65

เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพไนลอนโปรติเอสตรึงรูปสำหรับป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์

นายประพันธ์ ปิ่นศิโรดม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2534

ISBN 974-578-532-6

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

IMMOBILIZED PROTEASE NYLON BIOREACTOR FOR PREVENTION OF CHILL-HAZE FORMATION IN BEER

Mr. Praphan Pinsirodom

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement

for the Degree of Master of Science

Department of Food Technology

Graduate School

Chulalongkorn University

1991

ISBN 974-578-532-6

หัวข้อวิทยานิพนธ์	เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพไนลอนโปรดิเอสตริงรูปสำหรับป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์
โดย	นายประพันธ์ ปิ่นศิโรดม
ภาควิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.ปราณี อ่านเปรื่อง

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

Thanan Vajrabhaya
..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.พัชรี ปานกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปราณี อ่านเปรื่อง)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรรณา ดุลยธัญ)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม : เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพไนลอนโปรติเอสตรึงรูปสำหรับป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ (IMMOBILIZED PROTEASE NYLON BIOREACTOR FOR PREVENTION OF CHILL-HAZE FORMATION IN BEER) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.ปราณี อ่านเปรื่อง, 142 หน้า. ISBN 974-578-532-6

ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียม Neutrase ตรึงรูปแบบเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์คือ ใช้ผ้าไนลอนที่ผ่านการย่อยบางส่วนด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2 นอร์มัล ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง เป็นตัวพยุง มีสารละลาย APTS ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร (pH 5) เป็นตัวกระตุ้น สารละลายกลูทารัลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยปริมาตร (pH 9) เป็นสารสร้างพันธะร่วม และใช้สารละลาย Neutrase ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยปริมาตร (pH 7.1) Neutrase ตรึงรูปที่เตรียมได้มีค่าคงที่ Michaelis (K_m) เท่ากับ 9.71×10^{-4} มิลลิโมลาร์ ซึ่งต่ำกว่าของ Neutrase อิสระ 6.9 เท่า Neutrase ตรึงรูปแสดงแอคติวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และที่ pH 6.6 ในขณะที่ Neutrase อิสระแสดงแอคติวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และที่ pH 7.1 แอคติวิตีจำเพาะของ Neutrase ตรึงรูปเท่ากับ 611.8 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งมีค่าต่ำกว่า Neutrase อิสระ 0.9 เท่า นอกจากนี้ Neutrase ตรึงรูปมีเสถียรภาพเมื่อเก็บในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7.1 ที่อุณหภูมิ 8-10 และ 30-33 องศาเซลเซียส ดีกว่า Neutrase อิสระ โดยมีค่าครึ่งชีวิตมากกว่า 80 วัน

ภาวะที่เหมาะสมสำหรับป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ได้จากการวัดปริมาณโปรตีนที่เหลือ ค่าความขุ่น และความเสถียรของฟองเบียร์ของเบียร์ที่ผ่านเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตรึงรูปแบบ spiral membrane ขนาด 1.7x75 เซนติเมตร พบว่าภาวะที่ให้ผลดีสำหรับการย่อยสลายโปรตีนในเบียร์คือ ใช้ปริมาณ Neutrase ตรึงรูปในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพอย่างน้อยเท่ากับ 144 ตารางเซนติเมตรต่อเบียร์ 1 มิลลิลิตรต่อนาที โดยสามารถลดความขุ่นของเบียร์ได้ร้อยละ 55.3-72.1 นอกจากนี้เบียร์ที่ผ่านการป้องกันการเกิดกตะกอนด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตรึงรูป มีค่าความขุ่นและความเสถียรของฟองเบียร์สัมพันธ์กับปริมาณโปรตีนโมเลกุลใหญ่แบบพาราโบลา โดยมีค่า r^2 เท่ากับ 0.92 และ 0.81 ตามลำดับ ในการใช้ Neutrase ตรึงรูปซ้ำเดิม 9 ครั้ง สำหรับย่อยสลายโปรตีนในเบียร์ พบว่าหลังจากการใช้แต่ละครั้ง เบียร์ที่ได้มีค่าความขุ่นเพิ่มขึ้นเล็กน้อย

ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีการอาหาร ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2533 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

PRAPHAN PINSIRODOM : IMMOBILIZED PROTEASE NYLON BIOREACTOR FOR PREVENTION OF CHILL-HAZE FORMATION IN BEER. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. PRANEE ANPRUNG, Ph.D., 142 PP. ISBN 974-578-532-6

The optimum conditions for the preparation of immobilized Neutrase by a covalent bonding method were : partially hydrolysed nylon cloth with 2 N hydrochloric acid at 50°C, 4 hrs. as carrier, 5% by volume of APTS (pH 5) as carrier activator, 3% by volume of glutaraldehyde (pH 9) as intermolecular cross-linker, and 1.0% by volume of Neutrase (pH 7.1). The Michaelis constant, K_m, of the immobilized Neutrase is 9.71×10^{-4} mM which is 6.9 times lower than that of the soluble Neutrase. The immobilized and soluble Neutrase had optimum temperature for protein hydrolysis at 55°C and 45°C as well as the optimum pH of 6.6 and 7.1, respectively. The specific activity of the immobilized Neutrase is 611.8 unit/mg. which is 0.9 times smaller than that of the soluble Neutrase. The storage stability in buffer at pH 7.1 at 8-10°C and at 30-33°C were better than that of the soluble Neutrase. The half life of immobilized Neutrase was longer than 80 days.

The appropriate operating conditions for prevention of chill-haze formation in beer were derived from the protein hydrolysis activity, turbidity and foam stability data. It was found that good protein hydrolysis activity of beer resulted when at least 144 cm^2 of immobilized Neutrase per ml beer per min. were applied at 30°C in the spiral membrane bioreactor with 1.7x75 cm. in size. Under such condition, the turbidity of beer was decreased about 55.3-72.1%. Furthermore, the turbidity and foam stability of treated beer were parabolically correlated to the amount of high molecular weight proteins with r^2 = 0.92 and 0.81, respectively. After using the same immobilized enzyme 9 times for protein hydrolysis in beer, the turbidity of beer become slightly higher after each successive use.

ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีการอาหาร

ปีการศึกษา 2533 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงต่อ รองศาสตราจารย์ ดร.ปราณี อ่านเปรื่อง อาจารย์ที่ปรึกษา ซึ่งให้คำแนะนำต่าง ๆ อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่องานวิจัย จนเป็นผลให้งานวิจัยและวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.พัชรี ปานกุล ประธานกรรมการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรรณา ตุลยธัญ และ อาจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล กรรมการ ในการสอบวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบคุณ บริษัท อีสต์เอเชียติก (ประเทศไทย) จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์เอนไซม์ Neutrase ตลอดงานวิจัย

ขอขอบคุณ บริษัท ไทยอมฤตบริวเวอร์รี่ จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างเบียร์ตลอดงานวิจัย

ขอขอบคุณโครงการผลิตและพัฒนาอาจารย์ (U.D.C.) ที่กรุณาให้เงินทุนอุดหนุนการศึกษาประจำปีการศึกษา 2532 แก่ผู้เขียน ตลอดระยะเวลาของการศึกษา

ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย ที่ให้เงินทุนอุดหนุนการค้นคว้าและวิจัย รวมทั้งเจ้าหน้าที่บัณฑิตวิทยาลัยทุกท่านที่อำนวยความสะดวกแก่ผู้เขียน

ขอขอบคุณ คุณดุษฎี แซ่ไหล กองเคมี กรมวิทยาศาสตร์บริการ ที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องวัดความขุ่น

ขอขอบคุณ คุณฉัตรชัย กันยาวุธ เพื่อน พี่ และน้อง ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ทุกคนที่ให้กำลังใจและกำลังกายแก่ผู้เขียนเสมอมา

สุดท้ายผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และขอบพระคุณพี่ ๆ ทุกท่าน ที่คอยให้กำลังใจและสนับสนุนให้ผู้เขียนประสบความสำเร็จในการศึกษา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ฌ

สารบัญรูป ..... ฐ

บทที่

1. บทนำ 1
2. วารสารปริทัศน์ 5
   - 2.1 กรรมวิธีการผลิตเบียร์ 5
   - 2.2 การเกิดตะกอนในเบียร์ 9
   - 2.3 การป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ 11
   - 2.4 เอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน 12
   - 2.5 การตรึงรูปเอนไซม์ 15
   - 2.6 การป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์โดยใช้โปรติเอสตรึงรูป 26
3. อุปกรณ์และสารเคมี 29
   - 3.1 อุปกรณ์ 29
   - 3.2 วัสดุและสารเคมี 29
   - 3.3 ตัวอย่างเบียร์ที่ใช้ในการทดลอง 31
4. วิธีทดลอง 32
   - 4.1 วิธีเตรียม Neutrase ตรึงรูปบนผ้าไนลอน 32
   - 4.2 การเตรียมผ้าไนลอนขั้นต้นก่อนการตรึงรูปเอนไซม์ 34
   - 4.3 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียม Neutrase ตรึงรูปบนผ้าไนลอน 34
     - 4.3.1 กำหนดความเข้มข้น และ pH ของสารละลาย APTS ที่เหมาะสม 34

บทที่ หน้า

4.3.2 กำหนดความเข้มข้น และ pH ของสารละลายกลูทารัลดีไฮด์ที่เหมาะสม 35
4.3.3 กำหนดความเข้มข้นของสารละลาย Neutrase ที่เหมาะสมในการตรึงรูป 35
4.4 การศึกษาโครงสร้างของ Neutrase ตรึงรูปเปรียบเทียบกับโครงสร้างของผ้าไนลอนด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน 36
4.5 การศึกษาสมบัติเกี่ยวกับจลนพลศาสตร์ของ Neutrase ตรึงรูปเปรียบเทียบกับ Neutrase อิสระ 36
4.5.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ 36
4.5.2 pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ 37
4.5.3 ศึกษาค่าคงที่ Michaelis (Michaelis constant, K_m) 38
4.5.4 ผลของ pH ต่อความเสถียรของเอนไซม์ (pH stability) 38
4.5.5 เสถียรภาพของเอนไซม์ในระหว่างการเก็บและค่าครึ่งชีวิต 38
4.5.6 ค่าแอคติวิตีจำเพาะ (specific activity) ของเอนไซม์ 38
4.5.7 ศึกษาประสิทธิภาพการทำปฏิกิริยาซ้ำของ Neutrase ตรึงรูป 39
4.6 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการย่อยสลายโปรตีนในเบียร์ด้วย Neutrase ตรึงรูป 39
4.7 ศึกษาการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตรึงรูป 39
4.7.1 ผลของปริมาณ Neutrase ตรึงรูปในเครื่องปฏิกรณ์ต่อการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ 40
4.7.2 ศึกษาการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตรึงรูปที่อุณหภูมิต่ำ 40
4.8 ศึกษาสมบัติบางประการของตัวอย่างเบียร์ที่มีจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ 41
4.9 ศึกษาเสถียรภาพการใช้งานของ Neutrase ตรึงรูปในเครื่องปฏิกรณ์ 41

บทที่ หน้า

5. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง 42
5.1 การเตรียมผ้าไนลอนขั้นต้นก่อนการตรึงรูปเอนไซม์ 42
5.2 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียม Neutrase ตรึงรูปบนผ้าไนลอน 46
5.2.1 กำหนดความเข้มข้นและ pH ของสารละลาย APTS ที่เหมาะสม 46
5.2.2 กำหนดความเข้มข้นและ pH ของสารละลายกลูทารัลดีไฮด์ที่เหมาะสม 51
5.2.3 กำหนดความเข้มข้นของสารละลาย Neutrase ที่เหมาะสมในการตรึงรูป 55
5.3 การศึกษาโครงสร้างของ Neutrase ตรึงรูปเปรียบเทียบกับโครงสร้างของผ้าไนลอนด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน 58
5.4 การศึกษาสมบัติเกี่ยวกับจลนพลศาสตร์ของ Neutrase ตรึงรูปเปรียบเทียบกับ Neutrase อิสระ 60
5.4.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ 60
5.4.2 pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ 62
5.4.3 ศึกษาค่าคงที่ Michaelis 65
5.4.4 ผลของ pH ต่อความเสถียรของเอนไซม์ 68
5.4.5 เสถียรภาพของเอนไซม์ในระหว่างการเก็บ 71
5.4.6 ค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ 74
5.4.7 ศึกษาประสิทธิภาพการทำปฏิกิริยาซ้ำหลายครั้งของ Neutrase ตรึงรูป 75
5.5 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการย่อยสลายโปรตีนในเบียร์ด้วย Neutrase ตรึงรูป 77

บทที่		หน้า
	5.6 ศึกษาการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตรึงรูป	78
	5.6.1 ผลของปริมาณ Neutrase ตรึงรูปในเครื่องปฏิกรณ์ต่อการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์	78
	5.6.2 ศึกษาการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตรึงรูป ที่อุณหภูมิต่ำ	86
	5.7 ศึกษาสมบัติบางประการของตัวอย่างเบียร์ที่มีจำหน่ายในเชิงพาณิชย์	94
	5.8 ศึกษาเสถียรภาพการใช้งานของ Neutrase ตรึงรูป ในเครื่องปฏิกรณ์	98
6.	สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	100
	6.1 สรุปผลการทดลอง	100
	6.2 ข้อสังเกตและข้อเสนอแนะ	104
เอกสารอ้างอิง		107
ภาคผนวก		111
ประวัติผู้เขียน		141

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	กำลังการผลิตและปริมาณการผลิตเบียร์ในประเทศไทย	2
1.2	แนวโน้มปริมาณการผลิตและความต้องการเบียร์	3
5.1	ค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของ Neutrase ตรึงรูปบนผ้าไนลอนที่ผ่านการย่อยบางส่วนด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้นและอุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง	43
5.2	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของแอคติวิตีของ Neutrase ตรึงรูปบนผ้าไนลอนที่ผ่านการย่อยบางส่วนด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้นและอุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง	44
5.3	การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของ Neutrase ตรึงรูปบนผ้าไนลอนที่ผ่านการย่อยบางส่วนด้วยกรดไฮโดรริกที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง	45
5.4	ค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของ Neutrase ตรึงรูป เมื่อกระตุ้นผ้าไนลอนด้วยสารละลาย APTS ที่มี pH และความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง	47
5.5	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของแอคติวิตีของ Neutrase ตรึงรูป เมื่อกระตุ้นผ้าไนลอนด้วยสารละลาย APTS ที่มี pH และความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง	48
5.6	การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของ Neutrase ตรึงรูป เมื่อกระตุ้นผ้าไนลอนด้วยสารละลาย APTS ที่มี pH หรือความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง	49
5.7	ค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของ Neutrase ตรึงรูป บนผ้าไนลอนเมื่อใช้สารละลายกลูทารัลดีไฮด์ที่มี pH และความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง	52
5.8	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของแอคติวิตีของ Neutrase ตรึงรูป บนผ้าไนลอน เมื่อใช้สารละลายกลูทารัลดีไฮด์ที่มี pH และความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง	53
5.9	การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของ Neutrase ตรึงรูป บนผ้าไนลอนเมื่อใช้สารละลายกลูทารัลดีไฮด์ที่มี pH และความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง	54

ตารางที่ หน้า

5.10 แอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ pH ต่าง ๆ ของ Neutrase อิสระ และ Neutrase ตรึงรูป 63

5.11 ค่า K_m ของ Neutrase อิสระ และ Neutrase ตรึงรูป ที่อุณหภูมิ 45 และ 55 องศาเซลเซียส จากการเขียนกราฟแบบ Lineweaver Burk plot 68

5.12 ค่าครึ่งชีวิตของ Neutrase อิสระ และ Neutrase ตรึงรูป เมื่อเก็บในทรีสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมล/ลิตร pH 7.1 ที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิตู้เย็น 73

5.13 เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของ Neutrase อิสระ และ Neutrase ตรึงรูป 74

5.14 ปริมาณ HMWP ที่เหลือในเบียร์ที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับ Neutrase ตรึงรูป ที่อุณหภูมิต่าง ๆ 77

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 79

5.16 ปริมาณ HMWP ค่าความขุ่น และค่าซิกมา ของเบียร์ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่ผ่านเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพซึ่งบรรจุ Neutrase ตรึงรูป บนผ้าไนลอนขนาด 20 x 60 ตารางเซนติเมตร ด้วยอัตราการไหลต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 10 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 87

5.17 ปริมาณ HMWP ค่าความขุ่น และค่าซิกมา ของตัวอย่างเบียร์ที่มีจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ 6 ตรา 94

5.18 ค่าความขุ่นของเบียร์ที่ผ่านเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตรึงรูป ในแต่ละครั้ง 98

6.1 สรุปสมบัติทางจลนพลศาสตร์ของ Neutrase อิสระ และ Neutrase ตรึงรูป 101

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	แผนภูมิกรรมวิธีผลิตเบียร์โดยสังเขปของ บริษัท ไทยอมฤต บริวเวอรี่ จำกัด	
2.2	แรงดึงดูดแบบพันธะไฮโดรเจนและพันธะไฮโดรโฟบิกระหว่างโปรตีนที่มีผลต่อการเกิดตะกอนในเบียร์กับสารประกอบพอลิฟีนอล	8
2.3	การย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในโปรตีนโดยเอกโซเปปทิเดส และเอนโด-เปปทิเดส	10
2.4	การตรึงรูปเอนไซม์โดยวิธีต่าง ๆ (1) การเชื่อมกับตัวพยุง (2) การเชื่อมข้าม (3) การห่อหุ้ม	16
2.5	ขั้นตอนการตรึงรูปปาเปนบนเรซินแลกเปลี่ยนประจุลบด้วยกลูทารัลดีไฮด์ ..	18
2.6	ปฏิกิริยาการตรึงรูปเอนไซม์บนไนลอนโดยวิธีสลายพันธะเอไมด์บางส่วนและกระตุ้นหมู่อะมิโนอิสระด้วยกลูทารัลดีไฮด์	23
2.7	ปฏิกิริยา O-alkylation ของไนลอนกับเกลือของไตรเอธิลออกโซเนียม และปฏิกิริยาของเกลืออิมิเดทของไนลอนกับสารประกอบประเภทไฮดราไซด์ เอนไซม์ และเอมีน	24
2.8	ขั้นตอนการสังเคราะห์พอลิไอโซไนไทรล์ไนลอน	25
4.1	แผนภูมิขั้นตอนการเตรียม Neutrase ตรึงรูปบนผ้าไนลอนแบบเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์	33
5.1	การคาดคะเนโครงสร้างของเอนไซม์ตรึงรูปบนตัวพยุงประเภทไนลอนที่มี APTS เป็นตัวกระตุ้น และกลูทารัลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะร่วม	51
5.2	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย Neutrase กับแอคติวิตีของ Neutrase ตรึงรูป	56
5.3	โครงสร้างของผ้าไนลอนจากเครื่อง SEM ที่กำลังขยาย 200 เท่า	58
5.4	โครงสร้างของผ้าไนลอนจากเครื่อง SEM ที่กำลังขยาย 2000 เท่า	58
5.5	โครงสร้างของผ้าไนลอนที่ผ่านการย่อยบางส่วนด้วยกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 2 นอร์มัล ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากเครื่อง SEM ที่กำลังขยาย 2000 เท่า	59

รูปที่ หน้า

5.6 โครงสร้างของ Neutrase ตรึงรูปบนผ้าไนลอน จากเครื่อง SEM ที่กำลังขยาย 2000 เท่า 59

5.7 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของ Neutrase อิสระ และ Neutrase ตรึงรูป 61

5.8 pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของ Neutrase อิสระ และ Neutrase ตรึงรูป 64

5.9 เปรียบเทียบกราฟแบบ Lineweaver Burk plot ของ Neutrase อิสระ และ Neutrase ตรึงรูป ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส 66

5.10 เปรียบเทียบกราฟแบบ Lineweaver Burk plot ของ Neutrase อิสระ และ Neutrase ตรึงรูป ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 67

5.11 ผลของ pH ต่อความเสถียรของ Neutrase อิสระ 69

5.12 ผลของ pH ต่อความเสถียรของ Neutrase ตรึงรูป 70

5.13 เปรียบเทียบแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ระยะเวลาการเก็บต่าง ๆ ของ Neutrase อิสระ และ Neutrase ตรึงรูป ซึ่งเก็บในทรีสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมล/ลิตร pH 7.1 ที่อุณหภูมิห้อง (30-33 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิตู้เย็น (8-10 องศาเซลเซียส) 72

5.14 sterric effect ที่เกิดกับเอนไซม์ตรึงรูปเนื่องจากการบดบังของตัวพยุง 75

5.15 เปรียบเทียบประสิทธิภาพซ้ำหลายครั้งของ Neutrase ตรึงรูป ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ 55 องศาเซลเซียส 76

5.16 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ HMWP ค่าความขุ่น และค่าซิกมา กับอัตราการไหลของเบียร์ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่ผ่านเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ซึ่งบรรจุ Neutrase ตรึงรูป บนผ้าไนลอนขนาด 20 x 30 ตารางเซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 30 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 80

5.17 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ HMWP ค่าความขุ่น และค่าซิกมา กับอัตราการไหลของเบียร์ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่ผ่านเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ซึ่งบรรจุ Neutrase ตรึงรูป บนผ้าไนลอนขนาด 20 x 60 ตารางเซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 30 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 81

รูปที่		หน้า
5.18	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างระดับขั้นการย่อยสลายกับอัตราการไหลของเบียร์ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่ผ่านเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพซึ่งบรรจุ Neutrase ตริงรูปบนผ้าไนลอน ขนาด 20 x 30 และ 20 x 60 ตารางเซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 30 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง	84
5.19	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ HMWP ค่าความขุ่น และค่าซิกมา กับอัตรการไหลของเบียร์ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่ผ่านเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ซึ่งบรรจุ Neutrase ตริงรูป บนผ้าไนลอนขนาด 20 x 60 ตารางเซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 10 $\pm$ 1 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง	88
5.20	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างระดับขั้นการย่อยสลายกับอัตราการไหลของเบียร์ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่ผ่านเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพซึ่งบรรจุ Neutrase ตริงรูปบนผ้าไนลอนขนาด 20 x 60 ตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิ 10 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส	90
5.21	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ HMWP กับค่าความขุ่นของเบียร์ที่ผ่านการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตริงรูป โดยมีความสัมพันธ์แบบพาราโบลา (r^2 = 0.92)	92
5.22	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ HMWP กับค่าซิกมาของเบียร์ที่ผ่านการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ ด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตริงรูป โดยมีความสัมพันธ์แบบพาราโบลา (r^2 = 0.81)	93
5.23	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่นของเบียร์กับจำนวนครั้งในการใช้งานของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตริงรูป	99
6.1	เปปไทด์ในเบียร์ก่อนและหลังจากทำปฏิกิริยากับปาเปนตริงรูป	105
6.2	ตัวอย่างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง space velocity กับค่าความขุ่นของเบียร์ที่ได้ ที่อุณหภูมิ t_1 และ t_2	106