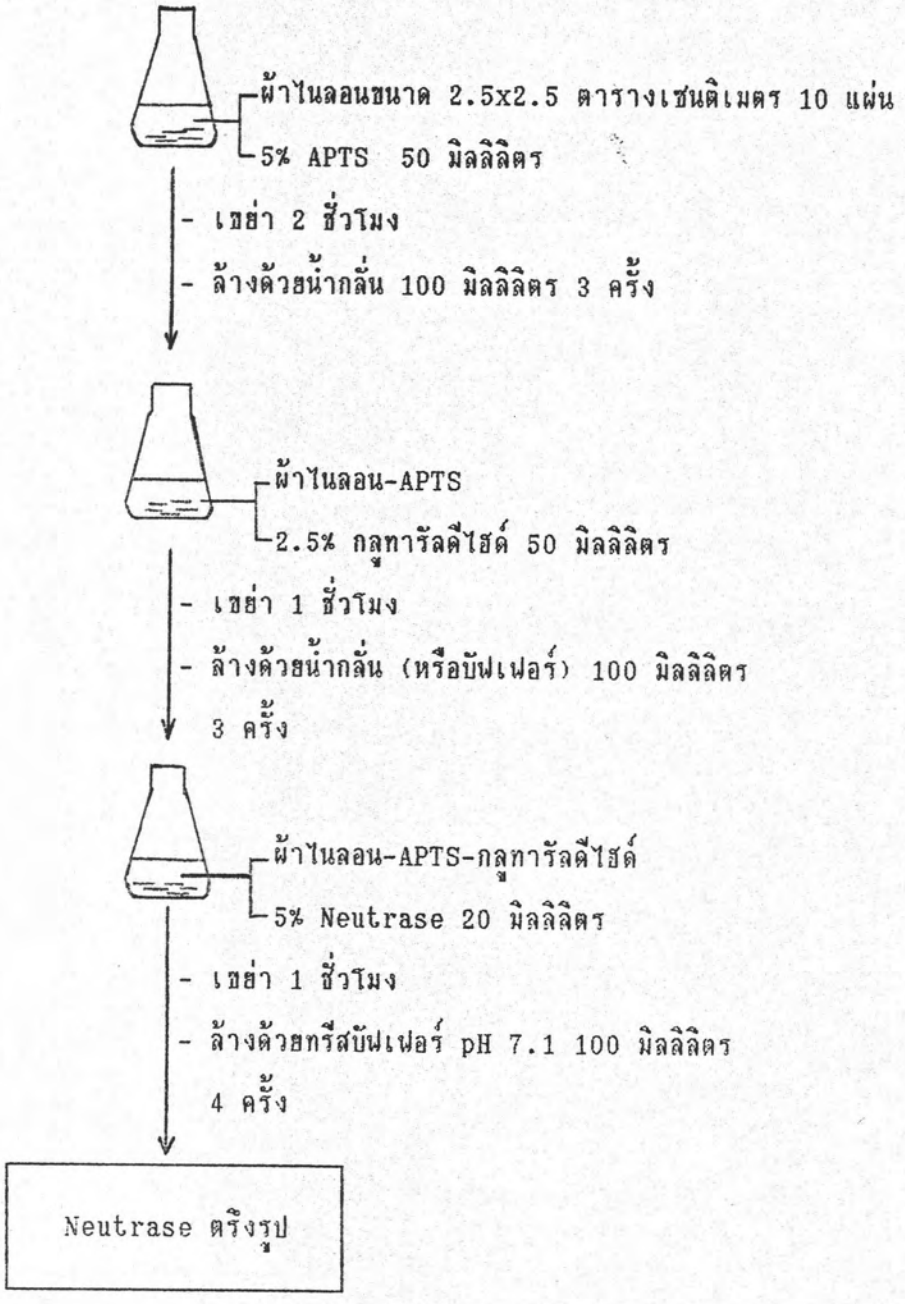
บทที่ 4

วิธีการทดลอง

4.1 วิธีเตรียม Neutrase ตรึงรูปบนผ้าไนลอน

การเตรียม Neutrase ตรึงรูปบนผ้าไนลอน ใช้วิธีเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์โดยมีสารละลาย ɣ-aminopropyltriethoxysilane (APTS) ทำหน้าที่เป็นสารกระตุ้นตัวพยุงและสารละลายกลูทารัลดีไฮด์ทำหน้าที่เป็นสารสร้างพันธะร่วม มีขั้นตอนการเตรียมดังนี้

นำผ้าไนลอนขนาด 2.5 x 2.5 ตารางเซนติเมตร ที่ผ่านการเตรียมขั้นต้นก่อนการตรึงรูปเอนไซม์แล้วจำนวน 10 แผ่น ในสารละลาย APTS ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร ปริมาณ 50 มิลลิลิตร มาเข้าเครื่องเขย่านาน 2 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร 3 ครั้ง เติมสารละลายกลูทารัลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 โดยปริมาตร ปริมาณ 50 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องเขย่านาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำกลั่น (หรือบัฟเฟอร์ในกรณีที่ใช้บัฟเฟอร์ในการเตรียมสารละลายกลูทารัลดีไฮด์) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร 3 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลาย Neutrase ใน 0.1 โมล/ลิตร ทรีสบัฟเฟอร์ pH 7.1 ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องเขย่านาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วยทรีสบัฟเฟอร์ pH 7.1 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร 4 ครั้ง ซึ่งขั้นตอนทั้งหมดดังกล่าวแสดงดังรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 แผนภูมิขั้นตอนการเตรียม Neutrase ตรึงรูปบนผ้าไนลอน แบบเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์

4.2 การเตรียมผ้าไนลอนขั้นต้นก่อนการตริงรูปเอนไซม์

ศึกษาผลของความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกและอุณหภูมิต่อการย่อยผ้าไนลอนบางส่วน โดยแปรความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก 3 ระดับ คือ 2, 3 และ 4 นอร์มัล แปรอุณหภูมิ 4 ระดับ คือ อุณหภูมิห้อง, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส

นำผ้าไนลอนขนาด 2.5 x 2.5 ตารางเซนติเมตร จำนวน 10 แผ่น ในกรดไฮโดร-คลอริกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังกล่าว ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ไปเขย่าใน shaking water bath ที่อุณหภูมิต่าง ๆ นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นจนหมดกรด ล้างด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร 1 ครั้ง นำไปอบแห้งที่ 100 องศาเซลเซียส 15 นาที

นำผ้าไนลอนที่ได้จากทุกภาวะไปใช้ตริงรูปเอนไซม์ ตามวิธีในข้อ 4.1 และวัดแอคติวิตี ของ Neutrase ตริงรูปตามวิธีในภาคผนวก ก-1.3 เลือกภาวะของการย่อยผ้าไนลอนบางส่วน ที่เหมาะสมสำหรับการตริงรูป Neutrase โดยวางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลแบบ Factorial completely randomized design เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

ภาวะที่เหมาะสมนี้จะใช้ในการเตรียมผ้าไนลอนขั้นต้น สำหรับเตรียม Neutrase ตริงรูป ตั้งแต่ข้อ 4.3 เป็นต้นไป

4.3 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียม Neutrase ตริงรูปบนผ้าไนลอน

ใช้ผ้าไนลอนที่ผ่านการย่อยบางส่วนด้วยกรดไฮโดรคลอริกตามภาวะที่เหมาะสม ซึ่งได้จากการทดลองข้อ 4.2 ในการเตรียม Neutrase ตริงรูป

4.3.1 กำหนดความเข้มข้นและ pH ของสารละลาย APTS ที่เหมาะสม

เตรียม Neutrase ตริงรูปตามวิธีในข้อ 4.1 โดยแปรความเข้มข้นของสาร ละลาย APTS 5 ระดับ คือ 0, 1, 3, 5 และ 7 โดยปริมาตร แปร pH ของสารละลาย APTS 3 ระดับ คือ 5, 7 และ 9 โดยปรับ pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2 นอร์มัล

วัดแอคติวิตีของ Neutrase ตริงรูปที่ได้ตามวิธีในภาคผนวก ก-1.3 เลือก ความเข้มข้น และ pH ของสารละลาย APTS ที่เหมาะสมสำหรับการเตรียม Neutrase ตริงรูป โดยวางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลแบบ Factorial completely randomized

design เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

4.3.2 กำหนดความเข้มข้น และ pH ของสารละลายกลูทารัลดีไฮด์ที่เหมาะสม

เตรียม Neutrase ตริงรูป ตามวิธีในข้อ 4.1 โดยกำหนดความเข้มข้นและ pH ของสารละลาย APTS ให้คงที่ตามภาวะที่ได้จากการทดลองข้อ 4.3.1 และแปรความเข้มข้นของสารละลายกลูทารัลดีไฮด์ในบัฟเฟอร์ 4 ระดับ คือ ร้อยละ 1, 3, 5 และ 7 โดยปริมาตร แปร pH ของบัฟเฟอร์ที่ใช้เป็นตัวทำละลาย 2 ระดับ คือ 7 และ 9 โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และบอเรตบัฟเฟอร์ ตามลำดับ

วัดแอคติวิตีของ Neutrase ตริงรูปที่ได้ตามวิธีในภาคผนวก ก-1.3 เลือกความเข้มข้นและ pH ของสารละลายกลูทารัลดีไฮด์ที่เหมาะสมสำหรับการเตรียม Neutrase ตริงรูป โดยวางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลแบบ Factorial completely randomized design เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

4.3.3 กำหนดความเข้มข้นของสารละลาย Neutrase ที่เหมาะสมในการตริงรูป

เตรียม Neutrase ตริงรูป ตามวิธีในข้อ 4.1 โดยกำหนดความเข้มข้นและ pH ของสารละลาย APTS และสารละลายกลูทารัลดีไฮด์ให้คงที่ตามภาวะที่ได้จากการทดลองข้อ 4.3.1 และ 4.3.2 ตามลำดับ แปรความเข้มข้นของสารละลาย Neutrase ใน 0.1 โมล/ลิตร ทรีสบัฟเฟอร์ pH 7.1 ในช่วงร้อยละ 0.1 ถึง 3 โดยปริมาตร

วัดแอคติวิตีของ Neutrase ตริงรูปที่ได้ตามวิธีในภาคผนวก ก-1.3 และเลือกความเข้มข้นของสารละลาย Neutrase ที่ให้เอนไซม์ตริงรูปที่มีแอคติวิตีสูงสุดจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าแอคติวิตีของ Neutrase ตริงรูปกับความเข้มข้นของสารละลาย Neutrase

4.4 การศึกษาโครงสร้างของ Neutrase ตริงรูป เปรียบเทียบกับโครงสร้างของผ้าไนลอนด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอน (22)

4.4.1 ผ้าไนลอนและผ้าไนลอนที่ผ่านการย่อยบางส่วนด้วยกรดไฮโดรคลอริก

เคลือบทองผ้าไนลอนและผ้าไนลอนที่ผ่านการย่อยบางส่วนด้วยกรดไฮโดรคลอริกตามภาวะที่ได้จากการทดลองข้อ 4.2 ขนาด 2.5 x 2.5 ตารางเซนติเมตร ด้วยเครื่อง fine coat นาน 5 นาที ตรวจดูโครงสร้างด้วยเครื่อง Scanning electron microscope (SEM) ที่กำลังขยาย 200 และ 2000 เท่า สำหรับผ้าไนลอนเริ่มต้น และที่ 2000 เท่า สำหรับผ้าไนลอนที่ผ่านการย่อยบางส่วนด้วยกรดไฮโดรคลอริก

4.4.2 Neutrase ตริงรูปบนผ้าไนลอน

แช่ Neutrase ตริงรูปบนผ้าไนลอนขนาด 2.5 x 2.5 ตารางเซนติเมตร ในสารละลายกลูทารัลดีไฮด์ ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร นาน 3 ชั่วโมง เทสารละลายกลูทารัลดีไฮด์ออก จากนั้นแช่ในเอธิลแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 50, 70 และ 95 ความเข้มข้นละ 15 นาที ตามลำดับ อบ Neutrase ตริงรูปให้แห้งสนิท เคลือบทองด้วยเครื่อง fine coat นาน 5 นาที ตรวจดูโครงสร้างด้วยเครื่อง SEM ที่กำลังขยาย 2000 เท่า

4.5 การศึกษาสมบัติเกี่ยวกับจลนพลศาสตร์ของ Neutrase ตริงรูป เปรียบเทียบกับ Neutrase อิสระ

4.5.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์

วัดแอคติวิตีของ Neutrase อิสระตามวิธีในภาคผนวก ก-1.2 และ Neutrase ตริงรูป ตามวิธีในภาคผนวก ก-1.3 โดยบ่ม (incubate) เอนไซม์กับสับสเตรทที่อุณหภูมิห้อง, 40, 45, 50, 55, 60 และ 70 องศาเซลเซียส

เปรียบเทียบช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ทั้งสองโดยใช้กราฟความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละแอคติวิตีสัมพัทธ์กับอุณหภูมิ

4.5.2 pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์

เตรียมสับสเตรทเคซีนความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยละลายเคซีน 0.5 กรัม ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ซึ่งเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล 1 มิลลิลิตร ปรับ pH ของสารละลายให้เป็น 7.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

บัฟเฟอร์ที่ใช้ควบคุม pH ของสารละลายปฏิกิริยาคือ แอซีเตทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมล/ลิตร pH 5-6 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมล/ลิตร pH 6-8 และทรีสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมล/ลิตร pH 7-9

4.5.2.1 Neutrase อิสระ

บ่มสับสเตรท 4.5 มิลลิลิตร กับบัฟเฟอร์ที่ pH ต่าง ๆ 1 มิลลิลิตร ใน shaking water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5 นาที เติมสารละลาย Neutrase ใน 0.1 โมล/ลิตร ทรีสบัฟเฟอร์ pH 7.1 ความเข้มข้น 0.8 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มต่อไปอีก 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายกรดไตรคลอโรแอซีติกความเข้มข้น 0.3 โมล/ลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 3500 รอบ/นาที นาน 10 นาที กรองส่วนใสด้วยกระดาษกรอง (Whatman No. 2) ก่อนนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร

4.5.2.2 Neutrase ตรึงรูป

บ่มสับสเตรท 4.5 มิลลิลิตร กับบัฟเฟอร์ที่ pH ต่าง ๆ 1.5 มิลลิลิตร ใน shaking water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5 นาที ใส่ Neutrase ตรึงรูปบนผ้าไนลอนขนาด 2.5 x 2.5 ตารางเซนติเมตร ปริมาณ 2 แผ่น บ่มต่อไปอีก 20 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายกรดไตรคลอโรแอซีติกความเข้มข้น 0.3 โมล/ลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร รินสารละลายปฏิกิริยาไปหมุนเหวี่ยงที่ 3500 รอบ/นาที นาน 10 นาที กรองส่วนใสด้วยกระดาษกรอง (Whatman No.2) ก่อนนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร

เปรียบเทียบช่วง pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ทั้งสอง โดยใช้กราฟความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละแอคติวิตีสัมพัทธ์กับ pH

