

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ไธออลโปรตีเอส (Thiol proteases) ที่พบในยางมะละกอซึ่งรู้จักกันทั่วไปในชื่อของปาเปน มีคุณสมบัติในการไฮโดรไลสโปรตีนและนิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมหลายชนิดได้แก่ อุตสาหกรรมอาหาร เบียร์ และฟอกหนัง เป็นต้น ในปีหนึ่งๆ มีการนำเข้าปาเปนมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ในประเทศไทยเป็นจำนวนมาก ในขณะที่ประเทศไทยมีสภาพดินฟ้าอากาศที่เหมาะสมสำหรับปลูก และมะละกอได้รับการสนับสนุนจากรัฐบาลจนทำให้ในบางปีมีปริมาณมะละกอมากเกินความต้องการของตลาด ดังนั้นการใช้อย่างจากมะละกอเพื่อเตรียมปาเปนซึ่งเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมต่างๆ ในประเทศ จึงเป็นทางเลือกในการช่วยเพิ่มรายได้ให้กับเกษตรกรที่ปลูกมะละกอ

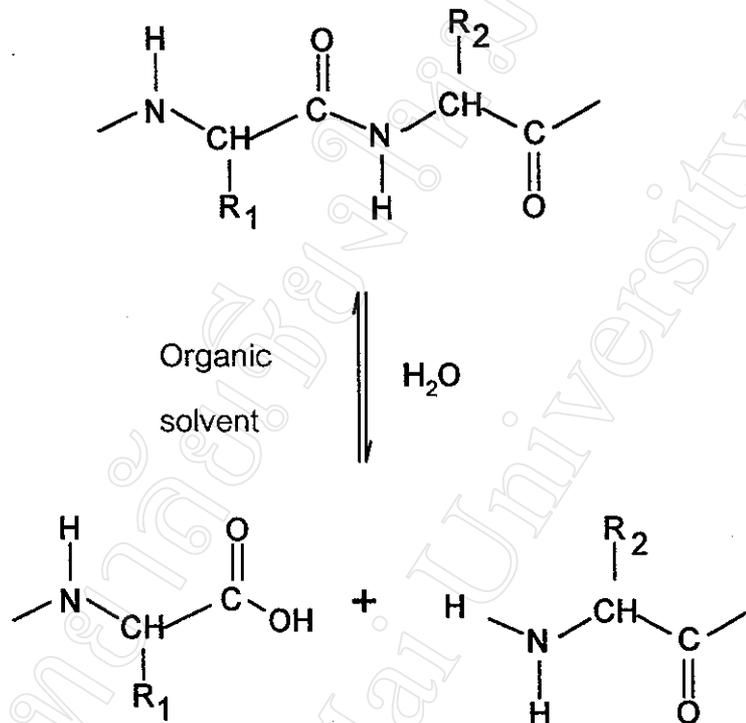
ในประเทศไทยเริ่มศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับปริมาณยางมะละกอที่เก็บและรวบรวมได้จากมะละกอพันธุ์ต่างๆ ในปี พ.ศ. 2525<sup>(1)</sup> ต่อมามีการสร้างอุปกรณ์ที่ใช้ในการกรีดและรวบรวมยาง<sup>(2)</sup> ทั้งนี้เพื่อความสะดวกและรวดเร็วในการทำงาน การเตรียมปาเปนจากยางของก้านใบ<sup>(3)</sup> การศึกษาผลของสารเคมีที่มีต่อการรักษาความเสถียรของปาเปน<sup>(4,5)</sup> การทำปาเปนให้บริสุทธิ์<sup>(4,7)</sup> การตรวจสอบความบริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติของปาเปนที่เตรียมได้<sup>(6)</sup> การอบแห้งยางมะละกอซึ่งทำให้ได้ปาเปนที่สะดวกใช้<sup>(3-7)</sup> ในอุตสาหกรรมต่างๆ<sup>(9,10)</sup> และการตรึงปาเปนเพื่อนำไปใช้ในการไฮโดรไลสโปรตีนจากยางพารา<sup>(11,12)</sup> อย่างไรก็ตามยังไม่มีการผลิตปาเปนในทางการค้าขึ้นภายในประเทศไทยในปัจจุบัน ถึงแม้จะมีรายงานการร่วมลงทุนของบริษัท รัชตะโพลีซิปพลาย จำกัด และบริษัท อินดัสเตรียล บิลด์ดิ้ง คอนสตรัคชัน เอสเอ จากประเทศเบลเยียม ปรากฏในปี พ.ศ. 2522-2533 ด้วยเงินทุน 90 ล้านบาท<sup>(13)</sup> ดังนั้นการศึกษากการเตรียมปาเปนหรือไธออลโปรตีเอสจากยางมะละกอพันธุ์พื้นเมืองในครั้งนี้ จึงมีจุดมุ่งหมายให้เป็นข้อมูลพื้นฐานของการพัฒนาให้เกิดอุตสาหกรรมผลิตปาเปนขนาดย่อมในประเทศ และได้ทดลองเตรียมปาเปนตรึงด้วยวิธีต่างๆ ทั้งนี้เพื่อใช้ย่อยโปรตีนในนมถั่วเหลืองซึ่งจะช่วยเพิ่มการละลายของนมถั่วเหลืองผงที่เตรียมได้

#### 1.2 ทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง

##### 1.2.1 ไธออลโปรตีเอสในยางมะละกอ

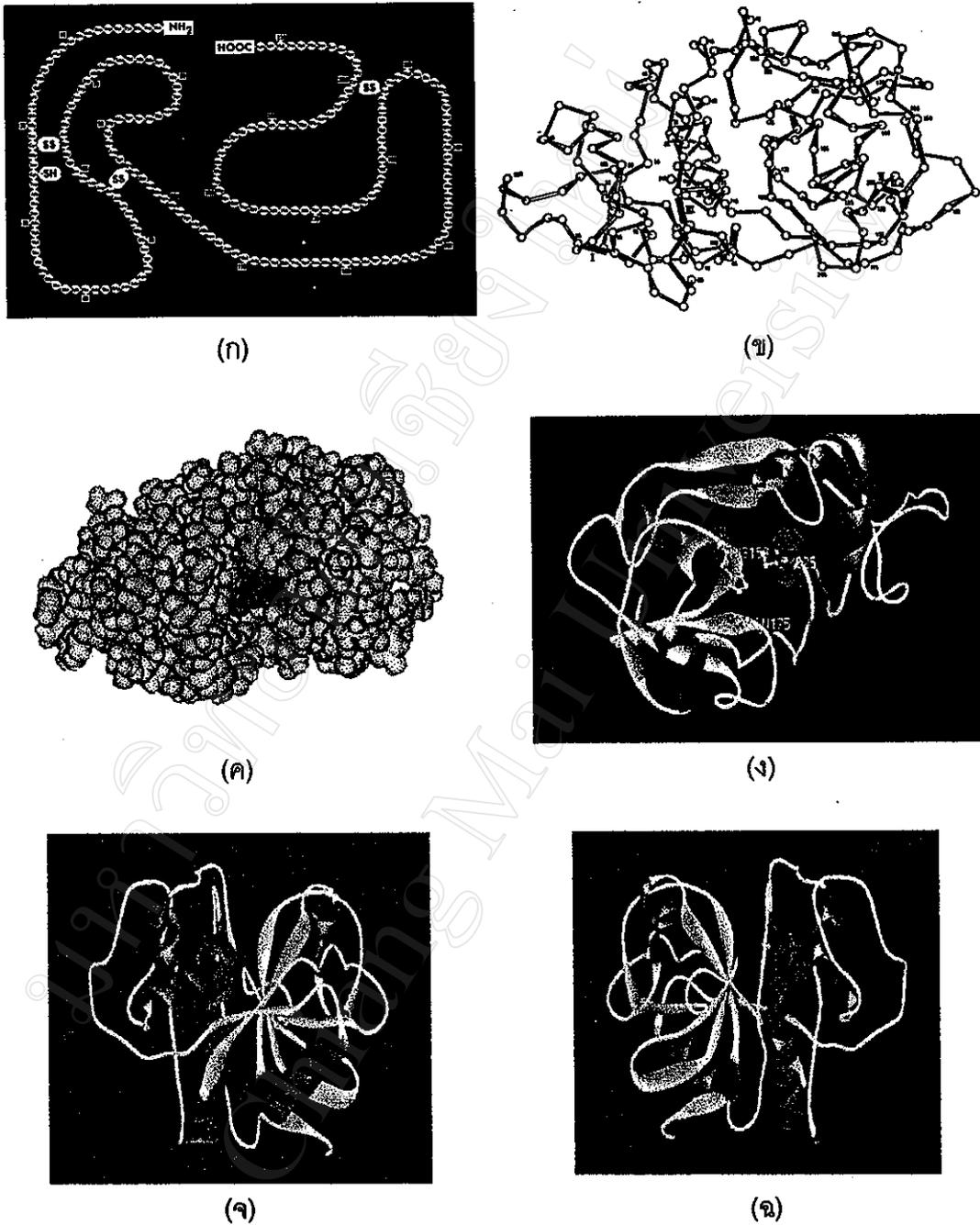
ไธออลโปรตีเอสหรือซิสเทอีนโปรตีเอสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในสารละลายน้ำ (aqueous) และเร่งปฏิกิริยาการสร้างพันธะเปปไทด์ในตัวทำละลายอินทรีย์

ดังกลไกในรูปที่ 1.1 เช่นเดียวกับโปรตีนชนิดอื่นๆ



รูป 1.1 การสลายพันธะเปปไทด์ในสารละลายของน้ำและการสร้างพันธะเปปไทด์ในตัวทำละลายอินทรีย์โดยไฮดรอลิซิสโปรตีน

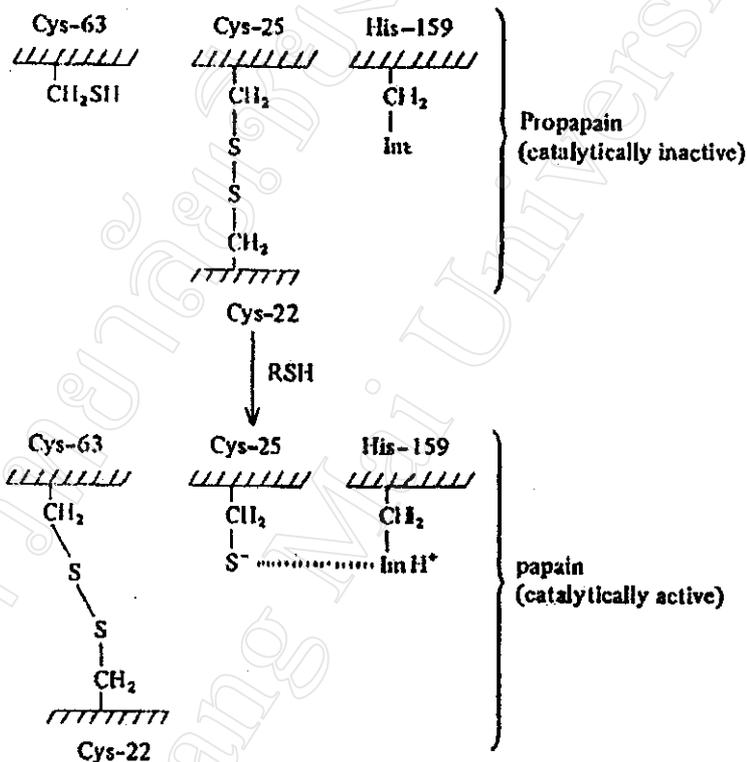
โมเลกุลของไฮดรอลิซิสจากยางมะละกอประกอบด้วยกรดอะมิโนต่อกันเป็นสายโพลีเปปไทด์สายเดี่ยวมีพันธะไดซัลไฟด์ (mixed disulfide bond) 3 พันธะ และขดอยู่ในลักษณะถูกแบ่งเป็น 2 ส่วน ตัวอย่างของลำดับกรดอะมิโนและโครงสร้างสามมิติของโมเลกุลปลาแปนซึ่งเป็นไฮดรอลิซิสชนิดหนึ่งในยางมะละกอแสดงดังรูปที่ 1.2 ซึ่งในบริเวณเร่งมีกรดอะมิโนที่ต่างไปจากโปรตีนชนิดอื่นจึงทำให้มีความจำเพาะต่อพันธะเปปไทด์ของกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน โดยในสภาพธรรมชาติของเอนไซม์หมูไฮดรอลิซิสของซิสเทอีนที่บริเวณเร่งจะจับกับหมูไฮดรอลิซิสของซิสเทอีนที่ตำแหน่งอื่น (Cysteine 22) ในโมเลกุลด้วยพันธะไดซัลไฟด์<sup>(14)</sup> ทำให้ไฮดรอลิซิสโปรตีนอยู่ในรูปที่ไม่สามารถทำงานได้ (inactive form) ส่งผลให้แอกติวิตีของโปรตีนมีค่าต่ำ ดังนั้นจึงต้องมีการกระตุ้นการทำงานของไฮดรอลิซิสให้อยู่ในรูปที่สามารถทำงานได้ (active form) โดยเติมสารต่างๆ ลงในสารละลายเอนไซม์ ได้แก่ สารรีดิวซ์อย่างอ่อน เช่น ซิสเทอีน ซัลไฟด์ ซัลไฟต์ และไซยาไนด์ ดังกลไกในรูปที่ 1.3 นอกจากนี้สารอื่นๆ เช่น EDTA



