เอกสารอ้างอิง

1. จันทนี จงนิตยกาล และ ชัชวาลย์ จีนเลิศ, "รายงานภาวะอุตสาหกรรมเบียร์", ฝ่ายนโยบาย 4, กองเศรษฐกิจอุตสาหกรรม, สำนักงานปลัดกระทรวงอุตสาหกรรม, ตุลาคม 2529.
2. Frazier, W.C., Food Microbiology, pp. 384-387, McGraw-Hill Inc., New Delhi, 2nd ed., 1967.
3. Asano, K., K. Shinagawa, and N. Hashimoto, "Characterization of Haze-Forming Proteins of Beer and Their Roles in Chill Haze Formation," J. Am. Soc. Brew. Chem., 40 (4), 147-154, 1982.
4. Asano, K., K. Ohtsu, K. Shinagawa, and N. Hashimoto, "Affinity of Proanthocyanidins and Their Oxidation Products for Haze-forming Proteins of Beer and the Formation of Chill Haze," Agric. Biol. Chem., 48 (5), 1139-1146, 1984.
5. Boyer, P. D., H. Lardy, and K. Myrback, The Enzyme, Vol. 4, pp. 223-228, Academic Press, New York, 1960.
6. ปราณี อ่านเปรื่อง, เอนไซม์ทางอาหาร ตอนที่ 1, หน้า 117-161, ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพมหานคร, 2533.
7. Finley, J. W., W. L. Staley, and G. G. Watters, "Chill Proofing Beer with Papain Immobilized on Chitin," Proc. Biochem., 14 (7), 12-13, 1979.
8. Hartmeier, W., "Immobilized Pepsin : Properties and Use to Prevent Haze Formation in Beer and Wine," Biotechnol. Lett., 1 (5), 225-230, 1979.
9. Sheu, Y. J., and W. P. Chen, "Utilization of Domestic Bromelain for Chillproofing of Beer," Chung-kuo Nung Yeh Hua Hsueh Hui Chih, 24 (1), 63-71, 1986. (Abst.)

10. Hansen, N.L., "Chillproofing Beer with Immobilzed Proteinase," Proc. Congr.-Eur. Brew. Conv. 18th, 435-442, 1981.

11. ภาวิณี คณาสวัสดิ์, การตรึงเอนไซม์และเซลล์, หน้า 1-94, ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่, 2531.

12. Jasim, M. A., G. M. Hall, J. Mann, and K. D. A. Yaylor, "A Comparison Immobilised Protease Activities," J. Chem. Tech. Biotechnol., 40, 251-258, 1987.

13. Chiou, R. Y.-Y., and L. R. Beuchat, "Immobilization of Papain on an Anion Exchange Resin by Physical Adsorption Followed by Cross Linking with Glutaraldehyde," J. Food Biochem., 11 (2), 163-176, 1987.

14. Monsan, P., B. Duteurtre, M. Moll, and G. Durand, "Use of Papain Immobilized on Spherosil for Beer Chillproofing," J. Food Sci., 43, 424-427, 1978.

15. Weetall, H. H., "Trypsin and Papain Covalently Coupled to Porous Glass : Preparation and Characterization," Science, 116, 615-616, 1969.

16. Venkatasubramanian, K., R. Saini, and W.R. Vieth, "Immobilization of Papain on Collagen and the Use of Collagen-Papain Membranes in Beer Chill-Proofing," J. Food Sci., 40, 109-113, 1975.

17. Jin, F., and K. Toda, "Preparation of Immobilized Papain Covalently Bound on Natural Cellulose for Treatment of Beer," Biotechnol. Lett., 10 (3), 221-223, 1988.

18. Wiseman, A., Handbook of Enzyme Biotechnology, pp. 409-411, Ellis Horwood Ltd., Chichester, 2nd ed., 1985.

19. Hornby, W. E., and L. Goldstein, "Immobilization of Enzyme on Nylon," Method in Enzymology (Mosbach, K., ed.), Vol. 44, pp. 118-134, Acadermic Press, New York, 1976.

20. Onyezili, F. N., "Glutaraldehyde Activation Step in Enzyme Immobilization on Nylon," Biotechnol. Bioeng., 29, 399-402, 1987.

21. ประกอบ กิจไชยา, "การตรึงกลูโคสออกซิเดสบนผ้าไนลอนสำหรับวัดกลูโคสด้วยเอนไซม์อิเล็กโทรด," วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2531.

22. Tipayang, P., and M. Kozaki, "Lactic Acid Production by a New *Lactobacillus* sp., *Lactobacillus vaccinostercus* Kosaki and Okada sp. nov., Immobilized in Calcium Alginate," J. Ferment. Technol., 60, 595-598, 1982.

23. AOAC., "Association of Official Analytical Chemists," 14th ed., Washington, D.C., 1984.

24. Treven, D. M., Immobilized Enzymes : An Introduction and Application in Biotechnology, pp. 11-102, John Wiley & Sons Ltd., New York, 1980.

25. Anprung, P., S. Chuengsaengsatityaporn, and C. Thunpithayakul, "Immobilized Rennin for Cheese Making I : Preparation and Enzymic Properties of Rennin Immobilized on Sand," Asean Food J., 4 (3), 107-110, 1989.

26. นฤมล ศรีพุทธิรัตน์, "การเตรียมเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปเพื่อทดลองผลิตแอลไลซีนจากกากสับปะรด," วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2532.

27. พรรณจิรา วงศ์สวัสดิ์, "เบตา-กาแลคโตสิเดสตรึงรูปบนคาร์บอนสำหรับการผลิตน้ำตาลไซรัปจากหางนมเนยแข็ง," วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2533.

28. Chibata, I., Immobilized Enzyme, pp. 108-142, Kodansha Ltd., Tokyo, 1978.

29. Narinesingh, D., and T. T. Ngot, "Papain Covalently Immobilized on Fractogel Derivative : Preparation, Bioreactor Flow Kinetics, and Stability," Biotechnol. Appl. Biochem., 9, 450-461, 1987.

30. Lewis, M. J., S. C. Krumland, and D. J. Muhleman, "Dye-Binding Method for Measurement of Protein in Wort and Beer," J. Am. Soc. Brew. Chem., 38 (2), 37-41, 1980.

31. Yasunobu, N. L., and J. McConn, "*Bacillus subtilis* Neutral Protease," Method in Enzymology (Prelmann, G. E., and L. Lorand, eds.), Vol. 19, pp. 569-575, Academic Press, New York, 1971.

32. Walter, H. E., "Method with Hacmoglobin, Casein and Azocoll as Substrate," Method of Enzymatic Analysis (Bermeyer, J. and M. GraBl, eds.), Vol. 5, pp. 270-277, Verlag Chemic Chemie GmbH, Weinheim, 3rd ed., 1984.

33. Hii, V., and W. C. Herwing, "Determination of High Molecular Weight Proteins in Beer Using Coomassie Blue," J. Am. Soc. Brew. Chem., 40 (2), 46-50, 1982.

34. AOAC, "Association of Official Analytical Chemists," 15th ed., Washington, D.C., 1990.

35. Pollock, J. R. A., Brewing Science, Vol. 2, pp. 265-266, Academic Press, London, 1981.

36. Haslam, J., and H. A. Willis, Identification and Analysis of Plastic, pp. 108-133, Iliffe Books Ltd., London, 1965.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ข้อมูลเพิ่มเติม

ก-1 วิธีวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ Neutrase (31, 32)

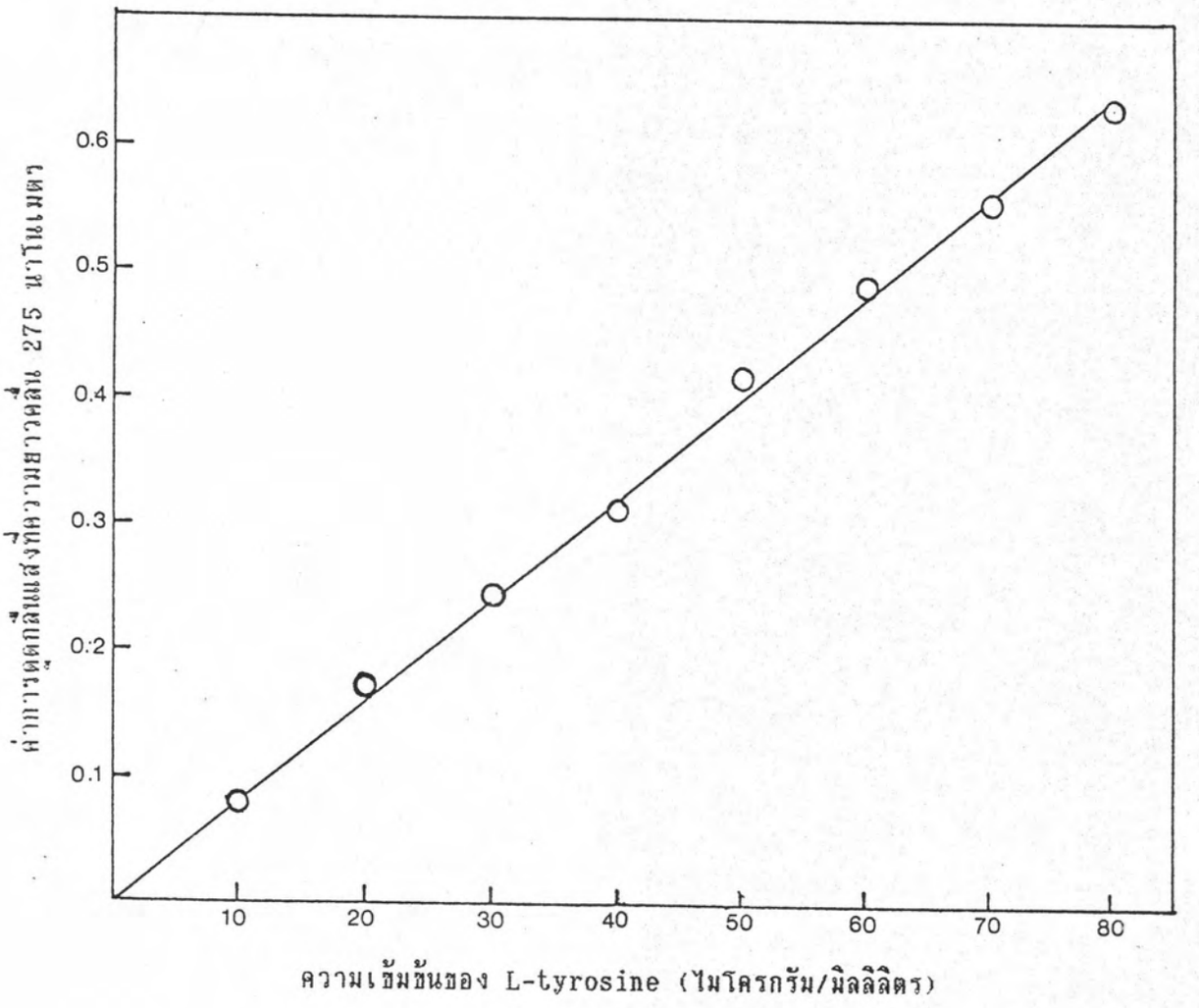
ก-1.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานของ L-tyrosine สำหรับวัดแอคติวิตีของ Neutrase

เตรียมสารละลายมาตรฐาน L-tyrosine ในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นในช่วง 10-80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้น ดังรูปที่ ก-1

ก-1.2 วิธีวัดแอคติวิตีของ Neutrase อิสระ

นำหลอดตัวอย่างที่บรรจุสารละลายเคซีนใน 0.1 โมล/ลิตร ทรีสบัฟเฟอร์ pH 7.1 ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ไปบ่มใน shaking water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เติมสารละลายเอนไซม์ที่ต้องการวัดแอคติวิตี 1 มิลลิลิตร บ่มต่อไปเป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายกรดไตรคลอโรแอซีติกความเข้มข้น 0.3 โมล/ลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 3,500 รอบ/นาที นาน 10 นาที กรองส่วนใสด้วยกระดาษกรอง Whatman No.2 จากนั้นนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร

สำหรับหลอดเปรียบเทียบ (blank) จะเติมสารละลายกรดไตรคลอโรแอซิติกก่อน หลังจากบ่ม 10 นาที แล้วจึงเติมสารละลายเอนไซม์



รูปที่ ก-1 กราฟมาตรฐานของ L-tyrosine สำหรับหาแอคติวิตีของเอนไซม์ Neutrase

ก-1.3 วิธีวัดแอคติวิตีของ Neutrase ตริงรูป

นำขวดรูปชมพู่ที่บรรจุสารละลายเคซีนใน 0.1 โมล/ลิตร ทรีสบัฟเฟอร์ pH 7.1 ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ไปบ่มใน shaking water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ใส่ Neutrase ตริงรูปบนผ้าไนลอนขนาด 2.5x2.5 ตารางเซนติเมตร จำนวน 2 แผ่น บ่มต่อไปเป็นเวลา 20 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายกรดไตรคลอโรแอซีติกความเข้มข้น 0.3 โมล/ลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร รินสารละลายปฏิกิริยาไปหมุนเหวี่ยงที่ 3,500 รอบ/นาที นาน 10 นาที กรองส่วนใสด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 2 นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร

สำหรับหลอดเปรียบเทียบจะเติมสารละลายกรดไตรคลอโรแอซีติกก่อน หลังจากบ่ม 10 นาที แล้วจึงเติม Neutrase ตริงรูป

1 ยูนิตเอนไซม์ (unit enzyme) หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เปลี่ยนสับสเตรทเคซีนไปเป็นผลิตภัณฑ์ (คำนวณเปรียบเทียบกับ L-tyrosine) 1 ไมโครกรัม ในเวลา 1 นาที ที่ 37 องศาเซลเซียส หรือในภาวะที่กำหนด

ก-2 วิธีวิเคราะห์ปริมาณ high molecular weight proteins (HMWP) โดย dye-binding method (30, 33)

ก-2.1 วิธีเตรียมสารละลาย coomassie

ละลาย coomassie brilliant blue G-250 0.100 กรัม ในเอธิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมกรดฟอสฟอริกความเข้มข้นร้อยละ 85 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น กรองสารละลายที่ได้ด้วยกระดาษกรอง เตรียมใหม่ทุก 3 วัน

ก-2.2 วิธีเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

ละลาย bovine serum albumin (BSA) 0.2500 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตร ได้สารละลาย BSA ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 ปิเปตสารละลายดังกล่าว 400 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 10 มิลลิลิตร ได้สารละลายโปรตีนมาตรฐานความเข้มข้นร้อยละ 0.04

ก-2.3 การเตรียมกราฟมาตรฐาน

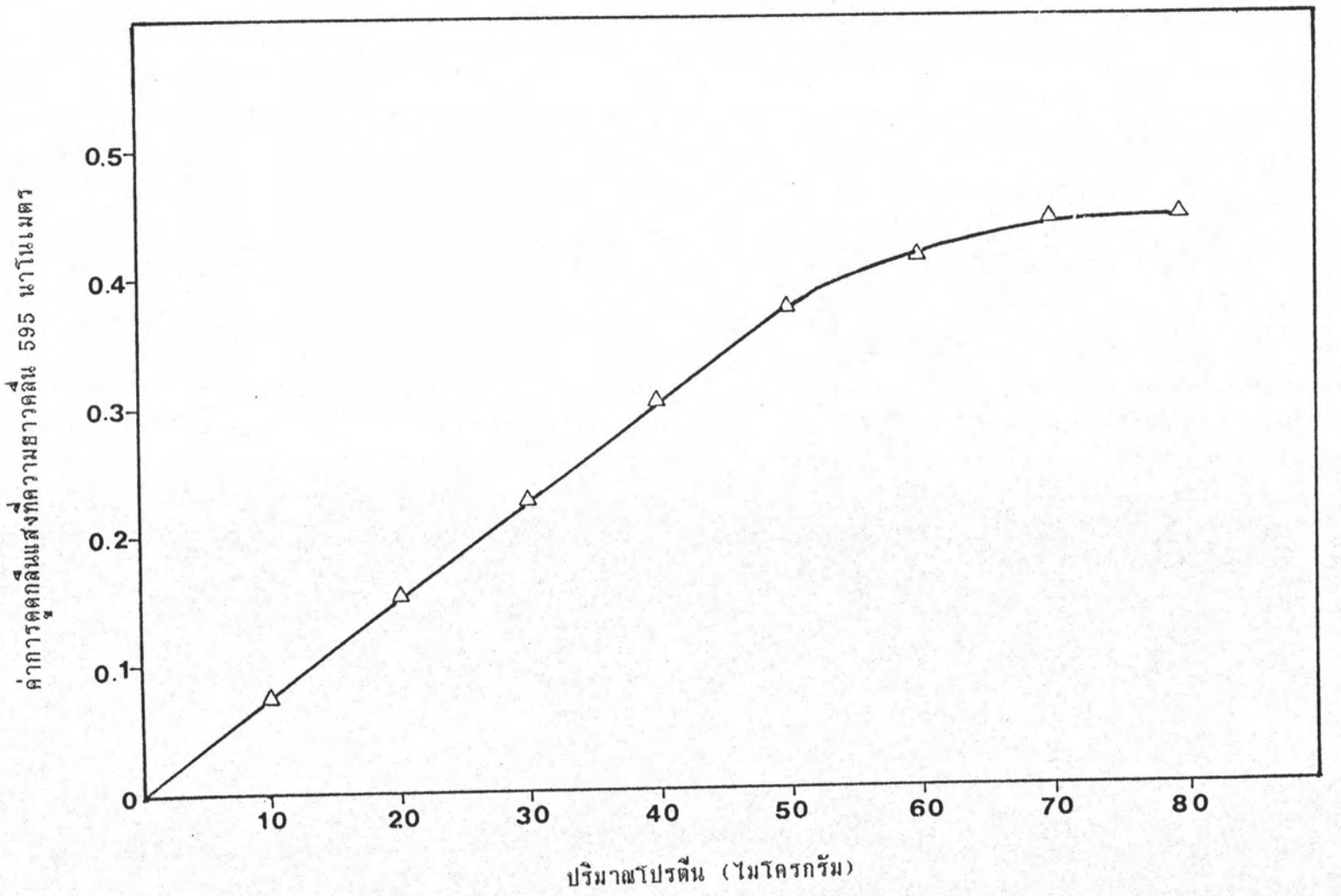
ปิเปตสารละลายโปรตีนมาตรฐานความเข้มข้นร้อยละ 0.04 ปริมาตรต่าง ๆ ตามตารางที่ ก-2 เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรของสารละลายโปรตีนเป็น 200 ไมโครลิตร เติมสารละลาย coomassie 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณ HMWP ดังรูปที่ ก-2

ก-2.4 วิธีวิเคราะห์ปริมาณ HMWP ในเบียร์

ปิเปตตัวอย่างเบียร์ 0.2 มิลลิลิตร เติมสารละลาย coomassie 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร อ่านปริมาณ HMWP จากกราฟมาตรฐาน (รูปที่ ก-2)

ตารางที่ ก-2 การเตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ HMWP ในเบียร์โดย dye-binding method

หลอดที่	ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัม)	0.04% BSA (ไมโครลิตร)	น้ำกลั่น (ไมโครลิตร)	สารละลาย coomassie (มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 595 นาโนเมตร
Blank	0	0	200	10.0	0.000
1	10	25	175	10.0	0.075
2	20	50	150	10.0	0.150
3	30	75	125	10.0	0.230
4	40	100	100	10.0	0.300
5	50	125	75	10.0	0.370
6	60	150	50	10.0	0.410
7	70	175	25	10.0	0.440
8	80	200	0	10.0	0.440



รูปที่ ก-2 กราฟมาตรฐานของ bovine serum albuminสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ HMWP ในเบียร์

ก-3 วิธีวัดความขุ่นของเบียร์โดย Nephelometric method (34)

ก-3.1 วิธีเตรียมสารเคมี

Hydrazine sulfate solution : ละลาย $H_4N_2.H_2SO_4$ 1.000 กรัม ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร จนละลายหมด ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

Stock formazin suspension : ละลาย hexamethylenetetramine 2.500 กรัม ในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร ใส่ขวดที่มีฝาปิด ปิเปต hydrazine sulfate solution ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดดังกล่าว ปิดฝาให้แน่น ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 คืน (เตรียมใหม่ทุก 3 เดือน)

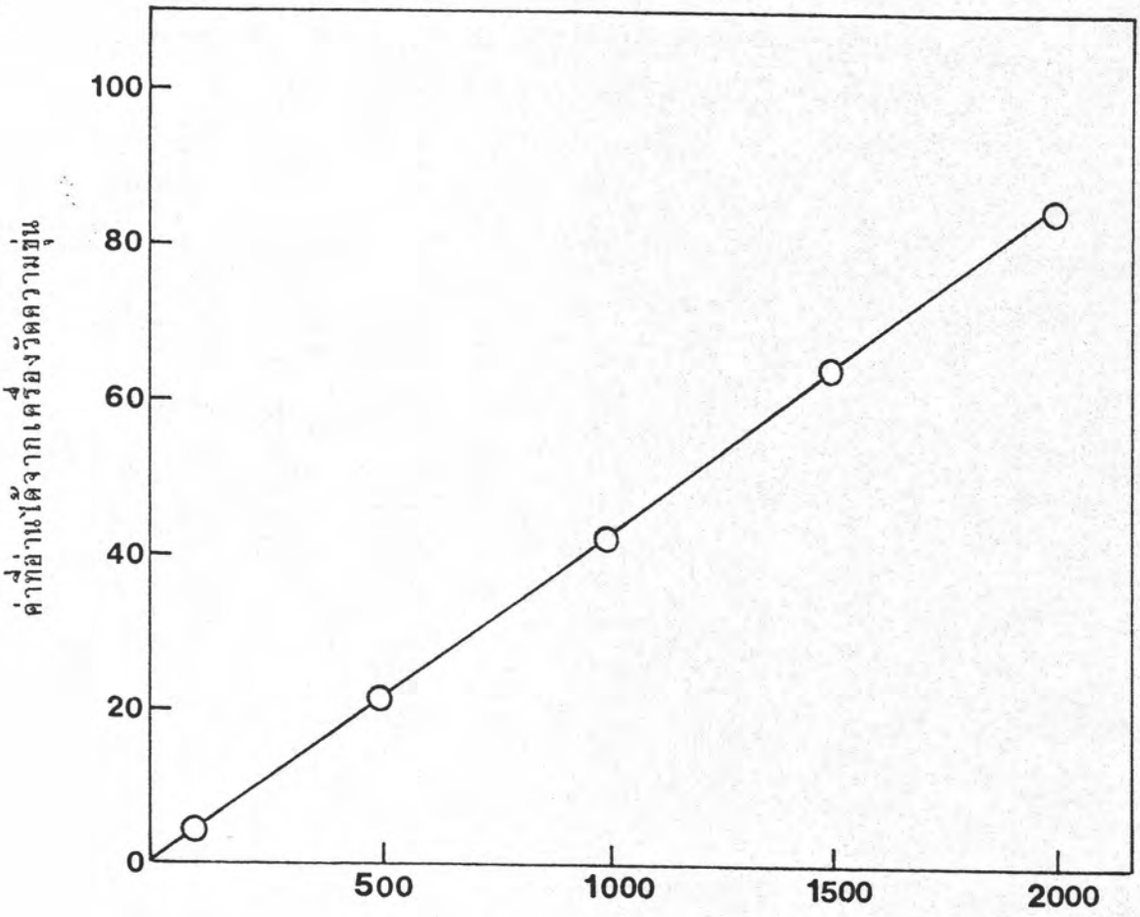
Turbidity standard : เตรียม turbidity standard 10,000 FTU โดยเจือจาง stock formazin suspension 14.5 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นเตรียม turbidity standard 100, 500, 1,000, 1,500 และ 2,000 FTU โดยเจือจางจาก turbidity standard 10,000 FTU (FTU = Formazin Turbidity Units)

ก-3.2 การเตรียมกราฟมาตรฐาน

วัดความขุ่นของ turbidity standard ที่เตรียมได้ด้วยเครื่อง turbidimeter เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง FTU กับค่าที่วัดได้ ดังรูปที่ ก-3

ก-3.3 วิธีวัดความขุ่นของตัวอย่างเบียร์

บ่มตัวอย่างเบียร์ที่ต้องการวัดความขุ่นโดยแช่ในน้ำที่มีอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน และที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส อีก 1 วัน (35) รินตัวอย่างเบียร์ลงในหลอดบรรจุตัวอย่าง แล้วแช่ในอ่างน้ำแข็งที่เติมเอธิลแอลกอฮอล์เพื่อป้องกันการเกิดฝ้าไอน้ำจับข้างหลอด เมื่อตัวอย่างเบียร์มีอุณหภูมิลดลงถึง 0 องศาเซลเซียส แล้วนำไปวัดความขุ่นด้วยเครื่อง turbidimeter และเปลี่ยนค่าที่อ่านได้เป็นค่าความขุ่นในหน่วย FTU โดยใช้กราฟมาตรฐาน



รูปที่ ก-3 กราฟมาตรฐานสำหรับวัดความขุ่นของเบียร์

ก-4 วิธีวิเคราะห์ความเสถียรของฟองเบียร์ (ดัดแปลงจากวิธีของ AOAC) (34)

รินตัวอย่างเบียร์ที่มีอุณหภูมิคงที่เท่ากับอุณหภูมิห้อง 100 มิลลิลิตร ใส่กรวยแยกขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าให้เกิดฟองด้วยแรงที่สม่ำเสมอ 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ 30 วินาที เปิดฝากรวยแยกออก ไขเบียร์ส่วนที่เป็นของเหลวออกภายในเวลา 30 วินาที เมื่อหยดสุดท้ายของเบียร์ไหลออกรีบไขปิดทันที พร้อมกับเริ่มจับเวลา เมื่อเวลาผ่านไป 120 วินาที ให้ไขเบียร์ส่วนที่เป็นของเหลวออกใส่กระบอกตวงขนาด 10 มิลลิลิตร ภายในเวลา 15 วินาที เมื่อเบียร์หยดสุดท้ายไหลออกรีบไขปิดทันทีพร้อมกับอ่านเวลาที่ใช้ทั้งหมดเป็น "t" ในหน่วยวินาที (ไม่เกิน 135 วินาที) และอ่านปริมาตรของเบียร์ในกระบอกตวงเป็น "b" มิลลิลิตร จากนั้นใช้ 2-propanol 1.5

มิลลิลิตร ชะผนังของกรวยแยกเพื่อให้ฟองเบียร์ที่เหลือกลับคืนเป็นของเหลวหมด ไขของเหลวลงในกระบอกตวง อ่านปริมาตรของเหลวที่เกิดจากฟองเบียร์เป็น "c" มิลลิลิตร โดย c เท่ากับปริมาตรที่อ่านได้จากกระบอกตวงลบด้วย 1.5

วิธีคำนวณ : คำนวณในรูปของค่าซิกมา (sigma value) ดังนี้

$$\text{sigma value} = t/\{2.303 \log [(b+c)/c]\}$$

ก-5 รายละเอียดของเอนไซม์ Neutrase

เอนไซม์โปรติเอสที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีชื่อทางการค้า คือ Neutrase 0.5 L ซึ่งเป็นนิวทรัลโปรติเอสที่เตรียมได้จากการหมักแบบจุ่ม (submerged fermentation) ของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์เฉพาะ

โดยทั่วไปโปรติเอสที่เตรียมได้จาก *Bacillus subtilis* จะมีเอนไซม์ที่เป็นองค์ประกอบรวมอยู่ 2 ชนิด คือ นิวทรัลโปรติเอสและแอลคาไลโปรติเอส แต่ในกรณีของ Neutrase นี้จะประกอบด้วยนิวทรัลโปรติเอสเท่านั้น สำหรับสมบัติของนิวทรัลและแอลคาไลโปรติเอสแสดงในตารางที่ ก-5 จะเห็นว่าโปรติเอสทั้งสองชนิดมีบริเวณเร่งที่ต่างกัน ทำให้มีความจำเพาะของเอนไซม์ (enzyme specificity) ต่างกัน นอกจากนี้ยังมีข้อสังเกตว่าตัวยับยั้งโปรติเอส (protease inhibitor) ที่มีอยู่ในข้าวบาร์เลย์ไม่มีผลต่อนิวทรัลโปรติเอส แต่มีผลในการยับยั้งแอลคาไลโปรติเอส

ตารางที่ ก-5 สมบัติของนิวทรัลและแอลคาไลโปรติเอสที่เตรียมได้จาก *Bacillus subtilis*

	นิวทรัลโปรติเอส	แอลคาไลโปรติเอส
บริเวณเร่ง	Zn^{++}	Serine
ผลของ Ca^{++} ต่อการเพิ่มเสถียรภาพ	+	0
ถูกยับยั้งโดย :		
DFP[1] & PMSF[2]	0	+
EDTA[3] & phosphate	+	0
Barlay extract	0	+

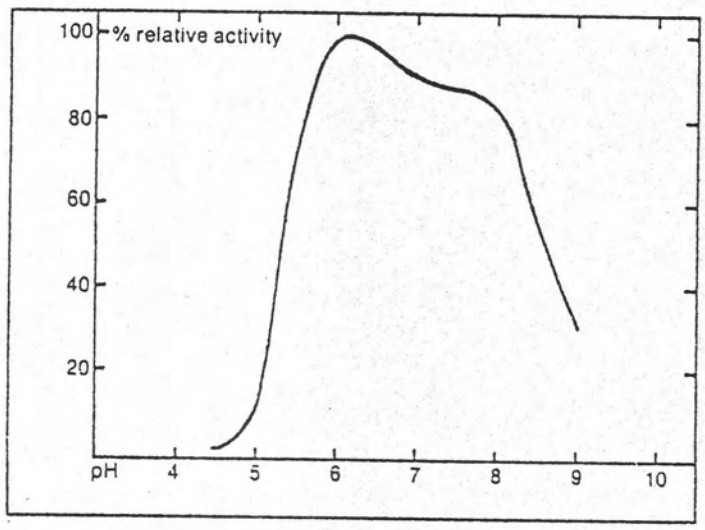
1) DFP = Diisopropylfluorophosphate

2) PMSF = Phenylmethanesulfonylfluoride

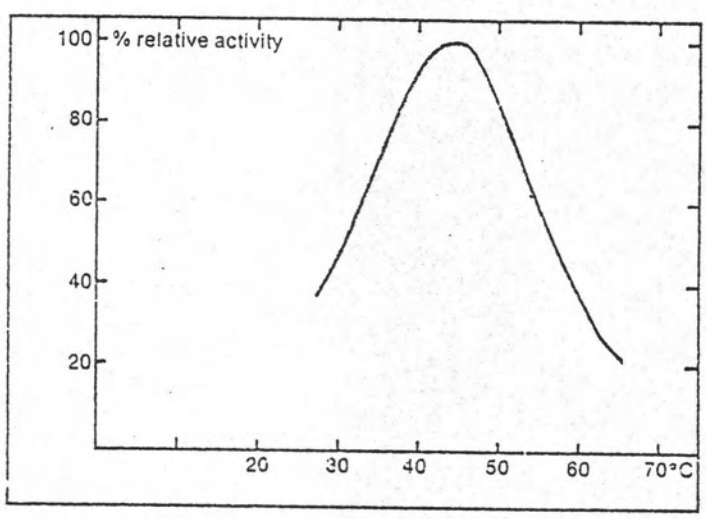
3) EDTA = Ethylenediaminetetraacetic acid

Neutrase 0.5 L มีลักษณะเป็นของเหลวสีน้ำตาลเข้ม ละลายน้ำได้ดี มีความหนาแน่นประมาณ 1.25 กรัม/มิลลิลิตร มีแอคติวิตี 0.5 AU/กรัม โดยที่ 1 AU (Anson Unit) หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายฮีโมโกลบิน (denatured hemoglobin) ภายใต้ภาวะที่กำหนด (25 องศาเซลเซียส pH 7.5 10 นาที) ให้ผลิตภัณฑ์ที่ละลายได้ในกรดไตรคลอโรแอซีติกและเกิดสีกับนีนอลรีเอเจนต์เท่ากับ 1 มิลลิสมมูล (milliequivalent) ของไทโรซีน

แอคติวิตีของ Neutrase ที่ pH และอุณหภูมิต่าง ๆ แสดงในรูปที่ ก-5.1 และ ก-5.2 ตามลำดับ จะเห็นว่าภาวะที่เหมาะสมสำหรับการใช้งานของ Neutrase คือ อุณหภูมิ 45-55 องศาเซลเซียส ที่ pH 5.5-7.5

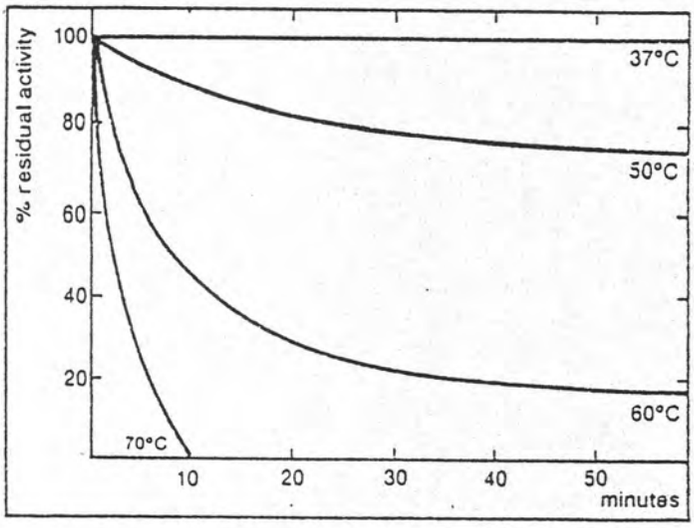


รูปที่ ก-5.1 ผลของ pH ต่อแอคติวิตีของ Neutrase



รูปที่ ก-5.2 ผลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของ Neutrase

เสถียรภาพของ Neutrase เมื่ออยู่ในรูปของสารละลายที่อุณหภูมิต่าง ๆ แสดงในรูปที่ ก-5.3



รูปที่ ก-5.3 ผลของอุณหภูมิต่อเสถียรภาพของ Neutrase
ความเข้มข้น : 0.75 AU/100 มิลลิลิตร
pH : 7.0 (ฟอสเฟตบัฟเฟอร์)

โดยทั่วไปการเก็บ Neutrase ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน จะไม่มีการสูญเสียแอคติวิตี และหลังจากนั้นเอนไซม์จะมีแอคติวิตีลดลงร้อยละ 1-2 ต่อเดือน การเก็บ Neutrase ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส อายุการเก็บจะนานขึ้นโดยไม่มีการสูญเสียแอคติวิตีอย่างน้อย 1 ปี

สำหรับการประยุกต์ใช้นั้นสามารถนำ Neutrase ไปใช้ในกระบวนการใด ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายโปรตีนให้ได้เปปไทด์และกรดอะมิโน ในอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์มีการใช้ Neutrase แทนโปรติเอสจากข้าวมอลท์ในกรณีที่ใช้ธัญพืชอื่นแทนข้าวบาร์เลย์

เนื่องจาก Neutrase สามารถใช้ในอุตสาหกรรมผลิตเบียร์ได้ดีดังกล่าว ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ Neutrase สำหรับการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์

ก-6 เครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์ตริงรูป

เครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์ตริงรูปที่ประกอบขึ้นสำหรับใช้ในงานวิจัยนี้เป็นแบบ spiral membrane reactor ซึ่งมีส่วนประกอบและอุปกรณ์ที่ใช้ร่วม ดังนี้

1. คอลัมน์ มีลักษณะเป็นคอลัมน์ 2 ชั้น โดยใช้ท่อพอลิไวนิลคลอไรด์ (PVC) ชนิดใส มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายในต่างกัน 2 ขนาด คือ 2.3 และ 1.7 เซนติเมตร ท่อใหญ่ทำหน้าที่เป็นท่อน้ำรักษาอุณหภูมิห่อหุ้มภายนอก ท่อเล็กภายในสำหรับบรรจุ Neutrase ตริงรูป และเป็นส่วนที่เบียร์ไหลผ่านโดยมีจุกยางปิดที่ปลายทั้งสองด้าน ดังรูปที่ ก-6.1 ความยาวของท่อเล็กเท่ากับ 75.0 เซนติเมตร วัดจากจุดของเหลวไหลเข้าถึงจุดของเหลวไหลออก ดังนั้นปริมาตรของเครื่องปฏิกรณ์เท่ากับ 170.2 ลูกบาศก์เซนติเมตร

Neutrase ตริงรูปบนผ้าไนลอนที่บรรจุในคอลัมน์นี้จะม้วนให้มีลักษณะเป็นท่อกลม ดังรูปที่ ก-6.2 แล้วสอดเข้าไปในท่อเล็กของคอลัมน์

2. หม้อแปลงไฟฟ้า ทำหน้าที่แปลงไฟฟ้ากระแสสลับให้เป็นกระแสตรง (AC adaptor input AC 220 V 50 c/s output DC 3A 4.5-12 V) สำหรับใช้กับเครื่องสูบ (รูปที่ ก-6.3)

3. เครื่องสูบ (pump) เป็นเครื่องสูบขนาด 300 และ 500 แกลลอนต่อชั่วโมง ทำหน้าที่สูบน้ำหรือเบียร์ให้เกิดการไหลเวียนในระบบ (รูปที่ ก-6.4)

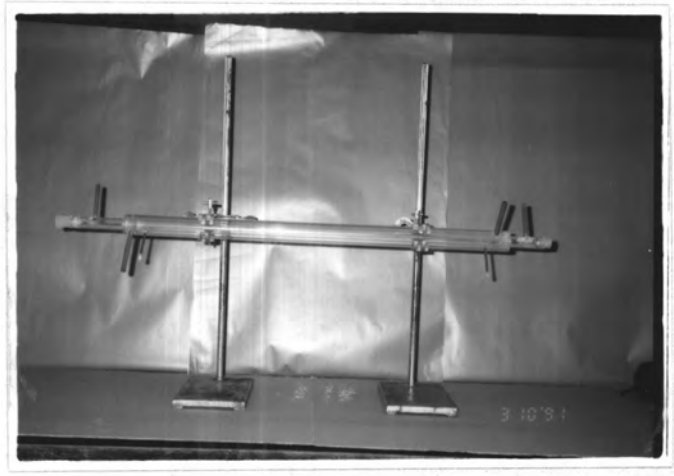
4. ท่อเชื่อม ใช้สายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.5 มิลลิเมตร ทำหน้าที่เชื่อมระหว่างเครื่องสูบกับจุดที่ของเหลวไหลเข้าคอลัมน์ และระหว่างจุดที่ของเหลวไหลออกจากคอลัมน์กับภาชนะบรรจุเบียร์ หรืออ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

5. วาล์วเปิด-ปิด ทำหน้าที่ควบคุมอัตราการไหลของเบียร์ที่ผ่านเข้าคอลัมน์โดยการขันหรือคลายน็อต (รูปที่ ก-6.5)

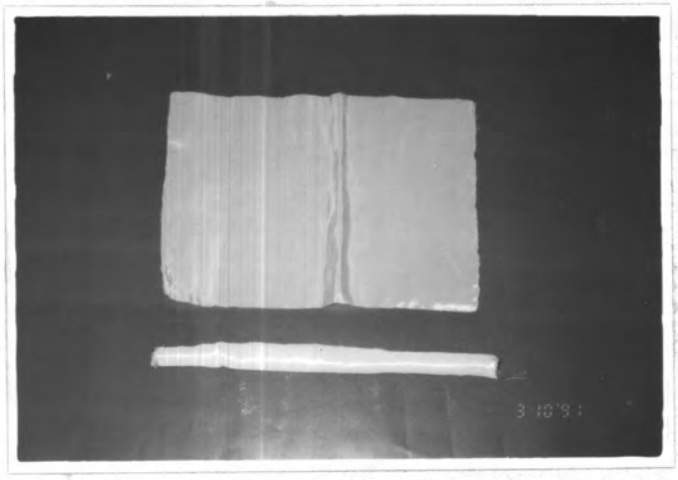
6. ภาชนะบรรจุเบียร์ ใช้ภาชนะสเตนเลสปากกว้างสำหรับบรรจุตัวอย่างเบียร์

7. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) (รูปที่ ก-6.6)

เมื่อประกอบเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์ตริงรูปเข้ากับอุปกรณ์อื่น ๆ จะได้ระบบของเครื่องปฏิกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง ดังรูปที่ ก-6.7 และ ก-6.8



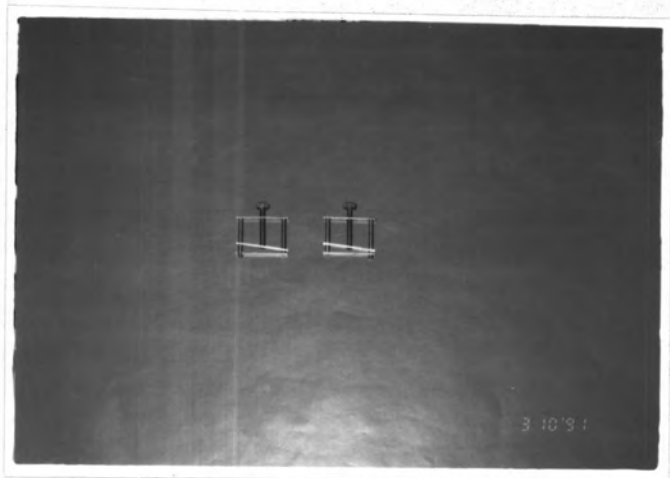
รูปที่ ก-6.1 คอลัมน์ 2 ชั้น ชั้นนอกเป็นท่อน้ำควบคุมอุณหภูมิ ชั้นในสำหรับบรรจุ Neutrase ตริงรูป



รูปที่ ก-6.2 วิธีม้วน Neutrase ตริงรูป บนผ้าไนลอนให้เป็นท่อกลม สำหรับสอดเข้าไปในคอลัมน์

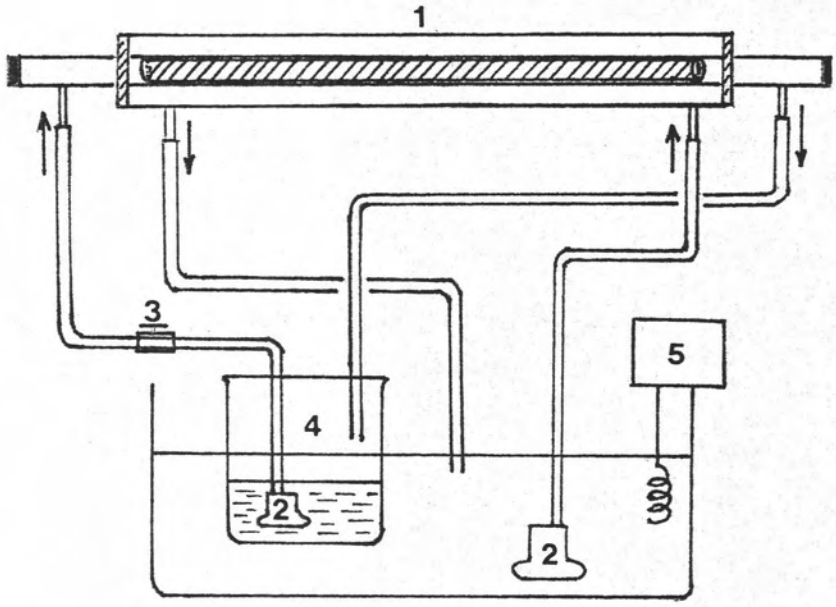
รูปที่ ก-6.3 หม้อแปลงไฟฟ้ากระแสสลับ

รูปที่ ก-6.4 เครื่องสูบขนาด 300 แกลลอนต่อชั่วโมง (ซ้าย)
และ 500 แกลลอนต่อชั่วโมง (ขวา)



รูปที่ ก-6.5 วาล์วเปิด-ปิด สำหรับควบคุมอัตราการไหลของเบียร์

รูปที่ ก-6.6 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ



รูปที่ ก-6.7 แผนผังระบบเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์ตรึงรูปที่ใช้ในการทดลองป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์

1 = คอลัมน์ที่บรรจุ Neutrase ตรึงรูป

2 = เครื่องสูบ

3 = วาล์วเปิด-ปิด

4 = ภาชนะบรรจุเบียร์

5 = อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

รูปที่ ก-6.8 ระบบเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์ตรึงรูปที่ใช้ในการทดลองป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์

ก-7 วิธีเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์

ก-7.1 โซเดียมแอซีเตท-กรดแอซีติกบัฟเฟอร์ pH 3.7-5.6

สารละลาย A : สารละลาย $CH_3COONa.3H_2O$ ความเข้มข้น 0.1 โมล/ลิตร

สารละลาย B : สารละลาย CH_3COOH ความเข้มข้น 0.1 โมล/ลิตร

ผสมสารละลาย A กับสารละลาย B ตามตารางที่ ก-7.1

ตารางที่ ก-7.1 วิธีเตรียมโซเดียมแอซีเตท-กรดแอซีติกบัฟเฟอร์ pH 3.7-5.6

pH	ปริมาตรสารละลาย A (มิลลิลิตร)	ปริมาตรสารละลาย B (มิลลิลิตร)
3.7	10.0	90.0
3.8	12.0	88.0
4.0	18.0	82.0
4.2	26.5	73.5
4.4	37.0	63.0
4.6	49.0	51.0
4.8	59.0	41.0
5.0	70.0	30.0
5.2	79.0	21.0
5.4	86.0	14.0
5.6	91.0	9.0

ก-7.2 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5.8-8.0

สารละลาย A : สารละลาย $Na_2HPO_4.2H_2O$ ความเข้มข้น 0.1 โมล/ลิตร

สารละลาย B : สารละลาย $NaH_2PO_4.H_2O$ ความเข้มข้น 0.2 โมล/ลิตร

ตารางที่ ก-7.2 วิธีเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5.8-8.0

pH	ปริมาตรสารละลาย A (มิลลิลิตร)	ปริมาตรสารละลาย B (มิลลิลิตร)
5.8	4.00	46.00
6.0	6.15	43.85
6.2	9.25	40.75
6.4	13.25	36.75
6.6	18.75	31.25
6.8	24.50	25.50
7.0	30.50	19.50
7.2	36.00	14.00
7.4	40.50	9.50
7.6	43.50	6.50
7.8	45.75	4.25
8.0	47.35	2.65

ผสมสารละลาย A กับสารละลาย B ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

ก-7.3 ทรีสบัฟเฟอร์ pH 7.1-8.9

สารละลาย A : สารละลาย tris (hydroxymethyl) aminomethane ความเข้มข้น 0.1 โมล/ลิตร

สารละลาย B : สารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 โมล/ลิตร

ตารางที่ ก-7.3 วิธีเตรียมทรีสบัฟเฟอร์ pH 7.1-8.9

pH	ปริมาตรสารละลาย A (มิลลิลิตร)	ปริมาตรสารละลาย B (มิลลิลิตร)
7.1	50.0	45.7
7.2	50.0	44.7
7.3	50.0	43.4
7.4	50.0	42.0
7.5	50.0	40.3
7.6	50.0	38.5
7.7	50.0	36.6
7.8	50.0	34.5
7.9	50.0	32.0
8.0	50.0	29.2
8.1	50.0	26.2
8.2	50.0	22.9
8.3	50.0	19.9
8.4	50.0	17.2
8.5	50.0	14.7
8.6	50.0	12.4

ตารางที่ ก-7.3 (ต่อ)

pH	ปริมาตรสารละลาย A (มิลลิลิตร)	ปริมาตรสารละลาย B (มิลลิลิตร)
8.7	50.0	10.3
8.8	50.0	8.5
8.9	50.0	7.0

ผสมสารละลาย A กับสารละลาย B ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

ก-7.4 บอเรตบัฟเฟอร์ pH 8.1-9.0

สารละลาย A : สารละลาย $Na_2B_4O_7.10H_2O$ ความเข้มข้น 0.025 โมล/ลิตร

สารละลาย B : สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 โมล/ลิตร

ตารางที่ ก-7.4 วิธีเตรียมบอเรตบัฟเฟอร์ pH 8.1-9.0

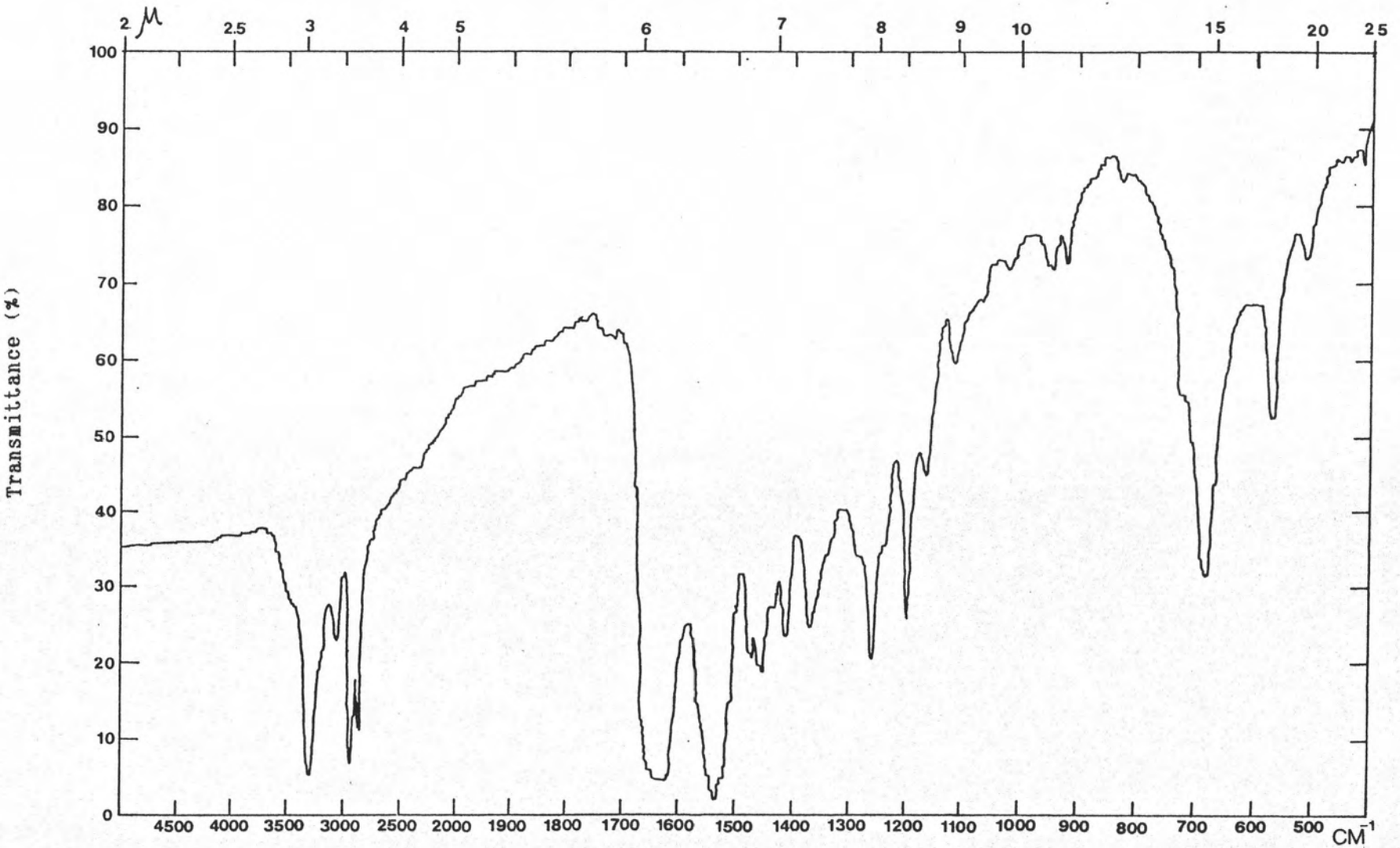
pH	ปริมาตรสารละลาย A (มิลลิลิตร)	ปริมาตรสารละลาย B (มิลลิลิตร)
8.1	50.0	19.7
8.2	50.0	18.8
8.3	50.0	17.7
8.4	50.0	16.6
8.5	50.0	15.2
8.6	50.0	13.5
8.7	50.0	11.6
8.8	50.0	9.4
8.9	50.0	7.1
9.0	50.0	4.6

ผสมสารละลาย A กับสารละลาย B ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

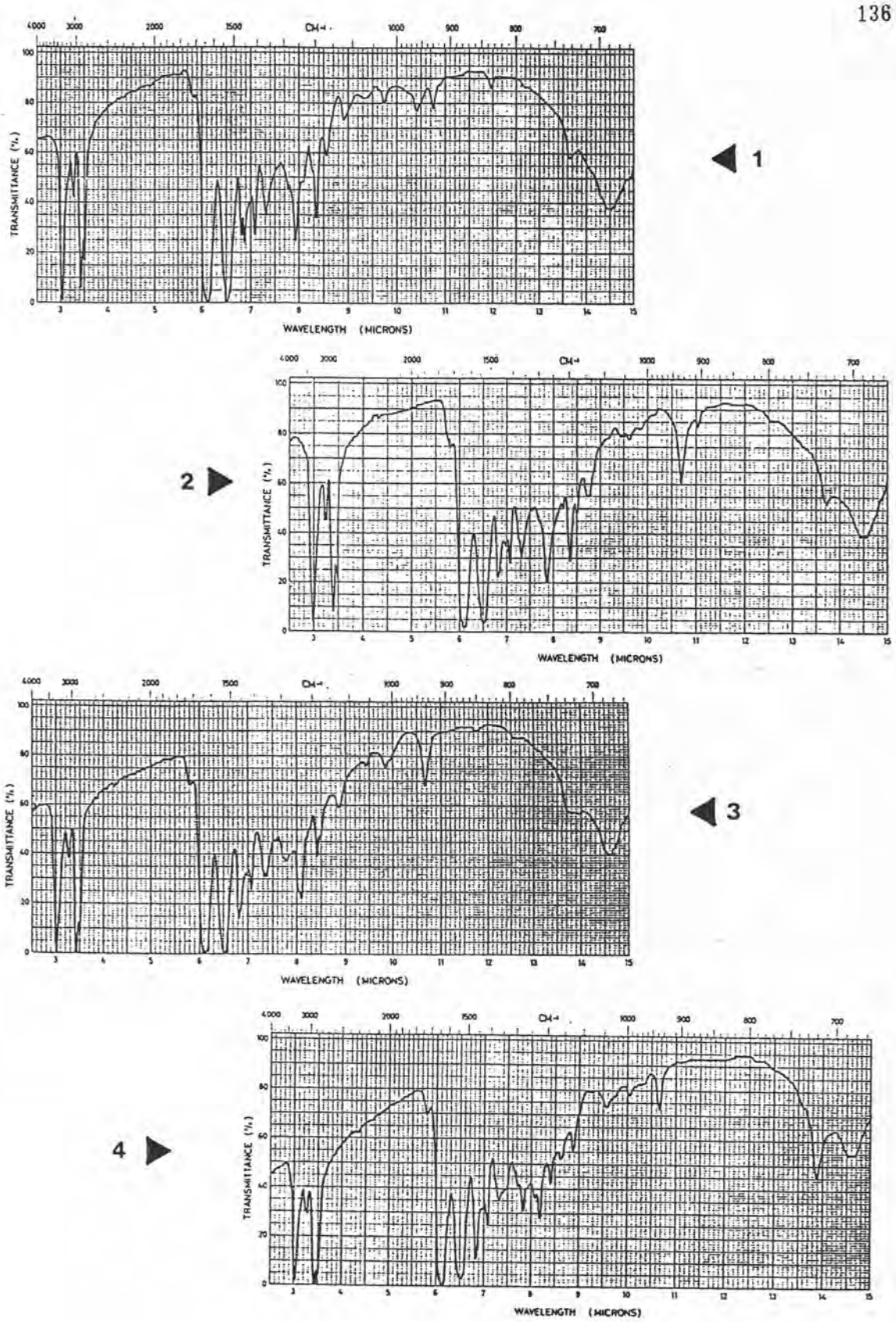
ก-8 วิธีวิเคราะห์ชนิดของผ้าไนลอนโดยอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (31)

เตรียมแผ่นฟิล์มโดยละลายตัวอย่างผ้าไนลอนให้มีความเข้มข้นประมาณร้อยละ 2 ในกรดฟอร์มิกที่มีความเข้มข้นร้อยละ 90 รินสารละลายดังกล่าวประมาณ 10 มิลลิลิตร ใส่ในจานแก้วที่มีผิวเรียบ นำไปอบที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ลอกแผ่นฟิล์มที่ได้ออกล้างด้วยน้ำกลั่น ทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปวิเคราะห์ด้วยอินฟราเรดสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

เปรียบเทียบอินฟราเรดสเปกตรัมของผ้าไนลอนในรูปที่ ก-8.1 กับสเปกตรัมมาตรฐานของไนลอน 6, ไนลอน 6,6, ไนลอน 6,10 และไนลอน 11 ในรูปที่ ก-8.2 (1), (2), (3) และ (4) ตามลำดับ จะเห็นว่าผ้าไนลอนมีสเปกตรัมเหมือนสเปกตรัมมาตรฐานของไนลอน 6 ทุกประการ กล่าวคือ ในช่วง 900-1000 cm^{-1} ไนลอน 6 เท่านั้นที่ปรากฏพีกคู่ที่ประมาณ 920 และ 960 cm^{-1} สำหรับไนลอน 6,6, ไนลอน 6,10 และไนลอน 11 จะปรากฏพีกเดี่ยวที่ชัดเจนในช่วงดังกล่าว ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าผ้าไนลอนที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นชนิดไนลอน 6



รูปที่ ก-8.1 อินฟราเรดสเปกตรัมของผ้าไนลอน



รูปที่ ก-8.2 สเปกตรัมมาตรฐานของ ไนลอน 6 (1), ไนลอน 6,6 (2), ไนลอน 6,10 (3) และไนลอน 11 (4)

ภาคผนวก ข

ตัวอย่างการวิเคราะห์และคำนวณข้อมูล

ข-1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลแบบสุ่มตลอดสำหรับการทดลองแบบแฟคทอเรียล 2 ปัจจัย

ทำได้โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป "FLASH CAT" หรือใช้วิธีคำนวณ ดังตารางที่ ข-1

ตารางที่ ข-1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลแบบสุ่มตลอด สำหรับการทดลองแบบแฟคทอเรียล 2 ปัจจัย

SOV	df	SS	MS	$F_{calculated}$	F_{table}
A	(a - 1)	$\sum_{i=1}^{a} Y_{i...}^2/br - CT$	SS_A/df_A	MS_A/MS_E	$f(\% \text{ sig.}, df_A, df_E)$
B	(b - 1)	$\sum_{j=1}^{b} Y_{.j.}^2/ar - CT$	SS_B/df_B	MS_B/MS_E	$f(\% \text{ sig.}, df_B, df_E)$
AB	(a-1)(b-1)	$\sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b} Y_{ij.}^2/r - CT - SS_A - SS_B$	SS_{AB}/df_{AB}	MS_{AB}/MS_E	$f(\% \text{ sig.}, df_{AB}, df_E)$
Error	ab(r-1)	$\sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b}\sum_{k=1}^{r} Y_{ijk}^2 - CT - SS_A - SS_B - SS_{AB}$	SS_E/df_E		
Total	abr - 1				

โดยที่ $CT = \left(\sum_{i=1}^{a} \sum_{j=1}^{b} \sum_{k=1}^{r} Y_{ijk} \right)^2 / n$

เมื่อ A และ B คือ ปัจจัยที่ศึกษา

a และ b คือ จำนวนระดับทั้งหมดของปัจจัย A และ B ตามลำดับ

r คือ จำนวนของการทำซ้ำ (replication) ในแต่ละทรีตเมนต์

n คือ จำนวนข้อมูลทั้งหมด = abr

Y_{ijk} คือ แต่ละระดับของปัจจัย A และ B ตามลำดับ

k คือ แต่ละค่าของการทำซ้ำ

. คือ การรวมค่าของข้อมูลตามแนวอักษรนั้น ๆ ในทุกระดับของปัจจัยที่เหลือ เช่น $Y_{ij.}$ หมายถึง การรวมค่าของข้อมูลที่ได้จากการทำซ้ำในแต่ละทรีตเมนต์คอมบิเนชัน (treatment combination) ของปัจจัย A และ B

ข-2 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูลโดยวิธี Duncan's new multiple range test สำหรับการทดลองแบบแฟคทอเรียล

หาค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่ได้สำหรับแต่ละทรีตเมนต์คอมบิเนชัน แล้วเรียงลำดับค่าเฉลี่ยจากน้อยไปหามาก จากนั้นคำนวณค่า $S_{\bar{y}} = (MS_E/r)^{1/2}$ เมื่อ r คือจำนวนการทำซ้ำ เปิดตารางหาค่า Significant Studentized Range (SSR) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ตั้งแต่ค่า p = 2 ถึง p = n-1 ที่ df_E (n คือจำนวนค่าเฉลี่ยทั้งหมดที่ต้องการเปรียบเทียบ) แล้วคำนวณค่า $LSR = S_{\bar{y}} \times SSR$ จากนั้นเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแต่ละคู่กับค่า LSR ตามค่า p ถ้าผลต่างของค่าเฉลี่ยดังกล่าวมีค่ามากกว่า LSR แสดงว่าค่าเฉลี่ยคู่นั้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ข-3 ตัวอย่างการวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลแบบสุ่มตลอด และการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูลโดยวิธี Duncan's new multiple range test สำหรับการทดลองแบบแฟคทอเรียล 2 ปัจจัย

จากการทดลองในข้อ 4.3.2 กำหนดความเข้มข้นและ pH ของสารละลายกลูทารัลดีไฮด์ที่เหมาะสม โดยใช้การทดลองแบบแฟคทอเรียลขนาด 2x4

เมื่อ A คือ pH ของสารละลายกลูทารัลดีไฮด์ มี 2 ระดับคือ 7 และ 9

B คือ ความเข้มข้นของสารละลายกลูทารัลดีไฮด์ มี 4 ระดับคือ ร้อยละ 1, 3, 5 และ 7 โดยปริมาตร

โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำ

ข้อมูลจากการทดลองแสดงดังตารางที่ ข-2

ตารางที่ ข-2 ข้อมูลจากการทดลองแปร pH และความเข้มข้นของสารละลายกลูทารัลดีไฮด์

A	B	Replications		ค่าเฉลี่ยทรีตเมนต์
		1	2	
a_1 = 7	b_1 = 1	19.50	20.61	20.06
	b_2 = 3	20.55	21.85	21.20
	b_3 = 5	25.88	25.68	25.78
	b_4 = 7	25.49	25.75	25.62
a_2 = 9	b_1 = 1	23.15	23.93	23.54
	b_2 = 3	29.00	28.87	28.94
	b_3 = 5	30.43	30.17	30.30
	b_4 = 7	30.04	28.09	29.07

ตารางที่ ข-3 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลแบบสุ่มตลอดโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป FLASH CAT

SOV	df	SS	MS	$F_{cal.}$	F_{table}
A	1	91.97	91.97	204.38	5.32
B	3	94.83	31.61	70.24	4.07
AB	3	12.27	4.09	9.09	4.07
Error	8	3.63	0.45	-	-

การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละทรีตเมนต์ทำได้โดยคำนวณ

$$LSR = SSR \quad MS_E/r$$

$$= SSR \quad 0.45/2$$

$$= SSR \times 0.47$$

ที่ $df_E = 8$

p	2	3	4	5	6	7	8
SSR	3.26	3.39	3.47	3.52	3.55	3.56	3.56
LSR	1.53	1.59	1.63	1.65	1.66	1.67	1.67

เรียงลำดับค่าเฉลี่ยของแต่ละทรีตเมนต์จากน้อยไปหามาก

20.06^{d} 21.20^{d} 23.54^{c} 25.62^{b} 25.78^{b} 28.94^{a} 29.07^{a} 30.30^{a}

ประวัติผู้เขียน

นายประพันธ์ ปิ่นศิโรดม เกิดเมื่อวันที่ 11 พฤษภาคม 2508 ณ จังหวัดนราธิวาส สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมปีที่ 6 จากโรงเรียนปทุมคงคา กรุงเทพมหานคร เมื่อปี พ.ศ.2527 สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมี) ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในปี พ.ศ. 2531 เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2531 โดยได้รับเงินทุนอุดหนุนการศึกษา ประจำปีการศึกษา 2532 จากโครงการผลิตและพัฒนาอาจารย์ (U.D.C.) ตามความต้องการ ของภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ในระหว่างการศึกษาระดับปริญญาบัณฑิต ทำ senior project ในหัวข้อเรื่อง "การศึกษาการทำงานของเอนไซม์อะมิเลสในต้นกล้าข้าวสาลี เพื่อใช้ในการผลิตกลูโคสซีรัป" และได้รับเกียรติบัตรรางวัลเรียนดีประจำปีการศึกษา 2530 ประเภทผลการเรียนดีประจำปี จากภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในระหว่างศึกษาต่อระดับปริญญามหาบัณฑิตมีกิจกรรมทางวิชาการดังนี้

18-20 ตุลาคม 2532 เข้าร่วมการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 15 ณ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ โดยเสนอผลงานวิจัยภาคโปสเตอร์ในหัวข้อเรื่อง "การศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์อะมิเลสจากต้นอ่อนข้าวสาลี เพื่อเป็นแนวทางประยุกต์ใช้ในการผลิตแบะแซ"

25-27 ตุลาคม 2533 เข้าร่วมประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 16 ณ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และโรงแรมเซ็นทรัลพลาซา ลาดพร้าว กรุงเทพมหานคร โดยเสนอผลงานวิจัยภาคโปสเตอร์ในหัวข้อเรื่อง "การตรึงรูปเอนไซม์โปรติเอสบนผ้าไนลอนสำหรับป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์"

ผลงานทางวิชาการ

1. ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม และ นวลศรี รักอริยะธรรม, "การศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์อะมิเลสจากต้นอ่อนข้าวสาลีเพื่อเป็นแนวทางประยุกต์ใช้ในการผลิตแบะแช," การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 15, หน้า 546-547, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2532.
2. ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม และ ปราณี อ่านเปรื่อง, "การตรึงรูปเอนไซม์โปรติเอสบนผ้าไนลอนสำหรับป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์," การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 16, หน้า 562-563, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, 2533.