

การแยกให้บริสุทธิ์ และตรวจสอบสมบัติของโพลิเมอร์
จากต้นเส้นประรด

นางสาว นิตยา ว่องนราธิวัฒน์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2531

ISBN 974-569-286-7

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Purification and Characterization of Bromelain
from Pineapple Stem.



Miss Nitaya Wongnarativat

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Programme Biotechnology

Graduate School

Chulalongkorn University

1968

ISBN 974-569-286-7

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การแยกให้บริสุทธิ์ และตรวจสอบสมบัติของ โบรมีเลนจากต้นเล็บปรด

โดย นางสาว นิตยา ว่องนารัตน์

หลักสูตร เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วิมล ชำวีวรรณ์ รองศาสตราจารย์ ดร. สันต์ ณิชยกุล

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับเป็น ส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิต



..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

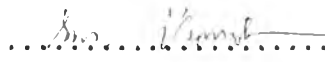
(รองศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชรากัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. สันต์ ณิชยกุล)



..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพบเราะ บินพานิชการ)



..... กรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ ดำรงเสิศ)



..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วิมล ชำวีวรรณ์)

นิตยา ว่องนราธิวัฒน์: การแยกให้บริสุทธิ์ และตรวจสอบสมบัติของโบรมิเลนจากต้นสับปะรด

(PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF BROMELAIN FROM PINEAPPLE STEM)

อ.ที่ปรึกษา : ผศ.วินิจ ขำวิวรรณ์ รศ.ดร.สันต์ พนิชยกุล, 141 หน้า

การวิจัยเพื่อเพิ่มความบริสุทธิ์ของผงโบรมิเลนที่เตรียมโดยการตกตะกอนด้วยอะซีโตนให้สูงขึ้น ด้วยเทคนิคการโคอะไลซิส อุลตราฟิลเตรชัน คูโอไลซ์ ซี225 และเซฟาเดกซ์ จี100 โครมาโตกราฟี พบว่าเทคนิคดังกล่าวไม่สามารถเพิ่มความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ให้สูงขึ้นได้ไม่มากนัก (~1.4-2 เท่า) แอคติวิตีของผงโบรมิเลนมีค่าประมาณ 281-604 หน่วยซีตยูต่อมิลลิกรัมผง แอคติวิตีของโบรมิเลนในน้ำสกัดจากต้นสับปะรดสามารถกระตุ้นให้สูงขึ้นได้ด้วยการคละมีโนซีสเทอีนไฮโดรคลอไรด์ และโซเดียมเมทาไบซัลไฟท์ กรดเอทิลลีนไดอะมีน เทระอะซีทิกสามารถเสริมฤทธิ์การกระตุ้นแอกติวิตีของเอนไซม์โดยการคละมีโนซีสเทอีนไฮโดรคลอไรด์ได้ประมาณ 1.5 เท่า ผงโบรมิเลนที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการตกตะกอนด้วยกรดโพลีอะไคริลิกจะมีแอกติวิตีต่อมิลลิกรัมผงสูงกว่าผงโบรมิเลนจากการตกตะกอนโดยอะซีโตนประมาณ 4-5 เท่า (~1941 หน่วยซีตยูต่อมิลลิกรัมผง) และให้ผลผลิตประมาณ 1.2 กรัมต่อกิโลกรัมต้นสับปะรด การทำให้เอนไซม์จากผงโบรมิเลนที่เตรียมได้บริสุทธิ์สูงขึ้นโดยใช้เทคนิคอูลตราฟิลเตรชัน คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสโครมาโตกราฟี เซฟาเดกซ์ จี100 โครมาโตกราฟี หรือเทคนิคร่วมของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสกับเซฟาเดกซ์ จี100 โครมาโตกราฟีไม่มีผลในการเพิ่มแอกติวิตีของเอนไซม์ แต่จากการตรวจสอบด้วยเทคนิคโพลีอะไคริลไมด์เจล อีเล็กโตรโฟรีซิสพบว่ามีชนิดของโปรตีนในผงโบรมิเลนลดลง ผงโบรมิเลนที่มีความบริสุทธิ์สูงนี้จะมีคุณสมบัติต่าง ๆ ในการเร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์ เคซีนเกือบไม่แตกต่างกันกับผงโบรมิเลนก่อนเพิ่มความบริสุทธิ์ ยกเว้นเอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์สูงจะมีความเสถียรต่ออุณหภูมิลดลง เอนไซม์โบรมิเลนสามารถตรึงบนคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสและเสริมด้วยกลูตาร์ลดีไฮด์ได้ โดยที่เอนไซม์ครึ่งหนึ่งชนิดเสริมและไม่เสริมด้วยกลูตาร์ลดีไฮด์จะเร่งปฏิกิริยาได้สูงสุดที่อุณหภูมิต่ำกว่าเอนไซม์อิสระ (45 °C สำหรับเอนไซม์ครึ่งและ 65 °C สำหรับเอนไซม์อิสระ) โบรมิเลนครึ่งมีความเสถียรต่ออุณหภูมิ (30-50 °C) สูงกว่าเอนไซม์อิสระอย่างชัดเจน นอกจากนี้การตรึงเอนไซม์บนคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสจะช่วยให้ความสามารถในการไฮโดรไลซ์สับสเตรทเคซีนเพิ่มขึ้นประมาณ 15-20 เท่าเมื่อเทียบกับเอนไซม์อิสระ

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ.....
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ.....
ปีการศึกษา 2530.....

ลายมือชื่อนิสิต นิตยา ว่องนราธิวัฒน์
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.วินิจ ขำวิวรรณ์

NITAYA WONGNARATIVAT : PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF BROMELAIN FROM PINEAPPLE STEM. THESIS ADVISOR: ASSIST. PROF. VINICH KHAMVIWAT ASSO. PROF. SANHA PANICHAJAKUL. Ed.D. 141 PP.

Several attempts to further purify the bromelain powder obtained from acetone precipitation step were made on dialysis, ultrafiltration, Duolite C-225 and Sephadex G-100 chromatography. By using those techniques, the purity of the enzyme were found to be insignificantly increased (~1.4-2 folds). The activity of bromelain powder was 281-604 CDU/mg powder. The activity of bromelain from stem extracts could be raised by either cysteine hydrochloride or sodium metabisulphite. The activation effect of cysteine hydrochloride on the enzyme activity was additionally enhanced (~1.5 folds) when supplemented with ethylenediaminetetraacetic acid. Partial purification by polyacrylic acid yielded approximately 1.2 g bromelain powder/kg stem with the activity per mg powder (~1941 CDU) 4-5 folds higher than that from the acetone precipitation. The further purification of so obtained enzyme powder by ultrafiltration, CM-Cellulose chromatography and Sephadex G-100 chromatography or combination of the two later techniques gave no improvement of bromelain activity. Nevertheless, results from PAGE analysis clearly illustrated the decrease in types of protein in the enzyme powder. This highly purified bromelain powder was not significantly different from the polyacrylic acid enzyme powder at the aspect of its properties to catalyze casein hydrolysis although its stability to temperature was found to be lowered. Bromelain could be immobilized on CM-Cellulose, either with or without glutaraldehyde. Both immobilized enzymes had the optimum temperature at 45°C, while the free form optimally catalyzed reaction at 65°C. The immobilized was more stable at 30-50°C than the free enzyme. Moreover the results also indicated that immobilization of bromelain on CM-Cellulose could enhance its capacity to hydrolyze substrate casein by 15-20 folds in comparison to the free enzyme.

ภาควิชา Biotechnology.....
สาขาวิชา Biotechnology.....
ปีการศึกษา 2530.....

ลายมือชื่อนิติ Nitaya Wongnarativat.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนได้ร่ำเรียนจากพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สิทธิ์ นิชชยกุล เป็นอย่างสูงที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำแนวคิดต่าง ๆ แก่ผู้เขียนในหลาย ๆ ด้าน รวมทั้งความช่วยเหลือและกำลังใจ อันมีค่ายิ่งตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์นี้

กราบขอพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ วินิจ ขำวิวรชรัณ คาสตราจารย์ ดร.ลมศักดิ์ ดำรงค์เลิศ และรองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ บินพาณิชการ ที่ได้กรุณาแนะนำจนทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี และภาควิชาเคมีเทคนิค คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณบริษัทอาหารสยาม จำกัด ที่ได้เก็บเนื้อตัวอย่างต้นฉบับสัตว์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่ได้กรุณามอบเงินทุนวิจัยปี 2529 กุศลหนุนการวิจัยนี้

สุดท้ายนี้ผู้เขียนขอขอบคุณ คุณ นิรมิตพิสุทธิ์ ณรงค์ขบวนะ และคุณ ลุพร นุชดำรงค์ สำหรับความช่วยเหลือด้านงานวิจัย รวมทั้ง เพื่อน ที่คอยช่วยเหลือ สนับสนุน และเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์นี้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
รายการตารางประกอบ.....	ญ
รายการรูปประกอบ.....	ฎ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. วิธีการทดลอง	
2.1 ครุภัณฑ์.....	10
2.2 เคมีภัณฑ์.....	11
2.3 การเตรียมสารละลาย.....	11
2.4 วิธีวัดแอกติวิตีของ โบรมิเลน.....	13
2.5 วิธีวัดปริมาณโปรตีน.....	15
2.6 การแยกสารละลายโปรตีนด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบโพสิ- อะไครลอะไมด์ เจล.....	16
2.7 การเตรียมสารละลายโบรมิเลนจากต้นสับปะรด.....	16
2.8 การผลิตโบรมิเลนจากต้นสับปะรดโดยวิธีตกตะกอนด้วยอะซีโตน.....	17
2.9 การสกัดแยกเอนไซม์โบรมิเลนจากต้นสับปะรดให้บริสุทธิ์โดยใช้ กรดไนลิกอะไครลิก.....	19
2.10 การตรึงโบรมิเลนด้วยคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส.....	20
3. ผลการทดลอง	
3.1 ประสิทธิภาพของการผลิตโบรมิเลนผงจากต้นสับปะรดโดยวิธีตก ตะกอนด้วยอะซีโตน.....	22
3.2 การเพิ่มความบริสุทธิ์ของผงโบรมิเลน.....	22

บทที่	หน้า
3.3 การศึกษาหาวิธีเตรียมโบรมิเลนบริสุทธิ์จากชั้นลับปรอท.....	34
3.4 การศึกษาความเสถียรของผงโบรมิเลน.....	44
3.5 การเพิ่มความบริสุทธิ์ของผงโบรมิเลนที่เตรียมได้โดยการตกตะกอนด้วยกรดฟอสฟอริก.....	54
3.6 การศึกษาความเสถียรของผงโบรมิเลนที่มีความบริสุทธิ์สูง.....	62
3.7 การศึกษาสมบัติทางกายภาพ และจลนศาสตร์ของโบรมิเลน...	66
3.8 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงโบรมิเลนด้วยคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส.....	77
3.9 การศึกษาอิทธิพลของกลูตารัลดีไฮด์ต่อแอกติวิตีของโบรมิเลนตรึงคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส.....	83
3.10 การศึกษาอิทธิพลของกลูตารัลดีไฮด์และ เออกซาเมทิลลีนไดอะมีนต่อแอกติวิตีของโบรมิเลนตรึงคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส.....	83
3.11 การศึกษาความเสถียรทางกายภาพของโบรมิเลนตรึงด้วยคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส.....	86
3.12 การศึกษาเปรียบเทียบสมบัติของโบรมิเลน และโบรมิเลนตรึงคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส.....	86
3.13 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเก็บรักษาโบรมิเลน และโบรมิเลนตรึงคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส.....	96
4. บทสรุปและวิจารณ์.....	100
เอกสารอ้างอิง.....	119
ภาคผนวก	
1. กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีลอร์รี่.....	127
2. กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีไบยูเรต.....	128
3. กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีที่ตัดแปลงจากวิธีไบยูเรต.....	129
4. กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณกรดอะมิโนไทโรซีนที่เกิดจากการย่อยสลายเคซีนด้วยเอนไซม์โบรมิเลน.....	130

ภาคผนวกที่	หน้า
5. กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอนไซม์กับปริมาณกรดอะมิโนไทโรซีน ที่ได้จากการย่อยสลายเคซีนด้วยเอนไซม์โบรมิเลน.....	131
6. กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอนไซม์กับปริมาณกรดอะมิโนไทโรซีน ที่ได้จากการย่อยสลายเจลาตินด้วยเอนไซม์โบรมิเลน.....	132
7. กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโบรมิเลนกับส่วนกลับของเวลาในการ แข็งตัวของสารละลายนม.....	133
8. กราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอกติวิตีของโบรมิเลนที่วัดด้วยวิธีตัดแปลงจาก คู่มือการวัดแอกติวิตีจากบริษัท Polyamine (Taiwan) Corporation และวิธีที่ตัดแปลงจากวิธีของ Kunitz.....	134
9. ผลของไนลิ่งไคร์ละไมด์เจลซึ่งใช้เป็นตัวรองรับในการทำอิเล็กโตรโฟเรซิส ต่อแอกติวิตีของโบรมิเลน.....	135
10. การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (Ash) โดยวิธีของ AOAC.....	136
11. ตารางแสดงผลการเตรียมโบรมิเลนจากต้นกล้วยสดโดยวิธีตกตะกอนด้วย กรดโพลิอะไคร์ลิก.....	137
12. ผลงานวิจัยพิมพ์เผยแพร่เรื่อง " Purification and Characteri- zation of Bromelain from Pineapple Stem. ".....	138
13. มาตรฐานของผลิตภัณฑ์โบรมิเลนที่ได้จากอุตสาหกรรม.....	140
ประวัติผู้เขียน.....	141



รายการตารางประกอบ

ตารางที่		หน้า
1	เปรียบเทียบความสามารถในการย่อยสลายสเตรทโบรมีเลนบริสุทธิ์ที่แยกจากส่วนลำต้นและผลของสับปรด.....	3
2	การศึกษาวีรสกัดแยกที่เหมาะสมต่อการแยกโบรมีเลนจากต้นสับปรดแล้วทำการตกตะกอนแยกผงโบรมีเลนจากสารละลายด้วยอะซิโตน.....	29
3	เปรียบเทียบผลกระทบของชนิดตัวทำละลายที่ใช้ทำไดอะไลซิสต่อแอกติวิตีของโบรมีเลน.....	30
4	แสดงผลการศึกษารูปแบบของการแยกสารละลายผงโบรมีเลนให้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นด้วยคอลัมน์ไอไลซ์ ซี 225.....	35
5	แสดงผลการศึกษารูปแบบของการแยกสารละลายเอนไซม์จากผงโบรมีเลนให้มีความบริสุทธิ์ขึ้นด้วยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 100.....	36
6	การเตรียมโบรมีเลนบริสุทธิ์สูงจากต้นสับปรด โดยการตกตะกอนโบรมีเลนด้วยกรดโพสโอะไครลิก.....	43
7	การศึกษาวีรสกัดแยกที่เหมาะสมต่อการแยกโบรมีเลนจากต้นสับปรดแล้วทำการตกตะกอนแยกผงโบรมีเลนจากสารละลายด้วยกรดโพสโอะไครลิก.....	45
8	แสดงผลการศึกษารูปแบบของการแยกสารละลายเอนไซม์จากผงโบรมีเลนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกรดโพสโอะไครลิกให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นด้วยคอลัมน์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส.....	57
9	แสดงผลการศึกษารูปแบบของการแยกสารละลายเอนไซม์จากผงโบรมีเลนที่เตรียมด้วยกรดโพสโอะไครลิกให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นด้วยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 100.....	59
10	แสดงผลการศึกษารูปแบบของการเพิ่มความบริสุทธิ์ของโบรมีเลนที่แยกได้จากคอลัมน์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส แล้วนำมาผ่านต่อในคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 100.....	63

รายการรูปประกอบ

รูปที่		หน้า
1	แสดงคุณสมบัติในการละลายของผง โบรมิเลน.....	24
2	เปรียบเทียบรูปแบบและลักษณะของการเพิ่มการละลายของผง โบรมิเลนใน น้ำกลั่น.....	26
3	เปรียบเทียบรูปแบบและลักษณะของการเพิ่มการละลายของผง โบรมิเลนใน สารละลายอะซีเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.5.....	28
4	การศึกษ ปริมาณอะซีโตนที่เหมาะสมในการตกตะกอน โบรมิเลน.....	29
5	การศึกษาผลกระทบของเวลาในการไดอะไลซิสสารละลายผง โบรมิเลน...	32
6	การเพิ่มความบริสุทธิ์ของผง โบรมิเลนโดยใช้เทคนิคอุลตราฟิลเตรชัน.....	33
7	รูปแบบของการแยกสารละลายผง โบรมิเลนให้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นด้วย คอลัมน์ดีไอไลซ์ จี 225.....	35
8	รูปแบบของการแยกสารละลายเอนไซม์จากผง โบรมิเลนให้มีความบริสุทธิ์ขึ้น ด้วยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 100.....	36
9	ผลกระทบของกรดอะมิโนซิลเทอีนไฮโดรคลอไรด์ ต่อการทำงานของ โบรมิเลนจากน้ำคั้นของต้นสับปะรด.....	38
10	ผลกระทบร่วมของกรดอะมิโนซิลเทอีนไฮโดรคลอไรด์ และกรดเอทิลลีน- ไดอะมินเททระอะซีติก ต่อการทำงานของโบรมิเลนจากน้ำคั้นของต้น สับปะรด.....	39
11	ผลกระทบของโซเดียมเมทาไบซัลไฟต์ ต่อการทำงานของโบรมิเลนจาก น้ำคั้นของต้นสับปะรด.....	41
12	การศึกษาอัตราส่วนของปริมาณโปรตีนต่อกรดโพลีอะไคริลิกที่เหมาะสมใน การตกตะกอนโบรมิเลนจากน้ำคั้นของต้นสับปะรด.....	42
13	การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการทำแห้งผง โบรมิเลนด้วยตู้อบ.....	46
14	การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำแห้งผง โบรมิเลนด้วยตู้อบสุญญากาศ	47
15	เปรียบเทียบความเสถียรของผง โบรมิเลนที่เตรียมโดยวิธีตกตะกอนด้วยกรด โพลีอะไคริลิก และอะซีโตน.....	49

รูปที่	หน้า	
16	เปรียบเทียบผลกระทบของโซเดียมเบนโซเอต (0.1% w/w) ต่อความเสถียรของผงโบรมีเลนที่เตรียมด้วยวิธีตกตะกอนด้วยกรดโพลีอะไคริลิก.....	50
17	เปรียบเทียบอิทธิพลของสารเพิ่มความเสถียรของผงโบรมีเลนเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส.....	52
18	เปรียบเทียบอิทธิพลของสารเพิ่มความเสถียรของผงโบรมีเลนเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส.....	53
19	การเพิ่มความบริสุทธิ์ของผงโบรมีเลนที่เตรียมได้โดยการตกตะกอนด้วยกรดโพลีอะไคริลิกด้วยเทคนิคคอลตราฟิลเตรชัน.....	55
20	การศึกษารูปแบบและการแยกสารละลายเอนไซม์จากผงโบรมีเลนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกรดโพลีอะไคริลิกให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นด้วยคอลัมน์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส.....	57
21	การศึกษาคำบริสุทธิ์ของ โบรมีเลนหลังจากที่เพิ่มความบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส โดยใช้เทคนิคโพลีอะไคริไลต์ เจล ย้อมสีโปรตีนด้วยคิวมาสซี บิลเลี่ยนท์บลู.....	58
22	การศึกษารูปแบบและการแยกสารละลายเอนไซม์จากผงโบรมีเลนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกรดโพลีอะไคริลิกให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นด้วยคอลัมน์เซฟาเดกซ์จี 100.....	60
23	การศึกษาคำบริสุทธิ์ของ โบรมีเลนที่แยกให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น โดยผ่านคอลัมน์เซฟาเดกซ์จี 100 เมื่อใช้เทคนิคโพลีอะไคริไลต์ เจล แล้วย้อมสีโปรตีนด้วยคิวมาสซี บิลเลี่ยนท์บลู.....	61
24	รูปแบบการเพิ่มความบริสุทธิ์ของ โบรมีเลนที่แยกได้จากคอลัมน์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส แล้วนำมาผ่านต่อในคอลัมน์เซฟาเดกซ์จี 100.....	63
25	การศึกษาคำบริสุทธิ์ของ โบรมีเลนที่ผ่านการเพิ่มความบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์คาร์บอกซีเมทิล เซลลูโลส และคอลัมน์เซฟาเดกซ์จี 100 โดยใช้เทคนิคโพลีอะไคริไลต์ เจล ย้อมสีโปรตีนด้วยคิวมาสซี บิลเลี่ยนท์บลู.....	64

รูปที่	หน้า
26	เปรียบเทียบความเสถียรของผง โบรมิเลนก่อนเพิ่มความบริสุทธิ์และหลังจากนำไปเพิ่มความบริสุทธิ์ให้สูงขึ้นด้วยเทคนิคต่าง ๆ 65
27	ผลกระทบของพีเอชต่อแอกติวิตีของผง โบรมิเลนที่เตรียมโดยวิธี โพลีอะไคริลิก และ โบรมิเลนที่มีความบริสุทธิ์สูง 67
28	ผลกระทบของอุณหภูมิต่อแอกติวิตีของผง โบรมิเลนที่เตรียมด้วยวิธี โพลีอะไคริลิก และ โบรมิเลนที่มีความบริสุทธิ์สูง 69
29	ผลของพีเอชต่อความเสถียรของผง โบรมิเลนที่ตกตะกอนด้วยกรด โพลีอะไคริลิก และ โบรมิเลนที่มีความบริสุทธิ์สูง 70
30	ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของผง โบรมิเลนที่ตกตะกอนด้วยกรด โพลีอะไคริลิก และ โบรมิเลนที่มีความบริสุทธิ์สูง 71
31	Lineweaver-Burk Plot ของเอนไซม์ โบรมิเลนจากน้ำคั้นของต้นสับปะรดกับความเข้มข้นสับสเตรทเคซีน 73
32	Lineweaver-Burk Plot ของ โบรมิเลนที่เตรียมโดยการตกตะกอนด้วย อะซีโตนกับความเข้มข้นสับสเตรทเคซีน 74
33	Lineweaver-Burk Plot ของ โบรมิเลนที่เตรียมโดยการตกตะกอนด้วย กรดโพลีอะไคริลิกกับความเข้มข้นสับสเตรทเคซีน 75
34	Lineweaver-Burk Plot ของ โบรมิเลนที่มีความบริสุทธิ์สูงกับความเข้มข้น สับสเตรทเคซีน 76
35	อิทธิพลของปริมาณโปรตีนในสารละลายผง โบรมิเลนที่เหมาะสมต่อการจับกับ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส 78
36	ผลกระทบของเวลาในการตรึง โบรมิเลนกับคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสที่ 4 องศาเซลเซียส 79
37	ผลกระทบของความเข้มข้นบัฟเฟอร์ต่อการจับของ โบรมิเลนบนคาร์บอกซีเมทิล เซลลูโลส 81
38	ผลกระทบของพีเอชต่อการจับของ โบรมิเลนกับคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส ... 82

รูปที่	หน้า	
39	เปรียบเทียบผลกระทบของความเข้มข้นกลูตาไรลดีไฮด์ต่อแอกติวิตีของ โบรมิเลน อีสระ และ โบรมิเลนตรังคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส.....	84
40	ผลกระทบรวมของกลูตาไรลดีไฮด์ ๒.๒1 โมลาร์ กับความเข้มข้นของเอกซาเมทิลลีน ไดอะมีนต่อแอกติวิตีของ โบรมิเลนตรังคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส..	85
41	เปรียบเทียบความเสถียรทางกายภาพของ โบรมิเลนตรังคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสที่อุณหภูมิแตกต่างกัน.....	87
42	เปรียบเทียบความเสถียรทางกายภาพของ โบรมิเลนตรังคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสชนิดเสริม และไม่เสริมด้วย ๒.๒1 โมลาร์ กลูตาไรลดีไฮด์....	88
43	เปรียบเทียบผลกระทบของพีเอชต่อแอกติวิตีของ เอนไซม์โบรมิเลน และ โบรมิเลนตรังคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสชนิดเสริมและไม่เสริมกลูตาไรลดีไฮด์	90
44	เปรียบเทียบผลกระทบของอุณหภูมิต่อแอกติวิตีของ เอนไซม์โบรมิเลน และ โบรมิเลนตรังคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสชนิดเสริมและไม่เสริมกลูตาไรลดีไฮด์	91
45	เปรียบเทียบพีเอชต่อความเสถียรของ โบรมิเลนอีสระ และ โบรมิเลนตรังคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสชนิดเสริมและไม่เสริมกลูตาไรลดีไฮด์.....	92
46	เปรียบเทียบผลกระทบของอุณหภูมิต่อความเสถียรของ เอนไซม์โบรมิเลนอีสระ และ โบรมิเลนตรังคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสชนิดเสริม และไม่เสริมกลูตาไรลดีไฮด์.....	94
47	Lineweaver-Burk Plot ของ โบรมิเลนอีสระ และ โบรมิเลนตรังคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสชนิดเสริม และไม่เสริมกลูตาไรลดีไฮด์.....	95
48	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเก็บรักษาโบรมิเลนอีสระ และ โบรมิเลนตรังคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสชนิดเสริมและไม่เสริมกลูตาไรลดีไฮด์ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.๒	97
49	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเก็บรักษาโบรมิเลนอีสระ และ โบรมิเลนตรังคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสชนิดเสริมและไม่เสริมกลูตาไรลดีไฮด์ในสารละลายอะซีเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.๒	98