

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

6.1 สรุปผลการวิจัย

6.1.1 สภาวะที่เหมาะสมต่อการเตรียมเอนไซม์ เรนินตรีงรูปแบบเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์

ใช้ทรายแม่น้ำสะอาดขนาด 50 เมช เป็นตัวพุง โดยมี APTS เป็นสารกระตุ้นที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร และมีกลูตาราลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะร่วมที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 โดยปริมาตร นอกจากนี้ใช้เรนนิเลส-แอล ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.050 โดยปริมาตร/ปริมาตรของสารละลายบัฟเฟอร์ pH 5.5

6.1.2 จลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ เรนินตรีงรูป

ค่าที่ศึกษา (หน่วยวัด)	ชนิดตัวอย่าง			
	IR <sub>ref</sub>	SR <sub>ref</sub>	IR <sub>rot</sub>	SR <sub>rot</sub>
K <sub>m</sub> (μM)	4.18	6.75	-	-
V <sub>max</sub> (RU/นาที)	3.57x10 <sup>3</sup>	3.02x10 <sup>3</sup>	-	-
ช่วง pH ที่เหมาะสม	5-7	5-7	-	-
ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสม (°C)	35-60	35-50	-	-
แอกติวิตีจำเพาะ (KRU/มก.)	6.08	-	-	-
เสถียรภาพการเก็บ (ร้อยละ)*	82.61	74.64	72.46	59.42
ค่าครึ่งชีวิต (เดือน)	>4	-	>4	-

หมายเหตุ \* ร้อยละของแอกติวิตีสัมพัทธ์หลังเก็บไว้ 4 เดือน เมื่อเทียบกับแอกติวิตีก่อนการเก็บ

### 6.1.3 สภาวะของน้ำนมที่เหมาะสมต่อเอนไซม์เรนินตรีงรูปในการตกตะกอนนม

โดยพิจารณาจากเวลาในการตกตะกอนนมและความแข็งของลิ่มนมพบว่า ควรใช้น้ำนมพาสเจอร์ไรซ์ที่ pH 5.9 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ไม่จำเป็นต้องเติมแคลเซียม-คลอไรด์เพิ่มในน้ำนม เนื่องจากปริมาณแคลเซียมที่มีในน้ำนมปกติคือร้อยละ 0.123 โดยน้ำหนัก/ ปริมาตรเพียงพอต่อการตกตะกอนนมได้อย่างสมบูรณ์

### 6.1.4 ประสิทธิภาพของการใช้เอนไซม์เรนินตรีงรูปเพื่อผลิตเนยแข็งเชดคาร์

ในเครื่องปฏิกรณ์แบบถังกวนขนาด  $16 \times 12 \times 12$  นิ้ว ซึ่งมีขนาดบรรจุนม 10 ลิตร เป็นดังนี้

#### 6.1.4.1 เอนไซม์เรนินตรีงรูปถูกแยกจากน้ำนมที่กำลังจะเกิดลิ่มนมใน

ขั้นตอนการผลิตเนยแข็งเชดคาร์ได้อย่างสมบูรณ์โดยใช้ตะแกรงลวดที่มีขนาดตะแกรง 200 เมช

#### 6.1.4.2 เนยแข็งเชดคาร์ที่ผลิตจากเอนไซม์เรนินตรีงรูปมีคุณลักษณะ

ทางด้านสี กลิ่น รสชาติ ลักษณะเนื้อสัมผัส และการยอมรับรวมค่อนข้างดีเมื่อเปรียบเทียบกับ เนยแข็งเชดคาร์ตรา Kraft

#### 6.1.4.3 การนำเอนไซม์เรนินตรีงรูปเดิมกลับมาใช้ซ้ำในปฏิบัติการ

ตกตะกอนนมจนเกิดลิ่มนมแข็ง 10 ครั้ง พบว่าการเกิดลิ่มนมแข็งเกิดขึ้นได้สมบูรณ์ทุกครั้ง แต่ เวลาจะช้าลงเล็กน้อย

## 6.2 ข้อเสนอแนะ

การศึกษาวิจัยในหัวข้อ "การเตรียมเอนไซม์เรนินตรีงรูปเพื่อการผลิตเนยแข็ง" นี้ ได้อาศัยฐานข้อมูลบางส่วนจากผลงานของ Thomplison และคณะ (1983) (5) ซึ่งได้ชี้ให้เห็นประโยชน์ของการใช้ทรายเป็นตัวพุง อย่างไรก็ตามการศึกษาวิจัยเรื่องนี้ได้ให้ผลงาน สืบต่อผลงานวิจัยที่ผ่านมาหลายประการ กล่าวคือ แสดงข้อมูลพร้อมผลวิเคราะห์เชิงสถิติ เปรียบเทียบด้านภาวะที่เหมาะสมสูงสุดของการผลิตเอนไซม์เรนินตรีงรูปแบบเชื่อมพันธะ โคเวเลนต์กับทรายขนาด 50 เมช สำหรับใช้ในเครื่องปฏิกรณ์แบบถังกวนขนาด  $16 \times 12 \times 12$  นิ้ว และคุณสมบัติทางด้านจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ตรีงรูปพร้อมทั้งข้อมูลเชิงสถิติ แสดงแนวทางการทดลองเพื่อผลิตเนยแข็งเชดคาร์จากเอนไซม์ที่ผลิตได้

จากข้อมูลผลงานวิจัยในส่วนการผลิตเอนไซม์เรนนินครึ่งรูปพร้อมกับการศึกษาคุณสมบัติด้านจลนพลศาสตร์ ที่ได้ศึกษามานี้ได้ให้ข้อมูลที่นำเสนอเกี่ยวกับผลกระทบ ซึ่งจะจำแนกได้ดังนี้

1. เอนไซม์เรนนินครึ่งรูปที่เตรียมได้มีค่า  $K_m$  ต่ำกว่าของเอนไซม์เรนนินไม่ครึ่งรูปถึง 1.6 เท่าโดยประมาณ ด้วยวิธีการเตรียมแบบพันธะโคเวเลนต์กับเม็ดทรายที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อนและค่าใช้จ่ายไม่สูงเมื่อเทียบกับวิธีอื่น ๆ (4, 25, 26) แต่เอนไซม์เรนนินครึ่งรูปที่ผลิตได้มีประสิทธิภาพสูงมากตามค่า  $K_m$  ที่ประเมินได้
2. เอนไซม์เรนนินครึ่งรูปที่เตรียมภายใต้ภาวะ  $A_5G_{2.5}$  มีปริมาณการหลุดของเอนไซม์เรนนินจากตัวพวงน้อยที่สุด คิดเป็นร้อยละเพียง 4.54 ของแอกติวิตีหลังจากทำปฏิกิริยาในภาวะที่กำหนด ข้อมูลนี้ชี้ชัดถึงการลดการสูญเสียของเอนไซม์ในระหว่างปฏิกิริยาได้ดี และเพิ่มปริมาณการใช้ซ้ำของเอนไซม์ได้ด้วย
3. เอนไซม์เรนนินครึ่งรูปมีช่วงอุณหภูมิของการทำปฏิกิริยากับเคซีนกว้างกว่าเอนไซม์เต็มมาก จึงนับว่าช่วยเพิ่มศักยภาพการนำเอนไซม์ไปใช้งานเป็นอย่างยิ่ง
4. เอนไซม์เรนนินครึ่งรูปมีค่าครึ่งชีวิตค่อนข้างสูงคือ นานกว่า 4 เดือน ทั้งที่อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิห้องเย็น (8-10 องศาเซลเซียส) และสูงกว่าเอนไซม์เต็มทั้งสองสภาวะ
5. ภาพถ่ายจาก Scanning electron microscope เป็นหลักฐานประกอบการแสดงให้เห็นการติดแน่นของเอนไซม์กับตัวพวงอย่างชัดเจน นอกเหนือจากค่าแอกติวิตีที่วัดในปฏิกิริยาการย่อยสลายเคซีน
6. ผลการวิเคราะห์เชิงสถิติด้านความสัมพันธ์ร่วม (Interaction) ระหว่าง APTS ซึ่งใช้เป็นตัวกระตุ้นตัวพวง และกลูตาราลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์ที่มีต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ครึ่งรูปแสดงให้เห็นว่าปัจจัยทั้งสองนี้ไม่มีความสัมพันธ์ร่วมต่อกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
7. เสถียรภาพในระหว่างการเก็บเอนไซม์เรนนินครึ่งรูปซึ่งเก็บในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 5.5 ที่อุณหภูมิห้องเย็นและอุณหภูมิห้อง พบว่ามีเสถียรภาพสูงกว่าเอนไซม์เต็มทั้ง 2 สภาวะ และถ้าเป็นไปได้หากสามารถเลือกหาวิธีการรักษาเสถียรภาพในการเก็บที่อุณหภูมิห้องและเก็บในสภาพแห้งโดยไม่ต้องใช้สารละลายบัฟเฟอร์จะทำให้เพิ่มความสะดวกต่อการขนส่งเพื่อจำหน่ายยิ่งขึ้น

ในส่วนข้อมูลและผลวิเคราะห์เชิงสถิติ ของการตกตะกอนเคซีนในนมด้วยเอนไซม์ตรีงรูป ได้ศึกษาเปรียบเทียบกับผลงานวิจัยของนักวิจัยที่ได้ตีพิมพ์เผยแพร่ ได้แก่ ผลงานวิจัยของ Angelo และ Shahani (1983) (26) ซึ่งได้ศึกษากับเอนไซม์เรนนินตรีงรูปบน Sepharose-4B ส่วน Mathur และคณะ (1983) (35) ศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์เรเนตตรีงรูปบนทรายกับ APTS และ กลูตาราลดีไฮด์ รวมทั้งผลงานวิจัยของ Green และคณะ (1969) (4) ผลงานวิจัยดังที่ได้ รวบรวมนี้ได้แสดงให้เห็นเฉพาะส่วนของการเปลี่ยนอัตราการตกตะกอนเคซีนกับการเปลี่ยนระดับ pH และอุณหภูมิของนม (pH and temperature profiles) แต่ไม่ได้มีผลงานใดได้ชี้ชัดด้าน ความสัมพันธ์ร่วม (Interaction) ของทั้งสองปัจจัยที่จะมีต่อกันในเชิงสถิติหรือไม่กับการตก ตะกอนเคซีนในนม ด้วยเหตุนี้ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยเรื่องนี้มีส่วนเสริมฐานข้อมูลเดิม กล่าวคือ จากการวิเคราะห์ pH profile และ temperature profile ของการตกตะกอนเคซีนในนม พบว่า pH และอุณหภูมิที่น่าจะเหมาะสมที่สุดในการตกตะกอนเคซีนนมเป็น pH 5.4 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แต่เมื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์ร่วม เชิงสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ระหว่างภาวะทั้งสองตัวแปรนี้แล้วพบว่า ภาวะที่เหมาะสมที่สุดเปลี่ยนเป็นที่ pH 5.5 และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังได้ศึกษาวิจัยต่อในระดับความสัมพันธ์ร่วมระหว่าง pH อุณหภูมิ และปริมาณการเติมแคลเซียมคลอไรด์ในนมในเชิงสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นถึงร้อยละ 99 แล้ว พบว่านมที่ pH 5.9 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และไม่ต้องเติมแคลเซียมคลอไรด์เพิ่มใน นมเลย ภายใต้สภาวะนี้เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่ใช้ในการตกตะกอนนมที่มีระดับความแข็ง ลึมนมพอเหมาะสำหรับการผลิตเนยแข็งเชดคาร์ด้วยเอนไซม์ตรีงรูปที่ผลิตได้ นับได้ว่าข้อมูลและ ผลวิเคราะห์เชิงสถิตินี้จะให้ความแม่นยำและความมั่นใจ เพื่อใช้ประกอบเป็นแนวทางการขยาย ส่วนในการผลิตที่ถูกต้องและเป็นไปได้มากที่สุด

ขั้นตอนสุดท้ายของงานวิจัยนี้ได้ทดลองเพื่อกำหนดแนวทางการผลิตเนยแข็งเชดคาร์ จากเอนไซม์ตรีงรูปที่ผลิตได้ โดยได้ทดลองในเครื่องปฏิกรณ์แบบถังกวน 2 ชั้น ซึ่งจำลองแบบ จากการผลิตเนยแข็งระดับอุตสาหกรรม พร้อมกับได้เพิ่มส่วนตะแกรงลวดขนาดเท่าเครื่องปฏิกรณ์ มีขนาดรูตะแกรงเล็กกว่าขนาดเอนไซม์ตรีงรูป 40 เท่า สำหรับแยกคั้นเอนไซม์ตรีงรูปจากปฏิกิริยา ย่อยสลายเคซีนนม เพื่อลดการติดค้างของเอนไซม์ทั้งในลึมนมและเวย์ พบว่าเอนไซม์ตรีงรูปที่ผลิต ได้มีคุณสมบัติทางจลนพลศาสตร์ที่เอื้อประโยชน์ให้กับการผลิตเนยแข็งในเครื่องปฏิกรณ์แบบถังกวน เป็นอย่างยิ่ง ทั้งนี้สังเกตจากช่วงอุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสมที่สุดของเอนไซม์ในปฏิกิริยาการ ย่อยสลายเคซีน เรียกว่า ภาวะสำหรับระยะที่ 1 หรือระยะการย่อยสลายเคซีนด้วยเอนไซม์

ได้พาราแคปทา-เคซีน มีค่าใกล้เคียงกับช่วงอุณหภูมิ และ pH ของการตกตะกอน พาราแคปทา-เคซีนซึ่งเป็นผลผลิตจากระยะที่ 1 ทำให้สามารถเข้าสู่ระยะที่ 2 ซึ่งเป็นระยะการสร้างร่างแหตาข่ายของพาราแคปทา-เคซีน เกิดเป็นลิมนที่มีความแข็งแรงเหมาะสม โดยไม่ต้องปรับภาวะใหม่ ซึ่งกลไกนี้เหมือนกับการผลิตเนยแข็งในระดับอุตสาหกรรมทั่วไป จึงนับว่าเอนไซม์ตรีงรูปที่ผลิตได้นี้จะเอื้ออำนวยความสะดวกในการนำไปใช้เพื่อการผลิตเนยแข็งระดับอุตสาหกรรมตามเป้าหมายได้ นอกจากนี้ยังมีข้อมูลเสริมสำหรับประสิทธิภาพการใช้ชีวะของเอนไซม์ตรีงรูปที่ได้นี้ ซึ่งได้แสดงให้เห็นว่าเมื่อทำการทดลองเพื่อพิสูจน์ประสิทธิภาพการใช้เอนไซม์ตรีงรูปกับการผลิตเนยแข็งภายใต้กรรมวิธีเดียวกันถึง 10 ครั้ง พบว่า ประสิทธิภาพของเอนไซม์จะลดลงไปบ้าง แต่มิได้แสดงให้เห็นข้อเสียเปรียบของเอนไซม์ตรีงรูปนี้แต่อย่างใด ทั้งนี้ผู้นำไปใช้อาจจะปรับระดับประสิทธิภาพการใช้ให้คงเดิมได้ โดยการเพิ่มระยะเวลาของปฏิกิริยาในระยะที่ 1 (ระยะการย่อยสลายเคซีน) โดยการกวนให้นานขึ้นกว่าเดิม ดังข้อมูลที่เคยได้ทดลอง แต่ไม่อาจชี้ชัดลงไปได้ในจำนวนเวลาวันแต่จะได้ศึกษาวิจัยเพิ่มเติม ซึ่งข้อมูลดังกล่าวนี้กำหนดขึ้นตามความเหมาะสมของการใช้งานสำหรับผลิตเนยแข็ง และไม่จำเพาะกับเนยแข็งเชดคาร์เท่านั้น การนำไปใช้เพื่อผลิตเนยแข็งประเภทอื่นก็สามารถทำได้โดยกรรมวิธีและหลักการเดียวกัน

ข้อคิดและประสบการณ์ที่มีอยู่เดิม เสริมด้วยข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้จะช่วยเพิ่มแนวทางและศักยภาพในการผลิตผลงานวิจัยในระดับที่พัฒนาต่อจากผลงานวิจัยที่ผ่านมาในอดีต ให้เอื้อประโยชน์ต่อการประยุกต์ใช้สำหรับอุตสาหกรรมการผลิตเนยแข็งต่อไปได้ โดยเฉพาะกับอุตสาหกรรมเนยแข็งเท่านั้น แต่จะมีผลประโยชน์ไปสู่อุตสาหกรรมอาหารประเภทอื่น ๆ ด้วยแนวคิดและเหตุผลที่ได้ศึกษามาทั้งหมดนี้