บทที่ 4

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

4.1 อุณหภูมิและระยะเวลาการเก็บต้นสับปะรดหลังเก็บเกี่ยวจากไร่

ต้นสับปะรดซึ่งเป็นวัตถุดิบของการผลิตโบรมิเลน เมื่อเก็บเกี่ยวจากไร่ในปริมาณมากจำเป็นต้องมาเก็บไว้ เอนไซม์แอคติวิตีอาจมีการเปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาการเก็บได้ จากการศึกษาการเก็บต้นสับปะรดไว้ในห้องเย็น 4° ซ. หรือที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน แอคติวิตีของเอนไซม์เหลือประมาณ 96% - 97% และเมื่อเก็บต้นสับปะรดมากกว่า 7 ถึง 30 วัน ควรเก็บที่ห้องเย็น 4° ซ. แอคติวิตีของเอนไซม์จะสูงกว่าการเก็บที่อุณหภูมิห้อง 27% อาจเป็นเพราะที่อุณหภูมิต่ำ การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของเอนไซม์เกิดขึ้นช้ากว่าที่อุณหภูมิห้อง

4.2 การสกัดแยกโบรมิเลนด้วยวิธีปอกเปลือกและไม่ปอกเปลือกต้นสับปะรด

การสกัดแยกโบรมิเลนจากต้นสับปะรดที่ปอกเปลือก จะได้เอนไซม์ที่มีแอคติวิตีสูงกว่าการสกัดแยกโบรมิเลนจากต้นสับปะรดที่ไม่ปอกเปลือกประมาณ 85% เนื่องจากการสกัดแยกทั้งสองวิธีนี้ใช้น้ำหนักต้นสับปะรดเท่า ๆ กัน แต่เปลือกของต้นสับปะรดมีปริมาณเอนไซม์อยู่น้อย นอกจากนี้การปลูกต้นสับปะรดมักมีการใช้สารเคมีปราบศัตรูพืช และฮอร์โมนต่าง ๆ(16) ซึ่งรากหรือเปลือกอาจดูดซึมไว้ เมื่อสกัดแยกต้นสับปะรดที่ไม่ปอกเปลือก สารเหล่านี้อาจยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ทำให้แอคติวิตีต่ำลง

4.3 การสกัดแยกโบรมิเลนจากต้นสับปะรด

การสกัดแยกโบรมิเลนจากต้นสับปะรดโดยใช้อัตราส่วนน้ำ : เนื้อต้นสับปะรด เท่ากับ 2:1 และ 3:1 เอนไซม์ที่ได้จะมีแอคติวิตีสูงกว่าการสกัดแยกโดยใช้อัตราส่วน น้ำ : เนื้อต้นสับปะรดเท่ากับ 2:1 และ 1:1 ประมาณ 60% และ 22% ตามลำดับ อาจเป็นเพราะน้ำซึ่งเป็นตัวทำละลายมีน้อยจึงสกัดแยกเอนไซม์ออกมาจากเซลของต้นสับปะรดไม่หมด เมื่อเพิ่มน้ำในอัตราส่วน 2:1 และ 3:1 จะทำให้สกัดแยกได้เอนไซม์สูงขึ้นจนถึงจุดสมดุลย์ จึงได้ใช้อัตราส่วน น้ำ : เนื้อต้นสับปะรดเท่ากับ 2:1

เวลาที่ใช้สกัดแยกเอนไซม์ที่เหมาะสมคือ 5 นาที โดยให้แอคติวิตีสูงกว่าการสกัดแยกที่เวลา 1-3, 10-15 และ 15-30 นาที ประมาณ 18%, 5% และ 10% ตามลำดับ การสกัดแยกเอนไซม์นาน 5 ถึง 15 นาที เอนไซม์ที่ได้จะมีแอคติวิตีใกล้เคียงกัน แต่ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการสกัดแยกเอนไซม์ เพราะโปรตีนอื่น ๆ ที่ไม่ใช่เอนไซม์อาจละลายปนลงมา ทำให้แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ลดลงตามระยะเวลา การสกัดแยกเอนไซม์นานกว่า 15 นาที แอคติวิตีของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนเริ่มคงที่แสดงว่าการสกัดเริ่มเข้าสู่สมดุลย์

การใช้สารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 6.5 สกัดแยกเอนไซม์ จะได้เอนไซม์ที่มีแอคติวิตีสูงกว่าใช้น้ำสกัดแยกเอนไซม์ประมาณ 45% และสูงกว่าใช้สารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 3.5, 4.5, 5.5 และ 7.5 สกัดแยกเอนไซม์ ประมาณ 49%, 22%, 10% และ 41% ตามลำดับ อาจเป็นเพราะโบรมิเลนมีการละลายในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 6.5 ได้ดี โบรมิเลนมีค่าไอโซอีเลคตริคที่พีเอช 9.5 (48) ดังนั้นการสกัดแยกเอนไซม์ที่พีเอชต่ำกว่าค่าไอโซอีเลคตริคจะทำให้โบรมิเลนมีประจุรวมเป็นบวก ส่วนโปรตีนอื่น ๆ อาจละลายได้น้อยที่พีเอช 6.5 ทำให้แอคติวิตีจำเพาะของการสกัดที่พีเอชนี้สูงที่สุด

ความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการสกัดแยกเอนไซม์คือ 0.2 โมลาร์ จะได้เอนไซม์ที่มีแอคติวิตีสูงกว่าใช้น้ำสกัดแยกประมาณ 39% และสูงกว่าใช้สารละลายบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 และ 0.1 โมลาร์ ประมาณ 16% และ 9% ตามลำดับ การเพิ่มความเข้มข้นของบัฟเฟอร์อาจช่วยเพิ่มการละลายของเอนไซม์ เพราะการเพิ่มความเข้มข้นของบัฟเฟอร์เป็นการเพิ่ม Ionic strength ในสารละลายและการสกัดที่พีเอชเท่ากับ 6.5 ซึ่งห่างจากจุดไอโซอีเลคตริคของโบรมิเลน ทำให้โบรมิเลนละลายได้มากที่สุด

การสกัดแยกเอนไซม์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2 โมลาร์ จะได้เอนไซม์ที่มีแอคติวิตีสูงกว่าการสกัดแยกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 6.5 เข้มข้น 0.2 โมลาร์ ประมาณ 19% และสูงกว่าการกสัดแยกด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.05 และ 0.1 โมลาร์ ประมาณ 31% และ 21% ตามลำดับ อาจเป็นเพราะการเพิ่มความเข้มข้นของเกลือเล็กน้อยจะทำให้เอนไซม์ซึ่งเป็นโปรตีนละลายได้ดีขึ้น ซึ่งเป็นปรากฏการณ์ที่เรียกว่า salting in (29)

การสกัดแยกเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 10-60^{o} ซ. พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์มีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก อาจเป็นเพราะโบรมิเลนเป็นเอนไซม์ที่มีความเสถียร ทนต่ออุณหภูมิสูงได้

และเวลาที่ใช้สกัดแยกเอนไซม์ก็เป็นช่วงเวลาสั้น ทำให้อุณหภูมิที่ใช้สกัดแยกไม่มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์มากนัก

ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดแยกโบรมิเลนจากต้นสับปะรดแบบขั้นตอนเดียวคือ ใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 2 ส่วนต่อเนื้อต้นสับปะรด 1 ส่วน สกัดแยกเอนไซม์เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

การสกัดแยกแบบขั้นตอนเดียวเป็นการสกัดแยกเอนไซม์จากต้นสับปะรดที่ทำในถังกวนเพียงครั้งเดียว ทำให้ยังมีเอนไซม์ติดค้างอยู่กับกากต้นสับปะรด จึงต้องสกัดแยกแบบต่อ-เนื่องและสวนทางที่มีการสกัดแยกหลายขั้นตอนร่วมกัน ซึ่งอาจทำให้ได้ผลผลิตของเอนไซม์สูงขึ้น ก่อนการสกัดแยกเอนไซม์แบบต่อเนื่องและสวนทางนี้ต้องหาขั้นตอนการสกัดที่ทำให้การสกัดแยกถึงจุดสมดุลย์เพื่อนำไปใช้ในแถวการสกัดแยกแบบต่อเนื่องและสวนทาง พบว่าการสกัดแยก 4 ขั้นตอนด้วยน้ำกลั่นจากขั้นตอนที่ 1 ถึงขั้นตอนที่ 2 แอคติวิตีสูงขึ้นประมาณ 47% เมื่อสกัดแยกขั้นตอนที่ 3 แอคติวิตีสูงขึ้นอีกประมาณ 26 % ต่อจากนี้แอคติวิตีจะคงที่ แสดงว่าการสกัดเพียง 3 ขั้นตอนก็ทำให้เกิดสภาพสมดุลย์

จากการสกัดแยกแบบต่อเนื่องและสวนทางพบว่า ในแถวที่ 1 ได้เอนไซม์ที่มีแอคติวิตีและโปรตีนสูง เป็นเพราะในแถวที่ 1 เป็นการสกัดแยกเอนไซม์จากต้นสับปะรดใหม่ 2 ชุด เมื่อสกัดแยกในแถวที่ 2 แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลง 9% โปรตีนลดลง 28% เพราะในแถวที่ 2 เป็นการสกัดแยกเอนไซม์จากต้นสับปะรดที่ถูกสกัดมาแล้วจากแถวที่ 1 การสกัดแยกในแถวที่ 3 ได้เอนไซม์ที่มีแอคติวิตีต่ำกว่าแถวที่ 2 ประมาณ 30% โปรตีนต่ำลง 26% การลดลงนี้เนื่องจากเป็นการสกัดแยกเอนไซม์จากต้นสับปะรดที่ถูกสักัดมาแล้วจากแถวที่ 2 เมื่อสกัดแยกต่อไปในแถวที่ 4 แอคติวิตีของเอนไซม์จะต่ำกว่าแถวที่ 3 ประมาณ 12% ส่วนปริมาณโปรตีนคงที่ .แสดงว่าการสกัดแยกในแถวที่ 4 เริ่มเข้าสู่สภาวะสมดุลย์แล้ว เนื่องจากแอคติวิตีของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนเปลี่ยนแปลงน้อย เมื่อสกัดต่อไปในแถวที่ 5 และ 6 แอคติวิตีของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนจะคงที่ ดังนั้นจึงเลือกการสกัดแยกแบบต่อเนื่องและสวนทางตั้งแต่แถวที่ 4 เป็นต้นไป

การตีปั่นต้นสับปะรดเป็นการสกัดแยกเอนไซม์ที่ใช้แรงเฉือนและใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย การใช้น้ำตีปั่นต้นสับปะรดในอัตราส่วน 2:1 จะได้เอนไซม์ที่มีแอคติวิตีสูงกว่าใช้น้ำตีปั่นต้นสับปะรดในอัตราส่วน 1:2, 1:1 และ 3:2 ประมาณ 66% 55%และ 9% ตามลำดับ เพราะน้ำที่ใช้ในการสกัดแยกมีปริมาณน้อยไม่เพียงพอในการละลายเอนไซม์จากเนื้อเยื่อได้หมด แต่ถ้าเพิ่มน้ำในการตีปั่นมากกว่า 2:1 แอคติวิตีของเอนไซม์มีค่าคงที่เนื่องมาจากการสกัดแยกถึงจุดสมดุลย์ แต่น้ำจะละลายโปรตีนออกมามากด้วยทำให้แอคติวิตีจำเพาะลดลง

เวลาที่เหมาะสมในการสกัดแยกเอนไซม์ด้วยเครื่องตีปั่นแบบตั้งโต๊ะคือ 2 นาที โดยให้เอนไซม์ที่มีแอคติวิตีสูงกว่าที่เวลาการสกัดแยก 0.5 และ 1 นาที ประมาณ 63%และ 38 % ตามลำดับ การเพิ่มเวลาการสกัดมากกว่า 2 นาที แอคติวิตีของเอนไซม์ไม่เปลี่ยนแปลงแต่โปรตีนจะถูกสกัดออกมามากขึ้น ทำให้แอคติวิตีจำเพาะต่ำลง ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Seizen (28) ซึ่งสกัดแยกเอนไซม์จากต้นสับปะรดด้วยเครื่องตีปั่นภายในเวลา 2 นาที ทำให้ได้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุด

ดังนั้นการสกัดแยกโบรมิเลนจากต้นสับปะรดโดยเครื่องตีปั่นแบบตั้งโต๊ะใช้น้ำปริมาตร 2 ส่วน ตีปั่นเนื้อต้นสับปะรด 1 ส่วน เป็นเวลา 2 นาที

การสกัดแยกแบบขั้นตอนเดียว แบบต่อเนื่องและส่วนทาง และแบบตีปั่นต้องใช้น้ำเป็นตัวทำละลายในการสกัดแยกเอนไซม์จากต้นสับปะรด ทำให้เอนไซม์ที่สกัดแยกได้มีความเข้มข้นน้อยลง เนื่องจากมีน้ำเข้าไปผสมกับสารละลายเอนไซม์ จึงศึกษาการแยกน้ำที่มีโบรมิเลนออกจากต้นสับปะรดด้วยการบีบด้วยเครื่องบีบไฮดรอลิคและเครื่องบีบแบบสกรู ซึ่งใช้ใช้แรงอัดแยกเอาสารละลายเอนไซม์ออกมาโดยตรง

การบีบแยกโบรมิเลนออกจากต้นสับปะรดด้วยเครื่องบีบไฮดรอลิค พบว่าการตีปั่นต้นสับสับปะรดแล้วบีบ เอนไซม์ที่ได้จะมีแอคติวิตีสูงกว่าการบดและการหั่นต้นสับปะรดแล้วบีบประมาณ 21%และ 25 % ตามลำดับ แต่วิธีการตีปั่นต้นสับปะรดแล้วบีบนี้ทำให้ได้ปริมาณโปรตีนสูงมาก ทำให้แอคติวิตีจำเพาะต่ำ ดังนั้นจึงเลือกการหั่นต้นสับปะรดแล้วบีบซึ่งจะให้แอคติวิตีจำเพาะสูงกว่าการบดและการตีปั่นต้นสับปะรดประมาณ 41%และ 59 % ตามลำดับ

การแช่แข็งต้นสับปะรดก่อนการบีบแยกโบรมิเลนก็เพื่อให้เซลต้นสับปะรดแตก เมื่อบีบต้นสับปะรดจะได้เอนไซม์ในปริมาณมากขึ้น และการแช่ต้นสับปะรดในสารละลายโซเดียมคลอไรด์

ก่อนการบีบต้นสับปะรดก็เพื่อให้สารละลายเกลือช่วยสกัดเอนไซม์ออกมามากขึ้น การหั่นต้นสับปะรดแล้วบีบแยกเอนไซม์ทันทีด้วยเครื่องบีบไฮดรอลิค ทำให้แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์สูงกว่าการหั่นต้นสับปะรดแล้วแช่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ และการหั่นต้นสับปะรดแล้วแช่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์และนำไปแช่แข็งประมาณ 43%และ 21% ตามลำดับ แต่มีค่าแอคติวิตีจำเพาะใกล้เคียงกับการหั่นต้นสับปะรดแล้วแช่แข็ง

การบีบแยกเอนไซม์ออกจากต้นสับปะรดด้วยเครื่องบีบไฮดรอลิคเหมาะสำหรับการผลิตโบรมิเลนระดับห้องทดลอง เพราะไม่สามารถบีบต้นสับปะรดในปริมาณมากและไม่สามารถทำอย่างต่อเนื่องได้ เนื่องจากต้องแยกกากต้นสับปะรดออกก่อนทำการบีบต้นสับปะรดชุดใหม่ การบีบแยกเอนไซม์จากต้นสับปะรดด้วยเครื่องบีบแบบสกรูเป็นวิธีการบีบที่ทำได้อย่างต่อเนื่อง เพราะสามารถบีบต้นสับปะรดได้ในขณะที่กากจะถูกแยกออกจากเครื่องในเวลาเดียวกันและแยกเอาน้ำออกจากเครื่องด้วย จากการทดลองพบว่าในการบีบแยกเอนไซม์จากต้นสับปะรดครั้งที่หนึ่งจะได้แอคติวิตีสูงประมาณ 29×10^5 CDU/กก.ต้นสับปะรด ส่วนกากจะแยกมาเติมสารละลายโซเดียมเบนโซเอท 0.1% ในอัตราส่วนน้ำหนักกากต้นสับปะรดต่อปริมาตรสารละลายเบนโซเอทเท่ากับ 2:1 ซึ่งจะให้แอคติวิตีสูงกว่าที่อัตราส่วน 3:1 และ 4:1 ประมาณ 10% และ 74% ตามลำดับ การเติมสารละลายโซเดียมเบนโซเอทลงในกากเพราะสารเคมีชนิดนี้เป็นสารเคมีกันเสีย (chemical preservative) (42) สามารถป้องกันการเน่าเสียเนื่องจากจุลินทรีย์ เพราะการเก็บกากไว้บีบช้าต้องทิ้งไว้เป็นเวลานานอาจจะเกิดการเน่าเสียได้ จากรายงานการของ Wilson (25) พบว่าการบีบต้นสับปะรดด้วยเครื่องบีบแบบสกรูมีข้อดีคือ สามารถทำได้อย่างต่อเนื่องและสามารถบีบน้ำได้ปริมาตร 400 ลิตรต่อต้นสับปะรด 1 ตัน และเอนไซม์ที่ได้มีแอคติวิตีสูงเมื่อเทียบกับการบีบด้วยเครื่องมืออื่น ๆ

จากการสกัดแยกโบรมิเลนจากต้นสับปะรดด้วยวิธีต่าง ๆ (ตารางที่ 1) พบว่าการบีบแยกโบรมิเลนจากต้นสับปะรดด้วยเครื่องบีบแบบสกรู เอนไซม์ที่ได้มีแอคติวิตีสูงกว่าการสกัดแยกแบบขั้นตอนเดียวแบบต่อเนื่องและสวนทาง แบบตีป่น และแบบบีบด้วยเครื่องบีบไฮดรอลิคประมาณ 68% 61% 63%และ 68 % ตามลำดับ แต่การสกัดแยกแบบตีป่นต้นสับปะรดทำให้ได้ปริมาณโปรตีนสูงที่สุด จึงทำให้แอคติวิตีจำเพาะมีค่าต่ำสุด ส่วนค่าค่าแอคติวิตีจำเพาะของการสกัดแยกแบบบีบด้วยเครื่องบีบแบบสกรูมีค่าสูงสุด ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ ดังนั้นจึงเลือกการสกัดแยกโบรมิเลนจากต้นสับปะรดโดยบีบต้นสับปะรดที่หั่นด้วยเครื่องบีบแบบสกรู

4.4 การตกตะกอนโบรมิเลนด้วยสารเคมีต่าง ๆ

การตกตะกอนเอนไซม์ด้วยอะซีโตน 29%ถึง 41% โดยปริมาตรทั้งหมด พบว่าแอคติวิตี recovery เพิ่มขึ้น 3.5% โปรตีน recovery เพิ่มขึ้น 18% แสดงว่าการใช้อะซีโตนปริมาตร 41% จะตกตะกอนโปรตีนอื่น ๆ ได้มาก และเมื่อเพิ่มอะซีโตนตั้งแต่ 41%ถึง 50% โดยปริมาตรทั้งหมด แอคติวิตี recovery เพิ่มขึ้นอีกประมาณ 15% โปรตีนเพิ่มขึ้นอีกประมาณ 22% แสดงว่าเอนไซม์เริ่มตกตะกอนมากขึ้น เมื่อเพิ่มเอนไซม์ตั้งแต่ 50%ถึง 57% โดยปริมาตรทั้งหมด แอคติวิตี recovery เพิ่มขึ้นถึง 71% โปรตีน recovery เพิ่มขึ้น 22% แอคติวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้น 63% และผลผลิตเพิ่มขึ้นถึง 31% แสดงว่าการเพิ่มปริมาตรอะซีโตนในช่วงดังกล่าวเอนไซม์จะตกตะกอนออกมามาก ดังนั้นการตกตะกอนแบบขั้นตอนเดียวจะใช้อะซีโตน 41% โดยปริมาตรทั้งหมด

การตกตะกอนด้วยอะซีโตนแบบขั้นตอนเดียาทำให้ตะกอนโปรตีนอื่น ๆ ที่ไม่ใช่เอนไซม์ลงมาด้วย ซึ่งทำให้เอนไซม์มีแอคติวิตีจำเพาะต่ำ ดังนั้นจึงได้ทดลองตกตะกอนแบบสองขั้น-ตอน โดยขั้นตอนแรกเป็นการกำจัดโปรตีนที่มีแอคติวิตีต่ำออกมาก่อน จากการตกตะกอนแบบขั้นตอนเดียวพบว่าการใช้อะซีโตน 41% โดยปริมาตรทั้งหมดจะได้เอนไซม์ที่มีแอคติวิตีต่ำ ส่วนปริมาณโปรตีนมีค่าสูง ดังนั้นจึงตกตะกอนครั้งแรกก่อนด้วยอะซีโตน 41% โดยปริมาตรทั้งหมด หลังจากนั้นแยกส่วนใสตกตะกอนครั้งที่สองด้วยอะซีโตน 60% ถึง 80% โดยปริมาตรทั้งหมด พบว่าการตกตะกอนตั้งแต่ 60%ถึง 75% โดยปริมาตรทั้งหมด แอคติวิตี recovery เพิ่มขึ้น 75% โปรตีน recovery เพิ่มขึ้น 57% แอคติวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้น 18.5% โดยปริมาตรทั้งหมด และผลผลิตเพิ่มขึ้น 82% แต่เมื่อเพิ่มอะซีโตนเป็น 80% โดยปริมาตรทั้งหมด พบว่าแอคติวิตีลดลง 25% แสดงว่าการเพิ่มอะซีโตนความเข้มข้นสูงอาจทำให้เอนไซม์ถูกทำลายได้ (24)

การตกตะกอนโบรมิเลนด้วยกรดแทนนิค 0.3% โดยน้ำหนักต่อปริมาณน้ำต้นสับปะรด เอนไซม์ที่ได้มีแอคติวิตี recovery สูงกว่าการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยกรดแทนนิค 0.1% 0.2% 0.4% 0.6%และ 0.8% ประมาณ 22% 6% 9% 10%และ 13% ตามลำดับ อาจเป็นเพราะกรดแทนนิคเป็นโมเลกุลที่มีประจุลบ ถ้าใช้ในปริมาณน้อยเกินไปจะไม่สามารถจับกับเอนไซม์ให้ตกตะกอนได้หมด ถ้าใช้ปริมาณมากเกินไปอาจทำให้เอนไซม์เสียสภาพไปบางส่วน จากรายงานของ Soong (26) พบว่าการตกตะกอนโบรมิเลนด้วยกรดแทนนิคนั้น ปริมาณที่ใช้ขึ้นอยู่กับความบริสุทธิ์ของกรดแทนนิคด้วย

การตกตะกอนโบรมิเลนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 80%ถึง 90% โดยปริมาตรทั้งหมด เอนไซม์ที่ได้มีแอคติวิตี recovery สูงกว่าการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 30%- 40% และ 50%- 70% โดยปริมาตรทั้งหมดประมาณ 39%และ 10% อาจเนื่องมาจากการใช้ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตน้อยเกินไปไม่สามารถจับกับเอนไซม์ให้ตกตะกอนได้หมด การตกตะกอนด้วยวิธีนี้เลือกใช้แอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 80%โดยปริมาตร เพราะให้ค่าแอคติวิตีต่อกรัมผงเอนไซม์สูงกว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 90%โดยปริมาตรประมาณ 8%

จากการตกตะกอนโบรมิเลนด้วยสารเคมีต่าง ๆ (ตารางที่ 2) พบว่าการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยกรดแทนนิคให้แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์สูงกว่าการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยอะซีโตนแบบขั้นตอนเดียว อะซีโตนแบบสองขั้นตอน และแอมโมเนียมซัลเฟตประมาณ 76% 69%และ 29% ตามลำดับ แสดงว่าการตกตะกอนด้วยกรดแทนนิคทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น เนื่องจากมีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงที่สุด การตกตะกอนด้วยอะซีโตนมีข้อเสียคือ สิ้นเปลืองอะซีโตนในการตกตะกอนเอนไซม์ และการเพิ่มปริมาตรทำให้ต้องเสียเวลาในการกรองแยกหรือปั่นแยกเอาตะกอนออก ดังนั้นเอนไซม์ที่อยู่ในสารละลายที่มีอะซีโตนอาจเสียสภาพได้ การใช้แอมโมเนียมซัลเฟตตกตะกอนโบรมิเลนมีข้อเสียคือ ต้องไดอะไลซ์ตะกอนโบรมิเลนเพื่อแยกเอาแอมโมเนียมซัลเฟตออกไป แล้วตกตะกอนอีกครั้งด้วยอะซีโตนเพื่อแยกเอาโบรมิเลน ซึ่งเป็นการเพิ่มขั้นตอนการผลิตทำให้เสียเวลามากขึ้น ดังนั้นเลือกใช้กรดแทนนิค 0.3% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรตกตะกอนโบรมิเลน

4.5 สภาวะในการตกตะกอนโบรมิเลน

การตกตะกอนโบรมิเลนที่พีเอช 4.0 - 5.5 เอนไซม์ที่ได้มีแอคติวิตีจำเพาะสูงกว่าการตกตะกอนเอนไซม์ที่พีเอช 2.5 - 3.5 และที่พีเอช 6.5 ประมาณ 28% 45%และ 14% ตามลำดับ แต่ที่พีเอช 4.0 นี้แอคติวิตี recoveryมีค่าสูงสุดประมาณ 87% อาจเป็นเพราะที่พีเอชนี้เอนไซม์จะมีหมู่อะมิโนที่มีประจุเป็นบวกมากขึ้นสามารถจับกับกรดแทนนิคซึ่งประจุลบตกตะกอนลงมาได้มากที่สุด การเปลี่ยนแปลงพีเอชอาจมีผลต่อการเปลี่ยนสภาพของประจุบวกและลบในหมู่อะมิโนของโบรมิเลน ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการรายงานของ Heinicke (24) ซึ่งพบว่าโบรมิเลนตกตะกอนได้ดีในช่วงพีเอช 3.5 - 5.5 โดยที่พีเอช 4.5 แอคติวิตีเท่ากับ 4,000 MCU/กรัมผงเอนไซม์ และผลผลิต 0.9%

โบรมิเลนเป็นซัลฟ์ไฮดริลโปรตีเอสซึ่งต้องการสารรีดิวส์เพื่อทำให้กลุ่มไดซัลไฟด์ (S-S) ที่ไม่ active เป็นกลุ่มไธออล (-SH) ที่ active สารเคมีที่เป็นตัวเร่งได้แก่โซเดียมเมตา-ไบซัลไฟท์ ซีสเตอีนไฮโดรคลอไรด์ โซเดียมเบนโซเอท และโซเดียมไฮโดรเจนซัลไฟด์ สามารถรักษาความเสถียรของเอนไซม์เนื่องจากลดการเกิดออกซิเดชั่นจากออกซิเจนและตัวออกซิไดส์ต่าง ๆ (49) การใช้โซเดียมเมตาไบซัลไฟท์ 0.01 โมลาร์ ซีสเตอีนไฮโดร-คลอไรด์ 0.05 โมลาร์ โซเดียมเบนโซเอท 0.01 โมลาร์ และโซเดียมไฮโดรเจนซัล-ไฟด์ 0.01 โมลาร์ ทำให้เอนไซม์มีแอคติวิตีเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับไม่เติมตัวเร่งเหล่านี้ประมาณ 46% 50% 27% และ 60% ตามลำดับ และมีแอคติวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้นประมาณ 50% 43% 40% และ 61%ตามลำดับ ตัวเร่งเหล่านี้นอกจากจะเป็นสารรีดิวซ์ป้องกันการเกิดออกซิเดชันแล้วยังเป็นสารกันเสียที่สามารถชะงักการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เช่น โซเดียมเมตาไบซัลไฟท์ และโซเดียมเบนโซเอท (48) จากรายงานของ Heinicke (49) พบว่าโซเดียมเบนโซ-เอทเป็นสารที่ช่วยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนสซึ่งเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาออกซิเดชัน มีผลทำให้ลดการออกซิเดชันของหมู่ซัลฟ์ไฮดริล จึงสามารถเก็บรักษาเอนไซม์ได้นานขึ้น

การเก็บรักษาเอนไซม์ด้วยตัวเร่งต่าง ๆ นี้ พบว่าการใช้ซีสเตอีนไฮโดรคลอไรด์ ช่วยในการเก็บรักษาเอนไซม์ สามารถเก็บได้นานถึง 7 วัน ที่อุณหภูมิ 4° ซ. โดยแอคติวิตีลดลงเพียง 8% โดยที่เมื่อใช้ตัวเร่งอื่น ๆ แอคติวิตีลดลงประมาณ 28% เปรียบเทียบกับไม่มีตัวเร่งแอคติวิตีลดลงถึง 40% และเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4° ซ. เป็นเวลานาน 15 วัน แอคติวิตีลดลงประมาณ 84-90% ถึงแม้จะมีหรือไม่มีตัวเร่งในการเก็บรักษาเอนไซม์ ดังนั้นเลือกใช้ซีสเตอีนไฮโดรคลอไรด์ 0.05 โมลาร์ เป็นตัวเร่งและช่วยในการเก็บรักษาเอนไซม์

4.6 การทำให้เอนไซม์แห้ง

การทำให้เอนไซม์แห้งด้วยวิธีการอบแห้งที่อุณหภูมิ 50° ซ. เอนไซม์จะมีแอคติวิตีที่เหลือสูงกว่าการอบแห้งที่อุณหภูมิ 40, 45 และ 60° ซ. ประมาณ 9% 11%และ 14% ตามลำดับ ส่วนการอบแห้งภายใต้สูญญากาศที่อุณหภูมิ 45°- 50° ซ. เอนไซม์จะมีแอคติวิตีที่เหลือสูงกว่าการอบแห้งภายใต้สูญญากาศที่อุณหภูมิ 40 และ 60°ซ. ประมาณ 3%และ 13%ตามลำดับ การอบแห้งที่อุณหภูมิต่ำซึ่งความชื้นระเหยช้ามาก ต้องใช้เวลาในการทำแห้งนาน ซึ่งอาจทำให้เอนไซม์เกิดการเปลี่ยนแปลงได้ และการอบแห้งที่อุณหภูมิสูงซึ่งความชื้นระเหยได้เร็วแต่เอน-ไซม์ก็มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูงลดลง แต่การอบแห้งภายใต้สูญญากาศซึ่งมีการถ่ายเทความชื้น

ออกไปอย่างรวดเร็ว ทำให้เวลาที่ใช้ในการทำแห้งลดลงค่าแอคติวิตีที่เหลือของเอนไซม์จึงมีค่าสูง เมื่อเปรียบเทียบการทำให้อนไซม์แห้งด้วยการอบแห้งที่ 50°ซ. การอบแห้งภายใต้สูญญากาศที่ 50°ซ. และการอบแห้งภายใต้สภาวะเยือกแข็งที่ -40° ซ. พบว่าการอบแห้งภายใต้สภาวะเยือกแข็งเอนไซม์ที่ได้มีแอคติวิตีลดลงเพียง 10% เมื่อเทียบกับการอบแห้งด้วยวิธีอื่น ๆ แอคติวิตีลดลงประมาณ 40% และการอบแห้งที่อุณหภูมิ 50°ซ. เอนไซม์ที่ได้มีสีคล้ำเนื่องจากเกิดปฏิกิริยามิลลาร์ด (millard reaction) (40) ดังนั้นวิธีการที่เหมาะสมในการทำให้เอนไซม์แห้งคือการอบแห้งภายใต้สภาวะเยือกแข็ง

4.7 การวิเคราะห์คุณภาพผงโบรมิเลน

ผงโบรมิเลนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกรดแทนนิคมีแอคติวิตีสูงกว่าการตกตะกอนด้วยอะซีโตนและแอมโมเนียมซัลเฟต ประมาณ 87%และ 55% ตามลำดับ มีเปอร์เซ็นต์โปรตีนสูงกว่าประมาณ 35%และ 20% ตามลำดับ แสดงว่ากรดแทนนิคจับตัวกับโปรตีนโดยเฉพาะจึงตกตะกอนได้มาก มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตมีค่าใกล้เคียงกับการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยวิธีอื่น ส่วนปริมาณเถ้ามีค่าต่ำกว่าประมาณ 39%และ 23 % ตามลำดับ แสดงว่ากรดแทนนิคไม่ทำให้สารอนินทรีย์และสิ่งเจือปนอื่น ๆ ตกตะกอนลงมามากเกินไป ค่าเปอร์เซ็นต์ insoluble solid มีค่าต่ำประมาณ 1.3% ทำให้ผงโบรมิเลนที่ได้มีการละลายดี แต่สีของเอนไซม์เข้มกว่าการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยวิธีอื่น ส่วนจำนวนแบคทีเรียมีปริมาณ ใกล้เคียงกับการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยวิธีอื่น

4.8 สรุปผลการทดลอง

การศึกษาการผลิตโบรมิเลนจากต้นสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียอายุ 2-3 ปี สรุปได้ดังนี้

1. การเก็บต้นสับปะรดที่ห้องเย็น 4° ซ. หรือที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน แอคติวิตีลดลง 3%- 4% ถ้าเก็บนานกว่า 7 วัน ควรเก็บในห้องเย็นอุณหภูมิ 4° ซ.

2. การสกัดแยกโบรมิเลนจากต้นสับปะรด ใช้วิธีบีบแยกด้วยเครื่องบีบแบบสกรู โดยบีบต้นสับปะรดและนำกากต้นสับปะรดที่ได้ผสมกับสารละลายโซเดียมเบนโซเอท 0.1% ในอัตราส่วน 2:1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แล้วบีบซ้ำอีกครั้ง

3. การตกตะกอนโบรมิเลน ใช้วิธีตกตะกอนด้วยกรดแทนนิค 0.3% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

4. สภาวะที่เหมาะสมในการตกตะกอนโบรมิเลนคือ เติมตัวเร่งได้แก่ ซีสเตอีนไฮโดรคลอไรด์ 0.05 โมลาร์ แล้วปรับพีเอชน้ำต้นสับปะรด 4.0 นอกจากนี้ซีสเตอีนไฮโดร-คลอไรด์ 0.05 โมลาร์ ช่วยเก็บรักษาเอนไซม์ได้นาน 7 วัน ที่อุณหภูมิ 4° ซ. โดยแอคติวิตีลดลง 8%

5. การทำให้เอนไซม์แห้ง ใช้วิธีการอบแห้งภายใต้สภาวะเยือกแข็ง อุณหภูมิ-40°ซ.

6. คุณภาพและองค์ประกอบทางเคมีของผงโบรมิเลนที่ตกตะกอนด้วยกรดแทนนิค 0.3% มีแอคติวิตี 832 x 10^3 CDU /กรัมผงเอนไซม์แห้ง แอคติวิตีจำเพาะ 2237 CDU/มก.โปรตีน โปรตีน 65.1% คาร์โบไฮเดรต 9.1% และเถ้า 3.8%

4.9 ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาเปรียบเทียบความเสถียรของเอนไซม์ที่ตกตะกอนด้วยอะซีโตน กรดแทนนิค และแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเก็บที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ และทดลองใช้สารเพิ่มความเสถียรเอนไซม์ เช่น BHA (butylated hydroxy anisole), BHT (butylated hydroxy toluene) และ tocopherol ฯลฯ สารเหล่านี้จะช่วยป้องกันการออกซิเดชันจากตัวออกซิไดส์ต่าง ๆ

2. กระบวนการที่ใช้ในงานวิจัยนี้ต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์(อะซีโตน) หากมีวิธีการนำกลับมาใช้ใหม่ ย่อมจะเป็นการลดต้นทุนการผลิตของเอนไซม์

3. การสกัดแยกโบรมิเลนในขั้นตอนแรกจะมีสารเหลือทิ้งที่เป็นองค์ประกอบสำคัญ คือ ส่วนของคาร์โบไฮเดรตซึ่งหากมีการศึกษาถึงประโยชน์อย่างแท้จริงแล้วอาจมีคุณค่าต่อการผลิตในเชิงพาณิชย์ได้

4. ควรศึกษาการผลิตโบรมิเลนในระดับขยายส่วน และการเพิ่มขั้นตอนในการทำให้โบรมิเลนบริสุทธิ์มากขึ้นด้วยวิธีการต่าง ๆ เช่น อุลตราฟิลเตรชัน (ultrafiltration) หรือเจลฟิลเตรชัน (gelfiltration)