บทที่ 3
ผลการทดลอง

ไธออลโปรติเอสที่นำมาทำการศึกษาในงานวิจัยนี้ เป็นเอนไซม์ที่รวบรวมได้จากมะละกอพันธุ์พื้นเมืองในจังหวัดเชียงใหม่ โดยศึกษาคุณสมบัติและชนิดของไธออลโปรติเอสก่อนที่จะนำไปเตรียมไธออลโปรติเอสชนิดหยาบ (crude thiol proteases) ด้วยการอบให้แห้งพร้อมกับหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ KMS ที่เติมลงไปเพื่อรักษาแอคติวิตีของโปรติเอสที่เตรียมได้ ไธออลโปรติเอสทั้งหมดในยางแห้งถูกตรึงด้วยวิธีดักจับ ดูดติด และจับด้วยไอออนบนตัวยึดต่างๆ ได้แก่ อัลจิเนต ทราย เบนโทไนท์ ซีไลท์ แอมเบอไลท์ XAD-7 ดูโอไลท์ A-368 ดูโอไลท์ C-280 ดูโอไลท์ C-464 CM-เซลลูโลส และDEAE-เซลลูโลส ทั้งนี้ได้เลือกวิธีตรึงด้วยดูโอไลท์ A-368 และ CM-เซลลูโลส เพื่อใช้ในการย่อยโปรตีนในถั่วเหลืองซึ่งทำให้เตรียมนมถั่วเหลืองสำเร็จรูปที่มีการละลายดีขึ้น โดยได้หาอัตราส่วนที่เหมาะสมของตัวยึดต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ และพีเอชที่เหมาะสมในการตรึง ตลอดจนตรวจหาอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของไธออลโปรติเอสตรึงก่อนนำไปหาประสิทธิภาพในการไฮโดรไลส์โปรตีนในถั่วเหลือง

3.1 แอคติวิตีของโปรติเอสจากยางมะละกอที่แตกต่างกัน

ส่วนต่างๆ ของมะละกอ เช่น ก้าน ใบ ผล และลำต้น มีน้ำยางมากน้อยแตกต่างกัน แต่เนื่องจากในลำต้นมีน้ำยางน้อยมาก ดังนั้นจึงนำยางจากส่วนอื่นๆ มาหาแอคติวิตีโปรติเอส โดยละลายยางในความเข้มข้น 1 มก./ลบ.ซม. ทำให้ได้ค่า A_{275} ซึ่งสามารถคำนวณหาแอคติวิตีได้ตามวิธีในภาคผนวก 1 ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 3.1 จากค่าที่ได้นำมาเปรียบเทียบกับ

ตาราง 3.1 แอคติวิตีของโปรติเอสในยางมะละกอของตัวอย่างต่างๆ จากการย่อยเคซีนในสารละลายพีเอช 7 ที่ 37 °C

ตัวอย่าง	A_{275} (แอคติวิตี)				แอคติวิตี (ยูนิต/มก.)
	1	2	3	เฉลี่ย	
ยางแห้ง (ซิกมา, 1.1 U/mg solid)	0.401	0.457	0.417	0.425	1.64
ยางสด					
ก้าน	0.189	0.248	0.193	0.210	0.81
ใบ	0.204	0.220	0.221	0.215	0.83
ผล	0.210	0.206	0.211	0.209	0.81
ผงเนื้อนุ่ม	0.037	0.024	0.038	0.033	0.0013

โปรติเอสในยางมะละกอออบแห้งของบริษัทซิกมา และโปรติเอสในผงเนื้อนุ่มเบลลี่ พบว่ายางมะละกอออบแห้งจากซิกมามีความเข้มข้นแอคติวิตีโปรติเอส 1.64 ยูนิต/มก. ในขณะที่ในผงเนื้อนุ่มมีความเข้มข้นแอคติวิตีเพียง 0.0013 ยูนิต/มก. ซึ่งต่ำมาก ส่วนโปรติเอสในยางมะละกอจากก้าน ใบ และผลมีค่าแอคติวิตีใกล้เคียงกันซึ่งเท่ากับ 0.81, 0.83 และ 0.81 ยูนิต/มก. ตามลำดับ แต่ปริมาณยางจากส่วนต่างๆ ของมะละกอแตกต่างกัน โดยผลมะละกอให้น้ำยางมากกว่าส่วนอื่น ซึ่งในการกรีดผลดิบที่มีน้ำหนัก 1 กก. ครั้งแรกจะมีปริมาณน้ำยางประมาณ 5 กรัม และลดลงเรื่อยๆ เมื่อกรีดในครั้งต่อไป ซึ่งปริมาณยางที่ได้ทั้งหมดประมาณ 10-15 กรัม ในขณะที่ลำต้นมีปริมาณยางน้อยกว่า 1 มก. ส่วนในก้านและใบให้น้ำยางประมาณ 2 มก. ดังนั้นจึงนำก้านและใบมาปั่นให้ละเอียดและสกัดเอาน้ำออกมาเพื่อหาแอคติวิตีโปรติเอสทั้งหมดต่อหนึ่งก้านและหนึ่งใบ โดยเจือจางสารสกัดที่เซนตริฟิวจ์แยกตะกอนที่ไม่ละลายออกแล้ว 100 เท่า ก่อนหาแอคติวิตี ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 3.2 ซึ่งพบว่าก้านและใบที่มีน้ำหนัก 44.84 และ 41.57 กรัม เมื่อนำมาปั่นจะได้สารละลายปริมาตร 15 และ 10 ลบ.ซม. และมีแอคติวิตีโปรติเอสเท่ากับ 8 และ 226 ยูนิต ตามลำดับ

ตาราง 3.2 แอคติวิตีทั้งหมดของโปรติเอสในก้านและใบมะละกอในสารละลายพีเอช 7 ที่ 37 °C

ตัวอย่าง	น้ำหนัก (กรัม)	สารละลาย (ลบ.ซม.)	A_{275} (แอคติวิตี)				แอคติวิตีทั้งหมด (ยูนิต)
			1	2	3	เฉลี่ย	
ก้าน	44.84	15	0.527	0.531	0.524	0.527	8
ใบ	41.57	10	0.468	0.483	0.449	0.467	226

3.2 คุณสมบัติของโปรติเอสในยางมะละกอ

เนื่องจากผลมะละกอดิบมีปริมาณน้ำยางมากกว่าส่วนอื่นของต้นมะละกอ ดังนั้นจึงเลือกกรีดยางจากผลมาศึกษาคุณสมบัติของโปรติเอส

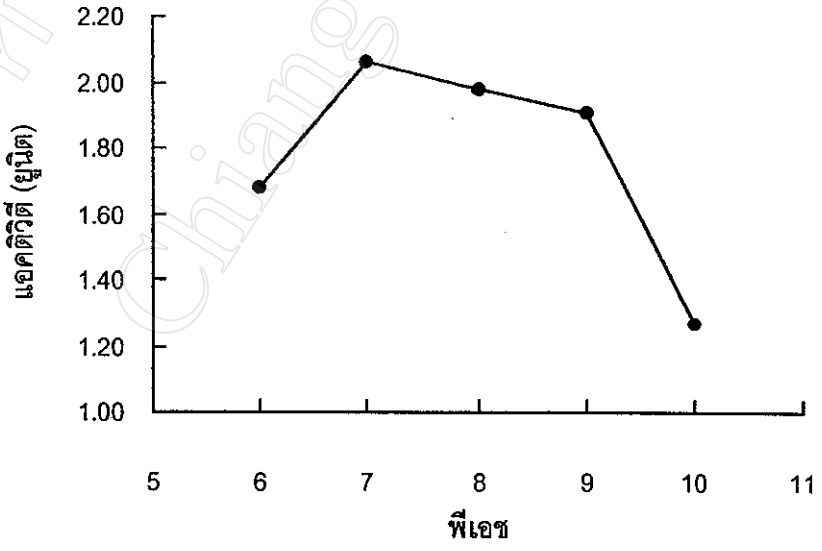
3.2.1 พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสม

ผลจากการใช้สารละลายยางมะละกอสด 1 มก./ลบ.ซม. ในการย่อยเคซีนที่อุณหภูมิ 37°C ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 6, 7, 8, 9 และ 10 พบว่าแอคติวิตีของโปรติเอสมีค่ามากที่สุดในสารละลายพีเอช 7 ซึ่งเท่ากับ 2.06 ยูนิต/มก. ดังแสดงในตารางที่ 3.3 และเมื่อนำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีกับพีเอชซึ่งแสดงในรูปที่ 3.1 จะเห็นได้ว่าแอคติวิตีของโปรติเอสมีค่าใกล้เคียงกันในช่วงพีเอช 7-9 และที่พีเอช 7 โปรติเอสมีแอคติวิตีสูงที่สุดเท่ากับ 2.06

ยูนิต/มก. ส่วนที่พีเอช 6 และ 10 โปรติเอสมีแอคติวิตีคิดเป็น 82 และ 62% เมื่อเทียบกับแอคติวิตีสูงสุด

ตาราง 3.3 แอคติวิตีของโปรติเอสจากยางมะละกอสดในการย่อยเคซีนที่อุณหภูมิ 37°C ในสารละลายพีเอช 6-10

พีเอช	A_{275} (แอคติวิตี)				แอคติวิตี (ยูนิต/มก.)
	1	2	3	เฉลี่ย	
6	0.441	0.428	0.436	0.435	1.68
7	0.529	0.531	0.539	0.533	2.06
8	0.509	0.517	0.510	0.512	1.98
9	0.487	0.511	0.484	0.494	1.91
10	0.331	0.325	0.331	0.329	1.27

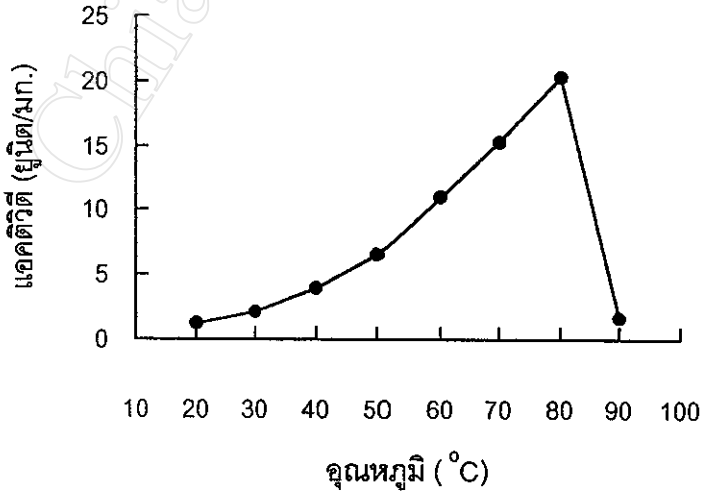


รูป 3.1 แอคติวิตีของโปรติเอสจากยางมะละกอสดในการย่อยเคซีนในสารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ ที่อุณหภูมิ 37°C

ในการหาแอคติวิตีของโปรติเอสจากสารละลายยางมะละกอสด 1 มก./ลบ.ซม.โดยใช้เคซีนเป็นสับเสตรทในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7 ที่อุณหภูมิ 20-90°C พบว่าโปรติเอสมีแอคติวิตีสูงที่สุดที่ 80°C ซึ่งเท่ากับ 20.29 ยูนิต/มก. (ตารางที่ 3.4) และเมื่อเทียบแอคติวิตีที่อุณหภูมิต่างๆ กับแอคติวิตีที่อุณหภูมิ 80°C ทำให้ได้แอคติวิตีที่มีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิดังแสดงในรูปที่ 3.2 จะเห็นได้ว่าโปรติเอสมีแอคติวิตีเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิจาก 20-80°C และลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 90°C ซึ่งเหลือเพียง 8% ของแอคติวิตีสูงสุด

ตาราง 3.4 แอคติวิตีของโปรติเอสจากยางมะละกอสดในการย่อยเคซีนในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7 ที่อุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิ (°C)	เจือจาง (เท่า)	A_{275} (แอคติวิตี)				แอคติวิตี (ยูนิต/มก.)
		1	2	3	เฉลี่ย	
20	-	0.304	0.278	0.312	0.298	1.15
30	-	0.497	0.548	0.617	0.554	2.14
40	10	0.104	0.102	0.100	0.102	3.96
50	10	0.167	0.173	0.170	0.170	6.57
60	10	0.291	0.272	0.289	0.284	10.98
70	10	0.389	0.404	0.395	0.396	15.30
80	10	0.531	0.519	0.525	0.525	20.29
90	-	0.441	0.448	0.431	0.440	1.70



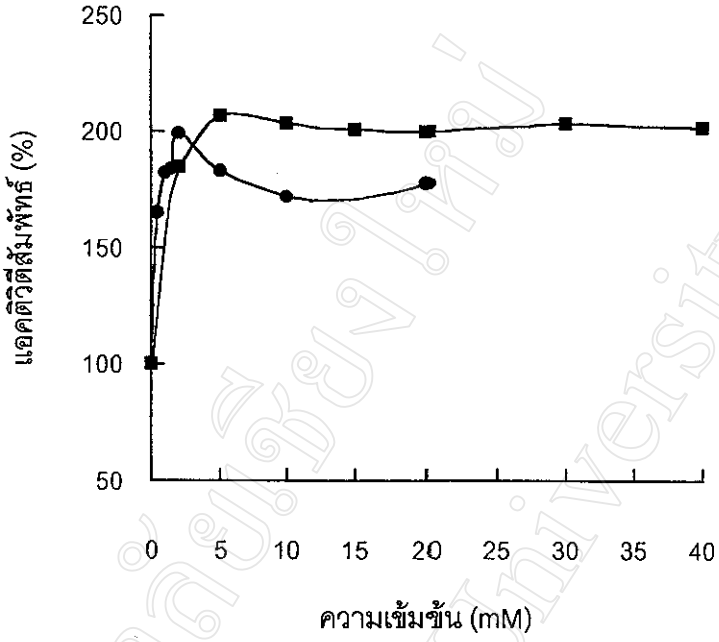
รูป 3.2 การย่อยเคซีนโดยโปรติเอสในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 7 ที่อุณหภูมิต่างๆ

3.2.2 อิทธิพลของ EDTA และซิสเทอีนต่อการทำงานของโปรติเอส

EDTA และซิสเทอีนมีผลต่อการทำงานของไธออลโปรติเอส ซึ่งจากการเติม EDTA 0.5-20 mM และซิสเทอีน 2-40 mM ลงไปในสารละลายปฏิกิริยาของการย่อยเคซีนด้วยโปรติเอสจากยางมะละกอสด 1 มก./ลบ.ซม. ที่อุณหภูมิ 37 °C ในสารละลายพีเอช 7 พบว่าโปรติเอสมีแอคติวิตีสูงที่สุดเท่ากับ 1.95 และ 2.51 ยูนิต/มก. เมื่อใช้ EDTA และซิสเทอีน 2 และ 5 mM ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3.5 และเมื่อเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีสัมพัทธ์ (แอคติวิตีเมื่อไม่มี EDTA หรือซิสเทอีน = 100%) กับความเข้มข้นของ EDTA และซิสเทอีน ได้ผลแสดงดังรูปที่ 3.3 จะเห็นได้ว่า โปรติเอสมีแอคติวิตีเพิ่มขึ้นและมากที่สุดถึง 199 และ 207% เมื่อมีความเข้มข้นของ EDTA และซิสเทอีน 2 และ 5 mM ตามลำดับ ในขณะที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ EDTA เป็น 5 และ 10 mM มีผลทำให้แอคติวิตีสัมพัทธ์ลดลงและค่อนข้างคงที่หลังจากเพิ่ม EDTA เป็น 20 mM ในขณะที่การเติมซิสเทอีนนั้นให้ค่าแอคติวิตีสัมพัทธ์ค่อนข้างคงที่หลังจากเพิ่มความเข้มข้นสูงกว่า 5 mM นั่นคือควรเติม EDTA และซิสเทอีน 2 และ 5 mM ตามลำดับ เพื่อให้ได้แอคติวิตีของโปรติเอสมากที่สุด

ตาราง 3.5 แอคติวิตีของโปรติเอสจากยางมะละกอสดในการย่อยเคซีนที่อุณหภูมิ 37°C ในสารละลายพีเอช 7 เมื่อมี EDTA และซิสเทอีน 0-20 และ 0-40 mM

EDTA (mM)	A_{275} (แอคติวิตี)			แอคติ-วิตี (U/mg)	แอคติ-วิตีสัมพัทธ์ (%)	cysteine (mM)	A_{275} (แอคติวิตี)			แอคติ-วิตี (U/mg)	แอคติ-วิตีสัมพัทธ์ (%)
	1	2	เฉลี่ย				1	2	เฉลี่ย		
0	0.249	0.259	0.254	0.98	100	0	0.309	0.317	0.313	1.21	100
0.5	0.417	0.421	0.419	1.62	165	2	0.578	0.582	0.580	2.24	185
1.0	0.458	0.464	0.461	1.78	182	5	0.652	0.646	0.649	2.51	207
1.5	0.459	0.473	0.466	1.80	184	10	0.627	0.645	0.636	2.46	203
2.0	0.512	0.498	0.505	1.95	199	15	0.631	0.627	0.629	2.43	201
5.0	0.462	0.463	0.463	1.79	183	20	0.632	0.620	0.626	2.42	200
10.0	0.431	0.443	0.437	1.69	172	30	0.643	0.625	0.634	2.45	202
20.0	0.448	0.452	0.450	1.74	178	40	0.636	0.626	0.631	2.44	202



รูป 3.3 ผลของ EDTA (●) และซิสเทอีน (■) ต่อแอคติวิตีของโปรติเอสจากยางมะละกอสดในการย่อยเคซีนในสารละลายพีเอช 7 ที่อุณหภูมิ 37°C

3.3 การแยกและตรวจสอบไธออลโปรติเอสจากยางมะละกอ

ปาเปนและไคโมปาเปนเป็นไธออลโปรติเอส 2 ใน 5 ชนิดหลักที่พบในยางมะละกอที่สามารถแยกได้โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 40 และ 60% ตามลำดับ[41,65] ไธออลโปรติเอสทั้งสองที่แยกได้นี้ทำให้บริสุทธิ์มากขึ้น โดยการตกตะกอนต่อด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 10 และ 100% สำหรับปาเปนและไคโมปาเปน ตามลำดับ[65,66] ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทดลองใช้วิธีตกตะกอนด้วย 30-80% แอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว เพื่อตรวจสอบการแยกไธออลโปรติเอสชนิดอื่น ทั้งนี้ได้ใช้แคโทดอิเลคโตรฟอริซิสวิเคราะห์ชนิดของไธออลโปรติเอสโดยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานและรูปแบบของแถบโปรตีนที่ศึกษาไว้โดย Buttle และ Sumner[21,22]

3.3.1 การทำบริสุทธิ์ปาเปน

การเตรียมปาเปนจากน้ำยางมะละกอ 10 กรัม ซึ่งมีแอคติวิตีเริ่มต้น 7,738 ยูนิต และปริมาณโปรตีน 460 มก. ดังแสดงในตารางที่ 3.6 โดยขั้นตอนต่างๆ ได้แก่ การเตรียมสารสกัดหยาบ การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 40% อิ่มตัว การตกตะกอนด้วยโซเดียมคลอไรด์ 10% การตกผลึกและการตกผลึกใหม่ด้วยโซเดียมคลอไรด์ พบว่าปาเปนที่ได้มีแอคติวิตี 340 ยูนิต และปริมาณโปรตีน 13 มก. ซึ่งเมื่อนำไปคำนวณหาแอคติวิตีจำเพาะและผลผลิต พบว่า

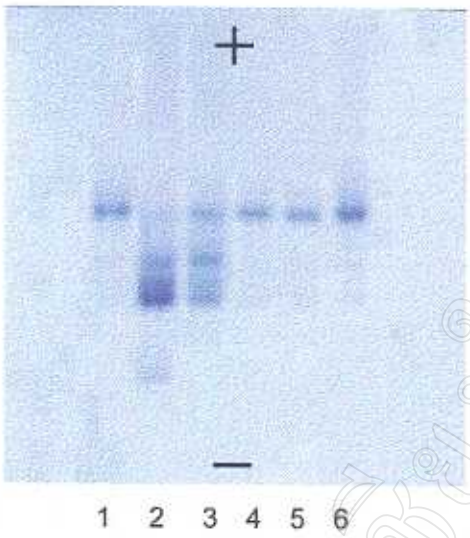
ปาเปนมีแอคติวิตีจำเพาะ 26 ยูนิต/มก. และผลผลิตเท่ากับ 4% ดังแสดงในตารางที่ 3.7 นำโปรติเอสที่ตกตะกอนได้จากขั้นตอนต่างๆ ในการทำบริสุทธิ์ปาเปนไปตรวจสอบด้วยแคโทดอิเลคโตรฟอริซิส ได้ผลดังในรูปที่ 3.4 จะเห็นว่า ในสารสกัดหยาบของเอนไซม์ (ช่องที่ 2) ประกอบด้วยโปรตีน 4 ชนิด หลังจากตกตะกอนด้วยสารละลาย 40% แอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว (ช่องที่ 3) สามารถแยกโปรตีนได้ 3 ชนิด เมื่อตกผลึกตะกอนโปรตีนต่อไปด้วย NaCl 10% จะเห็นว่า ได้แถบโปรตีนเหลือเพียงแถบเดียว (ช่อง 4) ซึ่งแสดงว่าตะกอนโปรตีนที่ได้มีความบริสุทธิ์ และเมื่อเทียบกับแถบโปรตีนของปาเปนมาตรฐาน (ช่อง 6) แสดงว่าการตกผลึกด้วย NaCl 10% นั้น

ตาราง 3.6 แอคติวิตีและโปรตีนของปาเปนในขั้นตอนต่างๆ ของการทำปาเปนให้บริสุทธิ์

ขั้นตอน	สารละลายทั้งหมด (ลบ.ซม.)	เจือจาง (เท่า)	A_{275} (แอคติวิตี)			เจือจาง (เท่า)	A_{595} (โปรตีน)		
			1	2	เฉลี่ย		1	2	เฉลี่ย
สารสกัดหยาบ	70	100	0.295	0.277	0.286	100	0.074	0.050	0.062
40 % sat. $(NH_4)_2SO_4$	20	100	0.118	0.184	0.151	10	0.298	0.228	0.263
10 % NaCl	10	100	0.289	0.290	0.290	100	0.055	0.029	0.042
ตกผลึกด้วย NaCl	10	100	0.158	0.148	0.153	10	0.229	0.213	0.221
ตกผลึกใหม่ด้วย NaCl	5	100	0.180	0.172	0.176	10	0.235	0.259	0.247

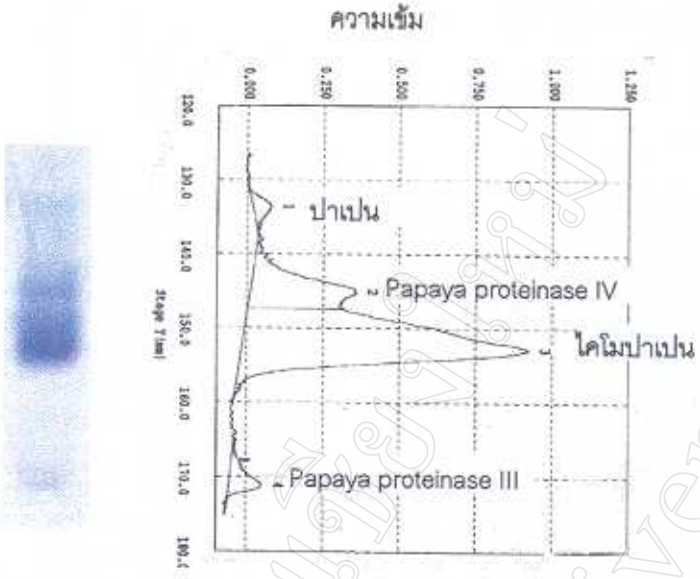
ตาราง 3.7 แอคติวิตีจำเพาะและผลผลิตของปาเปนในขั้นตอนต่างๆ ของการทำปาเปนให้บริสุทธิ์บางส่วน

ขั้นตอน	แอคติวิตี (ยูนิต)	โปรตีน (มก.)	แอคติวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มก.)	ผลผลิต (%)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
สารสกัดหยาบ	7,738	460	17	100	1.00
40 % sat.$(NH_4)_2SO_4$	1,167	56	21	15	1.24
10 % NaCl	1,121	45	25	14	1.47
ตกผลึกด้วย NaCl	591	23	26	8	1.53
ตกผลึกใหม่ด้วย NaCl	340	13	26	4	1.53

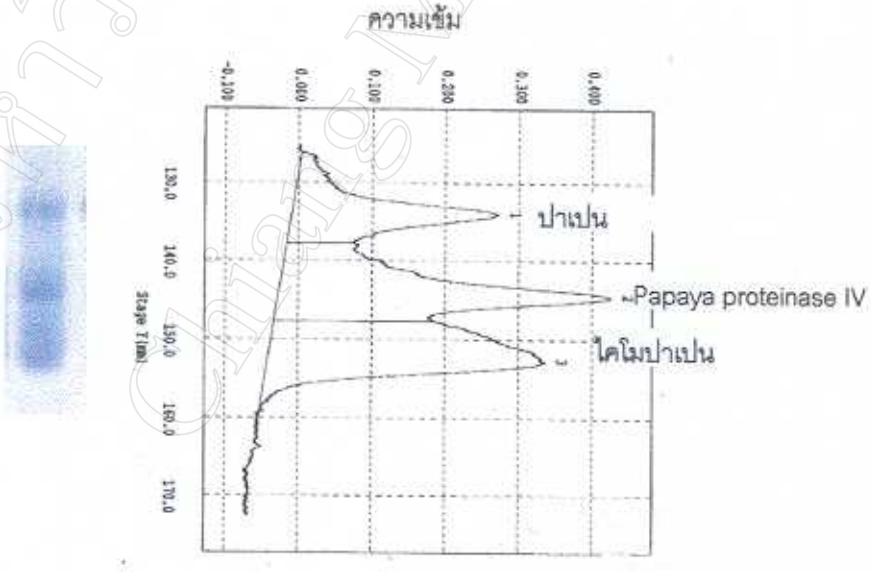


รูป 3.4 แคโทดอิเลคโตรฟอริซิสของปาเปนที่ทำบริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอน โดยช่องที่ 1 และ 6 เป็นปาเปนมาตรฐาน ช่องที่ 2 เป็นสารสกัดหยาบ ช่องที่ 3, 4 และ 5 เป็นโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 40% อิ่มตัว โปรตีนที่ตกผลึกอีกครั้งด้วยโซเดียมคลอไรด์ 10% และโปรตีนที่ตกผลึกใหม่ด้วยโซเดียมคลอไรด์ ตามลำดับ

ทำให้ได้ปาเปนที่บริสุทธิ์ โดยไม่ต้องตกผลึกใหม่อีกครั้ง (ช่อง 5) และจากการเทียบผลอิเลคโตรฟอริซิสที่ได้กับแถบโปรตีนที่แยกได้ของ Buttle และ Sumner คาดว่าโปรตีนทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ปาเปน พาพายา โปรติเนส IV (papaya protenase IV) ไคโมปาเปน และพาพายา โปรติเนส III (papaya protenase III) ซึ่งเมื่อตรวจความเข้มของแถบโปรตีนในสารสกัดหยาบ (ช่อง 2) และโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต 40% อิ่มตัว (ช่อง 3) โดยใช้เครื่องเดนซิโทมิเตอร์ ได้ผลดังรูปที่ 3.5 และ 3.6 ตามลำดับ โดยมีพื้นที่ใต้พีคดังในตารางที่ 3.8 ซึ่งสามารถนำไปคำนวณหาปริมาณโปรติเอสแต่ละชนิดได้ คาดว่าสารสกัดหยาบประกอบด้วยปาเปน พาพายาโปรติเนส IV ไคโมปาเปน และพาพายาโปรติเนส III 2, 21, 72 และ 5% ตามลำดับ และหลังจากตกตะกอนด้วยสารละลาย 40% แอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว พบว่า ได้ไธออลโปรติเอสที่ประกอบด้วยปาเปน 21% ส่วนพาพายา โปรติเนส IV และไคโมปาเปนได้ 39% เท่ากัน ทั้งนี้คิดเป็นสัดส่วนของแอคติวิตีโปรติเอสทั้งหมด



รูป 3.5 ความเข้มของแถบโปรตีนในสารสกัดหยาบที่แยกโดยอิเลคโตรฟอริซิสซึ่งตรวจด้วยเครื่องเดนซิโทมิเตอร์



รูป 3.6 ความเข้มของแถบโปรตีนในสารละลายโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต 40% อิ่มตัว และแยกโดยอิเลคโตรฟอริซิสซึ่งตรวจด้วยเครื่องเดนซิโทมิเตอร์

ตาราง 3.8 ร้อยละของไธออลโปรติเอสในสารสกัดหยาบจากยางมะละกอ และโปรตีนที่ตกตะกอนออกมาด้วย 40% ของแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว ซึ่งแยกโดยแคโทดอิเลคโตรฟอริซิสและวัดปริมาณโดยเดนซิโทมิเตอร์

สารตัวอย่าง	พื้นที่ใต้พีค (ตร.มม.)	ร้อยละ
สารสกัดหยาบจากยางมะละกอ	7314.433	100
ปาเปน	173.585	2
พาพายา โปรติเนส IV	1536.042	21
ไคโมปาเปน	5267.113	72
พาพายา โปรติเนส III	337.693	5
โปรตีนที่แยกด้วย 40% sat.$(NH_4)_2SO_4$	5871.755	100
ปาเปน	1258.691	21
พาพายา โปรติเนส IV	2305.907	39
ไคโมปาเปน	2307.157	39

3.3.2 การแยกโปรติเอส

การตกตะกอนแยกโปรติเอสจากสารสกัดหยาบ (crude extract) ของยางมะละกอสด 10 กรัม ซึ่งมีแอคติวิตีของโปรติเอสเริ่มต้นเท่ากับ 6,957 ยูนิต (ตารางที่ 3.9) โดยทำให้สารละลายเอนไซม์มีแอมโมเนียมซัลเฟต 20-80% ของสารละลายอิ่มตัว พบว่าโปรติเอสเริ่มตกตะกอนได้ที่แอมโมเนียมซัลเฟต 30% ของสารละลายอิ่มตัว และเมื่อทำให้สารละลายเอนไซม์มีแอมโมเนียมซัลเฟต 60% ของสารละลายอิ่มตัว โปรติเอสมีแอคติวิตีมากที่สุดเท่ากับ 2,408 ยูนิต พร้อมกับได้ปริมาณโปรตีน 91 มก. ซึ่งมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับตะกอนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 20-80% ของสารละลายอิ่มตัว แอคติวิตีจำเพาะและผลผลิตที่ได้แสดงในตารางที่ 3.10 จะเห็นว่าโปรติเอสมีแอคติวิตีจำเพาะมากที่สุดและรองลงมาเท่ากับ 26 และ 21 ยูนิต/มก. ตามลำดับ เมื่อทำให้สารละลายเอนไซม์มีแอมโมเนียมซัลเฟต 60 และ 40% ของสารละลายอิ่มตัว ตามลำดับ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 60% ของสารละลายอิ่มตัว สามารถแยกโปรติเอสออกมาได้ถึง 20% ซึ่งเป็นผลผลิตที่สูงที่สุดในบรรดาตะกอนโปรติเอสที่แยกได้

ตาราง 3.9 แอคติวิตีและโปรตีนของโปรติเอสที่ได้จากการตกตะกอนออกจากสารละลายยางมะละกอสดด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 20-80% อิ่มตัว

แอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว (%)	สารละลายทั้งหมด (ลบ. ซม.)	A_{275} (แอคติวิตี)			เจือจาง (เท่า)	แอคติวิตี (ยูนิต)	A_{595} (โปรตีน)			เจือจาง (เท่า)	โปรตีน (มก.)
		1	2	เฉลี่ย			1	2	เฉลี่ย		
0	60	0.287	0.313	0.300	100	6,957	0.062	0.080	0.071	100	453
1-30	10	0.471	0.453	0.462	10	179	0.091	0.099	0.095	10	10
31-40	10	0.678	0.622	0.650	10	251	0.121	0.111	0.116	10	12
41-50	10	0.313	0.273	0.293	100	1,132	0.061	0.057	0.059	100	63
51-60	10	0.689	0.557	0.623	100	2,408	0.066	0.096	0.081	100	91
61-70	10	0.183	0.231	0.207	100	800	0.067	0.079	0.073	100	78
71-80	10	0.304	0.258	0.281	10	109	0.108	0.125	0.117	10	12

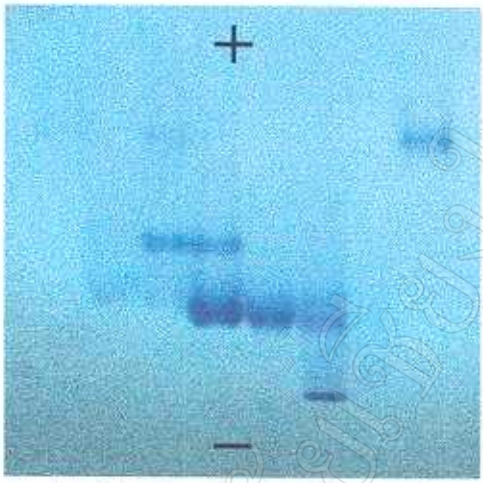
ตาราง 3.10 แอคติวิตีจำเพาะและผลผลิตของโปรติเอสจากการตกตะกอนออกจากสารละลายยางมะละกอสดด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 20-80% อิ่มตัว

แอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว (%)	แอคติวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มก.)	ผลผลิต (%)
0	15	100
1-30	18	2
31-40	21	3
41-50	18	14
51-60	26	20
61-70	10	17
71-80	9	3

3.3.3 ชนิดของไธออลโปรติเอสในยางมะละกอ

จากการแยกไธออลโปรติเอสจากยางมะละกอ โดยตกตะกอนสารละลายเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 20-80% อิ่มตัวและกำจัดเกลืออออกจากตะกอนโดยไดอะไลซิสในสารละลายซิสเทอีน ก่อนการตรวจสอบชนิดของไธออลโปรติเอสด้วยแคทไอออนิคอิเลคโตรฟอริซิส ซึ่งได้แถบสีโปรตีนหลังจากย้อมด้วย coomassie brilliant blue ดังผลในรูปที่ 3.7 เห็นได้ว่า ปาเปน

พาพายาโปรติเนส IV ไคโมปาเปน และพาพายาโปรติเนส III สามารถแยกออกจากกันได้เมื่อตกตะกอนด้วย 40, 40-50, 50-70 และ 70% สารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว ตามลำดับ



รูป 3.7 แคโทดอิเลคโตรฟอริซิสของโปรตีนจากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 20-80% อิ่มตัว โดยช่องที่ 1 และ 8 เป็นปาเปนมาตรฐาน ช่องที่ 2 เป็นสารสกัดหยาบ ช่องที่ 3, 4, 5, 6 และ 7 เป็นไธออลโปรติเอสที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 40, 50, 60, 70 และ 80% อิ่มตัว ตามลำดับ

3.4 การเตรียมไธออลโปรติเอสจากยางมะละกอสด

ในการเตรียมไธออลโปรติเอสจากยางมะละกอ ได้ทดลองอบยางสด 1 กรัม เปรียบเทียบกับยางสดที่ผสม KMS โดยให้มีพื้นที่ผิว 7 ตร.ซม. หนา 1 มม. ในช่วงอุณหภูมิ 60-80°C เพื่อเลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมก่อนที่จะทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมในช่วง 1-5 ชั่วโมง ตามด้วยการศึกษาอิทธิพลของ KMS ที่มีต่อประสิทธิภาพของไธออลโปรติเอส

3.4.1 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการอบแห้ง

ผลของการอบยางมะละกอที่เติมและไม่เติม KMS 0.05% ที่อุณหภูมิ 60, 70 และ 80°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ได้ยางมะละกออบแห้งที่มีน้ำหนักดังแสดงในตาราง 3.11 และในตารางที่ 3.12 แสดงร้อยละของน้ำหนักยางอบแห้งเทียบกับยางสดและแอคติวิตีโปรติเอสที่เตรียมได้ ซึ่งจะเห็นได้ว่าแอคติวิตีของไธออลโปรติเอสในยางมะละกอที่อบในอุณหภูมิ 60°C มีค่าสูงที่สุด 151% และลดลงเหลือ 148 และ 122% เมื่ออบที่อุณหภูมิ 70 และ 80°C ตามลำดับ เช่นเดียวกับ

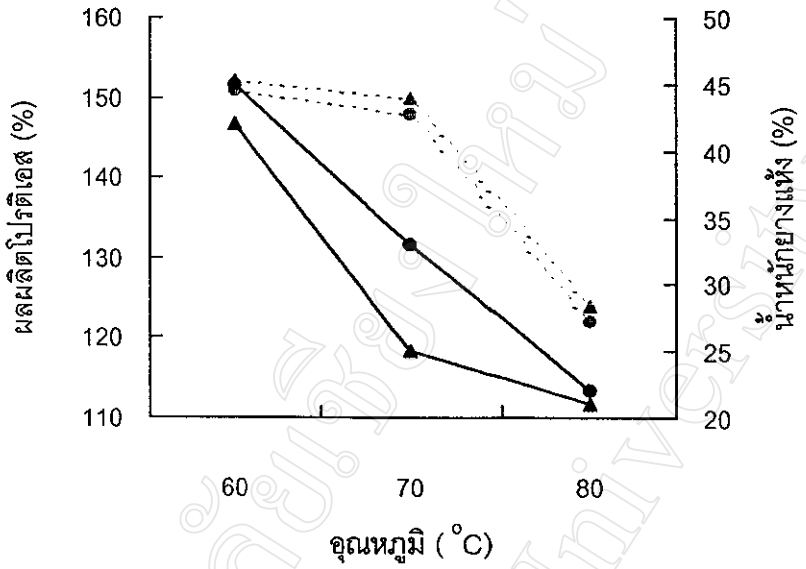
ยางอบที่มี 0.05 % KMS มีแอคติวิตีโปรติเอสเมื่ออบที่อุณหภูมิ 60, 70 และ 80°C เท่ากับ 152, 150 และ 124% ตามลำดับ จากรูป 3.8 ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิกับร้อยละของแอคติวิตีโปรติเอสและของน้ำหนักยางแห้งเทียบกับยางสด จะเห็นว่าการอบยางที่ 60°C ทำให้ได้ยางอบที่มีไธออลโปรติเอสมากที่สุด แต่เนื่องจากน้ำหนักยางอบ (45%) ยังคงเหลือน้ำค่อนข้างมากเมื่อเปรียบเทียบกับการอบที่ 80°C ซึ่งเหลือน้ำหนักยางอบเพียง 21-22% ดังนั้นจึงได้ทดลองเพิ่มเวลาในการอบเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสม

ตาราง 3.11 น้ำหนักยางแห้งที่ได้จากการอบยางสด 1 กรัม ที่อุณหภูมิต่างๆ 1 ชั่วโมง และผลการวิเคราะห์แอคติวิตีโปรติเอสที่ 37°C

ตัวอย่าง	เจือจาง (เท่า)	อุณหภูมิ (°C)					
		60		70		80	
		น้ำหนัก (กรัม)	A_{275}	น้ำหนัก (กรัม)	A_{275}	น้ำหนัก (กรัม)	A_{275}
ยางสดเริ่มต้น	-	1.0000	0.218	1.0000	0.218	1.0000	0.218
ยางอบ	100	0.4507	0.330	0.3339	0.322	0.2162	0.266
ยางอบ+0.5%KMS	100	0.4203	0.332	0.2455	0.327	0.2141	0.270

ตาราง 3.12 ผลผลิตของไธออลโปรติเอสและร้อยละของน้ำหนักยางแห้งเมื่ออบยางสด 1 กรัมที่อุณหภูมิ 60, 70 และ 80 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	อุณหภูมิ (°C)								
	60			70			80		
	น.น. (%)	แอคติวิตี (ยูนิต)	ผลผลิตโปรติเอส (%)	น.น. (%)	แอคติวิตี (ยูนิต)	ผลผลิตโปรติเอส (%)	น.น. (%)	แอคติวิตี (ยูนิต)	ผลผลิตโปรติเอส (%)
ยางสด	100	843	100	100	843	100	100	843	100
ยางอบ	45	1,276	151	33	1,244	148	22	1,028	122
ยางอบ+0.5%KMS	42	1,283	152	25	1,264	150	21	1,044	124



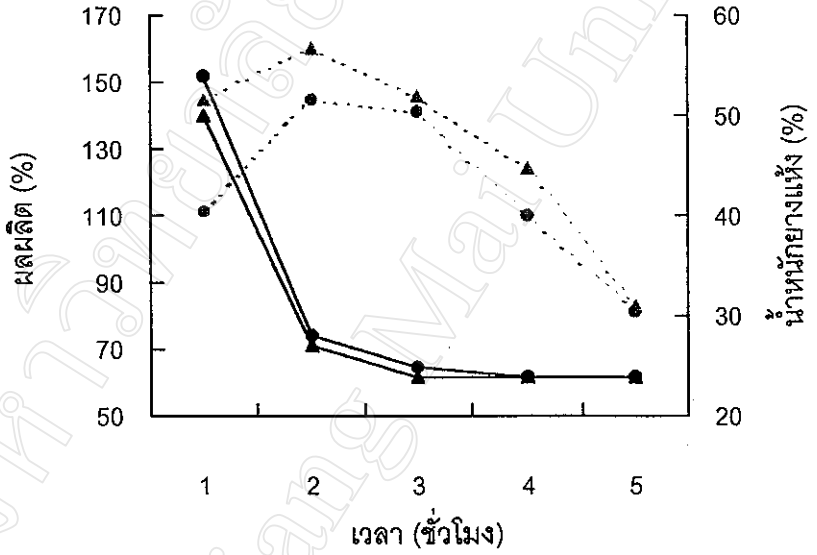
รูป 3.8 ร้อยละของน้ำหนัก (—) และผลผลิตของโปรติเอส (---) ที่ได้จากการอบยางสด (●) และยางผสม KMS 0.5% (▲) ที่อุณหภูมิ 60-80°C 1 ชั่วโมง

3.4.2 การเลือกระยะเวลาที่เหมาะสม

การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเตรียมไธออลโปรติเอส ในกรณีของยางอบที่ไม่ได้เติม KMS เมื่ออบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 1-5 ชั่วโมง ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3.13 ซึ่งได้น้ำหนักยางแห้งและแอคติวิตีโปรติเอสดังแสดงในตารางที่ 3.14 แอคติวิตีของโปรติเอสมีค่าสูงสุดที่ 145% เมื่ออบยางมะละกอเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในขณะที่การอบที่ 1, 3, 4 และ 5 ชั่วโมง ทำให้ได้ยางอบที่มีแอคติวิตีโปรติเอสที่ 111, 141, 110 และ 81% ตามลำดับ ส่วนยางอบที่มี 0.5% KMS มีแอคติวิตีของโปรติเอสที่ต่างจากกรณีที่ไม่เติม KMS ซึ่งเท่ากับ 145, 160, 146, 124 และ 83% เมื่ออบยางเป็นเวลา 1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่าแอคติวิตีโปรติเอสยังคงสูงสุดในการอบ 2 ชั่วโมง เช่นเดียวกับยางอบที่ไม่เติม KMS จากผลที่ได้ในตารางที่ 3.14 เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลผลิตของโปรติเอสและน้ำหนักยางแห้งกับเวลาที่ใช้ในการอบได้ดังในรูปที่ 3.9 ซึ่งแสดงว่ายางอบที่เติมหรือไม่เติม KMS 0.05% มีแอคติวิตีโปรติเอสและน้ำหนักที่เทียบกับยางสดใกล้เคียงกันมาก ยกเว้นแอคติวิตีโปรติเอสในยางอบที่ 1 ชั่วโมง ที่แตกต่างกันค่อนข้างมาก เมื่อพิจารณาจากกราฟจะเห็นว่าการอบที่ 60°C 2 ชั่วโมงจะทำให้ได้ยางอบที่มีความแห้งที่ไม่ต่างจากการอบ 3-5 ชั่วโมง โดยยังคงมีไธออลโปรติเอสที่มีแอคติวิตีสูงที่สุด นั่นคือควรอบน้ำยางมะละกอที่ 60°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งทำให้ได้ไธออลโปรติเอสที่มีแอคติวิตีดีที่สุด

ตาราง 3.13 A_{275} ของไธออลโปรติเอสในยางมะละกอออบแห้งและน้ำหนักยางแห้งเมื่ออบยางสด 1 กรัม ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	เวลา (ชั่วโมง)									
	1		2		3		4		5	
	น.น. (กรัม)	A_{275}	น.น. (กรัม)	A_{275}	น.น. (กรัม)	A_{275}	น.น. (กรัม)	A_{275}	น.น. (กรัม)	A_{275}
ยางดิบ	1.0000	0.215	1.0000	0.215	1.0000	0.215	1.0000	0.215	1.0000	0.215
ยางอบ	0.5443	0.238	0.2779	0.311	0.2462	0.304	0.2404	0.236	0.2380	0.173
ยางอบ+ 0.5%KMS	0.5046	0.311	0.2663	0.343	0.2427	0.313	0.2372	0.267	0.2354	0.179



รูป 3.9 ร้อยละของน้ำหนัก (—) และผลผลิตของโปรติเอส (---) ที่ได้จากการอบยางสด (●) และยางผสม KMS 0.5% (▲) ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 1-5 ชั่วโมง

3.4.3 การศึกษาอิทธิพลของ KMS

เมื่ออบยางมะละกอสด 1 กรัม ที่มีแอคติวิตีของโปรติเอส 1,070 ยูนิต โดยเติม KMS 0.05-100% (w/w) ก่อนอบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าโปรติเอสมีแอคติวิตีมากที่สุดในยางที่เติม 0.5% KMS ดังในตารางที่ 3.15 ซึ่งจะเห็นว่าการเติม KMS 0.05% จะทำให้โปรติเอสในยางอบมีแอคติวิตีสูงขึ้น 46% เมื่อเทียบกับแอคติวิตีของยางสด การเติม KMS 0.05-5% ทำให้โปรติเอสมีแอคติวิตีค่อนข้างจะอยู่ในระดับเดียวกันคือมีแอคติวิตีสูงขึ้น 40-53% เมื่อเพิ่ม

ตาราง 3.14 ผลผลิตของไธออลโปรติเอสและร้อยละของน้ำหนักยางแห้งเมื่ออบยางสด 1 กรัมที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 1- 5 ชั่วโมง

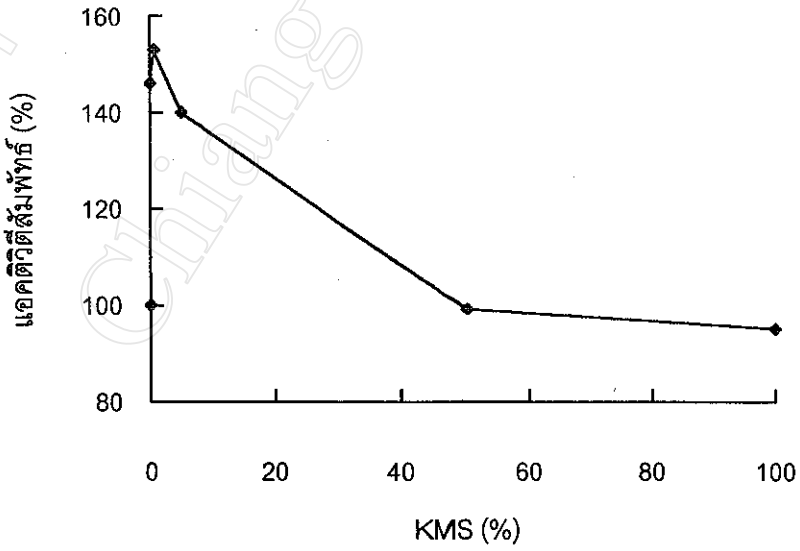
ตัวอย่าง	เวลา (ชั่วโมง)														
	1			2			3			4			5		
	น.น. (%)	แอคติวิตี (ยูนิต)	ผลผลิต (%)	น.น. (%)	แอคติวิตี (ยูนิต)	ผลผลิต (%)	น.น. (%)	แอคติวิตี (ยูนิต)	ผลผลิต (%)	น.น. (%)	แอคติวิตี (ยูนิต)	ผลผลิต (%)	น.น. (%)	แอคติวิตี (ยูนิต)	ผลผลิต (%)
ยางดิบ	100	831	100	100	831	100	100	831	100	100	831	100	100	831	100
ยางอบ	54	920	111	28	1,202	145	25	1,175	141	24	912	110	24	669	81
ยางอบ +0.5%KMS	50	1,202	145	27	1,326	160	24	1,210	146	24	1,032	124	24	692	83

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ปริมาณ KMS เป็น 50 และ100% แอคติวิตีของโปรติเอสลดลง 1-5% เมื่อเทียบกับแอคติวิตีเริ่มต้น ดังแสดงในรูปที่ 3.10 ซึ่งแสดงว่าการเติม KMS 0.5% ก่อนอบที่ 60°C 2 ชั่วโมง ทำให้ได้ยางอบแห้งที่มีแอคติวิตีโปรติเอสสูงสุด

ตาราง 3.15 แอคติวิตีสัมพัทธ์ของไธออลโปรติเอสในยางมะละกออบแห้งที่มีการเติม 0-100% KMS ลงในยางก่อนอบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

KMS (%)	น้ำหนักยางแห้ง (กรัม)	A_{275}			แอคติวิตี (ยูนิต)	แอคติวิตีสัมพัทธ์ (%)
		1	2	เฉลี่ย		
0	0.2775	0.314	0.308	0.311	1,202	100
0.05	0.2753	0.468	0.440	0.454	1,755	146
0.5	0.2669	0.480	0.474	0.477	1,844	153
5	0.3021	0.421	0.447	0.434	1,677	140
50	0.7697	0.323	0.291	0.307	1,187	99
100	1.2482	0.299	0.293	0.296	1,144	95



รูป 3.10 ผลของ KMS ต่อแอคติวิตีของไธออลโปรติเอสในยางมะละกออบแห้งเมื่อเทียบกับแอคติวิตีในยางสด

3.5 การตรึงไธออลโปรติเอส

ไธออลโปรติเอสในยางมะละกอออบแห้งซึ่งเตรียมได้จากการอบยางที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ถูกนำมาตรึงบนตัวยึดชนิดต่างๆ จากนั้น จึงเลือกศึกษาการตรึงเอนไซม์ด้วยดูโอไลท์ A-368 และ CM-เซลลูโลส โดยทดสอบหาปริมาณตัวยึดและพีเอชที่เหมาะสมในการตรึงก่อนตรวจหาอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสม ตลอดจนประสิทธิภาพของเอนไซม์ตรึงที่นำกลับคืนมาใช้ใหม่ ไธออลโปรติเอสที่ถูกตรึงด้วย CM-เซลลูโลส ถูกเลือกเพื่อทดสอบประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในนมถั่วเหลือง

3.5.1 ไธออลโปรติเอสตรึงบนตัวยึดชนิดต่าง ๆ

การตรึงไธออลโปรติเอสจากยางมะละกอ 10 มก./ลบ.ซม. ที่มีแอคติวิตีทั้งหมด 120 ยูนิต ด้วยอัลจิเนตโดยวิธีดักจับ ทราย เบนโทไนท์ ซีไลท์โดยวิธีดูดติด แอมเบอร์ไลท์ XAD-7 ดูโอไลท์ A-368 ดูโอไลท์ C-280 ดูโอไลท์ C-464 CM-เซลลูโลส และ DEAE-เซลลูโลสโดยวิธีจับด้วยไอออน พบว่าเอนไซม์ตรึงแต่ละชนิดมีน้ำหนักและแอคติวิตีแตกต่างกันดังแสดงในตาราง 3.16 ซึ่งประสิทธิภาพของการตรึง หมายถึงร้อยละของแอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงซึ่งคิดเทียบกับเอนไซม์อิสระเริ่มต้นผลการทดลองแสดงว่าโปรติเอสในยางมะละกอถูกตรึงด้วยอัลจิเนตได้มากที่สุดโดยมีแอคติวิตีของเอนไซม์หลังจากถูกตรึงแล้วคิดเป็น 11.3% ของแอคติวิตีเริ่มต้น ในขณะที่เอนไซม์ตรึงด้วยตัวยึดอื่นๆ มีแอคติวิตีต่ำกว่า 5% ยกเว้นเอนไซม์ที่ตรึงด้วย CM-เซลลูโลสซึ่งมีแอคติวิตีเหลืออยู่เพียง 6.1% ถึงแม้ว่าเอนไซม์ตรึงด้วยอัลจิเนตมีแอคติวิตีดีที่สุด แต่รูพรุนอัลจิเนตมีขนาดใหญ่ทำให้ไธออลโปรติเอส (MW = 23,000-25,000) หลุดได้และเม็ดเจลสามารถละลายในสารละลายที่มีไอออนที่จับกับ Ca^{2+} ได้ เช่น ฟอสเฟต ซิเตรท และ EDTA เป็นต้น[43] ดังนั้นจึงเลือกใช้ CM-เซลลูโลสและได้ทดลองดูโอไลท์ A-368 ควบคู่กันไป เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาต่อไป

3.5.2 การศึกษาวิธีเตรียมและคุณสมบัติของไธออลโปรติเอสตรึงบนดูโอไลท์ A-368

แม้ว่าไธออลโปรติเอสที่ตรึงด้วยดูโอไลท์ A-368 มีแอคติวิตีค่อนข้างต่ำ แต่เนื่องจากขนาดเม็ดกลมที่คงตัวซึ่งเหมาะสมกับการนำเอนไซม์ตรึงไปใช้ในระบบต่อเนื่องผ่านคอลัมน์ของเอนไซม์ตรึง ดังนั้นจึงได้ทดสอบหาอัตราส่วนของเอนไซม์กับดูโอไลท์ และพีเอชเพื่อจะได้เลือกใช้ไธออลโปรติเอสให้ได้แอคติวิตีสูงสุด นอกจากนี้ยังได้ตรวจสอบประสิทธิภาพของไธออลโปรติเอสตรึงในการนำกลับคืนมาใช้อีก 3 ครั้ง

ตาราง 3.16 แอคติวิตีโปรติเอสในไธออลโปรติเอสตรึงด้วยตัวยึดชนิดต่างๆ โดยเทียบกับไธออลโปรติเอสเริ่มต้น 120 ยูนิต

ตัวยึด	เอนไซม์ตรึง (ลบ.ซม.)	A_{275}			แอคติวิตีโ ปรติเอสทั้งหมด (ยูนิต)	แอคติวิตีเอนไซม์ตรึง (%)
		1	2	เฉลี่ย		
วิธีดักจับ						
อัลจิเนต	6.5	0.168	0.190	0.179	13.5	11.3
วิธีดูดติด						
ซีไลท์	2.5	0.148	0.156	0.152	4.4	3.7
เบนโทไนท์	4.5	0.067	0.043	0.055	2.9	2.4
ทราย	0.8	0.315	0.314	0.314	2.9	2.4
วิธีจับด้วยไอออน						
แอมเบอร์ไลท์ XAD-7	1.4	0.102	0.062	0.082	1.3	1.1
ดูโอไลท์ A-368	1.7	0.178	0.148	0.163	3.2	2.7
ดูโอไลท์ C-280	1.6	0.121	0.015	0.068	1.3	1.1
ดูโอไลท์ C-464	3.0	0.071	0.059	0.065	2.3	2.0
CM-เซลลูโลส	8.0	0.075	0.085	0.080	7.4	6.1
DEAE-เซลลูโลส	7.5	0.014	0.042	0.028	2.4	0.2

3.5.2.1 ปริมาณดูโอไลท์ A-368 ที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์

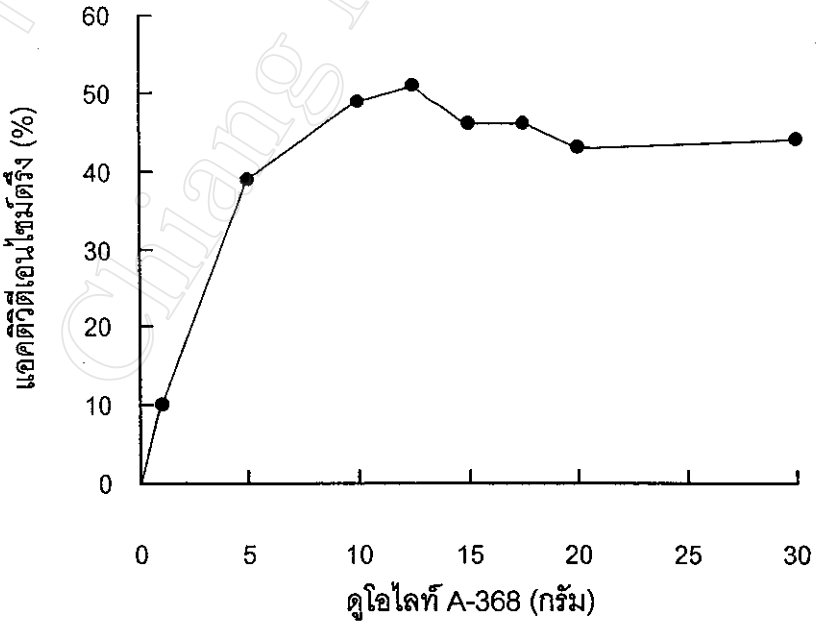
การตรึงไธออลโปรติเอสในสารละลายพีเอช 7 ของยางมะละกอ 10 มก./ลบ.ซม. ซึ่งมีแอคติวิตีทั้งหมด 70 ยูนิต บนดูโอไลท์ A-368 ในปริมาณ 1-30 กรัม ที่อุณหภูมิ 25 °C ได้แอคติวิตีในภาวะต่างๆ ดังแสดงในตาราง 3.17 ประสิทธิภาพของเอนไซม์ตรึงที่ได้แสดงให้เห็นว่า เมื่อใช้ดูโอไลท์ 12.5 กรัม ทำให้ได้ประสิทธิภาพการตรึง 51% ซึ่งสูงที่สุด แต่เมื่อพิจารณาจากกราฟรูป 3.11 คาดว่าดูโอไลท์ 10 กรัม เป็นปริมาณต่ำสุดที่ทำให้ได้ประสิทธิภาพการตรึงในระดับสูงสุด ดังนั้นจึงควรตรึงไธออลโปรติเอสในยางมะละกอ 70 ยูนิตด้วยดูโอไลท์ 10 กรัม ส่วนน้ำหนักของไธออลโปรติเอสตรึงนั้นสังเกตได้ว่าเพิ่มขึ้นจากน้ำหนักของดูโอไลท์ A-368 1.80-1.95 เท่า

3.5.2.2 พีเอชที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์

จากการตรึงไธออลโปรติเอส 60 ยูนิต บนดูโอไลท์ A-368 ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ในสารละลายพีเอช 3-10 ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 3.18 จะเห็นว่าแอคติวิตีของไธออลโปรติเอสสูงที่สุดเมื่อตรึงในสารละลายพีเอช 6 ซึ่งมีค่าแอคติวิตีเท่ากับ 33 ยูนิต เมื่อนำค่าแอคติวิตีที่ได้มาคำนวณหาประสิทธิภาพของการตรึงและเขียนกราฟระหว่างประสิทธิภาพการตรึง

ตาราง 3.17 แอคติวิตีของไธออลโปรติเอสตรึงบนดูโอไลท์ A-368 ปริมาณต่างๆ ในสารละลายพีเอช 7 ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยเทียบกับแอคติวิตีเริ่มต้น 70 ยูนิต

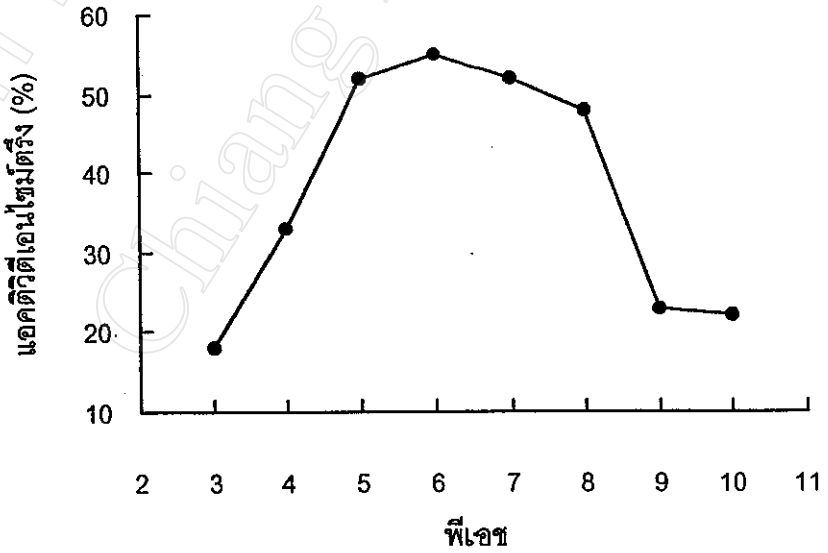
ดูโอไลท์ A-368 (กรัม)	เอนไซม์ตรึง (กรัม)	A_{275}			แอคติวิตีทั้งหมด (ยูนิต)	แอคติวิตีเอนไซม์ตรึง (%)
		1	2	เฉลี่ย		
1	1.95	0.134	0.177	0.156	7	10
5	9.00	0.143	0.112	0.128	27	39
10	18.56	0.058	0.099	0.079	34	49
12.5	22.81	0.054	0.083	0.069	36	51
15	28.03	0.056	0.044	0.050	32	46
17.5	32.56	0.050	0.033	0.042	32	46
20	38.43	0.039	0.029	0.034	30	43
30	58.50	0.028	0.017	0.023	31	44



รูป 3.11 ปริมาณดูโอไลท์ A-368 ที่เหมาะสมในการตรึงไธออลโปรติเอส 70 ยูนิต

ตาราง 3.18 แอคติวิตีของไธออลโปรติเอสตรึงบนดูโอไลท์ A-368 ซึ่งมีน้ำหนักเปียกทั้งหมด 18.43 กรัม ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ในสารละลายพีเอช 3-10 โดยเทียบกับแอคติวิตีเริ่มต้น 60 ยูนิต

พีเอช	A_{275}			แอคติวิตีทั้งหมด (ยูนิต)	แอคติวิตีเอนไซม์ตรึง (%)
	1	2	เฉลี่ย		
3	0.062	0.040	0.051	11	18
4	0.087	0.101	0.094	20	33
5	0.139	0.147	0.143	31	52
6	0.172	0.140	0.156	33	55
7	0.161	0.127	0.144	31	52
8	0.128	0.144	0.136	29	48
9	0.071	0.059	0.065	14	23
10	0.059	0.065	0.062	13	22



รูป 3.12 แอคติวิตีไธออลโปรติเอสตรึงบนดูโอไลท์ A-368 ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอชต่างๆ ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

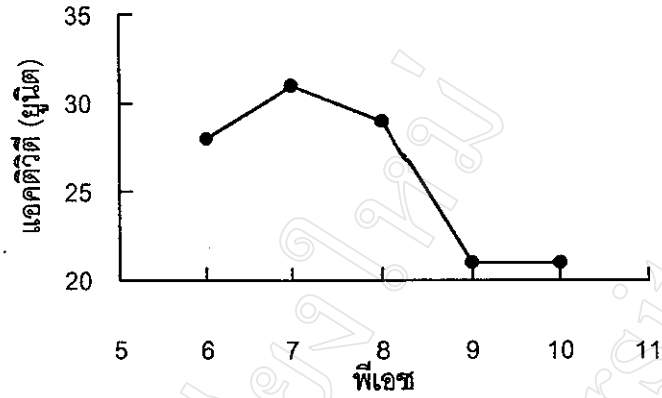
กับพีเอชดังในรูปที่ 3.12 จะเห็นว่าประสิทธิภาพในการตรึงเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อตรึงในสารละลายพีเอช 3-5 และใกล้เคียงกันเมื่อตรึงในสารละลายพีเอช 5-8 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการตรึงสูงที่สุดที่ 55% เมื่อตรึงในสารละลายพีเอช 7 ส่วนการตรึงในสารละลายพีเอช 8-9 ได้ประสิทธิภาพการตรึงลดลงเกินกว่า 50% ของประสิทธิภาพสูงสุด ดังนั้นในการศึกษาพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมรวมทั้งประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ตรึงต่อไปนี้จึงเลือกตรึงไธออลโปรติเอสด้วยดูโอไลท์ A-368 โดยใช้สารละลายไธออลโปรติเอสจากยางมะละกอ 10 มก./ลบ.ซม. ปริมาตร 2 ลบ.ซม. ซึ่งมีแอคติวิตีโปรติเอส 70 ยูนิต ตรึงด้วยดูโอไลท์ A-368 10 กรัมในสารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์พีเอช 6

3.5.2.3 พีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของไธออลโปรติเอสตรึง

ในการย่อยเคซีนโดยไธออลโปรติเอสตรึงบนดูโอไลท์ A–368 (โปรติเอส 70 ยูนิต/ดูโอไลท์ 10 กรัม) ที่อุณหภูมิ 37°C ในสารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์พีเอช 6 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7 และ 8 และบอริกบัฟเฟอร์พีเอช 9 และ 10 ได้ผลดังตาราง 3.19 และรูป 3.13 ซึ่งพบว่า โปรติเอสตรึงสามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 6-8 และมีแอคติวิตีสูงที่สุดเท่ากับ 31 ยูนิต เมื่อย่อยเคซีนในสารละลายพีเอช 7 แอคติวิตีของโปรติเอสลดลง 32% เทียบกับแอคติวิตีสูงสุด เมื่อย่อยเคซีนในสารละลายพีเอช 9 และ 10 ตามลำดับ นั่นคือไธออลโปรติเอสที่ตรึงด้วยดูโอไลท์ A-368 มีแอคติวิตีดีที่สุด เมื่ออยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 7

ตาราง 3.19 แอคติวิตีของโปรติเอสตรึงบนดูโอไลท์ A–368 ในการย่อยเคซีนที่อุณหภูมิ 37°C ในสารละลายพีเอช 6-10

พีเอช	A_{275}			แอคติวิตีทั้งหมด (ยูนิต)
	1	2	เฉลี่ย	
6	0.375	0.417	0.396	28
7	0.451	0.433	0.442	31
8	0.427	0.399	0.413	29
9	0.295	0.301	0.295	21
10	0.296	0.295	0.294	21



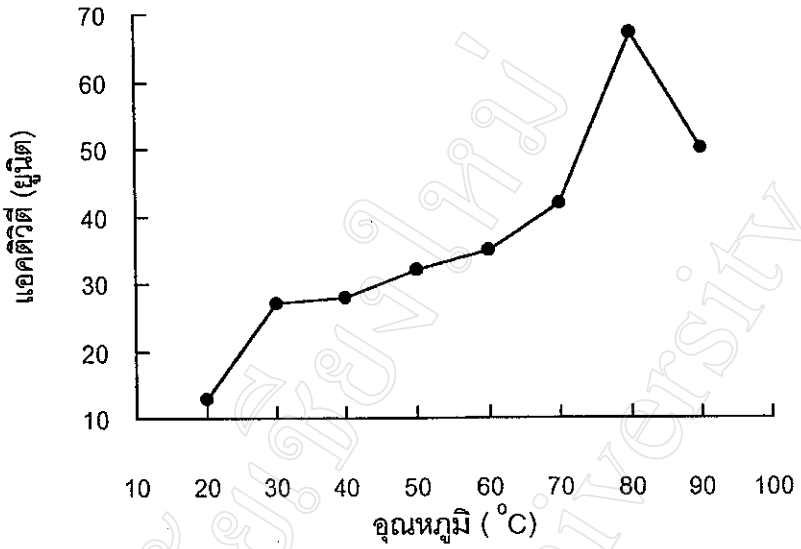
รูป 3.13 แอคติวิตีของไธออลโปรติเอสตรึงบนดูโอไลท์ A-368 ที่อุณหภูมิ 37°C ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอชต่างๆ

3.5.2.4 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของไธออลโปรติเอสตรึง

ไธออลโปรติเอสตรึงบนดูโอไลท์ A-368 ในสารละลายพีเอช 7 ที่อุณหภูมิ 20-90°C มีแอคติวิตีดังแสดงในตารางที่ 3.20 และรูป 3.14 ซึ่งพบว่า โปรติเอสมีแอคติวิตีสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 20-80°C และสูงที่สุดเท่ากับ 67 ยูนิต ที่ 80°C และที่อุณหภูมิ 90°C มีแอคติวิตีลดลง 25% ของแอคติวิตีสูงสุด นั่นคือ ไธออลโปรติเอสที่ตรึงด้วยดูโอไลท์ A-368 ทำงานได้ดีที่สุดที่ 80°C เมื่อใช้เคซีนเป็นสับสเตรท

ตาราง 3.20 แอคติวิตีของโปรติเอสตรึงบนดูโอไลท์ A-368 ในการย่อยเคซีนในสารละลายพีเอช 7 ที่อุณหภูมิ 20-90 °C

อุณหภูมิ	A_{275}			แอคติวิตี
(°C)	1	2	เฉลี่ย	(ยูนิต)
20	0.068	0.052	0.060	13
30	0.133	0.117	0.125	27
40	0.138	0.124	0.131	28
50	0.162	0.140	0.151	32
60	0.141	0.187	0.164	35
70	0.205	0.189	0.197	42
80	0.327	0.295	0.311	67
90	0.213	0.255	0.234	50



รูป 3.14 แอคติวิตีของไธออลโปรติเอสตรึงบนดูโอไลท์ A-368 ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 7 ที่อุณหภูมิต่างๆ

3.5.2.5 ประสิทธิภาพในการทำงานของไธออลโปรติเอสตรึง

ไธออลโปรติเอส 70 ยูนิต ที่ตรึงบนดูโอไลท์ A-368 10 กรัม สามารถย่อยเคซีนในสารละลายพีเอช 7 ที่อุณหภูมิ 37°C 4 ครั้ง ต่อเนื่องกัน ได้แอคติวิตีของไธออลโปรติเอสแตกต่างกัน ดังแสดงในตาราง 3.21 เมื่อให้ประสิทธิภาพการทำงานครั้งแรกเท่ากับ 100% พบว่าการใช้ซ้ำในครั้งแรกทำให้แอคติวิตีลดลง 19% และลดลงเหลือ 47 และ 9% ในการใช้ซ้ำครั้งที่ 2 และ 3 ตามลำดับ

ตาราง 3.21 ประสิทธิภาพของไธออลโปรติเอสตรึงบนดูโอไลท์ A-368 ในการย่อยเคซีน 4 ครั้ง ที่อุณหภูมิ 37°C

การใช้งาน (ครั้ง)	A_{275}			แอคติวิตี (ยูนิต)	ประสิทธิภาพในการทำงาน (%)
	1	2	เฉลี่ย		
1	0.148	0.160	0.154	32	100
2	0.119	0.125	0.122	26	81
3	0.083	0.057	0.070	15	47
4	0.018	0.006	0.012	3	9

3.5.3 การศึกษาวิธีเตรียมและคุณสมบัติของไธออลโปรติเอสตรึงบน CM-เซลลูโลส

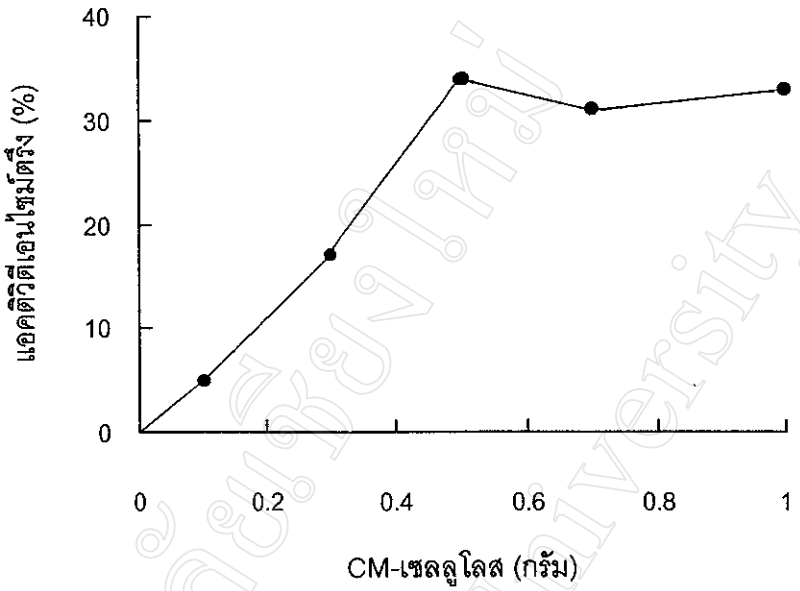
ผลการตรึงไธออลโปรติเอสจากยางมะละกอ 120 ยูนิต ด้วย CM-เซลลูโลส พบว่าได้เอนไซม์ตรึงที่มีแอคติวิตีโปรติเอสเพียง 6.1% ของแอคติวิตีเริ่มต้น ดังนั้นจึงได้ทดสอบหาอัตราส่วนเอนไซม์ต่อ CM-เซลลูโลส และพีเอชของสารละลายที่ใช้ในการตรึง ทั้งนี้เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพการตรึงสูงสุด จากนั้นจึงตรวจสอบอุณหภูมิและพีเอชที่ทำให้ไธออลโปรติเอสที่ตรึงด้วย CM-เซลลูโลส มีแอคติวิตีดีที่สุดสำหรับการย่อยโปรตีนในนมถั่วเหลือง

3.5.3.1 ปริมาณ CM-เซลลูโลสที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์

การหาปริมาณ CM-เซลลูโลส ที่เหมาะสมในการตรึงไธออลโปรติเอสจากยางมะละกอทำได้โดยใช้ไธออลโปรติเอสที่มีแอคติวิตีทั้งหมด 420 ยูนิต ตรึงด้วย CM-เซลลูโลส ปริมาณ 0.1-1 กรัม ทำให้ได้น้ำหนักและแอคติวิตีโปรติเอสของเอนไซม์ตรึง ดังในตาราง 3.22 และรูป 3.15 ซึ่งพบว่าไธออลโปรติเอสถูกตรึงได้มากขึ้นในการใช้ CM-เซลลูโลส 0.1-0.5 กรัม และมากที่สุดเมื่อใช้ CM-เซลลูโลส 0.5 กรัม ซึ่งให้ประสิทธิภาพการตรึงคิดเป็น 34% และเมื่อเพิ่มปริมาณ CM-เซลลูโลสมากกว่า 0.5 กรัม พบว่าประสิทธิภาพการตรึงใกล้เคียงกับการใช้ CM-เซลลูโลส 0.5 กรัม นั่นคือ ปริมาณ CM-เซลลูโลส 0.5 กรัม เป็นปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรึงโปรติเอสได้มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับการตรึงครั้งแรกซึ่งให้ประสิทธิภาพการตรึงเพียง 6.1%

ตาราง 3.22 แอคติวิตีของไธออลโปรติเอสตรึงบน CM-เซลลูโลสปริมาณต่างๆ ในสารละลายพีเอช 7 ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยเทียบกับแอคติวิตีเริ่มต้น 420 ยูนิต

CM-เซลลูโลส (กรัม)	เอนไซม์ตรึง (ลบ.ซม.)	A_{275}			แอคติวิตีทั้งหมด (ยูนิต)	แอคติวิตีเอนไซม์ตรึง (%)
		1	2	เฉลี่ย		
0.1	0.6	0.856	0.738	0.797	22	5
0.3	2.5	0.719	0.507	0.613	71	17
0.5	4.5	0.675	0.693	0.684	143	34
0.7	5.5	0.513	0.495	0.504	130	31
1.0	7.5	0.410	0.394	0.402	140	33



รูป 3.15 ปริมาณ CM-เซลลูโลสที่เหมาะสมในการตรึงไธออลโปรติเอส 420 ยูนิต

3.5.3.2 พีเอชที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์

การตรึงไธออลโปรติเอส 460 ยูนิต บน CM-เซลลูโลส ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ในสารละลายพีเอช 3-10 ทำให้เอนไซม์ตรึงที่มีปริมาตรเม็ดเจล 4.5 ลบ.ซม. ซึ่งเมื่อหาแอคติวิตีโดยใช้เอนไซม์ตรึง 20 ไมโครลิตร ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3.23 จะเห็นได้ว่าแอคติวิตีของไธออลโปรติเอสสูงที่สุดเมื่อตรึงในสารละลายพีเอช 9 ซึ่งคิดเป็น 35% ของแอคติวิตีเริ่มต้น ในขณะที่ ประสิทธิภาพในการตรึงที่พีเอชอื่นๆ มีค่าต่ำกว่า 27% ดังนั้นจึงควรเลือกตรึงโปรติเอสในสารละลายพีเอช 9

นั่นคือ การตรึงไธออลโปรติเอสในยางมะละกอด้วย CM-เซลลูโลสที่ดีที่สุด จึงใช้เอนไซม์ต่อตัวยึดในอัตราส่วน 460 ยูนิต/0.5 กรัม ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 9 เพื่อใช้ในการตรวจสอบอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสม

3.5.3.3 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของไธออลโปรติเอสตรึง

ไธออลโปรติเอสที่ตรึงบน CM-เซลลูโลสมีแอคติวิตีในสารละลายพีเอช 7 ที่อุณหภูมิ 20-90°C ดังแสดงในตารางที่ 3.24 และ รูป 3.16 ซึ่งแสดงว่าโปรติเอสตรึงมีแอคติวิตีค่อนข้างต่ำ ในช่วง 20-40°C และสูงขึ้นไปเรื่อยๆ เมื่อเพิ่มอุณหภูมิไปถึง 80°C และมีแอคติวิตีสูงที่สุด ณ อุณหภูมิซึ่งเท่ากับ 136 ยูนิต และลดลงเพียง 15% จากแอคติวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิ 90°C นั่นคือ

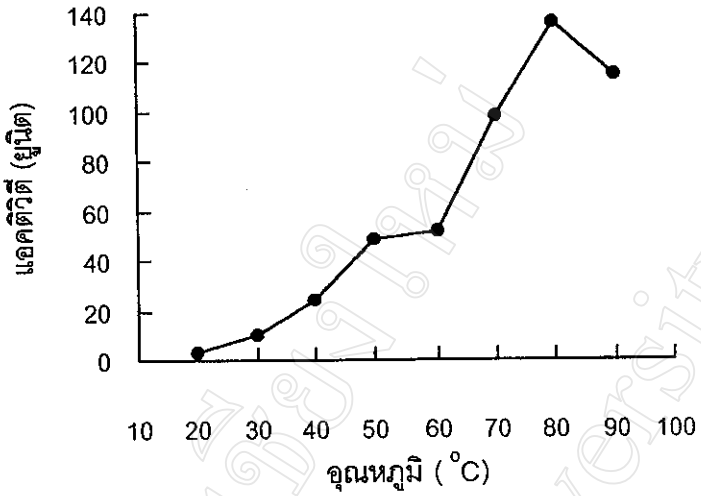
ไธออลโปรติเอสตรึงมีประสิทธิภาพสูงสุดที่อุณหภูมิ 80°C

ตาราง 3.23 แอคติวิตีของไธออลโปรติเอสตรึงบน CM-เซลลูโลสที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ในสารละลายพีเอช 3-10 โดยเทียบกับแอคติวิตีเริ่มต้น 460 ยูนิต

พีเอช	A_{275}			แอคติวิตีทั้งหมด (ยูนิต)	แอคติวิตีเอนไซม์ตรึง (%)
	1	2	เฉลี่ย		
3	0.782	0.627	0.704	92	20
4	0.877	1.052	0.965	126	27
5	0.598	0.868	0.733	96	21
6	0.747	0.684	0.716	93	20
7	0.878	1.005	0.942	123	27
8	0.586	0.686	0.636	83	18
9	1.163	1.193	1.178	154	35
10	0.925	0.860	0.893	116	25

ตาราง 3.24 แอคติวิตีของโปรติเอสตรึงบน CM-เซลลูโลส ในการย่อยเคซีนในสารละลายพีเอช 7 ที่อุณหภูมิ 20-90°C

อุณหภูมิ (°C)	A_{275}			แอคติวิตีทั้งหมด (ยูนิต)
	1	2	เฉลี่ย	
20	0.024	0.008	0.016	3
30	0.051	0.047	0.049	10
40	0.112	0.118	0.115	24
50	0.241	0.231	0.236	49
60	0.254	0.243	0.251	52
70	0.508	0.434	0.471	98
80	0.678	0.626	0.652	136
90	0.574	0.526	0.550	115



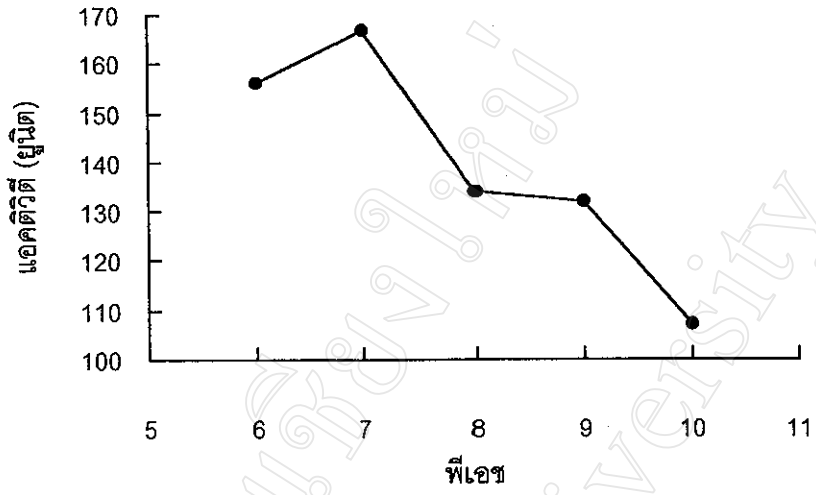
รูป 3.16 แอคติวิตีของไธออลโปรติเอสตรึงบน CM-เซลลูโลส ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 7 ที่อุณหภูมิ 20-90 °C

3.5.3.4 พีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของไธออลโปรติเอสตรึง

ผลของการย่อยเคซีนโดยไธออลโปรติเอสตรึงบน CM-เซลลูโลสที่อุณหภูมิ 80°C ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 6-10 พบว่า โปรติเอสตรึงสามารถทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอช 7 และมีแอคติวิตีสูงที่สุดเท่ากับ 167 ยูนิต ในสารละลายพีเอช 6 แอคติวิตีของโปรติเอสลดลง 7% ที่พีเอช 8, 9 และ 10 แอคติวิตีโปรติเอสต่ำกว่าแอคติวิตีสูงสุด 20, 21 และ 36% ตามลำดับ (ตาราง 3.25) นั่นคือไธออลโปรติเอสที่ตรึงด้วย CM-เซลลูโลส มีประสิทธิภาพในการย่อยเคซีนได้ดีที่สุดที่ พีเอช 7 (รูป 3.17)

ตาราง 3.25 แอคติวิตีของโปรติเอสตรึงบน CM-เซลลูโลส ในการย่อยเคซีนที่อุณหภูมิ 80°C ในสารละลายพีเอช 6-10

พีเอช	A_{275}			แอคติวิตี (ยูนิต)
	1	2	เฉลี่ย	
6	0.741	0.751	0.746	156
7	0.783	0.815	0.799	167
8	0.705	0.575	0.640	134
9	0.613	0.651	0.632	132
10	0.553	0.469	0.511	107



รูป 3.17 แอคติวิตีของไธออลโปรติเอสที่ตรึงบน CM-เซลลูโลส ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 6-10 ที่อุณหภูมิ 80°C

นั่นคือ ไธออลโปรติเอสที่ตรึงด้วย CM-เซลลูโลสมีแอคติวิตีต่อเคซีนดีที่สุด ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7 และที่อุณหภูมิ 80°C

3.5.3.5 ประสิทธิภาพในการใช้งานซ้ำของไธออลโปรติเอสตรึง

ในการหาประสิทธิภาพการทำงานของไธออลโปรติเอสที่ตรึงด้วย CM-เซลลูโลส ในสภาวะที่ทำงานได้ดีที่สุด(พีเอช 7, 80°C) ซึ่งนำมาใช้ซ้ำถึง 4 ครั้ง ได้ผลดังแสดงในตาราง 3.26 พบว่าในการย่อยเคซีน ครั้งที่ 1 มีค่าเท่ากับ 170 ยูนิต และลดลง 75%ในการใช้ครั้งที่ 2 ในขณะที่

ตาราง 3.26 ประสิทธิภาพของไธออลโปรติเอสที่ตรึงบน CM-เซลลูโลส ในการย่อยเคซีนซ้ำหลายครั้งที่อุณหภูมิ 80 °C

การใช้งาน (ครั้ง)	A_{275}			แอคติวิตี (ยูนิต)	ประสิทธิภาพในการทำงาน (%)
	1	2	เฉลี่ย		
1	0.795	0.831	0.813	170	100
2	0.214	0.196	0.205	43	25
3	0.039	0.049	0.044	9	5
4	0.018	0.024	0.021	4	2

การใช้ครั้งที่ 3 และ 4 มีแอคติวิตีเหลือเพียง 5 และ 2% ตามลำดับ ส่วนการใช้ในครั้งที่ 5 ไม่มีแอคติวิตีเลย

3.6 การไฮโดรไลส์โปรตีนในนมถั่วเหลืองโดยไธออลโปรติเอสอิสระและตรึง

จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรึงด้วยดูโอไลท์ A-368 และ CM-เซลลูโลส โดยนำเอนไซม์ตรึงด้วยตัวยึดทั้งสองชนิดในสภาวะที่เหมาะสมมาไฮโดรไลส์เคซีนในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7 ที่ 80°C ผลที่ได้แสดงดังตาราง 3.27 พบว่า CM-เซลลูโลส มีประสิทธิภาพในการตรึงไธออลโปรติเอสได้สูงถึง 31% ซึ่งมากกว่าเอนไซม์ตรึงด้วยดูโอไลท์ A-368 ประมาณ 2 เท่า ดังนั้นจึงเลือกใช้ไธออลโปรติเอสที่ตรึงด้วย CM-เซลลูโลส เพื่อใช้ในการย่อยโปรตีนในนมถั่วเหลือง โดยได้หาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อย และประสิทธิภาพในการใช้งานของเอนไซม์ตรึง ก่อนการหาเปอร์เซนต์การย่อยโปรตีนในนมถั่วเหลืองเทียบกับเอนไซม์อิสระ

ตาราง 3.27 ประสิทธิภาพในการตรึงเอนไซม์ด้วย ดูโอไลท์ A-368 และ CM-เซลลูโลส เมื่อย่อยเคซีนในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 7 ที่ 80°C

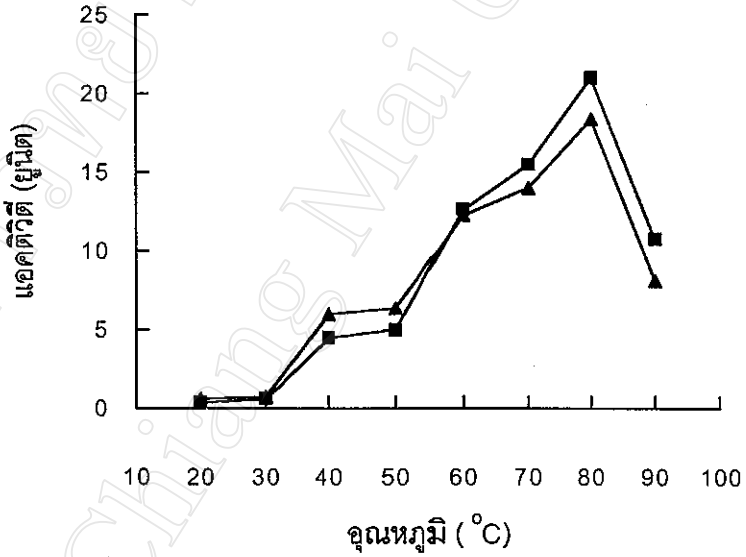
ไธออลโปรติเอสตรึงด้วย	แอคติวิตีเริ่มต้น (ยูนิต)	แอคติวิตีเอนไซม์ตรึง (ยูนิต)	ประสิทธิภาพการตรึง (%)
ดูโอไลท์ A-368	412	76	18
CM-เซลลูโลส	426	134	31

3.6.1 อุณหภูมิที่เหมาะสม

เมื่อใช้ไธออลโปรติเอสอิสระ 10 มก./ลบ.ซม. 50 ไมโครลิตร โดยเจือจาง 10 เท่า ช่วยในการย่อยโปรตีนจากน้ำเต้าหู้และนมถั่วเหลืองดอยคำ ในสารละลายพีเอช 7 ที่อุณหภูมิ 20-90°C พบว่าโปรตีนในน้ำเต้าหู้และนมถั่วเหลืองดอยคำถูกไฮโดรไลส์ได้ดีที่สุดที่ 80°C เท่ากันโดยที่มีแอคติวิตีโปรติเอสเท่ากับ 18.4 และ 21.0 ยูนิต ตามลำดับ (ตารางที่ 3.28) ส่วนที่อุณหภูมิอื่นๆ ไธออลโปรติเอสมีแอคติวิตีต่อน้ำเต้าหู้และนมถั่วเหลืองดอยคำใกล้เคียงกันมาก ดังจะเห็นได้จากรูป 3.18 ซึ่งกราฟทั้งสองเกือบซ้อนทับกันพอดี

ตาราง 3.28 แอคติวิตีของไธออลโปรติเอสอิสระในการย่อยโปรตีนจากน้ำเต้าหู้และนมถั่วเหลืองดอยคำ ในสารละลายพีเอช 7 ที่อุณหภูมิ 20-90°C

อุณหภูมิ (°C)	A_{275}						แอคติวิตี (ยูนิต)	
	น้ำเต้าหู้			นมถั่วเหลืองดอยคำ			น้ำเต้าหู้	นมถั่วเหลืองดอยคำ
	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย		
20	0.012	0.018	0.015	0.017	0.005	0.011	0.6	0.4
30	0.024	0.012	0.018	0.020	0.012	0.016	0.7	0.6
40	0.139	0.169	0.154	0.109	0.125	0.117	6.0	4.5
50	0.171	0.161	0.166	0.123	0.133	0.128	6.4	5.0
60	0.327	0.309	0.318	0.318	0.334	0.326	12.3	12.6
70	0.353	0.371	0.362	0.414	0.388	0.401	14.0	15.5
80	0.468	0.484	0.476	0.538	0.544	0.541	18.4	21.0
90	0.209	0.211	0.210	0.276	0.280	0.278	8.1	10.7



รูป 3.18 แอคติวิตีของไธออลโปรติเอสที่ช่วยย่อยโปรตีนจากน้ำเต้าหู้ (▲) และนมถั่วเหลืองดอยคำ(■) ในสารละลายพีเอช 7 ที่อุณหภูมิต่างๆ

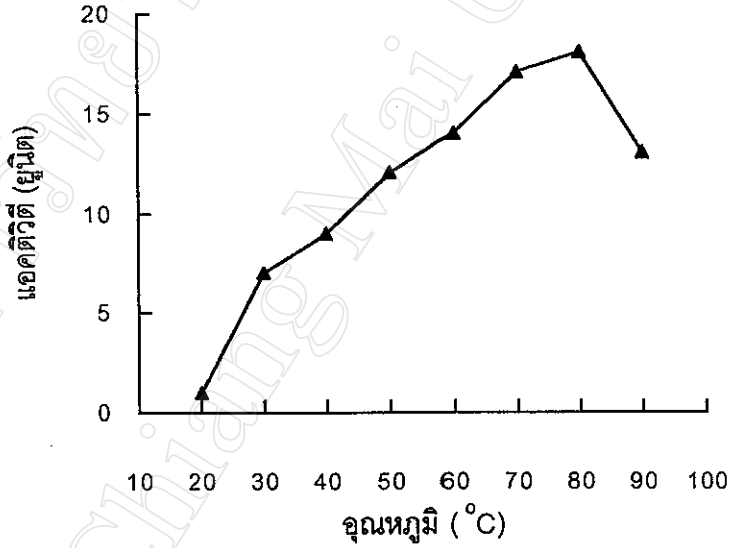
สำหรับไธออลโปรติเอสที่ตรึงด้วย CM-เซลลูโลส (42 ยูนิต/กรัม) สามารถย่อยโปรตีนในน้ำเต้าหู้ ในสารละลายพีเอช 7 ที่อุณหภูมิ 20-90°C ดังแสดงในตาราง 3.29 และรูป 3.19 ซึ่งแสดงว่าไธออลโปรติเอสตรึงนี้ทำงานได้ดีที่สุดเมื่อมีน้ำเต้าหู้เป็นสับสเตรทที่ 80°C โดยมีแอคติวิตีสูงสุดเท่ากับ 18 ยูนิต ในขณะที่แอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงในช่วงอุณหภูมิ 20-30°C เพิ่มขึ้นอย่าง

รวดเร็ว หลังจากนั้นในช่วงอุณหภูมิ 30-80°C อัตราเร็วของแอคติวิตีที่เพิ่มขึ้นมีค่าค่อนข้างคงที่และต่ำกว่า 20-30°C และที่อุณหภูมิ 90°C แอคติวิตีลดลง 18% จากแอคติวิตีสูงสุด

นั่นคือทั้งไธออลโปรติเอสอิสระและไธออลโปรติเอสตรึงด้วย CM-เซลลูโลส มีแอคติวิตีสูงสุดในการไฮโดรไลส์โปรตีนในน้ำเต้าหู้ ที่ 80°C เช่นเดียวกับการใช้เคซีนเป็นสับสเตรท

ตาราง 3.29 แอคติวิตีของไธออลโปรติเอสตรึงบน CM-เซลลูโลส ในการย่อยโปรตีนในน้ำเต้าหู้ในสารละลายพีเอช 7 ที่อุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิ (°C)	20	30	40	50	60	70	80	90
A_{275}	0.018	0.132	0.178	0.230	0.272	0.328	0.352	0.248
แอคติวิตี (ยูนิต)	1	7	9	12	14	17	18	13



รูป 3.19 แอคติวิตีของไธออลโปรติเอสที่ตรึงด้วย CM-เซลลูโลสซึ่งช่วยเร่งในการย่อยโปรตีนจากน้ำเต้าหู้ในสารละลายพีเอช 7 ที่อุณหภูมิต่างๆ

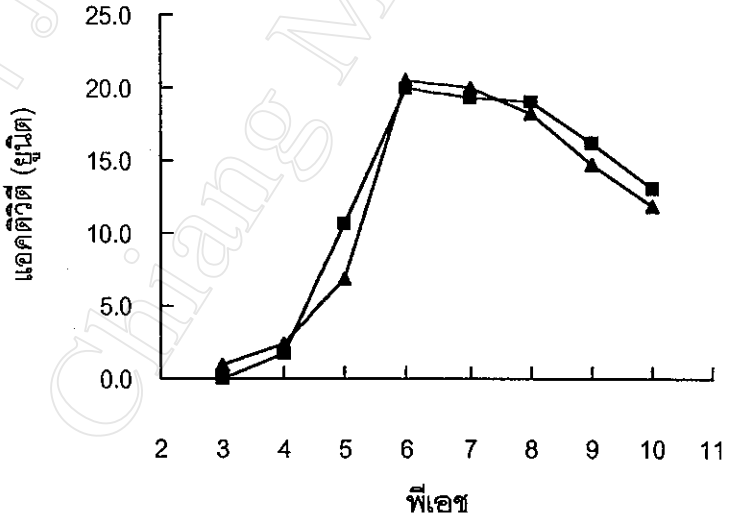
3.6.2 พีเอชที่เหมาะสม

จากการไฮโดรไลส์โปรตีนในน้ำเต้าหู้และนมถั่วเหลืองดอยคำด้วยไธออลโปรติเอสอิสระ (10 มก./ลบ.ซม. โดยเจือจาง 10 เท่า) ที่อุณหภูมิ 80°C ในสารละลายพีเอช 3-10 ได้ผลดังแสดงในตาราง 3.30 และ รูป 3.20 ซึ่งพบว่า พีเอชที่เหมาะสมในการย่อยสับสเตรททั้ง 2 ชนิด อยู่ที่ 6

เหมือนกัน ส่วนที่พีเอชอื่นๆ พบว่ามีแอคติวิตีใกล้เคียงกันมากซึ่งจะเห็นได้จากรูป 3.20 และเส้นกราฟแอคติวิตีที่ได้จากการย่อยโปรตีนในน้ำเต้าหู้และนมถั่วเหลืองดอยคำเกือบซ้อนทับกัน

ตาราง 3.30 แอคติวิตีของไธออลโปรติเอสอิสระในการย่อยโปรตีนจากน้ำเต้าหู้ และนมถั่วเหลืองดอยคำ ที่อุณหภูมิ 80°C ในสารละลายพีเอชต่างๆ

พีเอช	A_{275}						แอคติวิตี (ยูนิต)	
	น้ำเต้าหู้			นมถั่วเหลืองดอยคำ			น้ำเต้าหู้	นมถั่วเหลืองดอยคำ
	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย		
3.0	0.032	0.020	0.026	0	0	0	1.0	0
4.0	0.071	0.059	0.065	0.048	0.042	0.045	2.5	1.7
5.0	0.174	0.182	0.178	0.257	0.295	0.276	6.9	10.7
6.0	0.529	0.533	0.531	0.530	0.510	0.520	20.5	20.0
7.0	0.520	0.516	0.518	0.518	0.482	0.500	20.0	19.3
8.0	0.493	0.451	0.472	0.507	0.483	0.495	18.2	19.1
9.0	0.364	0.398	0.381	0.411	0.427	0.419	14.7	16.2
10.0	0.314	0.300	0.307	0.340	0.336	0.338	11.9	13.1



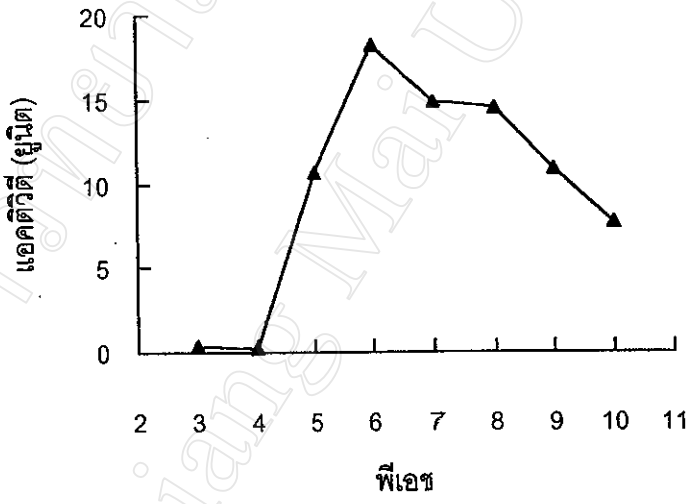
รูป 3.20 แอคติวิตีโปรติเอสของเอนไซม์อิสระในการย่อยโปรตีนจากน้ำเต้าหู้ (▲) และนมถั่วเหลืองดอยคำ (■) ที่พีเอชต่างๆ

สำหรับการไฮโดรไลส์โปรตีนในน้ำเต้าหู้ด้วยไธออลโปรติเอสตรึงด้วย CM-เซลลูโลสที่อุณหภูมิ 80°C ในสารละลายพีเอช 3-10 ได้ผลดังแสดงในตาราง 3.31 ซึ่งให้ความสัมพันธ์ของ

แอคติวิตีที่พีเอชต่างๆ ดังรูป 3.21 ซึ่งพบว่าพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ตรึงอยู่ที่ 6 เท่ากับเอนไซม์อิสระ

ตาราง 3.31 แอคติวิตีของไธออลโปรติเอสตรึงบน CM-เซลลูโลส ในการย่อยโปรตีนในน้ำเต้าหู้ที่อุณหภูมิ 80°C ในสารละลายพีเอช 3-10

พีเอช	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0
A_{275}	0.008	0.004	0.206	0.348	0.284	0.278	0.208	0.148
แอคติวิตี (ยูนิต)	0.4	0.2	10.7	18.2	14.8	14.5	10.9	7.7



รูป 3.21 พีเอชที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนจากน้ำเต้าหู้ด้วยไธออลโปรติเอสตรึงบน CM-เซลลูโลส

นั่นคือ ไธออลโปรติเอสอิสระและที่ตรึงด้วย CM-เซลลูโลส มีแอคติวิตีต่อการไฮโดรไลส์โปรตีนในน้ำเต้าหู้ได้ดีที่สุดในสารละลายพีเอช 6 ที่ 80°C

3.6.3 เปอร์เซนต์การไฮโดรไลส์โปรตีน

เมื่อไฮโดรไลส์น้ำเต้าหู้ 250 ลบ.ซม. ในซิเตรทบัฟเฟอร์พีเอช 6 ด้วยไธออลโปรติเอสอิสระและที่ตรึงด้วย CM-เซลลูโลส ที่ 80°C 10 นาที เทียบกับน้ำเต้าหู้ที่ไม่ถูกไฮโดรไลส์ ได้ตะกอน

หลังจากหยุดปฏิกิริยา ดังปรากฏในตาราง 3.32 ซึ่งเมื่อแบ่งตะกอนนี้อย่างละ 0.5 กรัมเปียก ไปหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl โดยใช้ 0.0889 M HCl 50 ลบ.ซม. จับกาซแอมโมเนียที่เกิดขึ้นแล้วไทเทรตกับ 0.1042 M NaOH (ดูภาคผนวก 3) ดังปรากฏผลของปริมาตรการไทเทรตในตาราง 3.32

ตาราง 3.32 น้ำหนักตะกอนหลังจากหยุดปฏิกิริยาการไฮโดรไลส์โปรตีนในน้ำเต้าหู้โดยไธออลโปรติเอสอิสระและที่ตรึงด้วย CM-เซลลูโลส และปริมาตร 0.1042 M NaOH ที่ใช้ไทเทรตหาปริมาณโปรตีนจากตะกอนเปียก 0.5 กรัม

ตัวอย่าง	ตะกอนเปียกหลังหยุดปฏิกิริยา (กรัม)	โซเดียมไฮดรอกไซด์ (ลบ.ซม.)		
		1	2	เฉลี่ย
น้ำเต้าหู้ก่อนย่อย	7.96	37.80	38.40	38.10
น้ำเต้าหู้หลังย่อยด้วย				
เอนไซม์อิสระ	6.72	39.70	39.50	39.60
เอนไซม์ตรึง	6.51	41.80	40.90	41.35

ปริมาณโปรตีนสามารถคำนวณได้ดังนี้

$$M_1V_1 = M_2V_2$$

โดย M_1 = ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ = 0.1042 M

V_1 = ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ = 38.10 ลบ.ซม.

M_2 = ความเข้มข้นของสารละลายกรดไฮโดรคลอริก

V_2 = ปริมาตรของสารละลายกรดไฮโดรคลอริก = 50.00 ลบ.ซม.

จะได้ว่า $0.1042 \times 38.10 = M_2 \times 50.00$

$$M_2 = \frac{0.1042 \times 38.10}{50.00}$$

ดังนั้น สารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่เหลือ เท่ากับ 0.0794 M นั่นคือ สารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่จับกับกาซแอมโมเนียมีความเข้มข้น

$$= 0.0926 - 0.0794$$

$$= 0.0132 \text{ M}$$

ซึ่งคิดเป็น $= \frac{0.0132 \times 50}{1000}$ โมล

$= 6.6 \times 10^{-4}$ โมล

จะได้ปริมาณไนโตรเจน $= 6.6 \times 10^{-4} \times 14$ กรัม

$= 9.24 \times 10^{-3}$ กรัม

ค่าคงที่ของโปรตีนจากนมเท่ากับ 6.38

ดังนั้น คิดเป็นปริมาณโปรตีนได้ $= 9.24 \times 10^{-3} \times 6.38$ กรัม

$= 0.059$ กรัม

นั่นคือ ตะกอนโปรตีน 0.5 กรัม มีปริมาณโปรตีน 0.059 กรัม

ถ้าตะกอนโปรตีน 7.96 กรัม จะมีปริมาณโปรตีน $= \frac{0.059 \times 7.96}{0.5}$ กรัม

$= 0.94$ กรัม

ดังนั้น ตะกอนโปรตีนในน้ำเต้าหู้ก่อนย่อยมีปริมาณโปรตีนทั้งหมด 0.94 กรัม ในกรณีของตะกอนโปรตีนที่ได้จากการย่อยด้วยไธออลโปรติเอสอิสระและตรึงนั้นสามารถคำนวณได้เช่นเดียวกัน ซึ่งผลการคำนวณแสดงในตารางที่ 3.33 และคิดเป็นเปอร์เซนต์การไฮโดรไลส์ได้ดังนี้

ปริมาณโปรตีนในน้ำเต้าหู้ดิบ = 0.94 กรัม

เมื่อไฮโดรไลส์โปรตีนในน้ำเต้าหู้ด้วยเอนไซม์อิสระได้โปรตีน = 0.60 กรัม

แสดงว่าโปรตีนในตะกอนถูกไฮโดรไลส์ = 0.94-0.60 กรัม

= 0.34 กรัม

ดังนั้น %โปรตีนที่ถูกไฮโดรไลส์ $= \frac{0.34 \times 100}{0.94}$

$= 36$

ในทำนองเดียวกัน สามารถคำนวณร้อยละของโปรตีนที่ถูกไฮโดรไลส์โดยไธออลโปรติเอสที่ตรึงด้วย CM-เซลลูโลส ได้ผลดังในตาราง 3.33 ซึ่งจะเห็นได้ว่า ไธออลโปรติเอสที่ตรึงด้วย CM-เซลลูโลส สามารถไฮโดรไลส์โปรตีนในนมถั่วเหลืองได้ดีกว่าเอนไซม์อิสระ 25%

ตาราง 3.33 ปริมาณโปรตีนและร้อยละของการไฮโดรไลส์โปรตีนในน้ำเต้าหู้

ตัวอย่าง	ปริมาณโปรตีน (กรัม)	การไฮโดรไลส์ (%)
น้ำเต้าหู้ก่อนย่อย	0.94	0
น้ำเต้าหู้แปรสภาพ		
เอนไซม์อิสระ	0.60	36
เอนไซม์ตรึง	0.37	61

3.6.4 ประสิทธิภาพของไธออลโปรติเอสตรึง

การย่อยโปรตีนในน้ำเต้าหู้ในสารละลายพีเอช 6 ที่อุณหภูมิ 80°C ด้วยไธออลโปรติเอส ที่ตรึงบน CM-เซลลูโลส ซึ่งเป็นสภาวะที่เอนไซม์ทั้งสองมีแอคติวิตีสูงสุดนั้น ได้ผลดังตาราง 3.34 ซึ่งพบว่า แอคติวิตีของโปรติเอสครั้งที่ 1 มีค่า เท่ากับ 18.2 ยูนิต และลดลงเหลือ 26 และ 6% ในการใช้ซ้ำครั้งแรกและครั้งที่ 2 ตามลำดับ ส่วนการใช้ซ้ำครั้งสุดท้ายซึ่งเป็นครั้งที่ 3 ไม่มีแอคติวิตีโปรติเอสเหลืออยู่

ตาราง 3.34 ประสิทธิภาพของไธออลโปรติเอสตรึงบน CM-เซลลูโลส ในการไฮโดรไลส์โปรตีนในน้ำเต้าหู้ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 6 ที่อุณหภูมิ 80 °C

การใช้งาน (ครั้ง)	A_{275}			แอคติวิตี (ยูนิต)	ประสิทธิภาพเอนไซม์ (%)
	1	2	เฉลี่ย		
1	0.338	0.358	0.348	18.2	100
2	0.076	0.108	0.092	4.8	26
3	0.018	0.022	0.020	1.0	6