

บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ไรออลโปรติเอสในยางมะละกอซึ่งในทางการค้าเรียกว่าปาเปนเป็นเอนไซม์ที่ได้รับความสนใจและเป็นที่ยอมรับนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ซึ่งได้สั่งซื้อปาเปนเข้ามาจากต่างประเทศและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี ปัจจุบันการผลิตปาเปนทางการค้ายังไม่ได้ทำกันอย่างจริงจังมากนักทั้งที่ได้มีการศึกษาหาข้อมูลต่างๆ และในงานวิจัยนี้ไรออลโปรติเอสจากยางมะละกอพันธุ์พื้นเมืองในอำเภอหางดงและอำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ถูกนำมาศึกษาสมบัติและตรวจสอบชนิดของไรออลโปรติเอสในยางมะละกอ จากนั้นเตรียมปาเปนในรูปของยางมะละกออบแห้งแล้วนำมาทดลองตรึงด้วยตัวยึดชนิดต่างๆ โดยศึกษาสมบัติของไรออลโปรติเอสตรึงด้วยคูโอล์ A-368 และ CM-เซลลูโลสซึ่ง CM-เซลลูโลสถูกเลือกมาใช้ในการไฮโดรไลส์โปรตีนจากถั่วเหลืองเพื่อเตรียมนมถั่วเหลืองผงละลายง่ายต่อไป

4.1 โปรติเอสแอคติวิตีจากส่วนต่างๆ ของมะละกอ

แอคติวิตีของไรออลโปรติเอสในยางจากก้าน ใบ และผลมะละกอโดยวิธีเคซีนไฮโดรไลซิสมีค่าใกล้เคียงกันคือเท่ากับ 0.81, 0.83 และ 0.81 ยูนิต ต่อยางสด 1 มก. ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าโปรติเอสแอคติวิตีในยางอบแห้งของซึกมา (1.64 ยูนิต) 2 เท่า และมากกว่าในผงเนื้อนุ่มที่มีแอคติวิตีเพียง 0.0013 ยูนิต จากผลที่ได้แม้ว่าแอคติวิตีของโปรติเอสในยางจากก้าน ใบ และผลจะมีค่าใกล้เคียงกันแต่ปริมาณจากผลมีมากที่สุดโดยได้น้ำยาง 10-15 กรัม เมื่อกรีดจากผลดิบ 1 ผลที่มีขนาด 1 กิโลกรัม 3 ครั้ง ในขณะที่ก้านและใบให้ปริมาณน้ำยางน้อยมาก และจากสารละลายที่ได้จากการปั่นและคั้น พบว่าก้าน 1 ก้าน ที่มีน้ำหนัก 45 กรัม มีแอคติวิตีโปรติเอส 8 ยูนิต และใน 1 ใบ ซึ่งมีน้ำหนัก 42 กรัม มีโปรติเอสแอคติวิตี 226 ยูนิต ซึ่งจากรายงานของ Ball⁽⁶⁷⁾ พบว่าใบ 1 ใบ ที่มีน้ำหนัก 70 กรัม เมื่อนำมาปั่นและคั้นจะได้สารละลาย 25 ลบ.ซม. ซึ่งสกัดสีออกโดย Sepro-sieve และตกตะกอนสารอื่นออกด้วยกรดซัลฟูริก ไฮโดรคลอริก หรือ อะซิติก จะมีแอคติวิตีของโปรติเอส 75-88 ยูนิต (โดยวิธีตกตะกอนนม) โปรติเอสแอคติวิตีในน้ำยางจากผล และสารละลายที่ได้จากการปั่นและคั้น ก้าน และใบ แสดงดังในตาราง 4.1

ตาราง 4.1 โปรตีนแอคทีวิตีในยางจากผลมะละกอ และสารสกัดจากก้านและใบ

ตัวอย่าง		แอคทีวิตีทั้งหมด
ชนิด	น้ำหนัก (กรัม)	(ยูนิต)
ยางจาก		
ผล	10-15	8,100-12,150
ก้าน	0-0.005	0-4
ใบ	0-0.002	0-2
สารสกัดจาก		
ก้าน	45	8
ใบ	42	226

4.2 สภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลส์เคซีนของโปรตีนในยางมะละกอ

เมื่อนำโปรตีนในยางมะละกอจากผลดิบมาหาแอคทีวิตีโดยการไฮโดรไลส์เคซีนที่ 37°C ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 6-10 พบว่า โปรตีนมีแอคทีวิตีสูงที่สุดเมื่อทำงานในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7 โดยมีแอคทีวิตี 2.06 ยูนิต/มก. และเมื่อไฮโดรไลส์เคซีนในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 7 ที่ $20-90^{\circ}\text{C}$ พบว่าโปรตีนมีแอคทีวิตีสูงที่สุด 20.29 ยูนิต/มก. ที่ 80°C ในขณะที่การไฮโดรไลส์ BAEE ของโปรตีนในสารละลายพีเอช 6.2 โปรตีนมีแอคทีวิตีสูงที่สุด 14 ยูนิต/มก. ที่ 80°C ⁽⁵⁾

ในการหาปริมาณ EDTA และซิสเทอีนที่เหมาะสมต่อการย่อยเคซีนของโปรตีน พบว่า EDTA 2 mM และซิสเทอีน 5 mM ทำให้โปรตีนมีค่าแอคทีวิตีมากที่สุดเท่ากับ 1.95 และ 2.51 ยูนิต/มก. ตามลำดับ ซึ่งเพิ่มขึ้น 2 เท่า จากสารละลายปฏิกิริยาที่ไม่ได้เติม EDTA หรือซิสเทอีน ทั้งนี้เนื่องจาก EDTA จะช่วยจับโลหะหนักซึ่งยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และซิสเทอีนเป็นสารรีดิวซ์อย่างอ่อนที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการทำงานของโปรตีน โดยทำให้พันธะไดซัลไฟด์ (S-S) ระหว่างซิสเทอีนตำแหน่งที่ 25 และ 22 ในโมเลกุล (รูป 1.2) แตกและเกิดเป็นหมู่ซัลไฟดริลซิสเรชั่น (-SH) ที่ซิสเทอีนตำแหน่งที่ 25 ซึ่งอยู่บริเวณแรงของโมเลกุลจึงทำให้โปรตีนสามารถทำปฏิกิริยาได้ดีขึ้น ปริมาณ EDTA และซิสเทอีนที่เหมาะสมนี้ (2 และ 5 mM) เป็นความเข้มข้นที่ใช้ในวิธีหาแอคทีวิตีของโปรตีนโดยเคซีนไฮโดรไลซิส โดยปริมาณซิสเทอีนที่น้อยเกินไปจะทำให้

ปาเปนไม่ถูกกระตุ้นให้ทำงานชั่วคราว⁽¹⁵⁾

นั่นคือ โปรติเอสในยางมะละกอสามารถไฮโดรไลส์เคซีนได้มากที่สุดในสารละลายพีเอช 7 ที่อุณหภูมิ 80°C โดยมี EDTA 2 mM และซิสเทอีน 5 mM

4.3 การแยกและตรวจสอบไฮดรอลโปรติเอสจากยางมะละกอ

การแยกปาเปนจากยางมะละกอสดพันธุ์พื้นเมือง 10 กรัม ซึ่งมีแอกติวิตีเริ่มต้น 7,738 ยูนิต และมีโปรตีน 460 มก. โดยตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 40% อิมัตว ทำให้ได้โปรตีน 56 มก. ที่มีโปรติเอสแอกติวิตี 1,167 ยูนิต ซึ่งคิดเป็นแอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ 21 ยูนิต/มก. หลังจากตกผลึกครั้งที่สองด้วย 10% NaCl พบว่าได้ผลผลิตของโปรติเอส 4% เมื่อเทียบกับการแยกปาเปนด้วยวิธีเดียวกันแต่ใช้ยางอบแห้ง 100 กรัม และหาแอกติวิตีโดยใช้ Benzoyl-L-Arginine Amide (BAA) เป็นสับสเตรท⁽¹⁵⁾ พบว่าได้ผลผลิต 18% โปรตีนในยางมะละกอพันธุ์พื้นเมืองซึ่งตรวจสอบด้วยแคโทดิกอิเล็กโตรฟอรีซิสและหาปริมาณด้วยเดนซิโตมิเตอร์ ชี้ให้เห็นว่า นอกจากปาเปนแล้วยางมะละกอยังประกอบด้วยไฮดรอลโปรติเอสชนิดอื่นอีก ซึ่งจากการนำแถบโปรตีนที่ได้นี้ไปเทียบกับผลแคโทดิกอิเล็กโตรฟอรีซิสของ Buttle และ Sumner (รูป 1.4 และ 1.5)^(21,22) คาดว่าไฮดรอลโปรติเอสแต่ละชนิดได้แก่ ปาเปน พาพายาโปรติเนส IV ไคโมปาเปน และพาพายาโปรติเนส III ดังแสดงในตาราง 4.2 สารสกัดหยาบที่ประกอบด้วยไฮดรอลโปรติเอสต่างๆ เหล่านี้เมื่อนำมาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 40% อิมัตว ทำให้ได้ปาเปนที่ไม่มีพาพายาโปรติเนส III แต่ยังคงมีพาพายาโปรติเนส IV และไคโมปาเปนปนอยู่อย่างละ 39% นั่นคือตะกอนโปรตีนที่แยกได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 40% อิมัตว มีปาเปนเพิ่มขึ้นจากสารสกัดหยาบ 19% เมื่อตกผลึกตะกอนโปรตีนนี้ต่อไปด้วย 10% NaCl ทำให้ได้ปาเปนบริสุทธิ์ซึ่งปรากฏแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวเมื่อตรวจสอบด้วยอิเล็กโตรฟอรีซิส (รูป 3.4) ดังนั้นเมื่อทำการตกผลึกใหม่ด้วย 10% NaCl จึงพบแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวเช่นเดิม

การแยกไฮดรอลโปรติเอสจากยางมะละกอพันธุ์พื้นเมืองโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 30-80% อิมัตว โดยใช้ยางมะละกอดิบ 10 กรัม ซึ่งมีแอกติวิตีเริ่มต้น 6,957 ยูนิต และโปรตีน 453 มก. แยกตะกอนโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตแต่ละความเข้มข้นไปตรวจสอบด้วยแคโทดิกอิเล็กโตรฟอรีซิส ผลที่ได้แสดงในรูป 3.7 และสรุปผลได้ดังตารางที่ 4.3 จะเห็นได้ว่าโปรติเอสสามารถแยกออกมาได้มากที่สุด 20% เมื่อตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 60% อิมัตว และโปรติเอสแต่ละชนิดสามารถแยกออกมาได้เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตในความเข้มข้นต่างกัน โดยปาเปน และพาพายาโปรติเนส IV แยกออกมาได้

เมื่อตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 40% อิ่มตัว ไคโมปาเปนและพาพายาโปรตีนเอส IV สามารถแยกได้เมื่อตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 50% อิ่มตัว เมื่อตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 60% อิ่มตัว ไคโมปาเปนสามารถแยกออกมาได้โดยไม่มีโปรตีนเอสตัวอื่นปนมาด้วย ไคโมปาเปนและพาพายาโปรตีนเอส III แยกออกมาได้เมื่อตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 70 และ 80% อิ่มตัว ซึ่งจากรายงานของ Pickersgill⁽²⁸⁾ พบว่าพาพายาโปรตีนเอส III สามารถแยกได้ค่อนข้างบริสุทธิ์เมื่อตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 75% อิ่มตัว

ตาราง 4.2 ชนิดและปริมาณของไฮดรอลโปรตีนเอสในยางมะละกอที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ปาเปนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 40% อิ่มตัว

ขั้นตอนการตกตะกอน	ชนิดของไฮดรอลโปรตีนเอส	ส่วนประกอบ (%)
สารสกัดหยาบ	ปาเปน	2
	พาพายา โปรตีนเอส IV	21
	ไคโมปาเปน	72
	พาพายา โปรตีนเอส III	5
ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 40% อิ่มตัว	ปาเปน	21
	พาพายา โปรตีนเอส IV	39
	ไคโมปาเปน	39
ตกผลึกด้วย 10% NaCl	ปาเปน	100
ตกผลึกใหม่ด้วย 10% NaCl	ปาเปน	100

ตาราง 4.3 ไฮดรอลโปรตีนเอสที่แยกได้จากน้ำยางมะละกอพันธุ์พื้นเมืองโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 40-80% อิ่มตัว

% sat. (NH ₄) ₂ SO ₄	ชนิดของไฮดรอลโปรตีนเอส		ผลผลิตรวม (%)
	ส่วนประกอบหลัก	ส่วนประกอบย่อย	
31-40	พาพายา โปรตีนเอส IV	ปาเปน	3
41-50	ไคโมปาเปน	พาพายา โปรตีนเอส IV	14
51-60	ไคโมปาเปน	-	20
61-70	พาพายา โปรตีนเอส III	ไคโมปาเปน	17
71-80	ไคโมปาเปนและพาพายา โปรตีนเอส III	-	3

4.4 การเตรียมไฮดรอลโปรตีนจากยางมะละกอ

การเตรียมไฮดรอลโปรตีนจากยางมะละกอ 1 กรัม ที่มีแอกติวิตี 843 ยูนิต โดยการอบที่อุณหภูมิ $60-80^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าไฮดรอลโปรตีนในยางมะละกออบมีค่าแอกติวิตีสูงขึ้นเมื่ออบที่ 60°C และเมื่อเติม 0.5% KMS ทำให้ได้ยางอบที่มีแอกติวิตีเพิ่มขึ้น 52%

ในการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการอบยางมะละกอที่ 60°C นั้น ได้ทดลองเติม 0.5% KMS ลงในยางดิบก่อนนำไปทำแห้ง ผลปรากฏว่าเมื่ออบยาง 1 กรัมที่ 60°C ในเวลา 1-5 ชั่วโมง พบว่าการอบ 2 ชั่วโมง เป็นเวลาที่เหมาะสมที่สุดเนื่องจากทำให้ได้ยางอบที่มีไฮดรอลโปรตีนแอกติวิตีเพิ่มขึ้นจากยางสด 45 และ 60% สำหรับยางที่ไม่เติมและเติม KMS ซึ่งสูงที่สุดในบรรดาที่ยอบในช่วง 5 ชั่วโมง (ตาราง 3.14) โดยที่ได้ยางอบที่คงเหลือความชื้นน้อยกว่า 5% อย่างไรก็ตาม ระยะเวลาที่เหมาะสมในการอบยางมะละกอนี้จะแปรตามชนิดของเตาอบ พื้นที่ผิวและความหนาของน้ำยาง

ผลของ KMS ต่อการทำงานของโปรตีนในยางอบแห้ง (ตาราง 3.15 และรูป 3.10) แสดงให้เห็นว่า KMS ที่เติมลงไปทำให้แอกติวิตีของโปรตีนสูงขึ้นโดยเพิ่มขึ้น 53% เมื่อเติม 0.5% w/w KMS ลงในยางก่อนอบเช่นเดียวกับผลของ Krishnamerthy ซึ่ง 0.5% KMS ทำให้ไฮดรอลโปรตีนในยางอบแห้งเพิ่มขึ้น 13% เมื่อหาแอกติวิตีโดยวิธี milk clotting⁽³⁵⁾ และเพิ่มขึ้น 25% เมื่อหาแอกติวิตีโดยเคซีน⁽⁴⁾

4.5 การตรึงไฮดรอลโปรตีนด้วยวิธีต่างๆ

การตรึงไฮดรอลโปรตีนในงานวิจัยนี้เป็นการตรึงเพื่อนำไปทดลองใช้ในการไฮโดรไลส์โปรตีนจากนมถั่วเหลือง ดังนั้นการเลือกใช้ตัวยึดและวิธีการตรึงจึงต้องคำนึงถึงความปลอดภัยของผู้บริโภคด้วยโดยได้เลือกทดลองใช้วิธีตรึง 3 วิธี ซึ่งได้แก่การดักจับด้วยอัลจินต การดูดติดบนทราย ซิลิกา และเบนโทไนท์ และการจับด้วยแรงไอออนิกโดยใช้แอมเบอร์ไลท์ ดูโอไลท์ A-368 C-280 และ C-464 CM-เซลลูโลส และ DEAE-เซลลูโลส พบว่าการตรึงไฮดรอลโปรตีนโดยการดักจับด้วยแคลเซียมอัลจินตให้ผลผลิตสูงถึง 11.3% ซึ่งทำได้ง่าย สะดวกและรวดเร็ว แต่การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้มีข้อบกพร่องคือ เม็ดเจลจะเกิดการสลายตัวได้เมื่อใช้เอนไซม์ตรึงในสารละลายที่ประกอบด้วยไอออนที่สามารถทำปฏิกิริยากับไอออนของแคลเซียม ซึ่งได้แก่ ฟอสเฟต ซิเตรท แมกนีเซียม โพแทสเซียม และ EDTA และรูปทรงของอัลจินตมีขนาดใหญ่ อาจทำให้ไฮดรอลโปรตีนซึ่งมีมวลโมเลกุลอยู่ในช่วง 23,000-25,000 ดาลตัน หลุดออกมาได้ ดังนั้นจึงไม่เลือกใช้เอนไซม์ตรึงด้วยอัลจินต CM-เซลลูโลสสามารถตรึงไฮดรอลโปรตีนได้ดีรองลงมาจากอัลจินต

