| | |
|---|---|
| ชื่อวิทยานิพนธ์ | การผลิตและคุณสมบัติของเอนไซม์สลายไฟบรินจาก *Schizophyllum commune* BL 23 |
| ผู้เขียน | นางสาวพัชราภรณ์ ปานดี |
| สาขาวิชา | เทคโนโลยีชีวภาพ |
| ปีการศึกษา | 2545 |

## บทคัดย่อ

เมื่อเลี้ยง *Schizophyllum commune* BL 23 เพื่อผลิตเอนไซม์สลายไฟบรินในอาหารเหลว พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ ระยะเวลาในการเลี้ยง พีเอชเริ่มต้นของอาหาร อุณหภูมิ และความเร็วในการเขย่า มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์สลายไฟบริน จากการทดลองพบว่าเมื่อเลี้ยงราในอาหาร Peptone yeast extract glucose medium ที่ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 6.0 บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน รามีการเจริญและผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุด ให้มวลชีวภาพและกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 8.93 กรัม/ลิตร และ 576.73 ยูนิต ตามลำดับ เมื่อทำการตกตะกอนโปรตีน พบว่าเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 80 เปอร์เซ็นต์ จะให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดเท่ากับ 150,720 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในขั้นตอนไดอะไลซิส พบว่าเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตมีผลกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ เอนไซม์ที่ผ่านโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุในคอลัมน์ที่บรรจุ DEAE-Sephacel มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 86 เท่า ของเอนไซม์เริ่มต้น โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 11,794 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อนำเอนไซม์สลายไฟบรินที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนมาตรวจสอบโดยใช้พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลกโตรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (Native PAGE) พบแถบโปรตีนของเอนไซม์สลายไฟบริน เอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนมีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์สลายไฟบรินมีความคงตัวที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วัน และมีความคงตัวในช่วงอุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง แต่กิจกรรมของเอนไซม์สูญเสียทั้งหมดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีความคงตัวในช่วงพีเอชตั้งแต่ 5.0-11.0 เมื่อเก็บสารละลายเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง ความคงตัว

ของเอนไซม์อยู่ในช่วงพีเอช 6.0-9.0 กิจกรรมของเอนไซม์สลายไฟบรินถูกยับยั้งด้วย 1, 10-phenanthroline และ EDTA เมื่อความเข้มข้นของ EDTA เพิ่มขึ้นกิจกรรมของเอนไซม์ถูกยับยั้งมากขึ้น อมุมูล $Hg^{2+}$ มีผลยับยั้ง กิจกรรมของเอนไซม์อย่างรุนแรง ในขณะที่ PMSF และ SBTI ไม่ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ จากผลการทดลองแสดงว่าเอนไซม์สลายไฟบรินจัดอยู่ในกลุ่ม metalloprotease

| | |
|---|---|
| Thesis Title | Production and Properties of Fibrinolytic Enzyme from *Schizophyllum commune* BL 23 |
| Author | Ms. Patcharaporn Pandee |
| Major Program | Biotechnology |
| Academic Year | 2002 |


**Abstract**

*Schizophyllum commune* BL 23 was cultivated for the production of fibrinolytic enzyme under submerged culture. The cultural medium, incubation period and initial pH of the culture medium, as well as cultivation temperature and shaking speed affected growth of the fungus and fibrinolytic enzyme production. The maximum growth and fibrinolytic enzyme activity were achieved when *S. commune* BL 23 was cultured in peptone yeast extract glucose medium with the initial pH of 6.0 at 35°C under shaking speed of 150 rpm for 7 days. The maximum biomass and the fibrinolytic activity were 8.93 g/l and 576.73 units, respectively. The protein fraction precipitated from 80% ammonium sulfate saturation showed the highest fibrinolytic activity (150,720 units/ml). It was found, during dialysis, that ammonium sulfate activated the fibrinolytic activity. The purity of the partially purified enzyme was increased 86 fold after using anion exchange chromatography (DEAE-Sephacel) and the fibrinolytic activity of 11,794 units/ml was obtained. The protein band from native polyacrylamide gel electrophoresis (Native PAGE) showed the fibrinolytic enzyme activity. The partially purified enzyme showed the maximum activity at 50°C. Fibrinolytic enzyme was stable at 30°C for 60 days, however, the stability maintained for 48 hours in the temperature range of 40-50°C. The enzyme activity was totally lost at 60°C. The enzyme was stable in the pH range of 5.0-11.0 at 28°C for 20 minutes. After 48 hours of incubation, its stability was found in the pH range of 6.0-9.0. Fibrinolytic

activity was inhibited by 1,10-phenanthroline and EDTA and its activity was gradually decreased with increasing the concentration of EDTA. $Hg^{2+}$ totally inhibited the enzyme activity. However, its activity was not inhibited by PMSF and SBTI. The results indicated that the enzyme is a metalloprotease.