บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

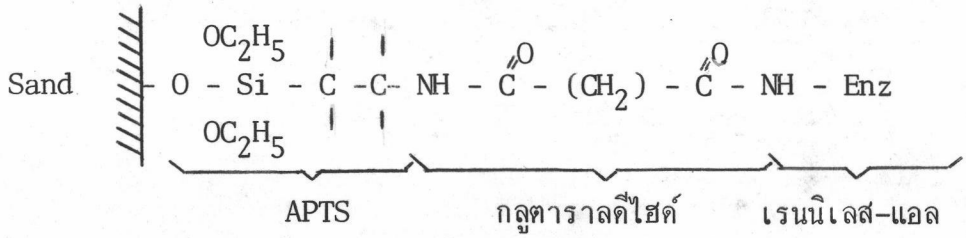
5.1 การเตรียมเอนไซม์เรนนินตรึงรูป

5.1.1 กำหนดปริมาณเอนไซม์เรนนินที่พอเหมาะในการตรึงรูป

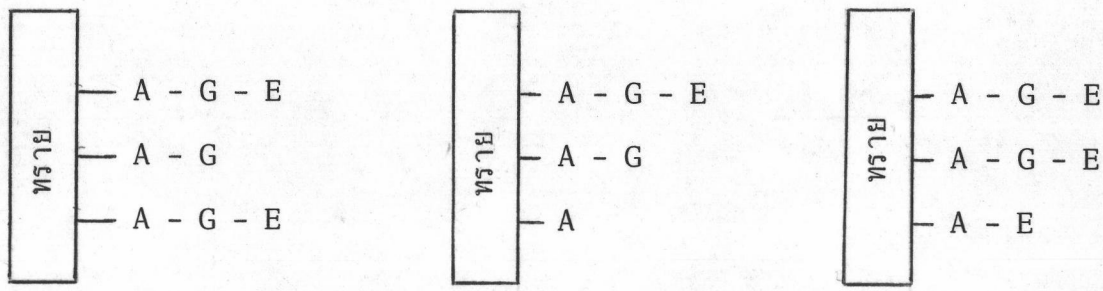
จากการทดลองในข้อ 4.1.1 พบว่าที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เรนนินที่เหมาะสมต่อการตรึงรูปเอนไซม์เรนนินตามภาวะ A_5G_1 เท่ากับ 0.10 มิลลิลิตร/มิลลิลิตรของสารละลายบัฟเฟอร์ pH 5.5 เนื่องจากให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตรสูงสุด แสดงว่าในสภาวะดังกล่าวนี้เอนไซม์เรนนินที่เกาะบน G-APTS-ทรายมีโครงสร้างสามมิติที่พอเหมาะต่อการที่สารตั้งต้น ซึ่งในที่นี้คือเคซีนเข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์เรนนินตรึงรูปที่บริเวณเร่ง (Active site) ของเอนไซม์เรนนินได้ดี สำหรับที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เรนนินมีค่าเท่ากับ 0.05 มิลลิลิตร/มิลลิลิตรของสารละลายบัฟเฟอร์ pH 5.5 เนื่องจากปริมาณเอนไซม์เรนนินน้อยกว่าเป็นผลให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตรมีค่าน้อยกว่าที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เรนนินมีค่าเท่ากับ 0.10 มิลลิลิตร/มิลลิลิตรของสารละลายบัฟเฟอร์ pH 5.5 ด้วย ส่วนที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เรนนินมีค่ามากกว่า 0.10 มิลลิลิตร/มิลลิลิตรของสารละลายบัฟเฟอร์ pH 5.5 เอนไซม์เรนนินตรึงรูปที่เตรียมได้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร น้อยกว่าเนื่องจากการที่มีปริมาณเอนไซม์เกาะบน G-APTS-ทรายในปริมาณมากขึ้นจะทำให้เกิดการบดบังกันเองของบริเวณเร่งของเอนไซม์เป็นผลให้การที่เคซีนเข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์เรนนินตรึงรูปเป็นไปได้ยากขึ้น ซึ่งก็หมายถึง steric effect

5.1.2 กำหนดความเข้มข้นของ APTS และกลูตาราลดีไฮด์ที่เหมาะสมต่อการเตรียมเอนไซม์เรนนินตรึงรูป

จากผลการทดลองในข้อ 4.1.2 เนื่องจาก APTS เป็นสารกระตุ้นให้เกิดพันธะโคเวเลนต์และกลูตาราลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะร่วม ซึ่งคาดการว่าสูตรโครงสร้างของเอนไซม์เรนนินตรึงรูปน่าจะออกมาในลักษณะ



ดังนั้นความเข้มข้นของ APTS และความเข้มข้นของกลูตาราลดีไฮด์จึงควรจะมีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปด้วยเหตุผลที่มีส่วนในการเป็นสารช่วยสร้างโครงสร้างของเอนไซม์เรนนินตรึงรูป แต่แอคติวิตีของเอนไซม์เรนนินไม่ขึ้นอยู่กับความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ APTS กับความเข้มข้นของกลูตาราลดีไฮด์ ซึ่งอธิบายได้ดังนี้



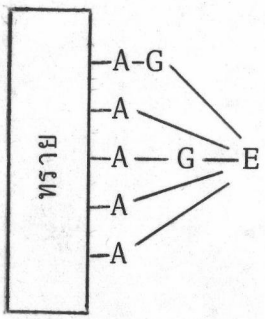
รูป ก. รูป ข. รูป ค.

พบว่ารูป ก ข และ ค มีความเข้มข้นของ A เท่ากัน แต่ความเข้มข้นของกลูตาราลดีไฮด์รูป ก มากกว่ารูป ข และ ค จะสังเกตว่ามีปริมาณเอนไซม์เกาะบน G-APTS-ทรายแตกต่างกัน นั่นแสดงว่าความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ APTS และความเข้มข้นของกลูตาราลดีไฮด์ไม่มีผลต่อปริมาณเอนไซม์เรนนินที่จะเข้ามาเกาะซึ่งเกี่ยวพันถึงแอคติวิตีของเอนไซม์เรนนินตรึงรูปด้วย

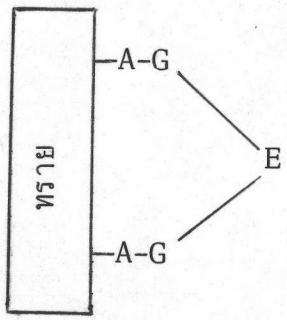
เมื่อพิจารณาถึงผลการวิเคราะห์ข้อมูลในการหาความเข้มข้นของ APTS และกลูตาราลดีไฮด์ในการตรึงรูปเอนไซม์เรนนินด้วยวิธี Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่าที่ภาวะ $A_2G_{2.5}$ และ $A_5G_{2.5}$ ให้แอคติวิตีของเอนไซม์เรนนินตรึงรูปสูงสุด การที่ความเข้มข้นของ APTS ต่างกัน แต่แอคติวิตีของเอนไซม์-เรนนินตรึงรูปมีค่าเท่ากันเป็นผลเนื่องจากแอคติวิตีของเอนไซม์เรนนินตรึงรูปไม่ขึ้นกับความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ APTS กับความเข้มข้นของกลูตาราลดีไฮด์

5.1.3 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการเกาะเกี่ยวระหว่างเอนไซม์เรนนินกับ G-APTS-ทราย ของภาวะ $A_2G_{2.5}$และ $A_5G_{2.5}$

จากผลการทดลองในข้อ 4.1.3 พบว่าภาวะ $A_5G_{2.5}$มีปริมาณการหลุดของเอนไซม์เรนนินจาก G-APTS-ทราย ร้อยละ 4.54 ซึ่งน้อยกว่าที่ภาวะ $A_2G_{2.5}$ที่มีการหลุดของเอนไซม์เรนนินจาก G-APTS-ทราย ร้อยละ 7.23



รูป ก. ($A_5G_{2.5}$)



รูป ข. ($A_2G_{2.5}$)

อธิบายตามรูปจำลองได้ว่าที่ภาวะ $A_5G_{2.5}$นั้นเอนไซม์เรนนินถูกยึดเหนี่ยวด้วยกลูตาราลดีไฮด์แข็งแรงกว่าที่ภาวะ $A_2G_{2.5}$ดังนั้นโอกาสที่เอนไซม์จะหลุดจาก G-APTS-ทราย ที่ภาวะ$A_2G_{2.5}$จึงมีสูงกว่าที่ภาวะ$A_5G_{2.5}$ จึงสรุปว่าภาวะในการเตรียมเอนไซม์เรนนินตรึงรูปที่เหมาะสมที่สุดคือ $A_5G_{2.5}$

5.1.4 กำหนดปริมาณเอนไซม์เรนนินที่พอเหมาะในการตรึงรูปที่ภาวะ $A_5G_{2.5}$

จากผลการทดลองในข้อ 4.1.4 ดังรูปที่ 15 พบว่าปริมาณเอนไซม์เรนนินที่พอเหมาะในการตรึงรูปที่ภาวะ $A_5G_{2.5}$คือ 0.050 มิลลิลิตร/มิลลิลิตรของสารละลายบัฟเฟอร์ pH 5.5 สำหรับเหตุผลของผลการทดลองนี้คงอธิบายได้เช่นเดียวกับข้อ 5.1.1 นั่นเอง

5.1.5 ศึกษาโครงสร้างของเอนไซม์ตรึงรูปเปรียบเทียบกับทรายสะอาดขนาด 50 เมช ที่ใช้เป็นตัวพยุง

พิจารณาโครงสร้างของเม็ดทรายสะอาดขนาด 50 เมช ทั้งเม็ดจากภาพถ่ายจาก Scanning electron microscope (SEM) พบว่าไม่ปรากฏความพรุนดังเช่นภาพถ่ายจาก SEM ในรูปที่ 19 ซึ่งใช้กำลังขยาย 3,500 เท่า จะเห็นความพรุนของพื้นผิวเม็ดทรายสะอาดขนาด 50 เมช ได้ดีกว่า

ส่วนภาพถ่ายจาก SEM ในรูปที่ 20 แสดงพื้นผิวของเม็ดทรายที่มีเอนไซม์เรนนินตรึงอยู่ภายใต้ภาวะ $A_5G_{2.5}$ โดยสังเกตเห็นเอนไซม์เรนนินที่ตรึงอยู่บนเม็ดทรายจะเป็นจุดขาวกระจายตัวทั่ว นั่นคือเอนไซม์เรนนินถูกตรึงบนตัวพยุงด้วยวิธีแบบเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์ได้ เมื่อเพิ่มกำลังขยายเป็น 10,000 เท่า จะปรากฏเอนไซม์เรนนินตรึงบนเม็ดทรายอย่างเด่นชัดขึ้น และบางบริเวณจะสังเกตเห็นเอนไซม์เรนนินตรึงรูปหลายโมเลกุลรวมเป็นกลุ่มใหญ่สีขาว ดังปรากฏในรูปที่ 21

5.2 ศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์เรนนินตรึงรูป

5.2.1 วัดค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์เรนนินตรึงรูปและเอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูป

ดังผลการทดลองในข้อ 4.2.1 ซึ่งพิจารณาจากรูปที่ 22 พบว่า K_m ของเอนไซม์เรนนินตรึงรูปซึ่งมีค่าเท่ากับ 4.18 ไมโครโมลาร์ มีค่าต่ำกว่า K_m ของเอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูปซึ่งมีค่าเท่ากับ 6.75 ไมโครโมลาร์ ดังนั้น K_m ของเอนไซม์เรนนินตรึงรูปมีค่าต่ำกว่า K_m ของเอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูปถึง 1.6 เท่า แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าเอนไซม์เรนนินตรึงรูปมีประสิทธิภาพในการจับสารตั้งต้นได้สูงกว่าเอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูป เนื่องจากการตรึงเอนไซม์เรนนินบนตัวพยุงมีผลให้โครงรูป (Conformation) ของเอนไซม์เรนนินอยู่ในลักษณะที่สารตั้งต้นจะเข้าจับกับบริเวณเร่งของเอนไซม์เรนนินได้ดีขึ้นทำให้เกิด ES complex สูง ซึ่งนับเป็นผลดีของการตรึงรูปเอนไซม์เรนนินบนทรายแม่น้ำสะอาดขนาด 50 เมช

5.2.2 เปรียบเทียบ pH profile ของแอคติวิตีของเอนไซม์เรนนินตรึงรูป และเอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูป

จากผลการทดลองในข้อ 4.2.2 ซึ่งพิจารณาตามรูปที่ 23 พบว่า pH profile ของแอคติวิตีของเอนไซม์เรนนินตรึงรูปและเอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูปมีลักษณะใกล้เคียงกัน อธิบายได้ว่าโดยปกติเอนไซม์เรนนินจะมีความสามารถในการทำงานได้ดีที่ pH ที่เหมาะสม และการที่เอนไซม์จับกับสารตั้งต้นจะขึ้นอยู่กับสภาพการเป็นกรดหรือด่างของ side chain ของกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ เมื่อมีการเปลี่ยน pH ไป side chain เหล่านี้อาจได้หรือสูญเสียโปรตอนไปเป็นผลให้บางส่วนของสารตั้งต้นอาจจับกับเอนไซม์เรนนินได้ดีขึ้นหรือเลวลง ทำให้ได้ลักษณะของ pH profile ของเอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูปดังปรากฏ สำหรับ pH profile

ของเอนไซม์เรนนินตรึงรูปมีลักษณะใกล้เคียงกับ pH profile ของเอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูป เพราะว่าการตรึงรูปเอนไซม์เรนนินด้วยวิธีเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์ โดยมีตัวพยุงคือทราย-แม่น้ำสะอาดขนาด 50 เมช APTS เป็นสารกระตุ้นและกลูตาราลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะร่วมไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงประจุบน side chain ของเอนไซม์เรนนิน ดังนั้นการเปลี่ยน-แปลงประจุบน side chain ของเอนไซม์เรนนินตรึงรูปจึงแปรตาม pH ของบัฟเฟอร์ที่ใช้ละลายเคซีนเช่นเดียวกับเอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูป

5.2.3 เปรียบเทียบ temperature profile ของแอคติวิตีของเอนไซม์เรนนินตรึงรูปและเอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูป

ดังผลการทดลองในข้อ 4.2.3 ในรูปที่ 24 อธิบายได้ดังนี้คือ เอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูปจะมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ระหว่าง 35-50 องศาเซลเซียส กราฟของการเปลี่ยนแปลงแอคติวิตีของเอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูปที่แปรตามอุณหภูมิมีลักษณะรูประฆังคว่ำ ในช่วงของแอคติวิตีเพิ่มขึ้นนั้นเป็นเพราะโมเลกุลของเอนไซม์เรนนินมีพลังงานจลน์มากขึ้น ซึ่งจะนำไปกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาได้ดีขึ้นจนถึงช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมจากนั้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิต่อไปอีก เอนไซม์เรนนินซึ่งเป็นโปรตีนจะเริ่มเสียสภาพธรรมชาติ (Denature) เป็นเหตุให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาลดลงเป็นผลให้แอคติวิตีลดลงด้วย

สำหรับ temperature profile ของเอนไซม์เรนนินตรึงรูปนั้นพบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์เรนนินตรึงรูปในช่วงอุณหภูมิ 0-25 องศาเซลเซียส จะต่ำกว่าเอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูปเนื่องจากเอนไซม์เรนนินตรึงรูปอยู่ในสภาพของแข็ง สารละลายเคซีน 6 กรัม/ลิตร ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 5.5 จะจับตัวกับเอนไซม์เรนนินตรึงรูปอยู่ก้นหลอดทดลอง การเขย่าหลอดไม่สามารถทำให้เอนไซม์เรนนินตรึงรูปทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นได้ทั่วถึง แต่ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอคติวิตีของเอนไซม์เรนนินตรึงรูปจะมีค่า 35-60 องศาเซลเซียส ซึ่งกว้างกว่าของเอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูป และที่อุณหภูมิสูงขึ้นไปอีก แอคติวิตีของเอนไซม์เรนนินตรึงรูปจะไม่ลดลงอย่างรวดเร็ว เช่นเอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูป เนื่องจากการตรึงรูปเอนไซม์เรนนินบนตัวพยุงที่เป็นทรายแม่น้ำสะอาดขนาด 50 เมช ช่วยรักษาสภาวะธรรมชาติของเอนไซม์เรนนินซึ่งเป็นโปรตีนที่อุณหภูมิสูงได้ เนื่องจากโปรตีนของเอนไซม์เรนนินที่ถูกตรึงบนทรายสะอาดขนาด 50 เมช ด้วยพันธะทางเคมีที่มีความแข็งแรงอยู่ในภาวะที่จะคลายเกลียวได้ยากกว่าเอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูป ดังนั้นเอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูปจะสูญเสียสภาวะธรรมชาติได้ง่ายกว่า

5.2.4 หาค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์เรนนินตรึงรูป

คำจำกัดความของแอคติวิตีจำเพาะ หมายถึง จำนวนหน่วยเอนไซม์ใน 1 มิลลิกรัมของโปรตีนในสารผสม จากผลการทดลองในข้อ 4.2.4 พบว่าเอนไซม์เรนนินตรึงรูปมีแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 6.08 กิโลหน่วยเอนไซม์เรนนินต่อมิลลิกรัม นั่นคือปริมาณโปรตีน 1 มิลลิกรัม ที่อยู่ในทรายสะอาดขนาด 50 เมช ที่มีเอนไซม์เรนนินตรึงรูปอยู่ในปริมาณ 6.08 กิโลหน่วยเอนไซม์เรนนิน

5.2.5 เสถียรภาพระหว่างการเก็บเอนไซม์เรนนินตรึงรูป

จากผลการทดลองในข้อ 4.2.5 ดังรูปที่ 25 พบว่าเอนไซม์เรนนินตรึงรูปจะมีเสถียรภาพระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิห้องเย็น (8-10 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) สูงกว่าเอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูปที่เก็บในสภาวะเดียวกัน เนื่องจากการตรึงรูปเอนไซม์ไว้บนตัวพยุงโดยใช้พันธะโคเวเลนต์ซึ่งเป็นพันธะที่มีความแข็งแรงสูง มีผลให้เอนไซม์เรนนินตรึงรูปรักษาโครงรูป (Conformation) ไว้ได้คงทนกว่าเอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูป หรืออีกนัยหนึ่งเอนไซม์เรนนินตรึงรูปมีผลกระทบต่อการเสียสภาพธรรมชาติได้ยากกว่าเอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูป

สำหรับเอนไซม์เรนนินตรึงรูปที่เก็บในสภาพอุณหภูมิห้องมีเสถียรภาพที่ต่ำกว่าเอนไซม์เรนนินตรึงรูปที่เก็บในสภาพอุณหภูมิห้องเย็น เนื่องจากอุณหภูมิสูงขึ้นมีผลให้เอนไซม์เรนนินตรึงรูปมีโอกาสแปรสภาพธรรมชาติได้ง่ายขึ้น

5.2.6 หาค่าครึ่งชีวิตของเอนไซม์เรนนินตรึงรูป

จากผลการวิจัยในข้อ 4.2.6 ซึ่งอ่านค่าครึ่งชีวิตของเอนไซม์เรนนินตรึงรูปจากรูปที่ 25 ซึ่งพบว่าค่าครึ่งชีวิตของเอนไซม์เรนนินตรึงรูปที่เก็บในอุณหภูมิห้องเย็นและอุณหภูมิห้องมีค่าครึ่งชีวิตมากกว่า 4 เดือน สิ่งที่พึงพิจารณาถึงคือปัจจัยที่มีผลให้ปรากฏค่าครึ่งชีวิตของเอนไซม์เรนนินดังกล่าว

ชนิดตัวอย่าง	แอคติวิตีสัมพัทธ์เมื่อเก็บไว้นาน 4 เดือน (%)
IR ref	82.61
SR ref	74.64
IR rot	72.46
SR rot	59.42

จากตารางข้างต้นพบว่าปัจจัยที่มีผลต่อค่าครึ่งชีวิตของเอนไซม์คือ

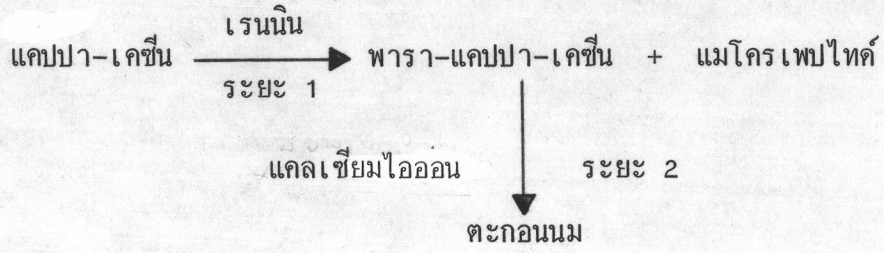
1. การตรึงรูปช่วยให้เอนไซม์เรนนินรักษาโครงรูปของเอนไซม์ไว้ได้นานกว่าเอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูป

2. อุณหภูมิสูงมีผลต่อการแปรสภาพของเอนไซม์เรนนินทั้งในสภาพตรึงรูปและในสภาพปกติได้มากกว่าที่อุณหภูมิต่ำ

5.3 ศึกษาภาวะการใช้เอนไซม์เรนนินตรึงรูปในการตกตะกอนเคซีนในน้ำนม

5.3.1 หาปริมาณเอนไซม์เรนนินตรึงรูปที่เหมาะสมต่อการตกตะกอนนม

ดังผลการทดลองในข้อ 4.3.1 ที่แสดงผลด้วยกราฟรูปที่ 26 พบว่าปริมาณเอนไซม์เรนนินตรึงรูปที่เหมาะสมต่อการตกตะกอนนม 10 มิลลิลิตรมีปริมาณ 0.43 กรัม ของเอนไซม์เรนนินตรึงรูป เมื่อพิจารณาจากปฏิกิริยาของเอนไซม์เรนนินต่อแคปปา-เคซีน (Mackinlay และ Wake, 1971) (22)



อธิบายได้ว่าเอนไซม์เรนนินตรึงรูปปริมาณ 0.43 กรัม สามารถทำให้แคปปา-เคซีนในน้ำนม 10 มิลลิลิตร เปลี่ยนเป็นพารา-แคปปา-เคซีน ได้อย่างสมบูรณ์ในระยะเวลาที่รวดเร็ว

ที่สุดและเข้าสู่ระยะ 2 ทันที ซึ่งสังเกตเห็นตะกอนนมแรกดังการทดลองในข้อ 3.3.3.1

5.3.2 เปรียบเทียบ pH profile ในการตกตะกอนนมของเอนไซม์เรนนินตรึงรูปและเอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูป

จากผลการทดลองในข้อ 4.3.2 พบว่า pH profile ในการตกตะกอนนมของเอนไซม์เรนนินตรึงรูปและเอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูปมีลักษณะใกล้เคียงกัน ดังนั้นการตรึงรูปเอนไซม์เรนนินจึงไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงประจุบน side chain ของเอนไซม์เรนนินซึ่งผลการทดลองนี้ให้ผลเสริมกับ pH profile ในด้านแอคติวิตีของเอนไซม์เรนนินตรึงรูปและเอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูป

เป็นที่สังเกตว่าในการศึกษา pH profile ในการตกตะกอนนมของเอนไซม์เรนนินตรึงรูปและเอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูปจะศึกษาระดับ pH 5.4 จนถึง pH ของน้ำนมปกติ เพราะน้ำนมจะเริ่มตกตะกอนด้วยกรดเมื่อ pH ประมาณ 5.2 เนื่องจากเป็น isoelectric point ของโปรตีนนม

5.3.3 เปรียบเทียบ temperature profile ในการตกตะกอนนมของเอนไซม์เรนนินตรึงรูปและเอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูป

จากผลการทดลองในข้อ 4.3.3 พบว่าช่วงอุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส เวลาในการตกตะกอนของเอนไซม์เรนนินตรึงรูปและเอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูปจะลดต่ำลงในลักษณะใกล้เคียงกันเพราะโมเลกุลของเอนไซม์เรนนินมีพลังงานจลน์เพิ่มขึ้น ซึ่งกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาระยะที่ 1 อย่างสมบูรณ์ได้รวดเร็ว และที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จะเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการตกตะกอนนมของทั้งเอนไซม์เรนนินตรึงรูปและเอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูปดังจะเห็นได้จากเวลาในการตกตะกอนนมต่ำที่สุด เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส เวลาในการตกตะกอนนมของเอนไซม์เรนนินตรึงรูปจะแตกต่างจากเอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูปอย่างเด่นชัด โดยเฉพาะที่เวลาตกตะกอนนมภายในเวลา 50 วินาที ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการตกตะกอนนมของเอนไซม์เรนนินตรึงรูปเท่ากับ 40-80 องศาเซลเซียส แต่ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการตกตะกอนของเอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูปเท่ากับ 40-70 องศาเซลเซียส แสดงว่าเอนไซม์เรนนินตรึงรูปด้วยการเชื่อมพันธะแบบโคเวเลนต์นี้มีผลให้โครงรูป (Conformation) ของเอนไซม์อยู่ในลักษณะที่ไม่ถูกแปรสภาพธรรมชาติไปได้ง่ายเหมือนเอนไซม์ทั่วไป ดังที่ได้อธิบายไว้ในกรณีของ temperature profile ของแอคติวิตีของเอนไซม์เรนนินตรึงรูปและเอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูป

5.3.4 ศึกษาภาวะ pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการตกตะกอนนม

จากผลการทดลองในข้อ 4.3.4 ด้วยการวิเคราะห์ข้อมูลในการหา pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดลิ่มนมด้วยวิธีวาเรียนซ์แบบสุ่มตลอดพบว่าระดับ pH และอุณหภูมิมีผลต่อเวลาในการตกตะกอนนมอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 เนื่องจากการเปลี่ยน pH ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงประจุบน side chain ของเอนไซม์เรนนินและมีผลไปสู่การจับระหว่างสารตั้งต้นกับเอนไซม์ที่บริเวณเร่ง ดังนั้นระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เรนนินต่อแคปปา-เคซีนที่จะเข้าสู่ระยะ 1 ของปฏิกิริยาของเอนไซม์เรนนินต่อแคปปา-เคซีนอย่างสมบูรณ์ จึงแปรเปลี่ยนไปด้วย สำหรับอุณหภูมิก็เช่นกัน จาก temperature profile ทราบว่าช่วงอุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส มีผลให้เวลาในการตกตะกอนนมเร็วขึ้น เพราะว่าพลังงานจลน์ในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เรนนินต่อแคปปา-เคซีนเพิ่มขึ้น แต่ที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส เวลาในการตกตะกอนนมจะช้าลงเนื่องจากเอนไซม์เรนนินตรึงรูปเริ่มแปรสภาพธรรมชาติ นอกจากนี้ยังพบว่าเวลาในการตกตะกอนนมขึ้นอยู่กับความสัมพันธ์ระหว่าง pH และอุณหภูมิของน้ำนมอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วย

จากการวิเคราะห์ผลด้วย Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่าภาวะของน้ำนมที่ pH 5.5 และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดลิ่มนมมากที่สุด เพราะที่ภาวะนี้สามารถทำให้ระยะเวลาสำหรับปฏิกิริยาของเอนไซม์เรนนินต่อแคปปา-เคซีน ในระยะที่ 1 เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ได้รวดเร็วที่สุด

5.3.5 ศึกษาความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการตกตะกอนนม

ดังผลการทดลองในข้อ 4.3.5 ตามรูปที่ 29 พบว่าความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการตกตะกอนนมมีค่าเท่ากับร้อยละ 0.091 โดยน้ำหนัก/ปริมาตรของน้ำนม เนื่องจากปฏิกิริยาของเอนไซม์เรนนินต่อแคปปา-เคซีนในระยะที่ 2 ชี้ให้เห็นชัดเจนว่าแคลเซียมเป็นปัจจัยสำคัญต่อการเกิดตะกอนนม ดังนั้นการเติมแคลเซียมคลอไรด์ลงในน้ำนมจึงมีผลให้การเข้าสู่ระยะ 2 รวดเร็วขึ้น โดยแคลเซียมเป็นตัวช่วยสร้างสะพานแคลเซียมเชื่อมโยงพารา-แคปปา-เคซีนให้ตกตะกอนเป็นลิ่มนม จากผลการทดลองข้างต้นสรุปว่าความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ร้อยละ 0.091 โดยน้ำหนัก/ปริมาตรของน้ำนมเป็นความเข้มข้นที่น้อยสุดที่ทำให้ระยะเวลาในการเกิดตะกอนนมสั้นที่สุด

5.3.6 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดลิ่มแข็งของน้ำนม

แม้จะได้ภาวะที่เหมาะสมต่อการตกตะกอนนมดังผลการทดลองในข้อ 4.3.4 แล้วก็ตาม ในการผลิตเนยแข็งสิ่งที่ยังต้องคำนึงถึงอีกก็คือ pH อุณหภูมิของน้ำนม และความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่ต้องเติมลงในน้ำนม วิธีการศึกษาปรากฏในข้อ 3.3.3.6 ผลการทดลองดังข้อ 4.3.6 ซึ่งแสดงการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธีวาเรียนซ์แบบสุ่มตลอด พบว่าความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่ต้องเติมลงในน้ำนม pH และอุณหภูมิของน้ำนมมีผลต่อความแข็งของลิ่มนม (Curd firmness) อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 นอกจากนี้ความสัมพันธ์ของ 2 ตัวแปรในแต่ละคู่และความสัมพันธ์ของ 3 ตัวแปรยังมีผลต่อความแข็งของลิ่มนมอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 ซึ่งสรุปได้ว่า pH ของน้ำนมมีผลต่อระยะที่ 1 ของการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เรนนินกับแคปปา-เคซีน นั่นหมายถึง pH ของน้ำนมมีผลต่อปริมาณของพารา-แคปปา-เคซีนที่จะเกิดขึ้น และพารา-แคปปา-เคซีน ก็จะดำเนินเข้าสู่ระยะที่ 2 เป็นผลให้ได้ตะกอนนมซึ่งหากพารา-แคปปา-เคซีนมีปริมาณมาก ร่างแหของพารา-แคปปา-เคซีน ก็จะมีมากขึ้น นั่นคือความแข็งของลิ่มนมก็จะมีมากตามมาด้วย ดังนั้น pH ของน้ำนมจึงมีผลต่อความแข็งของลิ่มนม สำหรับอุณหภูมิของน้ำนมก็มีผลต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์เรนนินกับแคปปา-เคซีน ดังอธิบายในข้อ 5.3.3 และอุณหภูมิของน้ำนมมีผลต่อปริมาณของพารา-แคปปา-เคซีนเช่นเดียวกับ pH ซึ่งจะมีผลต่อความแข็งของลิ่มนมด้วย นอกจากนี้การเกิดสะพานแคลเซียมเชื่อมต่อพารา-แคปปา-เคซีน ให้เกิดลักษณะร่างแหนั้น pH และอุณหภูมิก็มีผลต่อความแข็งแรงของสะพานแคลเซียมด้วย ซึ่งก็เป็นอีกเหตุผลหนึ่งว่า pH และอุณหภูมิของน้ำนมมีผลต่อความแข็งของลิ่มนม ส่วนความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์มีผลต่อความแข็งของลิ่มนมอย่างแน่นอน เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เรนนินต่อแคปปา-เคซีนในระยะ 2 ต้องอาศัยแคลเซียมในการเชื่อมต่อโมเลกุลของพารา-แคปปา-เคซีนทำให้เกิดตะกอนนม หากปริมาณแคลเซียมสูงความแข็งแรงของร่างแหก็น่าจะสูงตามนั่นคือความแข็งของลิ่มนมขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของแคลเซียม-คลอไรด์ที่เติมลงในน้ำนมด้วย

จากการวิเคราะห์ข้อมูลด้วย Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่าภาวะการเกิดลิ่มแข็งของน้ำนมได้ดีที่สุดมี 3 ภาวะ แต่เลือกภาวะที่ใช้น้ำนมที่มี pH 5.9 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ไม่ต้องเติมแคลเซียมคลอไรด์ในน้ำนม เพราะว่าในน้ำนมปกติมีแคลเซียมประมาณร้อยละ 0.123 โดยน้ำหนัก/ปริมาตร ซึ่ง

เพียงพอต่อการสร้างสะพานแคลเซียมแล้ว ส่วนอีก 2 ภาวะนั้นมีการเติมแคลเซียมคลอไรด์ลงในน้ำนม ไม่มีความจำเป็นและเป็นการยุ่งยากรวมทั้งสิ้นเปลือง จึงไม่พิจารณา 2 ภาวะนี้ ภาวะที่เลือกใช้ดังกล่าวข้างต้นจะนำมาเป็นภาวะในการทดลองเบื้องต้นในการผลิตเนยแข็งเชดดาร์

5.4 การทดลองเบื้องต้นในการผลิตเนยแข็งเชดดาร์

5.4.1 การผลิตเนยแข็งเชดดาร์

ก. การเตรียมสตาร์ตเตอร์

ลักษณะของสตาร์ตเตอร์ที่เตรียมได้ตามข้อ 4.4.1 แสดงว่าวิธีการเตรียมสตาร์ตเตอร์ในข้อ ก. ของ 3.3.4.1 นั้นเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสำหรับการเตรียมสตาร์ตเตอร์ชนิด Streptococcus lactis เพื่อใช้เปลี่ยนน้ำตาลแลคโตสเป็นกรดแลคติคซึ่งเป็นประโยชน์ต่อผลิตภัณฑ์นมหลายชนิด อาทิเช่น เนยแข็ง

ข. วิธีการผลิตเนยแข็งเชดดาร์ โดยใช้ถังแสตนเลส 2 ชั้น ที่มีขนาด 16 × 12 × 12 นิ้ว ซึ่งมีขนาดบรรจุน้ำนมสำหรับผลิตเนยแข็ง 10 ลิตร และควบคุมอุณหภูมิของน้ำนมที่บรรจุในถังกวนให้คงที่ตลอดเวลาด้วยน้ำที่ปรับอุณหภูมิอยู่ชั้นนอกของถังกวน ในขั้นแรกปรับอุณหภูมิของน้ำนมเป็น 38 องศาเซลเซียส เพื่อให้เหมาะสมกับการเปลี่ยนน้ำตาลแลคโตสในน้ำนมให้เป็นกรดแลคติคโดยสตาร์ตเตอร์ชนิด Streptococcus lactis เมื่อ pH ของน้ำนมลดต่ำลงถึงระดับ 5.9 จึงเพิ่มอุณหภูมิของน้ำนมขึ้นเป็น 40 องศาเซลเซียส เพื่อให้ได้ภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เรนนินต่อแคปปา-เคซีนในนม แล้วจึงนำตะแกรงที่บรรจุเอนไซม์เรนนินตรึงรูปจุ่มลงถังกวนที่มีน้ำนม กวนน้ำนมนาน 10 นาที เพื่อให้เอนไซม์เรนนินเปลี่ยนแคปปา-เคซีนไปเป็นพารา-แคปปา-เคซีนได้อย่างสมบูรณ์ แล้วจึงยกตะแกรงขึ้นเพื่อแยกเอนไซม์เรนนินตรึงรูปออกจากน้ำนม และนำเอนไซม์เรนนินตรึงรูปกลับมาผลิตเนยแข็งได้ใหม่ การตั้งพักน้ำนมนี้ไว้ 20 นาที เพื่อให้พารา-แคปปา-เคซีน เกิดการเชื่อมข้ามกันด้วยสะพานแคลเซียมอย่างสมบูรณ์จะได้ลิ่มนมที่มีความแข็งที่ดี จากนั้นมีการตัดลิ่มนมให้ได้ขนาด 3/4 นิ้ว× 3/4 นิ้ว แล้วกวนลิ่มนมให้ทั่วโดยมีวัตถุประสงค์ให้ลิ่มนมขนาดเล็ก ๆ นี้เกิดการรัดตัวแล้วปล่อยเวย์จากลิ่มนมได้มากเท่าที่จะเป็นได้ ในขั้นตอนการระบายเวย์ออกจากถังนมนี้เพราะต้องการเพียงส่วนของลิ่มนมที่จะดำเนินสู่ขั้นตอนการผลิตเนยแข็งเชดดาร์ต่อไป มีการเติมเกลือในปริมาณร้อยละ 2.5 ของน้ำหนักลิ่มนม เพื่อช่วยไล่เวย์จากลิ่มนม ชะงักการผลิตกรดแลคติคโดยสตาร์ต-

เตอร์ และช่วยปรับรสชาติของเนยแข็งเชดดาร์ให้ดีขึ้น การขึ้นรูปเนยแข็งด้วยพิมพ์นอกจากเพื่อให้ได้รูปร่างของเนยแข็งที่ชวนบริโภคแล้วยังมีวัตถุประสงค์เพื่อสะดวกต่อการเคลื่อนย้ายในขั้นตอนการบ่ม ตกแต่ง และบรรจุหีบห่อด้วย การบ่มเนยแข็งเชดดาร์เพื่อให้ได้เนยแข็งที่มีและรสชาติที่ดี

ส่วนสำคัญที่สุดในการทดลองขั้นนี้คือ การใช้เอนไซม์เรนนินตรึงรูปผลิตเนยแข็งเชดดาร์แทนเอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูปโดยใช้ถังกวน นอกจากสามารถแยกเอนไซม์เรนนินตรึงรูปได้ด้วยตะแกรงลวดที่มีขนาดของรูตะแกรง 200 เมชแล้ว เนยแข็งเชดดาร์ก่อนบ่มที่ผลิตจากเอนไซม์เรนนินตรึงรูปให้ลักษณะปรากฏคือ สี กลิ่น เนื้อสัมผัสที่ใกล้เคียงกันมาก

5.4.2 วิเคราะห์คุณภาพเนยแข็งประเภทเชดดาร์เมื่อเริ่มบ่ม

จากผลการทดลองในข้อ 4.4.2 แสดงว่าเนยแข็งเชดดาร์ก่อนบ่มที่ผลิตด้วยเอนไซม์เรนนินตรึงรูปและเอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูปมีคุณภาพด้านปริมาณความชื้น ไขมัน และโปรตีนใกล้เคียงกัน แสดงว่าเอนไซม์เรนนินตรึงรูปนอกจากจะมีประสิทธิภาพในการตกตะกอนโปรตีนนมได้เช่นเดียวกับเอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูปแล้วยังเหนี่ยวนำไขมันให้ตกตะกอนมาพร้อมกับโปรตีนนมได้ นอกจากนี้ปริมาณความชื้นใกล้เคียงกันแสดงว่าในขั้นตอนการไล่เวย์ออกจากลิ่มนมตลอดจนช่วงการระเหยน้ำออกจากลิ่มนมในการผลิตเนยแข็งเชดดาร์จากเอนไซม์เรนนินตรึงรูปมีประสิทธิภาพใกล้เคียงการผลิตเนยแข็งเชดดาร์จากเอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูป

เมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษาของ Ohmiya และคณะ, 1975 (34) ซึ่งใช้ Alkaline protease ที่ตรึงไว้บน Dowex MWA-1 ด้วยกลูตาราลดีไฮด์แล้วนำมาพัฒนาเข้าสู่กระบวนการผลิตเนยแข็งเชดดาร์ ผลการตรวจคุณภาพของเนยแข็งเชดดาร์ทางปริมาณความชื้น ไขมัน และโปรตีน พบว่าให้ค่าในทุกคุณภาพที่ตรวจสอบใกล้เคียงกับผลการตรวจสอบเนยแข็งเชดดาร์ดังกล่าวข้างต้น

5.4.3 ศึกษาประสิทธิภาพของการนำเอนไซม์เรนนินตรึงรูปกลับมาใช้ใหม่

ในผลการทดลองในข้อ 4.4.3 แสดงว่าสามารถนำเอนไซม์เรนนินตรึงรูปกลับมาใช้ใหม่ได้ โดยลิ่มนมเกิดได้อย่างสมบูรณ์ แต่เวลาการเกิดลิ่มนมจะช้าลงบ้างเล็กน้อยตามจำนวนครั้งที่นำเอนไซม์เรนนินตรึงรูปกลับมาใช้ใหม่ เนื่องจากในแต่ละครั้งที่ใช้เอนไซม์เรนนินตรึงรูปทำปฏิกิริยากับโปรตีนนมอาจถูกกระทบกระเทือนด้วยแรงเขย่าเป็นผลให้เอนไซม์

เรนนินตรึงรูปกลับมาใช้ใหม่อาจมีสารบางอย่างในน้ำนม อาทิเช่น ไขมัน เกลือแร่ ติดมากับเอนไซม์เรนนินตรึงรูปและไม่สามารถแยกออกโดยการล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ pH 5.5 ได้หมด สารประกอบดังกล่าวนี้จะกั้นและบดบังบริเวณเร่งของเอนไซม์เรนนินตรึงรูปได้

5.4.4 การทดสอบทางประสาทสัมผัส

จากผลการทดสอบในข้อ 4.4.4 ซึ่งทดสอบทางประสาทสัมผัสระหว่างเนยแข็งเชดดาร์ที่ผลิตด้วยเอนไซม์เรนนินตรึงรูปและเอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูป โดยใช้เนยแข็งตรา Kraft เป็นมาตรฐาน ดังวิธีการในข้อ 3.3.4.4 พบว่ารสชาติซึ่งเป็นคุณลักษณะสำคัญที่พิจารณาถึงรวมทั้งการยอมรับรวม ซึ่งแสดงถึงการยอมรับผลิตภัณฑ์ในภาพรวมของทุกคุณลักษณะไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แม้ว่าคุณลักษณะทางสี กลิ่น และเนื้อสัมผัสของเนยแข็งเชดดาร์ที่ผลิตโดยเอนไซม์เรนนินตรึงรูปมีความแตกต่างจากเนยแข็งเชดดาร์ที่ผลิตโดยเอนไซม์เรนนินไม่ตรึงรูป เนื่องจากปริมาณแคโรทีนซึ่งให้สีเหลืองแก่น้ำนมที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเนยแข็งเชดดาร์อาจมีปริมาณต่างกัน เป็นผลให้ผลิตภัณฑ์มีสีแตกต่างกันด้วย และเทคนิคการผลิตเนยแข็งเชดดาร์ยังไม่ชำนาญนักเป็นผลให้เนื้อสัมผัสและกลิ่นแตกต่างกันด้วย

หากพิจารณาจากคะแนนในทุกคุณลักษณะของเนยแข็งเชดดาร์ที่ผลิตด้วยเอนไซม์เรนนินตรึงรูปอายุการบ่ม 1 เดือน กับเนยแข็งตรา Kraft ที่มีคะแนนในทุกคุณลักษณะเต็ม5 คะแนน ได้ผลดังข้อ 4.4.4 พบว่าสีและกลิ่นใกล้เคียงมากกับเนยแข็งเชดดาร์ตรา Kraft รสชาติและการยอมรับรวมค่อนข้างใกล้เคียงเนยแข็งเชดดาร์ตรา Kraft แต่เนื้อสัมผัสเมื่อเทียบกับเนยแข็งตรา Kraft อยู่ในระดับพอใช้ ดังนั้นสรุปว่าเอนไซม์เรนนินตรึงรูปใช้ผลิตเนยแข็งเชดดาร์ที่มีคุณลักษณะบางประการใกล้เคียงเนยแข็งเชดดาร์ตรา Kraft หากเนยแข็งเชดดาร์ที่ผลิตด้วยเอนไซม์เรนนินตรึงรูปมีอายุการบ่มที่นานประมาณ 6-12 เดือน อาจจะมีคุณลักษณะทุกประการเช่นเดียวกับเนยแข็งตรา Kraft ก็เป็นได้