช่น *Clostridium acetobutylicum*

1,4- β -D-xylosidase

ศึกษากันมากในเชื้อราและแบคทีเรีย โดยปกติมักจะเป็น intracellular enzyme พบใน mycelium ของเชื้อราในช่วงแรกของการเจริญ เชื้อราที่ผลิต β -xylosidase เช่น *Botryodiplodia* และ Black *Aspergillus* สำหรับแบคทีเรียเช่น *Bacillus pumilus*

α -Arabinosidase

จุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ดังกล่าวมีทั้ง เชื้อรา แบคทีเรีย Actinomycetes, Protozoa และพืช โดยเอนไซม์จะสลายหมู่ nonreducing จากด้านปลายของ α -L-arabinofluranoside, arabinans, arabinoxylan และ arabinogalactan

α -D-Glucuronidase

เอนไซม์ดังกล่าวมีการศึกษาน้อยมากในแง่บทบาทของการย่อยสลายไซเลน เนื่องจากยังไม่มีวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจสอบหากิจกรรมของเอนไซม์ เชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์นี้ได้ เช่น *Agaricus bisporus* และ *Pleurotus ostreatus* ในขณะที่พบไซลานเนสและ β -xylosidase น้อยมาก (Erikson และคณะ 1990)

การนำไซลานเนสมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม (Beg และคณะ 2001)

1. นำมาใช้ในอุตสาหกรรมฟอกสีเยื่อกระดาษ โดยจะทำหน้าที่ในการกำจัดส่วนของไซเลน และได้เยื่อกระดาษที่มีคุณภาพมากขึ้น
2. นำไปใช้ในอาหารสัตว์โดยการทำให้ประสิทธิภาพการนำไปใช้ของอาหารในระบบลำไส้ของสัตว์ดีขึ้น จากการเข้าไปช่วยลดความหนืดของอาหารในระบบทางเดินอาหาร
3. ช่วยในการปรับปรุงคุณภาพของขนมปังให้ดีขึ้น โดยจะเข้าไปเพิ่มความพรุนให้มากขึ้น โดยจะเข้าไปกำจัดส่วนของ arabinoxylan ที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในสับสเตรทออกไป และทำให้การขึ้น dough ของขนมปังเร็วขึ้น
4. ช่วยในการกำจัดน้ำเสียในอุตสาหกรรมอาหาร และเปลี่ยนวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรต่างๆ โดยจะทำการเปลี่ยนไซเลนให้เป็นไซโลส
5. นำมาใช้ในการชักนำให้เกิด glycosylation และ fatty acetylation ของ photosterols ในเซลล์พืช
6. ใช้ร่วมกับ cellulase ในอุตสาหกรรมน้ำผลไม้ และ นำไปใช้ในการเตรียมอาหารสัตว์ทำให้มีการย่อยได้ง่ายขึ้น
7. ใช้ในการผลิต alkyl glycoside ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น surfactant ปกติจะผลิตมาจากน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเช่น D-glucose และ fatty alcohol

เอนโดไฟติกฟังไจ (Esser และ Lemke 1997)

เอนโดไฟท์ เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในเซลล์หรือระหว่างเซลล์ของพืชโดยที่ไม่ทำให้พืชแสดงอาการผิดปกติ มีการค้นพบครั้งแรกที่ประเทศนิวซีแลนด์และสหรัฐอเมริกา ในช่วงปลายปี 1940 จากอาการผิดปกติของสัตว์ที่ไม่สามารถอธิบายได้ และต่อมาพบว่าเป็นผลมาจากสารในกลุ่ม alkaloid ซึ่งสารกลุ่มนี้มักจะมีพิษ โดยทั่วไปจะพบเอนโดไฟท์ในส่วนต่างๆของพืช เช่น ราก ใบ กิ่ง เป็นต้น มีการคาดคะเนว่ามีการค้นพบพืชที่มีระบบต่อลำเลียงประมาณ 400,000 สปีชีส์ และจะมีเอน

โคไฟท์ที่มีความจำเพาะต่อพืชในแต่ละสปีชีส์ประมาณ 6 สปีชีส์ ดังนั้นควรจะพบเอนโคไฟท์ในโลกนี้อย่างน้อย 2,000,000 สปีชีส์ ในธรรมชาติเอนโคไฟท์มีบทบาทต่อพืชหลายแบบ เช่น ช่วยทำให้พืชมีความต้านทานต่อการเข้าทำลายของสัตว์กินพืชบางชนิด สร้างสารที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืช ทำให้การงอกของเมล็ดพืชเกิดขึ้นได้โดยสมบูรณ์ เป็นต้น ในอนาคตคาดว่าจะมีการนำเอนโคไฟท์มาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น ในอุตสาหกรรมยา และเกี่ยวกับการนำเอนโคไฟท์เข้ามาใช้กับเมล็ดพืชเพื่อให้มีความต้านทานต่อการเข้าทำลายของแมลงต่างๆ นอกจากนี้ยังรวมไปถึงการผลิตเอนไซม์ และสารควบคุมทางชีวภาพ

การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ (Harris และ algal 1989)

1. การตกตะกอนโปรตีน

วิธีการนี้เป็นวิธีการขั้นต้นที่นิยมใช้กันมากในการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ โดยคุณสมบัติในการละลายของโปรตีนนั้นจะขึ้นอยู่กับประจุของ amino acid ซึ่งมีทั้งกลุ่มที่ชอบและไม่ชอบน้ำ ที่อยู่ที่ผิวของโปรตีน การตกตะกอนของโปรตีนจะอยู่ในรูปของการเข้ามาจับตัวรวมกันของโมเลกุลโปรตีน เมื่อสารละลายมีการเปลี่ยนค่า พีเอช หรือ ionic strength จากการเติมสารละลายอินทรีย์ต่างๆ (organic solvent) นอกจากนี้อุณหภูมิยังมีผลต่อการจับกันของโปรตีนด้วย โปรตีนที่ได้ในรูปของตะกอนสามารถแยกออกได้โดยการกรอง หรือ การเหวี่ยง และนำตะกอนที่ได้ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม สารละลายโปรตีนจะนำไปทำไดอะไลซิส (dialysis) หรือ เจลฟิลเตรชัน (gel filtration) เพื่อแยกเกลือออกจากสารละลายโปรตีน วิธีการตกตะกอนโปรตีนสามารถทำได้หลายวิธีคือ

1.1 การตกตะกอนโดยการเปลี่ยนค่าพีเอช

การตกตะกอนโดยวิธีการเปลี่ยนค่า พีเอช สามารถทำได้โดยการปรับค่าพีเอชของสารละลายจนเข้าใกล้ค่า pI (Isoelectric point) ของโปรตีน โดยที่ผิวของโมเลกุลโปรตีนจะมีกลุ่มของประจุบวกและลบอยู่โดยรอบ การที่ค่าของ พีเอช มากกว่าค่า pI จะทำให้ประจุรวมที่ผิวของโปรตีนมีประจุเป็นลบ และในทางตรงกันข้ามเมื่อค่า พีเอช ของสารละลายน้อยกว่า pI ของโปรตีนจะทำให้ประจุรวมที่ผิวของโปรตีนมีประจุเป็นบวก ดังนั้นที่ค่า พีเอช เท่ากับ pI ของโปรตีนจะทำให้ประจุมบนโปรตีนเป็นศูนย์ จะไม่มีแรงกระทำระหว่างโมเลกุลของโปรตีนและสารละลายโดยรอบ แต่จะเกิดแรงจับกันระหว่างประจุบนโมเลกุลของโปรตีนกับโปรตีนที่อยู่ข้างเคียงและรวมตัวกันในรูปของตะกอน โดยปกติการตกตะกอนโดยวิธีการปรับค่า พีเอช จะใช้ตกตะกอนกลุ่มโปรตีนที่ไม่ต้องการมากกว่าที่จะใช้ในการตกตะกอนโปรตีนที่สนใจ เนื่องจากอาจเกิดการเสียสภาพของโปรตีนได้

1.2 การตกตะกอนโดยลดค่า ionic strength

โปรตีนบางชนิดสามารถจะตกตะกอนได้เมื่อมี ionic strength ค่ำๆ กรณีดังกล่าวเกิดขึ้นได้ยาก โดยเฉพาะในกรณีของ crude extract เนื่องจากการลด ionic strength สามารถทำได้ง่าย แต่การเติมน้ำลงในสารละลายก็จะทำให้ความเข้มข้นของ crude extract ลดลง และการละลายก็จะเพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามการตกตะกอนโดยผลจากการลด ionic strength สามารถเกิดได้ในขั้นตอนต่างๆของการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ เช่น จากการแยกเกลือออกหลังจากการทำ ไดอะไลซิส เจลฟิเลเทชั่นหรือ ไดอะฟิเลเทชั่น (diafiltration) โดย การตกตะกอนจะมีความสัมพันธ์กับค่า pI ของโปรตีน

1.3 การตกตะกอนโดยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate)

การตกตะกอนด้วยวิธีนี้นิยมใช้เกลือ (neutral salt) ในการเพิ่ม ionic strength จาก การที่เกลือจะทำให้โปรตีนมีความเสถียรมากขึ้น ทำให้โปรตีนเสถียรสภาพได้ยากขึ้น และได้ โปรตีนในรูปของตะกอนในปริมาณที่สูง นอกจากนี้ยังป้องกันการย่อยสลายจาก โปรตีเอส (protease) และการปนเปื้อนเนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ ที่เข้าไปเจริญในน้ำเลี้ยงโดยการใช้ สับสเตรทที่เกลืออยู่ การจับกันของโปรตีนจากการทำ salting out จะขึ้นอยู่กับกลุ่มที่ไม่ ชอบน้ำ (hydrophobic group) ที่อยู่ที่ผิวของโปรตีน ซึ่งโดยปกติแล้วกลุ่มดังกล่าวจะอยู่ด้าน ในโครงสร้างของโปรตีน และมีบางส่วนที่อยู่ผิว โดยน้ำที่อยู่โดยรอบโมเลกุลสามารถที่ จะเข้าไปจับกับหมู่ดังกล่าวได้ เมื่อมีการเติมเกลือลงไปในสารละลาย น้ำที่อยู่ในสาร ละลายจะเป็นตัวทำลายเกลือที่เติมลงไปทำให้เกลือมีความเข้มข้นมากขึ้น ในขณะที่ว ถั กั้นโมเลกุลของน้ำที่อยู่รอบโมเลกุลของโปรตีนจะเริ่มลดลง จนน้ำที่อยู่รอบในส่วนพื้นที่ที่ ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic path) บนผิวโมเลกุลของโปรตีนหมดไป ทำให้เกิดการจับกันของ ส่วนที่ไม่ชอบน้ำในแต่ละโมเลกุลของโปรตีนเกิดขึ้น และรวมตัวกันตกตะกอนลงมา คัง นั้นโปรตีนที่มีส่วนไม่ชอบน้ำมากก็จะตกตะกอนออกมาก่อนโปรตีนที่มีส่วนไม่ชอบน้ำที่ น้อยกว่า ทำให้สามารถแยกโปรตีนต่างชนิดกันได้จากการตกตะกอนเป็นลำดับขั้น (salt fractionation) โดยค่อยๆทำการเพิ่มความเข้มข้นของเกลือ และแยกตะกอนในแต่ละความ เข้มข้นมาทดสอบคุณสมบัติของโปรตีนที่สนใจ ตะกอนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเกลือ จะมีโปรตีนผสมหลายชนิด เช่นเดียวกับผลของการตกตะกอนโดยการปรับค่า พีเอช แต่ใน การตกตะกอนโดยการปรับค่า พีเอช จะมีผลของอุณหภูมิเข้ามาเกี่ยวข้องโดยเมื่อทำการเพิ่ม อุณหภูมิให้สูงขึ้นการตกตะกอนจะมีมากขึ้น ในขณะที่การตกตะกอนด้วยเกลือสามารถทำ

ได้ที่อุณหภูมิต่ำ (4 °C) ซึ่งจะลดอัตราความเสี่ยงจากการทำงานของ protease และ การเสียสภาพของโปรตีนได้

เกลือที่นิยมใช้มีหลายชนิดแต่ประสิทธิภาพจะขึ้นอยู่กับประจุ โดย phosphate > sulphate > acetate > chloride เป็นต้น และ monovalent cation ที่จะให้ประสิทธิภาพดีที่สุดคือ $\text{NH}_4^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+$ เป็นต้น สิ่งที่ต้องระวังคือ การละลายของเกลือต้องไม่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน เช่น เกลือของโพแทสเซียมไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ เนื่องจากการละลายของเกลือจะมีอุณหภูมิที่สูงขึ้นเสี่ยงต่อการเสียสภาพของโปรตีนและความร้อนที่เกิดขึ้นทำให้การละลายของเกลือน้อยลง เป็นต้น เกลือที่นิยมใช้กันมากที่สุดคือ แอมโมเนียมซัลเฟต เนื่องจากเกลือชนิดนี้มีค่าการละลายน้ำที่สูงมากและค่าสัมประสิทธิ์ของการละลายจะสูงที่อุณหภูมิต่ำ (0-30 °C) (ตาราง 1) ทำให้สามารถตกตะกอนโปรตีนได้ที่อุณหภูมิต่ำ ช่วยเลี่ยงการสลายตัวของโครงสร้างโปรตีนที่สลายตัวได้ง่ายที่อุณหภูมิสูงได้

1.4 การตกตะกอนโดยการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent)

โปรตีนหลายชนิดสามารถตกตะกอนได้จากการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น acetone หรือ ethanol โดยปัจจัยที่มีผลต่อการตกตะกอนของโปรตีนคล้ายกับการตกตะกอนโดยการปรับค่า พีเอช ของสารละลายให้เข้าใกล้ค่า pI ของโปรตีนและแตกต่างจากการตกตะกอนโดยการทำให้ salting out ในการเติมตัวทำละลายอินทรีย์จะเป็นการลด dielectric constant ของสารละลายโปรตีนลง (ค่ากิจกรรมของน้ำลดลง) ทำให้ความสามารถในการเป็นตัวทำละลายของน้ำลดลงเมื่อความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์มากขึ้น การจับกันเนื่องจากแรงของประจุที่ผิวโมเลกุลของโปรตีนจะเกิดขึ้น ทำให้โปรตีนจับตัวกันตกตะกอนออกมาได้ การตกตะกอนมักจะเกิดขึ้นเมื่อค่า พีเอช ของสารละลายเข้าใกล้ค่า pI ของโปรตีน และขนาดของโปรตีนมีผลต่อการตกตะกอนโดยโปรตีนที่มีโมเลกุลใหญ่จะสามารถตกตะกอนได้เมื่อใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ความเข้มข้นต่ำ ในขณะที่โปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจะใช้ความเข้มข้นที่สูงกว่า

การตกตะกอนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์นิยมทำที่อุณหภูมิ 0 °C เพื่อลดความเสี่ยงต่อการเสียสภาพของโปรตีน โดยที่อุณหภูมิสูงจะทำให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนอย่างรวดเร็ว โมเลกุลของตัวทำละลายอินทรีย์สามารถแทรกเข้าไปด้านในโครงสร้างของโปรตีนและเข้าไปรบกวนการจับกันของกลุ่มที่ไม่ชอบน้ำภายในโครงสร้างของโปรตีน ทำให้โปรตีนเสียสภาพได้ และนอกจากนี้ ionic strength ควรอยู่ในช่วง 0.05-0.2 โดย ionic

strength ที่สูงเกินไปจะเสี่ยงต่อการเสียสภาพของโปรตีนในขณะที่ ionic strength ที่ต่ำเกินไปจะทำให้โปรตีนตกตะกอนในลักษณะที่แขวนลอยกระจายอยู่ในสารละลายซึ่งยากต่อการแยกตะกอนทั้งหมดออกมา ตัวทำละลายอินทรีย์ ที่นิยมใช้คือ อะซิโตน (acetone) และ เอทานอล (ethanol) และสามารถใช้ เมทานอล (methanol), propan-1-ol และ propan-2-ol สิ่งที่ต้องคำนึงถึงคือ สารที่ใช้ควรมีความปลอดภัยสูง ความเป็นพิษต่ำ และจุดติดไฟที่อุณหภูมิมากกว่า 20 °C โดยสารในกลุ่ม ไดออกแซน (dioxans) และ อีเธอร์ (ether) ควรหลีกเลี่ยง สำหรับสารในกลุ่ม long chain alcohol เช่น บิวทานอล (butanol) ไม่ควรใช้เนื่องจากทำให้โปรตีนเสียสภาพได้ง่ายเมื่อเทียบกับเอทานอล ในการตกตะกอนโปรตีนโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ควรมีโปรตีนเริ่มต้นอย่างน้อย 1 mg/ml เนื่องจากการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ จะเป็นการเจือจางโปรตีนในสารละลายเพิ่มมากขึ้น

1.5 การตกตะกอนโดย organic polymer

นิยมใช้ polyethylene glycol (PEG) โดยกลไกจะคล้ายกับการตกตะกอนโดยใช้ organic solvent แต่ความเข้มข้นของสารที่ใช้ยังคงมีความสำคัญในการตกตะกอนโปรตีน โดยปกติจะใช้ PEG ไม่เกิน 20 %w/v เนื่องจากที่ความเข้มข้นที่สูงเกินไปจะทำให้สารละลายมีความหนืดสูงขึ้นทำให้การเก็บตะกอนโปรตีนทำได้ยาก ในการแยก PEG ออกสามารถทำได้โดยการใช้ ultrafiltration เนื่องจากขนาดโมเลกุลของ PEG มีขนาดที่แตกต่างจากโมเลกุลของโปรตีนมากทำให้แยกโปรตีนที่สนใจออกมาได้ และ PEG ยังไม่รบกวนการแยกโปรตีนในขั้นตอนอื่นๆด้วย เช่น ion exchange, affinity chromatography

1.6 การตกตะกอนโดยการทำให้เสียสภาพ

วิธีการนี้โปรตีนที่สนใจต้องไม่เสียสภาพพร้อมกับโปรตีนอื่นที่ไม่ต้องการ และวิธีนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์ (gel electrophoresis หรือ amino acid analysis)

