วิจารณ์ผลการทดลอง

1. ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆต่อการผลิตเอนไซม์สลายไฟบริน

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นได้ชัดเจนว่าองค์ประกอบหรือชนิดของอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ อาหารPYGM มี yeast extract ประกอบอยู่ด้วยถึง 2% (W/V) เทียบกับที่มีอยู่ในอาหาร MY และ MM ซึ่งมีเพียง 0.3% และ 0.1% ตามลำดับ แต่ MY มี malt extract ผสมอยู่ด้วย 0.3% ทั้ง malt extract และ yeast extract ต่างก็มีรายงานว่าช่วยในการสร้างเอนไซม์สลายไฟบรินในรา (El-Aassar *et al.*, 1990 และ Hirasawa *et al.*,1997b)

นอกจากนี้ผลการทดลองของ Hirasawa และคณะ (1997b) ยังแสดงให้เห็นว่า malt extract ช่วยในการผลิตเอนไซม์ของราหลายสายพันธุ์ แต่เมื่อเทียบปริมาณเอนไซม์ที่เชื้อสายพันธุ์เดียวกันสร้างพบว่าเมื่อใช้ yeast extract และ malt extract ในความเข้มข้นเท่ากัน ราที่เจริญในอาหารที่มี yeast extract จะสร้างเอนไซม์ได้สูงกว่า

2. ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของราและการผลิตเอนไซม์

ผลจากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของราและการผลิตเอนไซม์ของรา *Xylaria* sp.BL25 จะคล้ายกับที่เสนอในรายงานของ El-Aassar และคณะ (1990) ซึ่งเลี้ยงรา *Penicillum chrysogynum* H9 ในอาหารเหลวเปรียบเทียบระหว่างการเลี้ยงแบบตรึงเซลล์(cell immobilization) และแบบเซลล์อิสระ (free cell) ที่มีและไม่มีการเขย่า การเจริญของเซลล์ในทุกการทดลองจะสูงสุดในวันที่สาม หลังจากนั้นน้ำหนักแห้งของเซลล์จะลดลงอย่างต่อเนื่อง น้ำหนักแห้งของเซลล์ที่เลี้ยงแบบอิสระไม่มีการเขย่าจะลดลงอย่างรวดเร็ว ในขณะที่น้ำหนักแห้งของเซลล์ที่เลี้ยงแบบอิสระและมีการเขย่าร่วมด้วยจะรักษาระดับของปริมาณเซลล์ช่วงวันที่สามถึงวันที่หกค่อนข้างคงที่ จากนั้นจึงมีปริมาณลดลงแต่มีอัตราการลดลงที่ต่ำกว่าการเลี้ยงแบบตรึงเซลล์ สำหรับการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ใน *Penicillum chrysogynum* H9 เมื่อเปรียบเทียบกับ *Xylaria* sp.BL25 มีรูปแบบที่คล้ายกันในช่วงแรกแต่แตกต่างกันในตอนหลัง กล่าวคือ *Penicillum chrysogynum* H9 สร้างเอนไซม์และสามารถตรวจพบได้ในวันที่สาม ปริมาณเอนไซม์วัดได้สูงสุดในวันที่หกเมื่อเลี้ยงแบบเซลล์อิสระและมีการเขย่าร่วมด้วย แต่ถ้าเป็นการเลี้ยงแบบอิสระที่ไม่มีการเขย่าจะมีปริมาณเอนไซม์สูงสุดในวันที่สี่ หลังจากนั้นปริมาณเอนไซม์ที่ได้จากการเลี้ยงแบบเซลล์อิสระที่มีการเขย่าและไม่มีการเขย่าจะลดลงอย่างรวดเร็วในอัตราที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งต่างจาก *Xylaria* sp.BL25 ที่ปริมาณเอนไซม์ค่อนข้างคงที่แม้ปริมาณน้ำหนักแห้งจะหายไปก็ตาม

Choi and shin (1998) ได้ศึกษาการเจริญและการสร้างเอนไซม์สลายไฟบรินจากเส้นใยของ *Pleurotus ostreatus* พบว่ามีรูปแบบคล้ายกับของ *Penicillium chrysogynum* H9 และ *Xylaria* sp.BL25 กล่าวคือจะได้น้ำหนักแห้งของเซลล์สูงสุดในวันที่หก แต่จะคงที่อยู่จนถึงวันที่แปด หลังจากนั้นน้ำหนักแห้งจะลดลงประมาณ 15% ก่อนที่จะมีระดับคงที่เมื่อสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 11 สำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ตรวจไม่พบในวันที่สาม แต่พบได้ในวันที่ 5 ปริมาณของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นตามการเจริญที่เพิ่มขึ้น ปริมาณเอนไซม์สูงสุดวัดได้ในวันที่7 หลังจากนั้นปริมาณเอนไซม์ลดลงอย่างมากและต่อเนื่อง เมื่อสิ้นสุดการทดลองกิจกรรมของเอนไซม์เหลือเพียงครึ่งหนึ่งของกิจกรรมที่วัดได้สูงสุด

ฝ่ายหอสมุด
คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

3. ผลของปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์

ในกรณีของ *Xylaria* sp.BL25 พีเอชเริ่มต้นของอาหารที่ใช้ในการทดลองไม่มีผลต่อการสร้างเอนไซม์แต่มีผลต่อการเจริญ ไม่มีรายงานในเรื่องพีเอชเริ่มต้นของอาหารที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์สลายไฟบริน แต่มีรายงานที่ศึกษาการสร้าง Protease ใน *Aspergillus oryzae* U1521 พบว่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารมีความสำคัญต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์ ราเจริญได้ดีในอาหารที่พีเอชเป็นกรด (pH 5) แต่การสร้างเอนไซม์จะน้อย (Samarntarn *et al.*,1998)

อุณหภูมิในการบ่มเชื้อมีผลต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์อย่างเห็นได้ชัดเจน อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์จะผันแปรไปในราแต่ละชนิด เอนไซม์สลายไฟบรินใน *F. pallidorosum* เมื่อเลี้ยงบนอาหารแห้ง พบว่าที่อุณหภูมิ 25°ซ ราผลิตเอนไซม์ได้ดีกว่าที่ 30°ซ (El-Aassar, 1995) แต่จากผลการทดลองนี้ *Xylaria* sp.BL25 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30°ซ อาจเป็นไปได้ว่ารามีการปรับตัวให้เหมาะสมกับสภาพภูมิอากาศของที่ที่ราเจริญอยู่ ในประเทศแถบร้อนอุณหภูมิเฉลี่ยจะประมาณ 28-30°ซ ราจึงมีการเจริญมีกิจกรรมทางเมทาบอลิสมได้ดีที่อุณหภูมิระดับนี้ ซึ่งอาจจะสูงกว่าในประเทศแถบอบอุ่นที่อุณหภูมิเฉลี่ยจะอยู่ประมาณ 25°ซ

การเลี้ยงราโดยมีการเขย่าเป็นการเพิ่มออกซิเจนให้กับรา เนื่องจากราเป็นพวกที่ต้องการออกซิเจน ดังนั้นจากการเลี้ยง *Xylaria* sp.BL25 ทำให้ได้น้ำหนักแห้งของเซลล์สูงขึ้นเมื่อรอบของการเขย่าเพิ่มขึ้น แต่ผลการทดลองนี้แตกต่างจาก El-Aassar และคณะ (1995) ที่พบว่าการเลี้ยงในอาหารเหลวแบบเซลล์อิสระไม่มีการเขย่าได้น้ำหนักแห้งสูงสุดของรามากกว่าเมื่อเลี้ยงโดยมีการเขย่า และการสร้างเอนไซม์ในราที่เลี้ยงแบบไม่มีการเขย่าจะให้ผลดีกว่า

4. การเตรียมเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์

เอนไซม์สลายไฟบรินจาก culture broth ที่เลี้ยง *Xylaria* sp.BL25 ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นอิ่มตัว 80%จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด Choi และ Shin (1998) ทำให้เอนไซม์สลายไฟบรินจาก *P. ostreatus* บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้นอิ่มตัวเท่ากับ 80% เช่นเดียวกัน แต่ต่างจาก *F. pallidoroseum* ที่เอนไซม์จะให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเมื่อตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นอิ่มตัว 60% โดยให้ yield 37.6% (El-Aassar, 1995) ในขณะที่การทดลองนี้ได้ yield เพียง 6.9% การที่เอนไซม์สูญหายไปมากอาจเนื่องจากเอนไซม์ได้เสียสภาพไปในระหว่างการตกตะกอนโปรตีน

5. ปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์

อุณหภูมิที่เหมะสมในการทำงานของเอนไซม์สลายไฟบรินกึ่งบริสุทธิ์ของ *Xylaria* sp.BL25 จากการทดลองนี้ (35°ซ) จะต่ำกว่าที่มีรายงานในราชนิดอื่น เช่น *Schizophyllum commune* BL23 กิจกรรมของเอนไซม์สลายไฟบรินเกิดขึ้นได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 50°ซ (Pandee, 2003) และ *F. pallidoroseum* ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์ที่สลาย human fibrin จะเกิดได้ดีที่อุณหภูมิ 40°ซ (El-Aassar, 1995) เอนไซม์สลายไฟบรินจากแบคทีเรีย *Bacillus* spp. มีรายงานว่าเกิดขึ้นได้ดีที่อุณหภูมิสูง 48-55°ซ (Chang *et al.*, 2000 Peng *et al.*,2003)

จากรายงานพบว่าชนิดของอนุมูลของโลหะมีผลให้กิจกรรมของเอนไซม์สลายไฟบรินในราเพิ่มขึ้นและลดลงไปแตกต่างกัน เอนไซม์สลายไฟบรินจาก *P. ostreatus* จะถูกยับยั้งด้วยอนุมูลของโลหะทุกชนิดที่ทำการทดสอบ โดยที่ Mg^{+2},Ca^{+2} และ Cu^{+2} ที่ความเข้มข้น 2 mM ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ได้อย่างสมบูรณ์ (Choi and Shin,1998) ในขณะที่ El-Aassar (1995) รายงานว่าอนุมูลของโลหะ Ca^{+2} และ Co^{+2} ที่ความเข้มข้น 1 mM มีผลให้กิจกรรมของ

เอนไซม์สลายไฟบรินใน *F. pallidoroseum* เพิ่มขึ้น อนุมูลของโลหะ Co^{+2} ช่วยให้กิจกรรมของเอนไซม์สลายไฟบรินใน *Schizophyllum commune* BL23 เพิ่มขึ้นในขณะที่อนุมูลของโลหะอื่นๆที่ทดสอบ (ความเข้มข้น 1 mM) มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ และ Hg^{+2} มีผลยับยั้งเอนไซม์ได้อย่างสมบูรณ์

เมื่อพิจารณาสารยับยั้งพบว่าเอนไซม์สลายไฟบรินกึ่งบริสุทธิ์ของ *Xylaria* sp.BL25 ไม่ถูกยับยั้งด้วย PCMB และ SBTI และถูกยับยั้งด้วย TPCK ได้เล็กน้อย แต่ถูกยับยั้งด้วย PMSF และ NPGB ในระดับที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งสารยับยั้งที่กล่าวมามีผลกับเอนไซม์ที่จัดอยู่ในพวก serine protease (Ward, 1987) เอนไซม์สลายไฟบรินในแบคทีเรีย *Bacillus* spp. มีรายงานว่าเป็น serine protease (Chang *et al.*, 2000 และ Peng *et al.*,2003) Choi และ Shin (1998) พบว่า เอนไซม์สลายไฟบรินจาก *Pleurotus ostreatus* ที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ถูกยับยั้งด้วย 1,10-Phenanthroline และ EDTA ซึ่งจากการทดลองนี้เอนไซม์สลายไฟบรินกึ่งบริสุทธิ์ของ *Xylaria* sp.BL25 ถูกยับยั้งด้วย 1,10-Phenanthroline และ EDTA เช่นกัน แสดงว่าเอนไซม์สลายไฟบรินของ *Xylaria* sp.BL25 มีแนวโน้มเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม metallo protease แต่ Hirasawa และคณะ (1997b) ทดลองนำส่วนของอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเส้นใยเห็ดชนิดต่างๆมาผสมกับ proteinase inhibitor เช่น PMSF, EDTA, EPNP, PCMB และ iodoacetic acid พบว่า proteinase inhibitor มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ในอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเส้นใยเห็ดแตกต่างกันไป

6. ปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวของเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์

เอนไซม์สลายไฟบรินกึ่งบริสุทธิ์ของ *Xylaria* sp.BL25 ไม่เสถียรถ้าเก็บไว้ที่อุณหภูมิสูงซึ่งต่างจากที่มีรายงานว่าเอนไซม์สลายไฟบรินจาก *Pleurotus ostreatus* ที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์แล้ว เมื่อนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 60°ซ เป็นเวลา 15 นาที กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง 20% (Choi and Shin,1998) ในขณะที่เอนไซม์สลายไฟบรินใน *F. pallidoroseum* ที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์กิจกรรมของเอนไซม์จะสูญเสียไป 70% เมื่อนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 55°ซ เป็นเวลา 15 นาที (El-Aassar, 1995)

ความคงตัวของเอนไซม์สลายไฟบรินของ *Xylaria* sp.BL25 จะดีในสภาวะที่เป็นกรด (พีเอช 3-5.7) แต่เอนไซม์จะสูญเสียสภาพอย่างสิ้นเชิงเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นด่าง (พีเอช 9-11) Hirasawa และคณะ (1997b) พบว่าเอนไซม์ที่อยู่ในอาหารที่ทำการทดลองเลี้ยงเส้นใยเห็ดราได้แก่ *Schizophyllum commune, Laetiporus sulphureus* และ *Coriolus* sp. จะมีความคงตัวในช่วงพีเอชกว้างตั้งแต่ 6-9 โดยที่ยังคงมีกิจกรรมของเอนไซม์อยู่มากกว่า 70% เช่นเดียวกับที่ Pandee (2003) รายงานไว้ว่าเอนไซม์สลายไฟบรินของ *Schizophyllum commune* BL23 มีความคงตัวในช่วงพีเอชกว้าง (5-11) ที่อุณหภูมิห้อง ในระยะเวลา 20 นาที กิจกรรมของเอนไซม์เหลืออยู่มากกว่า 70% เอนไซม์สลายไฟบรินใน *F. pallidoroseum* จะมีความเสถียรในช่วงพีเอช 6.5-9 โดยที่ยังคงมีกิจกรรมของเอนไซม์อยู่สูงถึง 80% (El-Aassar, 1995)

เมื่อเก็บเอนไซม์สลายไฟบรินกึ่งบริสุทธิ์ของ *Xylaria* sp.BL25 ไว้เป็นเวลานานที่อุณหภูมิต่างๆจะเห็นว่าที่อุณหภูมิ 30°ซ ในเวลา 1 เดือนเอนไซม์ยังคงมีกิจกรรมอยู่ถึง 75% เอนไซม์ของ *S. commune* และ *Coriolus* sp. มีความคงตัวเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ-15°ซ เป็นเวลา 12 เดือน แต่ถ้าเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37°ซ กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็วในเวลา 1 วัน และ 3 วัน ตามลำดับ ส่วน *L. sulphureus* ที่อุณหภูมิ-15°ซ และ 37°ซ เอนไซม์มีความคงตัวเป็นเวลา 12 เดือน และ 6 เดือน ตามลำดับ แต่ที่อุณหภูมิ 0-10°ซ กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงภายในเวลา 5 เดือน (Hirasawa *et al.*, (1997b)