บทที่ 1

บทนำ

โบรมิเลน (Bromelain) (E.C.3.4.4.24) เป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่พบในเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของพืชในตระกูล Bromeliaceae พืชในตระกูลนี้ที่รู้จักกันดีคือสับปะรด (Ananas comosus (L.) Merr.) (Heinicke and Gortner, 1957) สามารถตรวจพบแอคติวิตีของโบรมิเลนในส่วนต่าง ๆ ของต้น สับปะรดเช่น ผล เปลือก แกน เนื้อ ใบ และลำต้น (Ota และคณะ,1961) Heinicke (1953) รายงานว่าส่วนลำต้นของสับปะรดเป็นบริเวณที่มีการสะสมของโบรมิเลนสูงสุด Su และคณะ (1975) ได้รายงานถึงปริมาณแอคติวิตีของโบรมิเลนที่สะสมในเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของสับปะรดคือ ส่วนลำต้น ผล เปลือก แกน และใบ ว่ามีปริมาณแอคติวิตีของโบรมิเลนที่พบคิดเป็นร้อยละ 36.1, 34.6, 14.9, 6.6 และ 3.5 ของแอคติวิตีทั้งหมด ตามลำดับ Heinicke และ Gortner (1957) รายงานว่าปริมาณของโบรมิเลนในเนื้อเยื่อส่วนลำต้นจะแปรผันตามปัจจัยอื่น ๆ อีกหลายชนิด อาทิเช่น อายุของลำต้น โดยพบว่าลำต้นที่มีอายุมากจะมีการสะสมปริมาณโบรมิเลนมากกว่าลำต้นที่มีอายุน้อย มีรายงานว่าลำต้นสับปะรดอายุ 3.5 ปีอาจสะสมปริมาณโบรมิเลนไว้ได้มากถึงร้อยละ 53 ของโบรมิเลนในเนื้อเยื่อทั้งหมด ในขณะที่ลำต้นสับปะรดอายุ 2 ปี และ 1 ปี จะสะสมปริมาณโบรมิเลนไว้ได้เพียงร้อยละ 36 และร้อยละ 11 ของโบรมิเลนในเนื้อเยื่อทั้งหมด ตามลำดับ นอกจากนี้บริเวณที่ผลิตโบรมิเลนสูงในส่วนของลำต้นจะขึ้นอยู่กับตำแหน่งในลำต้นนั้นด้วย โดยเฉพาะในลำต้นส่วนใต้ดินที่แก่จัดจะมีโบรมิเลนสะสมอยู่สูงกว่าในลำต้นที่ยังสดอยู่และอยู่เหนือดิน และในส่วนของลำต้นเองนั้นบริเวณแกนกลางของลำต้น (stele) จะมีปริมาณโบรมิเลนอยู่มากกว่าในส่วนนอก (cortex) ยิ่งไปกว่านั้นสับปะรดสายพันธุ์ต่างกันก็มีปริมาณโบรมิเลนสะสมอยู่ในปริมาณที่แตกต่างกันด้วย (Ball และ Thomson, 1941)

1.1 คุณสมบัติทั่วไปของโบรมิเลน

โบรมิเลนจัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์ที่มีหมู่ซัลไฟดริล (-SH ; sulfhydryl) ในบริเวณเร่ง (active site) เช่นเดียวกับเอนไซม์ปาเปน (papain) จากมะละกอ และเอนไซม์ฟิซิน (ficin) จากมะเดื่อ โดยที่โบรมิเลน 1 โมเลกุลจะมี disulfide bridge 5 ตำแหน่ง และมีหมู่ซัลไฟดริล 1 กลุ่ม ทั้งหมดนี้ล้วนอยู่ในกลุ่มที่มีความจำเป็นต่อการทำงานของบริเวณเร่งในการเร่งปฏิกิริยาของโบรมิเลน (Murachi และ Yasui, 1965) โบรมิเลนสามารถย่อยพันธะเพปไทด์ (peptide) เอไมด์ (amide) และเอสเทอร์ (ester) ของกรดอะมิโนและเพปไทด์ชนิดอื่นได้ดี ตัวอย่างเช่น benzoyl-L-arginine ethyl ester (BAEE) และ benzoyl-L-arginine amide (BAA) (Yamamoto, 1975) โบรมิเลนสามารถย่อยสับสเตรทจำพวกโพลีเพปไทด์ได้ดีคล้ายกันกับปาเปนและฟิซิน ต่างกันที่โบรมิเลนจะมีความจำเพาะในการย่อยพันธะที่เชื่อมระหว่างกรดอะมิโนอาร์จีนีน-อะลานีน (Arg-Ala) และ อะลานีน-กรดกลูตามิค (Ala-Glu) แต่ไม่สามารถย่อยพันธะที่เชื่อมระหว่างอาร์จีนีน-อาร์จีนีน (Arg-Arg) และ ไลซีน-ไทโรซีน (Lys-Tys) (Murachi และ Neurath, 1960) นอกจากนี้ยังพบว่าโบรมิเลนย่อยสลายตัวเองได้ดีที่พีเอชประมาณ 4.6 (Glazer และ Smith, 1971) ตารางที่ 1 เปรียบเทียบความสามารถในการย่อยสับสเตรทชนิดต่าง ๆ ด้วยโบรมิเลนบริสุทธิ์ที่แยกจากส่วนลำต้น และผลของสับปะรด สับสเตรทที่ใช้คือ เคซีน (casein), benzoyl-L-arginine amide (BAA) และ benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide (BAPA)

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบความสามารถในการย่อยสับสเตรทของโบรมิเลนบริสุทธิ์ที่แยกจากส่วนลำต้น และผลของสับปะรด

สับสเตรท	แอคติวิตีสัมพัทธ์ [1]		
	โบรมิเลนจากต้น	โบรมิเลนจากผลดิบ	โบรมิเลนจากผลสุก
BAA [2]	1.0	52.1	45.0
BAPA [3]	6.4	102.1	105.0
casein	65.7	180.7	169.3

1 กำหนดความสามารถในการย่อย BAA ด้วยโบรมิเลนจากต้น(0.14 OD_{570} /min/mg) มีค่าแอคติวิตีสัมพัทธ์เป็น 1.0 (Ota et al., 1964)

2 BAA ; benzoyl-L-arginine amide

3 BAPA ; benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide

1.2 การแยกและการทำให้โบรมิเลนบริสุทธิ์

Murachi และ Neurath (1960) ได้ศึกษาการทำให้โบรมิเลนบริสุทธิ์โดยผ่านสารละลายโบรมิเลนลงในคอลัมน์ Duolite CS 101, พีเอช 6.05 แยกองค์ประกอบของโบรมิเลนที่มีความสามารถในการย่อยสลายโปรตีน โพลีเพปไทด์ และสารตั้งต้นสังเคราะห์ (Synthetic substrate) ได้เหมือนกัน 2 ชนิด แต่ต่างกันที่องค์ประกอบโดยสังเกตุได้จากการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าที่พีเอช 7.4 แตกต่างกัน El-Gharbawi และ Whitaker (1963) ได้ปรับปรุงวิธีของ Murachi และ Neurath (1960) โดยผ่านสารละลายโบรมิเลนลงในคอลัมน์โครมาโตกราฟฟีที่บรรจุ Bio-Rex 70 พีเอช 6.10 สามารถแยกองค์ประกอบของโบรมิเลนได้ถึง 5 ชนิด ซึ่งแต่ละชนิดมีความสามารถในการย่อยโปรตีนได้เช่นกัน Murachi และคณะ (1964) รายงานว่าสามารถแยกโบรมิเลน

ให้บริสุทธิ์ได้โดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ชนิดแลกเปลี่ยนประจุ และการกรองผ่านเซฟาเดกซ์เจล สารละลายโบรมิเลนที่แยกให้บริสุทธิ์แล้วนี้จะมีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงขึ้นกว่าสารละลายโบรมิเลนเริ่มต้นเพียง 1.4 เท่า และเมื่อนำสารละลายโบรมิเลนนี้มาตกตะกอนโบรมิเลนด้วยอะซีโตนจะได้ผงโบรมิเลนที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นจากสารละลายโบรมิเลนเริ่มต้นประมาณ 1.1 เท่า ในปีเดียวกัน Ota และคณะ (1964) รายงานว่าสามารถแยกโบรมิเลนให้บริสุทธิ์ได้โดยใช้คอลัมน์เซฟาเดกซ์เจล และซัลโฟเอทธิลเซฟาเดกซ์แยกได้โบรมิเลนบริสุทธิ์เพียง 1 ชนิด Heinicke (1969, 1970) ผ่านสารละลายโบรมิเลนจากน้ำคั้นของต้นสับปะรดลงในคอลัมน์ Duolite C-25 ที่มีแอมโมเนียมไอออน (NH_4^+) เป็นตัวแลกเปลี่ยนในช่วง พีเอช 4.0-5.7 แล้วจึงตกตะกอนโบรมิเลนด้วยอะซีโตนได้โบรมิเลนที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเช่นกัน Minami และคณะ (1971) ใช้เทคนิค isoelectric focusing แยกโบรมิเลนได้ 2 ชนิดแล้วทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วยคอลัมน์คาร์บอกซีเมทธิลเซฟาเดกซ์ คอลัมน์ไดเอทธิลอะมิโนเอทธิลเซฟาเดกซ์ คอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 75 และคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 50 ในปี ค.ศ.1972 Golding พยายามทำให้โบรมิเลนบริสุทธิ์ขึ้นโดยผ่านสารละลายโบรมิเลนลงในคอลัมน์ Amberlite IRA-68, Amberlite IRC-84 และ Amberlite IRA-93 และในปี ค.ศ.1982 Thomson แยกโบรมิเลนได้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีชนิดดูดซับ

1.3 สมบัติของโบรมิเลน

โบรมิเลนจากต้นสับปะรด (Stem bromelain) เป็นสารประกอบอินทรีย์จำพวกไกลโคโปรตีน ซึ่งภายใน 1 โมเลกุลจะมีส่วนของโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) ที่ประกอบด้วยน้ำตาลแมนโนส 3 โมเลกุล ฟูโคส 1 โมเลกุล ไซโลส 1 โมเลกุล และเอน-อะซิทิลกลูโคซามีน 2 โมเลกุล จับอยู่กับสายเพปไทด์ด้วยพันธะโคเวาเลนต์ (Yasuda, 1970) สายเพปไทด์นี้ประกอบด้วยกรดอะมิโน 285 หน่วย และเฮกโซซามีน 4 โมเลกุล โดยที่กรดอะมิโนเหล่านี้เป็นพวกที่มีคุณสมบัติเป็นเบสอยู่เป็นจำนวนมากกว่ากรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติเป็นกรด (Murachi, 1964) สายโพลีเพปไทด์ของโบรมิเลนมีกรดอะมิโนไกลซีนอยู่ทางด้านปลายคาร์บอกซิล (C-terminal) และกรดอะมิโนวาลีน (valine) อยู่ทางด้านปลายอะมิโน (N-terminal) (Murachi และ Yasui, 1965) นอกจากนี้

ในโมเลกุลของโบรมิเลนยังประกอบด้วยกรดกลูคูโรนิค (glucuronic acid) กรดกาแลคตูโรนิค (galacturonic acid) และกรดเฟอรูลิค (ferulic acid) เชื่อมต่อกับส่วนที่เป็นโมเลกุลของคาร์โบไฮเดรตภายในโมเลกุลของโบรมิเลนอีกด้วย (Heinicke และ Levand, 1968)

โบรมิเลนจากต้นสับปะรดจัดเป็นโปรตีนพวกที่มีคุณสมบัติเป็นเบส (basic protein) สามารถละลายน้ำได้ แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น แอลกอฮอล์ คีโตน คลอโรฟอร์ม อีเทอร์ หรือเกลืออนินทรีย์ เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต โซเดียมคลอไรด์ โพแตสเซียมซัลเฟต มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 33,000 มีจุดไอโซอีเลคตริค (isoelectric point, pI) ที่พีเอช 9.55 ค่าคงที่ของการตกตะกอน (sedimentation constant, $S_{20,w}$) เท่ากับ 2.735 ค่าคงที่ของการแพร่ (diffusion constant, $D_{20,w}$) เท่ากับ 7.77×10^{-7} ตารางเซนติเมตรต่อวินาที ความหนืด (frictional ratio, η) เท่ากับ 0.039 เดซิลิตรต่อกรัม และมีค่าคงที่ของการดูดกลืนแสง (absorbancy, $A_{1\ ซม.}$) ที่ 280 นาโนเมตร เท่ากับ 19.0 (Murachi และคณะ, 1964)

1.4 <u>ประโยชน์ของโบรมิเลน</u>

โบรมิเลนสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากมายหลายอย่างเช่นเดียวกับโปรตีเอสชนิดอื่น ๆ เช่น ในอุตสาหกรรมอาหารมีการนำไปใช้ในการทำให้เบียร์ใส (chill proofing) (Wallerstein, 1911 ; Melton, 1937) การทำให้เนื้อนุ่ม (meat tenderizing) (Kang et al., 1974) การเร่งกระบวนการหมักของน้ำปลาให้เร็วขึ้น (บังอร เชื้อโพธิหัก และคณะ, 2524) ช่วยเพิ่มความยืดหยุ่นและปริมาตรของขนมปังในการผลิตขนมปังกรอบ (Reed, 1966) ยิ่งไปกว่านั้นยังสามารถนำโบรมิเลนมาใช้ในการผลิตเนยแข็งแทนเอนไซม์เรนเนทได้อีกด้วย (Heinicke, 1953 ; Ernstrom, 1978) สำหรับอุตสาหกรรมอื่น ๆ ที่สามารถนำโบรมิเลนมาใช้ประโยชน์ได้แก่ อุตสาหกรรมฟอกหนัง เพื่อทำให้หนังพองและอ่อนนุ่มขึ้น (Langlyleke และคณะ, 1952) อุตสาหกรรมเส้นใย (Inone, 1976) สารซักฟอก (Iida, 1972) ยาสีฟัน (Canero et al., 1972) และสารสกัดจากยีสต์ (Chao et al, 1980) นอกจากนี้ในทางเภสัชกรรมสามารถใช้โบรมิเลนที่มีความบริสุทธิ์สูงผลิตยาสมานแผล ยา

ช่วยย่อย และยาถ่ายพยาธิ เป็นต้น (Liener, 1974 ; Sato, 1976 ; Inner field, 1975) มีรายงานว่าสามารถใช้โบรมิเลนในการเตรียมอนุพันธ์ไทโรซีนที่ใช้ในการรักษาโรค Parkinson (Wiseman, 1981)

1.5 <u>การผลิตในระดับอุตสาหกรรม</u>

การที่โบรมิเลนสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้มากมายดังกล่าวข้างต้น จึงมีผู้สนใจทำการศึกษาวิจัยและพัฒนาขบวนการผลิตโบรมิเลนในระดับอุตสาหกรรมกันอย่างกว้างขวาง Heinicke (1961) ใช้เครื่องบีบแบบต่าง ๆ คือ sugar cane mill, hammer mill และ stacomicer mill บีบน้ำจากต้นสับปะรดที่ปอกเปลือกแล้ว พบว่าเครื่องบีบแบบ sugar cane mill ชนิดที่มีแกนหมุน 3 อันสามารถสกัดเอนไซม์จากลำต้นได้สูงสุด คือบีบได้น้ำถึงร้อยละ 36 ของน้ำหนักลำต้นทั้งหมด มีโปรตีนร้อยละ 0.38 และมีแอคติวิตีของโบรมิเลนทั้งหมด 25,000 หน่วย MCU (Milk Clotting Unit) ต่อต้นสับปะรด 1 ปอนด์ เมื่อนำน้ำสับปะรดที่บีบได้มาตกตะกอนเอนไซม์ด้วยอะซีโตนแบบ 2 ขั้นตอน (ร้อยละ 30-33 กับร้อยละ 60-66 โดยปริมาตรทั้งหมด) ตะกอนที่ได้เมื่อนำไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่แข็ง (freeze dryer) ผงโบรมิเลนที่ได้มีแอคติวิตีประมาณ 2,000-5,000 หน่วย MCU (Milk Clotting Unit) ต่อกรัม (190 Tyrosine Digestion Units ต่อมิลลิกรัม) Seizen (1969) ทำการศึกษาวิธีเตรียมโบรมิเลนโดยการตกตะกอนด้วยอะซีโตนเช่นกัน ผลปรากฏว่าได้ผงโบรมิเลนที่มีแอคติวิตีประมาณ 4,000 หน่วย MCU ต่อกรัม ผลผลิตของเอนไซม์เท่ากับ 0.8-1.6 เปอร์เซนต์ Soong (1972) ได้รายงานถึงการใช้เครื่องบีบแบบไฮดรอลิคบีบน้ำจากต้นสับปะรดแช่แข็งสามารถบีบได้น้ำสับปะรด 590 มิลลิลิตรต่อต้นสับปะรด 1 กิโลกรัม น้ำสับปะรดมีแอคติวิตี 8,348หน่วย BTU (Bromelain Tyrosine Unit) ต่อต้นสับปะรด 1 กิโลกรัม แล้วตกตะกอนโบรมิเลนจากน้ำสับปะรดด้วยกรดแทนนิคแบบ 2 ขั้นตอน (ร้อยละ 0.02-0.1 กับร้อยละ 0.5-1.0 โดยน้ำหนัก) ในปีเดียวกัน Chen และ Liu (1972) ได้ศึกษาวิธีการตกตะกอนโบรมิเลนจากน้ำสับปะรดด้วยกรดแทนนิคเช่นกัน พบว่าการใช้กรดแทนนิคในช่วงความเข้มข้น 2-4 กรัมต่อลิตรจะเป็นช่วงที่ตกตะกอนเอนไซม์ได้สูงสุด Su และคณะ (1975) ได้ตก

ตะกอนแยกโบรมิเลนจากน้ำสับปะรดออกมาโดยใช้เอธิลแอลกอฮอล์ (ความเข้มข้นร้อยละ 40-60) นอกจากนี้ยังรายงานว่าโบรมิเลนสามารถตกตะกอนได้ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต อิ่มตัวร้อยละ 60 แล้วตามด้วยแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 50 ในปี 1983 Caygill และคณะได้รายงานกรดโพลีอะไครลิคเป็นสารเคมีที่ใช้ตกตะกอนโบรมิเลนได้ถ้าใช้ปริมาณที่เหมาะสม

1.6 การตรึงโบรมิเลน

การตรึงโบรมิเลนหรือโปรตีเอสชนิดอื่น ๆ มีผู้สนใจและศึกษากันมาก และมีรายงานว่าสามารถทำได้หลายวิธี เช่น

ก. วิธี Physical adsorption วัสดุที่ใช้ตรึงมีหลายชนิดทั้งพวกที่เป็นสารอินทรีย์ เช่น activated carbon, porous glass, acid clay, Kaolinite, alumina, silica gel เป็นต้น หรือพวกที่เป็นสารอินทรีย์จำพวกสารโพลีเมอร์ที่ได้จากธรรมชาติ เช่น starch, gluten, cellulose, sepharose เป็นต้น

ตัวอย่างเอนไซม์โปรตีเอสที่ตรึงด้วยวิธีนี้คือ ปาเปน วัสดุที่ใช้ตรึงคือ Tannin-aminohexyl cellulose (Tosa และคณะ, 1977) และ porousglass (Messing, 1969 ; Messing, 1970)

ข. การตรึงเอนไซม์ด้วยพันธะอิออนิก วัสดุที่ใช้ตรึงมีหลายชนิด เช่น อนุพันธ์ของโพลีแซคคาไรด์ เช่น DEAE-cellulose หรืออาจเป็นสารจำพวกโพลีเมอร์สังเคราะห์ เช่น Amberlite

ตัวอย่างเอนไซม์โปรตีเอสที่ตรึงด้วยพันธะอิออนิก ได้แก่ เอนไซม์เพบซิน ทริปซิน ไคโมทริปซิน (Mitz & Schlueter, 1959 ; Brandenberger, 1956)

ค. การตรึงเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนต์ ตัวอย่างเช่น การตรึงเอนไซม์ทริปซิน ไคโมทริปซิน ปาเปน โบรมิเลน (Suinov & Manoilov, 1966 ; Wharton et al, 1968 ; Manecke et al., 1970 ; Wetall, 1970 ; Brummer et al., 1972 ; Weetall & Mason, 1973)

ง. วิธี crosslinking เป็นการตรึงโดยใช้สารพวก bi หรือ multi-functional reagent เป็นตัวเชื่อมโดยตรง เช่น กลูตารัลดีไฮด์ (Jansen &

Olson, 1969 ; Witt et all, 1970) เฮกซาเมทธิลสีนไดอามีน ฯลฯ

จ. วิธีกักขัง (entrapping method) เป็นการกักขังเอนไซม์โปรตีเอสไว้ในร่างแหของวัสดุตรึงที่ไม่ละลายน้ำ เช่น โพลีอะไครล์ละไมด์เจล (polyacrylamide gel) (Bernfeld & Wan, 1963 ; Kawashima & Umeda, 1974)

นิมิตพิสุทธิ์ แรงคะชวนะ (2530) ทำการศึกษาและวิจัยเพื่อพัฒนาขบวนการผลิตโบรมิเลนจากต้นสับปะรดในระดับขยายส่วน ด้วยวิธีบีบเอาน้ำสับปะรดจากต้นแล้วนำมาตกตะกอนโบรมิเลนด้วยอะซีโตน แอมโมเนียมซัลเฟต หรือกรดแทนนิค พบว่าเมื่อตกตะกอนโบรมิเลนด้วยอะซีโตนแบบสองขั้นตอนเข้มข้นร้อยละ 75 โดยปริมาตรได้ผงโบรมิเลนที่มีแอคติวิตีเท่ากับ 102 หน่วยซีดียู (CDU, casein digestion unit) ต่อมิลลิกรัม และเมื่อตกตะกอนโบรมิเลนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวเข้มข้นร้อยละ 80 ได้ผงโบรมิเลนที่มีแอคติวิตีเป็น 374 หน่วยซีดียูต่อมิลลิกรัม ในขณะที่ผงโบรมิเลนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกรดแทนนิคเข้มข้นร้อยละ 0.3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรมีแอคติวิตีสูงประมาณ 832 หน่วยซีดียูต่อมิลลิกรัม แอคติวิตีจำเพาะของโบรมิเลน 2.2×10^{3} หน่วยซีดียูต่อมิลลิกรัมโปรตีน อย่างไรก็ตามโบรมิเลนที่เตรียมได้ยังมีความบริสุทธิ์ค่อนข้างต่ำเหมาะสำหรับอุตสาหกรรมบางประเภท เช่น อุตสาหกรรมฟอกหนัง หรือการเร่งกระบวนการหมักของน้ำปลาเท่านั้น

โครงงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการแยกโบรมิเลนจากต้นสับปะรดที่มีในประเทศไทยให้มีความบริสุทธิ์สูงขึ้นกว่าเดิม เพื่อศึกษาสมบัติทางกายภาพ และจลนศาสตร์ของโบรมิเลนที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว เพื่อนำไปสู่การเตรียมโบรมิเลน และการใช้โบรมิเลนในระดับอุตสาหกรรมชนิดอื่น ๆ เช่น อุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ การทำให้เนื้อนุ่ม และใช้ในทางเภสัชกรรม เป็นต้น นอกจากนี้การวิจัยยังได้ครอบคลุมไปถึงการศึกษาศักยภาพของการใช้ประโยชน์ของโบรมิเลนในสภาวะเอนไซม์ตรึงในขบวนการทางอุตสาหกรรมอีกด้วย

ขั้นตอนของการวิจัยมีดังต่อไปนี้

1. ศักยภาพและวิธีการปรับปรุงให้ผงโบรมิเลนที่เตรียมได้จากวิธีตกตะกอนด้วยอะซีโตนมีความบริสุทธิ์สูงขึ้น

2. ศึกษาวิธีการและขั้นตอนในการทำให้โบรมิเลนที่แยกได้จากต้นสับปะรดบริสุทธิ์

3. ศึกษาเปรียบเทียบสมบัติทางกายภาพและจลนศาสตร์ของโบรมิเลนที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว กับผงโบรมิเลนที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

4. ศึกษาสภาวะในการตรึงโบรมิเลนด้วยคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส

5. ศึกษาเปรียบเทียบสมบัติทางกายภาพและจลนศาสตร์ของโบรมิเลนตรึงกับโบรมิเลนอิสระ