บทที่ 6

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

6.1 สรุปผลการทดลอง

6.1.1 ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียม Neutrase ตรึงรูปบนผ้าไนลอน โดยวิธีเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์

ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียม Neutrase ตรึงรูปคือ ใช้ผ้าไนลอนที่ผ่านการย่อยบางส่วนด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2 นอร์มัล ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง เป็นตัวพยุง มีสารละลาย APTS ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร ที่ pH 5 เป็นตัวกระตุ้น สารละลายกลูทารัลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยปริมาตร ที่ pH 9 เป็นสารสร้างพันธะร่วม และทำปฏิกิริยากับสารละลาย Neutrase ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยปริมาตร ในทรีสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมล/ลิตร pH 7.1

6.1.2 สมบัติทางจลนพลศาสตร์ของ Neutrase อิสระ และ Neutrase ตรึงรูป

สมบัติทางจลนพลศาสตร์ของ Neutrase อิสระ และ Neutrase ตรึงรูป สรุปได้ดังตารางที่ 6.1

ตารางที่ 6.1 สรุปสมบัติทางจลนพลศาสตร์ของ Neutrase อิสระ และ Neutrase ตรึงรูป

ค่าทางจลนพลศาสตร์ที่ศึกษา	Neutrase อิสระ	Neutrase ตรึงรูป
1) อุณหภูมิที่เอนไซม์แสดงแอคติวิตีสูงสุด (องศาเซลเซียส)	45	55
2) pH ที่เอนไซม์แสดงแอคติวิตีสูงสุด	7.1	6.6
3) ค่าคงที่ Michaelis (K_m, มิลลิโมลาร์)		
ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส	6.7×10^{-3}	1.25×10^{-3}
ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส	1.25×10^{-2}	9.71×10^{-4}
4) pH ที่เหมาะสมในการเก็บ	7.1	7.1
5) ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บ (องศาเซลเซียส)	8-10	8-10
6) ค่าครึ่งชีวิตเมื่อเก็บในภาวะที่เหมาะสม(วัน)	25	> 80
7) แอคติวิตีจำเพาะ (ยูนิต/โปรตีน 1 มิลลิกรัม)	717.2	611.8
8) ประสิทธิภาพการทำปฏิกิริยาซ้ำหลายครั้ง		
ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	-	สูงกว่า
ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส	-	ต่ำกว่า

6.1.3 ผลของอุณหภูมิต่อการย่อยสลายโปรตีนในเบียร์ด้วย Neutrase ตรึงรูป

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยสลายโปรตีนในเบียร์ด้วย Neutrase ตรึงรูป คือ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งทำให้ปริมาณ HMWP ในเบียร์ลดลงสูงกว่าที่อุณหภูมิ 10 และ 50 องศาเซลเซียส

6.1.4 การป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตรึงรูป

การป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตรึงรูป ขนาด 1.7 x 75 เซนติเมตร โดยปริมาตรของเบียร์ที่ผ่านเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตรึงรูปแต่ละครั้งเท่ากับ 500 มิลลิลิตร กำหนดเวลาในการชำรอบ 1 ชั่วโมง และแปลอัตราการไหลของเบียร์อยู่ในช่วง 25-200 มิลลิลิตร/นาที สรุปผลการทดลองได้ดังนี้

การเพิ่มปริมาณ Neutrase ตรึงรูปในเครื่องปฏิกรณ์เป็น 2 เท่า เมื่อภาวะอื่น ๆ คงที่ มีผลทำให้ระดับขั้นการย่อยสลายโปรตีนในเบียร์สูงขึ้นและประสิทธิภาพการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์สูงขึ้นด้วย และเมื่อปริมาณ Neutrase ตรึงรูปในเครื่องปฏิกรณ์คงที่ ระดับขั้นการย่อยสลายโปรตีนในเบียร์ที่อุณหภูมิ 10 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส ต่ำกว่าที่อุณหภูมิ 30 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส จึงทำให้ประสิทธิภาพการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ที่อุณหภูมิ 10 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส ต่ำกว่าที่อุณหภูมิ 30 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามเมื่อ space velocity คงที่ อัตราการไหลของเบียร์ที่ผ่านเครื่องปฏิกรณ์มีผลต่อปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนในเบียร์ กล่าวคือ ในช่วงอัตราการไหลของเบียร์ 25-100 มิลลิลิตร/นาที ปริมาณ HMWP ในเบียร์ลดลงน้อยกว่าในช่วงอัตราการไหล 100-200 มิลลิลิตร/นาที โดยอาจเป็นผลเนื่องจากการเสื่อมสภาพของ Neutrase ตรึงรูป ขณะใช้งานภายใต้ภาวะที่มีอัตราการไหลต่ำเกิดขึ้นมากกว่าเมื่ออัตราการไหลสูง นอกจากนี้ยังพบว่าตัวอย่างเบียร์ที่ผ่านการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตรึงรูป มีค่าความขุ่นและความเสถียรของฟองเบียร์สัมพันธ์กับปริมาณ HMWP กล่าวคือ เบียร์ที่มีปริมาณ HMWP ต่ำ จะมีค่าความขุ่นและความเสถียรของฟองเบียร์ต่ำ และเบียร์ที่มีปริมาณ HMWP สูง จะมีค่าความขุ่นและความเสถียรของฟองเบียร์สูงด้วยโดยที่ความสัมพันธ์ดังกล่าวมีลักษณะเป็นแบบพาราโบลา ที่มีค่า r^2 เท่ากับ 0.92 สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่นกับปริมาณ HMWP และ r^2 เท่ากับ 0.81 สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างค่าชิกมากับปริมาณ HMWP

เมื่อพิจารณาคุณภาพด้านความขุ่นและความเสถียรของฟองเบียร์ของเบียร์ที่ผ่านการป้องกันการเกิดตะกอนด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตรึงรูป โดยใช้ตัวอย่างเบียร์ที่มีจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ 6 ตรา เป็นตัวอย่างทดสอบอ้างอิง พบว่าตัวอย่างเบียร์ที่ได้จากการทดลองนี้ทุกภาวะมีค่าความขุ่นและความเสถียรของฟองเบียร์ไม่ต่างไปจากกรณีของตัวอย่างอ้างอิง และภาวะที่ให้ผลดีสำหรับการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตรึงรูป คือ ผ่านเบียร์เข้าเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพโดยมี space velocity เท่ากับ 144 ตารางเซนติเมตร/มิลลิลิตร/นาที ที่อุณหภูมิ 30 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส ซึ่งภาวะดังกล่าวสามารถลดความขุ่นของเบียร์ลงจากเบียร์เริ่มต้นคิดเป็นร้อยละ 55.3-72.1 อย่างไรก็ตาม เมื่อทดสอบกับตัวอย่างเบียร์ตราคลอสเตอร์ที่ผลิตโดย บริษัท ไทยอมฤต บริวเวอร์รี่ จำกัด พบว่าเบียร์ที่ผ่านการป้องกันการเกิดตะกอนด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตรึงรูป ในภาวะเดียวกันนี้ ในช่วงอัตราการไหลของเบียร์ 150-200 มิลลิลิตร/นาที มีความเสถียรของฟองเบียร์ค่อนข้างต่ำ แม้ว่ามีค่าความขุ่นเป็นที่น่าพอใจก็ตาม กล่าวคือ ถ้าโปรตีนในเบียร์ถูกย่อยสลายมากเกินไป จะมีผลทำให้ความเสถียรของฟองเบียร์ลดลงมาก

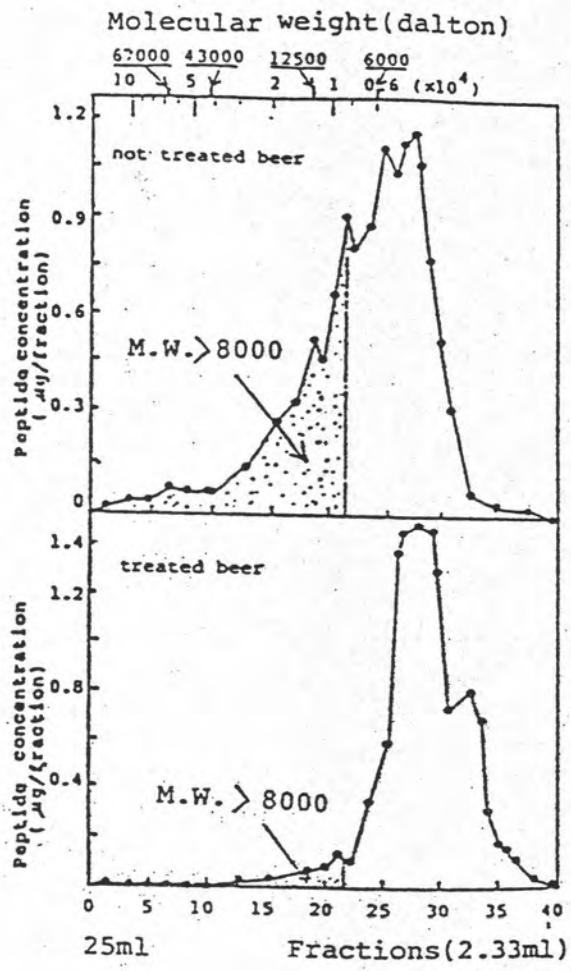
6.1.5 เสถียรภาพการใช้งานของ Neutrase ตรึงรูป ในเครื่องปฏิกรณ์

การใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตรึงรูปสำหรับป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ซ้ำหลายครั้งอย่างต่อเนื่อง มีผลทำให้ประสิทธิภาพการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตรึงรูปลดลง เนื่องจากการเสียสภาพธรรมชาติของเอนไซม์ รวมทั้งมีเอนไซม์หลุดจากตัวพยุง อย่างไรก็ตามการใช้เครื่องปฏิกรณ์ Neutrase ตรึงรูปอย่างต่อเนื่องรวม 9 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส โดยปริมาตรของเบียร์ในแต่ละครั้งเท่ากับ 500 มิลลิลิตร และผ่านเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพด้วย space velosity 144 ตารางเซนติเมตร/มิลลิลิตร/นาที พบว่ายังคงสามารถลดความขุ่นของเบียร์ลงจากเบียร์เริ่มต้นร้อยละ 30.4

6.2 ข้อสังเกตและข้อเสนอแนะ

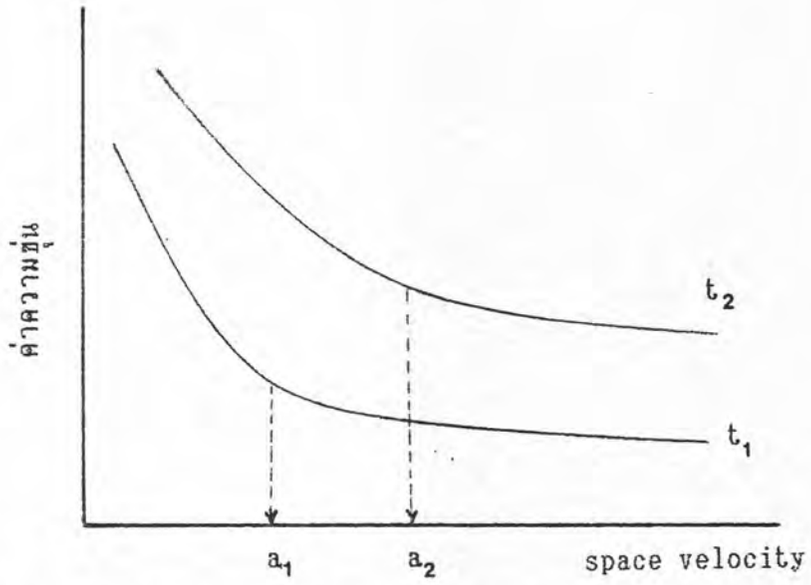
การตรึงรูปเอนไซม์บนตัวพยุงประเภทไนลอนแบบเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์นั้น ยังไม่ปรากฏว่ามีการทดลองใช้ APTS เป็นตัวกระตุ้น และจากผลการทดลอง พบว่าสามารถใช้ APTS เป็นตัวกระตุ้นผ้าไนลอนในการตรึงรูป Neutrase ได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงนับได้ว่าเป็นการพัฒนาเทคนิคการตรึงรูปเอนไซม์สำหรับตัวพยุงประเภทไนลอนอีกขั้นหนึ่ง และสามารถนำเทคนิคการตรึงรูปนี้ไปประยุกต์ใช้กับการตรึงรูปเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ ได้อีกด้วย สำหรับการเกิดปฏิกิริยาของ APTS ในการกระตุ้นผ้าไนลอนนั้นคาดว่า APTS เกิดปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอกซิลอิสระบนไนลอน ดังรูปที่ 5.1 ดังนั้นจึงน่าจะมีการศึกษากลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง APTS กับตัวพยุงประเภทไนลอนต่อไป

สำหรับการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตรึงรูปนั้น จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าสามารถใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตรึงรูป ในการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และมีความเป็นไปได้สูง จึงสามารถใช้ผลการทดลองที่ได้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการนำไปสู่อุตสาหกรรมผลิตเบียร์ต่อไป อย่างไรก็ตาม ยังมีจุดที่น่าสนใจศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนในเบียร์ด้วย Neutrase ตรึงรูป ดังได้กล่าวมาแล้วว่าโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดตะกอนในเบียร์ประกอบด้วยโปรตีน 4 กลุ่ม ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันคือ 1,000-10,000, 16,000, 19,000 และ 40,000 ดาลตัน โดยที่โปรตีนกลุ่มที่มีน้ำหนักโมเลกุล 19,000 มีความสามารถในการรวมตัวกับสารประกอบพอลีฟีนอลและเกิดเป็นตะกอนในเบียร์ได้ดีที่สุด นอกจากนี้เอนไซม์โปรติเอสแต่ละชนิดก็มีความจำเพาะต่อสับสเตรทต่างกัน ดังนั้นในกรณีของ Neutrase ตรึงรูปนี้น่าจะติดตามผลของการย่อยสลายโปรตีนในเบียร์โดยใช้เทคนิคเจลฟิลเตรชันโครมาโทกราฟี เพื่อดูว่าโปรตีนในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการเกิดตะกอนในเบียร์ดังกล่าวมีปริมาณลดลงอย่างไร ซึ่งจะเป็นการยืนยันประสิทธิภาพการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ได้ดียิ่งขึ้น ดังตัวอย่างงานวิจัยของ Jin และ Tada (17) ซึ่งทดลองป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ด้วยปาเปนตรึงรูปโดยเติมปาเปนตรึงรูป 250 ยูนิต ในเบียร์ 100 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง พบว่าสามารถลดปริมาณโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 8,000 ดาลตัน จากร้อยละ 34.3 เป็นร้อยละ 4.4 ของปริมาณโปรตีนทั้งหมด ดังรูปที่ 6.1



รูปที่ 6.1 เปปไทด์ในเบียร์ก่อนและหลังจากทำปฏิกิริยากับปาเปนตริงรูป

นอกจากนี้ในส่วนของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตริงรูปนั้น เพื่อให้ได้ข้อมูลเพิ่มเติมที่ชัดเจนขึ้น อาจศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง space velocity กับประสิทธิภาพการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ โดยอาจติดตามความขุ่นของเบียร์ที่ได้ ซึ่งความสัมพันธ์ดังกล่าวจะเกี่ยวข้องกับอุณหภูมิด้วย ดังได้กล่าวมาแล้วว่าการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ที่อุณหภูมิต่ำมีข้อได้เปรียบกว่าที่อุณหภูมิสูง ดังนั้นจึงควรศึกษาความสัมพันธ์ดังกล่าวที่อุณหภูมิต่ำเปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิสูง ผลที่ได้จะทำให้ทราบ space velocity ที่เหมาะสมที่สุด ทั้งในด้านประสิทธิภาพการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ และความประหยัด ดังตัวอย่างในรูปที่ 6.2



รูปที่ 6.2 ตัวอย่างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง space velocity กับค่าความขุ่นของเบียร์ที่ได้ที่อุณหภูมิ t_1 และ t_2

จากรูปที่ 6.2 จะเห็นว่าที่อุณหภูมิ t_1 space velocity ที่เหมาะสมที่สุดคือ a_1 และที่อุณหภูมิ t_2 คือ a_2 โดยที่การเพิ่ม space velocity หลังจากจุดนี้แล้ว ประสิทธิภาพการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์จะเพิ่มขึ้นน้อยมาก หรือมีลักษณะคงที่

สำหรับข้อมูลต่าง ๆ ที่ได้จากการทดลองทั้งหมดนั้น นอกจากจะเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมผลิตเบียร์โดยตรงแล้ว ยังสามารถใช้เป็นข้อมูลต้นแบบสำหรับอุตสาหกรรมอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องได้มากมาย กล่าวคือ ในส่วนของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตรึงรูปนั้น สามารถประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรมผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเลือดเพื่อใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารสัตว์ หรือโปรตีนไฮโดรไลเซทจากน้ำนึ่งปลาสำหรับผลิตสารปรุงแต่งกลิ่นรส นอกจากนี้อาจใช้กับอุตสาหกรรมเนื้อสัตว์ในการทำให้เนื้อนุ่ม อุตสาหกรรมน้ำปลาเพื่อลดระยะเวลาการผลิตและปรับปรุงกลิ่นรสในน้ำปลา เป็นต้น ซึ่งอุตสาหกรรมดังกล่าวสามารถนำ Neutrase ตรึงรูปบนผ้าไนลอนไปประยุกต์ใช้ได้โดยตรง เนื่องจากเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายโปรตีนเช่นเดียวกัน สำหรับในส่วนของเทคนิคการตรึงรูปเอนไซม์บนตัวพยุงประเภทไนลอน โดยมี APTS เป็นตัวกระตุ้นนั้นเป็นข้อมูลริเริ่มที่ให้ผลดี และก่อให้เกิดแนวที่สามารถเตรียมเอนไซม์ตรึงรูปชนิดอื่น ๆ เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารด้วยเป้าหมายสำหรับการผลิตและการพัฒนาผลิตภัณฑ์ ทั้งนี้เทคนิคการตรึงรูปเอนไซม์บนไนลอนได้ตอบสนองกระบวนการแปรรูปอาหารทั้ง 2 ระบบไว้ คือ ระบบการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ และระบบการกรอง ตัวอย่างของอุตสาหกรรมอาหารเหล่านี้ เช่น การทำไวน์หรือน้ำผลไม้ให้ใสด้วยเพคติเนสตรึงรูป การผลิตฟรุกโตสไซรัปโดยใช้กลูโคสไอโซเมอเรสตรึงรูป เป็นต้น