# โปรติเอสตรึงรูปสำหรับทำให้เบียร์ใส
## ตอนที่ 1: การเตรียมและสมบัติ
## ทางเอนไซม์ของโปรติเอสตรึงรูปบนผ้าไนลอน

## Immobilized Protease for Beer Chillproofing 1: Preparation and Enzymic Properties of Protease Immobilized on Nylon Cloth

ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม[1] และปราณี อ่านเปรื่อง[2]
Praphan Pinsirodom and Pranee Anprung

**ABSTRACT**

The optimum conditions for the preparation of the immobilized Neutrase (the commercial name of Protease) by covalent binding on the nylon cloth were : patially hydrolysed nylon cloth with 2N hydrochloric acid for 4 h as a carrier, 5% by volume of APTS (pH 5) as the carrier activator, 3% glutaraldehyde (pH 9) as the intermolecular cross-linker, and 1.0% by volume of Neutrase (pH 7.1). 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 Michaelis constant, $K_m$, of the immobilized Neutrase is $9.71 \times 10^{-4}$ mM which is 6.9 times lower than that of the soluble Neutrase. The specific activity is 611.8 unit/mg protein which is 0.9 times smaller than that of the soluble Neutrase. The storage stability (pH 7.1) at 8-10 °C and at 30-33 °C were greater than that of the soluble Neutrase and the half life of immobilized Neutrase was longer than 80 days. The optimum temperature for hydrolysis of protein in beer using immobilized Neutrase is 30 °C.

**Keyword :** *Immobilized protease, Beer chillproofing.*

**บทคัดย่อ**

ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียม Neutrase ตรึงรูปแบบเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์ คือ ใช้ผ้าไนลอนที่ย่อยบางส่วนด้วยกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น2 นอร์มัล นาน 4 ชั่วโมง เป็นตัวพยุง มีสารละลาย APTS ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร (pH 5) เป็นตัวกระตุ้น สารละลายกลูทารัลดีไฮด์ ความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยปริมาตร (pH 9) เป็นสารสร้างพันธะร่วมและใช้สารละลาย Neutrase ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยปริมาตร (pH 7.1) Neutrase ตรึงรูปที่ได้แสดงแอคติวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิ 55 °ซ และที่ pH 6.6 ในขณะนี้ Neutrare อิสระแสดงแอคติวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิ 45 °ซ และที่ pH 7.1

[1]ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
Dept. of Agro-Industry, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang.
[2]ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Dept. of Food Technology, Chulalongkorn University.

ค่าคงที่ไมเคิลลิส ($K_m$) ของ Neutrase ตรึงรูป เท่ากับ 9.7 x$10^{-4}$ มิลลิโมลาร์ ซึ่งต่ำกว่าของ Neutrase อิสระ 6.9 เท่า แอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 611.8 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งต่ำกว่า Neutrase อิสระ 0.9 เท่า นอกจากนี้ Neutrase ตรึงรูปมีเสถียรภาพ เมื่อเก็บในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7.1 ที่อุณหภูมิ 8-10 และ 30-33 °ซ ดีกว่า Neutrase อิสระ โดยมีค่าครึ่งชีวิตมากกว่า 80 วัน อุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยสลายโปรตีนในเบียร์ด้วย Neutrase ตรึงรูป คือ 30 °ซ

## คำนำ

เบียร์เป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่ได้จากกระบวนการหมักของเหลวจากข้าวมอลท์โดยบทบาทของยีสต์ และมีการผสมดอกฮอพส์ (hops) เพื่อให้เบียร์มีกลิ่นรสเฉพาะที่ดี ปัจจุบันอุตสาหกรรมเบียร์ในประเทศไทยมีแนวโน้มเติบโตขึ้นเรื่อย ๆ เนื่องจากมีผู้นิยมดื่มเบียร์มากขึ้นตามอัตราการเพิ่มของประชากรและภาวะเศรษฐกิจของประเทศ (จันทนี และชัชวาลย์, 2529)

ความขุ่นในเบียร์เกิดจากการรวมตัวของโปรตีนและสารประกอบพอลิฟีนอล (polyphenolic compounds) เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงขึ้น และมีความสามารถในการละลายลดลงที่อุณหภูมิต่ำ จึงเกิดเป็นตะกอนความขุ่น (chill-haze) ขึ้นในเบียร์ ตะกอนความขุ่นดังกล่าวประกอบด้วยโปรตีน ร้อยละ 31-50 สารประกอบพอลิฟีนอล ร้อยละ 13-17 และคาร์โบไฮเดรต ร้อยละ 39-57 (Asano และคณะ, 1982)

ผลิตภัณฑ์เบียร์ที่ดีนอกจากคุณภาพด้านกลิ่นรสแล้ว ความใสของเบียร์ยังเป็นลักษณะปรากฏที่สำคัญซึ่งมีผลต่อการยอมรับของผู้บริโภคและเป็นปัจจัยที่กำหนดอายุการเก็บของเบียร์อีกด้วย การทำให้เบียร์ใส (chillproofing of beer) จึงเป็นขั้นตอนที่สำคัญในกระบวนการผลิตเบียร์ วิธีที่ให้ผลดีวิธีหนึ่งคือการย่อยสลายโปรตีนในเบียร์ด้วยเอนไซม์โปรติเอสให้มีขนาดโมเลกุลเล็กลงจนไม่สามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับสารประกอบพอลิฟีนอลได้ และการนำเทคโนโลยีการตรึงรูปเอนไซม์มาประยุกต์ใช้ จะให้ผลดีกว่าการใช้เอนไซม์อิสระ ทั้งในด้านประสิทธิภาพการใช้งานและความประหยัด กล่าวคือ ไม่มีเอนไซม์เหลือตกค้างอยู่ในผลิตภัณฑ์เบียร์ สามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ได้ ตลอดจนสามารถควบคุมการทำงานในลักษณะของกระบวนการแบบต่อเนื่อง (continuous process) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สำหรับโปรติเอสที่นิยมใช้ทำให้เบียร์ใสได้แก่ ปาเปน (papain) ซึ่งเป็นโปรติเอสที่ได้จาก ยางมะละกอ ปัจจุบันมีการผลิตปาเปนในเชิงการค้าเพื่อใช้สำหรับทำให้เบียร์ใสโดยเฉพาะ นอกจากปาเปนแล้วยังมีโปรติเอสชนิดอื่นที่สามารถนำมาใช้ทำให้เบียร์ใสได้แก่ เปปซิน (pepsin) จากระบบทางเดินอาหารของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โบรมิเลน (bromilain) จากสับปะรด รวมทั้งโปรติเอสจากจุลินทรีย์ เช่น นิวทรัลโปรติเอส (neutral protease) ที่มีชื่อทางการค้า (Neutrase) ซึ่งผลิตจาก *Bacillus subtilis* เป็นต้น

ในงานวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมโปรติเอสตรึงรูปบนผ้าไนลอนโดยวิธีเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์ (covalent binding) และศึกษาสมบัติทางเอนไซม์ของโปรติเอสตรึงรูปที่ได้ เพื่อนำไปใช้สำหรับป้องกันการเกิดตะกอนความขุ่นในเบียร์ต่อไป

## อุปกรณ์และวิธีการ

**วัสดุ** ผ้าไนลอน (ไนลอนขนาด 0.018 กรัม/ตารางเซนติเมตร)

**เอนไซม์โปรติเอส** Neutrase 0.5 L บริษัท Novo industri A/S Copenhagen Denmark

**สารเคมี** γ-Aminopropyltriethoxysilane หรือ APTS (Sigma) Glutaraldehyde (Fluka), Casein hammarsten (BOH), Trichloroacetic acid (Merck), L-tyrosine (Merck), Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Merck), Coomassie brilliant blue G-250 (Fluka), Phosphoric acid (Merck) และ Hydrochloric acid (Merck)

**ตัวอย่างเบียร์ที่ใช้ในการทดลอง** ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทไทยอมฤตบริวเวอร์รี่ จำกัด

**วิธีเตรียม Neutrase ตรึงรูปบนผ้าไนลอน** การเตรียม Neutrase ตรึงรูปบนผ้าไนลอนใช้วิธีเชื่อมด้วยพันธะ โคเวเลนต์ โดยมีสารละลาย γ-Aminopropyltriethoxysilane (APTS) ทำหน้าที่เป็นสารกระตุ้นตัวพยุง (carrier activator) และสารละลายกลูทารัลดีไฮด์ เป็นสารสร้างพันธะร่วม (cross-linking agent) ขั้นตอนการเตรียม Neutrase ตรึงรูป แสดงดังรูปที่ 1

ผ้าไนลอนขนาด 2.5 x 2.5 ตารางเซนติเมตร
(ย่อยบางส่วนด้วยกรดไฮโดรคลอริก 2 นอร์มัล 4 ชั่วโมง)

↓ - เขย่าในสารละลาย APTS 2 ชั่วโมง
- ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง

ผ้าไนลอน - APTS

↓ - เขย่าในสารละลายกลูทารัลดีไฮด์ 1 ชั่วโมง
- ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง

ผ้าไนลอน - APTS กลูทารัลดีไฮด์

↓ - เขย่าในสารละลาย Neutrase 1 ชั่วโมง
- ล้างด้วยบัฟเฟอร์ pH 7.1 4 ครั้ง

Neutrase ตรึงรูป
(ผ้าไนลอน - APTS - กลูทารัลดีไฮด์ - Neutrase)

*รูปที่ 1 แผนภูมิขั้นตอนการเตรียม Neutrase ตรึงรูปบนผ้าไนลอน โดยวิธีเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์*

**ศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมNeutrase ตรึงรูปบนผ้าไนลอน** เตรียม Neutrase ตรึงรูปตามวิธีในแผนภูมิรูปที่ 1 โดยศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้

1. ความเข้มข้นของสารละลาย APTS 5 ระดับ คือ 0 1 3 5 และ 7 โดยปริมาตร และ pH ของสารละลาย APTS 3 ระดับ คือ 5 7 และ 9

2. ความเข้มข้นของสารละลายกลูทารัลดีไฮด์ 4 ระดับ คือร้อยละ 1 3 5 และ 7 โดยปริมาตร และ pH 2 ระดับคือ 7 และ 9

3. ความเข้มข้นของสารละลาย Neutrase ในบัฟเฟอร์ pH 7.1 (pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์) ในช่วงร้อยละ 0.1 ถึง 3.0 โดย ปริมาตร และเลือกภาวะที่เหมาะสมซึ่งเอนไซม์ตรึงรูปมีแอคติวิตีสูงสุดด้วยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Walter (1984)

**การศึกษาสมบัติทางเอนไซม์ของ Neutrase ตรึงรูปเปรียบเทียบกับ Neutrase อิสระ** ดังนี้

อุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ ค่าคงที่ไมเคิลลิส (Michailis constant, $K_m$) ค่าครึ่งชีวิตของเอนไซม์ (half life) และค่าแอคติวิตีจำเพาะ (specific activity) ของเอนไซม์ตามลำดับ

**ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการย่อยสลายโปรตีนในเบียร์ด้วย Neutrase ตรึงรูป** บ่มตัวอย่างเบียร์กับ Neutrase ตรึงรูป ใน shaking water bath ที่อุณหภูมิ 10 30 และ 50 °ซ เป็นเวลา 30 นาที นำเบียร์ที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโมเลกุลใหญ่ (high molecular weight proteins, HMWP) ที่เหลือ โดยวิธี dye binding method (Lewis, 1980)

## วิธีวิเคราะห์

**วิธีวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ Nuetrase** (ดัดแปลงจากวิธีของ Walter, 1984)

บ่มเอนไซม์กับสับสเตรทเคซีนที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ในทรีสบัฟเฟอร์ pH 7.1 ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 10 นาที สำหรับ Neutrase อิสระ และ 20 นาที สำหรับ Neutrase ตรึงรูป จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติกความเข้มข้น 0.3 โมล/ลิตร นำสารละลายปฏิกิริยาไปหมุนเหวี่ยงที่ 3,500 รอบต่อนาที รินส่วนใสไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 357 นาโนเมตร คำนวณแอคติวิตีของเอนไซม์โดยกำหนดให้ 1 ยูนิตเอนไซม์ (unit enzyme) หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่เปลี่ยนสับสเตรทเคซีน (casein) ไปเป็นผลิตภัณฑ์ (คำนวณเปรียบเทียบกับ L-tyrosine) 1 ไมโครกรัม ในเวลา 1 นาที ที่ 37 °ซ และ pH 7.1

**วิธีวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโมเลกุลใหญ่** (high molecular weight protein) โดยวิธี **dye-binding method** (Lewis, 1980)

**การเตรียมสารละลาย coomassie (Lewis, 1980)**

ละลาย coomassie brillient blue G-2500 100 กรัม ในเอธิลแอลกอฮอล์ 50 มิลลิลิตร เติมกรดฟอสฟอริกความเข้มข้นร้อยละ 85 จำนวน 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น กรองสารละลายที่ได้ด้วยกระดาษกรอง เตรียมใหม่ทุก 3 วัน

**วิธีวิเคราะห์ปริมาณ HMWP ในเบียร์**

ปิเปตตัวอย่างเบียร์ 0.2 มิลลิลิตร เติมสารละลาย coomassie 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร อ่านปริมาณ HMWP จากกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

## ผลและการวิจารณ์

**1. ภาวะที่เหมาะสมสำหรับเตรียม Neutrase ตรึงรูปบนผ้าไนลอน**

ตารางที่ 1 ผลของ pH และความเข้มข้นของสารละลาย APTS ต่อการตรึงรูป Neutrase บนผ้าไนลอน

| ปัจจัย | | ค่าเฉลี่ยแอคติวิตี/กรัมของเอนไซม์ตรึงรูป (ยูนิต) |
|---|---|---|
| pH | 5 | 20.25a |
| | 7 | 17.49b |
| | 9 | 15.38c |
| APTS (%) | 0 | 9.08d |
| | 1 | 15.01c |
| | 3 | 18.21b |
| | 5 | 23.11a |
| | 7 | 22.78a |

*a,b,c... ตัวเลขในแต่ละปัจจัยที่มีอักษรกำกับต่างกันแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)*

จากตารางที่ 1 จะเห็นได้ว่า การใช้สารละลาย APTS ที่ pH 5 กระตุ้นผ้าไนลอนให้แอคติวิตีของ Neutrase ตรึงรูปสูงสุด และเมื่อความเข้มข้นของสารละลาย APTS เพิ่มขึ้น แอคติวิตีของ Neutrase ตรึงรูปที่ได้จะสูงขึ้นด้วย แต่ให้แอคติวิตีที่ไม่ต่างกันเมื่อความเข้มข้มเป็นร้อยละ 5 และ 7 โดยปริมาตร

เนื่องจาก APTS เป็นสารที่มีสมบัติเป็นตัวกระตุ้นที่มีประสิทธิภาพสูง โดยเฉพาะเมื่อใช้กับตัวพยุงประเภททรายหรือซิลิกา ซึ่งมีงานวิจัยที่เลือกใช้ APTS ในการกระตุ้นตัวพยุงประเภทดังกล่าวแล้ว (Weetall, 1969; Anprung และคณะ, 1989; นฤมล. 2532) ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจที่จะนำ APTS มาใช้กระตุ้นตัวพยุงประเภทอื่นซึ่งเริ่มมีงานวิจัยที่ทดลองใช้ APTS ในการกระตุ้นตัวพยุงประเภทอื่น นอกเหนือจากทรายและซิลิกา คือ พรรณจิรา (2533) ใช้ APTS กระตุ้นคาร์บอนก่อกัมมันต์ (activated carbon) ตัวพยุงประเภทถ่านสำหรับตรึงรูปเบต้า-กาแลคโตสิเดส พบว่า สามารถใช้ได้ผลดี และจากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่า สามารถใช้ APTS เป็นตัวกระตุ้นตัวพยุงประเภทไนลอนได้เป็นอย่างดี

ตารางที่ 2 ผลของ pH และความเข้มข้นของสารละลายกลูทารัลดีไฮด์ต่อการตรึงรูป Neutrase บนผ้าไนลอน

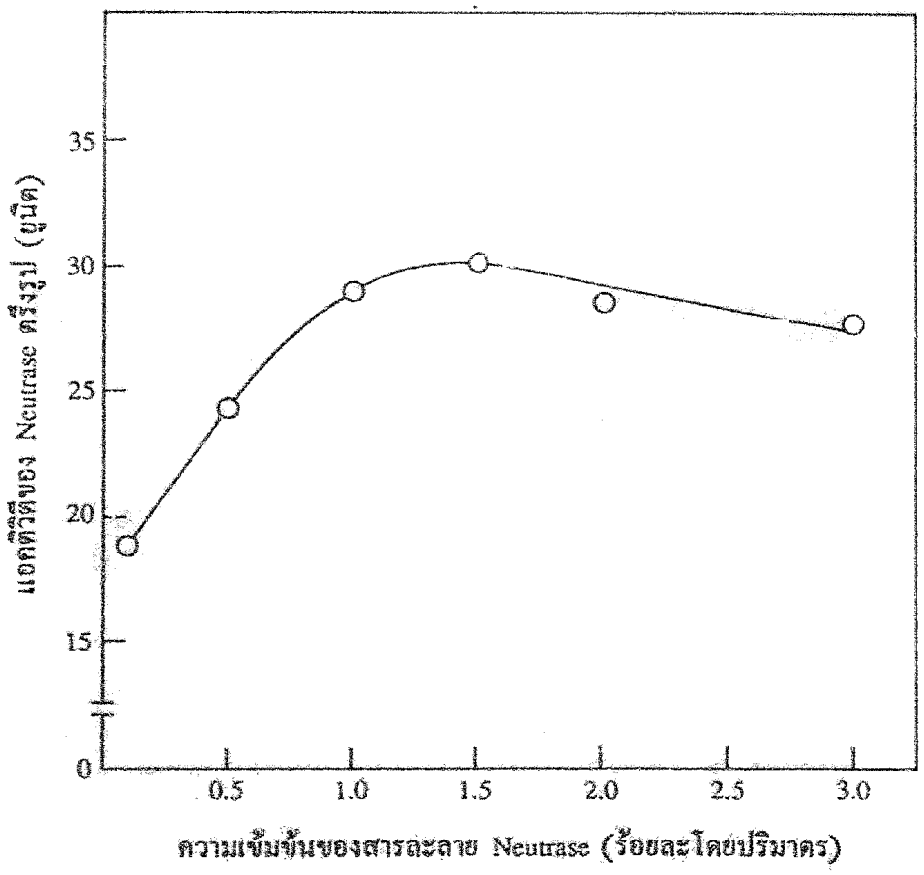
| pH | ความเข้มข้นของสารละลายกลูทารัลดีไฮด์ (ร้อยละโดยปริมาตร) | ค่าเฉลี่ยแอคติวิตี/กรัมของเอนไซม์ตรึงรูป (ยูนิต) |
|---|---|---|
| 7 | 1 | 20.06d |
| | 3 | 21.20d |
| | 5 | 25.78b |
| | 7 | 25.62b |
| 9 | 1 | 23.54c |
| | 3 | 28.94a |
| | 5 | 30.30a |
| | 7 | 29.07a |

*a, b, c... ตัวเลขในแต่ละปัจจัยที่มีอักษรกำกับต่างกันแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)*

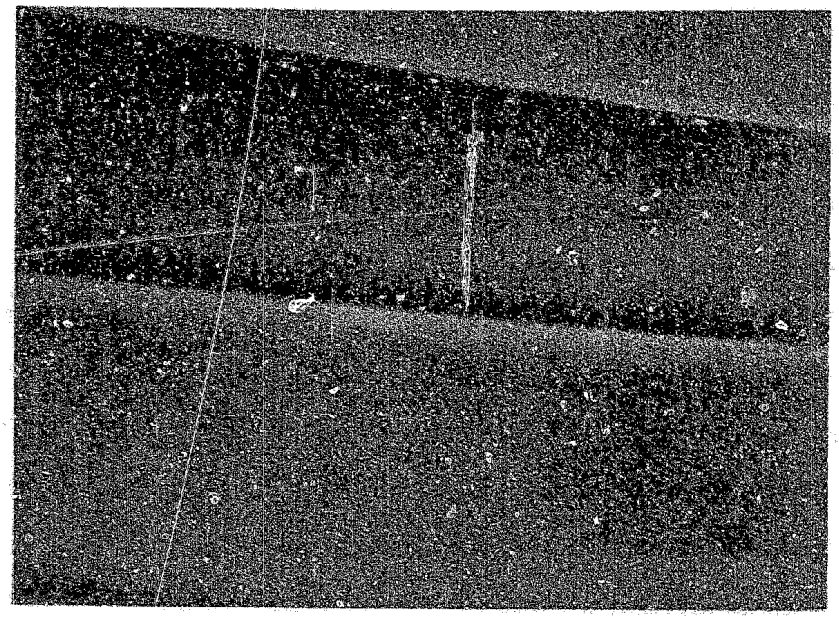
จากตารางที่ 2 จะเห็นว่าที่ pH 9 ให้แอคติวิตีของ Neutrase ตรึงรูปสูงกว่าที่ pH 7 ในทุกระดับความเข้มข้นของสารสารละลายกลูทารัลดีไฮด์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Onyezili (1987) ที่ตรึงรูปอินเวอร์เทสบนตัวพยุงประเภทไนลอนโดยใช้กลูทารัลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะร่วม เขาพบว่า pH ของสารละลายกลูทารัลดีไฮด์ที่เหมาะสม ซึ่งให้แอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปสูงสุด คือ pH 9 นอกจากนี้ ประกอบ (2531) ยังพบว่า pH ของสารละลายกลูทารัลดีไฮด์ที่เหมาะสมในการใช้เป็นสารสร้างพันธะร่วมสำหรับตรึงรูปกลูโคสออกซิเดสบนผ้าไนลอนคือ pH 9

อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาความเข้มข้นของสารละลายกลูทารัลดีไฮด์ ที่ pH 9 พบว่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 5 และ 7 โดยปริมาตร ให้แอคติวิตีของ Neutrase ตรึงรูป ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นภาวะที่เหมาะสม คือใช้สารละลายกลูทารัลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยปริมาตรที่ pH 9

จากรูปที่ 2 จะเห็นได้ว่า แอคติวิตีของ Neutrase ตรึงรูปที่ได้เพิ่มสูงขึ้น เมื่อความเข้มข้นของสารละลาย Neutrase เพิ่มจากร้อยละ 0.1 ถึง 1.0 โดยปริมาตร จากนั้นเริ่มคงที่และลดลงเล็กน้อย เมื่อความเข้มข้นของสารละลาย Neutrase มากกว่าร้อยละ 1.0 โดยปริมาตร ดังนั้นภาวะที่เหมาะสมคือ ใช้สารละลาย Neutrase ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยปริมาตร ที่ pH 7.1

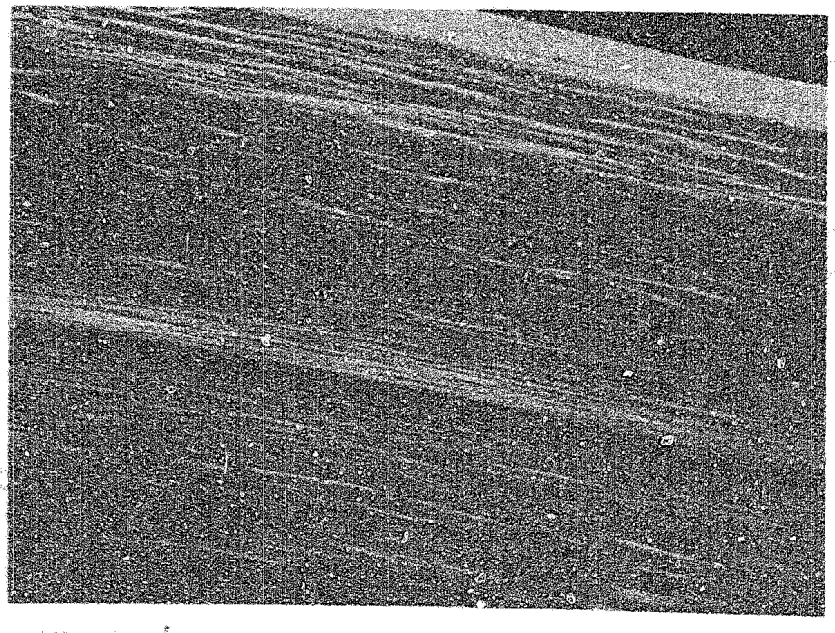



*รูปที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย Neutrase กับแอคติวิตีของ Neutrase ตรึงรูป*

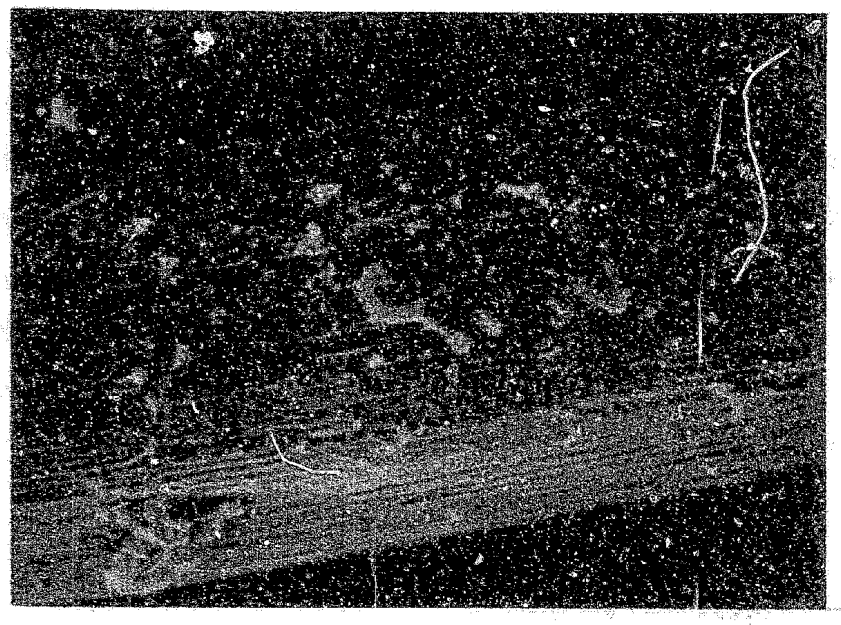


*รูปที่ 3 พื้นผิวเส้นใยของผ้าไนลอนจากเครื่อง SEM ที่กำลังขยาย 2,000 เท่า*

จากการตรวจดูพื้นผิวเส้นใยของผ้าไนลอนด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอน (Scanning electron microscope. SEM) พบว่า พื้นผิวเส้นใยของผ้าไนลอนเริ่มต้นมีลักษณะเรียบสะอาด (รูปที่ 3) เมื่อผ่านการย่อยบางส่วนด้วยกรดไฮโดรคลอริกแล้ว พื้นผิวเส้นใยของผ้าไนลอนจะมีลักษณะขรุขระ (รูปที่ 4) และในกรณีของ Neutrase ตรึงรูปบนผ้าไนลอนจะปรากฏมีกลุ่มโปรตีนของเอนไซม์เกาะกระจายอยู่บนพื้นผิวเส้นใยของผ้าไนลอนที่มีลักษณะขรุขระ (รูปที่ 5)

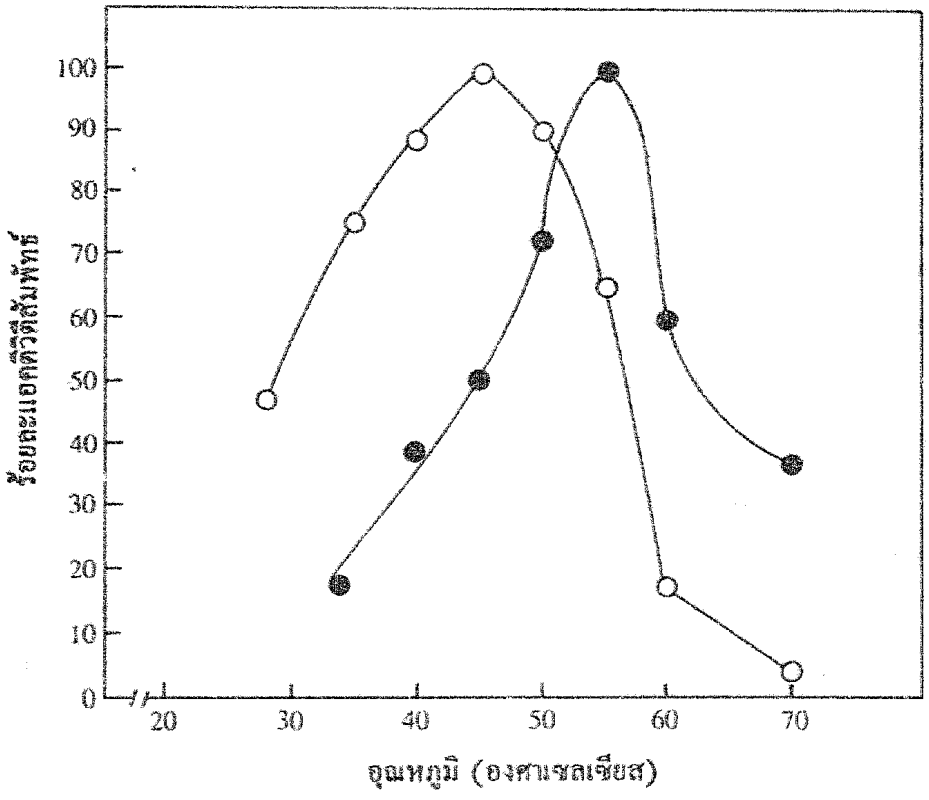


*รูปที่ 4 พื้นผิวเส้นใยของผ้าไนลอนที่ผ่านการย่อยบางส่วนด้วยกรดไฮโดรคลอริกจากเครื่อง SEM ที่กำลังขยาย 2,000 เท่า*

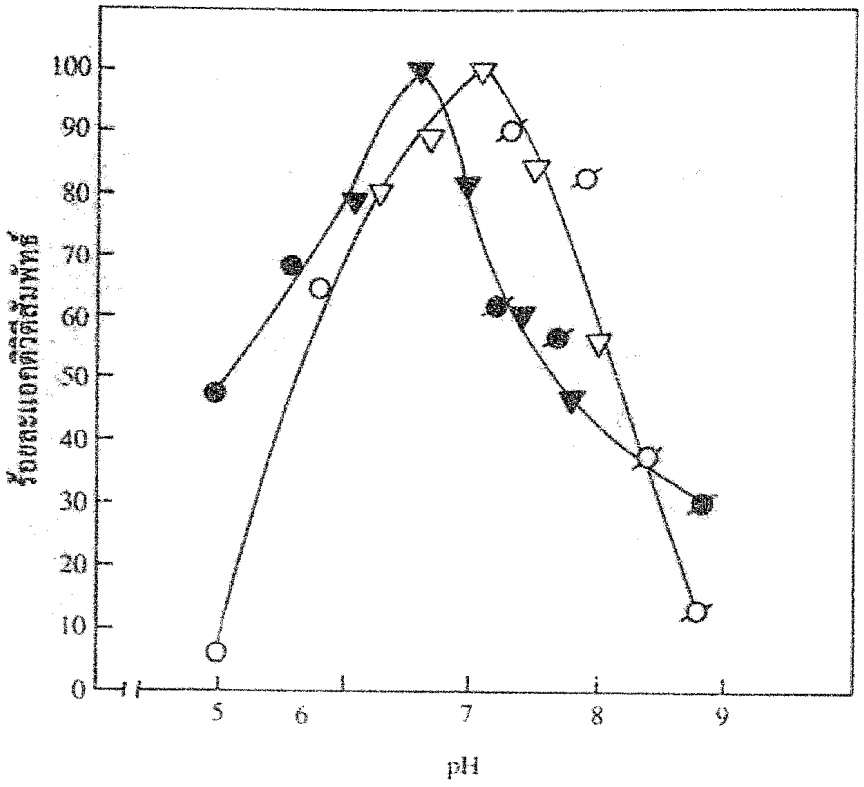


*รูปที่ 5 พื้นผิวเส้นใยของผ้าไนลอนที่มี Neutrase ตรึงรูป จากเครื่อง SEM ที่กำลังขยาย 2,000 เท่า*

## 2. สมบัติทางเอนไซม์ของ Neutrase ตรึงรูปเปรียบเทียบกับ Neutrase อิสระ




*รูปที่ 6 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของ Neutrase อิสระ (-o-o-) และ Neutrase ตรึงรูป (-●-●-)*




รูปที่ 7 *pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของ Neutrase อิสระ (-o-Δ-φ-) และ Neutrase ตรึงรูป (●-▲-ϕ) o, ● แอซีเตทบัฟเฟอร์ Δ, ▲ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ϕ, ϕ ทรีสบัฟเฟอร์*

จากรูปที่ 6 อุณหภูมิที่เอนไซม์แสดงแอคติวิตีสูงสุด (optimum temperature) คือ 45°ซ สำหรับ Neutrase อิสระ และ 55°ซ สำหรับ Neutrase ตรึงรูป ที่อุณหภูมิ 70°ซ Neutrase ตรึงรูปมีแอคติวิตีสัมพัทธ์มากกว่า 30% ในขณะที่ Neutrase อิสระมีแอคติวิตีต่ำมาก แสดงให้เห็นว่า Neutrase ตรึงรูปสามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดีกว่า Neutrase อิสระ

จากรูปที่ 7 pH ที่เอนไซม์แสดงแอคติวิตีสูงสุด (optimum pH) สำหรับ Neutrase อิสระ คือ 7.1 และ Neutrase ตรึงรูป คือ 6.6 ซึ่งลดลงจาก Neutrase อิสระ 0.5 หน่วย

ตารางที่ 3 ค่า $K_m$ ของ Neutrase อิสระ และ Neutrase ตรึงรูป ที่อุณหภูมิ 45 และ 55°ซ จากการเขียนกราฟแบบ Line-weaver Burk plot

| เอนไซม์ | $K_m$ (มิลลิโมลาร์) | |
|---|---|---|
| | 45°ซ | 55°ซ |
| Neutrase อิสระ | $6.67 \times 10^{-3}$ | $1.25 \times 10^{-2}$ |
| Neutrase ตรึงรูป | $1.25 \times 10^{-3}$ | $9.71 \times 10^{-4}$ |

จากตารางที่ 3 จะเห็นว่า Neutrase ตรึงรูป มีค่า $K_m$ ต่ำกว่า Neutrase อิสระทั้งที่อุณหภูมิ 45 และ 55 °ซ จึงอาจกล่าวได้ว่า การตรึงรูป Neutrase บนผ้าไนลอนโดยวิธีเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์มีผลช่วยปรับปรุงโครงรูป (conformation) ของเอนไซม์ให้มีลักษณะเหมาะสมสำหรับการเข้าจับของสับสเตรทในบริเวณแร่ง (active site) ของเอนไซม์ได้ดีขึ้น ทำให้ Neutrase ตรึงรูปมีความจำเพาะต่อสับสเตรทมากขึ้น

**ตารางที่ 4** ค่าครึ่งชีวิตของ Neutrase อิสระและ Neutrase ตรึงรูป เมื่อเก็บในบัฟเฟอร์ pH 7.1 ที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิตู้เย็น

| เอนไซม์ | ค่าครึ่งชีวิต (วัน) | |
|---|---|---|
| | อุณหภูมิห้อง (30-33°ซ) | อุณหภูมิตู้เย็น (8-10°ซ) |
| Neutrase อิสระ | 11 | 25 |
| Neutrase ตรึงรูป | 20 | >80 |

เมื่อพิจารณาค่าครึ่งชีวิตซึ่งหมายถึง ระยะเวลาในการเก็บที่ทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงเหลือครึ่งหนึ่งของแอคติวิตีเริ่มต้น ดังตารางที่ 4 จะเห็นว่า Neutrase ตรึงรูป มีค่าครึ่งชีวิตสูงกว่า Neutrase อิสระ ทั้งที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิตู้เย็น แสดงให้เห็นว่าการตรึงรูป Neutrase บนผ้าไนลอนโดยวิธีเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์ มีผลทำให้เอนไซม์มีเสถียรภาพในระหว่างการเก็บ (storage stability) ดีขึ้น

จากตารางที่ 5 จะเห็นว่า Neutrase ตรึงรูปมีค่าแอคติวิตีจำเพาะต่ำกว่า Neutarse อิสระเล็กน้อย ทั้งนี้อธิบายได้ด้วยเหตุผล 2 ประการ คือ ประการแรก การตรึงรูป Neutrase บนผ้าไนลอนโดยวิธีเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์เป็นวิธีที่ค่อนข้างรุนแรง โดยเฉพาะถ้าการเชื่อมพันธะเกิดขึ้นกับหมู่ไวปฏิกิริยาของบริเวณแร่งในโมเลกุลของเอนไซม์ จะมีผลทำให้สูญเสียแอคติวิตีบางส่วนได้ ประการที่สอง การเกิด steric effect (Treven, 1980) เนื่องจากผ้าไนลอนที่ใช้เป็นตัวพยุงประกอบด้วยเส้นใยไนลอนขนาดเล็กจำนวนมาก ทำให้โมเลกุลของเอนไซม์บางส่วนถูกบดบังโดยเส้นใยดังกล่าว ส่งผลให้โมเลกุลของสับสเตรทซึ่งมีขนาดใหญ่ไม่สามารถเข้าทำปฏิกิริยา

**ตารางที่ 5** แอคติวิตีจำเพาะของ Neutrase อิสระ และ Neutrase ตรึงรูป

| เอนไซม์ | แอคติวิตี (ยูนิต) | ปริมาณโปรตีน* (มิลลิกรัม) | แอคติวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน) |
|---|---|---|---|
| Neutrase อิสระ | 116.9 | 0.163 | 717.2 |
| Neutrase ตรึงรูป | 62.4 | 1.102 | 611.8 |

** ปริมาณโปรตีน หาโดยวิธี Macro Kjeldahl distillation (AOAC, 1984)*

กับเอนไซม์ได้ นั่นคือ โมเลกุลของเอนไซม์ส่วนที่ถูกบดบังนั้นเสมือนว่าไม่แสดงแอคติวิตี จึงทำให้ Neutrase ตรึงรูป มีค่าแอคติวิตีจำเพาะต่ำกว่า Neutrase อิสระ

**3. ผลของอุณหภูมิต่อการย่อยสลายโปรตีนในเบียร์ด้วย Neutrase ตรึงรูป**

จากตารางที่ 6 จะเห็นว่า ปริมาณ HMWP ในเบียร์ลดลงสูงสุดเมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยากับ Neutrase ตรึงรูปเท่ากับ 30°ซ นั่นคือ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยสลายโปรตีนในเบียร์ด้วย Neutrase ตรึงรูป คือ 30 °ซ

เมื่อเปรียบเทียบอุณหภูมิที่เหมาะในการทำปฏิกิริยาของ Neutrase ตรึงรูป (รูปที่ 6) ซึ่งเท่ากับ 55°ซ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายโปรตีนในเบียร์ด้วย Neutrase ตรึงรูป จะเห็นว่าแตกต่างกัน

**ตารางที่ 6** ปริมาณ HMWP ที่เหลือในเบียร์ที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับ Neutrase ตรึงรูปที่อุณหภูมิต่าง ๆ

| อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | ปริมาณ HMWP ที่เหลือในเบียร์ (มิลลิกรัม/ลิตร) |
|---|---|
| 10 | 117.5 |
| 30 | 88.5 |
| 50 | 115.0 |

*ตัวอย่างเบียร์เริ่มต้น HMWP เท่ากับ 150.0 มิลลิกรัม/ลิตร*

ทั้งนี้เนื่องจากภาวะที่มีสับสเตรทและ pH ของระบบต่างกัน จึงมีผลทำให้อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของ Neutrase ตรึงรูปแตกต่างกัน

## สรุปผลการทดลอง

ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียม Neutrase ตรึงรูป คือ ใช้ผ้าไนลอนที่ย่อยสลายบางส่วนด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2 นอร์มัล นาน 4 ชั่วโมง เป็นตัวพยุง มีสารละลาย APTS ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร ที่ pH 5 เป็นตัวกระตุ้น สารละลายกลูทาร์ลดีไฮด์ ความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยปริมาตร ที่ pH 9 เป็นสารสร้างพันธะร่วม และทำปฏิกิริยากับสารละลาย Neutrase ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยปริมาตร ในบัฟเฟอร์ pH 7.1

สมบัติทางเอนไซม์ของ Neutrase ตรึงรูปเปรียบเทียบกับ Neutrase อิสระ สรุปได้ดังตารางที่ 7 และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยสลายโปรตีนในเบียร์ซึ่งทำให้ปริมาณ HMWP ในเบียร์ลดลงสูงสุด 30°ซ

**ตารางที่ 7** สรุปสมบัติทางเอนไซม์ของ Neutrase อิสระ และ Neutrase ตรึงรูป

| สมบัติทางเอนไซม์ | Neutrase อิสระ | Neutrase ตรึงรูป |
|---|---|---|
| 1) อุณหภูมิที่เอนไซม์แสดงแอคติวิตีสูงสุด (°ซ) | 45 | 55 |
| 2) pH ที่เอนไซม์แสดงแอคติวิตีสูงสุด | 7.1 | 6.6 |
| 3) ค่า $K_m$ (มิลลิโมลาร์) ที่อุณหภูมิ 45°ซ | $6.70 \times 10^{-3}$ | $1.25 \times 10^{-3}$ |
| ที่อุณหภูมิ 55°ซ | $1.25 \times 10^{-2}$ | $9.71 \times 10^{-4}$ |
| 4) ค่าครึ่งชีวิตเมื่อเก็บในภาวะที่เหมาะสม (วัน) | 25 | >80 |
| 5) แอคติวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน) | 717.2 | 611.8 |

## คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณบริษัทอีสต์เอเชียติก (ประเทศไทย) จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์เอนไซม์ Neutrase 0.5 L ตลอดงานวิจัย และขอขอบคุณบริษัทไทยอมฤตบริวเวอร์รี่ จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างเบียร์ที่ใช้ในงานวิจัย

## บรรณานุกรม

จันทนี จงนิตยกาล และ ชัชวาลย์ จีนเลิศ. 2529. รายงานภาวะอุตสาหกรรมเบียร์. ฝ่ายนโยบาย 4, กองเศรษฐกิจอุตสาหกรรม, สำนักงานปลัดกระทรวงอุตสาหกรรม, 24 หน้า.

นฤมล ศรีพุทธิรัตน์. 2532. การเตรียมเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปเพื่อทดลองผลิตแอลไลซีนจากกากสับปะรด. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ประกอบ กิจไชยา. 2531. การตรึงกลูโคสออกซิเดสบนผ้าในลอนสำหรับวัดกลูโคสด้วยเอนไซม์อิเล็กโทรด. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พรรณจิรา วงศ์สวัสดิ์. 2533. เบตา-กาแลคโตสิเดสตรึงรูปบนคาร์บอนสำหรับการผลิตน้ำตาลไซรัปจากหางนมเนยแข็ง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

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

107-110.

AOAC. 1984. Association of Official Analytical chemists. 14 th ed. Association of Official Chemist, Inc., Washington, D.C.

Asano, K., Shinagawa, K. and Hashimoto, N., 1982. Characterization of Haze-Forming Proteins of Beer and Their Roles in Chill Haze Formation. J. Am. Soc. Brew Chem., 40(4) : 147-154.

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

Onyezili, F.N., 1987. Glutaraldehyde Activation Step in Enzyme immobilization on Nylon. Biotechnol. Bioeng., 29 : 399-402.

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

Walter, H.E., 1984. Method with Haemoglobin. Casein and Azocoll as Substrate. Method of Enzymatic Analysis 3 rd ed., vol.5, p.270-277.

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