บทที่ 3

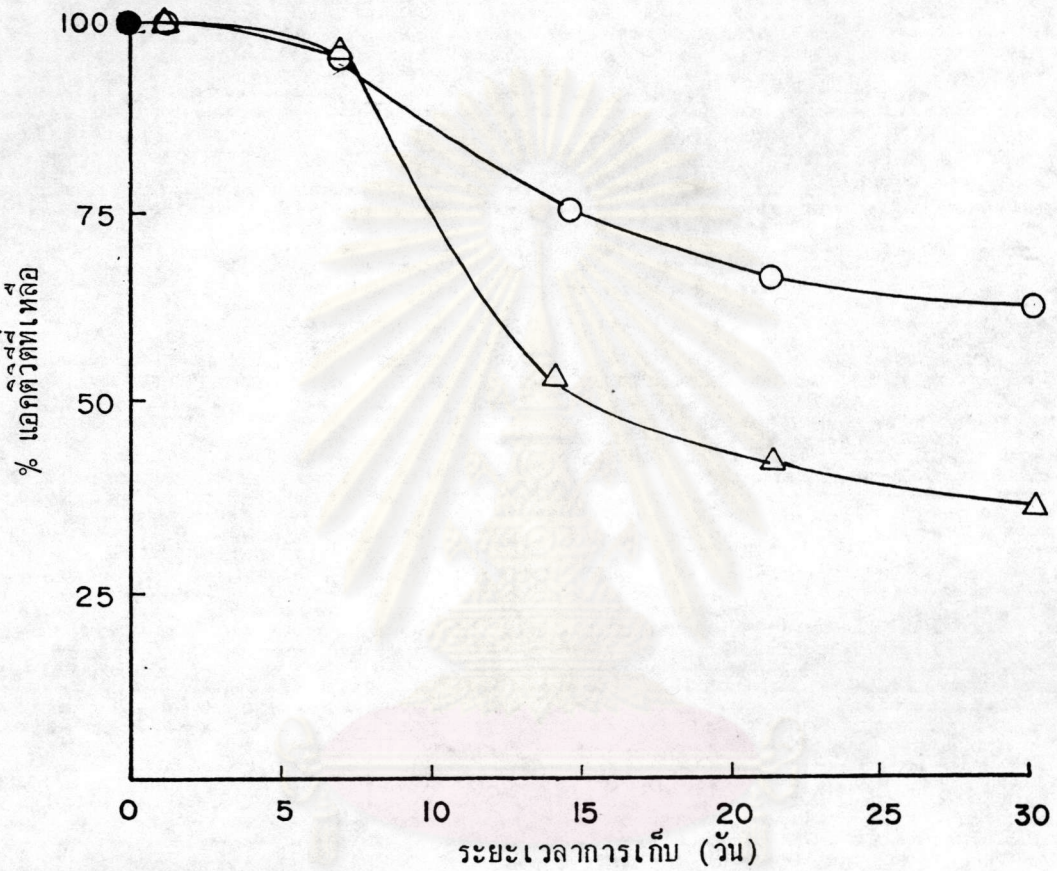
ผลการทดลอง

3.1 อุณหภูมิและระยะเวลาการเก็บต้นสับปะรดหลังเก็บเกี่ยวจากไร่

ทดลองตามวิธีทดลองข้อ 2.10 โดยเก็บต้นสับปะรดไว้ในห้องเย็น 4^{o} ซ. และที่อุณหภูมิห้อง แปรเปลี่ยนเวลาการเก็บตั้งแต่ 1, 7, 14, 21 และ 30 วัน ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 17 พบว่าการเก็บต้นสับปะรดที่อุณหภูมิ 4^{o} ซ. และที่อุณหภูมิห้องในช่วงระยะ 7 วันแรก แอคติวิตีจะลดลงเพียงเล็กน้อย แต่เมื่อใช้เวลาการเก็บนานกว่านี้คือช่วง 7 - 14 วัน แอคติวิตจะลดลงอย่างรวดเร็ว และหลังจากวันที่ 14 แอคติวิตีจะค่อย ๆ ลดลงและเริ่มคงที่เมื่อเก็บนาน 30 วัน จะมีแอคติวิตีเหลือประมาณ 62% เมื่อเก็บต้นสับปะรดที่อุณหภูมิห้อง 4^{o} ซ. และแอคติวิตีเหลือประมาณ 35% เมื่อเก็บต้นสับปะรดที่อุณหภูมิห้อง ดังนั้นจึงเลือกเก็บต้นสับปะรดหลังเก็บเกี่ยวจากไร่ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลาไม่เกิน 7 วัน โดยแอคติวิตีของเอนไซม์ในต้นสับปะรดเหลือประมาณ 96% - 97%

3.2 การสกัดแยกโบรมิเลนด้วยวิธีปอกเปลือกและไม่ปอกเปลือกต้นสับปะรด

ทดลองตามวิธีทดลองข้อ 2.11 ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 18 พบว่าการปอกเปลือกต้นสับปะรดแล้วสกัดแยกโบรมิเลนในถังกวนจะได้เอนไซม์ที่มีแอคติวิตี 2.8×10^{5} CDU/กก.ต้นสับปะรดที่ปอกเปลือก โปรตีน 6.7×10^{3} มก./กก.ต้นสับปะรดที่ปอกเปลือก แอคติวิตีจำเพาะ 3.1×10^{2} CDU/มก.โปรตีน ซึ่งสูงกว่าการสกัดแยกโบรมิเลนจากต้นสับปะรดที่ไม่ปอกเปลือก ซึ่งได้เอนไซม์ที่มีแอคติวิตีเพียง 0.4×10^{5} CDU/กก.ต้นสับปะรด ที่ไม่ปอกเปลือก โปรตีน 2.7×10^{3} มก./กก.ต้นสับปะรดที่ไม่ปอกเปลือก แอคติวิตีจำเพาะ 1.6×10^{2} CDU/มก.โปรตีน ดังนั้นการทดลองทุกครั้งจึงปอกเปลือกต้นสับปะรดก่อนทำการสกัดแยกโบรมิเลน

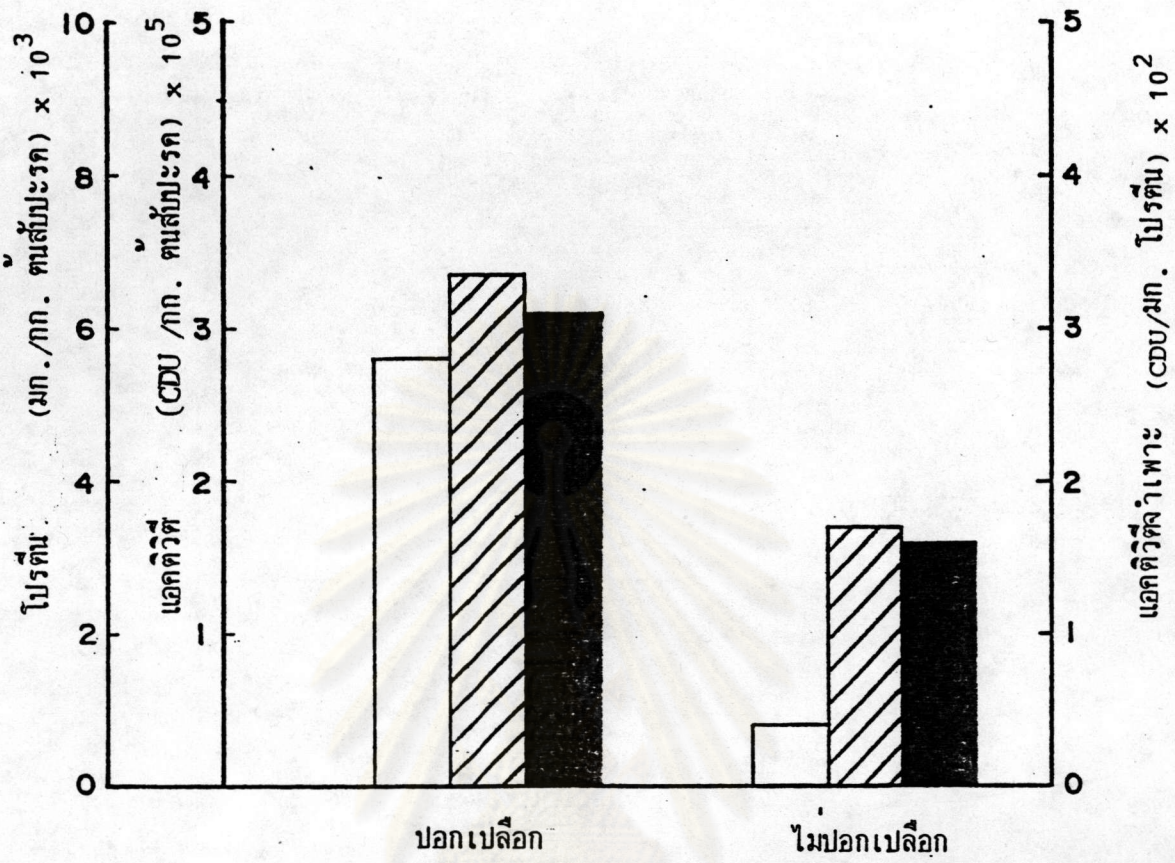


รูปที่ 17 เปรียบเทียบระยะเวลาการเก็บต้นสับปะรดที่อุณหภูมิ 4°ซ. และอุณหภูมิห้อง

● % แอคติวิตีที่ได้จากการวิเคราะห์ทันทีหลังจากเก็บมาจากไร่

○—○ % แอคติวิตีที่เหลือที่อุณหภูมิ 4° ซ.

△—△ % แอคติวิตีที่เหลือที่อุณหภูมิห้อง



รูปที่ 18 เปรียบเทียบการสกัดเอนไซม์จากต้นสับประรดที่ปอกเปลือกและไม่ปอกเปลือก

□ แอคติวิตี

▨ โปรตีน

■ แอคติวิตีจำเพาะ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 การสกัดแยกโบรมิเลนด้วยวิธีสกัดแบบขั้นตอนเดียว

3.3.1 การสกัดแยกด้วยน้ำกลั่น

ทดลองตามวิธีทดลองข้อ 2.12.1 แปรเปลี่ยนอัตราส่วนปริมาตรน้ำกลั่นต่อต้นสับปะรดเท่ากับ 1:2, 1:1, 2:1 และ 3:1 ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 19 พบว่าเอนไซม์ที่สกัดแยกได้มีแอคติวิตี โปรตีนและแอคติวิตีจำเพาะมีค่าสูงเมื่อสกัดแยกโดยใช้ปริมาตรน้ำต่อต้นสับปะรดในอัตราส่วน 1:1 ซึ่งมีค่าสูงกว่าเมื่อใช้อัตราส่วน 1:2 และเมื่อเพิ่มปริมาณน้ำเป็นอัตราส่วน 2:1 แอคติวิตีจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยและเริ่มคงที่ถึงแม้จะเพิ่มปริมาณน้ำที่ใช้สกัดแยกเอนไซม์มากขึ้น เช่นที่อัตราส่วน 3:1 เป็นต้น โดยจะมีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ 8.8×10^5 CDU/กก.ต้นสับปะรด โปรตีน 2.9×10^3 CDU/กก.ต้นสับปะรด และแอคติวิตีจำเพาะ 3×10^2 CDU/มก.โปรตีน ดังนั้นเลือกใช้อัตราส่วนน้ำต่อต้นสับปะรดเป็น 2:1 ในการสกัดแยกโบรมิเลนจากต้นสับปะรด

3.3.2 เวลาในการสกัดแยกเอนไซม์

ทดลองตามวิธีทดลองข้อ 2.12.2 แปรเปลี่ยนเวลาในการสกัดแยกเอนไซม์เป็น 1, 3, 5, 10, 15, 30, 45 และ 60 นาที ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 20 พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์จะสูงขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อเริ่มการสกัดแยกจาก 1 จนถึง 10 นาที โดยแอคติวิตีมีค่าสูงสุดประมาณ 2.9×10^5 CDU/กก.ต้นสับปะรด เมื่อใช้เวลาสกัดแยกนาน 5 นาที แอคติวิตีเริ่มคงที่ตั้งแต่นาทีที่ 15 ของการสกัดแยกเอนไซม์เป็นต้นไป ปริมาณโปรตีนจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อเพิ่มเวลาในการสกัดแยกเอนไซม์ ส่วนแอคติวิตีจำเพาะมีค่าสูงในช่วงการสกัดแยกเอนไซม์ที่เวลานาน 5 นาที มีค่าประมาณ 2×10^2 CDU/มก.โปรตีน หลังจากนั้นแอคติวิตีจำเพาะเริ่มลดลงเรื่อย ๆ ดังนั้นจึงเลือกใช้เวลาในการสกัดแยกเอนไซม์ที่เวลา 5 นาที

3.3.3 พีเอชที่ใช้สกัดแยกเอนไซม์

ทดลองตามวิธีทดลองข้อ 2.12.3 แปรเปลี่ยนพีเอชของการสกัดแยกเอนไซม์เป็น 3.5, 4.5, 5.5, 6.5 และ 7.5 ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 21 พบว่าเมื่อเพิ่มพีเอชในการสกัดแยกเอนไซม์จาก 3.5 - 5.5 แอคติวิตีของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ แต่หลังจากพีเอช 6.5 - 7.5 แอคติวิตีค่อนข้างคงที่มีค่าประมาณ 8.6×10^5 CDU/กก.ต้นสับปะรด ปริมาณโปรตีนมีค่าเพิ่มขึ้นในช่วงพีเอชของการสกัดเป็น 3.5 - 5.5 หลังจากนั้นเริ่มลดลงและคงที่ที่พีเอช 6.5 - 7.5 โดยมีปริมาณโปรตีนประมาณ 9.8×10^3 มก./กก.ต้นสับปะรด ส่วนแอคติวิตีจำเพาะมีค่าสูงสุดที่พีเอชของการสกัดเป็น 6.5 มีค่าประมาณ

4.4×10^2 CDU/มก.โปรตีน ดังนั้นเลือกใช้พีเอชในการสกัดแยกเอนไซม์เป็น 6.5

3.3.4 สารละลายบัฟเฟอร์โปแตสเซียมฟอสเฟต

จากผลการทดลองข้อ 3.3.3 พบว่าพีเอชที่เหมาะสมในการสกัดแยกเอนไซม์คือพีเอช 6.5 จึงได้ศึกษาต่อถึงความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 6.5 ทดลองตามวิธีทดลองข้อ 2.12.4 แปรเปลี่ยนความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์โปแตสเซียม-ฟอสเฟตพีเอช 6.5 เป็น 0.05, 0.10, 0.20, 0.25 และ 0.50 โมลาร์ ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 22 พบว่าเมื่อสกัดแยกเอนไซม์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.05 - 0.2 โมลาร์ แอคติวิตีของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ และคงที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์เป็น 0.2 - 0.5 โมลาร์ โดยแอคติวิตีของเอนไซม์มีค่าสูงสุด 8.7×10^5 CDU/กก.ต้นสับปะรด ปริมาณโปรตีนสูงสุดเท่ากับ 2×10^3 มก./กก.ต้นสับปะรด และแอคติวิตีจำเพาะมีค่า 4.3×10^2 CDU/มก.โปรตีน ดังนั้นจึงเลือกสารละลายบัฟเฟอร์โปแตสเซียมฟอสเฟตพีเอช 6.5 ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ในการสกัดแยกเอนไซม์

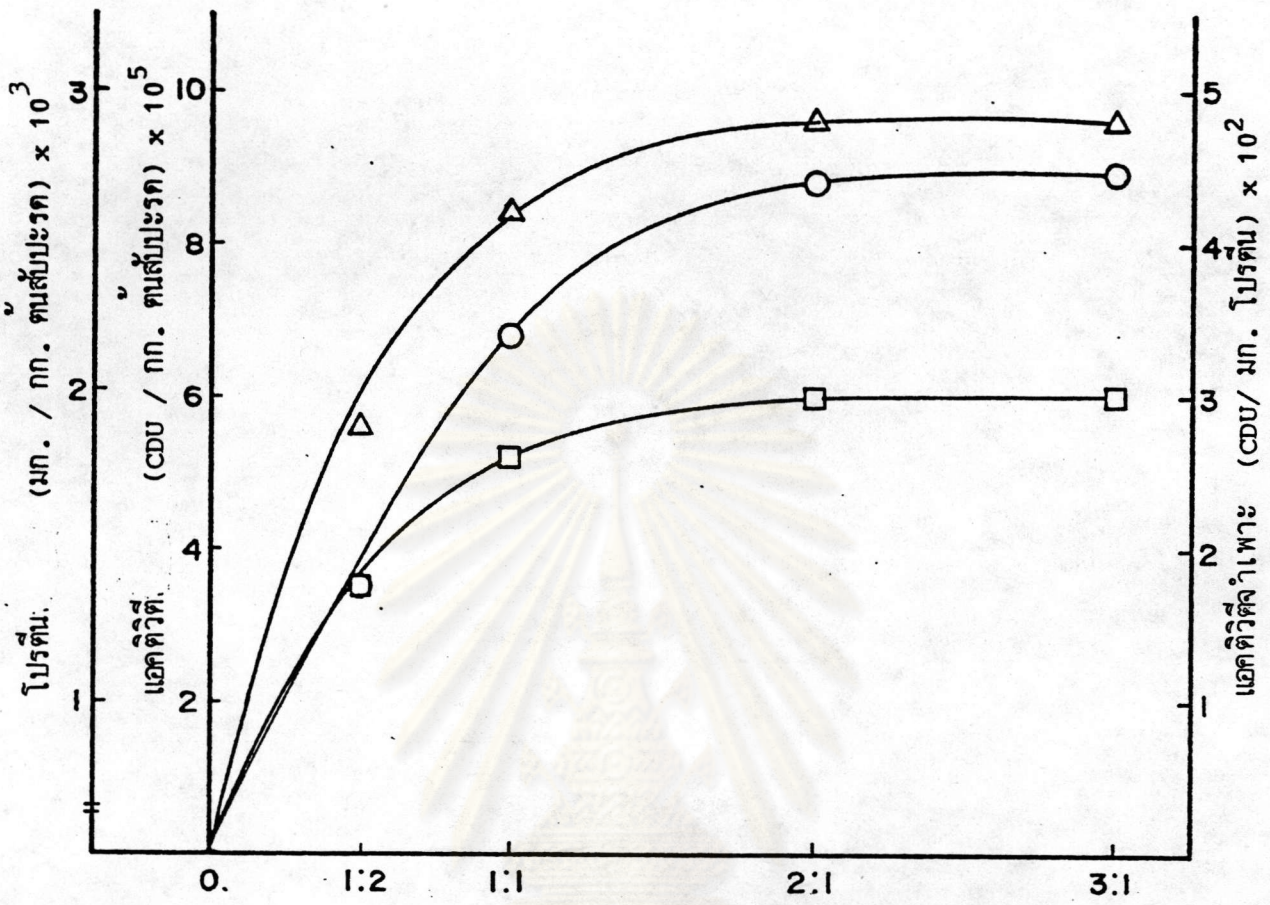
3.3.5 สารละลายโซเดียมคลอไรด์

ทดลองตามวิธีทดลองข้อ 2.12.4 แปรเปลี่ยนความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เป็น 0.05, 0.10, 0.20, 0.25 และ 0.50 โมลาร์ ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 23 พบว่าการสกัดแยกเอนไซม์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.05 - 0.2 โมลาร์ แอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ และเริ่มคงที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ โดยมีค่าแอคติวิตีสูงสุดประมาณ 10×10^5 CDU/กก.ต้นสับปะรด ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมคลอไรด์โดยให้ค่าโปรตีนสูงสุด 3.3×10^3 มก./กก.ต้นสับปะรด ส่วนแอคติวิตีจำเพาะมีค่าสูงสุดประมาณ 3.4×10^2 CDU/มก.โปรตีน เมื่อใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.05 - 0.20 โมลาร์ ดังนั้นเลือกใช้สารละลายโซเดียม-คลอไรด์ 0.2 โมลาร์ ในการสกัดแยกเอนไซม์

3.3.6 อุณหภูมิของการสกัดแยกเอนไซม์

ทดลองตามวิธีทดลองข้อ 2.12.5 แปรเปลี่ยนอุณหภูมิของน้ำกลั่นที่ใช้สกัดแยกเอนไซม์เป็น 10, 30, 35, 40 และ 60° ซ. ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 24 พบว่าอุณหภูมิของน้ำกลั่นที่ใช้สกัดแยกไม่มีผลต่อการสกัดแยกเอนไซม์จากต้นสับปะรด เพราะแอคติวิตีของเอนไซม์ โปรตีน และแอคติวิตีจำเพาะมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากเมื่อแปรเปลี่ยนอุณหภูมิของการสกัดแยก โดยมีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ประมาณ 5.2×10^5 CDU/กก.ต้นสับปะรด โปรตีนประมาณ 1.5×10^3 มก./กก.ต้นสับปะรด และแอคติวิตีจำเพาะ 3.3×10^2 CDU/มก.โปรตีน ดังนั้นเลือกสกัดแยกเอนไซม์จากต้นสับปะรดที่อุณหภูมิห้อง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

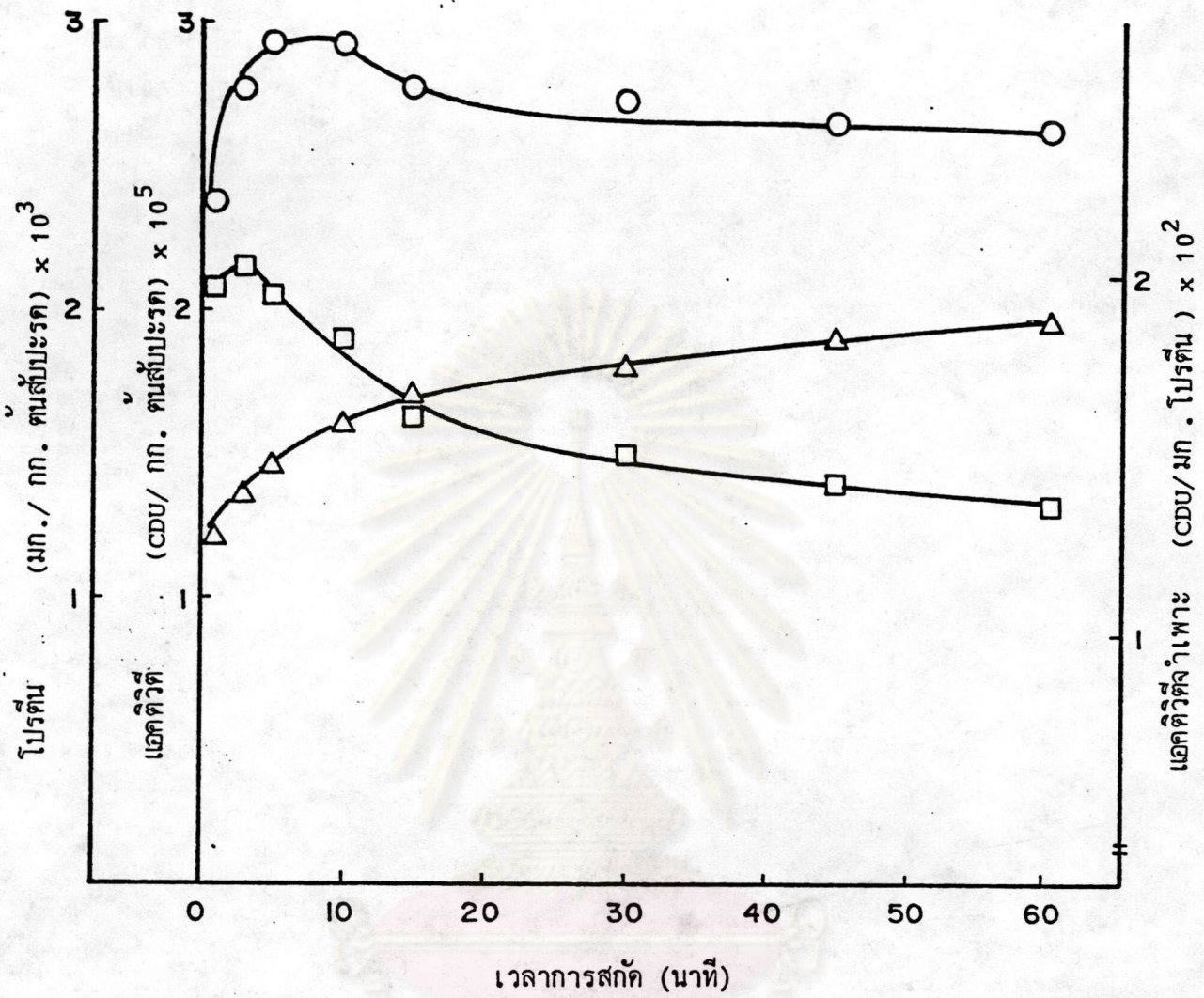


รูปที่ 19 เปรียบเทียบอัตราส่วนของน้ำที่ผสมกับต้นสับปะรดในการสกัดเอนไซม์จากต้นสับปะรดด้วยวิธีสกัดแบบขั้นตอนเดียว

○—○ แอคติวิตี

△—△ โปรตีน.

□—□ แอคติวิตีจำเพาะ

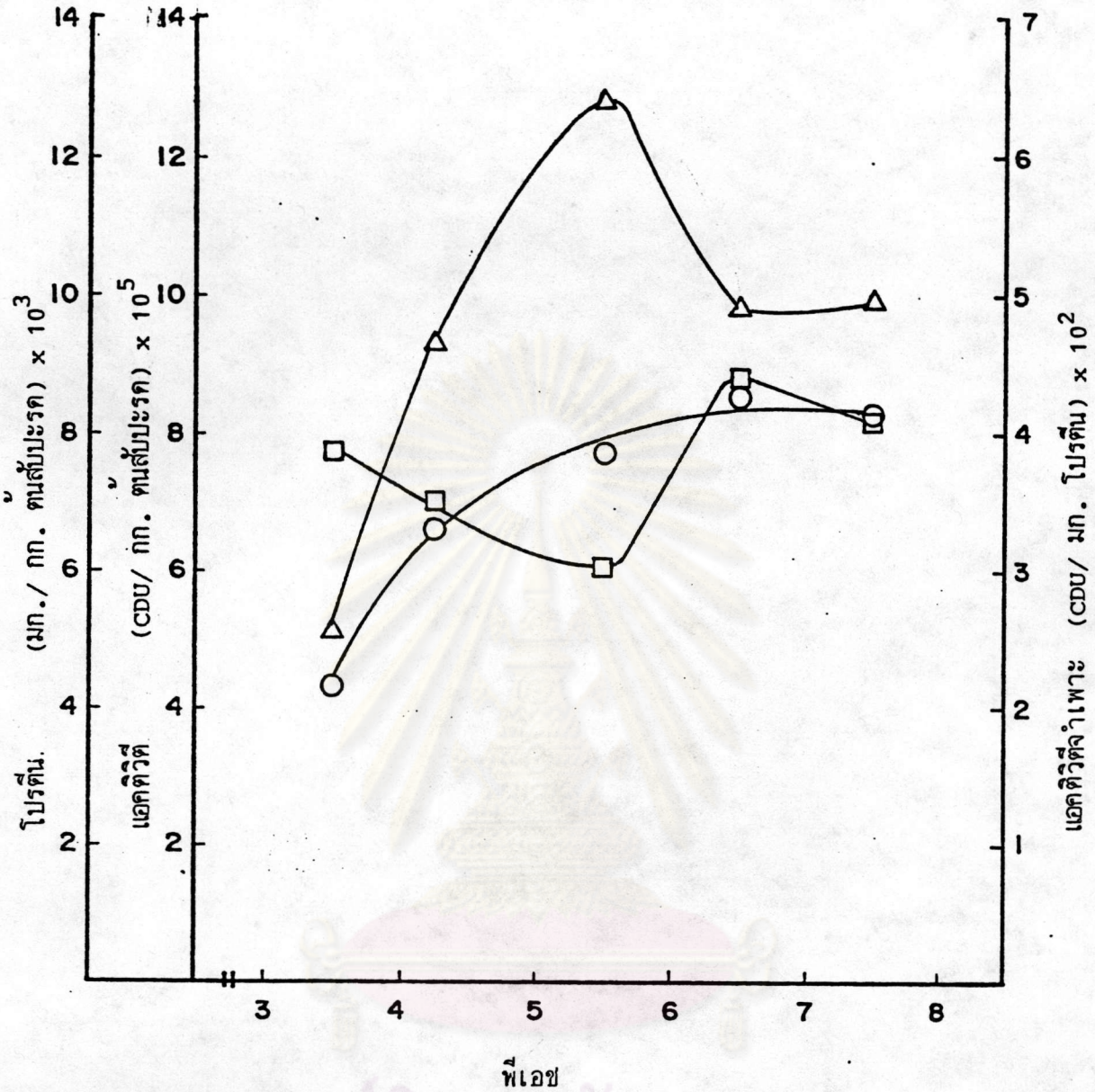


รูปที่ 20 เปรียบเทียบเวลาในการสกัดเอนไซม์จากต้นสับปะรดด้วยวิธีสกัดแบบขั้นตอนเดียว

○—○ แอคติวิตี

△—△ โปรตีน

□—□ แอคติวิตีจำเพาะ

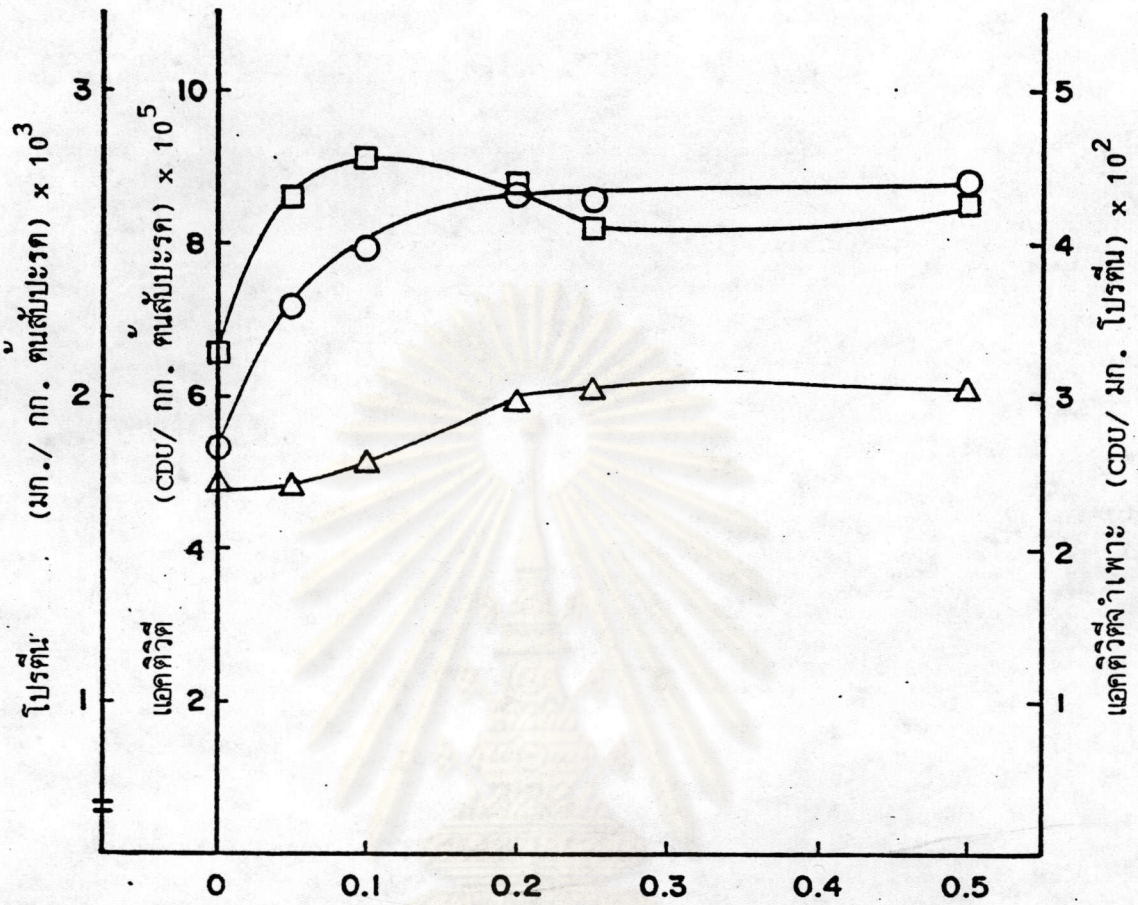


รูปที่ 21 เปรียบเทียบพีเอชที่มีผลต่อการสกัดเอนไซม์จากต้นสับประรดด้วยวิธีสกัดแบบขั้นตอนเดียว

○—○ แอคติวิตี.

△—△ โปรตีน

□—□ แอคติวิตีจำเพาะ

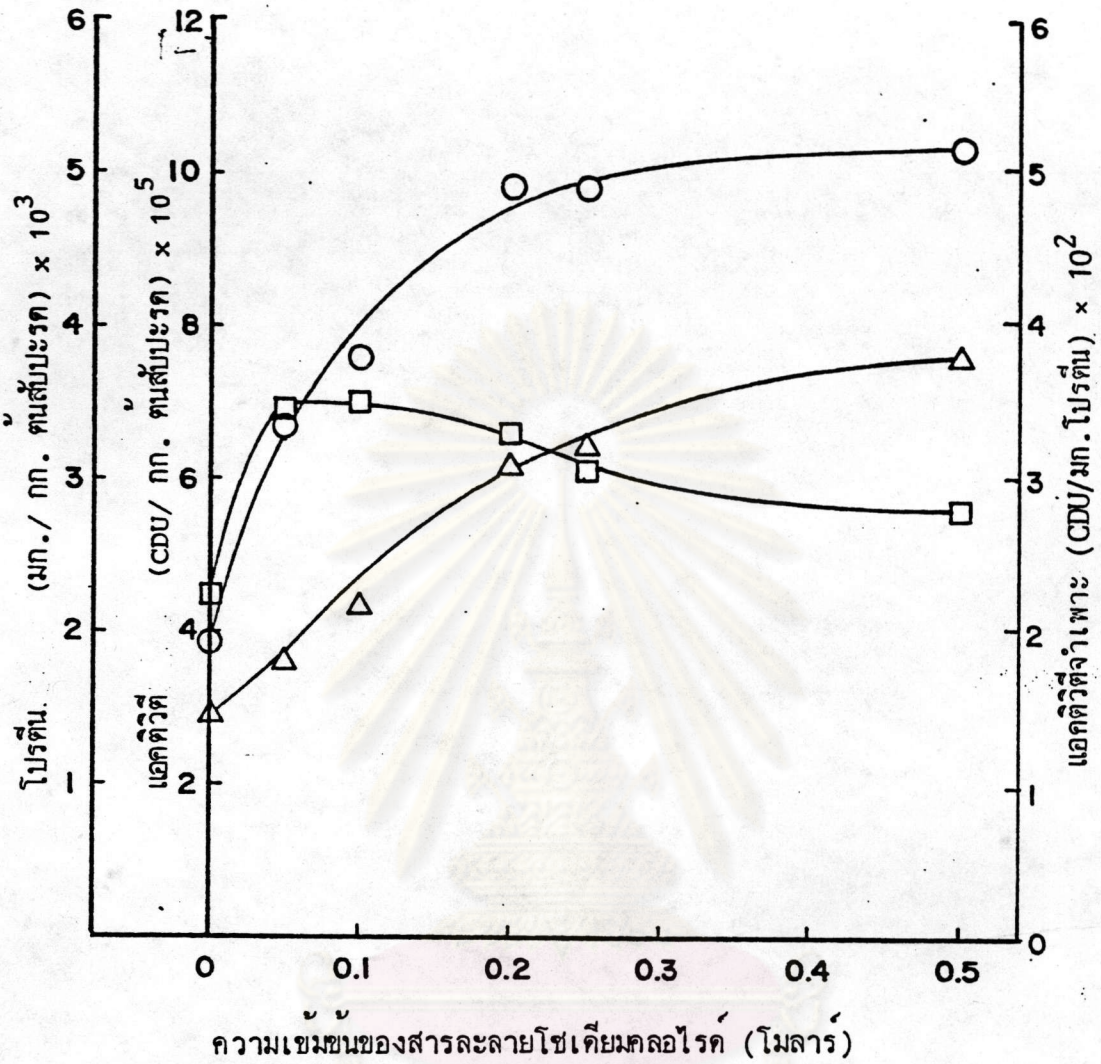


รูปที่ 22 เปรียบเทียบสารละลายบัฟเฟอร์โปแตสเซียมฟอสเฟต พี เอช 6.5 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการสกัดเอนไซม์จากต้นสับปะรดด้วยวิธีสกัดแบบขั้นตอนเดียว

○—○ แอคติวิตี

△—△ โปรตีน

□—□ แอคติวิตีจำเพาะ

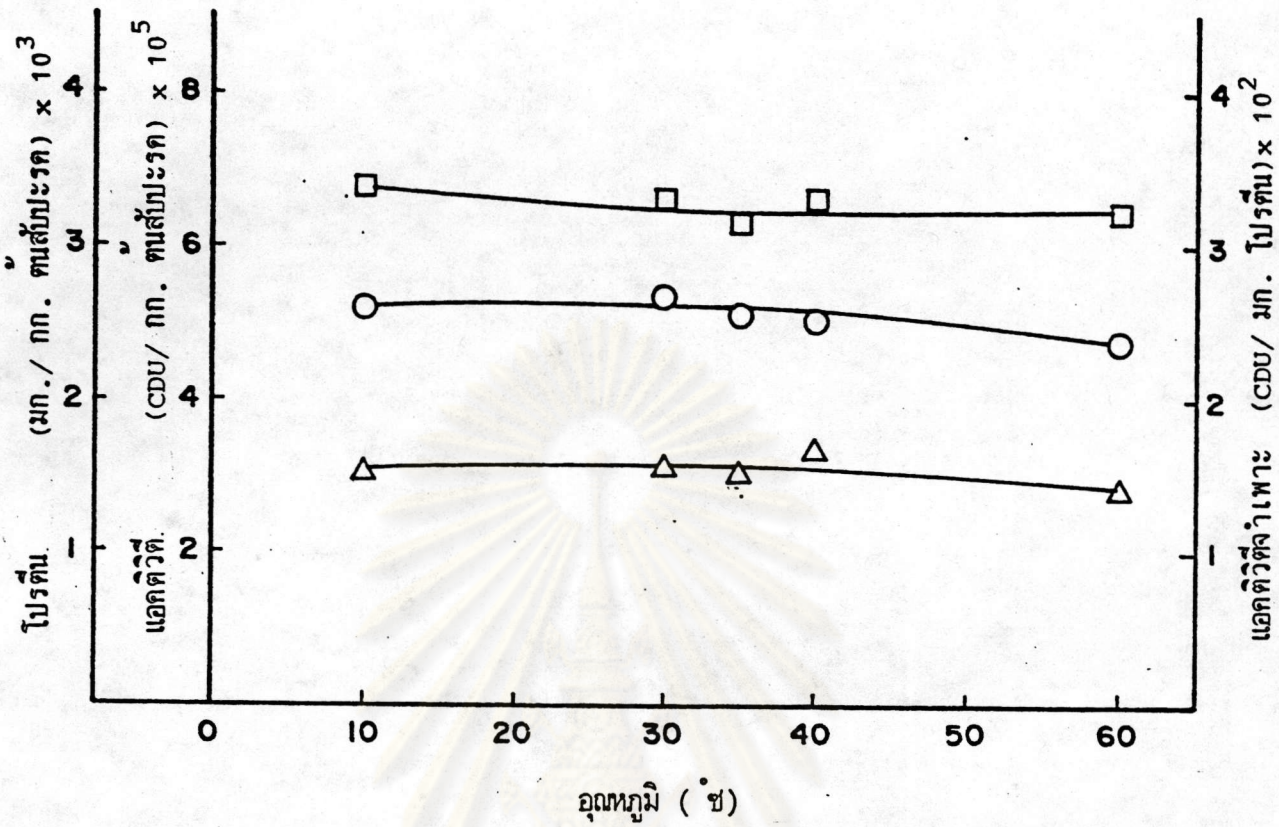


รูปที่ 23 เปรียบเทียบสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการสกัดเอนไซม์จากต้นสับประรดด้วยวิธีสกัดแบบขั้นตอนเดียว

○—○ แอคติวิตี

△—△ โปรตีน

□—□ แอคติวิตีจำเพาะ



รูปที่ 24 เปรียบเทียบอุณหภูมิที่มีผลต่อการสกัดเอนไซม์จากต้นสับปะรดด้วยวิธีสกัดแบบขั้นตอนเดียว

○—○ แอคติวิตี

△—△ โปรตีน

□—□ แอคติวิตีจำเพาะ

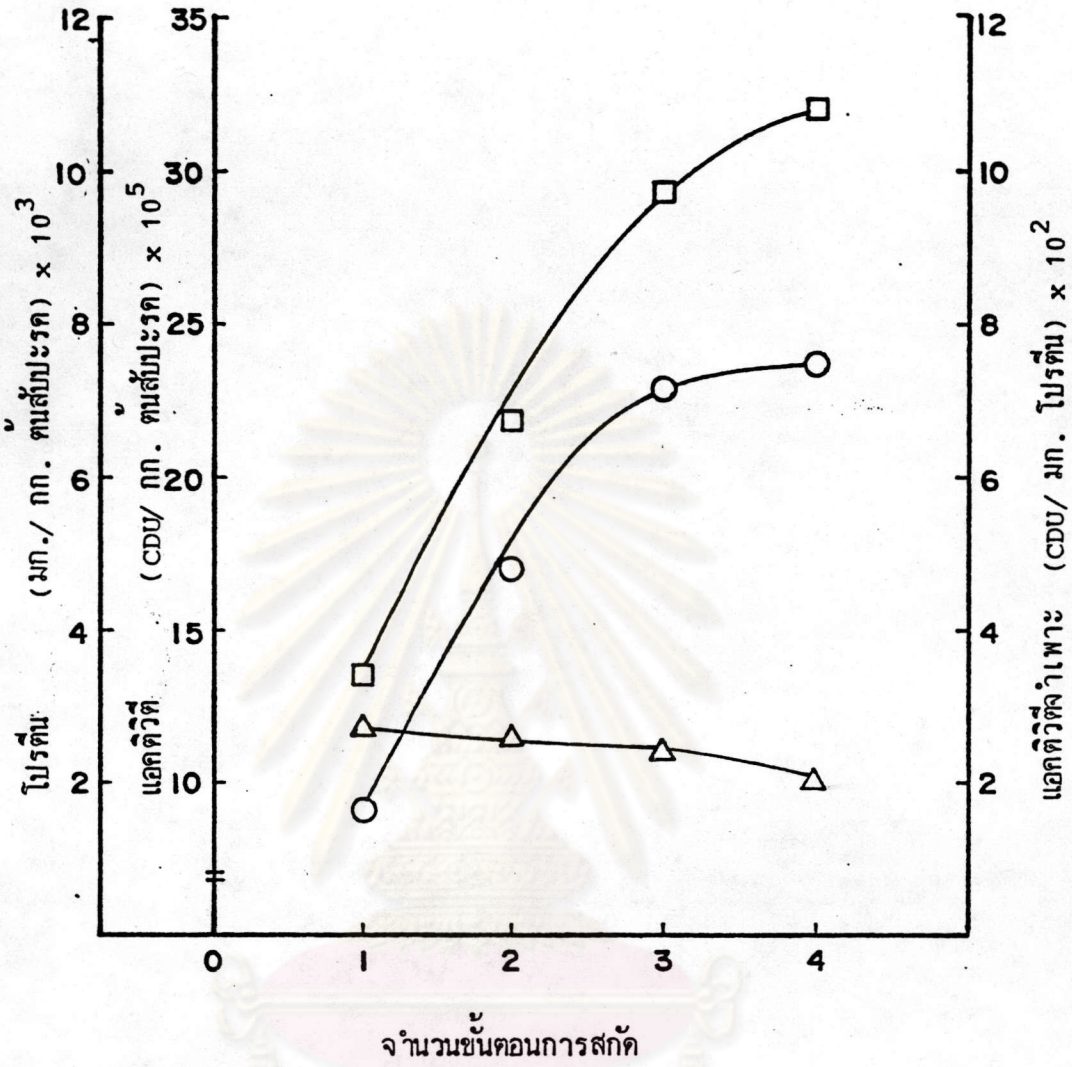
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4 การสกัดแยกโบรมิเลนด้วยวิธีสกัดแบบต่อเนื่องและสวนทาง

ศึกษาขั้นตอนการสกัดแยกโดยทำตามวิธีทดลองข้อ 2.13 โดยสกัดแยกโบรมิเลนจากต้นสับปะรดตามขั้นตอน 1, 2, 3 และ 4 ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 25 พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นตามจำนวนขั้นตอนการสกัดแยกเอนไซม์ แต่ที่การสกัดแยกเอนไซม์ 3-4 ขั้นตอน เอนไซม์ที่ได้จะมีแอคติวิตีใกล้เคียงกันคือ 24 x 10^5 CDU/กก.ต้นสับปะรด และปริมาณโปรตีนของการสกัดแยกที่ขั้นตอนที่ 3 มีค่า 9.8 x 10^3 มก./กก.ต้นสับปะรด ดังนั้นในการสกัดแยกโบรมิเลนด้วยวิธีการสกัดแบบต่อเนื่องและสวนทางเลือกใช้การสกัด 3 ขั้นตอนในแต่ละแถวของการสกัดแยก

ศึกษาจำนวนแถวการสกัดแยกโดยทำตามวิธีทดลองข้อ 2.13 แปรเปลี่ยนจำนวนแถวที่สกัดเป็น 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 26 พบว่าเมื่อเพิ่มจำนวนแถวการสกัดจากแถวที่ 1 จนถึงแถวที่ 3 แอคติวิตีของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนลดลงอย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นจะเริ่มคงที่จนกระทั่งถึงแถวการสกัดที่ 6 โดยมีค่าแอคติวิตี 2.2 x 10^6 CDU./กก. ต้นสับปะรด และโปรตีน 4.5 x 10^3 มก./กก.ต้นสับปะรด สำหรับแอคติวิตีจำเพาะเริ่มคงที่ตั้งแต่แถวการสกัดที่ 2 เป็นต้นไป ดังนั้นในการสกัดแยกโบรมิเลนแบบต่อเนื่องและสวนทางเลือกใช้น้ำต้นสับปะรดสกัดแยกแถวที่ 3 เป็นต้นไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

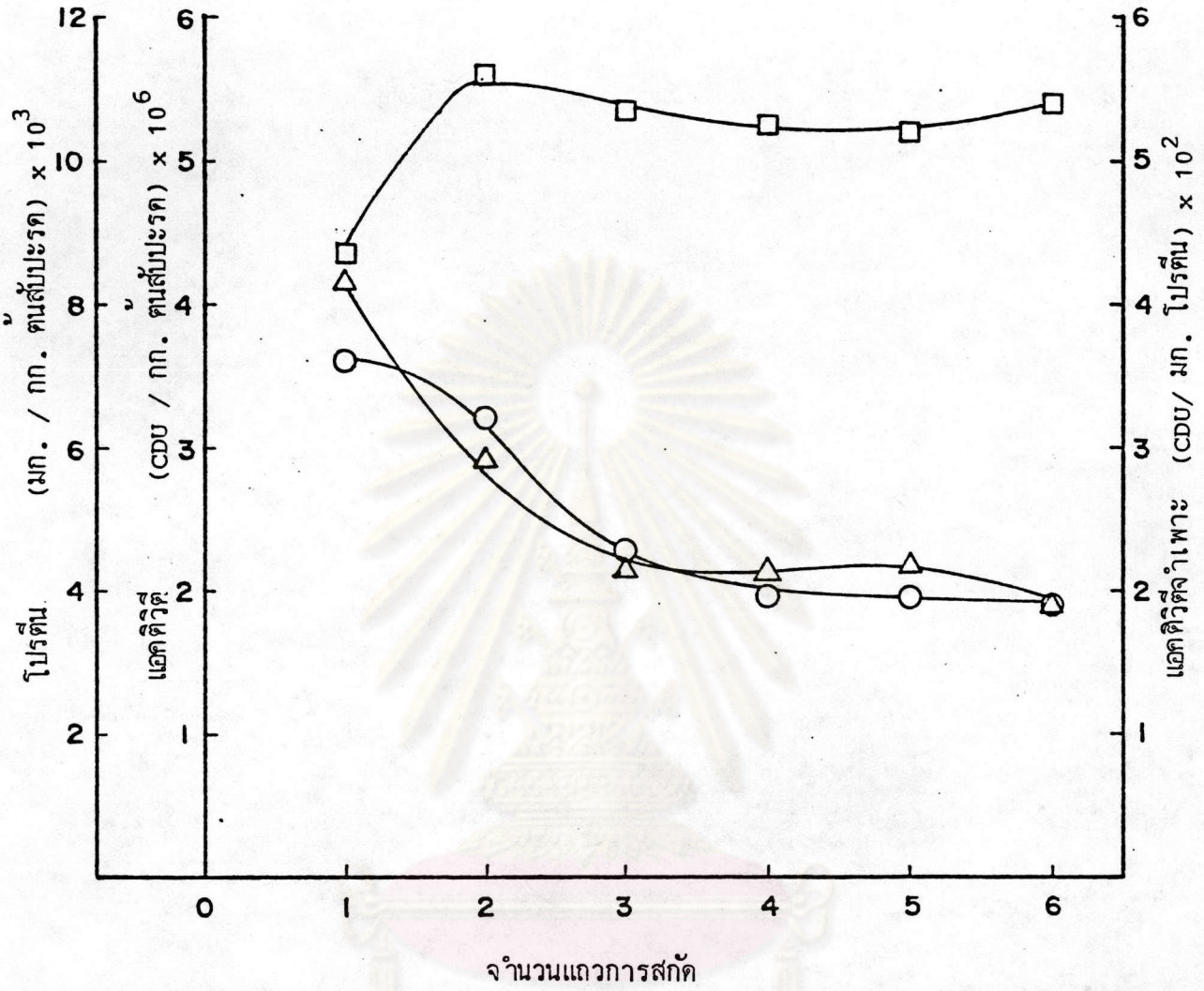


รูปที่ 25 ผลการศึกษาจำนวนขั้นตอนการสกัดเอนไซม์จากต้นสับปะรดด้วยวิธีสกัดแบบต่อเนื่องและส่วนทาง

○—○ แอคติวิตี

□—□ โปรตีน

△—△ แอคติวิตีจำเพาะ



รูปที่ 26 ผลการศึกษาจำนวนแถวการสกัดเอนไซม์จากต้นส้มปะรด ด้วยวิธีสกัดแบบต่อเนื่องและสวนทาง

○—○ แอคติวิตี

△—△ โปรตีน

□—□ แอคติวิตีจำเพาะ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

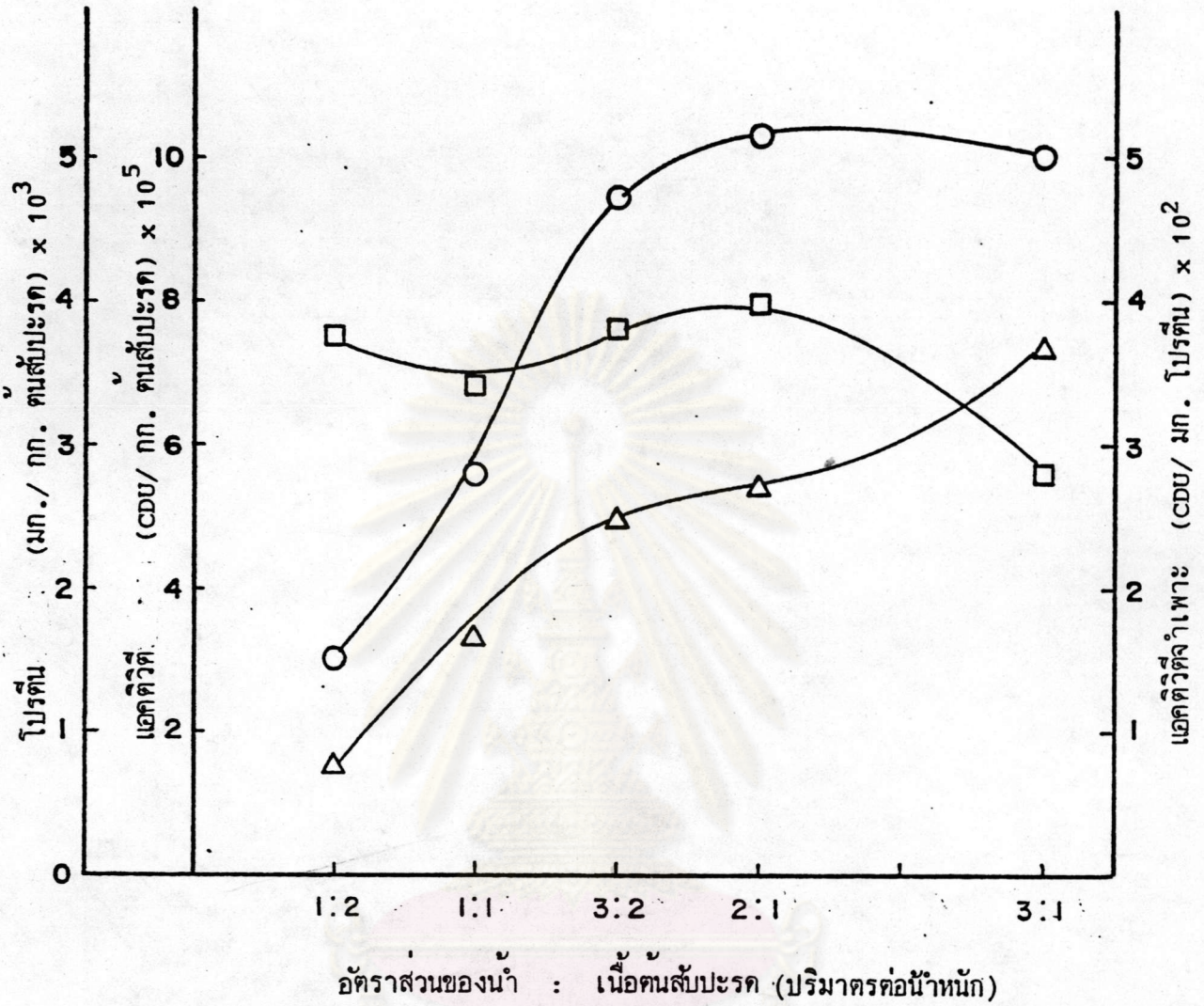
3.5 การสกัดแยกโบรมิเลนด้วยเครื่องตีปั่นแบบตั้งโต๊ะ

3.5.1 อัตราส่วนของน้ำที่ใช้ตีปั่นต้นสับปะรด

ทดลองตามวิธีทดลองข้อ 2.14.1 แปรเปลี่ยนอัตราส่วนน้ำต่อต้นสับปะรด เป็น 1:2, 1:1, 3:2, 2:1 และ 3:1 ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 27 พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้นตามอัตราส่วนของน้ำต่อต้นสับปะรดจาก 1:2 จนถึง 2:1 ซึ่งได้แอคติวิตีสูงสุด 10×10^5 CDU./กก.ต้นสับปะรด หลังจากนั้นแอคติวิตีเริ่มคงที่ถึงแม้จะเพิ่มปริมาณน้ำที่ใช้ตีปั่น ส่วนปริมาณโปรตีนนั้นเพิ่มขึ้นตามปริมาณน้ำที่ใช้ตีปั่น โดยให้ปริมาณโปรตีนสูงสุด 3.6×10^3 มก./กก.ต้นสับปะรด การผันแปรปริมาณน้ำที่ใช้ตีปั่นมีผลต่อแอคติวิตีจำเพาะเพียงเล็กน้อย แต่เมื่อเพิ่มอัตราส่วนน้ำเป็น 3:1 แอคติวิตีจำเพาะจะลดลงอย่างรวดเร็ว จาก 3.8×10^2 CDU./มก.โปรตีน เหลือเพียง 2.8×10^2 CDU/มก.โปรตีน ดังนั้นเลือกใช้อัตราส่วนน้ำต่อเนื้อต้นสับปะรดเป็น 2:1 ในการสกัดแยกเอนไซม์ด้วยเครื่องตีปั่นแบบตั้งโต๊ะ

3.5.2 เวลาตีปั่นต้นสับปะรด

ทดลองตามวิธีทดลองข้อ 2.14.2 แปรเปลี่ยนเวลาในการตีปั่นเป็น 0.5, 1, 2, 3 และ 4 นาที ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 28 พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้นตามเวลาที่ใช้ในการตีปั่นจาก 0.5 - 2 นาที ซึ่งได้แอคติวิตีสูงสุดประมาณ 11×10^5 CDU./กก.ต้นสับปะรด หลังจากนั้นแอคติวิตีค่อย ๆ ลดลงถึงแม้จะเพิ่มเวลาในการตีปั่น ส่วนปริมาณโปรตีนนั้นเพิ่มขึ้นตามเวลาที่ใช้ตีปั่น โดยให้ปริมาณโปรตีนสูงสุดประมาณ 3.2×10^3 มก./กก.ต้นสับปะรด ส่วนแอคติวิตีจำเพาะมีค่าสูงสุด 3.5×10^2 CDU/มก.โปรตีน ที่เวลาการตีปั่น 2 นาที หลังจากนั้นจะค่อย ๆ ลดลง ดังนั้นเลือกใช้เวลาในการตีปั่นต้นสับปะรดนาน 2 นาที

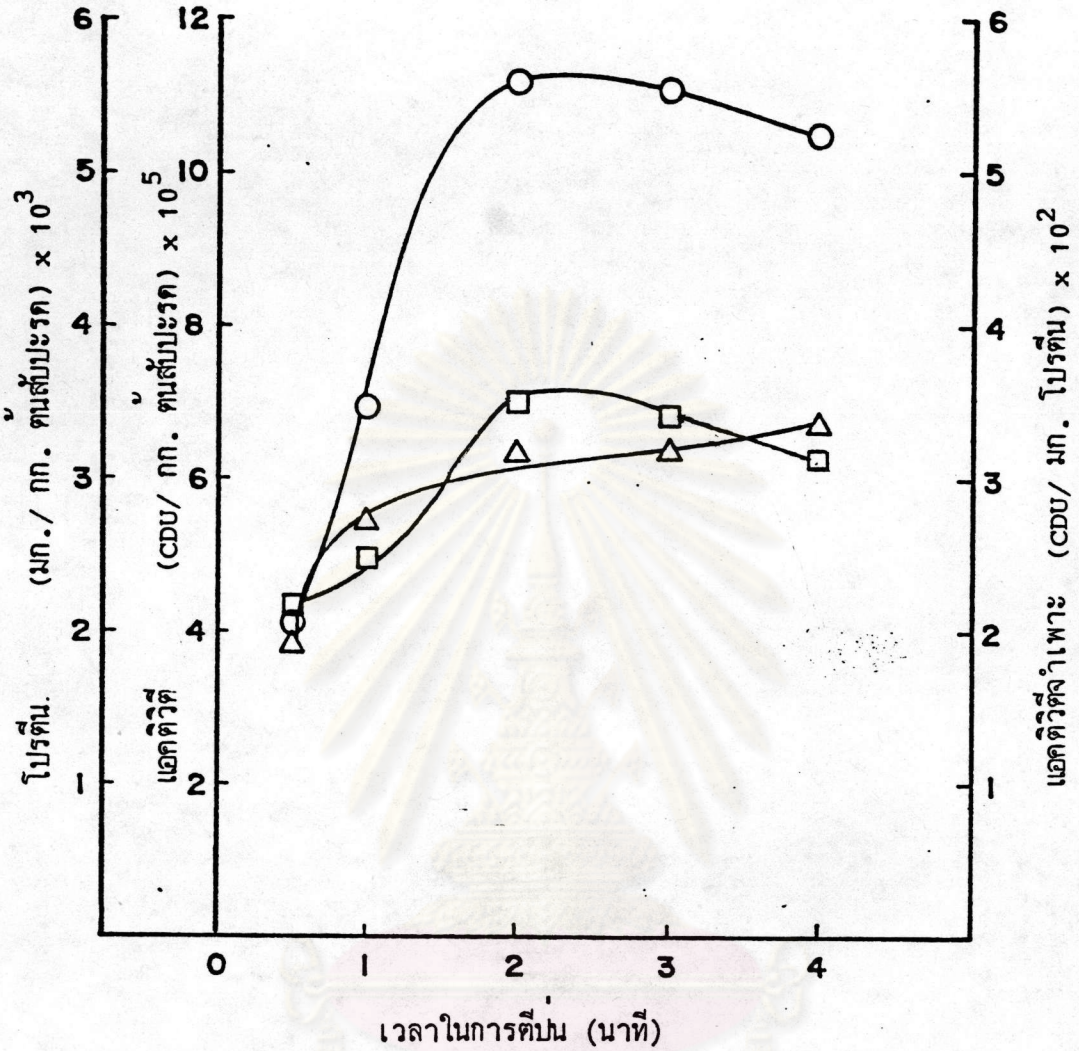


รูปที่ 27 เปรียบเทียบอัตราส่วนของน้ำที่ผสมกับต้นสับปะรดในการสกัดเอนไซม์จากต้นสับปะรดโดยวิธีสกัดด้วยเครื่องตีปั่น

○—○ แอคติวิตี

△—△ โปรตีน

□—□ แอคติวิตีจำเพาะ



รูปที่ 28 เปรียบเทียบเวลาในการสกัดเอนไซม์จากต้นสับปะรดโดยวิธีสกัดด้วยเครื่องตีป่นแบบตั้งโต๊ะ

○—○ แอคติวิตี

△—△ โปรตีน

□—□ แอคติวิตีจำเพาะ

3.6 การบีบต้นสับปะรด

3.6.1 การบีบต้นสับปะรดด้วยเครื่องบีบไฮดรอลิค

ทดลองตามวิธีทดลองข้อ 2.15 แปรเปลี่ยนการทดลองเป็น 4 สภาวะ ดังนี้ สภาวะที่ 1 บีบต้นสับปะรดที่บดหรือหั่นหรือตีป่นทันทีด้วยเครื่องบีบไฮดรอลิค สภาวะที่ 2 บีบต้นสับปะรดที่บดหรือหั่นหรือตีป่นที่แช่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.2 โมลาร์ สภาวะที่ 3 บีบต้นสับปะรดที่บดหรือหั่นหรือตีป่นแล้วแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20^{o} ซ. และสภาวะที่ 4 บีบต้นสับปะรดที่บดหรือหั่นหรือตีป่นซึ่งแช่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.2 โมลาร์ แล้วแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20^{o} ซ. การทดลองทั้ง 4 สภาวะนี้เป็นการทำให้เซลของต้นสับปะรดแตกด้วยวิธีการต่าง ๆ กัน ทำให้เอนไซม์ออกมาในปริมาณมากขึ้น ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 29 - 32 พบว่าเมื่อเปรียบเทียบการบีบต้นสับปะรดที่ผ่านการบดหรือหั่นหรือตีป่นทันทีการหั่นต้นสับปะรดแล้วบีบจะทำให้ต้นสับปะรดที่ได้มีแอคติวิตีสูงที่สุดเมื่อเทียบกับการบดหรือตีป่นต้นสับปะรด และเมื่อเปรียบเทียบการบดหรือหั่นหรือตีป่นต้นสับปะรดในสภาวะอื่น ๆ ก็ให้ผลทำนองเดียวกัน

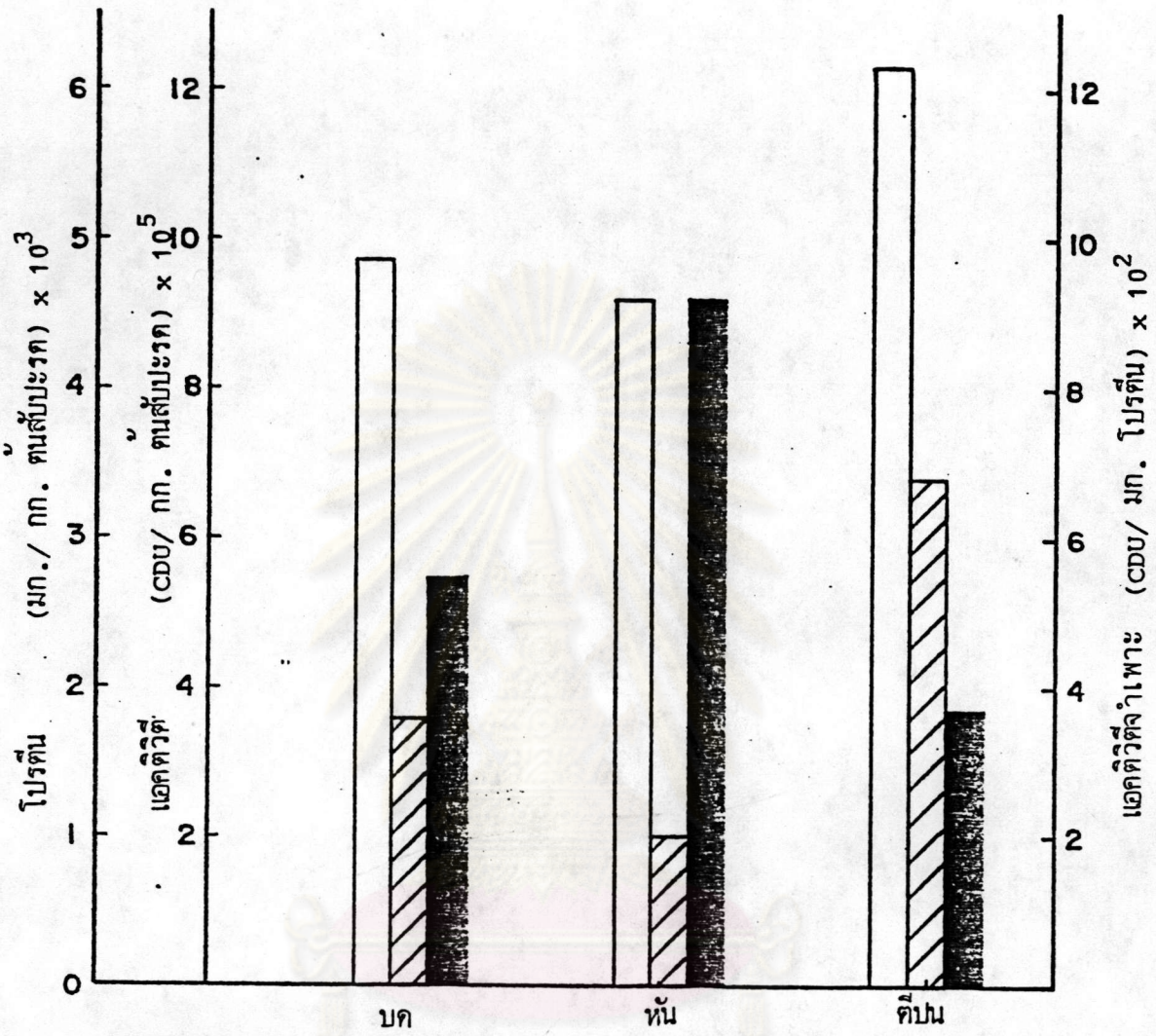
นอกจากนี้พบว่าการบีบต้นสับปะรดที่หั่นในสภาวะที่ 1 และสภาวะที่ 3 จะได้เอนไซม์ที่มีแอคติวิตีจำเพาะสูงกว่าการบีบต้นสับปะรดที่หั่นในสภาวะที่ 2 และสภาวะที่ 4 โดยน้ำที่บีบได้จากต้นสับปะรดที่หั่นในสภาวะที่ 1 และสภาวะที่ 3 แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์มีค่า 9.2×10^{2} และ 9.4×10^{2} CDU/มก.โปรตีน ตามลำดับ ดังนั้นเลือกใช้การบีบต้นสับปะรดที่หั่นแล้วบีบทันทีด้วยเครื่องบีบไฮดรอลิค

3.6.2 การบีบต้นสับปะรดด้วยเครื่องบีบแบบสกรู

ทดลองตามวิธีทดลองข้อ 2.16 บีบต้นสับปะรดครั้งที่หนึ่ง แล้วแยกส่วนกากมาเติมสารละลายโซเดียมเบนโซเอท 0.1% เพื่อป้องกันการบูดเน่าเปื่อยของจุลินทรีย์ที่อาจเกิดขึ้นในกากของต้นสับปะรด แล้วบีบกากต้นสับปะรดซ้ำอีกครั้งหนึ่ง แปรเปลี่ยนอัตราส่วนน้ำหนักกากต่อปริมาตรโซเดียมเบนโซเอทเท่ากับ 4:1, 3:1 และ 2:1 ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 33 พบว่าการบีบกากต้นสับปะรดที่ผสมกับโซเดียมเบนโซเอทในอัตราส่วน 2:1 จะได้เอนไซม์ที่มีแอคติวิตี 17.3×10^{5} CDU/กก.ต้นสับปะรด โปรตีน 1.07×10^{3} มก./กก.ต้นสับปะรด และแอคติวิตีจำเพาะ 1.6×10^{2} CDU/มก.โปรตีน

ซึ่งมีค่าสูงกว่าน้ำที่ได้จากการบีบกากต้นสับปะรดที่ผสมกับโซเดียมเบนโซเอทในอัตราส่วนอื่น ๆ ดังนั้นเลือกใช้น้ำหนักกากต้นสับปะรดต่อปริมาตรโซเดียมเบนโซเอทในอัตราส่วน 2 : 1 ในการบีบกากต้นสับปะรดซ้ำเป็นครั้งที่สองด้วยเครื่องบีบแบบสกรู

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

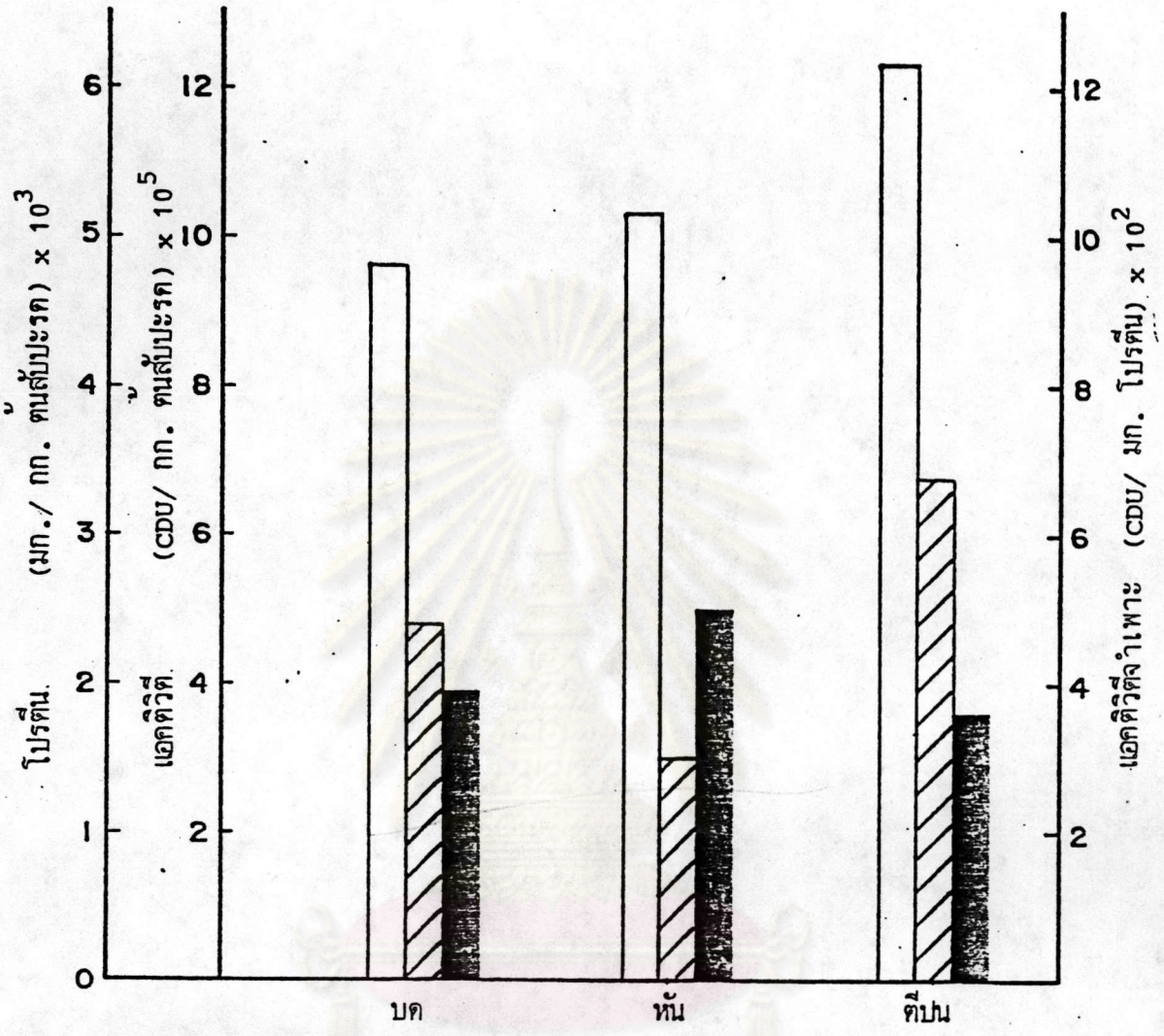


รูปที่ 29 เปรียบเทียบการบีบต้นสับปะรดที่บดหรือหั่นหรือตีป่นทันที ด้วยเครื่องบีบไฮดรอลิค

แอคติวิตี

โปรตีน

แอคติวิตีจำเพาะ



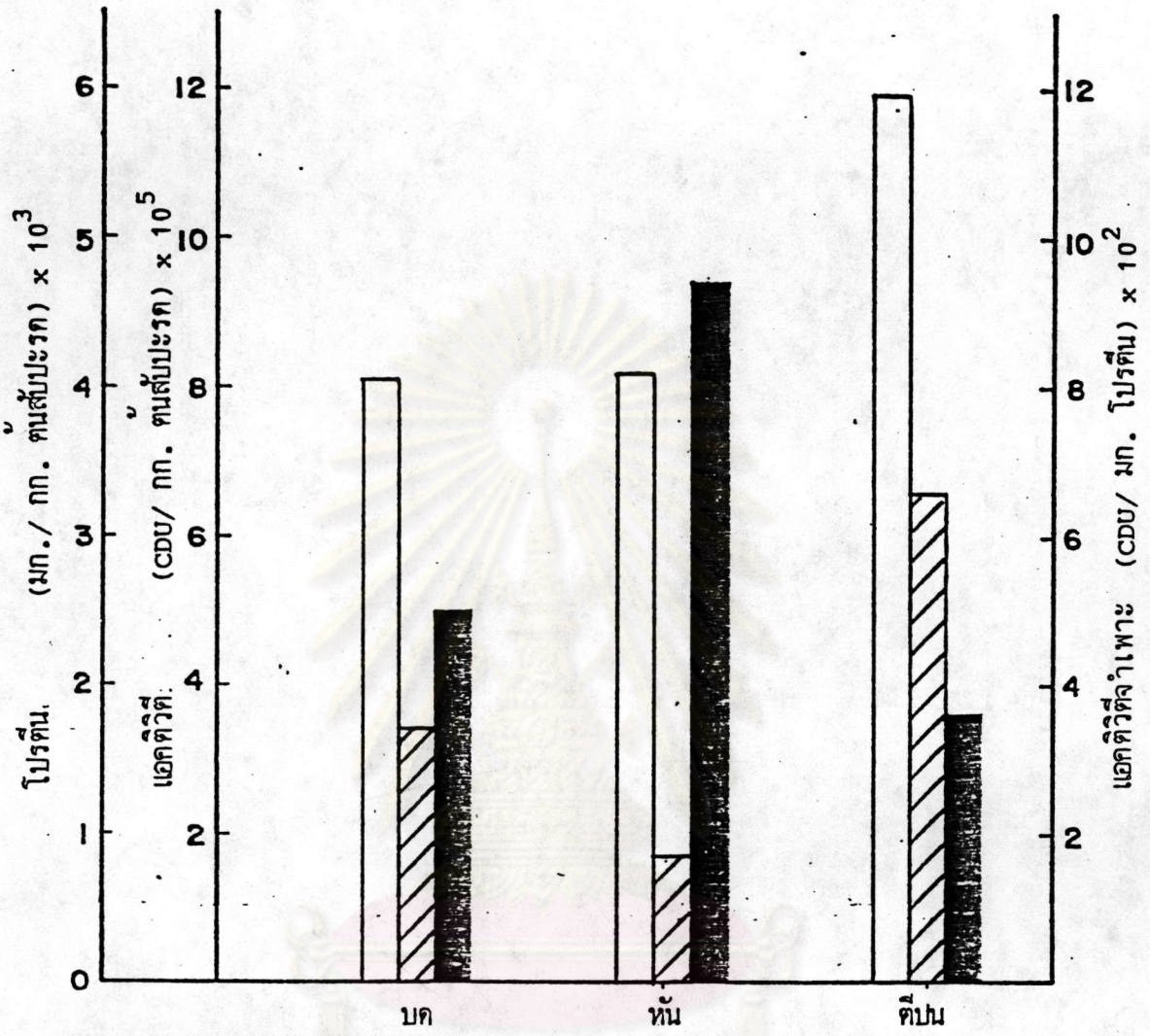
บีบต้นสับปะรดที่แช่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.2 โมลาร์

รูปที่ 30 เปรียบเทียบการบีบต้นสับปะรดที่บดหรือหั่นหรือตีปั่นแล้วแช่ในสารละลาย โซเดียมคลอไรด์ 0.2 โมลาร์ ด้วยเครื่องบีบไฮดรอลิค

□ แอคติวิตี

▨ โปรตีน

■ แอคติวิตีจำเพาะ

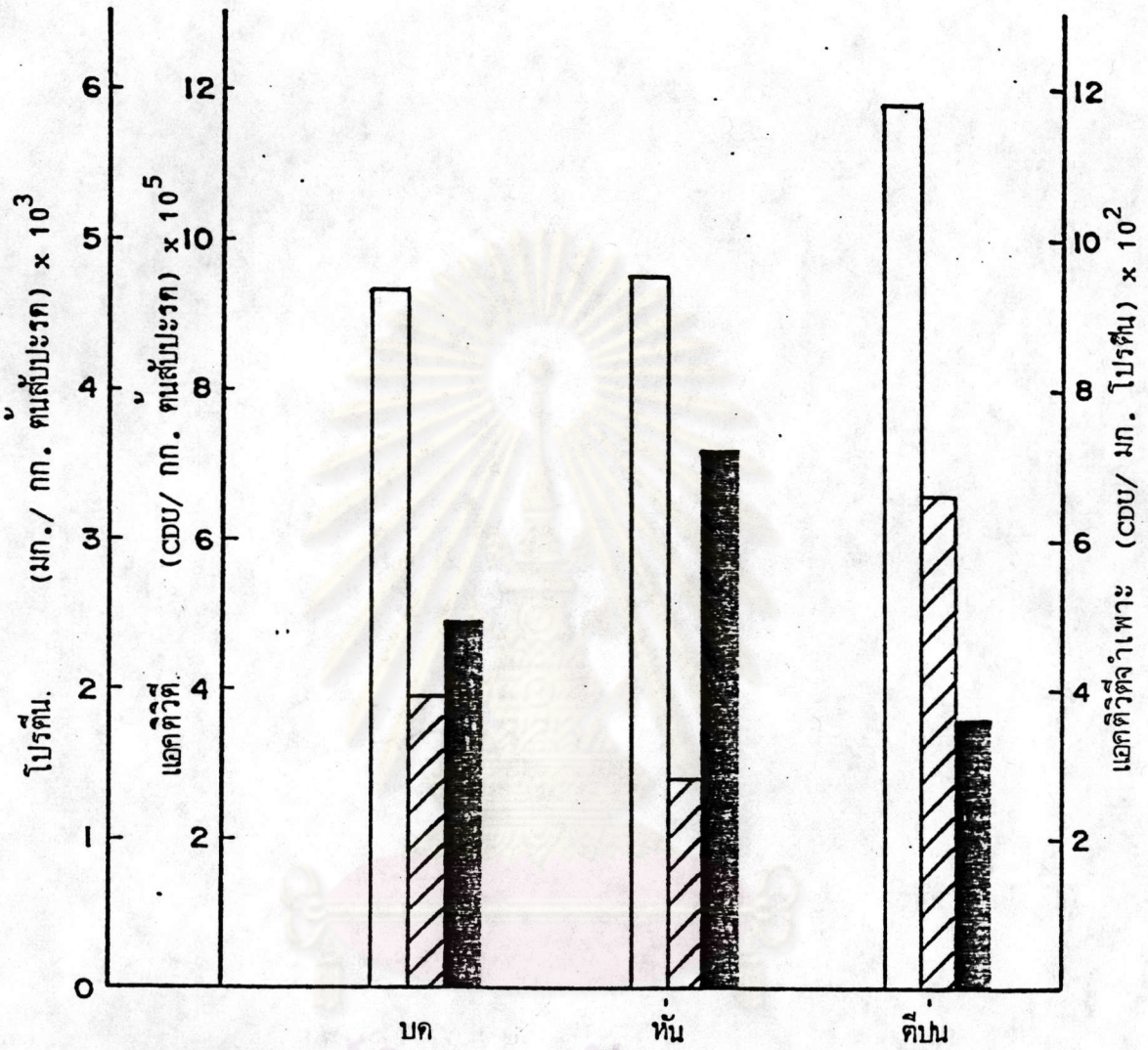


รูปที่ 31 เปรียบเทียบการบีบต้นสับปะรดที่บดหรือหั่นหรือตีป่นแล้วแช่แข็ง ที่อุณหภูมิ -20 °ซ นาน 4 ชั่วโมง ด้วยเครื่องบีบไฮดรอลิค

□ แอคติวิตี

▨ โปรตีน

■ แอคติวิตีจำเพาะ



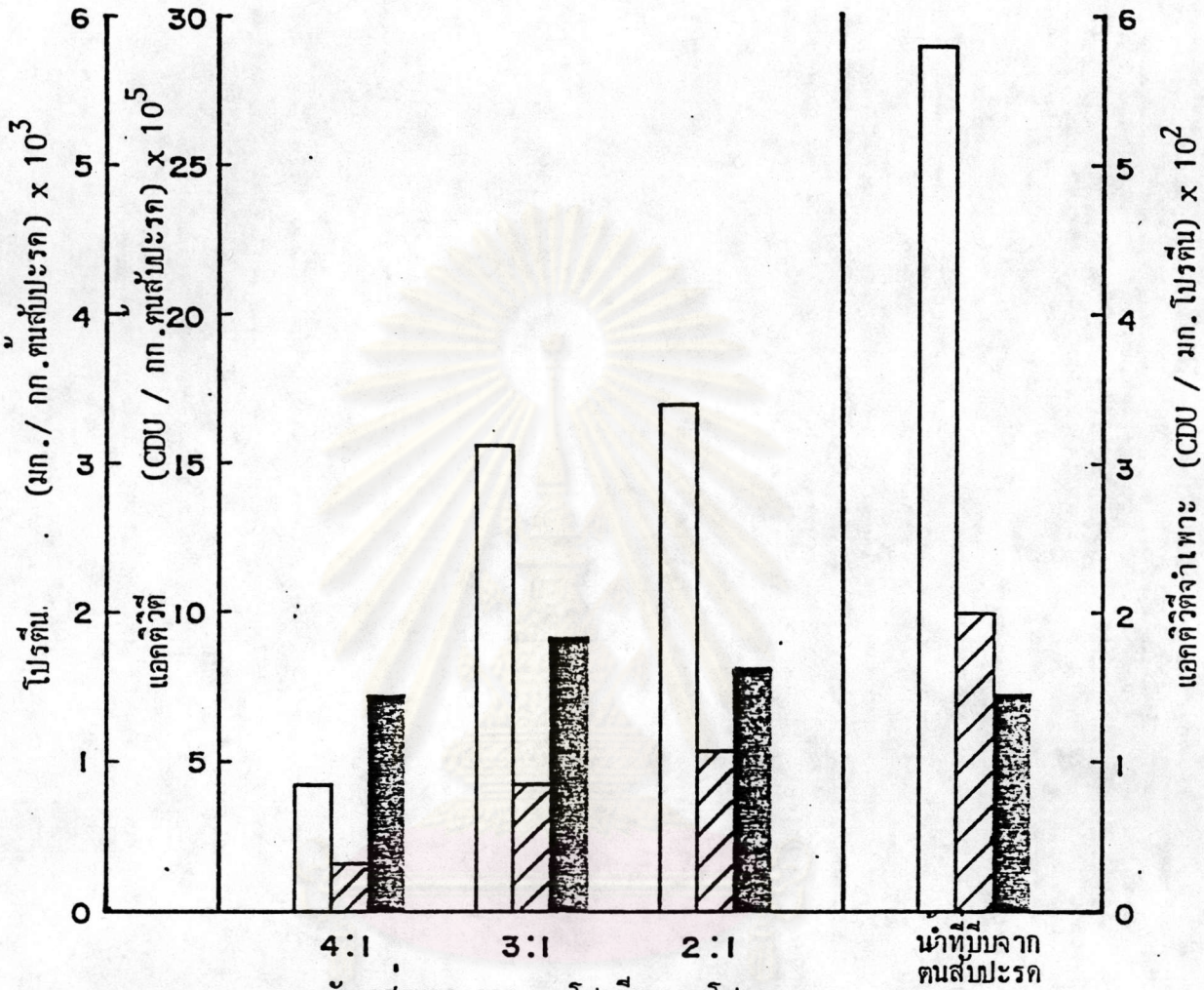
บีบต้นสับประรดที่แช่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.2 โมลาร์ และแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 °ซ

รูปที่ 32 เปรียบเทียบการบีบต้นสับประรดที่บดหรือหั่นหรือตีป่นแล้วแช่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.2 โมลาร์ และนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 °ซ นาน 4 ชั่วโมง ด้วยเครื่องบีบไฮดรอลิค

□ แอคติวิตี

▨ โปรตีน.

■ แอคติวิตีจำเพาะ



รูปที่ 33 เปรียบเทียบการบีบกากตันส้มปะรดที่ผสมกับโซเดียมเบนโซเอท ในอัตราส่วนต่าง ๆ ด้วยเครื่องบีบแบบสกรู

□ แอคติวิตี

▨ โปรตีน

■ แอคติวิตีจำเพาะ

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบการสกัดแยกโบรมิเลนจากต้นสับปะรดด้วยวิธีการต่าง ๆ

วิธีการ	แอคติวิตี (CDU/กก.ต้นสับปะรด) $\times 10^5$	โปรตีน (มก./กก.ต้นสับปะรด) $\times 10^3$	แอคติวิตีจำเพาะ (CDU/มก.โปรตีน) $\times 10^2$
การสกัดแยกแบบขั้นตอนตอนเดียว	9.3	3.2	2.9
การสกัดแยกแบบต่อเนื่องและสวนทาง	11.2	3.6	3.1
การตีป่น	10.6	5.5	1.9
การบีบแยกด้วยเครื่องบีบไฮดรอลิค	9.2	1.0	9.2
การบีบแยกด้วยเครื่องบีบแบบสกรู	29.1	2.0	14.5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.7 การตกตะกอนเอนไซม์ด้วยสารเคมีต่าง ๆ

3.7.1 การตกตะกอนด้วยอะซีโตนแบบขั้นตอนเดียว

การตกตะกอนด้วยอะซีโตนแบบขั้นตอนเดียวเพื่อที่จะตกตะกอนเอาโปรตีนอื่น ๆ ออกไปก่อน ทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น ทดลองตามวิธีทดลองข้อ 2.17.1 แปรเปลี่ยนปริมาตรอะซีโตนเย็น 4°ซ. เป็น 29%, 33%, 41%, 50%, 60%, 67%, 71% และ 75% โดยปริมาตรทั้งหมด ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 34 พบว่าเมื่อตกตะกอนด้วยอะซีโตน 29-41% โดยปริมาตรทั้งหมด เอนไซม์มีแอคติวิตีจำเพาะ 0.86 x 10^2 CDU/มก.โปรตีน แอคติวิตี recovery 5% โปรตีน recovery 20% และผลผลิต 1.1% ซึ่งมีค่าต้ำมาก เมื่อเพิ่มอะซีโตนจาก 41% โดยปริมาตรทั้งหมด เอนไซม์จะมีแอคติวิตีจำเพาะ 4.1 x 10^2 CDU/มก.โปรตีน แอคติวิตี recovery 91% โปรตีน recovery 64% และผลผลิต 2.8% ดังนั้นเลือกใช้อะซีโตน 41% โดยปริมาตรทั้งหมดตกตะกอนในขั้นตอนแรก

3.7.2 การตกตะกอนด้วยอะซีโตนแบบสองขั้นตอน

การตกตะกอนด้วยอะซีโตนแบบสองขั้นตอนนี้ ในขั้นตอนแรกจะตกตะกอนด้วยอะซีโตนเย็น 4 ซ. 41% โดยปริมาตรทั้งหมดก่อนแล้วทิ้งตะกอนไป แยกส่วนใสมาตกตะกอนต่อ ทดลองตามวิธีทดลองข้อ 2.17.2 แปรเปลี่ยนปริมาตรอะซีโตนเย็น 4°ซ. เป็น 60% 70% 75%และ 80% โดยปริมาตรทั้งหมด ผลการทดลองแสดงในรูป 35 พบว่าการเพิ่มปริมาตรอะซีโตนจาก 60 - 75% โดยปริมาตรทั้งหมด แอคติวิตีจำเพาะ % แอคติวิตี recovery % โปรตีน recovery และ % ผลผลิตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและมีค่าสูงสุดที่ 75% อะซีโตน ซึ่งตกตะกอนได้เอนไซม์ที่มีแอคติวิตีจำเพาะ 5.4 x 10^2 CDU/มก.โปรตีน แอคติวิตี recovery 89% โปรตีน recovery 71% และผลผลิต 1.8% ดังนั้นในการตกตะกอนด้วยอะซีโตนแบบสองขั้นตอนเลือกใช้อะซีโตนเย็น 4 ซ. 75% โดยปริมาตรทั้งหมด

3.7.3 การตกตะกอนด้วยกรดแทนนิค

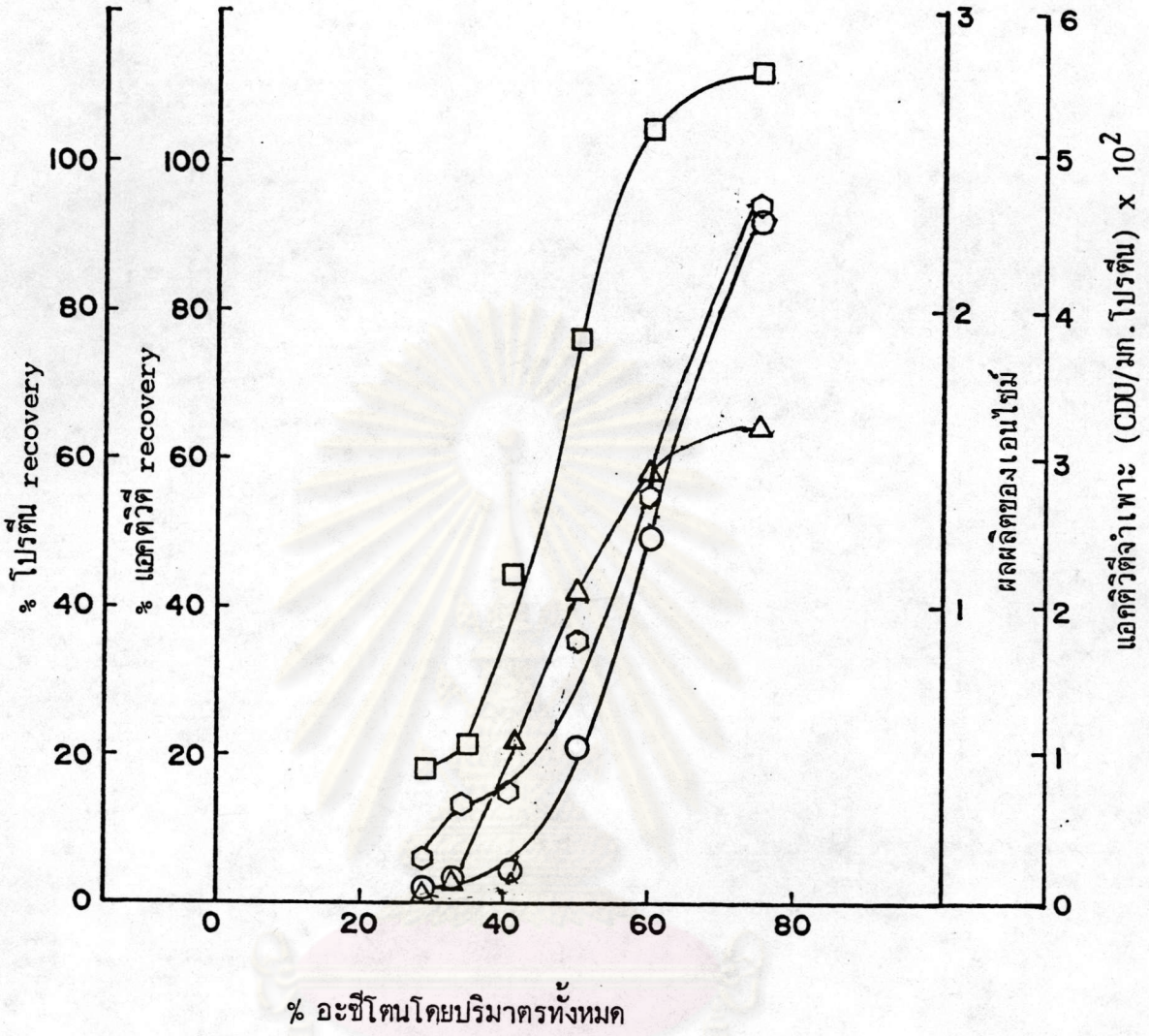
ทดลองตามวิธีทดลองข้อ 2.17.3 แปรเปลี่ยนปริมาณกรดแทนนิคเป็น 0.04% 0.06% 0.08% 0.1% 0.2% 0.3% 0.4% 0.6%และ 0.8% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 36 พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณกรดแทนนิคจาก 0.04%- 0.3%

แอคติวิตีจำเพาะ % แอคติวิตี recovery % โปรตีน recovery และ % ผลผลิตมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยเมื่อตกตะกอนด้วยกรดแทนนิค 0.3% จะได้เอนไซม์ที่มีแอคติวิตีจำเพาะ 1.8×10^2 CDU/มก.โปรตีน แอคติวิตี recovery 29% โปรตีน recovery 47% และผลผลิต 0.13% เมื่อเพิ่มปริมาณกรดแทนนิคตั้งแต่ 0.3% - 0.4% แอคติวิตีจำเพาะ % แอคติวิตี recovery % โปรตีน recovery และ % ผลผลิตจะต่ำลง ดังนั้นเลือกใช้กรดแทนนิค 0.3% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรในการตกตะกอนเอนไซม์

3.7.4 การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

ทดลองตามวิธีทดลองข้อ 2.17.4 แปรเปลี่ยนปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% และ 90% อิ่มตัวโดยปริมาตรน้ำต้นสับปะรด ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 37 พบว่าการเพิ่มแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวจาก 30% -- 70% ทำให้ได้เอนไซม์ที่มีแอคติวิตีจำเพาะ % แอคติวิตี recovery % โปรตีน recovery และ % ผลผลิตมีค่าเพิ่มขึ้นตามปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต และเมื่อตกตะกอนด้วยแอมโมเนียม-ซัลเฟตอิ่มตัว 80% จะได้ผงเอนไซม์ที่มีแอคติวิตีต่อกรัมสูงสุด 34.5×10^4 CDU/มก.ผงเอนไซม์ แอคติวิตี recovery 41% โปรตีน recovery 81% และผลผลิต 1.2% ดังนั้นเลือกใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 80% อิ่มตัวโดยปริมาตรน้ำต้นสับปะรดในการตกตะกอนเอนไซม์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



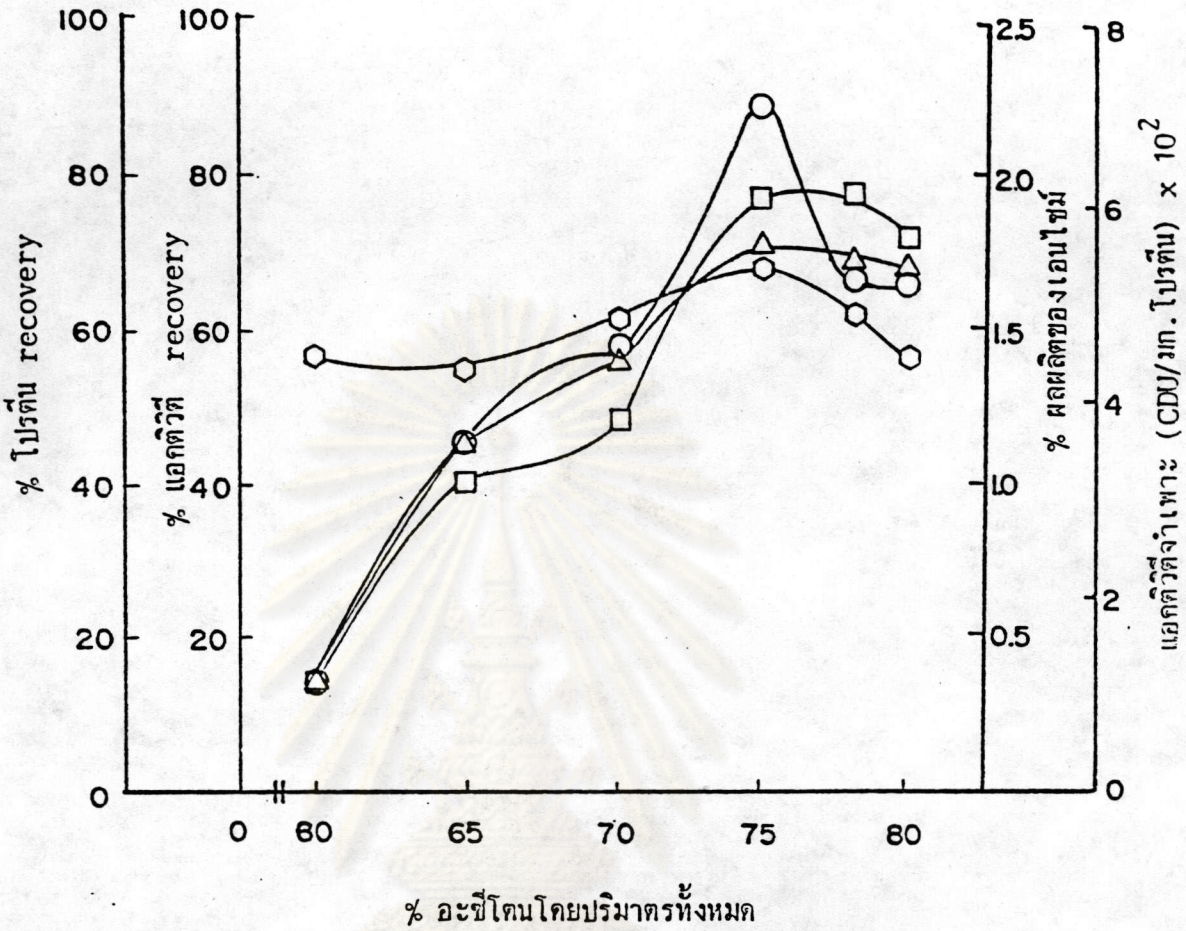
รูปที่ 34 เปรียบเทียบการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยอะซีโตนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แบบขั้นตอนเดียว

○—○ % แอคติวิตี recovery

△—△ % โปรตีน recovery

□—□ % ผลผลิตของเอนไซม์

⬡—⬡ แอคติวิตีจำเพาะ



รูปที่ 35 เปรียบเทียบการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยอะซีโตนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นครั้งที่สองหลังจากการตกตะกอนเอนไซม์ครั้งแรกด้วยอะซีโตน 41% โดยปริมาตรทั้งหมด

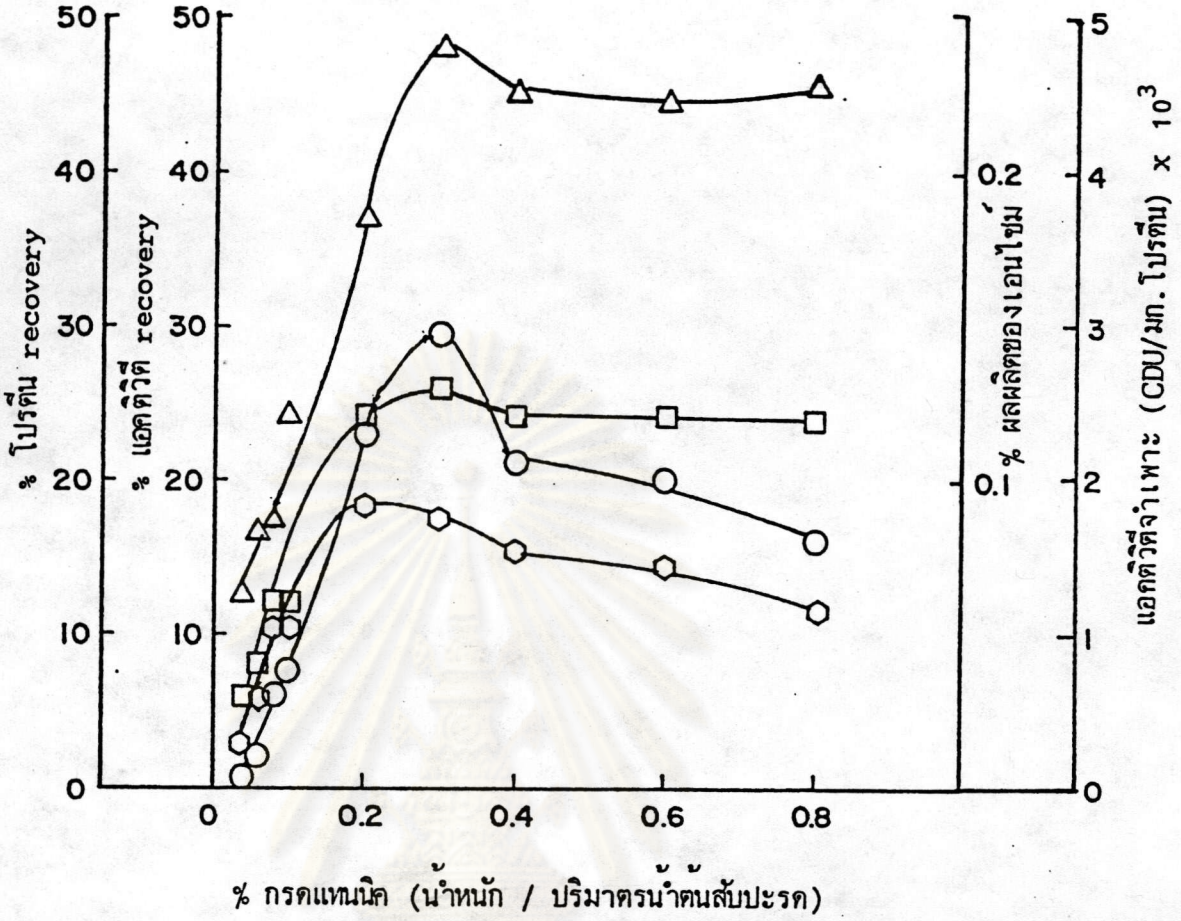
○—○ % แอคติวิตี recovery

△—△ % โปรตีน recovery

□—□ % ผลผลิตของเอนไซม์

⬡—⬡ แอคติวิตีจำเพาะ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 36 เปรียบเทียบการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยกรดแทนนิคที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

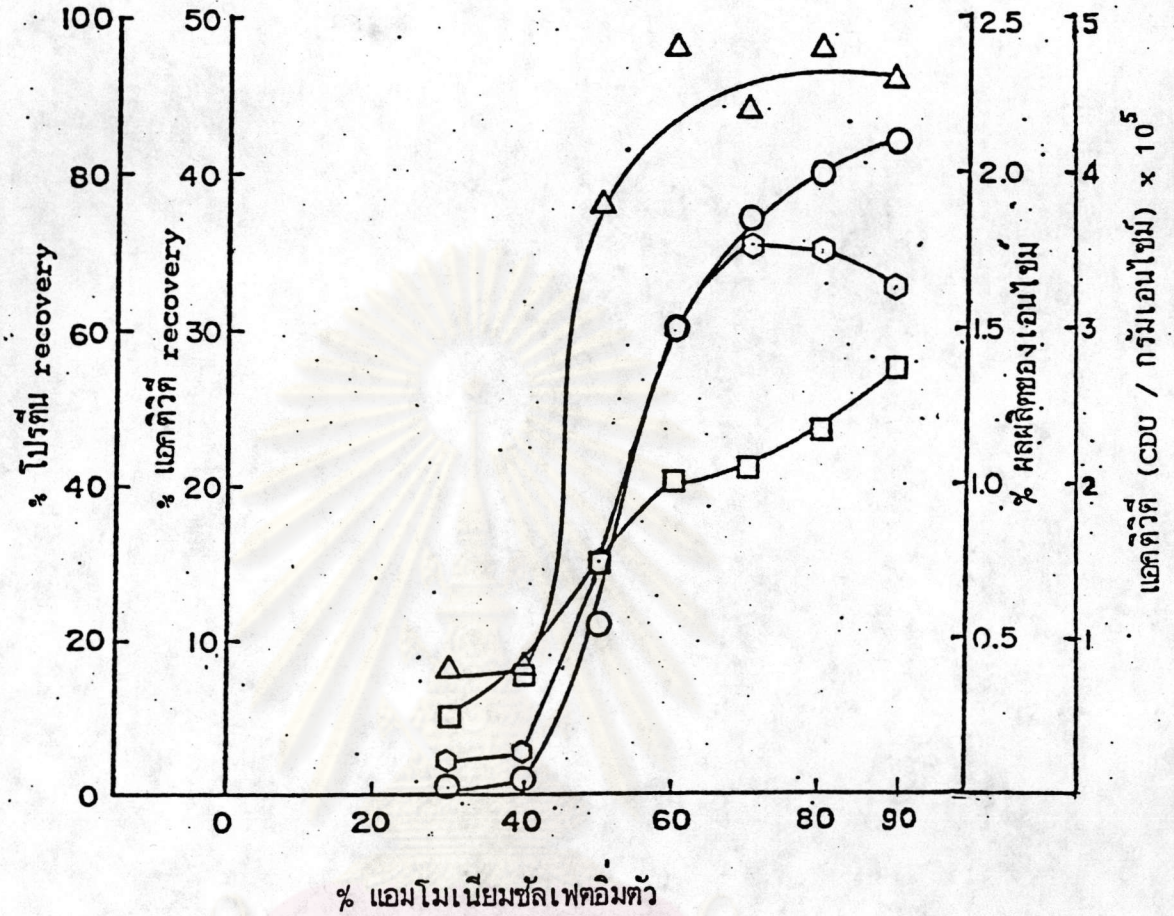
○—○ % แอคติวิตี recovery

△—△ % โปรตีน recovery

□—□ % ผลผลิตของเอนไซม์

⬡—⬡ แอคติวิตีจำเพาะ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 37 เปรียบเทียบการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

○—○ % แอคติวิตี recovery

△—△ % โปรตีน recovery

□—□ % ผลผลิตของเอนไซม์

⬡—⬡ แอคติวิตี

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบการตกตะกอนโบรมิเลนด้วยสารเคมีต่าง ๆ

สารเคมี	แอคติวิตีจำเพาะ (CDU/มก.โปรตีน) x 10^2	แอคติวิตี recovery (%)	โปรตีน recovery (%)	ผลผลิตของเอนไซม์ (%)
อะซีโตนแบบขั้นตอนเดียว 75% โดยปริมาตร	4.1	91	64	2.8
อะซีโตนแบบสองขั้นตอน 75% โดยปริมาตร	5.4	89	71	1.8
กรดแทนนิก 0.3% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร	17.7	29	47	0.1
แอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 80%	12.0	40	96	1.1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.8 สภาวะในการตกตะกอนเอนไซม์

3.8.1 พีเอช

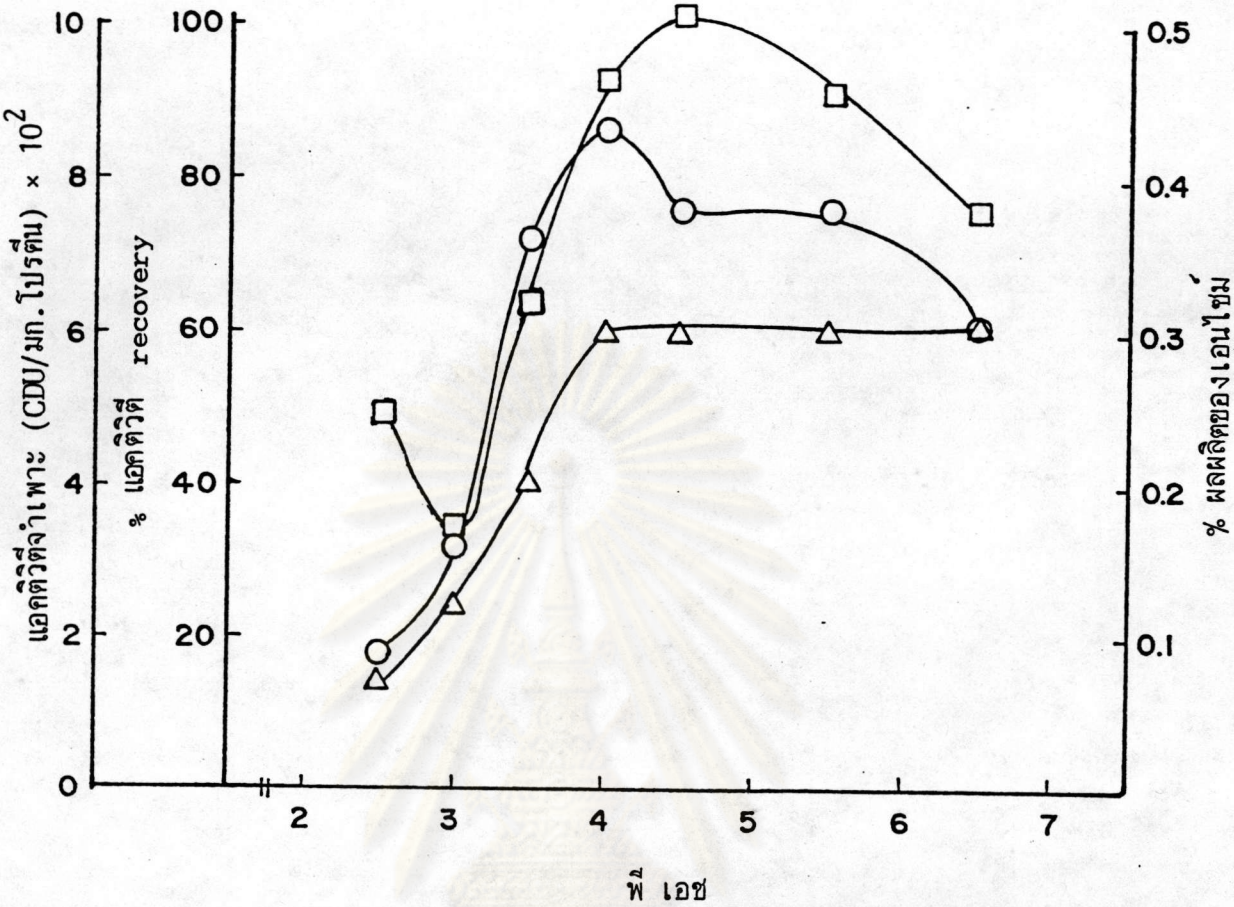
ทดลองตามวิธีทดลองข้อ 2.18.1 แปรเปลี่ยนพีเอชเป็น 2.5, 3,0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.5 และ 6.5 ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 38 พบว่าการตกตะกอนเอนไซม์ที่พีเอช 4.0 - 4.5 เอนไซม์จะมีแอคติวิตีจำเพาะสูงสุดประมาณ 9.2×10^2 CDU/มก.โปรตีน แอคติวิตี recovery 86% และผลผลิต 0.3% ดังนั้นเลือกตกตะกอนเอนไซม์ที่พีเอช 4.0

3.8.2 ตัวเร่งที่ใช้ก่อนตกตะกอนเอนไซม์

ทดลองตามวิธีทดลองข้อ 2.18.2 แปรเปลี่ยนตัวเร่งซึ่งเป็นสารรีดิวซ์ ได้แก่โซเดียมเมตาไบซัลเฟท์ ซีสเตอีนไฮโดรคลอไรด์ โซเดียมเบนโซเอท และโซเดียมไฮโดรเจนซัลไฟด์ เข้มข้น 0.01, 0.05, 0.1 และ 0.2 โมลาร์ ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 39 - 42 พบว่าการใช้โซเดียมเมตาไบซัลไฟท์ 0.01 โมลาร์ เอนไซม์จะมีแอคติวิตีจำเพาะสูงสุด 51×10^2 CDU/มก.โปรตีน การใช้ซีสเตอีนไฮโดร-คลอไรด์ 0.05 โมลาร์ เอนไซม์จะมีแอคติวิตีจำเพาะสูงสุด 32×10^2 CDU/มก.โปรตีน การใช้โซเดียมเบนโซเอท 0.01 โมลาร์ เอนไซม์จะมีแอคติวิตีจำเพาะสูงสุด 20×10^2 CDU/มก.โปรตีน และการใช้โซเดียมไฮโดรเจนซัลไฟด์ 0.01 โมลาร์ เอนไซม์จะมีแอคติวิตีจำเพาะสูงสุด 36×10^2 CDU/มก.โปรตีน

3.8.3 ตัวเร่งต่อความคงตัวของเอนไซม์ในน้ำต้นสับปะรด

ทดลองตามวิธีทดลองข้อ 2.18.3 เติมตัวเร่งได้แก่ โซเดียมเมตาไบซัลไฟท์ 0.01 โมลาร์ ซีสเตอีนไฮโดรคลอไรด์ 0.05 โมลาร์ โซเดียมเบนโซเอท 0.01 โมลาร์ และโซเดียมไฮโดรเจนซัลไฟด์ 0.01 โมลาร์ ลงในน้ำต้นสับปะรดและเก็บที่ห้องเย็น 4°ซ. นาน 0, 2, 7, 10 และ 15 วัน ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 43 พบว่าการเก็บน้ำต้นสับปะรดที่เติมตัวเร่ง แอคติวิตีลดลงน้อยกว่าน้ำต้นสับปะรดที่ไม่เติมตัวเร่ง โดยน้ำต้นสับปะรดที่เติมซีสเตอีนไฮโดรคลอไรด์แอคติวิตีลดลงเพียง 8% เมื่อเก็บครบ 7 วัน เปรียบเทียบกับน้ำต้นสับปะรดที่เติมตัวเร่งอื่น ๆ ซึ่งแอคติวิตีลดลงประมาณ 25% เมื่อเก็บครบ 7 วัน หลังจากนั้นแอคติวิตีจะลดลงอย่างรวดเร็วประมาณ 80 - 90% เมื่อเก็บครบ 15 วัน ถึงแม้จะเติมหรือไม่เติมตัวเร่งในน้ำต้นสับปะรด



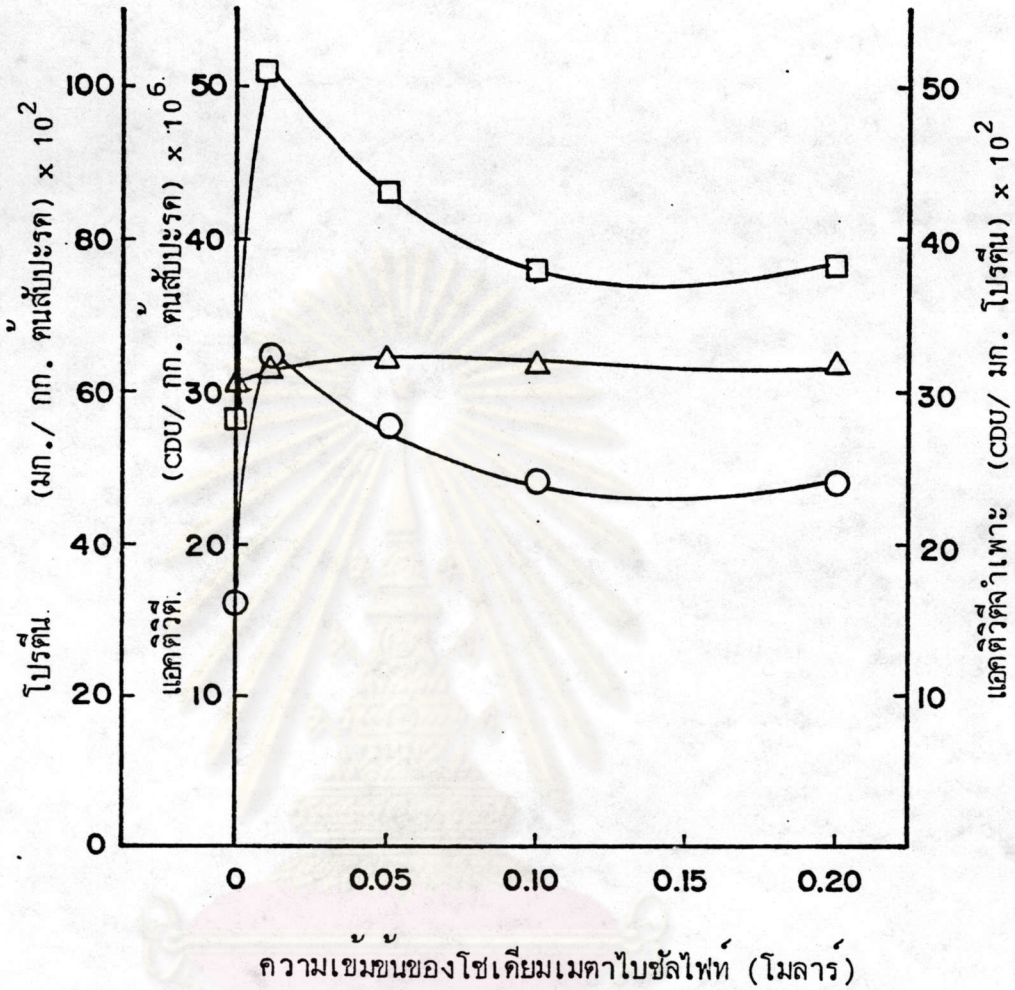
รูปที่ 38 เปรียบเทียบการตกตะกอนเอนไซม์ที่พีเอชต่าง ๆ

○—○ % แอคติวีตี recovery

△—△ % ผลผลิตของเอนไซม์

□—□ แอคติวีตีจำเพาะ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

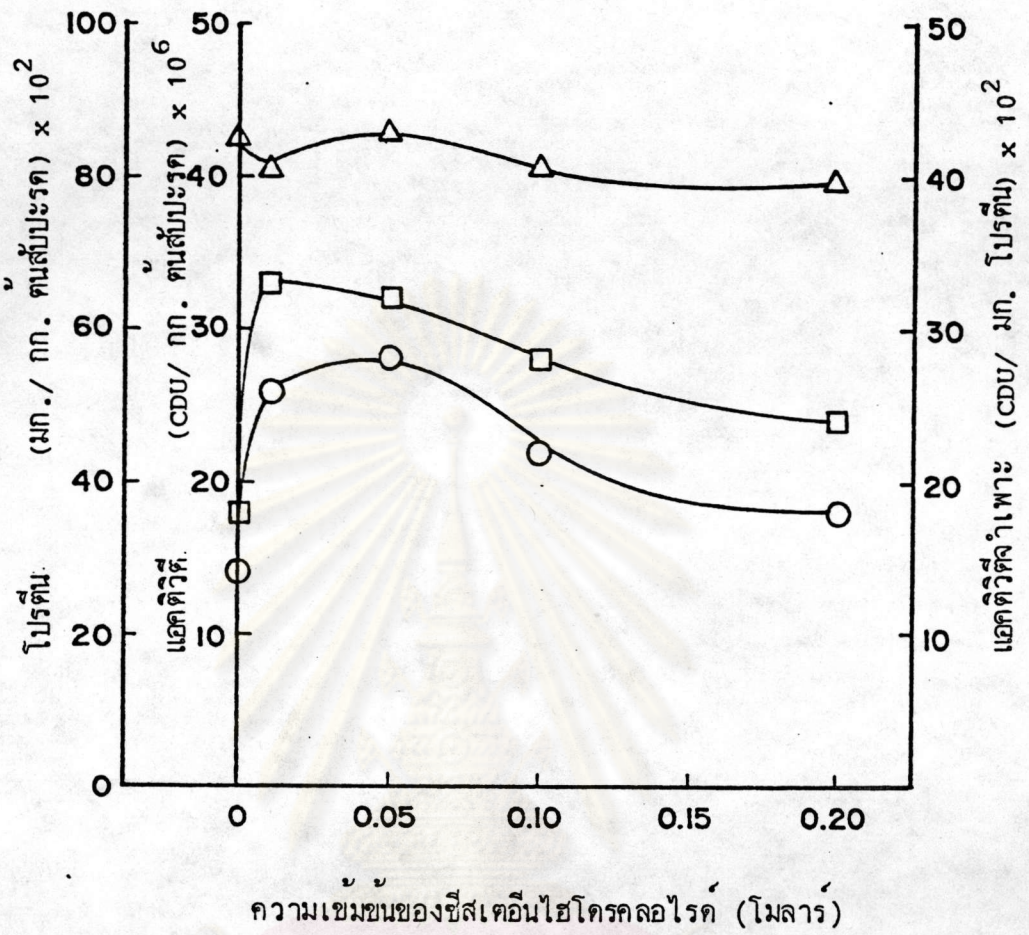


รูปที่ 39 เปรียบเทียบการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยโซเดียมเมตาไบซัลไฟท์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

○—○ แอคติวิตี

△—△ โปรตีน

□—□ แอคติวิตีจำเพาะ

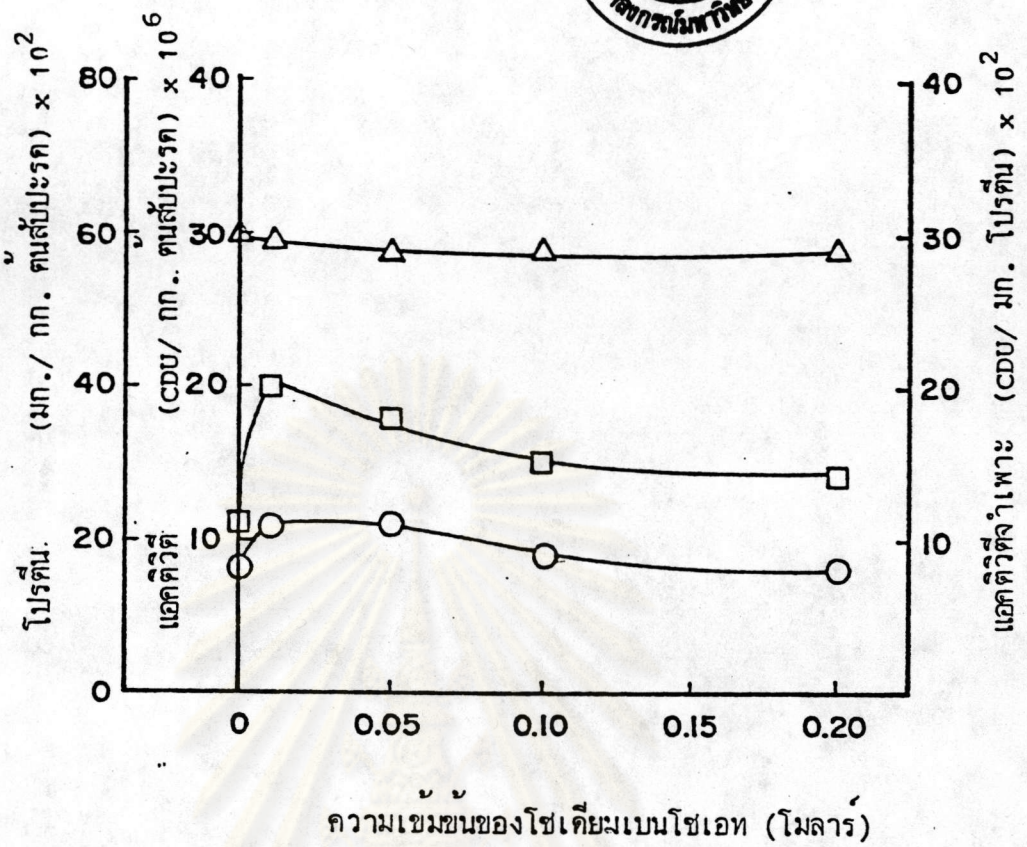


รูปที่ 40 เปรียบเทียบการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยซีสเตอีนไฮโดรคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

○—○ แอคติวิตี

△—△ โปรตีน

□—□ แอคติวิตีจำเพาะ



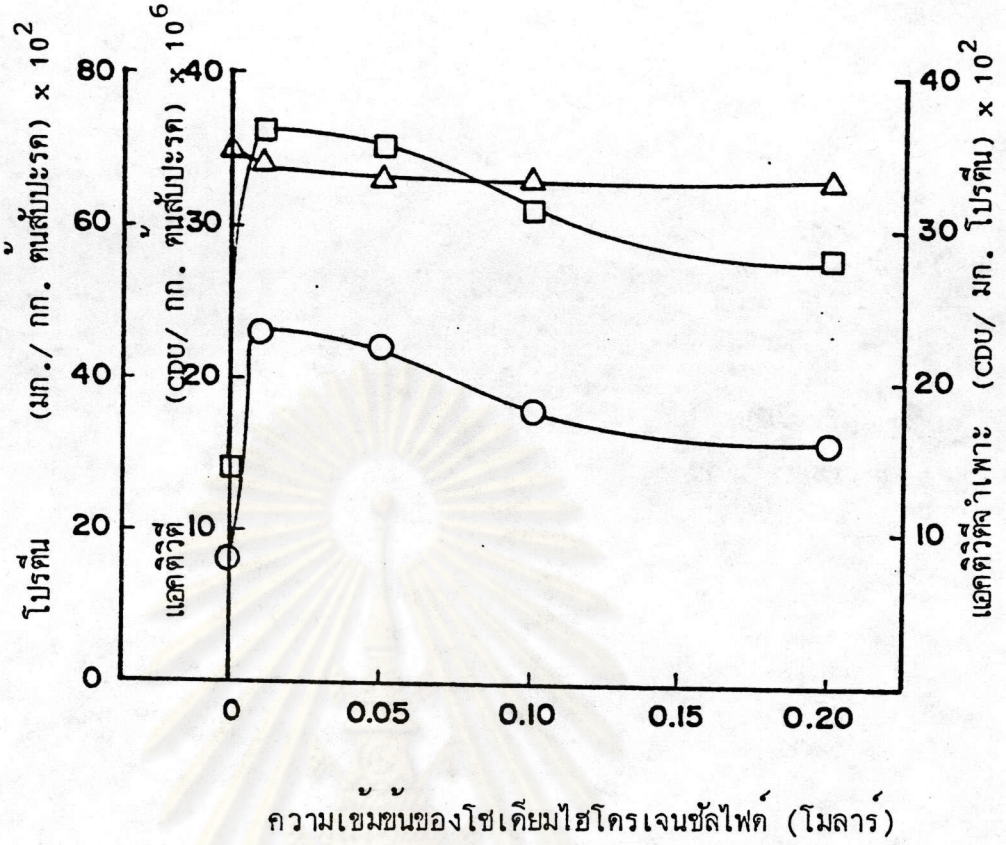
รูปที่ 41 เปรียบเทียบการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยโซเดียมเบนโซเอทที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

○—○ แอคติวิตี

△—△ โปรตีน

□—□ แอคติวิตีจำเพาะ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



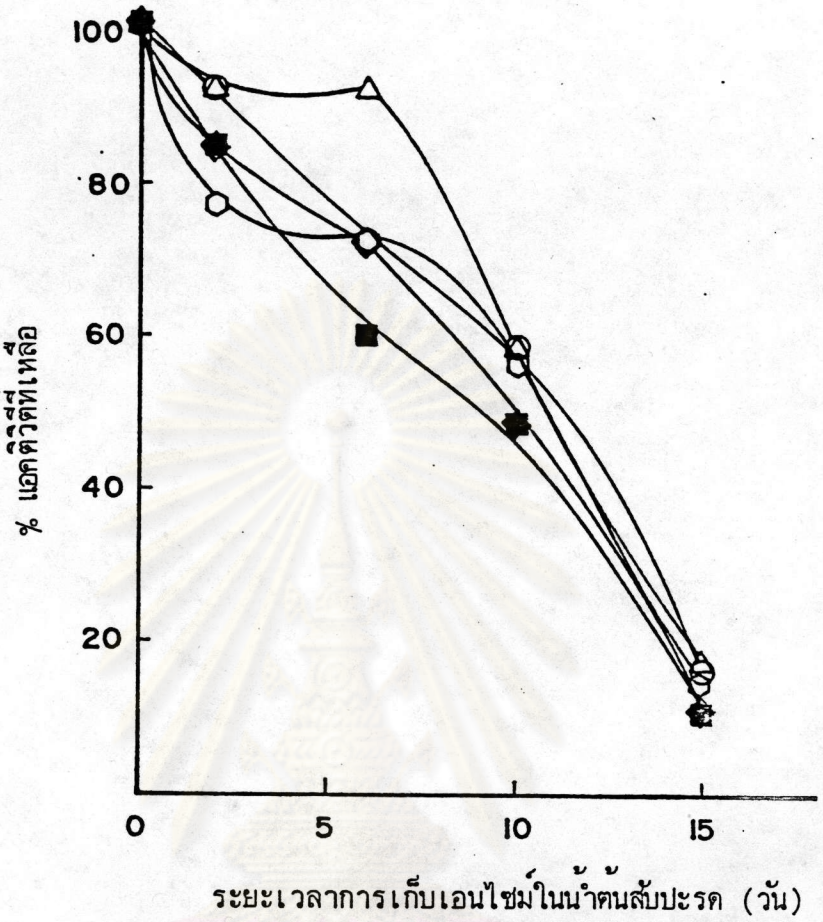
รูปที่ 42 เปรียบเทียบการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยโซเดียมไฮโดรเจนซัลไฟต์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

○—○ แอคติวิตี

△—△ โปรตีน

□—□ แอคติวิตีจำเพาะ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 43 เปรียบเทียบตัวเร่งชนิดต่าง ๆ ต่อความคงตัวของเอนไซม์ในการเก็บน้ำต้นสับปะรดที่อุณหภูมิ 4 °ซ

■—■ ไม่มีตัวเร่ง

○—○ โซเดียมเมตาไบซัลไฟท์

△—△ ซีสเตอีนไฮโดรคลอไรด์

◇—◇ โซเดียมเบนโซเอท

⬡—⬡ โซเดียมไฮโดรเจนซัลไฟด์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

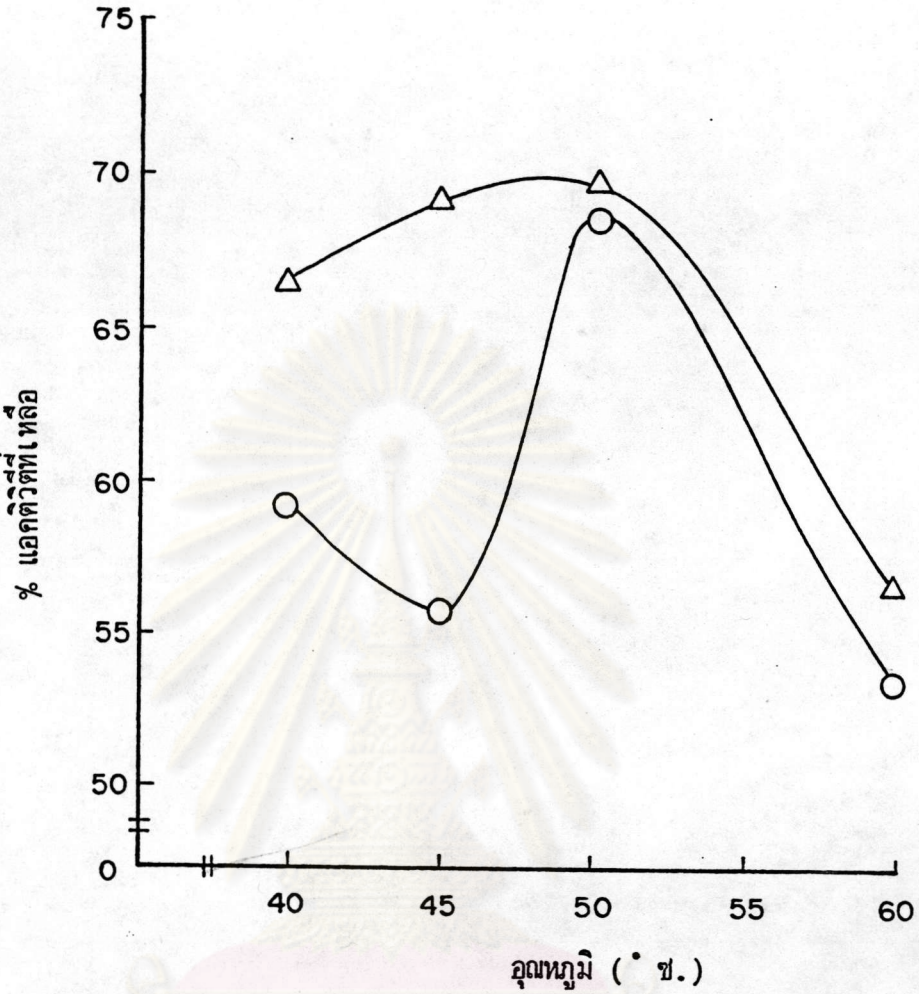
3.9 การทำให้เอนไซม์แห้ง

ทดลองตามวิธีทดลองข้อ 2.19 โดยทำให้เอนไซม์แห้งด้วยวิธีการอบแห้งและอบแห้งภายใต้สูญญากาศที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน แปรเปลี่ยนอุณหภูมิเป็น 40, 45, 50 60° ซ. ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 44 พบว่าการทำให้เอนไซม์แห้งที่อุณหภูมิ 50°ซ. แอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลงน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับการทำให้เอนไซม์แห้งที่อุณหภูมิอื่น ๆ โดยการทำให้แห้งด้วยการอบแห้งที่ 50°ซ. แอคติวิตีลดลง 33% และการทำให้แห้งภายใต้สูญญากาศที่อุณหภูมิ 50° ซ. แอคติวิตีลดลง 30%

เมื่อเปรียบเทียบการทำให้เอนไซม์แห้งด้วยวิธีการอบแห้งและอบแห้งภายใต้สูญญากาศที่อุณหภูมิ 50°ซ. เปรียบเทียบกับการอบแห้งภายใต้สภาวะเยือกแข็งที่อุณหภูมิ -40° ซ. ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 45 พบว่าการทำให้เอนไซม์แห้งภายใต้สภาวะเยือกแข็งแอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงเพียง 10% ดังนั้นเลือกวิธีการทำให้เอนไซม์แห้งภายใต้สภาวะเยือกแข็งที่อุณหภูมิ -40° ซ.

3.10 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของโบรมิเลน

การทดลองนี้ต้องการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีได้แก่ เปอร์เซ็นต์โบรตีน เปอร์เซ็นต์คาร์โบไฮเดรต เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน และองค์ประกอบอื่น ๆ เช่น เปอร์เซ็นต์เถ้า เปอร์เซ็นต์ความชื้น % insoluble solid ของผงโบรมิเลนที่ได้จากการตกตะกอนในระดับห้องทดลองด้วยอะซีโตน 75% โดยปริมาตรทั้งหมด กรดแทนนิค 0.3% โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก และแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 80% โดยทดลองตามวิธีทดลองข้อ 2.20 ผลการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 3 พบว่าผงโบรมิเลนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกรดแทนนิค 0.3% จะมีคุณภาพดีกว่าการตกตะกอนด้วยวิธีอื่น โดยมีแอคติวิตีจำเพาะ 22.37×10^2 CDU/มก.โปรตีน โปรตีน 65% คาร์โบไฮเดรต 9% insoluble solid 1.3% เถ้า 3.8% และความชื้น 6.5%

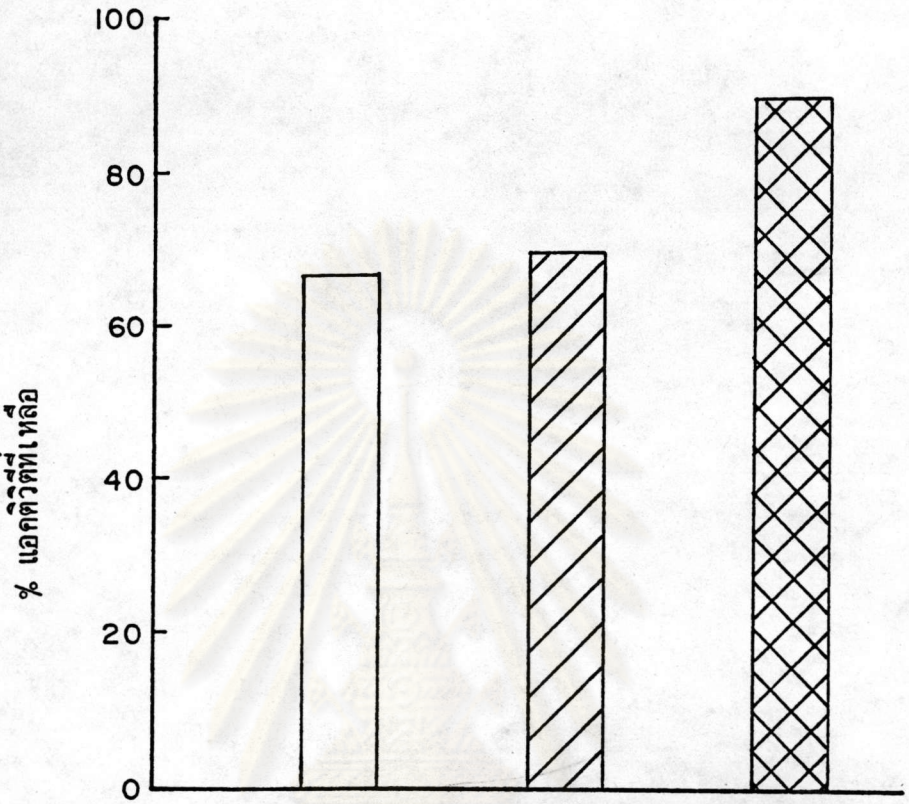


รูปที่ 44 เปรียบเทียบการทำให้เอนไซม์แห้งด้วยวิธีการอบแห้งและอบแห้งภายใต้สูญญากาศที่อุณหภูมิต่าง ๆ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

○—○ % แอคติวิตีที่เหลือของเอนไซม์ที่อบแห้ง

△—△ % แอคติวิตีที่เหลือของเอนไซม์ที่อบแห้งภายใต้สูญญากาศ



รูปที่ 45 เปรียบเทียบการทำให้เอนไซม์แห้งด้วยวิธีการต่าง ๆ

การอบแห้ง

การอบแห้งภายใต้สูญญากาศ

การอบแห้งภายใต้สภาวะเยือกแข็ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 แสดงองค์ประกอบทางเคมีและคุณภาพผงโบรมิเลน

สารตกตะกอนที่ใช้	จำนวนซ้ำ	แอคติวิตี (CDU/กรัมผงเอนไซม์) x 10^3	โปรตีน (มก/กรัมผงเอนไซม์)	แอคติวิตีจำเพาะ (CDU/มก. โปรตีน)	ไนโตรเจนทั้งหมด	%โปรตีน (N x 6.25)	%การโปไฮเดรต	%insoluble solid	%เถ้า	%ความชื้น	สี
อะซีโตนแบบสองขั้นตอน 75% โดยปริมาตร	1	116.0	85.0	1364.7	4.10	25.6	12.5	2.4	39.6	6.7	ขาว
	2	121.9	90.0	1283.2	4.26	26.5	11.2	2.7	41.5	6.4	ขาว
	3	107.5	180.0	597.2	6.25	39.1	13.2	2.1	48.0	6.4	ขาว
	4	70.5	80.0	881.2	3.85	24.1	7.8	2.4	38.8	6.2	ขาวนวล
	5	94.0	150.0	626.7	5.50	34.4	9.76	2.5	46.2	6.2	ขาว
	$\bar{X}$	102.0	117.0	950.6	4.79	29.9	10.9	2.4	42.8	6.4	
กรดแทนนิค 0.3% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร	1	661.0	345.0	1916.0	9.8	61.1	9.2	1.2	4.96	6.6	ขาวเหลือง
	2	725.0	345.0	2101.0	10.4	64.8	9.76	1.36	3.60	7.2	ขาวเหลือง
	3	825.0	437.5	1885.7	10.8	67.5	8.3	1.26	3.40	6.1	ขาวเหลือง
	4	750.0	418.8	1790.8	9.6	60.0	8.9	1.43	4.10	5.9	ขาวเหลือง
	5	1200.0	343.8	3490.4	11.5	71.9	9.1	1.41	3.05	6.7	ขาวเหลือง
	$\bar{X}$	832.2	378.0	2237.0	10.40	65.1	9.1	1.3	3.8	6.5	
แอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 80%	1	486.2	345.0	1357.1	7.50	46.8	8.0	1.8	27.8	6.9	ขาว
	2	312.5	362.5	862.1	6.40	40.0	8.9	2.4	28.9	6.6	ขาว
	3	380.4	349.2	1089.3	6.80	42.5	8.3	2.1	28.2	6.9	ขาว
	4	331.2	422.5	784.0	7.60	47.5	6.9	1.4	24.7	5.4	ขาว
	5	362.5	480.2	754.5	8.0	50.0	7.2	1.3	24.6	5.8	ขาว
	$\bar{X}$	374.4	392.0	969.4	7.3	45.4	7.9	1.80	26.8	6.3	

หมายเหตุ จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง 13,000 - 18,000 โคโลนีต่อกรัมผงเอนไซม์แห้ง