

**Thesis Title** Production, Stability and Behavior in Non-conventional Media of Cysteine  
Proteases from Papaya (*Carica papaya* L.) Latex

**Author** Mr. Theerapong Theppakorn

**Degree** Doctor of Philosophy (Biotechnology)

**Thesis Advisory Committee**

Assoc. Prof. Dr. Pawinee Kanasawud Chairperson

Dr. Bundit Leelasart Member

Dr. Pairoje Kijjanapanich Member

### ABSTRACT

*Carica papaya* L. latex was collected from unripe papaya planted in Chiang Mai by using the designed collecting device. It was dried to produce two commercial cysteine proteases, crude and spray-dried papain. Crude papain was prepared by drying the liquid latex with a built hot-air oven at 55°C for 1 h. The dried product yielded averagely 21% having the remaining activity  $91.71 \pm 4.55\%$ . The addition of 1% w/w sodium tetrathionate to the papaya latex optimized the stability of crude papain during oven-drying and prolonged storage. Spray-dried papain was prepared by separating the insoluble material in papaya latex and the clarified enzyme solution was spray-dried by a built spray dryer. The fine white product had no activity loss on spray drying. Both crude and spray-dried papain had optimum pH of 6-7 and showed maximal activity at 60-70°C. Their analysis on moisture, ash, protein, lipid and carbohydrate were determined and compared.

Crude papain and fresh latex had the same stability at -20°C over 20 months. In high humidity at 25°C, the stability of crude papain was very poor comparing to spray-dried papain. Spray-dried papain which adsorbed water to form a liquid state, had the good stability as the solid form. Good stability of spray-dried papain was a result of transformation from the active to a reversibly inactive form. This transformation was not probably due to dissolved oxygen or contaminated small molecule. Storage of the papain in the presence of cysteine slowed down the enzyme transformation. The transformation occurred via an intermediate form, which cannot be re-activated by reducing agents

(cysteine and EDTA). Transformation of this intermediate to reversibly inactive enzyme markedly depends on water content. The reversibly inactive enzyme is likely to be an intramolecular disulfide bond isomer.

The study on the behavior of cysteine proteases in low-water media indicated that the water activity of 0.2 was optimal for catalyzing reaction in organic solvent. The catalytic activity of enzymes in the presence of solid-state buffers (acids/their sodium salts and bases/their hydrochloride salts) decreased for all buffers tested when compared to the control. Moreover, these buffer pairs were unable to erase the pH memory phenomena and to overcome the effect of acid-base change. The buffers do not seem to be able to affect the protonation state of cysteine proteases in low-water media. In the last aqueous solution before drying the enzyme, the presence of activating agents (cysteine and EDTA) was more important than buffers.

The study on the efficiency of cysteine proteases in high concentrations of inorganic salt showed that the catalytic efficiency of enzymes ( $k_{cat}/K_m$ ) can increase or decrease depending on concentrations and ion types of salts. The effect of salts became apparently at high concentrations (1.5-2 M) and correlated with the Hofmeister anion series but not perfect for cation series. Kosmotropic ions trend to increase whereas chaotropic ions reduced the catalytic efficiency of cysteine proteases.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การผลิต ความเสถียร และพฤติกรรมในตัวกลางแบบอสัญนิยมของซีตเทอีน

โปรติเอสจากยางมะละกอ (*Carica papaya* L.)

ผู้เขียน นายธีรพงษ์ เทพกรณ์

ปริญญา วิทยาศาสตร์คณวิบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. ภาวิณี คณาสวัสดิ์

ประธานกรรมการ

ดร. บัณฑิต อิศาศาสตร์

กรรมการ

ดร. ไพโรจน์ กิจจนะพานิช

กรรมการ

#### บทคัดย่อ

ยางมะละกอเก็บได้จากผลดิบของมะละกอที่ปลูกในจังหวัดเชียงใหม่โดยใช้อุปกรณ์เก็บรวบรวมน้ำยางที่ออกแบบขึ้น น้ำยางถูกทำแห้งเพื่อผลิตซีตเทอีน โปรติเอสทางการค้า 2 ชนิด คือ ปาเปนดิบและปาเปนพันฝอย ปาเปนดิบเตรียมได้โดยการทำแห้งน้ำยางด้วยเตาอบลมร้อนที่สร้างขึ้นที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 1 ชม. ได้ผลผลิตโดยเฉลี่ยร้อยละ 21 ที่มีแอกติวิตีเหลืออยู่ร้อยละ 91.71±4.55 การเติมโซเดียมเตตระโทไอเนตร้อยละ 1 โดยน้ำหนักลงในน้ำยางช่วยให้รักษาความเสถียรของปาเปนดิบระหว่างการอบแห้งและการเก็บได้ดีที่สุด ปาเปนพันฝอยเตรียมได้โดยแยกองค์ประกอบที่ไม่ละลายน้ำในยางมะละกอออกไป และทำแห้งสารละลายเอนไซม์ส่วนใสด้วยเครื่องทำแห้งแบบพันฝอยที่ได้สร้างขึ้น ผลผลิตแห้งจะเฉลี่ยต่ำกว่าที่ได้ไม่มีการสูญเสียแอกติวิตีระหว่างการทำแห้ง ทั้งปาเปนดิบและปาเปนพันฝอยมีพีเอชที่เหมาะสมที่ 6-7 และแสดงแอกติวิตีสูงสุดที่ 60-70°C การวิเคราะห์ความชื้น เถ้า โปรตีน ไขมันและคาร์โบไฮเดรตของปาเปนทั้งสองได้ถูกตรวจหาและเปรียบเทียบ

ปาเปนดิบและยางสดมีความเสถียรเหมือนกันที่ -20°C ในช่วง 20 เดือน ในภาวะความชื้นสูงที่ 25°C ปาเปนดิบมีความเสถียรต่ำมากเมื่อเปรียบเทียบกับปาเปนพันฝอย ปาเปนพันฝอยที่อุณหภูมิทำงานกลายเป็นของเหลวมีความเสถียรดีเทียบเท่ากับรูปแบบของแข็ง ความเสถียรที่ดีของปาเปนพันฝอยเป็นผลของการเปลี่ยนจากรูปแบบที่ทำงานได้สู่

รูปแบบที่ทำงานได้เมื่อถูกกระตุ้น การเปลี่ยนแปลงนี้ไม่ได้ขึ้นอยู่กับออกซิเจนที่ละลายอยู่ในสารละลาย หรือสารโมเลกุลเล็กที่เจือปนอยู่ การเก็บปฏิกิริยาในที่มีซิสเทอีนช่วยลดการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของเอนไซม์ให้ช้าลง การเปลี่ยนรูปแบบเกิดผ่านตัวกลางที่ถูกกระตุ้นกลับคืนไม่ได้ด้วยสารรีดิวซ์ (ซิสเทอีน และ EDTA) การเปลี่ยนรูปของตัวกลางนี้สู่รูปแบบเอนไซม์ที่ทำงานได้เมื่อถูกกระตุ้นขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำอย่างชัดเจน รูปแบบของเอนไซม์ที่ทำงานได้เมื่อถูกกระตุ้นน่าจะเป็น ไอโซเมอร์ของพันธะโคvalent ไฟด์ภายใน โมเลกุล

การศึกษาพฤติกรรมของซิสเทอีนโปรติเอสในระบบน้ำน้อยบ่งชี้ว่าค่าแอกติวิตีน้ำที่ 0.2 เป็นค่าที่ดีที่สุดสำหรับการเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายอินทรีย์ แอกติวิตีของการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ขณะที่มีบัฟเฟอร์สถานะของแข็ง (กรด/คู่เกลือโซเดียม และเบส/คู่เกลือไฮโดรคลอไรด์) ลดลงในทุกบัฟเฟอร์ที่ได้ทดสอบเมื่อเปรียบเทียบกับ การควบคุม ยิ่งไปกว่านั้นบัฟเฟอร์ทั้งหลายไม่สามารถบดล้างปรากฏการณ์การจำที่เอช และมีอิทธิพลเหนือการเปลี่ยนแปลงกรด-เบส ดูเหมือนว่าบัฟเฟอร์เหล่านี้ไม่สามารถส่งผลต่อสถานะ protonation ของซิสเทอีนโปรติเอสในระบบน้ำน้อย ในสารละลายสุดท้ายก่อนทำแห้งเอนไซม์ การมีสารกระตุ้น (ซิสเทอีน และ EDTA) สำคัญมากกว่าบัฟเฟอร์

การศึกษาประสิทธิภาพของซิสเทอีนโปรติเอสในสารละลายเกลืออนินทรีย์เข้มข้นสูงแสดงว่าประสิทธิภาพการเร่งของเอนไซม์ ( $k_{cat}/K_m$ ) สามารถเพิ่มหรือลดลงได้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและชนิดของไอออนในเกลือ ผลของเกลือสามารถเห็นได้เด่นชัด ณ ความเข้มข้นสูง (1.5-2 โมล/ลิตร) และสัมพันธ์กับลำดับไอออนลบของ Hofmeister แต่ไม่สมบูรณ์สำหรับลำดับไอออนบวก สิ่งที่เด่นชัดคือ kosmotropic ไอออนมีแนวโน้มเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ในขณะที่ chaotropic ไอออน ลดประสิทธิภาพการเร่งของซิสเทอีนโปรติเอส