4.5.3 ศึกษาค่าคงที่ Michaelis (Michaelis constant, K_m)

หาแอคติวิตีของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 45 และ 55 องศาเซลเซียส ตามวิธีในภาคผนวก ก-1.2 สำหรับ Neutrase อิสระ และภาคผนวก ก-1.3 สำหรับ Neutrase ตรึงรูป โดยใช้สับสเตรทเคซีนที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ คือ $1x10^{-3}$, $2x10^{-3}$, $4x10^{-3}$, $8x10^{-3}$ และ $16x10^{-3}$ มิลลิโมล/ลิตร (น้ำหนักโมเลกุลของเคซีนเท่ากับ 375,000 ดาลตัน) หาค่า K_m โดยการพลอตแบบ Lineweaver Burk plot

4.5.4 ผลของ pH ต่อความเสถียรของเอนไซม์ (pH stability)

บ่ม Neutrase อิสระ และ Neutrase ตรึงรูป ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH ต่าง ๆ คือ 0.1 โมล/ลิตร แอซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.0 และ 1.0 โมล/ลิตร ทรีสบัฟเฟอร์ pH 7.1 และ 8.9 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 15, 30, 60, 120 และ 160 นาที จากนั้นนำมาวัดแอคติวิตีที่เหลือ

เปรียบเทียบผลของ pH ต่อความเสถียรของเอนไซม์ทั้งสองด้วยกราฟความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละแอคติสัมพัทธ์กับเวลาในการบ่มที่ภาวะต่าง ๆ ดังกล่าว

4.5.5 เสถียรภาพของเอนไซม์ในระหว่างการเก็บและค่าครึ่งชีวิต

เก็บ Neutrase อิสระ (64.3 ยูนิต/มิลลิลิตร) และ Neutrase ตรึงรูป (62.4 ยูนิต/กรัม) ในบัฟเฟอร์ที่มี pH ที่เอนไซม์ มีเสถียรภาพสูงสุดจากการทดลองข้อ 4.5.4 ที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิตู้เย็น (8-10 องศาเซลเซียส) วัดแอคติวิตีที่เหลือของเอนไซม์ทั้งสองที่ระยะเวลาการเก็บต่าง ๆ และหาค่าครึ่งชีวิตโดยพิจารณาระยะเวลาการเก็บที่ทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงร้อยละ 50 ของแอคติวิตีเริ่มต้น จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละแอคติวิตีสัมพัทธ์กับระยะเวลาในการเก็บ

4.5.6 ค่าแอคติวิตีจำเพาะ (specific activity) ของเอนไซม์

วัดแอคติวิตีของสารละลาย Neutrase ที่มีความเข้มข้น 0.4 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และ Neutrase ตรึงรูป ปริมาณ 0.5 กรัม ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

หาปริมาณโปรตีนของ Neutrase อิสระ และ Neutrase ตรึงรูป โดยวิธี macro Kjeldahl distillation (23) คำนวณร้อยละปริมาณโปรตีนโดยการคูณร้อยละปริมาณไนโตรเจนด้วยแฟคเตอร์ 6.25 จากนั้นคำนวณหาค่าแอคติวิตีจำเพาะจากสูตรต่อไปนี้

$$\text{แอคติวิตีจำเพาะ} = \frac{\text{จำนวนหน่วยเอนไซม์ (ยูนิต)}}{\text{ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม)}}$$

4.5.7 ศึกษาประสิทธิภาพการทำปฏิกิริยาซ้ำของ Neutrase ตรึงรูป

วัดแอคติวิตีของ Neutrase ตรึงรูป ที่อุณหภูมิ 30 และ 55 องศาเซลเซียส ตามวิธีในภาคผนวก ก-1.3 ซ้ำหลาย ๆ ครั้ง โดยแยก Neutrase ตรึงรูป ออกจากสับสเตรทก่อนหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดไตรคลอโรแอซีติก จากนั้นล้าง Neutrase ตรึงรูปด้วยทรีสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมล/ลิตร pH 7.1 ทุกครั้งก่อนนำไปหาแอคติวิตีซ้ำในครั้งต่อไป

เปรียบเทียบประสิทธิภาพการทำปฏิกิริยาซ้ำของ Neutrase ตรึงรูป ที่อุณหภูมิทั้งสอง โดยใช้กราฟความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละแอคติวิตีสัมพัทธ์กับจำนวนครั้งในการทำปฏิกิริยา

4.6 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการย่อยสลายโปรตีนในเบียร์ด้วย Neutrase ตรึงรูป

นำขวดรูปชมพู่ที่บรรจุตัวอย่างเบียร์ขวดละ 5 มิลลิลิตร ไปบ่มใน shaking water bath ที่อุณหภูมิ 10, 30 และ 50 องศาเซลเซียส 5 นาที ใส่ Neutrase ตรึงรูปบนผ้าไนลอนขนาด 2.5x2.5 ตารางเซนติเมตร ขวดละ 3 แผ่น บ่มต่อไปที่อุณหภูมิดังกล่าวเป็นเวลา 30 นาที แยก Neutrase ตรึงรูปออก นำเบียร์ที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณ high molecular weight proteins (HMWP) ที่เหลือโดยวิธี dye-binding method ตามรายละเอียดในภาคผนวก ก-2

4.7 ศึกษาการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตรึงรูป

เครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์ตรึงรูปที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นแบบ spiral membrane reactor (24) ซึ่งประกอบด้วยคอลัมน์พลาสติกใสสองชั้น ชั้นนอกสำหรับควบคุมอุณหภูมิโดยใช้น้ำ ชั้นในสำหรับบรรจุ Neutrase ตรึงรูปบนผ้าไนลอน และเป็นส่วนที่ให้เบียร์ไหลผ่าน ดังรายละเอียดในภาคผนวก ก-6

4.7.1 ผลของปริมาณ Neutrase ตริงรูป ในเครื่องปฏิกรณ์ต่อการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์

ศึกษาการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์โดยแปรปริมาณ Neutrase ตริงรูปในเครื่องปฏิกรณ์ด้วยการใช้ผ้าไนลอน 2 ขนาด คือ 20 x 30 และ 20 x 60 ตารางเซนติเมตร แปรอัตราการไหลของเบียร์ที่ผ่านเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตริงรูป ในช่วง 25-200 มิลลิลิตร/นาที โดยกำหนดปริมาตรของเบียร์สำหรับแต่ละอัตราการไหลคงที่เท่ากับ 500 มิลลิลิตร และกำหนดเวลาในการซ้ำรอบ (recycle) 1 ชั่วโมง ควบคุมอุณหภูมิของเครื่องปฏิกรณ์ให้คงที่ที่ 30 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส

เก็บตัวอย่างเบียร์ที่ได้จากการทดลองทุกภาวะ ๆ 3 ชุด ดังนี้

ชุดที่ 1 : เก็บตัวอย่างเบียร์ 5 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองชนิดฝาเกลียว สำหรับหาปริมาณ HMWP

ชุดที่ 2 : เก็บตัวอย่างเบียร์ 10 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองชนิดฝาเกลียว ภาวะละ 2 หลอด สำหรับวัดความขุ่น

ชุดที่ 3 : เก็บตัวอย่างเบียร์ 330 มิลลิลิตร ใส่ขวดบรรจุเบียร์ชนิดฝาจีบ สำหรับวัดความเสถียรของฟองเบียร์

นำหลอดทดลองและขวดบรรจุตัวอย่างเบียร์ทั้งหมด ซึ่งปิดฝาเรียบร้อยแล้วมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นถึงอุณหภูมิห้อง จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณ HMWP ของตัวอย่างเบียร์ชุดที่ 1 ตามวิธีในภาคผนวก ก-2 วัดความขุ่นของตัวอย่างเบียร์ชุดที่ 2 ตามวิธีในภาคผนวก ก-3 และวัดความเสถียรของฟองเบียร์ในรูปของค่าซิกมา (sigma value) สำหรับตัวอย่างเบียร์ชุดที่ 3 ตามวิธีในภาคผนวก ก-4 เปรียบเทียบผลของปริมาณ Neutrase ตริงรูป ต่อการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ โดยใช้กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าทั้งสามดังกล่าวกับอัตราการไหลของเบียร์

4.7.2 ศึกษาการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตริงรูป ที่อุณหภูมิต่ำ

แปรอัตราการไหลของเบียร์ในเครื่องปฏิกรณ์ที่มี Neutrase ตริงรูปบนผ้าไนลอนขนาด 20 x 60 ตารางเซนติเมตร ในช่วง 25-200 มิลลิลิตร/นาที กำหนดปริมาตรของเบียร์สำหรับแต่ละอัตราการไหลเท่ากับ 500 มิลลิลิตร และเวลาในการซ้ำรอบ 1 ชั่วโมง

โดยควบคุมอุณหภูมิของเครื่องปฏิกรณ์ให้คงที่ที่ 10 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส

เก็บตัวอย่างเบียร์ที่ได้จากการทดลองภาวะละ 3 ชุด และวิเคราะห์สมบัติต่าง ๆ เช่นเดียวกับข้อ 4.7.1 ทุกประการ เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ HMWP ค่าความขุ่น และความเสถียรของฟองเบียร์ กับอัตราการไหลของเบียร์

4.8 ศึกษาสมบัติบางประการของตัวอย่างเบียร์ที่มีจำหน่ายในเชิงพาณิชย์

สุ่มตัวอย่างเบียร์บรรจุกระป๋อง 5 ตรา ๆ ละ 2-3 ตัวอย่าง และเบียร์ดราคลอสเตอร์ 3 ตัวอย่าง เปิดฝาและใช้จุกสำลีปิดแทน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 8-10 องศาเซลเซียส 5 วัน นำตัวอย่างเบียร์ทั้งหมดมาวิเคราะห์ปริมาณ HMWP วัดความขุ่นและความเสถียรของฟองเบียร์ ตามวิธีในภาคผนวก ก-2, ก-3 และ ก-4 ตามลำดับ

4.9 ศึกษาเสถียรภาพการใช้งานของ Neutrase ตรึงรูปในเครื่องปฏิกรณ์

ผ่านเบียร์ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เข้าเครื่องปฏิกรณ์ที่บรรจุ Neutrase ตรึงรูปบนผ้าไนลอนขนาด 20 x 60 ตารางเซนติเมตร ด้วยอัตราการไหล 100 มิลลิลิตร/นาที กำหนดเวลาในการชำรอบ 1 ชั่วโมง และควบคุมอุณหภูมิของเครื่องปฏิกรณ์ให้คงที่ที่ 30 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างเบียร์ที่ได้ 30 มิลลิลิตร สำหรับวัดความขุ่น ตามวิธีในภาคผนวก ก-3 เทเบียร์ที่เหลือออกจากเครื่องปฏิกรณ์ทั้งหมด จากนั้นผ่านเบียร์ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เข้าเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตรึงรูป ชำเดิมในภาวะเหมือนเดิม ทำการทดลองซ้ำเช่นเดียวกันนี้โดยไม่ต้องเปลี่ยน Neutrase ตรึงรูปที่บรรจุในเครื่องปฏิกรณ์รวม 9 ครั้ง ซึ่งปริมาตรของเบียร์ที่ใช้ทั้งหมดเท่ากับ 4.5 ลิตร วัดความขุ่นของเบียร์ที่ได้จากการทดลองทั้งหมด เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่นของเบียร์กับจำนวนครั้งในการใช้งานของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตรึงรูป