บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ตอนที่ 1 : ผลการศึกษาคุณภาพทางจุลชีววิทยาและเคมีของน้ำนมดิบจากฟาร์มของเกษตรกร

4.1.1 ผลการศึกษาคุณภาพทางด้านจุลชีววิทยาของน้ำนมดิบ

ตรวจหาคุณภาพทางด้านจุลชีววิทยาของน้ำนมดิบด้วยการหาค่า methylene blue reduction test จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (total plate count) และตรวจหาแบคทีเรียโคลิฟอร์มด้วยวิธี MPN method ได้ผลดังนี้

4.1.1.1 ตรวจคุณภาพทางจุลชีววิทยาโดยวิธี Methylene Blue Reduction Method

จากการตรวจหาค่า MBR ของน้ำนมดิบที่สุ่มจากฟาร์มของเกษตรกรที่เป็นสมาชิกของศูนย์รวบรวมน้ำนม 2 แห่ง คือ สหกรณ์โคนมเชียงใหม่ และองค์การส่งเสริมกิจการโคนม (อ.ส.ค.) ห้วยแก้ว จังหวัดเชียงใหม่ และฟาร์ม 1 แห่ง คือฟาร์มของภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงธันวาคม 2544 พบว่า น้ำนมดิบจากแหล่งผลิตทั้ง 3 แหล่ง ให้ค่า MBR อยู่ในเกณฑ์ที่ดีเหมือนกัน ($P>0.05$) จัดอยู่ในเกรด 2 คือให้ค่า MRB อยู่ในช่วง 4-6 ชั่วโมง (อ.ส.ค., 2543) ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 คุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำนมดิบ

แหล่งผลิตน้ำนมดิบ	ค่า MBR (ชั่วโมง)	เชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (log cfu/ml)	แบคทีเรียโคลิฟอร์ม (MPN/ml)
ฟาร์มคณะเกษตรศาสตร์ มช.	6	5.44 ± 0.21	235
ฟาร์มของสมาชิกอ.ส.ค. ห้วยแก้ว	6	5.45 ± 0.73	629
ฟาร์มของสมาชิกสหกรณ์โคนมเชียงใหม่	6	5.22 ± 0.15	1020

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.1.1.2 ตรวจคุณภาพทางจุลชีววิทยาโดยการวิเคราะห์หาจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด

จากการตรวจหาจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดของน้ำนมดิบที่สุ่มจากฟาร์มของเกษตรกรที่เป็นสมาชิกของสหกรณ์โคนมเชียงใหม่ ฟาร์มของเกษตรกรที่เป็นสมาชิก อ.ส.ค. ห้วยแก้ว และฟาร์มของภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในช่วงเดือนพฤศจิกายน-ธันวาคม 2544 พบว่า น้ำนมดิบจากแหล่งผลิตทั้ง 3 แหล่งมีคุณภาพทางจุลชีววิทยาที่ดีไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) จัดอยู่ในเกรดที่ 1 และ 2 คือมีเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดต่ำกว่า $4.0X10^5$ cfu/ml หรือ 5.6 log cfu/ml (อ.ส.ค., 2543) ดังแสดงในตารางที่ 4.1

4.1.1.3 ตรวจคุณภาพทางจุลชีววิทยาโดยการวิเคราะห์หาเชื้อแบคทีเรียโคลิฟอร์ม

ปริมาณของเชื้อแบคทีเรียโคลิฟอร์มบ่งบอกถึงสุขอนามัยของน้ำนมดิบ และการจัดการน้ำนมดิบ จากการตรวจหาจำนวนเชื้อแบคทีเรียโคลิฟอร์มในน้ำนมดิบที่สุ่มจากฟาร์มของเกษตรกรที่เป็นสมาชิกของสหกรณ์โคนมเชียงใหม่ ฟาร์มของเกษตรกรที่เป็นสมาชิกขององค์การส่งเสริมกิจการโคนม (อ.ส.ค.) ห้วยแก้ว และฟาร์มของภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในช่วงเดือนพฤศจิกายน-ธันวาคม 2544 พบว่าน้ำนมดิบจากฟาร์มโคนมทั้ง 3 แห่ง มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียโคลิฟอร์มไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) แสดงปริมาณเชื้อแบคทีเรียโคลิฟอร์มในตารางที่ 4.1

จากการศึกษาคุณภาพทางจุลชีววิทยาโดยการหาค่า methylene blue reduction test (MBR) ตรวจหาจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด และเชื้อโคลิฟอร์มแบคทีเรีย พบว่าน้ำนมดิบจากฟาร์มโคนมทั้ง 3 แห่งมีคุณภาพทางจุลชีววิทยาที่ไม่แตกต่างกัน โดยมีค่า MBR 6 ชั่วโมง มีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดอยู่ในช่วง 5.22-5.44 log cfu/ml และมีแบคทีเรียโคลิฟอร์มอยู่ในช่วง 235-1020 MPN/ml จัดเกรดคุณภาพของน้ำนมดิบอยู่ในเกรดที่ 2 ตามมาตรฐานขององค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย พ.ศ. 2539 และ 2543 (ภาคผนวก จ) ที่กำหนดให้น้ำนมดิบเกรด 2 มีค่า MBR อยู่ระหว่าง 4-6 ชั่วโมง และมีจำนวนเชื้อทั้งหมดอยู่ในช่วง $2.0 X 10^5 – 4.0 X 10^5$ cfu/ml หรือ 5.30-5.60 log cfu/ml แต่เมื่อเปรียบเทียบกับมาตรฐานของอเมริกา (American Public Health Association) ในภาคนวก ก แล้วพบว่าน้ำนมดิบทั้ง 3 ฟาร์มมีคุณภาพจัดอยู่ในเกรด 3 คือคุณภาพพอใช้ได้ (fair) เท่านั้น ดังนั้นเกษตรกรจึงควรต้องระมัดระวังเรื่องความสะอาด สุขอนามัยของผู้รีดน้ำนม และวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการรีดน้ำนมเพิ่มมากขึ้นกว่าที่เป็นอยู่ในปัจจุบัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.1.2 ผลการศึกษาคุณภาพทางเคมีของน้ำนมดิบ

คุณภาพทางเคมีของน้ำนมดิบ ได้ตรวจหาปริมาณของแข็งทั้งหมด (total solid; T.S.) ปริมาณไขมัน และโปรตีนในน้ำนมดิบ พบว่าน้ำนมดิบจากแหล่งผลิตทั้ง 3 แหล่งมีปริมาณของแข็งทั้งหมด และไขมันไม่แตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) โดยมีปริมาณของแข็งทั้งหมดร้อยละ 11.54 - 12.78 และไขมันประมาณร้อยละ 4 น้ำนมดิบจากฟาร์มคณะเกษตรศาสตร์มีปริมาณโปรตีนมากกว่าน้ำนมดิบจากฟาร์มสมาชิก อ.ส.ค.ห้วยแก้ว และฟาร์มสมาชิกของสหกรณ์โคนมเชียงใหม่ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.05$) คือ ร้อยละ 3.84 ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 คุณภาพทางเคมีของน้ำนมดิบ

แหล่งผลิตน้ำนมดิบ	ของแข็งทั้งหมด (ร้อยละ)	ไขมัน (ร้อยละ)	โปรตีน (ร้อยละ)
ฟาร์มคณะเกษตรศาสตร์ มช.	12.78±1.48	4.34±0.74	3.83±0.74 [a]
ฟาร์มของสมาชิกอ.ส.ค. ห้วยแก้ว	11.76±0.11	4.15±1.13	3.21±0.18 [b]
ฟาร์มของสมาชิกสหกรณ์โคนมเชียงใหม่	11.54±0.21	3.80±0.42	3.32±0.73 [b]

หมายเหตุ : อักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.05$)

