ผลการทดลอง

1. ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆต่อการผลิตเอนไซม์สลายไฟบริน

จากการเลี้ยงเชื้อรา *Xylaria* sp. BL 25 ในอาหารเหลวชนิดต่างๆ ได้แก่ PDB, SDB, MY, PYGM และ MM ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 1 พบว่าถึงแม้รามีการเจริญในอาหารใกล้เคียงกัน (PDB กับ PYGM) แต่กิจกรรมของเอนไซม์สลายไฟบรินที่เกิดขึ้นมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน ค่าของกิจกรรมของเอนไซม์สลายไฟบรินที่วัดได้เมื่อราเจริญอยู่ในอาหาร PYGM จะมากกว่าค่าของกิจกรรมของเอนไซม์สลายไฟบรินที่วัดได้เมื่อราเจริญอยู่ในอาหาร PDB ถึง 2.5 เท่า แสดงว่าอาหารที่ใช้มีอิทธิพลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของ *Xylaria* sp. BL25 อาหาร PYGM ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดถึง 159 ตารางมิลลิเมตร จึงเลือกอาหาร PYGM ไปใช้ในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 1 กิจกรรมการสร้างเอนไซม์สลายไฟบรินของ *Xylaria* sp.BL25 ในอาหารเหลวชนิดต่างๆ เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°ซ ความเร็วรอบการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน

อาหาร	น้ำหนักแห้งของเส้นใย (กรัมต่อลิตร)	กิจกรรมของเอนไซม์ (ตารางมิลลิเมตร)
MM	1.87	48
PDB	3.03	63
SDB	2.19	114
MY	1.43	126
PYGM	3.01	158

2. ผลของความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของราและการผลิตเอนไซม์

จากการเลี้ยง *Xylaria* sp. BL25 ในอาหาร PYGM เก็บตัวอย่างเพื่อหาน้ำหนักแห้งและกิจกรรมการสลายไฟบรินในเวลา 14 วัน ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 2 *Xylaria* sp.BL25 เจริญให้น้ำหนักแห้งสูงสุดในวันที่ 7 (5.36 กรัมต่อลิตร) หลังจากนั้นน้ำหนักแห้งลดลงอย่างต่อเนื่อง เมื่อเลี้ยงจนครบ 14 วัน น้ำหนักแห้งที่ได้เหลือเพียง 25 % ของน้ำหนักแห้งสูงสุด กิจกรรมของเอนไซม์สลายไฟบรินตรวจไม่พบในเวลา 3 วัน แต่เมื่อรามีการเจริญมากที่สุดในวันที่ 7 กิจกรรมของเอนไซม์สลายไฟบรินวัดได้ 182 ตารางมิลลิเมตร กิจกรรมของเอนไซม์สลายไฟบรินตรวจได้สูงสุดในวันที่ 10 (193 ตารางมิลลิเมตร)หลังจากนั้นถึงแม้ค่าน้ำหนักแห้งจะลดลงแต่ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ค่อนข้างคงที่จนถึงสิ้นสุดการทดลองในเวลา 14 วัน (ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สลายไฟบรินที่เวลาแตกต่างกัน เมื่อนำไปทดสอบโดยใช้วิธีการทางสถิติพบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%) การทดลองต่อไปจึงทำการเลี้ยงราเป็นเวลา 7วัน

ตารางที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของรา *Xylaria* sp.BL25 กับการผลิตเอนไซม์สลายไฟบริน เมื่อเลี้ยงในอาหาร PYGM ที่อุณหภูมิ 30°ซ ความเร็วรอบการเขย่า 150 รอบต่อนาที

เวลา (วัน)	น้ำหนักแห้งของเส้นใย (กรัมต่อลิตร)	กิจกรรมของเอนไซม์ (ตารางมิลลิเมตร)
3	1.08	0
7	5.36	182
10	2.04	193
12	1.53	189
14	1.37	181

3 ผลของปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์

3.1 ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหาร

เมื่อใช้อาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นแตกต่างกัน พบว่าเมื่อปรับพีเอชของอาหารเป็น 4 จะเกิดเป็นตะกอน จึงทำการทดลองเฉพาะอาหารที่มีพีเอช เริ่มต้นเป็น 5, 6 และ 7 ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3 *Xylaria* sp.BL25 เจริญได้ดีในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นเป็นกลาง (pH 7) เมื่อครบ 7 วันได้น้ำหนักแห้งสูงสุดคือ 4.93 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ราเมื่อเจริญในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นเป็น 5 และ 6 ให้ค่าน้ำหนักแห้งใกล้เคียงกัน แต่เมื่อพิจารณาถึงค่าของเอนไซม์สลายไฟบรินที่ตรวจสอบได้พบว่าในอาหารที่มีพีเอช 7 ถึงแม้ว่าราเจริญดีแต่กิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้น้อยกว่าที่พีเอช 5 และ 6 อาจเป็นไปได้ว่า พีเอชไม่เหมาะสม ค่ากิจกรรมของเอนไซม์วัดได้จากอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้น 5 และ 6 มีความใกล้เคียงกันมาก จึงเลือกใช้พีเอชของอาหารเป็น 6 สำหรับการทดลองต่อไป เนื่องจากอาหาร PYGM เมื่อเตรียมเสร็จจะมีพีเอชประมาณ 6

ตารางที่ 3 ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหาร ต่อการผลิตเอนไซม์สลายไฟบรินของ *Xylaria* sp.BL25 เมื่อเลี้ยงในอาหาร PYGM เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 30°ซ ความเร็วรอบการเขย่า 150 รอบต่อนาที

พีเอชเริ่มต้นของอาหาร	น้ำหนักแห้งของเส้นใย (กรัมต่อลิตร)	กิจกรรมของเอนไซม์ (ตารางมิลลิเมตร)
5	3.00	215
6	3.17	209
7	4.93	184

3.2 ผลของอุณหภูมิในการบ่มเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์

จากการเลี้ยงรา *Xylaria* sp.BL25 ในอาหาร PYGM ที่มีพีเอชเริ่มต้นเป็น 6 ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35°ซ ความเร็วรอบการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน ผลการทดลองในตารางที่ 4 แสดงว่าอุณหภูมิของการบ่มเชื้อมีผลต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์สลายไฟบริน ที่อุณหภูมิ 25 และ 30°ซ รามีการเจริญไม่แตกต่างกัน แต่

ต่างจากการเจริญที่อุณหภูมิ 35°ซ อย่างชัดเจน ที่อุณหภูมิ 35°ซ ราเจริญได้น้อยมาก (1.18 กรัมต่อลิตร) คิดเป็น 36 % ของน้ำหนักแห้งที่อุณหภูมิ 30°ซ นอกจากนี้ที่อุณหภูมิสูงยังส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง ค่าของกิจกรรมสลายไฟบรินวัดได้เพียง 75 ตารางมิลลิเมตร ซึ่งคิดเป็น 39% ของกิจกรรมที่วัดได้เมื่อเชื้อเจริญที่อุณหภูมิ 30°ซ ดังนั้น การทดลองที่ใช้อุณหภูมิ 30°ซ จึงมีความเหมาะสม

ตารางที่ 4 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์สลายไฟบรินของ *Xylaria* sp.BL25 เมื่อเลี้ยงในอาหาร PYGM ที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6 เป็นเวลา 7 วัน ความเร็วรอบการเขย่า 150 รอบต่อนาที

อุณหภูมิ (°ซ)	น้ำหนักแห้งของเส้นใย (กรัมต่อลิตร)	กิจกรรมของเอนไซม์ (ตารางมิลลิเมตร)
25	3.13	167
30	3.24	192
35	1.18	75

3.3 ผลของความเร็วรอบในการเขย่าต่อการผลิตเอนไซม์

เมื่อทำการเลี้ยงราในอาหาร PYGM ที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6 บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ โดยใช้ความเร็วรอบการเขย่าเป็น 150, 200 และ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 5 จากผลการทดลองพบว่าเมื่อความเร็วรอบของการเขย่าเพิ่มขึ้นเป็น 250 รอบต่อนาที *Xylaria* sp.BL25 จะเจริญได้ดีขึ้นเห็นได้จากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่สูงกว่าเมื่อเลี้ยงเซลล์ที่ความเร็วรอบ 150 และ 200 รอบต่อนาที แต่ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ทดสอบได้จากแต่ละความเร็วรอบไม่แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 5 ผลของความเร็วรอบในการเขย่าต่อการผลิตเอนไซม์ของ *Xylaria* sp. BL25 เมื่อเลี้ยงในอาหาร PYGM ที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6 อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 7 วัน

ความเร็วรอบการเขย่า (รอบต่อนาที)	น้ำหนักแห้งของเส้นใย (กรัมต่อลิตร)	กิจกรรมของเอนไซม์ (ตารางมิลลิเมตร)
150	2.92	199
200	2.86	202
250	4.03	196

4. การเตรียมเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์

เพื่อความสะดวกในการคำนวณค่าของเอนไซม์เพื่อเปรียบเทียบในการทดลองนี้จึงกำหนดให้

เอนไซม์ 1 unit เท่ากับ 1 ตารางมิลลิเมตรของพื้นที่วงใสที่ได้จากการทำงานของเอนไซม์เมื่อทดสอบโดยใช้วิธี fibrin plate

ทำการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์แต่ละขั้นตอนได้ผลดังแสดงในตารางที่ 6 จาก culture broth เมื่อนำมาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ พบว่าที่ความเข้มข้นอิ่มตัว 80% จะให้ค่าของกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด แต่พบว่าเหลือกิจกรรมของเอนไซม์เพียง 6.9% หลังจากทำ dialysis เพื่อกำจัดแอมโมเนียมซัลเฟตออกไปแล้วพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์เหลืออยู่ 4.6% อย่างไรก็ตามค่า Specific activity ของเอนไซม์เพิ่มขึ้นทุกขั้นตอน โดยเฉพาะที่ผ่านการทำ ultrafiltration โดยใช้ membrane สำเร็จรูป Vivacell 70 ทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์สูงขึ้นถึง 82.5 เท่า

ตารางที่ 6 ผลการเตรียมเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์จาก culture broth ของ *Xylaria* sp. BL25

Step	Volume (ml)	Protein (mg/ml)	Activity (unit/ml)	Specific activity (unit/mg protein)	Total activity (unit)	Yield (%)	Purity (fold)
Culture broth	900	7.64	43,900	5746	39.51×10^6	100	1
80 % sat. $(NH_4)_2SO_4$	16	9.69	171,100	17,657	2.74×10^6	6.9	3.1
Dialysis	22.5	3.27	80,000	24,465	1.8×10^6	4.6	4.3
Ultrafiltration	6.4	0.51	241667	473,857	1.55×10^6	3.9	82.5

5. ปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์

5.1 อุณหภูมิ

จากการทดสอบหากิจกรรมของเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์โดยการบ่ม fibrin plate ที่อุณหภูมิ 25,30, 35 และ 40°ซ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เปรียบเทียบกิจกรรมที่ได้เป็นค่า relative activity ดังแสดงในตารางที่ 7 จากผลการทดลองที่อุณหภูมิ 35°ซ กิจกรรมของเอนไซม์เกิดขึ้นได้ดีที่สุด ถ้าอุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่านี้กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลง ดังนั้นการหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์โดยวิธี fibrin plate ที่ใช้อยู่จึงให้ผลที่สอดคล้องกัน

ตารางที่ 7 ผลของอุณหภูมิในการบ่ม fibrin plate ต่อกิจกรรมของเอนไซม์สลายไฟบรินกึ่งบริสุทธิ์ของ *Xylaria* sp.BL25

อุณหภูมิ (°ซ)	Relative activity (%)
25	56
30	84
35	100
40	63

5.2 อนุมูลโลหะบางชนิด

อนุมูลโลหะมีผลการยับยั้งเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์ได้แตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 8 จากตารางได้แสดงให้เห็นว่าอนุมูลโลหะที่ความเข้มข้นสูงการยับยั้งจะมากกว่าที่ความเข้มข้นต่ำ และ Zn^{+2} ทำให้เอนไซม์เสียสภาพอย่างสิ้นเชิงในเวลา 20 นาที ในขณะที่อนุมูลโลหะที่ใช้ในการทดสอบส่วนใหญ่ทำให้เอนไซม์สูญเสียสภาพไปประมาณ 40%

ตารางที่ 8 ผลของอนุมูลโลหะต่อกิจกรรมของเอนไซม์สลายไฟบรินกึ่งบริสุทธิ์ของ *Xylaria* sp. BL25 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 20 นาที

Substances	Final Concentration (mM)	Relative activity (%)
$CaCl_2$	1 mM	96
$CaCl_2$	2 mM	63
$CoCl_2$	1 mM	83
$CoCl_2$	2 mM	60
$CuSO_4$	2 mM	61
$HgCl_2$	2 mM	60
KCl	2 mM	64
$MgCl_2$	2 mM	62
MnCl	2 mM	58
$ZnCl_2$	2 mM	0
Control	-	100

5.3 สารยับยั้ง

ผลการทดลองในตารางที่ 9 แสดงว่ากิจกรรมของเอนไซม์ถูกยับยั้งได้ด้วยสารยับยั้ง EDTA, PMSF และ NPGB โดยมีผลการยับยั้งใกล้เคียงกัน (40-55%) ส่วน TPCK และ 1,10 Phenanthroline มีผลยับยั้งได้น้อยกว่า (15-30%) ในขณะที่ PCMB และ SBTI ไม่มีผลในการยับยั้งเอนไซม์สลายไฟบรินกึ่งบริสุทธิ์ของ *Xylaria* sp. BL25 เลย

6. ปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวของเอนไซม์

6.1 ผลของอุณหภูมิ

ผลของอุณหภูมิระดับต่างๆที่มีต่อความคงตัวของเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์ของ *Xylaria* sp. BL25 ภายในเวลา 20 นาที แสดงในตารางที่ 10 เอนไซม์ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิสูงจะเสียสภาพได้เร็วกว่าเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ ที่อุณหภูมิ 70°ซ กิจกรรมของเอนไซม์หายไปถึง 75% แต่นับได้ว่าเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์ของ *Xylaria* sp. BL25 มีความคงตัวที่อุณหภูมิสูงแม้เมื่อได้รับความร้อนที่ 50°ซ นาน 20 นาที ยังคงมีกิจกรรมของเอนไซม์อยู่มากกว่า 80%

ตารางที่ 9 ผลของสารยับยั้งต่อกิจกรรมของเอนไซม์สลายไฟบรินกึ่งบริสุทธิ์ของ *Xylaria* sp. BL25 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 20 นาที

Substances	Final Concentration	Relative activity (%)
PCMB	2 mM	100
SBTI	10 µg/mL	100
PMSF	0.5 mM	54
NPGB	0.5 mM	60
TPCK	2 mM	87
EDTA	5 mM	54
1,10 Phenanthroline	1 mM	70
Control	-	100

ตารางที่ 10 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์สลายไฟบรินกึ่งบริสุทธิ์ของ *Xylaria* sp. BL25 เมื่อบ่มเป็นเวลา 20 นาที

Temperature (°C)	Relative activity (%)
30	100
40	90
50	86
60	31
70	25

6.2 ผลของพีเอช

จากผลการทดลองเก็บเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์ของ *Xylaria* sp. BL25 ไว้ที่อุณหภูมิ 30°ซ ในสภาพที่มีพีเอชแตกต่างกันตั้งแต่ pH 3 -11 ในเวลา 20 นาที (ตารางที่ 11) พบว่าพีเอช 3 ช่วยให้กิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้น (Relative activity 129%) และเอนไซม์จะสูญเสียการทำงานในพีเอชที่เป็นด่าง ที่พีเอช 8 กิจกรรมของเอนไซม์คงเหลือเพียง 23% และตั้งแต่พีเอช 9 จะไม่พบกิจกรรมการสลายไฟบริน

6.3 ระยะเวลาในการเก็บรักษา

เอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์เมื่อนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิตู้เย็น อุณหภูมิ 30°ซ และ 37°ซ เป็นเวลา 3 เดือน พบว่าการเก็บไว้ในตู้เย็นเอนไซม์มีความเสถียรมากที่สุด กิจกรรมของเอนไซม์คงเหลือมากกว่า 75% ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 30°ซ จะคงเหลือประมาณ 50% และที่นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37°ซ จะสูญเสียสภาพมากที่สุด เกือบ 30%ของกิจกรรมจะหายไปในเวลา 2 สัปดาห์ และคงเหลือเพียง 24% ในเวลา 3 เดือน (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 11 ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์สลายไฟบรินกึ่งบริสุทธิ์ของ *Xylaria* sp. BL25 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 20 นาที

pH	Relative activity (%)
3	129
4	89
5	78
5.7	100
7	60
8	23
9	0
10	0
11	0

ตารางที่12 ผลของระยะเวลาในการเก็บเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์ของ Xylaria sp.BL25 ไว้ที่อุณหภูมิ ต่างๆ

Temperature	Time (week)	Relative activity (%)
control	0	100
4-10	2	92
	4	87
	8	80
	12	77
30	2	83
	4	75
	8	62
	12	56
37	2	72
	4	57
	8	36
	12	24