

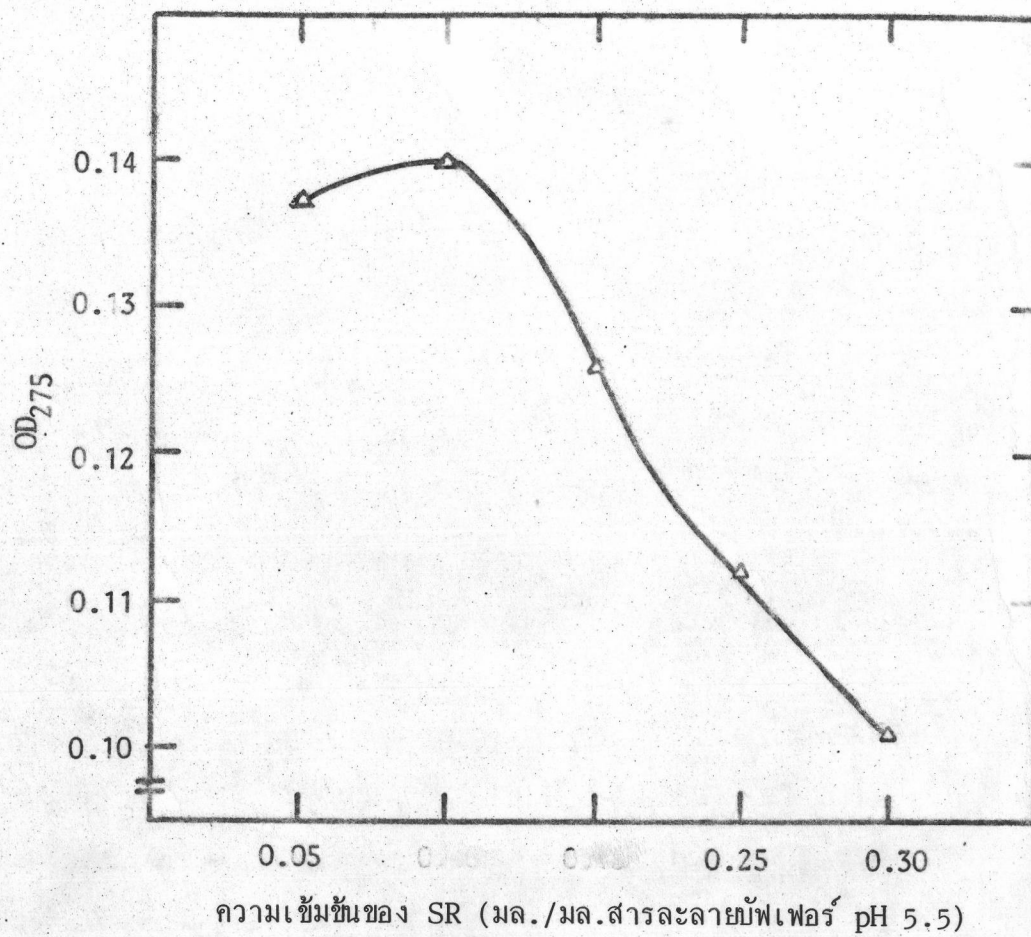
บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การเตรียมอนุโซมเรนินตรึงรูป

4.1.1 กำหนดปริมาณอนุโซมเรนินที่พอเหมาะในการตรึงรูป

จากการทดลองข้อ 3.3.1.1. โดยเตรียมอนุโซมเรนินตรึงรูปในภาวะที่ใช้ APTS ร้อยละ 5 โดยปริมาตร และกลูตาราลดีไฮด์ร้อยละ 1 โดยปริมาตร ซึ่งมีปริมาตรของเรนินเลส-แอลเป็นตัวแปร แล้ววัดแอกติวิตีของอนุโซมเรนินตรึงรูปที่เตรียมได้ดังสภาวะข้างต้นในค่าของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 14 พบว่าที่ความเข้มข้นของเรนินเลส-แอล 0.10 โดยมิลลิลิตร/มิลลิลิตรของสารละลายบัฟเฟอร์ pH 5.5 ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตรสูงสุด ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปที่ศึกษาถึงอนุโซมเรนินตรึงรูปที่ภาวะต่าง ๆ จะใช้เรนินเลส-แอล ในปริมาณ 0.10 มิลลิลิตร/มิลลิลิตร ของสารละลายบัฟเฟอร์ pH 5.5 ในการเตรียมอนุโซมเรนินตรึงรูป



รูปที่ 14 ความสัมพันธ์ระหว่างแอกติวิตีของ IR ที่เตรียมในภาวะ A₅G₁ จาก SR ในความเข้มข้นต่างกับความเข้มข้นของ SR ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 5.5

4.1.2 กำหนดความเข้มข้นของ APTS และกลูตาราลดีไฮด์ที่เหมาะสมต่อการเตรียม เอนไซม์เรนินตรีงรูป (32)

ตามการทดลอง 3.3.1.2 ซึ่งเตรียมเอนไซม์เรนินตรีงรูปแบบแผน แพกตอเรียล 3×3 โดยแปรความเข้มข้นของ APTS เท่ากับร้อยละ 2 5 และ 7 โดยปริมาตร และความเข้มข้นของกลูตาราลดีไฮด์เท่ากับร้อยละ 1 2.5 และ 5 โดยปริมาตร พร้อมทั้งกำหนด ปริมาณเรนินเลส 0.10 มิลลิลิตร/มิลลิลิตรของสารละลายบัฟเฟอร์ pH 5.5 ตามผลการทดลอง 4.1.1 หลังจากวัดแอกติวิตีของเอนไซม์เรนินตรีงรูปที่เตรียมได้จึงนำข้อมูลมาวิเคราะห์ วาเรียนซ์แบบสุ่มตลอด ดังตารางที่ 4 พบว่าความเข้มข้นของ APTS มีผลต่อค่าแอกติวิตี ของเอนไซม์เรนินตรีงรูปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และความ เข้มข้นของกลูตาราลดีไฮด์มีผลต่อค่าแอกติวิตีของเอนไซม์เรนินตรีงรูปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 แต่ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์เรนินตรีงรูปจะไม่ขึ้นกับความเข้มข้น ของ APTS และความเข้มข้นของกลูตาราลดีไฮด์

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลด้วย Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังตารางที่ 5 พบว่าภาวะที่เหมาะสมต่อการเตรียมเอนไซม์ เรนินตรีงรูปมี 2 ภาวะ คือ ภาวะแรกที่ความเข้มข้นของ APTS ร้อยละ 2 โดยปริมาตร และความเข้มข้นของกลูตาราลดีไฮด์ร้อยละ 2.5 โดยปริมาตร ($A_2G_{2.5}$) สำหรับภาวะที่สอง ที่ความเข้มข้นของ APTS ร้อยละ 5 โดยปริมาตรและความเข้มข้นของกลูตาราลดีไฮด์ร้อยละ 2.5 โดยปริมาตร ($A_5G_{2.5}$)

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลในการหาความเข้มข้นของ APTS และกลูตาไรลดีไฮด์
ที่เหมาะสมในการตรึงรูปแอนไซม์เรนินด้วยวิธีวาเรียนซ์แบบสุ่มตลอด
(ภาคผนวก ข-1.1)

SOV	df	SS	MS	F cal
A	2	8.01×10^{-4}	4.00×10^{-4}	6.21*
B	2	5.35×10^{-3}	2.68×10^{-3}	41.49**
AB	4	0.09×10^{-4}	2.27×10^{-4}	3.50
Error	9	5.81×10^{-4}	6.46×10^{-5}	
Total	17	7.64×10^{-3}		

A = APTS

B = G

* = มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

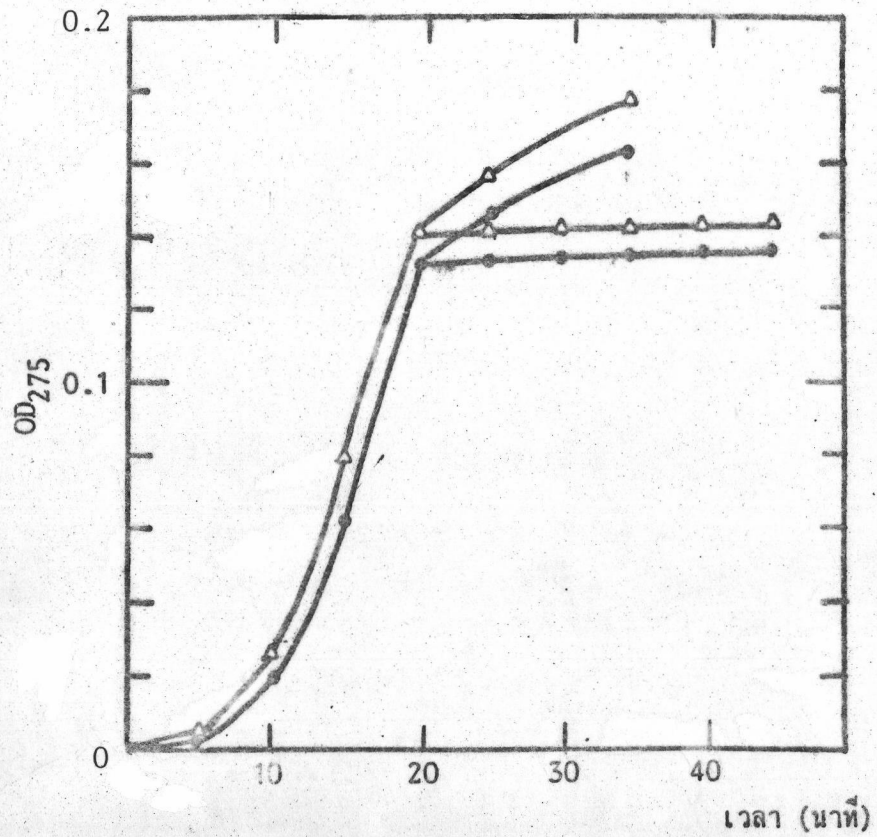
** = มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลในการหาความเข้มข้นของ APTS และกลูทาราลดีไฮด์ที่เหมาะสมในการตรึงรูปแอนไซม์เรนนินด้วยวิธี Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ภาคผนวก ข-1.2)

ตัวอย่าง	OD ₂₇₅
A ₂ G ₁	0.109 ^b
A ₂ G _{2.5}	<u>0.130</u> ^a
A ₂ G ₅	0.097 ^b
A ₅ G ₁	0.098 ^b
A ₅ G _{2.5}	<u>0.139</u> ^a
A ₅ G ₅	0.073 ^d
A ₇ G ₁	0.094 ^{bc}
A ₇ G _{2.5}	0.110 ^b
A ₇ G ₅	0.083 ^{cd}

4.1.3 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการเกาะเกี่ยวระหว่างเอนไซม์เรนินกับ G-APTS – ทรายของภาวะ $A_2G_{2.5}$ และ $A_5G_{2.5}$

เนื่องจากผลการทดลองในข้อ 4.1.2 พบว่าภาวะที่เหมาะสมต่อการเตรียม
เอนไซม์เรนินตรีงรูปมี 2 ภาวะ ดังนั้นจึงมีการทดลองในข้อ 3.3.1.3 เพื่อหาภาวะที่เหมาะสม
ที่สุดเพียงภาวะเดียวโดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพการเกาะเกี่ยวระหว่างเอนไซม์เรนินกับ
G-APTS-ทรายของภาวะ $A_2G_{2.5}$ และ $A_5G_{2.5}$ ด้วยวิธีการคำนวณร้อยละของการหลุดของ
เอนไซม์เรนินออกจาก G-APTS-ทราย จากกราฟรูปที่ 15 พบว่าเอนไซม์เรนินตรีงรูป
ที่เตรียมจากภาวะ $A_5G_{2.5}$ มีปริมาณการหลุดของเอนไซม์เรนินจาก G-APTS-ทรายร้อยละ
4.54 โดยแอกติวิตีซึ่งต่ำกว่าการหลุดของเอนไซม์เรนินจาก G-APTS-ทรายของเอนไซม์เรนิน
ตรีงรูปที่เตรียมจากภาวะ $A_2G_{2.5}$ ซึ่งมีค่าเท่ากับร้อยละ 7.23 โดยแอกติวิตี



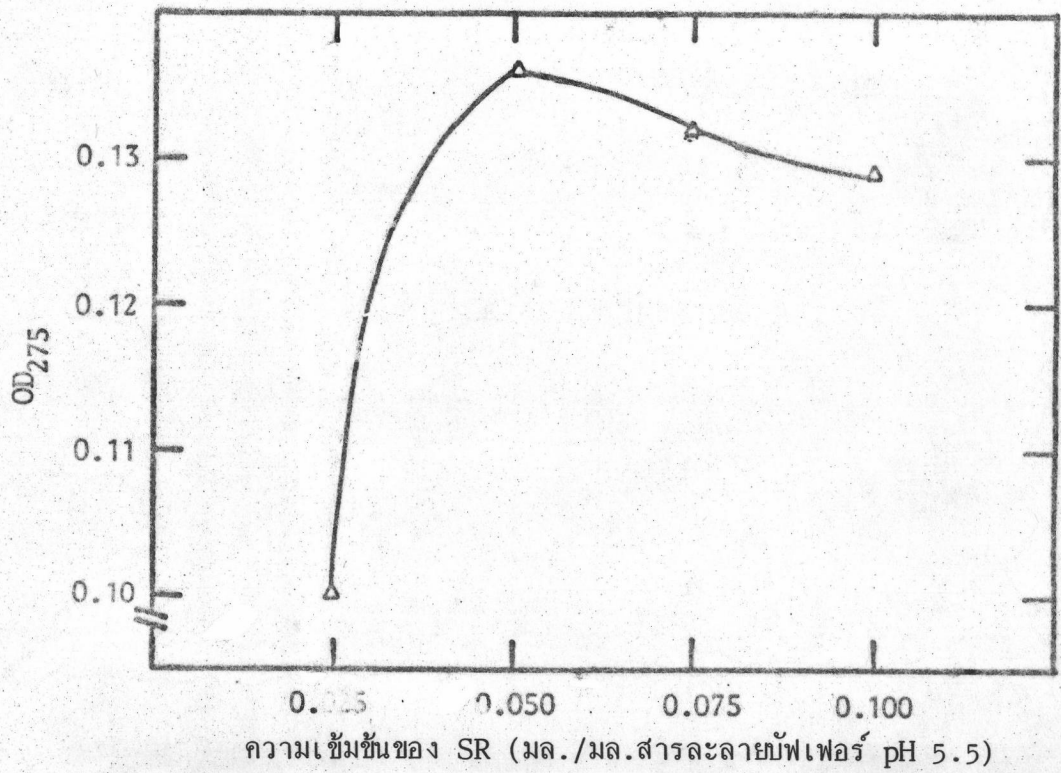
รูปที่ 15 เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างแอกติวิตีของ IR ที่เตรียมจากภาวะ A₅G_{2.5} และ A₂G_{2.5} กับเวลาในการทำปฏิกิริยากับเคซีน ซึ่งแสดงประสิทธิภาพการเกาะเกี่ยวของ SR กับ G-APTS-ทราย

△—△ A₅G_{2.5}

●—● A₂G_{2.5}

4.1.4 กำหนดปริมาณเอนไซม์เรนินที่พอเหมาะในการตรึงรูปที่ภาวะ $A_5G_{2.5}$

จากการทดลองในข้อ 3.3.1.4 ด้วยวิธีการวัดแอกติวิตีของเอนไซม์เรนิน ตรึงรูปที่เตรียมตามภาวะ $A_5G_{2.5}$ โดยมีความเข้มข้นของสารละลายเรนินเลส-แอลในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 5.5 เป็นตัวแปร และจากการรายงานผลการทดลองด้วยกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร กับความเข้มข้นของเรนินเลส-แอล ดังรูปที่ 16 พบว่าที่ความเข้มข้นของเรนินเลส-แอล เท่ากับ 0.050 มิลลิกรัม/มิลลิกรัม ของสารละลายบัฟเฟอร์ pH 5.5 ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร หรือค่าแอกติวิตีสูงสุด



รูปที่ 16 ความสัมพันธ์ระหว่างแอกติวิตีของ IR ที่ภาวะ A₅G_{2.5} กับความเข้มข้นของ SR ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 5.5

4.1.5 ศึกษาโครงสร้างของเอนไซม์เรนินตรีงรูปเปรียบเทียบกับทรายสะอาดขนาด 50 เมช ที่ใช้เป็นตัวพุง

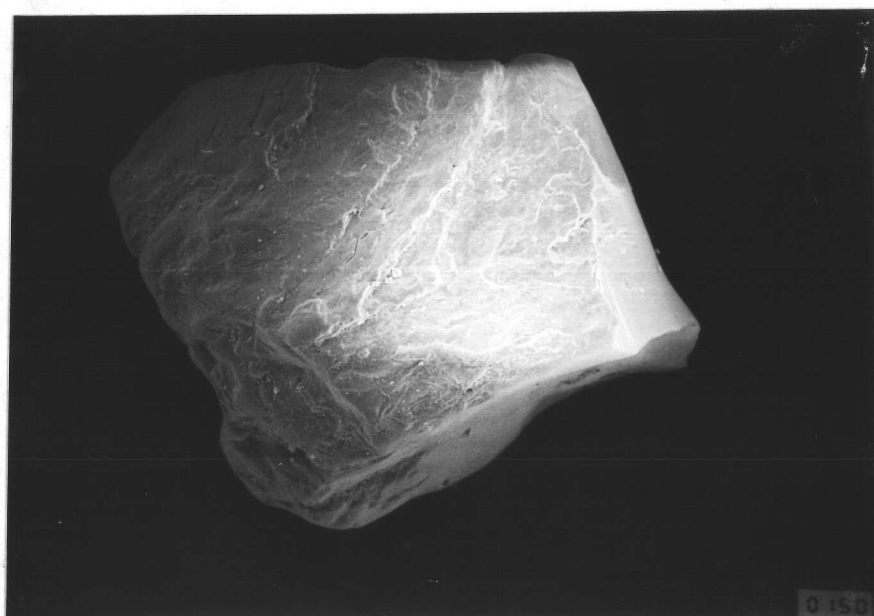
จากการทดลองในข้อ 3.3.1.5 ซึ่งเป็นการศึกษาโครงสร้างของเอนไซม์เรนินตรีงรูปที่เตรียมด้วยภาวะ $A_5G_{2.5}$ และความเข้มข้นของเรนินเลส-แอล เท่ากับ 0.050 มิลลิตร/มิลลิตร ของสารละลายบัฟเฟอร์ pH 5.5 เปรียบเทียบกับทรายสะอาดขนาด 50 เมช

ในรูปที่ 17 เป็นภาพเปรียบเทียบระหว่างทรายแม่น้ำขนาด 50 เมช ในสภาพก่อนและหลังการทำความสะอาดด้วยสารละลายกรดในตริกความเข้มข้น 14 นอร์มัล

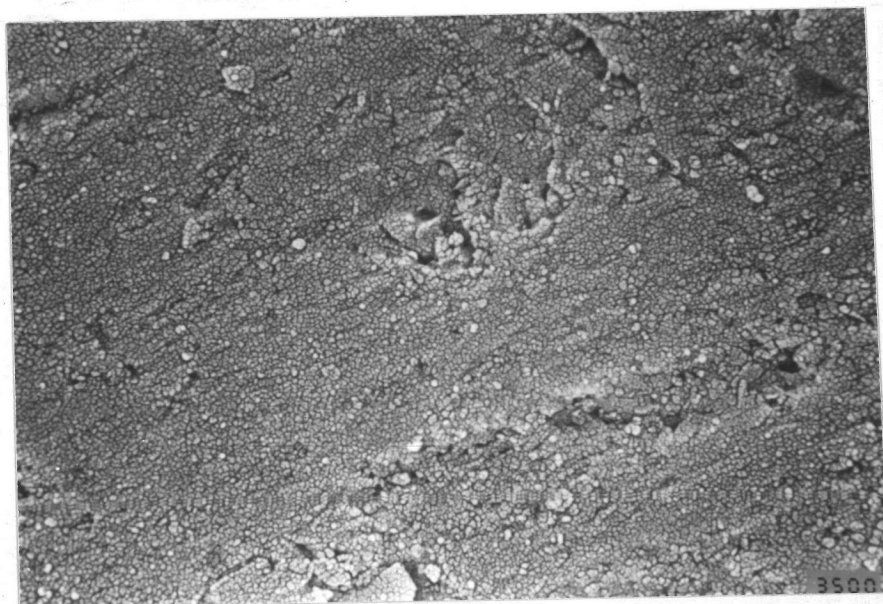
พิจารณาโครงสร้างจากภาพถ่ายด้วย Scanning electron microscope ของเม็ดทรายสะอาดขนาด 50 เมช ทั้งเม็ด ดังรูปที่ 18 ยังไม่ปรากฏความพรุนของพื้นผิวของเม็ดทรายสะอาดขนาด 50 เมช ดังรูปที่ 19 ซึ่งใช้กำลังขยาย 3,500 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับรูปที่ 20 กับรูปที่ 21 จะสังเกตเห็นว่าพื้นผิวของเม็ดทรายที่มีเอนไซม์เรนินตรีงรูปเกาะอยู่จะมีจุดขาวของเอนไซม์เรนินตรีงรูปเกาะบนผิวทรายสะอาดอย่างชัดเจน เมื่อเพิ่มกำลังขยายสูงขึ้นเป็น 10,000 เท่า



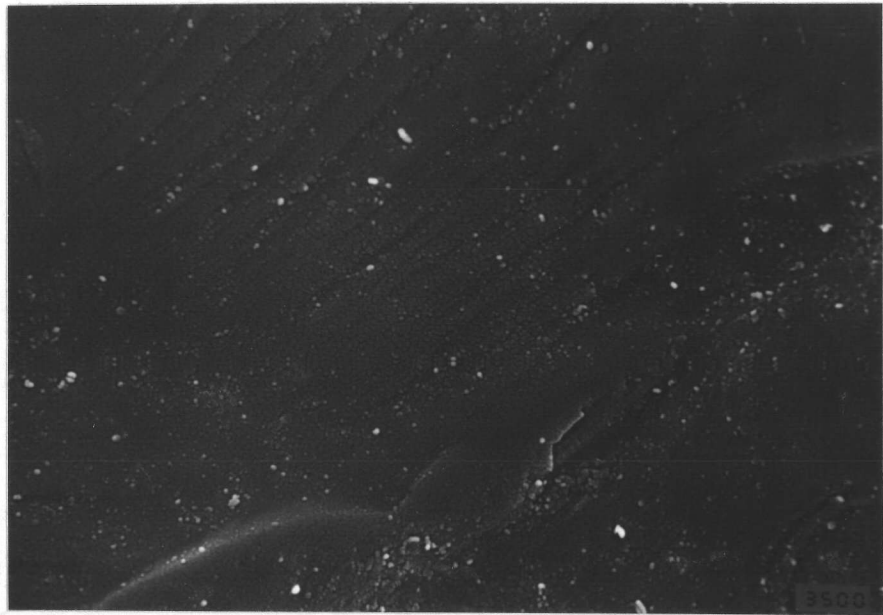
รูปที่ 17 เปรียบเทียบทรายแม่ข่ายขนาด 50 เมช ในสภาพปกติและหลังจาก
ทำความสะอาดด้วยสารละลายกรดไนตริกเข้มข้น 14 นอร์มัล



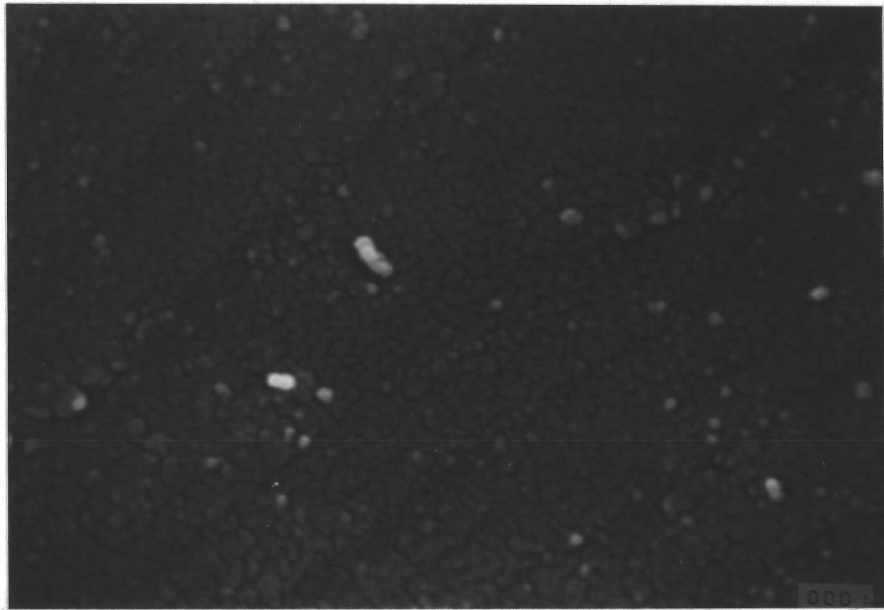
รูปที่ 18 เม็ดทรายสะอาดขนาด 50 เมช (กำลังขยาย 150 เท่า)



รูปที่ 19 พื้นผิวที่มีความพรุนของเม็ดยาขนาด 50 ไมครอน
(กำลังขยาย 3,500 เท่า)



รูปที่ 20 พื้นที่ของเมฆทรายที่มีไอออนไนซ์เรซินตรงอยู่ภายใต้ภาวะ
A₅G_{2.5} (กำลังขยาย 3,500 เท่า)

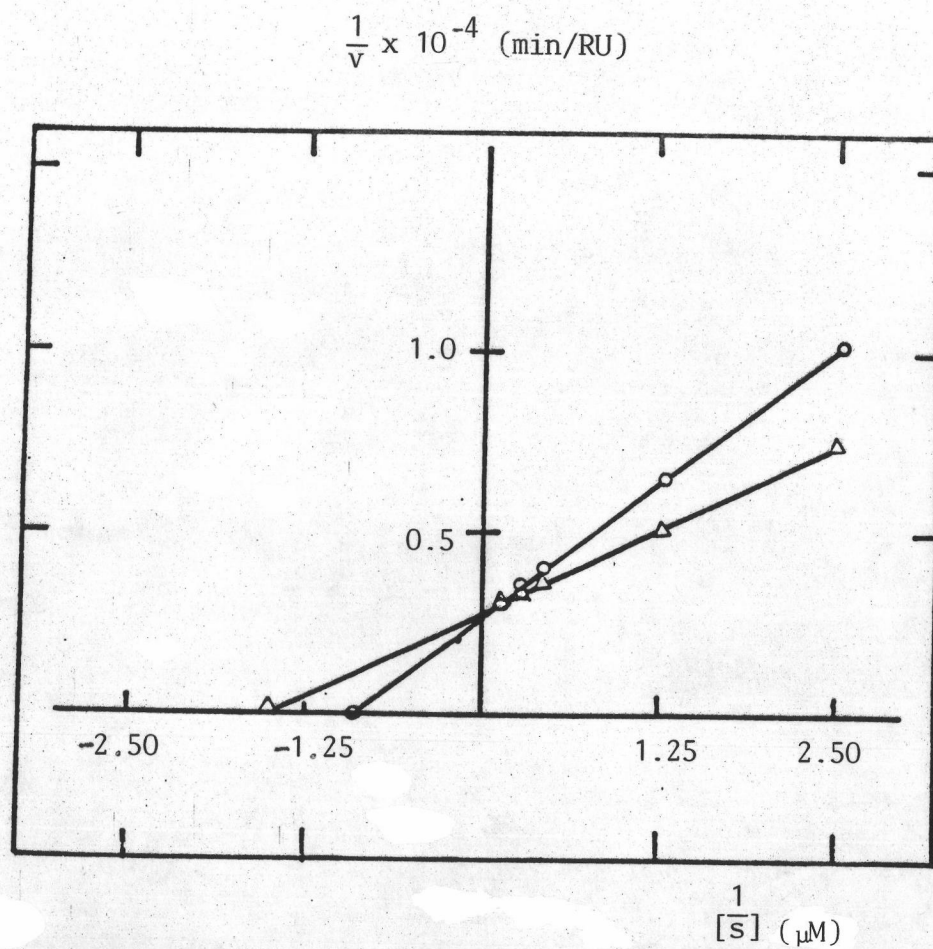


รูปที่ 21 ๕ พันผิวของเม็คทรายที่มีเอนไซม์เรนินตรึงอยู่ภายใต้ภาวะ
A₅G_{2.5} (กำลังขยาย 10,000 เท่า)

4.2 ศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์เรนินตรีงรูป

4.2.1 วัดค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์เรนินตรีงรูปและเอนไซม์เรนินไม่ตรีงรูป

ตั้งการทดลองใน 3.3.2.1 ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบ Lineweaver Burk plot ของเอนไซม์เรนินตรีงรูปกับเอนไซม์เรนินไม่ตรีงรูปได้ผลดังรูปที่ 22 จากการคำนวณจากกราฟที่จุดตัด x ซึ่งมีค่าเท่ากับ $-\frac{1}{K_m}$ พบว่า K_m ของเอนไซม์เรนินตรีงรูปและเอนไซม์เรนินไม่ตรีงรูปมีค่าเท่ากับ 4.18 และ 6.75 ไมโครโมลาร์ และจากการคำนวณจากกราฟที่จุดตัดแกน y ซึ่งมีค่าเท่ากับ $\frac{1}{V_{max}}$ พบว่า V_{max} ของเอนไซม์เรนินตรีงรูปและเอนไซม์เรนินไม่ตรีงรูปมีค่าเท่ากับ 3.57×10^3 , 3.02×10^3 หน่วยเอนไซม์เรนิน/นาที



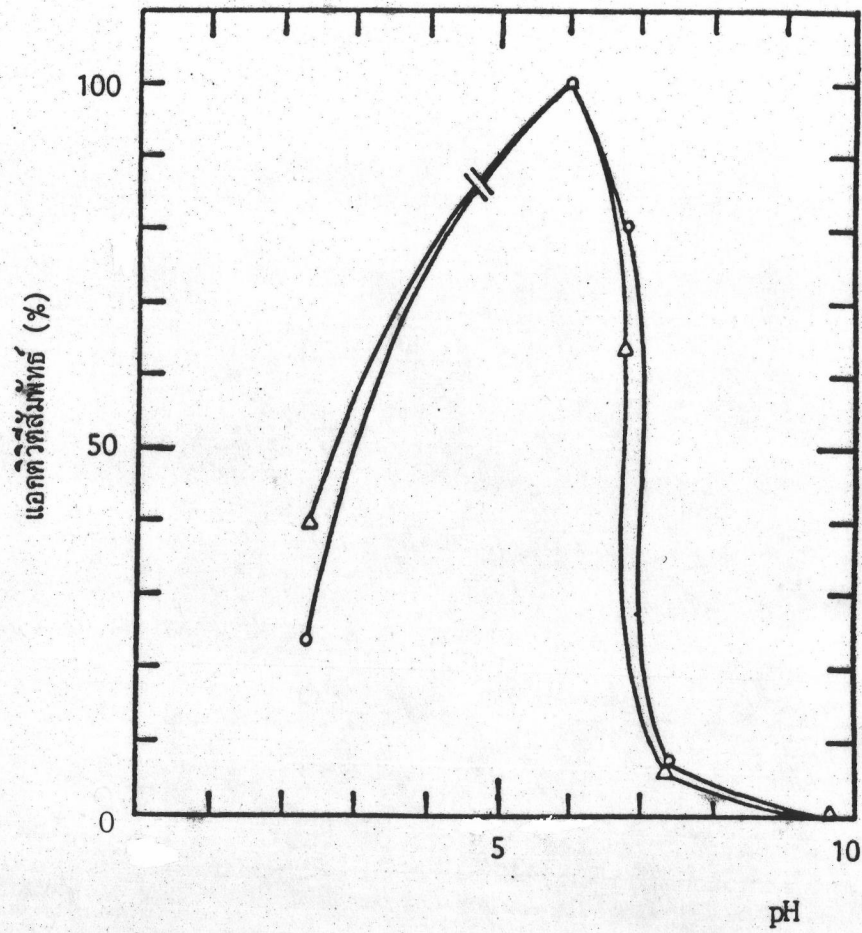
รูปที่ 22 เปรียบเทียบ Lineweaver Burk plot ของ SR และ IR

$\Delta \text{---} \Delta$ IR : K_m 4.18 μM , V_{max} 3.57×10^3 RU/นาที

$\circ \text{---} \circ$ SR : K_m 6.75 μM , V_{max} 3.02×10^3 RU/นาที

4.2.2 เปรียบเทียบ pH profile ของแอกติวิตีของเอนไซม์เรนินตรีงรูปและเอนไซม์เรนินไม่ตรีงรูป

ในการทดลอง 3.3.2.2 เนื่องจาก isoelectric zone ของเคซีนมีค่าประมาณ 4.7 (33) ดังนั้นเคซีนจึงตกตะกอนในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH 3 4 และ 5 เป็นผลให้วัดแอกติวิตีของเคซีนที่ pH ดังกล่าวไม่ได้ อย่างไรก็ตามผลการทดลองในรูปที่ 23 ชี้ให้เห็นว่าเอนไซม์เรนินตรีงรูปและเอนไซม์เรนินไม่ตรีงรูปมี pH profile ลักษณะใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ pH ที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยากับสารละลายเคซีนของเอนไซม์เรนินตรีงรูปและเอนไซม์เรนินไม่ตรีงรูปยังอยู่ที่ pH ประมาณ 5-7 เช่นกัน



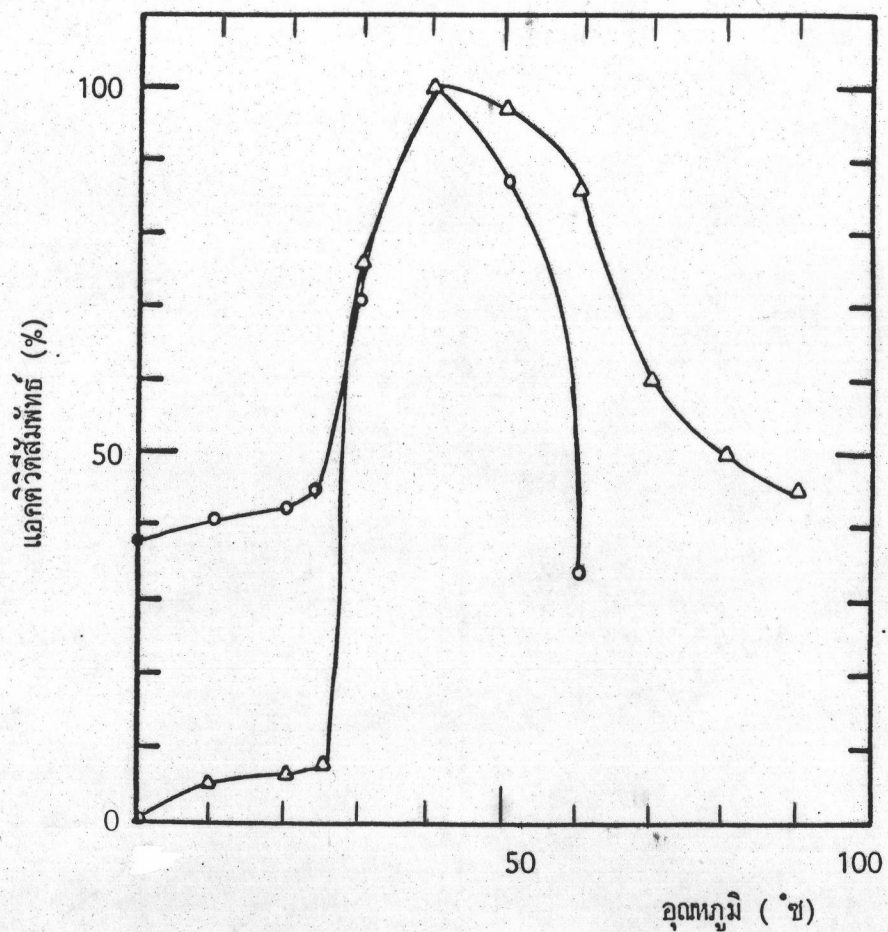
รูปที่ 23 เปรียบเทียบ pH profile ของ IR และ SR ด้วยความสัมพันธ์ระหว่างแอกติวิตีที่สัมพันธ์ของ IR และ SR กับ pH ของสารละลายเกิดขึ้น

△—△ IR

○—○ SR

4.2.3 เปรียบเทียบ temperature profile ของแอกติวิตีของเอนไซม์เรนิน ครึ่งรูปและเอนไซม์เรนินไม่ครึ่งรูป

จากการทดลองข้อ 3.3.2.3 แสดงผลด้วยรูปที่ 24 พบว่าเอนไซม์
เรนินครึ่งรูปจะมี temperature profile ที่กว้างกว่าเอนไซม์เรนินไม่ครึ่งรูป หาก
พิจารณาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยากับเคซีนของเอนไซม์เรนินครึ่งรูปจะอยู่ในช่วง
35-60 องศาเซลเซียส ขณะที่เอนไซม์เรนินไม่ครึ่งรูปอยู่ในช่วง 35-50 องศาเซลเซียส



รูปที่ 24 เปรียบเทียบ temperature profile ของ IR และ SR ด้วยความสัมพันธ์ระหว่างแอกติวิตีสัมพันธ์ของ IR และ SR กับอุณหภูมิของสารละลายเคซีนในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 5.5

△—△ IR

○—○ SR

4.2.4 ทาค่าแอกติวิตีจำเพาะ (Specific activity) ของเอนไซม์เรนินตรีงรูป

จากผลการทดลองในข้อ 3.3.2.4 วัดแอกติวิตีของเอนไซม์เรนินตรีงรูปได้เท่ากับ 0.1314 กิโลหน่วยเอนไซม์เรนิน และหาปริมาณโปรตีนของเอนไซม์เรนินตรีงรูป 2 กรัม โดยวิธี Macro Kjeldahl distillation ได้เท่ากับ 1.0808 มิลลิกรัม จากนั้นคำนวณหาค่าแอกติวิตีจำเพาะได้จากสูตร

$$\begin{aligned} \text{แอกติวิตีจำเพาะ} &= \frac{\text{จำนวนหน่วยเอนไซม์}}{\text{มิลลิกรัมโปรตีนในสารผสม}} \\ &= \frac{0.1314 \text{ กิโลหน่วยเอนไซม์เรนิน}}{1.0808 \text{ มิลลิกรัม}} \\ &= 6.08 \text{ กิโลหน่วยเอนไซม์เรนิน/มิลลิกรัม} \end{aligned}$$

ดังนั้นเอนไซม์เรนินตรีงรูปมีค่าแอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ 6.08 กิโลหน่วยเอนไซม์เรนิน/มิลลิกรัม

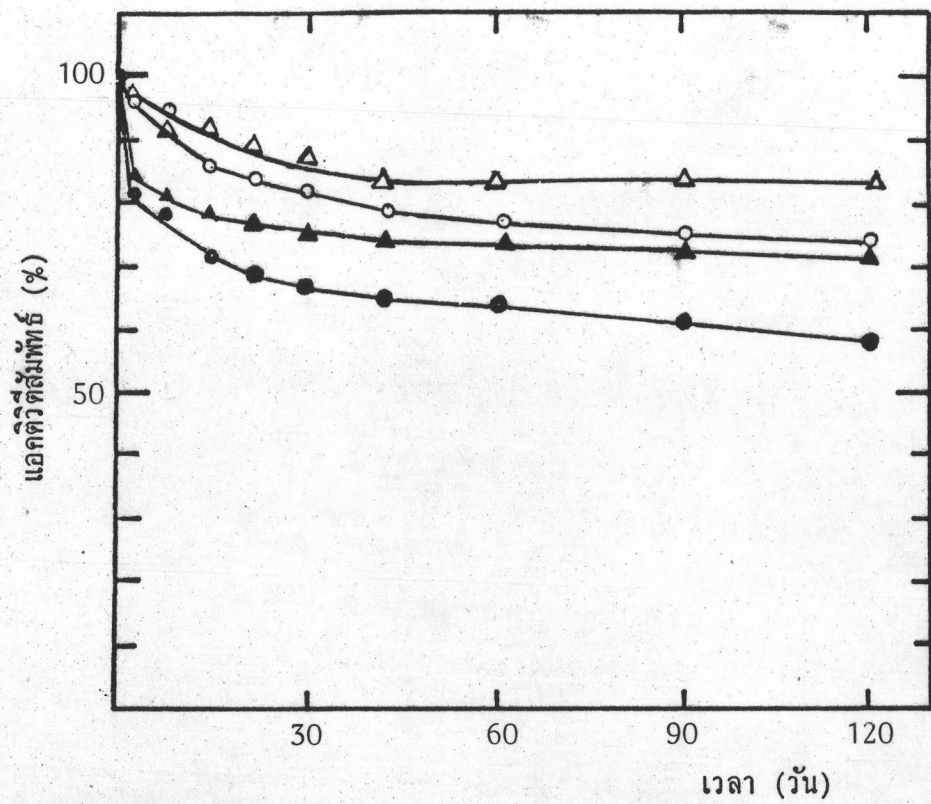
4.2.5 เสถียรภาพระหว่างการเก็บของเอนไซม์เรนินตรีงรูป

จากการทดลองในข้อ 3.3.2.5 ซึ่งเปรียบเทียบเสถียรภาพระหว่างการเก็บด้วยกราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอกติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์เรนินตรีงรูปและเอนไซม์เรนินไม่ตรีงรูปกับระยะเวลาในการเก็บที่สภาวะที่กำหนด ดังรูปที่ 25 พบว่าเมื่อระยะเวลาในการเก็บเอนไซม์เรนินตรีงรูปดำเนินไปได้ 120 วันแล้วที่ภาวะอุณหภูมิห้องเย็นเอนไซม์เรนินตรีงรูปมีค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ลดลงร้อยละ 17.39 แต่เอนไซม์เรนินไม่ตรีงรูปมีค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ลดลงร้อยละ 27.34 สำหรับที่ภาวะอุณหภูมิห้องเอนไซม์เรนินตรีงรูปมีค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ลดลงร้อยละ 25.36 ขณะที่เอนไซม์ไม่ตรีงรูปมีค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ลดลงร้อยละ 40.58 เมื่อระยะเวลาในการเก็บ 120 วัน

4.2.6 ทาค่าครึ่งชีวิตของเอนไซม์เรนินตรีงรูป

วิธีดำเนินงานวิจัยในข้อ 3.3.2.7 เป็นการอ่านค่าครึ่งชีวิตในระยะเวลาการเก็บของเอนไซม์เรนินตรีงรูปที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิห้องเย็นที่แอกติวิตีสัมพัทธ์เป็นร้อยละ 50 ในกราฟรูปที่ 25 ตามผลการทดลองในข้อ 4.2.5 พบว่าที่ระยะเวลาในการเก็บ

เอนไซม์เรนินที่รูปที่อุดมหมู่ที่ห้องเย็นและที่อุดมหมู่ที่ห้อง 120 วัน นั้นค่าแอกติวิตีที่สัมพันธ์ยังลดลงไม่ถึงร้อยละ 50 ดังนั้นค่าครึ่งชีวิตของเอนไซม์เรนินที่รูปที่เก็บในอุดมหมู่ที่ห้องเย็นและอุดมหมู่ที่ห้องมีค่ามากกว่า 4 เดือน



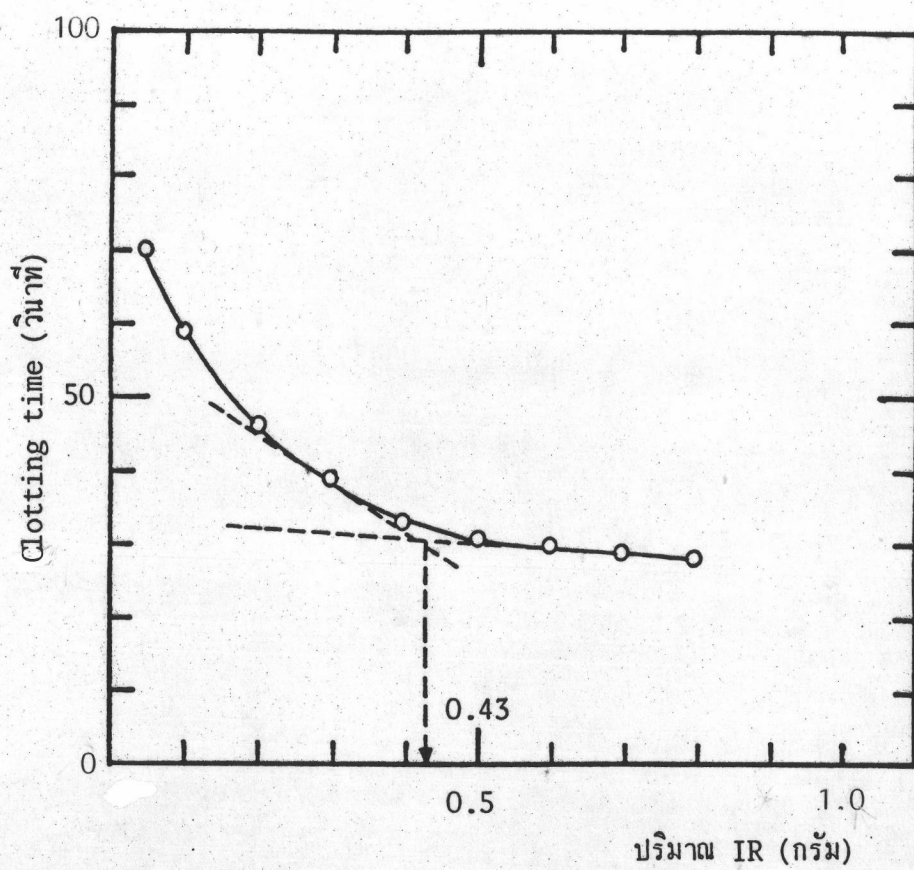
รูปที่ 25 เปรียบเทียบเสถียรภาพระหว่างการเก็บของ IR และ SR ที่อุณหภูมิห้องเย็น (8-10 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) ด้วยความสัมพันธ์ระหว่างแอกติวิตีสัมพัทธ์ของ IR และ SR ที่เก็บในสภาวะที่กำหนดกับระยะเวลาในการเก็บ

- △—△ IR ที่เก็บในอุณหภูมิห้องเย็น (IR ref)
- ▲—▲ IR ที่เก็บในอุณหภูมิห้อง (IR rot)
- SR ที่เก็บในอุณหภูมิห้องเย็น (SR ref)
- SR ที่เก็บในอุณหภูมิห้อง (SR rot)

4.3 ศึกษาภาวะการใช้เอนไซม์เรนินตรีงรูปในการตกตะกอนเคซีนในนม

4.3.1 หาปริมาณเอนไซม์เรนินตรีงรูปที่เหมาะสมต่อการตกตะกอนนม

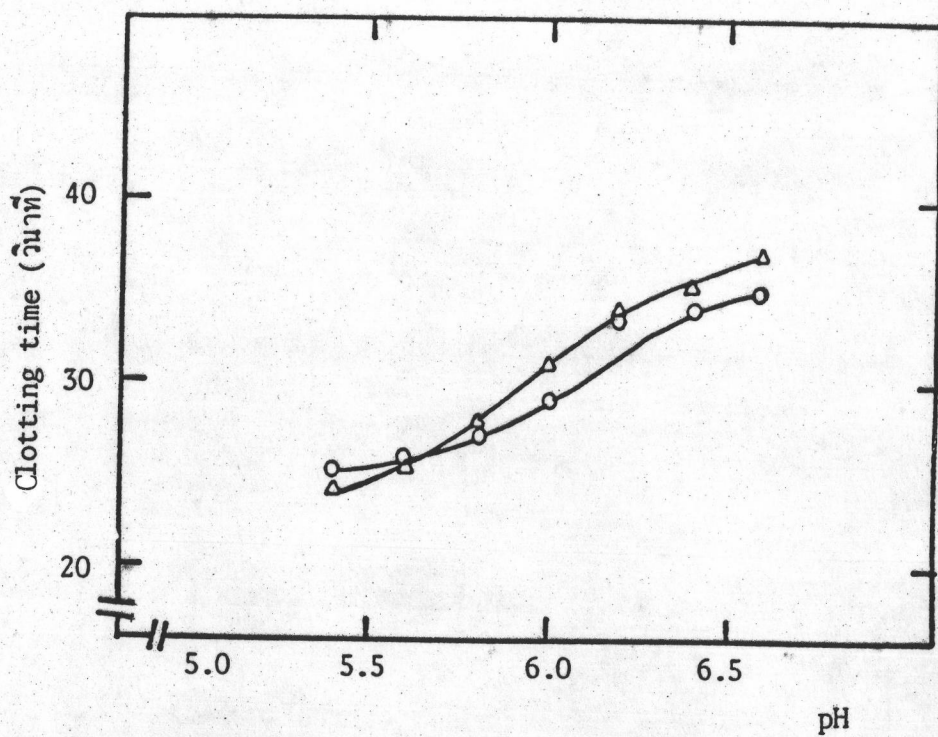
จากการทดลองในข้อ 3.3.3.1 ซึ่งหาเวลาในการตกตะกอนนม โดยมี ปริมาณเอนไซม์เรนินตรีงรูปเป็นตัวแปร เมื่อพิจารณาจากรูปที่ 26 ซึ่งเป็นกราฟความสัมพันธ์ ระหว่างเวลาในการตกตะกอนนมกับปริมาณเอนไซม์เรนินตรีงรูป พบว่าปริมาณเอนไซม์เรนิน ตรีงรูปที่เหมาะสมต่อการตกตะกอนนมมีค่าเท่ากับ 0.43 กรัม



รูปที่ 26 ความสัมพันธ์ระหว่าง Clotting time กับปริมาณ IR

4.3.2 เปรียบเทียบ pH profile ในการตกตะกอนของเอนไซม์เรนินตรีงรูป และเอนไซม์เรนินไม่ตรีงรูป

ด้งการทดลอง 3.3.3.2 โดยวัดเวลาในการตกตะกอนที่ค่า pH ของ น้ำนมต่าง ๆ กัน เมื่อเปรียบเทียบ pH profile ในการตกตะกอนของเอนไซม์เรนิน ตรีงรูปและเอนไซม์เรนินไม่ตรีงรูปด้วยกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการตกตะกอน กับ pH ของน้ำนมพบว่าเอนไซม์เรนินตรีงรูปและเอนไซม์เรนินไม่ตรีงรูปมี pH-profile ใกล้เคียงกัน โดยมี pH ที่เหมาะสมที่ใกล้เคียงกัน ยิ่ง pH ค่าเวลาในการตกตะกอนของ เอนไซม์เรนินตรีงรูปและเอนไซม์เรนินไม่ตรีงรูปจะยิ่งเร็วขึ้นเช่นกัน ดังรูปที่ 27



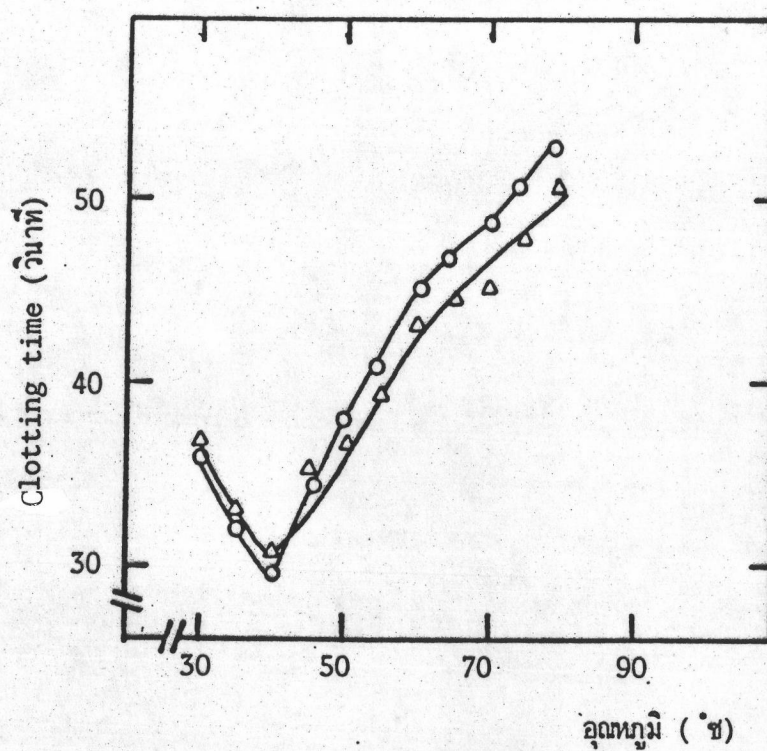
รูปที่ 27 เปรียบเทียบ pH profile ของ IR และ SR ในการตกตะกอนนม ด้วยความสัมพันธ์ระหว่าง Clotting time ของ IR และ SR กับ pH ของน้ำนมที่อุณหภูมิห้อง

△—△ IR

○—○ SR

4.3.3 เปรียบเทียบ temperature profile ในการตกตะกอนนมของเอนไซม์ เรนินนรีรูปและเอนไซม์เรนินไม่त्रीรูป

จากการทดลองในข้อ 3.3.3.3 ซึ่งวัดเวลาในการตกตะกอนนม โดยมี อุณหภูมิของน้ำนมเป็นตัวแปร เมื่อพิจารณา temperature profile ของเอนไซม์ เรนิน นรีรูปและเอนไซม์เรนินไม่त्रीรูปด้วยกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการตกตะกอนนม กับอุณหภูมิของน้ำนมค้รูปที่ 28 พบว่า temperature profile ในการตกตะกอนนมของ เอนไซม์ เรนินนรีรูปและเอนไซม์เรนินไม่त्रीรูปมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการตกตะกอนนมที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเช่นกัน แต่ที่เวลาในการตกตะกอนนมเท่ากับ 50 วินาที พบว่าอุณหภูมิของการ ตกตะกอนนมของเอนไซม์เรนินนรีรูปมีค่าเท่ากับ 80 องศาเซลเซียส ขณะที่เอนไซม์เรนิน ไม่त्रीรูปมีค่าเท่ากับ 70 องศาเซลเซียส



รูปที่ 28 เปรียบเทียบ temperature profile ของ IR และ SR ในการตกตะกอนนมด้วยความสัมพันธ์ระหว่าง Clotting time ของ IR และ SR กับอุณหภูมิของน้ำนม ที่ pH 6.5

Δ—Δ IR

○—○ SR

4.3.4 ศึกษาภาวะ pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการตกตะกอนนม (33)

ตามการทดลองที่ 3.3.3.4 โดยเตรียมน้ำนมพาสเจอร์ไรซ์แบบแพนแพกตอเรียล 3×3 ซึ่งมี pH และอุณหภูมิเป็นตัวแปร จากนั้นหาเวลาในการตกตะกอนนมของเอนไซม์เรนินครึ่งรูปปริมาณ 0.43 กรัม กับน้ำนมในแต่ละ treatment combination แล้วนำข้อมูลมาวิเคราะห์ว่าเรซินแบบส่มตลอด ดังตารางที่ 6 พบว่า pH และอุณหภูมิมีผลต่อเวลาในการตกตะกอนนมอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 และเวลาในการตกตะกอนนมขึ้นอยู่กับความสัมพันธ์ระหว่างระดับ pH และอุณหภูมิอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 สำหรับผลการวิเคราะห์ข้อมูลด้วย Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังตารางที่ 7 พบว่าภาวะของน้ำนมที่เหมาะสมที่สุดต่อการตกตะกอนนมคือที่ pH 5.5 และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลในการหา pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการตกตะกอนนม ด้วยวิธีวาเรียนซ์แบบสุ่มตลอด (ภาคผนวก ข-2.1)

SOV	df	SS	MS	F cal
A	2	544.74	272.37	423.33 ^{**}
B	2	170.89	85.44	135.62 ^{**}
AB	4	10.03	2.51	3.98 [*]
Error	9	5.63	0.63	
total	17	731.3		

A = pH

B = อุณหภูมิ

* = มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

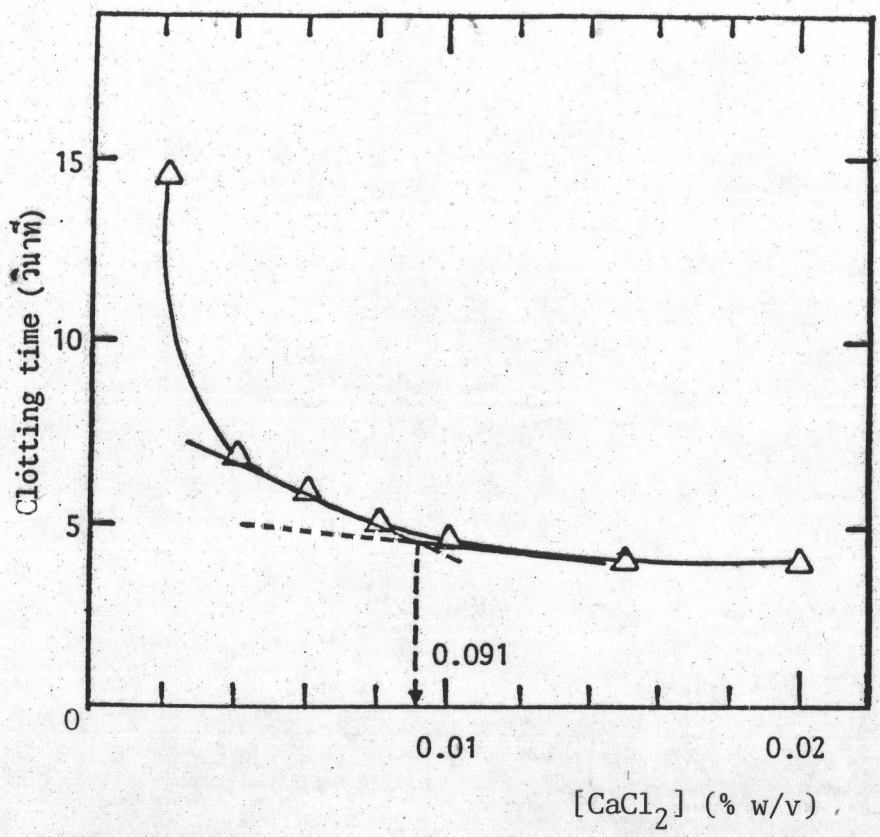
** = มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

ตารางที่ 7 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลในการหา pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการตกตะกอนนม
ด้วยวิธี Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น
ร้อยละ 95 (ภาคผนวก ข-2.2)

ตัวอย่าง		clotting time (วินาที)
อุณหภูมิ (°ซ)	pH	
30	5.5	21.10 ^f
30	6.0	29.35 ^c
30	6.5	32.14 ^b
40	5.5	<u>16.50</u> ^g
40	6.0	26.00 ^d
40	6.5	30.00 ^c
50	5.5	23.70 ^e
50	6.0	32.60 ^b
50	6.5	38.80 ^a

4.3.5 ศึกษาความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการตกตะกอนนม

จากการทดลองในข้อ 3.3.3.5 ด้วยวิธีการหาเวลาในการตกตะกอนนมของน้ำนมที่เติมแคลเซียมคลอไรด์ในปริมาณต่าง ๆ กัน เมื่อพิจารณาจากรูปที่ 29 ซึ่งเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการตกตะกอนนมกับความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์พบว่าความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการตกตะกอนนมเป็นร้อยละ 0.091 โดยน้ำหนัก/ปริมาตรของน้ำนม



รูปที่ 29 ความสัมพันธ์ระหว่าง Clotting time กับความเข้มข้นของ CaCl₂ ที่เติมในน้ำนมที่ภาวะ pH 5.9 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

4.3.6 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดลิ่มแข็ง (Curd firmness) ของนํ้านม (33)

ตั้งการทดลองในข้อ 3.3.3.6 โดยเตรียมนํ้านมแบบแผนแพกตอเรียล $3 \times 3 \times 2$ แปรอุณหภูมิ 3 ระดับคือ 35 40 และ 45 องศาเซลเซียส แปร pH 3 ระดับคือ 5.5 5.7 และ 5.9 และแปรความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ 2 ระดับ คือ ร้อยละ 0 และ 0.091 กรัม/มิลลิลิตรของนํ้านม และนำข้อมูลความแข็งของลิ่มนมที่วัดได้ตั้งวิธีที่กล่าวมาข้างต้น มาวิเคราะห์ด้วยวิธีวาเรียนซ์แบบสุ่มตลอดตามตารางที่ 8 พบว่าความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ pH และอุณหภูมิมีผลต่อความแข็งของลิ่มนมอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์กับ pH ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์กับอุณหภูมิ และ pH กับอุณหภูมิ ตลอดจนความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ pH กับอุณหภูมิ มีผลต่อความแข็งของลิ่มนมอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลด้วย Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังตารางที่ 9 พบว่า มีภาวะที่ให้ความแข็งของลิ่มนมสูงสุด 3 ภาวะดังนี้คือ ภาวะของนํ้านมที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส pH 5.9 ต้องเติมแคลเซียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.091 กรัม/มิลลิลิตรของนํ้านม สำหรับภาวะที่ 2 ได้แก่ภาวะนํ้านมที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส pH 5.9 ไม่ต้องเติมแคลเซียมคลอไรด์ ส่วนภาวะที่ 3 ได้แก่ ภาวะนํ้านมที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส pH 5.9 ต้องเติมแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น ร้อยละ 0.091 กรัม/มิลลิลิตรของนํ้านม อย่างไรก็ตามภาวะที่จะเลือกสำหรับการทดลอง เบื้องต้นในการผลิตเนยแข็งเชดคาร์คือ ภาวะของนํ้านมที่ 40 องศาเซลเซียส pH 5.9 ไม่ต้องเติมแคลเซียมคลอไรด์ ส่วนอีก 2 ภาวะจะเป็นการยุ่งยากและสิ้นเปลืองที่ต้องเติมแคลเซียมคลอไรด์

ตารางที่ 8 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลในการหาอุณหภูมิ pH และความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมในการเกิดลิ้มแข็งของนํ้านม ด้วยวิธีวาเรียนซ์แบบสุ่มตลอด (ภาคผนวก ข-3.1)

SOV	df	SS	MS	F cal
A	1	239.8363	239.8368	59.6619**
B	2	1336.0034	668.0017	166.1723**
C	2	3452.0993	1726.0496	429.3727**
AB	2	46.2114	23.1057	5.7478**
AC	2	33.4242	16.7121	4.1573**
BC	4	126.5193	31.6298	7.8682**
ABC	4	141.9519	35.4880	8.8280**
Error	18	72.3588	4.0199	
total	35	5448.4051		

A = ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์

B = pH

C = อุณหภูมิ

** = มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

ตารางที่ 9 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลในการหาอุณหภูมิ pH และความเข้มข้นของแคลเซียม-คลอไรด์ที่เหมาะสมในการเกิดลิ้มแข็งของนํ้านมด้วยวิธี Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ภาคผนวก ข-3.2)

อุณหภูมิ (°ซ)	ตัวอย่าง		Curd firmness (cm/Volt)
	pH	[CaCl ₂] % W/V	
35	5.5	0.091	7.78 ^h
35	5.5	0	4.00 ^h
35	5.7	0.091	6.76 ^h
35	5.7	0	5.76 ^h
35	5.9	0.091	29.00 ^{cd}
35	5.9	0	10.80 ^g
40	5.5	0.091	23.80 ^e
40	5.5	0	22.00 ^f
40	5.7	0.091	33.90 ^b
40	5.7	0	27.80 ^{de}
40	5.9	0.091	42.00 ^a
40	5.9	0	41.00 ^a
45	5.5	0.091	27.88 ^{de}
45	5.5	0	22.84 ^{ef}
45	5.7	0.091	33.25 ^{bc}
45	5.7	0	29.60 ^{bcd}
45	5.9	0.091	39.60 ^a
45	5.9	0	33.70 ^b

4.4 การทดลองเบื้องต้นในการผลิตเนยแข็งเชดคาร์

4.4.1 การผลิตเนยแข็งเชดคาร์

จากการเตรียมสแตร์ตเตอร์ในข้อ ก. ของ 3.3.4.1 ทำให้ได้สแตร์ตเตอร์มีสีขาวขุ่นเช่นเดียวกับนํ้านม กลิ่นหอมของนมเปรี้ยวปรากฏชัดเจนของลิ้นนม เมื่อวัด pH ของสแตร์ตเตอร์ได้ค่าโดยเฉลี่ยเท่ากับ 4.7

ในการทดลองผลิตเนยแข็งเชดคาร์โดยใช้เอนไซม์เรนินตรีงรูป ดังวิธีการในข้อ ข. ของ 3.3.4.1 พบว่าใช้เอนไซม์เรนินตรีงรูปผลิตเนยแข็งเชดคาร์ได้ด้วยปริมาณเอนไซม์เรนินตรีงรูป 193.6 กิโลหน่วยเอนไซม์เรนิน/นํ้านม 100 ลิตร เช่นเดียวกับเอนไซม์เรนินไม่ตรีงรูป นอกจากนี้พบว่าแยกเอนไซม์เรนินตรีงรูปออกจากรนํ้านมได้อย่างสมบูรณ์ด้วยตะแกรงลวดที่มีขนาดของตะแกรง 200 เมช

4.2.2 วิเคราะห์คุณภาพเนยแข็งเชดคาร์เมื่อเริ่มนม

ผลการวิเคราะห์คุณภาพเนยแข็งเชดคาร์ที่ผลิตจากเอนไซม์เรนินชนิดตรีงรูปและเอนไซม์เรนินไม่ตรีงรูปในด้าน ปริมาณความชื้นจากการทดลองในข้อ 3.3.4.2.1 ปริมาณไขมันในข้อ 3.3.4.2.2 และปริมาณโปรตีนในข้อ 3.3.4.2.3 ปรากฏค่าดังตารางที่ 10 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปริมาณความชื้น ไขมัน และโปรตีนของเนยแข็งเชดคาร์ที่ถูกรผลิตโดยเอนไซม์เรนินตรีงรูปและเอนไซม์เรนินไม่ตรีงรูปให้ค่าใกล้เคียงกัน นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษาของ Ohmiya และคณะ ในปี ค.ศ. 1979 (34) พบว่าให้ค่าในทุกคุณภาพที่ตรวจสอบใกล้เคียงกันด้วย

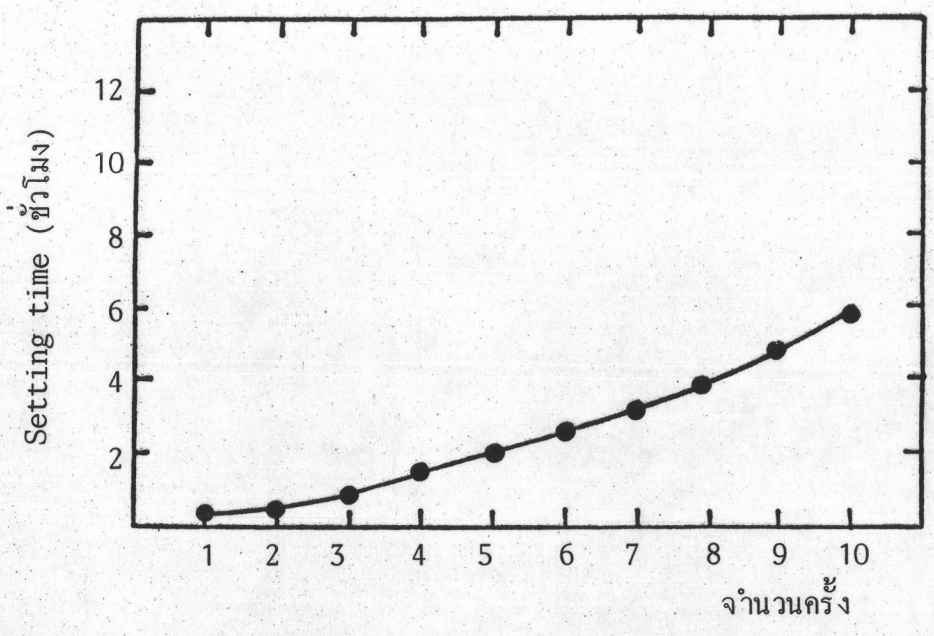
ตารางที่ 10 เปรียบเทียบคุณภาพเนยแข็งเชคदारที่ผลิตจาก SR. IR และ AP
ในด้านปริมาณความชื้น ไขมัน และโปรตีน

ตัวอย่าง	ความชื้น (%)	ไขมัน (%)	โปรตีน (%)
เนยแข็งผลิตจาก SR	44.09	17.52	20.57
เนยแข็งผลิตจาก IR	43.66	18.02	20.57
เนยแข็งผลิตจาก AP	49.00	16.50	19.50

(Ohmiya และคณะ,
1979) (34)

4.4.3 ศึกษาประสิทธิภาพของการนำเอนไซม์เรนินตรีงรูปกลับมาใช้ใหม่

ตามการทดลองในข้อ 3.3.4.3 ซึ่งเป็นการทดสอบประสิทธิภาพการนำเอนไซม์เรนินตรีงรูปกลับมาใช้ใหม่โดยการทดลอง มีลักษณะการจำลองแบบการใช้เอนไซม์เรนินตรีงรูปเพื่อใช้ในการผลิตเนยแข็งเชดคาร์ กล่าวคือ ใช้น้ำนมที่มีภาวะ pH 5.9 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ขณะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์เรนินตรีงรูปในปริมาณ 193.6 กิโลหน่วย-เอนไซม์เรนิน/น้ำนม 100 ลิตร และระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์เรนินตรีงรูปกับน้ำนมยังคงเป็น 10 นาทีเช่นกัน เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพของการนำเอนไซม์เรนินตรีงรูปกลับมาใช้ใหม่จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาการเกิดลิ่มนม (Setting time) ของเอนไซม์เรนินตรีงรูปกับจำนวนครั้งที่นำเอนไซม์เรนินตรีงรูปกลับมาใช้ใหม่ ตามรูปที่ 30 พบว่า การนำเอนไซม์เรนินตรีงรูปกลับมาใช้ติดต่อก่อนนมใหม่ถึง 10 ครั้งนั้น มีผลให้เวลาในการเกิดลิ่มนมช้าลงบ้าง อย่างไรก็ตามในการใช้เอนไซม์เรนินตรีงรูปซ้ำถึง 10 ครั้ง ยังทำให้เกิดลิ่มนมได้สมบูรณ์



รูปที่ 30 ประสิทธิภาพของการนำเอนไซม์เรนินตรีงรูปกลับมาใช้ใหม่ด้วยความสัมพันธ์ระหว่าง Setting time ของ IR กับจำนวนครั้งที่นำ IR กลับมาใช้ใหม่

4.4.4 การทดสอบทางประสาทสัมผัส

ตามการประเมินคุณลักษณะของเนยแข็งเชดคาร์ที่ผลิตโดยเอนไซม์เรนินตรีงรูปและเอนไซม์เรนินไม่ตรีงรูปที่มีอายุการบ่ม 1 เดือน ในข้อ 3.3.4.4 ซึ่งใช้เนยแข็งเชดคาร์ตรา Kraft เป็นมาตรฐานโดยให้คะแนนทุกคุณลักษณะเต็ม 5 คะแนน ใช้วิธีทดสอบแบบ Scoring test จากการวิเคราะห์ข้อมูลด้วย Randomized complete block design (RCBD) ได้ผลดังตารางที่ 11 พบว่ารสชาติซึ่งเป็นคุณลักษณะหลักที่มีความสำคัญมาก และการยอมรับรวมของเนยแข็งเชดคาร์ที่ผลิตโดยเอนไซม์เรนินตรีงรูปและเอนไซม์เรนินไม่ตรีงรูปไม่แตกต่างกันมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แม้ว่าคุณลักษณะทางสี กลิ่น และเนื้อสัมผัส จะมีความแตกต่างกันในการวิเคราะห์ผลดังกล่าว แต่ทั้ง 3 คุณลักษณะนี้ได้ถูกนำมาพิจารณาในส่วนของการยอมรับรวมด้วยดังผลที่กล่าวมาข้างต้น

หากพิจารณาจากระดับคะแนนพบว่า เนยแข็งเชดคาร์ที่ผลิตจากเอนไซม์เรนินไม่ตรีงรูปที่มีอายุการบ่ม 1 เดือน มีคุณลักษณะทางสี กลิ่น ที่ใกล้เคียงกับเนยแข็งตรา Kraft มาก ส่วนคุณลักษณะทางรสชาติและการยอมรับรวมจัดว่าค่อนข้างใกล้เคียงกับเนยแข็งตรา Kraft แต่คุณลักษณะทางด้านเนื้อสัมผัสอยู่ในระดับพอใช้เมื่อเทียบกับเนยแข็งตรา Kraft

ตารางที่ 11 ผลการประเมินคุณภาพเนยแข็งเขตकारที่ผลิตจากเอนไซม์เรนินตรงรูป
และเอนไซม์เรนินไม่ตรงรูปด้วยการวิเคราะห์ข้อมูลแบบ RCBD

คุณภาพ	IR chesse	SR chesse
สี	3.30 ^a	2.37 ^b
กลิ่น	3.25 ^b	4.00 ^a
รสชาติ ^{NS}	2.75	3.12
เนื้อสัมผัส	1.78 ^b	2.50 ^a
การยอมรับรวม ^{NS}	2.59	2.87