

แบบสรุปผู้บริหาร

[Executive Summary]

โครงการวิจัยเรื่อง(ภาษาไทย) การสกัดบรอมีเลนจากวัสดุเศษเหลือของสับปะรดเพื่อประยุกต์ใช้ในอาหารและเครื่องสำอาง

(ภาษาอังกฤษ) Extraction of bromelain from pineapple wastes for application in food and cosmetics

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

นายภาณุพงษ์ ใจวุฒิ

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

โทรศัพท์ 0-5391-6839 โทรสาร 0-5391-6831

ผู้ร่วมวิจัย

นายสาโรจน์ รอดคีน

สำนักวิชาอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

โทรศัพท์ 0-5391-6752 โทรสาร 0-5391-6738

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปี 2553 จำนวนเงิน 570,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี เริ่มทำการวิจัยเมื่อ 21 มิถุนายน 2553 วันที่สิ้นสุดสัญญา 20 มิถุนายน 2554

สรุปโครงการวิจัย

ประเทศไทยมีศักยภาพสูงในการผลิตสับปะรด ปัจจุบันประเทศไทยเป็นผู้ผลิตสับปะรดกระป๋องและน้ำสับปะรดรายใหญ่ที่สุดของโลก เมื่อสับปะรดหนึ่งผลเข้าสู่กระบวนการแปรรูปในโรงงานผู้ผลิตจะผลิตกาก ก้าน ปอกเปลือก และแกนออก ซึ่งคิดเป็นน้ำหนักประมาณร้อยละ 50 ของน้ำหนักทั้งผล นั่นคือจะมีวัสดุเศษเหลือจากการแปรรูปสับปะรดหรือการบริโภคในประเทศประมาณ 1.14 ล้านตันต่อปี มีรายงานการนำวัสดุเศษเหลือเหล่านี้ไปใช้ประโยชน์ทำกระดาษ ปุ๋ยหมัก เลี้ยงสัตว์ อย่างไรก็ตามการใช้ประโยชน์จากวัสดุเศษเหลือสับปะรดข้างต้นยังมีมูลค่าต่ำเมื่อเทียบกับการนำไปผลิตสัตว์ชีวภาพ เช่น เอนไซม์บรอมีเลน ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจจะสกัดบรอมีเลนจากวัสดุเศษเหลือสับปะรดโดยใช้เทคนิคระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค ซึ่งมีข้อดีคือทำให้โปรตีนเข้มข้นได้ในขั้นตอนเดียว มีความสะดวก รวดเร็ว ใช้ต้นทุนต่ำ ที่สำคัญคือสามารถขยายขนาดการผลิตสู่ระดับอุตสาหกรรมได้

ดังนั้นงานวิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบผลผลิตบรอมิเลนจากวัสดุเศษเหลือจากส่วนต่างๆ ของสับปะรดสายพันธุ์นางแล ภูแล และปัตตาเวีย ซึ่งได้รับความนิยมบริโภคสูง สำหรับสกัดบรอมิเลนจากวัสดุเศษเหลือสับปะรดที่คิดว่ามีศักยภาพจะเป็นแหล่งสกัดได้โดยใช้เทคนิคระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค และเพื่อศึกษาสมบัติทางชีวเคมีและความเสถียรของบรอมิเลนที่สกัดได้

ตัวอย่างวัสดุเศษเหลือที่ใช้ศึกษาคือสับปะรดพันธุ์ภูแล นางแล และปัตตาเวียซึ่งได้จากร้านค้าปลีก และกากสับปะรดจากโรงงานแปรรูปสับปะรด สำหรับนำมาเปรียบเทียบปริมาณบรอมิเลนและสมบัติทางชีวเคมีต่างๆ เพื่อคัดเลือกส่วนของวัสดุเศษเหลือที่มีปริมาณมากที่สุดไปศึกษาผลของสารละลายสกัด ประสิทธิภาพการย่อยกล้ำเนื้อสัตว์ และจากนั้นนำไปสกัดบรอมิเลนโดยใช้ระบบน้ำสองวัฏภาค (ATPS) ที่ประกอบด้วยพอลิเอธิลีน ไกลคอล (PEG) และเกลือชนิดต่างๆ คัดเลือกบรอมิเลนจากสถานะ ATPS ที่ให้ผลผลิตเอนไซม์สูงที่สุดไปศึกษาสมบัติทางชีวเคมีและทำแห้งด้วยระบบเยือกแข็ง จากนั้นศึกษาความคงตัวของบรอมิเลนในสถานะต่างๆ และความคงตัวในสูตรตำรับเครื่องสำอาง 5 ตำรับ โดยเปรียบเทียบระหว่างบรอมิเลนที่สกัดกับ PEG กับบรอมิเลนอิสระ จากนั้นจึงทดสอบความจำเพาะต่อการย่อยโปรตีน 5 ชนิดของบรอมิเลน และทดสอบประสิทธิภาพการย่อยคอลลาเจนจากเอ็นกกล้ำเนื้อวัวเปรียบเทียบกับบรอมิเลนทางการค้า

ผลการทดลองพบว่าวัสดุเศษเหลือของสับปะรดสายพันธุ์ภูแล นางแล และปัตตาเวียมีปริมาณร้อยละ 62.05 51.35 และ 46.91 ของน้ำหนักผล โดยพบว่าส่วนเปลือกเป็นวัสดุเศษเหลือที่มีสัดส่วนสูงที่สุดซึ่งมีปริมาณมากที่สุด ผู้วิจัยจึงได้คัดเลือกเปลือกเพื่อศึกษาการสกัดบรอมิเลนต่อไป วัสดุเศษเหลือรวมของสายพันธุ์ปัตตาเวียจากร้านค้าให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดคือ 220.21 ยูนิตต่อกรัม ตามด้วยภูแล กากหยาบจากโรงงาน นางแล และกากละเอียดจากโรงงาน ซึ่งมีค่า 187.17 122.73 77.29 และ 40.30 ยูนิตต่อกรัม ตามลำดับ ผลการทดลองนี้แสดงว่ากากจากโรงงานแปรรูปสับปะรดแม้จะผ่านกระบวนการและสถานะแวดล้อมต่างๆจากโรงงานมากมาย แต่ก็ยังคงมีกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ การใช้สารละลายบัฟเฟอร์ pH 7 ผสม cysteine และ EDTA ในการสกัดจะให้ปริมาณโปรตีนและกิจกรรมบรอมิเลนสูงที่สุดคือ 1,031.94 และ 866.88 ยูนิต ต่อ 100 กรัมของเปลือกสับปะรดภูแลและนางแล ตามลำดับ การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในกล้ำเนื้อสัตว์พบว่าสารสกัดบรอมิเลนจากเปลือกสับปะรดภูแลให้กิจกรรมการย่อยโปรตีนในกล้ำเนื้อสัตว์สูงกว่าสารสกัดจากเปลือกสับปะรดนางแล

การศึกษากการแยกบรอมิเลนจากสารสกัดเปลือกสับปะรดด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคพบว่าส่วนประกอบที่ให้ประสิทธิภาพในการแยกดีที่สุดคือ PEG 2000 15% และ $MgSO_4$ 14% สำหรับสารสกัดจากเปลือกสับปะรดพันธุ์นางแล และ PEG 6000 18% และ $MgSO_4$ 17% สำหรับสารสกัดจากเปลือกพันธุ์ภูแล ซึ่งให้ผลผลิตบรอมิเลน 205.78 % มีกิจกรรมจำเพาะสูงสุดคือ 31.39 ยูนิตต่อมก. โปรตีน และมีความบริสุทธิ์ 3.44 เท่าของสารสกัดเริ่มต้น ผู้วิจัยได้คัดเลือกบรอมิเลนจากเปลือกสับปะรดภูแลสำหรับการศึกษาสมบัติทางชีวเคมีและความคงตัวต่อไป ซึ่งพบว่าบรอมิเลนมีความคงตัว

ในช่วง pH กว้างและมีค่าสูงสุดที่พีเอช 9 มีความคงตัวมากกว่า 50% ที่อุณหภูมิ 30-50 องศาเซลเซียส และที่ความเข้มข้นของเกลือน้อยกว่า 4% โดยปริมาตร

การเปรียบเทียบความคงตัวของบรอมีเลนที่ผ่านการกำจัด PEG ออก (free-bromelain) และที่ยังมี PEG จับอยู่ (PEG-bromelain) พบว่าหลังจากการทำแห้ง PEG-bromelain ยังคงกิจกรรมเอนไซม์ไว้มากกว่า free-bromelain ถึงร้อยละ 30 แม้จะเก็บไว้ที่อุณหภูมิสูง 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 84 วันก็ตาม นอกจากนี้ PEG-bromelain ยังมีความคงตัวสูงกว่า free-bromelain ในสูตรตำรับเครื่องสำอางแบบโลชั่น ครีม มาร์คัส เจล และ โทนเนอร์ภายใต้สภาวะอุณหภูมิการเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส อุณหภูมิห้อง และ 50 องศาเซลเซียส ผง PEG-bromelain ที่ได้จากงานวิจัยสามารถย่อยโปรตีนสับสเตรททั้ง 5 ชนิด ได้แก่ ซีโมโกลบิน เคซีน เอโซเคซีน BSA และเจลาติน ต่ำกว่าบรอมีเลนทางการค้าจาก Sigma และบรอมีเลนแคปซูลในรูปของอาหารเสริม แต่สูงกว่าบรอมีเลนในผงหมักเนื้อนุ่ม การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยคอลลาเจนจากเอ็นกัลลามเนื้อวัวพบว่า PEG-bromelain สามารถย่อยคอลลาเจนได้อย่างมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับบรอมีเลนจาก Sigma โดยสามารถย่อยสายโปรตีนหลัก $\beta \alpha 1$ และ $\alpha 2$ ในเวลาเพียง 20 นาที และสามารถย่อยคอลลาเจนทั้งโมเลกุลเวลาเพียง 40 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ด้วยปริมาณเอนไซม์ 0.02 ยูนิต

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าวัสดุเศษเหลือทุกส่วนจากสับประรดสามารถนำมาเป็นแหล่งของการสกัดบรอมีเลนได้ โดยเฉพาะวัสดุเศษเหลือจากโรงงานอุตสาหกรรมซึ่งเป็นกากจากกระบวนการคั้นน้ำสับประรดถึงแม้จะปรากฏกิจกรรมของบรอมีเลนน้อยกว่าเปลือกของผลสด แต่มีบรอมีเลนในปริมาณที่มากพอและสามารถเป็นแหล่งการสกัดบรอมีเลนได้ ด้วยปริมาณการผลิตสับประรดที่สูงขึ้นทุกปี เชื่อว่าวัสดุเศษเหลือสับประรดทุกส่วนจะมีศักยภาพในการเป็นแหล่งของการสกัดบรอมีเลน อย่างไรก็ตามแม้จะสกัดบรอมีเลนแล้วยังเหลือกากจากการสกัดซึ่งมีความน่าสนใจศึกษาวิจัยแนวทางการใช้ประโยชน์ต่อไป เพื่อเป็นแนวทางการช่วยเพิ่มมูลค่าวัสดุเหลือทิ้งจากสับประรดอย่างยั่งยืน บรอมีเลนที่ได้จากงานวิจัยนี้มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงในเกือบทุกช่วง pH แม้แต่ที่ pH ต่ำหรือสูงมากๆ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงน่าจะเป็นประโยชน์ต่อการประยุกต์บรอมีเลนในอุตสาหกรรมที่หลากหลายไม่เฉพาะแต่ในอาหารและเครื่องสำอาง

บรอมีเลนจากงานวิจัยมีลักษณะที่ง่ายต่อการประยุกต์ใช้นั้นคือมีลักษณะเป็นผงสีขาวละลายน้ำได้ง่าย เมื่อละลายแล้วได้สารละลายสีเหลืองอ่อนทำให้ง่ายต่อการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ โดยเฉพาะอาหารและเครื่องสำอาง ต่างจากบรอมีเลนจาก Sigma แม้จะละลายน้ำได้ง่ายเช่นกันแต่เมื่อละลายแล้วได้สารละลายสีเหลืองเข้มและมีราคาแพงกว่ามาก และข้อบ่งชี้ในเอกสารแนบจากบริษัทผู้ผลิตแนะนำให้ใช้บรอมีเลนสำหรับการวิจัยในห้องปฏิบัติการเท่านั้นไม่แนะนำให้นำไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่น มากไปกว่านั้นผลการทดสอบรูปแบบโปรตีนยังพบว่าบรอมีเลนจาก Sigma มีโปรตีนปนเปื้อนในปริมาณสูงในขณะที่บรอมีเลนจากการทดลองที่ได้จาก ATPS แทบไม่มีโปรตีนปนเปื้อน จึงกล่าวได้ว่าวิธี ATPS ช่วยแยกและทำบริสุทธิ์บางส่วนแก่บรอมีเลนไปพร้อมกัน ส่วนบรอมี

เลนจากแคลซูลที่แม้จะมีกิจกรรมเอนไซม์สูงกว่าบรอมีเลนจากงานวิจัยแต่มีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาลเข้ม เมื่อละลายน้ำแล้วต้องแยกกากที่ไม่ละลายออกก่อนใช้ นอกจากนี้ยังมีกลิ่นน้ำตาลไหม้ค่อนข้างแรง จึงไม่มีความเหมาะสมในการประยุกต์ใช้

ในการผลิตเอนไซม์ทางการค้าทั่วไป ขั้นตอนการแยกและทำแห้งเอนไซม์มีความยุ่งยากและต้องใช้เครื่องมือชั้นสูง ซึ่งขั้นตอนเหล่านี้คิดเป็นมูลค่า 60-90% ของต้นทุนการผลิตเอนไซม์ ดังนั้นข้อดีของการเลือกใช้ ATPS ในงานวิจัยนี้คือมีขั้นตอนที่ไม่ยุ่งยาก สามารถขยายขนาดการผลิตได้โดยไม่ต้องใช้เครื่องมือชั้นสูง สามารถแยกบรอมีเลนให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น และ PEG ยังช่วยในการรักษาความคงตัวของบรอมีเลนอีกด้วย โดยพบว่า PEG ที่ติดอยู่กับบรอมีเลนมีความปลอดภัยสูง ไม่ถูกดูดซึมโดยลำไส้มนุษย์แต่ละลายน้ำได้ดีจึงนิยมใช้ในทางเภสัชกรรมมาเป็นเวลานาน

บทคัดย่อ

ผลผลิตสับปะรดมีเพิ่มมากขึ้นทุกปีตามปริมาณการบริโภค สับปะรดได้รับความนิยมในการบริโภคสดในประเทศและการแปรรูปเพื่อการส่งออก โดยประเทศไทยเป็นผู้ส่งออกสับปะรดแปรรูปรายใหญ่ที่สุด การบริโภคสับปะรดที่เพิ่มขึ้นก่อให้เกิดวัสดุเศษเหลือเช่น เปลือก แกน ก้าน จุกและใบเป็นจำนวนมาก งานวิจัยนี้จึงหาแนวทางการเพิ่มมูลค่าแก่วัสดุเศษเหลือเหล่านี้โดยมุ่งศึกษาเปรียบเทียบบรอมีเลนในวัสดุเศษเหลือของสับปะรดสายพันธุ์ภูแล นางแล และปัตตาเวีย และศึกษาการสกัดบรอมีเลนโดยวิธีระบบน้ำสองวัฏภาค (ATPS) จากวัสดุเหล่านี้เพื่อประยุกต์ในอาหารและเครื่องสำอาง จากการเปรียบเทียบพบว่าสับปะรดพันธุ์ภูแลมีวัสดุเศษเหลือมากที่สุดคิดเป็นปริมาณร้อยละ 62.05 ของน้ำหนักผล รองลงมาคือนางแลและปัตตาเวียคิดเป็นร้อยละ 51.35 และ 46.91 ตามลำดับ แม้ว่าจุกและใบจะเป็นวัสดุเศษเหลือที่มีปริมาณบรอมีเลนสูงที่สุดแต่เปลือกสับปะรดมีปริมาณเหลือทิ้งมากกว่า จึงได้คัดเลือกเปลือกเพื่อทำการศึกษการแยกบรอมีเลนด้วยวิธี ATPS ต่อไป การใช้สารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 7 ร่วมกับสารกระตุ้นการทำงานของบรอมีเลนจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดเอนไซม์ยิ่งขึ้น โดยพบว่าทำให้ได้บรอมีเลนที่มีกิจกรรมสูงที่สุดและมีประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนในกล้ามเนื้อวัว ไข่ และปลาหมึกมากที่สุด

การแยกบริสุทธิ์บางส่วนบรอมีเลนด้วย ATPS จากเปลือกสับปะรดพันธุ์นางแลพบว่าสภาวะที่ดีที่สุดคือการใช้พอลิเอธิลีนไกลคอล (PEG) 2000 ปริมาณร้อยละ 15 (w/w) คู่กับเกลือแมกนีเซียมซัลเฟต ปริมาณร้อยละ 14 (w/w) ซึ่งทำให้ได้ผลผลิตบรอมีเลนร้อยละ 113.54 และมีความบริสุทธิ์ 2.23 เท่าของสารสกัดเริ่มต้น ในขณะที่การแยกบรอมีเลนจากเปลือกสับปะรดพันธุ์ภูแลด้วย ATPS พบว่าการใช้ PEG 6000 ร้อยละ 18 (w/w) คู่กับแมกนีเซียมซัลเฟต ร้อยละ 17 (w/w) ทำให้ได้ผลผลิตบรอมีเลนสูงที่สุดคือร้อยละ 205.78 และมีค่าความบริสุทธิ์ 3.44 เท่าของสารสกัดเริ่มต้น การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีพบว่าบรอมีเลนจากสับปะรดทั้งสองสายพันธุ์มีช่วงพีเอชที่เหมาะสมคือ 7-8 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 60 องศาเซลเซียส มีมวลโมเลกุลซึ่งทดสอบด้วย SDS-PAGE ประมาณ 28 กิโลดาลตัน

บรอมีเลนที่ยึดจับกับ PEG ทั้งในรูปผงแห้งและในรูปที่ผสมในสูตรตำรับเครื่องสำอางสามารถคงตัวอยู่ได้มากกว่าร้อยละ 50 เมื่อเปรียบเทียบกับเวลาเริ่มต้น ในขณะที่บรอมีเลนอิสระซึ่งถูกกำจัด PEG ออกจากโมเลกุลแล้วมีความคงตัวต่ำโดยเฉพาะเมื่อผสมในสูตรตำรับเครื่องสำอาง บรอมีเลนจากงานวิจัยมีความจำเพาะต่อโปรตีนสับสเตรทที่หลากหลาย โดยสามารถย่อยฮีโมโกลบินได้ดีที่สุดและสามารถย่อยเคซีน เอโซเคซีน และเจลาตินได้ใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ยังสามารถย่อยคอลลาเจนจากเอ็นก้ามเนื้อวัวได้อย่างมีประสิทธิภาพ งานวิจัยนี้สามารถผลิตบรอมีเลนจากเปลือกสับปะรดได้ด้วยต้นทุนที่ถูกลงกว่าราคาของบรอมีเลนทางการค้า ได้บรอมีเลนที่มีลักษณะดีและมีความคงทนเหมาะสมต่อการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอาง

คำสำคัญ: บรอมีเลน สับปะรด วัสดุเศษเหลือ ระบบนำส่งวัฏภาค อาหาร เครื่องสำอาง

Production of pineapple is annually increased because of this fruit is favorite domestic consumption and appreciation for processing. Thailand is the largest exporter of processed pineapple. Increase in pineapple consumption produces large amount of waste for example peel, core, stem, crown and leave. Therefore, this research was aimed to value-add these wastes by study the comparison of bromelain from the wastes of pineapple Phulae, Nanglae and Pattawia cultivars. Extraction of bromelain from the wastes by aqueous two phase system (ATPS) was also studied. Biochemical properties and stability of the extracted bromelain were also investigated for further application in food and cosmetics. Phulae cultivar provided the largest wastes accounted for 62.05% followed by Nanlae and Pattawia for 51.35 and 46.91%, respectively. The peels were the major portion among the wastes. Buffer pH 7 containing bromelain activators increased efficiency of enzyme extraction. This bromelain extract showed the highest hydrolysis in beef, chicken and squid.

Bromelain from Phulae cultivar peel could be partially purified by the ATPS with the optimal condition was 15% PEG2000 and 14% $MgSO_4$. This bromelain exhibited 113.54% yield and purification factor 2.33 folds. The ATPS condition of 18% PEG6000 and 17% $MgSO_4$ provided the highest yield of bromelain from Nanglae pineapple peel at 205.78% with 3.44 fold of purification. Both bromelain showed the optimal conditions of pH 7-8, temperature $60^\circ C$ and illustrated the molecular weight assayed by SDS-PAGE of 28 kDa. Bromelain without polyethylene glycol removal (PEG-bromelain) revealed more than 50% stability either storage as powder at $-20^\circ C$, $4^\circ C$, room temperature and $50^\circ C$ or mixing in cosmetic formulations and then storage at $4^\circ C$, room temperature and $50^\circ C$. In contrast, the bromelain with PEG removal (free-bromelain) could not retain its stability

during storages. The PEG-bromelain efficiently hydrolyzed various protein assayed. Haemoglobin was the most hydrolyzed protein followed by similar competence for casein, azocasein and gelatin. The enzyme also capably decomposed the bovine tendon collagen comparable to commercial bromelain. This research provided the low cost bromelain from pineapple waste. It was cheaper and greater appearance than the commercial enzyme. Moreover, it was also high stability in various conditions which was proper for application in food and cosmetic.

Keywords: Bromelain; pineapple; waste; aqueous two-phase system; food; cosmetic