บทที่ 1

บทนำ

1. บทนำต้นเรื่อง

เอนไซม์ที่ทำให้นมจับตัวเป็นก้อน มีความสำคัญในการผลิตเนยแข็ง ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่คุณค่าทางโภชนาการสูง การผลิตเนยแข็งในอดีตใช้เอนไซม์เรนนินที่สกัดจากกระเพาะอาหารของลูกวัวที่ยังไม่หย่านม ต่อมาเมื่อมีการบริโภคเนยแข็งกันมากขึ้นทำให้มีการใช้เรนนินมากขึ้นส่งผลให้มีการฆ่าลูกวัวเพิ่มมากขึ้น แต่การฆ่าลูกวัวเพียงเพื่อสกัดเอาเอนไซม์เรนนินจากกระเพาะมาสกัดเอนไซม์เรนนินเป็นการไม่คุ้มค่าถ้าเทียบกับการขายเนื้อวัวซึ่งสามารถขายได้ทุกส่วน ทำให้การฆ่าลูกวัวเพื่อเอากระเพาะมาสกัดเอนไซม์มีจำนวนลดลง ส่งผลให้เกิดปัญหาขาดแคลนเอนไซม์เรนนิน ดังนั้นจึงมีงานวิจัยเพื่อศึกษาค้นคว้าหาแหล่งของเอนไซม์เรนนินหรือเอนไซม์ที่ทดแทนเรนนินจากแหล่งอื่น ได้แก่ เอนไซม์จากสัตว์ชนิดต่าง ๆ เช่น เอนไซม์เปปซินจากกระเพาะไก่ (Schwimmer, 1981) เอนไซม์เปปซินจากกระเพาะหมู (Green, 1972) เอนไซม์ไคโมทริปซินจากปลา (An *et al*., 1994) เอนไซม์จากจุลินทรีย์ พวกเชื้อรา เช่น *Mucor pusillus* (Beldarrain *et al*., 2000) *M. miehei* (Seker *et al*., 1999; 1998) เอนไซม์จากแบคทีเรีย เช่น *Bacillus subtilis*, *B. cereus* (Van den berg, 1988) เอนไซม์จากพืช เช่น เอนไซม์คาร์โดซิน (cardosin) จากดอกคาร์โดน (cardoon) (Tavaria *et al.,* 2001) เอนไซม์โปรติเอสที่สกัดจากพืชมีกรรมวิธีการสกัดและทำบริสุทธิ์ง่าย (Silva and Malcata., 1999)

ประเทศไทยมีความหลากหลายทางพืชพันธุ์ที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ กอปรกับน้ำนมที่ได้จากฟาร์มของเกษตรกรไทยบางครั้งมีคุณภาพไม่สม่ำเสมอ ปริมาณไขมันนมหรือปริมาณของแข็งทั้งหมดไม่เท่ากับมาตรฐานที่กำหนดไว้ จึงต้องมีการปรับคุณภาพให้เท่ากับมาตรฐานซึ่งต้องเสียค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้น บริษัทที่ผลิตนมพร้อมดื่มจึงหันไปสั่งนมผงจากต่างประเทศซึ่งมีราคาถูกกว่าและมีคุณภาพที่สม่ำเสมอมากกว่า

น้ำนมที่ผลิตในประเทศไทย ทำให้น้ำนมภายในประเทศมีปริมาณมากเกินความต้องการ การผลิตเนยแข็งจากน้ำนมดิบเป็นแนวทางหนึ่งที่จะแปรรูปและใช้ประโยชน์จากน้ำนมที่มีอยู่ได้มากขึ้น โดยเนยแข็งที่ผลิตได้สามารถดัดแปลงให้ตรงตามความต้องการของคนในประเทศไทย อาจจะช่วยลดการนำเข้าเนยแข็งจากต่างประเทศและช่วยสนับสนุนผลิตภัณฑ์ที่ผลิตภายในประเทศอีกด้วย

2. ตรวจเอกสาร

2.1 เอนไซม์ที่ทำให้นมจับตัวเป็นก้อน (Milk clotting enzyme)

เอนไซม์ที่ทำให้นมจับตัวเป็นก้อนจัดเป็นเอนไซม์โปรติเอสซึ่งสามารถย่อยโปรตีนเคซีนในน้ำนม ทำให้เคซีนไมเซลล์ (casein micell) เปลี่ยนแปลงไปและจับตัวเป็นก้อนตะกอน เอนไซม์โปรติเอสที่มีบทบาททำให้นมจับตัวเป็นก้อนจากแหล่งต่างๆ ได้แก่ เอนไซม์โปรติเอสจากสัตว์ เช่น เอนไซม์เรนนินจากกระเพาะลูกวัว (Pang and Ernstrom, 1986) เอนไซม์เปปซิน (pepsin) จากกระเพาะไก่ (Mcmahon and Brown, 1985) เอนไซม์เรนนินจากกระเพาะลูกอูฐ (Elagamy, 2000) เอนไซม์โปรติเอสจากหอยกาบ (Chen and Zall, 1986a; 1986b) เอนไซม์โปรติเอสจากพืช เช่น เอนไซม์ปาเปน (papain) จากยางมะละกอ (Arnon, 1970) เอนไซม์โบรมิเลน (bromelain) จากผลและใบสับปะรด (Ernstrom, 1980) เอนไซม์ฟิซิน (ficin) จากยางมะเดื่อ (Whitaker, 1959) เอนไซม์โปรติเอสจากจุลินทรีย์ เช่น เอนไซม์นูรี เรนนิน (noury rennin) จาก *Mucor pusillus* (Arima *et al*., 1970) เอนไซม์ซูพาเรน (suparen) จาก *Endothia parasitica* (Alichanidis *et al*., 1984) เอนไซม์เคซีเนส (caseinase) ที่ผลิตจาก *Penicillium oxalicum* (Hashem, 2000; 1999) เป็นต้น เอนไซม์ที่ทำให้นมจับตัวเป็นก้อนจากแหล่งต่าง ๆ มีกิจกรรมย่อยสลายโปรตีนแตกต่างกัน โดยทั่วไปเอนไซม์เรนนินจากสัตว์มีกิจกรรมย่อยสลายโปรตีนน้อยกว่าเอนไซม์โปรติเอสที่ทำให้นมจับตัวเป็นก้อนจากพืช (Freitas and Malcata, 1996)

เอนไซม์โปรติเอสที่มีบทบาททำให้นมจับตัวเป็นก้อนจากแหล่งต่าง ๆ จัดเป็นเอนไซม์โปรติเอสชนิดย่อยพันธะเปปไทด์ภายในสายโปรตีน (endopeptidase) ได้แก่ ซีรีน โปรติเอส (serine protease) ซีสเตอีน (cysteine protease) แอสปาติก โปรติเอส (aspartic protease) และเมททัลโลโปรติเอส (mettalloprotease) ซึ่งมีพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนและความจำเพาะในการย่อยสลายพันธะเปปไทด์แตกต่างกันดังตาราง 1 ชนิดของเอนไซม์โปรติเอสตามกลไกการทำงานสามารถจำแนกได้ดังนี้ (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2543)

1. เซรีน โปรติเอส (serine protease, EC 3.4.21) สามารถย่อยโปรตีนได้ในสภาวะที่เป็นด่าง (alkali protease) ในช่วงพีเอช 7-11 เช่น เอนไซม์ไคโมทริปซิน (cymotrypsin) เอนไซม์ทริปซิน (trypsin)

2. ซิสเตอีน โปรติเอส (cystein protease, EC 3.4.22) สามารถย่อยโปรตีนได้ในสภาวะที่เป็นกลาง (neutral protease) ในช่วงพีเอช 6.0 -7.5 เช่น เอนไซม์ปาเปน เอนไซม์โบรมีเลน และเอนไซม์ฟิซิน

3. แอสปาติก โปรติเอส (aspartic protease, EC 3.4.23) สามารถย่อยโปรตีนได้ในสภาวะที่เป็นกรด (acid protease) ในช่วงพีเอช 2-4 ได้แก่ เอนไซม์เรนนินและเอนไซม์เปปซิน เป็นต้น

4. เมททัลโลโปรติเอส (mettalloprotease, EC 3.4.24) สามารถย่อยโปรตีนได้ในสภาวะที่เป็นกลาง ในช่วงพีเอช 6.5 -7.5 เช่น คาร์บอกซีเปปตีเดส (carboxypeptidase)

ตาราง 1 เอนไซม์โปรติเอสที่ทำให้นมจับตัวเป็นก้อนจากแหล่งต่างๆ

Source of milk clotting protease

Source	Type of protease	Enzyme	Typical pH rang	Preferential specificity
Animals -				
Ox, pig	Serine protease	Trypsin, Chymotrypsin	pH 7-9 pH 8-9	Lys-,Arg-COOH Phe-,Tyr-, Trp-COOH
	Aspartic protease	Pepsin, pepsin A	pH 1-4	Mainly hydrophobic-COOH and -NH_2
Calf	Aspartic protease	Chymosin, rennin	pH 4-6	Rennet specificity on casein; mainly hydrophobic-COOH and -NH_2 onprotein subtrates in general
Plants-				
Papaya latex	Cysteine protease	Papain	pH 5-8	Broad specificity, mainly hydrophobic-X-COOH
Pineapple stem	Cysteine protease	Bromelain	pH 5-8	
Fig latex	Cysteine protease	Ficin	pH 5-8	
Microbial -				
Mold				
Mucor pusilus	Aspartic protease	Noury rennet	pH 4-6	Rennet specificity on casein; mainly hydrophobic-COOH and -NH_2 onprotein subtrates in general
Mucor miehei	Aspartic protease	Rennilase	pH 4-6	
Endothia parasitica	Aspartic protease	Suparen	pH 4-6	Also Glx-COOH
Bacterial				
Bacillus subtilis	Mettalloprotease	Neutrase	pH 6-8	Leu-,phe-NH_2, and other

Source: Nissen (1993); Alichanidis *et al*. (1984) and Greenberg (1955)

2.2 เอนไซม์เรนนิน (Rennin)

เป็นเอนไซม์โปรติเอสชนิดแอสปาติก โปรติเอส มีชื่อสามัญว่าไคโมซิน (chymosin, EC 3.4.4.23) หรือ มีชื่อเรียกในทางการค้าว่า เรนเนท (rennet) ใช้ตกตะกอนนมในการผลิตเนยแข็ง เอนไซม์เรนนินสกัดได้จากกระเพาะส่วนที่ 4 (Abomasa) ของลูกวัว มีปริมาณมากที่สุดในช่วงที่มีการให้นม (period of lactation) จากนั้นเอนไซม์เรนนินก็จะค่อยๆ ลดลง (เชษฐ์ เอี่ยมจิตกุศล, 2532) แต่จะมีปริมาณเอนไซม์เปปซิน ในกระเพาะอาหารเพิ่มมากขึ้น ทำให้เอนไซม์เรนนินในกระเพาะลูกวัวประกอบด้วยเอนไซม์เรนนินและเปปซินในอัตราส่วนประมาณ 80:20 (Van den Berg, 1988; Rothe *et al*., 1976) ส่วนที่อวัยวะอื่น เช่น ตับ ไต ปอด มีปริมาณเอนไซม์เรนนินน้อยกว่าในกระเพาะมาก เอนไซม์เรนนินได้จากการนำกระเพาะลูกวัวมาแช่ในน้ำเกลือ เอนไซม์ที่ได้ประกอบด้วยเอนไซม์เรนนินซึ่งมีกิจกรรมและโปรเรนนินซึ่งไม่มีกิจกรรม เมื่อเติมกรดในน้ำเกลือโปรเรนนินจะถูกเปลี่ยนเป็นเรนนิน ซึ่งจะให้กิจกรรมสูงที่พีเอช 5.0 ถ้าพีเอชต่ำกว่า 3.5 หรือสูงกว่า 6 เอนไซม์เรนนินจะเริ่มเสียสภาพ พีเอชที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เรนนินต่อแคปปา-เคซีน คือ 5.1-5.3 และมีความจำเพาะต่อการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ระหว่าง Phe_{105}-Met_{106} ของแคปปา-เคซีน (Sousa and Malcata, 1998a) เมื่อแคปปา-เคซีนถูกย่อยสลายโครงสร้างไมเซลล์จะถูกทำลาย ทำให้เกิดการย่อยสลาย แอลฟาเอส-เคซีน และ เบต้า-เคซีน ในระยะต่อมามีความสำคัญในช่วงการบ่มเนยแข็ง ซึ่งส่งผลต่อโครงสร้าง เนื้อสัมผัสและกลิ่นรสของเนยแข็ง

2.3 น้ำนม (Milk)

น้ำนมและผลิตภัณฑ์นมเป็นอาหารที่นิยมบริโภคกันมาก เนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการสูง ร่างกายสามารถย่อยน้ำนมได้โดยเฉลี่ยร้อยละ 95 และดูดซึมได้เกือบสมบูรณ์ น้ำนมมีโปรตีนที่มีคุณภาพดี ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นครบถ้วน นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งแร่ธาตุและวิตามินที่สำคัญ ได้แก่ วิตามิน เอ ดี อี เค มีปริมาณแคลเซียมและฟอสฟอรัสในอัตราส่วนสมดุลกันและปริมาณสูง (มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช, 2544)

น้ำนมได้จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดต่าง ๆ เช่น น้ำนมคน น้ำนมแกะ น้ำนมวัว น้ำนมแพะ น้ำนมอูฐ น้ำนมกระบือ เป็นต้น ซึ่งน้ำนมจากแหล่งต่าง ๆ กัน มีองค์ประกอบแตกต่างกันด้วย โดยมีปริมาณน้ำ ไขมัน โปรตีน น้ำตาล เกลืออินทรีย์และเกลืออนินทรีย์ เฉลี่ยร้อยละ 87.3, 3.67, 3.42, 4.78 และ 0.7 ตามลำดับ (รัชนี ตัณฑะพานิชกุล, 2542) ปริมาณไขมันและสารประกอบคล้ายไขมัน ได้แก่ ไขมันนมเป็นส่วนใหญ่ ฟอสฟอไลปิด (phospholipid) สเตอรอล (sterol) แคโรทีนอยด์ (carotenoid) วิตามินเอ (vitamin A) วิตามินดี (vitamin D) วิตามินอี (vitamin E) และ วิตามินเค (vitamin K) น้ำตาลในน้ำนมประกอบด้วยน้ำตาล 2 ชนิด คือ น้ำตาลแลคโตส (lactose) และน้ำตาลกลูโคส (glucose) เอนไซม์ที่สำคัญในน้ำนม ได้แก่ เอนไซม์คะตะเลส (catalase)เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase) เอนไซม์รีดักเตส (reductase) เอนไซม์ไลเปส (lipase) เอนไซม์ฟอสฟาเตส (phosephatase) เอนไซม์โปรติเอส (protease) และเอนไซม์อะไมเลส (amylase) (Walstra *et al*., 1999)

ในที่นี้กล่าวถึงโปรตีนในนมซึ่งมีส่วนสำคัญในการจับตัวกันเป็นก้อน โปรตีนในน้ำนมแบ่งเป็น 2 ชนิด ได้แก่ เคซีนเป็นโปรตีนที่มีมากในน้ำนม (ร้อยละ 80) และเวย์โปรตีน (ร้อยละ 20) เคซีนเป็นโปรตีนที่พบในน้ำนมเท่านั้น เคซีนเป็นสารประกอบฟอสโฟโปรตีน (phosphoprotein) ประกอบด้วย แอลฟาเอส 1-เคซีน (α_{s1}-casein), แอลฟาเอส 2-เคซีน (α_{s2}-casein), เบต้า-เคซีน (β-casein), แกรมมา-เคซีน γ-casein และ แคปปา-เคซีน (κ-casein) ดังตาราง 2 และ เวย์โปรตีนประกอบด้วย เบต้า-แลคโตโกลบูลิน (β-Lactoglubulin) แอลฟ่า-แลคโตอัลบูมิน (α-Lactalbumin) และโปรตีนอื่น (รัชนี ตัณฑะพานิชกุล, 2542)

ตาราง 2 องค์ประกอบของเคซีน

Component of casein

Type of casein	Casein (%)	Molecule weight	pI*
α_{s1}-casein	39-46	23,600	4.6
α_{s2}-casein	8-11	25,150	5.1
β-casein	25-35	24,000	5.3
γ-casein	3-7	11-21,000	3.7-4.2
κ-casein	8-15	19,000	5.8

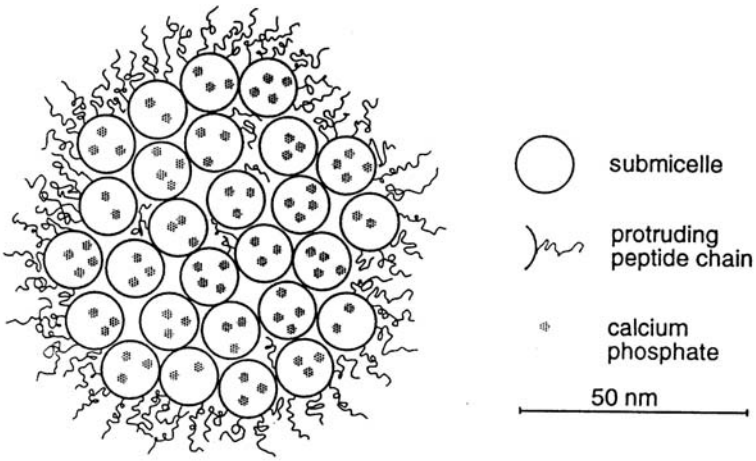
* pI = isoelectric point

Source: Walstra *et al*.(1999) ; Zapsalis and Beck (1985, อ้างโดย เสาวลักษณ์ จิตรบรรเจิดกุล, 2534)

เคซีนในนมอยู่ในรูปของไมเซลล์ (micelles) เรียกว่า เคซีนไมเซลล์ซึ่งกระจายตัวแขวนลอยในน้ำนมมีลักษณะทรงกลม ผิวหยาบ (roughly spherical aggregates form) เกิดจากการรวมตัวเป็นก้อนของซับไมเซลล์ (submicell) ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 12-15 นาโนเมตร แต่ละซับไมเซลล์ประกอบด้วยเคซีน 20-25 โมเลกุล แคลเซียมฟอสเฟส (calcium phosphate) ประมาณ 8 กรัม/เคซีน 100 กรัม และโปรตีนชนิดอื่น ๆ ปริมาณเล็กน้อย เช่น โปรติโอส-เปปโตน (proteose-peptone) และซับไมเซลล์มีพันธะไม่ชอบน้ำ (hydrophobic bonds) และสะพานเกลือ (salt bridges) ยึดโมเลกุลของเคซีนและแคลเซียมฟอสเฟตไว้ด้วยกัน ส่วนที่ไม่ชอบน้ำจะซ้อนอยู่ด้านในแกนกลางของซับไมเซลล์ ขณะที่ผิวด้านนอกของซับไมเซลล์จะมีส่วนของกลุ่มที่มีประจุและมีส่วนไม่ชอบน้ำอยู่ปริมาณน้อย

ซับไมเซลล์ประกอบด้วยโปรตีน 25 โมเลกุล มีอัตราส่วนของ แอลฟาเอส1-เคซีน ต่อแอลฟาเอส2-เคซีน ต่อเบต้า-เคซีนรวมกันแกรมมา-เคซีน ต่อแคปปา-เคซีน ประมาณ 4: 1: 4: 1.6 โดยส่วนแคปปา-เคซีนที่เป็นสายโซ่ (polymer) ประกอบด้วยเคซีน 6 โมเลกุลรวมตัวกันด้วยพันธะไดซัลไฟล์ (S-S linkages) ส่วนพันธะชอบน้ำ

(hydrophilic bonds) ด้าน C- terminal ของแคปปา-เคซีน จะยื่นออกจากซับไมเซลล์ มีลักษณะเป็นเส้นผมยื่น (protuding hairs) มีความยืดหยุ่น (flexible) ซับไมเซลล์แบ่งเป็น 2 ส่วน ได้แก่ซับไมเซลล์ส่วนที่ประกอบด้วยแคปปา-เคซีน และ ส่วนไม่มี (หรือมีเล็กน้อย) แคปปา-เคซีน ซับไมเซลล์จะเข้าใกล้กันในด้านที่ไม่มีเส้นผมโดยทั่วไป ความหนาของชั้นขนประมาณ 7 นาโนเมตร การรวมตัวกันของซับไมเซลล์จะดำเนินไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งได้กลุ่มของเคซีนไมเซลล์ที่มีลักษณะทรงกลม ผิวหยาบ คือมีส่วนขนของแคปปา-เคซีนปกคลุมอยู่ทั่วเคซีนไมเซลล์ แสดงดังภาพ 1 โมเลกุลของเคซีนในซับไมเซลล์จะจับตัวกันหลวม ๆ ด้วยพันธะเปปไทด์ (peptide chain) และสามารถเคลื่อนย้ายได้อย่างอิสระ พันธะเปปไทด์ภายในซับไมเซลล์จะสูญเสียความยืดหยุ่น (flexibility) เกือบทั้งหมดเพราะแคลเซียมฟอสเฟตภายในซับไมเซลล์ ยกเว้นเปปไทด์ด้าน C- terminal ซึ่งเป็นส่วนของแคปปา-เคซีนที่ยื่นออกจากซับไมเซลล์ แคปปา-เคซีนสามารถละลายในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันในช่วงกว้าง แต่แอลฟาเอส-เคซีน และ เบต้า-เคซีนไม่ละลายในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ แคปปา-เคซีนจึงมีความสำคัญในการรักษาความเสถียร (stability) ของเคซีนไมเซลล์ เพราะช่วยทำให้แอลฟาเอส-เคซีนและเบต้า-เคซีนเสถียรอยู่ได้ เมื่อมีการเติมเอนไซม์เรนนินในการผลิตเนยแข็ง แคปปา-เคซีนจะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์เรนนินได้ง่ายที่สุด (Walstra *et al*., 1999)



ภาพ 1 เคซีนไมเซลล์

Casein micell

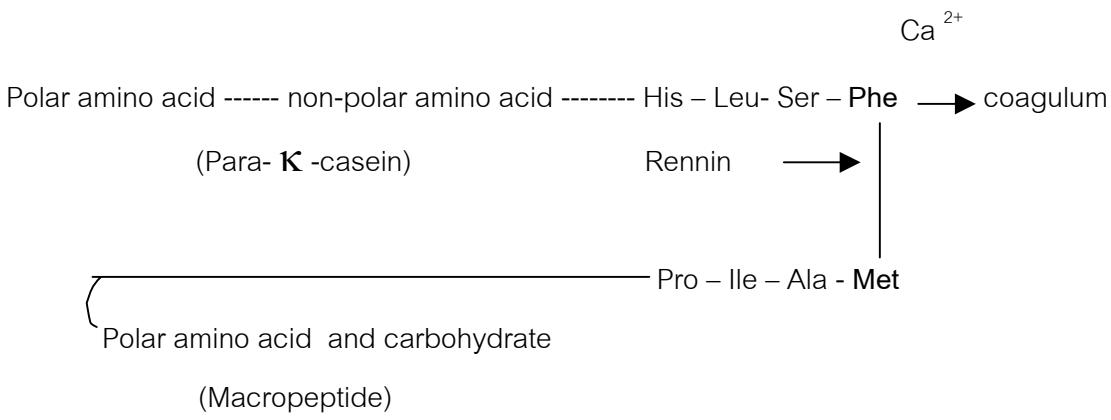
Source: Walstra *et al.* (1999)

ปฏิกิริยาของเอนไซม์เรนนินต่อเคซีน การตกตะกอนนมด้วยเอนไซม์เรนนินจะเกิดได้ 2 ขั้นตอน (Eskin, 1990) คือ

ขั้นตอน 1 (primary enzymatic hydrolysis) เอนไซม์เรนนินทำให้โปรตีนเคซีนเสียสภาพ การย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในแคปปา-เคซีนตำแหน่ง Phe_{105}-Met_{106} ทำให้ได้โปรตีนใหม่ชื่อว่า พารา-แคปปา-เคซีน (para-κ-casein) และแมคโครเปปไทด์ (macropeptide) ซึ่งละลายอยู่ในส่วนของเวย์โปรตีน ระยะนี้นมจะยังไม่ตกตะกอน ถ้าหากเอนไซม์ยังทำปฏิกิริยากับโปรตีนยังไม่เสร็จ เอนไซม์จะทำปฏิกิริยากับนมในช่วงอุณหภูมิ 15 – 60 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่ต่ำหรือสูงกว่านี้เอนไซม์จะไม่ทำปฏิกิริยา เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นทุก ๆ 10 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะทำปฏิกิริยาเร็วขึ้น 2-4 เท่า

ขั้นตอน 2 (clotting) คือระยะที่นมตกตะกอน คือ เคซีนจะถูกทำให้เสียสภาพโดยเอนไซม์ พารา-แคปปา-เคซีน ซึ่งไม่มีสมบัติของคอลลอยด์ จะจับตัวกับแคลเซียมอิออน (Ca^{2+}) ที่มีในน้ำนม อยู่ในรูปแคลเซียมพาราเคซีเนท (cacium - para casinate) ซึ่งไม่ละลายน้ำและรวมตัวกันในลักษณะร่างแห โดยมีแคลเซียมอิออนเชื่อมระหว่างโมเลกุลของแคลเซียมพาราเคซีเนททำให้เกิดร่างแหขนาดใหญ่ขึ้น เกิดเป็น

ตะกอนลิ่มนมหรือตะกอนโปรตีน (coagulum) ข้อสังเกต คือ แคลเซียมเคซีเนท (cacium casinate) นั้นละลายน้ำได้ ส่วนแคลเซียมพาราเคซีเนทไม่ละลายน้ำ และประกอบด้วยเกลือแร่รวมอยู่มาก ดังนั้นเนยแข็งจึงเป็นอาหารที่อุดมสมบูรณ์ไปด้วยโปรตีน ไขมัน และเกลือแร่ (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2543)



ภาพ 2 บทบาทของเอนไซม์เรนินต่อแคปปา-เคซีน

Figure 2 Role of rennin on κ-casein

Source : Schwimmer (1981)

การตรวจวัดกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนของเอนไซม์ (milk clotting activity, MCA) สามารถทำได้หลายวิธี โดยมีเครื่องมือและวิธีการแตกต่างกัน เช่น

1. วิธี Rolling bottle เป็นวิธีที่วัดระยะเวลาทำให้นมจับตัวเป็นก้อน โดยบรรจุน้ำนมในขวดแก้วใส เอียงทำมุมประมาณ 45 องศาเซลเซียส มีการหมุนตลอดด้วยความเร็วสม่ำเสมอ แช่ในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิและและบันทึกระยะเวลาที่นมจับตัวเป็นก้อนโดยจับเวลาที่เมื่อเติมเอนไซม์ลงไปในน้ำนมแล้วสังเกตเห็นตะกอนเคซีนที่จับตัวติดอยู่ข้างขวดเป็นจุดเล็กๆ สีขาว

2. การใช้เครื่อง Formagraph เป็นอุปกรณ์ที่มีลูกตุ้มจุ่มลงในน้ำนมและแกว่งไปมา บันทึกการเคลื่อนไหวของลูกตุ้มด้วยกราฟซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดของน้ำนมที่เปลี่ยนไปที่ระยะเวลาหนึ่ง ๆ (Mcmahon *et al.,* 1984; Mcmahon and Brown, 1982)

การวัดกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนด้วยเครื่อง Formagraph จะทำให้นมจับตัวเป็นก้อนนานกว่าการวัดด้วยวิธี Rolling bottle แต่กราฟมาตรฐานของทั้ง 2 วิธี เป็นเส้นตรงเมื่อใช้เอนไซม์เรนนินเป็นสารมาตรฐานความเข้มข้น 0.2-1.0 ยูนิต/มล. (Mcmahon and Brown, 1982)

3. เทคนิค Casein-agar diffusion เป็นวิธีการที่วัดได้ทั้งกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนหรือกิจกรรมย่อยสลายโปรตีน วิธีนี้ค่อนข้างจะมีความไวและใช้ได้กับความเข้มข้นของเอนไซม์ช่วงกว้าง (Carlson and Hill, 1985)

4. ปฏิกิริยา Immunological agglutination เป็นวิธีการวัดกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนที่มีความไวและมีความจำเพาะ สามารถระบุชนิดและปริมาณของเอนไซม์ได้ (Singh and Creamea, 1990)

5. เทคนิค Berridge clotting เป็นวิธีการวัดกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนจากระยะเวลาที่ทำให้นมจับตัวเป็นก้อนหลังจากเติมเอนไซม์ลงในน้ำนม แล้วบ่มไว้ภายใต้สภาวะที่กำหนด เป็นวิธีที่สะดวกแต่ค่าที่วัดได้มีความแปรปรวนสูง ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของนม (Singh and Creamea, 1990)

6. เทคนิค Colorimetric เป็นวิธีการวัดกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อน โดยวัดค่าความขุ่นของน้ำนมที่เปลี่ยนแปลงเมื่อเติมเอนไซม์ลงไป ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโต-มิเตอร์ (spectrophotometer) วัดค่าความขุ่นที่เปลี่ยนแปลงไปซึ่งสัมพันธ์กับกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนของเอนไซม์ ตัวอย่างเช่นเมื่อเติมเอนไซม์เปปซินความเข้มข้นสูงค่าดูดกลืนแสงลดลงอย่างรวดเร็วหรือน้ำนมมีความขุ่นน้อยลง เมื่อเติมเอนไซม์เปปซินความเข้มข้นต่ำค่าดูดกลืนแสงจะค่อย ๆ ลดลงช้า ๆ โดยที่เอนไซม์เปปซินความเข้มข้น 20 นาโนกรัม จะให้กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาที่ทำให้นมจับตัวเป็นก้อนและค่าดูดกลืนแสงเป็นเส้นตรง (Mcphie, 1976)

Uchikoba และ Kaneda (1996) ทำการวัดค่าความขุ่นของสารละลายเคซีน เมื่อเติมเอนไซม์คูคูมมิซิน (cucumisin; EC. 3.4.21.25) จากผลแตงไท โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร พบว่า เอนไซม์ความเข้มข้นสูง ค่าความขุ่นที่วัดได้จะเปลี่ยนแปลงเร็วกว่าเอนไซม์ความเข้มข้นต่ำ เช่น เมื่อเติมเอนไซม์คูคูมมิซินความเข้มข้น 0.85 ไมโครโมลาร์ ให้ค่าความขุ่นสูงสุดที่เวลา 8 นาที หลังจากเติมเอนไซม์จากนั้นค่าความขุ่นก็จะลดลงอย่างรวดเร็ว ขณะที่การเติมเอนไซม์คูคูมมิซินที่มีความเข้มข้น 0.11 ไมโครโมลาร์ ค่าความขุ่นค่อย ๆ เพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ และมีค่าความขุ่นสูงสุดที่เวลา 45 นาที

2.4 **พืชที่มีเอนไซม์ทำให้นมจับตัวเป็นก้อน** (Milk clotting enzyme from plants)

พืชที่มีทำให้นมจับตัวเป็นก้อนและพืชที่มีเอนไซม์โปรติเอสที่น่าสนใจแสดง ดังตาราง 3 ดังนี้

ตาราง 3 พืชที่มีเอนไซม์โปรติเอสและทำให้นมจับตัวเป็นก้อน

Protease clotted milk enzyme from plants

Families	Scientific name	Common name	References
Cucurbitaceae	*Benincasa cerifera*	Ash gourd	Gupta and Eskin (1977)
	Cucumis melo	Melon	Uchikoba and Kaneda (1996)
	Cucubita pepo	Pumpkin	Schwimmer (1981)
Solanaceae	*Solanum dobium*	Jubein	Yousif *et al*. (1996)
	Solanum torvum	Prickly solanum	Hamdy (1976, quoted in Yousif *et al*., 1996)
	Withania coagulans	Gourd cherry	Singh *et al*. (1973)
	Solanum eleagnifolium	Horse nettle	Schwimmer (1981)
Leguminosae	*Eriosema shirense*		Lopes *et al*. (1998)
	E. ellipticum		Lopes *et al*. (1998)
	E. pauciflorum		Lopes *et al*. (1998)
	E. gossweilleri		Lopes *et al*. (1998)
	E. psoraleoides		Lopes *et al*.(1998)
	Adenolichos anchietae		Lopes *et al*. (1998)
	Droogmansia megalantha		Lopes *et al*. (1998)
	Soja hispidus	Soybean	Schwimmer (1981)
	Arachis hypogea	Peanut	Schwimmer (1981)
Compositae	*Onopordum taurricum*	Tauria thistle	Tamer (1993)
	Centaurea calcitrapa	Redstar thistle	Tavaria *et al*. (1997)
	Cynara cardunculus	Artichoke thistle	Salguero and Sanjuan (1999)
	Cynara humilis	Artichoke thistle	Vieira (1972, quoted in Tavaria *et al*., 2001)
	Cynara scolymus	Artichoke thistle	Vieira (1972, quoted in Tavaria *et al*., 2001)
	Silybum marianum	Milk thistle	Fevereiro (1986, quoted in Tamer,1993)

ตาราง 3 (ต่อ)

(Continued)

Families	Scientific name	Common name	Reference
Bromeliaceae	*Ananas comosus*	Pineapple	Schwimmer (1981)
	Bromelia hieronymi	Chaguar	Bruno *et al.* (2002)
	Bromelia pinguin	Maya	Schwimmer (1981)
Asclepiadaceae	*Calotropis porcera*	Sodom apple	Aworh and Nakai (1986)
	Asclepias mexicana	Milkweed	Schwimmer (1981)
Caricaeae	*Carica papaya*	Papaya	Ernstrom (1980)
	Pileus mexicanus	Cuaguayote	Schwimmer (1981)
Araceae	*Dieffenbachia maculata*	Dumb cane	Padmanabham (1993, quoted in Lopes, 1998)
Euphorbiaceae	*Euphorbia cerifera*	Caper	Schwimmer (1981)
	Hura crepitans	Jabillo	Schwimmer (1981)
	Cnidoscolus chayamansa	Chaya	Iturbe-chinas and canales (1986)
Moraceae	*Ficus carica*	Fig	Whitaker (1959)
Phytolaccaceae	*Phytolacca americana*	Pokeweed	Kaneda *et al.* (1988)
Asteraceae	*Lactuca sativa*	Lettuce	Piero *et al*. (1990)

2.4.1 **พืชวงศ์** Cucurbitaceae

ฟักเขียว (ash gourd; *Benincasa cerifera*)

ฟักเขียว (ash gourd หรือ white gourd หรือ wax gourd , *Benincasa cerifera* หรือ *B. hispida*) เป็นพืชที่เจริญในเขตร้อนชื้น มีน้ำหนักผลเฉลี่ยผลละประมาณ 5 กิโลกรัมความยาวประมาณ 20-40 เซนติเมตร ฟักเขียวมีปริมาณความชื้น ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และโปรตีน 96.2 0.1 2.9 0.5 กรัมต่อส่วนที่กินได้ 100 กรัม ตามลำดับ (กองโภชนาการ กรมอนามัย, 2530)

GuptaและEskin(1977) ทำการสกัดและทำบริสุทธิ์เอนไซม์จากเนื้อฟักเขียว โดยการบีบคั้นเนื้อฟักที่บดละเอียด ทำให้เข้มข้นโดยระเหยที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตกตะกอนโปรตีนด้วยอะซิโตนเย็น ปริมาณ 3 เท่าของสารสกัดเอนไซม์ ละลายตะกอนที่ได้ด้วยสารละลายอะซิเตต บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.01 โมลาร์ พีเอช 5.6 และทำการไดอะไลซิสเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำสารสกัดเอนไซม์มาทำการอบแห้งที่อุณหภูมิจุดเยือกแข็ง (freeze dry) ได้ปริมาณผลผลิตของเอนไซม์ร้อยละ 60และมีความบริสุทธิ์ 5 เท่า เอนไซม์มีกิจกรรมย่อยสลายโปรตีน (protelytic activity, PA)ต่ำสุดที่พีเอช 5.2 และมีค่าสูงขึ้นในช่วงพีเอช 6-8 ในทางกลับกันเอนไซม์เรนนินจากลูกวัวมีกิจกรรมย่อยสลายโปรตีนสูงที่สุดที่พีเอช 5.2 และค่อย ๆ ลดลงจนไม่มีกิจกรรมที่พีเอช 6.6 เอนไซม์จากฟักเขียวเป็นเอนไซม์โปรติเอสซีสเตอีน โปรติเอส ทำงานได้ดีที่สภาวะเป็นกลาง และเอนไซม์เรนนินจากลูกวัวเป็นเอนไซม์แอสปาติก โปรติเอสที่ทำงานได้ดีที่สภาวะเป็นกรด เอนไซม์จากเนื้อฟักเขียวมีกิจกรรมย่อยสลายโปรตีนสูงกว่าเอนไซม์เรนนินจากลูกวัว เอนไซม์จากฟักเขียวที่บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน เอนไซม์ยังคงมีกิจกรรม นอกจากนี้เมื่อเก็บสารละลายเอนไซม์ที่พีเอช 3-5 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน เอนไซม์ยังมีกิจกรรมร้อยละ 98 แต่ในสารละลายเอนไซม์ที่พีเอช 6-9 เอนไซม์มีกิจกรรมลดลง ร้อยละ 20-35

การผลิตเนยแข็งเชดดาร์ (cheddar cheese) โดยตกตะกอนโปรตีนด้วยเอนไซม์จากเนื้อฟักเขียว จะมีการปรับเปลี่ยนสภาวะในการผลิต โดยเพิ่มความเป็นกรดในน้ำนมและเพิ่มอุณหภูมิการบ่มเป็น 35 องศาเซลเซียส พีเอช 5.2 ซึ่งเป็นพีเอชที่เอนไซม์มีกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนต่ำ พบว่าเนยแข็งที่ผลิตไม่เกิดกลิ่นรสหรือรสขมที่ไม่ต้องการ และได้รับการยอมรับสูง (Gupta and Eskin, 1977)

Eskin และ Landman (1975) ทำการสกัดเอนไซม์ที่ทำให้นมจับตัวเป็นก้อนจากเนื้อฟักเขียวโดยการบีบคั้นเนื้อฟักที่บดละเอียด แล้วตกตะกอนโปรตีนด้วยอะซิโตนเย็น 2 ครั้ง พบว่า เอนไซม์ที่ตกตะกอนด้วย อะซิโตนครั้งที่ 1 และ 2 มีความบริสุทธิ์ 5.5 และ 7.6 เท่าของสารสกัดเอนไซม์ ตามลำดับ และมีกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนสูง

ที่พีเอช 5.5 นอกจากนี้ เมื่อเก็บรักษาเอนไซม์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน เอนไซม์ยังคงมีกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนร้อยละ 98

แตงไท (prince melon; *Cucumis melo*)

Uchikoba และ Kaneda (1996) ทำการสกัดเอนไซม์คูคูมมิซิน (cucumisin, EC. 3.4.21.25) จากเนื้อแตงไท จัดเป็นเอนไซม์เซรีน โปรติเอส มีกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อน กิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนและอัตราส่วนระหว่างกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนต่อกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนคล้ายกับเอนไซม์ปาเปน แต่เอนไซม์คูคูมมิซินมีความคงตัวสูงกว่าเอนไซม์ปาเปน การย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์คูคูมมิซินไม่ทำให้เกิดรสขม ดังนั้นจึงเป็นทางเลือกในการนำไปใช้ผลิตเนยแข็ง โดยต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมสภาวะที่เหมาะในการตกตะกอนโปรตีน

2.4.2 **พืชวงศ์** Solanaceae

จูบีน (jubein ; *Solanum dobium*)

จูบีน (jubein) เป็นไม้ยืนต้นพบมากในประเทศซูดานเติบโตเร็วช่วงฤดูฝน ผลมีสีเขียวและจะกลายเป็นสีเหลืองเมื่อสุกเต็มที่ ผลมักแห้งติดลำต้น ผิวหน้าเต็มไปด้วยหนามสามารถเกาะสัตว์กินหญ้าไปตามที่ต่าง ๆ ทำให้ขยายพันธุ์ได้รวดเร็ว ก่อปัญหาให้ชาวนา สัตว์จะไม่กินพืชชนิดนี้เนื่องจากผลมีรสขมและใบเต็มไปด้วยหนาม ในประเทศซูดานมีการใช้ผลจูบีนผลิตเนยแข็งชนิดอ่อน ชื่อ จิบนา บีดา (jibna beida) แต่เนยแข็งที่ได้มีรสขมและเนื้อสัมผัสนิ่ม ดังนั้นมีการแนะนำให้ทำบริสุทธิ์เอนไซม์หรือใช้ความเข้มข้นของสารละลายที่เหมาะสมเพื่อช่วยลดความขมของเนยแข็ง

Yousif และคณะ (1996) ทำการสกัดเอนไซม์ที่ทำให้นมจับตัวเป็นก้อนจากส่วนต่าง ๆ ของผลจูบีน (เมล็ด ทั้งผล เปลือก และผลที่นำมาบด) ด้วยน้ำกลั่นหรือสารละลายโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 5 (มก. /มล.) โดยแช่ตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลาต่าง ๆ คือ 3 ชั่วโมง 3 วัน 7 วัน และ 14 วัน พบว่า เอนไซม์ที่สกัดจากสารละลายโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 5 นาน 3 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อน

ไม่ต่างกันกับเอนไซม์ที่สกัดด้วยน้ำกลั่น แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาแช่ตัวอย่างเป็น 7 วัน และ 14 วัน เอนไซม์ที่สกัดจากสารละลายโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 5 มีกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนสูงกว่าเอนไซม์ที่สกัดด้วยน้ำกลั่น นอกจากนี้ เอนไซม์ที่สกัดจากเมล็ดจูบีนมีกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนสูงที่สุด รองลงมา ได้แก่ เอนไซม์ที่สกัดจากผล ผลที่นำมาบด และเปลือก ตามลำดับ สารสกัดเอนไซม์จากทั้งผลที่ได้รับความร้อนอุณหภูมิ 40 หรือ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที กิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนของสารสกัดเอนไซม์ไม่เปลี่ยนแปลง แต่เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 หรือ 70 องศาเซลเซียส สารสกัดเอนไซม์จะมีกิจกรรมลดลงร้อยละ 28 และ 86 ตามลำดับ และสารสกัดเอนไซม์จะสูญเสียกิจกรรมเมื่อได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นอกจากนี้ ผลจูบีนที่ได้รับความร้อน (ลมร้อน) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาสกัดเอนไซม์ พบว่า สารสกัดเอนไซม์สูญเสียกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อน

โกด เชอร์รี (gourd cherry ; *Withania coagulans*)

Singh และคณะ (1973) ทำการสกัดเอนไซม์ที่ทำให้นมจับตัวเป็นก้อนจากส่วนเนื้อ เปลือก เมล็ด และ ทั้งผลของ โกด เชอร์รีด้วยสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 5 (ร่วมกับกรดบอริกร้อยละ 1) พบว่า สารสกัดเอนไซม์จากเนื้อมีกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนสูงกว่าสารสกัดเอนไซม์จากเปลือกและเมล็ด และการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์อิ่มตัวทำให้เอนไซม์ที่มีกิจกรรมจำเพาะทำให้นมจับตัวเป็นก้อนสูงกว่าการตกตะกอนโปรตีนด้วยสารละลายอินทรีย์ (อะซิโดนและแอลกอฮอล์) ในประเทศอินเดียมีการนำเอนไซม์จากผลโกด เชอร์รี มาผลิตเชดดาร์ชีส และเนยแข็งชนิดอ่อน (solf cheese) เช่น คอทเทจชีส(cottage cheese) เนยแข็งที่ได้มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับเนยแข็งที่ผลิตจากเอนไซม์เรนนินจากสัตว์ มีรสขมเล็กน้อย แต่ถ้าเพิ่มเมื่อระยะการบ่มให้นานขึ้น ทำให้รสขมจะลดน้อยลง

2.4.3 **พืชวงศ์** Papilionoideae (Leguminosae)

Lopes และคณะ (1998) ทำการสกัดเอนไซม์ที่ทำให้นมจับตัวเป็นก้อนจากส่วน ราก ลำต้น ใบ ผลและช่อดอก ของพืช Papilionoideae 7 ชนิด (*Eriosema shirense, E.ellipticum, E. pauciflorum, E.gossweilleri, E.psoraleoides Adenolichos anchietae* และ *Droogmansia megalantha*) ด้วยสารละลายผสมทริส-ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 8.3, อีดีทีเอ (EDTA) เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และเบต้า-เมอแคปโตเอทานอล (β-mercaptoethanol) เข้มข้น 3 โมลาร์ กวนสารละลายตลอดเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เหวี่ยงแยกสารสกัดที่ 15,000 xg เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสที่ได้ทดสอบกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนและกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีน พบว่า สารสกัดเอนไซม์จากรากและใบมีกิจกรรมย่อยสลายโปรตีนสูงกว่า ลำต้น ผล และช่อดอก ซึ่งมีค่าต่ำมากหรือไม่มีเลย สารสกัดเอนไซม์จากใบ *D. megalantha* มีกิจกรรมย่อยสลายโปรตีนสูงและไม่ทำให้เกิดลิ่มนม จึงไม่ควรนำมาใช้ผลิตเนยแข็ง สารสกัดเอนไซม์จากใบ *A. anchietae E.psoraleoides* และ *E.ellipticum* มีกิจกรรมย่อยสลายโปรตีนต่ำและมีกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนสูง นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าทางแถบใต้ของประเทศแองโกลา (Angola) ใช้รากของพืชชนิดนี้ในการทำผลิตภัณฑ์เนยแข็งชนิดอ่อน

เอนไซม์ที่สกัดจากใบ *A. anchietae E.psoraleoides* และ *E.ellipticum* ในรูปของแข็งมีกิจกรรมย่อยสลายโปรตีนลดลงร้อยละ 16-40 เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 เดือน แต่กิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนเพิ่มสูงขึ้นร้อยละ 10-40 เมื่อเก็บสารสกัดเอนไซม์จากใบ *E.psoraleoides* ในรูปของแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ปี พบว่า เอนไซม์ยังคงมีกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนร้อยละ 90 (Lopes *et al.*,1998)

2.4.4 **พืชวงศ์** Compositae

ทอเรีย ทีสทิล (tauria thistle; *Onopordum tauricum*)

ทอเรีย ทีสทิล จัดเป็นพืชมีหนาม (thistle) ไม่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ และไม่มีการนำไปใช้ประโยชน์ ลำต้นบริโภค มีเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนทำให้นมจับตัวเป็นก้อน (Tamer ,1993)

Tamer (1993) ทำการสกัดและทำบริสุทธิ์เอนไซม์ที่ทำให้นมจับตัวเป็นก้อนจาก เมล็ด ดอก และ ใบของทอเรีย ทีสทิล ด้วยสารละลายผสมของสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 5 สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ร้อยละ 0.75 อีดีทีเอ ร้อยละ 0.13 โพลิไวนิลโพลิไพโรลิโดน (polyvinylpolypyrolidone) ร้อยละ 0.2 และเบต้า-เมอแคปโตเอทานอลร้อยละ 0.025 และตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 80 จากนั้นแยกโปรตีนด้วย gel filtration โดยใช้ตัวดูดซับคือ sephadex G-150 และ ion-exchange chromatography แบบ anion exchanger ซึ่งใช้ตัวดูดซับคือ DEAE -sephadex A-50 เอนไซม์ที่ได้มีความบริสุทธิ์ 200 เท่า มีน้ำหนักโมเลกุล 19–24 กิโลดาลตัน มีค่าพีไออยู่ในช่วงพีเอช 3.3 -3.7 และอุณหภูมิที่เหมาะสำหรับทำให้นมจับตัวเป็นก้อนประมาณ 55 องศาเซลเซียส เอนไซม์จากทอเรีย ทีสทิล มีกิจกรรมย่อยสลายโปรตีนน้อยกว่าเอนไซม์เรนนินจากลูกวัว

เรดสตาร์ ทีสทิล (redstar thistle; *Centaurea calcitrapa*)

Tavaria และคณะ (1997) สกัดและทำบริสุทธิ์เอนไซม์จากดอกเรดสตาร์ ทีสทิล พบว่า เอนไซม์จากดอกเรดสตาร์ ทีสทิลย่อยสลายแอลฟา-เคซีนและเบต้า-เคซีนในน้ำนมวัว น้ำนมแกะและน้ำนมแพะ โดยที่จากดอกเรดสตาร์ ทีสทิลย่อยสลายโปรตีนในน้ำนมวัวมากกว่าเอนไซม์เรนนินทางการค้า เอนไซม์จากดอกเรดสตาร์ ทีสทิลมีความจำเพาะในการย่อยสลายโปรตีนในน้ำนมแกะและน้ำนมแพะมากกว่าเอนไซม์เรนนินทางการค้า ดังนั้นจึงนำเอนไซม์จากดอก เรดสตาร์ ทีสทิล มาใช้ในการผลิตเนยแข็งทดแทนเอนไซม์จากสัตว์ในอุตสาหกรรมของเนยแข็งจากน้ำนมแกะและน้ำนมแพะ

คาร์โดน (cardoon ; *Cynara cardunculus*)

เป็นพืชมีหนาม เติบโตในพื้นที่แห้งแล้งเต็มไปด้วยหินและพื้นที่ที่ไม่สามารถทำการเกษตร พบในประเทศแถบยุโรป โดยเฉพาะในประเทศโปรตุเกสและประเทศสเปน สารสกัดเอนไซม์จากดอกคาร์โดน เป็นเอนไซม์แอสปาติก โปรติเอสชนิดย่อยพันธะเปปไทด์ภายในสายโปรตีน (Farzao *et al*., 1999) มีชื่อเรียกว่า ไคนาเรส (cynarases) ประกอบด้วย ไคนาเรส 1, 2 และ 3 (Campos *et al*., 1990; Heimgartner *et al*., 1990) ต่อมาพบว่าไคนาเรส 1 และ 2 มีสมบัติย่อยสลายโปรตีนเหมือนกัน จึงรวมเรียกว่าเป็น คาร์โดซิน เอ (cardosin A) ขณะที่เรียก ไคนาเรส 3 ว่า คาร์โดซิน บี (cardosin B) (Faro *et al.,* 1992) เอนไซม์คาร์โดซินแต่ละชนิดประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันคือ คาร์โดซิน เอ ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุล 31 กิโลดาลตัน และ 15 กิโลดาลตัน สำหรับคาร์โดซิน บี ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุล 34 กิโลดาลตัน และ 14 กิโลดาลตัน (Barros *et al.,* 2001; Verissimo *et al.,* 1995)

เอนไซม์คาร์โดซินมีกิจกรรมย่อยสลายแคปปา-เคซีนที่ตำแหน่ง Phe_{105}-Met_{106} (Macedo *et al.,* 1993; Faro *et al*., 1992) ที่พีเอช 6.4 ค่า turnover number (k_{cat}) ค่าคงที่มิเคลิส (Michaelis constant, k_m) และ specificty constant (k_{cat}/k_m) ในการย่อยแคปปา-เคซีนในน้ำนมวัว เท่ากับ 1.04 วินาที$^{-1}$, 0.16 ไมโครโมล และ 6.5 ไมโครโมล$^{-1}$วินาที$^{-1}$ ตามลำดับ ซึ่งค่า k_m ต่ำแสดงว่ามีความจำเพาะต่อแคปปา-เคซีนสูง (Macedo *et al.,*1993) เอนไซม์คาร์โดซิน บี ย่อยสลายพันธะเปปไทด์ได้จำเพาะมากกว่าเอนไซม์คาร์โดซิน เอ (Santos *et al.,* 1996; Picon *et al.,* 1994) เอนไซม์คาร์โดซิน เอ คล้ายเอนไซม์ไคโมซินและเอนไซม์คาร์โดซิน บี คล้ายเอนไซม์เปปซิน นอกจากนี้ เอนไซม์คาร์โดซิน เอ และคาร์โดซิน บี ยังสามารถย่อยสลายโปรตีนในเวย์ ได้แก่ แอลฟา-แลคโตอัลบูมิน มากที่สุด คือร้อยละ 90 (Lamas *et al*., 2001) รองลงมา ได้แก่ โบวิน ซีรัมแอลบูมิน (bovine serum albumin, BSA) ซึ่งถูกย่อยสลายร้อยละ 65-70 และ ส่วนเบต้า-แลคโตโกลบูลิน ถูกย่อยน้อยมาก

เอนไซม์คาร์โดซินมีอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาย่อยสลายโปรตีนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 5.7 และ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 5.1 (Heimgartner *et al*., 1990) และยังคงมีกิจกรรมเมื่อได้รับความร้อนที่อุณหภูมิสูง 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที (De sa and Barbosa, 1972) เอนไซม์ยังคงมีกิจกรรมเมื่อบ่มที่พีเอช 7 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง แต่เอนไซม์สูญเสียกิจกรรมเมื่อบ่มที่พีเอช 10 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (Lamas *et al.,* 2001)

