ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การเตรียมและการตรึงไธออลโปรติเอสจากยางมะละกอพันธุ์พื้นเมือง
ชื่อผู้เขียน นางสาวปัฐมาวดี ทะนันชัย
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์
รองศาสตราจารย์ ดร. ภาวิณี คณาสวัสดิ์ ประธานกรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ สาระเวก กรรมการ
อาจารย์ วีระศักดิ์ สหชัยเสรี กรรมการ

บทคัดย่อ

การกรีดยางจากส่วนต่างๆ ของต้นมะละกอพันธุ์พื้นเมือง พบว่าในลำต้นส่วนที่แก่ ไม่มีน้ำยาง ส่วนก้านและใบมีปริมาณน้ำยางน้อยมาก ต่างจากยางของผลมะละกอดิบซึ่งให้ปริมาณน้ำยางได้โดยเฉลี่ย 10-15 กรัม ต่อผลขนาด 1 กิโลกรัม โดยประมาณ ความเข้มข้นของโปรติเอสแอคติวิตีในยางมะละกอจากผล ก้าน และใบมีค่าใกล้เคียงกันมากในช่วง 0.081-0.083 ยูนิต/มก. สารละลายที่สกัดจากก้านและใบที่ปั่นละเอียดมีโปรติเอสแอคติวิตี 7.6 และ 226 ยูนิต ต่อ 1 ก้าน และ 1 ใบ ซึ่งมีน้ำหนัก 45 และ 42 กรัม ตามลำดับ โปรติเอสในยางมะละกอจากผลดิบสามารถไฮโดรไลส์เคซีนได้ดีที่สุดในสารละลายพีเอช 7 ที่อุณหภูมิ 80°C โดยเมื่อมี EDTA 2 mM และซิสเทอีน 5 mM ทำให้โปรติเอสมีแอคติวิตีเพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่า

การแยกและตรวจสอบชนิดของไธออลโปรติเอสจากยางมะละกอพันธุ์พื้นเมืองด้วยแคโทดอิเลคโตรฟอริซิสและหาปริมาณด้วยเดนซิโทมิเตอร์ พบว่าในยางมะละกอประกอบด้วย ปาเปน พาพายาโปรติเนส IV ไคโมปาเปน พาพายาโปรติเนส III ร้อยละ 2, 21, 72 และ 5 ตามลำดับ เมื่อตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 40% อิ่มตัว ปาเปนสามารถแยกออกมาได้ 21% โดยที่ยังมีพาพายาโปรติเนส IV และไคโมปาเปนปนอยู่ การตกผลึกตามด้วยโซเดียมคลอไรด์ 10% ทำให้แยกปาเปนให้บริสุทธิ์ได้ การตกตะกอนแยกไธออลโปรติเอสด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 20-80% อิ่มตัว ได้ผลผลิตไธออลโปรติเอสสูงสุดที่ 20% เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 51-60% อิ่มตัว ทั้งนี้มีไคโมปาเปนเป็นส่วนประกอบสำคัญ

การเตรียมไธออลโปรติเอสจากยางมะละกอซึ่งในทางการค้าเรียกว่าปาเปนนั้น ทำโดยใช้น้ำยางซึ่งกรีดจากผลมะละกอดิบ 1 กรัม เกลี่ยให้มีพื้นที่ผิว 7 ตร.ซม. และอบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ผลผลิตไธออลโปรติเอสที่ได้คิดเป็น 28% โดยน้ำหนัก และมีแอคติวิตีสูงสุด

คิดเป็น 145% ของยางดิบ การเติมโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ 0.05-5% ลงในน้ำยางก่อนอบในสภาวะเดียวกัน พบว่าแอคติวิตีของโปรติเอสเพิ่มขึ้น 46-53%

ไธออลโปรติเอสในยางมะละกออบแห้งถูกดักจับไว้ด้วยอัลจิเนต ดูดติดด้วยทราย ซีไลท์ และเบนโทไนท์ และถูกจับด้วยแรงไอออนิคกับแอมเบอร์ไลท์ XAD-7 ดูโอไลท์ A-368 ดูโอไลท์ C-280 ดูโอไลท์ C-464 DEAE-เซลลูโลส และCM-เซลลูโลส เอนไซม์ที่ตรึงด้วยอัลจิเนตมีแอคติวิตีโปรติเอสสูงสุดและคิดเป็น 11.3% ของแอคติวิตีเริ่มต้น ส่วน CM-เซลลูโลส ซีไลท์และดูโอไลท์ A-368 ให้เอนไซม์ตรึงที่มีแอคติวิตีรองลงมาซึ่งคิดเป็น 6.1, 3.7 และ 2.7% ตามลำดับ การเตรียมไธออลโปรติเอสตรึงด้วย CM-เซลลูโลสและดูโอไลท์ A-368 ได้ถูกเลือกเพื่อศึกษาต่อไป อัตราส่วนของโปรติเอสแอคติวิตีต่อน้ำหนักเป็นกรัมของ CM-เซลลูโลสและดูโอไลท์ A-368 ที่เหมาะสมคือ 820:1 และ 7:1 และมีพีเอชที่เหมาะสมในการตรึงเท่ากับ 9 และ 6 ตามลำดับ ไธออลโปรติเอสตรึงทั้งสองชนิดมีแอคติวิตีดีที่สุดในการไฮโดรไลส์เคซีนที่อุณหภูมิ 80°C และในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 7 เหมือนกัน ไธออลโปรติเอสอิสระและที่ตรึงด้วย CM-เซลลูโลส ไฮโดรไลส์โปรตีนในนมถั่วเหลืองได้ดีที่อุณหภูมิ 80°C ในสารละลายพีเอช 6 การไฮโดรไลส์โปรตีนในน้ำเต้าหู้ด้วยไธออลโปรติเอสตรึงด้วย CM-เซลลูโลสทำให้โปรตีนในน้ำเต้าหู้ถูกสลายไป 61% ซึ่งมากกว่าการใช้ไธออลโปรติเอสอิสระ 25% แอคติวิตีของไธออลโปรติเอสตรึงด้วย CM-เซลลูโลสในการไฮโดรไลส์โปรตีนในน้ำเต้าหู้ซ้ำ 2 ครั้ง พบว่าประสิทธิภาพของเอนไซม์ลดลงเหลือ 26 และ 6% ตามลำดับ

Thesis Title	Preparation and Immobilization of Thiol Proteases from Local *Carica papaya* Latex
Author	Miss Pattamawadee Tananchai
M.S.	Biotechnology
Examining Committee	
	Assoc. Prof. Dr. Pawinee Kanasawud — Chairman
	Asst. Prof. Dr. Sirirat Sarawek — Member
	Lect. Verasak Sahachaisaree — Member

Abstract

The incision of latex from each part of local papaya tree indicated that aging trunk has no latex. Whereas a stalk and a leaf gave the small amount of latex and a green fruit of about one kilogram produced 10-15 g latex. The concentration of proteolytic activity in latex from fruit, stalk and leaf are nearly the same in between 0.081-0.083 U/mg. The extracted solutions of blending stalk and leaf contained proteases activities at 7.6 and 226 units per a stalk of 45 g and a leaf of 42 g respectively. Proteases in papaya latex from green fruit hydrolysed the best casein in phosphate buffer pH 7 at 80^{o}C. In the presence of 2 mM of EDTA and 5 mM of cysteine, proteolytic activity increased twice.

The determination of thiol proteases in papaya latex by cathodic electrophoresis and densitometer indicated that papaya latex contained papain, papaya proteinase IV, chymopapain and papaya proteinase III 2, 21, 72 and 5% respectively. The precipitation of proteins from papaya latex with 40% saturated ammonium sulfate provided 21% papain mixed with papaya proteinase IV and chymopapain. The consequently crystallization using 10% sodium chloride yielded purified papain. The precipitation of thiol proteases using 20-80% saturated ammonium sulfate showed that at 51-60% saturated ammonium sulfate, the maximum yield of thiol proteases was obtained at 20% in which chymopapain is a major component.

The preparation of mixed thiol proteases from papaya latex, commercially called papain, was done by spreading one gram of fresh latex trapping from unripe fruit to obtain 7 cm^2 surface area and dried at 60°C for 2 hrs. The yield of thiol proteases is 28% by weight and the maximum activity yield is 145% of fresh latex. Addition of 0.05-0.5% potassium metabisulfite to crude papaya latex before drying in the same condition increased 46-53% yield of thiol proteases.

Thiol proteases in dried papaya latex were entrapped with alginate, adsorbed on sand, celite and bentonite and ionic bound with amberlite XAD-7, duolite A-368, duolite C-280, duolite C-464, DEAE-cellulose and CM-cellulose. The entrapped enzyme has the maximum protease activity, which is 11.3% of original activity. The proteolytic activities of the immobilized enzyme were declined to 6.1, 3.7 and 2.7% by using CM-cellulose, celite and Duolite A-368 respectively. The preparations of thiol proteases immobilization on CM-cellulose and Duolite A-368 were chosen for further study. The ratios of proteases activities and gram of CM-cellulose and Duolite A-368 are 820:1 and 7:1 respectively. The immobilization of enzyme by CM-cellulose and Duolite A-368 were optimum at pH 9 and 6 respectively. Both immobilized enzymes had the maximum activity on casein hydrolysis in buffer pH 7 at 80°C. Free thiol proteases and its immobilization on CM-cellulose hydrolysed the best fresh soybean milk in citrate buffer pH 6 at 80°C. The hydrolysis of protein in fresh soybean milk by immobilized thiol proteases with CM-cellulose provided 61% yield which was 25% higher than the hydrolysis by free enzyme. The reused of immobilized thiol proteases on CM-cellulose for hydrolysis of fresh soybean milk showed the decline on proteases activity to 26 and 6% in the second and the third used respectively.