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 นอกจากนี้เบียร์ที่ผ่านการป้องกันการเกิดตะกอนด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Neutrase ตรึงรูป มีค่าความขุ่นและความเสถียรของฟองเบียร์สัมพันธ์กับปริมาณโปรตีนโมเลกุลใหญ่แบบพาราโบลา โดยมีค่า r^2 เท่ากับ 0.92 และ 0.81 ตามลำดับ ในการใช้ Neutrase ตรึงรูปซ้ำเดิม 9 ครั้ง สำหรับย่อยสลายโปรตีนในเบียร์ พบว่าหลังจากการใช้แต่ละครั้ง เบียร์ที่ได้มีค่าความขุ่นเพิ่มขึ้นเล็กน้อย

TE133732

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 60 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.