บทที่ 4

ผลการทดลอง

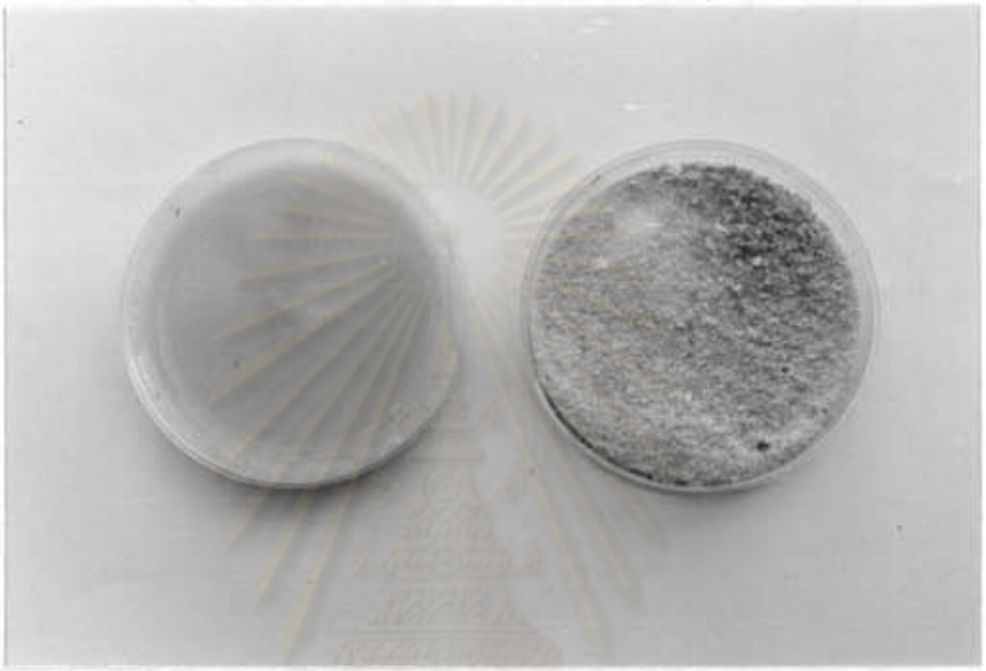
4.1 ผลของการเก็บยางมะละกอที่สภาวะต่างๆ

นำน้ำยางมะละกอ 30 กรัม(ประมาณ 30 มล.) มาเติม EDTA 0.2 เปอร์เซนต์ และโซเดียมไบซัลไฟต์ 1 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนัก ก่อนนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียส(รูปที่ 4) พบว่า แอคติวิตีทั้งหมด(total activity)ของน้ำยางมะละกอที่เติมสารเคมีทั้งสองชนิดจะมากกว่าจากน้ำยางที่ไม่ได้เติมถึงประมาณ 56 เปอร์เซนต์และเมื่ออบแห้งเป็นยางมะละกอแห้ง(dried papaya latex)แอคติวิตีทั้งหมดจะลดลง แต่ก็ยังสูงกว่าน้ำยางมะละกอที่ไม่เติมสารเคมีทั้งสองชนิดถึงประมาณ 21 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 3 น้ำหนักของยางมะละกอแห้งที่ได้ประมาณ 8.18 กรัม หรือ คิดเป็น 27 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักยางมะละกอสด

น้ำยางมะละกอแห้งที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ(4 และ -20 องศาเซลเซียส)และน้ำยางมะละกอที่แช่แข็ง มาตรวจสอบแอคติวิตีที่ช่วงเวลาต่างๆ เป็นเวลา 10 เดือน พบว่า ยางมะละกอแห้งที่เก็บที่ 4 องศาเซลเซียสจะมีการลดลงของแอคติวิตีมากที่สุด รองลงมาคือ ยางมะละกอแช่แข็งที่ -20 องศาเซลเซียส และยางมะละกอแห้งที่เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส ตามลำดับ(รูปที่ 5) โดยที่ยางมะละกอแห้งที่เก็บที่ 4 องศาเซลเซียสจะมีแอคติวิตีเหลืออยู่ประมาณ 83 เปอร์เซนต์ของแอคติวิตีเริ่มต้น ส่วนน้ำยางมะละกอแช่แข็งที่ -20 องศาเซลเซียสจะมีแอคติวิตีเหลืออยู่ประมาณ 86 เปอร์เซนต์ของแอคติวิตีเริ่มต้น และยางมะละกอแห้งที่เก็บที่ -20 องศาเซลเซียสจะมีแอคติวิตีเหลืออยู่ประมาณ 94 เปอร์เซนต์ของแอคติวิตีเริ่มต้น

4.2 ผลของการทำให้เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์จากยางมะละกอพันธุ์แขกดำ

4.2.1 ผลของการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและโซเดียมคลอไรด์



(1) (2)

รูปที่ 4 แสดงน้ำยางมะละกอพันธุ์แขกดำสดและน้ำยางมะละกอพันธุ์แขกดำที่ผ่านการอบแห้งที่ 50-55 องศาเซลเซียส

1) น้ำยางมะละกอสด

2) ยางมะละกอแห้ง

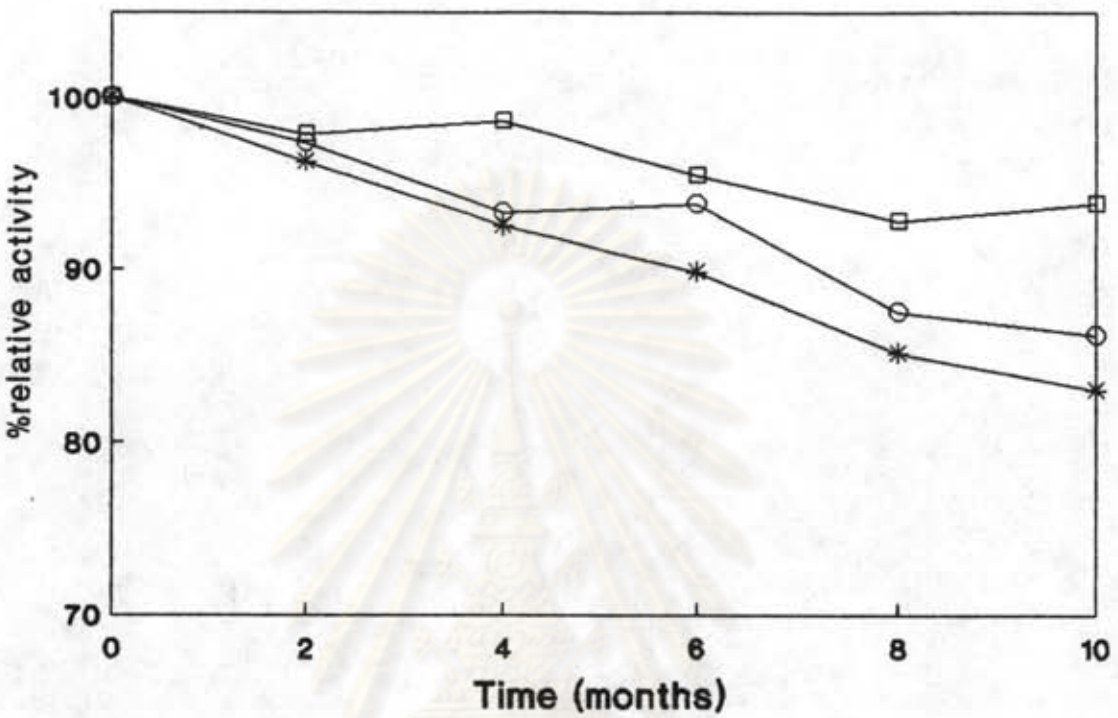
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชนิดของยางมะละกอ	ปริมาตร (ml)	แอคติวิตี (CDU/ml)	แอคติวิตีทั้งหมด (CDU)	%relative * activity
น้ำยางมะละกอสด	30	2.39	71.70	100.00
น้ำยางมะละกอ + EDTA + sodium bisulfite	30	3.74	112.20	156.49
ยางมะละกออบแห้ง	30 ** (8.18 กรัม)	2.90	87.00	121.34

* %relative activity เท่ากับ (แอคติวิตีของยางมะละกอชนิดต่างๆ/แอคติวิตีของน้ำยางมะละกอ) x100

** การวัดแอคติวิตีของยางมะละกอแห้ง จะนำยางมะละกอแห้งมาละลายในน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 30 มล. แล้วจึงวัดแอคติวิตี

ตารางที่ 3 แสดงแอคติวิตีของน้ำยางมะละกอสดและยางมะละกอที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียส



รูปที่ 5 ผลของความเสถียรในการเก็บน้ำยางมะละกอสดและยางมะละกอแห้งที่อุณหภูมิต่างๆ

-○- = น้ำยางมะละกอสดเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

-✳- = ยางมะละกอแห้งเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

-□- = ยางมะละกอแห้งเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หลังจากนำยางมะละกอมาเติมน้ำและปั่นแยกเอาตะกอนออก จะได้เป็นสารละลาย crude enzyme และนำมาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 2 ครั้งคือ 45 เปอร์เซนต์และ 30 เปอร์เซนต์ แล้วจึงตกตะกอนต่อด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซนต์ (ตารางที่ 4) พบว่า ส่วนที่เป็นตะกอน(precipitate)และ ส่วนที่เป็นน้ำใส(supernatant) จะมีแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสอยู่และเมื่อนำเอา crude enzyme, สารละลายตะกอนและส่วนน้ำใสที่ได้จากขั้นตอนการตกตะกอนต่างๆไปตรวจสอบด้วยวิธี คาโทดิคโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟเรซีส (รูปที่ 6 และ7) พบว่า รูปแบบของแถบโปรตีนของสารละลายยางมะละกอ และสารละลายตะกอนของโซเดียมคลอไรด์ 10% เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายเอนไซม์ปาเปนมาตรฐานแล้ว(รูปที่ 8) จะมีแถบโปรตีนแถบที่อยู่บนสุดและใกล้กับขั้วบวกที่ตรงกันอยู่ ดังนั้นแถบโปรตีนดังกล่าวนั้นคาดน่าว่าจะเป็นแถบโปรตีนของเอนไซม์ปาเปน

จากรูปที่ 6 และ 7 พบว่า แถบโปรตีนที่คาดว่าเป็นเอนไซม์ปาเปนในสารละลายของตะกอน จะมีความเข้มข้นมากขึ้นเรื่อยๆตามลำดับการตกตะกอนที่เพิ่มขึ้น โดยจะมีโปรตีนชนิดอื่นตกตะกอนปนเปื้อนออกมาบางส่วน และมีบางส่วนที่ไม่ตกตะกอนออกมาซึ่งจะละลายในส่วนน้ำใส นำสารละลายตะกอนของเอนไซม์ที่ได้จากการตกตะกอนครั้งสุดท้ายไปทำการกำจัดเกลือด้วยวิธีไดอะไลซิส หลังจากนั้นจึงนำไปผ่านคอลัมน์ของเซฟาเดกซ์ จี-50 เพื่อทำให้เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์ยิ่งขึ้น

4.2.2 <u>ผลการแยกเอนไซม์ปาเปนด้วยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี-50 และ การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์</u>

จากผลการทดลองแสดงในรูปที่ 9 พบว่า คอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี-50 สามารถแยกโปรตีนออกได้เป็น 3 peak คือ peak A, B และ C ตามลำดับ โดยที่โปรตีนส่วนใหญ่จะถูกชะออกมาจากคอลัมน์ใน peak B และ C ส่วนใน peak A มีปริมาณโปรตีนน้อยมาก นอกจากนี้ทุกๆ peak ที่แยกได้ยังมีแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส และเมื่อนำสารละลายของ peak B และ C มาทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธีอุลตราฟิลเตรชัน หลังจากนั้นจึงนำไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โดยวิธี คาโทดิค โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟเรซีส(รูปที่ 10) พบว่า ใน peak C จะมีโปรตีนที่คาดว่าเป็นเอนไซม์ปาเปนอยู่เป็นส่วนใหญ่และมีโปรตีนอื่นปะปนอยู่บ้าง ดัง

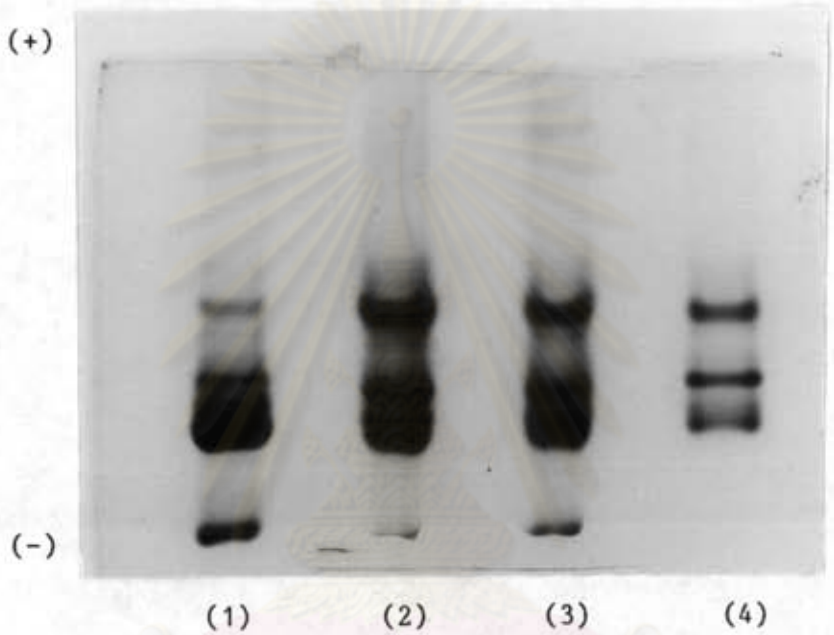
ขั้นตอนการตกตะกอน	ปริมาตร (ml)	แอคติวิตี* (CDU/ml)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)	แอคติวิตีทั้งหมด (CDU)	ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (mg)	แอคติวิตีจำเพาะ (CDU/mg)	Yield (%)
crude enzyme	116.20	2.49	8.80	289.95	1022.75	0.28	100.00
ตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว							
45%	38.00	4.84	15.40	183.89	585.26	0.31	63.42
30%	20.50	4.93	15.24	101.08	312.36	0.32	34.86
ตะกอนโซเดียมคลอไรด์ 10%	15.80	3.78	10.74	59.76	169.72	0.35	20.61

* 1 หน่วยเอนไซม์(CDU) คือ ไมโครโมลของกรดอะมิโน(ไทโรซีน)ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายเคซีน ในเวลา 1 นาที ที่ 40 องศาเซลเซียส pH 6.0

ตารางที่ 4 ผลของการตกตะกอนสารละลายยางมะละกอด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวและเกลือโซเดียมคลอไรด์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17846008



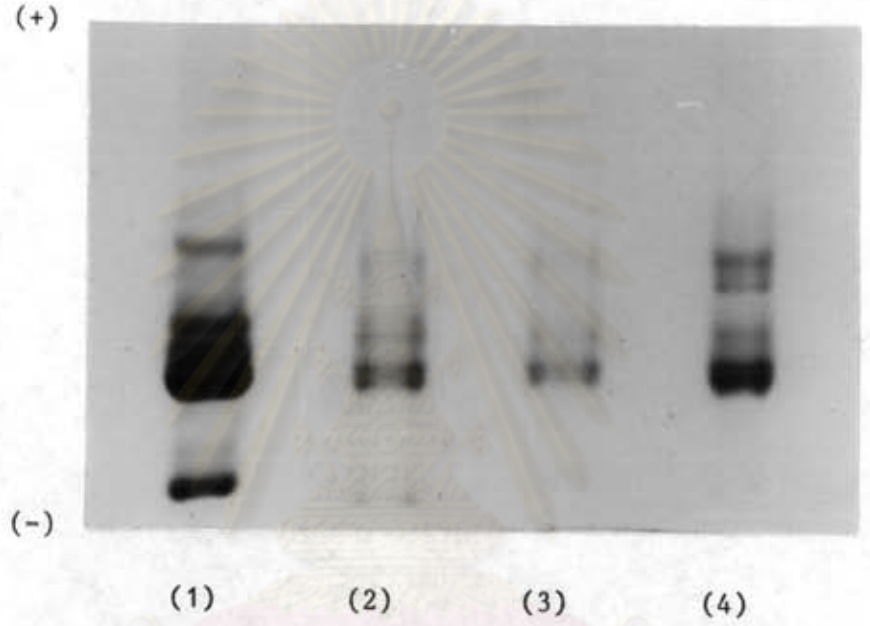
รูปที่ 6 รูปแบบของแถบโปรตีนของสารละลายตะกอนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว และเกลือโซเดียมคลอไรด์

1) สารละลายยางมะละกอ (ปริมาณโปรตีน 50 ไมโครกรัม)

2) สารละลายตะกอนของแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 45% (ปริมาณโปรตีน 50 ไมโครกรัม)

3) สารละลายตะกอนของแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 30% (ปริมาณโปรตีน 50 ไมโครกรัม)

4) สารละลายตะกอนของ 10% โซเดียมคลอไรด์ (ปริมาณโปรตีน 30 ไมโครกรัม)



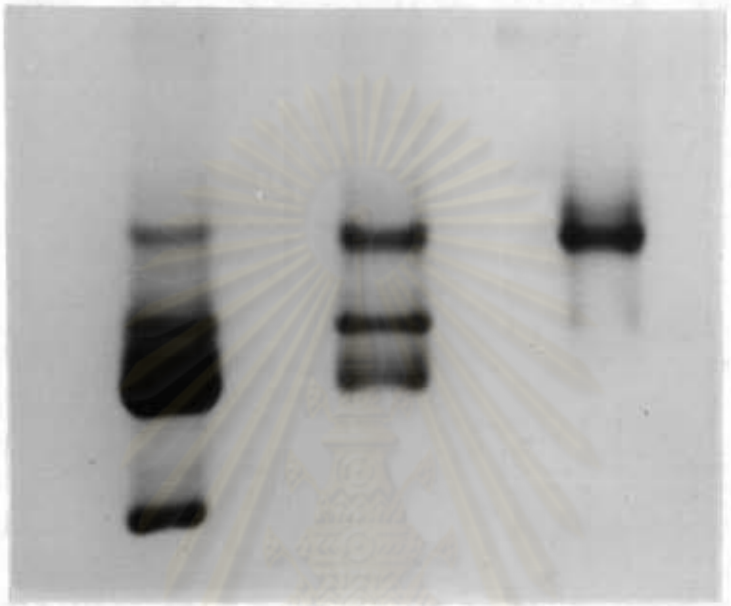
รูปที่ 7 รูปแบบของแถบโปรตีนของสารละลายส่วนน้ำใสที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว และเกลือโซเดียมคลอไรด์

1) สารละลายยางมะละกอ(ปริมาณโปรตีน 50 ไมโครกรัม)

2) สารละลายส่วนน้ำใสของแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 45% (ปริมาณโปรตีน 10 ไมโครกรัม)

3) สารละลายส่วนน้ำใสของแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 30% (ปริมาณโปรตีน 10 ไมโครกรัม)

4) สารละลายส่วนน้ำใสของ 10% โซเดียมคลอไรด์ (ปริมาณโปรตีน 20 ไมโครกรัม)

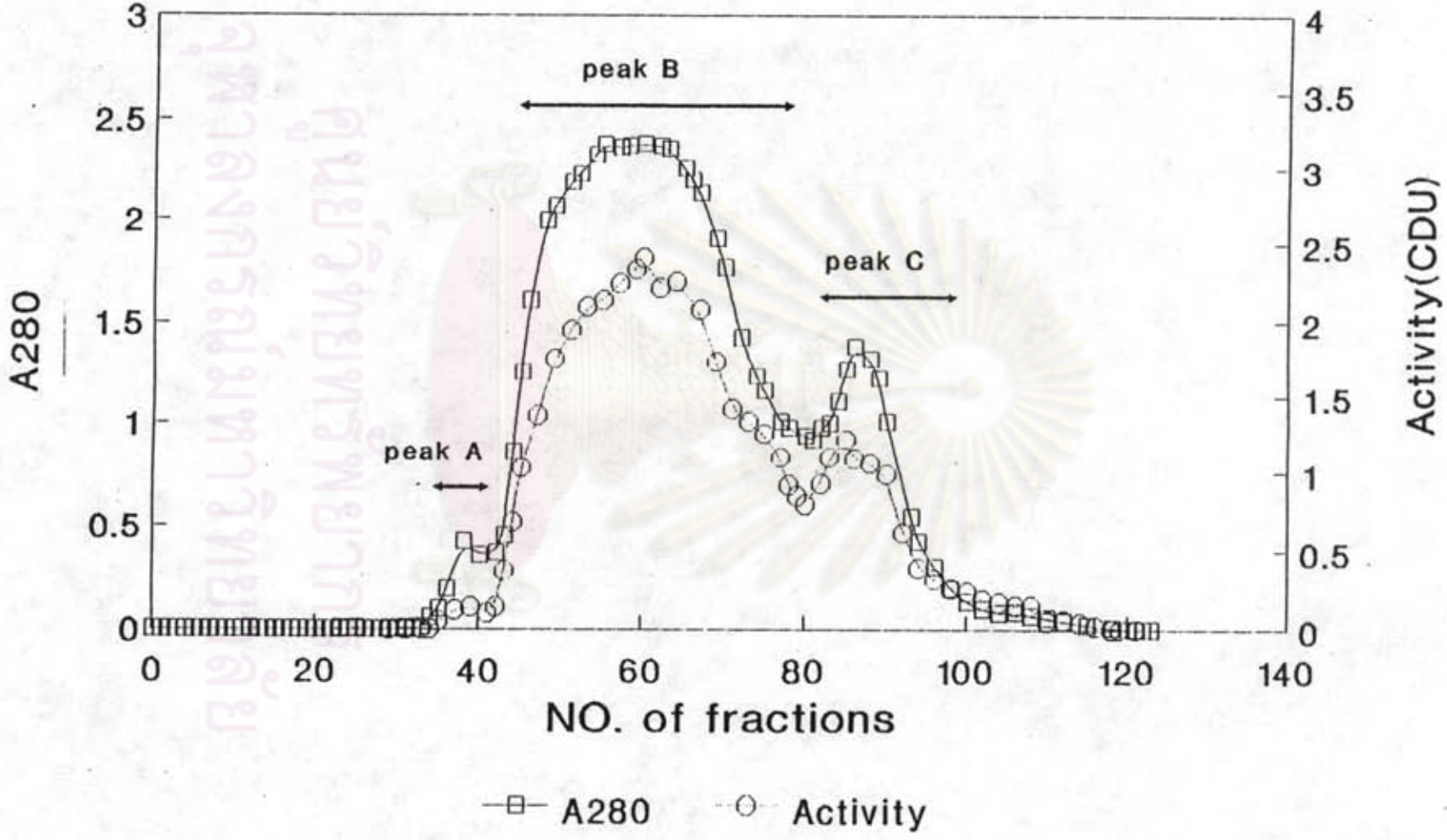


รูปที่ 8 รูปแบบของแถบโปรตีนของสารละลายยางมะละกอ, สารละลายตะกอน 10% โซเดียมคลอไรด์ และเอนไซม์ปาเปนมาตรฐาน

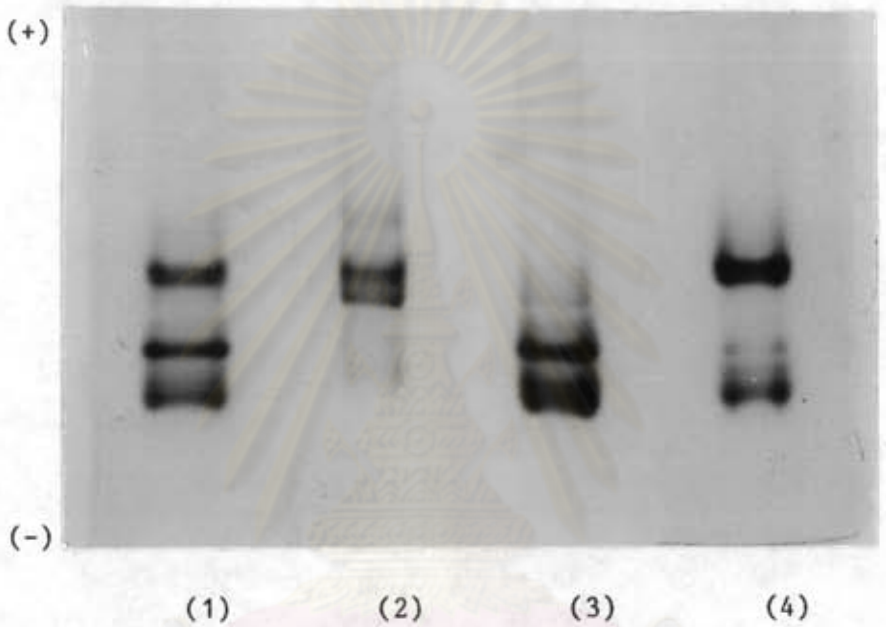
1) สารละลายยางมะละกอ(ปริมาณโปรตีน 50 ไมโครกรัม)

2) สารละลายตะกอนของ 10% โซเดียมคลอไรด์ (ปริมาณโปรตีน 30 ไมโครกรัม)

3) สารละลายเอนไซม์ปาเปนมาตรฐาน(ปริมาณโปรตีน 20 ไมโครกรัม)



รูปที่ 9 ผลของการแยกเอนไซม์ปาเปนให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี-50 ครั้งที่ 1



รูปที่ 10 รูปแบบของแถบโปรตีนของสารละลายที่ได้จากการแยกโดยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี-50 เจล ฟิลเตรชัน ครั้งที่ 1

1) สารละลายตะกอนของ 10% โซเดียมคลอไรด์ (ปริมาณโปรตีน 30 ไมโครกรัม)

2) สารละลายโปรตีนของ peak A(ปริมาณโปรตีน 20 ไมโครกรัม)

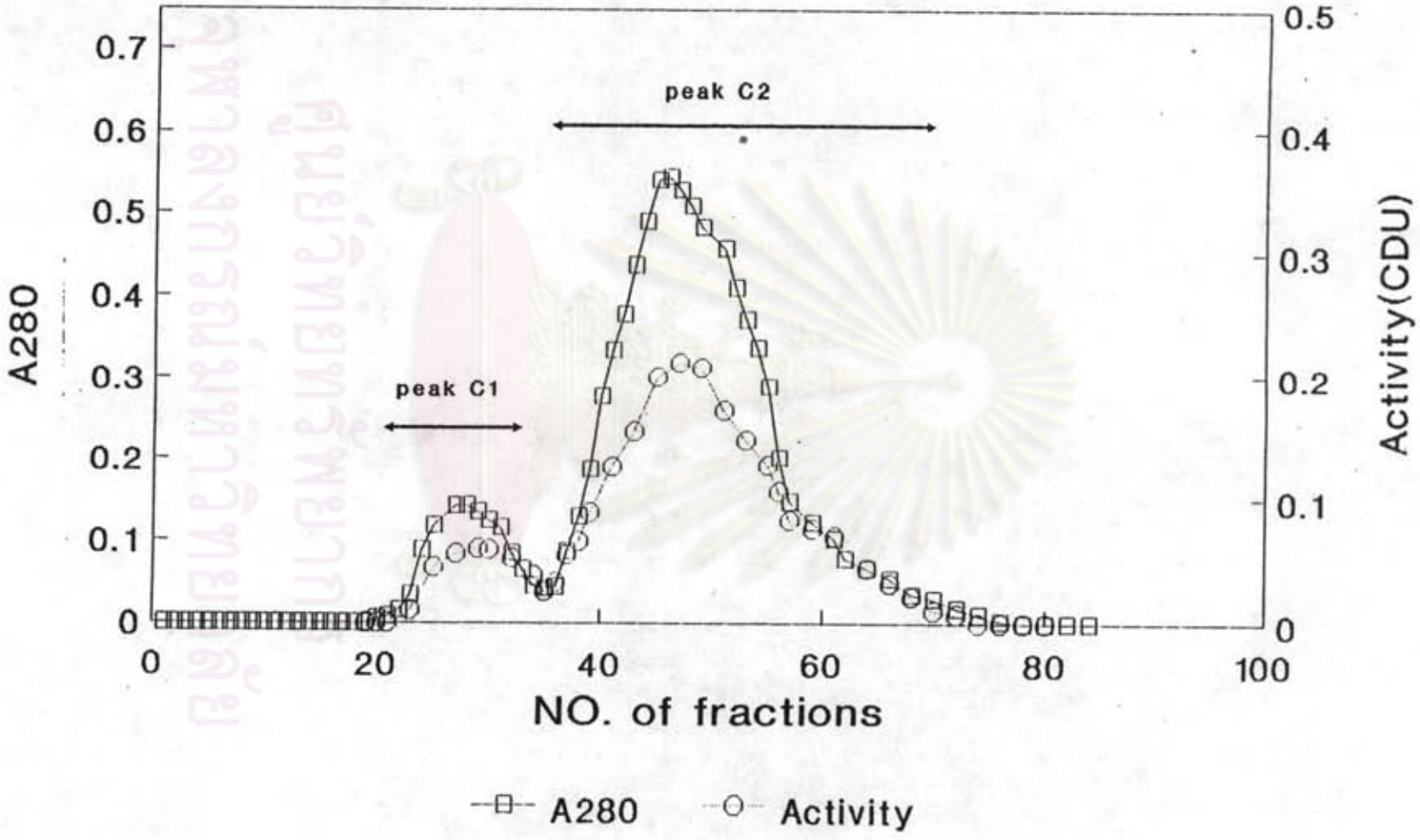
3) สารละลายโปรตีนของ peak B(ปริมาณโปรตีน 30 ไมโครกรัม)

4) สารละลายโปรตีนของ peak C(ปริมาณโปรตีน 20 ไมโครกรัม)

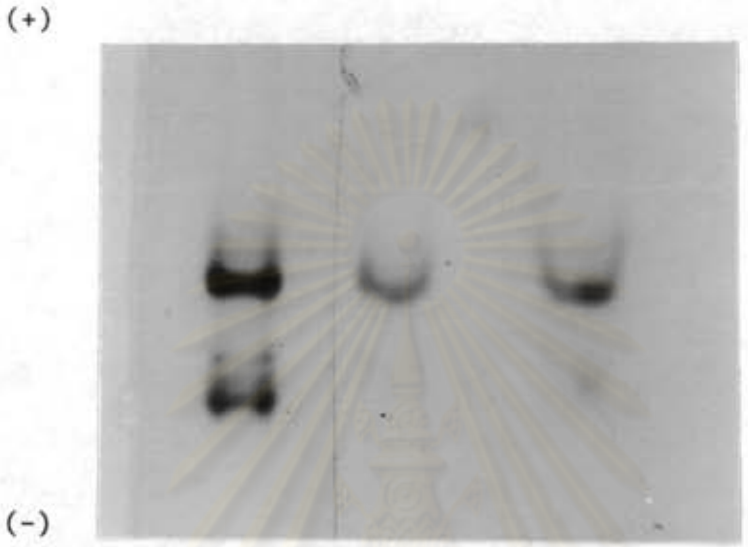
นั้น จึงนำโปรตีนใน peak C มาทำให้เข้มข้นแล้วจึงนำมาแยกอีกครั้งในคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี-50 พบว่า สามารถแยกโปรตีนได้ 2 peak คือ peak C_1 และ C_2 (รูปที่ 11) โดยที่ทั้งสอง peak ที่ได้มีแอคติวิตีของโปรติเอสและเมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยดาโทดิค โพลีอะคริลาไมด์เจล อิเลคโตรโฟเรซีสอีกครั้ง จะได้ผลดังรูปที่ 12 พบว่า peak C_2 จะมีแถบของโปรตีนเพียงแถบเดียว ทั้งนี้เมื่อตรวจสอบเปรียบเทียบกับเอนไซม์ปาเปนมาตรฐานแล้ว พบว่า เป็นแถบที่ตรงกัน และเมื่อตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส พบว่ามีแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสเช่นเดียวกัน ดังนั้น การคาดการณ์ที่ว่า แถบโปรตีนแถบแรกของแผ่นเจลที่ผ่านการตรวจสอบโดยวิธี ดาโทดิค โพลีอะคริลาไมด์เจล อิเลคโตรโฟเรซีส เป็นเอนไซม์ปาเปนนั้นจึงน่าที่จะเป็นความจริง ซึ่งหมายถึงว่า peak C_2 คือ เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์ที่แยกได้จากยางมะละกอพันธุ์แขกดำ โดยความบริสุทธิ์ของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นมาประมาณ 1.5 เท่า ดังตารางที่ 5

4.3 <u>ผลการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดยวิธี เซฟาเดกซ์ จี-75 เจลฟิลเตรชัน</u>

เมื่อผ่านสารละลายโปรตีนมาตรฐานทั้ง 4 ชนิดและสารละลายเอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์ที่แยกได้ลงในคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี-75 แล้วชะออกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ จะได้ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 14 ซึ่งพบว่า โปรตีนมาตรฐาน Bovine serum albumin , Ovalbumin , Carbonic anhydrase และ Cytochrome C จะถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วย elution volume ต่างๆกัน คือ 93 มล. , 106.5 มล., 124.5 มล. และ 157.5 มล. ตามลำดับ ในขณะที่เอนไซม์ปาเปนที่แยกได้จะถูกชะออกจากคอลัมน์ที่ elution volume เท่ากับ 136.5 มล. โดยมีค่า void volume และ bed volume เท่ากับ 84 มล. และ 208.5 มล. ตามลำดับ เมื่อทำการคำนวณค่า K_{av} ของเอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์ที่ได้ และ ค่า K_{av} ของโปรตีนมาตรฐาน นำค่า K_{av} ที่ได้ไปเขียนกราฟกับค่าน้ำหนักโมเลกุล พบว่า เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์ที่ได้จะมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 22,000 ดาลตันเมื่อเปรียบเทียบจากกราฟ (รูปที่ 15) และเมื่อนำสารละลายเอนไซม์ใน peak B มาหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีเดียวกัน จะได้ผลการทดลองดังรูปที่ 16 โดยพบว่า โปรตีนมาตรฐาน Bovine serum albumin , Ovalbumin , Carbonic anhydrase และ Cytochrome C จะถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วย elution



รูปที่ 11 ผลของการแยกเอนไซม์ทางเทนไทบริสุทธิ์โดยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี-50 ครั้งที่ 2



รูปที่ 12 รูปแบบของแถบโปรตีนของสารละลายที่ได้จากการแยกโดยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี-50 เจล ฟิลเตรชัน ครั้งที่ 2

1) สารละลายโปรตีนของ peak C(ปริมาณโปรตีน 20 ไมโครกรัม)

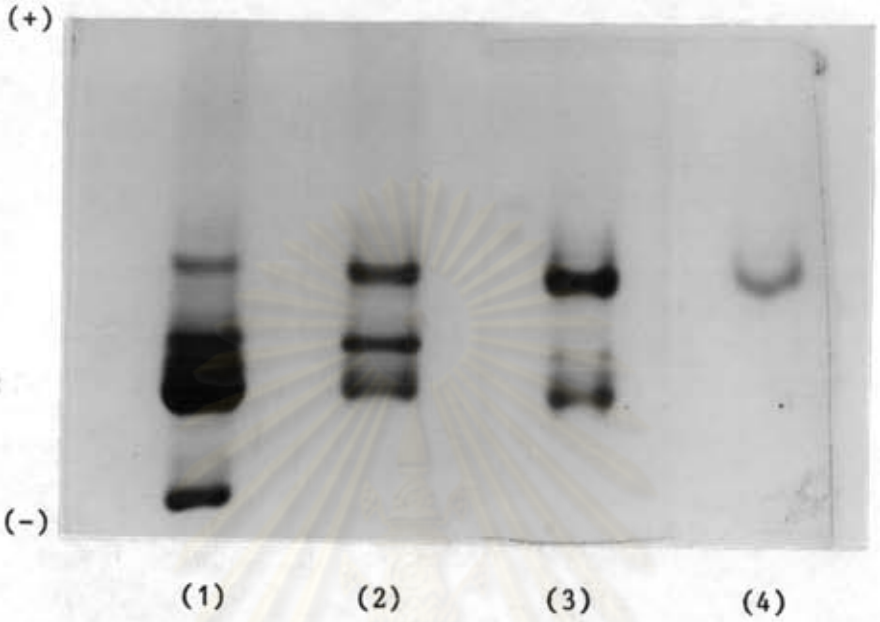
2) สารละลายโปรตีนของ peak C_2(ปริมาณโปรตีน 8 ไมโครกรัม)

3) สารละลายเอนไซม์ปาเปนมาตรฐาน(ปริมาณโปรตีน 10 ไมโครกรัม)

ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ปริมาตร (มล.)	แอคติวิตีทั้งหมด (CDU)	ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (mg)	แอคติวิตีจำเพาะ (CDU/mg)	Yield (%)	Purification fold
crude enzyme	116.2	289.95	1022.75	0.28	100.00	1.00
ตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว						
45%	38.0	183.89	585.26	0.31	63.42	1.11
30%	20.5	101.08	312.36	0.32	34.86	1.14
ตะกอนโซเดียมคลอไรด์ 10%	15.8	59.76	169.72	0.35	20.61	1.25
คอลัมน์ Sephadex G-50 ครั้งที่ 1						
peak B	51.4	37.75	118.82	0.32	13.02	1.14
peak C	28.2	12.44	33.33	0.37	4.29	1.32
คอลัมน์ Sephadex G-50 ครั้งที่ 2						
peak C_2	4.6	9.93	23.85	0.42	3.42	1.50

ตารางที่ 5 แสดงผลของการทำให้เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์จากน้ำยางมะละกอพันธุ์แขกดำในขั้นตอนต่างๆ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



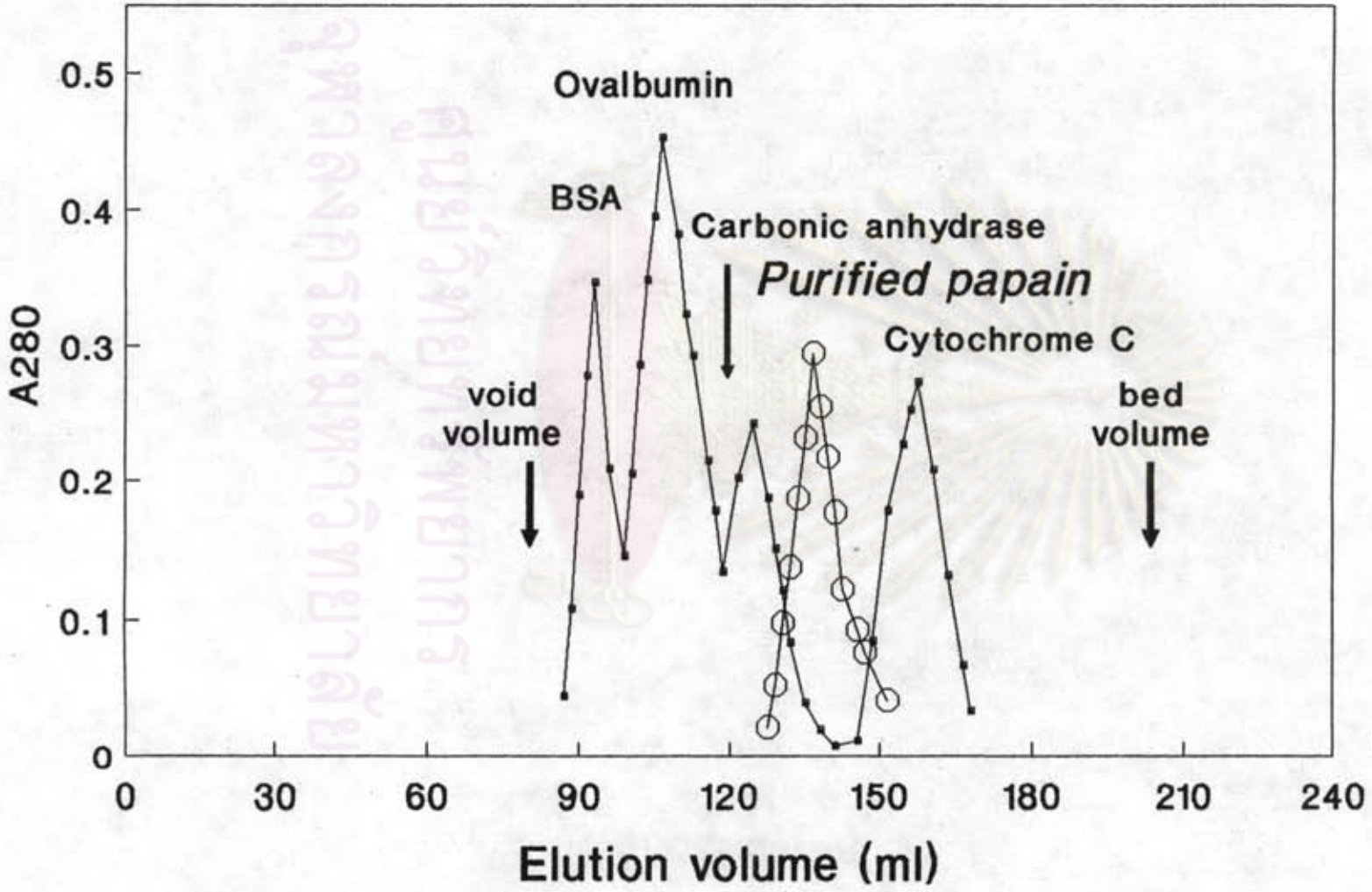
รูปที่ 13 รูปแบบของแถบโปรตีนจากขั้นตอนต่างๆในการทำให้เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์จากยางมะละกอพันธุ์แขกดำ

1) สารละลายยางมะละกอ(ปริมาณโปรตีน 50 ไมโครกรัม)

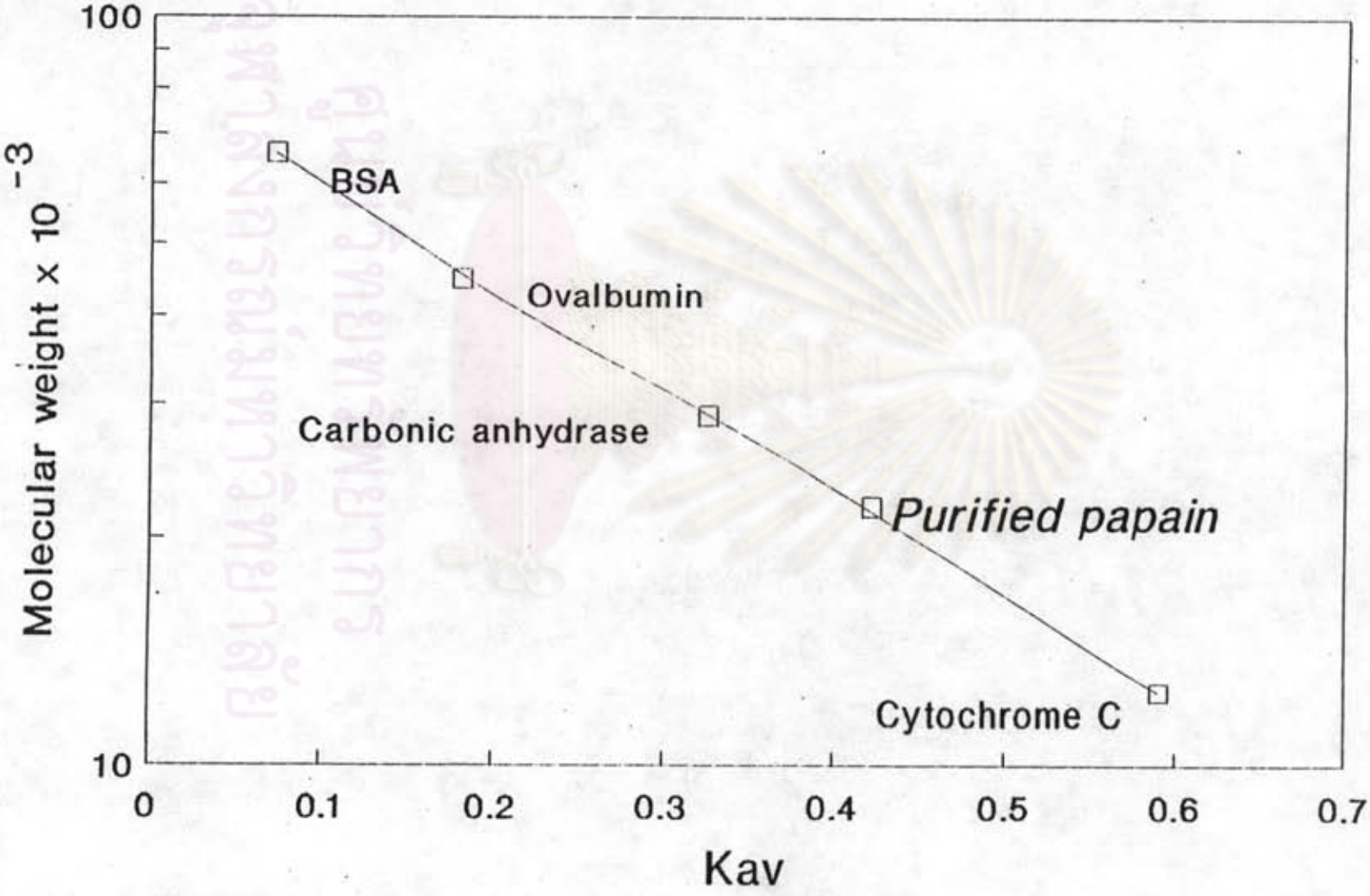
2) สารละลายตะกอนของ 10% โซเดียมคลอไรด์ (ปริมาณโปรตีน 30 ไมโครกรัม)

3) สารละลายโปรตีนของ peak C(ปริมาณโปรตีน 20 ไมโครกรัม)

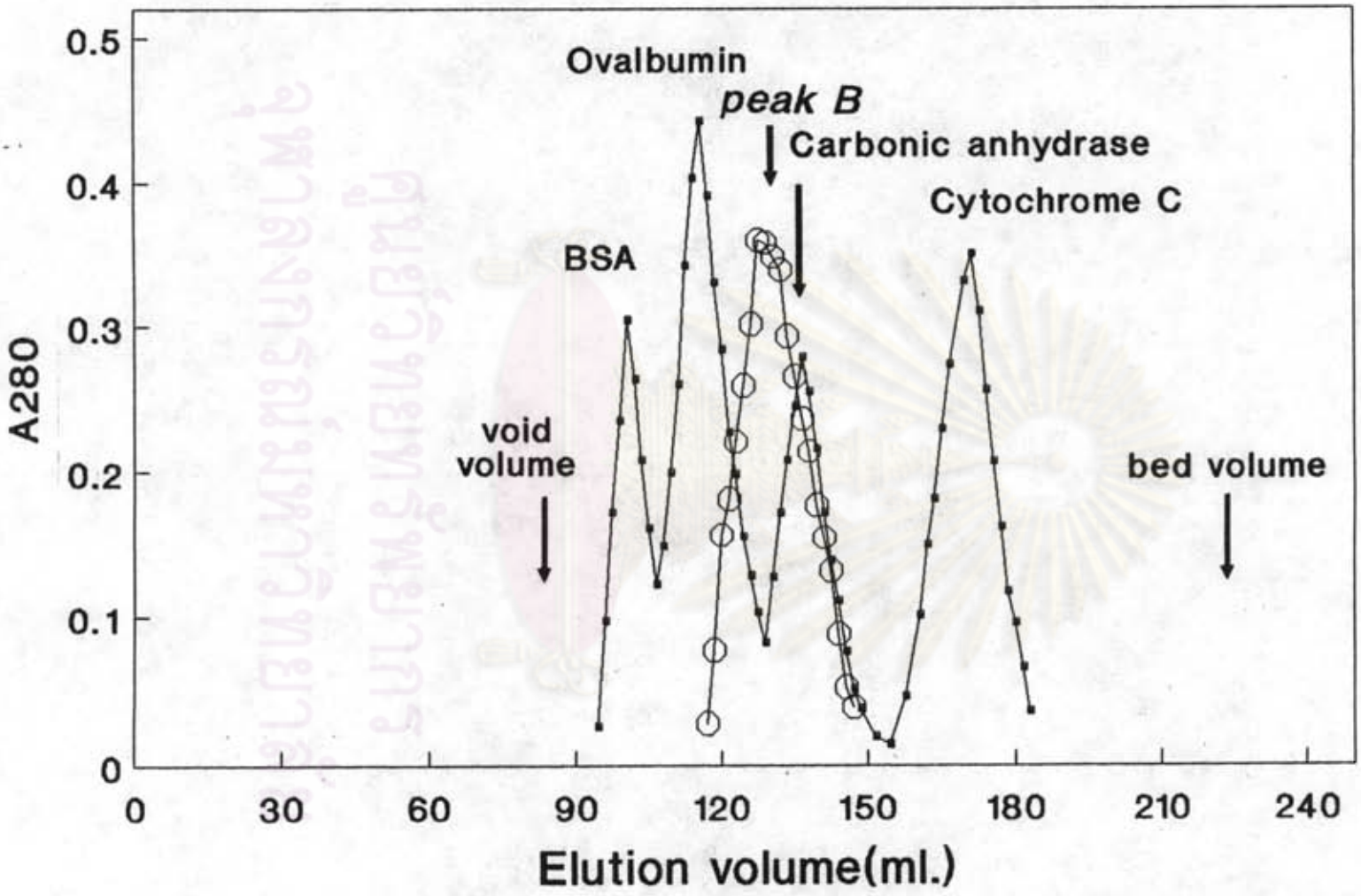
4) สารละลายโปรตีนของ peak C_2(ปริมาณโปรตีน 8 ไมโครกรัม)



รูปที่ 14 ผลของการหาน้ำหนักโมเลกุลโดยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี-75



รูปที่ 15 กราฟของค่า K_{av} กับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานและเอนไซม์ปาเปน



รูปที่ 16 ผลของการหาน้ำหนักโมเลกุลของสารละลายเอนไซม์ใน peak B โดยคอลัมน์ เซฟาเดกซ์ จี-75

volume ต่างๆกัน คือ 100.5 มล. , 115.5 มล., 136.5 มล. และ 171 มล. ตามลำดับ ในขณะที่สารละลายเอนไซม์ใน peak B จะถูกชะออกจากคอลัมน์ที่ elution volume เท่ากับ 127.5 มล. โดยมีค่า void volume และ bed volume เท่ากับ 93 มล. และ 216 มล. ตามลำดับ เมื่อทำการคำนวณค่า K_{av} ของสารละลายเอนไซม์ใน peak B และ ค่า K_{av}ของโปรตีนมาตรฐาน นำค่า K_{av} ที่ได้ไปเขียนกราฟกับค่าน้ำหนักโมเลกุล พบว่า สารละลายเอนไซม์ใน peak B จะมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 35,000 ดาลตัน เมื่อเปรียบเทียบจากกราฟ (รูปที่ 17)

4.4 <u>ผลของ pH ที่มีต่อแอคติวิตีและความเสถียรของเอนไซม์</u>

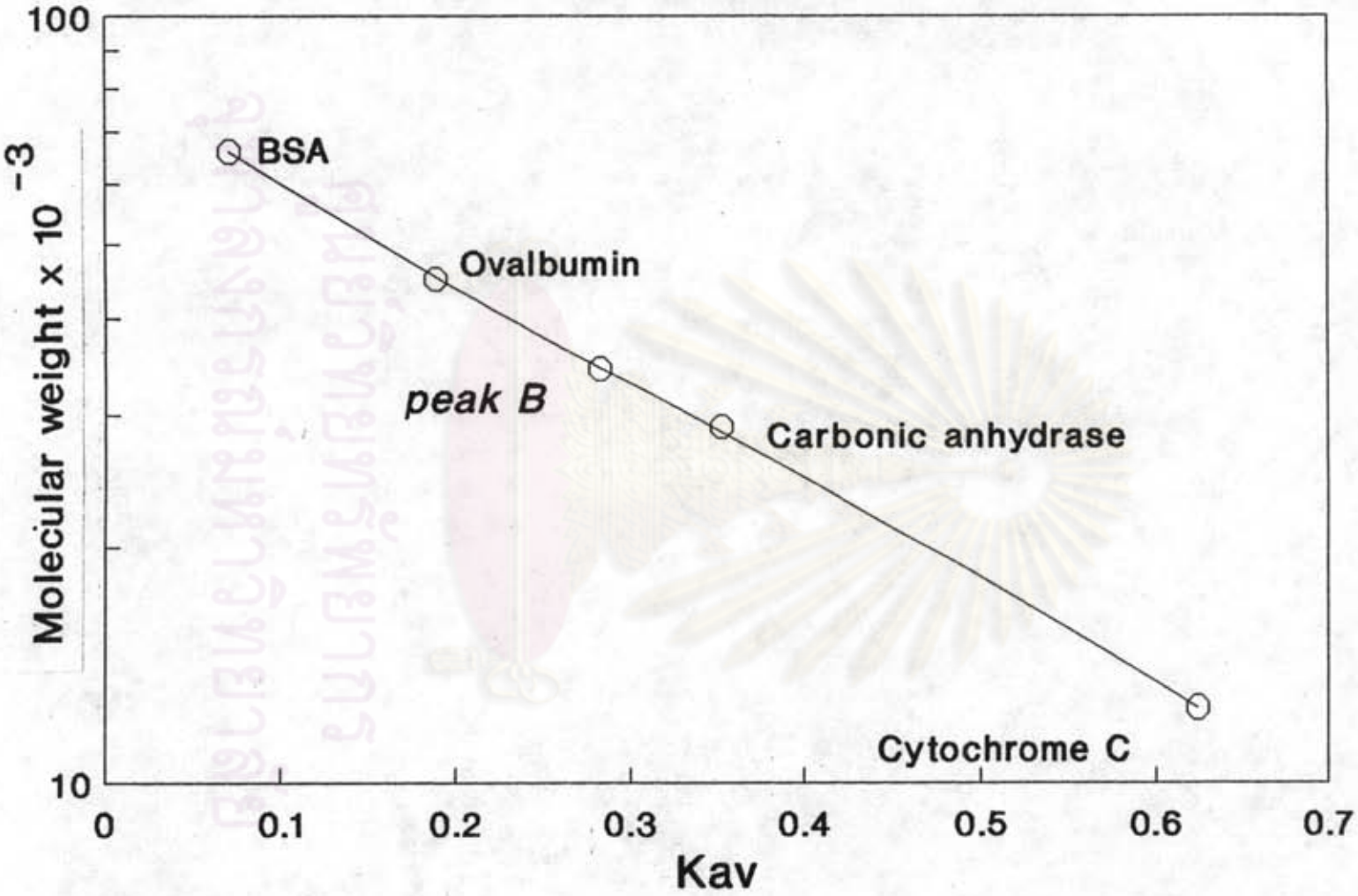
4.4.1 <u>ผลของ pH ที่มีต่อแอคติวิตีของเอนไซม์</u>

เมื่อเตรียมสับสเตรท โดยละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ pH ต่างๆ(pH 5.0 -10.0) แล้วทำการตรวจสอบแอคติวิตี พบว่า ที่ pH 7.5 จะมีแอคติวิตีของเอนไซม์ปาเปนที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วสูงที่สุด ส่วนสารละลายเอนไซม์ใน peak B จะมีแอคติวิตีสูงที่สุดที่ pH 7.0 นอกจากนี้แล้วเอนไซม์ปาเปนที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วและสารละลายเอนไซม์ใน peak B จะมีอัตราการลดลงของแอคติวิตีของเอนไซม์ในช่วงที่ pH ของสับสเตรทเป็นกรด (pH 5.0-7.0) มากกว่าในช่วงที่ pHของสับสเตรทเป็นด่าง (pH 7.0-10.0) ดังแสดงในรูปที่ 18

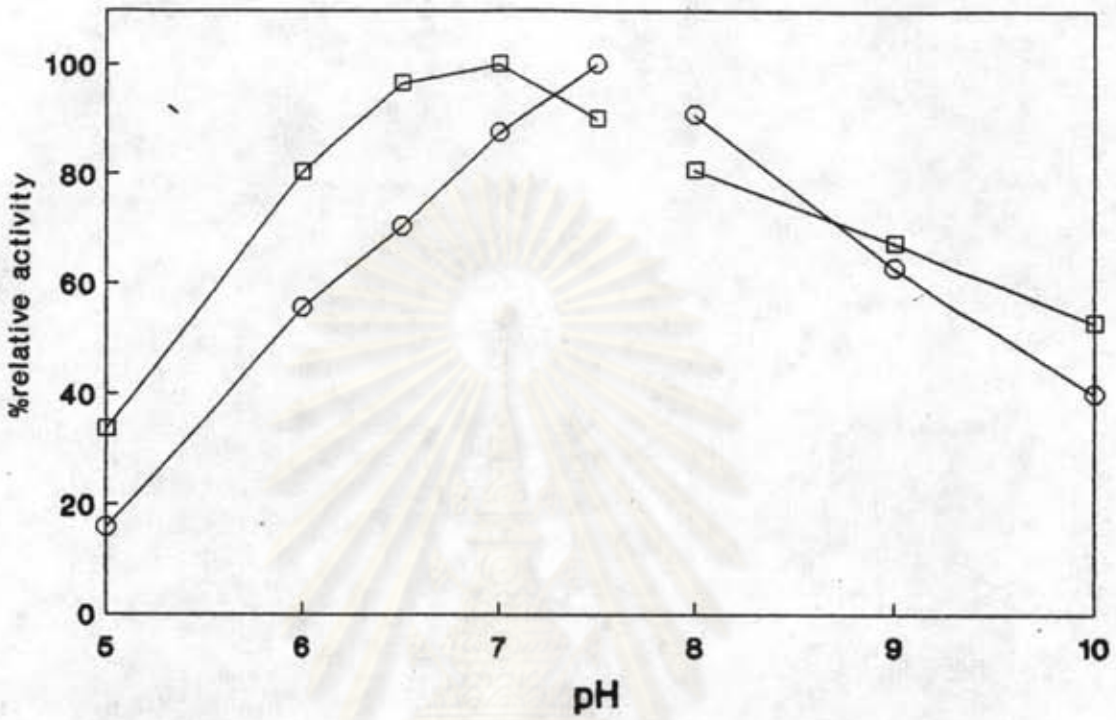
4.4.2 <u>ผลของ pH ที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์</u>

ทำการบ่มสารละลายเอนไซม์ที่ pH ต่างๆคือ pH 2.0-11.0 เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ พบว่า เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์ และสารละลายเอนไซม์ peak B จะให้ผลที่มีรูปแบบที่คล้ายคลึงกันคือ มีแอคติวิตีของเอนไซม์หลังการบ่มในช่วง pH 6.0-8.0 จะอยู่ในระดับที่คงที่ ส่วนแอคติวิตีที่เหลืออยู่ในช่วงของ pH 6.0 ลงมา (pH 2.0-6.0) จะมีอัตราการลดลงมากกว่าในช่วง pH 8.0 ขึ้นไป(pH 8.0-11.0) โดยจะมีแอคติวิตีเหลืออยู่น้อยที่สุดที่ pH 2.0 ดังแสดงในรูปที่ 19

4.5 <u>ผลของอุณหภูมิที่มีต่อแอคติวิตีและความเสถียรของเอนไซม์</u>



รูปที่ 17 กราฟของค่า K_{av} กับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานและสารละลายเอนไซม์ใน peak B

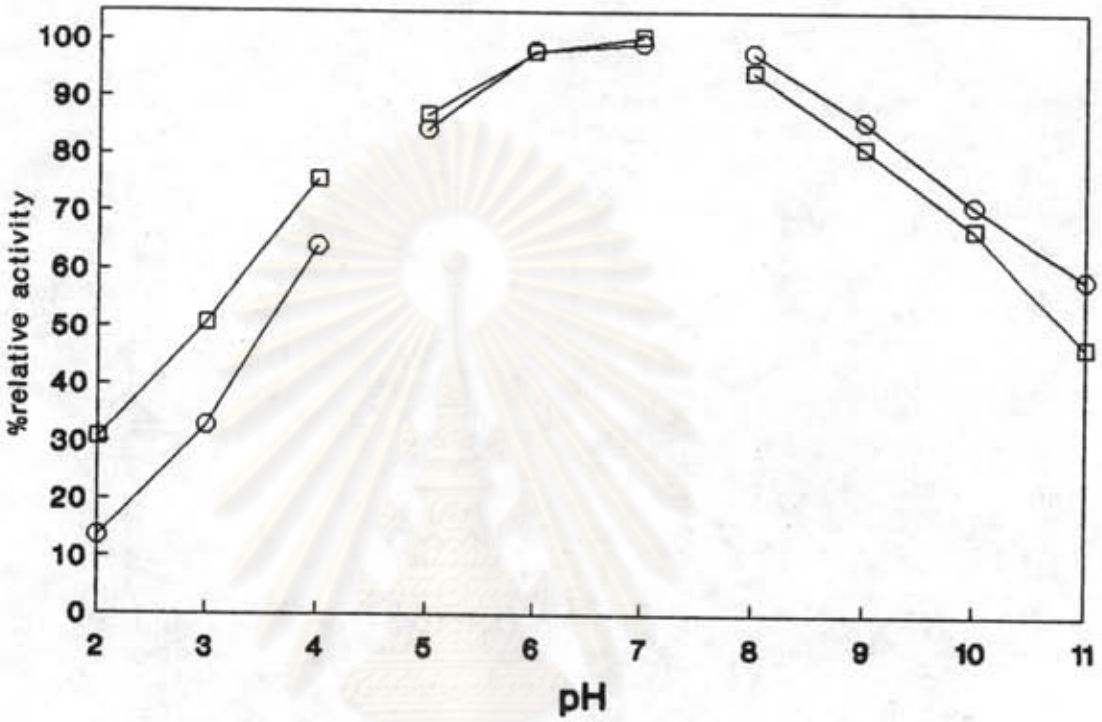


รูปที่ 18 ผลของ pH ที่มีต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ปาเปนและสารละลายเอนไซม์ใน peak B (ช่วง pH 5-7.5 ใช้ 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และช่วง pH 8-10 ใช้ 0.1 โมลาร์ ทริส-ไกลซีน บัฟเฟอร์)

—○— = เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์

—□— = สารละลายเอนไซม์ใน peak B

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 19 ผลของ pH ที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์ปาเปนและสารละลายเอนไซม์ใน peak B (ช่วง pH 2-4 ใช้ 0.1 โมลาร์ ซิเตรต บัฟเฟอร์, ช่วง pH 5-7 ใช้ 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และช่วงpH 8-11 ใช้ 0.1 โมลาร์ ทริส-ไกลซีน บัฟเฟอร์)

—○— = เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์

—□— = สารละลายเอนไซม์ใน peak B

4.5.1 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อแอคติวิตีของเอนไซม์

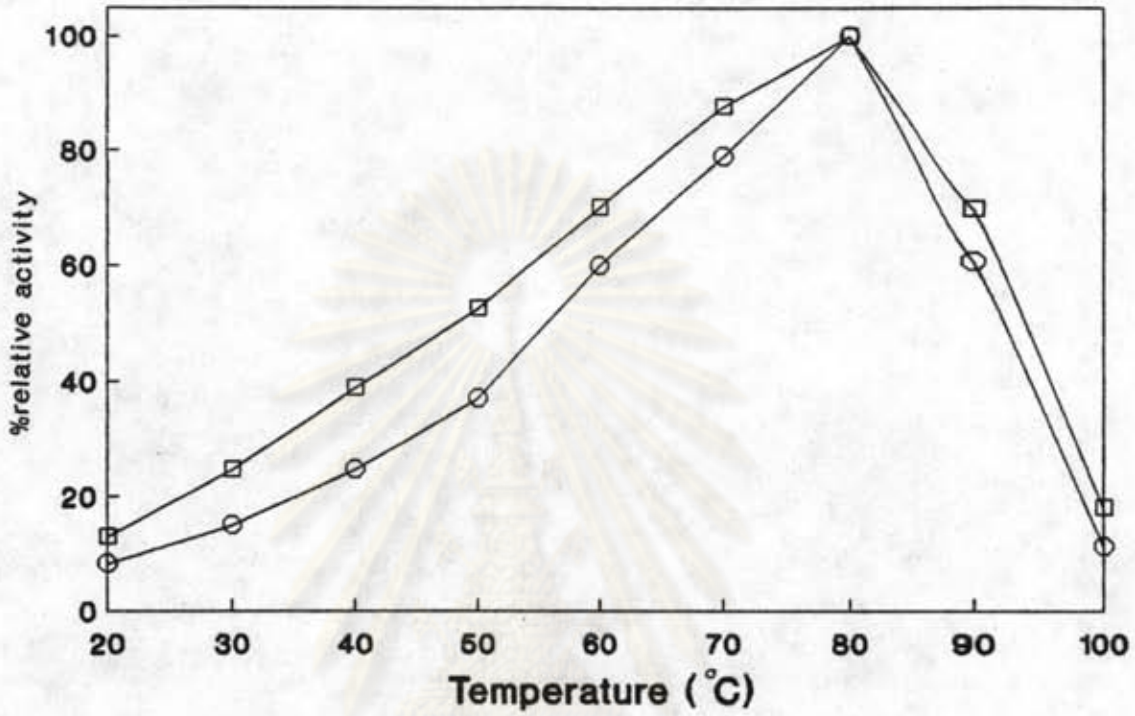
เมื่อทำการวัดแอคติวิตีโดยใช้อุณหภูมิในช่วง 20-100 องศาเซลเซียส พบว่าเอนไซม์บาเปนบริสุทธิ์และสารละลายเอนไซม์ peak B จะให้ผลที่มีรูปแบบคล้ายคลึงกัน คือ จะมีแอคติวิตีเพิ่มสูงขึ้นตามอุณหภูมิที่สูงขึ้นและที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสจะมีแอคติวิตีของเอนไซม์สูงที่สุดเมื่อเทียบกับที่อุณหภูมิอื่นๆ เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 80 องศาเซลเซียส แอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็ว ดังแสดงในรูปที่ 20

4.5.2 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์

ทำการบ่มสารละลายเอนไซม์บาเปนบริสุทธิ์และสารละลายเอนไซม์ peak B ที่อุณหภูมิต่างๆ(0-100 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ พบว่า แอคติวิตีของเอนไซม์บาเปนบริสุทธิ์ที่เหลืออยู่หลังการบ่มในช่วงอุณหภูมิ 0-60 องศาเซลเซียส จะอยู่ในระดับที่สูงใกล้เคียงกันกับแอคติวิตีของหลอดควบคุมที่ไม่ได้ทำการบ่มก่อนวัดแอคติวิตี แต่เมื่ออุณหภูมิที่ใช้บ่มเอนไซม์เพิ่มขึ้นเป็น 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส แอคติวิตีของเอนไซม์ที่เหลืออยู่จะค่อยๆลดลงตามลำดับ ส่วนสารละลายเอนไซม์ใน peak B แอคติวิตีของเอนไซม์ที่เหลืออยู่หลังการบ่มในช่วง 0-70 องศาเซลเซียส จะอยู่ในระดับที่สูงใกล้เคียงกันกับแอคติวิตีของหลอดควบคุมที่ไม่ได้ทำการบ่มก่อนวัดแอคติวิตี แต่เมื่ออุณหภูมิที่ใช้บ่มเพิ่มเป็น 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส แอคติวิตีของเอนไซม์ที่เหลืออยู่จะค่อยๆลดลงเช่นเดียวกัน ดังแสดงในรูปที่ 21

4.6 ผลของการเก็บรักษาเอนไซม์บาเปนบริสุทธิ์

หลังจากวัดแอคติวิตีของเอนไซม์บาเปนบริสุทธิ์ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 และ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือนพบว่า อัตราการสูญเสียแอคติวิตีในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะมากกว่าการเก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียสมาก โดยเอนไซม์จะมีแอคติวิตีเหลือเพียงประมาณ 40 เปอร์เซนต์เมื่อเทียบกับแอคติวิตีเริ่มต้น แต่ที่ -20 องศาเซลเซียส เหลืออยู่ถึงประมาณ 80 เปอร์เซนต์ ดังแสดงในรูปที่ 22

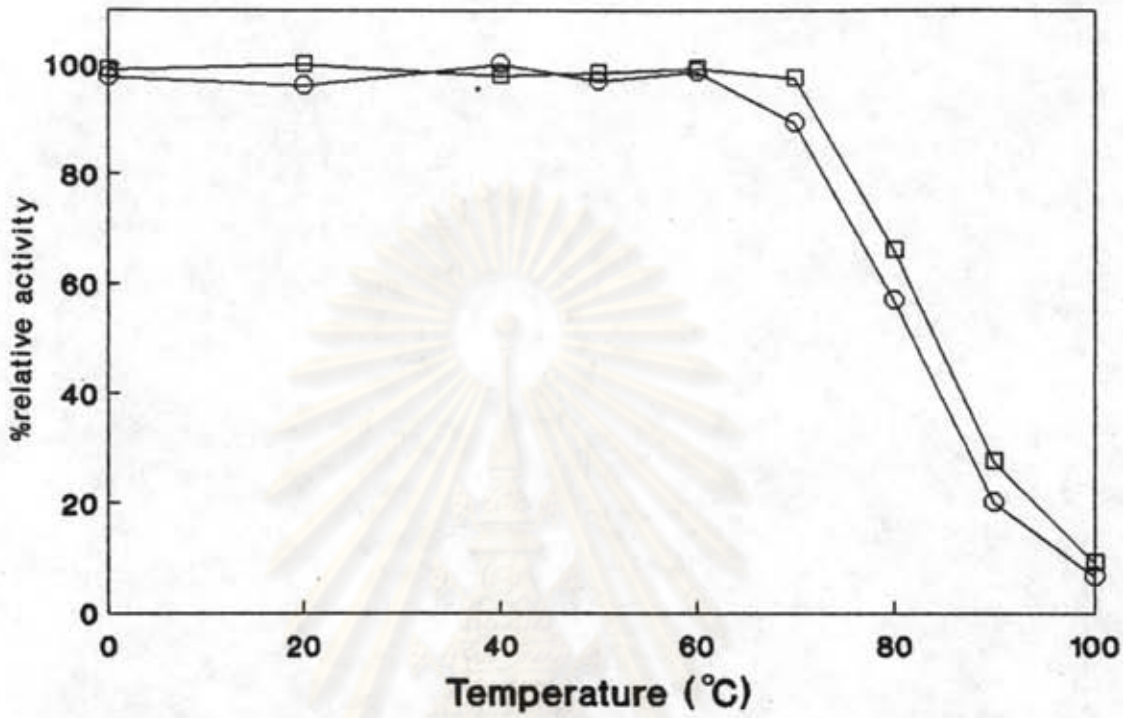


รูปที่ 20 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ปาเปนและสารละลายเอนไซม์ใน peak B

—○— = เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์

—□— = สารละลายเอนไซม์ใน peak B

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

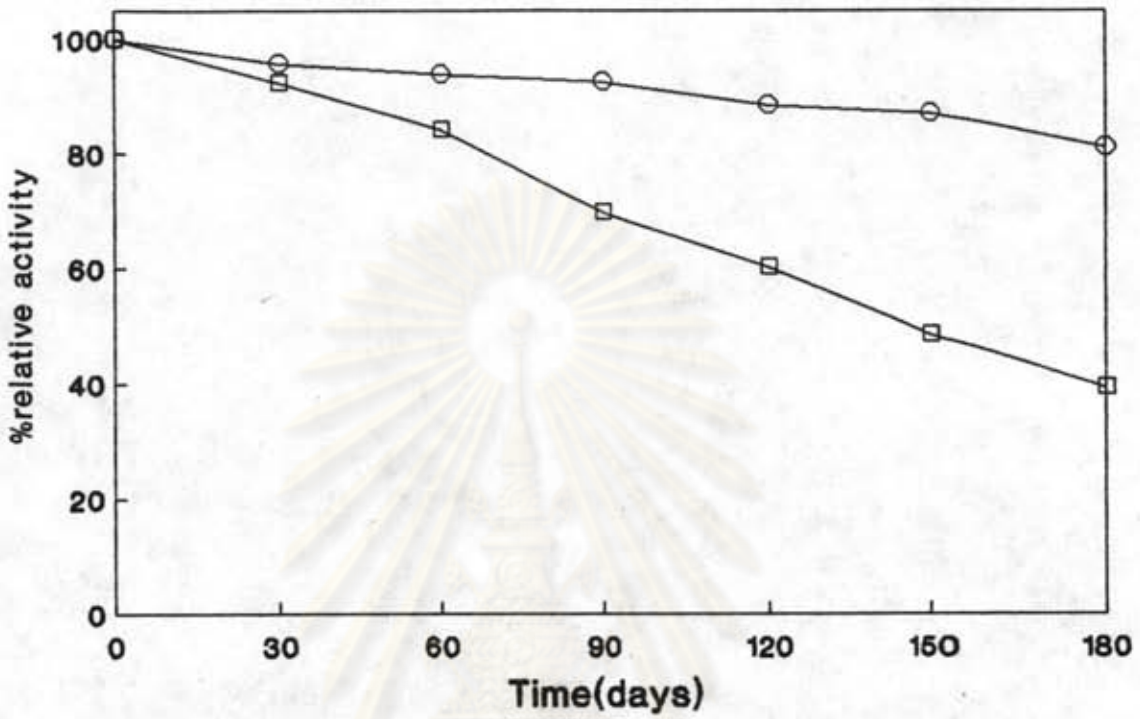


รูปที่ 21 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์ปาเปนและสารละลายเอนไซม์ใน peak B

—○— = เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์

—□— = สารละลายเอนไซม์ใน peak B

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 22 ผลของความเสถียรในการเก็บรักษาเอนไซม์ปาเปนที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วที่อุณหภูมิ 4 และ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน

—□— = 4 องศาเซลเซียส

—○— = -20 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.7 ผลของโลหะหนักและสารบางชนิดที่มีต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์

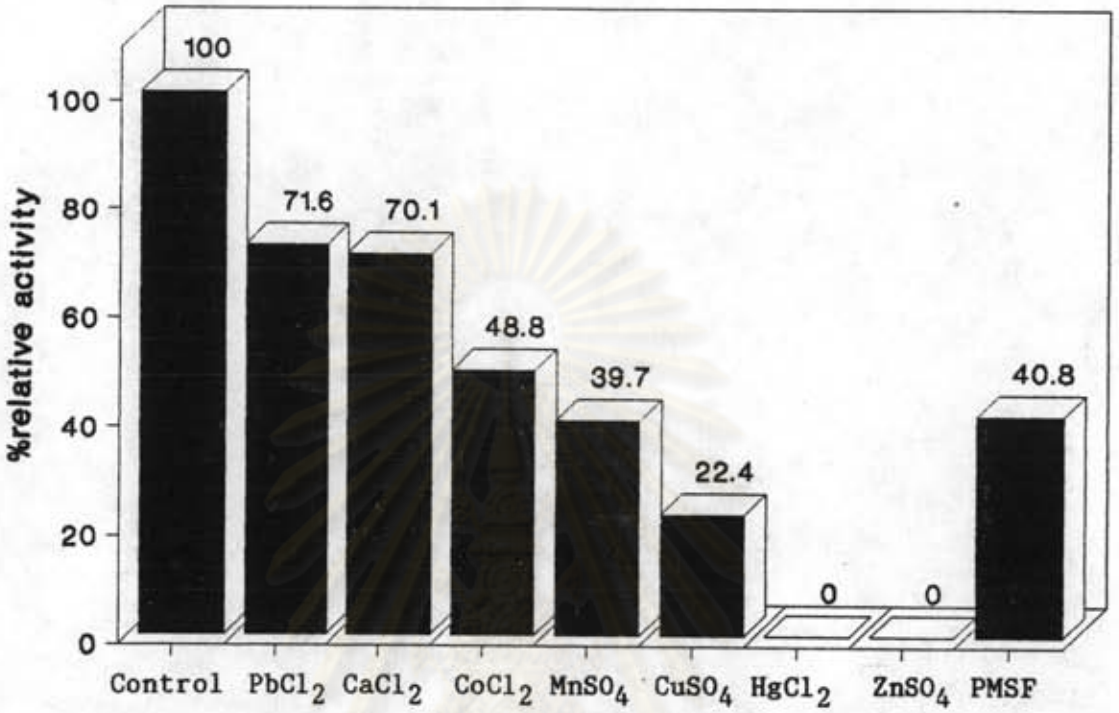
จากการศึกษาอิทธิพลของโลหะหนักและสารยับยั้งชนิดต่างๆที่มีต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์โดยใช้ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ พบว่า $HgCl_2$ และ $ZnSO_4$ จะทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงเป็นศูนย์(ยับยั้งได้อย่างสมบูรณ์) ในขณะที่ $PbCl_2$, $CaCl_2$, $CoCl_2$, $MnSO_4$, $CuSO_4$ จะมีผลในการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มมากขึ้นตามลำดับ ส่วนสารยับยั้ง PMSF จะมีผลทำให้แอคติวิตีลดลงเหลือประมาณ 40.8 เปอร์เซนต์ ดังแสดงในรูปที่ 23

4.8 ผลของสารเคมีชนิดต่างๆในการเร่งแอคติวิตีของเอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์

จากการศึกษา อิทธิพลของสารเคมีชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่มีต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์พบว่า โปตัสเซียม เมตาไบซัลไฟต์(KMS)จะช่วยเร่งแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ดีที่สุด รองลงมา คือ โซเดียม ไบซัลไฟต์, เมอร์แคปโต เอธทานอล, โซเดียม ไซยาไนด์, ซีสเตอีนและแอมโมเนียม ซัลไฟด์ ตามลำดับ โดยที่สารเคมีเหล่านี้จะเร่งแอคติวิตีให้เพิ่มขึ้นประมาณ 3-5 เท่าเมื่อเทียบกับหลอดควบคุมที่ไม่ได้เติมสารอะไรเลย ส่วน EDTA จะมีผลในการเร่งแอคติวิตีของเอนไซม์น้อยมาก ดังแสดงในรูปที่ 24

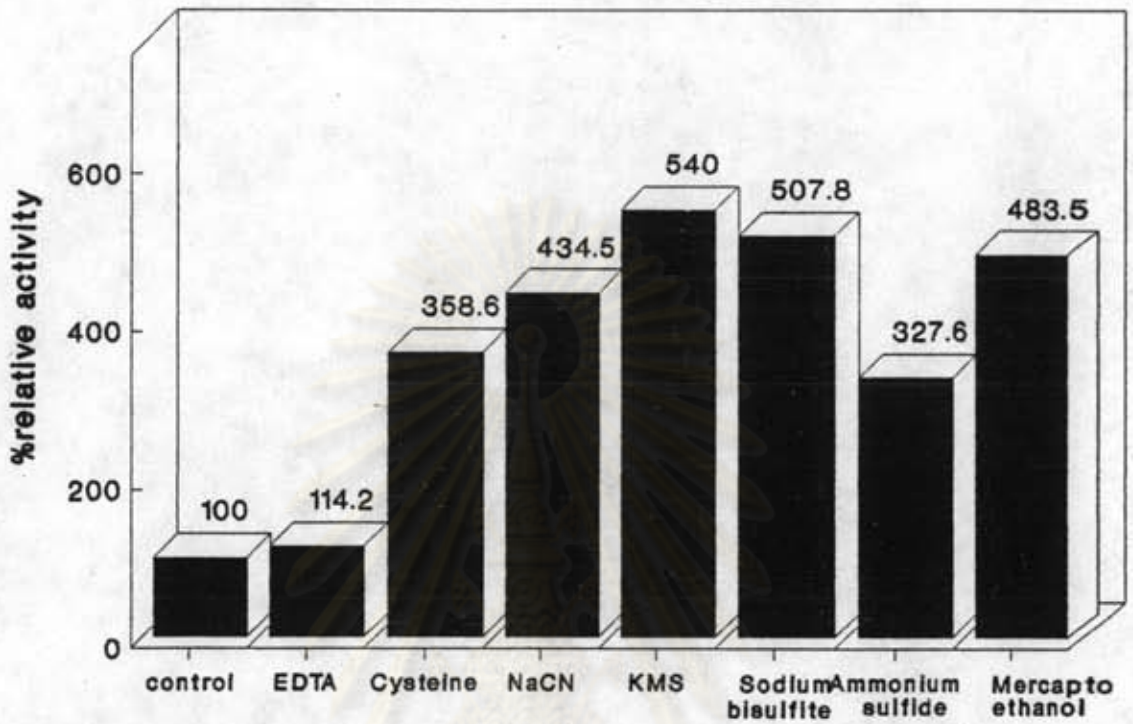
4.9 ผลการศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์

เมื่อทำการศึกษาลักษณะทางจลนศาสตร์ของ เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์ และ สารละลายเอนไซม์ peak B โดยวัดแอคติวิตีในการย่อยสลายสับสเตรทชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นำผลที่ได้มาเขียนกราฟโดย Lineweaver-Burk plot (รูปที่ 25, 26, 27, 28) และคำนวณหาค่า K_m(ความเข้มข้นของสับสเตรทที่ทำให้ความเร็วของปฏิกิริยาเป็นครึ่งหนึ่งของความเร็วสูงสุด) และ V_{max}(ความเร็วปฏิกิริยาสูงสุด) ของสับสเตรทแต่ละชนิด ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 6 และ ตารางที่ 7 จากตารางที่ 6 พบว่า เมื่อใช้เคซีนและ BSA เป็นสับสเตรท ค่า K_m ของเอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์จะมีค่าที่ต่ำกว่า ค่า K_m ของสารละลายเอนไซม์



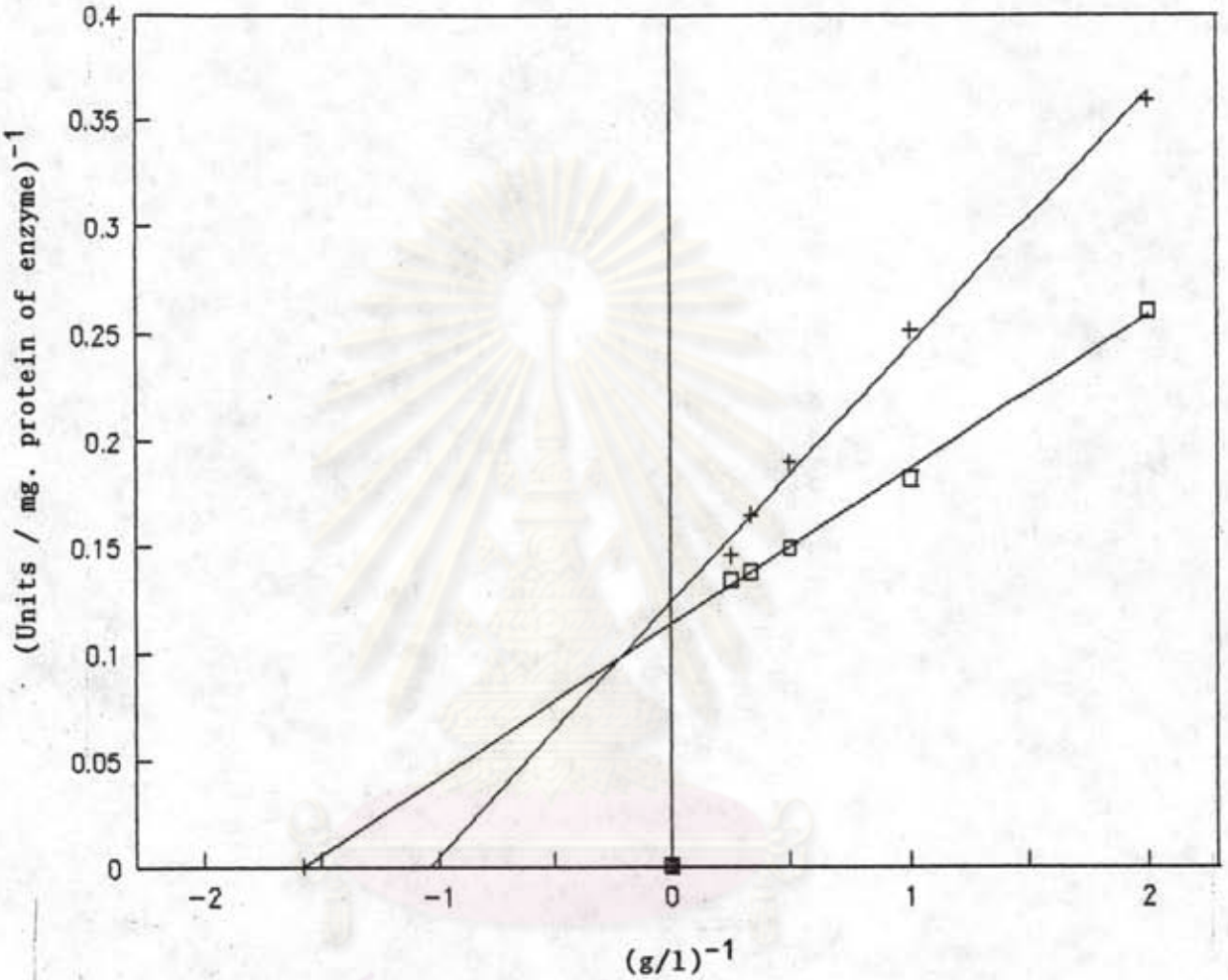
รูปที่ 23 ผลของโลหะหนักและสารยับยั้งต่างๆ ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่มีต่อแอคติวิตี ของเอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 24 ผลของสารเคมีชนิดต่างๆในการเร่งแอคติวิตีของเอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์ โดยใช้ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

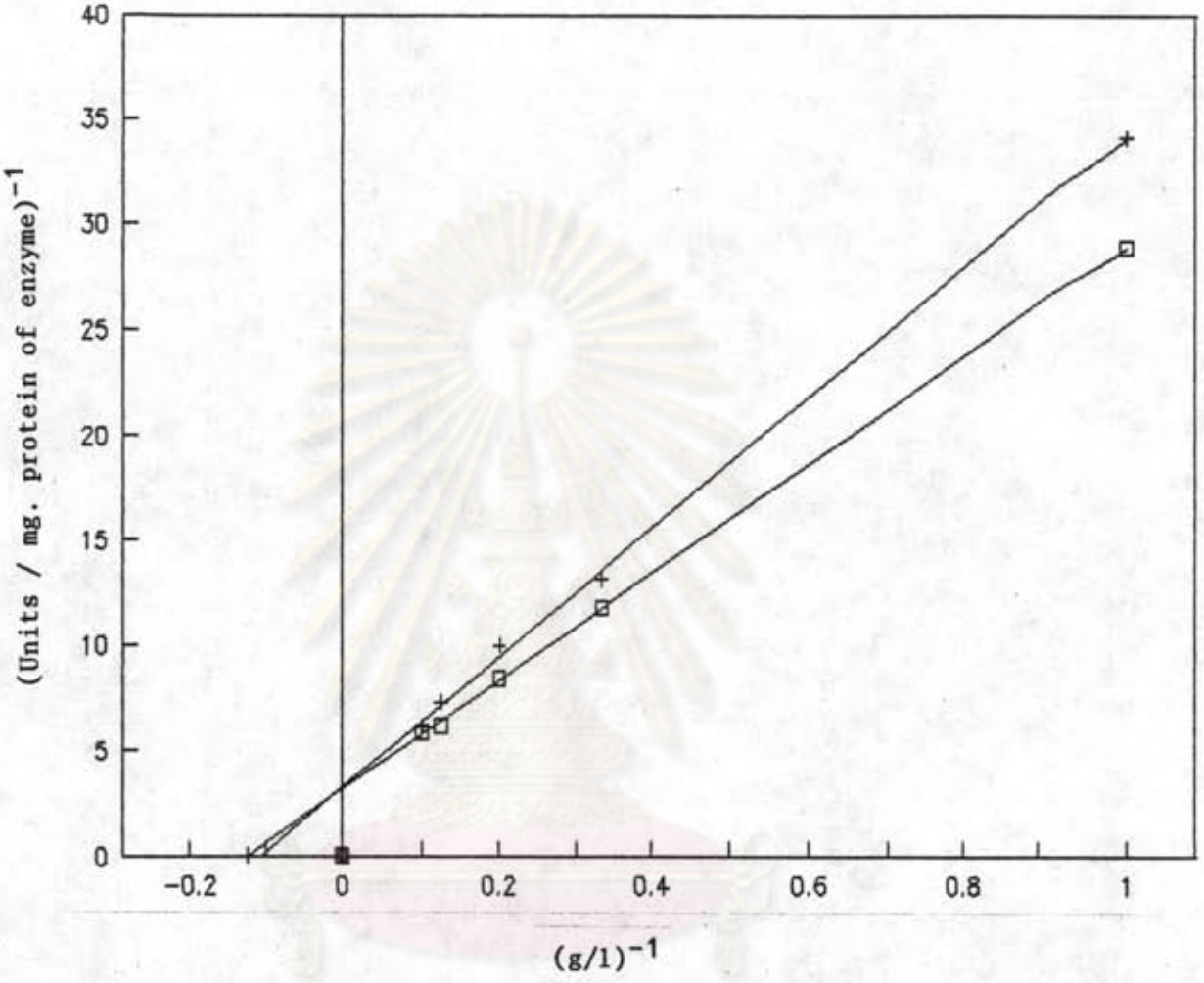
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 25 กราฟ Lineweaver-Burk plot ของเอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์และสารละลายโปรตีนของ peak B โดยใช้เคซีนเป็นสับสเตรต

□ = เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์ ความเข้มข้น 0.94 ไมโครโมลาร์(20.6 ไมโครกรัม/มล.)

+ = เอนไซม์ peak B ความเข้มข้น 1.14 ไมโครโมลาร์(40.0 ไมโครกรัม/มล.)

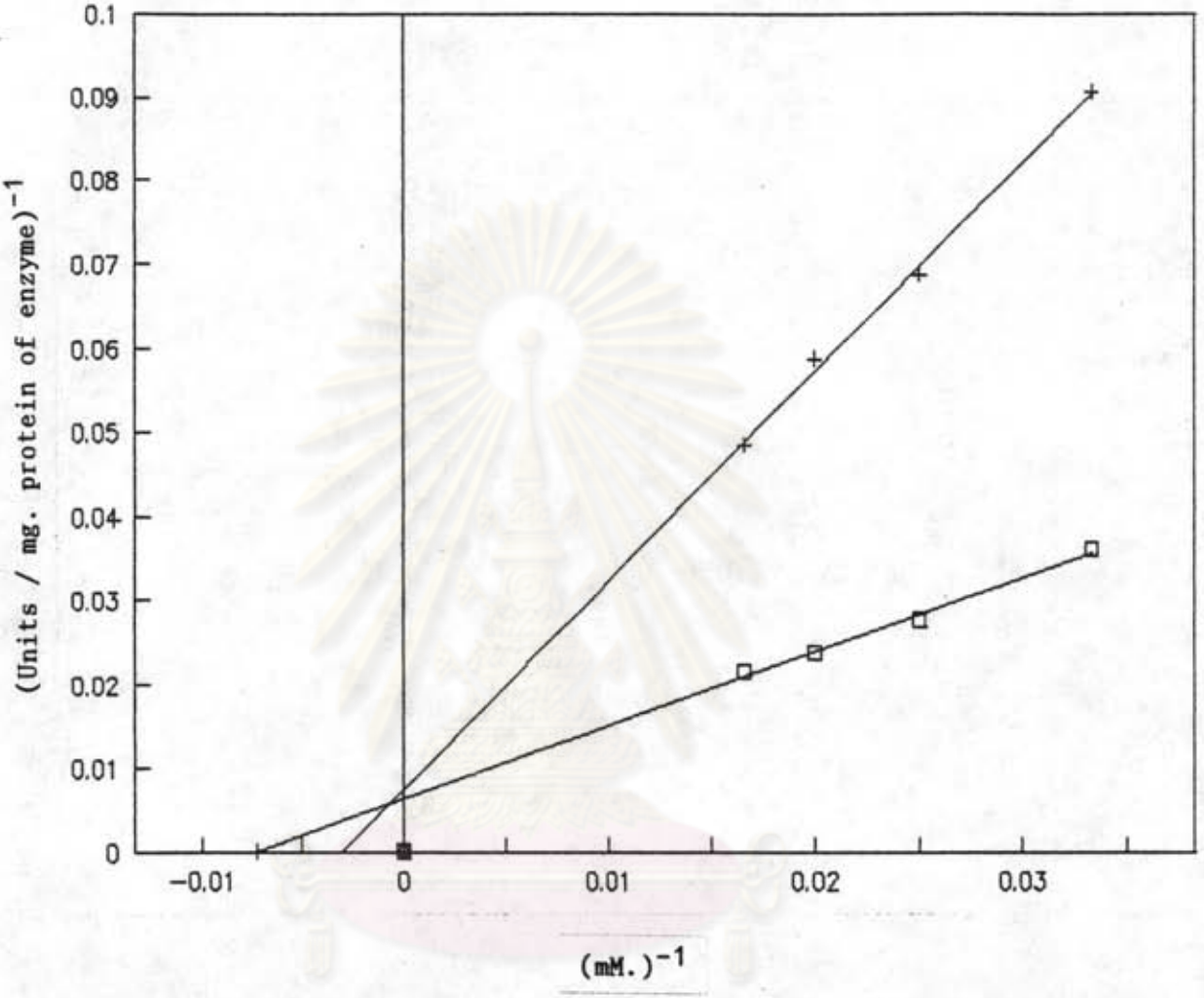


รูปที่ 26 กราฟ Lineweaver-Burk plot ของเอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์และสารละลายโปรตีน ของ peak B โดยใช้ BSA เป็นสับสเตรต

□ = เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์ ความเข้มข้น 0.94 ไมโครโมลาร์(20.6 ไมโครกรัม/มล.)

+ = เอนไซม์ peak B ความเข้มข้น 1.14 ไมโครโมลาร์(40.0 ไมโครกรัม/มล.)

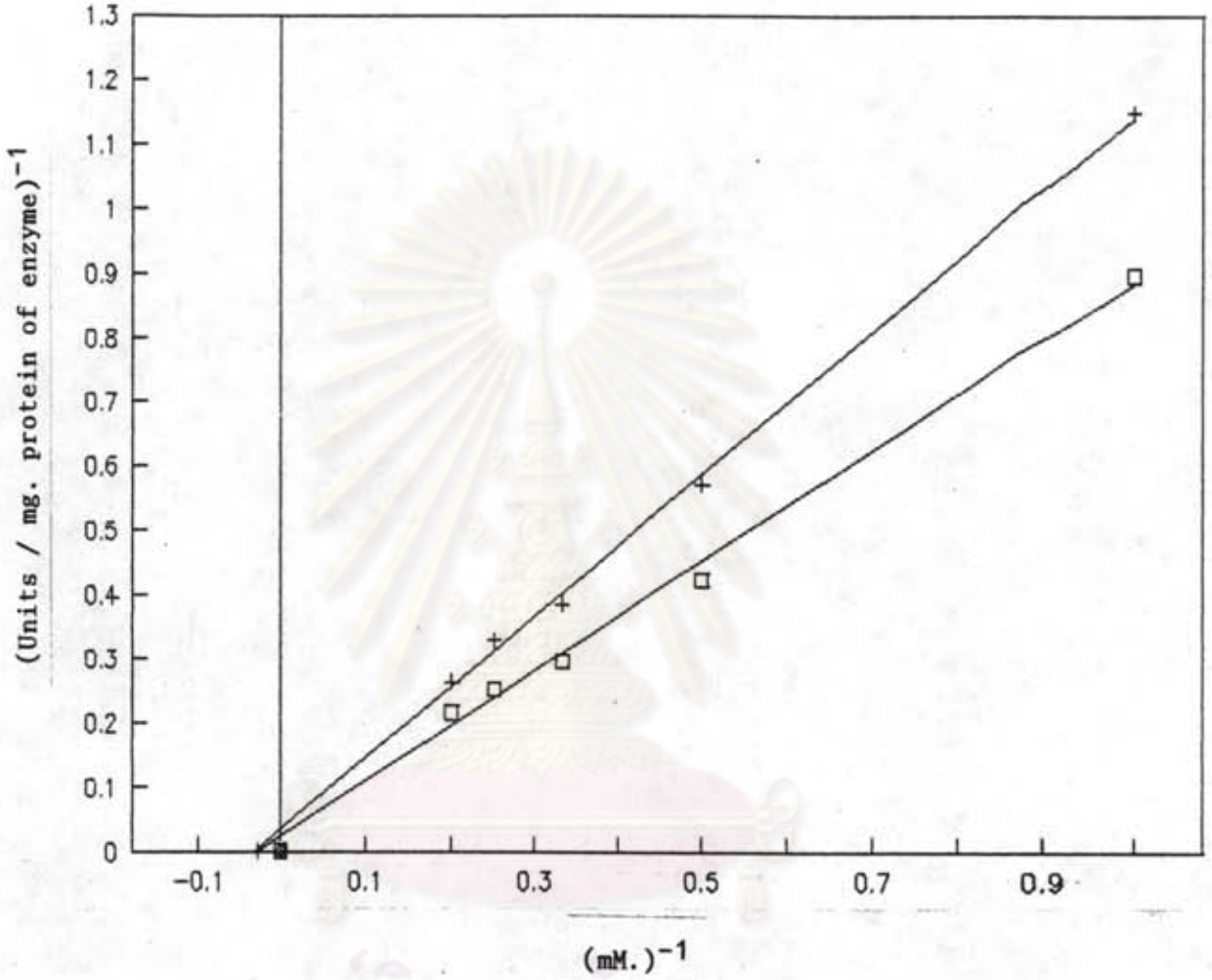
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 27 กราฟ Lineweaver-Burk plot ของเอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์และสารละลายโปรตีน ของ peak B โดยใช้ BAEE เป็นสับสเตรต

□ = เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์ ความเข้มข้น 0.33 ไมโครโมลาร์(7.2 ไมโครกรัม/มล.)

+ = เอนไซม์ peak B ความเข้มข้น 0.40 ไมโครโมลาร์(28.0 ไมโครกรัม/มล.)



รูปที่ 28 กราฟ Lineweaver-Burk plot ของเอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์และสารละลายโปรตีน ของ peak B โดยใช้ BAPNA เป็นสับสเตรต

□ = เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์ ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์(12.0 ไมโครกรัม/มล.)

+ = เอนไซม์ peak B ความเข้มข้น 0.67 ไมโครโมลาร์(23.3 ไมโครกรัม/มล.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ใน peak B ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ใกล้เคียงกันคือ 0.94 และ 1.14 ไมโครโมลาร์ เมื่อพิจารณาการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรทธรรมชาติของเอนไซม์ทั้งสอง พบว่า ค่า K_m ของเอนไซม์ที่มีสับสเตรทเป็นเคซีนต่ำกว่า BSA ทำให้คาดได้ว่า เอนไซม์ทั้งสองน่าจะมีความจำเพาะในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเพปไทด์ในเคซีนได้ดีกว่า BSA ส่วนในการย่อยสลายสับสเตรทสังเคราะห์ คือ BAEE และ BAPNA (ตารางที่ 7) พบว่า ทั้งเอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์และเอนไซม์ peak B สามารถย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ใน BAEE และพันธะเอไมด์ใน BAPNA ได้โดยมีค่า K_m ของ BAPNA ต่ำกว่า BAEE ประมาณ 4 เท่าและ 10 เท่า ตามลำดับ หมายความว่าเอนไซม์ทั้งสองมีแนวโน้มที่จะสามารถย่อยสลายพันธะเอไมด์ใน BAPNA ด้วยความจำเพาะที่สูงกว่าพันธะเอสเทอร์ใน BAEE อย่างมีนัยสำคัญ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

substrate	K_m (g/l)		V_{max} (units/mg. prot. of enz.)	
	papain	peak B	papain	peak B
Casein	0.6334	0.9609	8.7936	8.0479
BSA	8.0233	9.3739	0.3129	0.3044

ตารางที่ 6 แสดงค่า K_m และ V_{max} ต่อสับสเตรตธรรมชาติของเอนไซม์ปาเปนที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วและสารละลายเอนไซม์ใน peak B ที่ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ปาเปนและ peak B เท่ากับ 0.94 ไมโครโมลาร์(20.6 ไมโครกรัม/มล.)และ 1.14 ไมโครโมลาร์ (40 ไมโครกรัม/มล.)

substrate	K_m (mM.)		V_{max} (units/mg. prot. of enz.)	
	papain	peak B	papain	peak B
BAEE	136.41	326.94	155.59	131.62
BAPNA	34.88	31.40	40.66	28.42

ตารางที่ 7 แสดงค่า K_m และ V_{max} ต่อสับสเตรตสังเคราะห์ของเอนไซม์ปาเปนที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วและสารละลายเอนไซม์ peak B ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยที่ BAEE ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ปาเปนและ peak B เท่ากับ 0.33 ไมโครโมลาร์ (7.2 ไมโครกรัม/มล.)และ 0.40 ไมโครโมลาร์(28.0 ไมโครกรัม/มล.) ส่น BAPNA ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ปาเปนและ peak B เท่ากับ 0.54ไมโครโมลาร์ (12.0 ไมโครกรัม/มล.)และ 0.67 ไมโครโมลาร์(23.3 ไมโครกรัม/มล.)