ผลของพีเอชต่อกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสในสับปะรดผงที่ผลิตจากกระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง

The Effect of pH on the Protease Activity in Pineapple Powder Derived from Freeze-Drying

ครองศักดา ภัคธนกนก[1*] วรรณรัตน์ เฉลิมแสนยากร[1] รพีพรรณ กองตูม[1]
รินรำไพ พุทธิพันธ์[1] ศศิธร สายแก้ว[1] และศิริชดา เปล่งพานิช[2]

Krongsakda Phakthanakanok[1*], Wannarat Chalermsanyakon[1], Rapeepan Kongtoom[1],
Rinrampai Puttipan[1], Sasithorn Saikaew[1] and Sirichada Plengphanich[2]

Received: December 20, 2022
Revised: March 27, 2023
Accepted: April 3, 2023

Abstract: Pineapple contains a protease enzyme called bromelain, which has a wide range of applications in the food, cosmetic and pharmaceutical industries. The activity and the stability of protease are influenced by various factors, including pH. This research investigated the effect of pH on the physical properties and the protease activity of pineapple powder derived from freeze-drying. The production of pineapple powder was carried out using a solution of Normal Saline Solution (NSS) and buffer solution. A comparative analysis was conducted to evaluate the physical properties of pineapple powder, including water activity (aw), moisture content, enzyme activity, and stability over a period of 120 days. The results showed that 40 mM sodium phosphate buffer was capable of effectively adjusting the pH of pineapple juice from weakly acidic to neutral or weakly basic. The pineapple powder produced from the NSS had a high a_w value of 0.57 and had a high moisture content value of 11%. The protease activity in the pineapple powder produced from the NSS deteriorated rapidly, with a residual enzyme activity of only 36.65% at day 120. The pineapple powder produced from buffer solutions at pH 6.5, 7.0, and 7.5 had a_w values of 0.4, 0.3, and 0.3, respectively, and moisture content of 8%. The pineapple powder produced from all buffer solutions had lower a_w and moisture content than that produced from the NSS, resulting in better stability of protease enzyme activity for 120 days. At the end of the experiment, the residual enzyme activity was over 80%.

Keywords: Bromelain, Enzyme, Freeze-drying, Pineapple, Protease

บทคัดย่อ: สับปะรดมีเอนไซม์โปรติเอสชนิดหนึ่งผสมอยู่ชื่อเอนไซม์โบรมิเลน มีการผลิตเอนไซม์โบรมิเลนและนำไปประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอาง และยา กิจกรรมเอนไซม์และเสถียรภาพของเอนไซม์โปรติเอสขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างรวมไปถึงค่า pH งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ pH

[1] มหาวิทยาลัยราชภัฏหมู่บ้านจอมบึง 46 หมู่ 3 ตำบลจอมบึง อำเภอจอมบึง จังหวัดราชบุรี 70150
[1] Muban Chombueng Rajabhat University, 46 Moo 3, Chombueng, Ratchaburi, 70150
[2] กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก 88/23 หมู่ 4 ตำบลตลาดขวัญ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000
[2] Department of Thai Traditional and Alternative Medicine, 88/23 Moo 4, Talad Khwan, Mueang, Nonthaburi, 11000
* Corresponding author: krongsakdapha@mcru.ac.th

Agricultural Science and Management J. 7 (1) : 30-39 (2024)

ต่อคุณสมบัติทางกายภาพของสับปะรดผง และค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในผลิตภัณฑ์สับปะรดผงที่ผลิตจากกระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง ทำการผลิตสับปะรดผงด้วยสารละลายนอร์มอลซาไลน์โซลูชัน (NSS) และสารละลายบัฟเฟอร์ วิเคราะห์เปรียบเทียบคุณสมบัติทางกายภาพของสับปะรดผงด้านปริมาณน้ำอิสระ (a_w) ปริมาณความชื้น ค่ากิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์โปรติเอสในช่วงเวลา 120 วัน ผลการทดลองพบว่าสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ สามารถปรับค่า pH ของน้ำสับปะรดจากกรดอ่อนให้เปลี่ยนเป็นกลางและเบสอ่อนได้ดี สับปะรดผงที่ผลิตจากสารละลาย NSS มีค่า a_w สูง โดยมีค่าเท่ากับ 0.57 และมีปริมาณความชื้นสูงโดยมีค่าเท่ากับร้อยละ 11 ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในสับปะรดผงที่ผลิตจาก NSS เสื่อมประสิทธิภาพอย่างรวดเร็ว โดยในวันที่ 120 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสเหลือร้อยละ 36.65 สับปะรดผงที่ผลิตจากสารละลายบัฟเฟอร์ pH 6.5, 7.0 และ 7.5 มีค่า a_w เท่ากับ 0.4, 0.3 และ 0.3 ตามลำดับ และมีปริมาณความชื้นร้อยละ 8 โดยสับปะรดผงที่ผลิตจากบัฟเฟอร์ทั้งสามชนิดมี aw และปริมาณความชื้นต่ำกว่าของสับปะรดที่ผลิตจาก NSS จึงส่งผลกระทบให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสมีเสถียรภาพที่ดีเป็นเวลานาน 120 วัน โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสมากกว่าร้อยละ 80 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง

คำสำคัญ: โบรมิเลน, เอนไซม์, การทำแห้งเยือกแข็ง, สับปะรด, โปรติเอส

คำนำ

ในผล ลำต้น และเหง้าของสับปะรดมีเอนไซม์โปรติเอสในกลุ่มซีสเตอีนโปรติเอสผสมอยู่ เอนไซม์ที่สำคัญชนิดหนึ่งได้แก่ เอนไซม์โบรมิเลน ปัจจุบันมีการนำเอนไซม์โบรมิเลนไปใช้ในอุตสาหกรรมด้านต่างๆ อาทิเช่น อุตสาหกรรมอาหาร อาหารเสริม และเครื่องดื่ม โดยเอนไซม์โบรมิเลนที่นำมาใช้เป็นเอนไซม์ที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์หรือเรียกว่าเอนไซม์หยาบ (crude bromelain) ในขณะที่อุตสาหกรรมยา เวชภัณฑ์ และเทคโนโลยีชีวภาพ จะใช้เอนไซม์โบรมิเลนบริสุทธิ์ (purified bromelain) มีรายงานวิจัยที่นำเอนไซม์โบรมิเลนมาใช้ในการแพทย์ทางเลือกเพื่อบำบัด และรักษาโรคต่างๆ ได้แก่ มะเร็ง การต้านอนุมูลอิสระ และการชะลอวัย (Manzoor *et al*., 2016) และเมื่อเร็วๆ นี้มีรายงานว่าเอนไซม์ โบรมิเลนมีส่วนในการยุติกลไกการเพิ่มจำนวนไวรัสโคโรนา 2019 ในเซลล์ของโฮสต์ได้ (Kritis *et al*., 2020)

ปัจจุบันเอนไซม์โบรมิเลนทางการค้ามีลักษณะเป็นผง ซึ่งวิธีการสกัดและการแปรรูปแต่ละวิธีมีข้อดีข้อเสียที่ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพของเอนไซม์โบรมิเลนที่แตกต่างกัน เนื่องจากเอนไซม์โบรมิเลนเป็นเอนไซม์โปรติเอสจึงสามารถย่อยสลายโมเลกุลเอนไซม์ด้วยกันเองได้ เมื่อสิ่งแวดล้อมเช่น pH อุณหภูมิ และชนิดของบัฟเฟอร์มีความเหมาะสมประสิทธิภาพของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็วในขณะเก็บรักษา จึงจำเป็นต้องใช้สารยับยั้งเอนไซม์เพื่อช่วยชะลอการเสื่อมประสิทธิภาพ (Liliana *et al*., 2015) และหากในกระบวนการแปรรูปมีการใช้อุณหภูมิสูง เช่น เทคนิคการทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray dry) เอนไซม์โบรมิเลนจะเสียสภาพ (denature) และจะสูญเสียความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาอย่างถาวร

เทคโนโลยีการทำแห้งเยือกแข็ง (freeze dry) จึงเป็นทางเลือกที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในขั้นตอนการสกัด หรือการเก็บรักษาเอนไซม์โปรติเอส ซึ่งการทำแห้งเยือกแข็งอาศัยหลักการแช่แข็งตัวอย่างที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง (โดยทั่วไปประมาณ -30 ถึง -50 องศาเซลเซียส) ชั่วระยะเวลาหนึ่ง จากนั้นจึงทำการระเหิดน้ำภายใต้สภาวะสุญญากาศจนตัวอย่างแห้งทันทีโดยไม่เปลี่ยนสถานะกลับมาเป็นของเหลวเมื่อตัวอย่างแห้งจะสามารถแปรรูปต่อไปเป็นผงได้ง่ายและนำไปบรรจุหรือนำไปใช้ได้ทันที การนำเอนไซม์มาทำแห้งเยือกแข็งมีข้อดีคือสามารถรักษาประสิทธิภาพของเอนไซม์ไว้ได้เป็นระยะเวลานานนับปีหรือหลายปี หากเก็บรักษาในสถานที่เย็น ไม่มีการสัมผัสอากาศ แสง และความชื้น (Bhatta *et al*., 2020)

อย่างไรก็ตามการแปรรูปผลิตภัณฑ์ชีวภาพด้วยกระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง ต้องคำนึงถึงปัจจัย

ที่จะส่งผลกระทบต่อฤทธิ์ทางชีวภาพ การวิจัยที่ผ่านมารายงานว่า ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ค่าปริมาณน้ำอิสระ (water activity; a_w) ค่าปริมาณความชื้น (moisture content) ชนิดของตัวพยุง (carrier) และเวลาที่ใช้ในกระบวนการมีผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพของผลิตภัณฑ์สุดท้าย หากคุณสมบัติทางกายภาพไม่ดีก็จะส่งผลเสียต่อฤทธิ์ทางชีวภาพ (Silva-Espinoza *et al*., 2019) โดยเฉพาะค่า pH และ a_w เป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการก่อตัวเป็นรูปร่างผงของผลิตภัณฑ์ ซึ่งหาก pH ไม่เหมาะสม ผลิตภัณฑ์อาจจับตัวเป็นก้อนและทำให้ a_w สูงขึ้น และหากผลิตภัณฑ์มีการปนเปื้อนจุลินทรีย์อยู่แล้วก็จะทำให้เกิดการเสื่อมสภาพทางกายภาพ และสูญเสียฤทธิ์ทางชีวภาพไปอย่างรวดเร็วในระหว่างการเก็บรักษา (Shofian *et al*., 2011)

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปัจจัยด้าน pH และการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ในกระบวนการผลิตสับปะรดผงด้วยวิธีการทำแห้งเยือกแข็ง โดยศึกษาผลกระทบของปัจจัยต่อลักษณะทางกายภาพของสับปะรดผงและค่ากิจกรรมเอนไซม์ (enzyme activity) ของเอนไซม์โปรติเอสในระหว่างการเก็บรักษา ผลการศึกษาที่ได้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลสำหรับพัฒนากระบวนการผลิตสับปะรดผงและการผลิตเอนไซม์โบรมิเลนในระดับอุตสาหกรรม ที่มีประสิทธิภาพได้ต่อไปในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

การผลิตสับปะรดผงด้วยวิธีการทำแห้งเยือกแข็ง

เตรียมสารละลายจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ สารละลายโซเดียมคลอไรด์ (Normal Saline Solution; NSS) ความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ pH 6.5, 7.0 และ 7.5 นำชิ้นสับปะรดแช่ในสารละลายแต่ละชนิด ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปั่นให้ละเอียดด้วยโถปั่นน้ำผลไม้ กรองแยกกากด้วยผ้าขาวบาง นำส่วนสารละลายไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวส์ชนิดทำความเย็น (ยี่ห้อ Thermo Scientific รุ่น Lynx) ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปแช่เย็นไว้เพื่อเตรียมการผสม เตรียมตัวพยุง (carrier) จำนวน 4 ชนิด โดยละลายมอลโทเดกซ์ทรินความเข้มข้นร้อยละ 30 ด้วยสารละลาย 4 ชนิดที่เตรียมไว้ข้างต้น นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส คนให้เข้ากันจนละลายเป็นเนื้อเดียว วางทิ้งไว้อุณหภูมิห้องให้เกิดการพองตัวอย่างเต็มที่เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำสับปะรดไปผสมกับตัวพยุงแต่ละชนิดในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) คนให้เข้ากันแล้วนำไปแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง freeze dry (ยี่ห้อ Labconco รุ่น Freezone 6L) โดยระเหิดที่สภาวะความดันคงที่เท่ากับ 50 มิลลิบาร์ ตลอดการทดลอง โดยเริ่มการระเหิดที่อุณหภูมิ -60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นค่อยๆ เพิ่มอุณหภูมิครั้งละ 5 องศาเซลเซียส ทุกๆ 1 ชั่วโมงจนกระทั่งอุณหภูมิสุดท้ายเท่ากับ 25 องศาเซลเซียส จึงนำสับปะรดผงออกมาบรรจุในซองอลูมิเนียม โดยทำให้เป็นสุญญากาศและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสในสับปะรด

การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสในสับปะรดผงที่ผลิตได้จากกระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง

เตรียมเคซีนความเข้มข้น 0.65 เปอร์เซ็นต์ในสารละลาย 4 ชนิดที่เตรียมไว้ข้างต้นเพื่อเป็นสับสเตรท ชั่งสับปะรดผง 1 กรัมละลายในสารละลายชนิดละ 100 มิลลิลิตร จากนั้นดูดสารละลาย 0.3 มิลลิลิตร ผสมกับสับสเตรท 0.8 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติมไตรคลอโรอะซิติกแอซิด 0.9 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา ตั้งทิ้งไว้ 10 นาทีจนเกิดตะกอน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดส่วนใสส่วนบนออกมา 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย Na_2CO_3 ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย folin reagent ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

(ยี่ห้อ Biochrome รุ่น Libra) ในการทดลองนี้ให้เตรียมกราฟมาตรฐานกรดอะมิโนไทโรซีนที่ ความเข้มข้น 25, 50, 100, 200, 400 และ 500 ไมโครโมลาร์ และนำไปวิเคราะห์ตามวิธีการข้างต้นเพื่อนำไปใช้ในการคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส โดยค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสมีหน่วยเป็นเคซีนยูนิต (Casein Digestion Unit; CDU) ตามสูตรดังนี้

CDU = (ไมโครกรัมของไทโรซีน x จำนวนเท่าที่เจือจางเอนไซม์ในการทดลอง) / (มวลโมเลกุลของไทโรซีน x เวลาบ่ม [นาที] x ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ทำปฏิกิริยา [มิลลิลิตร])

โดย 1 CDU คือปริมาณเอนไซม์โปรติเอสที่ย่อยเคซีนจนได้กรดอะมิโนไทโรซีนออกมา 1 มิลลิโมลาร์ ในเวลา 1 นาทีภายใต้สภาวะที่ทดลอง

การวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพของสับปะรดผงด้านปริมาณความชื้น (moisture content), a_w **และสัมประสิทธิ์ของสีในหน่วย** CIE L*a*b*

วิเคราะห์ค่าปริมาณความชื้นด้วยเครื่อง Moisture Analyzer (ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น MOC63U) ในหน่วยร้อยละความชื้น วิเคราะห์ ค่า aw ด้วยเครื่อง Water Activity Meter (ยี่ห้อ AQUA LAB) และวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของสี ด้วยเครื่อง Color Meter Analysis (ยี่ห้อ Hunterlab รุ่น Ultra Scan VIS) ในหน่วย CIE L*a*b* โดยค่า L* แสดงถึงความสว่าง ค่า a* แสดงถึงค่าสีแดง และค่า b* แสดงถึงค่าสีเหลือง

การวิเคราะห์เสถียรภาพของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส

ดึงตัวอย่างสับปะรดผงที่ผลิตได้ทุก10 วัน จำนวน 12 ครั้ง รวมเป็น 120 วัน มาทำการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส โดยกำหนดให้ค่ากิจกรรมโปรติเอสที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างวันที่ผลิตสับปะรดผงวันแรกคิดเป็นร้อยละ 100 ของค่าเสถียรภาพ

สถิติที่ใช้ในการทดลอง

ออกแบบการทดลองการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) ทำการเปรียบเทียบค่า pH และค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสในน้ำสับปะรดก่อนและหลังการผสมกับ carrier โดยใช้ *t*-Test ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย one-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรม PSPP freeware version 1.6

ผลการทดลอง

ผลของค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสในน้ำสับปะรดและในสับปะรดผง

ตัวอย่างน้ำสับปะรดที่คั้นได้ก่อนที่จะนำไปเข้าสู่กระบวนการแช่เยือกแข็ง สามารถตรวจพบค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสต่อสับสเตรทเคซีนโดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 0.35 เคซีนยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีค่า pH เป็นกรดเท่ากับ 4.23 เมื่อนำน้ำสับปะรดไปผสมกับสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ที่มีระดับ pH 6.5, 7.0 และ 7.5 พบว่าบัฟเฟอร์ดังกล่าวสามารถปรับค่า pH ของน้ำสับปะรดให้เปลี่ยนแปลงได้โดยมีค่าเท่ากับ 6.26, 6.54 และ 7.41 ตามลำดับ โดยค่า pH ทั้ง 3 ค่าของน้ำสับปะรดที่ผสมสารละลายบัฟเฟอร์มีความแตกต่างจากค่า pH ของตัวบัฟเฟอร์เองอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) นอกจากนี้น้ำสับปะรดที่ผ่านการปรับค่า pH แล้วสามารถตรวจพบกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 0.38, 0.40 และ 0.41 เคซีนยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสในน้ำสับปะรดที่ผสมสารละลายบัฟเฟอร์มีความแตกต่างจากค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสในน้ำสับปะรดก่อนการผสมบัฟเฟอร์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

Table 1 The value of pH and protease activity of pineapple and buffer mixing solution with various pH buffer (Mean ± SD)

Target pH	pH changed	*t*-value (pH)	Protease activity (CDU/mL)	*t*-value (Activity)
6.5	6.26±0.04	10.82*	0.38±0.10	-5.19*
7.0	6.54±0.02	46.00*	0.40±0.08	-8.66*
7.5	7.41±0.01	15.59*	0.41±0.06	-17.00*

*Means values between target pH and pH changed are significantly different ($p < 0.05$), analyzed by *t*-test.

น้ำสับปะรดที่ผสมสารละลาย 4 ชนิดได้แก่ สารละลาย NSS ความเข้มข้นร้อยละ 0.9 สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ pH 6.5, 7.0 และ 7.5 เมื่อนำไปผ่านกระบวนการทำแห้งเยือกแข็งพบว่าการผสมน้ำสับปะรดในสารละลายทั้ง 4 ชนิดสามารถแปรรูปน้ำสับปะรดให้เป็นผงได้ โดยสับปะรดผงที่ผลิตได้คิดเป็นผลผลิตร้อยละ 22.25 โดยน้ำหนักเมื่อเทียบกับน้ำหนักน้ำสับปะรดเริ่มต้น สับปะรดผงมีลักษณะเป็นผงละเอียดสีเหลืองนวลและพบว่าบางส่วนมีลักษณะเป็นแผ่นและเกร็ด (Figure 1)

Figure 1 Freeze dried pineapple powder

สับปะรดผงที่ผลิตจากสารละลาย NSS และสารละลายบัฟเฟอร์ที่ระดับ pH 6.5, 7.0 และ 7.5 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 2.63, 3.25, 3.37 และ 3.46 เคซีนยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Table 2) โดยพบว่าเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากสารละลาย NSS มีค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสน้อยที่สุด และแตกต่างจากเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากสารละลายบัฟเฟอร์ทั้งสามชนิด โดยค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสในสารละลายบัฟเฟอร์ทั้งสามชนิดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

Table 2 Protease activity analysis of pineapple powder made of four types of solution (Mean ± SD)

Characteristic	Solution			
	NSS	pH 6.5	pH 7.0	pH 7.5
Protease activity (CDU/mL)	2.63^{b}±0.03	3.25^{a}±0.03	3.37^{a}±0.06	3.46^{a}±0.08

**Means in the same row followed by the same alphabet are not significantly different ($p < 0.05$), analyzed by one-way ANOVA.

ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพของสับปะรดผงด้าน a_w ปริมาณความชื้น (moisture content) และสัมประสิทธิ์ของสีในหน่วย CIE L*a*b*

การวิเคราะห์ปริมาณ a_w ซึ่งค่านี้บ่งบอกถึงปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ หากตัวอย่างมีค่า a_w สูงหมายความว่าตัวอย่างมีโอกาสมากที่จะเกิดการเสื่อมเสียจากจุลินทรีย์ ผลการวิเคราะห์พบว่าสับปะรดผงที่ผลิตจาก NSS มีค่า a_w เท่ากับ 0.57 ซึ่งมีค่าสูงที่สุด รองลงมาได้แก่สับปะรดผงที่ผลิตจากบัฟเฟอร์ pH 6.5, 7.5 และ 7.0 ซึ่งมีค่า a_w เท่ากับ 0.46, 0.34 และ 0.32 ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์จะเห็นได้ว่าการผลิตโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ส่งผลให้ค่า a_w ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญ (Table 3)

การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น ซึ่งค่านี้บ่งบอกถึงปริมาณน้ำที่ผสมอยู่ในเนื้อของตัวอย่าง หากตัวอย่างใดมีค่าสูงกว่าหมายความว่าตัวอย่างนั้น

จะมีลักษณะเปียกหรือแฉะมากกว่า ผลการวิเคราะห์ค่าปริมาณความชื้นพบว่า สับปะรดผงที่ผลิตจาก NSS มีปริมาณความชื้นเท่ากับร้อยละ 11.25 ซึ่งมีค่าสูงที่สุดและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสับปะรดผงที่ผลิตจากบัฟเฟอร์รองลงมาได้แก่สับปะรดผงที่ผลิตจากบัฟเฟอร์ pH 7.0, 6.5 และ 7.5 ซึ่งมีปริมาณความชื้นร้อยละ 8.67, 8.63 และ 8.63 ตามลำดับ จากผลการทดลองเห็นได้ว่าการผลิตโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ส่งผลให้ปริมาณความชื้นมีค่าน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ (Table 3)

Table 3 a_w and moisture content analysis of pineapple powder made at four types of solution (Mean ± SD)

Characteristics	Solution			
	NSS	pH 6.5	pH 7.0	pH 7.5
a_w	0.57^{a}±0.01	0.46^{b}±0.02	0.32^{c}±0.01	0.34^{c}±0.02
moisture content (%)	11.25^{a}±0.03	8.63^{b}±0.06	8.67^{b}±0.08	8.63^{b}±0.04

**Means in the same row followed by the same alphabet are not significantly different ($p < 0.05$), analyzed by one-way ANOVA.

การวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของสี บ่งบอกถึงความเข้มของสีแดง-เขียว (a*) สีเหลือง-น้ำเงิน (b*) และความสว่าง (L*) โดยค่า a* และ b* ที่เป็น + หรือไม่ได้แสดงเครื่องหมายใดหมายความว่าตัวอย่างมีการแสดงเฉดสีแดงและเหลืองตามลำดับ หากค่า a* และ b* มีค่าเป็น – หมายความว่าตัวอย่างมีการแสดงเฉดสีเขียวและน้ำเงินตามลำดับ ส่วนตัวเลขของค่าทั้ง a* และ b* ที่มากกว่าหมายความว่าเฉดสีนั้นเข้มขึ้น และตัวเลขที่น้อยกว่าหมายความว่าเฉดสีนั้นซีดลง ส่วนค่า L* หมายถึงค่าความสว่าง โดยค่าเข้าใกล้ 100 หมายความว่าตัวอย่างมีเฉดสีขาว หากค่า L* มีค่าเข้าใกล้ 0 แสดงว่าตัวอย่างมีเฉดสีดำ โดยผลการวิเคราะห์ความสว่างพบว่าสับปะรดผงที่ผลิตจาก NSS และสับปะรดผงที่ผลิตจากสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7.0, 6.5 และ 7.5 มีค่าความสว่าง (L*) เท่ากับ 55.23, 58.70, 62.29 และ 63.11 ตามลำดับ โดยมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (Table 4)

การวิเคราะห์ความเข้มของสีแดง-เขียว (a*) และสีเหลือง-น้ำเงิน (b*) พบว่าสับปะรดผงที่ผลิตจากสารละลาย NSS มีความเข้มของสีแดงมากที่สุด โดยมีค่าสีแดง (a*) เท่ากับ 18.34 ซึ่งมีค่าสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสับปะรดผงที่ผลิตจากสารละลายบัฟเฟอร์ทั้ง 3 ชนิด ส่วนสับปะรดผงที่ผลิตจากบัฟเฟอร์ pH 6.5, 7.0 และ 7.5 มีค่าสีแดง (a*) เท่ากับ 9.66, 9.54 และ 9.30 ตามลำดับ โดยมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนสับปะรดผงที่ผลิตจากสารละลายบัฟเฟอร์ pH 6.5 และ 7.0 มีความเข้มของสีเหลือง (b*) เท่ากันคือ 25.56 และ 25.62 ตามลำดับ และมีค่ามากกว่าสับปะรดผงที่ผลิตจากสารละลาย NSS และสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7.5 อีกด้วย โดยสับปะรดผงที่ผลิตจากสารละลาย NSS และสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7.5 มีความเข้มของสีเหลือง (b*) เท่ากับ 23.19 และ 24.03 ตามลำดับ

Table 4 Color analysis of pineapple powder made of four types of solution (Mean ± SD)

Characteristics	Solution			
	NSS	pH 6.5	pH 7.0	pH 7.5
(L*) ^{ns}	55.23±0.01	58.70±0.17	62.29±0.08	63.11±0.12
(a*)	$+18.34^{a}$±0.09	$+9.66^{b}$±0.04	$+9.54^{b}$±0.09	$+9.30^{b}$±0.05
(b*)	$+23.19^{b}$±0.12	$+25.56^{a}$±0.22	$+25.62^{a}$±0.55	$+24.03^{b}$±0.06

**Means in the same row followed by the same alphabet are not significantly different ($p < 0.05$), analyzed by one-way ANOVA.

ผลการวิเคราะห์เสถียรภาพของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส

เมื่อเก็บรักษาสับปะรดผงไว้เป็นเวลา 120 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยดึงตัวอย่างมาทำการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสทุกๆ 10 วันเป็นเวลา 12 ครั้ง โดยกำหนดให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่วิเคราะห์ได้วันแรกของการผลิตคิดเป็นค่าเสถียรภาพร้อยละ 100 โดยผลการวิเคราะห์พบว่าในช่วง 50 วันแรกของการเก็บรักษา สับปะรดผงที่ผลิตจากสารละลาย NSS และสารละลายบัฟเฟอร์ pH 6.5, 7.0 และ 7.5 ยังมีเสถียรภาพของกิจกรรมโปรติเอสเท่ากับร้อยละ 97.41, 98.58, 99.60 และ 99.00 ตามลำดับ หลังจากนั้นพบว่าสับปะรดผงที่ผลิตจากสารละลาย NSS มีแนวโน้มของค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสลดลงอย่างรวดเร็ว โดยวันที่ 60, 70, 80, 90, 100 และ 110 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับร้อยละ 88.55, 55.52, 55.02, 48.50, 45.50, 45.00 ตามลำดับ และในวันที่ 90 พบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสลดลงเหลือครึ่งหนึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับวันแรก (Figure 2) ส่วนสับปะรดผงที่ผลิตจากสารละลายบัฟเฟอร์ทั้งสามชนิดมีค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่มีเสถียรภาพดีกว่า โดยพบว่าสับปะรดผงที่ผลิตจากสารละลายบัฟเฟอร์ pH 6.5, 7.0 และ 7.5 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสในวันที่ 100 เท่ากับร้อยละ 95, 98.56 และ 85.65 ตามลำดับ และพบว่าในวันที่ 120 สับปะรดผงที่ผลิตจากสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7.0 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสคงเหลือสูงที่สุดเท่ากับร้อยละ 98 รองลงมาได้แก่ สับปะรดผงที่ผลิตจากสารละลายบัฟเฟอร์ pH 6.5 และ 7.5 โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสคงเหลือเท่ากับร้อยละ 91 และ 81 ตามลำดับ ทั้งนี้สับปะรดผงที่ผลิตจากสารละลาย NSS มีค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสเหลืออยู่น้อยที่สุดเท่ากับร้อยละ 36.65

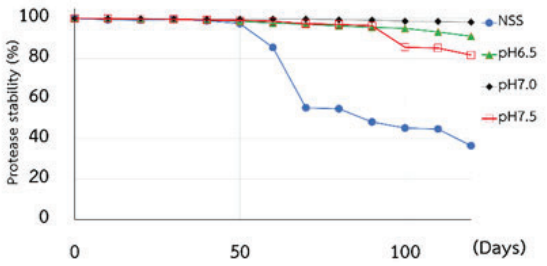

Figure 2 Stability of protease activity evaluated from pineapple powder within 120 days

วิจารณ์

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าน้ำสับปะรดในสารละลาย NSS และในสารละลายบัฟเฟอร์สามารถย่อยสับสเตรทเคซีนได้ดี โดยตรวจพบค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสอยู่ในช่วง 0.38-0.41 เคซีนยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่ตรวจพบนี้สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีในช่วงกรดอ่อนไปจนถึงเบสอ่อน (6.5-7.5) และในช่วงอุณหภูมิและเวลาที่กำหนด (37 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที) ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์โบรมิเลนก่อนหน้านี้ ทำให้สรุปได้ว่าเอนไซม์โปรติเอสที่ตรวจพบกิจกรรมได้ในน้ำสับปะรดที่นำมาทดลองในงานวิจัยนี้เป็นเอนไซม์โบรมิเลน (Kaur *et al.*, 2015)

โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นสารที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ควบคุม pH เนื่องจากสารประกอบมีความปลอดภัยกับสิ่งมีชีวิต โดยในปัจจุบันมีการใช้สารละลายโซเดียมฟอสเฟตเกรดอาหาร (food grade) ในอุตสาหกรรมต่างๆ สำหรับในประเทศไทย โซเดียมฟอสเฟตถูกจัดให้เป็นวัตถุเจือปนอาหารที่สามารถ

นำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตอาหารได้ ตามข้อกำหนดทางกฎหมายที่ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการโคเด็กซ์ฉบับปี พ.ศ. 2563 (กระทรวงสาธารณสุข, 2563) โดยโซเดียมฟอสเฟตจัดเป็นวัตถุเจือปนอาหารกลุ่มฟอสเฟต ทำหน้าที่ควบคุมความเป็นกรด ป้องกันการเกิดออกซิเดชัน และทำให้เกิดความคงตัว โดยมีรหัส INS339 ซึ่งสามารถใช้ได้ในปริมาณช่วงกว้าง 350-6,600 พีพีเอ็ม ขึ้นอยู่กับประเภทอาหาร การนำโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์มาผลิตสับปะรดผงในงานวิจัยนี้ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์โบรมิเลน สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ferreira *et al*. (2011) ที่ได้รายงานการศึกษาผลกระทบของ pH จากสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ที่มีผลต่อเอนไซม์โบรมิเลน โดยผลการทดลองชี้ว่าโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์มีความสำคัญต่อเอนไซม์โบรมิเลน โดยจะช่วยรักษา pH ให้คงที่ ซึ่งที่ pH 7.0 และ pH ใกล้เคียง ไอออนที่แวดล้อมโมเลกุลเอนไซม์จะมีคุณสมบัติทางไฟฟ้าช่วยรักษาโครงสร้าง (conformation) ของเอนไซม์โบรมิเลนไม่ให้เกิดการเสียสภาพตลอดขั้นตอนการสกัดและการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

จากงานวิจัยด้านการพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ผงแช่เยือกแข็งก่อนหน้านี้ได้ทำการศึกษาการทำแห้งเยือกแข็งของน้ำกีวี พบว่าค่า pH ในช่วงเป็นกลางให้ผลของคุณสมบัติทางกายภาพที่ดีกว่าในช่วง pH เป็นกรด ผลิตภัณฑ์กีวีผงที่ผลิตจากค่า pH เป็นกรดมีค่า a_w และปริมาณความชื้นสูงกว่าผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากค่า pH เป็นกลาง (Chakraborty *et al*., 2020) ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ โดยสับปะรดผงที่ผลิตจากสารละลาย NSS ซึ่งไม่ได้ทำการปรับค่า pH และมีค่า pH เท่ากับ 4.23 ซึ่งถือว่าเป็นกรดอ่อนมีค่า a_w สูงกว่าสับปะรดผงที่ผลิตจากสารละลายบัฟเฟอร์ทั้งสามชนิด หากพิจารณาจากมาตรฐานผลิตภัณฑ์สินค้าชุมชนประเภทสมุนไพรแปรรูปชนิดผง (มผช. 1441/2556) ได้กำหนดว่าผลิตภัณฑ์สมุนไพรแปรรูปชนิดผงต้องมีค่า a_w ไม่เกิน 0.6 จึงจะผ่านมาตรฐาน ทั้งนี้ค่า a_w ของสับปะรดผงที่ผลิตจากสารละลาย NSS ในงานวิจัยนี้มีค่าเท่ากับ 0.57 นั่นหมายความว่าสับปะรดผงจะมีความเสี่ยงที่ผลิตภัณฑ์จะเกิดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ผลิตภัณฑ์จะเสื่อมเสียเร็วและทำให้ประสิทธิภาพของเอนไซม์โบรมิเลนลดลง

ผลการศึกษาปริมาณความชื้นในสับปะรดผงชี้ว่า ปริมาณความชื้นมีผลกระทบต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส โดยมีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกันกับผลการวิเคราะห์ค่า a_w คือ การผลิตสับปะรดผงจากสารละลาย NSS มีปริมาณความชื้นมากกว่าสับปะรดผงจากสารละลายบัฟเฟอร์ทั้งสามชนิด โดยปริมาณความชื้นที่มากกว่าประมาณร้อยละ 3 ส่งผลให้สับปะรดผงจากสารละลาย NSS มีค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสลดลงอย่างรวดเร็วเหลือเพียงครึ่งหนึ่งภายในเวลา 50 วันเมื่อเปรียบเทียบกับสับปะรดผงที่ผลิตจากสารละลายบัฟเฟอร์ ผลการทดลองนี้สามารถอธิบายได้ว่าปริมาณความชื้นที่มากกว่าหมายถึงมีโมเลกุลน้ำมากพอที่จะทำให้เอนไซม์โบรมิเลนเร่งปฏิกิริยาได้อย่างปกติ (Erez *et al*., 2009) โดยเอนไซม์โบรมิเลนและเอนไซม์โปรติเอสชนิดอื่นที่มีอยู่ในสับปะรดผงจะเกิดปฏิกิริยาย่อยกันเองอย่างต่อเนื่อง ทำให้ เอนไซม์สูญเสียประสิทธิภาพและมีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็ว

อีกเหตุผลประการหนึ่งที่น่าสนใจก็คือมีเอนไซม์โปรติเอสชนิดอื่นนอกเหนือจากเอนไซม์โบรมิเลนเจือปนอยู่ และการผลิตสับปะรดผงจากสารละลาย NSS มีค่า pH เป็นกรดอ่อน ซึ่งอาจเป็นสภาวะที่เหมาะสมและเอื้อต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรติเอสชนิดอื่น เอนไซม์ที่ผสมอยู่ในสับปะรดผงของงานวิจัยนี้เป็นเอนไซม์โปรติเอสหยาบ (crude) จึงอาจมีเอนไซม์โปรติเอสอีกชนิดหนึ่งที่เคยมีรายงานการค้นพบในสับปะรดเช่นกันนั่นคือ เอนไซม์อะนาเนน (ananain; EC 3.4.22.31) ซึ่งเอนไซม์อะนาเนนเป็นเอนไซม์โปรติเอสที่มีโครงสร้างสามมิติคล้ายคลึงกับเอนไซม์โบรมิเลน (Azarkan *et al*., 2020) แต่มีความแตกต่างกันตรงลำดับของกรดอะมิโนในบริเวณเร่งปฏิกิริยา (Rowan *et al*., 1988) ซึ่ง pH ที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์อะนาเนนจะอยู่ในช่วงกรดอ่อนถึงกลาง ดังนั้นเหตุผลนี้จึงสามารถนำมาใช้อธิบายปรากฏการณ์ที่เกิดการลดลงอย่างรวดเร็วของค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสในสับปะรดผง ที่ผลิตได้จากสารละลาย NSS

จากการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของสีในสับปะรดผงบ่งชี้ว่า สับปะรดผงที่ผลิตจากสารละลาย NSS มีแนวโน้มของเฉดสีไปในทางสีเขียวอมแดง เนื่องจากสับปะรดผงจากสารละลาย NSS มีค่าสีแดง (a*) สูงกว่าสับปะรดผงจากสารละลายบัฟเฟอร์สองเท่า แต่จากการสังเกตด้วยสายตาพบว่าสับปะรดผงที่ผลิตจากสารละลาย NSS และสารละลายบัฟเฟอร์มีสีเขียวอมเหลืองเหมือนกัน อย่างไรก็ตามค่าของสีที่แตกต่างกันในแต่ละตัวอย่างไม่ได้ส่งผลกระทบหรือมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของค่ากิจกรรมเอนไซม์โปติเอส ส่วนสาเหตุที่พบว่าสับปะรดผงจากสารละลาย NSS มีค่าสีแดง (a*) สูง ผลการทดลองนี้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Song *et al*. (2018) ซึ่งได้ทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวของสีในผลิตภัณฑ์น้ำบลูเบอรี่ และพบว่า pH เป็นปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงสีในผลิตภัณฑ์มากที่สุด โดยส่งผลต่อไอออนของโมเลกุลอินทรีย์และโมเลกุลสีขนาดเล็ก ทำให้ความสามารถในการดูดกลืนแสงและการหักเหแสงเปลี่ยนแปลงไป จึงทำให้เกิดความไม่คงตัวของสีในผลิตภัณฑ์ ดังนั้นในงานวิจัยนี้ค่า pH ของสับปะรดผงที่ผลิตจากสารละลาย NSS มีค่าเป็นกรดอ่อน ขณะที่ในสารละลายบัฟเฟอร์มีค่าเป็นกลางและเบส ซึ่งค่า pH ที่ต่างกันจึงอาจส่งผลต่อสารประกอบชนิดอื่นที่เจือปนอยู่ และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าสีแดง (a*) ให้มีความแตกต่างกัน

สรุป

จากวัตถุประสงค์ของงานวิจัย สามารถสรุปได้ว่าสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ มีความเหมาะสมและสามารถนำมาใช้เปลี่ยนแปลงค่า pH ของน้ำสับปะรดจากกรดอ่อนให้กลายเป็นกลางและเบสอ่อนในกระบวนการทำแห้งเยือกแข็งน้ำสับปะรดได้ดี ปัจจัยด้าน pH มีผลต่อกระบวนการทำแห้งเยือกแข็งเพื่อผลิตสับปะรดผง pH เป็นกรดจะส่งผลกระทบด้านกายภาพโดยทำให้สับปะรดผงมีค่า a_w และปริมาณความชื้นสูง และส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในสับปะรดผงเสื่อมประสิทธิภาพอย่างรวดเร็ว ในขณะที่กระบวนการผลิตโดยมีบัฟเฟอร์ที่ pH เป็นกลางผสมจะส่งผลให้ได้ผลิตภัณฑ์สับปะรดผงที่มีคุณสมบัติดีกว่า โดยค่า a_w และปริมาณความชื้นต่ำกว่า และกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสมีเสถียรภาพที่ดีเป็นเวลานาน 120 วัน ผลการศึกษาที่ได้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลสำหรับพัฒนากระบวนการผลิตสับปะรดผงและการผลิตเอนไซม์โบรมิเลนในระดับอุตสาหกรรมที่มีประสิทธิภาพได้ต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้บูรณาการงบประมาณสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยราชภัฏหมู่บ้านจอมบึง ภายใต้กองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัย และนวัตกรรม (ววน.) และชุดโครงการวิจัยการพัฒนาวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์แปรรูปสับปะรดจังหวัดราชบุรีระยะที่ 2 (สกว.) และขอขอบคุณนักวิจัยของกรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข ที่ได้ผลักดันให้มีการทดลองผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากสับปะรดต้นแบบในระดับอุตสาหกรรม โดยประยุกต์ใช้ข้อมูลจากผลงานวิจัยนี้เพื่อนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้จริงต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงสาธารณสุข. 2563. กำหนดหลักเกณฑ์เงื่อนไข วิธีการใช้ และอัตราส่วนของวัตถุเจือปนอาหาร (ฉบับที่2). ประกาศกระทรวงสาธารณสุข. ราชกิจจานุเบกษา. 657 หน้า.

Azarkan, M., E. Maquoi, F. Delbrassine, R. Herman, N. M'Rabet, R.C. Esposito, P. Charlier and F. Kerff. 2020. Structures of the free and inhibitors-bound forms of bromelain and ananain from *Ananas comosus* stem and *in vitro* study of their cytotoxicity. Scientific Reports 10(1): 19570, doi: 10.1038/s41598-020-76172-5.

Bhatta, S., T.S. Janezic and C. Ratti. 2020. Freeze-drying of plant-based foods. Foods 9(1): 87, doi: 10.3390/foods 9010087.

Chakraborty, N., R. Chakraborty and A. Saha. 2020. Fortified and freeze-dried kiwi fruit (*Actinidia deliciosa*): quality and sensory assessment. Brazilian Journal of Food Technology 23, doi: 10.1590/1981-6723.07719.

Erez, E., D. Fass and E. Bibi. 2009. How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane. Nature 459(7245): 371-378.

Ferreira, J.F., J.C.C. Santana and E.B. Tambourgi. 2011. The effect of pH on bromelain partition from *Ananas comosus* by PEG4000/phosphate ATPS. Brazilian Archives of Biology and Technology 54(1): 125-132.

Kaur, T., A. Kaur and R.K. Grewal. 2015. Kinetics studies with fruit bromelain (*Ananas comosus*) in the presence of cysteine and divalent ions. Journal of Food Science and Technology 52(9): 5954-5960,

Kritis, P., L. Karampela, S. Kokoris and M. Dalamaga. 2020. The combination of bromelain and curcumin as an immune-boosting nutraceutical in the prevention of severe COVID-19. Metabolism Open 8: 100066, doi: 10.1016/j.metop.2020.100066.

Liliana, S-C., PV-M. Diana and A.A. Alfredo. 2015. Structural, physical, functional and nutraceutical changes of freeze-dried fruit. African Journal of Biotechnology 14(6): 442-50.

Manzoor, Z., A. Nawaz., H. Mukhtar and I. Haq. 2016. Bromelain: methods of extraction, purification and therapeutic applications. Brazilian Archives of Biology and Technology 59: 1-16.

Rowan, A.D., D.J. Buttle and A.J. Barrett. 1988. Ananain: a novel cysteine proteinase found in pineapple stem. Archives of Biochemistry and Biophysics 267(1): 262-270.

Shofian, N.M., A.A. Hamid, A. Osman, N. Saari, F. Anwar, M.S. Dek and R.H. Hairuddin. 2011. Effect of freeze-drying on the antioxidant compounds and antioxidant activity of selected tropical fruits. International Journal of Molecular Science 12(7): 4678-4692.

Silva-Espinoza, M.A., C. Ayed, T. Foster, M.D.M. Camacho and N. Martinez-Navarrete. 2019. The impact of freeze-drying conditions on the physico-chemical properties and bioactive compounds of a freeze-dried orange puree. Foods 9(1): 32, doi: 10.3390/foods9010032.

Song, H. N., S.A., Ji, H.R. Park, H.H. Kim and C. Hogstrand. 2018. Impact of various factors on color stability of fresh blueberry juice during storage. Preventive Nutrition and Food Science 23(1): 46–51.