รูป 1.2 ลำดับกรดอะมิโน (ก) โครงสร้างตติยภูมิของโมเลกุลอินซูลิน แบบ skeleton (ข)<sup>(15)</sup>  
แบบ ball and stick, top view (ค) และแบบ  $\beta$  sheets, top view (ง) front view (จ) และ back  
view (ฉ)

thioglycolate และ 2,3'-dimercaptopropanol (BAL) ซึ่งมีคุณสมบัติในการทำงานเหมือนกับทั้ง  
สารประกอบไรออลและ EDTA ตัวกระตุ้นการทำงานของไรออลโปรตีนเอสที่นิยมใช้กันมากคือ

ซีสเทอีนและ EDTA อย่างไรก็ตาม ไธออลโปรตีนสามารถถูกยับยั้งการทำงานหรือถูกทำให้อยู่ในรูปที่ไม่สามารถทำงานได้โดยอากาศ ไอออนของโลหะหนัก เช่น  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  และ  $Pb^{2+}$  สารเอมีน เช่น phenylhydrazine และ hydroxylamine เป็นต้น และสารอื่นเช่น p-chloromercuribenzoate (pCMB), iodoacetic acid, chloromethyl ketone ของ phenylalanine และ lysine (TPCK และ TLCK) และ carbobenzoxy-L-glutamic acid<sup>(15)</sup>



รูป 1.3 กลไกการเปลี่ยนรูป (active-inactive) ของไธออลโปรตีน<sup>(16)</sup>

ไธออลโปรตีนในยางมะละกอถูกค้นพบตั้งแต่ปี ค.ศ. 1750 และเรียกชื่อต่างๆ กัน เช่น papayotin, papoid และ papain จากการค้นคว้าวิจัยในปี ค.ศ.1905 พบว่ายางมะละกอประกอบด้วยไธออลโปรตีนอีกหลายชนิด<sup>(17)</sup> การแยกไธออลโปรตีนชนิดต่างๆ ในเวลาต่อมาพบว่าในยางมะละกอประกอบด้วยไธออลโปรตีน 4 ชนิด ดังปรากฏผลการตรวจจลด้วยแคโทดอิเล็กโตรฟอเรซิส (cathodic electrophoresis) ในรูปที่ 1.4 การทำบริสุทธิ์ปเปนและไธออลโปรตีนชนิดอื่นในงานวิจัยในระยะต่อมา พบว่าไคโมปเปนประกอบด้วย chymopapain A และ B ซึ่งแสดงดังรูปที่ 1.5 และไธออลโปรตีนชนิดต่างๆ ในยางมะละกอมีคุณสมบัติแตกต่างกันไป

ดังในตารางที่ 1.1 ซึ่งนอกจากไฮดรอลิโปรติเอสเหล่านี้แล้ว ในยางมะละกอยังประกอบด้วยเอนไซม์อื่นๆ เช่น ไลโซไซม์ พายาเอนโด-1,3-กลูคาเนส (papaya endo-1,3-glucanase)<sup>(16)</sup> พายา กลูตามีน ไสโคลทรานสเฟอเรส (papaya glutamine cyclotransferase)<sup>(18)</sup> ไคตินเนสชนิดที่ 2 (Class II Chitinase)<sup>(19)</sup> และพายา เพคตินเอสเทอเรส (papaya pectinesterase)<sup>(20)</sup> เป็นต้น



รูป 1.4 ไฮดรอลิโปรติเอส 4 ชนิดในยางมะละกอ<sup>(21)</sup>

- 1 papain
- 2 papaya proteinase IV
- 3 chymopapain
- 4 papaya proteinase III

+

— Papain

— Papaya proteinase 4

— Chymopapain B

— Chymopapain A

— Papaya proteinase 1

-

รูป 1.5 ไฮดรอลิโปรติเอสทั้งหมดในยางมะละกอ<sup>(22)</sup>

ตาราง 1.1 คุณสมบัติของเอนไซม์โปรตีเอสชนิดต่างๆ ในยางมะละกอ

คุณสมบัติ	ปาเปน (papain)	ไคโมปาเปน (chymopapain)	พาทายา โปรตีเนส III (papaya proteinase III)	พาทายา โปรตีเนส IV (papaya proteinase IV)
1. Enzyme Commission (EC) <sup>(23)</sup>	3.4.22.2	3.4.22.6	3.4.22.30	3.4.22.25
2. มวลโมเลกุล (MW.)	23,400 <sup>(24)</sup>	23,600±1,000 <sup>(25)</sup>	24,600-24,900 <sup>(25)</sup>	23,316 <sup>(23)</sup>
3. จำนวนกรดอะมิโนในโมเลกุล (residues)	212 <sup>(26)</sup>	218 <sup>(27)</sup>	216 <sup>(28)</sup>	212 <sup>(23)</sup>
4. isoelectric point (pI)	8.75 <sup>(25)</sup>	10.2 <sup>(25)</sup>	11 <sup>(25)</sup>	11 <sup>(29)</sup>
5. จำนวนหมู่ -SH ในโมเลกุล	1 <sup>(25)</sup>	2 <sup>(30)</sup>	1 <sup>(31,32)</sup>	1 <sup>(23)</sup>
6. ชื่ออื่นๆ	1. papaya peptidase I 2. papayotin 3. papaine	1. papaya proteinase II 2. chymopapain A 3. chymopapain B	1. papaya proteinase Ω 2. caricane 3. papaya peptidase II 4. papaya peptidase A 5. papaya proteinase Q 6. chymopapain S	1. glycyI endopeptidase 2. chymopapain M 3. papaya peptidase B
7. ชนิดของเอนไซม์	Endoprotease	Endoprotease	Endoprotease	Endoprotease
8. ความจำเพาะต่อกรดอะมิโน	aa <sub>2</sub> -aa <sub>1</sub> ↓aa <sub>1</sub> '-aa <sub>2</sub> ' <sup>(33)</sup> aa <sub>2</sub> = Phe, Lys, Leu, Ala, Val	aa <sub>2</sub> -aa <sub>1</sub> ↓aa <sub>1</sub> '-aa <sub>2</sub> ' <sup>(34)</sup> aa <sub>1</sub> = Glu	aa <sub>2</sub> -aa <sub>1</sub> ↓aa <sub>1</sub> '-aa <sub>2</sub> ' <sup>(32)</sup> aa <sub>2</sub> = Ala aa <sub>1</sub> = Leu aa <sub>1</sub> '= Tyr aa <sub>2</sub> '= Leu	aa <sub>2</sub> -aa <sub>1</sub> ↓aa <sub>1</sub> '-aa <sub>2</sub> ' <sup>(35)</sup> aa <sub>1</sub> = Gly

### 1.2.2 การเก็บและรวบรวมยางมะละกอ

ยางมะละกอสามารถพบได้ในส่วนต่างๆ ของต้นมะละกอ โดยพบมากในส่วนที่เป็นผล ดังนั้นจึงนิยมเก็บและรวบรวมยางจากผลมะละกอมาใช้ในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส ผลมะละกอที่เหมาะสมในการให้น้ำยางควรเป็นผลดิบที่มีอายุ 75-100 วัน<sup>(36)</sup> ซึ่งให้ปริมาณน้ำยางมากกว่าผลที่อายุน้อยกว่าซึ่งการกรีดยางจากผลมะละกอที่มีอายุน้อยนั้นจะทำให้มะละกอสุกเร็วขึ้นส่งผลให้ปริมาณน้ำยางต่อหนึ่งผลลดลง<sup>(37)</sup> ในมะละกอต้นหนึ่งๆ จะสามารถให้น้ำยางได้ดีจนถึงอายุ 2 ปี หลังจากนั้นปริมาณน้ำยางและแอกติวิตีของโปรตีเอสจะต่ำมาก ในการกรีดยางควรกรีดในช่วงเวลา 05.00 น. ถึง 10.00 น.<sup>(13)</sup> ก่อนกรีดควรขีดผลมะละกอด้วยโซเดียมซัลเฟตหรือสารป้องกันเชื้อราที่เหมาะสมเพื่อป้องกันการติดเชื้อ โดยใช้มีดสแตนเลสหรือพลาสติกที่คม ไม่ควรใช้มีดหรือโลหะ

ที่ทำด้วยเหล็กหรือสังกะสีเพราะจะทำให้สีของน้ำยางที่ได้คล้ำ เริ่มกรีดตามยาวจากหัวผลถึงปลายผล โดยให้แผลที่กรีดลึกประมาณ 1-2 มม. ไม่ควรกรีดลึกเกินไปเพื่อหลีกเลี่ยงการติดเชื้อของผล และการเชื้อจางยางโดยน้ำจากเนื้อมะละกอ<sup>(37)</sup> ควรกรีด 3-4 แผลในระยะห่างเท่าๆ กันและเว้นระยะในการกรีด 4-8 วัน จนกระทั่งผลแก่เกือบสุก ซึ่งปริมาณน้ำยางจะมากที่สุดในการกรีดครั้งแรกจากนั้นจะลดลงและน้อยที่สุดเมื่อกรีดในครั้งที่ 4-6 ในการกรีดผลมะละกอนั้นพบว่า หลังจากน้ำยางไหล 30-60 วินาที ยางจะเริ่มจับตัวเป็นลิ่มบนผิวมะละกอและเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งยางที่จับตัวเป็นก้อนนี้คิดเป็น 20% โดยน้ำหนัก และมีแอกติวิตีใกล้เคียงกับโปรตีนเอสในบางส่วนที่เป็นน้ำ<sup>(38)</sup>

เนื่องจากการเก็บรวบรวมน้ำยางเป็นขั้นตอนที่ใช้เวลา ดังนั้นจึงมีการประดิษฐ์อุปกรณ์หลายรูปแบบเพื่อช่วยทุ่นเวลาในการเก็บยาง ตัวอย่างเช่น การใช้ภาชนะที่ประกอบด้วยแท่งไม้ 2 อัน ประกบกันในลักษณะคล้ายขากรรไกรโดยปลายข้างหนึ่งยึดติดกัน รองภาชนะด้วยแผ่นพลาสติกหรือผ้าใบ นำภาชนะไปครอบลำต้นมะละกอโดยรองแผ่นยางระหว่างภาชนะกับลำต้นดังในรูปที่ 1.6 ซึ่งหลังจากกรีดยางแล้วขูดยางมะละกอบนภาชนะและบนผิวมะละกอลงในขวดหรือถังที่เป็นพลาสติก แก้วหรืออะลูมิเนียมที่มีฝาปิด จากการกรีดยางพบว่า ในมะละกอหนึ่งผลจะให้น้ำยางประมาณ 14.3 กรัม ซึ่งใช้ในการผลิตปาเปนได้ประมาณ 1.57 กรัม<sup>(13)</sup>

ยางมะละกอที่เก็บรวบรวมได้นำมากรองผ่านตะแกรงขนาด 50 ช่องต่อตารางนิ้ว (mesh) เพื่อเอาเศษผงต่างๆ ที่ปนมาออก เก็บยางมะละกอที่อุณหภูมิ 4°C ซึ่งสามารถรักษาแอกติวิตีของโปรตีนเอสได้ภายใน 3 เดือน หลังจากนั้นแอกติวิตีลดลง 2-5% ในแต่ละเดือน<sup>(40)</sup> ในขณะที่การเก็บยางในประเทศเขตร้อนเป็นเวลา 2-24 ชั่วโมง แอกติวิตีจะลดลงประมาณ 20% ใน 6 ชั่วโมงแรก เนื่องมาจากการสลายตัวเองโดยการออกซิไดส์และตัวยับยั้งที่มีอยู่ในยาง เช่น วิตามินซีและ isothiocyanate หลังจากนั้นแอกติวิตีจะเพิ่มมากขึ้นซึ่งอาจเนื่องมาจากโปรตีนเอสบางรูปแบบถูกกระตุ้นจากสารต่างๆ ในน้ำยาง และหลังจากเก็บยาง 10 ชั่วโมง จะเริ่มมีกลิ่นไม่ดีเนื่องจากจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นทำให้แอกติวิตีลดลง นอกจากอุณหภูมิและระยะเวลาที่มีผลต่อแอกติวิตีของโปรตีนเอสในการเก็บยางแล้ว แสงสว่างและอากาศก็มีผลต่อแอกติวิตีเช่นเดียวกัน โดยเมื่อเก็บยางภายใต้แสงสว่างแอกติวิตีจะลดลงมากกว่าเก็บในที่มืดถึง 10% เนื่องจากแสงสว่างมีผลต่อฮีสทิดีนในโมเลกุลของโปรตีนเอส<sup>(38)</sup> และในการเก็บยางไม่ควรให้ถูกอากาศเนื่องจากมีผลทำให้หมู่ซัลไฟดริลในโมเลกุลของโปรตีนเอสถูกออกซิไดส์ได้ง่ายส่งผลให้แอกติวิตีของเอนไซม์ลดลง นอกจากนี้หมู่ซัลไฟดริลยังสามารถจับกับโลหะหนักต่างๆ เช่น Fe, Cu, Zn, Hg, Ag และ Co ได้ง่าย ดังนั้นในการเก็บยางมะละกอจึงควรหลีกเลี่ยงจากโลหะหนักเหล่านี้<sup>(37)</sup>



รูป 1.6 วิธีการเก็บและรวบรวมยางมะละกอโดยใช้อุปกรณ์ช่วย<sup>(38)</sup>

### 1.2.3 การเตรียมไฮดรอลิโปรติเอส

การเตรียมไฮดรอลิโปรติเอสในระยะเริ่มต้นทำได้ด้วยการผึ่งแดดและอบในเตาอบ โดยเกลี่ยยางมะละกอบนถาดหรือผ้าฝ้ายแล้วนำไปผึ่งแดดหรือวางเหนือเตาไฟ (Kiln-drying) ซึ่งวิธีการดังกล่าว โดยเฉพาะการผึ่งแดดทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีคล้ำและมีกลิ่นฉุนเพราะเกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังทำให้ได้แอกติวิตีของเอนไซม์ค่อนข้างต่ำ ทั้งนี้เนื่องมาจากรังสียูวีในแสงแดด ต่อมาการทำแห้งได้รับการปรับปรุงโดยไม่ใช้ความร้อนโดยตรงด้วยการนำยางมะละกอที่เกลี่ยบางๆ บนถาดไปวางบนท่อซึ่งให้ความร้อนผ่านท่อประมาณ  $55^{\circ}\text{C}$  และพัฒนาเป็นการใช้ตู้อบซึ่งมีการเป่าอากาศร้อน  $55^{\circ}\text{C}$  และมีการหมุนเวียนของอากาศตลอดเวลา ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นผงสีขาวและมีแอกติวิตีสูงกว่าการทำแห้งโดยการผึ่งแดดและการใช้เตาอบ<sup>(37)</sup> เมื่อใช้อุณหภูมิในการอบ  $45^{\circ}\text{C}$  พบว่าแอกติวิตีต่ำเนื่องจากใช้ระยะเวลาในการอบนานเกินไป ต่อมาพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการอบยางอยู่ในช่วง  $50-55^{\circ}\text{C}$ <sup>(41)</sup> การเติมสารเคมีบางชนิดเช่นโซเดียมหรือโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ลงในยางก่อนทำให้แห้งสามารถช่วยรักษาแอกติวิตีของไฮดรอลิโปรติเอสและป้องกันการเน่าเสียซึ่งเกิดจากเชื้อจุลินทรีย์<sup>(37)</sup> พบว่าการเติม 0.2% EDTA และ 1%

โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ลงในยางก่อนอบแห้งเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทำให้แอกติวิตีของเอนไซม์สูงขึ้น 25 และ 21% ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับแอกติวิตีของโปรติเอสในยางที่เติมสารทั้ง 2 ชนิดพร้อมกัน<sup>(36)</sup> การเติม KMS ซิสเทอีนและ EDTA 0.5 0.1 และ 0.2% ทำให้แอกติวิตีของไรออลโปรติเอสสูงกว่าในยางมะละกอที่ไม่ได้เติมสารเคมีร้อยละ 25 21 และ 20 ตามลำดับ<sup>(4)</sup> การเติมโซเดียมคลอไรด์ลงในยางทำให้แอกติวิตีของโปรติเอสลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือเป็น 20% ดังนั้นไม่ควรเติม NaCl ลงในยางก่อนการทำแห้ง<sup>(38)</sup> การเติม 0.5% KMS และ 0.2% thymol ลงในยางพร้อมกันก่อนการทำแห้งในตู้อบสูญญากาศ ทำให้แอกติวิตีของโปรติเอสสูงขึ้นและสูงกว่าการเติม KMS หรือ thymol ชนิดเดียวลงในยางก่อนอบเพียงเล็กน้อย<sup>(40)</sup>

ไรออลโปรติเอสจากยางมะละกอสามารถเตรียมได้ด้วยวิธีง่าย ๆ โดยการกรองยางผ่านตะแกรงขนาด 50 ช่องต่อตารางนิ้ว (mesh) เพื่อขจัดเศษผงต่างๆ ออก จากนั้นเติม KMS 50 มิลลิกรัมต่อยางมะละกอ 100 กรัม แล้วนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 50-60°C บดยางอบที่ได้และกรองผ่านตะแกรงขนาด 10 mesh จะได้ไรออลโปรติเอสเป็นผงสีขาวละเอียด เก็บผลิตภัณฑ์ที่ได้ไว้ในถุงพลาสติกหรือถุงตึก<sup>(13)</sup> อย่างไรก็ตามไรออลโปรติเอสที่เตรียมได้จากวิธีการดังกล่าวข้างต้นเป็นเอนไซม์ที่ยังไม่บริสุทธิ์ ถ้าต้องการให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์มากขึ้น สามารถทำได้โดยการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยเกลือหรือตัวทำละลายอินทรีย์<sup>(15)</sup> ในการเตรียมไรออลโปรติเอสเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆ นั้น นิยมเตรียมในรูปของสารละลายมากกว่าในรูปผง ทั้งนี้เนื่องจากทำให้สะดวกในการเติมสารเคมีต่างๆ ลงไป และไม่มีฝุ่นผงที่ทำให้เกิดการแพ้เมื่อสูดดมเข้าไปแต่มีข้อเสียที่ไม่สามารถเก็บไว้ได้นาน ดังนั้นจึงต้องเติมสารรักษาความเสถียร เช่น โพแทสเซียมหรือโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์แล้วกรองสารละลายผ่านกระดาษกรองหรือเซนต์ปีทิว์จเพื่อขจัดสิ่งปนเปื้อนออก กระบวนการนี้ช่วยลดปริมาณของแข็งทั้งหมดจาก 20% เหลือประมาณ 8% ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับคุณภาพของยางมะละกอเริ่มต้น พบว่าเมื่อทำการระเหยแห้งสารละลายของไรออลโปรติเอสปริมาตร 100 ลบ.ซม. ด้วยเครื่องพ่นแห้ง (spray dryer) ทำให้ได้ไรออลโปรติเอสเป็นผงละเอียด สีขาวในปริมาณมากกว่าหรือเท่ากับ 25 กรัม มีแอกติวิตีของโปรติเอสสูง ซึ่งคิดเป็นผลผลิต 1 : 12 w/v ของยางดิบ โดยผงละเอียดที่ได้มีการละลายน้ำได้ดีขึ้น<sup>(37)</sup>

#### 1.2.4 การหาแอกติวิตีของไรออลโปรติเอส

แอกติวิตีของไรออลโปรติเอสสามารถหาได้ด้วยการติดตามอัตราการย่อยโปรตีนและสับสเตรทสังเคราะห์ขนาดเล็กซึ่งมีหลายชนิด จึงทำให้วิธีการหาแอกติวิตีแตกต่างกันไป

การหาแอกติวิตีของโปรติเอสในยางมะละกอในการย่อยโปรตีนจากนมผงขาดมันเนยทำได้โดยจับเวลาในการเกิดตะกอนของสารละลายนม (milk clotting) โดยกำหนดให้ 1 ยูนิต ของ

เอนไซม์หมายถึงปริมาณของไฮดรอลิเอสที่ทำให้สารละลายนมซึ่งเตรียมที่ 30°C ปริมาตร 5 ลบ.ซม. จับตัวกันเป็นก้อนในเวลา 1 นาที

การหาประสิทธิภาพการย่อย hippurylamide ด้วยไฮดรอลิเอสในยางมะละกอกำโดย การไทเทรตหาปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการไฮโดรไลส์ โดยกำหนดให้ 1 ยูนิต เท่ากับ ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิดอัตราเร็วเริ่มต้นเท่ากับ 1 meq ใน 1 นาที

แอกติวิตีของโปรติเอสในยางมะละกอกที่ใช้ย่อยฮีโมโกลบินที่เสียสภาพธรรมชาติแล้วที่ อุณหภูมิ 30°C ได้กำหนดให้ 1 ยูนิต คือปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ไม่ตกตะกอนและให้สีเหมือนสาร ฟีนอลเท่ากับ 1 meq ของไทโรซีน<sup>(41)</sup>

การวัดความหนืดของสารละลายที่เกิดจากการย่อยเจลาตินด้วยไฮดรอลิเอสในยาง มะละกอก ทำโดยจับเวลาในการเคลื่อนที่ของสารละลายในปริมาตรหนึ่งๆ เทียบกับสารละลาย เจลาติน<sup>(42)</sup>

การย่อยเคซีนด้วยไฮดรอลิเอสในยางมะละกอก ที่อุณหภูมิ 37°C จัดได้ว่าเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้กันมากที่สุด โดยกำหนดให้ 1 ยูนิต เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ตก ตะกอนและให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร เทียบเท่ากับไทโรซีน 1  $\mu\text{mole}$  ในเวลา 1 นาที ณ สภาวะการทดลองนั้นๆ<sup>(15)</sup>

แอกติวิตีของโปรติเอสในยางมะละกอก สามารถไฮโดรไลส์สับสเตรทที่เป็นอนุพันธ์ของ เอไมด์ของกรดอะมิโน เช่น benzoyl-L-arginine amide (BAA) ซึ่งหาแอกติวิตีได้โดยไทเทรตหมู่ คาร์บอกซิลิกอิสระที่เกิดจากการย่อยสับสเตรทโดยโปรติเอส benzoyl-arginine-p-nitroanilide (BAPNA) เป็นสับสเตรทเอไมด์ที่ใช้ในการหาแอกติวิตี โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร ของ p-nitroanilide ที่เกิดขึ้นหลังจากการสลายสับสเตรท โดยให้ 1 ยูนิต ต่อ BAPNA (amidase activity) เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสับสเตรท 1  $\mu\text{mole}$  ที่ 25°C ในเวลา 1 นาที ที่ สภาวะการ ทดลองนั้นๆ<sup>(15)</sup>

ในกรณีของการหาแอกติวิตีของโปรติเอสในยางมะละกอกซึ่งสามารถสลายพันธะเอสเทอร์ (esterase activity) ของสับสเตรทจำพวกเอสเทอร์ซึ่งมักจะนิยมใช้เป็นเอสเทอร์ของกรดอะมิโน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง benzoyl arginine ethyl ester (BAEE) ใช้ในการหาแอกติวิตีโดยการไทเทรต หมู่คาร์บอกซิลิกอิสระที่เกิดขึ้นจากการไฮโดรไลส์ BAEE โดยโปรติเอสในยางมะละกอก โดยที่ กำหนดให้ 1 ยูนิต เอสเตอเรส หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่ย่อย BAEE 1  $\mu\text{mole}$  ที่ 37°C เป็น เวลา 1 นาที ณ สภาวะการทดลองนั้นๆ<sup>(15)</sup>

### 1.2.5 การตรึงไฮโดรโปรตีนในยางมะละกอ

เอนไซม์ตรึงเป็นเอนไซม์ที่มีโมเลกุลถูกจับ ยึด หรือกักขังไว้ในขอบเขตจำกัดโดยที่ยังคงมีแอกติวิตีในการเร่งปฏิกิริยาได้เช่นเดียวกับเอนไซม์อิสระ เอนไซม์ตรึงมีข้อได้เอนไซม์อิสระในแง่ของการใช้เอนไซม์ซ้ำใหม่ได้ ทำให้สามารถจัดระบบการใช้งานและการควบคุมให้เป็นไปอย่างต่อเนื่องได้ สารผลิตภัณฑ์จะถูกแยกออกได้โดยง่ายจากสารอื่นในปฏิกิริยาซึ่งช่วยลดปัญหาการกรองผ่านและช่วยรักษาสภาพของอุปกรณ์ใช้งาน นอกจากนี้ในบางกรณี เอนไซม์ตรึงจะมีแอกติวิตีและความเสถียรดีขึ้นในภายหลัง<sup>(43)</sup> จากข้อได้เปรียบเหล่านี้ทำให้อุตสาหกรรมต่างๆ ให้ความสนใจกับการนำเอนไซม์ตรึงเข้าไปใช้

ปาเปนหรือไฮโดรโปรตีนสามารถตรึงบนสารพาหะหลายชนิดในวิธีที่แตกต่างกัน เช่น การตรึงปาเปนบนอนุพันธ์ชนิดต่างๆ ของแก้ว (porous glass) ด้วยพันธะโควาเลนต์<sup>(44)</sup> การตรึงปาเปนด้วยพันธะโควาเลนต์บนคอลลาเจนในรูปของเมมเบรน (collagen-papain membrane) เพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเบียร์<sup>(45)</sup> การตรึงปาเปนบนสารพาหะที่มีประจุ (ionic carriers) และไม่มีประจุ (neutral carriers)<sup>(46)</sup> การเตรียมปาเปนตรึงบนอนุพันธ์ของเซฟาไรส 4B<sup>(47)</sup> การตรึงปาเปนด้วยพันธะโควาเลนต์บนอนุพันธ์ของแฟรกโตเจล (fractogel) ซึ่งเป็นสารพาหะที่ไม่มีประจุชอบน้ำ (hydrophilic) เป็นสารสังเคราะห์ที่ย่อยสลายตามธรรมชาติได้ยาก<sup>(48)</sup> เสถียรต่อสารเคมี อุณหภูมิและการกระทำทางกายภาพ การเตรียมปาเปนตรึงบนอะลูมินาด้วยตัวเชื่อมที่เป็นสารออร์แกนิกฟอสเฟต<sup>(49)</sup> การตรึงปาเปนบนอนุพันธ์ของยางที่มีความไวต่ออุณหภูมิ (Thermo-sensitive latex particles) เป็นพาหะ<sup>(50)</sup> การตรึงปาเปนบนโคตินเพื่อนำไปใช้ในขบวนการ depolymerization ของโคโคซาน<sup>(51)</sup> การตรึงปาเปนด้วยพันธะโควาเลนต์บนเม็ดโคโคซาน (porous chitosan beads) เพื่อศึกษาผลของแซน (spacer) ของโคโคซาน<sup>(52)</sup> นอกจากนี้ยังมีการตรึงปาเปนด้วยการดูดติดบนซิลิเกต การยึดด้วยพันธะไฮดรอนิคบน CM-เซลลูโลส และ QAE-เซฟาเด็กซ์ การเชื่อมข้ามด้วยพันธะโควาเลนต์บนโปรตีนจากไข่ เพื่อนำไปใช้ในการสังเคราะห์เปปไทด์ขนาดเล็กในสารละลายอินทรีย์<sup>(53)</sup> อย่างไรก็ตาม ในการเลือกใช้ชนิดของตัวยึดและวิธีตรึงนั้นขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการนำไปใช้และความเหมาะสมต่องานนั้นๆ ในงานวิจัยนี้เป็น การตรึงไฮโดรโปรตีนเพื่อทดลองใช้ในการไฮโดรไลสโปรตีนในนมถั่วเหลืองเพื่อเตรียมนมถั่วเหลืองผงที่ละลายน้ำได้ง่ายขึ้น ซึ่งมีรายงานการนำปาเปนตรึงบนขี้เลื่อย (wood chips) ด้วยวิธี radiation polymerization มาใช้ในการย่อยนมถั่วเหลือง พบว่าปาเปนตรึงสามารถใช้ในการไฮโดรไลสนมถั่วเหลืองได้ 6 ครั้ง โดยแอกติวิตีสูญเสียไปเพียงเล็กน้อยเท่านั้น<sup>(54)</sup>

### 1.2.6 ประโยชน์ของไฮดรอลโปรตีนเอส

ไฮดรอลโปรตีนเอสจากยางมะละกอเป็นเอนไซม์ที่อุตสาหกรรมต่างๆ นำมาใช้ประโยชน์กันอย่างแพร่หลายและเป็นที่ยอมรับกันทั่วไปในชื่อ " ปาเปน " ทั้งๆที่ในทางวิชาการนั้นปาเปนเป็นไฮดรอลโปรตีนเอส 1 ใน 5 ชนิด ที่มีในยางมะละกอ โดยเริ่มใช้กับอุตสาหกรรมเบียร์<sup>(55)</sup> หลังจากนั้นปริมาณการใช้เพิ่มมากขึ้นในอุตสาหกรรมอื่นๆ ปรากฏในปัจจุบันโดยในอุตสาหกรรมเบียร์นั้น ปาเปนจะเข้าไปออกซิไดซ์และตกตะกอนสารประกอบฟีนอล (Protein-polyhydric phenol complex) ทำให้เบียร์ใส ไม่ขมเมื่อเก็บไว้นานที่อุณหภูมิต่ำ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องดื่มอื่นๆ ได้ในทำนองเดียวกัน<sup>(37)</sup>

ในอุตสาหกรรมการฟอกผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้แก่การฟอกหนังซึ่งมีการแปรสภาพหนังสัตว์ 2 ขั้นตอนคือการดึงขน (dehairing) และการทำให้หนังนิ่ม (bathing) โดยในขั้นตอนแรกใช้สารเคมีซึ่งสามารถใช้ปาเปนแทนได้โดยผสมในน้ำยาแช่หนังเพื่อให้หนังเรียบและนุ่ม ทำให้ปลอดภัยและลดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อม ในอุตสาหกรรมทอผ้าใหม่ใช้ปาเปนในขั้นตอนของการฟอกไหมเพื่อให้ไหมหมดเมือก มีความมันวาวและนุ่มต่อการสัมผัส ส่วนอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษนั้นใช้ปาเปนในลักษณะเดียวกับอุตสาหกรรมฟอกหนังและทอผ้า<sup>(55)</sup> อุตสาหกรรมการผลิตสารทำความสะอาดต่างๆ เช่น น้ำยาล้างเลนส์สัมผัสชนิดนุ่มและผงซักฟอกเพื่อช่วยสลายคราบโปรตีนชนิดต่างๆ ที่ติดบนเสื้อผ้าทำให้ซักออกง่าย และช่วยลดการเติมสารฟอสเฟตซึ่งเป็นสารก่อมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม<sup>(56)</sup> นอกจากนี้ปาเปนยังเป็นส่วนผสมในกระบวนการผลิตฟิล์มถ่ายรูป<sup>(37)</sup>