โดยถูกตรึง 6.1% เนื่องจาก CM-เซลลูโลสเป็นตัวยึดที่ทำหน้าที่แลกเปลี่ยนไอออนบวกและไฮดรอกไซด์โปรตีนมี pI สูงกว่า 8 ดังนั้นในสารละลายที่ pH ต่ำกว่า 8 ไฮดรอกไซด์โปรตีนจึงสามารถยึดติดกับ CM-เซลลูโลสได้ดีด้วยแรงดึงดูดประจุ ไฮดรอกไซด์โปรตีนสามารถตรึงด้วยซีไลท์ได้ดีรองลงมาจาก CM-เซลลูโลส โดยถูกตรึง 3.7% ซึ่งเป็นการดูดซับไว้บนผิวของซีไลท์ แรงดึงดูดระหว่างเอนไซม์กับตัวยัดนี้ค่อนข้างอ่อนจึงทำให้เอนไซม์หลุดออกจากตัวยัดในระหว่างกระบวนการใช้งานได้ง่าย นั่นคือการใช้เอนไซม์ตรึงด้วยวิธีดังกล่าวนี้มีช่วงเวลาที่จำกัดดังนั้นจึงไม่เลือกใช้ คูโอไลท์ A-368 สามารถตรึงไฮดรอกไซด์โปรตีน 2.7% ด้วยแรงดึงดูดประจุเหมือน CM-เซลลูโลสและยังไม่มีปฏิกิริยาการตรึงไฮดรอกไซด์โปรตีนจากยางมะละกอ ดังนั้นจึงเลือกศึกษาการตรึงด้วยคูโอไลท์และ CM-เซลลูโลส

4.6 การศึกษาวิธีเตรียมและคุณสมบัติของไฮดรอกไซด์โปรตีนตรึงด้วยคูโอไลท์ A-368 และ CM-เซลลูโลส

จากการศึกษาการตรึงไฮดรอกไซด์โปรตีน 70 หน่วย ด้วยคูโอไลท์ A-368 1-30 กรัม ที่พีเอช 7 อุณหภูมิ $37^{\circ}C$ (รูป 3.11) พบว่าคูโอไลท์ A-368 10 กรัม เป็นปริมาณตัวยัดที่เหมาะสมสำหรับตรึงไฮดรอกไซด์โปรตีนซึ่งมีประสิทธิภาพการตรึงเพิ่มขึ้นเป็น 49% สูงกว่าเดิมที่เคยได้ประสิทธิภาพการตรึงเพียง 2.7% ดังนั้นจึงทำให้ได้อัตราส่วนของไฮดรอกไซด์โปรตีนกับคูโอไลท์ A-368 ที่เหมาะสมในการตรึงเท่ากับ 3.4 หน่วย/กรัม จากอัตราส่วนที่เหมาะสมนี้นำไปใช้ในการตรึงเอนไซม์ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 3-10 และพบว่าไฮดรอกไซด์โปรตีนถูกตรึงได้ดีในช่วงพีเอช 5-7 และตรึงได้ดีที่สุดที่พีเอช 6 ด้วยประสิทธิภาพการตรึง 55%

การหาอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมของไฮดรอกไซด์โปรตีนตรึงด้วยคูโอไลท์ A-368 พบว่าเอนไซม์ที่ตรึงในสภาวะที่เหมาะสม ทำงานได้ดีที่สุดในสารละลายพีเอช 7 ที่อุณหภูมิ $80^{\circ}C$ และเมื่อศึกษาประสิทธิภาพในการไฮโดรไลสเคซีนของไฮดรอกไซด์โปรตีนตรึงโดยนำกลับมาใช้ 4 ครั้ง ที่ $37^{\circ}C$ พบว่าประสิทธิภาพในการทำงานของโปรตีนตรึงลดลงเหลือ 81.47 และ 9% ในครั้งที่ 2 3 และ 4 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าไฮดรอกไซด์โปรตีนตรึงมีประสิทธิภาพสูงในการใช้งาน 2 ครั้ง ตารางที่ 4.4 แสดงผลการหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์และการทำงานของเอนไซม์ตรึงรวมทั้งประสิทธิภาพการใช้งานเอนไซม์ตรึงหลายๆ ครั้ง

CM-เซลลูโลส 0.5 กรัม สามารถตรึงไฮดรอกไซด์โปรตีนได้ 34% เมื่อตรึงไฮดรอกไซด์โปรตีน 426 หน่วย ด้วย CM-เซลลูโลส 0.1-1 กรัม ในสารละลายพีเอช 7 ที่อุณหภูมิ $25^{\circ}C$ และเมื่อเพิ่มปริมาณ CM-เซลลูโลสมากขึ้น ปริมาณไฮดรอกไซด์โปรตีนถูกตรึงลดลงไม่มากนัก นั่นคือเอนไซม์ 426 หน่วย สามารถถูกตรึงด้วย CM-เซลลูโลสได้มากที่สุดเมื่อใช้ CM-เซลลูโลส 0.5 กรัม สรุปได้ว่าอัตราส่วน

ของไฮดรอลิโปรติเอสกับ CM-เซลลูโลสที่เหมาะสมในการตรึงเท่ากับ 286 ยูนิต/กรัม จากการตรึงไฮดรอลิโปรติเอสด้วย CM-เซลลูโลสในอัตราส่วนที่เหมาะสมดังกล่าวในสารละลายพีเอช 3-10 พบว่าไฮดรอลิโปรติเอสถูกตรึงได้ดีที่สุดที่พีเอช 9 ซึ่ง เท่ากับ 154 ยูนิต และมีประสิทธิภาพในการตรึง 35% ในสารละลายพีเอช 9 ซึ่งเป็นเบสค่อนข้างมากไฮดรอลิโปรติเอสมีประจุเป็นบวกอ่อนๆ ในขณะที่ตัวยัดมีประจุเป็นลบมาก ดังนั้นเอนไซม์กับตัวยัดจึงสามารถจับกันได้ดี เมื่อไฮโดรไลสเคซินที่อุณหภูมิ 20-90°C ในสารละลายพีเอช 7 พบว่าแอกติวิตีของไฮดรอลิโปรติเอสตรึงมากที่สุดถึง 136 ยูนิต เมื่อย่อยเคซินที่ 80°C และเมื่อไฮโดรไลสเคซินด้วยเอนไซม์ตรึง 80°C ในสารละลายพีเอช 6-10 พบว่าเอนไซม์ตรึงทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 6-7 ซึ่งมีแอกติวิตี 156 และ 167 ซึ่งจะเห็นว่าในสารละลายพีเอช 7 โปรติเอสตรึงมีแอกติวิตีมากที่สุด ประสิทธิภาพในการไฮโดรไลสเคซินของไฮดรอลิโปรติเอสตรึงด้วย CM-เซลลูโลสในการนำกลับมาใช้ 4 ครั้ง ที่ 80°C พบว่าในการใช้ไฮดรอลิโปรติเอสตรึงครั้งที่ 2 แอกติวิตีของเอนไซม์ลดลงมากถึง 75% และเหลือ 5% ในการใช้งานในครั้งที่ 3 และเหลือเพียง 2% ในครั้งที่ 4 จะเห็นได้ว่าเมื่อใช้ไฮดรอลิโปรติเอสตรึงในการย่อยเคซินที่ 80 °C สามารถนำกลับมาใช้ในการย่อยได้เพียง 2 ครั้งเท่านั้น และในครั้งที่ 2 แอกติวิตีของเอนไซม์ลดลงค่อนข้างมากเนื่องจากอุณหภูมิที่ใช้อาจจะสูงมากเกินไป ทั้งนี้ถ้าทำการย่อยเคซินที่อุณหภูมิต่ำกว่านี้เช่น 60-70°C เอนไซม์ตรึงอาจจะถูกนำกลับมาใช้ได้มากกว่า 2 ครั้ง โดยที่แอกติวิตีอาจจะลดลงเพียงเล็กน้อยซึ่งจะได้มีการศึกษากันต่อไป คุณสมบัติของโปรติเอสตรึงด้วย CM-เซลลูโลสแสดงในตารางที่ 4.4 จากคุณสมบัติของไฮดรอลิโปรติเอสตรึงด้วยคูโอล์ A-368 และ CM-เซลลูโลสที่ได้ พบว่าไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้เนื่องจากอุณหภูมิที่ใช้ในการหาแอกติวิตีไม่เหมือนกัน ดังนั้นจึงนำไฮดรอลิโปรติเอสตรึงด้วยตัวยัดทั้งสองมาหาแอกติวิตีที่ 80°C เหมือนกัน พบว่า CM-เซลลูโลสมีประสิทธิภาพในการตรึงไฮดรอลิโปรติเอสได้มากกว่าคูโอล์ A-368 13% นั่นคือเลือก CM-เซลลูโลสมาใช้ในการไฮโดรไลสโปรตีนจากนมถั่วเหลืองในการทดลองต่อไป

4.7 การไฮโดรไลสโปรตีนจากถั่วเหลืองโดยไฮดรอลิโปรติเอสอิสระและตรึง

จากการหาสภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลสโปรตีนจากน้ำเต้าหู้ด้วยโปรติเอสอิสระพบว่าไฮดรอลิโปรติเอสมีแอกติวิตีมากที่สุด ซึ่งเท่ากับ 18.4 ยูนิต (ตาราง 3.28) เมื่อไฮโดรไลสที่อุณหภูมิ 80°C และมีแอกติวิตีมากที่สุดเท่ากับ 20.5 ยูนิต (ตาราง 3.30) อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมในการไฮโดรไลสน้ำเต้าหู้ใกล้เคียงกับของนมถั่วเหลืองคอกาซึ่งมีโปรติเอสแอกติวิตี 21 และ 20 ยูนิต (ตาราง 3.28 และ 3.30) เมื่อไฮโดรไลสนมถั่วเหลืองคอกาที่ 80°C ในสารละลาย

ตาราง 4.4 สภาวะที่เหมาะสมในการตรึงไฮดรอลโปรตีนและการทำงานของไฮดรอลโปรตีนตรึงด้วยคูโอล์ท์ A-368 และ CM-เซลลูโลส

ไฮดรอลโปรตีน	ตัวยัด	
	คูโอล์ท์ A-368	CM-เซลลูโลส
สภาวะการตรึง		
อัตราส่วนของแอคติวิตี/ตัวยัด (ยูนิต/กรัม)	7	820
พีเอช	6	9
อุณหภูมิ (°C)	25	25
ประสิทธิภาพการตรึง (ยูนิต/กรัม)	3.4	286
การทำงานของเอนไซม์ตรึง		
พีเอช	7	7
อุณหภูมิ (°C)	80	80
ประสิทธิภาพการใช้ซ้ำ 4 ครั้ง		
แอคติวิตีครั้งที่ 1 – 2 – 3 – 4 (%)	100 – 81 – 47 – 9	100 – 25 – 5 – 2

พีเอช 6 เช่นเดียวกัน และจากรูป 3.18 และ 3.20 จะเห็นว่าแนวโน้มของเส้นกราฟมีลักษณะคล้ายกัน และเนื่องจากนมถั่วเหลืองคอกามีแป้งมากและละลายน้ำได้น้อย ดังนั้นจึงเลือกใช้น้ำเต้าหู้เป็นสับสเตรทในการไฮโดรไลสด้วยไฮดรอลโปรตีนจากยางมะละกอ และเมื่อไฮโดรไลสน้ำเต้าหู้ด้วยไฮดรอลโปรตีนตรึง พบว่าโปรตีนแอคติวิตีมีค่ามากที่สุด 18 และ 18.2 ยูนิต เมื่อไฮโดรไลสที่ 80°C ในสารละลายพีเอช 6 เช่นเดียวกับเอนไซม์อิสระ ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ghosh⁽⁵⁴⁾ ซึ่งกล่าวว่าพีเอชที่เหมาะสมในการไฮโดรไลสโปรตีนจากนมถั่วเหลืองของไฮดรอลโปรตีนตรึงด้วยซีลลูลูสอยู่ในช่วง 6-7.5 เช่นเดียวกัน

ในการนำไฮดรอลโปรตีนตรึงด้วย CM-เซลลูโลสมาใช้ในการไฮโดรไลสโปรตีนจากน้ำเต้าหู้ในสารละลายพีเอช 6 ที่ 80°C โดยเปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระและหาเปอร์เซ็นต์การไฮโดรไลสด้วยวิธี Kjeldahl พบว่าไฮดรอลโปรตีนตรึงสามารถย่อยโปรตีนได้ 61% ซึ่งมากกว่าเอนไซม์อิสระ 25% และเมื่อใช้ไฮดรอลโปรตีนตรึงด้วย CM-เซลลูโลสไปไฮโดรไลสโปรตีนจากน้ำเต้าหู้ซ้ำ 3 ครั้ง พบว่าในครั้งที่ 2 แอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงลดลงเหลือเพียง 26% และเหลือเพียง 4% ในครั้งที่ 3 จะเห็นได้ว่าเมื่อใช้เอนไซม์ตรึงในการย่อยโปรตีนในน้ำเต้าหู้ที่ 80°C สามารถนำกลับมาใช้ได้เพียง 2 ครั้งเท่านั้นและในครั้งที่ 2 แอคติวิตีของเอนไซม์ก็ลดลงค่อนข้างมาก ซึ่งอาจ

ต้องมีการลดอุณหภูมิที่ใช้ในการย่อย และหาวิธีการตรึงที่มีประสิทธิภาพมากขึ้นดังเช่นการไฮโดรไลสโปรตีนจากนมถั่วเหลืองที่ 55°C ด้วยไฮดรอลิโปรติเอสตรึงบนซีลเยื่อด้วยวิธี radiation polymerization พบว่าสามารถใช้เอนไซม์ตรึงในการไฮโดรไลสได้ถึง 6 ครั้ง โดยที่แอกติวิตีเปลี่ยนแปลงน้อยมาก⁽⁵⁴⁾

4.8 สรุปผลการทดลอง

ไฮดรอลิโปรติเอสในยางมะละกามีแอกติวิตีสูงสุดเมื่อเร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลสเคซีนที่อุณหภูมิ 80°C ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 7 โดยความเข้มข้นของ EDTA และซีลเยื่อที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 2 และ 5 mM ตามลำดับ

ในยางมะละกอประกอบด้วยไฮดรอลิโปรติเอส 4 ชนิด ได้แก่ ปาเปน พาพายาโปรติเนส IV ไคโมปาเปน และพาพายาโปรติเนส III ในปริมาณ 2 21 72 และ 5% ตามลำดับ โดยไคโมปาเปนมีปริมาณมากที่สุด และไฮดรอลิโปรติเอสแต่ละชนิดสามารถแยกออกมาได้เมื่อตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณต่างกัน กล่าวคือเมื่อตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 40, 40-50, 50-70 และ 70% อิมดัว สามารถแยกปาเปน พาพายา โปรติเนส IV ไคโมปาเปน และพาพายาโปรติเนส III ออกมาได้

ไฮดรอลิโปรติเอสในยางมะละกอที่เตรียมได้โดยการอบยาง 0.14 กรัม/ตร.ซม. หน้า 1 มม. มีอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมในการอบคือ 60°C และ 2 ชั่วโมง โดยมีโปรติเอสแอกติวิตีเพิ่มมากที่สุดเมื่อเติม 0.5% KMS ลงในยางก่อนอบ

ไฮดรอลิโปรติเอสที่ตรึงด้วยอัลจิเนตมีแอกติวิตีโปรติเอสมากที่สุด และรองลงมาได้แก่ เอนไซม์ที่ตรึงด้วย CM-เซลลูโลส ซีไลท์ และดูโอไลท์ A-368 ตามลำดับ อัตราส่วนของแอกติวิตีและตัวยึดที่เหมาะสมในการตรึงไฮดรอลิโปรติเอสด้วยดูโอไลท์ A-368 และ CM-เซลลูโลสเท่ากับ 7 และ 286 ยูนิต/กรัม พีเอชที่เหมาะสมในการตรึงไฮดรอลิโปรติเอสด้วยดูโอไลท์ A-368 และ CM-เซลลูโลส เท่ากับ 6 และ 9 พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการไฮโดรไลสเคซีนของไฮดรอลิโปรติเอสตรึงด้วยดูโอไลท์ A-368 และ CM-เซลลูโลสอยู่ที่เดียวกันคือ 7 และ 80°C

แอกติวิตีโปรติเอสของไฮดรอลิโปรติเอสที่ตรึงด้วย CM-เซลลูโลส สูงกว่าเอนไซม์ที่ตรึงด้วยดูโอไลท์ A-368 ดังนั้นจึงเลือกใช้ไฮดรอลิโปรติเอสตรึงด้วย CM-เซลลูโลสในการไฮโดรไลสโปรตีนจากน้ำเต้าหู้ซึ่งมีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 6 และ 80°C และจากสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าว เบอร์เซนต์การไฮโดรไลสโปรตีนจากน้ำเต้าหู้ของโปรติเอสตรึงมากกว่าเมื่อใช้ไฮดรอลิ

โปรตีนเอสอีอีต่ำกว่า 25% โดยในครั้งที่ 2 ของการใช้โปรตีนเอสอีอีในการไฮโดรไลสโปรตีนจากน้ำเต้าหู้แอคติวิตีของโปรตีนเอสอีอีเพียง 26% ซึ่งสรุปผลดังในตารางที่ 4.5

ตาราง 4.5 ข้อเปรียบเทียบการไฮโดรไลสโปรตีนจากน้ำเต้าหู้ด้วยเอนไซม์โปรตีนเอสอีอีและที่ตรึงด้วย CM-เซลลูโลส

ข้อเปรียบเทียบ	เอนไซม์ตรึง	เอนไซม์อิสระ
พีเอชที่เหมาะสม	6	6
อุณหภูมิที่เหมาะสม (°C)	80	80
เปอร์เซ็นต์การไฮโดรไลส	61	36
ประสิทธิภาพในการนำเอนไซม์ไปใช้ซ้ำ (%)		
ครั้งแรก	100	100
ครั้งที่ 2	26	0
ครั้งที่ 3	6	0