ว.เกษตรศาสตร์ (วิทย) 20 : 37-43 (2529)

# ผลของสภาพวัตถุดิบและการสกัดต่อการผลิตบรอมิเลน

## Role of raw Material Conditions and Extraction in Bromelain Production

ทนง ภัครัชพันธุ์[1]
Thanong Pukrushpan

**ABSTRACT**

Bromelain activity in pineapple stem of different maturities, sources and storage conditions was investigated. Extraction method was comparatively studied between two roller press and blending. The bromelain activity was expressed as CDU (Casein Digesting Unit) per gram of peeled stem. The result showed that, the three years old stem contains 25,671.85 CDU per gram of stem which account for 43.7%, while those of the second and the first year contain only 32.0 and 19.3% respectively. The pineapple stem from Cholburi and Prachaubkirikhan contain 25,479.1 and 31.030.1 CDU bromelain activity per gram of stem respectively, and only 14,000 CDU/gm of stem was found in those from Lampang.

Pineapple stem could be stored at least for 2 weeks in cold room (5°C) or 3 days at room temperature, without considerable loss of bromelain activity. Under experimental condition, better yield of enzyme extration was obtained from blending with water than two roll-press method.

## บทคัดย่อ

จากการศึกษาปริมาณเอ็นไซม์บรอมิเลนในลำต้นสับปะรดเพื่อพัฒนากรรมวิธีการผลิตบรอมิเลน โดยการสกัดจากลำต้นสับปะรดที่มีอายุ แหล่งปลูก และสภาพการเก็บรักษาก่อนการสกัดแตกต่างกันและได้เปรียบเทียบกรรมวิธีการสกัดด้วยเครื่องตีปั่นและเครื่องหีบอ้อย คิดปริมาณเอ็นไซม์เป็น CDU(Casein Digesting Unit) ต่อกรัมลำต้นปอกเปลือกแล้ว หรือคิดเป็น 48.7% เมื่อเปรียบเทียบกับลำต้นที่มีอายุ 2 ปี และ 1 ปี คือมีเอ็นไซม์เพียง 32.0 และ 19.3% ตามลำดับ บรอมิเลนในลำต้นที่ปลูกแถบชลบุรี และประจวบคีรีขันธ์มีเอ็นไซม์ 25,479.1 และ 31,030.1 CDU/กรัม ตามลำดับและสูงกว่าจากแหล่งปลูกที่ลำปางซึ่งมีเพียง 14,000 CDU/กรัม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

หลังการเก็บเกี่ยวแล้วสามารถเก็บรักษาลำต้นสับปะรดไว้ในห้องเย็น (5°ซ) ได้ถึง 2 สัปดาห์ โดยที่ปริมาณเอ็นไซม์ไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก ทำนองเดียวกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องจะได้เพียง 3 วันเท่านั้น นอกจากนี้พบว่าการสกัดเอ็นไซม์ด้วยเครื่องตีปั่นด้วยน้ำกลั่นให้ผลดีกว่าการใช้เครื่องหีบอ้อยแบบ 2 ลูกกลิ้งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

1 ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
Dept. of Food science and Technology, Faculty of Agro-Industy, Kasetsart Univ.

## คำนำ

บรอมิเลนเป็นเอ็นไซม์ที่สามารถผลิตได้จากสับปะรดเพียงแหล่งเดียว Chittenden พบเอ็นไซม์นี้ครั้งแรกประมาณศตวรรษที่ 19 ในน้ำสับปะรด (Heinicke and Gortner, 1957) และต่อมาพบว่าเอ็นไซม์นี้มีมากในลำต้นซึ่งจะแตกต่างกันไปตามความแก่อ่อนและแหล่งที่ปลูกอย่างเช่นไต้หวันและโอกินนาวา (Ota, Horie and Hagino, 1969) และแตกต่างไปตามส่วนต่าง ๆ ของสับปะรดอีกด้วย (ทนง ภัครัชพันธุ์ และอรวิณท์ วงศ์มีเกียรติ. 2527) เนื่องจากบรอมิเลนเป็นเอ็นไซม์ที่ใช้ประโยชน์ในการย่อยโปรตีน ใช้กันมากในอุตสาหกรรมอาหาร และอุตสาหกรรมอื่น ๆ เช่น การฟอกหนังอุตสาหกรรมยาและสารเคมีเป็นต้น ประกอบกับประเทศไทยมีการผลิตสับปะรดเป็นจำนวนมากเพิ่มขึ้นตามความต้องการของตลาดในแต่ละปี เป็นผลให้มีส่วนเหลือทิ้งมากมาย จึงมีความจำเป็นในการศึกษาเพื่อนำเอาบรอมิเลนมาใช้ประโยชน์มากขึ้น เนื่องจากเอ็นไซม์เป็นโปรตีนที่สามารถทำงานได้ พบอยู่ในส่วนต่าง ๆ ของสับปะรดโดยเฉพาะลำต้นซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่แข็งแรง Heinicke, (1961) จึงได้พยายามศึกษาเพื่อสกัดให้ได้เอ็นไซม์ที่มีความสามารถในการทำงานสูงด้วยวิธีการต่าง ๆ เช่น การปอกเปลือกและใช้แรงบีบอัดจะให้ปริมาณเอ็นไซม์ที่สูงกว่าการไม่ปอกเปลือก และ SU และคณะ (1975) รายงานวิธีการที่เหมาะสมคือทำการสกัดด้วยแรงขนาด 15,000 ปอนด์ต่อนาที/ตารางนิ้ว จากนั้นเหวี่ยงแยกน้ำสกัดที่ประมาณ 5000 รอบต่อนาทีที่ 5℃ นาน 10 นาที

เนื่องจากปริมาณและความสามารถในการทำงานของบรอมิเลนมีผลมาจากสภาพวัตถุดิบ การเก็บรักษาและการสกัด ฉะนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อศึกษาผลของสภาพวัตถุดิบ การเก็บรักษาและวิธีการสกัดต่อปฏิกิริยาการทำงานของเอ็นไซม์สำหรับการพัฒนากรรมวิธีการผลิตบรอมิเลนต่อไป

## อุปกรณ์และวิธีการ

### วัตถุดิบ

ลำต้นสับปะรดพันธุ์ปัตตาเรีย จากไร่ของโรงงานบริษัทอาหารสยาม ชลบุรี, อาหารสากล ลำปาง และโดล (ประเทศไทย) ประจวบคีรีขันธ์ นำมาศึกษาที่ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร

*การเตรียมวัตถุดิบ* จากลำต้นทำความสะอาดโดยการแยกใบออก ปอกเปลือกแล้วสับละเอียดด้วยมีด สุ่มตัวอย่างประมาณ 20 กรัม ตีปั่นในเครื่องปั่นขนาด 500 มล. ด้วย 20 มล. 0.05 โมลาฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 นาน 1 นาที กรองแยกกากด้วยผ้าขาวบาง แล้วนำสารละลายที่ได้ไปเหวี่ยงแยกที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4℃ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปตรวจหาโปรตีนโดยวิธีของ Lowry และคณะ (1951) และตรวจสอบปฏิกิริยาเอ็นไซม์บรอมิเลน

### การตรวจสอบปฏิกิริยาเอ็นไซม์

นำของเหลวที่สกัดได้ มาตรวจหาปฏิกิริยาของเอ็นไซม์โดยใช้สารละลายเคซีนเข้มข้นร้อยละ 0.6 ใน 0.05 โมลาฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 เป็นซับสเตรทจำนวน 5 มล. ทำปฏิกิริยากับสารละลายเอ็นไซม์ที่ทำให้เจือจางแล้วด้วยสารละลายซึ่งประกอบด้วย 0.03 โมลา L -cysteine และ 0.006 โมลา EDTA pH 4.5 จนมีความเข้มข้นพอเหมาะจำนวน 1 มล. ปล่อยให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37℃ นาน 10 นาที เมื่อครบกำหนดหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลายซึ่งประกอบด้วย trichloroacetic acid 0.11 โมลา, Sodium acetate 0.22 โมลา และ Acetic acid 0.33 โมลา 5 มล. เขย่าให้เข้ากันแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37℃ 30 นาที เพื่อให้ตะกอนตกสมบูรณ์ จากนั้นกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำสารละลายที่ได้ไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 275 nm แล้วคำนวณปริมาณเอ็นไซม์เป็นหน่วย CDU/กรัม ดังนี้

1. CDU (Casein digesting unit) คือปริมาณเอ็นไซม์ที่สามารถย่อยเคซีนได้สารใหม่ซึ่งอยู่ในอัตราส่วนเท่ากับไทโรซีน 1 ไมโครกรัมต่อ มล. ต่อนาทีที่ pH 7.0 อุณหภูมิ 37℃ (Anonymous)

### สภาพวัตถุดิบและการเก็บรักษา

ทำการศึกษาในลำต้นสับปะรดที่มีอายุ 1, 2 และ 3 ปี จากไร่บริษัทอาหารสยาม ชลบุรี สำหรับความแตกต่างอื่น ๆ ทำการศึกษา จากลำต้นที่มีอายุ 3 ปี ของ

ทั้ง 3 แหล่ง คือ ชลบุรี ลำปาง และประจวบคีรีขันธ์

สำหรับการเก็บรักษาทำการศึกษาโดยนำลำต้นอายุ 3 ปี มาผ่าครึ่งตามความยาวเพื่อแบ่งลำต้นเป็น 2 ส่วนเท่า ๆ กัน แยกส่วนหนึ่งเก็บไว้ในห้องเย็นที่ 5°ซ และอีกส่วนหนึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 32°ซ) และทำการตรวจสอบปริมาณโปรตีนและเอ็นไซม์เมื่อเก็บไว้ 1, 3, 7, 13 และ 30 วัน

## ศึกษาเปรียบเทียบการสกัดบรอมิเลน

นำลำต้นสับปะรด (อายุ 3 ปี) มาแยกใบออก ปอกเปลือกแล้วทำการสกัด (1) ด้วยเครื่องหีบอ้อย โดยนำลำต้นที่ปอกเปลือกแล้วไปแช่น้ำกลั่นอัตราส่วน 1 : 1 โดยน้ำหนักนาน 30 นาที แล้วทำการบีบอัดลำต้นเพื่อสกัดน้ำออกจากลำต้นด้วยเครื่องหีบอ้อยหลาย ๆ ครั้งจนไม่สามารถสกัดน้ำได้อีกแล้ว (2) สกัดด้วยเครื่องตีป่น (Blender) โดยนำลำต้นปอกเปลือกแล้วมาหั่น, สับแล้วตีป่นร่วมกับน้ำกลั่นในอัตรา 1 : 1 น้ำหนักโดยปริมาตรเป็นเวลา 1, 2 และ 3 นาที กรองแยกตะกอนแล้วตรวจหาโปรตีนและเอ็นไซม์

## การศึกษาผลของ pH และอุณหภูมิต่อการสกัดบรอมิเลน

เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดด้วยเครื่องตีป่นนาน 2 นาที ทำการเปรียบเทียบการสกัดด้วย 0.05 โมลาซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 3.5, 4.5 และ 5.5 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH6.5, 7.0, 7.5 และน้ำกลั่น pH 6.0 และ เฉพาะ 0.05 โมลาซิเตรท ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 4.5 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กันคือ 10, 20, 30, 40, 50 และ 70°ซ

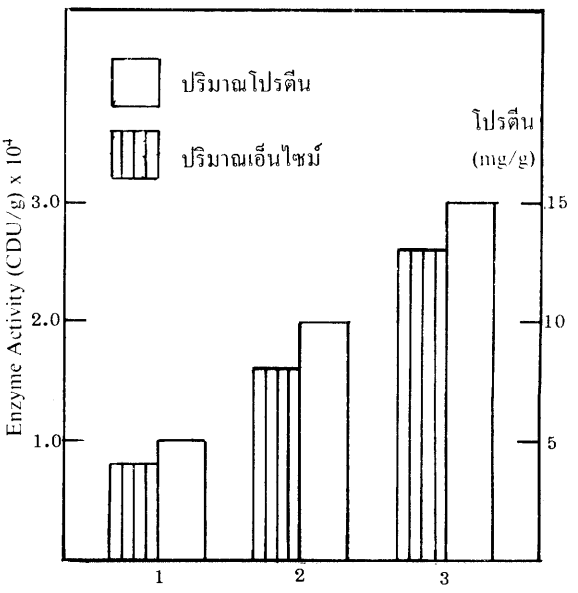
# ผลการทดลองและวิจารณ์

## สภาพวัตถุดิบและการเก็บรักษา

### 1. ผลของอายุต่อปริมาณเอ็นไซม์

การศึกษาผลของอายุวัตถุดิบ สามารถทำได้เพียงอายุ 3 ปี ทั้งนี้เนื่องจากการเก็บเกี่ยวสับปะรดในประเทศไทยนั้น จะเก็บผลครั้งแรกเมื่อสับปะรดมีอายุประมาณ 1.5 ปี และเก็บเกี่ยวครั้งที่สองเมื่ออายุประมาณ 3 ปี หลังจากนั้นเก็จะไถกลบหรือเผาเพื่อเตรียมดินไว้ปลูกสับปะรดรุ่นใหม่ต่อไป

จากการสุ่มตัวอย่างลำต้นสับปะรดจากแหล่งปลูกของโรงงาน ที่มีอายุ 1, 2 และ 3 ปี มาหาปริมาณเอ็นไซม์พบว่า ลำต้นอายุ 3 ปี จะมีเอ็นไซม์มากที่สุด โดยเฉลี่ย 25, 671.85 CDU/กรัมของน้ำหนักลำต้นที่ปอกเปลือก และปริมาณเอ็นไซม์มีแนวโน้มลดลงตามอายุ คือ 2 ปี มีเอ็นไซม์โดยเฉลี่ย 16,862.12 CDU/กรัม และ 10,190.12 CDU/กรัม สำหรับลำต้นอายุ 1 ปี ตามลำดับส่วนโปรตีนก็เช่นกัน มีแนวโน้มเพิ่มตามอายุคือ 5.9 และ 13 มิลลิกรัม/กรัม ของน้ำหนักลำต้นปอกเปลือกเมื่ออายุเพิ่มขึ้นจาก 1, 2 และ 3 ปี ตามลำดับ (ภาพที่ 1) จากการคำนวณเปรียบเทียบทางสถิติปริมาณเอ็นไซม์ในลำต้นสับปะรดที่มีอายุ 3 ปี มากกว่า 2 และ 1 ปี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ




**ภาพที่ 1 ปริมาณเอ็นไซม์บรอมิเลนและปริมาณโปรตีนในลำต้นสับปะรดที่มีอายุ 1, 2 และ 3 ปี**

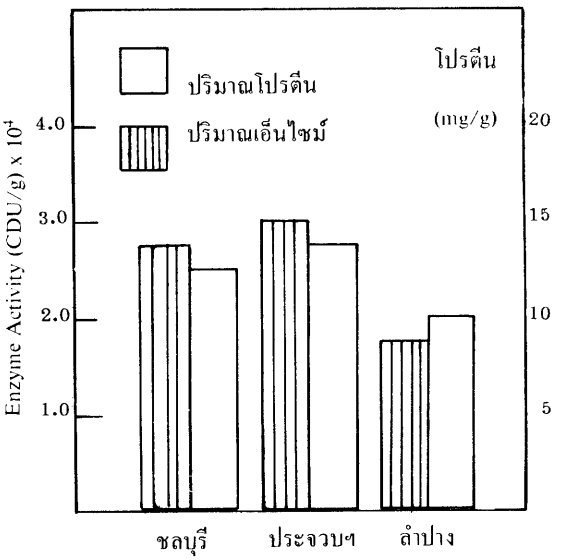
ฉะนั้น อายุหรือความแก่อ่อนจึงเป็นปัจจัยอันหนึ่งที่มีผลต่อปริมาณเอ็นไซม์บรอมิเลน โดยเอ็นไซม์จะมีมากที่สุดในลำต้นที่แก่จัด เมื่อคำนวณเปรียบเทียบกับปริมาณเอ็นไซม์ในลำต้นรวม 3 ปีแล้วพบว่าในลำต้นแก่จัดอายุ 3 ปีจะมีเอ็นไซม์ประมาณร้อยละ 48.69 (1975) เอ็นไซม์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามอายุลำต้นสับปะรด

ขณะที่ลำต้นอายุ 2 ปีมีร้อยละ 31.98 และ 1 ปี มีเพียง ร้อยละ 19.35 ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาของ Heinicke and Gortner (1957) และ Su และคณะ ซึ่งมีปริมาณเอ็นไซม์ร้อยละ 53, 36 และ สำหรับอายุ 3.5, 2 และ 1 ปี ตามลำดับ ส่วนความแตกต่างที่เกิดขึ้นอาจเกิดจากสภาวะในการปลูก สภาพดินฟ้าอากาศ การบำรุงดูแลรักษาและฤดูกาลเก็บเกี่ยวที่แตกต่างกัน ระหว่างของประเทศไทยกับต่างประเทศก็เป็นได้ตลอดจนประเทศไทยเก็บเกี่ยวผลครั้งที่ 2 เมื่ออายุเพียง 3 ปี

## 2. ผลของแหล่งปลูกต่อปริมาณเอ็นไซม์

ชลบุรี ประจวบคีรีขันธ์ และลำปาง เป็นแหล่งสำคัญในการผลิตสับปะรดของประเทศไทยในปัจจุบัน จากการศึกษาปริมาณเอ็นไซม์พบว่าทั้งปริมาณเอ็นไซม์และโปรตีนที่ได้จะแตกต่างกันดังภาพที่ 2 ลำต้นสับปะรดจากจังหวัดชลบุรี และประจวบคีรีขันธ์ มีเอ็นไซม์โดยเฉลี่ย 25, 479.11 และ 31,030.13 CDU/กรัมของน้ำหนักลำต้นปอกเปลือก ส่วนโปรตีน 12.53 และ 13.17 มิลลิกรัม/กรัมของน้ำหนักลำต้นปอกเปลือก และปริมาณเอ็นไซม์จากทั้งสองแหล่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ลำต้นสับปะรดจากลำปางมีเอ็นไซม์น้อยกว่าแหล่งอื่น คือมีเพียง 14,000 CDU/กรัม และโปรตีนเพียง 7.11 มิลลิกรัม/กรัม ซึ่งต่างจากปริมาณเอ็นไซม์และโปรตีนในลำต้นสับปะรดจากจังหวัด ชลบุรี และประจวบคีรีขันธ์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

การที่ปริมาณเอ็นไซม์บรอมิเลนในลำต้นสับปะรดจากแหล่งต่าง ๆ แตกต่างกันไปอาจเนื่องจาก สภาพดิน ภูมิอากาศ การให้น้ำ การบำรุงรักษา โดยเฉพาะอย่างยิ่ง สภาพดิน ดังนั้นลักษณะ ชนิดและความสมบูรณ์ของดินจึงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อปริมาณการผลิตเอ็นไซม์ของต้นสับปะรด โดยลักษณะทั่วไปสภาพดินจากประจวบคีรีขันธ์ และ ชลบุรี เป็นดินทรายมากกว่า ความอุดมสมบูรณ์น้อยกว่าทางลำปาง ฉะนั้นปริมาณเอ็นไซม์อาจมีความสัมพันธ์กับสาเหตุเหล่านี้ก็เป็นได้ ซึ่งเป็นสิ่งที่น่าสนใจ และควรมีการศึกษาต่อไป

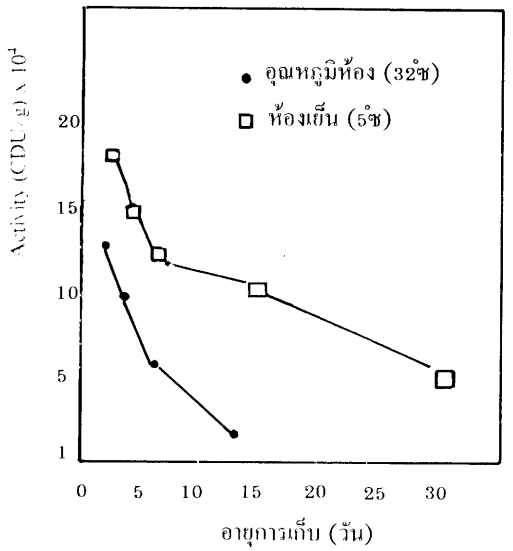



**ภาพที่ 2 ปริมาณเอ็นไซม์บรอมิเลนและปริมาณโปรตีนในลำต้นสับปะรดจากแหล่งต่าง ๆ คือ ชลบุรี ประจวบคีรีขันธ์ และ ลำปาง แหล่งปลูก**

## 3. ผลการเก็บรักษาวัตถุดิบ

จากการนำลำต้นสับปะรดอายุประมาณ 3 ปี มาแยกเป็น 2 ส่วนให้เหมือนกัน เพื่อกำจัดความแตกต่างของปริมาณเอ็นไซม์ในแต่ละต้น ส่วนหนึ่งเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง (32°ซ) อีกส่วนหนึ่งเก็บไว้ในห้องเย็น (5°ซ) เมื่อนำมาหาปริมาณเอ็นไซม์บรอมิเลนหลังเก็บไว้ในระยะเวลาต่าง ๆ กัน พบว่า เอ็นไซม์มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณ โดยมีแนวโน้มที่จะลดลงตามระยะเวลาในการเก็บรักษาทั้งที่อุณหภูมิห้องและห้องเย็น (ภาพที่ 3) แต่การเก็บที่อุณหภูมิห้องจะให้เอ็นไซม์มีการสูญเสียปฏิกิริยาการทำงานได้เร็วกว่าเก็บที่ห้องเย็นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และที่อุณหภูมิห้องสามารถเก็บได้เพียง 3 วันโดยปริมาณเอ็นไซม์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเก็บไว้ 1 สัปดาห์ จะเริ่มมีราสีเขียวขึ้นและหลังปอกเปลือก ลำต้นสับปะรดจะมีสีเหลืองสารละลายเอ็นไซม์ที่สกัดได้มีสีเหลืองเข้ม เอ็นไซม์มีการเปลี่ยนแปลงในทางลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 หลังจาก 2 สัปดาห์ไปแล้ว ลำต้นจะแห้งแข็งไม่สามารถสกัดได้ และมีราสีเขียวขึ้นทั่วไป ไม่สามารถ

วิเคราะห์ต่อไปส่วนการเก็บรักษาที่ห้องเย็น สามารถเก็บไว้ได้อย่างน้อย 2 สัปดาห์โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงของเอ็นไซม์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติปริมาณเอ็นไซม์จะลดลงร้อยละ 43.75 ของปริมาณเอ็นไซม์เริ่มต้นภายในเวลา 1 เดือนหลังจากนั้นจะมีเมือก ราสีเขียวและมีการเสื่อมเสียเกิดขึ้น



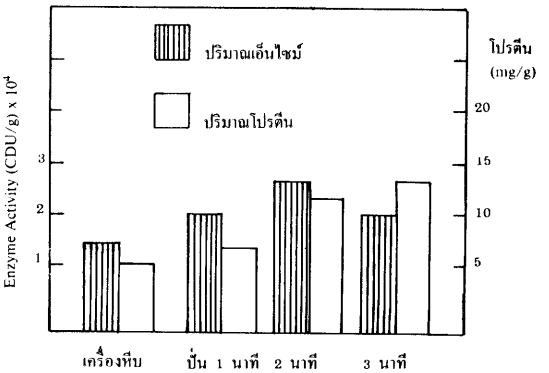

**ภาพที่ 3 การเปลี่ยนแปลงของเอ็นไซม์บรอมิเลนในลำต้นสับปะรดระหว่างการเก็บรักษา**

## ผลการเปรียบเทียบวิธีการสกัดบรอมิเลน

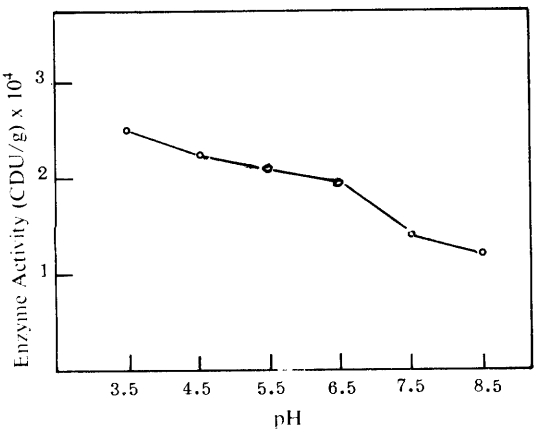
จากการทดลองเปรียบเทียบการสกัดด้วยเครื่องหีบอ้อยและการตีป่น เวลา 1, 2 และ 3 นาที ปรากฏว่าการสกัดด้วยเครื่องบีบอ้อยจะให้เอ็นไซม์ที่มีปฏิกิริยาการทำงานต่ำกว่าการใช้เครื่องตีป่นอย่างมีนัยสำคัญของสถิติ ทั้งนี้เพราะเครื่องตีป่นมีความสามารถทำให้เซลแตกเป็นชิ้นส่วนขนาดเล็กซึ่งมีพื้นที่ผิวในการสัมผัสกับน้ำได้มากกว่า จึงทำให้เอ็นไซม์ละลายออกมาได้มากกว่าการใช้เครื่องหีบอ้อยแบบ 2 ตัวหมุน และการสกัดด้วยเครื่องตีป่นเป็นเวลา 2 นาที จะให้เอ็นไซม์ที่มีปฏิกิริยาสูงสุด ซึ่งเมื่อคำนวณเปรียบเทียบทางสถิติจะแตกต่างจากการใช้เครื่องตีป่น เวลา 1 และ 3 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการสกัด 3 นาที จะให้เอ็นไซม์พอ ๆ กับการสกัด 1 นาที แต่ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้จะเพิ่มขึ้นตามเวลาในการสกัด คือ เวลา 3 นาที จะให้โปรตีนสูงสุด ดังภาพที่ 4 แสดงว่ายิ่งใช้เวลาในการสกัดนานขึ้น ก็จะสามารถสกัดเอ็นไซม์จากลำต้นสับปะรดได้มากขึ้นด้วย เมื่อพิจารณาจากปริมาณโปรตีน แต่การใช้เวลาสกัดนานอาจทำให้เอ็นไซม์บางส่วน denature จากความร้อนที่เกิดขึ้นในช่วงตีป่น จึงทำให้ปฏิกิริยาการทำงานของเอ็นไซม์ที่ได้ลดลง ฉะนั้นการใช้เครื่องตีป่นสกัดในเวลา 2 นาที จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมในการสกัดเอ็นไซม์จากลำต้นสับปะรดที่ใช้ในสภาพการทดลอง

## ผลของ pH สารละลายและอุณหภูมิต่อการสกัดบรอมิเลน

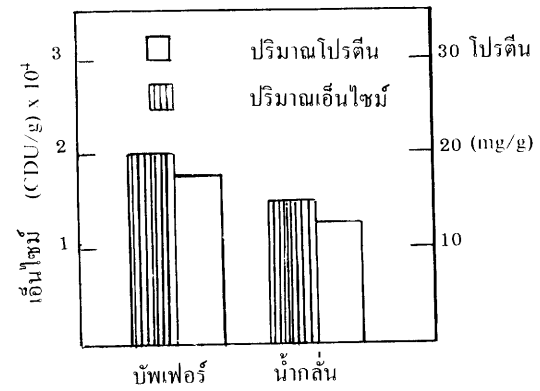
จากการศึกษาระดับ pH ของสารละลาย 0.05 โมลาฟอสเฟต บัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดเอ็นไซม์บรอมิเลนจากลำต้นสับปะรดปรากฏว่า จากระดับ pH ต่าง ๆ ตั้งแต่ 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7.0 และ 7.5 แล้วได้เอ็นไซม์เมื่อคิดเป็นหน่วยเอ็นไซม์ต่อกรัมของน้ำหนักลำต้นปอกเปลือกแล้ว มีแนวโน้มที่จะลดลงเมื่อ pH สูงขึ้น pH ในช่วงเป็นกรดคือ 3.5–4.5 จะได้เอ็นไซม์สูงสุดคือ 23165.09 และ 23440.41 CDU/กรัม ตามลำดับ จากนั้นจะได้เอ็นไซม์น้อยลงเล็กน้อย (ภาพที่ 5) เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติแล้วในช่วง pH 3.5–6.5 ปฏิกิริยาทำงานของเอ็นไซม์ไม่แตกต่างกันทางสถิติแต่จะแตกต่างกันที่ pH 7.0 และ 7.5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติดังนั้น การสกัดเอ็นไซม์บรอมิเลนจากลำต้นสับปะรด จึงอาจทำได้ในช่วง pH เป็นกรดตั้งแต่ 3.5–6.5 แต่ที่ช่วง pH 3.5–4.5 จะให้เอ็นไซม์ที่มีปฏิกิริยาสูงสุด



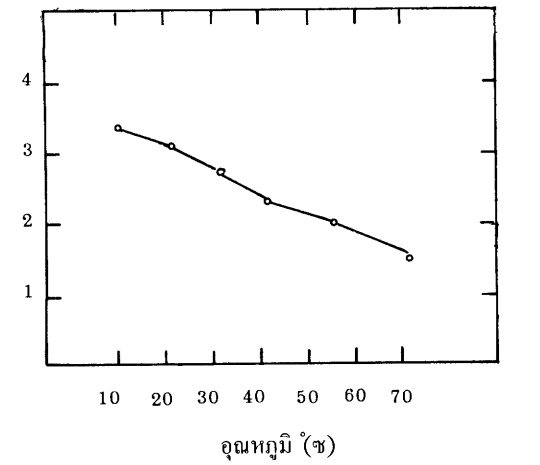

**ภาพที่ 4 ปฏิกิริยาการทำงานของเอ็นไซม์และปริมาณโปรตีนในลำต้นสับปะรดที่สกัดด้วยวิธีการต่างกัน**




**ภาพที่ 5 ผลของ pH ต่อการสกัดเอ็นไซม์**




**ภาพที่ 6 เปรียบเทียบของเอ็นไซม์บรอมิเลนที่สกัดด้วยน้ำกลั่น และ 0.05 โมลาฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 4.5**




**ภาพที่ 7 ผลของอุณหภูมิต่อการสกัดเอ็นไซม์บรอมิเลนจากลำต้นสับปะรด**

เพื่อความสะดวกของการผลิตจึงได้เปรียบเทียบการสกัดเอ็นไซม์ด้วยน้ำกลั่น (pH 6.0) กับการใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 4.5 ซึ่งเป็นช่วงให้เอ็นไซม์สูงสุด ปรากฏว่าเอ็นไซม์ที่สกัดได้มีค่าใกล้เคียงกัน ดังภาพที่ 6 การสกัดด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จะได้เอ็นไซม์สูงกว่าใช้น้ำกลั่นเล็กน้อย ซึ่งเป็นที่เข้าใจว่าบัฟเฟอร์จะช่วยป้องกันการ denature ของเอ็นไซม์จากกรดที่ละลายออกมาเมื่อเซลแตก แต่อย่างไรก็ตามการสกัดด้วยน้ำกลั่นก็ให้ผลที่ไม่แตกต่างทางสถิติกับการใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ส่วนการศึกษาการสกัดเอ็นไซม์ด้วยน้ำกลั่นที่ระดับอุณหภูมิต่าง ๆ จาก 10°ซ คือ 70°ซ ในเครื่องตีปั่นปรากฏผลดังภาพที่ 7 อุณหภูมิที่เหมาะแก่การสกัด ซึ่งให้เอ็นไซม์สูง ๆ และไม่แตกต่างกันทางสถิติ อยู่ระหว่าง 10–30°ซ การสกัดจึงสามารถทำได้ที่อุณหภูมิห้อง (30°ซ) ส่วนที่อุณหภูมิสูง (มากกว่า 40°ซ) จะทำให้เอ็นไซม์มีปฏิกิริยาน้อยลง และต่างจากการสกัดที่อุณหภูมิช่วงต่ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วย

## สรุป

จากการศึกษาสภาพวัตถุดิบและการสกัดเอ็นไซม์บรอมิเลนจากลำต้นสับปะรดพอสรุปได้ดังนี้คือ

1. ลำต้นสับปะรดที่แก่จัด คืออายุ 3 ปี จะมีเอ็นไซม์สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับลำต้นที่มีอายุ 2 ปี และ 1 ปี คือมีเอ็นไซม์ร้อยละ 48.69, 31.98 และ 19.33 ตามลำดับ

2. แหล่งปลูกต่างกันให้ปริมาณเอ็นไซม์ต่างกัน ด้วยพบว่าสับปะรดปลูกที่ชลบุรี และประจวบคีรีขันธ์ให้เอ็นไซม์สูงกว่าจากที่ลำปางอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

3. การเก็บรักษาที่ห้องเย็นสามารถเก็บไว้ได้อย่างน้อย 2 สัปดาห์โดยไม่แตกต่างกันทางสถิติกับปริมาณเอ็นไซม์เริ่มต้นส่วนการเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องสามารถเก็บไว้ได้เพียง 3 วัน

4. การสกัดด้วยเครื่องตีปั่น เวลา 2 นาทีด้วยน้ำกลั่นหรือ 0.05 โมลาฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 3.5–6.5) อุณหภูมิ 10–30°ซ ให้ปริมาณเอ็นไซม์ไม่แตกต่างกัน และเป็นวิธีที่เหมาะสมในสภาพการทดลอง

## เอกสารอ้างอิง

ทนง ภัครัชพันธุ์ และอรวิณท์ วงศ์มีเกียรติ. 2527. น. 440–450. ในรายงานการประชุมวิชาการครั้งที่ 22. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (ภาคโปสเตอร์) กรุงเทพ.

Anonymous. No Date. CDU/mg method for Bromelain assay. Polyamine (Taiwan) Corporation. 3 pp.

Heinicke, R.M. 1961. Process for the preparation of pineapple stem bromelain. US. patent 3,003,891.

Heinicke, R.M. and W.A. Gortner. 1957. Stem bromelain a new protease preparation from pineapple plant. Economic Botany. 11:225-229.

Lowry, O.H., N.J. Roslsbough, A.L. Fan and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. J. of Biol. chem. 193:265-272.

Ota, S.; K. Horie and F. Aagino. 1969. Heterogeniety of bromelain of the pineapple stalk. J. of Biochemistry. 66:413-419.