เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

กฤษณา โพธิสารัตนะ. 2533. การศึกษาสมบัติของอัลคาไลน์ โปรติเอส จาก *Bacillus spp.* ชนิดทนต่อสภาวะด่าง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

จีรวัฒน์ กันต์เกรียงวงศ์. 2532. การใช้ยางมะละกอและปาเปนในการปรับปรุงคุณภาพเนื้อโคอายุมาก. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ทวีเกียรติ์ ยิ้มสวัสดิ์. 2527. มะละกอ. กรุงเทพมหานคร:กรุงสยามการพิมพ์.

ประเทือง จุลเอียด. 2533. การผลิตปาเปนจากน้ำยางมะละกอพันธุ์แขกดำ. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2535. เอนไซม์ทางอาหาร. 2 เล่ม. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

แม้น อมรสิทธิ์และ อมร เพชรสม. 2535. Principles and Technique of Instrumental Analysis. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร. โรงพิมพ์ชวนพิมพ์.

อุดมลักษณ์ ธิติรักษ์พาณิชย์. 2534. การแยกให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของแอลคาไลน์ โปรติเอสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Arnon, R. 1970. Method in enzymology. Vol. 19. (Pearlman, G.F. and Lorand, L., eds.) New York: Academic Press.

Baines, B.S. and Brocklehurst, K. 1979. A necessary modification to the preparation of papain from any high-quality latex of

Carica papaya and evidence for the structural integrity of the enzyme produced by traditional methods. Biochem. J. 177: 541-548.

Beynon, R.J., and Bond, J.S. 1989. Proteolytic enzyme. pp. 260 Oxford England : IRL Press.

Brocklehurst, K., Baines, B.S., and Kierstan, M.P.J. 1981. Topic in enzyme and fermentation biotechnology. Vol. 5. (Wiseman, A., eds.) Chichester: Halsted Press.

_____., _____., Salih, E., and Harzoulis, C. 1984. Chymopapain S is chymopapain A. Biochemical Journal 221: 553-554.

_____., Carlson, J., Kierstan, M.P.J., and Crook, E.M. 1973. Preparation of fully active papain from dried papaya latex. Biochem. J. 133: 573-584.

_____., and Salih, E. 1983. A re-evaluation of the nomenclature of the cysteine proteinases of Carica papaya and a rational basis of their identification. Biochemical Journal 213: 559-560.

Burke, D.E., Lewis, S.D., and Shafer, J.A. 1974. A two step procedure for purification of papain from extract of papaya latex. Arch. Biochem. Biophys. 164: 30-36.

Cayle, T. 1965. Purification of papain from fresh plant latex. U.S. patent 3,210,257 .

Cooper, T.G. 1977. The tool of biochemistry. Singapore. New York. Chichester. Brisbane. Toronto : John Wiley & Sons, Inc.

Ebata, M. and Yasunobu, K.T. 1962. Chymopapain I. isolation,

crystallization, and preliminary characterization. J. Biol. Chem. 237: 1086-1094.

Enzyme Nomenclature. 1972. Recommendations of the Internationnal Union of Biochemistry on the Nomenclature and Classification of Enzymes, together with their units and Symbols of Enzyme Kinetics.

Flynn, G. 1975. The market potential for papain. Rep. Trop. Prop. Inst. G-99: 1-58.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. 1981. FAO food and nutrition paper. The 25th Session of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additive, March,23-Apirl,1 Geneva.

Husain, S.S., and Lowe, G. 1970. Biochem. J. 116: 279-283.

Jansen, E.F., and Balls, A.K. 1941. Chymopapain A : new crystalline proteinase from papaya latex. J. Biol. Chem. 18: 320-324.

Jone, J.G., and Mercier, P.L. 1974. Refined papain. Process Biochem 9(6): 21-24.

Kang, C.K., and Warner, W.D. 1974. Tenderization of meat with papaya latex proteases. J. Food Science. 39: 812-818.

Khan, I.U., and Polgar, 1. 1983. Purification and characterization of a novel proteinase, chymopapain S. Biochim. Biophys. Acta. 760: 350-356.

Kimmel, J.R., and Smith, E.L. 1954. Crystalline papain. J. Biol. Chem. 207: 515-576.

Klein, I.B., and Kirsch, J.F. 1969. The activation of papain and the inhibition of the active enzyme by carbonyl

reagents. J. Biol. Chem. 244: 5928.

Kunimitsu, D.K., and Yasunobu, K.T. 1967. Chymopapain. IV. specificity and activation. J. Biol. Chem. 207: 515-523.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227:680-685

Lowe, G. 1975. The cysteine proteinases. Tetrahedron 32: 291-302.

Lynn, 1979. A purification and some properties of two protease from papaya latex. Biochimica et Biophysica Acta. 569:193-201.

Madrigal, L., Ortiz, A., Fernandez, R., and Cooke, R.D. 1980. The dependent of crude papain yields on different collection('tapping') procedure for papaya latex. J. Sci.Food.Agric. 31: 279-285.

Morihara, K. 1967. Chemical nature of the active site of papain. I. inhibition by carbonyl reagents with active methylene groups. J. Biochem. 62: 250-254.

Ortiz, A., Madrigal, L., Fernandez, R., and Cooke, R.D. 1980. The storage and drying characteristics of papaya (*Carica papaya* L.)latex. J. Sci.Food.Agric. 31: 510-514.

Ozawa, K., Ohnishi, T., and Tanaka, S. 1962. Activation and inhibition of papain. J. Biochem. 51: 372-373.

Peter, M.S., and Timmerhaus, K.D. 1980. Plant design and economics for chemical engineers. 3rd eds. USA. Mc Graw-Hill Book Company.

Polgar, L. 1981. Isolation of highly active papayapeptidase A and B from commercial chymopapain. Biochimica et

Biophysica Acta. 658: 262-269

_____. 1984. Problems of classification of papaya latex proteinases. Biochemical Journal 221: 555-556.

Poulter, N.H., and Caygill, J.C. 1985. Production and utilization of papain-a proteolytic enzyme from *Carica papaya* L. Trop. Sci. 25: 123-137.

Reisfeld, R.A., Lewis, U.J., and Williams, D.E. 1962. Nature 195: 281-283.

Smith, E.L. and Kimmel, J.R. 1960. Papain, in The Enzyme Vol. 4 (Boyer, P.D., Lardy, H., and Myrback, K., eds.) pp. 133 New York: Academic Press.

_____. and Parker, M.J. 1958. J. Biol. Chem. 233: 1387-1389.

Sluyterman, L.A.E. 1967a. The activation reaction of papain. Biochim Biophys. Acta. 139: 430-438.

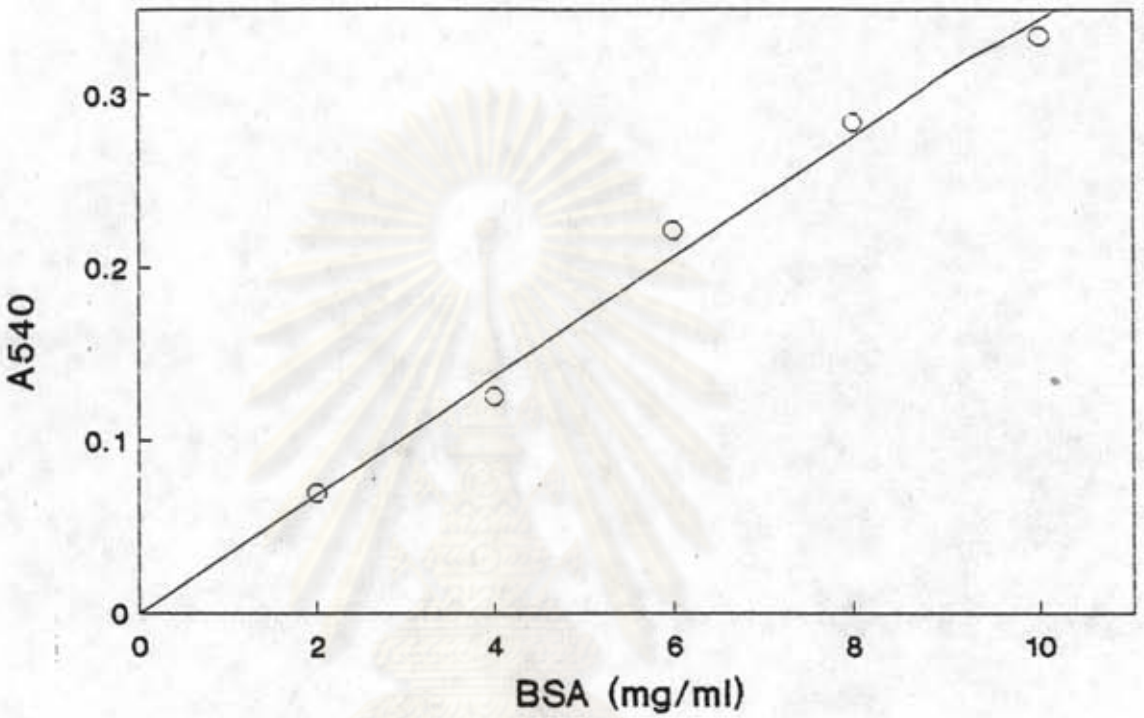
_____. 1967b. Reversible inactivation of papain by cyanate. Biochim. Biophys. Acta. 139: 439.

Ward, O.P. 1985. Comprehensive Biotechnology. Vol. 3. (Moo Yang, M., ed.) Oxford. New York. Toronto. Sydney. Frankfurt: Pergamon Press.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

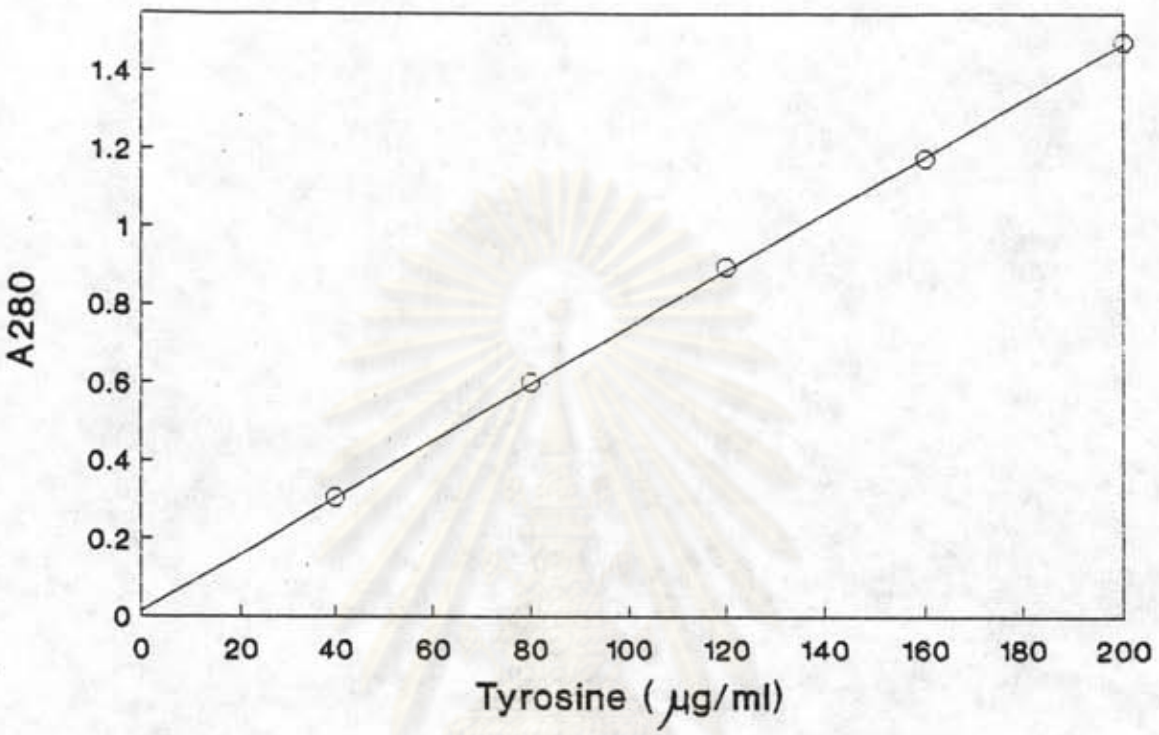
ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานสารละลาย BSA สำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีของไบยูเรต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวกที่ 2 กราฟมาตรฐานของไทโรซีนสำหรับการวัดโปรติเอสแอคติวิตี เมื่อใช้เคซีนเป็นสับสเตรต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ 3

การคำนวณแอคติวิตีของเอนไซม์โดยใช้ BAPNA เป็นสับสเตรต

- จากกฎของเบียร์และแลมเบิร์ต (Beer and Lambert's law) ที่กล่าวไว้ว่า " ค่าแอบซอร์แบนซ์ของสารละลายจะเป็นปฏิภาคโดยตรงกับความเข้มข้น "

$$A = \epsilon bc \qquad \text{หรือ} \qquad \epsilon = A/bc$$

โดย A = ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance)

ϵ = molar extinction coefficient หรือ molar absorptivity

b = ความกว้างของเซลล์ (เซนติเมตร)

c = ความเข้มข้น (โมลาร์)

แต่ ϵ ของ p-nitroaniline ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร = 8,800

ความกว้างของเซลล์(คิวเวทท์)ที่ใช้ = 1 เซนติเมตร

เพราะฉะนั้นแล้ว

p-nitroaniline 1 โมลาร์($1x10^6$ ไมโครโมล) จะมีค่า A_{410} = 8,800

หรือ ค่า A_{410} ที่เพิ่มขึ้น $8.8x10^{-3}$ หน่วย มีค่าเทียบเท่ากับปริมาณของ p-nitroaniline ที่เกิดขึ้น 1 ไมโครโมล

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ = ปริมาณของ p-nitroaniline ที่เกิดขึ้น 1 ไมโครโมล ต่อ 1 นาที ที่ 50 องศาเซลเซียส

แต่ ความเร็วของปฏิกิริยา(V) = หน่วยเอนไซม์ต่อมิลลิกรัมโปรตีนของเอนไซม์

ดังนั้น ความเร็วของปฏิกิริยา(V) = $a / 8.8x10^{-3} (y)(z)$

โดย $a = A_{410}$ ที่วัดได้

y = เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา (นาที)

z = ปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา (มิลลิกรัม)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ 4

การประมาณการต้นทุนในการผลิตยางมะละกออบแห้ง

จากผลการทดลอง การผลิตยางมะละกออบแห้งโดยใช้ยางมะละกอพันธุ์แขกดำและใช้ข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์ต้นทุนการผลิตยางมะละกออบแห้ง ดังต่อไปนี้

กำหนดขนาดกำลังการผลิต = 500 กก. ยางมะละกอสดต่อวันหรือ 135 กก.ยางมะละกอแห้ง (ผลผลิตของยางมะละกอแห้ง = 27% ของน้ำยางมะละกอสด)

ขั้นตอนการผลิต

ยางมะละกอสด ⟶ อบแห้ง ⟶ บรรจุ

ประมาณการค่าใช้จ่าย

1. น้ำยางมะละกอสด 500 กก.

ราคารับซื้อ 500 บาทต่อกก. รวม = 250,000 บาท

2. ตู้อบ

2.1 ราคา

ปริมาตรน้ำยางมะละกอสดที่อบแห้งประมาณ 500,000 ซม.^{3}

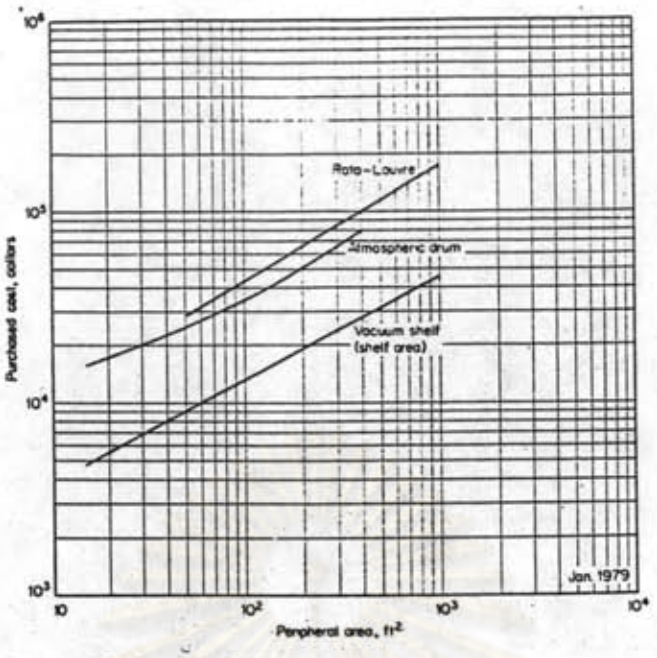
ความหนาของน้ำยางมะละกอระหว่างอบประมาณ 0.1 ซม.

ดังนั้น พื้นที่ผิวของการอบแห้ง = 5,000,000 ซม.^{2} หรือ 5,555.5 ฟุต^2

ลักษณะของตู้อบที่ใช้จะเป็นแบบตู้อบที่เป็นชั้นๆและเป็นระบบสูญญากาศ จำนวน 5 ตู้ โดยมีจำนวนชั้นต่อตู้อย่างน้อย 15 ชั้น

เพราะฉะนั้น พื้นที่ของตู้อบต่อชั้น = 5,555.5/(5x15) = 74 ฟุต^2 หรือประมาณ 80 ฟุต^2

ราคาของเครื่องอบแห้งแบบ vacuum shelf ที่มี shelf area = 80 ฟุต^2 ประมาณ 13,000 US.dollar. เมื่อ คศ. 1979 (Peter และ Timmerhaus,1980) เทียบเป็นราคาของปีปัจจุบัน คือ คศ.1993โดยมีการขึ้นราคาเครื่องมือปีละ 5%



ที่มา : Peter และ Timmerhaus, 1980

$p = s(1+i)^n$ โดย p = ราคาปัจจุบัน

$p = 13,000(1+0.05)^{14}$ s = ราคาในอดีต

$= 25,738.7$ i = อัตราดอกเบี้ย

n = จำนวนปี

ดังนั้น ราคาปัจจุบันของตู้อบ = 25,738.7 US.dollar หรือ 643,467.5 บาท

ราคาตู้อบทั้ง 5 ตู้ = 643,467.5x5 = 3,217,337.5

แต่ กำหนดอายุการใช้งานของตู้อบ = 10 ปี และมีราคาซากประมาณ 7%

หรือมีราคาซาก = 225,213.6 บาท

ค่าเสื่อมราคาต่อวัน(แบบเส้นตรง) = (ราคาตู้อบ - ราคาซาก)/จำนวนวัน

= (3,217,337.5-225,213.6)/(365x10)

= <u>819.75 บาท</u>

2.2 <u>พลังงานที่ใช้</u>

ปริมาณน้ำที่ต้องระเหย = 500X(1.00-0.27) = 365 กก.

ความร้อนที่ทำให้น้ำอุณหภูมิ 30 ^{o}C มีอุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 100 ^{o}C เท่ากับ Q_1

โดย $Q_1 = mc(t_2-t_1)$, m = มวลของสาร

c = ค่าเฉลี่ยความจุความร้อนจำเพาะของน้ำ

เท่ากับ 4,196.95 $J.kg^{-1}.K^{-1}$

แทนค่าได้ $Q_1 = (365)(4196.95)(100-30)$

$= 107,232.06$ kJ

ค่าความร้อนแฝงของการกลายเป็นไอของน้ำ = 2,257 kJ/kg

ความร้อนที่ใช้ในการเปลี่ยนน้ำ 100^{o}C ให้กลายเป็นไอ เท่ากับ Q_2

และ $Q_2 = 2,257x365 = 823,805$ kJ

เพราะฉนั้น ความร้อนที่ใช้ในการระเหยน้ำทั้งหมด $= Q_1+Q_2$

$= 107,232.06+823,805$

$= 931,037$ kJ

(1 kWh = $3.6x10^3$ kJ) $= 255.62$ kWh

ประมาณว่า พลังงานที่สูญเสียในระหว่างกระบวนการผลิต(energy loss) เช่น ความร้อนในการทำให้ตู้อบ, shelf ร้อน, ปั๊มพ์ เป็นต้น ประมาณ 30% ของพลังงานที่ใช้ในการระเหยน้ำ เท่ากับ (255.62x0.3) = 76.69 kWh

ดังนั้น พลังงานที่ใช้ทั้งหมดประมาณ 255.62+76.69 = <u>332.31 kWh</u>

อัตราค่าไฟฟ้า เท่ากับ 2.50 บาทต่อ 1 kWh

คิดเป็นค่าไฟฟ้า = (332.31x2.50) = <u>830 บาท</u>

3. **ค่าแรงงาน**

จำนวนคนงานประมาณ 8 คน ค่าแรงงานวันละ 120 บาท = <u>960 บาท</u>

4. **อื่นๆ**

เช่น น้ำ, ภาชนะบรรจุ, อื่นๆ ประมาณ <u>5,000 บาทต่อวัน</u>

ต้นทุนในการผลิตยางมะละกอแห้ง = (250,000+819.75+830+960+5,000)

= 257,609.75 บาทต่อ 135 กก.

= 1908.22 บาทต่อกก.

ราคาขายของยางมะละกอออบแห้ง

จาก Sigma Chemical Company(1993) ราคายางมะละกอออบแห้งจากแอฟริกา (P.3250)เท่ากับ 125.95 US.dollar/kg หรือ 3,148 บาทต่อกก.

ดังนั้น ต้นทุนการผลิตยางมะละกอออบแห้ง = (1,908.22/3,148.00)x100

= 60.6 % ของราคาขาย

การประมาณการค่าใช้จ่ายในการทำให้เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์

ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ คือ ปาเปนในรูปของ lyophilized powder ที่ได้จากการตกตะกอนด้วย NaCl และมีปริมาณโปรตีนประมาณ 80% ราคาขาย จาก Sigma Chemical Company 1993 (P.4762) = 180.7 US.dollar/g (4517.5 บาทต่อกรัม) หรือ 135.52 บาทต่อ 30 มิลลิกรัม

ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์

- ยางมะละกอสด
- บั่นแยกเอาของแข็งออก
- ตกตะกอนด้วย $(NH_4)_2SO_4$ และ NaCl
- ไดอะไลซิส
- ผ่าน เซฟาเดกซ์ จี-50
- ตกตะกอนด้วย NaCl
- Lyophilization

ประมาณการค่าใช้จ่าย

จากการทดลองเมื่อใช้ยางมะละกอเริ่มต้น 50 กรัมหลังจากผ่านขั้นตอนในการทำให้บริสุทธิ์จะได้เอนไซม์ปาเปนที่มีปริมาณโปรตีนประมาณ 24 มิลลิกรัม และถ้าทำการตกตะกอนด้วย NaCl และนำ lyophilized แล้วควรจะได้ lyophilized powderประมาณ 30 มิลลิกรัม(คำนวณจากปริมาณโปรตีน 80%)

1. ยางมะละกอ

ใช้น้ำยางมะละกอ 50 กรัม (ราคา 500 บาทต่อกก.) ราคาประมาณ 25 บาท

2. สารเคมี

$(NH_4)_2SO_4$ ใช้ประมาณ 20 กรัม (ราคา 300 บาทต่อกก.)= 6 บาท

NaCl และสารอื่นๆ = 10 บาท

รวมค่าสารเคมีที่ใช้ = 16 บาท

3. dialysis tube

ราคาของ dialysis tube(D 9777) ความยาว 100 ฟุต (Sigma Chemical Company 1993) = 57.80 US.dollar

หรือ เท่ากับ 1,445 บาทต่อ 100 ฟุต

ความยาวที่ใช้ต่อครั้ง = 0.5 ฟุต หรือเท่ากับ 7.25 บาท

4. เซฟาเดกซ์ จี-50

ปริมาณของเซฟาเดกซ์ จี-50 ที่ใช้ = 30 กรัม

ราคาของ เซฟาเดกซ์ จี-50 (G-50-150 จาก Sigma Chemical Company 1993) เท่ากับ 475 US.dollar/500g หรือ 23.75 บาทต่อกรัม

แต่ เซฟาเดกซ์ จี-50 สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้เรื่อยๆ(ประมาณ 10 ครั้ง)

เพราะฉนั้น ค่าใช้จ่ายต่อครั้ง = (23.75x30)/10 = 71.25 บาท

ดังนั้น ค่าใช้จ่ายในการทำให้บริสุทธิ์โดยประมาณ(ไม่รวมค่าเครื่องมือ) เท่ากับ

(25+16+7.25+71.25) = 119.5 บาท ต่อ ปาเปนบริสุทธิ์ 30 มิลลิกรัม

แต่ในการทดลองจะได้ เอนไซม์ที่คาดว่าเป็นเอนไซม์ไคโมปาเปนด้วย โดยมีปริมาณโปรตีน 118.82 มิลลิกรัมและมีแอคติวิตีต่อ BAEE ที่ 50 °C ประมาณ 80 units/มิลลิกรัม

โดย 1 unit = ปริมาณ BAEE ที่ถูกไฮโดรไลซ์ 1 ไมโครโมลต่อนาที ที่ 50 °C

จาก Sigma Chemical Company(1993) เอนไซม์ไคโมปาเปนจากยางมะละกอ ที่อาจมีการปนเปื้อนของปาเปน, ไลโซไซม์ และปาปายา เพปติเดส เอ (C. 9007) มีราคา 41.30 US.dollar ต่อ 5,000 units

โดย 1 unit = ปริมาณ BAEE ที่ถูกไฮโดรไลซ์ 1 ไมโครโมลต่อนาที ที่ 25 °C

จากผลการทดลอง ผลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตี พบว่า ที่อุณหภูมิ 25 °C เอนไซม์ที่คาดว่าเป็นเอนไซม์ไคโมปาเปนจะมีแอคติวิตีประมาณ 40%ของที่อุณหภูมิ 50 °C

ดังนั้น แอคติวิตีของเอนไซม์ที่คาดว่าเป็นเอนไซม์ไคโมปาเปน ที่ 25 °C มีค่าเท่ากับ 32 units/มิลลิกรัม

และคิดเป็นแอคติวิตีทั้งหมด = (118.82x32)

= 3,800 units

แอคติวิตีของเอนไซม์ไคโมปาเปน 3,800 units เมื่อเทียบกับ C 9007 จาก Sigma Chemical Company(1993) มีราคา = (3,800/5,000)x41.30

= 31.40 US.dollar หรือ 785.00 บาท

ดังนั้น ในการทำให้เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์จะใช้ค่าใช้จ่ายในการทำให้บริสุทธิ์โดยประมาณ (ไม่รวมค่าเครื่องมือ) เท่ากับ 119.5 บาท แต่จะได้เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์และเอนไซม์ไคโมปาเปนที่มีมูลค่าประมาณ 920.52 บาท (135.52+785.00)

การคาดคะเนรายได้ของเกษตรกรที่ปลูกมะละกอและกรีดยางมะละกอ

ราคาขายส่งมะละกอพันธุ์แขกดำ กิโลกรัมละ 5-8 บาท (ราคารับซื้อของโรงงานผลไม้อบแห้ง

และผลไม้กระป๋อง)

น้ำหนักผลมะละกอพันธุ์แขกดำ เฉลี่ยประมาณ 1.5 กิโลกรัม

ดังนั้น รายได้จากการขายผลมะละกอ = 7.5-12 บาท

ราคารับซื้อน้ำยางมะละกอสด กิโลกรัมละ 500 บาท หรือ 0.50 บาทต่อกรัม

น้ำหนักน้ำยางมะละกอสดที่กรีดได้ต่อผล ประมาณ 10-15 กรัม

เพราะฉะนั้น รายได้จากการขายน้ำยางมะละกอ = 5-7.5 บาท

นั่นคือ รายได้จากการขายน้ำยางมะละกอ มีสัดส่วนที่สูงถึงประมาณ 40-100% ของรายได้จากการขายผลมะละกอ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน

นาย ทวีศักดิ์ วุฒิเวียงธรรม เกิดวันที่ 18 มกราคม พ.ศ. 2512 ที่อำเภอ เมือง จังหวัดชลบุรี สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขา เทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัย ขอนแก่น ในปีการศึกษา 2532 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อ พ.ศ. 2533

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย