บทที่ 3

ผลและวิจารณ์

1. การคัดเลือกชนิดของพืชที่มีกิจกรรมเอนไซม์ทำให้นมจับตัวเป็นก้อน

ทำการสกัดเอนไซม์จากส่วนต่าง ๆ (ดอก ใบ ผล เมล็ด หัว และลำต้น) ของพืชสด 71 ชนิด จาก 18 วงศ์ ด้วยสารละลายซิเตรต บัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.9 ภายใต้สภาวะเดียวกัน โดยดอกที่ใช้ในการสกัด ได้แก่ ดอกขี้เหล็ก ดอกคูน ดอกชงโค และดอกโยทะกา (วงศ์ Leguminosae-Caesalpiniodeae) ดอกแค ดอกมะกล่ำตาหนู ดอกมะกล่ำเผือก (วงศ์ Leguminosae-Papilionoideae) ดอกฉำฉา (วงศ์ Leguminosae-Minosoideae) ดอกผักคราดหัวแหวน ดอกบานชื่น ดอกดาวเรือง ดอกหญ้าละออง ดอกหนาด ดอกตีนตุ๊กแก (วงศ์ Compositae) ดอกสิงหโมรา (วงศ์ Araceae) ดอกบานไม่รู้โรย (วงศ์ Amaranthaceae)

ส่วนใบที่ใช้ในการสกัด ได้แก่ ใบตำลึง (วงศ์ Cucurbitaceae) ใบชะอม (วงศ์ Leguminosae-Minosoideae) ใบลำโพง (วงศ์ Solanaceae) ใบยางน่อง (วงศ์ Moraceae) ใบนมตำเลีย (วงศ์ Asclepiadaceae)ใบชะมวง (วงศ์ Gutttiferae)

ส่วนเนื้อของผลมาใช้ในการสกัด ได้แก่ ฟักเขียว แตงกวา บวบหอม มะระ เต้าหู้ (วงศ์ Cucurbitaceae) มะขามแขก (วงศ์ Leguminosae-Caesalpiniodeae) สาเก ขนุน (วงศ์ Moraceae) มะขามป้อม (วงศ์ Euphorbiaceae) ยอ (วงศ์ Rubiaceae) พืชที่นำทั้งผลมาใช้ในการสกัดได้แก่ มะเขือชนิดต่างๆ (วงศ์ Solanaceae) กระเจี๊ยบ (วงศ์ Malvaceae)

ส่วนเมล็ดที่ใช้ในการสกัดได้แก่ กระถิน ชงโค โยทะกา (วงศ์ Leguminosae-Caesalpiniodeae) มะกล่ำ อัญชัน ถั่วลันเตา ถั่วแขก (วงศ์ Leguminosae-Papilionoideae) ผักฉำฉา มะขามเทศ เนียงนก (วงศ์ Leguminosae-Minosoideae)

ส่วนหัวที่ใช้ในการสกัด ได้แก่ มันฝรั่ง (วงศ์ Solanaceae) หัวบุก หัวเผือก (วงศ์ Araceae) หัวแครอท (วงศ์ Umbellifere) หัวไชเท้า (วงศ์ Cruciferae) และส่วน

ลำต้นที่ใช้ในการสกัดได้แก่ เดหลีใบกล้วย (วงศ์ Araceae) แสดงดังตาราง 5 จากนั้นนำสารสกัดเอนไซม์จากของพืชดังกล่าว มาทดสอบกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อน (milk clotting activity) โดยคัดเลือกสารสกัดเอนไซม์จากพืชที่ทำให้นมจับตัวเป็นก้อน (milk clotting time) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายในระยะเวลา 3 ชั่วโมง ผลการสกัดเอนไซม์จากพืชพบว่า ปริมาณสารสกัดเอนไซม์ที่ได้มีปริมาตร 12-15 มล./ตัวอย่างสด 10 กรัม มีพีเอชอยู่ในช่วง 5.8-6.0 และสารสารสกัดเอนไซม์จากพืชที่ทำให้นมจับตัวเป็นก้อนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสภายในระยะเวลา 3 ชั่วโมง ได้แก่ มะเขือพวง (Turkey berry) มะแว้ง (Sparrow's brinjal) มะเขือเหลือง (Craib egg plant) มะเขือไข่เต่า (Egg plant 1) และมะเขือลาย (Egg plant 2) จัดอยู่ในวงศ์ Solanaceae และฟักเขียว (Ash gourd) และแตงไท (Musk melon) จัดอยู่ในวงศ์ Cucurbitaceae โดยสารสกัดเอนไซม์จากพืชวงศ์ Solanaceae จะมีสีน้ำตาลซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล (browning reaction) ที่มีเอนไซม์เกี่ยวข้อง ได้แก่ เอนไซม์ฟีนอเลส (phenolase) พอลิฟีนอเลส (polyphenolase) ที่มีในพืชเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอล ทำให้เกิดสารสีน้ำตาลที่เรียกว่า เมลาโนดิน (melanodin) เมื่อหั่นหรือตัดพืช ส่วนที่สัมผัสกับอากาศจะมีสีน้ำตาลเกิดขึ้น (มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช, 2539) และเมื่อเติมสารสกัดเอนไซม์จากพืชวงศ์ Solanaceae ลงในน้ำนมทำให้สีของน้ำนมเปลี่ยนจากสีขาวขุ่นเป็นสีน้ำตาลอ่อน สำหรับสารสกัดเอนไซม์จากพืชวงศ์ Cucurbitaceae มีสีขาวขุ่น-เขียวอ่อน ทั้งนี้เนื่องจากในกระบวนการสกัดได้ทำการตัดแต่ง ทิ้งส่วนเปลือกและไส้ นำส่วนเนื้อมาใช้ในการสกัดและเหวี่ยงแยก ได้สารสกัดเอนไซม์ใส จะไม่มีผลทำให้สีน้ำนมเปลี่ยน เมื่อเติมสารสกัดเอนไซม์จากพืชลงในน้ำนม (หางนมร้อยละ 12 ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.01 โมลาร์พีเอช 6.5) สารละลายผสมที่ได้มีค่าพีเอชลดลงเพียงเล็กน้อยอยู่ในช่วง 6.3-6.4 เนื่องจากน้ำนมมีสมบัติความเป็นบัฟเฟอร์ที่ดีมีโปรตีนและเกลือโดยเฉพาะเกลือฟอสเฟตเป็นตัวป้องกันมิให้พีเอชของนมเปลี่ยนแปลงมาก (วัฒนา ประทุมสินธุ์, 2534)

ทำการทดสอบกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนของสารสกัดเอนไซม์จากพืช โดยนำเวลาทำให้นมจับตัวเป็นก้อนของสารสกัดเอนไซม์จากพืชมาเปรียบเทียบกับเวลา

ทำให้นมจับตัวเป็นก้อนของเอนไซม์เรนนินทางการค้า ทำการวัดปริมาณโปรตีนและคำนวณกิจกรรมจำเพาะทำให้นมจับตัวเป็นก้อนของสารสกัดเอนไซม์จากพืช 7 ชนิด ที่คัดเลือกได้ พบว่า สารสกัดเอนไซม์จากพืชทั้ง 7 ชนิดมีกิจกรรมจำเพาะทำให้นมจับตัวเป็นก้อนอยู่ในช่วง 0.01-0.02 ยูนิต/ตัวอย่าง 1กรัม. ขณะที่เอนไซม์เรนนิน ทางการค้ามีกิจกรรมจำเพาะทำให้นมจับตัวเป็นก้อนสูงถึง 6.25 X 10^5 ยูนิต/ กรัม แสดงดังตาราง 6 นั่นคือ เอนไซม์เรนนินทางการค้ามีความบริสุทธิ์มากกว่าสารสกัดเอนไซม์จากพืชหลายเท่าเนื่องจากสารสกัดเอนไซม์จากพืชที่ได้ไม่ผ่านกระบวนการทำบริสุทธิ์ทำให้มีสารหลายชนิดปะปนอยู่ จึงมีความจำเพาะต่อกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนต่ำ

ตาราง 6 ระยะเวลาและกิจกรรมจำเพาะทำให้นมจับตัวเป็นก้อนของสารสกัดเอนไซม์จากพืช 7 ชนิดที่สกัดด้วยซิเตรต บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1โมลาร์ พีเอช 5.9

Milk clotting time and specific milk clotting activity of 7 plants enzyme extracted by 0.1 M citrate buffer at pH 5.9

Source of enzyme	MCT (min)	MCA (unit/g)	Protein (mg/g)	SMA (unit/ mg protein)
1. Turkey berry	17.75±0.96	1.03±0.05	77.42±3.30	0.01±0.00
2. Sparrow's brinjal	14.50±1.29	1.27±0.11	52.00±3.84	0.02±0.00
3. Craib egg plant	24.00±0.82	0.76±0.03	31.59±4.18	0.02±0.00
4. Egg plant 1	137.25±1.50	0.13±0.00	36.13±2.52	0.00±0.00
5. Egg plant 2	132.00±1.41	0.14±0.00	38.20±1.13	0.00±0.00
6. Ash gourd	47.75±2.06	0.58±0.03	26.52±2.47	0.02±0.00
7. Musk melon	138.00±2.94	0.20±0.00	32.36±1.13	0.01±0.00
8. Commercial rennin	2.25±0.08	1.25 X 10^6	2.0±0.14	6.25 X 10^5

Mean ± Standard deviation of two replication

Egg plant 1 = Makhuea khait tao , Egg plant 2 = Makhuea Lai, MCT = milk clotting time, MCA = milk clotting activity, SMA = specific milk clotting time

2. การคัดเลือกชนิดของสารสกัดที่เหมาะสม

จากการคัดเลือกชนิดของพืชที่มีกิจกรรมเอนไซม์ทำให้นมจับตัวเป็นก้อนภายใน 3 ชั่วโมง พบว่า มีพืช 7 ชนิด ได้แก่ มะเขือพวง มะแว้ง มะเขือเหลือง มะเขือไข่เต่า มะเขือลาย ฟักเขียวและแตงไท อย่างไรก็ตามความสามารถในการสกัดของสารละลายบัฟเฟอร์แต่ละชนิดอาจมีความแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ที่ต้องการและค่าคงที่การแตกตัวของกรดอ่อนหรือพีเคเอ (pKa) ของบัฟเฟอร์แต่ละชนิด ดังนั้นจึงทำการศึกษาชนิดของสารสกัดที่เหมาะสม โดยนำพืชทั้ง 7 ชนิดดังกล่าว มาสกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 2 ชนิด ที่พีเอชต่าง ๆ ได้แก่ สารละลายซิเตรต บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.0, 5.9, 6.2 สารละลายอะซิเตต บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.0, 5.6 ผลการทดลอง พบว่า สารสกัดเอนไซม์จากพืชที่สกัดด้วยสารละลายซิเตรต บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.0 ให้ค่ากิจกรรมจำเพาะทำให้นมจับตัวเป็นก้อนสูงกว่าสารสกัดเอนไซม์จากพืชที่สกัดด้วยสารละลายซิเตรต บัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.9, 6.2 สารละลายอะซิเตต บัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.0, 5.6 และน้ำกลั่น ตามลำดับ โดยสารสกัดเอนไซม์จากมะเขือเหลืองและฟักเขียวที่สกัดด้วยสารละลายซิเตรต บัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.0 มีกิจกรรมจำเพาะทำให้นมจับตัวเป็นก้อน (0.04 ยูนิต/โปรตีน 1 มก.) สูงกว่าสารสกัดเอนไซม์จากมะแว้งและมะเขือพวง (0.03 และ 0.02 ยูนิต/โปรตีน 1 มก. ตามลำดับ) ขณะที่สารสกัดเอนไซม์จากมะเขือลาย มะเขือไข่เต่า และแตงไทยมีกิจกรรมจำเพาะทำให้นมจับตัวเป็นก้อนต่ำมาก แสดงดังตาราง 7 ดังนั้นจึงเลือกสารสกัดเอนไซม์จากฟักเขียว มะเขือเหลือง มะแว้งและมะเขือพวงที่สกัดด้วยสารละลายซิเตรต บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.0 ในการศึกษาการทำบริสุทธิ์บางส่วนของสารสกัดเอนไซม์จากพืชต่อไป

Gupta และ Eskin (1977) และ Eskin และ Landman (1975) ใช้สารละลายอะซิเตต บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.01 โมลาร์ พีเอช 5.5-5.6 ละลายตะกอนเอนไซม์จากฟักเขียวที่ผ่านการตกตะกอนโปรตีนด้วยอะซิโตนเย็น ก่อนนำไปทำการไดอะไลซิสเป็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมงและทำแห้งที่อุณหภูมิจุดเยือกแข็ง ได้ปริมาณผลผลิตเอนไซม์ร้อยละ 60 และมีความบริสุทธิ์ 5 เท่า

Sousa และ Malcata (1998a) และ Tavria และคณะ (2001) ทำการสกัดเอนไซม์คาร์โดซินจากดอกคาร์โดนแห้งด้วยชนิดของสารละลายซิเตรต บัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.9 และ 5.4 ตามลำดับ เพื่อศึกษาการย่อยสลายโปรตีนเคซีนในน้ำนม

Tamer (1993) ทำการสกัดและทำบริสุทธิ์เอนไซม์ที่ทำให้นมจับตัวเป็นก้อนจาก เมล็ด ดอก และ ใบของทอเรีย ทีสทิล ด้วยสารละลายผสมของสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 5 แคลเซียมคลอไรด์ร้อยละ 0.75 อีดีทีเอร้อยละ 0.13 โพลิไวนิลโพลิไพโรลิโดนร้อยละ 0.2 และเบต้า-เมอแคปโตเอทานอลร้อยละ 0.025 และตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 80 เอนไซม์ที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุล 19–24 กิโลดาลตัน มีค่าพีไออยู่ในช่วงพีเอช 3.3 -3.7

ตาราง 7 ผลของสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอชต่างๆ ต่อกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อน ปริมาณโปรตีนและกิจกรรมจำเพาะทำให้นมจับตัวเป็นก้อนของสารสกัดเอนไซม์จากพืช 7 ชนิด

Effect of buffers at various pH on milk clotting activity, protein content and specific milk clotting activity of 7 crude plants enzyme

	Buffers								
	0.1 M citrate buffer pH 5.0			0.1 M citrate buffer pH 5.9			0.1 M citrate buffer pH 6.2		
Extracted plants	MCA (unit/g)	Protein (mg/g)	SMA (unit/ mg protein)	MCA (unit/g)	Protein (mg/g)	SMA (unit/ mg protein)	MCA (unit/g)	Protein (mg/g)	SMA (unit/ mg protein)
1. Turkey berry	1.36±0.13	72.79±8.38	0.02±0.00c	1.20±0.08	75.71±6.02	0.02±0.00b	0.07±0.00	70.16±1.05	0.00±0.00a
2. Sparrow's brinjal	1.39±0.10	40.97±1.52	0.03±0.00b	1.24±0.08	55.19±8.91	0.02±0.00b	0.07±0.00	54.29±4.08	0.00±0.00a
3. Craib egg plant	0.97±0.08	25.97±1.48	0.04±0.00a	0.88±0.04	32.69±5.45	0.03±0.00a	0.07±0.00	34.97±4.21	0.00±0.00a
4. Egg plant 1	0.13±0.08	31.12±2.24	0.00±0.01e	0.13±0.02	33.72±0.84	0.00±0.00d	0.09±0.00	30.26±1.25	0.00±0.00a
5. Egg plant 2	0.13±0.00	11.12±2.24	0.01±0.00d	0.13±0.00	21.12±3.55	0.01±0.00c	0.10±0.00	25.57±0.78	0.00±0.00a
6. Ash gourd	0.67±0.00	16.31±0.83	0.04±0.00a	0.60±0.02	21.79±1.30	0.03±0.01a	0.09±0.00	30.29±0.71	0.00±0.00a
7. Musk melon	0.19±0.00	38.95±0.91	0.00±0.00e	0.19±0.00	42.70±0.39	0.00±0.00d	0.14±0.00	38.10±0.76	0.00±0.00a

Mean ± Standard deviation of two replication. Egg plant 1 = Makhuea Khait tao; Egg plant 2 = Makhuea Lai , MCA = milk clotting activity, SMA = specific milk clotting time. abcde in the same column is significant at the 0.5 level.

ตาราง 7 (ต่อ)

(Continued)

Extracted plants	Buffers								
	0.1 M acetate buffer pH 5.0			0.1 M acetate buffer pH 5.6			Distilled water pH 6.5		
	MCA (unit/g)	Protein (mg/g)	SMA (unit/ mg protein)	MCA (unit/g)	Protein (mg/g)	SMA (unit/ mg protein)	MCA (unit/g)	Protein (mg/g)	SMA (unit/ mg protein)
1. Turkey berry	0.63±0.05	65.65±2.45	0.01±0.00b	0.55±0.02	68.57±2.31	0.01±0.00b	0.49±0.02	69.96±2.36	0.01±0.00a
2. Sparrow's brinjal	0.68±0.02	41.69±0.63	0.02±0.00a	0.57±0.04	50.54±1.49	0.01±0.00b	0.52±0.03	57.71±0.79	0.01±0.00a
3. Craib egg plant	0.49±0.03	25.94±0.84	0.02±0.00a	0.51±0.03	31.20±0.95	0.02±0.00a	0.12±0.00	37.87±0.81	0.00±0.00b
4. Egg plant 1	0.06±0.00	29.87±1.60	0.00±0.00c	0.06±0.00	33.44±0.57	0.00±0.01bc	0.05±0.00	31.06±0.94	0.00±0.01ab
5. Egg plant 2	0.10±0.00	12.89±0.76	0.00±0.00b	0.10±0.00	21.96±1.02	0.00±0.00c	0.06±0.00	27.65±0.44	0.00±0.00b
6. Ash gourd	0.24±0.01	15.59±1.03	0.02±0.00a	0.22±0.01	21.45±0.84	0.01±0.00b	0.14±0.00	32.34±0.79	0.00±0.00b
7. Musk melon	0.17±0.00	38.91±0.86	0.00±0.00c	0.18±0.01	41.77±0.36	0.00±0.00c	0.14±0.00	37.62±0.76	0.00±0.00b

Mean ± Standard deviation of two replication. Egg plant 1 = Makhuea Khait tao; Egg plant 2 = Makhuea Lai , MCA = milk clotting activity, SMA = specific milk clotting time. abc in the same column is significant at the 0.5 level.

3. การทำบริสุทธิ์บางส่วนของสารสกัดเอนไซม์

3.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว

ทำการตกตะกอนโปรตีนสารสกัดเอนไซม์จากพืช 4 ชนิด คือ ฟักเขียว มะเขือเหลือง มะแว้งและมะเขือพวง ที่สกัดด้วยสารละลายซิเตรต บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์พีเอช 5.0 (คัดเลือกได้จากข้อ 2.) ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 20, 40, 60 และ 80 นำตะกอนมาไดอะไลซิส แล้วนำสารละลายเอนไซม์แต่ละส่วนมาทดสอบกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อน กิจกรรมย่อยสลายโปรตีน และวัดปริมาณโปรตีน พบว่า แต่เอนไซม์จากพืชที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 21-60 มีกิจกรรมจำเพาะทำให้นมจับตัวเป็นก้อนสูงกว่าสารสกัดเอนไซม์และเอนไซม์จากพืชที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 0-20 และ 61-80 โดยเอนไซม์จากพืชที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 0-20 มีกิจกรรมจำเพาะทำให้นมจับตัวเป็นก้อนต่ำ (0.00 ยูนิต/ตัวอย่าง 1 กรัม) และเอนไซม์จากพืชที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 61-80 ทำให้นมจับตัวเป็นก้อนนานกว่า 3 ชั่วโมง

เอนไซม์จากพืชทั้ง 4 ชนิด ที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 21-60 มีกิจกรรมจำเพาะทำให้นมจับตัวเป็นก้อนไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) โดยเอนไซม์จากมะแว้งที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 21-60 มีกิจกรรมจำเพาะทำให้นมจับตัวเป็นก้อนสูงที่สุดเท่ากับ 0.04 ยูนิต/โปรตีน 1 มก. และเอนไซม์จากและฟักเขียว มะเขือพวงและ มะเขือเหลือง มีกิจกรรมจำเพาะทำให้นมจับตัวเป็นก้อนเท่ากับ 0.03 0.03 และ 0.02 ยูนิต/โปรตีน 1 มก. ตามลำดับ เอนไซม์จากพืชที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 21-60 จะมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 2-4 เท่า แสดงดังตาราง 8 ทั้งนี้เนื่องจากการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต เป็นการทำให้การละลายของโปรตีนลดลงและจับตัวกันตกตะกอนลงมาทำให้โปรตีนที่แยกได้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น

เอนไซม์จากพืชทั้ง 4 ชนิด ที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 21-60 มีอัตราส่วนระหว่างกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนต่อกิจกรรมย่อย

สลายโปรตีนสูงกว่าสารสกัดเอนไซม์ โดยเอนไซม์จากมะแว้งมีค่าสูงสุดเท่ากับ 1.17-1.26 รองลงมา ได้แก่ มะเขือพวง (0.74-0.82) มะเขือเหลือง (0.52-0.56) และฟักเขียว (0.32-0.38) ตามลำดับ แสดงดังตาราง 8 ซึ่งอัตราส่วนระหว่างกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนต่อกิจกรรมย่อยสลายโปรตีน เป็นค่าที่แสดงถึงปริมาณเอนไซม์โปรติเอสที่มีกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อน มีประโยชน์ในการคัดเลือกชนิดเอนไซม์และสภาวะที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีนเพื่อผลิตเนยแข็ง (Green *et al*., 1972; Chen and zen, 1980) โดยเอนไซม์และสภาวะที่เหมาะในตกตะกอนโปรตีนควรมีกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนสูง แต่มีกิจกรรมย่อยสลายโปรตีนต่ำและมีกิจกรรมจำเพาะย่อยสลายพันธะ Phe_{105}-Met_{106} ในแคปปา-เคซีน (Tavaria *et al.,* 1997)

จากผลการทดลองข้างต้นจึงเลือกเอนไซม์จากมะแว้ง และ ฟักเขียวเป็นตัวแทนของพืชทั้ง 2 วงศ์ ที่ผ่านการคัดเลือก ได้แก่เอนไซม์จะมะแว้งเป็นตัวแทนของพืชวงศ์ Solanaceae และเอนไซม์จากฟักเขียวจะเป็นตัวแทนของพืชวงศ์ Cucurbitaceae ในการศึกษาต่อไป

Eskin และ Landman (1975) ทำการสกัดเอนไซม์ที่ทำให้นมจับตัวเป็นก้อนจากเนื้อฟักเขียวโดยการบีบคั้นเนื้อฟักที่บดละเอียด แล้วตกตะกอนโปรตีนด้วยอะซิโตนเย็นปริมาณ 4 เท่าของสารสกัดเอนไซม์ นำไปเหวี่ยงแยกที่ความเร็วรอบ 7000 xg เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ละลายตะกอนด้วยสารละลาย อะซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.01 โมลาร์ พีเอช 5.5 ทำการตกตะกอนและแยกตะกอนโปรตีนอีกครั้งดังวิธีที่กล่าวข้างต้น ดังนั้นเอนไซม์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยอะซิโตนเย็นทั้ง 2 ครั้ง มีความบริสุทธิ์เท่ากับ 5.5 และ 7.6 เท่า นอกจากนี้ Gupta และ Eskin (1977) ทำการสกัดและทำบริสุทธิ์เอนไซม์จากเนื้อฟักเขียวด้วยวิธีการบีบคั้นและทำให้เอนไซม์เข้มข้นที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้มีปริมาตรเหลือร้อยละ 40 ของสารสกัดเริ่มต้น แล้วตกตะกอนโปรตีนด้วยอะซิโตนเย็นปริมาณ 3 เท่าของสารสกัดเอนไซม์ ละลายตะกอนที่ได้ด้วยสารละลายอะซิเตต บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.01 โมลาร์ พีเอช 5.6 และไดอะไลซิสที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง พบว่า เอนไซม์มีความบริสุทธิ์ 6.89 เท่า

ตาราง 8 การทำบริสุทธิ์บางส่วนของสารสกัดเอนไซม์จากพืช 4 ชนิด ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวความเข้มข้นต่าง ๆ

Partial purification of 4- crude plants enzyme by various saturated ammonium sulfates

Plant sample	Fraction	Volume (ml)	MCA (unit/g)	PA (unit/g/1hr);	MCA/PA	Protein (mg/g)	SMA (unit/ mg protein)	Yield (%)	Fold
Ash gourd	Crude extract	170	0.66±0.02	6.01±0.08	0.14±0.00Cb	198.32±3.39	0.01±0.00ABb	100	1
	21-40% sat. $(NH_4)_2SO_4$ precipitate	22	5.95±0.14	18.83±0.16	0.32±0.01Ca	542.61±8.99	0.03±0.01ABa	37.67	3.31
	41-60% sat. $(NH_4)_2SO_4$precipitate	22	6.38±0.23	16.89±0.22	0.38±0.01Ca	519.80±2.64	0.03±0.02ABa	42.23	3.71
Craib egg	Crude extract	150	1.06±0.06	5.46±0.07	0.19±0.02Bb	180.02±3.08	0.01±0.00Bb	100	1
plant	21-40% sat. $(NH_4)_2SO_4$precipitate	23	9.28±0.60	16.60±0.28	0.56±0.06Ba	478.46±9.06	0.02±0.00Ba	43.20	3.30
	41-60% sat. $(NH_4)_2SO_4$precipitate	23	6.60±0.21	12.68±0.58	0.52±0.03Ba	390.17±17.08	0.02±0.00Ba	39.94	2.88
Sparrow's	Crude extract	150	2.52±0.12	5.46±0.01	0.46±0.03Ab	180.01±3.08	0.01±0.00Ab	100	1
brinjal	21-40% sat. $(NH_4)_2SO_4$precipitate	22	21.36±0.86	16.98±1.17	1.26±0.04Aa	489.15±31.34	0.04±0.00Aa	39.02	3.12
	41-60% sat. $(NH_4)_2SO_4$precipitate	23	16.82±0.78	14.37±0.84	1.17±0.03Aa	442.31±25.12	0.04±0.00Aa	35.58	2.72
Turkey berry	Crude extract	150	2.00±0.02	5.38±0.12	0.38±0.03Bb	177.29±1.51	0.01±0.00ABb	100	1
	21-40% sat. $(NH_4)_2SO_4$precipitate	27	16.78±1.90	20.36±0.72	0.82±0.06Ba	586.90±26.40	0.03±0.01ABa	39.39	2.52
	41-60% sat. $(NH_4)_2SO_4$precipitate	26	10.26±0.45	13.80±0.19	0.74±0.03Ba	424.75±3.21	0.03±0.03ABa	32.13	2.14

Note: Mean ± Standard deviation of two replication. ABC in the same column between plants is significant at the 0.5 level; ab in the same column between fraction is significant at the 0.5 llevel; MCA = Milk clotting activity; PA= Proteolytic activity SMA = specific milk clotting activity (unit/mg protein)

3.2 ศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน

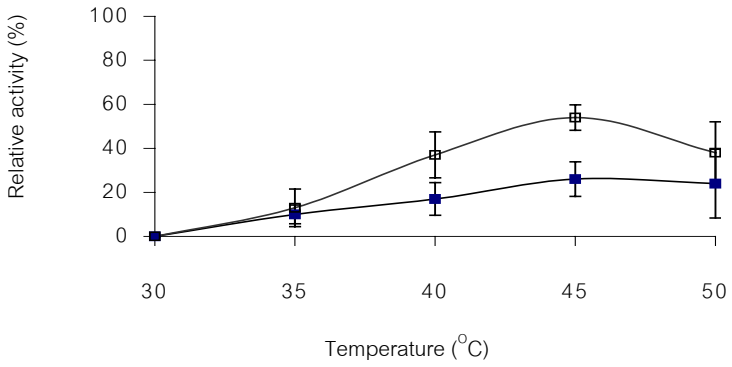
นำเอนไซม์จากฟักเขียวและมะแว้งที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนที่ได้จากข้อ 3.1 มาศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ดังต่อไปนี้

3.2.1 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อน โดยการเติมสารละลายเอนไซม์จากฟักเขียวและมะแว้ง 0.03 และ 0.09 ยูนิต / นม 1 มล. ลงในน้ำนมและบ่มสารผสม ที่อุณหภูมิ 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 และ 80 องศาเซลเซียส แล้วทดสอบกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ เทียบกับกิจกรรมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า กิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนของเอนไซม์จากฟักเขียวและมะแว้งมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น และมีค่าสูงสุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นั่นคือ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนสูงสุดของเอนไซม์จากฟักเขียวและมะแว้งอยู่ในช่วง 45 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 6.0-6.2แสดงดังภาพ 3 และเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 45 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนลดลงเนื่องจากความร้อนทำให้โครงสร้างของเอนไซม์ในส่วนของหมู่พรอสเตติก (prosthetic groups) ถูกทำลายและเสียสภาพการทำงานไป (Garcia *et al.*, 2000) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Tamer (1993) ที่รายงานว่าโดยปกติเอนไซม์ที่ทำให้นมจับตัวเป็นก้อนจะถูกทำลายที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส

3.2 ศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน

นำเอนไซม์จากฟักเขียวและมะแว้งที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนที่ได้จากข้อ 3.1 มาศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ดังต่อไปนี้

3.2.1 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อน โดยการเติมสารละลายเอนไซม์จากฟักเขียวและมะแว้ง 0.03 และ 0.09 ยูนิต / นม 1 มล. ลงในน้ำนมและบ่มสารผสม ที่อุณหภูมิ 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 และ 80 องศาเซลเซียส แล้วทดสอบกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ เทียบกับกิจกรรมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า กิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนของเอนไซม์จากฟักเขียวและมะแว้งมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น และมีค่าสูงสุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นั่นคือ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนสูงสุดของเอนไซม์จากฟักเขียวและมะแว้งอยู่ในช่วง 45 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 6.0-6.2แสดงดังภาพ 3 และเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 45 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนลดลงเนื่องจากความร้อนทำให้โครงสร้างของเอนไซม์ในส่วนของหมู่พรอสเตติก (prosthetic groups) ถูกทำลายและเสียสภาพการทำงานไป (Garcia *et al.*, 2000) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Tamer (1993) ที่รายงานว่าโดยปกติเอนไซม์ที่ทำให้นมจับตัวเป็นก้อนจะถูกทำลายที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส

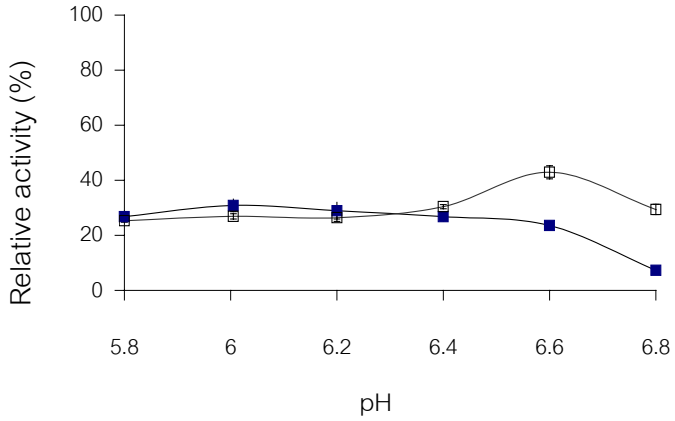


ภาพ 3 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนของเอนไซม์จากฟักเขียว (✿) และมะแว้ง (□)

Effect of temperature on milk clotting activity of enzymes from Ash gourd (✿) and Sparrow's brinjal (□)

3.2.2 ศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อน

น้ำนม (หางนมร้อยละ 12 ในสารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์) ที่เตรียมได้มีค่าพีเอชสุดท้ายเท่ากับ 6.1 6.2 6.3 6.5 6.6 6.7 และ 6.8 นำมาบ่ม ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.1) เติมสารละลายเอนไซม์จากฟักเขียว มะแว้งและเอนไซม์เรนนินทางการค้า 0.03 0.09 และ 500 ยูนิต/นม 1 มล. ลงในน้ำนมที่มีค่าพีเอชต่าง ๆ ทดสอบกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนของเอนไซม์จากพืช พบว่า ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนของเอนไซม์จากฟักเขียวและมะแว้ง คือ 6.0 และ 6.6 ตามลำดับ ดังภาพ 4 โดยกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนของเอนไซม์มีค่าลดลงที่พีเอชต่ำหรือสูงเกินไป ทั้งนี้เนื่องจากในสารละลายที่มีความเป็นกรดหรือเป็นด่างมากๆ ทำให้เอนไซม์เสียสภาพได้ง่าย โดยพีเอชจะไปมีผลต่อการแตกตัวของอิออน (ionization) ของหมู่โพรโททรอพิค (prototropic group) ที่อยู่ในบริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนโครงรูปสามมิติซึ่งจะมีผลไปสู่การเบี่ยงเบนในด้านการจับกับสับสเตรต หรือการเร่งปฏิกิริยา นอกจากนี้พีเอชยังไปมีผลต่อการเกิดสารประกอบร่วมระหว่างเอนไซม์และสับสเตรต (enzyme substrate complex) การแตกตัวของอิออนของสับสเตรตและโคแฟคเตอร์ส่งผลให้การจับกับเอนไซม์เปลี่ยนไป (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2543)



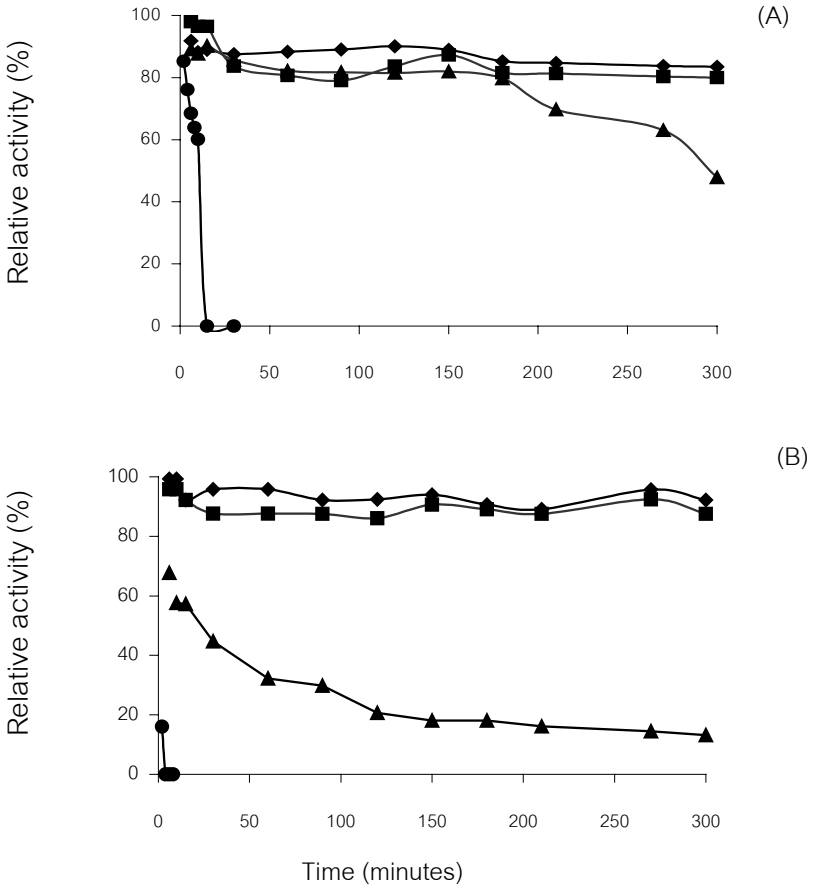
ภาพ 4 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนของเอนไซม์จากฟักเขียว (❁) และมะแว้ง (□)

Effect of pH on milk clotting activity of enzymes from Ash gourd (❁) and Sparrow's brinjal (□)

3.2.3 ศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

โดยให้ความร้อนแก่เอนไซม์จากฟักเขียวและมะแว้งที่อุณหภูมิ 30 40 และ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 10 15 30 60 90 120 150 180 210 270 300 นาที และที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 4 6 8 10 และ15 นาที แล้วนำมาทดสอบกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนของเอนไซม์จากฟักเขียวและมะแว้งโดยปรับพีเอชของน้ำนมให้มีค่าเท่ากับ 6.0. และ 6.6 ตามลำดับและบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พบว่า เอนไซม์จากฟักเขียวและมะแว้งยังคงมีกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนที่อุณหภูมิ 30 40 และ 65 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 5 ชั่วโมง โดยที่ ณ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีความคงตัวต่ออุณหภูมิดีที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์จากฟักเขียวและมะแว้งจะสูญเสียกิจกรรมเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 และ 4 นาที ตามลำดับ แสดงดังภาพ 5 การทนร้อนของเอนไซม์อาจเนื่องพันธะภายในของสารเปปไทด์ ได้แก่ พันธะไดซัลไฟด์ที่ช่วยยึดกรดอะมิโนซิสเตอีนสองตัวในเปปไทด์สายเดียวกันหรือต่างสายกันให้อยู่ใกล้ชิดกัน เป็นพันธะที่แข็งแรงทำให้โครงสร้างของเอนไซม์ไม่เปลี่ยนไปและไม่เกิดการเสียสภาพเมื่อได้รับความร้อนระดับหนึ่ง (Nissen,1993)

การให้ความร้อนแก่สารสกัดเอนไซม์จากผลจูบีน ที่อุณหภูมิ 40 หรือ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จะไม่มีผลต่อการลดลงของกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนของสารสกัดเอนไซม์ แต่ที่อุณหภูมิ 60 หรือ 70 องศาเซลเซียส กิจกรรมของสารสกัดเอนไซม์จะลดลงร้อยละ 28 และ 86 ตามลำดับ และจะสูญเสียกิจกรรมเมื่อได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (Yousif *et al.*, 1996)



(A) enzyme from Ash gourd

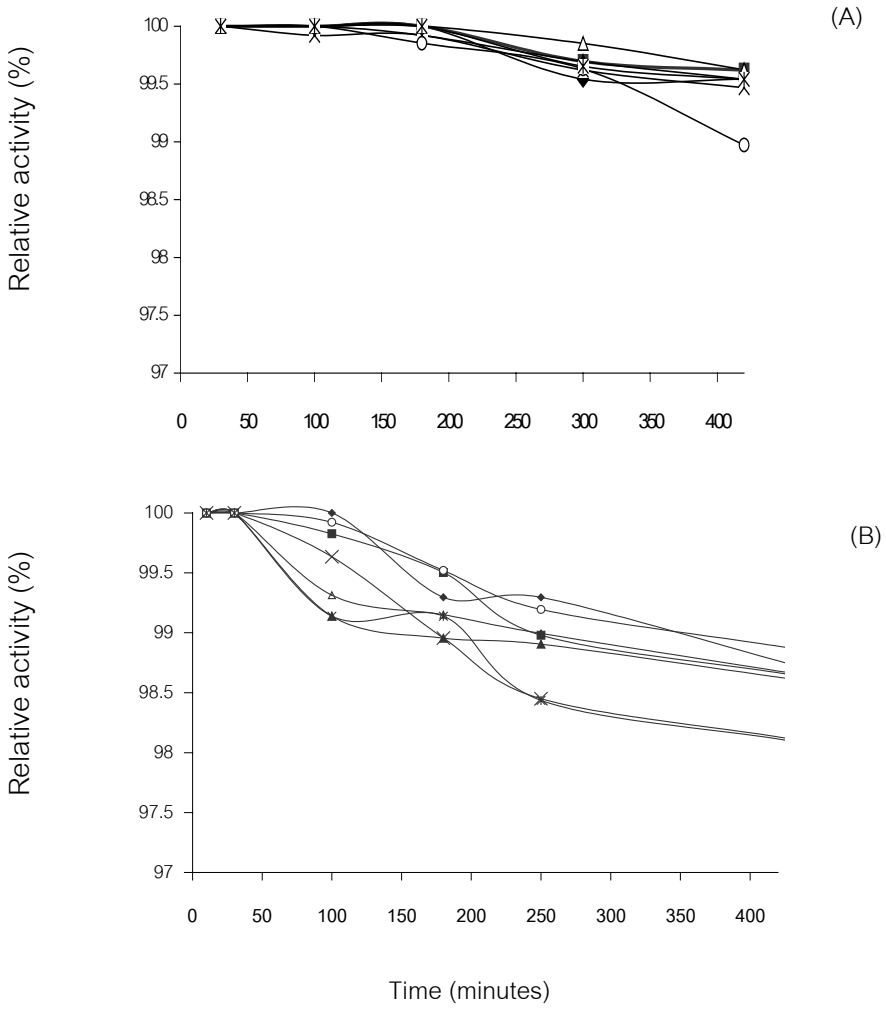
(B) enzyme from sparrow's brinjal

ภาพ 5 การทนต่อความร้อนของเอนไซม์จากฟักเขียว (A) และมะแว้ง (B) ที่อุณหภูมิ 30°C (♈), 40°C (❄), 65°C (✠) และ 80°C (✦)

Thermal stability of enzymes from Ash gourd (A) and Sparrow's brinjal (B) at various temperature, 30°C (♈), 40°C (❄), 65°C (✠) and 80°C (✦)

3.2.4 ศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ที่พีเอชต่างๆ

สารละลายเอนไซม์จากฟักเขียวและมะแว้งที่ละลายในสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 3.6 4.8 และ 5.2 และสารละลายทริส-มาลีเอท บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.2 6.2 7.7 และ 8.4 มีค่าเท่ากับ 4.4 4.6 4.8 4.9 5.2 5.6 และ 6.0 ตามลำดับ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลาต่างๆ แล้วทดสอบกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พีเอช 6.0 และ 6.6 พบว่า เอนไซม์ในสารละลายพีเอช 4.4-6.0 ยังคงมีกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนร้อยละ 98 เมื่อบ่มเป็นเวลา 7 ชั่วโมง แต่กิจกรรมของเอนไซม์จากมะแว้งจะลดลงเมื่อบ่มนาน 3-3.5 ชั่วโมง แสดงดังภาพ 6 แสดงว่า เอนไซม์จากฟักเขียวทนต่อพีเอชได้ดีกว่าเอนไซม์จากมะแว้ง



(A) enzyme from Ash gourd

(B) enzyme from Sparrow's brinjal

ภาพ 6 การทนต่อพีเอชของเอนไซม์จากฟักเขียว (A) **และมะแว้ง** (B) **ที่พีเอช** 4.4(♈), 4.6(❁), 4.8(✠), 4.9 (☼), 5.2(☜), 5.6(O) **และ** 6.0 (♦)

pH stability of enzymes from Ash gourd(A) and Sparrow's brinjal (B) at pH 4.4(♈), 4.6(❁), 4.8(✠), 4.9(☼), 5.2(☜), 5.6(O) and 6.0 (♦)

4. ผลของสารประกอบฟีนอลต่อกิจกรรมของเอนไซม์จากพืช

สารประกอบฟีนอลเป็นองค์ประกอบหนึ่งในพืช ถูกสกัดออกมาและปะปนอยู่ในสารสกัดเอนไซม์ทำให้สารสกัดเอนไซม์มีสีน้ำตาล ซึ่งเป็นสาเหตุยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์และยังมีผลทำให้โปรตีนเคซีนในนมตกตะกอนเร็วขึ้น (Gegenheimer, 1990; Iturbe-chinas and Canals, 1986) ดังนั้น จึงศึกษาผลของสารประกอบฟีนอลต่อกิจกรรมของเอนไซม์จากพืช โดยการเติมสารโพลีไวนิลไพโรลิโดนร่วมกับสารละลายบัฟเฟอร์ เพื่อยับยั้งกิจกรรมของสารประกอบฟีนอลที่มีในสารสกัดเอนไซม์ ซึ่งทางอุตสาหกรรมอาหารมีการนำโพลีไวนิลไพโรลิโดนมาใช้เป็นวัตถุเจือปนอาหาร ทำหน้าที่เป็นสารให้ความคงตัว (stabilizer) สารเพิ่มความหนืด (thickener) อิมัลซิไฟเออร์ เป็นต้น (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2545)

4.1 ศึกษาผลของโพลีไวนิลไพโรลิโดนต่อกิจกรรมของเอนไซม์จากพืช

ทำการทดลองเบื้องต้น โดยสกัดเอนไซม์จากฟักเขียวและมะแว้งด้วยสารละลายซิเตรต บัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.0 ร่วมกับสารโพลีไวนิลไพโรลิโดนร้อยละ 1.5 แล้วนำไปทดสอบกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อน พบว่า สารสกัดเอนไซม์จากฟักเขียวที่เติมและไม่เติมสารโพลีไวนิลไพโรลิโดนร้อยละ 1.5 มีค่ากิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนเท่ากับ 0.55 และ 0.58 ยูนิต/ตัวอย่าง 1 กรัม ซึ่งไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) ทางสถิติ ขณะที่สารสกัดเอนไซม์จากมะแว้งที่เติมโพลีไวนิลไพโรลิโดนร้อยละ 1.5 มีกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนต่ำกว่าสารสกัดเอนไซม์จากมะแว้งที่ไม่เติมโพลีไวนิล-ไพโรลิโดนร้อยละ 1.5 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.58 และ 0.74 ยูนิต/ตัวอย่าง 1 กรัม ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากสารโพลิไวนิลไพโรลิโดนจะทำหน้าที่ในการยับยั้งกิจกรรมของสารประกอบฟีนอลที่ปะปนอยู่ในสารสกัดเอนไซม์จากมะแว้ง มีผลทำให้นมจับตัวเป็นก้อนนานขึ้นและมีค่ากิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนของเอนไซม์มีค่าลดลง และสรุปว่าสารประกอบฟีนอลในสารสกัดเอนไซม์จากมะแว้งมีผลต่อกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนสูงขึ้น แต่เมื่อสกัดด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันร่วมกับสารโพลิไวนิลไพโรลิโดนร้อยละ 1.5 สามารถยับยั้งกิจกรรมของสารประกอบฟีนอลได้และทำให้กิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนมีค่าลดลง แต่สำหรับสารสกัดเอนไซม์จากฟักเขียวซึ่งมีปริมาณสารประกอบฟีนอล

ในปริมาณน้อย (สังเกตจากสีของสารสกัดซึ่งมีสีใส) การเติมสารโพลิไวนิลไพโรลิโดนไม่มีผลต่อกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนของสารสกัดเอนไซม์ นอกจากนี้ พบว่าลักษณะตะกอนโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยสารสกัดเอนไซม์จากพืชที่สกัดด้วยสารละลาย บัฟเฟอร์ร่วมกับโพลิไวนิลไพโรลิโดนร้อยละ 1.5 มีการเกาะตัวดีกว่าตะกอนโปรตีนที่ได้จากการสกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เพียงอย่างเดียว

ผลการสกัดเอนไซม์จากฟักเขียวและมะแว้งที่สกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 2 ชนิด พีเอช ต่างๆ พบว่า สารสกัดเอนไซม์จากฟักเขียวมีกิจกรรมจำเพาะทำให้นมจับตัวเป็นก้อน (0.02-0.03 ยูนิต/โปรตีน 1 กรัม) สูงกว่าสารสกัดเอนไซม์จากมะแว้ง (0.01 ยูนิต/โปรตีน 1 กรัม) โดยสารสกัดเอนไซม์จากฟักเขียวที่สกัดด้วยสารละลายซิเตรต บัฟเฟอร์และสารละลายอะซิเตต บัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.0 มีค่ากิจกรรมจำเพาะทำให้นมจับตัวเป็นก้อน (0.03 ยูนิต/โปรตีน 1 กรัม) สูงกว่าสารสกัดเอนไซม์จากฟักเขียวที่สกัดด้วยสารละลายซิเตรต บัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.9, 6.2 สารละลายอะซิเตต บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.6 และน้ำกลั่น (0.02 ยูนิต/โปรตีน 1 กรัม) นอกจากนี้ สารสกัดเอนไซม์จากฟักเขียวและมะแว้งที่สกัดด้วยสารละลายอะซิเตต บัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.0 มีอัตราส่วนระหว่างกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนต่อกิจกรรมย่อยสลายโปรตีนสูงกว่าการสกัดด้วยสารละลายซิเตรต บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.0 แสดงดังตาราง 9 และเมื่อสังเกตลักษณะตะกอนโปรตีน โดยการเอียงหลอดทดลอง พบว่า ตะกอนโปรตีนที่ได้จากสารสกัดเอนไซม์จากพืชที่สกัดด้วยสารละลายอะซิเตต บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.0 และ 5.6 มีการเกาะตัวแน่นเมื่อเอียงหลอดทดลองตะกอนโปรตีนไม่แตกเป็นก้อนเล็ก ๆ ขณะที่ตะกอนโปรตีนที่ได้จากสารสกัดเอนไซม์จากพืชที่สกัดด้วยสารละลายซิเตรต บัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.0 5.9 6.2 และน้ำกลั่น มีการเกาะตัวกันไม่แน่นเมื่อเอียงหลอดทดลองตะกอนโปรตีนจะแตกเป็นก้อนเล็ก ๆ ดังนั้น ในการทดลองนำเอนไซม์จากพืชมาประยุกต์ใช้ในการผลิตคอทเทจชีส สเปรด เพื่อให้ตะกอนที่ได้มีการเกาะตัวกันดี จึงเลือกสกัดเอนไซม์จากพืชด้วยสารละลายอะซิเตต บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.0

ตาราง 9 ผลของโพลีไวนิลไพโรลิโดนร้อยละ1.5 ร่วมกับสารสกัดบัฟเฟอร์ต่อกิจกรรมของสารสกัดเอนไซม์จากฟักเขียวและมะแว้ง

Effect of 1.5 %polyvinylpyrrolidone compose with extracted buffer on activity of crude enzyme from Ash gourd and Sparrow's brinjal

Plant sample	Extracted buffer	MCA (unit/g)	PA (unit/g/1hr);	MCA/PA	Protein (mg/g)	SMA (unit/ mg protein)
Ash gourd	0.1M Citrate 5.0	0.56±0.01	0.55±0.12	1.06±0.26a	16.26±0.22	0.03±0.00a
	0.1M Citrate 5.9	0.48±0.01	0.54±0.00	0.88±0.01c	17.22±0.38	0.02±0.00b
	0.1M Citrate 6.2	0.46±0.01	0.48±0.02	0.95±0.02b	18.26±0.14	0.02±0.00b
	0.1M Acetate 5.0	0.37±0.02	0.34±0.03	1.10±0.001a	15.49±0.13	0.03±0.00a
	0.1M Acetate 5.6	0.30±0.01	0.44±0.02	0.68±0.03d	16.40±0.15	0.02±0.00b
	Distilled water	0.20±0.00	0.50±0.01	0.50±0.03e	16.33±0.49	0.01±0.00c
Sparrow's brinjal	0.1M Citrate 5.0	1.36±0.06	2.76±0.18	0.57±0.03b	113.13±7.82	0.01±0.00a
	0.1M Citrate 5.9	1.18±0.04	2.45±0.02	0.48±0.02c	134.27±1.55	0.01±0.00a
	0.1M Citrate 6.2	1.11±0.04	2.38±0.04	0.47±0.00c	113.27±1.46	0.01±0.00a
	0.1M Acetate 5.0	1.08±0.07	1.96±0.03	0.64±0.04a	107.69±3.36	0.01±0.00a
	0.1M Acetate 5.6	0.87±0.05	1.64±0.01	0.53±0.04b	116.87±1.77	0.01±0.00a
	Distilled water	0.31±0.01	1.98±0.04	0.16±0.01d	99.89±1.34	0.00±0.00a

Mean ± Standard deviation of two replication. abcd in the same column is significant at the 0.5 level; MCA = milk clotting activity; PA= proteolytic activity; SMA = milk specific clotting activity

4.2 ความเข้มข้นของโพลีไวนิลไพโรลิโดนต่อกิจกรรมของเอนไซม์จากพืช

จากการทดลองข้อ 4.1 พบว่า สารโพลีไวนิลไพโรลิโดนร้อยละ 1.5 สามารถยับยั้งสารประกอบฟีนอลที่ปะปนอยู่ในสารสกัดเอนไซม์จากพืชส่งผลให้กิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนมีค่าลดลง ในกรณีที่มีการเพิ่มความเข้มข้นของโพลีไวนิลไพโรลิโดนมากขึ้นจะมีผลอย่างไรกับกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนของสารสกัดเอนไซม์จากพืช ดังนั้น จึงได้ทำการศึกษาความเข้มข้นของโพลีไวนิลไพโรลิโดนร่วมกับสารละลายบัฟเฟอร์ในการสกัดเอนไซม์จากพืชต่อกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อน พบว่า สารสกัดเอนไซม์จากฟักเขียวที่เติมโพลีไวนิลไพโรลิโดนร้อยละ 0 1.5 2 และ 3 มีกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนและกิจกรรมจำเพาะทำให้นมจับตัวเป็นก้อนไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) อยู่ในช่วง 0.43-0.44 ยูนิต/ตัวอย่าง 1 กรัม และ 0.05 ยูนิต/ โปรตีน 1 กรัม ตามลำดับ สำหรับสารสกัดเอนไซม์จากมะแว้งที่เติมโพลีไวนิลไพโรลิโดนร้อยละ 0 1.5 2 และ 3 มีกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนลดลง ($p>0.05$) เท่ากับ 2.20 1.97 1.78 1.72 ยูนิต/ตัวอย่าง 1 กรัม. ตามลำดับ นั่นคือความเข้มข้นของโพลีไวนิลไพโรลิโดนที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้กิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนและกิจกรรมจำเพาะทำให้นมจับตัวเป็นก้อนของสารสกัดเอนไซม์จากมะแว้งลดลง แต่การเพิ่มความเข้มข้นของโพลิไวนิลไพโรลิโดนไม่มีต่อกิจกรรมของสารสกัดเอนไซม์จากฟักเขียว เมื่อพิจารณาอัตราส่วนระหว่างกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนต่อกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีน พบว่า สารสกัดเอนไซม์จากฟักเขียวและมะแว้งที่เติมสารโพลีไวนิลไพโรลิโดนร้อยละ 1.5 มีค่าอัตราส่วนระหว่างกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนต่อกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนสูงกว่าสารสกัดเอนไซม์ที่เติมสารโพลีไวนิลไพโรลิโดน ร้อยละ 0 2 และ 3 แสดงในตาราง 10 จึงเลือกใช้สารโพลีไวนิลไพโรลิโดนร้อยละ 1.5 ร่วมกับบัฟเฟอร์ในการสกัดเอนไซม์จากพืช ในการผลิตคอทเทจชีส สเปรด โดยพืชที่เลือกใช้ได้แก่ ฟักเขียว เนื่องจากสารสกัดเอนไซม์จากฟักเขียวมีกิจกรรมจำเพาะทำให้นมจับตัวเป็นก้อนสูงกว่ามะแว้ง สารสกัดใสไม่มีสี หาซื้อง่าย มีผลผลิตตลอดทั้งปี ขณะที่สารสกัดเอนไซม์จากมะแว้งมีสีน้ำตาลซึ่งมีอาจผลต่อสีของตะกอนโปรตีนและจะมีผลผลิตในช่วงหน้าฝนเท่านั้น

ตาราง 10 ผลของความเข้มข้นของโพลีไวนิลไพโรลิโดนต่อกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อน กิจกรรมย่อยสลายโปรตีนและปริมาณโปรตีนของสารสกัดเอนไซม์จากฟักเขียวและมะแว้ง

Effect of concentration of polyvinylpyrrolidone on milk clotting activity, proteolytic activity and protein content of crude enzyme from Ash gourd and Sparrow's brinjal

Plant sample	Polyvinylpyrrolidone (%)	MCA (unit/g)	PA (unit/g/1hr);	MCA/PA	Protein (mg/g)	SMA (unit/ mg protein)
Ash gourd	0	0.44±0.01	0.47±0.03	0.94±0.03ab	8.71±0.05	0.05±0.01a
	1.5	0.44±0.00	0.40±0.01	1.10±0.17a	8.67±0.03	0.05±0.01a
	2	0.43±0.00	0.44±0.01	0.96±0.02ab	8.55±0.02	0.05±0.00a
	3	0.44±0.01	0.46±0.03	0.97±0.10ab	8.65±0.01	0.05±0.01a
Sparrow's	0	2.20±0.45	3.14±0.05	0.70±0.03c	81.45±0.25	0.03±0.00a
brinjal	1.5	1.97±0.12	0.56±0.04	3.50±0.37a	80.03±0.60	0.02±0.00b
	2	1.78±0.10	0.54±0.01	3.26±0.17ab	79.62±0.18	0.02±0.00b
	3	1.72±0.07	0.61±0.02	2.83±0.09b	81.45±0.27	0.02±0.00b

Mean ± Standard deviation of triplication. abc in the same column is significant at the 0.5 level; MCA = milk clotting activity ; PA= proteolytic activity ; MSA = milk specific clotting activity

การสกัดและทำบริสุทธิ์บางส่วนเอนไซม์ที่สกัดจากฟักเขียว เพื่อใช้ในการผลิตคอทเทจชีส สเปรด โดยสกัดเอนไซม์จากฟักเขียวด้วยสารละลายอะซิเตต บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.0 ร่วมกับโพลีไวนิลไพโรลิโดนร้อยละ 1.5 และตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 20 40 60 และ 80 และนำตะกอนโปรตีนแต่ละส่วนมาทดสอบกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อน กิจกรรมย่อยสลายโปรตีน วัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford พบว่า ตะกอนโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 21-40 และ 41-60 มีความบริสุทธิ์ เพิ่มเป็น 3.70 และ 3.20 เท่า ตามลำดับ โดยเอนไซม์ที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 21-60 มีกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนเท่ากับ 18.90 ยูนิต/ ตัวอย่าง 1 กรัม. และมีกิจกรรมจำเพาะทำให้นมจับตัวเป็นก้อนสูงกว่าเอนไซม์ที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0-20 และ 61-80 ดังนั้น จึงนำเอนไซม์จากฟักเขียวที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 21-60 นำมาไดอะไลซิสในสารละลายอะซิเตต บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1โมลาร์ พีเอช 5.0 ทำแห้งที่อุณหภูมิจุดเยือกแข็ง ได้เอนไซม์ผง 0.623 กรัม มีกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อน 18.02 ยูนิต/ตัวอย่าง 1 กรัม. เอนไซม์ผงมีกิจกรรมลดลงร้อยละ 4 และมีความบริสุทธิ์ 4.15 เท่า ดังแสดงในตาราง 11

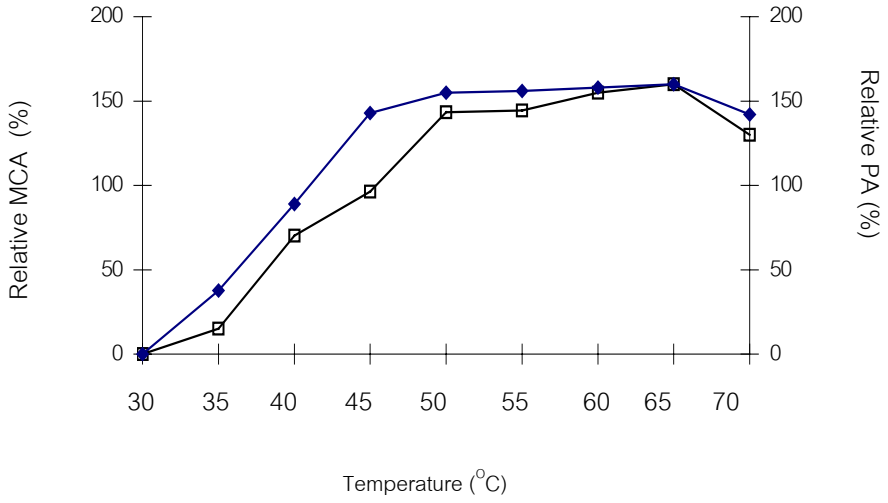
ตาราง 11 การทำบริสุทธิ์บางส่วนของสารสกัดเอนไซม์จากฟักเขียวด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวความเข้มข้นต่าง ๆ

Partial purification of crude enzyme from Ash gourd by various saturated ammonium sulfates

Fraction	Weight/ volume	MCA (unit/g)	PA (unit/g/1hr);	MCA/PA	Protein (mg/g)	SMA (unit/ mg protein)	Yield	Fold
Ash gourd (Pulp)	300 g							
Crude extract	450 ml	0.53±0.01	6.03±0.08	0.09±0.00	48.04±2.97	0.01±0.00	100	1
0-20% sat. $(NH_4)_2SO_4$precipitate, dialyzed	25 ml	1.61±0.02	15.69±0.15	0.10±0.00	181.44±11.71	0.01±0.00	3.01	0.80
21-40% sat. $(NH_4)_2SO_4$precipitate, dialyzed	25 ml	11.34±0.65	22.18±0.14	0.50±0.03	274.94±4.83	0.04±0.00	19.71	3.70
41-60% sat. $(NH_4)_2SO_4$precipitate, dialyzed	20 ml	7.86±0.37	18.07±0.33	0.43±0.01	220.19±3.39	0.04±0.00	14.61	3.20
61-80% sat. $(NH_4)_2SO_4$precipitate, dialyzed	5 ml	0.21±0.01	4.57±0.35	0.04±0.01	358.21±16.36	0.00±0.00	0.36	0.05
Freeze dried powder (21-60% sat. $(NH_4)_2SO_4$precipitate)	0.623 g	18.02±0.31	6.13±0.22	2.97±0.31	450.49±2.41	0.04±0.11	28.22	4.15

MCA = milk clotting activity; PA= proteolytic activity; SMA = specific milk clotting activity

เมื่อเปรียบเทียบกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนและกิจกรรมย่อยสลายโปรตีนของเอนไซม์ฟักเขียว พบว่า เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อน (MCA) และกิจกรรมย่อยสลายโปรตีน (PA) มีค่าเพิ่มขึ้น โดยมีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นกิจกรรมของเอนไซม์จะลดลง แสดงดังภาพ 7 ทั้งนี้เนื่องจากความร้อนจะเร่งให้เกิดปฏิกริยาการย่อยสลายโปรตีนและทำให้โปรตีนเสียสภาพและตกตะกอนเร็วขึ้น ดังนั้นในการผลิตคอทเทจชีส สเปรดด้วยเอนไซม์จากฟักเขียวควรคำนึงถึงอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มน้ำนมที่มีกิจกรรมย่อยสลายโปรตีนต่ำเนื่องจากถ้าบ่มน้ำนมที่มีกิจกรรมย่อยสลายโปรตีนสูงจะทำให้ปริมาณตะกอนโปรตีนที่ได้ต่ำ จากการทดลองของ Aworh และ Nakai (1986) พบว่าเอนไซม์ที่สกัดจากใบโซดอม มีกิจกรรมย่อยสลายโปรตีนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสสูงกว่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส



MCA = milk clotting activity

PA = proteolytic activity

ภาพ 7 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อน (□) และกิจกรรมย่อยสลายโปรตีน (✹) ของเอนไซม์จากฟักเขียว

Effect of temperature on milk clotting activity (□) and proteolytic activity (✹) of enzyme from Ash gourd

5. การผลิตคอทเทจชีส สเปรดด้วยเอนไซม์จากฟักเขียว

5.1 สภาวะที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีนด้วยเอนไซม์จากฟักเขียวในการผลิตคอทเทจชีส สเปรด

การผลิตคอทเทจชีส สเปรดจากน้ำนมพร่องไขมัน (ไขมันนมร้อยละ 0.2-0.4) ผ่านการพาสเจอไรส์ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที และตกตะกอนโปรตีนด้วยเอนไซม์จากฟักเขียวร่วมกับหัวเชื้อ *S. lactis* เข้มข้น 1.70 X10^9 เซลล์/มล. (ภาคผนวก ง) โดยเชื้อ *S. lactis* เป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-45 องศาเซลเซียส (มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช, 2539) ขณะที่อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนของเอนไซม์จากฟักเขียวเท่ากับ 50 องศาเซลเซียส 6.0 ดังนั้น การตกตะกอนโปรตีนด้วยเอนไซม์จากฟักเขียวร่วมกับหัวเชื้อ *S. lactis* ควรคำนึงสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์และกิจกรรมทำให้นมตกตะกอนด้วยเอนไซม์เพื่อให้ได้ปริมาณผลผลิตตะกอนโปรตีนสูงและตะกอนโปรตีนเกาะตัวกัน

5.1.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีนด้วยเอนไซม์จากฟักเขียว

น้ำนมพร่องไขมันนมพาสเจอไรส์มีค่าพีเอชเท่ากับ 6.5 และเมื่อเติมหัวเชื้อ *S. lactis* ร้อยละ 5 บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง น้ำนมมีพีเอชลดลงเป็น 6.3 จากนั้นเมื่อเติมเอนไซม์จากฟักเขียว 1.45 ยูนิต/นม 1 มล. และบ่มต่อที่อุณหภูมิต่างๆ (32 35 40 และ 45 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่า น้ำนมที่เติมหัวเชื้อ *S. lactis* ร้อยละ 5 และไม่เติมเอนไซม์จากฟักเขียว โปรตีนไม่ตกตะกอน น้ำนมที่เติมหัวเชื้อ *S. lactis* ร้อยละ 5 และเอนไซม์จากฟักเขียว 1.45 ยูนิต/นม 1 มล. และบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ หลังจากการบ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมง น้ำนมมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 5.8-6.1 เมื่อบ่มน้ำนมที่อุณหภูมิสูงขึ้น ทำให้ปริมาณตะกอนโปรตีนลดลงขณะที่ปริมาณเวย์เพิ่มขึ้น โดยการบ่มที่อุณหภูมิ 32 35 และ 40 องศาเซลเซียส มีปริมาณผลผลิตตะกอนโปรตีนไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) อย่างมีนัยสำคัญและมีปริมาณผลผลิตตะกอนโปรตีนสูงกว่าการบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยปริมาณผลผลิตตะกอนโปรตีนที่ได้จากการบ่มที่อุณหภูมิ 35 มีค่าสูงสุดเท่ากับร้อยละ 11.14

แสดงดังตาราง 12 จึงเลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการตกตะกอนโปรตีนของน้ำนมที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมงในการผลิตคอทเทจชีส สเปรด

ตาราง 12 การตกตะกอนโปรตีนของนมพร่องไขมันที่อุณหภูมิต่างๆ
Milk clotting of skim milk at various temperature

Treatment	Temp (°C)	pH*	Curd (g)	Whey (ml)	Yield (%) (Curd)
S. lactis 5%	32	6.06± 0.10	-	-	-
S. lactis 5% + enz**.	32	6.09±0.10	21.55±1.22a	168.50±0.71b	10.78±0.61a
S. lactis 5% + enz.	35	5.97±0.20	22.29±1.03a	168.00±1.41b	11.14±0.51a
S. lactis 5% + enz.	40	6.01±0.10	20.77±1.39a	169.50±0.71ab	10.39±0.25a
S. lactis 5% + enz.	45	6.10±0.10	15.66±1.78b	174.00±1.41a	7.83±0.85b

Mean ± Standard deviation of two replication.

** enz = enzyme from Ash gourd 1.45 unit/ml milk

*pH of incubated milk at various temperature for 4 h

ab in the same column is significant at the 0.5 level.

- not detected

5.1.2 ปริมาณเอนไซม์จากฟักเขียวที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีน

น้ำนมพร่องไขมันพาสเจอไรส์ (ไขมันร้อยละ 0.2-0.4) มีค่าพีเอชเท่ากับ 6.5 และเมื่อเติมหัวเชื้อ *S. lactis* ร้อยละ 5 บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง น้ำนมมีพีเอชลดลงเป็น 6.3 จากนั้นเมื่อเติมเอนไซม์ปริมาตรต่างๆ (0.95 1.45 1.95 2.45 ยูนิต/นม1 มล.) และบ่มต่อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (คัดเลือกได้จากข้อ 5.1.1) พบว่า เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้น ค่าพีเอชของน้ำนมมีค่าลดลง ตะกอนโปรตีนที่ได้ลดลง ปริมาณเวย์เพิ่มขึ้น และปริมาณผลผลิตของตะกอนโปรตีนที่ได้มีค่าลดลง โดยการเติมเอนไซม์ 0.95 ยูนิต/น้ำนม 1มล. มีปริมาณผลผลิตตะกอนโปรตีนสูงสุด เท่ากับร้อยละ 10.27 แสดงดังตาราง 13 แต่การเกาะตัว

ของตะกอนโปรตีนต่ำกว่าตะกอนโปรตีนที่ได้จากการเติมเอนไซม์ 1.45 ยูนิต/นม 1 มล. ซึ่งมีปริมาณผลผลิตตะกอนโปรตีนต่ำกว่า (ร้อยละ 9.71) แต่ลักษณะตะกอนโปรตีนที่ต้องการก่อนที่จะมีการผสมรวมกับครีม ตะกอนโปรตีนที่ต้องการ ต้องไม่เป็นเนื้อแป้ง (mealy) ไม่ร่วน (crumble) ไม่เป็นลักษณะแป้งเปียก (pasty) ไม่เหนียว (sticky) ไม่เป็นน้ำแฉะ (watery) หรือ มีลักษณะเป็นเลน (slimy) (United States department of agriculture, 2001) ซึ่งตะกอนโปรตีนที่ได้จากการเติมเอนไซม์ 1.45 ยูนิต/นม 1มล. ลักษณะใกล้เคียงกับตะกอนโปรตีนที่ต้องการมากที่สุด ดังนั้น ในการตกตะกอนโปรตีนเพื่อผลิตคอทเทจชีส สเปรดจึงเติมเอนไซม์จากฟักเขียว 1.45 ยูนิต/นม 1 มล.ในนมพร่องไขมันพาสเจอไรส์ที่เติมหัวเชื้อ *S lactis* ร้อยละ 5 และบ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วบ่มน้ำนมต่อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

ตาราง 13 ปริมาณตะกอนโปรตีนจากนมพร่องไขมันที่ตกตะกอนด้วยเอนไซม์จากฟักเขียวความเข้มข้นต่าง ๆ

Coagulum from skim milk clotted with enzyme from Ash gourd at various concentrations

Conc. of enzyme (unit/ml milk)	pH*	Curd (g)	Whey (ml)	Yield (%) (Curd)
0.95	5.78±0.10	5.13±0.04a	37.00±1.41c	10.27±0.09a
1.45	5.67±0.20	4.86±0.07b	41.50±0.71bc	9.71±0.14b
1.95	5.62±0.10	3.53±0.02c	43.00±1.41ab	7.07±0.04c
2.45	5.60±0.10	3.50±0.10c	47.50±0.71a	6.99±0.20c

Mean ± Standard deviation of two replication.

*pH of incubated milk at various temperature for 4 h

abc in the same column is significant at the 0.5 level

5.1 ผลของสารให้ความคงตัวและปริมาณไขมันในการผลิตคอทเทจชีส สเปรดด้วยเอนไซม์จากฟักเขียว

5.2.1 ชนิดและความเข้มข้นของสารให้ความคงตัวในการผลิตคอทเทจชีส สเปรดด้วยเอนไซม์จากฟักเขียว

ทำการผลิตคอทเทจชีส สเปรด จากน้ำนมพร่องไขมัน (ไขมันร้อยละ 0.2-0.4) ตามวิธีในภาคผนวก ง โดยนำตะกอนโปรตีนที่ผลิตได้มาผสมกับไขมันนมซึ่งมีการเติมสารให้ความคงตัวที่ต้องการศึกษา จากผลการทดลอง พบว่า ปริมาณสารให้ความคงตัวทุกชนิดจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับคุณลักษณะเนื้อสัมผัส คือ เมื่อใช้ปริมาณสารให้ความคงตัวเพิ่มขึ้นความแน่นเนื้อของผลิตภัณฑ์คอทเทจชีส สเปรด จะสูงขึ้นซึ่งพิจารณาจากค่าแรง (force) ค่าความนิ่ม (softness) และความเหนียว (adhesive) โดยคอทเทจชีส สเปรดที่เติมสารให้ความคงตัวร้อยละ 0.5 มีลักษณะเนื้อสัมผัสดีกว่าที่ระดับ 0.2 นอกจากนี้สารให้ความคงตัวยังมีสมบัติในการเป็นสารทดแทนไขมัน (Fat replacer) ซึ่งเมื่อนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารจะทำให้ช่วยลดปริมาณไขมันที่ต้องเติมลงไปและได้ผลิตภัณฑ์ที่มีไขมันต่ำแต่มีลักษณะกายภายทางด้านเนื้อสัมผัส ใกล้เคียงผลิตภัณฑ์ที่เติมไขมันตามอัตราส่วนปกติ (Lindsay, 1996) จากการทดลองผลิตภัณฑ์คอทเทจชีส สเปรดที่เติมเจลาตินและคาร์ราจีแนนร้อยละ 0.5 (เติมปริมาณไขมันร้อยละ 10) มีเนื้อสัมผัสใกล้เคียงกับครีมคอทเทจชีส สเปรด ทางการค้า ซึ่งมีค่าแรงและค่าความนิ่มเท่ากับ 47.06 กรัม และ 405.64 กรัมวินาที ตามลำดับ แสดงดังตาราง 14 แต่ครีมคอทเทจชีส สเปรดมีปริมาณไขมัน (ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 54) สูงกว่าผลิตภัณฑ์คอทเทจชีส สเปรดที่ผลิตได้ ดังนั้นจึงสามารถเลือกใช้เจลาตินหรือคาร์ราจีแนนเป็นสารให้ความคงตัวในผลิตภัณฑ์คอทเทจชีส สเปรดได้ แต่เนื่องจากแนวโน้มการใช้คาร์ราจีแนนในผลิตภัณฑ์นมสูงกว่าเจลาติน และคาร์ราจีแนนมีสมบัติเด่นในการเกิดปฏิกิริยากับโปรตีน (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2545) ดังนั้นจึงเลือกใช้คาร์ราจีแนนร้อยละ 0.5 เป็นสารให้ความคงตัวในการผลิตคอทเทจชีส สเปรดต่อไป

ตาราง 14 ผลของสารให้ความคงตัวต่อเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์คอทเทจ ชีส สเปรดที่ตกตะกอนนมด้วยเอนไซม์จากฟักเขียว

Effect of type of stabilizer on texture of cottage cheese spread coagulated by enzyme from Ash gourd

Stabilizer	Concentration	Texture		
	(%)	Force(g)	A1(gs)	A2(gs)
Gelatin	0	27.49±2.65Cc	260.98±27.05Cb	-138.57±8.30ABa
	0.2	27.16±1.60Bb	249.98±14.10Ba	-140.63±8.22BCab
	0.5	48.11±1.33Ba	413.63±51.68Ba	-222.09±41.61BCb
Carragenan	0	27.49±2.65Cc	260.98±27.05Cb	-138.57±8.30ABa
	0.2	40.87±1.00Ab	557.91±434.58Aa	-246.00±2.97Cab
	0.5	48.69±3.34Aa	434.58±23.78Aa	-205.20±10.76Cb
Salt CMC	0	27.49±2.65Cc	260.98±27.05Cb	-138.57±8.30ABa
	0.2	25.93±0.93Cb	248.47±18.15Ca	-121.57±12.31Aab
	0.5	32.23±1.23Ca	301.67±0.65Ca	–135.73±0.42Ab
C		47.06±4.84	405.64±57.62	-191.29±5.15

Mean ± Standard deviation of two replication. C= Commercial cream cottage cheese spread, A1 (gs)= Softness; A2(gs)= Adhesive; ABC in the same column between type of stabilizer is significant at the 0.5 level. abc in the same column between concentration of stabilizer is significant at the 0.5 level .

5.2.2 ปริมาณไขมันนมในการผลิตคอทเทจชีสสเปรดด้วยเอนไซม์จากฟักเขียว

ทำการผลิตคอทเทจชีส สเปรดจากน้ำนมพร่องไขมันตามวิธีในภาคผนวก ง โดยนำตะกอนโปรตีนที่ผลิตได้มาผสมกับไขมันนมซึ่งมีการเติมคาร์ราจีแนนร้อยละ 0.5 และใช้ความเข้มข้นของไขมันนมร้อยละ 0 10 และ 25 พบว่า ผลิตภัณฑ์คอทเทจชีส สเปรดที่เติมไขมันนมร้อยละ 0 มีเนื้อสัมผัสแน่นกว่าการเติมไขมันความเข้มข้นอื่น โดยให้ค่าแรง (force) ค่าความนิ่ม (softness) เท่ากับ 36.02 กรัมและ 331.22 กรัมวินาที ตามลำดับและมีค่าใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์ครีมคอทเทจชีส สเปรดทางการค้าซึ่งให้ค่า

แรงและค่าความนิ่มเท่ากับ 47.06 กรัมและ 405.64 กรัมวินาที แต่คอทเทจชีส สเปรดที่เติมไขมันนมร้อยละ 10 และ 25 มีความนิ่มกว่าการเติมไขมันนมร้อยละ 0 โดยให้ค่าความหนืด (adhesive) เท่ากับ -202 และ -174 กรัมวินาที ตามลำดับและมีค่าใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์ครีมคอทเทจชีส สเปรดทางการค้า ซึ่งให้ค่าความหนืดเท่ากับ -191.29 กรัมวินาที นั่นคือ ปริมาณไขมันที่เพิ่มขึ้นทำให้ผลิตภัณฑ์ครีมคอทเทจชีส สเปรดมีความนิ่มมากขึ้นและมีค่าความหนืดลดลง

ผลิตภัณฑ์คอทเทจชีส สเปรดที่เติมไขมันนมร้อยละ 0 10 และ 25 มีค่าความสว่าง เท่ากับ 92.24 92.22 และ 91.73 ตามลำดับ นั่นคือ ปริมาณไขมันนมเพิ่มขึ้นทำให้ค่าความสว่างมีแนวโน้มลดลงแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แต่ปริมาณไขมันที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้ค่าสีแดงและสีเหลืองของคอทเทจชีส สเปรดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.05$) โดยผลิตภัณฑ์ครีมคอทเทจชีส สเปรดที่เติมไขมันนมร้อยละ 0 10 และ 25 มีค่าสีแดงเท่ากับ -0.80 -0.35 และ 0.25 ตามลำดับนั่นคือผลิตภัณฑ์คอทเทจชีส สเปรดที่เติมไขมันร้อยละ 25 มีสีแดงเข้มกว่าเนยแข็งที่เติมไขมันนมร้อยละ 0 และ 10 สำหรับค่าสีเหลืองของผลิตภัณฑ์คอทเทจชีส สเปรดที่เติมไขมันนมร้อยละ 0 10 และ 25 เท่ากับ 9.55 11.67 และ 14.57 ตามลำดับ นั่นคือ ผลิตภัณฑ์คอทเทจชีส สเปรด ที่เติมไขมันนมร้อยละ 25 มีสีเหลืองเข้มกว่าผลิตภัณฑ์คอทเทจชีส สเปรดที่เติมไขมันนมร้อยละ 0 และ 10 แสดงดังตาราง 15

จากการทดลองพบว่าผลิตภัณฑ์คอทเทจชีส สเปรดที่ไม่เติมไขมันนมและใช้คาร์ราจีแนนร้อยละ 0.5 มีความแข็งใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์ครีมคอทเทจชีส สเปรด ทางการค้ามากที่สุด ขณะที่ผลิตภัณฑ์คอทเทจชีส สเปรดที่เติมไขมันนมร้อยละ 25 มีความนิ่มใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์ครีมคอทเทจชีส ทางการค้ามากที่สุดและผลิตภัณฑ์คอทเทจชีส สเปรดที่เติมไขมันนมร้อยละ 25 มีค่าสีใกล้เคียงผลิตภัณฑ์ครีมคอทเทจชีส สเปรดทางการค้ามากที่สุด ดังนั้นในการคัดเลือกปริมาณไขมันนมในการผลิตคอทเทจชีส สเปรดด้วยเอนไซม์จากฟักเขียว จะเลือกทำการผลิตคอทเทจชีส สเปรดที่ไม่เติมไขมันนมและใช้คาร์ราจีแนนร้อยละ 0.5 เนื่องจากต้องการผลิตภัณฑ์คอทเทจชีส สเปรดที่มีปริมาณไขมันต่ำ แต่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงและสามารถนำไปเป็นส่วนประกอบอาหารทดแทนไขมันได้โดยเนื้อสัมผัสไม่เปลี่ยนแปลง ซึ่งเหมาะสำหรับผู้ที่ต้องการควบคุมอาหารและผู้ที่รักสุขภาพทั่วไป

ตาราง 15 ผลของปริมาณไขมันนมต่อเนื้อสัมผัสและสีของผลิตภัณฑ์คอทเทจชีส สเปรดที่ตกตะกอนนมด้วยเอนไซม์จากฟักเขียว

Effect of cream on texture and color of cottage cheese spread coagulated by enzyme from Ash gourd

Cream (%)	Characteristic					
	Texture			Color		
	Force (g)	A1 (gs)	A2 (gs)	L*	a*	b*
0	36.02±1.40a	331.22±12.13a	-293.66±0.25b	92.24±0.21a	-0.80±0.07c	9.55±0.69c
10	26.39±4.05b	242.47±28.11b	-202.89±59.20ab	92.22± 0.01a	–0.35±0.08b	11.62±0.10b
25	25.46±3.08b	234.14±30.51b	-174.58±24.43a	91.73±0.06b	0.25±0.07a	14.57±0.12a
C	47.06±4.84	405.64±57.62	-191.29±5.15	93.60±0.42	0.33±0.38	14.55±0.47

Mean ± Standard deviation of two replication., C= Commercial cream cottage cheese, A1(gs) = Softness ; A2 (gs) = Adhesive; L* =Lightness (0 being black ,100 being white) , a* = Red verses green (+being red, - being green, 0 being gray); b* = Yellow verses blue (+being yellow, - being blue, 0 being gray). abc in the same column is significant at the 0.5 level

5.3 คุณสมบัติของผลิตภัณฑ์คอทเทจชีส สเปรด

5.3.1 คุณสมบัติทางเคมีของผลิตภัณฑ์คอทเทจชีส สเปรด

ผลิตภัณฑ์คอทเทจชีส สเปรดที่ผลิตด้วยเอนไซม์จากฟักเขียว มีปริมาณความชื้น ไขมัน โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และ เถ้า ร้อยละ 73.88 0.98 15.17 9.15 และ 0.82 ตามลำดับ และมีค่าพีเอชเท่ากับ 6.03 ซึ่งสูงกว่าค่าพีเอชของคอทเทจชีส สเปรดที่กำหนดไว้ไม่ควรเกิน 5.2 (United States department of agriculture, 2001) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเติมหัวเชื้อความเข้มข้นน้อยไปและใช้เวลาในการบ่มเพียง 4-5 ชั่วโมง ประกอบกับหัวเชื้อ *S. lactis* เป็นจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลกติกในปริมาณสูงปานกลาง โดยปริมาณกรดแลคติกที่วัดได้จากผลิตภัณฑ์คอทเทจชีส สเปรดที่ผลิตได้มีค่าร้อยละ 0.38 ดังนั้นการผลิตคอทเทจชีส สเปรดให้มีค่าพีเอชต่ำลง สามารถทำได้โดยการเพิ่มปริมาณหัวเชื้อหรือเพิ่มระยะเวลาการบ่มน้ำนมหรือใช้หัวเชื้อผสมระหว่างเชื้อ *S. lactis* ร่วมกับแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติกในปริมาณสูงมากได้แก่พวก Lactobacilli เช่น *Lactobacillus thermophilus* และ *L. helveticus* เป็นต้น

เมื่อพิจารณาปริมาณความชื้นและปริมาณไขมันของคอทเทจชีส สเปรดที่ผลิตได้ จัดเป็นเนยแข็งชนิดอ่อนไขมันต่ำ (skimmed milk soft cheese) โดยมีความชื้นไม่เกินร้อยละ 80 และปริมาณไขมันน้อยกว่าร้อยละ 2 (National Dairy Council Education Department, 2001) ให้พลังงาน 106 กิโลแคลอรี/100 กรัม ขณะที่ครีมคอทเทจชีส สเปรดทางการค้า ให้พลังงาน 187. กิโลแคลอรี/100 กรัม โดยมีปริมาณไขมันไม่ต่ำกว่าร้อยละ 54 ปริมาณโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตเท่ากับร้อยละ 9.3 และ 4.6 ตามลำดับ นอกจากผลิตภัณฑ์คอทเทจชีส สเปรดที่ผลิตได้มีปริมาณแคลเซียมเท่ากับ 323.53 มก/100 กรัม แสดงดังตาราง 16 ซึ่งน้ำนมและผลิตภัณฑ์จากน้ำนมเป็นแหล่งแคลเซียมที่สำคัญที่สุด โดยเฉพาะน้ำนมวัวให้แคลเซียมได้ถึง 120 มก./100 มล. ในขณะที่น้ำนมคนให้เพียง 30 มก./100 มล.(สุรัตน์ โคมินทร์, 2535)

ตาราง 16 องค์ประกอบทางเคมีของนมพร่องไขมัน ตะกอนโปรตีนและผลิตภัณฑ์คอทเทจชีส สเปรด ที่ผลิตด้วยเอนไซม์จากฟักเขียว
Chemical component of skim milk, curd and cottage cheese spread produced by enzyme from Ash gourd

Sample	Moisture (%)	Fat (%)	Protein (%)	CHO (%)	Ash (%)	Ca (mg/100ml/g)	Energy (KCal)
Skim milk+$CaCl_2$*	92.88	0.38	1.78	4.2	0.76	118.68	27.34
C1	73.88	0.98	15.17	9.15	0.82	323.53	106.1
C2	-	<54	9.3	4.6	-	-	187.3

* 0.01 M $CaCl_2$

C1= Cream cottage cheese spread, C2= Commercial cream cottage cheese spread

- not determined

5.3.2 คุณสมบัติทางจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์คอทเทจชีส สเปรด

ผลการตรวจวิเคราะปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด โคลิฟอร์มและอี-โคไล *S. aureus* จุลินทรีย์ที่ผลิตกรด และยีสต์และรา ในน้ำนมพร่องไขมัน (พาสเจอร์ไรด์ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 วินาที) เอนไซม์จากฟักเขียว (พาสเจอไรส์ที่

อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 นาที ตะกอนโปรตีนและผลิตภัณฑ์คอทเทจชีส สเปรด พบว่า ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดที่เจริญได้ที่อุณหภูมิปานกลางในเอนไซม์จากฟักเขียว น้ำนมพาสเจอร์ไรส์ ตะกอนโปรตีนและผลิตภัณฑ์คอทเทจชีส สเปรด มีค่าเท่ากับ 5.1 X10 , $3.6X10^5$, $3.2X10^6$, $3.4X10^6$ CFU/มล. ตามลำดับ ซึ่งปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดที่เจริญได้ที่อุณหภูมิปานกลางในน้ำนมพาสเจอร์ไรส์มีค่าสูงกว่าปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำนมที่ผ่านการพาสเจอไรส์ซึ่งกำหนดโดยกระทรวงสาธารณสุข ซึ่งกำหนดไว้ไม่เกิน 10,000 CFU/มล. (กองสัตวแพทย์สาธารณสุข กรมปศุสัตว์, 2539) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากกระบวนการหล่อเย็นหรืออาจเกิดการปนเปื้อนจากวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในกระบวนการผลิต ส่งผลให้ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดที่เจริญได้ที่อุณหภูมิปานกลางในตะกอนโปรตีนและผลิตภัณฑ์คอทเทจชีส สเปรด มีค่าสูงเช่นกัน ผลการตรวจวัดปริมาณโคลิฟอร์มโดยใช้ตาราง จำนวน MPN 3 หลอด พบว่า เอนไซม์ผงจากฟักเขียว น้ำนมพาสเจอร์ไรส์ ตะกอนโปรตีนและผลิตภัณฑ์คอทเทจแสดงผลเป็นลบ ไม่พบโคลิฟอร์มในตัวอย่าง แสดงว่าน้ำที่นำมาใช้ในกระบวนการผลิตมีความสะอาด ไม่มีการปนเปื้อนของสิ่งสกปรกจากคนและสัตว์ การตรวจวัดปริมาณเชื้อ *S. aureus* ในเอนไซม์จากฟักเขียว น้ำนมพาสเจอไรส์ ตะกอนโปรตีนและผลิตภัณฑ์คอทเทจชีส สเปรด ไม่พบเชื้อ *S. aureus* เจริญบนอาหาร BP ซึ่งสาเหตุที่ต้องทำการตรวจวัดปริมาณ *S. aureus* ในผลิตภัณฑ์เนยแข็ง เนื่องจาก *S. aureus* เป็นจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคสามารถถ่ายทอดโดยทางปาก จมูก ผิวหนัง และ อุจจาระซึ่งแสดงถึงสุขลักษณะของผู้ปฏิบัติงาน นอกจากนี้ *S. aureus* สามารถทนต่อในอาหารที่มีน้ำอิสระ (available water, a_w).ต่ำเท่ากับ 0.86 โดยแบคทีเรียส่วนใหญ่จะเจริญได้ดีในอาหารที่มีค่า a_w ประมาณ 1 ซึ่งในผลิตภัณฑ์เนยแข็งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีการดึงน้ำออกบางส่วนเท่านั้น ดังนั้นจุลินทรีย์สามารถเจริญได้ (สุมารี เหลืองสกุล, 2535) การตรวจวัดปริมาณจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดในตะกอนโปรตีนและผลิตภัณฑ์คอทเทจชีส สเปรดมีปริมาณ $3.7X10^4$ CFU/มล. และ $2.8X10^4$ CFU/มล. ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องจากในกระบวนการผลิตมีการเติมจุลินทรีย์ *S. lactis* ร้อยละ 5 ลงในน้ำนมพาสเจอร์ไรส์ ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์แสดงดังตาราง 17 ผลิตภัณฑ์คอทเทจชีส

สเปรดที่ผลิตได้ ปลอดจากเชื้อโรค *S. aureus* และมีคุณภาพทางจุลินทรีย์อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของ USDA ว่ามีปริมาณ โคลิฟอร์ม ไม่เกิน 10 CFU/มล. และปริมาณยีสต์และรา ไม่เกิน 10 CFU/มล. (United States department of agriculture, 2001)

ตาราง 17 ชนิดและปริมาณจุลินทรีย์ของวัตถุดิบหลักและผลิตภัณฑ์คอทเทจชีส สเปรด

Type and load of microorganism of raw material and product in cottage cheese spread

Sample	Mesophile (CFU/ml.)	Coliforms (MPN/g.)	*S. aureus* (CFU/ml.)	Lactic acid bacteria (CFU/ml.)	Yeast mold (CFU/ml.)
Plant enzyme	5.1 X10	ND	ND	-	ND
Skim milk	$3.6 X10^{5}$	ND	ND	-	ND
Curd	$3.2 X10^{6}$	ND	ND	$3.7 X10^{4}$	ND
Cottage cheese	$3.4 X10^{6}$	ND	ND	$2.8 X10^{4}$	ND

ND = not detected

- = not determined