การตรวจเอกสาร

การใช้ประโยชน์จากรา

Hawksworth (2001) ได้กล่าวถึงการนำรามาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น ด้านการแพทย์ ได้แก่ การใช้ราผลิตสารปฏิชีวนะ ด้านอาหารโดยการนำรา(เห็ด)มาใช้เป็นอาหาร หรือใช้ในการผลิตอาหาร ได้แก่ เทมเป้(tempe), ข้าวแดง(ang-kak) และซีอิ้ว (soy souce) เป็นต้น ด้านสิ่งแวดล้อมโดยการใช้ราเป็นตัวช่วยย่อยสลายวัสดุการเกษตร วัสดุเหลือทิ้ง หรือสลายพวกสารตกค้างในดิน ด้านการเกษตร ราใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ ช่วยควบคุมวัชชพืช แมลง หรือราก่อโรคในพืช หรือราที่อยู่ร่วมกับรากพืช (mycorrhiza) ช่วยให้พืชเจริญเติบโตได้ดีขึ้น ด้านอุตสาหกรรม เอนไซม์หรือสารเมทาโบไลท์ที่ราสร้างขึ้น เช่น กรดอินทรีย์ต่างๆ เอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteases) เอนไซม์ย่อยไขมัน (lipases) ได้ถูกนำไปใช้ในกิจกรรมต่างๆมากมาย การนำราไปใช้ประโยชน์แทนสารเคมีเป็นการรักษาสภาวะแวดล้อม มีความเป็นมิตรกับธรรมชาติและเป็นการใช้ทรัพยากรที่ยั่งยืน

เอนไซม์ย่อยโปรตีน (Word, 1983; Loffler, 1986)

เอนไซม์ย่อยโปรตีนจัดเป็นเอนไซม์ไฮโดรเลส จะเร่งปฏิกริยาการสลายพันธะเปปไทด์ด้วยน้ำ (peptide hydrolase) แบ่งออกเป็น 4 กลุ่มตามกลไกการทำงาน ได้แก่ โปรติเอสซีรีน (The serine proteases) โปรติเอสซัลไฟดริล (The sulfhydryl proteases) โปรติเอสมีโลหะ (The metal-containing proteases) และ โปรติเอสกรด (The acid proteases)

โปรติเอสซีรีน เป็นเอนไซม์ที่บริเวณเร่ง(active site) ประกอบด้วยกรดอมิโนซีรีน และหมู่ imidazole เอนไซม์ในกลุ่มนี้ทั้งหมดเป็นพวก endopeptidases มีความสามารถดำเนินกิจกรรมในสภาวะที่เป็นด่าง (pH 7-11) เอนไซม์ในกลุ่มนี้ถูกยับยั้งโดย DPF (diisopropyl-phosphofluoridate)

โปรติเอสซัลไฟดริล เป็นเอนไซม์ที่มีหมู่ซัลไฟดริลที่บริเวณเร่งมีสมบัติเป็น neutral proteases พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ที่ 6-7.5 เป็น endopeptidases เอนไซม์จะถูกยับยั้งด้วยสารที่เรียกว่า Sulfhydryl reagents หรือ sulfhydryl group(-SH)

โปรติเอสมีโลหะ เป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่มีอิออนของโลหะรวมอยู่ในโมเลกุลของเอนไซม์หรือรวมอยู่ในปฏิกริยาการย่อยสลาย ส่วนใหญ่เป็น exopeptidases การทำงานจะเกิดขึ้นได้ดีที่พีเอชเป็นกลาง (pH 6.5-7.5) จึงจัดเป็น neutral proteases เนื่องจากมีอิออนของโลหะร่วมในปฏิกริยา จึงถูกยับยั้งได้ด้วยสารจับอิออนของโลหะ เช่น EDTA

โปรติเอสกรด เอนไซม์ในกลุ่มนี้ผลิตโดยรา และยีสต์ บางครั้งพบในแบคทีเรีย พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานจะอยู่ในช่วงกรด (pH 2-4) อนุมูลกรดอมิโนที่มีบทบาทในบริเวณเร่งของเอนไซม์ในกลุ่มนี้มีหมู่คาร์บอกซิลมากกว่า 1 หมู่ เช่น กรดอมิโนแอสพาติค โปรติเอสกรดแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่มีคุณสมบัติคล้ายเปปซิน (pepsin like-enzyme) และกลุ่มที่มีคุณสมบัติคล้ายเรนนิน (rennin like-enzyme) โปรติเอสกรดกลุ่มแรกผลิตโดย *Asprgillus*, *Penicillium* และ *Rhizopus* สำหรับเอนไซม์จากราและยีสต์ที่มีคุณสมบัติคล้ายเรนนิน และมีความสำคัญทางการค้าส่วนใหญ่ผลิตจาก *Endothia parasitica*, *Mucor pusillus* และ *M. miehei* นำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมการผลิตเนย

การผลิตเอนไซม์สลายไฟบรินจากจุลินทรีย์

การผลิตเอนไซม์สลายไฟบรินจากจุลินทรีย์มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางทั้งจาก แบคทีเรีย ยีสต์ และรา มีการทดลองเลี้ยงเซลล์หรือเส้นใยราทั้งในอาหารเหลว(submerged culture) แบบเซลล์อิสระ(free cells) และแบบตรึงเซลล์ (immobilized cells) ตลอดจนการใช้อาหารแห้ง(solid state culture) โดยมีสับสเตรทต่างๆกันดังนี้

Abdel-Rahman และคณะ (1990) นำราที่แยกได้จากปุ๋ยหมักมาทดสอบการสร้างเอนไซม์สลายไฟบริน พบรา 5 สายพันธุ์ โดยที่ *Aspergillus fumigatus* มีกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ในระดับที่น่าพอใจ

Ismail และคณะ (1990) ทดสอบการสร้างเอนไซม์สลายไฟบริน เอนไซม์คาซีเนส และเอนไซม์เจลาตีเนส จากรา 8 สายพันธุ์ของจีนัส *Aspergillus, Penicillium, Fusarium* และ *Trichoderma* พบว่า *F. oxysporum* สามารถผลิตเอนไซม์สลายไฟบรินได้ดีกว่าราชนิดอื่น ต่อมามีรายงานการใช้รา *F. oxysporum* เพื่อศึกษาการผลิตเอนไซม์สลายไฟบรินโดยการเลี้ยงแบบ batch บนอาหารแห้งสามารถผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ได้ 80 IU ต่อมิลลิลิตรของของเหลวที่ได้จากการสกัดอาหารแห้ง เมื่อทำการเลี้ยงราเป็นเวลา 96 ชั่วโมง (Tao *et al.*,1997) เมื่อปรับปรุงวิธีการผลิตเป็นแบบ repeated batch การผลิตเอนไซม์สามารถทำต่อเนื่องได้ 31.5 วัน ปริมาณเอนไซม์ที่ได้ทั้งหมดเป็น 154,500 IU/ลิตร (Tao *et al.*,1998)

Fusarium pallidoroseum เป็นราอีกสายพันธุ์หนึ่งที่มีผู้นำไปใช้ศึกษาการผลิตเอนไซม์สลายไฟบรินโดยการเลี้ยงราบนอาหารแห้งที่มี wheat bran เป็นสับสเตรทพบกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดในอาหารที่มีความชื้น 50% ที่อุณหภูมิ 25°ซ การสร้างเอนไซม์สูงขึ้นอีก 1.7 เท่า เมื่อมีเคซีนความเข้มข้น 2% รวมอยู่ด้วย เมื่อทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติต่างๆพบว่าเอนไซม์นี้เป็นโปรตีเอสมีโลหะ ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกลาง (El-Aassar,1995)

El-Aassar และ คณะ (1995) รายงานการผลิตเอนไซม์สลายไฟบรินของรา *P. chrysogynum* H9 ว่าองค์ประกอบของอาหารมีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์ การผลิตโดยวิธีตรึงเซลล์ทำให้รามีความคงตัวมากกว่าการเลี้ยงแบบเซลล์อิสระ แต่ปริมาณของเอนไซม์ที่ผลิตได้โดยวิธีตรึงเซลล์จะต่ำกว่าปริมาณของเอนไซม์ที่ได้จากการเลี้ยงแบบเซลล์อิสระที่ไม่มีการเขย่าแต่สูงกว่าปริมาณของเอนไซม์ที่ได้จากการเลี้ยงแบบเซลล์อิสระเมื่อมีการเขย่าร่วมด้วย

Hirasawa และคณะ (1997a) ได้นำเส้นใยราที่แยกจากเห็ดที่ผลิตเป็นการค้าและเห็ดที่ขึ้นตามธรรมชาติมาคัดเลือกหาสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์สลายไฟบรินพบว่ามี 2 สายพันธุ์คือ *Pleurotus corenucopiae* ซึ่งเป็นเห็ดที่ผลิตเป็นการค้า (Tamogitake) และ สายพันธุ์ W510 ซึ่งเป็นเห็ดที่ขึ้นตามธรรมชาติสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดี เมื่อนำสายพันธุ์ W510 มาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์พบว่าราจะผลิตเอนไซม์ได้สูงในอาหาร glucose medium ที่มี potato dextrose, malt extract หรือ corn steep liquor อย่างใดอย่างหนึ่งเป็นส่วนประกอบ (Hirasawa *et al.*,1997b)

Choi และ Shin (1998) นำดอกเห็ด *Pleurotus ostreatus* มาปั่นและสกัดเอนไซม์สลายไฟบรินนำไปทำให้บริสุทธิ์พบว่าเป็นโปรติเอสมีโลหะ

Takeno และ คณะ (1999) ทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์สลายไฟบรินได้พบว่าแบคทีเรีย (ยกเว้น *Serratia plymuthica* IFO 3055) ยีสต์ และรา รวมทั้งเส้นใยที่แยกจากดอกเห็ดที่นำมาศึกษาผลิตเอนไซม์สลายไฟบรินได้ในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจนอย่างใดอย่างหนึ่งหรือผลิตได้ทั้งสองสภาวะ

พัชราภาณ์ และ เยาวลักษณ์ (2543) รายงานว่าจากเส้นใยราที่แยกจากเห็ดที่ผลิตเป็นการค้าและเห็ดที่ขึ้นตามธรรมชาติจำนวน 15 สายพันธุ์ พบว่า *Flammulina velutipes* (เห็ดเข็มเงิน) และ *Schizophyllum commune* (เห็ดแครง) เป็นราที่ผลิตเอนไซม์สลายไฟบรินได้ในปริมาณที่สูงสองอันดับแรก

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์สลายไฟบรินในรา

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ขึ้นกับรูปแบบการผลิต ซึ่งอาจเป็นการผลิตโดยการเลี้ยงบนอาหารแห้ง หรือโดยการเลี้ยงราในสภาพอาหารเหลวแต่โดยทั่วไป อาหารที่ใช้เลี้ยงรา และสภาพแวดล้อมเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ในรา ในการเลี้ยงราบนอาหารแห้ง ขนาดอนุภาค และปริมาณความชื้นของสับสเตรต เป็นสิ่งที่ต้องพิจารณาร่วมด้วย

- องค์ประกอบของอาหาร

แหล่งของอาหารที่ใช้มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของรา Hirasawa และคณะ (1997b) ทำการเลี้ยงราในกลุ่ม Basidiomycetes ในอาหารเหลว โดยใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารประกอบอินทรีย์ชนิดต่างๆ พบว่าราทั้ง 6 สายพันธุ์ ที่ใช้ในการทดลองเมื่อเจริญในอาหารที่มี corn steep liquor และ malt extract จะพบการสร้างเอนไซม์สลายไฟบรินได้ แต่ถ้าส่วนผสมอาหารเป็น yeast extract พบราเพียง 3 สายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์สลายไฟบรินได้ สำหรับ urea ไม่ช่วยในการสร้างเอนไซม์ของราใดๆ สำหรับแหล่งคาร์บอนพบว่า sucrose และ corn starch จะให้ผลดีกกว่า glucose นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ malt extract มีส่วนช่วยในการสร้างเอนไซม์สลายไฟบรินในรา *Penicillium chrysogyum* H9 (El-Aassar *et.al.*, 1990)

- อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์จะผันแปรไปในราแต่ละชนิด ส่วนใหญ่ราที่นำมาใช้ในการทดลองเป็นพวกที่เจริญในช่วงอุณหภูมิปานกลาง การทดลองส่วนใหญ่จึงทำที่อุณหภูมิระหว่าง 25-30°ซ (Hirasawa *et al.*,1997a and 1997b; Tao *et al.*,1997; Tao *et al.*,1998 ;Takeno *et al.*,1999) มีการทดลองเปรียบเทียบอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อต่อการสร้างเอนไซม์สลายไฟบรินในรา *Fusarium pallidorosum* โดยการเลี้ยงบนอาหารแห้ง เป็นเวลา 4 วัน พบว่าที่อุณหภูมิ 25°ซ ราผลิตเอนไซม์ได้ดีกว่าที่ 30°ซ (El-Aassar, 1995)

- ปริมาณออกซิเจน

ราเป็นพวกที่ต้องการออกซิเจนเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวจะนำไปวางบนเครื่องเขย่า โดยใช้ความเร็วรอบแตกต่างกันไป Hirasawa และคณะ, 1997a และ 1997b) ใช้การเขย่า 80 รอบต่อนาที Takeno และ คณะ, (1999) ใช้ 100 รอบต่อนาที El-Aassar และ คณะ, (1990) ใช้การเขย่า 120 รอบต่อนาที พัชราภาณ์ และ เยาวลักษณ์ (2543) ใช้ความเร็วรอบของการเขย่า 150 รอบต่อนาที ไม่พบรายงานที่เปรียบเทียบความเร็วรอบของการเขย่าต่อการสร้างเอนไซม์โดยตรง El-Aassar และ คณะ (1990) ที่ทำการศึกษาเอนไซม์สลายไฟบรินในรา *P. chrysogyum* H9 เปรียบเทียบให้เห็นความแตกต่างของการเลี้ยงในอาหารเหลวแบบเซลล์อิสระที่มีการเขย่าและไม่มีการเขย่า (static culture) ผลการทดลองพบว่าเมื่อไม่มีการเขย่าน้ำหนักแห้งสูงสุดของราจะมากกว่าเมื่อเลี้ยงโดยมีการเขย่า นอกจากนี้เส้นใยราที่เลี้ยงแบบไม่มีการเขย่าจะสลายตัวได้มากและรวดเร็ว การสร้างเอนไซม์ในราที่เลี้ยงแบบไม่มีการเขย่าจะให้ผลดีกว่า

- เวลาในการบ่ม

ระยะเวลาในการเลี้ยงรามีผลต่อการผลิตเอนไซม์ การผลิตเอนไซม์จะพบได้มากที่สุดเมื่อรามีการเจริญหรือมีมวลชีวภาพสูงสุด (El-Aassar *et al.*, (1990)

ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

- สารยับยั้ง (inhibitors)

เนื่องจากเอนไซม์สลายไฟบรินเป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิดหนึ่ง ดังนั้นสารยับยั้งที่มีผลต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีนจึงมีผลต่อเอนไซม์สลายไฟบรินด้วย การทดลองเรื่องสารยับยั้งมักจะทดสอบกับเอนไซม์ที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์มาก่อน เช่น Choi and Shin (1998) พบว่า เอนไซม์สลายไฟบรินจาก *P. ostreatus* ที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ถูกยับยั้งด้วย 1,10-Phenanthroline และ EDTA แต่ Hirasawa และคณะ 1997b ทดลองนำส่วนของอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเส้นใยเห็ดชนิดต่างๆมาผสมกับ Proteinase inhibitor เช่น Phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF) 1 mM, Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) 10 mM, 1,2-Epoxy-3-phenoxypropane (EPNP) 1mM, p-Chloromercuri-benzoic acid (PCMB) 2mM และ Iodoacetic acid 1 mM พบว่า proteinase inhibitor มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ในอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเส้นใยเห็ดแตกต่างกันไป

- อนุมูลของโลหะ

อนุมูลของโลหะอาจมีผลช่วยให้เอนไซม์มีความคงตัว หรือส่งผลให้เอนไซม์มีการทำงานดีขึ้นหรือลดลงได้เช่นกัน El-Aassar (1995) พบว่าเอนไซม์สลายไฟบรินจาก *Fusarium pallidoroseum* ที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์จะทำงานได้ดีขึ้น 1.7 เท่า เมื่อมีอนุมูล cobolt ความเข้มข้น 1mM รวมอยู่ด้วย ในขณะที่ อนุมูล calcium, zinc และ sodium มีผลช่วยให้เอนไซม์มีความคงตัวขึ้นเท่านั้น Choi and Shin (1998) พบว่าเอนไซม์สลายไฟบรินจาก *Pleurotus ostreatus* ที่ถูกยับยั้งด้วย 1,10-Phenanthroline และ EDTA เมื่อเติมอนุมูล zinc cobolt และ copper จะกลับมีกิจกรรมใหม่ได้ ในขณะที่ calcium และ magnesium ไม่ช่วยให้กิจกรรมของเอนไซม์คืนมา

- อุณหภูมิ และพีเอช

การทำงานและความคงตัวของเอนไซม์ขึ้นกับอุณหภูมิและพีเอช Hirasawa และคณะ (1997a) ทดสอบความคงตัวของเอนไซม์สลายไฟบรินที่อยู่ในอาหารซึ่งได้จากการเลี้ยงเส้นใยเห็ดหลายชนิดที่อุณหภูมิและพีเอชต่างๆ ภายในเวลา 20 นาที พบว่าเอนไซม์ส่วนใหญ่มีความคงตัวในที่อุณหภูมิสูง 50°ซ สำหรับพีเอชที่เกี่ยวข้องกับความคงตัวของเอนไซม์ในอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเส้นใยเห็ด พบว่ามีความหลากหลาย กิจกรรมของเอนไซม์ในอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเส้นใยเห็ดมีทั้งที่มีความคงตัวในช่วงพีเอชกว้าง (pH 4-10) และในช่วงแคบเฉพาะช่วงที่เป็นกรด (pH 4-4.5) ส่วนเอนไซม์สลายไฟบรินจาก *P. ostreatus* มีพีเอชที่เหมาะสมกับการทำงานในช่วง 7.5-8 เอนไซม์มีความคงตัวที่อุณหภูมิสูงระดับ 50°ซ นาน 15 นาที แต่กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง 20% เมื่อนำเอนไซม์ไปไว้ที่อุณหภูมิ 60°ซ นาน 15 นาที (Choi and Shin ,1998) El-Aassar (1995) พบว่าเอนไซม์สลายไฟบรินจาก *F. pallidoroseum* ที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานอยู่ที่ 40°ซ และพีเอชเป็น 7 กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงถ้าอยู่ในพีเอชที่เป็นกรด และกิจกรรมของเอนไซม์จะสูญเสียไป 70% เมื่อนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 55°ซ เป็นเวลา 15 นาที