ตาราง 1 ปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่เติมตัว (กรัม) ที่เติมลงไปในสารละลายโปรตีน

Final concentration of ammonium sulphate, % saturation at 0°C		20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
Initial concentration of ammonium sulphate																		
g solid ammonium sulphate to add to 100 ml of solution																		
0	10.7	13.6	16.6	19.7	22.9	26.2	29.5	33.1	36.6	40.4	44.2	48.3	52.3	56.7	61.1	65.9	70.7	
5	8.0	10.9	13.9	16.8	20.0	23.2	26.6	30.0	33.6	37.3	41.1	45.0	49.1	53.3	57.8	62.4	67.1	
10	5.4	8.2	11.1	14.1	17.1	20.3	23.6	27.0	30.5	34.2	37.9	41.8	45.8	50.0	54.5	58.9	63.6	
15	2.6	5.5	8.3	11.3	14.3	17.4	20.7	24.0	27.5	31.0	34.8	38.6	42.6	46.6	51.0	55.5	60.0	
20	0	2.7	5.6	8.4	11.5	14.5	17.7	21.0	24.4	28.0	31.6	35.4	39.2	43.3	47.6	51.9	56.5	
25	0	2.7	5.7	8.5	11.7	14.8	18.2	21.4	24.8	28.4	32.1	36.0	40.1	44.2	48.5	52.9	57.3	
30	0	2.8	5.7	8.7	11.9	15.0	18.4	21.7	25.3	28.9	32.8	36.7	40.8	45.1	49.5	53.9	58.3	
35	0	2.8	5.8	8.8	12.0	15.3	18.7	22.1	25.8	29.5	33.4	37.4	41.6	45.9	50.2	54.5	58.8	
40	0	2.9	5.9	9.0	12.2	15.5	19.0	22.5	26.2	30.0	34.0	38.1	42.4	46.7	51.0	55.3	59.6	
45	0	2.9	6.0	9.1	12.5	15.8	19.3	22.9	26.7	30.6	34.7	38.8	42.9	47.1	51.3	55.5	59.7	
50	0	3.0	6.1	9.3	12.7	16.1	19.7	23.3	27.2	31.2	35.3	39.4	43.5	47.6	51.7	55.8	59.9	
55	0	3.0	6.2	9.4	12.9	16.3	19.9	23.5	27.4	31.4	35.5	39.6	43.7	47.8	51.9	56.0	60.1	
60	0	3.1	6.3	9.6	13.1	16.6	20.0	23.8	27.7	31.7	35.8	39.9	44.0	48.1	52.2	56.3	60.4	
65	0	3.1	6.4	9.8	13.4	17.0	20.8	24.7	28.8	32.8	36.9	41.0	45.1	49.2	53.3	57.4	61.5	
70	0	3.2	6.6	10.0	13.6	17.3	21.2	25.3	29.4	33.5	37.6	41.7	45.8	49.9	54.0	58.1	62.2	
75	0	3.2	6.7	10.2	13.9	17.6	21.6	25.7	29.8	33.9	38.0	42.1	46.2	50.3	54.4	58.5	62.6	
80	0	3.3	6.8	10.4	14.1	17.8	21.8	25.9	30.0	34.1	38.2	42.3	46.4	50.5	54.6	58.7	62.8	
85	0	3.4	6.9	10.6	14.3	18.0	22.0	26.1	30.2	34.3	38.4	42.5	46.6	50.7	54.8	58.9	63.0	
90	0	3.4	7.1	10.8	14.5	18.2	22.2	26.3	30.4	34.5	38.6	42.7	46.8	50.9	55.0	59.1	63.2	
95	0	3.5	7.3	11.0	14.7	18.4	22.4	26.5	30.6	34.7	38.8	42.9	47.0	51.1	55.2	59.3	63.4	
100	0	3.5	7.5	11.2	14.9	18.6	22.6	26.7	30.8	34.9	39.0	43.1	47.2	51.3	55.4	59.5	63.6	

ที่มา : Harris and Angal, 1989

2. การทำสารละลายโปรตีนให้เข้มข้น

ในการทำสารละลายโปรตีนให้เข้มข้นขึ้น จะเป็นการลดปริมาตรโดยรวมลงทำให้โปรตีนมีความเข้มข้นขึ้น และปริมาตรที่น้อยมีผลทำให้การทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไปง่ายขึ้น เช่น การตกตะกอน หรือการเติมตัวอย่างลงในคอลัมน์ โดยในสารละลายโปรตีนที่มีความเข้มข้นสูงจะทำให้การสูญเสียโปรตีนจากการจับกับผนังของภาชนะ หรือ คอลัมน์ลดลง ในการทำให้สารละลายโปรตีนเข้มข้นขึ้นสามารถปฏิบัติได้หลายวิธีดังนี้

2.1 การเติม dry matrix polymer

เป็นวิธีการรวดเร็วในการทำสารละลายให้เข้มข้นขึ้นและใช้เครื่องมือน้อยมาก เช่น การใช้ sephadex ซึ่งจะไปดูดซับน้ำและสารโมเลกุลขนาดเล็กเช่น โปรตีน แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้ไม่สามารถที่จะนำโปรตีนที่สนใจทั้งหมดในสารละลายกลับคืนมาได้ทั้งหมด ดังนั้นจึงไม่นิยมวิธีการนี้ในการทำ โปรตีนให้เข้มข้นขึ้น

2.2 Ultrafiltration

การทำ ultrafiltration ในส่วนของน้ำและสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก จะถูกดันผ่าน membrane โดยอาศัยแรงเช่น การเหวี่ยง (centrifugation) หรือการใช้ความดันในการดันของเหลวให้ผ่าน เมมเบรน (membrane) โดย เมมเบรน ที่ใช้ในการทำ ultrafiltration จะมีขนาดของ pore size เท่ากับ 1-20 nm. โดยโปรตีนที่สนใจจะมีขนาดใหญ่กว่า pore size จึงไม่สามารถผ่านเมมเบรนออกไปได้ (Harris และ Angal 1989)

ultrafiltration membrane จะมี cut-off limits (ขนาดโมเลกุลของสารที่น้อยที่สุดที่ไม่สามารถผ่านเมมเบรนได้) ที่แตกต่างกันไป จาก 1,000 Daltons ไปจนถึง 300,000 Daltons ในการทำ ultrafiltration นิยมที่จะใช้ในการทำสารละลายโปรตีนให้เข้มข้นขึ้น โดยจะสามารถแยกเกลือและสารที่มีโมเลกุลเล็กได้อย่างมีประสิทธิภาพ และวิธีการดังกล่าวสามารถทำได้ง่ายและรวดเร็ว (Janson และ Ryden 1989)

2.3 Lyophilization (Freeze-drying)

การทำ lyophilization มีผลให้สารทั้งหมดเข้มข้นขึ้น โดยให้ผลตรงข้ามกับการทำ ultrafiltration โดยมีผลทำให้เกลือมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามไปด้วย ในกรณีของ

เอนไซม์อาจทำให้เกิดการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ได้ แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้จะให้ผลดีในการทำให้ peptide สะสม และมีขนาดเล็กมีความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นดีกว่าการใช้วิธี ultrafiltration ผลจากการทำ lyophilization จะทำให้โปรตีนอยู่ในรูปของผงแห้งซึ่งจะมีความคงตัวมากกว่าในรูปของสารละลาย ดังนั้นในทางการค้าจึงมักนิยมเก็บโปรตีนในรูปผงโดยการทำ lyophilization (Harris และ Angal 1989)

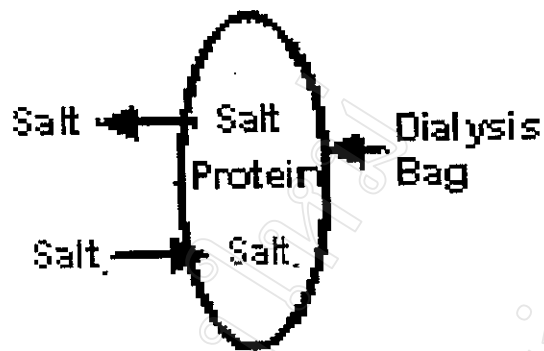
การทำ lyophilization จะอาศัยหลักการเปลี่ยนสถานะของของเหลวให้อยู่ในรูปของแข็ง และทำให้เกิดการระเหิด (sublimation) ของน้ำให้เป็นไอ โดยการลดความดันให้ต่ำกว่า triple point ของน้ำทำให้ของแข็งสามารถเปลี่ยนสถานะเป็นไอน้ำได้โดยตรงโดยที่ไม่ต้องมีการหลอมเหลวเป็นของเหลวก่อน (Verrall, 1996)

3. การกำจัดเกลือออกจากสารละลายโปรตีน

การกำจัดเกลือออกและการเปลี่ยนบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ในลำดับต่อไป เช่น ion exchange chromatography ซึ่งจำเป็นต้องมีการเปลี่ยนค่าพีเอช หรือ ionic strength เพื่อให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมในการจับกันระหว่างเอนไซม์กับตัวกลางที่ใช้ วิธีการแยกเกลือสามารถทำได้ดังนี้

3.1 Dialysis

สารละลายโปรตีนจะถูกนำมาใส่ในถุงไดอะไลซิส (dialysis bag) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นเยื่อเลือกผ่าน (รูป 4) และนำถุงไดอะไลซิสที่มีสารละลายโปรตีนอยู่ แช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม โมเลกุลของสารที่มีขนาดเล็กเช่นเกลือ จะสามารถผ่านเมมเบรนออกไปได้ในขณะที่สารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ เช่น โปรตีน จะไม่สามารถผ่านเมมเบรนออกไปได้ สารที่มีโมเลกุลเล็กจะผ่านจะผ่านเมมเบรนจนกระทั่งแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) บริเวณด้านในและด้านนอกเมมเบรนเท่ากันซึ่งจะไม่มี การเคลื่อนที่ของสารระหว่างเมมเบรน จำเป็นที่ต้องมีการเปลี่ยนบัฟเฟอร์ที่ใช้แช่ใหม่ก็จะมี การเคลื่อนที่ของสารผ่านเข้าออกเมมเบรน อีกครั้ง จากการที่มีแรงดันออสโมติกที่ต่างกัน ในการทำไดอะไลซิส จะทำที่อุณหภูมิต่ำ (4°C) เป็นเวลา 1 คืน เพื่อให้เกลือแยกออกจากสารละลายโปรตีนมากที่สุด เมมเบรน ที่ใช้โดยทั่วไปจะทำมาจาก เซลลูโลสอะซิเตต (cellulose acetate) ซึ่งจะมี pore size เท่ากับ 1-20 nm. (Harris and Angal, 1989)



รูป 4 การเคลื่อนที่ของสารผ่านถุงไดอะไลซิส

นอกจากการใช้เซลลูโลส (cellulose) เป็นเยื่อเลือกผ่านแล้วยังสามารถใช้ collodion หรือ cellophone ได้ โดยสามารถที่จะผลิตให้มีขนาดของ pore size ต่างๆกันได้ (สุภโชค, 2541)

3.2 Diafiltration

การทำไดอะฟิลเตรชันจะใช้หุคอุปกรณ์เช่นเดียวกับการทำ ultrafiltration โดยจะทำการเติมสารละลายบัฟเฟอร์ หรือน้ำลงไปในสารละลายโปรตีน และทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการทำ ultrafiltration จะทำซ้ำจนกว่าสารที่ออกมามี ionic strength เท่ากับบัฟเฟอร์ที่เติมลงไปตอนเริ่มต้น ระยะเวลาในการดำเนินการขึ้นอยู่กับปริมาณของตัวอย่าง

3.3 Gel filtration

การนำตัวอย่างสารละลายโปรตีนมาใช้ในขั้นตอนนี้ต้องมีปริมาณที่น้อย โดยปกติจะไม่เกิน 25-30% ของปริมาณคอลัมน์ เพื่อประสิทธิภาพในการแยกเกลือออกจากโปรตีน โดยสมบูรณ์ ตัวกลางที่ใช้จะมีขนาด pore size ที่แตกต่างกัน โดยส่วนใหญ่จะนิยมที่มี pore size ขนาดเล็กเช่น sephadex G-25 เป็นต้น

4. Ion exchange chromatography

เป็นการแยกโปรตีน โดยอาศัยความแตกต่างของประจุบนผิวโมเลกุลของโปรตีน โดยตัวกลางที่ใช้จะเป็นตัวแลกเปลี่ยนประจุ ซึ่งจะให้ประจุเป็นบวกหรือเป็นลบขึ้นอยู่กับ functional group ที่อยู่รอบตัวกลาง (ตาราง 2)

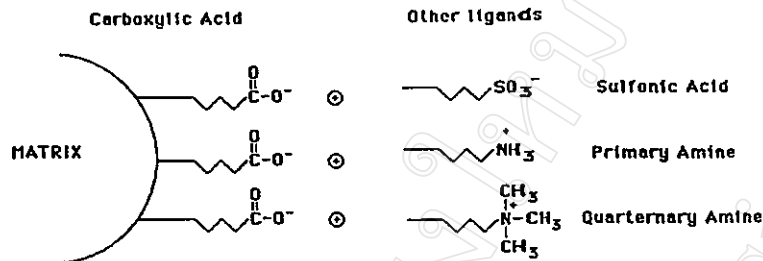
ตาราง 2 Functional groups ของตัวแลกเปลี่ยนประจุ

Name	Designation	pK	Structure
<i>Anion exchangers</i>			
Diethyl aminoethyl	DEAE	9.0 to 9.5	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2$
Trimethyl hydroxypropyl	QA		$-\text{OCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$
Quaternary aminoethyl, diethyl-(2-hydroxypropyl) -aminoethyl	QAE		$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$
Quaternary aminomethyl	Q	9.5*	$-\text{OCH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$
Triethyl aminomethyl	TEAE		$-\text{OCH}_2\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_3$
Triethylaminopropyl	TEAP		$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_3$
Polychthylenimine	PEI		polymerized $\text{CH}_2=\text{CH}=\text{NH}$
<i>Cation exchangers</i>			
Methacrylate		6.5	polymerized $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COOH}$
Carboxymethyl	CM	3.5-4	$-\text{OCH}_2\text{COOH}$
Orthophosphate	P	3 and 6	$-\text{OPO}_3\text{H}_2$
Sulfonate	S	2	$-\text{OCH}_2\text{SO}_3\text{H}$
Sulfoethyl	SE	2	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$
Sulfopropyl	SP	2-2.5	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$

* The pK value apparently does not refer to quaternary groups

ที่มา : Janson and Ryden, 1989

ตัวกลางที่มีคุณสมบัติแลกเปลี่ยนประจุลบจะเป็นกลุ่ม primary, tertiary หรือ quaternary amine ในขณะที่ตัวกลางที่มีคุณสมบัติแลกเปลี่ยนประจุบวกจะเป็นกลุ่ม sulphonic acid หรือ carboxylic acid (รูปที่ 5)



รูป 5 ประจุที่อยู่บนผิวของตัวแลกเปลี่ยนประจุ

ที่มา : Stein, 1990

เมื่อตัวแลกเปลี่ยนประจุถูกทำให้อิ่มตัวในสารละลายบัฟเฟอร์ ตัวแลกเปลี่ยนประจุจะถูกห้อมล้อมไปด้วยประจุที่เป็นองค์ประกอบในบัฟเฟอร์เพื่อเป็นการรักษาสมดุลทางไฟฟ้าจะเรียกประจุนี้ว่า counter ion ซึ่งจะมีประจุตรงข้ามกับประจุของตัวแลกเปลี่ยนประจุ โดยการจับกับตัวแลกเปลี่ยนประจุของ counter ion จะขึ้นอยู่กับ ionic strength โดยไอออนที่มี ionic strength สูงกว่าจะจับกับตัวแลกเปลี่ยนประจุได้ดีกว่า ดังนั้นเมื่อทำการเติมตัวอย่างสารละลายโปรตีนผ่านตัวแลกเปลี่ยนประจุ สารที่มี ionic strength สูงกว่า เช่น โปรตีน จะเข้าไปแทนที่ counter ion และจะถูกชะออกมาด้วยสารที่มี ionic strength สูงกว่า ซึ่งสามารถทำได้จากการเปลี่ยนค่าพีเอชหรือ เพิ่มความเข้มข้นของสารที่ใช้เป็นตัวชะเพื่อให้มี ionic strength ที่สูงกว่า โดยใช้เกลือ เช่น โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride), แมกนีเซียมคลอไรด์ (magnesium chloride), โพแทสเซียมฟอสเฟต (potassium phosphate) และ แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate) (Stein, 1990)

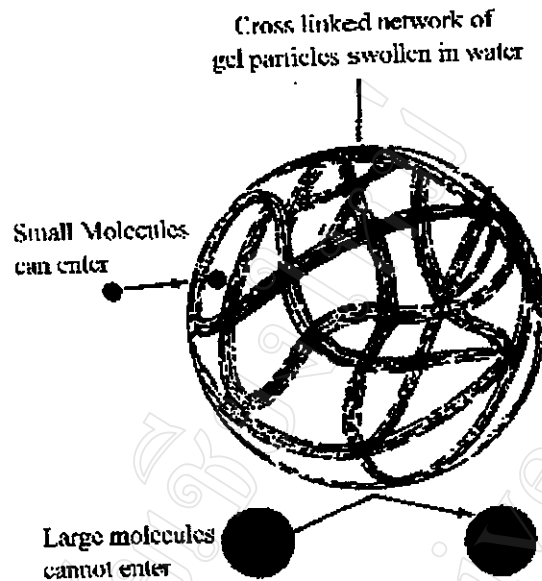
บริเวณผิวโมเลกุลของโปรตีนจะมีทั้งประจุบวกและลบ โดยโปรตีนจะให้ประจุบวกเมื่อ มีกลุ่ม ฮิสติดีน (histidine), ไลซีน (lysine), อาร์จินีน (arginine) และจะให้ประจุลบเมื่อมีแอสพาทิกแอซิด (aspartic acid) และ กลูตามิกแอซิด (glutamic acid) ดังนั้นประจุรวมของโปรตีนจะขึ้นอยู่กับกรดอะมิโน (amino acid) บริเวณผิวของโปรตีน ค่าพีเอชที่ทำให้ผลรวมของประจุบวกและลบ บนผิวโมเลกุลของโปรตีนเท่ากัน เรียกว่า isoelectric point โดยโปรตีนส่วนใหญ่จะมีค่า pI อยู่ในช่วง 5-9 เมื่อในสภาวะที่ค่า พีเอช ของสารละลายโปรตีนมีค่าสูงกว่า pI ของโปรตีนจะมีผลทำให้ประจุรวมที่ผิวโมเลกุลของโปรตีนเป็นลบ ในขณะที่เมื่อค่า พีเอช ของสารละลายโปรตีนมีค่าต่ำกว่า pI ของโปรตีนจะมีผลทำให้ประจุรวมที่ผิวโมเลกุลของโปรตีนเป็นบวก ดังนั้นประสิทธิภาพในการจับ

กับตัวแลกเปลี่ยนประจุของโปรตีนกับตัวแลกเปลี่ยนประจุ จะขึ้นอยู่กับประจุที่ผิวของโมเลกุล โปรตีนว่าเป็นประจุบวกหรือลบ เมื่อประจุที่อยู่ล้อมรอบตัวแลกเปลี่ยนประจุเป็นประจุบวกจะสามารถจับกับโปรตีนที่มีประจุเป็นลบ (anion exchanger) ในขณะที่ประจุที่อยู่ล้อมรอบตัวแลกเปลี่ยนประจุเป็นประจุลบจะสามารถจับกับโปรตีนที่มีประจุเป็นบวกจะสามารถจับกับโปรตีนที่มีประจุรวมเป็นบวก (cation exchanger) (Harris and Angal, 1989)

5. Gel filtration chromatography หรือ Size exclusion (Gel permeation) chromatography

การทำ gel filtration chromatography เป็นขั้นตอนหนึ่งในการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ โดยตัวกลางที่ใช้แยกโปรตีน จะมีช่องว่างภายในที่เกิดจากการเชื่อมไขว้ของโพลิเมอร์ (polymer) ที่ใช้ทำเจล ดังรูป 6 ขนาดของช่องว่างภายในจะมีขนาดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเจลและกระบวนการผลิต ในการเคลื่อนที่ของสารผ่านตัวกลาง สารที่มีโมเลกุลใหญ่จะไม่เข้าสู่เจลและจะถูกชะออกมา ก่อน ในขณะที่สารที่มีโมเลกุลเล็กจะสามารถผ่านเข้าสู่เจลได้ และถูกชะออกมาทีหลัง แต่อย่างไรก็ตามการแยกสารโดยการทำ gel filtration chromatography นอกจากจะขึ้นอยู่กับขนาดของโมเลกุลแล้วยังขึ้นอยู่กับรูปร่างของโมเลกุลด้วย โดยโมเลกุลที่มีรูปร่างกลม (spherical shape) จะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่น้อยกว่าโมเลกุลที่มีรูปร่างยาว (elongate shape) เมื่อมีน้ำหนักโมเลกุลที่เท่ากันทำให้โมเลกุลที่มีรูปร่างยาว จะถูกชะออกมาก่อน

ตัวกลาง (stationary phase) ที่ใช้มีหลายชนิด เช่น dextran, agarose, silica, cellulose, polystyrene และ polyacralamide เป็นต้น สำหรับสารละลายที่ใช้ในการชะ (mobile phase) จะใช้สารที่ความเข้มข้นที่ต่ำ (<100 mM) และค่าพีเอช ที่ใช้ยังขึ้นอยู่กับชนิดของตัวกลางที่ใช้ และควรจะช่วยในการทำให้โปรตีนอยู่ในสภาวะที่เสถียรหรือป้องกันไม่ให้มีการจับกันของโปรตีน (Stein, 1990)



The Principle of Gel Filtration

รูป 6 การเชื่อมโยงของเจล

6. Electrophoresis

ในทางทฤษฎีเกี่ยวกับ gel electrophoresis มีความซับซ้อนมาก แต่สามารถเข้าใจหลักการแยกโดย electrophoresis ได้คือ ประจุที่อยู่บนอนุภาคเป็นสาเหตุทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของอนุภาคไปยังบริเวณที่มีประจุตรงข้ามจากการชักนำโดยสนามไฟฟ้า การเคลื่อนที่ของอนุภาคจะขึ้นอยู่กับขนาดของช่องว่างระหว่างเจลที่อยู่รอบๆอนุภาค ดังนั้นอนุภาคที่มีความแตกต่างในการตอบสนองต่อสนามแม่เหล็กไฟฟ้า และขนาดที่ต่างกันจะมีอัตราในการเคลื่อนที่ผ่านเจลได้ต่างกันด้วย

การแยกโดย electrophoresis จะขึ้นอยู่กับ ขนาด รูปร่าง และ ประจุรวมบนโมเลกุลของโปรตีน การแยกโปรตีนโดย electrophoresis ภายใต้สภาวะที่ไม่ทำให้คุณสมบัติของโปรตีนเสียไป (native condition) จะไม่เห็นความแตกต่างระหว่างผลของขนาด รูปร่าง และประจุ จากการเคลื่อนที่บนสนามไฟฟ้าของโปรตีนต่างชนิดกันได้ ทำให้โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันจะเคลื่อนที่ได้เหมือนกันในระบบเดียวกัน ดังนั้นในการทำ PAGE method สำหรับ native protein จะไม่สามารถประเมินได้ว่าการปนเปื้อนจากโปรตีนชนิดอื่นหรือบอกลำดับโมเลกุลของโปรตีนที่ไม่ทราบชนิดได้ ในการทำ SDS-PAGE จะสามารถแก้ไขปัญหาดังกล่าวได้ โดยการเติม SDS (anionic detergent) ลงในสารละลายโปรตีน ซึ่งสาร SDS จะจับกับส่วนที่ไม่ชอบน้ำบนโมเลกุลของโปรตีน

โดยจะมีผลเข้าไปทำลาย noncovalent bond ทำให้โปรตีนอยู่ในสภาพที่คลายตัว (unfolded) และทำการทำลาย disulfide bond ของโปรตีน โดยการเติม disulfide-reducing agent เช่น 2-mercaptoethanol หรือ dithiothreitol จะทำให้โปรตีนเสียสภาพ ในการเคลื่อนที่ของสารประกอบเชิงซ้อน (detergent-polypeptide complex) จะมีความสัมพันธ์กับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน โดยสารประกอบเชิงซ้อนของโปรตีนที่มีขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าสารประกอบเชิงซ้อนที่มีขนาดใหญ่ ดังนั้นจึงสามารถบอกน้ำหนักของโปรตีนได้จากการเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลแล้วในระบบเดียวกัน ซึ่งจะสามารถเห็นแถบของโปรตีนที่ปนเปื้อนอยู่ในโปรตีนที่สนใจได้ และสามารถประมาณค่าน้ำหนักโมเลกุลได้พร้อมกันด้วย

Polyacrylamide gel จะเกิดจากการจับกันระหว่าง acrylamide monomer ($\text{CO}=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) และ cross-linking comonomer ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$) คือ N,N-methylenebisacrylamide โดยกลไกในการเกิด เจล คือ เกิดจากการกระตุ้นโดย free-radical ในระบบ ซึ่งจะเกิดจาก ammonium persulfate โดย TEMED (tetramethylenediamine) จะทำให้เกิด free-radical จาก persulfate โดยการเกิด polymerization จะถูกรบกวนด้วย oxygen ที่ละลายอยู่ในสารละลาย ดังนั้น ควรที่จะกำจัดออกจาก acrylamide solution ก่อน ช่องว่างของ เจล ที่เกิดขึ้นจากการเกิด polymerization จะขึ้นกับความเข้มข้นของ acrylamide โดยขนาดของ pore size จะลดลงเมื่อความเข้มข้นของ acrylamide เพิ่มขึ้น (Harris และ Algal 1989)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาเกี่ยวกับเอนโดไฟท์ (endophytes) ซึ่งเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในพืชและมีบทบาททางนิเวศวิทยาแง่ของการช่วยย่อยสลายซากพืชที่ตายแล้วการนำเชื้อเอนโดไฟท์มาศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ต้องมีเทคนิคและวิธีการแยกที่เหมาะสมเพื่อให้ได้เชื้อที่คุณสมบัติตามต้องการสามารถปฏิบัติได้โดย การนำตัวอย่างพืชมาทำการฆ่าเชื้อที่ผิว (surface-sterilized) (70% ethanol 1 นาที, 5.3% sodiumhypochloride 5 นาที, 95% ethanol 30 % 30 วินาที) วิธีการดังกล่าวสามารถแยก เอนโดไฟท์ได้มากกว่า 900 ไอโซเลต จากตัวอย่างพืชที่มาจากประเทศมาเลเซีย และอินโดนีเซีย เชื้อที่แยกได้นำมาทำการทดสอบการผลิตโอลิโกแซคคาไรด์ พบว่า 66% ของ เอนโดไฟติกฟังไจ (endophytic fungi) ที่แยกได้สามารถย่อยสลายไซเลน และมีเอนโดไฟท์จำนวนน้อยที่สามารถย่อยสลายแมนแนน (mannan) และ อินนูลิน(inulin) จากการศึกษาพบว่าในธรรมชาติ 76-90% ของเอนโดไฟติกฟังไจสามารถที่จะย่อยสลาย polysaccharide ให้เป็นโอลิโกแซคคาไรด์ได้ disaccharide หรือ trisaccharide ได้ เมื่อทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตโอลิโกแซคคาไรด์ของเอนโดไฟท์ในกลุ่มของเชื้อราและ แบคทีเรียพบว่า เชื้อราจะให้ประสิทธิภาพที่ดีกว่า (Asano และคณะ 1999) ซึ่งจากการศึกษาดังกล่าวชี้ให้เห็นได้ว่าเชื้อราในกลุ่มเอนโดไฟท์ สามารถผลิต เอนไซม์ในกลุ่มไซลานเนส (xylanase) แมนแนนเนส(mannanase) และ เซลลูเลส (cellulase) ได้

Kqueen และคณะ (1999) ได้ทำการศึกษาเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มเอนโดไฟท์ที่แยกจากพืชสมุนไพรจากประเทศมาเลเซีย โดยทำการคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตโอลิโกแซคคาไรด์บนอาหารแข็งที่มีสับสเตรท คือเซลลูโลส ไซเลน และ starch สังเกตวงใสที่เกิดขึ้นเมื่อทำการย้อมด้วยสารละลายไอโอดีน และทำการตรวจสอบชนิดของโอลิโกแซคคาไรด์ โดย Thin-layer chromatography แต่พบว่า endophytic fungi ที่แยกได้ผลิตโอลิโกแซคคาไรด์ในปริมาณที่ต่ำมาก

นอกจากการศึกษาคูณสมบัติในการย่อยสลาย polysaccharide ของเอนโดไฟท์ที่แยกได้โดยตรงจากพืชแล้ว เชื้อในกลุ่ม saprophytes ที่มีรายงานว่าเป็นเอนโดไฟท์ก็มีความสามารถในการย่อยสลายสับสเตรทในกลุ่มของ cellulose และ ไซเลน ได้ โดยจากรายงานของ Wei และคณะ. (1992) ได้ศึกษาเกี่ยวกับสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อในกลุ่ม Xylaria ทั้งหมด 18 สายพันธุ์ ที่ถูกคัดเลือกมาและให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ทำการตรวจสอบเปรียบเทียบกับเชื้อ *Trichoderma reesei* QM9414 พบว่า *X. anisopleura* และ *X. regalis* ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ endoglucanase (73.6 munit/ml.) และ exoglucanase (18.8 munit/ml) ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่อุณหภูมิ 20 °C เป็นเวลา 2 สัปดาห์ นอกจากนี้ *Hypoxylon stygium* ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงเอนไซม์เป็นเวลา 3 วัน ค่า พีเอช ที่เหมาะสมเท่ากับ 5.0 และอุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 37-50

°C จากรายงานดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าเชื้อเอนโคไฟท์มีบทบาทในการย่อยสลายซากพืชในธรรมชาติได้ในสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ จากรายงานเห็นได้ว่าการศึกษเกี่ยวกับเอนโคไฟท์ที่มีคุณสมบัติสามารถย่อยสลายโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) เพื่อผลิตโอลิโกแซคคาไรด์ แต่ยังไม่มีมีการตรวจสอบถึงคุณลักษณะของเอนไซม์ที่เชื้อสร้างขึ้นและการทำให้บริสุทธิ์ โดยเฉพาะเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการสลายเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) ซึ่งมีอยู่มากในธรรมชาติเป็นต้น

การศึกษาการผลิตไซลานเนสจากเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นเชื้อราในกลุ่ม saprophytes หรือ แบคทีเรียมีกระบวนการที่มีประสิทธิภาพหลายวิธีที่จะสามารถผลิตเอนไซม์ที่สนใจได้ในปริมาณที่สูงเพียงพอกับค่าใช้จ่ายที่เสียไป การนำสับสเตรทจากธรรมชาติมาใช้ก็เป็นแนวทางหนึ่ง จากรายงานของ Jain (1995) ทำการเลี้ยงเชื้อ *Melanocapus albomyces* IIS-68 ที่ทนอุณหภูมิสูง ทำการเลี้ยงเชื้อแบบ solid state fermentation โดยใช้ ลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) เป็นสับสเตรทพบว่าเชื้อสามารถผลิตไซลานเนสได้ ดังนั้นจึงสามารถนำวัสดุเหลือทิ้งต่างๆที่เป็นลิกโนเซลลูโลส มาใช้ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ได้ และจากรายงานของ Gokhale และคณะ. (1998) ได้ทำการผลิต cellulase-free xylanase จากยีสต์ โดยสับสเตรทที่ใช้การทดสอบคือ corn cob powder, raw jute fiber และ sugarcane bagasses pulp โดยเอนไซม์ที่ได้สามารถที่จะกำจัดส่วนของ เฮมิเซลลูโลส จากสับสเตรท เมื่อใช้เอนไซม์ 22 IU/ml ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายตรวจสอบโดย HPLC ในระยะเริ่มต้นของการย่อยสลายสับสเตรทจะพบ xylobiose และ xylotriose แต่เมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมง น้ำตาลทั้งสองชนิดจะหมด พบเฉพาะไซโลส เท่านั้น จากรายงานดังกล่าวมุ่งประโยชน์ในการเพิ่มคุณค่าของสับสเตรทจากธรรมชาติ และมีการศึกษาการผลิตไซลานเนสจากเชื้อ *Phanerocheate chrysosporium* พบว่าสามารถใช้ corn stalk ในการชักนำให้เชื้อสามารถผลิตไซลานเนสได้ (Dobozi et al, 1992)

ในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสอาจไม่จำเป็นที่จะต้องมีการชักนำโดยการใช้ไซเลนเสมอไป อาจใช้สับสเตรทชนิดอื่นที่เหมาะสมเป็นตัวชักนำให้มีการสร้างเอนไซม์ มีศึกษาการผลิตและการชักนำให้มีการสร้าง เอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลส และ ไซเลนในเชื้อ *Streptomyces* sp. พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อใน microcrystalline cellulose จะพบเอนไซม์ที่สามารถย่อยได้ทั้ง cellulose และ ไซเลนทั้งนี้กิจกรรมของเอนไซม์ยังพบสูงกว่าที่ใช้ไซเลนเป็นสับสเตรท โดยพบว่าการใช้ไซเลนเป็นสับสเตรทจะเป็นตัวชักนำให้เกิดการเกิดการสร้างเอนไซม์ cellulase และไซลานเนสในระดับหนึ่งเท่านั้น นอกจากนี้จากการศึกษาในเชื้อ *Streptomyces* sp. พบว่ามีกลไกในการควบคุมที่แตกต่างกันขึ้นกับชนิดของสายพันธุ์ (Okake และ Peterson, 1992) นอกจากนี้ Karni และคณะ (1993) ได้ใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร คือ wheat bran, paddy husk และ rice straw เป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อ *Aueobasidium pullulans* เพื่อผลิตไซลานเนส พบว่าสับสเตรทที่ใช้สามารถชักนำให้มีการผลิตไซลา

เนสได้ดีและไม่มีการสร้างเซลล์สออกมา โดยเฉพาะการใช้ wheat bran และการใช้ tween 80 สามารถช่วยกระตุ้นให้มีการปล่อยเอนไซม์ออกมานอกเซลล์มากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามสถานะที่ใช้ในการเลี้ยง และคุณสมบัติของสับสเตรทที่ใช้ในการเลี้ยงเชื่อจะมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ โดยในปี 1993 Bailey และ Viikari ได้ทำการศึกษาการผลิตไซลานเนสจากเชื้อ *Aspergillus fumigatus* และ *A. oryzae* ในอาหารที่ใช้ ไซแลน เป็นสับสเตรทพบว่า *A. fumigatus* จะผลิตไซลานเนส เมื่อใช้ insoluble beech xylan เป็นสับสเตรท แต่การเจริญและการผลิตเอนไซม์เมื่อใช้ xylo-oligosaccharide จากการทำให้ steam explosion ของไม้เนื้อแข็ง เป็นสับสเตรท จะน้อยกว่า และการสร้างเอนไซม์จะมีน้อยลงเมื่อพีเอชของระบบต่ำกว่า 3.0 และที่พีเอชของระบบที่สูงจะมีผลทำให้เกิดการย่อยสลายเอนไซม์จากโปรตีนที่เชื้อสร้างขึ้น โดยจากการเปรียบเทียบการสร้างเอนไซม์ของเชื้อทั้งสองพบว่า *A. oryzae* จะให้กิจกรรมของเอนไซม์ที่น้อยกว่า *A. fumigatus* เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อทั้งสองใน insoluble beech xylan และเมื่อทำการเปลี่ยนรูปของสับสเตรท (insoluble beech xylan) ให้อยู่ในรูปของ xylo-oligosaccharide มากขึ้น จะมีผลทำให้การผลิตเอนไซม์เพิ่มมากขึ้น (Bailey และ Viikari, 1993) ดังนั้นจากการทดลองจะเห็นได้ว่ารูปแบบของสับสเตรทมีผลต่อการสร้างเอนไซม์ของเชื้อซึ่งเกี่ยวข้องกับสถานะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อด้วยเช่นกัน แต่อย่างไรก็ตามการนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์เพื่อที่จะทำให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดควรจะมีการเตรียมสับสเตรทให้เหมาะสมก่อนที่จะดำเนินการย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์และการเลือกวิธีที่เหมาะสมในการเตรียมสับสเตรทจึงมีความจำเป็นเพิ่มขึ้นโดยมีรายงานเกี่ยวกับการใช้กรดในการย่อยสลายสับสเตรทก่อนที่จะใช้กระบวนการย่อยสลายโดยเอนไซม์ถึงแม้ว่าการย่อยสลายด้วยกรดจะให้ประสิทธิภาพในการแซคคาไรไฟด์ (saccharified) ที่สูงกว่า แต่พบว่าการใช้กรดจะมีปัญหาในเรื่องต้นทุนที่สูงกว่าและอุปกรณ์บางส่วนถูกทำลายจากการถูกกัดกร่อน และต่อมาได้มีการเตรียมสับสเตรทโดยใช้ steam explosion ซึ่งสามารถที่จะเลี่ยงปัญหาดังกล่าวได้ (Nunes และ Pourquie, 1996)

การศึกษาคูสมบัติของเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มีความจำเป็นมากในแง่ของการนำเอนไซม์ไปใช้ในทางปฏิบัติ โดยที่สามารถทราบคุณสมบัติของเอนไซม์จะทำให้การนำไปใช้เกิดประโยชน์ได้สูงสุดและลดความเสี่ยงต่อการที่เอนไซม์จะถูกทำลายได้จากสถานะที่ไม่เหมาะสม จำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาถึงสถานะในการผลิตและคุณสมบัติของเอนไซม์ เช่น ความคงตัวของ พีเอช อุณหภูมิ ความจำเพาะต่อการย่อยสลายสับสเตรท เป็นต้น มีรายงานด้านการผลิตและการศึกษาคูสมบัติของไซลานเนสจากเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด Viet และคณะ (1990) ศึกษาไซลานเนสจาก *Aeromonas caviae* W-61 พบว่าเอนไซม์หลังจากการทำให้บริสุทธิ์แล้ว มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 22,000 ค่า pI เท่ากับ 9.2 อุณหภูมิและ พีเอช ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์คือ 55 °C และ 7.0 ตามลำดับ เอนไซม์มีความคงตัวที่ พีเอช 7.0 และ อุณหภูมิ 50 °C ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อย

สลาย xyloligosaccharide คือ xylobiose, xylotriose, xyloetraose และ xylopentaose โดยพบไซโลส ในปริมาณน้อย เอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วไม่สามารถย่อยสลายแป้ง (starch), เซลลูโลส, CMC หรือ β -1,3-xylan Christakopoulos และคณะ (1996) ได้ทำการผลิตและศึกษาสมบัติของไซ ลานเนส จากเชื้อ *Fusarium oxysporum* พบว่าสายได้สภาวะที่เหมาะสมเชื้อสามารถให้กิจกรรมของ เอนไซม์เท่ากับ 245 unit/ml และคุณสมบัติที่สำคัญของเอนไซม์คือ มีความคงตัวที่ พีเอช 9.0 เมื่อทำ การตรวจสอบเอนไซม์โดย isoelectrofocusing พบว่า ไซลานเนสที่ได้เป็น multienzyme ประกอบด้วย major xylanase, minor xylanase และ β -xylosidase มีค่า pI 9.5, 6.5 และ 3.8 ตามลำดับ

Chen และคณะ (1997) ศึกษาการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์และตรวจสอบคุณสมบัติของ เอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *Trichoderma longibrachiatum* เพื่อใช้ในการผลิต xylooligosaccharide ในการเลี้ยงเชื้อจะใช้ oat spelt xylan เป็นแหล่งคาร์บอน และการทำให้บริสุทธิ์ตามลำดับคือ ammoniumsulphate precipitation, ion exchange chromatography, gel filtration ทำการตรวจสอบ ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โดย SDS-PAGE พบว่าเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มีมวลโมเลกุล เท่ากับ 37.7 kDa อุณหภูมิและ พีเอช ที่เหมาะสมในการทำงานคือ 45 °C และ 5-6 ตามลำดับ เอนไซม์ที่ได้สามารถที่จะย่อยได้ทั้ง birch wood xylan และ oat spelt xylan และเมื่อทำการตรวจ สอบผลิตภัณฑ์จากการย่อยสลายโดย Thin layer chromatography โดยใช้ oat spelt xylan เป็นสับส เตรทจะพบ xylobiose, xyloetraose และ xylooligosaccharide นอกจากนี้ Salles และคณะ (2000) ทำการศึกษาการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์และหาลักษณะเฉพาะบางประการของเอนไซม์ไซลานเนสที่ เพิ่งมีการค้นพบใหม่จากเชื้อ *Acrophialophora nainana* เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ใช้ birch wood xylan เป็นสับสเตรท พบว่าเอนไซม์ที่ผ่านขั้นตอนในการทำให้บริสุทธิ์แล้วจะมีอุณหภูมิที่เหมาะสม ในการทำงาน คือ 55 °C และ พีเอช 7.0 และเมื่อเวลาผ่านไป 44 ชั่วโมง จะทำให้กิจกรรมของ เอนไซม์ลดลงครั้งหนึ่งที่ 55 °C นอกจากนี้ยังสามารถที่จะย่อยสลายเฉพาะไซแลนเท่านั้น

ในปัจจุบันการนำไซลานเนสเข้ามาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมมีมากขึ้น เช่นการนำเอนไซม์ มาใช้ในการปรับปรุงคุณภาพของอาหารให้ดีขึ้น โดยเฉพาะอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ ได้ที่ได้จากการย่อยสลายจะเป็นสารพวกโอลิโกเมอร์ (oligomer) ที่มีมวลโมเลกุลน้อยลง เช่น xylobiose และ xylotriose มีผลช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อในกลุ่ม microflora ให้ดีขึ้น (Park และ คณะ 2000) และยังมีการศึกษาถึงผลของโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) ต่อการนำไปใช้ของ จุลินทรีย์ที่อยู่ในทางเดินอาหารของสัตว์พบว่า เชื้อ *Selenomonas ruminantium* ที่อยู่ในลำไส้ของ สัตว์สามารถช่วยลดการสะสมของ xylooligosaccharide ให้น้อยลงโดยกระบวนการหมักและผลิต ภัณฑ์ที่ได้คือ กรดแลคติก (lactic acid), กรดอะซิติก (acetic acid) และ กรดโพรไพโอนิก (propionic acid) (Cotta และ Whitehead, 1998) ซึ่งสภาวะดังกล่าวช่วยในการควบคุมการเจริญของเชื้อที่ทำให้

เกิดโรคได้ นอกจากนี้อุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับการฟอกสีเยื่อกระดาษก็มีการนำเอนไซม์มาใช้เพื่อเป็นการลดอัตราส่วนของสารเคมีที่ใช้ในระบบและทำให้ความเสี่ยงของน้ำเสียที่เข้าไปมีผลต่อสภาวะแวดล้อมน้อยลงทั้งยังสามารถที่จะบำบัดได้ในขั้นตอนที่ไม่ยุ่งยากมาก (Arribas และคณะ 1995) จึงจำเป็นต้องใช้เอนไซม์ที่มีความจำเพาะสูง ซึ่งเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อต่างชนิดกันจะมีคุณสมบัติที่ต่างกันเป็นเหตุผลหนึ่งที่ต้องจำเป็นต้องมีการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ก่อนที่จะนำไปใช้ในทางปฏิบัติ จากรายงานที่เกี่ยวข้องกับการผลิตและศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ของ Christov และคณะ. (1999) ทำการผลิต cellulase-free xylanase จากเชื้อ *Aspergillus foetidus* (ATCC 14916), *A. oryzae* (NRRL 1808) และ *Gliocladium viride* (CBS 658.70) เพื่อใช้ในการฟอกสีเยื่อกระดาษ โดยสับสเตรทที่ใช้คือ wheat bran, corn cob, oat spelt xylan และน้ำเสียจากการฟอกเยื่อกระดาษ ในสภาวะที่เหมาะสมเมื่อใช้ corn cob เป็นสับสเตรท เชื้อ *A. foetidus* (ATCC 14916) สามารถให้ค่ากิจกรรมของไซลานเนส 547.4 unit/ml. และพบ cellulase 6.6 unit/ml. ปนเปื้อนอยู่ ในขณะที่ *A. oryzae* (NRRL 1808) และ *G. viride* (CBS 658.70) ให้ค่ากิจกรรมของ cellulase-free xylanase ได้สูงเมื่อใช้ oat spelt xylan เป็นสับสเตรท นำเชื้อทั้งสองไอโซเลตมาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์และฟอกสีเยื่อกระดาษ พบว่าเชื้อทั้งสองให้ผลของการลดน้ำตาลรีดิวซ์ที่ต่างกันในการฟอกสีเยื่อกระดาษและพบว่าการฟอกสีเยื่อกระดาษจะมีประสิทธิภาพมากขึ้นเมื่อมีการใช้ H_2O_2 ในการกำจัดลิกนิน (lignin) ผลจากการทำงานของเอนไซม์ไซลานเนสที่ได้จากเชื้อทั้งสองไอโซเลต ทำให้เยื่อกระดาษมีความขาวเพิ่มมากขึ้น 1.4 points และกำจัด เฮมิเซลลูโลส ได้ 7 %

การนำเอนไซม์เข้ามาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมฟอกสีเยื่อกระดาษนอกจากการผลิตเพื่อให้ได้ปริมาณเอนไซม์และความบริสุทธิ์ที่สูงแล้วการพัฒนากระบวนการผลิตและการเลือกเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติทนอุณหภูมิสูงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษามากขึ้น เพื่อให้เหมาะสมกับการใช้งานจริงในการฟอกสีเยื่อกระดาษซึ่งในกระบวนการนั้นมีอุณหภูมิค่อนข้างสูง Beg และคณะ (2000) ได้ทำการศึกษาการเพิ่มการผลิต thermostable xylanase จากเชื้อ *Streptomyces* sp. QG-11-3 เพื่อใช้ในการฟอกสีเยื่อกระดาษจาก eucalyptus kraf pulp โดยทำการตรึงเซลล์ไว้กับ polyurethane foam และวัสดุที่เป็น nonwoven fabrics เช่น polyester, silk และ cotton พบว่าจะทำให้การผลิตเพิ่มขึ้น 2-5 เท่า (203 U/ml.), 1.91 เท่า(155 U/ml.), 1.54 เท่า(125 U/ml.) โดยเอนไซม์เริ่มต้นมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 81 U/ml. ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการใช้ polyurethane foam เป็นตัวกลางที่ใช้จับกับเชื้อจะให้ประสิทธิภาพดีในการผลิตเอนไซม์ ผลจากการนำเยื่อกระดาษที่ผ่านการฟอกสีด้วยเอนไซม์มาทำการฟอกสีอีกครั้งโดยใช้ 4.5% chlorine พบว่าสามารถลด kappa No. ได้ 25% และเพิ่มความสว่าง (%ISO) 20% นอกจากนี้ยังทำให้เยื่อกระดาษที่ได้มีคุณสมบัติที่ดีขึ้นเช่น มีความยืดหยุ่นและทนต่อการฉีกขาดได้ดีมากขึ้น ในปีเดียวกัน Rani และ Nand ได้ทำการศึกษาการผลิต cellulase-free

xylanase ที่ทนอุณหภูมิสูงจากเชื้อ *Clostridium absonum* CFR-702 ภายใต้สภาวะไร้อากาศและอุณหภูมิสูง (>65 °C) จากการใช้แหล่งคาร์บอนอื่นๆหลายชนิดในการเลี้ยงเชื้อเช่น cellobiose, lactose, melezitose, raffinose, mannitol, sorbitol, myo-inositol, starch, pectin, cellulose, carboxymethylcellulose พบว่าไม่ส่งเสริมการสร้างเอนไซม์ ในขณะที่การใช้ไซเลน และ ไซโลส จะช่วยส่งเสริมการสร้างเอนไซม์ โดยเชื้อจะสร้างเอนไซม์ได้ดีเมื่อใช้ birch wood xylan เป็นสับสเตรทและให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 43,000 nkatal/ml. นอกจากนี้ยังสามารถใช้ corn cob ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ ซึ่งจะเป็นการลดต้นทุนในการผลิตเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรมให้น้อยลง นอกจากนี้การศึกษา cellulase free xylanase น้อยมากในเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย และฟังไจ เช่น *Sacchromonospora viridis*, *Thermomyces lanuginosus*, *Bacillus* sp. และ *Chinia* sp. เป็นต้น

Dhillon และคณะ (2000) ศึกษาการผลิตไซลานเนสที่ทนด่างและอุณหภูมิสูงจาก *Bacillus circulans* AB16 เมื่อใช้ rice straw เป็นสับสเตรท เพื่อประยุกต์ใช้ในการฟอกสีเยื่อกระดาษจากยูคาลิปตัส พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์คือ 80 °C และ พีเอช 6-7 มีความคงตัวอยู่ที่ พีเอช 5-9 กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงครึ่งหนึ่งเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 70 °C เอนไซม์ที่ได้ถูกนำมาทดลองใช้ในการฟอกสีเยื่อกระดาษ จะช่วยลดการใช้คลอรีนลงได้ 20 % โดยที่ไม่ทำให้ความขาวของเยื่อกระดาษลดลง และความหนืดจากการบำบัดด้วยเอนไซม์ อยู่ในช่วง 9.5-9.7 cp. สูงกว่าเยื่อกระดาษที่ใช้คลอรีน ในการฟอกสีซึ่งค่าความหนืดเท่ากับ 5.2

ในปัจจุบันการผลิตเอนไซม์มีการใช้ gene technology เข้ามาเพิ่มการผลิต และปรับปรุงคุณสมบัติของเอนไซม์ให้ดีขึ้น ซึ่งจะช่วยให้การทำให้บริสุทธิ์ทำได้ง่ายขึ้น โดยมีการหาลำดับของกรดอะมิโนของ endo-1,4-xylanase จากเชื้อ *Streptomyces* sp. S38 เพื่อศึกษา overproduction และการทำให้บริสุทธิ์ ทำให้ทราบว่าเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อดังกล่าวมีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิดกับเอนไซม์ในกลุ่มของ Actinomycetales และเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมีความคงตัวที่ 4 °C ใน 25 mM sodium phosphate buffer นานหลายเดือน (Georis และคณะ 1999)

การศึกษการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อจุลินทรีย์นั้นมีการศึกษาแยกเชื้อจากแหล่งใหม่ๆ อยู่ตลอดเวลาเนื่องจากเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อต่างชนิดกันมักมีคุณสมบัติที่จำเพาะแตกต่างกัน โดยผลของการย่อยสลายไซเลนที่มีโครงสร้างที่แตกต่างกันจากเอนไซม์ไซลานเนส พบว่าสิ่งที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์คือ ความยาวของ polymer และ หมู่แทนที่ต่างๆ (Li และคณะ 2000) ดังนั้นการนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์จะมีมากขึ้นและเหมาะสมกับการใช้งาน มีการศึกษาการแยกเชื้อที่ผลิตไซลานเนส จาก *Scierocarya birrea* fruits ซึ่งยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อนพบว่า เชื้อส่วนใหญ่ที่แยกได้ คือ *Bacillus* sp. และเอนไซม์ที่เชื้อสร้างขึ้นทำงานได้ดีที่ พีเอช 8.0 และ อุณหภูมิ 60 °C (Chivero และคณะ 2001) แต่อย่างไรก็ตามการผลิตไซลานเนสนอกจากการใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้

จากธรรมชาติแล้ว ยังสามารถศึกษาจากแหล่งอื่นที่มีความสัมพันธ์กับการย่อยสลายไขมันตามธรรมชาติ Trigo และคณะ (1999) ทำการสกัดเอนไซม์ไซลันเนสจากไส้ส่วนปลายของ earthworm โดยใช้ inorganic waste เป็นอาหาร เอนไซม์ที่ได้จากการสกัดคือ ไซลันเนส, acetyl xylan esterase โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 2.06 U/g และ 0.55 U/g ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบกิจกรรมของเอนไซม์ β -D-glucuronidase (0.17 U/g), α -L-arabinosidase (0.04 U/g) และ β -xylosidase (0.03 U/g) และเมื่อทำการทดลองโดยให้อาหารที่มีไขมันแก่ earthworm จะพบกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งหมดสูงขึ้น เมื่อศึกษาลักษณะเฉพาะบางประการของเอนไซม์พบว่า ไซลันเนส และ α -L-arabinosidase และ acetyl xylan esterase มีพีเอชที่เหมาะสมในช่วงเป็นกลาง ในขณะที่ β -xylosidase และ β -D-glucuronidase ทำงานได้ดีที่พีเอชเท่ากับ 3.0 และ 4.0 ตามลำดับ เอนไซม์ทั้งหมดทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 35-40 °C จากรายงานดังกล่าวจะเห็นได้ว่าในสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังที่มีบทบาททางนิเวศน์วิทยาในแง่ของการช่วยย่อยสลายพวกโพลีแซคคาไรด์ สามารถที่จะใช้เป็นแหล่งในการผลิตเอนไซม์ในกลุ่มไซลันเนสได้ นอกจากนี้ยังพบเอนไซม์กลุ่มอื่นเช่น amylase, laminarinase, lichenase, cellulase, glucoamylase ในไส้ของ earthworm อีกด้วย