บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 กรรมวิธีการผลิตเบียร์

วัตถุดิบที่สำคัญในการผลิตเบียร์มีดังนี้

1. ข้าวมอลท์ ได้จากข้าวบาร์เลย์ซึ่งเป็นธัญพืชที่เหมาะสำหรับผลิตเบียร์ นอกจากนี้ยังมีธัญพืชชนิดอื่น ๆ ที่สามารถใช้ร่วมกับข้าวบาร์เลย์ คือ ข้าวโพด ข้าวสาลี และข้าวโอ๊ต เป็นต้น

2. ฮอพส์ ในการผลิตเบียร์จะผสมดอกฮอพส์เพื่อให้เบียร์มีกลิ่นรสเฉพาะที่ดี

3. ยีสต์ ยีสต์ที่ใช้ในการผลิตเบียร์จะเป็นยีสต์สายพันธุ์เฉพาะตัวอย่างของยีสต์ที่นิยมใช้ได้แก่ *Saccharomyces carlsbergensis*

4. น้ำ น้ำที่ใช้ในการผลิตเบียร์จะต้องผ่านการปรับสภาพให้มีแร่ธาตุต่าง ๆ ในสัดส่วนที่พอเหมาะ ซึ่งจะมีผลต่อคุณภาพของเบียร์ที่ได้

5. วัตถุดิบอื่น ๆ ที่ใช้ในการปรุงแต่งเบียร์ เช่น น้ำตาล วิตามินซี เป็นต้น

กรรมวิธีการผลิตเบียร์โดยทั่วไปประกอบด้วย 6 ขั้นตอนใหญ่ ๆ คือ (2)

1. การเตรียมข้าวมอลท์ (Malting)

โดยการแช่เมล็ดข้าวบาร์เลย์ในน้ำที่อุณหภูมิประมาณ 10-15 องศาเซลเซียส แล้วนำมาเพาะโดยควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ระหว่าง 15-21 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน จากนั้นอบให้แห้งจนมีความชื้นประมาณร้อยละ 5 ข้าวมอลท์ที่ได้จะเป็นแหล่งของเอนไซม์อะมิเลส (amylase) และโปรติเอส (protease)

2. การบดข้าวมอลท์ (Mashing)

วัตถุประสงค์ของขั้นตอนนี้คือ เพื่อให้สารประกอบต่าง ๆ ในข้าวมอลท์ละลายออกมาได้ดี ทำให้เกิดการย่อยสลายแป้งและน้ำตาลโมเลกุลใหญ่ให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเล็กลงโดยเอนไซม์อะมิเลส และเกิดการย่อยสลายโปรตีนโดยเอนไซม์โปรติเอส ขั้นตอนนี้ทำได้โดยบด

ข้าวมอลท์ผสมกับน้ำที่อุณหภูมิ 38-50 องศาเซลเซียส และเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นเป็น 65-70 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ในการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นไปถึงประมาณ 75 องศาเซลเซียส เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ทิ้งไว้ให้กากหรือตะกอนที่ไม่ละลายน้ำนอนก้น ของเหลวที่ได้เรียกว่า เวิร์ท (wort)

3. การต้มส่วนผสมของเวิร์ทกับฮอพส์ (Boiling the wort with hops)

เติมดอกฮอพส์ลงในเวิร์ท แล้วต้มให้เดือดประมาณ 2.5 ชั่วโมง จากนั้นกรองเอากากดอกฮอพส์และตะกอนออก ล้างกากและตะกอนด้วยน้ำร้อนเทรวมกับเวิร์ทที่กรองได้

วัตถุประสงค์ในการต้มส่วนผสมของเวิร์ทกับฮอพส์ คือ

1) เพื่อให้มีความเข้มข้นสูงขึ้น

2) เพื่อฆ่าเชื้อโรค

3) เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

4) เพื่อสกัดเอาสารประกอบต่าง ๆ จากดอกฮอพส์ ได้แก่ สารที่ให้กลิ่นรส รวมทั้งสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

5) เพื่อตกตะกอนโปรตีนและสารโมเลกุลใหญ่ชนิดอื่น

6) เพื่อให้น้ำตาลบางส่วนเกิดปฏิกิริยา caramelization

4. การหมัก (Fermentation)

โดยการเติมยีสต์ลงในเวิร์ทที่เย็นแล้ว และควบคุมอุณหภูมิในขณะเกิดกระบวนการหมักให้เหมาะสม โดยทั่วไปอุณหภูมิที่ใช้จะอยู่ในช่วง 3-14 องศาเซลเซียส และใช้เวลาในการหมักประมาณ 8-14 วัน

ในระหว่างกระบวนการหมักนี้ยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลในเวิร์ทให้เป็นแอลกอฮอล์และกาซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้อาจมีกลีเซอรอล (glycerol) และกรดแอซีติกเกิดขึ้นเล็กน้อย โปรตีนและอนุพันธ์ของไขมันบางชนิดจะเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นแอลกอฮอล์โมเลกุลใหญ่ (higher alcohol) และกรดบางชนิด นอกจากนี้ยังเกิดการรวมตัวของแอลกอฮอล์กับกรดอินทรีย์ได้เป็นสารประกอบอะโรมาติกเอสเทอร์ (aromatic ester)

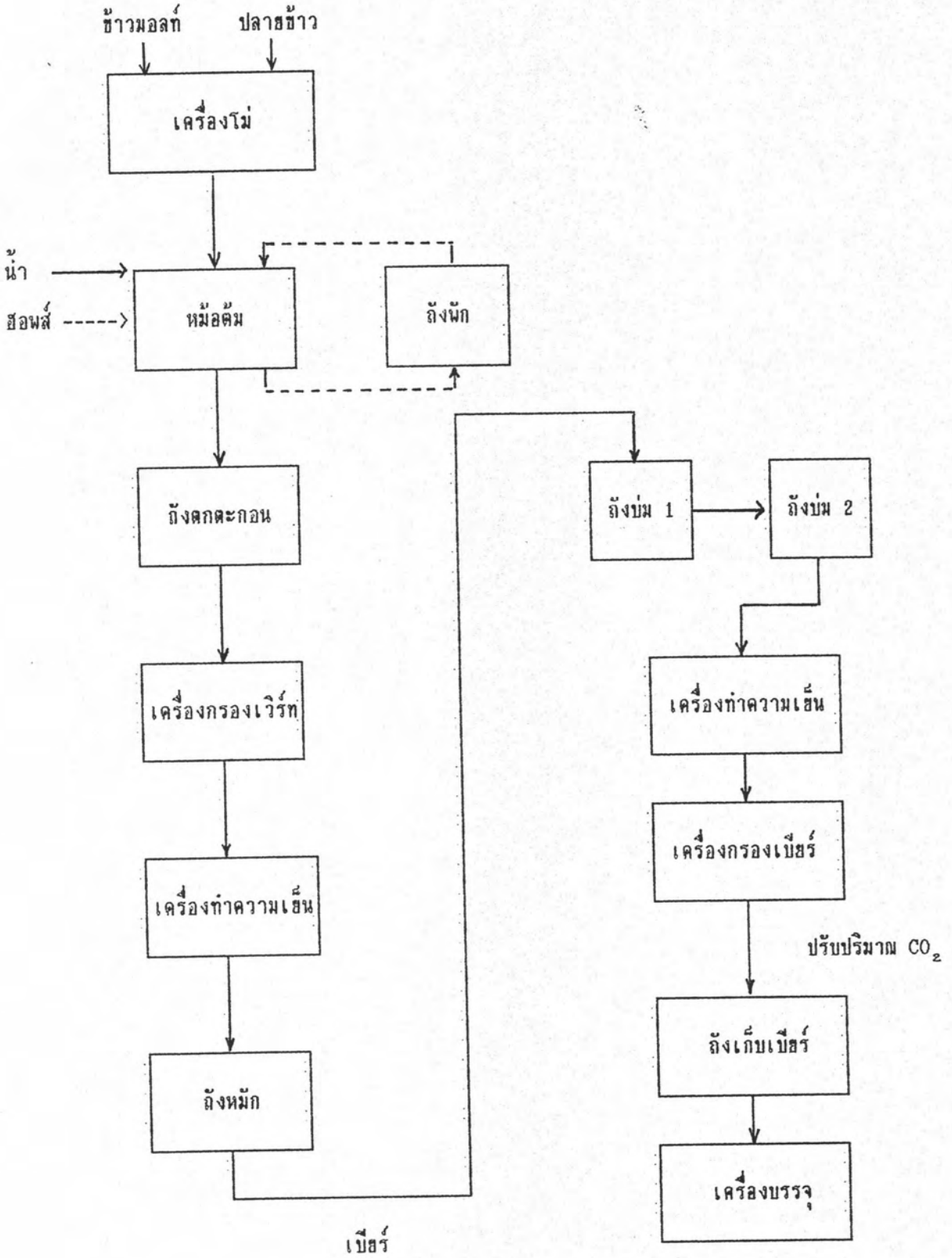
5. การบ่ม (Aging or Maturing)

เป็นการนำเบียร์ที่ผลิตได้ใหม่ ๆ ไปบ่ม โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 0 องศาเซลเซียส อาจใช้เวลาในการบ่มนานหลายสัปดาห์หรือหลายเดือน ซึ่งในระหว่างนี้จะเกิดการตกตะกอนของโปรตีน ยีสต์ และสารประกอบอื่น ๆ ที่ไม่ต้องการ ทำให้เบียร์มีลักษณะใสขึ้น รสชาติกลมกล่อม มีกลิ่นรสเฉพาะที่ดี

6. ขั้นตอนสุดท้าย (Finishing)

หลังจากบ่มเบียร์จนได้ที่แล้วจะปรับระดับของกาซคาร์บอนไดออกไซด์ในเบียร์ให้มีปริมาณประมาณร้อยละ 0.45-0.52 จากนั้นลดอุณหภูมิให้เย็นลง และผ่านขั้นตอนการกรอง รวมทั้งขั้นตอนการทำให้เบียร์ใส พร้อมทั้งบรรจุใส่ขวด หรือภาชนะที่เหมาะสมต่อไป

รูปที่ 2.1 เป็นแผนภูมิกรรมวิธีผลิตเบียร์โดยสังเขปของ บริษัทไทยอมฤต บริวเวอร์รี่ จำกัด โดยเริ่มจากข้าวมอลท์และปลายข้าวส่วนที่ 1 ถูกลำเลียงเข้าสู่เครื่องโม่เพื่อบดให้ละเอียด จากนั้นผ่านเข้าสู่หม้อต้ม ส่วนผสมที่ผ่านการต้มจะเก็บไว้ในถังพัก ข้าวมอลท์และปลายข้าวส่วนที่ 2 เข้าสู่เครื่องโม่ แล้วผ่านเข้าสู่หม้อต้มโดยผสมกับส่วนผสมจากถังพักพร้อมกับเติมดอกฮอพส์ ส่วนผสมที่ผ่านการต้มทั้งหมดจะเข้าสู่ถังตกตะกอน ของเหลวที่ได้เรียกว่า เวิร์ท ซึ่งจะผ่านเครื่องกรอง เครื่องทำความเย็น ก่อนที่จะเข้าสู่ถังหมัก เบียร์ที่ได้จะถูกเก็บบ่มไว้ในถังบ่มที่ 1 และถังบ่มที่ 2 จนได้ที่แล้วจึงผ่านการกรอง ปรับปริมาณของกาซคาร์บอนไดออกไซด์ แล้วเข้าสู่ถังเก็บเบียร์เพื่อรอการบรรจุต่อไป



รูปที่ 2.1 แผนภูมิกรรมวิธีผลิตเบียร์โดยสังเขปของบริษัท ไทยอมฤต บริวเวอร์รี่ จำกัด

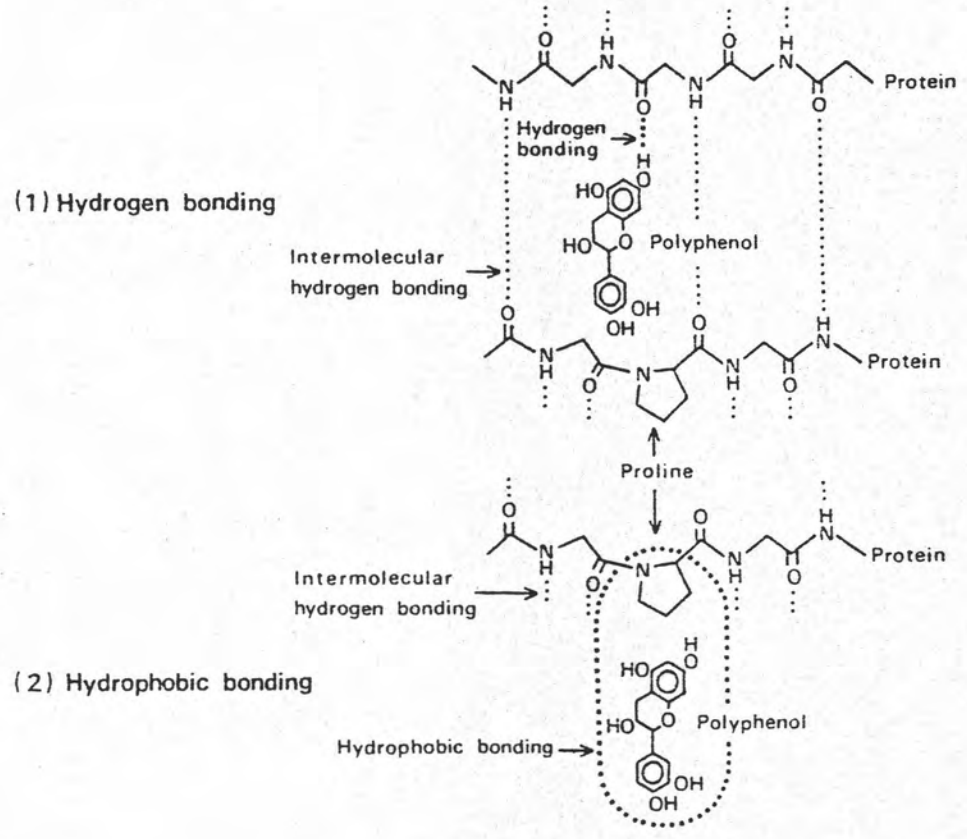
2.2 การเกิดตะกอนในเบียร์ (Chill-haze formation in beer)

เบียร์ที่ไม่ได้ผ่านขั้นตอนการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ เมื่อผลิตได้ใหม่ ๆ แม้ว่ามีลักษณะใส แต่เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ ๆ ระยะเวลาหนึ่งจะเกิดความขุ่นขึ้นในเบียร์ ทั้งนี้เนื่องจากในเบียร์มีสารประกอบต่าง ๆ ละลายอยู่มากมาย เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต สารประกอบพอลิฟีนอล (polyphenolic compounds) วิตามิน รวมทั้งสารให้กลิ่นรสต่าง ๆ เป็นต้น สารประกอบที่เป็นสาเหตุสำคัญในการทำให้เกิดตะกอนในเบียร์ ได้แก่ โปรตีน และสารประกอบพอลิฟีนอล ซึ่งสารประกอบทั้งสองนี้จะรวมตัวกันเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงขึ้น และมีความสามารถในการละลายลดลงที่อุณหภูมิต่ำ ๆ จึงเกิดเป็นตะกอนขึ้นในเบียร์ ทำให้เบียร์มีลักษณะขุ่น

Asano และคณะ (3) ศึกษาองค์ประกอบในตะกอนเบียร์ที่แยกได้ พบว่าประกอบด้วยโปรตีนร้อยละ 31-50 สารประกอบพอลิฟีนอลร้อยละ 13-17 และคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 39-57

2.2.1 โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดตะกอนในเบียร์ (Haze forming proteins)

Asano และคณะ (3) พบว่า โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดตะกอนในเบียร์ประกอบด้วยโปรตีน 4 กลุ่ม ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันคือ 1,000-10,000, 16,000, 19,000 และ 40,000 ดาลตัน โดยที่โปรตีนดังกล่าวมีกรดอะมิโนโพรลีน (proline) เป็นองค์ประกอบในปริมาณที่แตกต่างกัน ซึ่งปริมาณของโพรลีนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนนี้จะสัมพันธ์กับสัมพรรคภาพ (affinity) ต่อสารประกอบพอลิฟีนอล กล่าวคือโปรตีนที่ประกอบด้วยโพรลีนในปริมาณสูงจะมีสัมพรรคภาพต่อสารประกอบพอลิฟีนอลสูง สำหรับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดตะกอนในเบียร์ทั้ง 4 กลุ่มนั้น มีโพรลีนเป็นองค์ประกอบ 5.5, 10.3, 19.9 และ 8.7 โมลเปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้นโปรตีนในกลุ่มที่มีน้ำหนักโมเลกุล 19,000 จึงมีผลต่อการเกิดตะกอนในเบียร์มากที่สุด เนื่องจากเกิดการรวมตัวกับสารประกอบพอลิฟีนอลได้ดี ทั้งนี้เกี่ยวข้องกับแรงดึงดูดแบบพันธะไฮโดรเจน และพันธะไฮโดรโฟบิก ดังแสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 แรงดึงดูดแบบพันธะไฮโดรเจน (1) และพันธะไฮโดรโฟบิก (2) ระหว่างโปรตีนที่มีผลต่อการเกิดตะกอนในเบียร์กับสารประกอบพอลิฟีนอล

2.2.2 สารประกอบพอลิฟีนอลที่เกี่ยวข้องกับการเกิดตะกอนในเบียร์

โดยทั่วไปสารประกอบพอลิฟีนอลแบ่งได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ

1. โมโนเมอริกพอลิฟีนอล (Monomeric polyphenols) ได้แก่ แคทิคิน (catechin), รีโซซินอล (resocinol) และพอลิแคทิคอล (polycatechol) เป็นต้น

2. โอลิโกเมอริก และพอลิเมอริกพอลิฟีนอล (Oligomeric and polymeric polyphenols) ได้แก่ โปรแอนโธไซยานิดิน (proanthocyanidin) ซึ่งอาจอยู่ในรูปของไดเมอร์ (dimer) คือ โปรไซยานิดิน-บี 3 (procyanidin-B_3) และโปรเดลฟินิดิน-บี 3 (prodelphinidin-B_3) หรืออยู่ในรูปไตรเมอร์ (trimer) คือ โปรไซยานิดิน-ซี 2 (procyanidin-C_2) เป็นต้น

แม้ว่าสารประกอบพอลิฟีนอลมีอยู่มากมาย แต่มีเพียงบางกลุ่มเท่านั้นที่สามารถรวมตัวกับโปรตีนในเบียร์แล้วเกิดเป็นตะกอน Asano และคณะ (4) พบว่า แคทิคินและโปรแอนโธไซยานิดินเท่านั้นที่รวมตัวกับโปรตีนแล้วทำให้เกิดตะกอนในเบียร์ได้ นอกจากนี้สัมพรรคภาพของโปรแอนโธไซยานิดินต่อโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดตะกอนในเบียร์มีความสัมพันธ์กับขนาดโมเลกุล กล่าวคือ โปรแอนโธไซยานิดินที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่จะมีความสามารถในการรวมตัวกับโปรตีนและเกิดเป็นตะกอนในเบียร์ได้ดีกว่าโปรแอนโธไซยานิดินที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก ทั้งนี้เนื่องจากการรวมตัวระหว่างโปรแอนโธไซยานิดินกับโปรตีนเกิดจากพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลของโปรแอนโธไซยานิดินกับคาร์บอนิลออกซิเจนของพันธะเปปไทด์ในโปรตีน ดังนั้นโปรแอนโธไซยานิดินที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่จะมีจำนวนหมู่ไฮดรอกซิลมาก ทำให้เกิดพันธะไฮโดรเจนกับโปรตีนได้ง่าย และแข็งแรงกว่าโปรแอนโธไซยานิดินที่มีโมเลกุลขนาดเล็กกว่า

2.3 การป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์

การป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์อาจทำได้หลายวิธี เป็นต้นว่าการกรองผ่านตัวดูดซับซึ่งทำหน้าที่จับโปรตีนหรือสารประกอบพอลิฟีนอลที่เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดตะกอนในเบียร์ ตัวอย่างของตัวดูดซับที่ใช้ได้แก่ เบนโทไนต์, ซิลิกา, ผงไนลอน และผงถ่าน เป็นต้น เนื่องจากโปรตีนเป็นสารประกอบที่เกี่ยวข้องกับการเกิดตะกอนในเบียร์โดยตรง ดังนั้นวิธีป้องกันการเกิดตะกอนดังกล่าวซึ่งให้ผลดีวิธีหนึ่งคือ การใช้เอนไซม์โปรติเอสย่อยสลายโปรตีนในเบียร์ให้มีขนาดโมเลกุลเล็กลง ทำให้ไม่เกิดการรวมตัวกับสารประกอบพอลิฟีนอล จึงสามารถป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ได้

การใช้ตัวดูดซับในการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ อาจมีผลกระทบต่อคุณภาพของเบียร์ที่ได้ กล่าวคือ ตัวดูดซับบางชนิด นอกจากมีสมบัติในการดูดซับสารประกอบที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่แล้ว ยังมีสมบัติในการดูดกลิ่นและฟอกสีอีกด้วย ดังนั้นผลิตภัณฑ์เบียร์ที่ผ่านการป้องกันการเกิดตะกอนด้วยตัวดูดซับเหล่านี้อาจมีสีและกลิ่นรสจางลงได้ จึงต้องเลือกใช้ตัวดูดซับให้เหมาะสมเพื่อให้เกิดผลกระทบต่อคุณภาพของเบียร์น้อยที่สุด อย่างไรก็ตาม การป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์โดยใช้เอนไซม์โปรติเอสก็มีข้อควรระวังเช่นเดียวกัน กล่าวคือ จะต้องควบคุมปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม เพราะถ้าโปรตีนในเบียร์ถูกย่อยสลายมากเกินไปจะมีผลกระทบต่อคุณภาพของเบียร์ที่ได้ โดยทำให้ความเสถียรของฟองเบียร์ลดลงมาก ซึ่งเป็นลักษณะที่ไม่ต้องการในผลิตภัณฑ์เบียร์

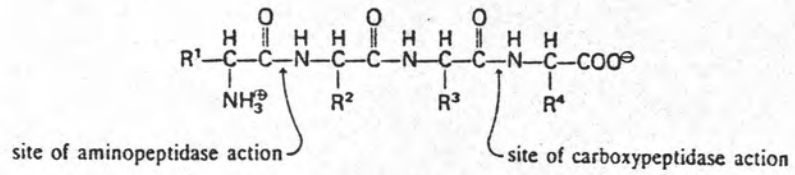
2.4 **เอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน** (Proteolytic enzymes)

เอนไซม์ที่มีสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในโปรตีน แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ (5)

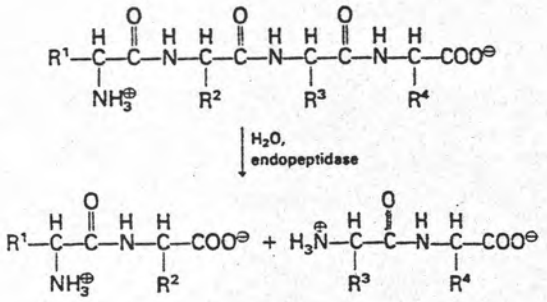
1. เอกโซเปปทิเดส (Exopeptidases) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในโปรตีนทางด้านปลายแอลฟาอะมิโน หรือปลายแอลฟาคาร์บอกซิลเท่านั้น (รูปที่ 2.3, (1)) ตัวอย่างของเอนไซม์กลุ่มนี้ ได้แก่ อะมิโนเปปทิเดส, คาร์บอกซิลเปปทิเดส และไดเปปทิเดส

2. เอนโดเปปทิเดส (Endopeptidases) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในโปรตีนได้หลายตำแหน่ง ไม่เฉพาะปลายทั้งสองด้านเท่านั้น (รูปที่ 2.3, (2)) ตัวอย่างของเอนไซม์กลุ่มนี้ ได้แก่

- โปรติเอสในระบบทางเดินอาหาร (gastrointestinal proteases) เช่น เปปซิน (pepsin) ทริปซิน (trypsin) ไคโมทริปซิน (chymotrypsin)
- โปรติเอสจากพืช เช่น ปาเปน (papain) โบรมิเลน (bromilain) และไฟซิน (ficin)
- โปรติเอสภายในเซลสัตว์ เช่น คาเธปซิน (cathepsins)
- โปรติเอสจากแบคทีเรียและราบางชนิด เช่น ซับทิลิซิน (subtilisin), นิวทรัลโปรติเอส (neutral proteases) และแอลคาไลโปรติเอส (alkaline proteases) เป็นต้น



(1)



(2)

รูปที่ 2.3 การย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในโปรตีนโดยเอกโซเปปทิเดส (1) และเอนโดเปปทิเดส (2)

ในกรณีที่ใช้กลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เป็นเกณฑ์ จะจำแนกโปรติเอสออกได้เป็น 4 กลุ่ม คือ (5, 6)

1. ไธออลโปรติเอส (Thiol proteases) เป็นโปรติเอสที่มีหน่วยเร่งปฏิกิริยาเป็นหมู่ไธออล (thiol group) ซึ่งอาจมีมากกว่า 1 หมู่ และถูกยับยั้งได้โดยสารประกอบที่สามารถทำปฏิกิริยากับหมู่ไธออลได้ เช่น ไอออนของโลหะหนักหรืออนุพันธ์ของไอออนโลหะหนัก สารที่มีสมบัติเติมหมู่อัลคิล (alkylating agent) และสารที่มีสมบัติเป็นตัวออกซิไดส์ (oxidizing agent) เป็นต้น ตัวอย่างของโปรติเอสที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้คือ ปาเปน ไฟซิน คาเธปซิน และโปรติเอสจากแบคทีเรียและราบางชนิด

2. เมธอลโปรติเอส (Metal proteases) เป็นโปรติเอสที่มีกลไกการทำงานเกี่ยวข้องกับไอออนของโลหะที่จับอยู่กับโมเลกุลของเอนไซม์ เช่น Mg^{2+}, Mn^{2+}, CO^{2+}, Zn^{2+} Fe^{2+} เป็นต้น ซึ่งอาจยึดติดกันอย่างแน่นหนาหรือจับกันอย่างหลวม ๆ ขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ โปรติเอสที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ เอกโซเปปทิเดสเป็นส่วนใหญ่ เช่น ลิวซีนอะมิโนเปปทิเดส (leucine aminopeptidase) โพรลิเดส (prolidase) เป็นต้น โปรติเอสกลุ่มนี้จะถูก

ยับยั้งเมื่อไอออนของโลหะที่จับอยู่กับโมเลกุลของเอนไซม์ถูกกำจัดไป

3. เซอรีนโปรติเอส (Serine proteases) เป็นโปรติเอสที่หน่วยเร่งปฏิกิริยาประกอบด้วยกรดอะมิโนเซอรีน ซึ่งจะถูกยับยั้งโดยสารประกอบ organophosphorus เช่น diisopropyl phosphofluoridate (DFP) ตัวอย่างของโปรติเอสที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ ทริปซิน ซับทิลิซิน และธรอมบิน (thrombin) เป็นต้น

4. แอซิดโปรติเอส (Acid proteases) เป็นโปรติเอสที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีในภาวะที่มี pH ในช่วงที่เป็นกรด และที่หน่วยเร่งปฏิกิริยาจะประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิลมากกว่า 1 หมู่ ตัวอย่างของโปรติเอสกลุ่มนี้คือ เปปซิน และเรนนิน (rennin) เป็นต้น

สำหรับโปรติเอสที่นิยมนำมาใช้ป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ ได้แก่ ปาเปน ซึ่งเป็นโปรติเอสที่ได้จากยางมะละกอ ปัจจุบันมีการผลิตปาเปนในเชิงการค้าเพื่อใช้สำหรับป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์โดยเฉพาะ เนื่องจากปาเปนมีความจำเพาะต่อโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดตะกอนในเบียร์ และควบคุมปฏิกิริยาได้ง่ายภายใต้ภาวะที่ใช้ในการผลิตเบียร์ (7) อย่างไรก็ตาม ปาเปนมีความจำเพาะต่อสับสเตรท (substrate) ค่อนข้างกว้าง (broad specificity) และมีความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนได้ดีกว่าโปรติเอสชนิดอื่นหลายชนิด กล่าวคือ สับสเตรทที่ถูกย่อยโดยปาเปนแล้วจะไม่ถูกย่อยโดยเปปซินหรือทริปซินอีก ในทางตรงกันข้าม สับสเตรทที่ถูกย่อยโดยเปปซินหรือทริปซินแล้ว ยังสามารถถูกย่อยต่อโดยปาเปนได้อีก แสดงให้เห็นว่าปาเปนมีความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนได้ดีกว่า ซึ่งลักษณะนี้อาจมีผลต่อคุณภาพของเบียร์ที่ผ่านการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์โดยใช้ปาเปนในรูปอิสระ เพราะการที่โปรตีนในเบียร์ถูกย่อยสลายมากเกินไป จะมีผลทำให้ความเสถียรของฟองเบียร์ลดลงมาก ซึ่งเป็นลักษณะที่ไม่ต้องการในผลิตภัณฑ์เบียร์

นอกจากปาเปนแล้วยังมีการทดลองนำโปรติเอสชนิดอื่น ๆ มาใช้กับการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ เช่น เปปซิน (8) โบรมิเลน (9) และโปรติเอสจากจุลินทรีย์ (10) เป็นต้น

2.5 การตรึงรูปเอนไซม์ (Enzyme immobilization)

เอนไซม์ตรึงรูปหมายถึง เอนไซม์ที่ถูกกำหนดให้อยู่ในขอบเขตที่จำกัด แต่ยังมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาเหมือนเดิม โดยที่ความไวต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์ตรึงรูปอาจมีมากกว่า น้อยกว่า หรือเท่ากับเอนไซม์เดิม นอกจากนี้เอนไซม์ตรึงรูปจะมีสมบัติไม่ละลายน้ำ สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำ และใช้ในระบบต่อเนื่องได้ (6, 11)

ข้อดีโดยทั่วไปของการใช้เอนไซม์ตรึงรูป

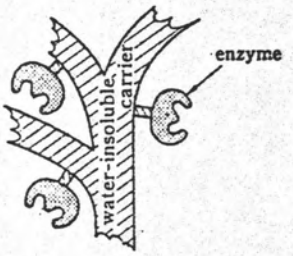
1. เพิ่มเสถียรภาพของเอนไซม์
2. สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ เพราะการแยกเอนไซม์ออกจากระบบทำได้โดยง่าย
3. นำไปใช้ในปฏิกิริยาที่เป็นกระบวนการต่อเนื่องได้อย่างมีประสิทธิภาพ
4. ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์สูง และได้ผลผลิตสูงกว่า
5. การควบคุมปฏิกิริยาทำได้ดีและสะดวกกว่าการใช้เอนไซม์อิสระ
6. สามารถกำหนดรูปร่างของเอนไซม์ได้ตามชนิดของตัวพยุงที่เลือกใช้ เพื่อให้เหมาะสมกับชนิดของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (bioreactor)

การตรึงรูปเอนไซม์แบ่งได้เป็น 3 วิธีใหญ่ ๆ คือ (6)

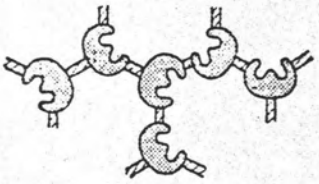
1. การเชื่อมกับตัวพยุง (Carrier-binding method) โดยวิธีนี้โมเลกุลของเอนไซม์จะเชื่อมติดกับตัวพยุงที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งอาจทำได้ 3 วิธี คือ การดูดซับทางกายภาพ (physical adsorption) การเชื่อมด้วยพันธะไอออนิก (ionic binding) และการเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์ (covalent binding)

2. การเชื่อมข้าม (Cross-linking method) วิธีนี้จะอาศัยตัวกลางที่ทำหน้าที่เชื่อมโมเลกุลของเอนไซม์เข้าด้วยกัน ซึ่งตัวกลางอาจทำหน้าที่เชื่อมระหว่าง 2 โมเลกุล (bifunctional reagent) หรือเชื่อมระหว่างหลายโมเลกุล (multifunctional reagent)

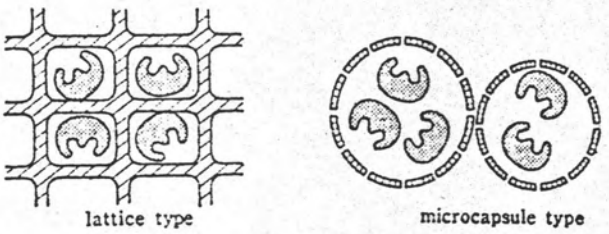
3. การห่อหุ้ม (Entrapping method) เป็นการบรรจุเอนไซม์ลงในช่องว่างหรือโพรง (lattice) ของเจลที่ยอมให้สารซึมผ่านได้บางส่วน หรือห่อหุ้มเอนไซม์ด้วยเมมเบรน-พอลิเมอร์ที่ยอมให้สารซึมผ่านได้บางส่วน (encapsulation)



(1)



(2)



(3)

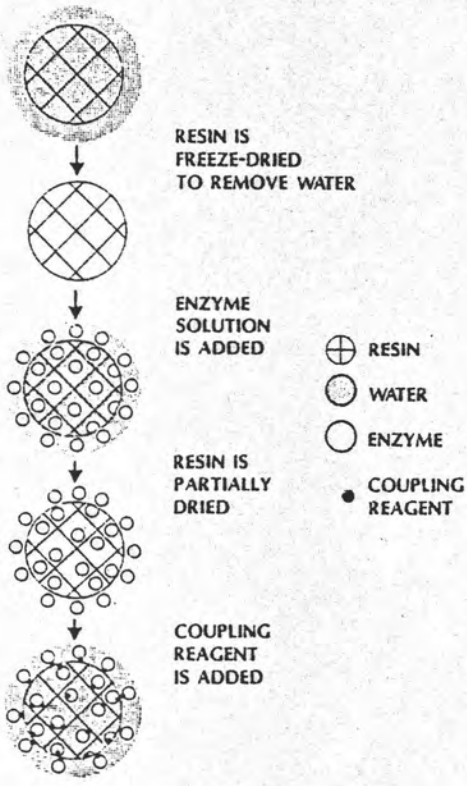
รูปที่ 2.4 การตรึงรูปเอนไซม์โดยวิธีต่าง ๆ (1) การเชื่อมกับตัวพยุง
(2) การเชื่อมข้าม (3) การห่อหุ้ม

2.5.1 การตรึงรูปเอนไซม์โปรติเอสบนตัวพยุงชนิดต่าง ๆ

Jasim และคณะ (12) ศึกษาการตรึงรูปโปรติเอส 5 ชนิด คือ โบรมิเลน ไฟซิน ปาเปน เปปซิน และทริปซิน บนตัวพยุงที่เป็นอนุพันธ์ของเซลลูโลส 2 ชนิด คือ AE-cellulose และ Sephadex G-100 โดยใช้สารที่ทำหน้าที่เชื่อมพันธะโคเวเลนต์ระหว่างตัวพยุงกับเอนไซม์ 2 ชนิด ได้แก่ ไซยาโนเจนโบรไมด์ (cyanogenbromide) สำหรับ AE-cellulose และกลูทารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) สำหรับ Sephadex G-100 พบว่าการใช้ไซยาโนเจนโบรไมด์ในการตรึงรูปโปรติเอสทั้ง 5 ชนิด จะให้แอคติวิตีดีกว่าการใช้กลูตารัลดีไฮด์ และโดยการตรึงรูปทั้ง 2 วิธีดังกล่าว ไธออลโปรติเอส ซึ่งได้แก่ โบรมิเลน ไฟซิน และปาเปน จะให้แอคติวิตีสูงกว่าเปปซินและทริปซิน นอกจากนี้ยังพบว่าโปรติเอสตรึงรูปที่ได้ทั้ง 2 วิธีนี้ มีแอคติวิตีลดลงเมื่อผ่านการใช้งานหลาย ๆ ครั้ง เนื่องจากโมเลกุลของเอนไซม์หลุดออกจากตัวพยุงขณะใช้งาน รวมทั้งการสูญเสียบริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์

Chiou และ Beuchat (13) ศึกษาการตรึงรูปปาเปนบน Dowex MWA-1 ซึ่งเป็นเรซินแลกเปลี่ยนประจุลบ (anion exchange resin) โดยอาศัยวิธีดูดซับทางกายภาพและตามด้วยการเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์ระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์กับเรซินโดยใช้กลูทารัล-ดีไฮด์

ในการตรึงรูปปาเปนโดยวิธีดังกล่าวจะใช้เรซินผสมกับสารละลายปาเปนในบัฟเฟอร์ แล้วผ่านการทำให้แห้งในภาวะสุญญากาศ จากนั้นจึงผสมกับสารละลายกลูทารัลดีไฮด์ ดังแสดงในรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 ขั้นตอนการตรึงรูปปาเปนบนเรซินแลกเปลี่ยนประจุลบด้วยกลูทารัลดีไฮด์

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างการตรึงรูปปาเปนบนเรซิน คือ เมื่อผสมเรซินลงในสารละลายปาเปน โมเลกุลของปาเปนจะกระจายอยู่ตามรูพรุนของเรซิน เมื่อผ่านการทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศจะมีผลทำให้เกิดแรงยึดเหนี่ยวทางกายภาพระหว่างโมเลกุลของปาเปนกับเรซินได้ดีขึ้น ทำให้โมเลกุลของปาเปนอยู่ชิดกับพื้นผิวของเรซินมากขึ้น จากนั้นกลูทารัลดีไฮด์จะทำหน้าที่สร้างพันธะเชื่อมระหว่างโมเลกุลของปาเปนกับเรซิน โดยอาศัยหมู่เอมีน (amine groups) ของเรซินกับหมู่แอบซิลอน อะมิโน (ε-amino groups) ของไลซีนในปาเปน

ผลการทดลองตรึงรูปปาเปนบน Dowex MWA-1 โดยวิธีดังกล่าวข้างต้นในภาวะที่มี pH ของสารละลายปาเปนต่างกัน 3 ค่า คือ pH 4.0, 7.0 และ 12.5 พบว่าปาเปนตรึงรูปที่ได้ทั้งสามภาวะมีแอคติวิตีใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตาม ที่ pH 7.0 ปริมาณปาเปนที่ถูกตรึงติดบนเรซินจะน้อยที่สุด ทั้งนี้ผู้วิจัยอธิบายว่าเนื่องจากปาเปนมีจุดไอโซอิเล็กตริก (isoelectric point) 8.75 ดังนั้นที่ pH 7.0 ปาเปนจะมีความสามารถในการละลายต่ำกว่าที่ pH 4.0 และ 12.5 ทำให้ปริมาณของปาเปนที่ถูกตรึงติดบนเรซินเมื่อตรึงรูปที่ pH 7.0

น้อยที่สุด สำหรับที่ pH 12.5 ปาเปนจะมีประจุสุทธิเป็นลบ ซึ่งน่าจะเกิดแรงดึงดูดกับเรซิน แลกเปลี่ยนประจุลบได้ดีกว่าที่ pH 4.0 แต่จากผลการทดลองพบว่า ทั้งแอคติวิตีและปริมาณปาเปนที่ถูกตรึงติดบนเรซินที่ pH ทั้งสองนี้ไม่แตกต่างกัน ผู้วิจัยให้เหตุผลว่า แรงดึงดูดทางกายภาพที่เกิดขึ้นในระหว่างการทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศมีผลทำให้เกิดการจับยึดระหว่างโมเลกุลของปาเปนกับเรซินมากกว่าภาวะ pH ของสารละลายปาเปนที่ต่างกัน

การเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายปาเปน มีผลทำให้แอคติวิตีจำเพาะของปาเปนตรึงรูปที่ได้ลดลง ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อความเข้มข้นของปาเปนเพิ่มขึ้นจะทำให้โมเลกุลของปาเปนที่ถูกตรึงติดบนผิวของเรซินหนาแน่นมากขึ้น โมเลกุลของปาเปนบางส่วนจึงถูกบดบังทำให้สับสเตรทไม่สามารถแพร่ผ่านเข้าทำปฏิกิริยาได้อย่างทั่วถึง ดังนั้นแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ตรึงรูปที่ได้จึงลดลง

ในการศึกษาผลของเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยากับกลูทารัลดีไฮด์ ซึ่งทำหน้าที่เชื่อมระหว่างโมเลกุลของปาเปนกับเรซิน พบว่าเมื่อเวลาในการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น ปริมาณของปาเปนที่ถูกตรึงติดบนเรซินจะเพิ่มขึ้นด้วย แต่แอคติวิตีจำเพาะของปาเปนตรึงรูปที่ได้กลับลดลง อย่างไรก็ตาม เสถียรภาพของปาเปนตรึงรูปจะสูงขึ้นเมื่อเวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยากับกลูทารัลดีไฮด์นานขึ้น ช่วงเวลาในการทำปฏิกิริยากับกลูทารัลดีไฮด์ที่เหมาะสมกับการตรึงรูปปาเปนบน Dowex MWA-1 มากที่สุดคือ 10 นาที ซึ่งจะทำให้ปาเปนตรึงรูปที่มีแอคติวิตีและความเสถียรดีที่สุด

Monsan และคณะ (14) ตรึงรูปปาเปนบนสเฟียโรซิล (Spherosil) ซึ่งเป็นซิลิกาพรุน โดยใช้วิธีที่แตกต่างกัน 2 วิธี ในการทำให้เกิดพันธะโคเวเลนต์ระหว่างโมเลกุลของปาเปนกับสเฟียโรซิล

วิธีที่ 1 : กระตุ้นสเฟียโรซิลด้วย ɣ-aminopropyltrimethoxysilane ($(CH_3O)_3$ Si-$(CH_2)_3$-NH_2) เพื่อให้เกิดหมู่อะมิโนบนสเฟียโรซิลซึ่งเรียกว่า อะมิโนสเฟียโรซิล จากนั้นทำปฏิกิริยากับกลูทารัลดีไฮด์เพื่อสร้างพันธะเชื่อมระหว่างโมเลกุลของปาเปนกับหมู่อะมิโนบนสเฟียโรซิลดังกล่าว

วิธีที่ 2 : กระตุ้นสเฟียโรซิลด้วย δ-diethoxybutyltrimethoxysilane ($(CH_3O)_3$ Si-$(CH_2)_3$-$CH(OC_2H_5)_2$) เพื่อให้เกิดหมู่อะเซทอล (acetal group) บนสเฟียโรซิลซึ่งเรียกว่า อะเซทอลสเฟียโรซิล จากนั้นอาศัยหมู่อะเซทอลในการเกิดพันธะกับโมเลกุลของปาเปนโดยตรง

ผลการทดลองพบว่า pH ที่เหมาะสมกับการตรึงรูปปาเปนบนสเฟียโรซิลทั้งสองวิธีคือ pH 4.0 การเติมซีสเตอีน (cysteine) และ EDTA ในระหว่างการตรึงรูปปาเปนโดยวิธีทั้งสองจะมีผลทำให้แอคติวิตีและเสถียรภาพของปาเปนตรึงรูปที่ได้สูงขึ้น อย่างไรก็ตาม การตรึงรูปปาเปนบนอะเซทอลสเฟียโรซิลมีข้อได้เปรียบกว่าการตรึงรูปบนอะมิโนสเฟียโรซิล เนื่องจากให้แอคติวิตีสูงกว่า และมีขั้นตอนการตรึงรูปที่ไม่ยุ่งยาก กล่าวคือ ไม่ต้องอาศัยกลูทารัลดีไฮด์ในการสร้างพันธะร่วม แต่สามารถเกิดพันธะเชื่อมระหว่างโมเลกุลของปาเปนกับหมู่อะเซทอลบนสเฟียโรซิลได้โดยตรง นอกจากนี้ยังให้ปาเปนตรึงรูปที่มีเสถียรภาพสูงกว่าด้วย โดยพบว่าปาเปนตรึงรูปบนอะเซทอลสเฟียโรซิลที่เก็บในบัฟเฟอร์ pH 4.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน ไม่มีการสูญเสียแอคติวิตีเลย

Weetall (15) ทดลองตรึงรูปทริปซินและปาเปนบนแก้วพรุน (porous glass) โดยเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์ด้วยการกระตุ้นแก้วพรุนด้วย ɣ-aminopropyltriethoxysilane (APTS) จากนั้นเปลี่ยนให้อยู่ในรูปอนุพันธ์ของไอโซไธโอไซยาเนต (isothiocyanate) หรืออนุพันธ์ของอะมิโนเอริล (aminoaryl) ซึ่งแก้วพรุนที่ประกอบด้วยอนุพันธ์ของไอโซไธโอไซยาเนตจะใช้เป็นตัวพยุงสำหรับตรึงรูปทริปซินโดยอาศัยพันธะซัลโฟนาไมด์ (sulfonamide linkage) ส่วนแก้วพรุนที่ประกอบด้วยอนุพันธ์ของอะมิโนเอริลจะใช้เป็นตัวพยุงสำหรับตรึงรูปทริปซินหรือปาเปนโดยอาศัยพันธะอะโซ (azo-linkage)

โดยปกติทริปซินและปาเปนในรูปอิสระจะเสียสภาพธรรมชาติที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 30 นาที และถ้าอุณหภูมิสูงกว่านี้อัตราเร็วในการเสียสภาพธรรมชาติจะสูงขึ้น จากการทดลองพบว่า ทริปซินตรึงรูปบนแก้วพรุนโดยอาศัยพันธะซัลโฟนาไมด์ และพันธะอะโซจะมีเสถียรภาพต่อความร้อนลดลง กล่าวคือ การเสียสภาพธรรมชาติจะเกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 50 และ 53 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 30 นาที ตามลำดับ แต่ในกรณีของปาเปนตรึงรูปบนแก้วพรุนโดยพันธะอะโซจะมีเสถียรภาพต่อความร้อนเพิ่มขึ้น โดยการเสียสภาพธรรมชาติเกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 88 องศาเซลเซียส และต้องใช้เวลาอย่างน้อย 80 นาที ดังนั้นปาเปนตรึงรูปจึงให้ประสิทธิภาพสูงกว่าทริปซินตรึงรูปโดยวิธีดังกล่าว

Venkatasubramanian และคณะ (16) ศึกษาการตรึงรูปปาเปนบนคอลลาเจน (collagen) ในลักษณะของคอลลาเจน-ปาเปนเมมเบรน (collagen-papain

membrane) 2 วิธี

วิธีที่ 1 : เรียกว่า complexation method โดยอาศัยการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโมเลกุลของปาเปนกับคอลลาเจนโดยตรง การเตรียมคอลลาเจน-ปาเปนเมมเบรนโดยวิธีนี้ทำได้โดยเทสารละลายผสมของคอลลาเจนและปาเปนในน้ำกลั่นใส่พิมพ์เพื่อให้มีลักษณะเป็นเมมเบรน จากนั้นแช่เมมเบรนที่ได้ในสารละลายกลูทารัลดีไฮด์ ซึ่งเรียกขั้นตอนนี้ว่า แทนนิง (tanning)

วิธีที่ 2 : การเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์โดยกระตุ้นให้เกิดอนุพันธ์ของไดอะโซเนียม (diazonium) บนคอลลาเจน จากนั้นทำปฏิกิริยากับสารละลายปาเปนก่อนทำให้มีลักษณะเป็นเมมเบรน

จากการศึกษาพบว่า การเตรียมคอลลาเจน-ปาเปนเมมเบรนโดย complexation method มีข้อได้เปรียบกว่าวิธีเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์ ด้วยเหตุผลหลายประการ กล่าวคือ ในกรณีของวิธีเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์นั้น จะต้องปรับสภาพของคอลลาเจนโดยทำให้เกิดอนุพันธ์ของไดอะโซเนียมก่อน และการเกิดพันธะโคเวเลนต์ระหว่างโมเลกุลของปาเปนกับคอลลาเจนจะเกิดแบบสุ่ม ทำให้แอคติวิตีของปาเปนบางส่วนถูกทำลายไป นอกจากนี้ปาเปนตรึงรูปที่ได้ยังมีเสถียรภาพต่ำอีกด้วย สำหรับ complexation method นั้น การจับยึดระหว่างโมเลกุลของปาเปนกับคอลลาเจนอาศัยแรงดึงดูดแบบพันธะไฮโดรเจนและแรงแวนเดอร์วาล (Van der Waal's interaction) ทำให้เกิดเป็นโครงร่างตาข่ายของคอลลาเจนและเอนไซม์ที่เสถียร นอกจากนี้ปริมาณของปาเปนที่ถูกตรึงรูปต่อหน่วยน้ำหนักของคอลลาเจนมีค่าค่อนข้างสูง ทำให้แอคติวิตีของปาเปนตรึงรูปที่ได้โดยวิธีนี้สูงกว่าวิธีเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์

Jin และ Toda (17) ทดลองตรึงรูปปาเปนบนตัวพยุง 2 ชนิด คือ ขี้เลื่อยและฝ้าย โดยวิธีเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์ ซึ่งตัวพยุงทั้ง 2 ชนิด ผ่านการออกซิไดส์ด้วยโซเดียม-เพอริโอเดท (sodium periodate) ก่อนที่จะทำปฏิกิริยากับสารละลายปาเปน ผลการทดลองพบว่า แอคติวิตีจำเพาะของปาเปนตรึงรูปบนขี้เลื่อยและฝ้ายเท่ากับ 250-350 และ 250-400 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ pH ที่ปาเปนตรึงรูปแสดงแอคติวิตีสูงสุดอยู่ที่ช่วง 6-10 ซึ่งใกล้เคียงกับปาเปนอิสระ และอุณหภูมิที่ปาเปนตรึงรูปแสดงแอคติวิตีสูงสุดคือ 67 องศาเซลเซียส ซึ่งสูงกว่าของปาเปนอิสระ 7 องศาเซลเซียส

นอกจากงานวิจัยที่กล่าวมาแล้วยังมีการศึกษาการตรึงรูปโปรติเอสบนตัวพยุงชนิดอื่น ๆ คือ Finley และคณะ (7) ตรึงรูปปาเปนบนไคติน (chitin) โดยวิธีเชื่อมพันธะโคเวเลนต์ด้วยกลูทารัลดีไฮด์ Hartmeier (8) ตรึงรูปเปปซินบนเจลาติน (gelatin) ที่ผ่านการกระตุ้นด้วยฟอร์มัลดีไฮด์ (formaldehyde) และใช้กลูทารัลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะร่วม และ Hansen (10) ตรึงรูปโปรติเอสจากจุลินทรีย์บนเคซีน (casein) โดยวิธีเชื่อมพันธะโคเวเลนต์ด้วยกลูทารัลดีไฮด์

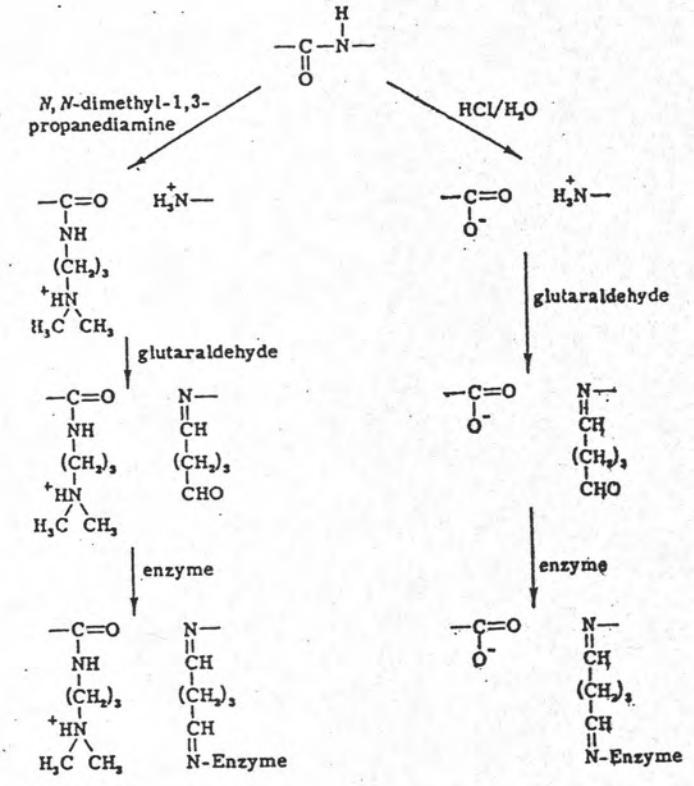
2.5.2 การตรึงรูปเอนไซม์บนตัวพยุงประเภทไนลอน

ไนลอนจัดเป็นพอลิเมอร์สังเคราะห์ประเภทพอลิเอไมด์ ซึ่งได้จากปฏิกิริยา condensation ระหว่าง α, w-diamines และ α, w-dicarboxylic acids ไนลอนแต่ละชนิดแตกต่างกันในส่วนของจำนวนหมู่เมธิลีน (methylene group) ใน repeating structure ซึ่งความแตกต่างดังกล่าวเป็นผลมาจากจำนวนอะตอมของคาร์บอนที่ต่างกันในองค์ประกอบที่ใช้เป็นโมโนเมอร์ในการสังเคราะห์ไนลอน ตัวอย่างเช่น ไนลอน 6 เตรียมจากคาโพรแลคแทม (caprolactam) ซึ่งมีคาร์บอน 6 อะตอม ไนลอน 6,10 เตรียมจาก 1,6-ไดอะมิโนเฮกเซน (1,6-diaminohexane) และกรดเซบาอิก (sebaic acid) ซึ่งมีคาร์บอน 6 และ 10 อะตอม ตามลำดับ เป็นต้น นอกจากนี้ไนลอนอาจอยู่ในรูปที่ต่างกัน เช่น ผงไนลอน, ท่อไนลอน, เส้นใยไนลอน และผ้าไนลอน เป็นต้น

การใช้ไนลอนเป็นตัวพยุงในการตรึงรูปเอนไซม์มีข้อดีหลายประการ (18,19) กล่าวคือ ไนลอนมีเสถียรภาพเชิงกลดี ไม่ฉีกขาดง่าย ไม่ถูกย่อยสลายโดยทางชีวภาพ นอกจากนี้โครงสร้างของไนลอนบางชนิด เช่น ไนลอน 6 และไนลอน 6,6 มีสมบัติค่อนข้างชอบน้ำ ลักษณะนี้จะช่วยให้เอนไซม์ตรึงรูปที่ได้มีเสถียรภาพดี อย่างไรก็ตามโครงสร้างของไนลอนปกติจะอยู่ในสภาพที่เฉื่อยต่อการเกิดปฏิกิริยา จึงจำเป็นต้องผ่านการปรับสภาพหรือกระตุ้นให้เกิดหมู่ที่ไวต่อปฏิกิริยาด้วยสารเคมี ก่อนนำไปใช้เป็นตัวพยุงสำหรับตรึงรูปเอนไซม์ Hornby และ Goldstein (19) ได้กล่าวถึงวิธีตรึงรูปเอนไซม์บนตัวพยุงประเภทไนลอน โดยแบ่งเป็น 3 วิธี ดังนี้

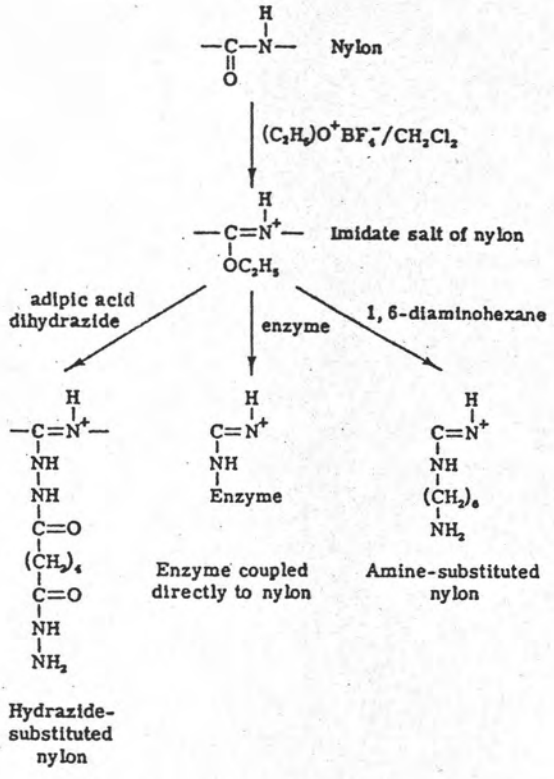
1. ทำให้เกิดหมู่อะมิโน และ/หรือหมู่คาร์บอกซิลอิสระ โดยการสลายพันธะเอไมด์บางส่วนในสายพอลิเมอร์ของไนลอน ตามด้วยการกระตุ้นหมู่อะมิโนหรือหมู่คาร์บอกซิลอิสระที่เกิดขึ้นด้วยสารเคมีก่อนที่จะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์

การสลายพันธะเอไมด์บางส่วนทำได้โดยใช้กรด (partial acid hydrolysis) หรือในภาวะที่ไม่มีน้ำ (nonaqueous condition) โดยใช้ N,N-dimethyl-1, 3-propanediamine ดังรูปที่ 2.6 สำหรับตัวอย่างสารเคมีที่ใช้กระตุ้นหมู่อะมิโนอิสระที่เกิดขึ้นได้แก่ ฟอสจีน (phosgene) ไซยานิวริกคลอไรด์ (cyanuric chloride) และกลูทารัลดีไฮด์ และสารเคมีที่ใช้กระตุ้นหมู่คาร์บอกซิลอิสระคือ คาร์โบไดอิไมด์ (carbodiimide) เป็นต้น



รูปที่ 2.6 ปฏิกิริยาการดริงรูปเอนไซม์บนไนลอนโดยวิธีสลายพันธะเอไมด์บางส่วน และกระตุ้นหมู่อะมิโนอิสระ ด้วยกลูทารัลดีไฮด์

2. ทำให้เกิดเกลืออิมิเดท (imidate salt) ของไนลอนโดยอาศัยปฏิกิริยา O-alkylation ด้วยสารที่มีสมบัติในการเติมหมู่อัลคิล เช่น ไดเมธิล-ซัลเฟต (dimethylsulfate) และเกลือของไตรเอธิลออกโซเนียม (triethyloxonium salts) เป็นต้น จากนั้นทำปฏิกิริยากับเอนไซม์โดยตรง หรือแทนที่ด้วยสารประกอบประเภทเอมีน (amine) หรือไฮดราไซด์ (hydrazide) ก่อนทำปฏิกิริยากับสารสร้างพันธะร่วมและเอนไซม์ต่อไป โดยวิธีนี้พันธะเอไมด์ในสายพอลิเมอร์ของไนลอนจะไม่ถูกทำลาย ดังรูปที่ 2.7



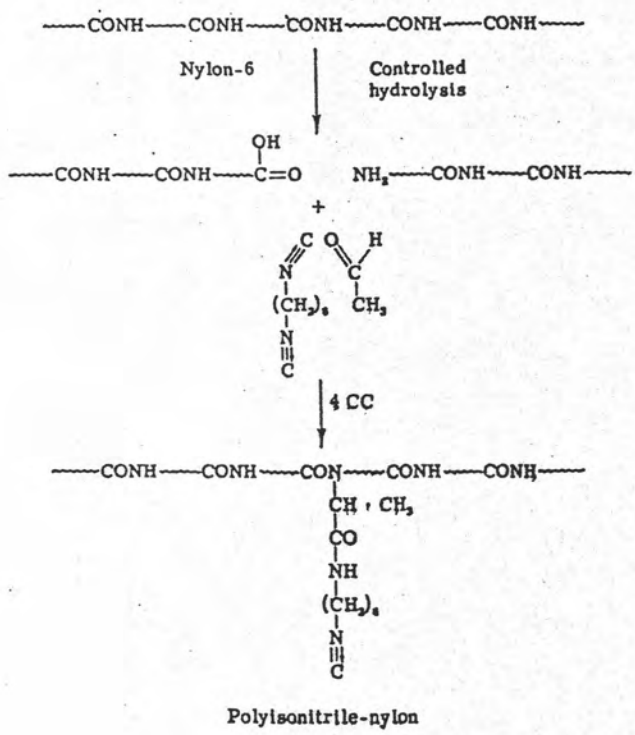
รูปที่ 2.7 ปฏิกิริยา O-alkylation ของไนลอนกับเกลือของไตรเอธิลออกโซเนียม และปฏิกิริยาของเกลืออิมิเดทของไนลอนกับสารประกอบประเภทไฮดราไซด์ เอนไซม์ และเอมีน

3. ทำให้เกิดหมู่ที่ไวต่อปฏิกิริยาบนไนลอนโดยอาศัยปฏิกิริยา N-alkylation ซึ่งประกอบด้วยปฏิกิริยาหลัก 2 ขั้นตอน คือ

ขั้นตอนที่ 1 : สลายพันธะเอไมด์บางส่วนเพื่อให้เกิดหมู่อะมิโน และหมู่คาร์บอกซิลอิสระบนพื้นผิวของไนลอน

ขั้นตอนที่ 2 : เชื่อมหมู่อะมิโนและหมู่คาร์บอกซิลกลับคืนโดยอาศัยปฏิกิริยา four-component condensation (4CC) ของหมู่อะมิโน และหมู่คาร์บอกซิลที่อยู่ใกล้เคียงร่วมกับสารประกอบประเภทอัลดีไฮด์ (aldehyde) และไอโซไซยาไนด์ (isocyanide) ดังแสดงในรูปที่ 2.8

จากปฏิกิริยา 4 CC จะทำให้ได้พอลิไอโซไนไทรล์ไนลอน (polyisonitrile-nylon) ซึ่งหมู่ไอโซไซยาไนด์สามารถเกิดปฏิกิริยากับเอนไซม์ หรือทำปฏิกิริยากับสารสร้างพันธะร่วมอื่น ๆ ก่อนทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ต่อไป



รูปที่ 2.8 ขั้นตอนการสังเคราะห์พอลิไอโซไนไทรล์ไนลอน

Onyezili (20) ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการใช้กลูทารัลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะร่วมสำหรับการตรึงรูปเอนไซม์บนไนลอน โดยใช้ท่อไนลอนที่ผ่านการทำปฏิกิริยา O-alkylation ด้วยไดเมธิลซัลเฟต และกระตุ้นด้วยไดอะมิโนเฮกเซน (diaminohexane) สำหรับตรึงรูปเอนไซม์อินเวอร์เทส (invertase) พบว่า เมื่อ pH ของสารละลายกลูทารัลดีไฮด์เพิ่มขึ้นจะทำให้แอคติวิตีของอินเวอร์เทสตรึงรูปที่ได้สูงขึ้น และ pH ของสารละลายกลูทารัลดีไฮด์ที่ให้แอคติวิตีของอินเวอร์เทสตรึงรูปสูงสุดคือ pH 9 นอกจากนี้ยังพบว่า pH ที่เหมาะสมของเอนไซม์ที่ใช้ตรึงรูปจะเป็น pH ที่ทำให้เอนไซม์อิสระมีเสถียรภาพสูงสุด แม้ว่าการเกิดปฏิกิริยากับกลูทารัลดีไฮด์จะเกิดได้ดีในช่วง pH ที่เป็นด่างก็ตาม แต่ถ้าเอนไซม์มีเสถียรภาพต่ำในช่วง pH ดังกล่าว ก็จะทำให้เอนไซม์ตรึงรูปที่ได้มีแอคติวิตีต่ำด้วย

ประกอบ กิจไชยา (21) ทดลองตรึงรูปกลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase) บนผ้าไนลอนสำหรับวัดกลูโคสด้วยเอนไซม์อิเล็คโตรด ภาวะที่เหมาะสมคือ กระตุ้นผ้าไนลอนด้วยไดเมธิลซัลเฟต 5 นาที ทำปฏิกิริยากับเฮกซาเมธิลีนไดเอมีนความเข้มข้นร้อยละ 1 ที่ pH 9 เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยากับกลูทารัลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 1 ที่ pH 9 เป็นเวลา 45 นาที และตรึงรูปกลูโคสออกซิเดสความเข้มข้นร้อยละ 0.3 ที่ pH 9 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เอนไซม์ตรึงรูปที่ได้สามารถใช้งานได้ที่อุณหภูมิ 25-45 องศาเซลเซียส และ pH ที่เหมาะสมคือ 6.5-7 นอกจากนี้ยังพบว่ามีค่าครึ่งชีวิต 11 และ 6 วัน ที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

2.6 การป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์โดยใช้โปรติเอสตรึงรูป

เนื่องจากโปรตีนเป็นสารประกอบสำคัญที่ทำให้เกิดตะกอนในเบียร์ อันเป็นสาเหตุทำให้ผลิตภัณฑ์เบียร์มีลักษณะขุ่น และการใช้โปรติเอสตรึงรูปในการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ดังกล่าวมีข้อได้เปรียบกว่าการใช้โปรติเอสในรูปอิสระในแง่ของความสะดวกในการควบคุมระดับการย่อยสลายโปรตีนในเบียร์ให้เหมาะสม โดยควบคุมอัตราการไหลของเบียร์ที่ผ่านเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์ตรึงรูป นอกจากนี้ยังสามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ได้หลายครั้ง รวมทั้งไม่มีปัญหาเรื่องเอนไซม์เหลือตกค้างอยู่ในผลิตภัณฑ์เบียร์ จึงมีงานวิจัยที่ศึกษาการนำโปรติเอสตรึงรูปมาใช้ป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ ดังนี้

ในปี 1975 Venkatasubramanian และคณะ (16) ทดลองใช้คอลลาเจน-ปาเปน เมมเบรน สำหรับป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ โดยประกอบเป็นเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ และผ่านตัวอย่างเบียร์เข้าไปอย่างต่อเนื่องด้วยอัตราการไหลต่าง ๆ กัน เมื่อตรวจวัดความขุ่นของเบียร์ที่ได้จากการทดลองหลังจากเก็บไว้เป็นเวลา 3 เดือน พบว่าเบียร์ทุกตัวอย่างยังคงมีลักษณะใสเป็นที่ยอมรับ และมีคุณภาพทางด้านสีและความเสถียรของฟองเบียร์เป็นปกติ อย่างไรก็ตามเมื่ออัตราการไหลต่ำลงประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์จะสูงขึ้น เนื่องจากเวลาที่สับสเตรทสัมผัสกับเอนไซม์นานขึ้น การย่อยสลายโปรตีนจึงเกิดได้ดีขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า การใช้งานอย่างต่อเนื่องติดต่อกันเป็นเวลานาน ประสิทธิภาพของเครื่องปฏิกรณ์ในการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์จะลดลง ทั้งนี้เนื่องจากเกิดการสูญเสียแอคติวิตีของปาเปนตรึงรูปในระหว่างการใช้งาน

ในปี 1978 Monsan และคณะ (14) ทดลองใช้ปาเปนตรึงรูปบนอะเซทอลสเฟียโรซิลบรรจุในคอลัมน์ประกอบเป็นเครื่องปฏิกรณ์แบบ packed bed สำหรับป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ โดยเริ่มด้วยปาเปนตรึงรูปที่มีแอคติวิตี 127.6 ยูนิต/กรัมของซิลิกา ควบคุมอุณหภูมิของเครื่องปฏิกรณ์ให้คงที่ที่ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นผ่านตัวอย่างเบียร์เข้าไปอย่างต่อเนื่องด้วยอัตราการไหล 250 มิลลิลิตร/ชั่วโมง เป็นเวลา 47 วัน พบว่า แอคติวิตีสุดท้ายของปาเปนตรึงรูป เหลือเพียงร้อยละ 7.8 ของแอคติวิตีเริ่มต้น แต่เครื่องปฏิกรณ์ยังคงมีประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ได้ดี กล่าวคือ ตัวอย่างเบียร์ที่ได้จากการทดลองมีระดับความขุ่นต่ำกว่าเบียร์ชุดควบคุมมาก

ต่อมาในปี 1979 Finley และคณะ (7) ได้ทดลองใช้ปาเปนตรึงรูปบนไคตินในการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ พบว่า การเติมปาเปนตรึงรูปลงในเบียร์โดยตรงให้ประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ได้ดีพอ ๆ กับการใช้ปาเปนในรูปอิสระ แต่การใช้ปาเปนตรึงรูปบรรจุในคอลัมน์ และควบคุมอัตราการไหลของเบียร์ที่ผ่านคอลัมน์จะให้ประสิทธิภาพสูงกว่าการใช้ปาเปนอิสระ นอกจากนี้เบียร์ที่ได้มีคุณภาพด้านกลิ่นรสปกติ ดังนั้นจึงสามารถนำปาเปนตรึงรูปมาใช้ในการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ได้เป็นอย่างดี ในปีเดียวกัน Hartmeimer (8) ได้ทดลองใช้เปปซินตรึงรูปบนเจลาตินประกอบเป็นเครื่องปฏิกรณ์แบบ packed bed สำหรับป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์และไวน์ พบว่า สามารถใช้เปปซินตรึงรูปดังกล่าวในการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์และไวน์ได้ดี แต่ในกรณีของเบียร์นั้นพบว่ามีผลทำให้ความเสถียรของฟองเบียร์ลดลง ดังนั้นการใช้เปปซินตรึงรูปจึงเหมาะกับผลิตภัณฑ์ประเภทไวน์มากกว่า เนื่องจากเป็นเครื่องดื่ม

ที่ไม่ต้องการการเกิดฟองในขณะดื่ม

ปี 1981 Hansen (10) ศึกษาการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์โดยใช้เอนไซม์โปรติเอสจากจุลินทรีย์ตริงรูปบนเคซีน ประกอบเป็นเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพเปรียบเทียบกับการใช้ collupulin ซึ่งเป็นปาเปนในรูปอิสระที่ผลิตเพื่อการค้า (commerical papain) สำหรับป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์โดยเฉพาะ พบว่าเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์ตริงรูปสามารถลดความขุ่นของเบียร์ได้ดีกว่า collupulin และจากการศึกษาผลกระทบของการใช้โปรติเอสตริงรูปต่อคุณภาพของเบียร์เปรียบเทียบกับการใช้ collupulin พบว่า การใช้โปรติเอสตริงรูปจะทำให้สีของเบียร์จางลงเล็กน้อย และทั้งสองกรณีมีผลทำให้ความเสถียรของฟองเบียร์ลดลง แต่การใช้ collupulin ทำให้ความเสถียรของฟองเบียร์ลดลงมากกว่า ดังนั้นการใช้โปรติเอสจากจุลินทรีย์ตริงรูปจึงให้ประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ได้ดีกว่าการใช้ collupulin โดยตรง

ในปี 1989 Jin และ Toda (17) ทดลองนำปาเปนตริงรูปบนชิ้นเลื่อยและฝ้าย มาใช้ป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ โดยเติมปาเปนตริงรูป 250 ยูนิต ลงในเบียร์ 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณโปรตีนในเบียร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 8,000 ดาลตัน ลดลงจากร้อยละ 34.3 เป็นร้อยละ 4.4 ของปริมาณโปรตีนทั้งหมด และไม่เกิดความขุ่นขึ้นในเบียร์ที่ได้จากการทดลองดังกล่าว หลังจากเก็บไว้เป็นเวลา 70 วัน โดยเก็บไว้ได้นานเป็น 2 เท่าของตัวอย่างเบียร์เริ่มต้น นอกจากนี้ยังพบว่า ปาเปนตริงรูปที่เตรียมได้มีเสถียรภาพดีในระหว่างใช้งาน กล่าวคือ สามารถใช้ป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นานถึง 28 วัน โดยไม่สูญเสียแอคติวิตี