บทที่ 5

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การเตรียมผ้าไนลอนขั้นต้นก่อนการตรึงรูปเอนไซม์

จากการวัดแอคติวิตีของ Neutrase ตรึงรูปบนผ้าไนลอนที่ผ่านการย่อยบางส่วนด้วยกรดไฮโดรคลอริกตามภาวะต่าง ๆ คือ ความเข้มข้น 2, 3 และ 4 นอร์มัล ที่อุณหภูมิห้อง, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส ให้ผลการทดลองดังตารางที่ 5.1

ตารางที่ 5.1 ค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของ Neutrase ตรึงรูปบนผ้าไนลอนที่ผ่านการย่อยบางส่วนด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้นและอุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก (นอร์มัล)	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ค่าเฉลี่ยแอคติวิตี/กรัมของเอนไซม์ตรึงรูป (ยูนิต)
2	อุณหภูมิห้อง	16.45
	40	16.43
	50	19.45
	60	19.19
3	อุณหภูมิห้อง	14.83
	40	15.08
	50	22.21
	60	19.05
4	อุณหภูมิห้อง	13.04
	40	14.05
	50	17.17
	60	20.65

เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล ดังตารางที่ 5.2 พบว่า ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ย่อยผ้าไนลอนบางส่วนไม่มีผลต่อแอคติวิตีของ Neutrase ตริงรูปที่ได้ ในขณะที่อุณหภูมิในการย่อยผ้าไนลอนบางส่วนด้วยกรดไฮโดรคลอริกมีผลต่อแอคติวิตีของ Neutrase ตริงรูปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 5.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของแอคติวิตีของ Neutrase ตริงรูป บนผ้าไนลอนที่ผ่านการย่อยบางส่วนด้วยกรดไฮโดรคลอริก ที่ความเข้มข้นและอุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

ปัจจัย	df.	SS.	MS.	ค่า F
ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก (A)	2	20.25	10.13	2.02
อุณหภูมิ (B)	3	94.12	31.37	6.26*
AB	6	34.71	5.79	1.16
ERROR	12	60.09	5.01	

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

เนื่องจากความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกและปัจจัยร่วม (AB) ไม่มีผลต่อแอคติวิตีของ Neutrase ตริงรูปที่ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ดังนั้นการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของ Neutrase ตริงรูป โดยวิธี Duncan's new multiple range test จึงพิจารณาเฉพาะอุณหภูมิ ดังตารางที่ 5.3 จะเห็นว่าผ้าไนลอนที่ผ่านการย่อยบางส่วนที่อุณหภูมิ 50 และ 60 องศาเซลเซียส ให้แอคติวิตีของ Neutrase ตริงรูปที่สูงกว่าผ้าไนลอนที่ผ่านการย่อยบางส่วนที่อุณหภูมิห้อง และ 40 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากการเตรียมผ้าไนลอนขั้นต้นโดยย่อยผ้าไนลอนบางส่วนด้วยกรดไฮโดรคลอริกมีวัตถุประสงค์เพื่อให้เกิดหมู่ไวต่อปฏิกิริยาคือ หมู่คาร์บอกซิล และหมู่อะมิโนอิสระ บนพื้นผิวของผ้าไนลอน เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นปฏิกิริยาการสลายพันธะเอไมด์ในสายพอลิเมอร์ของไนลอน โดยกรดไฮโดรคลอริกจึง

เกิดได้ดีขึ้น ทำให้มีหมู่คาร์บอกซิลและหมู่อะมิโน ซึ่งเป็นหมู่ไวต่อปฏิกิริยาการตริงรูปเอนไซม์เพิ่มขึ้น ปริมาณเอนไซม์ที่เกาะติดบนผ้าไนลอนมีมากขึ้น เป็นผลให้แอคติวิตีของ Neutrase ตริงรูปสูงขึ้นด้วย อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบแอคติวิตีของ Neutrase ตริงรูปบนผ้าไนลอนที่ผ่านการย่อยบางส่วนที่อุณหภูมิ 50 และ 60 องศาเซลเซียส พบว่า ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ดังนั้นภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมผ้าไนลอนขั้นต้นก่อนการตริงรูปเอนไซม์เพื่อความประหยัด และได้แอคติวิตีของ Neutrase ตริงรูปสูงสุด คือ ย่อยผ้าไนลอนบางส่วนด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2 นอร์มัล ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวจะใช้ในการเตรียมผ้าไนลอนขั้นต้น ก่อนการตริงรูปเอนไซม์สำหรับการทดลองในข้อต่อ ๆ ไป

ตารางที่ 5.3 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของ Neutrase ตริงรูปบนผ้าไนลอนที่ผ่านการย่อยบางส่วนด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ค่าเฉลี่ยแอคติวิตี/กรัม ของเอนไซม์ตริงรูป (ยูนิต)
อุณหภูมิห้อง	14.77[b]
40	15.19[b]
50	19.61[a]
60	19.63[a]

a, b ตัวเลขที่มีอักษรต่างกันกำกับแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

5.2 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียม Neutrase ตริงรูปบนผ้าไนลอน

5.2.1 กำหนดความเข้มข้นและ pH ของสารละลาย APTS ที่เหมาะสม

จากการเตรียม Neutrase ตริงรูป ตามวิธีทดลองข้อ 4.3.1 โดยแปรความเข้มข้นของสารละลาย APTS เป็นร้อยละ 0, 1, 3, 5 และ 7 โดยปริมาตร และแปร pH ของสารละลาย APTS เป็น 5, 7 และ 9 วัดแอคติวิตีของ Neutrase ตริงรูปที่ได้ ให้ผลการทดลองดังตารางที่ 5.4

ตารางที่ 5.4 ค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของ Neutrase ตริงรูปเมื่อกระตุ้นผ้าไนลอนด้วยสารละลาย APTS ที่มี pH และความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

pH	ความเข้มข้นของสารละลาย APTS (ร้อยละโดยปริมาตร)	ค่าเฉลี่ยแอคติวิตี/กรัมของเอนไซม์ตริงรูป (ยูนิต)
5	0	10.34
	1	17.82
	3	20.10
	5	26.99
	7	25.00
7	0	9.82
	1	13.17
	3	17.76
	5	22.18
	7	24.52
9	0	7.09
	1	14.04
	3	16.78
	5	20.16
	7	18.83

เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล ดังตารางที่ 5.5 พบว่า ทั้ง pH และความเข้มข้นของสารละลาย APTS มีผลต่อแอคติวิตีของ Neutrase ตรึงรูป ที่ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 5.5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของแอคติวิตีของ Neutrase ตรึงรูป เมื่อกระตุ้นผ้าไนลอนด้วยสารละลาย APTS ที่มี pH และความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

ปัจจัย	df.	SS.	MS.	ค่า F
pH (A)	2	109.30	54.65	24.18*
ความเข้มข้นของสารละลาย APTS (B)	4	821.01	205.25	90.82*
AB	8	35.27	4.41	1.95
ERROR	15	33.93	2.26	

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

เนื่องจากปัจจัยร่วม (AB) ไม่มีผลต่อแอคติวิตีของ Neutrase ตรึงรูปที่ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ดังนั้นการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของ Neutrase ตรึงรูป โดยวิธี Duncan's new multiple range test จึงแยกพิจารณาทีละปัจจัย ดังตารางที่ 5.6

ตารางที่ 5.6 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของ Neutrase ตรึงรูป เมื่อกระตุ้นผ้าไนลอนด้วยสารละลาย APTS ที่มี pH หรือความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

ปัจจัย	ค่าแอคติวิตี/กรัม ของเอนไซม์ตรึงรูป (ยูนิต)
pH	
5	20.05 [a]
7	17.49 [b]
9	15.38 [c]
ความเข้มข้นของสารละลาย APTS (%)	
0	9.08 [d]
1	15.01 [c]
3	18.21 [b]
5	23.11 [a]
7	22.78 [a]

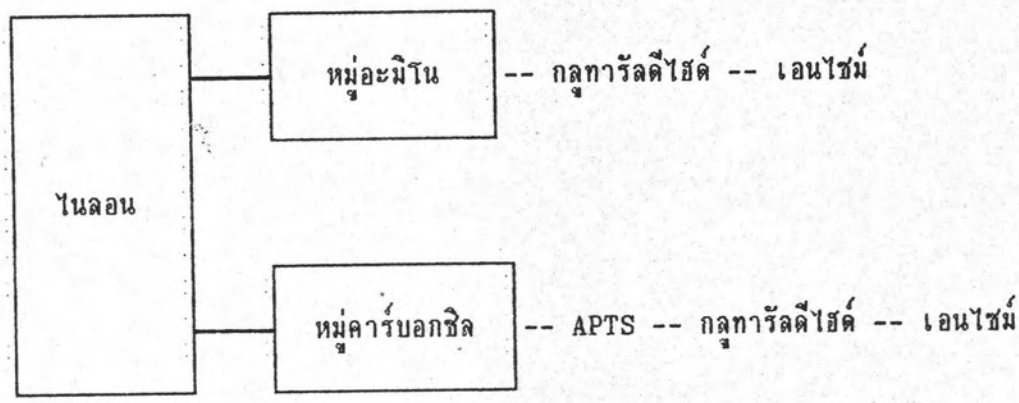
a, b, c ... ตัวเลขในแต่ละปัจจัยที่มีอักษรกำกับต่างกันแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

จากตารางที่ 5.6 จะเห็นได้ว่า การใช้สารละลาย APTS ที่ pH 5 กระตุ้นผ้าไนลอนให้แอคติวิตีของ Neutrase ตรึงรูปสูงสุด และเมื่อ pH ของสารละลาย APTS สูงขึ้น คือ ที่ pH 7 และ 9 แอคติวิตีของ Neutrase ตรึงรูปที่ได้ลดลงตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปฏิกิริยาระหว่างหมู่ฟังก์ชันของ APTS ซึ่งได้แก่ $(C_2H_5O)_3$-Si- กับหมู่ไวต่อปฏิกิริยาบนผ้าไนลอน ซึ่งคาดว่าเป็นหมู่คาร์บอกซิล จะเกิดได้ดีที่ pH ต่ำ และเมื่อพิจารณาความเข้มข้นของสารละลาย APTS พบว่า เมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น แอคติวิตีของ Neutrase ตรึงรูปที่ได้สูงขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากปฏิกิริยาเชื่อมพันธะโคเวเลนต์ระหว่าง APTS กับหมู่ไวต่อปฏิกิริยาบนผ้าไนลอนเป็นปฏิกิริยาเคมี

ดังนั้นการเพิ่มความเข้มข้นของสารตั้งต้นย่อมทำให้ปฏิกิริยาเกิดได้ดีขึ้น อย่างไรก็ตาม เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย APTS ถึงจุดหนึ่ง แอคติวิตีของ Neutrase ตรึงรูปที่ได้จะไม่เพิ่มขึ้นอีก ทั้งนี้อาจเป็นเพราะที่ความเข้มข้นดังกล่าว ปฏิกิริยาระหว่าง APTS กับหมู่ไวต่อปฏิกิริยาบนผ้าไนลอนเกิดขึ้นโดยสมบูรณ์แล้ว ทำให้แอคติวิตีของ Neutrase ตรึงรูปที่ได้ไม่เพิ่มขึ้นอีก แม้ว่าความเข้มข้นของสารละลาย APTS จะเพิ่มขึ้นก็ตาม ดังจะเห็นได้จากที่ความเข้มข้นของสารละลาย APTS เป็นร้อยละ 5 และ 7 โดยปริมาตร ให้แอคติวิตีของ Neutrase ตรึงรูปไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ดังนั้นภาวะที่เหมาะสมในการกระตุ้นผ้าไนลอนด้วย APTS ซึ่งเป็นภาวะที่ประหยัด และให้แอคติวิตีของ Neutrase ตรึงรูปสูงสุดคือ ใช้สารละลาย APTS ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร ที่ pH 5 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และภาวะดังกล่าวจะใช้ในการเตรียม Neutrase ตรึงรูปสำหรับการทดลองในข้อต่อ ๆ ไป

เนื่องจาก APTS เป็นสารที่มีสมบัติเป็นตัวกระตุ้นที่มีประสิทธิภาพสูง โดยเฉพาะเมื่อใช้กับตัวพยุงประเภททรายหรือซิลิกา ซึ่งมีตัวอย่างงานวิจัยที่เลือกใช้ APTS ในการกระตุ้นตัวพยุงประเภทดังกล่าวคือ Weetall (15) ตรึงรูปทริปซินบนแก้วพรุนโดยใช้ APTS เป็นตัวกระตุ้น Anprung และคณะ (25) ตรึงรูปเรนินบนทรายที่ผ่านการกระตุ้นด้วย APTS และนฤมล ศรีพุทธิรัตน์ (26) ตรึงรูปเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนบนทรายที่ผ่านการกระตุ้นด้วย APTS เช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจที่จะนำ APTS มาใช้เป็นตัวกระตุ้นสำหรับตัวพยุงประเภทอื่น ซึ่งเริ่มมีงานวิจัยที่ทดลองใช้ APTS ในการกระตุ้นตัวพยุงประเภทอื่น นอกเหนือจากทรายและซิลิกาคือ พรรณจิรา วงศ์สวัสดิ์ (27) ใช้ APTS ในการกระตุ้นตัวพยุงประเภทถ่านสำหรับตรึงรูป เบต้า-กาแลคโตสิเดส พบว่าสามารถใช้ได้ผลดี และจากผลการทดลองที่กล่าวมาข้างต้น แสดงให้เห็นว่า สามารถใช้ APTS เป็นตัวกระตุ้นตัวพยุงประเภทไนลอนได้เป็นอย่างดี โดยคาดคะเนโครงสร้างของเอนไซม์ตรึงรูปบนตัวพยุงประเภทไนลอนที่มี APTS เป็นตัวกระตุ้น และมีกลูทารัลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะร่วมได้ดังรูปที่ 5.1 ดังนั้น APTS จึงไม่จำกัดเฉพาะตัวพยุงประเภททรายหรือซิลิกาเท่านั้น



รูปที่ 5.1 การคาดคะเนโครงสร้างของเอนไซม์ตรึงรูปบนตัวพยุงประเภทไนลอน ที่มี APTS เป็นตัวกระตุ้น และกลูทารัลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะร่วม

5.2.2 กำหนดความเข้มข้นและ pH ของสารละลายกลูทารัลดีไฮด์ที่เหมาะสม

จากการเตรียม Neutrase ตรึงรูปตามวิธีทดลองข้อ 4.3.2 โดยแปรความเข้มข้นของสารละลายกลูทารัลดีไฮด์เป็นร้อยละ 1, 3, 5 และ 7 โดยปริมาตร และแปร pH ของสารละลายกลูทารัลดีไฮด์เป็น 7 และ 9 วัดแอคติวิตีของ Neutrase ตรึงรูปที่ได้ ให้ผลการทดลองดังตารางที่ 5.7

ตารางที่ 5.7 ค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของ Neutrase ตรึงรูปบนผ้าไนลอนเมื่อใช้สารละลายกลูทารัลดีไฮด์ ที่มี pH และความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

pH	ความเข้มข้นของสารละลายกลูทารัลดีไฮด์ (ร้อยละโดยปริมาตร)	ค่าเฉลี่ยแอคติวิตี/กรัมของเอนไซม์ตรึงรูป (ยูนิต)
7	1	20.06
	3	21.20
	5	25.78
	7	25.62
9	1	23.54
	3	28.94
	5	30.30
	7	29.07

เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลดังตารางที่ 5.8 พบว่า ทั้ง pH และความเข้มข้นของสารละลายกลูทารัลดีไฮด์มีผลต่อแอคติวิตีของ Neutrase ตรึงรูปที่ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 5.8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของแอคติวิตีของ Neutrase ตริงรูป บนผ้าไนลอน เมื่อใช้สารละลายกลูทารัลดีไฮด์ที่มี pH และความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

ปัจจัย	df.	SS.	MS.	ค่า F
pH (A)	1	91.97	91.97	204.38*
ความเข้มข้นของสารละลายกลูทารัลดีไฮด์ (B)	3	94.83	31.61	70.24*
AB	3	12.27	4.09	9.09*
ERROR	8	3.63	0.45	

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

เนื่องจากปัจจัยร่วม (AB) มีผลต่อแอคติวิตีของ Neutrase ตริงรูปที่ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ดังนั้นการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของ Neutrase ตริงรูป โดยวิธี Duncan's new multiple range test จึงนิจารณาร่วมกันทั้งสองปัจจัย ดังตารางที่ 5.9

ตารางที่ 5.9 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของ Neutrase ตรึงรูป บนผ้าไนลอน เมื่อใช้สารละลายกลูทารัลดีไฮด์ที่มี pH และความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

pH	ความเข้มข้นของสารละลายกลูทารัลดีไฮด์ (ร้อยละโดยปริมาตร)	ค่าเฉลี่ยแอคติวิตี/กรัมของเอนไซม์ตรึงรูป (ยูนิต)
7	1	20.06 [d]
	3	21.20 [d]
	5	25.78 [b]
	7	25.62 [b]
9	1	23.54 [c]
	3	28.94 [a]
	5	30.30 [a]
	7	29.07 [a]

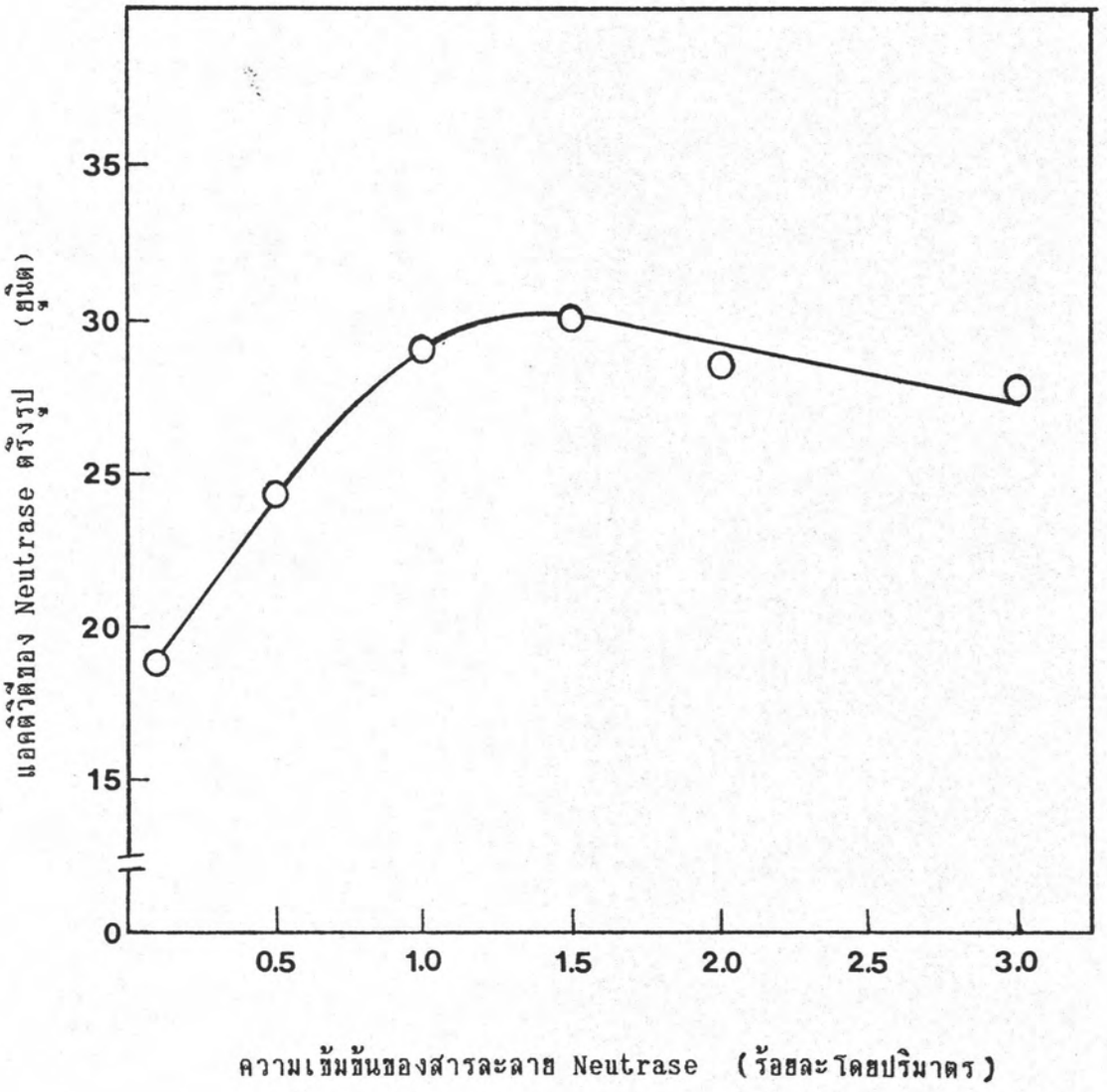
a, b, c ... ตัวเลขที่มีอักษรต่างกันกำกับแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

จากตารางที่ 5.9 จะเห็นได้ว่าที่ pH 9 ให้แอคติวิตีของ Neutrase ตรึงรูปสูงกว่าที่ pH 7 ในทุกระดับความเข้มข้นของสารละลายกลูทารัลดีไฮด์ ทั้งนี้เนื่องจากปฏิกิริยาระหว่างกลูทารัลดีไฮด์กับหมู่อะมิโนอิสระบนผ้าไนลอนหรือหมู่อะมิโนของ APTS เกิดได้ดีในภาวะที่มี pH เป็นด่าง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Onyezili (20) ที่กล่าวถึงการตรึงรูปอินเวอร์เทสบนตัวพยุงประเภทไนลอนโดยใช้กลูทารัลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะร่วม พบว่าเมื่อ pH ของสารละลายกลูทารัลดีไฮด์เพิ่มขึ้น จะทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปที่ได้สูงขึ้น และ pH ของสารละลายกลูทารัลดีไฮด์ที่ให้แอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปสูงสุดคือ pH 9 นอกจากนี้ ประกอบ กิจไชยา (21) ยังพบว่า pH ของสารละลายกลูทารัลดีไฮด์ที่เหมาะสมในการใช้เป็นสารสร้างพันธะร่วมสำหรับตรึงรูปกลูโคสออกซิเดสบนผ้าไนลอนคือ pH 9

อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของ Neutrase ตรึงรูปที่ pH 9 และความเข้มข้นของสารละลายกลูทารัลดีไฮด์เป็นร้อยละ 3, 5 และ 7 โดยปริมาตร พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ดังนั้นภาวะที่เหมาะสมซึ่งประหยัดและให้แอคติวิตีของ Neutrase ตรึงรูปสูงสุดคือ ใช้สารละลายกลูทารัลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยปริมาตร ที่ pH 9 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และภาวะดังกล่าวใช้สำหรับเตรียม Neutrase ตรึงรูป ในการทดลองข้อต่อ ๆ ไป

5.2.3 กำหนดความเข้มข้นของสารละลาย Neutrase ที่เหมาะสมในการตรึงรูป

จากการเตรียม Neutrase ตรึงรูป ตามวิธีทดลองข้อ 4.3.3 โดยแปรความเข้มข้นของสารละลาย Neutrase ในช่วงร้อยละ 0.1-3 โดยปริมาตร วัดแอคติวิตีของ Neutrase ตรึงรูปที่ได้ ให้ผลการทดลองแสดงด้วยกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าแอคติวิตีของ Neutrase ตรึงรูปที่ได้กับความเข้มข้นของสารละลาย Neutrase ดังรูปที่ 5.2



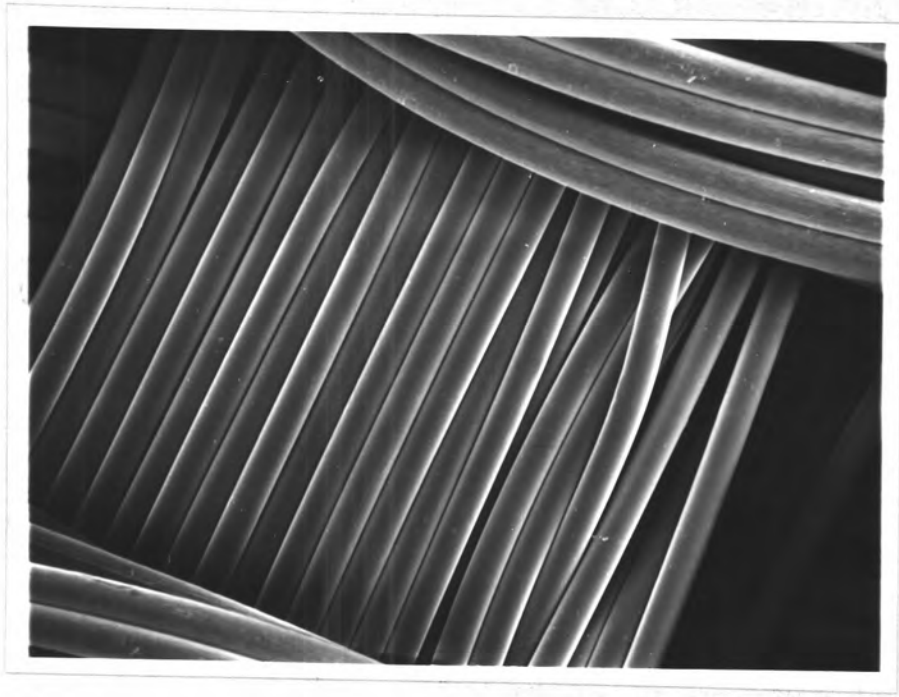
รูปที่ 5.2 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย Neutrase กับแอคติวิตีของ Neutrase ตรึงรูป

จากรูปที่ 5.2 จะเห็นว่า แอคติวิตีของ Neutrase ตรึงรูปที่ได้เพิ่มสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารละลาย Neutrase เพิ่มจากร้อยละ 0.1 ถึง 1.0 โดยปริมาตร โดยสังเกตได้จากความชันของกราฟที่เพิ่มขึ้นในช่วงดังกล่าว เนื่องจากการตรึงรูปเอนไซม์โดยการเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์นี้เป็นปฏิกิริยาทางเคมีที่เกิดขึ้นระหว่างหมู่ไวต่อปฏิกิริยาของกลูทารัลดีไฮด์ ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารสร้างพันธะร่วมกับหมู่ฟังก์ชันของเอนไซม์ Neutrase ดังนั้นที่ความเข้มข้นของสารละลาย Neutrase ต่ำ ๆ ปฏิกิริยาดังกล่าวจึงเกิดได้น้อย ทำให้โมเลกุลของเอนไซม์ที่เกาะบนผ้าไนลอนมีปริมาณน้อย Neutrase ตรึงรูปที่ได้จึงมีแอคติวิตีต่ำ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย Neutrase จนถึงร้อยละ 1.0 โดยปริมาตร โอกาสเกิดปฏิกิริยาระหว่างหมู่ไวต่อปฏิกิริยาของกลูทารัลดีไฮด์กับหมู่ฟังก์ชันของเอนไซม์จึงมีมากขึ้น ทำให้ได้ Neutrase ตรึงรูปที่มีแอคติวิตีเพิ่มขึ้นตามลำดับ

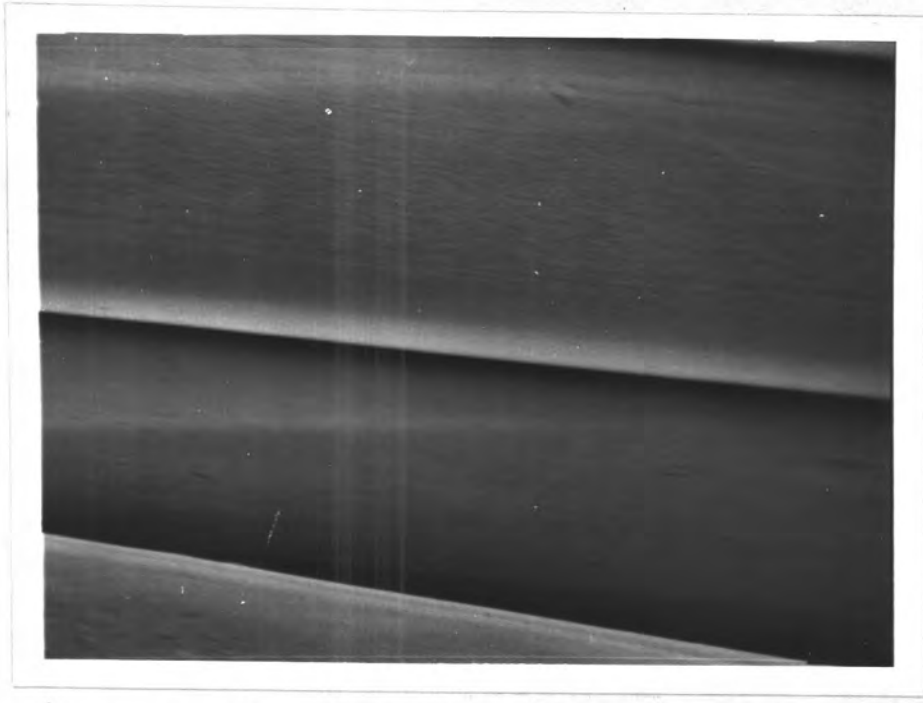
อย่างไรก็ตาม เมื่อความเข้มข้นของสารละลาย Neutrase เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 1.5 โดยปริมาตร แอคติวิตีของ Neutrase ตรึงรูปที่ได้เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น และที่ความเข้มข้นของสารละลาย Neutrase สูงกว่าร้อยละ 1.5 พบว่า แอคติวิตีของ Neutrase ตรึงรูปเริ่มลดลง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยปริมาตร มีการสร้างพันธะโคเวเลนต์ของเอนไซม์บนผ้าไนลอนค่อนข้างสมบูรณ์แล้ว ดังนั้นการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย Neutrase จึงไม่มีผลต่อการเพิ่มแอคติวิตีของ Neutrase ตรึงรูปอีก แต่กลับมีแนวโน้มลดลง ซึ่งอาจเนื่องมาจากความหนาแน่นของเอนไซม์ที่มากเกินไป เป็นผลให้เกิดการบดบัง (steric effect) ทำให้ปฏิกิริยาระหว่างหมู่ฟังก์ชันของเอนไซม์กับหมู่ไวต่อปฏิกิริยาของกลูทารัลดีไฮด์เกิดได้น้อยลง แอคติวิตีของ Neutrase ตรึงรูปจึงมีแนวโน้มลดลงในช่วงความเข้มข้นของสารละลาย Neutrase ดังกล่าว ดังนั้นภาวะที่เหมาะสมในการเตรียม Neutrase ตรึงรูป คือ ใช้สารละลาย Neutrase ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยปริมาตร ที่ pH 7.1 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวจะใช้สำหรับเตรียม Neutrase ตรึงรูปในการทดลองข้อต่อ ๆ ไป

5.3 การศึกษาโครงสร้างของ Neutrase ตรึงรูป เปรียบเทียบกับโครงสร้างของผ้าไนลอนด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

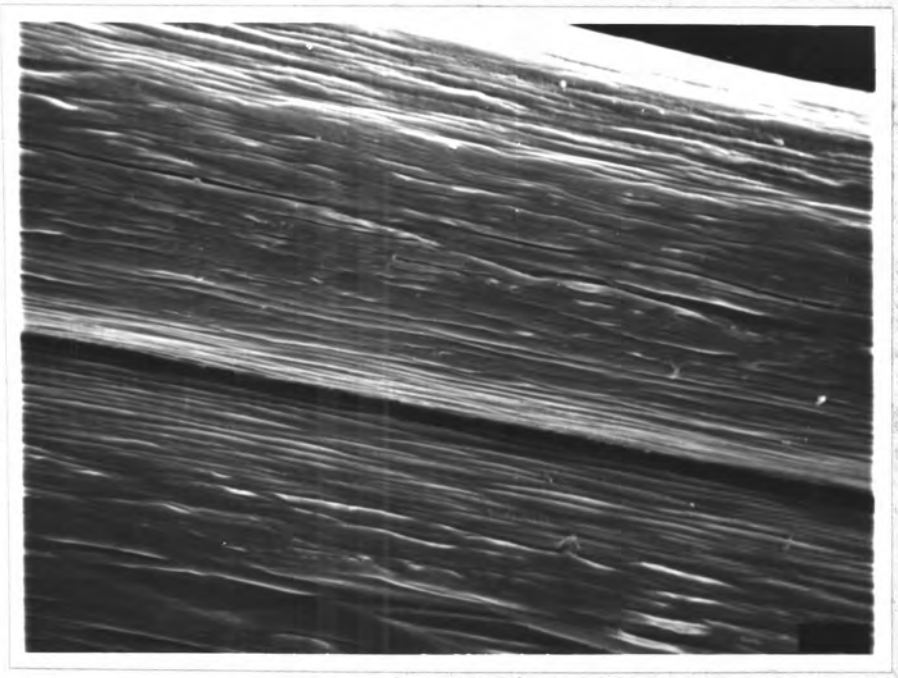
จากการทดลองข้อ 4.4 เมื่อตรวจดูโครงสร้างของผ้าไนลอนเริ่มต้น ผ้าไนลอนที่ผ่านการย่อยบางส่วนด้วยกรดไฮโดรคลอริก และ Neutrase ตรึงรูปบนผ้าไนลอนด้วยเครื่อง SEM ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 5.3, 5.4, 5.5 และ 5.6



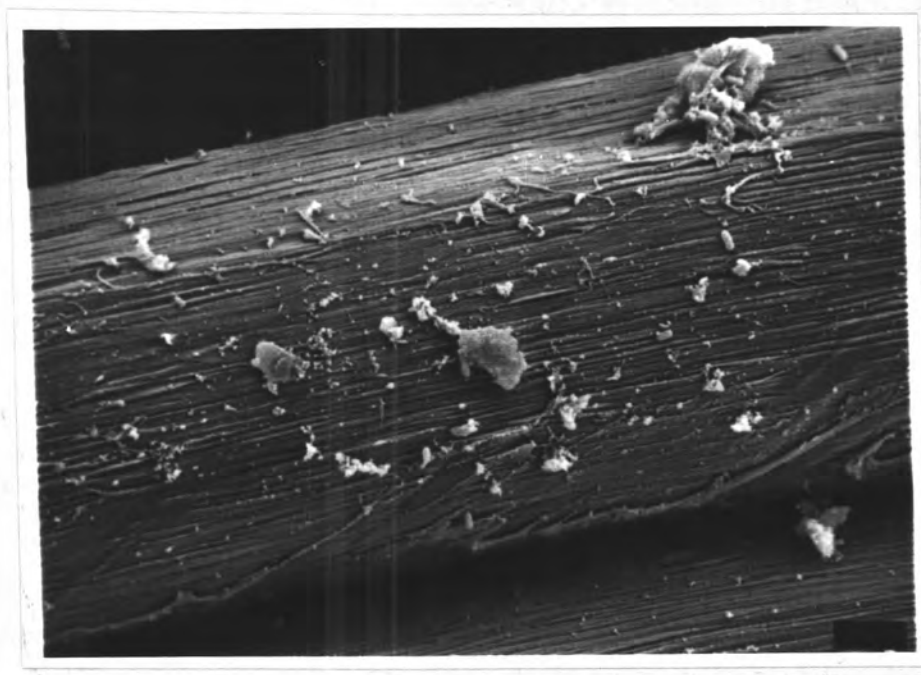
รูปที่ 5.3 โครงสร้างของผ้าไนลอนจากเครื่อง SEM ที่กำลังขยาย 200 เท่า



รูปที่ 5.4 โครงสร้างของผ้าไนลอนจากเครื่อง SEM ที่กำลังขยาย 2000 เท่า



รูปที่ 5.5 โครงสร้างของผ้าไนลอนที่ผ่านการย่อยบางส่วนด้วยกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 2 นอร์มัล ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากเครื่อง SEM ที่กำลังขยาย 2000 เท่า



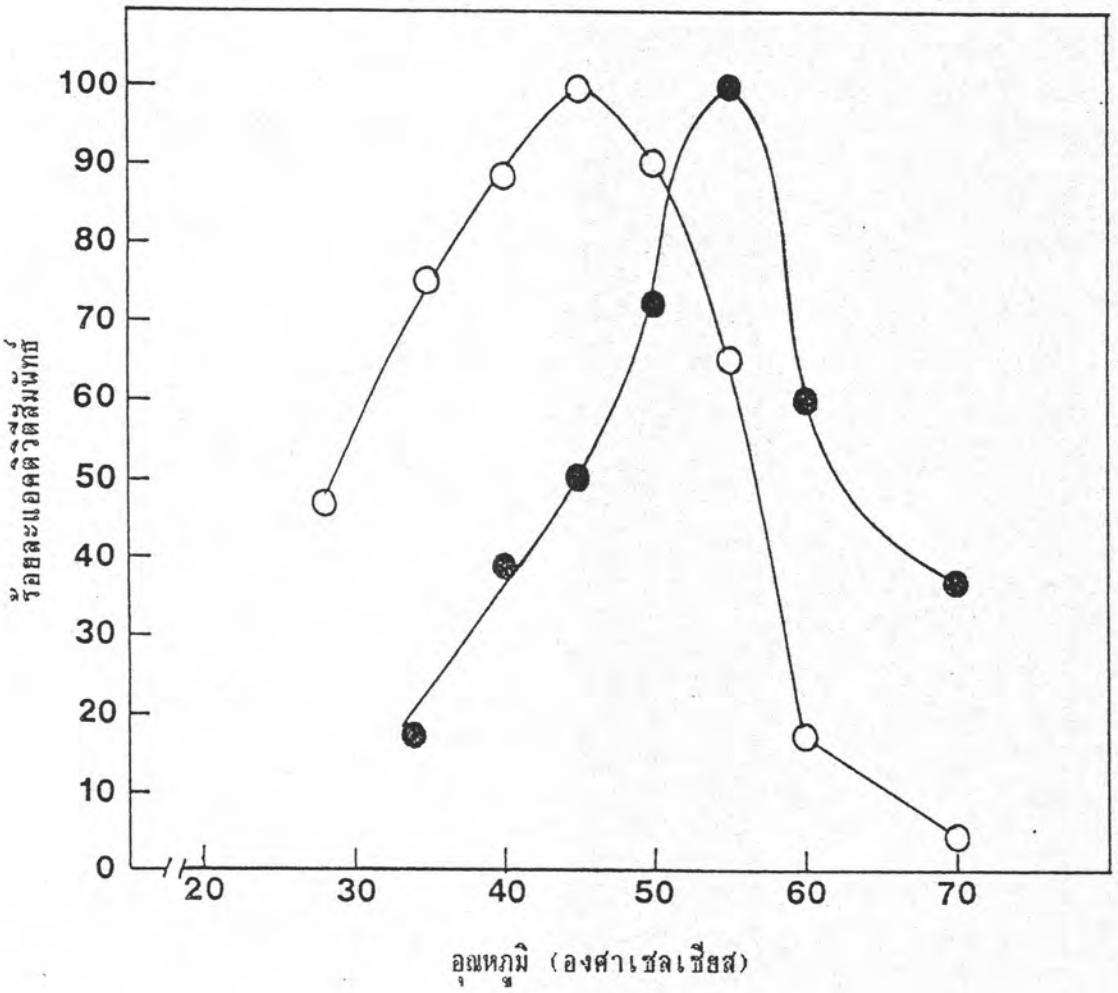
รูปที่ 5.6 โครงสร้างของ Neutrase ตรึงรูปบนผ้าไนลอน จากเครื่อง SEM ที่กำลังขยาย 2000 เท่า

จากรูปที่ 5.3 ซึ่งเป็นรูปของผ้าไนลอนเริ่มต้นจากเครื่อง SEM ที่กำลังขยาย 200 เท่า จะเห็นว่า ผ้าไนลอนมีลักษณะที่ประกอบด้วยเส้นใยไนลอนเล็ก ๆ รวมกันเป็นมัดและสานกันเป็นผ้า เมื่อพิจารณารูปที่ 5.4, 5.5 และ 5.6 ซึ่งเป็นรูปพื้นผิวของเส้นใยไนลอนจากเครื่อง SEM ที่กำลังขยาย 2000 เท่า จะเห็นความแตกต่างอย่างชัดเจน กล่าวคือ ผ้าไนลอนเริ่มต้นจะมีพื้นผิวของเส้นใยที่เรียบสะอาด (รูปที่ 5.4) เมื่อผ่านการย่อยบางส่วนด้วยกรดไฮโดรคลอริกแล้ว พื้นผิวของเส้นใยไนลอนมีลักษณะเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมคือ มีลักษณะขรุขระ (รูปที่ 5.5) และในกรณีของ Neutrase ตริงรูป (รูปที่ 5.6) ปรากฏชัดเจนว่ามีกลุ่มโปรตีนของเอนไซม์เป็นจำนวนมากเกาะกระจายตัวอยู่บนพื้นผิวของเส้นใยไนลอนที่มีลักษณะขรุขระ ซึ่งการเกาะของเอนไซม์ Neutrase บนพื้นผิวเส้นใยไนลอนนี้เกิดจากพันธะโคเวเลนต์ระหว่างหมู่ไวต่อปฏิกิริยาของกลูทา-รัลดีไฮด์กับหมู่ฟังก์ชันของเอนไซม์

5.4 การศึกษาสมบัติเกี่ยวกับจลนพลศาสตร์ของ Neutrase ตริงรูป เปรียบเทียบกับ Neutrase อิสระ

5.4.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์

จากการวัดแอคติวิตีของ Neutrase อิสระ และ Neutrase ตริงรูป ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ตามวิธีทดลองข้อ 4.5.1 ให้ผลการทดลองแสดงด้วยกราฟความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละแอคติวิตีสัมพัทธ์กับอุณหภูมิ ดังรูปที่ 5.7



รูปที่ 5.7 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของ Neutrase อิสระ (-o-o-) และ Neutrase ตรึงรูป (-●-●-)

จากรูปที่ 5.7 จะเห็นได้ว่า อุณหภูมิที่เอนไซม์แสดงแอคติวิตีสูงสุดคือ 45 องศาเซลเซียส สำหรับ Neutrase อิสระ และ 55 องศาเซลเซียส สำหรับ Neutrase ตรึงรูป การเพิ่มอุณหภูมิจาก 30 ถึง 45 องศาเซลเซียส สำหรับ Neutrase อิสระ และจาก 30 ถึง 55 องศาเซลเซียส สำหรับ Neutrase ตรึงรูป มีผลทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ทั้งสองเพิ่มสูงขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากปฏิกิริยาการย่อยสลาย ซึ่งเป็นปฏิกิริยาเคมีนั้นจะต้องมีการชนกันระหว่างอนุภาคของเอนไซม์กับสับสเตรท และการเพิ่มอุณหภูมิทำให้อนุภาคของเอนไซม์และสับสเตรทมีพลังงานจลน์สูงขึ้น เกิดการชนกันมากขึ้น ปฏิกิริยาการย่อยสลายจึงเกิดได้ดีขึ้น อย่างไรก็ตาม กรณีของ Neutrase ตรึงรูป ช่วงอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 50 องศาเซลเซียส แสดงแอคติวิตีต่ำกว่า Neutrase อิสระ ทั้งนี้

อาจเนื่องมาจากการที่อนุภาคของ Neutrase ตริงรูปไม่มีอิสระในการเคลื่อนที่ เพราะเกาะติดอยู่บนพื้นผิวของผ้าไนลอน การเพิ่มอุณหภูมิจึงมีผลต่ออนุภาคของสับสเตรทในการเคลื่อนเข้าชนอนุภาคของเอนไซม์เป็นส่วนใหญ่ ดังนั้น Neutrase ตริงรูปจึงแสดงแอคติวิตีต่ำกว่า Neutrase อิสระ ในช่วงอุณหภูมิต่ำ เมื่อพิจารณาในช่วงอุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส พบว่า Neutrase อิสระมีแอคติวิตีลดลงอย่างรวดเร็ว และเหลือแอคติวิตีต่ำมากที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ในขณะที่ Neutrase ตริงรูปยังคงมีแอคติวิตีสูงกว่า เนื่องจากพันธะโคเวเลนต์ที่เกิดขึ้นเป็นพันธะเคมีที่แข็งแรง จึงมีผลช่วยตริงอนุภาคของเอนไซม์ไว้บนพื้นผิวของผ้าไนลอนได้อย่างแข็งแรง ทำให้เอนไซม์ตริงรูปเสียสภาพธรรมชาติที่อุณหภูมิสูงได้ยากกว่าเอนไซม์ในรูปอิสระ นอกจากนี้การที่โมเลกุลของเอนไซม์เกาะติดอยู่บนสารพาหะที่มีขนาดใหญ่ ทำให้อุณหภูมิรอบ ๆ โมเลกุลของเอนไซม์ต่ำกว่าอุณหภูมิของสารละลายทั้งหมด (11) ดังนั้น Neutrase ตริงรูปจึงทนต่ออุณหภูมิได้สูงกว่า Neutrase อิสระ

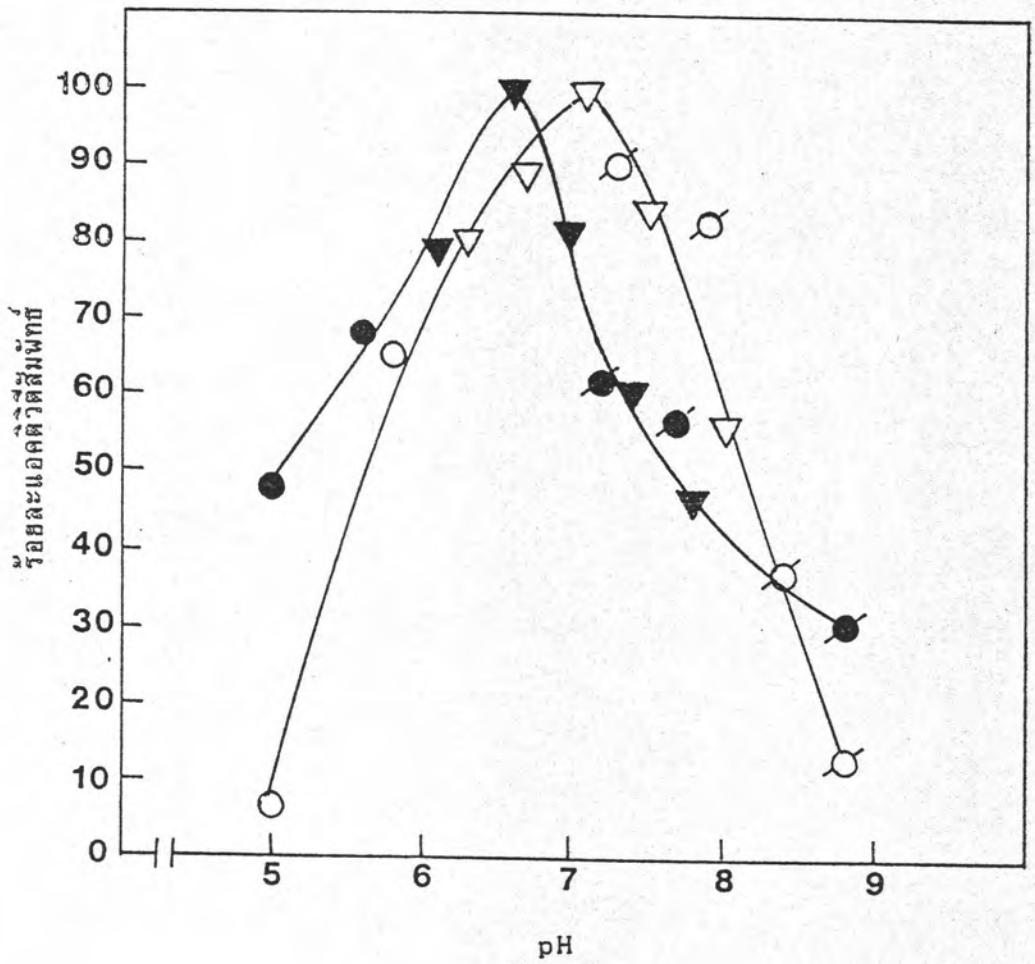
5.4.2 pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์

จากการวัดแอคติวิตีของ Neutrase อิสระ และ Neutrase ตริงรูปที่ pH ต่าง ๆ ตามวิธีทดลองข้อ 4.5.2 ให้ผลการทดลองดังตารางที่ 5.10 และรูปที่ 5.8

ตารางที่ 5.10 แอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ pH ต่าง ๆ ของ Neutrase อิสระ และ Neutrase ตรึงรูป

บัฟเฟอร์	pH ของสารละลายปฏิกิริยา*		ร้อยละแอคติวิตีสัมพัทธ์	
	เอนไซม์อิสระ	เอนไซม์ตรึงรูป	เอนไซม์อิสระ	เอนไซม์ตรึงรูป
แอซีเตท	5.0	5.0	6.8	48.2
	5.8	5.6	65.5	68.2
ฟอสเฟต	6.3	6.1	80.6	79.6
	6.7	6.6	89.3	100.0
	7.1	7.0	100.0	81.6
	7.5	7.4	84.8	60.8
	8.0	7.8	56.4	46.9
ทรีส	7.3	7.2	90.7	62.0
	7.9	7.7	83.2	57.1
	8.4	8.8	37.8	31.0
	8.8	-	13.1	-

* วัด pH ของสารละลายปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วยสับสเตรทและบัฟเฟอร์



รูปที่ 5.8 pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของ Neutrase อิสระ (-o-Δ-ø-) และ Neutrase ตรึงรูป (-●-▲-ø-)

o, ● แอซีเตทบัฟเฟอร์

Δ, ▲ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์

ø, ø ทรีสบัฟเฟอร์

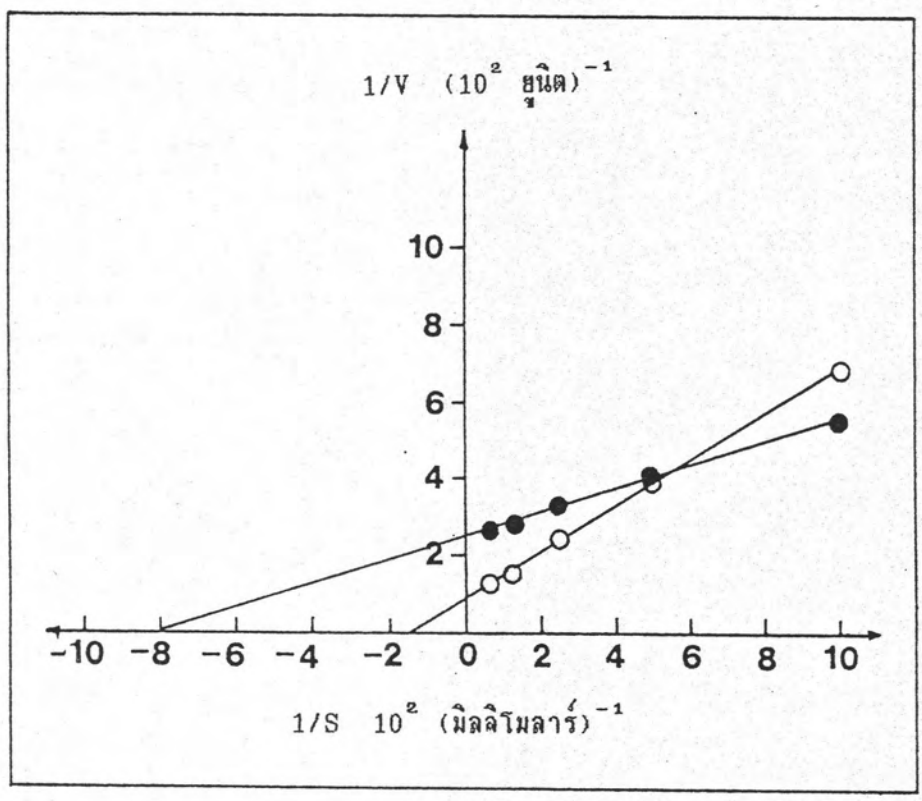
จากตารางที่ 5.10 และรูปที่ 5.8 จะเห็นว่า Neutrase อิสระ แสดงแอคติวิตีสูงสุดที่ pH 7.1 ในขณะที่ Neutrase ตรึงรูปแสดงแอคติวิตีสูงสุดที่ pH 6.6 ซึ่งลดลงจาก Neutrase อิสระ 0.5 หน่วย ทั้งนี้อาจอธิบายได้โดยอาศัยหลักการกระจายของโปรตอนบริเวณรอบ ๆ โมเลกุลของเอนไซม์ (enzyme's microenvironment) (24,28) โดยที่บริเวณรอบ ๆ โมเลกุลของเอนไซม์ตรึงรูปมีการกระจายของโปรตอนลดลง กล่าวคือ การตรึงรูป Neutrase บนผ้าไนลอนโดยวิธีนี้ทำให้เกิดไอออนบวกที่บริเวณรอบ ๆ โมเลกุลของเอนไซม์ตรึงรูปเป็นส่วนใหญ่

ดังนั้นไอออนลบในระบบ เช่น OH^- จึงเข้าล้อมรอบทำให้บริเวณรอบ ๆ โมเลกุลของเอนไซม์ตริงรูปดังกล่าวมีความหนาแน่นของไอออนลบมากขึ้น หรืออีกนัยหนึ่งคือ มี pH สูงขึ้น และสูงกว่า pH ของระบบที่วัดได้ จากการทดลองอาจกล่าวได้ว่า เมื่อ Neutrase ตริงรูปอยู่ในระบบบัฟเฟอร์ที่มี pH 7.1 ไอออนลบจากระบบที่เข้าล้อมรอบบริเวณรอบ ๆ โมเลกุลของ Neutrase ตริงรูปจะทำให้บริเวณดังกล่าวมี pH สูงกว่า 7.1 จึงยังไม่แสดงแอคติวิตีสูงสุด แต่เมื่อ Neutrase ตริงรูปอยู่ในระบบบัฟเฟอร์ที่มี pH 6.6 ไอออนลบที่เข้าล้อมรอบบริเวณรอบ ๆ โมเลกุลของ Neutrase ตริงรูป จะมีปริมาณน้อยกว่าในระบบบัฟเฟอร์ที่มี pH 7.1 เป็นผลให้บริเวณดังกล่าวมี pH สูงกว่า pH ของระบบ 0.5 หน่วย หรือมี pH เป็น 7.1 พอดี จึงทำให้ Neutrase ตริงรูปแสดงแอคติวิตีสูงสุด ดังนั้น pH ที่ Neutrase ตริงรูป แสดงแอคติวิตีสูงสุดจึงเลื่อนไปทาง pH ที่เป็นกรดจาก Neutrase อิสระ 0.5 หน่วย

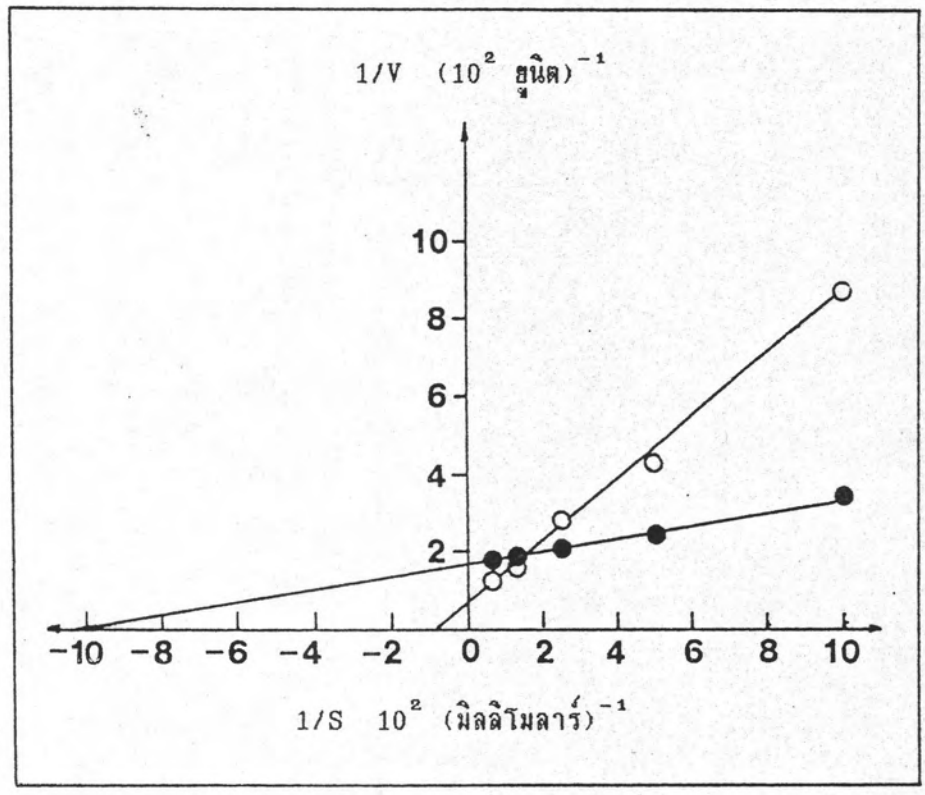
เมื่อพิจารณาภาวะที่มี pH ต่ำหรือสูงเกินไป จะเห็นว่า Neutrase ตริงรูปมีแอคติวิตีสูงกว่า Neutrase อิสระ กล่าวคือ ที่ pH 5 Neutrase ตริงรูปยังคงมีแอคติวิตีสูงถึงร้อยละ 48.2 ในขณะที่ Neutrase อิสระ มีแอคติวิตีเหลือเพียงร้อยละ 6.8 เท่านั้น เช่นเดียวกับที่ pH 8.8 Neutrase ตริงรูปมีแอคติวิตีร้อยละ 31.0 ในขณะที่ Neutrase อิสระมีแอคติวิตีเพียงร้อยละ 13.1 แสดงให้เห็นว่า Neutrase ตริงรูปทนต่อภาวะความเป็นกรด-ด่างที่สูงหรือต่ำเกินไปได้ดีกว่า Neutrase อิสระ ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นข้อได้เปรียบในการนำ Neutrase ตริงรูปไปประยุกต์ใช้สำหรับป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ เนื่องจากเบียร์มี pH ประมาณ 4.6 ซึ่งในภาวะดังกล่าวคาดว่า Neutrase ตริงรูป ยังคงมีแอคติวิตีสูงกว่า Neutrase อิสระ จึงน่าจะให้ผลดีกว่าการใช้ Neutrase อิสระ

5.4.3 ศึกษาค่าคงที่ Michaelis

จากการวัดแอคติวิตีของ Neutrase อิสระ และ Neutrase ตริงรูปที่อุณหภูมิ 45 และ 55 องศาเซลเซียส โดยใช้สับสเตรทที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ตามวิธีทดลองข้อ 4.5.3 จากนั้นหาค่า K_m โดยการพลอตแบบ Lineweaver Burk plot ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 5.9, 5.10 และตารางที่ 5.11



รูปที่ 5.9 เปรียบเทียบกราฟแบบ Lineweaver Burk plot ของ Neutrase อิสระ (-o-o-) และ Neutrase ตรึงรูป (-●-●-) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส



รูปที่ 5.10 เปรียบเทียบกราฟแบบ Lineweaver Burk plot ของ Neutrase อิสระ (-o-o-) และ Neutrase ตรึงรูป (-●-●-) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

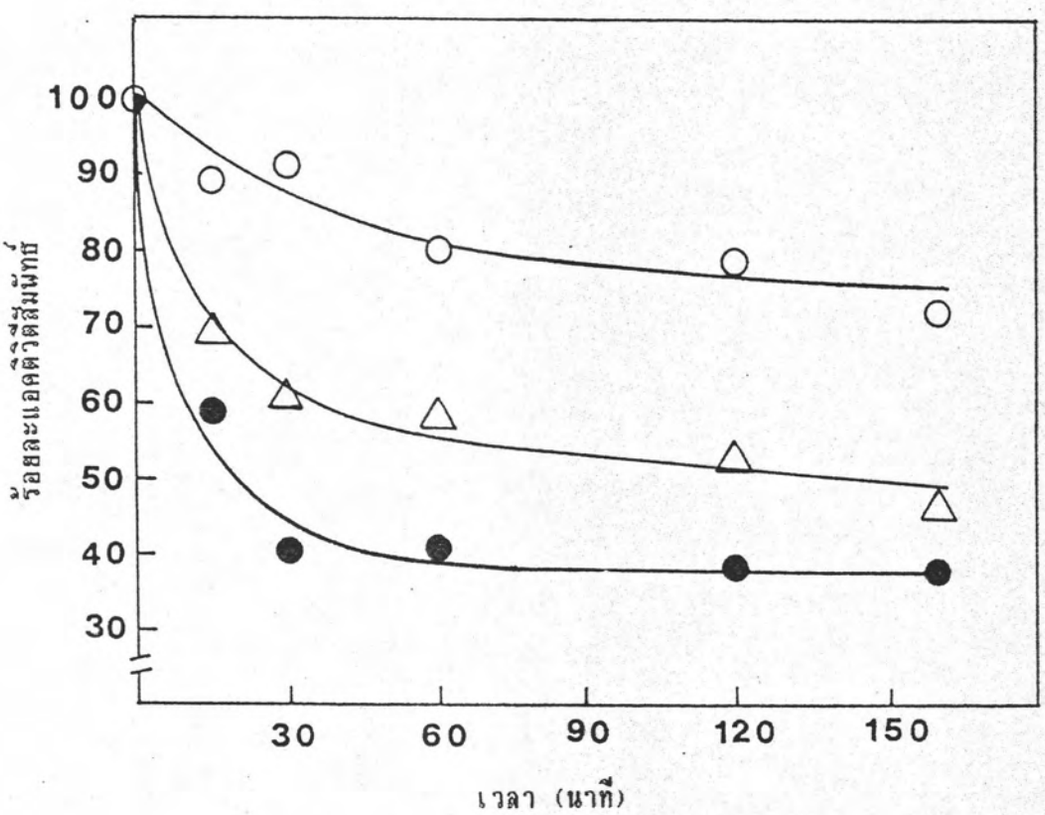
ตารางที่ 5.11 ค่า K_m ของ Neutrase อิสระ และ Neutrase ตรึงรูป ที่อุณหภูมิ 45 และ 55 องศาเซลเซียส จากการเขียนกราฟแบบ Lineweaver Burk plot

ชนิดของเอนไซม์	ค่า K_m (มิลลิโมลาร์)	
	45 องศาเซลเซียส	55 องศาเซลเซียส
Neutrase อิสระ	6.67×10^{-3}	1.25×10^{-2}
Neutrase ตรึงรูป	1.25×10^{-3}	9.71×10^{-4}

จากรูปที่ 5.9, 5.10 และตารางที่ 5.11 จะเห็นได้ว่า Neutrase ตรึงรูปมีค่า K_m ต่ำกว่า Neutrase อิสระ ทั้งที่อุณหภูมิ 45 และ 55 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ Neutrase อิสระ แสดงแอคติวิตีสูงสุดนั้น ค่า K_m ของ Neutrase ตรึงรูปต่ำกว่า Neutrase อิสระ 5.3 เท่า และที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ Neutrase ตรึงรูป แสดงแอคติวิตีสูงสุด ค่า K_m ของ Neutrase ตรึงรูปต่ำกว่า Neutrase อิสระถึง 12.9 เท่า ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าการตรึงรูป Neutrase บนผ้าไนลอนโดยวิธีเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์มีผลช่วยปรับปรุงโครงรูป (conformation) ของเอนไซม์ให้มีลักษณะเหมาะสมสำหรับการเข้าจับของสับสเตรทในบริเวณเร่งของเอนไซม์ได้ดีขึ้น หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคือ Neutrase ตรึงรูปมีประสิทธิภาพในการจับกับสับสเตรทสูงกว่า Neutrase อิสระนั่นเอง

5.4.4 ผลของ pH ต่อความเสถียรของเอนไซม์

จากการวัดแอคติวิตีของ Neutrase อิสระ และ Neutrase ตรึงรูป หลังจากบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH 5.0, 7.1 และ 8.9 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่าง ๆ ตามวิธีทดลองข้อ 4.5.4 ผลการทดลองแสดงด้วยกราฟความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละแอคติวิตีสัมพัทธ์กับเวลาในการบ่ม ดังรูปที่ 5.11 และ 5.12

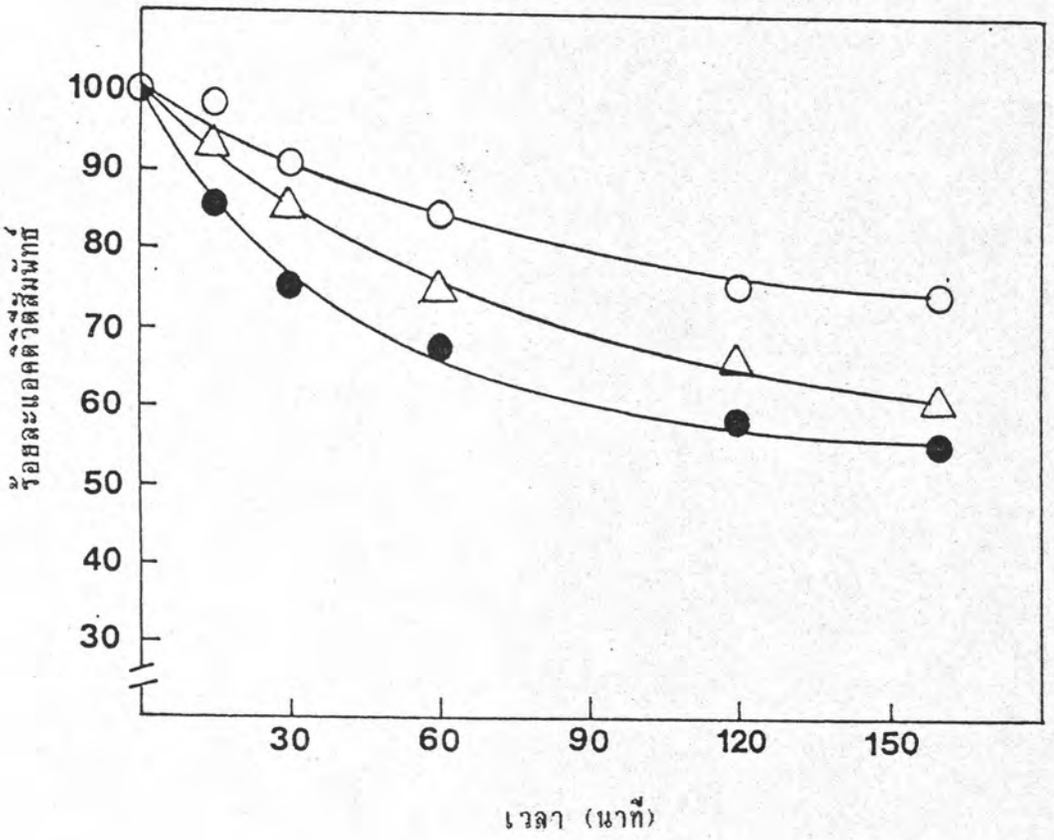


รูปที่ 5.11 ผลของ pH ต่อความเสถียรของ Neutrase อิสระ

-●-●- แอซีเตทบัฟเฟอร์ pH 5.0

-o-o- ทรีสบัฟเฟอร์ pH 7.1

-△-△- ทรีสบัฟเฟอร์ pH 8.9



รูปที่ 5.12 ผลของ pH ต่อความเสถียรของ Neutrase ตริงรูป

-●-●- แอซีเตทบัฟเฟอร์ pH 5.0

-o-o- ทรีสบัฟเฟอร์ pH 7.1

-△-△- ทรีสบัฟเฟอร์ pH 8.9

จากรูปที่ 5.11 และ 5.12 จะเห็นว่าทั้ง Neutrase อิสระ และ Neutrase ตริงรูป มีความเสถียรสูงสุดที่ pH เป็นกลาง (pH 7.1) โดยสังเกตได้จากอัตราการลดลงของแอคติวิตีเมื่อเวลาในการบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์เพิ่มขึ้นที่ pH 7.1 ช้ากว่าที่ pH 8.9 และ pH 5.0 ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์ Neutrase ซึ่งเป็นนิวทรัลโปรติเอส เมื่ออยู่ในภาวะที่เป็นกรดหรือด่างสูงเกินไปจะทำให้เกิดการเสียสภาพธรรมชาติได้ในอัตราที่สูง อย่างไรก็ตาม ทั้ง Neutrase อิสระ และ Neutrase ตริงรูป มีเสถียรภาพในภาวะที่มี pH เป็นด่าง (pH 8.9) สูงกว่าที่ pH เป็นกรด (pH 5.0) นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบความเสถียรระหว่าง Neutrase อิสระ และ Neutrase ตริงรูป ในภาวะที่มี pH 5.0 และ 8.9 พบว่า Neutrase ตริงรูปมีเสถียรภาพสูงกว่า Neutrase อิสระ โดยจะเห็นได้จากอัตราการลดลงของแอคติวิตีที่ช้ากว่า ซึ่งอาจกล่าว

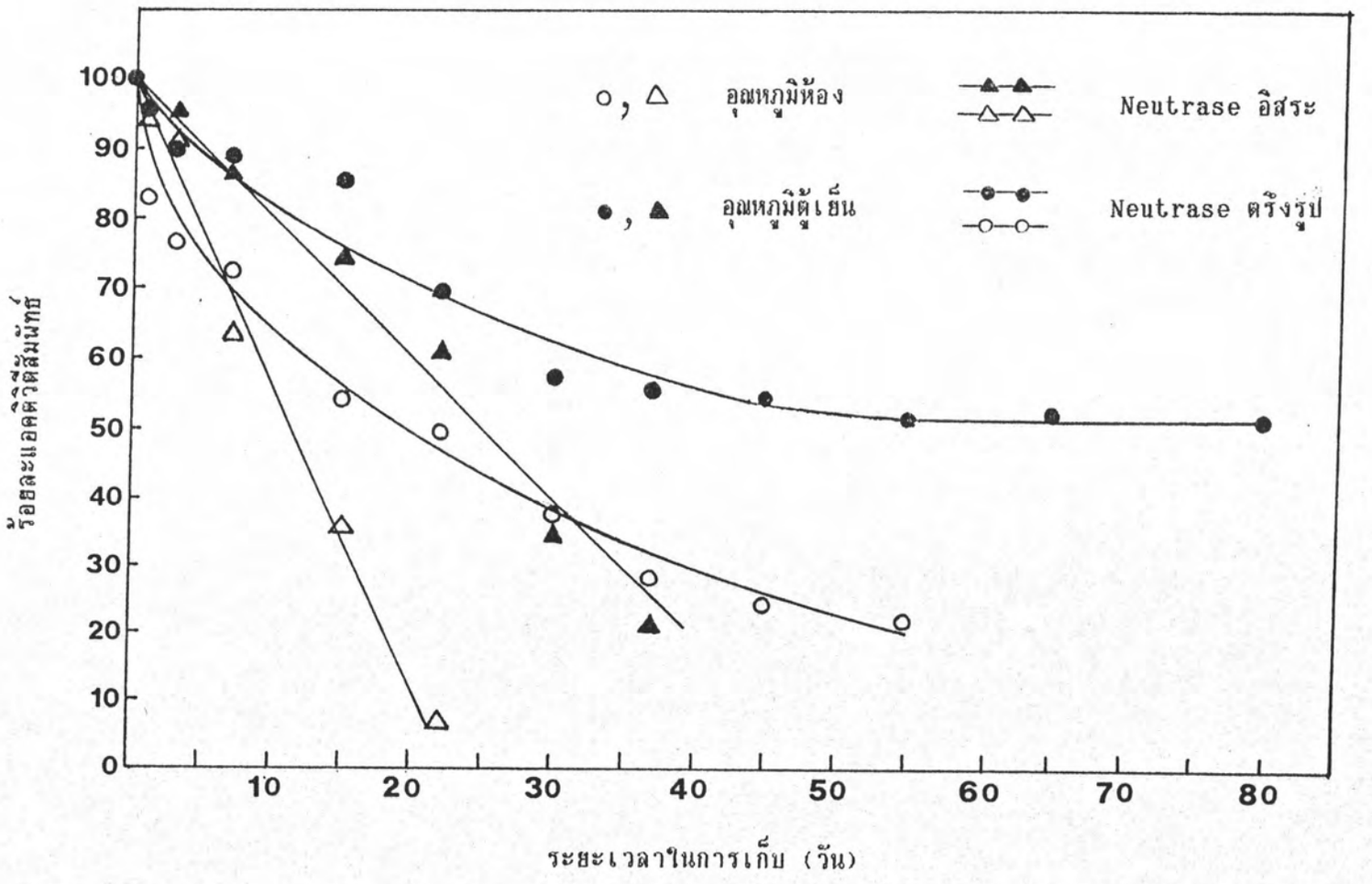
ได้ว่าการตรึงรูป Neutrase บนผ้าไนลอนโดยวิธีเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์นี้ทำให้ Neutrase ตรึงรูปที่ได้มีเสถียรภาพต่อการเปลี่ยนแปลงภาวะความเป็นกรด-ด่างดีกว่า Neutrase อิสระ

จากผลการทดลองดังกล่าวจึงเลือกเก็บ Neutrase อิสระ และ Neutrase ตรึงรูปในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH 7.1 สำหรับการทดลองในข้อ 4.5.5

5.4.5 เสถียรภาพของเอนไซม์ในระหว่างการเก็บ

จากการวัดแอคติวิตีของ Neutrase อิสระ และ Neutrase ตรึงรูป ซึ่งเก็บในทรีสบัฟเฟอร์ pH 7.1 ที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิตู้เย็น ในระยะเวลาการเก็บต่าง ๆ ผลการทดลองแสดงด้วยกราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีสัมพัทธ์กับระยะเวลาในการเก็บดังรูปที่ 5.13

จากรูปที่ 5.13 จะเห็นว่าการเก็บ Neutrase อิสระ และ Neutrase ตรึงรูป ในทรีสบัฟเฟอร์ pH 7.1 ที่อุณหภูมิตู้เย็น (8-10 องศาเซลเซียส) มีความเสถียรสูงกว่าเมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้อง (30-33 องศาเซลเซียส) โดยสังเกตได้จากอัตราการลดลงของแอคติวิตีที่อุณหภูมิตู้เย็นช้ากว่าที่อุณหภูมิห้อง และเมื่อเปรียบเทียบเสถียรภาพในระหว่างการเก็บของ Neutrase อิสระ และ Neutrase ตรึงรูปที่อุณหภูมิเดียวกัน พบว่า Neutrase อิสระมีแอคติวิตีลดลงอย่างรวดเร็วในลักษณะเป็นเส้นตรง ในขณะที่ Neutrase ตรึงรูปมีแอคติวิตีลดลงมากในช่วง 15 วันแรกของระยะเวลาในการเก็บ หลังจากนั้นอัตราการลดลงของแอคติวิตีจะช้าลงจนเกือบคงที่ ทั้งนี้เนื่องจากการตรึงรูป Neutrase บนผ้าไนลอนโดยวิธีเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์ซึ่งเป็นพันธะที่แข็งแรงนี้ทำให้ Neutrase ตรึงรูปที่ได้มีเสถียรภาพในระหว่างการเก็บสูงขึ้น กล่าวคือ เกิดการเสียสภาพธรรมชาติได้ยากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ Neutrase อิสระ



รูปที่ 5.13 เปรียบเทียบแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ระยะเวลาการเก็บต่าง ๆ ของ Neutrase อิสระ และ Neutrase ตริงรูป ซึ่งเก็บในทรีสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมล/ลิตร pH 7.1 ที่อุณหภูมิห้อง (30-33 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิตู้เย็น (8-10 องศาเซลเซียส)

ตารางที่ 5.12 ค่าครึ่งชีวิตของ Neutrase อิสระ และ Neutrase ตรึงรูป เมื่อเก็บในทรีสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมล/ลิตร pH 7.1 ที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิตู้เย็น

ชนิดของเอนไซม์	ค่าครึ่งชีวิต (วัน)	
	อุณหภูมิห้อง (30-33 องศาเซลเซียส)	อุณหภูมิตู้เย็น (8-10 องศาเซลเซียส)
Neutrase อิสระ	11	25
Neutrase ตรึงรูป	20	> 80

เมื่อพิจารณาค่าครึ่งชีวิต ซึ่งหมายถึงระยะเวลาในการเก็บที่ทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงเหลือครึ่งหนึ่งของแอคติวิตีเริ่มต้น ดังตารางที่ 5.12 จะเห็นว่า Neutrase ตรึงรูปมีค่าครึ่งชีวิตสูงกว่า Neutrase อิสระ ทั้งที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิตู้เย็น และเมื่อพิจารณาค่าครึ่งชีวิตเมื่อเก็บที่อุณหภูมิตู้เย็นซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เอนไซม์ทั้งสองมีเสถียรภาพสูง จะเห็นว่า Neutrase ตรึงรูปมีค่าครึ่งชีวิตมากกว่า 80 วัน ในขณะที่ Neutrase อิสระมีค่าครึ่งชีวิตเพียง 25 วันเท่านั้น แสดงให้เห็นว่าการตรึงรูป Neutrase บนผ้าไนลอนโดยวิธีเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์นี้มีผลทำให้ได้ Neutrase ตรึงรูปที่มีเสถียรภาพในระหว่างการเก็บดีกว่า Neutrase อิสระ

อย่างไรก็ตาม ทั้ง Neutrase อิสระ และ Neutrase ตรึงรูป มีเสถียรภาพในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิต่ำสูงกว่าที่อุณหภูมิสูง และจากผลการทดลองภาวะที่เหมาะสมในการเก็บ Neutrase อิสระ และ Neutrase ตรึงรูป คือ เก็บในทรีสบัฟเฟอร์ pH 7.1 ที่อุณหภูมิ 8-10 องศาเซลเซียส

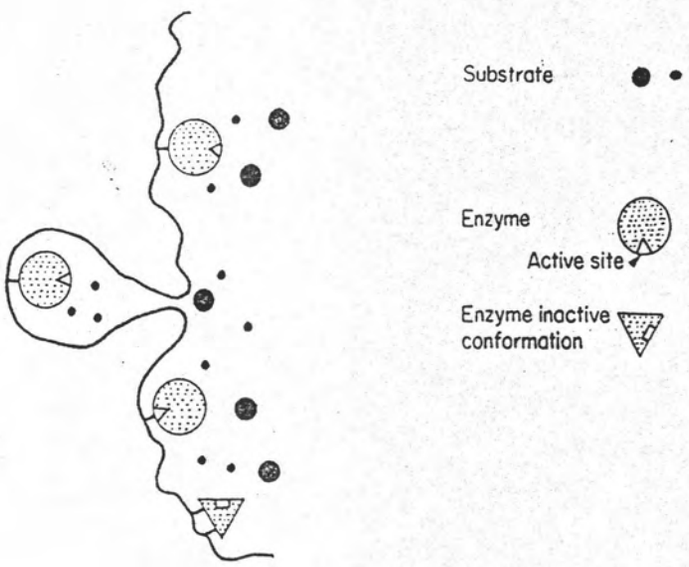
5.4.6 ค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์

จากการหาค่าแอคติวิตีจำเพาะของ Neutrase อิสระ และ Neutrase ตรึงรูป ตามวิธีทดลองข้อ 4.5.6 ให้ผลการทดลองดังตารางที่ 5.13

ตารางที่ 5.13 เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของ Neutrase อิสระ และ Neutrase ตรึงรูป

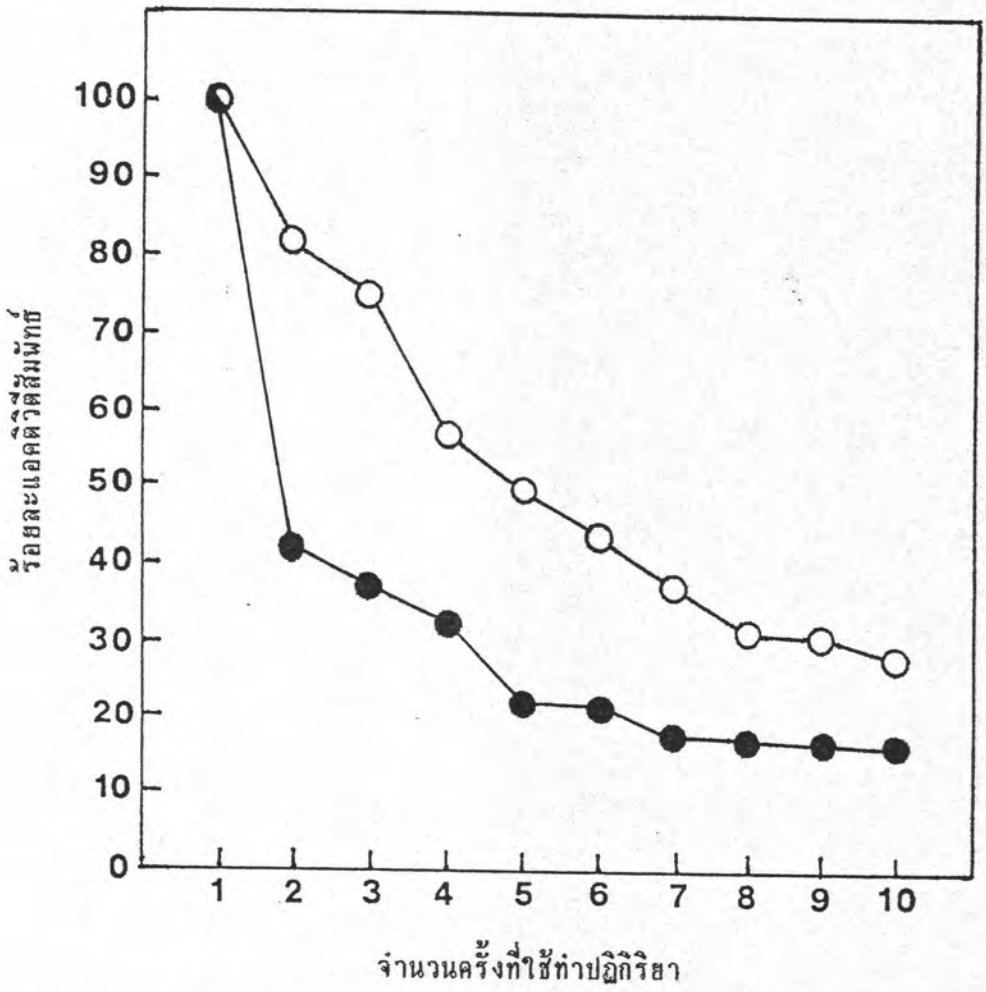
เอนไซม์	แอคติวิตี (ยูนิต)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม)	แอคติวิตีจำเพาะ (ยูนิต/โปรตีน 1 มิลลิกรัม)
Neutrase อิสระ	116.9	0.163	717.2
Neutrase ตรึงรูป	62.4	0.102	611.8

จากตารางที่ 5.13 จะเห็นว่า Neutrase อิสระ มีค่าแอคติวิตีจำเพาะ 717.2 ยูนิต/โปรตีน 1 มิลลิกรัม ในขณะที่ Neutrase ตรึงรูปมีค่าแอคติวิตีจำเพาะ 611.8 ยูนิต/โปรตีน 1 มิลลิกรัม ซึ่งมีค่าต่ำกว่าของ Neutrase อิสระเล็กน้อย ทั้งนี้อาจอธิบายได้ด้วยเหตุผลสองประการ ประการแรกคือ การตรึงรูป Neutrase บนผ้าไนลอนโดยวิธีเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์ นี้เป็นวิธีที่ค่อนข้างรุนแรง โดยเฉพาะเมื่อการเชื่อมพันธะโคเวเลนต์เกิดขึ้นกับหมู่ไวต่อปฏิกิริยาของบริเวณเร่งในโมเลกุลของเอนไซม์ จะมีผลทำให้โมเลกุลของเอนไซม์ตรึงรูปดังกล่าวสูญเสียแอคติวิตีไปได้ ประการที่สองคือ การเกิด steric effect (24) เนื่องจากผ้าไนลอนที่ใช้เป็นตัวพยุงประกอบด้วยเส้นใยไนลอนขนาดเล็กจำนวนมากรวมกันเป็นมัดและสานกันเป็นผ้า ทำให้โมเลกุลของเอนไซม์ตรึงรูปบางส่วนถูกบดบังโดยเส้นใยดังกล่าว ส่งผลให้โมเลกุลของสับสเตรทซึ่งมีขนาดใหญ่ไม่สามารถเคลื่อนที่เข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของเอนไซม์ นั่นคือ โมเลกุลของเอนไซม์ส่วนที่ถูกบดบังนี้เสมือนว่าไม่แสดงแอคติวิตี (รูปที่ 5.14) ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงทำให้ Neutrase ตรึงรูป มีค่าแอคติวิตีจำเพาะต่ำกว่า Neutrase อิสระ



รูปที่ 5.14 steric effect ที่เกิดกับเอนไซม์ตริงรูป เนื่องจากการบดบังของตัวพยุง

5.4.7 ศึกษาประสิทธิภาพการทำปฏิกิริยาซ้ำหลายครั้งของ Neutrase ตริงรูป จากการวัดแอคติวิตีของ Neutrase ตริงรูปซ้ำหลายครั้ง ที่อุณหภูมิ 30 และ 55 องศาเซลเซียส ตามวิธีทดลองข้อ 4.5.7 ให้ผลการทดลองแสดงด้วยกราฟความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละแอคติวิตีสัมพัทธ์กับจำนวนครั้งในการทำปฏิกิริยา ดังรูปที่ 5.15



รูปที่ 5.15 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการทำปฏิกิริยาซ้ำหลายครั้งของ Neutrase ตรึงรูปที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (-o-o-) และ 55 องศาเซลเซียส (-●-●-)

จากรูปที่ 5.15 จะเห็นได้ว่าที่อุณหภูมิ 30 และ 55 องศาเซลเซียส ประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยาของ Neutrase ตรึงรูป ลดลงเมื่อใช้ทำปฏิกิริยาซ้ำหลาย ๆ ครั้ง โดยที่อัตราการลดลงของแอคติวิตีเกิดขึ้นสูงในช่วงการใช้ทำปฏิกิริยา 5 ครั้งแรก หลังจากนั้นอัตราการลดลงของแอคติวิตีจะช้าลงจนเกือบคงที่ อย่างไรก็ตาม การใช้ทำปฏิกิริยาซ้ำหลาย ๆ ครั้งที่อุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส) ทำให้ Neutrase ตรึงรูปสูญเสียแอคติวิตีด้วยอัตราที่เร็วกว่าที่อุณหภูมิต่ำ (30 องศาเซลเซียส) กล่าวคือ ในการใช้ทำปฏิกิริยาครั้งที่ 2 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส Neutrase ตรึงรูป มีแอคติวิตีลดลงเหลือเพียงร้อยละ 41.8 ของแอคติวิตีเริ่มต้น ในขณะที่ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส Neutrase ตรึงรูปยังคงมีแอคติวิตีร้อยละ 81.3 ของแอคติวิตีเริ่มต้น ทั้งนี้เนื่องจากการใช้เอนไซม์ตรึงรูปทำปฏิกิริยาซ้ำหลาย ๆ ครั้งที่อุณหภูมิสูง ซึ่งเป็นภาวะที่ค่อนข้างรุนแรง โอกาสที่โมเลกุลของเอนไซม์จะเกิดการเสียสภาพธรรมชาติและหลุดจากตัวพยุงจึงมีมากกว่าที่อุณหภูมิต่ำ ดังนั้นที่อุณหภูมิสูง Neutrase ตรึงรูปจึงสูญเสียแอคติวิตีได้เร็วกว่าที่อุณหภูมิต่ำ

5.5 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการย่อยสลายโปรตีนในเบียร์ด้วย Neutrase ตริงรูป

จากการวัดปริมาณ HMWP ที่เหลือในเบียร์ซึ่งผ่านการทำปฏิกิริยากับ Neutrase ตริงรูป ที่อุณหภูมิ 10, 30 และ 50 องศาเซลเซียส ตามวิธีทดลองข้อ 4.6 ให้ผลการทดลองดังตารางที่ 5.14

ตารางที่ 5.14 ปริมาณ HMWP ที่เหลือในเบียร์ที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับ Neutrase ตริงรูป ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ปริมาณ HMWP ที่เหลือในเบียร์ (มิลลิกรัม/ลิตร)
ตัวอย่างเบียร์เริ่มต้น (control)	150.0
10	117.5
30	88.5
50	115.0

จากตารางที่ 5.14 จะเห็นว่าปริมาณ HMWP ในเบียร์ลดลงสูงสุดเมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยากับ Neutrase ตริงรูปเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 10 และ 50 องศาเซลเซียส ปริมาณ HMWP ในเบียร์ลดลงใกล้เคียงกัน ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยสลายโปรตีนในเบียร์ด้วย Neutrase ตริงรูป ซึ่งทำให้ปริมาณ HMWP ในเบียร์ลดลงสูงสุดคือ 30 องศาเซลเซียส ทั้งนี้เนื่องจากเบียร์ที่ใช้ในการทดลองมี pH เท่ากับ 4.6 ภาวะที่เป็นกรดนี้ร่วมกับอุณหภูมิสูงถึง 50 องศาเซลเซียส ย่อมมีผลทำให้เอนไซม์เกิดการเสียสภาพธรรมชาติ และหลุดออกจากตัวพยุงได้ง่าย และภาวะที่เป็นกรดร่วมกับอุณหภูมิที่ต่ำเกินไปปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนในเบียร์เกิดได้น้อย อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดจึงเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส

เมื่อเปรียบเทียบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของ Neutrase ตริงรูป (ผลการทดลองข้อ 5.4.1) ซึ่งเท่ากับ 55 องศาเซลเซียส กับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายโปรตีน

ในเบียร์ด้วย Neutrase ตริงรูป จะเห็นว่าแตกต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจากภาวะที่มีสับสเตรท และ pH ของระบบต่างกัน จึงมีผลทำให้อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของ Neutrase ตริงรูป แตกต่างกัน

5.6 ศึกษาการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตริงรูป

5.6.1 ผลของปริมาณ Neutrase ตริงรูปในเครื่องปฏิกรณ์ต่อการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์

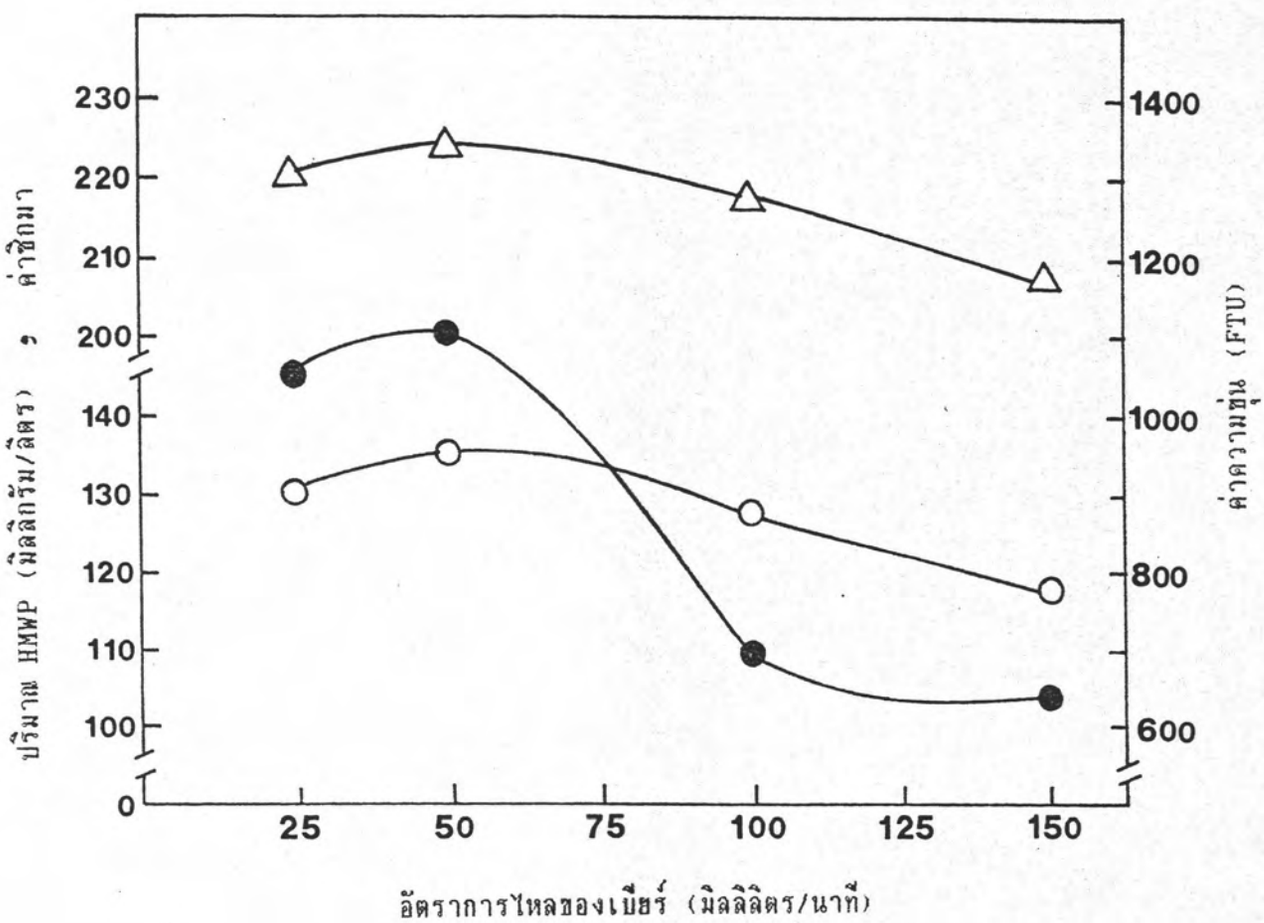
จากการทดลองใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตริงรูป ในการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ตามวิธีทดลองข้อ 4.7.1 โดยแปรปริมาณของ Neutrase ตริงรูป ในเครื่องปฏิกรณ์ด้วยการใช้ผ้าไนลอน 2 ขนาด คือ 20 x 30 และ 20 x 60 ตารางเซนติเมตร และแปรอัตราการไหลของเบียร์ที่ผ่านเครื่องปฏิกรณ์ในช่วง 25-200 มิลลิลิตร/นาที ควบคุมอุณหภูมิของเครื่องปฏิกรณ์ให้คงที่ที่ 30 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส กำหนดปริมาตรของเบียร์สำหรับแต่ละอัตราการไหลคงที่เท่ากับ 500 มิลลิลิตร และเวลาในการซ้ำรอบเท่ากับ 1 ชั่วโมง

เหตุผลที่กำหนดเวลาในการวนซ้ำรอบเท่ากับ 1 ชั่วโมง เนื่องจากตัวอย่างเบียร์ที่ผ่านเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตริงรูปตามภาวะดังกล่าวข้างต้นเพียง 1 รอบ ยังไม่สามารถลดความขุ่นของเบียร์ถึงระดับที่ต้องการ รวมทั้งมองไม่เห็นแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจน จึงจำเป็นต้องผ่านตัวอย่างเบียร์ซ้ำรอบ นั่นคือ เวลาในการทำปฏิกิริยา (reaction time) หรือ space velocity ซึ่งหมายถึงปริมาณของ Neutrase ตริงรูป โดยคิดเป็นพื้นที่ของผ้าไนลอน คูณด้วยจำนวนรอบของเบียร์ที่ไหลผ่านเครื่องปฏิกรณ์ หารด้วยอัตราการไหลของเบียร์ มีค่าเท่ากันสำหรับทุกอัตราการไหล คือ ในกรณีของ Neutrase ตริงรูปบนผ้าไนลอนขนาด 20 x 30 ตารางเซนติเมตร มี space velocity เท่ากับ 72 ตารางเซนติเมตร/มิลลิลิตร/นาที และสำหรับ Neutrase ตริงรูปบนผ้าไนลอน ขนาด 20 x 60 ตารางเซนติเมตร มี space velocity เท่ากับ 144 ตารางเซนติเมตร/มิลลิลิตร/นาที อย่างไรก็ตามผลของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตริงรูปในแต่ละรอบที่วนซ้ำย่อมไม่เท่ากัน ดังนั้นผลของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นที่ space velocity ใด ๆ หลังจากการซ้ำรอบ 1 ชั่วโมง จึงเป็นผลของปฏิกิริยาโดยเฉลี่ยจากจำนวนรอบที่วนซ้ำทั้งหมด

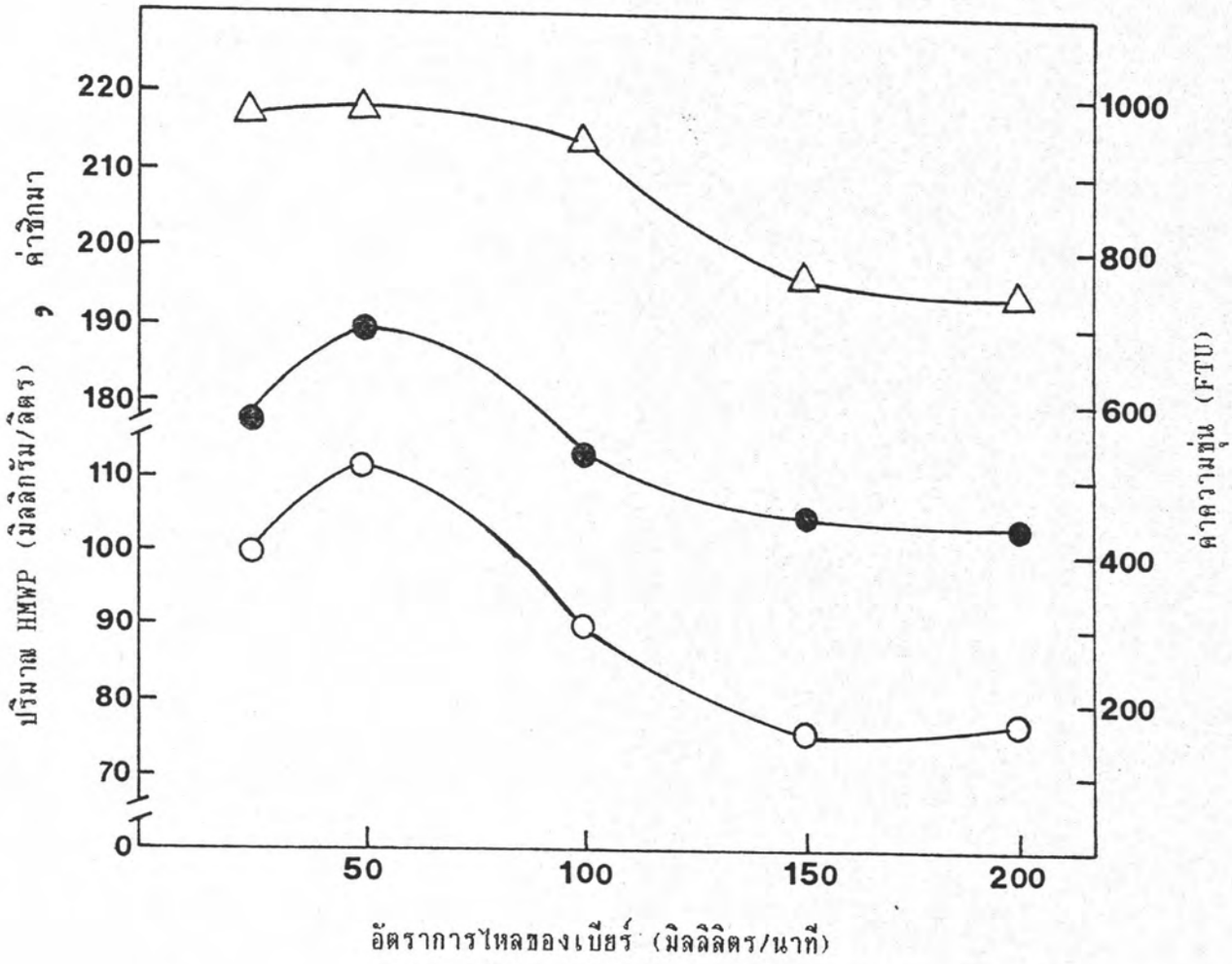
จากนั้นเก็บตัวอย่างเบียร์ที่ได้จากการทดลองทุกภาวะ ๆ ละ 3 ชุด สำหรับวิเคราะห์ปริมาณ HMWP ค่าความขุ่นและความเสถียรของฟองเบียร์ ตามวิธีทดลองข้อ 4.7.1 ให้ผลการทดลองดังตารางที่ 5.15 และกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าทั้งสามดังกล่าวกับอัตราการไหลของเบียร์ ดังรูปที่ 5.16 และ 5.17

ตารางที่ 5.15 ปริมาณ HMWP ค่าความขุ่น และค่าซิกมา ของเบียร์ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่ผ่านเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพซึ่งบรรจุ Neutrase ตรึงรูป บนผ้าไนลอนขนาด 20 x 30 และ 20 x 60 ตารางเซนติเมตร ด้วยอัตราการไหลต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 30 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

อัตราการไหล (มิลลิลิตร/นาที)	ปริมาณ Neutrase ตรึงรูปในเครื่องปฏิกรณ์					
	20 x 30 ตารางเซนติเมตร			20 x 60 ตารางเซนติเมตร		
	HMWP (มิลลิกรัม/ลิตร)	ค่าความขุ่น (FTU)	ค่าซิกมา	HMWP (มิลลิกรัม/ลิตร)	ค่าความขุ่น (FTU)	ค่าซิกมา
เบียร์เริ่มต้น (control)	148.0	1500	235.5	144.0	1560	232.1
25	130.5	1055	220.8	100.0	576	217.2
50	135.5	1105	224.0	111.5	697	218.1
100	128.0	695	217.5	90.0	530	214.4
150	118.0	640	207.4	76.0	450	196.4
200	-	-	-	77.5	435	194.1



รูปที่ 5.16 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ HMWP (-o-o-) ค่าความขุ่น (-●-●-) และค่าซิกมา (-Δ-Δ-) กับอัตราการไหลของเบียร์ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่ผ่านเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพซึ่งบรรจุ Neutrase ตรึงรูปบนผ้าไนลอนขนาด 20x30 ตารางเซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 30 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (space velocity = 72 ตารางเซนติเมตร/มิลลิลิตร/นาที)



รูปที่ 5.17 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ HMWP (-o-o-) ค่าความขุ่น (-●-●-) และค่าซิกมา (-△-△-) กับอัตราการไหลของเบียร์ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่ผ่านเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพซึ่งบรรจุ Neutrase ตรึงรูปบนผ้าไนลอนขนาด 20 x 60 ตารางเซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 30 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (space velocity = 144 ตารางเซนติเมตร/มิลลิลิตร/นาที)

จากรูปที่ 5.16 และ 5.17 จะเห็นว่า เมื่อ space velocity คงที่ อัตราการไหลของเบียร์ยังคงมีผลต่อปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนในเบียร์ กล่าวคือ ในช่วงอัตราการไหลของเบียร์ 25-100 มิลลิลิตร/นาที ปริมาณ HMWP ในเบียร์ลดลงน้อยกว่าในช่วงอัตราการไหล 100-150 มิลลิลิตร/นาที หรือ 100-200 มิลลิลิตร/นาที เมื่อ space velocity เท่ากับ 72 และ 144 ตารางเซนติเมตร/มิลลิลิตร/นาที ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการเสื่อมสภาพของ Neutrase ตรึงรูปในขณะใช้งาน เนื่องจากกำหนดเวลาในการชำรอบเท่ากันที่ 1 ชั่วโมง และจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเสื่อมสภาพของ Neutrase ตรึงรูป ในช่วงอัตราการไหลของเบียร์ต่ำเกิดได้มากกว่าในช่วงอัตราการไหลสูง จึงทำให้ปริมาณ HMWP ในเบียร์หลังจากทำปฏิกิริยา 1 ชั่วโมง ในช่วงอัตราการไหล 25-100 มิลลิลิตร/นาที ลดลงน้อยกว่าในช่วงอัตราการไหล 100-150 หรือ 100-200 มิลลิลิตร/นาที เมื่อ space velocity เท่ากับ 72 และ 144 ตารางเซนติเมตร/มิลลิลิตร/นาที ตามลำดับ

อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ HMWP ค่าความขุ่น และค่าชิกมา ซึ่งหมายถึงความเสถียรของฟองเบียร์ของตัวอย่างเบียร์ที่ผ่านเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดบรรจุ Neutrase ตรึงรูปบนผ้าไนลอนขนาด 20 x 30 และ 20 x 60 ตารางเซนติเมตร พบว่ามีลักษณะสอดคล้องกัน กล่าวคือเมื่อปริมาณ HMWP ต่ำ ค่าความขุ่นและค่าชิกมามีค่าต่ำ และในทางตรงกันข้ามถ้าปริมาณ HMWP สูง ค่าความขุ่นและค่าชิกมามีค่าสูงด้วย ทั้งนี้เนื่องจากสาเหตุของการเกิดความขุ่นและการเกิดฟองเบียร์เกี่ยวข้องกับโปรตีนโมเลกุลใหญ่โดยตรง กรณีของความขุ่นนั้นเกิดจากการรวมตัวของโปรตีนกับสารประกอบพอลีฟีนอลเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง และความสามารถในการละลายต่ำ สำหรับกรณีการเกิดฟองเบียร์นั้นเกี่ยวข้องกับโปรตีน 3 กลุ่ม ที่มีสมบัติเป็น surface-active compound และมีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันคือ 15,000, 40,000 และ 90,000-1,000,000 ดาลตัน ดังนั้นถ้าโปรตีนในเบียร์ถูกย่อยสลายไป หรืออีกนัยหนึ่งคือ เมื่อปริมาณ HMWP ลดลง ย่อมมีผลทำให้ค่าความขุ่นและความเสถียรของฟองเบียร์ลดลง

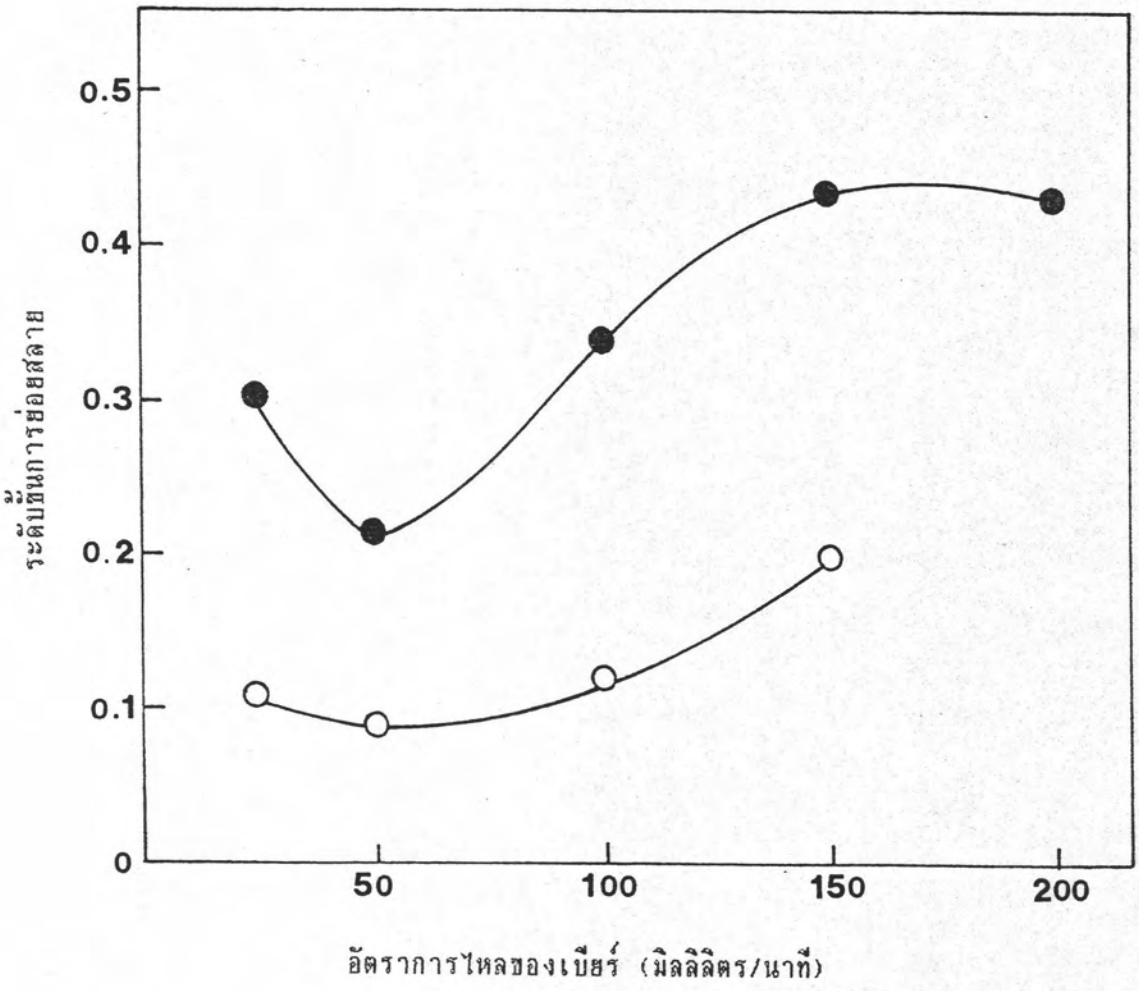
การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายโปรตีนในเบียร์ด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพที่บรรจุ Neutrase ตรึงรูป บนผ้าไนลอนขนาด 20 x 30 และ 20 x 60 ตารางเซนติเมตร หรือ space velocity เท่ากับ 72 และ 144 ตารางเซนติเมตร/มิลลิลิตร/นาที ตามลำดับ ใช้วิธีคำนวณข้อมูลในรูประดับขั้นการย่อยสลาย (degree of hydrolysis) ดังสมการต่อไปนี้ (29)

$$\text{ระดับขั้นการย่อยสลาย} = \frac{C_o - C_f}{C_o}$$

C_o = ปริมาณ HMWP ในเบียร์เริ่มต้น

C_f = ปริมาณ HMWP ที่เหลือในเบียร์ที่ผ่านเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตรึงรูป

เมื่อเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างระดับขั้นการย่อยสลายกับอัตราการไหลของเบียร์ที่ผ่านเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพซึ่งบรรจุ Neutrase ตรึงรูป บนผ้าไนลอนขนาด 20 x 30 และ 20 x 60 ตารางเซนติเมตร ได้ผลดังรูปที่ 5.18



รูปที่ 5.18 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างระดับขั้นการย่อยสลายกับอัตราการไหลของเบียร์ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่ผ่านเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพซึ่งบรรจุ Neutrase ตรึงรูปบนผ้าไนลอนขนาด 20x30 ตารางเซนติเมตร (-o-o-) และ 20x60 ตารางเซนติเมตร (-●-●-) ที่อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

จากรูปที่ 5.18 จะเห็นว่า การเพิ่มปริมาณ Neutrase ตรึงรูปในเครื่องปฏิกรณ์ทำให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายโปรตีนในเบียร์สูงขึ้น โดยสังเกตได้จากระดับขั้นการย่อยสลายที่ทุกอัตราการไหลของเบียร์ที่ผ่านเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพซึ่งบรรจุ Neutrase ตรึงรูปบนผ้าไนลอนขนาด 20 x 60 ตารางเซนติเมตร มีค่าสูงกว่าเมื่อใช้ผ้าไนลอนขนาด 20 x 30 ตารางเซนติเมตร ทั้งนี้เนื่องจากการเพิ่มปริมาณ Neutrase ตรึงรูปในเครื่องปฏิกรณ์มีผลทำให้โอกาสที่สับสเตรทสัมผัสกับเอนไซม์มีมากขึ้น ปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนในเบียร์จึงเกิดได้ดีขึ้น

จากตารางที่ 5.15 เมื่อพิจารณาค่าความขุ่นของตัวอย่างเบียร์ที่ผ่านเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพซึ่งบรรจุ Neutrase ตรึงรูปบนผ้าไนลอนขนาด 20 x 30 ตารางเซนติเมตร จะเห็นว่าช่วงอัตราการไหล 100-150 มิลลิลิตร/นาที เท่านั้นที่ทำให้ค่าความขุ่นของเบียร์ที่ได้ลดลงประมาณครึ่งหนึ่งของเบียร์เริ่มต้น ในขณะที่เบียร์ที่ผ่านเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพซึ่งบรรจุ Neutrase ตรึงรูปบนผ้าไนลอนขนาด 20 x 60 ตารางเซนติเมตร มีค่าความขุ่นลดลงต่ำกว่าครึ่งหนึ่งของเบียร์เริ่มต้นที่ทุกช่วงอัตราการไหล นั่นคือ ประสิทธิภาพการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพที่บรรจุ Neutrase ตรึงรูป บนผ้าไนลอนขนาด 20 x 60 ตารางเซนติเมตร สูงกว่าเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพที่บรรจุ Neutrase ตรึงรูปบนผ้าไนลอนขนาด 20 x 30 ตารางเซนติเมตร ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณ Neutrase ตรึงรูปที่เพิ่มขึ้นทำให้ปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนในเบียร์เกิดได้มากขึ้น ค่าความขุ่นของเบียร์ที่ได้จึงลดลงมากขึ้น ลักษณะดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hartmeier (8) ซึ่งศึกษาการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์และไวน์ด้วยเปปซินตรึงรูป พบว่า การเพิ่มปริมาณเปปซินตรึงรูปในเครื่องปฏิกรณ์ มีผลทำให้ประสิทธิภาพการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์และไวน์สูงขึ้น อย่างไรก็ตาม เมื่อเพิ่มปริมาณเปปซินตรึงรูปในเครื่องปฏิกรณ์จนถึงจุดหนึ่ง ประสิทธิภาพการป้องกันการเกิดตะกอนดังกล่าวเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยหรือคงที่ กล่าวคือ ที่อุณหภูมิของเครื่องปฏิกรณ์เท่ากับ 40 องศาเซลเซียส ในกรณีของเบียร์ประสิทธิภาพการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์สูงขึ้น เมื่อเพิ่มปริมาณเปปซินตรึงรูปในเครื่องปฏิกรณ์จาก 0 ถึง 40 กรัมต่อหน่วยปริมาตรของเบียร์ต่อหน่วยเวลา หลังจากนั้นประสิทธิภาพการป้องกันการเกิดตะกอนเริ่มคงที่ และกรณีของไวน์นั้นการเพิ่มปริมาณเปปซินตรึงรูป จาก 0 ถึง 20 กรัมต่อหน่วยปริมาตรของไวน์ต่อหน่วยเวลาเท่านั้นที่ทำให้ประสิทธิภาพการป้องกันการเกิดตะกอนในไวน์สูงขึ้น หลังจากนั้นเริ่มมีลักษณะคงที่เช่นเดียวกัน

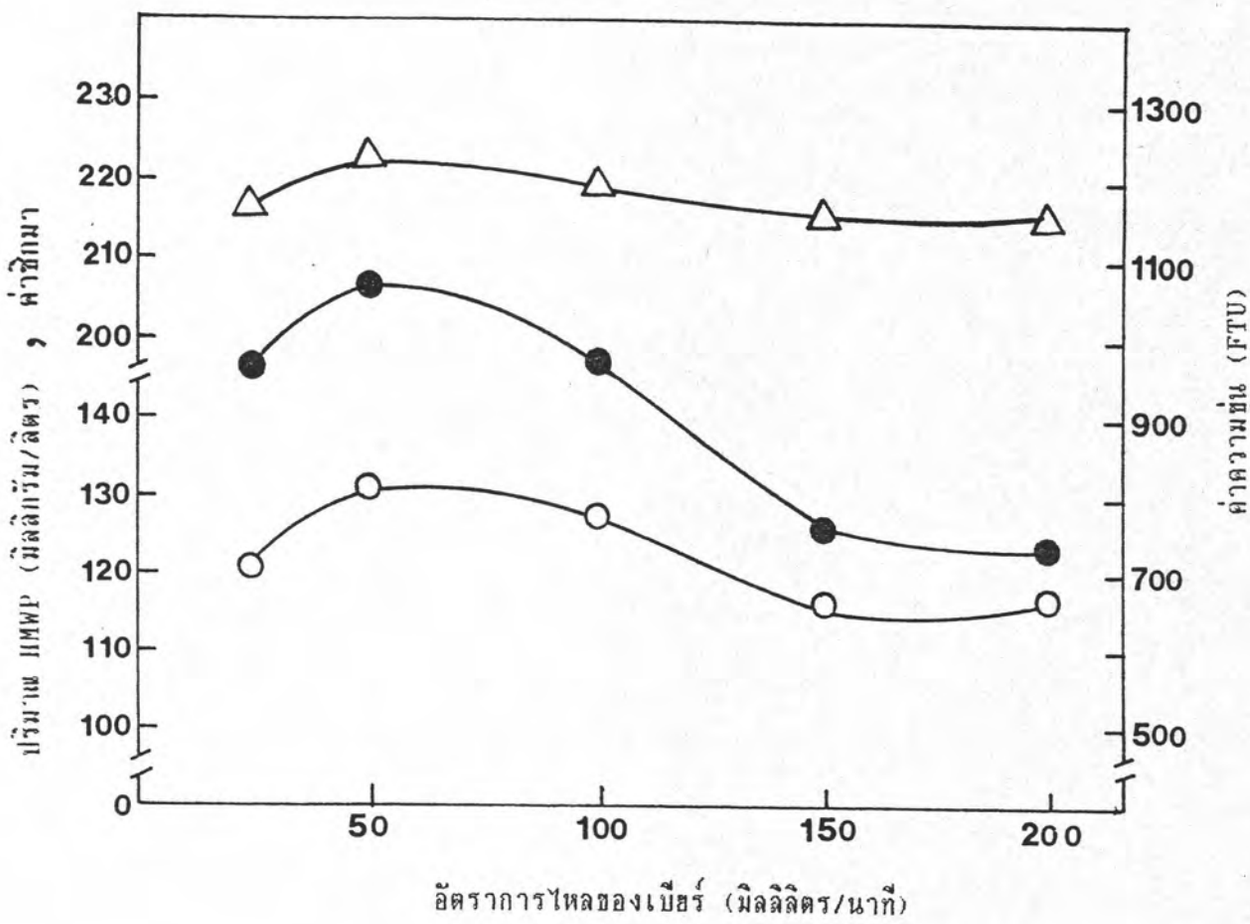
เมื่อพิจารณาความเสถียรของฟองเบียร์จากค่าชิกมาของเบียร์ที่ผ่านเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ซึ่งบรรจุ Neutrase ตรึงรูปบนผ้าไนลอนขนาด 20 x 60 ตารางเซนติเมตร (ตารางที่ 5.15) จะเห็นว่า ที่อัตราการไหลของเบียร์ในช่วง 150-200 มิลลิลิตร/นาที เบียร์ที่ได้มีค่าชิกมาลดลงจากเบียร์เริ่มต้นค่อนข้างมาก นั่นคือ มีความเสถียรของฟองเบียร์ลดลงมาก เนื่องจากโปรตีนในเบียร์ถูกย่อยสลายมากเกินไปซึ่งเป็นลักษณะที่ไม่ต้องการในผลิตภัณฑ์เบียร์ แม้ว่าตัวอย่างเบียร์ที่ได้มีค่าความขุ่นน้อยมากก็ตาม ดังนั้นการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตรึงรูป จึงต้องคำนึงถึงผลกระทบต่อความเสถียรของฟองเบียร์ด้วย Hartmeier (8) กล่าวถึงผลกระทบของการใช้เปปซินตรึงรูปในการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ต่อความเสถียรของฟองเบียร์ โดยสรุปว่า เปปซินตรึงรูปเหมาะสมกับการป้องกันการเกิดตะกอนในผลิตภัณฑ์ประเภทไวน์มากกว่าเบียร์ เนื่องจากกรณีของเบียร์มีผลทำให้ความเสถียรของฟองเบียร์ลดลงมาก

5.6.2 ศึกษาการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตรึงรูป ที่อุณหภูมิต่ำ

จากการวิเคราะห์ปริมาณ HMWP ค่าความขุ่น และค่าชิกมา ของเบียร์ที่ผ่านเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตรึงรูป ด้วยอัตราการไหลต่าง ๆ โดยใช้ Neutrase ตรึงรูปบนผ้าไนลอนขนาด 20 x 60 ตารางเซนติเมตร และควบคุมอุณหภูมิของเครื่องปฏิกรณ์ให้คงที่ที่ 10 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส ตามวิธีทดลองข้อ 4.7.2 ให้ผลการทดลองดังตารางที่ 5.16 และรูปที่ 5.19

ตารางที่ 5.16 ปริมาณ HMWP ค่าความขุ่น และค่าซิกมา ของเบียร์ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่ผ่านเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดบรรจุ Neutrase ตรึงรูปบนผ้าไนลอนขนาด 20 x 60 ตารางเซนติเมตร ด้วยอัตราการไหลต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 10 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

อัตราการไหล (มิลลิลิตร/นาที)	HMWP (มิลลิกรัม/ลิตร)	ค่าความขุ่น (FTU)	ค่าซิกมา
เบียร์เริ่มต้น (control)	142.5	1564	230.1
25	121.0	963	216.6
50	131.0	1067	222.9
100	127.5	970	219.9
150	116.0	761	215.9
200	117.0	734	216.4

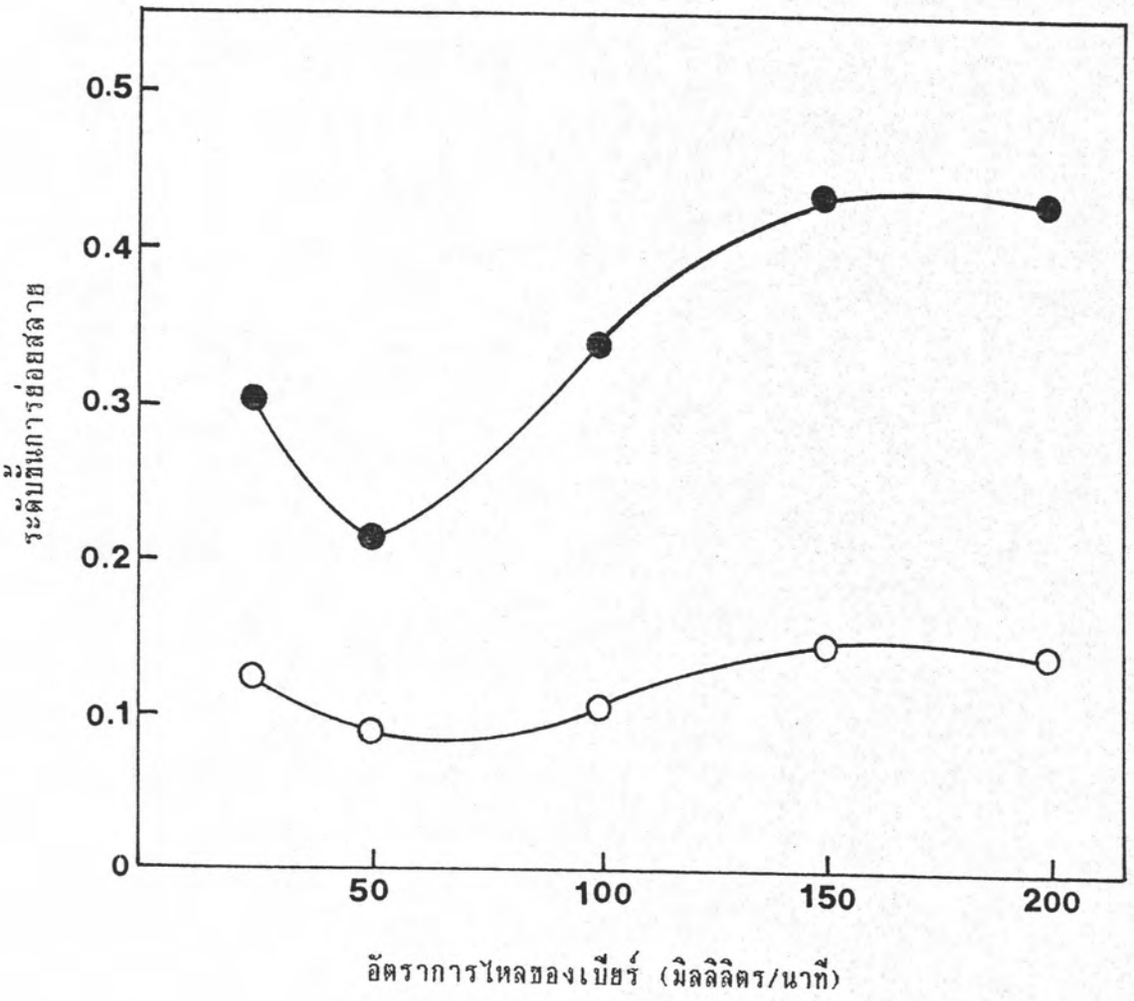


รูปที่ 5.19 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ HMWP (-o-o-) ค่าความขุ่น (-●-●-) และค่าชิกมา (-△-△-) กับอัตราการไหลของเบียร์ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่ผ่านเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพซึ่งบรรจุ Neutrase ตรึงรูปบนผ้าไนลอนขนาด 20 x 60 ตารางเซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 10 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

จากรูปที่ 5.19 จะเห็นได้ว่าแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ HMWP ค่าความขุ่น และค่าชิกมาของเบียร์ที่ผ่านเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตรึงรูป ที่อุณหภูมิ 10 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส มีลักษณะคล้ายคลึงกับกรณีของเบียร์ที่ผ่านเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตรึงรูป ที่อุณหภูมิ 30 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส ดังผลการทดลองในข้อ 5.6.1 กล่าวคือ เมื่อปริมาณ HMWP ต่ำ ค่าความขุ่นและค่าชิกมาของเบียร์ที่ได้มีค่าต่ำด้วย และในช่วงอัตราการไหลของเบียร์ 25-100 มิลลิลิตร/นาที ปริมาณ HMWP ลดลงน้อยกว่าในช่วงอัตราการไหล 100-200 มิลลิลิตร/นาที

เนื่องจากผลของการเสื่อมสภาพของ Neutrase ตรึงรูปขณะใช้งานที่อัตราการไหล 25-100 มิลลิลิตร/นาที สูงกว่าในช่วงอัตราการไหล 100-200 มิลลิลิตร/นาที

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายโปรตีนในเบียร์ที่อุณหภูมิของเครื่องปฏิกรณ์เท่ากับ 30 $\pm$ 1 (จากผลการทดลองข้อ 5.6.1) และ 10 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส ในรูปของระดับขั้นการย่อยสลายดังรูปที่ 5.20 จะเห็นว่าเมื่อปริมาณ Neutrase ตรึงรูปในเครื่องปฏิกรณ์เท่ากัน ที่อุณหภูมิ 30 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส มีระดับขั้นการย่อยสลายสูงกว่าที่อุณหภูมิ 10 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส สำหรับทุกอัตราการไหลของเบียร์ ทั้งนี้เนื่องจากที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนในเบียร์ด้วย Neutrase ตรึงรูปเกิดขึ้นน้อยกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ดังผลการทดลองในข้อ 5.6 ดังนั้นประสิทธิภาพการย่อยสลายโปรตีนในเบียร์ด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตรึงรูป ที่อุณหภูมิ 30 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส จึงสูงกว่าที่อุณหภูมิ 10 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส ด้วยเหตุนี้จึงเป็นผลให้ประสิทธิภาพการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตรึงรูป ที่อุณหภูมิ 10 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส ต่ำกว่าที่อุณหภูมิ 30 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส โดยสังเกตได้จากค่าความขุ่นของเบียร์ที่ผ่านเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตรึงรูป ที่อุณหภูมิ 10 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 5.16) มีค่าสูงกว่าเบียร์ที่ผ่านเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตรึงรูป ที่อุณหภูมิ 30 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 5.15) เมื่อปริมาณ Neutrase ตรึงรูปในเครื่องปฏิกรณ์เท่ากัน โดยสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hartmeier (8) ซึ่งพบว่าประสิทธิภาพการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์และไวน์ด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพเปปซินตรึงรูป ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สูงกว่าที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

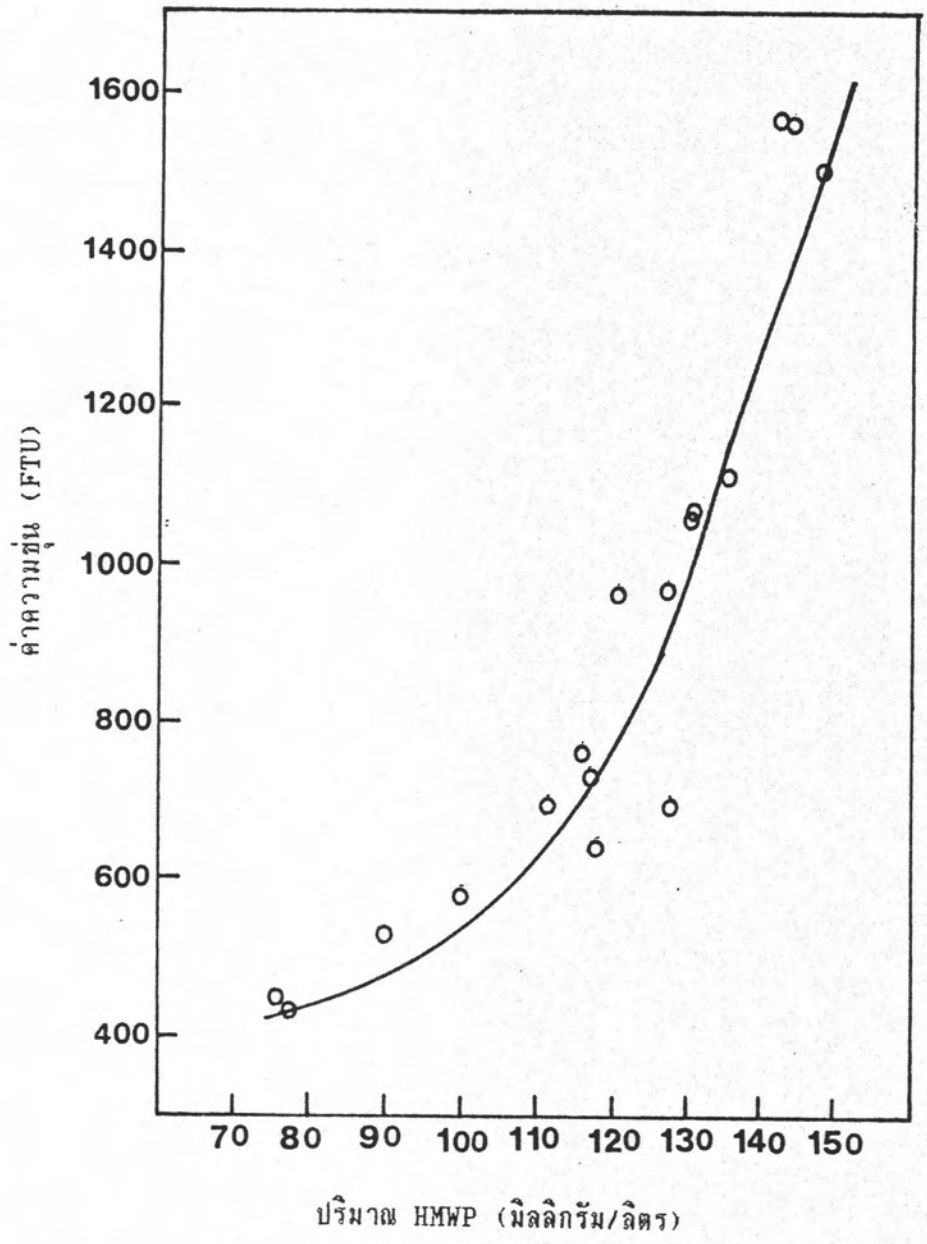


รูปที่ 5.20 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างระดับขั้นการย่อยสลายกับอัตราการไหลของเบียร์ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่ผ่านเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพซึ่งบรรจุ Neutrase ตรึงรูป บนผ้าไนลอนขนาด 20x60 ตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียส (-●-●-) เปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิ 10±1 องศาเซลเซียส (-o-o-)

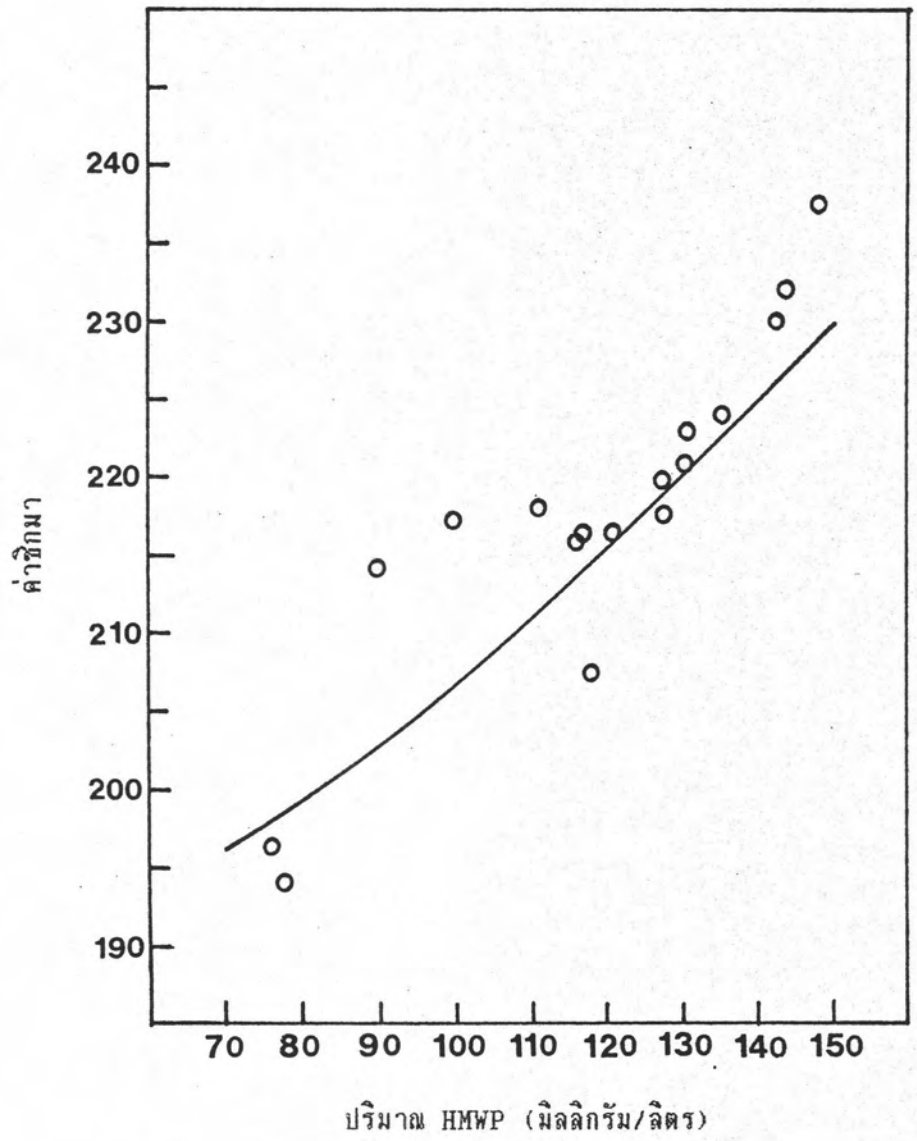
อย่างไรก็ตาม การป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ที่อุณหภูมิต่ำ มีข้อได้เปรียบกว่าที่อุณหภูมิสูง เนื่องจากในกระบวนการผลิตเบียร์ของ บริษัท ไทยอมฤต บริวเวอร์รี่ จำกัด ตัวอย่างเบียร์ที่เก็บจากถังบ่ม 2 (ดูรูปที่ 2.1) ซึ่งใช้ในการทดลองนั้นมีอุณหภูมิประมาณ 0 องศาเซลเซียส นอกจากนี้กระบวนการผลิตเบียร์โดยทั่วไปอุณหภูมิของเบียร์ในถังบ่มปกติจะต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส ดังนั้นถ้าสามารถใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตรึงรูป สำหรับป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ที่อุณหภูมิต่ำได้ดี ระบบการทำงานแบบต่อเนื่องของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตรึงรูปจะมีประสิทธิภาพสูงขึ้น กล่าวคือ สามารถผ่านเบียร์จากถังบ่มซึ่งมีอุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส เข้าสู่เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตรึงรูปได้ทันที โดยไม่ต้องผ่านเครื่องทำความร้อน (heater) เพื่อเพิ่มอุณหภูมิให้ถึงจุดที่เหมาะสมกับการทำงานของ Neutrase ตรึงรูปในเครื่องปฏิกรณ์ซึ่งเป็นการประหยัดพลังงานอีกด้วย มีงานวิจัยที่ศึกษาการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ที่อุณหภูมิต่ำด้วยเอนไซม์โปรติเอสตรึงรูป และพบว่าให้ประสิทธิภาพการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ได้ดี กล่าวคือ Finley และคณะ (7) สามารถใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพปาเปนตรึงรูปป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้เป็นอย่างดี Hansen (10) ทดลองใช้เครื่องปฏิกรณ์ที่บรรจุโปรติเอสจากจุลินทรีย์ตรึงรูปสำหรับป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส พบว่าได้ผลดี นอกจากนี้ Jin และ Toda (17) ทดลองป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยใช้ปาเปนตรึงรูปซึ่งให้ผลดีเช่นเดียวกัน

จากตารางที่ 5.16 เมื่อพิจารณาอัตราการไหลของเบียร์ในช่วง 150-200 มิลลิลิตร/นาที จะเห็นว่าเบียร์ที่ได้มีค่าความขุ่นลดลงมากกว่าครึ่งหนึ่งของเบียร์เริ่มต้น (control) ดังนั้นการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตรึงรูปที่อุณหภูมิต่ำจึงมีความเป็นไปได้ค่อนข้างสูง โดยอาจเพิ่มปริมาณ Neutrase ตรึงรูปในเครื่องปฏิกรณ์ให้มากขึ้น ซึ่งจะมีผลทำให้ประสิทธิภาพการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์สูงขึ้นด้วย ดังตัวอย่างผลงานวิจัยของ Hartmeier (8) ซึ่งพบว่าที่อุณหภูมิต่ำจะต้องใช้ปริมาณเอนไซม์ตรึงรูปในเครื่องปฏิกรณ์มากกว่าที่อุณหภูมิสูง จึงจะให้ประสิทธิภาพการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์หรือไวน์เท่ากัน

ดังได้กล่าวมาแล้วว่า ค่าความขุ่นและค่าซิกมาของเบียร์ที่ผ่านการป้องกันการเกิดตะกอนด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตรึงรูป มีความสัมพันธ์กับปริมาณ HMWP ในเบียร์ และเพื่อให้เห็นแนวโน้มดังกล่าวได้ชัดเจนขึ้น จึงนำข้อมูลของปริมาณ HMWP ค่าความขุ่น และค่าซิกมาของเบียร์ที่ได้จากการทดลองทั้งหมด (ตารางที่ 5.15 และ 5.16) มาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ HMWP กับค่าความขุ่นและค่าซิกมา ดังรูปที่ 5.21 และ 5.22



รูปที่ 5.21 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ HMWP กับค่าความขุ่นของเบียร์ที่ผ่านการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตรึงรูป โดยมีความสัมพันธ์แบบพาราโบลา (r^2 = 0.92)



รูปที่ 5.22 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ HMWP กับค่าซิกมาของเบียร์ที่ผ่านการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตรึงรูป โดยมีความสัมพันธ์แบบพาราโบลา (r^2 = 0.81)

จากรูปที่ 5.21 และ 5.22 พบว่าค่าความขุ่นและค่าซิกมาของเบียร์ที่ผ่านการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตรึงรูป มีความสัมพันธ์กับปริมาณ HMWP แบบพาราโบลา โดยมีค่า r^2 เท่ากับ 0.92 และ 0.81 ตามลำดับ จากกราฟความสัมพันธ์ดังกล่าวทำให้สามารถคาดคะเนได้ว่าจะต้องลดปริมาณ HMWP ในเบียร์ด้วยเครื่องปฏิกรณ์-ชีวภาพ Neutrase ตรึงรูป ลงถึงระดับใดจึงจะได้เบียร์ที่มีค่าความขุ่นและความเสถียรของฟองเบียร์ตามต้องการ ตัวอย่างเช่น ถ้าต้องการให้เบียร์ที่ได้มีค่าความขุ่นไม่เกิน 600 FTU โดยที่ค่าซิกมาไม่ต่ำกว่า 200 จะต้องลดปริมาณ HMWP ในเบียร์ให้อยู่ในช่วง 80-110 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นต้น

5.7 ศึกษาสมบัติบางประการของตัวอย่างเบียร์ที่มีจำหน่ายในเชิงพาณิชย์

จากการวิเคราะห์ปริมาณ HMWP ค่าความขุ่น และค่าซิกมาของเบียร์ทั้งหมด 15 ตัวอย่าง ตามวิธีทดลองข้อ 4.8 ให้ผลการทดลองดังตารางที่ 5.17

ตารางที่ 5.17 ปริมาณ HMWP ค่าความขุ่น และค่าซิกมา ของตัวอย่างเบียร์ที่มีจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ 6 ตรา

ชื่อตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	ปริมาณ HMWP (มิลลิกรัม/ลิตร)	ค่าความขุ่น (FTU)	ค่าซิกมา
คลอสเตอร์	3	117.5	640	217.9
A	3	37.5	1400	209.7
B	2	67.5	1060	226.0
C	2	73.0	796	230.2
D	2	70.5	465	228.9
E	3	32.5	890	160.0

จากตารางที่ 5.17 เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบปริมาณ HMWP ค่าความขุ่น และค่าชิกมา ของตัวอย่างเบียร์ทุกตัวอย่าง จะเห็นว่าค่าทั้งสามดังกล่าวแปรเปลี่ยนไปโดยไม่มีความสัมพันธ์ที่ชัดเจน กล่าวคือ เบียร์บางตัวอย่างมีปริมาณ HMWP ต่ำ แต่มีค่าความขุ่น และค่าชิกมา ซึ่งหมายถึงความเสถียรของฟองเบียร์สูงกว่าตัวอย่างเบียร์ที่มีปริมาณ HMWP สูง เช่น เบียร์ตัวอย่าง E มีปริมาณ HMWP และค่าชิกมาต่ำที่สุด แต่มีค่าความขุ่นสูงกว่าตัวอย่าง C และ D ซึ่งมีปริมาณ HMWP สูงกว่า หรือเบียร์ตัวอย่าง A มีปริมาณ HMWP ใกล้เคียงกับเบียร์ตัวอย่าง E แต่กลับมีค่าความขุ่นสูงสุด เป็นต้น โดยทั่วไปแล้วเบียร์ที่มีปริมาณโปรตีนต่ำน่าจะมีความขุ่นและความเสถียรของฟองเบียร์ต่ำด้วย แต่จากผลการทดลองที่ได้สังเกตแนวโน้มดังกล่าวไม่ชัดเจน ทั้งนี้อาจอธิบายได้ดังนี้

เนื่องจากการเกิดตะกอนในเบียร์ซึ่งเป็นสาเหตุของความขุ่นนั้นเกิดจากการรวมตัวของโปรตีนกับสารประกอบพอลิฟีนอล และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดตะกอนในเบียร์ดังกล่าวประกอบด้วยโปรตีน 4 กลุ่ม ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1,000-10,000, 16,000, 19,000 และ 40,000 ดาลตัน โดยที่โปรตีนแต่ละกลุ่มมีความสามารถในการรวมตัวกับสารประกอบพอลิฟีนอลได้ดีต่างกัน กล่าวคือ โปรตีนกลุ่มที่มีน้ำหนักโมเลกุล 19,000 ดาลตัน มีความสามารถในการรวมตัวกับสารประกอบพอลิฟีนอลสูงที่สุด รองลงมาคือ กลุ่มที่มีน้ำหนักโมเลกุล 16,000, 40,000 และ 1,000-10,000 ดาลตัน ตามลำดับ (3) และวิธีวิเคราะห์ปริมาณ HMWP ในเบียร์โดย dye-binding method นั้นสามารถวิเคราะห์โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 4,000 ดาลตันขึ้นไป (30) ดังนั้นในกรณีที่ตัวอย่างเบียร์มีปริมาณโปรตีนทั้งสี่กลุ่มดังกล่าวแตกต่างกัน ย่อมมีผลทำให้ความขุ่นที่เกิดขึ้นแตกต่างกันไปด้วย กล่าวคือ เมื่อปริมาณโปรตีนที่วิเคราะห์ได้โดย dye-binding method เท่ากัน เบียร์ที่มีโปรตีนกลุ่มที่มีน้ำหนักโมเลกุล 19,000 ดาลตัน มาก จะทำให้เกิดความขุ่นได้ดีว่าเบียร์ที่มีโปรตีนในกลุ่มดังกล่าวน้อย หรือมีโปรตีนในกลุ่มที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1,000-10,000 ดาลตัน มาก เป็นต้น นั่นคือ เบียร์คนละตัวอย่างที่มีปริมาณ HMWP เท่ากัน ไม่จำเป็นต้องมีค่าความขุ่นใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ปริมาณและชนิดของสารประกอบพอลิฟีนอลที่มีอยู่ในเบียร์แต่ละตัวอย่างก็อาจแตกต่างกัน ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงทำให้ตัวอย่างเบียร์แต่ละชนิดมีปริมาณ HMWP ค่าความขุ่น และค่าชิกมา แตกต่างกันไป

สำหรับสาเหตุที่เป็นไปได้ซึ่งทำให้เบียร์แต่ละตัวอย่างมีปริมาณและชนิดของโปรตีน และสารประกอบพอลิฟีนอลแตกต่างกันคือ วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเบียร์ การใช้ยีสต์ต่างชนิดกันย่อมมีผลทำให้เบียร์ที่ได้มีปริมาณและชนิดของโปรตีนและสารประกอบพอลิฟีนอลต่างกัน นอกจากนี้

กระบวนการผลิตและวิธีการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ที่ต่างกันก็มีผลต่อปริมาณและชนิดของโปรตีนและสารประกอบพอลิฟีนอลในผลิตภัณฑ์เบียร์ที่ได้ อาทิ การใช้ตัวดูดซับในการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์นั้น ตัวดูดซับจะทำหน้าที่ดูดซับสารประกอบที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ซึ่งรวมทั้งโปรตีนและสารประกอบพอลิฟีนอล แต่การใช้เอนไซม์โปรติเอสนั้น เอนไซม์จะทำหน้าที่ย่อยสลายโปรตีนขนาดใหญ่ให้มีขนาดเล็กลง ซึ่งเอนไซม์ต่างชนิดกันก็มีความจำเพาะต่อสับสเตรทต่างกันอีกด้วย เป็นต้น ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงทำให้เบียร์แต่ละตัวอย่างมีปริมาณและชนิดของโปรตีนและสารประกอบพอลิฟีนอลแตกต่างกัน

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบค่าความขุ่น และค่าชิกมา ของเบียร์ตราคลอสเตอร์ ซึ่งผลิตโดย บริษัท ไทยอมฤต บริวเวอร์รี่ จำกัด และผ่านกระบวนการป้องกันการเกิดตะกอนโดยใช้ตัวดูดซับกับตัวอย่างเบียร์ที่ผ่านการป้องกันการเกิดตะกอนด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตริงรูป จากผลการทดลองข้อ 5.6.1 และ 5.6.2 (ตารางที่ 5.15 และ 5.16) จะเห็นว่าถ้าใช้เบียร์ตราคลอสเตอร์เป็นเกณฑ์ การป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตริงรูป จะให้ประสิทธิภาพดี คือได้เบียร์ที่มีค่าความขุ่น และค่าชิกมา ใกล้เคียงกับเบียร์ตราคลอสเตอร์ เมื่ออัตราการไหลของเบียร์ที่ผ่านเครื่องปฏิกรณ์ Neutrase ตริงรูป อยู่ในช่วงที่เหมาะสม กล่าวคือ กรณีที่ใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพซึ่งบรรจุ Neutrase ตริงรูปบนผ้าไนลอนขนาด 20x30 ตารางเซนติเมตร และอุณหภูมิของเครื่องปฏิกรณ์เท่ากับ 30$\pm$1 องศาเซลเซียส ช่วงอัตราการไหลที่ให้ผลดีคือ 100-200 มิลลิลิตร/นาที สำหรับเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพที่บรรจุ Neutrase ตริงรูปบนผ้าไนลอนขนาด 20 x 60 ตารางเซนติเมตร และอุณหภูมิของเครื่องปฏิกรณ์เท่ากับ 30 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส ถ้าพิจารณาเฉพาะค่าความขุ่นพบว่าให้ผลดีในทุกช่วงอัตราการไหล แต่ถ้าพิจารณาค่าชิกมาร่วมด้วยจะเห็นว่า อัตราการไหลของเบียร์ในช่วง 150-200 มิลลิลิตร/นาที เบียร์ที่ได้มีความเสถียรของฟองเบียร์ค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับเบียร์ตราคลอสเตอร์ ในกรณีที่ใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพซึ่งบรรจุ Neutrase ตริงรูปบนผ้าไนลอนขนาด 20 x 60 ตารางเซนติเมตร และอุณหภูมิของเครื่องปฏิกรณ์เท่ากับ 10 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส ช่วงอัตราการไหลของเบียร์ที่มีแนวโน้มให้ผลดีคือ 150-200 มิลลิลิตร/นาที

อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบค่าความขุ่น และค่าชิกมาของตัวอย่างเบียร์ที่มีจำหน่ายในเชิงพาณิชย์กับเบียร์ที่ผ่านการป้องกันการเกิดตะกอนด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตริงรูป (ตารางที่ 5.15 และ 5.16) จะเห็นว่าถ้าใช้ตัวอย่างเบียร์ที่มีจำหน่ายในเชิงพาณิชย์เป็นเกณฑ์ อาจกล่าวได้ว่า สามารถใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตริงรูปในการป้องกัน

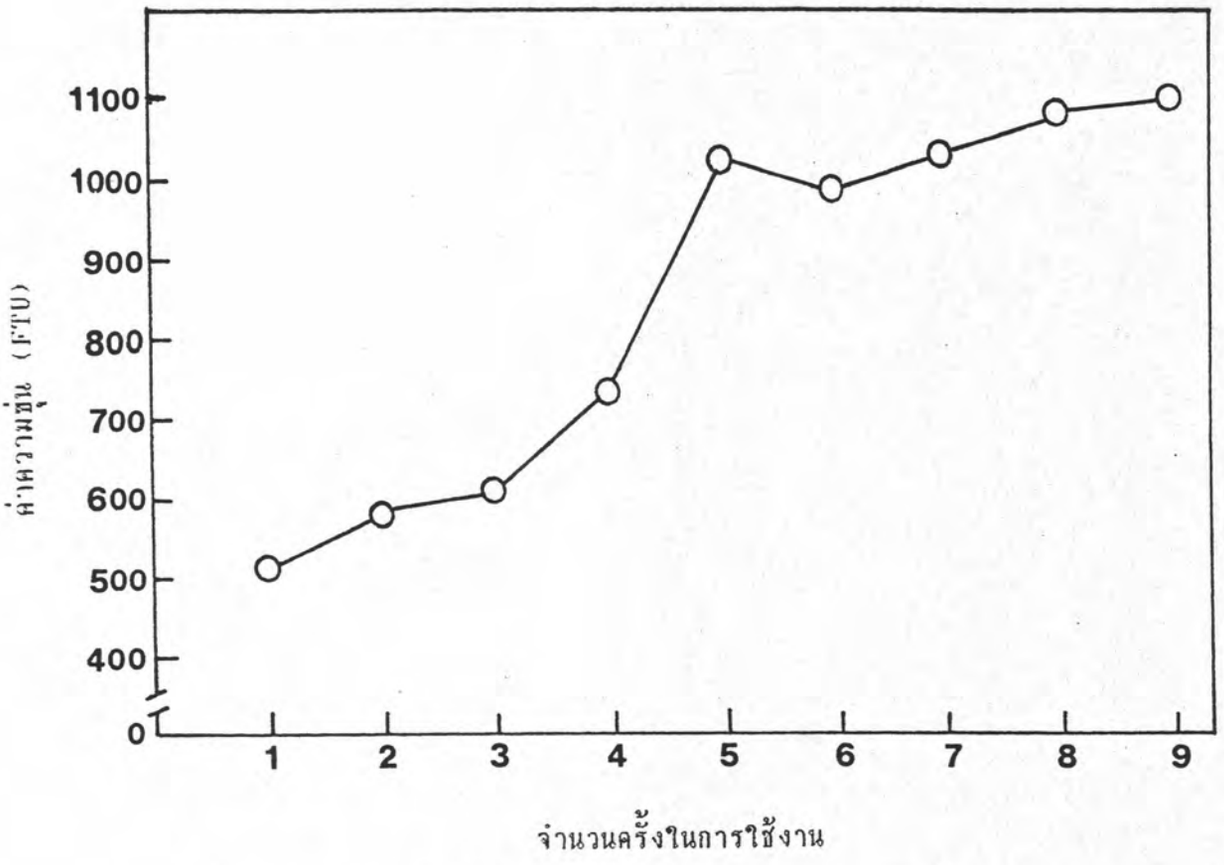
การเกิดตะกอนในเบียร์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ กล่าวคือ เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพที่บรรจุ Neutrase ตรึงรูปบนผ้าไนลอนขนาด 20 x 30 ตารางเซนติเมตร และอุณหภูมิของเครื่องปฏิกรณ์ 30 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส สามารถลดความขุ่นของเบียร์ลงจากเบียร์เริ่มต้น (control) ร้อยละ 26.3-57.3 และมีค่าชิกมา 207.4-224.0 สำหรับเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพที่บรรจุ Neutrase ตรึงรูปบนผ้าไนลอนขนาด 20 x 60 ตารางเซนติเมตร และอุณหภูมิของเครื่องปฏิกรณ์เท่ากับ 30 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส สามารถลดความขุ่นของเบียร์ลงจากเบียร์เริ่มต้นร้อยละ 55.3-72.1 โดยมีค่าชิกมา 194.1-217.2 และเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพที่บรรจุ Neutrase ตรึงรูปบนผ้าไนลอน ขนาด 20 x 60 ตารางเซนติเมตร และอุณหภูมิของเครื่องปฏิกรณ์เท่ากับ 10 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส สามารถลดความขุ่นของเบียร์ลงจากเบียร์เริ่มต้นร้อยละ 31.8-53.1 และมีค่าชิกมา 215.9-222.9

5.8 ศึกษาเสถียรภาพการใช้งานของ Neutrase ตรึงรูปในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

จากการทดลองผ่านเบียร์เข้าเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตรึงรูป อย่างต่อเนื่องรวม 9 ครั้ง ๆ ละ 500 มิลลิลิตร ด้วยอัตราการไหล 100 มิลลิลิตร/นาที และวัดความขุ่นของเบียร์ที่ได้ตามวิธีทดลองข้อ 4.9 ให้ผลการทดลองดังตารางที่ 5.18 และกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่นกับจำนวนครั้งในการใช้งานของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตรึงรูป ดังรูปที่ 5.20

ตารางที่ 5.18 ค่าความขุ่นของเบียร์ที่ผ่านเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตรึงรูปในแต่ละครั้ง

จำนวนครั้งในการใช้งานของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตรึงรูป	ความขุ่น (FTU)
เบียร์เริ่มต้น (control)	1580
1	515
2	585
3	610
4	739
5	1022
6	986
7	1029
8	1080
9	1100



รูปที่ 5.23 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่นของเบียร์กับจำนวนครั้งในการใช้งานของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตรึงรูป

จากรูปที่ 5.20 จะเห็นว่า เมื่อจำนวนครั้งในการใช้งานของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตรึงรูปเพิ่มขึ้น เบียร์ที่ได้มีค่าความขุ่นเพิ่มขึ้น นั่นคือ ประสิทธิภาพการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตรึงรูปลดลง เมื่อผ่านการใช้งานซ้ำหลาย ๆ ครั้ง ทั้งนี้เป็นผลเนื่องจากการเสียสภาพธรรมชาติของเอนไซม์ รวมทั้งอาจเกิดการหลุดของเอนไซม์จากตัวพยุง อย่างไรก็ตาม การใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตรึงรูปอย่างต่อเนื่องถึง 9 ครั้ง ที่อุณหภูมิของเครื่องปฏิกรณ์เท่ากับ 30 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส รวมปริมาตรเบียร์ทั้งหมด 4.5 ลิตร ยังสามารถลดความขุ่นของเบียร์จากเบียร์เริ่มต้นคิดเป็นร้อยละ 30.4 และถ้าอุณหภูมิของเครื่องปฏิกรณ์ในระหว่างใช้งานต่ำกว่านี้น่าจะทำให้เสถียรภาพการใช้งานของ Neutrase ตรึงรูปในเครื่องปฏิกรณ์ดียิ่งขึ้น เนื่องจากอุณหภูมิต่ำ Neutrase ตรึงรูปมีเสถียรภาพสูงกว่าที่อุณหภูมิสูง