หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

มะละกอ เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ คาริคาซีอี (Family Caricaceae) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า Carica papaya Linn. เป็นพืชล้มลุกที่มีช่วงอายุสั้น มีระบบรากเป็นระบบรากแก้ว ลำต้นมีลักษณะอวบน้ำและไม่มีแกนกลาง ใบมะละกอเป็นลักษณะใบเดี่ยว กว้างประมาณ 25-75 ซม. แผ่นของใบจะมีแฉก 7-11 แฉก ก้านใบเป็นท่อกลวง เปราะหักง่าย ออกดอกและติดผลตามบริเวณปลายยอดของลำต้น มะละกอ มีแหล่งกำเนิดดั้งเดิมอยู่ในประเทศในแถบเขตร้อนของอเมริกาและอเมริกากลาง ต่อมาจึงได้แพร่หลายออกไปอย่างรวดเร็วทั่วโลก สำหรับในประเทศไทย ได้มีการปลูกมะละกอกันมานานแล้ว แต่ไม่มีหลักฐานยืนยันว่าเริ่มปลูกกันในสมัยใด ส่วนในปัจจุบันได้มีการปลูกเป็นสวนขนาดใหญ่ในหลายๆจังหวัด เช่น นครราชสีมา, นครปฐม, ระยอง, ราชบุรี, ชุมพร, สระบุรี เป็นต้น (ทวีเกียรติ์ ยิ้มสวัสดิ์, 2527) สายพันธุ์ที่มีการปลูกกัน เช่น พันธุ์แขกดำ , พันธุ์โกโก้, พันธุ์จำปาดะ, พันธุ์สายน้ำผึ้ง , พันธุ์ไซโล และ พันธุ์พื้นเมือง โดยเฉพาะพันธุ์แขกดำ จะเป็นพันธุ์ที่นิยมปลูกกันมากที่สุดและเป็นที่ต้องการของตลาด เนื่องจาก มีลักษณะเป็นมะละกอต้นเตี้ย มีก้านใบสีเขียว สั้น แข็งแรง ใบหนากว่ามะละกอพันธุ์อื่นๆ ผลมีขนาดพอเหมาะ ทั้งส่วนหัวและส่วนท้ายมีขนาดเกือบเท่ากัน เปลือกหนาสีเขียวเข้ม ผลดิบมีน้ำหนักประมาณ 500-750 กรัมต่อผล เนื้อแน่นแข็งกรอบ ชาวสวนส่วนใหญ่จะเก็บผลขณะที่ยังอ่อนเพื่อส่งขายเป็นมะละกอสำหรับบริโภคดิบโดยจะนำไปทำส้มตำ ผลมะละกอสุกจะมีรสหวาน มีสีแดง เมล็ดน้อยและช่องว่างภายในผลแคบ มักนิยมใช้รับประทานแบบผลไม้สุก โดยจะรับประทานเป็นอาหารเช้า ของว่าง และเป็นส่วนผสมในสลัดผลไม้ อีกทั้งยังสามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการแปรรูปเช่น ใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตซีอสมะเขือเทศและซีอสพริก, ใช้ในการผลิตผลไม้กระป๋อง, มะละกอผง, มะละกอเชื่อม และมะละกออบแห้ง เป็นต้น ผลมะละกอสุกมีคุณค่าทางอาหารสูง ประกอบด้วย น้ำ 88 เปอร์เซนต์, น้ำตาล 10 เปอร์เซนต์ , โปรตีน 0.5 เปอร์เซนต์ , ไขมัน 0.1 เปอร์เซนต์ , กากและเส้นใย 1.3 เปอร์เซนต์ และ

กรด 0.1 เปอร์เซนต์ นอกจากนี้ยังมีวิตามินและเกลือแร่ที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายสูงมากคือ ในมะละกอสุก 100 กรัมจะมีวิตามิน เอ 2,000-3,000 หน่วยสากล, ไทอะมิน 15-64 ไมโครกรัม, ไรโบฟลาวิน 28-83 ไมโครกรัม, ไนอะซิน 0.15 - 0.76 ไมโครกรัมและกรดแอสคอบิค 33-136 ไมโครกรัม นอกจากนั้นส่วนอื่นๆของมะละกอยังสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อีก เช่น เปลือกมะละกอสุก จะใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ หรือ ใช้สกัดเป็นสีผสมอาหาร , ราก และก้านใบใช้เป็นยาขับปัสสาวะและยาถ่ายพยาธิ, ยอดหรือลำต้นใช้เป็นอาหารสัตว์ , ใบ จะมีสารประกอบอัลคาลอยด์ ที่ชื่อ คาร์เปน (Carpain) ที่ใช้ในการรักษาโรคหัวใจ, เมล็ด จะมีน้ำมันที่สามารถบริโภคได้(edible oil) เป็นส่วนประกอบถึง 25 เปอร์เซนต์ (Jone และ Mercier, 1974) และยางมะละกอ ซึ่งจะมีเอนไซม์โปรติเอสชนิดหนึ่งที่เรียกกันว่า "ปาเปน" (Papain)

โปรติเอส(Protease) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีน พบทั้งในสัตว์, พืช และจุลินทรีย์ โดยโปรติเอสมีอยู่มากมายหลายชนิด ซึ่งจะมีลักษณะที่แตกต่างกันทางด้าน ความจำเพาะต่อสับสเตรต, กลไกในการเร่งปฏิกิริยา, ลักษณะของบริเวณเร่ง, สารยับยั้งและสารเร่งปฏิกิริยา , ลำดับของกรดอะมิโนในโมเลกุล , ช่วง pH และอุณหภูมิในการทำงาน, น้ำหนักโมเลกุล เป็นต้น ดังนั้น จึงมีการจัดแบ่งกลุ่มของโปรติเอสไว้หลายวิธี เช่น จัดแบ่งตามแหล่งกำเนิด คือ จากสัตว์, พืช และจุลินทรีย์ หรือ จัดแบ่งตามลักษณะการย่อยสลายพันธะเพปไทด์บนสายโพลีเพปไทด์ คือ การย่อยสลายพันธะเพปไทด์จากปลายสาย (exopeptidase)และการย่อยสลายพันธะเพปไทด์อย่างอิสระภายในสายโพลีเพปไทด์ (endopeptidase) หรือ จัดแบ่งตามลักษณะของบริเวณเร่งของเอนไซม์ ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ชนิด คือ (Enzyme Nomenclature,1972)

1. <u>ซีรีน โปรติเอส</u> (Serine protease)

เอนไซม์ในกลุ่มนี้จะมีกรดอะมิโน ซีรีน และฮิสติดีน อยู่ที่บริเวณเร่ง นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อยได้อีก คือ

1.1 อัลคาไลน์ โปรติเอส (Alkaline protease) เอนไซม์ในกลุ่มนี้เป็นพวก

endopeptidase มี pH ที่เหมาะสมในการทำงานที่ pH สูงกว่า 7 เช่น Subtilisin เป็นต้น

1.2 โปรติเอสที่มีคุณสมบัติคล้ายทริปซิน (Trypsin-like protease) เช่น ทริปซิน และ ไคโมทริปซิน เป็นต้น

2. <u>เมทัลโล โปรติเอส</u> (Metallo-protease)

เอนไซม์ในกลุ่มนี้จะมีอิออนของโลหะอยู่ที่บริเวณเร่ง(active site) ตัวอย่าง เช่น Thermolysin ซึ่งมีอิออนของสังกะสี(Zn^{2+}) ที่บริเวณเร่ง ดังนั้น เอนไซม์กลุ่มนี้จะถูกยับยั้งด้วยสารพวก metal chelating agents เช่น EDTA, 1,10 phenanthroline มี pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานในช่วง pH ที่เป็นกลาง (pH 6.5-7.5) นั่นคือ เป็นนิวทรัล โปรติเอส

3. <u>แอซิด โปรติเอส</u> (Acid protease) หรือ แอสปาร์ติค โปรติเอส(Aspartic protease)

เอนไซม์ในกลุ่มนี้จะมีกรดอะมิโน แอสปาร์เทต อยู่ที่บริเวณเร่ง และสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH 2-5 ตัวอย่างเช่น เรนนิน, เปปซิน เป็นต้น

4. <u>ไทออล โปรติเอส</u> (Thiol protease) หรือ ซิสเตอีน โปรติเอส(Cysteine protease)

เอนไซม์ในกลุ่มนี้จะมีกรดอะมิโน ซิสเตอีน อยู่ที่บริเวณเร่ง ตัวอย่างเช่น ไฟซิน (Ficin), โบรมิเลน (Bromilain) และ ปาเปน (Papain) ซึ่งคุณสมบัติของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดแสดงในตารางที่ 1

คำว่า "ปาเปน"ได้มีการนำมาใช้เป็นครั้งแรกเพื่ออธิบายคุณสมบัติของน้ำยางมะละกอที่สามารถย่อยสลายโปรตีนได้ โดย Wurt และ Bouchet เมื่อปี ค.ศ. 1879 ต่อมามีการใช้คำนี้ในความหมายของน้ำยางมะละกอที่ถูกทำให้แห้ง หรือ ตะกอนของโปรตีนที่ได้จากการตก

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. คุณสมบัติต่างๆของเอนไซม์ปาเปน, ไบรมิเลน และไฟซิน 4
2. คุณสมบัติต่างๆของเอนไซม์ปาเปน, ไคโมปาเปน และปาปายา เพปติเดส เอ ... 6
3. แสดงแอคติวิตีของน้ำยางมะละกอสดและยางมะละกอที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียส 32
4. ผลของการตกตะกอนสารละลายยางมะละกอด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว และเกลือโซเดียมคลอไรด์ 35
5. แสดงผลของการทำให้เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์จากน้ำยางมะละกอพันธุ์แขกดำ ในขั้นตอนต่างๆ 44
6. แสดงค่า K_m และ V_{max} ต่อสับสเตรตธรรมชาติของเอนไซม์ปาเปนที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วและสารละลายเอนไซม์ใน peak B ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ... 65
7. แสดงค่า K_m และ V_{max} ต่อสับสเตรตสังเคราะห์ของเอนไซม์ปาเปนที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วและสารละลายเอนไซม์ใน peak B ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ... 65

