บทที่ 4
ค่ากิจกรรมโบรมิเลนในกระบวนการทำไวน์สับปะรด

บทนำ

ปัจจุบันเอนไซม์มีบทบาทต่ออุตสาหกรรมอาหารและอุตสาหกรรมเครื่องดื่มเป็นอย่างมาก เช่น การใช้เพคติเนสในการสกัดน้ำผลไม้ การเติมอะไมเลส และ โปรติเอสจากแบคทีเรียลงไปในการผลิตเบียร์ การใช้เอนไซม์ปาเปนและอะไมโลกลูโคสซิเดสในการกรองเบียร์ เพื่อลดปัญหาของการเกิดตะกอนโปรตีน เป็นต้น (นิธิยา และ ไพโรจน์, 2547) โบรมิเลนเป็นเอนไซม์ในกลุ่มเอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteolytic enzyme) ที่สำคัญชนิดหนึ่งในอุตสาหกรรมอาหาร พบในสับปะรดเป็นส่วนใหญ่ (Hebber *et al*., 2008) โบรมิเลนเป็น endoprotease ที่อยู่ในกลุ่ม cysteine protease (Khan *et al*., 2003) ที่พบในเนื้อเยื่อ ลำต้น ผล และใบของสับปะรด โบรมิเลนจากส่วนของลำต้นสับปะรดหรือ stem bromelain (EC 3.4.22.32) มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 24.5 kDa และโบรมิเลนจากส่วนของผลสับปะรดหรือ fruit bromelain (EC 3.4.22.3) มีขนาดโมเลกุล 25 kDa (Polaina and MacCabe, 2007; Xue *et al*., 2010; Anonymous, 2010c) โบรมิเลนประกอบด้วยกรดอะมิโน 283 หน่วย มีพีเอชที่เหมาะสมในการย่อยเคซีนที่พีเอชเท่ากับ 7.0 cysteine hydrogen sulfide (H_2S) และ sodium cyanide (NaCN) ช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ส่วน Hg^{2+}และ Ag^{+}ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (Koh *et al*., 2006) โบรมิเลนได้ถูกนำไปใช้กันอย่างแพร่หลายในกระบวนการแปรรูปอาหาร ได้แก่ การทำให้เนื้อนุ่ม การนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเบเกอรี่ และ การทำให้โปรตีนคงตัวในอุตสาหกรรมเครื่องดื่ม โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มน้ำผลไม้และเบียร์ (Meyer, 2001; Esti *et al.,* 2011) นอกจากนั้นยังมีการศึกษาวิจัยการนำโบรมิเลนไปใช้ในประโยชน์กันอย่างกว้างขวาง แพรวไพลิน และคณะ (2552) ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติและการย่อยสลายเห็ดด้วยโบรมิเลนเพื่อนำมาเป็นสารปรุงแต่งรสในอาหาร ซึ่งพบว่าหลังจากที่นำโปรตีนมาทำการย่อยเห็ดแล้วทำการวิเคราะห์สารหอมระเหยที่ให้กลิ่นในโปรตีนถึง 7 ชนิด วราพันธุ์ และคณะ (2547) ได้นำโบรมิเลนเข้ามาช่วยในการย่อยถั่วเหลือง พบว่า โปรตีนในถั่วเหลืองละลายออกมาได้ดีเมื่อนำมาแช่ในน้ำสับปะรด Ilaria *et al.* (2011) ทำการวิจัยโดยทำให้โปรตีนในไวน์ขาวเกิดความคงตัวโดยใช้โบรมิเลน คณะวิจัยได้ศึกษาสภาวะความเข้มข้นของเอทธานอลอยู่ในช่วงระหว่างร้อยละ 0-25 ผลการศึกษา พบว่า ปริมาณเอทธานอลที่ระดับต่ำสุดร้อยละ10 จะมีผลในการยับยั้งค่ากิจกรรมโบรมิเลน Esti *et al.* (2011) ศึกษาสารประกอบในไวน์ที่มีผลต่อการยับยั้งค่ากิจกรรมโบรมิเลนที่ได้จากส่วนของลำต้นสับปะรดในไวน์สังเคราะห์

ผลการศึกษา พบว่า แอลกอฮอล์ในไวน์ และซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่เติมในไวน์ มีคุณสมบัติเป็นตัวยับยั้งค่ากิจกรรมโบรมิเลน โดยซัลเฟอร์ไดออกไซด์มีความสามารถในการยับยั้งค่ากิจกรรมโบรมิเลนสูงสุด ในขณะที่ gallic tannin และ ellagic tannin ไม่มีคุณสมบัติในการยับยั้งค่ากิจกรรมโบรมิเลนที่ได้จากส่วนของลำต้นสับปะรด

โปรตีน เป็นโพลีเอไมด์ (polyamides) ที่พบในสิ่งมีชีวิตประกอบไปด้วยหน่วยย่อยที่เรียกว่า กรดอะมิโน (amino acids) สามารถแสดงบทบาทได้หลายๆอย่างเช่น เอนไซม์ ฮอร์โมน เป็นต้น (ยานี, 2554) โปรตีนในไวน์ส่วนใหญ่พบในน้ำหมักที่มาจากผลองุ่น หรือตัวผลไม้ที่ใช้ในการหมัก และในระหว่างกระบวนการหมัก โดยโปรตีนจะถูกสกัดออกมาในระหว่างกระบวนการหมัก ซึ่งจะมากกว่าที่มาจากน้ำหมักเริ่มต้นที่ใช้ โปรตีนที่พบในไวน์มีปริมาณอยู่ในช่วง 10-500 มิลลิกรัมต่อลิตร มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 20-30 kDa (Sauvag *et al.*, 2010) แม้ว่าปริมาณโปรตีนในไวน์จะมีอยู่น้อย แต่ก็มีความสำคัญต่อคุณภาพลักษณะของไวน์ โดยเฉพาะในไวน์ขาว จะมีผลต่อลักษณะความคงตัวที่พบในไวน์ขาว เมื่อทำการบรรจุไวน์จะพบปัญหาคือ เกิดตะกอนขึ้นหลังทำการบรรจุ เช่นเดียวกับการผลิตไวน์ขาวจากสับปะรดจะพบปัญหาตะกอนหลังทำการบรรจุขวด ซึ่งเป็นลักษณะของตะกอนของโปรตีน ดังนั้น การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาผลของโบรมิเลนและโปรตีนที่มีในผลสับปะรดที่ระดับความสุกแก่ต่างๆ ของสับปะรดที่มีผลต่อคุณภาพไวน์ขาวจากสับปะรดที่หมักด้วยยีสต์ 4 สายพันธุ์

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีการเกษตร

อุปกรณ์และวิธีการ

4.1 คุณลักษณะของโบรมิเลนในน้ำสับปะรดที่ระดับความสุกแก่ต่าง ๆ

วางแผนการทดลองแบบ CRD (completely randomized design) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยใช้ผลสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียที่ปลูกในเขตพื้นที่จังหวัดลำปาง ปี 2555 ในการศึกษาครั้งนี้ แบ่งระดับความสุกของผลสับปะรดเป็น 3 ระดับ โดยอาศัยสีเหลืองของเปลือกตาสับปะรดคือ สีเหลืองของตาบนเปลือกสับปะรดร้อยละ 10-35 (M2) ร้อยละ 35-70 (M3) และร้อยละ 70-80 (M4) ตามวิธีของ Mohammed (2004) ล้างทำความสะอาดผลสับปะรด ปอกเปลือก หั่นเป็นชิ้น คั้นเอาน้ำสับปะรด แล้วใช้น้ำสับปะรดที่ได้นี้เป็นโบรมิเลนหยาบ (crude bromelain) ไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ทั้งหมด ตามวิธีดัดแปลงจาก Bollag *et al*. (1996) และค่ากิจกรรมของโปรติเอส ตามวิธีดัดแปลงจาก Chomsri (2001) และ Khan *et al.* (2003) ดังแสดงใน ภาคผนวก ค

4.2 ค่ากิจกรรมของโบรมิเลนในระหว่างการหมักน้ำสับปะรดและในไวน์สับปะรด

วางแผนการทดลองแบบ 3x4 factorial in CRD (completely randomized design) ในการหมักไวน์สับปะรด โดยมีปัจจัยที่ศึกษา 2 ปัจจัย คือ ระดับความสุกแก่ของสับปะรดแบ่งออกเป็น 3 ระดับ คือ สีเหลืองของตาบนเปลือกสับปะรดร้อยละ 10-35 (M2) ร้อยละ 35-70 (M3) และร้อยละ 70-80 (M4) และสายพันธุ์ยีสต์ที่แตกต่างกัน 4 พันธุ์ คือ *Saccharomyces cerevisiae* E1 *S. cerevisiae* B1 *Toluraspora delbrueckii* และ *Kluyveromyces thermotolerans* ในการหมักไวน์สับปะรดมีวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.2 (บทที่ 3) เก็บตัวอย่างไวน์สับปะรด มาทำการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของโบรมิเลนและโปรตีนในระหว่างการหมักทุก 3 วัน ของการหมักจนครบ 15 วัน

4.3 การจำแนกโปรตีนของไวน์สับปะรด

เก็บตัวอย่างไวน์สับปะรดหลังจากยุติการหมัก นำไปจำแนกขนาดของโปรตีนในไวน์สับปะรดที่ได้จากการหมักโดยวิธี sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ด้วยชุดวิเคราะห์โปรตีน (mini protein ® tetra cell; Bio-rad, Biorad laboratories, USA) ตามวิธีของ Laemmli (1970) กำหนดสภาวะการวิเคราะห์ คือ 4% stacking และ 12 % running gel พร้อมทั้งใช้โปรตีนมาตรฐาน (marker; Amersham, low

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

molecular weight, GE healthcare UK) เพื่อแสดงขนาดโปรตีนโดยประมาณ และ ทำการย้อมสีโปรตีนด้วย Coomassie brilliant Blue R 250 โปรตีนมาตรฐานประกอบด้วยโปรตีน 6 ชนิด ดังแสดงในภาคผนวก ค

4.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

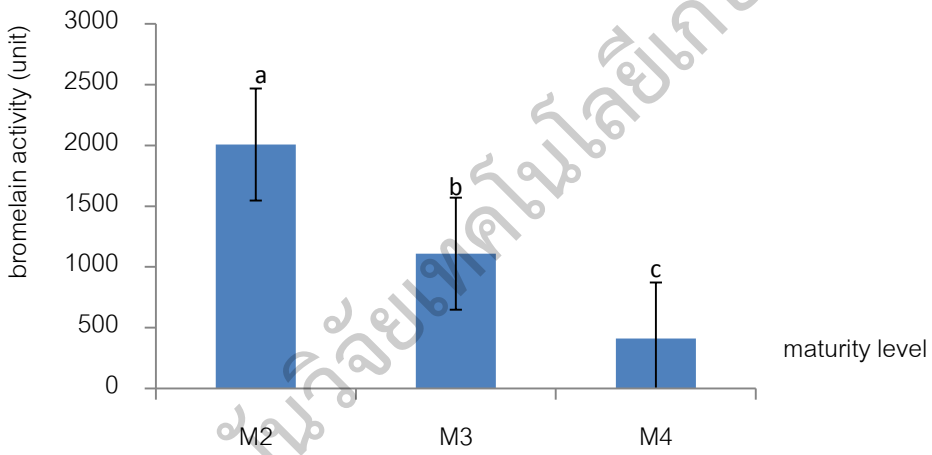
วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลโดยวิธี ANOVA (analysis of variance) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

ผลการทดลอง

4.1 คุณลักษณะของโบรมิเลนในน้ำสับปะรดที่ระดับความสุกแก่ต่าง ๆ

การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของโบรมิเลนในสับปะรดที่ความสุกแก่ต่างกัน พบว่า ที่ระดับความสุกแก่ของสับปะรดต่างกัน มีผลต่อค่ากิจกรรมของโบรมิเลนที่พบในสับปะรดที่แตกต่างกัน ($p<0.05$) โดยค่ากิจกรรมของโบรมิเลนในผลสับปะรดที่ระดับความสุกแก่ระดับ M2 มีค่ากิจกรรมของโบรมิเลนสูงสุดคือ 2,007.35 หน่วย รองลงมาคือ สับปะรดที่ระดับความสุก M3 และ M4 คือ 1,108.82 และ 411.03 หน่วย ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 ค่ากิจกรรมของโบรมิเลนที่พบในสับปะรดที่ความสุกแก่ทั้ง 3 ระดับ

หมายเหตุ: อักษรกำกับต่างกันบนกราฟแท่ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$)

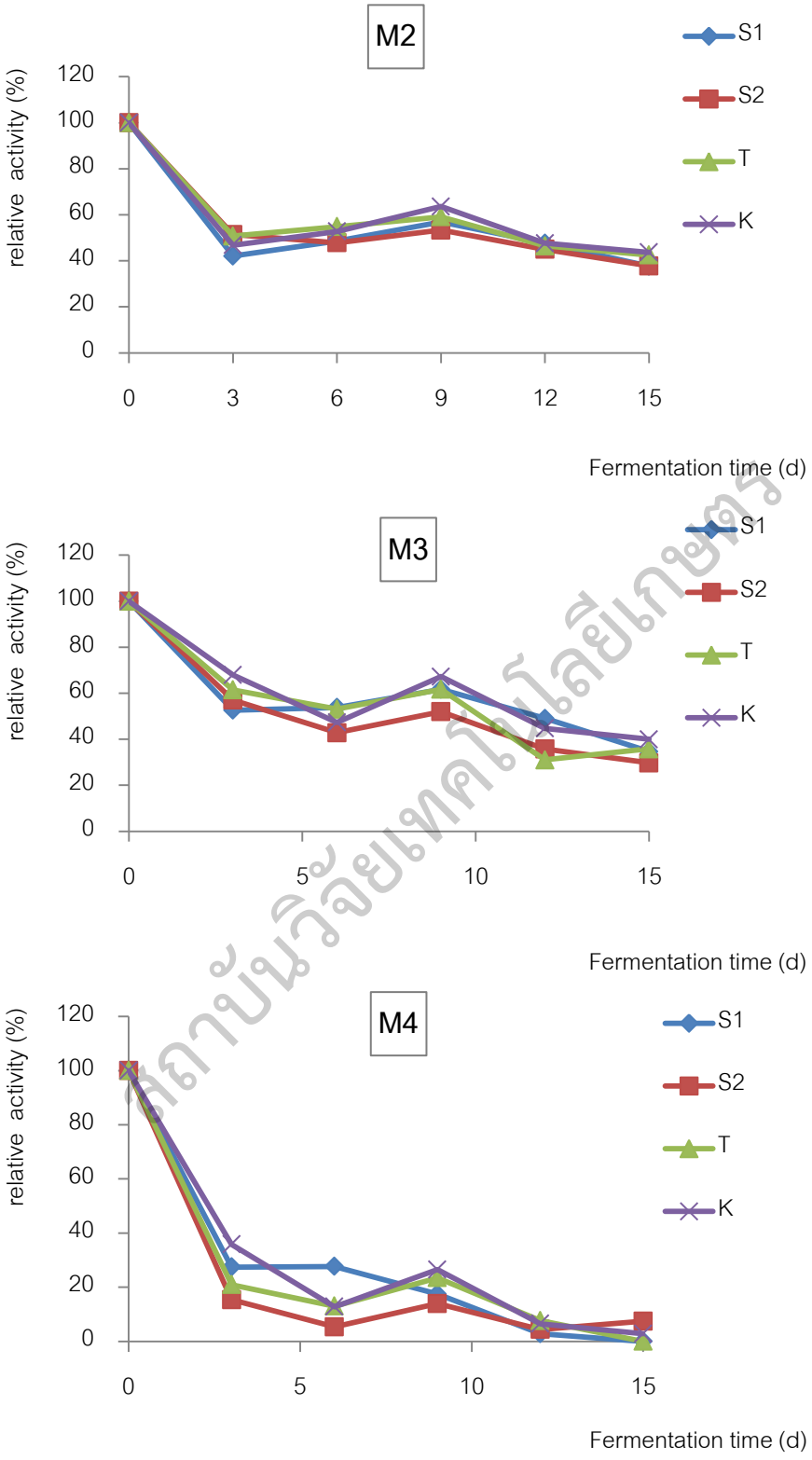
สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

4.2 ค่ากิจกรรมโบรมิเลนในระหว่างการหมักน้ำสับปะรดและในไวน์สับปะรด

เมื่อทำการตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงค่ากิจกรรมของโบรมิเลนในระหว่างการหมักไวน์สับปะรดที่ระดับความสุกแก่ต่างๆ ทั้ง 3 ระดับ พบว่า ค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ (relative activity) ของโบรมิเลนจะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงระยะเวลา 3 วันแรกของการหมัก โดยที่ค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของโบรมิเลนที่เหลือสูงสุดของ M2 M3 และ M4 มีค่าคิดเป็นร้อยละเท่ากับ 51.38 67.93 และ 35.81 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.2) เมื่อทำการหมักไวน์สับปะรดโดยใช้น้ำสับปะรดที่ระดับความสุกแก่แตกต่างกันทั้ง 3 ระดับ นาน 15 วัน พบว่า ไวน์สับปะรดที่ได้จากการหมักน้ำสับปะรดที่ระดับความสุกแก่ระดับ M4 มีค่ากิจกรรมของโบรมิเลนสัมพัทธ์เหลือสูงสุดเพียงร้อยละ 7.44 ในขณะที่การใช้

น้ำสับปะรดที่มาจากสับปะรดความสุกแก่ระดับ M2 มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของโบรมิเลนคงเหลือสูงสุดคือร้อยละ 43.71 ดังแสดงในภาพที่ 4.2

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร



ภาพที่ 4.2 การเปลี่ยนแปลงของค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของโบรมิเลนในระหว่างการหมักไวน์สับปะรดจากสับปะรดที่มีความสุกแก่ทั้ง 3 ระดับ

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

การตรวจวิเคราะห์ค่ากิจกรรมโบรมิเลนในไวน์สับปะรดหลังจากเสร็จสิ้นการหมัก 15 วัน พบว่า ค่ากิจกรรมโบรมิเลนที่เหลืออยู่ในไวน์สับปะรดมีค่าแตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 4.2 ในด้านปัจจัยของความสุกแก่ของผลสับปะรดที่แตกต่างกัน 3 ระดับ คือ M2 M3 และ M4 พบว่า การใช้ผลสับปะรดที่ระดับความสุกแก่แตกต่างกัน ส่งผลให้ค่ากิจกรรมโบรมิเลนที่เหลืออยู่ในไวน์สับปะรดมีความแตกต่างกัน ($p \leq 0.05$) โดยพบว่า ไวน์สับปะรดที่ทำจากสับปะรดที่ระดับความสุกแก่ M2 มีค่ากิจกรรมโบรมิเลนเหลืออยู่เท่ากับ 817.53 หน่วย ซึ่งมีค่าสูงกว่าไวน์สับปะรดที่ทำจากสับปะรดที่ระดับความสุกแก่ M3 (372.20 หน่วย) และ M4 (11.23 หน่วย) ตามลำดับ ส่วนในด้านปัจจัยของสายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ในการหมักน้ำสับปะรดจำนวน 4 สายพันธุ์ พบว่าการใช้ยีสต์ *T. delbrueckii* และ *K. thermotolerans* ในการหมักน้ำสับปะรด มีผลทำให้ไวน์สับปะรดมีค่ากิจกรรมของโบรมิเลนสูงกว่าการใช้ *S. cerevisiae* E1 *S. cerevisiae* B1 ในการหมักน้ำสับปะรด ($p \leq 0.05$) และเมื่อพิจารณาปฏิสัมพันธ์ (interaction) พบว่า กิจกรรมโบรมิเลนที่เหลืออยู่ในไวน์สับปะรดมีค่าแตกต่างกัน โดยมีความสอดคล้องกับผลกระทบจากแต่ละปัจจัย

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีการเกษตร

ตารางที่ 4.1 ผลของระดับความสุกแก่ของสับปะรดและสายพันธ์ยีสต์ต่อค่ากิจกรรมโบรมิเลนและโปรตีนที่เหลืออยู่ในไวน์สับปะรด

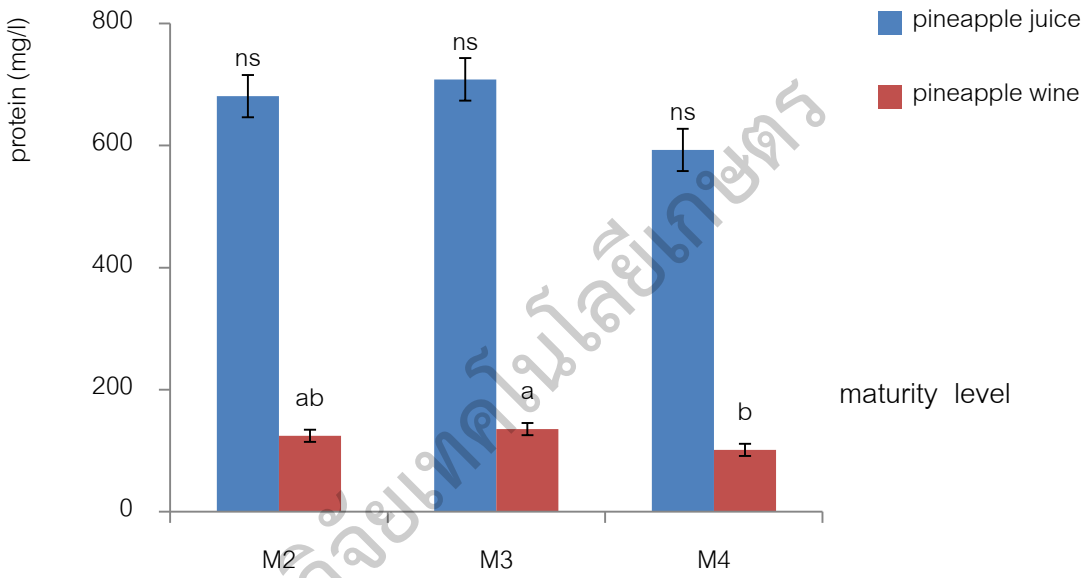
Factor	Bromelain activity (unit)	Protein (mg/l)
maturity level	*	*
M2	817.53±90.66[a]	124.51±29.97[ab]
M3	372.20±44.86[b]	135.21±26.60[a]
M4	11.23±21.68[c]	101.28±12.71[b]
yeast strain	*	ns
S. cerevisiae E1 (S1)	371.04±328.30[c]	106.83±7.42
S. cerevisiae B1 (S2)	355.75±336.75[c]	117.40±16.64
T. delbrueckii (T)	306.41±385.22[b]	127.26±26.94
K. thermotolerans (K)	468.22±398.18[a]	129.83±44.54
interaction	*	ns
M2xS1	732.20±48.67[c]	110.06±0.59
M2xS2	748.93±33.12[c]	124.10±7.83
M2xT	857.42±10.81[b]	116.60±13.38
M2xK	931.98±24.33[a]	147.26±66.83
M3xS1	380.91±11.49[cd]	105.00±9.26
M3xS2	318.31±28.38[ef]	123.51±24.66
M3xT	361.80±23.36[f]	159.64±13.47
M3xK	427.76±10.14[d]	152.67±13.21
M4xS1	0.00±0.00[g]	105.42±12.54
M4xS2	0.00±0.00[g]	104.58±14.89
M4xT	0.00±0.00[g]	105.53±0.77
M4xK	44.93±16.22[g]	89.58±19.61

*ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)
ns = ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

4.3 ผลของการจำแนกโปรตีนของไวน์สับปะรด

ผลการวิเคราะห์ปริมาณของโปรตีนในน้ำสับปะรดที่มาจากสับปะรดความสุกแก่ต่างๆ พบว่า ในผลสับปะรดมีปริมาณของโปรตีนอยู่ระหว่าง 592.86-708.33 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4.3) และหลังจากการหมักน้ำสับปะรดนาน 15 วัน พบว่า ไวน์สับปะรดหลังเสร็จสิ้นการหมักมีปริมาณโปรตีนลดลงเหลืออยู่ระหว่าง 89.58-159.64 มิลลิกรัมต่อลิตร



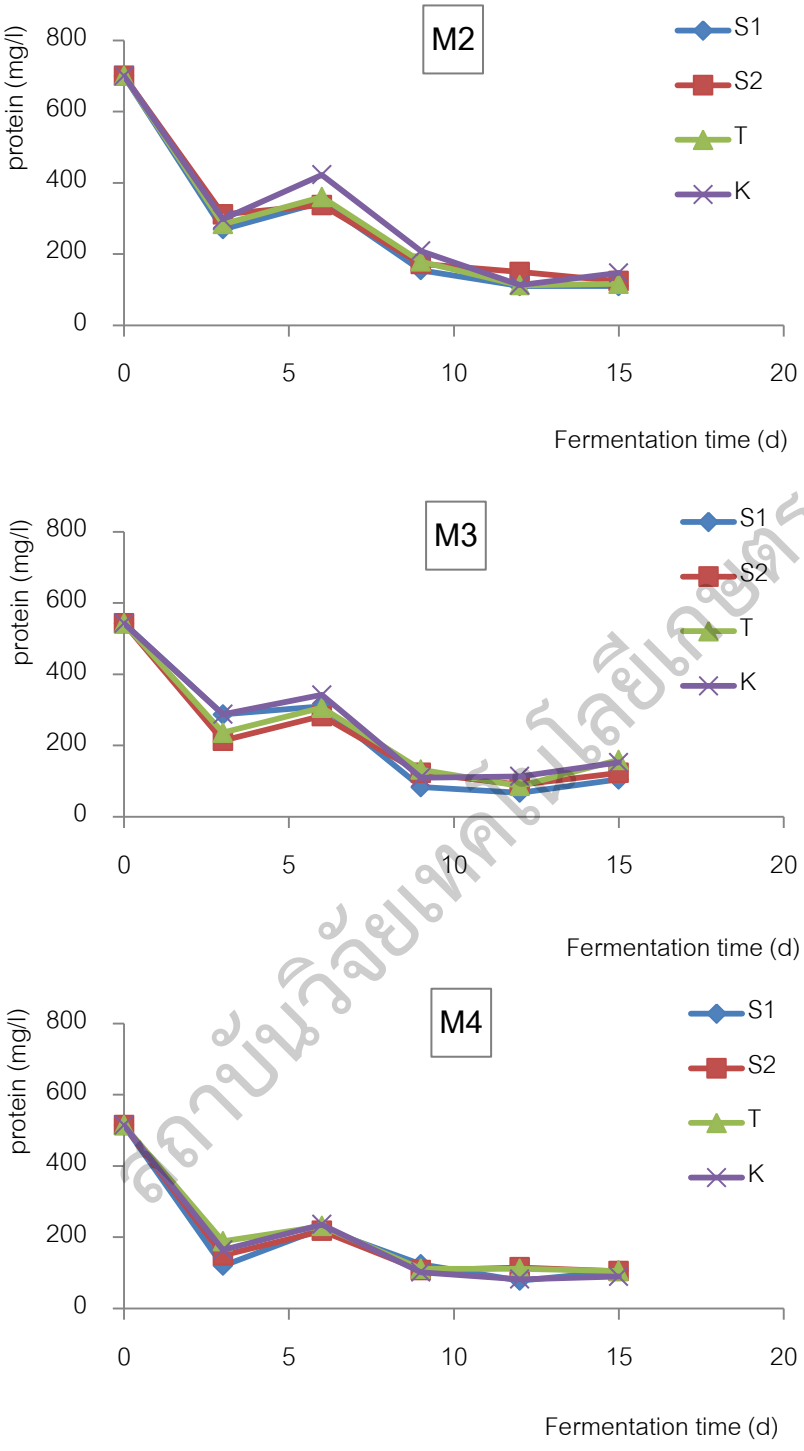
ภาพที่ 4.3 ปริมาณโปรตีนเฉลี่ยที่พบในน้ำคั้นของผลสับปะรดที่ความสุกแก่ทั้ง 3 ระดับ และในไวน์สับปะรด

หมายเหตุ: อักษรกำกับบนกราฟแท่งสีฟ้าและสีแดงที่แตกต่างกันแสดงถึงข้อมูลมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p \leq 0.05$)

ns = ที่กำกับบนกราฟแท่งสีแดงแสดงถึงข้อมูลไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากการตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนระหว่างการหมักไวน์สับปะรดโดยใช้สับปะรดที่ระดับความสุกแก่ต่างกัน พบว่า ในระหว่างการหมักปริมาณโปรตีนจะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 3 วันแรกของการหมัก จากนั้นการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนมีแนวโน้มลดลงอย่างช้าๆ และค่อนข้างคงที่ประมาณ 9-10 วัน ระหว่างการหมัก (ภาพที่ 4.4) โดยปริมาณของโปรตีนเฉลี่ยที่พบในไวน์สับปะรดที่ได้จากสับปะรดที่ระดับความสุกแก่ต่างกันอยู่ในช่วง 432.47-770.69 มิลลิกรัมต่อลิตร

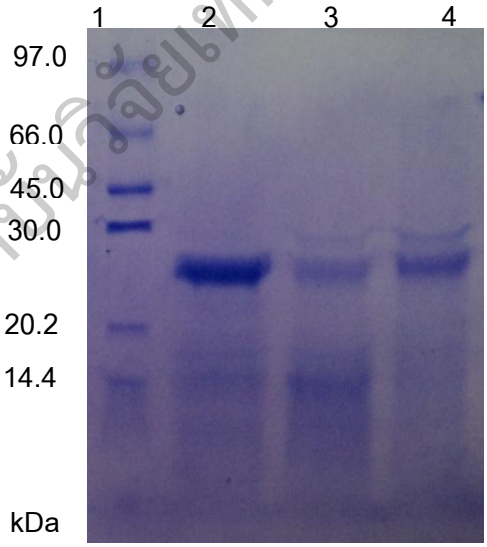
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

ภาพที่ 4.4 การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในระหว่างการหมักน้ำส้บปะรดจากผลที่มีระดับความสุกแก่ 3 ระดับ

ภาพที่ 4.5 แสดงรูปแบบของโปรตีนที่พบในน้ำสับปะรด และภาพที่ 4.6 และ 4.7 แสดงรูปแบบของโปรตีนที่พบในไวน์สับปะรด โดยเปรียบเทียบการใช้ผลสับปะรดที่ระดับความแก่ M2 M3 และ M4 ในเตรียมน้ำสับปะรด แล้วหมักด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* E1 *S. cerevisiae* B1 *T. delbrueckii* และ *K. thermotolerans* พบว่า ไวน์สับปะรดที่ทำจากผลสับปะรดที่มีระดับความสุกแก่แตกต่างกันและหมักด้วยยีสต์ที่แตกต่างกัน มีผลทำให้รูปแบบของโปรตีนที่พบในไวน์มีความแตกต่างกัน จากภาพที่ 4.6 และ 4.7 จะเห็นได้ว่า ไวน์สับปะรดจากผลสับปะรดระดับความสุกแก่ M3 และ M4 มีแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดประมาณ 28. 4 kDa ที่มี ความเข้มมากกว่าไวน์สับปะรดจากสับปะรดที่ระดับความสุกแก่ M2 และการใช้สับปะรดที่ระดับความสุกแก่เพิ่มมากขึ้น แถบโปรตีนขนาดเล็กกว่า 20 kDa จะมีความเข้มที่ลดลง นอกจากนี้ยังพบว่ามีแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาด 25.4 kDa ในไวน์สับปะรดทุกสิ่งทดลองที่ทำจากผลสับปะรดที่ความสุกแก่ทั้ง 3 ระดับ และหมักด้วยยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยจะพบว่ารูปแบบของโปรตีนที่พบน้ำสับปะรดแต่ละระดับความสุกแก่ที่ใช้ในการหมักไวน์สับปะรด หลังจากที่ทำการหมักไวน์เห็นได้ว่ารูปแบบของโปรตีนในไวน์สับปะรดที่ปรากฏจะมีลักษณะใกล้เคียงกับน้ำสับปะรดที่นำมาใช้ในการหมัก



ภาพที่ 4.5 แผ่นเจล SDS-PAGE ของน้ำสับปะรดที่ระดับความสุกแก่ทั้ง 3 ระดับ

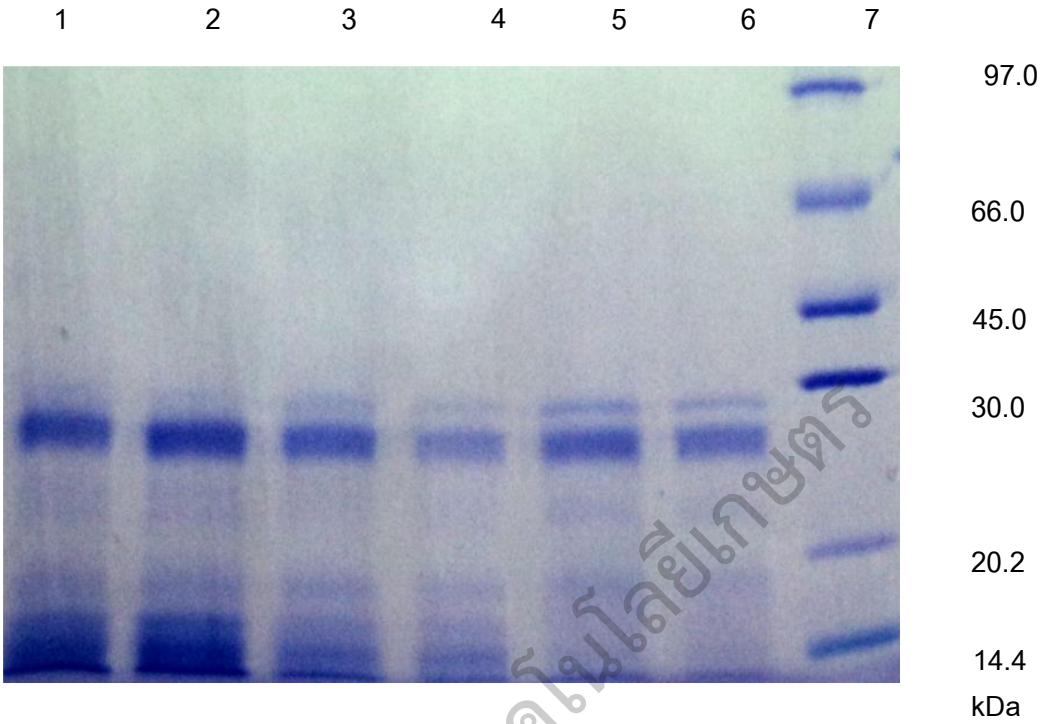
(1) โปรตีนมาตรฐาน

(2) น้ำสับปะรดที่ระดับความสุก M2

(3) น้ำสับปะรดที่ระดับความสุก M3

(4) น้ำสับปะรดที่ระดับความสุก M4

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีการเกษตร



ภาพที่ 4.6 แผ่นเจล SDS-PAGE ของไวน์สับปะรดที่มาจากสับปะรดความสุกแก่ทั้ง 3 ระดับ ร่วมกับ *S. cerevisiae* E1 และ *S. cerevisiae* B1 หลังยุติการหมัก 15 วัน

(1) ไวน์สับปะรด M2S1

(2) ไวน์สับปะรด M2S2

(3) ไวน์สับปะรด M3S1

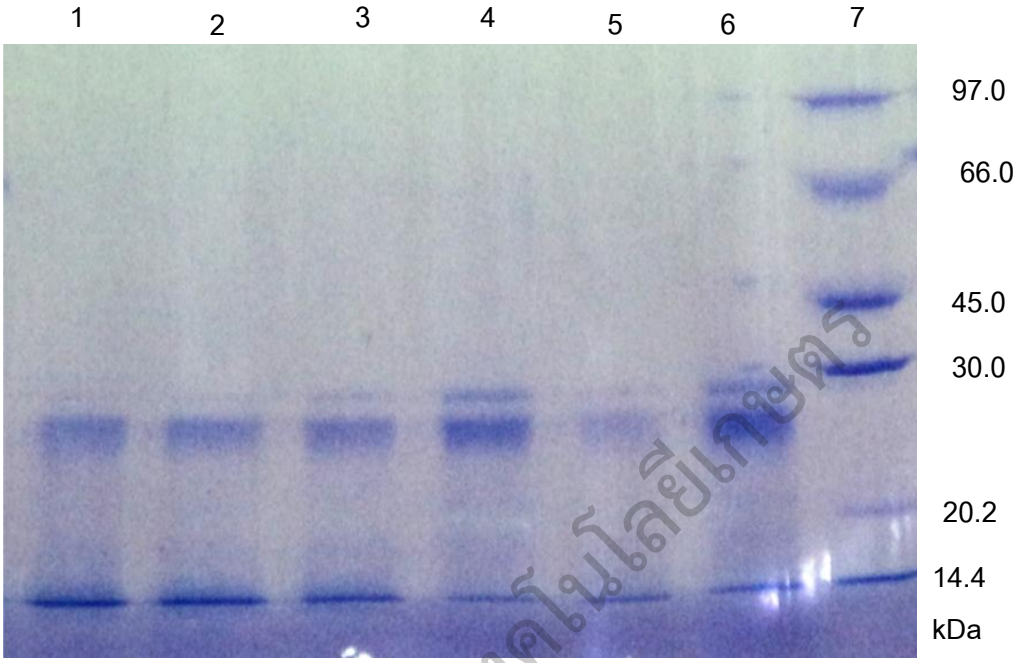
(4) ไวน์สับปะรด M3S2

(5) ไวน์สับปะรด M4S1

(6) ไวน์สับปะรด M4S2

(7) โปรตีนมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีเกษตร



ภาพที่ 4.7 แผ่นเจล SDS-PAGE ของไวน์สับปะรดที่มาจากสับปะรดความสุกแก่ ร่วมกับ *T. delbrueckii* และ *K. thermotolerans* หลังยุติการหมัก 15 วัน

(1) ไวน์สับปะรด M2T

(2) ไวน์สับปะรด M2K

(3) ไวน์สับปะรด M3T

(4) ไวน์สับปะรด M3K

(5) ไวน์สับปะรด M4T

(6) ไวน์สับปะรด M4K

(7) โปรตีนมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

วิจารณ์

โบรมิเลนซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มเอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteolytic enzyme) เป็น endoprotease ที่อยู่ในกลุ่ม cysteine protease (Khan *et al*., 2003) ที่พบในเนื้อเยื่อลำต้น ผล และใบของสับปะรด โบรมิเลนจากส่วนของผลสับปะรด หรือ fruit bromelain (EC 3.4.22.33) เป็นโปรติเอสที่เรียกว่า glucoprotein proteinase (Corzo *et al*., 2011) มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 25 kDa (Xue *et al*., 2010; Anoymous, 2010c) การศึกษากิจกรรมโบรมิเลนในครั้งนี้ ทำการทดลองเพื่อตรวจสอบอิทธิพลของค่ากิจกรรมโบรมิเลนของน้ำหมักที่เตรียมจากผลสับปะรดที่ระดับความสุก 3 ระดับ โดยใช้ยีสต์ 4 สายพันธุ์ในกระบวนการหมัก ผลจากการตรวจวิเคราะห์ค่ากิจกรรมโบรมิเลนในน้ำสับปะรดเริ่มต้นที่ใช้ในการหมักไวน์สับปะรด ทำให้ทราบว่าค่ากิจกรรมของโบรมิเลนจะมีค่าลดลงเมื่อผลสับปะรดมีระดับความสุกแก่เพิ่มมากขึ้น ซึ่งผลการศึกษาที่ได้นี้สอดคล้องกับผลงานวิจัยของนิอร และคณะ (2554) และค่ากิจกรรมของโบรมิเลนมีค่าลดลงในระหว่างการหมัก และพบหลงเหลืออยู่ในไวน์สับประรดที่ทำจากผลสับปะรดที่ระดับความสุกแก่ M2 และ M3 ในขณะที่ไวน์สับปะรดที่ทำจากสับปะรดระดับความสุกแก่ M4 ตรวจไม่พบค่ากิจกรรมของโบรมิเลน ยกเว้นไวน์สับปะรดที่หมักด้วยยีสต์ *K. thermotolerans* การลดลงของค่ากิจกรรมโบรมิเลนนี้ คาดว่าเกิดขึ้นจากผลของความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ที่เข้มข้นมากขึ้นจากการหมักน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ของยีสต์ โดยแอลกอฮอล์ที่ระดับความเข้มข้นสูงกว่าร้อยละ 10 จะส่งผลต่อการยับยั้งค่ากิจกรรมโบรมิเลน (Ilaria *et al*., 2011;) ปริมาณโปรตีนที่พบในผลสับปะรดที่ระดับความสุกแก่ทั้ง 3 ระดับ (592.86-708.33 มิลลิกรัมต่อลิตร) มีค่าใกล้เคียงกับผลการศึกษาวิจัยของนิอร และคณะ (2554) แต่มีค่าสูงกว่าผลการศึกษาของเข็มทอง (2554) ในขณะที่ผลการวิเคราะห์โปรตีนในไวน์สับปะรด พบว่ามีปริมาณโปรตีนอยู่ในปริมาณที่น้อยกว่าน้ำหมักเริ่มต้น (89.58-159.64 มิลลิกรัมต่อลิตร) ปริมาณโปรตีนในไวน์สับปะรดนี้ มีค่าอยู่ในระดับที่พบในไวน์ขาวจากผลองุ่น (Ribéreau-Gayon *et al*., 2006a) การลดลงของโปรตีนนี้อาจเกิดจากโบรมิเลนซึ่งเป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีน ที่ยังคงมีค่ากิจกรรมของการย่อยโปรตีนอยู่ทั้งในระหว่างการหมัก และในผลิตภัณฑ์ไวน์สับปะรด โบรมิเลนอาจย่อยโปรตีนที่มีอยู่ในระหว่างกระบวนการหมัก ซึ่งมีทั้งโปรตีนจากสับปะรด โปรตีนจากจุลินทรีย์ที่พบในระหว่างการหมัก โดยเฉพาะยีสต์ (Chomsri, 2008) ผลจากการทำงานของโบรมิเลนที่ทำการย่อยโปรตีนดังกล่าว ทำให้เกิดหน่วยย่อยของโปรตีน เปปไทด์สายสั้นๆ และกรดอะมิโนเพิ่มขึ้น (พัชรา, 2541) ซึ่งอาจจะทำให้เกิดรสขมขึ้นในไวน์สับปะรดได้ เนื่องจาก

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กรดอะมิโนหรือเพปไทด์บางกลุ่มที่ได้จากการย่อยสลายของโปรตีนที่มีคุณสมบัติให้รสขม (Belitz *et al*., 2009)

เมื่อพิจารณาผลจากการจำแนกโปรตีนเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้แยกและวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุล (อาภัสสรา, 2537) จะเห็นได้ว่า ไวน์สับปะรดที่ทำจากน้ำสับปะรดที่มีค่ากิจกรรมโบรมิเลนสูง หรือไวน์สับปะรดที่มีค่ากิจกรรมโบรมิเลนเหลืออยู่ จะมีแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดเล็กกว่า 20 kDa เป็นจำนวนมาก เมื่อเทียบกับไวน์สับปะรดที่ตรวจไม่พบค่ากิจกรรมโบรมิเลน ซึ่งน่าจะมีส่วนสัมพันธ์กับผลการวิเคราะห์โปรตีนที่ลดลง กล่าวคือ โบรมิเลนย่อยโปรตีนในน้ำหมักและไวน์ ได้เป็นเปปไทด์หรือกรดอะมิโน ทำให้ปริมาณโปรตีนลดลงในผลิตภัณฑ์ไวน์สับปะรด ผลจากการศึกษานี้ น่าจะบ่งบอกได้ถึงระดับความสุกแก่ของผลสับปะรดที่มีผลต่อค่ากิจกรรมของโบรมิเลน และระดับของค่ากิจกรรมโบรมิเลนที่พบในน้ำสับปะรดที่ใช้เป็นน้ำหมักเริ่มต้น ในระหว่างกระบวนการหมัก และในผลิตภัณฑ์ไวน์สับปะรดส่งผลกระทบต่อคุณภาพของไวน์สับปะรด ซึ่งน่าจะได้มีการศึกษาถึงอิทธิพลของค่ากิจกรรมโบรมิเลนที่มีต่อองค์ประกอบทางเคมี และคุณภาพทางประสาทสัมผัสของไวน์สับปะรดต่อไป

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีการเกษตร

สรุป

การศึกษาคุณลักษณะของโบรมิเลนในน้ำสับปะรดที่ระดับความสุกแก่ 3 ระดับคือ สีเหลืองของตาบนเปลือกร้อยละ 10-35 (M2) ร้อยละ 35-70 (M3) และร้อยละ 70-80 (M4) โดยใช้ยีสต์ 4 สายพันธุ์คือ *Saccharomyces cerevisiae* E1 *S. cerevisiae* B1 *Toluraspora delbrueckii* และ *Kluyveromyces thermotolerans* ทำให้ได้ข้อสรุปผลการศึกษาดังนี้

1. ค่ากิจกรรมของโบรมิเลนในผลสับปะรดที่ระดับความสุกแก่ระดับ M2 มีค่ากิจกรรมของโบรมิเลนสูงสุดคือ 2,007.35 หน่วย รองลงมาคือ สับปะรดที่ระดับความสุก M3 และ M4 คือ 1,108.82 และ 411.03 หน่วย ตามลำดับ

2. ระดับความสุกแก่ระดับของผลสับปะรดมีผลต่อค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ (relative activity) ของโบรมิเลนที่ลดลงในระหว่างการหมักไวน์สับปะรด

3. การใช้ผลสับปะรดที่ระดับความสุกแก่แตกต่างกันในการทำไวน์สับปะรด ส่งผลให้ค่ากิจกรรมโบรมิเลนที่เหลืออยู่ในไวน์สับปะรดมีความแตกต่างกัน

4. แถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 20 kDa ของไวน์สับปะรดที่ปรากฏอยู่บนแผ่นเจลบ่งชี้ถึงอิทธิพลของค่ากิจกรรมโบรมิเลนในน้ำหมักและไวน์ที่มีต่อองค์ประกอบโปรตีนที่พบในไวน์สับปะรด

5. การใช้น้ำสับปะรดที่มีค่ากิจกรรมของโบรมิเลนสูงส่งผลต่อลักษณะของโปรตีนที่มีในไวน์สับปะรดมีน้ำหนักโมเลกุลเล็กลง

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย