การทำให้บริสุทธิ์และตรวจสอบคุณสมบัติของเอนไซม์ปาเปนจากยางมะละกอพันธุ์แขกดำ(Carica papaya Linn.)

นาย ทวีศักดิ์ วุฒิเวียงธรรม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2536

ISBN 974-583-536-6

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

018758
1133669038

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PAPAIN FROM LATEX OF PAPAYA (Carica papaya Linn.)

Mr. Taweesak Wuttiwiangtham

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Sciences

Programme of Biotechnology

Graduate School

Chulalongkorn University

1993

ISBN 974-583-536-6

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การทำให้บริสุทธิ์และตรวจสอบคุณสมบัติของเอนไซม์ปาเปนจากยางมะละกอพันธุ์แขกดำ(Carica papaya Linn.)
โดย	นาย ทวีศักดิ์ วุฒิเวียงธรรม
สาขาวิชา	หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วินิจ ชาวิวรรธน์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. จริยา บุญญวัฒน์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร. ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วินิจ ชาวิวรรธน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร. จริยา บุญญวัฒน์)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. สัณห์ พณิชยกุล)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

ทวีศักดิ์ วุฒิเวียงธรรม : การทำให้บริสุทธิ์และตรวจสอบคุณสมบัติของเอนไซม์ปาเปนจากยางมะละกอพันธุ์แยกดำ (Carica papaya Linn.) (PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PAPAIN FROM LATEX OF PAPAYA (Carica papaya Linn.)) อ.ที่ปรึกษา: ผศ. วินิจ ทำวิวรรธน์, รศ.ดร.จริยา บุญญวัฒน์, 93 หน้า. ISBN 974-583-536-6

การแยกเอนไซม์ปาเปนให้บริสุทธิ์จากยางมะละกอพันธุ์แยกดำ โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 45% ทำซ้ำที่ 30% แล้วตกตะกอนอีกครั้งด้วยโซเดียมคลอไรด์ 10% ตามลำดับ หลังจากนั้นนำไปแยกโดยขนาดโมเลกุลด้วย เซฟฟาเดกซ์ จี-50 เจล ฟิลเตรชัน 2 รอบ สามารถแยกเอนไซม์ปาเปนออกจากโปรตีเอสอื่นที่คาดว่าเป็นเอนไซม์ไคโมปาเปน (peak B) และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.50 เท่า ทดสอบความบริสุทธิ์โดย คาโทดิค โพลีอะคริลาไมด์เจล อิเลคโตรโฟเรซิส ได้แถบโปรตีนเพียงแถบเดียว และมีตำแหน่งที่ตรงกันกับเอนไซม์ปาเปนมาตรฐาน (Sigma P.4762) ปาเปนบริสุทธิ์ที่ได้มีขนาดโมเลกุลประมาณ 22,000 ดาลตันโดยเซฟฟาเดกซ์ จี-75 เจลฟิลเตรชันและมีแอคติวิตีจำเพาะ 0.42 CDU/mg ในสภาวะมาตรฐานที่ 40 °ซ. ซึ่งใกล้เคียงกับปาเปนมาตรฐาน ปาเปนบริสุทธิ์ที่แยกจากมะละกอพันธุ์แยกดำมีข้อดีคือสามารถย่อยสลายเคซีนที่อุณหภูมิสูงถึง 80 °ซ. ที่ pH 7.5 และมีความเสถียรมากกว่า 80% เมื่อบ่มในช่วงอุณหภูมิ 0 - 70 °ซ. เป็นเวลา 30 นาที ก่อนทำปฏิกิริยาและมีความเสถียรต่อ pH ในช่วง pH 5.0 - 9.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาคือ -20 °ซ. แอคติวิตีของปาเปนบริสุทธิ์จะลดลงเมื่อเติมสารประกอบโลหะหนัก 5 มิลลิโมลาร์ และถูกกระตุ้นให้เพิ่มขึ้นเมื่อเติมสารรีดิวซ์ เช่น เมอร์แคปโตเอทธานอล โซเดียมไซยาไนด์ ซิสเตอีน โซเดียมไบซัลไฟต์และโปแตสเซียม เมตาไบซัลไฟต์ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ สารละลายเอนไซม์ peak B ซึ่งมีปริมาณมากกว่าปาเปนและแยกออกมาก่อนในคอลัมน์ของเซฟฟาเดกซ์ จี-50 น่าจะเป็นไคโมปาเปนเนื่องจากมีขนาดโมเลกุลประมาณ 35,000 ดาลตันและสามารถย่อยสลายเคซีนได้ดีที่ 80 °ซ. และ pH 7.0 รวมทั้งมีความเสถียรต่อ pH และอุณหภูมิที่คล้ายคลึงกับปาเปนบริสุทธิ์ จากการศึกษาจลนศาสตร์ของปาเปนและเอนไซม์ peak B พบว่าเอนไซม์ทั้งสองที่แยกได้สามารถย่อยสลายฟันธะเพปไทด์ในเคซีนและ BSA ฟันธะเอสเทอร์ใน BAEE และฟันธะเอไมด์ใน BAPNA ได้ ปาเปนบริสุทธิ์และเอนไซม์ peak B แสดงค่า K_m สำหรับเคซีนต่ำกว่า BSA แสดงว่าเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้สามารถย่อยสลายฟันธะเพปไทด์ในเคซีนได้ดีกว่าใน BSA

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ..... ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2536 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

C326518 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: PAPAIN / PURIFICATION / PAPAYA LATEX (Carica papaya Linn.)
TAWEESAK WUTTIWIANGTHAM : PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PAPAIN FROM LATEX OF PAPAYA (Carica papaya Linn.) THESIS ADVISOR : ASST. PROF. VINICH KHAMVIWATH, ASSO. PROF. JARIYA BOONJAWAT, Ph.D., 93 pp. ISBN 974-583-536-6

Papain from latex of papaya (Carica papaya Linn.) cv. Khagdam was purified by serial precipitation in saturated ammonium sulfate 45%, 30% and 10% sodium chloride respectively. Papain was separated from other proteases, which was expected to be chymopapain (peak B) by molecular seived on Sephadex G-50 gel filtration twice. The purity of papain is only 1.50 fold increased and showed a single band in cathodic polyacrylamide gel electrophoresis and corresponding with standard papain (Sigma P.4762). The molecular weight of pure papain was 22,000 dalton by Sephadex G-75 gel filtration with specific activity 0.42 CDU/mg assayed under standard condition at 40 ^{o}C, which is similar to standard papain. Pure papain from papaya cv.Khagdam showed maximum activity for casein hydrolysis at 80 ^{o}C pH 7.5, and high stability >80% at preincubation temperature of 0-70 ^{o}C 30 minutes. The pH stability of papain is in the range of 5.0 - 9.0 with optimal storage temperature at -20 ^{o}C. The enzyme activity was inhibited by heavy metals at 5 mM. concentration and activated by reducing agents such as mercaptoethanol, sodium cyanide, cysteine, sodium bisulfite and potassium metabisulfite at 10 mM. concentration. Enzyme solution of peak B was separated on Sephadex G-50 column earlier than papain with higher quantity and expected to be chymopapain because its molecular weight was 35,000 dalton, can hydrolyse casein at 80 ^{o}C and pH 7.0 and showed pH and temperature stability as well as pure papain.

Kinetics studies of pure papain and enzyme peak B indicated that both enzymes can hydrolyse peptide bond in casein and BSA, ester bond in BAEE and amide bond in BAPNA. The K_m of pure papain and enzyme peak B for casein are lower than BSA, indicating that both enzymes can hydrolyse peptide bond in casein better than BSA.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2536 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วินิจ ชาวิวรรธน์ อาจารย์ที่ปรึกษาที่ได้ให้คำแนะนำ และความช่วยเหลือในด้านต่างๆในการวิจัย รวมทั้งช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วง

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. จริยา บุญยวัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และ รองศาสตราจารย์ ดร. สัณห์ พณิชยกุล ที่ได้กรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณ คณาจารย์ทุกท่าน ที่ได้สั่งสอนให้ความรู้ ความเข้าใจ ตลอดระยะเวลาของการศึกษา

ขอขอบคุณ ภาควิชาชีวเคมี ที่ได้ให้ความสะดวกและความช่วยเหลือในด้าน สถานที่ วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ในภาควิชาชีวเคมีทุกท่านสำหรับความช่วยเหลือต่างๆในระหว่างทำงานวิจัย

ขอขอบคุณ คุณ สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ คุณ สันศนี จงจิตสำราญ และ คุณ อลิสา วังใน สำหรับความช่วยเหลือในระหว่างการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ คุณ รัชนี บัวเกิด สำหรับความช่วยเหลือและกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความอนุเคราะห์ด้านทุนวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ และญาติพี่น้องทุกท่าน ที่ให้การสนับสนุน ความรัก กำลังใจ และความช่วยเหลือทุกอย่าง ต่อผู้เขียน

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ญ

สารบัญรูป ..... ฏ

คำย่อ ..... ฑ

บทที่

1 บทนำ 1

2 ครุภัณฑ์และวัสดุภัณฑ์

2.1 ครุภัณฑ์ 15

2.2 วัสดุภัณฑ์ 16

2.3 ยางมะละกอที่ใช้ในการทดลอง 16

3 วิธีการทดลอง

3.1 การกรีดและเก็บรักษายางมะละกอ 17

3.2 การเตรียมสารละลายยางมะละกอ 17

3.3 การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธีของไบยูเรต 18

3.4 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์

3.4.1 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์โดยใช้เคซีนเป็นสับสเตรต 18

3.4.2 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์โดยใช้ BAEE เป็นสับสเตรต 19

3.4.3 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์โดยใช้ BAPNA เป็นสับสเตรต 20

3.5 ขั้นตอนในการทำให้เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์จากยางมะละกอพันธุ์แขกดำ

3.5.1 การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและโซเดียมคลอไรด์ 21
3.5.2 การขจัดเกลือออกโดยวิธีไดอะไลซิส 22
3.5.3 การทำให้เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์โดยเซฟาเดกซ์ จี-50 เจล ฟิลเตรชัน 22
3.6 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ปาเปนโดยวิธี ดาโทดิค โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟเรซีส 23
3.7 การหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดยเซฟาเดกซ์ จี-75 เจล ฟิลเตรชัน 25
3.8 การศึกษาผลของ pH ที่มีต่อแอคติวิตีและความเสถียรของเอนไซม์ 26
3.9 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อแอคติวิตีและความเสถียรของเอนไซม์ 27
3.10 การศึกษาอุณหภูมิในการเก็บรักษาเอนไซม์ปาเปนที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว 27
3.11 การศึกษาผลของโลหะหนักและสารยับยั้งที่มีต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ปาเปนที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว 27
3.12 การศึกษาผลของสารเคมีต่างๆในการเร่งแอคติวิตีของเอนไซม์ปาเปนที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว 28
3.13 การศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์
3.13.1 เคซีน 28
3.13.2 Bovine Serum Albumin 28
3.13.3 BAEE 29
3.13.4 BAPNA 29
4 ผลการทดลอง
4.1 ผลของการเก็บยางมะละกอที่สภาวะต่างๆ 30
4.2 ผลของการทำให้เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์จากยางมะละกอพันธุ์แขกดำ
4.2.1 ผลของการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและโซเดียมคลอไรด์ 30
4.2.2 การทำให้เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์โดยเซฟาเดกซ์ จี-50 เจล

ฟิลเตรชันและการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ 34
4.3 ผลการหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดยเซฟาเดกซ์ จี-75 เจล
ฟิลเตรชัน 41
4.4 ผลของ pH ที่มีต่อแอคติวิตีและความเสถียรของเอนไซม์ 49
4.5 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อแอคติวิตีและความเสถียรของเอนไซม์ 53
4.6 ผลการศึกษาอุณหภูมิในการเก็บรักษาเอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์ 53
4.7 ผลของโลหะหนักและสารยับยั้งที่มีต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ปาเปน
ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว 57
4.8 ผลของสารเคมีต่างๆในการเร่งแอคติวิตีของเอนไซม์ปาเปน
ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว 57
4.9 ผลการศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ 57
5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 66
เอกสารอ้างอิง 76
ภาคผนวก
ภาคผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานสารละลาย BSA สำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน
โดยวิธีของไบยูเรต 82
ภาคผนวกที่ 2 กราฟมาตรฐานของไทโรซีนสำหรับการวัดโปรติเอสแอคติวิตี
เมื่อใช้เคซีนเป็นสับสเตรต 83
ภาคผนวกที่ 3 การคำนวณแอคติวิตีของเอนไซม์โดยใช้ BAPNA เป็นสับสเตรต .. 84
ภาคผนวกที่ 4 การประมาณการต้นทุนในการผลิตยางมะละกอออบแห้งและค่าใช้
จ่ายในการทำให้เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์ 85
ประวัติผู้เขียน 93

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1. ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ปาเปน 8
2. กลไกการทำงานของเอนไซม์ปาเปน 9
3. รูปแบบของแถบโปรตีนของเอนไซม์ปาเปนและโปรติเอสอื่นในยางมะละกอจาก
เอกสารต่างๆ 12
4. น้ำยางมะละกอพันธุ์แขกดำสดและน้ำยางมะละกอพันธุ์แขกดำที่ผ่านการอบแห้ง
ที่ 50-55 องศาเซลเซียส 31
5. ผลของความเสถียรในการเก็บน้ำยางมะละกอสดและยางมะละกอแห้งที่
อุณหภูมิต่างๆ 33
6. รูปแบบของแถบโปรตีนของสารละลายตะกอนที่ได้จากการตกตะกอนด้วย
เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวและเกลือโซเดียมคลอไรด์ 36
7. รูปแบบของแถบโปรตีนของสารละลายส่วนน้ำใสที่ได้จากการตกตะกอนด้วย
เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวและเกลือโซเดียมคลอไรด์ 37
8. รูปแบบของแถบโปรตีนของสารละลายยางมะละกอ, สารละลายตะกอน
10% โซเดียมคลอไรด์และเอนไซม์ปาเปนมาตรฐาน 38
9. ผลของการทำให้เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์โดยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี-50 ครั้งที่ 1 39
10. รูปแบบของแถบโปรตีนจากการทำดาโทดิค โพลีอะคริลาไมด์ เจล
อิเลคโตรโฟเรซีสของสารละลายที่ได้จากการแยกโดยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี-50
ครั้งที่ 1 40
11. ผลของการทำให้เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์โดยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี-50 ครั้งที่ 2 42
12. รูปแบบของแถบโปรตีนจากการทำดาโทดิค โพลีอะคริลาไมด์ เจล
อิเลคโตรโฟเรซีสของสารละลายที่ได้จากการแยกโดยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี-50
ครั้งที่ 2 43

13. รูปแบบของแถบโปรตีนจากการทำดาโหดิด โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟเรซีสของสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากขั้นตอนต่างๆในการทำให้เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์จากยางมะละกอพันธุ์แขกดำ 45
14. ผลของการหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ปาเปนที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วโดยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี-75 46
15. กราฟของค่า K_{av} กับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานและเอนไซม์ปาเปนที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว 47
16. ผลของการหาน้ำหนักโมเลกุลของสารละลายเอนไซม์ใน peak B โดยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี-75 48
17. กราฟของค่า K_{av} กับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานและสารละลายเอนไซม์ใน peak B 50
18. ผลของ pH ที่มีต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ปาเปนที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วและสารละลายเอนไซม์ใน peak B 51
19. ผลของ pH ที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์ปาเปนที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วและสารละลายเอนไซม์ใน peak B 52
20. ผลของอุณหภูมิที่มีต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ปาเปนที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วและสารละลายเอนไซม์ใน peak B 54
21. ผลของอุณหภูมิที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์ปาเปนที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วและสารละลายเอนไซม์ใน peak B 55
22. ผลของความเสถียรในการเก็บรักษาเอนไซม์ปาเปนที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว ที่อุณหภูมิ 4 และ -20 องศาเซลเซียส 56
23. ผลของโลหะหนักและสารยับยั้งต่างๆ ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่มีต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ปาเปนที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว 58
24. ผลของสารเคมีชนิดต่างๆในการเร่งแอคติวิตีของเอนไซม์ปาเปนที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วโดยใช้ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ 59
25. กราฟ Lineweaver-Burk plot ของเอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว

และสารละลายเอนไซม์ใน peak B โดยใช้เคซีนเป็นสับสเตรท 60
26. กราฟ Lineweaver-Burk plot ของเอนไซม์ปาเปนที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว และสารละลายเอนไซม์ใน peak Bโดยใช้ Bovine Serum Albumin เป็นสับสเตรท 61
27. กราฟ Lineweaver-Burk plot ของเอนไซม์ปาเปนที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว และสารละลายเอนไซม์ใน peak Bโดยใช้ BAEE เป็นสับสเตรท 62
28. กราฟ Lineweaver-Burk plot ของเอนไซม์ปาเปนที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว และสารละลายเอนไซม์ใน peak Bโดยใช้ BAPNA เป็นสับสเตรท 63

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย