บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 เนยแข็ง

2.1.1 นิยามของเนยแข็ง ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 31 (พ.ศ.2522) (6) กำหนดให้เนยแข็งเป็นอาหารควบคุมเฉพาะ และให้นิยามของเนยแข็งว่าเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำน้ำนม (Milk) ครีมบัตเตอร์มิลค์ (Butter milk) หรือเวย์ (Whey) อย่างใดอย่างหนึ่งหรือหลายอย่างมาผสมกับเอนไซม์ กรด หรือจุลินทรีย์จนเกิดการรวมตัวเป็นก้อนแล้วแยกส่วนที่เป็นน้ำออก แล้วจะนำมาบ่มให้ได้ที่ก่อนใช้หรือจะนำมาใช้ในลักษณะสด

2.1.2 ประวัติของเนยแข็ง (7) แหล่งกำเนิดของเนยแข็งยังไม่ทราบแน่ชัด แต่เป็นที่รู้กันว่ามีการทำเนยแข็งมานานแล้ว เนื่องจากหลักฐานที่นักเขียนชาวกรีกและโรมันได้บันทึกว่ามีการค้นพบวิธีการทำเนยแข็งตั้งแต่ก่อนคริสต์ศักราช ในระยะแรกเนยแข็งทำจากลิ่มนมของน้ำนมที่เปรี้ยวโดยธรรมชาติ ต่อมาจึงมีการรู้จักใช้เรนเนต แม้ว่าวิธีการทำเนยแข็งจะเป็นแบบง่าย ๆ แต่ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีอายุการเก็บนานกว่าน้ำนมธรรมดา มีคุณค่าอาหารสูง รสชาติดี และย่อยได้เร็ว น้ำนมที่นิยมใช้ทำเนยแข็งในระยะแรกได้แก่น้ำนมจากแพะ แกะ โค กระบือ ม้า ลา และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่น ๆ เรนเนต น้ำส้มสายชู หรือน้ำยาใสอื่น ๆ จากพืช นอกจากนี้ยังมีการเติมเครื่องปรุงแต่งอื่น ๆ รวมทั้งเกลือด้วย สำหรับเนยแข็งบางชนิดจะผ่านการรมควันด้วย ปัจจุบันวิธีการทำเนยแข็งก้าวหน้าไปมาก แต่หลักการผลิตเนยแข็งโดยทั่วไปยังคงใกล้เคียงกันดังนี้

ขั้นแรก ทำให้เกิดความเป็นกรดขึ้นในน้ำนม

ขั้นสอง ทำให้น้ำนมรวมตัวเป็นลิ่มโดยใช้เอนไซม์เรนนินหรือสารอื่นที่ให้คุณสมบัติคล้ายคลึงกัน

ขั้นสาม ทำให้ลิ่มนมแตกออกโดยการตัดจากนั้นพยายามไล่เวย์ในลิ่มนมออกมา

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขั้นที่สี่ ทำให้ลิ่มนมมีความแข็งตัวขึ้น

ขั้นสุดท้าย ขึ้นรูปเนยแข็งด้วยพิมพ์และอาจเข้าสู่การบ่มตามชนิดเนยแข็ง

2.1.3 ประเภทของเนยแข็ง (8)

เนยแข็งแบ่งประเภทใหญ่ ๆ ได้ดังนี้

2.1.3.1 เนยแข็งชนิดอ่อนนุ่ม (Soft cheese) มีความชื้นประมาณร้อยละ 55-80 ซึ่งแบ่งชนิดเป็น

2.1.3.1.1 ชนิดไม่ผ่านการบ่ม ได้แก่

ก. พวกไขมันต่ำ ได้แก่ เนยแข็งคอตเทจ (Cottage cheese) เนยแข็งพอต (Pot cheese) เนยแข็งเบเกอร์ (Baker cheese)

ข. พวกไขมันสูง ได้แก่ เนยแข็งครีม (Cream cheese) เนยแข็งนิวฟีฮาเตล (Neufehatel cheese)

2.1.3.1.2 ชนิดผ่านการบ่ม ได้แก่ เนยแข็งไบร์ (Bire cheese) เนยแข็งคาเมมเบิร์ท (Camembert cheese) เนยแข็งคูลด์ (Cooled cheese), เนยแข็งแฮนด์ (Hand cheese)

2.1.3.2 เนยแข็งชนิดค่อนข้างอ่อนนุ่ม (Semi soft cheese) มีความชื้นประมาณร้อยละ 45-55 ซึ่งแบ่งชนิดเป็น

2.1.3.2.1 ชนิดผ่านการบ่มโดยอาศัยแบคทีเรีย ได้แก่ เนยแข็งบริกค์ (Brick cheese) เนยแข็งมันสเตอร์ (Munster cheese)

2.1.3.2.2 ชนิดผ่านการบ่มโดยอาศัยแบคทีเรียและแบคทีเรียบ่มผิวนอก ได้แก่ เนยแข็งลิมเบอร์เกอร์ (Limburger cheese) เนยแข็งแทรปพิสต์ (Trappist cheese)

2.1.3.2.3 ชนิดผ่านการบ่มโดยอาศัยราสีน้ำเงิน ได้แก่ เนยแข็งรัวก์ฟอร์ท (Roque fort cheese) เนยแข็งบลู (Blue cheese)

2.1.3.3 เนยแข็งชนิดค่อนข้างแข็ง (Semi-hard cheese) มีความชื้นร้อยละ 34-45 ซึ่งแบ่งชนิดเป็น

2.1.3.3.1 ชนิดผ่านการบ่มโดยอาศัยแบคมีเรียที่ไม่สร้างแก๊ส ได้แก่ เนยแข็งเชดดาร์ (Cheddar cheese) เนยแข็งกรานูลาร์(Granular cheese),

เนยแข็งโปรโวโลน (Provolone cheese)

2.1.3.3.2 ชนิดผ่านการบ่มโดยอาศัยแบคทีเรียที่สร้างแก๊ส ได้แก่ เนยแข็งสวิส (Swiss cheese) เนยแข็งเอมเมนทาเลอร์ (Emimentaler cheese) เนยแข็งอีแดม (Edam cheese)

2.1.3.4 เนยแข็งชนิดแข็ง (Hard cheese) มีความชื้นประมาณร้อยละ 13-14 ผ่านการบ่มด้วยแบคทีเรีย เช่น เนยแข็งอาเซียโก (Asiago cheese) เนยแข็งปาร์มีแซน (Parmesan cheese)

2.1.3.5 เนยแข็งชนิดปรุงแต่ง (Process cheese) ปริมาณความชื้นขึ้นอยู่กับชนิดของเนยแข็งที่นำมาปรุงแต่ง ได้แก่ เนยแข็งที่ใช้กับอาหารโดยทั่วไป (Cheese foods) และเนยแข็งที่ใช้ทา (Cheese spreads)

2.1.3.6 เนยแข็งชนิดที่ผลิตจากเวย์ (Whey cheese) ได้แก่ เนยแข็งไพรโมสต์ (Primost cheese) และเนยแข็งริโคเทีย (Ricotia cheese)

2.2 โปรตีนนม (9)

องค์ประกอบหลักที่สำคัญในน้ำนมที่นำมาผลิตเนยแข็ง คือโปรตีนนม โดยเฉพาะอย่างยิ่งเคซีน (Casein) ซึ่งมีปริมาณมากที่สุดของโปรตีนนมทั้งหมด ดังนั้นจึงควรที่จะศึกษาชนิดของโปรตีนนมเคซีนประเภทต่าง ๆ ตลอดจนโครงสร้างของโมเลกุลเคซีน

ในน้ำนมวัวมีโปรตีนร้อยละ 3.5 โดยเฉลี่ย ซึ่งแบ่งได้ 2 ประเภทดังนี้

1. เคซีน มีมากถึงร้อยละ 80 ของโปรตีนนมทั้งหมด
2. เวย์โปรตีน (Whey protein) มีประมาณร้อยละ 20 ของโปรตีนนมทั้งหมด

ยังมีโปรตีนอื่น ๆ ซึ่งมีปริมาณน้อยมากจากการศึกษาด้วยวิธีอีเล็คโตรโฟริสิส (Electrophoresis)

2.2.1 เคซีน

2.2.1.1 ประเภทของเคซีน เคซีนเป็นฟอสโฟโปรตีน (Phosphoprotein) ซึ่งมีประมาณร้อยละ 80 ของโปรตีนนมทั้งหมดหรือประมาณร้อยละ 2.5-3.2 ของน้ำนม เคซีนมีฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบอยู่ร้อยละ 0.85 กำมะถันร้อยละ 0.78 มีซีสเตอีน (Cysteine)

ร้อยละ 0.09 มีเมไธโอนีน (Methionine) และโพรลีน (Proline) ในปริมาณสูง สำหรับฟอสฟอรัสที่พบจะอยู่ในรูปของฟอสเฟตเอสเตอร์กับกรดอะมิโนที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl group) เช่น ซีรีน (Serine) และธรีโอนีน(Threonine)

เคซีนยังแบ่งเป็นแอลฟาเอส-เคซีน (α_s-casein) เบตา-เคซีน (β-casein) แคปปา-เคซีน (K-casein) ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่มีจำนวนมาก และแกมมา-เคซีน (γ-casein) ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่มีจำนวนน้อย รายละเอียดของเคซีนแต่ละชนิดมีดังนี้

2.2.1.1.1 แอลฟาเอส-เคซีน มีประมาณร้อยละ 50-55 ของเคซีนทั้งหมด ซึ่งแบ่งเป็นชนิดย่อย ๆ อีกมากมาย ได้แก่ α_{s0}, α_{s1}, α_{s2}, α_{s3}, α_{s4}, α_{s5} ชนิดที่มีความสำคัญและปริมาณมากคือ แอลฟาเอส 1-เคซีน ซึ่งมี 2 ชนิดคือ แอลฟาเอส 1-เคซีนบีเป็นพอลิเพปไทด์สายเดี่ยวซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 199 ตัวโดยมีน้ำหนักโมเลกุล 23600 ดาลตัน และแอลฟาเอส 1-เคซีนเอ ประกอบด้วยกรดอะมิโน 186 ตัว โดยขาดตัวที่ 14-25 ไป 13 ตัว

2.2.1.1.2 เบตา-เคซีน มีประมาณร้อยละ 30-35 ของเคซีนทั้งหมด ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 24500 ดาลตัน มีความไวต่อแคลเซียมไอออน (Ca^{+2}) มากคือตกตะกอนแคลเซียมไอออนได้ง่าย

2.2.1.1.3 แกมมา-เคซีน ในปี ค.ศ. 1976 คณะกรรมการ Milk Protein Nomenclature and Methodology ของ ADSA (9) ได้สรุปว่า แกมมา-เคซีนเป็นส่วนเบตา-เคซีน ที่เกิดจากการสลายตัวของเบตา-เคซีน โดยอาศัยเอนไซม์โปรติเอส แกมมา-เคซีน มีประมาณร้อยละ 5 ของเคซีนทั้งหมด แบ่งเป็นชนิดย่อย ๆ ได้ 3 ชนิด ได้แก่

2.2.1.1.3.1 แกมมา 1-เคซีน (γ_1-casein) เกิดจากส่วนของเบตา-เคซีนที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 29-209 และมีน้ำหนักโมเลกุล 20,500 ดาลตัน

2.2.1.1.3.2 แกมมา 2-เคซีน (γ_2-casein) เกิดจากส่วนของเบตา-เคซีนที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 106-209 มีน้ำหนักโมเลกุล 11800 ดาลตัน

2.2.1.1.3.3 แกมมา 3-เคซีน (γ_3-casein) เกิดจากส่วนของเบตา-เคซีนที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 108-209 มีน้ำหนักโมเลกุล 11600 ดาลตัน

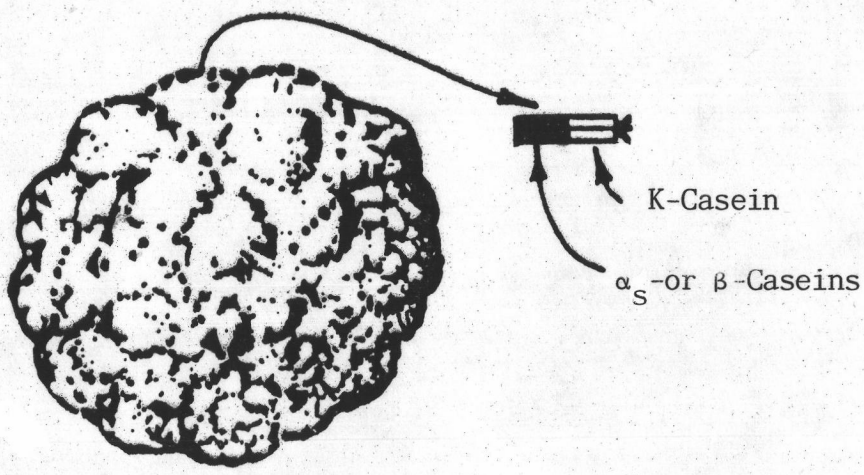
2.2.1.1.4 แคปปา-เคซีน (K-casein) มีประมาณร้อยละ 15 ของเคซีนทั้งหมด ไม่มีความไวต่อแคลเซียมไอออน โมเลกุลของแคปปา-เคซีนประกอบด้วยกรดอะมิโน 169 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุล 10005 ดาลตัน ในโมเลกุลประกอบด้วยซีสเตอีน (Cysteine) 2 ตัว ซึ่งทำหน้าที่ให้เกิดพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างโมเลกุลได้เป็นพอลิเมอร์ ทำให้มีน้ำหนักโมเลกุล 60,000-600,000 ดาลตัน แคปปา-เคซีนเป็นสารตั้งต้น (Substrate) ที่มีความจำเพาะต่อเอนไซม์เรนนินและถูกย่อยที่พันธะฟีนิลอลานีน 105- เมไธโอนีน 106 (Phenylalanine 105-Methionine 106 linkages)

2.2.1.2 รูปแบบของไมเซลล์ของเคซีน (Casein micelle model) ไมเซลล์ (Micelle) หมายถึงโปรตีนซึ่งอยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อน สำหรับเคซีนมักประกอบด้วยแคลเซียม (Ca) แมกนีเซียม (Mg) เกลือซิเตรท (Citrate) และเกลือฟอสเฟต (Phosphate) เสมอ องค์ประกอบของไมเซลล์ของเคซีน (Casein micelle) นั้นมีแอลฟาเอส 1 - เคซีนมากกว่าเบตา-เคซีน และมากกว่าแคปปา-เคซีน ตามลำดับ มีผู้ตั้งทฤษฎีรูปแบบของไมเซลล์ของเคซีนซึ่งพอสรุปได้ 3 ทฤษฎีดังนี้

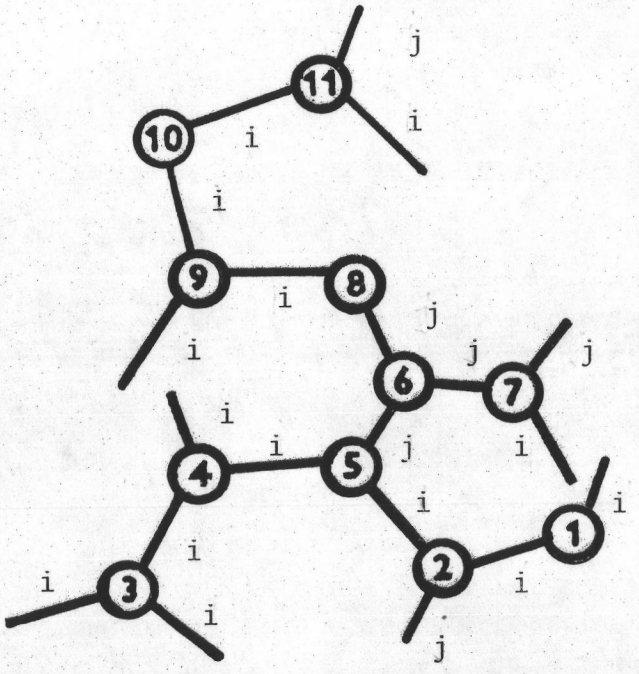
2.2.1.2.1 Solid sphere milk micelle model ทฤษฎีนี้เสนอโดย Waugh และ Noble (10) ซึ่งอาจให้ชื่อรูปแบบนี้ว่า Coat-core model ดังรูปที่ 1 แต่ละหน่วยย่อยจะประกอบด้วยส่วนแกน (Core) ซึ่งเป็นแอลฟาเอส-เคซีน หรือเบตา-เคซีน และส่วนที่ล้อมรอบอยู่ภายนอกจะเป็นส่วนของแคปปา-เคซีน สำหรับบริเวณที่ยื่นออกภายนอกของแคปปา-เคซีนเป็นส่วนของแมโครเพปไทด์ (Macropeptide) ซึ่งมีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดีมาก (Strongly hydrophilic property) จากนั้นแต่ละหน่วยจะเข้ามารวมตัวกันเกิดเป็นลักษณะของรูปแบบทรงกลมซึ่งแขวนลอยอยู่ในส่วนของน้ำนมได้

2.2.1.2.2. Sponge-Like micelle model ทฤษฎีนี้เสนอโดย Garnier และ Ribadeau-Dumas (11) ดังรูปที่ 2 รูปแบบนี้เป็นลักษณะของการเชื่อม-โยงกันเป็นร่างแหของหน่วยย่อยของเคซีน อันได้แก่ แอลฟาเอส-เคซีน เบตา-เคซีน และแคปปาเคซีน

2.2.1.2.3 Milk micelle model ทฤษฎีนี้เสนอโดย Parry และ Carroll (12) ดังรูปที่ 3 โดยรูปแบบนี้ แคปปา-เคซีนจะรวมตัวกันเป็นกลุ่มตรงกลาง และมีพอลิเมอร์ของแอลฟาเอส-เคซีนและเบตา-เคซีนสร้างตัวอยู่รอบ ๆ โดยมีแคลเซียมฟอสเฟต (Calcium phosphate) ช่วยในการยึดเกาะของหน่วยย่อยเหล่านี้



รูปที่ 1 Solid sphere milk micelle model

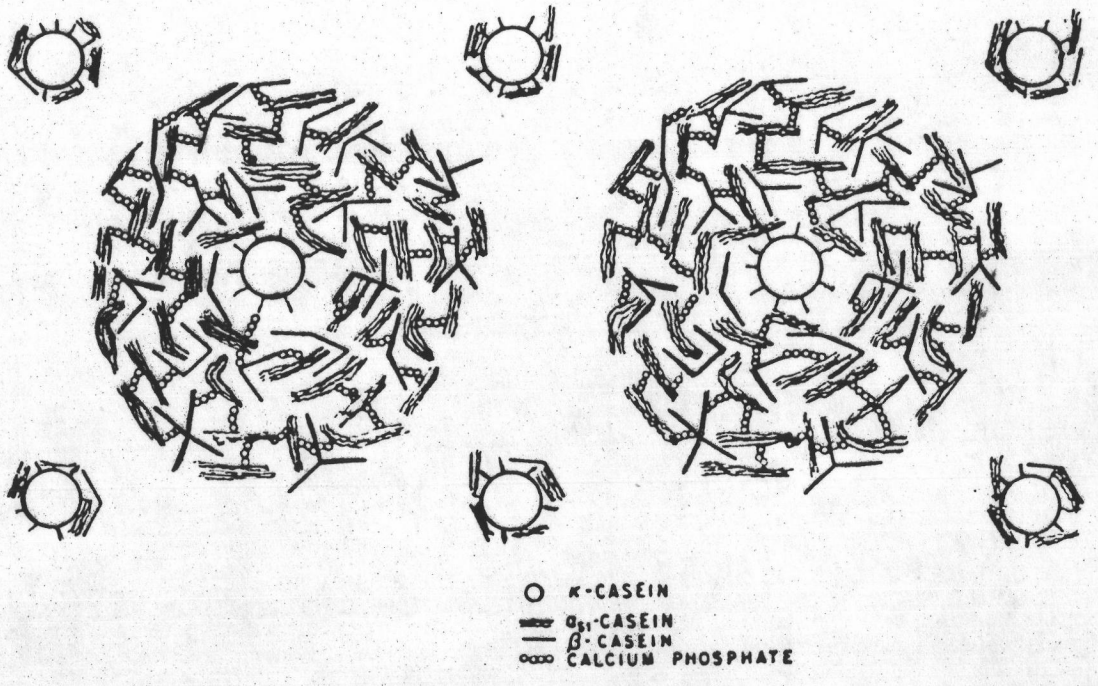


รูปที่ 2 Sponge-like micelle model

○ = trimer ของแคปปา-เคซีน

i = mixed octamers ของ 4-แอลฟาเอส-เคซีนกับ 4-เบตา-เคซีน

j = mixed tetramers ของ 2-แอลฟาเอส-เคซีนกับ 2-เบตา-เคซีน



รูปที่ 3 Milk micelle model

2.2.2 เวย์โปรตีน (13)

ส่วนที่เหลือจากน้ำนมปราศจากไขมันที่แยกเคซีนออกแล้วคือ เวย์ หรือมิลค์-เซรัม (Milk serum) ในการแยกเคซีนออกนี้ถ้าตกตะกอนด้วยกรดที่ pH 4.6 เวย์ที่ได้เป็นแอซิดเวย์ (Acid whey) แต่ถ้าแยกเคซีนด้วยการตกตะกอนด้วยเอนไซม์เรนนินหรือเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติคล้ายเรนนิน (Rennin like enzyme) เช่น ในการทำเนยแข็งเชดดาร์ (Cheddar cheese) ส่วนที่เหลือจะเป็นเรนนินเวย์ (Rennin whey) หรือสวีทเวย์ (Sweet whey) เวย์ทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกันเล็กน้อยคือ แอซิดเวย์ ไม่มีเคซีนแต่มีแคลเซียมสูง ส่วนสวีทเวย์จะมีกรดอะมิโนอิสระมากกว่า และมีส่วนของเคซีนที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์เรนนินปนอยู่ด้วย

เวย์โปรตีนที่มีปริมาณมากได้แก่

2.2.2.1 แอลฟา-แลคโตอัลบูมิน (α-Lactoalbumin)

2.2.2.2 เบตา-แลคโตกลอบูลิน (β-Lactoglobulin)

2.2.2.3 โบวีน-เซรัม-อัลบูมิน (Bovine serum albumin)

2.2.2.4 ชั้นโปรตีโอส-เปปโตน (Proteose-peptone fraction)

นอกจากนี้ยังมีโปรตีนอื่น ๆ อีกหลายชนิด แต่มีในปริมาณน้อยมาก ทราบโดยการศึกษาด้วยวิธีอีเลคโตรโฟริสิส โปรตีนที่สำคัญเหล่านี้ได้แก่

แลคโตเฟอริน (Lactoferrin)

แลคโทลลิน (Lactollin)

เซรัม-ทรานส์เฟอริน (Serum transferrin)

เอ็ม-1 ไกลโคโปรตีน (M-1 Glycoprotein)

2.3 เอนไซม์เรนนิน

จุดสำคัญของการผลิตเนยแข็งคือ การตกตะกอนโปรตีนนมซึ่งในทางอุตสาหกรรมนิยมใช้เอนไซม์เรนนินเป็นสารทำให้เกิดการตกตะกอน (Coagulant)

เอนไซม์เรนนินเป็นเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน (Proteolytic enzyme) ชนิดหนึ่งซึ่งจัดอยู่ในประเภทเอนโดเพปติเดส (Endopeptidase) ซึ่งมีชื่อรหัสของ Enzyme Commission เป็น E.C.3.4.23.4 นอกจากนี้ Foltmann (1970) (14) เสนอแนะให้ใช้คำว่าไคโมซิน (Chymosin) แทนคำว่าเรนนิน (Rennin) เพื่อหลีกเลี่ยงความสับสนกับคำว่าเรนิน (Renin)

จากไต ในทางการค้านิยมใช้คำว่าเรนเนต (Rennet) แทนคำว่าเรนนิน ดังนั้นคำว่าเรนนิน เรนเนต และไคโมซิน จึงหมายถึงเอนไซม์ตัวเดียวกัน

2.3.1 แหล่งของเอนไซม์เรนนิน

แหล่งดั้งเดิมของเอนไซม์เรนนินมาจากสัตว์เคี้ยวเอื้องที่มีอายุน้อย เช่น ลูกวัว ลูกแพะ และลูกแกะ แต่เมื่อสัตวโตขึ้นแล้วกระเพาะที่สี่ของสัตว์เคี้ยวเอื้องเหล่านี้จะสร้างเอนไซม์เพปซินขึ้นทดแทนเอนไซม์เรนนิน

เมื่อมีผู้นิยมบริโภคเนยแข็งมากขึ้น เป็นผลให้เอนไซม์เรนนินเริ่มขาดแคลน ประกอบกับเอนไซม์เรนนินมีราคาแพง ทำให้ผู้ผลิตพยายามหาแหล่งเอนไซม์เรนนินในทางการค้ากันมากขึ้น เช่น การนำเอนไซม์เรนนินผสมกับเอนไซม์อื่นที่ให้คุณสมบัติคล้ายคลึงกับเอนไซม์เรนนิน ดังตารางที่ 1 (15)

นอกจากนี้ Burnett (1976) (16) ได้ชี้ให้เห็นว่ามีผู้วิจัยหลายท่านพยายามศึกษาถึงพืชและสารสกัดจากพืชที่มีคุณสมบัติในการตกตะกอนนมด้วยความคาดหวังที่จะนำมาใช้แทนเอนไซม์เรนนิน ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 1 แหล่งเอนไซม์ทางการค้าที่ใช้ทดแทนเอนไซม์เรนนิน

เอนไซม์เรนนิน	แหล่ง	ผู้ผลิต
50/50 Rennets	Calf rennet/Porcine pepsin; Calf rennet/Bovine pepsin	
Bovine rennet	Bovine extracts	
Hannilase	Mucor miehei	Chr. Hansens Laboratories
Rennilase	Mucor miehei	Novo Industries Ltd.
Fromase	Mucor miehei	Wallerstein Co.
Miki	Mucor miehei	
Marzyme	Mucor miehei	Miles Laboratories
Novadel	Mucor pusillus	
Noury	Mucor pusillus (Lindt)	Vitex
Meito	Mucor pusillus (Lindt)	Meito Sangyo
Emporase	Mucor pusillus (Lindt)	Dairyland Food Laboratory
Suparen	Endothia parasitica	Pfizer Ltd.
Mikrozyme	Bacillus subtilis	
Sure curd	Endothia parasitica	Pfizer Ltd.
Lactochym	Calf abomasum (suckling calf)	

019095

ตารางที่ 2 พืชและสารสกัดจากพืชที่มีคุณสมบัติตกตะกอนนม

Artichoke (cardoon)	Cynara cardunculus
Burdock	Arctium minus
Bittersweet	Solanum dalcamara
Butterwort	Penquicula vulgaris
Butterwort	Penquicula alpina
Common Daisy	Bellis perennis
Common Mallow	Malva sylvestris
Creeping Thistle	Cirsium arvense
Fever few	Chrysanthemum parthenium
Fig tree	Ficus carica
Ground Thistle	Cirsium acaule
Hemlock	Conium maculatum
Himalayan Balsam	Impatiens glandulifera
Hogweed	Heracleum spondylum
Knapweed	Centaurea scabosa
Knapweed	Centaurea negra
Lady's Bedstraw	Galium verum
Paw Paw	Carica papaya (Papain)
Ragwort	Senecio jacobaea
Pineapple	Ananas sativa (Bromelain)
Solomon's seal	Polygonatum multiflorium
Sorrel	Rumex acetosa
Spearwort	Ranunculus flaminula
Spearwort	Ranunuclus lingua
Stinging Nettle	Urtica dioica
Sundew	Drosera rotundifolia
Sundew	Drosera intermedia
Teasel	Dipsacus sylvestris
Thistle	Carlina corymbosa
Thistle	Carlina acaulis
Yarrow	Achillea millefolium
White Bryony	Bryonia doicia
Withiana Berry	Withiania coagulans
Strebulus tree	Strebulus asper
Castor oil seeds	Ricinus communis (Rincin)
Spurge	Euphorbia lathyrus

2.3.2 โครงสร้างของเอนไซม์เรนนิน

เอนไซม์เรนนินจะมีตัวตั้งต้น (Precursor) ซึ่งเรียกว่าโพรเรนนิน (Prorennin) หรือโพรไคโมซิน (Prochymosin) ในสภาวะที่ pH 2.47 นั้น โพรเรนนินจะปล่อยเพปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 5300 ดาลตัน ออกมาแล้วได้เอนไซม์เรนนินซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 31,000 ดาลตัน (17)

ปลายหมู่แอมโมเนียม (N-terminal) ของเอนไซม์เรนนินคือ ไกลซีน (Glycine) และมีลำดับของกรดอะมิโนดังนี้

N-gly-glu-ral-ala-ser-ral-pro-leu-thr-asn
-tyr-ile-lys-gly-phe-tyr-glu-ser-asp-leu-tyr

Jirgensons และคณะ (1958) (18) พบว่าปลายหมู่ไฮดรอกซิล (C-termianl) ของเอนไซม์เรนนินคือลิวซีน (Leucine) หรือไอโซลิวซีน (Isoleucine) โดยมีลำดับของกรดอะมิโนดังนี้

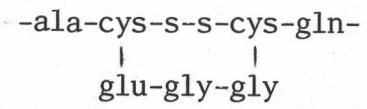
ile-leu-gly-asp-ral-phe
ala-arg-asp-phe-val-ser-tyr-tyr-glu-arg-ile
asn-asn-leu-val-gly-leu-ala-lys-ala-ile-COOH

โครงสร้างของโพรเรนนินจะเป็นโปรตีนสายเดี่ยว (A single-chain protein) ที่มีพันธะไดซัลไฟด์ (Disulfide bond) ซึ่งหลังจากโพรเรนนินเปลี่ยนเป็นเอนไซม์เรนนินแล้วพันธะไดซัลไฟด์ทั้ง 3 ตำแหน่งยังคงอยู่ในเอนไซม์เรนนิน จากรายงานของ Fryer (1969) (19) ได้กล่าวว่า จากการศึกษาลำดับของกรดอะมิโนของแต่ละตำแหน่งของพันธะไดซัลไฟด์ทั้ง 3 ตำแหน่ง โดย Foltman และ Hartley (1967) ปรากฏผลดังนี้

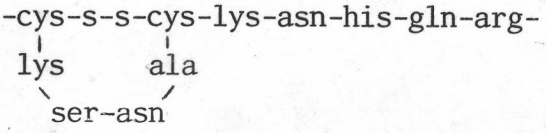
สายที่ 1 เป็นสายของกรดอะมิโน 270 ตัว

asp-ile-asp-cys-asp-asn-leu-glu-glu-gly-ser-
S
S
-tyr-thr-ser-gln-asp-gln-gly-phe-cys-thr-ser-gly-phe-

สายที่ 2 เป็นห่วงเล็กของกรดอะมิโน 6 ตัว



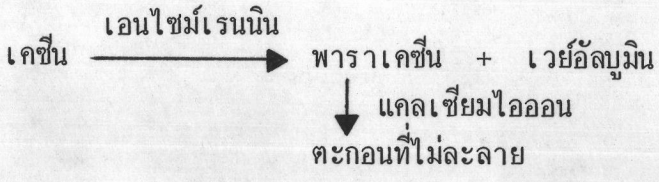
สายที่ 3 เป็นห่วงเล็กของกรดอะมิโน 6 ตัว



เนื่องจากองค์ประกอบของกรดอะมิโนดังกล่าวมานั้นเป็นลักษณะเฉพาะของเอนไซม์เรนนิน ดังนั้นพันธะไดซัลไฟด์ทั้ง 3 ตำแหน่ง และลำดับกรดอะมิโนทั้งสองปลายของเอนไซม์เรนนินจึงเป็นองค์ประกอบหลักของเอนไซม์เรนนินจากทุกแหล่ง

2.3.3 ปฏิกิริยาของเอนไซม์เรนนินต่อเคซีน

เริ่มด้วยทฤษฎีของ Hammarsten (1914) (20) และ Van Slyke กับ Bosworth (1914) (21) ได้อธิบายการตกตะกอนโปรตีนนมโดยเอนไซม์เรนนินว่าเคซีนเป็นโฮโมโมเลกุล (Homomolecule) และเอนไซม์เรนนินจะเปลี่ยนเคซีนไปอยู่ในรูปพาราเคซีน (Paracasein) จากนั้นการตกตะกอนจะเกิดในภาวะที่มีแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) ดังแผนภูมินี้



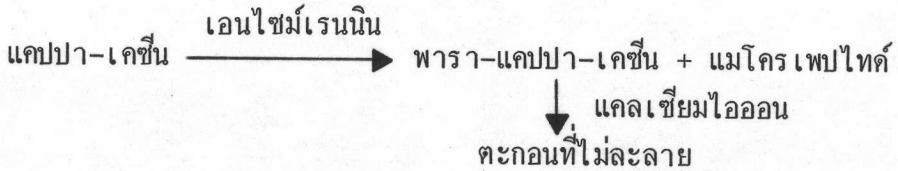
จากนั้นมีการศึกษาถึงโครงสร้างของเคซีนอีกมากมายดังกล่าวมาข้างต้น จึงสรุปว่าเคซีนไม่ใช่โฮโมโมเลกุล แต่เป็นเฮเทอโรโมเลกุล (Heteromolecule) ซึ่งประกอบด้วย

แอลฟาเอส-เคซีน มีร้อยละ 45-55 ของโปรตีนนมขาดมันเนย

เบตา-เคซีน " 25-35 " ———— "

แคปปา-เคซีน " 8-15 " ———— "

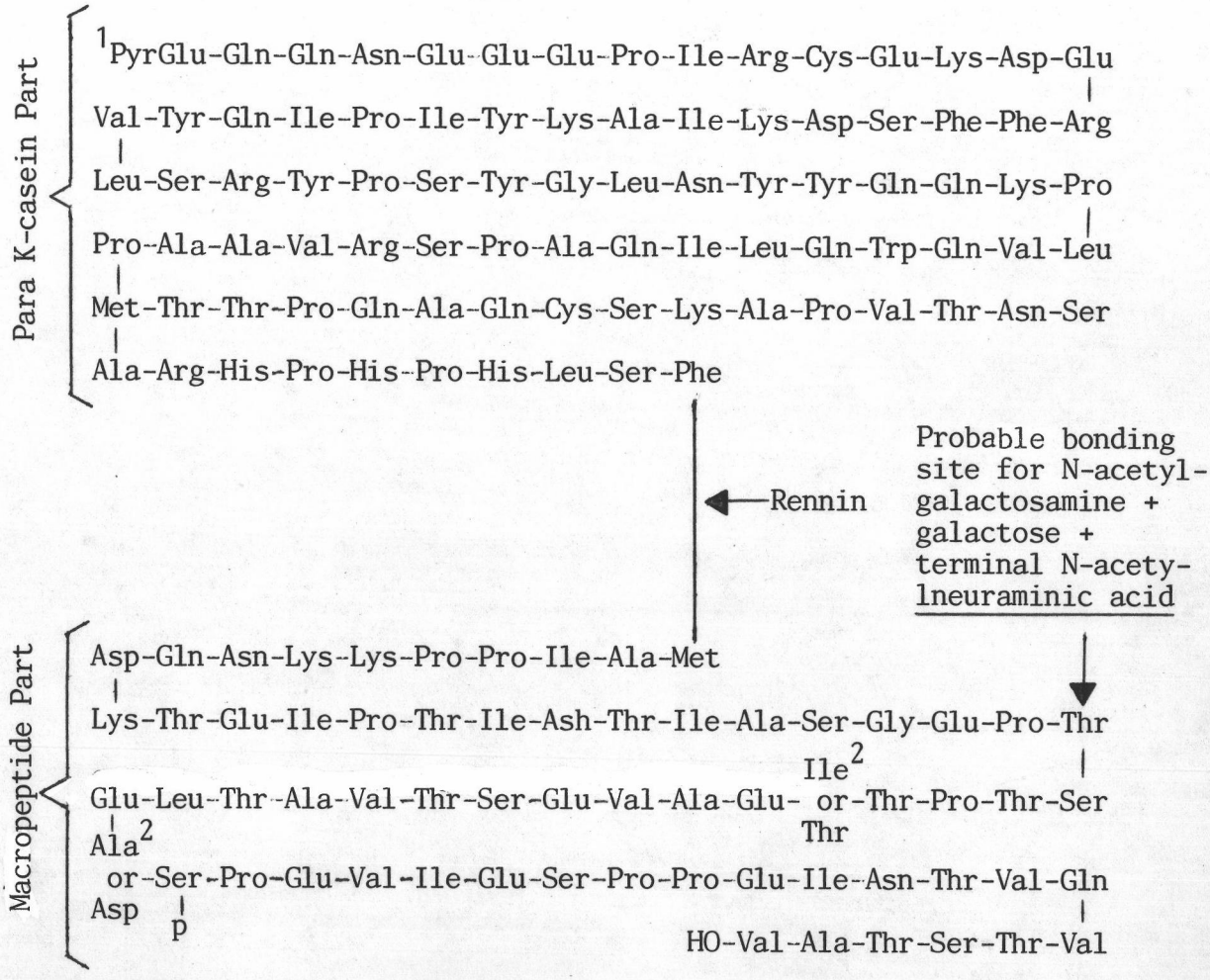
แคปปา-เคซีน ทำหน้าที่เป็นสารที่ทำให้เกิดการกระจายตัว (Emulsifying agent) จึงทำให้เคซีนไมเซลล์ (Casein micelle) สามารถรักษาสภาพกระจายตัวในน้ำนมได้ เหตุผลที่สรุปเช่นนี้คือ แคปปา-เคซีนมีซีสเตอีน (Cysteine) 2 หมู่ทำให้เกิดพันธะไดซัลไฟด์ในสายเคซีนแต่เสถียรภาพของแคปปา-เคซีนจะถูกทำลายโดยเอนไซม์เรนนินซึ่งเสนอโดย Mackinlay และ Wake (1971) (22) ดังนี้



จึงสรุปว่าปฏิกิริยาของเอนไซม์เรนนินต่อเคซีนประกอบด้วย 2 ระยะ

2.3.3.1 ระยะแรกที่ใช้เอนไซม์ (Primary enzymatic phase) เป็นช่วงที่เอนไซม์เรนนินจะเข้าทำปฏิกิริยากับแคปปา-เคซีนเพื่อทำลายเสถียรภาพของไมเซลล์ของเคซีน นั่นคือแคปปา-เคซีนเป็นเป้าหมายของเอนไซม์เรนนินซึ่งเป็นผลให้เกิดปฏิกิริยาดังกล่าวข้างต้น Jolles และคณะ (1968) (23) เป็นผู้พบว่าพันธะเพปไทด์ (Peptide bond) ที่มีความไวต่อเอนไซม์เรนนินคือ ที่พันธะฟีนิลอลานีน 105 - เมไธโอนีน 106 ทำให้แคปปา-เคซีนแยกเป็นสองส่วนคือ พารา-แคปปา-เคซีน และแมโครเพปไทด์ ดังรูปที่ 4 ในส่วนของแมโครเพปไทด์นี้ได้แก่ ไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน (Non-protein-nitrogen, NPN) ซึ่งก็คือไกล-โคแมโครเพปไทด์ (Glycomacropeptide) ที่มีคุณสมบัติละลายได้ดีในกรดไตรคลอโรอะซิติค (Trichloroacetic acid, TCA) สำหรับไกลโคแมโครเพปไทด์นี้ประกอบด้วย เอ็น-อะเซ-ทิลกาแลคโตซามีน (N-acetylgalactosamine) กาแลคโตส (Galactose) และกรดเซียลิค (Sialic acid) นอกจากนี้ไกลโคแมโครเพปไทด์มีคุณสมบัติการละลายได้สูง ซึ่งเป็นผลให้เกิดเสถียรภาพแก่แคปปา-เคซีน

2.3.3.2 ระยะสองที่ไม่ใช้เอนไซม์ (Secondary nonenzymatic phase) เป็นช่วงของการตกตะกอนซึ่งมีผลจากประจุในน้ำนมโดยเฉพาะแคลเซียมไอออนซึ่งจะสร้างสะพานแคลเซียม (Calcium bridge) เชื่อมโยงพารา-แคปปา-เคซีนในลักษณะร่างแหตาข่าย (Cross-link net work) ในที่สุดตกตะกอนลงมาเป็นลิ่มนม นอกจากนี้ไขมันและแลคโตสจะรวมอยู่ในโครงสร้างด้วย ดังนั้นจึงมักพบว่าในการผลิตเนยแข็งนิยมเติมแคลเซียมไอออนในรูปของแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)



รูปที่ 4 ตำแหน่งที่เอนไซม์เรนนินเข้าทำปฏิกิริยากับแคปปา-เคซีน

2.4 การตรึงรูปเอนไซม์

2.4.1 นิยามของเอนไซม์ตรึงรูป เอนไซม์ตรึงรูปคือ เอนไซม์ที่ถูกกำหนด หรือจัดให้มาอยู่ภายในขอบเขตที่กำหนดไว้และต้องมีแอคติวิตี (Activity) เท่ากับหรือสูงกว่าเอนไซม์เดิมรวมทั้งสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้

ข้อดีของการตรึงรูปเอนไซม์

1. เพิ่มเสถียรภาพของเอนไซม์เมื่อคำนึงถึงการเก็บในระยะยาว
2. สามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ได้
3. สามารถแยกเอนไซม์ตรึงรูปออกจากระบบได้ง่าย
4. การกำหนดรูปร่างของเอนไซม์ตรึงรูปให้เหมาะกับเครื่องปฏิกรณ์ทำได้ง่าย
5. เอนไซม์ที่จะนำมาตรึงรูปไม่จำเป็นต้องมีความบริสุทธิ์ก็ได้
6. ใช้กับระบบที่มีเอนไซม์หลายตัว (Multienzyme system) ได้ง่าย
7. เพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ได้โดยเลือกวิธีและตัวพยุงเพื่อช่วยเสริมแอคติวิตีได้

สำหรับข้อเสียของการตรึงรูปเอนไซม์นั้นได้แก่

1. แอคติวิตีของเอนไซม์ มักถูกกระทบกระเทือนเนื่องจากวิธีการตรึงรูปเอนไซม์อาจมีผลให้เอนไซม์เปลี่ยนโครงแบบ (Configuration) ไปได้ง่าย
2. ตัวพยุงอาจมีผลกระทบต่อผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น เช่น ตัวพยุงอาจทำปฏิกิริยากับผลิตภัณฑ์

2.4.2 วิธีการตรึงรูปเอนไซม์ (24)

วิธีการตรึงรูปเอนไซม์แบ่งเป็น 3 วิธี ดังรูปที่ 5 ซึ่งมีรายละเอียดของวิธีการดังนี้

2.4.2.1 วิธีเชื่อมกับตัวพยุง (Carrier binding method)

การยึดเกาะระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุงแบ่งได้ 3 ชนิดคือ

2.4.2.1.1 การยึดเกาะด้วยการดูดซับทางกายภาพ (Physical adsorption) ใช้แรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์ไว้บนตัวพยุง วิธีนี้ไม่ทำให้เอนไซม์เสียแอคติวิตี แต่มีข้อเสียคือแรงยึดเกาะระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุงอ่อนและ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ง่ายต่อการแยกออกจากตัวพยุงที่ใช้กับเอนไซม์

2.4.2.1.2 การเชื่อมด้วยพันธะอิออนิก (Ionic bonding) ใช้ตัวยึดที่เป็นตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุภาค (Ion exchanger) ที่ไม่ละลายน้ำเกาะกับเอนไซม์ วิธีนี้ไม่ทำให้เอนไซม์เสียแอคติวิตี แต่มีข้อเสียคือ แรงยึดเกาะระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุงจะเป็นแรงที่อ่อน ดังนั้นเมื่ออยู่ในสภาวะไม่เหมาะสมเช่น มีประจุภาคมากเกินไปหรือเกิดการเปลี่ยนแปลง pH เอนไซม์จะหลุดออกจากตัวพยุงได้ง่าย

2.4.2.1.3 การเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์ (Covalent bonding) วิธีนี้จะมีแรงดึงดูดระหว่างตัวยึดกับเอนไซม์แข็งแรงกว่า ดังนั้นจึงมีอายุการใช้งานได้นาน แต่วิธีการตรึงรูปเอนไซม์ซับซ้อนเป็นผลให้มีการสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์ได้

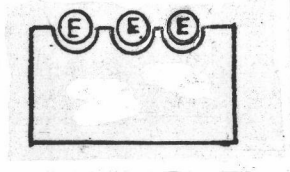
2.4.2.2 วิธีการเชื่อมข้าม (Cross-linkage method) หมายถึง การเชื่อมโยงของเอนไซม์กับสารไบฟังชันนัล (Bifunctional reagent) วิธีนี้มีแรงยึดที่แข็งแรงเช่นเดียวกับการเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์ หากใช้วิธีนี้ควบคู่กับวิธีเชื่อมกับตัวพยุงด้วยการดูดซับทางกายภาพจะเพิ่มเสถียรภาพของเอนไซม์

2.4.2.3 วิธีห่อหุ้ม (Entrapping method) วิธีนี้ใช้กับสารตั้งต้นที่มีโมเลกุลเล็กเท่านั้น แบ่งเป็น 2 ชนิด ดังนี้

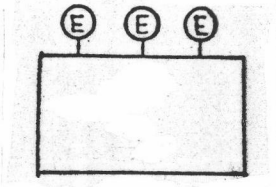
2.4.2.3.1 การห่อหุ้มเป็นช่องตาข่าย (Lattice type) เป็นวิธีการกักเก็บเอนไซม์ไว้ในสารพอลิเมอร์ที่เป็นตาข่าย

2.4.2.3.2 การห่อหุ้มในแคปซูลขนาดเล็ก (Microcapsule type) เป็นการกักเอนไซม์โดยห่อหุ้มไว้ในสารพวกเซมิเปอร์มิเอเบิล เมมเบรน (Semi-permeable membrane)

1. วิธีเชื่อมกับตัวพยุง



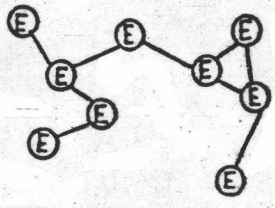
1.1 การดูดซับ



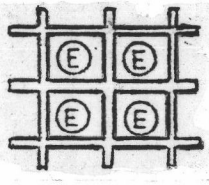
1.2 การเชื่อมด้วยพันธะอิออนิก

1.3 การเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์

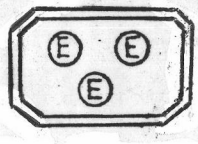
2. วิธีเชื่อมข้าม



3. วิธีห่อหุ้ม



3.1 การห่อหุ้มเป็นช่อง



3.2 การห่อหุ้มในแคปซูล

รูปที่ 5 วิธีเตรียมเอนไซม์ตรึงรูป

2.4.3 การเตรียมเอนไซม์เรนนินตรึงรูป

เอนไซม์เรนนินเป็นเอนไซม์ที่ใช้ตกตะกอนนม (Milk clotting enzyme) ชนิดหนึ่งเป็นแกนหลักในการผลิตเนยแข็ง เอนไซม์เรนนินที่นิยมใช้ได้แก่เอนไซม์เรนนินจากลูกวัว ซึ่งเริ่มมีราคาสูงและเกิดการขาดแคลนมากขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อการบริโภคเนยแข็งเป็นที่นิยมมากขึ้น จึงมีความพยายามหาแหล่งเอนไซม์เรนนินใหม่ ทั้งจากพืชและจุลินทรีย์ การนำเทคโนโลยีทางเอนไซม์ซึ่งได้แก่ การตรึงรูปเอนไซม์เรนนินก็จัดเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้แก้ไขปัญหาดังกล่าว ซึ่งยังมีผลดีที่น่าพิจารณาถึงอีกคือ การเตรียมเอนไซม์เรนนินตรึงรูปเป็นการช่วยให้นำเอนไซม์เรนนินกลับมาใช้ใหม่ได้ และยังมีส่วนช่วยให้ไม่สูญเสียเอนไซม์เรนนินถึงร้อยละ 70-90 ไปกับเวย์ รวมทั้งเอนไซม์เรนนินร้อยละ 10-30 ก็ไม่ตกค้างในลิ่มนมซึ่งแก้ไขปัญหาการผลิตเพปโตนที่จะให้รสขมแล้วทำให้เนยแข็งด้อยคุณภาพ

ได้มีงานวิจัยมากมายที่ศึกษาถึงการใช้เอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนแบบตรึงรูปเพื่อตกตะกอนนม อาทิเช่น

ในปี ค.ศ. 1969 Green และคณะ (4) ทำการตรึงรูปเอนไซม์เรนนินและเอนไซม์ไคโมทริปซิน (Chymotrypsin) กับอะกาโรส (Agarose) ด้วยวิธีเชื่อมด้วยพันธะ-โคเวเลนต์โดยใช้แพคเบด (Packed bed) และถังกวน (Stirred tank) ผลปรากฏว่าเอนไซม์ตรึงรูปที่ได้มีแอคติวิตีต่ำ นอกจากนี้ยังทดลองตรึงรูปเอนไซม์เรนนินกับดีอีเออี-เซลลูโลส (DEAE-cellulose) ด้วยวิธีเชื่อมกับตัวพยุงด้วยการดูดซับโดยใช้แพคเบด (Packed bed) และถังกวน (Stirred tank) เป็นเครื่องปฏิกรณ์ ผลปรากฏว่าเอนไซม์เรนนินตรึงรูปมีแอคติวิตีอยู่เล็กน้อย

ในปี ค.ศ. 1975 Cheryan และคณะ (25) ได้ทดลองตรึงรูปเอนไซม์เรนเนตกับแก้วพรุน (Porous glass) โดยวิธีเชื่อมกับตัวพยุงด้วยพันธะโคเวเลนต์ แล้วใช้เครื่องปฏิกรณ์ชนิดฟลูอิไดซ์เบด (Fluidized bed) ผลปรากฏว่าเอนไซม์ตรึงรูปที่ได้มีแอคติวิตีที่ดีมาก

ในปี ค.ศ. 1983 Angelo และคณะ (26) ได้ตรึงรูปเอนไซม์เรนเนต (Rennet) กับเซฟาโรส-4 บี (Sepharose-4B) แบบเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์โดยมีเครื่องปฏิกรณ์เป็นถังกวนและแพคเบด ปรากฏว่าเอนไซม์เรนนินตรึงรูปมีแอคติวิตีดี

นอกจากนี้ ในปี ค.ศ. 1983 Thomplison และคณะ (5) ทำงานวิจัยเบื้องต้นถึงความเป็นไปได้ในการใช้ทรายเป็นตัวพยุงแทนแก้วพรุน เนื่องจากทรายราคาถูกหาง่าย และมีความเป็นไปได้สูงในการขยายสู่ระดับอุตสาหกรรม การวิจัยของเขาเริ่มด้วยการเตรียมเอนไซม์เรนเนตตรึงรูปกับทรายด้วยพันธะโคเวเลนต์ ใช้ถังกวนเป็นเครื่องปฏิกรณ์แล้วศึกษาประสิทธิภาพในการเกิดปฏิกิริยากับโปรตีนนมเทียบกับเอนไซม์เรนเนตไม่ตรึงรูปโดยพิจารณาจากเวลาในการตกตะกอนนมและการเกาะเกี่ยวของเอนไซม์กับตัวพยุงพบว่าเอนไซม์เรนเนตตรึงรูปที่เตรียมได้ มีเวลาในการตกตะกอนนมเร็วกว่าเอนไซม์เรนเนตไม่ตรึงรูปและเอนไซม์เรนเนตเกาะเกี่ยวกับตัวพยุงได้ดี นอกจากนี้ยังศึกษาการใช้แพคเบดเป็นเครื่องปฏิกรณ์พบว่าให้ผลที่ดีเช่นเดียวกับการใช้ถังกวนเป็นเครื่องปฏิกรณ์ ดังนั้นเขาจึงสรุปจากผลงานเบื้องต้นนี้ว่า ทรายเป็นตัวพยุงที่มีคุณสมบัติดีไม่ต่างจากแก้วพรุน ดังนั้นงานวิจัยในหัวข้อ "การเตรียมเอนไซม์เรนนินตรึงรูปเพื่อการผลิตเนยแข็ง" ที่ดำเนินการจึงเลือกทรายแม่น้ำเป็นตัวพยุงซึ่งหาง่าย ราคาถูก เป็นวัตถุดิบที่มีภายในประเทศ โดยอาศัยข้อมูลในส่วนของการเตรียมเอนไซม์เรนนินตรึงรูปแบบเชื่อมพันธะโคเวเลนต์จากผลงานของ Thomplison สำหรับสิ่งที่ศึกษานอกเหนือจากผลงานของนักวิทยาศาสตร์ท่านก่อน ๆ คือ การศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์เรนนินตรึงรูปและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตกตะกอนโปรตีนนมเพื่อนำไปสู่การผลิตเนยแข็งในที่สุด ดังนั้นงานวิจัยที่ศึกษาจึงมีจุดเด่นในแง่ของการศึกษาที่ครบวงจรโดยเริ่มจากการเตรียมเอนไซม์เรนนินตรึงรูป ซึ่งเป็นส่วนของเทคโนโลยีชีวภาพจนมาสู่การผลิตเนยแข็ง โดยใช้เอนไซม์เรนนินตรึงรูปซึ่งเป็นเทคโนโลยีทางอาหาร