บทที่ 4

บทสรุปและวิจารณ์

4.1 ศักยภาพของเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มความบริสุทธิ์ของผงโบรมิเลนที่เตรียมโดยวิธีตกตะกอนด้วยอะซีโตน

จากการติดตามทั้งเอกสารวิจัยและค้าขอจดสิทธิบัตรพบว่าการผลิตโบรมิเลนผงจากต้นสับปะรดในระดับอุตสาหกรรมที่ได้ผลดี และเป็นที่นิยมใช้โดยส่วนใหญ่จะทำโดยวิธีตกตะกอนด้วยอะซีโตนและแอลกอฮอล์ (Ball et.al, 1941; Heinicke & Gortner, 1957; Heinicke, 1961; Su et.al, 1967; Makay, 1969; Toyama, 1969; นิมิตพิสุทธิ์ แรงคะชวนะ, 2530) ในงานวิจัยนี้ได้ใช้วิธีที่รายงานไว้โดยนิมิตพิสุทธิ์ แรงคะชวนะ (2530) ผลิตผงโบรมิเลนโดยการตกตะกอนด้วยอะซีโตนจากสารละลายโบรมิเลนที่แยกได้จากต้นสับปะรด พบว่าผงโบรมิเลนที่เตรียมจากสารละลายโบรมิเลนที่บีบจากต้นสับปะรดด้วยเครื่องบีบแบบสกรูให้ค่าแอคติวิตีของผงโบรมิเลนสูงกว่าค่าที่ได้จากการบีบด้วยเครื่องบีบแบบไฮดรอลิค ซึ่งน่าจะเป็นผลเนื่องมาจากวิธีบีบแบบสกรูสามารถทำให้ได้ปริมาณน้ำคั้นจากต้นสับปะรดมากกว่า นอกจากนี้อาจมีผลทำให้เซลของต้นสับปะรดแตกมากกว่าวิธีบีบด้วยไฮดรอลิคจึงทำให้ได้ผลผลิตของผงโบรมิเลนสูงขึ้นมากกว่า ผงโบรมิเลนที่เตรียมได้มีแอคติวิตีสูงประมาณ 352 หน่วยซีดียูต่อมิลลิกรัมผง ซึ่งมีค่าแอคติวิตีสูงกว่าผงโบรมิเลนที่นิมิตพิสุทธิ์ แรงคะชวนะ (2530) เคยรายงานไว้ (102 หน่วยซีดียูต่อมิลลิกรัมผง) เมื่อเตรียมโดยวิธีตกตะกอนด้วยอะซีโตนเช่นเดียวกัน ความแตกต่างนี้อาจมีสาเหตุมาจากหลายประการ เช่นความแตกต่างของอายุต้นสับปะรด ช่วงฤดูของการเก็บเกี่ยว รวมทั้งระยะเวลาในการเก็บรักษาต้นสับปะรดก่อนนำมาสกัดแยกเอนไซม์ ซึ่งปัจจัยเหล่านี้มีรายงานว่ามีผลต่อแอคติวิตีของโบรมิเลน (วินิจ ชำวิวรรธน์, 2527 ; Heinicke & Gortner, 1957) Heinicke (1961) ได้รายงานค่าแอคติวิตีของผงโบรมิเลนที่เตรียมโดยวิธีตกตะกอนด้วยอะซีโตนว่ามีค่าประมาณ 190 หน่วยซีดียูต่อมิลลิกรัมผง นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ชนิดอื่น เช่นเอนไซม์แอซิคฟอสฟาเทส เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และสารอนินทรีย์จำนวนมาก (ประมาณ 20-60 เปอร์เซนต์) ตกตะกอนลงมา

พร้อมกับเอนไซม์โบรมิเลน จึงมีผลให้ผงโบรมิเลนที่เตรียมได้โดยวิธีตกตะกอนด้วยอะซีโตนมีค่าแอคติวิตีต่อมิลลิกรัมผงต่ำ

ผลการเพิ่มความบริสุทธิ์ของผงโบรมิเลนด้วยเทคนิคพื้นฐานทางชีวภาพทั่วไป โดยเริ่มจากการศึกษาชนิดของตัวทำละลาย และความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการละลายผงโบรมิเลน ซึ่งพบว่าความเข้มข้นของผงโบรมิเลนในน้ำกลั่นไม่เกิน 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะให้ค่าการละลายของโปรตีนและเอนไซม์เป็นสัดส่วนกับผงโบรมิเลนที่ละลาย และปริมาณของการละลายของสารไม่ละลายน้ำก็เกือบมีค่าคงที่ ในขณะที่แอคติวิตีของเอนไซม์โบรมิเลนจะลดลงเมื่อละลายใน 0.2 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.6 แสดงให้เห็นค่า ionic strength อาจมีผลต่อความเสถียรของเอนไซม์ ดังนั้นในการเตรียมสารละลายผงโบรมิเลนเพื่อใช้เป็นสารเริ่มต้นในการทำให้บริสุทธิ์สูงขึ้นจึงทำได้โดยการละลายผงโบรมิเลนในน้ำกลั่นแทนที่จะใช้ 0.2 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.6 จึงทำให้ต้องทดลองศึกษาหาความเข้มข้นอะซีโตนที่เหมาะสมในการตกตะกอนผงโบรมิเลนออกจากสารละลายซ้ำใหม่อีกครั้งหนึ่ง ผลการทดลอง (รูปที่ 4) แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของอะซีโตนที่ใช้ตกตะกอนผงโบรมิเลนจากสารละลายในน้ำไม่มีความแตกต่างกับค่าที่ใช้ในการตกตะกอนโบรมิเลนจากสารละลายผงโบรมิเลนใน 0.2 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.6 ซึ่งรายงานไว้โดยนิมิตพิสุทธิ์ ณรงคะชวนะ (2530) (อัตราส่วนของปริมาตรสารละลายเอนไซม์ต่ออะซีโตนมีค่าอยู่ในช่วง 1:3 ถึง 1:4) ดังนั้นในการตกตะกอนโบรมิเลนจากสารละลายผงโบมิเลนในน้ำกลั่นจะใช้อัตราส่วนของสารละลายเอนไซม์ต่ออะซีโตนเป็น 1:3

การไดอะไลซีสเป็นวิธีแรกที่เลือกใช้ในการเพิ่มความบริสุทธิ์ของสารละลายผงโบรมิเลน เพื่อลดปริมาณสารอนินทรีย์ที่มีในผงโบรมิเลนซึ่งแสดงออกด้วยค่าปริมาณเถ้า (ash) ในผงโบรมิเลนที่เตรียมด้วยอะซีโตน เมื่อทดลองไดอะไลซ์สารละลายผงโบรมิเลนในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง แล้วตกตะกอนผงโบรมิเลนด้วยอะซีโตน ผลปรากฏว่าผงโบรมิเลนมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นบ้างเล็กน้อย ให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์สูงขึ้น 1.4 เท่า แอคติวิตีต่อมิลลิกรัมผงเพิ่มขึ้นประมาณ 1.9 เท่า และปริมาณเถ้าลดลงเหลือประมาณ 28 เปอร์เซนต์จากผงเริ่มต้น (รูปที่ 5) อธิบายได้ว่าเทคนิคดังกล่าวน่าจะมีส่วนช่วยในการแยกเอาสารอนินทรีย์ เช่น แร่ธาตุที่เป็นองค์ประกอบของดินหรือของปุ๋ยที่เติมลงไปเหล่านี้ออกจากโมเลกุลของผงโบรมิเลน โดยอาศัยหลักการ

แพร่ของสารที่มีขนาดเล็กกว่ารูของเยื่อสังเคราะห์จึงถูกแยกออกไปได้บ้างบางส่วน ในขณะที่โบรมิเลนซึ่งมีขนาดใหญ่ (น้ำหนักโมเลกุล 33,000) และองค์ประกอบอื่น ๆ เช่น โปรตีนชนิดอื่น และคาร์โบไฮเดรตยังถูกกักขังไว้ภายใน จะเห็นได้ว่าวิธีไดอะไลซีสนี้เพิ่มความบริสุทธิ์ของผงโบรมิเลนได้ไม่มากนักแต่ก็สามารถลดปริมาณสารอนินทรีย์ลงไปได้ Wilson (1974) ให้ข้อสังเกตว่าวิธีไดอะไลซีสไม่เหมาะสมกับการประยุกต์ในอุตสาหกรรมเนื่องจากต้องใช้เวลานาน และต้องใช้ต้นทุนในการผลิตค่อนข้างสูง

การทดลองเพิ่มความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ผงโบรมิเลนด้วยวิธีกรองด้วยอุลตราฟิล-เตรชัน โดยผ่านสารละลายผงโบรมิเลนในเครื่องอุลตราฟิลเตรชันที่ใช้เยื่อแผ่นสังเคราะห์แบบ YM 10 ของบริษัท Amicon (รูปที่ 6) พบแอคติวิตีของโบรมิเลนส่วนใหญ่ในส่วนเอนไซม์เข้มข้นที่เหลืออยู่ในภาชนะ เพราะโบรมิเลนมีน้ำหนักโมเลกุลสูงประมาณ 33,000 ดาลตัน จึงไม่สามารถไหลผ่านแผ่นเยื่อสังเคราะห์ชนิด YM 10 ได้ ส่วนโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลต่ำกว่า 10,000 จะถูกกำจัดออกไปบางส่วน จึงมีผลทำให้ค่าแอคติวิตีต่อน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้นประมาณ 1.5 เท่า และให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะของโบรมิเลนเพิ่มขึ้นประมาณ 1.9 เท่า จะเห็นได้ว่าวิธีอุลตราฟิลเตรชันเหมาะสมสำหรับการทำให้เอนไซม์โบรมิเลนเข้มข้นขึ้นมากกว่าที่จะนำมาใช้ในการเพิ่มความบริสุทธิ์ของผงโบรมิเลน ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานของโชคชัย ธีรกุลเกียรติ (2528) ซึ่งรายงานว่าเทคนิคอุลตราฟิลเตรชันไม่สามารเพิ่มความบริสุทธิ์ของสารละลายผงโบรมิเลนได้มากนัก ไม่ว่าจะใช้เยื่อแผ่นสังเคราะห์ทั้งแบบ YM 10 และ YM 30 ก็ตาม

เมื่อทดลองเพิ่มความบริสุทธิ์ของผงโบรมิเลนด้วยคอลัมน์ดูโอไลซ์ซี 225 ซึ่งเป็นเรซินที่มีธรรมชาติ และสมบัติในการแลกเปลี่ยนประจุบวก ผลปรากฏว่าที่พีเอชของการทดลอง (พีเอช 5.5) จะตรวจพบแอคติวิตีของโบรมิเลนส่วนใหญ่ในส่วนของสารละลายเอนไซม์ที่ไหลผ่านคอลัมน์ที่บรรจุไว้ด้วยดูโอไลซ์ ซี 225 เรซิน ผงโบรมิเลนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยอะซีโตนจะมีแอคติวิตีต่อน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้นประมาณ 1.9 เท่า และมีแอคติวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้น 2 เท่า (รูปที่ 7 และตารางที่ 4) ซึ่งเป็นค่าใกล้เคียงกันกับรายงานของ Heinicke (1969) ถึงแม้จะใช้โบรมิเลนจากแหล่งที่ต่างกัน เป็นที่น่าสังเกตว่าการเพิ่มความบริสุทธิ์ของสารละลายผงโบรมิเลนด้วยคอลัมน์ดูโอไลซ์ ซี 225 เป็นไปในลักษณะที่สารแปลกปลอมอื่น ๆ รวมทั้งโปรตีนบางชนิดเป็นตัวเข้าจับกับเรซินในขณะที่โบรมิเลน

เองไม่จับ ที่สภาวะดังกล่าวนี้เอนไซม์โบรมิเลนจึงควรจะมีประจุสุทธิเป็นลบ นอกจากนี้สารชนิดอื่น ๆ ที่มีประจุลบก็จะไหลผ่านเรซินชนิดนี้ได้เช่นกัน วิธีนี้จึงอาจไม่เหมาะนักที่จะใช้เพิ่มความบริสุทธิ์ของผงโบรมิเลนซึ่งทำให้บริสุทธิ์บางส่วนแล้ว อย่างไรก็ตามขั้นตอนการทำให้โบรมิเลนบริสุทธิ์วิธีนี้น่าจะเหมาะสำหรับการแยกสิ่งปนเปื้อนในน้ำคั้นที่ได้จากต้นสับปะรดโดยตรง ซึ่งมีส่วนประกอบของสิ่งปนเปื้อนสูง และมีปริมาตรของสารละลายเอนไซม์มาก ๆ ด้วย

เทคนิคการเพิ่มความบริสุทธิ์ของโปรตีนที่นิยมใช้กันทั่วไปอีกวิธีหนึ่ง คือ การแยกโดยอาศัยความแตกต่างของขนาดโมเลกุล เมื่อนำสารละลายผงโบรมิเลนที่เตรียมด้วยอะซีโตนมาเพิ่มความบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 100 (รูปที่ 8, ตารางที่ 5) ได้ผงโบรมิเลนที่มีแอคติวิตีต่อน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้น 1.9 เท่า ในขณะที่แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ลดลงเล็กน้อย แสดงให้เห็นว่าเทคนิคของการแยกด้วยเซฟาเดกซ์มีส่วนในการลดปริมาณของสารอินทรีย์บางส่วนลงได้แต่ทำให้แอคติวิตีของผงโบรมิเลนสูญเสียไปบ้าง ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ที่เทคนิคนี้อาจมีการแยกเอามหโมเลกุลบางชนิด เช่นคาร์โบไฮเดรตที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีน หรือโปรตีนบางส่วนที่ปนเปื้อนออกไป จึงทำให้โบรมิเลนที่มีความบริสุทธิ์สูงนี้มีโอกาสถูกย่อยสลายตัวเองได้เพิ่มขึ้นในระหว่างขั้นตอนการเพิ่มความบริสุทธิ์ก็เป็นได้

จากผลการทดลองที่ได้พยายามทำให้ผงโบรมิเลนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยอะซีโตนบริสุทธิ์มากขึ้นด้วยวิธีการต่าง ๆ ไม่สามารถเพิ่มความบริสุทธิ์ของผงโบรมิเลนได้มากนัก โดยเฉลี่ยแล้วสามารถทำให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะของโบรมิเลนสูงขึ้นได้ประมาณ 1.4-2.0 เท่า และมีแอคติวิตีต่อมิลลิกรัมผงเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเช่นกันประมาณ 1.4-1.9 เท่า ผลที่ได้จะได้ผลิตภัณฑ์ของผงโบรมิเลนที่มีค่าแอคติวิตีต่อน้ำหนักแห้งอยู่ในช่วงระหว่าง 281-604 หน่วยซีดียู ซึ่งเป็นค่าความบริสุทธิ์ที่ไม่สูงนัก ซึ่งอาจเป็นได้ว่าการนำผงโบรมิเลนที่ใช้วิธีการเตรียมเริ่มต้นด้วยการตกตะกอนด้วยอะซีโตนแล้วนำมาเพิ่มความบริสุทธิ์ด้วยวิธีที่เหมาะสมอื่น ๆ ต่อไปดังที่ทดลองมานี้ อาจไม่ใช่วิธีที่เหมาะสมในการเตรียมผงโบรมิเลนที่มีแอคติวิตีต่อน้ำหนักแห้ง และแอคติวิตีจำเพาะของโบรมิเลนสูงตามต้องการก็ได้

4.2 การเตรียมโบรมิเลนบริสุทธิ์จากต้นสับปะรด

มีรายงานมากมายว่าแอคติวิตีของโบรมิเลนในสารละลายที่สกัดจากส่วนต่าง ๆ ของสับปะรดสามารถกระตุ้นให้มีแอคติวิตีสูงขึ้นด้วยสารเคมีต่าง ๆ หลายชนิด (Greenberg & Winnick, 1940 ; Heinicke, 1966 ; Toyama, 1969 ; Wiseman, 1973) การศึกษาเบื้องต้นถึงอิทธิพลของสารกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ต่อการทำงานของโบรมิเลนจากน้ำคั้นของต้นสับปะรด พบว่ากรดอะมิโนซีสเทอีนไฮโดรคลอไรด์ และโซเดียมเมทาไบซัลไฟท์ความเข้มข้นเหมาะสมจะสามารถกระตุ้นการทำงานของโบรมิเลนให้สูงขึ้นได้ใกล้เคียงกันประมาณ 1.4-1.5 เท่า (รูปที่ 9 และ 11) และความสามารถในการกระตุ้นการทำงานของโบรมิเลนจะเพิ่มสูงสุดเมื่อเติมกรดเอทธิลลีนไดอะมีนเททระอะซีทิคร่วมกับกรดอะมิโนซีสเทอีนไฮโดรคลอไรด์ (รูปที่ 10) พบว่าจะกระตุ้นให้โบรมิเลนมีแอคติวิตีเพิ่มสูงขึ้นอีกประมาณ 1 เท่าของการทำงานเมื่อกระตุ้นโบรมิเลนด้วยกรดอะมิโนซีสเทอีนไฮโดรคลอไรด์อย่างเดียวโดด ๆ อาจอธิบายได้ว่ากรดอะมิโนซีสเทอีนไฮโดรคลอไรด์ และโซเดียมเมทาไบซัลไฟท์มีคุณสมบัติเป็นตัวรีดิวซ์ สามารถไปรีดิวซ์พันธะไดซัลไฟด์บนโมเลกุลของโบรมิเลนให้เปลี่ยนเป็นหมู่ซัลไฟดริลที่สามารถทำงานได้ในบริเวณแร่งของโบรมิเลน จึงทำให้การทำงานของโบรมิเลนเพิ่มสูงขึ้นได้ (Heinicke, 1966) สำหรับกรดเอทธิลลีนไดอะมีนเททระอะซีทิคนั้นเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการเป็นตัวจับประจุของโลหะต่าง ๆ ได้ดี เช่น Cu^{2+}, Mg^{2+}, Hg^{2+} ที่อาจปนมากับสารละลายเอนไซม์จากน้ำคั้นของต้นสับปะรด โดยเฉพาะอิออนของโลหะปรอท (Hg^{2+}) ซึ่งมีรายงานว่าเป็นสารยับยั้งการทำงานของโบรมิเลน (Glazer & Smith, 1971) ดังนั้นการเติมกรดเอทธิลลีนไดอะมีนเททระอะซีทิคร่วมกับซีสเทอีนไฮโดรคลอไรด์อาจช่วยลดผลของอิออนต่อการยับยั้งการทำงานของโบรมิเลน Smith & Kimmel, 1960 รายงานว่าการเสริมด้วยกรดเอทธิลลีนไดอะมีนเททระอะซีทิคจะมีผลให้มีการกระตุ้นการทำงานของโบรมิเลนสูงกว่าเมื่อมีสารกระตุ้นกรดอะมิโนซีสเทอีนไฮโดรคลอไรด์เพียงอย่างเดียวเช่นกัน

Caygill และคณะ (1983) รายงานว่ากรดโพลีอะไครลิคเป็นสารเคมีที่ใช้ในการตกตะกอนโบรมิเลนจากน้ำคั้นของต้นสับปะรดได้ถ้าใช้ปริมาณที่เหมาะสมทำการตกตะกอน ในงานวิจัยนี้ได้ทำการดัดแปลงวิธีการของ Caygill มาใช้ตกตะกอนโบรมิเลนจากสารละลายโบรมิเลนที่ได้จากต้นสับปะรดโดยใช้กรดโพลีอะไครลิค ผลปรากฏว่า (รูปที่ 12)

อัตราส่วนของปริมาณโปรตีนต่อกรดที่ให้ค่าแอคติวิตีของโบรมิเลนสูงสุดคือที่อัตราส่วน 2.0 สามารถตกตะกอนแอคติวิตีของโบรมิเลนลงมาได้เกือบสมบูรณ์ ในขณะที่พบปริมาณโปรตีน 60 เปอร์เซนต์ และเมื่อนำสารละลายโบรมิเลนที่มีความบริสุทธิ์ของเอนไซม์สูงขึ้นนี้ไปตกตะกอนโบรมิเลนซ้ำด้วยอะซีโตน จะได้ผงโบรมิเลนที่มีแอคติวิตีสูงถึง 2,145 หน่วยซีดียูต่อมิลลิกรัมผง และมีค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไม่เปลี่ยนไปจากเดิมมากนัก (ตารางที่ 6) แสดงให้เห็นว่าการตกตะกอนโบรมิเลนด้วยอะซีโตนในขั้นตอนนี้ไม่ช่วยเพิ่มความบริสุทธิ์ของโบรมิเลน แต่เป็นเพียงวิธีที่ใช้เพื่อแยกโบรมิเลนจากสารละลายเอนไซม์ลงมาให้อยู่ในรูปเอนไซม์ผงเท่านั้น นอกจากนี้ยังพบว่าผงโบรมิเลนที่เตรียมด้วยกรดโพลีอะไคร์ลิคมีปริมาณเถ้าต่ำมาก (มีค่าไม่เกิน 4 เปอร์เซนต์) การทำงานของกรดโพลีอะไคร์ลิคในการตกตะกอนโปรตีนได้ อาจอธิบายว่าเกิดขึ้นได้เนื่องจากกรดโพลีอะไคร์ลิคเป็นสารโมเลกุลใหญ่ที่สามารถแตกตัวให้ประจุลบจำนวนมาก (complex anions) ดังนั้นโปรตีนที่จะสามารถตกตะกอนได้จะต้องเป็นโปรตีนที่มีการแตกตัวให้ประจุสุทธิเป็นบวกในสภาวะของการตกตะกอนนี้ (พีเอช 4.5) มีรายงานว่าเอนไซม์โบรมิเลนจากส่วนลำต้นนี้มีค่าไอโซอิเลคทริคที่พีเอชประมาณ 9.5 (Murachi et.al, 1964) จากผลการทดลองพอจะกล่าวได้ว่าวิธีตกตะกอนโบรมิเลนจากน้ำคั้นต้นสับปะรดด้วยกรดโพลีอะไคร์ลิคเป็นวิธีที่เหมาะสมในการเตรียมโบรมิเลนให้มีความบริสุทธิ์สูง ผงโบรมิเลนที่ได้มีค่าแอคติวิตีต่อน้ำหนักแห้งสูงประมาณ 1,941 หน่วยซีดียูต่อมิลลิกรัมผง ปริมาณผลิตภัณฑ์ของผงโบรมิเลนมีค่าประมาณ 1.2 กรัม จากต้นสับปะรดที่ปอกเปลือกแล้วจำนวน 1 กิโลกรัม (จากค่าเฉลี่ยการทดลอง 7 ครั้ง ดูในภาคผนวกที่ 11) นอกจากนี้ผลการวิจัย (ตารางที่ 7) ยังแสดงให้เห็นว่าการเตรียมโบรมิเลนบริสุทธิ์สูงด้วยกรดโพลีอะไคร์ลิคยังไม่มีข้อจำกัดของวิธีการสกัดโบรมิเลนจากต้นสับปะรดไม่ว่าจะใช้วิธีสกัดด้วยเครื่องตีป่นชนิดตั้งโต๊ะ เครื่องบีบแบบสกรู หรือเครื่องบีบไฮดรอลิค ทุกวิธีสามารถเตรียมได้ผงโบรมิเลนที่มีแอคติวิตีสูงใกล้เคียงกัน

การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการทำแห้งผงโบรมิเลนที่เตรียมด้วยกรดโพลีอะไคร์ลิค ผลการทดลอง (รูปที่ 13 และ 14) พบว่าวิธีอบแห้งด้วยตู้อบสูญญากาศใช้เวลาในการอบแห้งผงโบรมิเลนน้อยกว่าการอบแห้งในตู้อบธรรมดาประมาณ 4 เท่า (ใช้เวลา 20 นาที สำหรับตู้อบสูญญากาศ และใช้เวลา 80 นาทีสำหรับตู้อบธรรมดา) ทั้งนี้

เพราะตู้อบสูญญากาศมีการระเหยเอาน้ำออกไปได้เร็วกว่า แต่อย่างไรก็ตามพบว่าทั้ง 2 วิธีมีการสูญเสียแอคติวิตีใกล้เคียงกัน (ประมาณ 30 เปอร์เซนต์) ซึ่งเป็นผลมาจากการเสียสภาพเอนไซม์ไปเนื่องจากความร้อน (อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส) การที่ตู้อบธรรมดามีการสูญเสียแอคติวิตีไปใกล้เคียงกับตู้อบสูญญากาศ อาจเป็นผลมาจากเวลาที่ใช้ในการอบแห้งในการทดลองนี้ (ไม่เกิน 120 นาที) การสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์อยู่ในระดับใกล้เคียงกัน แต่ถ้าเพิ่มเวลาอบแห้งนานขึ้นคาดว่าการลดลงของแอคติวิตีควรเพิ่มขึ้นตามลำดับ ดังนั้นเพื่อหลีกเลี่ยงไม่ให้เกิดผลกระทบจากอุณหภูมิให้มากนัก จึงเลือกใช้วิธีอบแห้งด้วยตู้อบสูญญากาศ เพื่อให้ผงโบรมิเลนสัมผัสอยู่ ณ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสน้อยที่สุด

เมื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบความเสถียรของผงโบรมิเลน ผลการทดลอง (รูปที่ 15) แสดงให้เห็นอย่างเด่นชัดว่าผงโบรมิเลนที่เตรียมด้วยกรดโพลีอะไคร์ลิคมีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงกว่าผงโบรมิเลนที่เตรียมด้วยอะซิโตน ซึ่งเป็นข้อดีของผลิตภัณฑ์ผงโบรมิเลนที่เตรียมได้ในเชิงพาณิชย์อีกด้วย และเมื่อทำการทดลองเก็บผงโบรมิเลนที่เตรียมด้วยกรดโพลีอะไคร์ลิคไว้ที่อุณหภูมิห้องพบว่าที่แอคติวิตีเหลือประมาณ 50 เปอร์เซนต์เมื่อเก็บนาน 1 เดือน และความคงตัวของผงโบรมิเลนจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเติมโซเดียมเบนโซเอตเป็นสารเพิ่มความเสถียรของผงโบรมิเลน ผลจากการศึกษาผลกระทบของสารเพิ่มความเสถียรชนิดต่าง ๆ คือกรดอะมิโนซีสเทอีนไฮโดรคลอไรด์ โซเดียมเบนโซเอตและน้ำตาลแลคโตส ต่อแอคติวิตีของผงโบรมิเลนที่อุณหภูมิ 25 และ 4 องศาเซลเซียส (รูปที่ 17 และ 18) แสดงให้เห็นว่าการเก็บรักษาผงโบรมิเลนไว้ที่อุณหภูมิต่ำประมาณ 4 องศาเซลเซียส ผงโบรมิเลนจะมีความคงตัวสูงสุด และที่อุณหภูมินี้ไม่พบความแตกต่างของผลกระทบจากสารเพิ่มความเสถียรชนิดต่าง ๆ มากนัก ในขณะที่ความเสถียรของผงโบรมิเลนที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสจะเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อมีสารเพิ่มความเสถียรต่าง ๆ อยู่ด้วย ในจำนวนสารเพิ่มความเสถียรเหล่านี้พบว่าโซเดียมเบนโซเอต 1% น่าจะเป็นสารเพิ่มความเสถียรที่ดีสุด รองลงมาคือ ซีสเทอีนไฮโดรคลอไรด์ และน้ำตาลแลคโตส การที่สารเหล่านี้สามารถรักษาความเสถียรของผงโบรมิเลนได้คาดว่าเป็นผลมาจากการเป็นตัวช่วยป้องกันการเกิดออกซิเดชั่นที่บริเวณเร่งของเอนไซม์จากสารที่ทำให้เกิดออกซิเดชั่นต่าง ๆ เช่น ออกซิเจน (Heinicke, 1966) นอกจากนี้ผงเบนโซเอตยัง

ช่วยป้องกันการปนเปื้อนของแบคทีเรีย หรือจุลชีพบางชนิดได้อีกด้วย

4.3 <u>การเพิ่มความบริสุทธิ์ของผงโบรมิเลนที่เตรียมได้จากการตกตะกอนด้วยกรดโพลีอะไคร์ลิค</u>

ผงโบรมิเลนที่เตรียมโดยการตกตะกอนด้วยกรดโพลีอะไคร์ลิดถึงแม้จะมีแอคติวิตีต่อมิลลิกรัมผง และแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์สูงก็ตาม แต่เมื่อนำมาศึกษาความบริสุทธิ์ของโบรมิเลนโดยการติดตามรูปแบบของโปรตีนที่ได้จากเทคนิคโพลีอะไคร์ละไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซีสก็ยังตรวจพบจำนวนแถบสีของโปรตีนมากถึง 7 แถบ แสดงให้เห็นว่ายังมีโปรตีนอีกหลายชนิดที่ปนเปื้อนอยู่กับโบรมิเลน เมื่อทำการศึกษาดูว่าองค์ประกอบใดของโปรตีนซึ่งแยกได้เป็นส่วนที่มีแอคติวิตีของโบรมิเลน โดยผ่าแท่งเจลที่ได้หลังจากทำอิเลคโตรโฟรีซีสเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งนำไปย้อมสีโปรตีน และอีกส่วนนำไปตัดเป็นท่อน ๆ ชิ้นละประมาณ 0.5 เซนติเมตร บดในสารละลายบัฟเฟอร์ แล้วตรวจสอบแอคติวิตีของโบรมิเลน พบว่าไม่สามารถตรวจพบแอคติวิตีของโบรมิเลนได้เลย ทั้งนี้อาจเป็นเพราะปริมาณโบรมิเลนที่ใส่ลงในแท่งเจลอาจน้อยเกินไปจนไม่สามารถตรวจพบแอคติวิตีหรืออาจเป็นเพราะในระหว่างการแยกด้วยเทคนิคโพลีอะไคร์ละไมด์เจลมีการสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์โบรมิเลนไปก็ได้ ผลการทดลอง (ภาคผนวกที่ 9) พบว่าโพลีอะไคร์ละไมด์เจลสามารถยับยั้งแอคติวิตีของโบรมิเลนบางส่วนได้ด้วย อย่างไรก็ตามในการที่จะศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของโบรมิเลนเอง จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องเพิ่มความบริสุทธิ์ของโบรมิเลนที่ผลิตให้ได้มากที่สุดเท่าที่จะทำได้ ทั้งนี้เพื่อลดผลของปฏิกิริยาข้างเคียงอันอาจเกิดจากองค์ประกอบอื่นที่ปะปนอยู่ด้วย อีกประการหนึ่งการจะนำผงโบรมิเลนไปใช้อุตสาหกรรมบางประเภทจำเป็นต้องใช้ผงโบรมิเลนที่มีความบริสุทธิ์สูง ๆ เช่นในอุตสาหกรรมยา และอาหารบางประเภท (Berndt, et.al, 1968)

ในงานวิจัยนี้ได้พยายามเพิ่มความบริสุทธิ์ของผงโบรมิเลนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกรดโพลีอะไคร์ลิคด้วยเทคนิคต่าง ๆ พบว่าวิธีการเพิ่มความบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์คาร์-บอกซีเมทธิลเซลลูโลสติดตามด้วยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 100 สามารถเพิ่มความบริสุทธิ์ของผงโบรมิเลนได้สูงสุด ถึงแม้ว่าวิธีนี้จะแยกองค์ประกอบของโบรมิเลนให้มีค่าแอคติวิตีจำเพาะ และค่าแอคติวิตีต่อน้ำหนักแห้งเพิ่มสูงขึ้นได้ไม่มากนัก (ตารางที่ 10) แต่วิธีนี้ก็สามารถแยกองค์ประกอบของโบรมิเลนที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้นได้ (ลดชนิดของโปรตีนที่

แยกได้ลง รูปที่ 25) การที่ค่าแอคติวิตีจำเพาะของสารละลายเอนไซม์โบรมิเลนเพิ่มขึ้น อาจเป็นผลเนื่องมาจากในขั้นตอนการเพิ่มบริสุทธิ์ของโบรมิเลนโดยการแยกโปรตีนชนิดอื่นออกไปนั้น อาจมีการแยกเอาองค์ประกอบบางส่วนของโบรมิเลน เช่นคาร์โบไฮเดรต หรืออาจมีการแยกเอาเอนไซม์โบรมิเลนในรูปแบบบางรูปซึ่งอาจมีคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาได้เหมือนกัน แต่มีสมบัติทางกายภาพบางชนิดต่างกันและมีแอคติวิตีน้อยกว่าซึ่งปะปนมาในสารละลายผงโบรมิเลนบางส่วนออกไปด้วยคอลัมน์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส Minami และคณะ (1971) ได้รายงานการแยกองค์ประกอบของโบรมิเลนด้วยเทคนิคไอโซอีเลคทริคโฟกัสซิ่ง ว่าสามารถแยกองค์ประกอบโบรมิเลนที่เป็นโปรตีนเบส (basic protein) และโปรตีนกรด (acidic protein) ออกจากกันได้ และมีค่าไอโซอิเลคทริคที่พีเอช 9.45 และ 4.7 ตามลำดับ Murachi และคณะ (1964) รายงานว่าโปรตีนที่มีแอคติวิตีของโบรมิเลนสูงซึ่งแยกได้จากต้นสับปะรดมีคุณสมบัติเป็นโปรตีนจำพวกโปรตีนเบสที่มีค่าไอโซอิเลคทริคพีเอชประมาณ 9.55 ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าโบรมิเลนที่แยกได้จากคอลัมน์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสในงานวิจัยนี้ ซึ่งเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ และมีแอคติวิตีของโบรมิเลนสูง (รูปที่ 20) น่าจะเป็นโปรตีนในกลุ่มโปรตีนเบสเช่นเดียวกัน และเมื่อนำส่วนของโบรมิเลนที่แยกได้จากคอลัมน์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสไปเพิ่มความบริสุทธิ์ต่อด้วยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 100 คาดว่ามีการแยกโปรตีนชนิดอื่นออกไปได้บ้างอีกเช่นกัน และอาจเป็นไปได้ว่ามีการแยกเอาองค์ประกอบของเอนไซม์บางส่วน เช่น คาร์โบไฮเดรตออกไป จึงทำให้โบรมิเลนมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นได้เล็กน้อย Murachi (1964) ; Scocca & Lee (1969) ; Husain และ Lowe (1970) ได้รายงานการใช้คอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 100 ว่าสามารถเพิ่มค่าแอคติวิตีจำเพาะของโบรมิเลนได้เล็กน้อยเช่นกัน เป็นไปได้ว่าการจะเพิ่มความบริสุทธิ์ของโบรมิเลนให้มากขึ้นอาจต้องการขั้นตอนที่มากกว่านี้หรือต้องการขั้นตอนที่มีความจำเพาะสูง เช่นเทคนิคของแอฟฟินิตีโครมาโตกราฟฟี (Bobb , D., 1972 ; Cooreman ,et. al, 1976)

ผลการศึกษาความบริสุทธิ์ของโบรมิเลนในแต่ละขั้นของการแยกด้วยทั้งคอลัมน์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส และเซฟาเดกซ์จี 100 (รูปที่ 24) ถึงแม้จะพบรูปแบบของการแยกโบรมิเลนมีความสมมาตร และมีเพียงองค์ประกอบเดียวแล้วก็ตาม แต่จากรูปแบบการแยกโปรตีนด้วยเทคนิคโพลีอะไครล์ละไมด์เจล อิเลคโตรโฟรีซีส (รูปที่ 25)

กลับแสดงให้เห็นว่ามีองค์ประกอบของเอนไซม์ถึง 2 ชนิด ที่เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่แถบหนึ่ง และองค์ประกอบรองอีกแถบหนึ่ง (แถบสีเข้มและจางต่างกัน) ซึ่งยังไม่ทราบแน่ว่าเป็นโปรตีนที่ปนเปื้อนมา หรืออาจเป็นโปรตีนที่เป็นผลมาจากการย่อยสลายตัวเองของเอนไซม์โบรมิเลนที่เกิดขึ้นในระหว่างขั้นตอนของการเพิ่มความบริสุทธิ์ก็เป็นได้ (Ota 1964, 1968)

และเมื่อเปรียบเทียบความเสถียรของผงโบรมิเลนที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (รูปที่ 26) พบว่าการเพิ่มความบริสุทธิ์ของผงโบรมิเลนไม่มีผลต่อการเพิ่มความเสถียรของโบรมิเลน และการเพิ่มความบริสุทธิ์บางวิธีมีแนวโน้มลดความเสถียรลงกว่าเดิม แสดงให้เห็นว่าการแยกองค์ประกอบอื่น ๆ เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต หรือแร่ธาตุต่าง ๆ ออกไป อาจทำให้ผงโบรมิเลนได้รับอิทธิพลของสภาวะที่มีผลทำให้เอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติ เช่น ความร้อนได้มากกว่าผงโบรมิเลนที่อยู่ในลักษณะที่เป็นองค์ประกอบของสารหลาย ๆ ชนิดก็ได้

4.4 <u>การศึกษาสมบัติทางกายภาพ และจลนศาสตร์ของโบรมิเลน</u>

การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมในการย่อยสลายสับสเตรทเคซีนด้วยเอนไซม์โบรมิเลน ทำให้ช่วยพีเอชตั้งแต่ 6.0 ขึ้นไป เพราะสับสเตรทเคซีนจะละลายได้น้อยลงเมื่อพีเอชของสารละลายต่ำกว่า 6.0 ผลการทดลอง (รูปที่ 27) แสดงให้เห็นว่าโบรมิเลนที่เตรียมด้วยกรดโพลีอะไคร์ลิคทั้งชนิดที่นำไปเพิ่มความบริสุทธิ์ขั้นด้วยคอมสัมน์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสตามด้วยคอลัมน์เซฟาเดกซ์จี 100 และชนิดที่ไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น มีพีเอชที่เหมาะสมในการย่อยเคซีนในช่วงพีเอชที่เป็นด่างทั้งคู่ โดยที่โบรมิเลนบริสุทธิ์สูงจะมีช่วงพีเอชของการทำงานกว้างกว่าเล็กน้อย (พีเอช 8-10) อาจอธิบายได้ว่าที่บริเวณเร่งของเอนไซม์โบรมิเลนมีกรดอะมิโนซีสเทอีนซึ่งจำเป็นในการทำงานของเอนไซม์อยู่ (Murachi และ Yasui, 1965) และค่าการแตกตัวของกรดอะมิโนซีสเทอีน (pK_a) มีค่าประมาณ 8.3 ดังนั้นการทำงานของโบรมิเลนจะเกิดได้ดีที่พีเอชสูง ๆ ในช่วงที่เป็นด่าง การเพิ่มความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ไม่ได้ทำให้โครงรูปของเอนไซม์โบรมิเลนเปลี่ยนไปมากนักโดยเฉพาะที่บริเวณเร่ง โบรมิเลนบริสุทธิ์สูงจึงยังคงสามารถย่อยสับสเตรทเคซีนได้ดีในช่วงพีเอชที่เป็นด่างเช่นกัน เพียงแต่โอกาสที่สับสเตรทเคซีนจะเข้ามาอยู่ใกล้ชิดกับเอนไซม์โบรมิเลนบริสุทธิ์มีมากกว่าโบรมิเลนที่ไม่ได้เพิ่มความบริสุทธิ์ จึงพบว่ามีช่วงพีเอชของการทำงาน

กว้างกว่าเล็กน้อย และเมื่อพีเอชเพิ่มมากกว่า 10.0 เอนไซม์โบรมิเลนทั้ง 2 ชนิดอาจจะเสียสภาพธรรมชาติไปบางส่วนมีผลให้การทำงานของเอนไซม์โบรมิเลนลดลงอย่างเห็นได้ชัด

การศึกษาพีเอชต่อความเสถียรของโบรมิเลน (รูปที่ 29) อาจอธิบายได้ด้วยเหตุผลเดียวกันว่า การที่โบรมิเลนทั้ง 2 ชนิด มีความเสถียรสูงในด้านพีเอชค่อนไปทางกรด (พีเอชประมาณ 3-8) อาจเป็นเพราะพีเอชช่วงที่เป็นกรดนี้หมู่ซัลไฟดริลของกรดอะมิโนซีสเทอีนในบริเวณเร่งจะไม่อยู่ในรูปที่เหมาะต่อการทำงาน การย่อยตัวเองของเอนไซม์โบรมิเลนจึงเกิดได้น้อยกว่าเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นด่าง ซึ่งโบรมิเลนสามารถทำงานได้ดี · หรืออาจเป็นไปได้ว่ามีกลุ่มบางกลุ่มของกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมไม่มากนักในสภาวะที่ค่อนไปทางกรด แต่เมื่อพีเอชสูงมากขึ้นจะมีผลกระทบต่อกลุ่มดังกล่าวได้มากจึงเสียสภาพธรรมชาติไปอย่างรวดเร็วได้

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์โบรมิเลนจะอยู่ในช่วง 60-65 องศาเซลเซียส ทั้งในโบรมิเลนที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน และโบรมิเลนบริสุทธิ์สูง แสดงให้เห็นว่าการทำงานของโบรมิเลนนี้ไม่ขึ้นอยู่กับเอนไซม์อื่น ๆ ที่เป็นองค์ประกอบ (รูปที่ 28) เมื่อทดลองเก็บสารละลายโบรมิเลนไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ (37 -70° ซ) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่าที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส โบรมิเลนทั้ง 2 ชนิด ไม่มีความแตกต่างของความเสถียร ในขณะที่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้น (50 องศาเซลเซียส) โบรมิเลนบริสุทธิ์จะมีความเสถียรน้อยลง (รูปที่ 30 ค.) ซึ่งเป็นผลมาจากการเพิ่มอุณหภูมิทำให้อัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นจนมองเห็นความแตกต่างของความเสถียรต่ออุณหภูมิในโบรมิเลนทั้ง 2 แหล่ง โบรมิเลนบริสุทธิ์สูงมีการกำจัดเอาโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตบางส่วนออกไป จึงได้รับอิทธิพลของความร้อนโดยตรงมากกว่าในขณะที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิเดียวกัน และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นอีกจนถึง 70 องศาเซลเซียส โบรมิเลนทั้ง 2 ชนิดจะถูกทำลายสภาพธรรมชาติของเอนไซม์ไปอย่างรวดเร็ว

เมื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบความสามารถของโบรมิเลนจากแหล่งต่าง ๆ ในการเข้าทำปฏิกริยากับสับสเตรทเคซีน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 โดยดูจากค่า K_m ที่ได้จากการสร้างความสัมพันธ์ตามวิธี Lineweaver - Burk Plot พบว่าโบรมิเลนในสารละลายที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์ (น้ำคั้นต้นสับปะรด) สารละลายของโบรมิเลนที่ผ่านการเพิ่มความบริสุทธิ์ด้วยอะซีโตน ด้วยกรดโพลีอะไครลิค และโบรมิเลน

ที่มีความบริสุทธิ์สูง (ผ่านคอลัมน์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส และเซฟาเดกซ์ จี 100) จะให้ค่า K_m ต่อสับสเตรทเคซีนไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าความจำเพาะต่อเคซีน หรือความสามารถของโบรมิเลนในการจับกับสับสเตรทเคซีนไม่เปลี่ยนแปลงไปมากนัก ถึงแม้โบรมิเลนจะมีความบริสุทธิ์สูงขึ้นจนเกือบเหลือเพียงโปรตีนชนิดเดียวแล้วก็ตาม แสดงให้เห็นว่าการแยกเอาองค์ประกอบบางส่วนส่วนที่ไม่ใช่โปรตีน หรือโปรตีนที่ไม่ใช่เอนไซม์ หรือแม้กระทั่งโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ที่เป็นองค์ประกอบส่วนน้อยบางส่วนออกไปจะไม่มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาของโบรมิเลนแต่อย่างไร

4.5 <u>การตรึงโบรมิเลนด้วยคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส</u>

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาวิธีตรึงโบรมิเลนด้วยคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส และติดตามด้วยการทำปฏิกิริยาของโบรมิเลนตรึงคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส กับสารเสริมความแข็ง (strength) ของเอนไซม์ตรึง ในที่นี้ใช้กลูตารัลดีไฮด์ซึ่งเป็นสารที่มีกลุ่มปฏิกิริยา 2 กลุ่มต่อโมเลกุล และมีรายงานมากมายที่ใช้ในการตรึงโปรตีเอสได้โดยการเกิด cross - linking (Ohmiya และคณะ, 1978 ; Khan และ Siddigi (1985) ;Dua และคณะ, 1985)

คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสได้ถูกใช้เป็นวัสดุตรึงเอนไซม์ทริปซิน แอลฟา - ไคโมทริปซิน มาตั้งแต่ปี ค.ศ.1969 (Chibata, 1978) ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสเป็นวัสดุตรึงเอนไซม์เพราะเป็นสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากธรรมชาติ เมื่อใช้ตรึงเอนไซม์แล้วผลผลิตที่ได้จะสามารถนำไปใช้ประโยชน์สำหรับมนุษย์หรือสัตว์ได้โดยไม่มีผลกระทบข้างเคียง ทำให้เหมาะสมที่จะประยุกต์ในขบวนการทางด้านอาหารได้ จากผลงานวิจัยได้พบปัจจัยที่มีผลกระทบต่อแอคติวิตีของโบรมิเลนตรึงคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส เช่น ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ พีเอชของสารละลายที่ใช้ทำปฏิกิริยา ionic strength ของสารละลายที่ใช้ และเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาเหล่านี้เป็นต้น ผลการทดลอง (รูปที่ 35) แสดงให้เห็นว่าโบรมิเลนสามารถจับกับคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสได้ดีเมื่อมีปริมาณเอนไซม์ไม่สูงนัก (ปริมาณโปรตีน 3-6 มิลลิกรัม) อาจเป็นเพราะโบรมิเลนเป็นเอนไซม์ที่มีขนาดค่อนข้างใหญ่และมีสายคาร์โบไฮเดรตเชื่อมต่อกับโมเลกุลด้วย การศึกษาผลของเวลาในการตรึงโบรมิเลนพบว่าโบรมิเลนจะจับกับคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสได้เร็ว

มาก (รูปที่ 36) การจับกันจะเสร็จสิ้นสมบูรณ์ถึงขั้นอิ่มตัวภายในเวลา 10 นาที สำหรับการศึกษา ionic strength ของบัฟเฟอร์ต่อการตรึงพบว่าการตรึงจะเกิดขึ้นได้ดีในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า ionic strength ไม่สูงนัก (0.05 โมลาร์) (รูปที่ 37) ทั้งนี้เป็นผลมาจากการเพิ่ม ionic strength จะทำให้ความเสถียรของเอนไซม์ลดลง ซึ่งผลการทดลองที่สนับสนุนได้รายงานไว้ในข้างต้นแล้ว (ดูรูปที่ 1) เนื่องจากการตรึงโบรมิเลนด้วยคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสนี้เป็นการตรึงด้วยวิธีอิออนิก จึงได้ทำการศึกษาผลของพีเอชต่อการตรึงโบรมิเลน (รูปที่ 38) แสดงให้เห็นว่าการตรึงเกิดขึ้นได้ดีในสภาวะที่พีเอชเป็นกรด (พีเอชประมาณ 3.5-5.5) ซึ่งอยู่ในช่วงพีเอชที่เอนไซม์โบรมิเลนมีความเสถียรสูง ในขณะเดียวกันก็มีส่วนของโมเลกุลที่มีประจุเป็นบวกเหมาะกับการจับกลุ่มคาร์บอกซีลบนเซลลูโลสได้สูงด้วยเช่นกัน เมื่อเพิ่มพีเอชให้สูงขึ้นมีแนวโน้มว่าการจับของโบรมิเลนกับคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสจะลดลง คุณสมบัติที่กล่าวถึงนี้เป็นข้อจำกัดของการนำโบรมิเลนตรึงคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสไปใช้ในการย่อยสลายโปรตีนในสภาวะที่พีเอชสูง ๆ (พีเอชที่เหมาะสมของการเร่งปฏิกิริยาด้วยโบรมิเลนมีค่าประมาณ 9-10) จึงได้ศึกษาหาวิธีเพิ่มความเสถียรของโบรมิเลนตรึงคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสให้สูงขึ้น โดยการเสริมด้วยสารจำพวกที่มีกลุ่มที่ว่องไวต่อปฏิกิริยาหลายกลุ่มในที่นี้เลือกกลูตารัลดีไฮด์

เมื่อทดลองตรึงโบรมิเลนด้วยคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสแล้วเสริมด้วยกลูการัลดีไฮด์ความเข้าข้น 0.01 โมลาร์ พบว่าไม่สามารถเพิ่มความเสถียรทางกายภาพของโบรมิเลนตรึง เมื่อนำมาเขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (รูปที่ 42) ซึ่งอาจอธิบายได้ว่ากลูตารัลดีไฮด์ที่เสริมเข้าไปนี้สามารถเชื่อมต่อภายในโมเลกุล หรือเชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลโบรมิเลนทำให้มีโครงรูปที่คงตัวขึ้น แต่กลูตารัลดีไฮด์ไม่สามารถเชื่อมต่อกับคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสที่ใช้เป็นสารตรึงเอนไซม์ได้ เนื่องจากไม่มีหมู่ที่จะเข้าทำปฏิกิริยากัน จึงทำให้โบรมิเลนตรึงทั้งชนิดที่เสริมและไม่เสริมกลูตารัลดีไฮด์มีความเสถียรทางกายภาพใกล้เคียงกัน

สำหรับเฮกซาเมทธิลลีนไดอะมีน ซึ่งเป็นสารเพิ่มความแข็งของเอนไซม์ตรึงอีกชนิดซึ่งมีรายงานว่าสามารถเพิ่มความเสถียรของเอนไซม์ได้เมื่อทำงานร่วมกับกลูตารัลดีไฮด์ (Chibata, 1982) แต่สำหรับในงานวิจัยนี้พบว่าเฮกซาเมทธิลลีนไดอะมีนไม่สามารถเพิ่มความเสถียรทางกายภาพให้โบรมิเลนตรึงคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสที่เสริมด้วยกลูตารัล

ดีไฮด์ (รูปที่ 40) นอกจากนี้ยังไปยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์อย่างรุนแรงอีกด้วยจึงไม่ได้เลือกการตรึงเอนไซม์โดยเสริมด้วยเฮกซาเมทธิลลีนไดอะมีน

4.6 การศึกษาสมบัติของโบรมิเลนและโบรมิเลนตรึงคาร์บ๊อกซีเมทธิลเซลลูโลส

การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมในการย่อยสลายเคซีน (รูปที่ 43) พบว่าโบรมิเลนทั้ง 3 รูปแบบ คือ โบรมิเลนอิสระ โบรมิเลนตรึงทั้งชนิดที่เสริมและไม่เสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์ สามารถเร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์เคซีนได้ดีที่พีเอชประมาณ 9.6 เท่ากัน แสดงให้เห็นว่าการตรึงโบรมิเลนไม่มีผลทำให้โครงรูปของเอนไซม์เปลี่ยนไปโดยเฉพาะที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ โบรมิเลนตรึงจึงทำงานได้ในสภาวะเดียวกับเมื่ออยู่ในรูปเอนไซม์อิสระ และเมื่อทำการศึกษาความเสถียรต่อพีเอช (รูปที่ 45) จึงพบว่าโบรมิเลนตรึงทั้งชนิดที่เสริมและไม่เสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์ไม่มีผลในการเพิ่มความเสถียรต่อพีเอชเช่นกัน

เมื่อศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของโบรมิเลนพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยสลายเคซีนของโบรมิเลนตรึงทั้งชนิดที่เสริมและไม่เสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์มีค่าใกล้เคียงกัน (45 องศาเซลเซียส) และมีความเสถียรต่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นกว่าเอนไซม์อิสระในช่วงอุณหภูมิ 30-50 องศาเซลเซียส (รูปที่ 46) คาดว่าเป็นผลมาจากการตรึงเอนไซม์ไว้บนคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสจะช่วยให้เอนไซม์มีโครงรูปที่แน่นอนขึ้น โดยเฉพาะเมื่อเสริมกลูตารัลดีไฮด์ให้เป็นตัวเชื่อมภายในโมเลกุล การเปลี่ยนแปลงรูปแบบโครงสร้างของโบรมิเลนตรึงชนิดเสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์เมื่อได้รับอิทธิพลของความร้อนจึงเกิดขึ้นน้อย (รูปที่ 46 ข.)

เมื่อเปรียบเทียบค่าคงที่ทางจลนศาสตร์ของโบรมิเลนทั้ง 3 ชนิด พบว่าการตรึงเอนไซม์ทำให้ค่า K_m ลดลง โบรมิเลนตรึงคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสจะมีค่า K_m ต่ำที่สุด (รูปที่ 47) อาจอธิบายได้ว่าการตรึงโบรมิเลนบนคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสนี้โบรมิเลนจะถูกตรึงให้มีรูปที่ค่อนข้างแน่นอนเป็นการลดพลังงานจลน์บางส่วนของโมเลกุลเอนไซม์ลง เนื่องจากโมเลกุลของสับสเตรทเคซีนมีขนาดใหญ่การลดพลังงานจลน์ของเอนไซม์ลงจะมีผลทำให้โอกาสที่เอนไซม์จะจับกับสับสเตรทตรงตำแหน่งที่มีความจำเพาะได้มากขึ้น และสับสเตรทจะถูกย่อยสลายได้มากกว่าเมื่อเอนไซม์อยู่ในสภาวะที่เป็นอิสระ แต่เมื่อเสริมกลูตารัลดีไฮด์มาเป็นตัวเชื่อมโครงสร้างของโมเลกุล โอกาสที่โครงรูปของเอนไซม์จะ

เปลี่ยนไปจึงมีน้อยกว่าเมื่ออยู่ในรูปเอนไซม์ตรึงชนิดไม่เสริมกลูตารัลดีไฮด์ ดังนั้นการที่เอนไซม์จะขดตัวให้มีลักษณะโครงรูปที่พอเหมาะกับการเข้าทำปฏิกิริยาของสับสเตรทจึงเกิดขึ้นได้น้อยกว่าด้วย

การเก็บรักษาโบรมิเลนพบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของโบรมิเลนทั้งที่อยู่สภาพอิสระ และโบรมิเลนตรึงคือที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งเอนไซม์จะลดการทำงานลง โบรมิเลนอิสระมีความเสถียรเมื่อเก็บรักษาในฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 มากกว่าอะซีเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 ซึ่งให้ผลสนับสนุนกับผลการทดลองข้างต้น (รูปที่ 29) ในขณะที่โบรมิเลนตรึงคาร์บอกซีเมทธิลลูโลสทั้งชนิดที่เสริมและไม่เสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์ แสดงให้เห็นว่าเหมาะสมที่จะเก็บในสารละลายอะซีเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 มากกว่า ทั้งนี้อาจเป็นเพราะพีเอชมีผลกระทบต่อการจับของโบรมิเลนกับคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส ซึ่งได้กล่าวมาแล้วในข้างต้นว่าที่พีเอช 5.0 การจับกันเกิดขึ้นได้ดีกว่าที่พีเอช 7.0 ดังนั้นเมื่อเก็บโบรมิเลนตรึงไว้ที่พีเอช 7.0 เป็นไปได้ว่าจะมีโบรมิเลนบางส่วนที่หลุดออกจากโบรมิเลนตรึงคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสได้ และพบว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โบรมิเลนตรึงทั้ง 2 ชนิดมีความเสถียรกว่าเอนไซม์อิสระ แต่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โบรมิเลนตรึงคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสมีความเสถียรสูงสุด แสดงให้เห็นว่าการตรึงโบรมิเลนด้วยคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสทำให้เอนไซม์มีความเสถียรต่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น

สรุปผลการทดลอง

1. การทำให้โบรมิเลนจากน้ำคั้นต้นสับปะรดบริสุทธิ์ โดยการตกตะกอนด้วยอะซีโตน ได้ผงโบรมิเลนที่มีแอคติวิตีประมาณ 352 ±9 หน่วยซีดียู่ต่อมิลลิกรัมผง แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ 2.4×10^3 หน่วยซีดียูต่อมิลลิกรัมโปรตีน และเตรียมได้ผลิตภัณฑ์ผงโบรมิเลน 3.7 กรัมต่อต้นสับปะรด 1 กิโลกรัม

2. ผลการเพิ่มความบริสุทธิ์ของผงโบรมิเลนด้วยเทคนิคทางชีวภาพต่าง ๆ กัน ให้ผลดังนี้

วิธี	แอคติวิตีสัมพัทธ์[1]	แอคติวิตีจำเพาะสัมพัทธ์[2]
ไดอะไลซีส	1.9	1.4
อุลตราฟิลเตรชัน	1.5	1.9
ดูโอไลซ์ ซี 225	1.9	2.0
เซฟาเดกซ์ จี 100	1.9	0.8

[1] แอคติวิตีสัมพัทธ์ = $\frac{\text{แอคติวิตีผงโบรมิเลน}}{\text{แอคติวิตีผงโบรมิเลนเริ่มต้น}}$

[2] แอคติวิตีจำเพาะสัมพัทธ์ = $\frac{\text{แอคติวิตีจำเพาะ}}{\text{แอคติวิตีจำเพาะของผงเริ่มต้น}}$

3. ผลการศึกษาสารกระตุ้นแอคติวิตีของโบรมิเลนจากน้ำคั้นต้นสับปะรดพบกรดอะมิโนซีสเทอีนไฮโดรคลอไรด์ 6 มิลลิโมลาร์ที่มีกรดเอทธิลลีนไดอะมีนเททระอะซีทิคความเข้มข้น 5-10 มิลลิโมลาร์ สามารถกระตุ้นการทำงานของโบรมิเลนสูงสุดประมาณ 4.3 เท่าของการทำงานเมื่อไม่มีสารกระตุ้น

4. การเตรียมผงโบรมิเลนบริสุทธิ์สูงจากต้นสับปะรดโดยการตกตะกอนโบรมิเลนจากน้ำคั้นต้นสับปะรดด้วยกรดโพลีอะไครลิค ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในอัตราส่วน

ของปริมาณโปรตีนต่อกรดเท่ากับ 2.0 ได้ผงโบรมิเลนที่มีแอคติวิตีสูง 1,941 หน่วยซีดียูต่อมิลลิกรัมผง แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ 3.17×10^3 หน่วยซีดียูต่อมิลลิกรัมโปรตีน และปริมาณเถ้า 3.9 เปอร์เซนต์ ปริมาณผลิตภัณฑ์ผงโบรมิเลนที่ได้ 1.2 กรัมต่อต้นสับปะรด 1 กิโลกรัม

5. ผลการเพิ่มความบริสุทธิ์ของโบรมิเลนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกรดโพลีอะไคร์ลิคด้วยเทคนิคต่าง ๆ ให้ผลดังนี้

วิธี	แอคติวิตีสัมพัทธ์	แอคติวิตีจำเพาะสัมพัทธ์
อุลตราฟิลเตรชัน	1.2	1.0
คอลัมน์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส	1.0	1.2
คอลัมน์เซฟาเดกซ์จี 100	1.2	1.2
คอลัมน์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส ตามด้วยเซฟาเดกซ์จี 100	1.1	1.3

6. การแยกให้ได้โบรมิเลนบริสุทธิ์สูงทำได้โดยการผ่านสารละลายผงโบรมิเลนที่เตรียมด้วยกรดโพลีอะไคร์ลิคลงในคอลัมน์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส ชะโบรมิเลนด้วยเกรเดียนท์แบบเส้นของสารละลายผสมโพแตสเซียมคลอไรด์ แยกเอาโบรมิเลนที่เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ (0.12 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์) ไปผ่านต่อในคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 100 แล้วนำไปตกตะกอนด้วยอะซิโตน ได้ผงโบรมิเลนที่มีแอคติวิตีสูง 2,255 หน่วยซีดียูต่อมิลลิกรัมผง แอคติวิตีจำเพาะ 3.53×10^3 หน่วยซีดียูต่อมิลลิกรัมโปรตีน ในปริมาณผลิตภัณฑ์ผงโบรมิเลน 0.2 กรัมจากผงโบรมิเลนเริ่มต้น 1 กรัม

7. การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของผงโบรมิเลนที่มีความบริสุทธิ์สูงด้วยเทคนิคโพลีอะไคร์ละไมด์เจล อิเลคโตรโฟรีซิส พบแถบสีโปรตีน 2 แถบ แถบที่เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่มีค่า R_f 0.52 และแถบที่จางมากมีค่า R_f 0.66 ตามลำดับ

8. สมบัติของผงโบรมิเลนที่ผ่านขั้นตอนการเพิ่มความบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสตามด้วยเซฟาเดกซ์จี 100 เทียบกับผงโบรมิเลนก่อนนำมาเพิ่มความบริสุทธิ์ พบว่า

8.1 พีเอชที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของการไฮโดรไลซ์สับสเตรทเคซีนไม่ต่างกันอย่างเห็นชัด โบรมิเลนบริสุทธิ์สูงมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 8-10 และโบรมิเลนก่อนเพิ่มความบริสุทธิ์มีค่าพีเอชระหว่าง 9-10

8.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของการไฮโดรไลซ์สับสเตรทเคซีนมีค่าเท่ากันคือ ประมาณ 60-65 องศาเซลเซียส

8.3 พีเอชต่อความเสถียรของโบรมิเลนทั้งก่อนและหลังการเพิ่มความบริสุทธิ์มีค่าพีเอชอยู่ช่วงระหว่าง 3-7

8.4 โบรมิเลนบริสุทธิ์สูงมีค่าเสถียรต่ออุณหภูมิลดลงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แอคติวิตีของโบรมิเลนบริสุทธิ์สูงลดลง 50 เปอร์เซนต์ ในเวลาครึ่งชั่วโมง ในขณะที่โบรมิเลนก่อนเพิ่มความบริสุทธิ์ใช้เวลานาน 1 ชั่วโมง

8.5 การเพิ่มความบริสุทธิ์ไม่ทำให้ความสามารถในการจับกันของเอนไซม์กับสับสเตรทเคซีนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับโบรมิเลนก่อนเพิ่มความบริสุทธิ์

9. สภาวะที่เหมาะสมในการตรึงโบรมิเลนด้วยคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส

9.1 ปริมาณโบรมิเลนที่ใช้ควรมีค่าปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 3-6 มิลลิกรัมต่อคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส 1 กรัม (น้ำหนักเปียก)

9.2 เวลาในการตรึง 10-60 นาที

9.3 บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการตรึง คือ อะซีเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์

10. กลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ มีผลในการเพิ่มความเสถียรต่ออุณหภูมิของโบรมิเลนตรึงคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส แต่ไม่มีผลในการเพิ่มความเสถียรทางกายภาพ

11. เฮกซาเมทธิลลีนไดอะมีนมีผลยับยั้งการทำงานของโบรมิเลนตรึงคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส

12. ผลการศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติของโบรมิเลนและโบรมิเลนตรึงคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสทั้งชนิดเสริมและไม่เสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์ให้ข้อสรุปดังนี้

12.1 พีเอชที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซ์สับสเตรทเคซีนมีค่าพีเอชใกล้เคียงกัน คือ พีเอชประมาณ 9.6

12.2 การตรึงเอนไซม์ด้วยคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสทั้งชนิดเสริมและไม่เสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์ทำให้อุณหภูมิที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซ์สับสเตรทเคซีนมีค่าลดต่ำลง คือมีค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 45 องศาเซลเซียส ในขณะที่โบรมิเลนอิสระมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานสูงประมาณ 65 องศาเซลเซียส

12.3 ความเสถียรต่อพีเอชของโบรมิเลนทั้ง 3 รูปแบบ มีความเสถียรได้ดีในช่วงพีเอชที่เป็นกรด โบรมิเลนตรึงคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสมีความเสถียรในช่วงพีเอช 4-5 และโบรมิเลนตรึงเสริมกลูตารัลดีไฮด์มีช่วงความเสถียรกว้างขึ้นเป็น 4-6 โบรมิเลนอิสระมีความเสถียรต่อพีเอชช่วงกว้างที่สุดคือในช่วงพีเอช 4-7

12.4 โบรมิเลนตรึงทั้งชนิดเสริมและไม่เสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์มีความเสถียรต่ออุณหภูมิมากกว่าโบรมิเลนอิสระอย่างเห็นชัดที่อุณหภูมิ 30-50 องศาเซลเซียส โบรมิเลนตรึงชนิดเสริมกลูตารัลดีไฮด์มีความเสถียรต่ออุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียสได้สูงกว่าโบรมิเลนตรึงคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสชนิดไม่เสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์

12.5 การตรึงโบรมิเลนด้วยคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสทำให้ความสามารถในการไฮโดรไลซ์สับสเตรทเคซีน (K_m) ดีขึ้นประมาณ 20 เท่า เมื่อเทียบกับโบรมิเลนอิสระ และเร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์เคซีน (K_m) ดีขึ้นประมาณ 15 เท่า สำหรับโบรมิเลนตรึงคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสชนิดเสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์

ผลงานวิจัยทั้งหมดนี้บรรลุวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ และสามารถใช้เป็นแนวทางในการผลิตผงโบรมิเลนที่มีความบริสุทธิ์สูงจากต้นสับปะรดในประเทศไทยในระดับขยายส่วนได้ รวมทั้งสามารถใช้เป็นแนวทางในการผลิตเอนไซม์โบรมิเลนในรูปโบรมิเลนตรึง ซึ่งเป็นรูปแบบหนึ่งที่เหมาะสมเพื่อนำไปสู่การใช้งานอย่างต่อเนื่อง อันเป็นแม่แบบของการประยุกต์ใช้เอนไซม์โบรมิเลนในระดับอุตสาหกรรมต่อไป