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

มล	=	มิลลิลิตร
A	=	Absorbance
BAEE	=	N-∝-Benzoyl-L-arginine ethyl ester
BAPNA	=	N-∝-Benzoyl-DL-arginine p-nitroaniline
BTEE	=	N-∝-Benzoyl-L-tyrosine ethyl ester
BSA	=	Bovine Serum Albumin
CDU	=	Casein Digestion Unit
EDTA	=	Ethylene diaminetetraacetic acid
KMS	=	Potassium metabisulfite
K_m	=	Michaelis-Menten constant
mg	=	milligram
mM	=	millimolar
PMSF	=	Phenylmethylsulfonylfluoride
ppt.	=	precipitate
prot.	=	protein
sp. act.	=	specific activity
TEMED	=	Tetramethylethylenediamine
V_{max}	=	Maximum velocity
ϵ	=	Molar extinction coefficient

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอนไซม์	ปาเปน	โบรมิเลน	ไฟซิน
enzyme commission(E.C.)	3.4.4.10	3.4.4.24	3.4.4.12
แหล่งที่มา	Carica papaya	Bromiliaceae spp.	Ficus carica
pH ที่เหมาะสมในการทำงาน	5-8	5-8	5-8
อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงาน	60-75	50	60
ความจำเพาะต่อการตัดพันธะเพปไทด์ระหว่างกรดอะมิโน	กว้าง	อะโรมาติค	อะโรมาติค
สารยับยั้ง	ทั้งสามชนิดถูกยับยั้งด้วยสารออกซิไดซ์ ซัลไฟดริลและโลหะหนัก		
สารกระตุ้น	สารรีดิวซ์, สารประกอบไทออล และ ซิสเตอีน		
ความสำคัญในอุตสาหกรรม	มาก	ปานกลาง	น้อย

ที่มา : Ward (1983)

ตารางที่ 1 คุณสมบัติต่างๆของเอนไซม์ ปาเปน, โบรมิเลน และไฟซิน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตะกอนสารละลายยางมะละกอด้วยเกลือหรือสารละลายอินทรีย์ที่ถูกทำให้แห้ง แต่ต่อมาภายหลังพบว่า ในน้ำยางมะละกอยังมีโปรติเอสชนิดอื่นอยู่อีก คือ ไคโมปาเปน เอ (Chymopapain A) , ไคโมปาเปน บี(Chymopapain B) และปาปายา เพปติเดส เอ(Papaya peptidase A) ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้ล้วนแต่มีคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนเช่นเดียวกับเอนไซม์ปาเปน (Jansen และ Balls, 1941 ; Kunimitsu และ Yasunobu, 1967) โดยที่โปรติเอสแต่ละชนิดที่มีอยู่ในน้ำยางมะละกอจะมีคุณสมบัติต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 2

จากตารางที่ 2 พบว่า คุณสมบัติต่างๆของไคโมปาเปน เอ และ บี จะมีลักษณะที่ใกล้เคียงกันมาก ดังนั้น ในบางครั้งจึงมักเรียกรวมเอาไคโมปาเปน เอ และ บี ว่า ไคโมปาเปน (Chymopapain) เพียงอย่างเดียวและในภายหลังเมื่อพบว่า ในน้ำยางมะละกอมีโปรติเอสชนิดอื่นอีกนอกจากเอนไซม์ปาเปน จึงมีการจำแนกเอนไซม์ (Commission of Enzyme) โดยให้เอนไซม์ไคโมปาเปน มีชื่อตามรหัสเป็น E.C. 3.4.22.6 และเอนไซม์ปาเปนมีชื่อตามรหัสเป็น E.C. 3.4.22.2 (Khan และ Polgar, 1983) อีกทั้งยังเกิดความสับสนกันระหว่าง ปาเปน ในความหมายของโปรติเอสทั้งหมดในยางมะละกอ (ความหมายเดิม) กับ ปาเปน ในความหมายของโปรติเอสชนิดหนึ่งในยางมะละกอ (ความหมายใหม่) ดังนั้น จึงตั้งข้อสังเกตในการพิจารณาได้ง่ายๆ คือ ถ้าเป็นการกล่าวถึง ปาเปน ในทางอุตสาหกรรมอาหาร , เครื่องดื่ม หรือในทางเกษตรกรรม จะหมายถึง ปาเปน ในความหมายเดิม แต่ถ้าหากว่าเป็นการกล่าวถึง ปาเปน ในทางการแพทย์หรือทางชีวเคมี ก็มักจะหมายถึง ปาเปน ในความหมายใหม่ และถ้านอกเหนือจากกรณีที่กล่าวมาแล้ว ก็มักจะมีการระบุเอาไว้โดยเป็นการเฉพาะ หรืออาจจะใช้คำอื่นแทน ปาเปน ในความหมายเดิม เช่น Papaya latex , Papaya latex proteases Papaya latex proteinases, Crude papain เป็นต้น

<u>คุณสมบัติของเอนไซม์ปาเปน</u>

เอนไซม์ปาเปน เป็น สายโพลีเพปไทด์สายเดี่ยวที่เกิดขึ้นจากการเรียงตัวกันของกรดอะมิโนจำนวน 212 ตัว ซึ่งในจำนวนนั้นจะเป็นกรดอะมิโน ซิสเตอีน จำนวน 7 ตัว โดยที่กรด

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คุณสมบัติ	Papain	Chymopapain		Papaya peptidase A
		Chymo A	Chymo B	
pI	8.75	10.1	10.4	> 11
น้ำหนักโมเลกุล	20,700-24,000	36,400±1,500	34,500±1,500	N.A.
จำนวนหมู่ -SH ในโมเลกุล	1 SH	2 SH	2 SH	1 SH
กรดอะมิโนที่ปลายด้าน N ของสายโพลีเพปไทด์	ไอโซลิวซีน	กรดกลูตามิค	ไทโรซีน	ลิวซีน
extinction coeff. at280nm	25.0	18.7	18.4	N.A.
sedimentation coeff. ($S_{20,w}$)	2.42±0.04s	2.71s	2.82s	N.A.
ลักษณะผลึกที่ได้จากการตกตะกอนด้วย NaCl	N.A.	Rods	Needles	N.A.
ชื่ออื่นๆที่พบ	Papaya peptidase I	Chymopapain S	Chymopapain B_1-B_3	Papaya peptidase II

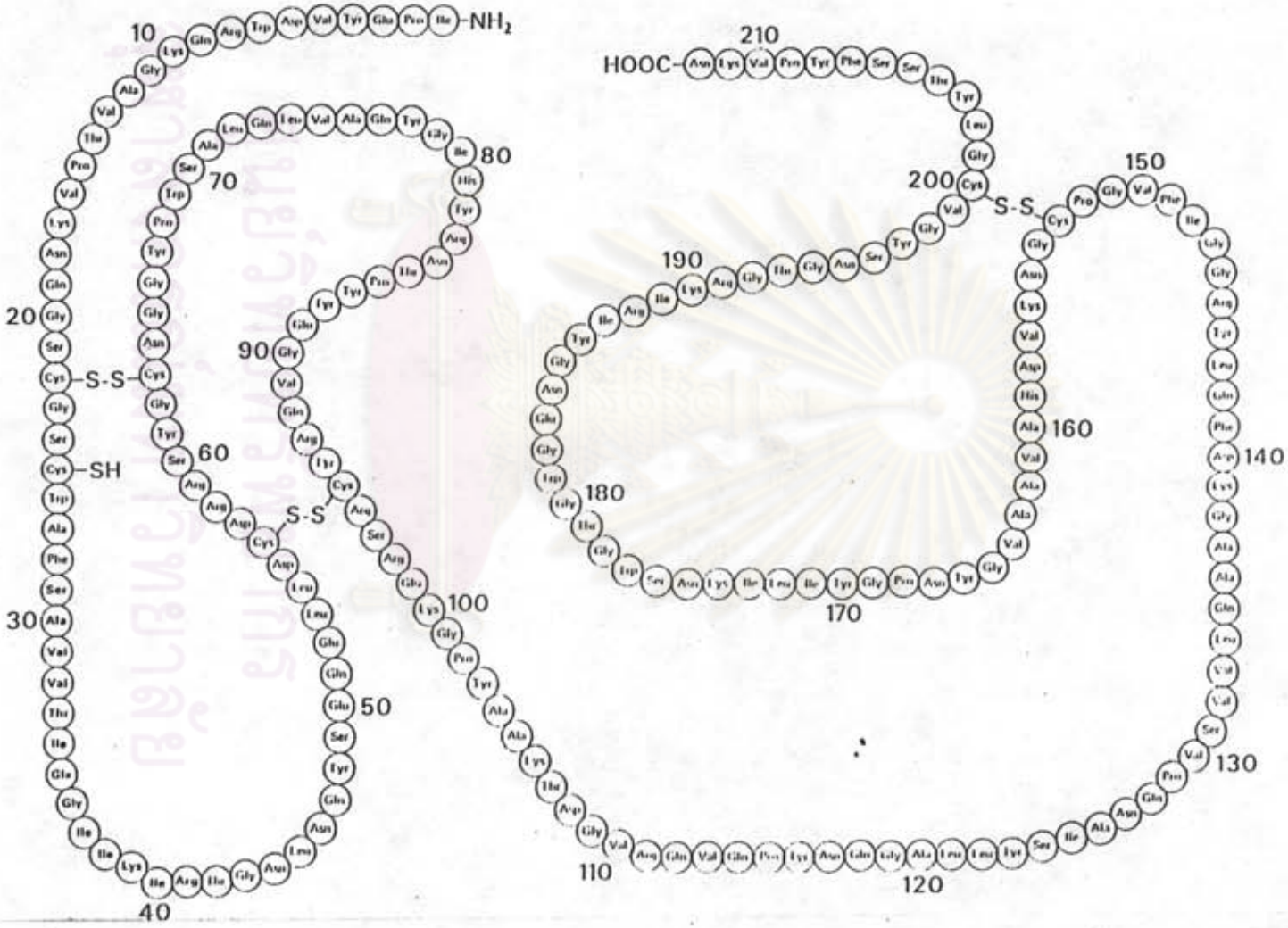
ที่มา : Arnon (1970) ; Lynn (1979) ; Kunimitsu และ Yasunobu (1967)

ตารางที่ 2 คุณสมบัติต่างๆของเอนไซม์ปาเปน,ไคโมปาเปน และปาปายา เพปติเดส เอ

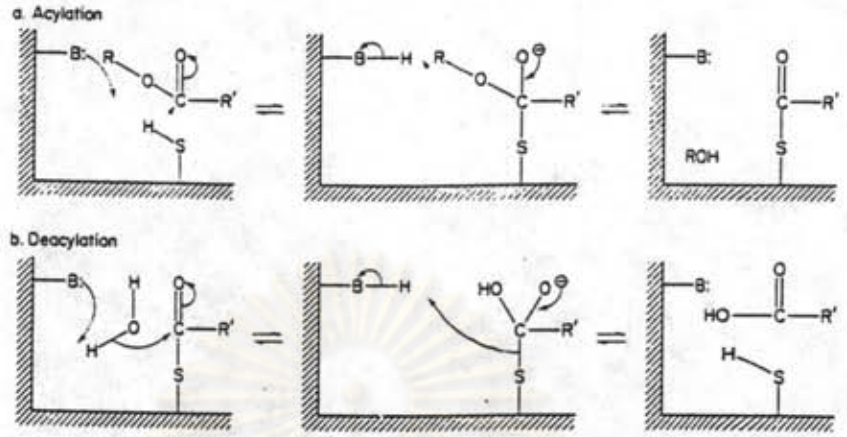
อะมิโนซิสเตอีนจำนวน 6 ตัวจะจับกันเป็นพันธะไดซัลไฟด์ 3 พันธะ และ กรดอะมิโนซิสเตอีนอีก ตัวจะอยู่ที่ตำแหน่งที่ 25 ซึ่งเป็นบริเวณเร่ง (active site) ดังรูปที่ 1(Husain and Lowe , 1970) ปาเปนสามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของโปรตีน, เปปไทด์, เอไมด์ และเอสเทอร์ของกรดอะมิโน เช่น Benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide (BAPNA) , Benzoyl-L-arginine ethyl ester (BAEE) , Benzoyl-L-argininamide เป็นต้น สารเคมีที่เร่งปฏิกิริยา(activator) ส่วนใหญ่จะเป็นพวกสารรีดิวซ์(reducing agent) เช่น ซิสเตอีน,ซัลไฟด์(sulfide), ซัลไฟต์ (sulfite), ไซยาไนด์(cyanide) และสารประกอบไทออล (Arnon, 1970 ; Sluyterman, 1967b) ส่วนสารยับยั้งของเอนไซม์ปาเปนได้แก่ สารประกอบโลหะหนัก เช่น Hg^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+}, Cd^{2+} (Sluyterman, 1967a) , สารประกอบคาร์บอนิล (Morihara, 1967) , diisopropylfluorophosphate(DFP), กรดแอสคอบิค (Ozawa และคณะ, 1962) ส่วนคุณสมบัติและลักษณะอื่นๆของเอนไซม์ปาเปน แสดงไว้ในตารางที่ 2

กลไกการทำงานของเอนไซม์ปาเปน

กลไกในการทำงานของเอนไซม์ปาเปน เรียกว่า "thiol-imidazole system" โดยจะเป็นการทำงานร่วมกันของกรดอะมิโนซิสเตอีนที่ตำแหน่งที่ 25 (Cys-25) กับกรดอะมิโนฮิสติดีนที่ตำแหน่งที่ 159 (His-159) ซึ่งมีระยะห่างระหว่างหมู่ซัลไฟดริลของ Cys-25 กับหมู่อิมิดาโซลของ His-159 เท่ากับ 4.5 อังสตรอม (Lowe, 1975) ทั้งนี้กลไกการทำงานของเอนไซม์ปาเปน แสดงไว้ดังรูปที่ 2



รูปที่ 1 ลำดับของกรดอะมิโนของเอนไซม์ปาเปน (Husain และ Lowe, 1970)



รูปที่ 2 กลไกการทำงานของเอนไซม์ปาเปน (Lowe, 1975)

จากรูปที่ 2 สามารถอธิบายกลไกการทำงานของเอนไซม์ปาเปนได้ดังนี้คือ เอนไซม์ปาเปนจะมีหมู่ซัลไฟดริล (-SH) และหมู่อิมิดาโซลในบริเวณเร่ง โดยให้ B: เป็นหมู่อิมิดาโซล ซึ่งจะทำหน้าที่เป็น general base หมู่อิมิดาโซล(B:) จะดึงไฮโดรเจน อิออน(H^+) ของหมู่ -SH มีผลทำให้ S ในหมู่ -SH เข้าจับกับหมู่คาร์บอนิล(-$\overset{O}{\overset{\|}{C}}$-) ของสับสเตรตได้ง่ายและรวดเร็ว เกิดเป็น enzyme-substrate complex (ES complex) จากนั้นจะเกิดการหลุดของอนุมูล R (R-OH) ออกมา และจะเหลืออีกส่วนเป็น acyl-enzyme ในรูปของ thiol ester (E-S-$\overset{O}{\overset{\|}{C}}$-R)ขั้นตอนนี้เรียกว่า "acylation" ต่อมา E-S-$\overset{O}{\overset{\|}{C}}$-R จะเข้าสู่การ deacylation โดยหมู่อิมิดาโซล(B:) ซึ่งทำหน้าที่เป็นเบส จะแยกไฮโดรเจน อิออน(H^+) จากโมเลกุลของน้ำ ทำให้ไฮดรอกไซด์ อิออน(OH^-) ของน้ำ จะเข้าจับกับหมู่คาร์บอนิล (-$\overset{O}{\overset{\|}{C}}$-) ใน acyl-enzyme ทำให้เกิดการหลุดของหมู่ acyl คือ R-$\overset{O}{\overset{\|}{C}}$-OH ส่วนเอนไซม์ (E-SH) จะกลับคืนสู่สภาพปกติ (Lowe, 1975)

การตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ปาเปนโดยการวัดโปรติเอสแอคติวิตี แบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม (Poulter และ Caygill, 1985) คือ 1) การวัดการไฮโดรไลซ์สับสเตรตสังเคราะห์ เช่น BAEE, BAPNA, BTEE เป็นต้น ซึ่งวิธีนี้จะมีความจำเพาะต่อปฏิกิริยา ให้ผลที่แม่นยำและทำซ้ำได้ง่าย แต่มีค่าใช้จ่ายสูง 2) การวัดการไฮโดรไลซ์โปรตีนธรรมชาติ เช่น เคซีน-แฮมเมอร์สเตน(Casein-Hammersten), ฮีโมโกลบิน วิธีนี้เป็นที่นิยมมากเนื่องจากค่าใช้จ่ายไม่สูงมาก ใช้เวลาน้อยและผลที่ได้ค่อนข้างถูกต้อง 3) การวัดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของโปรตีนเมื่อบ่มกับเอนไซม์เช่น การจับตัวเป็นก้อนของนม(milk clotting) วิธีนี้ทำได้ง่ายและค่าใช้จ่ายต่ำที่สุด แต่ใช้เวลามากและผลการวัดที่ได้ไม่น่าเชื่อถือ เพราะต้องใช้ประสบการณ์ของผู้ทดลองในการตัดสินผล

<u>การแยกเอนไซม์ปาเปนให้บริสุทธิ์</u>

ในยางมะละกอ เอนไซม์ไคโมปาเปน จะเป็นโปรติเอสที่มีอยู่มากที่สุด รองลงมาก็คือ เอนไซม์ปาเปน และเอนไซม์ปาปายา เพปติเดส เอ ตามลำดับ (Khan และ Polgar,1983) ดังนั้น ในการแยกเอนไซม์ปาเปนให้บริสุทธิ์จากยางมะละกอโดยที่ไม่ให้มีโปรติเอสชนิดอื่นปะปนออกมาด้วย จะต้องแยกโดยอาศัยความแตกต่างของลักษณะทางด้านกายภาพและชีวภาพต่างๆ เช่น การตกตะกอนด้วยเกลือซึ่งจะเป็นการแยกโดยอาศัยความแตกต่างในการละลายของโปรตีน โดยที่ไคโมปาเปนจะละลายในสารละลายเกลือได้ดีกว่าปาเปน ดังนั้น ปาเปนจึงตกตะกอนออกมาได้ง่ายกว่า (Arnon, 1970) การแยกด้วยวิธีทางคอลัมน์ โครมาโตกราฟฟี จะอาศัยความแตกต่างทางด้านประจุ, ขนาด, น้ำหนักโมเลกุล, ความจำเพาะต่อสับสเตรตและสารยับยั้ง เป็นต้น Baines และคณะ (1979) ทำการแยกเอนไซม์ปาเปนจากยางมะละกอโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียม ซัลเฟต อิ่มตัว 45 เปอร์เซนต์และ 40 เปอร์เซนต์ตามลำดับ แล้วตกตะกอนต่ออีกครั้งด้วยผลึกโซเดียมคลอไรด์จนมีความเข้มข้นเป็น 10 เปอร์เซนต์ จากนั้นจึงนำไปผ่านคอลัมน์ของ SP-Sephadex-50 Burke และคณะ (1974) ทำการแยกโดยใช้วิธีของ Affinity chromatography โดยตกตะกอนสารละลายของยางมะละกอด้วยผลึกเกลือโซเดียมคลอไรด์จนมีความเข้มข้นเป็น 34 เปอร์เซนต์ แล้วจึงนำไปผ่านคอลัมน์ของ Sepharose 4B ที่มี Gly-

Gly-Tyr(Bzl)-Arg ต่อเชื่อมอยู่ด้วยพันธะโควาเลนต์ Brocklehurst และคณะ (1979) ทำการตกตะกอนสารละลายยางมะละกอด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต อิ่มตัว 40 เปอร์เซนต์และ 35 เปอร์เซนต์ตามลำดับ แล้วจึงใช้วิธี Affinity chromatography โดยใช้คอลัมน์ของ Sepharose-glutathione-L-pyridyl disulphide gel ส่วนรูปแบบของการเคลื่อนที่ของเอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์กับโปรติเอสอื่นในยางมะละกอโดยวิธีคาโทดิค โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟเรซีส แสดงในรูปที่ 3

ประโยชน์ของเอนไซม์ปาเปน

เอนไซม์ปาเปนที่นำมาใช้ในทางอุตสาหกรรม มักจะไม่ใช้เอนไซม์บริสุทธิ์(purified enzyme) แต่จะใช้ในรูปของเอนไซม์ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์บางส่วน (partailly purified enzyme) ยกเว้นแต่ในอุตสาหกรรมเวชภัณฑ์ที่ต้องใช้เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์ มีรายงานการใช้เอนไซม์ปาเปนในอุตสาหกรรมต่างๆคือ ใช้ในอุตสาหกรรมเบียร์ 75 เปอร์เซนต์, อุตสาหกรรมเนื้อสัตว์ 10 เปอร์เซนต์, อุตสาหกรรมปลา 5 เปอร์เซนต์ , อุตสาหกรรมอาหารประเภทอื่นๆ 5 เปอร์เซนต์,อุตสาหกรรมเวชภัณฑ์ 2 เปอร์เซนต์และอื่นๆอีก 3 เปอร์เซนต์ (Flynn,1975) แต่ปริมาณการใช้เอนไซม์ปาเปนในอุตสาหกรรมของแต่ละประเทศจะแตกต่างกัน เช่น ประเทศฝรั่งเศส จะใช้เอนไซม์ปาเปนในอุตสาหกรรมปลาถึง 50 เปอร์เซนต์ของปริมาณการใช้เอนไซม์ปาเปนทั่วประเทศ ในขณะที่ประเทศสหรัฐอเมริกา จะใช้เอนไซม์ปาเปนในอุตสาหกรรมเนื้อสัตว์เป็นส่วนใหญ่

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อุตสาหกรรมเบียร์

จะมีการเติมเอนไซม์ปาเปนลงไปในขั้นตอนของกระบวนการ mashing เพื่อที่จะช่วยในการย่อยสลายโปรตีนในมอลท์ แอดจังค์(malt adjunct) ซึ่งเป็นส่วนผสมของข้าวบาร์เลย์และมอลท์ สำหรับใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเบียร์ โปรตีนที่ถูกย่อยสลายจะกลายเป็นแหล่งของไนโตรเจนของยีสต์ในการหมักเบียร์ นอกจากนี้ยังมีการใช้ในขั้นตอนสุดท้ายของการผลิตเบียร์ โดยมีการเติมเอนไซม์ปาเปนลงไปเพื่อลดปริมาณของโปรตีนในน้ำเบียร์ เป็นการป้องกัน

ที่มา : Polgar(1980)

A = Commercial chymopapain B = Papain

C = Chymopapain A D = Chymopapain B

E = B + C + D

ที่มา : Kang และ Warner(1974)

A = Crude papaya latex

B = Papain

C = Chymopapain

D = Papaya peptidase A

รูปที่ 3 รูปแบบของแถบโปรตีนของเอนไซม์ปาเปนและโปรติเอสอื่นในยางมะละกอจากเอกสารต่างๆ

(Kang และ Warner,1974 ;Polgar,1980)

การเกิดตะกอนในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิต่ำ (chill-haze prevention) หรือ การทำให้เบียร์ใส(chill-proofing) การขุ่นหรือการเกิดตะกอนของเบียร์จะเกิดขึ้นได้เมื่อเก็บเบียร์ที่ผ่านการบ่ม(beer aging) และกรองแยกอนุภาคสารประกอบใหญ่ออกไป แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำๆในระยะเวลาหนึ่งจะเกิดความขุ่นขึ้นเรื่อยๆ แม้ว่าในตอนต้นเบียร์ที่ผ่านการกรองใหม่ๆจะใส มองด้วยตาเปล่าไม่เห็นความขุ่นของตะกอนเลยก็ตาม ทั้งนี้เนื่องจากการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโปรตีนและสารประกอบโพลีฟีนอล (polyphenolic compounds) เกิดเป็นสารเชิงซ้อนที่มีมวลโมเลกุลสูงและมีการละลายลดลงที่อุณหภูมิต่ำๆ จึงเกิดเป็นตะกอนในเบียร์ทำให้เบียร์ขุ่น ดังนั้น วิธีนี้จึงเป็นวิธีที่ได้ผลอีกทางหนึ่ง อีกทั้งการนำเทคโนโลยีเอนไซม์ตรึงรูปมาใช้ ก็เป็นแนวทางที่ทำให้ประหยัดและมีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยจะเป็นการลดปริมาณเอนไซม์ที่ใช้, ลดการตกค้างและการสูญเสียของเอนไซม์ในผลิตภัณฑ์ เป็นต้น

อุตสาหกรรมเนื้อสัตว์

จะใช้ปาเปนทำให้เนื้อนุ่มขึ้น โดยเอนไซม์ปาเปนจะย่อยสลายโปรตีนจำพวกไมโอ-ไฟบริลและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน มีเทคนิคการใช้ 2 วิธี คือใช้โรยเอนไซม์ผงลงบนชิ้นเนื้อหรือจุ่ม, ทา, พ่นชิ้นเนื้อด้วยสารละลายเอนไซม์(post-slaughter) กับวิธีการฉีดสารละลายเอนไซม์เข้าไปในเส้นโลหิตของสัตว์ก่อนการฆ่า(pre-slaughter)

อุตสาหกรรมปลา

จะใช้เอนไซม์ปาเปนในการผลิต fish protein concentrates จากของเสียจากโรงงานผลิตปลากระป๋องเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตอาหารสัตว์ นอกจากนั้นยังใช้ในการหมักน้ำปลา จะช่วยลดระยะเวลาในการหมักและลดปริมาณปลาที่ใช้หมักด้วย

อุตสาหกรรมเวชภัณฑ์

จะใช้เอนไซม์ปาเปนที่บริสุทธิ์(purified papain)เป็นส่วนใหญ่ เช่น ใช้ผสมในยาช่วยย่อยอาหาร, เป็นส่วนผสมในน้ำยาทำความสะอาดคอนแทคเลนส์, ใช้ในการเตรียมวัคซีนป้องกันบาดทะยัก, เป็นส่วนผสมในขี้ผึ้งที่ใช้รักษาบาดแผล , ใช้ในการบำบัดรักษาโรคเส้นโลหิตอุดตัน(thrombosis), เป็นส่วนผสมในยาสีฟัน เป็นต้น

ในประเทศไทยมีการเพาะปลูกและบริโภคมะละกอกันอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะพันธุ์แขกดำ ซึ่งเป็นพันธุ์ที่นิยมบริโภคกันมากทั้งในรูปของผลดิบและผลสุก อีกทั้งยังสามารถให้น้ำยางมะละกอในปริมาณที่มากอีกด้วย ดังนั้นจึงเป็นพันธุ์หนึ่งซึ่งน่าสนใจในการศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์ปาเปนในน้ำยางมะละกอ เพื่อที่จะพัฒนายางมะละกอและเอนไซม์ปาเปนขึ้นมาเป็นผลิตภัณฑ์ที่เป็นผลพลอยได้จากการเพาะปลูกมะละกอ แต่พบว่ายังมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับเอนไซม์ปาเปนกันน้อยมาก โดยที่ส่วนใหญ่จะเป็นการศึกษาถึงการใช้ในรูปของน้ำยางมะละกอ หรือ การตกตะกอนสารละลายยางมะละกอด้วยสารละลายอินทรีย์และเกลือชนิดต่างๆ เพื่อนำมาใช้ในการหมักเนื้อให้นุ่ม (จีรวัฒน์ กันต์เกรียงวงศ์,2532 ; ประเทือง จุลเอียด, 2533) สำหรับ โครงงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาถึงวิธีการในการทำให้เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์จากน้ำยางมะละกอพันธุ์แขกดำ รวมทั้งศึกษาคุณสมบัติต่างๆและจลนศาสตร์ของเอนไซม์ปาเปนที่แยกได้ เพื่อเป็นข้อมูลในการศึกษาวิธีการแยกเอนไซม์ปาเปนจากยางมะละกอและการนำเอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์ไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

1. ศึกษาวิธีการในการเก็บรักษายางมะละกอพันธุ์แขกดำ
2. ศึกษาวิธีการแยกเอนไซม์ปาเปนให้บริสุทธิ์จากยางมะละกอพันธุ์แขกดำ และ ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่แยกได้
3. ศึกษาปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์ที่แยกได้ เช่น อุณหภูมิ , pH, โลหะหนัก, สารยับยั้ง, สารกระตุ้น เป็นต้น
4. ศึกษาลักษณะทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์ที่แยกได้