บทที่ 3
ประสิทธิภาพของโบรมิเลนจากผลสับปะรดในการย่อยถั่วเหลือง

บทนำ

โบรมิเลน (bromelain) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มซิสเตอีนโปรติเอส (cysteine protease) พบในสับปะรด (*Ananas comosus* (L.) Merr.) ซึ่งเป็นพืชตระกูล *Bromeliaceae* (Devakate *et al.,* 2009) โบรมิเลนพบในส่วนเนื้อเยื่อลำต้น ผล และใบของสับปะรด โดยพบในส่วนของเนื้อมากที่สุด(วราพันธุ์ และคณะ, 2547) สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมทางอาหารและยา เช่น ผลิตผงทำให้เนื้อนุ่ม ทำให้เบียร์ใส ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสท และผลิตยาช่วยย่อยอาหารและยาขับปัสสาวะ เป็นต้น โบรมิเลนจากส่วนของลำต้นหรือ stem bromelain (EC 3.4.22.32) มีจุดตัดกว้าง จำเพาะกับตำแหน่งกรดอะมิโนไลซีน อะลานีน ไทโรซีน ไกลซีน และแอสพาราจีน (Silverstain and Kezdy, 1975) โบรมิเลนจากส่วนของผลหรือ fruit bromelain (EC 3.4.22.33) ซึ่งพบในน้ำสับปะรดทำหน้าที่ตัดพันธะเปปไทด์ในโมเลกุลของโปรตีน ทั้งนี้ การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมโบรมิเลนส่วนของผลสามารถใช้เคซีน ฮีโมโกลบิน เจลาติน หรือสับสเตรทสังเคราะห์เป็นสับสเตรทในการทำปฏิกิริยา โดยสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเคซีน คือ พีเอช 7.7 ที่อุณหภูมิ 59 องศาเซลเซียส ฮีโมโกลบิน คือ พีเอช 2.9 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส azoalbumin คือ พีเอช 7.5 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และ azocasein คือ พีเอช 6.5 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส (Corzo *et al*., 2011)

ถั่วเหลืองจัดเป็นพืชตระกูลถั่วที่มีโปรตีนสูงถึงร้อยละ 34 (อาณดี, 2553) ราคาถูกและคุณภาพดี โปรตีนจากถั่วเหลืองประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็น เยื่อใย ไขมันไม่อิ่มตัว วิตามิน และแร่ธาตุที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ นอกจากนั้นยังมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นเปปไทด์ เช่น lunasin และสารพฤกษเคมี (phytochemical) ที่สำคัญคือ isoflavones lecithin saponin phytic acid phytosterols phenolic acid tocopheral boron folic acid และ omega-3 fatty acid เป็นต้น (สุวลี, 2548; Dia *et al*., 2009) เนื่องจากโปรตีนถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีนคุณภาพสูง จึงมีการศึกษาวิจัยการใช้ประโยชน์จากโปรตีนถั่วเหลืองกันอย่างแพร่หลาย มีการนำเอนไซม์ย่อยโปรตีนหลายชนิดมาใช้ในการย่อยโปรตีนถั่วเหลือง รวมถึงโบรมิเลน ซึ่ง Lamsal *et al*. (2007) ได้ทำการศึกษาวิจัยการใช้โบรมิเลนในการย่อยโปรตีนถั่วเหลือง โดยพบว่า โปรตีนถั่วเหลืองหลังการย่อยมีคุณสมบัติการไหลเปลี่ยนแปลงไป Ma *et al*. (1996) ทำการสกัดโปรตีนจากกากถั่วเหลืองที่พีเอช 9.0 อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่า ได้โปรตีนถั่วเหลืองร้อยละ 53 วราพันธุ์ และคณะ (2547) พบว่า การใช้น้ำสับปะรดซึ่งเป็นแหล่งของโบรมิเลนต่อถั่วเหลือง

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

ในอัตราส่วน 1:2 ในการย่อยโปรตีนถั่วเหลืองเป็นเวลา 90 นาที ทำให้ได้โปรตีนละลายได้ทั้งหมดมีค่าเพิ่มสูงขึ้น และวารยา (2538) นำกากถั่วเหลืองไปย่อยด้วยเอนไซม์ Neutrase (‘R) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 6.5 เป็นเวลา 120 นาที พบว่า ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีปริมาณ amino acid nitrogen เท่ากับ 3.21 กรัมต่อลิตร จากศักยภาพการย่อยสลายโปรตีนของโบรมิเลนดังกล่าว การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของโบรมิเลนในการย่อยโปรตีนถั่วเหลือง

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 การเตรียมโบรมิเลนหยาบ (preparation of crude bromelain)

ใช้ผลสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย อายุประมาณ 5 เดือน ที่ปลูกในเขตพื้นที่จังหวัดลำปาง ในการศึกษาครั้งนี้ ล้างทำความสะอาดผลสับปะรด ปอกเปลือก หั่นเป็นชิ้นขนาดเล็ก คั้นเอาน้ำสับปะรด แล้วกรองด้วยผ้าขาวบางจะได้เป็นโบรมิเลนหยาบ (crude bromelain) ดังภาพที่ 4 จากนั้นทำการตรวจวิเคราะห์คุณภาพ ค่าพีเอชโดยใช้เครื่องวัดพีเอช (pH meter) ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดโดยใช้hand refractometer ปริมาณกรดทั้งหมด(เทียบกับกรดซิตริก) โดยวิธีการไตเตรท ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ทั้งหมด(Bollag *et al.*, 1996) ปริมาณ free alpha amino nitrogen (FAN) ตามวิธีดัดแปลงจาก Wylie and Johnson (1961) และทำการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมโปรติเอส ตามวิธีดัดแปลงจาก Chomsri (2001) และ Khan *et al.* (2003)

สับปะรด
↓
ล้างน้ำสะอาด
↓
ปอกเปลือก
↓
หั่นเป็นชิ้นขนาดเล็ก
↓
คั้นเอาแต่น้ำ
↓
กรองด้วยผ้าขาวบาง
↓
โบรมิเลนหยาบ (crude bromelain)

ภาพที่ 4 ขั้นตอนการเตรียมโบรมิเลนหยาบ(crude bromelain) จากผลสับปะรด

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

3.2 ศึกษาประสิทธิภาพของโบรมิเลนจากผลสับปะรดในการย่อยโปรตีนจากถั่วเหลือง

ใช้ถั่วเหลืองพันธุ์ราชมงคล 1 ที่ปลูกและเก็บเกี่ยวจากสถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร โดยมีปัจจัยที่ศึกษา 2 ปัจจัย คือ อัตราส่วนถั่วเหลืองกับโบรมิเลนหยาบจากผลสับปะรด (โดยน้ำหนัก) 5 ระดับ คือ 1:1 1:2 1:3 1:4 และ 1:5 และระยะเวลาในการย่อยโปรตีนถั่วเหลือง 4 ระยะเวลา คือ 2 4 6 และ 12 ชั่วโมง กระบวนการศึกษาดังภาพที่ 5 ทำโดยชั่งถั่วเหลืองบดละเอียด 10 กรัม ใส่ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 5 ขวด จากนั้นเติมโบรมิเลนหยาบ 10 20 30 40 และ 50 กรัม เพื่อให้ได้อัตราส่วนของถั่วเหลืองบดละเอียดต่อโบรมิเลนหยาบเท่ากับ 1:1 1:2 1:3 1:4 และ 1:5 ตามลำดับ นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 4 6 และ 12 ชั่วโมง เติมน้ำเดือดจนได้น้ำหนักรวมเท่ากับ 60 กรัม แล้วนำไปต้มให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนด เติมน้ำจำนวน 40 กรัม แล้วนำไปกรองด้วยผ้าขาวบาง เรียกของเหลวที่ได้นี้ว่าไฮโดรไลเสท ทำการวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีของไฮโดรไลเสท โดยนำตัวอย่างของเหลวที่แยกได้ไปเหวี่ยงแยกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge; Ortoasa, digicen 20–R, Spain) ที่ระดับความเร็ว 8,000*g* เป็นเวลานาน 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ทั้งหมด ปริมาณ FAN และจำแนกโปรตีนถั่วเหลืองหลังการย่อยด้วยวิธี SDS-PAGE

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

3.3 การจำแนกโปรตีนถั่วเหลืองหลังจากการย่อย

จำแนกขนาดของโปรตีนในถั่วเหลืองไฮโดรไลเสทโดยใช้วิธี sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ด้วยชุดวิเคราะห์โปรตีน (mini Protein® tetra cell; Bio-Rad, Biorad Laboratories, USA) ตามวิธีของ Laemmli (1970) โดยกำหนดสภาวะการวิเคราะห์ คือ 4% stacking gel และ 15% running gel พร้อมทั้งใช้โปรตีนมาตรฐาน(marker; Amersham, low molecular weight, GE Healthcare UK) เพื่อแสดงขนาดโปรตีนโดยประมาณ และทำการย้อมสีโปรตีนด้วย Coomassie Brilliant Blue R 250 โปรตีนมาตรฐานประกอบด้วยโปรตีน 6 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 5

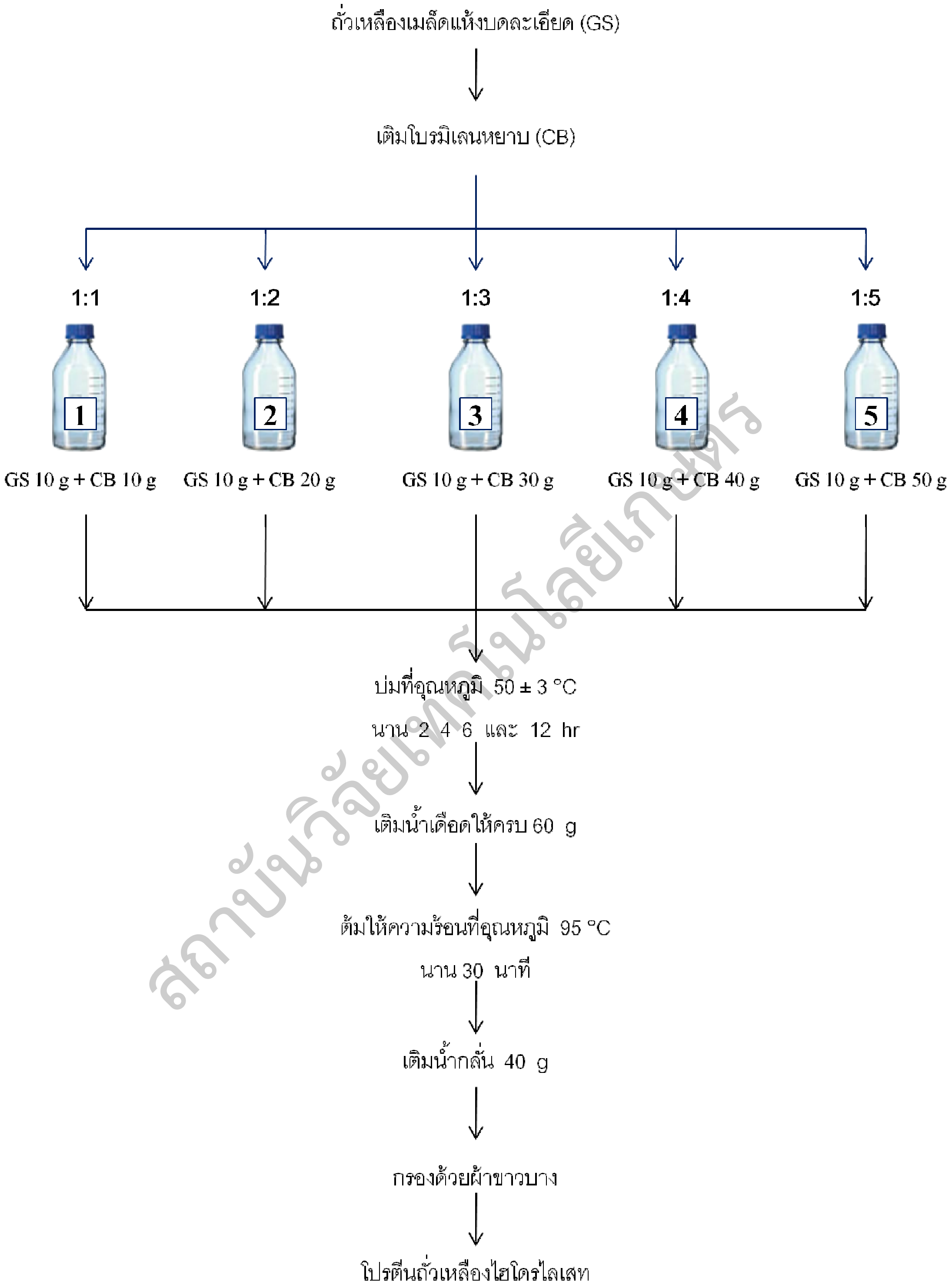
ตารางที่ 5 องค์ประกอบของโปรตีนมาตรฐาน (low molecular weight ของ GE Healthcare)

ชนิดโปรตีน	**ขนาดโมเลกุล (kDa)**
phophorylase b	97.00
Albumin	66.00
Ovalbumin	45.00
carbonic anhydrase	30.00
trypsine inhibitor	20.10
α–lactalbumin	14.40

3.4 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ 5x4 factorial in completely randomized design (5x4 factorial in CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ ANOVA (analysis of variance) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติแบบ Duncan's new multiple range test (DMRT) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร



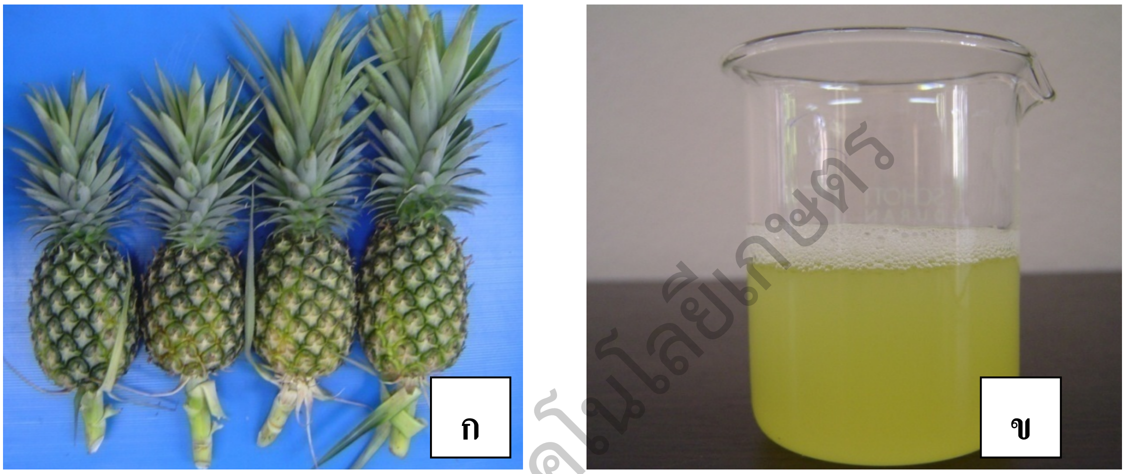
ภาพที่ 5 ขั้นตอนการเตรียมโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเสทด้วยโบรมิเลนจากผลสับปะรด

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

ผลการทดลอง

3.1 คุณสมบัติและคุณภาพของโบรมิเลนจากผลสับปะรด

โบรมิเลนหยาบหรือ crude bromelain (ภาพที่ 6) ที่ใช้ในการศึกษานี้ มีค่ากิจกรรมโบรมิเลนเฉลี่ยเท่ากับ 2,297.83 หน่วย เมื่อนำโบรมิเลนหยาบมาทำการตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี พบว่า โบรมิเลนหยาบที่ได้มีค่าพีเอช ปริมาณกรดทั้งหมด ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ปริมาณ FAN และปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ทั้งหมด ดังตารางที่ 6



ภาพที่ 6 ลักษณะสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียที่ใช้ในการศึกษา

(ก) ลักษณะผลสับปะรดที่ใช้เตรียมโบรมิเลน

(ข) น้ำสับปะรดที่คั้นได้หรือ โบรมิเลนหยาบ (crude bromelain)

ตารางที่ 6 คุณสมบัติของโบรมิเลนหยาบจากผลสับปะรด

คุณสมบัติ	ปริมาณ
ค่ากิจกรรมโบรมิเลน (units)	2,297.83±511.27
pH	3.45±0.35
TA (%)	0.45±0.01
TSS (^{o}Brix)	12.80±0.95
FAN (mg/l)	105.37±31.84
โปรตีนที่ละลายได้ทั้งหมด (mg/l)	200.34±0.03

ภาพที่ 7 ลักษณะถั่วเหลืองพันธุ์ราชมงคล1 ที่ใช้ในการศึกษา

(ก) ลักษณะเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ราชมงคล1

(ข) ลักษณะถั่วเหลืองพันธุ์ราชมงคล1 เมล็ดแห้งบดละเอียด

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยเกษตร

3.2 ผลการศึกษาสภาวะการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วเหลืองด้วยโบรมิเลนหยาบ

การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วเหลืองบดละเอียด (ภาพที่ 7) โดยใช้โบรมิเลนหยาบหรือน้ำสับปะรดเติมในถั่วเหลืองบดละเอียดที่อัตราส่วนถั่วเหลืองต่อโบรมิเลนหยาบ 1:1 1:2 1:3 1:4 และ 1:5 (โดยน้ำหนัก) พบว่า ไฮโดรไลเสทที่ได้มีปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ทั้งหมดอยู่ระหว่าง 155.51–252.18 มิลลิกรัมต่อลิตร และปริมาณ FAN อยู่ระหว่าง 346.96–1,181.26 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 7) โดยที่ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ทั้งหมดมีแนวโน้มลดลง เมื่ออัตราส่วนของถั่วเหลืองต่อโบรมิเลนหยาบเพิ่มขึ้นและระยะเวลาในการย่อยที่นานขึ้นส่วนปริมาณ FAN ของไฮโดรไลเสทที่ได้จากการใช้ถั่วเหลืองต่อโบรมิเลนหยาบในอัตราส่วน 1:3 1:4 และ 1:5 มีปริมาณสูงกว่าอัตราส่วน 1:1 และ 1:2 ($p \leq 0.05$) เมื่อพิจารณาปัจจัยด้านระยะเวลา พบว่า การย่อยถั่วเหลืองด้วยโบรมิเลนหยาบนาน 2 4 6 และ 12 ชั่วโมง มีผลทำให้ได้ไฮโดรไลเสทที่ได้มีปริมาณ FAN แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยระยะเวลาย่อยนาน 12 ชั่วโมง จะทำให้ไฮโดรไลเสทที่ได้มีปริมาณ FAN สูงสุด คือ 964.20 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับการศึกษาครั้งนี้ได้ทดลองใช้น้ำแทนโบรมิเลนหยาบ เติมลงในถั่วเหลืองบด นำไปไว้ในสภาพเดียวกับการย่อยด้วยโบรมิเลนหยาบ เมื่อนำของเหลวที่กรองได้ไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณ FAN และปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ทั้งหมด พบว่า มีค่าอยู่ระหว่าง 92.71-250.44 และ 110.10-450.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 7 ผลของอัตราส่วนของถั่วเหลืองกับโบรมิเลนหยาบและระยะเวลาในการย่อยโปรตีนถั่วเหลืองต่อปริมาณ FAN และปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ทั้งหมดในไฮโดรไลเสท

ปัจจัย	ปริมาณ FAN (mg/l)	โปรตีนที่ละลายได้ทั้งหมด (mg/l)
ถั่วเหลือง:น้ำสับปะรด (w/w)	*	*
อัตราส่วน 1:1	423.72±71.57[c]	230.19±25.17[a]
อัตราส่วน 1:2	637.31±196.20[b]	228.56±28.80[a]
อัตราส่วน 1:3	818.73±291.12[a]	206.99±17.27[b]
อัตราส่วน 1:4	753.24±294.98[a]	170.48±23.75[c]
อัตราส่วน 1:5	801.30±249.30[a]	176.09±21.92[c]
ระยะเวลาในการย่อย (ชั่วโมง)	*	*
2 ชั่วโมง	468.33±81.71[d]	214.97±31.90[a]
4 ชั่วโมง	607.50±177.89[c]	206.72±29.74[a]
6 ชั่วโมง	707.40±184.21[b]	200.10±42.65[ab]
12 ชั่วโมง	964.20±310.46[a]	188.05±28.30[b]
อิทธิพลร่วม (อัตราส่วน x ชั่วโมง)	*	*
อัตราส่วน 1:1 x 2 ชั่วโมง	346.96±9.24[i]	252.18±5.40[a]
อัตราส่วน 1:1 x 4 ชั่วโมง	407.39±37.30[hi]	245.51±10.99[ab]
อัตราส่วน 1:1 x 6 ชั่วโมง	444.61±70.57[hi]	220.00±21.34[abcde]
อัตราส่วน 1:1 x 12 ชั่วโมง	495.92±63.25[ghi]	203.07±23.29[cdefg]
อัตราส่วน 1:2 x 2 ชั่วโมง	446.10±81.49[hi]	235.26±9.74[abcd]
อัตราส่วน 1:2 x 4 ชั่วโมง	577.54±148.92[efghi]	218.20±14.27[abcde]
อัตราส่วน 1:2 x 6 ชั่วโมง	631.12±100.58[defgh]	240.64±59.62[abc]
อัตราส่วน 1:2 x 12 ชั่วโมง	894.46±115.45[bc]	220.13±12.50[abcde]
อัตราส่วน 1:3 x 2 ชั่วโมง	528.84±53.51[fghi]	213.72±23.44[abcdef]
อัตราส่วน 1:3 x 4 ชั่วโมง	736.08±150.53[cdefg]	217.69±7.18[abcde]
อัตราส่วน 1:3 x 6 ชั่วโมง	828.74±133.72[cde]	196.15±22.66[defgh]
อัตราส่วน 1:3 x 12 ชั่วโมง	1181.26±298.55[a]	200.39±6.67[cdefg]
อัตราส่วน 1:4 x 2 ชั่วโมง	504.22±30.84[ghi]	187.56±31.67[efgh]
อัตราส่วน 1:4 x 4 ชั่วโมง	586.84±225.27[efghi]	180.77±14.63[efgh]
อัตราส่วน 1:4 x 6 ชั่วโมง	773.83±156.37[cdef]	155.51±25.77[h]
อัตราส่วน 1:4 x 12 ชั่วโมง	1148.09±182.67[a]	158.08±7.68[gh]
อัตราส่วน 1:5 x 2 ชั่วโมง	515.53±50.87[fghi]	186.15±19.41[efgh]
อัตราส่วน 1:5 x 4 ชั่วโมง	729.68±123.27[cdefg]	171.41±9.18[fgh]
อัตราส่วน 1:5 x 6 ชั่วโมง	858.69±68.93[cd]	188.21±35.65[efgh]
อัตราส่วน 1:5 x 12 ชั่วโมง	1101.29±221.47[ab]	158.59±6.77[gh]

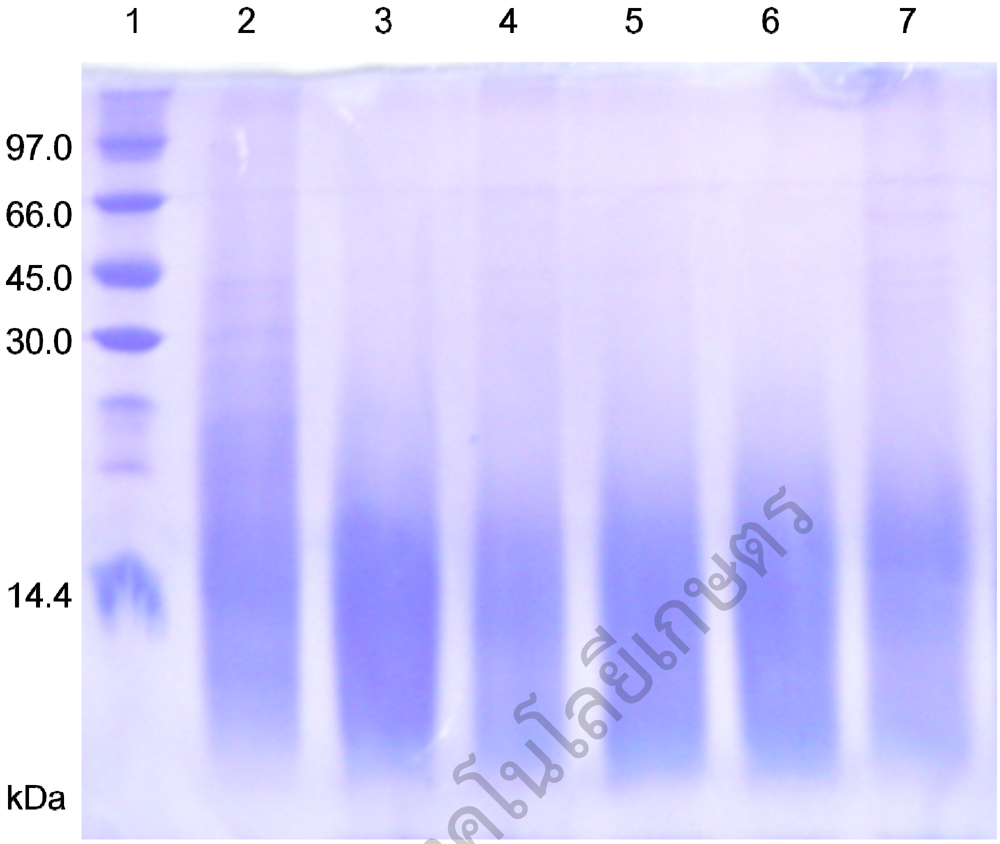
[*]ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

3.3 ผลการจำแนกโปรตีนถั่วเหลืองหลังจากการย่อยด้วยโบรมิเลนหยาบ

ภาพที่ 8 9 และ 10 แสดงรูปแบบ (pattern) ของโปรตีนถั่วเหลืองที่พบในไฮโดรไลเสทที่เตรียมได้จากการทดลองครั้งนี้ ผลการเปรียบเทียบและการวิเคราะห์รูปแบบของโปรตีนถั่วเหลืองในไฮโดรไลเสทที่เตรียมจากถั่วเหลืองกับโบรมิเลนหยาบที่อัตราส่วน 1:1 1:2 1:3 1:4 และ 1:5 ด้วยระยะเวลานาน 2 ชั่วโมง (ภาพที่ 8) พบว่า โปรตีนที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลเล็กกว่า 30 kDa ปรากฏบนแถบบนแผ่นเจลเป็นจำนวนมาก ในขณะที่โปรตีนขนาดน้ำหนักมากกว่า 30 kDa ปรากฏเป็นแถบบนแผ่นเจลในปริมาณที่น้อยกว่า ซึ่งรูปแบบของโปรตีนมีลักษณะคล้ายกับระยะเวลาในการย่อยนาน 12 ชั่วโมง นั่นคือแถบโปรตีนขนาดเล็กกว่า 30 kDa จะปรากฏในลักษณะของแถบโปรตีนที่มีความเข้มข้นสูงกว่าแสดงในภาพที่ 9

ผลการจำแนกโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเสทที่เตรียมจากการใช้ถั่วเหลืองต่อโบรมิเลนหยาบอัตราส่วน 1:3 โดยใช้ระยะเวลาในการย่อยนาน 2 4 6 และ 12 ชั่วโมง พบว่า ระยะเวลาการย่อยที่นานขึ้น ทำให้โปรตีนขนาดใหญ่มีปริมาณลดลง ในทางตรงกันข้ามโปรตีนขนาดเล็กมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น จากการพิจารณาแถบโปรตีนบนแผ่นเจลที่แสดงให้เห็นถึงความเข้มข้นของแถบโปรตีนขนาดใหญ่ที่ลดลง ในขณะที่ความเข้มข้นของแถบโปรตีนขนาดเล็กมีปริมาณเพิ่มขึ้น

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร



ภาพที่ 8 แผ่นเจล SDS-PAGE ของไฮโดรไลเสทที่ได้จากการย่อยถั่วเหลืองด้วยโบรมิเลนหยาบ อัตราส่วนต่างๆ ระยะเวลานาน 2 ชั่วโมง

(1) โปรตีนมาตรฐาน

(2) ถั่วเหลืองผสมน้ำกลั่นอัตราส่วน 1:3

(3) ถั่วเหลืองย่อยด้วยโบรมิเลนหยาบ อัตราส่วน 1:1

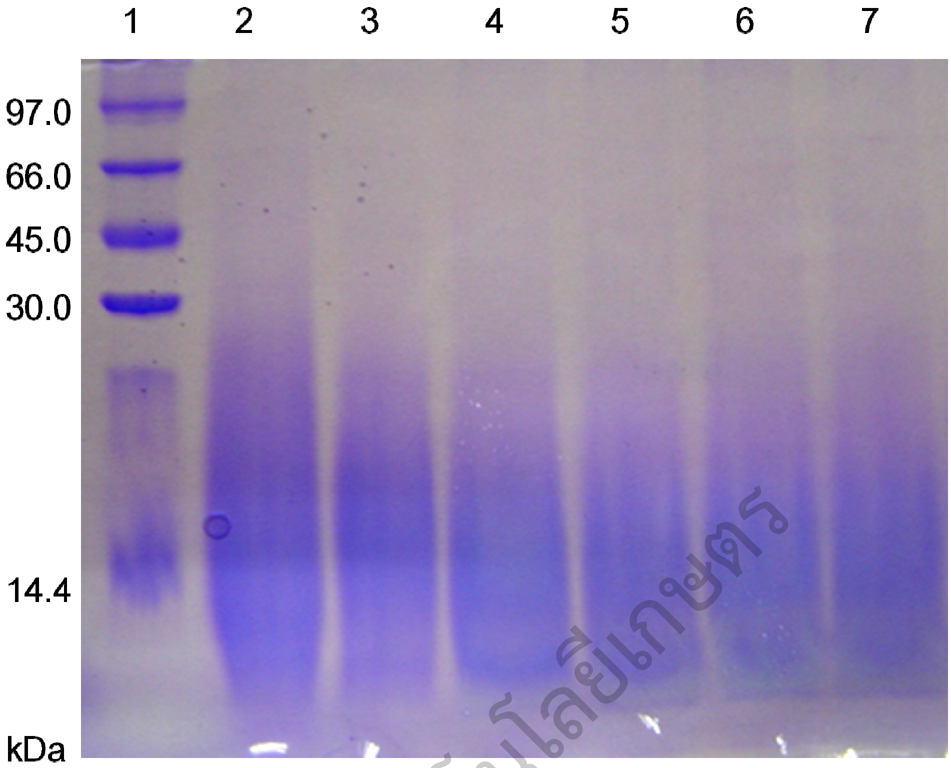
(4) ถั่วเหลืองย่อยด้วยโบรมิเลนหยาบ อัตราส่วน 1:2

(5) ถั่วเหลืองย่อยด้วยโบรมิเลนหยาบ อัตราส่วน 1:3

(6) ถั่วเหลืองย่อยด้วยโบรมิเลนหยาบ อัตราส่วน 1:4

(7) ถั่วเหลืองย่อยด้วยโบรมิเลนหยาบ อัตราส่วน 1:5

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร



ภาพที่ 9 แผ่นเจล SDS-PAGE ของไฮโดรไลเสทที่ได้จากการย่อยถั่วเหลืองด้วยโบรมิเลนหยาบที่อัตราส่วนต่างๆ ระยะเวลานาน 12 ชั่วโมง

(1) โปรตีนมาตรฐาน

(2) ถั่วเหลืองผสมน้ำกลั่นอัตราส่วน1:3

(3) ถั่วเหลืองย่อยด้วยโบรมิเลนหยาบ อัตราส่วน 1:1

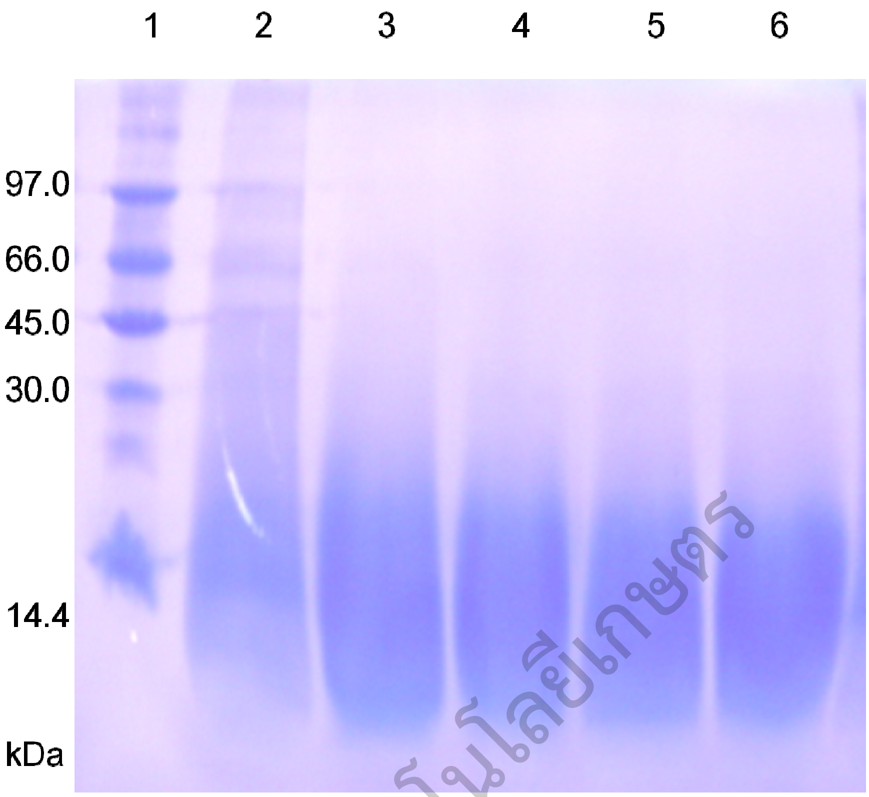
(4) ถั่วเหลืองย่อยด้วยโบรมิเลนหยาบ อัตราส่วน 1:2

(5) ถั่วเหลืองย่อยด้วยโบรมิเลนหยาบ อัตราส่วน 1:3

(6) ถั่วเหลืองย่อยด้วยโบรมิเลนหยาบ อัตราส่วน 1:4

(7) ถั่วเหลืองย่อยด้วยโบรมิเลนหยาบ อัตราส่วน 1:5

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร



ภาพที่ 10 แผ่นเจล SDS-PAGE ของไฮโดรไลเสทที่ได้จากการย่อยถั่วเหลืองด้วยโบรมิเลนหยาบ อัตราส่วน 1:3 ที่ระยะเวลาต่างๆ

(1) โปรตีนมาตรฐาน

(2) ถั่วเหลืองผสมน้ำกลั่น12 ชั่วโมง

(3) ถั่วเหลืองย่อยด้วยโบรมิเลนหยาบ นาน 2 ชั่วโมง

(4) ถั่วเหลืองย่อยด้วยโบรมิเลนหยาบ นาน 4 ชั่วโมง

(5) ถั่วเหลืองย่อยด้วยโบรมิเลนหยาบ นาน 6 ชั่วโมง

(6) ถั่วเหลืองย่อยด้วยโบรมิเลนหยาบ นาน 12 ชั่วโมง

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

วิจารณ์

โบรมิเลน เป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่พบได้ทั้งในส่วนของลำต้น ผล และใบ ของสับปะรด (Devakate *et al.*, 2009) จากผลการศึกษาวิจัยของนิอร และคณะ (2554) พบว่า สับปะรดที่มีระดับความสุกที่มากเกินไป ค่ากิจกรรมเอนไซม์ย่อยโปรตีนของโบรมิเลนจะมีค่าลดลง การศึกษานี้จึงคัดเลือกผลสับปะรดที่มีลักษณะของผลสีเหลืองของตาร้อยละ 10 (Mohammed, 2004) ภาพที่ 6 มาใช้ในการเตรียมโบรมิเลนหยาบ โบรมิเลนหยาบที่ใช้ในการศึกษามีค่ากิจกรรมเฉลี่ยเท่ากับ 2,297 หน่วย โดย 1 หน่วยของเอนไซม์ในการศึกษานี้ แสดงถึงกิจกรรมโปรติเอสที่สามารถย่อยได้ 1 ไมโครกรัมสัมมูลย์ (μg equivalent) ไทโรซีนต่อนาที ณ สภาวะที่กำหนด (ภาคผนวก ค) ค่ากิจกรรมโบรมิเลนที่ตรวจวิเคราะห์ได้จากการศึกษานี้ สอดคล้องกับผลการวิจัยของรุ่งทิพย์ และสงวนศรี (2551) และ Pardo *et al.* (2000) ที่พบว่าค่ากิจกรรมโบรมิเลนอยู่ในช่วง 992-3312 หน่วย การนำโบรมิเลนหยาบไปใช้ย่อยถั่วเหลืองบดละเอียดในการศึกษานี้ จะเห็นได้ว่าโบรมิเลนหยาบมีศักยภาพในการย่อยโปรตีนถั่วเหลืองสายพันธุ์ราชมงคล1 โดยพิจารณาจากผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ทั้งหมดและปริมาณ free α-amino nitrogen หรือ FAN ที่มีค่าเพิ่มขึ้นตามปริมาณการใช้โบรมิเลนและระยะเวลาในการย่อยเพิ่มขึ้น ทั้งนี้การเพิ่มปริมาณโบรมิเลนหยาบจากอัตราส่วนของถั่วเหลืองกับโบรมิเลนหยาบจาก 1:1 เป็น 1:5 ทำให้ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ทั้งหมดมีค่าลดลงร้อยละ 76 และปริมาณ FAN มีค่าเพิ่มขึ้นร้อยละ 52 ส่วนการเพิ่มระยะในการย่อยโปรตีนถั่วเหลืองจาก 2 ชั่วโมง เป็น 12 ชั่วโมง ทำให้ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ทั้งหมดมีค่าลดลงร้อยละ 87 และปริมาณ FAN มีค่าเพิ่มขึ้นร้อยละ48 ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวเป็นผลเนื่องจากการทำกิจกรรมของโบรมิเลนที่ทำการย่อยโปรตีน ทำให้เกิดหน่วยย่อยของโปรตีนเปปไทด์สายสั้นๆ และกรดอะมิโนเพิ่มขึ้น (พัชรา, 2541) โดยที่การเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์และเพิ่มระยะเวลาในการย่อยส่งผลต่อผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น (Rickwood and Hame, 1992) ทั้งนี้คณะวิจัยหลายกลุ่มได้รายงานศักยภาพในการย่อยโปรตีนถั่วเหลืองของโบรมิเลนในลักษณะใกล้เคียงกับการศึกษานี้ (วราพันธุ์ และคณะ, 2547; Lamsal *et al.*, 2007; วารยา, 2538) เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์ปริมาณ FAN ที่มีผลมาจากปัจจัยของอัตราส่วนของถั่วเหลืองต่อโบรมิเลนหยาบและปัจจัยของระยะเวลาในการย่อย จึงคัดเลือกอัตราส่วนของถั่วเหลืองต่อโบรมิเลนหยาบที่อัตราส่วน 1:3 และปัจจัยของระยะเวลาในการย่อยนาน 12 ชั่วโมง เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนในถั่วเหลืองด้วยโบรมิเลนหยาบจากผลสับปะรด เนื่องจากสภาวะดังกล่าว ทำให้เกิดปริมาณ FAN สูงสุดในไฮโดรไลเสท (ตารางที่ 6)

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

เทคนิคอิเล็กโตรไฟรีซิส เป็นเทคนิคที่ใช้แยกและวิเคราะห์ชีวโมเลกุล (อาภัสสรา, 2537) ซึ่งการทดลองครั้งนี้ได้นำเอาวิธี SDS-PAGE ของ Laemmli (1970) มาใช้ในการศึกษารูปแบบและจำแนกขนาดของโปรตีนถั่วเหลืองในไฮโดรไลเสทที่เตรียมจากสภาวะที่กำหนดที่แตกต่างกัน จากผลการทดลองที่ได้ พบว่า โบรมิเลนมีความสามารถในการย่อยโปรตีนถั่วเหลืองได้ โดยอธิบายได้จากจำนวนโปรตีนขนาดใหญ่ที่มีปริมาณลดลงและจำนวนโปรตีนขนาดเล็กที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นในไฮโดรไลเสทที่เตรียมโดยใช้โบรมิเลนหยาบในปริมาณความเข้มข้นที่สูงขึ้นและระยะเวลานานขึ้น ซึ่งวราพันธุ์ และคณะ (2547) และวารยา (2538) ก็ได้รายงานการใช้โบรมิเลนย่อยโปรตีนถั่วเหลืองแล้วทำให้โปรตีนมีขนาดเล็กลงด้วยเช่นกัน และผลการศึกษารูปแบบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ยังสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ทางเคมีอีกด้วย กล่าวคือ ปริมาณ FAN ที่เพิ่มขึ้นกับโปรตีนโมเลกุลขนาดเล็กที่มีปริมาณมากขึ้นตามความเข้มข้นของโบรมิเลนและระยะเวลาในการย่อยที่เพิ่มขึ้น ซึ่งปริมาณ FAN เป็นค่าที่แสดงถึงปริมาณไนโตรเจนของกรดอะมิโนอิสระ (Fleet, 1992) แสดงว่า ไฮโดรไลเสทที่มีปริมาณ FAN สูงก็จะบ่งชี้ได้ว่าไฮโดรไลเสทนั้นมีกรดอะมิโนอยู่สูงด้วย

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

สรุป

ประสิทธิภาพของโบรมิเลนจากผลสับปะรดในการย่อยถั่วเหลือง สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนในถั่วเหลืองด้วยโบรมิเลนหยาบจากผลสับปะรด คือ การใช้อัตราส่วนระหว่างถั่วเหลืองบดละเอียดต่อโบรมิเลนหยาบจากผลสับปะรด ในอัตราส่วน 1:3 และทำการย่อยที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร