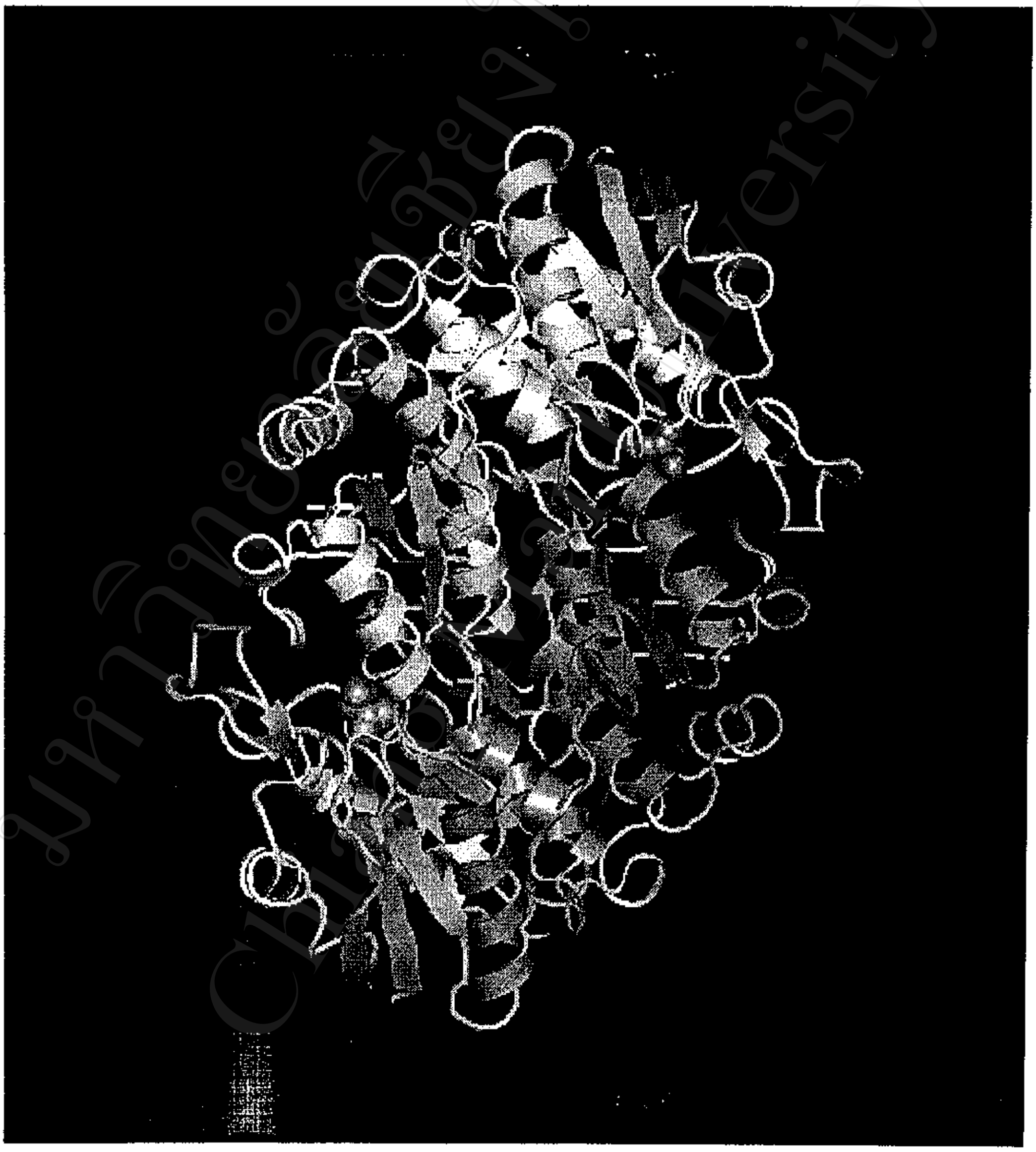
บทที่ 2
ทบทวนเอกสาร

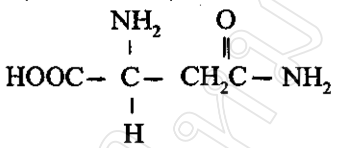
แอล-แอสพาราจิเนส (L-asparaginase หรือ L-asparagine amidohydrolases)

แอล-แอสพาราจิเนส (ภาพ 1) เป็นเอนไซม์ประเภท tetrameric enzyme ที่มีมวลโมเลกุลประมาณ 141,000 ดาลตัน เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม oxidoreductases ใช้เร่งปฏิกิริยาการออกซิไดซ์สับสเตรทหนึ่ง และรีดิวซ์อีกสับสเตรทหนึ่ง (มนตรี และคณะ, 2521) ปกติใช้ย่อยสลาย แอล-แอสพาราจีน (ภาพ 2)ซึ่งเป็นกรดอมิโนที่อยู่ในกลุ่ม acidic amino acid และ amide (สุนันทา, 2527) พบได้ทั่วไป ทั้งในเนื้อเยื่อของสัตว์หลายชนิด พืช และยังพบอีกด้วยว่า จุลินทรีย์บางชนิดก็สามารถผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ได้เช่นกัน แต่ไม่พบในเซลล์มนุษย์ (www.worthington-biochen.com/priceList/A/Asparaginase.html) โดยในครั้งแรกพบว่า แอล-แอสพาราจิเนส ที่ได้จากซีรั่มของหนูตะเภามีคุณสมบัติในการรักษาโรคมะเร็งบางชนิดได้ โดยพบว่า แอล-แอสพาราจิเนส จะไปทำให้เซลล์มะเร็งนั้น "ขาดอาหาร" กล่าวคือ แอล-แอสพาราจิเนส จะไปย่อยสลาย แอล-แอสพาราจีน ซึ่งเป็นสารสำคัญของเซลล์มะเร็ง ทำให้เซลล์มะเร็งนั้นขาดสารนี้นั่นเอง (www.sdsc.edu/10TW/week10.97/iotw.html) และจากคุณสมบัติพิเศษนี้เองจึงได้มีการศึกษาต่อในเรื่องนี้มากยิ่งขึ้นทั้งในด้านชีวเคมีและภูมิคุ้มกันวิทยา ต่อมาพบว่า จุลินทรีย์อีกหลายชนิดที่สามารถผลิต แอล-แอสพาราจิเนส ได้ เช่น *Escherichia coli*, *Serratia* sp., *Erwinia* sp., *Pseudomonas* sp., *Saccharomyces* sp. เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตาม แอล-แอสพาราจิเนส ที่จุลินทรีย์เหล่านี้ผลิตนั้นยังคงเป็นเอนไซม์ประเภท intracellular enzyme ดังนั้น จึงได้มีความพยายามค้นคว้าศึกษาหา แอล-แอสพาราจิเนส ที่เป็นเอนไซม์ประเภท extracellular enzyme ทั้งนี้เพราะจะทำให้สามารถผลิตได้ปริมาณมากในอาหารเหลว และยังสามารถทำให้บริสุทธิ์ (purification) ได้ง่ายกว่าอีกด้วย แต่อย่างไรก็ตาม แอล-แอสพาราจิเนส ที่ผลิตได้นี้ ก็ยังคงมีผลข้างเคียง (side effect) มากอยู่เมื่อนำมาใช้เป็นยาเพื่อรักษาผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งบางชนิด ดังนั้น จึงยังมีการศึกษาวิจัยหา แอล-แอสพาราจิเนส นี้อย่างต่อ

เนื่อง โดยทำการหาจุลินทรีย์จากแหล่งใหม่ ๆ เพื่อที่จะได้ แอล-แอสพาราจิเนส ที่มีประสิทธิภาพในการรักษาที่ดี และไม่มีผลข้างเคียงหรือมีผลข้างเคียงให้น้อยที่สุด



ภาพ 1 โครงสร้าง 3 มิติของ แอล-แอสพาราจิเนส



ภาพ 2 สูตรโครงสร้างของ แอล-แอสพาราจีน

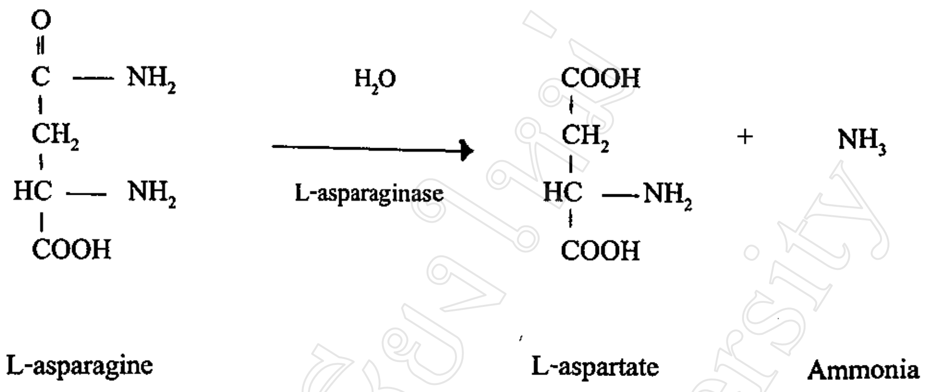
การใช้ แอล-แอสพาราจิเนส เป็นยารักษามะเร็งบางชนิด

ในปัจจุบัน ในการรักษามะเร็งด้วยสารเคมีหรือเคมีบำบัด (chemotherapy) (อาคม, 2528) จะมีการใช้สารเคมีหลายชนิด เช่น methotrexate (MTX) ซึ่งเป็น folic acid analog (Gordon, 1996) มีโครงสร้างคล้าย folic acid ใช้เป็นยาฆ่ามะเร็ง type : antimetabolite : antifolates agents, class : S phase specific agents มีผลต่อเซลล์ในระยะ S phase โดยมีผลต่อการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก จะเข้าแทนที่เมตาบอไลท์ปกติ โดยจะสามารถรวมได้กับ active site ของ dihydrofolate reductase (DHFR) จึงไม่สามารถสร้างโฟเลทได้ดังที่ควรจะเป็น จึงสามารถยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ทำให้สร้าง DNA ไม่ได้ (อำไพ, 2541) มีชื่อทางการค้าว่า Rhematex® ,Folex® USA, Mexate (USA) นิยมใช้ในการรักษา leukemias, lymphomas, head cancer, neck cancer, choriocarcinoma และมะเร็งปอด และยังสามารถรักษาโรคอื่น ๆ ได้ เช่น rheumatoid arthritis, graft versus host disease ที่เกิดจากการปลูกถ่ายไขกระดูก เป็นต้น MTX มีคุณสมบัติเป็น antifolates ซึ่งตัวมันมีคุณสมบัติเป็นสารอนุพันธ์ของสารโฟเลต MTX เข้าสู่เซลล์โดยอาศัยพลังงาน (energy dependent) และความไวต่ออุณหภูมิ (temperature sensitive) โดยการทำงานนี้จะขึ้นอยู่กับการทำงานของโปรตีนที่จำเพาะเจาะจงบนผิวของเยื่อหุ้มเซลล์ (specific tntramembrane protein) ซึ่งกลไกการเข้าสู่เซลล์ของ MTX จะเหมือนกับการเข้าสู่เซลล์ของโฟเลต และมี membrane carrier สำหรับMTX ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม การมี MTX ภายในเซลล์เพิ่มขึ้นจะเป็นการลดการขนส่งโฟเลตเข้าสู่เซลล์ เมื่อ MTX เข้าสู่เซลล์จะเข้ารวมกับ active site ของ dihydrofolate reductase รบกวนการสังเคราะห์โฟเลต ซึ่งเป็นปัจจัยร่วมในการสังเคราะห์ thymidilate, purine nucleotides, serine และ methionine ทำให้รบกวนการสังเคราะห์โปรตีน, DNA และ RNA ด้วยเหตุนี้จึงถือว่า MTX เป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen หรือ mutagen) เนื่องจากมีฤทธิ์ในการทำให้โครโมโซมผิดปกติหรือถูกทำลาย มีรายงานว่า การให้

MTX ในหญิงมีครรภ์มักเกิดการแท้งตามมา และมีการปนเปื้อนของ MTX ในน้ำนมทำให้ทารกที่รับเข้าไปมีพัฒนาการหรือการเจริญเติบโตที่ผิดปกติ (BC cancer agency, 1998b) แต่อย่างไรก็ตาม MTX ยังเป็นสารที่นิยมนำมาใช้รักษามะเร็ง แม้ว่าตัวมันเองจะเป็นสารก่อมะเร็งก็ตาม เนื่องจากการเกิดมะเร็งจากสารก่อมะเร็งได้ต้องอาศัยกระบวนการเมตาบอลิซึม เอ็นไซม์ และปัจจัยบางอย่างภายในร่างกาย เช่น กรรมพันธุ์ ฮอร์โมน ปัจจัยภายนอกร่างกาย เช่น อาหาร พฤติกรรมการกิน และสิ่งแวดล้อม เข้าช่วยเพื่อให้สารเคมีว่องไวเต็มที่ที่จะเปลี่ยนแปลงลักษณะการแบ่งตัวของเซลล์จนทำให้การควบคุมผิดปกติไป มิใช่เกิดจากการได้รับสารก่อมะเร็งเพียงชนิดเดียว (ไมตรี, 2522) ดังนั้น เมื่อเปรียบเทียบระหว่างผลดีและผลเสียแล้ว MTX ยังสามารถใช้เป็นยารักษามะเร็งได้เป็นอย่างดี เมื่อทราบผลข้างเคียงและเลี่ยงใช้กับผู้ที่มีสภาวะเสี่ยงต่ออันตรายมากเกินไป

การใช้ แอล-แอสพาราจิเนส เป็นยาในการรักษานั้นเป็นการรักษาด้วยสารเคมีหรือเคมีบำบัด (chemotherapy) วิธีหนึ่ง โดย แอล-แอสพาราจิเนส จะไปย่อยสลาย (hydrolysis) แอล-แอสพาราจีน เปลี่ยนไปเป็น แอล-แอสพาเตท กับ แอมโมเนีย (ภาพ 3) แต่กระบวนการการทำงานของ แอล-แอสพาราจิเนส นั้นทางด้านวิทยาศาสตร์ยังไม่ทราบแน่นอน แต่อย่างไรก็ตาม ก็รู้ว่าในกระบวนการย่อยสลายนี้จะผ่านกระบวนการ 2 ขั้นตอน โดยเปลี่ยนเป็นสารตัวกลางชนิดหนึ่งคือ beta-acyl-enzyme (www.pdb.bmcuu.se/pdb-docs/pdb255p10/abstracts/poster.html)

การใช้ แอล-แอสพาราจิเนสในฐานะที่เป็นยาในปัจจุบัน มีชื่อการค้าว่า Kidrolase เป็นยาต้านมะเร็งที่จัดอยู่ใน type : enzyme, class : non phase specific agent เป็นกรดอมิโนที่สังเคราะห์ได้จากกระบวนการ transamination ของกรดแอสพาร์ติด โดยได้หมู่เอมีนจากกลูตามีน และมี เอ็นไซม์ L-asparagine synthetase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ปฏิกิริยาการสร้าง แอล-แอสพาราจีน มีพอเพียงในเซลล์ปกติ แต่ในเซลล์มะเร็งจะขาดเอ็นไซม์ L-asparagine synthetase (Chabner *et al.*, 1996) ทำให้เซลล์มะเร็งมีความต้องการ แอล-แอสพาราจีน จากสิ่งแวดล้อมซึ่งได้จากกระแสเลือด หรือเซลล์ปกติที่อยู่ข้างเคียง (Capizzi *et al.*, 1997) หรือได้จากอาหารเลี้ยงเซลล์ (กมล, 2543)



ภาพ 3 ปฏิกิริยาการเปลี่ยน แอล-แอสพาราจีน ไปเป็น แอล-แอสพาร์เทต โดยมี แอล-แอสพาราจิเนส เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

การรักษามะเร็งบางชนิด โดยการให้ แอล-แอสพาราจิเนส ในการรักษา มีวิธีการใช้ 3 วิธี (www.cancerbacup.org.uk/info/asparaginase.htm)

1. ฉีดเข้าทางเส้นโลหิตดำ (intravenously) โดยผ่านทางท่อกลวงเล็ก ๆ (cannula) หรือ ฉีดเข้าใต้ผิวหนังเพื่อผ่านไปยังเส้นโลหิตดำบริเวณกระดูกไหปลาร้า
2. การหยดให้ผ่านทางท่อขนาดเล็ก
3. การฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (intramuscular)

การใช้ แอล-แอสพาราจิเนส ในฐานะที่เป็นยารักษามะเร็งบางชนิดนั้น อาจก่อให้เกิดอาการแพ้บางอย่างได้ (www.cancerbacup.org.uk/info/asparaginase.htm)

จากการทำการศึกษาพบว่า แอล-แอสพาราจิเนส สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ปี (www.worthington-biochen.com/priceList/A/Asparaginase.html)

ราเอนโดไฟท์ (Endophytic fungi)

ราเอนโดไฟท์ ในศัพท์ของทางเชื้อราวิทยาหมายถึง ราที่อาศัยอยู่ภายในใบ ท่อลำเลียงของพืชที่มีสุขภาพดี โดยที่จะไม่ทำให้พืชอาศัยนั้นแสดงอาการของการติดเชื้อหรือเป็นโรค (Isaac, 1992)

โดยราเอนโดไฟท์จะใช้ไฮฟา (hypha) แทงทะลุเข้าไปภายในของพืชระหว่างเซลล์พืชหรืออยู่ภายในของเซลล์พืช ซึ่งจะได้อาหารจากพืชโดยวิธีดังกล่าวนี้ด้วย เป็นศัพท์ที่เริ่มใช้ครั้งแรกโดย De Bary (1860) เพื่อใช้แยกความแตกต่างระหว่างราที่อยู่ภายในพืชที่เป็นการเข้ามาโดยการบุกรุกจากภายนอก (epiphytic fungi) และยังให้คำจำกัดความเพื่อแยกความแตกต่างออกจาก pathogen และ mycorrhizal fungi ด้วย

ความสำคัญของ ราเอนโดไฟท์ ต่อพืชอาศัย

1. เนื่องจากโครงสร้างและขนาดของไฮฟาของราเอนโดไฟท์บางชนิดมีขนาดใหญ่ (ประมาณ 10-15 ไมโครเมตร) อาจทำให้รูปร่างของเซลล์พืชอาศัยนั้นเปลี่ยนแปลงไป
2. ในบางครั้งพบว่า ราเอนโดไฟท์ ในปริมาณที่มากพอ จะทำหน้าที่ช่วยในการค้ำจุนในส่วนของเนื้อเยื่อพืชอาศัย
3. ทางด้านรูปแบบและโครงสร้าง จะทำให้พืชที่ติดเชื้อหรือเป็นโรคนั้นมีโอกาสรอดหรือหายจากอาการของโรคมากยิ่งขึ้น ต้านทานต่อโรคมากยิ่งขึ้น มีความต้านทางต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมมากยิ่งขึ้น เช่น ในที่ที่มีความชื้นสูงเกินไป (Belesly *et al.*,1987)
4. ช่วยในการชักนำให้พืชสร้าง plant growth regulators บางชนิด
5. ไม่มีรายงานเกี่ยวกับผลกระทบเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืช (Clay, 1989)
6. ช่วยให้พืชอาศัยมีความต้านทานเมื่ออยู่ในสภาวะที่ "ขาดน้ำ"
7. ต้านทานการกัดกินของแมลง
8. ช่วยควบคุมการติดเชื้อในลักษณะ latent infection (Carris, 1996)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ตั้งแต่ในช่วงต้นของปี ค.ศ. 1900 เป็นต้นมาได้มีการทำการแยกเชื้อที่สามารถผลิต แอล-แอสพาราจิเนส จากแหล่งต่าง ๆ เช่น *Penicillium camemberti* (Dox, 1909), *Aspergillus niger* (Bach, 1928 ; Schmalfuss & Mothes, 1930), *Brucella abortus* (Altenbern & Housewright, 1954), Pseulomonads (de Groot & Lichtenstein, 1960 ; Ramadan *et al.*, 1964), *Staphylococcus aureus* (Tsuji, 1957), *Bacillus stearothermophilus* (Manning & Campbell, 1957), *Mycobacterium avium* (Tsuju, 1957), *Rhodopseudomonas capsulatum* (Tchan *et al.*, 1971) แต่ แอล-แอสพาราจิเนส ที่

แยกได้ดังกล่าวยังไม่ได้นำเอามาทดสอบความสามารถในการยับยั้งมะเร็งบางชนิด (antilymphoma activity)

Broome (1961) ได้ศึกษาถึงผลในการยับยั้งมะเร็งบางชนิดของซีรั่มที่แยกได้จากหนูตะเภา พบว่า ปัจจัยในการยับยั้งมะเร็งบางชนิด (antilymphoma factor) นั้น เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่มีอยู่ในซีรั่มจากหนูตะเภา คือ แอล-แอสพาราจิเนส (L-asparaginase)

Mashburn และ Wriston (1963) ได้ทำการศึกษาพบว่า แอล-แอสพาราจิเนส ที่แยกได้จาก *E. coli* มีความสามารถในการยับยั้งมะเร็งบางชนิด (an-titumor activity) ได้เช่นกัน และยังพิสูจน์ว่า แอล-แอสพาราจิเนส จาก *E. coli* สามารถยับยั้ง 6C_3HED lymphosarcoma ในหนูได้

Mathews และ Brown (1974) สามารถแยก แอสพาราจิเนส ได้จากตับของหนูตะเภา

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิต แอล-แอสพาราจิเนส ได้

การแยกเชื้อที่สามารถผลิต แอล-แอสพาราจิเนส เริ่มมาตั้งแต่ปี 1964 โดย Greenberg *et al.* (1964) ทำการแยกเชื้อ *Sacchromyces cerevisiae*, Yamada (1970) และ Tosa *et al.* (1971) ทำการแยกเชื้อ *Alcaligenes faecalis*, Sakamoto (1970) ทำการแยกเชื้อ *Candida utilis*, Tosa *et al.* (1972-3), Lee และ Yang (1973) ทำการแยกเชื้อ *Proteus bulgaris*, Soru *et al.* (1972) ทำการแยกเชื้อ *Mycobacterium bovis*, DeJong (1972) ทำการแยกเชื้อ *Streptomyces griseus*, Roberts *et al.* (1972) ทำการแยกเชื้อในกลุ่ม Achromobacteraceae, Cammack *et al.* (1972), Shifrin *et al.* (1973) ทำการแยกเชื้อ *Erwinia carotovora*, Holcenberg *et al.* (1972), Jones *et al.* (1973) ทำการแยกเชื้อ *Acinetobacter*, Han และ Ohnuma (1972), King *et al.* (1974) ทำการแยกเชื้อ *Erwinia*, Whelan และ Wriston (1974) ทำการแยกเชื้อ *Serratia marcescens*, และ Siechiechowicz และ Ireland (1989) ทำการแยกเชื้อ *Pisum sativum* ที่สามารถผลิต แอล-แอสพาราจิเนส ได้

Robinson, Phillips (1971) พบว่า มีแบคทีเรียจำนวนมากที่สามารถผลิต แอล-แอสพาราจิเนส ได้ เช่น *Pseudomonas fluorescens, Alcaligenes viscolactis, Escherichia coli, Erwinia carotovora, Serratia marcescens, Proteus vulgaris, Micrococcus lysodeikticus, Bacillus subtilis,* และ *B. megaterium* นอกจากนั้นยังพบว่า *Erwinia carotovora* มีค่า specific activity สูงสุด กล่าวคือ มีค่าเท่ากับ 4.7 ไอยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน

Arima *et al.* (1972) พบว่ามีแบคทีเรีย ฟังไจ และยีสต์ จำนวนมากที่สามารถผลิต แอล-แอสพาราจิเนส ได้ และเป็นชนิด extracellular L-asparaginase ด้วย เช่น *Pseudomonas* sp. *Candida* sp. ,

Rhodotorula sp., *Escherichia* sp. โดยเฉพาะอย่างยิ่งใน *Pseudomonas* sp. จากการนำ *Psuedomonase* sp. จำนวน 104 strains ที่นำมาทดสอบ พบว่า มีจำนวน 51 strains (ประมาณ 49 เปอร์เซ็นต์) ที่ให้ผลบวก กล่าวคือ สามารถผลิต แอล-แอสพาราจิเนส ได้

Imada *et al.* (1973) ทำการศึกษาการผลิต แอสพาราจิเนส และ กลูตามิเนส ในจุลินทรีย์หลายชนิด โดยทำการศึกษาในแบคทีเรียจำนวน 464 species ในฟังไจจำนวน 4,158 species ในยีสต์จำนวน 1,326 species พบว่า ให้ผลเป็นบวก กล่าวคือ พบความสามารถในการผลิต แอล-แอสพาราจิเนสได้ โดยในแบคทีเรียโดยเฉพาะประเภทกรัมลบ เช่น ใน Enterobacteriaceae แบคทีเรียกรัมบวก เช่น ใน *Bacillus* spp. ในฟังไจ เช่น *Fusarium* spp. ในยีสต์ เช่น ในกลุ่มของ *Hansenula* ในกลุ่มของ *Cryptococcus* ในกลุ่มของ *Rhodotorula* และในกลุ่มของ *Candida*

การศึกษาความสามารถในการยับยั้งมะเร็งของ แอล-แอสพาราจิเนส

Roberts *et al.* (1966), Boyse *et al.* (1967), Hill *et al.* (1967), Old *et al.* (1967), Clarkson *et al.* (1970), Oettgen *et al.* (1970) ได้พยายามนำเอา แอล-แอสพาราจิเนส มาใช้รักษากับผู้ป่วยจริง โดยทำการรักษาในผู้ป่วยที่เป็น leukemia พบว่า ได้ผลดีโดยเฉพาะในการยับยั้ง acute lymphatic leukemia ในผู้ป่วยเด็กได้เป็นอย่างดี

Schwartz *et al.* (1966) ศึกษาพบว่า แอล-แอสพาราจิเนส บางชนิดเท่านั้น ที่มีความสามารถในการยับยั้งมะเร็งและยับยั้งมะเร็งได้เพียงบางชนิด

Campbell *et al.* (1967) ได้ทำการศึกษาพบว่า จาก แอล-แอสพาราจิเนส ที่แยกได้จาก *E. coli* 2 ชนิด คือ EC-1 และ EC-2 พบว่าเฉพาะแค่ EC-2 เท่านั้น ที่สามารถยับยั้งมะเร็งบางชนิด (antilymphoma) ได้

Reddy, Jayaram และ Sirsi, Ramakrishnan (1969) พบว่า แอล-แอสพาราจิเนส จาก *Mycobacterium tuberculosis* สามารถยับยั้งมะเร็งชนิด Yoshida ascites sarcoma ในหนูได้

De-angeli (1970) พบว่า แอล-แอสพาราจิเนส จาก *Aspergillus terreus* สามารถยับยั้งมะเร็งชนิด Walker 256 ascites carcinoma ในหนูได้

Bodey *et al.* (1974), Lay *et al.* (1975) นำเอา แอสพาราจิเนส ไปใช้ในฐานะที่เป็นยา (chemotherapy) ในการรักษาผู้ป่วยที่ป่วยเป็น lymphoblastic leukemia

Abuchowski *et al.* (1984), Yoshimoto *et al.* (1986), MacEwen *et al.* (1987) Sur *et al.* (1987) ได้ทำการทดลองประยุกต์ใช้ แอล-แอสพาราจิเนส รวมกับสารบางชนิดคือ polyehylene glycol ได้เป็น polyehylene glycol-asparaginase เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการใช้เป็นยารักษามะเร็ง

Scheetz และ Whelan และ Wriston (1971) ทำการแยกเชื้อ *Fusarium tricinctum* ที่สามารถผลิต แอล-แอสพาราจิเนส ได้ แต่ไม่พบความสามารถในการยับยั้งมะเร็งต่อมน้ำเหลืองได้ (antilymphoma activity)

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต แอล-แอสพาราจิเนส

Wade *et al.* (1971) ทำการศึกษา แอสพราจิเนส และ กลูตามิเนส จากแบคทีเรีย โดยในการศึกษา แอสพาราจิเนส ใช้แบคทีเรียจำนวน 78 species 200 strains และในการศึกษา กลูตามิเนส ใช้แบคทีเรียจำนวน 13 species 46 strains พบว่า ปัจจัยในการผลิตทั้ง แอสพาราจิเนส และ กลูตามิเนส ขึ้นอยู่กับ ค่า พี เอ็ช ชนิดของอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ และเวลาที่ใช้ในการทำการทดลอง เช่น *Serratia marcescens* ที่เลี้ยงในอาหาร plate count agar จะสามารถผลิต แอสพาราจิเนส ได้มากกว่าในอาหาร lister peptone agar

Chang (1971), Mori *et al.* (1973), Allison *et al.* (1972), Cooney *et al.* (1975), Inada *et al.* (1975) ได้เริ่มทำการศึกษาเกี่ยวกับ แอล-แอสพาราจิเนส ในการเป็น immobilized enzyme

King *et al.* (1974) ทำการศึกษาพบว่า แอสพาราจิเนส ไม่สามารถกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันทำงาน (non-antigenicity)

Rutter (1975) ทำการศึกษาพบว่า แอสพาราจิเนส มีคุณสมบัติที่ไม่เป็นพิษ (non-toxicity)

Kil *et al.* (1995) ทำการศึกษาการผลิต extracellular L-asparaginase จาก *Candida utilis* โดยใช้ reducing agent ที่แตกต่างกันหลายชนิด คือ glutathione, L-ascorbic acid, 2-mercaptoethanol, dithiothreitol, และ L-cysteine พบว่า ผลของจำนวนเอ็นไซม์ที่สามารถผลิตได้ ขึ้นอยู่กับปัจจัยบางอย่าง เช่น ชนิดของ reducing agent อุณหภูมิ เวลาในการทำการทดลอง และค่า พี เอ็ช ของบัฟเฟอร์ โดยพบว่าถ้าใช้อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยใช้ 2-mercaptoethanol จำนวน 20 ไมโครโมล เป็น reducing agent และใช้ potassium phosphate จำนวน 20 ไมโครโมลเป็นบัฟเฟอร์ ที่ พี เอ็ช 7 จะทำให้ *Candida utilis* ผลิต แอล-แอสพาราจิเนส ได้ สูงสุดคือ 0.8 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

Gulati *et al.* (1997) ได้ศึกษาถึงเทคนิคในการตรวจวัดการผลิต แอล-แอสพาราจิเนส ได้อย่างรวดเร็วของจุลินทรีย์บนอาหารแข็ง โดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า pH indicator phenol red โดยมีหลักการว่า ถ้าจุลินทรีย์สามารถสร้าง แอล-แอสพาราจิเนส ได้ จะไปเปลี่ยนสภาวะของ พี เอ็ช ในอาหารแข็งให้เปลี่ยนไปเป็นเบส ซึ่งจะทำให้สีของ phenol red ที่ใช้เป็น indicator เปลี่ยนสีจากสีเหลือง (ภายใต้สภาวะที่เป็นกรด) ไปเป็นสีชมพูรอบ ๆ โคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์นั้น ๆ พบว่า ได้ผลดีทั้งในฟังไจและแบคทีเรีย เช่น *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Bacillus* spp., *Eschericher* spp., *Erwinia herbicola, Enterobacter aerogenes, Vibrio fescheri*, และ *Zymomones mobilis* และพบว่า ที่ความเข้มข้น 0.009 เปอร์เซ็นต์ (0.009 %v/v) จะสามารถทำให้เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ คือ *Fusarium oxysporium* มีการเจริญและการผลิต แอล-แอสพาราจิเนส บนอาหารแข็งสูงที่สุด คือ มีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 2.57 เซนติเมตร และมีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของวงสีชมพูเท่ากับ 1.06 เซ็นติเมตร