ในทางการแพทย์และเภสัช ใช้ปาเปนช่วยย่อยอาหารในผู้ป่วยที่อาหารไม่ย่อยและกระเพาะอาหารอักเสบ หรือในคนชราที่ร่างกายมีการสร้างน้ำย่อยน้อยลงทำให้โปรตีนถูกย่อยไม่หมดและเกิดแก๊สในกระเพาะอาหารซึ่งเป็นผลให้เกิดอาการจุกเสียด จากการที่ปาเปนมีคุณสมบัติในการทำให้เลือดแข็งตัวจึงใช้ในการทำให้เลือดหยุดไหล ใช้ผสมในยารักษาโรคผิวหนังแผลติดเชื้อ ผื่น และรอยแผลเป็น ช่วยย่อยและลดการบวม อักเสบของบาดแผลจากการผ่าตัดรวมทั้งบาดแผลจากการบาดเจ็บทั่วไป นอกจากนี้ ปาเปนในรูปยางมะละกอสดยังสามารถใช้ในการฆ่าพยาธิในลำไส้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพยาธิเส้นด้ายในเด็ก<sup>(55,56)</sup>

ปาเปนใช้ในการผลิตเครื่องสำอางเพื่อลบรอยฝ้าและจุดต่างดำนบนใบหน้า และเป็นส่วนผสมในการทำสบู่<sup>(55)</sup>

ปาเปนถูกนำมาใช้ประโยชน์มากที่สุดในอุตสาหกรรมอาหาร โดยที่โรงงานอาหารกระป๋องนิยมนำมาทำให้เนื้อนุ่มโดยฉีดสารละลายปาเปนเข้ากล้ามเนื้อสัตว์ทันทีก่อนนำไปฆ่า ซึ่งปาเปนจะเข้าไปในระบบเลือดของสัตว์และแผ่เข้าไปในกล้ามเนื้อตลอดจนเนื้อเยื่อต่างๆ ทำให้เนื้อชำแหละ

ของสัตว์นั้นอ่อนนุ่มและเปื่อยมากยิ่งขึ้นเมื่อใช้ประกอบอาหาร นอกจากการใช้ปาเปนในรูปแบบนี้แล้วยังมีการใช้ในรูปแบบของปาเปนผงโดยนำไปผสมกับเครื่องเทศต่างๆ เพื่อทำเป็นสารปรุงรสบรรจขวดสำหรับคลุกเคล้ากับเนื้อสัตว์ที่เหนียวก่อนนำไปประกอบอาหารซึ่งจะทำให้เนื้อนุ่มและเปื่อยมากขึ้น นอกจากนี้ปาเปนยังใช้เตรียมเนยแข็งโดยที่ปาเปนช่วยในการตกตะกอนของนม ทำขนมอบโดยปาเปนช่วยให้ขนมมีความนุ่มมากขึ้นเนื่องจากปาเปนสามารถย่อยโปรตีนกลูเทน (gluten) ซึ่งทำให้แป้งมีความยืดหยุ่นมากขึ้น การผลิตอาหารเสริมธัญพืชที่อุดมไปด้วยโปรตีนหรือแม้แต่อาหารแบบบริบถ้วน (fast food) ต่างๆ ใช้ผลิตโปรตีนเข้มข้นจากเนื้อปลาในโรงงานผลิตอาหารสัตว์<sup>(55)</sup> ใช้เตรียมเปปไทน์ซึ่งเป็นโปรตีนที่ถูกไฮโดรไลส์จากเนื้อและนมเพื่อใช้เป็นอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์<sup>(56)</sup> และปาเปนบริสุทธิ์สามารถนำไปใช้ในการสังเคราะห์แอสปาร์แทม ซึ่งเป็นสารให้ความหวานได้อีกด้วย<sup>(57)</sup>

นมถั่วเหลืองเป็นแหล่งอาหารที่อุดมไปด้วยโปรตีนและสารอาหารอื่นๆ ได้แก่ โปรตีนคาร์โบไฮเดรต ไขมัน และความชื้นในปริมาณ 7 14 4 และ 75% ตามลำดับ<sup>(58)</sup> ซึ่งมีคุณประโยชน์มากมายต่อสุขภาพเช่น ป้องกันโรคมะเร็งเต้านม โรคกระดูกพรุน โรคหัวใจ และแม้กระทั่งป้องกันอาการผิวร้อนแดงของสตรีวัยหมดรอบเดือน<sup>(59)</sup> การดื่มนมถั่วเหลืองแทนนมวัวจึงเป็นทางเลือกที่ดีที่สุดโดยเฉพาะในผู้ที่ระบบย่อยมีปัญหาเกี่ยวกับแลคโตสหรือน้ำตาลนม กล่าวคือไม่สามารถย่อยแลคโตสได้ซึ่งจะทำให้เกิดอาการท้องอืดหรือท้องร่วงจนกลายเป็นอาการแพ้อาหารอย่างหนึ่ง<sup>(60)</sup> นมถั่วเหลืองนอกจากจะบริโภคในรูปแบบของเหลวแล้วยังสามารถเตรียมให้อยู่ในรูปแบบนมถั่วเหลืองผงได้ด้วย แต่เนื่องจากนมถั่วเหลืองผงที่ได้ละลายน้ำยากทำให้ไม่น่ารับประทาน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้นำไรออลโปรตีนจากยางมะละกอมาใช้ในการไฮโดรไลส์โปรตีนจากนมถั่วเหลืองที่เตรียมเองซึ่งในงานวิจัยนี้ได้เรียกว่าน้ำเต้าหู้ เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการเตรียมนมถั่วเหลืองสำเร็จรูปที่ละลายได้ดีในน้ำ

### 1.3 วัตถุประสงค์การวิจัย

ในงานวิจัยนี้ มีจุดมุ่งหมายในการศึกษาข้อมูลพื้นฐานของกระบวนการเตรียมไรออลโปรตีนจากน้ำยางมะละกอพันธุ์พื้นเมืองโดยเริ่มตั้งแต่การกรีดยางจากผลมะละกอเปรียบเทียบกับส่วน ลำต้น ก้าน และใบ เตรียมไรออลโปรตีนโดยใช้ความร้อนจากเตาอบ เพื่อเป็นข้อมูลในการประดิษฐ์เตาอบลมร้อนต่อไป ตรวจสอบชนิดและปริมาณของไรออลโปรตีนในยางมะละกอพันธุ์พื้นเมือง ก่อนการตรึงเอนไซม์เพื่อใช้ในการไฮโดรไลส์โปรตีนในนมถั่วเหลือง ทั้งนี้เพื่อเพิ่มการละลายและการดูดซึมให้กับผลิตภัณฑ์นมถั่วเหลืองสดหรือน้ำเต้าหู้และนมถั่วเหลืองผง