หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

โบรมิเลนมีชื่อรหัสของ Enzyme Commission คือ E.C. 3.4.4.24 (1) เป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteolytic enzyme) ที่มี active site ประกอบด้วยกลุ่มซัลโฮไครล (sulfhydryl) หรือกลุ่มไธออล (-SH) พบในเซลล์ของสับปะรด (Ananas Comosus (L.) Merr.) และพันธุ์ไม้วงศ์ Bromeliaceae (2) ทั่ว ๆ ไป

1.1 คุณสมบัติของโบรมิเลนจากต้นสับปะรด

1.1.1 คุณสมบัติทางเคมี โบรมิเลนเป็นไกลโคโปรตีนซึ่งส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรต เป็นโอลิโกแซคคาไรด์ซึ่งประกอบด้วย แมนโนส 3 โมเลกุล ไซโลส 3 โมเลกุล และ เอ็น-อะซีทิลกลูโคซามีน 2 โมเลกุล ต่อ 1 โมเลกุลของโบรมิเลน (3,4,5) สารประกอบคาร์โบ-ไฮเดรตเชิงซ้อนเหล่านี้เชื่อมต่อกับสายโพลีเปปไตด์ด้วยโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 1 ส่วนที่เป็นโพลีเปปไตด์ประกอบด้วยเปปไตด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 285 ตัว ซึ่งกรดอะมิโนเหล่านี้มีคุณสมบัติเป็นเบสมากกว่ากรด (6) นอกจากกรดอะมิโนแล้วยังมีกรดอื่น ได้แก่ กรดกลูคูโรนิค (glucuronic acid) กรดกาแลคตูโรนิค (galacturonic acid) และกรดเฟอรูลิค (feruslic acid) เชื่อมต่อกับคาร์โบไฮเดรตเชิงซ้อนในโมเลกุลของโบรมิเลนด้วย (7)

โบรมิเลนมีกลุ่มไธออล (-SH) ของซีสเตอีน (cysteine residue) และอิมิดา-โซล (imidazole) ของฮีสติดีน (histidine residue) อยู่ที่ active site ของเอนไซม์ (8,9) กลุ่มเหล่านี้ทำหน้าที่จับกับสับสเตรทซึ่งคล้ายกับปาเปนและไฟซิน (8) โบรมิเลนย่อยเคซีนได้ดีกว่าฮีโมโกลบินที่พีเอช 7.2 และย่อยเจลาตินได้ดีที่พีเอช 5.0 (10,11) ความเสถียรของโบรมิเลนอยู่ในช่วงพีเอช 3.0 - 5.5 ที่อุณหภูมิ 35 - 60^{o} ซ. (12,13)

1.1.2 คุณสมบัติทางฟิสิกส์

โบรมิเลนมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 33,000 ดัลตัน (14,15) ละลายน้ำ แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น แอลกอฮอล์ คีโตน คลอโรฟอร์ม อีเทอร์ หรือเกลืออนินทรีย์เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต โซเดียมคลอไรด์ โปตัสเซียมซัลเฟต มีจุดไอโซอีเลคตริกที่พีเอช 9.55 มีค่าคงที่ของการตกตะกอน (sedimentation constant, S_{20}) 2.73 S

polypeptide (285 amino acids) - α - D - Man (1$\longrightarrow$2) - α - D - Man (1$\longrightarrow$2 or 6) - (α - L - Fuc - (1$\longrightarrow$6 or 2) - α - D - Man - (β - D - Xyl) - β - D - GlcNAc - (1$\longrightarrow$3 or 4) - β - D - GlcNAc - (1$\rightarrow$ β - NH_2 - N of Asn) - peptide

รูปที่ 1 โมเลกุลของโบรมิเลน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ค่าคงที่ของการแพร่กระจาย (diffusion constant, D_{20}) 7.77 x 10^{-1} ซม^2./วินาที ความหนืด (frictional ratio, η) 0.039 เดซิลิตรต่อกรัม มีค่าคงที่ของการดูดกลืนแสง (absorbancy, $A_{1\ ซม.}$) ที่ 280 นาโนเมตร 19.0 (15)

1.2 วัตถุดิบสำหรับผลิตโบรมิเลน

วัตถุดิบที่ใช้ผลิตโบรมิเลนคือสับปะรด ซึ่งเป็นพืชล้มลุกใบเลี้ยงเดี่ยว อยู่ในวงศ์บรอมมิเลียซีอี้ (Family Bromeliaceae) แหล่งปลูกสับปะรดที่สำคัญของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ชลบุรี เพชรบุรี ระยอง ฉะเชิงเทรา จันทบุรี ตราด จังหวัดต่าง ๆ ในภาคใต้ ภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

Heinicke และ Gortner (2) รายงานว่าโบรมิเลนมีในทุกส่วนของต้นสับปะรด แต่บริเวณลำต้นมีปริมาณเอนไซม์สูงกว่าส่วนอื่นของต้นสับปะรด ลำต้นที่มีอายุมากจะมีเอนไซม์ในปริมาณมากกว่าลำต้นที่มีอายุน้อยกว่า และในส่วนล่างของลำต้นมีปริมาณเอนไซม์สูงกว่าบริเวณอื่น ส่วนสตีล (stele) มีเอนไซม์มากกว่าส่วนคอร์เท็กซ์ (cortex) นอกจากนี้ปริมาณเอนไซม์ยังขึ้นกับพันธุ์ของต้นสับปะรด ความอุดมสมบูรณ์ของดินของแหล่งปลูกต่าง ๆ (17)

1.3 การผลิตโบรมิเลน

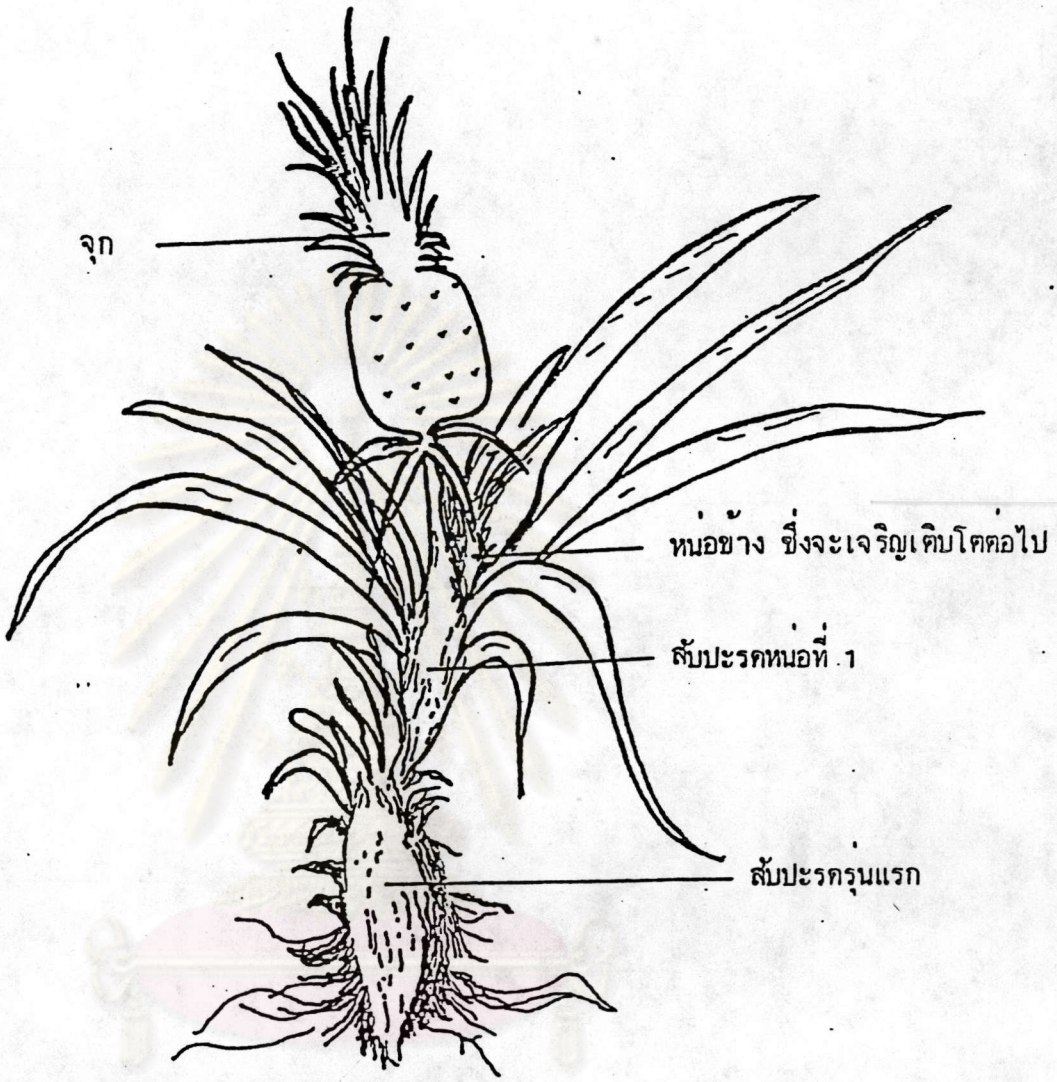
ต้นสับปะรดที่ใช้เป็นแหล่งผลิตโบรมิเลนควรเป็นต้นสับปะรดที่หมดอายุเก็บเกี่ยวแล้ว อายุต้นสับปะรดเหล่านี้มากกว่า 3 ปี ถ้าเป็นระบบปลูกสับปะรดแบบ 4 ปี เก็บผลได้ 2 ครั้ง ต้นสับปะรดก็จะมีอายุ 3 ปี ถ้าเป็นระบบปลูก 5 ปี เก็บผลได้ 3 ครั้ง จะมีต้นสับปะรดรุ่นตอ 1 และรุ่นตอ 2 อายุครบ 2 และ 4-5 ปี ตามลำดับ (16)

การสกัดแยกโบรมิเลนจากต้นสับปะรดมีหลักการคือให้ของเหลวสัมผัสกับเนื้อเยื่อที่จะสกัดและแยกส่วนที่ต้องการออกโดยใช้สารละลายและวิธีการที่เหมาะสม การสกัดแยกทั่วไปมีขั้นตอนที่สำคัญ คือ ขั้นตอนที่หนึ่ง ตัวทำละลายซึมผ่านผนังและเข้าไปสู่ภายในเนื้อของวัตถุดิบ ขั้นตอนที่สอง ตัวทำละลายไปละลายให้ตัวถูกละลายและพาสู่ผนังของวัตถุดิบ และขั้นตอนที่สาม เป็นการละลายของตัวถูกละลายจากผนังวัตถุดิบสู่ผิวสัมผัส จากนั้นตัวถูกละลายจะกระจายเข้าสู่สารละลายทั้งหมดของระบบ (18,19) การสกัดแยกทำได้ทั้งแบบขั้นตอนเดียว (batch) และแบบต่อเนื่อง (continuous) ในการสกัดแยกแบบขั้นตอนเดียว หลังการสกัดยังมีตัว

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2 ไร่สับปะรดโรงงานอาหารสยาม อ.บ้านบึง จ.ชลบุรี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3 ลักษณะและส่วนประกอบของต้นสับปะรด (16)

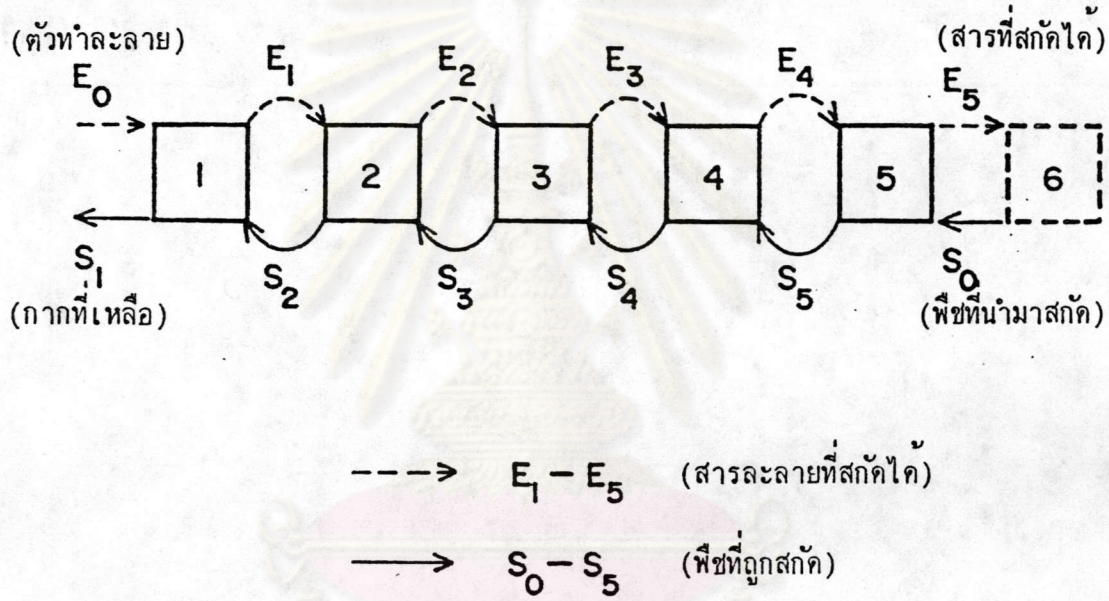
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถูกละลายตกค้างอยู่เป็นจำนวนมากพอสมควร เมื่อนำมาสกัดแยกด้วยตัวทำละลายอีก ตัวถูกละลายที่ยังตกค้างอยู่จะถูกแยกออกมาในปริมาณที่น้อยกว่าครั้งแรกมาก ถ้านำไปใช้ต่อในกระบวนการผลิตย่อมไม่คุ้มกับการลงทุน จึงมีนักวิทยาศาสตร์หลายท่านค้นคิดวิธีการสกัดแยกแบบต่อเนื่องและสวนทางขึ้นโดยใช้ถังกวนหลาย ๆ ใบ ทำงานแบบอนุกรมเช่น เครื่องมือสกัดแบบ Dorr thickener (20) และ Kennedy extractor (21) หลักการของการสกัดแบบสวนทางได้แสดงไว้ในรูปที่ 4 ในกระบวนการมีถังกวน 6 ใบ ทำงานแบบอนุกรมดังนี้ ตัวทำละลายบริสุทธิ์ (E_o) ป้อนเข้าถังหมายเลข 1 ผสมกับกากของแข็งที่แยกจากถังหมายเลข 2 เมื่อถึงจุดสมดุลย์หรือใกล้จุดสมดุลย์ที่ตัวถูกละลายในกากของแข็งไม่ละลายต่อไปแล้ว ก็แยกสารละลายออกเป็นสารละลาย E_1 ป้อนเข้าถังหมายเลข 2 ต่อไป ส่วนกากในขณะนี้มีตัวถูกละลายอยู่น้อยมากแล้ว (S_1) นำไปทิ้งเป็นของเสียจากกระบวนการ ในถังหมายเลข 2 มีสารละลายจาก E_1 ผสมกับกากที่เหลือจากถังหมายเลข 3 (S_3) เปิดเครื่องกวนจนถึงจุดสมดุลย์ของการละลาย ก็แยกส่วนทั้งสองออกจากกัน สารละลาย E_2 ก็ถูกนำไปใช้ในถังหมายเลข 3 ต่อไป ความเข้มข้นของตัวถูกละลายใน E_2 จะสูงกว่า E_1 ส่วนกากถูกนำไปใช้ในถังกวนหมายเลข 1 ต่อไป ทำการสกัดดังนี้ต่อไปเรื่อย ๆ จนถึงถังกวนหมายเลข 5 สารละลายจากถังหมายเลข 4 ถูกนำมาใช้เป็นตัวทำละลายที่จะสกัดแยกตัวถูกละลายใหม่หรือสด (S_o) เมื่อสกัดไปแล้วสารละลายที่แยกจากถังที่ 5 จะมีความเข้มข้นสูงมาก (E_5) ส่วนกาก (S_s) ถูกนำไปใช้ถังหมายเลข 4 ต่อไป (22)

การบีบเป็นการแยกน้ำจากเนื้อเยื่อพืชโดยใช้แรงอัดดันและแรงเฉือน เครื่องมือที่ใช้มีหลายชนิด อาทิ เครื่องบีบแบบไฮดรอลิค (hydraulic press) เครื่องบีบแบบสกรู (screw press) และเครื่องหีบแบบลูกกลิ้ง (roller mills) (23) Heinicke (24) ใช้เครื่องหีบแบบลูกกลิ้งบีบน้ำจากต้นสับปะรดได้ผลผลิต 37% ของน้ำหนักต้นสับปะรด น้ำที่บีบมีแอคติวิตี 152 MCU/มิลลิลิตร Wilson (25) ใช้เครื่องบีบแบบสกรูบีบน้ำจากต้นสับปะรดได้น้ำมีปริมาตร 100-125 แกลลอนต่อต้นสับปะรด 1 ตัน น้ำต้นสับปะรดที่ได้มีแอคติวิตี 140 MCU*/มิลลิลิตร Soong (26) ใช้เครื่องบีบแบบไฮดรอลิคบีบน้ำจากต้นสับปะรดที่แช่แข็งได้

---

*MCU = Milk Clotting Unit คือปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยนมขาดไขมัน (skim milk) โปรตีนในน้ำนมจะตกตะกอน จับเวลาที่นมแข็งตัว แล้วคำนวณแอคติวิตี



รูปที่ 4 แผนภาพการสกัดแบบต่อเนื่องและสวนทาง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

น้ำปริมาตร 590 มิลลิลิตรต่อต้นสับปะรด 1 กิโลกรัม น้ำต้นสับปะรดมีแอคติวิตี 8,348 BTU** ต่อต้นสับปะรด 1 กิโลกรัม Heinicke (24) ทดลองใช้ sharple centrifuge ซึ่งเป็นเครื่องปั่นแยกแบบต่อเนื่องร่วมกับการใช้เครื่องกรอง filter press เพื่อใช้ผลิตโบรมิเลนในระดับกึ่งอุตสาหกรรม การกรองต้องใช้สารช่วยกรองเช่น diatomaceus earth

การตกตะกอนโบรมิเลน ทำได้หลายวิธีเช่น การเติมเกลือ สารอินทรีย์ ตัวทำละลายอินทรีย์ Soong (26)ใช้กรดแทนนิคตกตะกอนโบรมิเลน แล้วล้างตะกอนด้วยอะซีโตนเพื่อกำจัดกรดแทนนิคออกจากเอนไซม์ วิธีนี้ได้เอนไซม์ที่มีแอคติวิตีสูงและมีความคงตัวดี โดยไม่จำเป็นต้องใช้ตัวเร่ง ส่วนกรดอินทรีย์อื่น ๆ เช่น กรดโพลีอะครัยลิค Caygill (27) ใช้กรดซินิคนี้ตกตะกอนโบรมิเลนที่พีเอช 3.5 - 4.5 ทำให้ได้เอนไซม์ที่มีแอคติวิตีสูงเช่นกัน Heinicke และ Seizen ได้ศึกษาการตกตะกอนโบรมิเลนด้วยอะซีโตน เอนไซม์ที่ได้มีแอคติวิตีประมาณ 4,000 MCU.ต่อกรัมเอนไซม์ ผลผลิตของเอนไซม์ 0.8 - 1.6% (24,28)

หลังจากตกตะกอนโบรมิเลนแล้วก็แยกตะกอนออกด้วยการปั่นแยกหรือการกรอง แล้วนำเอนไซม์ไปทำแห้งต่อไป

การทำให้เอนไซม์แห้ง คือกระบวนการที่ความร้อนถูกถ่ายเทด้วยวิธีใดวิธีหนึ่งไปยังวัสดุที่มีความชื้น เพื่อไล่ความชื้นออกโดยการระเหยโดยอาศัยความร้อนที่ได้รับเป็นความร้อนแฝงของการระเหย (29) วิธีการอบแห้งที่ใช้ในการทำแห้งทั่วไป เช่น การอบแห้งโดยใช้ตู้อบแห้ง (oven dryer) การอบแห้งโดยใช้ตู้อบแห้งสูญญากาศ (vaccuum dryer) และการอบแห้งโดยใช้ตู้อบแห้งเยือกแข็ง (freeze dryer) (30) ซึ่งสามารถมาใช้อบแห้งกับโบรมิเลน

1.4 <u>ประโยชน์ของโบรมิเลน</u>

มีการนำโบรมิเลนไปใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมยาและอุตสาหกรรมทางเคมี การใช้โบรมิเลนในอุตสาหกรรมอาหารโดยนำไป

** BTU = Bromelain Tyrosine Unit คือปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยเคซีนแล้วทำให้เกิดไทโรซีน 1 มิลลิโมลต่อนาที ที่สภาวะที่กำหนด)

ย่อยโปรตีนในอาหารได้หลายชนิดเช่น การทำให้เนื้อนุ่ม (meat tenderizing) มีสองวิธี คือ ฉีดเข้าไปในตัวสัตว์ก่อนฆ่า (31) และใช้หลังจากฆ่าแล้ว (32) การใช้ในสัตว์ก่อนฆ่า โดยเตรียมสารละลายโบรมิเลน 0.25 - 2.5% แล้วทำให้อยู่ในสภาวะ inactive ฉีดเข้าไปใน เส้นเลือดของสัตว์ก่อนฆ่าในปริมาณ 0.1 - 150 มิลลิกรัมต่อปอนด์ของสัตว์ เอนไซม์จะกลับคืนสู่สภาพที่ active อย่างช้า ๆ ประมาณ 10 - 30 นาทีแล้วจึงฆ่าสัตว์ Beuk (33) เตรียมโบรมิเลนโดยเติม EDTA 0.2% + ซิเทรท 0.2% ปรับพีเอชประมาณ 8.0 - 10.0 กรองร่วมกับสารช่วยกรองทำให้เอนไซม์มีแอคติวิตีสูง ใช้ฉีดเข้าไปในเส้นเลือดของสัตว์ก่อนฆ่า ทำให้เนื้อของสัตว์นุ่มมากหลังจากการฆ่าแล้ว นอกจากนี้ยังทำให้เนื้อทุกส่วนมีคุณภาพสม่ำเสมอทั่วทุกส่วน การใช้เอนไซม์ย่อยเนื้อหลังจากฆ่าแล้วชำแหละเนื้อเป็นส่วน ๆ ทำโดยสเปรย์สารละลายโบรมิเลนหรือจุ่มเนื้อลงในสารละลายโบรมิเลน Kang (34) พบว่า การที่เนื้อนุ่มเพราะโบรมิเลนย่อยไมโอไฟบริลลาโปรตีนซึ่งเป็นโปรตีนในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ทำให้ความเหนียวของเนื้อลดลง.

การทำให้เบียร์ใส ในการหมักเบียร์ในระยะเวลานานที่อุณหภูมิต่ำ เบียร์จะขุ่นเนื่องจากโปรตีนพวกอัลบูมินและโปรตีนจากข้าวมอลท์ เมื่อเติมสารละลายของโบรมิเลนและปาเปนพร้อมกับเกลือโซเดียมซิเตรท (sodium citrate) ในเบียร์ที่หมัก โปรตีนดังกล่าวจะถูกย่อยทำให้เบียร์ใสขึ้น (35,36) โบรมิเลนใช้ย่อยโปรตีนในแป้งที่มีโปรตีนสูงเพื่อให้เหมาะสมกับการทำขนมปังกรอบ (37,38) ใช้ในการหมักน้ำปลา ปลาส้อย ช่วยเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเนื้อปลาจึงทำให้ลดระยะเวลาหมักให้สั้นลง (39) ใช้ในการสกัดโปรตีนจากปลา (37,38) ใช้ในอุตสาหกรรมเนยแข็ง โบรมิเลนจะตกตะกอนโปรตีนในน้ำนมเกิดการแข็งตัว (38,40) ใช้ในการสกัดโปรตีนจากหญ้าและเมล็ดฝ้าย ซึ่งได้โปรตีนในปริมาณสูงกว่าการใช้เอนไซม์ทริปซินและไฟซินซึ่งใช้ความความร้อนสกัดที่พีเอช 6.5 (41) โบรมิเลนยังใช้ในการสกัดโปรตีนจากยีสต์ (42) ใช้ในการทำอาหารเด็กอ่อน ทำโปรตีนเข้มข้นจากปลา ชอสจากหอยนางรมและใช้ในการผลิตหมากฝรั่ง (43)

ในอุตสาหกรรมยา โบรมิเลนเป็นส่วนประกอบในยาช่วยย่อย (38,43) ใช้ในยารักษาแผลเป็น (43) ใช้เตรียมอนุพันธ์ไทโรซีนที่ใช้ในการรักษาโรค parkinson และใช้ในยารักษาแผลไฟไหม้ (38,43)

ในอุตสาหกรรมทอผ้าและฟอกหนัง โบรมิเลนและเอนไซม์ย่อยโปรตีนอื่น ๆ ใช้ในกรรมวิธีฟอกหนัง ได้แก่การกำจัดขนและทำให้หนังนุ่มขึ้น โดยเอนไซม์จะย่อยโปรตีนคอลลาเจน ใช้ในการปรับปรุงขนแกะและผ้าไหมให้มีคุณภาพดีขึ้น (37,43) ในอุตสาหกรรมอื่น ๆ โบรมิเลนช่วยในการ recover เงินจากฟิล์มที่ใช้ในกล้องถ่ายรูป (43) ใช้ในผงซักฟอกและยาสีฟัน (38)

1.5 <u>วัตถุประสงค์ของการวิจัย</u>

1. ศึกษาวิธีการและสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดแยกโบรมิเลนจากต้นสับปะรด ซึ่งเป็นของเหลือทิ้งจากไร่สับปะรด
2. ศึกษาวิธีการและสภาวะที่เหมาะสมในการทำให้โบรมิเลนบริสุทธิ์มากขึ้น
3. ศึกษาองค์ประกอบของผงโบรมิเลนที่สกัดได้
4. รวบรวมข้อมูลเพื่อเป็นแนวทางประกอบการผลิตระดับขยายส่วนต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย