รายงานการวิจัย

เรื่อง

การผลิตเอนไซม์โบรมิเลนจากลำต้นของสับปะรดและการนำไปใช้ประโยชน์ในการทำผงหมักเนื้อนุ่ม

Bromelain production from pineapple stem and application for tenderizing meat powder

โดย

รศ. อารี ฤทธิบูรณ์

โครงการวิจัยเชิงบูรณาการและพาณิชย์ งบประมาณเงินรายได้ ประจำปี 2554

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยี พระจอมเกล้า เจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการสกัดเอนไซม์โบรมิเลนจากส่วนเหลือทิ้งสับปะรด คือ แกน เปลือก และลำต้น โดยการตีปั่นร่วมกับน้ำแข็งปราศจากไอออน เป็นเวลา 5 นาที พบว่าส่วนลำต้นให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โบรมิเลนสูงสุด และเมื่อนำส่วนของลำต้นมาทำการตีปั่นร่วมกับน้ำแข็งปราศจากไอออนเป็นเวลา 5 นาที ร่วมกับโฮโมจีไนส์ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบางและนำไปปั่นเหวี่ยง นำส่วนใสที่ได้ไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์โบรมิเลนพบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าการไม่ใช้เครื่องโฮโมจีไนส์ จากนั้นนำส่วนใสไปตกตะกอนสองครั้งด้วยอะซีโตนเย็น 4 องศาเซลเซียส โดยให้ความเข้มข้นของอะซิโตนเย็นเริ่มต้นร้อยละ 35 และให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็นร้อยละ 80 นำตะกอนเอนไซม์ที่ได้ไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งจะได้เอนไซม์ผง และทำการศึกษาผลของเวลาที่ใช้ในการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งต่อการละลายของเอนไซม์ กิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์ กิจกรรมจำเพาะทั้งหมด ร้อยละของผลได้ และจำนวนเท่าของความบริสุทธิ์และพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (วิเคราะห์ทางสถิติในทุกสดมภ์) เมื่อทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์พบว่า เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอช 7.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์โบรมิเลนพบว่าในสภาวะสารละลายเอนไซม์มีความคงตัวเมื่ออยู่ในบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 และช่วงอุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียสเอนไซม์มีความคงตัวมากที่สุด และหากทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลือเท่ากับร้อยละ 93.86

ABSTRACT

The study of bromelain extraction from pineapple wastes which cores peels and stems. There was the stem have the highest bromelain activity in pineapple stems. Bromelain was obtained from stems using blender with deionized ice for 5 minutes, homogenizing for 5 minutes, filtering by a filter cloth and then centrifuging. The absorbance of the supernatant of this process was measured for bromelain activity. The result showed that the proteolytic activity of this extract was higher than non homogenizing extract. The supernatant was then precipitated by 35% cold acetone (4°C). The supernatant was repeatedly precipitated with 80% cold acetone.The first and second precipitates were combined and then freeze dryed for 10 hours. The powdered enzyme was statistically analyzed for the effects on the solubility of enzyme, total activity, specific activity, yield and purity factor and the the freeze drying time had significantly effects on all 5 factors of the enzyme. The optimum conditions for activity and stability of powdered bromelain were examined. The result showed that the optimum conditions were at pH 7.0 and 60°C. This enzyme was steadied at pH 7.0 and 30-40 °C. After maintaining at 4°C for 24 hours, bromelain had the residual activity at 93.86%.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยโดยเงินทุนวิจัยงบรายได้ประเภทบูรณาการและพาณิชย์ของคณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2554 จึงขอกราบขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

รศ. อารี ฤทธิบูรณ์
หัวหนโครงการวิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	1
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	2
1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	3
2.1 สับปะรด	3
2.1.1 พฤกษศาสตร์ของสับปะรด	3
2.1.1.1 การจำแนกทางอนุกรมวิธานของสับปะรด	4
2.1.1.2 สัณฐานวิทยาและกายวิภาคของสับปะรด	4
2.1.2 องค์ประกอบทางเคมีของสับปะรด	5
2.1.3 พันธุ์สับปะรด	5
2.1.4 พันธุ์สับปะรดที่ปลูกในประเทศไทย	6

2.1.5 การแปรรูปสับปะรด 8
2.2 เอนไซม์โบรมิเลน 8
2.2.1 เอนไซม์โบรมิเลนและการเรียกชื่อเอนไซม์ 8
2.2.2 แหล่งของเอนไซม์โบรมิเลน 9
2.2.3 คุณสมบัติทางเคมีของเอนไซม์โบรมิเลน 9
2.2.4 คุณสมบัติทางกายภาพของเอนไซม์โบรมิเลน 9

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.2.5 คุณสมบัติการทำงานของเอนไซม์โบรมิเลน 10
2.2.6 ประโยชน์ของเอนไซม์โบรมิเลน 11
2.2.7 การผลิตเอนไซม์โบรมิเลน 11
2.2.8 การรักษาความคงตัวของเอนไซม์ 13
2.2.9 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โบรมิเลน 13
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย 16
3.1 วัตถุดิบ 16
3.2 สารเคมี 16
3.3 อุปกรณ์ 16
3.4 วิธีการทดลอง 17
3.4.1 ศึกษาการสกัดเอนไซม์โบรมิเลนจากส่วนต่างๆของสับปะรด 17
3.4.2 ศึกษาการสกัดเอนไซม์โบรมิเลนจากลำต้นสับปะรด 18
3.4.3 ศึกษาปริมาณความเข้มข้นของอะซิโตนเย็นที่ใช้ในการตกตะกอนเอนไซม์โดยใช้อะซิโตนเย็นเริ่มต้นที่ร้อยละ 35 และใช้อะซิโตนเย็นซ้ำครั้งที่สองเป็นร้อยละ 50, 60, 70 และ 80 18
3.4.4 ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์โบรมิเลน 20
3.4.3.1 อุณหภูมิ 20
3.4.3.2 พีเอช 20
3.4.4 ศึกษาสภาวะที่มีผลต่อความคงตัวของเอนไซม์ 20

3.4.4.1 อุณหภูมิ 20
3.4.4.2 พีเอช 20
3.4.6 ทำการวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) และทำการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 21
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง 22
4.1 ศึกษาการสกัดเอนไซม์โบรมิเลนจากส่วนต่างๆของสับปะรด 22
4.2 ศึกษาการสกัดเอนไซม์โบรมิเลนจากลำต้นสับปะรด 23

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.3 ศึกษาปริมาณความเข้มข้นของอะซิโตนเย็นที่ใช้ในการตกตะกอนเอนไซม์โดยใช้อะซิโตนเย็นเริ่มต้นที่ร้อยละ 35 และใช้อะซิโตนเย็นซ้ำครั้งที่สองเป็นร้อยละ 50, 60, 70 และ 80 23
4.4 ศึกษาระยะเวลาการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ผง 25
4.5 ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์โบรมิเลน 27
4.5.1 อุณหภูมิ 27
4.5.2 พีเอช 27
4.6 ศึกษาสภาวะที่มีผลต่อความคงตัวของเอนไซม์ 29
4.6.1 อุณหภูมิ 29
4.6.2 พีเอช 30
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 33
เอกสารอ้างอิง 34
ภาคผนวก ก 37
ภาคผนวก ข 39
ภาคผนวก ค 43

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์โบรมิเลน	10
4.1	ผลของกิจกรรมของเอนไซม์โบรมิเลนที่สกัดได้จากส่วนต่างๆของสับปะรด คือ แกน เปลือก ลำต้นโดยการตีป่น เป็นเวลา 5 นาที ร่วมกับน้ำแข็งปราศจากไอออน	22
4.2	ผลของวิธีการสกัดเอนไซม์โบรมิเลนจากลำต้นสับปะรดด้วยวิธีการตีป่นและการตีป่นร่วมกับโฮโมจิไนส์ เป็นเวลา 5 นาที	23
4.3	ผลของการตกตะกอนเอนไซม์โบรมิเลนจากลำต้นสับปะรดโดยอะซิโตนเย็น 4 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ35 และตกตะกอนซ้ำครั้งที่ 2 เป็นความเข้มข้นร้อยละ 50, 60, 70 และ 80 เป็นเวลา 90 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	24
4.4	ผลของระยะเวลาการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งที่ระยะเวลา 8, 10 และ12 ชั่วโมง ที่มีผลต่อการละลายหลังการแช่เยือกแข็ง กิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์ กิจกรรมจำเพาะทั้งหมดของเอนไซม์ ร้อยละของผลได้ และจำนวนเท่าของความบริสุทธิ์	25
4.5	ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของการเก็บรักษาเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่เวลา 2, 4, 6, 8, 16, 20 และ 24 ชั่วโมง	30
ตารางภาคผนวกที่ 1	แสดงการผสมกันระหว่างสารละลาย ก และสารละลาย ข ของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ให้ได้ค่ากรดด่างที่ต้องการ	37
ตารางภาคผนวกที่ 2	แสดงการผสมกันระหว่างสารละลาย ก และสารละลาย ข ของสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ให้ได้ค่ากรดด่างที่ต้องการ	38
ตารางภาคผนวกที่ 3	การวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานไทโรซีน ที่ 280 นาโนเมตร	39
ตารางภาคผนวกที่ 4	การวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานโปรตีน Bovine serum albumin ที่ 595 นาโนเมตร	41
ตารางภาคผนวกที่ 5	ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของกิจกรรมของเอนไซม์โบรมิเลนที่สกัดได้จากส่วนต่างๆของสับปะรด คือแกน เปลือก ลำต้น โดยการตีป่น เป็นเวลา 5 นาที ร่วมกับน้ำแข็งปราศจากไอออน	43

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
ตารางภาคผนวกที่ 6	ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของปริมาณอะซิโตนเย็น 4 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 35 และตกตะกอนเพิ่มครั้งที่สองเป็นความเข้มข้นร้อยละ 50, 60, 70 และ 80 ที่มีผลต่อกิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์ในการตกตะกอนเอนไซม์โบรมิเลนจากลำต้นสับปะรด	43
ตารางภาคผนวกที่ 7	ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของปริมาณอะซิโตนเย็น 4 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 35 และตกตะกอนเพิ่มครั้งที่สองเป็นความเข้มข้นร้อยละ 50, 60, 70 และ 80 ที่มีผลต่อกิจกรรมจำเพาะทั้งหมดของเอนไซม์ในการตกตะกอนเอนไซม์โบรมิเลนจากลำต้นสับปะรด	44
ตารางภาคผนวกที่ 8	ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของปริมาณอะซิโตนเย็น 4 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 35 และตกตะกอนเพิ่มครั้งที่สองเป็นความเข้มข้นร้อยละ 50, 60, 70 และ 80 ที่มีผลต่อร้อยละของผลได้ของเอนไซม์ในการตกตะกอนเอนไซม์โบรมิเลนจากลำต้นสับปะรด	44
ตารางภาคผนวกที่ 9	ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของปริมาณอะซิโตนเย็น 4 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 35 และตกตะกอนเพิ่มครั้งที่สองเป็นความเข้มข้นร้อยละ 50, 60, 70 และ 80 ที่มีผลต่อจำนวนเท่าของความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โบรมิเลนจากลำต้นสับปะรด	45
ตารางภาคผนวกที่ 10	ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของระยะเวลาการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ที่ระยะเวลา 8, 10 และ 12 ชั่วโมง ที่มีผลต่อการละลายของเอนไซม์หลังจากผ่านการแช่เยือกแข็งและกิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์	45
ตารางภาคผนวกที่ 11	ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของระยะเวลาการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ที่ระยะเวลา 8, 10 และ 12 ชั่วโมง ที่มีผลต่อการละลายของเอนไซม์หลังจากผ่านการแช่เยือกแข็ง และกิจกรรมจำเพาะทั้งหมดของเอนไซม์	46

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

ตารางภาคผนวกที่ 12 ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของระยะเวลาการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ที่ระยะเวลา 8, 10 และ 12 ชั่วโมง ที่มีผลต่อการละลายของเอนไซม์หลังจากผ่านการแช่เยือกแข็ง และร้อยละของผลได้ 46

ตารางภาคผนวกที่ 13 ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของระยะเวลาการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ที่ระยะเวลา 8, 10 และ 12 ชั่วโมง ที่มีผลต่อจำนวนเท่าของความบริสุทธิ์ด้วย 47

ตารางภาคผนวกที่ 14 ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของผลของค่าความคงตัวของเอนไซม์ต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลือ เมื่อทำการบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2, 4, 6, 8, 16, 20 และ 24 ชั่วโมง 47

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่

2.1 สัณฐานวิทยาและกายวิภาคของสับปะรด 5

4.1 ผลของอุณหภูมิที่หมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โบรมิเลนเมื่อทำการบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที 27

4.2 ผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โบรมิเลน โดยการบ่มเอนไซม์ที่พีเอชต่าง ๆ กัน คือซิเตรตบัฟเฟอร์(พีเอช 3-6) และใช้ฟอตเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 6-9) เป็นเวลา 20 นาที 28

4.3 ผลของค่าความคงตัวของเอนไซม์โบรมิเลนต่ออุณหภูมิ เมื่อทำการบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 29

4.4 ผลของค่าความคงตัวของเอนไซม์โบรมิเลนต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลือ เมื่อทำการบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 2, 4, 6, 8, 16, 20 และ 24 ชั่วโมง 31

4.5 ผลของความคงตัวต่อพีเอชของเอนไซม์โบรมิเลนต่อค่าของกิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลือ เมื่อทำการบ่มเอนไซม์ในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ (พีเอช 3-6) และฟอตเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 6-9) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 31

รูปภาคผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานไทโรซีนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร 40

รูปภาคผนวกที่ 2 กราฟมาตรฐาน Bovin Serum Albumin ที่ระดับความเข้มข้น 100, 200, 300, 400 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร 42

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

สับปะรดเป็นพืชทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทย มีปริมาณการผลิตจำนวนมาก ซึ่งผลผลิตนี้จะนำไปจัดจำหน่ายโดยตรง และส่วนมากจะนำเข้าสู่อุตสาหกรรมสับปะรดกระป๋อง จากอุตสาหกรรมนี้เองที่ทำให้มีของเหลือทิ้งจากสับปะรดมากมาย เช่น เปลือก แกน ใบ และลำต้น โดยส่วนที่เหลือทิ้งเหล่านี้ ส่วนใดที่นำไปแปรรูปต่อได้ก็นำไปแปรรูป เช่น ปุ๋ย หรืออาหารสัตว์ ซึ่งผลิตภัณฑ์เหล่านี้มีมูลค่าทางการตลาดต่ำ และจากการค้นคว้าพบว่าในสับปะรดมีเอนไซม์โบรมิเลนอยู่เป็นจำนวนมาก เราจึงคาดว่าน่าจะนำของเหลือทิ้งจากสับปะรดโดยเฉพาะส่วนลำต้น มาเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอนไซม์โบรมิเลนซึ่งมีมูลค่าทางการตลาดสูงกว่า

เอนไซม์โบรมิเลนนั้นเป็นเอนไซม์เร่งการย่อยสลายโปรตีน มีน้ำหนักโมเลกุล 23 กิโลดาลตัน มีลักษณะพิเศษ คือมีโอลิโกแซ็กคาไรด์สายเดี่ยวเชื่อมต่อกับพอลิเปปไทด์ และมีคุณสมบัติต้านการอักเสบ และยับยั้งลักษณะการจับตัวเป็นก้อนของเลือด ปัจจุบันถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างมากมาย ไม่ว่าจะเป็นอุตสาหกรรมอาหาร ผงซักฟอก ฟอกหนัง อุตสาหกรรมเกษตรต่างๆ และที่สำคัญคืออุตสาหกรรมยาซึ่งสามารถนำโบรมิเลนมาใช้รักษาโรคต่างๆได้เช่น การอักเสบติดเชื้อต่างๆ โรคไขข้ออักเสบ ถือเป็นเอนไซม์ที่มีประโยชน์หลายด้านในทางการค้า เราจึงศึกษาการผลิตเอนไซม์โบรมิเลนจากลำต้นสับปะรดเพื่อดูแนวโน้มในการผลิตเอนไซม์ เพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมในด้านต่างๆที่กล่าวมาต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์โบรมิเลนจากลำต้นของสับปะรดและการทำเอนไซม์โบรมิเลนให้บริสุทธิ์
2. ทำการศึกษาวิธีการและสภาวะที่เหมาะสมในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์เพื่อผลิตเป็นเอนไซม์ผง
3. ทำการศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์โบรมิเลนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ เช่นพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานและค่าความคงตัวต่อพีเอชและอุณหภูมิ

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

การทำการศึกษาสภาวะที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์โบรมิเลนจากต้นสับปะรด เพื่อใช้การสกัดและได้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด และนำเอนไซม์สกัดหยาบที่สกัดได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการที่เหมาะสมต่อการนำไปผลิตเอนไซม์ผงเพื่อใช้เป็นส่วนประกอบของผงหมักเนื้อนุ่ม ทำการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์โบรมิเลนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ เช่น พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน ค่าความคงตัวพีเอชและอุณหภูมิ

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อให้ได้วิธีการที่เหมาะสมในการสกัดและทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วน
2. ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานและสภาวะที่มีผลต่อค่าความคงตัวของเอนไซม์
3. เพื่อเป็นแนวทางในการใช้ของเหลือทิ้งในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูงขึ้น คือผลิตเป็นเอนไซม์ผงเพื่อหมักเนื้อนุ่ม

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 สับปะรด (ศิริชัย, 2541)

สับปะรดเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวจัดอยู่ใน Family Bromeliaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Ananas comosus* ซึ่งเป็นพืชที่มีใบประเภทอุ้มน้ำ และมีดอกแยกเป็นสามส่วน ใบยาวขึ้นเป็นเกลียวรอบต้น พืชในตระกูลนี้ประกอบด้วย 2000 สปีชีส์ จากทั้งหมด 46 จีนัส เป็นพืชที่ขึ้นในเขตร้อนและร้อนชื้น โดยมีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปอเมริกา มีเพียงหนึ่งสปีชีส์ที่พบในทวีปแอฟริกาตะวันตก สับปะรดที่เราคุ้นเคยและรับประทานกันมีเพียงสปีชีส์เดียว มีบางสปีชีส์ที่ใช้ปลูกเพื่อใช้ทำเป็นเส้นใย บางชนิดใช้ปลูกเป็นไม้ประดับและเป็นอาหารสัตว□ พืชอีกชนิดหนึ่งชื่อ Bromeliads เป็นไม้ประดับของทวีปอเมริกา จัดเป็นพืชโบราณที่มีวิวัฒนาการเช่นเดียวกับสับปะรด ซึ่งเป็นบรรพบุรุษของสับปะรดบางจีนัส อาจมีความสูงถึง 10 เมตร พืชในจีนัสเหล่านี้ทั้งหมดเป็นพืชที่ขึ้นบนบก มีลำต้นยาว มีรากจำนวนมาก ใบแคบ และมีขนเพื่อช่วยลดการสูญเสียน้ำ สับปะรดซึ่งเดิมมีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกาใต้ แต่ปัจจุบันได้แพร่กระจายไปยังเขตร้อนและร้อนชื้นทั่วโลก ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นการปลูกเพื่อบริโภคผลสด และทำเป็นน้ำผลไม้ สับปะรดที่ปลูกกันโดยทั่วไปจะมีความสูงประมาณ 1 เมตร ลำต้นจริงๆจะสั้น แต่ส่วนของใบและก้านดอกจะขยายยาวออกมา แหล่งปลูกสับปะรดที่ใหญ่ที่สุดคือที่รัฐฮาวายของสหรัฐอเมริกา ซึ่งมีพื้นที่ปลูก 1 ใน 3 ของโลก และผลิตสับปะรดกระป๋องได้ถึงร้อยละ 60 ของโลก รองลงไปได้แก่ จีน บราซิล และเม็กซิโก

2.1.1 พฤกษศาสตร์ของสับปะรด

การศึกษาทางชีววิทยาด้านพฤกษศาสตร์ของสับประรด เป็นการศึกษาเพื่อพัฒนาไปสู่ความรู้ทางชีววิทยาด้านอนุกรมวิธานสัณฐานวิทยาและพันธุศาสตร์ของสับปะรด เพื่อใช้เป็นการเทียบเคียงระหว่างพืชชนิดเดียวกันและพืชในวงศ์ที่ใกล้เคียงกัน สับปะรดถูกจัดอยู่ในประเภทไม้ดิน ซึ่งพืชในวงศ์นี้อาจแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิดตามสภาพความเป็นอยู่คือ กลุ่มที่เจริญเติบโตโดยมีรากหาอาหารบนพื้นดิน (terrestrial) กลุ่มที่เจริญเติบโตบนต้นไม้โดยมีรากอากาศคล้ายกล้วยไม้ (epiphytes) และกลุ่มที่เจริญเติบโตอยู่บนผาหินหรือโขดหิน (saxicolous) แม้ว่าสับปะรดจะถูกจัดอยู่ในกลุ่มแรก คือพืชดิน แต่ก็มีลักษณะบางอย่างของพืชในกลุ่มที่ 2 ด้วยเหมือนกัน กล่าวคือ สามารถเก็บน้ำเอาไว้ตามซอกใบได้เล็กน้อย และมีเซลล์สำหรับเก็บน้ำเอาไว้ในใบ ทำให้ทนทานต่อสภาพแห้งแล้ง

2.1.1.1 การจำแนกทางอนุกรมวิธานของสับปะรด

Kingdom Plant Kingdom

Sub-kingdom Spermatophyta

Class Angiospermae

Sub-class Monocotyledones

Order Farinosae

Family Bromeliaceae

Genera *Ananas* and *Pseudananas*

Species *comosus*

Scientific name ของสับปะรด คือ *Ananas comosus* (L.) Merr.)

2.1.1.2 สัณฐานวิทยาและกายวิภาคของสับปะรด

สับปะรดพันธุ์ที่ปลูกเป็นการค้าได้แก่พันธุ์ปัตตาเวีย (Cayenne variety) มีส่วนประกอบที่สำคัญดังนี้

1. ลำต้น (stem) ประกอบด้วยปล้องสั้น ๆ และใบมากมาย

2. ก้านผล (peduncle) คือก้านพยุงผลซึ่ง มีใบเล็ก ๆ ติดอยู เชื่อมติดกับส่วนบนของลำต้น ก้านผลนี้อาจมีตาเล็กๆ ติดอยู่ถ้าสภาพเหมาะสมจะพัฒนาไปเป็นตะเกียง

3. ตะเกียง (slip) คือ หน่อที่เกิดจากตาบนก้านผล ตะเกียงนี้ถ้านำไปปลูกขยายจะกินเวลา 18 –20 เดือนจึงจะให้ผล

4. ใบ (leaf) รูปร่างแคบ ยาว เรียว จำนวนใบอาจมีถึง 50 – 100 ใบต่อต้น ขึ้นกับความอุดมสมบูรณ์

5. ผล (multiple fruit) จัดเป็นผลรวมที่เกิดจากการเชื่อมติดกันของผลย่อย (จำนวน 100 – 200 ผล) เข้ากับแกนกลางของช่อดอก

6. จุก (crown) ส่วนขยายพันธุ์ที่มีลักษณะคล้ายหน่อ แต่เกิดขึ้นบนส่วนยอดของผลใช้ปลูกขยายพันธุ์ได้ดี ตามปกติหนึ่งผลจะมี 1 จุก ถ้านำไปปลูกขยายพันธุ์จะกินเวลานาน 22 – 24 เดือน

7. หน่ออุ้มลูก (hapas) คือหน่อที่เกิดจากตาในบริเวณจุดเชื่อมระหว่างก้านผล และลำต้นใช้ขยายพันธุ์ได้เช่นเดียวกับหน่อข้าง

8. หน่อข้าง (aerial sucker) คือหน่อที่เกิดจากตาบนลำต้น ใช้ขยายพันธุ์ได้ดีโดยจะกินเวลาประมาณ 14 – 16 เดือนจึงจะให้ผล

9. หน่อดิน (underground sucker) เป็นหน่อที่เกิดจากตาบนลำ ต้นส่วนที่อยู่ใต้ผิวดิน

10. ราก (root) อาจแบ่งได้เป็น 2 พวกคือ รากเหนือดิน และรากใต้ดิน ทำ หน้าที่หาอาหารและยึดเหยี่ยวลำต้น

รูปที่ 2.1 สัณฐานวิทยาและกายวิภาคของสับปะรด (ศิริชัย, 2541)

2.1.2 องค์ประกอบทางเคมีของสับปะรด

จากน้ำหนักของผล 100 กรัมจะประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ดังนี้คือ พลังงาน 47 – 52 แคลอรี่ น้ำ 85 - 87 กรัม โปรตีน 0.4 -0.7 กรัม ไขมัน 0.2 - 0.3 กรัม ปริมาณคาร์โบไฮเดรตสุทธิ 11.6 -13.7 กรัม เส้นใย (fiber) 0.4 -0.5 กรัม เถ้า 0.3 - 0.4 กรัม แคลเซียม 17 -18 มิลลิกรัม ฟอสฟอรัส 8 - 12 มิลลิกรัม เหล็ก 0.5 มิลลิกรัม โซเดียม 1 - 2 มิลลิกรัม โพตัสเซียม 125 -146 มิลลิกรัม แคโรทีน 32 - 42 มิลลิกรัม ไทเอมีน 0.06 - 0.08 มิลลิกรัม ไรโบฟลาวิน 0.03 - 0.04 มิลลิกรัม ไนเอซิน 0.2 - 0.3 มิลลิกรัม และกรดแอสคอร์บิก 17 - 61 มิลลิกรัม

2.1.3 พันธุ์สับปะรด (เกศิณี, 2539)

พันธุ์สับปะรด สับปะรดที่นิยมปลูกทั่วโลกแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มคาเยน (Cayenne) เป็นสับปะรดรับประทานสดและแปรรูปที่สำคัญที่สุดมีกำเนิดในประเทศเวเนซูเอลา เป็นพันธุ์มาตรฐานส่งออกของรัฐฮาวายของประเทศสหรัฐอเมริกา ประเทศฟิลิปปินส์ เคนยา เม็กซิโก ไต้หวัน ออสเตรเลีย แอฟริกาใต้ กินี และเปอร์โตริโก มีพันธุ์ย่อย 2 พันธุ์ คือ พันธุ์คาเยนหนาม (Spiny Cayenne) ปัจจุบันไม่นิยมปลูก และพันธุ์คาเยนไร้หนาม (Smooth Cayenne) เป็นพันธุ์ที่นิยมปลูก ลักษณะทั่วไป ทรงต้นสูง 20-50 เซนติเมตร ใบมีจำนวน 60-80 ใบต่อต้น ยาวประมาณ 100 เซนติเมตร กว้างประมาณ 6.5 เซนติเมตร สีเขียวเข้มด้านหลังใบมีจุดประสีแดง ด้านใต้ใบสีเทาเงิน ขอบใบตรงและเรียบ ที่ส่วนปลายและฐานใบมีหนามขนาดเล็กอยู่ประปราย ช่อดอก ประกอบด้วยดอกย่อยประมาณ 150 ดอก ก้านช่อดอกยาว 7.5-15.0 เซนติเมตร

ดอกมีสีน้ำเงินปนม่วงอ่อน รูปร่างของผลเกือบจะเป็นทรงกระบอก โดยฐานผลใหญ่กว่าส่วนอื่น เล็กน้อย ผลอ่อน สีเขียวคล้ำ ผลสุกสีเหลืองมีจุดประสีเขียว ผลย่อยหรือตาแบนและกว้าง ขนาดประมาณ 2.5 เซนติเมตร เนื้อแน่นมีสีเหลืองอ่อนจนถึงสีเหลือง รสชาติดีมาก ไม่มีเมล็ด น้ำสับปะรดมีน้ำตาลร้อยละ 12-16 และกรดร้อยละ 0.5-0.9 มีจุก 1 อัน ตะเกียง 0-10 อัน หน่อ 0-3 อัน อ่อนแอต่อโรคและแมลงหลายชนิดโดยเฉพาะโรคเหี่ยว เช่น พันธุ์ปัตตาเวีย ตาดำ ตาแดง นางแล น้ำผึ้งของไทย St. Michael ของเกาะอะซอร์เลส Cayenne Lisse ของไอโวรีโคสต์ มาร์ตินิค Cayenne ของแอฟริกาใต้ เคนยา และ Hilo ของรัฐฮาวาย สหรัฐอเมริกา

กลุ่มควีน (Queen) เป็นสับปะรดรับประทานสด ปลูกมากที่ออสเตรเลีย และ แอฟริกาใต้ ลักษณะทั่วไป ทรงต้น ใบ และผลขนาดเล็กกว่าพันธุ์คาเยน ขอบใบมีหนามขนาดเล็กอยู่ถี่ๆ ผลแก่ก่อนพันธุ์อื่น ผลหนัก 0.5-1.0 กิโลกรัม ก้านผลยาว 7-12 เซนติเมตร ผลย่อยขนาดเล็กและนูน ผลสุกสีเหลืองทอง เนื้อสีเหลืองทองเข้ม เนื้อกรอบไม่มีเส้นใย กลิ่นและรสชาติดีเยี่ยม ต้านทานโรคดีกว่าพันธุ์คาเยน เช่น พันธุ์ภูเก็ต สวี สิงคโปร์ ของไทย Macgregor ของออสเตรเลีย Z Queen ของแอฟริกาใต้ Ripley Queen Red ของมาเลเซีย ฟิลิปปินส์ อินเดีย อเมริกาใต้ และ Cabezona ของเปอร์โตริโก

กลุ่มเรดสแปนิช (Red Spanish) เป็นสับปะรดรับประทานสด ปลูกมากที่หมู่เกาะอินดีส-ตะวันตก คิวบา เปอร์โตริโก และเม็กซิโก ลักษณะทั่วไป ทรงต้น ใบ และผล ขนาดกึ่งกลางระหว่างพันธุ์คาเยนและพันธุ์ควีน ใบ ยาวประมาณ 1.2 เมตร ใบมีหนาม ผลผอมยาว 20-25 เซนติเมตร หนัก 0.9-1.8 กิโลกรัม รูปค่อนข้างสี่เหลี่ยมจัตุรัส ผลย่อยประมาณ 80 ผล ผลย่อยขนาดใหญ่ ผลสุกสีแดงปนส้ม เนื้อสีเหลืองอ่อน มีเส้นใย กลิ่นหอม เป็นที่นิยม รสชาติเปรี้ยวและเผ็ดเล็กน้อย แกนใหญ่ จุกยาว 20-25 เซนติเมตร บนจุกมีใบโค้งและมีหนามยาวมีตะเกียงเกิดอยู่ใกล้กับผล มีความต้านทานต่อโรคและแมลง โดยเฉพาะโรคเหี่ยวและมวน เช่น อินทรชิต ขาวของไทย Sugar Loaf ของอเมริกาเขตร้อน Yellow Mauritius ของศรีลังกา อินเดียตะวันตก และรัฐฟลอริดา ของอเมริกา

กลุ่มสิงคโปร์สแปนิช (Singapore Spanish) เป็นสับปะรดแปรรูป ปลูกมากที่ประเทศมาเลเซีย ลักษณะทั่วไป ใบ มีจำนวนประมาณ 50 ใบต่อต้น ใบยาว 100 เซนติเมตร ขอบใบเรียบและมีหนามที่ปลายเล็กน้อย ผล ก้านผลเล็กและยาวความยาว 20-25 เซนติเมตร ผลทรงกระบอก ผลสุกสีส้มปนแดง น้ำหนัก 1.6-2.3 กิโลกรัม ผลย่อยลึก เนื้อสีเหลืองทอง มีเส้นใย รสชาติดี แกนเล็ก จุกยาว 10-30 เซนติเมตร มักมีหลายอัน ตะเกียง 0-15 อัน ต้านทานโรคและแมลงบางอย่างดี

2.1.4 พันธุ์สับปะรดที่ปลูกในประเทศไทย

จารุพันธ์ ทองแถม (2526) ระบุว่า มีการปลูกสับปะรดในประเทศไทยเป็นเวลานานแล้ว โดยการสันนิษฐานว่า ชาวโปรตุเกสเป็นชาติแรกที่นำมาเผยแพร่ยังกรุงศรีอยุธยาในตอนต้น

คริสต์ศตวรรษที่ 16 จากนั้นมีการนำพันธุ์สับปะรดเข้ามาอีกหลายครั้ง ซึ่งพันธุ์สับปะรดที่ปลูกในปัจจุบันอาจมีชื่อเรียกต่างกันไปตามท้องที่แต่ที่พบมากมีดังนี้คือ

พันธุ์ปัตตาเวีย (Smooth Cayenne ; Sarawak, Kew) สับปะรดพันธุ์นี้เริ่มเข้ามาแพร่หลายในประเทศไทยและได้รับความนิยมอย่างมาก โดยเราอาจรู้จักในนามสับปะรดศรีราชาทั้งนี้เพราะบาทหลวงผู้หนึ่งได้นำพันธุ์มาจากอินเดียและทดลองปลูกในไร่ของโรงเรียนอัสสัมชัญศรีราชา จ. ชลบุรี ส่วนที่เรียกว่าสับปะรดปัตตาเวียนั้น อาจเป็นเพราะมีชาวมลายูได้นำเอาพันธุ์สับปะรดนี้มาจากประเทศอินโดนีเซีย มาปลูกแพร่หลายที่อำเภอปราณบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์ จนมีผู้รู้จักในนามสับปะรดปราณบุรี อย่างไรก็ตามไม่ว่าจะเป็นชื่อ ศรีราชา ปัตตาเวีย และปราณบุรี ทั้งหมดจัดอยู่ในกลุ่มของพันธุ์ Smooth Cayenne ซึ่งเป็นพันธุ์เดียวกับที่ปลูกในแหล่งผลิตสำคัญอื่นๆ ของโลกโดยที่เป็นพันธุ์ที่มีรสหวานและรูปทรงดีจึงเหมาะแก่การปลูกเป็นอุตสาหกรรม สับปะรดพันธุ์นี้มีใบสีเขียวเข้ม ผิวใบด้านบนเป็นมันเงา ขอบใบเรียบ กลางใบมักมีสีแดงอมน้ำตาล ปลายใบมีหนามเล็กน้อย ช่อดอกมีดอกย่อยเฉลี่ยประมาณ 150 ดอก กลีบดอกสีม่วงอมน้ำเงินผลอาจมีขนาดใหญ่ เปลือกผลสีเขียวปนดำ ตาตื้น เนื้อในสีเหลืองอ่อนถึงเหลืองเข้ม

พันธุ์อินทรชิต หรืออินทรชิตแดง (Singapore Spanish) จัดเป็นสับปะรดพันธุ์เก่าแก่ที่สุดของประเทศไทย ซึ่งสันนิษฐานว่าชาวโปรตุเกสเป็นผู้นำเอาเข้ามาเผยแพร่ในประเทศไทยสมัยกรุงศรีอยุธยา และมีการขยายพันธุ์สืบต่อกันมาจนกลายเป็นพันธุ์พื้นเมือง สับประรดพันธุ์อินทรชิตมีทรงต้นใหญ่ขนาดเดียวกับพันธุ์ปัตตาเวีย แต่มีหนามคมรูปโค้งงอ มีสีน้ำตาลอมแดงที่ขอบใบ ใบมีสีเขียวอ่อน ลักษณะด้านไม่เป็นมัน ใบไม่เป็นร่องเช่นพันธุ์ปัตตาเวีย ผลมีขนาดเล็กกว่าพันธุ์ปัตตาเวีย ตาลึก เนื้อสีเหลืองทองเมื่อแก่ รสหวานอ่อนไม่หอม มีเส้นใยมาก ผลเล็กเกินกว่าจะบรรจุกระป๋อง อาจมีตะเกียงที่ก้อนผล ทนทานต่อโรครากและไส้เน่า

พันธุ์ขาว (Green Spanish) เป็นพันธุ์สับปะรดที่มีทรงพุ่มเตี้ย ใบแคบและสั้นกว่าพันธุ์อินทรชิต ขอบใบเต็มไปด้วยหนาม เนื้อมีสีเหลืองทองรสหวานอ่อนคุณภาพของเนื้อไม่ดีนัก ผลมักมีหลายจุก เข้าใจว่าเป็นพันธุ์ที่กลายมาจากอินทรชิต

พันธุ์ภูเก็ต หรือพันธุ์สวี (Mauritius Pine ; Malacca Queen; Ceylon ; Red Ceylon)ใบของสับปะรดพันธุ์นี้จะแคบและยาวกว่าพันธุ์ขาวและอินทรชิต ใบมีสีเขียวอ่อนและมีแถบสีแดงตอนกลางใบ ขอบใบเต็มไปด้วยหนามสีแดง ผลมีขนาดเล็ก เนื้อสีเหลืองรสหวานกรอบ มีกลิ่นหอม นิยมบริโภคสด ปลูกกันมากในจังหวัดภูเก็ตและชุมพร

พันธุ์นางแล และพันธุ์น้ำผึ้ง อาจจัดเป็นสายพันธุ์ย่อยของพันธุ์ปัตตาเวีย ซึ่งเป็นพันธุ์ในกลุ่มของ Cayenne โดยมีรูปทรงของใบและดอกคล้ายคลึงกับพันธุ์ปัตตาเวียมาก ขอบใบไม่มีหนาม

แต่มีหนามเล็กน้อยที่ปลายใบ กล่าวกันว่าผู้นำพันธุ์นี้มาจากประเทศศรีลังกาและมาปลูกที่ตำบลนางแล อ.เมือง จ.เชียงราย จึงมีผู้เรียกว่า พันธุ์นางแล

พันธุ์ตราดสีทอง จัดเป็นสับปะรดสายพันธุ์ใหม่ที่ถูกพัฒนาโดยเกษตรกรจังหวัดตราด มีลักษณะผสมระหว่างสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย และสับปะรดภูเก็ต ผลเล็ก เนื้อฉ่ำน้ำและหวาน

2.1.5 การแปรรูปสับปะรด (สำนักงานเศรษฐกิจอุตสาหกรรม, 2545)

เนื่องจากสับปะรดหลังจากการเก็บเกี่ยวแล้วอาจเกิดการเน่าเสียโดยง่าย ไม่สามารถรักษาความสดไว้ได้นาน และไม่สะดวกแก่การขนส่งหรือขายระหว่างประเทศ จึงจำเป็นต้องมีการแปรรูปเพื่อให้เก็บรักษาได้นานขึ้นหรืออาจแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้หลายชนิด

สับปะรดกระป๋องนับว่าเป็นการแปรรูปที่นิยมมากที่สุด เนื่องจากสามารถกำหนดมาตรฐานได้ง่ายและสะดวกแก่การขนส่งและการเก็บรักษา นอกจากนี้โรงงานบางแห่งได้นำผลพลอยได้ คือ น้ำสับปะรด มาผลิตในรูปของน้ำสับปะรดเข้มข้นแบบแช่แข็ง (frozen concentrate) แบบปลอดเชื้อ (aseptic concentrate) สับปะรดบดละเอียดที่บรรจุในถุงปลอดเชื้อ (aseptic crushed pineapple) และการสกัดกลิ่นสับปะรด (pineapple essence) เป็นต้น ทั้งนี้ เพื่อให้ผลิตภัณฑ์มีความหลากหลายตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคในตลาดเพื่อรักษายอดขายและส่วนแบ่งด้านการตลาดไว้ ส่วนของเหลือทิ้งในการผลิตเช่นเปลือกนั้นพบว่ามีการนำไปขายเพื่อผลิตอาหารสัตว์ในราคาที่ถูก

2.2 เอนไซม์โบรมิเลน

2.2.1 เอนไซม์โบรมิเลนและการเรียกชื่อเอนไซม์

เอนไซม์โบรมิเลนเป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโมเลกุลของสารประเภทโปรตีน จัดอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์พวกที่มีกลุ่มซัลไฟดริลในบริเวณเร่ง (sulfhydryl protease) เช่นเดียวกับเอนไซม์ปาเปนจากมะละกอ และเอนไซม์ฟิซินจากมะเดื่อ (Murachi, 1964) เป็นเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์ (intracellular enzyme) พบในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของพืชวงศ์บรอมิเลียซิอี้ เป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยโปรตีนและเปปไทด์ ยังสามารถเร่งการย่อยสารพวกเอไมด์ (amide) และเอสเทอร์ (ester) ของกรดอะมิโนและเปปไทด์ด้วย เพื่อเป็นการตัดปัญหาความยุ่งยากในการเรียกชื่อเอนไซม์จึงรวบรวมชื่อทั่วๆไปของเอนไซม์ที่มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสารประเภทโปรตีนที่พบในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของพืชชนิดต่างๆในวงศ์นี้ว่า โบรมิเลน (Bromelain) เพื่อให้การเรียกชื่อเอนไซม์มีความจำเพาะยิ่งขึ้น บ่งบอกถึงส่วนของเนื้อเยื่อ สายพันธุ์ และสกุลของพืชในวงศ์ดังกล่าว จึงมีการใช้ชื่อที่สมบูรณ์ (complete name) ขึ้น โดยจะมีการเติมคำนำหน้าระบุถึงสกุล สายพันธุ์ และส่วนของเนื้อเยื่อที่พบในเอนไซม์ดังกล่าว ตัวอย่างเช่น *Ananas comosus* (L) Merr.variety, stem

bromelain ซึ่งหมายถึงเอนไซม์ที่มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของการย่อยสารโปรตีน พบในลำต้นของสับปะรดสายพันธุ์ Cayenne ซึ่งมักเรียกสั้นๆโดยทั่วไปว่า stem bromelain (Heinicke และCortner, 1957) ปัจจุบันมักมีการใช้รหัสของ Enzyme Commission ซึ่งเป็นรหัส 4 ตัวตามหลังชื่อเอนไซม์ทั่วๆไป เช่น Bromelain (E.C.3.4.4.24) ซึ่งรหัส 4 ตัวนี้จะบ่งบอกถึงลักษณะของปฏิกิริยาการเร่งการย่อยของเอนไซม์นั้นๆ

2.2.2 แหล่งของเอนไซม์โบรมิเลน

โบรมิเลนเป็นเอนไซม์ที่พบในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของพืชในวงศ์บรอมิเลียซิอี้ที่รู้จักกันดีคือ สับปะรด (*Ananas comosus* (L) Merr.) เอนไซม์ชนิดนี้พบครั้งแรกเมื่อประมาณศตวรรษที่ 19 ซึ่งพบในน้ำสกัดที่สกัดจากเนื้อเยื่อของผลสับปะรด ต่อมาพบเอนไซม์เดียวกันในส่วนอื่นๆ ของสับปะรด เช่น ก้าน เปลือก แกน ใบที่ผล ใบที่ต้น หน่อข้างลำต้น และลำต้น โดยเฉพาะในน้ำสกัดจากส่วนของลำต้นจะมีปริมาณเอนไซม์สูงสุด โดยลำต้นสับปะรดที่มีความแก่อ่อนต่างกันจะมีปริมาณต่างกัน ลำต้นที่มีความแก่มากขึ้นจะยิ่งมีปริมาณเอนไซม์มากขึ้น กล่าวคือ ลำต้นอายุ 3 ปี มีเอนไซม์ร้อยละ 53 ในขณะที่ลำต้นอายุ 2 ปี และ 1 ปี มีเอนไซม์อยู่ร้อยละ 36 และร้อยละ 11 ตามลำดับ ส่วนเนื้อเยื่ออ่อนจะมีเอนไซม์เพียงเล็กน้อย (Heinicke และ Cortner, 1957)

2.2.3 คุณสมบัติทางเคมีของเอนไซม์โบรมิเลน

เอนไซม์โบรมิเลนเป็นสารประกอบประเภทไกลโคโปรตีน(glycoprotein) โดยมีส่วนโมเลกุลของโอลิโกแซ็กคาไรด์หนึ่งกลุ่มต่อหนึ่งโมเลกุลเอนไซม์ ในหนึ่งกลุ่มนี้จะมีน้ำตาลแมนโนส 3 โมล กลูโคส 1 โมล ไซโลส 1 โมล และแอล-อะซิติลกลูโคซามีน 2 โมล ซึ่งจับคู่อยู่กับสายเปปไทด์ด้วยพันธะโคเวาเลนต์ (Scocca และ Lee, 1969) สำหรับชนิดและปริมาณกรดอะมิโนในโมเลกุลโบรมิเลน 1 โมเลกุล ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 285 ตัวและเฮกโซซามีน 4 โมเลกุล มีกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติเป็นเบสอยู่จำนวนมากกว่าพวกที่เป็นกรด ดังตารางที่ 2.1 ในโมเลกุลของเอนไซม์จะมีไกลซีน (glycine) อยู่ทางด้าน C-terminal และวาลีน (valine) อยู่ทางด้าน N-terminal โมเลกุลประกอบด้วย disulfide bridge 5 ตำแหน่งต่อโมเลกุล แต่จะมีกลุ่มซัลไฟดริลเพียง 1 กลุ่มต่อโมเลกุลเท่านั้นซึ่งจำเป็นสำหรับเร่งปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ (Murachi และคณะ, 1964)

2.2.4 คุณสมบัติทางกายภาพของเอนไซม์โบรมิเลน

เอนไซม์โบรมิเลนจากลำต้นสับปะรด จัดเป็นโปรตีนพวกมีคุณสมบัติเป็นเบส (basic protein) สามารถละลายน้ำได้ ไม่ละลายในแอลกอฮอล์ อะซีโตน มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30,000 ดาลตัน เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ปาเปนจากมะละกอ พบว่าเอนไซม์โบรมิเลนมีคุณสมบัติเป็นเบสมากกว่าและโมเลกุลมีขนาดใหญ่กว่าปาเปนประมาณ 1.5 เท่า มีค่าคงที่ของการตกตะกอน (sedimentation constant, $S°_{20,w}$) เท่ากับ 2.73 S ค่าคงที่ของการแพร่ (diffusion constant,

$D°_{20,w}$) เท่ากับ 7.77×10^{-7} ตารางเซนติเมตรต่อวินาที โมเลกุลจะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงร่างอย่างถาวรเมื่ออยู่ในสภาพที่กรดด่างสูงกว่า 10.3 (Murachi และคณะ, 1964)

ตารางที่ 2.1 ชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของ Stem bromelain

ชนิดของสาร	จำนวนต่อโมเลกุล	ชนิดของสาร	จำนวนต่อโมเลกุล
ไขมัน	20	อะลานีน	30
ฮิสทีดีน	1	ฮาฟ ซีสเตอีน	11
แอมโมเนีย	25	วาลีน	19
ฮาจินีน	10	เมไทโอนีน	4
กรดแอสปาติค	27	ไอโซลิวซีน	20
ทรีโอนีน	12	ลิวซีน	9
ซีรีน	24	ไทโรซีน	19
กรดกลูตามิค	20	เฟนิลอะลานีน	9
โปรตีน	13	ทริฟโตเฟน	8
ไกลซีน	29		
รวม 285			
เฮกโซซามีน 4			

ที่มา : Murachi และคณะ, 1964

2.2.5 คุณสมบัติการทำงานของเอนไซม์โบรมิเลน

เอนไซม์โบรมิเลนจากลำต้นสับปะรดมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสารประเภทโปรตีน เป็นเอนไซม์ที่มีกลุ่มซัลไฟดริลในบริเวณเร่ง โดยการเร่งปฏิกิริยาสารตั้งต้นนั้นจะใช้กลุ่มไทออล (thiol group) และกลุ่มอิมิดาโซล (imidazole group) ที่บริเวณเร่ง เป็นตัวทำให้เกิดการย่อยพันธะของสารตั้งต้น นอกจากโบรมิเลนจะสามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสารพวกโปรตีนแล้ว ยังสามารถย่อยพวกเปปไทด์ เอไมด์ เอสเทอร์ของกรดอะมิโนและเปปไทด์ได้ด้วย เอนไซม์โบรมิเลนเป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยเคซีนและฮีโมโกลบินได้อย่างรวดเร็ว สภาวะที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์นั้นจะมีพีเอชเท่ากับ 7.0 เมื่อใช้เคซีนเป็นสารตั้งต้น และอุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 63-65 องศาเซลเซียส (กัลยา, 2520 ; Ball และคณะ, 1941; Glazer และคณะ, 1971) เอนไซม์โบรมิเลนนี้สามารถทำลายด้วยความร้อนที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 70 องศา-

เซลเซียส มีความคงตัวในช่วงพีเอช 3.0-3.5 เมื่อพีเอชต่ำกว่า 2.5 เอนไซม์จะไม่คงตัว (Su และคณะ, 1975)

2.2.6 ประโยชน์ของเอนไซม์โบรมิเลน

เนื่องจากเอนไซม์โบรมิเลนมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสารประเภทโปรตีนเช่นเดียวกับเอนไซม์ปาเปน และโปรตีนอื่นๆ จึงมีการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่นเดียวกัน ในอุตสาหกรรมมีการนำเอนไซม์นี้ไปใช้ในการผลิตเบียร์ เพื่อช่วยป้องกันการเกิดความขุ่นของเบียร์ในขณะเก็บรักษา (Heinicke และ Cortner , 1957) ช่วยเพิ่มความยืดหยุ่นและปริมาณของขนมปัง ทำให้เนื้อนุ่มขึ้น ช่วยเร่งกระบวนการหมักน้ำปลาไส้ตัน (ประเสริฐ, 2526) ยิ่งไปกว่านั้นเอนไซม์โบรมิเลนยังมีความสามารถในการตกตะกอนโปรตีนในน้ำนมได้ ดังนั้นอาจนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตเนยแข็งแทนเอนไซม์เรนเนทได้ นอกจากนี้ในอุตสาหกรรมยา มีการใช้เอนไซม์โบรมิเลนในตัวยาช่วยย่อยอาหาร ยาถ่ายพยาธิ (Hwang, 1951) ใช้ช่วยละลายเมือกก่อนเอ็กซ์เรย์มดลูก ใช้เป็นยาแก้อักเสบ (Hunter และ Henry, 1955) ยับยั้งการจับตัวเป็นลิ่มหรือก้อนเลือด ปรับปรุงการไหลเวียนของเลือดที่หัวใจและหลอดเลือด ยับยั้งการเจริญของเนื้องอก เอาเนื้อเยื่อที่ตายออกไปจากบาดแผล ส่งเสริมการดูดซึมตัวยาชนิดต่างๆ (Gregory และ N.D., 1996) และยังใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ เช่นอุตสาหกรรมฟอกหนัง เพื่อทำให้พองและนุ่มขึ้น

2.2.7 การผลิตเอนไซม์โบรมิเลน

เอนไซม์โบรมิเลนเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในเนื้อเยื่อของสับปะรดดังนั้นการผลิตเอนไซม์โบรมิเลนจะต้องสกัดโดยการทำให้เซลล์แตกและปลดปล่อยเอนไซม์ออกมาจากเซลล์อย่างสมบูรณ์ เช่นการบดด้วยทราย การโฮโมจิไนซ์ด้วยเครื่องตีปั่น หรือใช้แรงเฉือนร่วมกับการใช้ความดันสูงๆอัดเนื้อเยื่อ Heinicke (1957) พบว่าการใช้เครื่องหีบอ้อยที่มีแกนหมุน 3 อัน จะสามารถสกัดเอนไซม์จากลำต้นได้มากที่สุดคือสามารถบีบน้ำออกจากลำต้นได้ร้อยละ 36 ของน้ำหนักลำต้นที่ปอกเปลือก Su และคณะ (1975) สกัดเอนไซม์จากลำต้นสับปะรดด้วยวิธีอัดด้วยความดัน แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นอกจากนี้ในการสกัดเอนไซม์มีการตีปั่นกับน้ำกลั่นและปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (ทนง, 2529; นภนีรา และคณะ, 2535) และมีการศึกษาพบว่าการบีบลำต้นสับปะรดด้วยเครื่องไฮโดรริกให้ผลดีกว่าการตีปั่นร้อยละ 21-25 (นิมิตพิสุทธิ์, 2530) เมื่อสกัดเอนไซม์แล้วจะต้องนำมาทำให้มีความเข้มข้นและบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น

จุรีรัตน์ (2530) พบว่าความเข้มข้นของอะซิโตนที่เหมาะสมในการตกตะกอนมีค่าร้อยละ 65 – 70 และมีรายงานว่าการตกตะกอนสองครั้งด้วยอะซิโตนเย็นครั้งที่หนึ่งในปริมาณ

ร้อยละ 35 และครั้งที่สองเติมให้ได้ปริมาณร้อยละ 56 จะให้ผลดีที่สุด (ทนง, 2529 ; นภนีรา และคณะ, 2535)

Heinicke (1957) ศึกษาการตกตะกอนเอนไซม์โดยใช้อะซิโตน โดยนำส่วนใสจากน้ำที่สกัดได้มาเติมสารรีดิวส์ซิ่ง (reducing agent) ลงไปให้มีความเข้มข้น 0.005-0.01 โมลาร์ และปรับพีเอชให้อยู่ช่วง 3.5-5.5 แล้วจึงตกตะกอนเอนไซม์ด้วยอะซิโตน 2 ขั้นตอน โดยขั้นแรกจะตกตะกอนด้วยอะซิโตนเย็น (ประมาณ 1 องศาเซลเซียส) เข้มข้นร้อยละ 30-33 โดยปริมาณทั้งหมดเพื่อตกตะกอนโปรตีนส่วนนี้ทิ้งไป หลังจากนั้นจึงนำส่วนใสที่แยกตะกอนออกหมดแล้วมาตกตะกอนด้วยอะซิโตนเย็นร้อยละ 60-66 โดยปริมาณทั้งหมด จะได้ตะกอนเอนไซม์สีขาว นำไปทำแห้งโดยใช้เครื่องทำแห้งแบบแช่แข็ง (freeze dryer) แล้วนำมาบดจะได้เอนไซม์โบรมิเลนเข้มข้นในสภาพแห้งที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ประมาณ 300-2200 GDU (Gelatin Digestion Unit) ต่อกรัม

Su และคณะ (1975) ศึกษาพบว่าการตกตะกอนโบรมิเลนด้วยเอธิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 40-60 จะได้ตะกอนเอนไซม์สูงสุด หรืออาจตกตะกอนเป็น 2 ขั้นตอนคือขั้นตอนแรกอาจตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 60 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แยกตะกอนเอนไซม์ด้วยเครื่องเหวี่ยงความเร็ว 6500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วตกตะกอนอีกครั้งด้วยแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 50 แล้วเอาไปทำแห้ง เอนไซม์ที่ได้สามารถเก็บไว้นาน 60 วัน โดยปฏิกิริยาลดลงเพียงร้อยละ 13

นิมิตพิสุทธิ์ (2530) ศึกษาวิธีการตกตะกอนเอนไซม์โบรมิเลนโดยการใช้กรดแทน-นิก พบว่าการใช้กรดแทนนิกในช่วงความเข้มข้น 2-4 กรัมต่อลิตรจะได้ช่วงที่ตกตะกอนเอนไซม์ออกมาได้มากที่สุด

Apte (1979) ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสัปปะรดเพื่อสกัดเอนไซม์ และทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยอะซีโตนต่อด้วยเจลฟิวเตรชั่นโดยใช้เซฟาเด็กซ์จี 100 (Sephadex G 100) แล้วทำการเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ในแต่ละระยะการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ

Rowan และคณะ (1988) ค้นพบเอนไซม์อะแนนนาอิน (ananain) ซึ่งเป็นซิสเตอีนโปรตีเอส ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบของเอนไซม์โบรมิเลน โดยการทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการโครมาโตรกราฟฟี (affinity chromatography) บน Sepharose-Gly-Phe-glycinaldehyde semicarbazone และโครมาโตรกราฟฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (cation exchange chromatography) จากการทดลองนี้พบว่า เอนไซม์อะแนนนาอินมีน้ำหนักโมเลกุล 25000 กิโลดาลตันใกล้เคียงกับเอนไซม์โบรมิเลนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 25000 กิโลดาลตัน ต่างกันตรงที่ความจำเพาะต่อสับสเตรทที่เป็นเปปไทด์และโปรตีน

Doko (1991) ทำการสกัดเอนไซม์โบรมิเลนจากน้ำสับปะรด และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ ไมโครฟิวเตรชั่น (microfiltration) ใช้เมมเบรนขนาด 8 ไมโครเมตรและทำอัลตราฟิว-เตรชั่นโดยการใช้เมมเบรนที่มี molecular weight cut-off 1000 ดาลตัน ต่อจากนั้นทำการตกตะกอนโปรตีน 2 ครั้ง ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัวร้อยละ 60 และ 70 นำไปอัลตราเซนติ-ฟิวส์ที่ 27000 g อุณหภูมิ 2-3 องศาเซลเซียส และนำไปแช่เยือกแข็ง ในการทดลองนี้มีผลได้ร้อยละ 50 สารสกัดที่ได้มีโปรตีนร้อยละ 98 และพบว่าเอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลงระหว่างกระบวนการทำให้บริสุทธิ์

2.2.8 การรักษาความคงตัวของเอนไซม์

เมื่อเอนไซม์อยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมอาจทำให้เอนไซม์สูญเสียกิจกรรม ดังนั้นความคงตัวจึงเป็นสิ่งสำคัญมาก โดยเฉพาะหากต้องการผลิตทางการค้า จึงมีการศึกษาวิธีการรักษาความคงตัวของเอนไซม์โบรมิเลน Heinicke (1957) พบว่าการพ่นฟองก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ลงไปในน้ำสกัดเอนไซม์จะช่วยรักษาความคงตัวของเอนไซม์ได้ดีขึ้น นอกจากนี้ยังมีการใช้สารรีดิวส์ซึ่งเป็นตัวช่วยรักษาความคงตัวของเอนไซม์ Heinicke พบว่าสามารถใช้กรดเบนโซเอทเป็นสารเพิ่ม-ความคงตัวได้โดยอาจอยู่ในรูปกรดเบนโซอิก รูปเกลือโซเดียมโพตัสเซียม แอมโมเนีย แคลเซียม แมกนีเซียม ลิเทียมเบนโซเอทและรูปอื่นๆ โดยอาจเติมในช่วงสกัดเอนไซม์ เติมในน้ำสกัดหรือเติมในตะกอนเอนไซม์เปียกก่อนแห้ง จากรายงานของ Wiseman (1978) พบว่าพอลิเอธิลีนไกลคอลกับเกลือของตะกั่วและแบเรียมสามารถช่วยกระตุ้นและรักษาความคงตัวของเอนไซม์ได้ แต่ไม่ควรใช้กับอาหารเนื่องจากอาจได้รับสารพิษ และนิมิตพิสุทธิ์ (2530) พบว่าหากใช้โซเดียมเมตาไบ-ซัลไฟด์ ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ หรือซีสเตอีนไฮโดรคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ช่วยทำให้เอนไซม์เสถียร เก็บได้นาน โดยในระยะเวลา 7 วัน กิจกรรมเอนไซม์ลดลงเพียงร้อยละ 8

2.2.9 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โบรมิเลน

ในการตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์โบรมิเลนมีหลายวิธีซึ่งในการหากิจกรรมวิธีต่างๆนั้น อาศัยคุณสมบัติในการเร่งการย่อยสลายสารประกอบโปรตีนและการเร่งปฏิกิริยาการจับตัวเป็นก้อนของโปรตีนนม (milk clotting)

Heinicke (1957) ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โบรมิเลนโดยทำปฏิกิริยากับโปรตีนในสารละลายพร่องไขมัน (skim milk solution) ในสภาพที่มีพีเอชเท่ากับ 3.5 แล้วจับเวลาจนกระทั่งโปรตีนในน้ำนมเริ่มแข็งตัวเกาะเป็นก้อน (clot) ซึ่งจะรายงานเป็นหน่วย MCU (Milk Clotting Unit)

Su และคณะ (1975) ได้ดัดแปรงวิธีการหากิจกรรมของเอนไซม์ โดยใช้สารละลายเอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลายเคซีน ความเข้มข้นร้อยละ 0.6 ในฟอตเฟตบัฟเฟอร์

ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.0 จำนวน 5.0 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยสารตกตะกอนโปรตีนจำนวน 5 มิลลิลิตร ซึ่งสารละลายตกตะกอนโปรตีนนี้ประกอบด้วยกรดไตรคลอโรอะซิติก (Trichloroacetic acid, TCA) ความเข้มข้น 0.11 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตท ความเข้มข้น 0.22โมลาร์ และกรดอะซิติก ความเข้มข้น 0.33 โมลาร์ บ่มไว้เป็นเวลา 30 นาที กรองเคซีนที่ตกตะกอนออกด้วยกระดาษกรองแล้วนำไปวัดเปปไทด์ที่ละลายอยู่โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร รายงานปฏิกิริยาเอนไซม์ออกมาในรูป CDU (Casein Digestion Unit) หมายถึง ปฏิกิริยาเอนไซม์ที่ย่อยเคซีนที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรเพิ่มขึ้นเท่ากับไทโรซีน 1 ไมโครกรัม ในเวลา 1 นาที

Shinya (2003) ทำการตรึงเอนไซม์โบรมิเลนและตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โบรมิเลน 2 วิธี วิธีแรก ทำโดยเจือจางเอนไซม์ด้วยฟอตเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 8.0 ที่มี EDTA ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์และซิสเตอีน ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ นำสารละลายโบรมิเลนเจือจาง ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร มาเติมสารตั้งต้น N-benzyl- L-arginine ethyl ester (BAEF) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันไทเทรตด้วยโพตัสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.05 นอร์มอล จนถึงระยะเวลาที่กำหนด คำนวณกิจกรรมจากอัตราเริ่มต้นของการไฮโดรไลซิส BAEF และปริมาณโพตัสเซียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ภายในเวลาที่กำหนด และสร้างกราฟกิจกรรมสัมพัทธ์กับเวลา ส่วนวิธีที่ 2 ทำการเจือจางเอนไซม์ตามเดิม นำสารละลายเอนไซม์มา 1 มิลลิลิตร เติมฟอตเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 8.0 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และสารละลายเคซีนเข้มข้นร้อยละ 2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เติมสารละลายกรดไตรคลอโรแอซีติก ความเข้มข้นร้อยละ 3 เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

Huang (2004) ทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โบรมิเลนโดยใช้ Z-L-asparagine-4-nitrophenyl ester ปริมาตร 75 ไมโครลิตรเป็นสารตั้งต้น เติมสารละลายโบรมิเลน 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร และอะซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 4.6 ที่ประกอบด้วยโพตัสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และแอล-ซิสเตอีน ความเข้มข้น1.0 โมลาร์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร

Grabovac และคณะ (2006) ทำการตรึงเอนไซม์โบรมิเลนบนเฮปพาริน (Heparin) และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์จาก พารา-ไนโตรฟีนอล (*p*-nitrophenol) ที่ปล่อยออกมาจาก N-α -CBZ-L-lysin *p*-nitrophenol ester ของเอนไซม์โบรมิเลน โดยเติมโซเดียมอะซิเตต

บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ พีเอช 4.6 ปริมาตร 2.6 มิลลิลิตร และสารละลายโบรมิเลน ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติม N-α-CBZ-L-lysine *p*-nitrophenol ester ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เพื่อตกตะกอนเฮปพาลิน และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร

Gupta และคณะ (2006) ทำการตรึงเอนไซม์โบรมิเลนบนตัวดูดซับที่เป็นโลหะ และตรวจสอบกิกรรมของเอนไซม์ โดยใช้เคซีนเป็นสารตั้งต้น ปฏิกิริยาของสารผสมในปริมาตรทั้งหมด 0.5 มิลลิลิตร ประกอบด้วยโบรมิเลนในปริมาณที่เหมาะสม โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 7.5 แอล-ซิสเตอีนความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ และโพตัสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปฏิกิริยาเริ่มเมื่อเติมสารละลายเคซีน ความเข้มข้นร้อยละ 1 น้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และเติมสารละลายกรดไตรคลอโรแอซิติก ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร 1 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 670 นาโนเมตร

Vall'es และคณะ (2007) ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โบรมิเลนโดยเติมสารสกัดหยาบของเอนไซม์โบรมิเลน 0.1 มิลลิลิตร สารละลายเคซีนในTris-HCl บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 8.0 ปริมาตร 1.1 มิลลิลิตร และซิสเตอีน ความเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เติมสารละลายกรดไตรคลอโรแอซีติก ความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยแรง 3000 g นาน 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

Habib และคณะ (2007) ทำการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โบรมิเลน โดยใช้เคซีนเป็นสารตั้งต้น ปฏิกิริยาพื้นฐานของสารผสมในปริมาตรทั้งหมด 0.5 มิลลิลิตร ประกอบด้วยโบรมิเลนในปริมาณที่เหมาะสม สารละลายซีสเตอีนไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ และเคซีน ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 7.0 ปฏิกิริยาเริ่มจากการเติมเคซีน บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 15 นาที และเติมสารละลายกรดไตรคลอโรแอซิติก ความเข้มข้นร้อยละ 20โดยปริมาตรที่เย็น เพื่อไปจับกับเคซีน นำไปวางบนน้ำแข็ง 10 นาที เร่งการตกตะกอนโดยใช้การปั่นเหวี่ยงที่ 2000 รอบต่อนาที 20 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ละลายในกรดที่ 275 นาโนเมตร

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุดิบ

สับปะรดจากไร่สับปะรดที่ อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี

3.2 สารเคมี

3.2.1 สารเคมีที่ใช้ทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ คือ EDTA ซีลเตอีน ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เคซีน และกรดไตรคลอโรแอซีติก

3.2.2 สารเคมีที่ใช้ตกตะกอนเอนไซม์ คือ อะซีโตน

3.2.3 สารเคมีที่ใช้ในการหาโปรตีนโดยวิธีการ Bradford's คือ Bovin Serum Albumin, Bradford's reagent 1X

3.3 อุปกรณ์

3.3.1 เครื่องชั่งสาร

3.3.2 เครื่องวัดพีเอช

3.3.3 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.3.4 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ คิวเวตต์ชนิดควอทต์ และเซมิควอทต์

3.3.5 เครื่องปั่นเหวี่ยง และหลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาดต่างๆ

3.3.6 เครื่องโฮโมจิไนส์แบบใช้คลื่นความถี่สูง (sonic homogenizer) ปิเปต และลูกยาง

3.3.7 เครื่องอังน้ำ

3.3.8 เครื่องคนสาร (stirrer) และแท่งแม่เหล็ก

3.3.9 เครื่องตีป่น (blender)

3.3.10 บิกเกอร์

3.3.11 ออโตปิเปต (autopipette) และทริป

3.3.12 ปิเปต และลูกยางหลอดทดลอง

3.3.13 ขวดปรับปริมาตรขนาดต่างๆ และขวดสีชา

3.3.14 หลอดทดลอง และที่วางหลอดทดลอง

3.3.15 ผ้าขาวบาง

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 ศึกษาการสกัดเอนไซม์โบรมิเลนจากส่วนต่างๆของสับปะรด

(ดัดแปลงจากนภนีราและคณะ, 2535)

3.4.1.1 นำสับปะรดส่วนต่างๆ 3 ส่วน แยกเป็น แกน เปลือก ลำต้น มาสับละเอียดใส่ในเครื่องตีปั่น เป็นเวลา 5 นาที โดยใส่น้ำแข็งปราศจากไอออน(deionized water) ในอัตราส่วน 1 : 1

3.4.1.2 แยกกากออกด้วยผ้าขาวบาง

3.4.1.3 นำส่วนใสที่ได้ไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนใส

3.4.1.4 นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้ไปตรวจหากิจกรรม (activity) ของเอนไซม์และเปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์ที่สกัดได้

<u>การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์</u> (Shinya และคณะ, 2003)

1. นำเอนไซม์ที่ได้มาเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 8.0 เติม EDTA ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ และซีลเตอีนความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ เพื่อเจือจางเอนไซม์และเร่งปฏิกิริยาผสมให้เข้ากัน

2. นำสารละลายเอนไซม์ที่เจือจาง 1.0 มิลลิลิตร มาทำปฏิกิริยากับเคซีนความเข้มข้นร้อยละ 2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 8.0 ปริมาตร 2 มิลลิลิตรใส่หลอดทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที สำหรับแบลงค์ใช้น้ำปราศจากไอออนแทนสารละลายเอนไซม์เจือจาง

3. เติมสารละลายกรดไตรคลอโรแอซีติกความเข้มข้นร้อยละ 3 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. นำส่วนใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปหาปริมาณกรดอะมิโนโดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐาน

5. ทำกราฟมาตรฐานของกรดอะมิโนไทโรซีน โดยนำสารละลายมาตรฐานที่เตรียมไว้มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน

6. คำนวนกิจกรรมของเอนไซม์ในหน่วย Casein Digestion Unit (CDU)/ml โดย CDU คือ Casein Digestion Unit หมายถึง ปฏิกิริยาเอนไซม์ที่ย่อยเคซีนที่ พีเอช 8.0 อุณหภูมิ 37

องศาเซลเซียส แล้วทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรเพิ่มขึ้นเท่ากับไทโรซีน 1 ไมโครกรัม ในเวลา 1 นาที

3.4.2 ศึกษาการสกัดเอนไซม์โบรมิเลน จากลำต้นสับปะรด

(ดัดแปลงจาก นภนีรา และคณะ, 2535)

3.4.2.1 นำลำต้นสับปะรดมาสับละเอียด ใส่ในเครื่องตีป่นโดยเปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์ที่ได้จากการนำลำต้นสับปะรดมาสับละเอียด ใส่ในเครื่องตีป่นเป็นเวลา 5 นาที โดยใส่น้ำแข็งปราศจากไอออนในอัตราส่วน 1 : 1 นำไปทำการโฮโมจิไนส์ด้วยเครื่องโฮโมจิไนส์แบบใช้คลื่นความถี่สูง เป็นเวลา 5 นาที แยกกากออกด้วยผ้าขาวบาง นำส่วนใสไปปั่นเหวี่ยงเช่นเดิม

3.4.2.2 นำส่วนใสที่ได้ไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนใส

3.4.2.3 นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้ไปตรวจหากิจกรรม (activity) ของเอนไซม์และเปรียบเทียบกิจกรรมเอนไซม์ทั้ง 2 วิธีการ

3.4.3 ศึกษาปริมาณความเข้มข้นของอะซิโตนเย็นที่ใช้ในการตกตะกอนเอนไซม์ โดยใช้อะซิโตนเย็นเริ่มต้นที่ร้อยละ 35 และใช้อะซิโตนเย็นซ้ำครั้งที่สองเป็นร้อยละ 50, 60, 70 และ 80

(ดัดแปลงจาก นภนีรา และคณะ, 2535)

3.4.3.1 นำสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมได้ 100 มิลลิลิตร เติมอะซิโตนเย็น 4 องศาเซลเซียสร้อยละ 35 ของปริมาตรสารละลายเอนไซม์ ทิ้งให้ตกตะกอน 90 นาที ที่ 4 อาศาเซลเซียสในสภาวะคนตลอดเวลา

3.4.3.2 ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 20 นาที เก็บตะกอนโดยใช้ฟอตเฟตบัฟเฟอร์ล้างตะกอนที่ได้

3.4.3.3 นำส่วนใสมาเติมอะซิโตนจนกระทั่งมีความเข้มข้นตามที่กำหนด ทิ้งให้ตกตะกอนในสภาวะเดิม

3.4.3.4 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 20 นาที เก็บตะกอนรวมกับตะกอนครั้งแรก

3.4.3.5 นำตะกอนเอนไซม์ที่ได้ไปตรวจหากิจกรรม (activity) ของเอนไซม์ก่อนการทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dryer) เพื่อเปรียบเทียบผลของการทำแห้ง

3.4.3.6 นำไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

1. ทำความสะอาดเครื่อง ตรวจเช็กระดับน้ำมัน ปิดปลายท่อน้ำทิ้ง ก่อนทำแห้งประมาณ 30 นาทีให้เปิดเครื่อง และเปิดสวิตซ์ลดอุณหภูมิ

2. เปิดฝาเครื่อง นำภาชนะที่บรรจุสารละลายเอนไซม์วางเรียงลงในเครื่อง ปิดฝา เปิดสวิตซ์ลดความดัน ปิดปลายท่ออากาศให้หมดทุกท่อ สภาวะภายในเครื่องจะเป็นสุญญากาศ การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งจะเริ่มขึ้น

3. เมื่อครบกำหนดระยะเวลา ในที่นี้ใช้ 10 ชั่วโมง ปิดสวิทซ์ลดความดัน เปิดท่อให้อากาศเข้า เปิดฝาเครื่องนำเอนไซม์ผงที่ได้ออก นำไปชั่งน้ำหนักและเก็บในภาชนะที่เหมาะสม

4. เปิดสวิตซ์เพิ่มอุณหภูมิเพื่อละลายน้ำแข็ง เปิดปลายท่อน้ำทิ้งให้น้ำไหลออก และเช็ดทำความสะอาดเครื่องให้เรียบร้อย

3.4.3.7 นำเอนไซม์ผงที่ได้ไปตรวจสอบการละลายได้ หากิจกรรม (activity) และปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ด้วยวิธี Brandford's (Vall´es และคณะ, 2007) โดยนำเอนไซม์ผงมาละลายในฟอตเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 8.0 ให้ได้ความเข้มข้น 25 กรัมต่อลิตร แล้วตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนตามวิธีดังกล่าว

การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Brandford's มีขั้นตอนต่อไปนี้

1. นำสารละลายเอนไซม์ตัวอย่างมาเจือจางให้ได้ระดับที่ต้องการ

2. ดูดสารละลายเอนไซม์เจือจางปริมาตร 40 ไมโครลิตรใส่ในหลอดทดลอง เติม Bradford's reagent 1X ปริมาตร 2 มิลลิลิตร สำหรับแบลงค์ใช้น้ำปราศจากไอออนแทนสารละลายเอนไซม์ ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที

3. ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบหาปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน

4. ทำกราฟมาตรฐานโปรตีน โดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน Bovin Serum Albumin (B2) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการเจือจางให้มีระดับความเข้มข้น 100, 200, 300, 400 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดูดสารละลายมาตรฐานเจือจาง 40 ไมโครลิตรใส่หลอดทดลองและทำตามขั้นตอนเช่นเดียวกับการหาปริมาณโปรตีนในสารละลายเอนไซม์ แล้วนำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน

3.4.3.8 ทำการศึกษาเปรียบเทียบระยะเวลาการทำแห้งที่เหมาะสมโดยการเก็บผลที่ 8, 10 และ 12 ชั่วโมง ตรวจสอบการละลายได้ หากิจกรรมและปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ด้วยวิธี Brandford's ตามขั้นตอนในหัวข้อ 3.4.1.4 และ 3.4.3.7 ตามลำดับ

3.4.4 ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์โบรมิเลน

(ดัดแปลงจาก Vall´es และคณะ, 2007)

3.4.4.1 อุณหภูมิ

1. นำเอนไซม์ผง มาละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 8.0 ให้ได้ความเข้มข้น 25 กรัมต่อลิตร

2. ปิเปตสารละลายเอนไซม์ 1 มิลลิลิตรทำการตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์โดยให้ทำปฏิกิริยากับสารละลายเคซีนที่อุณหภูมิต่างๆได้แก่ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส

3.4.4.2 พีเอช

1. นำเอนไซม์ผงมาละลายในซิเตรตบัฟเฟอร์ (พีเอช 3-6) หรือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 6-9) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ให้มีความเข้มข้น 25 กรัมต่อลิตรและมีพีเอชในช่วง 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0

2. ปิเปตสารละลายเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร ทำการตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์โดยให้ทำปฏิกิริยากับสารละลายเคซีน

3.4.5 ศึกษาสภาวะที่มีผลต่อความคงตัวของเอนไซม์

3.4.5.1 อุณหภูมิ

1. นำเอนไซม์ผง มาละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.0 ให้ได้ความเข้มข้น 25 กรัมต่อลิตร

2. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิต่างๆคือ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และอีกชุดหนึ่งบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส สุ่มตัวอย่างเอนไซม์เพื่อหากิจกรรมที่เวลา 2, 4, 6, 8, 16, 20 และ 24 ชั่วโมง

3. ปิเปตสารละลายเอนไซม์ 1 มิลลิลิตรทำการตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์โดยให้ทำปฏิกิริยากับสารละลายเคซีน

3.4.5.2 พีเอช

1. นำเอนไซม์ผง มาละลายในซิเตรตบัฟเฟอร์ (พีเอช 3-6) หรือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 6-9) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ให้ได้ความเข้มข้น 25 กรัมต่อลิตร และมีพีเอชในช่วง 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3. ปิเปตสารละลายเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร ทำการตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์โดยให้ทำปฏิกิริยากับสารละลายเคซีน

3.4.6 ทำการวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) และทำการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยตัวแปรที่ทำการศึกษาโดยวิธี Duncans New Multiple Range Test (DMRT) และทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS version 11.5

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ศึกษาการสกัดเอนไซม์โบรมิเลนจากส่วนต่างๆของสับปะรด

จากการศึกษาการสกัดเอนไซม์จากส่วนต่างๆของสับปะรดที่เหลือทิ้งในอุตสาหกรรมทางการเกษตรแบ่งวิเคราะห์ 3 ส่วน คือ แกน เปลือก ลำต้น โดยนำส่วนดังกล่าวในปริมาณที่เท่ากันมาสกัดโดยการตีป่นร่วมกับน้ำแข็งปราศจากไอออน อัตราส่วน 1:1 แยกกากออกด้วยผ้าขาวบาง นำส่วนใสที่ได้ไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนใสนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้ไปตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากการสกัดทั้ง 3 ส่วนคือ แกน เปลือก และลำต้น มีค่าเท่ากับ 0.56, 0.34 และ 3.16 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 ซึ่งเมื่อทำการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ของทั้ง 3 ส่วน พบว่าส่วนของลำต้นเป็นส่วนที่พบปริมาณของเอนไซม์มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับแกนและเปลือก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Heinicke และ Cortner (1957) ที่วิเคราะห์ก้าน เปลือก แกน ใบที่ผล ใบที่ต้น หน่อข้างลำต้น และลำต้น พบว่าโดยเฉพาะในน้ำสกัดจากส่วนของลำต้นจะมีปริมาณเอนไซม์สูงสุด และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Laura และคณะ (2005) ที่พบว่าลำต้นของสับปะรดมีปริมาณเอนไซม์สูงสุดเมื่อเทียบกับส่วนต่างๆจากผลของสับปะรด ดังนั้นในการศึกษาในขั้นต่อไปจึงเลือกใช้ส่วนของลำต้นในผลิตเอนไซม์โบรมิเลนเพื่อให้ได้ปริมาณเอนไซม์ที่สูง และคุ้มกับค่าใช้จ่ายในกระบวนการผลิต

ตารางที่ 4.1 ผลของกิจกรรมของเอนไซม์โบรมิเลนที่สกัดได้จากส่วนต่างๆของสับปะรด คือ แกน เปลือก ลำต้นโดยการตีป่น เป็นเวลา 5 นาที ร่วมกับน้ำแข็งปราศจากไอออน

ตัวอย่าง	กิจกรรมของเอนไซม์ (CDU/ml.)
แกน	0.56^{b}
เปลือก	0.34^{c}
ลำต้น	3.16^{a}

หมายเหตุ ตัวอักษร a, b และ c หลังตัวเลขที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95

4.2 ศึกษาการสกัดเอนไซม์โบรมิเลนจากลำต้นสับปะรด

ในการสกัดเอนไซม์โบรมิเลนจากลำต้นของสับปะรดซึ่งมีปริมาณเอนไซม์สูงเมื่อเทียบกับส่วนอื่นๆของสับปะรด ได้ทำการศึกษาวิธีการสกัดที่สามารถสกัดแยกเอนไซม์ออกมาได้มากที่สุด สองวิธีการ คือ วิธีการที่หนึ่งการตีป่นลำต้นสับปะรดกับน้ำแข็งปราศจากไอออน และวิธีการที่สองตีป่นลำต้นสับปะรดกับน้ำแข็งปราศจากไอออนร่วมกับนำไปโฮโมจิไนส์ด้วยเครื่องโฮโมจิไนส์แบบใช้คลื่นความถี่สูง พบว่าวิธีการที่หนึ่งและวิธีการที่สองให้ผลของกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 3.36 และ4.13 CDU/ml. ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.2 ซึ่งวิธีที่สองให้กิจกรรมเอนไซม์สูงกว่า ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการโฮโมจิไนส์ทำให้เซลล์พืชมีการแตกตัวปลดปล่อยเอนไซม์โบรมิเลนออกมามากขึ้น ดังนั้นวิธีที่สองคือการตีป่นลำต้นสับปะรดกับน้ำแข็งปราศจากไอออนร่วมกับนำไปโฮโมจิ-ไนส์ด้วยเครื่องโฮโมจิไนส์แบบใช้คลื่นความถี่สูงจึงเหมาะสมในการสกัดเอนไซม์ และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Heinicke (1961) ที่กล่าวว่าการโฮโมจิไนส์และการบดกับทรายจะทำให้การสกัดดีมากขึ้นเพราะว่าสามารถทำให้เซลล์แตกและปลดปล่อยเอนไซม์ออกมาจากส่วนเนื้อเยื่อของสับปะรด และงานวิจัยของ Vall'es และคณะ (2007) ได้รายงานว่าเมื่อทำการโฮโมจิไนส์ผลไม้ในการสกัดเอนไซม์จะพบว่าน้ำผลไม้หรือสารละลายเอนไซม์ที่ได้มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงขึ้น

ตารางที่ 4.2 ผลของวิธีการสกัดเอนไซม์โบรมิเลนจากลำต้นสับปะรดด้วยวิธีการตีป่น และการตีป่นร่วมกับโฮโมจิไนส์ เป็นเวลา 5 นาที

วิธีการสกัด	กิจกรรมของเอนไซม์ (CDU/ml.)
การตีป่น 5 นาที	3.36
การตีป่น 5 นาทีร่วมกับโฮโมจิไนส์ 5 นาที	4.13

4.3 ศึกษาปริมาณความเข้มข้นของอะซิโตนเย็นที่ใช้ในการตกตะกอนเอนไซม์ โดยใช้อะซิโตนเย็นเริ่มต้นที่ร้อยละ 35 และใช้อะซิโตนเย็นซ้ำครั้งที่สองเป็นร้อยละ 50, 60, 70 และ 80

การสกัดเอนไซม์โบรมิเลนจากลำต้นสับปะรดโดยวิธีการตีป่นลำต้นสับปะรดกับน้ำแข็งปราศจากไอออน เป็นเวลา 5 นาที ร่วมกับนำไปโฮโมจิไนส์ด้วยเครื่องโฮโมจิไนส์แบบใช้คลื่นความถี่สูง 5 นาที แยกกากออกด้วยผ้าขาวบาง นำส่วนใสที่ได้ไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมได้ 100 มิลลิลิตร เติมอะซิโตนเย็น 4 องศาเซลเซียส 35 มิลลิลิตร ทิ้งให้ตกตะกอนในสภาวะคน 90 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ4 องศา-

เซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บตะกอนโดยการล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 8.0 นำส่วนใสมาเติมอะซิโตนจนกระทั่งมีความเข้มข้นสุดท้ายตามที่กำหนด ทิ้งให้ตกตะกอนในสภาวะเดิม ปั่นเหวี่ยงเก็บตะกอนรวมกับตะกอนครั้งแรก นำตะกอนเอนไซม์ที่ได้ไปตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์

กิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยอะซิโตนเย็น 4 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นสุดท้ายที่ร้อยละ 50, 60, 70 และ 80 มีค่าเท่ากับ 89.1, 94.2, 219 และ352.78 ยูนิต ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ผลของการตกตะกอนเอนไซม์โบรมิเลนจากลำต้นสับปะรดโดยอะซิโตนเย็น 4 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ35 และตกตะกอนซ้ำครั้งที่ 2 เป็นความเข้มข้นร้อยละ 50, 60, 70 และ 80 เป็นเวลา 90 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ร้อยละของอะซิโตนเย็น	กิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์ (ยูนิต)	กิจกรรมจำเพาะทั้งหมดของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	ร้อยละของผลได้	จำนวนเท่าของความบริสุทธิ์
50	89.1[d]	0.94[d]	18.56[d]	0.09[d]
60	94.2[c]	1.18[c]	19.60[c]	0.12[c]
70	219[b]	1.50[b]	45.63[b]	0.15[b]
80	352.78[a]	2.19[a]	73.99[a]	0.22[a]

หมายเหตุ ตัวอักษร a, b, c และ d หลังตัวเลขที่แตกต่างกันในแต่ละสดมภ์แสดงถึงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95

ซึ่งเมื่อทำการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่าที่ปริมาณความเข้มข้นของอะซิโตนเย็น 4 องศาเซลเซียส ร้อยละ 80ให้ค่ากิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์ กิจกรรมจำเพาะทั้งหมดของเอนไซม์ ร้อยละของผลได้และจำนวนเท่าของความบริสุทธิ์ดีที่สุด โดยจากผลดังกล่าวพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของอะซิโตนเย็น 4 องศาเซลเซียส ทำให้กิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์เพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้อาจเกิดมาจากอะซิโตนที่มากขึ้นสามารถลดค่าไดอิเลคตริกคอนสแทนต์ (dielectric constant)ได้มาก เพราะอะซิโตนจะไปแยกเกาะยึดกับน้ำทำให้วงแหวนรอบๆโปรตีนหมดไปทำให้โปรตีนตกตะกอน แต่เมื่อมีการทดลองตกตะกอนซ้ำอีกเป็นความเข้มข้นร้อยละ 90 พบว่าได้เอนไซม์เพิ่มขึ้นจากเดิมน้อยมาก ทั้งนี้อาจเกิดจากปริมาณความเข้มข้นของอะซิโตนเย็น 4 องศาเซลเซียส ร้อยละ 80 เป็นปริมาณสมดุลที่เหมาะสมในการตกตะกอน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Vall'es และคณะ (2007) ที่รายงานว่าการเติมอะซิโตน

4 ใน 5 ของปริมาตรสารละลายเอนไซม์จะทำการเก็บตะกอนได้ถึงร้อยละ 96 และสอดคล้องกับการศึกษาของ Heinicke (1961) ที่พบว่ามีการตกตะกอนที่เหมาะสมเมื่อทำการตกตะกอนครั้งที่หนึ่งโดยใช้ปริมาตรของอะซิโตนเป็น 1 ใน 3 ของปริมาตรสารละลายเอนไซม์ และตกตะกอนเพิ่มจนมีปริมาตรอะซิโตนเป็น 2 ใน 3 ของปริมาตรสารละลายเอนไซม์ นอกจากนี้พบงานวิจัยที่ขัดแย้งคือ งานวิจัยของ จุรีรัตน์ (2530) พบว่าความเข้มข้นของอะซิโตนที่เหมาะสมในการตกตะกอนเอนไซม์โบรมิเลนมีค่าร้อยละ 65 – 70 และงานวิจัยของ ทนง (2529) กับงานวิจัยของ นภนีรา และคณะ (2535) รายงานว่าการตกตะกอนเอนไซม์โบรมิเลนสองครั้งด้วยอะซิโตนเย็นครั้งที่หนึ่งในปริมาณร้อยละ 35 และครั้งที่สองเป็นปริมาณร้อยละ 56 จะให้ผลดีที่สุด สำหรับงานวิจัยที่ขัดแย้งนั้นอาจเกิดจากสภาวะในการศึกษาต่างกันส่งผลให้ข้อมูลที่ศึกษาได้นั้นมีความแตกต่างกัน

4.4 ศึกษาระยะเวลาการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ผง

ทำการศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เพื่อสังเกตการละลายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งของเอนไซม์ และกิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์ที่ดีที่สุด โดยทำการสกัดเอนไซม์และตกตะกอน 2 ครั้งด้วยอะซีโตนเย็น 4 องศาเซลเซียส ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็นร้อยละ 80 เก็บตะกอนตามขั้นตอนเดิม สังเกตลักษณะการละลายของเอนไซม์ แล้วนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ทำการเก็บผลที่ 8, 10 และ12 ชั่วโมง ได้ค่ากิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์เท่ากับ 379.91, 389.22 และ 152.4 ยูนิต ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ผลของระยะเวลาการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งที่ระยะเวลา 8, 10 และ12 ชั่วโมงที่มีผลต่อการละลายหลังการแช่เยือกแข็ง กิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์ กิจกรรมจำเพาะทั้งหมดของเอนไซม์ ร้อยละของผลได้ และจำนวนเท่าของความบริสุทธิ์

ระยะเวลาการทำแห้ง (ชั่วโมง)	การละลายหลังการแช่เยือกแข็ง	กิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์ (ยูนิต)	กิจกรรมจำเพาะทั้งหมดของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	ร้อยละของผลได้	จำนวนเท่าของความบริสุทธิ์
8	การละลายค่อนข้างดี มีลักษณะคล้ายสภาพก่อนการทำแห้ง	379.91[b]	0.566[b]	31.98[b]	0.345[b]

ตารางที่ 4.4 ผลของระยะเวลาการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งที่ระยะเวลา 8, 10 และ12 ชั่วโมงที่มีผลต่อการละลายหลังการแช่เยือกแข็ง กิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์ กิจกรรมจำเพาะทั้งหมดของเอนไซม์ ร้อยละของผลได้ และจำนวนเท่าของความบริสุทธิ์ (ต่อ)

ระยะเวลาการทำแห้ง (ชั่วโมง)	การละลายหลังการแช่เยือกแข็ง	กิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์ (ยูนิต)	กิจกรรมจำเพาะทั้งหมดของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	ร้อยละของผลได้	จำนวนเท่าของความบริสุทธิ์
10	การละลายค่อนข้างดีมาก มีลักษณะคล้ายสภาพก่อนการทำแห้ง	389.22[a]	0.595[a]	32.76[a]	0.363[a]
12	การละลายไม่ดี มีตะกอนของเอนไซม์แขวนลอยอยู่ในสารละลายอย่างเห็นได้ชัด	152.4[c]	0.213[c]	12.83[c]	0.130[c]

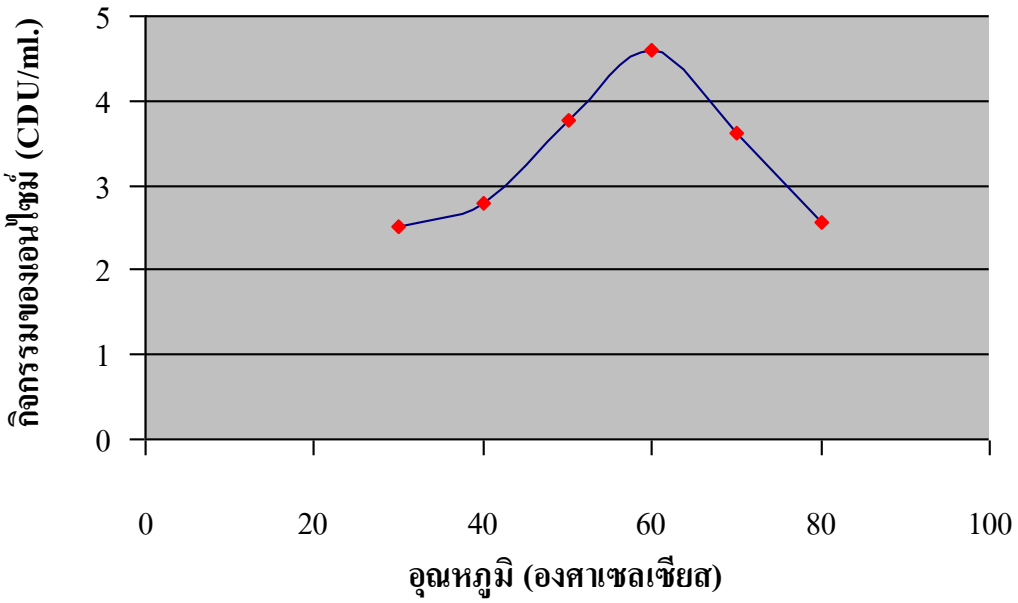
หมายเหตุ ตัวอักษร a, b และ c หลังตัวเลขที่แตกต่างกันในแต่ละสดมภ์แสดงถึงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95

ซึ่งเมื่อทำการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยดูได้จากตัวอักษรหลังตัวเลขในข้อมูลแต่ละสดมภ์ พบว่าแต่ละระยะเวลาการทำแห้ง ข้อมูลที่นำมาวิเคราะห์ทางสถิติมีลักษณะสัมพันธ์กัน คือระยะเวลาการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งที่ชั่วโมงที่ 10 มีการละลาย กิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์ กิจกรรมจำเพาะทั้งหมดของเอนไซม์ ร้อยละของผลได้และจำนวนเท่าความบริสุทธิ์ดีที่สุด เมื่อเทียบกับชั่วโมงที่ 8 และ12 คือมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการแช่เยือกแข็งเมื่อใช้เวลาน้อยหรือมากกว่า 10 ชั่วโมง ทั้งนี้เนื่องจากระยะเวลาการทำแห้งที่มากเกินไปทำให้เอนไซม์เสียสภาพ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Heinicke (1961), Huang (1999) และ Vall'es และคณะ (2007) ที่รายงานว่าการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดในการเก็บรักษาเอนไซม์

4.5 ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์โบรมิเลน

4.5.1 อุณหภูมิ

ทำการศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์โดยนำเอนไซม์ผงที่ได้มาละลายในฟอตเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 8.0 ให้มีความเข้มข้น 25 กรัมต่อลิตร แล้วนำไปหาค่ากิจกรรมที่อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ได้ค่ากิจกรรม 2.51, 2.797, 3.78, 4.59, 3.62 และ 2.57 CDU/ml. ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.1



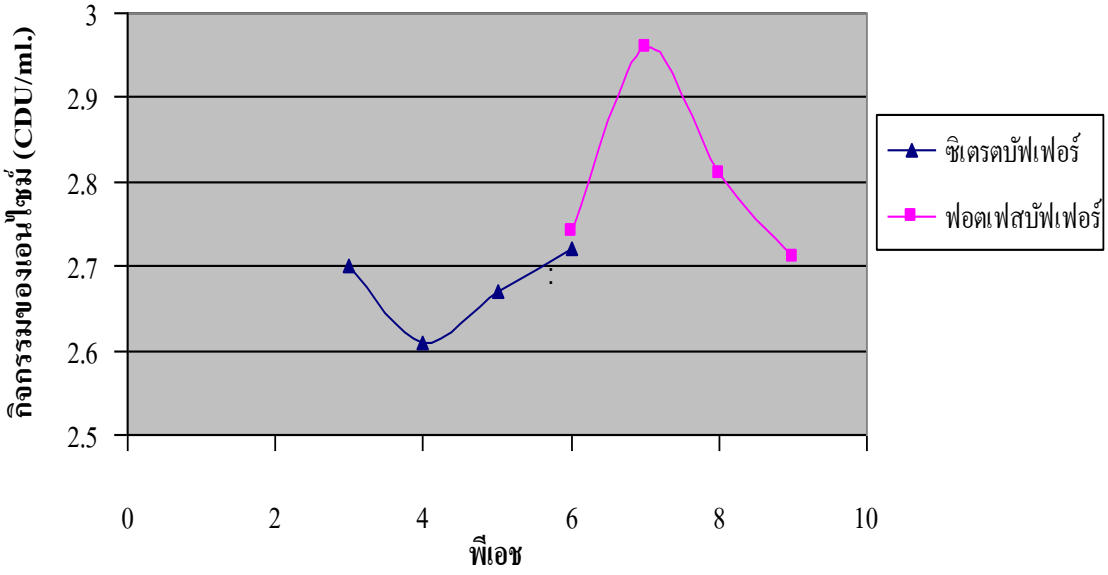
รูปที่ 4.1 ผลของอุณหภูมิที่หมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โบรมิเลนเมื่อทำการบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

จากกราฟจะเห็นว่า การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิทำให้กิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นจนถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมซึ่งในที่นี้คือที่ 60 องศาเซลเซียส เนื่องจากการเพิ่มอุณหภูมิทำให้สารที่จะเข้าทำปฏิกิริยามีพลังงานมากพอที่จะเข้าสู่สภาพเปลี่ยน (อารี, 2548) แต่เมื่อผ่านอุณหภูมินี้ไป จะพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากความร้อนที่มากเกินไปทำให้เอนไซม์เสียสภาพตามธรรมชาติซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Gupta และ Saleemuddin (2006) และ Vall'es และคณะ (2007) ที่พบว่าอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์

4.5.2 พีเอช

ทำการศึกษาหาพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์โดยนำเอนไซม์ผงที่ได้มาละลายในฟอตเฟตบัฟเฟอร์หรือซิเตรตบัฟเฟอร์ ให้มีค่าพีเอชเท่ากับ 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 9

โดยให้มีความเข้มข้น 25 กรัมต่อลิตร แล้วนำไปหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่พีเอชต่างๆ พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์โบรมิเลนได้สูงสุดที่พีเอช 7 ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 2.96 CDU/ml. และรองลงมาคือพีเอช 8 และ 6 และให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 2.81 และ 2.74 CDU/ml. ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.2



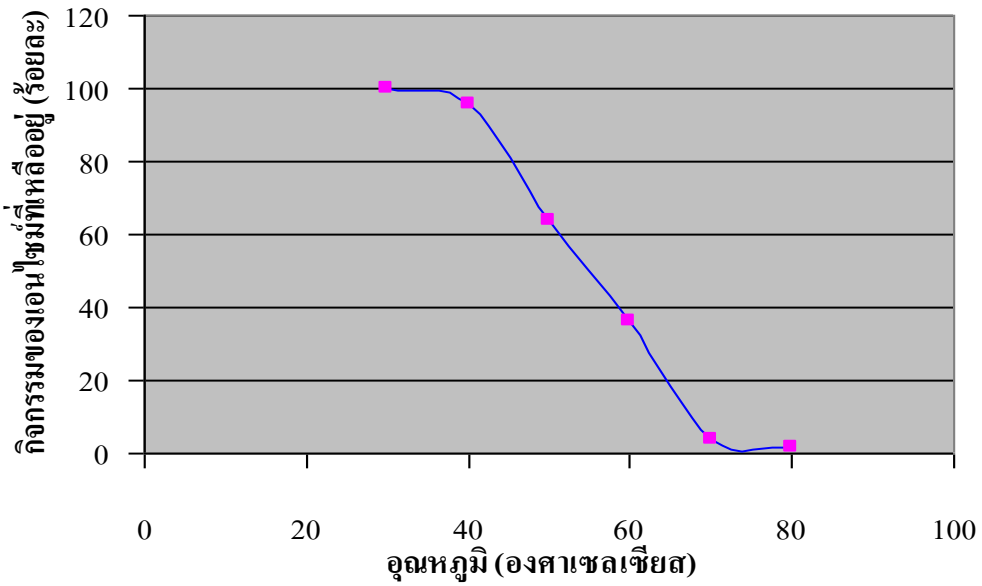
รูปที่ 4.2 ผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โบรมิเลน โดยการบ่มเอนไซม์ที่พีเอชต่าง ๆ กัน คือซิเตรตบัฟเฟอร์(พีเอช 3-6) และใช้ฟอตเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 6-9) เป็นเวลา 20 นาที

จากกราฟพบว่า เอนไซม์ให้ค่ากิจกรรมสูงสุดที่ฟอตเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 เนื่องจากที่พีเอชนี้ทำให้เอนไซม์มีประจุสุทธิที่ทำให้มีอัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาสูงส่งผลให้เอนไซม์มีประสิทธิภาพในการทำงาน แต่เมื่อพีเอชเปลี่ยนแปลงไปไม่ว่าจะลดลงหรือเพิ่มขึ้นจะส่งผลให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ลดลง เพราะกรดอะมิโนที่เป็นกรดและเบสเกิดการแตกตัวทำให้พันธะไอออนิกในโครงสร้างตติยภูมิสูญเสียไป เอนไซม์สูญเสียสภาพตามธรรมชาติและประจุสุทธิของเอนไซม์โดยเฉพาะบริเวณเร่ง ทำให้ปฏิกิริยาเกิดได้ไม่ดี (อารี, 2548) จึงสามารถกล่าวได้ว่า ฟอตเฟสบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 เป็นพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์โบรมิเลน ซึ่งค่อนข้างสอดคล้องกับงานวิจัยของ Huang (1999) ที่รายงานว่าพีเอชที่เหมาะสมที่สุดในการทำงานอยู่ในช่วง พีเอช 6.8-9.0 และเหมาะสมที่สุดที่ 7.8 ส่วนงานวิจัยของ Gupta และSaleemuddin (2006) พบว่าพีเอชที่เหมาะสมที่สุดในการทำงานคือ พีเอช 7.5

4.6 ศึกษาสภาวะที่มีผลต่อความคงตัวของเอนไซม์

4.6.1 อุณหภูมิ

ทำการศึกษาหาอุณหภูมิที่มีผลต่อความคงตัวของเอนไซม์ โดยนำเอนไซม์ผงที่ได้มาละลายในฟอตเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ให้มีความเข้มข้น 25 กรัมต่อลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆได้แก่ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ พบว่าได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โบรมิเลนเท่ากับ 2.75, 2.63, 1.76, 0.989, 0.108 และ 0.05 CDU/ml. ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละของกิจกรรมเอนไซม์ที่เหลืออยู่สูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และรองลงมาคือ 40 และ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่เท่ากับร้อยละ 100, 95.64 และ 64 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 ผลของค่าความคงตัวของเอนไซม์โบรมิเลนต่ออุณหภูมิเมื่อทำการบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

จากกราฟพบว่า เอนไซม์มีความคงตัวที่อุณหภูมิในช่วง 30-40 องศาเซลเซียสและสูญเสียความคงตัวอย่างรวดเร็วในช่วงอุณหภูมิ 40-70 องศาเซลเซียส เห็นได้ว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นความคงตัวของเอนไซม์จะลดลงตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องการศึกษาของนภนีรา และคณะ(2535) ที่พบว่าความคงตัวของเอนไซม์ลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงมากกว่า 50 องศาเซลเซียส

และเมื่อทำการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาเอนไซม์ โดยนำเอนไซม์ผงที่ได้มาละลายในฟอตเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ให้มีความเข้มข้น 25 กรัมต่อลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการสุ่มตรวจใน

ชั่วโมงที่ 0, 2 , 4, 6, 8, 16, 20 และ 24 ชั่วโมง พบว่าได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โบรมิเลนเท่ากับ 2.93, 2.91, 2.90, 2.89, 2.87, 2.85 และ 2.84 CDU/ml. ซึ่งเมื่อทำการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์มีค่าลดลงตามระยะเวลาในการเก็บรักษาในทุก 2 ชั่วโมงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในตารางที่ 4.5 และเมื่อคิดเป็นกิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลือหลังจากเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลือเท่ากับร้อยละ 93.86 ดังแสดงในรูป 4.4 Vall'es และคณะ(2007)ได้ทำการศึกษาโดยเก็บรักษาเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 7.0 พบว่าสามารถเก็บรักษาเอนไซม์ได้นานถึง 50 ชั่วโมง โดยไม่สูญเสียค่ากิจกรรมของเอนไซม์อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเก็บรักษาเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่ำจะช่วยให้ค่าความคงตัวของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิมีมากขึ้น

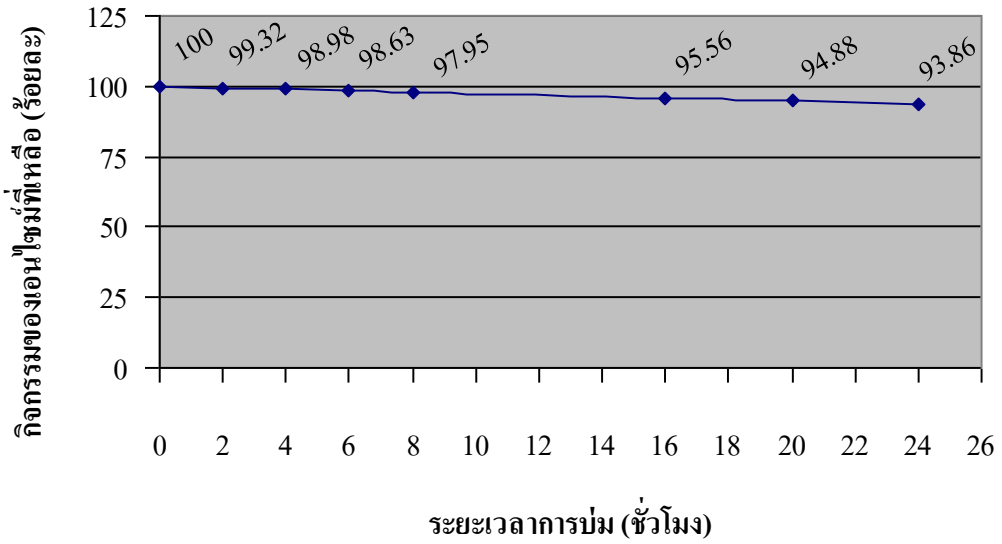
ตารางที่ 4.5 ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของการเก็บรักษาเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่เวลา 2, 4, 6, 8, 16, 20 และ 24 ชั่วโมง

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	กิจกรรมของเอนไซม์ (CDU/ml)
0	2.93^{a}
2	2.91^{b}
4	2.90^{bc}
6	2.89^{c}
8	2.87^{d}
16	2.80^{e}
20	2.78^{f}
24	2.75^{g}

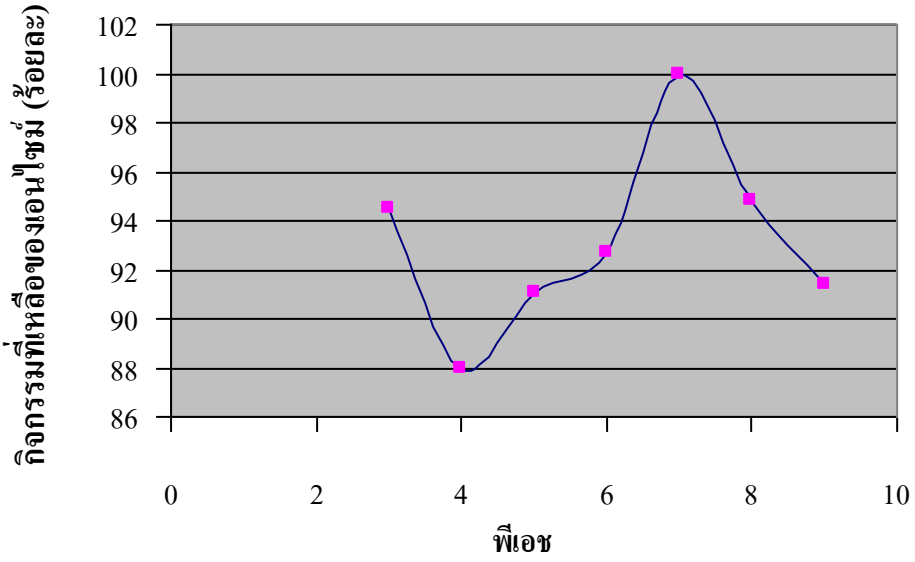
หมายเหตุ ตัวอักษร a, b, c, d, e, f และ g หลังตัวเลขที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95

4.6.2 พีเอช

ทำการศึกษาหาพีเอชที่มีผลต่อความคงตัวของเอนไซม์ โดยนำเอนไซม์ผงที่ได้มาละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์หรือซิเตรตบัฟเฟอร์ ที่พีเอชต่างๆได้แก่ 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 โดยให้มีความเข้มข้น 25 กรัมต่อลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ พบว่าได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 2.75, 2.56, 2.65, 2.69, 2.91, 2.76, 2.66 และ 2.64 CDU/ml. ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละของกิจกรรมเอนไซม์ที่เหลือ ดังแสดงในรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.4 ผลของค่าความคงตัวของเอนไซม์โบรมิเลนต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลือ เมื่อทำการบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2, 4, 6, 8, 16, 20 และ 24 ชั่วโมง



รูปที่ 4.5 ผลของความคงตัวต่อพีเอชของเอนไซม์โบรมิเลนต่อค่าของกิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลือ เมื่อทำการบ่มเอนไซม์ในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ (พีเอช 3-6) และฟอตเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 6-9) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

จากกราฟพบว่าเอนไซม์มีความคงตัวดีในฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 และเมื่อพีเอชเปลี่ยนแปลงไปพบว่าความคงตัวของเอนไซม์ลดลงส่งผลให้ประสิทธิภาพในการทำงานของ

เอนไซม์ลดลงด้วย ดังนั้นหากต้องการเก็บรักษาเอนไซม์ในสภาพสารละลายฟอตเฟสบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 จึงเหมาะสมที่สุดในการเก็บรักษาเอนไซม์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Gupta และ Saleemuddin (2006) พบว่าเมื่อเก็บรักษาเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชมากกว่าหรือน้อยกว่าในช่วง พีเอช 7.0-7.5 ความคงตัวของเอนไซม์จะมีค่าลดลง ทั้งนี้เอนไซม์โบรมิเลนที่ได้เป็นเอนไซม์ที่ได้จากลำต้นของสับปะรดซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความแตกต่างทางโครงสร้างกับเอนไซม์ในส่วนของผลสับปะรดดังนั้น พีเอช 4.0 ซึ่งเป็นพีเอชที่อยู่ในน้ำผลสับปะรดจึงไม่เหมาะสมในการรักษาความคง-ตัวของเอนไซม์

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การทดลองนี้เป็นการศึกษากระบวนการผลิตเอนไซม์โบรมิเลน โดยทำการวิเคราะห์ส่วนต่างๆของสับปะรดได้แก่ แกน เปลือกและลำต้น พบว่าลำต้นมีปริมาณเอนไซม์มากที่สุด ซึ่งกระบวนการผลิตเริ่มจาก การนำส่วนของลำต้นมาทำการตีปั่นร่วมกับน้ำแข็งปราศจากไอออนเป็นเวลา 5 นาที นำไปโฮโมจีไนส์ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบาง และนำไปปั่นเหวี่ยง นำส่วนใสที่ได้ไปตกตะกอน 2 ครั้งด้วยอะซีโตนเย็น 4 องศาเซลเซียส ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็นร้อยละ 80 นำตะกอนเอนไซม์ที่ได้ไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งเป็นเวลา 10 ชั่วโมงจะได้เอนไซม์ผงที่มีประสิทธิภาพการละลาย กิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์ กิจกรรมจำเพาะทั้งหมดของเอนไซม์ ร้อยละของผลได้ และจำนวนเท่าของความบริสุทธิ์มากที่สุด เมื่อทำการวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์พบว่า เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอช 7.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส สำหรับความคงตัวของเอนไซม์พบว่าในสภาวะสารละลายเอนไซม์มีความคงตัวเมื่ออยู่ในบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 และช่วงอุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียสเอนไซม์สามารถรักษาสภาพความคงตัวได้ หากทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลือเท่ากับร้อยละ 93.86 ซึ่งสามารถรักษาประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ไว้ได้

เอกสารอ้างอิง

กัลยา วงศ์สินอุดม. 2520. การแยกและการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์จากลำต้นสับปะรดที่สามารถย่อยโปรตีนได้. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

เกศินี ระมิงค์วงศ์. 2539. ตระกูลสับปะรด. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

จารุพันธ์ ทองแถม. 2526. สับปะรดและอุตสาหกรรมสับปะรดในประเทศไทย. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ .

จุรีรัตน์ สมสุข. 2530. การเพิ่มปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์โบรมิเลนผงจากลำต้นสับปะรด. โครงงานพิเศษวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, มหาลัยวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ทนง ภัครัชพันธุ์. 2529. กระบวนการตกตะกอนและความคงตัวของโบรมิเลน. โครงงานพิเศษวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาลัยวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นภนีรา แสงสุริยะ, สุฑนี ติยะชัยพานิช และ เอื้ออารีย์ พรเศรษฐคุณ . 2535. การผลิตเอนไซม์โบรมิเลนจากลำต้นสับปะรด. วิทยานิพนธ์สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

นิมิตพิสุทธิ์ ณรงคะชวนะ. 2530. การผลิตโบรมิเลนจากต้นสับปะรด. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ประเสริฐ กองทิพย์. 2526. การทดลองใช้โบรมิเลนช่วยในการทำน้ำปลา. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สำนักงานเศรษฐกิจอุตสาหกรรม. 2545. รายงานภาวะอุตสาหกรรมแปรรูปสับปะรด. กรุงเทพฯ : กระทรวงอุตสาหกรรม. 1-31.

ศิริชัย อุ่นศรีส่ง. 2541. สับปะรด. ภาควิชาพืชไร่ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

อารี ฤทธิบูรณ์. 2548. ปฏิบัติการเทคโนโลยีของเอนไซม์. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

อารี ฤทธิบูรณ์. 2550. เทคโนโลยีของเอนไซม์. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

Apte P.V., Kaklij G. S.and Heble M. R. 1979. Proteolytic enzymes (bromelains) in tissue cultures of *Ananas sativus* (pineapple). *Plant Science Letters*. 14 : 57-62.

Balls, A.K., Thompson R.R. and Kies M.W. 1941. Bromelain properties and commercial production. *Inductrial and Engineering Chemistry*. 33 : 33-35.

Doko M. B., Bassani V., Casadebaig J., Cavailles L. and Jacob M. 1991. Preparation of proteolytic enzyme extracts from *Ananas comosus* L., Merr. fruit juice using semipermeable membrane, ammonium sulfate extraction, centrifugation and freeze-drying processes. *International Journal of Pharmaceutics*. 76 : 199-206.

Glazer, A.N. and Smith E.L. 1971. Papain and other plant sulfhydryl proteolytic enzyme. *The enzyme Academic Press*, New York

Grabovac V. and Bernkop-Schnürch A. 2006. Improvement of the intestinal membrane permeability of low molecular weight heparin by complexation with stem bromelain. *International Journal of Pharmaceutics.* 326 : 153-159.

Gregory S.K., N.D. 1996. Bromelain: A Literature Review and Discussion of its Therapeutic Applications. *Alternative Medicine Review 1*. 4 : 243-257.

Gupta P., Saleemuddin M. 2006. Bioaffinity based oriented immobilization of stem Bromelain. *Biotechnol Letter*. 28 : 917–922.

Gupta P., Maqbool T. and Saleemuddin M. 2007. Oriented immobilization of stem bromelain via the lone histidine on a metal affinity support. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 45 : 78-83.

Habib S. , Khan M.A. , and Younus H.. 2007. Thermal Destabilization of Stem Bromelain by Trehalose . *The Protein Journal*. 26 : 117-124.

Heinicke. 1961. Process for the preparation of pineapple stem bromelain. [Online].Available : http://www.freepatentsonline.com/5106621.html

Heinicke, R.M. and Cortnor W.A.. 1957. Stem bromelain a new protease preparation from pineapple plant. *Economic botany*. 11 : 25-28.

Huang H.H., Liang H.H., Kwok K.C.. 1999. Properties of tea-polyphenol-complexed bromelain. *Food Research International*. 32 : 545-551.

Huang S.H. and Chen D.H. 2004. Fast separation of bromelain by polyacrylic acid-bound iron oxide magnetic nanoparticles. *Process Biochemitry*. 39 : 2207-2211.

Hunter, P.G. and Henry S.W. 1955. Cerotokysterocaeping graphy. Fertility and Sterility. 6 : 68-70.

Hwang, K. and Ivy, A.C. 1951. A review of literature on the potential therapeutic significance of papain. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 16 : 54-61.

Laura P.H., Paula K.G.r, Chau T.T. and Cindy L.J. 2005. Proteinase activity and stability of natural bromelain preparations. *International Immunopharmacology*. 5 : 783-793.

Murachi, T. and Neurath H. 1964. Fractionation and Specificity studies on stem bromelain. *Journal Biology Chemistry*. 2 : 90-99.

Rowan A.D., Buttle D.J. and Barrett A. J. 1988. Ananain: A novel cysteine proteinase found in pineapple stem. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 267 : 262- 270.

Scocca.T. and Lee Y.C. 1969. The composition and structure of the carbohydrate of pineapple stem bromelain. *Journal Biology Chemistry*. 14 : 48-52.

Shinya Y., Tetsuya T., Michiyoshi K., Takanori H., Masakazu F., Masahito O. and Toshio H. January 2003. Immobilization of bromelain onto porous copoly (γ-methyl- -glutamate/-leucine) beads. *European Polymer*. 39 : 173-180.

Su, Y.C. ; Chu C.Y. ; Lai Y.T. and Lai. K.S. 1975. Studies on the production of stem bromelain from pineapple waste. *Journal of the Chinese Agricultural Chemical Society*. 10 : 5-10

Vall´es D. , Furtado S., Cantera A.M.B. 2007. Characterization of news proteolytic enzymes from ripe fruits of Bromelia antiacantha Bertol. (Bromeliaceae). *Enzyme and Microbial Technology*. 40 : 409–413.

Wiseman A. 1978. Topic in enzyme and fermentation biotechnology. *The Quarterly Review of Biology*. 53 : 51-52

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (อารี, 2548)

ทำการเตรียมสารละลาย ก และ ข โดยการทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการและนำมาผสมกันให้ได้ค่ากรดด่างที่ต้องการ

สารละลาย ก : สารละลายของโมโนเบสิค โซเดียมฟอสเฟต (ทำการละลาย NaH_2PO_4 27.8 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย ข : สารละลายของไดเบสิค โซเดียมฟอสเฟต (ทำการละลาย $Na_2HPO_4.7H_2O$ 53.65 กรัมหรือ $Na_2HPO_4.12H_2O$ 71.7 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

จำนวนมิลลิลิตรของสารละลาย ก (x) ผสมกับสารละลาย ข (y) เจือจางด้วยน้ำกลั่นเป็น 200 มิลลิลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 1 แสดงการผสมกันระหว่างสารละลาย ก และสารละลาย ข ของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ให้ได้ค่ากรดด่างที่ต้องการ

X	Y	ค่ากรดด่าง	X	Y	ค่ากรดด่าง
93.5	6.5	5.7	45.0	55.0	6.9
92.0	8.0	5.8	39.0	61.0	7.0
90.0	10.0	5.9	33.0	67.0	7.1
87.7	12.3	6.0	28.0	72.0	7.2
85.0	15.0	6.1	23.0	77.0	7.3
81.5	18.5	6.2	19.0	81.0	7.4
77.5	22.5	6.3	16.0	84.0	7.5
73.5	26.5	6.4	13.0	87.0	7.6
68.5	31.5	6.5	10.5	90.5	7.7
62.5	37.5	6.6	8.5	91.5	7.8
56.5	43.5	6.7	7.0	93.0	7.9
51.0	49.0	6.8	5.3	94.7	8.0

การเตรียมสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ (อารี, 2548)

ทำการเตรียมสารละลาย ก และ ข โดยการทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการและนำมาผสมกันให้ได้ค่ากรดด่างที่ต้องการ

สารละลาย ก : สารละลายของกรดซิตริก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (ทำการละลายกรดซิตริก 51.01 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย ข : สารละลายของโซเดียมซิเตรต (ทำการละลาย $C_6H_5O_7Na_3.2H_2O$ 29.41กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

จำนวนมิลลิลิตรของสารละลาย ก (x) ผสมกับสารละลาย ข (y) เจือจางด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 2 แสดงการผสมกันระหว่างสารละลาย ก และสารละลาย ข ของสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ ให้ได้ค่ากรดด่างที่ต้องการ

X	Y	ค่ากรดด่าง	X	Y	ค่ากรดด่าง
46.5	3.5	3.0	23.0	27.0	4.8
43.7	6.3	3.2	20.5	29.5	5.0
40.0	10.0	3.4	18.0	32.0	5.2
37.0	13.0	3.6	16.0	34.0	5.4
35.0	15.0	3.8	13.7	36.3	5.6
33.0	17.0	4.0	11.8	38.2	5.8
31.5	18.5	4.2	9.5	41.5	6.0
28.0	22.0	4.4	7.2	42.8	6.2
25.5	24.5	4.6			

ภาคผนวก ข

1. การหากิจกรรมของเอนไซม์โบรมิเลน

สารเคมีที่ใช้

ก. สารละลายเคซีน : ละลายเคซีนความเข้มข้นร้อยละ 2 ในสารละลาย0.05 โมลาร์ ไดเบสิคโซเดียมฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.7H_2O$) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ปรับพีเอชเป็น 7.0 ด้วยกรดเกลือ 0.1 นอร์มอล โดยเตรียมสารในสภาวะคนและให้ความร้อนตลอดเวลา สารละลายเคซีนต้องเตรียมใหม่ทุกวัน

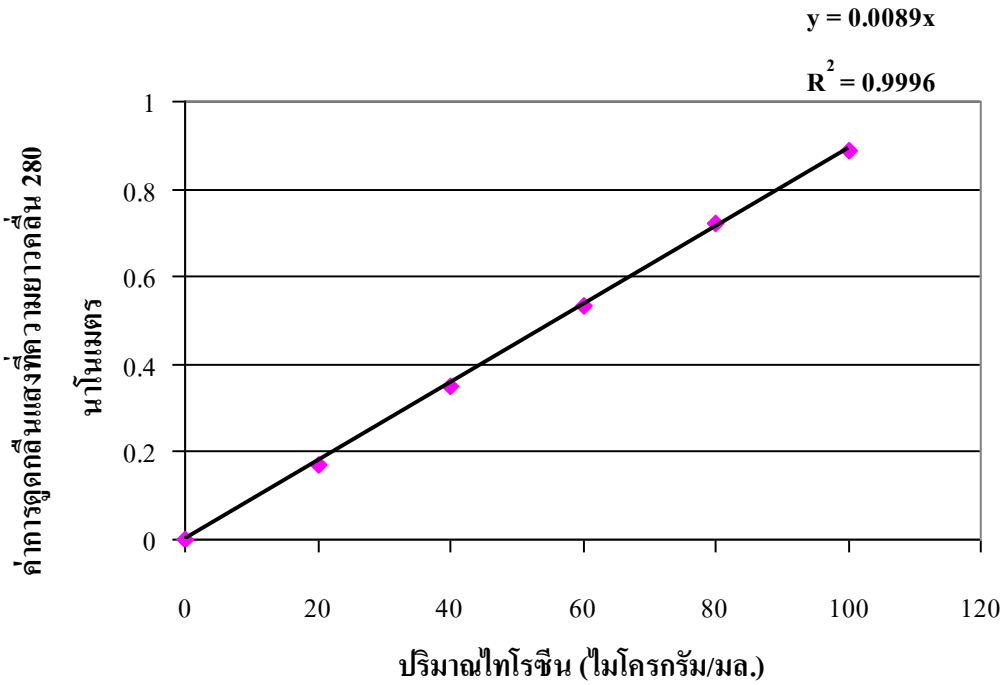
ข. สารละลายที่ใช้เจือจางเอนไซม์ : ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 8.0 เติม EDTA ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ และซีลเตอีนความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ เตรียมใหม่ทุกวัน

ค. สารละลายกรดไตรคลอโรแอซีติก : ละลายกรดไตรคลอโรแอซีติกความเข้มข้นร้อยละ 3 ในน้ำปราศจากไอออนเตรียมใหม่ทุกวัน

การหากราฟมาตรฐาน

ตารางภาคผนวกที่ 3 การวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานไทโรซีนที่ 280 นาโนเมตร

ปริมาณไทโรซีน (ไมโครกรัม/มล.)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร			
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย
20	0.172	0.164	0.170	0.171
40	0.356	0.350	0.350	0.350
60	0.521	0.553	0.541	0.532
80	.0710	0.727	0.721	0.724
100	0.899	0.892	0.910	0.890



รูปภาคผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานไทโรซีนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

การหากิจกรรมของเอนไซม์โบรมิเลน

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์โบรมิเลน (ยูนิต/มล.)} = \frac{\text{ไมโครกรัมของไทโรซีน} \times \text{จำนวนเท่าการเจือจางสารละลายเอนไซม์}}{\text{น้ำหนักโมเลกุลของไทโรซีน} \times \text{ระยะเวลาบ่ม} \times \text{ปริมาณเอนไซม์ (มล.)}}$$

จากสมการของกราฟมาตรฐาน $y = 0.0089x$ เมื่อแทนค่า y ด้วยค่าการดูดกลืนแสงของไทโรซีนสามารถคำนวณหาความเข้มข้นของไทโรซีน (ไมโครกรัม/มล.) และนำมาคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์โบมิเลนได้ในหน่วย Casein Digestion Unit (CDU)/mg และ CDU/ml โดย CDU คือ Casein Digestion Unit หมายถึง ปฏิกิริยาเอนไซม์ที่ย่อยเคซีนที่ พีเอช 8.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรเพิ่มขึ้นเท่ากับไทโรซีน 1 ไมโครกรัม ในเวลา 1 นาที

วิธีการคำนวณค่าต่างๆ

1. กิจกรรมของเอนไซม์ทั้งหมด = กิจกรรมของเอนไซม์ × ปริมาตรของเอนไซม์
2. กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ = $\frac{\text{กิจกรรมของเอนไซม์}}{\text{ปริมาณโปรตีน}}$

3. ผลได้ $= \frac{\text{กิจกรรมของเอนไซม์ทั้งหมดในแต่ละขั้นตอนของการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์}}{\text{กิจกรรมของเอนไซม์ทั้งหมดของ crude enzyme}} \times 100$

4. จำนวนเท่าของความบริสุทธิ์ของเอนไซม์

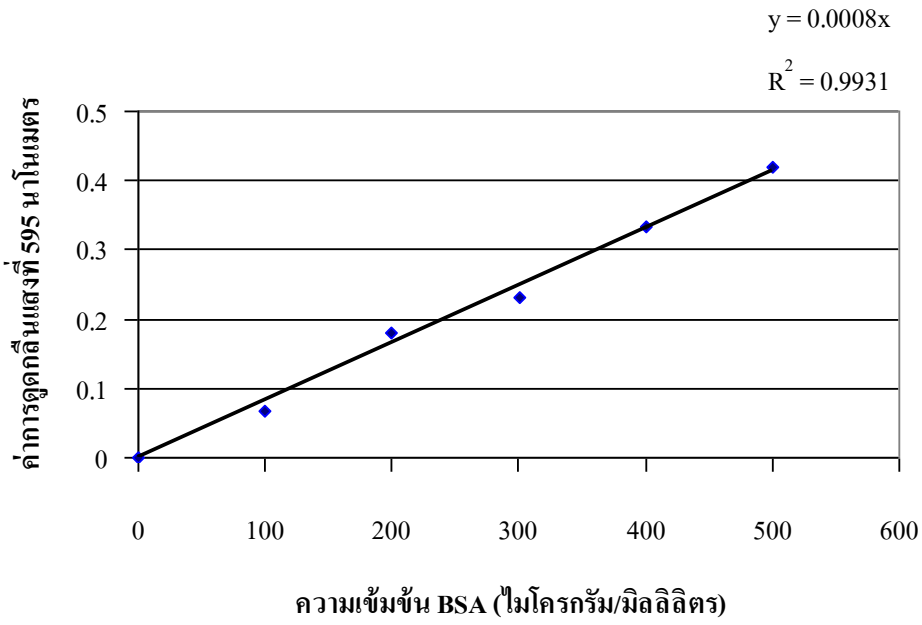
$= \frac{\text{กิจกรรมจำเพาะของแต่ละขั้นตอนของการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์}}{\text{กิจกรรมจำเพาะของ crude enzyme}}$

2. การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีทำ Brandford's Method

ทำกราฟมาตรฐานโปรตีน โดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน Bovin Serum Albumin (B2) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการเจือจางให้มีระดับความเข้มข้น 100, 200, 300, 400 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเติม Brand ford reagent 1x ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร และสร้างกราฟมาตรฐานปริมาณโปรตีน

ตารางภาคผนวกที่ 4 การวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานโปรตีน Bovine serum albumin ที่ 595 นาโนเมตร

ปริมาณBovine serum albumin (ไมโครกรัม/มล.)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร			
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย
100	0.052	0.085	0.060	0.066
200	0.136	0.205	0.200	0.180
300	0.219	0.310	0.245	0.230
400	0.415	0.328	0.338	0.333
500	0.405	0.434	0.420	0.420



รูปภาคผนวกที่ 2 กราฟมาตรฐานของ Bovin Serum Albumin ที่ระดับความเข้มข้น 100, 200, 300, 400 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร