บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 ประสิทธิภาพของการผลิตโบรมิเลนผงจากต้นสับปะรดโดยวิธีตกตะกอนด้วยอะซีโตน

เมื่อทำการผลิตผงโบรมิเลนโดยใช้ขั้นตอนที่เสนอโดย นิมิตพิสุทธิ์ แรงคะชวนะ (2530) ผลการทดลองในตารางที่ 2 แสดงให้เห็นว่าการนำต้นสับปะรดมาบีบเอาน้ำออกด้วยเครื่องบีบแบบสกรูเป็นวิธีที่ให้น้ำคั้นซึ่งมีแอคติวิตีของโบรมิเลน และปริมาณโปรตีนสูงกว่าน้ำคั้นของต้นสับปะรดที่บีบได้โดยเครื่องบีบแบบไฮดรอลิค หลังจากตกตะกอนโบรมิเลนจากน้ำคั้นของต้นสับปะรดที่เตรียมได้ทั้ง 2 วิธีด้วยอะซีโตนแบบสองขั้นตอนคือ ในขั้นตอนแรกใช้อัตราส่วนของสารละลายเอนไซม์ต่ออะซีโตนเป็น 1 ต่อ 0.7 โดยปริมาตร ส่วนน้ำใสที่ได้นำไปตกตะกอนซ้ำอีกครั้งด้วยอะซีโตน โดยเพิ่มอัตราส่วนของสารละลายเอนไซม์ต่ออะซีโตนเป็น 1 ต่อ 3 โดยปริมาตร เพื่อตกตะกอนโบรมิเลนลงมา แล้วนำไปอบแห้ง ผลปรากฏว่าผงโบรมิเลนที่เตรียมจากน้ำคั้นของต้นสับปะรดที่ได้จากการบีบด้วยเครื่องบีบแบบสกรูให้ค่าแอคติวิตีต่อมิลลิกรัมผงโบรมิเลนสูงประมาณ 352 หน่วยซีดียูต่อมิลลิกรัมผง ในขณะที่วิธีการเตรียมน้ำสับปะรดด้วยการบีบแบบไฮโดรลิคให้ค่าต่ำกว่าเล็กน้อย นอกจากนี้ผลผลิตของผงโบรมิเลนที่เตรียมได้โดยวิธีบีบแบบสกรูยังมีค่าสูงอีกด้วย (3.68 กรัมจากต้นสับปะรดที่ปอกเปลือกแล้วจำนวน 1 กิโลกรัม)

3.2 การเพิ่มความบริสุทธิ์ของผงโบรมิเลน

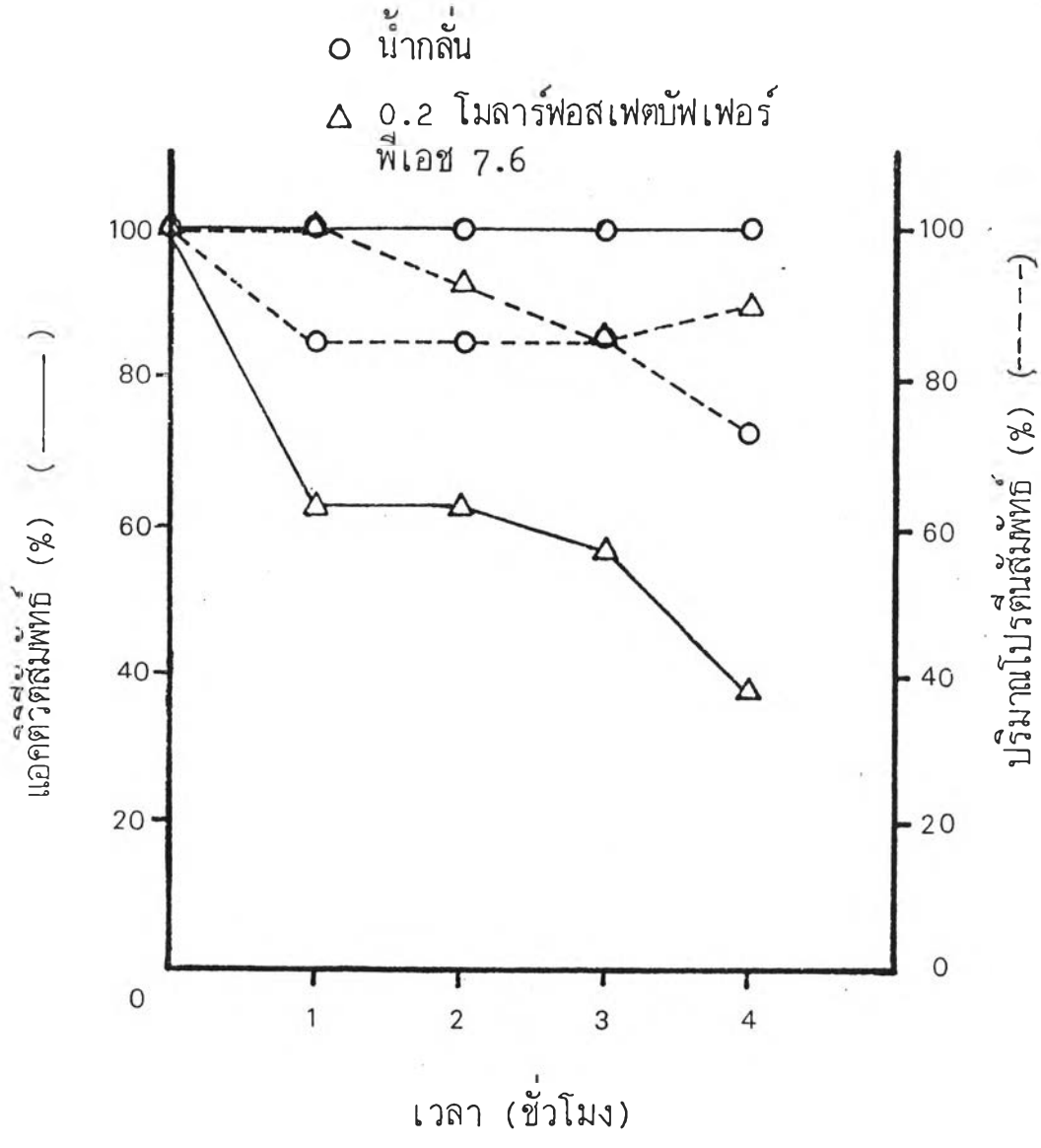
3.2.1 การศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมของผงโบรมิเลน

ละลายผงโบรมิเลน (100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ในตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ น้ำกลั่น และสารละลาย 0.2 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.6 กวนเบา ๆ ที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วตรวจสอบแอคติวิตีของโบรมิเลนและปริมาณโปรตีนในทุก ๆ 1 ชั่วโมง จนครบ 4 ชั่วโมง

จากรูปที่ 1 จะเห็นได้ว่าแอคติวิตีของโบรมิเลนในสารละลายที่ใช้น้ำ

ตารางที่ 2 การศึกษาวิธีสกัดแยกที่เหมาะสมต่อการแยกโบรมิเลนจากต้นสับปะรด แล้วทำการตกตะกอนแยกผงโบรมิเลนจากสารละลายด้วยอะซีโตนตามวิธีข้อ 2.8

วิธีการสกัด	โปรตีน/ต้น 1 กก. ($\times 10^3$ มก.)	แอคติวิตี/ต้น 1 กก. ($\times 10^6$ หน่วยซีดียู)	เอนไซม์แอคติวิตี (หน่วยซีดียู/มก.ผง)	แอคติวิตีจำเพาะของผงโบรมิเลน ($\times 10^3$ หน่วยซีดียู/มก.โปรตีน)	ปริมาณผงโบรมิเลน (ก./ต้น1กก.)
เครื่องบีบแบบสกรู	3.54	6.37	352	2.44	3.68
เครื่องบีบไฮดรอลิค	1.69	4.79	314	2.84	2.93



รูปที่ 1 แสดงคุณสมบัติในการละลายของผงโบรมิเลน เมื่อทดลองละลายผงโบรมิเลน (100 มก./มล.) ในน้ำกลั่น และในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.6 ตรวจสอบแอคติวิตีของโบรมิเลน และความเข้มข้นของโปรตีนที่เวลาต่าง ๆ

เป็นตัวทำละลายมีค่าคงที่ตลอดเวลาของการทดลอง ในขณะที่แอคติวิตีของโบรมิเลนในสารละลายที่ใช้ ๐.๐2 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.6 เป็นตัวทำละลายมีค่าลดลงเหลือเพียง 38 เปอร์เซนต์ หลังจากตั้งทิ้งไว้นานเพียง 4 ชั่วโมงเท่านั้น ดังนั้นน้ำกลั่นจึงเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมของผงโบรมิเลนมากกว่าสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ๐.2 โมลาร์ พีเอช 7.6

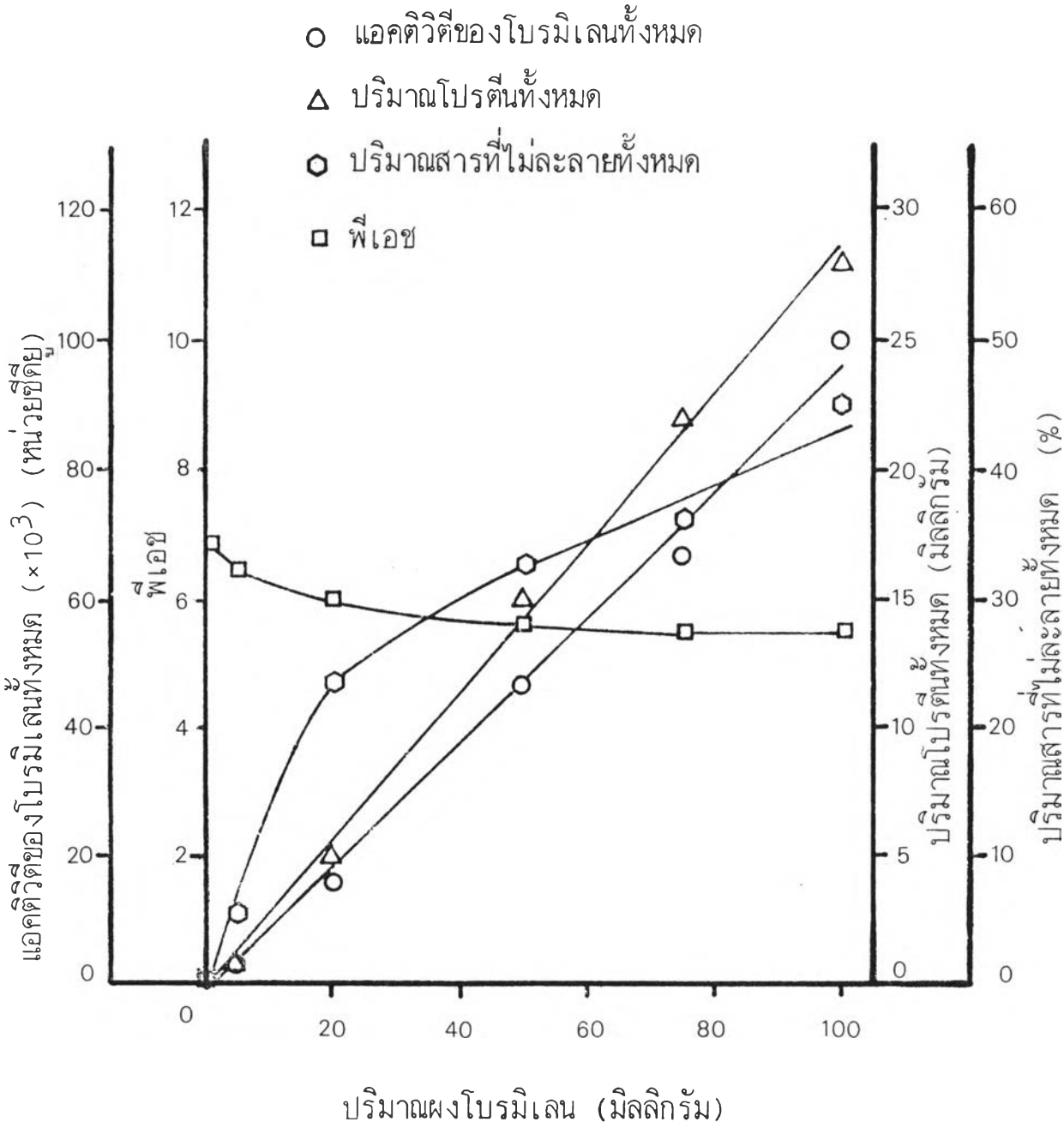
3.2.2 <u>การศึกษาการละลายของผงโบรมิเลนในน้ำกลั่น</u>

ได้ทำการทดลองศึกษาความสามารถในการละลายของผงโบรมิเลนในน้ำกลั่น โดยแปรผันปริมาณของผงโบรมิเลนต่าง ๆ กันในช่วงระหว่าง 1-1๐๐ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เซนตริฟิวส์แยกสารละลายใสมาตรวจสอบแอคติวิตีของโบรมิเลน และความเข้มข้นของโปรตีน ตามวิธีข้อ 2.4.1 และ 2.5.3 ตามลำดับ ส่วนตะกอนเปียกนำไปอบแห้งที่ 1๐5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาชั่งน้ำหนัก

จากรูปที่ 2 จะเห็นได้ว่าแอคติวิตีของโบรมิเลน และความเข้มข้นโปรตีนมีค่าเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับผงโบรมิเลนที่ใช้เพิ่มขึ้นในช่วง 1 ถึง 1๐๐ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พีเอชของสารละลายมีค่าเริ่มต้นประมาณ 6.9 และจะมีค่าลดลงเมื่อปริมาณผงโบรมิเลนที่ละลายมีค่าสูงขึ้น และมีค่าเกือบคงที่ (พีเอช 5.5) เมื่อปริมาณผงโบรมิเลนเพิ่มจาก 5๐-1๐๐ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนตะกอนที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble) จะมีค่าเพิ่มสูงในช่วงความเข้มข้นของโบรมิเลนต่ำ ๆ แต่เมื่อใช้ปริมาณผงโบรมิเลนสูงขึ้นแล้วสารเหล่านี้จะละลายได้มากขึ้น ดังนั้นในการเตรียมสารละลายเอนไซม์จากผงโบรมิเลนในงานวิจัยนี้จึงจำกัดการเตรียมสารละลายให้มีความเข้มข้นไม่สูงกว่า 1๐๐ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของน้ำ เพื่อแน่ใจว่าไม่เกินขีดจำกัดของการละลายของผงโบรมิเลน

3.2.3 <u>การศึกษาการละลายของผงโบรมิเลนในอะซีเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.5</u>

ละลายผงโบรมิเลนในสารละลายอะซีเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.5 ให้มีปริมาณผงโบรมิเลนในสารละลาย 1 มิลลิลิตร เป็น 1, 5, 2๐, 5๐, 75 และ 1๐๐ มิลลิกรัม เซนตริฟิวส์แยกสารละลายใสมาตรวจสอบแอคติวิตีของโบรมิเลน ตามวิธีข้อ 2.4.1 วัดความเข้มข้นของโปรตีน ตามวิธีข้อ 2.5.3 และชั่งน้ำหนักของสารที่ไม่ละลายหลังจากนำไปอบแห้งที่ 1๐5 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง



รูปที่ 2 เปรียบเทียบรูปแบบ และลักษณะของการเพิ่มการละลายของผงโบรมิเลนในน้ำกลั่น เมื่อแปรผันปริมาณของผงโบรมิเลนอยู่ในช่วง 1-100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เซนตริฟิวส์แยกสารละลายใสนำมาวัดพีเอช แล้วตรวจสอบแอคติวิตีของโบรมิเลน และความเข้มข้นของโปรตีน

จากรูปที่ 3 พบว่าทั้งแอคติวิตีของโบรมิเลนและความเข้มข้นของโปรตีนเพิ่มเป็นสัดส่วนโดยตรงกับผงโบรมิเลนที่เพิ่มขึ้นในช่วง 1 ถึง 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พีเอชของสารละลายไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก มีค่าอยู่ในช่วง 5.5-6.0 และส่วนของสารที่ไม่ละลายจะเพิ่มมากขึ้นตามผงโบรมิเลนที่เพิ่มขึ้นในช่วงที่ใช้ปริมาณของผงโบรมิเลนเท่ากับ 1-50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นถ้าเพิ่มปริมาณของผงโบรมิเลนสูงกว่านี้แล้วส่วนที่ละลายไม่ได้นี้จะมีการละลายได้ดีขึ้น ดังนั้นการใช้อะซีเตตบัฟเฟอร์เป็นตัวทำละลายผงโบรมิเลนจะจำกัดให้มีค่าไม่เกินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของบัฟเฟอร์

3.2.4 <u>การศึกษาปริมาณอะซีโตนที่เหมาะสมในการตกตะกอนโบรมิเลนจากสารละลายผงโบรมิเลน</u>

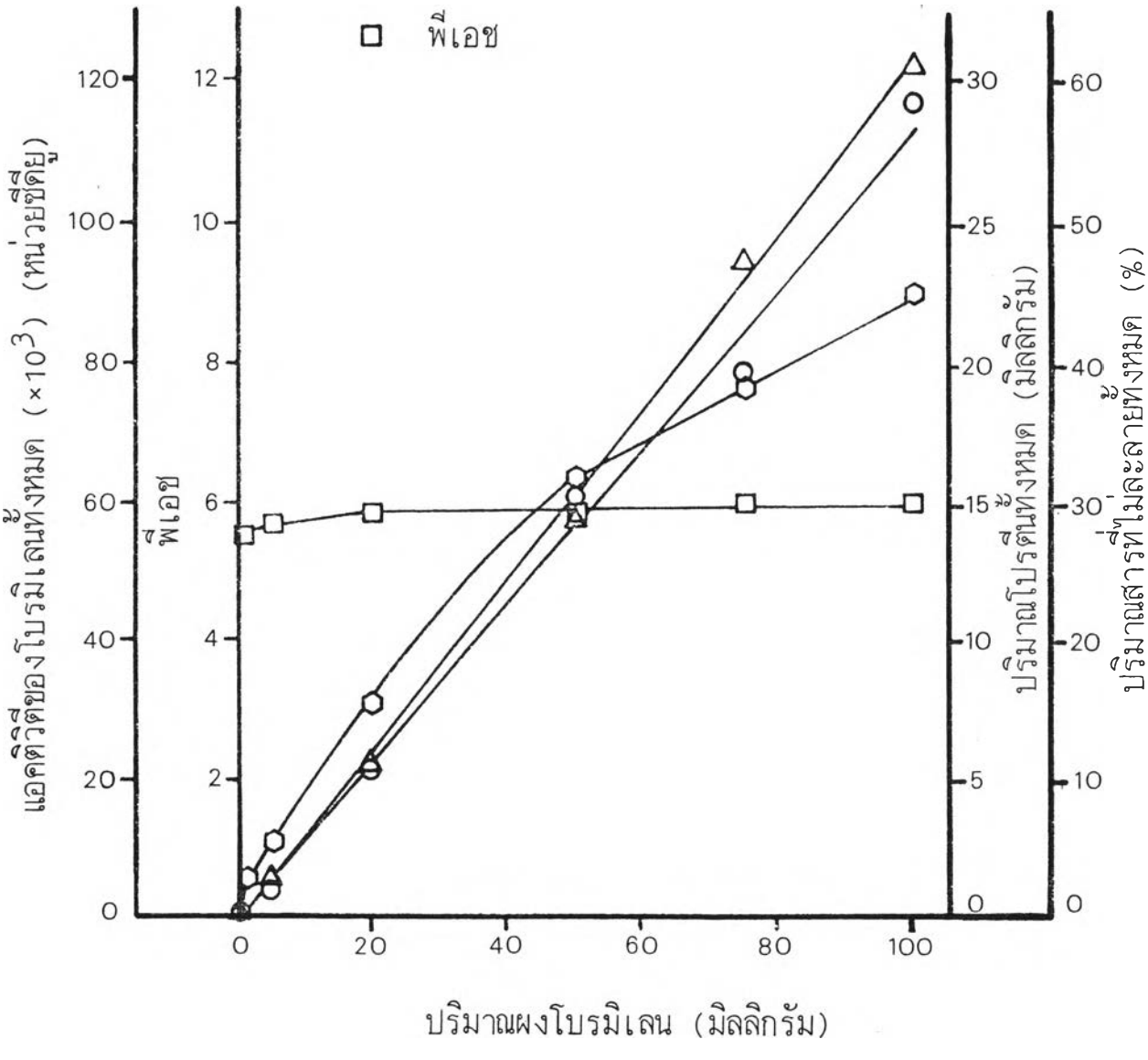
เนื่องจากโบรมิเลนที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นสารละลายในน้ำซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยของนิมิตพิสุทธิ์ ณรงคะชวนะ (2530) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการตกตะกอนโบรมิเลนด้วยอะซีโตนความเข้มข้นที่เหมาะสมใหม่ โดยนำสารละลายโบรมิเลน (แอคติวิตีเท่ากับ 3.6×10^{5} หน่วยซีดียู และมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 160 มิลลิกรัม) มาปรับพีเอชเป็น 4.3 แล้วนำไปตกตะกอนโบรมิเลนด้วยอะซีโตนในอัตราส่วนของสารละลายต่ออะซีโตนต่าง ๆ คือ 1:2, 1:3, 1:3.5, 1:4 และ 1:5

ผลการทดลองในรูปที่ 4 จะเห็นได้ว่าอัตราส่วนของสารละลายโบรมิเลนต่ออะซีโตนที่เหมาะสมต่อการตกตะกอนจะมีอัตราส่วนอยู่ระหว่าง 1:3 ถึง 1:4 โดยที่อัตราส่วน 1:3.5 จะให้ค่าแอคติวิตีที่วัดได้สูงที่สุด และค่าแอคติวิตีจำเพาะของโบรมิเลนสูงใกล้เคียงกัน

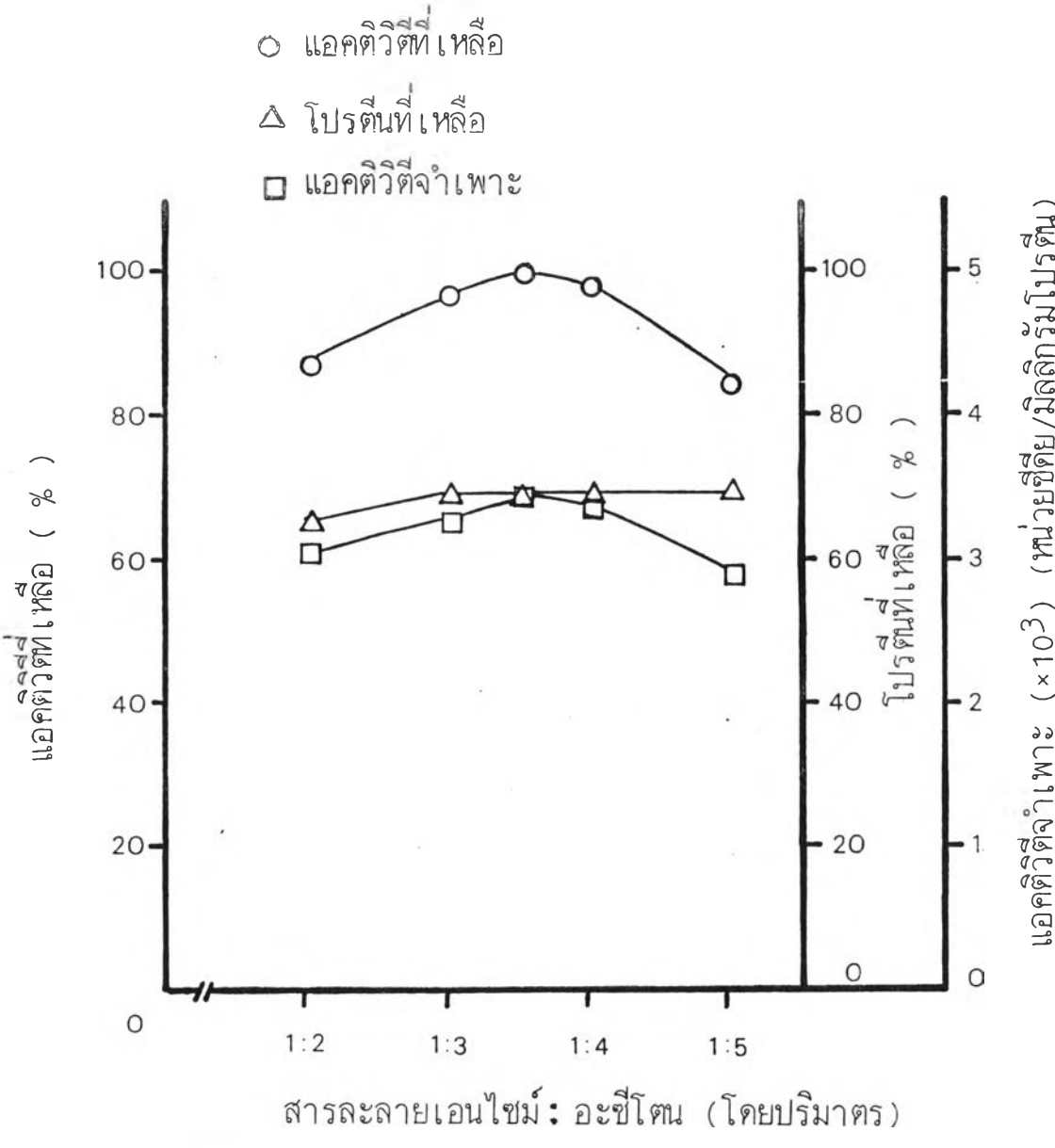
3.2.5 <u>การศึกษาชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการไดอะไลซีสสารละลายผงโบรมิเลน</u>

ทำการศึกษาโดยใช้สารละลายผงโบรมิเลนในน้ำกลั่นไปไดอะไลซ์ในสารละลาย 0.1 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.6 และในสารละลาย 0.1 โมลาร์ โพแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.6 ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามวิธีข้อ 2.8.1 แล้วตรวจสอบแอคติวิตีของโบรมิเลน ตามวิธีข้อ 2.4.1

ผลการทดลองในตารางที่ 3 แสดงให้เห็นว่าไม่มีการสูญเสียแอคติวิตี



รูปที่ 3 เปรียบเทียบรูปแบบ และลักษณะของการเพิ่มการละลายของผงโบรมิเลน เมื่อมีปริมาณเพิ่มขึ้นในสารละลายอะซีเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.5 เซนตริฟิวส์แยกสารละลายใสนำมาตรวจสอบพีเอช แอคติวิตีของโบรมิเลน และปริมาณโปรตีน



รูปที่ 4 การศึกษาปริมาณอะซีโตนที่เหมาะสมในการตกตะกอนโบรมิเลนที่อุณหภูมิ 0 ถึง -10 องศาเซลเซียส ตรวจสอบแอคติวิตีของโบรมิเลน และปริมาณโปรตีน

$$\text{แอคติวิตีที่เหลือ (\%)} = \frac{\text{แอคติวิตีที่วัดได้ทั้งหมด}}{\text{แอคติวิตีเริ่มต้นทั้งหมด}} \times 100$$

$$\text{โปรตีนที่เหลือ (\%)} = \frac{\text{โปรตีนที่วัดได้ทั้งหมด}}{\text{โปรตีนเริ่มต้นทั้งหมด}} \times 100$$

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบผลกระทบของชนิดตัวทำละลายที่ใช้ทำไดอะไลซีสต่อแอคติวิตีของโบรมิเลน เมื่อไดอะไลซ์สารละลายผงโบรมิเลน (แอคติวิตีเริ่มต้น 1.15×10^6 หน่วยซีดียู และปริมาณโปรตีนเริ่มต้น 483.3 มิลลิกรัม) ในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบแอคติวิตีของโบรมิเลนตามวิธีข้อ 2.4.1

ตัวทำละลาย	แอคติวิตีทั้งหมด ($\times 10^6$ ซีดียู)	แอคติวิตี[1] ที่เหลือ (%)	โปรตีน[2] ที่เหลือ (%)	แอคติวิตีจำเพาะ ($\times 10^3$ ซีดียู/มก.โปรตีน)
น้ำกลั่น	1.03	89.6	86.2	2.47
0.1 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์, พีเอช 7.6	1.18	102.6	94.8	2.55
0.1 โมลาร์ โพแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์, พีเอช 7.6	0.95	82.6	94.8	2.07

1. แอคติวิตีที่เหลือ (%) = $\frac{\text{แอคติวิตีที่วัดได้ทั้งหมด}}{\text{แอคติวิตีเริ่มต้นทั้งหมด}} \times 100$

2. โปรตีนที่เหลือ (%) = $\frac{\text{โปรตีนที่วัดได้ทั้งหมด}}{\text{โปรตีนเริ่มต้นทั้งหมด}} \times 100$

ของโบรมิเลนไปเลยเมื่อไดอะไลซ์ในสารละลาย ø.1 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.6 และในขณะเดียวกันก็ให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะของโบรมิเลนสูงสุดอีกด้วย แต่อย่างไรก็ตามพบว่า การไดอะไลซ์สารละลายผงโบรมิเลนในน้ำกลั่นก็ให้แอคติวิตีจำเพาะที่สูงใกล้เคียงกัน ถึงแม้จะมีการสูญเสียแอคติวิตีของโบรมิเลนไปบ้างเล็กน้อย

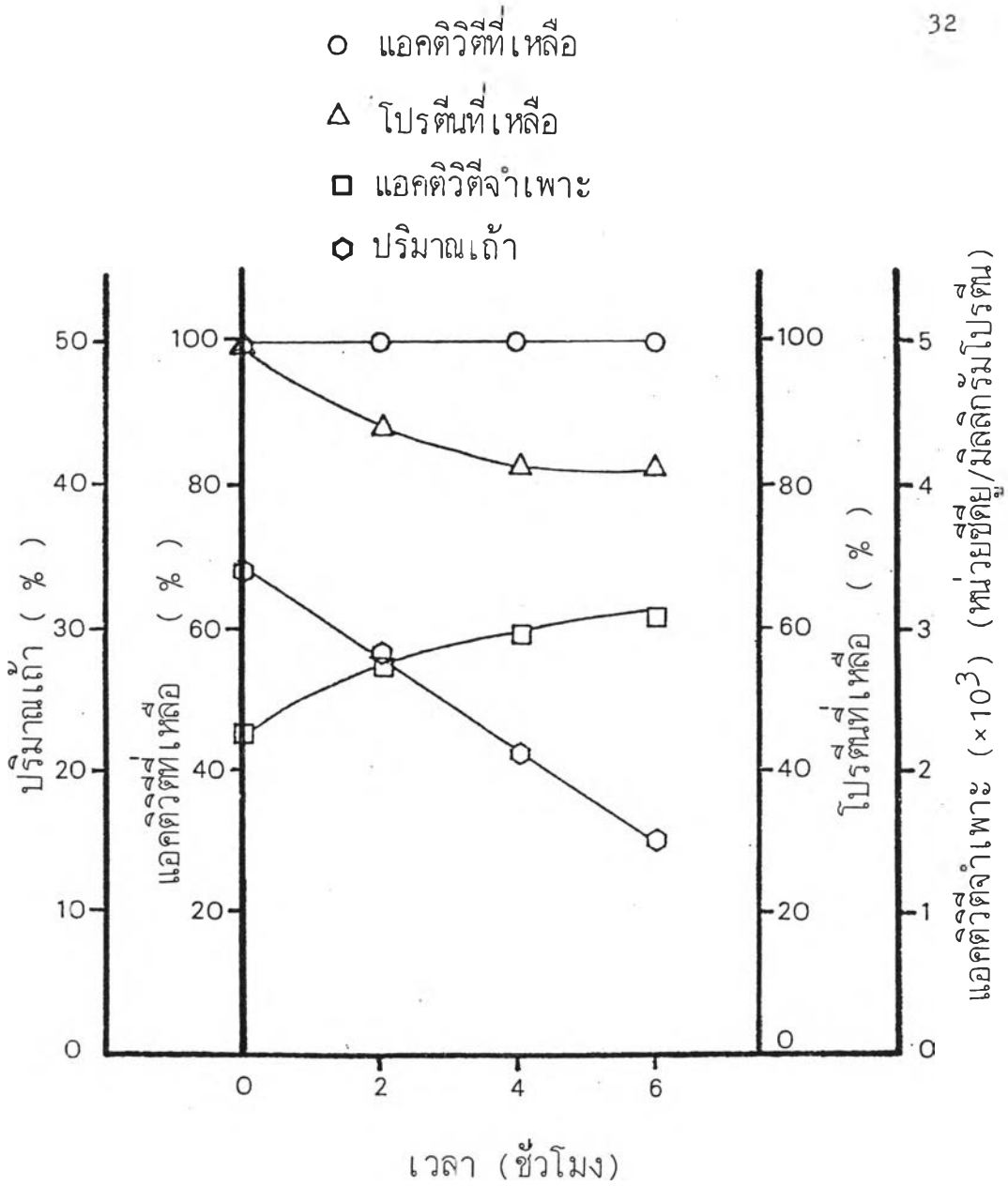
3.2.6 <u>การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการไดอะไลซีสสารละลายผงโบรมิเลน</u>

เมื่อนำสารละลายโบรมิเลน (แอคติวิตี 6.4x10^{5} หน่วยซีดียู และปริมาณโปรตีน 320 มิลลิกรัม) มาไดอะไลซ์ในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2-6 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนน้ำทุก ๆ 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาตรวจสอบแอคติวิตีของโบรมิเลน และปริมาณโปรตีน ตามวิธีข้อ 2.4.1 และ 2.5.3 หลังจากนั้นนำไปตกตะกอนด้วยอะซีโตน (อัตราส่วน 1 ต่อ 3) เปรียบเทียบแอคติวิตีของผงโบรมิเลนที่เตรียมได้กับผงโบรมิเลนเริ่มต้น

จากรูปที่ 5 จะเห็นได้ว่าสารละลายโบรมิเลนที่ผ่านการไดอะไลซ์ในน้ำกลั่นนาน 6 ชั่วโมงไม่สูญเสียแอคติวิตีของโบรมิเลนไปเลย ในขณะที่ปริมาณโปรตีนลดลงไปถึง 17 เปอร์เซนต์ ผงโบรมิเลนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยอะซีโตนมีแอคติวิตีต่อน้ำหนักผง 1 มิลลิกรัมเพิ่มขึ้นจาก 225 เป็น 417 หน่วยซีดียู แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ก็มีค่าเพิ่มขึ้นด้วย โดยเฉพาะผงโบรมิเลนที่ไดอะไลซ์นาน 6 ชั่วโมงจะมีแอคติวิตีจำเพาะสูงที่สุด นอกจากนี้ปริมาณเถ้าที่วัดได้จากผงโบรมิเลนหลังจากทำไดอะไลซีสก็จะลดลงเมื่อใช้เวลาทำไดอะไลซีสเพิ่มมากขึ้น

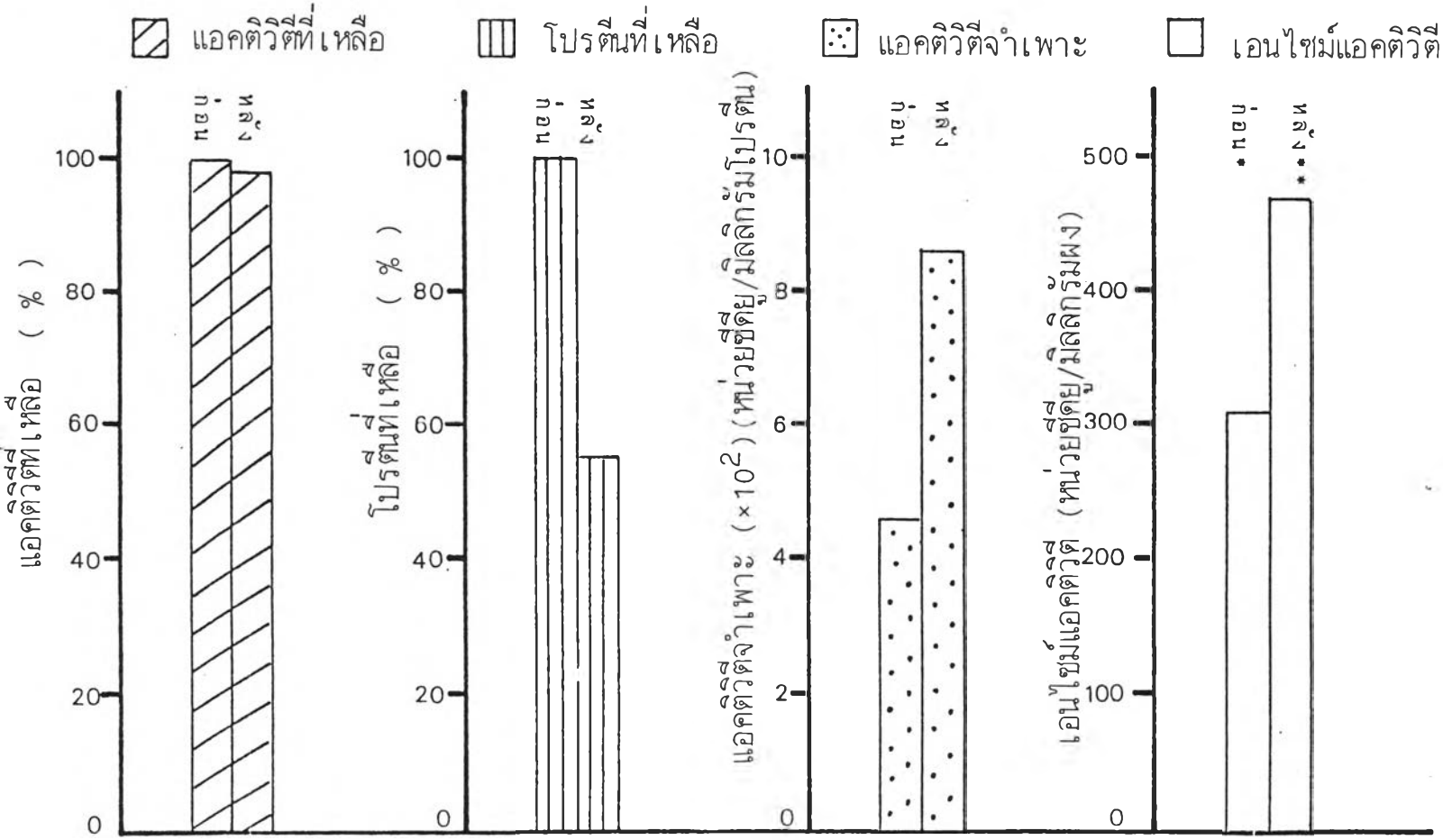
3.2.7 <u>การเพิ่มความบริสุทธิ์ของผงโบรมิเลนโดยเทคนิคอุลตราฟิลเตรชัน</u>

เมื่อผ่านสารละลายผงโบรมิเลนที่เตรียมได้ตามวิธี 2.8 ลงในเครื่องอุลตราฟิลเตรชันที่ใช้เยื่อแผ่นสังเคราะห์แบบ YM10 ของบริษัท Amicon ตามวิธีข้อ 2.8.2 วัดแอคติวิตีของโบรมิเลนในส่วนที่ทำให้เข้มข้นขึ้น และส่วนที่ผ่านเยื่อแผ่นสังเคราะห์ ผลปรากฏว่าพบแอคติวิตีส่วนใหญ่ (ประมาณ 98 เปอร์เซนต์) ในส่วนของสารละลายโบรมิเลนที่ถูกทำให้เข้มข้นขึ้น ในขณะที่พบแอคติวิตีของโบรมิเลนในส่วนที่ผ่านเยื่อแผ่นสังเคราะห์ต่ำกว่า 1 เปอร์เซนต์ และเมื่อนำสารละลายโบรมิเลนเข้มข้นนี้มาตกตะกอนด้วยอะซีโตนจะได้ผงโบรมิเลนที่มีแอคติวิตีต่อผง 1 มิลลิกรัม เพิ่มขึ้นจาก 308 เป็น 473 หน่วยซีดียู และให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะของโบรมิเลนเพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน (รูปที่ 6)



รูปที่ 5 การศึกษาผลกระทบของเวลาในการไดอะไลซีสสารละลายผงโบรมิเลน เมื่อไดอะไลซ์ในน้ำกลั่นเป็นเวลาต่าง ๆ กัน ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนน้ำทุก ๆ 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา เซนตริฟิวส์แยกสารละลายใสมาตกตะกอนโบรมิเลนด้วยอะซีโตน ตรวจสอบแอคติวิตี ปริมาณโปรตีน และปริมาณเถ้า (ดูภาคผนวกที่ 10) ของผงโบรมิเลนที่เตรียมได้

รูปที่ 6 การเพิ่มความบริสุทธิ์ของผงโบรมิเลนโดยใช้เทคนิคอุลตราฟิลเตรชัน (YM 10 membrane)ตามวิธีข้อ 2.8.2 แล้วตกตะกอนโบรมิเลนด้วยอะซีโตน ผงโบรมิเลนที่เตรียมได้นำมาตรวจสอบแอคติวิตี และปริมาณโปรตีน



* ก่อน = แอคติวิตีเริ่มต้น ** หลัง = แอคติวิตีหลังกรองด้วยอุลตราฟิลเตรชัน

3.2.8 การเพิ่มความบริสุทธิ์ของผงโบรมิเลนโดยคอลัมน์ดูโอไลซ์ ซี 225

เมื่อผ่านสารละลายโบรมิเลน (ปริมาณโปรตีน 641 มิลลิกรัม และเอนไซม์แอคติวิติ 6.83×10^{5} หน่วยซีดียู) ลงในคอลัมน์ที่บรรจุเรซินชนิดดูโอไลซ์ ซี 225 ตามวิธีข้อ 2.8.3 แยกได้สารละลายเอนไซม์ที่เป็นโปรตีนส่วนใหญ่ 1 พีค และเป็นส่วนที่มีแอคติวิตีของโบรมิเลนอยู่ด้วย (รูปที่ 7) เมื่อรวมส่วนของเอนไซม์ที่มีแอคติวิตีของโบรมิเลนสูงเข้าด้วยกัน แล้วนำไปตกตะกอนด้วยอะซีโตน (1 ต่อ 3 โดยปริมาตร) จะได้ผงโบรมิเลนที่มีแอคติวิตีต่อมิลลิกรัมผงเพิ่มขึ้นเป็น 375 หน่วยซีดียู แต่มีแอคติวิตีของโบรมิเลนเหลือ 63.5 เปอร์เซนต์ ในขณะที่มีโปรตีนเหลือ 31.5 เปอร์เซนต์ แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเป็น 2.14×10^{3} หน่วยซีดียูต่อมิลลิกรัมโปรตีน และปริมาณเถ้าลดลงเหลือเพียง 21.9 เปอร์เซนต์ (ตารางที่ 4)

3.2.9 การเพิ่มความบริสุทธิ์ของผงโบรมิเลนโดยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 100

เมื่อผ่านสารละลายโบรมิเลน (ปริมาณโปรตีน 207 มิลลิกรัม และเอนไซม์แอคติวิติ 5.6×10^{5} หน่วยซีดียู) ลงในเซฟาเดกซ์ จี 100 ซึ่งทำให้สมดุลย์อยู่ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.6 ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ตามวิธีข้อ 2.8.4

จากรูปที่ 8 พบว่าสามารถชะโบรมิเลนได้เพียง 1 พีค ซึ่งเมื่อนำไปตกตะกอนโบรมิเลนด้วยอะซีโตน (1 ต่อ 3 โดยปริมาตร) ได้ผงโบรมิเลนที่มีแอคติวิตีต่อมิลลิกรัมผงเพิ่มขึ้นเป็น 604 หน่วยซีดียู แต่มีแอคติวิตีของโบรมิเลนเหลือเพียง 31 เปอร์เซนต์ ในขณะที่มีโปรตีนเหลือประมาณ 42 เปอร์เซนต์ แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์เป็น 2.01×10^{3} หน่วยซีดียูต่อมิลลิกรัมโปรตีน และมีปริมาณเถ้าลดลงเหลือเพียง 25.7 เปอร์เซนต์ (ตารางที่ 5)

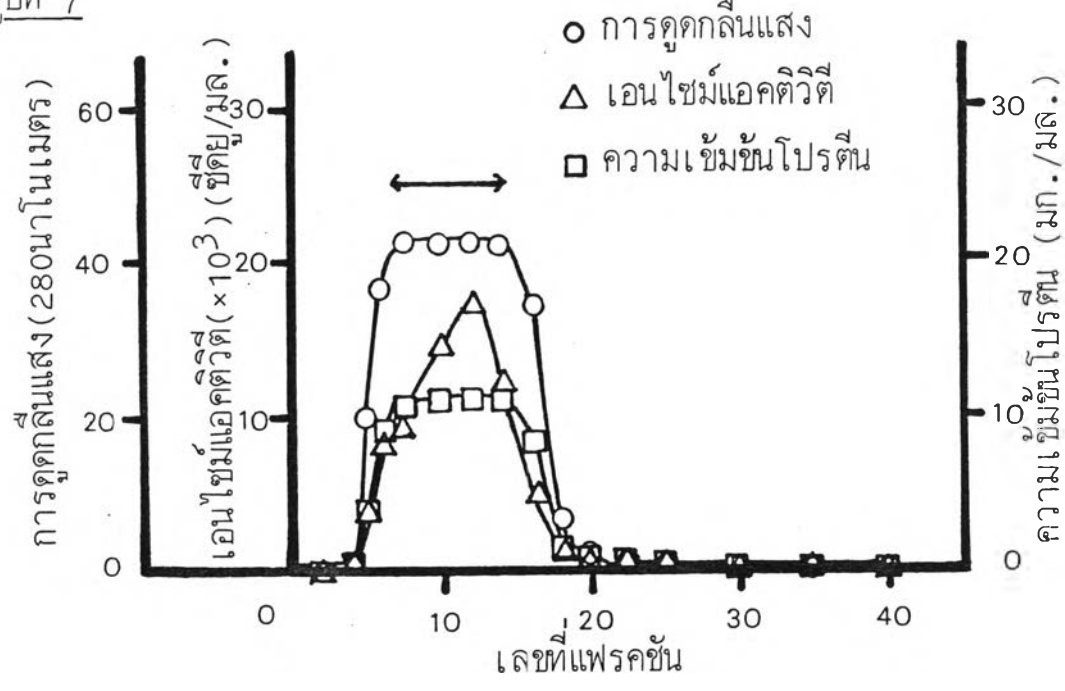
3.3 การศึกษาวิธีเตรียมโบรมิเลนบริสุทธิ์จากต้นสับปะรด

3.3.1 การศึกษาอิทธิพลของสารกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ (Activator) ต่อการทำงานของโบรมิเลนจากน้ำคั้นของต้นสับปะรด

3.3.1.1 กรดอะมิโนซิสเทอีนไฮโดรคลอไรด์

เมื่อนำน้ำคั้นของต้นสับปะรด (เตรียมตามวิธี 2.7.1) มาเติมกรดอะมิโนซิสเทอีนไฮโดรคลอไรด์ ความเข้มข้นแตกต่างกันตั้งแต่ 1-20 มิลลิ

รูปที่ 7

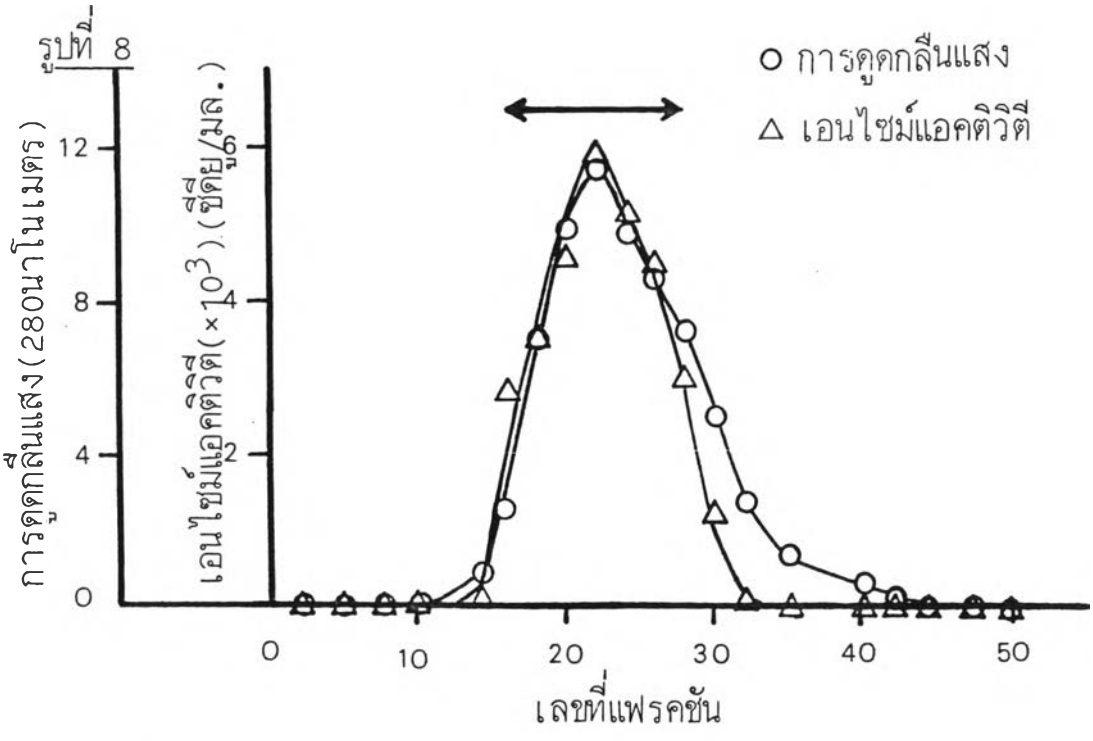


ตารางที่ 4

ขั้นตอน	แอคติวิตีที่เหลือ (%)	โปรตีนที่เหลือ (%)	แอคติวิตีจำเพาะ (×10³ยีดียู/มก.โปรตีน)	เอนไซม์แอคติวิตี (ยีดียู/มก.ผง)	ปริมาณเถ้า (%)
ผงโบรมิเลน	100	100	1.07	195	43.3
ดูโอไลซ์ ซี225	63.5	31.5	2.14	375	21.9

รูปที่ 7 และตารางที่ 4 แสดงผลการศึกษารูปแบบของการแยกสารละลายผงโบรมิเลนให้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นด้วยคอลัมน์ดูโอไลซ์ ซี225 (ขนาด 1.5×20 ซม.) ชะสารละลายเอนไซม์ด้วย 0.02 โมลาร์ อะซีเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.5 (อัตราเร็ว 50 มล./ชม.) เก็บแฟรคชันละ 3 มล. รวมแฟรคชันที่มีแอคติวิตีของโบรมิเลนสูง นำไปตกตะกอนด้วยอะซีโตน วัดแอคติวิตี และปริมาณโปรตีนของผงโบรมิเลนที่เตรียมได้

รูปที่ 8



ตารางที่ 5

ขั้นตอน	แอคติวิตีที่เหลือ (%)	โปรตีนที่เหลือ (%)	แอคติวิตีจำเพาะ ($\times 10^3$ซีดียู/มก.โปรตีน)	เอนไซม์แอคติวิตี (ซีดียู/มก.ผง)	ปริมาณเถ้า (%)
ผงโบรมิเลน	100	100	2.71	320	37.9
เซฟาเดกซ์	31.0	41.8	2.01	604	25.7

รูปที่ 8 และตารางที่ 5 แสดงผลการศึกษารูปแบบของการแยกสารละลายเอนไซม์จากผงโบรมิเลนให้มีความบริสุทธิ์สูงขึ้นด้วยคอลัมน์เซฟาเดกซ์จี 100 (ขนาด 2.5×34 ซม.) กรองสารละลายเอนไซม์ด้วยอัตราเร็ว 116 มล./ชม. เก็บแฟรคชันละ 5 มล. รวมแฟรคชันที่มีแอคติวิตีของโบรมิเลนสูงนำไปตกตะกอนด้วยอะซีโตน วัดแอคติวิตีและปริมาณโปรตีนของผงโบรมิเลนที่เตรียมได้

โมลาร์ นำไปอุนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำสารละลายที่ได้ไปวัดแอคติวิตีของโบรมิเลน ตามวิธีข้อ 2.4.1

ผลการทดลองรูปที่ 9 แสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโนซีสเทอีนไฮโดรคลอไรด์ความเข้มข้น 5-20 มิลลิโมลาร์ สามารถเร่งการทำงานของโบรมิเลนจากน้ำคั้นของต้นสับปะรดเพิ่มขึ้นได้ประมาณ 1.4 เท่าของการทำงานของโบรมิเลนเมื่อไม่มีสารกระตุ้นแอคติวิตี

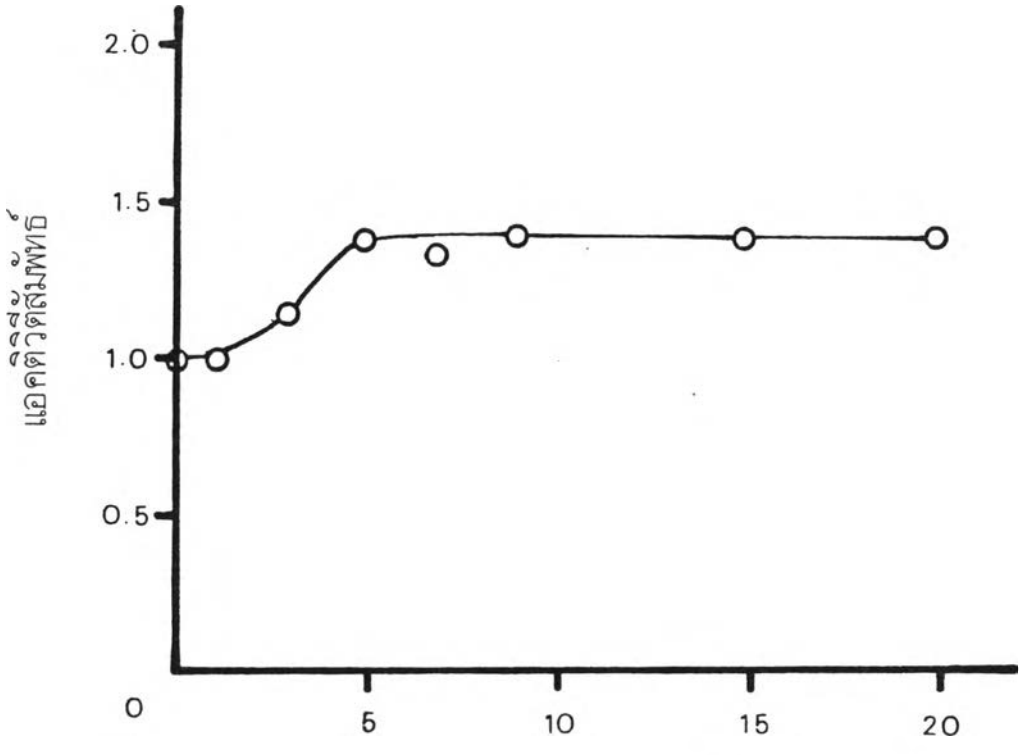
3.3.1.2 <u>กรดอะมิโนซีสเทอีนไฮโดรคลอไรด์ และกรดเอทธิลลีนไดอะมีนเททระอะซีทิค</u>

เมื่อให้น้ำคั้นของต้นสับปะรด (เตรียมตามวิธีข้อ 2.7.1) ทำปฏิกิริยากับกรดเอทธิลลีนไดอะมีนเททระอะซีทิค ความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 1-10 มิลลิโมลาร์ นาน 10 นาที ที่ 37 องศาเซลเซียส แล้ววัดแอคติวิตีของโบรมิเลน (วิธีข้อ 2.4.1)

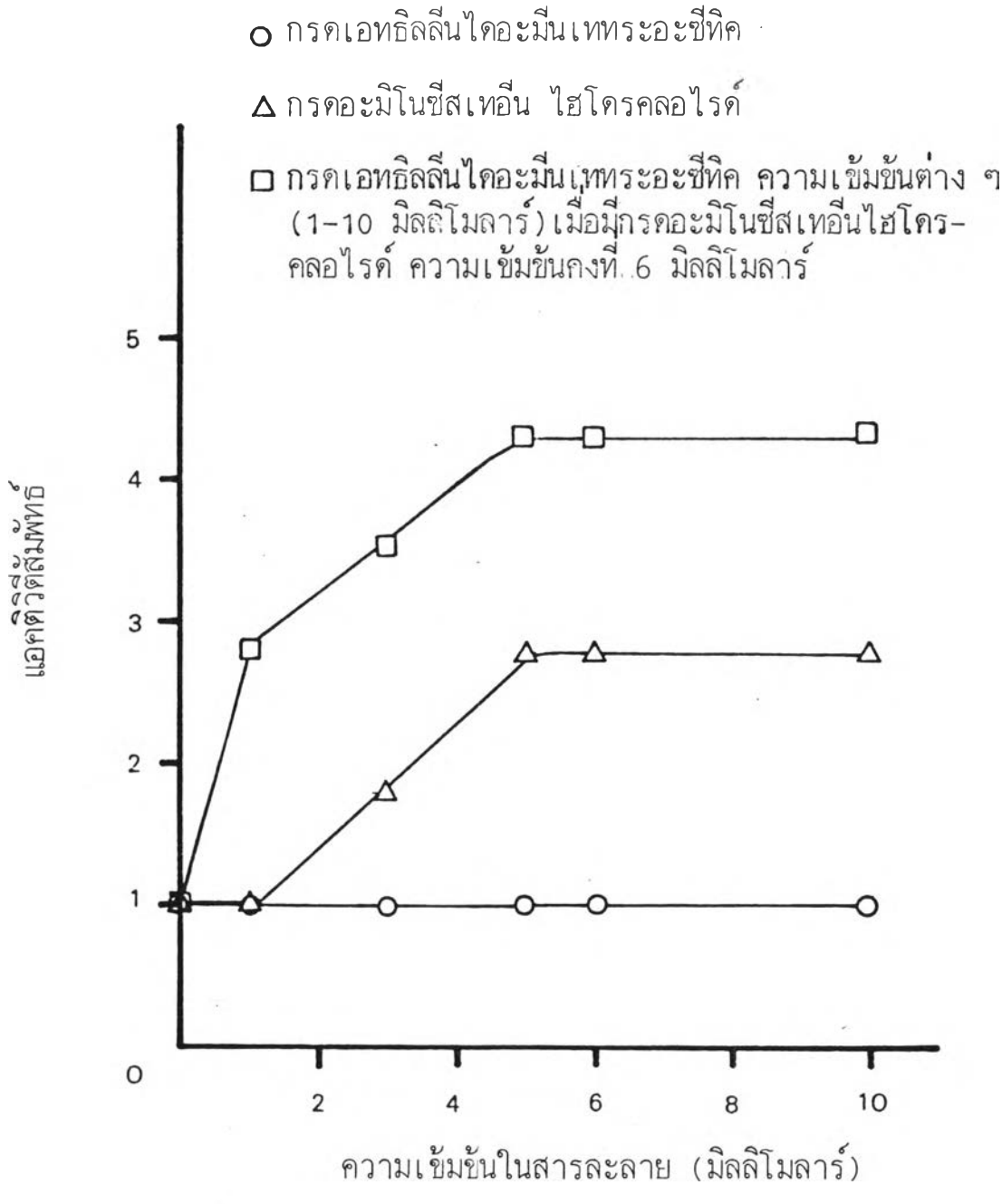
ผลการทดลองรูปที่ 10 พบว่ากรดเอทธิลลีนไดอะมีนเททระอะซีทิคไม่มีความสามารถในการกระตุ้นการทำงานของโบรมิเลนเลย แต่เมื่อเติมกรดเอทธิลลีนไดอะมีนเททระอะซีทิค ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในสารละลายโบรมิเลนซึ่งมีกรดอะมิโนซีสเทอีน ไฮโดรคลอไรด์ ความเข้มข้น 6 มิลลิโมลาร์อยู่ก่อนแล้ว นำไปอุ่นที่สภาวะเดียวกันกับข้างบนนาน 10 นาที พบว่ากรดอะมิโนซีสเทอีน ไฮโดรคลอไรด์ 6 มิลลิโมลาร์ที่มีกรดเอทธิลลีนไดอะมีนเททระอะซีทิค ความเข้มข้นตั้งแต่ 5-10 มิลลิโมลาร์ สามารถกระตุ้นการทำงานของโบรมิเลนได้สูงกว่าเมื่อกระตุ้นด้วยกรดอะมิโนซีสเทอีนไฮโดรคลอไรด์หรือกรดเอทธิลลีนไดอะมีนเททระอะซีทิคเพียงอย่างเดียว ยิ่งไปกว่านั้นระยะเวลาที่ใช้ในการกระตุ้นเอนไซม์ยังสั้นกว่าเมื่อใช้กรดอะมิโนซีสเทอีนไฮโดรคลอไรด์เพียงอย่างเดียวโดด ๆ อีกด้วย อย่างไรก็ตามสารกระตุ้นแอคติวิตีของโบรมิเลนทั้ง 2 ชนิดจะทำงานได้สูงสุดเมื่ออุ่นกับเอนไซม์ที่ 37 องศาเซลเซียส นานอย่างน้อย 10 นาที

3.3.1.3 <u>โซเดียมเมทาไบซัลไฟท์</u>

อุ่นน้ำคั้นของต้นสับปะรด (เตรียมตามวิธีข้อ 2.7.1) กับสารละลายโซเดียมเมทาไบซัลไฟท์ความเข้มข้น 10-50 มิลลิโมลาร์ ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวัดแอคติวิตีของโบรมิเลน



รูปที่ 9 ผลกระทบของกรดอะมิโนซีสเทอีน ไฮโดรคลอไรด์ ต่อการทำงานของโบรมิเลนจากน้ำคั้นของต้นสับปะรด เมื่อให้ทำปฏิกิริยากับโบรมิเลน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นวัดแอคติวิตีของโบรมิเลน



รูปที่ 10 ผลกระทบร่วมของกรดอะมิโนซีสเทอีน ไฮโดรคลอไรด์ และกรดเอทธิลลีนไดอะมีนเททระอะซีทิค ต่อการทำงานของโบรมิเลนจากน้ำคั้นของต้นสับปะรด โดยแปรผันความเข้มข้นของกรดเอทธิลลีนไดอะมีนเททระอะซีทิค (1-10 มิลลิโมลาร์) และกรดอะมิโนซีสเทอีน ไฮโดร-คลอไรด์ (1-10 มิลลิโมลาร์) ทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดแอคติวิตีของโบรมิเลน ตามวิธีข้อ 2.4.1

ผลการทดลองตามรูปที่ 11 จะเห็นได้ว่าโซเดียมเมทาไบซัลไฟท์ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ขึ้นไป สามารถกระตุ้นการทำงานของโบรมิเลนจากน้ำคั้นของต้นสับปะรดได้เพิ่มขึ้นประมาณ 1.5 เท่าของการทำงานของโบรมิเลนเมื่อไม่มีสารกระตุ้นแอคติวิตี

3.3.2 การศึกษาอัตราส่วนของปริมาณโปรตีนต่อกรดโพลีอะไคร์ลิคที่เหมาะสมในการตกตะกอนโบรมิเลน

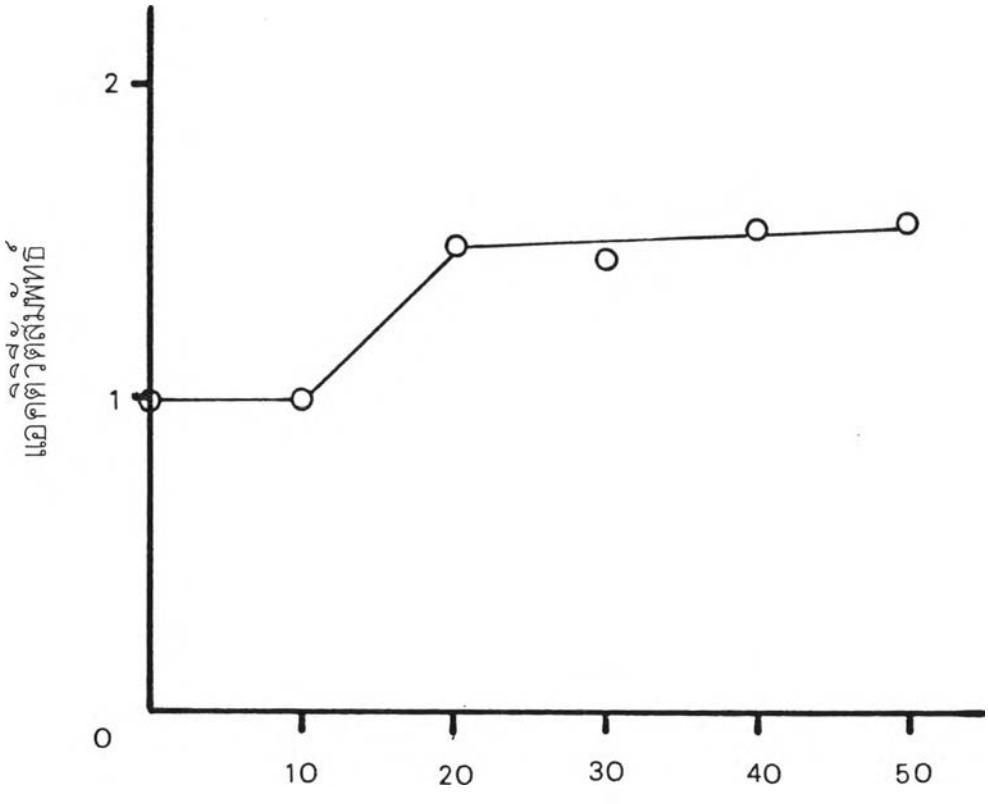
เมื่อนำสารละลายโบรมิเลนที่แยกได้จากต้นสับปะรดตามวิธีข้อ 2.7 มาตกตะกอนโบรมิเลนด้วยกรดโพลีอะไคร์ลิค ตามวิธีข้อ 2.9 โดยแปรค่าอัตราส่วนของโปรตีนต่อกรดอยู่ในช่วงระหว่าง 0.4-8.0 (น้ำหนัก/น้ำหนัก)

ผลการทดลองพบว่ากรดโพลีอะไคร์ลิคสามารถตกตะกอนโบรมิเลนได้เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณที่ใช้ตกตะกอน ค่าสูงสุดอยู่ที่อัตราส่วนของโปรตีนต่อกรดเท่ากับ 2.0 และถ้าเพิ่มปริมาณกรดโพลีอะไคร์ลิคต่อไป ก็พบว่าไม่มีการเพิ่มปริมาณโบรมิเลนที่ตกลงได้ ตรงกันข้ามกลับมีการสูญเสียแอคติวิตีของโบรมิเลนเพิ่มขึ้นด้วย ผงโบมิเลนที่เตรียมจากสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกรดโพลีอะไคร์ลิคจะมีปริมาณเถ้าต่ำมาก ค่าสูงสุดของเถ้าที่พบในผงโบรมิเลนมีค่าไม่เกิน 4 เปอร์เซนต์เท่านั้น (รูปที่ 12)

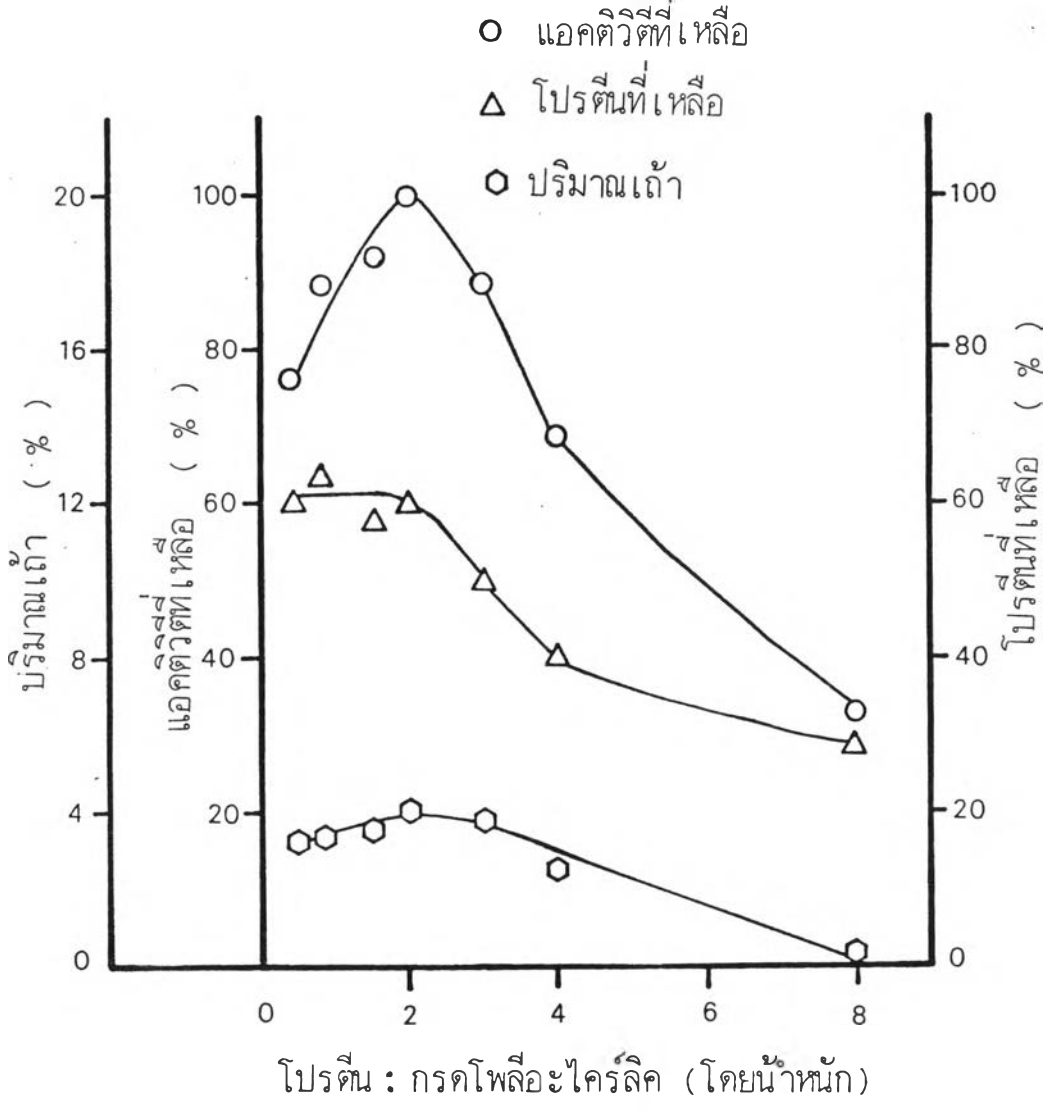
เป็นที่น่าสนใจว่า เมื่อนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการตกตะกอนโบรมิเลนด้วยกรดโพลีอะไคร์ลิคในอัตราส่วนของปริมาณโปรตีนต่อกรดเป็น 2.0 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ปรับพีเอชเป็น 4.3 แล้วตกตะกอนต่อด้วยอะซีโตน (1 ต่อ 3 โดยปริมาตร) ตามวิธีข้อ 2.9 สามารถเตรียมได้ผงโบรมิเลนที่มีแอคติวิตีสูงถึง 2,145 หน่วยซีดียูต่อมิลลิกรัมผง ในขณะที่ค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์จะยังมีค่าไม่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมมากนัก (2.74×10^3 หน่วยซีดียูต่อมิลลิกรัมโปรตีน) (ตารางที่ 6)

3.3.3 ผลกระทบของวิธีสกัดแยกโบรมิเลนจากต้นสับปะรดต่อแอคติวิตีของผงโบรมิเลนที่เตรียมได้ด้วยวิธีตกตะกอนด้วยกรดโพลีอะไคร์ลิค

เมื่อนำสารละลายโบรมิเลนที่ได้จากการสกัดหรือบีบเอาน้ำออกจากต้นสับปะรดด้วยเครื่องตีบ่น เครื่องบีบไฮดรอลิค หรือ เครื่องบีบแบบสกรู (เตรียมตามวิธีข้อ 2.7) นำไปตกตะกอนด้วยกรดโพลีอะไคร์ลิคที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในอัตราส่วนของปริมาณโปรตีนต่อกรดเป็น 2.0 ตามวิธีข้อ 2.9 แล้วตรวจสอบแอคติวิตีของผง



รูปที่ 11 ผลกระทบของโซเดียมเมทาไบซัลไฟท์ต่อการทำงานของโบรมิเลนจากน้ำคั้นของต้นสับปะรด เมื่อให้ทำปฏิกิริยากับโบรมิเลน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หลังจากนั้นวัดแอคติวิตีของโบรมิเลน



รูปที่ 12 การศึกษาอัตราส่วนของปริมาณโปรตีนต่อกรดโพลีอะไครลิคที่เหมาะสมในการตกตะกอนโบรมิเลนจากน้ำคั้นของต้นสับปะรด โดยแปรค่าปริมาณกรดโพลีอะไครลิค แล้วทำการตกตะกอนโบรมิเลน ตามวิธีข้อ 2.9 ตรวจสอบแอคติวิตีของโบรมิเลน ความเข้มข้นโปรตีน และปริมาณเถ้าของผงโบรมิเลนที่เตรียมได้

ตารางที่ 6 การเตรียมโบรมิเลนบริสุทธิ์สูงจากต้นสับปะรด โดยการตกตะกอนโบรมิเลนด้วยกรดโพลีอะไครลิค (อัตราส่วนโปรตีนต่อกรดเท่ากับ 2) ตามวิธีข้อ 2.9 แล้วตรวจสอบแอคติวิตีและปริมาณโปรตีนของผงโบรมิเลนที่เตรียมได้ ตามวิธีข้อ 2.4.1 และ 2.5.3 ตามลำดับ

ขั้นตอนการเพิ่มความบริสุทธิ์	แอคติวิตีทั้งหมด ($\times 10^6$ ซีดียู)	โปรตีนทั้งหมด ($\times 10^3$ มก.)	แอคติวิตีที่เหลือ (%)	แอคติวิตีจำเพาะ ($\times 10^3$ ซีดียู/มก.โปรตีน)	เอนไซม์แอคติวิตี (ซีดียู/มก.ผง)
น้ำคั้นต้นสับปะรด	117.37	50.59	100	2.32	-
กรดโพลีอะไครลิค	99.52	34.56	84.8	2.88	-
อะซีโตน	57.20	20.84	48.7	2.74	2,145

โบรมิเลนที่เตรียมได้

จากตารางที่ 7 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการบีบเอาน้ำออกจากต้นสับปะรดด้วยเครื่องบีบแบบสกรูเป็นวิธีที่ให้น้ำคั้นจากต้นสับปะรดที่มีแอคติวิตีของโบรมิเลน และปริมาณโปรตีนสูงสุด ในขณะที่การบีบเอาน้ำออกด้วยเครื่องบีบไฮดรอลิคและการสกัดแยกด้วยเครื่องตีป่นจะได้น้ำคั้นของต้นสับปะรดที่มีแอคติวิตีของโบรมิเลนใกล้เคียงกัน แต่น้ำคั้นที่ได้จากการสกัดด้วยเครื่องตีป่นจะมีปริมาณโปรตีนที่สูงกว่าน้ำคั้นที่ได้จากการบีบด้วยเครื่องบีบไฮดรอลิค เมื่อนำน้ำคั้นที่ได้จากการแยกทั้ง 3 วิธีไปตกตะกอนด้วยกรดโพลีอะไคร์ลิค ผลปรากฏว่าผงโบรมิเลนที่เตรียมจากน้ำคั้นที่บีบโดยเครื่องบีบแบบสกรูมีแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์สูงสุด ในเวลาเดียวกันก็ให้ค่าแอคติวิตีต่อมิลลิกรัมผงโบรมิเลนสูงสุดด้วยเช่นกัน โดยมีค่าสูงถึง 2,365 หน่วยซีดียูต่อมิลลิกรัม ในขณะที่อีก 2 วิธีให้ค่าต่ำกว่าเล็กน้อย นอกจากนี้ปริมาณผลิตภัณฑ์ผงโบรมิเลนที่เตรียมได้ยังมีปริมาณสูงสุดอีกด้วย (1.9 กรัมจากต้นสับปะรดที่ปอกเปลือกแล้วจำนวน 1 กิโลกรัม)

3.3.4 <u>การศึกษาวิธีการทำแห้งที่เหมาะสมต่อผงโบมิเลน</u>

เตรียมผงโบรมิเลนโดยวิธีตกตะกอนด้วยกรดโพลีอะไคร์ลิค ตามวิธีข้อ 2.9 ตะกอนเปียกที่ได้นำไปอบแห้งในตู้อบและตู้อบสูญญากาศอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่าง ๆ (10-60 นาที) เมื่อครบเวลาชั่งน้ำหนักผงโบรมิเลนแล้วตรวจสอบแอคติวิตีของโบรมิเลนที่เหลือหลังจากการทำแห้ง

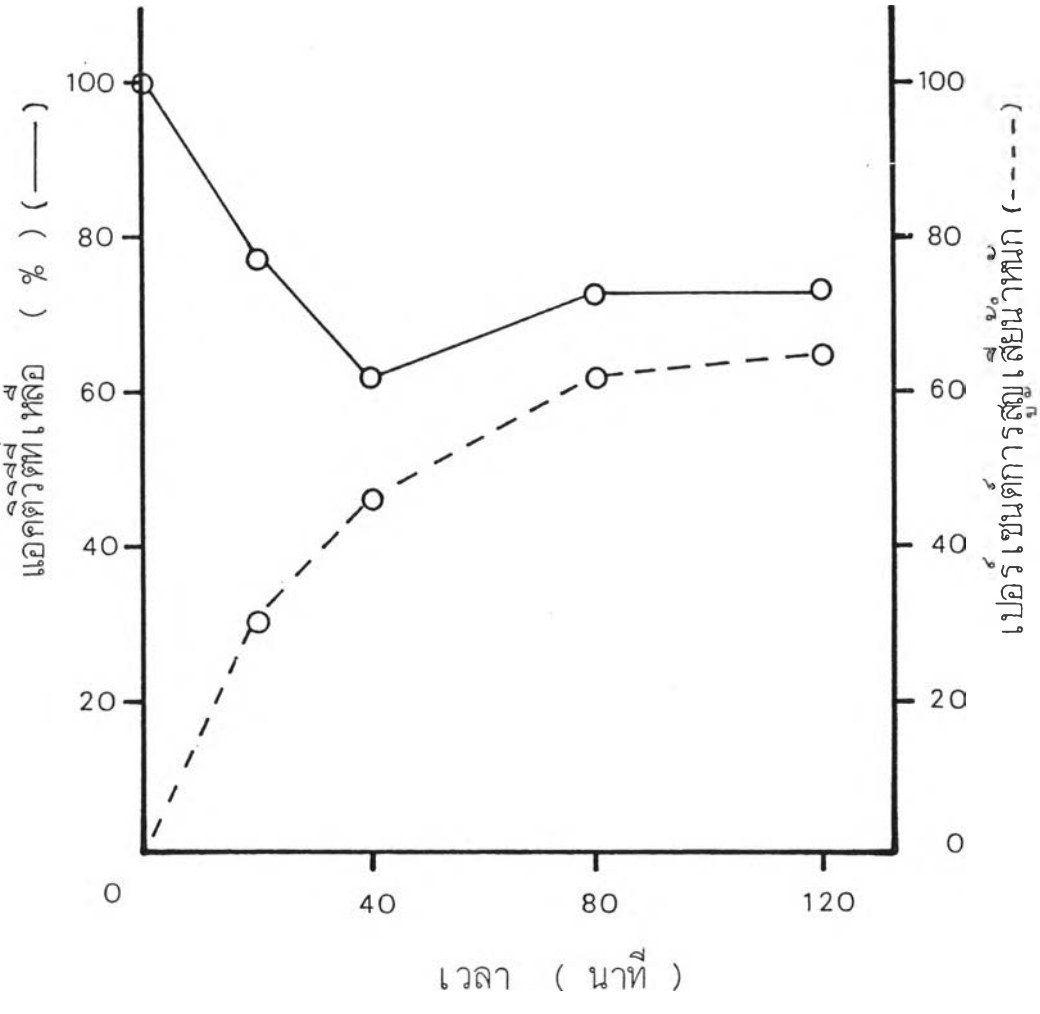
ผลการทดลองรูปที่ 13 และรูปที่ 14 จะเห็นได้ว่าการทำแห้งผงโบรมิเลนด้วยการอบตะกอนเปียกในตู้อบ หรือในตู้อบสูญญากาศที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสมีการสูญเสียแอคติวิตีของโบรมิเลนเกิดขึ้นใกล้เคียงกัน (ประมาณ 30 เปอร์เซนต์) หากแต่ว่าการอบแห้งด้วยตู้อบสูญญากาศจะช่วยให้การระเหยของน้ำออกไปได้เร็วกว่าตู้อบธรรมดาที่อุณหภูมิเดียวกัน (ตะกอนเปียก 1 กรัม ตู้อบสูญญากาศใช้เวลาในการอบแห้งเพียง 20 นาที ในขณะที่ตู้อบธรรมดาจะต้องใช้เวลาถึง 80 นาที จึงจะได้ผงโบรมิเลนที่มีความแห้งคงที่ประมาณ 98 เปอร์เซนต์)

3.4 <u>การศึกษาความเสถียรของผงโบรมิเลน</u>

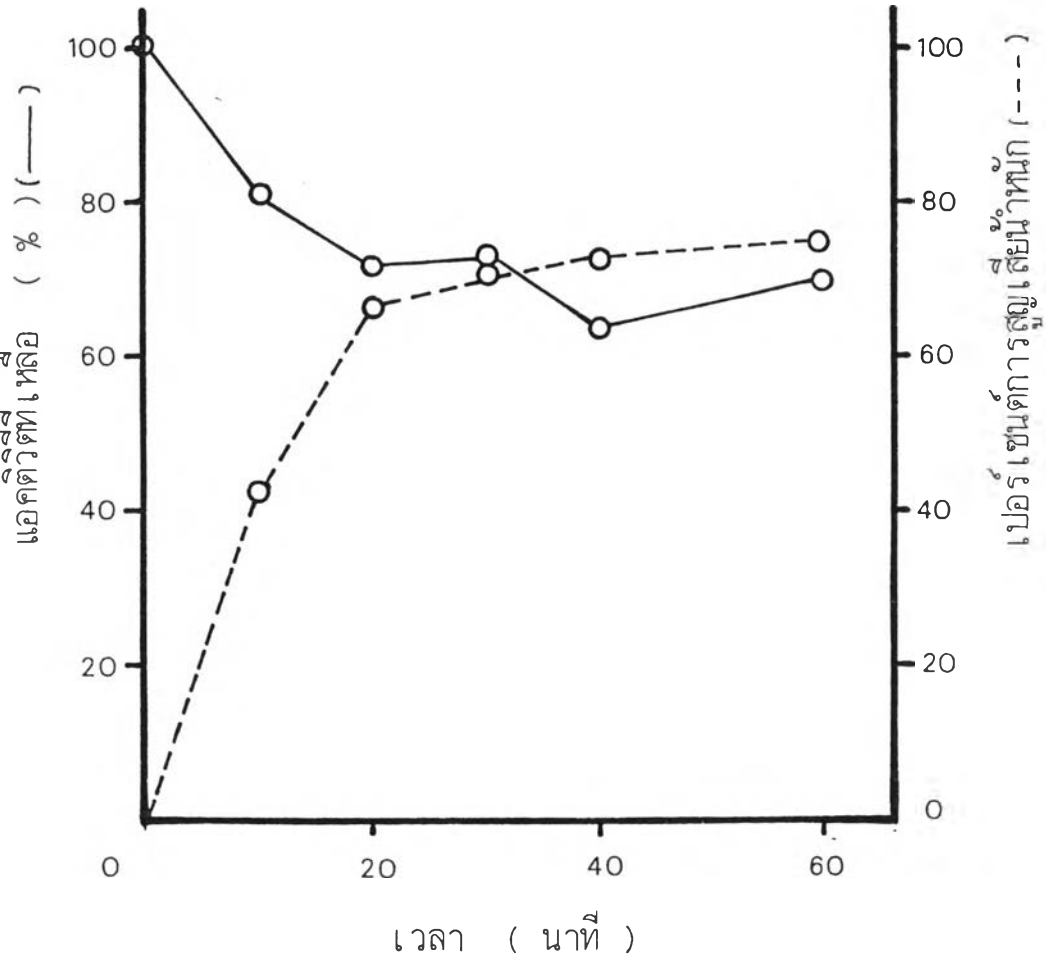
3.4.1 <u>เปรียบเทียบความเสถียรของผงโบรมิเลนที่เตรียมโดยวิธีตกตะกอนด้วย</u>

ตารางที่ 7 การศึกษาวิธีสกัดแยกที่เหมาะสมต่อการแยกโบรมีเลนจากต้นสับปะรด แล้วทำการตกตะกอนแยกผงโบรมีเลนจากสารละลายด้วยกรดโพลีอะไคร์ลิค ตามวิธีข้อ 2.9

วิธีบีบหรือสกัด	โปรตีน/กก.ต้น ($\times 10^3$ มก.)	แอคติวิตี/กก.ต้น ($\times 10^6$ ซีดียู)	เอนไซม์แอคติวิตี (ซีดียู/มก.ผง)	แอคติวิตีจำเพาะ (ซีดียู/มก.โปรตีน)	แอคติวิตีที่เหลือ (%)	โปรตีนที่เหลือ (%)	ปริมาณผลผลิต (ก./กก.ต้น)
เครื่องตีป่น	2.26	5.22	2,255	3.22	68.8	45.9	1.5
เครื่องบีบไฮดรอลิค	1.44	5.12	2,090	3.67	37.9	46.6	0.9
เครื่องบีบแบบสกรู	3.48	12.94	2,365	4.30	48.7	42.1	1.9



รูปที่ 13 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการทำแห้งของผงโบรมิเลน เมื่อเตรียมโบรมิเลนโดยการตกตะกอนด้วยกรดโพลีอะไครลิค ตามวิธีข้อ 2.9 แล้วนำไปอบแห้งในตู้อบธรรมดาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่าง ๆ กัน แล้วทำการวัดแอคติวิตีของโบรมิเลนที่เหลือ



รูปที่ 14 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำแห้งผงโบรมิเลน เมื่อเตรียมผงโบรมิเลนโดยการตกตะกอนด้วยกรดโพลีอะไครลิค ตามวิธีข้อ 2.9 แล้วนำไปอบแห้งในตู้อบสูญญากาศ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่าง ๆ กัน ทำการวัดแอคติวิตีของโบรมิเลนที่เหลือ

กรดโพลีอะไครลิค และอะซีโตน

นำผงโบมิเลนที่เตรียมโดยวิธีตกตะกอนด้วยกรดโพลีอะไครลิค (วิธีข้อ 2.9) และผงโบรมิเลนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยอะซีโตน (วิธีข้อ 2.8) มาเก็บรักษาไว้ที่ 25 องศาเซลเซียส ติดตามวัดแอคติวิตีของโบรมิเลนในช่วงเวลาต่าง ๆ กันนาน 90 วัน

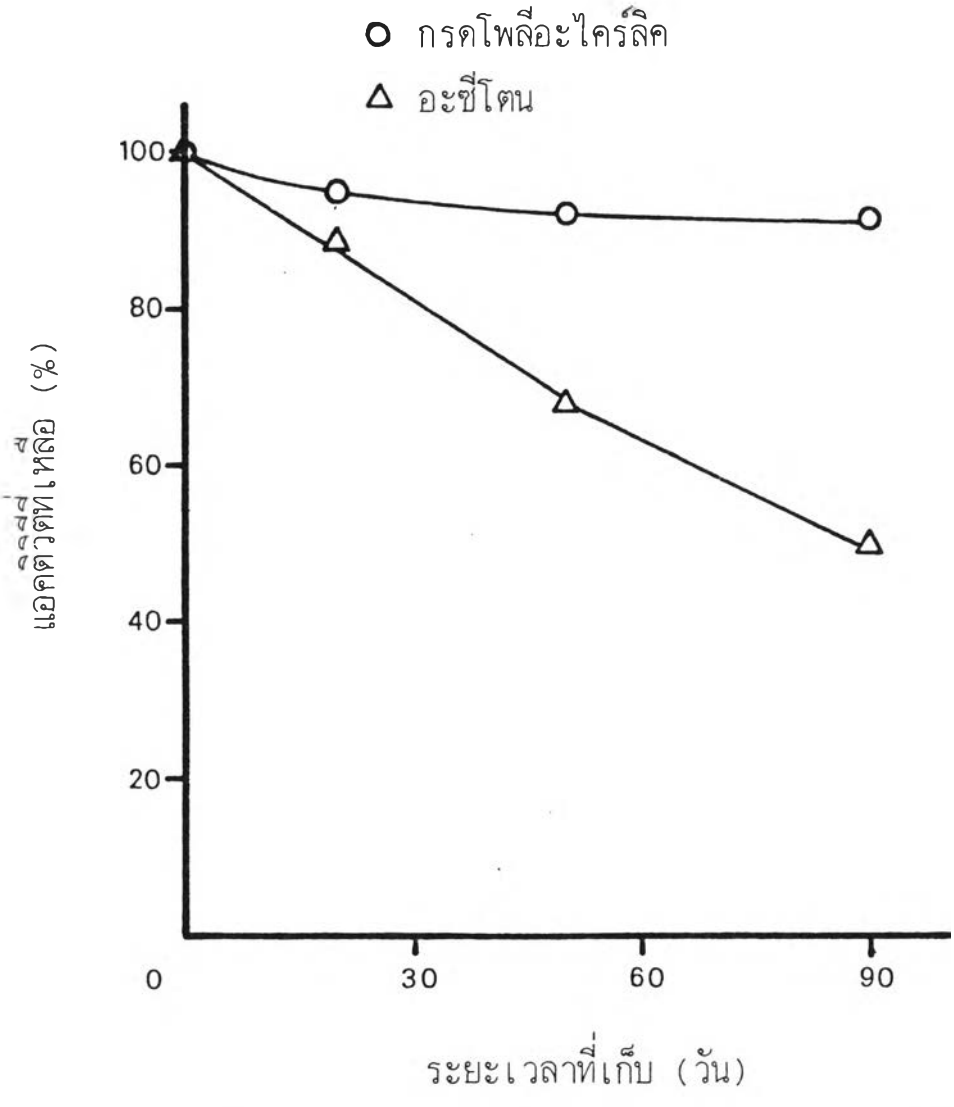
ผลการทดลอง (รูปที่ 15) แสดงให้เห็นว่าผงโบรมิเลนที่เตรียมโดยวิธีตกตะกอนด้วยกรดโพลีอะไครลิคมีความเสถียรสูงกว่าผงโบรมิเลนที่เตรียมโดยวิธีตกตะกอนด้วยอะซีโตนอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเก็บไว้ในสภาวะที่กำหนด พบว่าในช่วงระยะเวลาของการเก็บนาน 90 วัน ผงโบรมิเลนที่เตรียมด้วยกรดโพลีอะไครลิคเกือบจะไม่มีการสูญเสียแอคติวิตีของโบรมิเลนเลย (แอคติวิตีเหลือประมาณ 95 เปอร์เซนต์ ใน 90 วัน) ในขณะที่ผงโบรมิเลนที่เตรียมด้วยอะซีโตนจะมีการลดแอคติวิตีของโบรมิเลนลงอย่างสม่ำเสมอจนเหลือแอคติวิตีประมาณ 50 เปอร์เซนต์เมื่อเก็บไว้ในสภาวะเดียวกัน นาน 90 วัน

3.4.2 ผลกระทบของโซเดียมเบนโซเอตต่อความเสถียรของผงโบรมิเลนที่อุณหภูมิห้อง

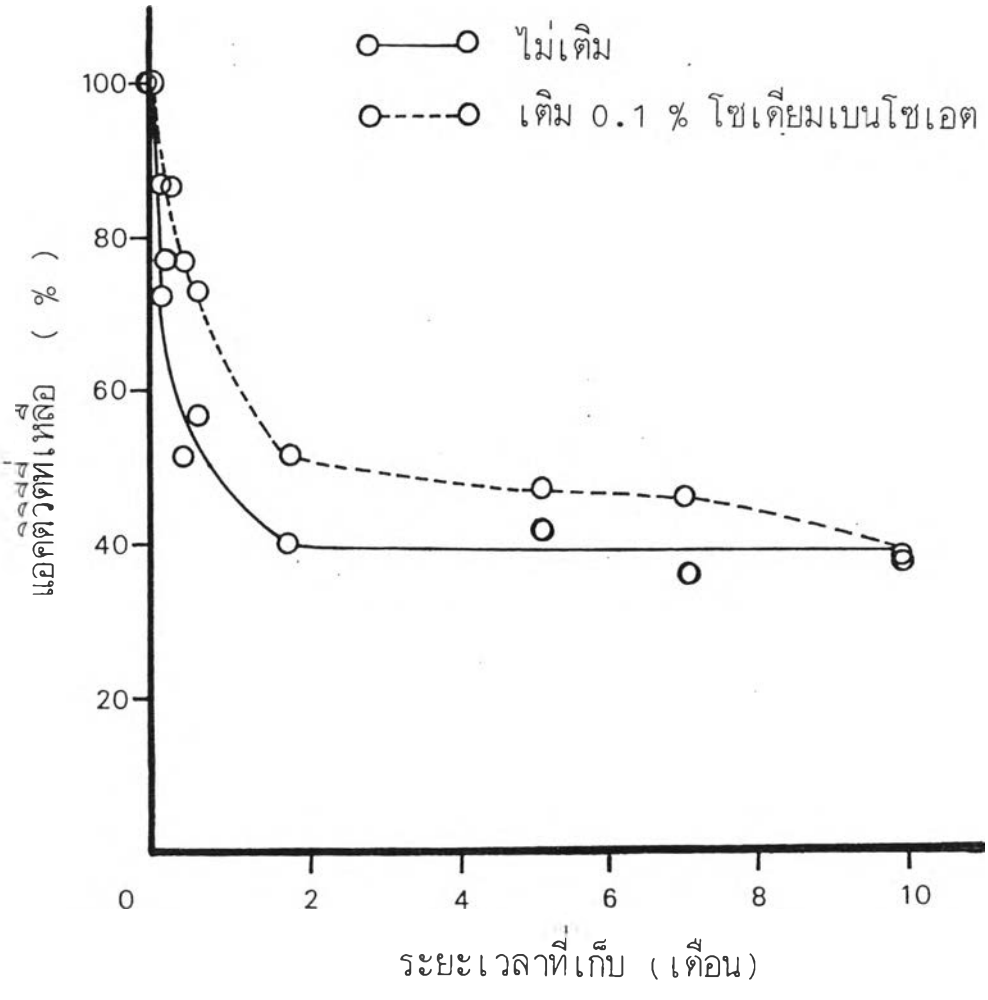
เตรียมผงโบรมิเลนโดยวิธีตกตะกอนด้วยกรดโพลีอะไครลิค ตามวิธีข้อ 2.9 แบ่งตะกอนโบรมิเลนเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งนำมาเติมผงเบนโซเอต (0.1 เปอร์เซนต์ โดยน้ำหนัก) บดให้เข้ากันดี นำไปอบให้แห้ง แล้วนำทั้งสองส่วนไปเก็บรักษาไว้ในเดสซิเคเตอร์ที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) ติดตามวัดแอคติวิตีของโบรมิเลนในช่วงเวลาต่าง ๆ นาน 10 เดือน

ผลการทดลองรูปที่ 16 พบว่าสำหรับผงโบรมิเลนที่ไม่ได้เติมเบนโซเอตในช่วงแรกจะมีอัตราการลดแอคติวิตีอย่างรวดเร็ว จนกระทั่งเหลือแอคติวิตีเพียง 50 เปอร์เซนต์เมื่อเก็บไว้นาน 1 เดือน หลังจากนั้นอัตราการลดแอคติวิตีของโบรมิเลนจะช้าลงจนเกือบคงที่ โดยยังสามารถตรวจพบแอคติวิตีของโบรมิเลนถึง 40 เปอร์เซนต์เมื่อเก็บไว้เป็นเวลานาน 10 เดือน

ในขณะที่ผงโบรมิเลนที่เติมเบนโซเอต (0.1 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนัก) ในช่วงแรกก็จะมีอัตราการลดลงของแอคติวิตีอย่างรวดเร็วเช่นกัน และจะลดลงจนเหลือแอคติวิตีของโบรมิเลนประมาณ 50 เปอร์เซนต์ในช่วงระยะเวลาที่เก็บรักษานาน 2 เดือน



รูปที่ 15 เปรียบเทียบความเสถียรของผงโบรมิเลนที่เตรียมโดยวิธีตกตะกอนด้วยกรดโพลีอะไครลิค (วิธีข้อ 2.9) และอะซีโตน (วิธีข้อ 2.8) หลังจากเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ติดตามวัดแอคติวิตีที่ช่วงเวลาต่าง ๆ กัน จนครบ 90 วัน



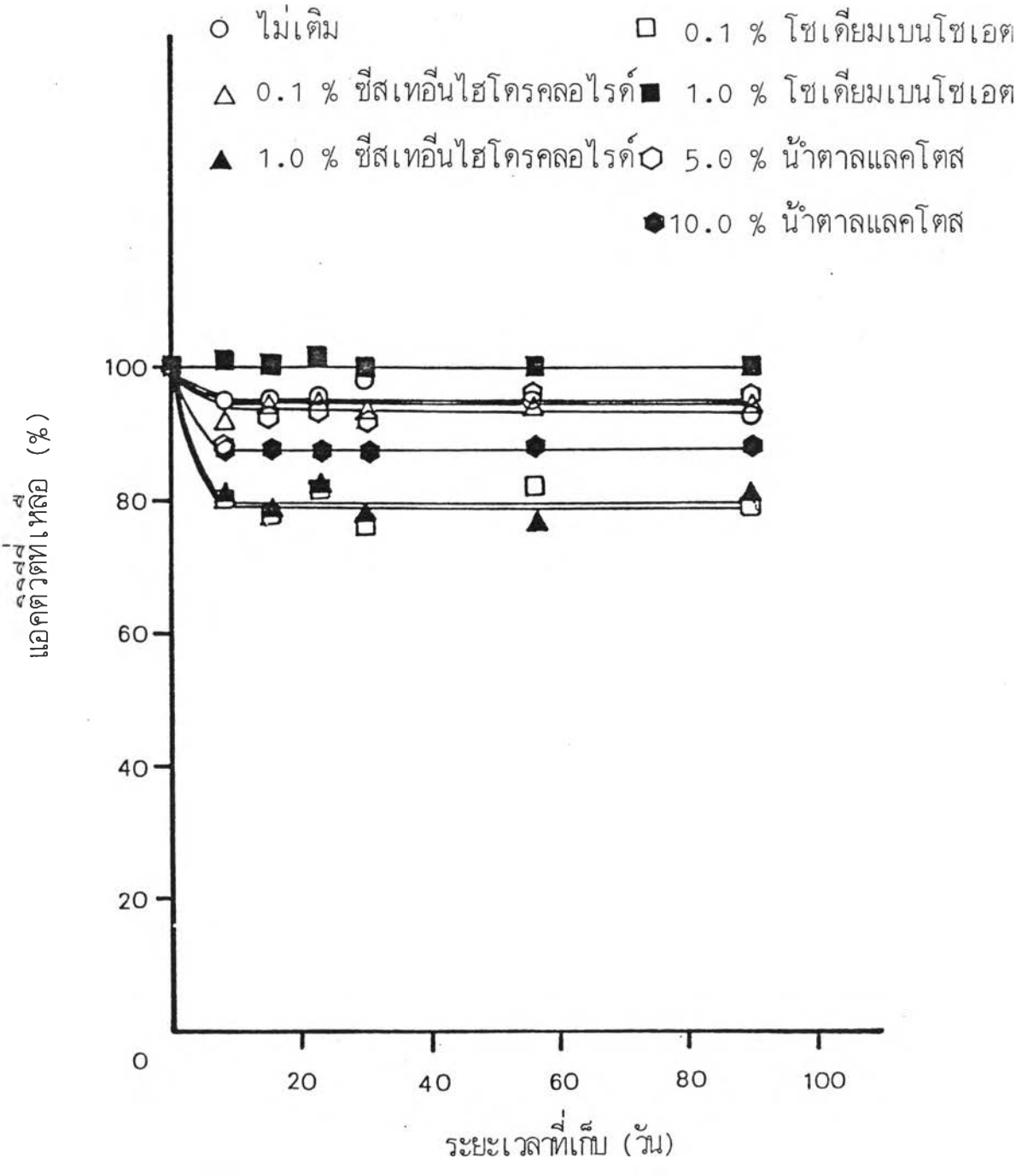
รูปที่ 16 เปรียบเทียบผลกระทบของโซเดียมเบนโซเอต (0.1% w/w) ต่อความเสถียรของผงโบรมิเลนที่เตรียมด้วยกรดโพลีอะไคร์ลิค เมื่อเก็บรักษาไว้ ณ อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) ในสภาวะที่มี และไม่มี 0.1% โซเดียมเบนโซเอต ติดตามวัดแอคติวิตีของโบรมิเลนในช่วงเวลาต่าง ๆ กันจนครบ 10 เดือน

หลังจากนั้นอัตราการลดของแอคติวิตีจะลดลงจนเกือบจะคงที่เช่นกัน พบว่ามีแอคติวิตีของโบรมิเลนเหลืออยู่ประมาณ 50 เปอร์เซนต์เมื่อเก็บไว้นาน 7 เดือน หลังจากนั้นแอคติวิตีของโบรมิเลนจะลดลงจนใกล้เคียงกับแอคติวิตีของผงโบรมิเลนที่ไม่เติมเบนโซเอต

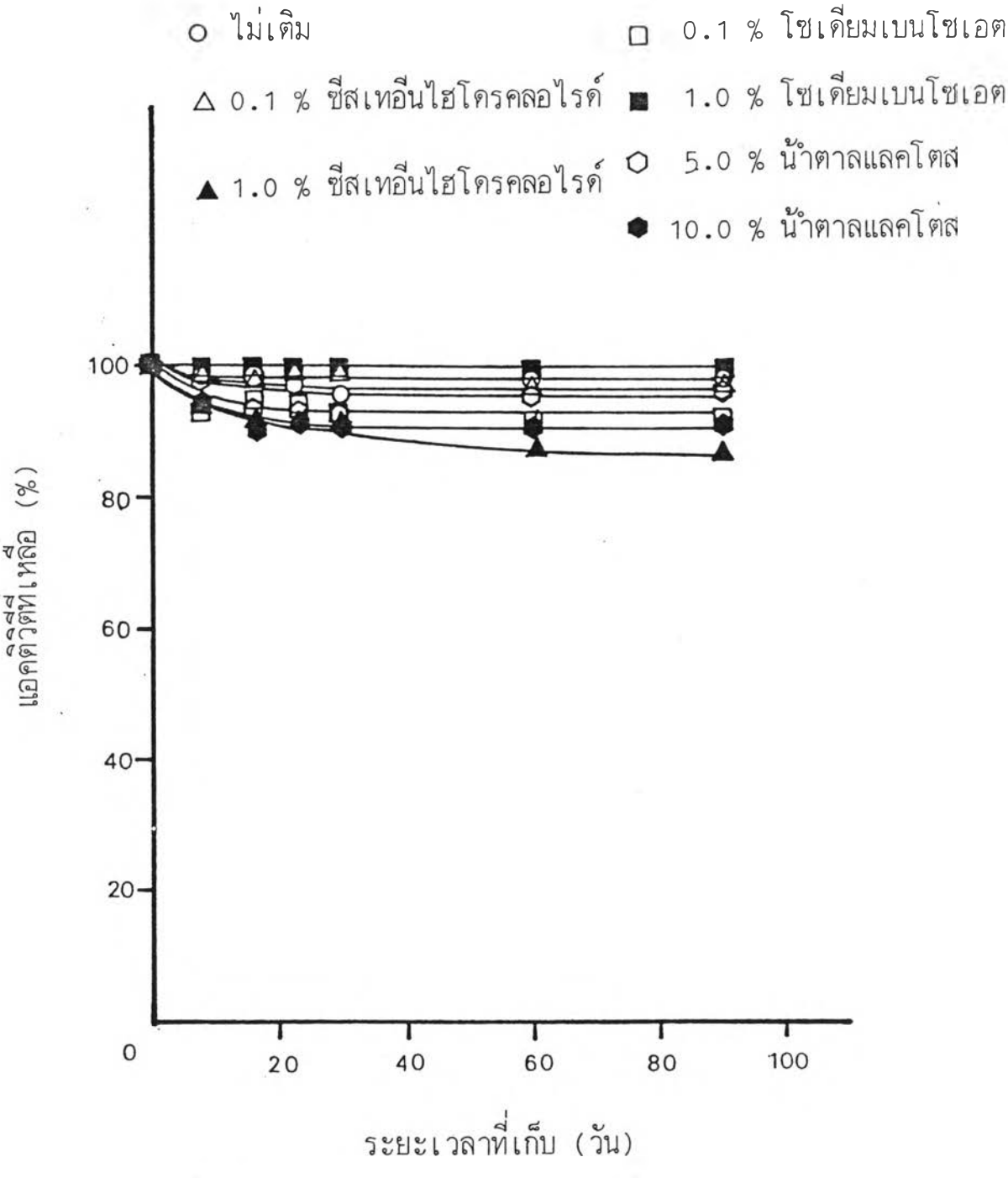
3.4.3 ผลกระทบของสารเพิ่มความเสถียรของผงโบรมิเลนที่อุณหภูมิ 25 และ 4 องศาเซลเซียส

เตรียมผงโบรมิเลนโดยวิธีตกตะกอนด้วยกรดโพลีอะไคร์ลิค ตามวิธีข้อ 2.9 เติมสารเพิ่มความเสถียรชนิดต่าง ๆ คือ กรดอะมิโนซีสเทอีนไฮโดรคลอไรด์ (0.1 และ 1.0 เปอร์เซนต์) โซเดียมเบนโซเอต (0.1 และ 1.0 เปอร์เซนต์) และน้ำตาลแลคโตส (5 และ 10 เปอร์เซนต์) ลงในตะกอนเปียกของโบรมิเลนที่เตรียมได้ก่อนนำไปอบแห้งด้วยตู้อบสูญญากาศอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสนาน 1 ชั่วโมง ผงโบรมิเลนที่เตรียมได้นำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25 และ 4 องศาเซลเซียส วัดแอคติวิตีของโบรมิเลนเป็นระยะ ๆ จนครบ 90 วัน

ผลการทดลอง (รูปที่ 17 และ 18) จะเห็นได้ว่ารูปแบบของความเสถียรของผงโบรมิเลนที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเมื่อมีสารเพิ่มความเสถียรชนิดต่าง ๆ กันจะมีลักษณะคล้ายกัน คือแอคติวิตีของโบรมิเลนจะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 8 วันแรก หลังจากนั้นแอคติวิตีจึงเริ่มคงที่ สารเพิ่มความเสถียรชนิดต่าง ๆ จะมีความสามารถในการรักษาความเสถียรของโบรมิเลนได้แตกต่างกันคือ โซเดียมเบนโซเอต 1 เปอร์เซนต์น่าจะเป็นสารเพิ่มความเสถียรที่ดีที่สุด พบว่าในช่วงระยะเวลาของการเก็บรักษาผงโบรมิเลนเมื่อมี 1 เปอร์เซนต์โซเดียมเบนโซเอตนาน 90 วันเกือบไม่มีการสูญเสียแอคติวิตีของโบรมิเลนเลย ส่วนผงโบรมิเลนที่เติมกรดอะมิโนซีสเทอีนไฮโดรคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซนต์ และน้ำตาลแลคโตส 5 เปอร์เซนต์จะมีแอคติวิตีเหลืออยู่ในปริมาณที่ใกล้เคียงกับผงโบรมิเลนที่ไม่เติมสารเพิ่มความเสถียรเมื่อเก็บไว้เป็นระยะเวลาเดียวกัน (แอคติวิตีเหลือประมาณ 95 เปอร์เซนต์ ใน 90 วัน) ในขณะที่การเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลแลคโตสเป็น 10 เปอร์เซนต์ และซีสเทอีนไฮโดรคลอไรด์เป็น 1 เปอร์เซนต์ และโซเดียมเบนโซเอต ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซนต์ ไม่มีผลในการเพิ่มความเสถียรให้ผงโบรมิเลน ในทางตรงกันข้ามกลับมีแนวโน้มไปลดความเสถียรของเอนไซม์ในผงโบรมิเลนลงอีกด้วย (แอคติวิตีเหลือเพียง 87, 80 และ 80 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ในระยะเวลา



รูปที่ 17 เปรียบเทียบอิทธิพลของสารเพิ่มความเสถียรของผงโบรมิเลน เมื่อเติมสารเพิ่มความเสถียรชนิดต่างกันตามสภาวะที่กำหนด เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ติดตามวัดแอคติวิตีของโบรมิเลนที่ช่วงเวลาต่าง ๆ กัน นาน 90 วัน



รูปที่ 18 เปรียบเทียบอิทธิพลของสารเพิ่มความเสถียรของผงโบรมิเลน เมื่อเก็บรักษาผงโบรมิเลนที่มีสารเพิ่มความเสถียรชนิดต่าง ๆ ตามกำหนด ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ติดตามวัดแอคติวิตีที่ช่วงเวลาต่าง ๆ กันนาน 90 วัน

90 วัน)

ผลการทดลองที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 90 วันให้ผลคล้ายคลึงกับที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสมาก พบว่าแอคติวิตีของโบรมิเลนลดลงน้อยกว่าผงโบรมิเลนที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ผงโบรมิเลนที่เติมโซเดียมเบนโซเอต 1 เปอร์เซนต์ ยังคงเป็นผงโบรมิเลนที่มีความเสถียรสูงสุดซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับผงโบรมิเลนที่เติมกรดอะมิโนซิสเทอีนไฮโดรคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซนต์ อย่างไรก็ตามความเสถียรที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสของโบรมิเลนจะสูงกว่าที่ 25 องศาเซลเซียส ผงโบรมิเลนที่เติมน้ำตาลแลคโตส 5 เปอร์เซนต์จะให้แอคติวิตีที่ใกล้เคียงกับแอคติวิตีของผงโบรมิเลนที่ไม่เติมสารเพิ่มความเสถียร (เหลือแอคติวิตีประมาณ 96-98 เปอร์เซนต์ของแอคติวิตีเริ่มต้น) สำหรับผงโบรมิเลนที่เติมโซเดียมเบนโซเอต 0.1 เปอร์เซนต์ น้ำตาลแลคโตส 10 เปอร์เซนต์ และเติมกรดอะมิโนซิสเทอีนไฮโดรคลอไรด์ 1 เปอร์เซนต์จะมีแอคติวิตีลดลงไปบ้างเล็กน้อย คือเหลือแอคติวิตีประมาณ 93, 90 และ 87 เปอร์เซนต์ตามลำดับ

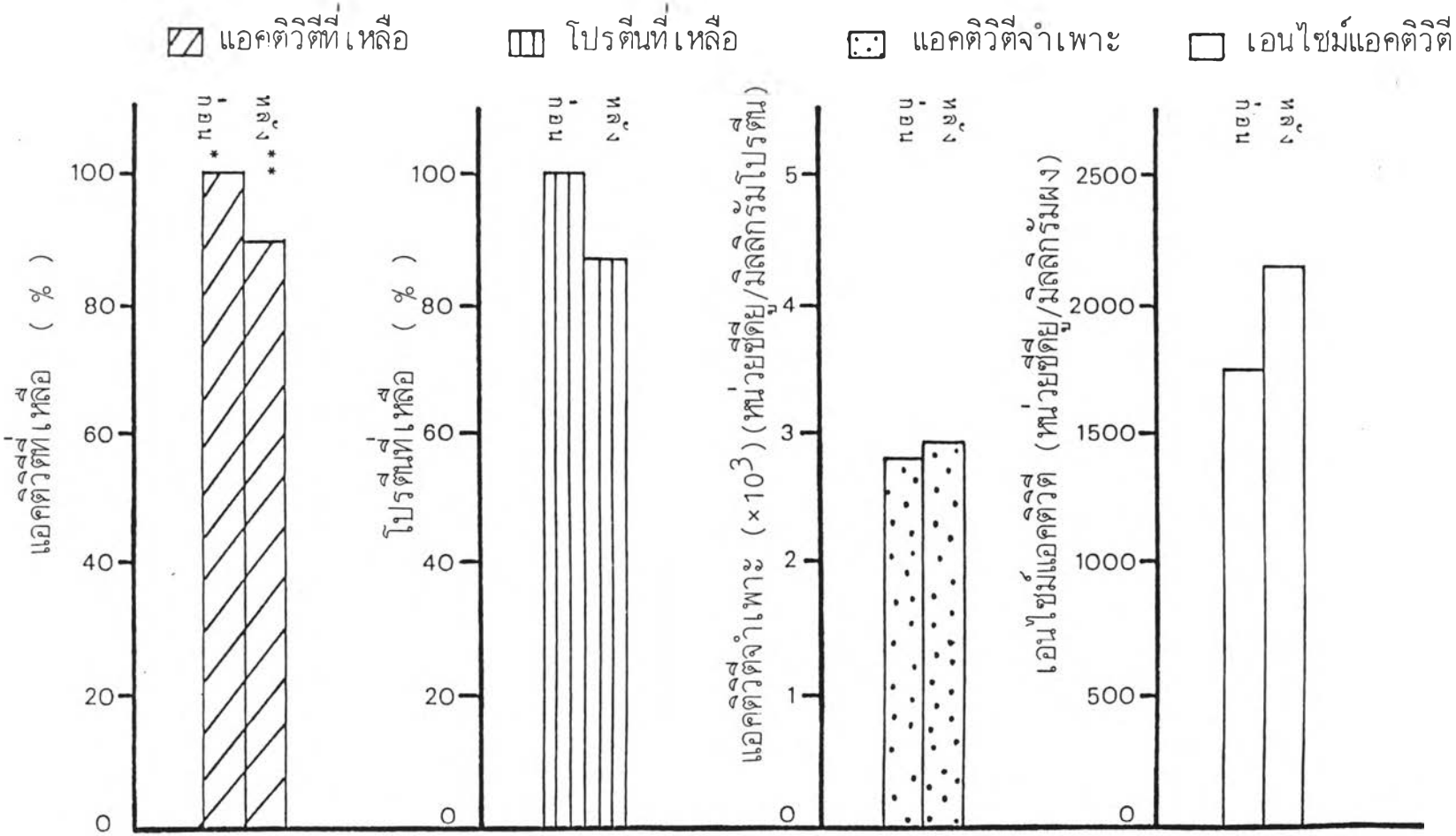
3.5 <u>การเพิ่มความบริสุทธิ์ของผงโบรมิเลนที่เตรียมได้โดยการตกตะกอนด้วยกรดโพลีอะไคร์ลิค</u>

3.5.1 <u>เทคนิคอุลตราฟิลเตรชัน</u>

ผ่านสารละลายเอนไซม์ของผงโบรมิเลนที่เตรียมโดยวิธีตกตะกอนด้วยกรดโพลีอะไคร์ลิคลงในเครื่องอุลตราฟิลเตรชัน ที่ใช้เยื่อแผ่นสังเคราะห์แบบ YM 10 ของบริษัท Amicon ตามวิธีในข้อ 2.8.2 นำโบรมิเลนส่วนเข้มข้นที่เหลือในภาชนะซึ่งเป็นส่วนที่มีแอคติวิตีสูงไปตกตะกอนโบรมิเลนด้วยอะซีโตน ผลการทดลอง (รูปที่ 19) จะตรวจพบแอคติวิตีส่วนใหญ่ (ประมาณ 90 เปอร์เซนต์) ในส่วนของสารละลายโบรมิเลนที่ถูกทำให้เข้มข้นขึ้น หลังจากตกตะกอนโบรมิเลนจากส่วนเข้มข้นด้วยอะซีโตนจะได้ผงโบรมิเลนที่มีแอคติวิตีเพิ่มขึ้นจาก 1,760 เป็น 2,140 หน่วยซีดียูต่อมิลลิกรัมผง ในขณะที่ค่าแอคติวิตีจำเพาะของโบรมิเลนเกือบคงที่ (2.92 $\times 10^3$ หน่วยซีดียูต่อมิลลิกรัมโปรตีน)

และเมื่อศึกษาความบริสุทธิ์ของโบรมิเลนที่แยกได้เทียบกับโบรมิเลนเริ่มต้นโดยใช้เทคนิคโพลีอะไคร์ละไมด์เจล ตามวิธีข้อ 2.6 จะยังคงตรวจพบจำนวนแถบสีของโปรตีน 7 แถบ ซึ่งมีรูปแบบคล้ายคลึงกันกับที่ตรวจพบในเอนไซม์โบรมิเลน

รูปที่ 19 การเพิ่มความบริสุทธิ์ของผงโบรมิเลนที่เตรียมได้โดยการตกตะกอนด้วยกรดโพลีอะไครลิคด้วยเทคนิคอุลตราฟิลเตรชัน (YM 10 membrane) ตามวิธีข้อ 2.8.2 แล้วตกตะกอนโบรมิเลนด้วยอะซีโตน ตรวจสอบแอคติวิตีและปริมาณโปรตีนของผงโบรมิเลนที่เตรียมได้



* ก่อน = ก่อนกรองผ่านอุลตราฟิลเตรชัน ** หลัง = หลังกรองผ่านอุลตราฟิลเตรชัน

ก่อนเพิ่มความบริสุทธิ์ (R_f มีค่า 0.20, 0.43, 0.47, 0.55, 0.62, 0.76 และ 0.89 ตามลำดับ) แสดงให้เห็นว่าเทคนิคนี้อาจจะเหมาะสำหรับการเพิ่มความเข้มข้นของโบรมิเลนชแต่ไม่มีผลต่อการทำให้บริสุทธิ์มากนัก

3.5.2 วิธี ion exchange chromatography

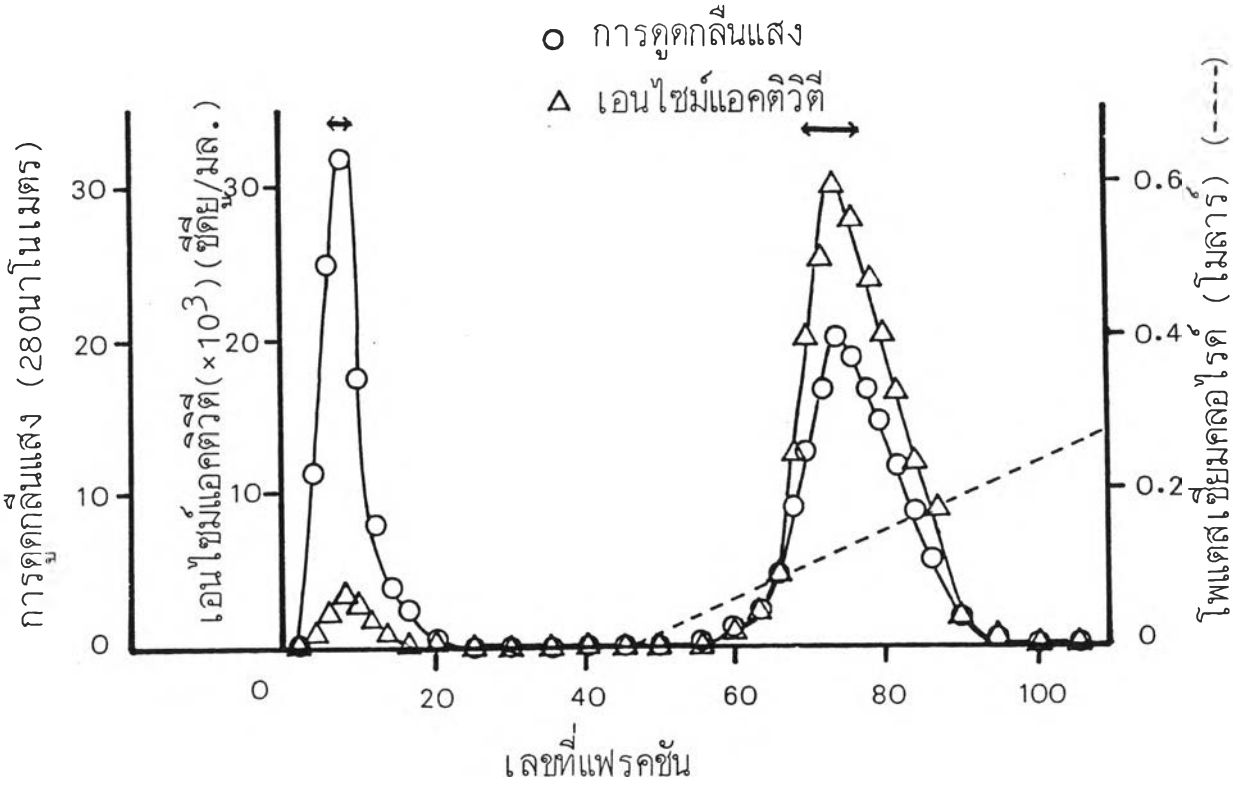
เมื่อผ่านสารละลายเอนไซม์ของผงโบรมิเลนที่เตรียมได้โดยการตกตะกอนด้วยกรดโพลีอะไครลิคลงในคอลัมน์ที่บรรจุด้วยคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส แล้วชะด้วย 0.01 โมลาร์ ซิเตรทบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 จนกระทั่งไม่มีโปรตีนออกมาอีก จึงชะสารละลายเอนไซม์ต่อด้วยของผสมโพแตสเซียมคลอไรด์ (เกรเดียนท์เส้นตรง) ความเข้มข้น 0 ถึง 0.5 โมลาร์ ใน 0.1 โมลาร์ซิเตรทบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 วัดแอคติวิตีของโบรมิเลนในแต่ละแฟรคชันที่แยกได้ ตามวิธีข้อ 2.4.1 ผลการทดลอง (รูปที่ 20) ปรากฏว่าพบองค์ประกอบของโบรมิเลน 2 ชนิด โดยองค์ประกอบแรกไม่จับกับคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส ส่วนองค์ประกอบที่สองจับกับคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส และแยกได้โดยการชะด้วยสารละลายเกรเดียนท์ของโพแตสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.12 โมลาร์ องค์ประกอบที่สองนี้เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ของโบรมิเลน ซึ่งเมื่อนำไปตกตะกอนด้วยอะซีโตนจะได้ผงโบรมิเลนที่มีแอคติวิตีสูงประมาณ 2,222 หน่วยซีดียูต่อมิลลิกรัมผง มีแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ 3.18×10^{3} หน่วยซีดียู ต่อมิลลิกรัมโปรตีน ในปริมาณของผงโบรมิเลนที่เตรียมได้ 0.3 กรัมจากผงโบรมิเลนเริ่มต้น 1 กรัม (ตารางที่ 8)

ผลการศึกษาความแตกต่างของชนิดเอนไซม์ในองค์ประกอบทั้ง 2 ชนิดนี้โดยใช้เทคนิคโพลีอะไครัลละไมด์เจล ตามวิธีข้อ 2.6 (รูปที่ 21) พบรูปแบบโปรตีนขององค์ประกอบทั้ง 2 ชนิดนี้แตกต่างกัน โดยองค์ประกอบแรกจะให้แถบสีของโปรตีนจำนวน 5 แถบซึ่งมีค่า R_f เท่ากับ 0.40, 0.47, 0.51, 0.70 และ 0.84 ตามลำดับ ส่วนองค์ประกอบที่สองซึ่งเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ให้จำนวนแถบสีโปรตีนเพียง 3 แถบเท่านั้น และมีค่า R_f เป็น 0.20, 0.50 และ 0.65 ตามลำดับ ในขณะที่ตรวจพบแถบสีโปรตีนของสารละลายโบรมิเลนก่อนเพิ่มความบริสุทธิ์มีจำนวนมากถึง 7 แถบ (R_f เท่ากับ 0.20, 0.24, 0.38, 0.44, 0.49, 0.66 และ 0.82) แสดงให้เห็นว่าเทคนิคนี้อาจเหมาะสำหรับการเพิ่มความบริสุทธิ์ของโบรมิเลน

รูปที่ 20 และตารางที่ 8

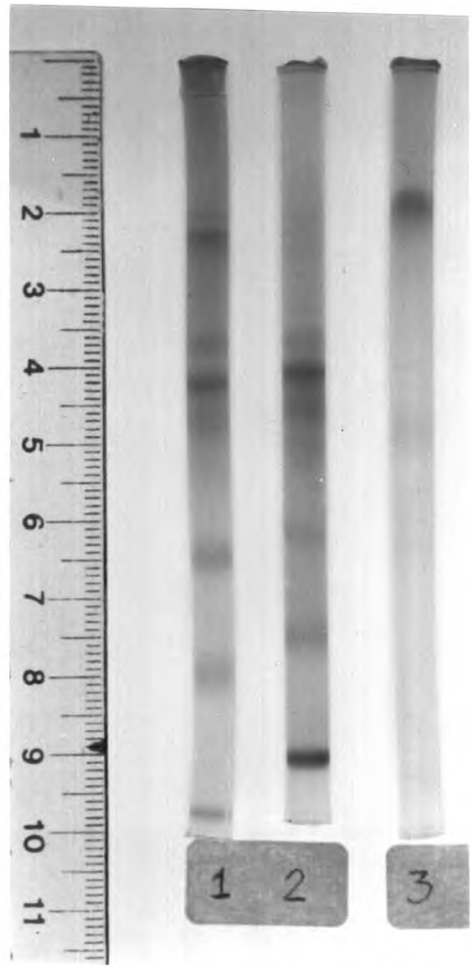
แสดงผลการศึกษารูปแบบของการแยกสารละลายเอนไซม์จากผงโบรมิเลน ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกรดโพลีอะไคร์ลิค ให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น ด้วยคอลัมน์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส (ขนาด 2.5×10 ซม.)ชะโบรมิเลน ด้วยเกรเดียนท์แบบเส้นตรงของโพแตสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0-0.5 โมลาร์ ใน 0.01 โมลาร์ ซิเตรทบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 ด้วย อัตราเร็วของการไหล 50 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บแฟรคชันละ 10 มล. ที่ 4 องศาเซลเซียส รวมแฟรคชันที่มีแอคติวิตีของโบรมิเลนสูงนำไป ตกตะกอนด้วยอะซีโตน ตรวจสอบแอคติวิตี และปริมาณโปรตีนของผง โบรมิเลนที่เตรียมได้

รูปที่ 20



ตารางที่ 8

ขั้นตอน	แอคติวิตีทั้งหมด (×10⁶ซีดียู)	โปรตีนทั้งหมด (×10³มก.)	แอคติวิตีที่เหลือ (%)	แอคติวิตีจำเพาะ (×10³ซีดียู/มก.โปรตีน)	เอนไซม์แอคติวิตี (ซีดียู/มก.ผง)
ผงโบรมิเลน	6.86	2.50	100	2.74	2,145
คาร์บอกซีเมทธิล-เซลลูโลส (.01โมลาร์ ซิเตรท)	0.14	0.52	2.1	0.27	-
คาร์บอกซีเมทธิล-เซลลูโลส (0-0.5 โมลาร์ โพแตสเซียมคลอไรด์)	2.58	0.81	37.6	3.19	-
อะซีโตน	2.10	0.66	36.9	3.18	2,222



รูปที่ 21 การศึกษาความบริสุทธิ์ของโบรมิเลนหลังจากที่เพิ่มความบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส โดยใช้เทคนิคโพลีอะไคร์ละไมด์ เจลย้อมสีโปรตีนด้วยคูมาสซี บริลเลียนท์บลู

1. โบรมิเลนก่อนเพิ่มความบริสุทธิ์ (จากผงโบรมิเลนที่เตรียมด้วยกรดโพลีอะไคร์ลิค) (100 ไมโครกรัม)
2. องค์ประกอบที่หนึ่งของโบรมิเลนซึ่งได้จากการชะด้วยซิเตรท-บัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ (100 ไมโครกรัม)
3. องค์ประกอบที่สองของโบรมิเลนที่แยกโดยการชะด้วยสาร-ละลายผสมโพแตสเซียมคลอไรด์ (เกรเดียนท์เส้นตรง) ความเข้มข้น 0-0.5 โมลาร์ ใน 0.01 โมลาร์ซิเตรท-บัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 (100 ไมโครกรัม)

3.5.3 วิธี gel filtration

นำผงโบรมิเลนที่เตรียมด้วยกรดโพลีอะไคร์ลิคมาละลายน้ำ เซนตริฟิวส์แยกส่วนสารละลายใส นำมาผ่านลงในคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 100 ซึ่งทำให้สมดุลย์อยู่ด้วยซิเตรทบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ เก็บแฟรคชันและวัดแอคติวิตีของโบรมิเลน ตามวิธีข้อ 2.4.1 ผลการทดลอง (รูปที่ 22) พบองค์ประกอบของโบรมิเลน 1 พีคที่มีแอคติวิตีของโบรมิเลนอยู่ประมาณ 58 เปอร์เซนต์ และเมื่อนำองค์ประกอบส่วนนี้ไปตกตะกอนด้วยอะซีโตน จะได้ผงโบรมิเลนที่มีแอคติวิตีต่อมิลลิกรัมผงเพิ่มสูงประมาณ 1,980 หน่วยซีดียู แอคติวิตีจำเพาะของโบรมิเลน 1.80×10^{3} หน่วยซีดียูต่อมิลลิกรัมโปรตีน และการเพิ่มความบริสุทธิ์ของผงโบรมิเลนด้วยวิธีข้างต้นนี้สามารถเตรียมได้ผงโบรมิเลนประมาณ 0.6 กรัมจากผงโบรมิเลนเริ่มต้น 1 กรัม (ตารางที่ 9)

ผลการศึกษาความบริสุทธิ์ของโบรมิเลนที่แยกได้โดยใช้เทคนิคโพลีอะไคร์ละไมด์เจล ตามวิธีข้อ 2.6 (รูปที่ 23) ผลปรากฏว่าพบจำนวนแถบสีโปรตีนลดลงเหลือเพียง 5 แถบซึ่งมีค่า R_f 0.39, 0.45, 0.49, 0.67 และ 0.81 ตามลำดับ (โบรมิเลนก่อนเพิ่มความบริสุทธิ์มีจำนวนแถบสีโปรตีน 7 แถบที่มี R_f เป็น 0.20, 0.24, 0.38, 0.44, 0.49, 0.66 และ 0.82) แสดงให้เห็นว่าผงโบรมิเลนที่เตรียมได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นกว่าเดิม

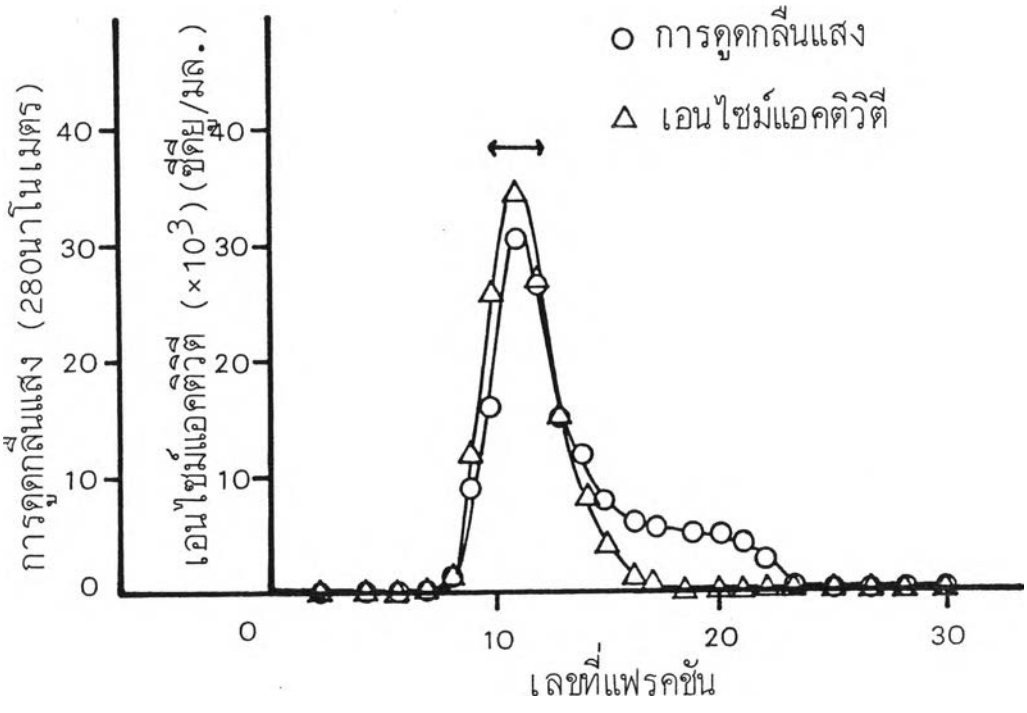
3.5.4 วิธี ion exchange และ gel filtration

การเพิ่มความบริสุทธิ์ของผงโบรมิเลนที่เตรียมโดยการตกตะกอนด้วยกรดโพลีอะไคร์ลิคอีกวิธีหนึ่ง ทำได้โดยผ่านสารละลายโบรมิเลนลงในคอลัมน์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส ชะสารละลายเอนไซม์ด้วย 0.01 โมลาร์ ซิเตรทบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 จนกระทั่งไม่มีโปรตีนออกมาอีกแล้ว หลังจากนั้นชะด้วยสารละลายผสมโพแตสเซียมคลอไรด์ (เกรเดียนท์เส้นตรง) ความเข้มข้น 0 ถึง 0.5 โมลาร์ ใน 0.01 โมลาร์ ซิเตรทบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อที่ 3.5.3 แยกเอาโบรมิเลนในแฟรคชันที่เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ (0.12 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์) ไปผ่านในคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 100 (ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อที่ 3.5.3) ผลปรากฏว่าได้โบรมิเลนเพียงองค์ประกอบเดียวที่มีลักษณะของรูปแบบการแยก (รูปที่ 24) และเมื่อนำองค์ประกอบนี้ไปตกตะกอนโบรมิเลนด้วยอะซีโตน จะได้ผงโบรมิเลนที่มีแอคติวิตีต่อ

รูปที่ 22 และตารางที่ 9

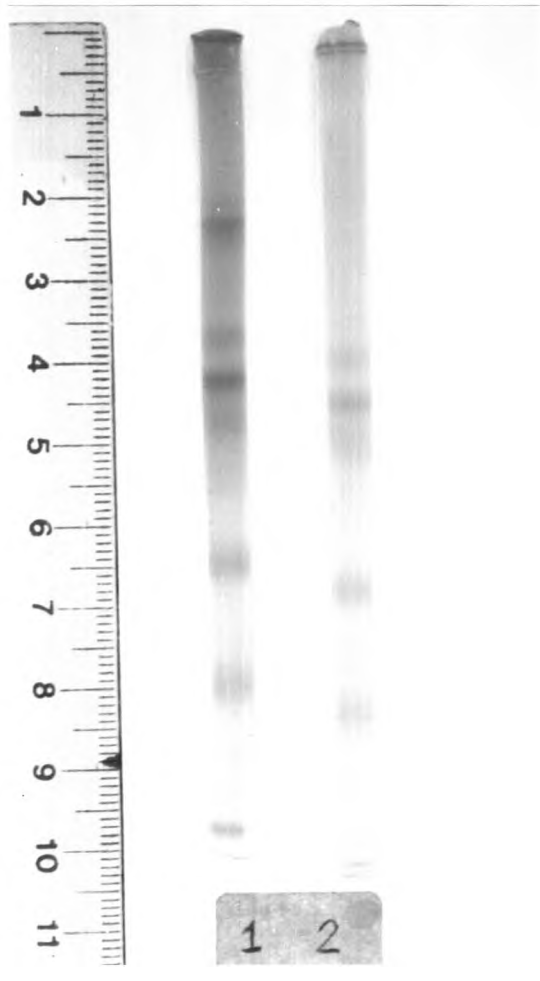
แสดงผลการศึกษารูปแบบของการแยกสารละลายเอนไซม์จากผงโบรมิเลนที่เตรียมด้วยกรดโพลีอะไคร์ลิค ให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นด้วยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 100 (ขนาด 2.5×35 ซม.) ซึ่งทำให้สมดุลย์อยู่ด้วยซิเตรทบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ที่ 4 องศาเซลเซียส เก็บแฟรคชันละ 10 มิลลิลิตร ด้วยอัตราการไหล 70 มล./ชม. แล้วรวมแฟรคชันที่มีแอคติวิตีของโบรมิเลนสูง นำไปตกตะกอนด้วยอะซีโตน ตรวจสอบแอคติวิตี และปริมาณโปรตีนของผงโบรมิเลนที่เตรียมได้

รูปที่ 22



ตารางที่ 9

ขั้นตอน	แอคติวิตีทั้งหมด (×10⁶ชีคียู)	โปรตีนทั้งหมด (×10³มก.)	แอคติวิตีที่เหลือ (%)	แอคติวิตีจำเพาะ (×10³ชีคียู/มก.โปรตีน)	เอนไซม์แอคติวิตี (ชีคียู/มก.ผง)
ผงโบรมิเลน	1.79	1.20	100	1.50	1,628
เซฟาเดกซ์	1.23	0.69	58.0	1.77	-
อะซีโตน	1.22	0.68	57.2	1.80	1,980



รูปที่ 23 การศึกษาความบริสุทธิ์ของโบรมิเลนที่แยกให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น โดยผ่านคอลัมน์เซฟาเดกซ์จี 100 เมื่อใช้เทคนิคโพลีอะไคร์ละไมด์ เจล แล้วย้อมสีโปรตีนด้วยคูมาสซีบริลเลียนท์บลู

1. โบรมิเลนก่อนทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น (จากผงโบรมิเลนที่เตรียมด้วยกรดโพลีอะไคร์ลิค) (100 ไมโครกรัม)
2. โบรมิเลนที่แยกจากคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 100 (100 ไมโครกรัม)

มิลลิกรัมผงสูงถึง 2,255 หน่วยซีดียู แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์เพิ่มขึ้นมีค่าประมาณ 3.53×10^{3} หน่วยซีดียูต่อมิลลิกรัมโปรตีน สามารถแยกเอนไซม์แอคติวิตีออกมาได้ประมาณ 16.5 เปอร์เซนต์ของแอคติวิตีเริ่มต้น และแยกได้ผงโบรมิเลนประมาณ ๐.2 กรัม จากผงโบรมิเลนเริ่มต้น 1 กรัมก่อนนำมาเพิ่มความบริสุทธิ์ (ตารางที่ 1๐)

เมื่อศึกษาความบริสุทธิ์ของโบรมิเลนในแต่ละขั้นตอนของการแยกให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นด้วยวิธีดังกล่าวข้างต้น โดยติดตามรูปแบบของโปรตีนที่ได้จากเทคนิคของโพลีอะไครล์ละไมด์เจล อิเลคโตรโฟริซิส ผลปรากฏว่าสามารถตรวจพบจำนวนแถบสีของโปรตีนลดลงจาก 7 แถบ เป็น 3 แถบ และ 2 แถบจากโบรมิเลนที่แยกได้แต่ละขั้นตอนตามลำดับ (รูปที่ 25) โดยที่ค่า R_f ของโบรมิเลนก่อนเพิ่มความบริสุทธิ์มีค่าเป็น ๐.21, ๐.24, ๐.38, ๐.44, ๐.49, ๐.66 และ ๐.82 ค่า R_f ของโบรมิเลนที่ผ่านคอลัมน์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสมีค่าเป็น ๐.21, ๐.5๐ และ ๐.65 และค่า R_f ของโบรมิเลนหลังจากที่ผ่านทั้งคอลัมน์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส และคอลัมน์เซฟาเดกซ์จี 1๐๐ มีค่าเป็น ๐.52 ซึ่งเป็นแถบที่เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ และแถบที่จางมากมีค่า ๐.66 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่ามีการเพิ่มความบริสุทธิ์ของโบรมิเลนเกิดขึ้นในแต่ละขั้นตอนการแยกที่ใช้ในวิธีข้างต้น

3.6 <u>การศึกษาความเสถียรของผงโบรมิเลนที่มีความบริสุทธิ์สูง</u>

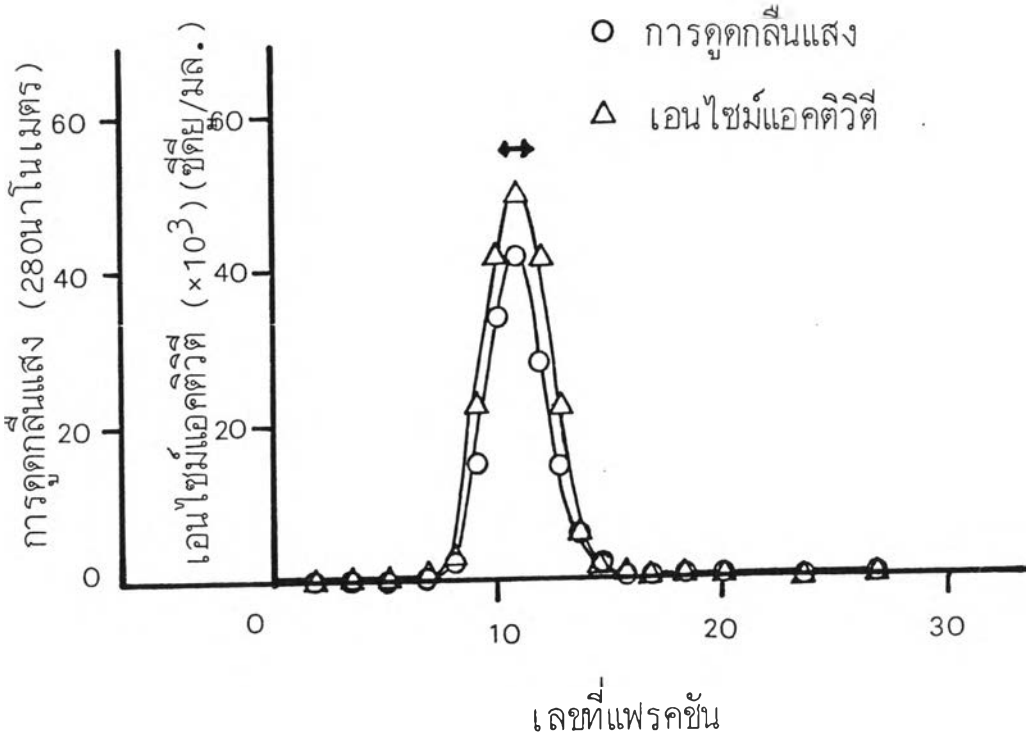
นำผงโบรมิเลนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกรดโพลีอะไครล์ลิคไปเพิ่มความบริสุทธิ์ด้วยวิธีต่าง ๆ คือ เทคนิคอุลตราฟิลเตรชัน (การทดลองข้อ 3.5.1) คอลัมน์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส (การทดลองข้อ 3.5.2) คอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 1๐๐ (การทดลองข้อ 3.5.3) ทั้งคอลัมน์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสและคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 1๐๐ (การทดลองข้อ 3.5.4) แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ในเดสซิเคเตอร์ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นติดตามวัดแอคติวิตีของโบรมิเลน เปรียบเทียบกับแอคติวิตีของผงโบรมิเลนก่อนเพิ่มความบริสุทธิ์ และเก็บรักษาไว้ ณ อุณหภูมิเดียวกัน เป็นระยะ ๆ จนครบ 9๐ วัน

จากผลการทดลอง (รูปที่ 26) จะเห็นได้ว่าผงโบรมิเลนที่เพิ่มความบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 1๐๐ มีความเสถียรสูงที่สุด พบว่าเกือบไม่มีการสูญเสียแอคติวิตีของโบรมิเลนเลยในช่วง 5๐ วันแรก หลังจากนั้นแอคติวิตีจึงลดลงเล็กน้อย (แอคติวิตี

รูปที่ 24 และตารางที่ 10

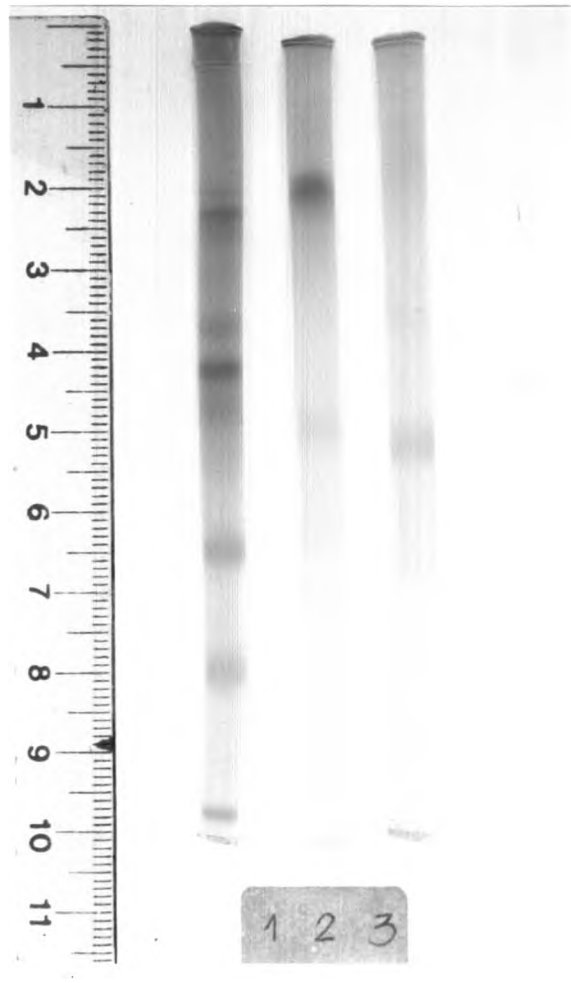
แสดงผลการศึกษาและรูปแบบการเพิ่มความบริสุทธิ์ของโบรมิเลนที่แยกได้จากคอลัมน์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส แล้วนำมาผ่านต่อในคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 100 (ขนาด 2.5×35 ซม.) ชะโบรมิเลนด้วย 0.01 โมลาร์ ซิเตรทบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 อัตราการไหล 70 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียส เก็บแฟรคชั่นละ 10 มิลลิลิตร

รูปที่ 24



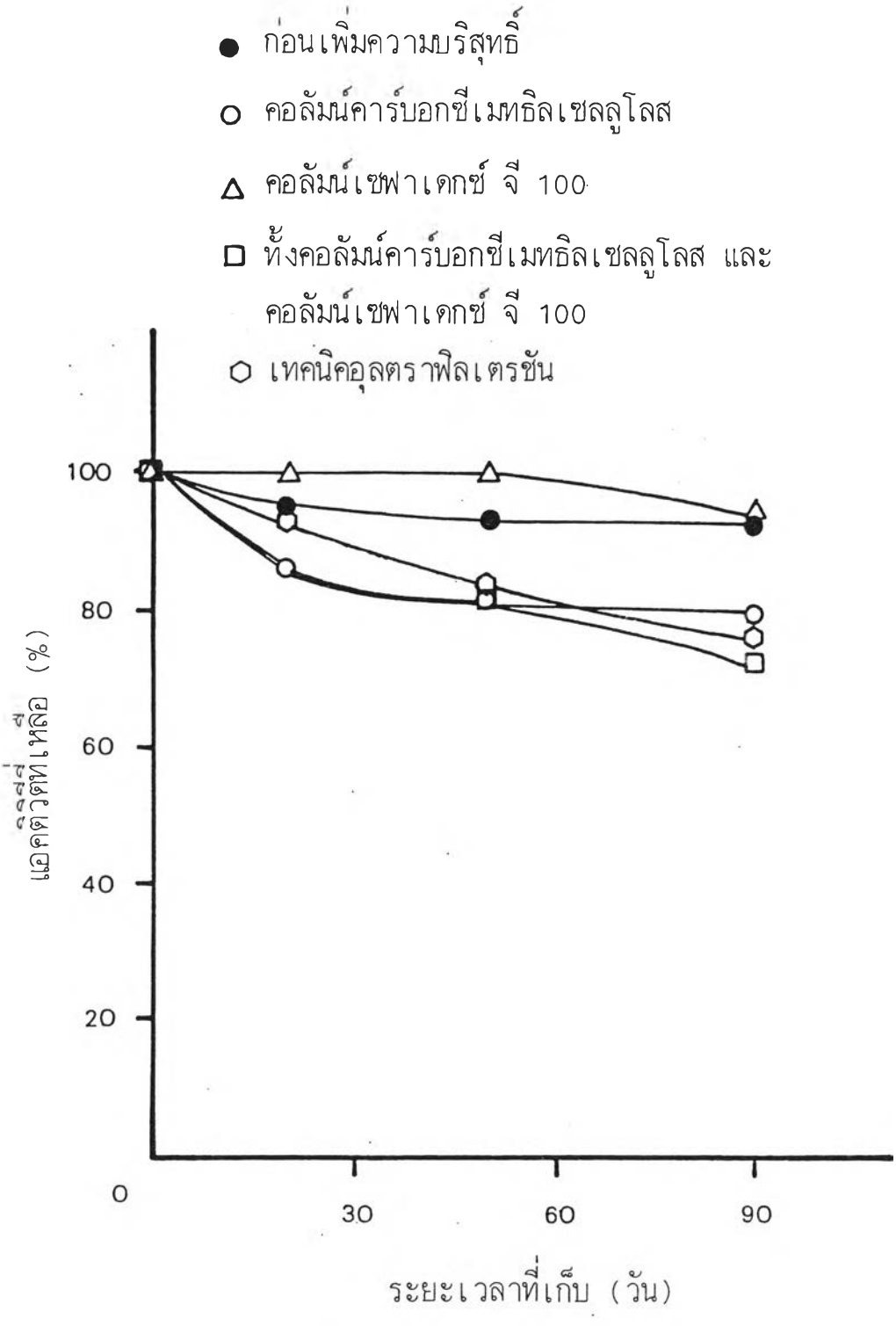
ตารางที่ 10

ขั้นตอน	แอคติวิตีทั้งหมด ($\times 10^6$ ซีดียู)	โปรตีนทั้งหมด ($\times 10^3$ มก.)	แอคติวิตีที่เหลือ (%)	แอคติวิตีจำเพาะ ($\times 10^3$ ซีดียู/มก.โปรตีน)	เอนไซม์แอคติวิตี (ซีดียู/มก.ผง)
ผงโบรมิเลน	6.86	2.49	100	2.76	2,145
คาร์บอกซีเมทธิล-เซลลูโลส	2.58	0.81	37.6	3.19	-
เซฟาเดกซ์ จี100	1.17	0.33	17.1	3.55	-
อะซีโตน	1.13	0.32	16.5	3.53	2,255



รูปที่ 25 การศึกษาความบริสุทธิ์ของโบรมิเลนที่ผ่านการเพิ่มความบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์คาร์บอกซีเมทธิล เซลลูโลส และคอมลัมน์เซฟาเดกซ์จี 100 โดยใช้เทคนิคโพลีอะไคร์ละไมด์เจล (วิธีข้อ 2.6) แล้วย้อมสีโปรตีนด้วยคูมาสซีบริลเลียนท์บลู

1. โบรมิเลนก่อนทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น (จากผงโบรมิเลนที่เตรียมด้วยกรดโพลีอะไคร์ลิค) (100 ไมโครกรัม)
2. โบรมิเลนที่แยกจากคอลัมน์คาร์บอกซีเมทธิล เซลลูโลส (100 ไมโครกรัม)
3. โบรมิเลนที่แยกจากคอลัมน์เซฟาเดกซ์จี 100 (100 ไมโครกรัม)



รูปที่ 26 เปรียบเทียบความเสถียรของผงโบรมิเลนก่อนเพิ่มความบริสุทธิ์และหลังจากนำไปเพิ่มความบริสุทธิ์ให้สูงขึ้นด้วยเทคนิคต่าง ๆ กัน หลังจากนั้นเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ติดตามวัดแอคติวิตีที่ช่วงเวลาต่าง ๆ กัน จนครบ 90 วัน

เหลือประมาณ 93 เปอร์เซนต์) ในขณะที่การเพิ่มความบริสุทธิ์ด้วยวิธีอื่น ๆ มีรูปแบบของการสูญเสียแอคติวิตีที่คล้ายกัน แอคติวิตีจะลดลงอย่างรวดเร็วในระยะการเก็บ 20 วันแรกจนเหลือแอคติวิตีประมาณ 72-80 เปอร์เซนต์เมื่อเก็บนาน 90 วัน เช่นเดียวกันกับผงโบรมิเลนที่ไม่ได้ผ่านขั้นตอนเพิ่มความบริสุทธิ์จะมีแอคติวิตีลดลงในช่วง 20 วันแรกเช่นกัน แต่แอคติวิตีลดลงในปริมาณที่น้อยกว่า (แอคติวิตีลดลงเพียง 8 เปอร์เซนต์) แล้วหลังจากนั้นแอคติวิตีของโบรมิเลนจะลดลงน้อยมากจนมีค่าค่อนข้างคงที่ เป็นที่น่าสังเกตได้ว่า การเพิ่มความบริสุทธิ์ของผงโบรมิเลนไม่มีผลต่อการเพิ่มความเสถียรของโบรมิเลนเมื่อเก็บรักษาไว้ในสภาวะที่กำหนดนั้นาน 90 วัน ในทางตรงกันข้ามผงโบรมิเลนที่ได้จากการเพิ่มความบริสุทธิ์บางวิธีอาจมีแนวโน้มของการลดความเสถียรลงกว่าเดิม

3.7 <u>การศึกษาสมบัติทางกายภาพและจลนศาสตร์ของโบรมิเลน</u>

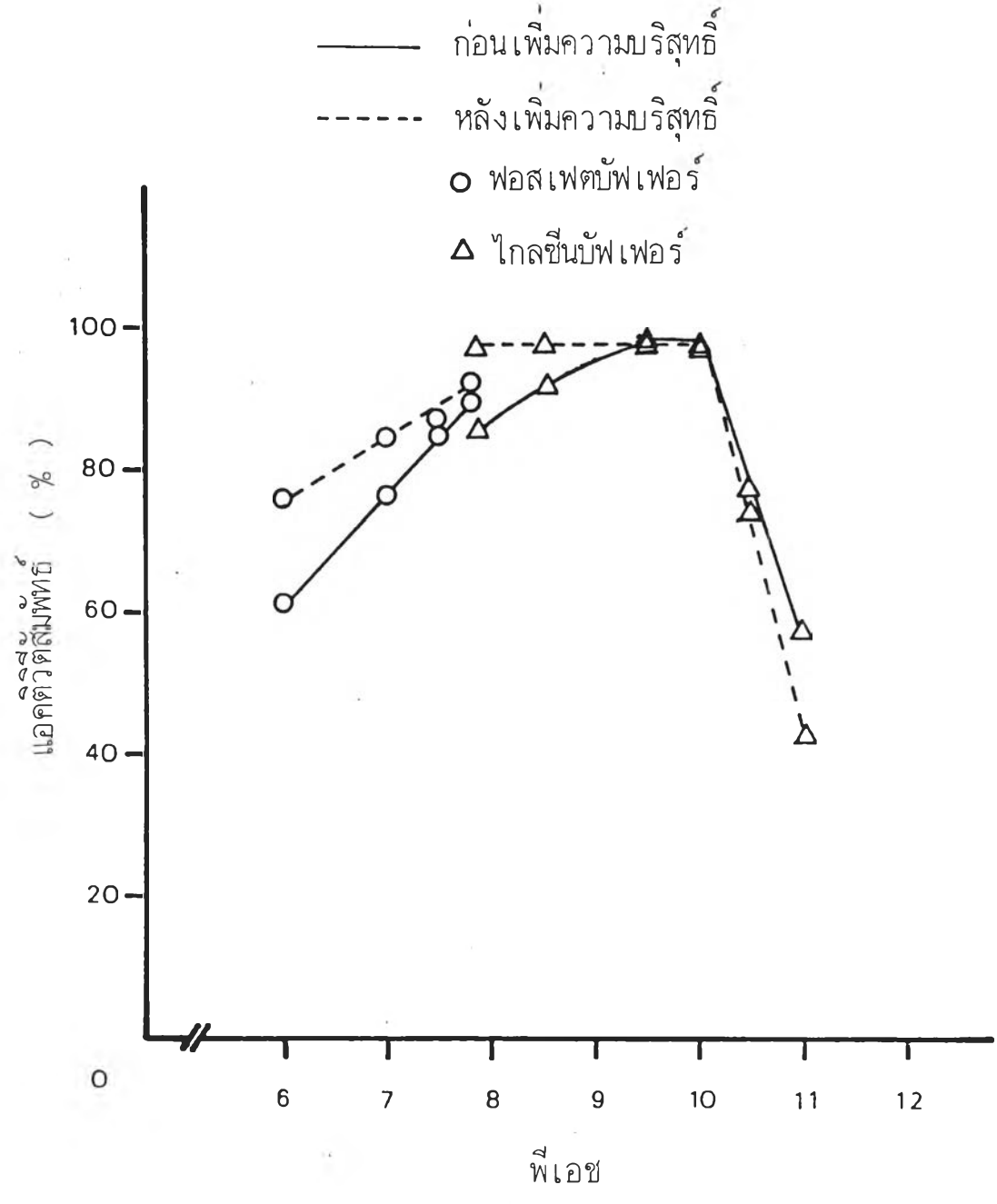
3.7.1 <u>ผลกระทบของพีเอชต่อการทำงานของโบรมิเลน</u>

ใช้สารละลายผงโบรมิเลนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกรดโพลีอะไคร์ลิคและสารละลายโบรมิเลนซึ่งมีความบริสุทธิ์สูงที่ได้จากการเพิ่มความบริสุทธิ์ผงโบรมิเลนด้วยคอลัมน์คาร์บ๊อกซีเมทธิลเซลลูโลส ตามด้วยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 100 จากการทดลองข้อ 3.5.4 นำมาวัดแอคติวิตีของโบรมิเลนเมื่อให้ทำปฏิกิริยากับเคซีนที่พีเอชต่าง ๆ ในช่วง 6-11.0 (พีเอช 6 ถึง 8 ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์) (พีเอช 8 ถึง 11.0 ใช้ไกลซีนบัฟเฟอร์) ตามวิธีข้อ 2.4.1

ผลการทดลอง (รูปที่ 27) แสดงให้เห็นว่าพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของผงโบรมิเลนที่เตรียมได้จากกรดโพลีอะไคร์ลิคจะอยู่ในช่วงพีเอชที่เป็นด่างคือพีเอชประมาณ 9-10 ในขณะที่มีแนวโน้มว่าพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของโบรมิเลนซึ่งมีความบริสุทธิ์สูงจะมีช่วงพีเอชของการทำงานที่เหมาะสมกว้างกว่าเล็กน้อย คือประมาณช่วงของพีเอชระหว่าง 8 ถึง 10

3.7.2 <u>ผลกระทบของอุณหภูมิต่อการทำงานของโบรมิเลน</u>

เตรียมสารละลายจากผงโบรมิเลนที่ตกตะกอนด้วยกรดโพลีอะไคร์ลิคและสารละลายโบรมิเลนซึ่งมีความบริสุทธิ์สูงที่ได้จากการเพิ่มความบริสุทธิ์ของผงโบรมิเลนด้วยคอลัมน์คาร์บ๊อกซีเมทธิลเซลลูโลส ตามด้วยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 100 (การทดลอง



รูปที่ 27 ผลกระทบของพีเอชต่อแอคติวิตีของผงโบรมิเลนที่เตรียมโดยวิธีโพลีอะไครล์คและโบรมิเลนที่มีความบริสุทธิ์สูง วัดแอคติวิตีของโบรมิเลนที่ 37 องศาเซลเซียส ในสารละลายบัฟเฟอร์ (0.05 โมล/ลิตร) พีเอชต่าง ๆ คือ 6.0 - 8.0 (ฟอสเฟตบัฟเฟอร์) และ 8.0 - 11.0 (ไกลซีนบัฟเฟอร์) ตามวิธีข้อ 2.4.1

ข้อ 3.5.4) นำมาทำปฏิกิริยากับเคซีนที่อุณหภูมิต่าง ๆ กันในระหว่าง 25-85 องศาเซลเซียส วัดผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นตามวิธีข้อ 2.4.1

ผลการทดลอง (รูปที่ 28) แสดงให้เห็นว่าผลกระทบของอุณหภูมิต่อการทำปฏิกิริยาของโบรมิเลนในทั้ง 2 แหล่งจะมีรูปแบบคล้ายคลึงกัน อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของโบรมิเลนทั้งก่อนและหลังเพิ่มความบริสุทธิ์จะมีค่าเท่ากันคือประมาณ 60- 65 องศาเซลเซียส

3.7.3 ผลกระทบของพีเอชต่อความเสถียรของโบรมิเลน

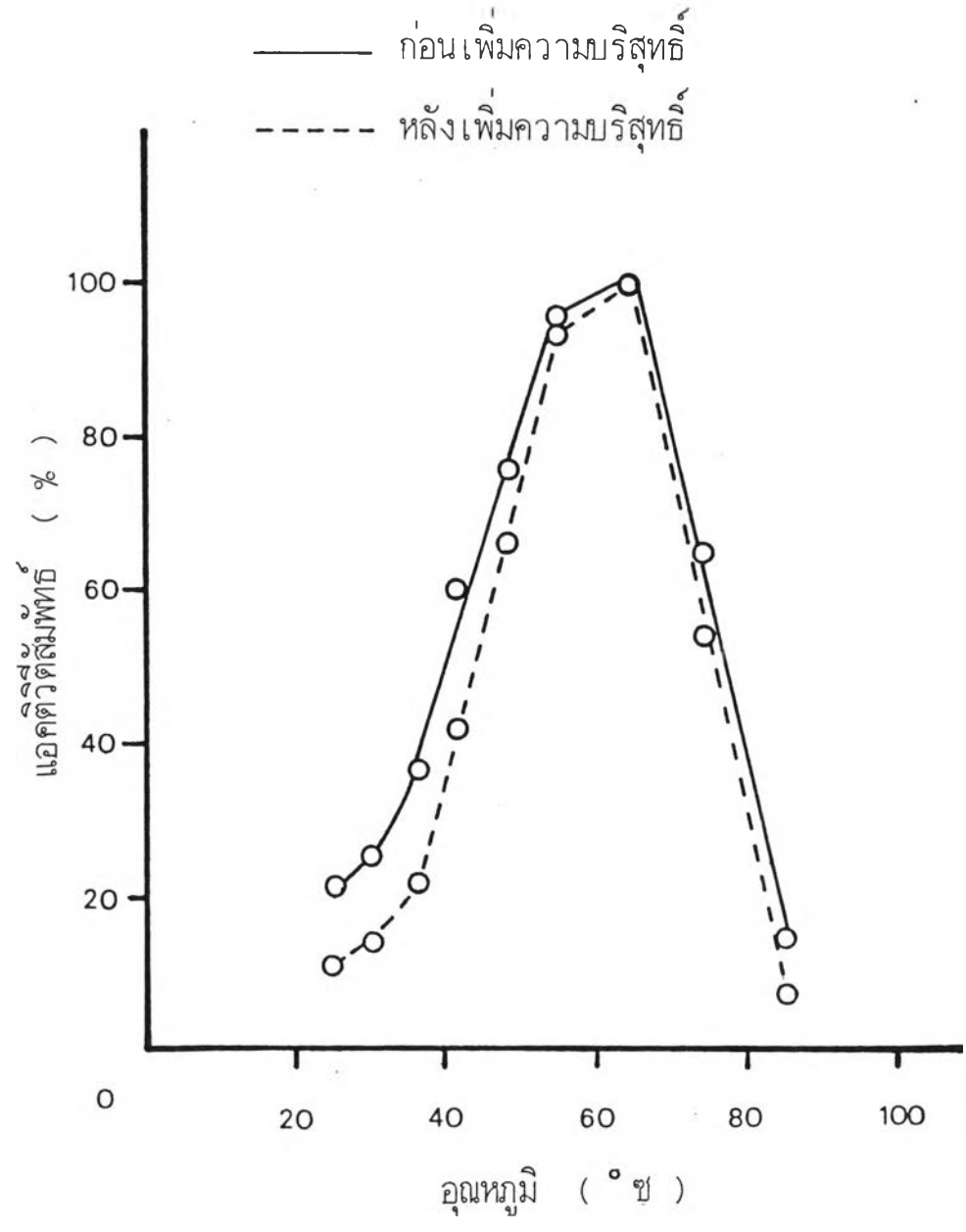
เมื่อเก็บรักษาสารละลายเอนไซม์จากผงโบรมีเลน (ตกตะกอนด้วยกรดโพลีอะไคร์ลิค) และจากผงโบรมิเลนที่เพิ่มความบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส ตามด้วยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 100 (การทดลองข้อ 3.5.4) ไว้ในสารละลายบัฟเฟอร์ (0.05 โมลาร์) ต่างชนิดที่มีพีเอชต่าง ๆ กัน คือ อะซีเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 3.0-6.0 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0-8.0 และทริส-ไฮโดรคลอริค บัฟเฟอร์ พีเอช 8.0-10.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วนำไปวิเคราะห์แอคติวิตีของโบรมิเลนที่เหลืออยู่ตามวิธีข้อ 2.4.1

จากรูปที่ 29 พบว่าความเสถียรของโบรมิเลนจะมีค่าสูงในด้านที่พีเอชค่อนไปทางเป็นกรด คือ พีเอชต่ำกว่า 7 ลงไป ถึงแม้ที่พีเอชลดลงไปถึง 3.0 เอนไซม์ก็ยังคงมีความเสถียรสูงอยู่ (แอคติวิตียังเหลือถึง 80 เปอร์เซนต์เมื่อเก็บไว้ที่พีเอชนั้นนาน 24 ชั่วโมง) แต่ถ้าพีเอชสูงกว่า 8.0 ขึ้นไปความเสถียรของโบรมิเลนต่อพีเอชจะลดลงอย่างรวดเร็ว เช่นที่พีเอช 10 จะมีแอคติวิตีเหลือเพียง 50 เปอร์เซนต์เมื่อเติมเอนไซม์ไว้ที่บัฟเฟอร์นั้นนาน 24 ชั่วโมงเท่านั้น การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นจะไม่มีผลต่อความเสถียรของโบรมิเลนต่อพีเอชแต่อย่างใด

3.7.4 ผลกระทบของอุณหภูมิต่อความเสถียรของโบรมิเลน

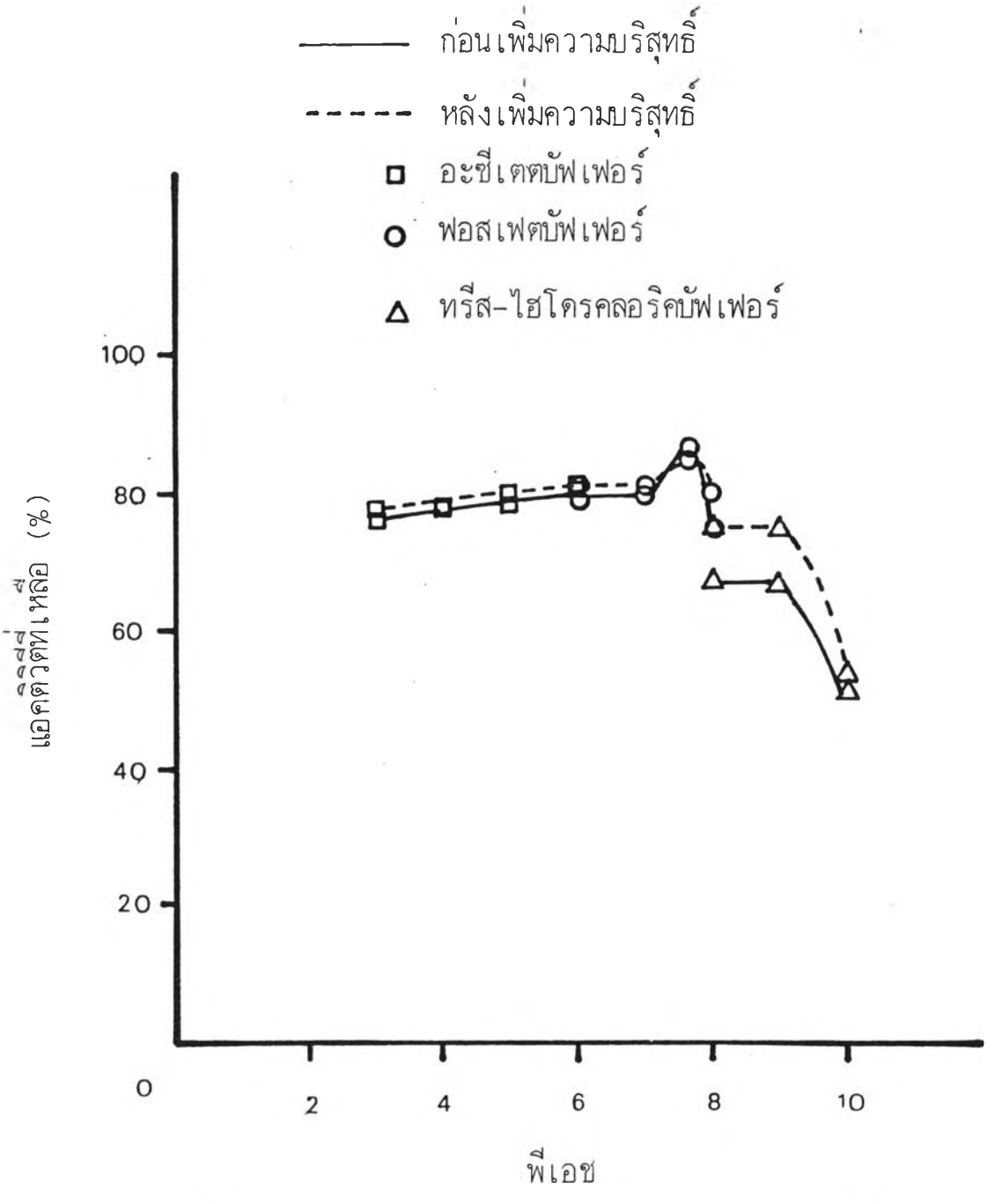
นำสารละลายเอนไซม์ของผงโบรมิเลนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกรดโพลีอะไคร์ลิค และสารละลายโบรมิเลนที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว (การทดลองข้อ 3.5.4) มาอุ่นที่อุณหภูมิ 30, 37, 50 และ 70 องศาเซลเซียส นาน 0, 0.5, 1, 2 และ 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาวัดแอคติวิตีของโบรมิเลนที่เหลืออยู่ตามวิธีข้อ 2.4.1

ผลการศึกษา (รูปที่ 30) จะเห็นได้ว่าอุณหภูมิมีผลต่อความเสถียร



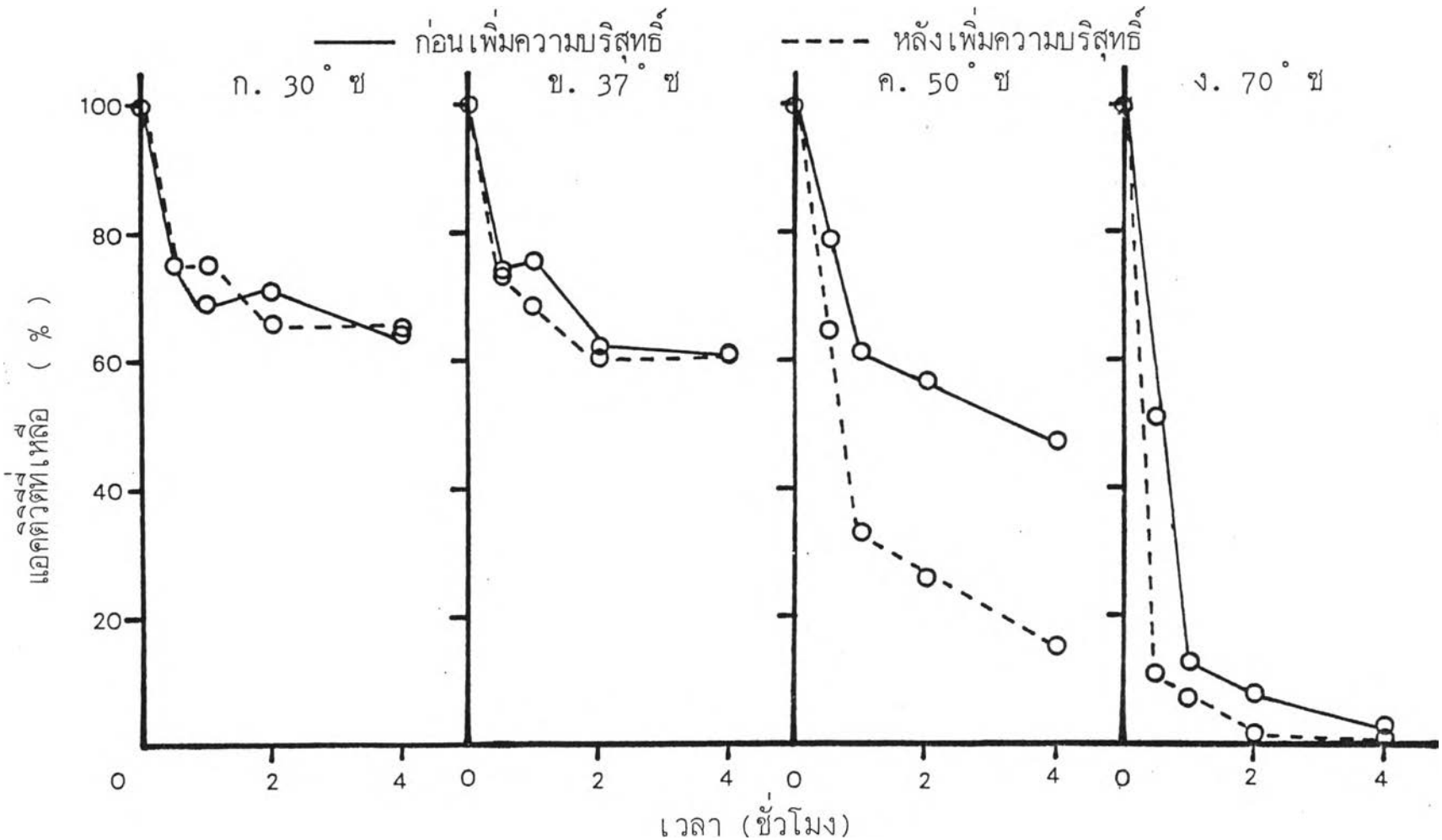
รูปที่ 28 ผลกระทบของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของผงโบรมิเลน (เตรียมด้วยกรดโพลีอะไคร์ลิค) และโบรมิเลนที่มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น วัดแอคติวิตีของโบรมิเลนที่อุณหภูมิต่าง ๆ ใน 0.05 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 .

เลขหมู่ 3531
เลขทะเบียน 1870
วันเดือนปี 24 ส.ค. 2537



รูปที่ 29 ผลของพีเอชต่อความเสถียรของผงโบรมิเลนที่ตกตะกอนด้วยกรดโพลีอะไคร์ลิคและโบรมิเลนที่มีความบริสุทธิ์สูง เมื่อละลายอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ (0.05 โมลาร์) พีเอชต่าง ๆ คือ 3.0 - 6.0 (อะซีเตตบัฟเฟอร์) 6.0 - 8.0 (ฟอสเฟตบัฟเฟอร์) 8.0 - 10.0 (ทรีส-ไฮโดรคลอริค) บัฟเฟอร์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้ววัดแอคติวิตีของโบรมิเลนที่เหลือ ตามวิธีข้อ 2.4.1

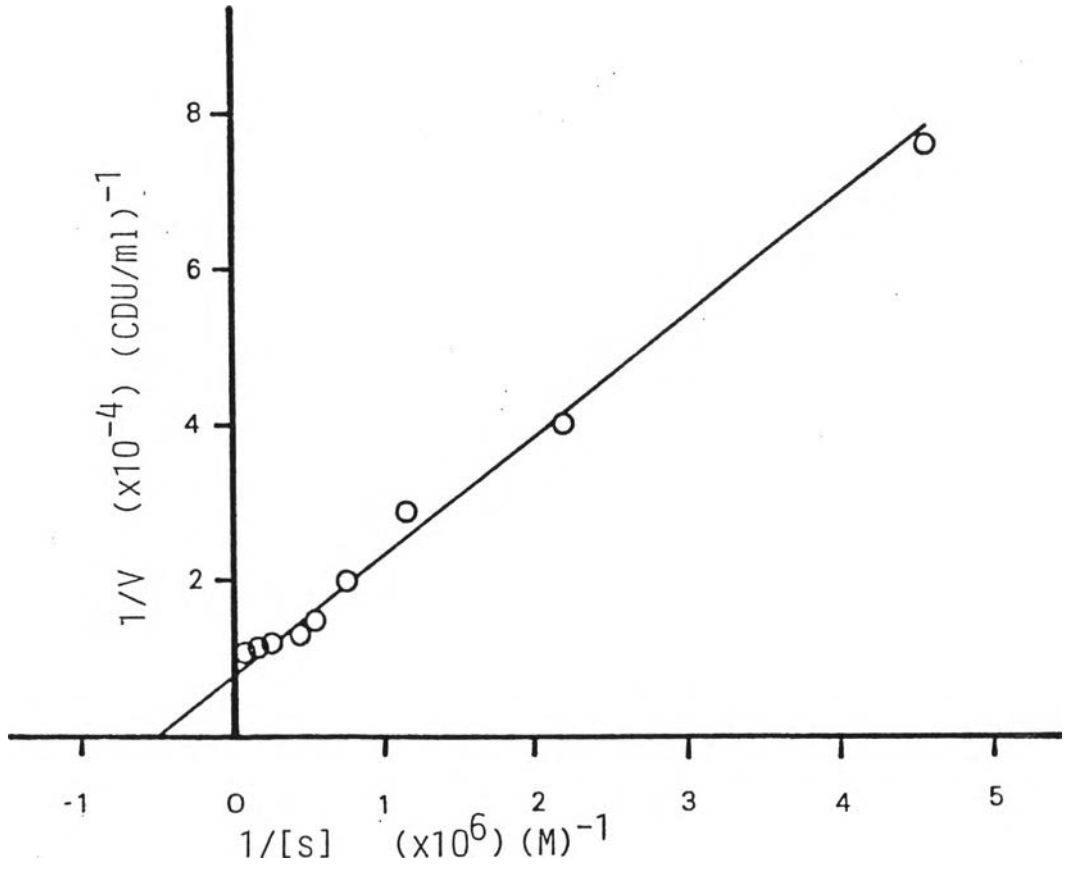
รูปที่ 30 ผลการศึกษาความเสถียรของผงโบรมิเลนที่เตรียมโดยการตกตะกอนด้วยกรดโพลีอะไครลิค และโบรมิเลนที่ทำให้บริสุทธิ์ขึ้น เมื่อทดลองเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 30, 37, 50 และ 70 องศาเซลเซียส นาน 0, 0.5, 1, 2 และ 4 ชั่วโมง วัดแอคติวิตีของโบรมิเลนที่ 37 องศาเซลเซียส ใน 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ตามวิธีข้อ 2.4.1



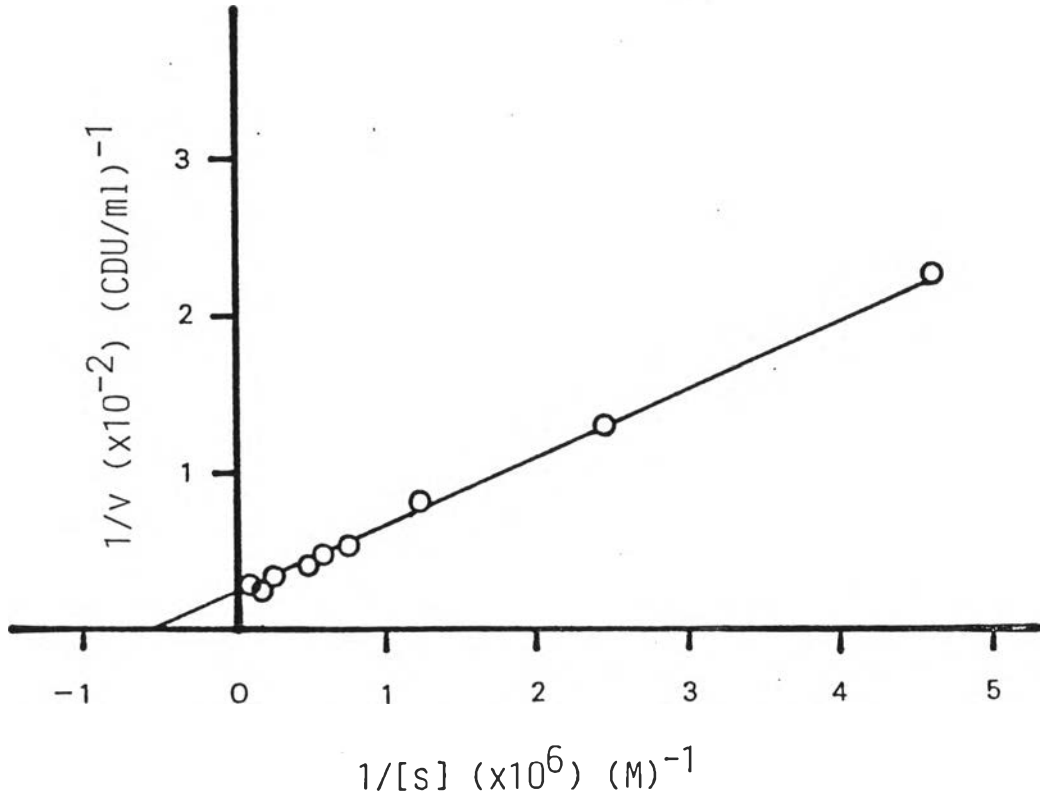
ของโบรมิเลนทั้ง 2 แหล่ง คือเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียสในช่วง 1 ชั่วโมงแรกจะสูญเสียแอคติวิตีไปประมาณ 30 เปอร์เซนต์ หลังจากนั้นจะมีค่าค่อนข้างคงที่ถึงแม้จะเก็บไว้ที่อุณหภูมินั้นนานถึง 4 ชั่วโมง (แอคติวิตีเหลืออยู่ประมาณ 60 เปอร์เซนต์) เมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นเป็น 50 องศาเซลเซียส โบรมิเลนทั้ง 2 แหล่งจะมีแอคติวิตีลดลงอย่างรวดเร็ว แต่โบรมิเลนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกรดโพลีอะไคร์ลิคจะมีความเสถียรสูงกว่าโบรมิเลนที่มีความบริสุทธิ์สูง ดังจะเห็นได้จากแอคติวิตีของโบรมิเลนที่ตกตะกอนด้วยกรดโพลีอะไคร์ลิคจะลดลงเหลือประมาณ 50 เปอร์เซนต์ เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมินี้นาน 1 ชั่วโมง ในขณะที่โบรมิเลนซึ่งมีความบริสุทธิ์สูงกว่าจะมีแอคติวิตีลดลงไป 50 เปอร์เซนต์ เมื่อเก็บไว้ที่สภาวะเดียวกันนี้นานครึ่งชั่วโมงเท่านั้น เช่นเดียวกันที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เอนไซม์จากทั้ง 2 แหล่งสูญเสียแอคติวิตีไปเกือบหมดเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมินี้นาน 1 ชั่วโมง(มีแอคติวิตีของโบรมิเลน เหลือเพียง 5 เปอร์เซนต์ และ 10 เปอร์เซนต์ สำหรับโบรมิเลนที่มีความบริสุทธิ์สูงกับโบรมิเลนที่ตกตะกอนด้วยกรดโพลีอะไคร์ลิคตามลำดับ)

3.7.5 <u>ผลกระทบของความเข้มข้นของสับสเตรทเคซีนต่อแอคติวิตีของโบรมิเลน</u>

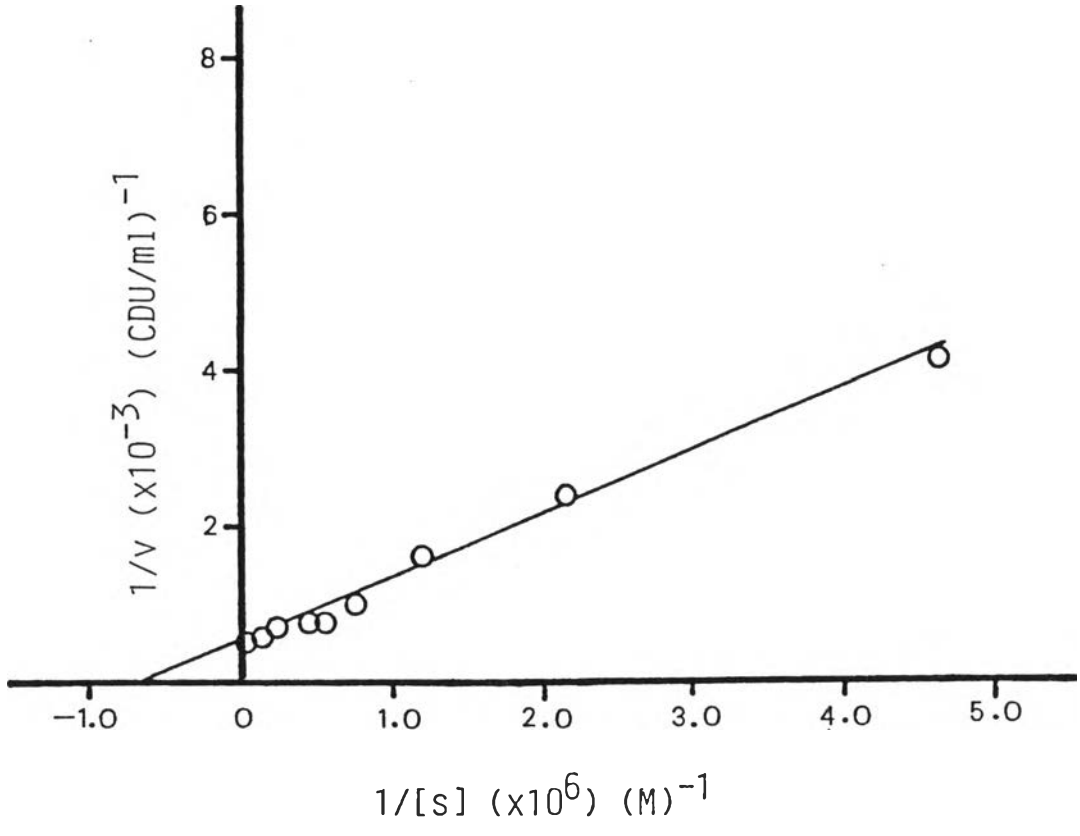
เมื่อวัดแอคติวิตีของโบรมิเลน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสตามวิธีข้อ 2.4.1 โดยแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของเคซีน ตั้งแต่ 2.17×10^{-7} ถึง 133×10^{-7} โมลาร์ พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างส่วนกลับของความเข้มข้นของเคซีนต่อส่วนกลับของแอคติวิตีโบรมิเลนจากส่วนน้ำคั้นของต้นสับปะรด (เตรียมตามวิธีข้อ 2.7) จากผงโบรมิเลนที่เตรียมโดยวิธีตกตะกอนด้วยอะซีโตน (วิธีทดลองข้อ 2.8) จากผงโบรมิเลนที่เตรียมโดยวิธีตกตะกอนด้วยกรดโพลีอะไคร์ลิค (วิธีทดลองข้อ 2.9) และผงโบรมิเลนที่มีความบริสุทธิ์สูง (การทดลองข้อ 3.5.4) โดย Lineweaver-Burk plot มีลักษณะดังรูปที่ 31, 32, 33 และ 34 ตามลำดับ เมื่อคำนวณค่า K_m ของโบรมิเลนจะได้ค่า K_m ที่ได้จากแหล่งต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญคือมีค่า 2.0×10^{-5}, 1.67×10^{-5}, 1.43×10^{-5} และ 1.11×10^{-5} โมลาร์ สำหรับโบรมิเลนจากน้ำคั้นต้นสับปะรด ผงโบรมิเลนเตรียมด้วยอะซีโตน ผงโบรมิเลนเตรียมด้วยกรดโพลีอะไคร์ลิค และผงโบรมิเลนที่มีความบริสุทธิ์สูงตามลำดับ



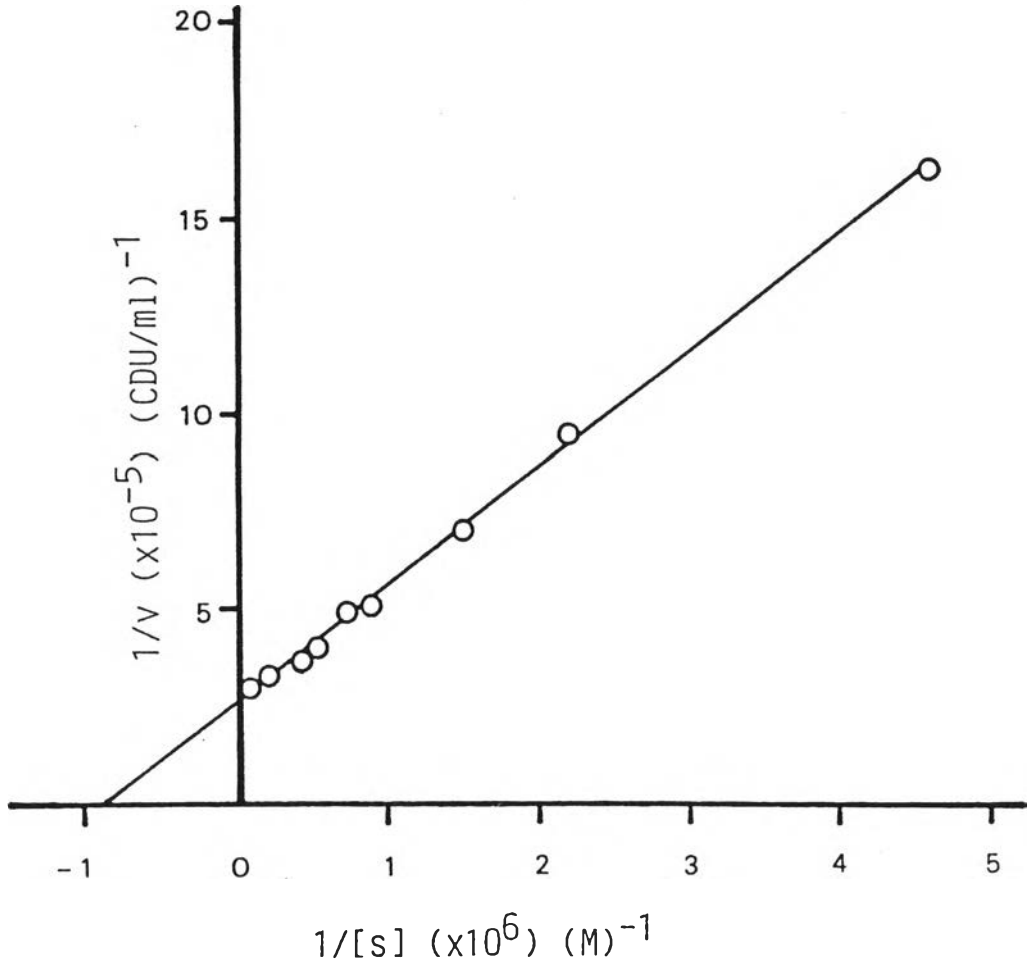
รูปที่ 31 Lineweaver - Burk Plot ของเอนไซม์โบรมิเลนจากน้ำคั้นของต้นสับปะรด (เตรียมตามวิธีข้อ 2.7) กับความเข้มข้นของสับสเตรทเคซีน วัดแอคติวิตีตามวิธีข้อ 2.4.1 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้เคซีนความเข้มข้นต่าง ๆ กันตั้งแต่ 2.17×10^{-7} ถึง 133×10^{-7} โมลาร์



รูปที่ 32 Lineweaver-Burk Plot ของโบรมิเลนที่เตรียมโดยการตกตะกอนด้วยอะซีโตน (วิธีข้อ 2.8) กับความเข้มข้นของสับสเตรทเคซีน วัดแอคติวิตีของโบรมิเลน ตามวิธีข้อ 2.4.1 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้เคซีนความเข้มข้นต่าง ๆ กันตั้งแต่ 2.17×10^{-7} ถึง 133×10^{-7} โมลาร์



รูปที่ 33 Linewever-Burk Plot ของโบรมิเลนที่เตรียมโดยการตกตะกอนด้วยกรดโพลีอะไครลิค (วิธีข้อ 2.9) กับความเข้มข้นสับสเตรทเคซีน วัดแอคติวิตีของโบรมิเลน ตามวิธีข้อ 2.4.1 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้เคซีนความเข้มข้นต่าง ๆ กันตั้งแต่ 2.17×10^{-7} ถึง 133×10^{-7} โมลาร์



รูปที่ 34 Lineweaver-Burk Plot ของโบรมิเลนที่มีความบริสุทธิ์สูง (การทดลองข้อ 3.5.4) กับความเข้มข้นสับสเตรทเคซีน วัดแอคติวิตีของโบรมิเลนตามวิธีข้อ 2.4.1 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้เคซีนความเข้มข้นแตกต่างกันตั้งแต่ 2.17×10^{-7} ถึง 133×10^{-7} โมลาร์

3.8 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงโบรมิเลนด้วยคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส (CM-cellulose)

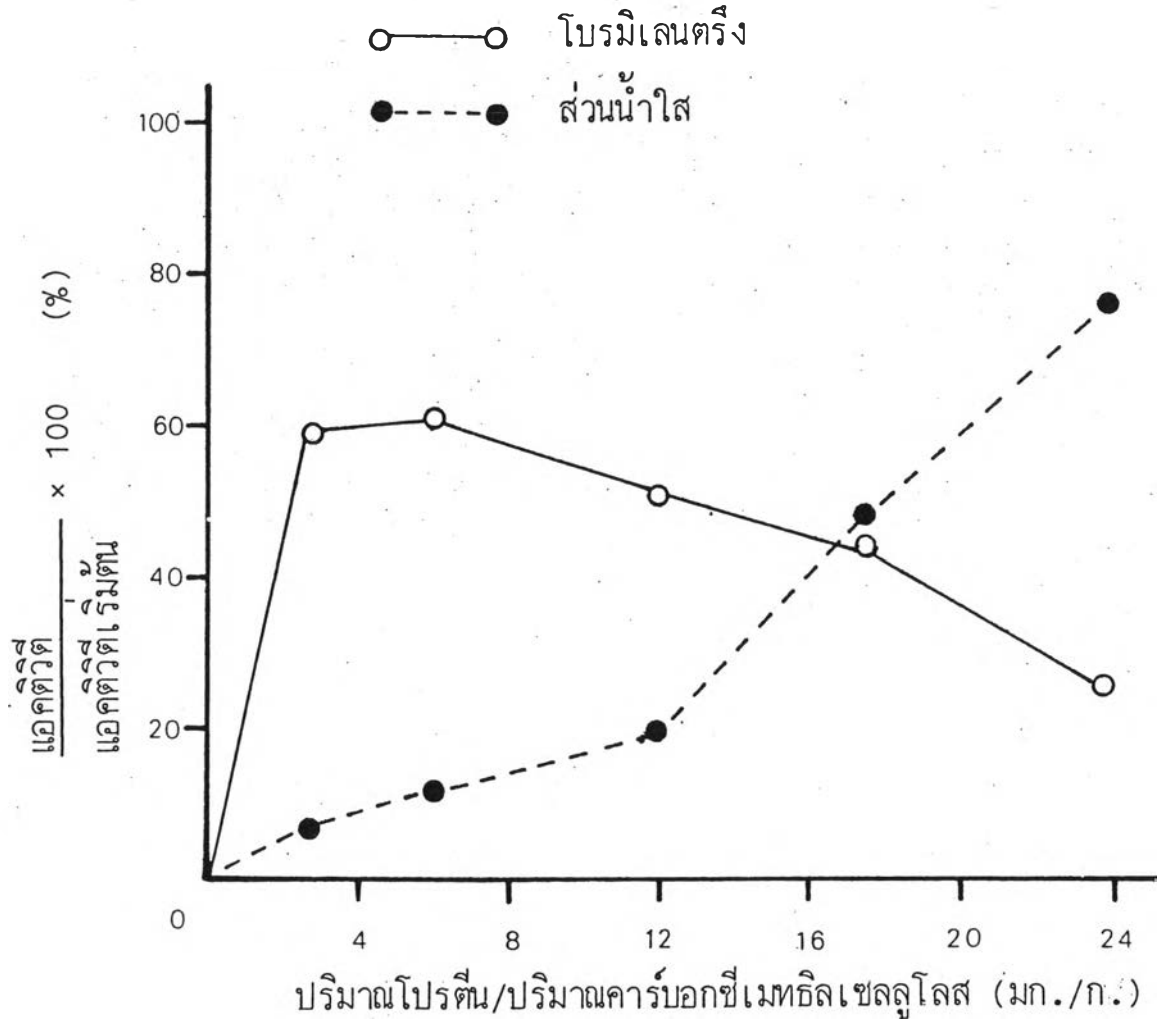
เมื่อทำการทดลองตรึงเอนไซม์ในสารละลายผงโบรมิเลนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกรดโพลีอะไคร์ลิค (วิธีข้อ 2.9) บนคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส โดยแปรผันความเข้มข้นของโปรตีน (3-24 มิลลิกรัม) ตามวิธีข้อ 2.10.2 แล้ววัดแอคติวิตีของโบรมิเลนทั้งในส่วนของโบรมิเลนตรึง และที่อยู่ในส่วนน้ำใส (วิธีข้อ 2.4.1)

ผลการทดลอง (รูปที่ 35) จะเห็นได้ว่าเมื่อแปรค่าปริมาณของโปรตีนของสารละลายที่จับกับคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสปริมาณคงที่ 1 กรัม (น้ำหนักเปียก) (ปริมาตร 1 มิลลิลิตร) ให้อยู่ในช่วงตั้งแต่ 3-24 มิลลิกรัม โบรมิเลนตรึงที่ได้จะจับเอาโบรมิเลนไว้ได้สูงสุดเมื่อปริมาณโปรตีนในสารละลายโบรมิเลนมีค่าอยู่ในช่วงประมาณ 3-6 มิลลิกรัม หลังจากนั้นความสามารถในการจับโบรมิเลนจะมีค่าลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณโปรตีน ในขณะเดียวกันถ้าพิจารณาแอคติวิตีของโบรมิเลนที่เหลือในส่วนน้ำใสหลังการตรึงโบรมิเลนในแต่ละความเข้มข้นของโปรตีน จะเห็นได้ว่าเมื่อใช้ปริมาณโปรตีนในสารละลายมากขึ้นไปกว่า 6 มิลลิกรัมแล้ว ความสามารถในการจับโบรมิเลนของคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสจะลดลงจริง ๆ

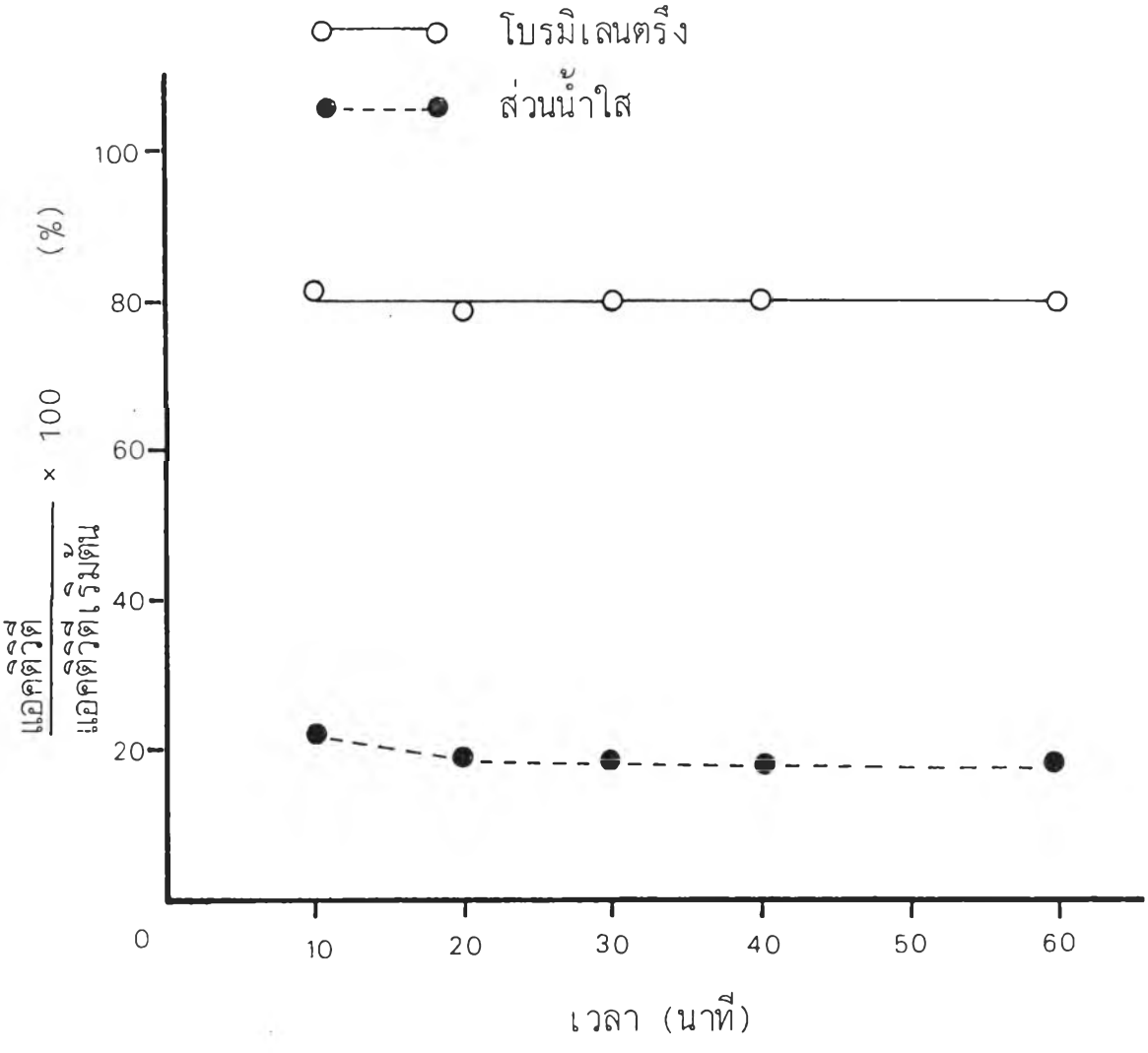
3.8.2 ผลกระทบของเวลาในการตรึงโบรมิเลนกับคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส

เมื่อตรึงเอนไซม์โบรมิเลนในสารละลายของผงโบรมิเลน (เตรียมตามวิธีข้อ 2.9) กับคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส ตามวิธีข้อ 2.10.2 ที่ 4 องศาเซลเซียส โดยแปรค่าของเวลาในการตรึง (10 - 60 นาที) แล้วตรวจสอบแอคติวิตีของโบรมิเลนที่ถูกตรึงเข้ากับคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส (วิธีข้อ 2.4.1) พบว่าการเพิ่มเวลาจาก 10 เป็น 60 นาทีไม่มีผลกระทบต่อแอคติวิตีของเอนไซม์โบรมิเลนในส่วนของโบรมิเลนตรึงเลย ในขณะเดียวกันเมื่อตรวจสอบแอคติวิตีของโบรมิเลนส่วนที่เหลือในน้ำใสหลังการตรึง จะพบว่าปริมาณแอคติวิตีของโบรมิเลนทั้งหมดจะลดต่ำลงบ้างเล็กน้อย เมื่อเพิ่มเวลาในการตรึงให้นานขึ้น (รูปที่ 36) แสดงให้เห็นว่าการจับกันระหว่างเอนไซม์กับคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วมาก (ต่ำกว่า 10 นาที)

3.8.3 ผลกระทบของความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ต่อการตรึงโบรมิเลนบนคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส



รูปที่ 35 อิทธิพลของปริมาณโปรตีนในสารละลายผงโบรมิเลนที่เหมาะสมต่อการจับกับคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส เมื่อตรึงโบรมิเลนที่มีความเข้มข้นของโปรตีนต่าง ๆ กันบนคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส (วิธีข้อ 2.10.2) แล้ววัดแอคติวิตีของโบรมิเลนทั้งในส่วนของโบรมิเลนตรึง และที่อยู่ในส่วนน้ำใสหลังการตรึงโบรมิเลนในแต่ละความเข้มข้นของโปรตีน



รูปที่ 36 ผลกระทบของเวลาในการตรึงโบรมิเลนกับคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสที่ 4 องศาเซลเซียส ตามวิธีข้อ 2.10.2 เมื่อครบเวลาติดตามวัดแอคติวิตีของโบรมิเลนทั้งในส่วนของโบรมิเลนตรึงและที่อยู่ในส่วนน้ำใสหลังการตรึงโบรมิเลนเป็นเวลานานต่าง ๆ กัน

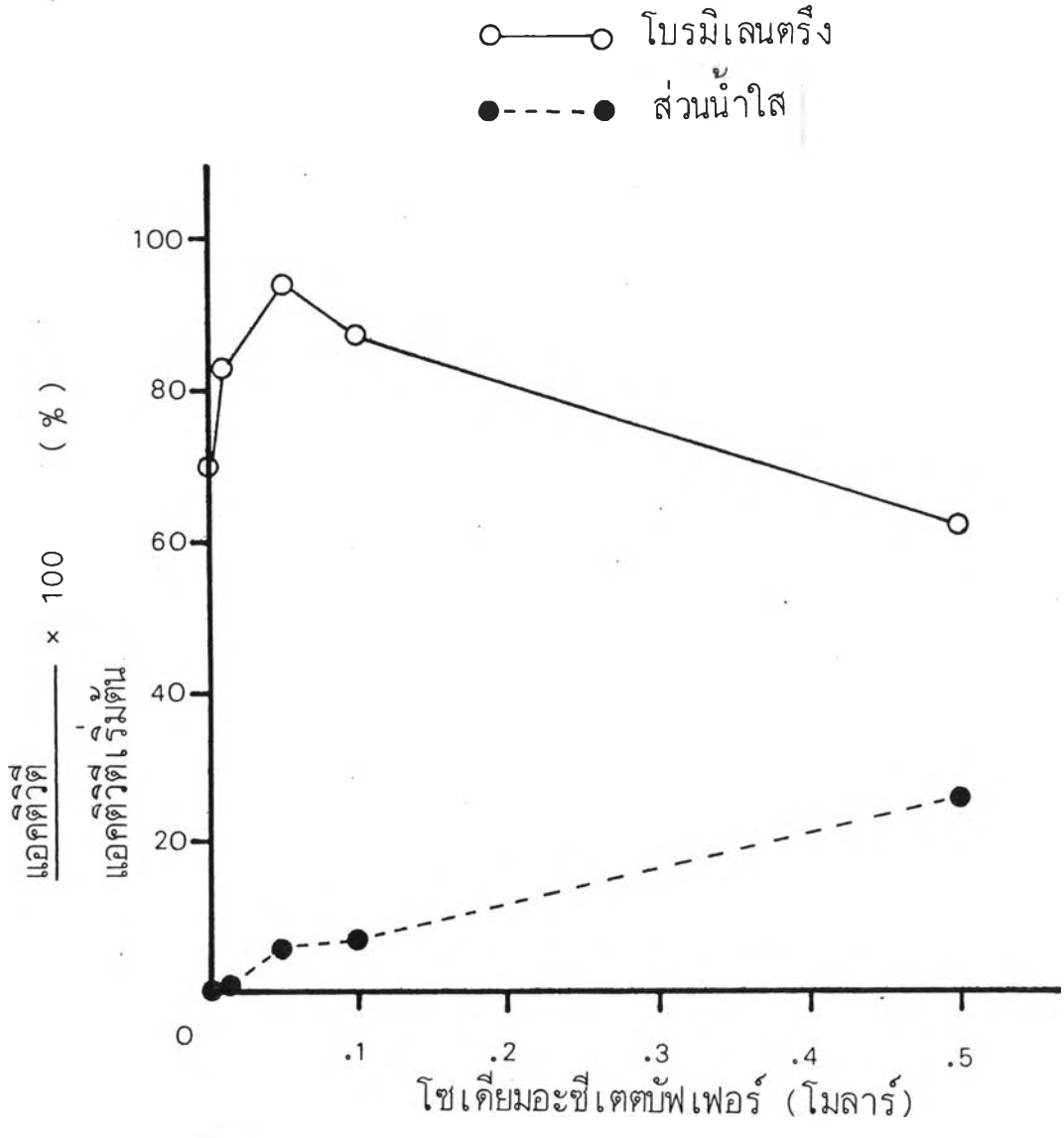
เมื่อทำการตรึงโบรมิเลนกับคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสในโซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-0.5 โมลาร์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตามวิธีข้อ 2.10.2 แล้ววัดแอคติวิตีของโบรมิเลนทั้งในส่วนของโบรมิเลนตรึงและส่วนน้ำใสที่เหลือหลังการตรึง

ผลการทดลอง (รูปที่ 37) พบว่าความเข้มข้นของโซเดียมอะซีเตตมีอิทธิพลต่อการจับของโบรมิเลนกับคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสโดยตรง การจับของโบรมิเลนกับคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสเกิดได้ดีที่สุดในสภาวะที่มีสารละลายโซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ณ พีเอช 5.0 พบแอคติวิตีของโบรมิเลนตรึงสูงถึง 94 เปอร์เซนต์ แต่ถ้าเพิ่มความเข้มข้นของอะซีเตตบัฟเฟอร์ขึ้นไปความสามารถในการตรึงโบรมิเลนบนคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสจะลดลง (พบแอคติวิตีของโบรมิเลนตรึงเพียง 62 เปอร์เซนต์เมื่อตรึงในอะซีเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์) และเมื่อวิเคราะห์แอคติวิตีของโบรมิเลนที่เหลือในส่วนน้ำใสหลังการตรึงก็จะพบแอคติวิตีของโบรมิเลนเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอะซีเตต บัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 เช่นกัน

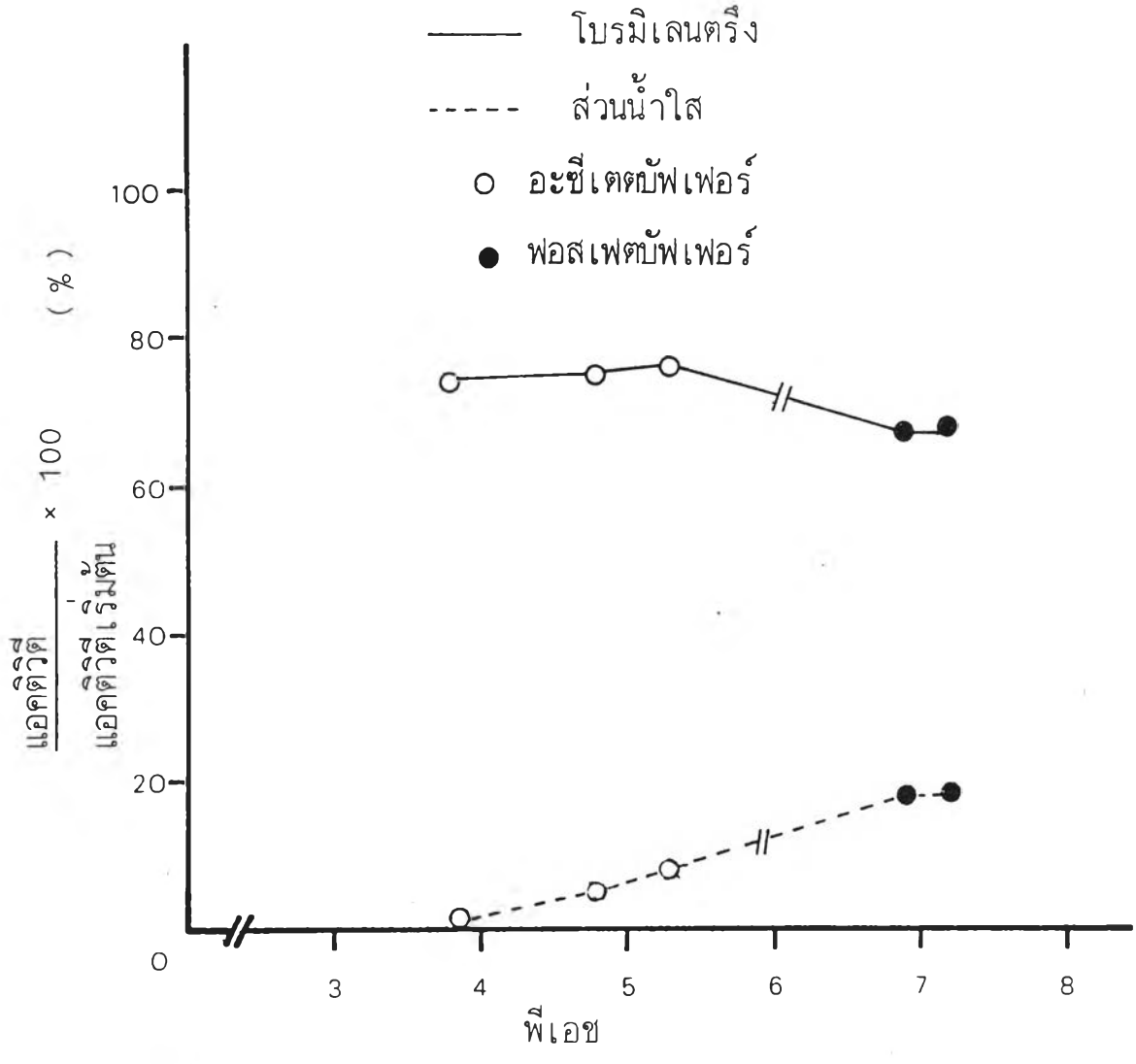
3.8.4 <u>ผลของพีเอชต่อการตรึงของโบรมิเลนกับคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส</u>

ทำการตรึงโบรมิเลนเข้ากับคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสในสภาวะที่มีความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ คือ โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์คงที่ 0.05 โมลาร์ แต่แปรผันค่าพีเอชของสารละลาย 3 ค่าคือ 3.8, 4.8 และ 5.3 และในขณะเดียวกันได้ทดลองตรึงโบรมิเลนใน 0.05 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ค่าพีเอชต่างกัน 2 ค่าคือ 6.9 และ 7.2 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเช่นเดียวกัน (วิธีข้อ 2.10.2) แล้วติดตามวัดแอคติวิตีของโบรมิเลนในส่วนของเอนไซม์ที่ถูกตรึง และส่วนที่เหลือในสารละลาย

ผลการทดลองในรูปที่ 38 แสดงให้เห็นว่าการแปรผันค่าพีเอชที่ใช้ในการตรึงโบรมิเลนในช่วงระหว่าง 3.5-7.0 ไม่น่าจะมีผลต่อการจับของโบรมิเลนกับคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสมากนัก (แอคติวิตีคงเหลือประมาณ 75 เปอร์เซนต์) สำหรับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.9 กับ 7.2 จะคงพบแอคติวิตีในโบรมิเลนตรึงประมาณ 68 เปอร์เซนต์ ซึ่งอาจเป็นได้ว่าการจับของโบรมิเลนกับคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสในสารละลายอะซีเตตที่พีเอชต่ำ ๆ จะดีกว่า เมื่อใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอชสูงขึ้นเช่นเดียวกันเมื่อติดตามวัดแอคติวิตีของโบรมิเลนในส่วนน้ำใสที่เหลือ จะพบได้ว่าโบรมิเลน



รูปที่ 37 ผลกระทบของความเข้มข้นบัฟเฟอร์ต่อการจับของโบรมิเลน บนคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส เมื่อตรึงโบรมิเลนในสภาวะที่มีโซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 ความเข้มข้นต่าง ๆ ตามวิธีข้อ 2.10.2 แล้ววัดแอคติวิตีของโบรมิเลนทั้งในส่วนโบรมิเลนตรึงและในส่วนน้ำใสหลังการตรึง



รูปที่ 38 ผลกระทบของพีเอชต่อการจับของโบรมิเลนกับคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส เมื่อตรึงโบรมิเลนในสภาวะที่มีความเข้มข้นของบัฟเฟอร์คงที่ (0.05 โมลาร์) แต่แปรผันค่าพีเอชในสารละลายตามวิธีข้อ 2.10.2 หลังจากนั้นวัดแอคติวิตีของโบรมิเลนในส่วนโบรมิเลนตรึง และในส่วนน้ำใสหลังการตรึง

ที่ไม่จับกับคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเพิ่มพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์เช่นกัน

3.9 การศึกษาอิทธิพลของกลูตารัลดีไฮด์ต่อแอคติวิตีของโบรมิเลน ตรึงคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส

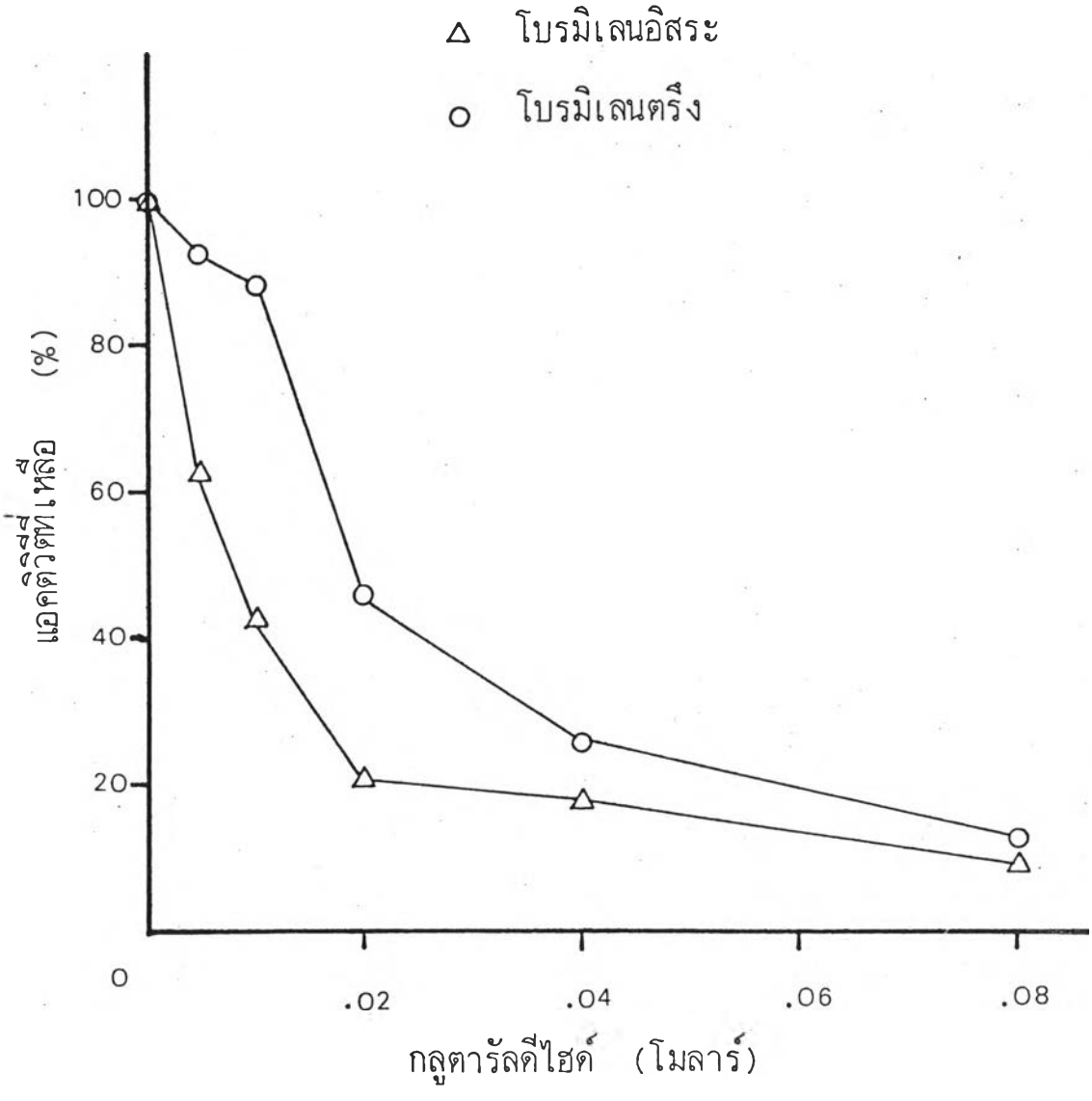
เมื่อนำโบรมิเลนตรึง (เตรียมตามวิธีข้อ 2.10.2) 1 กรัม มาทำปฏิกิริยากับกลูตารัลดีไฮด์ 10 มิลลิลิตรที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน (0.005-0.08 โมลาร์) โดยนำไปเขย่าเบา ๆ ด้วยเครื่องเขย่าอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างกลูตารัลดีไฮด์ออก แล้ววัดแอคติวิตีของโบรมิเลนในโบรมิเลนตรึงเทียบกับค่าที่วัดได้เมื่อใช้โบรมิเลนอิสระทำปฏิกิริยากับกลูตารัลดีไฮด์ในสภาวะเดียวกัน

ผลการทดลอง (รูปที่ 39) แสดงให้เห็นว่ากลูตารัลดีไฮด์สามารถยับยั้งแอคติวิตีของโบรมิเลนได้เมื่อความเข้มข้นสูงขึ้น อย่างไรก็ตามกลูตารัลดีไฮด์จะสามารถยับยั้งแอคติวิตีของโบรมิเลนอิสระได้สูงกว่าโบรมิเลนตรึงอย่างเห็นได้ชัดที่ทุกความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ที่ใช้ ที่ความเข้มข้นกลูตารัลดีไฮด์ 0.01 โมลาร์จะยับยั้งแอคติวิตีของโบรมิเลนอิสระได้สูงถึงเกือบ 60 เปอร์เซนต์ ในขณะที่โบรมิเลนตรึงด้วยคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสจะถูกยับยั้งไปประมาณ 10 เปอร์เซนต์เท่านั้น แต่ที่ความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์สูงขึ้นจะสามารถยับยั้งแอคติวิตีของทั้งโบรมิเลนตรึงและโบรมิเลนอิสระได้ใกล้เคียงกันมากขึ้น

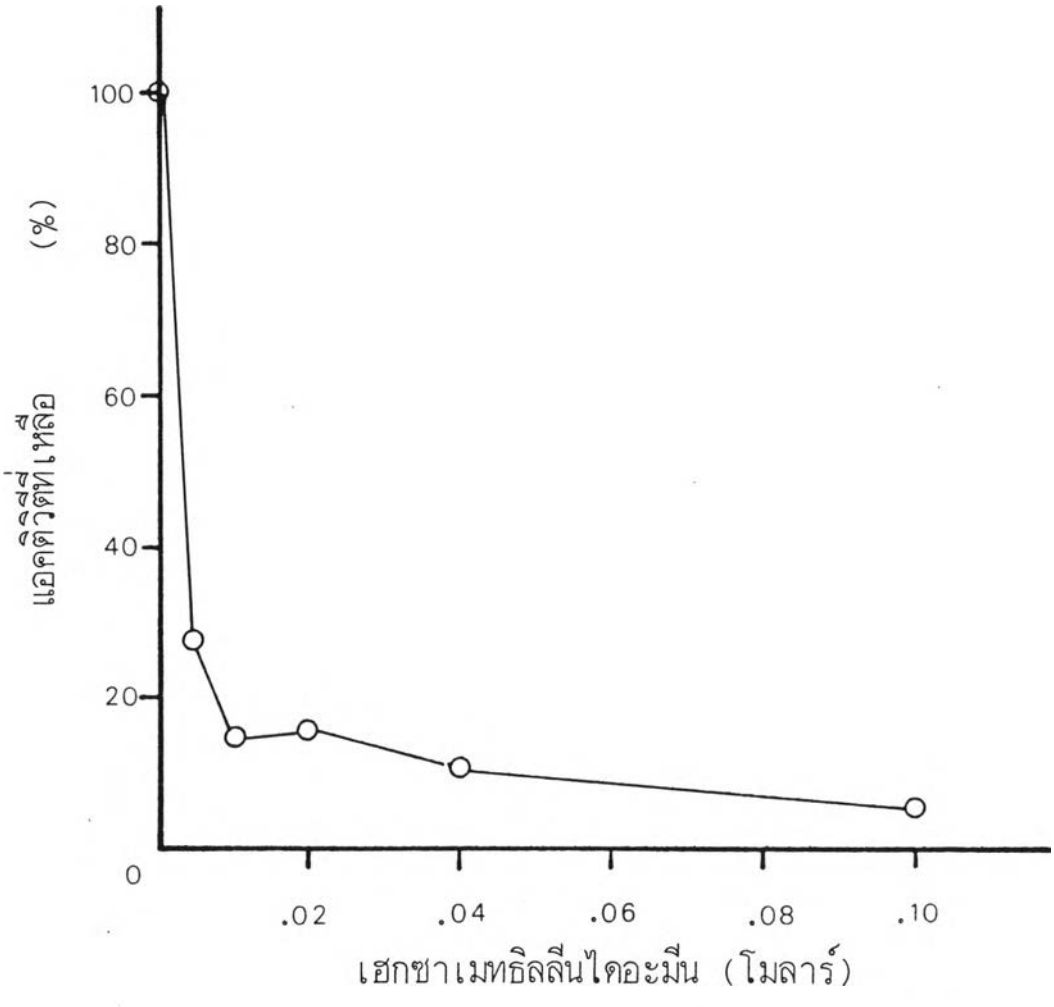
3.10 การศึกษาอิทธิพลของกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอะมีนต่อแอคติวิตีของโบรมิเลนตรึงคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส

เมื่อให้โบรมิเลนตรึงทำปฏิกิริยากับกลูตารัลดีไฮด์ 0.01 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง หลังจากล้างกลูตารัลดีไฮด์ออกแล้ว นำไปทำปฏิกิริยากับเฮกซาเมทธิลลีนไดอะมีนความเข้มข้นต่าง ๆ (0-0.1 โมลาร์) ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วล้างเฮกซาเมทธิลลีนไดอะมีนออก โบรมิเลนตรึงคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสที่ได้นำไปวัดแอคติวิตีของโบรมิเลน โดยวิธีข้อ 2.4.1

ผลการทดลอง (รูปที่ 40) แสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้กลูตารัลดีไฮด์ 0.01 โมลาร์



รูปที่ 39 เปรียบเทียบผลกระทบของความเข้มข้นกลูตารัลดีไฮด์ต่อแอคติวิตีของโบรมิเลนอิสระ และโบรมิเลนตรึงคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส โดยแปรผันความเข้มข้นกลูตารัลดีไฮด์ (0.005- 0.08 โมลาร์) แล้วให้ทำปฏิกิริยากับกลูตารัลดีไฮด์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ติดตามวัดแอคติวิตีของโบรมิเลน ตามวิธีข้อ 2.4.1



รูปที่ 40 ผลกระทบรวมของกลูตารัลดีไฮด์ 0.01 โมลาร์ กับความเข้มข้นของเฮกซาเมทธิลลีนไดอะมีนต่อแอคติวิตีของโบรมิเลนตรึงคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส เมื่อให้โบรมิเลนตรึงคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสที่เสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์ 0.01 โมลาร์ (วิธีข้อ 2.10.3) ทำปฏิกิริยากับเฮกซาเมทธิลลีนไดอะมีนที่ 15 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้ววัดแอคติวิตีของโบรมิเลน ตามวิธีข้อ 2.4.1

และเฮกซาเมทธิลลีนไดอะมีน (0-0.1 โมลาร์) จะมีผลในการยับยั้งแอคติวิตีของโบรมิเลนในโบรมิเลนตรึงคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสเกือบสมบูรณ์ คือโบรมิเลนตรึงจะสูญเสียแอคติวิตีของโบรมิเลนไปถึง 85 เปอร์เซนต์เมื่อใช้เฮกซาเมทธิลลีนไดอะมีนความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ และจะลดแอคติวิตีลงเหลือเพียง 5 เปอร์เซนต์เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเฮกซาเมทธิลลีนไดอะมีนเป็น 0.1 โมลาร์

3.11 <u>การศึกษาความเสถียรทางกายภาพของโบรมิเลนตรึงคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส</u>

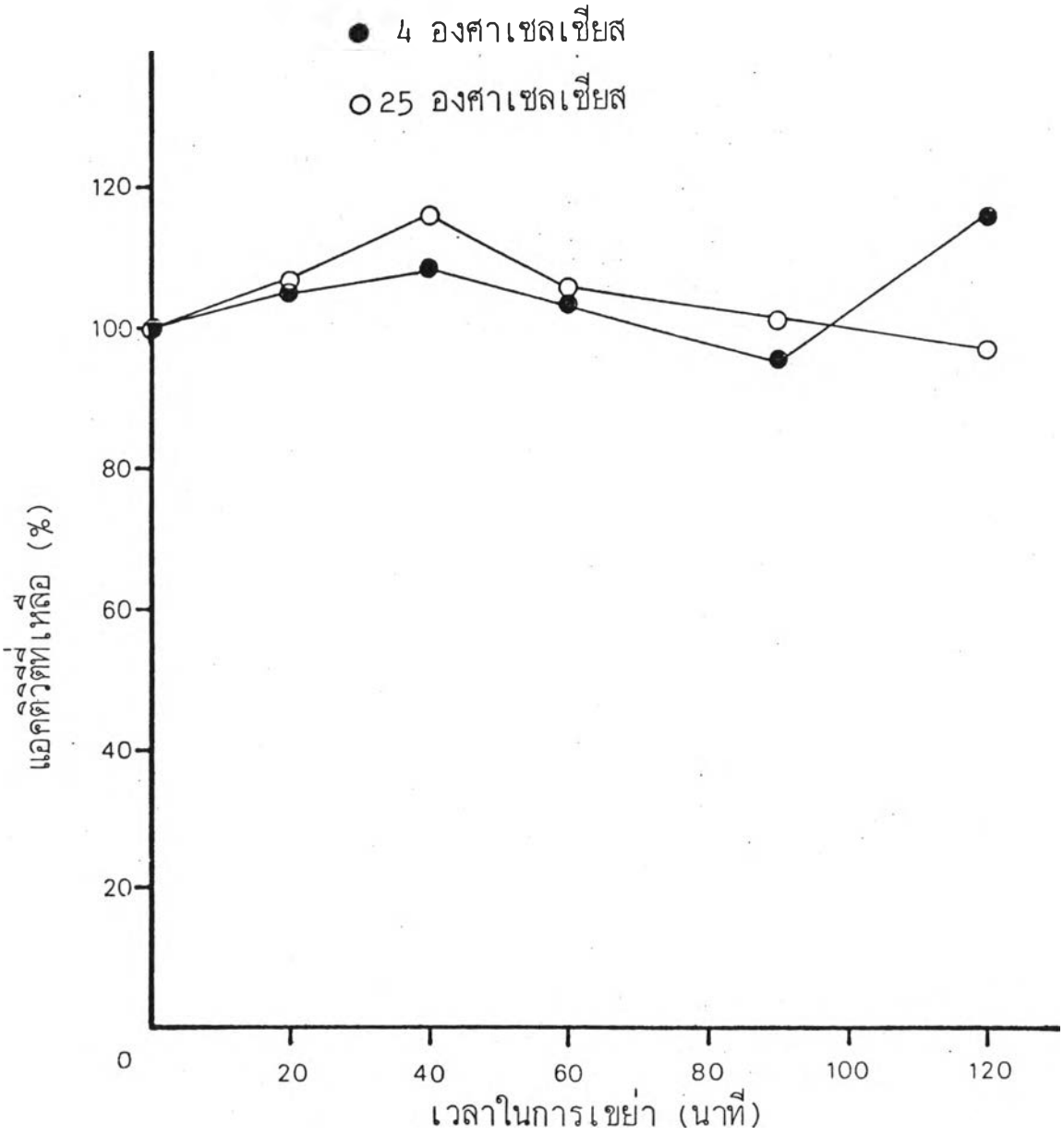
เมื่อนำโบรมิเลนตรึงคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส (วิธีข้อ 2.10.2) มาเขย่าในเครื่องเขย่าซึ่งควบคุมอุณหภูมิไว้ที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส (ความเร็ว 100 รอบต่อนาที) หลังจากนั้นวัดแอคติวิตีของโบรมิเลนตรึงที่ช่วงเวลาต่าง ๆ กันนาน 120 นาที ผลการทดลอง (รูปที่ 41) พบว่าโบรมิเลนตรึงเกือบไม่มีการสูญเสียแอคติวิตีเมื่อเขย่าที่สภาวะที่กำหนดให้นี้นาน 120 นาที ทั้งที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส

ผลการทดลองในรูปที่ 42 แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าแต่ถ้าหากเพิ่มเวลาของการเขย่าไปเป็น 65 วันที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โบรมิเลนตรึงคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสจะมีการสูญเสียของแอคติวิตีของโบรมิเลนส่วนหนึ่งไป จะเหลือแอคติวิตีเพียงประมาณ 50 เปอร์เซนต์เมื่อเขย่านานประมาณ 24 วัน และแอคติวิตีของโบรมิเลนตรึงนี้จะลดลงค่อนข้างสม่ำเสมอจนเหลืออยู่ประมาณ 26 เปอร์เซนต์ เมื่อเขย่าโบรมิเลนตรึงคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสนาน 65 วัน เป็นที่น่าสังเกตว่าโบรมิเลนตรึงชนิดที่เสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์เมื่อทำการทดลองในสภาวะเดียวกันจะมีการสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์ในช่วงแรกอย่างรวดเร็วจนเหลือแอคติวิตีประมาณ 50 เปอร์เซนต์เมื่อเขย่านานเพียง 5 วัน แล้วจึงมีค่าค่อนข้างคงที่ หลังจากนั้นแอคติวิตีจึงเริ่มลดลงอีกในรูปแบบที่คล้ายกันกับโบรมิเลนตรึงด้วยคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสชนิดที่ไม่เสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์

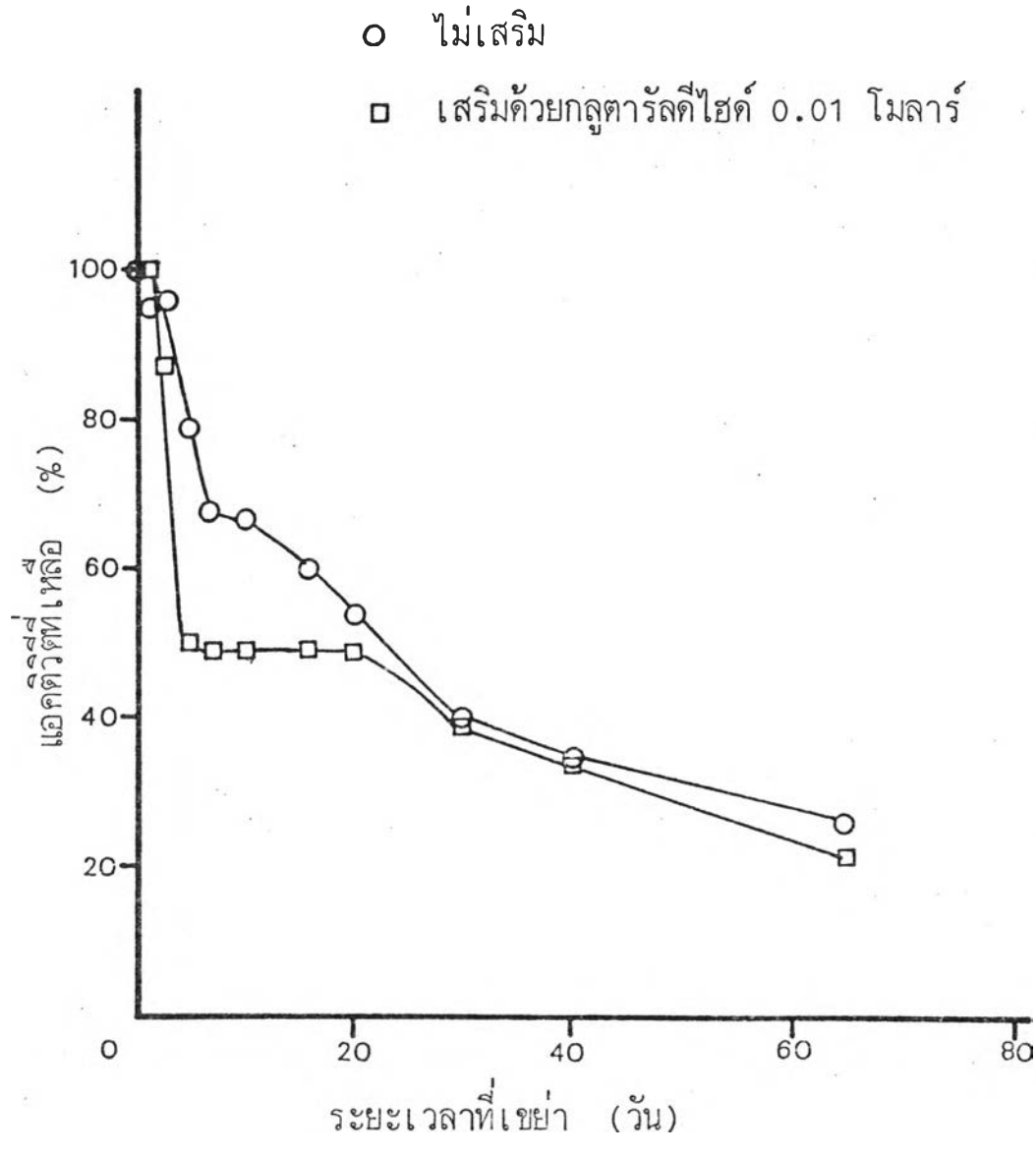
3.12 <u>การศึกษาเปรียบเทียบสมบัติของโบรมิเลนและโบรมิเลนตรึงด้วยคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส</u>

3.12.1 <u>ผลกระทบของพีเอชต่อการทำงานของโบรมิเลนและโบรมิเลนตรึง</u>

เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพีเอชกับแอคติวิตีของโบรมิเลนอิสระ



รูปที่ 41 เปรียบเทียบความเสถียรทางกายภาพของโบรมิเลนตรึงคาร์บอกซี-เมทธิลเซลลูโลสที่อุณหภูมิแตกต่างกัน เมื่อนำมาเขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 120 นาทีติดต่อกัน ติดตามวัดแอคติวิตีของโบรมิเลนที่ช่วงเวลาต่าง ๆ กัน



รูปที่ 42 เปรียบเทียบความเสถียรทางกายภาพของโบรมิเลนตรึงคาร์บอกซี-เมทธิลเซลลูโลสชนิดเสริม และไม่เสริมด้วย 0.01 โมลาร์ กลูตารัลดีไฮด์ เมื่อนำมาเขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิคงที่ 25 องศาเซลเซียส แล้วติดตามวัดแอคติวิตีของโบรมิเลนเป็นระยะ ๆ นาน 65 วัน

โบรมิเลนตรึง และโบรมิเลนตรึงเสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์ ผลการทดลอง (รูปที่ 43) พบว่าทั้งโบรมิเลนอิสระ โบรมิเลนตรึง และโบรมิเลนตรึงที่เสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์ 0.01 โมลาร์ สามารถเร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์เคซีนได้ดีที่ค่าพีเอชใกล้เคียงกันคือ ที่ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ประมาณ 9.6 และที่พีเอชสูงกว่านี้เพียงเล็กน้อยแอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็ว ในขณะที่ค่าพีเอชในด้านที่ต่ำกว่านี้จะมีผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์โบรมิเลนน้อยกว่า

3.12.2 <u>ผลกระทบของอุณหภูมิต่อความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของโบรมิเลน และโบรมิเลนตรึง</u>

เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของโบรมิเลนกับโบรมิเลนตรึงคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสทั้งชนิดที่เสริมและไม่เสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์กับอุณหภูมิของการเกิดปฏิกิริยา ผลการทดลองรูปที่ 44 แสดงให้เห็นว่าทั้งโบรมิเลนตรึงชนิดที่เสริมและไม่เสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์ สามารถเร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์เคซีนได้ดีที่อุณหภูมิใกล้เคียงกัน และมีอุณหภูมิที่เหมาะสมของการเกิดปฏิกิริยาต่ำกว่าโบรมิเลนอิสระอย่างชัดเจน คือมีค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 45 องศาเซลเซียส ในขณะที่โบรมิเลนอิสระมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาสูงประมาณ 65 องศาเซลเซียส

3.12.3 <u>ผลกระทบของพีเอชต่อความเสถียรของโบรมิเลนและโบรมิเลนตรึงคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส</u>

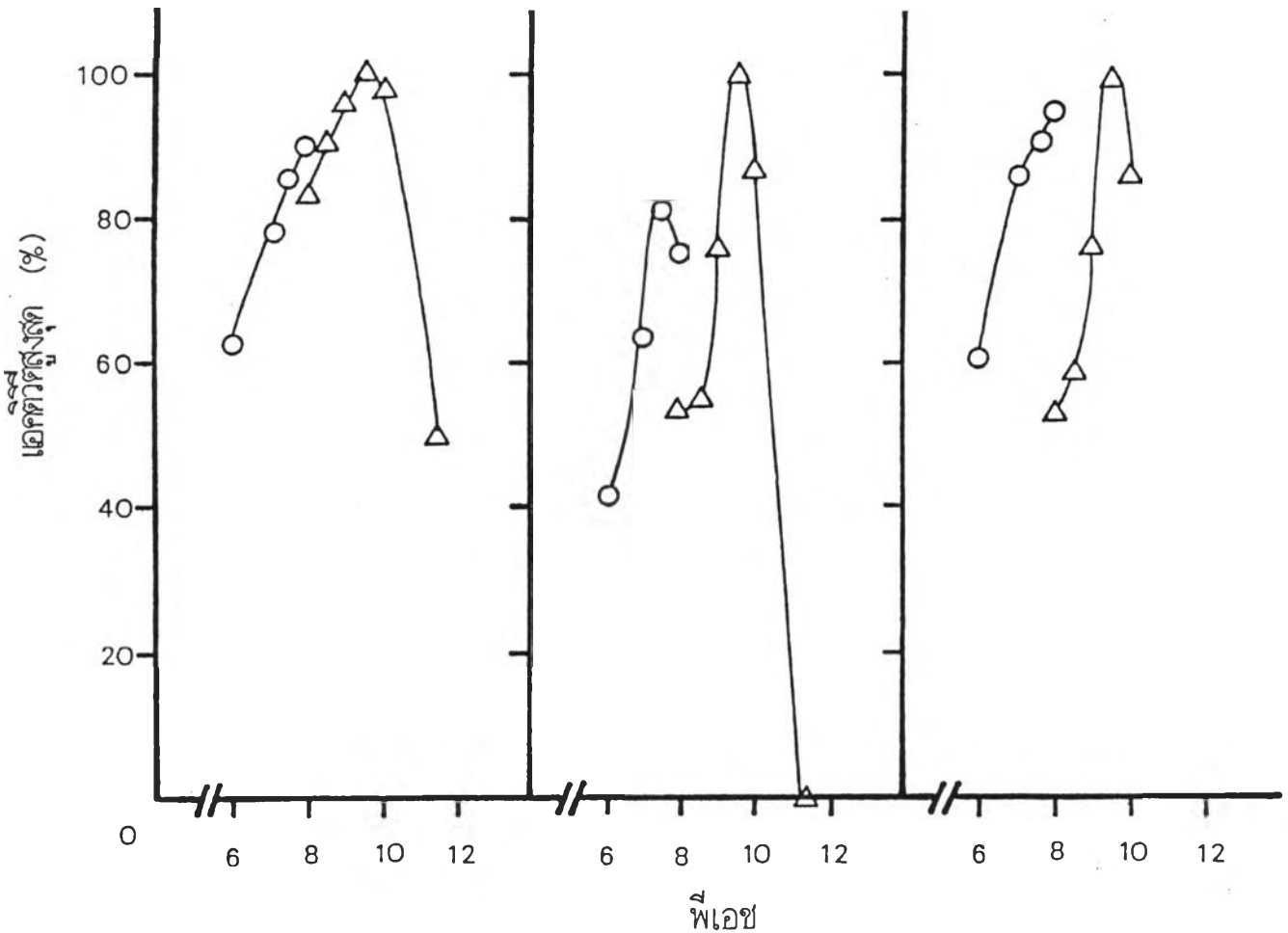
เมื่ออินคิวเบตเอนไซม์โบรมิเลน และโบรมิเลนตรึงคาร์บอกซีแมทธิลเซลลูโลสชนิดที่เสริมและไม่เสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชต่าง ๆ ตั้งแต่ 3.5-9.6 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดแอคติวิตีของโบรมิเลน ตามวิธีข้อ 2.4.1 ผลการทดลองในรูปที่ 45 จะเห็นได้ว่าเอนไซม์โบรมิเลนทั้ง 3 ชนิดจะมีความเสถียรได้ดีในช่วงพีเอชที่เป็นกรด โดยโบรมิเลนตรึงมีความเสถียรในช่วงของพีเอชแคบกว่าโบรมิเลนอิสระ และโบรมิเลนตรึงที่เสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์ โบรมิเลนอิสระจะมีความเสถียรต่อพีเอชในช่วงกว้างมากที่สุดคืออยู่ในช่วงพีเอช 4-7 ในขณะที่โบรมิเลนตรึงเสริมกลูตารัลดีไฮด์มีความเสถียรระหว่างค่าพีเอชประมาณ 4-6 และโบรมิเลนตรึงที่ไม่ได้เสริมจะมีค่าความเสถียรที่พีเอชประมาณ 5 เท่านั้น

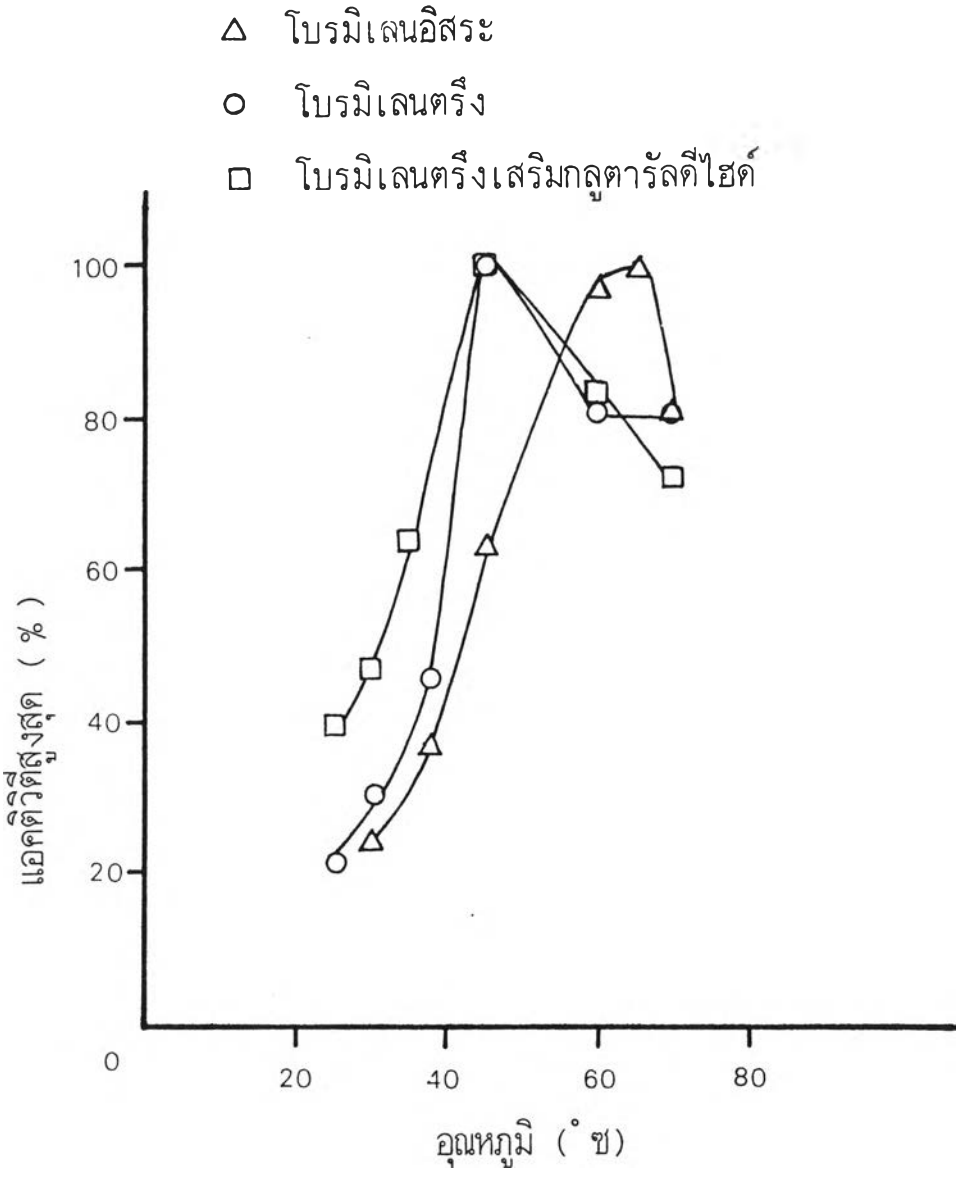
รูปที่ 43 เปรียบเทียบผลกระทบของพีเอชต่อแอคติวิตีของเอนไซม์โบรมิเลน วัดแอคติวิตีตามวิธีทดลองข้อ 2.4.1 ที่ 37 องศาเซลเซียส เมื่อใช้โบรมิเลนอิสระ (รูปที่ 43 ก) โบรมิเลนตรึง (รูปที่ 43 ข) และโบรมิเลนตรึงเสริมกลูตารัลดีไฮด์ (รูปที่ 43 ค) ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ พีเอช ต่าง ๆ คือ พีเอช 6.0-8.0 (ฟอสเฟตบัฟเฟอร์) พีเอช 8.0-11.5 (ไกลซีนบัฟเฟอร์)

รูปที่ 43 ก. รูปที่ 43 ข. รูปที่ 43 ค.

(โบรมิเลนอิสระ) (โบรมิเลนตรึง) (โบรมิเลนตรึงเสริมกลูตารัลดีไฮด์)

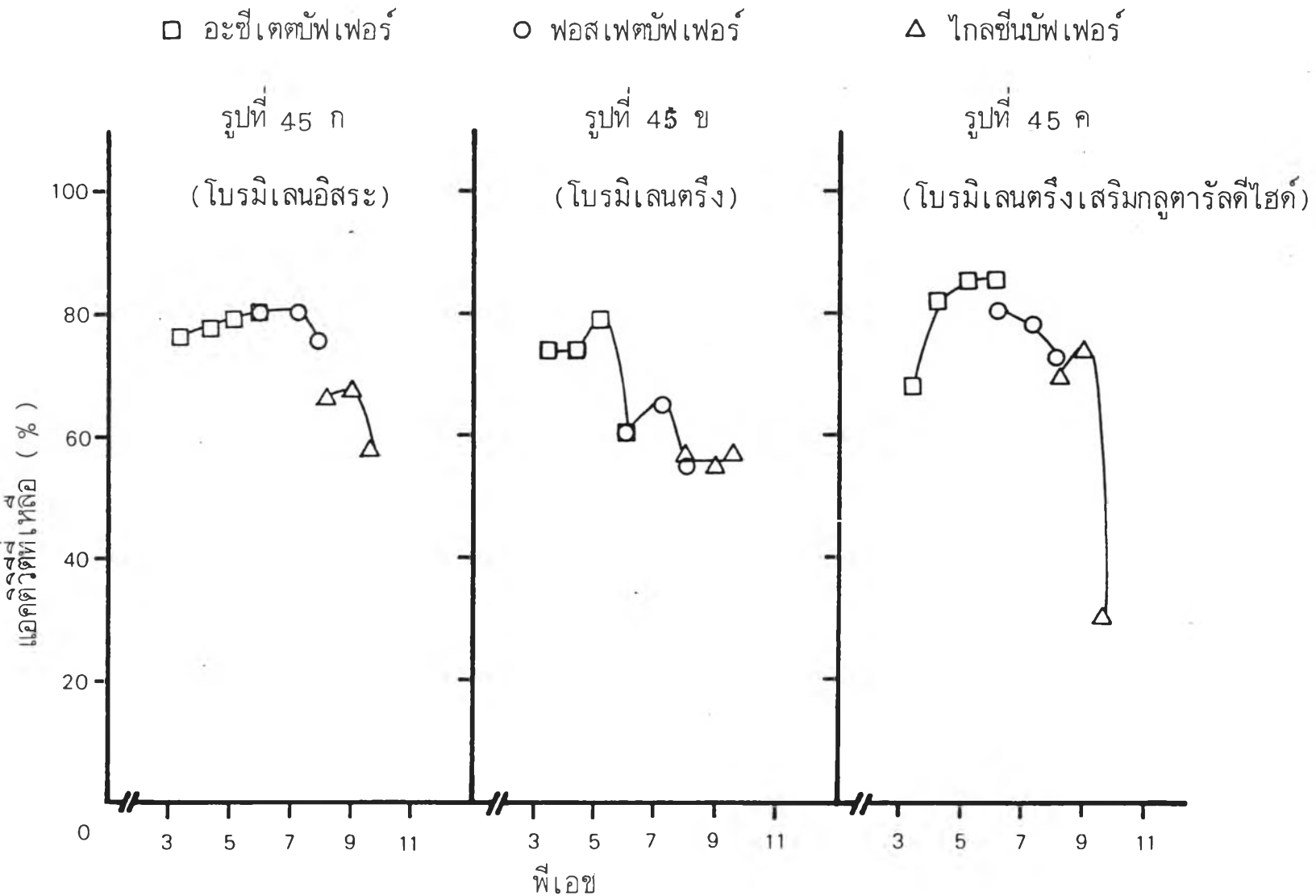
○ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ △ ไกลซีนบัฟเฟอร์





รูปที่ 44 เปรียบเทียบผลกระทบของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของเอนไซม์โบรมิเลน และโบรมิเลนตรึงคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสชนิดเสริมและไม่เสริมกลูตารัลดีไฮด์ เมื่อวัดแอคติวิตีของโบรมิเลนที่พีเอช 7.0

รูปที่ 45 เปรียบเทียบผลของพีเอชต่อความเสถียรของโบรมิเลน เมื่อใช้โบรมิเลนอิสระ (รูปที่ 45 ก) โบรมิเลนตรึงคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส (รูปที่ 45 ข) และโบรมิเลนตรึงเสริมกลูตารัลดีไฮด์ (รูปที่ 45 ค) แช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ชนิดต่าง ๆ คือ อะซีเตต-บัฟเฟอร์ (พีเอช 3.5-6.0) ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 6.0-8.0) และไกลซีนบัฟเฟอร์ (พีเอช 8.0-9.5) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซียลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้ววัดแอคติวิตีของโบรมิเลน


□ อะซีเตตบัฟเฟอร์
○ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์
△ ไกลซีนบัฟเฟอร์
รูปที่ 45 ก
(โบรมิเลนอิสระ)
รูปที่ 45 ข
(โบรมิเลนตรึง)
รูปที่ 45 ค
(โบรมิเลนตรึงเสริมกลูตารัลดีไฮด์)
แอคติวิตี้เหลือ (%)
100
80
60
40
20
0
3
5
7
9
11
พีเอช

3.12.4 <u>เปรียบเทียบผลกระทบของอุณหภูมิต่อความเสถียรของโบรมิเลนและโบรมิเลนตรึงคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส</u>

เมื่อวัดแอคติวิตีของโบรมิเลนในรูปโบรมิเลนอิสระและโบรมิเลนตรึงคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสชนิดที่เสริมและไม่เสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์ หลังจากอินคิวเบตที่อุณหภูมิ 30, 37, 50 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0.5, 1,2 และ 4 ชั่วโมง (วิธีข้อ 2.4.1)

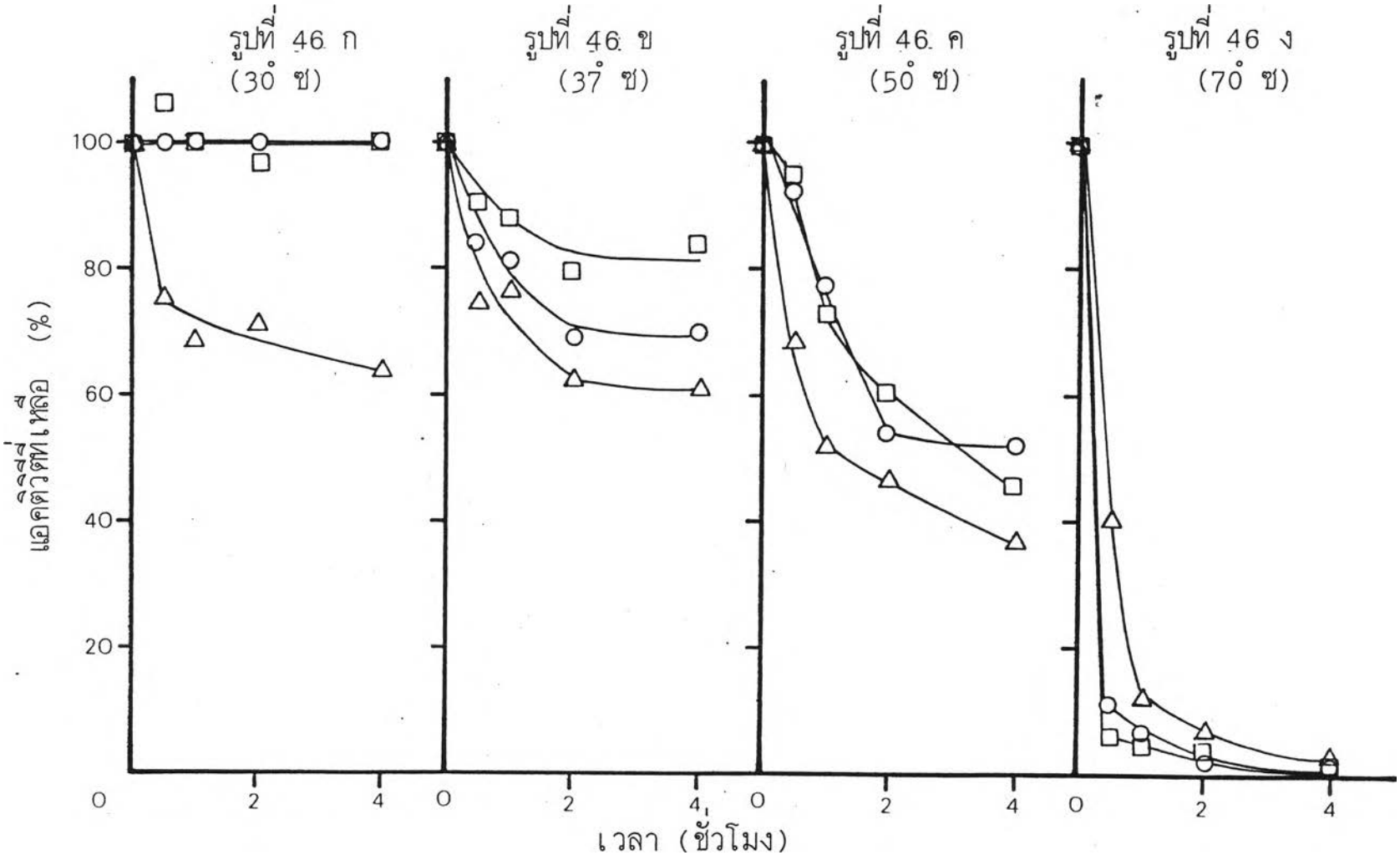
ผลการทดลอง (รูปที่ 46) แสดงให้เห็นว่าในช่วงอุณหภูมิที่ไม่สูงมากนัก (30-50 องศาเซลเซียส) โบรมิเลนตรึงทั้งชนิดที่เสริมและไม่เสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์มีความเสถียรมากกว่าโบรมิเลนอิสระอย่างเห็นได้ชัด (ที่ 30 องศาเซลเซียส โบรมิเลนตรึงจะไม่มีการสูญเสียแอคติวิตีเลย ในขณะที่โบรมิเลนอิสระเสียแอคติวิตีไปกว่า 40 เปอร์เซนต์) แต่ถ้าเพิ่มอุณหภูมิให้สูงมากขึ้น (70 องศาเซลเซียส) แล้วจะไม่สามารถจำแนกความเสถียรของโบรมิเลนตรึงและอิสระได้ชัดเจนนัก เพราะโบรมิเลนทั้ง 3 ชนิดจะสูญเสียแอคติวิตีไปอย่างรวดเร็วจนไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ นอกจากนี้ผลการทดลองในรูปที่ 46 ข. ยังมีแนวโน้มที่แสดงให้เห็นว่าที่อุณหภูมิไม่สูงมากนักคือที่ 37 องศาเซลเซียสนั้น โบรมิเลนตรึงที่เสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์จะมีความเสถียรสูงกว่าโบรมิเลนตรึงคาร์บ๊อกซีเมทธิลเซลลูโลสชนิดที่ไม่ได้เสริม

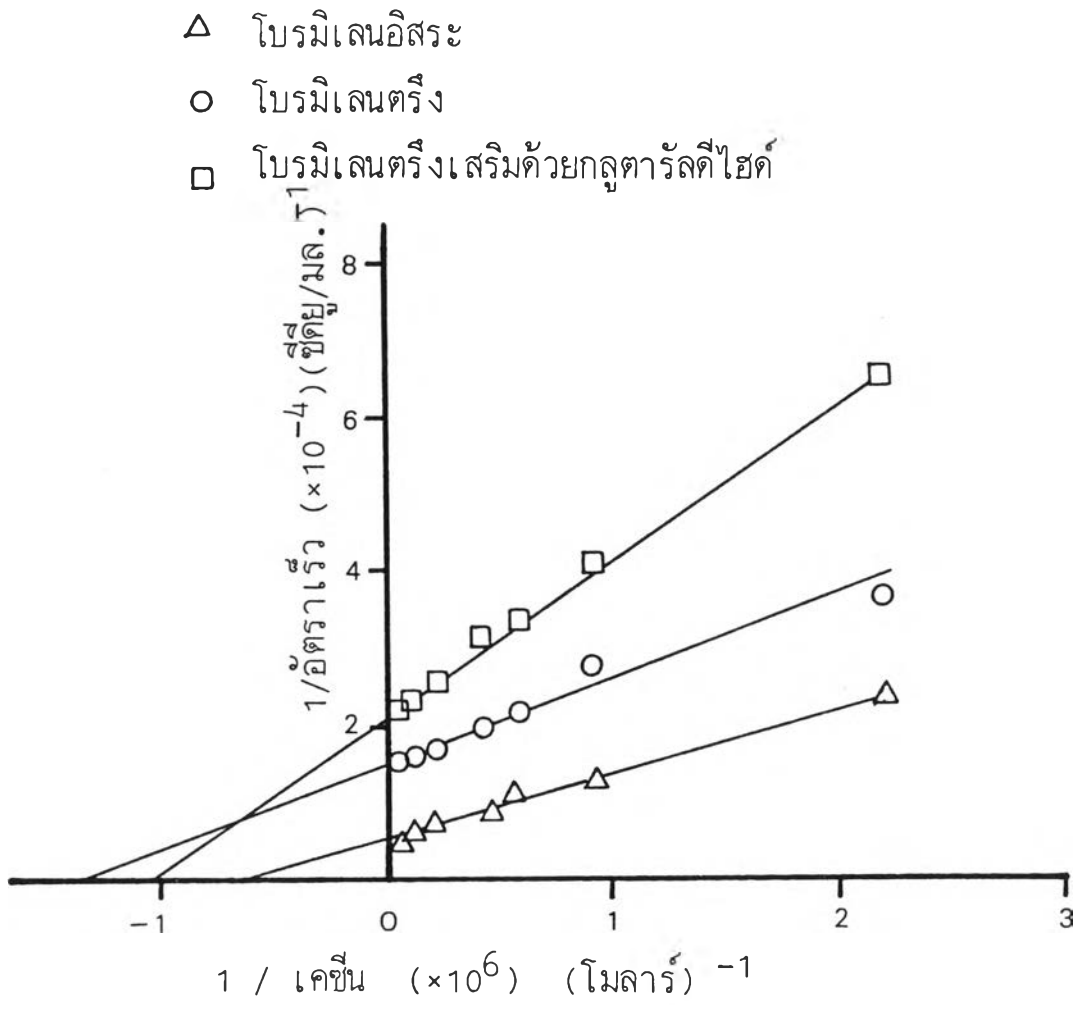
3.12.5 <u>การศึกษาผลของความเข้มข้นสับสเตรทเคซีนต่อแอคติวิตีของโบรมิเลน และโบรมิเลนตรึงคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส</u>

เมื่อวัดแอคติวิตีของโบรมิเลนอิสระ โบรมิเลนตรึงคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสชนิดที่เสริมและไม่ได้เสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตามวิธีข้อ 2.4.1 โดยแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของเคซีนตั้งแต่ 4.5×10^{-7} ถึง 133×10^{-7} โมลาร์ พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างส่วนกลับของความเข้มข้นของเคซีนต่อส่วนกลับแอคติวิตีของโบรมิเลนตรึงโดย Lineweaver-Burk Plot มีลักษณะดังรูปที่ 47 ซึ่งเมื่อคำนวณค่าคงที่ทางจลนศาสตร์คือ K_m ของโบรมิเลนอิสระ โบรมิเลนตรึงคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส และโบรมิเลนตรึงที่เสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์พบว่ามีค่าเป็น 1.43×10^{-5}, 7.41×10^{-7} และ 9.52×10^{-7} โมลาร์ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการตรึงเอนไซม์โบรมิเลนจะมีผลให้ค่า K_m ของการเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายเคซีนลดน้อยลงกว่าโบรมิเลน

รูปที่ 46 เปรียบเทียบผลกระทบของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์โบรมิเลน เมื่อใช้โบรมิเลนอิสระ โบรมิเลนตรึงคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส ชนิดที่เสริมและไม่เสริมกลูตารัลดีไฮด์ โดยอินคิวเบตไว้ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (รูปที่ 46 ก) 37 องศาเซลเซียส (รูปที่ 46 ข) 50 องศาเซลเซียส (รูปที่ 46 ค) และ 70 องศาเซลเซียส (รูปที่ 46 ง) เป็นเวลา 0.5, 1, 2, และ 4 ชั่วโมง แล้ววัดแอคติวิตีของโบรมิเลนที่ 37 องศาเซลเซียส

△ โบรมิเลนอิสระ ○ โบรมิเลนตรึง □ โบรมิเลนตรึงเสริมกลูตารัลดีไฮด์





รูปที่ 47 Lineweaver-Burk Plot ของโบรมิเลนอิสระ และโบรมิเลนตรึงคาร์บอกซิเมทธิลเซลลูโลสชนิดที่เสริมและไม่เสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์ กับความเข้มข้นสับสเตรทเคซีน วัดแอคติวิตีตามวิธีทดลองข้อ 2.4.1 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้เคซีนความเข้มข้นแตกต่างกันตั้งแต่ 4.5×10^{-7} ถึง 133×10^{-7} โมลาร์

อิสระอย่างชัดเจน 20 และ 15 เท่า สำหรับโบรมิเลนตรึงและโบรมิเลนตรึงเสริมกลูตารัลดีไฮด์ ตามลำดับ

3.13 <u>การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเก็บรักษาโบรมิเลน และโบรมิเลนตรึงคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส</u>

เมื่อนำเอนไซม์โบรมิเลนในรูปโบรมิเลนอิสระ และโบรมิเลนตรึงคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสทั้งชนิดที่เสริมและไม่เสริมกลูตารัลดีไฮด์ มาเก็บรักษาไว้ในสารละลายบัฟเฟอร์ (0.05 โมลาร์) ต่างชนิดกันคือ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 และอะซีเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 ที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส แล้วติดตามวัดแอคติวิตีของโบรมิเลนที่เหลือในระยะเวลาต่าง ๆ นาน 120 วัน ตามวิธีข้อ 2.4.1

ผลการทดลอง (จากรูปที่ 48) จะเห็นได้ว่าสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ไม่เหมาะสมนักที่จะใช้ในการเก็บรักษาโบรมิเลนอิสระ และโบรมิเลนตรึงทั้งสองชนิดที่เสริมและไม่เสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์ ซึ่งเห็นได้จากการลดลงของแอคติวิตีอย่างรวดเร็วตั้งแต่ช่วงแรกของระยะการเก็บทั้งที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส และเมื่อเก็บที่อุณหภูมิสูงขึ้น (37 องศาเซลเซียส) โบรมิเลนทั้ง 3 ชนิดจะมีการลดแอคติวิตีลงอย่างรวดเร็วใกล้เคียงกันจนไม่สามารถจำแนกความแตกต่างได้ อย่างไรก็ตาม เมื่อเก็บโบรมิเลนไว้ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โบรมิเลนทั้ง 3 รูปแบบจะมีความเสถียรมากกว่าเมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เป็นที่น่าสังเกตว่าในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.0) ที่ใช้นี้ โบรมิเลนในสภาพอิสระจะมีความเสถียรสูงสุดไม่ว่าที่อุณหภูมิใดก็ตาม รองลงมาคือโบรมิเลนตรึงคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส และโบรมิเลนที่มีความเสถียรต่ำที่สุดก็คือโบรมิเลนตรึงคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสที่เสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์

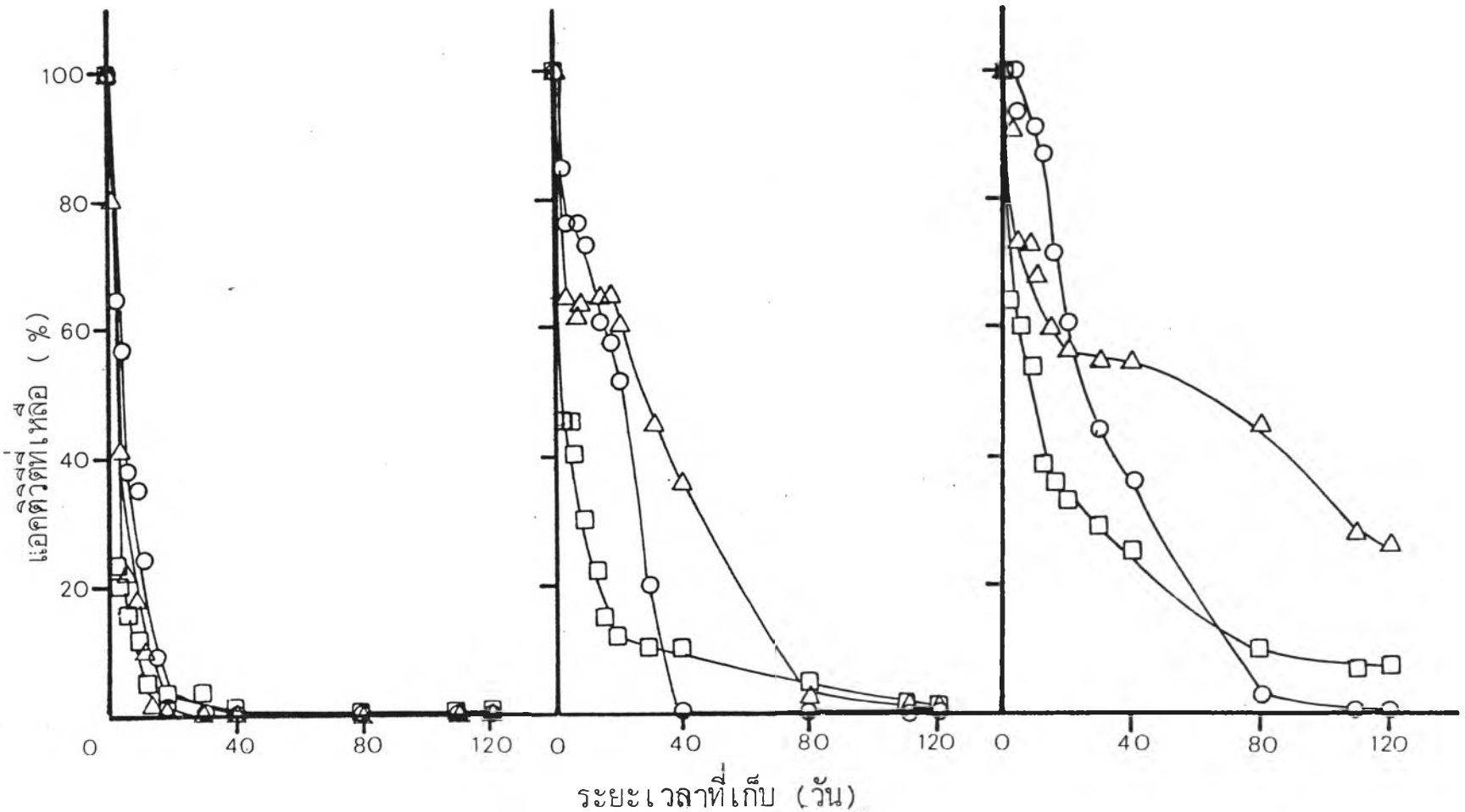
แต่เมื่อนำโบรมิเลนทั้ง 3 ชนิดนี้มาเก็บรักษาไว้ในอะซีเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียสเช่นเดียวกัน ผลการทดลอง (รูปที่ 49) แสดงให้เห็นว่าสารละลายอะซีเตตบัฟเฟอร์เหมาะสมที่จะใช้เก็บโบรมิเลนตรึงมากกว่าสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ซึ่งแสดงให้เห็นได้จากค่าแอคติวิตีของโบรมิเลนทั้ง 3 ชนิดที่เหลือหลังทำการทดลองที่สภาวะเดียวกันจะมีค่าสูงกว่าที่ทุกอุณหภูมิ

รูปที่ 48. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเก็บรักษาโบรมิเลน และโบรมิเลนตรึงด้วยคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส เมื่อเก็บรักษาโบรมิเลนในรูปโบรมิเลนอิสระและโบรมิเลนตรึงทั้งชนิดที่เสริมและไม่เสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์ ไว้ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน คือ อุณหภูมิ 37° ซ (รูปที่ 48 ก) อุณหภูมิ 25° ซ (รูปที่ 48 ข) และอุณหภูมิ 4° ซ (รูปที่ 48 ค) แล้วติดตามวัดแอคติวิตีของโบรมิเลนที่เหลือในทุก ๆ ระยะการเก็บนาน 120 วัน

△ โบรมิเลนอิสระ (รูปที่ 48 ก) (37° ซ)

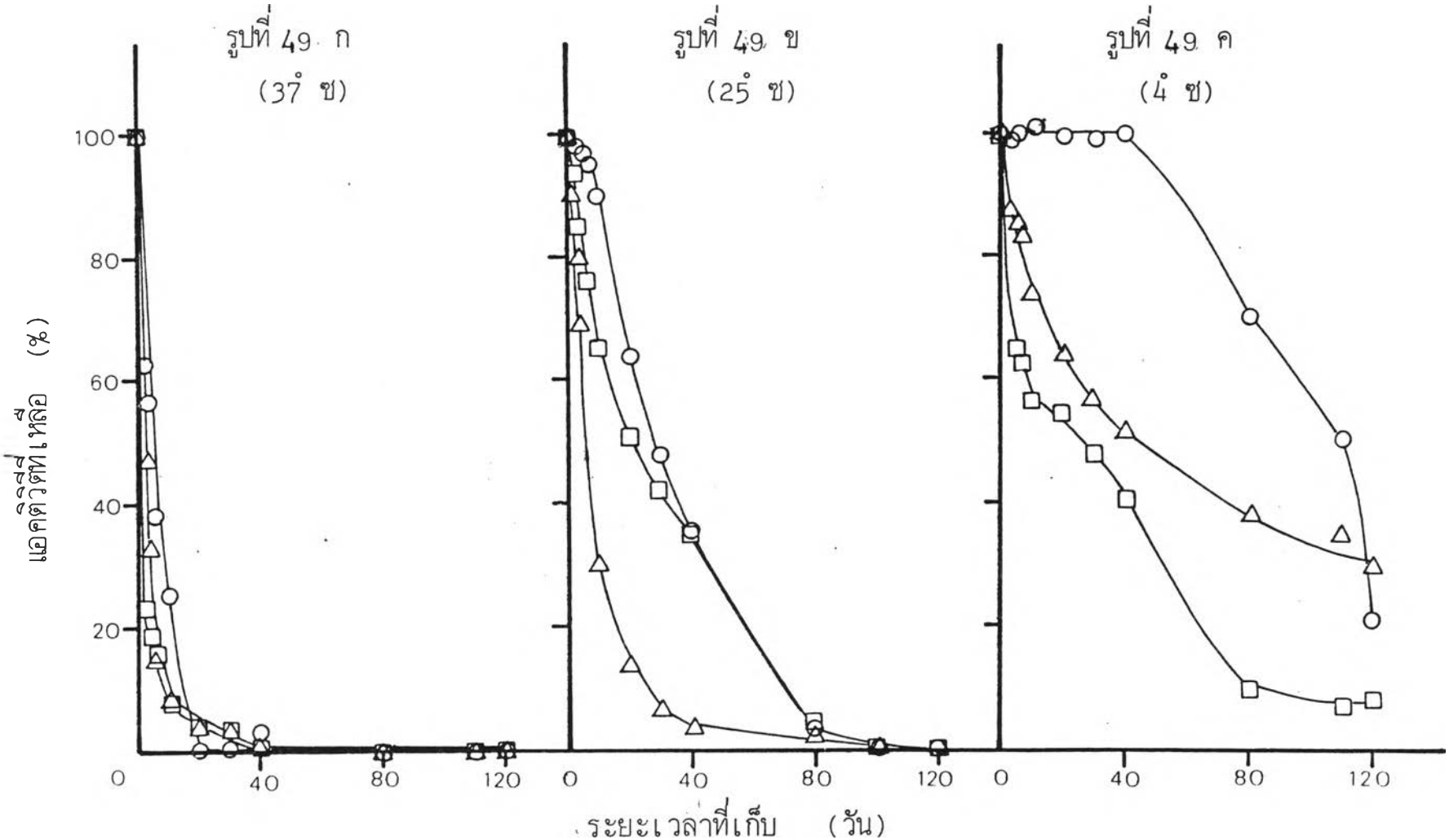
○ โบรมิเลนตรึง (รูปที่ 48 ข) (25° ซ)

□ โบรมิเลนตรึงเสริมกลูตารัลดีไฮด์ (รูปที่ 48 ค) (4° ซ)



รูปที่ 49 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเก็บรักษาโบรมิเลน และโบรมิเลนตรึงด้วยคาร์บอกซีเมทธิล เซลลูโลส เมื่อเก็บรักษาโบรมิเลนในรูปโบรมิเลนอิสระ และโบรมิเลนตรึงทั้งชนิดที่เสริมและไม่เสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์ ในสารละลายอะซีเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 5.0 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ อุณหภูมิ 37° ซ (รูปที่ 49 ก) อุณหภูมิ 25° ซ (รูปที่ 49 ข) และที่อุณหภูมิ 4° ซ (รูปที่ 49 ค) แล้วติดตามวัดแอคติวิตีของโบรมิเลนที่เหลือในทุก ๆ ระยะการเก็บนาน 120 วัน

△ โบรมิเลนอิสระ ○ โบรมิเลนตรึง □ โบรมิเลนตรึงที่เสริมกลูตารัลดีไฮด์



ของการทดลอง ที่น่าสนใจคือไนอะซีเตตบัฟเฟอร์นี้เอนไซม์โบรมิเลนตรึงทั้ง 2 ชนิด ดูเหมือนว่าจะมีความเสถียรสูงกว่าโบรมิเลนอิสระที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในขณะที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนั้นความเสถียรของเอนไซม์อิสระจะสูงขึ้นกว่าเอนไซม์ตรึงเสริมกลูตารัลดีไฮด์เล็กน้อย แต่ก็ยังมีค่าต่ำกว่าเอนไซม์ตรึงคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสที่ไม่ได้เสริมกลูตารัลดีไฮด์ เช่นเดียวกันที่อุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 37 องศาเซลเซียสจะไม่สามารถสังเกตเห็นความแตกต่างของความเสถียรต่ออุณหภูมิของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดอย่างเห็นชัดนัก เพราะจะมีการสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์ไปค่อนข้างเร็วมาก