บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

ชนิดอุปกรณ์	แบบ	ประเทศ บริษัท หรือหน่วยงานผู้ผลิต
1. ตู้อบความชื้น	Hot Air Incubator Model no. SC.1086	Scientific Instrument Development & Service Center
2. เครื่องเขย่า	-	ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
3. เครื่องเขย่าควบคุมความเร็ว	Type H-16	Kokusan Ensinki CO., Ltd.
4. เครื่องปั่น	Model A-06	-
5. เครื่องวัด pH	Model HM-5ES	TOA Electronics Ltd. Japan
6. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง	Beckman 25 Scan Absorption Spectra Model 25	Instruments INC. Made in USA. Marca Reg.
7. ตู้แช่แข็ง	-	ATR Made in France
8. ตู้เย็น	Still Air Freezer	-
9. เครื่องควบคุมอุณหภูมิ	Model 2563 Shaker Bath	Forma Scientific Marietta Ohio
10. เครื่องเคลือบทอง	Ion Sputter Model JEC-1100	JEOL
11. Scanning Electron Microscope	Model JSM-T20	JEOL

ชนิดอุปกรณ์	แบบ	ประเทศ บริษัท หรือหน่วยงานผู้ผลิต
12. เครื่องวัดลักษณะเนื้อสัมผัส (Texturometer)	Visco-Type Plunger	Honcho, Nihobashi, Chuo-ku Tokyo, Japan
13. ถังแสตนเลส 2 ชั้น ขนาด 16×12×12 นิ้ว	-	ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
14. ตัวควบคุมอุณหภูมิ	Model E5B	OMRON
15. คอยด์ให้ความร้อน	Heater 230-250 Volts 2000 Watts	W-Germany
16. ปั๊ม	Single Phase Induction Motor	Hitachi, Ltd., Tokyo Japan
17. แม่พิมพ์รูปสี่เหลี่ยม	-	ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
18. โครงลวดใช้ตัดลิ่มนม	-	
19. ตะแกรงลวด 200 เมช ขนาด 15×11×11 นิ้ว	-	
20. ชุดหาไขมันด้วยวิธี Soxhlet Extraction	-	-
21. ชุดหาโปรตีนด้วยวิธี Macro Kjeldahl Distillation	-	-
22. เครื่องอัดไฮโดรลิค	Machine Type Press	Phetkasem Machinery Ceramic Co., Ltd.
23. เครื่องชั่งอย่างละเอียด	Model A200S	Satorius Analytic

3.2 สารเคมี

3.2.1 สารเคมีที่ใช้ตรึงรูปเอนไซม์เรนนิน

ทรายแม่น้ำขนาด 50 เมช (ภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์-มหาวิทยาลัย

กรดไนตริก (Riedel-De Haen Ag Seelze-Hannover)

อะมิโนโพลพิลไตรเอทอกซีไซเลน (Sigma Chemical Company USA.)

กลูตารัลดีไฮด์ (Merck Chemical Company)

โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนออโทฟอสเฟต (BDH Chemical Ltd. Poole England)

ไดโซเดียมไฮโดรเจน-ออโทฟอสเฟต (Merck Chemical Company)

เรนนิเลส-แอล (NOVO Industri A/S Copenhegen Denmark)

วิธีเตรียม

3.2.1.1 ทรายแม่น้ำสะอาดขนาด 50 เมช (5)

แช่ทรายแม่น้ำขนาด 50 เมช ในสารละลายกรดไนตริกความเข้มข้น 14 นอร์มัล พร้อมทั้งกวนเป็นระยะ ๆ นาน 6 ชั่วโมง จากนั้นเทสารละลายกรดไนตริกความเข้มข้น 14 นอร์มัล ออกแล้วล้างทรายแม่น้ำขนาด 50 เมช ด้วยน้ำกลั่นหลายครั้งจนน้ำที่ได้จากการล้างมี pH เท่ากับน้ำกลั่น นำทรายแม่น้ำขนาด 50 เมช นี้ไปอบแห้งในตู้อบความชื้นที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 12 ชั่วโมง แล้วบรรจุลงขวดพลาสติกที่สะอาด ปิดฝาให้เรียบร้อยแล้วเก็บไว้ในที่แห้งซึ่งจะใช้เป็นตัวพยุงในการเตรียมเอนไซม์เรนนินตรึงรูป

3.2.1.2 กรดไนตริก

ใช้สารละลายกรดไนตริกความเข้มข้น 14 นอร์มัลตามที่บรรจุในขวดมาซึ่งจัดเป็นกรดไนตริกชนิดเข้มข้น

3.2.1.3 สารละลายอะมิโนโพรพิลไตรเอทอกซีไซเลน

เรียกย่อ APTS มาจาก Aminopropyltriethoxy silane ความเข้มข้นที่ใช้ขึ้นอยู่กับปริมาณที่ต้องการศึกษาโดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย APTS ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นในการเตรียมเอนไซม์เรนนินตรึงรูป

3.2.1.4 สารละลายกลูตาราลดีไฮด์

ความเข้มข้นที่ใช้ขึ้นอยู่กับปริมาณที่ต้องการศึกษาโดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลายเช่นกัน กลูตาราลดีไฮด์ทำหน้าที่เป็นสารสร้างพันธะร่วมในการเตรียมเอนไซม์เรนนินตรึงรูป

3.2.1.5 สารละลายบัฟเฟอร์ pH 5.5

เตรียมสารละลายโปแตสเซียมไดไฮโดรเจน-ออโทฟอสเฟต ที่ความเข้มข้น 0.024 โมลาร์ และสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจน-ออโทฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 0.009 โมลาร์ จากนั้นนำสารละลายทั้งสองมาผสมกันในอัตราส่วน 50 : 7.1 มิลลิลิตร

3.2.1.6 เรนนิเลส-แอล

เป็นเอนไซม์เรนนินชนิดหนึ่งที่สกัดจากเชื้อราชนิด Mucor miehei มีแอคติวิตี 121 กิโลหน่วยเอนไซม์เรนนินต่อมิลลิลิตร

3.2.2 สารเคมีที่ใช้วัดแอคติวิตีของเอนไซม์เรนนิน

โปแตสเซียมไดไฮโดรเจน-ออโทฟอสเฟต (BDH Chemical Ltd. Poole England)

ไดโซเดียมไฮโดรเจน-ออโทฟอสเฟต (Merck Chemical Company)

เคซีน (BDH Chemical Ltd. Poole England)

กรดเปอร์คลอริก (AJAX Chemical Ltd. Sydney-Melbourne-Perth)

แอล-ไทโรซีน (BDH Chemical Ltd. Poole England)

วิธีเตรียม

3.2.2.1 สารละลายบัฟเฟอร์ pH 6.55

เตรียมสารละลายโปแตสเซียมไดไฮโดรเจน-ออโทฟอสเฟตที่มีความเข้มข้น 0.024 โมลาร์ และสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจน-ออโทฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 0.009 โมลาร์ จากนั้นนำสารละลายทั้งสองมาผสมกันในอัตราส่วน 2 : 3 มิลลิลิตร

3.2.2.2 สารละลายเคซีนความเข้มข้น 6 กรัม/ลิตรของสารละลายบัฟเฟอร์ pH 6.55

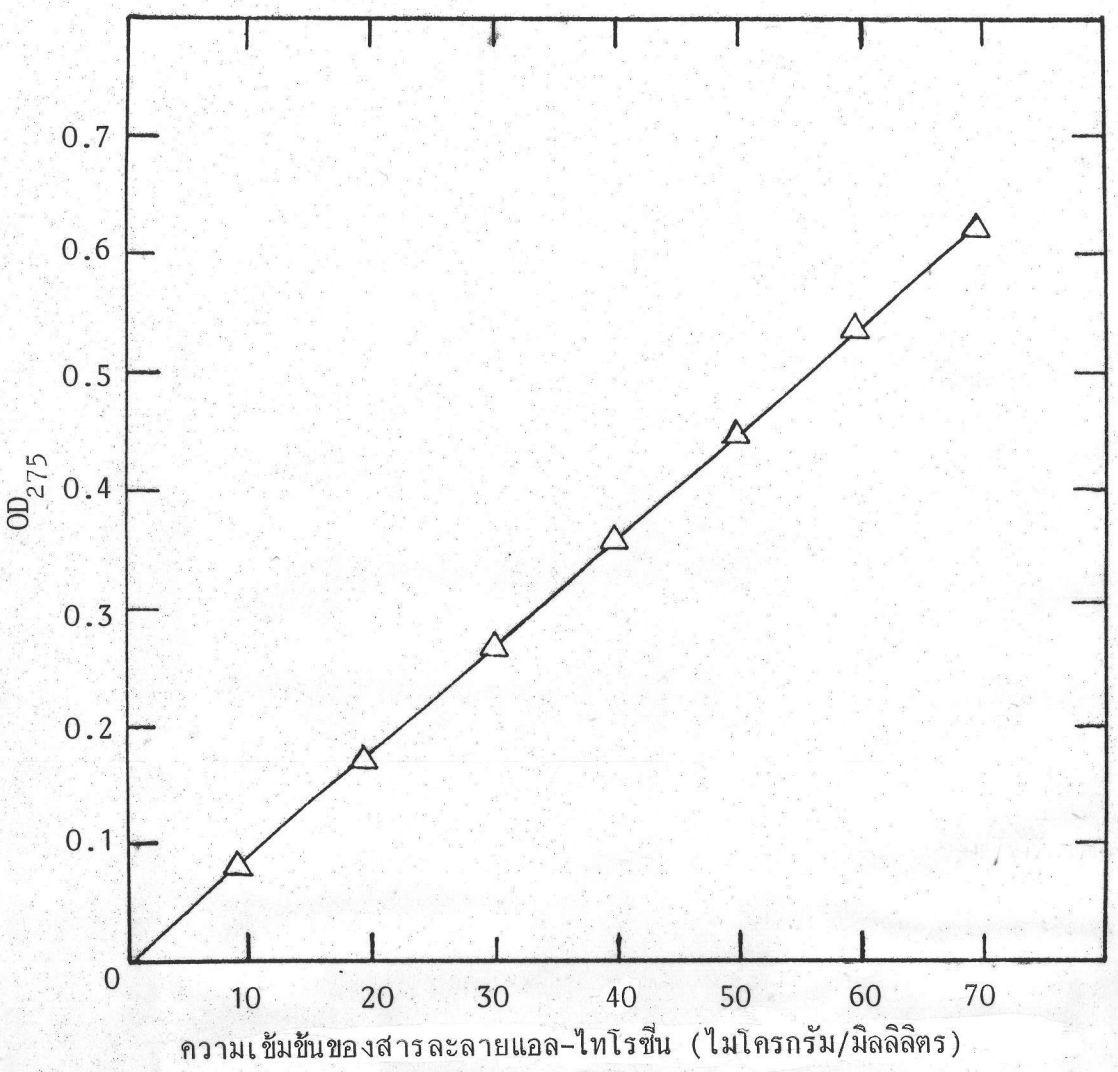
ละลายเคซีนปริมาณ 6 กรัม ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ pH 6.55 จากนั้นเก็บสารละลายเคซีนไว้ในห้องเย็นอุณหภูมิ 8-10 องศาเซลเซียส นาน 4-20 ชั่วโมงก่อนใช้งาน

3.2.2.3 สารละลายกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 0.36 โมลาร์

เตรียมสารละลายกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 0.36 โมลาร์ โดยมีน้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย

3.2.2.4 กราฟมาตรฐานของแอล-ไทโรซีน

แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร กับสารละลายมาตรฐานไทโรซีนในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 6.55 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ดังรูปที่ 6



รูปที่ 6 กราฟมาตรฐานแสดงค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร กับสารละลายแอล-ไทโรซีนที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

3.2.3 สารเคมีในการศึกษาภาวะการใช้เอนไซม์เรนนินตรึงรูปในการตกตะกอนเคซีนในนม

น้ำนมพาสเจอร์ไรซ์ (สหกรณ์โคนมหนองโพฯ จำกัด)

กรดแลคติก (Sigma Chemical Company USA.)

แคลเซียมคลอไรด์ (Merck Chemical Company)

วิธีเตรียม

3.2.3.1 น้ำนมพาสเจอร์ไรซ์

ตารางที่ 3 องค์ประกอบทางเคมีโดยเฉลี่ยของน้ำนมพาสเจอร์ไรซ์ที่ใช้ตลอดการทดลอง

องค์ประกอบ	ร้อยละ (โดยน้ำหนัก)
มันเนย	3.80
โปรตีน	3.29
ธาตุน้ำนมไม่รวมมันเนย	8.50

pH น้ำนม 6.5

3.2.3.2 สารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 5 และ 0.1 โมลาร์

เตรียมสารละลายกรดแลคติกให้มีความเข้มข้น 5 โมลาร์ และ 0.1 โมลาร์ เพื่อใช้ในการปรับ pH ของน้ำนมในระหว่างการทดลอง

3.2.3.3 แคลเซียมคลอไรด์

ใช้เติมน้ำนมในความเข้มข้นต่าง ๆ ตามที่ต้องการศึกษาในหน่วยของร้อยละโดยน้ำหนัก/ปริมาตร

3.2.4 สารเคมีที่ใช้ในการผลิตเนยแข็งเชดดาร์

Streptococcus lactis (Bangkok MIRCEN Thailand Institute of Scientific and Technological Research)

Nutrient broth (Difco Laboratories Detroit Michigan USA.)

โซเดียมคลอไรด์ (May & Baker Ltd. Dagenham England)

น้ำนมพาสเจอร์ไรซ์ (สหกรณ์โคนม หนองโพฯ จำกัด)

เอนไซม์เรนนินตรึงรูป (ผลิตด้วยภาวะ $A_5G_{2.5}$)

เอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูป (NOVO Industri A/S Copenhegen Denmark)

เกลือ (Kamol L.P. Bangkok)

วิธีเตรียม

3.2.4.1 สตาร์ตเตอร์

ใช้ Streptococcus lactis เป็นสตาร์ตเตอร์โดยมีขั้นตอนการเตรียมดังรายละเอียดในวิธีดำเนินงานวิจัย

3.2.5 สารเคมีที่ใช้หาปริมาณโปรตีน

คอปเปอร์ซัลเฟต (BDH Chemical Ltd. Poole England)

โปแตสเซียมซัลเฟต (P.P.H. Polskie Odczynniki Chemiczne Gliwice)

กรดบอริก (May & Baker Ltd. Dagenham England)

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Farmitalia Carloerba S.P.A. Milano/ Division Analitica)

กรดกำมะถัน (Riedel-De Haen Ag Seelze-Hannover)

กรดไฮโดรคลอริก (Merck Chemical Company)

โปแตสเซียมไฮโดรเจนแพทาเลต (BDH Chemical Ltd. Poole England)

เมธิลีน บลู (May & Baker Ltd. Dagenham England)

เมธิล เรด (May & Baker Ltd. Dagenham England)

ฟีนอฟทาลีน (May & Baker Ltd. Dagenham England)

เอธิล อัลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 (Merck Chemical Company)

3.2.5.1 สารละลายกรดบอริกความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก/ปริมาตร ละลายกรดบอริกในน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก/ปริมาตร

3.2.5.2 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 50 โดยน้ำหนัก/ปริมาตร ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้ได้ความเข้มข้นร้อยละ 50 โดยน้ำหนัก/ปริมาตร

3.2.5.3 สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.9223 นอร์มัล เตรียมสารละลายโปแตสเซียมไฮโดรเจนแพทาเลท (KHP) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัลปริมาตร 20 มิลลิลิตร และเติมอินดิเคเตอร์ (ฟีนอฟทาลีน ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร ในอัลกอฮอล์) 3 หยด จากนั้นไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียม-ไฮดรอกไซด์ที่เตรียมให้มีความเข้มข้นประมาณ 1.0 นอร์มัล จากนั้นคำนวณ

$$M_1V_1 = M_2V_2$$

$$0.1x20 = M_2x\ 2.19$$

$$M_2 = 0.9132$$

เตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้นประมาณ 1 นอร์มัล และเติมอินดิเคเตอร์ (ฟีนอฟทาลีนความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร ในอัลกอฮอล์) 3 หยด ไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.9132 นอร์มัล คำนวณ

$$M_2V_2 = M_3V_3$$

$$0.9132x20.2 = M_3x20$$

$$M_3 = 0.9223$$

ดังนั้นสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่เตรียมได้มีความเข้มข้น 0.9223 นอร์มัล

หมายเหตุ กรณีเตรียมสารละลายกรดกำมะถันที่มีความเข้มข้น 0.09899 นอร์มัล ก็ใช้หลักการเช่นเดียวกัน

3.2.5.5 อินดิเคเตอร์

ก. ฟีนอฟทาลีนความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตรในอัลกอฮอล์ ละลายฟีนอฟทาลีน 1 กรัม ในเอธิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 โดยให้ได้ปริมาตรสุทธิเท่ากับ 100 มิลลิลิตร

ข. เมธิลีน-บลู + เมธิล-เรด

เตรียมสารละลายเมธิลีน-บลูความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ในอัลกอฮอล์ และเตรียมสารละลายเมธิล-เรดความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ในอัลกอฮอล์ นำสารละลายทั้งสองนี้ผสมในอัตราส่วน 1 : 2 โดยปริมาตร

3.2.6 สารเคมีที่ใช้หาปริมาณไขมัน

ปิโตรเลียม อีเทอร์ (Riedel-De Haen Ag Seelze-Hannover)

3.3 วิธีดำเนินงานวิจัย

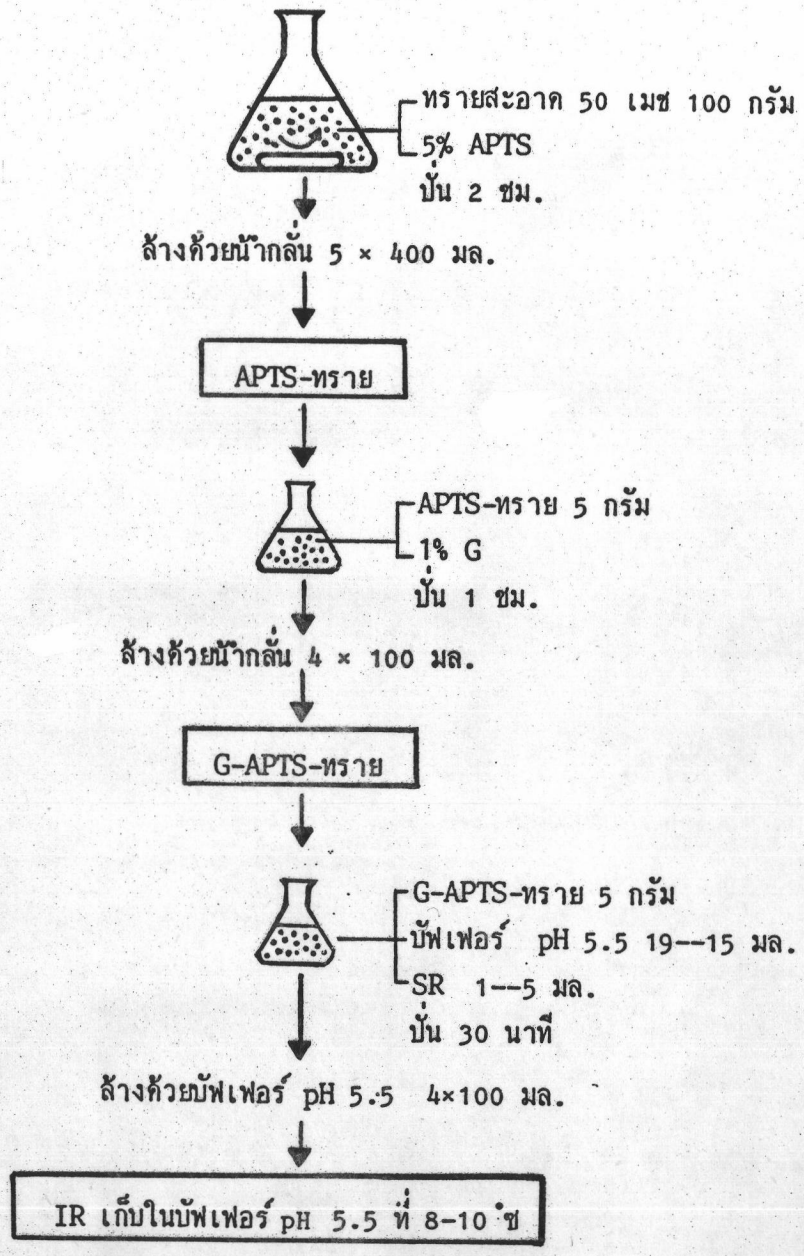
3.3.1 การเตรียมเอนไซม์เรนนินตรึงรูป

3.3.1.1 กำหนดปริมาณเอนไซม์เรนนินที่พอเหมาะในการตรึงรูป

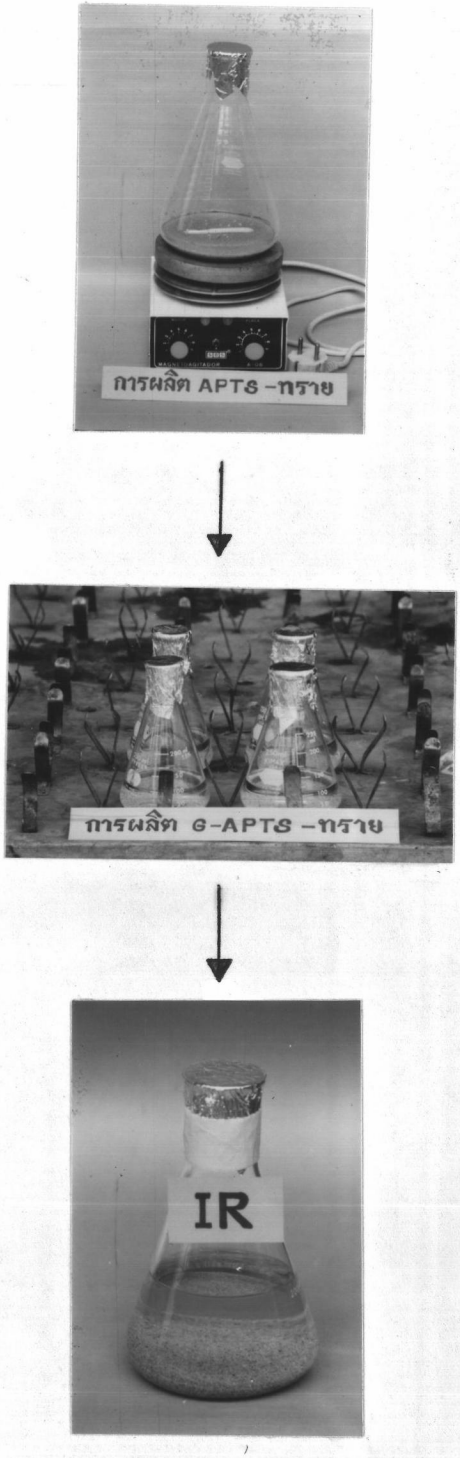
ก. วิธีเตรียมเอนไซม์เรนนินตรึงรูปแบบเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์ (5)

นำทรายแม่น้ำสะอาดขนาด 50 เมช ปริมาณ 100 กรัม และเติม APTS ร้อยละ 5 ของน้ำกลั่นโดยมีปริมาตรสุทธิ 100 มิลลิลิตร ปั่นด้วยเครื่องปั่นเป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง จากนั้นล้าง APTS ส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 400 มิลลิลิตร จำนวน 5 ครั้ง แล้วนำ APTS-ทราย 5 กรัม เติมสารละลายกลูตาราลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 เข้าเครื่องเขย่านาน 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างกลูตาราลดีไฮด์ส่วนเกินด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จำนวน 4 ครั้ง นำ G-APTS-ทราย 5 กรัม ที่ได้มาเติมเรนนิเลส-แอล ปริมาตร 1 2 3 4 และ 5 มิลลิลิตรในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 5.5 โดยมีปริมตรสุทธิ 20 มิลลิลิตร เข้าเครื่องเขย่านาน 30 นาที แล้วจึงล้างด้วยบัฟเฟอร์ pH 5.5 ในปริมาณ 100 มิลลิลิตร จำนวน 4 ครั้ง จากนั้นนำเอนไซม์เรนนินตรึงรูปเก็บในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 5.5 ที่ตู้เย็นอุณหภูมิ 8-10 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน ขั้นตอนดังกล่าวนี้แสดงในรูปที่ 7 และ 8

I17509187



รูปที่ 7 ขั้นตอนการเตรียมเอนไซม์เรนินตรึงรูปแบบเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์ (Thomplison, 1983) (5)



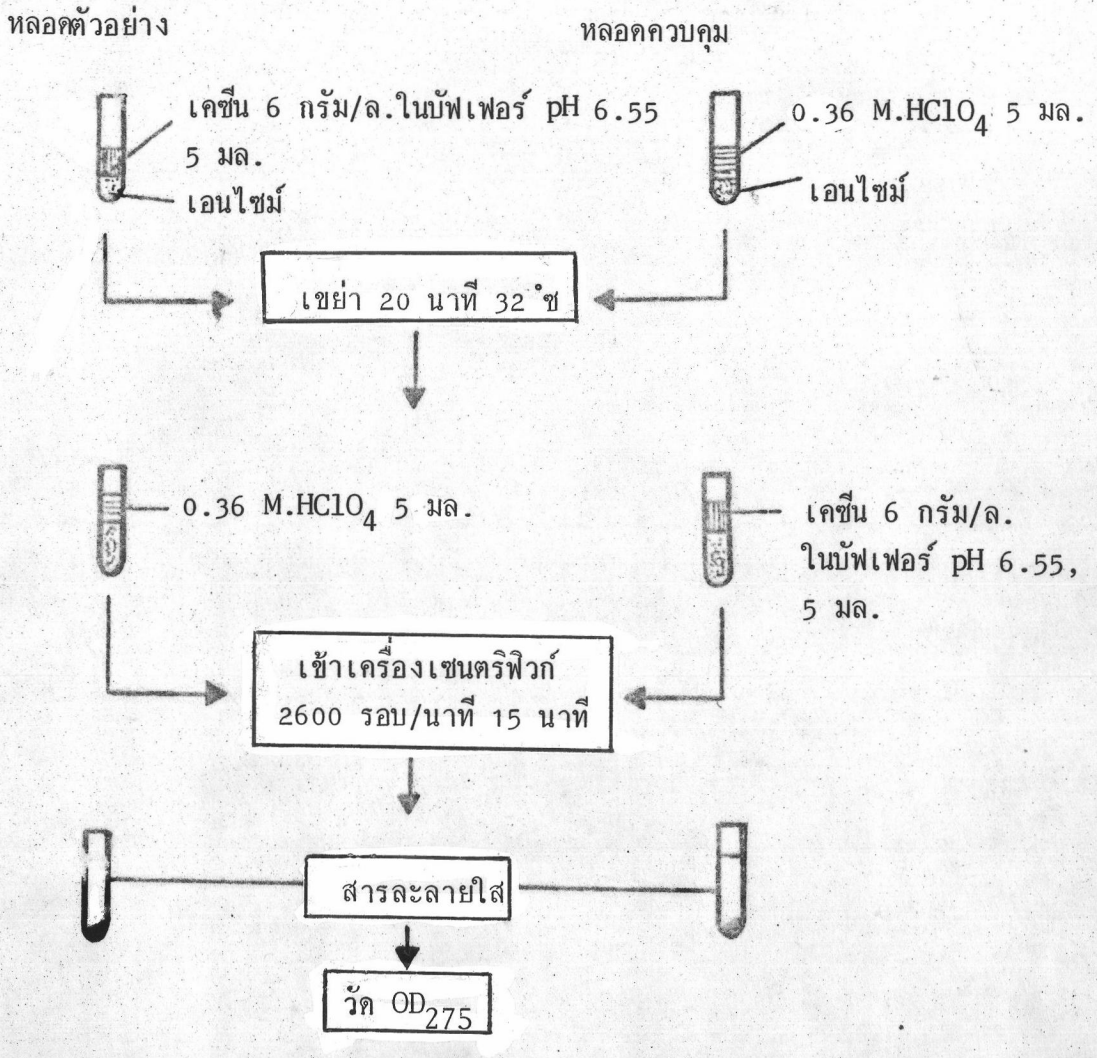
รูปที่ 8 แผนผังการผลิตเอนไซม์เรนนินตรึงรูปแบบเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์

ข. วิธีการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เรนนินตรึงรูป (27) มีดังนี้

สำหรับหลอดควบคุมนำเอนไซม์เรนนินตรึงรูปปริมาณ 2 กรัม เติมกรดเปอร์คลอริกที่ความเข้มข้น 0.36 โมลาร์ ในปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายเคซีนที่ความเข้มข้น 6 กรัม/ลิตรของสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 6.55 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำเข้าเครื่องเขย่าควบคุมความเร็วที่ 2600 รอบ/นาที นาน 15 นาที

ส่วนหลอดตัวอย่างนั้น นำเอนไซม์เรนนินตรึงรูป 2 กรัม เติมสารละลายเคซีนที่ความเข้มข้น 6 กรัม/ลิตรของสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 6.55 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าหลอดตัวอย่างนี้ที่ 32 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที จากนั้นเติมกรดเปอร์-คลอริกที่ความเข้มข้น 0.36 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำเข้าเครื่องเขย่าควบคุมความเร็วที่ 2600 รอบ/นาที นาน 15 นาที แล้วนำส่วนสารละลายใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสงเทียบกับหลอดควบคุมที่ค่าความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร ขั้นตอนดังกล่าวนี้แสดงในรูปที่ 9

หาปริมาณเรนนิเลส-แอล ที่พอเหมาะในการตรึงรูปโดยเปรียบเทียบค่าแอคติวิตีสูงสุดจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าแอคติวิตีกับความเข้มข้นของเรนนิเลส-แอล



รูปที่ 9 วิธีการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เรนนิน (Clarke และ Richards, 1973) (28)

3.3.1.2 กำหนดความเข้มข้นของ APTS และกลูตาราลดีไฮด์ที่เหมาะสมต่อการเตรียมเอนไซม์เรนนินตรึงรูป

เตรียมเอนไซม์เรนนินตรึงรูปดังวิธีในข้อ 3.3.1.1 โดยใช้แบบแผนแฟกตอเรียล 3×3 ซึ่งแปรความเข้มข้น APTS (A) เป็น 3 ระดับคือ ร้อยละ 2 5 และ 7 โดยปริมาตร ความเข้มข้นของกลูตาราลดีไฮด์ (G) เป็น 3 ระดับเช่นกัน คือ ร้อยละ 1 2.5 และ 5 โดยปริมาตร และกำหนดความเข้มข้นของเรนนิเลส-แอลเท่ากับ 0.10 มิลลิลิตร/มิลลิลิตรของสารละลายบัฟเฟอร์ pH 5.5

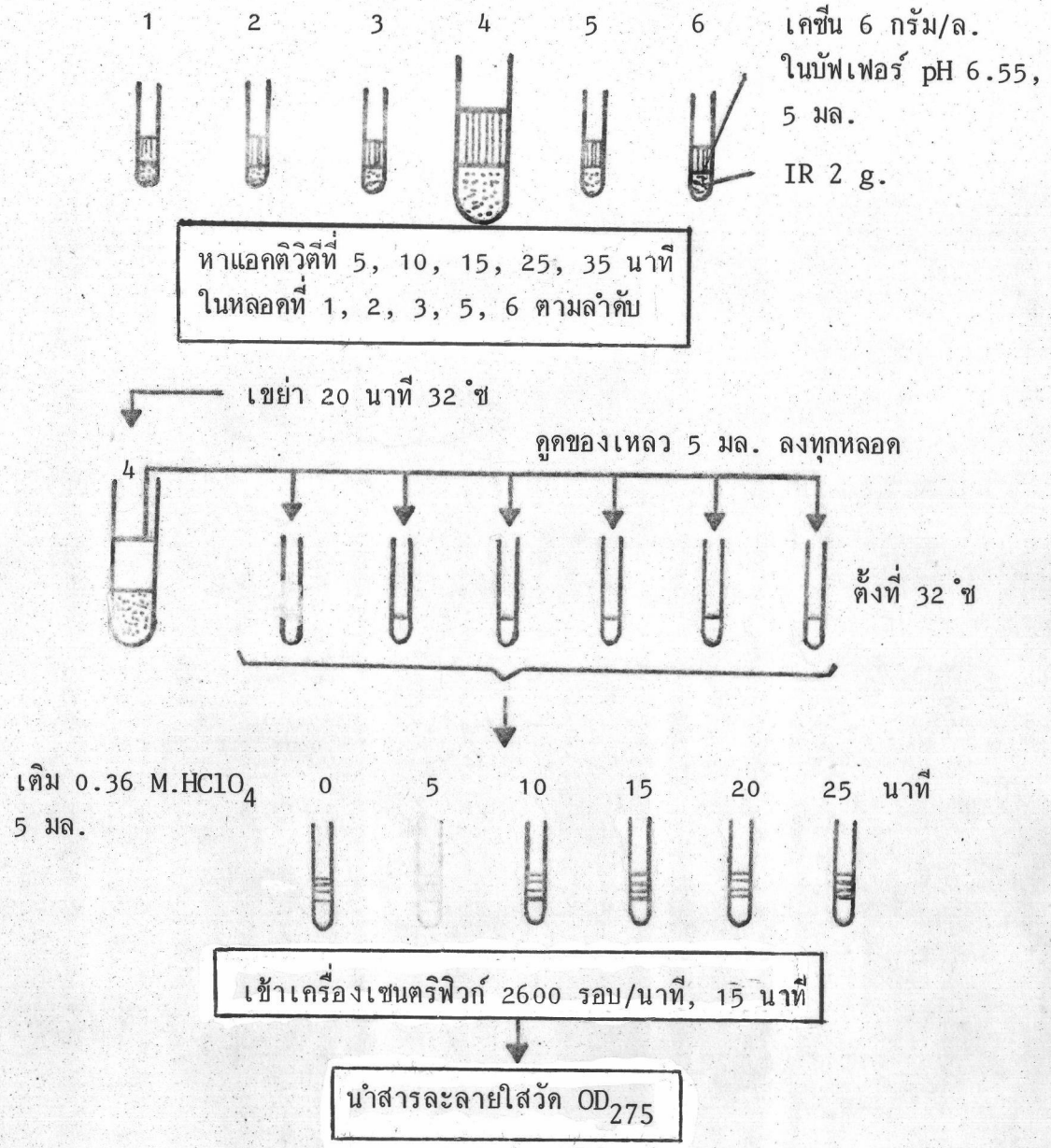
วัดแอคติวิตีของเอนไซม์เรนนินตรึงรูปที่เตรียมได้เช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 3.3.1.1

วิเคราะห์ข้อมูลด้วยการวิเคราะห์วาเรียนซ์ (Analysis of variance) แบบสุ่มตลอด (Completely random design, CRD)) และ Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เพื่อหาความเข้มข้นของ APTS และกลูตาราลดีไฮด์ที่เหมาะสมต่อการเตรียมเอนไซม์เรนนินตรึงรูป

3.3.1.3 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการเกาะเกี่ยวระหว่างเอนไซม์เรนนินกับ G-APTS-ทรายของภาวะ $A_2G_{2.5}$ และ $A_5G_{2.5}$

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์เรนนินตรึงรูปที่เตรียมจากภาวะ $A_2G_{2.5}$ และ $A_5G_{2.5}$ ด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.1.1.1 แต่ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลายเคซีน 6 กรัม/ลิตร ของบัฟเฟอร์ pH 6.55 โดยใช้ปริมาตร 5 มิลลิลิตรกับเอนไซม์เรนนินตรึงรูป 5 10 15 25 และ 35 นาที สำหรับเวลาในการทำปฏิกิริยา 20 นาทีนั้นจะดูดสารละลายเคซีนที่ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์เรนนินตรึงรูปแล้วตั้งพักไว้ในหลอดทดลองที่ 32 องศาเซลเซียส เติมกรดเปอร์คลอริกที่มีความเข้มข้น 0.36 โมลาร์ โดยใช้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่เวลา 0 5 10 15 20 และ 25 นาที ตามลำดับ จากนั้นนำหลอดทดลองดังกล่าวข้างต้นนี้เข้าเครื่องเขย่าควบคุมความเร็ว 2600 รอบ/นาที นาน 15 นาที แล้วดูดเฉพาะส่วนสารละลายใสวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร ขั้นตอนดังกล่าวนี้แสดงในรูปที่ 10

นำข้อมูลที่ได้สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าแอคติวิตีที่รายงานเป็นค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร กับเวลาในการทำปฏิกิริยาของ pH กับสาร-ละลายบัฟเฟอร์ pH 5.5



รูปที่ 10 วิธีการหาประสิทธิภาพการเกาะเกี่ยวระหว่าง SR กับ G-APTS-ทรายของ IR ที่เตรียมจากภาวะ $A_2G_{2.5}$ และ $A_5G_{2.5}$

3.3.1.4 กำหนดปริมาณเอนไซม์เรนนินที่พอเหมาะในการตรึงรูปที่ภาวะ $A_5G_{2.5}$

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์เรนนินตรึงรูปที่เตรียมจากภาวะ $A_5G_{2.5}$ โดยแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของเรนนิเลส-แอล 4 ระดับคือ 0.025 0.050 0.075 และ 0.100 มิลลิลิตร/มิลลิลิตรของสารละลายบัฟเฟอร์ pH 5.5

หาปริมาณเรนนิเลส-แอลที่พอเหมาะในการตรึงรูปโดยเปรียบเทียบค่าแอคติวิตีสูงสุดจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าแอคติวิตีกับความเข้มข้นของเรนนินเลส-แอล

3.3.1.5 ศึกษาโครงสร้างของเอนไซม์เรนนินตรึงรูปเปรียบเทียบกับทรายสะอาดขนาด 50 เมช ที่ใช้เป็นตัวพยุง (28)

นำทรายสะอาดขนาด 50 เมช เคลือบทองด้วยเครื่องเคลือบ Fine coat นาน 5 นาที แล้วดูโครงสร้างของเม็ดทรายสะอาดนี้ด้วย Scanning electron microscope (SEM) ที่กำลังขยาย 150 และ 3,500 เท่า

นำเอนไซม์เรนนินตรึงรูปปริมาณ 1 กรัม เติมสารละลายกลูตาราลดีไฮด์ ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร นาน 3 ชั่วโมง แล้วเทสารละลายกลูตาราลดีไฮด์ออก เติมสารละลายออสเมียม-เตตรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 2 พักไว้ 3 ชั่วโมง แล้วเทสารละลายออสเมียม-เตตรอกไซด์ ระเหยน้ำบางส่วนออกจากเอนไซม์เรนนินตรึงรูปด้วยสารละลายอัลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 อบเอนไซม์เรนนินตรึงรูปให้แห้งสนิทแล้วเคลือบทองด้วยเครื่อง Fine coat นาน 5 นาที จากนั้นดูโครงสร้างของเอนไซม์เรนนินตรึงรูปด้วย SEM ที่กำลังขยาย 3,500และ 10,000 เท่า

3.3.2 ศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์เรนนินตรึงรูป

3.3.2.1 วัดค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์เรนนินตรึงรูปและเอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูป

หาแอคติวิตีของเอนไซม์เรนนินตรึงรูปปริมาณ 2 กรัม และเอนไซม์-เรนนินไม่ตรึงรูปปริมาตร 2.15×10^{-3} มิลลิลิตร (มีจำนวนหน่วยเอนไซม์เรนนินเทียบเท่าเอนไซม์เรนนินตรึงรูป 2 กรัม) ตัวแปรในการหาแอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปและไม่ตรึงรูปนี้คือ ความ

เข้มข้นของเคซีนในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 6.55

เปรียบเทียบ Lineweaver Burk plot ของเอนไซม์เรนินตรึงรูปและเอนไซม์เรนินไม่ตรึงรูปในค่าของ K_m

3.3.2.2 เปรียบเทียบ pH profile ของแอคติวิตีของเอนไซม์เรนินตรึงรูปและเอนไซม์เรนินไม่ตรึงรูป

หาแอคติวิตีของเอนไซม์เรนินตรึงรูปปริมาณ 2 กรัม และเอนไซม์เรนินไม่ตรึงรูปปริมาตร 2.15×10^{-3} มิลลิลิตร ตัวแปรในการหาแอคติวิตีของเอนไซม์เรนินตรึงรูปและเอนไซม์เรนินไม่ตรึงรูปนี้คือระดับ pH ของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ละลายเคซีน

เปรียบเทียบ pH profile ของเอนไซม์เรนินตรึงรูปและเอนไซม์เรนินไม่ตรึงรูปด้วยกราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์เรนินตรึงรูปและเอนไซม์เรนินไม่ตรึงรูป กับ pH ของสารละลายบัฟเฟอร์

3.3.2.3 เปรียบเทียบ temperature profile ของแอคติวิตีของเอนไซม์เรนินตรึงรูปและเอนไซม์เรนินไม่ตรึงรูป

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์เรนินตรึงรูปปริมาณ 2 กรัม และเอนไซม์เรนินไม่ตรึงรูปปริมาตร 2.15×10^{-3} มิลลิลิตร ตัวแปรในการหาแอคติวิตีของเอนไซม์เรนินตรึงรูปและเอนไซม์เรนินไม่ตรึงรูปนี้คือ อุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์เรนินตรึงรูปและเอนไซม์เรนินไม่ตรึงรูปกับสารละลายเคซีน 6 กรัม/ลิตรของสารละลายบัฟเฟอร์ pH 6.55

เปรียบเทียบ temperature profile ของเอนไซม์เรนินตรึงรูปและเอนไซม์เรนินไม่ตรึงรูปด้วยกราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์เรนินตรึงรูปและเอนไซม์เรนินไม่ตรึงรูป กับอุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์เรนินตรึงรูปและเอนไซม์เรนินไม่ตรึงรูปกับสารละลายเคซีน 6 กรัม/ลิตรของสารละลายบัฟเฟอร์ pH 6.55

3.3.2.4 หาค่าแอคติวิตีจำเพาะ (Specific activity) ของเอนไซม์เรนนินตรึงรูป

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์เรนนินตรึงรูปเพื่อหาจำนวนหน่วยของเอนไซม์เรนนิน

หาปริมาณโปรตีนของเอนไซม์เรนนินตรึงรูปด้วยวิธี Macro Kjeldahl distillation ซึ่งมีรายละเอียดของวิธีการดังนี้ ชั่งเอนไซม์เรนนินตรึงรูปปริมาณ 2 กรัม (ใช้เครื่องชั่งละเอียด) ใส่ลงในขวดก้นกลม (Kjeldahl flask) เติมตัวเร่งปฏิกิริยา ($CuSO_4$. 5 H_2O = 0.5 กรัม, K_2SO_4 = 12.5 กรัม) และกรดกำมะถันเข้มข้น 25 มิลลิลิตร นำไปสกัด (Digest) จนได้สารละลายสีเขียวอมฟ้า หากมีสารอินทรีย์เหลืออยู่ในขวดก้นกลมให้ชะด้วยน้ำกลั่นแล้วสกัดต่อจนไม่มีสารอินทรีย์เหลืออยู่ โดยสังเกตจากไม่มีผลึกดำตกค้างในสารละลายสีเขียวอมฟ้าในขวดก้นกลม ทิ้งให้เย็นแล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร แล้วเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 50 โดยน้ำหนัก/ปริมาตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นต่อขวดก้นกลมเข้ากับอุปกรณ์ในการกลั่นโดยให้ปลายท่อเครื่องควบแน่นจุ่มลงในขวดชมพู่ ซึ่งมีกรดบอริกความเข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และหยดอินเคเตอร์ (Methyl red + methylene blue) 4 หยด จนสารละลายเป็นสีม่วง กลั่นจนได้สารที่กลั่นได้ประมาณ 200 มิลลิลิตร จะสังเกตเห็นสารละลายในขวดชมพู่มีสีเขียว ไทเทรตสารละลายในขวดชมพู่ที่กลั่นได้ด้วยกรดกำมะถันที่มีความเข้มข้น 0.09899 นอร์มัล แล้วคำนวณหาปริมาณไนโตรเจนตามสูตรนี้

$$\text{ไนโตรเจน (\%)} = \frac{(\text{ปริมาณกรดกำมะถันในตัวอย่าง} - \text{ปริมาณกรดกำมะถันในส่วนไร้ตัวอย่าง}) \times \text{ค่านอร์มัล} \times 14.007 \times 100}{\text{ปริมาณเอนไซม์เรนนินตรึงรูป}}$$

$$\text{โปรตีน (\%)} = \text{ไนโตรเจน (\%)} \times 6.25$$

จากนั้นคำนวณหาค่า Specific activity จากสูตร

$$\text{Specific activity} = \frac{\text{จำนวนหน่วยเอนไซม์ (KRU)}}{\text{โปรตีนในสารผสม (มิลลิกรัม)}}$$

3.3.2.5 ศึกษาเสถียรภาพระหว่างการเก็บของเอนไซม์เรนนินตรึงรูป

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์เรนนินตรึงรูปเปรียบเทียบกับเอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูปที่เก็บไว้ในอุณหภูมิห้องเย็น (8-10 องศาเซลเซียส) และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เรนนินตรึงรูปเปรียบเทียบกับเอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูปที่เก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) ที่ระยะเวลาในการเก็บ 2 7 14 21 28 42 60 90 และ 120 วัน

เปรียบเทียบเสถียรภาพระหว่างการเก็บด้วยกราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์เรนนินตรึงรูปและเอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูปกับระยะเวลาของการเก็บในสภาวะที่กำหนด

3.3.2.6 หาค่าครึ่งชีวิตของเอนไซม์เรนนินตรึงรูป

อ่านค่าครึ่งชีวิตของเอนไซม์เรนนินตรึงรูปที่เก็บในอุณหภูมิห้องและอุณหภูมิห้องเย็นจากกราฟใน 3.3.2.5 ที่ค่าแอคติวิตีสัมพัทธ์ มีค่าร้อยละ 50

3.3.3 ศึกษาภาวะการใช้เอนไซม์เรนนินตรึงรูปในการตกตะกอนเคซีนในนม

3.3.3.1 หาปริมาณเอนไซม์เรนนินตรึงรูปที่เหมาะสมต่อการตกตะกอนนม

นำเอนไซม์เรนนินตรึงรูปในปริมาณที่ต้องการจะศึกษาบรรจุลงหลอดทดลองชนิดจุกเกลียวเติมน้ำนมพาสเจอร์ไรซ์ 10 มิลลิลิตร แล้วจึงหมุนจุกเกลียวให้แน่น เขย่าหลอดทดลองภายใต้แสงไฟเพื่อสังเกตตะกอนนมแรกที่เกาะข้างหลอดทดลอง บันทึกเวลาในการตกตะกอนนม (Clotting time) ซึ่งนับตั้งแต่เริ่มเขย่าหลอดทดลองจนกระทั่งเห็นตะกอนนมแรก

หาปริมาณเอนไซม์เรนนินตรึงรูปที่เหมาะสมโดยการอ่านค่าจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการตกตะกอนนมกับปริมาณเอนไซม์เรนนินตรึงรูป

3.3.3.2 เปรียบเทียบ pH profile ในการตกตะกอนนมของเอนไซม์เรนนินตรึงรูปและเอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูป

วัดเวลาในการตกตะกอนนมของเอนไซม์เรนนินตรึงรูปปริมาณ 0.43 กรัม และเอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูปที่มีปริมาตร 2.41×10^{-3} มิลลิลิตร (มีจำนวนหน่วยเอนไซม์เรนนินเทียบเท่าเอนไซม์เรนนินตรึงรูป 0.43 กรัม) ในการวัดเวลาในการตกตะกอนนมนี้ ตัวแปรที่ศึกษาคือระดับ pH ของน้ำนม โดยแปรค่า pH ที่ 6.6 6.4 6.2 6.0 5.8

5.6 และ 5.4 และกำหนดอุณหภูมิของน้ำนมไว้ที่อุณหภูมิห้อง

เปรียบเทียบ pH profile ในการตกตะกอนนมของเอนไซม์เรนนินตรึงรูปและเอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูปด้วยกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการตกตะกอนกับระดับ pH ของน้ำนม

3.3.3.3 เปรียบเทียบ temperature profile ในการตกตะกอนนมของเอนไซม์เรนนินตรึงรูปและเอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูป

วัดเวลาในการตกตะกอนนมของเอนไซม์เรนนินตรึงรูปปริมาณ 0.43 กรัม และเอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูปที่มีปริมาตร 2.41×10^{-4} มิลลิลิตร ในการวัดเวลาในการตกตะกอนนมนี้ตัวแปรที่ศึกษาคืออุณหภูมิของน้ำนมโดยแปรค่าอุณหภูมิที่ 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 และ 80 องศาเซลเซียส และกำหนด pH ของน้ำนมไว้ที่ 6.5

เปรียบเทียบ temperature profile ในการตกตะกอนนมของเอนไซม์เรนนินตรึงรูปและเอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูปด้วยกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการตกตะกอนนมกับอุณหภูมิของน้ำนม

3.3.3.4 ศึกษาภาวะ pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการตกตะกอนนม

เตรียมน้ำนมพาสเจอร์ไรซ์แบบแผนแฟกตอเรียล 3×3 โดยแปร pH ของน้ำนม 3 ระดับคือ 5.5 6.0 และ 6.5 และแปรอุณหภูมิของน้ำนม 3 ระดับคือ 30 40 และ 50 องศาเซลเซียส กำหนดปริมาณเอนไซม์เรนนินตรึงรูปเท่ากับ 0.43 กรัม

วัดเวลาในการตกตะกอนนมในแต่ละ treatment combination ด้วยวิธีการในข้อ 3.3.3.1

วิเคราะห์ข้อมูลด้วยการวิเคราะห์วาเรียนซ์แบบสุ่มตลอดและ Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เพื่อหา pH และอุณหภูมิของน้ำนมที่เหมาะสมต่อการตกตะกอนนม

3.3.3.5 ศึกษาความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการตกตะกอนนม

เตรียมน้ำนมที่มีอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส pH 5.5 และเติมแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.02 0.04 0.06 0.08 0.10 0.15

และ 0.20 โดยน้ำหนัก/ปริมาตร ในน้ำนม 10 มิลลิลิตร

วัดเวลาในการตกตะกอนของน้ำนมทั้ง 7 สภาวะ

หาความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการตกตะกอนนม โดยการอ่านค่าจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการตกตะกอนนมกับความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์

3.3.3.6 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดลิ่มแข็ง (Curd firmness) ของน้ำนม (29)

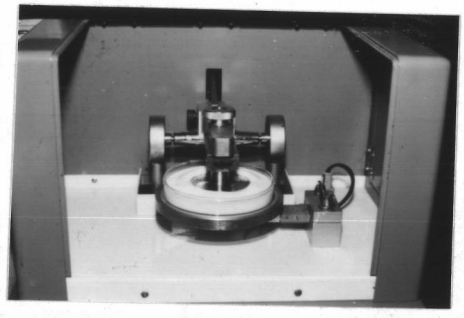
เตรียมน้ำนมแบบแผนแฟกตอเรียล 3×3×2 โดยแปรอุณหภูมิ 3 ระดับ คือ 35 40 และ 45 องศาเซลเซียส แปร pH 3 ระดับคือ 5.5 5.7 และ 5.9 และความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์แปร 2 ระดับ คือร้อยละ 0 และ 0.091 กรัม/มิลลิลิตร ของน้ำนม

นำน้ำนมแต่ละ treatment combination ปริมาตร 70 มิลลิลิตรใส่ในขวดชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีเอนไซม์เรนนินตรึงรูปอยู่ 3.01 กรัม เขย่าขวดชมพู่นาน 5 นาที เทเฉพาะส่วนของน้ำนมลงจานแก้ว ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วจึงวัดความแข็งของลิ่มนมด้วยเครื่องวัดลักษณะเนื้อสัมผัส (Texturometer) โดยใช้หัวกดแบบ Visco type กดลงบนลิ่มนมแล้วบันทึกค่าลงกราฟในลักษณะยอด (Peak) ดังแสดงในรูปที่ 11 คำนวณความแข็งของลิ่มนมจากสูตร

$$\text{ความแข็งของลิ่มนม} = \frac{\text{ความสูงของยอด (ซม.)}}{\text{ความต่างศักย์ไฟฟ้า (โวลต์)}} \times \text{อัตราส่วนแรงกด}$$

วิเคราะห์ข้อมูลด้วยการวิเคราะห์วาเรียนซ์แบบสุ่มตลอดและ Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เพื่อหาภาวะของค่า pH อุณหภูมิ และความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการเกิดลิ่มแข็งของน้ำนม ภาวะที่ได้นี้จะใช้เป็นภาวะในการทดลองเบื้องต้นในการผลิตเนยแข็งเชดดาร์

เครื่องวัดลักษณะเนื้อสัมผัส



หัวกดกดลงบนลิ่มนม

บันทึกความแข็งของลิ่มนมเป็นกราฟ

รูปที่ 11 แผนผังการวัดความแข็งของลิ่มนม

3.3.4 การทดลองเบื้องต้นในการผลิตเนยแข็งเชดดาร์

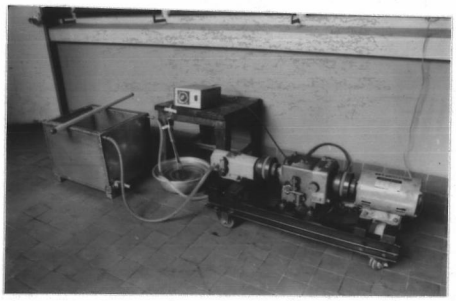
3.3.4.1 การผลิตเนยแข็งเชดดาร์

ก. การเตรียมสตาร์ตเตอร์

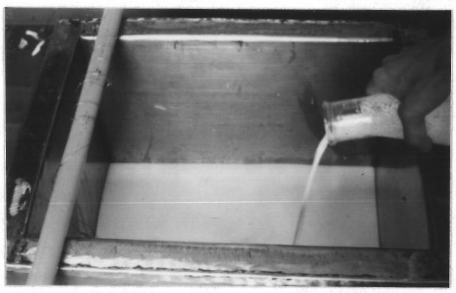
นำเชื้อ Sterptococcus lactis บริสุทธิ์ที่บรรจุใน ampule ลักษณะ freeze dried เพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Nutrient broth (NB) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24-28 ชั่วโมง แยกส่วนของเซลล์จุลินทรีย์ออกมาล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.85 เก็บเซลล์จุลินทรีย์นี้ในสารละลายโซเดียม-คลอไรด์ที่ความเข้มข้นเดียวกัน ได้สารละลายแขวนลอยของเซลล์ (8×10^5 เซลล์/มล.) ที่พร้อมสำหรับใช้ทดลองต่อไป ถ่ายสารแขวนลอยของเซลล์ 1 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองที่มีน้ำนม pH 6.5 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายน้ำนมส่วนนี้ลงในขวดชมพู่ที่มีน้ำนม pH 6.5 ปริมาตร 90 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิและเวลาเดียวกัน จะได้สตาร์ตเตอร์ที่พร้อมจะผลิตเนยแข็งเชดดาร์

ข. ขั้นตอนการผลิตเนยแข็งประเภทเชดดาร์ (30)

ประกอบชุดเครื่องมือการผลิตเนยแข็ง ดังรูปที่ 12 บรรจุน้ำนมพาสเจอร์ไรซ์ลงในถังแสตนเลส 2 ชั้น ขนาด 16 × 12 × 12 นิ้ว อุ่นนมให้ได้ 38 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมสตาร์ตเตอร์ร้อยละ 10 ของน้ำนม กวนให้สตาร์ตเตอร์เข้ากับน้ำนมได้ดีเป็นเวลานาน 5 นาที ตั้งพักไว้แล้วสุ่มตัวอย่างทุก ๆ 15 นาที สำหรับวัด pH จนถึงระดับ pH เท่ากับ 5.9 อุ่นน้ำนมขึ้นเป็น 40 องศาเซลเซียส นำตะแกรงที่บรรจุเอนไซม์เรนนินตรึงรูป (ใช้ในปริมาณ 193.6 KRU/น้ำนม 100 ลิตร) จุ่มลงถังน้ำนมกวนน้ำนม 10 นาที จึงยกตะแกรงขึ้น นำฝาปิดถังน้ำนม แล้วตั้งพักไว้ 20 นาที จะเกิดลิ่มนมอย่างสมบูรณ์ ตัดลิ่มนมให้ได้ขนาด 3/4 นิ้ว × 3/4 นิ้ว จากนั้นจึงกวนลิ่มนมให้ทั่วนาน 20 นาที เพื่อให้ลิ่มนมเกิดการรัดตัว แล้วระบายเวย์ออกทางลิ้นที่ส่วนล่างของถัง คลุกเคล้าลิ่มนมกับเกลือในปริมาณร้อยละ 2.5 ของน้ำหนักลิ่มนม จากนั้นห่อลิ่มนมลงผ้าขาวบางบรรจุลงพิมพ์สำหรับนำเข้าเครื่องไฮโดรลิคเพื่ออัดลิ่มนมเป็นเวลานาน 18-20 ชั่วโมง นำก้อนลิ่มนมออกจากพิมพ์และผึ่งในตู้เย็นอุณหภูมิ 8-10 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน แล้วจึงนำไปบ่มในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 5-7 องศาเซลเซียส ขั้นตอนดังกล่าวแสดงในรูปที่ 12



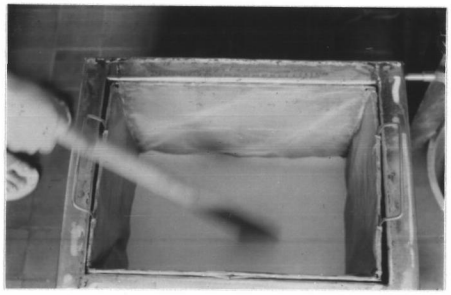
ชุดเครื่องมือผลิตเนยแข็ง



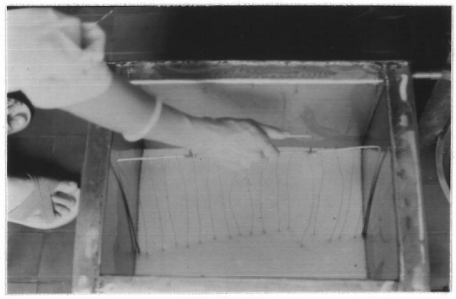
ใส่สตาร์ตเตอร์

วางตะแกรงลวดที่บรรจุเอนไซม์เรนนินตรึงรูป

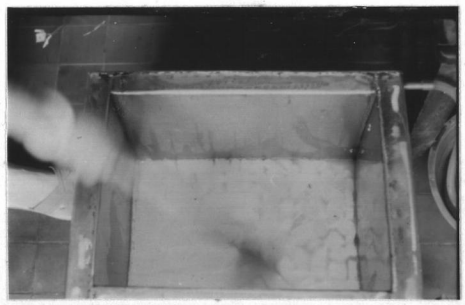
รูปที่ 12 แผนผังการผลิตเนยแข็งเชดดาร์



กวนเอนไซม์เรนนินตรึงรูป



ตัดลิ่มนม

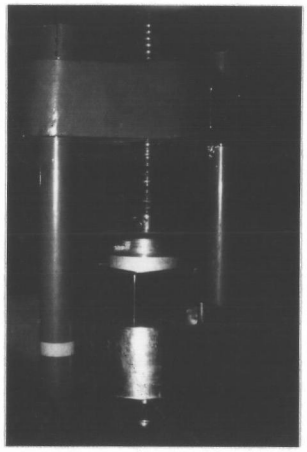


กวนลิ่มนม

ปล่อยเวย์ทิ้ง

รูปที่ 12 (ต่อ)

ใส่เกลือ



อัดลิ่มนม

รูปที่ 12 (ต่อ)

นอกจากนี้ได้ผลิตเนยแข็งเชดดาร์โดยใช้เอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูปในปริมาณ 1.6 มิลลิลิตร/น้ำนม 100 ลิตร ซึ่งมีวิธีการเช่นเดียวกับการผลิตเนยแข็งเชดดาร์โดยใช้เอนไซม์เรนนินตรึงรูป แต่ต่างที่เอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูปไม่สามารถแยกจากน้ำนมที่จะเกิดลิ่มนมได้เช่นเดียวกับเอนไซม์เรนนินตรึงรูป

3.3.4.2 วิเคราะห์คุณภาพเนยแข็งเชดดาร์เมื่อเริ่มบ่ม

3.3.4.2.1 ปริมาณความชื้น (31)

อบจานอลูมิเนียมที่บรรจุทรายสะอาดพร้อมฝาในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในโถทำแห้ง (Desiccator) แล้วชั่งน้ำหนักที่คงที่ของจานอลูมิเนียมที่บรรจุทรายและมีฝาปิดอย่างละเอียด บันทึกข้อมูลไว้

ชั่งเนยแข็งเชดดาร์ที่ผลิตโดยเอนไซม์เรนนินตรึงรูปและเอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูปประมาณ 1 กรัม (ใช้เครื่องชั่งอย่างละเอียด) ในจานอลูมิเนียม พร้อมกับทรายที่ทราบน้ำหนักรวม เกลี่ยเนยแข็งกับทรายให้เนยแข็งกระจายตัวทั่วจานอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ประมาณ 5 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักคงที่ของตัวอย่างหลังอบอย่างละเอียด คำนวณหาปริมาณความชื้น

$$\text{ความชื้น (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักที่หายไป} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

3.3.4.2.2 ปริมาณไขมัน (31)

ใช้วิธี Soxhlet extraction โดยมีรายละเอียดของวิธีการดังนี้คือ ชั่งเนยแข็งเชดดาร์โดยเอนไซม์เรนนินตรึงรูป และเอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูปประมาณ 1 กรัม (ใช้เครื่องชั่งอย่างละเอียด) บนกระดาษกรอง 2 ชั้น แล้วห่อ นำมาใส่ใน thimble วาง thimble ใน Central Syphon ของ Soxhlet ที่ต่อระหว่างเครื่องควบแน่นและขวดก้นกลมที่ชั่งน้ำหนักแห้งแล้ว บรรจุปิโตรเลียมอีเทอร์ 250 มิลลิลิตร ในขวดก้นกลม กลั่นไหลกลับนาน 8 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักขวดแก้วก้นกลมแห้งที่ระเหยแยกปิโตรเลียมอีเทอร์ออกไปเหลือเฉพาะส่วนของไขมัน แล้วคำนวณปริมาณไขมันได้จากสูตร

$$\text{ไขมัน (\%)} = \frac{(\text{น้ำหนักขวดแก้วก้นกลมแห้งมีไขมัน} - \text{น้ำหนักขวดก้นกลมแห้ง}) \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

3.3.4.2.3 ปริมาณโปรตีน (31)

ใช้วิธี Macro Kjeldahl distillation โดยมีรายละเอียดของวิธีการดังนี้ ชั่งเนยแข็งเชดดาร์ซึ่งถูกผลิตโดยเอนไซม์เรนนินตรึงรูปและเอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูปประมาณ 1 กรัม (ใช้เครื่องชั่งอย่างละเอียด) ลงในขวดก้นกลม (Kjeldahl flask) แล้วเติมตัวเร่งปฏิกิริยา ($CuSO_4.5H_2O$ = 0.5 กรัม, K_2SO_4 = 12.5 กรัม) ตามด้วยกรดกำมะถันเข้มข้น 25 มิลลิลิตร นำไปสกัด (Digest) จนได้สารละลายใสสีเขียวอมฟ้า หากมีสารอินทรีย์หลงเหลืออยู่ให้ชะล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วสกัดต่อจนไม่มีสารอินทรีย์เหลืออยู่ เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 50 โดยน้ำหนัก/ปริมาตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นต่อขวดก้นกลมเข้ากับชุดเครื่องกลั่นโดยให้ปลายเครื่องควบแน่นจุ่มอยู่ใต้สารละลายกรดบอริกที่มีความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก/ปริมาตร ที่เติมอินดิเคเตอร์ (Methyl Red + Methylene blue) ซึ่งทำให้สารละลายมีสีม่วง กลั่นจนได้สารที่กลั่นได้ 200 มิลลิลิตร ซึ่งจะสังเกตเห็นว่าได้สารละลายสีเขียว ไทเทรตสารละลายที่กลั่นได้ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.98223 นอร์มัล คำนวณหาปริมาณไนโตรเจนตามสูตร

$$\text{ไนโตรเจน (\%)} = \frac{(\text{ปริมาณกรดไฮโดรคลอริกในตัวอย่าง} - \text{ปริมาณกรดไฮโดรคลอริกในส่วนไร้ตัวอย่าง}) \times \text{ค่านอร์มัล} \times 14.007 \times 100}{\text{ปริมาณเนยแข็งเชดดาร์}}$$

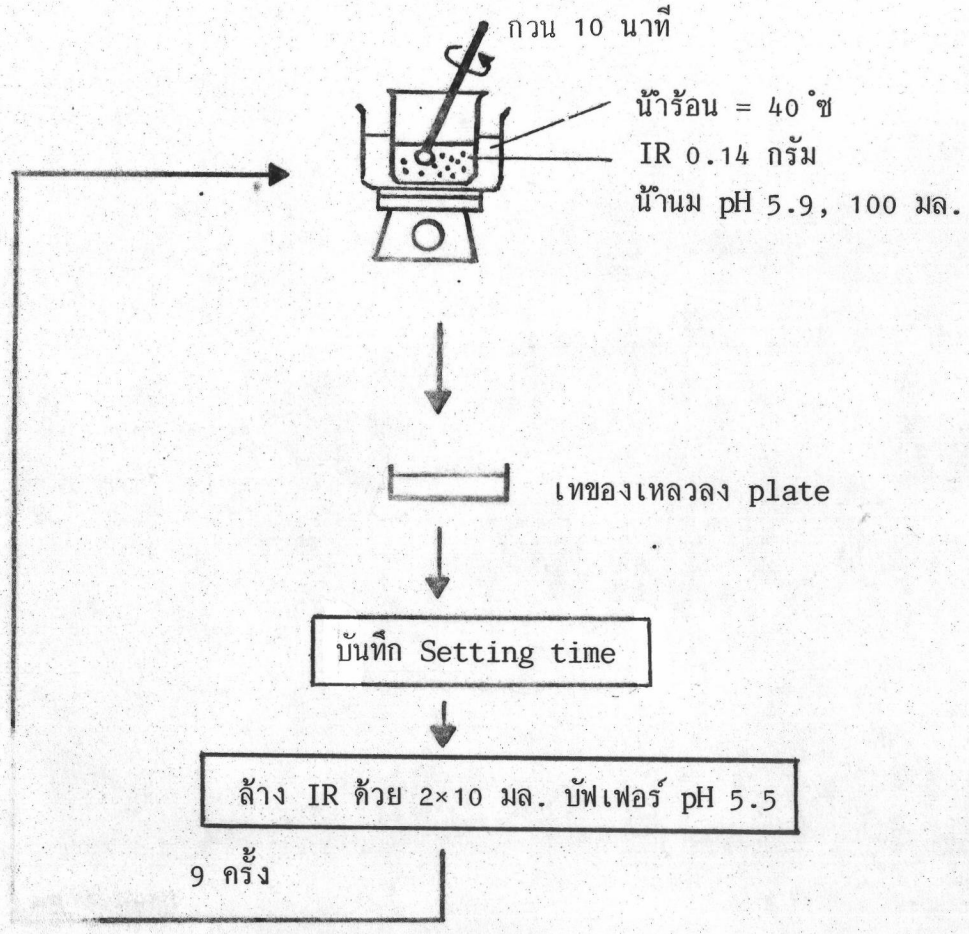
แล้วคำนวณหาปริมาณโปรตีนจากสูตร

$$\text{โปรตีน (\%)} = \text{ไนโตรเจน (\%)} \times 6.38$$

3.3.4.3 ศึกษาประสิทธิภาพของการนำเอนไซม์เรนนินตรึงรูปกลับมาใช้ใหม่

อุ่นน้ำนม pH 5.9 ปริมาตร 100 มิลลิลิตรที่ 40 องศาเซลเซียส เติมเอนไซม์เรนนินตรึงรูปปริมาณ 0.14 กรัม (ใช้อัตราส่วนเดียวกับการทดลองเบื้องต้นในการผลิตเนยแข็งเชดดาร์คือปริมาณ 193.6 KRU/น้ำนม 100 ลิตร) กวนนาน 10 นาที แล้วเทน้ำนมลงจานแก้วตั้งทิ้งไว้จนน้ำนมแข็งตัวเป็นลิ่มนมอย่างสมบูรณ์ บันทึกเวลาการเกิดลิ่มนมโดยจับเวลาตั้งแต่เทน้ำนมลงจานแก้วจนกระทั่งเกิดลิ่มนมอย่างสมบูรณ์ นำเอนไซม์เรนนินตรึงรูปที่หาเวลาการเกิดลิ่มนมไปแล้วล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ pH 5.5 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร 2 ครั้ง แล้วนำเอนไซม์เรนนินตรึงรูปนี้กลับมาหาเวลาการเกิดลิ่มนมอีก ทำเช่นนี้ถึง 10 ครั้ง ขั้นตอนดังกล่าวนี้ดังแสดงในรูปที่ 13

พิจารณาประสิทธิภาพของการนำเอนไซม์เรนนินตรึงรูปกลับมาใช้ใหม่จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาการเกิดลิ่มนมของเอนไซม์เรนนินตรึงรูปกับจำนวนครั้งที่นำเอนไซม์เรนนินตรึงรูปกลับมาใช้ใหม่



รูปที่ 13 ขั้นตอนการหาประสิทธิภาพของการนำ IR กลับมาใช้ใหม่

3.3.4.4 การทดสอบทางประสาทสัมผัส

ประเมินคุณลักษณะของเนยแข็งเชดดาร์ที่ผลิตโดยเอนไซม์เรนนินตรึงรูปและเอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูปที่มีอายุการบ่ม 1 เดือน ทางด้านสี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส การยอมรับรวม ด้วยวิธี Scoring test ซึ่งใช้เนยแข็งเชดดาร์ตรา Kraft เป็นมาตรฐาน โดยให้คะแนนทุกคุณลักษณะเต็ม 5 คะแนน ใช้ผู้ทดสอบชิม 16 ท่าน โดยมีแบบประเมินคุณภาพเนยแข็งเชดดาร์ ดังภาคผนวก ก-3

วิเคราะห์ข้อมูลแบบ Randomized complete block design (RCBD)