สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตเอนไซม์โบรมิเลนจากลำต้นสับปะรด

นางสาวนภนีรา แสงสุริยะ
นางสาวสุทนี ติยะชัยพานิช
นางสาวเอื้ออารีย์ ไชยญา

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2534

ปพ.
น1911

2535
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....
วัน,เดือน,ปี.....

b.1250821

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PRODUCTION OF ENZYME BROMELAIN FROM PINEAPPLE STEM

1. MISS NOPANEERA SANGSUKIYA

2. MISS SUTHANEE TIYACHAIPANICH

3. MISS AUER-AREE CHAIYA

A SPECIAL PROJECT SUBLIMITED IN PARTIAL FULFILLMENT OF

THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

DEPARTMENT OF APPLIED BIOLOGY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

1991 - 1992

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานนิเศษ	การผลิตเอนไซม์โบรมิเลนจากลำต้นสับปะรด
โดย	1. นางสาว นภนีรา แสงสุริยะ
	2. นางสาว สุทนี ติยะชัยพานิช
	3. นางสาว เอื้ออารีย์ ไชยญา
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ วรรณา พรเศรษฐคุณ

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง อนุมัติให้นับโครงงานนิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต

(ผศ.เนาวรัตน์ ปานแย้ม) หัวหน้าภาค

คณะกรรมการโครงงานนิเศษ

(ผศ.เนาวรัตน์ ปานแย้ม) ประธานกรรมการ

(อ. อรไท สุขเจริญ) กรรมการ

(ผศ. ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต) กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การผลิตเอนไซม์โบรมิเลนจากลำต้นสับปะรด
นักศึกษา	1. นางสาว แกนีรา แสงสุริยะ
	2. นางสาว สุทนี ติยะชัยนานิช
	3. นางสาว เอื้ออารีย์ ไชยญา
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ วรรณา พรเศรษฐคุณ
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา	1534 - 2535

บทคัดย่อ

การศึกษาเนื่อผลิตเอนไซม์โบรมิเลนจากลำต้นสับปะรดโดยทำการศึกษาเกี่ยวกับกรรมวิธีในการสกัด การตกตะกอนและความคงตัวของเอนไซม์ที่ผลิตได้โดยที่เอนไซม์โบรมิเลนนี้ จะมีกระจายตามส่วนต่าง ๆ ของสับปะรด ได้แก่ เปลือก แกน จุก ผล แต่จะพบมากที่สุดในลำต้น ลำต้นสับปะรดสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้ 30 วัน และห้องเย็น 14 วัน โดยไม่ทำปฏิกิริยา และการทำงานของเอนไซม์ก็ไม่เปลี่ยนแปลงทางสถิติ

การสกัดเอนไซม์จากลำต้นสับปะรดที่สับละเอียด โดยตีปนกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 2 นาที เปรียบเทียบการตกตะกอนเอนไซม์ที่สกัดได้ด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต เอธิลแอลกอฮอล์ และอะซีโตน พบว่าการตกตะกอนด้วยอะซีโตนเย็น 5 °ซ 2 ขั้นตอน คือ ครั้งแรกตกตะกอนด้วย อะซีโตนเข้มข้น 33 % เหวี่ยงแยกตะกอนออก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำสารละลายมาตกตะกอนอีกด้วยอะซีโตนเข้มข้น 56 % ที่ pH 4.3 จะได้ผลดีที่สุด

ความคงตัวของเอนไซม์ที่ผลิตได้ พบว่าการใช้โซเดียมเมตาไบซัลไฟท์ 0.06 % ลงในสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ก่อนตกตะกอน จะช่วยเพิ่มความคงตัวของเอนไซม์

สำหรับสภาวะการทำงานที่เหมาะสมของเอนไซม์ สามารถทำงานได้ดี pH เป็นกลาง คือ ประมาณ 7 และอุณหภูมิในช่วง 35 - 37 °ซ และความคงตัวในการทำงานของเอนไซม์จะอยู่ในช่วง pH เป็นกลางคือประมาณ 7 และอุณหภูมิ 40 - 50°ซ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title Production of enzyme bromelain from pineapple stem

Name 1. Nopaneera Sangsuriya
2. Suthanee Tiyachaipanich
3. Auer-aree Chaiya

Special Project Advisor Wanna Pornsettakul

Department Applied Biology

Acadamic Year 1991-1992

ABSTRACT

The study for produce enzyme bromelain from pineapple stem. In case of how to extract,precipitation and stability of the enzyme.Bromelain is distribute in many parts of pineapple for example fruit,peel,spindle,crown but most of them has found in stem. The stem can keep in room temperature about 3 days and 14 days in cold storage room. Under these condition it is have no change in activity of enzyme and not significant in statistic.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

To extract the enzyme from stem by mix the little pieces of stem with distilled water (use the ratio of 1:1)and then use blender at the highest velocity about 2 minutes. Comparison of the precipitation of the extract enzyme by ammonium sulfate, ethyl alcohol and acetone found that the best condition to precipitate enzyme is precipitation by two step cold acetone at 5°c under pH 4.3 .In the first step take acetone in enzyme soluble till the enzyme soluble have 33% acetone concentration. After seperate the solid take the liquid to treate in the secound step by take acetone in it till the concentration of acetone is about 56%.The enzyme have the best stability when take sodium metabisulfide 0.06% in the enzyme before precipitation.

Condition of the best activity of enzyme is when the range of pH about 7 and the range of temperature about 35-37°c. The stable activity of the enzyme is when the range of pH about 7 and the range of temperature about 40-50°c.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เนื่องด้วยความอนุเคราะห์อย่างยิ่งจาก อ.วรรษา พรเศรษฐคุณ ผู้เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา และ อ.ธรไท สุวเจริญ และ ผศ. ดร. ชรรชี ฐิตาภิชัย ผู้เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่ได้สละเวลาอันมีค่าให้คำปรึกษาและชี้แนวทางที่เป็นประโยชน์นอกจากนี้ผู้เขียนยังได้รับ ความอนุเคราะห์จาก ผศ.เนาวรัตน์ ปานแย้ม อ.วันชัย สุทธินุ่น ตลอดจนเจ้าหน้าที่ประจำ ภาควิชาชีววิทยา ประยุกต์ทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือในเรื่องต่าง ๆ ทำให้โครงงานพิเศษนี้ สามารถสำเร็จลงได้และบริษัท อาหารสยาม จำกัด อ.บ้านบึง จ.ชลบุรี ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ลำต้น สับปะรดในการศึกษา ซึ่งผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้

ท้ายสุดนี้ ผู้เขียนขอบพระคุณ เพื่อนนักศึกษา และท่านผู้มีอุปการะคุณที่มิได้กล่าวนามไว้ครบถ้วน ณ ที่นี้ ซึ่งได้ช่วยเหลือเป็นกำลังใจ กำลังความคิด ตลอดจนร่วมมือในเรื่องต่างๆ ทำให้โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

25 กุมภาพันธ์ 2535

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาไทย		ก
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาอังกฤษ		ข
กิตติกรรมประกาศ		ค
สารบัญตาราง		ง
สารบัญภาพ		จ
บทที่ 1	บทนำ	1
บทที่ 2	ตรวจเอกสาร	3
บทที่ 3	อุปกรณ์และวิธีการ	24
บทที่ 4	ผลและวิจารณ์ผล	35
บทที่ 5	สรุผลและข้อเสนอแนะ	55
ภาคผนวก		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

			หน้า
ตารางที่	1	เนื้อที่เพาะปลูกจำนวนผลิตผลและผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่ของสับปะรดในปีการเพาะปลูก 2515/16 ถึง 2524/25	6
ตารางที่	2	ชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของ STEM BROMELAIN	14
ตารางที่	3	คุณสมบัติและองค์ประกอบของน้ำที่สกัดได้จากลำต้นสับปะรด	18
ตารางที่	4	เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ในการสกัดด้วยสารสกัดชนิดต่างๆ ที่ระดับ pH ต่างๆกัน	36
ตารางที่	5	เปรียบเทียบการตกตะกอนโบรมิเลนโดยสารตกตะกอนชนิดต่าง ๆ	41
ตารางที่	6	เปรียบเทียบปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์และปริมาณโปรตีน ในการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยอะซีโตน 2 ขั้นตอน	42
ตารางที่	7	เปรียบเทียบผลของpH ต่อปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนในการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยอะซีโตน 2 ขั้นตอน	43
ตารางที่	8	เปรียบเทียบการใช้สารคงตัว 2 ชนิด คือ โซเดียมซัลไฟต์ และโซเดียมเมตาไบซัลไฟท์ กับการไม่ใช้สารคงตัวเป็นเวลา 0 และ 20 วัน	46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

			หน้า
ภาพที่	1	ส่วนต่างๆ ของสับปะรด	8
ภาพที่	2	ลำต้นสับปะรดที่เป็นแหล่งของเอนไซม์โบรมิเลน	12
ภาพที่	3	แผนภาพตัดของลำต้นสับปะรด	13
ภาพที่	4	ผลของ pH ต่อการสกัดเอนไซม์โบรมิเลนจากลำต้นสับปะรด	37
ภาพที่	5	เปรียบเทียบปฏิกิริยาของเอนไซม์โบรมิเลนที่สกัดด้วยน้ำกลั่น pH 7 และ 0.05 โมลาร์ ซิเตรตฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 4.4	39
ภาพที่	6	ผลของ pH ในการตกตะกอนเอนไซม์โบรมิเลนจากลำต้นสับปะรด	44
ภาพที่	7	เปรียบเทียบการใช้สารคงตัว 2 ชนิดคือ โซเดียมซัลไฟต์ และโซเดียมเมตาไบซัลไฟท์ กับการไม่ใช้สารคงตัวในระยะเวลา 0 และ 20 วัน	47
ภาพที่	8	เปรียบเทียบอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์โบรมิเลน	49
ภาพที่	9	เปรียบเทียบ pH ที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์โบรมิเลน	50
ภาพที่	10	เปรียบเทียบความคงตัวของเอนไซม์โบรมิเลนที่อุรหภูมิต่างๆ	53
ภาพที่	11	เปรียบเทียบความคงตัวของเอนไซม์โบรมิเลนที่ pH ต่างๆ	54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

สับปะรดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย มีปริมาณการผลิตมากกว่า 2 ล้านตันทำรายได้เข้าประเทศไม่น้อยกว่า 2,000 ล้านบาท แม้ว่าจะมีอุตสาหกรรมสับปะรดกระป๋องเป็นที่รองรับวัตถุดิบเหล่านี้แล้วก็ตาม แต่ในการผลิตสับปะรดกระป๋อง ใช้สับปะรดเพียง 30% ของผลสับปะรดเท่านั้นส่วนอีก 70% เป็นส่วนเหลือทิ้ง และอีกประการหนึ่งชาวไร่จะตัดต้นสับปะรดทิ้งทุก ๆ 3 ปี เพื่อปลูกสับปะรดรุ่นใหม่ต่อไป ดังนั้นจึงทำให้มีส่วนเหลือทิ้งมากมาย แม้ว่าในปัจจุบันได้มีการนำส่วนเหลือทิ้งมาใช้ประโยชน์ใหม่มากมายแล้ว แต่ส่วนของลำต้นก็ยังเป็นส่วนที่เหลือทิ้งที่นำมาใช้ประโยชน์ได้น้อย จึงนำมาทำการผลิตเอนไซม์โบรมิเลน

การสกัดเอนไซม์ทำโดยการบด และมีส่วนที่เป็นน้ำออกมาแล้วกรองส่วนที่ไม่ละลายออกไป นำส่วนใสมาตกตะกอนเอนไซม์ด้วย สารเคมี ที่เหมาะสม แล้วนำตะกอนมาทำให้แห้ง บด ก็จะได้เอนไซม์โบรมิเลนผงที่มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นโปรติเอส ซึ่งมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารประเภทโปรตีน

เอนไซม์โบรมิเลนเป็นเอนไซม์ที่ใช้กันมากในอุตสาหกรรมอาหาร ยา เครื่องสำอาง ฟอกหนัง และอุตสาหกรรมเกษตรอื่น ๆ ซึ่งมักจะสั่งซื้อมาจากต่างประเทศ ดังนั้นเราจึงจำเป็นต้องศึกษาปรับปรุงถึงวิธีกรรมวิธีการผลิต เอนไซม์จากลำต้นสับปะรดในประเทศไทย เพื่อให้ได้ข้อมูลมาเป็นแนวทางในการผลิตเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์

1 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสม ในการสกัดและการตกตะกอนเอนไซม์โบรมิเลนจากลำต้นสับปะรด

2 เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์โบรมิเลน

3 เพื่อศึกษาสภาวะความคงตัวของเอนไซม์โบรมิเลนเมื่อการเก็บรักษา

4 เพื่อศึกษากรรมวิธีในการทำให้เอนไซม์โบรมิเลน มีความเข้มข้นสูงขึ้นในสภาพผงแห้งนอกจากนี้ทั้งศึกษาพื้นฐานและองค์ประกอบบางประการของเอนไซม์โบรมิเลนที่ผลิตได้ในรูปผงแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

ลักษณะทั่วไปและความสำคัญของสับปะรด

สับปะรด(pineapple)เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวประเภทล้มลุก วงศ์ บรอมิเลียซีอี (FAMILY BROMELIACEAE) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า Ananas comosus (L.)Merr.เป็นพืชพื้นเมืองที่มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกา ได้ค้นพบครั้งแรกโดยคริสโตเฟอร์ โคลัมบัส ในปีค.ศ. 1493 พบว่ามีการปลูกสับปะรดในบริเวณอัสสัม พม่าและไทยมาตั้งแต่ปี พ.ศ.2223-2243 (Collins , 1968) สับปะรดปลูกได้ในดินแทบทุกชนิด แต่ขึ้นได้ในดินร่วนปนทรายที่มีสภาพค่อนข้างเป็นกรด พันธุ์สับปะรดที่ปลูกกันเป็นการค้านั้นพอจะแยกออกได้เป็น 3กลุ่มใหญ่ ๆ ด้วยกันคือ

(1) กลุ่ม Queen เป็นสับปะรดที่มีผลค่อนข้างเล็ก แต่มีรสหวานเนื้อละเอียด ใช้ปลูกเพื่อบริโภคสดได้ดี สับปะรดในกลุ่มนี้ได้แก่ พันธุ์ภูเก็ต หรือสิงค์โปร์

(2) กลุ่ม Spanish เป็นสับปะรดที่มีผลขนาดเล็กถึงขนาดกลาง สีแสดปนส้มมีรสเปรี้ยวและเส้นใยมาก เปอร์เซนต์กรดและน้ำตาลค่อนข้างต่ำ ส่วนใหญ่ใช้บริโภคสด ได้แก่ พันธุ์อินทรชิต (เทพรส) และพันธุ์ขาว

(3) กลุ่ม Cayenne เป็นสับปะรดกลุ่มที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรม โดยเฉพาะอุตสาหกรรมกระป๋อง เนื่องจากผลมีเปอร์เซนต์กรดและน้ำตาลค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับสับปะรดในกลุ่มอื่น ๆ สับปะรดในกลุ่มนี้ ได้แก่ พันธุ์ปัตตาเวีย (Smooth Cayenne) หรือที่เรียกกันทั่วไปว่า พันธุ์สรีราชา หรือพันธุ์ปราณบุรี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พันธุ์สับปะรดที่ปลูกเพื่อเป็นการค้า ซึ่งจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญอย่างหนึ่งของประเทศไทย ได้แก่พันธุ์ปัตตาเวีย ซึ่งสามารถปลูกได้ทุกภาคของประเทศไทย แต่แหล่งปลูกที่สำคัญ โดยพิจารณาจากแหล่งที่ตั้งของโรงงานอุตสาหกรรมสับปะรดกระป๋องสามารถแบ่งเป็น 3 เขตคือ เขตจังหวัดประจวบคีรีขันธ์และเพชรบุรี เขตจังหวัดชลบุรี และระยอง และเขตจังหวัดลำปาง โดยเขตที่ผลิตสับปะรดที่มากที่สุดในประเทศ คือเขตจังหวัดประจวบคีรีขันธ์และเพชรบุรี ซึ่งผลิตได้ประมาณร้อยละ 70 ของผลผลิตทั้งประเทศ (กรมส่งเสริมการเกษตร,2525) และในช่วงระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมา ปริมาณการผลิตสับปะรดของไทยได้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว กล่าวคือในช่วงปี 2515/16 ถึง 2524/25 เนื้อที่ปลูกสับปะรดทั้งประเทศ
เพิ่มขึ้นจาก0.27 ล้านไร่เป็น 0.52 ไร่และผลผลิตเพิ่มขึ้นจาก 0.81 ล้านตันเป็น 1.99 ล้านตัน สับปะรดส่วนใหญ่จะนำมาแปรรูปเป็นสับปะรดกระป๋องเพื่อส่งออกไปจำหน่ายต่างประเทศ ซึ่งนำเงินเข้าประเทศจาก 44 ล้านบาทในปี 2515 เป็น 2,039 ล้านบาทในปี 2525 (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2525)

ระบบการปลูกสับปะรดที่นิยมใช้กันอยู่มี 2 ระบบ คือระบบ 4 ปี (ไว้หน่อครั้งเดียว) สามารถเก็บผลได้ 2 ครั้ง และระบบ 5 ปี (ไว้หน่อ 2 ครั้ง) ซึ่งเก็บผลได้ 3 ครั้งโดยสับปะรดที่ให้ผลครั้งแรกเรียกว่า สับปะรดรุ่น 1(mother หรือ first crop) ซึ่งจะเก็บผลเมื่ออายุประมาณ 18 เดือน สับปะรดรุ่นต่อไปเรียกว่า สับปะรดตอ 1 และตอ 2(first และ second ratoon crop) ซึ่งจะเก็บผลเมื่อปลูกไว้ประมาณ 3 ปี และ 4.5 ปี แต่ขนาดของผลผลิตจะลดลงตามลำดับขึ้น (Collins ,1968) ซึ่งแผนภาพแสดงการเจริญเติบโตดังภาพที่ 1 หลังจากเก็บผลไปแล้วทำให้มีวัสดุเหลือทิ้งจากไร่สับปะรดมากได้แก่ ใบและลำต้น โดยส่วนใบสามารถนำมาผลิตเป็นเส้นใย (fibers) และเยื่อกระดาษ(paper products) ได้ ส่วนลำต้นสับปะรดซึ่งนับว่าเป็นส่วนเหลือทิ้งจากไร่ที่มีปริมาณมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นับเป็นล้านตันต่อปีขึ้นไปนั้น เป็นแหล่งที่มีเอนไซม์โบรมิเลนอยู่สูงสามารถนำมาผลิตเอนไซม์ดังกล่าวได้ แต่ยังไม่มีงานวิจัยในด้านนี้มากนัก (Collins,1968)

ส่วนเศษเหลือของผลในระหว่างการทำอุตสาหกรรมบรรจุกระป๋องได้แก่ แกน เปลือก ก้าน ใบ และลำต้นสามารถนำมาทำเป็นผลผลิตพลอยได้หลายอย่างเช่น น้ำเชื่อม (sugar surup) แอลกอฮอล์ น้ำส้มสายชู ไวน์ อาหารสัตว์ เส้นใยและเยื่อกระดาษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 เนื้อที่เพาะปลูก จำนวนผลิตผล และผลัสลิกเฉลี่ยต่อไร่ของสับปะรด ในปีการเพาะปลูก 2515/16 ถึง 2524/25

ปีเพาะปลูก	เนื้อที่เพาะปลูก	ผลผลิต (x 1000 ตัน)	ผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่ (กก.)
2515/16	3,097	572.0	1,859
2516/17	3,298	859.5	2,627
2517/18	3,731	1,112.4	3,022
2518/19	4,029	1,354.2	3,440
2519/20	4,847	2,245.2	4,654
2520/21	5,511	2,141.4	3,914
2521/22	6,578	3,114.4	4,839
2522/23	6,290	2,895.8	4,752
2523/24	7,999	2,130.2	3,895
2524/25	5,145	2,446.6	4,779

ที่มา: กรมส่งเสริมการเกษตร (2525)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนประกอบของสับปะรด

ต้นสับปะรดประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ที่สำคัญดังนี้ (ภาพที่ 1)

1 จุก (Crown) อยู่ส่วนบนของผล ประกอบด้วยใบสั้น ๆ อัดกันแน่นใช้ปลูกขยายพันธุ์ได้ดีคล้ายหน่อ

2 ผล จัดเป็นผลรวม (multiple fruit)มีรูปร่างทรงกระบอก เกิดจากการเชื่อมติดกันของผลย่อย (จำนวน100-200 ผล) เข้ากับแกนกลางของช่อดอก

3 ใบ (leaf) ลักษณะแข็ง ยาว แหลม ท่อเป็นร่องคล้ายรางน้ำ ติดกับก้านผลและลำต้น จำนวนใบโดยเฉลี่ย 70-80 ใบ ภายในใบมีเซลพิเศษทำหน้าที่เก็บสำรองน้ำเอาไว้เวลาแห้งแล้ง

4 ลำต้น (stem) มีรูปร่างคล้ายกระบอง ยาวประมาณ 20-50 ซม.ประกอบด้วยปล้องสั้น ๆ และใบจากมาก ความยาวของปล้อง 1-6 ซม.ปล้องที่ยาวที่สุดจะอยู่ในปริมาณกึ่งกลางของลำต้น ส่วนตาจะติดอยู่ที่บริเวณโคนใบ

5 หน่อดิน (underground sucker) เป็นหน่อที่เกิดจากตาบนลำต้นที่อยู่ใต้ผิวดิน มีจำนวนน้อย รูปกรงเล็กเรียว ใบยาวกว่าหน่อข้าง

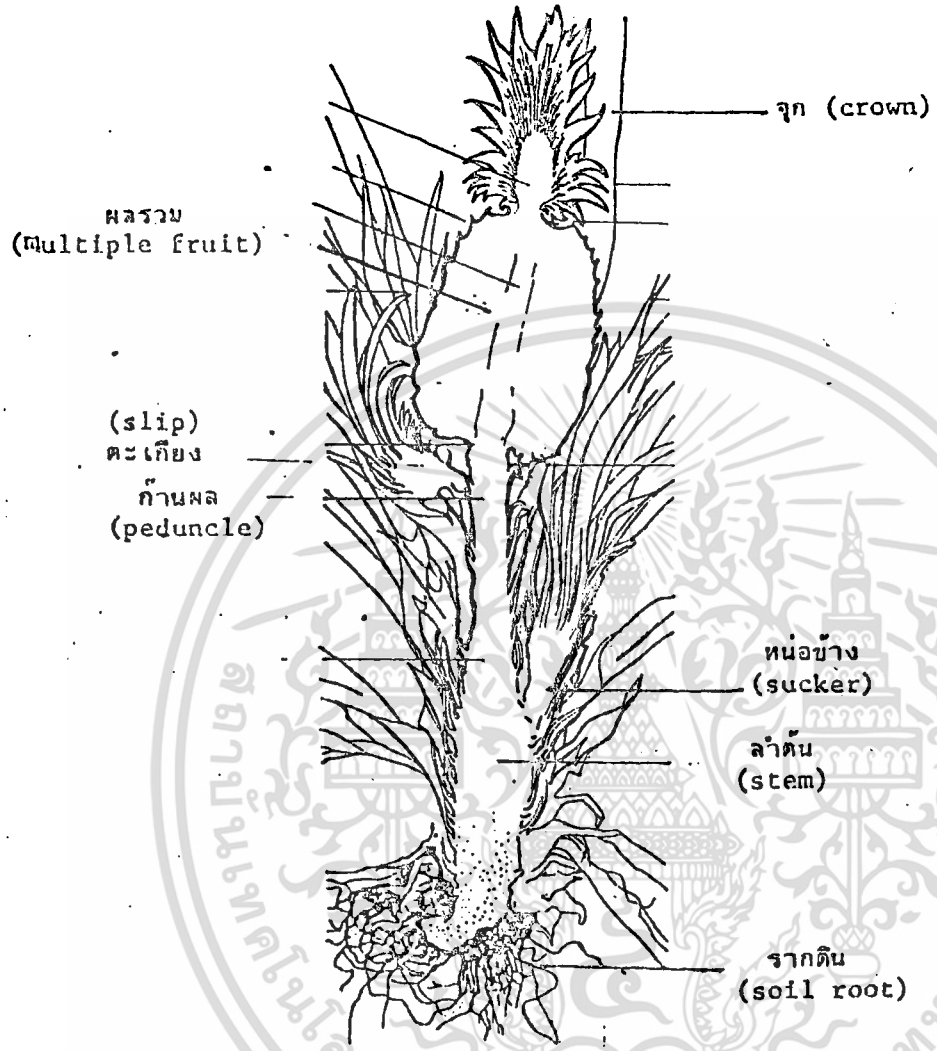
6 หน่อข้าง (aerial sucker) เป็นหน่อที่เกิดจากตาบนลำต้น ใช้ขยายพันธุ์ได้ดี

7 ราก (root) อาจแบ่งได้เป็น 2 พวก คือ รากที่เหนือดินที่อยู่ตามลำต้น ใบ กาบใบ และรากในดินที่เกิดจากลำต้นใต้ดิน ทำหน้าที่หาอาหารและยึดเหนี่ยวลำต้น

8 ก้านผล (peduncle) คือก้านผลซึ่งผลที่มีใบเล็ก ๆ ติดอยู่เชื่อมติดกับส่วนบนของลำต้น

9 ตะเกียง (slip) คือหน่อที่เกิดจากภายในบริเวณจุดเชื่อมระหว่างก้านผลและลำต้นใช้ขยายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 1 ส่วนต่างๆ ของสับปะรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สัณฐานวิทยาและกายวิภาคของลำต้นสับปะรด

ลำต้นสับปะรดส่วนใหญ่มีรูปร่างคล้ายตะบอง ยาวประมาณ 20-35 ซม.มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ2-3.5 ซม. (ภาพที่ 2)บริเวณถัดจากยอดลงมาเล็กน้อยจะเป็นส่วนที่กว้างที่สุด คือ ประมาณ 5.5-6 cm. ลำต้นส่วนที่อยู่เหนือดินจะมีลักษณะตั้งตรง แต่ส่วนที่อยู่ใต้ดินจะมีลักษณะโค้งงอไปด้านใดด้านหนึ่งโดยเฉพาะหากเจริญจากหน่อหรือตะเกียงที่ติดกับต้นแม่ แต่หากเป็นส่วนที่เจริญจากจุกแล้วจะมีลักษณะตั้งตรง (ม.ล.จารุพันธุ์ ,2525)

เมื่อตัดลำต้นสับปะรดออกตามแนวขวาง สามารถแบ่งลำต้นสับปะรดออกเป็น 2 ส่วน คือ stele และ cortex (Collins,1968)ดังแสดงในภาพที่ 3 กล่าวคือ stele เป็นเนื่อเยื่อของลำต้นส่วนที่อยู่ชั้นในสุดประกอบด้วยเซลพาเรนไคมาเบียดตัวกันแน่นภายในเซลเหล่านี้จะมีเม็ดแป้งอยู่ด้วย และระหว่างเซลจะมีผลึกแคลเซียมออกซาเลทอยู่ด้วยส่วน cortex นั้นจะอยู่ระหว่างชั้น stele และอีพิเดอร์มิส

เอนไซม์โบรมิเลนและการเรียกชื่อเอนไซม์

เอนไซม์โบรมิเลนเป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการเร่งปฏิกริยาการย่อยโมเลกุลของสารประเภทโปรตีน จัดอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์พวกที่มีกลุ่มซัลไฟดริลอยู่ในบริเวณเร่ง (sulfhydryl protease) เช่นเดียวกับเอนไซม์ปาเปนจากมะละกอ และเอนไซม์ฟิซินจากมะเดื่อ (Murachi, 1964) เป็นเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซล (intracellular enzyme) พบในเนื่อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของพืชวงศ์มิเลียซิอี้ เอนไซม์ชนิดนี้มีลักษณะเป็นโกลโคโปรตีน (glycoprotein) นอกจากเป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการเร่งปฏิกริยาการย่อยโปรตีนและเปปไตด์แล้ว ยังสามารถเร่งการย่อยสารพวกเอมีด(amide) และเอสเทอร์ (seter) ของกรดอะมิโนและเปปไตด์ด้วย (Murachi and Neurath, 1964)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สิชในวงศ์บรอมิเลียชีอีล้วนแต่มีเอนไซม์ที่มีความสามารถในการเร่งปฏิกริยาการย่อยสารประเภทโปรตีนด้วยกันทั้งสิ้น เพื่อตัดปัญหาความยุ่งยากในการเรียกชื่อเอนไซม์ Heinicke (1953) จึงรวมเรียกชื่อทั่ว ๆไป ของเอนไซม์ที่มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของสารประเภทโปรตีนที่พบในเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของพืชชนิดต่าง ๆ ในวงศ์บรอมิเลียชีอีนี้ว่า"โบรมิเลน"(Bromeline)แต่เพื่อให้การเรียกชื่อเอนไซม์มีความจำเพาะยิ่งขึ้น เพื่อบ่งบอกถึงส่วนของเนื้อเยื่อ สายพันธุ์ และสกุลของพืชในวงศ์บรอมิเลียชีอีดังกล่าว จึงมีการใช้ชื่อที่สมบูรณ์ (complete name) ขึ้น โดยจะมีการเติมคำนำหน้าระบุถึงสกุล สายพันธุ์ และส่วนของเนื้อเยื่อที่พบในเอนไซม์ดังกล่าว ตัวอย่างเช่น "Ananas comosus(L) Merr.variety , stem bromelain" ซึ่งหมายถึงเอนไซม์ที่มีความสามารถในการเร่งปฏิกริยาของย่อยสารโปรตีน พบในลำต้นของสับปะรดสายพันธุ์ Cayenne ซึ่งมักเรียกสั้น ๆ โดยทั่วไปว่า "stem bromelain " (Heinicke และ Cortner,1957) ปัจจุบันมักมีการใช้รหัสของEnzyme Commission ซึ่งเป็นรหัสของ Enzyme Commission ซึ่งเป็นรหัส 4 ตัว ตามหลังชื่อเอนไซม์ทั่ว ๆไป เช่น Bromelain (E.C.3.4.4.24) ซึ่งรหัส 4 ตัวนี้จะบ่งบอกถึงลักษณะของปฏิกิริยาการเร่งการย่อยของเอนไซม์นั้น ๆ (ตารางที่ 2)

แหล่งของเอนไซม์

โบรมิเลนเป็นเอนไซม์ที่พบในเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของพืชในวงศ์บรอมิเลียชีอีที่รู้จักกันดีคือ สับปะรด (Ananas comosus (L) Merr.) เอนไซม์ชนิดนี้พบครั้งแรกเมื่อประมาณสตวรรษที่ 19โดยChittenden (Heinicke,1957)ซึ่งพบในน้ำสกัดที่สกัดจากเนื้อเยื่อของผลสับปะรด ต่อมามีผู้รายงานว่าพบเอนไซม์เดียวกันนี้ในส่วนอื่น ๆ ของสับปะรดด้วย เช่น ก้าน เปลือก แกน ใบที่ผล ใบที่ลำต้น หน่อข้างลำต้น และลำต้น (Ota และคณะ 1961; Ota และคณะ ,1969; Su และคณะ 1975;อรวินทร์;2527) โดยเฉพาะในน้ำสกัดจากส่วนของลำต้นจะมีปริมาณของเอนไซม์สูงสุด (Heinicke,1953) โดยลำต้นสับปะรดที่มีความแก่อ่อนต่างกันจะมีปริมาณเอนไซม์ต่างกันลำต้นที่มีความแก่มากขึ้น

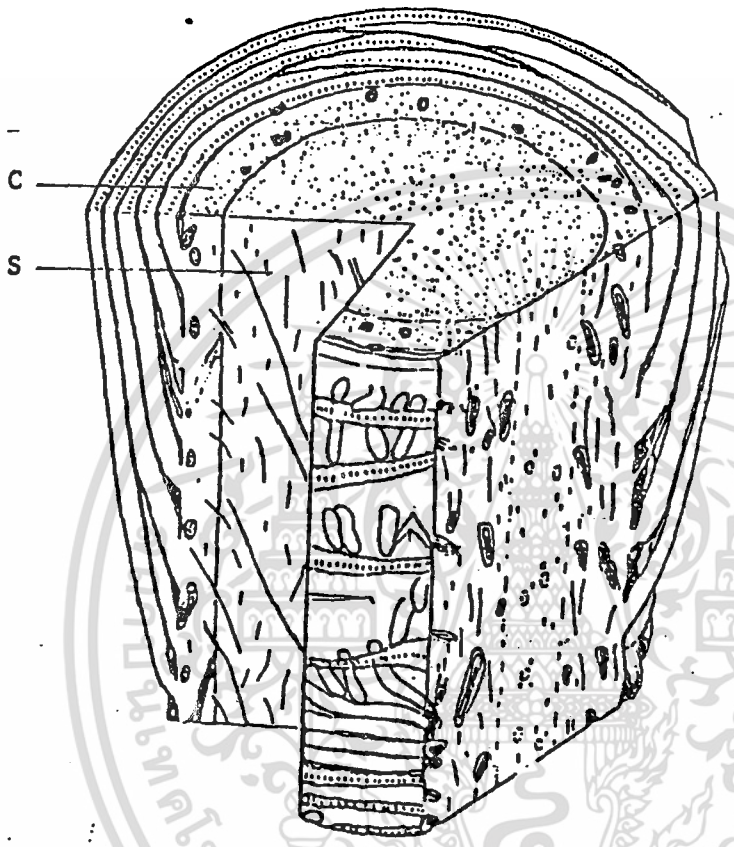
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะยิ่งมีปริมาณเอนไซม์มากขึ้น กล่าวคือต้นอายุ 3.5 ปี เอนไซม์ร้อยละ 53 ในขณะที่ต้นอายุ 2 ปี และ 1 ปี มีเอนไซม์อยู่ร้อยละ 36 และร้อยละ 11 ตามลำดับ ส่วนเนื้อเยื่อที่อ่อน (succulent) จะมีเอนไซม์อยู่ปริมาณเพียงเล็กน้อย (Heinicke and Gortner'1957)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 2 ลำต้นสับปะรดที่เป็นแหล่งเอนไซม์โบรมิเลน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3 แผนภาพตัดของลำต้นสับปะรดซึ่งประกอบด้วยเนื้อเยื่อที่สำคัญ 2 ส่วน คือ เนื้อเยื่อชั้นใน(stele หรือ central cylinder ; S) และเนื้อเยื่อชั้นนอก(cortex ; C)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Collins (1968)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 ชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของ Stem bromelain

ชนิดของกรดอะมิโน	จำนวนกรดอะมิโนต่อโมเลกุล	ชนิดของกรดอะมิโน	จำนวนกรดอะมิโนต่อโมเลกุล
ไขมัน	20	อะลานีน	30
ฮิสทีดีน	1	ซาฟ ซีสเตอีน	11
แอมโมเนีย	25	วาลีน	19
อาจินีน	10	เมโทโลนีน	4
กรดแอสพาติค	27	ไอโซลูซีน	20
ทรีโอนีน	12	ลูซิน	9
ซีรีน	24	ไทโรซีน	19
กรดกลูตามิค	20	เฟนิลอะลานีน	9
โปรลีน	13	ทริฟโตเฟน	8
ไกลซีน	29		
รวม	285		
เฮกโซซามีน	4		

ที่มา: Murachi, T. (1964)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิตเอนไซม์โบรมิเลนจากลำต้นสับปะรด

การผลิตเอนไซม์โบรมิเลนนิยมใช้ลำต้นสับปะรดที่แก่จัดเป็นวัตถุดิบในการผลิตเนื่องจากเป็นส่วนเหลือทิ้งจากไร่ซึ่งมีปริมาณมากและเป็นส่วนที่มีปริมาณเอนไซม์อยู่สูงสุดด้วยเมื่อเปรียบเทียบกับส่วนอื่น ๆ (Heinicke,1961;Suและคณะ,19745;อรวินทร์,2527) ในกระบวนการผลิตเอนไซม์นี้ มีรายงานว่า ควรมีการปลิดใบ ราก และปอกเปลือกลำต้นออกก่อนการสกัดจะทำให้น้ำสกัดจากลำต้นสับปะรดมีปริมาณเอนไซม์สูง(Heinicke,1961) ซึ่งการปอกเปลือกอาจใช้วิธีทางฟิสิกส์หรือวิธีทางเคมีเช่นใช้สารเคมีช่วยในการปอกเปลือกด้วยก็ได้ ลำต้นที่ปอกเปลือกแล้วจะนำมาสกัดเพื่อแยกน้ำสกัดเอนไซม์ แต่เนื่องจากลำต้นสับปะรดมีแป้ง กาก และปริมาณของแข็ง (solid content) อยู่สูงประกอบกับเอนไซม์นี้เป็นเอนไซม์ส่วนที่อยู่ภายในเซล ดังนั้นการสกัดเอนไซม์ออกจากส่วนของลำต้นจึงทำได้ยากวิธีสกัดเอนไซม์ส่วนที่อยู่ภายในเซล ดังนั้น การสกัดเอนไซม์ออกจากส่วนลำต้นจึงทำได้ยากวิธีสกัดเอนไซม์จากเนื้อเยื่อของพืชหรือสัตว์ที่ทำกันโดยทั่วไป เช่น การบดด้วยกราย การโฮโมจีไนซ์ด้วยเครื่องดีปน อาจไม่เพียงพอที่จะทำให้เซลแตกและปลดปล่อยเอนไซม์ออกมาจากเซลอย่างสมบูรณ์ได้ ในการสกัดเอนไซม์ออกจากเนื้อเยื่อต้นสับปะรดให้ได้ผลดีจำเป็นต้องอาศัยแรงเฉือนร่วมกับการใช้ความดันสูง ๆ อัดเนื้อเยื่อของลำต้นทำให้เซลแตกออกและปลดปล่อยเอนไซม์ออกมาให้ได้มากที่สุด ซึ่งวิธีการสกัดนั้นอาจกระทำได้หลายวิธี

Heinicke (1961)ใช้วิธีการอัดลำต้นสับปะรดที่ปลิดใบ ราก และปอกเปลือกเรียบร้อยแล้ว ผ่านเข้าเครื่องหีบแบบต่าง ๆเช่น sugar cane mill, hammer mill. stacomicer mill เป็นต้น แต่พบว่าการใช้เครื่องหีบอ้อยที่มีแกนหมุน 3 อัน (sugar cane three roll mill) จะสามารถสกัดเอนไซม์ออกจากลำต้นได้มากที่สุด คือสามารถบีบน้ำออกจากลำต้นได้ร้อยละ 36 ของน้ำหนักลำต้นที่ปอกเปลือกให้โปรตีนร้อยละ 0.38 และมีปฏิกริยาการทำงานของเอนไซม์ทั้งหมด (total activity) เท่ากับ 25,000 MCU (Milk Clotting Unit) ต่อปอนด์ นอกจากนี้ Su และคณะ(1975)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใช้วิธีอัดลำต้นสับประรดด้วยความดันประมาณ 1,020 บรรยากาศ (15000 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) แล้วเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 5° ซ. เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกน้ำสกัดเอนไซม์ออกมา

จากการศึกษาองค์ประกอบและคุณสมบัติของน้ำที่สกัดได้จากลำต้นสับประรดนี้พบว่าประกอบด้วยสารแขวนลอยต่างๆได้แก่ เม็ดแป้ง เซลพลาสติก ผลึกแคลเซียมออกซาเลท เศษเซล ไฟเบอร์ และสิ่งปนเปื้อนต่างๆนอกจากนี้ยังประกอบด้วยสารอื่น ๆ ที่ละลายอยู่ ได้แก่น้ำตาล เกลือแร่ สารประกอบโพลีแซคคาไรด์เชิงซ้อนต่าง ๆ โปรตีน และไขมัน เป็นต้น (Heinicke และ Gotner ,1975; Su และคณะ,1975) ดังนั้น จึงจำเป็นต้องแยกสารแขวนลอยและสิ่งปนเปื้อนต่าง ๆ ออกไปก่อนโดยนำไปปั่นแยก กรอง หรือปล่อยทิ้งไว้ให้ตกตะกอนอย่างอิสระ แล้วจึงนำส่วนใสที่ได้ไปใช้ในการทำให้เอนไซม์มีความเข้มข้นและความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นต่อไป

ส่วนที่ได้จากน้ำสกัดของลำต้นสับประรดจะนำมาทำให้เอนไซม์มีความเข้มข้นและความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ เมธิลแอลกอฮอล์ เอธิลแอลกอฮอล์ อะซีโตน หรือพวกเกลืออนินทรีย์ที่ละลายน้ำได้ เช่นแอมโมเนียมซัลเฟต โซเดียมคลอไรด์ เป็นต้น Heinicke (1961) ศึกษาการตกตะกอนเอนไซม์โบรมิเลนโดยใช้อะซีโตน โดยนำส่วนใสจากน้ำที่สกัดได้มาเติมสารรีดิวส์ซิ่ง (reducing agent) ลงไปในปริมาณ 0.005-0.01 โมลาร์ เพื่อเพิ่มปฏิกิริยาการทำงานและความคงตัวของเอนไซม์ สารรีดิวส์ซิ่งที่ใช้ได้แก่ ซิสเฟอร์ไดออกไซด์ ไฮโดรเจนซัลไฟด์ เกลือซัลไฟด์ที่ละลายน้ำเช่น โซเดียม แคลเซียม หรือ แอมโมเนียมซัลไฟด์ โซเดียมซัลฟ์ไฮเดรต เกลือไบซัลไฟต์ และไฮดรอกซิลามีน จากนั้นปรับ pH ของส่วนใสให้อยู่ในช่วง 3.5 - 5.5 แล้วจึงตกตะกอนเอนไซม์ด้วยอะซีโตน 2 ขั้นตอน โดยขั้นที่หนึ่งจะตกตะกอนด้วยอะซีโตนเย็น (ประมาณ 1° ซ) เข้มข้นร้อยละ 30-33 โดยปริมาณทั้งหมด เพื่อตกตะกอนโปรตีนส่วนนี้ทิ้งไป หลังจากนั้นจึงนำส่วนใสที่แยกตะกอนออกแล้วโดยใช้การเหวี่ยงหรือการกรอง มาตกตะกอนด้วยอะซีโตนเย็นร้อยละ 60-66 โดยปริมาณทั้งหมด จะได้ตะกอน เอนไซม์สีขาว นำไปทำแห้งโดยใช้เครื่องทำแห้งแบบแช่แข็ง (freeze dryer) แล้วนำมาบดจะได้เอนไซม์โบรมิเลนเข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ในสภาพผงแห้งที่มีปฏิกิริยาการทำงานประมาณ 300-2200 GDU (Gelatin Digestion Unit) ต่อกรัมมีปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ acid phosphatase ประมาณ 100-600 APU ต่อกรัมและมีสารอนินทรีย์ต่าง ๆ ได้แก่แมงกานีส โซเดียม โปแตสเซียม แคลเซียม รวมร้อยละ 20-60 (Heinicke,1961)

Suและคณะศึกษาพบว่าการตกตะกอนโบรมิเลนด้วยเอธิลอัลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 40-60 จะได้ตะกอนเอนไซม์สูงสุด หรืออาจตกตะกอนเอนไซม์เป็น 2 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนแรกอาจตกตะกอนด้วยแอมโมเนียซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ60 อุณหภูมิ 50°ซ แยกตะกอนเอนไซม์ออกด้วยเครื่องเหวี่ยงความเร็ว 6,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงตกตะกอนอีกครั้งด้วยแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 50 แล้วเอาไปทำแห้ง เอนไซม์ที่ได้สามารถเก็บไว้นาน 60 วัน โดยปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ลดลงเพียงร้อยละ 13 เท่านั้น นอกจากนี้ Chin และ Lin (1972) ยังศึกษาวิธีการตกตะกอนเอนไซม์โบรมิเลนโดยการใช้ กรดแทนนิก พบว่า การใช้กรดแทนนิกในช่วงความเข้มข้น 2-4 กรัมต่อลิตร จะเป็นช่วงที่ ตกตะกอนเอนไซม์ออกมาได้มากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 คุณสมบัติและองค์ประกอบของน้ำที่สกัดได้จากต้นสับปะรด

ความถ่วงจำเพาะ	1.02-1.03
ของแข็งที่ละลายได้ (กรัม/100 มล.ของน้ำสกัด)	5.2-2.4
ปริมาณไนโตรเจน (กรัม/100 มล. ของน้ำสกัด)	0.27
โปรตีนไนโตรเจน (กรัม/100 มล. ของน้ำสกัด)	0.14
น้ำตาล(ส่วนใหญ่เป็นโมโนแซคคาไลด์)(กรัม/100 มล. ของน้ำสกัด)	3.2-3.6
คาร์โบไฮเดรต (กรัม/ 100 มล. ของน้ำสกัด	1.6-2.8
เถ้า (กรัม/100 มล. ของน้ำสกัด)	0.7
pH ของน้ำสกัด	4.9-5.7

ที่มา : Su et al (1975)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากการทำให้เอนไซม์มีความเข้มข้นในสภาพผงแห้งแล้ว ยังสามารถทำให้เอนไซม์มีสภาพของเหลวได้อีกด้วย เทคนิคที่ใช้มีหลายวิธี เช่น การใช้เครื่องระเหยแบบสูญญากาศ การใช้แผ่นใยสังเคราะห์ได้แก่ ไดอะไลซิส (Dialysis) อุลตราฟิลเตรชั่น (Ultrafiltration) เป็นต้น โดยเฉพาะการทำให้เอนไซม์เข้มข้นขึ้นด้วยเทคนิคอุลตราฟิลเตรชั่นนั้นมีรายงานต่างๆ มากมายแต่เท่าที่ค้นคว้ายังไม่พบรายงานเกี่ยวกับการทำให้เอนไซม์โบรมิเลนจากลำต้นสับปะรดเข้มข้นขึ้นด้วยเทคนิคอุลตราฟิลเตรชั่น

ความเพิ่มความบริสุทธิ์ของเอนไซม์

ตามปรกติเอนไซม์ที่สกัดออกมาได้จะปนอยู่กับสารปนเปื้อนอื่น ๆ ทั้งในสภาพที่ไม่ละลายและละลายดังกล่าวแล้ว ในระหว่างกระบวนการผลิตเอนไซม์โบรมิเลนจึงจำเป็นต้องมีวิธีการกำจัดสารปนเปื้อนออกไปเช่น การปั่นแยกไฟเบอร์ เม็ดแป้งและสารแขวนลอยต่างๆ ออกจากน้ำสกัด หลังจากนั้นจึงนำเฉพาะส่วนใสมาตกตะกอนเอนไซม์ออกด้วยตัวทำละลายหรือเกลือที่เหมาะสม ผลสุดท้ายจะได้เอนไซม์โบรมิเลนออกมาในรูปผงแห้ง ซึ่งความบริสุทธิ์ที่ผลิตได้ยังไม่สูงนัก ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมบางประเภทได้ เช่น อุตสาหกรรมยา เป็นต้น ยิ่งไปกว่านั้นถ้าต้องการศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆของเอนไซม์โบรมิเลนเองโดยละเอียดจำเป็นอย่างยิ่งต้องเพิ่มความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่ผลิตได้ก่อนที่จะนำไปศึกษาเพื่อลดข้อผิดพลาดอันเกิดจากผลของสารปนเปื้อนต่างๆ ที่ปะปนลงมากับเอนไซม์ที่ผลิตได้

การศึกษาการเพิ่มความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โบรมิเลนเท่าที่มีรายงาน Murachi และ Neurath (1960) ได้ศึกษาการเพิ่มความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โบรมิเลนโดยการใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟฟีที่บรรจุด้วย Duolite CS 101 มี pH เท่ากับ 6.05 จะได้เอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยจะมีปฏิกิริยาการทำงานจำเพาะ (Specific activity) ของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 1.48 เท่าของเริ่มต้น ซึ่งเมื่อตรวจสอบด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอีเลคโตรฟอรีซีสที่มี pH เท่ากับ 7.4 พบว่า จะได้เอนไซม์บริสุทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปรากฏอยู่ 2 แถบซึ่งมีความสามารถในการเร่งปฏิกริยาการย่อยสลายสารประเภทโปรตีน โพลิเปปไตด์ และสารตั้งต้นสังเคราะห์ (synthetic substrate) ได้ แต่ต่างกันที่การเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า (eleatrophoretic mobility) ที่ pH เท่ากับ 7.4

ต่อมา El -Gharbawi และ Whitaker (1963) ได้ปรับปรุงวิธีของ Murachi และ Neurath (1980) โดยการผ่านสารละลายเอนไซม์โบรมิเลนที่ไม่บริสุทธิ์ (crude stem bromelain) ลงในคอลัมน์โครมาโตกราฟีที่บรรจุ Bio-Rex 70 ที่ pH 6.10 ปรากฏว่า สามารถแยกเอนไซม์ออกได้เป็น 5 ส่วน เมื่อทดสอบด้วยโซนอีเลคโตรฟอรีซีสบนเซฟฟาเด็กซ์จี -75 ก็จะให้เป็น 5 ส่วน เช่นกัน ซึ่งแต่ละส่วนจะมีความสามารถในการย่อยโปรตีนได้เช่นกัน Murchi และคณะ (1964) ได้ศึกษาพบว่า สามารถทำให้เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานได้สูงขึ้น โดยการนำเอนไซม์มาผ่าน Gel Filtration และ ion exchange chromatography เริ่มจากเอนไซม์ที่ไม่บริสุทธิ์ 10 กรัม จะได้ เอนไซม์บริสุทธิ์ 0.87 กรัม ซึ่งมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.43 เท่าเมื่อตรวจสอบด้วยอีเลคโตรฟอรีซีสและอุลตราเซนตริฟิวเตรชั่น พบว่าจะได้เอนไซม์บริสุทธิ์เพียงแถบเดียว

Heinicke (1969, 1970) ทำให้เอนไซม์โบรมิเลนที่ผลิตได้มีความสมบูรณ์เพิ่มขึ้นโดยการผ่านน้ำสกัดเอนไซม์จากลำต้นสับปะรดลงใน cation exchange resin coluan ที่มีแอมโมเนียมไอออน(NH^+_4) เป็นตัวแลกเปลี่ยนในช่วง pH เท่ากับ 4.0-5.7 ก่อนแล้วจึงตกตะกอนเอนไซม์ด้วยอะซิโตนจะทำให้เอนไซม์โบรมิเลนที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากเป็นการกำจัดสารปนเปื้อนโดยเฉพาะพวกเกลือแร่โลหะที่มีประจุบวก (cation) ที่ปะปนลงมามากในขณะตกตะกอนเอนไซม์ด้วยอะซิโตน

นอกจากนี้ Harland และคณะ (1969) ได้ศึกษาวิธีการเพิ่มความบริสุทธิ์โดยการนำเอาเอนไซม์ที่ไม่บริสุทธิ์มาละลายแล้วปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 3-6 แล้วเติมแมกนีเซียมออกไซด์หรือแมกนีเซียมไฮดรอกไซด์ ปรับpHเป็น 8-10 จะทำให้เกิดการจับกัน (flocculation) ของสารปนเปื้อน ซึ่งสามารถกรองออกได้ด้วยสารช่วยกรอง (filter aid) เช่น ไดอะโตมาเซียสเอิร์ท จะทำให้สารละลายเอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การรักษาความคงตัวของเอนไซม์

เอนไซม์จัดเป็นสารชีวโมเลกุลพวกโปรตีนชนิดหนึ่งที่มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสารตั้งต้นเฉพาะได้ แต่ความสามารถอันนี้จะคงอยู่ในช่วงระยะเวลาหนึ่งเท่านั้นถ้าอยู่ในสภาพที่ไม่เหมาะสมอาจมีผลทำให้เอนไซม์สูญเสียความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสารตั้งต้นได้ ความคงตัวของเอนไซม์จึงสำคัญมาก โดยเฉพาะเพื่อจุดประสงค์ในการผลิตเอนไซม์เพื่อการค้าแล้ว จำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องคำนึงถึงความคงตัวของเอนไซม์ ในระหว่างการเก็บรักษาเป็นประการสำคัญ ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีความสามารถในการรักษาปฏิกิริยาการทำงานไว้ได้แตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของเอนไซม์ วิธีการผลิต และสภาวะในการเก็บรักษา (Wiseman, 1978)

เอนไซม์โบรมิเลนเมื่อเก็บไว้จะมีการสูญเสียความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสารประเภทโปรตีนไปเช่นกัน จึงมีการศึกษาวิธีการรักษาความคงตัวของเอนไซม์โบรมิเลนขึ้น Heinicke (1961) พบว่า การพ่นฟองก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ลงไปในน้ำสกัดเอนไซม์จากลำต้นสับประรดจนอิ่มตัวจะช่วยรักษาปฏิกิริยาและความคงตัวของเอนไซม์โบรมิเลนได้ดีขึ้น นอกจากนี้ยังมีการใช้สารพวกรีดิวส์ซิ่งอื่นๆ เป็นตัวช่วยรักษาความคงตัวของเอนไซม์ เช่น ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ เกลือซัลไฟด์ที่ละลายน้ำ อาจเป็นเกลือโซเดียม แคลเซียม หรือแอมโมเนียมซัลไฟด์ และไฮดรอกซีลามีน หรืออาจใช้สารรักษาความคงตัวอื่นๆ ก็ได้ แต่สารนั้นถ้าจะใช้ทางการค้า นอกจากจะมีคุณสมบัติในการช่วยรักษาความคงตัวของเอนไซม์ให้ดีแล้ว ควรมีราคาถูกและไม่เป็นพิษอีกด้วย เช่น Heinicke (1966) พบว่าสามารถใช้เบนโซเอทเป็นสารเพิ่มความคงตัวได้โดยอาจอยู่ในรูปกรดเบนโซอิก รูปเกลือโซเดียมโปตัสเซียม แอมโมเนียม แคลเซียม แมกนีเซียม ลิเทียมเบนโซเอทหรือรูปอื่นๆและกรดซาลิไซลิก กรดนิโคอะซิดิกเป็นต้น ซึ่งสารดังกล่าวเหล่านี้สามารถช่วยทำให้เอนไซม์มีความคงตัวเพิ่มขึ้นได้ โดยอาจเติมในช่วงสกัดเอนไซม์ เติมในน้ำสกัดเอนไซม์ หรือเติมในตะกอนเอนไซม์เปียกก่อนทำแห้ง และจากรายงานของ Wiseman (1978) พบว่าโพลีเอธิลีนไกลคอลกับเกลือของตะกั่วและแบเรียมสามารถช่วยกระตุ้นและรักษาความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คงตัวของเอนไซม์ แต่ไม่ควรใช้กับอาหารเนื่องจากอาจได้รับพิษจากสารดังกล่าว

คุณสมบัติทางเคมีของเอนไซม์โบรมิเลน

เอนไซม์โบรมิเลนเป็นสารประกอบประเภทไกลโคโปรตีน โดยมีส่วนโมเลกุลของโอลิโกแซคคาไรด์หนึ่งกลุ่มต่อหนึ่งโมเลกุลของเอนไซม์ ในหนึ่งกลุ่มนี้จะมีน้ำตาลแมนโนส 3 โมล กลูโคส 1 โมล ไซโลส 1 โมล และ แอล-อะซิติลกลูโคซามีน 2 โมล ซึ่งจับอยู่กับสายเปปไตด์ด้วยพันธะโจวาเลนต์ (Murachi และคณะ, 1967; Scocca และ Lee,1969;Yasuda และคณะ,1970) สำหรับชนิดและปริมาณกรดอะมิโนในโมเลกุลโบรมิเลน 1โมเลกุลประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 285 ตัวและเฮกโซซามีน 4 โมเลกุล มีกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติเป็นเบสอยู่จำนวนมากกว่าพวกที่เป็นกรด (Murachi, 1964) ในโมเลกุลจะมีไกลซีน (glycine) อยู่ทางด้าน C-terminal และมีวาลีน (valine) อยู่ทางด้านN-terminalโมเลกุลประกอบด้วยdisulfide bridge 5ตำแหน่งต่อโมเลกุล แต่จะมีกลุ่มซัลไฟดริลเพียง 1 กลุ่มต่อโมเลกุลเท่านั้น ซึ่งจำเป็นสำหรับเร่งปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์นี้ (Murachiและ Yasui, 1965; Murachi, 1964) และถ้าเป็นเอนไซม์ที่ไม่บริสุทธิ์ (crude bromelain) ซึ่งผลิตขึ้นโดยการตกตะกอนด้วยอะซีโตนนั้น พบว่า จะมีสารประกอบอื่น ๆ ได้แก่เอนไซม์ชนิดอื่น ๆ ได้แก่ เอนไซม์ชนิดอื่น เช่น acid phosphatase รวมถึงสารประกอบคอลลอยด์ เกลืออนินทรีย์ และสารอินทรีย์อื่น ตกตะกอนลงมากับเอนไซม์ด้วย (Heinicke และGortner, 1957)

คุณสมบัติทางกายภาพของเอนไซม์โบรมิเลน

เอนไซม์โบรมิเลนจากลำดับสับปะรดจัดเป็นโปรตีนพวกมีคุณสมบัติเป็นเบส (basic protein) สามารถละลายน้ำได้ ไม่ละลายในแอลกอฮอล์ อะซีโตน มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 33,000 (Ota และคณะ, 1964; Murachi และคณะ, 1964)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ปาเปนจากมะละกอ พบว่า เอนไซม์โบรมิเลนจะมีคุณสมบัติเป็นเบสมากกว่า และโมเลกุลมีขนาดใหญ่กว่าปาเปนประมาณ 1.5 เท่า มีค่าคงที่ของการตกตะกอน (sedimentation constant, $S^{\circ}_{20,w}$) เท่ากับ 2.73 S ค่าคงที่ของการแพร่(diffusion constant,$D^{\circ}_{20,w}$)เท่ากับ 7.77×10^{-7} ตารางเซนติเมตรต่อวินาที (Murachi และคณะ, 1964) โมเลกุลจะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงร่างอย่างถาวรเมื่ออยู่ในสภาพที่ pH สูงกว่า 10.3(Murachi และ Yamazaki, 1970)

คุณสมบัติการทำงานของเอนไซม์โบรมิเลน

เอนไซม์โบรมิเลนจากลำดับสับปะรดมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสารประเภทโปรตีนได้เช่นเดียวกับเอนไซม์ปาเปน ฟิซิน จัดเป็นเอนไซม์ที่มีกลุ่มซัลไฟดริลในบริเวณเร่งโดยการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสารตั้งต้นนั้นจะใช้กลุ่มไธออล(thiol group) และกลุ่มอิมิดาโซล(imidazole group)ที่บริเวณเร่ง เป็นตัวทำให้เกิดการย่อยพันธะของสารตั้งต้น นอกจากโบรมิเลนจะสามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสารพวกโปรตีนแล้ว ยังสามารถย่อยพวกเปปไทด์ เอมีด เอสเทอร์ของกรดอะมิโนและเปปไทด์ได้ด้วย เช่น benzoyl-L-arginine ethyl ester(BAEE),benzoy-L-arginine amide(BAA) และL-tyrosine ethyl ester(Murachi และ Neurath,1964)เอนไซม์โบรมิเลนมีคุณสมบัติในการย่อยสารตั้งต้นต่างจากเอนไซม์ฟิซินและปาเปนที่ตำแหน่งที่เข้าย่อย โดยโบรมิเลนเข้าย่อยพันธะระหว่าง Arg-Ala และ Ala-Glu แต่ไม่สามารถเข้าย่อยพันธะที่เชื่อมระหว่างArg-Arg และ Lys-Tyr (Murachi และ Neurath, 1964) เอนไซม์โบรมิเลนเป็นเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยเคซีนและฮีโมโกลบินได้อย่างรวดเร็ว สภาวะที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์นั้นจะมี pH เท่ากับ 7.0เมื่อใช้เคซีนเป็นสารตั้งต้นและ pH เท่ากับ 5.0เมื่อใช้เจลาตินเป็นสารตั้งต้น อุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 63-65° ซ. (Ball และคณะ,1941;Ota และคณะ, 1966661; Inagami และ Murachi, 1963; Reed, 1966; Glazer และSmith, 1971; Whitaker, 1972; Lener; กัลยา, 2520) เอนไซม์นี้สามารถทำลายด้วยอุณหภูมิที่อุณหภูมิสูงกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

70° ซ. มีความคงตัวในช่วง pH เท่ากับ 3.0-3.5 เมื่อ pH ต่ำกว่า 2.5 เอนไซม์จะไม่คงตัว (Su และคณะ , 1975)

เอนไซม์โบรมิเลนสามารถเร่งให้มีปฏิกริยาการทำงานให้สูงขึ้นได้ด้วยสารเร่งปฏิกริยา (activator) หลายชนิด ได้แก่ ไซยาไนด์ EDTA ซีสเตอีน 2 - เมอร์แคปโตเอธานอล ไดโธโอกรีอิทอล (Murchi และ Neurath , 1960; Murchi และ Neurath, 1964 Murachi และ Yasai, 1965;โชคชัย, 2527) สารที่มีผลต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โบรมิเลนแบบย้อนกลับได้ (reversible inhibitor)ได้แก่สารประกอบอินทรีย์ของเมอร์คูริค สารประกอบอนินทรีย์ของเมอร์คูริค และเตตราไธโอเนท (Murachi และ Neurath, 1964; Ota และ Stein, 1964; Murachi และ Yasui 1965; Murachi, 1970;โชคชัย 2527)ส่วนสารที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แบบถาวร (irreversible inhibior) โดยจะจับกับหมู่ซัลไฟดริล (SH group) ของเอนไซม์ที่บริเวณเร่ง ได้แก่ N-ethyl maleimide , N-(4-dimethyl 3,5 dintrophenyl maleimide (DDPH) , monoiodoacetic acid และ 1,3 dibromoacetone (Murachi และคณะ, 1967; Murachi และ Katom, 1967)

<u>การตรวจสอบปฏิกริยาของเอนไซม์โบรมิเลน</u>

เอนไซม์โบรมิเลนมีคุณสมบัติในการเร่งปฏิกริยาการย่อยสลายสารประกอบโปรตีน เปปไตด์ เอมีด และเอสเทอร์ของกรดอะมิโน และเปปไตด์ (amidase และ esterolytic activity)(Hagihara และคณะ, 1958;Inagami และ Murachi 1963) และยังสามารถเร่งปฏิกริยาการจับตัวเป็นก้อนของโปรตีนในนม(milk clotting activity)(Heinicke,1953) ดังนั้น ในการตรวจสอบปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์อาศัยหลักการของคุณสมบัติการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวข้างต้นเอง

Grassman และ Heyde (1929) ตรวจสอบปฏิกริยาของเอนไซม์โบรมิเลนโดยให้เอนไซม์ย่อยเจลาตินที่อุณหภูมิ 38° ซ แล้วไตเตรทกับโซเดียมไฮดรอกไซด์เพื่อหาปริมาณของกรดอะมิโนที่ได้จากการย่อยในช่วงเวลาหนึ่ง ๆ และรายงานปฏิกิริยาการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทำงานของเอนไซม์เป็นหน่วย GDU (Gelatin Digestion Unit)

Su และคณะ (1975) และ Polyamine Corporationได้ดัดแปลงและวิธีการตรวจสอบปฏิกิริยาของเอนไซม์โบรมิเลนจากวิธีของ Kunita (1947) และ Hagiharaและคณะ (1958) โดยการใช้สารละลายเอนไซม์ 1.0 ทำปฏิกิริยากับสารละลายเคซีนความเข้มข้นร้อยละ 0.6 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่ pH เท่ากับ 7.0 จำนวน 5.0 บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37° ซ เป็นเวลา 10 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายตกตะกอนโปรตีนจำนวน 5 มล.ซึ่งสารละลายตกตะกอนโปรตีนนี้ประกอบด้วยกรดคลอโรอะซิติก 0.11 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตท 0.22 โมลาร์ และกรดอะซิติก 0.33โมลาร์ บ่มไว้เป็นเวลา 330 นาที กรองเคซีนที่ตกตะกอนออกด้วยกระดาษกรองแล้วนำไปวัดเปปไตด์ที่ละลายอยู่โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร รายงานปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ออกมาในรูป CDU (Casein Digestion Unit) ซึ่งหมายถึงปฏิกิริยาเอนไซม์ที่ย่อยเคซีนที่ pH เท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 37° ซ แล้วทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 275 นาโนเมตร เพิ่มขึ้นเท่ากับไทโรซีน 1 ไมโครกรัม ในเวลา 1 นาที

Heinicke (1953) ตรวจสอบปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์โบรมิเลนทำปฏิกิริยากับโปรตีนในสารละลายพร่องไขมัน (skim milk solution) ในสภาพที่มี pH เท่ากับ 3.5 แล้วจับเวลา จนกระทั่งโปรตีนในน้ำนม เริ่มแข็งตัวเกาะเป็นก้อน (clot) ซึ่งจะรายงานเป็นหน่วย MCU (Milk Clotting Unit)

นอกจากนี้ จากการรวบรวมของ Murachi (1970) รายงานว่า ยังมีวิธีการตรวจสอบปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วยวิธีการอื่น ๆ โดยใช้สารตั้งต้นที่แตกต่างกันออกไป กล่าวคือ การใช้ฮีโมโกลบินที่ทำให้เสียสภาพธรรมชาตินั่นเองเป็นสารตั้งต้นแล้ววัดปริมาณของโอลิโกเปปไตด์ที่ได้จากการย่อยของเอนไซม์ โดยทำให้ปฏิกิริยากับสารละลายโฟลิน(folin reagent) ยิ่งไปกว่านั้นยังสามารถใช้สารตั้งต้นสังเคราะห์ต่าง ๆ ที่เอนไซม์โบรมิเลนสามารถย่อยสลายได้ในการตรวจสอบปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ ได้แก่ a-N-benaoyl - L- arginine ethyl ester (Baee) เป็นสารตั้งต้นในการตรวจสอบความสามารถในการย่อยพันธะเอสเทอร์(esterase activity)ของเอนไซม์ซึ่งติดตาม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การย่อยสลายโดยการใช้เครื่องไตเตรตอัตโนมัติ (pH -sat),การใช้ a-N-benaoyl-L-arginine amide (BAA) เป็นสารตั้งต้นในการตรวจสอบความสามารถในการย่อยพันธะเอมีด (amidase activity)ของเอนไซม์โดยการตรวจสอบปริมาณของแอมโมเนียมที่ได้จากการย่อย BAA โดยทำปฏิกิริยากับนินไฮดริล หรือใช้เทคนิคร่วมกันระหว่าง microdiffusion technique และการให้ปฏิกิริยากับอินโดฟินอล โดยใช้โซเดียมไนโตรปรัสไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เป็นต้น

การใช้ประโยชน์ของเอนไซม์โบรมิเลน

เนื่องจากเอนไซม์โบรมิเลนมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสารประเภทโปรตีนเช่นเดียวกับเอนไซม์ปาเปน และโปรตีนอื่น ๆ จึงมีการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่นเดียวกัน ในอุตสาหกรรมมีการนำเอนไซม์นี้ไปใช้ในการผลิตเบียร์เพื่อช่วยป้องกันการเกิดความขุ่นของเบียร์ในขณะเก็บรักษา (Wallerstein,1911 ; Henry, 1937; Heinicke และ Gortner, 1957) ช่วยเพิ่มความยืดหยุ่นและปริมาตรของขนมปัง (Reed, 1966) ทำให้เนื้อนุ่มขึ้น (Hogan, 1962; McAnelly และ Warner, 1968) ช่วยเร่งกระบวนการหมักน้ำปลาไส้ตัน (ประเสริฐ, 2508) ยิ่งไปกว่านั้นเอนไซม์โบรมิเลนยังสามารถในการตกตะกอนโปรตีนในน้ำนมได้ ดังนั้น อาจนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตเนยแข็งแทนเอนไซม์เรนเนตได้ (Heinicke, 1953)

นอกจากนี้ ในอุตสาหกรรมยามีการใช้เอนไซม์โบรมิเลนในตัวยาช่วยย่อยอาหาร ยาถ่ายพยาธิ (Hwang, 1951) ใช้ช่วยละลายเมือกก่อนเอ็กซ์เรย์มดลูก ใช้เป็นยาแก้อักเสบ (Hunter และ Henry, 1952) และยังใช้ในอุตสาหกรรมอื่น ๆ เช่น อุตสาหกรรมฟอกหนัง เพื่อทำให้พองและนุ่มขึ้น (Langlykke และคณะ ,1952; Heinicke และ Gortner, 1957) อุตสาหกรรมสีเพื่อใช้เพิ่มความคงตัวและความหนืดของโปรตีนที่ใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์ในสีลาเทกซ์ (Ronai และ Weisberg, 1954)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์ และ วิธีการ

อุปกรณ์

วัตถุดิบ

สับปะรดจากไร่ของบริษัทลาหารสยาม ชลบุรี

สารเคมี

1 สารเคมีที่ใช้ในการหาโปรตีนโดยวิธีของ Lowry (ภาคผนวกที่ 2)

2 สารเคมีที่ใช้ในการหาปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์บรอมิเลนโดยวิธี CDU ของ Polyamine Corpolation (ภาคผนวกที่ 1)

3 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดและตกตะกอนของเอนไซม์ เช่น อะซีโตน เอทิลแอลกอฮอล์แอมโมเนียมซัลเฟต และฟอสเฟตบัฟเฟอร์

4 สารเคมีที่ใช้เพิ่มความคงตัวของเอนไซม์เช่นโซเดียมซัลไฟต์โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์

วัสดุและเครื่องมือ

1 เครื่องเหวี่ยง (Referigerated Centrifuge)

2 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

3 เครื่องวัด pH

4 เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

5 เครื่องสกัด (Blender)

6 หม้ออังไอน้ำชนิดควบคุมอุณหภูมิได้

7 นาฬิกาจับเวลา

8 ผ้าขาวบางและกระดาษกรอง Whatman No. 1

9 เครื่องแก้วต่าง ๆที่จำเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการ

เวลาและสถานที่

เริ่มการทดลองเมื่อเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2534 แล้วเสร็จในเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2535 รวมเวลา 7 เดือน การทดลองทั้งหมดนี้ทำที่ห้องปฏิบัติการของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง

วิธีการ

1. การศึกษา pH ของสารสกัดที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์โบรมิเลน

เพื่อให้การสกัดเอนไซม์โบรมิเลนมีประสิทธิภาพสูงสุดจึงได้ทำการศึกษาเพื่อหา pH ที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์โดยใช้สารสกัดดังต่อไปนี้

citrate phoaphate buffer 0.05 โมลาร์ pH 3.2,3.6,4.0,4.4,.4.8

phosphate buffer 0.05 โมลาร์ pH 5.5,6.0,6.5,7.0,7.5

น้ำกลั่น pH 6.0,6.5,7.0

วิธีการ

1 ชั่งลำต้นสับปะรดที่ปอกเปลือกแล้ว และสับละเอียดใส่ในสารสกัดแต่ละชนิดที่ pH ต่างๆ ในอัตราส่วน 1:1

2 นำใส่ในเครื่องตีปั่น เป็นเวลา 2 นาที

3 แยกกากออกด้วยผ้าขาวบาง นำส่วนใสที่ได้ไปทำการเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4° ซ เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเนื้อออก

4 นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้ไปตรวจหาปฏิกิริยาของเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจหาปฏิกริยาของเอนไซม

1 นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้ 3 มล. ทำปฏิกริยากับสารละลายเคซีนเข้มข้นร้อยละ 0.6 ใน 0.05 โมลาร์ phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 5 มล. ทิ้งไว้ที่ 37° ซ เป็นเวลา 10 นาที

2 เติมสารหยุดปฏิกิริยา 5 มล. เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่ 37 ° ซเป็นเวลา 30 นาที

3 กรองด้วยกระดาษกรอง whatman No.1

4 นำของเหลวที่ได้ไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 275 นาโนมิเตอร์ หากไม่สามารถวัดค่าได้ นำไปเจือจางด้วยสารละลายเจือจางเอนไซม์ก่อน

5 เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานไทโรซีน คำนวณผลในรูปของ CDU ต่อมิลลิลิตร

6 การทำดอนโทรลทำโดยเติมสารละลายหยุดปฏิกิริยาก่อนเติม สารละลายเคซีน

2 การศึกษาสารตะกอน

นำของเหลวที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำกลั่น อัตราส่วน1:1โดยใช้เครื่องตีปั่นเป็นเวลา 2 นาที หลังจากกรองแยกแป้งโดยใช้เครื่องเหวี่ยง ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4° ซ เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปศึกษาการตกตะกอนโดยใช้สารตกตะกอนดังนี้

1.เอธิลแอลกอฮอล์ 95%

1.1 นำสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมได้จากข้างต้นปริมาตร 200 มล. เติมเอธิลแอลกอฮอล์ 95% ลงไป 200 มล.ทิ้งให้ตกตะกอน

1.2 นำไปเหวี่ยงปั่นที่ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ4° ซ เป็นเวลา 10 นาที

1.3 นำตะกอนที่ได้ไปทำแห้งด้วยเครื่อง freeze dryer

2.เอธิลแอลกอฮอล์ 2 ขั้นตอน

2.1 นำสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมได้ 200 มล. เติมเอธิลแอลกอฮอล์ 95% ลงไป 60 มล. ทิ้งไว้ให้ตกตะกอน

2.2 นำไปเหวี่ยงปั่นที่ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4° ซ เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนไว้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 นำส่วนใสมาเติมเอธิลแอลกอฮอล์ 95% จนกระทั่งมีความเข้มข้นร้อยละ 50

2.4 เหวี่ยงนำตะกอนมารวมกับตะกอนครั้งแรก แล้วนำไปทำแห้งด้วยเครื่อง freeze dryer

3.อะซิโตนเย็น 2 ขั้นตอน

3.1 นำสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมได้ 200 มล. เติมอะซิโตนเย็น 5° ซ ลงไป 26 มล. ทิ้งให้ตกตะกอน

3.2 นำไปเหวี่ยงปั่นที่ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4° ซ เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนไว้

3.3 นำส่วนใสมาเติมอะซิโตนเย็นจนกระทั่งมีความเข้มข้นร้อยละ 56 ทิ้งให้ตกตะกอน

3.4 เหวี่ยงนำตะกอนมารวมกับตะกอนครั้งแรก แล้วนำไปทำแห้งด้วยเครื่อง freeze dryer

4.อะซิโตนเย็น 2 ขั้นตอน

4.1 นำสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมได้ 200 มล. เติมอะซิโตนเย็น 5° ซ ลงไป 46 มล. ทิ้งให้ตกตะกอน

4.2 นำไปเหวี่ยงปั่นที่ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4° ซ เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนไว้

4.3 นำส่วนใสมาเติมอะซิโตนจนกระทั่งมีความเข้มข้นร้อยละ 56 ทิ้งให้ตกตะกอน

4.4 เหวี่ยงนำตะกอนมารวมกับตะกอนครั้งแรก แล้วนำไปทำแห้งด้วยเครื่อง freeze dryer

5.อะซิโตนเย็น 2 ขั้นตอน

5.1 นำสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมได้ 200 มล. เติมอะซิโตนเย็น 5° ซ ลงไป 66 มล

5.2 นำไปเหวี่ยงปั่นที่ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4° ซ เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนไว้

5.3 นำส่วนใสมาเติมอะซิโตนเย็นจนมีความเข้มข้นร้อยละ 56 ทิ้งให้ตกตะกอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.4 เหวี่ยงน้ำตะกอนมารวมกับตะกอนครั้งแรกแล้วนำไปทำแห้งด้วยเครื่อง freeze dryer

6.แอมโมเนียมซัลเฟต ร้อยละ 60

6.1 นำสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมได้ 200 มล. เติมสารละลายแอมโมเนียม-ซัลเฟตอิ่มตัวจนกระทั่งมีความเข้มข้นร้อยละ 60 กวนให้เป็นเนื้อเดียวกัน ทิ้งไห้ตกตะกอน

6.2 เหวี่ยงน้ำตะกอนมาทำแห้งด้วยเครื่อง freeze dryer

นำเอนไซม์ผงที่ทำแห้งไว้มาตรวจสอบปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยให้เอนไซม์ผง 0.05 กรัมละลายในน้ำกลั่น 100 มล. ทำการตรวจหาปฏิกิริยาของเอนไซม์ตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้นและตรวจหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry และคณะ(1951)

3.การศึกษาการปรับpHของสารละลายเอนไซม์ก่อนตกตะกอน

วิธีการ 1.นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการสกัดโดยใช้น้ำกลั่นโดยใช้เครื่องตีปั่น หลังจากแยกกากและแป้งออกแล้ว 200 มล. ทำการปรับปรุง pH ด้วยกรดซัลฟูริกเจือจางให้มี pH 3.3, 4.3, 5.3 และ 6.3 ตามลำดับ

2.นำสารละลายเอนไซม์ที่ปรับpH แล้วแต่ละpH นำไปตกตะกอนด้วยอะซิโตนเย็น โดยเติมอะซิโตนเย็น 5° ซ ลงไป 66 มล. ทิ้งให้ตกตะกอน

3.นำไปเหวี่ยงปั่นที่ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4° ซเป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนไว้

4.แยกส่วนใสมาเติมอะซิโตนเย็น จนกระทั่งมีความเข้มข้นร้อยละ 56 ทิ้งให้ตกตะกอน

5.นำเข้าเครื่องเหวี่ยงปั่น นำตะกอนมารวมกับครั้งแรก และทำให้แห้งโดยใช้เครื่องfreeze dryer

6.เปรียบเทียบปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่ pH ต่าง ๆ ตามวิธีข้างต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7.ตรวจหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry และคณะ (1951)

4.ศึกษาการตกตะกอนของเอนไซม์

วิธีการ 1.เตรียมสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้เป็น 3 ส่วน ๆ ละ 500 มล.

2.ส่วนที่ 1 ปรับ pH ให้เป็น 4.3 โดยให้กรดซัลฟูริคเจือจางจากนั้นทำการตกตะกอนด้วยอะซิโตนเย็น โดยเติมอะซิโตนเย็น 5° ซ ลงไปให้มีความเข้มข้นร้อยละ 33 ทิ้งให้ตกตะกอน

-นำไปเหวี่ยงปั่นที่ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4° ซ เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนไว้

-นำส่วนใสมาเติมอะซิโตนเย็นจนกระทั่งมีความเข้มข้นร้อยละ 56ทิ้งให้ตกตะกอน

-เหวี่ยงนำตะกอนมารวมกับตะกอนครั้งแรก แล้วนำไปทำแห้งด้วยเครื่อง freeze dryer

3.ส่วนที่2. เติมโซเดียมซัลไฟด์ 0.286 กรัม คนจนละลายหมด ปรับ pH ให้เป็น 4.3 ตกตะกอนด้วยอะซิโตนเย็น ตามวิธีข้อ 2

4.ส่วนที่3. เติมโซเดียมเมต้าไบซัลไฟท์ 0.286 กรัม คนจนละลายหมดปรับ pH เป็น 4.3 ตกตะกอนด้วยอะซิโตนเย็นตามวิธีในข้อ 2

5.เก็บตะกอนที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 0 และ 20 วัน

6.จากนั้นจึงนำมาตรวจสอบปฏิกิริยาของเอนไซม์ และปริมาณโปรตีนเปรียบเทียบกันระหว่างระยะเวลาการเก็บ การใช้สารของตัวแต่ละชนิด

5.ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์

วิธีการ 1.นำสารละลายเอนไซม์ที่สกัดโดยใช้น้ำกลั่นและเครื่องมือในปรับ pH เป็น 4.3 โดยให้กรดซัลฟูริคเจือจาง

2.จากนั้นนำไปตกตะกอนด้วยอะซิโตนเย็น 2 ขั้นตอนความเข้มข้นร้อยละ 33และร้อยละ 56 ตามลำดับ

3.นำตะกอนที่ได้ไปทำแห้งโดยใช้ freeze dryer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.นำเอนไซม์ผงที่ได้ 0.05 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มล.

5.ปิเปตสารละลายเอนไซม์มา 1 มล. ทำการตรวจหาปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยให้ทำปฏิกิริยากับสารละลายเคซีนที่อุณหภูมิต่าง ๆ กันคือ 30° ซ, 35° ซ 37° ซและ 40° ซ ตามวิธีการตรวจหาปฏิกิริยาของเอนไซม์ดังที่กล่าวแล้ว

6.ศึกษาpHที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์

วิธีการ 1.เอนไซม์ผงที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำกลั่นและเครื่องตีปั่นปรับ pH เป็น 4.3 โดยใช้กรดซัลฟูริคเจือจางตกตะกอนด้วยอะซิโตนเย็น 2 ขั้นตอน นำตะกอนไปทำแห้งด้วยเครื่อง freeze dryer ตามวิธีที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

2.นำเอนไซม์ผงที่ได้ 0.05 กรัมละลายใน phosphate buffer 100มล. ที่ระดับpH ต่าง ๆ กันดังนี้ 3.0, 5.0, 7.0, และ 9.0

3.ปิเปตสารละลายเอนไซม์มา 1 มล. ทำการตรวจหาปฏิกิริยาของเอนไซม์ตามวิธีที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

7.ศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

วิธีการ 1.เอนไซม์ผงที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำกลั่น และเครื่องตีปั่นปรับ pH เป็น 4.3 โดยใช้กรดซัลฟูริคเจือจางตกตะกอนด้วยอะซิโตนเย็น 2 ขั้นตอน นำตะกอนไปทำแห้ง ด้วยเครื่อง freeze dryer ตามวิธีที่กล่าวแล้วข้างต้น

2.นำเอนไซม์ผงที่ได้ 0.05กรัมละลายในน้ำกลั่น100 มล.ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้คือ 30° ซ, 40° ซ, 50° ซ, 60° ซ, 70° ซ และ 80° ซเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.เมื่อครบกำหนดเวลาแล้วนำมาตรวจหาปฏิกิริยาของเอนไซม์

8.ศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ที่ pH ต่าง ๆ

วิธีการ 1.เอนไซม์ผงที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำกลั่น และเครื่องตีปั่นปรับ pH เป็น 4.3 โดยกรดซัลฟูริคเจือจางตกตะกอนด้วยอะซิโตนเย็น 2 ขั้นตอน นำตะกอนไปทำแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้วยเครื่องfreeze dryer ตามวิธีที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

2.นำเอนไซม์ผงที่ได้ 0.05 กรัมละลายใน phosphate buffer 100 มล. ที่ระดับpHต่าง ๆ ดังนี้ 3.0, 5.0, 7.0, และ 9.0

3.ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37° ซ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

4.เมื่อครบเวลาแล้วทำการตรวจหาปฏิกิริยาของเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผล

1 ศึกษา pH ของสารสกัดที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์โบรมิเลน

จากการศึกษาระดับ pH ที่เหมาะสมสำหรับการสกัดเอนไซม์โบรมิเลนจากลำต้นสับปะรด หลังจากทำการตรวจสอบปฏิกริยาของเอนไซม์โบรมิเลนในสารละลายที่สกัดจากลำต้นสับปะรดด้วย 0.05 โมลาร์ซิเตรทฟอสเฟส บัฟเฟอร์ pH ต่าง ๆ ตั้งแต่ 3.2 , 3.6, 4.0, 4.4, 4.8 และ 0.05 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH ต่าง ๆตั้งแต่ 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5ปรากฏว่าค่าของปฏิกิริยาเมื่อคิดเป็นหน่วยเอนไซม์ต่อมิลลิลิตรของสารละลายเอนไซม์ต่อมิลลิลิตรที่ได้จากการนำต้นสับปะรดมาปอกเปลือกนวัดีปนกรองแยกกากทิ้งไปแล้ว มีแนวโน้มที่จะลดลงเมื่อ pH สูงขึ้น คือ pH ในช่วงกรดตั้งแต่ 3.2-4.8 จะได้เอนไซม์ที่มีปฏิกริยาสูงสุดคือ 23,551 และ 23,480 CDU/ml. ที่ระดับ pH 4.1 และ 3.2 ตามลำดับ pH ในช่วงกลางและด่าง เอนไซม์จะมีปฏิกิริยาการทำงานน้อยลง (ตารางที่ 4 และภาพที่ 4) ดังนั้นการสกัดเอนไซม์โบรมิเลนจากลำต้นสับปะรดจึงอาจทำได้ในช่วง pH ที่เป็นกรดแต่เมื่อพิจารณาจากค่า Total CDU แล้วจะ ได้ที่pH 4.4 จะให้เอนไซม์ที่มีปฏิกิริยาและความคงตัวสูงสุด

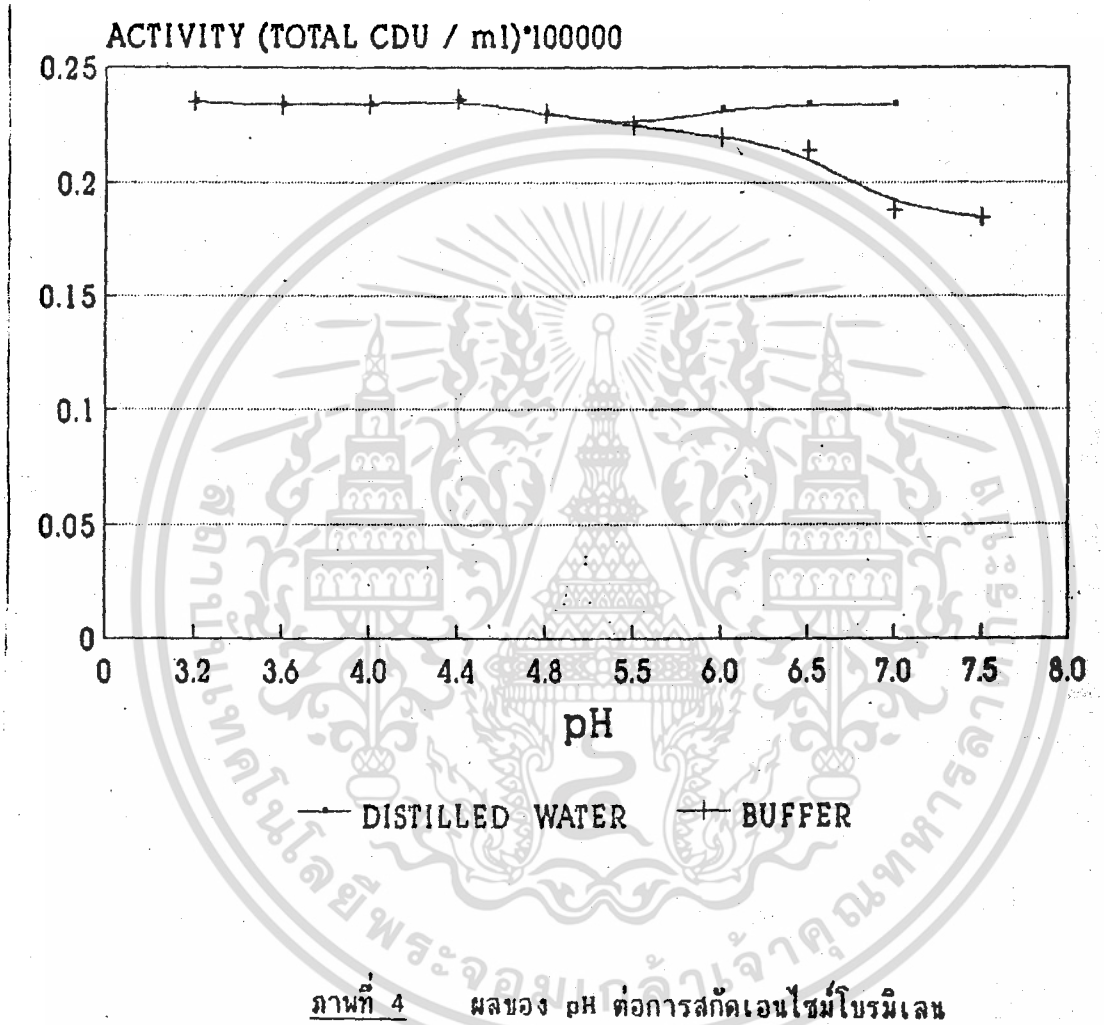
จากการเปรียบเทียบการสกัดเอนไซม์ด้วยน้ำกลั่น pH ประมาณ 7.0 กับการใช้ซิเตรตฟอสเฟตบัฟเฟอร์pH 4.4ซึ่งเป็นช่วงpH ที่เอนไซม์มีปฏิกิริยาสูงสุดปรากฏว่าเอนไซม์ที่สกัดใกล้เคียงกันดังภาพที่ 5 การสกัดด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์จะได้เอนไซม์ที่มีปฏิกิริยาการทำงานสูงกว่าใช้น้ำกลั่นสกัดเล็กน้อยเพราะบัฟเฟอร์จะช่วยป้องกันการสลายของเอนไซม์จากกรดที่ถูกปล่อยออกมาเมื่อเซลแตก แต่อย่างไรก็ตามการสกัดด้วยน้ำกลั่นให้ผลไม่แตกต่างทางสถิติกับการใช้ซิเตรท ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 99 (ตารางผนวกที่ 1) ดังนั้นในการศึกษาเพื่อผลิตจึงอาจใช้น้ำกลั่นแทน ทั้งสะดวกและลดค่าใช้จ่ายทางด้านสารเคมีลงด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์โบรมิเลนในการสกัดด้วยสารสกัดชนิดต่าง ๆ ที่ระดับ pH ต่าง ๆกัน โดยใช้อัตราส่วน ลำต้นสับประรดต่อสารสกัด = 1:1 น้ำหนักโดยปริมาตร จำนวนชนิดละ 50 มล.

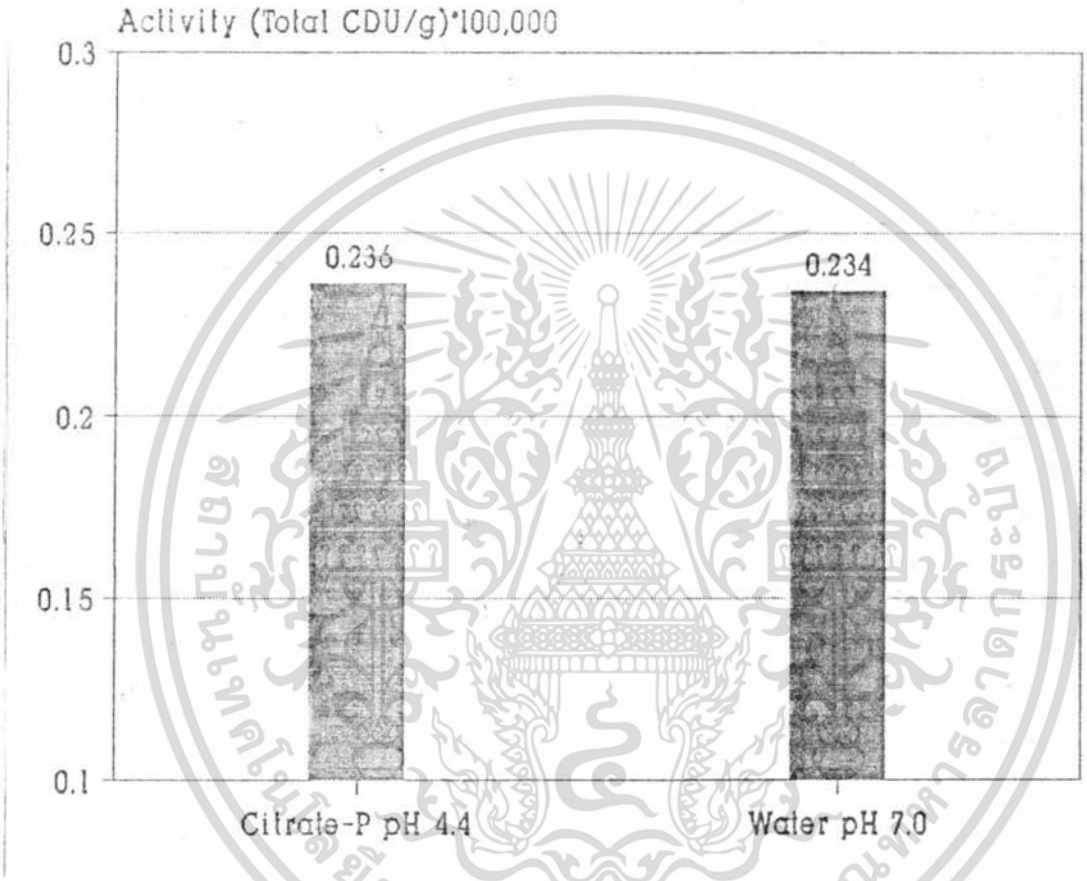
สารสกัดเอนไซม์	pH	Dilution factor	Activity (Total CDU/ml.)
0.05 โมลาร์ ซิเตรต-ฟอสเฟต บัฟเฟอร์	3.2	10^{-1}	23,480
	3.6	10^{-1}	23,410
	4.0	10^{-1}	23,410
	4.4	10^{-1}	23,551
	4.8	10^{-1}	22,987
0.05 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์	5.5	10^{-1}	22,493
	6.0	10^{-1}	22,000
	6.5	10^{-1}	21,365
	7.0	10^{-1}	18,756
	7.5	10^{-1}	18,474
น้ำกลั่น	6.0	10^{-1}	23,198
	6.5	10^{-1}	23,410
	7.0	10^{-1}	23,410

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4 ผลของ pH ต่อการสกัดเอนไซม์โบรมิเลน
จากลำต้นสับปะรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 5 เปรียบเทียบปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์โบรมิเลนที่สกัดด้วยน้ำกลั่น pH 7 และ 0.05 โมลาร์ ซิเตรตฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2 ศึกษาการตกตะกอนของเอนไซม์โบรมิเลน

ผลการตกตะกอนของเอนไซม์โบรมิเลน จากสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการสกัดลำต้นสับประรดด้วยน้ำกลั่นอัตราส่วน 1:1(นน.:ปริมาตร)โดยใช้เครื่องตีปั่นเป็นเวลา 2 นาทีที่อุณหภูมิห้องจำนวน 200 มล. ด้วย สารตกตะกอน 3 ชนิด คือ เอธิลแอลกอฮอล์ อะซีโตน แอมโมเนียมซัลเฟตโดยวิธีการตกตะกอนแบบต่าง ๆ แสดงในตารางที่ 5 ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตกตะกอนพบว่าการตกตะกอนด้วยอะซีโตนเย็น 5°ซ ในปริมาณร้อยละ 35เหวี่ยงแยกตะกอนออก แล้วตกตะกอนในสารละลายที่เหลืออีกครั้งด้วยอะซีโตนเพิ่มขึ้นอีกเป็นปริมาณร้อยละ 56 จะให้ผลดีที่สุดคือ ให้ปริมาณตะกอนซึ่งมีปฏิกิริยาของเอนไซม์สูงสุดคิดเป็น Total CDU /กรัม ของน้ำหนักตะกอนแห้งที่ได้จากสารละลายเอนไซม์ 200 มล.ได้เท่ากับ 2,383,333 Total CDU/g

วิธีการที่ให้ผลรองลงมาได้แก่การตกตะกอนครั้งแรกด้วยอะซีโตนร้อยละ 23 และตกเป็นครั้งที่ 2 ด้วยอะซีโตนร้อยละ 56 จะให้ปริมาณตะกอนที่มีเอนไซม์เท่ากับ 1,748,717 CDU/g

ส่วนการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยแอลกอฮอล์ในปริมาณร้อยละ 50 ตามวิธีการ SU และคณะ (1975) จะให้ปริมาณตะกอนที่เอนไซม์มีปฏิกิริยาต่ำสุดคือ 70,512 Total CDU/g

3 ศึกษาการปรับ pH ของเอนไซม์ก่อนตกตะกอน

แม้ว่าการใช้อะซีโตนเย็นตกตะกอน 2 ขั้นตอนโดยครั้งแรกปริมาณร้อยละ 33 แยกตะกอนสารละลายอีกครั้งด้วยอะซีโตนที่เพิ่มขึ้นร้อยละ 56 จะทำให้ปริมาณเอนไซม์สูงก็ตามแต่เมื่อตะกอนเอนไซม์จากของเหลวที่ได้จากการสกัดลำต้นสับประรดเพิ่มมากขึ้น จึงได้ทดลองปรับ pH ของสารละลาย ให้ได้ตั้งแต่ 3.3 ,4.3, 5.3 และ 6.3 แล้วจึงตกตะกอนด้วยอะซีโตนเย็น 2 ขั้นตอน จากนั้นนำไปทำแห้งเอาเอนไซม์ผงมาทดสอบปฏิกิริยาของเอนไซม์ ปรากฏว่าที่ pH 4.3 จะให้ผลดีที่สุด คือ ให้ตะกอนสูงสุดคือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.0917 กรัม และมีปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์เป็น 493.39 CDU / มิลลิกรัมของเอนไซม์แห้ง ที่ pH 5.3 และ 6.3 ปริมาณตะกอนและปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์จะลดลงตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 6

ดังนั้นจึงได้แสดงให้เห็นว่าการปรับ pH ของสารละลายเอนไซม์ให้ได้ 4.3 ก่อนตกตะกอนจะให้ผลดีที่สุดซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Heinicke (1961) ว่าการปรับ pH ของสารละลายให้อยู่ในช่วง pH 3.5-5.5 ก่อนการตกตะกอน จะได้ปริมาณตะกอน และมีกิจกรรมของเอนไซม์สูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบการตกตะกอนโปรตีนโดยสารตกตะกอนชนิดต่าง ๆ โดยใช้ลำดับสับปะรด สกัดด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 น้ำหนักโดยปริมาตร จำนวนชนิด 200 มล.

สารตกตะกอน		ผลผลิต (กรัม)	Activity (Total CDU /g)	ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัม)
เอธิลแอลกอฮอล์	50%	0.4384	70,512	137
เอธิลแอลกอฮอล์	30%	0.1435	719,230	162
	50%			
อะซีโตน	13%	3.1436	535,897	196
	56%			
อะซีโตน	23%	3.3247	1,748,717	202
	56%			
อะซีโตน	33%	3.7814	2,383,333	202
	56%			
แอมโมเนียมซัลเฟต	60%	3.4333	366,666	91

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนในการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยอะซีโตน 2 ขั้นตอน โดยใช้สารละลายที่สกัดได้จากลำต้นสับปะรดในอัตราส่วน 1:1 (นน./ปริมาตร) จำนวน 200 มล.

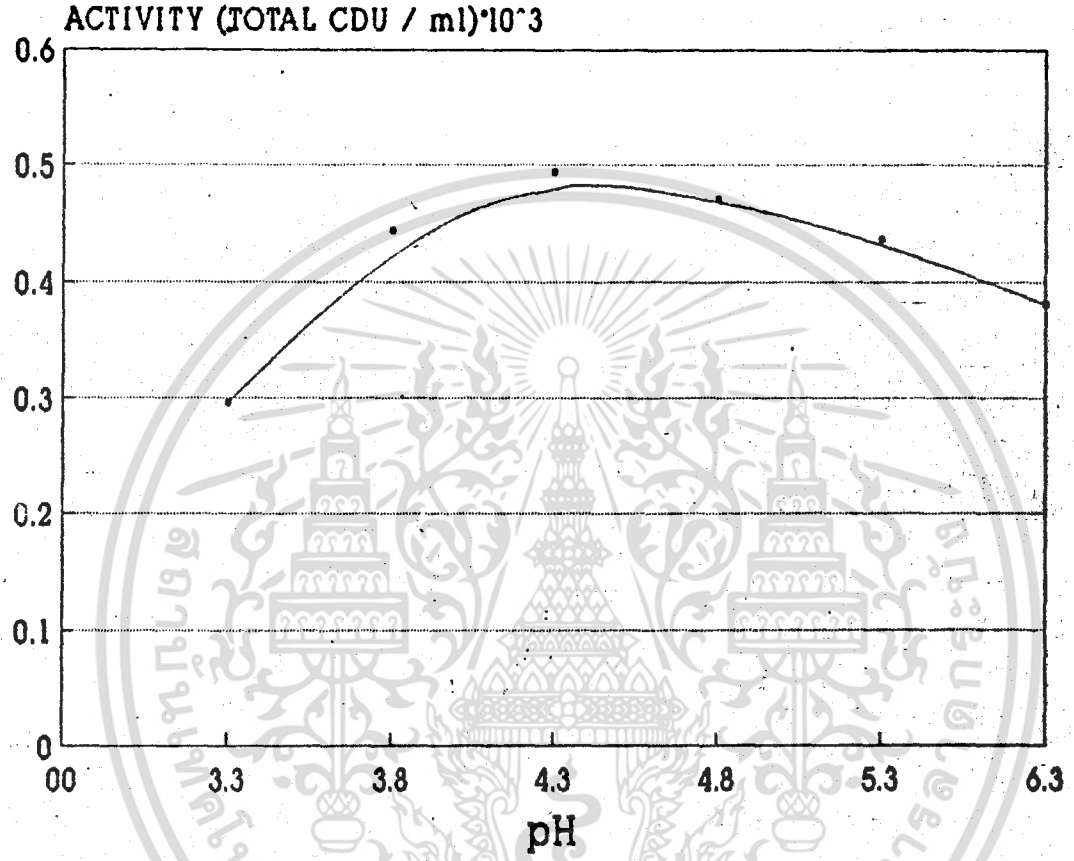
สารตกตะกอน		ผลผลิต(กรัม)	Activity (Tital CDU/g)	โปรตีน (ไมโครกรัม)
อะซีโตน	13% 56%	3.1436	535,897	196
อะซีโตน	23% 56%	3.3247	1,748,717	202
อะซีโตน	33% 56%	3.7814	2,383,333	202

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบผลของpH ต่อปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์และปริมาณโปรตีน ในการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยอะซีโตน 2 ขั้นตอน โดยใช้สารละลายที่สกัดได้จากลำต้นสับปะรด ในอัตราส่วน 1:1 (นน./ปริมาตร) จำนวน 200มล.

สารตกตะกอน		pH	ผลผลิต (กรัม)	Activity (Total CDU/g)	โปรตีน (ไมโครกรัม)
อะซีโตน	ร้อยละ 33 ร้อยละ 56	3.3	1.0492	296.15	158
อะซีโตน	ร้อยละ 33 ร้อยละ 56	4.3	1.0917	493.59	203.5
อะซีโตน	ร้อยละ 33 ร้อยละ 56	5.3	0.3965	437.18	181
อะซีโตน	ร้อยละ 33 ร้อยละ 56	6.3	1.0810	380.77	178

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 6 ผลของ pH ในการตกตะกอนเอนไซม์โบรมิเลน
จากลำต้นสับปะรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4 ศึกษาการคงตัวของเอนไซม์

การคงตัวของเอนไซม์ (stability) ของเอนไซม์หมายถึง ความคงทนของความสามารถในการก่อให้เกิดปฏิกิริยา การทำงานได้ในระหว่างการเก็บรักษาและนำไปใช้ประโยชน์ ซึ่งเอนไซม์จะมีความสามารถในการรักษาปฏิกิริยาการทำงานแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของเอนไซม์วิธีการผลิตและสภาวะในการเก็บรักษา เนื่องจุดประสงค์ในการค้าจำเป็นต้องผลิตเอนไซม์ที่มีความคงตัวในการเก็บรักษา เพื่อให้มีเวลาสำหรับการขนส่งไปยังผู้ที่ต้องการใช้ ดังนั้นจึงมีการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์

จากการใช้สารเพิ่มความคงตัวของเอนไซม์ 2 ตัวคือ โซเดียมซัลไฟต์ และโซเดียมเมตาไบซัลไฟท์โดยเพิ่มในสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ก่อนการตกตะกอนเอนไซม์ ปริมาณของสารเพิ่มความคงตัวที่ใช้คือ 2 กรัมต่อสารละลายเอนไซม์ 1 แกลลอน จากนั้นทำการตกตะกอนด้วยอะซีโตน 5° ซ 2 ขั้นตอนคือ 33% และ 56% ตามลำดับ แล้วนำเอนไซม์ที่ได้ไปทำแห้ง เก็บที่อุณหภูมิห้อง (25° ซ) แล้วนำมาหาปฏิกิริยาของเอนไซม์ในระยะเวลา 20 วันได้ผลในตารางที่ 8

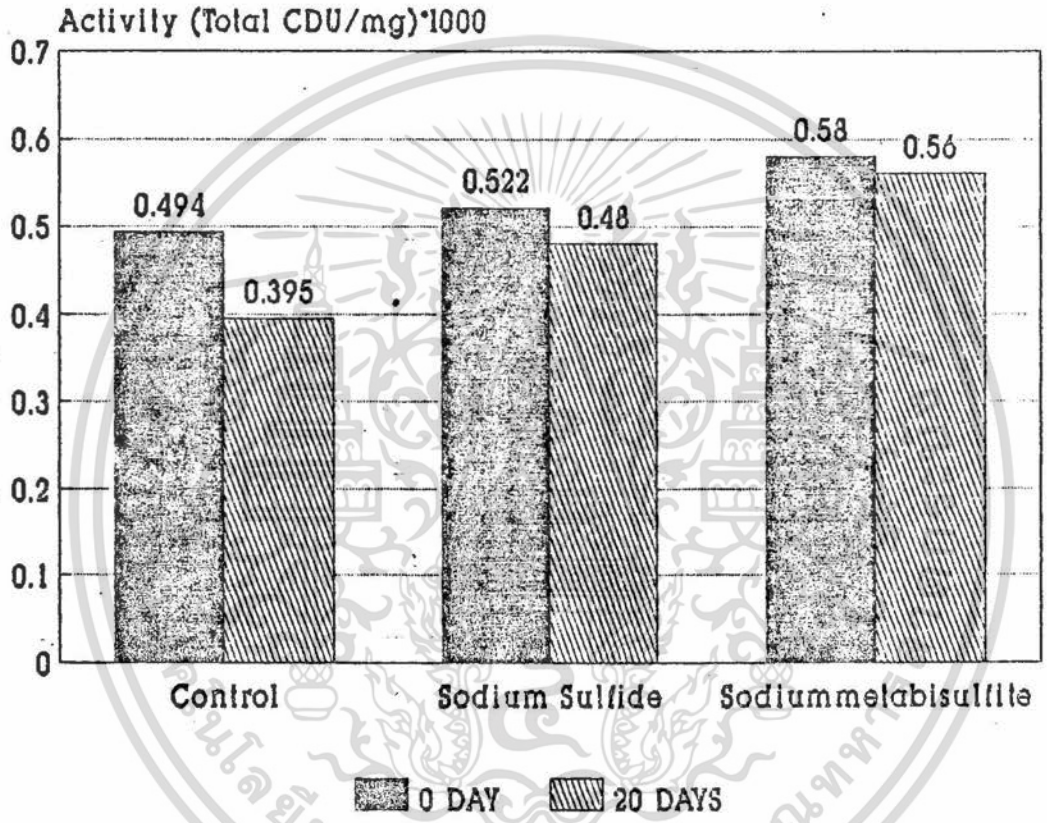
การใช้โซเดียมซัลไฟต์ และโซเดียมเมตาไบซัลไฟท์จะช่วยให้เอนไซม์มีปฏิกิริยาและการคงตัวที่ดีกว่า เนื่องจากเกลือซัลไฟต์ป้องกันการออกซิเดชั่น ระหว่างการเตรียมเอนไซม์ ทั้งจากโมเลกุลของออกซิเจนหรือจากปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์อื่น ซึ่งจะทำให้เอนไซม์เสียปฏิกิริยาและยังสามารถดูดการออกซิไดซ์ได้ด้วย ส่วนโซเดียมเมตาไบซัลไฟท์จะช่วยเพิ่มปฏิกิริยาและความคงตัวของเอนไซม์ด้วยเช่นกัน จากภาพที่ 7 พบว่าหลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 วันการใช้โซเดียมซัลไฟต์ทำให้ปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ลดลง ร้อยละ 7.92ส่วนการใช้โซเดียมเมตาไบซัลไฟท์ ทำให้ปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ลดลงร้อยละ 2.44 ในขณะที่เมื่อไม่ใช่สารเพิ่มความคงตัว ปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ลดลง ร้อยละ 20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบการใช้สารดงตัว 2 ชนิดคือ โซเดียมซัลไฟต์ โซเดียมเมตา-ไบซัลไฟท์ กับการไม่ใช้สารดงตัว ในระยะเวลา 20 วัน โดยใช้ลำต้นไบปะรดด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน1:1 น้ำหนักโดยปริมาณ จำนวนชนิดละ 500 มล.

ชนิดของสารดงตัว	ผลผลิต (กรัม)	ระยะเวลา (วัน)	Activity (Total CDU/g)	ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัม)
ไม่ใช่สารดงตัว	0.8911	0	493.59	240
		20	493.59	240
โซเดียมซัลไฟต์	1.3208	0	521.79	235
		20	479.49	
โซเดียมเมตาไบซัลไฟท์	2.5251	0	578.20	247.5
		20	564.10	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 7 เปรียบเทียบการใช้สารคงตัว 2 ชนิด คือโซเดียมซัลไฟด์ โซเดียมเมตาไบซัลไฟท์กับการไม่ใช้สารคงตัว ในระยะเวลา 0 และ 20 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

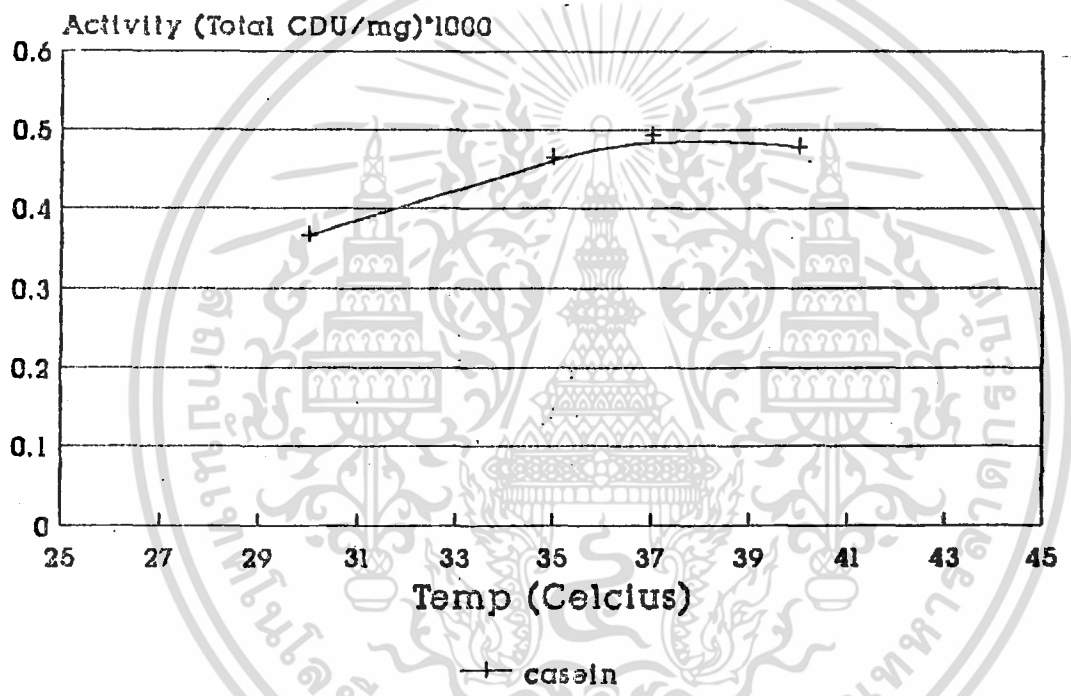
5 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์โบรมิเลน

จากการนำลำต้นสับปะรดมาปอกเปลือก ตีปน โดยใช้น้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 น้ำหนักโดยปริมาตรแล้วปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 4.5 แล้วตกตะกอนด้วยอะซีโตนเย็น 2 ชั้นตอนด้วยความเข้มข้น 33% และ 56% นำไปทำแห้ง จากนั้นนำเอนไซม์ผงมาทดสอบหาปฏิกิริยาการทำงานที่อุณหภูมิต่างกันคือ 30,35,37,40 °ซ โดยใช้เคซีนเป็นสับสเตรท พบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 37 °ซ ปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์จะมีค่าสูงสุดคือ 493.59 Total CDU/mg (ภาพที่ 8)

6 ศึกษา pH ที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์โบรมิเลน

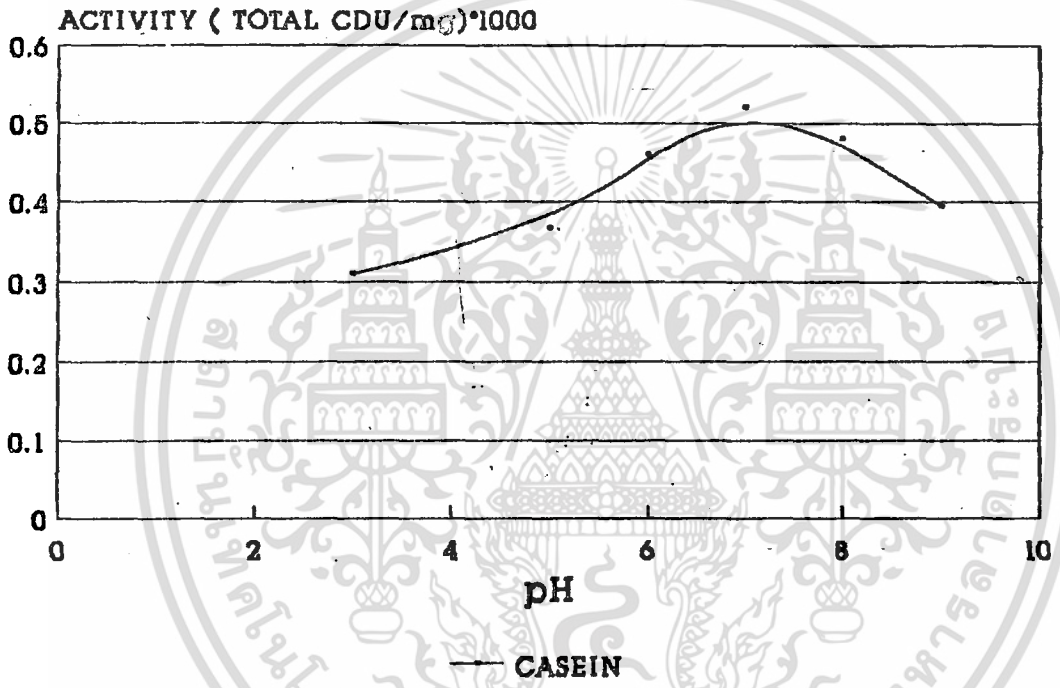
เมื่อนำเอนไซม์ผงที่ผลิตได้จากการนำต้นสับปะรดมาตีปนโดยใช้น้ำกลั่นในอัตราส่วน1:1 น้ำหนักโดยปริมาตร แล้วปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 4.3 แล้วตกตะกอนด้วยอะซีโตนเย็น 2 ชั้นตอนด้วยความเข้มข้น 33% และ 56 % นำไปทำแห้ง มาทดสอบหาปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ที่ระดับ pH ต่างๆกัน คือ ที่ pH 3,5,7และ 9 โดยใช้เคซีนเป็นสับสเตรท พบว่าเมื่อระดับ pHสูงขึ้นปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์จะสูงขึ้นตามลำดับจนถึง pH 7.0 ปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์มีค่าสูงสุดคือ 521.80 Total CDU/mg เมื่อระดับpH สูงกว่า 7.0 ปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์จะมีค่าลดลง (ภาพที่ 9)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 8 เปรียบเทียบอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์โบรมิเลน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 9 เปรียบเทียบ pH ที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์โบรมิเลน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7 ศึกษาความคงตัวของเอนไซม์โบรมิเลนที่อุณหภูมิต่าง ๆ

เป็นการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์โบรมิเลนจากเอนไซม์ผงที่ผลิตได้โดยการนำลำต้นสับปะรดมาปอกเปลือกตีปั่นด้วยน้ำกลั่น อัตราส่วน 1:1 น้ำหนักโดยปริมาตร ใส่สารคงตัวที่ดีที่สุดคือ โซเดียมเมตาไบซัลไฟท์ ปริมาณ 2 กรัมต่อสารละลายเอนไซม์ 1 แกลลอน แล้วปรับค่า pH ให้เท่ากับ 4.3 นำไปตกตะกอนด้วยอะซิโตนเย็น 2 ขั้นตอน ความเข้มข้น 33 % และ 56% จากนั้นนำตะกอนไปทำแห้ง

นำเอนไซม์ผงมาละลายน้ำกลั่น แล้วนำไปแช่ใน water bath ที่ระดับอุณหภูมิต่าง ๆคือ 30,40,50,60,70 และ80 ° ซ เป็นเวลา 12 ชม. จากนั้นนำมาปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ ปรากฏว่าปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์จะมีค่าสูงสุดที่อุณหภูมิ 40-50 ° ซ คือมีค่า 451.28 Total CDU/mg เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์จะลดลงตามลำดับดังแสดงในภาพที่ 10 เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นถึง 80 ° ซ ปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์จะมีค่าน้อยมากคือมีค่า เท่ากับ 183.33 Total CDU/mg จากการเปรียบเทียบค่า Total CDU สรุปได้ว่าเอนไซม์โบรมิเลนที่ผลิตได้โดยใส่สารคงตัว คือ โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์จะมีความคงตัวหรือปฏิกริยาการทำงานสูงสุดที่ช่วงอุณหภูมิ 40-50 ° ซ

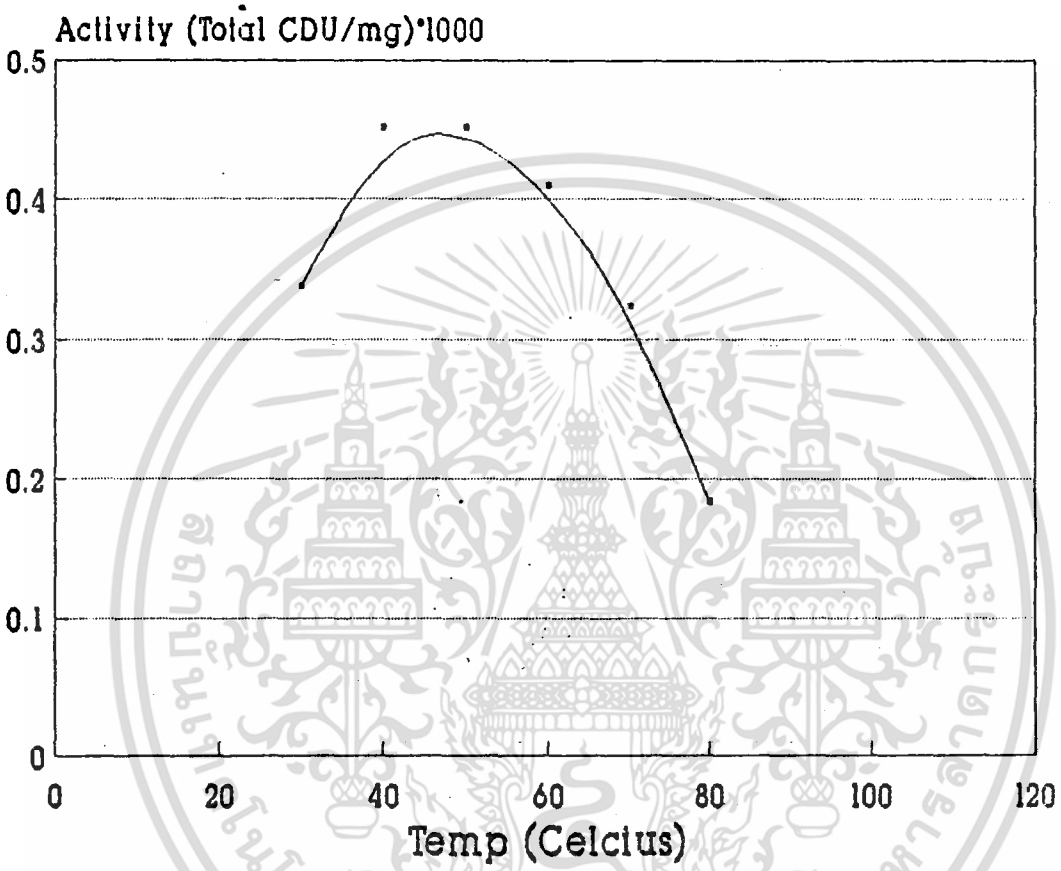
8 ศึกษาความคงตัวของเอนไซม์บรอมิเลนที่ pH ต่าง ๆ

จากการนำเอนไซม์ผงที่ผลิตได้โดยใส่สารคงตัวโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์มาทดสอบหาความคงตัวที่ระดับ pH ต่าง ๆคือ 3,5,7และ 9 ทิ้งไว้เป็นเวลา 12 ชม. นำมาหาปฏิกริยาการทำงานของเอนไซม์ปรากฏว่าปฏิกริยาการทำงานของเอนไซม์จะมีค่าสูงขึ้นตามลำดับ pH ที่เพิ่มขึ้น ที่ระดับ pH 7.0 ปฏิกริยาการทำงานของเอนไซม์จะมีค่าสูงสุด คือ 550.0 Total CDU/mg เมื่อระดับ pH เพิ่มขึ้นมากว่า 7.0 ปฏิกริยาการทำงานของเอนไซม์จะมีค่าลดต่ำลง ดังแสดงในภาพที่ 11 จากการเปรียบเทียบค่า Total CDU สรุปได้ว่าเอนไซม์โบรมิเลนที่ผลิตได้โดยใส่สารคงตัวคือโซเดียมเมตาไบซัลไฟท์จะมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

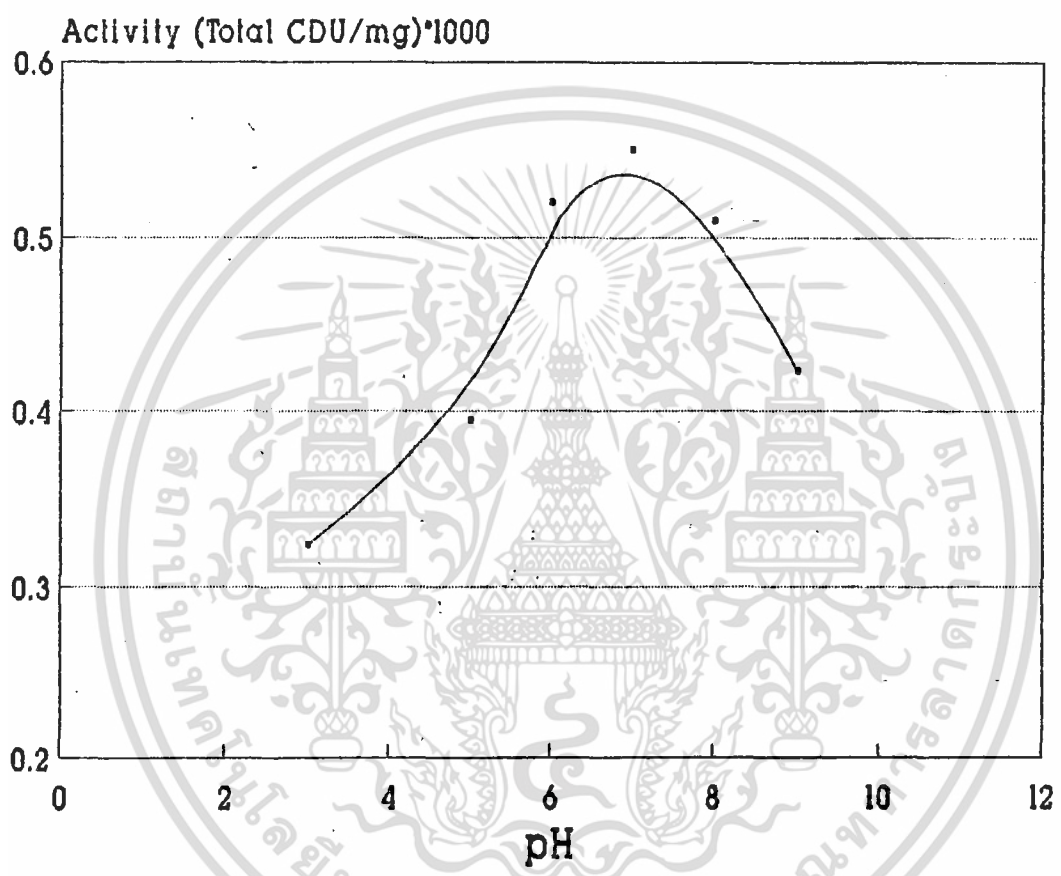
ความคงตัวหรือมีปฏิกิริยาการทำงานสูงสุดที่ช่วง pH 7.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 10 เปรียบเทียบความคงตัวของเอนไซม์โบรมิเลนที่อุณหภูมิต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 11 เปรียบเทียบความคงตัวของเอนไซม์โบรมิเลนที่ pH ต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตเอนไซม์โบรมิเลนจากลำต้นสับปะรด สรุปได้ดังนี้

1. การสกัดเอนไซม์โบรมิเลนโดยการใช้ 0.05 โมลาร์ ซิเตรทฟอสเฟต บัฟเฟอร์ และ 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ที่ระดับ pH ต่าง ๆ กันพบว่า ที่ระดับ pH 4.4 จะได้เอนไซม์ที่มีปฏิกิริยาการทำงานสูงสุด
2. การตกตะกอนน้ำสกัดจากลำต้นสับปะรด pH 4.3 ด้วยอะซีโตนเย็น 2 ขั้นตอน โดยครั้งแรกตกตะกอนอะซีโตนความเข้มข้นร้อยละ 33 เหวี่ยงแยกตะตกอนออกแล้วตกตะกอนสารละลายที่เหลือด้วยอะซีโตนที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นอีกเป็นร้อยละ 56 เป็นการตกตะกอนเอนไซม์โบรมิเลนที่ได้ผลดีที่สุด
3. เอนไซม์ที่ผลิตได้จะสูญเสียปฏิกิริยาการทำงานไปร้อยละ 20.0 เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25°ซ) และปฏิกิริยาการทำงานลดลงเนื่องร้อยละ 2.44 เมื่อใส่โซเดียม-เมตาไบซัลไฟท์ 0.06 %
4. อุณหภูมิและระดับความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์โบรมิเลนที่ผลิตได้คือ 37 °ซ และ pH = 7.0 และมีความคงตัวที่อุณหภูมิช่วง 40 - 50 °ซ และระดับ pH = 7.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

1 การหาปฏิกริยาของเอนไซม์แบบวิธีของ Polyamine corporation

1.1 สารเคมีที่ใช้

ก. สารละลายเคซีน : ละลาย 0.6 กรัมเคซีน (Hammerstein casein) ใน 80 มล. ของ 0.05 โมลาร์ Na_2HPO_4 โดยตั้งบนหม้ออังไอน้ำ คนตลอดเวลา ประมาณ 20-30 นาที จนละลายหมด ปรับ pH ให้เป็น 7 ด้วย 0.1 นอร์มอล กรดเกลือ แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มล.ด้วยน้ำกลั่น สารละลายสับสเตรทนี้ต้องเตรียมใหม่ทุกวัน

ข. สารละลายที่ใช้เจือจางเอนไซม์ : ผสม 0.03 โมลาร์ L-cysteine และ 0.05 โมลาร์ EDTA เข้าด้วยกัน แล้วปรับ pH เป็น 4.5 ด้วย 0.1 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือ 0.1 นอร์มอลกรดเกลือ สารละลายนี้ต้องเตรียมทุกวัน

ค. สารละลายที่ใช้ตกตะกอนโปรตีน : เตรียมได้จาก 0.11 โมลาร์ กรดไฮโดรคลอริก 0.22 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตท และ 0.83 โมลาร์ กรดอะซีติก

1.2 วิธีการ

นำสารละลายตัวอย่างที่ต้องการหาปฏิกริยามาเจือจางด้วยสารละลายที่ใช้เจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม สำหรับตัวอย่างที่ใช้เอนไซม์ผงใช้ 0.05 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มล. แล้วจึงนำมาเจือจางด้วยสารละลายดังกล่าวปริมาณ 1 มล. ใส่ในหลอดทดสอบ เติมสารละลายเคซีน 5 มล. ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกริยาสมบูรณ์เป็นเวลา 30 นาที กรองด้วยกระดาษกรอง whatman No.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลายที่กรองได้นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ช่วงคลื่น 275 นาโนเมตรโดยเทียบกับ blank น้ำกลั่น สำหรับคอนโทรลทำเช่นเดียวกันแต่เติมสารละลายกรดตะกอนโปรตีนก่อนเคชื่น ค่า OD ที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของไทโรซีนจะทราบปฏิกิริยาของเอนไซม์

1.3 การหากราฟมาตรฐาน (standard curve) ของโปรตีน

ใช้ไทโรซีนเป็นโปรตีนมาตรฐาน เตรียมสารละลายไทโรซีนให้มีความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม โดยละลายไทโรซีน 5 มิลลิกรัม ใน 0.1 นอร์มอลกรดเกลือให้มีปริมาตรเป็น 100 มล. แล้วนำสารละลายนี้มาเจือจางให้เป็น 10 20 30 40 ไมโครกรัม จากนั้นนำไปวัด O.D. ที่ช่วงคลื่น 275 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank เขียนกราฟมาตรฐานระหว่าง O.D. ที่ 275 นาโนเมตร กับไมโครกรัมของไทโรซีนจะได้เส้นกราฟดังรูป

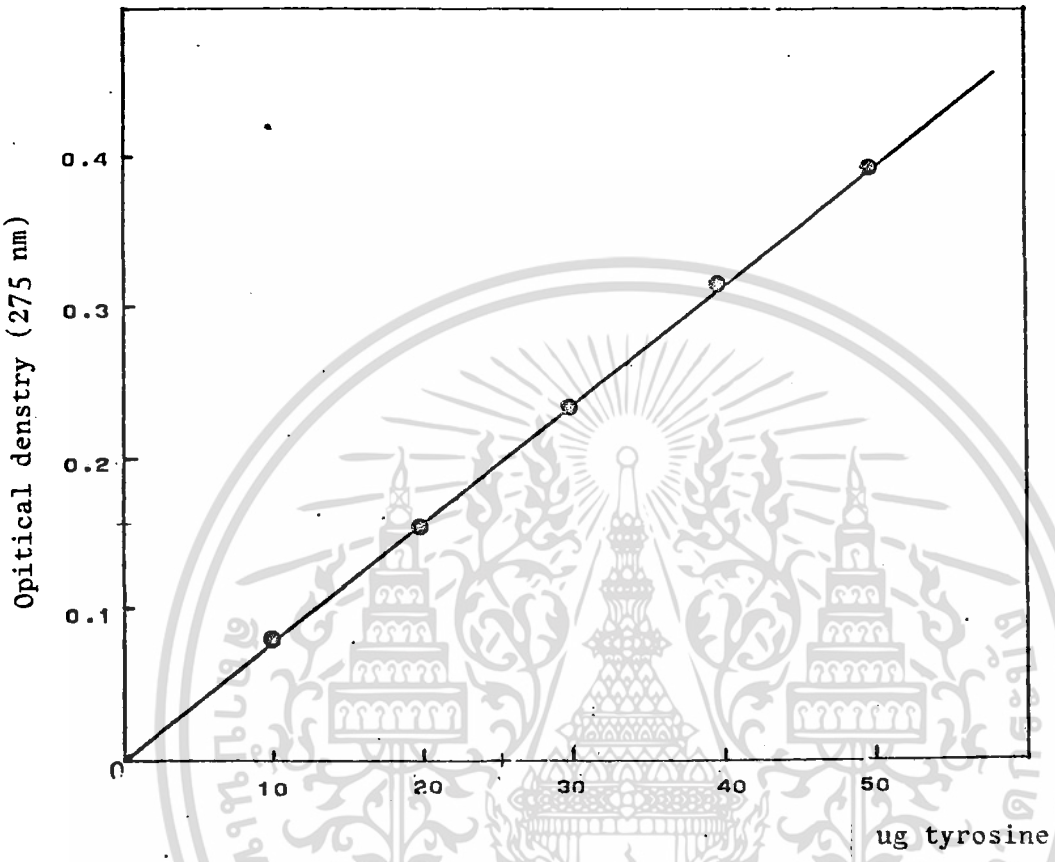
1.4 การคำนวณปฏิกิริยาของเอนไซม์เป็นหน่วยเอนไซม์ (casein digesting unit หรือ CDU)

1 หน่วยเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยเคชื่นได้สารใหม่ซึ่งอยู่ในอัตราเท่ากับไทโรซีน 1 ไมโครกรัมต่อ มล. ต่อนาที ที่ pH 7.0 อุณหภูมิ 37°c

$$CDU/mg = \frac{(E - E_o) \times 50 \times 11 \times dillution}{E_s \times 10 \times mg\ Bromelain\ /ml}$$

$$CDU/ml = \frac{(E - E_o) \times 50 \times 11 \times dillution}{E_s \times 10}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานไทโรซีน (50 ไมโครกรัม/มล.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

E = O.D. ที่วัดได้เมื่อปล่อยให้เอนไซม์ทำปฏิกริยากับสับสเตรทเคชั่น 10 นาที

E_o = O.D. ที่วัดได้เมื่อหยุดปฏิกริยาของเอนไซม์ก่อนจึงเติมสับสเตรท

E_s = ค่าคงที่ซึ่งได้จาก slope ของกราฟมาตรฐานไทโรซีน

2 การหาโปรตีนโดยวิธีของ Lowry (Lowry et al ,1951)

2.1 สารเคมีที่ใช้

ก. สาร A: สารละลาย 2% โซเดียมคาร์บอเนตใน 0.1 นอร์มอลโซเดียมไฮดรอกไซด์

ข. สาร B: สารละลาย 2% ของโซเดียมโปแตสเซียมทราเทรต

ค. สาร C: สารละลาย 1% w/v ของ $CuSO_4 . 5H_2O$

ง. alkaline copper solution ได้จากการผสม A 100 มล. B 1 มล. C 1 มล. เข้าด้วยกัน เตรียมแล้วใช้ทันที

จ. Folin reagent 1 นอร์มอล เจือจาง Folin Ciocalteu phenol reagent กับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1

ฉ. สารละลายโปรตีนมาตราฐาน ได้แก่ bovine serum albumin

2.2 วิธีการ

ใช้สารละลายตัวอย่าง (ที่มีโปรตีนอยู่ในปริมาณไม่เกิน 150 ไมโครกรัม/มล.)บรรจุในหลอดทดสอบ 1 มล.เติมสารละลายอัลคาไลด์ คอปเปอร์ 5 มล. ทิ้งไว้นาน 10 นาที แล้วรีบเติม Folin reagent 1 นอร์มอล 0.5 มล. ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันอย่างรวดเร็ว ทิ้งไว้ 50 นาที แล้วนำมาวัด O.D. ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank และนำค่า O.D. ที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐาน จะทราบโปรตีนที่มีในสารละลายตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 การหากราฟมาตรฐานของโปรตีน

ใช้ bovine serum albumin เป็นโปรตีนมาตรฐาน เตรียมสารละลาย bovine serum albumin ให้มีความเข้มข้น 150 125 100 75 50 และ 25 ไมโครกรัม /มล. ตามลำดับ ดูดแต่ละความเข้มข้นลงในหลอดทดลองที่สะอาด 1 มล. เติม alkaline copper solution 5.0 มล. ทิ้งไว้10 นาที แล้วเติม Folin reagent 1 นอร์มอล ผสม ให้เป็นเนื้อเดียวกัน ทิ้งไว้นาน 50 นาที นำมาวัด O.D. ที่ช่วงคลื่น 750 นาโนเมตร ใช้ น้ำกลั่นเป็น Blank เขียนกราฟมาตรฐานระหว่าง O.D.ที่ 750 นาโนเมตร กับไมโครกรัมของโปรตีนมาตรฐานจะได้กราฟดังรูป

3 การเตรียม 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5.5 -9.0

3.1 สารเคมีที่ใช้

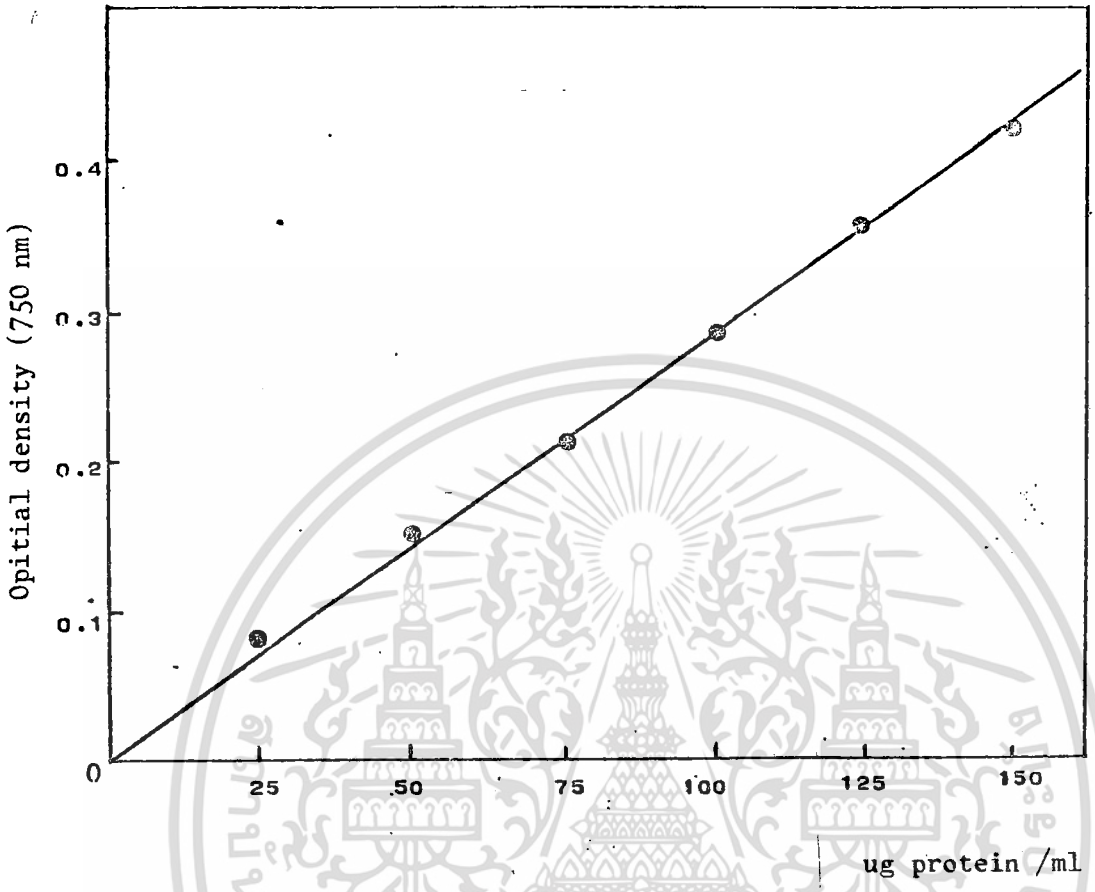
A สารละลาย 0.1 โมลาร์ของ monobasic sodium phosphate ($NaH_2PO_4.H_2O$) เตรียมโดยละลาย $NaH_2PO_2.H_2O$ 13.9 กรัมในน้ำ 1 ลิตร

B สารละลาย 0.1 โมลาร์ของ dibasic sodium phosphate ($Na_2H\ PO_4.7H_2O$) เตรียมโดยละลาย $Na_2H\ PO_4.7H_2O$ 26.825 กรัมในน้ำ 1 ลิตร

3.2 วิธีการ

ผสม x มล. ของสาร A กับ Y มล. ของสาร B ตาม pH ที่ต้องการ แล้วปรับปริมาตรเป็น 200 มล. ด้วย 0.1 นอร์มอลกรดเกลือหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพผนวกที่ 2 กราฟมาตรฐานของโปรตีน (Bovine serum albumin 150 ไมโครกรัม/มล.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

pH	5.5.	5.7	5.8	5.9	6.0	6.1	6.2	6.3	6.4	6.5
x	94.7	93.5	92.0	90.0	87.7	85.0	81.5	77.5	73.5	68.5
y	5.3	6.5	8.0	10.0	12.3	15.0	18.5	22.5	26.5	31.5

pH	6.6	6.7	6.8	6.9	7.0	7.1	7.3	7.4
x	62.5	66.5	51.0	45.0	39.0	33.0	28.0	23.0
y	37.5	43.5	49.0	55.0	61.0	67.0	72.0	77.0

pH	7.5	7.6	7.7	7.8	7.9	8.0	9.0
x	16.0	13.0	10.5	8.5	7.0	5.3	3.8
y	84.0	87.0	90.5	91.5	93.0	94.7	96.2

4 การเตรียมซิเตรท ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 2.6 - 7.0

4.1 สารเคมีที่ใช้

A สารละลาย 0.1 โมลาร์ของกรดซิตริก เตรียมโดยละลาย 13.21 กรัม ของกรดซิตริกในน้ำกลั่น 1000 มล.

B สารละลาย 0.2 โมลาร์ของdibasic sodium phosphateเตรียม โดยละลาย 53.65 กรัมของ $Na_2HPO_4.7H_2O$ หรือ 71.7 กรัมของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$Na_2HPO_4.12H_2O$ ในน้ำกลั่น 1000 มล.

4.1 วิธีการ

ผสม x มล. ของสาร A กับ Y มล. ของสาร B แล้วเจือจางให้มีปริมาตรเป็น1000 มล.

pH	2.6	2.8	3.0	3.2	3.4	3.6	3.8	4.0
x	44.6	42.2	39.8	37.7	35.9	33.9	32.3	30.7
y	5.4	7.8	10.2	12.5	14.1	16.1	17.7	19.3

pH	4.2	4.4	4,5	4.8	5.0	5.2	5.4	5.6
x	29.4	27.8	26.7	25.2	24.3	23.3	22.2	21.0
y	20.6	22.2	23.3	24.8	25.7	26.7	27.8	29.0

pH	5.8	6.0	6.2	6.4	6.6	6.8	7.0
x	19.7	17.9	16.9	15.4	13.6	9.1	6.5
y	30.3	32.1	33.1	39.6	36.4	40.9	43.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ตารางผนวกที่ 1

การวิเคราะห์สถิติของปฏิกริยาของเอนไซม์โดยใช้ pH ของสารสกัดต่าง ๆ กัน

ANOVA

SOV	df	SS	MS	F
Tratement	12	14.8×10^{8}	12.3×10^{7}	3.33^{**}
13vs 12,11, 10,9,8,7,6 5,4,3,2,1	1	3.56×10^{7}	5.56×10^{7}	0.096^{ns}
Error	27	10.2×10^{8}	3.7×10^{7}	
Total	38	25×10^{8}		

ns ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

** แตกต่างทางงาถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเหตุ

1 citrate phosphate buffer pH 3.2

2 citrate phosphate buffer pH 3.6

3 citrate phosphate buffer pH 4.0

4 citrate phosphate buffer pH 4.4

5 citrate phosphate buffer pH 4.8

6 phosphate buffer pH 5.5

7 phosphate buffer pH 6.0

8 phosphate buffer pH 6.5

9 phosphate buffer pH 7.0

10 phosphate buffer pH 7.5

11 น้ำกลั่น pH 6.0

12 น้ำกลั่น pH 6.5

13 น้ำกลั่น pH 7.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 2

การวิเคราะห์สถิติของปฏิกริยาของเอนไซม์โดยใช้สารตกตะกอนต่าง ๆ กัน

ANOVA

SOV	df	SS	MS	F
Treatment	5	1.2×10^{12}	2.4×10^{11}	333.8 **
6vs 5,4,3,2,1	1	7.18×10^{11}	7.18×10^{11}	999.32 **
5vs 4,3,2,1	1	4.22×10^{11}	4.22×10^{11}	586.6 **
4vs 3,2,1	1	5.09×10^{9}	5.09×10^{9}	7.08 *
3vs 2,1	1	1.59×10^{9}	1.59×10^{9}	0.22 ns
2vs 1	1	6.31×10^{10}	6.31×10^{10}	87.70 **
Error	12	8.64×10^{9}	7.91×10^{8}	
Total	17	1.209×10^{12}	7.11×10^{10}	

ns ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

หมายเหตุ 1.ethyl alcohol 50%

2 ethyl alcohol 30% ,50%

3 $(NH_4)_2SO_4$ 20%

4 acetone 13% ,56%

5 acetone 23% ,56%

6 acetone 33% ,56%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 3 การวิเคราะห์สถิติของปฏิกิริยาเอนไซม์โดยใช้ pH ในการตกตะกอนต่าง ๆ กัน

ANOVA

SOV	df	SS	MS	F
Treatment	3	67356.92	22452.30	1976.43**
1 VS 2,3,4	1	45867.36	45867.36	4037.82**
2 VS 3,4	1	16501.39	16501.39	1452.59**
3 VS 4	1	4988.16	4988.16	439.00**
ERROR	8	90.01	11.36	
TOTAL	11	67446.92		

** แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

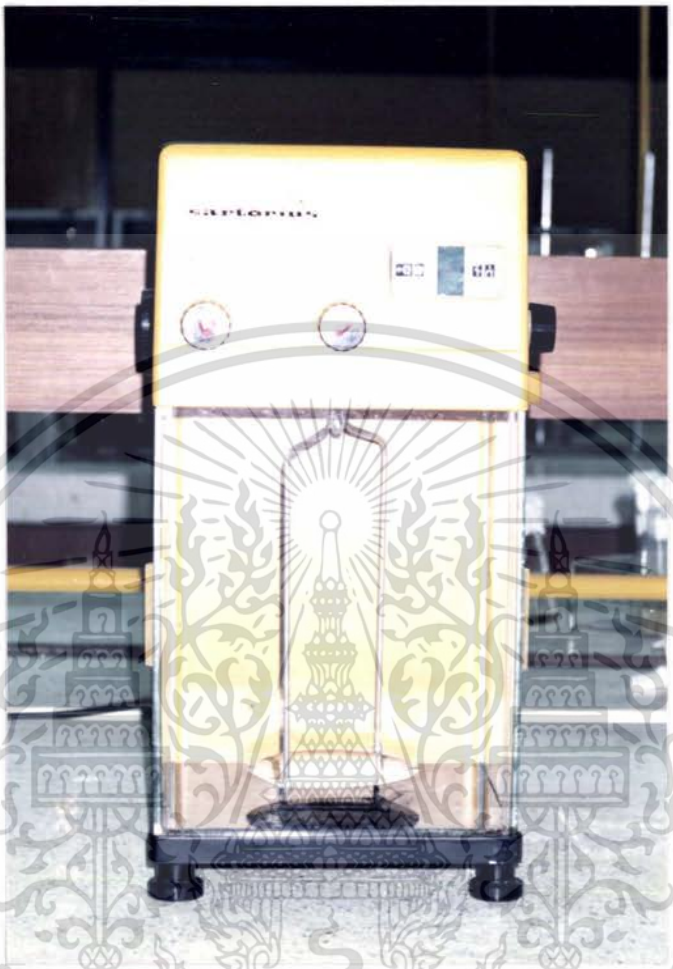
หมายเหตุ 1 pH 3.3

2 pH 4.3

3 pH 5.3

4 pH 6.3

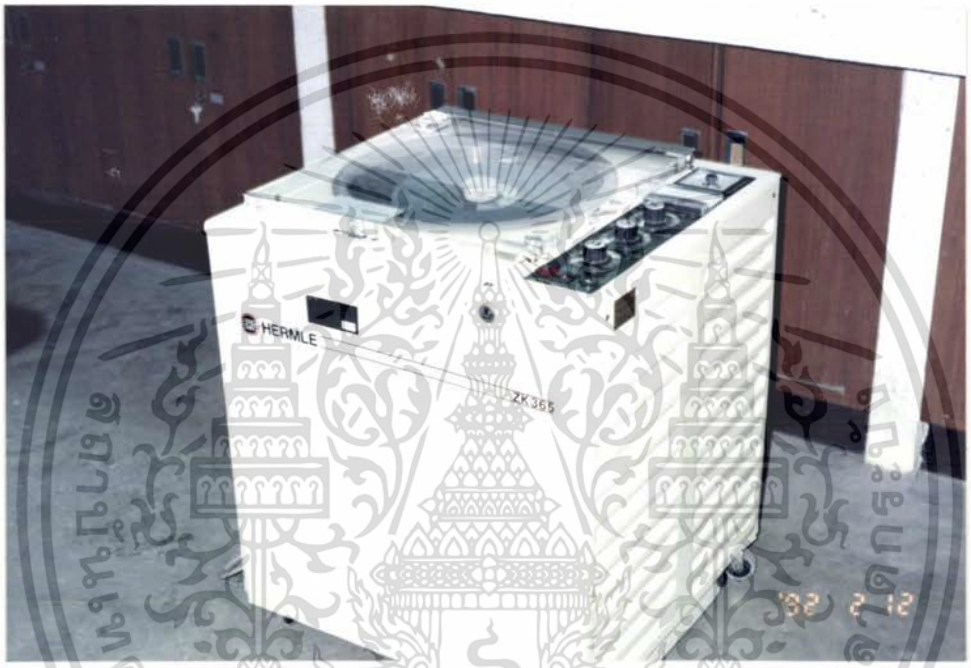
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพผนวกที่ 3 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

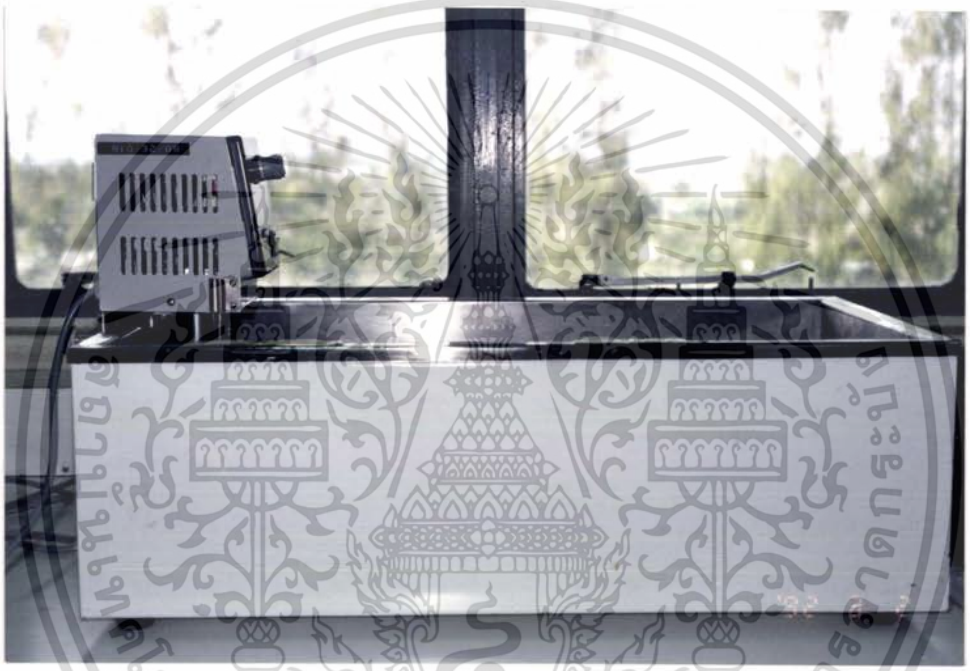
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



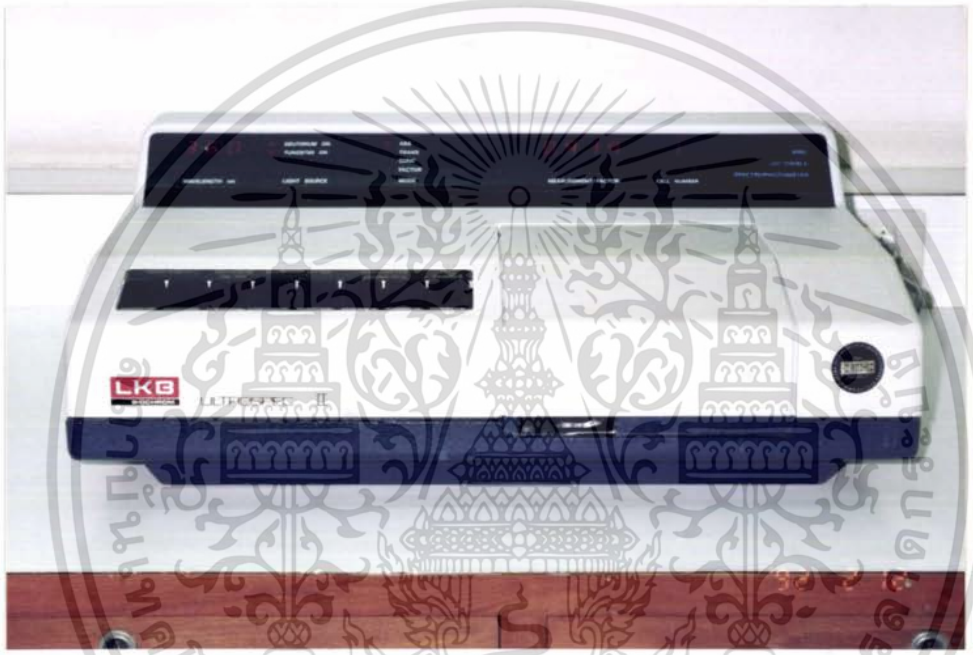
ภาพผนวกที่ 4 เครื่องเหวี่ยงปั่นปรับอุณหภูมิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



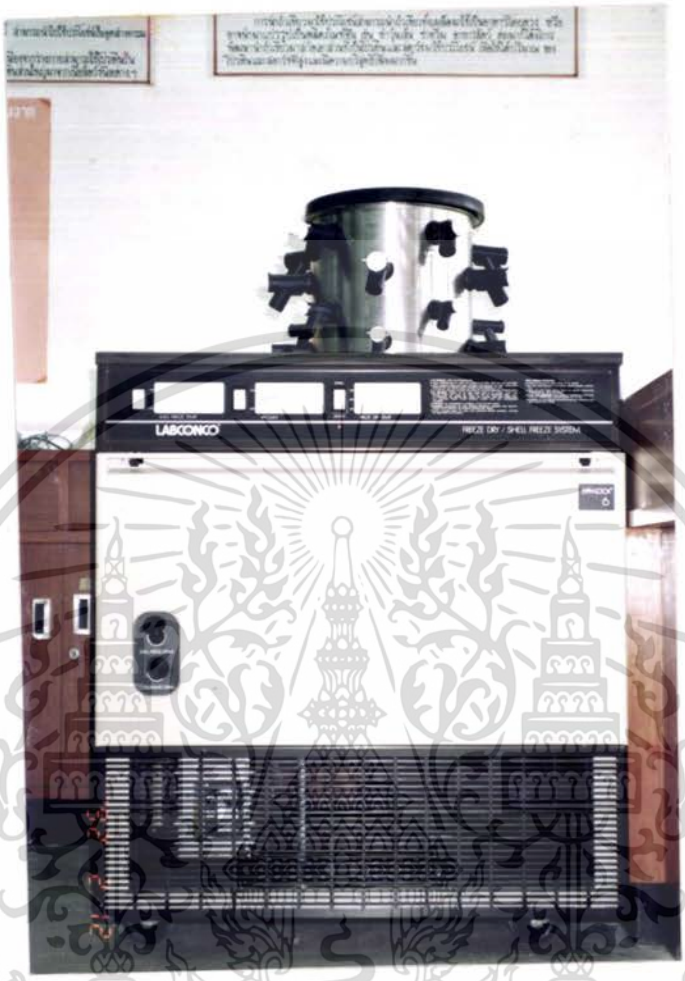
ภาพผนวกที่ 5 หม้ออังไอน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพผนวกที่ 6 สเปคโตรโฟโตมิเตอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพผนวกที่ 7 เครื่องทำแห้งแบบแช่แข็ง (Freeze dryer)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพผนวกที่ 8 สารเคมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

1.กรมส่งเสริมการเกษตร."สถิติการปลูกพืชไร่ ปี 2524/25"กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพมหานคร,2525

2.กัลยา วงศ์สินอุดม."การแยกและการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์จากลำต้นสับปะรดที่สามารถย่อยโปรตีนได้". วิทยานิพนธ์ ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2520

3.เจริญ จันทลักขณา.สถิติวิเคราะห์และการวางแผนการวิจัย,ไทยวัฒนาพานิชจำกัด, 2523

4.จารุพันธ์ ทองแถม.มล."สับปะรดและอุตสาหกรรมสับปะรดในประเทศไทย". วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. ภาควิชาพืชสวน,คณะเกษตร,มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,2526

5.ประเสริญ กองทิพย์."การทดลองใช้โบรมิเลนช่วยในการทำน้ำปลา".วิทยานิพนธ์ปริญญาโท,ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร,คณะเกษตร,มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2526

6.สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร"สถิติการเพาะปลูกพืชเศรษฐกิจ ประจำปี 2524/25" สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์,กรุงเทพมหานคร 2525

7.Balls,A.K.;R.R. Thompson and M.W.Kies."Bromelain properties and commercial production"Inductrial and Engineering Chemistry 33(1941) : 33 - 35

8.Collins, J.L.The Pineapple,2 nd ed.,pp 54 - 56. Leonard Hill, London, 1968

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

10.Hagihara,B.;H. Matsubara;M.Nakari and L.Okunuki."Crystalline bacterial proteinase.I.Preperation of crystalline protinase of *Bacillus subtilis*"J.Biochem", 45(1958):98-120

11.Harland,H.;Y.William;D.Warner and J.K. Mc Anelly."Process of purifying bromelain"U.S.Pat 2,442,764,1969

12.Heinike,R.M."Process of the preperation of pineapple stem bromelain"U.S. Pat 2,442,764,1956

13.Heinike,R.M.and W.A.Gortnor."Stem bromelain a new protease preperation from pineapple plant"Economic botany"11(1957): 25-28

14.Henry.E. "Chillproofing compound"U.S.Pat2,008,712,1937

15.Hogan,J.M. "Meat tenderization process"U.S. Pat3,052,851,1962

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

17.Hwang,K. and A.C.Ivy. "A review of literature on the potential therapeutic significance of papain"Ann.N.Y.Acad.Sci, 16(1951):54-16

18.Inagami,T.and T. Murachi.Kinetic studies of bromelain catalysis, biochemistry,No.2.pp.14-39,1961

19.Langlykke,A.E.;C.V. Smith and D. Perlman.Enzyme technology, The enzyme(J.B.and K.Myrbal1.ed.),Academic press,N.Y.1952

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

20.Linear,I.E.The sulfhydryl protease, Food releated enzyme (Whitaker,J.R.ed.), American Chemical Society, Whashington,D.C.1974

21.Murachi,T.Amino acid composition of stem bromelain,Biochemistry, 3rd.,1964

22.Murachi,T. and M. Yasui.Alkylphospholylation of stem bromelain by diisopropylpnosphofluoridate without inhibition on protenase activity,Biochemistry,4th ed.,1965

23.Murachi,T.and H.Neurath."Fractionation and Specificity studies on stem bromelain"J.Biol.Chemistry."2(1960):90-99

24.Ota,S.;K.Morie and F.Hangio."Heterogeniety of bromelain of the pineapple stalk "J. of Biomistry.4(1961):80-85

25.Ota,s.;t.fu and R. Hirohata."Studies on bromelain its activation and fractionation"J.of Biochemistry".1(1961):90-99

26.Ota,s.;S.Moore and W.H. Stein.Preperation and chemical properties of purified stem and fruit bromelain,Biochemistry,3rd.ed.

27.Reed,G.Enzyme in food processing, Academic Press,N.Y.,1966

28.Ronai,U.S. and M.W. Smull.Modified proteins for stabilitzing latex paints,Ind.Eng.Chem,1954

29.Scocca.T.and Y.C.Lee. "The composition and structure of the carbohydrate of pineapple stem bromelain"J.Biol.Chem." 14(1969):48-52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

30.Su,Y.C.;C.Y.Chu;Y.T.Lai and K.S. Lai."Studies on the production of stem bromelain from pineapple waste"J.Chinese. Agr. Chem.Soc.Spc.Iss.10(1975):5-10

31.Wallerstein,"Method of treating beer or ale" U.S. Pat 2,995,826

32.Whitaker,J.R. Principle of enzymology for the food science, Marvell Dekker,N.Y.,1972

33.Wiseman,a.Topic in enzyme and fermentation biotechnology,Biddles of Guideford, Great Britain,1978

34.Yasuda,Y.;N. Takahashi and T. Murachi.The composition and structure of carbohydrate moiety of stem bromelain, Biochemistry,1970

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้