ปัจจุบันมีการใช้เอนไซม์คาร์โดซินในการตกตะกอนนมในอุตสาหกรรมผลิตเนยแข็งชนิดต่าง ๆ ได้แก่ เนยแข็งชนิดอ่อนแบบดั้งเดิมจากน้ำนมแกะ (Sousa and Malcata; 1997a; Macedo and Malcata; 1997a) และน้ำนมแพะ ได้แก่ เซอร์ราชีส (serra cheese) (Macedo and Malcata, 1997b; De sa and Barbosa, 1972) ลอส เพดโดรเชสชีส (los Pedroches cheese) (Sanjuan *et al*., 2002; Salguero and Sanjuan, 1999) ลา เซอรีนา ชีส (la Serena cheese) (Roa *et al.,* 1999)

Sousa และ Malcata (1997b) พบว่า เนยแข็งจากน้ำนมแกะที่ตกตะกอนโปรตีนด้วยเอนไซม์คาร์โดซินมีองค์ประกอบทางเคมี (ความชื้น ไขมัน โปรตีน เกลือ และ พีเอช) ไม่แตกต่างกับเนยแข็งที่ตกตะกอนด้วยเอนไซม์เรนนินจากสัตว์ และเนยแข็งที่ตกตะกอนด้วยเอนไซม์คาร์โดซิน โดยมีปริมาณจุลินทรีย์ Enterobacteria, Lactococci และ Lactobacilli น้อยกว่าเนยแข็งที่ผลิตจากเอนไซม์เรนนิน แต่เอนไซม์คาร์โดซินมีกิจกรรมการย่อยสลาย เบต้า-เคซีน และ เอลฟาเอส1-เคซีนน้อยกว่าเอนไซม์เรนนินจากสัตว์

2.4.5 **พืชวงศ์** Asclepiadaceae

โซดอม แอปเปิล (sodom apple*; Calotropis porcera)*

Aworh และ Nakai (1986) สกัดเอนไซม์จากใบโซดอม แอปเปิลที่ผ่านการทำแห้งที่อุณหภูมิต่ำ ด้วยน้ำกลั่นและเหวี่ยงแยกที่ 13,000 xg นาน 20 นาที พบว่าสารสกัดเอนไซม์มีพีเอช 5.8-6.0 และเมื่อตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียซัลเฟต

อิ่มตัวร้อยละ 40-65 เอนไซม์มีกิจกรรมจำเพาะทำให้นมจับตัวเป็นก้อนและกิจกรรมจำเพาะย่อยสลายโปรตีนสูงขึ้น 1.74 และ 1.46 เท่า ตามลำดับ กิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส มีค่าสูงกว่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส กิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงอย่างเห็นได้ชัดที่พีเอช 6.4 และเอนไซม์มีกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าที่พีเอช 5.4-5.7 อย่างไรก็ตามค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงมีผลเพียงเล็กน้อยต่อกิจกรรมย่อยสลายโปรตีนของเอนไซม์ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พีเอช 5.0-5.7 เอนไซม์มีกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนลดลงและจะเพิ่มขึ้นเมื่อพีเอชเพิ่มเป็น 5.7-6.4 ในขณะที่พีเอช 7.2-8.0 เอนไซม์มีกิจกรรมย่อยสลายโปรตีนสูงกว่าที่พีเอช 6.3-6.8 และสูญเสียกิจกรรมร้อยละ 30-50 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน

Awort และ Muller (1987) สารสกัดเอนไซม์จากโซดอม แอปเปิล มีกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนเท่ากับ 1.41 ยูนิต/มล. คิดเป็นร้อยละ 0.13 ของเอนไซม์เรนนินจากลูกวัว และสารสกัดเอนไซม์โซดอม แอปเปิลมีกิจกรรมย่อยโปรตีนน้อยกว่าเอนไซม์ปาเปน เนยแข็งจากน้ำนมวัวที่ตกตะกอนด้วยเอนไซม์โซดอม แอปเปิล มีองค์ประกอบทางเคมีไม่ต่างกันเนยแข็งที่ตกตะกอนด้วยเอนไซม์เรนนิน ทางการค้า ซึ่งมีปริมาณผลผลิต ความชื้น ไขมัน และปริมาณโปรตีนร้อยละ 14.47 49.70 26.15 20.0 และ 12.45 44.80 29.84 20.40 ตามลำดับ

2.4.6 **พืชวงศ์** Moraceae

มะเดื่อ (fig; *Ficus carica*)

Whitaker (1959) ศึกษาสมบัติของกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนของเอนไซม์ฟิซิน ซึ่งสกัดจากยางมะเดื่อ พบว่า เป็นเอนไซม์ซีสเตอีน โปรติเอส มีพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนอยู่ในช่วง 5.2-6.0 และมีกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนสูงที่อุณหภูมิในช่วง 30-60 องศาเซลเซียส เอนไซม์ฟิซินตกตะกอนโปรตีนได้ทั้งในน้ำนมสัตว์และน้ำนมถั่วเหลืองได้ ขณะที่เอนไซม์เรนนินไม่สามารถตกตะกอนโปรตีนในน้ำนมถั่วเหลืองได้ ดังนั้นจึงมีการศึกษาการผลิตเนยแข็งจากน้ำนมถั่วเหลืองด้วยเอนไซม์ฟิซิน และเป็นที่นิยมผลิตกันในประเทศอินเดีย

2.4.7 **พืชวงศ์** Bromeliaceae

ชากัวร์ (chaguar *; Bromelia hieronymi)*

ชากัวร์ เป็นพืชที่เจริญในพื้นที่แห้งแล้ง ภายในลำต้นมีน้ำเก็บสะสมไว้ ใบเต็มไปด้วยหนาม ดอกสีม่วง ออกดอกบริเวณใบกับกิ่ง ผลเป็นพวงแต่ละลูกเป็นรูปกระสวยยาวประมาณ 2x5 เซนติเมตร และมีเป็นเส้นใยที่ผิว (Bruno *et al*., 2002)

Bruno และคณะ (2002) พบว่า เอนไซม์ไฮโรไนเมน 1 (hieronymain I) เป็นเอนไซม์ชนิดย่อยพันธะเปปไทด์ภายในสายโปรตีน สกัดได้จากผลชากัวร์ดิบ มีกิจกรรมย่อยสลายโปรตีนสูงที่พีเอช 7.3-10.7 เอนไซม์ยังมีกิจกรรมเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที หรือที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที แต่เอนไซม์สูญเสียกิจกรรมร้อยละ 20 เมื่อให้ความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และเอนไซม์จะสูญเสียกิจกรรมเกือบหมดเมื่อให้ความร้อน 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เอนไซม์ไฮโรไนเมน 1 ย่อยสลายแคปปา-เคซีนมากกว่าแอลฟ่าและเบต้า-เคซีน จึงมีศักยภาพที่จะนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเนยแข็ง เอนไซม์ไฮโรไนเมน 1 ถูกยับยั้งด้วย E-64 และ iodoacetic และจะมีกิจกรรมเพิ่มขึ้นเมื่อรวมกับซิสเตอีนเข้มข้น 0.05 โมลาร์

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์จากพืชที่ทำให้นมจับตัวเป็นก้อน (Factors for activity of milk clotting enzyme from plants)

2.5.1 กระบวนการสกัดเอนไซม์จากพืช

การสกัดเอนไซม์เป็นการทำให้ผนังเซลล์หรือสิ่งที่หุ้มเซลล์แตก โดยทั่วไปเซลล์สัตว์จะทำให้แตกง่าย ขณะที่เซลล์พืชและแบคทีเรียทำให้เซลล์แตกได้ยากกว่าเนื่องจากมีผนังเซลล์ที่แข็งแรงกว่า วิธีการทำให้เซลล์แตกมีหลายวิธีแบ่งตามความแรงของการสกัดเป็น 3 วิธี ได้แก่ วิธีรุนแรง (vigorous method) ด้วยการ บีบ อัด บด สิ่งที่ออกมากับสารสกัดเป็นพวก เซลลูลาร์ ออร์กาเนล (cellular organelles) เช่น French press และ Ultrasound วิธีรุนแรงปานกลาง (moderate method) ได้แก่ การปั่นผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน และวิธีสุดท้าย ได้แก่ วิธีไม่รุนแรง (gentle method) เช่น การทำให้

เซลล์แบคทีเรียแตกโดยใช้วิธีออสโมซิน (osmotic disruption) หรือการใช้สารละลายเคมี เช่น สารละลายอินทรีย์ หรือการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ (Robyt and White, 1987)

ปัจจัยที่มีผลต่อชนิดและปริมาณของเอนไซม์ ได้แก่ ส่วนของพืชที่นำมาสกัด ซึ่งจะมีปริมาณและชนิดของเอนไซม์แตกต่างกัน ระยะเวลาแช่ตัวอย่างในสารสกัด อุณหภูมิขณะทำการสกัด และชนิดของสารละลายที่ใช้ในการสกัด เช่น การสกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เพื่อรักษาระดับความเป็นกรด-ด่างหรือความเข้มข้นของไฮโดรเจนอิออนไว้ให้คงที่ สำหรับการสกัดเนื้อเยื่อพืชมักมีปัญหา คือ พืชหลายชนิดมีสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) เป็นองค์ประกอบ ซึ่งจะถูกออกซิไดส์ด้วยเอนไซม์ endogenous phenol oxidase ทำให้เกิดสีคล้ำ (dark pigment) ซึ่งจะดูดซับโปรตีนและขัดขวางกิจกรรมของเอนไซม์ทำให้กิจกรรมลดลง การลดหรือกำจัดไม่ให้เกิดออกซิเดชันโดยการเติม reducing agent เช่น เบต้า-เมอแคปโตเอทานอล เข้มข้น 20-30 มิลลิโมลาร์ หรือ 1,4-ไดไทโอทริทอล (1,4-dithiothreitol) เข้มข้น 2-5 มิลลิโมลาร์ หรือ โพลิไวนิลโพลิไพโรลิโดน เพื่อดูดซับสารประกอบฟีนอลิก (Robyt and White, 1987)

2.5.2 **กระบวนการทำบริสุทธิ์เอนไซม์**

การทำบริสุทธิ์เอนไซม์หรือโปรตีนสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลืออิ่มตัว การแยกสารผ่านคอลัมน์ชนิดต่าง ๆ เป็นต้น ซึ่งความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่ได้มีความแตกต่างกัน (Robyt and White, 1987) อาภัสสรา ชมิดท์ (2537) ได้สรุปถึงการตกตะกอนโปรตีนเพื่อแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ซึ่งมีหลายวิธี ดังนี้คือ

2.5.2.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลืออิ่มตัว (saturated salt precipitation) เป็นวิธีที่นิยมใช้เป็นขั้นตอนแรกในการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ โดยอาศัยหลักที่ว่าที่ความเข้มข้นของเกลือสูง ๆ การละลายของโปรตีนจะลดลง เมื่อปรับความเข้มข้นของเกลือในสารละลายที่มีโปรตีนรวมกันหลายชนิดให้มีความเข้มข้นที่จุดต่ำกว่าความเข้มข้นที่สามารถตกตะกอนโปรตีนชนิดที่ต้องการแยกให้บริสุทธิ์ เพราะฉะนั้นโปรตีนที่ไม่ต้องการจะถูกกำจัดโดยตกตะกอนแยกออกจากสารละลาย การกำจัด

ตะกอนโปรตีนที่ไม่ต้องการทำได้โดยการกรองหรือการเหวี่ยงแยก เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือให้สูงขึ้นอีกจะทำให้โปรตีนที่ต้องการละลายน้ำได้น้อยลงและตกตะกอนลงมา

การละลายของโปรตีนในสารละลายนอกจากจะขึ้นกับค่าไอออนิกสเตรนจ์ (ionic strength) แล้วยังขึ้นกับชนิดของไอออนในสารละลายด้วย โดยปรากฏการณ์ salting in เป็นปรากฏการณ์ที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือให้สูงขึ้นการละลายของโปรตีนในสารละลายที่มีค่าไอออนิกสเตรนจ์ต่ำจะเพิ่มขึ้น การที่เป็นเช่นนี้เพราะประจุของไอออนสามารถไปเพิ่มหรือไปบังประจุบนโมเลกุลของโปรตีนทำให้เกิดการผลักกันระหว่างโมเลกุลของโปรตีน โอกาสที่โมเลกุลของโปรตีนจะจับกับโมเลกุลของน้ำมากขึ้นทำให้การละลายของโปรตีนเพิ่มขึ้น

ปรากฏการณ์ salting out เป็นปรากฏการณ์ที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือให้สูงขึ้นมากหรือสารละลายมีค่าไอออนิกสเตรนจ์สูง การละลายของโปรตีนกลับลดลง ทั้งนี้เนื่องจากเกิดการแย่งโมเลกุลของน้ำหรือตัวทำละลาย ระหว่างไอออนของเกลือที่เติมลงไปในสารละลายกับตัวถูกละลายอื่น ๆ ไอออนของเกลือจะจับกับโมเลกุลของน้ำหรือตัวทำละลายเพื่อมาละลายได้ดีกว่า จึงทำให้โปรตีนละลายได้น้อยลงหรือตกตะกอนเพิ่มขึ้น เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นเกลือที่นิยมใช้ในการตกตะกอนโปรตีนด้วยวิธี salting out เนื่องจากเกลือชนิดนี้มีความสามารถในการละลายสูง (3.9 โมลาร์ในน้ำที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส) และมีไอออนที่มีประจุ 4 ประจุ/โมเลกุล การตกตะกอนด้วยวิธีนี้ทำอย่างช้า ๆ และสารละลายมีความเย็นเพื่อป้องกันการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน เนื่องจากความร้อนที่ถูกปล่อยออกมาในระหว่างการผสมสารละลาย

ไอออนบางชนิด เช่น I^-, ClO_4^-, SCN^-, Li^+ , Mg^{2+}, Ca^{2+} และ Ba^{2+} สามารถเพิ่มการละลายของโปรตีนมากกว่าที่จะตกตะกอนโปรตีน แต่ไอออนพวกนี้สามารถทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติอย่างถาวรด้วย ในทางตรงกันข้ามไอออนที่ลดการละลายของโปรตีนสามารถรักษาสภาพธรรมชาติของโปรตีนให้คงอยู่ เพราะฉะนั้นโปรตีนที่ตกตะกอนออกมาเมื่อแยกเกลือออกไปแล้วจะกลับมามีสภาพธรรมชาติเหมือนเดิม

Barros และคณะ (2001) ทำการสกัดเอนไซม์คาร์โดซินจากดอกคาร์โดนแห้งด้วยสารละลายซิเตรต บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.01 โมลาร์ พีเอช 3.0 และตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว พบว่า เอนไซม์ที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 30 และ 70 มีกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนร้อยละ 13 และ 28 ของสารสกัดเอนไซม์ ตามลำดับ อัตราส่วนระหว่างกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนต่อกิจกรรมย่อยสลายโปรตีนเท่ากับ 6-7 และ1.4-2.4 เท่า ตามลำดับ เอนไซม์ที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 30 มีกิจกรรมย่อยสลายโปรตีนลดลงร้อยละ 70 จึงนำเอนไซม์ที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 30 มาใช้ผลิตเนยแข็ง

Campos และคณะ (1990) สกัดและทำบริสุทธิ์บางส่วนเอนไซม์คาร์โดซินโดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 40 50 และ 80 พบว่า เอนไซม์ที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 40 50 และ 80 มีกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนเพิ่มขึ้น 1.19 8.7 และ 4.6 เท่าของสารสกัดตามลำดับ โดยเอนไซม์ที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 50 มีกิจกรรมจำเพาะทำให้นมจับตัวเป็นก้อนสูงกว่าเอนไซม์ที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 40 และ 80 แต่มีปริมาณผลผลิตต่ำกว่าเอนไซม์ที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 40 และ 80 นอกจากนี้ เอนไซม์ที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 50 มีอัตราส่วนระหว่างกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนต่อกิจกรรมย่อยสลายโปรตีนสูงกว่าเอนไซม์ที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 40 และ 80

2.5.2.2 การตกตะกอนที่จุดประจุสุทธิเป็นศูนย์หรือพีไอ (isoelectric point (pI) precipitation) เป็นอีกวิธีหนึ่งในการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ โปรตีนแต่ละชนิดประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ต่างกันทำให้มีค่าพีไอเฉพาะ เมื่อปรับค่าพีเอชของสารละลายโปรตีนหลายชนิดให้มีค่าเท่ากับพีไอของโปรตีน โปรตีนที่ต้องการจะมีประจุสุทธิเป็นศูนย์ทำให้มีการละลายน้อยที่สุด หรือเกิดการตกตะกอนมากที่สุด

2.5.2.3 การตกตะกอนโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent precipitation) ตัวทำละลายอินทรีย์ที่นิยมใช้ในการตกตะกอนโปรตีนจากสารละลายได้แก่ เอทานอลและอะซิโตน ตัวทำละลายอินทรีย์มีค่าคงที่ไดอิเล็กทริก (dielectric constant) ที่ต่ำกว่าน้ำ เมื่อใส่ตัวทำละลายอินทรีย์ลงไปในสารละลายโปรตีนจะทำให้ค่าคงที่ไดอิเล็กทริกของสารละลายลดลง ความสามารถในการทำหน้าที่ของตัวละลายของน้ำจะลดลง มีผลทำให้เพิ่มการจับกันระหว่างโมเลกุลของโปรตีนและลดการละลายของโปรตีน วิธีนี้มักทำที่อุณหภูมิใกล้ 0 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่าเพราะที่อุณหภูมิสูงตัวทำละลายอินทรีย์จะทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติไป นอกจากนี้ ตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิด เช่น ไดเมธิลซัลโฟไซด์ (dimethyl sulfoxide, DMSO) และไดเมทธิลฟอร์มาไมด์ (N,N-dimethyl formamide, DMF) เป็นตัวทำละลายโปรตีนที่ดีทั้งนี้เนื่องจากมีค่าคงที่ไดอิเล็กทริกค่อนข้างสูง

2.5.3 **สภาวะการเก็บรักษาเอนไซม์**

สภาวะในการเก็บรักษามีผลต่ออายุการใช้งานและประสิทธิภาพของเอนไซม์ โดยการเก็บรักษาเอนไซม์ในรูปของแข็งหรือของเหลวที่อุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ เช่น เอนไซม์ผงที่ผ่านการทำแห้งที่อุณหภูมิต่ำสามารถเก็บรักษาได้นานกว่าการเก็บรักษาเอนไซม์ในรูปสารละลาย และสูญเสียกิจกรรมเพียงเล็กน้อย เป็นการยืดอายุการเก็บรักษาเอนไซม์ให้ได้นานขึ้น

Tavaria และคณะ (2001) พบว่า เอนไซม์คาร์โดซินในรูปสารละลายที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน มีกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนลดลงร้อยละ 50 แต่เอนไซม์คาร์โดซินผงที่ผ่านทำแห้งที่อุณหภูมิจุดเยือกแข็ง สูญเสียกิจกรรม

Awort และ Nakai (1986) พบว่า เอนไซม์คาร์โดซินในรูปสารละลายที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน มีกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนลดลงร้อยละ 50 สำหรับเอนไซม์คาร์โดซินผงที่เก็บที่อุณหภูมิและเวลาเดียวกันกิจกรรมลดลงร้อยละ 10 และเมื่อเก็บรักษานานถึง 6 เดือน กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเพียง

ร้อยละ 25 ฉะนั้นการเก็บรักษาเอนไซม์ที่ 4 องศาเซลเซียส ในรูปของแข็งจะสูญเสียกิจกรรมน้อยกว่าการเก็บเอนไซม์ในรูปของเหลว

Singh และคณะ (1973) พบว่า เอนไซม์จากผลโซดอม แอปเปิลในรูปของแข็งที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 เดือน มีกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงร้อยละ 25 ขณะที่เอนไซม์จากผลโซดอม แอปเปิลในรูปสารละลายเอนไซม์มีกิจกรรมลดลงถึงร้อยละ 50 เมื่อเก็บรักษาเพียง 3 เดือน

2.5.4 **สับสเตรต**

น้ำนมจากแหล่งต่าง ๆ ได้แก่ น้ำนมวัว น้ำนมแพะ และ น้ำนมแกะ มีองค์ประกอบทางเคมีและโครงสร้างของเคซีนไมเซลล์แตกต่างกัน มีผลทำให้ระยะเวลาทำให้นมตกตะกอนแตกต่างกัน โดยน้ำนมแกะและน้ำนมแพะมีปริมาณไขมันน้อยกว่าและมีขนาดไมเซลล์เล็กกว่าน้ำนมวัว ทำให้การย่อยสลายเคซีนของเอนไซม์เป็นไปได้ยากโดยเฉพาะการย่อยสลายเบต้า-เคซีน ซึ่งเป็นส่วนไม่ชอบน้ำและจะรวมกับไขมัน นั่นคือ เอนไซม์จะย่อยสลายโปรตีนเคซีนในน้ำนมแกะและน้ำนมแพะได้ง่ายกว่าในน้ำนมวัว (Tavaria, *et al.,* 1997) Silva and Malcata (2000) พบว่า โปรตีนเคซีนน้ำนมแพะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ได้ง่ายกว่าในน้ำนมแกะ นอกจากนี้ปัจจัยที่มีผลต่อการจับตัวเป็นก้อนของนมเช่นกัน เช่น ความร้อนที่ให้แก่น้ำนมระหว่างกระบวนการผลิตหรือการเติมเกลือเพื่อช่วยเร่งในการตกตะกอน

Alloggio และคณะ (2000) พบว่า น้ำนมวัวใช้เวลาทำให้นมจับตัวเป็นก้อนนานกว่าน้ำนมแพะ และเมื่อให้ความร้อน (70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที) แก่น้ำนมแพะก่อนนำไปตกตะกอนทำให้นมจับตัวเป็นก้อนนานขึ้น

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือแคลเซียมคลอไรด์ในน้ำนม ทำให้กิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนเพิ่มสูง แต่ถ้าความเข้มข้นของมากเกินไปมีผลทำให้กิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนลดลง เช่นเดียวกับการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ลงในน้ำนมซึ่งมีผลทำให้กิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนลดลง เนื่องจากการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์และเกลือแคลเซียมคลอไรด์ในปริมาณมากเกินไปอาจทำให้ค่าไอออนิก สเตรนจ์เพิ่มขึ้น

ทำให้ยับยั้งการจับกันของพันธะไอออนิก (ionic bonding) ของเอนไซม์-สับสเตรตที่มีกิจกรรม (active enzyme substrate) มีผลทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายแคปปา-เคซีนได้น้อยลง (Tamer, 1993) ในขณะที่ Eskin และ Landman (1975) พบว่า เกลือแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.025 โมลาร์ มีผลทำให้กิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนของเอนไซม์จากฟักเขียวเพิ่มขึ้น

2.6 **เนยแข็ง** (Cheese)

เนยแข็งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการแปรรูปน้ำนมสดไปเป็นอาหารแข็ง หรือกึ่งแข็งกึ่งเหลว โดยนำนม ครีม (cream) บัตเตอร์มิล (butter milk) หรือเวย์อย่างใดอย่างหนึ่งหรือหลายอย่างมาผสมกับเอนไซม์หรือกรดหรือจุลินทรีย์หรือให้ความร้อนจนเกิดการรวมกันเป็นก้อน ตะกอนมีลักษณะเป็นลิ่ม หลักการในการผลิตเนยแข็ง คือการทำให้โปรตีนเคซีนในนมตกตะกอน โดยการเติมแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ ซึ่งสามารถเปลี่ยนน้ำตาลแลกโตสในนมให้กลายเป็นกรดแลกติค หรือ โดยเติมเอนไซม์เรนนินร่วมกับแบคทีเรีย แล้วแต่ชนิดของเนยแข็งที่ต้องการผลิต ตะกอนโปรตีนที่ได้จะมีลักษณะเป็นลิ่ม ประกอบด้วย ไขมันนม แคลเซียมเคซีเนตและวิตามินที่ละลายในไขมันและน้ำบางส่วนและวิตามินที่ละลายในไขมันติดมาด้วย จากนั้นนำก้อนตะกอนไปบ่มจนมีกลิ่นรสตามต้องการหรืออาจบริโภคสด ทั้งนี้แล้วแต่ประเภทของเนยแข็ง (วรรณา ตั้งเจริญชัยและญาณิณ โอภาสพัฒนกิจ, 2543)

เนยแข็งแต่ละชนิดมีลักษณะกายภาพในด้าน สี กลิ่น รสชาติ และปริมาณของแข็งแตกต่างกันออกไป และอายุการเก็บที่แตกต่างกัน การเติมเกลือ แบคทีเรีย หรือเชื้อรา บางชนิดลงไปเพื่อสร้างสารประกอบชนิดต่าง ๆ ที่ผสมผสานกันเป็นกลิ่นและรสชาติตามต้องการภายหลังจากบ่ม (ripening) ที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมก็จะได้เนยแข็งที่มีคุณลักษณะตามต้องการ เนยแข็งอุดมไปด้วยสารอาหารโปรตีน ไขมัน น้ำเกลือแร่ และวิตามิน ในปริมาณที่แตกต่างกัน โปรตีนเคซีนเป็นแหล่งที่ดีมากของกรดอะมิโนไลซิน (lysine amino acid) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนตัวหนึ่งที่จำเป็น (essential amino acid) สำหรับการเจริญเติบโตของร่างกาย (เกษม นันทชัย, 2526)

การผลิตเนยแข็งประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ (John, 1998)

ขั้นที่ 1 เป็นการพัฒนาเพื่อให้ได้องค์ประกอบและความเป็นกรดด่างที่ต้องการ มีการควบคุมองค์ประกอบของน้ำนมตั้งแต่เริ่มต้นของการผลิตและอัตราการเพิ่มความเป็นกรดโดยการใช้หัวเชื้อในระหว่างกระบวนการบ่มเนยแข็ง

ขั้นที่ 2 เป็นการพัฒนาคุณสมบัติทางกายภาพ และลักษณะกลิ่นรสจะมีการเปลี่ยนแปลงโดยได้รับอิทธิพลจากขั้นตอนแรก คือ การเปลี่ยนแปลงของผลิตภัณฑ์เนื่องจากชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นหัวเชื้อ ปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่เติมลงไปเพื่อใช้ในการตกตะกอนหรือปฏิกิริยาทางเคมีที่เกิดขึ้นระหว่างการบ่ม กระบวนการดังกล่าวเรียกว่าการบ่ม ripening curing หรือ maturation ซึ่งชนิดของเนยแข็งแต่ละชนิดมีระยะเวลาการบ่มที่แตกต่างกัน

2.6.1 การจำแนกชนิดเนยแข็ง

2.6.1.1 การจำแนกเนยแข็งตามชนิดของวัตถุดิบที่เป็นส่วนประกอบสำคัญในการผลิต แบ่งออกเป็น 5 ชนิด (กระทรวงสาธารณสุข, 2522 อ้างโดย ทองยศ อเนกะเวียง, 2527) ได้แก่

ก. ครีมชีส (cream cheese) เนยแข็งที่ใช้ครีมเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในการผลิต มีปริมาณไขมันเนยไม่น้อยกว่าร้อยละ 60 ของน้ำหนักและปริมาณน้ำไม่เกินร้อยละ 55 ของน้ำหนัก

ข. เนยแข็งโฮลมิลล์ (whole milk cheese) เนยแข็งที่ใช้นมเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในการผลิตมีปริมาณไขมันเนยไม่น้อยกว่าร้อยละ 50 ของน้ำหนักและปริมาณน้ำไม่เกินร้อยละ 37 ของน้ำหนัก

ค. เนยแข็งสกิมมิลล์ (skimmed milk cheese) เนยแข็งที่ใช้นมพร่องไขมันหรือนมขาดมันเนยหรือเวย์เป็นส่วนประกอบที่สำคัญในการผลิต มีปริมาณไขมันเนยไม่น้อยกว่าร้อยละ 45 ของน้ำหนักและปริมาณน้ำไม่เกินร้อยละ 60 ของน้ำหนัก

ง. เนยแข็งโพรเสส (processed cheese) เนยแข็งที่ผ่านกรรมวิธีทำให้ตะกอนโปรตีนเล็กลง เติมสารอิมัลซิฟายเออร์และนำมาพาสเจอร์ไรส์และจะแต่งสีกลิ่น รสหรือไม่ก็ได้มีปริมาณไขมันเนยไม่น้อยกว่าร้อยละ 45 ของน้ำหนักและปริมาณน้ำไม่เกินร้อยละ 45 ของน้ำหนัก

จ. เนมชีส (named cheese) เนยแข็งที่มีชื่อเป็นที่ยอมรับกันทั่วไปตามชนิดของเนยแข็งและมีกรรมวิธีการผลิตเฉพาะตามกรรมวิธีของเนยแข็งนั้น

2.6.1.2 การจำแนกเนยแข็งตามกระบวนการผลิต แบ่งเป็น 3 ชนิด

ก. เนยแข็งธรรมชาติ (natural cheese) คือ เนยแข็งที่ผลิตจากน้ำนมวัว เมื่อผลิตเป็นเนยแข็งเสร็จแล้ว (ไม่ว่าจะผ่านการบ่มหรือไม่ก็ตาม) ก็นำมารับประทานได้เลย โดยไม่ต้องนำไปปรุงแต่งหรือผ่านการพาสเจอรไรส์อีก

(1) เนยแข็งสดที่ไม่ต้องบ่ม (unriped cheese) เป็นเนยแข็งที่มีลักษณะอ่อนนิ่มมาก ทั้งนี้เพราะมีปริมาณน้ำมาก เมื่อผลิตเสร็จแล้วต้องนำไปบริโภคหรือเก็บในตู้เย็นได้ประมาณ 7 วัน เนยแข็งประเภทนี้แบ่งเป็น 2 ชนิดคือ

- เนยแข็งที่มีไขมันต่ำ (low fat) ได้แก่ คอทเทจชีส (cottage cheese) เบเกอร์ ชีส(baker's cheese) เป็นต้น

- เนยแข็งที่มีไขมันสูง (high fat) ได้แก่ ครีมชีส (cream cheese) นิวชาเทล ชีส (neufchatel cheese) เป็นต้น

(2) เนยแข็งบ่ม (ripened cheese) เนยแข็งประเภทนี้เป็นเนยแข็งที่พวกเราคนไทยคุ้นเคยบริโภคกัน เนยแข็งประเภทนี้จะต้องผ่านการบ่มนานพอสมควร ที่จะทำให้เกิดรสและกลิ่น เนยแข็งประเภทนี้จำแนกออกเป็น 4 ชนิด

- Hard grating cheese เช่น โรมาโนชีส (romano cheese) พาร์มาแซนชีส (parmarsan cheese) อะเซียโกชีส (asiago cheese)

- Hard cheese เช่น เชดดาร์ชีส (cheddar cheese) สวิสชีส (swiss cheese) กรูเยอร์ชีส (gruyere cheese) โพรวูโลนชีส (provolone cheese)

- Semi-soft cheese เช่น โรควีฟอร์ทชีส (roquefort cheese) บลูชีส (blue cheese) โกลโกนโซลาชีส (gorgonzola cheese) บริกชีส (brick cheese) ลิมเบอร์เกอร์ชีส (limburger cheese)

- Soft cheese เช่น แคมเมมเบอร์ชีส (camembert cheese) ไบร์น ชีส (brine cheese) ไลเดอร์แรนชีส (liederkranz cheese)

ข.เนยแข็งที่นำมาปรุงแต่งและผ่านขบวนการพาสเจอไรส์ (pasteurized processed cheese) คือ เนยแข็งที่นำมาปรุงแต่งใหม่ให้มีรสชาติอยู่ในมาตรฐาน ได้แก่ ฟูดส์ชีส (cheese foods) และ สเปรดชีส (cheese spreads)

ค. เนยแข็งที่ทำมาจากเวย์ (whey cheese) เนยแข็งประเภทนี้ผลิตมาจากเวย์มีชื่อว่า เวย์ชีส (whey cheese) ได้แก่ มิซซอสชีส (mysost cheese) และริคอททาชีส (ricotta cheese)

เนยแข็งที่ผลิตได้ต้องไม่มีจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค และไม่มีสารพิษจากเชื้อจุลินทรีย์ในปริมาณที่อาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพ ถ้าต้องใช้วัตถุเจือปนในอาหารจะต้องใช้ในปริมาณและชนิดที่ไม่เป็นอันตรายหรืออาจก่อให้เกิดอันตรายแก่ผู้บริโภค การตกตะกอนด้วยเรนนินอย่างเดียว ปรากฏว่าใช้เวลานานและได้เนยแข็งที่คุณภาพไม่ค่อยดี คือ มีกลิ่นน้อยไป แต่ถ้าใช้เชื้อแบคทีเรียประเภทสร้างกรดและกลิ่นเข้าร่วมในการตกตะกอนนมด้วยแล้วจะได้เนยแข็งที่มีกลิ่นที่ดี ทั้งยังทุ่นเวลาในการตกตะกอนนมอีกด้วย ดังนั้นจึงได้เลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการตกตะกอนนม (ทองยศ อเนกะเวียง, 2527)

2.6.2 แบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตหัวเชื้อ

2.6.2.1 การจำแนกแบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตหัวเชื้อตามปริมาณกรดและกลิ่นที่แบคทีเรียผลิตขึ้น เป็น 3 ประเภท คือ (ทองยศ อเนกะเวียง.2527)

ก. ประเภทที่สร้างกรดแลกติกได้สูงมากแต่สร้างกลิ่นได้น้อย เป็นแบคทีเรียพวกรูปร่างกลมยาว (rod shape) คือ Lactobacilli เช่น *Lactobacillus thermophilus, L. helveticus* และ *L. lactis*

ข. ประเภทที่สร้างกรดแลกติกได้สูงปานกลางแต่สร้างกลิ่นได้น้อย เป็นแบคทีเรียพวกสายโซ่ (chain) คือ Streptococci ยกตัวอย่างเช่น *Streptococcus lactis* และ *S. cremoris*

ค. ประเภทที่สร้างกรดแลกติกได้น้อยแต่สร้างกลิ่นได้มาก เป็นพวกสายโซ่ เช่นกัน แต่รูปเซลล์มีขนาดเล็กกว่าพวก Streptococci ยกตัวอย่าง เช่น *Leuconostoc citrovorum หรือ Streptococcus citrovorum Leuconostoc dextraincum* หรือ *Streptococcus dextraincum*

กลิ่นที่แบคทีเรียสร้างขึ้น เป็นสารเคมีประเภทอะซิโตน ที่สร้างจากเกลือซิเตรท และน้ำตาลแลกโตส การสร้างกลิ่นจะมีสองขั้นตอน คือ แบคทีเรียจะสร้างสารอะซิทิล เมททิล คาร์ไบนอล (acetyl methyl carbinol; CH_3COCH (OH) CH_3) สารชนิดนี้เป็นสารตั้งต้น (precursor) ที่จะเปลี่ยนเป็นสารในขั้นตอนที่สอง การเปลี่ยนเป็นสารในขั้นที่สองจะเปลี่ยนไปเองโดยอัตโนมัติ สารที่เกิดขึ้นตอนแรกจะเปลี่ยนเป็นสารไดอะซิทิล (diacetyl) หรือ ไบอะซิทิล (biacetyl) ($CH_3COC0CH_3$) ดังนั้นในการเลือกใช้แบคทีเรียเป็นหัวเชื้อทางอุตสาหกรรมการผลิตเนยแข็งจะผสมเชื้อทั้ง 3 ชนิดร่วมกัน เช่น *Lactobacillus Streptococcus* และ *Leuconostoc*

2.6.2.2 การจำแนกแบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตหัวเชื้อตามอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต (Vinderola *et al.,* 2002; Varnam and Sutherland, 1994)

ก.แบคทีเรียผลิตกรดที่เจริญเติบโตที่อุณหภูมิปานกลาง (mesophilic microorganism) มีอุณหภูมิที่เหมาะการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 18-37 องศาเซลเซียส เช่น *Lactobacillus spp.* และ *Leuconostoc spp.*

ข. แบคทีเรียผลิตกรดที่เจริญเติบโตที่อุณหภูมิสูง (thermophilic microorganism) มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 30-45 องศาเซลเซีย เช่น *Streptococci salivarius* และ *S. thermophilus*

2.6.2.3 ประโยชน์ของการใช้หัวเชื้อ ในการผลิตเนยแข็ง

ก. ช่วยให้เอนไซม์เรนนินตกตะกอนนมได้เร็วขึ้น

ข. ช่วยทำให้ตะกอนโปรตีนที่ผ่านการตัดแล้ว หดตัวได้ดีขึ้น

ค.ป้องกันการเจริญของแบคทีเรียอื่นอันอาจมีผลทำให้กลิ่นรสของเนยแข็งเปลี่ยนแปลง

ง. ทำให้เนยแข็งมีกลิ่นน่ารับประทาน (Soomro *et al*., 2002)

2.6.3 **เนยแข็งชนิดอ่อน** (Soft cheese)

เนยแข็งชนิดอ่อน มีลักษณะอ่อน นิ่ม มีกลิ่นรสของกรดเล็กน้อย (mild) และสามารถปาดได้ (spreadable) มีปริมาณความชื้นสูง (ร้อยละ 55-88) ตะกอนโปรตีนที่ไม่ผ่านการบีบอัดทำให้เนื้อสัมผัสไม่แข็งเหมือนกับเนยแข็งชนิดแข็ง (hard cheese) เนยแข็งชนิดอ่อนสามารถแบ่งตามปริมาณไขมันและความชื้นได้ 4 ประเภท ได้แก่ เนยแข็งชนิดอ่อนพร่องมันเนย (skimmed milk soft cheese) เนยแข็งชนิดอ่อนไขมันต่ำ (low fat soft cheese) เนยแข็งชนิดอ่อนไขมันปานกลาง (medium fat soft cheese) และเนยแข็งชนิดอ่อนไขมันสูง (full fat soft cheese) แสดงดังตาราง 4 นอกจากนี้ เนยแข็งชนิดอ่อนที่มีการเติมครีมหรือเรียกว่าครีมชีสสามารถจำแนกแบ่งตามปริมาณไขมันได้ดังนี้ คือ ครีมชีสที่มีปริมาณไขมันนมไม่น้อยกว่าร้อยละ 45 และครีมชีสที่มีปริมาณไขมันไม่น้อยกว่าร้อยละ 65 (National Dairy council education on department, 2001) ปัจจุบันมีการนำเนยแข็งชนิดอ่อนไขมันต่ำ มาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อลดสัดส่วนไขมันที่ต้องเติมในอาหาร เช่น ใช้เนยแข็งชนิดอ่อนไขมันต่ำในการปรุงสลัดผักแทนเนื้อหรือไข่ต้ม และเป็นส่วนผสม (Food ingredient) ในการผลิตขนมเบอร์เกอรีต่างๆ (Schantz and Mcnulty, 1999)

เนยแข็งชนิดอ่อนมีปริมาณความชื้นสูง จุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้ดี จึงมีอายุการเก็บรักษาสั้น ดังนั้น ในกระบวนการผลิตเนยแข็งต้องควบคุมความสะอาดในระหว่างกระบวนการผลิตและภาชนะบรรจุที่ใช้ อาจเติมสารช่วยยืดอายุการเก็บรักษา เช่น กรดซอร์บิก หรือบรรจุภายใต้บรรยากาศที่มีแก๊ซคาร์บอนไดออกไซด์ มีความเป็นกรด (Walstra *et al*.,1999)

ตาราง 4 การจำแนกเนยแข็งชนิดอ่อนตามปริมาณไขมันและปริมาณความชื้น
Typical fat and moisture content of soft cheese

Soft cheese	Fat (%)	Moisture (%)
Skimmed milk soft cheese	<2	≯80
Low fat soft cheese	≮ 2 but <10	≯ 80
Medium fat soft cheese	≮ 10 but <20	≯70
Full fat soft cheese	≮ 20	≯60

< less than, ≮ not less than, > more than, ≯ not more than

Source: National Dairy council education on department, 2001

สมจิต ฤกษ์หร่าย และคณะ (2537) ผลิตเนยแข็งชนิดอ่อนด้วยเอนไซม์เรนนินและหัวเชื้อผสม *Streptococcus lactis, S.cremoris* และ *Leuconostoc cremoris* พบว่า การพาสเจอร์ไรส์นมที่อุณหภูมิ 74±1 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 นาที แล้วลดอุณหภูมิลง 32±2 องศาเซลเซียส เติมหัวเชื้อร้อยละ 7 เติมเอนไซม์เรนนินผง 0.015 กรัม/หางนม 100 กิโลกรัม คนแล้วทิ้งไว้จนเกิดตะกอนโปรตีนและเวย์มีปริมาณกรดเป็นร้อยละ 0.5±0.2 ตัดตะกอนโปรตีน ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส บ่มต่อเป็นเวลา 150 นาที ถ่ายเวย์ออก ล้างตะกอนโปรตีนด้วยน้ำเย็น 3 ครั้ง ตะกอนโปรตีนที่ได้มีลักษณะปรากฏ รสชาติ กลิ่น เนื้อสัมผัสและการยอมรับดีที่สุด

2.6.4 **การผลิตคอทเทจชีส สเปรด** (Cottage cheese spreade production)

2.6.4.1 การพาสเจอร์ไรส์นม (pasteurization) เป็นกระบวนการให้ความร้อนที่ไม่รุนแรง มักจะทำที่อุณหภูมิต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียส เพื่อยืดอายุของผลิตภัณฑ์อาหาร ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความทนต่อความร้อนต่ำ โดยการพาสเจอร์ไรส์นมที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที หรือ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 วินาที เพื่อยับยั้งเอนไซม์อัลคาไลน ฟอสฟาเทส

(alkaline phosphatase; EC.3.1.3.1) ในน้ำนม และทำลายจุลินทรีย์ที่ก่อโรค โดยเฉพาะ *Mycrobacterium tuberculosis* แต่ยังคงมีจุลินทรีย์บางส่วนชนิด Microbacterium ที่ยังคงไม่ถูกทำลายและมีการเจริญเติบโตอย่างช้า ๆ อุณหภูมิพาสเจอร์ไรส์ทำลายยีสต์และราได้หมด กรณีที่ผลิตภัณฑ์นมมีปริมาณไขมันสูง ควรให้ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที เพื่อยับยั้งเอนไซม์แลคโทเพอออกซิเดส (Lactoperoxidase ; EC.1.11.1.7) การให้ความร้อนแก่น้ำนมที่อุณหภูมิพาสเจอร์ไรส์ไม่ทำให้กลิ่นรสและส่วนประกอบของนมเปลี่ยนแปลงไป (ปรียา วิบูลย์เศรษฐ์, 2524)

Drake และคณะ (1997) พบว่า เนยแข็งที่ผลิตจากน้ำนมพาสเจอร์ไรส์และน้ำนมดิบมีปริมาณไขมัน ความชื้น ปริมาณเกลือ ปริมาณผลผลิต ไม่ต่างกัน เนยแข็งที่ผลิตจากน้ำนมพาสเจอร์ไรส์ มีรสชาติขม มีความเป็นกรด มีกลิ่นคล้ายกลิ่นไม้ก๊อกเช่นเดียวกันกับเนยแข็งที่ผลิตจากน้ำนมดิบ แต่เนยแข็งที่ผลิตจากน้ำนมดิบมีกลิ่นหมักหรือกลิ่นผลไม้ (fermented / fruity) เนยแข็งที่ผลิตจากน้ำนมพาสเจอร์ไรส์ได้รับคะแนนสูงกว่าเนยแข็งที่ผลิตจากน้ำนมดิบในด้านกลิ่นรสและเนื้อสัมผัส

Sousa และ Malcata (1996) พบว่า เนยแข็งที่ผลิตจากน้ำนมแพะดิบ น้ำนมแพะพาสเจอร์ไรส์ และน้ำนมแพะพาสเจอร์ไรส์ที่เติมหัวเชื้อ มีปริมาณความชื้น ไขมัน โปรตีน เกลือโซเดียมคลอไรด์ พีเอช ไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้น้ำนมแพะดิบมีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดมากที่สุด รองลงมาได้แก่ น้ำนมแพะพาสเจอร์ไรส์และน้ำนมแพะพาสเจอร์ไรส์ที่เติมหัวเชื้อมีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดน้อยที่สุด

2.6.4.2 โฮโมจิไนส์ (homoginization) เพื่อลดขนาดของเม็ดไขมัน (fat globules) ให้มีขนาดใกล้เคียงกันและกระจายตัวในน้ำนม

2.6.4.3 การตกตะกอนน้ำนม (coagulation) โปรตีนเคซีนในน้ำนมสามารถตกตะกอนได้ด้วยเอนไซม์ร่วมกับการใช้หัวเชื้อ โดยทั่วไปจะเติมหัวเชื้อพร้อมกับเอนไซม์เรนนิน หรือเติมเอนไซม์เรนนินหลังจากบ่มหัวเชื้อเป็นเวลา 1-1.5 ชั่วโมง หัวเชื้อที่ใช้ควรเป็นหัวเชื้อที่ไม่สร้างแก๊ส (non gas forming starter) ซึ่งจะทำให้ตะกอนโปรตีนลอยตัวขึ้น และทำให้แยกเวย์ออกจากตะกอนโปรตีนได้ยาก โดยทั่วไปปริมาณหัวเชื้อที่เติมลงในน้ำนม มีจำนวนเซลล์จุลินทรีย์ในระดับ 10^6-10^7 CFU/มล. (Sousa and Malcata,1996)

2.6.4.4 การตัดตะกอนโปรตีน (cutting) เป็นการทำให้ตะกอนโปรตีนหดตัวและเพื่อระบายเวย์ออก โดยใช้เครื่องตัดลงไปจนถึงก้นถังและลากเครื่องตัดไปมาตามด้านกว้างและด้านยาวของถังหลาย ๆ ครั้ง ในที่สุดตะกอนโปรตีนจะถูกตัดออกเป็นก้อนเล็ก ๆ พีเอชของน้ำนมขณะตัดตะกอนโปรตีนมีผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพของตะกอนโปรตีนที่ได้ โดยทั่วไปควรตัดตะกอนโปรตีนในช่วงที่น้ำนมมีพีเอช 4.6-4.8 ถ้าตัดตะกอนโปรตีนที่พีเอชต่ำทำให้ตะกอนโปรตีนนิ่ม และถ้าตัดตะกอนโปรตีนที่พีเอชสูงกว่า 4.9 ทำให้ตะกอนโปรตีนแน่นและเหนียว หลังจากตัดตะกอนโปรตีนแล้วตั้งพักไว้ 10-15 นาที เพื่อแยกเวย์ออก ซึ่งจะทำให้อนุภาคของตะกอนโปรตีนมีความแน่นเพิ่มขึ้นและไม่แตกตัวง่าย

Emmons และ Beckett (1984) พบว่า การตัดตะกอนโปรตีนขณะที่พีเอชของน้ำนมต่ำมีผลทำให้ตะกอนโปรตีนนิ่มและปริมาณของแข็งทั้งหมดลดลงและการให้ความร้อนแก่ตะกอนโปรตีนมีผลทำให้เนื้อตะกอนโปรตีนแน่นขึ้น

2.6.4.5 การให้ความร้อน (cooking) ค่อย ๆ เพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นจนกระทั่งอุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส บ่มต่อเป็นเวลาเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วจึงแยกเวย์ออกจากตะกอนโปรตีน การให้ความร้อนทำให้ตะกอนโปรตีนจะหดตัวและคายน้ำออกมีผลต่อความเหนียว ความแข็ง และมีผลต่อปริมาณความชื้นของผลิตเนยแข็ง อัตราการเพิ่มอุณหภูมิเร็วเกินไปทำให้อนุภาคของตะกอนโปรตีนแห้งและลอยตัวขึ้น ควรกวนเบา ๆ ตลอดเวลาให้อนุภาคของตะกอนโปรตีนและเวย์ผสมกันเพื่อป้องกันไม่ให้ตะกอนโปรตีนเกาะตัวกัน การให้ความร้อนในช่วงแรกอุณหภูมิ 55-57 องศาเซลเซียส แบคทีเรียบางชนิดจะถูกทำลาย รวมทั้งจะยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เรนนินด้วย การให้ความร้อนนานเกินไปทำให้เกิดซินเนอเรซีส (syneresis) ของอนุภาคตะกอนโปรตีน ทำให้เวย์แยกออกจากตะกอนโปรตีน โดยซินเนอเรซีสเกิดขึ้นหลังจากมีการตัดตะกอนโปรตีนและการกวน การเกิดซินเนอเรซีสสูงมีผลทำให้มีปริมาณเวย์มากและทำให้ตะกอนโปรตีนมีเนื้อสัมผัสแน่นขึ้น

Calvo และ Balcones (2000) พบว่า การเกิดซินเนอเรซีสขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำนม ปริมาณไขมันในน้ำนม อุณหภูมิการบ่มตะกอนโปรตีน และพีเอชของเวย์ โดยที่อุณหภูมิสูงจะเกิดอัตราการซินเนอเรซีสสูงขึ้น ทำให้โปรตีนเวย์เกิดการเสียสภาพ

Basch และคณะ (1985) พบว่า การให้ความร้อนทำให้โปรตีนเวย์ ได้แก่ เบต้าแลคโตโกลบูลิน ถูกทำให้เสียสภาพและจะไปแทรกหรือจับกับโปรตีนในเวย์ตัวอื่น หรือจับกับแคบปา-เคซีนทำให้เกิดการตกตะกอนลงมากับเคซีน ซึ่งเป็นการลดปริมาณโปรตีนในส่วนเวย์

2.6.4.6 การแยกเวย์ออก (drain)

2.6.4.7 การล้างตะกอนโปรตีน (washed) โดยการล้างตะกอนโปรตีนด้วยน้ำ (ผ่านการต้มฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง) ปริมาณน้ำที่ล้างเท่ากับปริมาณของเวย์ที่ระบายออกไป ถ้าล้างน้อยเกินไปทำให้ไม่สามารถล้างกลิ่นรสกรดออกได้หมด น้ำสุดท้ายในการล้างตะกอนโปรตีนควรมีการเติม activated chloride 5-20 ppm เพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ (Hynes *et al.*, 2001)

2.6.4.8 การปั่นผสมตะกอนโปรตีน นำตะกอนโปรตีนที่ได้มาปั่นผสมรวมกับครีมเพื่อปรับปรุงกลิ่นรสของเนยแข็ง ตะกอนโปรตีนจะยึดพลาสมาของครีม คุณสมบัติของตะกอนโปรตีนจะเปลี่ยนไปโดยอนุภาคของตะกอนโปรตีน จะมีขนาดใหญ่ขึ้นและปริมาณน้ำเพิ่มขึ้น บางครั้งมีการเติมสารเพิ่มความหนืด (thickening agent) ลงในครีมเพื่อป้องกันการแยกตัวของครีม

3. วัตถุประสงค์

3.1 เพื่อคัดเลือกชนิดของพืชที่เป็นแหล่งของเอนไซม์ที่ทำให้นมจับตัวเป็นก้อน

3.2 ศึกษาชนิดของสารสกัดเอนไซม์จากพืชที่ให้เอนไซม์ที่มีกิจกรรมทำให้นมจับตัวเป็นก้อนสูง

3.3 ศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์จากพืชที่ทำให้นมจับตัวเป็นก้อน

3.4 ประยุกต์ใช้เอนไซม์ที่สกัดได้จากพืชในการผลิตคอทเทจชีส สเปรด

4. ขอบเขตการวิจัย

คัดเลือกชนิดของพืชที่มีกิจกรรมเอนไซม์ที่ทำให้นมจับตัวเป็นก้อนจากพืช 18 วงศ์ ได้แก่ วงศ์ Cucurbitaceae, Leguminosae-Caesalpiniodeae, Leguminosae-Papilionoideae, Leguminosae-Minosoideae, Compositae, Solanaceae, Moraceae, Araceae, Asclepiadaceae, Euphorbiaceae, Gutttiferae, Rubiaceae, Anacardiaceae, Malvaceae, Zingiberaceae, Umbellifere, Cruciferae และ Amaranthaceae แล้วศึกษาชนิดของสารละลายที่ใช้สกัดเอนไซม์ที่มีศักยภาพในการตกตะกอนนมจากพืชที่คัดเลือกได้ ศึกษาวิธีการทำบริสุทธิ์เอนไซม์บางส่วนและศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ที่สกัดได้ รวมถึงการนำเอนไซม์ที่แยกได้ไปประยุกต์ใช้ในการผลิตเนยคอทเทจชีส สเปรด