เมื่อพิจารณาจากคุณภาพทางเคมีของน้ำนมดิบจากฟาร์มโคนมทั้ง 3 แห่ง พบว่ามีคุณภาพที่ใกล้เคียงกัน โดยมีปริมาณของแข็งทั้งหมด และไขมันไม่แตกต่างกัน คือร้อยละ 11.54 – 12.78 และ 3.80 – 4.34 ตามลำดับ ซึ่งถือว่าเป็นไปตามมาตรฐานการรับซื้อน้ำนมดิบขององค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย พ.ศ. 2543 ที่ได้กำหนดให้น้ำนมดิบต้องมีปริมาณของแข็งทั้งหมดอยู่ระหว่างร้อยละ 12.50-12.84 สำหรับเกณฑ์มาตรฐานของไขมันในน้ำนมดิบนั้น ได้กำหนดให้มีไม่ต่ำกว่าร้อยละ 3.3 ดังนั้นน้ำนมดิบจากฟาร์มโคนมทั้ง 3 แห่งจึงมีคุณภาพอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานการรับซื้อน้ำนมดิบของ อ.ส.ค. แห่งประเทศไทย 2543

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.2 ตอนที่ 2: ผลการศึกษาปริมาณของไธโอไซยาเนตและค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสที่มีอยู่ในน้ำนมดิบ

4.2.1 ผลการศึกษาปริมาณของสารไธโอไซยาเนตที่มีอยู่ในน้ำนมดิบ

จากการวิเคราะห์หาปริมาณของสารไธโอไซยาเนตในน้ำนมดิบที่สุ่มจากฟาร์มเกษตรกรที่เป็นสมาชิกขององค์การส่งเสริมกิจการโคนม (อ.ส.ค.) ห้วยแก้ว สหกรณ์โคนมเชียงใหม่ และฟาร์มของคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จำนวน 4 ครั้ง ในช่วงเดือนพฤศจิกายน-ธันวาคม 2544 พบว่าน้ำนมดิบจากทั้ง 3 แหล่งมีปริมาณของไธโอไซยาเนตไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) โดยมีปริมาณของไธโอไซยาเนตอยู่ระหว่าง 3.38 – 4.00 มิลลิกรัมต่อลิตร แสดงในตารางที่ 4.3 และภาพที่ ก-2 ในภาคผนวก ก

ตารางที่ 4.3 ปริมาณของสารไธโอไซยาเนต และ ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส ในน้ำนมดิบ

แหล่งผลิตน้ำนมดิบ	ปริมาณของไธโอไซยาเนต (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ (units/ml)
ฟาร์มคณะเกษตรศาสตร์ มช.	4.00 ± 0.45	0.65 ± 0.13^{a}
ฟาร์มของสมาชิก อ.ส.ค. ห้วยแก้ว	3.38 ± 0.74	0.38 ± 0.17^{b}
ฟาร์มของสมาชิกสหกรณ์โคนมเชียงใหม่	3.43 ± 0.56	0.18 ± 0.05^{b}

หมายเหตุ : อักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

4.2.2 ผลการศึกษาค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสที่มีอยู่ในน้ำนมดิบ

จากการวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสในน้ำนมดิบที่สุ่มจากฟาร์มเกษตรกรที่เป็นสมาชิกขององค์การส่งเสริมกิจการโคนม (อ.ส.ค.) ห้วยแก้ว สหกรณ์โคนมเชียงใหม่ และฟาร์มของคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จำนวน 4 ครั้ง ในช่วงเดือนพฤศจิกายน-ธันวาคม 2544 พบว่าน้ำนมดิบจากคณะเกษตรศาสตร์มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสมากที่สุด คือ 0.65 ± 0.13 units/ml น้ำนมดิบจาก อ.ส.ค. ห้วยแก้ว และสหกรณ์โคนมเชียงใหม่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) คือ 0.38 ± 0.17 unit/ml และ 0.18 ± 0.05 unit/ml ตามลำดับ แสดงในตารางที่ 4.3 และภาพที่ ก-3 ในภาคผนวก ก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

น้ำนมดิบจากฟาร์มโคนมทั้ง 3 แห่ง มีปริมาณสารไธโอไซยาเนตใกล้เคียงกัน คือ อยู่ระหว่าง 3.38–4.00 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำนมดิบที่มีปริมาณของสารไธโอไซยาเนตสูงจะสามารถเก็บรักษาไว้ได้นานมากขึ้น (Wanapat และคณะ, 1977; FAO, 1999; Kussendrager และ Hooijidonk, 2000) และมีค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส อยู่ในช่วง 0.18-0.65 units/ml งานวิจัยนี้เลือกใช้น้ำนมดิบจากฟาร์มคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในการทดลองการเก็บรักษาน้ำนมดิบด้วยระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสในตอนต่อไป เนื่องจากมีความสะดวกในการขนส่งในระหว่างการทดลอง และมีคุณภาพที่ดีไม่แตกต่างจากน้ำนมดิบจากฟาร์มโคนมอื่น

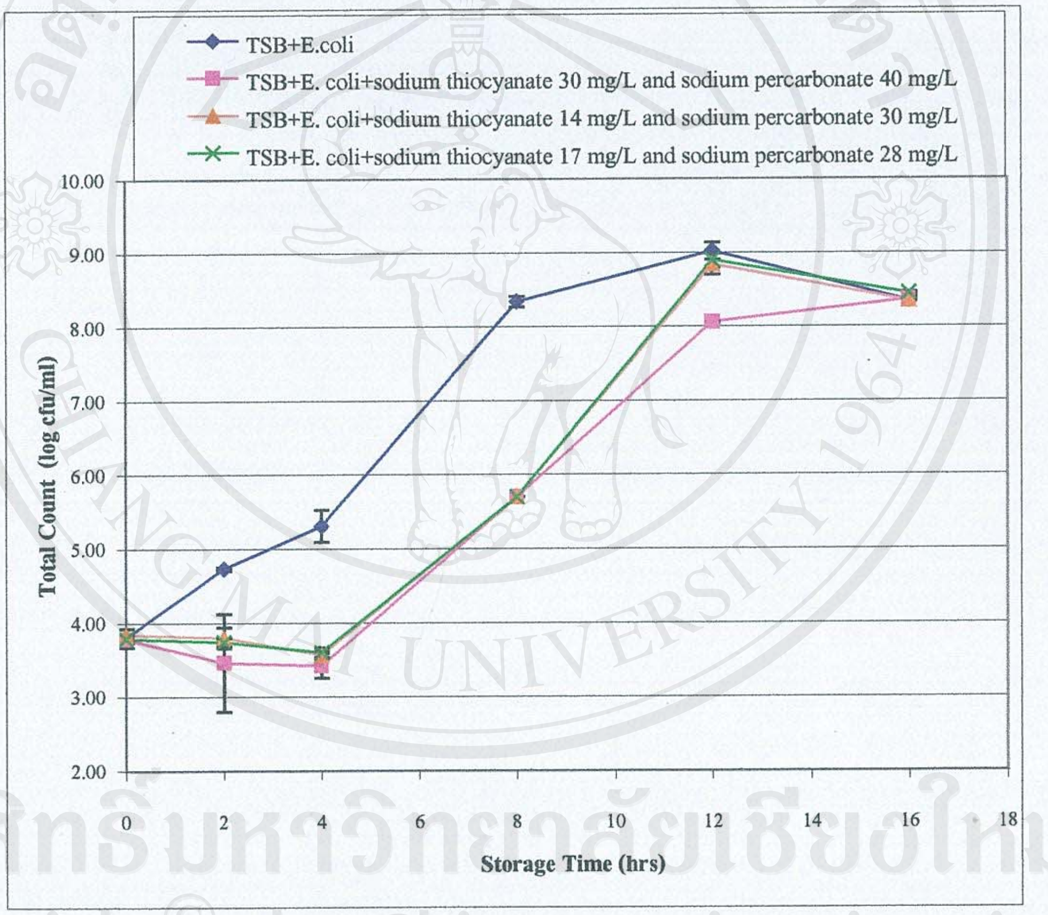
4.3 ตอนที่ 3 : ผลการทดลองการหาสัดส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารไธโอไซยาเนตและไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่ทำให้ระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสมีประสิทธิภาพ

ผลของการกระตุ้นระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Broth ที่มีเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10 µg/ml มีเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ประมาณ 10^3 cfu/ml แล้วเติมสารโซเดียมไธโอไซยาเนต (sodium thiocyanate; NaSCN) เป็นแหล่งของไธโอไซยาเนต และเติมโซเดียมเปอร์คาร์บอเนต (sodium percarbonate; $2Na_2CO_3.3H_2O_2$) เป็นแหล่งของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ในสัดส่วนความเข้มข้นที่แตกต่างกัน คือ สัดส่วน 30 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร, 14 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร และสัดส่วน 17 และ 28 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สุ่มตัวอย่างเพื่อตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด หลังบ่มนาน 0, 2, 4, 8, 12 และ 16 ชั่วโมง

ผลการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด พบว่าระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสที่สร้างขึ้นทุกระดับความเข้มข้นของสารโซเดียมไธโอไซยาเนตและโซเดียมเปอร์คาร์บอเนต สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ได้ในช่วง 4 ชั่วโมงแรกเท่านั้น เนื่องจากการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของสารไธโอไซยาเนตด้วยไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ของเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส จะได้สารที่ทำหน้าที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ คือ กรดไฮโปไธโอไซยานัส และไฮโปไธโอไซยาไนต์ไอออน ($HSCN/OSCN^-$) เกิดขึ้นมากที่สุดในช่วง 1 นาทีแรกของการเกิดปฏิกิริยาเท่านั้น (Tenovuo และคณะ, 1986) และหลังจาก 1 นาที สารต้านเชื้อจุลินทรีย์ ($HSCN/OSCN^-$) จะค่อยๆ ลดลงเนื่องจากการทำปฏิกิริยากับเชื้อจุลินทรีย์และการเกิดออโตรีดักชั่น (autoreduction) เปลี่ยนกลับไปเป็นไธโอไซยาเนต (SCN^-) และจะสลายตัวได้หมดภายในเวลา 2-3 ชั่วโมง (Thomas, 1981; Modi และคณะ, 1991) หลังจากนั้นเชื้อจุลินทรีย์ที่เหลือรอดจากการทำปฏิกิริยากับสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ก็จะสามารถเพิ่มจำนวนได้ตามปกติ จะเห็นว่าเชื้อจะเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากบ่มเชื้อนาน 8 ชั่วโมง และมีปริมาณของเชื้อสูงสุดหลังการบ่มนาน 12 ชั่วโมง ขณะที่ชุดควบคุม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ที่ไม่เติมสารโซเดียมไธโอไซยาเนตและโซเดียมเปอร์คาร์บอเนต เชื้อ *E. coli* สามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วตั้งแต่การบ่มเพียง 2 ชั่วโมงแรกเท่านั้น และมีปริมาณเชื้อสูงสุดหลังการบ่มนาน 12 ชั่วโมง คือ 9.05±0.09 log cfu/ml แล้วค่อยๆ ลดลงเป็น 8.36±0.02 log cfu/ml หลังเก็บน้ำนมไว้นาน 16 ชั่วโมง เนื่องจากสารอาหารและออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อลดน้อยลงประกอบกับมีสารพิษที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมของเชื้อเอง ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมนี้ตายอย่างรวดเร็ว ดังแสดงในภาพที่ 4.1 และตารางที่ ก-1 ในภาคผนวก ก



ภาพที่ 4.1 **การเจริญของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ในอาหาร Trypticase Soy Broth ที่ปรับให้เกิดระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส (LPS) โดยเติมโซเดียมไธโอไซยาเนต และโซเดียมเปอร์คาร์บอเนตในสัดส่วนที่แตกต่างกัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส**

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ของระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส ที่มีสารโซเดียมไธโอไซยาเนตและโซเดียมเปอร์คาร์บอเนตทั้ง 3 สัดส่วน พบว่าการใช้สารโซเดียมไธโอไซยาเนตร่วมกับโซเดียมเปอร์คาร์บอเนต ในสัดส่วนความเข้มข้น 30 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีที่สุด ($P \leq 0.05$) โดยสามารถลดปริมาณเชื้อได้ร้อยละ 64±4.62 ภายในเวลา 4 ชั่วโมง รองลงมาคือการใช้สารในสัดส่วน 14 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร และสัดส่วน 17 และ 28 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถลดปริมาณเชื้อได้ร้อยละ 44.46±3.74 และ 41.21±5.00 ตามลำดับ แสดงความสามารถในการลดปริมาณเชื้อในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ความสามารถในการลดปริมาณเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ของระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส ในอาหาร TSB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง

ปัจจัยศึกษา	ความสามารถในการลดปริมาณเชื้อ (%reduction)
1. TSB เติมเชื้อ *E. coli* (ชุดควบคุม)	-
2. TSB เติมเชื้อ *E. coli* และเติมเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส และสารโซเดียมไธโอไซยาเนตร่วมกับโซเดียมเปอร์คาร์บอเนต ในสัดส่วน 30 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ	64.00±4.62 [a]
3. TSB เติมเชื้อ *E. coli* และเติมเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส และสารโซเดียมไธโอไซยาเนตร่วมกับโซเดียมเปอร์คาร์บอเนต ในสัดส่วน 14 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ	44.46±3.74 [b]
4. TSB เติมเชื้อ *E. coli* และเติมเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส และสารโซเดียมไธโอไซยาเนตร่วมกับโซเดียมเปอร์คาร์บอเนต ในสัดส่วน 17 และ 28 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ	41.21±5.00 [b]

หมายเหตุ : อักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

$$\text{ความสามารถในการลดปริมาณเชื้อ (\%reduction)} = \frac{\text{ปริมาณเชื้อที่ถูกทำลาย (cfu/ml)} \times 100}{\text{ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (cfu/ml)}}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองในครั้งนี้ใช้สารโซเดียมไธโอไซยาเนตและโซเดียมเปอร์คาร์บอเนต 3 สัดส่วน คือ 30 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร, 14 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร และสัดส่วน 17 และ 28 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อคำนวณหาปริมาณของสารออกฤทธิ์คือสารไธโอไซยาเนต (SCN^-) และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) จะได้สัดส่วนความเข้มข้นเป็น 0.35 : 0.32 mM , 0.17 : 0.24 mM และ 0.20 : 0.22 mM ตามลำดับ (ตารางที่ ข-1 ในภาคผนวก ข) จะเห็นว่าการใช้โซเดียมไธโอไซยาเนตและโซเดียมเปอร์คาร์บอเนต ในสัดส่วนความเข้มข้น 30 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ จะให้สารออกฤทธิ์ คือไธโอไซยาเนต และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในอัตราส่วนความเข้มข้นโมลาร์ที่ใกล้เคียงกัน และมีความเข้มข้นที่สูงกว่าการใช้สารในสัดส่วน 14 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร และสัดส่วน 17 และ 28 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงทำให้ได้สารต้านเชื้อจุลินทรีย์คือกรดไฮโปไธโอไซยานัส และไฮโปไธโอไซยาไนต์ไอออน ($HOSCN/OSCN^-$) ในปริมาณที่สูงกว่าด้วย ทำให้มีประสิทธิภาพในการลดจำนวนเชื้อได้ดีกว่า ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Thomas (1981); Tenovou และคณะ (1986); Modi และคณะ (1991) ที่พบว่าการใช้ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และไธโอไซยาเนตในอัตราส่วนโมลาร์ที่เท่ากันจะได้สารต้านเชื้อจุลินทรีย์มากที่สุด และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งและฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด และจากรายงานของ Kamau และคณะ (1990) พบว่าการกระตุ้นระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส ด้วยสารไธโอไซยาเนตและไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในอัตราส่วนโมลาร์ที่เท่ากันในระดับความเข้มข้นที่สูงกว่า จะได้สารต้านเชื้อจุลินทรีย์ ($HOSCN/OSCN^-$) มากกว่า จึงทำให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีกว่าการใช้สารกระตุ้นในอัตราส่วนโมลาร์ที่เท่ากันความเข้มข้นต่ำ

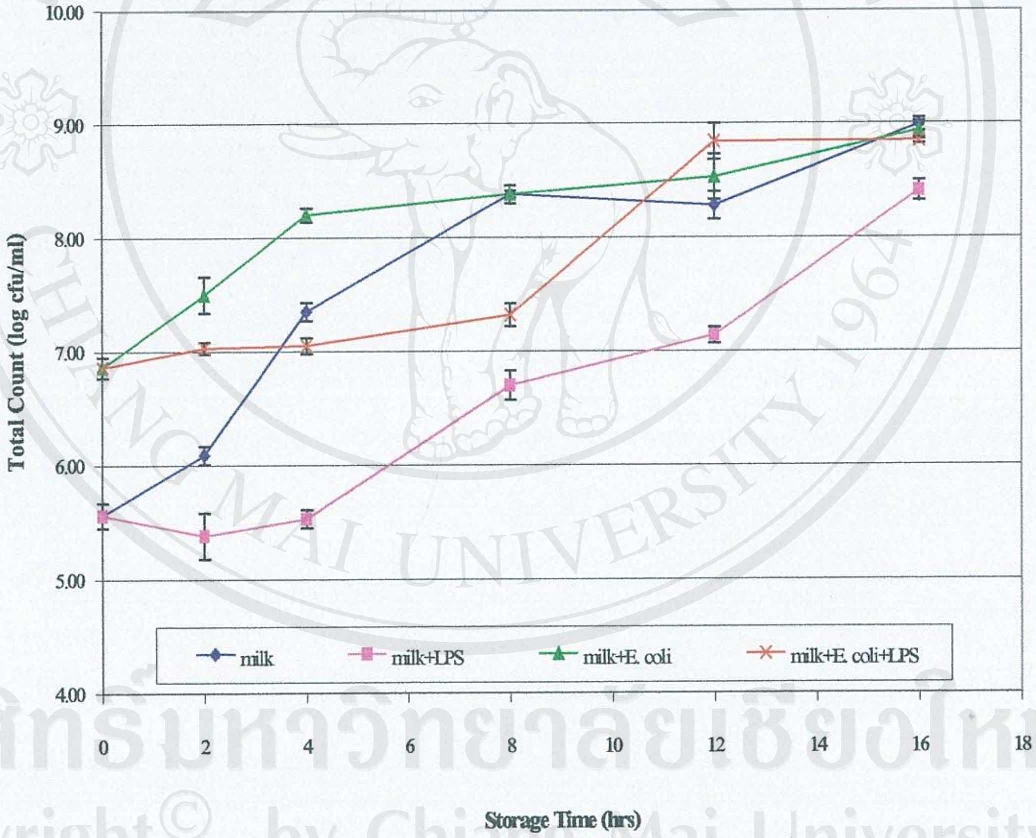
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.4 ตอนที่ 4 : ผลการศึกษาประสิทธิภาพของระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส ในการยืดอายุการเก็บรักษาน้ำนมดิบ

4.4.1 ศึกษาประสิทธิภาพของระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสในการรักษาคุณภาพน้ำนมดิบที่มีคุณภาพทางจุลชีววิทยาที่แตกต่างกัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

4.4.1.1 ผลการศึกษาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด

ผลการตรวจหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดแสดงในภาพที่ 4.2 และตารางที่ ก-2 ในภาคผนวก ก



ภาพที่ 4.2 การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำนมดิบที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นแตกต่างกัน หลังจากกระตุ้นให้เกิดระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส เก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

น้ำนมดิบชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมสารโซเดียมไธโอไซยาเนต และสารโซเดียมเปอร์คาร์บอเนต มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเป็น 5.56±0.11 log cfu/ml เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ไว้นาน 8 ชั่วโมง เชื้อเพิ่มมากขึ้นเป็น 8.38±0.03 log cfu/ml และหลังจากนั้นเชื้อจะเจริญได้ช้าลงจนสิ้นสุดการบ่ม 16 ชั่วโมง สำหรับน้ำนมดิบที่เก็บรักษาด้วยระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส โดยการเติมสารโซเดียมไธโอไซยาเนต และโซเดียมเปอร์คาร์บอเนต ในสัดส่วนความเข้มข้น 30 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร (การทดลองที่ 2) เชื้อจุลินทรีย์ลดลงร้อยละ 37 ภายในเวลา 2 ชั่วโมง และต้องใช้เวลามากกว่า 4 ชั่วโมงเชื้อจุลินทรีย์จึงจะมีปริมาณมากกว่าปริมาณเริ่มต้น

สำหรับชุดทดลองที่เติมเชื้อ *E. coli* จากภายนอกเพิ่มลงไปในน้ำนมดิบทำให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ 6.86±0.09 log cfu/ml ซึ่งถือว่าเป็นน้ำนมดิบที่มีคุณภาพทางจุลชีววิทยาต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดตามประกาศของ อ.ส.ค. พ.ศ. 2543 (ปริมาณเชื้อมากกว่า $8.0X10^5$ cfu/ml หรือ 5.9 log cfu/ml) ระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสไม่สามารถลดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ให้ต่ำกว่าปริมาณเริ่มต้นซึ่งเป็นคุณภาพทางจุลชีววิทยาที่แท้จริงของน้ำนมดิบได้ แต่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อให้ช้ากว่าน้ำนมดิบชุดควบคุม (การทดลองที่ 3) และเมื่อเก็บน้ำนมดิบไว้นาน 8 ชั่วโมงเชื้อเพิ่มจำนวนได้น้อยกว่าน้ำนมดิบชุดควบคุมประมาณ 1 log cfu/ml หรือ 10 เท่า การที่ระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส ไม่สามารถลดจำนวนของเชื้อในสภาวะที่มีจำนวนเชื้อเริ่มต้นสูงให้ต่ำกว่าปริมาณที่มีอยู่เดิมได้ เนื่องจากสารต้านจุลินทรีย์ที่เกิดจากระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสมีปริมาณไม่เพียงพอต่อการทำลายเซลล์ของเชื้อ ทำให้ยังมีเชื้อจุลินทรีย์เหลือรอดอยู่จำนวนมาก และสามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้ ซึ่งผลการทดลองในครั้งนี้สอดคล้องกับงานทดลองของ Wolfson และ Sumner (1994) ที่รายงานว่าระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสสามารถฆ่าเชื้อ *S. typhimurium* จำนวน 10^3 และ 10^5 cfu/ml ได้ทั้งหมดภายในเวลา 5 และ 15 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และไม่สามารถฆ่าเชื้อจำนวน 10^6-10^7 cfu/ml ได้หมด เชื้อยังสามารถกลับมาเจริญได้

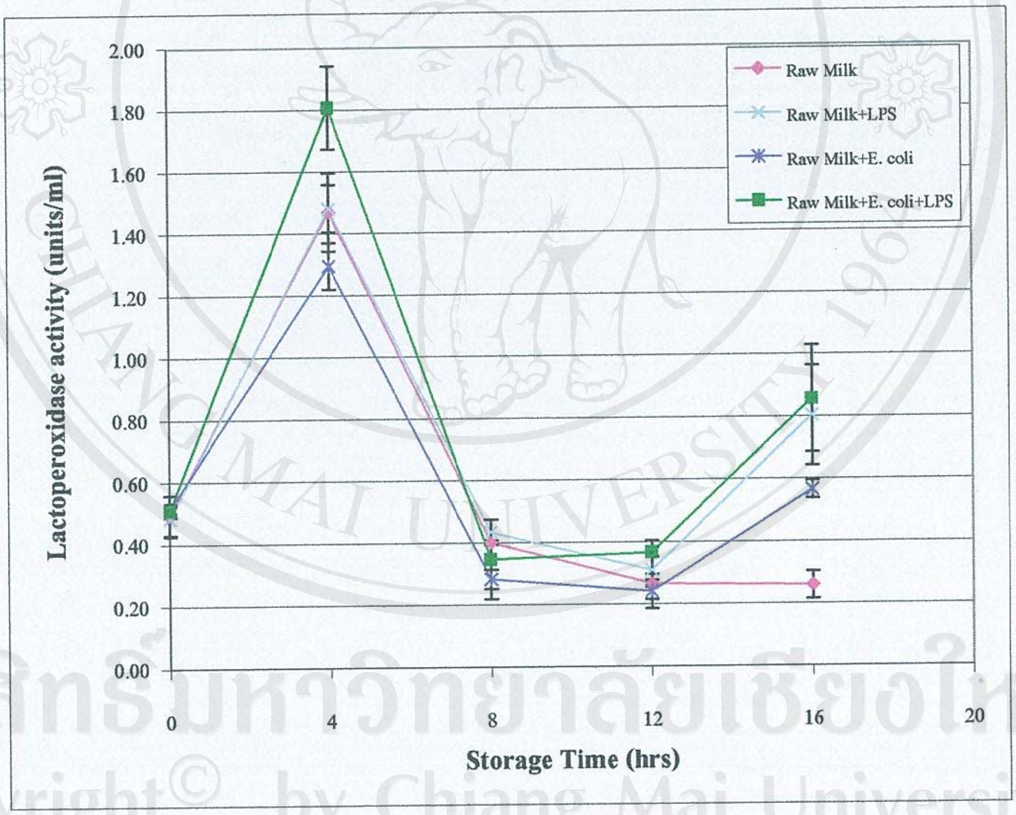
ระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสสามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำนมดิบได้ในช่วง 2 ชั่วโมงแรกเท่านั้น เนื่องจากจะเกิดสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ ($HSCN/OSCN^-$) มากที่สุดในช่วง 1 นาทีแรกของการเกิดปฏิกิริยาเท่านั้น และจะสลายตัวได้หมดภายในเวลา 2-3 ชั่วโมง (Thomas, 1981 ; Modi และคณะ, 1991) หลังจากนั้นเชื้อจุลินทรีย์ที่เหลือรอดจากการทำปฏิกิริยากับสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ก็จะสามารถเพิ่มจำนวนได้ตามปกติ การสลายตัวของสารต้านเชื้อจุลินทรีย์จะขึ้นอยู่กับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นในน้ำนมดิบ โดยในสภาวะที่มีเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นสูงจะเกิดการสลายตัวของสารต้านจุลินทรีย์ ($HSCN/OSCN^-$) ได้รวดเร็วกว่าน้ำนมที่มีเชื้อเริ่มต้นต่ำ เพราะเมื่อสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ ($HSCN/OSCN^-$) ทำปฏิกิริยากับเชื้อจุลินทรีย์แล้วจะสลายตัวเปลี่ยนกลับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ไปเป็นไธโอไซยาเนต ทำให้ระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำนมดิบที่มีปริมาณเชื้อริ่มต้น 5.56±0.11 log cfu/ml ได้ดีกว่าน้ำนมดิบที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 6.86±0.09 log cfu/ml

4.4.1.2 ผลการศึกษาค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสในน้ำนมดิบ หลังเติมสารกระตุ้นระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส เก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ผลจากการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสในน้ำนมดิบ หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตลอดการบ่ม 16 ชั่วโมง แสดงในภาพที่ 4.3 และตารางที่ ก-3 ในภาคผนวก ก



ภาพที่ 4.3 ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสในน้ำนมดิบที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นแตกต่างกัน หลังจากกระตุ้นให้เกิดระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส เก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากผลการทดลองพบความแปรปรวนของค่ากิจกรรมเอนไซม์ในระหว่างการเก็บรักษา โดยค่ากิจกรรมเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นสูงที่สุดเมื่อเก็บน้ำนมไว้นาน 4 ชั่วโมง แล้วลดลงหลังจากเก็บนาน 8 ชั่วโมง และจะเพิ่มขึ้นอีกครั้งเมื่อสิ้นสุดการเก็บรักษานาน 16 ชั่วโมง ซึ่งการเพิ่มขึ้นของค่ากิจกรรมเอนไซม์ในตอนหลังนี้จะลดน้อยลงกว่าในช่วงการบ่มใน 4 ชั่วโมงแรก แสดงว่ายิ่งบ่มน้ำนมดิบไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ไว้นานมากขึ้นปฏิกิริยาของเอนไซม์ก็จะลดลง เนื่องจากเอนไซม์จะค่อยๆ สูญเสียความคงตัวเมื่อถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิสูงนานๆ ความแปรปรวนของค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่เกิดขึ้น เป็นลักษณะของเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสในน้ำนมดิบที่ผลิตได้ในช่วงฤดูหนาว (งานวิจัยนี้ทดลองในเดือนกุมภาพันธ์) จากรายงานการทดลองของ Fonteh และคณะ (2001) และ Althaus และคณะ (2001) พบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ในน้ำนมดิบที่ผลิตได้ในฤดูหนาว จะมีความความแปรปรวนเพิ่มขึ้นและลดลงอย่างรวดเร็วสลับกันในระหว่างการเก็บรักษา และการที่ค่ากิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นสูงสุดในช่วง 4 ชั่วโมงแรกของการเก็บรักษานั้นอาจเป็นผลมาจากน้ำนมดิบในช่วงแรกๆ จะมีพีเอชเหมาะสมกับการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ (Blel และคณะ, 2001) และมีไธโอไซยาเนตและไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์อยู่ในปริมาณสูงทำให้เกิดการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของไธโอไซยาเนตด้วยไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ได้เร็วมากขึ้น แต่เมื่อเก็บน้ำนมไว้นานขึ้นไธโอไซยาเนตจะมีปริมาณลดลง ซึ่งจากรายงานของ Althaus และคณะ (2001) พบว่าไธโอไซยาเนตจะลดลงในระหว่างการเก็บรักษาน้ำนมแพะที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง และอาจจะเป็นผลมาจากพีเอชของน้ำนมดิบไม่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ เนื่องการเพิ่มขึ้นของเชื้อจุลินทรีย์ทำให้น้ำนมดิบมีความเป็นกรดมากขึ้น จึงทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในน้ำนมดิบลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเก็บไว้นาน 8 ชั่วโมง

การเติมสารกระตุ้นระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส ทำให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ในน้ำนมดิบเพิ่มสูงขึ้น โดยพบว่าน้ำนมดิบที่เติมสารกระตุ้นระบบเอนไซม์ (การทดลองที่ 2 และ 4) มีค่าเฉลี่ยของค่ากิจกรรมเอนไซม์ตลอดการบ่ม 16 ชั่วโมง สูงกว่าน้ำนมดิบชุดควบคุมที่ไม่เติมสารกระตุ้น (การทดลองที่ 1 และ 3) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) เนื่องจากเมื่อเติมสารโซเดียมไธโอไซยาเนต และโซเดียมเปอร์คาร์บอเนตจะทำให้มีสารออกฤทธิ์ คือ ไธโอไซยาเนต และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นซับสเตรตของเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสเพิ่มมากขึ้น ทำให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยาได้ดีมากขึ้น น้ำนมดิบที่เติมเชื้อ *E. coli* จากภายนอกเพิ่มและเติมสารกระตุ้นระบบเอนไซม์ (การทดลองที่ 4) มีค่าเฉลี่ยของค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด รองลงมาคือน้ำนมดิบที่เติมสารกระตุ้นระบบเอนไซม์ (การทดลองที่ 2) โดยมีค่าเฉลี่ยเป็น 0.78 ± 0.08 units/ml และ 0.70 ± 0.06 units/ml ตามลำดับ และน้ำนมดิบชุดควบคุมที่ไม่เติมสารกระตุ้นระบบเอนไซม์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

มีค่าเฉลี่ยของค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากันคือ 0.58±0.02 units/ml แสดงค่าเฉลี่ยของค่ากิจกรรมเอนไซม์ตลอดการบ่ม 16 ชั่วโมง ในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ค่าเฉลี่ยของค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสในน้ำนมดิบ ตลอดการบ่มนาน 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ปัจจัยศึกษา	ค่าเฉลี่ยของค่ากิจกรรมเอนไซม์ ตลอดการบ่ม 16 ชั่วโมง (units/ml)
การทดลองที่ 1 น้ำนมดิบ (ชุดควบคุม)	0.58±0.02 [c]
การทดลองที่ 2 น้ำนมดิบเติมโซเดียมไธโอไซยาเนตและโซเดียมเปอร์คาร์บอเนต ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เพื่อกระตุ้นให้เกิดระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส	0.70±0.06 [b]
การทดลองที่ 3 น้ำนมดิบเติมเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายประมาณ 10^6 cfu/ml	0.58±0.02 [c]
การทดลองที่ 4 น้ำนมดิบเติมเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายประมาณ 10^6 cfu/ml และเติมโซเดียมไธโอไซยาเนตร่วมกับโซเดียมเปอร์คาร์บอเนต ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เพื่อกระตุ้นให้เกิดระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส	0.78±0.08 [a]

หมายเหตุ : อักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

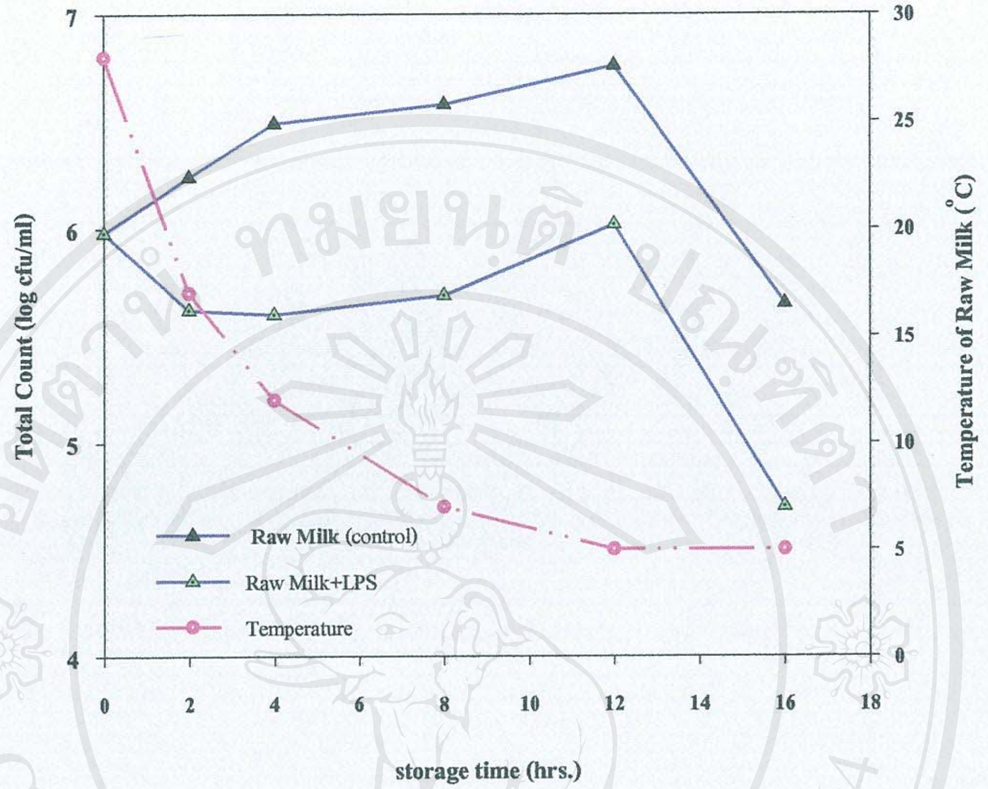
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.4.2 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส ในการเก็บรักษาน้ำนมดิบร่วมกับการเก็บที่อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส

4.4.2.1 ผลการศึกษาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Count)

ระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส ที่เติมสารโซเดียมไธโอไซยาเนต ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร และโซเดียมเปอร์คาร์บอเนต ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำนมดิบได้ร้อยละ 64 หลังจากเติมสารกระตุ้น 2 ชั่วโมง เนื่องจากเป็นช่วงที่มีสารที่ทำหน้าที่ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์มากที่สุด และจะมีปริมาณค่อยๆ ลดลงเมื่อทำปฏิกิริยากับเชื้อจุลินทรีย์ และเกิดการสลายตัวเอง (autoreduction) ที่อุณหภูมิต่ำของห้องเย็นจะช่วยรักษาความคงตัวของสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ทำให้สลายตัวได้ช้า (Bjorck, 1978) จึงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้นานถึง 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นเชื้อจุลินทรีย์จะถูกควบคุมด้วยความเย็นของห้องเย็น ทำให้ไม่สามารถเพิ่มจำนวนมากกว่าปริมาณเริ่มต้นได้ตลอดการบ่มนาน 16 ชั่วโมง สำหรับน้ำนมดิบชุดควบคุมเชื้อจุลินทรีย์จะสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ในช่วง 4 ชั่วโมงแรกเท่านั้น เพราะอุณหภูมิของน้ำนมดิบยังเหมาะสมกับการเจริญของเชื้ออยู่ โดยอุณหภูมิของน้ำนมดิบจะค่อยๆ ลดลงหลังจากบ่มในห้องเย็น หลังจากบ่มน้ำนมดิบนาน 4 ชั่วโมง อุณหภูมิจะลดลงจากอุณหภูมิห้องคือ 28 องศาเซลเซียส เป็น 12 องศาเซลเซียส และเมื่ออุณหภูมิของน้ำนมลดลงเรื่อยๆ เชื้อจุลินทรีย์จะเจริญได้ช้าลง จนในที่สุดอุณหภูมิของน้ำนมลดต่ำลงจนไม่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อและทำให้เชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ทนต่ออุณหภูมิต่ำตายไปบางส่วน จะเห็นว่าเมื่ออุณหภูมิของน้ำนมดิบเป็น 5 องศาเซลเซียส หลังจากเก็บไว้ในห้องเย็นนาน 12-16 ชั่วโมง ปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์จะลดลง แสดงในภาพที่ 4.4

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



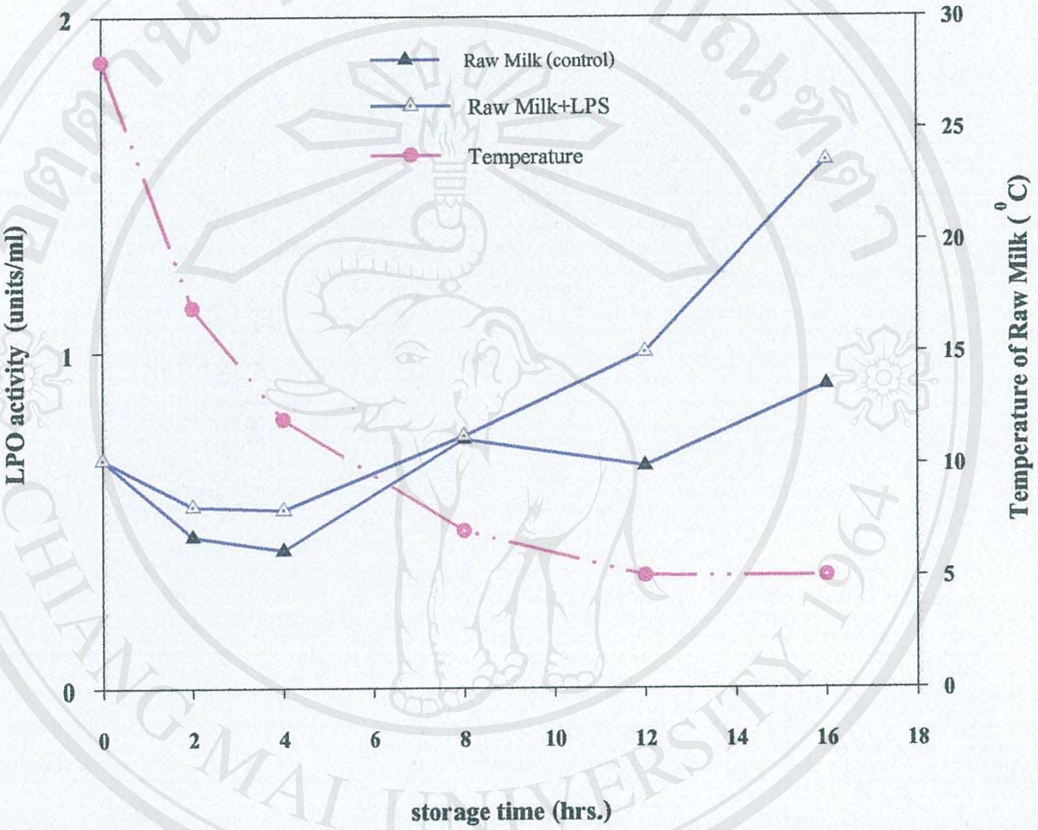
ภาพที่ 4.4 จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำนมดิบ หลังจากเติมสารกระตุ้นระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส

การเก็บรักษาน้ำนมดิบด้วยระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสน่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่เหมาะสมในพื้นที่ที่มีปัญหาเกี่ยวกับระบบการขนส่งน้ำนม และเครื่องมือในการทำความเย็นไม่มีประสิทธิภาพ ต้องใช้เวลานานในการลดอุณหภูมิของน้ำนมดิบ เพราะสามารถรักษาคุณภาพของน้ำนมไว้ได้โดยที่ไม่ต้องแช่เย็นนานขึ้นถึง 4 ชั่วโมง และเป็นระบบที่ไม่มีอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภค เนื่องจากใช้สารไธโอไซยาเนตในปริมาณที่ต่ำเมื่อเทียบกับปริมาณที่พบในน้ำคัดหลั่งของคน (ในน้ำลาย 40-50 มิลลิกรัมต่อลิตร ในน้ำย่อยในกระเพาะ 40-50 มิลลิกรัมต่อลิตร) (ANZFA, 2002) และสารต้านแบคทีเรีย (antibacterial agent) ที่เกิดจากปฏิกิริยาของระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสจะถูกทำลายอย่างสมบูรณ์เมื่อให้ความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทำให้น้ำนมที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์แล้วไม่พบสารต้านแบคทีเรียเหลืออยู่ และไม่ทำให้คุณสมบัติของน้ำนมเปลี่ยนไป ซึ่งจากรายงานของ Björck (1975; 1978) พบว่าน้ำนมดิบที่เก็บรักษาด้วยระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสมีค่า renneting time และปริมาณของกรดไขมันอิสระ (free fatty acid) ไม่เปลี่ยนแปลง เชื้อเริ่มต้นแลคติคที่เป็น mix starter culture ยังสามารถเจริญได้ตามปกติ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.4.2.2 ผลการศึกษาค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสในระหว่างการเก็บรักษาน้ำนมดิบที่อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง

ผลการวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสแสดงในภาพที่ 4.5 และ ตารางที่ ก-5 ในภาคผนวก ก



ภาพที่ 4.5 ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสในน้ำนมดิบ หลังจากเติมสารกระตุ้นระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

น้ำนมดิบชุดควบคุม และน้ำนมดิบที่เติมสารกระตุ้นระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ลดลงในช่วง 4 ชั่วโมงแรกของการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส โดยน้ำนมดิบชุดควบคุมมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ลดลงจากเริ่มต้น คือ 0.68$\pm$0.09 units/ml เป็น 0.41$\pm$0.05 units/ml และน้ำนมดิบที่เติมสารกระตุ้นระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ลดลงเป็น 0.53$\pm$0.07 units/ml หลังจากนั้นค่ากิจกรรมเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในช่วง 8-16 ชั่วโมง โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เป็น 0.90$\pm$0.11 units/ml และ 1.57$\pm$0.48 units/ml ตามลำดับ เมื่อสิ้นสุดการบ่ม 16 ชั่วโมง

จากผลการทดลอง พบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ในน้ำนมดิบจะลดลงในช่วง 0-4 ชั่วโมงแรก แล้วจะเพิ่มขึ้นในช่วง 8-16 ชั่วโมง ในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการทดลองของ Althaus และคณะ (2001) ที่พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นหลังจากเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 12-24 ชั่วโมง และหลังจาก 48 ชั่วโมง ค่ากิจกรรมเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็ว ขณะที่ปริมาณของไธโอไซยาเนต และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์จะลดลงอย่างต่อเนื่องหลังจากเก็บน้ำนมไว้นาน 6-48 ชั่วโมง และจากรายงานของ Shoos และคณะ (1999) พบความสัมพันธ์แบบผกผันของค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสกับปริมาณของสารไธโอไซยาเนต นั่นคือเมื่อเอนไซม์มีค่ากิจกรรมสูงจะเร่งการออกซิไดส์สารไธโอไซยาเนตได้เร็วมากขึ้น ทำให้ปริมาณของสารไธโอไซยาเนตลดลง

การเติมสารกระตุ้นระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส ทำให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ในน้ำนมดิบเพิ่มสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยพบว่าน้ำนมดิบที่เติมสารกระตุ้นระบบเอนไซม์มีค่าเฉลี่ยของค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงกว่าชุดควบคุม โดยมีค่าเฉลี่ยของค่ากิจกรรมเอนไซม์เป็น 0.90 ± 0.41 units/ml และ 0.64 ± 0.18 units/ml ตามลำดับ แสดงค่าเฉลี่ยของค่ากิจกรรมเอนไซม์ตลอดการบ่ม 16 ชั่วโมงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ค่าเฉลี่ยของค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสในน้ำนมดิบ ตลอดการบ่มนาน 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส

ปัจจัยศึกษา	ค่าเฉลี่ยของค่ากิจกรรมเอนไซม์ตลอดการบ่ม 16 ชั่วโมง (units/ml)
การทดลองที่ 1 น้ำนมดิบเก็บที่อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส	0.64 ± 0.18 [b]
การทดลองที่ 2 น้ำนมดิบเติมโซเดียมไธโอไซยาเนตและโซเดียมเปอร์คาร์บอเนต ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส	0.90 ± 0.41 [a]

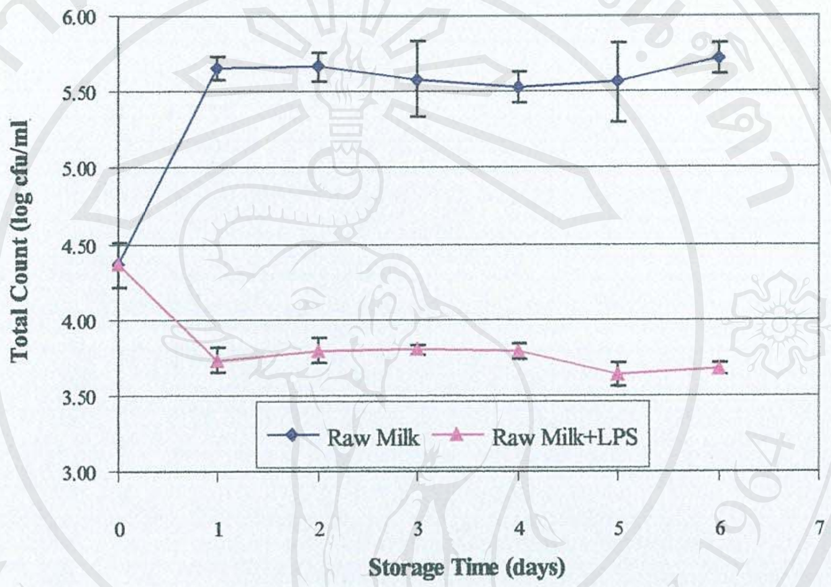
หมายเหตุ : อักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.4.3 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส ในการรักษาคุณภาพน้ำนมดิบร่วมกับการเก็บในอุณหภูมิตู้เย็น

4.4.3.1 ผลการศึกษาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Count)

แสดงผลการตรวจหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในภาพที่ 4.6 และตารางที่ ก-6 ในภาคผนวก ก



ภาพที่ 4.6 จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำนมดิบ หลังจากเติมสารกระตุ้นระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส นาน 6 วัน

การเติมสารกระตุ้นระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส คือสารโซเดียมไธโอไซยาเนต ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร และโซเดียมเปอร์คาร์บอเนต ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส สามารถลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำนมดิบได้ร้อยละ 77 ภายใน 1 วันแรกของการเก็บรักษา หลังจากนั้นเชื้อจุลินทรีย์จะถูกควบคุมด้วยอุณหภูมิต่ำของห้องเย็น เชื้อจุลินทรีย์จึงไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ตลอดการเก็บรักษา 6 วัน ขณะที่เชื้อจุลินทรีย์ในน้ำนมดิบชุดควบคุมถูกควบคุมด้วยระบบทำความเย็นเพียงอย่างเดียว จึงเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วในช่วง 1 วันแรกของการเก็บรักษา โดยเพิ่มขึ้นจากปริมาณเริ่มต้น 4.36 log cfu/ml เป็น 5.65 log cfu/ml หรือเชื้อเพิ่มมากกว่าเดิมประมาณ 10 เท่า เนื่องจากในช่วงแรกของการเก็บรักษาในห้องเย็น อุณหภูมิของน้ำนมดิบยังเหมาะสมกับการเจริญของเชื้อ คือมีอุณหภูมิประมาณ 28 องศาเซลเซียส และต้องใช้เวลาประมาณ 8 ชั่วโมงในการลดอุณหภูมิของน้ำนมดิบให้เป็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

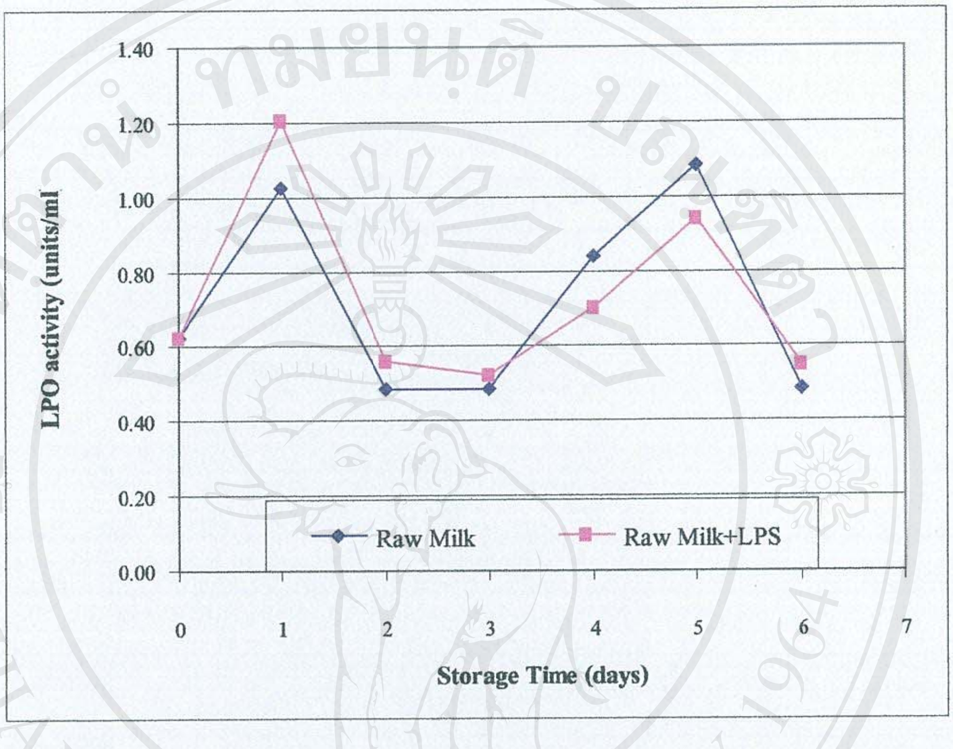
4-8 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิของน้ำนมดิบลดลงจนไม่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อจะทำให้เชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ทนต่ออุณหภูมิต่ำตายไปบางส่วน และมีเชื้อจุลินทรีย์บางส่วนที่ปรับตัวให้ทนต่ออุณหภูมิต่ำได้ก็จะสามารถกลับมาเพิ่มจำนวนเซลล์ได้อีกครั้ง จากผลการทดลองจะเห็นว่าจำนวนเซลล์จะคงที่ในช่วงการเก็บรักษา 2-5 วัน และมีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นหลังการเก็บรักษานาน 6 วัน ซึ่งผลการทดลองในครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานการทดลองของ Björck และคณะ (1975) ที่พบว่าระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสสามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ในช่วง 1 วันแรกที่เก็บที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส แต่หลังจาก 2 วัน ปริมาณเชื้อจะคงที่จนจนครบระยะเวลาในการเก็บ 6 วัน ซึ่งเป็นผลมาจากการควบคุมด้วยอุณหภูมิของตู้เย็น และสารต้านแบคทีเรียที่เกิดจากระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสจะมีความคงตัว (stable) มากกว่าเมื่ออยู่ที่อุณหภูมิต่ำ (Björck, 1978) จากภาพที่ 4.6 และตารางที่ ก-6 ในภาคผนวก ก จะเห็นว่าหลังจากเก็บน้ำนมดิบไว้นาน 6 วัน น้ำนมดิบที่เก็บด้วยระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสร่วมกับการเก็บที่อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส มีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์น้อยกว่าน้ำนมดิบชุดควบคุมถึง 100 เท่า (ประมาณ 2 log cycles) และมีปริมาณเชื้อที่ต่ำกว่าปริมาณเริ่มต้น ถึง 5 เท่า ซึ่งจะทำให้น้ำนมดิบสามารถเก็บไว้ได้นานมากขึ้นเพื่อรอการแปรรูปโดยที่น้ำนมดิบยังคงมีคุณภาพทางจุลชีววิทยาอยู่ในเกณฑ์ที่ดี

4.5 ผลการศึกษาค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส ในระหว่างการเก็บรักษาน้ำนมดิบที่อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส นาน 6 วัน

ผลการวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ตลอดการเก็บรักษาน้ำนมดิบที่อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส นาน 6 วัน ได้แสดงในภาพที่ 4.7 และตารางที่ ก-7 ในภาคผนวก ก พบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ในน้ำนมดิบชุดควบคุม และน้ำนมดิบที่เติมสารกระตุ้นระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส มีแนวโน้มที่เหมือนกัน คือค่ากิจกรรมเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อเก็บน้ำนมดิบไว้นาน 1 วัน และจะลดลงหลังเก็บไว้นาน 2 วัน และจะเพิ่มขึ้นและลดลงอีกครั้งเมื่อเก็บน้ำนมดิบไว้นาน 5 และ 6 วัน ตามลำดับ การเพิ่มขึ้นของค่ากิจกรรมเอนไซม์ในช่วงหลัง คือในวันที่ 5 ของการเก็บรักษาน้ำนมดิบ มีค่าใกล้เคียงกับค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นในช่วงแรกคือวันที่ 1 ของการเก็บน้ำนมดิบ แต่ในน้ำนมดิบที่เก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (การทดลองในตอนที่ 4.4.1.2) ค่ากิจกรรรมเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นในช่วงหลัง คือชั่วโมงที่ 16 ของการเก็บน้ำนมดิบจะมีค่าต่ำกว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นในช่วงแรก คือชั่วโมงที่ 4 ของการเก็บรักษา แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิต่ำของห้องเย็น สามารถรักษาสภาพความคงตัวของเอนไซม์ไว้ได้ดีกว่าการเก็บที่อุณหภูมิสูง 37 องศาเซลเซียส จึงทำให้เอนไซม์ยังสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ดีเมื่อเก็บไว้ในห้องเย็นนาน 6 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ค่ากิจกรรมเอนไซม์ในน้ำนมดิบที่เก็บด้วยระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสมีค่าสูงกว่าน้ำนมดิบชุดควบคุม ในช่วง 2 วันแรกของการเก็บรักษา แต่ในช่วง 4-5 วันของการเก็บรักษา น้ำนมดิบชุดควบคุมจะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงกว่าน้ำนมดิบที่เก็บด้วยระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส



ภาพที่ 4.7 ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสในน้ำนมดิบ หลังการเติมสารกระตุ้นระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส นาน 6 วัน

น้ำนมวัวที่ใช้ในการทดลองทั้งหมดเป็นน้ำนมจากฟาร์มคณะเกษตรศาสตร์ และทำการทดลองในช่วงเดือนมกราคมซึ่งเป็นฤดูหนาว (winter) ของประเทศไทย เมื่อเก็บน้ำนมดิบในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส ค่ากิจกรรมเอนไซม์จะแปรปรวนเพิ่มขึ้น-ลดลงเป็นวงจร (cyclic nature of the LP-System) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Fonteh และคณะ (2001) ที่พบว่าน้ำนมดิบที่ผลิตได้ในฤดูหนาว (winter milk) เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสแปรปรวนเพิ่มขึ้น-ลดลงเป็นวงจร โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เฉลี่ยอยู่ที่ 0.5 units/ml ในการทดลองนี้ได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เฉลี่ย คือ 0.73 units/ml

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved