5

# การผลิตโบรมิเลนจากต้นสับปะรด

นายนิมิตพิสุทธิ์ ณรงค์ชวนะ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2530

ISBN 974 - 567 - 738 - 8

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

012797

I1029A223

# Production of Bromelain from Pineapple Stem

Mr. Nimitpisut Narongajavana

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Programe Biotechnology

Graduate School

Chulalongkorn University

1987

ISBN 974 - 567 - 738 - 8

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การผลิตโบรมิเลนจากต้นสับปะรด

โดย นาย นิมิตพิสุทธิ์ ณรงคะชวนะ

หลักสูตร เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์วินิจ ขำวิวรรธน์

---

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล)

.....กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.สมศักดิ์ ดำรงค์เลิศ)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล)

.....กรรมการ
(อาจารย์วินิจ ขำวิวรรธน์)

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การผลิตโบรมิเลนจากต้นสับปะรด

ชื่อนิสิต นายนิมิตพิสุทธิ์ ณรงคะชวนะ

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์วินิจ ชำวิวรรธน์

หลักสูตร เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2529

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทคัดย่อ

โบรมิเลนเป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีนซึ่งพบในส่วนต่าง ๆ ของพืชวงศ์โบรมิเลียซีอี (Bromeliaceae) ตัวอย่างเช่น สับปะรด ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาวิธีการผลิตเอนไซม์โบรมิเลนจากส่วนลำต้นของสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย (อายุ 2-3 ปี) โดยการปอกเปลือก บดแล้วสกัดแยก หรือบีบ หลังจากนั้นตกตะกอนด้วยสารเคมีและทำเอนไซม์ให้แห้ง

เมื่อศึกษาเปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์โบรมิเลนจากต้นสับปะรดด้วยวิธีต่าง ๆ บดแล้วสกัดแยกแบบขั้นตอนเดียว แบบต่อเนื่องและสวนทาง บีบด้วยเครื่องบีบแบบสกรูและเครื่องบีบไฮดรอลิค พบว่าการบีบด้วยเครื่องบีบแบบสกรูจะให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์จากต้นสับปะรดสูงสุดประมาณ $2.9 \times 10^6$ CDU/กก.ต้นสับปะรด

เมื่อนำน้ำจากต้นสับปะรดที่แยกได้ไปปรับพีเอชให้มีค่าเท่ากับ 4.0 แล้วทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นโดยการตกตะกอนเป็นส่วน ๆ ด้วยสารตกตะกอนต่างชนิดเช่น อะซีโตน แอมโมเนียม-ซัลเฟต หรือกรดแทนนิค พบว่ากรดแทนนิคเป็นสารตกตะกอนที่ดีที่สุดเมื่อใช้ความเข้มข้น 0.3% (น้ำหนักต่อปริมาตร) จะได้ผงโบรมิเลนที่มีแอคติวิตีสูงถึง 832 CDU/มก.ผงเอนไซม์ แอคติวิตีจำเพาะ 2237 CDU/มก.โปรตีน และผลผลิต 0.13% ผงเอนไซม์ที่ได้จะมีความชื้นประมาณ 65% เถ้า 3.8% คาร์โบไฮเดรต 9.1% และโปรตีน 65.1%

โซเดียมเมตาไบซัลไฟท์ 0.01 โมลาร์ หรือซิสเตอีนไฮโดรคลอไรด์ 0.05 โมลาร์ จะช่วยเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์จากน้ำต้นสับปะรดให้สูงขึ้นประมาณ 50% นอกจากนี้ซิสเตอีนไฮโดรคลอไรด์ 0.05 โมลาร์ ยังช่วยทำให้เอนไซม์ในน้ำสกัดจากต้นสับปะรดเสถียรมากขึ้นได้ด้วย ดังจะเห็นได้จากการยืดอายุการเก็บสารละลายเอนไซม์ได้นานถึง 7 วัน โดยเหลือแอคติวิตีเหลือประมาณ 92%

เมื่อศึกษาเปรียบเทียบวิธีการที่เหมาะสมในการทำเอนไซม์ให้แห้งด้วยวิธีการอบแห้งในตู้อบ อบแห้งภายใต้สูญญากาศ และทำแห้งภายใต้สภาวะเยือกแข็ง พบว่าการทำแห้งภายใต้สภาวะเยือกแข็งจะให้ผลิตภัณฑ์ของผงเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติดีที่สุด ยิ่งไปกว่านั้นยังให้แอคติวิตีผงเอนไซม์สูงถึง 90% ของแอคติวิตีเริ่มต้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title Production of Bromelain from Pineapple Stem

Name Mr.Nimitpisut Narongajavana

Thesis Advisor Mr.Vinich Khamviwat

Programe Biotechnology

Academic Year 1986

## Abstract

Bromelain is a proteolytic enzyme found in tissues of Bromeliaceae plants eg. pineapple. The purpose of this research is to develope the method of bromelain production from the stem of pineapple, variety Smooth Cayene (age 2-3 years). The process involve peeling, crushing and extraction or pressing. The extracting enzyme was then recovered by chemical precipitants and finally drying to make up an enzyme powder.

Comparative study of bromelain activity from pineapple stem by simple blending method, crushing and extraction either by single stage or continuous counter current extraction, pressing by screw press or hydraulic press. The experimental results indicated that pressing the pineapple stems by screw press yielding stem juice with highest enzymetic activity (total activity of $2.9 \times 10^6$ CDU/Kg peeled stem).

The stem juice pH was adjusted to 4.0 furthur purified by fractionation precipitation with various precipitants acetone,ammonium sulfate or tannic acid. The data indicated that the most effective precipitant was 0.3% tannic acid (weight by volume). The compound produced highest activity of 832 CDU/mg enzyme powder (specific activity of 2237 CDU/mg protein) with 0.13% yield. Bromelain powder

contains 6.5% moisture content, 3.8% ash, 9.1% carbohydrate, and 65.1% protein.

Sodium metabisulfite, cysteine hydrochloride with concentration of 0.01 and 0.05 molar respectively can activate enzyme-rich juice from pineapple stem for over 50% in comparison to the original activity. Furthurmore, the same concentration of cysteine hydrochloride could stabilize enzyme activity as well (the remaining activity of 92% when kept at $4^{o}$c (for 7 days).

Comparative studies of drying methods among oven drying ($50^{o}$ c), vaccuum drying ($50^{o}$ c) and freeze drying indicated that freeze drying seemed to be the most effective one. Drying the enzyme by freeze dry gave the best characteristics of enzyme powder with the remaining of 92% enzyme activity compared to the activity found in juice extracts from pineapple stem.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์วินิจ ขำวิวรรธน์ ที่ได้กรุณารับเป็นที่ปรึกษา ให้คำแนะนำแนวความคิด ตลอดจนช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล ที่ได้กรุณาเป็นที่ปรึกษา และให้คำแนะนำแนวความคิดที่ใช้ในการวิจัยนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.สมศักดิ์ ดำรงค์เลิศ ที่ได้กรุณาเป็นที่ปรึกษา ให้คำแนะนำและออกแบบสร้างอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล ซึ่งได้กรุณารับเป็นประธาน กรรมการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณหัวหน้าภาควิชาชีวเคมีและภาควิชาเคมีเทคนิค ที่ได้กรุณาเอื้อเฟื้อ สถานที่และเครื่องมือในการทำวิจัยนี้ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ได้ช่วยเหลืออำนวยความ สะดวก

ขอขอบพระคุณ คุณสุพัฒน์ ตรีวงษ์ ผู้จัดการฝ่ายไร่ บริษัทอาหารสยาม จำกัด และ พนักงานฝ่ายไร่ทุกท่านที่ได้ให้ความสะดวกในการเก็บต้นสับปะรดที่ใช้ในการทดลอง

ท้ายสุดนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ญาติพี่น้อง และขอขอบคุณ คุณศิริลักษณ์ ธีระดากร ตลอดจนเพื่อน ๆ ทุกคน ที่สนับสนุนและให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# สารบัญ


หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ฉ

กิตติกรรมประกาศ ..... ช

สารบัญ ..... ฌ

สารบัญตาราง ..... ญ

สารบัญภาพ ..... ฏ

คำย่อ ..... ฑ

บทที่

1 บทนำ ..... 1

2 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย ..... 11

3 ผลการทดลอง ..... 38

4 วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง ..... 82

เอกสารอ้างอิง ..... 92

ภาคผนวก ..... 97

ประวัติผู้เขียน ..... 109


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# สารบัญตาราง


| ตารางที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | เปรียบเทียบการสกัดแยกโบรมิเลนจากคันสับปะรดด้วยวิธีการต่าง..... | 63 |
| 2 | เปรียบเทียบการตกตะกอนโบรมิเลนด้วยสารเคมีต่าง ๆ..... | 70 |
| 3 | แสดงองค์ประกอบทางเคมีและคุณภาพผงโบรมิเลน ..... | 81 |
| 4 | การตกตะกอนโบรมิเลนด้วยกรดแทนนิคในระดับขยายส่วนและองค์ประกอบทางเคมีของผงโบรมิเลน..... | 107 |


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# สารบัญภาพ


| ภาพที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | โครงสร้างของโบรมิเลน | 2 |
| 2 | ไร่สับปะรดโรงงานอาหารสยาม อ.บ้านบึง จ.ชลบุรี | 4 |
| 3 | ลักษณะและส่วนประกอบของต้นสับปะรด | 5 |
| 4 | แผนภาพการสกัดแบบต่อเนื่องและสวนทาง | 7 |
| 5 | เครื่องปอกเปลือกต้นสับปะรด | 13 |
| 6 | เครื่องหั่นต้นสับปะรด | 14 |
| 7 | เครื่องบด | 15 |
| 8 | เครื่องสกัดแยกโบรมิเลนจากต้นสับปะรด | 16 |
| 9 | เครื่องบีบไฮดรอลิค | 17 |
| 10 | เครื่องบีบแบบสกรู | 18 |
| 11 | เครื่องบีบด้วยมือแบบสกรู | 19 |
| 12 | ถังกรองขนาด 30 ลิตร | 20 |
| 13 | เครื่องกรองแบบ filter press | 21 |
| 14 | ถังตกตะกอนสเตนเลสขนาด 80 ลิตร | 22 |
| 15 | แสดงขั้นตอนการสกัดในการสกัดแยกเอนไซม์แบบต่อเนื่องและสวนทาง | 25 |
| 16 | การสกัดแยกเอนไซม์แบบต่อเนื่องและสวนทาง | 26 |
| 17 | เปรียบเทียบระยะเวลาการเก็บต้นสับปะรดที่อุณหภูมิ 4° ซ. และอุณหภูมิห้อง | 36 |
| 18 | เปรียบเทียบการสกัดแยกเอนไซม์จากต้นสับปะรดที่ปอกเปลือกและไม่ปอกเปลือก | 40 |
| 19 | เปรียบเทียบอัตราส่วนของน้ำที่ผสมกับต้นสับปะรดในการสกัดแยกเอนไซม์จากต้นสับปะรดด้วยวิธีสกัดแบบขั้นตอนเดียว | 44 |
| 20 | เปรียบเทียบเวลาในการสกัดแยกเอนไซม์จากต้นสับปะรดด้วยวิธีสกัดแบบขั้นตอนเดียว | 45 |
| 21 | เปรียบเทียบพีเอชที่มีผลต่อการสกัดแยกเอนไซม์จากต้นสับปะรดด้วยวิธีสกัดแบบขั้นตอนเดียว | 46 |

หน้า

22 เปรียบเทียบสารละลายบัฟเฟอร์โปแตสเซียมฟอสเฟต พีเอช 6.5 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการสกัดแยกเอนไซม์จากต้นสับปะรดด้วยวิธีสกัดแบบขั้นตอนเดียว..... 47

23 เปรียบเทียบสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการสกัดแยกเอนไซม์จากต้นสับปะรดด้วยวิธีสกัดแบบขั้นตอนเดียว..... 48

24 เปรียบเทียบอุณหภูมิที่มีผลต่อการสกัดแยกเอนไซม์จากต้นสับปะรดด้วยวิธีสกัดแบบขั้นตอนเดียว..... 49

25 ผลการศึกษาจำนวนขั้นตอนการสกัดแยกเอนไซม์จากต้นสับปะรดด้วยวิธีสกัดแบบต่อเนื่องและสวนทาง..... 51

26 ผลการศึกษาจำนวนแถวการสกัดแยกเอนไซม์จากต้นสับปะรดด้วยวิธีสกัดแบบต่อเนื่องและสวนทาง..... 52

27 เปรียบเทียบอัตราส่วนของน้ำที่ผสมกับต้นสับปะรดในการสกัดแยกเอนไซม์จากต้นสับปะรดโดยวิธีสกัดด้วยเครื่องตีปั่นแบบตั้งโต๊ะ..... 54

28 เปรียบเทียบเวลาในการสกัดแยกเอนไซม์จากต้นสับปะรดโดยวิธีสกัดด้วยเครื่องตีปั่นแบบตั้งโต๊ะ..... 55

29 เปรียบเทียบการบีบต้นสับปะรดที่บดหรือหั่นหรือตีปั่นทันทีด้วยเครื่องบีบไฮดรอลิค..... 58

30 เปรียบเทียบการบีบต้นสับปะรดที่บดหรือหั่นหรือตีปั่นแล้วแช่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.2 โมลาร์ ด้วยเครื่องบีบไฮดรอลิค..... 59

31 เปรียบเทียบการบีบต้นสับปะรดที่บดหรือหั่นหรือตีปั่นแล้วแช่แข็งที่อุณหภูมิ – 20°ซ. นาน 4 ชั่วโมง ด้วยเครื่องบีบไฮดรอลิค..... 60

32 เปรียบเทียบการบีบต้นสับปะรดที่บดหรือหั่นหรือตีปั่นแล้วแช่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.2 โมลาร์ และนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ –20° ซ. นาน 4 ชั่วโมง ด้วยเครื่องบีบไฮดรอลิค..... 61

33 เปรียบเทียบการบีบต้นสับปะรดที่ผสมกับโซเดียมเบนโซเอทในอัตราส่วนต่าง ๆ ด้วยเครื่องบีบแบบสกรู..... 62

| รูปที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 34 | เปรียบเทียบการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยอะซีโตนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แบบขั้นตอนเดียว..... | 66 |
| 35 | เปรียบเทียบการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยอะซีโตนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นครั้งที่สอง หลังจากตกตะกอนเอนไซม์ครั้งแรกด้วยอะซีโตน 41% โดยปริมาตรทั้งหมด..... | 67 |
| 36 | เปรียบเทียบการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยกรดแทนนิคที่ความเข้มข้นต่าง ๆ..... | 68 |
| 37 | เปรียบเทียบการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ..... | 69 |
| 38 | เปรียบเทียบการตกตะกอนเอนไซม์ที่พีเอชต่าง ๆ..... | 72 |
| 39 | แผนผังการผลิตโบรมิเลน..... | 108 |


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# คำย่อ

| | | |
|---|---|---|
| ซ | = | องศาเซลเซียล |
| มล. | = | มิลลิลิตร |
| มก. | = | มิลลิกรัม |
| กก. | = | กิโลกรัม |
| ชม. | = | ชั่วโมง |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย