การประเมินสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โบรมีเลนจากสับปะรดภูเก็ต

Evaluation of Optimal Conditions for Bromelain Enzyme Activity from *Ananas comosus* (L.) Merr. cv. Phuket

เชาวนีพร ชีพประสพ[1*] จิรภา คงเขียว[1] และกนิษฐา พงศ์อาทิตย์[1]

Chaowaneeporn Chepprasop[1*], Jirapa Kongkeaw[1] and Kanitta Phongarthit[1]

บทคัดย่อ

โบรมีเลนเป็นชื่อทั่วไปของเอนไซม์โปรตีโอไลติกที่มีหมู่ซัลฟ์ไฮดริลที่บริเวณเร่ง ซึ่งได้จากสับปะรด (*Ananas comosus* (L.) Merr.) ทำหน้าที่ในการย่อยสลายโปรตีน งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบกิจกรรมเอนไซม์โบรมีเลนสกัดหยาบจากส่วนเนื้อ แกน และเปลือกของสับปะรดภูเก็ต (*A. comosus* (L.) Merr. cv. Phuket) รวมถึงศึกษาความแตกต่างระหว่างสับปะรดภูเก็ตผลดิบและผลสุก ทำการหากิจกรรมเอนไซม์โบรมีเลนสกัดหยาบโดยวัดปริมาณไทโรซีนที่แสดงออกมาเปรียบเทียบกับไทโรซีนมาตรฐานและแสดงผลในหน่วยยูนิตต่อมิลลิลิตรของเอนไซม์ ผลการทดลองพบว่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดได้จากส่วนเนื้อของสับปะรดภูเก็ตผลสุก โดยแสดงค่ากิจกรรมสูงสุดภายใต้สภาวะค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.5 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และใช้ระยะเวลา 10 นาที เมื่อใช้เคซีนเป็นสารตั้งต้น ซึ่งให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เป็น 5.4 และ 5.7 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังได้ประเมินประสิทธิภาพของสารสกัดเอนไซม์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.5 และบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ในการขจัดคราบซีอิ๊วบนผ้าฝ้าย พบว่าเอนไซม์โบรมีเลนสกัดหยาบสามารถขจัดคราบได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อแช่ผ้าในสารสกัดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าเอนไซม์โบรมีเลนจากส่วนเนื้อของสับปะรดภูเก็ตมีศักยภาพสูงสำหรับการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมซักฟอกและอาจนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์เอนไซม์สำหรับการดูแลสิ่งทอในอนาคต

คำสำคัญ: การขจัดคราบ กิจกรรมเอนไซม์ สับปะรดภูเก็ต โบรมีเลน

[1] สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

[*] Corresponding author e-mail: chaowaneeporn.ch@skru.ac.th

DOI: https://doi.org/10.65217/wichchajnstru.2025.v44i2.263342

Received: 13 May 2024, Revised: 8 February 2025, Accepted: 13 February 2025

Abstract

Bromelain is a general term for proteolytic enzymes containing sulfhydryl groups at the active site, derived from pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.), which function in the hydrolysis of proteins. This study aimed to compare the activities of crude bromelain extracts obtained from the fruit, core, and peel of the *A. comosus* (L.) Merr. cv. Phuket, as well as to investigate the differences between unripe and ripe pineapples. The activity of crude bromelain was determined by measuring the amount of tyrosine released, compared with a tyrosine standard, and expressed in units per milliliter of enzyme. The results revealed that the highest enzyme activity was observed in the extract from the ripe fruit flesh under optimal conditions: pH 4.5, 50 ℃ and 10 minutes of incubation when using casein as a substrate, which yielded enzyme activity of 5.4 and 5.7 units per milliliter, respectively. Additionally, the efficiency of the crude enzyme extract at pH 4.5 and incubated at 50 ℃ was evaluated for removing soy sauce stains from cotton fabric. It was found that crude bromelain effectively removed stains, with the highest efficiency observed after soaking the fabric in the enzyme extract for 24 hours. These findings indicate that bromelain from the fruit flesh of *A. comosus* (L.) Merr. cv. Phuket has high potential for application in the detergent industry and could be further developed into enzyme-based textile care products in the future.

Keywords: Stain removal, Enzyme activity, *Ananas comosus* (L.) Merr. cv. Phuket, Bromelain

บทนำ

สับปะรด (*Ananas comosus* (L.) Merr.) เป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญของประเทศไทย โดยมีการผลิตในปริมาณมากและนำเข้าสู่อุตสาหกรรมหลากหลาย เช่น การแปรรูปผลไม้และการบริโภคผลสด สับปะรดมีคุณค่าทางโภชนาการสูง ประกอบด้วยวิตามิน น้ำตาล และแร่ธาตุที่จำเป็น (มนตรี, 2559) รวมถึงเป็นแหล่งสำคัญของเอนไซม์โบรมีเลน (bromelain) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่ม การผลิตแป้ง การผลิตเครื่องสำอาง สิ่งทอ ยา และการแพทย์ (Arshad *et al*., 2014) เนื่องจากมีคุณสมบัติเฉพาะตัวในการย่อยโปรตีน ซึ่งนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การทำให้เนื้อนุ่ม การเพิ่มความใสของเครื่องดื่ม และการอบคุกกี้ (Walsh, 2014) รวมถึงในอุตสาหกรรมอื่น ๆ เช่น การซักฟอก เครื่องสำอาง และผลิตภัณฑ์เสริมอาหารบางชนิด (Hebbar *et al*., 2011) นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติทางการแพทย์ เช่น การต้านการอักเสบ การละลายลิ่มเลือด และการฟื้นฟูบาดแผล (Kavitha *et al*., 2013) รวมทั้งนำมาช่วยในกระบวนการฟอกหนังซึ่งเป็นทางเลือกที่เป็นไปได้ในการลดการแปรรูปหนังโดยการใช้สารเคมี (Sivakumar and Kumar, 2012) สับปะรดภูเก็ต (*A. comosus* (L.) Merr. cv. Phuket) เป็นสายพันธุ์เฉพาะที่ปลูกมากในภาคใต้ของประเทศไทย โดยเฉพาะจังหวัดภูเก็ตและพังงา มีลักษณะเด่นที่แตกต่างจากสายพันธุ์อื่น เช่น ผลขนาด

เล็ก ทรงกระบอก เนื้อกรอบ เส้นใยน้อย กลิ่นหอม และรสหวาน (จารุพันธ์, 2526) ลักษณะเฉพาะนี้ทำให้ได้รับความนิยมในการบริโภค และได้รับการจดทะเบียนเป็นสิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์ (geographical indication: GI) ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2552 (ภาวิณีย์, 2559)

โบรมีเลนเป็นเอนไซม์โปรตีโอไลติก (proteolytic enzyme) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 212 ตัว และมีน้ำหนักโมเลกุล 33 กิโลดาลตัน (kDa) (Murachi and Neuratii, 1960) เอนไซม์โบรมีเลนที่พบในสับปะรดโดยส่วนใหญ่มีปริมาณมากในผลและลำต้น ส่วนในใบและแกนกลางพบในปริมาณเล็กน้อย (Hossain *et al*., 2015) เอนไซม์โบรมีเลนในผลสับปะรดเรียกว่าฟรุตโบรมีเลน (fruit bromelain: FBM) (EC 3.4.22.33) ส่วนในลำต้นเรียกว่าสเต็มโบรมีเลน (stem bromelain: SBM) (EC 3.4.22.32) (Babu *et al*., 2008) โดยเอนไซม์นี้ถูกกระตุ้นการทำงานด้วยสารต่าง ๆ เช่น แคลเซียมคลอไรด์ (calcium chloride) ซิสตีอีน (cysteine) โซเดียมไบซัลเฟต (sodium bisulfate) โซเดียมไซยาไนด์ (sodium cyanide) ไฮโดรเจนซัลไฟด์ (hydrogen sulfide) โซเดียมซัลไฟด์ (sodium sulfide) และเบนโซเอต (benzoate) แต่ถูกยับยั้งการทำงานด้วยไอออนปรอท (II) (Hg^{2+}) ไอออนเงิน (Ag^{+}) ไอออนทองแดง (II) (Cu^{2+}) อัลฟา-1 แอนติทริปซิน (α-1 antitrypsin) อีสแตติน เอและบี (estatin A and B) ไอโอโดแอซิเตท (iodoacetate) (Dubey *et al*., 2012) เอนไซม์โบรมีเลนสามารถทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่าง 3 ถึง 7 และอุณหภูมิระหว่าง 40 ถึง 60 องศาเซลเซียส (Mohapatra *et al*., 2013) เช่น การสกัดเอนไซม์โบรมีเลนจากลำต้นสับปะรดพันธุ์ศรีราชา พบกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดร้อยละ 80.14 ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 และอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (Sangkharak *et al*., 2016) หรือเอนไซม์โบรมีเลนจากเปลือกสับปะรดพันธุ์นางแลและภูแล ซึ่งมีกิจกรรมสูงสุด 867 และ 1,032 ยูนิต ตามลำดับ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่าง 5.1 ถึง 5.7 (Ketnawa *et al*., 2011) นอกจากนี้กิจกรรมเอนไซม์จากผลสับปะรดพันธุ์ศรีราชาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส สามารถคงค่ากิจกรรมได้ถึงร้อยละ 83.00 (Jutamongkon and Charoenrein, 2010) อย่างไรก็ตามการทำงานของเอนไซม์จะขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ และระยะเวลาบ่ม ซึ่งส่งผลต่อกิจกรรมเอนไซม์โดยตรง การศึกษาเพื่อกำหนดสภาวะที่เหมาะสมจึงเป็นสิ่งสำคัญในการเพิ่มประสิทธิภาพและการนำไปใช้ในเชิงอุตสาหกรรม

การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์โบรมีเลนจากสับปะรดภูเก็ตมีไม่มากนัก โดยเฉพาะในส่วนของกิจกรรมเอนไซม์โบรมีเลนสกัดหยาบจากแต่ละส่วนของสับปะรดสายพันธุ์นี้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์โบรมีเลนสกัดหยาบจากเนื้อ แกน และเปลือกของสับปะรดภูเก็ต ซึ่งวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โดยการใช้โปรตีนเคซีนเป็นสารตั้งต้น (casein digest unit: CDU) และวัดปริมาณไทโรซีนที่แสดงออกมาเปรียบเทียบกับไทโรซีนมาตรฐานในหน่วยยูนิตต่อมิลลิลิตรของเอนไซม์ โดยมุ่งเน้นปัจจัยสำคัญ เช่น ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ และระยะเวลาการบ่มที่ส่งผลต่อกิจกรรมเอนไซม์ นอกจากนี้ยังได้ประเมินประสิทธิภาพของเอนไซม์สกัดหยาบในการขจัดคราบซีอิ๊วบนพื้นผิวผ้าฝ้ายเพื่อประเมินศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมซักฟอกและอุตสาหกรรมอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง ซึ่งผลการศึกษานี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาเอนไซม์โบรมีเลนสำหรับเพิ่มมูลค่าให้กับผลผลิตทางการเกษตรในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สารเคมี อุปกรณ์ และวัสดุการทดลอง

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ กรดแอซีติก (acetic acid) ยี่ห้อ RCI Labscan เคซีน (casein) ยี่ห้อ Fluka แอล-ไทโรซีน (L-tyrosine) ยี่ห้อ Sigma ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (disodium hydrogen phosphate) โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (sodium dihydrogen phosphate) ยี่ห้อ Qrec โซเดียมแอซีเตท (sodium acetate) ยี่ห้อ Loba โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate) โซเดียมไบคาร์บอเนต (sodium bicarbonate) ยี่ห้อ Merck โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) ยี่ห้อ RCI Labscan และกรดไตรคลอโรแอซิติก (trichloroacetic acid) ยี่ห้อ Merck

อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ยี่ห้อ Sigma รุ่น 3-16KL อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ยี่ห้อ Memmert รุ่น WNE10 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ยี่ห้อ Hitachi รุ่น U-2900 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดและด่าง (pH meter) ยี่ห้อ Mettler toledo รุ่น S20 SevenEasy

สับปะรดในการศึกษา คือ สับปะรดภูเก็ต โดยนำผลดิบอายุประมาณ 140 วัน ลักษณะผลมีเปลือกเขียว เนื้อมีสีเหลืองอ่อน และไม่มีกลิ่น ส่วนผลสุกอายุประมาณ 160 วัน ลักษณะผลมีเปลือกสีเหลือง เนื้อมีสีเหลืองเข้ม และมีกลิ่นหอม

2. การสกัดเอนไซม์โบรมีเลนจากส่วนต่าง ๆ ของสับปะรดภูเก็ต

นำสับปะรดภูเก็ตมาล้างให้สะอาดและปอกเปลือก แบ่งสับปะรดภูเก็ตเป็นส่วนต่าง ๆ 3 ส่วน แยกเป็น แกน เปลือก เนื้อ ส่วนละ 200 กรัมของน้ำหนักสด มาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ จากนั้นทำการบีบแล้วกรองแต่ละส่วนด้วยผ้าขาวบาง นำส่วนใสที่ได้จากการกรองมาเติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันและนำไปหมุนเหวี่ยงโดยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ซึ่งจะเรียกส่วนใสที่ได้ว่าเอนไซม์โบรมีเลนสกัดหยาบ และจะเป็นส่วนที่ใช้สำหรับตรวจหากิจกรรม (Mohan *et al*., 2016)

3. การศึกษากิจกรรมเอนไซม์โบรมีเลนสกัดหยาบ

3.1 ศึกษากิจกรรมเอนไซม์

โดยวิธีการของ Mohan *et al*. (2016) เติมเอนไซม์โบรมีเลนสกัดหยาบ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีโซเดียมแอซิเตทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ (ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.5) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมเคซีนความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยอ่างควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 20 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมกรดไตรคลอโรแอซิติกความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มอีกครั้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยอ่างควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 10 นาที โดยทำไปพร้อมกับหลอดควบคุม ซึ่งจะเติมเอนไซม์โบรมีเลนสกัดหยาบ 1 มิลลิลิตร หลังจากการหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติกความเข้มข้นร้อยละ 5 จากนั้นจึงนำไปหมุนเหวี่ยงโดยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และหาค่ากิจกรรมเอนไซม์เทียบกับกราฟมาตรฐานไทโรซีน

3.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานไทโรซีน

เตรียมโดยการเติมไทโรซีน 10 มิลลิกรัม ลงในน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 2 นอร์มัล (N) ทีละหยดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนไทโรซีนละลาย และปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น โดยสารละลายนี้จะถูกเจือจางต่อไปในความเข้มข้น 10 ถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และสร้างกราฟมาตรฐานไทโรซีน (Mohan *et al*., 2016)

3.3 การคำนวณกิจกรรมเอนไซม์โบรมีเลน

โดยใช้สมการของ Mohan *et al*. (2016) ดังสมการ (1)

$$AB = \frac{C \times D}{V \times t} \quad (1)$$

เมื่อ AB แทน กิจกรรมเอนไซม์โบรมีเลน (ยูนิตต่อมิลลิลิตรเอนไซม์)

C แทน ความเข้มข้นของไทโรซีนเทียบเท่าที่ปล่อยออกมา (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

D แทน ระดับการเจือจาง

V แทน ปริมาตรของเอนไซม์ที่ใช้ (มิลลิลิตร)

T แทน เวลาในการวิเคราะห์ (นาที)

4. การศึกษากิจกรรมเอนไซม์โบรมีเลนสกัดหยาบจากส่วนต่าง ๆ ของสับปะรดภูเก็ต

ทำการศึกษาเปรียบเทียบกิจกรรมเอนไซม์โบรมีเลนสกัดหยาบจากส่วนแกน เปลือก และเนื้อของสับปะรดภูเก็ตผลดิบกับผลสุก โดยวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ด้วยวิธีการของ Mohan *et al.* (2016) ดังข้อ 3 ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.5 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเลือกใช้สารสกัดเอนไซม์โบรมีเลนที่สกัดได้จากส่วนเนื้อของผลการศึกษาไปทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์ในลำดับต่อไป

5. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โบรมีเลนสกัดหยาบ

5.1 ผลของความเป็นกรด-ด่างต่อกิจกรรมเอนไซม์โบรมีเลนสกัดหยาบ

ทำการศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่างต่อกิจกรรมเอนไซม์โบรมีเลนในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ คือ 3.5 4.0 4.5 5.0 7.0 และ 9.0 โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ต่างชนิดกัน ได้แก่ โซเดียมแอซิเตทบัฟเฟอร์ (มีค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่าง 3.5 ถึง 5.0) ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0) และโซเดียมคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ (มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 9.0) นำเอนไซม์โบรมีเลนไปบ่มร่วมกับบัฟเฟอร์ต่าง ๆ ที่เตรียมไว้โดยใช้เคซีนเป็นสารตั้งต้น และปฏิบัติตามขั้นตอนการศึกษากิจกรรมเอนไซม์โบรมีเลนสกัดหยาบดังที่อธิบายไว้ก่อนหน้านี้ เพื่อหาค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการทำงานของเอนไซม์

5.2 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมเอนไซม์โบรมีเลนสกัดหยาบ

ทำการประเมินผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมเอนไซม์โบรมีเลนในช่วงอุณหภูมิต่าง ๆ ได้แก่ 30 40 50 และ 60 องศาเซลเซียส โดยใช้เคซีนเป็นสารตั้งต้น ภายใต้ความเป็นกรด-ด่าง

ที่เหมาะสมที่สุดที่ได้จากการทดลองก่อนหน้านี้ ซึ่งเอนไซม์ถูกบ่มในแต่ละอุณหภูมิเป็นเวลา 20 นาที แล้วนำตัวอย่างไปวัดค่ากิจกรรม เพื่อกำหนดอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการทำงานของเอนไซม์

5.3 ผลของระยะเวลาต่อกิจกรรมเอนไซม์โบรมีเลนสกัดหยาบ

ทำการศึกษาผลของระยะเวลาต่อกิจกรรมเอนไซม์โบรมีเลน โดยบ่มสารละลายเอนไซม์ร่วมกับสารละลายเคซีนที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.5 และบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ ระยะเวลาที่ใช้ในการบ่ม ได้แก่ 10 20 30 40 50 60 และ 120 นาที หลังจากบ่มเสร็จในแต่ละช่วงเวลา นำตัวอย่างไปวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์โดยเปรียบเทียบกับสารละลายไทโรซีนมาตรฐาน จากนั้นจึงคำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์ในแต่ละช่วงเวลา เพื่อหาค่าระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการทำงานของเอนไซม์

6. ประสิทธิภาพของเอนไซม์โบรมีเลนสกัดหยาบต่อการขจัดคราบ

นำสารละลายเอนไซม์โบรมีเลนมาปรับสภาวะให้เหมาะสมด้วยโซเดียมแอซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ (ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.5) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 มาทดสอบประสิทธิภาพในการขจัดคราบซีอิ๊วบนผ้าฝ้าย โดยนำผ้าฝ้ายขนาด 6 x 6 เซนติเมตร แช่ลงในบีกเกอร์ที่มีปริมาณเอนไซม์ปรับสภาวะแล้วปริมาตร 100 มิลลิลิตร และทำการเปรียบเทียบกับสารละลายเอนไซม์ที่ไม่ได้ปรับสภาวะในปริมาตรเดียวกัน ดำเนินการทดลองในช่วงเวลา 6 ถึง 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วประเมินผลความสามารถในการขจัดคราบที่แตกต่างกันระหว่างตัวอย่างที่ปรับและไม่ได้ปรับสภาวะ

7. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

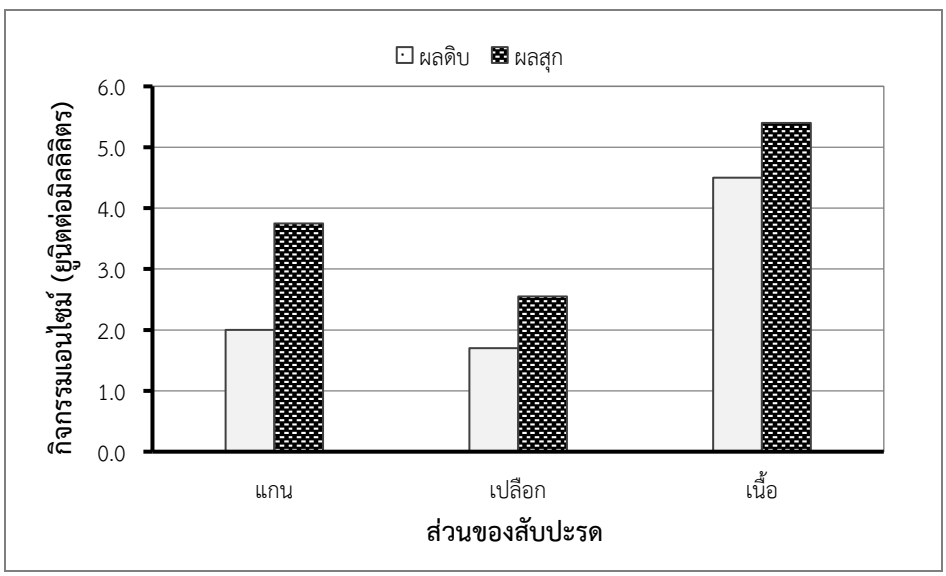
ในการศึกษากิจกรรมเอนไซม์โบรมีเลนสกัดหยาบในครั้งนี้ แต่ละชุดการทดลองทำการทำซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง (triplicate) แสดงข้อมูลในรูปแบบค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±SD) ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-way ANOVA) และเปรียบเทียบหาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์สถิติ IBM SPSS เวอร์ชัน 29

ผลการวิจัย

1. กิจกรรมเอนไซม์โบรมีเลนสกัดหยาบจากส่วนต่าง ๆ ของสับปะรดภูเก็ต

จากการศึกษากิจกรรมเอนไซม์โบรมีเลนสกัดหยาบจากส่วนแกน เปลือก และเนื้อ ของสับปะรดภูเก็ตทั้งผลดิบและผลสุก พบว่าสับปะรดภูเก็ตผลดิบให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 2.00±0.02 1.70±0.05 และ 4.50±0.07 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสับปะรดภูเก็ตผลสุกมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 3.75±0.09 2.55±0.03 และ 5.40±0.04 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ พบระดับเอนไซม์เฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยกิจกรรมเอนไซม์โบรมีเลนในส่วนเนื้อของสับปะรดภูเก็ตผลสุกมีค่าสูงสุด คือ 5.40±0.04 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมา คือ ในส่วนเนื้อของสับปะรดภูเก็ตผลดิบ 4.50±0.07 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ภายใต้สภาวะค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.5 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 1) สอดคล้องกับงานวิจัยของอาภัสสร และกาญจนาพร (2563) ซึ่งทำการศึกษากิจกรรมของสารสกัดหยาบจากสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียส่วนแกน เปลือก เนื้อก้าน และเหง้า ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในเวลา 10 นาที พบว่า

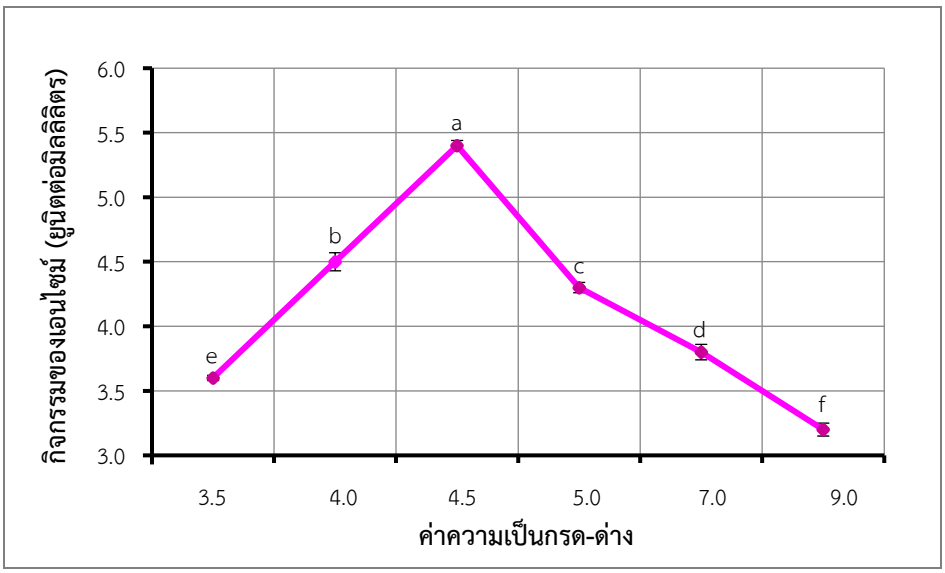
มีเอนไซม์จากส่วนเนื้อมากที่สุด รวมทั้งการศึกษาของ More *et al*. (2019) ทำการสกัดเอนไซม์โบรมีเลนจากส่วนเนื้อและเหง้าของสับปะรด ประเทศอินเดีย เมื่อวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในเวลา 5 นาที พบว่าส่วนเนื้อของสับปะรดมีกิจกรรมเอนไซม์สูงกว่าส่วนเหง้า ดังนั้นจึงนำเอนไซม์โบรมีเลนสกัดหยาบที่สกัดได้จากส่วนเนื้อของสับปะรดภูเก็ตผลสุกไปใช้ในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์ในลำดับต่อไป



ภาพที่ 1 กิจกรรมเอนไซม์โบรมีเลนสกัดหยาบจากส่วนแกน เปลือก และเนื้อของสับปะรดภูเก็ตผลดิบและผลสุก

2. ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างต่อกิจกรรมเอนไซม์โบรมีเลนสกัดหยาบ

ผลการศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์โบรมีเลนสกัดหยาบจากเนื้อสับปะรดภูเก็ตผลสุกที่ความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ ได้แก่ 3.5 4.0 4.5 5.0 7.0 และ 9.0 พบว่าแต่ละค่าความเป็นกรด-ด่างมีกิจกรรมเอนไซม์เป็น 3.6±0.02 4.5±0.07 5.4±0.04 4.3±0.04 3.8±0.06 และ 3.2±0.05 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ พบระดับเอนไซม์เฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยพบว่าที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.5 เอนไซม์โบรมีเลนมีค่ากิจกรรมสูงสุด (ภาพที่ 2) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Mohan *et al*. (2016) พบว่ากิจกรรมเอนไซม์โบรมีเลนสูงสุดในส่วนเนื้อที่สกัดจากสับปะรด ประเทศอินเดีย โดยมีกิจกรรมเอนไซม์ตั้งแต่ค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่าง 4 ถึง 5 แต่มีกิจกรรมสูงสุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.5 และการศึกษาของ Dubey *et al*. (2012) พบว่าเอนไซม์โบรมีเลนจากส่วนเนื้อของสับปะรด ประเทศอินเดียก็ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.5 เช่นกัน



ภาพที่ 2 กิจกรรมเอนไซม์โบรมีเลนสกัดหยาบที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ ตั้งแต่ 3.5 ถึง 9.0 (ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันบนเส้นกราฟ หมายถึง กลุ่มทดสอบมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$))

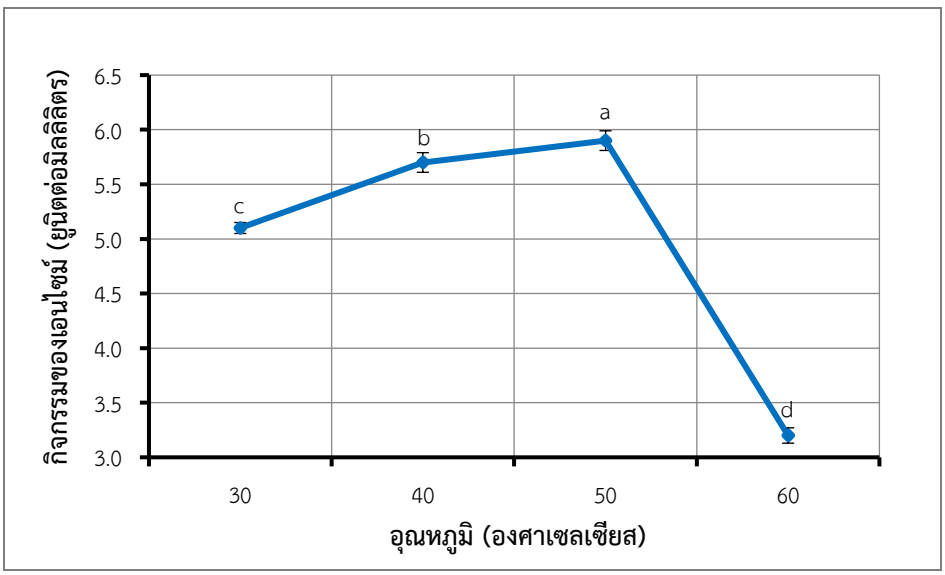
3. ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมเอนไซม์โบรมีเลนสกัดหยาบ

ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โบรมีเลนสกัดหยาบที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้แก่ 30 40 50 และ 60 องศาเซลเซียส ภายใต้ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.5) พบว่าแต่ละอุณหภูมิเอนไซม์มีค่ากิจกรรมเป็น 5.1±0.05 5.7±0.09 5.9±0.09 และ 3.2±0.07 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ พบระดับเอนไซม์เฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยพบว่าเอนไซม์มีค่ากิจกรรมดีที่สุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 3) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Ketnawa *et al*. (2012) Vallés *et al*. (2007) และ Koh *et al*. (2006)

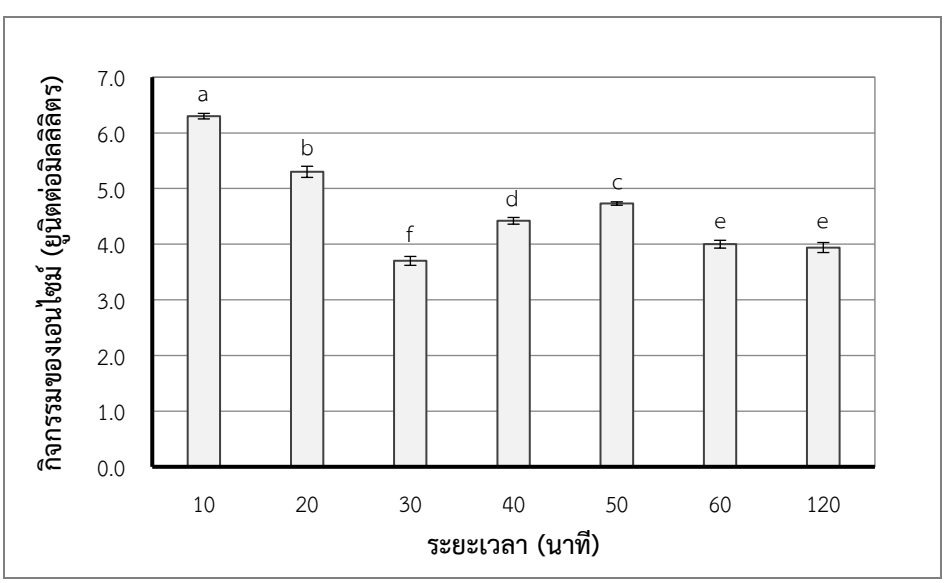
4. ผลของระยะเวลาต่อกิจกรรมเอนไซม์โบรมีเลนสกัดหยาบ

ผลการศึกษาระยะเวลาของการบ่มเอนไซม์ร่วมกับเคซีนต่อกิจกรรมเอนไซม์ในเวลา 10 20 30 40 50 60 และ 120 นาที ภายใต้สภาวะค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.5 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พบว่าที่ระยะเวลาต่าง ๆ เอนไซม์มีค่ากิจกรรมเป็น 6.3±0.05 5.3±0.10 3.7±0.08 4.4±0.06 4.7±0.03 4.0±0.07 และ 3.9±0.09 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ พบระดับเอนไซม์เฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ผลที่ปรากฏพบว่าการบ่มเอนไซม์ในเวลา 10 นาที เอนไซม์จะมีค่ากิจกรรมสูงที่สุด และเอนไซม์มีความสามารถคงกิจกรรมไว้ได้มากกว่าร้อยละ 50 (3.9±0.09 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) แม้จะใช้เวลาในการบ่มเป็นเวลา 120 นาที (ภาพที่ 4) แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์โบรมีเลนจากสับปะรดภูเก็ตมีกิจกรรมเอนไซม์ได้เร็วและสามารถคงสภาพกิจกรรมได้ดี เช่นเดียวกับเอนไซม์โบรมีเลนจากผลสับปะรดพันธุ์ศรีราชาที่มีกิจกรรมเอนไซม์ร้อยละ 83 เมื่อทำการบ่มเอนไซม์เป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (Jutamongkon and Charoenrein,

2010) หรือกิจกรรมเอนไซม์โบรมีเลนจากสับปะรดของประเทศมาเลเซียก็สามารถคงกิจกรรมได้ร้อยละ 90 ในเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (Poh and Abdul Majid, 2011)



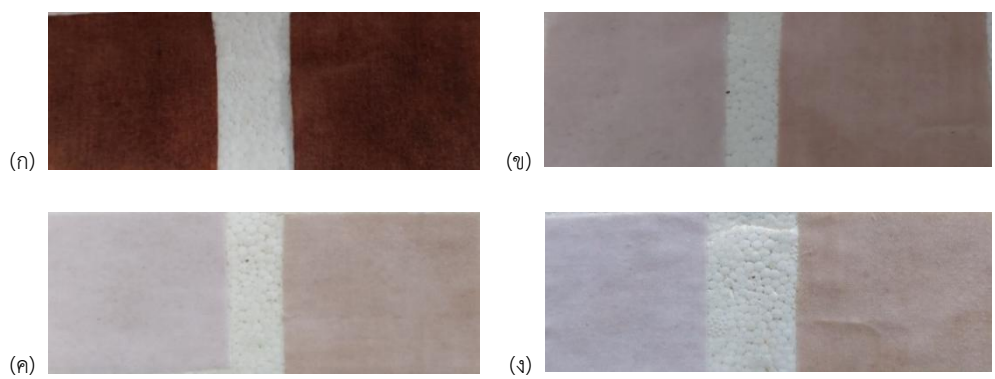
ภาพที่ 3 กิจกรรมเอนไซม์โบรมีเลนสกัดหยาบที่อุณหภูมิต่าง ๆ ตั้งแต่ 30 ถึง 60 องศาเซลเซียส (ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันบนเส้นกราฟ หมายถึง กลุ่มทดสอบมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$))



ภาพที่ 4 กิจกรรมเอนไซม์โบรมีเลนสกัดหยาบเมื่อบ่มที่ระยะเวลาแตกต่างกันตั้งแต่ 10 ถึง 120 นาทีที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.5 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันบนกราฟรูปแท่ง หมายถึง กลุ่มทดสอบมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$))

5. ประสิทธิภาพของเอนไซม์โบรมีเลนสกัดหยาบต่อการขจัดคราบ

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์โบรมีเลนสกัดหยาบต่อการกำจัดคราบซีอิ๊วบนผ้าฝ้าย โดยทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างเอนไซม์ที่ทำการปรับสภาวะให้เหมาะสมที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.5 กับเอนไซม์ที่ไม่ทำการการปรับสภาวะ ในช่วงเวลา 6 ถึง 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากผลการศึกษาพบว่าเอนไซม์ที่ทำการปรับสภาวะสามารถขจัดคราบซีอิ๊วได้ดีกว่าเอนไซม์ที่ไม่ทำการปรับสภาวะในทุกช่วงเวลาของการศึกษา โดยเอนไซม์ที่ทำการปรับสภาวะสามารถขจัดคราบได้ตั้งแต่ 6 ชั่วโมงแรกของการศึกษาและค่อย ๆ ขจัดคราบได้ดีขึ้นเมื่อเวลาผ่านไปเป็น 12 ชั่วโมง จนกระทั่งถึงเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์สามารถขจัดคราบได้ดีที่สุด ดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 ประสิทธิภาพของเอนไซม์โบรมีเลนสกัดหยาบต่อการขจัดคราบในช่วงเวลา 0 (ก) 6 (ข) 12 (ค) และ 24 ชั่วโมง (ง) โดยปรับสภาวะให้เหมาะสมที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.5 (ซ้าย) และไม่มีการปรับสภาวะ (ขวา)

การอภิปรายผลการวิจัย

จากการวัดกิจกรรมเอนไซม์โบรมีเลนที่สกัดหยาบจากแกน เปลือก และเนื้อ ของสับปะรดภูเก็ตที่ระยะการเจริญเติบโตแตกต่างกัน (ผลดิบและผลสุก) พบว่ากิจกรรมเอนไซม์มากที่สุดในส่วนเนื้อของผลสุก เนื่องจากสับปะรดเป็นผลไม้ที่มีเอนไซม์โบรมีเลนปริมาณสูงในระยะสุกแต่ไม่มีโบรมีเลนในระยะผลอ่อน โดยระดับของเอนไซม์โบรมีเลนจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและยังคงสูงอยู่จนกระทั่งผลสุก จากนั้นปริมาณจะลดลงเล็กน้อย (Silvestre *et al*., 2012)

การศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่างต่อกิจกรรมเอนไซม์จะทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ซึ่งเป็นที่ยอมรับว่าไม่ทำให้เอนไซม์เกิดการสูญเสียสภาพมากเกินไป (Bonner, 2007) เอนโซม์โบรมีเลนที่สกัดจากลำต้นและเนื้อโดยส่วนใหญ่จะมีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.0 ถึง 6.8 (Harrach, 1995) เอนไซม์โบรมีเลนที่สกัดได้จากส่วนเนื้อของสับปะรดภูเก็ตมีกิจกรรมสูงสุดในสารละลายโซเดียมแอซิเตทบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.5 ซึ่งสภาวะที่ค่าความเป็นกรด-ด่างมีค่าต่ำกว่าและสูงกว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์นี้มีผลให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ลดลง เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างจะมีผลต่อ

การแตกตัวของหมู่โซ่ข้าง (R-group) ของกรดอะมิโนในโมเลกุลของเอนไซม์ รวมทั้งมีผลทำให้ประจุของหมู่อะมิโน ($-NH_2$) และหมู่คาร์บอกซิล (-COOH) ของกรดอะมิโนในเอนไซม์เปลี่ยนแปลง ส่งผลต่อโครงรูปสามมิติ (tertiary structure) ของเอนไซม์เกิดการเปลี่ยนแปลงโดยเฉพาะบริเวณเร่ง (active site) ทำให้เอนไซม์เกิดการสูญเสียสภาพและความสามารถของเอนไซม์ในการจับกับสารตั้งต้นหรือซับสเตรต (substrate) ที่บริเวณเร่งไม่สามารถเกิดขึ้นได้ (Gu, 2024) จากการทดลองยังพบว่าเอนไซม์โบรมีเลนที่ทำการศึกษาในครั้งนี้มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิจะส่งผลต่อกิจกรรมเอนไซม์ โดยอุณหภูมิ 30 ถึง 50 องศาเซลเซียส ทำให้กิจกรรมเอนไซม์สูงขึ้น เนื่องจากโมเลกุลมีพลังงานจลน์มากขึ้นเพื่อรับปฏิกิริยา แต่เมื่ออุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum temperature) จะทำให้พันธะเปปไทด์และพันธะไดซัลไฟด์ถูกทำลาย ดังนั้นจึงทำให้กิจกรรมเอนไซม์ลดลง (Martin *et al*., 2014) จากผลการศึกษาระยะเวลาในการบ่มเอนไซม์โบรมีเลนสกัดหยาบพบว่าเอนไซม์มีกิจกรรมที่ดีที่สุดเมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 10 นาที ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.5 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการบ่มเอนไซม์เพิ่มขึ้นเป็น 20 ถึง 120 นาที พบว่ากิจกรรมเอนไซม์จะลดลงแต่ก็ยังคงรักษากิจกรรมไว้ได้มากกว่าร้อยละ 50 บ่งบอกถึงการจับกันระหว่างเอนไซม์กับซับสเตรตสามารถจับกันได้ดี นำไปสู่การเกิดเอนไซม์ซับสเตรตคอมเพลกซ์ (enzyme substrate complex) เพื่อที่จะเปลี่ยนแปลงไปจนได้สารผลิตภัณฑ์ในเวลาที่รวดเร็ว และยังคงความสามารถของกิจกรรมได้ในช่วงเวลาที่กว้าง ส่งผลดีต่อการนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพในการช่วยลดปริมาณการใช้สารเคมี (Sawant and Thumar, 2023)

การประยุกต์ใช้เอนไซม์โบรมีเลนสกัดหยาบต่อการขจัดคราบเปื้อนซีอิ๊วบนผ้าฝ้าย พบว่าสามารถเริ่มขจัดคราบได้เมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง และสามารถขจัดคราบได้ดีที่สุดเมื่อใช้เวลา 24 ชั่วโมง เนื่องจากซีอิ๊วผลิตจากองค์ประกอบหลัก คือ ถั่วเหลือง ซึ่งมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ ดังนั้นเอนไซม์โบรมีเลนจะทำหน้าที่ในการสลายหมู่เอไมด์ (amide) หรือพันธะเปปไทด์ (peptide bond) ในโมเลกุลของโปรตีนให้มีขนาดเล็กลงซึ่งจะช่วยทำให้ขจัดคราบได้ง่ายขึ้น (Muthuganesan, n.d.) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Bhagavathy *et al*. (2019) ที่แสดงถึงความสามารถของเอนไซม์โบรมีเลนในการนำไปใช้ประโยชน์ด้านการขจัดคราบโปรตีนโดยนำเอนไซม์โบรมีเลนจากส่วนต่าง ๆ ของสับปะรด ประเทศอินเดีย มาใช้ในการสลายคราบบนผ้าที่ปนเปื้อนชีส ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในเวลา 15 นาที หรือการใช้เอนไซม์โบรมีเลนผสมกับโซเดียมคาร์บอเนตในความเข้มข้น 9.8 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เพื่อลดเวลาการทำให้รังไหมอ่อนตัวลงจาก 20 ชั่วโมง เป็น 30 นาที (Singh *et al*., 2003) เป็นต้น จากความสามารถในการขจัดคราบของเอนไซม์โบรมีเลนที่สกัดได้ในครั้งนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการซักฟอก รวมทั้งสามารถพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์เอนไซม์สำหรับการดูแลสิ่งทอในอนาคต

สรุปผลการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เปรียบเทียบกิจกรรมเอนไซม์โบรมีเลนสกัดหยาบจากส่วนแกน เปลือกและเนื้อของสับปะรดภูเก็ต รวมถึงศึกษาความแตกต่างระหว่างผลดิบและผลสุก ผลการทดลองพบว่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดได้จากส่วนเนื้อของสับปะรดภูเก็ตผลสุก โดยแสดงค่ากิจกรรมสูงสุดที่ 5.4 ยูนิตต่อ

มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.5 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และระยะเวลา 10 นาที นอกจากนี้การประเมินประสิทธิภาพของสารสกัดเอนไซม์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.5 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ในการขจัดคราบชีอิ๊วบนผ้าฝ้าย พบว่าเอนไซม์โบรมีเลนที่สกัดจากส่วนเนื้อของสับปะรดภูเก็ตผลสุกสามารถขจัดคราบได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อแช่ผ้าในสารสกัดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าเอนไซม์โบรมีเลนจากส่วนเนื้อของสับปะรดภูเก็ตมีศักยภาพสูงสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมซักฟอก และอาจนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์เอนไซม์สำหรับการดูแลสิ่งทอในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ที่ให้สิ่งอำนวยความสะดวกและทรัพยากร ทำให้การวิจัยดำเนินไปได้อย่างราบรื่น รวมทั้งขอขอบคุณ อาจารย์จิราภรณ์ กวดขัน อาจารย์ประจำสาขาวิชาคณิตศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ที่ให้ความช่วยเหลือในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของงานวิจัย และขอแสดงความขอบคุณผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่านสำหรับการวิพากษ์เชิงสร้างสรรค์และข้อเสนอแนะอันมีค่า ซึ่งช่วยยกระดับคุณภาพของการวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

จารุพันธ์ ทองแถม. (2526). *สับปะรดและอุตสาหกรรมสับปะรดในประเทศไทย*. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ภาวิณีย์ เจริญยิ่ง. (2559). *สับปะรดภูเก็ต*. สืบค้นเมื่อ 5 พฤษภาคม 2566, จาก: https://www.khaosod.co.th/technologychaoban/techno/plants-vegetables-fruit/article_6226.

มนตรี กล้าขาย. (2559). เกษตรหลังเกษียณ ปลูกสับปะรดในถุงพลาสติกพลิกวิกฤตให้เป็นโอกาส. *เทคโนโลยีชาวบ้าน*, 28(625), 41-42.

อาภัสสร ศิริจริยวัตร และกาญจนาพร นนทะลุน. (2563). กิจกรรมการย่อยโปรตีนของสารสกัดหยาบจากส่วนต่าง ๆ ของสับปะรดและมะละกอ. *แก่นเกษตร*, 48(พิเศษ 1), 1887-1092.

Arshad, Z.I.M., Amid, A., Yusof, F., Jaswir, I., Ahmad, K. and Loke, S.P. (2014). Bromelain: An overview of industrial application and purification strategies. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(17), 7283-7297, doi: https://doi.org/10.1007/s00253-014-5889-y.

Babu, B.R., Rastogi, N.K. and Raghavarao, K.S.M.S. (2008). Liquid-liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system. *Chemical Engineering and Processing*, 47(1), 83-89, doi: https://doi.org/10.1016/j.cep.2007.08.006.

Bhagavathy, S., Gayathridevi, R., Pushya, K. and Jeniffer, J. (2019). Screening, optimization and antimicrobial activity of bromelain from *Ananas comosus*. *International Journal of Scientific Development and Research*, 4(8), 233-240.

Bonner, P.L.R. (2007). *Protein purification*. London: Taylor and Francis Group.

Dubey, R., Reddy, S. and Murthy, N.Y.S. (2012). Optimization of activity of bromelain. *Asian Journal of Chemistry*, 24(4), 1429-1431.

Gu, Y. (2024). The effect of buffer pH on enzyme activity. *Theoretical and Natural Science,* 33, 137-147, doi: https://doi.org/10.54254/2753-8818/33/20240893.

Harrach, T., Eckert, K., Schulze-Forster, K., Nuck, R., Grunow, D. and Maurer, H.R. (1995). Isolation and partial characterization of basic proteinases from stem bromelain. *Journal of Protein Chemistry*, 14(1), 41-52, doi: https://doi.org/10.1007/BF01902843.

Hebbar, H.U., Hemavathi, A.B., Sumana, B. and Raghavarao K.S.M.S. (2011). Reverse micellar extraction of bromelain from pineapple (*Ananas comosus* L. merryl) waste: Scale-up, reverse micelles characterization and mass transfer studies. *Separation Science and Technology*, 46(10), 1656-1664, doi: https://doi.org/10.1080/01496395.2011.572110.

Hossain, M.M., Lee, S.I. and Kim, I.H. (2015). Effects of bromelain supplementation on growth performance, nutrient digestibility, blood profiles, faecal microbial shedding, faecal score and faecal noxious gas emission in weanling pigs. *Veterinarni Medicina*, 60(10), 544-552, doi: https://doi.org/10.17221/8493-VETMED.

Jutamongkon, R. and Charoenrein, S. (2010). Effect of temperature on the stability of fruit bromelain from smooth cayenne pineapple. *Agriculture and Natural Resources*, 44(5), 943-948.

Kavitha, S., Kumar, S.A., Yogalakshmi, K.N., Kaliappan, S. and Banu, J.R. (2013). Effect of enzyme secreting bacterial pretreatment on enhancement of aerobic digestion potential of waste activated sludge interceded through EDTA. *Bioresource Technology*, 150, 210-219, doi: https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.021.

Ketnawa, S., Chaiwut, P. and Rawdkuen, S. (2011). Aqueous two-phase extraction of bromelain from pineapple peels (‘Phu Lae’ cultv.) and its biochemical properties. *Food Science and Biotechnology*, 20(5), 1219-1226, doi: https://doi.org/10.1007/s10068-011-0168-5.

Ketnawa, S., Chiwut, P. and Rawduken, S. (2012). Pineapple wastes: A potential source for bromelain extraction. *Food and Bioproducts Processing*, 90(3), 385-391, doi: https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.12.006.

Koh, J., Kang, S.-M., Kim, S.-J., Cha, M.-K. and Kwon, Y.-J. (2006). Effect of pineapple protease on the characteristics of protein fibers. *Fibers and Polymers*, 7(2), 180-185, doi: https://doi.org/10.1007/BF02908264.

Martins, B.C., Rescolino, R., Coelho, D.F., Zanchetta, B., Tambourgi, E.B. and Silveira, E. (2014). Characterization of bromelain from *Ananas comosus* agroindustrial residues purified by ethanol fractional precipitation. *Chemical Engineering Transactions*, 37, 781-786, doi: https://doi.org/10.3303/CET1437131.

Mohan, R., Sivakumar, V., Rangasamy, T. and Muralidharan, C. (2016). Optimisation of bromelain enzyme extraction from pineapple (*Ananas comosus*) and application in process industry. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 12(3), 188-195, doi: https://doi.org/10.3844/ajbbsp.2016.188.195.

Mohapatra, A., Rao, V.M. and Ranjan, M. (2013). Comparative study of the increased production and characterization of bromelain from the peel, pulp and stem pineapple (*Anannus commas*). *International Journal of Advanced Research and Technology*, 2, 249-279.

More, K., Popalghat, S., Yadav, S. and Namekar, T. (2019). Extraction and partial purification of bromelain from fruit and crown of pineapple (*Ananas comosus*) and it's application as a meat tenderizer. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 9(3), 1361-1367.

Murachi, T. and Neuratii, H. (1960). Fractionation and specificity studies on stem bromelain. *Journal of Biological Chemistry*, 235(1), 99-107, doi: https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)69593-6.

Muthuganesan, N. (n.d.). *Biodetergents*. Retrieved 24 March 2024, from: https://www.slideshare.net/slideshow/biodetergents/215498336.

Poh, S.S. and Abdul Majid, F.D. (2011). Thermal stability of free bromelain and bromelain-polyphenol complex in pineapple juice. *International Food Research Journal*, 18(3), 1051-1060.

Sangkharak, K., Wangsirikul, P., Pichid, N., Yunu, T. and Prasertsan, P. (2016). Partitioning of bromelain from pineapple stem (*Smooth Cayenne*) by aqueous two phase system and its application for recovery and purification of polyhydroxyalkanoate. *Chiang Mai Journal of Science*, 43(4), 794-807.

Sawant, P. and Thumar, J. (2023). Impact of substrate pH and enzyme-substrate incubation time on protease from a new halo-tolerant Bor S17B13 found in the mangroves of Western India. *Acta Scientific Microbiology,* 6(3), 3-9, doi: https://doi.org/10.31080/ASMI.2023.06.1210.

Silvestre, M.P.C., Carreira, R.L., Silva, M.R., Corgosinho, F.C., Monteiro, M.R.P., Morais, H.A. (2012). Effect of pH and temperature on the activity of enzymatic extracts from pineapple peel. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 1824-1831, doi: https://doi.org/10.1007/s11947-011-0616-5.

Singh, L.R., Devi, Y.R. and Devi, S.K. (2003). Enzymological characterization of pineapple extract for potential application in oak tasar (*Antheraea proylei* J.) silk cocoon cooking and reeling. *Electronic Journal of Biotechnology*, 6(3), 198- 207, doi: https://doi.org/10.2225/vol6-issue3-fulltext-4.

Sivakumar, V. and Kumar, D. (2012). Leather bioprocess intensification: Ultrasound assisted novel enzymatic hair-loosening system for leather processing. *Indian Journal of Biotechnology*, 11(3), 326-329.

Vallés, D., Furtado, S. and Cantera, A.M.B. (2007) Characterization of news proteolytic enzymes from ripe fruits of *Bromelia antiacantha* bertol. (Bromeliaceae). *Enzyme and Microbial Technology*, 40(3), 409-413, doi: https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.07.011.

Walsh, G. (2014). *Proteins: Biochemistry and biotechnology*. (2nd ed). New York: John Wiley & Sons Ltd.