บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. วัสดุ

1.1 วัตถุดิบ

1.1.1 พืชสด 71 ชนิด จาก 18 วงศ์ แสดงดังตาราง 5 ซื้อจากตลาดสดใน. อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา เก็บจากสวนสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา และจังหวัดใกล้เคียง โดยซื้อหรือเก็บตัวอย่างในถุงโพลีเอทิลีน นำมาสกัดทันทีหรือเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ไม่เกิน 12 ชั่วโมง

1.1.2 หางนมผง (Low-heat skimmed milk powder) ยี่ห้อ Hi-media สำหรับศึกษากิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อน

1.1.3 น้ำนมวัวดิบ จากคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำหรับผลิตคอทเทจชีสสเปรด

1.1.4 แบคทีเรีย *Streptococcus lactis* จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

1.1.5 เอนไซม์เรนนิน ผลิตจาก *Aspergilus niger* var. *awamori* ยี่ห้อ CHY-MAX ประเทศเดนมาร์ค

1.1.6 ครีมคอทเทจชีส สเปรด (cream cottage cheese spread) ยี่ห้อไลท์ฟิลาเดลเฟีย (Light Philladelphia) (ไขมันน้อยกว่าร้อยละ 54)

ตาราง 5 วงศ์พืชและส่วนต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษา

Families and part of plants in the experiment

Families	No.	Common name	Scientific name	Part of plant					
				1	2	3	4	5	6
Cucurbitaceae	1	ฟักเขียว	*Benincasa cerifera*			X			
	2	แตงกวา	*Cucumis sativus*			X			
	3	แตงกวาร้าน	*Cucumis sativus*			X			
	4	แตงไท	*Cucumis melo*			X			
	5	แตงส้ม	*Cucumis sp.*			X			
	6	บวบเหลี่ยม	*Luffa acutangula*			X			
	7	บวบหอม	*Luffa cylindrica*			X			
	8	มะระจีน	*Monordica charantia*			X			
	9	มะระขี้นก	*Monordica charantia*			X			
	10	มะระหวาน	*Monordica sp.*			X			
	11	ฟักทอง	*Cucurbita pepo*			X			
	12	ตำลึง	*Coccinia indica*		X	X			
	13	น้ำเต้า	*Lagenaria siceraria*			X			
	14	ซูกินี	*Cucurbita pepo*			X			
Leguminosae-	15	มะขามแขก	*Cassia acutifolia*			X			
Caesalpiniodeae	16	ขี้เหล็กบ้าน	*Cassia siamea*	X					
	17	กระถิน	*Leucaena glavca*				X		
	18	คูน	*Cassia fistula*	X					
	19	ชงโค	*Bauhinia pottsii*	X			X		
	20	โยทะกา	*Bauhinia monandra*	X			X		

Note: 1=Flower; 2=Leaf; 3=Fruit; 4=Seed; 5=Tuber; 6= Stem

ตาราง 5 (ต่อ)

(Continued)

Families	No.	Common name	Scientific name	Part of plant					
				1	2	3	4	5	6
Leguminosae-	21	แคบ้าน	*Sesbania granadiflora*	X					
Papilionoideae	22	มะกล่ำตาหนู	*Abrus precatorius*	X			X		
	23	มะกล่ำเผือก	*Abrus fruticulosus*	X			X		
	24	อัญชัน	*Clitorea ternatea*				X		
	25	ถั่วลันเตา	*Pisum sativum*				X		
	26	ถั่วแขก	*Phaseolus vulgaris*				X		
Leguminosae-	27	ฉำฉา	*Samanea Saman*	X			X		
Minosoideae	28	มะขามเทศ	*Pithecellobium dulce*				X		
	29	ชะอม	*Acacia pennata*		X				
	30	เนียงนก	*Archidendron bubalium*				X		
Compositae	31	ผักคราดหัวแหวน	*Spilanthes acmella*	X					
	32	บานชื่น	*Zinnia elegans*	X					
	33	ดาวเรือง	*Tagetes erecta*	X					
	34	หญ้าละออง	*Vernonia cinerea*	X					
	35	หนาด	*Blumea balsamifera*	X					
	36	ตีนตุ๊กแก	*Tridax procumbens*	X					
Solanaceae	37	มะเขือพวง	*Solanum torvum*			X			
	38	มะเขือยาวม่วง	*Solanum melongena*			X			
	39	มะเขือยาวขาว	*Solanum melongena*			X			

Note: 1=Flower; 2=Leaf; 3=Fruit; 4=Seed; 5=Tuber; 6= Stem

ตาราง 5 (ต่อ)

(Continued)

Families	No.	Common name	Scientific name	Part of plant					
				1	2	3	4	5	6
Solanaceae	40	มะแว้งเครือ	*Solanum indicum*			X			
	41	ลำโพง	*Datura metal*		X				
	42	มะเขือเทศสีดา	*Solanum sp.*			X			
	43	มะเขือเทศท้อ	*Solanum sp.*			X			
	44	มะเขือเหลือง	*Solanum xanthocarpum*			X			
	45	มะเขือเปราะ	*Solanum aculeatissimum*			X			
	46	มะเขือตอแหล	*Solanum sp.*			X			
	47	มะเขือไข่เต่า	*Solanum sp.*			X			
	48	มะเขือลาย	*Solanum sp.*			X			
	49	มะเขือม่วงเล็ก	*Solanum sp.*			X			
	50	มะเขือขืน	*Solanum sp.*			X			
	51	มันฝรั่ง	*Solanum tuberosum*					X	
Moraceae	52	ยางน่อง	*Antiaris toxicarica*		X				
	53	สาเก	*Artocarpus altilis*			X			
	54	ขนุน	*Artocarpus heterphyllus*			X			
	55	หม่อน	*Morus alba*			X			
Araceae	56	บุก	*Amorphophallus campanulatus*					X	
	57	เผือก	*Colocasia esclenta*					X	
	58	สิงหโมรา	*Cyrtosperma johnstoni*	X					
	59	เดหลีใบกล้วย	*Spathiphyllum cannaefolium*						X

Note: 1=Flower; 2=Leaf; 3=Fruit; 4=Seed; 5=Tuber; 6= Stem

ตาราง 5 (ต่อ)

(Continued)

Families	No.	Common name	Scientific name	Part of plant					
				1	2	3	4	5	6
Asclepiadaceae	60	นมตำเลีย	*Hoya ovalifolia*		X				
Euphorbiaceae	61	มะขามป้อม	*Phyllanthus emblica*			X			
Gutttiferae	62	ชะมวง	*Garcinia cowa*		X				
Rubiaceae	63	ยอบ้าน	*Morida citrifolia*			X			
	64	ยอป่า	*Morida sp.*			X			
Anacardiaceae	65	มะปรางหวาน	*Bouea burmanica*			X			
Malvaceae	66	กระเจี๊ยบแดง	*Hibiscus sabdariffa*			X			
	67	กระเจี๊ยบเขียว	*Abelmochus esculentus*			X			
Zingiberaceae	68	กาหลา	*Nicolaia speciosa*	X					
Umbellifere	69	แครอท	*Daucus carota*					X	
Cruciferae	70	หัวไชเท้า	*Raphanus sativus*					X	
Amaranthaceae	71	บานไม่รู้โรย	*Gomphrena globosa*	X					

Note: 1=Flower; 2=Leaf; 3=Fruit; 4=Seed; 5=Tuber; 6= Stem

1.2 สารเคมี (ภาคผนวก ก)

1.2.1 สารละลายซิเตรต บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.0 5.9 และ 6.2

1.2.2 สารละลายอะซิเตต บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.0 และ 5.6

1.2.3 สารเคมีสำหรับการทดสอบกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อน

1.2.4 สารเคมีสำหรับการตรวจวัดกิจกรรมย่อยสลายโปรตีนและปริมาณโปรตีน

1.2.5 เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

1.2.6 สารเคมีสำหรับการทดสอบคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์

1.2.7 สารเคมีสำหรับตรวจวัดปริมาณโปรตีน ไขมัน กรดแลกติก และแคลเซียม

1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ข)

1.3.1 อาหาร De Man Rogusa Sharpe (MRS) บริษัท Merck

1.3.2 อาหาร Lauryl Sulfate Tryptone (LST) Broth บริษัท Merck และ EC Broth บริษัท Merck

1.3.3 อาหาร Plate Count Agar (PCA) บริษัท Merck

1.3.4 อาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) บริษัท Merck

1.3.5 อาหาร Baird Parker Agar (BPA) บริษัท Merck

2. อุปกรณ์

2.1 อุปกรณ์สำหรับการสกัด การทำบริสุทธิ์บางส่วนและศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดเอนไซม์

2.1.1 เครื่องบดผสมยี่ห้อ Braun รุ่น MR 400 CA ประเทศสเปน

2.1.2 เครื่องโฮโมจีไนส์เซอร์ ยี่ห้อ Ultra turrax รุ่น T25B ประเทศมาเลเซีย

2.1.3 เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Sorvall รุ่น RC-5B plus ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.1.4 เครื่องหมุนเหวี่ยง Micorfuge ยี่ห้อ Eppendorf รุ่น 5415C ประเทศเยอรมัน

2.1.5 อ่างควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ W 350 รุ่น Memmert ประเทศเยอรมัน

2.1.6 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น UV-1601 ประเทศออสเตรเลีย

2.1.7 เครื่องวัดค่าพีเอช ยี่ห้อ Scientific รุ่น Denver 15 ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.1.8 เครื่องทำแห้งที่อุณหภูมิจุดเยือกแข็ง (Freeze dry) ยี่ห้อ Dura-Top/Dura- Dry MR รุ่น TD 97A 001

2.1.9 ถุงไดอะไลซิส (MW. Cut off 12 -14 กิโลดาลตัน) ยี่ห้อ Cellusep

2.1.10 เครื่องผสม ยี่ห้อ Velp scientifica รุ่น ZX^3 ประเทศอิตาลี

2.2 อุปกรณ์สำหรับการผลิตคอทเทจชีส สเปรด

2.2.1 หลอดเหวี่ยงแยกที่สามารถฆ่าเชื้อได้ยี่ห้อ Nalgene รุ่น Oak Ridge Centrifuge ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.2.2 เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Eppendorf รุ่น 5403

2.2.3 อ่างควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ W 350 รุ่น Memmert ประเทศเยอรมัน

2.2.4 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ LMS รุ่น VS-8480 RS-L ประเทศญี่ปุ่น

2.2.5 ตู้อบอากาศร้อนยี่ห้อ Memmert

2.2.6 ตู้ปลอดเชื้อ ยี่ห้อ Holten รุ่นMaxi Safe 2010 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ยี่ห้อ Tomy รุ่น ss-325 ประเทศญี่ปุ่น

2.2.7 ตู้เก็บเชื้ออุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส ยี่ห้อ Sanyo รุ่น SF C 69 ประเทศญี่ปุ่น

2.3 อุปกรณ์สำหรับตรวจวัดคุณสมบัติผลิตภัณฑ์คอทเทจชีส สเปรด

2.3.1 เครื่อง Texture analyzer ยี่ห้อ Stable Micro System รุ่น TA-XT2

2.3.2 เครื่องวัดสี Hunter Lab ยี่ห้อ Color Flex

3. การวิเคราะห์

3.1 การทดสอบกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อน (milk clotting activity, MCA)

ดัดแปลงจากวิธีของ Berridge (IDF standard, 1987 อ้างโดย Irigoyen *et al*., 2001)

1. เตรียมสับสเตรต โดยละลายหางนมผง 12 กรัม ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2 2H_2O$)เข้มข้น 0.01 โมลาร์ พีเอช 6.5 ปริมาตร 100 มล.

2. ทดสอบกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อน โดยนำสารสกัดเอนไซม์จากพืช ปริมาตร 0.2 มล.ทำปฏิกิริยากับสับสเตรตปริมาตร 2 มล. ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จับเวลาที่นมจับตัวเป็นก้อน (milk clotting time) โดยจะเกิดตะกอนนมก้อนเล็ก ๆ ติดข้างหลอดภายในระยะเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ที่ทำให้นมจับตัวเป็นก้อน (milk clotting activity, MCA) (Kuo *et al*., 1996) จากสมการ

$$MCA = \frac{(P \times f)}{t} \qquad (1)$$

เมื่อ P คือ เวลา (วินาที) ที่นมจับตัวเป็นจุดที่ข้างหลอดเมื่อเติมเอนไซม์เรนนินปริมาตร 0.2 มล.(2 มก./มล.) ลงในสับสเตรตปริมาตร 2 มล. ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากการทดลองค่า P เท่ากับ 130±5 วินาที

f คือ dilution factor ของสารสกัดเอนไซม์ คำนวณจากปริมาณสารสกัดเอนไซม์จากพืชที่สกัดได้ (มล.) หารด้วยน้ำหนักตัวอย่างพืชสดที่ใช้ (กรัม)

t คือ เวลา (วินาที) ที่นมจับตัวเป็นก้อนหลอด (milk clotting time)

ตัวอย่างการคำนวณกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อน

ตัวอย่างพืชสด 10 กรัม สกัดด้วยสารละลายซิเตรต บัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.9 ปริมาตร 10 มล.ได้สารสกัดเอนไซม์ปริมาตร 13 มล. มีค่า dilution factor เท่ากับ 1.3 นำไปทดสอบกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนและคำนวณกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนจากสมการ (1)

$$MCA = \frac{(130X\ 1.3)}{(180X60)}$$

= 0.0156 ยูนิต/ 0.2 มล.

= 0.0782 ยูนิต/ มล.

หรือ

$$MCA = \frac{0.0782\ \text{ยูนิต / มล. X ปริมาณสารสกัดเอนไซม์ (มล.)}}{\text{น้ำหนักพืชสด (กรัม)}}$$

$$= \frac{0.0782\ \text{ยูนิต/มล. X 13 มล.}}{10\ \text{กรัม}}$$

= 0.1017 ยูนิต/ กรัม

นั่นคือ สารสกัดเอนไซม์จากพืชสด 10 กรัม มีกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อน 0.1017 ยูนิต/ ตัวอย่าง 1 กรัม

3.2 **ปริมาณโปรตีน** (protein determination) ในเอนไซม์และสารสกัดเอนไซม์จากพืช (ภาคผนวก ค)

3.3 **กิจกรรมจำเพาะทำให้นมจับตัวเป็นก้อน** (specific milk clotting activity, SMA) ในเอนไซม์และสารสกัดเอนไซม์จากพืช

กิจกรรมจำเพาะทำให้นมจับตัวเป็นก้อนคำนวณจาก

$$SMA = \frac{\text{กิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อน (ยูนิต /ตัวอย่าง 1 กรัม)}}{\text{โปรตีน (มก./ ตัวอย่าง 1กรัม)}}$$

3.4 **การทดสอบกิจกรรมย่อยสลายโปรตีน** (proteolytic activity, PA) ในเอนไซม์และสารสกัดเอนไซม์จากพืช (ภาคผนวก ค)

3.5 การตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติของผลิตภัณฑ์คอทเทจชีส สเปรด (ภาคผนวก ค)

3.5.1 ศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของผลิตภัณฑ์คอทเทจชีส สเปรด

3.5.1.1 ตรวจวัดความชื้นด้วยวิธี Gravimetric (AOAC, 1999)

3.5.1.2 ตรวจวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Kjeldahl (AOAC, 1999)

3.5.1.3 ตรวจวัดปริมาณไขมันด้วยวิธี Werner schmid (Egan *et al.*, 1981)

3.5.1.4 ตรวจวัดค่าพีเอชด้วยเครื่อง วัดพีเอช (AOAC, 1999)

3.5.1.5 ตรวจวัดปริมาณกรดแลกติกด้วยวิธี Tritration (AOAC, 1999)

3.5.1.6 ตรวจวัดปริมาณแคลเซียมด้วยวิธี Atomic Absorption Spectrophotometric (AOAC, 1999)

3.5.2 ศึกษาคุณสมบัติทางจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์คอทเทจชีส สเปรด

3.5.2.1 ตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (total bacteria) ในอาหาร PCA โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (mesophilic bacteria)

3.5.2.2 ตรวจวิเคราะห์ปริมาณโคลิฟอร์ม (coliform) ในอาหาร LST Broth และ อี-โคไล (*E.coli*) ในอาหาร EC Broth โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

3.5.2.3 ตรวจวิเคราะห์ปริมาณ *Staphylococcus aureus* ในอาหาร BP Agar โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

3.5.2.4 ตรวจวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียที่ผลิตกรด (lactic acid bacteria) ในอาหาร MRS Agar โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.5.2.5 ตรวจวิเคราะห์ปริมาณยีสต์และรา (yeast and mold) ในอาหาร PDA โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

3.5.3 ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของผลิตภัณฑ์คอทเทจชีส สเปรด

3.5.3.1 วัดความแข็งและความนิ่มของผลิตภัณฑ์คอทเทจชีส สเปรดด้วยเครื่อง Texture analyzer

3.5.3.2 วัดค่าสีของผลิตภัณฑ์คอทเทจชีส สเปรด ด้วยเครื่องวัดสี

4. วิธีการทดลอง

วิธีการทดลองประกอบด้วยขั้นตอนหลัก ๆ 5 ขั้นตอนดังนี้

4.1 การคัดเลือกชนิดของพืชที่มีกิจกรรมเอนไซม์ทำให้นมจับตัวเป็นก้อน

4.2 การคัดเลือกชนิดของสารสกัดที่เหมาะสม

4.3 ศึกษาการทำบริสุทธิ์บางส่วนของสารสกัดเอนไซม์

4.4 ศึกษาผลของสารประกอบฟีนอลต่อกิจกรรมของเอนไซม์จากพืช

4.5 ศึกษาการผลิตคอทเทจชีส สเปรดด้วยเอนไซม์จากฟักเขียว

4.1 การคัดเลือกชนิดของพืชที่มีกิจกรรมเอนไซม์ทำให้นมจับตัวเป็นก้อน

ทำการสกัดเอนไซม์จากส่วนต่าง ๆ ของพืชสด 71 ชนิด แสดงดังตาราง 5 ด้วยสารละลายซิเตรต บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.9 โดยดัดแปลงวิธีการสกัดจากวิธีของ Sousa และ Malcata (1998a) ดังนี้

4.1.1 ล้างทำความสะอาดพืชด้วยน้ำประปา ตัดแต่ง แยกส่วนที่ไม่ใช้ในการทดลองทิ้ง และนำส่วนที่ใช้ในการทดลองมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 0.5X0.5 ซม. บดตัวอย่างพืชด้วยเครื่องบดของแห้งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที

4.1.2 ชั่งน้ำหนักตัวอย่างพืชที่บดแล้ว 10 กรัม เติมสารละลายซิเตรต บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.9 ปริมาตร 10 มล.นำมาโฮโมจิไนส์ที่ความเร็วรอบ 11,000 รอบ/วินาที เป็นเวลา 30 วินาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส กวนตัวอย่างเป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.1.3 กรองตัวอย่างด้วยผ้าขาวบาง นำส่วนใสที่กรองได้ไปเหวี่ยงแยกที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบ/วินาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บสารละลายส่วนใสหรือสารสกัดเอนไซม์จากพืชที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทดสอบกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนของสารสกัดเอนไซม์จากพืชโดยดัดแปลงวิธีของ Berridge จากนั้นคัดเลือกชนิดพืชที่ทำให้นมจับตัวเป็นก้อนที่อุณหภูมิ 30$\pm$1 องศาเซลเซียส ภายในระยะเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำเวลา (วินาที) ที่ทำให้นมจับตัวเป็นก้อนของสารสกัดเอนไซม์จากพืช (milk clotting time, MCT) เปรียบเทียบกับเวลาทำให้นมจับตัวเป็นก้อนของเอนไซม์เรนนินทางการค้า และคำนวณหากิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อน (milk clotting activity, MCA) (การวิเคราะห์ข้อ 3.1) วัดปริมาณโปรตีน (protein content) ของสารสกัดเอนไซม์จากพืช ด้วยวิธี Lowry (ภาคผนวก ค 1.1) และคำนวณกิจกรรมจำเพาะทำให้นมจับตัวเป็นก้อน (การวิเคราะห์ข้อ 3.3)

4.2 การคัดเลือกชนิดของสารสกัดที่เหมาะสม

ทำการสกัดเอนไซม์จากพืชที่คัดเลือกได้ในสภาวะเดียวกันกับการทดลองข้อ 4.1 แต่ทำการสกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 2 ชนิด ที่พีเอชต่างๆ ดังนี้ คือ สารละลายซิเตรต บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1โมลาร์ พีเอช 5.0, 5.9, 6.2 และสารละลายอะซิเตต บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.0, 5.6 ทดสอบกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนของสารสกัดเอนไซม์จากพืช วัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry และคำนวณกิจกรรมจำเพาะทำให้นมจับตัวเป็นก้อน นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชุดการทดลองด้วย Tukey HSD (จิราพร ชมพิกุล, 2532) โดยใช้โปรแกรม SPSS version 10.0 คัดเลือกชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์และพืชที่ให้กิจกรรมจำเพาะทำให้นมจับตัวเป็นก้อนของสารสกัดเอนไซม์จากพืชสูงเพื่อใช้การศึกษาการทำบริสุทธิ์บางส่วนของสารสกัดเอนไซม์จากพืชต่อไป

4.3 ศึกษาการทำบริสุทธิ์บางส่วนของสารสกัดเอนไซม์

4.3.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว

นำสารสกัดเอนไซม์จากพืชที่สกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.2 มาตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 20, 40, 60 และ 80 โดยเหวี่ยงแยกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 xg ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ละลายตกตะกอนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดประกอบด้วยซิสเตอีนเข้มข้น 0.02 โมลาร์เป็นตัวจับกับเอนไซม์เพื่อป้องกันการย่อยตัวเองของเอนไซม์ และนำไปไดอะไลซิส (MW. Cut off 12 กิโลดาลตัน) ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัด เป็นเวลา 36 ชั่วโมงที่ 4 องศาเซลเซียส ทำการทดสอบกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อน กิจกรรมย่อยสลายโปรตีนดัดแปลงตามวิธี Anson (ภาคผนวก ค) วัดปริมาณโปรตีนของสารสกัดเอนไซม์และเอนไซม์ด้วยวิธี Lowry

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชุดการทดลอง และคัดเลือกชนิดพืชและความเข้มข้นเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ให้เอนไซม์มีกิจกรรมจำเพาะทำให้นมจับตัวเป็นก้อน และ มีอัตราส่วนระหว่างกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนต่อกิจกรรมย่อยสลายโปรตีนสูงสุด

4.3.2 ศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน นำเอนไซม์จากพืช ที่คัดเลือกจากข้อ 4.3.1 มาทดสอบคุณสมบัติบางประการ ดังนี้

4.3.2.1 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อน

นำเอนไซม์จากพืชมาทดสอบกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อน โดยบ่มสารละลายผสมระหว่างเอนไซม์และน้ำนม (หางนมร้อยละ 12 ในสารละลายแคลเซียม 0.01 โมลาร์ พีเอช 6.5) ที่อุณหภูมิ 11 ระดับ คือ 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 และ 80 องศาเซลเซียส

4.3.2.2 ศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อน

นำเอนไซม์จากพืชมาทดสอบกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนโดยบ่มสารละลายผสมระหว่างเอนไซม์และน้ำนม (หางนมร้อยละ 12 ในสารละลายฟอสเฟต

บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่พีเอช 7 ระดับ คือ 5.7 6.0 6.2 6.4 6.6 6.8 และ 7.0 (ภาคผนวก ก)) โดยบ่มที่อุณหภูมิที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.3.2.1

4.3.2.3 ศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ

ให้ความร้อนแก่เอนไซม์ที่อุณหภูมิ 4 ระดับ คือ 30 40 65 และ 80 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิ 30 40 65 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 5 10 15 30 60 90 120 150 180 210 270 300 นาที และอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 2 4 6 8 10 และ 15 นาที และนำเอนไซม์ดังกล่าวมาทดสอบกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อน บ่มที่อุณหภูมิและพีเอชที่คัดเลือกจากข้อ 4.3.2.1 และ 4.3.2.2

4.3.2.4 ศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ที่พีเอชต่างๆ

ละลายเอนไซม์ในสารละลายอะซิเตต บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 3.6 4.8 5.2 และสารละลายทริส-มาลีเอท บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.2 6.2 7.7 8.4 (ภาคผนวก ก) ในอัตราส่วนเอนไซม์ต่อสารละลายบัฟเฟอร์ 1: 1 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 30 60 90 120 180 240 300 360 420 นาที และนำเอนไซม์ดังกล่าวมาทดสอบกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อน บ่มที่อุณหภูมิและพีเอชที่คัดเลือกจากข้อ 4.3.2.1และ 4.3.2.2

4.4 ศึกษาผลของสารประกอบฟีนอลต่อกิจกรรมของเอนไซม์จากพืช

4.4.1 ศึกษาผลของโพลีไวนิลไพโรลิโดนต่อกิจกรรมของเอนไซม์จากพืช

ทำการสกัดเอนไซม์จากพืชที่คัดเลือกจากข้อ 4.3.2 ด้วยบัฟเฟอร์ 2 ชนิด ที่พีเอชต่างๆ (ข้อ 4.2) ร่วมกับโพลีไวนิลไพโรลิโดนร้อยละ 1.5 โดยสกัดวิธีเดียวกับการทดลอง 4.1 และทดสอบกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อน กิจกรรมย่อยสลายโปรตีน และวัดปริมาณโปรตีนของสารสกัดเอนไซม์จากพืชด้วยวิธี Bradfort (ภาคผนวก ค 1.2)

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชุดการทดลอง จากนั้นคัดเลือกชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ให้สารสกัดเอนไซม์ที่มีกิจกรรมจำเพาะทำให้นมจับตัวเป็นก้อนและอัตราส่วนระหว่างกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนต่อกิจกรรมย่อยสลายโปรตีนสูงสุด

4.4.2 ศึกษาความเข้มข้นของโพลีไวนิลไพโรลิโดนต่อกิจกรรมของเอนไซม์จากพืช

สกัดเอนไซม์จากพืชด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่คัดเลือกจากข้อ 4.4.1 ร่วมกับโพลีไวนิลไพโรลิโดน ร้อยละ 1.5 2 และ 3 และทดสอบกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อน กิจกรรมย่อยสลายโปรตีนและ วัดปริมาณโปรตีนของสารสกัดเอนไซม์จากพืชด้วยวิธี Bradfort นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชุดการทดลอง จากนั้นคัดเลือกความเข้มข้นของโพลีไวนิลไพโรลิโดนที่ให้สารสกัดเอนไซม์ที่มีกิจกรรมจำเพาะทำให้นมจับตัวเป็นก้อนและอัตราส่วนระหว่างกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนต่อกิจกรรมย่อยสลายโปรตีนสูงสุด

การสกัดและทำบริสุทธิ์บางส่วนของสารสกัดเอนไซม์จากฟักเพื่อใช้ในการผลิตคอทเทจชีส สเปรด ทำการสกัดเอนไซม์จากเนื้อฟักเขียวด้วยสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.0 ร่วมกับโพลีไวนิลไพโรลิโดน ร้อยละ 1.5 ตกตะกอนโปรตีนสารสกัดเอนไซม์ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 20 40 60 และ 80 นำสารสกัดเอนไซม์และเอนไซม์มาทดสอบกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อน กิจกรรมย่อยสลายโปรตีน วัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradfort นำเอนไซม์จากฟักเขียวที่มีกิจกรรมจำเพาะทำให้นมจับตัวเป็นก้อนสูงมาทำแห้งที่อุณหภูมิจุดเยือกแข็งและทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนและกิจกรรมย่อยสลายโปรตีนที่อุณหภูมิ 11 ระดับ คือ 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 และ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นนำเอนไซม์จากฟักเขียวที่ได้มาใช้ในการผลิตคอทเทจชีส สเปรด

4.5 ศึกษาการผลิตคอทเทจชีส สเปรดด้วยเอนไซม์จากฟักเขียว

การผลิตคอทเทจชีส สเปรดด้วยเอนไซม์จากฟักเขียว ดัดแปลงตามวิธีของ Walstra และคณะ (1999) (ภาคผนวก ง)

4.5.1ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีนด้วยเอนไซม์จากฟักเขียวในการผลิตคอทเทจชีส สเปรด

4.5.1.1 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีนด้วยเอนไซม์จากฟักเขียว

นำน้ำนมพร่องไขมัน (ไขมันร้อยละ 0.2-0.4) ปริมาตร 1 ลิตร มาพาสเจอไรส์ (72 องศาเซลเซียส เวลา15 วินาที) แบ่งน้ำนมออกเป็น 5 ส่วน ส่วนละ 200 มล. นำมาหล่อเย็นจนกระทั่งน้ำนมมีอุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส เติมหัวเชื้อ *Streptococcus lactis* ร้อยละ 5 ลงในน้ำนม บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมเอนไซม์จากฟักเขียว 1.45 ยูนิต./น้ำนม 1 มล. และบ่มที่อุณหภูมิ 4 ระดับ คือ 32 35 40 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และน้ำนมอีก 1 ส่วน (ตัวอย่างควบคุม) บ่มต่อที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยไม่เติมเอนไซม์ เมื่อครบเวลาที่กำหนด ทำการกรองแยกตะกอนโปรตีนออกจากเวย์ วัดปริมาตรเวย์และชั่งน้ำหนักตะกอนโปรตีนหลังจากอบตะกอนโปรตีนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4.5.1.2 ศึกษาปริมาณเอนไซม์จากฟักเขียวที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีน

นำน้ำนมพร่องไขมันปริมาตร 300 มล. มาพาสเจอร์ไรส์ แบ่งเป็น 4 ส่วน ส่วนละ 50 มล. ตกตะกอนโปรตีนด้วยวิธีเดียวกับข้อ 4.5.1.1 โดยเติมเอนไซม์จากฟักเขียว 4 ระดับ คือ 0.95 1.45 1.95 และ 2.45 ยูนิต/น้ำนม 1 มล. หลังจากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (คัดเลือกได้จากข้อ 4.5.1.1) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนด ทำการกรองแยกตะกอนโปรตีนออกจากเวย์ วัดปริมาตรเวย์และชั่งน้ำหนักตะกอนโปรตีนหลังการอบตะกอนโปรตีนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4.5.2 ศึกษาผลของสารให้ความคงตัวและปริมาณไขมันในการผลิตคอทเทจชีส สเปรด ด้วยเอนไซม์จากฟักเขียว

4.5.2.1 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารให้ความคงตัวในการผลิตครีมคอทเทจชีส สเปรด ด้วยเอนไซม์จากฟักเขียว

นำน้ำนมพร่องไขมันปริมาตร 2 ลิตร มาพาสเจอร์ไรส์ ตกตะกอนโปรตีน โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีนจากการทดลองข้อ 4.5.1 จากนั้นนำตะกอนโปรตีน (ไม่ผ่านการอบ) ที่ได้จากแยกเวย์มาผสมรวมกับครีมนมปริมาณร้อยละ 10 (ผสมกับสารให้ความคงตัวชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ) สารให้ความคงตัวที่ศึกษาได้แก่ เจลาติน (gelatin) คาร์ราจีแนน (carrageenan) และ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (carboxymethylcellulose, CMC) ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 และ 0.5 ของครีมนม และทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพด้านเนื้อสัมผัสโดยวัดความแข็งและความนิ่มของผลิตภัณฑ์คอทเทจชีส สเปรดที่ผลิตได้เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ครีมคอทเทจชีส สเปรด ยี่ห้อไลท์ฟิดาเดลเฟีย

4.5.2.2 ศึกษาปริมาณไขมันนมในการผลิตคอทเทจชีส สเปรด ด้วยเอนไซม์จากฟักเขียว

นำน้ำนมพร่องไขมันปริมาตร 2 ลิตร มาพาสเจอร์ไรส์ ตกตะกอนโปรตีนและใช้สภาวะที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีนจากการทดลองข้อ 4.5.1 นำตะกอนโปรตีน (ไม่ผ่านการอบ)ที่ได้จากแยกเวย์มาผสมรวมกับครีมนม (ผสมคาร์ราจีแนนความเข้มข้นร้อยละ 0.5) ความเข้มข้นร้อยละ 0 10 และ 25 10 ของน้ำหนักตะกอนโปรตีน และทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพด้านเนื้อสัมผัสโดยวัดด้านความแข็งและความนิ่มและสีของผลิตภัณฑ์คอทเทจชีส สเปรดที่ผลิตได้ เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ครีมคอทเทจชีส สเปรด ยี่ห้อไลท์ฟิดาเดลเฟีย

4.5.3. ศึกษาคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์คอทเทจชีส สเปรด

4.5.3.1 ศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของผลิตภัณฑ์คอทเทจชีส สเปรด

ก. ตรวจวัดความชื้น

ข. ตรวจวัดปริมาณไขมัน

ค. ตรวจวัดปริมาณโปรตีน

ง. ตรวจวัดค่าพีเอช

จ. ตรวจวัดปริมาณกรดแลคติก

ฉ. ตรวจวัดปริมาณแคลเซียม

4.5.3.2 ศึกษาคุณสมบัติทางจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์คอทเทจชีส สเปรด

ก. ตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด

ข. ตรวจวิเคราะห์ปริมาณโคลิฟอร์ม และ อี-โคไล

ค. ตรวจวิเคราะห์ปริมาณ*Staphylococcus aureus*

ง. ตรวจวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียที่ผลิตกรด

จ. ตรวจวิเคราะห์ปริมาณยีสต์และรา