

This file has been cleaned of potential threats.

If you confirm that the file is coming from a trusted source, you can send the following SHA-256 hash value to your admin for the original file.

321aebcd0f7966fb7de76086d4b4803084d2bfcda22cf948e661346aed0bc85a

To view the reconstructed contents, please SCROLL DOWN to next page.



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์
รหัสโครงการ CRP6405030020
เรื่อง

การพัฒนากระบวนการตกตะกอนเอนไซม์โบรมีเลนจากต้นสับปะรด
แบบต่อเนื่อง

Development of continuous precipitation process of bromelain
from pineapple stem

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร.ปราโมทย์ คูวิจิตรจารุ
อาจารย์ ดร.ขวัญใจ กลิ่นจงกล
มหาวิทยาลัยศิลปากร

รองศาสตราจารย์ ดร.จินตนา วิบูลย์ศิริกุล
มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

ภายใต้แผนงานวิจัยความมั่นคงด้านอาหารและโภชนาการของประเทศไทย
ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน)

ปีงบประมาณ พ.ศ. 2564

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “การพัฒนากระบวนการตกตะกอนเอนไซม์โบริมีเลนจากต้นสับปะรดแบบต่อเนื่อง” ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) ปีงบประมาณ พ.ศ. 2564 โดยมี บริษัท อาหารสยาม จำกัด (มหาชน) ร่วมสนับสนุนการดำเนินโครงการ

บทคัดย่อ

เอนไซม์โบรมีเลนซึ่งพบในต้นสับปะรดถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหารและอุตสาหกรรมอื่น ๆ โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนากระบวนการตกตะกอนเอนไซม์โบรมีเลนจากสารสกัดเอนไซม์หยาบด้วยเอทานอลในระบบท่อแบบต่อเนื่อง งานวิจัยเริ่มจากการเลือกแหล่งเพาะปลูกและอายุของต้นสับปะรดเพื่อนำมาใช้เป็นวัตถุดิบซึ่งพบว่าวัตถุดิบจากจังหวัดชลบุรีที่อายุการปลูก 21 เดือนเป็นวัตถุดิบที่เหมาะสมที่สุดที่ให้ปริมาณโปรตีนและกิจกรรมเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์หยาบสูงสุด จากนั้นจึงศึกษาจลนพลศาสตร์การตกตะกอนโดยการใช้เอทานอลพบว่าการใช้เอทานอลที่ความเข้มข้น 60% v/v อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ทำให้สามารถตกตะกอนเอนไซม์โบรมีเลนได้สูงสุด การทดสอบการตกตะกอนแบบกะ (batch) ในหลอดทดลองพบว่าเวลาที่เหมาะสมในการตกตะกอนคือ 9 นาที การตกตะกอนโดยใช้เวลานานกว่าส่งผลให้ได้กิจกรรมเอนไซม์ได้น้อยลง ในการทดสอบการตกตะกอนเอนไซม์โบรมีเลนในท่อแบบต่อเนื่อง (continuous tubular reactor) พบว่าเวลาที่ให้ประสิทธิภาพการตกตะกอนดีที่สุดมีค่าน้อยกว่าในระบบหลอดทดลองคือ 7 นาที การเพิ่มความยาวของท่อจาก 1 เป็น 4 และ 9 เมตรช่วยให้สามารถเพิ่มกำลังการตกตะกอนได้ เมื่อนำตะกอนเอนไซม์ที่ได้จากการตกตะกอนในระบบท่อยาว 9 เมตรที่มีอัตราการป้อนสารสกัดเอนไซม์หยาบ 15.07 mL/min และอัตราการป้อนเอทานอลเข้มข้น 95% ที่ 25.65 mL/min มาทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งได้เอนไซม์โบรมีเลนผงสีขาวนวล โดยมีผลผลิต (yield) 1.75 g/100 mL extract ซึ่งทำให้ได้กำลังการผลิตเอนไซม์ผงเป็น 16.46 g/h เอนไซม์ผงที่ได้มีปริมาณโปรตีน 61.38 g/100 g powder และมีกิจกรรมเอนไซม์ 2075.94 CDU/mg powder ซึ่งเทียบเคียงได้กับเอนไซม์ทางการค้า เมื่อตรวจสอบเอนไซม์ด้วย HPLC พบว่าเอนไซม์ที่ได้มีรูปแบบของโครมาโตแกรมจากการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm เหมือนกับเอนไซม์โบรมีเลนมาตรฐาน และมีขนาดโมเลกุลที่วัดโดยวิธี SDS-PAGE เป็น 33.20 kDa

สารบัญเรื่อง

กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ.....	ข
1. บทนำ	1
1.1 ความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 ทฤษฎีและแนวคิดที่นำมาใช้ในงานวิจัย	2
1.4.1 สับปะรด	2
1.4.2 เอนไซม์โบรมีเลน	4
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	15
2. วิธีการดำเนินการวิจัย	16
2.1 วิธีการทดลอง.....	16
2.1.1 การศึกษาเปรียบเทียบแหล่งที่มาและอายุของต้นสับปะรด	16
2.1.2 การศึกษาอัตราส่วนปริมาณต้นสับปะรดต่อน้ำในการสกัด	16
2.1.3 การศึกษาผลของความเข้มข้นเอทานอลต่อการตกตะกอนโบรมีเลนในหลอดทดลอง	17
2.1.4 การศึกษาจลนพลศาสตร์การตกตะกอนโบรมีเลนในหลอดทดลอง.....	17
2.1.5 การติดตั้งอุปกรณ์สำหรับการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยเอทานอลแบบต่อเนื่องในท่อ	18
2.1.6 การศึกษาเวลาที่สารอยู่ในระบบการตกตะกอน.....	20
2.1.7 การศึกษาปัจจัยในการตกตะกอนโบรมีเลนในระบบท่อ	20
2.1.8 การขยายขนาด (scale up) ระบบการตกตะกอน	21
2.1.9 การปรับปรุงสภาวะการสกัดเอนไซม์หยาบ	22
2.1.10 การเตรียมและวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์ผง	23
2.2 วิธีการวิเคราะห์ทางเคมี.....	23
2.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (moisture content).....	23
2.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (ash content).....	23
2.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (crude protein content).....	24
2.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (crude fat content)	24
2.2.5 การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate content)	25
2.2.6 การวิเคราะห์ค่า pH	25
2.2.7 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โบรมีเลน	25

2.2.8 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมด	26
2.2.9 การวิเคราะห์โปรตีนด้วย HPLC	27
2.2.10 การวิเคราะห์ SDS-PAGE electrophoresis	27
3. ผลการวิจัยและการอภิปราย	29
3.1 การเปรียบเทียบแหล่งที่มาและอายุของต้นสับปะรด	29
3.2 ผลของอัตราส่วนปริมาณต้นสับปะรดต่อน้ำในการสกัด	33
3.3 ผลของความเข้มข้นเอทานอลต่อการตกตะกอนโบรมีเลนในหลอดทดลอง	33
3.4 จลนพลศาสตร์การตกตะกอนโบรมีเลนในหลอดทดลอง	34
3.5 การติดตั้งอุปกรณ์สำหรับการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยเอทานอลแบบต่อเนื่องในท่อ	36
3.6 การศึกษาเวลาที่สารอยู่ในระบบการตกตะกอน	37
3.7 การศึกษาปัจจัยในการตกตะกอนโบรมีเลนในระบบท่อ	38
3.8 การขยายขนาด (scale up) ระบบการตกตะกอน	41
3.9 การปรับปรุงสถานะการสกัดเอนไซม์หยาบ	44
3.10 การเตรียมและวิเคราะห์สมบัติของเอนไซม์โบรมีเลนผง	45
3.11 การคำนวณต้นทุนเบื้องต้นของเอนไซม์ผง	49
4. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	52
เอกสารอ้างอิง	53
ภาคผนวก	56
A1 การวิเคราะห์หาค่าเวลาที่สารอยู่ในท่อโดยเฉลี่ย	57

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ตัวอย่างการใช้ประโยชน์เอนไซม์โปรตีเอส	6
ตารางที่ 2 การใช้ประโยชน์เอนไซม์โบรมีเลน	8
ตารางที่ 3 สิทธิบัตรต่างประเทศที่เกี่ยวกับการสกัดเอนไซม์โบรมีเลนจากสับปะรด.....	10
ตารางที่ 4 สิทธิบัตรในประเทศไทยที่เกี่ยวกับการสกัดเอนไซม์โบรมีเลนจากสับปะรด.....	11
ตารางที่ 5 งานวิจัยในประเทศไทยเกี่ยวกับการผลิตเอนไซม์โบรมีเลนที่มีการรายงานบนฐานข้อมูล ThaiLIS12	
ตารางที่ 6 อัตราการไหลของสารสกัดเอนไซม์และเอทานอลเพื่อให้ได้เวลาในการตกตะกอนต่าง ๆ กัน	21
ตารางที่ 7 อัตราการไหลของสารสกัดเอนไซม์และเอทานอลเพื่อให้ได้เวลาในการตกตะกอนต่าง ๆ กันที่ความยาวท่อ 1, 4 และ 9 เมตร	22
ตารางที่ 8 แหล่งที่มาและข้อมูลเบื้องต้นของต้นสับปะรดที่ใช้ศึกษา.....	30
ตารางที่ 9 องค์ประกอบหลัก (wet basis) ของต้นสับปะรดแหล่งจังหวัดประจวบคีรีขันธ์และชลบุรีที่มีอายุแตกต่างกัน	31
ตารางที่ 10 สมบัติของสารสกัดเอนไซม์หยาบจากต้นสับปะรดแหล่งจังหวัดประจวบคีรีขันธ์และชลบุรีที่มีอายุแตกต่างกัน	32
ตารางที่ 11 สมบัติของสารสกัดเอนไซม์หยาบที่ได้เมื่อใช้อัตราส่วนต้นสับปะรดต่อน้ำระดับต่างๆ	33
ตารางที่ 12 ปริมาณโปรตีน กิจกรรมเอนไซม์และ Bromelain activity recovery ของตกตะกอนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเอทานอลความเข้มข้นต่างกัน	34
ตารางที่ 13 ค่าปริมาณโปรตีนและกิจกรรมเอนไซม์ของสารสกัดที่ใช้อัตราส่วนต้นต่อน้ำและเวลาในการสกัดต่างกัน	44
ตารางที่ 14 ผลผลิต ปริมาณโปรตีน และค่ากิจกรรมเอนไซม์ของเอนไซม์โบรมีเลนผงเปรียบเทียบกับเอนไซม์ทางการค้าและเอนไซม์มาตรฐาน	46
ตารางที่ 15 การคำนวณต้นทุนเบื้องต้นของการผลิตเอนไซม์ผงน้ำหนัก 100 g	49
ตารางที่ 16 การคำนวณค่าสำหรับการหาเวลาที่สารอยู่ในท่อโดยเฉลี่ย.....	57

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 ผลสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย (สถาบันวิจัยพืชสวน, 2560).....	3
ภาพที่ 2 (a) ส่วนต่างๆ ของสับปะรดแสดงส่วนต้น (stem) และเหง้า (basal stem) (Hassan และคณะ, 2011) (b) ภาพส่วนต้นสับปะรดจากจากไร่สับปะรด.....	4
ภาพที่ 3 จำนวนเอกสารตีพิมพ์ที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์โบรมีเลนในฐานข้อมูล Scopus ในช่วงปี 1946- 2021 โดยใช้คำค้น TITLE-ABS-KEY (bromelain).....	5
ภาพที่ 4 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์หมักเนื้อที่มีเอนไซม์โบรมีเลนผสมอยู่.....	6
ภาพที่ 5 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากเอนไซม์โบรมีเลน.....	9
ภาพที่ 6 สัดส่วนปริมาณเอนไซม์โบรมีเลนในต้นสับปะรดอายุต่างกัน Heinicke และ Gortner (1957).....	10
ภาพที่ 7 ผลการวิเคราะห์ SDS-PAGE สำหรับเอนไซม์โบรมีเลนทางการค้า (แถบ 1), และเอนไซม์สกัดหยาบที่ตกตะกอนได้ด้วยเอทานอล (แถบ 3) (Soares และคณะ, 2012).....	13
ภาพที่ 8 หน่วยปฏิบัติการในการตกตะกอนโปรตีนแบบต่างๆ (Martinez และคณะ, 2019).....	14
ภาพที่ 9 ภาพโครงร่างของชุดตกตะกอนเอนไซม์แบบต่อเนื่อง.....	19
ภาพที่ 10 ภาพถ่ายของชุดตกตะกอนเอนไซม์แบบต่อเนื่อง.....	19
ภาพที่ 11 (a) ภาพโครงร่าง และ (b) ภาพ 3-D ของอุปกรณ์ mixer สำหรับผสมสารสกัดเอนไซม์หยาบและเอทานอลก่อนไหลเข้าสู่ท่อสำหรับการตกตะกอน.....	20
ภาพที่ 12 กราฟมาตรฐานไทโรซีนสำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โบรมีเลน.....	26
ภาพที่ 13 ตัวอย่างกราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin (BSA) สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วย Bradford method.....	27
ภาพที่ 14 (a) ไร่สับปะรดจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ (b) ไร่สับปะรดจังหวัดชลบุรี (c) การเก็บตัวอย่างสับปะรด.....	29
ภาพที่ 15 ต้นสับปะรดสดจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์.....	30
ภาพที่ 16 ต้นสับปะรดสดจากจังหวัดชลบุรี.....	30
ภาพที่ 17 (a) ลักษณะปรากฏของต้นสับปะรดก่อนและหลังการปอกผิว (b) หลังหั่นเป็นชิ้น และ (c) สารสกัดเอนไซม์หยาบ.....	31
ภาพที่ 18 ตะกอนเอนไซม์ที่ทำการตกตะกอนด้วยเอทานอล (60% v/v) ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียสที่ระยะเวลา 0 – 15 นาที.....	35
ภาพที่ 19 ค่า bromelain activity recovery (%) ของตะกอนเอนไซม์ที่ตกตะกอนได้ที่อุณหภูมิ 0 -25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0 – 15 นาที.....	36
ภาพที่ 20 อุณหภูมิในอ่างควบคุม (Bath) อุณหภูมิที่ mixer (Mixer) และอุณหภูมิที่ปลายท่อออก (Exit) เมื่อควบคุมอุณหภูมิในอ่างควบคุมเป็น 0, 5 และ 10 องศาเซลเซียส.....	37

ภาพที่ 21 ความเข้มข้นของ BSA ที่ออกจากท่อความยาว 1 เมตรที่อัตราการไหลของ BSA:บัฟเฟอร์เป็น 4:6 (v/v) โดยความเข้มข้นเริ่มต้นของ BSA เป็น 2.0 mg/mL เมื่อเปิด (with mixer) และไม่เปิดการทำงานของ mixer (without mixer)	38
ภาพที่ 22 ค่าปริมาณโปรตีน (mg/mL extract) ที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ ในท่อขนาด 1 เมตร	39
ภาพที่ 23 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ (CDU/ mL extract) ของเอนไซม์ที่ตกตะกอนได้ที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ ในท่อขนาด 1 เมตร	40
ภาพที่ 24 ค่า specific activity (CDU/mg protein) ของเอนไซม์โบรมีเลนที่ตกตะกอนได้ที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ ในท่อขนาด 1 เมตร	40
ภาพที่ 25 ค่า bromelain activity recovery (%) ที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ ในท่อขนาด 1 เมตร .	41
ภาพที่ 26 ค่าปริมาณโปรตีนที่เวลาการตกตะกอนต่าง ๆ ในท่อขนาด 1, 4 และ 9 เมตร ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส	42
ภาพที่ 27 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ (CDU/ mL extract) ที่เวลาการตกตะกอนต่าง ๆ ในท่อขนาด 1, 4 และ 9 เมตร ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส	43
ภาพที่ 28 ค่า bromelain activity recovery (%) ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ในท่อขนาด 1, 4 และ 9 เมตร ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส	43
ภาพที่ 29 ค่า Specific activity ของเอนไซม์ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ในท่อขนาด 1, 4 และ 9 เมตร ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส	44
ภาพที่ 30 ลักษณะปรากฏของตัวอย่างสารสกัดเอนไซม์หยาบที่ผสมกับเอทานอลและตัวอย่างตะกอนที่ได้ .	45
ภาพที่ 31 เอนไซม์โบรมีเลนผงจากการทำแห้งด้วยวิธี freeze drying	46
ภาพที่ 32 โคโรมาโตแกรมจาก HPLC ของผงโบรมีเลนที่เตรียมด้วยการตกตะกอนในท่อแบบต่อเนื่อง (Continuous), เอนไซม์ทางการค้า (Commercial) และเอนไซม์มาตรฐาน (Standard) เมื่อตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm	47
ภาพที่ 33 แถบโปรตีนบน SDS-PAGE ของเอนไซม์โบรมีเลนมาตรฐาน (standard), เอนไซม์ทางการค้า (commercial), เอนไซม์ที่ตกตะกอนด้วยวิธีตกตะกอนแบบต่อเนื่อง, เอนไซม์ที่ตกตะกอนแบบกะเป็นเวลา 9 นาที (Batch 9 min), เอนไซม์ที่ตกตะกอนแบบกะเป็นเวลา 15 นาที (Batch 15 min) และสารสกัดเอนไซม์หยาบ (Crude extract)	48
ภาพที่ 34 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานโปรตีน	49
ภาพที่ 35 F-curve สำหรับการหาเวลาที่สารอยู่ในท่อโดยเฉลี่ย	58

1. บทนำ

1.1 ความสำคัญของปัญหา

เอนไซม์โบรมีเลน (bromelain) เป็นเอนไซม์ที่มีการจำหน่ายเชิงพาณิชย์อย่างกว้างขวาง โดยผลิตจากส่วนต้น (เหง้า) ของสับปะรดซึ่งเป็นวัตถุดิบที่มีมากในประเทศไทย แม้ว่าการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการสกัดเอนไซม์โบรมีเลนนี้มีมาเป็นระยะเวลานานแล้ว แต่เป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งว่าในช่วงระยะเวลาไม่กี่ปีมานี้มีความต้องการเอนไซม์โบรมีเลนของตลาดเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ โดยเฉพาะในด้านการใช้เพื่อประโยชน์ด้านสุขภาพ โดยส่วนหนึ่งเกิดจากการวิจัยเกี่ยวกับการนำเอนไซม์โบรมีเลนไปใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ โดยเฉพาะฤทธิ์ด้านการอักเสบ (anti-inflammatory) และลดอาการเจ็บปวดของโรคข้อเข่าเสื่อม ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญทางสุขภาพของผู้สูงอายุทั่วโลกซึ่งเป็นกลุ่มประชากรที่มีสัดส่วนเพิ่มมากขึ้นในปัจจุบัน ความต้องการทางตลาดเหล่านี้จึงนำไปสู่การวิจัยและพัฒนากระบวนการสกัดเอนไซม์ที่มีต้นทุนต่ำลง มีประสิทธิภาพสูงขึ้น การทำบริสุทธิ์เอนไซม์และการแปรรูปเอนไซม์โบรมีเลนให้อยู่ในรูปแบบต่าง ๆ เพิ่มขึ้นอย่างมากเช่นกัน โดยพบว่างานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับโบรมีเลนเพิ่มขึ้นอย่างก้าวกระโดดตั้งแต่ปี 2016 เป็นต้นมา จากการสอบถามบริษัทผู้จำหน่ายในประเทศ เอนไซม์โบรมีเลนที่มีกิจกรรมเอนไซม์ 80 GDU/g มีราคาจำหน่ายประมาณ 1,500 บาท/กิโลกรัม ในขณะที่จากข้อมูลออนไลน์เอนไซม์โบรมีเลนเกรดสำหรับอุตสาหกรรมอาหารจากประเทศจีนมีราคา 19 USD (600 บาท)/กิโลกรัม ในขณะที่เว็บไซต์ของอินเดียระบุราคาเป็น 1500 Rs (600 บาท)/กิโลกรัม จากข้อมูลของกรมโรงงานปัจจุบันในประเทศไทยมีผู้ผลิตเอนไซม์โบรมีเลนเพียงไม่กี่ราย ได้แก่บริษัท หงมาวไบโอเคมี จำกัด จ.ระยอง บริษัท เกรท ฟู้ด (ไบโอเคมี) จำกัด จ.สมุทรสาคร และบริษัท โชตธนะโชติ จำกัด จ.ชลบุรี (ในรูปผงหมักเนื้อ) ในขณะที่มีบริษัทเอกชนไทยอีกหลายรายที่มีความสนใจในการผลิตเอนไซม์โบรมีเลนทางการค้าแต่ยังไม่มีเทคโนโลยีเป็นของตนเอง

จากความต้องการของเอนไซม์โบรมีเลนนั้นทำให้มีการพัฒนากระบวนการในการผลิตเอนไซม์โบรมีเลนอย่างต่อเนื่อง โดยปัจจุบันกระบวนการตกตะกอนโปรตีนที่นิยมทั่วไปคือการใช้ถังกวนแบบกะ (batch stirred tank reactor) ซึ่งทำให้ต้องใช้ถังขนาดใหญ่ โดยจะค่อย ๆ เติมสารตกตะกอนลงในสารละลายโปรตีนทีละน้อยโดยมีการกวนตลอดเวลาเพื่อป้องกันการเกิดความแตกต่างของความเข้มข้นของสารตกตะกอนเมื่อถึงสภาวะคงที่หรือสมดุล ตะกอนจะถูกนำไปแยกโดยการหมุนเหวี่ยงหรือการกรอง

โครงการวิจัยนี้มุ่งเน้นการพัฒนากระบวนการตกตะกอนเอนไซม์แบบต่อเนื่องในท่อ (continuous tubular reactor) เป็นแนวทางที่จะช่วยลดขนาดของอุปกรณ์ที่จำเป็นในการผลิตเอนไซม์ลงได้ และทำให้ดำเนินการผลิตเอนไซม์แบบต่อเนื่อง จะทำให้เพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตและลดต้นทุนการผลิตได้ ในปัจจุบันการศึกษาระบบการตกตะกอนสารกลุ่มโปรตีนแบบต่อเนื่องในท่อนี้ยังมีการศึกษาวิจัยน้อยมาก และยังไม่พบการศึกษาสำหรับการตกตะกอนโบรมีเลน ดังนั้นโครงการนี้จึงมีเป้าหมายในการพัฒนาระบบการตกตะกอนด้วยเอทานอลแบบต่อเนื่องในท่อนี้ โดยศึกษาปัจจัยการตกตะกอนต่างๆ และตรวจสอบคุณสมบัติของโบรมีเลนที่ได้เปรียบเทียบกับกระบวนการตกตะกอนในถังกวนแบบกะ

1.2 วัตถุประสงค์

ศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการตกตะกอนเอนไซม์โบรมีเลนจากต้นสับปะรดและสร้างต้นแบบระบบในการตกตะกอนเอนไซม์โบรมีเลนแบบต่อเนื่องในท่อ โดยมีวัตถุประสงค์ย่อยดังนี้

1. เพื่อศึกษาจลนพลศาสตร์การตกตะกอนเอนไซม์โบรมีเลน
2. เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการตกตะกอนเอนไซม์โบรมีเลนจากต้นสับปะรดด้วยเอทานอลแบบต่อเนื่องในท่อ
3. เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการตกตะกอนเอนไซม์โบรมีเลนจากต้นสับปะรดด้วยเอทานอลแบบต่อเนื่องในท่อ
4. เพื่อศึกษาการขยายขนาดของกระบวนการตกตะกอนเอนไซม์โบรมีเลน
5. เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบและกิจกรรมเอนไซม์ของเอนไซม์โบรมีเลนที่ผลิตได้

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

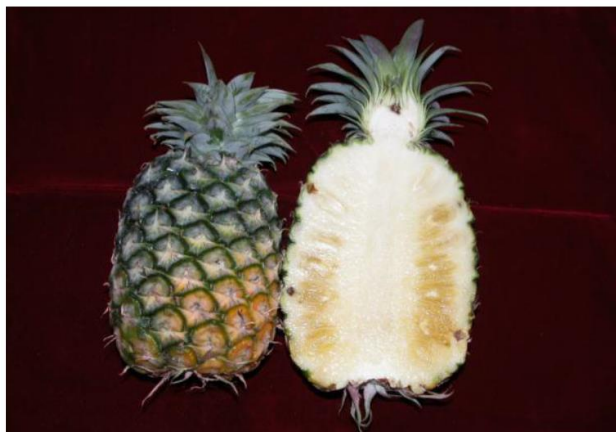
1. การศึกษาจลนพลศาสตร์ดำเนินการที่อุณหภูมิ 0-25 องศาเซลเซียส
2. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการตกตะกอนเอนไซม์โบรมีเลนแบบต่อเนื่องในท่อดำเนินการในอุปกรณ์ที่จัดทำขึ้นสำหรับการวิจัยระดับห้องปฏิบัติการ
3. การขยายขนาดของกระบวนการตกตะกอนเอนไซม์โบรมีเลนในระบบท่อใช้การปรับความยาวของท่อให้เพิ่มขึ้น 4 และ 9 เท่าของความยาวท่อเริ่มต้น
4. การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ใช้ casein digestion unit (CDU)

1.4 ทฤษฎีและแนวคิดที่นำมาใช้ในงานวิจัย

1.4.1 สับปะรด

สับปะรด (*Ananas comosus*) เป็นหนึ่งในพืชไร่สำคัญของประเทศ โดยในปี พ.ศ. 2563 ประเทศไทยมีผลผลิตสับปะรดมากเป็นอันดับ 7 ของโลก (FAO, 2022) และจากข้อมูลของสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรในปี พ.ศ. 2564 พบว่าประเทศไทยมีพื้นที่เพาะปลูกสับปะรดโรงงาน (สับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย) 460,262 ไร่ กระจายอยู่ทุกภูมิภาคของประเทศ และมีปริมาณการผลิตรวม 1,718,089 ตัน โดยพื้นที่เพาะปลูกที่สำคัญเรียงลำดับตามกำลังการผลิตคือ ประจวบคีรีขันธ์ ระยอง ราชบุรี ชลบุรี พิจิตร อุทัยธานีและเพชรบุรี ตามลำดับ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2564)

สับปะรดที่มีการเพาะปลูกในประเทศไทยมีหลายสายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ปัตตาเวีย (ภาพที่ 1) ซึ่งอยู่ในกลุ่มสับปะรดที่เรียกว่า Smooth cayenne เป็นสายพันธุ์หลักที่ใช้สำหรับโรงงานอุตสาหกรรมสับปะรดกระป๋อง (สถาบันวิจัยพืชสวน, 2560)

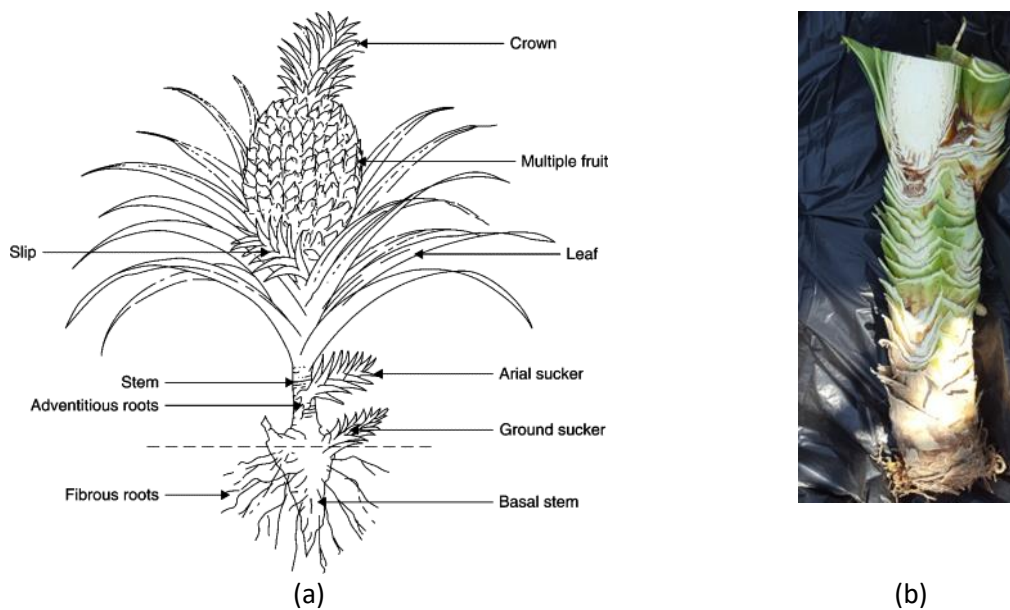


ภาพที่ 1 ผลสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย (สถาบันวิจัยพืชสวน, 2560)

สับปะรดโรงงานจะถูกแปรรูปเป็นสับปะรดบรรจุกระป๋อง และน้ำสับปะรดเข้มข้นเป็นหลัก ซึ่งการส่งออกผลิตภัณฑ์สับปะรดแปรรูปมีมูลค่าทางเศรษฐกิจต่อประเทศอย่างมาก โดยในปี พ.ศ. 2564 มีการส่งออกที่สำคัญคือสับปะรดกระป๋อง (HS 20082010) มูลค่าประมาณ 9,421 ล้านบาท น้ำสับปะรดเข้มข้น (HS 20094900) มูลค่าประมาณ 2,075 ล้านบาท และส่งผลสดหรือทำแห้ง (HS 08043000) อีกประมาณ 308 ล้านบาท (tradereport.moc.go.th)

อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์อาหารกระป๋องและผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปอื่น ๆ เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีผลกำไรต่ำ ใช้แรงงานมาก ดังนั้นการพัฒนาผลิตภัณฑ์เพิ่มมูลค่าจึงเป็นสิ่งสำคัญสำหรับอุตสาหกรรมเหล่านี้ นอกจากนี้การนำส่วนเหลือทิ้งมาใช้ประโยชน์ยังเป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มมูลค่าของห่วงโซ่ของสับปะรด และสอดคล้องกับโมเดลการพัฒนาทางเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยคือ BCG Economy หรือ เศรษฐกิจชีวภาพ เศรษฐกิจหมุนเวียน และเศรษฐกิจสีเขียว (Bio-Circular-Green Economy) ซึ่งแนวทางหนึ่งคือการสกัดหรือผลิตส่วนผสมฟังก์ชัน (functional ingredient) ที่เป็นที่ต้องการของอุตสาหกรรมอื่น ๆ เช่นการสกัดกลูโคซิลเซราไมด์ (glucosyl ceramide) จากกากหลังการคั้นน้ำสับปะรดซึ่งเป็นส่วนผสมฟังก์ชันที่มีราคาสูง สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอางค์ได้ (ปราโมทย์ คุวิจิตรจารุ และขวัญใจ กลิ่นจงกล, 2564) นอกจากนี้ Banerjee และคณะ (2018) ได้แสดงให้เห็นว่าส่วนเหลือทิ้งจากการแปรรูปสับปะรดสามารถนำไปเพิ่มมูลค่าโดยการสกัดและผลิตเป็นส่วนประกอบฟังก์ชันต่าง ๆ ได้อย่างหลากหลาย รวมถึงการสกัดเอนไซม์โบรมีเลน

จากภาพที่ 2 และ 3 ซึ่งแสดงส่วนประกอบที่สำคัญของต้นสับปะรดจะเห็นได้ว่าเมื่อเก็บเกี่ยวผลสับปะรดแล้วจะเหลือส่วนต่าง ๆ ของสับปะรดทิ้งในแปลงเพาะปลูกโดยเฉพาะส่วนใบและต้น ซึ่งในส่วนของต้นซึ่งหมายถึงรวมถึง stem และ basal stem (ลำต้นใต้ดิน หรือเหง้า) นั้นพบว่าเอนไซม์โบรมีเลนอยู่ในปริมาณสูงจึงนิยมนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตสกัดเอนไซม์โบรมีเลนในระดับอุตสาหกรรม



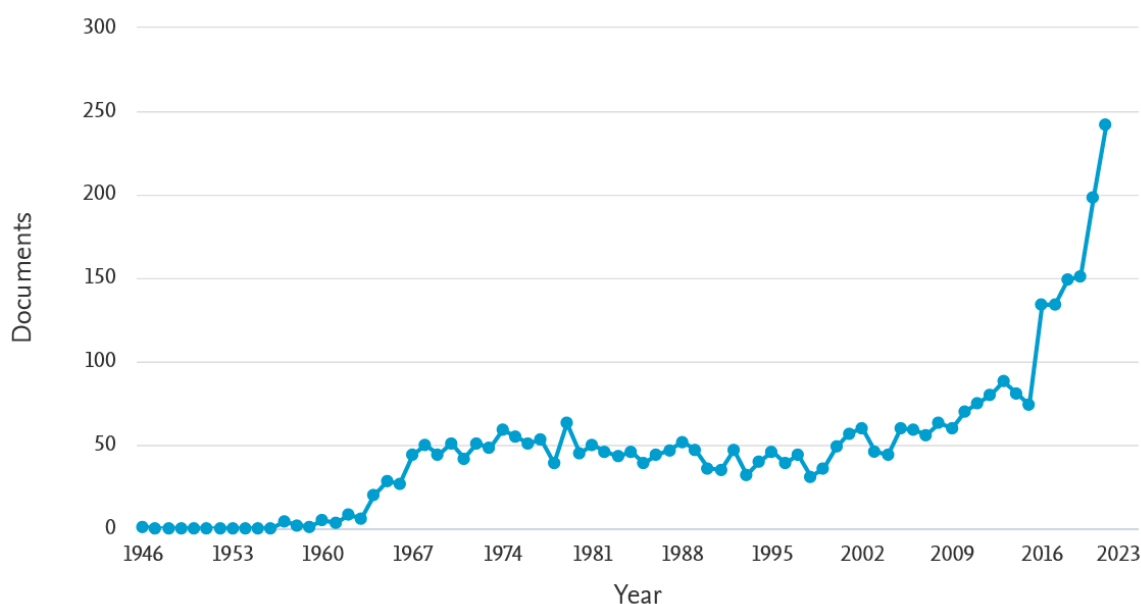
ภาพที่ 2 (a) ส่วนต่างๆ ของสับปะรดแสดงส่วนต้น (stem) และเหง้า (basal stem) (Hassan และคณะ, 2011) (b) ภาพส่วนต้นสับปะรดจากจากไร่สับปะรด

1.4.2 เอนไซม์โบรมีเลน

เอนไซม์โบรมีเลน (bromelain) เป็นชื่อโดยทั่วไปของเอนไซม์กลุ่มเอนไซม์โปรตีเอส (protease) ชนิดหนึ่ง เอนไซม์โปรตีเอสหมายถึงเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสพันธะเปปไทด์ของสายพอลิเปปไทด์ เอนไซม์โปรตีเอสเป็นเอนไซม์ที่มีการผลิตเชิงการค้ามากที่สุดในโลกคือสูงถึง 60% ของการใช้เอนไซม์ทั้งหมด (Feijoo-Siota และ Villa, 2011) เอนไซม์โปรตีเอสหลายชนิดสกัดได้จากพืชซึ่งเป็นกระบวนการที่ซับซ้อนหลายขั้นตอน ในทางการค้านั้นสับปะรดเป็นพืชที่นำมาสกัดโปรตีเอสมากที่สุด เรียกเอนไซม์ที่ได้ว่าเอนไซม์โบรมีเลน โดยโบรมีเลนที่สกัดได้นั้นเป็นเอนไซม์ผสมที่ประกอบด้วยเอนไซม์โปรตีเอสหลายชนิด และยังมีเอนไซม์ฟอสฟาเทส กลูโคซิเดส เพอร์ออกซิเดส เซลลูเลส และไกลโคโปรตีนผสมรวมอยู่ด้วย (Ramli และคณะ, 2017) โบรมีเลนพบได้ในหลายส่วนของสับปะรดและมีชื่อเรียกเฉพาะต่างกันไป เช่น เอนไซม์จากส่วนผลสับปะรด เรียกว่า fruit bromelain (EC 3.4.22.33) ในขณะที่เอนไซม์จากส่วนต้น (stem) (หรือเรียกว่า “เหง้า” ซึ่งหมายถึงลำต้นใต้ดิน) มีความเข้มข้นของโบรมีเลนสูงสุด และส่วนต้นยังเป็นส่วนที่มีราคาถูกเมื่อเทียบกับผล โดยต้นเป็นส่วนที่มักทิ้งในไร่สับปะรดและไม่ได้มีการนำไปใช้ประโยชน์หลังจากที่เกษตรกรจะต้องปลูกต้นใหม่ ดังนั้นในทางการค้าจึงมักใช้เอนไซม์ที่สกัดจากส่วนต้น เรียกว่า “stem bromelain” (EC 3.4.22.32) ซึ่งได้รับอนุญาตให้ใช้เป็นวัตถุเจือปนอาหาร INS No. 1101(iii) โดยการสกัดเอนไซม์จากต้นสับปะรดนี้มีการรายงานเป็นครั้งแรก ๆ ตั้งแต่ปี 1957 (Heinicke และ Gortner, 1957) (ภาพที่ 3) อย่างไรก็ตามโดยปกติเอนไซม์ที่สกัดได้จากต้นจะเป็นเอนไซม์ผสมประกอบด้วย stem bromelain (EC 3.4.22.32) ananain (EC 3.4.22.31) และ comosain (Arshad และคณะ, 2014)

เอนไซม์โบรมีเลนจากต้นเป็นเอนไซม์โปรตีเอสแบบ endoprotease นั่นคือเร่งการไฮโดรไลซ์ที่พันธะเพปไทด์ระหว่างกรดอะมิโนภายในสายพอลิเปปไทด์หรือโปรตีน และจัดแบ่งตามกลไกการไฮโดรไลซ์เป็น cysteine protease หรือ thiol protease (Arshad และคณะ, 2014; Kermasha และ Eskin, 2021) เอนไซม์โบรมีเลนจากต้นสับปะรดมีขนาดโมเลกุล 24.5 kDa และมีค่า isoelectric point 9.55 (Rowan, 2013) ในขณะที่บางรายงานระบุว่าเอนไซม์จากต้นมีขนาดโมเลกุลเป็นช่วงตั้งแต่ 23.40–35.73 kDa (Arshad และคณะ, 2014)

จากการสืบค้นฐานข้อมูล Scopus ล่าสุด พบว่ามีเอกสารตีพิมพ์ที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์โบรมีเลนมาอย่างยาวนาน โดยตลอดช่วงตั้งแต่ประมาณปี 1968 –2009 นั้นมีจำนวนงานวิจัยค่อนข้างคงที่ประมาณ 50-60 เรื่องต่อปี และเพิ่มอย่างก้าวกระโดดในปี 2016 เป็นปีละมากกว่า 130 เรื่อง และยังมีงานวิจัยใหม่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึง 242 เรื่อง ในปี 2021 ที่ผ่านมา (ภาพที่ 3) แสดงให้เห็นความน่าสนใจในการวิจัยเกี่ยวกับเอนไซม์นี้ทั้งในด้านการสกัดและการนำไปใช้ประโยชน์



ภาพที่ 3 จำนวนเอกสารตีพิมพ์ที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์โบรมีเลนในฐานข้อมูล Scopus ในช่วงปี 1946- 2021 โดยใช้คำค้น TITLE-ABS-KEY (bromelain)

ปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้โบรมีเลนทั้งในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การใช้เพื่อทำให้เนื้อนุ่มในรูปของผงหมักเนื้อ (ภาพที่ 4) ป้องกันไม่ให้เปียร์ชุนเมื่อแช่เย็น (chill proof) อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง และทางการแพทย์ เช่น ใช้เป็นสารช่วยย่อย และลดการอักเสบ และยังใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ อีกด้วย (Arshad และคณะ, 2014) ตารางที่ 1 และ 2 แสดงการใช้ประโยชน์เอนไซม์โบรมีเลนในอุตสาหกรรมต่าง ๆ (Grzonka และคณะ, 2007; Ramli และคณะ, 2017)



ภาพที่ 4 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์หมักเนื้อที่มีเอนไซม์โบรมีเลนผสมอยู่

ตารางที่ 1 ตัวอย่างการใช้ประโยชน์เอนไซม์โปรตีเอส

Application	Enzymes used	Reason (uses)
Biological detergent	papain, bromelain	protein stain removing
Baking industry	bromelain, papain	lowering the protein level of flour in biscuit manufacturing, dough relaxation, preventing dough shrinkback, better bread volume, crumbliness and browning uniformity
Brewing industry	bromelain, papain	removing cloudiness during storage of beers, splitting proteins in the malt
Dairy industry	bromelain, papain	whey hydrolyzates, sweetener, cheese ripening
Photographic industry	ficin	dissolving gelatin of the scraped film allowing to recovery of silver present
Food industry	bromelain, papain, cathepsins	tenderizer for meat, make high-level nutriment, make soluble protein products and breakfast, cereal and beverage, gelatin stabilization, health food, dry fermented food ripening
Waste removing (effluent)	bromelain, papain	lowering viscosity of water extract (stick water), protein and peptides production
Chitooligosaccharides production	crude bromelain, crude papain	chitosan depolymerization to use in pharmacy, animal food, medicine
Sea food	bromelain, papain	surimi production, protein hydrolyzates
Cosmetic industry	bromelain, papain	peeling effect, tooth whitening, can help to dispel taches and pimples, clean face
Pharmaceutical industry and medicine	bromelain, papain	kill the lymphatic leukemia cells, probacteria, parasite and bacillus tuberculars, helping diminish inflammation, normalize the functioning of the gallbladder, alleviating pain and promote digestion, soft lens cleaning
Textile	bromelain, papain	used for processing wool, boiling off cocoons and refining silks
Leather industry	papain	depilatory for tanning the leathers
Forage (animal's food)	bromelain, papain	to increase availability and inversion of proteins decreasing the cost of forages and exploiting sources of protein
Chemical industry (organic synthesis)	bromelain, papain	synthesis of aspartam, antitumor compounds, bioactive peptides

ที่มา: Grzonka และคณะ (2007)

ตารางที่ 2 การใช้ประโยชน์เอนไซม์โบรมีเลน

Table 2. Commercialisation of bromelain		
Field	Commercialisation	References
Clinical use	Treatment of osteoporosis	59–62,65–68
	Immunogenicity	59,71–74
	Fibrinolysis	59,75,76
	Diarrhoea	59,77–79
	Cancer cells	17,80–84
Pharmaceutical use	Surgery	65,102
	Potential of antibiotics	8,103–105
	Debridement of burns	106–110
	Dermatological disorders	111–113
Industrial use	Tenderisation	91,114–117
	Baking industry	87,118
	Textiles	88,90,91
	Tooth whitening	92–94
	Cosmetics	97,113

ที่มา: Ramli และคณะ (2017)

นอกจากนี้ยังพบผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร (dietary supplement) ที่มีเอนไซม์โบรมีเลนเป็นส่วนผสมสำคัญหลากหลายชนิดจำหน่ายเชิงพาณิชย์ ดังแสดงในภาพที่ 5 โดยทั่วไปมักจะกล่าวอ้างถึงสรรพคุณด้านการบรรเทาอาการเจ็บปวดของกล้ามเนื้อหรือส่วนอื่น ๆ ของร่างกาย อย่างไรก็ตามงานวิจัยที่แสดงฤทธิ์ทางสุขภาพของเอนไซม์โบรมีเลนในรูปแบบของผลิตภัณฑ์เสริมอาหารยังมีน้อยมาก

(www.nccih.nih.gov/health/bromelain)

Ramli และคณะ (2017) ระบุว่าเอนไซม์โบรมีเลนทางการค้านั้นมีราคาสูงถึงประมาณ 2,400 USD (80,000 บาท)/กิโลกรัม จากการสอบถามบริษัทผู้จำหน่ายในประเทศ เอนไซม์โบรมีเลนที่มีกิจกรรมเอนไซม์ 80 GDU/g มีราคาจำหน่ายประมาณ 1,500 บาท/กิโลกรัม ในขณะที่จากข้อมูลเว็บไซต์ออนไลน์เอนไซม์โบรมีเลนเกรดสำหรับอุตสาหกรรมอาหารจากประเทศจีนมีราคา 19 USD (600 บาท)/กิโลกรัม (www.foodgradeenzyme.com/sale-10715392-bromelain-for-beer-and-beverage-clarification-

food-additives.html) ในขณะที่เว็บไซต์ของอินเดียระบุราคาเป็น 1500 Rs (600 บาท)/ กิโลกรัม เช่นกัน (<https://www.indiamart.com/proddetail/bromelain-powder-15964771030.html>)



naturesplus.com



www.pharmaca.com



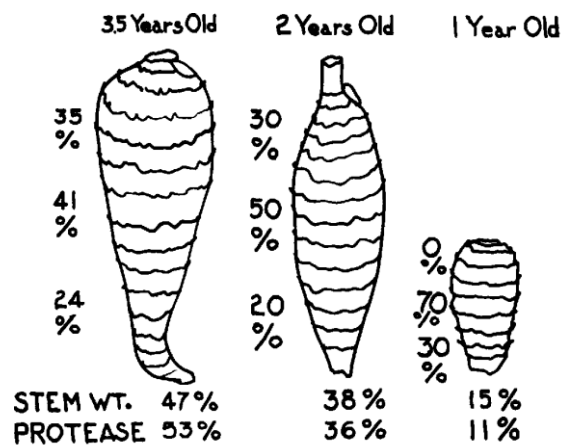
www.healthlane.com.my

ภาพที่ 5 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากเอนไซม์โบรมีเลน

1.4.3 การสกัดและการทำบริสุทธิ์โบรมีเลน

การผลิตเอนไซม์โบรมีเลนเป็นกระบวนการที่มีต้นทุนสูง ทำให้มูลค่าของเอนไซม์ที่ได้ราคาสูงไปด้วยการผลิตเอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์สูงประกอบไปด้วยขั้นตอนหลายขั้นตอน ได้แก่ การสกัด การทำบริสุทธิ์ การทำแห้ง และการบรรจุ ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ (purification) เป็นขั้นตอนสำคัญที่สุดเนื่องจากส่งผลต่อระดับความบริสุทธิ์และเป็นต้นทุนหลักของผลิตภัณฑ์

การแยกเอนไซม์โบรมีเลนหยาบออกจากต้นสับปะรดนั้นสามารถทำได้ไม่ยากนัก โดยนิยมใช้การคั้นหรือสกัดโดยผสมต้นที่สับเป็นชิ้นเล็ก ๆ กับน้ำที่อุณหภูมิต่ำ ในการศึกษาของ Heinicke และ Gortner (1957) ซึ่งเป็นงานวิจัยแรก ๆ ที่รายงานเรื่องการสกัดโบรมีเลนจากต้นสับปะรดนั้นใช้การสกัดโดยการคั้นน้ำจากต้นด้วยเครื่องบีบอัด ซึ่งในงานวิจัยดังกล่าวนักวิจัยพบว่าการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยอะซีโตนมีประสิทธิภาพมากที่สุด โดยแบ่งเป็น 2 ขั้นตอนคือขั้นแรกผสมอะซีโตน 1-2 ส่วนต่อน้ำ 2 ส่วน เพื่อตกตะกอนขั้นต้นซึ่งจะได้ส่วนที่มีเอนไซม์ปริมาณน้อย จากนั้นจึงใช้อะซีโตนอีกส่วนผสมกับส่วนของน้ำเพื่อตกตะกอนอีกครั้งแล้วจึงแยกตะกอนเอนไซม์ด้วยการหมุนเหวี่ยงและทำแห้ง ซึ่งพบว่าต้นสับปะรดที่มีอายุมาก (3.5 ปี) จะมีปริมาณเอนไซม์มากกว่าต้นอายุ 2 หรือ 1 ปี (ภาพที่ 6) เทคนิคการสกัดและตกตะกอนลักษณะนี้ถูกนำมาใช้ในการสกัดเอนไซม์กันเรื่อยมาในงานวิจัยอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 3 และ 4



ภาพที่ 6 สัดส่วนปริมาณเอนไซม์โบรมีเลนในต้นสับปะรดอายุต่างกัน Heinicke และ Gortner (1957)

ตารางที่ 3 สิทธิบัตรต่างประเทศที่เกี่ยวข้องกับการสกัดเอนไซม์โบรมีเลนจากสับปะรด

หมายเลขสิทธิบัตร	ชื่อ	รายละเอียด
US3002891A (expired)	Process for the preparation of pineapple stem bromelain	แยกน้ำด้วยเครื่องคั้น ปรับ pH ให้ได้ 3.5 – 5.5 ตกตะกอนด้วยอะซีโตน 2 รอบ รายละเอียดตาม Heinicke และ Gortner (1957)
US3455787A (expired)	Process for extracting bromelain	บดต้นสับปะรดให้ละเอียด สกัดน้ำด้วยแรงกล เพิ่มความเข้มข้นด้วยการแช่แข็งน้ำบางส่วน ตกตะกอนด้วยเอทานอล
US3699001A (expired)	Preparation of bromelain from pineapple stems	แช่แข็งและละลายต้นสับปะรด, สกัดน้ำด้วยแรงกล, ตกตะกอนเอนไซม์ด้วยกรดแทนนิก (0.3-1.2%) และแยกเอนไซม์ด้วยอะซีโตน
CN102071180 (2011)	New process for preparing pineapple bromelain	ใช้ tannin ในการตกตะกอนเอนไซม์จากน้ำสับปะรด
CN102586213 (2012)	Method for extracting bromelain ananase through chitosan carboxylation derivative	ใช้ chitosan carboxylation derivative ในการดูดซับเอนไซม์

หมายเลขสิทธิบัตร	ชื่อ	รายละเอียด
CN104531643 (2015)	Method for separating and purifying of bromelain from pineapple peels	สกัดจากเปลือกสับปะรดโดยใช้เทคนิค reverse micelle
CN106032530 (2016)	Method for extracting bromelain by using pineapple stem	ปอกเปลือก แยกส่วนแกน สกัดน้ำและตกตะกอนด้วยเกลือ (NaCl) 10%
EP3252156A1 (2017)	Method for extraction and/or isolation of bromelain from pineapple	การตกตะกอนด้วยการเกิดสารเชิงซ้อนกับพอลิแซคาไรด์ เช่น ไคโตซาน อัลจิเนต และคาราจีแนน ซึ่งเป็นงานวิจัยที่ตีพิมพ์โดย Campos และคณะ (2019)
CN107475226 (2017)	Novel bromelain preparation and preparation method thereof	ตกตะกอนโบรมีเลนด้วยคาร์โบไฮเดรตที่มีประจุลบ (polyanion polysaccharide) จากน้ำสับปะรด
CN109022402 (2018)	Method for extracting bromelain	น้ำสับปะรดหรือจากแกนสับปะรด, ใช้เอนไซม์ lignin enzyme, cellulose, pectinase จากนั้นใช้การปรับ pH ให้ได้ isoelectric point เพื่อตกตะกอนเอนไซม์

ตารางที่ 4 สิทธิบัตรในประเทศไทยเกี่ยวกับการสกัดเอนไซม์โบรมีเลนจากสับปะรด

หมายเลขสิทธิบัตร	ชื่อ	รายละเอียด
อนุสิทธิบัตรเลขที่ 14422 (กันยายน 2561)	กรรมวิธีการเตรียมโบรมีเลนจากสับปะรดด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคประสิทธิภาพสูง	สกัดเอนไซม์จากชิ้นส่วนสับปะรดด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7) จากนั้นนำไปแยกโดยผสมสารสกัดที่กรองแล้วพอลิเอทิลีนไกลคอล 1500 และเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ผสมเข้ากันตั้งทิ้งไว้ให้แยกเฟส นำเฟสบนซึ่งมีพอลิเอทิลีนไกลคอลและเอนไซม์ผสมอยู่ไปทำแห้ง

ตารางที่ 5 งานวิจัยในประเทศไทยเกี่ยวกับการผลิตเอนไซม์โบรมีเลนที่มีการรายงานบนฐานข้อมูล ThaiLIS

เรื่อง	สถาบัน (ปี)	สรุป
การผลิตเอนไซม์โบรมีเลนจากส่วนเหลือทิ้งของสับปะรด	วิทยานิพนธ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (2527)	- สกัดเอนไซม์จากต้นสับปะรด โดยตีป่น ต้นกับน้ำเย็น - ตกตะกอนเอนไซม์ด้วยอะซีโตนเย็นให้ ผลดีที่สุด
การปรับปรุงกรรมวิธีการผลิตเอนไซม์บรอมีเลนจากลำต้นสับปะรด	วิทยานิพนธ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (2528)	- สกัดเอนไซม์จากต้นสับปะรดโดยการใช้ เครื่องหีบที่อุณหภูมิเย็น - ตกตะกอนด้วยอะซีโตนเย็น - ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง - ทำเข้มข้นเอนไซม์ด้วยเครื่องอุลตรา ฟิลเตรชั่น
การผลิตโบรมีเลนจากต้นสับปะรด	วิทยานิพนธ์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย (2530)	- สกัดเอนไซม์จากต้นสับปะรด โดยคั้นน้ำ จากต้น - ตกตะกอนด้วยกรดแทนนิกให้ผลดีที่สุด - การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งรักษา กิจกรรมเอนไซม์ได้ดี
การเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์บรอมีเลนผงจากลำต้นสับปะรด	วิทยานิพนธ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (2530)	- สกัดเอนไซม์จากต้นสับปะรด โดยคั้นน้ำ จากต้น - ใช้ ion exchange resin เพื่อแยก สิ่งเจือปน - ตกตะกอนด้วยอะซีโตน - การเติมน้ำตาลซูโครสหรือกลูโคสใน เอนไซม์ผงช่วยเพิ่มการละลาย
การศึกษาการผลิตเอนไซม์จากพืชเพื่อใช้ในการการค้า	รายงานการวิจัย มหาวิทยาลัย ราชภัฏเพชรบูรณ์ (2550)	สกัดเอนไซม์จากน้ำสับปะรด ตรึงรูปกับ พาหะคือแป้งมันฝรั่งและเดกซ์ทริน

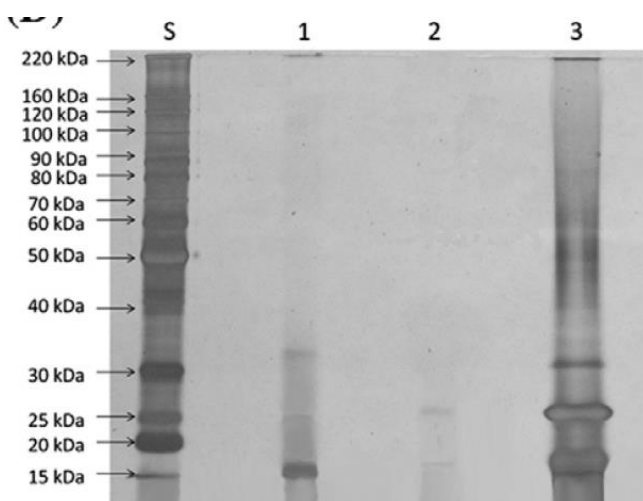
จากงานวิจัยต่าง ๆ จะเห็นว่าการวิจัยการสกัดและแยกเอนไซม์ด้วยการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น อะซีโตน หรือเอทานอลนั้นเป็นวิธีที่ง่าย และนิยมศึกษากันมานาน ปัจจุบันแม้ว่าจะมีเทคนิคที่มีประสิทธิภาพมากกว่า เช่น วิธี reversed micelle แต่วิธีเหล่านี้มักจะมีความยุ่งยาก ต้นทุนสูง โดย Soares และคณะ (2012) ได้ระบุว่าขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์นั้นอาจจะมีต้นทุนถึง 70-90% ของกระบวนการผลิต

เอนไซม์ทั้งหมด ดังนั้นการพัฒนากระบวนการทำบริสุทธิ์ที่มีต้นทุนต่ำจึงส่งผลต่อราคาของผลิตภัณฑ์เอนไซม์อย่างมาก

1.4.4 การตกตะกอนโปรตีน

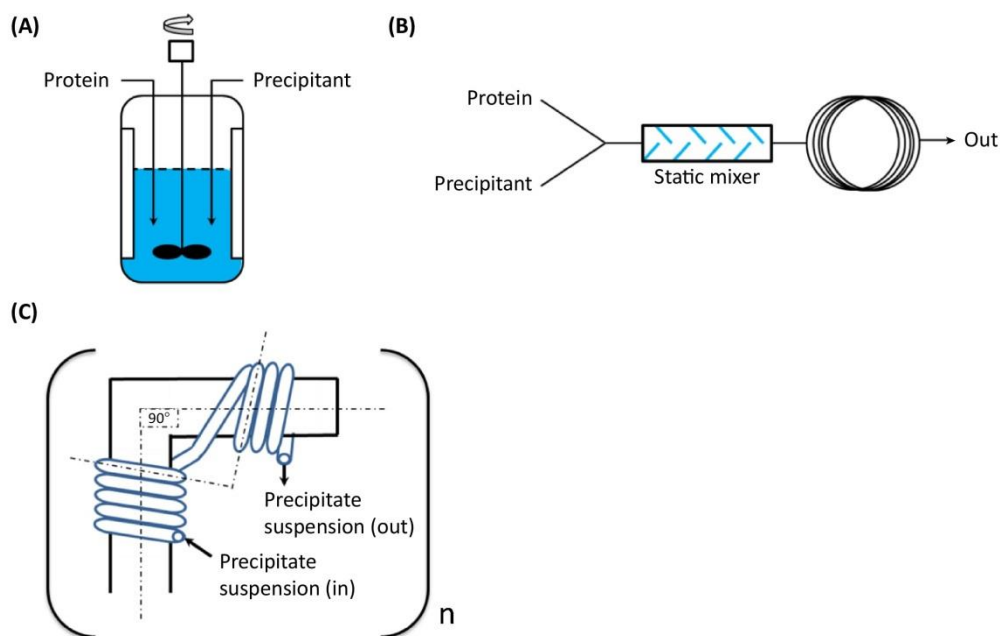
การตกตะกอนโปรตีน (protein precipitation) คือการเปลี่ยนสภาพโปรตีนที่ละลายได้ให้กลายเป็นโปรตีนที่ไม่ละลายโดยการปรับสภาวะของสารละลาย ในช่วงแรกเป็นช่วงการเกิด nucleation จะเกิดอนุภาคโปรตีนขนาดเล็ก (submicron) จากนั้นขนาดอนุภาคจะเพิ่มขึ้นโดยการเคลื่อนที่แบบบราวเนียน (Brownian motion) ในช่วงแรก และหลังจากนั้นจึงเป็นการชนกันระหว่างอนุภาคจำนวนมากขึ้นจนกระทั่งมีขนาดคงที่ซึ่งขึ้นอยู่กับ shear field กระบวนการผสม และธรรมชาติของโปรตีน สารที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีนมีหลายชนิดโดยอาจเป็นเกลือ ตัวทำละลายอินทรีย์ พอลิเมอร์ที่ไม่มีประจุ พอลิอิเล็กโตรไลต์ กรด และสารที่เป็น affinity ligand เป็นต้น ซึ่งแม้ว่าการตกตะกอนโปรตีนจะมีการศึกษากันมานาน แต่ความรู้เชิงลึกของกลไกการตกตะกอนโปรตีนแต่ละชนิดยังมีอยู่จำกัด (Martinez และคณะ, 2019)

การตกตะกอนเป็นวิธีการแยกเอนไซม์แบบดั้งเดิม โดยวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย ใช้อุปกรณ์ไม่ซับซ้อน ใช้พลังงานต่ำ และขยายขนาดการผลิตได้ง่าย และมีสารที่ใช้ในการตกตะกอนหลายชนิด ซึ่งรวมถึงเอทานอลซึ่งมีราคาถูก มีการศึกษาการตกตะกอนเอนไซม์หลายชนิดด้วยเอทานอล สำหรับการตกตะกอนเอนไซม์โบรมีเลน นั้น Soares และคณะ (2012) พบว่าเอทานอลความเข้มข้น 30 – 70% ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส สามารถตกตะกอนโบรมีเลนจากส่วนเหลือทิ้งของสับปะรด คือต้นและเปลือกได้ โดยเมื่อใช้น้ำสกัดที่มีโปรตีน 0.23 mg/mL พบว่าเมื่อตกตะกอนด้วยเอทานอล 70% จะได้โปรตีน 0.20 mg/mL โดยใช้เวลา 15 นาที ในการตรวจสอบบน SDS-PAGE เอนไซม์สกัดหยาบที่ได้พบแถบเปปไทด์ 2 แถบบน ดังภาพที่ 7 (แถบที่ 3) ซึ่งตรงกับโปรตีนน้ำหนักโมเลกุล 27.1 และ 14.9 kDa



ภาพที่ 7 ผลการวิเคราะห์ SDS-PAGE สำหรับเอนไซม์โบรมีเลนทางการค้า (แถบ 1), และเอนไซม์สกัดหยาบที่ตกตะกอนได้ด้วยเอทานอล (แถบ 3) (Soares และคณะ, 2012)

ระบบของการตกตะกอนโปรตีนที่มีอยู่อาจแบ่งได้เป็น 3 แบบ (Martinez และคณะ, 2019) ดังภาพที่ 8 แบบ (A) เป็นถังกวนแบบกะ (batch stirred tank) เป็นแบบที่ง่ายที่สุด มักมีถังกวนผสมขนาดใหญ่ โดยมักจะค่อยๆ เติมสารตกตะกอนลงในสารละลายโปรตีนที่ละน้อยโดยมีการกวนตลอดเวลาเพื่อช่วยให้ความเข้มข้นของสารตกตะกอนในถังสม่ำเสมอทั่วกัน เมื่อถึงสภาวะคงที่หรือสมดุลตะกอนจะถูกนำไปแยกโดยการหมุนเหวี่ยงหรือการกรอง แบบ (B) เป็นระบบต่อเนื่องแบบท่อ (continuous tubular reactor, CTR) ซึ่งสารตกตะกอนกับสารละลายโปรตีนถูกปั๊มเข้าอย่างต่อเนื่องผ่านอุปกรณ์ที่ช่วยทำการผสม (mixer) แล้วผ่านเข้าสู่ท่อยาวซึ่งจะเกิดการตกตะกอนของโปรตีน การเกิดปฏิกิริยาภายในท่อจะมีลักษณะแบบ plug flow ระบบแบบนี้สามารถช่วยลดพื้นที่ของเครื่องจักรได้ด้วยการม้วนหรืองอท่อ แบบ (C) เรียกว่า Coiled flow inversion reactor มีลักษณะคล้าย CTR แต่มีการปรับการม้วนของท่อให้มีลักษณะที่เพิ่มการผสมในแนวรัศมีมากขึ้น



ภาพที่ 8 หน่วยปฏิบัติการในการตกตะกอนโปรตีนแบบต่างๆ (Martinez และคณะ, 2019)

ปัจจุบันงานวิจัยเรื่องการตกตะกอนโปรตีนในระบบท่อยังมีอยู่ค่อนข้างน้อย เช่น Raphael และ Rohani (1999) และ Zelger และคณะ (2016) ศึกษาการตกตะกอนโปรตีนด้วยกรด ในขณะที่ Hammerschmidt และคณะ (2015) ศึกษาการตกตะกอน Immunoglobulin G ด้วย CaCl_2 และเอทานอล และ Hammerschmidt และคณะ (2016) ยังได้ศึกษาการตกตะกอน antibodies (mAbs) ด้วย polyethylene glycol แต่ยังไม่พบงานวิจัยเกี่ยวกับการตกตะกอนเอนไซม์แบบต่อเนื่อง

โดยในงานวิจัยของ Raphael และ Rohani (1999) พบว่าการใช้ท่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm ยาว 20 เมตรสามารถตกตะกอนโปรตีนจากเมล็ดดอกทานตะวันโดยใช้สารละลายกรดที่มีค่า pH ที่ค่า

isoelectric point โดยได้ปริมาณสูงสุดประมาณ 5.5 kg/m^3 เมื่อความเข้มข้นของสารละลายขาเข้า (feed) เป็น 11.8 kg/m^3 โดยใช้เวลาในการตกตะกอน 160 วินาที หรือคิดเป็นร้อยละการตกตะกอนได้ประมาณ 47%

1.4.5 กิจกรรมของเอนไซม์โบรมีเลน

เนื่องจากโบรมีเลนเป็นเอนไซม์โปรตีเอส กิจกรรมของเอนไซม์โบรมีเลน (bromelain enzyme activity) จึงวัดโดยความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโปรตีน ปัจจุบันพบว่ามีรายงานค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในหลายหน่วยตามชนิดของโปรตีนที่ใช้เป็นสารตั้งต้น (substrate) โดยหน่วยที่ใช้แพร่หลายได้แก่ gelatin digestion unit (GDU) ซึ่งวิเคราะห์ได้จากการใช้เจลาติน (gelatin) เป็นสารตั้งต้น ในขณะที่หน่วย casein digestion unit (CDU) วิเคราะห์ได้จากการใช้โปรตีนเคซีนเป็นสารตั้งต้น โดยการเทียบค่ากิจกรรมเอนไซม์นั้นมีการรายงานว่าสามารถเทียบค่าได้จาก $750 \text{ CDU/mg} = 1,200 \text{ GDU/g}$ (Mynott และ Fasano, 1999) หรือ $1 \text{ CDU/mg} \approx 1.6 \text{ GDU/g}$

บริษัทหงษ์มาวจำกัด ระบุว่าบริษัทผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรม $3,000 \text{ GDU/g}$ ($\approx 1,875 \text{ CDU/mg}$) ในขณะที่บริษัทบริษัทรูท ฟู้ด (ไบโอเคม) จำกัดระบุว่าเอนไซม์ที่ผลิตสำหรับอุตสาหกรรมอาหารจะมีกิจกรรม $500 - 1,000 \text{ CDU/mg}$ เอนไซม์ที่ผลิตสำหรับ pharmaceutical จะมีกิจกรรม $1,100 - 1,350 \text{ CDU/mg}$

1.5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ช่วงระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการตกตะกอนแบบ batch
2. อุปกรณ์ต้นแบบการตกตะกอนแบบต่อเนื่องที่มีกำลังการตกตะกอน 120 mg/h
3. ข้อมูลผลของปัจจัยต่อการตกตะกอนแบบต่อเนื่อง
4. สภาวะที่เหมาะสมในการตกตะกอนแบบต่อเนื่อง
5. ต้นแบบระบบการตกตะกอนที่มีกำลังการตกตะกอน 500 และ $1,100 \text{ mg/h}$
6. ตัวอย่างเอนไซม์แห้งที่มี activity อย่างน้อย $2,000 \text{ CDU (casein digestion units)/mg}$

2. วิธีการดำเนินการวิจัย

2.1 วิธีการทดลอง

2.1.1 การศึกษาเปรียบเทียบแหล่งที่มาและอายุของต้นสับปะรด

2.1.1.1 เก็บต้นสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียสดจากแหล่งปลูกใน 2 พื้นที่ คือจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และ จังหวัดชลบุรี และอายุของต้นสับปะรด 3 ช่วง คือ 1, 2 และ 3 ปี

2.1.1.2 นำต้นสดที่หั่นปอกส่วนผิวด้านนอกออกจนได้เป็นส่วนเนื้อด้านในสีขาว หั่นเป็นชิ้นขนาดเล็ก

2.1.1.3 วิเคราะห์ปริมาณความชื้น ปริมาณไขมัน ปริมาณโปรตีน ปริมาณเถ้า และคำนวณปริมาณคาร์โบไฮเดรตจากผลต่าง ตามวิธีของ AOAC (2000)

2.1.1.4 สกัดสารสกัดจากต้นสับปะรดตามวิธีการของ Campos และคณะ (2019) โดยผสมต้นสับปะรดกับน้ำกลั่นเย็นที่อัตราส่วน 100:100 g/g ปั่นผสมด้วยเครื่องผสมอาหาร ระดับ 1 เป็นเวลา 1 นาที นำของผสมมากรองผ่านผ้าขาวบาง 2 ชั้น นำส่วนของเหลวที่ได้ไปทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Sorvall RC 6 Plus Superspeed Centrifuge, Thermo Scientific, USA) ที่ความเร็ว 8,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เก็บส่วนใสซึ่งคือสารสกัดเอนไซม์หยาบ

2.1.1.5 วิเคราะห์ค่า pH ปริมาณของแข็งด้วยการนำตัวอย่างไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford (mg/mL) วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ด้วยวิธี casein digestion unit (CDU/mL) และคำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ (specific bromelain activity) (CDU/mg protein)

2.1.1.6 คัดเลือกแหล่งที่มาและอายุของต้นสับปะรดที่เหมาะสมสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

2.1.2 การศึกษาอัตราส่วนปริมาณต้นสับปะรดต่อน้ำในการสกัด

2.1.2.1 เปรียบเทียบอัตราส่วนของปริมาณต้นสับปะรดต่อน้ำต่อการสกัดเอนไซม์โบรมีเลนโดยใช้ อัตราส่วน 50:100 g/g, 100:100 g/g และ 200:100 g/g ปั่นผสมด้วยเครื่องผสมอาหาร ระดับ 1 เป็นเวลา 1 นาที และเตรียมเอนไซม์หยาบเช่นเดียวกับการทดลอง 2.1.1.4

2.1.2.2 วิเคราะห์ค่า pH ปริมาณของแข็งด้วยการนำตัวอย่างไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ด้วยวิธี casein digestion unit และคำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ (specific bromelain activity)

2.1.2.3 คัดเลือกอัตราส่วนปริมาณต้นสับปะรดต่อน้ำที่เหมาะสมสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

2.1.3 การศึกษาผลของความเข้มข้นเอทานอลต่อการตกตะกอนโบรมีเลนในหลอดทดลอง

2.1.3.1 สกัดสารสกัดจากต้นสับปะรด โดยผสมต้นสับปะรดกับน้ำกลั่นเย็นที่อัตราส่วน 100:100 g/g ปั่นผสมด้วยเครื่องผสมอาหาร ระดับ 1 เป็นเวลา 1 นาที และเตรียมสารสกัดเอนไซม์หยาบเช่นเดียวกับการทดลอง 2.1.1.4

2.1.3.2 นำสารสกัดเอนไซม์หยาบมาตกตะกอนเอนไซม์โบรมีเลนด้วยเอทานอลที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน 9 ระดับ ได้แก่ 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90% v/v ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส

2.1.3.3 นำเอทานอลและสารสกัดเอนไซม์หยาบมาแช่เย็นในอ่างควบคุมอุณหภูมิให้ได้อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส จากนั้นปิเปตสารสกัดเอนไซม์หยาบปริมาตร 1 mL ใส่หลอดทดลองและเติมเอทานอลเย็นลงไปตามสัดส่วนให้ได้ความเข้มข้นเอทานอลที่ต้องการ นำไปตกตะกอนโดยแช่ในอ่างน้ำเย็นที่ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที โดยมีแท่งแม่เหล็กขนาดเล็กกวนสารสกัดตลอดเวลาระหว่างการตกตะกอน จากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่สภาวะ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเก็บตะกอนที่ได้มาละลายสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 8.0) ปรับปริมาตรให้ได้ 10 mL ด้วยขวดปรับปริมาตร นำสารละลายสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนและกิจกรรมเอนไซม์ และคำนวณค่า Bromelain activity recovery (%) จากสมการเพื่อใช้แสดงประสิทธิภาพในการตกตะกอนเอนไซม์โบรมีเลน

$$\text{Bromelain activity recovery (\%)} = \frac{\text{กิจกรรมเอนไซม์ของตะกอนที่ได้}}{\text{กิจกรรมเอนไซม์ของสารสกัดหยาบ}} \times 100$$

2.1.3.4 เลือกความเข้มข้นของเอทานอลที่เหมาะสมสำหรับการตกตะกอน

2.1.4 การศึกษาจลนพลศาสตร์การตกตะกอนโบรมีเลนในหลอดทดลอง

2.1.4.1 ศึกษาจลนพลศาสตร์การตกตะกอนโดยใช้ความเข้มข้นของเอทานอลที่ 60% (v/v) ที่อุณหภูมิในช่วง 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 องศาเซลเซียส

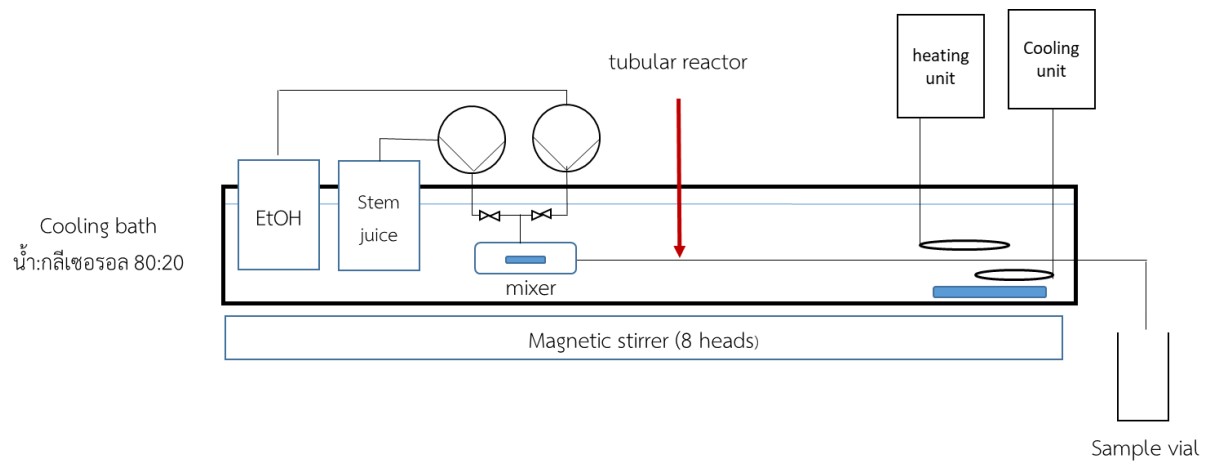
2.1.4.2 นำเอทานอลและสารสกัดเอนไซม์หยาบมาแช่เย็นในอ่างควบคุมอุณหภูมิให้ได้อุณหภูมิที่ปรับอุณหภูมิตามที่กำหนด จากนั้นปีเปิดสารสกัดเอนไซม์ลงในหลอดทดลองจำนวน 15 หลอด หลอดละ 1 mL แช่ไว้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ จากนั้นเติมเอทานอล 1.5 mL เพื่อให้สารสกัดมีความเข้มข้นเอทานอลร้อยละ 60 กวนสารสกัดตลอดเวลาด้วยแท่งแม่เหล็กระหว่างการตกตะกอน จับเวลาการตกตะกอน โดยเก็บตัวอย่างทุก 1 นาที นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวส่วนใสทิ้งทันที และใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 8.0) ละลายตะกอนในหลอดเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและกิจกรรมเอนไซม์ และคำนวณค่า Bromelain activity recovery (%) สำหรับเวลา 0 นาที คือเมื่อผสมผสมเอทานอลกับสารสกัดแล้วนำปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนทันที

2.1.4.3 เลือกความอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการตกตะกอน

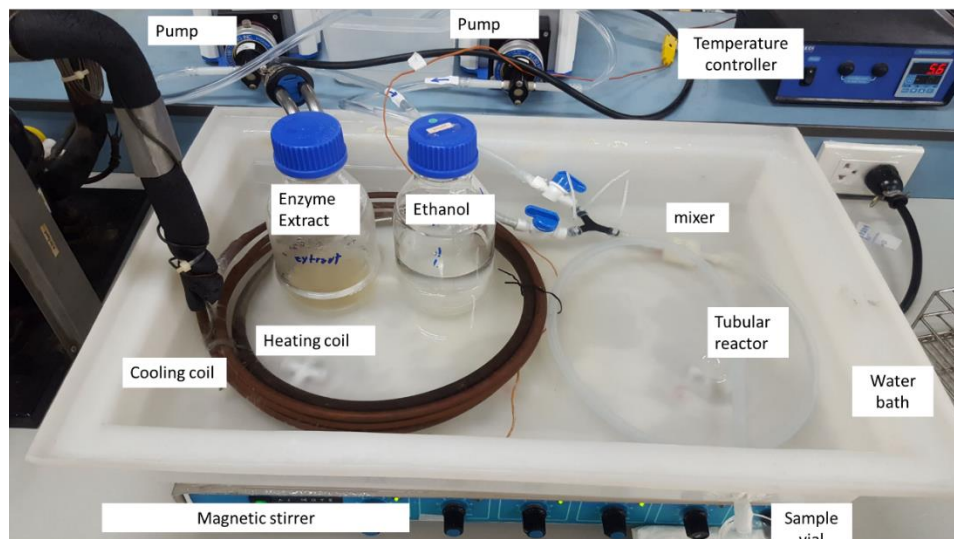
2.1.5 การติดตั้งอุปกรณ์สำหรับการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยเอทานอลแบบต่อเนื่องในท่อ

2.1.5.1 ติดตั้งอุปกรณ์สำหรับการตกตะกอนแบบต่อเนื่องในท่อ (continuous tubular reactor) แสดงเป็นภาพโครงร่างในภาพที่ 9 และภาพถ่ายอุปกรณ์จริงในภาพที่ 10 โดยประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้

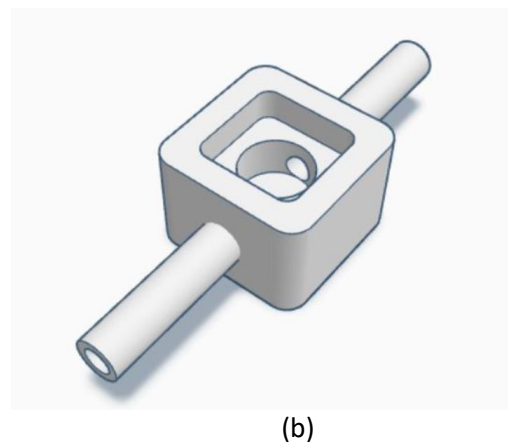
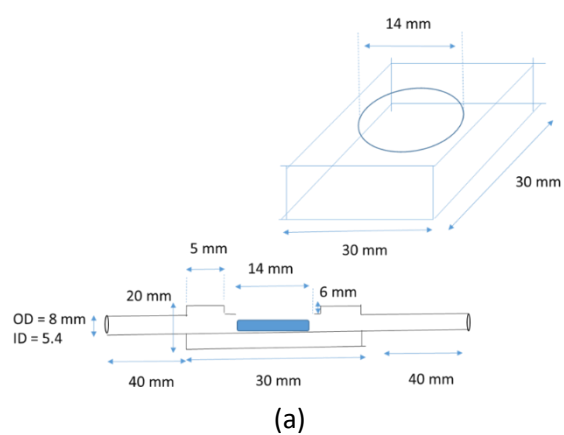
- (1) ปัมป์แบบ piston pump (Ismatec Reglo Digital Piston Pump, MasterFlex, USA) สามารถปรับอัตราการไหลได้ในช่วง 0.025 ถึง 180 mL/min จำนวน 2 เครื่องสำหรับปัมป์เอทานอลและสารสกัดเอนไซม์หยาบ
- (2) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิซึ่งประกอบด้วยอ่างพลาสติกขนาด 30 x 49 x 9 cm (กว้าง x ยาว x ลึก) ปริมาตรรวม 13.2 L บรรจุสารละลายกลีเซอริน 20% ปริมาตร 7 L (ระดับความสูงของสารละลายประมาณ 5 cm) ซึ่งทำให้จุดเยือกแข็งของสารละลายลดลงเป็น -4.8 องศาเซลเซียส (Lane, 1925)
- (3) เครื่องทำความเย็นที่มีคอมเพรสเซอร์ขนาด 1/5 HP ต่อกับท่อทำความเย็น (cooling coil) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวง 26 cm จุ่มอยู่ในอ่างน้ำเพื่อลดอุณหภูมิ
- (4) ขดลวดทำความร้อน (heating coil) ขนาดกำลังไฟ 1600 W ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวง 24 cm จุ่มอยู่ในอ่างน้ำและควบคุมอุณหภูมิด้วยชุดควบคุมอุณหภูมิ (temperature controller, Metrology Technical, Bangkok) แบบ PID โดยต่อกับเทอร์โมคัปเปิลชนิด K สำหรับวัดอุณหภูมิของน้ำ
- (5) ชุดกวนสารด้วยแท่งแม่เหล็กชนิด 8 หัว (Metrology Technical) วางอยู่ในอ่างพลาสติก โดยใช้ 1 หัวสำหรับสำหรับกวนน้ำในอ่างให้มีอุณหภูมิสม่ำเสมอ 1 หัวสำหรับหมุนแท่งแม่เหล็กในอุปกรณ์ mixer ที่ติดตั้งในท่อสำหรับตกตะกอน
- (6) ท่อสำหรับตกตะกอน (tubular reactor) เป็นท่อพลาสติกใส (Tygon LMT-55) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.635 cm ความยาว 1 m
- (7) อุปกรณ์ mixer ที่ออกแบบขึ้นมาสำหรับงานวิจัยนี้และขึ้นรูปด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติ (3D printer) (ภาพที่ 11) ภายในมีแท่งแม่เหล็กสำหรับผสมของเหลวที่ไหลเข้ามาจากปัมป์ทั้งสองทาง



ภาพที่ 9 ภาพโครงสร้างของชุดตกตะกอนเอนไซม์แบบต่อเนื่อง



ภาพที่ 10 ภาพถ่ายของชุดตกตะกอนเอนไซม์แบบต่อเนื่อง



ภาพที่ 11 (a) ภาพโครงร่าง และ (b) ภาพ 3-D ของอุปกรณ์ mixer สำหรับผสมสารสกัดเอ็นไซม์หยาบและเอทานอลก่อนไหลเข้าสู่ท่อสำหรับการตกตะกอน

2.1.5.3 ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในระบบตกตะกอนในท่อแบบต่อเนื่องโดยใช้น้ำกลั่นแทนสารสกัดเอ็นไซม์หยาบ หลังจากให้อุณหภูมิของน้ำและเอทานอล (95%) ในขวดมีอุณหภูมิตามที่กำหนดแล้วจึงเริ่มปั๊มเอทานอลที่อัตราการไหล 2.1 mL/min เข้าสู่อุปกรณ์ตกตะกอนโดยปิดวาล์วด้านปั๊มน้ำไว้จนกระทั่งในท่อเต็มไปด้วยเอทานอล จึงเปิดวาล์วด้านปั๊มน้ำและเริ่มปั๊มน้ำที่อัตราการไหล 1.4 mL/min เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของเอทานอลหลังการผสมเป็น 60% (v/v) ติดตามอุณหภูมิอุณหภูมิ 3 จุด ได้แก่ อุณหภูมิในอ่างควบคุม อุณหภูมิที่ mixer และอุณหภูมิที่ปลายท่อออกโดยใช้เทอร์โมคัปเปิลชนิด K ต่อกับเครื่องเก็บข้อมูล (GL240 midi Data Logger, Graphtech, Japan) เมื่อควบคุมอุณหภูมิในอ่างน้ำเป็น 0, 5 และ 10 องศาเซลเซียส

2.1.6 การศึกษาเวลาที่สารอยู่ในระบบการตกตะกอน

2.1.6.1 ดำเนินการทดสอบเพื่อหาระยะเวลาของสารที่อยู่ในท่อโดยเฉลี่ย เมื่อมีการใช้ mixer และไม่ใช่ mixer โดยใช้สารละลาย BSA เป็นสารตัวแทนเนื่องจากไม่เกิดการตกตะกอนและติดตามความเข้มข้นได้ง่าย โดยมีรายละเอียดดังนี้

- (1) ใช้ท่อยาว 1 m โดยวัดระยะตั้งแต่ mixer จนถึงปลายท่อ
- (2) เตรียมสารละลาย BSA เข้มข้น 2 mg/mL ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ไอโซโทนิกในขวดที่ 1 สำหรับขวดที่ 2 เป็นฟอสเฟตบัฟเฟอร์
- (3) ปั๊มฟอสเฟตบัฟเฟอร์ให้เต็มท่อที่อัตราการไหล 2.1 mL/min
- (4) เริ่มปั๊มสารละลาย BSA ที่อัตราการไหล 1.4 mL/min เริ่มจับเวลา
- (5) เก็บตัวอย่างที่ออกจากปลายท่อตั้งแต่นาทีที่ 5 ทุก 1 นาที ในหลอดทดลองจนครบ 30 นาที
- (6) นำตัวอย่างที่เก็บได้แต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm เพื่อวัดปริมาณ BSA โดยสร้างกราฟมาตรฐานของ BSA ที่ความเข้มข้น 0 – 2 mg/mL
- (7) พล็อตกราฟเวลากับค่าความเข้มข้นของ BSA ที่วัดได้และคำนวณค่าระยะเวลาของสารที่อยู่ในท่อโดยเฉลี่ย (mean residence time) ตามวิธีที่อธิบายโดย Fogler (2006)

2.1.6.2 เลือกรูปแบบการติดตั้งอุปกรณ์แบบที่มีหรือไม่มีอุปกรณ์ mixer ในระบบตกตะกอนในท่อแบบต่อเนื่อง

2.1.7 การศึกษาปัจจัยในการตกตะกอนโบรมีเลนในระบบท่อ

2.1.7.1 เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการตกตะกอนเอนไซม์ในระบบท่อแบบต่อเนื่องที่มี mixer โดยใช้ท่อความยาว 1 m ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน 3 ระดับ ได้แก่ 0, 5 และ 10 องศาเซลเซียส โดยปรับอัตราการไหลของสารสกัดเอนไซม์และเอทานอล 95% ดังตารางที่ 6 เพื่อให้ได้เวลาในการตกตะกอน 7, 9 และ 11 นาที โดยเวลาในการตกตะกอนที่ต้องการสามารถคำนวณจากอัตราการไหลรวมของสารสกัดเอนไซม์หยาบและเอทานอล (รวมกันเป็นอัตราการไหลรวม) และขนาดของท่อดังตัวอย่างต่อไปนี้

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางท่อ	0.635 cm
ความยาวท่อ	100 cm
อัตราการไหลรวม	3.52 mL/min

ความเร็วเฉลี่ย (v) = ปริมาตรท่อ/พื้นที่หน้าตัดของท่อ = $3.52 / (3.14 \times 0.3175 \times 0.3175) = 11.1$ cm/min

ดังนั้น เวลาที่อยู่ในท่อ = $100 / 11.1 = 9$ นาที

ตารางที่ 6 อัตราการไหลของสารสกัดเอนไซม์และเอทานอลเพื่อให้ได้เวลาในการตกตะกอนต่าง ๆ กัน

ความยาวท่อ (เมตร)	เวลาในการ ตกตะกอน (นาที)	อัตราการไหลรวม (mL/min)	เอทานอล 95% (mL/min)	สารสกัดเอนไซม์หยาบ (mL/min)
1	7	4.52	2.85	1.67
	9	3.52	2.22	1.30
	11	2.88	1.81	1.07

2.1.7.2 ขั้นตอนการตกตะกอนเอนไซม์ในระบบท่อดำเนินการดังนี้

- (1) เริ่มปั๊มเอทานอล 95% ไหลผ่านระบบเป็นระยะเวลา 15 นาที ซึ่งทำให้ภายในท่อดังกล่าวมีเอทานอลเต็มท่อ
- (2) ปั๊มสารสกัดเอนไซม์หยาบเข้าสู่ระบบผ่าน mixer เพื่อทำการตกตะกอนในท่อ ปล่องของผสมที่ได้ไหลออกทิ้งไปเป็นระยะเวลา 20 นาที เพื่อให้สภาวะในท่อดังกล่าวเข้าสู่สภาวะคงที่ จึงเริ่มเก็บตัวอย่าง
- (3) เก็บตัวอย่างปริมาตร 1 mL
- (4) นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 6,000 rpm เป็นระยะ 1 นาที เทส่วนใสทิ้งทันที และใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 8.0) ละลายตะกอนในหลอด และปรับปริมาตรให้ได้ 10 mL ในขวดปริมาตรเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและกิจกรรมเอนไซม์ และคำนวณค่า Bromelain activity recovery (%)

2.1.7.3 เลือกเวลาที่เหมาะสมสำหรับการตกตะกอนแบบต่อเนื่องในท่อ

2.1.8 การขยายขนาด (scale up) ระบบการตกตะกอน

2.1.8.1 ศึกษาการขยายขนาดระบบการตกตะกอนที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส โดยการเปลี่ยนท่อตกตะกอนซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเดิม (0.635 cm) ให้มีความยาวเป็น 4 และ 9 เมตร และดำเนินการทดลองตกตะกอนเช่นเดียวกับที่อธิบายในส่วน 2.1.7.2 โดยปรับอัตราการไหลเพื่อให้ได้เวลาของการไหลเป็น 5, 7, 9 และ 11 นาที ดังตารางที่ 7 ทั้งนี้ทำการทดลองที่ความยาวท่อ 1 เมตรซ้ำอีกครั้งด้วย

ตารางที่ 7 อัตราการไหลของสารสกัดเอนไซม์และเอทานอลเพื่อให้ได้เวลาในการตกตะกอนต่าง ๆ กันที่ความยาวท่อ 1, 4 และ 9 เมตร

ความยาวท่อ (เมตร)	เวลาในการ ตกตะกอน (นาที)	อัตราการไหลรวม (mL/min)	เอทานอล 95% (mL/min)	สารสกัดเอนไซม์หยาบ (mL/min)
1	5	6.33	3.99	2.34
	7	4.52	2.85	1.67
	9	3.52	2.22	1.30
	11	2.88	1.81	1.07
4	5	25.34	15.96	9.37
	7	18.10	11.40	6.70
	9	14.08	8.87	5.21
	11	11.52	7.26	4.26
9	5	57.00	35.91	21.09
	7	40.72	25.65	15.07
	9	31.67	19.95	11.72
	11	25.91	16.32	9.59

2.1.9 การปรับปรุงสภาวะการสกัดเอนไซม์หยาบ

2.1.9.1 ศึกษาหาสภาวะการสกัดเพื่อให้ได้เอนไซม์เริ่มต้นในสารสกัดเอนไซม์หยาบสูงขึ้นโดยศึกษาเพิ่มเติมจาก 2.1.2 ปัจจัยที่ทำการศึกษา ได้แก่ สัดส่วนของปริมาณต้นสับปะรดต่อน้ำต่อการสกัดเอนไซม์โบรมีเลนโดยใช้สัดส่วน 100:100 g/g, 150:100 g/g และ 200:100 g/g และเวลาในการปั่นผสม 1, 3 และ 5 นาที และเตรียมเอนไซม์หยาบเช่นเดียวกับการทดลอง 2.1.1.4

2.1.9.2 วิเคราะห์ค่า pH วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ด้วยวิธี casein digestion unit

2.1.9.3 คัดเลือกสัดส่วนและเวลาที่เหมาะสมสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

2.1.10 การเตรียมและวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์ผง

2.1.10.1 ใช้สารสกัดเอนไซม์หยาบที่ใช้สัดส่วนต้นสับปรด 200:100 g/g เพื่อตกตะกอนเอนไซม์โบรมีเลน 3 วิธี ได้แก่ (1) ตัวอย่างที่ตกตะกอนในท่อแบบต่อเนื่อง 7 นาที (2) ตัวอย่างที่ตกตะกอนแบบ batch เป็นเวลา 9 นาที ที่ 0 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นสภาวะที่ดีที่สุดจากการศึกษาในหลอดทดลอง และ (3) ตัวอย่างที่ตกตะกอนแบบ batch เป็นเวลา 15 นาที ที่ 0 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นสภาวะจากงานวิจัยของ Soares และคณะ (2012) จากนั้นนำมาทำแห้งด้วยวิธีทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze drying) โดยแช่แข็งตัวอย่างที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Labconco, USA)

2.1.10.2 คำนวณหาผลผลิต (yield) ของเอนไซม์ที่ได้จากการตกตะกอนทั้ง 3 แบบ จากสมการ

$$\text{Yield (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักเอนไซม์แห้ง}}{\text{ปริมาตรสารสกัดเอนไซม์หยาบ}} \times 100$$

2.1.10.2 ศึกษาสมบัติต่าง ๆ ได้แก่ ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford, กิจกรรมเอนไซม์, SDS-PAGE electrophoresis, ปริมาณโปรตีนด้วย HPLC, เทียบกับเอนไซม์ทางการค้า และเอนไซม์มาตรฐาน (Stem bromelain, Sigma-Aldrich, USA)

2.2 วิธีการวิเคราะห์ทางเคมี

2.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (moisture content)

อบถ้วยหาความชื้น (moisture can) อะลูมิเนียมในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง นำมาใส่โถดูดความชื้น เมื่อเย็นนำไปชั่งน้ำหนัก (ทำซ้ำอีกครั้ง จนน้ำหนักถ้วยคงที่ บันทึกน้ำหนัก) ชั่งตัวอย่างที่เตรียมไว้ ปริมาณ 2 กรัม ใส่ลงในถ้วยหาความชื้น บันทึกน้ำหนักตัวอย่าง จากนั้น นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน (ประมาณ 24 ชั่วโมง) นำออกจากตู้อบ ใส่ในโถดูดความชื้น เมื่อเย็นนำไปชั่งน้ำหนัก อบซ้ำอีกครั้ง ประมาณ 1 ชั่วโมง จนน้ำหนักคงที่ บันทึกน้ำหนักหลังอบ นำมาคำนวณปริมาณความชื้น

$$\text{ปริมาณความชื้น (\%)} = ((\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ}) / \text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ}) \times 100$$

2.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (ash content)

อบถ้วยกระเบื้องเคลือบในตู้อบอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง นำมาใส่โถดูดความชื้น เมื่อเย็นนำไปชั่งน้ำหนัก (ทำซ้ำอีกครั้ง จนน้ำหนักถ้วยคงที่ บันทึกน้ำหนักถ้วยกระเบื้อง) ชั่งตัวอย่างที่เตรียมไว้ ปริมาณ 2 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้องเคลือบ บันทึกน้ำหนักตัวอย่าง นำตัวอย่างไปเผาจนหมดควัน แล้วจึงนำเข้าเตาเผาที่ 600 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง แล้วร่อนอุณหภูมิภายในเตาเผาตลอดก่อน (ประมาณ 17-

18 ชั่วโมง) นำออกจากเตาเผาใส่ในโถดูดความชื้น สังเกตเถาที่ได้มีสีขาว หรือสีเทาอ่อน เมื่อเย็นนำไปชั่ง น้ำหนักบันทึกน้ำหนักหลังเผา นำมาคำนวณปริมาณเถา

$$\text{ปริมาณเถา (\%)} = (\text{น้ำหนักที่เหลือหลังเผา} / \text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนเผา}) \times 100$$

2.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (crude protein content)

วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Kjeldahl ซึ่งตัวอย่างที่เตรียมไว้ บันทึกน้ำหนักตัวอย่าง ใส่ลงในหลอดย่อยโปรตีน สำหรับ blank ใช้ น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง ใส่สาร Sodium sulphate (Na_2SO_4) 2 กรัม และ Copper (II) sulphate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0.1 กรัม โดยทำในตู้ดูดควัน โดยค่อย ๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นลงไป ในหลอดย่อย 25 mL ใส่ glass beads หลอดละ 2 เม็ด ตั้งหลอดย่อยในเครื่องย่อย ปิดปากหลอดย่อยส่วนบน ด้วย exhaust manifold ที่ต่อกับเครื่องจับไอกรด เปิดสวิต เตาย่อยและเครื่องดักไอกรด ทำการ Preheat โดยตั้งอุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นปรับอุณหภูมิ 380 องศาเซลเซียส ให้เครื่องทำการย่อยตัวอย่าง รอย่อยจนได้สารละลายใส ปล่อยให้เย็นก่อนที่จะนำไปกลั่น

ในการกลั่น นำขวดรูปชมพู่ ขนาด 500 ml ซึ่งมีกรดบอริก (เข้มข้น 4%) ปริมาณ 30 ml หยดอินดิเคเตอร์ (methyl red) 2 หยด นำไปรองรับของเหลวที่กลั่นได้ โดยให้ปลายสายจุ่มในกรดบอริก นำหลอดย่อยที่เย็นแล้ว เติมน้ำกลั่นปริมาณ 100 ml และนำหลอดย่อยเข้าเครื่องกลั่น (เครื่องจะเติม NaOH ลงไปเพื่อทำปฏิกิริยา สังเกต ของเหลวในหลอดเปลี่ยนจะเป็นสีดำ) นำสารละลายที่ได้จากการกลั่นมาไตเตรท กับสาร 0.1 M HCl จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อน บันทึกปริมาตรของ HCl ที่ใช้ไป นำไปคำนวณหาปริมาณโปรตีน โดยใช้ค่า conversion factor = 6.25

$$\text{ปริมาณโปรตีน (\%)} = ((\text{ปริมาณกรดที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง (mL)} - \text{ปริมาณกรดที่ใช้ไตเตรท blank (mL)}) \times \text{ความเข้มข้นของกรด (N)} \times 1.4007 \times 6.25) / \text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}$$

2.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (crude fat content)

วิเคราะห์หาปริมาณไขมันด้วย Soxhlet extractor โดยนำถั่วไขมัน อบในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ใส่ในโถดูดความชื้น รอจนถั่วเย็น แล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอน บันทึกน้ำหนักถั่วไขมัน ซึ่งตัวอย่างที่เตรียมไว้ ปริมาณ 2 กรัม ในกระดาดกรอง (เบอร์ 1) ห่อให้มิดชิด บันทึกน้ำหนักตัวอย่าง ใส่ลงใน thimble สำหรับใส่ตัวอย่าง นำ thimble ตัวอย่าง ใส่เข้าในเครื่อง เติมตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ ปริมาตร 60 ml ลงในถั่วไขมัน นำเข้าเครื่องสกัดไขมัน โดยวางถั่วบน heating plate เปิดเครื่องสกัด และใช้สภาวะในการสกัด คือ boil 1.30 ชั่วโมง rinsing 3.00 ชั่วโมง recovery 20 นาที เมื่อครบกระบวนการสกัด นำถั่วไขมัน ไประเหยสารละลายออกในตู้ดูดควันเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปอบต่อในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำเข้าโถดูดความชื้น เมื่อเย็นลง นำไปชั่งน้ำหนัก บันทึกน้ำหนักหลังอบ นำมาคำนวณปริมาณไขมัน

ปริมาณไขมัน (%) = น้ำหนักไขมันของตัวอย่างหลังอบ/น้ำหนักตัวอย่าง × 100

2.2.5 การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate content)

ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (%) คำนวณโดยผลต่าง (by difference) จาก 100 – (ปริมาณความชื้น + ไขมัน + โปรตีน + เถ้า)

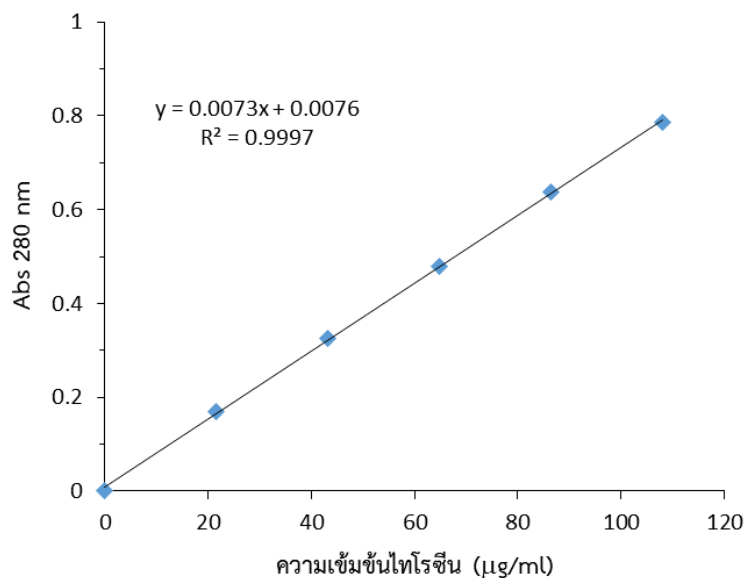
2.2.6 การวิเคราะห์ค่า pH

วัดค่า pH ของสารสกัดเอนไซม์ด้วยเครื่อง pH meter (SevenCompact S220, Metter Toledo, USA)

2.2.7 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โบรมีเลน

วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โบรมีเลนโดยใช้เคซีน (casein) เป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาการไฮโดรไลซิสตามวิธีที่อธิบายโดยงานวิจัยอื่นที่ผ่านมา (Chaurasiya และ Umesh Hebbar, 2013; Nadzirah และคณะ, 2012; Sharma และ Sharma, 2018) โดยรายงานค่าเป็น casein digestion unit (CDU)

นำตัวอย่างเอนไซม์ที่สกัดได้ 1 mL เติมลงใน 0.05 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 8.0 ที่เติม 0.03 cysteine และ 0.006 M EDTA) ปรับปริมาตรให้เป็น 10 mL เพื่อทำการเจือจางเอนไซม์ กรณีตัวอย่างที่ตกตะกอนด้วยเอทานอล (60%) นำสารตัวอย่างที่ได้ นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทเอทานอลทิ้งทันที นำตะกอนที่ได้ละลายใน ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 8) ปรับให้ได้ปริมาตร 10 mL ปิเปตสารละลายเอนไซม์เจือจาง ใส่ในหลอดทดลอง 0.1 mL มาทำปฏิกิริยากับเคซีนเข้มข้น 2% ใน 0.05 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 ปริมาตร 1 mL นำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงเติมสารละลาย 3% กรดไตรคลอโรแอซิดิก (TCA) ปริมาตร 3 mL เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มต่อใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 rpm เป็นเวลา 1 นาที นำส่วนใสที่ได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm โดยนำค่าที่ได้ไปหาปริมาณกรดอะมิโนโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน L-tyrosine เตรียมกราฟมาตรฐานของกรดอะมิโนไทโรซีน โดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน L-tyrosine ความเข้มข้น 20-100 µg/mL (ภาพที่ 12) และคำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์โบรมีเลน (bromelain enzyme activity) โดย 1 unit ของเอนไซม์นิยามเป็น 1 µg ของ L-tyrosine ที่เกิดขึ้นในเวลา 1 นาที ต่อมิลลิลิตรตัวอย่าง เมื่อทำการไฮโดรไลซิสเคซีนที่สภาวะมาตรฐาน 37 องศาเซลเซียส และค่า pH 7 เป็นเวลา 10 นาที

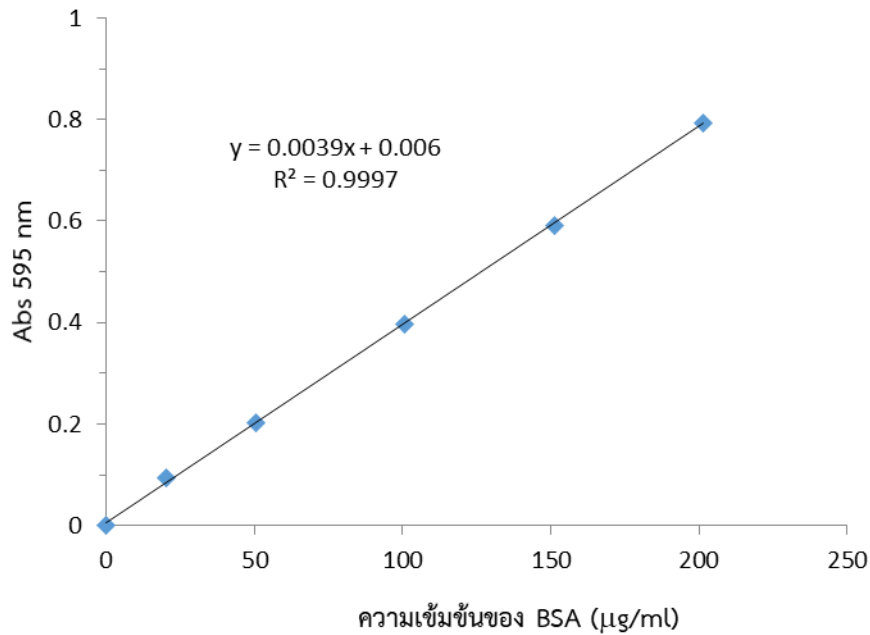


ภาพที่ 12 กราฟมาตรฐานไทโรซีนสำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โบรมีเลน

2.2.8 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดด้วยวิธี Bradford method ตามวิธีการของ Bradford (1976) นำตัวอย่างเอนไซม์ที่สกัดได้ 1 mL เติมลงใน 0.05 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 8.0) ปรับปริมาตรให้เป็น 10 mL เพื่อทำการเจือจางเอนไซม์ สำหรับตัวอย่างที่ตกตะกอนด้วยเอทานอลนำสารตัวอย่างไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทเอทานอลทิ้งทันที นำตะกอนที่ได้ละลายใน ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 8) ปรับให้ได้ปริมาตร 10 mL ปิเปตสารละลายเอนไซม์ที่เจือจาง ปริมาตร 0.2 mL ในหลอดทดลอง เติมสาร Bradford's reagent ปริมาตร 2 mL ตั้งพักไว้ 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 595 nm โดยนำค่าที่ได้ไปหาปริมาณโปรตีนทั้งหมดโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

เตรียมกราฟมาตรฐานโปรตีน โดยเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้น 20-200 µg/mL (ภาพที่ 13) ปิเปตละลายมาตรฐานเจือจาง 0.2 mL เติมสาร Bradford's reagent 2 mL นำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน ดังตัวอย่างในภาพที่ 13



ภาพที่ 13 ตัวอย่างกราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin (BSA) สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วย Bradford method

2.2.9 การวิเคราะห์โปรตีนด้วย HPLC

วิเคราะห์โปรตีนด้วย HPLC ตามวิธีของ Campos และคณะ (2019) โดยใช้คอลัมน์แบบ C18 (COSMOSIL ARII, 4.6 x 250 mm, GL Science, Japan) โดยใช้ mobile phase เป็น 55% Acetonitrile ที่มี 0.1% TFA อัตราการไหล 1 mL/min และตรวจวัดด้วย PDA detector ที่ 280 nm โดยนำตัวอย่างผงสกัดที่ได้ละลายน้ำปราศจากไอออน กวนผสมให้ละลาย นาน 20 นาที จากนั้นนำไปกรองผ่าน syringe filter ขนาด 0.22 μm ฉีดตัวอย่างที่ผ่านการกรองแล้วเข้าเครื่อง HPLC ปริมาตร 20 μL และวิเคราะห์เทียบกับสารมาตรฐานโบรมีเลน

2.2.10 การวิเคราะห์ SDS-PAGE electrophoresis

ใช้ SDS-PAGE electrophoresis เพื่อแยกโปรตีนชนิดต่างๆ ที่ได้จากการตกตะกอน ตามวิธีของ Chaurasiya และ Umesh Hebbar (2013) โดยใช้อะคริลาไมด์เจลความเข้มข้น 5% ใน 375 mM Tris-HCl, pH 8.3 เป็นเจลชั้นบน (separating gel) ใช้อะคริลาไมด์เจลความเข้มข้น 12% ใน 125 mM Tris-HCl, pH 6.8 เป็นเจลชั้นล่าง (sticking gel)

เตรียมสารละลายโปรตีนจากสารสกัด โดยละลายสารสกัดในน้ำปราศจากไอออน โดยให้ความเข้มข้น 1000 ppm กวนผสมให้ละลาย นาน 20 นาที จากนั้นนำไปกรองผ่าน filter ขนาด 0.45 μm ปิเปตสารสกัด 20 μL ผสมกับ 5X buffer 5 μL นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที จึงนำไปวิเคราะห์ เปิดกระแสไฟคงที่ 100 โวลต์

ใช้ระยะเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง สีของ bromophenol blue จะเคลื่อนที่ไปจนถึงขอบล่างของแผ่นเจล จากนั้นนำไปย้อมสี 1 ชั่วโมงและล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน 3 ชั่วโมง

นำเจลที่ได้มาวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐานเพื่อเขียนกราฟมาตรฐาน ด้วยการวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐานโดยจากกึ่งกลางของแถบที่ปรากฏให้เห็น นำระยะทางการเคลื่อนที่มาคำนวณหาค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative migration, R_f) ของโปรตีนที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

เตรียมกราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐานแต่ละชนิด โดยนำค่า R_f ของโปรตีนมาตรฐาน และค่า $\log$ มวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน ไปสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อใช้คำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ที่สกัดได้

3. ผลการวิจัยและการอภิปราย

3.1 การเปรียบเทียบแหล่งที่มาและอายุของต้นสับปะรด

ประเทศไทยมีแหล่งเพาะปลูกสับปะรดที่สำคัญกระจายอยู่ในหลายจังหวัด โดยพื้นที่เพาะปลูกที่สำคัญเรียงลำดับตามกำลังการผลิตคือจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ระยอง ราชบุรี ชลบุรี พืชณุโลก อุทัยธานีและเพชรบุรี ตามลำดับ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2564) ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาเปรียบเทียบต้นสับปะรดจาก 2 แหล่งเพาะปลูก (ภาพที่ 14) ประกอบด้วย

1. ไร่สับปะรดในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ของเกษตรกร นายวิวัฒนา ดีเลิศ ที่ตั้งไร่ 28 ม.13 ต.บ่อนอก อ.เมือง จ.ประจวบคีรีขันธ์ ซึ่งส่งขายผลสับปะรดสดภายในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และกรุงเทพฯ
2. ไร่สับปะรดในจังหวัดชลบุรี ของบริษัทอาหารสยามจำกัด (มหาชน) ที่ตั้งไร่ 160/1 ม. 6 ต. คลองแก้ว อ. บ้านบึง จ.ชลบุรี ซึ่งบริษัทฯ ปลูกสับปะรด เพื่อนำผลผลิตไปแปรรูปในโรงงานของบริษัทฯ



(a)



(b)



(c)

ภาพที่ 14 (a) ไร่สับปะรดจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ (b) ไร่สับปะรดจังหวัดชลบุรี (c) การเก็บตัวอย่างสับปะรด

โดยผู้วิจัยเก็บตัวอย่างต้นสับปะรดที่มีอายุการปลูกต่างกัน 3 ช่วงอายุ ซึ่งมีลักษณะภายนอกหลังการตัดส่วนใบและรากด้านนอกออกดังแสดงในภาพที่ 15 และ 16 ทั้งนี้เนื่องจากแหล่งปลูกทั้ง 2 แหล่งมีการดำเนินการในการเพาะปลูกแตกต่างกันทำให้อายุของตัวอย่างแตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 8



อายุ 15 เดือน



อายุ 28 เดือน



อายุ 39 เดือน

ภาพที่ 15 ต้นสับปะรดสดจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์



อายุ 11 เดือน



อายุ 21 เดือน



อายุ 28 เดือน

ภาพที่ 16 ต้นสับปะรดสดจากจังหวัดชลบุรี

ตารางที่ 8 แหล่งที่มาและข้อมูลเบื้องต้นของต้นสับปะรดที่ใช้ศึกษา

แหล่งปลูก	ช่วงอายุที่	อายุ (เดือน)	รายละเอียด
จังหวัดประจวบคีรีขันธ์	1	15	ยังไม่ได้เก็บเกี่ยวผล
	2	28	หลังเก็บเกี่ยวผลครั้งที่ 1 แล้ว
	3	39	หลังเก็บเกี่ยวผลครั้งที่ 2 แล้ว
จังหวัดชลบุรี	1	11	ยังไม่ได้เก็บเกี่ยวผล
	2	21	หลังเก็บเกี่ยวผลครั้งที่ 1 แล้ว

เมื่อนำต้นสับปะรดสดมาปอกผิวหนังด้านนอกออกจนได้เฉพาะเนื้อด้านในสีขาวเหลือง นำมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ และสกัดด้วยน้ำ หลังการการกรองด้วยผ้าขาวบาง ปั่นเหวี่ยงและกรองด้วยกระดาษกรองจะได้สารสกัดเอนไซม์หยาบสีเหลืองอ่อนดังแสดงในภาพที่ 17



(a) ต้นสดก่อนและหลังการปอกผิว



(b) หั่นเป็นชิ้นขนาดเล็ก



(c) สารสกัดเอนไซม์หยาบ

ภาพที่ 17 (a) ลักษณะปรากฏของต้นสับปะรดก่อนและหลังการปอกผิว (b) หลังหั่นเป็นชิ้น และ (c) สารสกัดเอนไซม์หยาบ

องค์ประกอบหลัก (Proximate composition) ของตัวอย่างต้นสับปะรดตัวอย่างหลังจากปอกผิวและหั่นเป็นชิ้นขนาดเล็กแล้วแสดงในตารางที่ 9 โดยพบว่าต้นสับปะรดทั้ง 2 แหล่งเพาะปลูกมีองค์ประกอบหลักไม่แตกต่างกัน โดยมีค่าความชื้นอยู่ในช่วง 60.92 – 68.12% มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบที่พบมากรองลงมาจากน้ำโดยมีอยู่ในช่วง 29 – 36% และมีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 1.21 – 1.25%

ตารางที่ 9 องค์ประกอบหลัก (wet basis) ของต้นสับปะรดแหล่งจังหวัดประจวบคีรีขันธ์และชลบุรีที่มีอายุแตกต่างกัน

แหล่ง	อายุ (เดือน)	เถา (%)	ความชื้น (%)	ไขมัน (%)	โปรตีน (%)	คาร์โบไฮเดรต (%)*
ประจวบคีรีขันธ์	15	1.15 ± 0.18	63.84±0.05	0.13±0.01	1.21±0.05	33.67
	28	1.10 ± 0.25	64.62±0.10	0.24±0.02	1.23±0.03	32.81
	39	1.04 ± 0.13	67.70±0.39	0.17±0.02	1.25±0.04	29.84

ชลบุรี	11	1.17 ± 0.38	60.92±1.28	0.13±0.01	1.23±0.04	36.55
	21	1.12 ± 0.26	62.74±0.49	0.21±0.02	1.24±0.03	34.69
	28	1.07 ± 0.20	68.12±0.76	0.17±0.01	1.25±0.01	29.39

* ปริมาณคาร์โบไฮเดรตคำนวณจาก 100 - (ปริมาณความชื้น + ไขมัน + โปรตีน + เถ้า)

สำหรับสารสกัดเอนไซม์หยาบที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำด้วยอัตราส่วนต้นสับปะรดต่อน้ำ 100:100 g/g มีสมบัติแสดงในตารางที่ 10 โดยค่าปริมาณของแข็งทั้งหมด (total solids content) ในช่วง 1.72 – 1.94 g/100 mL แสดงให้เห็นว่าการสกัดสามารถสกัดองค์ประกอบต่าง ๆ ออกมาได้ค่อนข้างน้อย สารสกัดที่ได้มีค่า pH ในช่วง 5.54-5.62 เมื่อวัดค่าปริมาณโปรตีนและกิจกรรมเอนไซม์ของสารสกัดเอนไซม์หยาบ พบว่าปริมาณโปรตีนของสารสกัดมีค่าในช่วง 0.96-1.40 mg/mL แสดงว่าวิธีการสกัดที่ใช้สามารถสกัดโปรตีนออกมาได้ประมาณ 10% ที่มีอยู่ในวัตถุดิบเท่านั้น โดยพบว่าตัวอย่างจากต้นสับปะรดอายุช่วงที่ 2 ของทั้ง 2 แหล่งให้ค่าปริมาณโปรตีนสูงกว่าช่วงอายุที่ 1 แต่เมื่ออายุของต้นสับปะรดเพิ่มขึ้นเป็นช่วงที่ 3 จะมีแนวโน้มการลดลงของปริมาณโปรตีน โดยตัวอย่างต้นสับปะรดจากจังหวัดชลบุรีให้ปริมาณโปรตีนสูงกว่าตัวอย่างจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และที่ช่วงอายุที่ 2 (21 เดือน) ให้ค่าโปรตีนสูงสุด สำหรับค่ากิจกรรมเอนไซม์โบรมิเลนนั้นให้ผลในลักษณะเดียวกันกับปริมาณโปรตีน โดยพบว่าตัวอย่างจากต้นอายุ 21 เดือนจากจังหวัดชลบุรีให้ค่าสูงที่สุดเช่นกัน คือ 3,296 CDU/mL เมื่อคำนวณค่า specific activity ของเอนไซม์พบว่ามีแนวโน้มเช่นเดียวกันกับปริมาณโปรตีนและค่ากิจกรรมเอนไซม์โดยมีค่าในช่วง 1,976-2,359 CDU/mg protein ทำให้สารสกัดจากต้นอายุ 21 เดือนจากจังหวัดชลบุรีมีค่า specific activity สูงสุด คือ 2,359.58 CDU/mg protein

จากผลการทดลองในส่วนนี้จึงเลือกต้นสับปะรดจากแหล่งจังหวัดชลบุรีที่มีอายุช่วงที่ 2 คือ 21 เดือนเป็นวัตถุดิบสำหรับการสกัดเอนไซม์โบรมิเลนในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 10 สมบัติของสารสกัดเอนไซม์หยาบจากต้นสับปะรดแหล่งจังหวัดประจวบคีรีขันธ์และชลบุรีที่มีอายุแตกต่างกัน

แหล่ง	อายุ (เดือน)	Solid content (g/100 mL extract)	pH	Protein (mg/mL extract)	Enzyme activity (CDU/mL extract)	Specific activity (CDU/mg protein)
ประจวบคีรีขันธ์	15	1.83 ± 0.03	5.54±0.02	0.96 ± 0.01	1,900.60 ± 147.64	1,976.63
	28	1.91 ± 0.03	5.56±0.02	1.34 ± 0.03	2,724.35 ± 74.16	2,032.19
	39	1.94 ± 0.02	5.62±0.04	1.31 ± 0.02	2,662.57 ± 21.26	2,034.75
ชลบุรี	11	1.72 ± 0.03	5.54±0.02	1.02 ± 0.08	2,222.89 ± 24.64	2,161.24
	21	1.83 ± 0.09	5.55±0.02	1.40 ± 0.07	3,296.70 ± 42.34	2,359.58
	28	1.87 ± 0.03	5.60±0.00	1.35 ± 0.03	3,116.65 ± 36.23	2,315.19

3.2 ผลของอัตราส่วนปริมาณต้นสับปรดต่อน้ำในการสกัด

ในการศึกษาผลของอัตราส่วนต้นสับปรดต่อน้ำในการสกัดสารสกัดเอนไซม์หยาบโดยใช้ตัวอย่างต้นสับปรดอายุ 21 วันจากจังหวัดชลบุรี มาทำการสกัดด้วยน้ำด้วยอัตราส่วนที่ต่างกัน 3 อัตราส่วน (ต้นสด : น้ำกลั่นเย็น) ได้แก่ 50:100 g/g 100:100 g/g และ 200:100 g/g โดยใช้เวลาในการปั่นผสมเท่ากัน (ตารางที่ 11) พบว่าการลดสัดส่วนของต้นลงเป็น 50:100 g/g จะทำให้สามารถสกัดโปรตีนได้น้อยลงทำให้กิจกรรมเอนไซม์ในสารสกัดเอนไซม์หยาบต่ำลงไปด้วย ในขณะที่การเพิ่มสัดส่วนของต้นเพิ่มขึ้นเป็น 200:100 g/g ทำให้สามารถสกัดโปรตีนได้สูงเพิ่มขึ้นแต่กิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย แสดงให้เห็นว่าอาจจะได้โปรตีนอื่น ๆ มากขึ้นเป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นสัดส่วน 100:100 g/g จึงเป็นสัดส่วนที่เหมาะสมที่สุด

ตารางที่ 11 สมบัติของสารสกัดเอนไซม์หยาบที่ได้เมื่อใช้อัตราส่วนต้นสับปรดต่อน้ำระดับต่างๆ

อัตราส่วน ต้นสด : น้ำ	pH	Protein (mg/mL extract)	Enzyme activity (CDU/mL extract)	Specific activity (CDU/mg protein)
50 : 100	5.54 ±0.01	0.86 ± 0.01	1,203.51 ± 82.48	1,405.01
100 : 100	5.58 ±0.03	1.02 ± 0.01	2,395.66 ± 33.38	2,337.51
200 : 100	5.58 ±0.02	1.74 ± 0.03	2,572.89 ± 42.00	1,481.32

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าต้นสับปรดเป็นวัตถุดิบที่เหมาะสมสำหรับการสกัดเอนไซม์โบรมีเลนเนื่องจากเมื่อเปรียบเทียบกับแกนและเปลือกสับปรดสามารถสกัดเอนไซม์ได้สูงกว่ามาก Soares และคณะ (2012) สกัดเอนไซม์โบรมีเลนหยาบจากส่วนเปลือกและแกนด้วยด้วยโดยใช้สัดส่วนเดียวกับการวิจัยนี้พบว่ามีปริมาณโปรตีนเพียง 0.23 mg/mL

3.3 ผลของความเข้มข้นเอทานอลต่อการตกตะกอนโบรมีเลนในหลอดทดลอง

เอทานอลเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่สามารถใช้ในการตกตะกอนโปรตีนโบรมีเลนได้ แม้ว่าที่ผ่านมามีงานวิจัยพบว่าประสิทธิภาพการตกตะกอนของเอทานอลจะต่ำกว่าการใช้อะซิโตน (ทง ภัครัชพันธุ์ และ อรวินท์ วงศ์มีเกียรติ, 2530) แต่เนื่องจากเอทานอลมีราคาถูก ผลิตในประเทศไทยได้ จึงมีความน่าสนใจในการปรับปรุงกระบวนการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยเอทานอล ในการศึกษาความเข้มข้นของเอทานอลในการตกตะกอนเอนไซม์โบรมีเลนนั้นใช้สารสกัดเอนไซม์หยาบจากต้นสับปรดอายุ 21 เดือน จากแหล่งปลูก จ. ชลบุรี นำมาตกตะกอนเอนไซม์ด้วยสารละลายเอทานอลที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน 9 ระดับ ได้แก่ 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90% v/v โดยศึกษาการตกตะกอนโบรมีเลนที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้เอทานอลความเข้มข้นต่ำในช่วง 10-30% นั้นไม่สามารถทำให้เกิดการตกตะกอนของเอนไซม์ได้ การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและค่ากิจกรรมเอนไซม์ของตะกอนที่ได้จากการตกตะกอนที่เอทา

นอลความเข้มข้นตั้งแต่ 40% ขึ้นไป (ตารางที่ 12) พบว่าปริมาณโปรตีนและค่ากิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของเอทานอลและมีค่าสูงสุดที่ความเข้มข้นเอทานอล 60% แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเอทานอลขึ้นไปอีกจะทำให้ปริมาณโปรตีนและกิจกรรมเอนไซม์ที่ได้ลดลงเล็กน้อย ค่า bromelain activity recovery แสดงให้เห็นว่าที่เอทานอล 40% สามารถตกตะกอนเอนไซม์ได้เพียง 57% และสามารถตกตะกอนเอนไซม์ได้สูงสุดที่เอทานอล 60% คือ 87.20% ดังนั้นความเข้มข้นของเอทานอลที่เหมาะสมในการตกตะกอนเอนไซม์โบรมีเลนคือที่ 60% Soares และคณะ (2012) ซึ่งศึกษาการตกตะกอนโบรมีเลนจากส่วนแกนและเปลือกผลสับปะรดรายงานผลเช่นเดียวกันว่าเอทานอลความเข้มข้นมากกว่า 30% ขึ้นไปจึงสามารถทำให้เกิดการตกตะกอนโบรมีเลนได้ และมีค่าสูงขึ้นมาเมื่อเพิ่มความเข้มข้นไปจนถึง 50% แต่พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นเอทานอลไปจนถึง 90% ยังคงทำให้สามารถตกตะกอนเอนไซม์ได้เพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อย อย่างไรก็ตามปริมาณโปรตีนเริ่มต้นในสารสกัดหยาบที่ใช้ในงานวิจัยของ Soares และคณะ (2012) มีค่าต่ำกว่า (0.23 mg/mL) งานวิจัยนี้ค่อนข้างมาก

ตารางที่ 12 ปริมาณโปรตีน กิจกรรมเอนไซม์และ Bromelain activity recovery ของตกตะกอนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเอทานอลความเข้มข้นต่างกัน

ความเข้มข้นของ เอทานอล (% v/v)	Protein (mg/mL extract)	Enzyme activity (CDU/mL extract)	Bromelain activity recovery (%)
40	0.57 ± 0.01	1,791.61 ± 9.97	57.70
50	0.85 ± 0.01	2,244.32 ± 14.79	72.28
60	1.33 ± 0.00	2,707.71 ± 25.89	87.20
70	1.25 ± 0.01	2,658.59 ± 6.41	85.63
80	1.13 ± 0.00	2,342.55 ± 31.60	75.45
90	1.11 ± 0.01	2,255.00 ± 11.10	72.63

* หมายเหตุ ไม่พบตะกอนที่ระดับความเข้มข้นเอทานอล 10-30% v/v

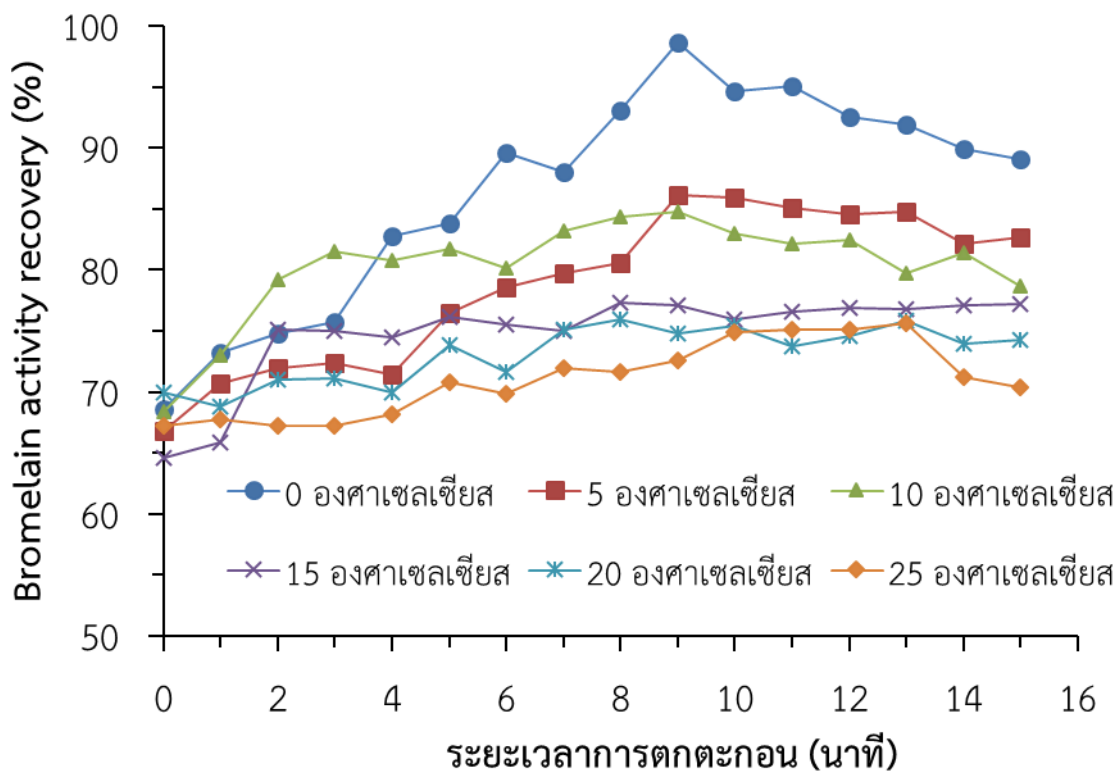
3.4 จลนพลศาสตร์การตกตะกอนโบรมีเลนในหลอดทดลอง

อุณหภูมิและเวลาเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการตกตะกอนของเอนไซม์ในตัวทำละลายอินทรีย์ เพื่อหาเวลาที่เหมาะสมในการตกตะกอนเอนไซม์โบรมีเลนจึงได้ศึกษาจลนพลศาสตร์ (kinetic) ของการตกตะกอนเอนไซม์ในหลอดทดลอง โดยใช้เอทานอลที่ความเข้มข้น 60% v/v อุณหภูมิที่ศึกษา คือ 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 องศาเซลเซียส และศึกษาการตกตะกอนทุก 1 นาที เป็นเวลา 15 นาที หลังการตกตะกอนและแยกส่วนของเหลวออกพบตะกอนเอนไซม์ที่ได้มีลักษณะสีขาวขุ่น ดังแสดงในภาพที่ 18 โดยสังเกตได้ว่ามีปริมาณตะกอนมากขึ้นเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น เมื่อวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ของตะกอนและคำนวณค่า bromelain activity recovery (ภาพที่ 19) พบว่าที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ให้ค่า bromelain activity recovery สูงกว่าอุณหภูมิอื่น ๆ โดย

ค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการตกตะกอน จากนั้นที่ 0 มีค่า เท่ากับ 68.58% จนถึงนาที่ที่ 9 มีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 98.62% แต่หลังจากนั้นค่า bromelain activity recovery จะค่อย ๆ ลดลงจนถึงนาที่ที่ 15 มีค่าเท่ากับ 89.04% ในขณะที่เมื่อใช้อุณหภูมิในการตกตะกอนสูงขึ้นมีแนวโน้มทำให้ค่า bromelain activity recovery มีค่าต่ำลงโดยที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสจะให้ค่า bromelain activity recovery ต่ำที่สุด โดยอยู่ในช่วง 67 – 75% เท่านั้น ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการตกตะกอนเอนไซม์โบรมีเลนคือที่ 0 องศาเซลเซียส เวลา 9 นาที การปล่อยให้เอนไซม์สัมผัสกับเอทานอลเป็นเวลานานเกินระยะเวลาที่เหมาะสมจะส่งผลให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์มีค่าต่ำลง ทั้งนี้เนื่องจากตัวทำละลายอินทรีย์สามารถให้เกิดการสูญเสียสภาพของเอนไซม์ได้ และการใช้อุณหภูมิต่ำในการตกตะกอนมีความสำคัญต่อความคงตัวของกิจกรรมเอนไซม์เป็นอย่างมาก โดยที่อุณหภูมิต่ำทำให้โครงสร้างเอนไซม์มีความยืดหยุ่นน้อยลงและลดการเคลื่อนที่ของเอทานอลเข้าไปสัมผัสกับโครงสร้างของเอนไซม์ได้ (Soares และคณะ, 2012) ทนง ภัครษ์พันธุ์ และ อรวินท์ วงศ์มีเกียรติ (2530) รายงานการลดลงของกิจกรรมเอนไซม์ของโบรมีเลนที่ตกตะกอนด้วยอะซิโตนในช่วง 5 ถึง 30 องศาเซลเซียส เช่นกัน



ภาพที่ 18 ตะกอนเอนไซม์ที่ทำการตกตะกอนด้วยเอทานอล (60% v/v) ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียสที่
ระยะเวลา 0 – 15 นาที



ภาพที่ 19 ค่า bromelain activity recovery (%) ของตะกอนเอนไซม์ที่ตกตะกอนได้ที่อุณหภูมิ 0 -25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0 – 15 นาที

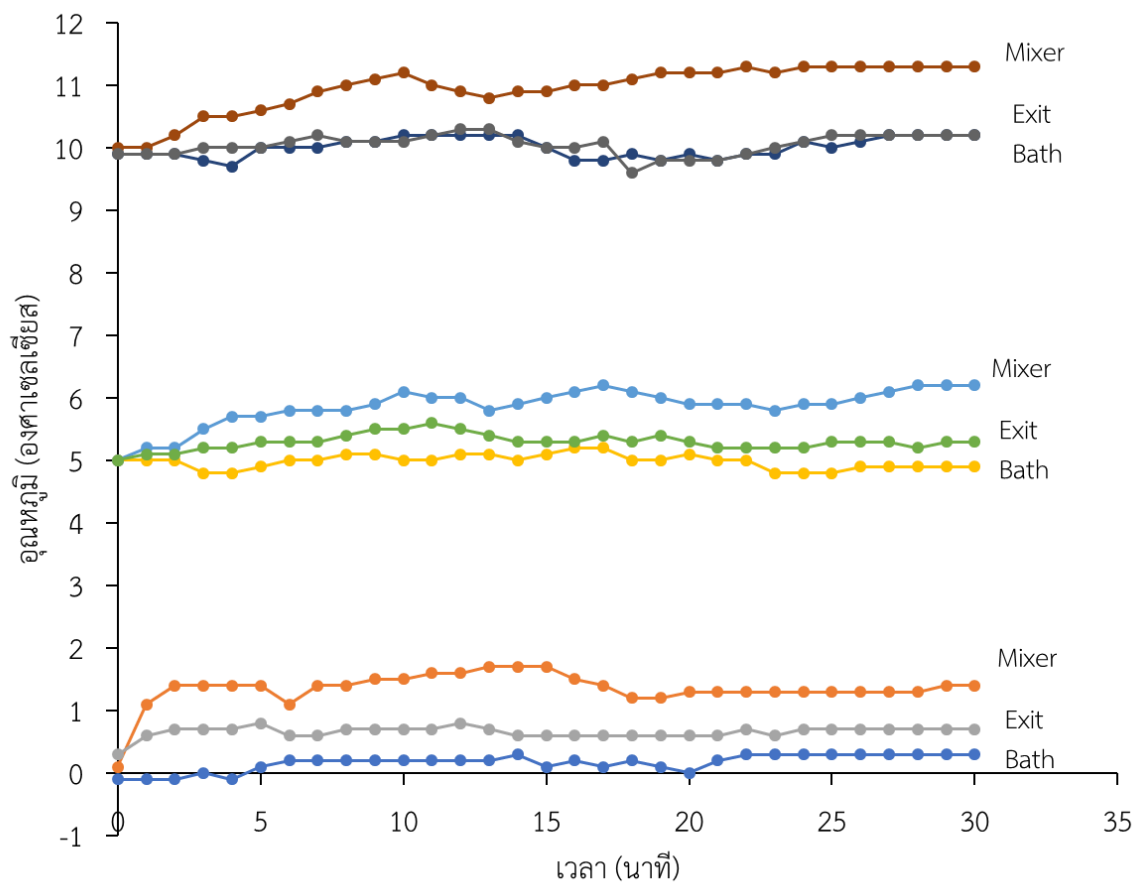
3.5 การติดตั้งอุปกรณ์สำหรับการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยเอทานอลแบบต่อเนื่องในท่อ

งานวิจัยนี้มีเป้าหมายหลักในการพัฒนาระบบการตกตะกอนเอนไซม์โบรมีเลนแบบต่อเนื่องในท่อ จึงได้ออกแบบระบบตกตะกอนในห้องปฏิบัติการซึ่งประกอบด้วยอุปกรณ์ต่าง ๆ ดังแสดงในวิธีการทดลองหัวข้อ 2.1.5

ในการทดสอบระบบควบคุมอุณหภูมิ พบว่าระบบควบคุมอุณหภูมิที่ติดตั้งซึ่งอาศัยชุดต่อความเย็นที่จุ่มอยู่ในสารละลายกลีเซอรอล 20% สามารถลดอุณหภูมิเริ่มต้นของสารละลายในอ่างควบคุมอุณหภูมิจาก 30 องศาเซลเซียส ลงมาถึง 10, 5 และ 0 องศาเซลเซียส ได้ภายในเวลา 50, 80, และ 120 นาที ตามลำดับ

สำหรับการติดตามการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในระบบตกตะกอนเมื่อมีการผสมน้ำกับเอทานอลโดยวัดอุณหภูมิ 3 จุดได้แก่ อุณหภูมิในอ่างควบคุม (Bath) อุณหภูมิที่ mixer (Mixer) และอุณหภูมิที่ปลายท่อออก (Exit) เมื่อควบคุมอุณหภูมิในอ่างควบคุมเป็น 0, 5 และ 10 องศาเซลเซียส แสดงในภาพที่ 20 พบว่าเมื่อมีการผสมของเอทานอล (2.1 mL/min) กับน้ำกลั่น (1.4 mL/min) ที่บริเวณ mixer ทำให้อุณหภูมิของสารละลายสูงขึ้นจากที่ตั้งไว้เริ่มต้นประมาณ 1.0-1.5 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นเนื่องจากกระบวนการผสมของเอทานอลกับน้ำเป็นกระบวนการที่มีการคายความร้อน (exothermic process) แต่เนื่องจากสารละลายกลีเซอรอล 20% ในอ่างถูกควบคุมอุณหภูมิด้วยระบบทำความเย็นจึงทำให้เกิดการถ่ายเทความร้อนจากภายในท่อตกตะกอนสู่อ่าง

สารละลาย ส่งผลให้อุณหภูมิภายในท่อหลังจากผสมที่ mixer ลดลงมาได้และอุณหภูมิที่ปลายท่อมีค่าใกล้เคียงกับอุณหภูมิในอ่างควบคุมตลอดเวลา 30 นาที



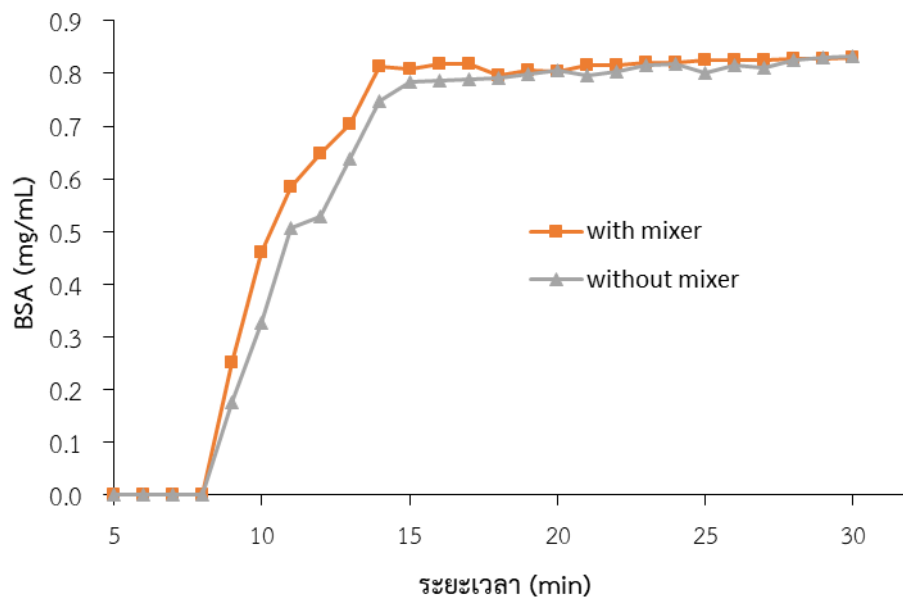
ภาพที่ 20 อุณหภูมิในอ่างควบคุม (Bath) อุณหภูมิที่ mixer (Mixer) และอุณหภูมิที่ปลายท่อออก (Exit) เมื่อควบคุมอุณหภูมิในอ่างควบคุมเป็น 0, 5 และ 10 องศาเซลเซียส

3.6 การศึกษาเวลาที่สารอยู่ในระบบการตกตะกอน

เนื่องจากพฤติกรรมการไหลในท่อทำให้ในระบบการตกตะกอนแบบท่อนั้นสารจะมีเวลาในการอยู่ในท่อที่ไม่ได้เป็นค่าเดียวกันเหมือนในระบบที่ใช้การกวนผสมในหลอดทดลอง จึงได้ดำเนินการเพื่อหาระยะเวลาของสารที่อยู่ในท่อโดยเฉลี่ยในระบบที่เปิดการทำงานของ mixer (with mixer) และระบบที่ไม่เปิดการทำงานของ mixer (without mixer) ซึ่งในการทดลองส่วนนี้ใช้สารละลาย BSA เป็นสารตัวแทนเนื่องจากไม่เกิดการตกตะกอนและสามารถวิเคราะห์ปริมาณได้ทันทีจึงทำให้ได้ค่าที่แม่นยำมากกว่าการใช้เอนไซม์

จากการทดสอบวัดปริมาณ BSA ในของผสมที่ออกจากท่อที่มีขนาดความยาว 1 เมตร เมื่อใช้อัตราการไหลของสารละลาย BSA 1.4 mL/min และสารละลายบัฟเฟอร์ 2.1 mL/min ซึ่งคิดเป็นสัดส่วน 4:6 v/v และค่าเวลาการไหลเฉลี่ยเป็น 9 นาที พบว่าเริ่มตรวจพบ BSA ที่เวลา 9 นาที (ภาพที่ 21) ซึ่งเป็นไปตามการคำนวณ

แต่ความเข้มข้นของ BSA ที่วัดได้มีเพียง 0.2 mg/mL เท่านั้น นั่นคือมีโมเลกุลของ BSA เพียงบางส่วนที่เคลื่อนที่อยู่ในท่อเป็นไปตามเวลาที่คำนวณได้ แต่โมเลกุลอื่นเกิดการกระจายไปในทิศทางอื่นและอยู่ในท่อนานกว่านั้น จากนั้นจะพบว่าความเข้มข้นของ BSA ที่วัดได้มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและเริ่มเข้าสู่สภาวะคงที่ที่ความเข้มข้นประมาณ 0.8 mg/mL ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ควรจะเป็นเมื่อมีการผสมเข้ากันอย่างสมบูรณ์ของสารละลาย BSA (2.0 mg/mL) กับสารละลายบัฟเฟอร์ที่สัดส่วน 4:6 v/v ($4/10 \times 2.0 \text{ mg/mL} = 0.8 \text{ mg/mL}$)



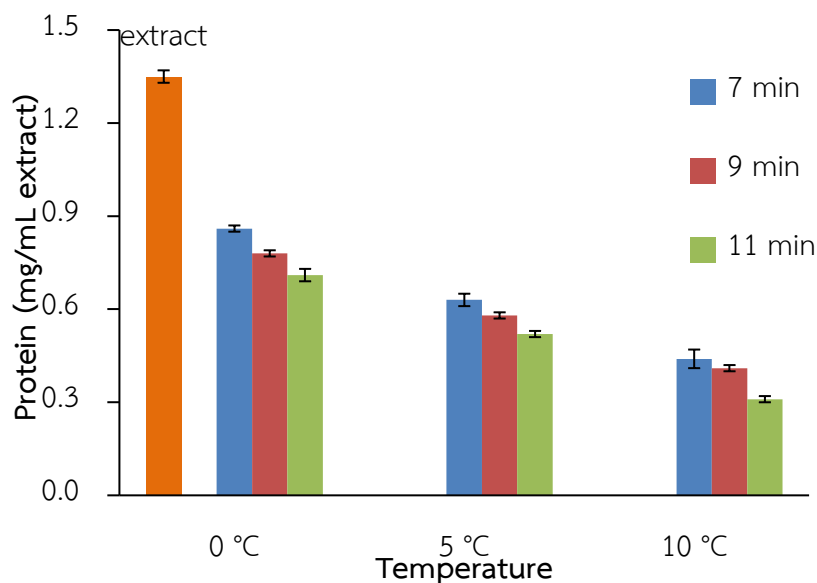
ภาพที่ 21 ความเข้มข้นของ BSA ที่ออกจากท่อความยาว 1 เมตรที่อัตราการไหลของ BSA:บัฟเฟอร์เป็น 4:6 (v/v) โดยความเข้มข้นเริ่มต้นของ BSA เป็น 2.0 mg/mL เมื่อเปิด (with mixer) และไม่เปิดการทำงานของ mixer (without mixer)

จากข้อมูลความเข้มข้นที่เวลาต่าง ๆ ที่วัดได้ เมื่อคำนวณเวลาของสารที่อยู่ในท่อโดยเฉลี่ย (mean residence time) ตามวิธีที่อธิบายใน Fogler (2006) และ Kashid และคณะ (2015) ดังแสดงรายละเอียดในภาคผนวก A1 พบว่าระยะเวลาที่สารอยู่ในท่อโดยเฉลี่ยมีค่ามากกว่าเวลาที่คำนวณไว้จากอัตราการไหลเพียงอย่างเดียว (9 นาที) โดยในระบบที่มี mixer มีเวลาที่สารอยู่ในท่อโดยเฉลี่ยเป็น 11.07 นาที ส่วนระบบที่ไม่มี mixer มีเวลาสารอยู่ในท่อโดยเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเป็น 11.99 นาที นั่นคือระบบที่มี mixer ทำให้ระยะเวลาการคงอยู่ของสารในท่อใกล้เคียงกับระบบที่เป็นการผสมในหลอดทดลองมากกว่า การใช้ mixer ในระบบจึงมีประโยชน์สำหรับการศึกษาในขั้นต่อไป โดยเวลาที่สารอยู่ในท่อโดยเฉลี่ยมีค่ามากกว่าเวลาที่ได้จากการคำนวณประมาณ 2 นาที ดังนั้นการตกตะกอนในระบบท่อแบบต่อเนื่องจำเป็นต้องพิจารณาความแตกต่างของเวลาดังกล่าวด้วย

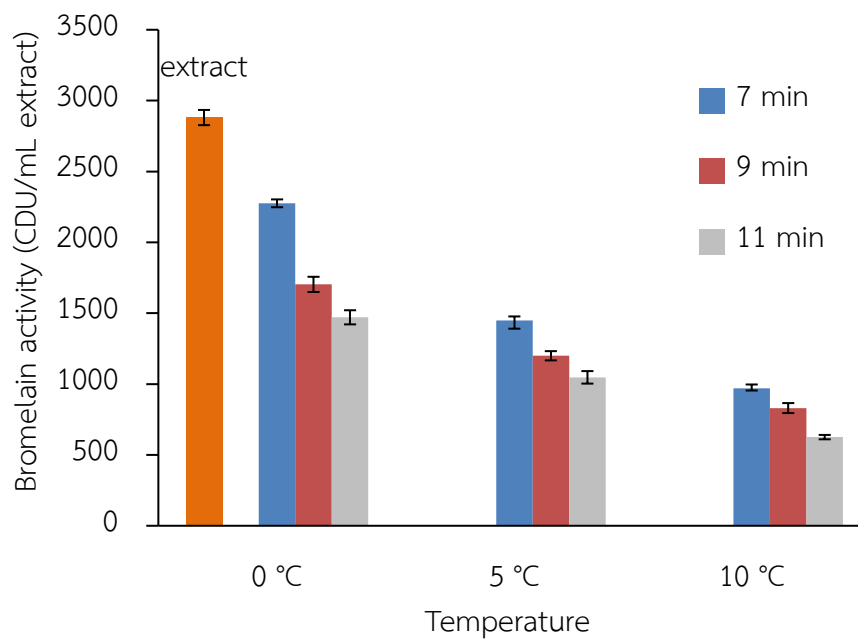
3.7 การศึกษาปัจจัยในการตกตะกอนโบริมีเลนในระบบท่อ

เนื่องจากผลการทดลองในหลอดทดลองแสดงให้เห็นว่าสภาวะที่เหมาะสมในการตกตะกอนเอนไซม์โบรมีเลนคือเอทานอลความเข้มข้น 60% อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส และเวลา 9 นาที จึงได้ศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการตกตะกอนเอนไซม์แบบต่อเนื่องในระบบท่อที่มี mixer โดยใช้ท่อความยาว 1 เมตร ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน 3 ระดับ ได้แก่ 0, 5 และ 10 องศาเซลเซียส และปรับอัตราการไหลของสารสกัดเอนไซม์และเอทานอล 95% เพื่อให้ได้เวลาในการตกตะกอน 7, 9 และ 11 นาที ซึ่งครอบคลุมเวลา 9 นาทีที่ได้จากการทดลองในหลอดทดลอง และเวลา 7 นาที (ซึ่งจะให้เวลาของสารที่อยู่ในท่อโดยเฉลี่ยนานกว่า 7 นาที)

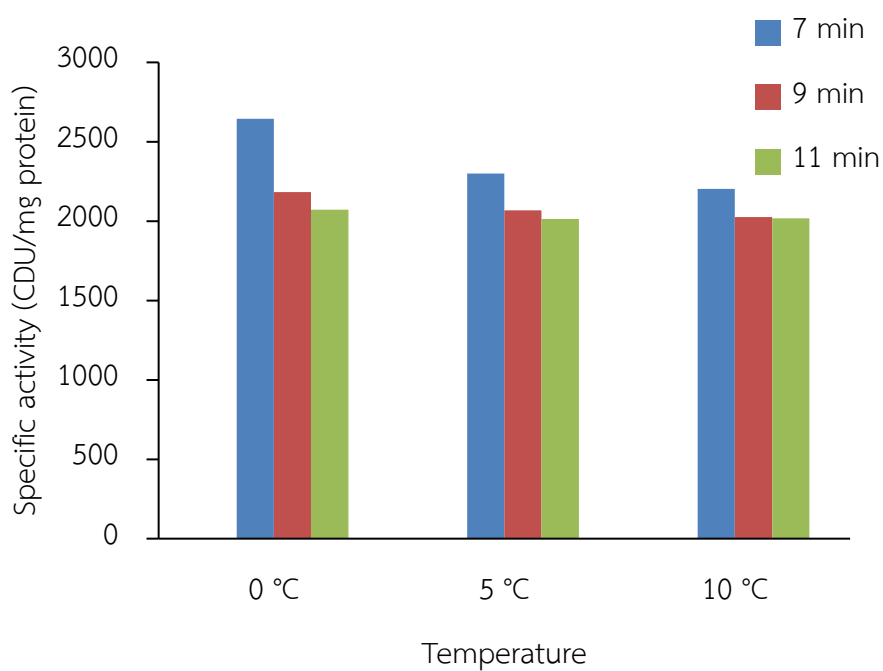
จากทำการวัดค่าปริมาณโปรตีนและกิจกรรมของเอนไซม์ พบว่าที่เวลา 7 นาที ให้ค่าปริมาณโปรตีน กิจกรรมเอนไซม์ และค่า specific activity สูงสุด ที่ทั้ง 3 อุณหภูมิ (ภาพที่ 22 -25) โดยที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ให้ค่า bromelain activity recovery สูงสุดเช่นเดียวกับการทดลองในหลอดทดลอง และพบว่าที่ 7 นาที มีค่า bromelain activity recovery เท่ากับ 72.01% นาทีที่ 9 มีค่า เท่ากับ 58.83% และนาทีที่ 11 มีค่า เท่ากับ 50.7 % (ภาพที่ 17) ซึ่งการลดลงของ bromelain activity recovery ที่เวลานานขึ้นอาจเกิดเนื่องจากเวลาจริงที่เอนไซม์อยู่ในท่อนานกว่าเวลาที่คำนวณตามที่แสดงผลข้างต้น ซึ่งเวลาที่นานขึ้นส่งผลให้ bromelain activity recovery มีแนวโน้มที่ลดลงดังที่พบในการตกตะกอนในหลอดทดลองเช่นกัน



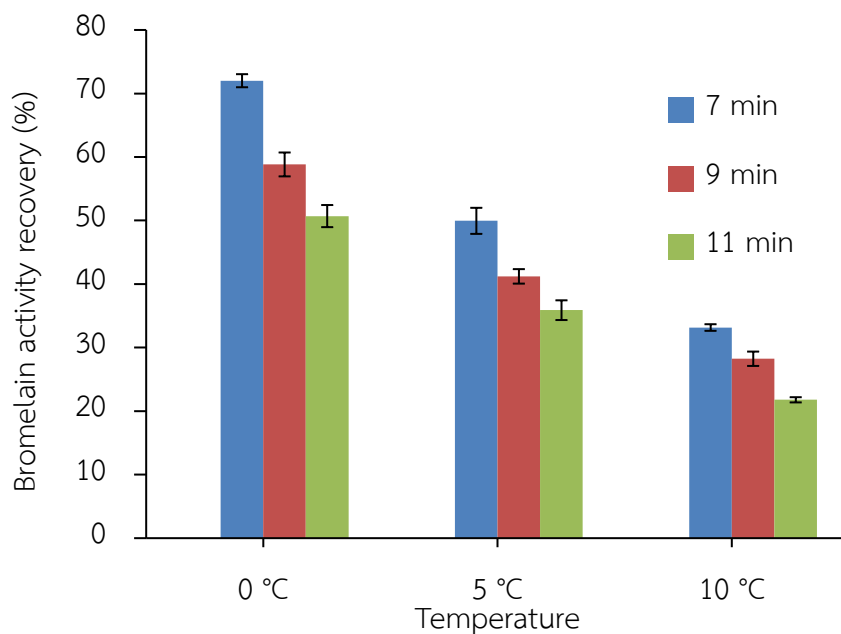
ภาพที่ 22 ค่าปริมาณโปรตีน (mg/mL extract) ที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ ในท่อขนาด 1 เมตร



ภาพที่ 23 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ (CDU/ mL extract) ของเอนไซม์ที่สกัดจากผลไม้ที่อุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ ใน
ท่อขนาด 1 เมตร



ภาพที่ 24 ค่า specific activity (CDU/mg protein) ของเอนไซม์โบรมีเลนที่สกัดจากผลไม้ที่อุณหภูมิและ
ระยะเวลาต่าง ๆ ในท่อขนาด 1 เมตร



ภาพที่ 25 ค่า bromelain activity recovery (%) ที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ ในท่อขนาด 1 เมตร

อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับผลการตกตะกอนในหลอดทดลองที่ผ่านมา ซึ่งพบว่าที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส มีค่า bromelain activity recovery สูงสุดถึง 98.62% ที่เวลาการตกตะกอน 9 นาที แสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพของการตกตะกอนโปรตีนด้วยวิธีแบบต่อเนื่องในท่อมีประสิทธิภาพต่ำกว่าการตกตะกอนแบบ batch

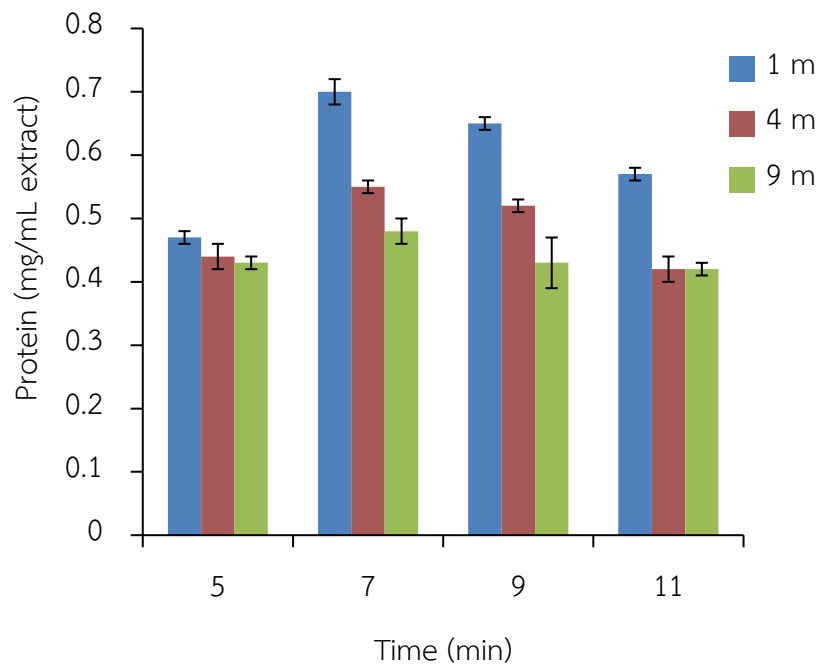
3.8 การขยายขนาด (scale up) ระบบการตกตะกอน

จากผลการทดลองที่ผ่านมาพบว่าผลการตกตะกอนแบบต่อเนื่องในท่อที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพสูงสุด จึงได้ศึกษาการขยายสเกลของระบบการตกตะกอนแบบต่อเนื่องในท่อโดยการปรับความยาวท่อซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเดิมจากขนาดความยาว 1 เมตร ให้มีความยาวเป็น 4 และ 9 เมตร จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ค่ากิจกรรมเอนไซม์ และการคำนวณค่า bromelain activity recovery (ภาพที่ 26-29) โดยได้เพิ่มการศึกษาระยะเวลาในการตกตะกอนที่ 5 นาที ด้วย จากผลการทดลองพบว่าที่เวลา 5 นาทีให้ปริมาณโปรตีนและค่ากิจกรรมต่ำกว่าเวลาอื่น ๆ ซึ่งเป็นการยืนยันผลการทดลองในส่วน 3.7 ว่าระยะเวลา 7 นาที เป็นเวลาที่เหมาะสมที่สุด

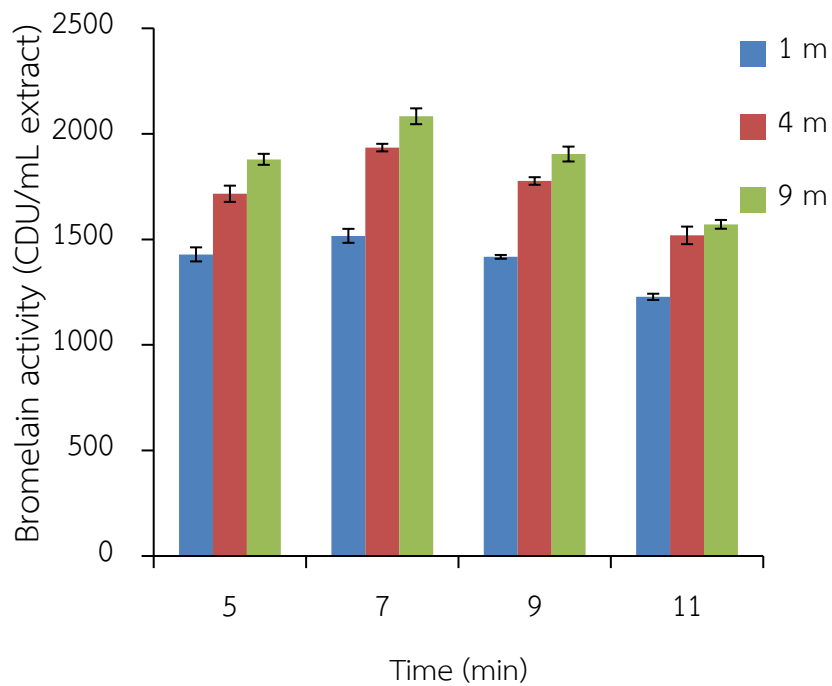
จากภาพที่ 26 จะเห็นได้ว่าการเพิ่มความยาวท่อส่งผลให้ได้ค่าปริมาณโปรตีนที่ตกตะกอนได้น้อยลงตามลำดับ แต่ค่ากิจกรรมเอนไซม์กลับมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 27) และเมื่อคำนวณค่า bromelain activity recovery พบว่าการใช้ท่อยาว 9 เมตรทำให้มีค่าเพิ่มเป็น 88.47%

นอกจากนี้เมื่อคำนวณค่า specific activity ของเอนไซม์ที่ได้พบว่ามีค่าสูงขึ้นตามความยาวของท่อโดยมีค่าสูงสุดประมาณ 4,400 CDU/mg protein เมื่อใช้ท่อขนาด 9 เมตร เมื่อใช้เวลาในการตกตะกอน 9 นาที แต่

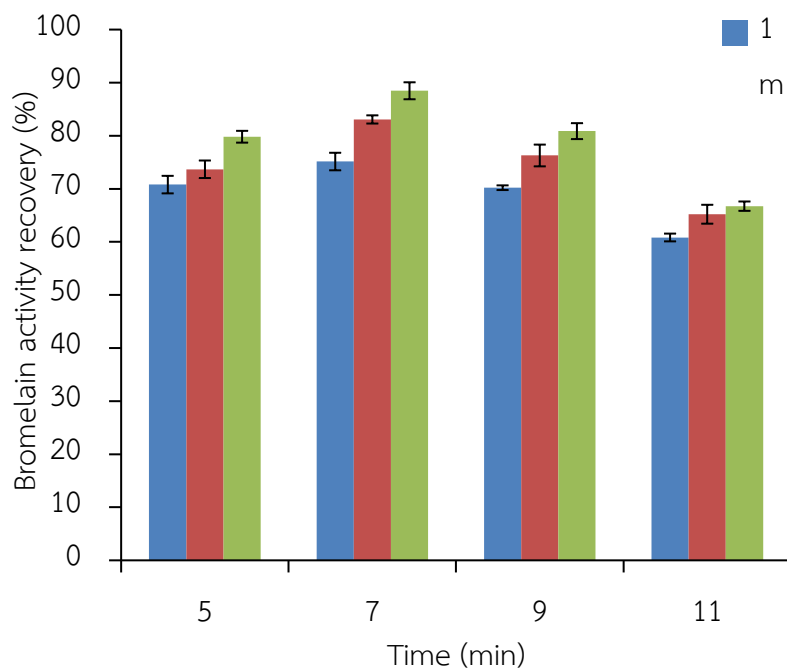
มีค่าสูงกว่าที่เวลา 5 และ 7 นาทีเพียงเล็กน้อย การใช้ต่อความยาวเพิ่มขึ้นทำให้ต้องปรับอัตราการใช้ของทั้ง สารสกัดเอนไซม์หยาบและเอทานอลเพิ่มขึ้น อาจส่งผลให้พฤติกรรมการไหลภายในท่อเปลี่ยนไปโดยเพิ่มความ ปั่นป่วนของการไหลช่วยให้เกิดการตกตะกอนของเอนไซม์ได้ดียิ่งขึ้น (Virkar และคณะ, 1982)



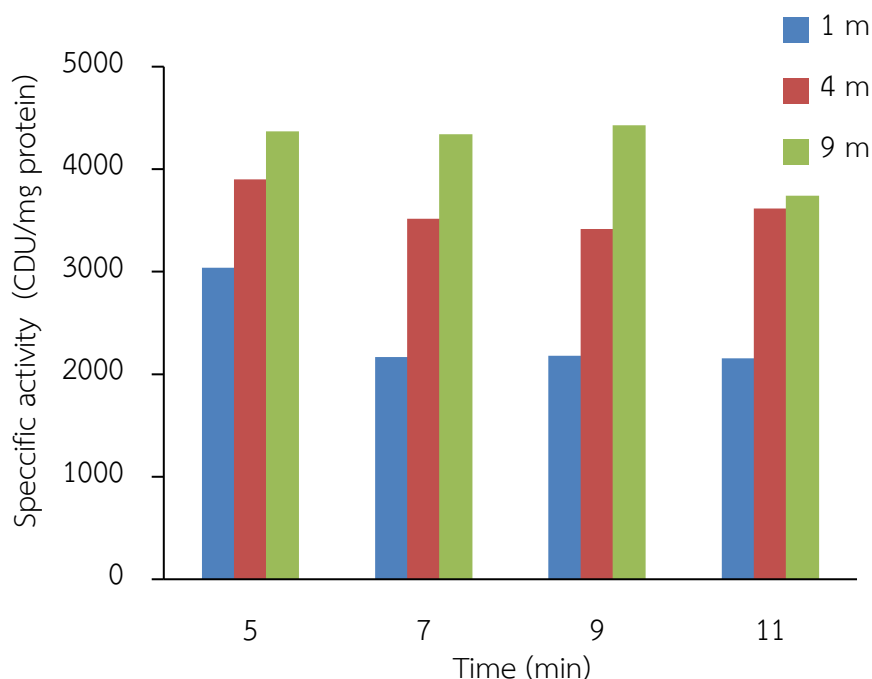
ภาพที่ 26 ค่าปริมาณโปรตีนที่เวลาการตกตะกอนต่าง ๆ ในท่อขนาด 1, 4 และ 9 เมตร ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 27 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ (CDU/ mL extract) ที่เวลาการตกตะกอนต่าง ๆ ในที่อุณหภูมิ 1, 4 และ 9 เมตร ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 28 ค่า bromelain activity recovery (%) ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ในที่อุณหภูมิ 1, 4 และ 9 เมตร ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 29 ค่า Specific activity ของเอนไซม์ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ในท่อขนาด 1, 4 และ 9 เมตร ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส

3.9 การปรับปรุงสภาวะการสกัดเอนไซม์หยาบ

จากการทดลองที่ผ่านมาพบว่าปริมาณเอนไซม์ที่ตกตะกอนได้ยังมีค่าต่ำเนื่องจากความเข้มข้นของเอนไซม์ในสารสกัดหยาบมีค่าต่ำ เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ในสารสกัดเอนไซม์หยาบ จึงศึกษาอัตราส่วนตัวอย่างต้นสับปะรดต่อน้ำในการสกัดสารสกัดเอนไซม์หยาบจากต้นสับปะรด ที่ 3 อัตราส่วน ได้แก่ 100:100 g/g, 150:100 g/g และ 200:100 g/g โดยน้ำหนัก ปั่นผสมด้วยเครื่องปั่นอาหาร ระดับ 1 เป็นเวลา 1, 3 และ 5 นาที จากตารางที่ 13 พบว่าการเพิ่มสัดส่วนของต้นสับปะรดจาก 100, 150 และ 200 ส่งผลให้ปริมาณโปรตีนในสารสกัดเพิ่มขึ้นตามลำดับ รวมถึงกิจกรรมของเอนไซม์ก็มีค่าเพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน

ตารางที่ 13 ค่าปริมาณโปรตีนและกิจกรรมเอนไซม์ของสารสกัดที่ใช้อัตราส่วนต้นต่อน้ำและเวลาในการสกัดต่างกัน

อัตราส่วนต้น สด : น้ำ	Protein (mg/mL extract)			Enzyme activity (CDU/mL extract)		
	1 นาที	3 นาที	5 นาที	1 นาที	3 นาที	5 นาที
100:100	1.18±0.02	1.46±0.02	1.68±0.05	2,229.98±40.56	3,493.16±40.40	4,132.50±36.89
150:100	1.48±0.02	1.95±0.01	2.04±0.03	2,536.03±37.57	3,700.06±51.67	4,287.64±40.84
200:100	1.85±0.03	2.16±0.02	2.00±0.04	2,676.55±20.82	4,055.01±45.56	4,234.08±33.24

ในขณะที่การเพิ่มเวลาในการปั่นผสมนั้นช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดเอนไซม์เช่นกัน การสกัดที่เวลา 3 นาที ใช้ต้นสดที่อัตราส่วน 200:100 g/g ให้มีปริมาณโปรตีนสูงสุด คือ 2.16 mg/mL ซึ่งเมื่อเทียบกับการใช้อัตราส่วน 100:100 g/g เวลาสกัด 1 นาที ซึ่งเป็นสถานะที่ใช้ในการทดลองก่อนหน้านี้ทั้งหมดจะพบว่าให้ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้น 1.7 เท่า และมีกิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้น 1.9 เท่า จึงเลือกสถานะการสกัดนี้สำหรับการเตรียมตัวอย่างในการศึกษาขั้นต่อไป

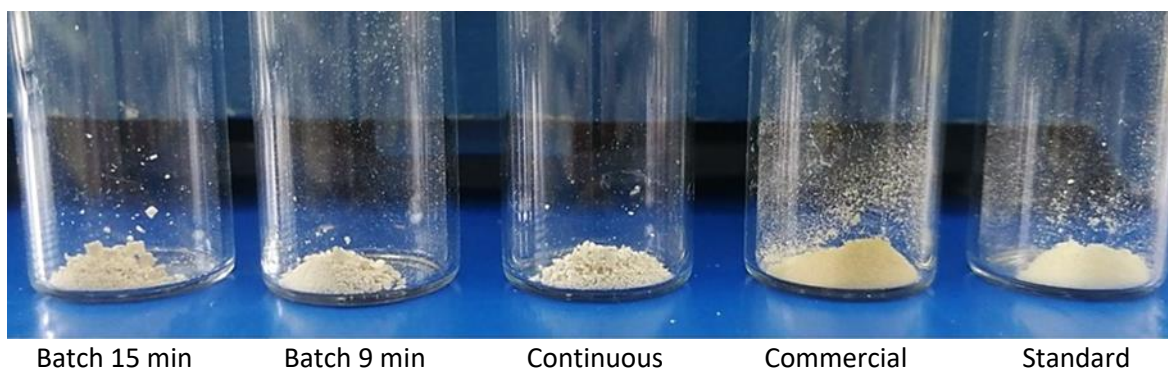
3.10 การเตรียมและวิเคราะห์สมบัติของเอนไซม์โบรมิเลนผง

การเตรียมตัวอย่างเอนไซม์ผงได้จากการสกัดตัวอย่างต้นสับประรดด้วยอัตราส่วน 200:100 g/g โดยปั่นผสม เวลา 3 นาที หลังจากการตกตะกอนเอนไซม์โบรมิเลนในสารสกัดเอนไซม์หยาบด้วยเอทานอลความเข้มข้น 60% โดยใช้สถานะที่เลือกมา 3 สถานะ คือ แบบหลอดทดลอง (batch) ด้วยเวลา 9 และ 15 นาที และตกตะกอนแบบท่อโดยใช้เวลา 7 นาที ในระบบท่อขนาด 9 เมตร จากนั้นจึงนำของผสมแต่ละตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ได้ตะกอนเอนไซม์ดังแสดงในภาพที่ 30



ภาพที่ 30 ลักษณะปรากฏของตัวอย่างสารสกัดเอนไซม์หยาบที่ผสมกับเอทานอลและตัวอย่างตะกอนที่ได้

สารสกัดเอนไซม์หยาบในการทดลองนี้มีค่าปริมาณโปรตีนเริ่มต้น 1.81 ± 0.02 mg/mL extract และกิจกรรมเอนไซม์ $4,335.66 \pm 35.62$ CDU/mL extract หลังจากตกตะกอนด้วยวิธีต่าง ๆ และนำส่วนตะกอนที่ได้ไปทำแห้งด้วยวิธี freeze drying ได้ผงเอนไซม์สีขาวนวล ในขณะที่เอนไซม์ทางการค้ามีสีเหลืองอ่อน และผงสกัดสารมาตรฐานโบรมิเลนมีสีขาวอมเหลือง (ภาพที่ 31) จากตารางที่ 14 จะเห็นได้ว่า การตกตะกอนแบบกะ (ในหลอดทดลอง) โดยใช้เวลา 9 นาที ให้ค่าร้อยละผลผลิตเอนไซม์ผง (yield) สูงสุด ในขณะที่การตกตะกอนแบบต่อเนื่องโดยใช้เวลา 7 นาทีในระบบท่อขนาด 9 เมตร แม้ว่าจะให้ค่า yield ต่ำกว่าเล็กน้อย (1.75 g/100 mL extract) แต่เอนไซม์ผงที่ได้มีปริมาณโปรตีนและกิจกรรมเอนไซม์โบรมิเลนสูงสุด คือ 61.38 g/100 g powder และ $2,075.94$ CDU/mg powder ตามลำดับ



ภาพที่ 31 เอนไซม์โบรมีเลนผงจากการทำแห้งด้วยวิธี freeze drying

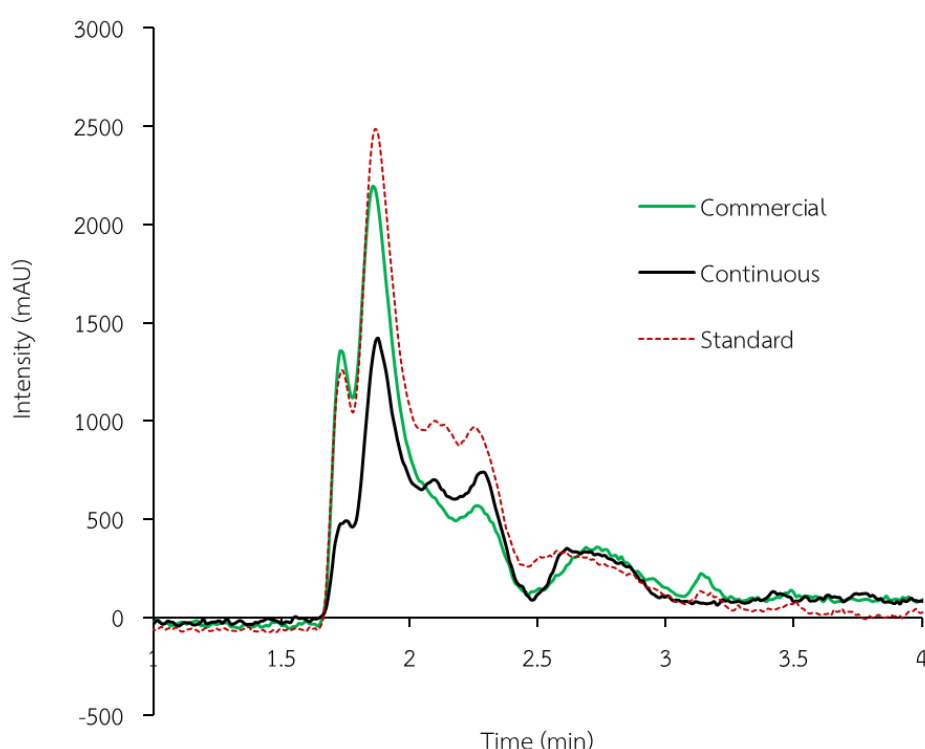
จากข้อมูลค่า yield ของผงเอนไซม์ (1.75/100 g/mL) ที่ได้จากการตกตะกอนในท่อแบบต่อเนื่องด้วยระยะเวลา 7 นาที โดยอัตราการไหลของสารสกัดหยาบเมื่อใช้ท่อความยาว 9 เมตร เป็น 15.07 mL/min (ตารางที่ 7) ทำให้สามารถคำนวณได้ว่าปริมาณการผลิตเอนไซม์ผงของระบบตกตะกอนในท่อแบบต่อเนื่องใน 1 ชั่วโมง จะมีค่าเป็น 16.46 g (คำนวณจาก $15.07 \text{ mL/min} \times 60 \text{ min} \times 1.75/100 \text{ g/mL}$) ซึ่งจากข้อมูลนี้สามารถประมาณกำลังการผลิตเอนไซม์ผงหากเพิ่มขนาดท่อตกตะกอนต่อไปได้ เช่น หากใช้ท่อเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 นิ้ว (25.4 mm) ความยาว 10 เมตร ซึ่งต้องปั๊มสารสกัดเอนไซม์หยาบที่อัตรา 267.83 mL/min จะสามารถผลิตเอนไซม์ผงได้ 281.22 g/h ($267.83 \text{ mL/min} \times 60 \text{ min} \times 1.75/100 \text{ g/mL}$)

อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ทางการค้า พบว่าเอนไซม์ผงที่ผลิตได้ในงานวิจัยนี้มีปริมาณโปรตีนและกิจกรรมเอนไซม์ต่ำกว่าอยู่เล็กน้อย แต่หากคำนวณเทียบต่อปริมาณโปรตีนจะพบว่าค่า Specific activity ของเอนไซม์ที่ผลิตได้ในงานวิจัยนี้ (3,403.18 CDU/mg protein) มีค่าสูงกว่าเอนไซม์ทางการค้า (2,634.72 CDU/mg protein)

ตารางที่ 14 ผลผลิต ปริมาณโปรตีน และค่ากิจกรรมเอนไซม์ของเอนไซม์โบรมีเลนผงเปรียบเทียบกับเอนไซม์ทางการค้าและเอนไซม์มาตรฐาน

ตัวอย่าง	Yield (g/100 mL extract)	Protein (g/100 g powder)	Enzyme activity (CDU/mg powder)
แบบกะ 9 นาที	1.86 ± 0.60	55.23 ± 11.30	$1,832.31 \pm 118.76$
แบบกะ 15 นาที	1.62 ± 0.10	49.82 ± 0.76	$1,612.90 \pm 91.51$
แบบต่อเนื่อง 7 นาที	1.75 ± 0.23	61.38 ± 2.19	$2,075.94 \pm 94.10$
ตัวอย่างทางการค้า	-	80.11 ± 3.25	$2,107.78 \pm 59.40$
โบรมีเลนมาตรฐาน	-	87.31 ± 6.77	$2,664.18 \pm 191.63$

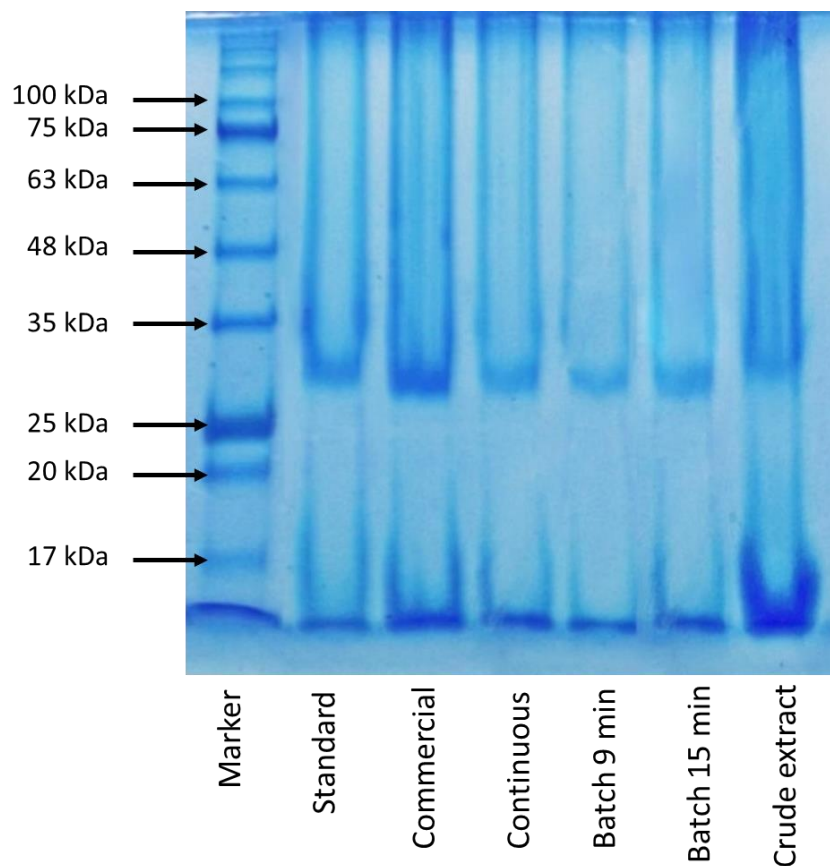
เมื่อนำตัวอย่างเอนไซม์ผงที่เตรียมได้ไปวิเคราะห์โปรตีนด้วย HPLC โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm (ภาพที่ 32) พบว่าตัวอย่างเอนไซม์ผงที่เตรียมด้วยการตกตะกอนแบบต่อเนื่องมีลักษณะของโครมาโตแกรมที่ปรากฏเช่นเดียวกันกับเอนไซม์โบรมีเลนมาตรฐานและเอนไซม์ทางการค้าเป็นการยืนยันว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้ประกอบไปด้วยเอนไซม์โบรมีเลนจริง เอนไซม์โบรมีเลนเป็นชื่อโดยทั่วไปที่ใช้เรียกเอนไซม์ที่สกัดได้จากสับปะรดประกอบไปด้วยเอนไซม์อย่างน้อย 3 ชนิดได้แก่ stem bromelain (EC 3.4.22.32) ananain (EC 3.4.22.31) และ comosain (Arshad และคณะ, 2014) ดังนั้นจึงเห็นพิกซึ่งแสดงองค์ประกอบที่เป็นโปรตีนจำนวนหลายพีคบนโครมาโตแกรม ซึ่งสอดคล้องกับโครมาโตแกรมที่การรายงานในงานวิจัยอื่น ๆ แม้ว่าลักษณะของของพีกอาจจะมีแตกต่างกันเนื่องจากชนิดของคอลัมน์และสภาวะของการวิเคราะห์ (Campos และคณะ, 2019; Pothacharoen และคณะ, 2021)



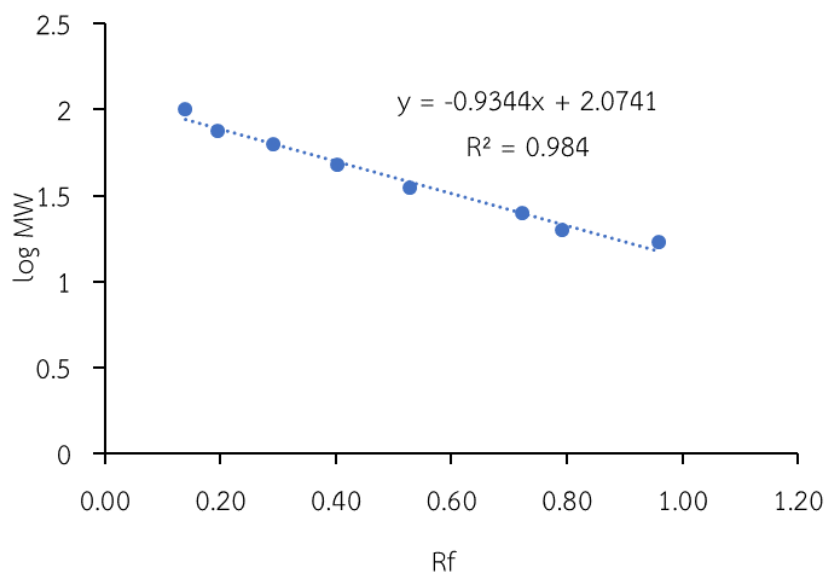
ภาพที่ 32 โครมาโตแกรมจาก HPLC ของผงโบรมีเลนที่เตรียมด้วยการตกตะกอนในท่อแบบต่อเนื่อง (Continuous), เอนไซม์ทางการค้า (Commercial) และเอนไซม์มาตรฐาน (Standard) เมื่อตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm

นอกจากนี้ได้ตรวจสอบหาองค์ประกอบโปรตีนที่พบในตัวอย่างเอนไซม์ที่เตรียมได้โดยใช้ SDS-PAGE ซึ่งแสดงผลการทดลองดังภาพที่ 33 พบว่าปรากฏแถบของเอนไซม์โบรมีเลนในทุกตัวอย่างเมื่อเทียบกับเอนไซม์โบรมีเลนมาตรฐาน (Standard) ที่บริเวณระหว่างโปรตีนมาตรฐานขนาด 25 และ 35 kDa เมื่อนำแผ่นเจลที่ได้มาวิเคราะห์ทางเคมีของโปรตีนมาตรฐานเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน ด้วยการวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐานจากกึ่งกลางของแถบที่ปรากฏ นำระยะทางการเคลื่อนที่มาคำนวณหาค่าการ

เคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative migration, R_f) ของโปรตีนมาตรฐานแต่ละชนิด จากนั้นจึงพล็อตกราฟระหว่างค่า $\log$ ของน้ำหนักโมเลกุล ($\log MW$) กับ ค่า R_f ของโปรตีนมาตรฐาน (ภาพที่ 33) ซึ่งกราฟมาตรฐานนี้สามารถนำมาประมาณน้ำหนักโมเลกุลเอนไซม์ที่พบในตัวอย่างได้ โดยพบว่าเอนไซม์ในสารสกัดเอนไซม์หยาบมีน้ำหนักโมเลกุลที่ 35.50 kDa ในขณะที่เอนไซม์จากการตกตะกอนแบบแบบกะ 9, 15 นาที และ แบบต่อเนื่อง 7 นาที มีน้ำหนักโมเลกุลที่ 33.20 kDa ซึ่งใกล้เคียงกับผงเอนไซม์โบรมีเลนทางการค้า และสารมาตรฐานโบรมีเลน (stem bromelain, Sigma-Aldrich, USA) ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 34.35 kDa จากรายงานต่าง ๆ พบว่ามีการรายงานน้ำหนักโมเลกุลของโบรมีเลนต้นสับปะรดอยู่ในช่วงกว้างคือ 23.40–35.73 kDa (Arshad และคณะ, 2014)



ภาพที่ 33 แถบโปรตีนบน SDS-PAGE ของเอนไซม์โบรมีเลนมาตรฐาน (standard), เอนไซม์ทางการค้า (commercial), เอนไซม์ที่ตกตะกอนด้วยวิธีตกตะกอนแบบต่อเนื่อง, เอนไซม์ที่ตกตะกอนแบบกะเป็นเวลา 9 นาที (Batch 9 min), เอนไซม์ที่ตกตะกอนแบบกะเป็นเวลา 15 นาที (Batch 15 min) และสารสกัดเอนไซม์หยาบ (Crude extract)



ภาพที่ 34 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานโปรตีน

3.11 การคำนวณต้นทุนเบื้องต้นของเอนไซม์ผง

การประเมินต้นทุนเบื้องต้นสำหรับการผลิตเอนไซม์ผงน้ำหนัก 100 g โดยใช้ระบบการตกตะกอนแบบท่อขนาดความยาว 9 เมตร ที่ใช้ในการศึกษานี้ และใช้ข้อมูลดังต่อไปนี้

1. วัตถุดิบต้นสัประรดที่ต้องใช้

ร้อยละผลผลิตเอนไซม์ผงจากสารสกัดหยาบ = 1.75/100 g/mL

ปริมาตรสารสกัดหยาบจากการสกัดด้วยอัตราส่วนต้นสัประรดต่อน้ำเป็น 200:100 g/g = 115 mL

ปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตได้ = 1.75/100 × 115 = 2.01 g/100 g ≈ 2.0 g/100 g ต้นสัประรด

ดังนั้นน้ำหนักต้นสัประรดที่ต้องใช้สำหรับสกัดเพื่อผลิตเอนไซม์ผงน้ำหนัก 100 g คือ 5 kg

2. น้ำสำหรับการสกัดที่อัตราส่วน 200:100 g/g = 2.5 kg ≈ 2.5 L และจะได้สารสกัดหยาบ 2.875 L

3. เอทานอลที่ต้องใช้ = 4.89 L

4. เวลาในการตกตะกอน = 2.875 × 1000/(15.07 mL/min × 60) = 3.2 h

ดังนั้นสามารถคำนวณต้นทุนเบื้องต้นของการผลิตเอนไซม์ผงได้ดังตารางที่ 15

ตารางที่ 15 การคำนวณต้นทุนเบื้องต้นของการผลิตเอนไซม์ผงน้ำหนัก 100 g

วัตถุดิบ/กระบวนการ	การคำนวณ	ต้นทุน (บาท/100 g)
วัตถุดิบต้นสัประรด	5 กก. × 4 บาท/กก.	20

น้ำกรองสำหรับการสกัด	2.5 ลิตร × 0.50 บาท/ลิตร	1.25
ค่าพลังงานในการปั่นผสม เวลา 3 นาที ต่อ 200 g - เครื่องปั่น 450 W	5 กก./0.2 กก. × 450 W/1000 × 3/60 × 4.75 บาทต่อหน่วย	2.67
เอทานอล 95%	4.89 ลิตร × 100 บาท/ลิตร	489
ค่าพลังงานในการตกตะกอน 3.2 ชั่วโมง - ปั๊ม peristaltic pump 100 W - ปั๊ม piston pump 140 W 2 เครื่อง - เครื่องทำความเย็น 175 W	(100 + 280 + 175) /1000 × 3.2 × 4.75 บาทต่อหน่วย	8.44
ค่าพลังงานในการทำแห้งด้วย freeze drying 24 ชั่วโมง - Freeze dryer Labconco 1000 W	1000/1000 × 24 × 4.75 บาทต่อหน่วย	114
รวม		635.36

จากตารางที่ 15 จะเห็นได้ในการใช้กระบวนการตกตะกอนในท่อแบบต่อเนื่องสำหรับการผลิตเอนไซม์ผง 100 กรัม มีต้นทุนคิดเป็น 635.36 บาท ซึ่งต้นทุนหลักของการผลิตเอนไซม์ผงคือค่าเอทานอลซึ่งใช้สำหรับการตกตะกอน (77% ของต้นทุนรวม) และค่าพลังงานในการทำแห้ง (18% ของต้นทุนรวม) ดังนั้น เอนไซม์ผงที่ผลิตได้ในห้องปฏิบัติการจึงมีต้นทุน ประมาณ 6,350 บาทต่อกิโลกรัม สำหรับการเปรียบเทียบการตกตะกอนแบบถังกวน (batch) นั้น เนื่องจากกระบวนการตกตะกอนแบบท่อและแบบถังมีความแตกต่างกันเฉพาะในแง่ของเครื่องมือแต่ใช้เอทานอลที่ความเข้มข้นเดียวกันและใช้ระบบทำความเย็นเหมือนกัน รวมถึงกระบวนการทำแห้งจะมีต้นทุนเท่ากันเนื่องจากไม่เกี่ยวข้องกับขั้นตอนการตกตะกอน ดังนั้นหากไม่พิจารณาต้นทุนที่เป็นค่าเครื่องจักรแล้วการใช้เอทานอลซึ่งเป็นต้นทุนส่วนใหญ่จึงมีค่าที่ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงทำให้ต้นทุนการผลิตไม่แตกต่างกับระบบการตกตะกอนในท่อแบบต่อเนื่อง จากการสำรวจราคาของเอนไซม์ที่จำหน่ายทางการค้าพบว่ามีราคาประมาณ 2,000-3,500 บาทต่อกิโลกรัม ซึ่งต่ำกว่าต้นทุนของการผลิตเอนไซม์ในห้องปฏิบัติการในการศึกษาอย่างมาก แต่ความแตกต่างนี้เป็นสิ่งที่เป็นไปได้ตามที่คาดหมายเนื่องจากโดยทั่วไปต้นทุนของการผลิตในห้องปฏิบัติการซึ่งผลิตในปริมาณน้อย (ดังเช่นในการคำนวณนี้คิดจากการผลิตเพียง 100 g ตามเครื่องมือที่ใช้จริงในห้องปฏิบัติการ) จะมีค่าสูงกว่าการผลิตในปริมาณมากในระดับอุตสาหกรรม เช่น ราคาของเอทานอลหากจัดซื้อในปริมาณมากจะมีราคาที่ต่ำลง รวมถึงการใช้เครื่องทำแห้งแบบ freeze dry ในระดับอุตสาหกรรมจะมีต้นทุนการผลิตต่ำกว่ามากเมื่อคิดต้นทุนต่อน้ำหนักผลิตภัณฑ์ที่สามารถทำแห้งได้ในแต่ละรอบการผลิต

4. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นว่าการตกตะกอนสารสกัดเอนไซม์หยาบจากต้นสับปะรดด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 60% v/v อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ทำให้ได้กิจกรรมเอนไซม์โบรมีเลนสูงสุดที่เวลา 9 นาที จากการออกแบบระบบการตกตะกอนในท่อแบบต่อเนื่อง (continuous tubular reactor) และทดสอบการตกตะกอนเอนไซม์พบว่ามีความเป็นไปได้ในการนำมาใช้เพื่อตกตะกอนเอนไซม์โบรมีเลนและการขยายสเกลโดยเพิ่มความยาวท่อ 4 และ 9 เท่าให้ผลการตกตะกอนที่ดีเช่นเดียวกัน กำลังการผลิตเอนไซม์ผงที่ได้จากการตกตะกอนและทำแห้งโดยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งมีค่า 16.46 g/h โดยมีโปรตีน 61.38 g/100 g powder และค่ากิจกรรมเอนไซม์ 2,075.94 CDU/mg powder ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับเอนไซม์ที่มีจำหน่ายทางการค้า ผลการตรวจสอบเอนไซม์ที่ตกตะกอนได้พบว่าเอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุล 33.20 kDa และแสดงโครมาโตแกรม HPLC เหมือนกับเอนไซม์โบรมีเลนมาตรฐาน

ในการพัฒนาเครื่องมือในการตกตะกอนในท่อแบบต่อเนื่องเพื่อใช้งานจริงต่อไปนั้นจำเป็นต้องคำนึงถึงระบบการควบคุมอุณหภูมิของสารผสมในท่อให้ได้ตามที่กำหนดและควรใช้ท่อสำหรับตกตะกอนเป็นท่อสเตนเลสเพื่อให้เกิดการถ่ายเทความร้อนได้ดีและเป็นไปตามมาตรฐานด้านสุขลักษณะในการผลิต โดยกระบวนการให้ความเย็นที่มีประสิทธิภาพจะเป็นประเด็นที่มีความสำคัญ และยังต้องออกแบบระบบการเก็บตัวอย่างตะกอนที่เหมาะสมเพื่อให้สามารถดำเนินการเก็บตะกอนได้แบบต่อเนื่อง นอกจากนี้การเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ในสารสกัดหยาบเริ่มต้นเป็นปัจจัยที่สำคัญที่จะสามารถทำให้ได้กำลังการผลิตสูงขึ้นและช่วยลดปริมาณเอทานอลที่ต้องใช้ลงได้มาก

เอกสารอ้างอิง

- AOAC. 2000. Official methods of analysis of AOAC International. Maryland, USA: AOAC International.
- Arshad, Z. I. M., Amid, A., Yusof, F., Jaswir, I., Ahmad, K., Loke, S. P. 2014. Bromelain: An overview of industrial application and purification strategies. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98(17): 7283-7297.
- Banerjee, S., Ranganathan, V., Patti, A., Arora, A. 2018. Valorisation of pineapple wastes for food and therapeutic applications. *Trends in Food Science and Technology*. 82: 60-70.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72(1): 248-254.
- Campos, D. A., Coscueta, E. R., Valetti, N. W., Pastrana-Castro, L. M., Teixeira, J. A., Picó, G. A., Pintado, M. M. 2019. Optimization of bromelain isolation from pineapple byproducts by polysaccharide complex formation. *Food Hydrocolloids*. 87: 792-804.
- Chaurasiya, R. S., Umesh Hebbar, H. 2013. Extraction of bromelain from pineapple core and purification by RME and precipitation methods. *Separation and Purification Technology*. 111: 90-97.
- FAO. 2022. FAOSTAT. <http://faostat.fao.org>
- Feijoo-Siota, L., Villa, T. G. 2011. Native and biotechnologically engineered plant proteases with industrial applications. *Food and Bioprocess Technology*. 4(6): 1066-1088.
- Fogler, S. H. 2006. *Elements of Chemical Reaction Engineering*: Pearson.
- Grzonka, Z., Kasprzykowski, F., Wicz, W. 2007. Cysteine proteases. In: Polaina, J., and MacCabe, A. P., editors. *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications*. Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- Hammerschmidt, N., Hintersteiner, B., Lingg, N., Jungbauer, A. 2015. Continuous precipitation of IgG from CHO cell culture supernatant in a tubular reactor. *Biotechnology Journal*. 10(8): 1196-1205.
- Hammerschmidt, N., Hobiger, S., Jungbauer, A. 2016. Continuous polyethylene glycol precipitation of recombinant antibodies: Sequential precipitation and resolubilization. *Process Biochemistry*. 51(2): 325-332.

- Hassan, A., Othman, Z., Siriphanich, J. 2011. 10 - Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). In: Yahia, E. M., editor. Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits: Woodhead Publishing. p. 194-218e.
- Heinicke, R. M., Gortner, W. A. 1957. Stem bromelain—A new protease preparation from pineapple plants. *Economic Botany*. 11(3): 225-234.
- Kashid, M. N., Renken, A., Kiwi-Minsker, L. 2015. Real reactors and residence time distribution (RTD). *Microstructured Devices for Chemical Processing*. p. 89-128.
- Kermasha, S., Eskin, M. N. A. 2021. Chapter 9. Selected industrial enzymes. In: Kermasha, S., and Eskin, M. N. A., editors. *Enzymes*. San Diego: Academic Press. p. 259-305.
- Lane, L. B. 1925. Freezing points of glycerol and its aqueous solutions. *Industrial & Engineering Chemistry*. 17(9): 924-924.
- Martinez, M., Spitali, M., Norrant, E. L., Bracewell, D. G. 2019. Precipitation as an enabling technology for the intensification of biopharmaceutical manufacture. *Trends in Biotechnology*. 37(3): 237-241.
- Mynott, T. L., Fasano, A.; 1999. Use of bromelain in the manufacture of a medicament for enhancement of intestinal permeability Patent WO1999000141A1.
- Nadzirah, K. Z., Zainal, S., Noriham, A., Normah, I., Roha, A. M. S. 2012. Physico-chemical properties of pineapple crown extract variety N36 and bromelain activity in different forms. *APCBEE Procedia*. 4: 130-134.
- Pothacharoen, P., Chaiwongsa, R., Chanmee, T., Insuan, O., Wongwichai, T., Janchai, P., Vaithanomsat, P. 2021. Bromelain extract exerts antiarthritic effects via chondroprotection and the suppression of TNF- α -induced NF- κ B and MAPK signaling. *Plants*. 10(11): 2273.
- Ramli, A. N. M., Aznan, T. N. T., Illias, R. M. 2017. Bromelain: from production to commercialisation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 97(5): 1386-1395.
- Raphael, M., Rohani, S. 1999. Sunflower protein precipitation in a tubular precipitator. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*. 77(3): 540-554.
- Rowan, A. D. 2013. Chapter 424 - Stem Bromelain. In: Rawlings, N. D., and Salvesen, G., editors. *Handbook of Proteolytic Enzymes (Third Edition)*: Academic Press. p. 1871-1873.

- Sharma, M., Sharma, R. 2018. Implications of designing a bromelain loaded enteric nanoformulation on its stability and anti-inflammatory potential upon oral administration. *RSC Advances*. 8(5): 2541-2551.
- Soares, P. A. G., Vaz, A. F. M., Correia, M. T. S., Pessoa, A., Carneiro-da-Cunha, M. G. 2012. Purification of bromelain from pineapple wastes by ethanol precipitation. *Separation and Purification Technology*. 98: 389-395.
- Virkar, P. D., Hoare, M., Chan, M. Y. Y., Dunnill, P. 1982. Kinetics of the acid precipitation of soya protein in a continuous-flow tubular reactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 24(4): 871-887.
- Zelger, M., Pan, S., Jungbauer, A., Hahn, R. 2016. Real-time monitoring of protein precipitation in a tubular reactor for continuous bioprocessing. *Process Biochemistry*. 51(10): 1610-1621.
- ทนง ภัครัชพันธุ์, อรวินท์ วงศ์มีเกียรติ. 2530. กระบวนการตกตะกอนและความคงตัวของบรอมีเลน. *วิทยาศาสตร์ สาขาสหวิทยาการ*. 21(3).
- ปราโมทย์ คูวิจิตรจารุ และขวัญใจ กลิ่นจงกล. 2564. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์โครงการ “การพัฒนากระบวนการสกัดและทำบริสุทธิ์เฮราไมด์ระดับอุตสาหกรรมจากกากสับปะรด”. 90 หน้า.
- สถาบันวิจัยพืชสวน. 2560. การจัดการการผลิตสับปะรดคุณภาพ. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพมหานคร 184 หน้า.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2564. สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปี 2564. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพมหานคร 210 หน้า.

ภาคผนวก

A1 การวิเคราะห์หาค่าเวลาที่สารอยู่ในท่อโดยเฉลี่ย

วิเคราะห์หาเวลาที่สารอยู่ในท่อโดยเฉลี่ย (mean residence time, $\bar{t}$) โดยวิธี Step Function Stimulus-Response Method (Kashid และคณะ, 2015)

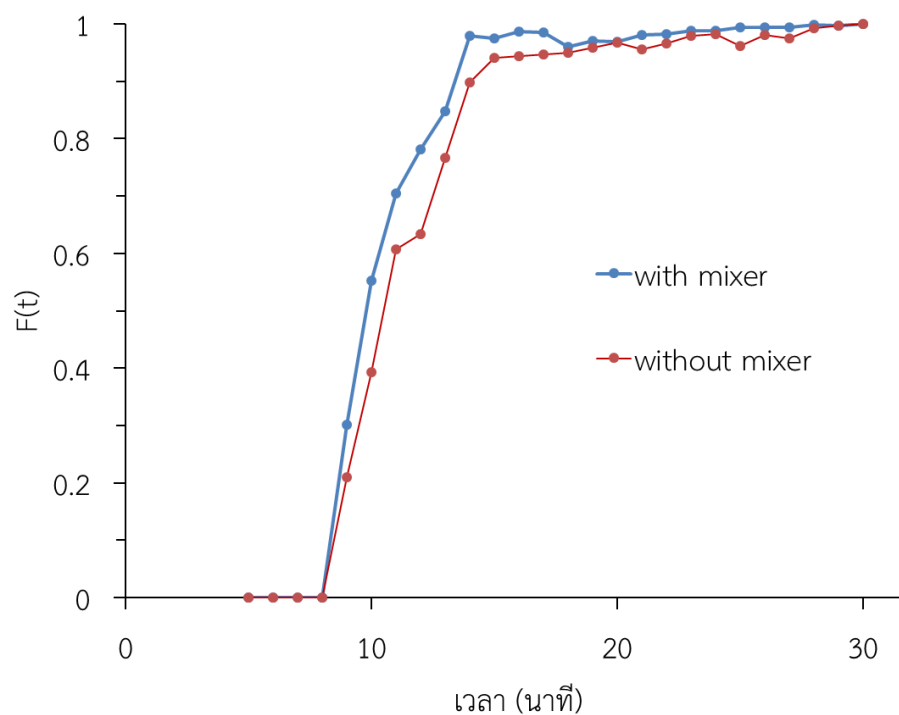
ตารางที่ 16 การคำนวณค่าสำหรับการหาเวลาที่สารอยู่ในท่อโดยเฉลี่ย

t	c	$F=c/c_0$	ΔF	$t\Delta F$	c	$F=c/c_0$	ΔF	$t\Delta F$
5	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0.2509	0.302071	0.302071	2.718637	0.1754	0.21056423	0.210564	1.895078
10	0.4595	0.553215	0.251144	2.511438	0.3272	0.39279712	0.182233	1.822329
11	0.5847	0.703949	0.150734	1.658078	0.5059	0.60732293	0.214526	2.359784
12	0.6486	0.780881	0.076932	0.923188	0.5278	0.63361345	0.026291	0.315486
13	0.7043	0.847941	0.06706	0.871779	0.6387	0.7667467	0.133133	1.730732
14	0.8128	0.97857	0.130628	1.828798	0.7484	0.89843938	0.131693	1.843697
15	0.8094	0.974476	-0.00409	-0.0614	0.7837	0.94081633	0.042377	0.635654
16	0.8189	0.985914	0.011438	0.183	0.7865	0.94417767	0.003361	0.053782
17	0.8183	0.985191	-0.00072	-0.01228	0.7888	0.94693878	0.002761	0.046939
18	0.7972	0.959788	-0.0254	-0.45726	0.7910	0.94957983	0.002641	0.047539
19	0.8061	0.970503	0.010715	0.203588	0.7989	0.95906363	0.009484	0.180192
20	0.8044	0.968457	-0.00205	-0.04093	0.8056	0.96710684	0.008043	0.160864
21	0.8150	0.981218	0.012762	0.267999	0.7966	0.95630252	-0.0108	-0.22689
22	0.8161	0.982543	0.001324	0.029136	0.8045	0.96578631	0.009484	0.208643
23	0.8205	0.98784	0.005297	0.12184	0.8151	0.9785114	0.012725	0.292677
24	0.8211	0.988562	0.000722	0.017337	0.8179	0.98187275	0.003361	0.080672

25	0.8250	0.993258	0.004695	0.117385	0.8011	0.96170468	-0.02017	-0.5042
26	0.8261	0.994582	0.001324	0.034433	0.8168	0.98055222	0.018848	0.490036
27	0.8261	0.994582	0	0	0.8117	0.97442977	-0.00612	-0.16531
28	0.8289	0.997953	0.003371	0.09439	0.8263	0.99195678	0.017527	0.490756
29	0.8283	0.997231	-0.00072	-0.02095	0.8308	0.99735894	0.005402	0.156663
30	0.8306	1	0.002769	0.083072	0.8330	1	0.002641	0.079232
Sum=				11.07127	Sum= 11.99436			

จากค่าความเข้มข้นของ BSA ที่เข้าสู่ระบบ, c_0 (ในที่นี้ใช้ค่าสูงสุดที่วัดได้แทน) และความเข้มข้นที่วัดได้จากปลายท่อที่เวลาต่าง ๆ, $c(t)$ สามารถสร้างกราฟ F (F-curve) (ภาพที่) จาก

$$F(t) = \frac{c(t)}{c_0}$$



ภาพที่ 35 F-curve สำหรับการหาเวลาที่สารอยู่ในท่อโดยเฉลี่ย

สามารถหาค่า $\bar{t}$ ได้จาก

$$\bar{t} = \int_0^1 t dF \cong \sum_i t_i \Delta F_i$$

ดังนั้น

$\bar{t}$ สำหรับระบบที่มี mixer = 11.07 min

$\bar{t}$ สำหรับระบบที่ไม่มี mixer = 11.99 min