บทที่ 5

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

การเติมสารเคมี 2 ชนิด คือ Sodium bisulfite 0.5 เปอร์เซนต์ และ EDTA 0.2 เปอร์เซนต์ ลงไปในน้ำยางมะละกอพันธุ์แขกดำ ทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ในน้ำยางมะละกอเพิ่มขึ้นถึง 56 เปอร์เซนต์ และเมื่อนำน้ำยางมะละกอนั้นไปอบแห้ง ทำให้แอคติวิตีลดลงแต่ก็ยังคงมากกว่าน้ำยางมะละกอที่ไม่ได้เติมสารเคมีอะไรเลย ถึงประมาณ 21 เปอร์เซนต์ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Ortiz และคณะ(1980) ที่เติมSodium bisulfite 0.5 เปอร์เซนต์ และ EDTA 0.2 เปอร์เซนต์ ลงไปในน้ำยางมะละกอจากแอฟริกา ก่อนที่จะอบแห้ง พบว่า แอคติวิตีเพิ่มขึ้น 21 เปอร์เซนต์เช่นเดียวกัน ในขณะที่ ประเทือง จุลเอียด(2533) รายงานว่า การเติม KMS 0.5 เปอร์เซนต์ และEDTA 0.2เปอร์เซนต์ลงไปในน้ำยางมะละกอพันธุ์แขกดำก่อนนำไปอบแห้ง จะทำให้แอคติวิตีเพิ่มขึ้นประมาณ 28 เปอร์เซนต์ ส่วนในการเติม cysteine 0.1 เปอร์เซนต์ และ EDTA 0.2 เปอร์เซนต์จะทำให้แอคติวิตีเพิ่มขึ้นประมาณ 24 เปอร์เซนต์ จะเห็นได้ว่าสารเคมีทั้ง 3 ชนิด(Sodium bisulfite, KMS, cysteine)จะให้ผลที่คล้ายคลึงกัน ทั้งนี้เพราะ สารเคมีทั้ง 3 ชนิด เป็นตัวรีดิวซ์ ซึ่งจะรีดิวซ์พันธะไดซัลไฟด์ในโมเลกุลของโปรติเอสในน้ำยางมะละกอให้เกิดเป็นหมู่ -SH อิสระจึงทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงขึ้น ส่วน EDTA จะเป็น chelating agent ที่ป้องกันการจับกันของโปรติเอสกับโลหะหนัก นอกจากนั้นอาจจะเติมผลึกเกลือโซเดียมคลอไรด์ลงไปในน้ำยางมะละกอเพื่อป้องกันการจับตัวกันของยาง และ ทำให้อัตราเร็วในการอบแห้งเพิ่มขึ้น (Ortiz และคณะ, 1980)

การเก็บยางมะละกอที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่า ยางมะละกอแห้งที่ 4 องศาเซลเซียสจะมีอัตราการลดลงของแอคติวิตีสูงที่สุด รองลงมา คือ น้ำยางมะละกอที่ -20 องศาเซลเซียสและยางมะละกอแห้งที่ -20 องศาเซลเซียสตามลำดับ ทั้งนี้การลดลงของแอคติวิตีอาจเกิดจากการเกิดออกซิเดชันและการเกิด autoproteolysis ของโปรติเอส โดยในการเก็บที่อุณหภูมิสูง (4 องศาเซลเซียส) จะเกิดการลดลงของแอคติวิตีได้รวดเร็วกว่าที่อุณหภูมิต่ำ (-20 องศาเซล

เซียส) รวมทั้งในรูปของของเหลว(น้ำยางมะละกอ) จะเกิดการลดลงได้เร็วกว่าในรูปของของแข็ง(ยางมะละกอแห้ง) แต่น้ำยางมะละกอที่ -20 องศาเซลเซียสจะมีขั้นตอนในการเก็บรักษาง่ายและการนำไปใช้งานได้สะดวกกว่ายางมะละกอแห้งที่ต้องอบแห้งก่อนเก็บ อีกทั้งยังต้องบดละลายกับน้ำหรือสารละลายบัฟเฟอร์ก่อนนำไปใช้อีกด้วย ในขณะที่แอคติวิตีของยางมะละกอแห้งที่ -20 องศาเซลเซียสก็ไม่แตกต่างจากน้ำยางมะละกอที่ -20 องศาเซลเซียสมากนัก คืออยู่ในระดับประมาณ 90 กว่าเปอร์เซ็นต์ ดังนั้น การเก็บในรูปยางมะละกอสดที่ -20 องศาเซลเซียส จึงเป็นวิธีที่สะดวกกว่าทั้งในแง่กรรมวิธีในการเก็บและการนำไปใช้ แต่ยางมะละกอแห้งจะเหมาะสมในแง่การขนส่งและประหยัดเนื้อที่ในการเก็บรักษา

ในการศึกษาการตกตะกอนสารละลายด้วยแอมโมเนียม ซัลเฟต และโซเดียมคลอไรด์ เมื่อพิจารณารูปแบบของแถบโปรตีนจากโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟเรซีสของสารละลายส่วนใสและสารละลายจากตะกอน พบว่า การตกตะกอน จะเป็นการกำจัดโปรตีนชนิดอื่นออกไปได้ส่วนหนึ่ง ทำให้ปริมาณโปรตีนชนิดอื่นที่ปนเปื้อนลดลงและความเข้มข้นของเอนไซม์ปาเปนเพิ่มมากขึ้น Arnon(1970) ได้รายงานไว้ว่า เอนไซม์ไคโมปาเปนจะมีคุณสมบัติในการละลายในสารละลายเกลือได้ดีกว่าเอนไซม์ปาเปน เอนไซม์ปาเปนจึงตกตะกอนได้ง่ายกว่าและจะตกตะกอนออกมาก่อนเอนไซม์ไคโมปาเปน หลังจากนั้นนำสารละลายจากตะกอนที่ได้ไปไดอะไลส์เพื่อกำจัดเอาเกลือที่ตกค้างออกก่อนที่จะนำไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยคอลัมน์ของ เซฟาเดกซ์ จี-50 เจล ฟิลเตรชัน ทั้งนี้เพราะไม่สามารถแยกเอนไซม์ปาเปนให้บริสุทธิ์ได้ด้วย อิออน เอกเชนจ์ คอลัมน์ ซึ่งจะให้ผลการแยกเป็น peakที่ไม่ชัดเจนและมีการปนเปื้อนของโปรตีนชนิดอื่นในปริมาณที่มาก ถึงแม้จะมีการเปลี่ยนไปใช้ ion exchanger resin หลายชนิดแล้วก็ไม่ได้ผลการแยกที่ดีขึ้น ซึ่งต่างจากการใช้เซฟาเดกซ์ จี-50 ที่สามารถแยก peak ได้ค่อนข้างชัดเจนโดยคาดว่าอาจจะเป็นเพราะเอนไซม์ปาเปนและโปรตีนชนิดอื่นในยางมะละกอพันธุ์แขกดำ มีคุณสมบัติทางด้านประจุ ที่ใกล้เคียงกันมากกว่าคุณสมบัติทางด้านขนาดของโมเลกุล รวมทั้งเซฟาเดกซ์ จี-50 (fractionation range: 1,500-30,000)มีช่วงในการแยกที่แคบจึงมีความสามารถในการแยกได้ดีกว่าเซฟาเดกซ์ จี-75(fractionation range : 3,000-80,000)และเซฟาเดกซ์ จี-100 (fractionation range : 4,000-150,000)

สารละลายเอนไซม์ของ peak C_2 ที่คาดว่าเป็นเอนไซม์ปาเปน มี yield เท่ากับ

3.42 เปอร์เซนต์ของแอคติวิตีทั้งหมดและคิดเป็น 2.34 เปอร์เซนต์ของโปรตีนทั้งหมด โดย Burke(1974) รายงานว่า เอนไซม์ปาเปนมีปริมาณเพียง 5 เปอร์เซนต์ของโปรตีนที่ละลายน้ำในยางมะละกอ ซึ่งหมายความว่า เกิดการสูญเสียเอนไซม์ปาเปนไปถึงกว่าครึ่งหนึ่งของทั้งหมดในระหว่างกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ ส่วนความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเพียง 1.50 เท่า Ebata และ Yasunobu (1962) ทำการตกตะกอนซ้ำหลายๆครั้งเพื่อทำให้เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์ และได้เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์มี yield ประมาณ 4 เปอร์เซนต์ของแอคติวิตีทั้งหมดและความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 1.757 เท่า จากที่กล่าวมาข้างต้น %yield และความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์ที่ได้ค่อนข้างต่ำ สาเหตุที่เป็นเช่นนี้เป็นเพราะว่า โดยทั่วไปแล้วในการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์จะเป็นการแยกเอนไซม์ที่มีแอคติวิตีที่ต้องการออกจากโปรตีนหรือเอนไซม์อื่นที่ไม่มีแอคติวิตี จึงทำให้ได้ %yield และความบริสุทธิ์สูง แต่ในการทำให้เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์ จะเป็นการแยกเอนไซม์ปาเปนออกจากโปรตีนชนิดอื่นซึ่งมีแอคติวิตีเช่นเดียวกันกับเอนไซม์ปาเปน ซึ่งในขณะที่กำจัดเอาโปรตีนชนิดอื่นออกไป จะทำให้ปริมาณโปรตีนและแอคติวิตีลดลงไปพร้อมๆกันด้วย

เมื่อตรวจสอบสารละลายยางมะละกอพันธุ์แขกดำ โดยวิธี คาโทดิค โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟเรซีส พบว่า สารละลายยางมะละกอพันธุ์แขกดำจะมีรูปแบบของแถบโปรตีนที่คล้ายคลึงกันกับสารละลายยางมะละกอที่ทดลองโดย Kang และ Warner(1974) , Polgar (1980) ที่ระบุว่า แถบโปรตีนบนสุดที่ใกล้กับขั้วบวกเป็นเอนไซม์ปาเปน ส่วนในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์ที่แยกได้จากยางมะละกอพันธุ์แขกดำพบว่าจะมีแถบโปรตีนเพียงแถบเดียว โดยเป็นแถบโปรตีนที่ตรงกับแถบโปรตีนของเอนไซม์ปาเปนมาตรฐาน (Sigma P.4762) เมื่อพิจารณาค่าแอคติวิตีจำเพาะ พบว่า แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์มีค่าเท่ากับ 0.42 CDU/mg ในขณะที่แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ปาเปนมาตรฐานมีค่าเท่ากับ 0.47 CDU/mg เมื่อทำการวัดโดยวิธีเดียวกัน

การหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีคอลัมน์ของเซฟาเดกซ์ จี-75 เจล ฟิลเตรชัน พบว่าเอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์จากยางมะละกอพันธุ์แขกดำจะมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 22,000 ดาลตัน โดยน้ำหนักโมเลกุลที่หาได้ มีค่าใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ปาเปนที่มีผู้รายงานไว้ คือ 20,700 ดาลตัน (Arnon, 1970) , 21,000 ดาลตัน (Smith และ Kimmel, 1960)

ดังนั้น จึงสามารถสรุปได้ว่า สารละลายโปรตีนที่มีแอคติวิตีที่แยกได้จากคอลัมน์ของเซฟาเดกซ์ จี -50 ครั้งที่ 2 (peak C_2)น่าจะเป็นเอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์

ในขั้นตอนการทำให้เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์โดยใช้เซฟาเดกซ์ จี-50 ครั้งที่ 1 จะได้สารละลายโปรตีนใน peak B ที่มีแอคติวิตีเช่นเดียวกับเอนไซม์ปาเปน ซึ่งเมื่อเทียบกับรูปแบบของสารละลายเอนไซม์จาก คาโทดิค โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟเรซีส ที่ทดลอง โดย Kang และ Warner(1974) , Polgar(1980) แล้ว คาดว่าน่าจะเป็น เอนไซม์ไคโมปาเปน อีกทั้งเมื่อหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี เซฟาเดกซ์ จี-75 เจล ฟิลเตรชัน พบว่า มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 35,000 ดาลตัน ซึ่งใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ไคโมปาเปน เอ และ บี ที่อยู่ในช่วงประมาณ 33,000-38,000 ดาลตัน

จากการศึกษาผลของ pH ที่มีต่อแอคติวิตี และความเสถียรของเอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์ และสารละลายเอนไซม์ใน peak B พบว่า มีรูปแบบที่คล้ายคลึงกัน โดยที่เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์ และสารละลายเอนไซม์ใน peak B จะมี pHที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเคซีน เท่ากับ 7.5 และ 7.0 ตามลำดับ ส่วนที่ pH อื่นๆจะมีแอคติวิตีที่ลดลงตามลำดับโดยในช่วง pH ที่เป็นกรดจะมีอัตราการลดลงมากกว่าในช่วง pH ที่เป็นด่าง ซึ่งคล้ายคลึงกับผลของ pH ที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์ คือ ที่ pH 6-8 เอนไซม์จะไม่สูญเสียแอคติวิตี แต่ในช่วง pH ที่เป็นกรดจะมีอัตราการสูญเสียแอคติวิตีมากกว่าในช่วง pH ที่เป็นด่าง ทั้งนี้แล้วการลดลงและการสูญเสียแอคติวิตีอาจจะมีสาเหตุเนื่องจาก ผลของ pH ที่มีต่อ ionizable groups เช่น หมู่อิมิดาโซลที่บริเวณเร่งของเอนไซม์รวมทั้งอาจจะเกิดการเสียสภาพธรรมชาติของเอนไซม์โดยในช่วง pH ที่เป็นกรดจะมีผลต่อเอนไซม์มากกว่าในช่วง pH ที่เป็นด่าง Kang และ Warner (1974) รายงานว่า เอนไซม์ปาเปนและเอนไซม์ไคโมปาเปน มี pH ที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเคซีนเท่ากับ 8.0 และ 7.0 ตามลำดับ

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อแอคติวิตีและความเสถียรของเอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์ และ สารละลายเอนไซม์ใน peak B พบว่า มีรูปแบบที่คล้ายคลึงกันอีก โดยที่เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์และสารละลายเอนไซม์ใน peak B จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายเคซีน ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเช่นเดียวกัน ส่วนที่อุณหภูมิต่ำๆแอคติวิตีของเอนไซม์จะค่อนข้างน้อยแล้วค่อยๆเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิที่มากขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่า การเพิ่มอุณหภูมิขึ้นจะ

ช่วยเพิ่มพลังงานจลน์ของโมเลกุลของเอนไซม์กับสับสเตรท ทำให้เกิดการชนกันได้มากขึ้นต่อหน่วยเวลา แต่ถ้าอุณหภูมิสูงมากเกินไป จะมีผลทำให้เอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติและสูญเสียแอคติวิตีไปได้ดังเช่น ที่อุณหภูมิ 90 และ 100 องศาเซลเซียส ส่วนผลของอุณหภูมิที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์ พบว่า การบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 0-60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ก่อนวัดแอคติวิตีจะไม่มีผลทำให้แอคติวิตีลดลงไปแต่อย่างใด แต่เมื่อใช้อุณหภูมิในการบ่มสูงขึ้น(70-100 องศาเซลเซียส)จะมีผลทำให้แอคติวิตีที่เหลืออยู่ลดลงตามอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น ส่วนสารละลายเอนไซม์ใน peak B จะมีความเสถียรสูงกว่าคือในช่วงอุณหภูมิ 0-70 องศาเซลเซียส สาเหตุที่เอนไซม์ปาเปนและสารละลายเอนไซม์ใน peak B มีความคงทนต่อความร้อนได้ดีนั้น อาจเป็นเพราะ เอนไซม์ทั้งสองเป็นเอนไซม์ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ ที่ประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์สายเดี่ยวและมีพันธะไดซัลไฟด์ในโมเลกุล จะทนต่อความร้อนได้ดีกว่าเอนไซม์ที่มีมวลโมเลกุลสูง ซึ่งตรงกับคุณลักษณะของเอนไซม์ปาเปนและสารละลายเอนไซม์ใน peak B ที่คาดว่า จะเป็นเอนไซม์ไคโมปาเปน Kang และ Warner(1974) ได้ศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ปาเปน, ไคโมปาเปนและปาปายา เพปติเดส เอ ต่ออุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที ที่ pH 7.0 พบว่า เอนไซม์ไคโมปาเปนมีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงกว่าเอนไซม์ปาเปนโดยมีความเสถียรในช่วงอุณหภูมิไม่เกิน 70 องศาเซลเซียส ขณะที่เอนไซม์ปาเปนมีความเสถียรในช่วงอุณหภูมิไม่เกิน 60 องศาเซลเซียสเท่านั้น เช่นเดียวกันกับผลการทดลองที่ได้ในงานวิจัยนี้ แต่ที่อุณหภูมิสูงๆ อัตราการสูญเสียแอคติวิตีจะมากกว่าเอนไซม์ปาเปนและสารละลายเอนไซม์ใน peak B ที่ได้จากยางมะละกอพันธุ์แขกดำ

ในการเก็บรักษาเอนไซม์ปาเปนที่ทำให้บริสุทธิ์จากยางมะละกอพันธุ์แขกดำที่อุณหภูมิ 4 และ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน พบว่า อัตราการสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจะมากกว่าที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสมาก ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ การเก็บที่ 4 องศาเซลเซียสจะเกิด autoproteolysis ของเอนไซม์ได้มากกว่า และเอนไซม์อาจจะมีความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงระหว่างการ freeze และ thaw เมื่อทำการเก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียสและนำมาวัดแอคติวิตี

จากการศึกษา ผลของสารประกอบโลหะหนักที่มีต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์ พบว่า สารประกอบโลหะหนัก จะยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์โดยการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ เกิด

เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ไม่มีแอคติวิตี (inactive complexes) โดยเฉพาะสารประกอบสังกะสี($ZnSO_4$)และปรอท($HgCl_2$) ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ จะสามารถยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ได้อย่างสมบูรณ์ทำให้เอนไซม์ไม่มีแอคติวิตีเหลืออยู่เลย แต่สารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นสามารถที่จะเปลี่ยนกลับให้มีแอคติวิตีได้อีกโดยเติม EDTA และ cysteine Arnon (1970) รายงานว่า สารประกอบปรอทจะเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับเอนไซม์ปาเปนเกิดเป็นเมอคิวริปาเปน(Mercuripapain) ซึ่งไม่มีแอคติวิตี แต่สามารถเปลี่ยนกลับให้มีแอคติวิตีได้โดยเติม EDTA และ cysteine หรือ เติมสารละลายโทลูอีนที่มี 4-methylbenzenediol ความเข้มข้น 10 mg/ml เพื่อกำจัดไมเลกุลของปรอท ซึ่งเมอคิวริปาเปนมีประโยชน์ในด้านการเก็บรักษาได้นานโดยที่ไม่เกิดการสูญเสียแอคติวิตี เนื่องจากไม่เกิดการ autoproteolysis

เมื่อทำการเติมสารเคมีต่างๆ คือ mercaptoehanol, sodium cyanide, KMS, sodium bisulfite , ammonium sulfide และ EDTA ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ลงไปในเอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์ พบว่า สารเคมีเหล่านี้จะทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้นมาก ยกเว้น EDTA ซึ่งเป็นสารคีเลตติ้ง(chelating agent) โดยที่ KMS จะทำให้แอคติวิตีเพิ่มขึ้นมากที่สุด ทั้งนี้ Lowe(1975)รายงานว่า เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์จะประกอบด้วยเอนไซม์ปาเปน 3 รูปแบบที่ปะปนกันอยู่ คือ 1) active papain ที่มีหมู่ -SH อิสระ ที่กรดอะมิโนซีสเตอีนลำดับที่ 25 (cys-25) 2)irreversible inactivated papain ซึ่งหมู่ -SH อิสระของ cys-25 จะถูกออกซิไดซ์เป็นกรดซัลฟินิค (sulphinic acid) และไม่สามารถที่จะเปลี่ยนกลับให้มาอยู่ในรูปของ active papain ได้ 3) reversible inactivated papain หมู่ -SH อิสระของ cys-25 จะทำปฏิกิริยากับซิสเตอีนอิสระเกิดเป็นพันธะไดซัลไฟด์ที่สามารถเปลี่ยนกลับให้มาอยู่ในรูปของ active papain ได้โดยสารรีดิวซ์ ดังนั้น สารเคมีที่เติมเหล่านี้ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารรีดิวซ์จะเปลี่ยน reversible inactivated papain ให้กลับมาอยู่ในรูป active papainได้ ทำให้มีปริมาณของ active papainมากขึ้นและแอคติวิตีเพิ่มสูงขึ้นตามไปด้วย อีกทั้งคาดว่าเอนไซม์ปาเปนที่อยู่ในรูปของ reversible inactivated papain คงจะมีอยู่มากและอาจจะมากกว่าในรูป active papain อีกด้วย จึงทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 3-5 เท่า นอกจากนั้น ผลที่ได้ยังสอดคล้องกับผลของการเติมสารเคมีก่อนการอบแห้งน้ำยางมะละกออีกด้วย Brocklehurst และคณะ(1981) รายงานว่า เอนไซม์

ปาเปนบริสุทธิ์ที่เตรียมได้ใหม่ๆ จะมี active papain 50% , reversible inactivated papain 30% และ irreversible inactivated papain 20% แต่เมื่อเก็บรักษาไว้เป็นเวลามากกว่า 3 วัน ปริมาณของ reversible inactivated papain จะเพิ่มจาก 30% เป็น 60-70% และ ปริมาณของ active enzyme จะลดลงจาก 50% เหลือเพียง 10-20% และการเติมสารรีดิวซ์จะสามารถรักษาให้มีปริมาณของ active papain อยู่ประมาณ 80% ได้เป็นเวลาอย่างน้อย 1 เดือน ซึ่งเอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์ที่ได้ในงานวิจัยนี้มีการเก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลามากกว่า 3 วัน ดังนั้น จึงเป็นเหตุให้แอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเป็น 3-5 เท่าเมื่อมีการเติมสารรีดิวซ์ ส่วนการทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนและผ่านคอลัมน์ของเซฟาเดกซ์ จี-50 สามารถได้เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์ทั้ง 3 รูปแบบ ขณะที่การทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีของ affinity chromatography จะได้เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์ในรูปแบบของ active papain เท่านั้น (Brocklehurst และคณะ ,1979)

ในการศึกษาทางด้านจลนศาสตร์ของเอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์ ที่มีต่อสับสเตรทธรรมชาติและสับสเตรทสังเคราะห์พบว่า เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์และสารละลายเอนไซม์ใน peak B ที่ได้จากยางมะละกอพันธุ์แขกดำสามารถที่จะเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของเคซีน และ BSA(peptidase activity) , พันธะเอสเทอร์ของ BAEE(esterase activity) และพันธะเอไมด์ของ BAPNA(amidase activity) ได้ด้วย Arnon(1970) รายงานว่าเอนไซม์ปาเปน มีความจำเพาะต่อสับสเตรทกว้างมาก (very broad specificity) และสามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนได้ดีกว่า ทริปซิน,เปปซิน และ ไคโมทริปซิน เมื่อเปรียบเทียบเอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์และสารละลายเอนไซม์ใน peak B จากค่า K_m และ V_{max} ในผลการทดลองพบว่า เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์และสารละลายเอนไซม์ใน peak B สามารถเร่งปฏิกิริยาในการย่อยสลายสับสเตรททั้ง 4 ชนิด คือ เคซีน , BSA, BAEE และ BAPNA ได้ และ เมื่อใช้เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์ที่มีความเข้มข้นของเอนไซม์ใกล้เคียงหรือต่ำกว่าความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์ใน peak B พบว่า ค่า K_m ของเอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์ต่อ เคซีน, BSA และ BAEE จะมีค่าที่ต่ำกว่าค่า K_m ของสารละลายเอนไซม์ peak B ทำให้คาดได้ว่า เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์ มีแนวโน้มที่สามารถจับและย่อยสลายสับสเตรททั้ง 3 ชนิดได้เร็วกว่าสารละลายเอนไซม์ใน peak B Kang และ Warner(1974) ; Ebata และ Yasunobu (1962) ได้เปรียบเทียบแอคติวิตีระหว่างเอนไซม์ปาเปนและไคโมปาเปนที่ความเข้มข้นเป็นไมโครกรัมต่อ

มิลลิลิตรเท่ากัน พบว่า เอนไซม์ปาเปนสามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเคซีนได้ดีกว่าเอนไซม์ไดโมปาเปน

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเอนไซม์ปาเปนและสารละลายเอนไซม์ใน peak B ในการย่อยสลายต่อสับสเตรทธรรมชาติ (เคซีนและ BSA) โดยพิจารณาจากค่า K_m พบว่า ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์เท่าๆกัน(0.94 ไมโครโมลาร์) จะสามารถย่อยสลายเคซีนได้ดีกว่า BSA และในกรณีของสารละลายเอนไซม์ของ peak B ก็เช่นเดียวกัน ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่าๆกัน(1.14 ไมโครโมลาร์) จะสามารถย่อยสลายเคซีนได้ดีกว่า BSA ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเคซีนมีลักษณะโครงสร้างในโมเลกุลที่เหมาะสมต่อการเข้าจับทำปฏิกิริยาของเอนไซม์มากกว่า BSA ซึ่งก็อาจจะเป็นสาเหตุหนึ่งที่นิยมใช้เคซีนเป็นสับสเตรทในการวัดแอคติวิตี

<u>สรุปผลการทดลอง</u>

1. การเก็บรักษาน้ำยางมะละกอพันธุ์แขกดำที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มีขั้นตอนการเก็บรักษาและการนำไปใช้งานที่ง่ายและสะดวก ส่วนการเก็บรักษาในรูปของยางมะละกอแห้งจะมีข้อดี คือ สามารถขนส่งได้ง่าย ใช้เนื้อที่น้อยและเหมาะในการเก็บรักษาไว้นานๆ โดยที่มีอัตราการลดลงของแอคติวิตีที่ใกล้เคียงกัน และมีแอคติวิตีเหลืออยู่มากกว่า 80% ของแอคติวิตีเริ่มต้นหลังจากเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 10 เดือน

2. ทำการแยกเอนไซม์ปาเปนให้บริสุทธิ์จากน้ำยางมะละกอพันธุ์แขกดำ โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 45% และ 30% ตามลำดับ แล้วตกตะกอนซ้ำอีกครั้งด้วยโซเดียมคลอไรด์ 10% แล้วผ่านลงในคอลัมน์ของเซฟาเดกซ์ จี-50 2 ครั้ง พบว่า ได้ yield เท่ากับ 3.42% ความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.5 เท่าและมีค่าแอคติวิตีจำเพาะ 0.42 CDU/mg ใกล้เคียงกับเอนไซม์ปาเปนมาตรฐานที่มีแอคติวิตีจำเพาะ 0.47 CDU/mg เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ด้วย คาโทดิค โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟเรซีส พบว่า ได้แถบโปรตีนเพียง 1 แถบ ที่มีตำแหน่งที่ตรงกับเอนไซม์ปาเปนมาตรฐาน

3. น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์ที่แยกได้ เมื่อตรวจสอบโดยคอลัมน์ของเซฟาเดกซ์ จี-75 มีค่าประมาณ 22,000 ดาลตัน

4. เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์ที่แยกได้ มี pH ที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาการย่อย

สลายเคซีนที่ pH 7 มีความเสถียรที่ดีในช่วง pH ที่เป็นกลางและจะมีแอคติวิตีและความเสถียรของเอนไซม์ในช่วง pH ที่เป็นด่าง ดีกว่าในช่วง pH ที่เป็นกรด

5. เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์ที่แยกได้ มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเคซีน คือ 80 องศาเซลเซียสและมีความเสถียรต่ออุณหภูมิ(temperature stability) ที่ดีในช่วงอุณหภูมิต่ำกว่า 70 องศาเซลเซียส รวมทั้งควรที่จะเก็บรักษาเอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

6. เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์จะถูกยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ ด้วยสารประกอบโลหะบางชนิด โดยที่ สารประกอบโลหะหนักของสังกะสีและปรอท สามารถยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ได้อย่างสมบูรณ์

7. เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์จะถูกกระตุ้นให้มีแอคติวิตีเพิ่มมากขึ้นได้ด้วยสารรีดิวซ์ เช่น mercaptoethanol, sodium cyanide , ammonium sulfide , sodium bisulfite potassium metabisulfite(KMS)และcysteine โดยจะมีแอคติวิตีเพิ่มขึ้นจากเดิมประมาณ 3-5 เท่า โดย KMS จะกระตุ้นให้แอคติวิตีเพิ่มขึ้นมากที่สุด นอกจากนี้ KMS ยังเป็นที่ยอมรับและมีการใช้ในอุตสาหกรรมอาหารด้วย ดังนั้น KMS จึงเป็นสารเคมีที่เหมาะสมที่สุด ในการใช้กระตุ้นแอคติวิตีของเอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์ที่ได้จากยางมะละกอพันธุ์แขกดำ

8. ในขั้นตอนการทำให้เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์โดยวิธีนี้ จะได้สารละลายโปรตีนที่มีโปรติเอสแอคติวิตี คือ สารละลายเอนไซม์ใน peak B จากการผ่านเซฟาเดกซ์ จี-50 ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นเอนไซม์ไคโมปาเปน เอ และบี ปนกันเนื่องจากมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 35,000 ดาลตัน แสดงค่า pH และ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเคซีนเท่ากับ 7.0 และ 80 องศาเซลเซียส ตามลำดับ อีกทั้งมีความเสถียรต่อ pH และอุณหภูมิที่คล้ายคลึงกับเอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์ที่แยกได้

9. ในการศึกษาทางด้านจลนศาสตร์ของเอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์พบว่า เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์และสารละลายเอนไซม์ของ peak B สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเพปไทด์ในเคซีนและ BSA พันธะเอสเทอร์ใน BAEE และพันธะเอไมด์ใน BAPNAได้ โดยในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเพปไทด์ในสับสเตรทธรรมชาติ พบว่า เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์และเอนไซม์ของpeak Bจะย่อยสลายพันธะเพปไทด์ในเคซีนได้ดีกว่า BSAและคาดว่าเอนไซม์ทั้งสองชนิดมีแนวโน้มที่จะสามารถย่อยสลายพันธะเอไมด์ใน BAPNA ได้ดีกว่าพันธะเอสเทอร์ใน BAEE

ข้อเสนอแนะ

1. เมื่อทำการประมาณการต้นทุนในการผลิตยางมะละกอแห้งจากน้ำยางมะละกอพันธุ์แขกดำ โดยใช้ขนาดกำลังการผลิต 500 กก.ต่อวัน(ภาคผนวกที่ 4) พบว่า ต้นทุนของการผลิตจะมีสัดส่วนประมาณ 60% ของราคาขายของยางมะละกอแห้ง โดยที่ต้นทุนส่วนใหญ่จะเป็นค่าใช้จ่ายเกี่ยวกับวัตถุดิบ(น้ำยางมะละกอ)เสียประมาณ 97% ของต้นทุนทั้งหมด ดังนั้น ถ้าสามารถควบคุมราคารับซื้อน้ำยางมะละกอได้ก็จะสามารถควบคุมต้นทุนในการผลิตได้ด้วย
2. ในการประมาณการค่าใช้จ่ายในการทำให้เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์(จากการทดลอง)ในส่วนของค่าวัตถุดิบและสารเคมีที่ใช้โดยไม่รวมค่าใช้จ่ายต่างๆที่เกี่ยวกับเครื่องมือที่ใช้(ภาคผนวกที่ 4) พบว่า ค่าใช้จ่ายในการทำให้เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์ต่อครั้ง ประมาณ 119.50 บาท ซึ่งใกล้เคียงกับมูลค่าของเอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์ที่ได้ จำนวน 30 มิลลิกรัม คือ 135.52 บาท แต่ในส่วนที่คาดว่าเป็นเอนไซม์ไคโมปาเปนที่ได้จากการทำให้เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์นั้นกลับมีมูลค่าที่มากกว่าคือประมาณ 785 บาท ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์ไคโมปาเปนมีปริมาณมากกว่าโปรติเอสในน้ำยางมะละกอ ดังนั้น การศึกษาเกี่ยวกับการทำให้เอนไซม์ไคโมปาเปนบริสุทธิ์จึงเป็นอีกหัวข้อหนึ่งที่น่าสนใจในการศึกษาวิจัยต่อไป
3. ถ้ามีตลาดที่สามารถรับซื้อผลมะละกอที่ผ่านการกรีดยางมะละกอแล้ว เช่น โรงงานแปรรูปผลไม้ เป็นต้น รายได้จากการกรีดเอายางมะละกอจากผลมะละกอ จัดเป็นรายได้เสริมอีกด้านจากการปลูกมะละกอที่น่าสนใจ โดยในกรณีที่ราคารับซื้อน้ำยางมะละกอ เท่ากับ 500 บาทต่อกิโลกรัม เกษตรกรสามารถที่จะมีรายได้เพิ่มขึ้นนอกเหนือจากการขายผลมะละกออย่างเดียว ถึงประมาณ 50-100% (ภาคผนวกที่ 4)