การทบทวนวรรณกรรมกระบวนการผลิตเอนไซม์โบรมิเลนจากสับปะรด

เอนไซม์ เป็นชีวโมเลกุลประเภทโปรตีนที่จัดได้ว่าเป็นกุญแจแห่งชีวิต เอนไซม์มีหน้าที่ขับเคลื่อนให้กระบวนการทางชีวเคมีในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตเดินหน้า และเอนไซม์ยังมีส่วนสำคัญที่ทำให้เกิดวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตอีกด้วย เอนไซม์มีอยู่ด้วยกันหลายกลุ่มจำแนกตามลักษณะกลไกการทำงาน โดยมีการจัดจำแนกเอนไซม์ไว้อย่างเป็นระบบภายใต้กลุ่มตัวเลข Enzyme Commission Number (EC) ซึ่งในปัจจุบันมีเอนไซม์อยู่ด้วยกัน EC1 ถึง EC6 ได้แก่ EC1 คือเอนไซม์กลุ่ม ออกซิโรดักเทส (Oxidoreductase) EC2 คือเอนไซม์กลุ่มทรานสเฟอเรส(Transferase) EC3 คือเอนไซม์กลุ่มไฮโดรเลส (Hydrolase) EC4 คือเอนไซม์กลุ่มไลเอส (Lyase) EC5 คือกลุ่มไอโซเมอเรส (Isomerase) และ EC6 คือเอนไซม์กลุ่มไลเกส (Ligase) ทั้งนี้ในแต่ละ EC ก็จะมีสมาชิกของเอนไซม์ที่มีคุณลักษณะเฉพาะที่แตกต่างกันแยกย่อยลงไปอีก โดยในปัจจุบันสามารถแยกย่อยสมาชิกของเอนไซม์ได้ถึง 4 กลุ่มย่อยโดยมีลักษณะเฉพาะของแต่ละ EC เช่น เอนไซม์กลุ่มไฮโดรเลสที่ชื่อปาเปนซึ่งเป็นที่รู้จักกันอย่างกว้างขวางจะมีเลข EC ของตัวเอนไซม์เองว่า 3.4.22.2 [1]

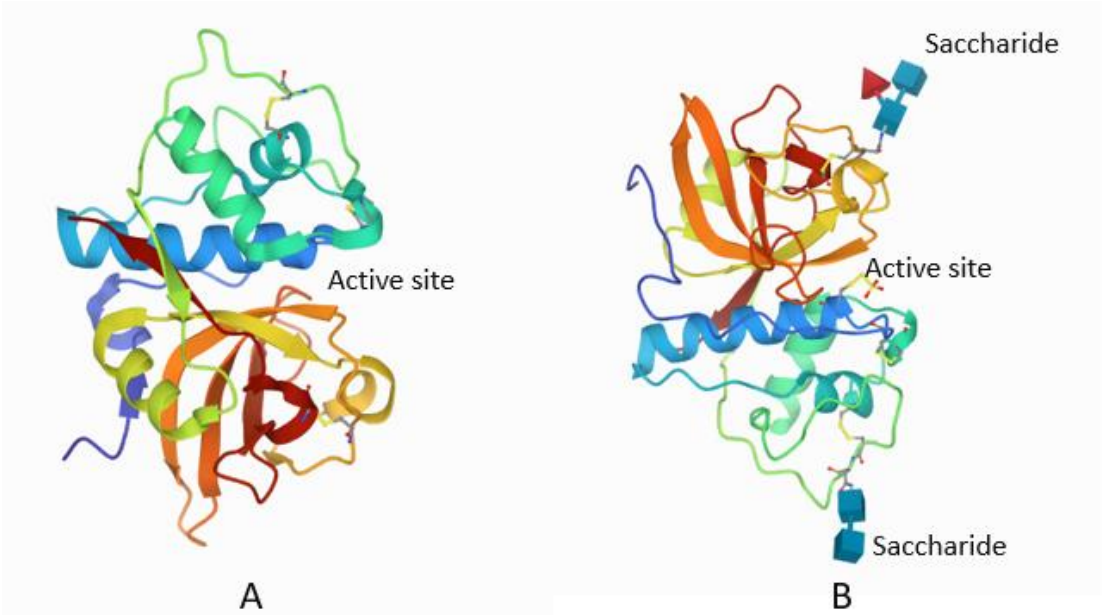
1. ความรู้พื้นฐานของเอนไซม์โบรมิเลน

เอนไซม์โบรมิเลน (EC 3.4.22.32 และ 3.4.22.33) พบในสับปะรด ปัจจุบันเราทราบแล้วว่าในสับปะรดทุกส่วนมีเอนไซม์โบรมิเลนเจือปนอยู่ ไม่ว่าจะเป็น ผล แกน ใบ และเหง้า [2-3] เอนไซม์โบรมิเลนเป็นหนึ่งในสมาชิกของเอนไซม์ชนิดย่อยสลายโปรตีน (Proteolytic หรือ Protease หรือ Proteinase) เลข EC ลำดับที่ 32/33 หมายถึงการค้นพบหรือมีการอ้างอิงเป็นลำดับเอนไซม์ตัวที่ 32 และ 33 ตามลำดับ ในกลุ่ม EC 3.4.22.X คือเอนไซม์ประเภทโปรติเอสที่มีกรดอะมิโน Cysteine อยู่ในบริเวณเร่งปฏิกิริยา และเป็น Catalytic Site ซึ่งจะมีกรดอะมิโนฮีสทิดีน (Histidine) อีกชนิดหนึ่งเป็นคู่ไอออน ซึ่งกลไกของเอนไซม์โบรมิเลนคือสลายพันธะเพปไทด์ในโมเลกุลของโปรตีนที่เป็นสับสเตรท [4] เอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มย่อยเดียวกันกับเอนไซม์โบรมิเลนและเป็นที่รู้จักกันดีได้แก่ เอนไซม์ปาเปน (Papain) และคาริเคน (Caricain) จากยางมะละกอ เอนไซม์แอคทินิเดน (Actinidain) จากกีวี่ เอนไซม์ไฟเซน (Ficain) จากมะเดื่อ ส่วนเอนไซม์ที่พบในสับปะรดเหมือนกันกับเอนไซม์โบรมิเลน โดยเป็นเอนไซม์ในกลุ่มแยกย่อยเหมือนกันแต่เป็นเอนไซม์อีกชนิดหนึ่งคือเอนไซม์อะนาเนน (Ananain) ซึ่งพบในเหง้าสับปะรดอ่อน [5]

เอนไซม์โบรมิเลนและอะนาเนน แม้จะเป็นเอนไซม์ในกลุ่มแยกย่อยเดียวกัน แต่การศึกษาเชิงลึกในระดับโมเลกุลพบว่าเอนไซม์ทั้งสองมีโครงสร้างสามมิติที่แตกต่างกันในบางตำแหน่ง และยังพบอีกว่าเอนไซม์ทั้งสองมีความเฉพาะเจาะจงต่อสับสเตรทที่แตกต่างกัน สำหรับเอนไซม์โบรมิเลนเองนั้นก็มีรายงานในทางชีวเคมีกล่าวว่าเอนไซม์โบรมิเลนที่พบในผลและที่พบในเหง้าสับปะรดก็มีความแตกต่างของคุณลักษณะทางเอนไซม์เช่นกัน จึงได้มีการตั้งชื่อเอนไซม์โบรมิเลนที่พบในแหล่งทั้งสองให้มีชื่อที่แตกต่างกัน โดยเอนไซม์โบรมิเลนที่พบในผลจะเรียกว่า Fruit Bromelain ขณะที่เอนไซม์โบรมิเลนที่พบในเหง้าจะเรียกว่า Stem Bromelain [6-7]

มีรายงานว่าเอนไซม์โบรมิเลนเป็นโปรติเอสที่มีลักษณะไกลโคโปรตีน นั่นก็คือในโมเลกุลของเอนไซม์จะมีสายของคาร์โบไฮเดตรชนิดต่างๆยึดเหนี่ยวอยู่ (ภาพที่ 1) โดยสามารถตรวจพบได้อย่างชัดเจนโดยใช้เทคนิค X-Ray Diffraction ผลึกโปรตีน ซึ่งในปัจจุบันสามารถพบเอนไซม์โปรติเอสที่มีลักษณะเช่นนี้อย่างต่อเนื่องและได้มีการ

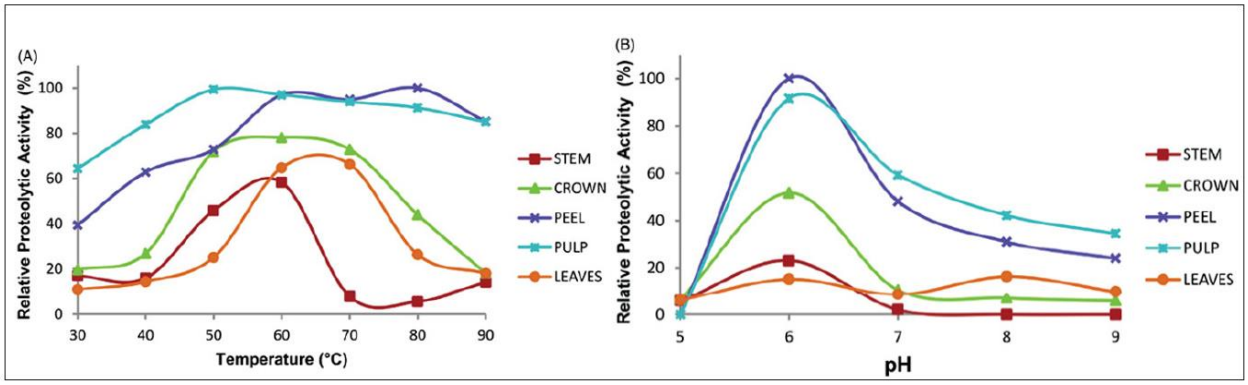
รายงานโครงสร้างสามมิติเอาไว้แล้วบนฐานข้อมูลธนาคารโปรตีน (Protein Data Bank) ตัวอย่างเอนไซม์โปรติเอสที่เป็นไกลโคโปรตีนและพบในพืชเหมือนกัน อาทิ เอนไซม์โปรติเอสจากเหง้าขิงที่ชื่อ Ginger Proteinase [8]



ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างสามมิติ X-RAY Diffraction ของเอนไซม์โบรมิเลน (A) และเอนไซม์โปรติเอสจากขิง (B) ที่มีโมเลกุลของสายแซ็คคาไรด์ยึดเหนี่ยวอยู่กับโครงสร้างของเอนไซม์ ซึ่งเอนไซม์ที่มีลักษณะโครงสร้างแบบนี้จะเรียกว่าเอนไซม์ชนิดไกลโคโปรตีน
ที่มา : https://www.rcsb.org

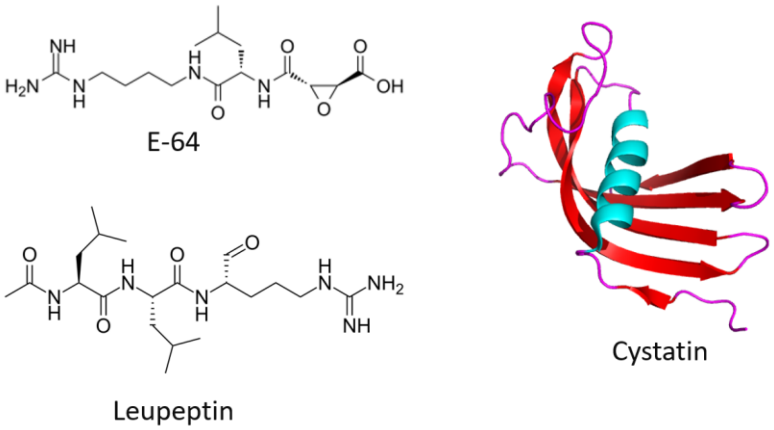
เอนไซม์โบรมิเลน มีกรดอะมิโนอยู่ในโมเลกุลประมาณ 211-230 residues มวลโมเลกุลที่วิเคราะห์ได้จาก เทคนิค SDS-PAGE มีค่าประมาณ 25 ถึง 28 กิโลดาลตัน (kDa) ผลการศึกษาบางแห่งกล่าวว่าโบรมิเลนมีมวลโมเลกุลใกล้เคียงกับเอนไซม์ปาเปนคือประมาณ 22-25 กิโลดาลตัน เอนไซม์โบรมิเลนมีค่ากิจกรรมที่ดี ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของ pH อยู่ในช่วง 5.5 ถึง 6.5 (ภาพที่ 2) เอนไซม์โบรมิเลนไม่เหมาะกับสารละลายที่มีโลหะโดยเฉพาะไอออนโลหะหนัก 2+ อาทิเช่น CU2+ และ Hg2+ เนื่องจากโลหะประเภทนี้จะเหนี่ยวนำให้บริเวณเร่งของเอนไซม์มีลักษณะโครงสร้างที่ผิดเพี้ยนไปจากเดิม ส่งผลให้การเร่งปฏิกิริยาถูกยับยั้งไปเพียงชั่วคราว [9-10] เมื่อทำการนำโลหะออกจากโมเลกุล และให้เอนไซม์โบรมิเลนอยู่ในสภาวะของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมเพียงชั่วเวลาหนึ่ง เอนไซม์โบรมิเลนก็จะฟื้นคืนสภาพกลับมาเร่งปฏิกิริยาได้อย่างเดิม อย่างไรก็ตามแม้โลหะไอออน CU2+ และ Hg2+ จะยับยั้งให้เอนไซม์โบรมิเลนชะลอการเร่งปฏิกิริยา แต่ก็ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้อย่างภาวร เอนไซม์โบรมิเลนทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิห้องหรือประมาณ 25 ถึง 35 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่สูงประมาณ 45 ถึง 60 องศาเซลเซียส สามารถเร่งให้เอนไซม์โบรมิเลนทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด ในขณะเดียวกันที่อุณหภูมิสูงเช่นนี้ โครงสร้างสามมิติกลับมีเสถียรภาพที่ไม่คงทน โดยเอนไซม์โบรมิเลนไม่ทนอุณหภูมิที่สูงเกินกว่า 60 องศาเซลเซียส โดยภายในเวลาอันสั้นที่เอนไซม์อยู่ในสภาวะอุณหภูมินี้ ก็จะเกิดการเสีย

สภาพ (Denature) ไปอย่างสิ้นเชิงโดยไม่สามารถเปลี่ยนกลับมา ให้โมเลกุลมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาได้อีกต่อไป



ภาพที่ 2 ค่ากิจกรรมและความคงทนของเอนไซม์โบรมิเลนจากส่วนต่างๆ ของสับปะรด ซึ่งทำการศึกษาที่สภาวะ pH และอุณหภูมิต่างๆ
ที่มา : Íngara Keisle São Paulo Barretto Miranda, 2016 [11]

เอนไซม์โบรมิเลนสามารถถูกยับยั้งอย่างถาวรได้ด้วยสารยับยั้ง N-[N-(L-3-trans-carboxyirane-2-carbonyl)-L-leucyl]-agmatine (E-64) ซึ่ง E-64 นี้เป็นสารยับยั้งประเภทไม่สามารถย้อนกลับได้ (irreversible inhibitor) ส่วนสารยับยั้งตามธรรมชาติชนิดอื่นที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โบรมิเลนแบบย้อนกลับได้ก็คือ Leupeptin และ Cystatin ซึ่ง Cystatin เป็นสารยับยั้งประเภทโปรตีนและมีขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 13 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 3) เป็นที่น่าปะหลาดใจก็คือนักวิทยาศาสตร์พบว่าสารยับยั้ง Cystatin สามารถพบได้ในเซลล์ของสับปะรดเช่นกัน โดยนักวิทยาศาสตร์เองก็ยังไม่ทราบกลไกอย่างชัดเจนว่าสับปะรดจะต้องอยู่ในเหตุการณ์ใดสารยับยั้ง Cystatin จึงจะเริ่มทำหน้าที่ของมัน



ภาพที่ 3 สารยับยั้งเอนไซม์โบรมิเลน E-64, Leupeptin และ Cystatin
ที่มา : https://www.rcsb.org/

2. การประยุกต์ใช้เอนไซม์โบรมิเลนทางการแพทย์

ด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์โปรติเอสคือความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนให้กลายเป็นเพปไทด์และกรดอะมิโน จึงมีการนำเอนไซม์โบรมิเลนมาใช้ตามความสามารถแบบตรงๆ อาทิ การทำผงหมักเนื้อนุ่ม การนำไปย่อยหนังสัตว์ให้ผิวเรียบเนียนขึ้น หรือการนำไปทำเวชสำอางเพื่อทำให้ผิวพรรณนุ่มเนียน เป็นต้น ต่อมามีการศึกษาวิจัยกันกว้างขวางขึ้น ก็พบว่าเอนไซม์โบรมิเลนมีความสารถในการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) จึงทำให้มีการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมผักผลไม้เพื่อลดการเกิดสีน้ำตาล (Browning Reaction) แต่ในเวลาต่อมาก็ไม่ได้รับความนิยมเนื่องจากการใช้เอนไซม์โบรมิเลนมีต้นทุนสูงและมีขั้นตอนยุ่งยากมากกว่าการใช้สารเคมีทั่วไปซึ่งให้ผลที่ไม่แตกต่างกัน [12]

ในช่วงทศวรรษ 90 มาจนถึงปัจจุบันนี้ นักวิทยาศาสตร์พยายามศึกษากลไกและความสามารถของเอนไซม์โบรมิเลนในการต้านอนุมูลอิสระให้ลึกซึ้งยิ่งขึ้น ในสหรัฐอเมริกาได้มีการขยายการศึกษาครอบคลุมไปยังกลุ่มเครื่องสำอางและการพัฒนายารักษาโรคมากขึ้น มีงานวิจัยในห้องปฏิบัติการและรวมถึงในระดับคลินิกที่ได้รายงานการออกฤทธิ์ของเอนไซม์โบรมิเลนที่น่าสนใจและสามารถเชื่อมโยงขยายผลไปสู่การรักษาโรคต่างๆได้ มีงานวิจัยหลายฉบับและค่อนข้างจะยืนยันได้อย่างมั่นใจว่าเอนไซม์โบรมิเลนมีฤทธิ์เป็นสารต้านการอักเสบของเซลล์ที่ดีมาก (Anti-inflammatory) เป็นสารต้านมะเร็ง (Anticancer) และเป็นสารต้านทานจุลินทรีย์ (Antimicrobial) เอนไซม์โบรมิเลนยังสามารถดูดซึมได้ดีในลำไส้เล็ก ถ้าสามารถห่อหุ้มหรือส่งผ่านไปถึงลำไส้ได้โดยตรงโดยไม่ผ่านกระเพาะอาหาร โดยจะสามารถตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์โบรมิเลนในกระแสเลือดประมาณ 1 ชั่วโมงหลังบริโภคเข้าไป และพบว่าเอนไซม์โบรมิเลนจะยังมีความคงตัวและสามารถออกฤทธิ์อยู่ในระบบเลือดได้นานประมาณ 6-9 ชั่วโมง [13]

การต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory)

การอักเสบของเซลล์เป็นจุดเริ่มต้นของการพัฒนาเซลล์ไปสู่การเป็นมะเร็ง และกลไกของเอนไซม์โบรมิเลนในการยับยั้งการอักเสบก็ยังไม่เป็นที่แน่ชัด โดยปกติเมื่อเซลล์เกิดการอักเสบ เซลล์จะสร้างกรด arachidonic ขึ้นมา จากนั้นเอนไซม์ Cyclooxygenase (COX) จะทำการเปลี่ยน arachidonic ให้กลายไปเป็น prostaglandins (PG) และ PG นี้จะส่งผลให้เกิดอาการปวดและมีไข้ แนวคิดในการออกแบบยาต้านการอักเสบคือการค้นหาสารหรือสังเคราะห์สารที่มีฤทธิ์ยับยั้ง (Inhibitor) การทำงานของเอนไซม์ COX ซึ่งปัจจุบันมียาที่ใช้กันอย่างกว้างขวางอยู่ด้วยกันหลายชนิด บางชนิดส่งผลข้างเคียงต่อผู้ใช้ยา จึงมีการค้นหาสารสำคัญจากธรรมชาติเพื่อนำมาทดแทนยา และในเวลาต่อมานักวิทยาศาสตร์ก็พบว่าเอนไซม์โบรมิเลนอาจเป็นคำตอบที่กำลังค้นหากันอยู่ โดยการศึกษาในห้องปฏิบัติการทางเซลล์วิทยาชี้ว่า เอนไซม์โบรมิเลนสามารถชะลอการสร้าง COX ในเซลล์ที่เพาะเลี้ยง สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างสารชักนำการอักเสบ (Inflammatory mediator) สามารถกระตุ้นให้เซลล์เอฟเฟคเตอร์ (Effector Cell) ที่ชื่อ CTL สามารถผลิตไซโตไคน์ที่สำคัญสองชนิดได้แก่ INF-γ และ TNF-α ซึ่งไซโตไคน์ทั้งสองชนิดนี้จะไปยับยั้งการแบ่งตัวที่ผิดปกติของเซลล์รวมทั้งไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บางชนิดที่ไม่พึงประสงค์ ทำให้เซลล์ที่กำลังอักเสบสามารถฟื้นตัวและกลับมาทำงานได้อย่างเป็นปกติ แม้กลไกการปรับความสมดุลต่อเซลล์ดังที่กล่าวมานี้จะยังไม่เป็นที่เข้าใจในเวลานี้ แต่ก็มีการทดลองซ้ำจากห้องปฏิบัติการหลายแห่งที่ได้พิสูจน์และให้ข้อสรุปไปในทิศทางเดียวกันว่าเอนไซม์โบรมิเลนมีศักยภาพที่ดีและสามารถนำมาใช้เป็นชีวโมเลกุลสำหรับส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันให้แข็งแรงอยู่เสมอ (Healthy Immune System) [13-14]

การต้านจุลินทรีย์

มีการศึกษาประยุกต์ใช้เอนไซม์โบรมิเลนในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ตั้งแต่ช่วงปี 1960 เป็นต้นมา โดยในปี 1961 Neubauer พบว่าการนำเอนไซม์โบรมิเลนมาใช้ร่วมกับยาต้านจุลินทรีย์ (Antibiotic) สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อ *Staphylococcus* ได้มากกว่าการใช้ยาต้านจุลินทรีย์เพียงอย่างเดียว [15] เอนไซม์โบรมิเลนสามารถต้านอาการท้องเสียอันเป็นสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia Coli* และ *Vibrio cholerae* โดยเอนไซม์โบรมิเลนจะทำการย่อยสลาย enterotoxin ทำให้สูญเสียโครงรูป การยึดเหนี่ยวของ enterotoxin ต่อตัวรับจึงไม่เสถียรมากพอทำให้การส่งสัญญาณเคมีและการออกฤทธิ์ของสารพิษไม่สมบูรณ์ จึงไม่มีการเหนี่ยนำให้เกิดสภาพความเป็นพิษในลำไส้ [16-17] Krishnan และ Gokulakrshnan ในปี 2015 ได้ศึกษาการประยุกต์ใช้เอนไซม์โบรมิเลนในการลดการเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรียอันเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดปัญหาโรคปริทันต์ (Periodontal Disease) การวิจัยได้ทำการแยกเอนไซม์โบรมิเลนจากใบและเหง้าสับปะรด จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโตรกราฟี นำเอนไซม์โบรมิเลนบริสุทธิ์ไปทดสอบผลต่อจุลินทรีย์โดยเพาะเลี้ยง *Streptococcus mutans, Porphyromonas gingivalis* และ *Serratia marcescens* ใน agar diffusion และหยดสารละลายเอนไซม์โบรมิเลนลงไปเปรียบเทียบกับยาต้านจุลินทรีย์บางชนิด ผลการทดลองพบว่าการใช้ยาต้านจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียวสามารถฆ่าแบคทีเรียได้ทุกชนิด ขณะที่การใช้เอนไซม์โบรมิเลนเพียงชนิดเดียวสามารถฆ่าเชื้อ *Porphyromonas gingivalis* ได้เพียงอย่างเดียว โดยไม่มีผลต่อแบคทีเรียอื่น ในขณะที่การใช้เอนไซม์โบรมิเลนร่วมกับยาต้านจุลินทรีย์สามารถฆ่าแบคทีเรียได้ทุกชนิด และให้ประสิทธิภาพการฆ่าจุลินทรีย์ที่ดีกว่าการใช้ยาต้านจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียว ขณะที่เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างเอนไซม์โบรมิเลนจากใบและจากเหง้าพบว่าให้ผลที่ไม่แตกต่างกัน [18]

การนำไปใช้ทางคลินิก

ตั้งแต่อดีตมาจนถึงปัจจุบันมีรายงานวิจัยทางการแพทย์จำนวนหนึ่ง ที่กล่าวถึงการนำเอนไซม์โบรมิเลนไปใช้ในทางคลินิคทั้งในยุโรปและอเมริกาเพื่อรักษาหรือบำบัดอาการป่วย ในปี 1960 Blonstein ได้ทดลองนำเอนไซม์โบรมิเลนมาใช้บำบัดอาการเซลล์ช้ำและบาดเจ็บจากการชกมวย โดยการใช้ประคบภายนอกและพบว่าเอนไซม์โบรมิเลนสามารถเร่งให้เซลล์ลดบวมได้อย่างรวดเร็วในบริเวณใบหน้า แขน และลำตัว [19] นอกเหนือไปจากการนำเอนไซม์โบรมิเลนมาประคบโดยตรงที่บริเวณที่จะทำการรักษาและเห็นผลที่ดีแล้ว การทดลองกินเอนไซม์โบรมิเลนก็พบว่าสามารถให้ผลการรักษาที่ดีเช่นกัน ในเยอรมันนี Uhlig และคณะได้รายงานว่าเอนไซม์โบรมิเลนสามารถดูดซึมได้ที่ลำไส้ และเอนไซม์โบรมิเลนยังคงมีฤทธิ์ทางชีวภาพอยู่อีกหลายชั่วโมงในระบบเลือดเมื่อถูกดูดซึมเข้าไปแล้ว ซึ่งเอนไซม์โบรมิเลนที่ดูดซึมเข้าไปสามารถช่วยลดอาการบวมของรอยฟกช้ำได้อย่างรวดเร็ว แม้ผลการรักษาจะช้ากว่าการประคบโดยตรงเมื่อเทียบเวลากับการศึกษาของที่อื่น แต่ก็พบว่าประสิทธิภาพในการรักษาเกิดผลสำเร็จไปในทิศทางเดียวกัน [20] ในปี 1967 Zatuchni พบว่าการใช้เอนไซม์โบรมิเลนพ่นเข้าไปโดยตรงเพื่อรักษาอาการไซนัสอักเสบในเด็ก ให้ผลการรักษาที่ดีเสมือนการฉีดพ่นด้วยยา แต่ให้ผลที่ดีกว่าในแง่ที่ไม่พบอาการข้างเคียงอันไม่พึงประสงค์ [21] ในปี 1978 Gutfreund และคณะพบว่าเอนไซม์โบรมิเลนสามารถช่วยลดอาการความดันโลหิตสูงและลดอัตราการเต้นของหัวใจในผู้ป่วยที่เป็นโรคความดันโลหิตสูง (Hypertensive Patients) ผลการศึกษาอาจอธิบายได้ว่าเอนไซม์โบรมิเลนที่ดูดซึมเข้าไปอาจเข้าไปควบคุมให้ระบบ renin – angiotensin ซึ่งควบคุมความดันโลหิตกลับมาเป็นปกติ ซึ่งก่อนหน้านี้ผู้ป่วยอาจมีสภาวะที่เอนไซม์ Angiotensin

Converting Enzyme; ACE (EC 3.4. 15.1) ในกระแสเลือดออกฤทธิ์ในการย่อยสลายฮอร์โมน angiotensin I เป็น vasoconstrictor angiotensin II มากเกินไป ระบบ renin – angiotensin จึงเต็มไปด้วยเพปไทด์ angiotensin ซึ่งจะไปเหนี่ยวนำให้เกิดความดันโลหิตสูงตามมา และเอนไซม์โบรมิเลนได้เข้าไปปรับระดับการเปลี่ยนแปลงในจุดนี้ให้กลับมาสมดุล แต่อย่างไรก็ตามผลการศึกษายังไม่สามารถอธิบายกลไกในเชิงชีวเคมีได้อย่างชัดเจนว่าเอนไซม์โบรมิเลนเข้าไปมีส่วนในกลไกที่จุดไหน เอนไซม์โบรมิเลนอาจเข้าไปย่อยโปรตีนบางตัว หรืออาจเข้าไปทำลายเอนไซม์บางชนิด หรืออาจเข้าไปแย่งจับสารบางชนิดที่มีมากเกิน หรืออาจทำหน้าที่ทุกอย่างดังที่กล่าวมานี้พร้อมกัน ซึ่งนักวิทยาศาสตร์เองยังคงต้องศึกษากันต่อไปอีกระยะหนึ่ง [22] ส่วน Kane และคณะในปี 2000 ได้ทำการศึกษาการใช้เอนไซม์โบรมิเลนเพื่อรักษาอาการลำไส้อักเสบ (Ulcerative Colitis) โดยอาสาสมัครที่มีอายุ 67 ปีเพศหญิงที่มีประวัติอาการเคยเป็นลำไส้อักเสบ (Inflammatory Bowel Disease: IBD) และเป็นๆ หายๆ ไม่หายขาด มานานหลายปี การศึกษาดำเนินการให้อาสาสมัครกินเอนไซม์โบรมิเลนที่มีขายในท้องตลาดในลักษณะของผลิตภัณฑ์เสริมอาหารต่อเนื่องเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ผลการศึกษาพบว่าอาการข้างเคียงที่เกิดขึ้นจากลำไส้อักเสบมีสภาวะที่ดีขึ้นได้แก่ การย่อยอาหารดีขึ้น ขับถ่ายได้คล่องขึ้น และอาการปวดท้องลดลงมาก ส่งผลให้มีสุขภาพและจิตใจที่ดีขึ้น [23] เมื่อเร็วๆนี้ Walker และคณะในปี 2002 ได้ทดลองใช้เอนไซม์โบรมิเลนในการลดการอักเสบเรื้อรังของโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (Rheumatoid Arthritis) การศึกษาได้ให้อาสาสมัครจำนวน 77 คน กินเอนไซม์โบรมิเลนขนาด 200-400 mg ต่อวัน ทุกวันเป็นเวลาติดต่อกัน 3 เดือน แบบ Double-Blinded ทำการประเมินอาสาสมัครด้วยแบบสอบถามความรุนแรงของโรคและการทดสอบมรรถภาพข้อเข่า (WOMAC Knee Health Index) ผลการศึกษาพบว่ากลุ่มอาสาสมัครที่กินเอนไซม์โบรมิเลน 200 จำนวน 59.5% และ 400 mg จำนวน 67.6% มีการเปลี่ยนแปลงของสมรรถภาพหัวเข่าที่ดีขึ้น [24]

3. การแยกและทำเอนไซม์โบรมิเลนให้บริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการและในอุตสาหกรรม

มีรายงานวิจัยจำนวนมากที่นำเสนอเทคนิคการแยกเอนไซม์โบรมิเลนออกจากเซลล์พืชไม่ว่าจะใช้เครื่องกลใช้สารเคมี หรือใช้กระแสไฟฟ้าแยกก็ตาม สิ่งที่แตกต่างกันของแต่ละวิธีคือขึ้นอยู่กับเป้าหมายของการแยกเอนไซม์โบรมิเลนว่าจะเอาไปทำอะไร เช่นหากการแยกเอนไซม์โบรมิเลนออกมามีเป้าหมายเพื่อนำไปใช้ศึกษาวิจัยหรือใช้ในงานด้านการพัฒนายาก็สามารถใช้เทคนิคทางเคมีผสมผสานกับเครื่องกลซึ่งมีหลายขั้นตอนและใช้งบประมาณสูงและยังขึ้นอยู่กับความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่ต้องการ หากต้องการความบริสุทธิ์ของเอนไซม์สูงก็ยิ่งใช้งบประมาณสูงเช่นกัน แต่หากการแยกเอนไซม์โบรมิเลนออกมาโดยมีเป้าหมายเพื่อนำไปใช้ในเชิงพาณิชย์ซึ่งไม่จำเป็นต้องทำเอนไซม์โบรมิเลนให้บริสุทธิ์ สามารถเลือกใช้วิธีการตกตะกอนด้วยเกลือหรือการใช้แอลกอฮอลล์และอาจจำเป็นต้องใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเอามวลเอนไซม์ออกจากส่วนน้ำ ส่วนสารเคมีที่นำมาใช้ในการแยกนั้นควรต้องคำนึงถึงความปลอดภัยและความเป็นพิษด้วย [25]

ในขั้นตอนการสกัดเอนไซม์โบรมิเลนออกจากเซลล์ต้องทำการบดปั่นสับปะรดร่วมกับสารละลายบัฟเฟอร์และสารยับยั้งกิจกรรม เพราะเอนไซม์โบรมิเลนสารมารถย่อยสลายตนเองได้ (Autolysis) และอาจเกิดการเสียสภาพอย่างรวดเร็วเมื่อถูกสกัดออกมาจากเซลล์จึงจำเป็นต้องอาศัยสารละลายบัฟเฟอร์ในการรักษาสภาพสิ่งแวดล้อมรอบๆโมเลกุลเอนไซม์โบรมิเลนให้สมดุลและเหมาะสม จากรายงานวิจัยที่ผ่านมา ได้มีการนำสารละลาย

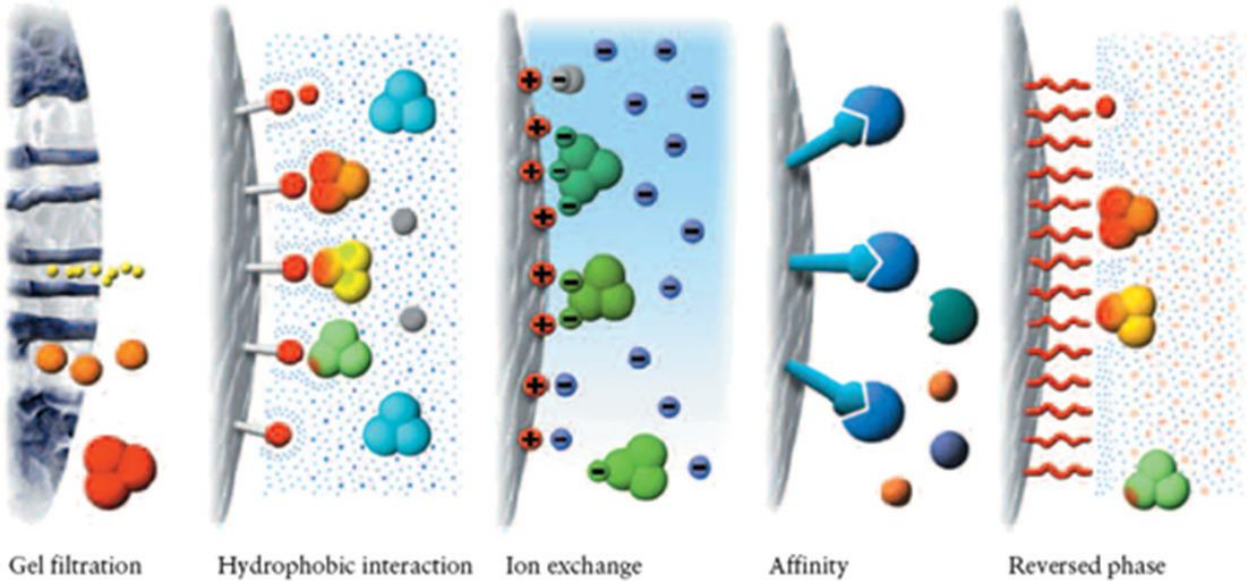
ไฮโดรเจนเปอร์อ๊อกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้น 0.1-0.3% หรือกรดอะมิโนซีสเตอีน (Cysteine) หรือกรดแอสคอบิค (Ascorbic Acid) ผสมลงไปในระหว่างการบดสับปะรดเพื่อช่วยชะลอกิจกรรมของเอนไซม์ [26] ในขณะที่ได้มีการเลือกใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่หลากหลาย ขึ้นอยู่กับต้องการนำไปใช้ที่ความเป็นกรดเป็นเบสเท่าไร อาทิ อะซีเตทบัฟเฟอร์ pH=4.5-5.5 หรือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH=6.5-7.0 หรือทริสบัฟเฟอร์ pH=8.0-8.5

การแยกเอนไซม์โบรมิเลนโดยใช้เกลือเติมลงไปในน้ำสับปะรดเป็นวิธีหนึ่งที่ทำได้ง่าย แต่มีความยุ่งยากในขั้นตอนต่อไปคือขั้นตอนการล้างเอาเกลือออกจากเอนไซม์ เกลือที่นิยมใช้ในการแยกเอนไซม์โบรมิเลนคือเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium Sulphate) ซึ่งการเติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตลงไปในสารละลายเอนไซม์เพียงเล็กน้อยจะช่วยให้เอนไซม์สามารถละลายในน้ำได้ดีขึ้น ซึ่งเรียกปรากฏการณ์เช่นนี้ว่า Salting-in ในเวลาต่อมา หากทำการเติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตลงไปมากจนถึงระดับหนึ่งที่ทำให้เกิดการตกตะกอนของโมเลกุลเอนไซม์ จะเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า Salting-out การตกตะกอนนั้นเกิดขึ้นเพราะในสารละลายเข้มข้นไปด้วยประจุไฟฟ้าของเกลือ (Ionic Strength) ทำให้โมเลกุลเอนไซม์ถูกเกลือดึงน้ำออกจากพื้นผิว และสูญเสียความสามารถในการละลายน้ำจึงตกตะกอนในที่สุด ส่วนการใช้แอลกอฮอล์เติมลงไปในน้ำสับปะรดโดยตรงก็เป็นวิธีที่ง่ายเช่นกัน แอลกอฮอลล์ที่นิยมใช้คือเอทานอล (Ethanol; C_2H_5OH) และต้องเย็นจัด โดยจะต้องนำเอทานอลไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสก่อนนำมาใช้งานจึงจะมีประสิทธิภาพสูงสุด ซึ่งก่อนหน้านี้มีรายงานวิจัยพบว่าเอนไซม์โบรมิเลนที่แยกออกมาด้วยวิธีการตกตะกอนด้วยแอลกอฮอลล์นั้น มีปริมาณและกิจกรรมของเอนไซม์โบรมิเลนที่สูงกว่าการใช้เกลือตกตะกอน [27]

อย่างไรก็ตามสิ่งที่ตกตะกอนออกมาจะได้ชีวโมเลกุลในน้ำสับปะรดทุกๆอย่างปะปนออกมา ซึ่งรวมถึงโพลีแซ็คคาไรด์ เช่นเพคตินซึ่งมีอยู่มากในสับปะรดปะปนออกมาและเป็นอุปสรรคในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์หรือการนำไปใช้ต่อไป เนื่องจากเพคตินที่ปะปนออกมานั้นมีความหนืดและแขวนลอยอย่างหนาแน่น ในช่วงของการละลายเอนไซม์โบรมิเลนผงเพื่อเตรียมจะนำไปใช้งานอาจทำให้เกิดความผิดพลาดของการเตรียม ซึ่งแน่นอนว่าควรจะต้องกำจัดเพคตินออกไปก่อนตั้งแต่เริ่มต้น แต่หากการนำเอนไซม์โบรมิเลนไปใช้ในบางงานที่ไม่ต้องคำนึงถึงการปะปนของเพคติน ก็สามารถนำเอนไซม์โบรมิเลนไปใช้ได้ทันทีโดยเพคตินเองก็ไม่ได้มีส่วนกีดขวางกิจกรรมของเอนไซม์โบรมิเลนแม้ว่าจะมีปะปนอยู่อย่างมากก็ตาม

นอกเหนือไปจากการคัดเลือกวิธีสกัดหรือการแยกเอนไซม์โบรมิเลนออกจากเซลล์สับปะรดที่เหมาะสมกับลักษณะงานได้แล้ว อีกสิ่งหนึ่งที่ควรต้องพิจารณาคือ ความเป็นไปได้ในการทำให้เอนไซม์โบรมิเลนบริสุทธิ์ ซึ่งจำเป็นต้องใช้เครื่องมือและกระบวนการทางวิทยาศาสตร์ที่ยุ่งยากและซับซ้อน การทำเอนไซม์โบรมิเลนให้บริสุทธิ์จำเป็นจะต้องใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ที่เฉพาะเจาะจง และต้องมีผู้ปฏิบัติงานที่มีความรู้ทางเอนไซม์วิทยา ซึ่งปัจจุบันเครื่องมือที่นิยมใช้มีราคาแพงมาก เครื่องมือที่นิยมใช้กันในระดับห้องปฏิบัติการสำหรับการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์นั้น มีชื่อว่า Fast Protein Liquid chromatography (FPLC) เครื่องมือชนิดนี้คือเครื่องมือที่แยกโปรตีนโดยอาศัยหลักการโครมาโตกราฟี (Chromatography) ผ่านวัสดุแยกซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดคอลัมน์และเป็นเฟสคงที่ ซึ่งวัสดุแยกนั้นจะมีคุณสมบัติต่างๆให้เลือกใช้ขึ้นอยู่กับคุณลักษณะของเอนไซม์ที่ต้องการจะทำให้บริสุทธิ์ และการดึงเอาเอนไซม์โบรมิเลนออกจากวัสดุแยก จะต้องใช้สารละลายที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ซึ่งจะใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมเป็นตัวชะ (Eluent) เอาเอนไซม์โบรมิเลนออกมา โดยทั่วไปคุณสมบัติของวัสดุแยกที่นิยมใช้มีอยู่ด้วยกัน 4 ชนิด ได้แก่ วัสดุแยกโปรตีนด้วยความแตกต่างของประจุไฟฟ้า (Ion Exchange) วัสดุแยกโปรตีนด้วยความ

แตกต่างของขนาดโมเลกุล (Size Exclusion หรือ Gel Filtration) วัสดุแยกโปรตีนด้วยความสามารถในการละลาย (Hydrophobic Interaction) และวัสดุที่แยกโปรตีนด้วยความเฉพาะเจาะจง (Affinity) [28-29]

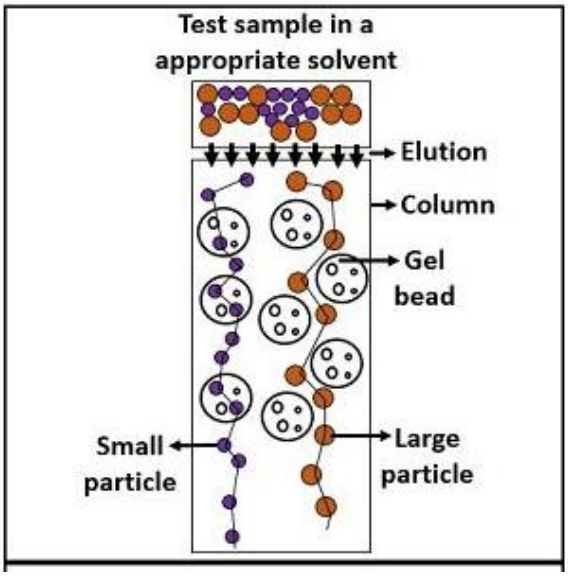


ภาพที่ 4 หลักการทั่วไปในการใช้แยกสารและทำสารชีวโมเลกุลให้บริสุทธิ์ ซึ่งการแยกและทำเอนไซม์โบรมิเลนให้บริสุทธิ์ส่วนใหญ่จะนิยมใช้ Ion exchange และ Gel filtration
ที่มา : https://www.cytivalifesciences.com/en/us/shop [29]

ภาพที่ 5 ลักษณะวัสดุแยกที่มีคุณสมบัติต่างๆและบรรจุในรูปของคอลัมน์ที่สามารถนำไปใช้งานได้ทันที
ที่มา : https://www.cytivalifesciences.com/en/us/shop [29]

วัสดุแยกโปรตีนด้วยความแตกต่างของประจุไฟฟ้า (Ion Exchange) วิธีการนี้เรียกอย่างย่อว่า IEX อาศัยหลักการวัสดุแยกที่มีแขนจับ (Ligand) เป็นประจุไฟฟ้าสองแบบคือประจุไฟฟ้าลบ (Cation; CIEX) และประจุไฟฟ้าบวก (Anion; AIEX) โดยแต่ละประจุมีชนิดย่อยๆ แบ่งได้เป็นแขนสั้น แขนยาว ประจุไฟฟ้าอ่อน และประจุไฟฟ้าเข้ม เป็นต้น และวัสดุแยกชนิดนี้ทางการค้าที่มีขายในท้องตลาดและเป็นที่นิยมใช้ อาทิเช่น วัสดุแยกของบริษัท AKTA ที่ชื่อ Mini-Q, Mono-Q และ Q-Sepharose เป็นต้น การใช้งานวัสดุแยกชนิดนี้ใช้หลักการสร้างสภาพแวดล้อมให้แก่โปรตีนมีสภาพประจุไฟฟ้าสุทธิบนโมเลกุลเป็นประจุที่ตรงกันข้ามกับวัสดุแยก เช่น ใช้วัสดุแยกชนิดประจุบวก ดังนั้นต้องสร้างสภาพแวดล้อมให้โปรตีนเป็นลบโดยใช้สารละลายบัพเฟอร์ที่มีคุณสมบัติเป็นลบ อาทิเช่น Tris buffer pH 9.0 เป็นต้น อย่างไรก็ตามต้องคำนึงถึงคุณสมบัติพื้นฐานทางชีวเคมีของโปรตีนที่จะสร้างสภาพแวดล้อมนั้นๆด้วย หากการปรับค่า pH ให้แตกต่างจากค่า PI (Isoelectric Point) ของโปรตีนมากเกินไป ก็อาจทำให้โปรตีนเกิดการเสียสภาพก่อนการเข้าสู่กระบวนการแยก

วัสดุแยกโปรตีนด้วยความแตกต่างของขนาดโมเลกุล (Size Exclusion) วิธีการนี้เรียกอย่างย่อว่า SEC อาศัยหลักการที่วัสดุแยกจะเป็นอนุภาคที่มีรูพรุนที่มีขนาดแน่นอนและรูพรุนนี้กว้างและลึกตลอดอนุภาคของวัสดุ โดยมีขนาดของรูพรุนที่แตกต่างกันเพื่อให้สามารถเลือกการคัดกรองโปรตีนที่มีขนาดต่างๆกัน คุณลักษณะของวัสดุนี้เรียกว่า molecular cut-off โดยการคัดกรองจะคัดจากตัวเลขมวลโมเลกุล เช่นวัสดุแยกที่สามารถ cut-off ได้ในช่วง 10,000-600,000 ดาลตัน หมายความว่าสามารถนำมาใช้ในการแยกโปรตีนที่มีขนาดในช่วงนี้ได้ดี การแยกจะถูกแบ่งแยกออกเป็นส่วนๆ โดยโมเลกุลโปรตีนที่มีขนาดใหญ่กว่าจะถูกชะออกจากคอลัมน์ได้เร็วกว่า ส่วนโมเลกุลโปรตีนที่มีขนาดเล็กกว่าจะถูกชะออกมาจากคอลัมน์ได้ช้ากว่า ยิ่งเล็กมากก็ยิ่งออกมาลำดับท้ายสุด เนื่องจากโมเลกุลที่เล็กจะสอดแทรกเข้าไปได้ในรูพรุนทุกๆอนุภาคของวัสดุแยก โดยต้องใช้เวลานานกว่าจะสามารถไหลผ่านวัสดุครบทุกอนุภาค ขณะที่โปรตีนที่โมเลกุลเล็กกว่าจะไหลเข้าไปได้บางอนุภาพบ้างก็ไหลผ่านรูพรุนออกไปจึงทำให้โปรตีนถูกชะออกมาเร็วที่สุด แต่ทั้งนี้ไม่ควรนำโปรตีนที่มีขนาดใหญ่เกินกว่า cut-off ที่กำหนดมาใส่ในวัสดุแยก เพราะโปรตีนซึ่งใหญ่มากไม่สามารถวิ่งผ่านวัสดุได้เลยทำให้คอลัมน์ที่บรรจุวัสดุเกิดการตันที่จุดเริ่มต้นส่วนบนและยากต่อการชะออก วัสดุแยกชนิด SEC โดยทั่วไปคอลัมน์จะมีลักษณะยาว เพื่อให้โมเลกุลของโปรตีนมีโอกาสเคลื่อที่ไหลผ่านรูพรุนได้ดีและทำให้เกิดการแยกโมเลกุลออกเป็น fraction ต่างๆ และวัสดุแยกชนิดนี้ทางการค้าที่มีขายในท้องตลาดและเป็นที่นิยมใช้ อาทิเช่น วัสดุแยกของบริษัท AKTA ที่ชื่อ Superdex Increase หรือ Sephadex เป็นต้น



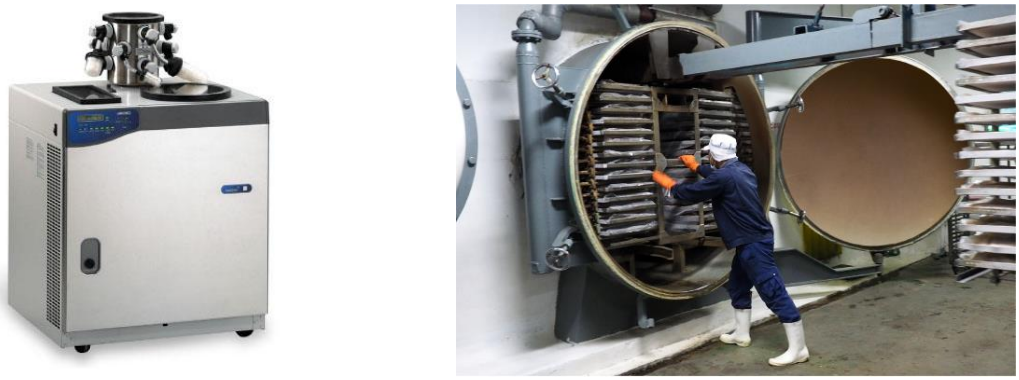
ภาพที่ 6 หลักการ Gel Filtration หรืออีกชื่อหนึ่งคือ Size Exclusion (SEC)
ที่มา : https://biologyreader.com/gel-filtration-chromatography.html [30]

วัสดุที่แยกโปรตีนด้วยความเฉพาะเจาะจง (Affinity) วิธีการนี้มีชื่อเรียกอย่างย่อว่า AC อาศัยหลักการให้โปรตีนได้ยึดเหนี่ยวกับวัสดุแบบเฉพาะเจาะจง คำว่าเฉพาะเจาะจงอาจอธิบายให้เข้าใจได้ง่ายขึ้นก็คือตัวอย่างของการยึดเหนี่ยวระหว่างแอนติบดีกับแอนติเจน หรือการยึดเหนี่ยวระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรท หรือการยึดเหนี่ยวด้วยพันธะทางเคมีที่เฉพาะอะตอมเท่านั้นเช่นการยึดเหนี่ยวระหว่างอะตอมกำมะถันด้วยกันในลักษณะโควาเลนท์ (Covalent Bond) เป็นต้น การใช้วัสดุแยกชนิดนี้ทำให้สามารถแยกได้เฉพาะโปรตีนเป้าหมายที่ต้องการโดยไม่มีการเจือปนของโปรตีนชนิดอื่นๆ วัสดุแยกของบริษัท AKTA ที่ชื่อ HisTrap หรือ GST-tagged เป็นต้น

การใช้เครื่อง FPLC ในการทำเอนไซม์โบรมิเลนให้บริสุทธิ์นี้ จะต้องใช้วัสดุแยก อย่างน้อย 2 ชนิด ซึ่งสามารถเริ่มต้นจากการใช้ ion exchange จากนั้นตามด้วยการใช้ size exclusion หรือในทางตรงกันข้ามสามารถเริ่มต้นด้วย size exclusion ก่อนและตามด้วย ion exchange ขึ้นอยู่กับเทคนิคที่ใช้และความเหมาะสมของสภาวะที่ใช้ในการทดลอง มีการทดลองก่อนหน้านี้ซึ่งใช้วัสดุแยกชนิด affinity เพียงอย่างเดียว ก็สามารถ ทำเอนไซม์โบรมิเลนให้บริสุทธิ์ได้มาก แต่อย่างไรก็ตามในท้ายที่สุดการทำเอนไซม์โบรมิเลนให้บริสุทธิ์นั้น ก็จำเป็นต้องแยกเกลือและไอออนขนาดเล็กที่เจือปนอยู่ออกจากโมเลกุลเอนไซม์ และก็ต้องตามด้วยการทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้เครื่องมืออีกแบบหนึ่ง อาทิเช่นอาทิเช่น การใช้เครื่อง vacuum concentrator หรือการระเหิดน้ำ (Lyophilization) ด้วยเครื่อง freeze dry ที่ทำให้เอนไซม์ที่บริสุทธิ์แล้วนั้นมีความเข้มข้นมากขึ้น ซึ่งเอนไซม์ที่เข้มข้นนี้จะมีเสถียรภาพมากกว่าเอนไซม์บริสุทธิ์ที่มีความเจือจาง

4. การแยกเอนไซม์โปรติเอสและเอนไซม์โบรมิเลนชนิด Crude ในส่วนของผลสับปะรด และการแปรรูปเป็นผงด้วยเทคโนโลยีทำแห้งเยือกแข็ง (Freeze Dry)

การทำแห้งเยือกแข็ง (Freeze Dehydration หรือ Lyophilization หรือ Freeze Drying) หมายถึงการทำแห้งด้วยการแช่ให้เย็นจัดมากจนเยือกแข็ง (Freezing) ทำให้น้ำเปลี่ยนสถานะเป็นผลึกน้ำแข็งก่อน จากนั้นจึงลดความดันเพื่อให้ผลึกน้ำแข็ง “ระเหิด” เป็นไอ ด้วยการลดความดันให้ต่ำกว่าบรรยากาศปกติ ขณะควบคุมให้อุณหภูมิต่ำ (ที่อุณหภูมิ เท่ากับหรือ ต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส น้ำแข็งระเหิดที่ความดันเท่ากับ 4.7 มิลลิเมตรปรอท หรือต่ำกว่า)



ภาพที่ 7 เครื่อง Freeze Dry ขนาดเล็ก (ซ้าย) และขนาดอุตสาหกรรม (ขวา)
ที่มา : https://thaicosmosfoods.co.th/th/index.php

หลักการในการ Freeze dry

1. การแช่เยือกแข็ง (Freezing) เป็นการลดอุณหภูมิของอาหารให้ต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง (Freezing Point) เพื่อให้เกิดผลึกน้ำแข็ง (Ice Crystal Formation) อัตราเร็วของการแช่เยือกแข็ง (Freezing Rate) ควรเป็นการแช่เยือกแข็งแบบเร็ว เพื่อให้เกิดผลึกและผลึกที่เกิดขึ้นจะมีขนาดเล็ก การแช่เยือกแข็งแบบเร็ว ที่นิยมใช้กันมีหลายวิธี เช่น การแช่เยือกแข็งแบบใช้ลมเย็นเป่า (Air Blast Freezing) การแช่เยือกแข็งแบบไครโอเจน (Cryogenic Freezing) และการแช่เยือกแข็งแบบจุ่มในของเหลวเย็นจัด (Immersion Freezing) เป็นต้น

2. การทำแห้งขั้นต้น (Primary Drying) เป็นการลดปริมาณน้ำ (Dehydration) โดยการระเหิด น้ำแข็งให้เป็นไอโดยการลดความดันบรรยากาศ เพื่อให้ผลึกน้ำแข็งที่อยู่ภายในเกิดการระเหิดเป็นไอ ออกไปจากผิวหน้าของผลิตภัณฑ์ ระดับของสุญญากาศควรอยู่ต่ำกว่า 132 Pa และ 132 mPa ตามลำดับ การระเหิดของผลึกน้ำแข็งจึงเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ การระเหิดของชั้นน้ำแข็ง (Ice Layer) จะเริ่มจากชั้นน้ำแข็งบริเวณผิวหน้าของผลิตภัณฑ์ระเหิดไปเป็นไอ ทำให้บริเวณนี้กลายเป็นชั้นแห้ง (Dry Layer) จากนั้น เป็นการระเหิดของชั้นน้ำแข็งที่อยู่ภายในผลิตภัณฑ์ ระเหิดผ่านชั้นแห้ง ออกไปสู่ผิวหน้าของผลิตภัณฑ์ โดยระยะเวลาการระเหิด ขึ้นอยู่กับขนาด รูปร่าง และโครงสร้างของผลิตภัณฑ์แต่ละชนิด

3. การทำแห้งขั้นที่สอง (Secondary Drying) เมื่อการทำแห้งขั้นต้นเสร็จสมบูรณ์ น้ำแข็งจะละลายไปหมด จะมีความชื้นที่หลงเหลืออยู่ จึงต้องมีการทำแห้งด้วยการเพื่ออุณหภูมิให้สูงขึ้น เพื่อดึงเอาความชื้นที่เหลืออยู่ออกถึงระดับความชื้นที่ปลอดภัยสำหรับการเก็บรักษา

ข้อดีการการทำแห้งเยือกแข็งก็คือ เป็นการทำแห้งขณะที่อาหารมีอุณภูมิต่ำจึงลดการสูญเสียของอาหารเนื่องจากความร้อน ลดการทำลายเนื้อเยื่อและโครงสร้างอาหาร ทำให้ได้อาหารแห้งที่ได้มีคุณภาพสูง มีการคืนตัว (Rehydration) ที่ดี รักษาคุณภาพอาหาร เช่น สี กลิ่น รสชาติ และลักษณะเนื้อสัมผัสของอาหารได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการทำแห้ง แบบอื่น เช่น การทำแห้งแบบพ่นละออง (Spray Drier) การทำแห้งด้วยลมร้อน เช่น ตู้อบลมร้อน (Tray Drier หรือ Cabinet Drier) แต่มีค่าใช้จ่ายสูงเมื่อเปรียบเทียบกับการทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งที่ใช้ลมร้อนทั่วไป

ขั้นตอนการสกัดเอนไซม์โบรมิเลนชนิด Crude จากผลสับปะรดและการแปรรูปเป็นผงด้วยวิธี Freeze Dry

1. ปอกสับปะรดหั่นเป็นชิ้นพอประมาณ
2. นำสับปะรดใส่ในถุงผ้าหรือห่อด้วยผ้าขาวบาง แล้วหีบน้ำสับปะรดออกมาโดยห้ามทำการปั่น
3. เตรียมสารละลาย Sodium bicarbonate โดยตัก Sodium bicarbonate 1 ช้อนโต๊ะ โรยลงไปในน้ำดื่ม 200 ml คนให้ละลายจนหมด
4. ค่อยๆเติมสารละลายจากข้อ 3 ลงไปในน้ำสับปะรดใช้อัตราส่วน น้ำสับปะรด : สารละลายข้อ 3 = 5 ลิตร : 200 ml หากต้องการให้ได้ผลที่ดี ให้ทำการปรับค่า pH ของน้ำสับปะรดขึ้นมาอยู่ที่ประมาณ 7.0-7.5 (โดยอาจใช้สารละลาย Sodium carbonate ร่วมกับ Sodium bicarbonate โดยการเติม Sodium carbonate เพียงเล็กน้อยจะช่วยในการเพิ่มค่า pH ให้เร็วขึ้น
5. นำสิ่งที่ได้ในข้อ 4 เทใส่ถังน้ำพลาสติกที่มีก๊อกระบายน้ำแล้วนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิช่วง 1-4 ° C ทิ้งไว้ข้ามคืน หรือจนเกิดตะกอนของ pectin ที่ก้นถังซึ่งอาจใช้เวลาที่เร็วกว่านี้
6. แบ่งน้ำสับปะรดในข้อ 5 มาเตรียม stock ของ Maltodextrin 20% w/v
7. แบ่งน้ำสับปะรดในข้อ 5 มาเตรียม stock ของ Tricalcium phosphate (TCP INS341(iii)) 2% w/v
8. แบ่งน้ำสับปะรดในข้อ 5 มาเตรียม stock ของ กรดอะมิโน Cysteine 1% w/v
9. นำน้ำสับปะรดจากข้อ 5 ผสมกับสารละลายในข้อ 6 และ 7 อัตราส่วนคือ น้ำสับปะรด : Maltodextrin : TCP : Cysteine = 1 L : 100 ml : 100 ml : 100 ml คนให้เป็นเนื้อเดียวกัน
10. ขั้นตอน Freeze นำไปราดบนถาดสแตนเลสบางๆแล้วแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -40 ° C ค้างคืน หากเป็นไปได้เมื่อครบเวลาให้ขูดเลาะน้ำสับปะรดเยือกแข็งแล้วกลับด้าน จากนั้นแช่ต่อไปอีก 4-6 ชม.
11. ขั้นตอน Dry นำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง Freeze dryer ที่อุณหภูมิ -60 ° C เป็นเวลา 36 ชม.
12. เมื่อครบเวลาหรือสังเกตเห็นว่าผลผลิตเป็นผงหรือแห้งดีแล้ว ให้นำออกมาเก็บใส่ซองอลูมิเนียมฟอร์ยดที่มีซิลิกาดูดความชื้นแล้วนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิช่วง 1-4 ° C (Secondary Drying)
13. สามารถทำให้เป็นผงได้โดยการใช้ไม้นวดแป้งโดบดคลึงซองอลูมิเนียมฟอร์ยดเบาๆ

5. การแยกเอนไซม์โปรติเอสและเอนไซม์โบรมิเลนให้บริสุทธิ์บางส่วน (Partial Purification) ด้วย Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)

การใช้เครื่อง FPLC สำหรับทำเอนไซม์โบรมิเลนให้บริสุทธิ์นั้น เหมาะสมสำหรับการนำเอนไซม์โบรมิเลนไปใช้ต่อในงานเกี่ยวกับการแพทย์ หรือการวิจัยทางด้านวิทยาศาสตร์ (ภาพที่ 8) แต่ถ้าเป็นการนำเอนไซม์โบรมิเลนไปใช้ต่อทางด้านเกี่ยวกับอาหาร ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร หรือในอุตสาหกรรม การใช้เครื่อง FPLC จะทำให้ไม่คุ้มค่า เนื่องจากแม้การใช้ FPLC จะทำให้ได้เอนไซม์โบรมิเลนที่บริสุทธิ์ แต่ปริมาณที่ได้มีน้อยมาก หากมีความต้องการเอนไซม์โบรมิเลนบริสุทธิ์ในปริมาณมากๆ ก็จำเป็นต้องใช้เครื่อง FPLC นี้ทำให้บริสุทธิ์จำนวนหลายรอบ จากนั้นจึงค่อยนำมา pool รวมกัน และอาจจำเป็นต้องทำให้มีความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้น ซึ่งเครื่อง FPLC ในปัจจุบันมีอยู่ด้วยกันหลายขนาดทั้งขนาดเล็กตั้งโต๊ะที่แยกได้ในระดับไมโครลิตรและเครื่องขนาดใหญ่ที่แยกได้ในระดับเป็นลิตร และแน่นอนว่าราคาย่อมต้องสูงตามปัจจุบัน

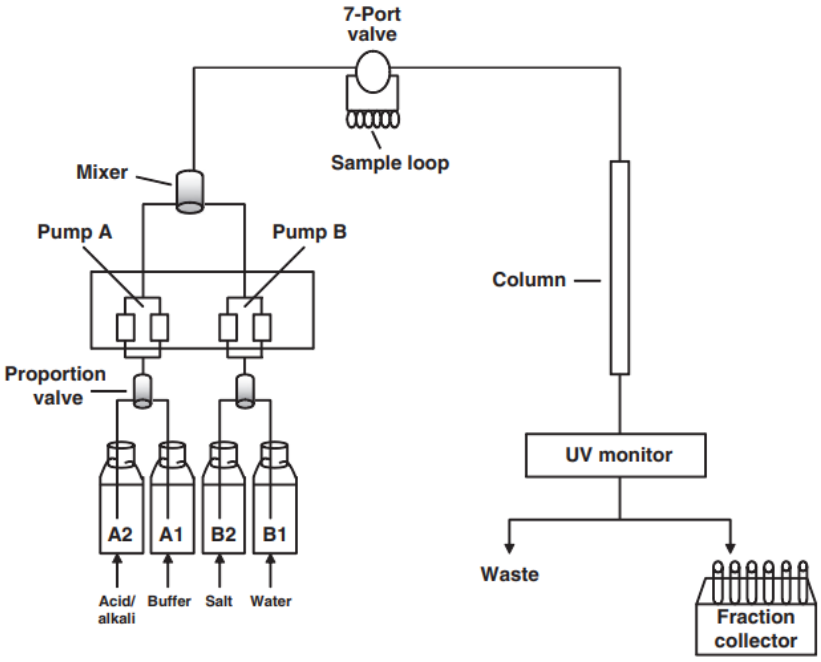
ปัจจุบันเครื่อง FPLC มีความทันสมัยและมีสมรรถนะที่ดีขึ้นกว่าก่อนมาก สามารถทำการดัดแปลงวัสดุแยกและนำไปต่อเข้ากับเครื่องหรือคอลัมน์หรือวัสดุแยกที่มีจำหน่ายอยู่ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทำให้บริสุทธิ์ให้ดีขึ้นและรวดเร็วขึ้น และยังมีการพัฒนาคอลัมน์ที่สามารถแยกเกลือออกจากโมเลกุลโปรตีนได้ด้วยการชะด้วยบัฟเฟอร์เพียงขั้นตอนเดียว โดยไม่ต้องเสียเวลาในการใช้เทคนิค Dialysis อีกต่อไป

ภาพที่ 8 เครื่องแยกหรือทำโปรตีนหรือเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) ยี่ห้อ Pharmacia โดยเครื่องซ้ายคือเครื่องรุ่นแรกๆ ส่วนเครื่องขวาคือเครื่องรุ่นปัจจุบันที่ใช้คอมพิวเตอร์ควบคุมทั้งระบบ ซึ่งในเวลาต่อมาได้ใช้ชื่อทางการค้าว่า AKTA
ที่มา : https://www.cytivalifesciences.com/en/us

การแยกและทำเอนไซม์โบรมิเลนให้บริสุทธิ์บางส่วน

ระบบการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์เมื่อใช้เครื่อง FPLC (ภาพที่ 9) ซึ่งในการปฏิบัติงาน จำเป็นต้องมีเครื่องมืออย่างอื่นประกอบเพิ่มเติม อาทิเช่น เครื่องทำให้เข้มข้นแบบสุญญากาศ (Vacuum Concentrator) ถุงไดอะไลซิส

(Dialysis Bag) และเครื่องปั่นเหวี่งความเร็วสูงแบบทำความเย็น (Refrigerated Centrifuge) เพื่อให้กระบวนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์มีความคล่องตัวขึ้น (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 9 ระบบการทำเอนไซม์โบรมิเลนให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่อง FPLC
ที่มา : Madadlou A และคณะ [28]

ภาพที่ 10 จากซ้ายไปขวา เครื่องทำให้เข้มข้นแบบสุญญากาศ (Vacuum Concentrator) ถุงไดอะไลซิส (Dialysis Bag) และเครื่องปั่นเหวี่งความเร็วสูงแบบทำความเย็น (Refrigerated Centrifuge)

ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์

1. นำเอนไซม์โบรมิเลนผงที่ผลิตได้จากขั้นตอนการทำ Freeze Dry จำนวน 1 กรัม มาละลายในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ปริมาตร 50 ml

2. เติมผงเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตลงไป 20.6 1 กรัม คนให้ละลายอย่างต่อเนื่องด้วย magnetic stirrer โดยหล่อเย็นด้วยน้ำแข็ง อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำตะกอนที่ได้มาละลายในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ปริมาตร 5 ml

4. นำสารละลาย enzyme ที่ได้ไปไดอะไลซิสในถุงไดอะไลซิส โดยแช่ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยทำการเปลี่ยนบัฟเฟอร์ ทุกๆ 3 ชั่วโมง

5. นำเอนไซม์ที่ไดละไลซิสเรียบร้อยแล้ว มาผ่านคอลัมน์ ion Exchange (IEX) โดยใช้วัสดุแยก DEAE ซึ่งในระบบของคอลัมน์จะทำการ equilibrate ด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0

6. ทำการชะเอนไซม์ที่จับกับคอลัมน์ IEX ออก ด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มี 0.5 โมล่าล์โซเดียมคลอไรด์ และทำการวัดปริมาณเอนไซม์ที่ถูกชะออกมา โดยวัดด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

7. เก็บเอนไซม์ที่ถูกชะออกมาในหลอดทดลอง fraction ละ 1 ml

8. จากนั้นทำการ pool fraction ที่ตรวจพบโปรตีนมารวมกัน

9. นำไปทำให้เข้มข้นโดยใช้เครื่องคอนเซนเตรเตอร์สุญญากาศ (Vacuum Concentrator)

10. นำเอนไซม์ที่เข้มข้นแล้วไปผ่านคอลัมน์ Gel filtration (SEC) เพื่อทำการแยกเกลือออกจากเอนไซม์

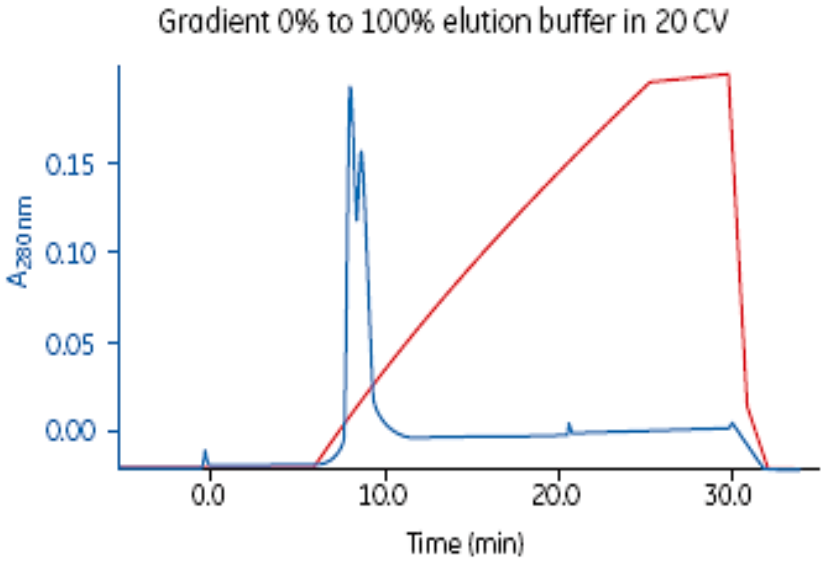
11. ทำการชะเอนไซม์ออกจากคอลัมน์ SEC ด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 และทำการวัดปริมาณเอนไซม์ที่ถูกชะออกมา โดยวัดด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

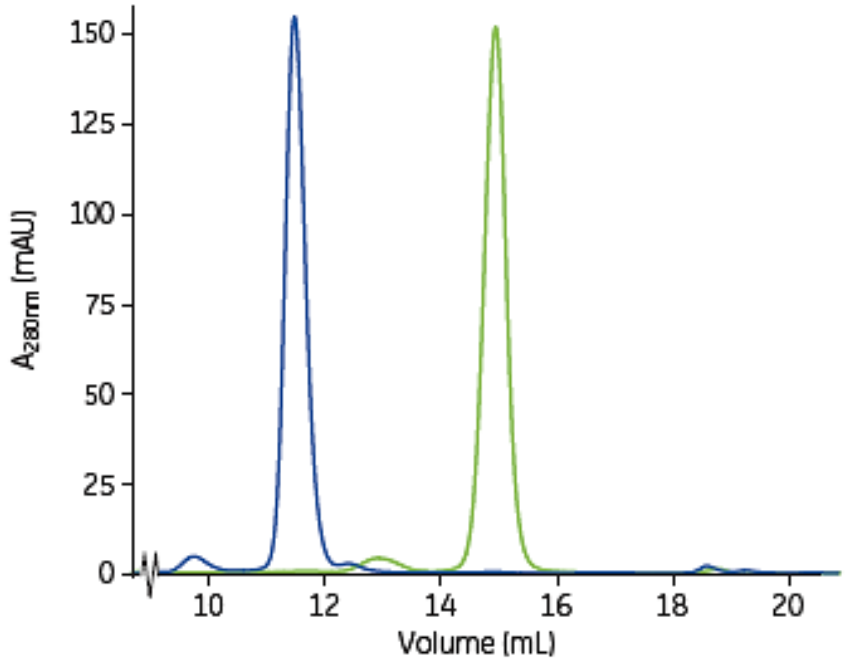
12. เก็บเอนไซม์ที่ถูกชะออกมาในหลอดทดลอง fraction ละ 1 ml

13. จากนั้นทำการ pool fraction ที่ตรวจพบโปรตีนมารวมกัน

14. นำไปทำให้เข้มข้นโดยใช้เครื่องคอนเซนเตรเตอร์สุญญากาศ (Vacuum Concentrator)

15. นำไปทำให้เป็นผงด้วยเทคนิค Freeze Dry โดยทำการทำแห้งในหลอดแอมพู่





ภาพที่ 11 ลักษณะของกราฟที่ได้จากการชะเอนไซม์ออกจากวัสดุแยกด้วย IEX (บน) และ SEC (ล่าง)
ที่มา : https://www.cytivalifesciences.com/en/us

6. การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสด้วยการย่อยสลายโปรตีนมาตรฐานเคซีน (Casein) และเจาติน (Gelatin)

วิธี Casein Digest Unit (CDU)

หลักการ ในการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสด้วยวิธีนี้จะใช้โปรตีน “เคซีน” เป็น substrate โดยโปรติเอสจะย่อยเคซีนจนกลายเป็นเพฟไทด์และกรดอะมิโน และกรดอะมิโนไทโรซีนอิสระจำนวนหนึ่ง รวมทั้งที่ยึดอยู่กับสายเพฟไทด์สายสั้นๆ จะสามารถทำปฏิกิริยากับสาร “Folin Ciocalteu” หรือ FC Reagent เกิดเป็นสารประกอบสีน้ำเงิน (blue colored chromophore) ซึ่งหากมีปริมาณไทซีนมาก สีน้ำเงินจะเข้มไปจนแสดงออกเป็นเฉดสีม่วง และสามารถตรวจสอบปริมาณสารประกอบนี้ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นช่วง Visible (ตรวจวัดได้ดีที่ช่วง 500-600 นาโนเมตร) โดยทำการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงกับสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโนไทโรซีนที่เตรียมจากการ dilution ความเข้มข้นระดับต่างๆ วิธี FC Reagent นี้สามารถวิเคราะห์ปริมาณการเกิดสารประกอบสีน้ำเงินได้ในระดับปริมาณไมโครโมล

สารเคมี

- Potassium Phosphate dibasic trihydrate
- Casein
- Trichloroacetic Acid
- Folin & Ciocalteu's Phenol Reagent
- Sodium Carbonate Anhydrous
- Sodium Acetate Trihydrate
- Calcium Acetate
- L-Tyrosine

อุปกรณ์ที่สำคัญ

- Spectrophotometer

วิธีการ

1. เตรียมสารต่อไปนี้

1.1 50 mM Potassium Phosphate Buffer pH7.5 (ปรับค่า pH ด้วย 1M HCl)

1.2 0.65% w/v Casein ใน 50 mM Potassium Phosphate Buffer pH7.5 (และปรับ pH ให้ได้ 7.5)

1.3 110 mM Trichloroacetic acid (TCA) โดยสามารถเตรียมได้อย่างง่ายคือ ใช้อัตราส่วน 6.1N TCA : DI Water = 1 : 55

1.4 0.5 M Folin Ciocalteu's Phenol Reagent โดยสามารถเตรียมอย่างง่ายคือ ใช้อัตราส่วน 2M Folin : DI Water = 1 : 4

1.5 500 mM Sodium Carbonate

1.6 10 mM Sodium Acetate + 5 mM Calcium Acetate Buffer pH 7.5 (ปรับ pH ด้วย 0.1 M Acetic acid และ 0.1 N NaOH)

1.7 1 mM L-Tyrosine

1.8 สารละลายเอนไซม์โปรติเอสมาตรฐาน หรือ Unknown เจือจางใน Sodium/Calcium Acetate Buffer pH7.5 และนำไปแช่น้ำแข็งไว้ (เตรียมใหม่ทุกครั้ง) โดยอาจใช้หลักการนำเอนไซม์ที่เจือจางแล้วไปวิเคราะห์ค่า Abs ที่ OD 280 nm ให้ได้ค่าที่เหมาะสมคือในช่วง 0.1-0.5

1.9 สร้างกราฟมาตรฐาน L-Tyrosine โดยใส่สารปริมาณต่อไปนี้ในหลอดทดลอง (ปริมาตร ml)

สาร	Point1	Point2	Point3	Point4	Point5	Blank
1 mM L-Tyrosine	0.05	0.1	0.2	0.4	0.5	-
DI Water	1.95	1.90	1.80	1.60	1.50	2
500 mM Na_2CO_3	5	5	5	5	5	5
0.5 M Folin	1	1	1	1	1	1
Concentration of Tyrosine	25 µM	50 µM	100 µM	200 µM	250 µM	0 µM

จากนั้นนำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที รอจนเย็นที่ Room Temp จากนั้นวัดค่า Abs OD660 nm โดยใช้ Blank ในการ Set 0

2. ขั้นตอนวิเคราะห์

2.1 ใส่สารปริมาณต่อไปนี้ในหลอดทดลอง (ปริมาตร ml)

สาร	Test	Blank
สารละลาย Casein	4	4

2.2 นำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 10 นาที

2.3 เติมสารละลายเอนไซม์โปรติเอสมาตรฐาน หรือ Unknown ในข้อ 1.8 ลงไป (ปริมาตร ml)

สาร	Test	Blank
เอนไซม์/Unknown	1	-
Sodium/Calcium Acetate Buffer pH7.5	1	2

2.4 ผสมและบ่มที่ อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 10 นาที

2.5 เติมสารต่อไปนี้ (ปริมาตร ml)

สาร	Test	Blank
TCA	5	5

2.6 ตรวจสอบปริมาตรให้ดีว่าทุกหลอดมีปริมาตร 11 ml จากนั้นนำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที

2.7 กรองเอาส่วนใสแต่ละหลอดมาใช้ โดยเติมสารต่อไปนี้ (ปริมาตร ml)

สาร	Test	Blank
ส่วนใสที่กรองได้จาก **Test**	2	-
ส่วนใสที่กรองได้หลอด Blank	-	2
500 mM Na_2CO_3	5	5
0.5 M Folin	1	1

จากนั้นนำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลา 30 นาที รอจนเย็นที่ Room Temp จากนั้นวัดค่า Abs OD660 nm โดยใช้ Blank ในการ Set 0

3. การคำนวณ

3.1 Plot graph แกน Y คือ OD660nm ที่วิเคราะห์ได้จากการทำกราฟมาตรฐาน L-Tyrosine

3.2 คำนวณค่า Slope แล้วนำสมการมาใช้เพื่อคำนวณโดยค่า OD660nm ที่วิเคราะห์จาก Unknown นำไปแทนค่า Y ในสมการจากนั้นคำนวณเพื่อหาค่า X จากนั้นนำค่า X ที่ได้ไปใส่ในสูตรต่อไปนี้

$$\text{Unit/mL} = \frac{(\mu\text{mol Tyrosine})\,(11)}{(1)(10)(2)}$$

(11) คือปริมาตรรวมที่ผสมในขั้นตอนที่ 2.1-2.5

(2) คือปริมาตรของส่วนใสที่กรองได้จากหลอด Test และนำมาผสมในตาราง 2.7

(1) คือปริมาตรของเอนไซม์ที่นำมาผสมในตารางที่ 2.3

(10) คือเวลาที่บ่มปฏิกิริยาในข้อ 2.4

$$\text{Unit/mg solid} = \frac{\text{Unit/mL}}{\text{mg Solid/mL}}$$

$$\text{Unit/mg protein} = \frac{\text{Unit/mL}}{\text{mg protein/mL}}$$

การวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้เมื่อถึงขั้นตอนที่ 2.7 จะสามารถวิเคราะห์เอนไซม์โปรติเอสได้ความเข้มข้นขั้นต่ำที่ 0.1-0.2 Unit/mL หากมีปริมาณโปรติเอสน้อยกว่านี้จะไม่สามารถวิเคราะห์ได้อย่างแม่นยำ ควรไปใช้วิธีอื่นที่มีความว่องไวกว่าอาทิเช่นการใช้ Substrate Specificity

วิธี Gelatin Digest Unit (GDU)

วิธีนี้ใช้โปรตีนเจลาตินเป็นสับสเตรท โดยให้เอนไซม์โบรมิเลนย่อยสลายเจลาตินในสภาวะเป็นกรดอ่อน (PH ประมาณ 4-5) จนได้โอลิโกเพปไทด์ จากนั้นจะไตรเตรทกับ NaOH โดยจุดยุติคือค่า pH และนำปริมาตรของ NaOH ที่ใช้ไปมาคำนวณตามสูตร ข้อดีของวิธีการนี้คือไม่ต้องสร้างกราฟมาตรฐานของสารอ้างอิง หรือ สับสเตรท และไม่ต้องคำนวณค่า factor ของความเจือจางหรือความเข้มข้นย้อนกลับซึ่งทำให้มีโอกาสเกิดความผิดพลาดสูง แต่อย่างไรก็ตามการใช้วิธี GDU นี้เป็นการบังคับให้เอนไซม์โบรมิเลนมีกิจกรรมที่ pH ประมาณ 4-5 ซึ่งในการทดลองจะต้องสังเกตในเบื้องต้นด้วยว่าเอนไซม์โบรมิเลนที่นำมาศึกษานั้นไม่เกิดการเสียสภาพในสภาวะการทดลอง

วิธีการ

1. เตรียมสารต่อไปนี้

1.1 น้ำ DI ซึ่งปรับ pH ให้เท่ากับ 4.5 ด้วย HCl

1.2 สารละลายเจลาติน โดยละลายเจลาติน 25 กรัม ในน้ำที่เตรียมจากข้อ 1 ปริมาตร 375 ml อุ่นให้ร้อนแต่ไม่เดือด จนเจลาตินละลายหมด ปรับ pH ให้เท่ากับ 4.5 ด้วย HCl จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 500 ml แล้วนำไปอุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 45 °C ตลอดเวลา

1.3 สารละลายบัฟเฟอร์ เตรียมโดยละลาย NaCl 15 กรัม ในน้ำ 50 ml และเติม Acetic acid ลงไปปริมาตร 0.5 ml จากนั้นปรับ pH ให้เท่ากับ 4.5 ด้วย NaOH

1.4 3% H_2O_2

1.5 37% Formaldehyde pH 9.0 (ปรับ pH ด้วย NaOH)

1.6 สารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH (ไม่ควรเตรียมเองแนะนำให้ซื้อ)

1.7 สารละลายเอนไซม์โบรมิเลน หรือ Unknown ที่ละลายในบัฟเฟอร์ที่เตรียมในข้อ 3.

2. ขั้นตอนการวิเคราะห์

2.1 เตรียมสารละลายต่อไปนี้ลงในบีเกอร์ ปริมาตรคือ ml

สาร	Test	Blank
Gelatin	25	25

2.2 นำไปอุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 45 °C ตลอดเวลา

2.3 เติมสารละลายต่อไปนี้ลงในบีเกอร์ Test ปริมาตรคือ ml

สาร	Test
Bromelain หรือ Unknown	1
อุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 20 นาที	
3% H_2O_2	0.1
อุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 5 นาที	

ปรับ pH ให้ได้ 6.0 ด้วย 0.1N NaOH	
37% Formaldehyde pH 9.0	10
ปรับ pH ให้ได้ 9.0 ด้วย 0.1N NaOH (จดบันทึกปริมาตรเป็น Test titer; T)	

2.4 เติมสารละลายต่อไปนี้ลงในบีเกอร์ Blank ปริมาตรคือ ml

สาร	**Test**
3% H_2O_2	0.1
อุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 20 นาที	
บัฟเฟอร์	1
อุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 5 นาที	
ปรับ pH ให้ได้ 6.0 ด้วย 0.1N NaOH	
37% Formaldehyde pH 9.0	10
ปรับ pH ให้ได้ 9.0 ด้วย 0.1N NaOH (จดบันทึกปริมาตรเป็น Blank titer; B)	

2.5 นำปริมาตรของ NaOH ที่ใช้และจดบันทึกไว้ตามค่า T และ B มาคำนวณในสูตร

$$GDU/g = \frac{(T-B) \times 14 \times N \times 50}{Wt\ (g)}$$

T คือ ปริมาตรของ Test titer (ml)

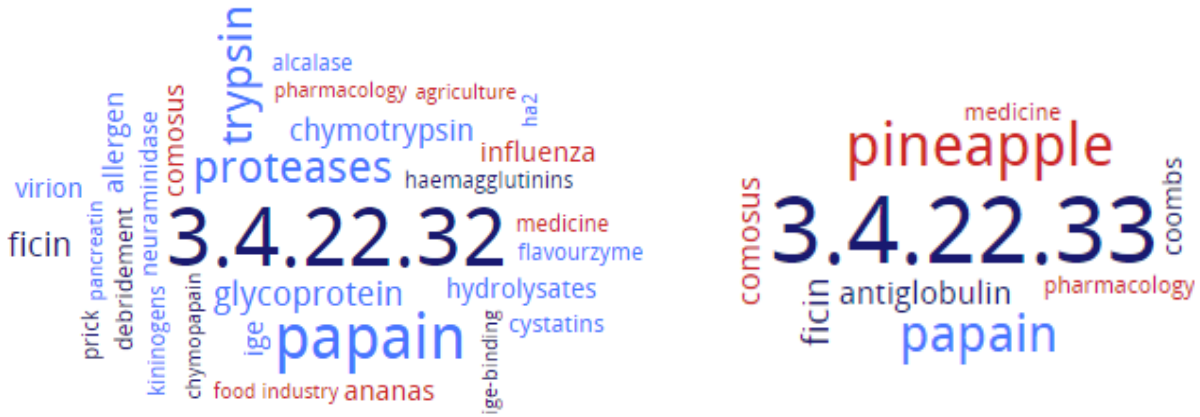
B คือ ปริมาตรของ Blank titer (ml)

N คือ ความเข้มข้นของ NaOH (ในขั้นตอนใช้ 0.1)

Wt (g) คือ น้ำหนักของผงเอนไซม์ หรือ ผง Unknown ที่นำมาวิเคราะห์

7. ประเด็นปัจจุบัน (Current Issue) ที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันการนำเอนไซม์โบรมิเลนไปใช้ประโยชน์ครอบคลุมทั้งในระดับอุตสาหกรรม การแพทย์ และรวมไปถึงเรื่องสุขภาพที่ประชาชนทั่วไปสามารถเอื้อมถึงประโยชน์ได้ หากวิเคราะห์จากฐานข้อมูล BRENDA ซึ่งเป็นฐานข้อมูลที่รวบรวมองค์ความรู้ที่สำคัญของเอนไซม์ชนิดต่างๆในโลกเข้าไว้ด้วยกัน (The Comprehensive Enzyme Information System) ก็จะพบความเชื่อมโยงของเอนไซม์โบรมิเลนเข้ากับสิ่งต่างๆหลายประเด็นดังที่แสดงในภาพที่ 12



ภาพที่ 12 แสดงการเชื่อมโยงคำสำคัญของเอนไซม์โบรมิเลนในสับปะรด (Stem Bromelain; 3.4.22.32 และ Fruit Bromelain; 3.4.22.33) กับคำสำคัญของสิ่งต่างๆ ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกันทั้งทางตรงและทางอ้อม ทั้งในมิติของการวิจัย การประยุกต์ใช้ ข้อกฎหมาย และอุตสาหกรรม
ที่มา : https://www.brenda-enzymes.org [32]

จะเห็นได้ว่าเอนไซม์โบรมิเลนมีความเกี่ยวข้องกับประเด็นสำคัญปัจจุบันของมนุษยชาติ ไม่ว่าจะเป็นเรื่องเกี่ยวกับสารภูมิแพ้ (Allergen) เกี่ยวกับไวรัส เกี่ยวกับการแพทย์ เกี่ยวกับความมั่นคงทางอาหาร การเกษตรพื้นฐาน อุตสาหกรรมเกษตร รวมไปถึงเรื่องสิ่งแวดล้อม งานวิจัยทางการแพทย์ล่าสุดในปี 2020 นี้ได้มีการรายงานเกี่ยวกับการศึกษาวิจัยเพื่อไขความลับของเอนไซม์โบรมิเลนที่มีศักยภาพในการลดภาวะความดันโลหิตสูงในผู้ป่วย ซึ่งมีหลักฐานให้เชื่อได้ว่า เอนไซม์โบรมิเลนเกี่ยวข้องกับกลไกบางอย่างของเอนไซม์แองจิโอเทนซินคอนเว๊อรติ้ง (Angiotensin Converting Enzyme I; ACE) ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าการใช้เอนไซม์โบรมิเลนควบคู่ไปกับยาต้านที่เป็น ACE inhibitor ซึ่งสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของตัวยาให้ดีมากขึ้น สามารถลดการใช้โดสยาลง ทำให้ผลข้างเคียงลดน้อยลง แต่ก็พบว่าเอนไซม์โบรมิเลนมีส่วนที่ทำให้ผู้ป่วยลดอาการไอซึ่งเป็นผลข้างเคียงของการใช้ยา ACE inhibitor ลงได้อย่างเห็นได้ชัด จึงได้มีการขนานนามให้เอนไซม์โบรมิเลนในสับประรดเป็น ”โภชนเภสัชภัณฑ์” (Nutraceutical) [33]

การวิเคราะห์ทางด้านธุรกิจที่เกี่ยวกับเอนไซม์โบรมิเลนชี้ว่า ปัจจุบันมีผู้ผลิตยักษ์ใหญ่ที่เป็นผู้สกัดและจำหน่ายเอนไซม์โบรมิเลนสำหรับนำไปแปรรูปต่อเป็นผลิตภัณฑ์กระจายอยู่ทั่วโลกใน 5 ภูมิภาคได้แก่ North America (United States, Canada and Mexico) Europe (Germany, France, UK, Russia and Italy) Asia-Pacific (China, Japan, Korea, India and Southeast Asia) South America (Brazil, Argentina, etc.) และ Middle East & Africa (Saudi Arabia, Egypt, Nigeria and South Africa) ในประเทศต่างๆเหล่านี้จะมีกลุ่มบริษัททางด้านเทคโนโลยีเพียงไม่กี่แห่งที่เป็นผู้ครอบครองเทคโนโลยีการสกัดเอนไซม์โบรมิเลนขาย บริษัทเหล่านั้นได้แก่

- Enzybel International SA Nanning Doing-Higher Bio-Tech Co., Ltd.
- Hong Mao Biochemicals Co., Ltd
- Biozym Gesellschaft fur Enzymtechnologie mbH

- Guangxi Nanning Javely Biological Products Co., Ltd
- Ursapharm Arzneimittel GmbH
- Enzyme Technologies
- Nanning Pangbo Biological Engineering Co., Ltd
- Great Food Group of Companies
- Changsha Natureway Co., Ltd

และในจำนวนบริษัทที่กล่าวมานี้ มีบริษัท 2 แห่งที่ตั้งฐานการผลิตอยู่ในประเทศไทยได้แก่ Hong Mao Biochemicals Co., Ltd ซึ่งอยู่ที่จังหวัดระยอง และ Great Food Group of Companies ซึ่งมีโรงงานอยู่ที่จังหวัดสมุทรสาคร ส่วนผลิตภัณฑ์จากการนำเอนไซม์โบรมิเลนไปพัฒนาต่อยอดก็พบว่าในปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่นำผลจากงานวิจัยมาใช้เป็นจุดขายเอนไซม์โบรมิเลนกันมากขึ้น อาทิเช่น เอนไซม์โบรมิเลนเพื่อบำบัดอาการของโรคข่อเข่าเสื่อม (Joint Support) เอนไซม์โบรมิเลนที่ผสมกับควอเซอติน (Quercertin) สำหรับส่งเสริมสุขภาพผู้ที่มีภาวะความดันและหลอดเลือด เอนไซม์โบรมิเลนเม็ดสำหรับผู้มีอาการไซนัส เอนไซม์โบรมิเลนผสมขมิ้น หรือเอนไซม์โบรมิเลนที่ผสมเอนไซม์โปรติเอสตัวอื่นเข้าไปเช่นปาเปน

ภาพที่ 13 การนำเอนไซม์โบรมิเลนมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ส่งเสริมสุขภาพ ซึ่งส่วนใหญ่จะนำเอนไซม์โบรมิเลนผงมาบรรจุในแคปซูลหรือขึ้นรูปเป็นเม็ด โดยมีการผสมสารสำคัญหรือพืชผงชนิดต่างๆเข้าไปเพื่อสร้างจุดขาย

กาญจนาพร และอาภัสสร ในปี 2561 ได้ทำการศึกษาการนำเอนไซม์โบรมิเลนมาใช้ประโยชน์ในการทำให้เนื้อสุกรนุ่มขึ้น โดยนำเนื้อมาหมักร่วมกับเอนไซม์โบรมิเลนที่ความเข้มข้น 0.5%, 1% และ 1.5% ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 2 ชม. เพื่อคัดเลือกชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการปรับปรุงเนื้อสัมผัสของเนื้อสุกร พบว่าหลังเนื้อผ่านการหมักด้วยเอนไซม์ที่ 0.5%ค่า Shear force, Springiness, Hardness, Chewiness และ Cohesiveness ลดลง 8.28%, 10.53%, 18.16%, 39.82% และ 5.98% ตามลำดับ ซึ่งเอนไซม์ไม่มีผลต่อค่า ΔE, L*, a* และค่า pH แต่มีผลทำให้ค่า b* เพิ่มขึ้น [34]

สุทธิวัฒน์ และคณะในปี 2561 ศึกษาปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญ ได้แก่ ปริมาณโปรตีน กิจกรรมเอนไซม์โบรมิเลนและค่า เอนไซม์ specific activity ปริมาณเบต้าแคโรทีน ใยอาหารที่ละลายน้ำ (SDF) ใยอาหารที่ไม่

ละลายน้ำ (IDF) และปริมาณใยอาหารทั้งหมด (TDF) ในสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียจากจังหวัด ลำปาง อุตรดิตถ์ หนองคาย อุทัยธานี กาญจนบุรี ราชบุรี ชลบุรี ระยอง ตราด เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ สับปะรดพันธุ์ภูเก็ตจากจังหวัด ระยอง ตราด และภูเก็ต สับปะรดพันธุ์นางแลและภูแลจากจังหวัดเชียงราย พบว่า ปริมาณโปรตีนในเนื้อผลสับปะรดมีความแตกต่างกันไปตามพันธุ์และในแต่ละพื้นที่ผลิต คือมีปริมาณอยู่ระหว่าง 82.90-167.71 mg/100gFW โดยสับปะรดพันธุ์ภูเก็ตจากจังหวัดภูเก็ตมีปริมาณโปรตีนในเนื้อสูงสุด ปริมาณโปรตีนในแกนสับปะรดมีปริมาณโปรตีนต่ำกว่าในเนื้อผล คือมีปริมาณ 35.21-118.83 mg/100gFW กิจกรรมของเอนไซม์โบรมิเลนในเนื้อผลสับปะรดมีปริมาณแตกต่างกันไปตามพันธุ์และพื้นที่ผลิต คือมีค่าอยู่ระหว่าง 146.92-254.48 mg tyrosine/100 g/ min โดยในเนื้อสับปะรดพันธุ์ภูแลมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด กิจกรรมของเอนไซม์โบรมิเลนในแกนสับปะรดมีปริมาณต่ำกว่าในเนื้อผล ซึ่งพบแนวโน้มเช่นเดียวกันนี้ในสับปะรดทั้ง 4 พันธุ์และจากทุกๆ พื้นที่ปลูก ค่า enzyme specific activity ในเนื้อผลสับปะรดมีค่าอยู่ระหว่าง 1.28 - 2.02 U/mg protein เนื้อสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียจากจังหวัดชลบุรีและอุทัยธานีมีค่า specific activity สูงสุด ซึ่งค่า specific activity ในแกนผลมีค่าใกล้เคียงกับในเนื้อผลคือ มีค่าอยู่ระหว่าง 0.99 - 2.5 U/mg protein ปริมาณเบต้าแคโรทีนมีความแตกต่างกันไปตามพันธุ์และพื้นที่ปลูกคือมีค่าอยู่ระหว่าง 1.41 - 8.40 ug/100gFW โดยพบว่าสับปะรดพันธุ์ภูเก็ตจากจังหวัดระยองมีปริมาณเบต้าแคโรทีนสูงกว่าสับปะรดจากแหล่งอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ปริมาณ SDF IDF และ TDF มีปริมาณแตกต่างกันไปตามพันธุ์และพื้นที่ปลูก โดยที่ SDF มีค่าอยู่ระหว่าง 0.06 - 0.34 g/100gFW โดยสับปะรดพันธุ์ภูแลและพันธุ์นางแลมีปริมาณ SDF สูงกว่าสับปะรดจากแหล่งอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) พบปริมาณ IDF ในปริมาณที่สูงกว่า SDF ในทุกๆ พันธุ์และพื้นที่ผลิต คือมีปริมาณอยู่ระหว่าง 1.05-1.69 g/100gFW สับปะรดพันธุ์ภูเก็ตจากจังหวัดภูเก็ตมีปริมาณสูงกว่าพันธุ์อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และ TDF มีปริมาณอยู่ระหว่าง 1.17-1.85 g/100gFW โดยสับปะรดพันธุ์ภูเก็ตจากจังหวัดภูเก็ตมีปริมาณสูงกว่าพันธุ์อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความบริบูรณ์ของผล (ค่าสีเปลือก) สับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียและพันธุ์ภูเก็ต กับปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญ ในสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย ค่าความสัมพันธ์ ระหว่างค่าสีเปลือกกับปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญในเนื้อสับปะรดค่อนข้างต่ำในทุกๆ ด้าน ($R2 = 0.00-0.39$) แต่ในพันธุ์ภูเก็ตพบค่าความสัมพันธ์ระหว่างความบริบูรณ์ของผลกับค่า SDF IDF และ TDF มีค่าความสัมพันธ์กันสูง ($R2 = 0.96$ 0.80 และ 0.90 ตามลำดับ) ซึ่งแสดงว่าเมื่อผลมีสีเหลืองมากหรือสุกมากขึ้น (ค่า hue ต่ำ) SDF IDF และ TDF มีปริมาณสูงขึ้น [35]

การสกัด แยก และทำเอนไซม์โบรมิเลนให้บริสุทธิ์ เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆสามารถทำได้อย่างเป็นรูปธรรมชัดเจนในปัจจุบัน ทุกวันนี้มีการพัฒนาถึงขั้นผลิตเป็นผลิตภัณฑ์และวางจำหน่ายให้ประชาชนสามารถเข้าถึงได้โดยง่าย ข้อคำถามในมิติต่างๆเกี่ยวกับเอนไซม์โบรมิเลน อาทิ ชิ้นส่วนไหนของสับปะรดมีเอนไซม์โบรมิเลนมากน้อย พันธุ์ที่ต่างกันมีผลต่อปริมาณและคุณภาพของเอนไซม์โบรมิเลน และสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมของการนำเอนไซม์โบรมิเลนไปใช้งาน ซึ่งข้อคำถามเหล่านี้ล้วนได้รับการศึกษาวิจัยจนได้คำตอบมาแล้วส่วนหนึ่ง ในขณะที่ความต้องการเอนไซม์โบรมิเลนยังคงมีมากขึ้นเรื่อยๆอย่างต่อเนื่อง เพราะผลจากการศึกษาและเผยแพร่ประโยชน์ด้านการแพทย์นี่เองจึงทำให้เกิดการให้ความสนใจเอนไซม์โบรมิเลนกันอย่างกว้างขวาง และจะยังคงสนใจต่อไปอย่างไม่สิ้นสุดในช่วงเวลานับทศวรรษจากนี้ ตราบเท่าที่นักวิทยาศาสตร์ยังคงสามารถค้นพบประโยชน์ที่แอบซ่อนอยู่ในเอนไซม์โบรมิเลนนี้ ซึ่งยังคงมีอยู่อีกมากมายและรอการค้นพบต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Schomburg D, Schomburg I. Enzyme databases. Methods Mol Biol. 2010;609:113-128.
2. Arshad ZI, Amid A, Yusof F, Jaswir I, Ahmad K, Loke SP. Bromelain: an overview of industrial application and purification strategies. Appl Microbiol Biotechnol. 2014;98(17):7283-7297.
3. Ketnawa S, Chaiwut P, Rawdkuen S. Extraction of bromelain from pineapple peels. Food Sci Technol Int. 2011;17(4):395-402.
4. de Lencastre Novaes LC, Jozala AF, Lopes AM, de Carvalho Santos-Ebinuma V, Mazzola PG, Pessoa Junior A. Stability, purification, and applications of bromelain: A review. Biotechnol Prog. 2016;32(1):5-13.
5. Ramli ANM, Manas NHA, Hamid AAA, Hamid HA, Illias RM. Comparative structural analysis of fruit and stem bromelain from Ananas comosus. Food Chem. 2018;266:183-191.
6. Rowan AD, Buttle DJ, Barrett AJ. The cysteine proteinases of the pineapple plant. Biochem J. 1990;266(3):869-875.
7. Rowan AD, Buttle DJ, Barrett AJ. Ananain: a novel cysteine proteinase found in pineapple stem. Arch Biochem Biophys. 1988;267(1):262-270.
8. Hatano KI, Takahashi K, Tanokura M. Bromein, a Bromelain Inhibitor from Pineapple Stem: Structural and Functional Characteristics. Protein Pept Lett. 2018;25(9):838-852.
9. Lee KL, Albee KL, Bernasconi RJ, Edmunds T. Complete amino acid sequence of ananain and a comparison with stem bromelain and other plant cysteine proteases. Biochem J. 1997;327(Pt 1):199-202.
10. Ritonja A, Rowan AD, Buttle DJ, Rawlings ND, Turk V, Barrett AJ. Stem bromelain: amino acid sequence and implications for weak binding of cystatin. FEBS Lett. 1989;247(2):419-424.
11. São Paulo Barretto Miranda ÍK, Fontes Suzart Miranda A, Souza FV, et al. The biochemical characterization, stabilization studies and the antiproliferative effect of bromelain against B16F10 murine melanoma cells. Int J Food Sci Nutr. 2017;68(4):442-454.
12. Taussig SJ, Batkin S. Bromelain, the enzyme complex of pineapple (Ananas comosus) and its clinical application. An update. J Ethnopharmacol. 1988;22(2):191-203.
13. Maurer HR. Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. Cell Mol Life Sci. 2001;58(9):1234-1245.
14. Pavan R, Jain S, Shraddha, Kumar A. Properties and therapeutic application of bromelain: a review. Biotechnol Res Int. 2012;2012:976203.

15. Neubauer RA. A plant protease for potentiation of and possible replacement of antibiotics. Exp Med Surg. 1961;19:143–160.
16. Mynott TL, Guandalini S, Raimondi F, Fasano A. Bromelain prevents secretion caused by *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* enterotoxins in rabbit ileum in vitro. Gastroenterology. 1997;113:175–184.
17. Chandler DS, Mynott TL. Bromelain protects piglets from diarrhoea caused by oral challenge with K88 positive enterotoxigenic Escherichia coli. Gut. 1998;43:196–202.
18. Mynott TL, Luke RK, Chandler DS. Oral administration of protease inhibits enterotoxigenic Escherichia coli receptor activity in piglet small intestine. Gut. 1996;38:28–32.
19. Blonstein JL. Control of swelling in boxing injuries. Practitioner. 1960;185:78.
20. Uhlig G, Seifert J. The effect of proteolytic enzymes (traumanase) on posttraumatic edema. Fortschr Med. 1981;99:554–556.
21. Zatuchni GI, Colombi DJ. Bromelains therapy for the prevention of episiotomy pain. Obstet Gynecol. 1967;29:275–278.
22. Gutfreund AE, Taussig SJ, Morris AK. Effect of oral bromelain on blood pressure and heart rate of hypertensive patients. Hawaii Med J. 1978;37:143–146.
23. Kane S, Goldberg MJ. Use of bromelain for mild ulcerative colitis. Ann Intern Med. 2000;132:680.
24. Walker AF, Bundy R, Hicks SM, Middleton RW. Bromelain reduces mild acute knee pain and improves well-being in a dose-dependent fashion in an open study of otherwise healthy adults. Phytomedicine. 2002;9:681–686.
25. Mazorra-Manzano MA, Ramírez-Suarez JC, Yada RY. Plant proteases for bioactive peptides release: A review. Crit Rev Food Sci Nutr. 2018;58(13):2147-2163.
26. Ha M, Bekhit Ael-D, Carne A. Effects of L- and iso-ascorbic acid on meat protein hydrolyzing activity of four commercial plant and three microbial protease preparations. Food Chem. 2014;149:1-9.
27. Ramli AN, Aznan TN, Illias RM. Bromelain: from production to commercialization. J Sci Food Agric. 2017;97(5):1386-1395.
28. Madadlou A, O'Sullivan S, Sheehan D. Fast protein liquid chromatography. Methods Mol Biol. 2011;681:439-447.
29. ÄKTA FPLC system manual (2000) Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden
30. https://biologyreader.com/gel-filtration-chromatography.html
31. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่องเอนไซม์สำหรับใช้ในการผลิตอาหาร, (2562, 15 สิงหาคม). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 136 ตอนพิเศษ 203ง หน้า 17

32. https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.4.22.32 เข้าถึงเมื่อ กันยายน พ.ศ. 2563
33. Esam, Zohreh. Bromelain containing oral nutraceuticals as a potential treatment for ACE inhibitor-induced cough. The Journal of Medical Research. 2020;6:44-45.
34. กาญจนาพร นนทะลุน, และ อาภัสสร ศิริจริยวัตร. ผลของชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่มีต่อความนุ่มเนื้อ. แก่นเกษตร. 2561;46:100-105.
35. สุทธิวัลย์ สีทา. สารออกฤทธิ์สำคัญในสับปะรดพันธุ์ที่ผลิตเพื่อการค้าในประเทศไทย. ค้นเมื่อกันยายน, 2561, จาก https://www.trf.or.th/2013-11-29-07-37-10/thaifruits/58-rdg5120085