



## รายงานการวิจัย

การศึกษาประสิทธิภาพของระบบ Lactoperoxidase ในการยับยั้งเชื้อที่ก่อโรคเต้านม  
อักเสบในพื้นที่จังหวัดชุมพร และระบบ Lactoperoxidase system ที่เกิดขึ้นเองโดย  
ธรรมชาติจากโคนมที่ได้รับใบมันสำปะหลังหมักเสริมในอาหารหยาบต่อการรักษาคุณภาพ  
น้ำนมดิบและผลิตภัณฑ์นม

Study of effectiveness lactoperoxidase system for inhibited microbial  
cause mastitis in Chumphon province and natural lactoperoxidase  
system induce by cassava leaf silage supplement in dairy cattle for  
preservative milk quality and characteristics of milk products.

โดย

นายเทียมพบ ก้านเหลือง หัวหน้าโครงการ

ผู้ร่วมโครงการ

นายวงศ์อนันต์ ณรงค์วาณิชการ นางสาววราลี คงกระพันธ์

นางสาวพรพรรณ พุ่มพวง นางสาวสมศรี ภูเลี้ยง

สารบัญ.....  
เลขทะเบียน 142701  
วันเดือนปี 23 พ.ค. 2559

b. 12779659  
i.

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2553-2554

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่มอบไว้สำหรับการใช้ส่วนตัวเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพร

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาประสิทธิภาพของระบบ Lactoperoxidase ในการยับยั้งเชื้อที่ก่อโรคเต้านมอักเสบในพื้นที่จังหวัดชุมพร และระบบ Lactoperoxidase system ที่เกิดขึ้นเองโดยธรรมชาติจากโคนมที่ได้รับใบมันสำปะหลังหมักเสริมในอาหารหยาบต่อการรักษาคุณภาพน้ำนมดิบและผลิตภัณฑ์นม

### บทคัดย่อ

สหกรณ์โคนมจังหวัดชุมพร จำกัด มีสมาชิกจำนวน 40 ฟาร์ม อยู่ในเขตอำเภอท่าแซะ และอำเภอปะทิว ฟาร์มส่วนใหญ่มีแม่โครีดนม 1-10 ตัว ผลิตน้ำนมดิบได้วันละ 5,987.70 กิโลกรัม ศึกษาการตกค้างของยาปฏิชีวนะในน้ำนมดิบโดยเก็บตัวอย่างน้ำนมระหว่างเดือนมกราคม-มิถุนายน เดือนละ 2 ครั้ง ตรวจการตกค้างของยาปฏิชีวนะด้วยชุดทดสอบ AM-test พบตัวอย่างน้ำนมดิบแสดงผลเป็นบวกในเดือนพฤษภาคมจำนวน 1 ฟาร์ม และเมื่อตรวจสอบด้วย European four plate test ให้ผลเป็นบวกที่ Test agar pH 8 ซึ่งคาดว่ามีการตกค้างของยาปฏิชีวนะในกลุ่ม Tylosin หรือ Erythromycin หรือ Neomycin หรือ Streptomycin เมื่อทำการติดตามไปที่ฟาร์มเพื่อยืนยันผลการวิเคราะห์ และทำการสอบถามพบว่าเกษตรกรใช้ยาปฏิชีวนะในกลุ่ม Streptomycin ในการรักษาโรคเต้านมอักเสบของโครีดนม

นอกจากนี้ยังพบการแสดงผลบวกของชุดทดสอบ AM-test ในตัวอย่างน้ำนมในเดือนมิถุนายนของฟาร์มจำนวน 1 ฟาร์มจำนวนสองครั้ง แต่ให้ผลเป็นลบเมื่อทดสอบด้วยวิธี European four plate test ที่ Test agar pH6, pH 7.2 และ pH 8 และเมื่อทำการติดตามไปที่ฟาร์ม เกษตรกรยืนยันว่าไม่ได้ใช้ยาปฏิชีวนะในช่วงเวลาที่มีการทดสอบการตกค้าง

กลุ่มวิสาหกิจผู้เลี้ยงโคนมใน ต. ชุมโค อ. ปะทิว จ. ชุมพร มีจำนวนสมาชิกทั้งหมด 18 ราย ได้ทำการเก็บตัวอย่างน้ำนมในเดือนธันวาคม โดยมีจำนวนโคที่รีดนมทั้งหมด 196 ตัว จำนวนโคหยุดการให้นม 43 ตัว จำนวนโคสาว 70 ตัว โคเพศผู้ และลูกโค 191 ตัว รวมโคนมทั้งหมด 500 ตัว ปริมาณน้ำนมเฉลี่ยต่อวันในเดือนธันวาคม มีปริมาณน้ำนมช่วงเช้าเฉลี่ย 1,549.30 กิโลกรัม ปริมาณน้ำนมช่วงเย็น 946.3 กิโลกรัม รวมปริมาณน้ำนมต่อวันทั้งหมด 2,495.60 กิโลกรัม ได้ทำการเก็บตัวอย่างน้ำนมแบบรายตัวแยกเต้า แล้วทำการตรวจด้วยน้ำยา CMT จึงทำการเก็บน้ำนมด้วยวิธี Aseptic technique จำนวนฟาร์มที่พบว่ามีโคป่วยเป็นโคเต้านมอักเสบ 5 ฟาร์ม โดยพบว่ามีโคที่ป่วยเป็นโรคเต้านมอักเสบจำนวน 6 ตัว

ศึกษาทดลองการยืดอายุการเก็บรักษาน้ำนมดิบโดยระบบการทำงานของ Lactoperoxidase ซึ่งแบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลอง โดยการทดลองที่ 1 มีสิ่งทดลอง 4 สิ่งทดลองคือน้ำนมดิบ (control) น้ำนมดิบที่เติม Sodiumthiocyanate และ Hydrogen peroxide ในอัตราส่วน 15:10, 100:50 และ 150:100 (mg/l : mg/l) เก็บรักษาตัวอย่างน้ำนมดิบที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเก็บผลการทดลองทุก 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 6 วัน การทดลองที่ 2 สิ่งทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 แต่เก็บรักษาตัวอย่างน้ำนมดิบที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเก็บผลการทดลองในชั่วโมงที่ 0, 3, 6, 9, 12 และ 15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาพบว่าสิ่งทดลองควบคุมมีการเพิ่มขึ้นของเปอร์เซ็นต์ Lactic acid จนไม่สามารถยอมรับได้ในชั่วโมงที่ 6 ขณะที่อัตราส่วน 15:10, 100:50 และ 150:100 สามารถชะลอการเพิ่มขึ้นของเปอร์เซ็นต์ Lactic acid ให้อยู่ในระดับที่ยอมรับได้ถึงชั่วโมงที่ 12 ของการทดลอง และที่ 4 องศาเซลเซียสพบว่าสิ่งทดลองควบคุมมีการเพิ่มขึ้นของเปอร์เซ็นต์ Lactic acid จนไม่สามารถยอมรับได้ในวันที่ 4 ของการทดลองขณะที่อัตราส่วน 15:10, 100:50 และ 150:100 สามารถชะลอการเพิ่มขึ้นของเปอร์เซ็นต์ Lactic acid ให้อยู่ในระดับที่ยอมรับได้ถึงวันที่ 6 ของการทดลอง ในส่วนของศึกษาปริมาณ Total Bacteria Count ที่ 30 องศาเซลเซียสพบว่าสิ่งทดลองควบคุมมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณ Total Bacteria Count จนไม่สามารถยอมรับได้ในชั่วโมงที่ 6 ขณะที่อัตราส่วน 15:10, 100:50 และ 150:100 สามารถชะลอการเพิ่มขึ้นของปริมาณ Total Bacteria Count ให้อยู่ในระดับที่ยอมรับได้ถึงชั่วโมงที่ 9 ของการทดลอง และที่ 4 องศาเซลเซียสพบว่าสิ่งทดลองควบคุมมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณ Total Bacteria Count จนไม่สามารถยอมรับได้ในวันที่ 5 ของการทดลองขณะที่อัตราส่วน 15:10, 100:50 และ 150:100 สามารถชะลอการเพิ่มขึ้นของปริมาณ Total Bacteria Count ให้อยู่ในระดับที่ยอมรับได้ถึงวันที่ 6 ของการทดลอง

คุณภาพบางประการของโยเกิร์ตที่ผลิตจากน้ำนมโคที่กระตุ้นระบบ Lactoperoxidase โดยการเติม Sodium thiocyanate 3 ระดับ คือ 10, 20 และ 30 ppm เพื่อเป็นแหล่งของ SCN<sup>-</sup> ซึ่งเป็นองค์ประกอบของระบบ Lactoperoxidase ก่อนให้ความร้อนแก่น้ำนมที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมเชื้อ Thermophilic yoghurt culture (Mixed culture ของ *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus bulgaricus*) 3 เปอร์เซ็นต์ แล้วบ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมง และเก็บรักษาในอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน ตรวจสอบคุณภาพโดยวัดค่า pH ปริมาณ Titratable acidity, Total solids และ Viable cell count ผลการทดลองพบว่าปริมาณ SCN<sup>-</sup> ในน้ำนมก่อนและหลังให้ความร้อน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ในขณะที่ทำการบ่มโยเกิร์ตค่า pH ลดลง และปริมาณ TA เพิ่มขึ้น จนยุติการบ่มที่ชั่วโมงที่ 4 ซึ่งค่า pH และ TA ของแต่ละกลุ่มการทดลองมีความแตกต่างกันทางสถิติ และในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน โยเกิร์ตทั้ง 4 กลุ่มทดลองมีค่า pH ลดลง เห็นได้ว่าการกระตุ้นระบบ Lactoperoxidase โดยการเติม Sodium thiocyanate ไม่มีผลต่อการทำงานของ Starter culture ในระหว่างการบ่ม และไม่สามารถยับยั้งการสร้างกรดที่มากเกินไปของโยเกิร์ตในระหว่างการเก็บรักษา

Study of effectiveness lactoperoxidase system for inhibited microbial cause mastitis in Chumphon province and natural lactoperoxidase system induce by cassava leaf silage supplement in dairy cattle for preservative milk quality and characteristics of milk products

Abstract

Chumphon Dairy Co-operative has 40 farm members in Amphur Tasaie and Pathiu. Most farms have 1-10 milking cows which produce 5,987.70 kg of raw milk per day. Study antibiotic residue in raw milk between January – June for twice per month. With AM-test for checking antibiotic residue get the positive result in 1 farm on May and get the positive result from the European four plate test as Test agar pH 8. The prospect of antibiotic group is Tyrosin or Erythomycin or Neomycin or Streptomycin. After follow up the test result by interviewing the farmer find Streptomycin used for mastitis treatment in milking cow.

Beside that we still find positive result from AM-test in June milk sample in 1 farm twice but get the negative result from European four plate test in Test agar pH 6, pH 7.2 and pH 8. After follow up the test with the farmer, his confirm is no antibiotic used in testing period.

Chumco's dairy farmers community enterprises has 18 farm members in Chumco, Pathiu, Chumphon. The total number of cows milked 196 cows and a number of lactation heifers 70 to 43 the number of male cattle and calves, 191 to 500, including all dairy milk per day in December. The average milk yield 1549.30 kg of milk in the morning, evening and 946.3 kg of milk per day, all of 2,495.60 kg was collected in the separator udder milk samples. Check with CMT reagent is then collected by Aseptic technique milk of cattle farms were found to have clinical mastitis cow 6 heads in 5 dairy farms.

Study on the raw milk preservation by Lactoperoxidase system, adding NaSCN and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the ratio 0:0, 15:10, 100:50 and 150:100 (mg/l). Milk was kept in 30°C and tested in the hour 0,3,6,9,12 and 15. The percentage of lactic acid, total bacteria count number and coliform count in ratio 0:0 was not acceptable level in hour 3. While the ratio 15:10, 100:50 and 150:100 was found the percentage of lactic acid be in the acceptable level in hour 15 and total bacteria count be in the acceptable level in hour 6, 9 and 12 respectively. In the ratio 15:10, 100:50 was in the acceptable level at hour 9 and 150:100 was in hour 12. At 4°C with the ratio 0:0, the percentage of lactic acid and

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

total bacteria count number were in the unacceptable in day 1 but coliform count was in the acceptable level in day 3. We found the percentage of lactic acid, total bacteria count number and coliform count were in the acceptable level in day 6 when the ratio as 15:10, 100:50 and 150:100. Boiling the milk at 95,80 and 72 °C for NaSCN and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> breakdown testing in the ratio 15:10 mg/l found NaSCN at 95 °C and 80 °C be significant lower than 72 °C ( $p < 0.05$ )

Study on shelf-life extension for raw milk by lactoperoxidase activity which divided to 2 experimental 1 there were 4 samples as control (raw milk) raw milk with Sodiumthiocyanate and Hydroxide in the ratio 15:10, 150:100 (mg/l: mg/l). Milk samples was kept in 4°c and determined every 24 hours for 6 days. Expenmental 2 , there was same sample conditions with the experimental 1 , but the samples was kept in 30°c and determined in hour 0, 3, 6, 9, 12 and 15.

Results obtained from this study, the percentage of lactic acid was higher in the control. It was an unacceptable level on hour 6, meantime at 15:10, 100:50 and 150:100 of Sodiumthiocyanate : Hydrogen peroxide could slow down the lactic acid increment to be the acceptable level to hour 12. At storage temperature 4 °c, lactic acid was in the unacceptable level on day 4 in the control but with Sodiumthiocyanate and Hydrogen peroxide at 15:10, 100:50 and 150:100 could maintain the acceptable level of lactic acid until day 6, At storage temperature 30 °c, Total Bacteria Count (TBC) was higher to the unacceptable level on hours 6 in the control but Sodiumthiocyanate and Hydrogen peroxide at 15:10, 100:50 and 150:100 could down TBC until 9, At 4 °c the control was in the unacceptable of TBC on day 5 meanwhile with these treatments could slow TBC down until day 6. For the Coliform count (CC) at 30 °c, it was an unacceptable level on hr 6 in the control meantime 15:10, 100:50 and 150:100 of Sodiumthiocyanate : Hydrogen peroxide could slow down CC in the unacceptable level until hr 9. AT storage temperature 4 °c, CC was in the unacceptable level on day 4 in the control but with Sodiumthiocyanate and Hydrogen peroxide at 15:10, 100:50 and 150:100 could maintain the acceptable of CC until day 6. From this study, there was significant difference on shelf life extension for raw milk at 30 °c and 4 °c storage temperature between the control and milk with Sodiumthiocyanate : Hydrogen peroxide could in each ratio

Certain quality of yogurt produced from milk that stimulates the system. Lactoperoxidase by adding Sodium thiocyanate 3 levels: 10, 20, and 30 ppm for the source of SCN-, which is a component of the Lactoperoxidase systme. Heating milk at 90 °C for 10 minutes, then leave to cool down the temperature of 45°C, then inoculate

Thermophilic yoghurt culture (Mixed culture of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*) 3 percent, then incubated for 4 hours and storage temperature 5°C for 15 days to check the quality by measuring the pH titratable acidity (TA), total solids and viable cell count results showed that the amount of SCN-in milk before and after heating non significant different. While incubating yogurt decreased the pH and TA volume increased until the end of the incubation at 4, the pH and TA of each experimental group were significant different. And during storage at 5°C for 15 days, yoghurt and four experimental groups with lower pH values demonstrated that the stimulation Lactoperoxidase by adding Sodiumthiocyanate not affect the operation of starter culture during incubation and can inhibit excessive acid of yoghurt during storage.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัย “การศึกษาประสิทธิภาพของระบบ Lactoperoxidase ในการยับยั้งเชื้อที่ก่อโรค เต้านมอักเสบในพื้นที่จังหวัดชุมพร และระบบ Lactoperoxidase system ที่เกิดขึ้นเองโดยธรรมชาติจาก โคนมที่ได้รับไขมันสำปะหลังหมักเสริมในอาหารหยাবต่อการรักษาคุณภาพน้ำนมดิบและผลิตภัณฑ์นม” เป็นโครงการวิจัยที่ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553 – 2554 ซึ่งคณะผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพร และบุคลากรของงานบริหารงานวิจัยของวิทยาเขตชุมพรที่มีส่วนผลักดันให้งานวิจัยนี้ สำเร็จ รวมทั้งเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมซึ่งเป็นสมาชิกของสหกรณ์โคนมจังหวัดชุมพร จำกัด และกลุ่ม วิสาหกิจผู้เลี้ยงโคนมตำบลชุมโค โดยเฉพาะคุณประชุม รูปสง่า เกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมที่ให้ความร่วมมือ เป็นอย่างดีในการจัดเก็บน้ำนมดิบ การตรวจหาการปนเปื้อนของยาปฏิชีวนะ และการตรวจหาโรคเต้านม อักเสบ รวมทั้งการอนุเคราะห์เป็นฟาร์มศึกษาวิจัย

คณะผู้วิจัย

20 เมษายน 2556



## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ณ
สารบัญภาพ	ญ
<b>บทที่ 1 บทนำ</b>	
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์	3
<b>บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง</b>	
2.1 กรอบแนวคิด	5
2.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง / ทบทวนวรรณกรรม	
กิจกรรมที่ 1 การศึกษาประสิทธิภาพของระบบ Lactoperoxidase ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคเต้านมอักเสบในโคนม เพื่อลดการใช้และการตกค้างของยาปฏิชีวนะในฟาร์มโคนม	10
กิจกรรมที่ 2 ผลของระบบ Lactoperoxidase ในน้ำนมต่อการรักษาคุณภาพน้ำนมดิบและคุณลักษณะของโยเกิร์ต	25
<b>บทที่ 3 การศึกษาประสิทธิภาพของระบบ Lactoperoxidase ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคเต้านมอักเสบในโคนมเพื่อลดการใช้และการตกค้างของยาปฏิชีวนะในฟาร์มโคนม</b>	
3.1 การสำรวจเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคเต้านมอักเสบในฟาร์มโคนมของเกษตรกรในพื้นที่จังหวัดชุมพร	32
3.2 ศึกษาการตกค้างของยาปฏิชีวนะรายฟาร์มของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมจังหวัดชุมพร	44
3.3 ประสิทธิภาพของระบบ Lactoperoxidase ในการรักษาคุณภาพน้ำนมดิบ	46
<b>บทที่ 4 ผลของระบบ Lactoperoxidase ในน้ำนมต่อการรักษาคุณภาพน้ำนมดิบและคุณลักษณะของโยเกิร์ต</b>	
4.1 ผลของระบบ Lactoperoxidase ในน้ำนมต่อคุณภาพน้ำนมดิบ	54
4.2 ผลของระบบ Lactoperoxidase ในน้ำนมต่อคุณลักษณะของโยเกิร์ต	60

ภาคผนวก

ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัย

73



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 แสดงการแบ่งชั้นคุณภาพน้ำนมดิบตามคุณลักษณะ	11
ตารางที่ 2.2 แสดงค่าเฉลี่ยของจำนวนจุลินทรีย์ตามวิธีวิเคราะห์ในรัฐนิวยอร์ก	12
ตารางที่ 2.3 แสดงการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบน้ำนมเนื่องจากจำนวน Somatic cell	13
ตารางที่ 2.4 แสดงการแนะนำมาตรฐานด้านจุลชีววิทยาสำหรับน้ำนมดิบเกรดดีมาก (Premiums) ในประเทศสหรัฐอเมริกา	17
ตารางที่ 2.5 แสดงสาเหตุของการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในน้ำนมดิบตามวิธีวิเคราะห์	20
ตารางที่ 2.6 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของน้ำนมและผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต	27
ตารางที่ 2.7 แสดงค่า pH ในระยะการบ่มโยเกิร์ตที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง	29
ตารางที่ 2.8 แสดงค่า Titratable acidity ในช่วงเวลาการบ่มโยเกิร์ตที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง	30
ตารางที่ 3.1 ตารางการตรวจ CMT ในน้ำนม	32
ตารางที่ 3.2 แสดงลำดับและปฏิกิริยาในการย้อมสีแบบแกรม	34
ตารางที่ 3.3 แสดงจำนวนโคไนแต่ละฟาร์ม	38
ตารางที่ 3.4 การทดสอบทางชีวเคมีในกลุ่มเชื้อในกลุ่ม <i>E. coli</i>	39
ตารางที่ 3.6 ผลการตรวจพบเชื้อกลุ่มก่อโรคมมาจากสิ่งแวดล้อม รายตัวแยกได้ในโคนม ที่เป็นเต้านมอักเสบ	41
ตารางที่ 3.7 แสดงเปอร์เซ็นต์ Lactic acid ที่ 30 องศาเซลเซียส	47
ตารางที่ 3.8 แสดงเปอร์เซ็นต์ Lactic acid ที่ 4 องศาเซลเซียส	48
ตารางที่ 3.9 แสดงจำนวน Total Bacteria Count ที่ 30 องศาเซลเซียส (CFU/ml)	48
ตารางที่ 3.10 แสดงจำนวน Total Bacteria Count ที่ 4 องศาเซลเซียส (CFU/ml)	49
ตารางที่ 3.11 แสดงจำนวน Coliform Count ที่ 30 องศาเซลเซียส (CFU/ml)	50
ตารางที่ 3.12 แสดงจำนวน Coliform Count ที่ 4 องศาเซลเซียส (CFU/ml)	51
ตารางที่ 3.13 แสดงปริมาณ Thiocyanate ในน้ำนมที่เติม Thiocyanate และได้รับความร้อนที่อุณหภูมิพาสเจอร์ไรซ์ และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	51
ตารางที่ 3.14 แสดงปริมาณ Thiocyanate ในน้ำนมที่เติม Thiocyanate และได้รับความร้อนที่อุณหภูมิพาสเจอร์ไรซ์ และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	52
ตารางที่ 4.1 แสดงเปอร์เซ็นต์ Lactic acid ที่ 30 องศาเซลเซียส	55
ตารางที่ 4.2 แสดงเปอร์เซ็นต์ Lactic acid ที่ 4 องศาเซลเซียส	56
ตารางที่ 4.3 แสดงจำนวน Total Bacteria Count ที่ 30 องศาเซลเซียส (CFU/ml)	56
ตารางที่ 4.4 แสดงจำนวน Total Bacteria Count ที่ 4 องศาเซลเซียส (CFU/ml)	57
ตารางที่ 4.5 แสดงจำนวน Coliform Count ที่ 30 องศาเซลเซียส (CFU/ml)	58
ตารางที่ 4.6 แสดงจำนวน Coliform Count ที่ 4 องศาเซลเซียส (CFU/ml)	59
ตารางที่ 4.7 คุณภาพบางประการของโยเกิร์ตที่ผลิตจากน้ำนมโคที่กระตุ้นระบบ Lactoperoxidase โดยการเติม Sodium thiocyanate 3 ระดับ คือ 10, 20 และ 30 ppm	65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 2.1 แสดงการกระตุ้นและการยับยั้งการทำงานของ <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus</i> และ <i>Streptococcus thermophilus</i> ในกระบวนการหมักโยเกิร์ต	8
ภาพที่ 3.1 ลักษณะโคโลนี ที่ขึ้นบน Blood agar และ Macconkey agar	39
ภาพที่ 3.2 แสดงผลการทดสอบ TSI ที่ให้ผล Negative (-) และ Positive (+)	40
ภาพที่ 3.3 แสดงผลการทดสอบ Motility ที่ให้ผล Negative (-) และ Positive (+)	40
ภาพที่ 3.4 การทดสอบ TSI, Indole, Citrate, MRVP, Motility, Arabinose และ Lysine เต้านมหน้าซ้ายฟาร์ม E โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบตัวที่ 2	41
ภาพที่ 3.5 การทดสอบ TSI, Indole, Citrate, MRVP, Motility, Arabinose และ Lysine เต้านมหลังขวาฟาร์ม E โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบตัวที่ 2	42
ภาพที่ 3.6 แสดงภาพทั่วไปของฟาร์ม A บริเวณรอบๆ ฟาร์มมีความชื้น มีน้ำท่วมขัง บริเวณโดยรอบ อุปกรณ์การรีดนมไม่สะอาด	42
ภาพที่ 3.7 แสดงภาพทั่วไปของฟาร์ม B บริเวณรอบๆ ฟาร์มมีความชื้น มีน้ำท่วมขัง บริเวณโดยรอบ มีสัตว์เลี้ยงอยู่ในบริเวณฟาร์ม อุปกรณ์ในการรีดนมไม่สะอาด	42
ภาพที่ 3.8 แสดงภาพทั่วไปของฟาร์ม C บริเวณคอกรีดไม่สะอาด มีการจัดการการรีดที่ไม่ดี อุปกรณ์ในการรีดนมไม่สะอาด ตัวผู้รีดไม่รักษาความสะอาด	43
ภาพที่ 3.9 แสดงภาพทั่วไปของฟาร์ม D สภาพฟาร์มอยู่บนที่ดอน มีการจัดการฟาร์มที่ดี พื้นคอกที่มีความสะอาด คอกรีดสะอาด	43
ภาพที่ 3.10 แสดงภาพทั่วไปของฟาร์ม E บริเวณรอบๆ ฟาร์มมีสภาพความเป็นที่ลุ่ม มีน้ำท่วมขังบริเวณโดยรอบ คอกพักรีดนมไม่สะอาด	43
ภาพที่ 4.1 แสดงกราฟมาตรฐานของ SCN <sup>-</sup> ในน้ำนมโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer	62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคเต้านมอักเสบ (Mastitis) มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อแบคทีเรียเข้าสู่เต้านม เชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุ คือ กลุ่มที่ก่อโรคบ่อย (Contagious microorganisms) เป็นกลุ่มที่เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคเต้านมอักเสบ ได้แก่ เชื้อ *Staphylococcus aureus* เชื้อชนิดนี้จะทำลายเนื้อเยื่อที่ผลิตน้ำนม ทำให้เซลล์น้ำนมสูงขึ้น และจะทำให้เกิดโรคเต้านมอักเสบแบบเรื้อรัง เชื้อ *Streptococcus agalactiae* เป็นเชื้อแกรมบวกมักจะอยู่ที่เต้านม แต่อาจจะพบได้ทั่วไปในที่รองนอนของโค หรือเครื่องรีด สามารถที่จะแพร่เชื้อไปสู่ตัวอื่นได้ เชื้อ *Mycoplasma bovis* จะมีขนาดอยู่ระหว่างแบคทีเรียและไวรัส หลังจากติดเชื้อแล้วจะแสดงอาการอย่างรวดเร็ว เชื้อไม่ค่อยจะตอบสนองต่อการรักษา อาจพบเชื้อได้จากอุจจาระ เลือด ระบบทางเดินอาหาร หายใจ ตา มดลูก และเชื้อ *Corynebacterium bovis* เป็นกลุ่มแกรมบวกที่มีขนาดเล็กมาก เต้าที่ติดเชื้อจะแสดงอาการน้อย

กลุ่มที่มาจากสิ่งแวดล้อม (Environmental microorganisms) เป็นเชื้อที่อาศัยอยู่ตามสิ่งแวดล้อมที่โคอาศัยอยู่ เชื้อจะเข้าสู่เต้านมได้เวลาที่โคไปสัมผัสโดยตรง หรืออาจจะเกิดในช่วงระหว่างการรีดนม ได้แก่ เชื้อกลุ่ม Coliforms เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างยาว พบเชื้อในอุจจาระ น้ำที่ไม่สะอาด พื้นดิน ที่รองนอน ที่พบคือ *Escherichia coli* และ *Klebsiella pneumonia* การติดเชื้อมักพบในช่วงระยะหยุดรีดนม และช่วงคลอดใหม่ เมื่อติดเชื้อแล้วเป็นแบบแสดงอาการ เนื่องจากการก่อโรคค่อนข้างที่จะไวมาก แม้อาจตายได้หากว่ารักษาไม่ทัน

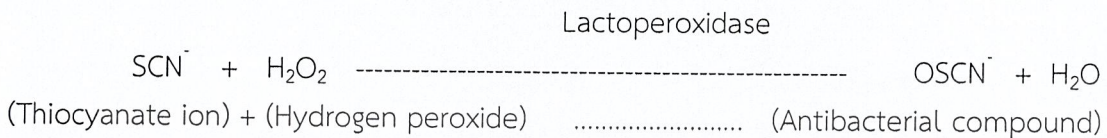
กลุ่มที่ก่อโรคบางโอกาส (Opportunitis microorganisms) ปกติเชื้อกลุ่มนี้มักจะอาศัยอยู่ตามผิวของเต้านมและหัวนม ได้แก่ เชื้อกลุ่มของ *Staphylococcus spp.* หรือ Coagulase-negative staphylococci (CNS) ค่าเซลล์ในน้ำนมจะสูงประมาณ 1 ล้าน เซลล์/มล. ส่วนใหญ่จะเป็นเต้านมแบบไม่แสดงอาการ และพบว่าการติดเชื้อจะสูงช่วงในระยะหยุดรีดนมและหลังคลอด

โคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบรุนแรง จะมีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของน้ำนมอย่างเห็นได้ชัดเจน แต่ในกรณีของโรคเต้านมอักเสบที่ไม่แสดงอาการ น้ำนมจะไม่มีเปลี่ยนแปลงใดๆ ให้เห็น แม้ว่ากระบวนการพาสเจอร์ไรส์จะทำลายจุลินทรีย์ที่เกิดโรคในโคนได้ แต่อาจจะมีเชื้อ *Staphylococcus aureus* บางสายพันธุ์ที่ทนความร้อนสามารถสร้างสารพิษในทางเดินอาหาร (Enterotoxin) และสิ่งสำคัญที่จะเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคคือ สารปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนม ซึ่งเกิดจากการรักษาโรคเต้านมอักเสบ สารตกค้างในน้ำนมจะทำให้เกิดปฏิกิริยาในคนที่แพ้ต่อสารปฏิชีวนะ และอาจกระตุ้นภูมิคุ้มกันในคนปกติทำให้เกิดแบคทีเรียชนิดที่ต้านยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### ระบบ Lactoperoxidase

เอนไซม์ Lactoperoxidase เป็นเอนไซม์ที่พบโดยธรรมชาติในน้ำนมดิบ ซึ่งมีปริมาณประมาณ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ในน้ำนมโค ทำงานต้านหรือทำลายจุลินทรีย์โดยการออกซิไดซ์ Thiocyanate ในสภาพที่มี Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) ทำให้เกิดสารประกอบที่สามารถต่อต้านการเจริญเติบโต และทำลายจุลินทรีย์ในน้ำนม แสดงดังสมการ (FAO,2003)



โดยมีการนำไปใช้ในการเก็บรักษาน้ำนมดิบในพื้นที่ห่างไกล และขาดเทคโนโลยีในการทำควมเย็น การทำงานของระบบ Lactoperoxidase ในน้ำนมมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ทั้งแกรมบวก และแกรมลบ (Seifu et al., 2005) จากการศึกษาของ Haddadin และคณะ (1996) พบว่าการกระตุ้นระบบ Lactoperoxidase ด้วยการเติม Sodium thiocyanate และ Sodium percarbonate เพื่อเป็นแหล่งของ  $SCN^-$  และ  $H_2O_2$  ในอัตราส่วน 15:10 มิลลิกรัมต่อลิตร จะสามารถยืดอายุการเก็บรักษาน้ำนมดิบที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้หลายวัน และสามารถเก็บที่อุณหภูมิห้องได้ 18 ชั่วโมง สอดคล้องกับ FAO (2003) ที่รายงานว่าการกระตุ้นระบบ Lactoperoxidase สามารถยืดอายุการเก็บรักษาน้ำนมดิบได้ 7 – 8 ชั่วโมงระหว่างการขนส่งมายังโรงงานแปรรูป

เอนไซม์ Lactoperoxidase เป็นเอนไซม์ที่พบโดยธรรมชาติในน้ำนมดิบ ซึ่งมีปริมาณประมาณ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ในน้ำนมโค ทำงานต้านหรือทำลายจุลินทรีย์โดยการออกซิไดซ์ Thiocyanate ในสภาพที่มี Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) ทำให้เกิดสารประกอบที่สามารถต่อต้านการเจริญเติบโต และทำลายจุลินทรีย์ในน้ำนม (FAO,2003) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ทั้งแกรมบวก และแกรมลบ สามารถนำไปใช้ในการเก็บรักษาน้ำนมดิบในพื้นที่ห่างไกล และขาดเทคโนโลยีในการทำควมเย็น (Seifu et al., 2005)

การกระตุ้นระบบ Lactoperoxidase โดยการเติม Sodium thiocyanate และ Sodium percarbonate เพื่อเป็นแหล่งของ  $SCN^-$  และ  $H_2O_2$  ในอัตราส่วน 20:20 ppm จะสามารถยืดอายุการเก็บรักษาน้ำนมที่อุณหภูมิห้องได้ 18 ชั่วโมง (Fonteh et al.,2005) และ Lactoperoxidase จะสลายตัวเมื่อพาสเจอร์ไรส์นมที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส 20 วินาที (Walstra et al., 2006) แต่เมื่อใช้อุณหภูมิในการพาสเจอร์ไรส์ที่ต่ำ ( 72 องศาเซลเซียส 15 วินาที ) เอนไซม์ Lactoperoxidase บางส่วนยังสามารถทำงานยับยั้งแบคทีเรียภายหลังกระบวนการพาสเจอร์ไรส์ ซึ่งสามารถยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์นมได้นานขึ้น (Marks et al., 2001)

โยเกิร์ต เป็นผลิตภัณฑ์นมประเภท Fermented milk มีประโยชน์ในการบริโภค เช่น ปรับปรุงการทำงานของระบบทางเดินอาหารให้ดีขึ้น เสริมระบบภูมิคุ้มกัน ช่วยให้ร่างกายสังเคราะห์อาหารได้มากขึ้น ลดอาการแพ้ Lactose และลดความเสี่ยงการเกิดมะเร็ง (Parvez et al.,2006) ประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ในน้ำนมของระบบ Lactoperoxidase ระหว่างการบ่มมีผลต่อกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่ใช้ในไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิตผลิตภัณฑ์ประเภท Fermented milk ซึ่งความสำเร็จของการผลิตผลิตภัณฑ์ประเภทนี้ ที่ผลิตจากนมที่มีการกระตุ้นระบบ Lactoperoxidase ขึ้นอยู่กับ ชนิดของนม สายพันธุ์ของ Starter cultures และอัตราส่วนในการใส่ ระดับของ Thiocyanate และ Hydrogenperoxide ที่ใช้ หรือระดับที่มีอยู่ตามธรรมชาติ อุณหภูมิที่ให้ความร้อนกับนมซึ่งจะทำให้ระบบ Lactoperoxidase ยังคงทำงานอยู่ เวลาและอุณหภูมิในการบ่ม(Seifu et al., 2005)

แนวความคิดในการนำนมน้ำนมที่กระตุ้น Lactoperoxidase มาผลิตโยเกิร์ตเพื่อศึกษาถึงอิทธิพลของ Lactoperoxidase ต่อคุณลักษณะของโยเกิร์ต และ Sensory test และเพื่อศึกษาถึงผลกระทบต่อคุณภาพผลิตภัณฑ์นมประเภท Fermented milk หากมีการกระตุ้นระบบ Lactoperoxidase ทั้งทางตรงหรือโดยธรรมชาติ เช่น การเสริมไขมันสำปะหลังให้แม่โครีดนม

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพร เป็นสถาบันการศึกษาในระดับอุดมศึกษา สังกัดสำนักคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ มีหน้าที่ในการจัดการเรียนการสอน การวิจัย การบริการวิชาการสู่สังคม โดยมุ่งเน้นทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ได้เล็งเห็นถึงความสำคัญในการพัฒนาคุณภาพน้ำนมดิบของเกษตรกรรายฟาร์ม เพื่อให้สามารถนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพ

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- กิจกรรมที่ 1: การศึกษาประสิทธิภาพของระบบ Lactoperoxidase ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคเต้านมอักเสบในโคนม เพื่อลดการใช้และการตกค้างของยาปฏิชีวนะในฟาร์มโคนม
1. เพื่อคัดแยกเชื้อ (Identify) ที่ก่อโรคเต้านมอักเสบในพื้นที่จังหวัดชุมพรเพื่อหาแนวทางในการควบคุมโรคเต้านมอักเสบ ลดการใช้ยาปฏิชีวนะในฟาร์มโคนม
  2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคเต้านมอักเสบ

กิจกรรมที่ 2 : ผลของระบบ Lactoperoxidase ในน้ำนมดิบต่อคุณลักษณะของโยเกิร์ต

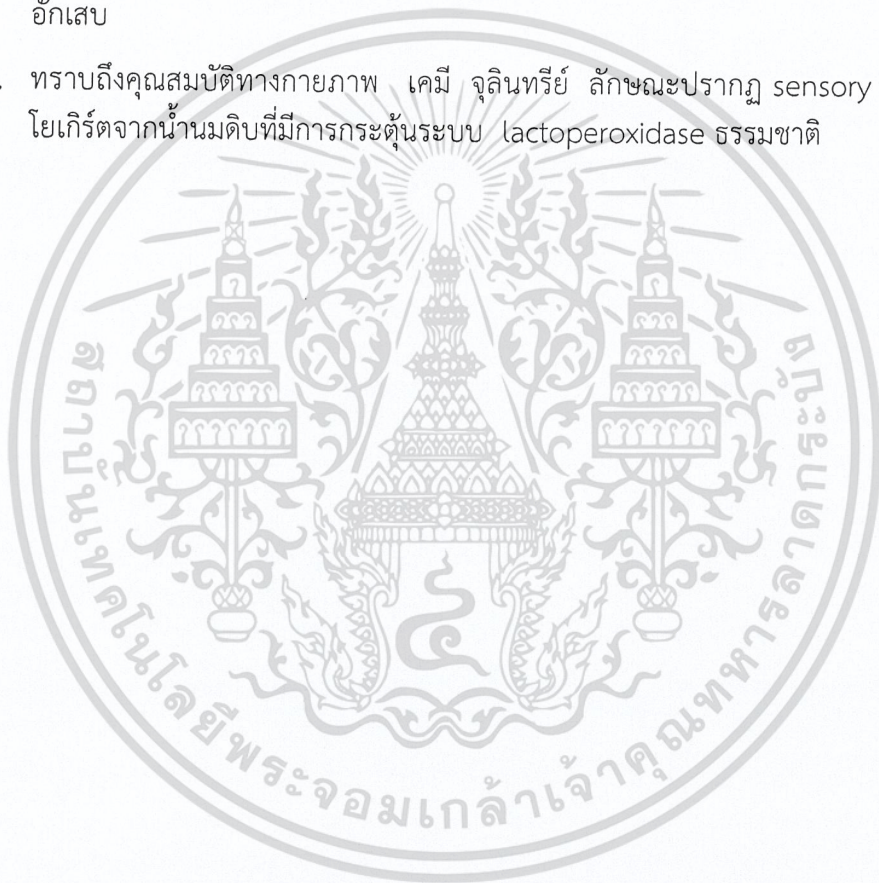
1. เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ เคมี จุลินทรีย์ ลักษณะปรากฏ Sensory test ของโยเกิร์ตที่ผลิตจากน้ำนมดิบที่มีการกระตุ้นระบบ Lactoperoxidase

## 1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. เพิ่มศักยภาพการผลิตน้ำนมดิบโดยใช้ทรัพยากรจากท้องถิ่น ลดการนำเข้าเวชภัณฑ์ ลดการปนเปื้อนของยาปฏิชีวนะ เพิ่มมูลค่าน้ำนมดิบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ได้น้ำนมดิบที่มีคุณภาพ ตลอดจนความปลอดภัยของอาหาร (food safety) เพื่อเพิ่มศักยภาพในการผลิต และการแข่งขัน
3. ได้ชนิดของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคเต้านมอักเสบในพื้นที่ของจังหวัดชุมพร เพื่อใช้ประโยชน์ในการควบคุมและรักษาโรคเต้านมอักเสบ
4. ผู้บริโภคนมและผลิตภัณฑ์นมได้บริโภคนมและผลิตภัณฑ์นมที่มีคุณภาพและปลอดภัยจากการปนเปื้อนจุลินทรีย์และยาปฏิชีวนะ
5. ทราบประสิทธิภาพของ lactoperoxidase ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคเต้านมอักเสบ
6. ทราบถึงคุณสมบัติทางกายภาพ เคมี จุลินทรีย์ ลักษณะปรากฏ sensory test ของโยเกิร์ตจากน้ำนมดิบที่มีการกระตุ้นระบบ lactoperoxidase ธรรมชาติ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### ตารางที่ 3.1 ตารางการตรวจ CMT ในน้ำนม

ปฏิกิริยา CMT และน้ำนม	ปริมาณเม็ดเลือดขาว
+	500,000 เซลล์ / มิลลิลิตร
++	1,000,000 เซลล์ / มิลลิลิตร
+++	4,000,000 เซลล์ / มิลลิลิตร
++++	> 4,000,000 เซลล์ / มิลลิลิตร

ที่มา : สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ (2548)

#### วิธีการเก็บตัวอย่างน้ำนมโคแบบรายตัวแยกเต้าด้วยวิธี Aseptic technique

1. เตรียมอุปกรณ์ในการเก็บน้ำนม ได้แก่ Rack ใส่หลอดทดลอง ตะเกียงแอลกอฮอล์ ที่ต้มน้ำนม กระจกพรอยด์ แอลกอฮอล์ ขวดเก็บตัวอย่าง และเครื่องแก้วที่จะใช้ต้องผ่านการฆ่าเชื้อจาก Hot air oven ที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง
2. ผู้เก็บน้ำนมก่อนที่จะเก็บต้องมีการสเปรย์มือด้วยแอลกอฮอล์ทุกครั้ง เพื่อป้องกันเชื้อโรค หลังจากนั้น ติดกระดาษ Label ที่หลอดทดลองทั้ง 4 หลอด และให้เขียนว่า หน้าซ้าย หลังซ้าย หน้าขวา หลังขวา เพื่อสะดวกในการเก็บน้ำนม
3. รีดน้ำนมโคใส่หลอดทดลองจนครบทั้ง 4 หลอด เมื่อรีดเสร็จจนไฟที่ปากหลอดทดลองเพื่อฆ่าเชื้อและป้องกันการปนเปื้อน และปิดด้วยกระจกพรอยด์ ทำจนครบ 4 หลอด หากหัวนมข้างใดเป็นเต้านมอักเสบต้องทำสัญลักษณ์เป็นรูป \* ที่หลอดทดลองเพื่อง่ายต่อการนำมาทดลอง

#### ขั้นตอนการเพาะแยกเชื้อการเพาะเชื้อ *Escherichia coli* (Carter, 1975)

##### วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

เตรียม Blood agar media 40 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นำไปต้มให้ละลายโดยสม่ำเสมอเป็นเวลา 3 นาที พักให้เย็นแล้วเทใส่ขวด ขวดละ 200 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดย Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที และทิ้งให้เย็นลงที่ 40 – 50 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเมื่อเย็นลงแล้วนำมาเทใส่เพลทประมาณ 1 ส่วน 4 แล้วหมุนเพลทเป็นวงกลมให้อาหารที่เหน็บกระจายทั่วเพลท Dry plate โดยเปิดฝาเพลทให้น้ำระเหยจากฝาเพลท เสร็จแล้วนำไปเพาะเชื้อ

เตรียม MacConkey agar 63 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร และนำไปต้มให้ละลายโดยสม่ำเสมอเป็นเวลา 3 นาที พักให้เย็นแล้วเทใส่ขวด ขวดละ 200 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดย Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที และทิ้งให้เย็นลงที่ 40 – 50 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเมื่อเย็นลงแล้วนำมาเทใส่เพลทประมาณ 1 ส่วน 4 แล้วหมุนเพลทเป็นวงกลมให้อาหารที่เหน็บกระจายทั่วเพลท Dry plate โดยเปิดฝาเพลทให้น้ำระเหยจากฝาเพลท เสร็จแล้วนำไปเพาะเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## การแยกเชื้อบริสุทธิ์

### การขีดในจานเพาะเชื้อ (Streak plate)

นำนํ้านมโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบที่ได้จากการเก็บตัวอย่างโดยวิธี Aseptic technique มา Streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง Blood agar และ MacConkey agar นำ Loop มาเผาให้ร้อนจนแดง แล้วตั้งทิ้งไว้ 2 – 3 วินาที เพื่อให้ Loop เย็นลง แล้วนำ Loop ไปแตะเชื้อจากตัวอย่าง นํ้านม และนำมา Streak plate แล้วขีดเชื้อลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแบบตัดกัน (Four – way cross streak) นำไปบ่มเพาะเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเชื้อที่ Streak ลง Blood agar และ MacConkey มา Streak อีกครั้งเพื่อแยกเชื้อบริสุทธิ์ก่อนจะนำไปย้อมสีแบบวิธีแกรม (Gram staining) (กนกรัตน์ และคณะ, 2548)

## การย้อมสีจุลินทรีย์

### วิธีการย้อมสีแบบแกรม (Gram staining) (กนกรัตน์ และคณะ, 2548)

สารเคมีที่ใช้ย้อมสีแบบแกรม

1. Crystal violet
2. Lugol's Iodine
3. Acetone alcohol 95 เปอร์เซ็นต์
4. Safranin

### วิธีการย้อมสีจุลินทรีย์

1. การเกลี่ยเชื้อ (Smear) บนสไลด์ให้กระจายบนฟิล์มบางๆ ไม่ให้หนาแน่นมากเกินไป และปล่อยให้แห้งในอากาศ (Air dry)
2. การตรึงเชื้อ (Fix) ให้ติดแน่นกับสไลด์ ทำให้ไม่หลุดออกขณะย้อมสี การตรึงเชื้อทำได้โดยการผ่านสไลด์ที่เกลี่ยเชื้อไว้แล้วบนเปลวไฟอย่างรวดเร็ว 2 – 3 ครั้ง
3. หยดสี Crystal violet บนรอยเกลี่ยของเชื้อให้ท่วม และทิ้งไว้ 1 นาที แล้วจึงเทสีทิ้ง
4. หยดสารละลาย Lugol's iodine บนรอยเกลี่ยของเชื้อ และทิ้งไว้ 1 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง สารละลาย Iodine จะทำหน้าที่เป็น Mordant ช่วยทำให้เซลล์ติดสีย้อมได้ดีขึ้น
5. ล้างสีออกด้วย Acetone alcohol 95 เปอร์เซ็นต์ ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที ล้างตามด้วยน้ำสะอาดซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญมากในการหยุดปฏิกิริยาการล้างสี
6. การหยดสี Safranin บนรอยเกลี่ย หยดทิ้งไว้ประมาณ 15 – 30 วินาที ตามด้วยการล้างน้ำและการซับให้แห้ง แล้วจึงนำมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ และนำไปทดสอบทางชีวเคมีต่อไป
7. ผลของการย้อมสี จะพบว่าแบคทีเรียแกรมบวกจะติดสีม่วงของ Crystal violet และแบคทีเรียแกรมลบจะติดสีแดงของ Safranin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### ตารางที่ 3.2 แสดงลำดับและปฏิกิริยาในการย้อมสีแบบแกรม

สารละลาย	แบคทีเรียแกรมบวก	แบคทีเรียแกรมลบ
คริสตัลไวโอเลต (Crystal violet)	เซลล์ติดสีม่วง	เซลล์ติดสีม่วง
สารละลายไอโอดีน (Iodine solution)	เกิดเป็นสารประกอบโมเลกุล คริสตัลไวโอเลต (Crystal violet) ไอโอดีนคอมเพล็กซ์ (Iodine complex) เซลล์ยังคง ติดสีม่วง	เกิดเป็นสารประกอบโมเลกุล คริสตัลไวโอเลต (Crystal violet) ไอโอดีนคอมเพล็กซ์ (Iodine complex) เซลล์ยังคง ติดสีม่วง
Acetone alcohol 95 เปอร์เซ็นต์	ผนังเซลล์เกิดการสูญเสียน้ำ เซลล์เหี่ยว เซลล์ยังคงติดสีม่วง	แอลกอฮอล์จะไปละลายไขมันที่ ผนังเซลล์ ทำให้รูของผนังเซลล์ กว้างขึ้นจึงยอมให้สารประกอบ โมเลกุลใหญ่ของสีหลุดมาได้
ซาฟรานิน (Safranin)	เซลล์ไม่ทำปฏิกิริยากับสีซาฟรา นิน (Safranin) จึงติดสีม่วง	เซลล์ทำปฏิกิริยากับสีซาฟรานิน (Safranin) จึงติดสีแดง

ที่มา : นงลักษณ์ และปรีชา (2550)

การทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *Escherichia coli* (กนกรัตน์ และคณะ, 2548)

การทดสอบ Triple sugar agar

จุดประสงค์	เป็นการทดสอบความสามารถของเชื้อในการใช้น้ำตาล 3 ชนิด Glucose Lactose และ Sucrose
หลักการ	ดูความสามารถของเชื้อในการใช้น้ำตาล Glucose Lactose และ Sucrose ซึ่งจะ ได้กรดและมีก๊าซเป็น End product และเป็นการทดสอบเชื้อในการสร้าง Hydrogen sulfide (H <sub>2</sub> S) อีกด้วย
วิธีการทดสอบ	1. Streak เชื้อที่ต้องการทดสอบลงบนผิวหน้า Slant TSI และ Stab ลงใน อาหารจนถึงก้นหลอดโดยใช้ Needle 2. Incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 - 24 ชั่วโมง 3. อ่านผลโดยการเกิดกรด ต่าง และการสร้าง Hydrogen sulfide

การทดสอบ Indole test

จุดประสงค์	แบคทีเรียที่ทดสอบนั้น สามารถสลายสารตั้งต้น Tryptophan ได้หรือไม่ ทดสอบการสร้าง Indole โดย Enzyme tryptophanase
หลักการ	Enzyme tryptophanase สามารถเปลี่ยนกรดอะมิโน Tryptophan เป็น Indole ammonia และ Pyruvic ซึ่งการทดสอบนี้จะทำให้เกิดสาร Indole ที่เมื่อทำปฏิกิริยากับ Kovac's reagent อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้คือ Sim medium

วิธีการทดสอบ หยดสารละลาย Kovac's reagent ถ้าให้สารประกอบสีแดงชมพูหรือบานเย็น ถือ  
เป็น Positive (+)

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับกรใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### การทดสอบ Citrate test

- จุดประสงค์ เพื่อทดสอบการใช้ Citrate เป็นแหล่งคาร์บอนและการสร้างพลังงาน
- หลักการ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้คือ Simmon's citrate agar สารอาหารนี้มีสีเขียวซึ่งมี Bromthymil blue เป็นอินดิเคเตอร์ ที่จะเปลี่ยนสีฟ้าเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นด่าง และเป็นสีเหลืองในสภาวะที่เป็นกรด
- วิธีการทดสอบ อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีลักษณะเอียงเล็กน้อย ให้เติมแบคทีเรียลงไปที่ยาวหน้า (Slant) แล้วนำไปบ่ม 24 ชั่วโมง สังเกตสีที่เปลี่ยนไปถ้าเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีฟ้าหรือน้ำเงินถือว่าเป็น Positive (+)

### การทดสอบ MR-VP Medium

#### MR (Methyl Red)

- จุดประสงค์ เป็นการทดสอบความสามารถของเชื้อที่จะผลิตและรักษาความเป็นกรดของอาหาร
- หลักการ อาหารเลี้ยงเชื้อจากการใช้ Glucose ให้มี pH ต่ำกว่า 4.4
- วิธีการทดสอบ
1. บ่มเชื้อที่ต้องการทดสอบลงใน MR-VP Medium
  2. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 - 24 ชั่วโมง
  3. แบ่งใส่หลอดทดลอง 3 มิลลิลิตร แล้วเติม Methyl red reagent ลงไป
  4. หากผลเป็นลบให้บ่มที่เหลือต่ออีก 24 - 48 ชั่วโมง แล้วนำมาทดสอบเหมือนเดิมอีกครั้ง

#### VP (Voges - Proskruer)

- จุดประสงค์ เป็นการทดสอบความสามารถของเชื้อในการให้ Acetyl - methylcarbinol (acetoin) เป็น End product จาก Glucose fermentation
- หลักการ อาหารเลี้ยงเชื้อจากการใช้ Glucose ให้มี pH ต่ำกว่า 4.4
- วิธีการทดสอบ
1. บ่มเชื้อที่ต้องการทดสอบลงใน MR - VP medium
  2. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 - 24 ชั่วโมง
  3. แบ่งใส่หลอดทดลอง 3 มิลลิลิตร
  4. หยด KOH 40 เปอร์เซ็นต์ 2 หยด และหยด  $\alpha$  Naphthol 5 เปอร์เซ็นต์ 6 หยด
  5. เขย่าให้เข้ากันเพื่อให้ออกซิเจนเข้าไปทำปฏิกิริยาแล้วตั้งทิ้งไว้ 10 - 15 นาที
  6. ถ้าผลเป็นลบให้บ่มที่เหลืออีก 24 - 48 ชั่วโมง แล้วทดสอบซ้ำ

### การทดสอบ Motility

- จุดประสงค์ เป็นการทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อที่มี Flagella เชื้อสามารถเคลื่อนที่ออกจากที่เดิมเพื่อไปเจริญเติบโตยังบริเวณใหม่

หลักการ ดูจากเคลื่อนที่ของเชื้อ

- ทดสอบ
1. Inoculate เชื้อที่ต้องการทดสอบลงใน Semi - solid medium โดยใช้ Needle stab เพียงครั้งเดียว ประมาณ 2/3 ของส่วนสูงของอาหาร
  2. Inoculate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ภายใต้การดูแลของมหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ จังหวัดปทุมธานี ไม่อนุญาตให้ผู้อื่นใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. นำมาอ่านผล หากได้ผลลบให้ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องต่อไปอีก 1 - 2 สัปดาห์  
สังเกตเป็นระยะๆ

#### การทดสอบ Arabinose

- จุดประสงค์ เพื่อทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการหมักน้ำตาล Arabinose
- หลักการ การหมักเป็นกระบวนการเมตะบอลิซึมที่มีตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายเป็นสารอินทรีย์ การทดสอบนี้ใช้ Phenol red เป็น pH indicator เป็นสารอาหารพื้นฐาน เมื่อต้องการทดสอบน้ำตาลชนิดใดก็เติมน้ำตาลชนิดนั้นลงไป ในปริมาณ Phenol red 1 เปอร์เซ็นต์ เมื่ออยู่ในสภาวะเป็นกรดจะให้สีเหลืองและเมื่ออยู่ในสภาวะต่างจะให้สีชมพู
- วิธีการทดสอบ เติมแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Phenol red broth base) แล้วนำไปบ่มเขื่อนาน 24 - 48 ชั่วโมง ถ้าแบคทีเรียสามารถหมักน้ำตาลได้จะให้สภาวะที่เป็นกรดเกิดขึ้น Phenol red ให้สีเหลืองถือเป็น Positive (+) และ Negative (-) ไม่เปลี่ยนสี

#### การทดสอบ Lysine

- จุดประสงค์ เพื่อทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการหมักน้ำตาล Lysine
- หลักการ การหมักเป็นกระบวนการเมตะบอลิซึมที่มีตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายเป็นสารอินทรีย์ การทดสอบนี้ใช้ Phenol red เป็น pH indicator เป็นสารอาหารพื้นฐาน เมื่อต้องการทดสอบน้ำตาลชนิดใดก็เติมน้ำตาลชนิดนั้นลงไป ในปริมาณ Phenol red 1 เปอร์เซ็นต์ เมื่ออยู่ในสภาวะเป็นกรดจะให้สีเหลืองและเมื่ออยู่ในสภาวะต่างจะให้สีชมพู
- วิธีการทดสอบ เติมแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Phenol red broth base) แล้วนำไปบ่มเขื่อนาน 24 - 48 ชั่วโมงถ้าแบคทีเรียสามารถหมักน้ำตาลได้จะให้สภาวะที่เป็นกรดเกิดขึ้น Phenol red ให้สีเหลือง ถือเป็น Positive และ Negative (+/-)

#### อุปกรณ์และเครื่องมือ

##### เครื่องมือ

1. Autoclave เป็นเครื่องที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ โดยการ Sterization 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
2. Hot air oven เป็นเครื่องที่ใช้อบเครื่องแก้ว โดยการใช้ความร้อน 180 องศาเซลเซียส
3. Incubator เป็นเครื่องมือที่ใช้บ่มเชื้อ โดยใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในการบ่ม
4. Laminar flow เป็นตู้ปลอดเชื้อ โดยใช้พัดลมดูดอากาศ และหลอด UV (ultraviolet) ในการฆ่าเชื้อ
5. Hot plate เป็นเครื่องให้ความร้อน ใช้สำหรับต้มน้ำ หรือให้ความร้อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## อุปกรณ์เครื่องแก้ว

1. หลอดทดลอง (Test tube) ใช้ใส่น้ำนมและอาหารเลี้ยงเชื้อ
2. ปีกเกอร์ (Beaker) ใช้ใส่สารเคมี
3. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ใช้ในการไทเทรต
4. ปิเปต (Pipette) ใช้การดูดสารเคมี
5. จานเพาะเชื้อ (Plate) ใช้ในการเพาะแยกเชื้อ
6. ช้อนตักสาร (Spoon) ใช้ตักสาร
7. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ใช้ชั่งสารเคมี และอาหารเลี้ยงเชื้อ
8. ที่ตักน้ำนม (Agigater) ใช้ตักน้ำนมจากถังน้ำนมรวม
9. ตะเกียงแอลกอฮอล์ ใช้ฆ่าเชื้อที่เข็มเย็บเชื้อ (Loop) และฆ่าเชื้อบริเวณปากหลอดทดลอง
10. น้ำกลั่น ใช้เป็นตัวทำละลาย ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อ
11. กระบอกฉีดยา (Syringe) ใช้เจาะดูดเลือดโค
12. เข็มเย็บเชื้อ (Loop) ใช้เลือกเชื้อเพื่อนำไปปม

## อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. BBL™ Blood agar media base Infusion agar อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ โดยต้องมีเลือดมาผสม และใช้ทดสอบจุลินทรีย์
2. Difco™ MacConkey agar media อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ และใช้ทดสอบจุลินทรีย์
3. BBL™ Simmons citrate agar ทำอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ และใช้ทดสอบจุลินทรีย์
4. Difco™ MR-VP medium อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์
5. Triple sugar iron agar (TSI) อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์
6. BBL™ SIM medium อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์
7. Indole medium อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์
8. เลือดโค

## สารเคมี

1. Methylred เป็น Indicator ทดสอบทางชีวเคมีของจุลินทรีย์
2. Kovac's reagent for indole ใช้ทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ทางชีวเคมี
3. Coagulase ใช้ทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ทางชีวเคมี
4. Lysine ใช้ทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ทางชีวเคมี
5. Arabinose เป็นน้ำตาลใช้ทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ทางชีวเคมี
6.  $\alpha$  Naphthol ใช้ทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ทางชีวเคมี
7. Potassium hydroxide ใช้ทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ทางชีวเคมี
8. Lugol's iodine สีสำหรับย้อมเชื้อจุลินทรีย์
9. Crystal violet สีสำหรับย้อมเชื้อจุลินทรีย์
10. Acetone alcohol ใช้ล้างสีย้อมเชื้อจุลินทรีย์
11. Safranin สีสำหรับย้อมเชื้อจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### สารละลายที่ใช้ในการทดลอง

1.  $\alpha$  Naphthol solution 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารละลายที่ใช้ทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อจุลินทรีย์
2. Potassium hydroxide (KOH) 40 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารละลายที่ใช้ทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อจุลินทรีย์

### ผลการทดลอง

กลุ่มวิสาหกิจผู้เลี้ยงโคนมใน ต. ชุมโค อ. ปะทิว จ. ชุมพร มีจำนวนสมาชิกทั้งหมด 18 ราย ได้ทำการเก็บตัวอย่างน้ำนมในเดือนธันวาคม โดยมีจำนวนโคที่รีดนมทั้งหมด 196 ตัว จำนวนโคหยุดการให้นม 43 ตัว จำนวนโคสาว 70 ตัว โคเพศผู้ และลูกโค 191 ตัว รวมโคนมทั้งหมด 500 ตัว ปริมาณน้ำนมเฉลี่ยต่อวันในเดือนธันวาคม มีปริมาณน้ำนมช่วงเช้าเฉลี่ย 1,549.30 กิโลกรัม ปริมาณน้ำนมช่วงเย็น 946.3 กิโลกรัม รวมปริมาณน้ำนมต่อวันทั้งหมด 2,495.60 กิโลกรัม ได้ทำการเก็บตัวอย่างน้ำนมแบบรายตัวแยกเต้า แล้วทำการตรวจด้วยน้ำยา CMT จึงทำการเก็บน้ำนมด้วยวิธี Aseptic technique จำนวนฟาร์มที่พบว่ามียาโคป่วยเป็นโรคเต้านมอักเสบ 5 ฟาร์ม โดยพบว่ามียาโคที่ป่วยเป็นโรคเต้านมอักเสบจำนวน 6 ตัว และให้ชื่อฟาร์มที่พบว่าโคเป็นโรคเต้านมอักเสบเป็นฟาร์ม A, B, C, D และ E โดยที่ฟาร์ม E มีโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ 2 ตัว

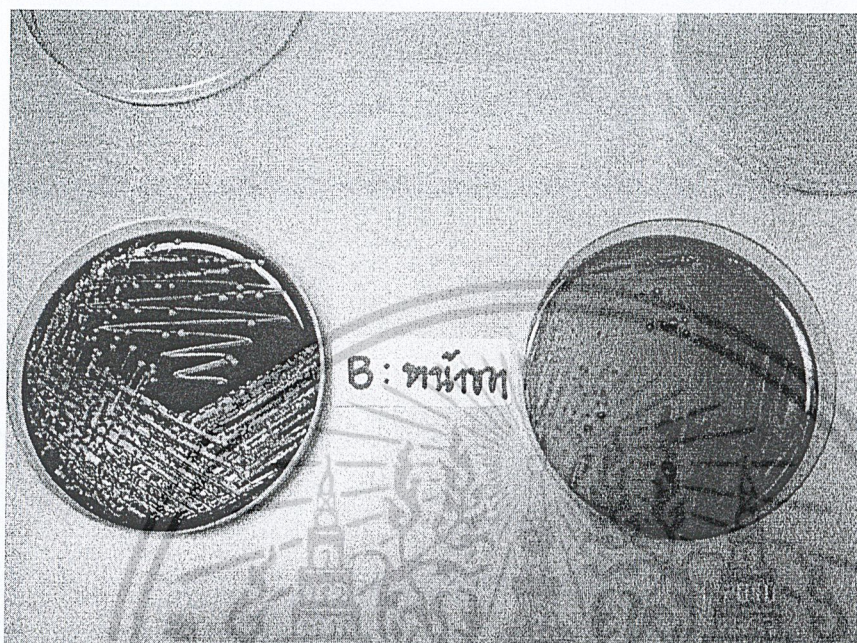
### ตารางที่ 3.3 แสดงจำนวนโคในแต่ละฟาร์ม

ฟาร์ม	จำนวน						รวมโคทั้งหมด	ปริมาณน้ำนม กิโลกรัมต่อวัน
	โครีดนม	โคทราย	โคสาว	โครุ่น	ลูกโค	โคตัวผู้		
A	8	3	3	0	2	7	39	92
B	15	0	5	2	4	0	26	230
C	4	11	10	0	12	0	37	35
D	7	3	0	6	2	9	27	86
E	24	1	7	0	24	0	56	320

การสำรวจอุบัติการณ์ของโรคเต้านมอักเสบกลุ่มก่อโรคจากสิ่งแวดล้อมได้แก่ *E. coli* โดยเก็บตัวอย่างน้ำนมแบบรายตัวแยกเต้า จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบในฟาร์มโคนมอำเภอปะทิว ทั้งหมด 5 ฟาร์ม คือ ฟาร์ม A, B, C, D และ E พบว่าโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบกลุ่มที่เกิดจากสิ่งแวดล้อมพบในฟาร์ม B และ E (โคตัวที่ 2) เนื่องจากฟาร์ม E (โคตัวที่ 1) ไม่มีเชื้อก่อโรคที่เกิดจากสิ่งแวดล้อม โดยฟาร์ม B พบโรคเต้านมอักเสบที่เต้านมหน้าขวา โคโลนิที่เกิดบนอาหาร Blood agar มีลักษณะกลมสีขาวขุ่น ส่วนบนอาหาร MacConkey agar มีลักษณะกลม สีชมพู ติดสีย้อมสีแดง และมีรูปร่างเป็นรูปท่อน ส่วนฟาร์ม E พบโคโลนิที่เต้านมหน้าซ้าย และเต้านมหลังขวา โดยมีลักษณะโคโลนิ การติดสีย้อม และรูปร่างเช่นเดียวกับฟาร์ม B แสดงผลดังตารางที่ 3.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แสดงลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียกลุ่มเชื้อ *E. coli* โดยในอาหาร Blood agar โคโลนีมีลักษณะกลม สีขาวขุ่น ส่วนบนอาหาร MacConkey agar มีลักษณะกลม สีชมพู ซึ่งเป็นคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ดังภาพที่ 3.1



ภาพที่ 3.1 ลักษณะโคโลนี ที่ขึ้นบน Blood agar และ Macconkey agar

ตารางที่ 3.4 การทดสอบทางชีวเคมีในกลุ่มเชื้อในกลุ่ม *E. coli*

ฟาร์ม	เต้านม	ทดสอบน้ำตาล						
		TSI	Indole	Citrate	MRVP	Motility	Arabinose	Lysine
B	หน้าขวา	A/A	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
E	หน้าซ้าย, หลังขวา	A/A	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)

หมายเหตุ A/A คือ Slant/Butt ; Slant คือ ส่วนบนของอาหารวันเอียง

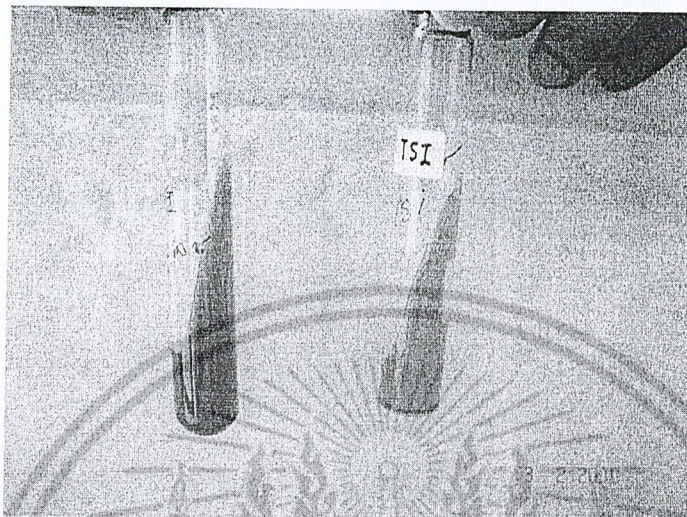
Butt คือ ส่วนล่างของอาหารวันเอียง

ฟาร์ม E (โคตัวที่ 2)

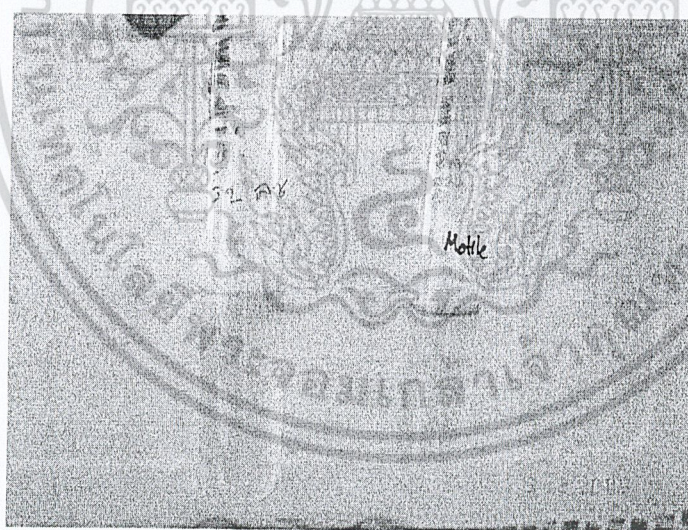
ผลการทดสอบทางชีวเคมีพบว่าฟาร์ม B เต้านมหน้าขวา ทดสอบ TSI ให้ผล A/A ทดสอบ Indole ให้ผลบวก (+) ทดสอบ Citrate ให้ผลลบ (-) ทดสอบ MRVP ให้ผลลบ (-) ทดสอบ Motility ให้ผลบวก (+) ทดสอบ Arabinose ให้ผลบวก (+) ทดสอบ Lysine ให้ผลลบ (-) และฟาร์ม E (โคตัวที่ 2) เต้านมหน้าซ้ายและหลังขวา ทดสอบ TSI ให้ผล A/A ทดสอบ Indole ให้ผลบวก (+) ทดสอบ Citrate ให้ผลลบ (-) ทดสอบ MRVP ให้ผลลบ (-) ทดสอบ Motility ให้ผลบวก (+) ทดสอบ Arabinose ให้ผลบวก (+) ทดสอบ Lysine ให้ผลบวก (+) ดังตารางที่ 3.5 และรูปที่ 3.4 และ 3.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งเชื้อในกลุ่ม *E. coli* เมื่อทดสอบทางชีวเคมีจะให้ผลให้ผล A/A ทดสอบ Indole ให้ผลบวก (+) ทดสอบ Citrate ให้ผลลบ (-) ทดสอบ MRVP ให้ผลลบ (-) ทดสอบ Motility ให้ผลบวก (+) ทดสอบ Arabinose ให้ผลบวก (+) ทดสอบ Lysine ให้ผลบวกหรือลบ (+/-)

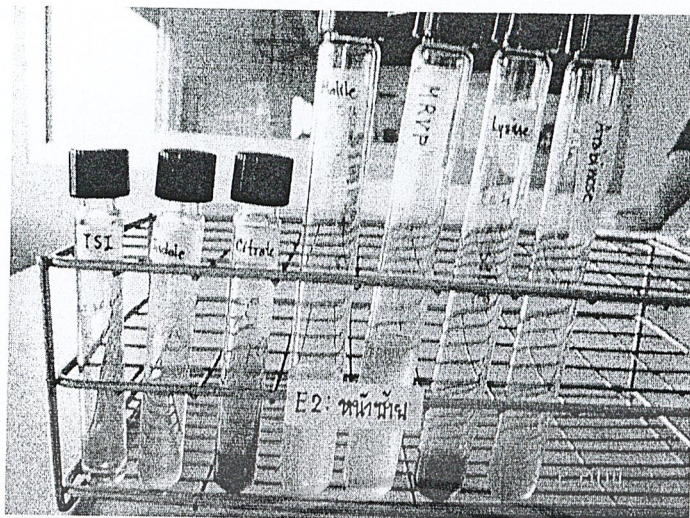


ภาพที่ 3.2 แสดงผลการทดสอบ TSI ที่ให้ผล Negative (-) และ Positive (+)



ภาพที่ 3.3 แสดงผลการทดสอบ Motility ที่ให้ผล Negative (-) และ Positive (+)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3.4 การทดสอบ TSI, Indole, Citrate, MRVP, Motility, Arabinose และ Lysine เต้านมหน้าซ้ายฟาร์ม E โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบตัวที่ 2

ตารางที่ 3.6 ผลการตรวจพบเชื้อในกลุ่มก่อโรคมารจากสิ่งแวดล้อม รายตัวแยกได้ในโคนมที่เป็นเต้านมอักเสบ

ฟาร์ม	เต้านม			
	FR	FL	RR	RL
A	ND	ND	ND	ND
B	D	ND	ND	ND
C	ND	ND	ND	ND
D	ND	ND	ND	ND
E (โคตัวที่ 1)	ND	ND	ND	ND
E (โคตัวที่ 2)	ND	D	D	ND

ผลการตรวจพบเชื้อในกลุ่มก่อโรคที่มาจากสิ่งแวดล้อม รายตัวแยกได้ในโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ พบว่าในฟาร์ม B พบเชื้อ *E. coli* ที่เต้าน้ำขวา และในฟาร์ม E (โคตัวที่ 2) พบเชื้อ *E. coli* ที่เต้านมหน้าซ้ายและหลังขวา ดังในตารางที่ 3.6

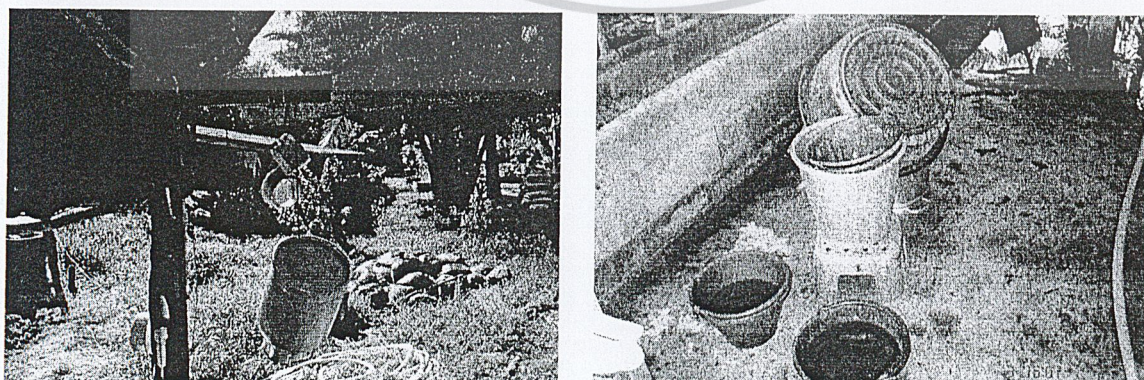


ภาพที่ 3.5 การทดสอบ TSI, Indole, Citrate, MRVP, Motility, Arabinose และ Lysine เต้านม  
หลังชาวฟาร์ม E โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบตัวที่ 2

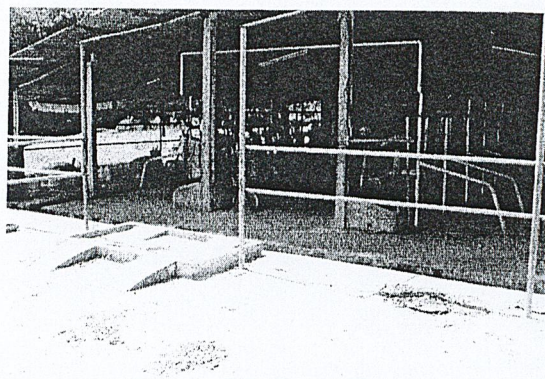
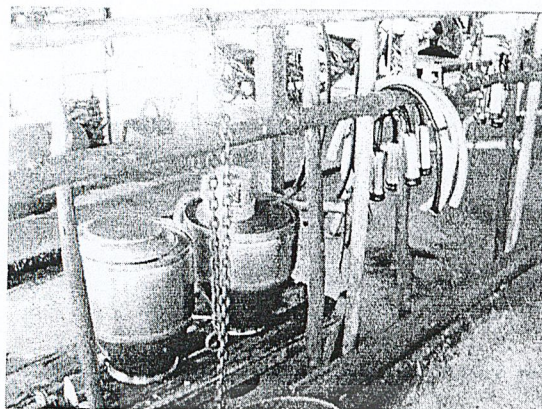
สภาพโดยทั่วไปของฟาร์มโคนมที่ได้ทำการเก็บตัวอย่างน้ำนม



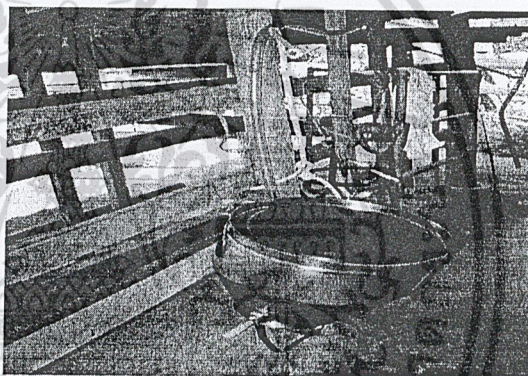
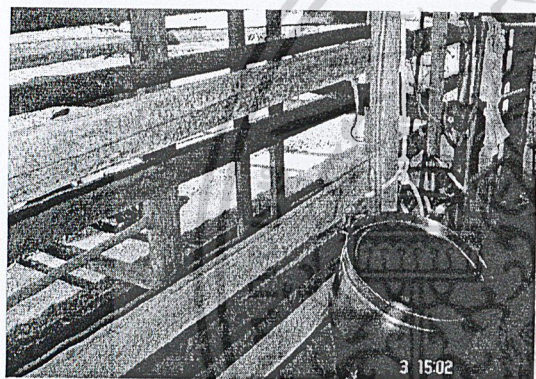
ภาพที่ 3.6 แสดงภาพทั่วไปของฟาร์ม A บริเวณรอบๆ ฟาร์มมีความชื้น มีน้ำท่วมขังบริเวณโดยรอบ  
อุปกรณ์การรีดนมไม่สะอาด



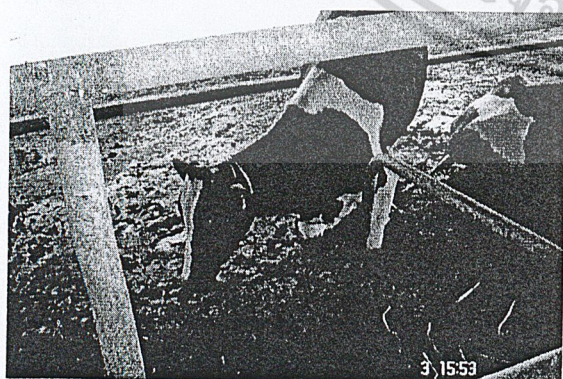
ภาพที่ 3.7 แสดงภาพทั่วไปของฟาร์ม B บริเวณรอบๆ ฟาร์มมีความชื้น มีน้ำท่วมขังบริเวณโดยรอบ มี  
เอกสารนี้สัตว์เลี้ยงอยู่ในบริเวณฟาร์ม อุปกรณ์ในการรีดนมไม่สะอาด ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3.8 แสดงภาพทั่วไปของฟาร์ม C บริเวณคอกรีดไม่สะอาด มีการจัดการการรีดที่ไม่ดี อุปกรณ์ในการรีดนมไม่สะอาด ตัวผู้รีดไม่รักษาความสะอาด



ภาพที่ 3.9 แสดงภาพทั่วไปของฟาร์ม D สภาพฟาร์มอยู่บนที่ดอน มีการจัดการฟาร์มที่ดี พื้นคอกที่มีความสะอาด คอกรีดสะอาด



ภาพที่ 3.10 แสดงภาพทั่วไปของฟาร์ม E บริเวณรอบๆ ฟาร์มมีสภาพความเป็นที่ลุ่ม มีน้ำท่วมขังบริเวณโดยรอบ คอกพักรีดนมไม่สะอาด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.2 ศึกษาการตกค้างของยาปฏิชีวนะรายฟาร์มของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมจังหวัดชุมพร

วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เพื่อศึกษาอุบัติการณ์และกลุ่มของยาปฏิชีวนะที่ตกค้างในน้ำนมดิบของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมรายย่อยของสหกรณ์โคนมจังหวัดชุมพร จำกัดในช่วงเวลาระหว่างเดือนมกราคม - มิถุนายน 2550 สำหรับใช้เป็นแนวทางในการจัดการการใช้ยาปฏิชีวนะของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนม

#### วิธีการศึกษาทดลอง

1. เก็บตัวอย่างน้ำนมดิบรายฟาร์มของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนม ณ ศูนย์รวบรวมน้ำนมดิบของสหกรณ์โคนมจังหวัดชุมพร จำกัดจำนวน 40 ฟาร์ม เดือนละ 2 ครั้ง ตัวอย่างละ 120 ml และทำการทดสอบด้วยชุดทดสอบ AM-test ระหว่างเดือนมกราคม - มิถุนายน 2550
2. วิเคราะห์กลุ่มของยาปฏิชีวนะที่ตกค้างในน้ำนมที่มีผลบวกในการทดสอบ AM-test ด้วยวิธี European four plate test ณ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

#### ผลการทดลองและวิจารณ์

สหกรณ์โคนมจังหวัดชุมพร จำกัด มีสมาชิกจำนวน 40 ฟาร์ม อยู่ในเขตอำเภอท่าแซะ และอำเภอปะทิว ฟาร์มส่วนใหญ่มีแม่โครีดนม 1-10 ตัว ผลิตน้ำนมดิบได้วันละ 5,987.70 กิโลกรัม

จากการตรวจการตกค้างของยาปฏิชีวนะด้วยชุดทดสอบ AM-test พบตัวอย่างน้ำนมดิบแสดงผลเป็นบวกในเดือนพฤษภาคมจำนวน 1 ฟาร์ม และเมื่อตรวจสอบด้วย European four plate test ให้ผลเป็นบวกที่ Test agar pH 8 ซึ่งคาดว่ามีการตกค้างของยาปฏิชีวนะในกลุ่ม Tylosin หรือ Erythromycin หรือ Neomycin หรือ Streptomycin เมื่อทำการติดตามไปที่ฟาร์มเพื่อยืนยันผลการวิเคราะห์ และทำการสอบถามพบว่าเกษตรกรใช้ยาปฏิชีวนะในกลุ่ม Streptomycin ในการรักษาโรคเต้านมอักเสบของโครีดนม

ชาติชาย (2545) พบว่าอุบัติการณ์ของการเกิดโรคเต้านมอักเสบในช่วงฤดูฝน คือเดือนมิถุนายน และกรกฎาคมจะมีอุบัติการณ์การเกิดโรคสูงกว่าช่วงเดือนสิงหาคมและกันยายน ทำให้มีความจำเป็นต้องใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญในการทำให้เกิดการปนเปื้อนของยาปฏิชีวนะในน้ำนม

ธงชัย และคณะ (2539) รายงานว่าสาเหตุของการตกค้างยาปฏิชีวนะในน้ำนมดิบมากที่สุด คือ การรีดนมเพื่อจำหน่ายก่อนครบกำหนดระยะเวลาหยุดยา 16.5-19.3% และความผิดพลาดจากการเทถังนมที่มียาปฏิชีวนะตกค้างลงไปในถังนมรวม 16.3-16.7% ส่วนสาเหตุรองลงมาคือโคนมบางตัวมีการขับยาปฏิชีวนะออกจากร่างกายช้ากว่าปกติ ทำให้ตรวจพบการตกค้างของยาปฏิชีวนะแม้จะพ้นระยะหยุดยา 8.2-9.8% การใช้ภาชนะหรือถังนมร่วมกัน 7.2-7.3% ความผิดพลาดเนื่องจากการรีดนมโคที่อยู่ในระยะพักเต้านม 5.1-6.2% ไม่ได้ทำการบันทึกหรือทำเครื่องหมายโคนมที่กำลังให้ยาปฏิชีวนะอยู่ 2.9-4.0% และรีดนมจากเต้าข้างเคียง (adjacent quarters) ในช่วงระยะเวลาการรักษาโรคเต้านมเต้าที่อักเสบ 2.5-3.8% ทำการรีดนมโคที่เพิ่งนำเข้ามาในฟาร์มโดยไม่ทราบประวัติการใช้ยา 2.4-3.1% และใช้ยาปฏิชีวนะสำหรับระยะพักเต้านมซึ่งจะทำให้ยาปฏิชีวนะอยู่ในเต้านมได้นานกว่าการรักษาโรคเต้านมอักเสบ 0.8-0.9%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Seymour และ Jones (1988) พบว่า Cephapirin และ Penicillin มีผลทำให้เกิดการตกค้างยาวนานกว่าการกำหนดระยะหยุดยา สำหรับแนวทางการควบคุมการตกค้างของยาปฏิชีวนะในน้ำนมดิบสามารถทำได้โดยการจัดการการรีดนมที่ถูกสุขลักษณะ เนื่องมาจากการจัดการรีดนมที่ดีจะมีผลทำให้อุบัติการณ์การเกิดโรคเต้านมอักเสบลดลง ส่งผลให้เกษตรกรมีความจำเป็นในการใช้ยาปฏิชีวนะสำหรับรักษาโรคเต้านมอักเสบลดลง (McEwen et al., 1991) รวมทั้งอาจมีความจำเป็นการใช้ชุดทดสอบเบื้องต้น (test kid) เพื่อควบคุมการปนเปื้อนยาปฏิชีวนะในน้ำนมดิบก่อนการส่งนม (Seymour et al., 1988; McEwen et al., 1991; Sischo et al., 1997)

นอกจากนี้ยังพบการแสดงผลบวกของชุดทดสอบ AM-test ในตัวอย่างน้ำนมในเดือนมิถุนายนของฟาร์มจำนวน 1 ฟาร์มจำนวนสองครั้ง และเมื่อยืนยันกลุ่มของยาปฏิชีวนะด้วยวิธี European four plate test ให้ผลลบที่ Test agar pH6, pH 7.2 และ pH 8 และเมื่อทำการติดตามไปที่ฟาร์มเกษตรกรยืนยันว่าไม่ได้ใช้ยาปฏิชีวนะในช่วงเวลาที่มีการทดสอบการตกค้าง

ศิริดา และชลลดา (2539) กล่าวว่า การทดสอบการตกค้างของยาปฏิชีวนะด้วยวิธีการทดสอบการยับยั้งการแบ่งตัวของแบคทีเรียจะมีข้อจำกัดที่จะตรวจได้ในระดับความเข้มข้นที่มากกว่าระดับต่ำสุด (detection limit) ของยาปฏิชีวนะแต่ละชนิด ดังนั้นการตกค้างของยาปฏิชีวนะในปริมาณที่น้อยทำให้ไม่สามารถตรวจสอบได้พบ หรืออาจเป็นผลเนื่องมาจากการให้ผลบวกเท็จของชุดทดสอบ AM-test เนื่องมาจากสารธรรมชาติในน้ำนมที่เรียกว่า Natural inhibitors (จงชัย และคณะ, 2538 ; Kang et al., 2005)

ในสภาพการเลี้ยงโคนมของเกษตรกรบางฟาร์มในจังหวัดชุมพรมีการใช้ไขมันสำปะหลังเสริมในอาหารหยาบเพื่อควบคุมโรคเต้านมอักเสบ สุริยวรรณ และคณะ (2549) รายงานว่าการใช้ไขมันสำปะหลังแห้งเป็นอาหารแม่โคทำให้ปริมาณ Thiocyanate ในน้ำนมดิบเพิ่มขึ้น โดยที่ Thiocyanate เป็นสารที่สำคัญต่อระบบ Lactoperoxidase ที่ใช้ในการต่อต้านและยับยั้งจุลินทรีย์ และมีส่วนสำคัญทำให้เกิดอุบัติการณ์ของโรคเต้านมอักเสบลดลง

การต้านแบคทีเรียของระบบ Lactoperoxidase เกิดโดยการทำปฏิกิริยาของ Hydrogen peroxide และ Thiocyanate โดยมี Lactoperoxidase เป็นตัวเร่งการสร้างสาร Hypothiocyanate ซึ่งเป็นสารหลักในการต้านแบคทีเรียเป็น คุณสมบัติของระบบ Lactoperoxidase คือการยับยั้ง metabolism ของแบคทีเรียที่มีชีวิตซึ่งเกิดจากปฏิกิริยา oxidation ของ Hypothiocyanate (Karen et al., 1998)

### สรุปผลและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาพบการตกค้างของยาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมดิบรายฟาร์มของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในจังหวัดชุมพร ในกลุ่มยา Streptomycin ในเดือนพฤษภาคม และพบผลบวกของการทดสอบด้วย AM-test แต่ให้ผลลบเมื่อทดสอบด้วย European four plate test ในเดือนมิถุนายน สำหรับแนวทางการแก้ไขและป้องกันปัญหาการตกค้างยาปฏิชีวนะในน้ำนมดิบของต่างประเทศได้กำหนดให้มีแนวทางร่วมกันระหว่างสหกรณ์โคนม ศูนย์รับน้ำนมดิบ หน่วยงานภาครัฐ และเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนม (Sischo et al., 1997; Sawant et al., 2005) ดังนั้นแนวทางที่ถูกต้องและเหมาะสมของประเทศไทยในการควบคุมการตกค้างของยาปฏิชีวนะในน้ำนม

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดิบควรเป็นการสร้างการมีส่วนร่วมระหว่างหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง เช่น โรงงานแปรรูปผลิตภัณฑ์นม ศูนย์รวบรวมน้ำนมดิบ สหกรณ์โคนม หน่วยงานภาครัฐ และเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนม

### 3.3 ประสิทธิภาพของระบบ Lactoperoxidase ในการรักษาคุณภาพน้ำนมดิบ

#### การทดลองที่ 1

เติม Sodiumthiocyanate (Asia Pacific Specialty Chemical Limited, AG) และ Hydrogen peroxide (30% aqueous solution) ในอัตราส่วน 0:0 (control), 15:10, 100:50 และ 150:100 (mg/l : mg/l) เก็บรักษาตัวอย่างน้ำนมดิบที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บผลการทดลองทุก 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 6 วัน และเก็บรักษาตัวอย่างน้ำนมดิบที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเก็บผลการทดลองในชั่วโมงที่ 0, 3, 6, 9, 12 และ 15

#### การวิเคราะห์ตัวอย่าง

1. Titratable acidity เพื่อหาเปอร์เซ็นต์กรด Lactic ตามวิธีของ Fonteh และคณะ (2005)
2. การวิเคราะห์หาจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total bacteria count) ทำการ Dilution ตัวอย่างให้มีความเข้มข้นตั้งแต่  $10^{-2}$  -  $10^{-7}$  ทำการเพาะเชื้อใน Petrifilm™ 3M™ ชนิด aerobic count plate (AMC\_plate) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และการตรวจหาจุลินทรีย์กลุ่ม Coliform โดยทำการ Dilution ตัวอย่างให้มีความเข้มข้นตั้งแต่  $10^{-2}$  -  $10^{-5}$  เพาะเชื้อใน Petrifilm™ 3M™ ชนิด E.coli Coliform count plate (EC\_plate) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

#### การทดลองที่ 2

ผลที่ได้จากการทดลองที่ 1 พบว่าอัตราส่วน (SCN : H<sub>2</sub>O) 15 : 10 ppm ซึ่งเป็นอัตราส่วนต่ำสุด และสามารถรักษาคุณภาพน้ำนมดิบที่ 30 องศาเซลเซียสได้นาน 6 ชั่วโมง โดยแบ่งน้ำนมออกเป็นสองส่วน ส่วนแรกเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เก็บข้อมูลในชั่วโมงที่ 0, 3, 6, 9, 12 และ 15 ส่วนที่สองนำไปต้มที่อุณหภูมิ 72, 80 และ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที ทำให้เย็นทันทีและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บข้อมูลในวันที่ 3, 4, 5 และ 6

#### การวิเคราะห์ตัวอย่าง

เตรียมสารละลาย Thiocyanate ความเข้มข้น 5,000 ppm ให้มีความเข้มข้น 200 ppm จากนั้นทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นเป็น 150, 100, 50, 30, 20, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0 ppm ตกตะกอนโปรตีนโดยเติม 20% Trichloroacetic acid และกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman® เบอร์ 40 นำส่วนที่ใสวัดค่าการดูดกลืนแสงตามวิธีของ Cosby และ Sumner (1945) ที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร ทำ Linear dynamic range ได้สมการการหาค่า Thiocyanate คือ

$$\text{ปริมาณของ Thiocyanate} = \text{ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้} \times 17.50 \text{ โดยมีค่า } r^2 = 0.9799$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### ผลการทดลองที่ 1

เปอร์เซ็นต์ Lactic acid ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในชั่วโมงที่ 0 และ 3 ระหว่าง Control กับน้ำนมดิบที่เติม Sodiumthiocyanate และ Hydrogen peroxide ที่อัตราส่วน 15:10, 100:50 และ 150:100 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ขณะที่ในชั่วโมงที่ 6, 9, 12 และ 15 ระหว่าง Control กับอัตราส่วนที่ 15:10, 100:50 และ 150:100 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

### ตารางที่ 3.7 แสดงเปอร์เซ็นต์ Lactic acid ที่ 30 องศาเซลเซียส

Time/ratios Hr	Ratio of Sodiumthiocyanate : Hydrogen peroxide			
	Control	15:10	100:50	150:100
0	0.19 <sup>a</sup>	0.18 <sup>a</sup>	0.18 <sup>a</sup>	0.19 <sup>a</sup>
3	0.20 <sup>a</sup>	0.19 <sup>a</sup>	0.19 <sup>a</sup>	0.19 <sup>a</sup>
6	0.23 <sup>a</sup>	0.19 <sup>b</sup>	0.19 <sup>b</sup>	0.20 <sup>b</sup>
9	0.25 <sup>a</sup>	0.20 <sup>b</sup>	0.20 <sup>b</sup>	0.20 <sup>b</sup>
12	0.26 <sup>a</sup>	0.21 <sup>b</sup>	0.21 <sup>b</sup>	0.21 <sup>b</sup>
15	0.31 <sup>a</sup>	0.22 <sup>b</sup>	0.21 <sup>b</sup>	0.21 <sup>b</sup>

หมายเหตุ a, b, c และ d เป็นอักษรเพื่อแสดงการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) ตามแผนวนอน

Haddadin และคณะ (1996) รายงานว่าน้ำนมดิบที่เติม Sodiumthiocyanate และ Hydrogen peroxide ในระดับ 15:10 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสมีค่า Lactic acid เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยหลังชั่วโมงที่ 6 ขณะที่น้ำนมดิบปกติมี Lactic acid สูงถึง 0.66 เปอร์เซ็นต์ในชั่วโมงที่ 3 และไม่สามารถยอมรับเข้าสู่กระบวนการผลิตได้ ซึ่งระบบ Lactoperoxidase สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้นาน 9 - 12 ชั่วโมง ขณะที่ Fonteh และคณะ (2005) พบว่าอัตราส่วน 20 : 20 ppm สามารถชะลอการเพิ่มขึ้นของ Lactic acid ได้นานถึง 12 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 21 - 23 องศาเซลเซียส)

ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสพบว่าเปอร์เซ็นต์ Lactic acid ในวันที่ 0, 1, 2 และ 3 ระหว่าง Control กับอัตราส่วนที่ 15:10, 100:50 และ 150:100 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ขณะที่วันที่ 4, 5 และ 6 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับ Haddadin และคณะ (1996) พบว่าความเป็นกรดของน้ำนมดิบที่เติม Sodiumthiocyanate และ Hydrogen peroxide และเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสเกือบจะไม่เปลี่ยนแปลงในช่วงเวลา 4 วัน และเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในวันที่ 6

ตารางที่ 3.8 แสดงเปอร์เซ็นต์ Lactic acid ที่ 4 องศาเซลเซียส

Time/ratios	Ratio of Sodiumthiocyanate : Hydrogen peroxide			
	Control	15:10	100:50	150:100
Day				
0	0.19 <sup>a</sup>	0.19 <sup>a</sup>	0.19 <sup>a</sup>	0.20 <sup>a</sup>
1	0.20 <sup>a</sup>	0.20 <sup>a</sup>	0.20 <sup>a</sup>	0.20 <sup>a</sup>
2	0.21 <sup>a</sup>	0.20 <sup>a</sup>	0.20 <sup>a</sup>	0.20 <sup>a</sup>
3	0.21 <sup>a</sup>	0.20 <sup>a</sup>	0.20 <sup>a</sup>	0.20 <sup>a</sup>
4	0.23 <sup>a</sup>	0.21 <sup>b</sup>	0.21 <sup>b</sup>	0.21 <sup>b</sup>
5	0.25 <sup>a</sup>	0.21 <sup>b</sup>	0.21 <sup>b</sup>	0.21 <sup>b</sup>
6	0.26 <sup>a</sup>	0.22 <sup>b</sup>	0.21 <sup>b</sup>	0.21 <sup>b</sup>

หมายเหตุ a, b, c และ d เป็นอักษรเพื่อแสดงการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) ตามแนวนอน

ตารางที่ 3.9 แสดงจำนวน Total Bacteria Count ที่ 30 องศาเซลเซียส (CFU/ml)

Time/ratios	Ratio of Sodiumthiocyanate : Hydrogen peroxide			
	Control	15:10	100:50	150:100
Hr				
0	$3.3 \times 10^{4a}$	$3.0 \times 10^{4b}$	$2.0 \times 10^{3c}$	$1.3 \times 10^{3d}$
3	$4.3 \times 10^{5a}$	$8.3 \times 10^{4b}$	$3.0 \times 10^{3c}$	$2.0 \times 10^{3d}$
6	$7.2 \times 10^{5a}$	$2.2 \times 10^{5b}$	$4.5 \times 10^{4c}$	$6.3 \times 10^{3d}$
9	$3.4 \times 10^{6a}$	$6.7 \times 10^{5b}$	$7.7 \times 10^{4c}$	$2.3 \times 10^{4d}$
12	$1.6 \times 10^{8a}$	$1.7 \times 10^{7b}$	$1.9 \times 10^{5c}$	$3.9 \times 10^{4d}$
15	$1.8 \times 10^{8a}$	$7.1 \times 10^{7b}$	$5.9 \times 10^{5c}$	$5.5 \times 10^{5d}$

หมายเหตุ a, b, c และ d เป็นอักษรเพื่อแสดงการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ ( $P < 0.01$ ) ตามแนวนอน

Total Bacteria Count ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในชั่วโมงที่ 0 พบว่า Control มีความแตกต่างกับอัตราส่วนที่ 15:10 ( $p < 0.05$ ) และแตกต่างกับอัตราส่วนที่ 100:50 และ 150:100 ( $p < 0.01$ ) ในส่วนชั่วโมงที่ 3, 6, 9, 12 และ 15 ระหว่าง Control กับทุกอัตราส่วนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

จำนวน Total Bacteria Count ของ Control ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสมีค่าเท่ากับ  $7.2 \times 10^5$  CFU/ml ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงกว่าการยอมรับในกระบวนการผลิตน้ำนม ในขณะที่อัตราส่วน 15:10 ซึ่งเป็นอัตราส่วนต่ำสุดสามารถยับยั้งไม่ให้ปริมาณเกินกว่ามาตรฐานได้ถึงชั่วโมงที่ 9 ซึ่งมีค่าเท่ากับ  $6.7 \times 10^5$  CFU/ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.10 แสดงจำนวน Total Bacteria Count ที่ 4 องศาเซลเซียส (CFU/ml)

Time/ratios Day	Ratio of Sodiumthiocyanate : Hydrogen peroxide			
	Control	15:10	100:50	150:100
0	$4.2 \times 10^3$ a	$2.7 \times 10^2$ b	$2.0 \times 10^2$ b	$2.0 \times 10^2$ b
1	$5.0 \times 10^4$ a	$4.8 \times 10^2$ b	$4.3 \times 10^2$ b	$2.0 \times 10^2$ c
2	$5.5 \times 10^4$ a	$5.5 \times 10^2$ b	$5.0 \times 10^2$ b	$4.8 \times 10^2$ b
3	$6.0 \times 10^4$ a	$2.7 \times 10^3$ b	$2.3 \times 10^3$ b	$1.2 \times 10^3$ c
4	$9.1 \times 10^4$ a	$4.0 \times 10^3$ b	$4.0 \times 10^3$ b	$2.6 \times 10^3$ c
5	$6.3 \times 10^5$ a	$6.1 \times 10^3$ b	$5.6 \times 10^3$ b	$4.2 \times 10^3$ c
6	$2.4 \times 10^6$ a	$9.0 \times 10^3$ b	$7.4 \times 10^3$ b	$6.4 \times 10^3$ c

หมายเหตุ a, b, c และ d เป็นอักษรเพื่อแสดงการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ ( $P < 0.01$ ) ตามแนวนอน

ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่า Control มีจำนวน Total Bacteria Count เท่ากับ  $6.3 \times 10^5$  CFU/ml ซึ่งไม่สามารถยอมรับเข้ากระบวนการผลิตได้ในวันที่ 5 ในขณะที่อัตราส่วน 15:10 สามารถยับยั้งปริมาณ Total Bacteria Count ได้นาน 6 วัน

Gregory และคณะ (1989) ได้ทำการศึกษา Lactoperoxidase ในการยับยั้ง *Listeria monocytogenes* แบคทีเรียแกรมบวก และ Aerobic Bacteria ในน้ำนมดิบโดยเติม Sodiumthiocyanate และ Hydrogen peroxide และเติม Hydrogen peroxide เพียงอย่างเดียว เปรียบเทียบกับ Control ซึ่งเป็นน้ำนมดิบที่ไม่เติมสารใดๆ ทำการทดลองที่อุณหภูมิ 5, 10, 20 และ 30 องศาเซลเซียส พบว่า Lactoperoxidase ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด คือ Lactoperoxidase ที่เกิดจากการเติม Sodiumthiocyanate และ Hydrogen peroxide ซึ่งจะสามารถยับยั้ง *Listeria monocytogenes* แบคทีเรียแกรมบวก และ Aerobic Bacteria บางชนิดได้ผลดีที่สุดที่ 5 องศาเซลเซียสซึ่งสามารถยับยั้งได้นานถึง 73 - 98 ชั่วโมง (4.5 วัน) ขณะที่ 10 องศาเซลเซียสสามารถยับยั้งได้นาน 22 - 32 ชั่วโมง ในส่วนที่ 20 องศาเซลเซียสสามารถยับยั้งได้นาน 8.9 ชั่วโมง และที่ 30 องศาเซลเซียสสามารถยับยั้งได้นาน 2.8 ชั่วโมง

สำหรับค่า Coliform Count ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสระหว่าง Control กับอัตราส่วนที่ 15:10, 100:50 และ 150:100 ในชั่วโมงที่ 0, 3, 6, 9, 12 และ 15 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ และที่อัตราส่วน 100:50 และ 150:100 ในชั่วโมงที่ 3 ไม่พบ Coliform Count จากการตรวจนับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.11 แสดงจำนวน Coliform Count ที่ 30 องศาเซลเซียส (CFU/ml)

Time/ratios	Ratio of Sodiumthiocyanate : Hydrogen peroxide			
	Control	15:10	100:50	150:100
Hr				
0	$1.2 \times 10^3$ <sup>a</sup>	$5.0 \times 10^2$ <sup>b</sup>	< 2.00 <sup>c</sup>	< 2.00 <sup>c</sup>
3	$1.8 \times 10^3$ <sup>a</sup>	$1.3 \times 10^3$ <sup>b</sup>	< 2.00 <sup>c</sup>	< 2.00 <sup>c</sup>
6	$1.4 \times 10^4$ <sup>a</sup>	$5.1 \times 10^3$ <sup>b</sup>	$5.8 \times 10^2$ <sup>c</sup>	$2.3 \times 10^2$ <sup>c</sup>
9	$1.8 \times 10^5$ <sup>a</sup>	$8.3 \times 10^3$ <sup>b</sup>	$2.4 \times 10^3$ <sup>b</sup>	$3.0 \times 10^2$ <sup>c</sup>
12	$3.0 \times 10^6$ <sup>a</sup>	$1.5 \times 10^4$ <sup>b</sup>	$5.5 \times 10^4$ <sup>b</sup>	$1.4 \times 10^3$ <sup>c</sup>
15	$2.4 \times 10^7$ <sup>a</sup>	$2.0 \times 10^5$ <sup>b</sup>	$7.7 \times 10^4$ <sup>c</sup>	$1.5 \times 10^4$ <sup>c</sup>

หมายเหตุ a, b, c และ d เป็นอักษรเพื่อแสดงการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ ( $P < 0.01$ ) ตามแนวนอน

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (2540) กำหนดว่าหากค่า Coliform Count มากกว่า 10,000 CFU/ml คุณภาพน้ำนมดิบนั้นไม่สามารถยอมรับได้ในกระบวนการผลิต จากการทดลองที่ 30 องศาเซลเซียส พบว่า Control ในชั่วโมงที่ 6 มีจำนวน Coliform Count เท่ากับ  $1.4 \times 10^4$  CFU/ml ซึ่งมีปริมาณสูงกว่ามาตรฐานจึงไม่สามารถยอมรับในกระบวนการผลิตได้ ในขณะที่อัตราส่วน 15:10 สามารถยับยั้งการเพิ่มปริมาณ Coliform Count ไม่ให้เกินกว่ามาตรฐานได้ถึงชั่วโมงที่ 9 สอดคล้องกับ Adamson และ Carlsson (1981) รายงานว่าระบบ Lactoperoxidase สามารถยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivai* และ *Streptococcus sanguis* ที่อุณหภูมิห้อง Eyassu และคณะ (2004) ศึกษา ระบบ Lactoperoxidase ในน้ำนมแพะพบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* และ *Brucella melitensis* ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ได้นาน 6 ชั่วโมง

ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสพบว่าตั้งแต่วันที่ 1 ถึง 6 ระหว่าง Control กับอัตราส่วนที่ 15:10, 100:50 และ 150:100 มีค่า Coliform Count แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยที่ Control สามารถเก็บรักษาน้ำนมดิบได้เพียง 4 วันขณะที่อัตราส่วน 15:10 สามารถยับยั้งปริมาณ Coliform Count ได้นานถึง 6 วัน

ตารางที่ 3.12 แสดงจำนวน Coliform Count ที่ 4 องศาเซลเซียส (CFU/ml)

Time/ratios	Ratio of Sodiumthiocyanate : Hydrogen peroxide			
	Control	15:10	100:50	150:100
Day				
0	$1.9 \times 10^3$ <sup>a</sup>	< 2.0 <sup>b</sup>	< 2.0 <sup>b</sup>	< 2.0 <sup>b</sup>
1	$2.7 \times 10^3$ <sup>a</sup>	< 2.0 <sup>b</sup>	< 2.0 <sup>b</sup>	< 2.0 <sup>b</sup>
2	$3.3 \times 10^3$ <sup>a</sup>	< 2.0 <sup>b</sup>	< 2.0 <sup>b</sup>	< 2.0 <sup>b</sup>
3	$4.3 \times 10^3$ <sup>a</sup>	< 2.0 <sup>b</sup>	< 2.0 <sup>b</sup>	< 2.0 <sup>b</sup>
4	$7.0 \times 10^3$ <sup>a</sup>	< 2.0 <sup>b</sup>	< 2.0 <sup>b</sup>	< 2.0 <sup>b</sup>
5	$1.0 \times 10^4$ <sup>a</sup>	< 2.0 <sup>b</sup>	< 2.0 <sup>b</sup>	< 2.0 <sup>b</sup>
6	$1.5 \times 10^4$ <sup>a</sup>	< 2.0 <sup>b</sup>	< 2.0 <sup>b</sup>	< 2.0 <sup>b</sup>

หมายเหตุ a, b, c และ d เป็นอักษรเพื่อแสดงการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ ( $P < 0.01$ ) ตามแนวนอน

### ผลการทดลองที่ 2

ปริมาณ Thiocyanate ในน้ำนมดิบเริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 2.88 ppm เมื่อเติม Thiocyanate ปริมาณ 15 ppm พบว่ามีปริมาณ Thiocyanate เพิ่มขึ้นเป็น 17.42 ppm เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 72, 80 และ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 30 และ 4 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณ Thiocyanate จะลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นทั้งกรณีที่ได้รับและไม่ได้รับความร้อน และลดลงตามอุณหภูมิพาสเจอร์ไรซ์ที่เพิ่มขึ้น โดยพบว่า Control กับอุณหภูมิที่ 72 °C ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่จะแตกต่างกับอุณหภูมิที่ 80 °C และ 95 °C ขณะที่อุณหภูมิที่ 72 °C กับ 80 °C และ 80 °C กับ 95 °C ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกันทั้งที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 30 และ 4 องศาเซลเซียส รายละเอียดแสดงในตารางที่ 3.13 และ 3.14

ตารางที่ 3.13 แสดงปริมาณ Thiocyanate ในน้ำนมที่เติม Thiocyanate และได้รับความร้อนที่อุณหภูมิพาสเจอร์ไรซ์ และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ชั่วโมงที่	ปริมาณ Thiocyanate (ppm)			
	Control	72 °C	80 °C	95 °C
1	6.046 <sup>a</sup>	5.968 <sup>ab</sup>	5.836 <sup>bc</sup>	5.696 <sup>c</sup>
3	5.915 <sup>a</sup>	5.784 <sup>ab</sup>	5.451 <sup>bc</sup>	5.399 <sup>c</sup>
6	5.714 <sup>a</sup>	5.548 <sup>ab</sup>	5.136 <sup>bc</sup>	5.084 <sup>c</sup>
9	5.495 <sup>a</sup>	5.285 <sup>ab</sup>	4.035 <sup>bc</sup>	4.226 <sup>c</sup>
12	5.303 <sup>a</sup>	4.655 <sup>ab</sup>	4.148 <sup>bc</sup>	3.579 <sup>c</sup>
15	5.206 <sup>a</sup>	4.113 <sup>ab</sup>	3.780 <sup>bc</sup>	3.483 <sup>c</sup>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ภายในเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้เข้าไปใช้ในระบบสารสนเทศ

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.14 แสดงปริมาณ Thiocyanate ในน้ำนมที่เติม Thiocyanate และได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ พาสเจอร์ไรซ์ และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

วันที่	ปริมาณ Thiocyanate (ppm)			
	Control	72 °C	80 °C	95 °C
3	6.493 <sup>a</sup>	5.880 <sup>ab</sup>	5.530 <sup>bc</sup>	5.408 <sup>c</sup>
4	6.256 <sup>a</sup>	5.644 <sup>ab</sup>	5.329 <sup>bc</sup>	5.215 <sup>c</sup>
5	5.854 <sup>a</sup>	5.565 <sup>ab</sup>	4.979 <sup>bc</sup>	4.060 <sup>c</sup>
6	5.688 <sup>a</sup>	5.285 <sup>ab</sup>	4.840 <sup>bc</sup>	3.763 <sup>c</sup>

Codex Alimentarius Commission (1991) รายงานว่าผลการต้านแบคทีเรียในน้ำนมดิบของระบบ Lactoperoxidase ขึ้นอยู่กับ Species และ Strains ของจุลินทรีย์ในน้ำนมดิบซึ่งมีอยู่หลายชนิด ระบบ Lactoperoxidase สามารถยับยั้ง Mesophilic Bacteria และแบคทีเรียแกรมลบบางตัว เช่น *Pseudomonades* และ *Escherichia coli* ได้ดีกว่าแบคทีเรีย Species และ Strains อื่นๆ

#### สรุปผลการทดลอง

น้ำนมดิบที่เติม Sodiumthiocyanate และ Hydrogen peroxide ที่อัตราส่วน ต่ำสุด คือ 15:10 อายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสซึ่งเป็นสภาพพาร์มโคนมทั่วไปที่ไม่มีระบบทำความเย็นสามารถยืดอายุได้นาน 6 - 9 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับคำแนะนำของ CAC (1991) ในขณะที่ Control คุณภาพของน้ำนมดิบไม่สามารถยอมรับได้ในชั่วโมงที่ 6 ส่วนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ศูนย์รวบรวมน้ำนมเก็บรักษาน้ำนมดิบให้ผลเช่นเดียวกัน โดยอัตราส่วน 15 : 10 สามารถยืดอายุการเก็บรักษาน้ำนมดิบได้นานถึง 6 วัน ในขณะที่ Control เก็บรักษาได้เพียง 4 วัน

Bennett (2000) กล่าวว่าจุดมุ่งหมายของการใช้ประโยชน์จากระบบ Lactoperoxidase คือ ใช้ยับยั้งปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำนมดิบระหว่างการขนส่งไปยังศูนย์รวมน้ำนมดิบไม่ให้สูงกว่ามาตรฐานการรับซื้อในพื้นที่ที่ไม่มีระบบทำความเย็น หรือระบบทำความเย็นไม่มีประสิทธิภาพ

Marks และคณะ (2001) รายงานว่าการพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 วินาที ทำให้ระบบ Lactoperoxidase ยังคงทำงานอยู่ประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความยืดหยุ่นมากกว่าการใช้อุณหภูมิพาสเจอร์ไรซ์ตั้งแต่ 80 องศาเซลเซียสขึ้นไปที่มีผลทำให้ระบบ Lactoperoxidase เสื่อมสภาพอย่างสมบูรณ์ Garcia - Graells และคณะ (2003) กล่าวว่าการทำงานพาสเจอร์ไรซ์ หรือสเตอริไรส์ร่วมกับการใช้ระบบ Lactoperoxidase สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับการใช้ระบบใดเพียงระบบเดียว ส่วน Jacob และคณะ (2000) กล่าวว่าระบบ การกระตุ้นให้เกิดระบบ Lactoperoxidase ทันทีก่อนที่จะนำน้ำนมดิบเข้าสู่กระบวนการแปรรูป อายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์นมยาวนานขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งอาจสามารถลดอุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตให้ต่ำลง เพื่อรักษาคุณค่าทางอาหาร และลดต้นทุนการผลิตที่เกิดจากความร้อนในการฆ่าเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองพบว่าเมื่อเติม Thiocyanate 15 ppm ทำให้น้ำนมดิบมีค่า Thiocyanate เป็น 17.42 ppm ถึงแม้ Thiocyanate จะยังคงเหลือเมื่อผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรส์แล้ว แต่จะอยู่ในปริมาณที่ไม่เป็นพิษต่อร่างกาย (3.483 – 5.968) FAO/WHO (2005) รายงานว่าการกิน Thiocyanate ในระดับสูงจะมีผลต่อการทำงานของต่อมไทรอยด์ซึ่งจะทำให้ร่างกายขาดไอโอดีน และจากการศึกษาในผู้ป่วยที่เป็นโรคคอหอยพอกที่กิน Thiocyanate 4.75 mg ต่อวันติดต่อกัน 4 สัปดาห์ทำให้ Thiocyanate ในซีรัมเพิ่มขึ้นเพียง 1.7 mg/l แต่จะไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ Thyroxine, Triiodothyronine และ TSH (Dahlberg et al., 1985)

ถึงแม้ว่าระบบ Lactoperoxidase ที่ได้จากการเติม Sodiumthiocyanate และ Hydrogen peroxide จะสามารถรักษาคุณภาพน้ำนมดิบด้วยการยับยั้งปริมาณจุลินทรีย์ได้ แต่ในทางปฏิบัติและข้อกำหนดที่เกี่ยวข้องไม่ยินยอมให้มีเติมสารใดๆ ลงไปในน้ำนมดิบ ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงเป็นการยืนยันผลการทำงานของ Lactoperoxidase และการสลายของ Thiocyanate ในกระบวนการพาสเจอร์ไรส์ สำหรับเป็นข้อมูลในการศึกษาผลของระบบ Lactoperoxidase ธรรมชาติจากการให้โคนมกินไบมันสำปะหลัง ซึ่ง Panthanara และคณะ (2006) ได้รายงานที่สามารถลด Total Plate และ Coliform count ได้

นอกจากนี้ยังพบว่าระบบ Lactoperoxidase ทำให้เกิดลักษณะเฉพาะใน yoghurt เช่น ความเป็นเนื้อเดียวกัน ค่า pH เปอร์เซ็นต์ของ Lactic acid เนื่องจากไปยับยั้งการทำงานของ Lactic acid bacteria และทำให้ *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus bulgaricus* ซึ่งเป็น Starter culture ทำงานมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นในขณะบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส (Khalid and Masud, 2004)

**บทที่ 4**  
**ผลของระบบ Lactoperoxidase ในน้ำนมต่อรักษาคุณภาพน้ำนมดิบ**  
**และคุณลักษณะของโยเกิร์ต**

**ผลของระบบ Lactoperoxidase ในน้ำนมต่อรักษาคุณภาพน้ำนมดิบ**

แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลอง โดยการทดลองที่ 1 มีสิ่งทดลอง 4 สิ่งทดลอง คือ น้ำนมดิบ (control) น้ำนมดิบที่เติม Sodiumthiocyanate (Asia Pacific Specialty Chemical Limited, AG) และ Hydrogen peroxide (30% aqueous solution) ในอัตราส่วน 15:10, 100:50 และ 150:100 (mg/L : mg/L) เก็บรักษาตัวอย่างน้ำนมดิบที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเก็บผลการทดลองทุก 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 6 วัน การทดลองที่ 2 สิ่งทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 แต่เก็บรักษาตัวอย่างน้ำนมดิบที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเก็บผลการทดลองในชั่วโมงที่ 0, 3, 6, 9, 12 และ 15

**การวิเคราะห์ตัวอย่าง**

1. Titratable acidity เพื่อหาเปอร์เซ็นต์กรด Lactic ตามวิธีของ Fonteh และคณะ (2005)
2. การวิเคราะห์หาจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total bacteria count) ทำการ Dilution ตัวอย่างให้มีความเข้มข้นตั้งแต่  $10^{-2}$  -  $10^{-7}$  ทำการเพาะเชื้อใน Petrifilm<sup>TM</sup> 3M<sup>TM</sup> ชนิด aerobic count plate (AMC\_plate) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และการตรวจหาจุลินทรีย์กลุ่ม Coliform โดยทำการ Dilution ตัวอย่างให้มีความเข้มข้นตั้งแต่  $10^{-2}$  -  $10^{-5}$  เพาะเชื้อใน Petrifilm<sup>TM</sup> 3M<sup>TM</sup> ชนิด E.coli Coliform count plate (EC\_plate) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง
3. ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยการ Transformation ข้อมูล Total Bacteria Count และ Coliform count เพื่อให้ข้อมูลมีการกระจายแบบปกติ (Normal Distributions) โดยการใช้ 10 Logarithm ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) โดยใช้แผนการทดลอง Completely Randomized Design (CRD) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย (Mean Comparison) ด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SAS

**ผลการทดลองและวิจารณ์**

จากผลการศึกษาการเพิ่มขึ้นของเปอร์เซ็นต์ Lactic acid ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสพบว่าในชั่วโมงที่ 0 และ 3 ระหว่างสิ่งทดลองควบคุมกับน้ำนมดิบที่เติม Sodiumthiocyanate และ Hydrogen peroxide ที่อัตราส่วน 15:10, 100:50 และ 150:100 เปอร์เซ็นต์ Lactic acid ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ขณะที่ในชั่วโมงที่ 6, 9, 12 และ 15 ระหว่างสิ่งทดลองควบคุมกับอัตราส่วนที่ 15:10, 100:50 และ 150:100 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ตารางที่ 4.1 แสดงเปอร์เซ็นต์ Lactic acid ที่ 30 องศาเซลเซียส

Time/ratios Hr	Ratio of Sodiumthiocyanate : Hydrogen peroxide			
	Control	15:10	100:50	150:100
0	0.19 <sup>a</sup>	0.18 <sup>a</sup>	0.18 <sup>a</sup>	0.19 <sup>a</sup>
3	0.20 <sup>a</sup>	0.19 <sup>a</sup>	0.19 <sup>a</sup>	0.19 <sup>a</sup>
6	0.23 <sup>a</sup>	0.19 <sup>b</sup>	0.19 <sup>b</sup>	0.20 <sup>b</sup>
9	0.25 <sup>a</sup>	0.20 <sup>b</sup>	0.20 <sup>b</sup>	0.20 <sup>b</sup>
12	0.26 <sup>a</sup>	0.21 <sup>b</sup>	0.21 <sup>b</sup>	0.21 <sup>b</sup>
15	0.31 <sup>a</sup>	0.22 <sup>b</sup>	0.21 <sup>b</sup>	0.21 <sup>b</sup>

หมายเหตุ a, b, c และ d เป็นอักษรเพื่อแสดงการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ ( $P < 0.01$ ) ตามแนวนอน

Haddadin และคณะ (1996) รายงานว่าน้ำนมดิบที่เติม Sodiumthiocyanate และ Hydrogen peroxide ในระดับต่ำสุด คือ 15:10 นำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสพบว่ามีความเป็นกรดเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยหลังชั่วโมงที่ 6 ซึ่งความเป็นกรดในสิ่งทดลองควบคุมไม่สามารถยอมรับเข้าสู่กระบวนการผลิตได้หลังจากชั่วโมงที่ 3 เนื่องจากมี Lactic acid สูงถึง 0.66 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นได้ว่าระบบ Lactoperoxidase สามารถยับยั้ง microorganism ได้นาน 9-12 ชั่วโมง ซึ่งเป็นสองเท่าของน้ำนมปกติ

Fonteh และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาทดลองระบบ Lactoperoxidase ในน้ำนมดิบโดยการเติม Sodiumthiocyanate และ Hydrogen peroxide ที่อัตราส่วนต่างๆ ดังนี้ 0:0, 7:10, 10:10 และ 20:20 ppm แล้วทำการทดสอบ Titratable acidity ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 21 - 23 องศาเซลเซียส) พบว่าที่อัตราส่วน 20:20 ppm สามารถชะลอการเพิ่มเปอร์เซ็นต์ Lactic acid ได้นานถึง 12 ชั่วโมง

ในส่วนของการศึกษาเก็บตัวอย่างน้ำนมดิบไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสพบว่าเปอร์เซ็นต์ Lactic acid ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในวันที่ 0, 1, 2 และ 3 ระหว่างสิ่งทดลองควบคุมกับอัตราส่วนที่ 15:10, 100:50 และ 150:100 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ในส่วนของวันที่ 4, 5 และ 6 พบว่าสิ่งทดลองควบคุมกับอัตราส่วนที่ 15:10, 100:50 และ 150:100 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Haddadin และคณะ (1996) พบว่าที่ 4 องศาเซลเซียสความเป็นกรดของน้ำนมดิบที่ได้รับ Sodiumthiocyanate และ Hydrogen peroxide เกือบจะไม่เปลี่ยนแปลงในช่วงเวลา 4 วัน และเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในวันที่ 6

ตารางที่ 4.2 แสดงเปอร์เซ็นต์ Lactic acid ที่ 4 องศาเซลเซียส

Time/ratios day	Ratio of Sodiumthiocyanate : Hydrogen peroxide			
	Control	15:10	100:50	150:100
0	0.19 <sup>a</sup>	0.19 <sup>a</sup>	0.19 <sup>a</sup>	0.20 <sup>a</sup>
1	0.20 <sup>a</sup>	0.20 <sup>a</sup>	0.20 <sup>a</sup>	0.20 <sup>a</sup>
2	0.21 <sup>a</sup>	0.20 <sup>a</sup>	0.20 <sup>a</sup>	0.20 <sup>a</sup>
3	0.21 <sup>a</sup>	0.20 <sup>a</sup>	0.20 <sup>a</sup>	0.20 <sup>a</sup>
4	0.23 <sup>a</sup>	0.21 <sup>b</sup>	0.21 <sup>b</sup>	0.21 <sup>b</sup>
5	0.25 <sup>a</sup>	0.21 <sup>b</sup>	0.21 <sup>b</sup>	0.21 <sup>b</sup>
6	0.26 <sup>a</sup>	0.22 <sup>b</sup>	0.21 <sup>b</sup>	0.21 <sup>b</sup>

หมายเหตุ a, b, c และ d เป็นอักษรเพื่อแสดงการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ ( $P < 0.01$ ) ตามแนวนอน

จากผลการศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่า Total Bacteria Count ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในช่วงเวลาที่ 0 พบว่าระหว่างสิ่งทดลองควบคุมกับอัตราส่วนที่ 15:10 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับอัตราส่วนที่ 100:50 และ 150:100 ในช่วงเวลาที่ 3, 6, 9, 12 และ 15 ระหว่างสิ่งทดลองควบคุมกับทุกอัตราส่วนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ตารางที่ 4.3 แสดงจำนวน Total Bacteria Count ที่ 30 องศาเซลเซียส (CFU/ml)

Time/ratios Hr	Ratio of Sodiumthiocyanate : Hydrogen peroxide			
	Control	15:10	100:50	150:100
0	0.19 <sup>a</sup>	0.18 <sup>a</sup>	0.18 <sup>a</sup>	0.19 <sup>a</sup>
3	0.20 <sup>a</sup>	0.19 <sup>a</sup>	0.19 <sup>a</sup>	0.19 <sup>a</sup>
6	0.23 <sup>a</sup>	0.19 <sup>b</sup>	0.19 <sup>b</sup>	0.20 <sup>b</sup>
9	0.25 <sup>a</sup>	0.20 <sup>b</sup>	0.20 <sup>b</sup>	0.20 <sup>b</sup>
12	0.26 <sup>a</sup>	0.21 <sup>b</sup>	0.21 <sup>b</sup>	0.21 <sup>b</sup>
15	0.31 <sup>a</sup>	0.22 <sup>b</sup>	0.21 <sup>b</sup>	0.21 <sup>b</sup>

หมายเหตุ a, b, c และ d เป็นอักษรเพื่อแสดงการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ ( $P < 0.01$ ) ตามแนวนอน

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (2548) รายงานว่าปริมาณ Total Bacteria Count มากกว่า 600,000 CFU / ml แสดงว่าคุณภาพน้ำนมดิบไม่สามารถยอมรับได้ในกระบวนการผลิตน้ำนม จากผลการทดลอง Total Bacteria Count ที่ 30 องศาเซลเซียสพบว่าสิ่งทดลองควบคุมในช่วงเวลาที่ 6 มีจำนวน Total Bacteria Count เท่ากับ  $7.2 \times 10^5$  CFU/ml ซึ่งมีปริมาณสูงกว่ามาตรฐานจึงไม่สามารถยอมรับในกระบวนการผลิตน้ำนมได้ ในขณะที่อัตราส่วน 15: 10 ซึ่งเป็นอัตราส่วนต่ำสุดสามารถยับยั้งไม่ให้ปริมาณเกินกว่ามาตรฐานได้ถึงช่วงเวลาที่ 9 ซึ่งมีค่าเท่ากับ  $6.7 \times 10^5$  CFU / ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 กรอบแนวคิด

กิจกรรมที่ 1 : การศึกษาประสิทธิภาพของระบบ Lactoperoxidase ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคเต้านมอักเสบในโคนม เพื่อลดการใช้และการตกค้างของยาปฏิชีวนะในฟาร์มโคนม

โรคเต้านมอักเสบส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย Streptococci, Staphylococci และแบคทีเรียชนิดแกรมลบอื่นๆ แบคทีเรียเหล่านี้อาจแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ 1. แบคทีเรียที่ติดต่อกับเต้านมสู่เต้านม (Contagious bacteria) และ 2. แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อม (Environmental bacteria) ซึ่งทำให้เกิดโรคโดยการเลียตลอดเข้าสู่เต้านมทางหัวนม ปัจจัยสำคัญที่ทำให้เต้านมมีโอกาสสัมผัสกับเชื้อจุลินทรีย์ และเป็นโรคเต้านมอักเสบ คือ อุปกรณ์การรีดนม การปฏิบัติทางด้านสุขศาสตร์การรีดนม

เต้านมอักเสบ เกิดขึ้นเมื่อจุลินทรีย์สามารถเล็ดลอดผ่านช่องเปิดของหัวนม และเข้าไปทึวจำนวนในเนื้อเยื่อที่สร้างเต้านม ในระยะแรกจุลินทรีย์จะยึดเกาะกับเยื่อบุของท่อน้ำนมใหญ่ๆ และแอ่งรับน้ำนม ซึ่งทำความเสียหายให้กับเนื้อเยื่อเพียงหย่อมเล็กๆ หลังจากนั้นจุลินทรีย์จะเข้าไปในท่อเล็กๆ และถุงสร้างน้ำนมที่อยู่ทางส่วนล่างๆ ของเต้านม จุลินทรีย์จะสร้างสารพิษและสารที่ระคายเคืองต่างๆ ทำให้เซลล์สร้างน้ำนมบวมและตาย เป็นผลให้มีการหลั่งของสารต่างๆ ซึ่งไปทำให้ผนังหลอดเลือดอ่อนแอ เพิ่มการซึมผ่านของพลาสมา เพิ่มการยึดเกาะของเม็ดเลือดขาว ชนิดมีนิวเคลียสหลายรูปร่าง (polymorphonuclear neutrophilic leukocytes, PMN) ต่อผนังหลอดเลือด (ธีรพงศ์, 2542)

เนื่องจากน้ำนมเป็นแหล่งอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์เนื่องจากมีสาร Non protein nitrogen สูง รวมถึงมีแลคโตส โปรตีน ไขมัน และแร่ธาตุต่างๆ ซึ่งจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในการเจริญได้ นอกจากนี้ น้ำนมมีค่า Aw 0.98 และ pH ประมาณ 6.6 ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสม ปกติ น้ำนมดิบที่มีคุณภาพดีจะมีจำนวนของจุลินทรีย์ประมาณ 100 -1,000 CFU/ml ส่วนน้ำนมดิบคุณภาพต่ำจะมีจำนวนของจุลินทรีย์มากกว่า 1,000,000 CFU/ml (ลาวัญญ์, 2549) สาเหตุที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ปะปนเข้าสู่ภายในเต้านมและเข้าสู่นมมีปัจจัยดังนี้

1. จุลินทรีย์ที่มีภายในเต้านมเอง (Interior of the udder) จะอาศัยอยู่รอบๆ เต้านม ถึงแม้ว่าจะเป็นแมโคที่มีสุขภาพดีเมื่อมีโอกาสก็จะแทรกเข้าไปอยู่ในเต้านมโคซึ่งจะมีจำนวนไม่มาก และไม่ค่อยทำให้เกิดความเสียหายในน้ำนมมาก นมที่รีดจากเต้านมนี้จะให้ปริมาณของจุลินทรีย์ที่แตกต่างไปตามแต่ละช่วงของการรีดนม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- นมต้น (Foremilk) เป็นน้ำนมที่รีดออกมาในระยะแรกๆ จะมีปริมาณของจุลินทรีย์อยู่สูง จึงมักนิยมทิ้งนมที่รีดได้ในส่วนนี้
- นมกลาง (Middle milk) เป็นน้ำนมที่รีดได้ในระยะที่ 2 ของการรีดนม นมในส่วนนี้จะมีปริมาณของจุลินทรีย์อยู่ไม่มากนักหรือมีอยู่น้อยมาก ซึ่งจุลินทรีย์จำนวนนี้จะไม่ส่งผลต่อคุณภาพของน้ำนมที่รีดได้
- นมปลาย (Stripping milk) เป็นนมที่รีดได้ในช่วงสุดท้ายของการรีดนม น้ำนมในส่วนนี้จะมีไขมันอยู่สูงมาก ส่วนจุลินทรีย์จะมีอยู่น้อยมาก

ในกรณีที่แม่โคเป็นโรคเต้านมอักเสบ (Mastitis) น้ำนมที่รีดได้จะมีปริมาณของจุลินทรีย์อยู่สูงมาก ซึ่งอาจทำให้ไม่สามารถนำมาบริโภคเป็นอาหารได้ โรคเต้านมอักเสบส่วนใหญ่จะเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Corynebacterium tuberculosis* ซึ่งก่อให้เกิดโรคกับมนุษย์

2. จุลินทรีย์จากภายนอกของเต้านม (Exterior of the udder) จุลินทรีย์ภายนอกที่มีโอกาสปนเปื้อนบริเวณเต้านม อาจเกิดจากสิ่งแวดล้อมบริเวณโรงเรือนที่ทำการเลี้ยงโค เช่น ฟางที่ใช้ปูรองพื้นให้กับโคอาจมีการสะสมของจุลินทรีย์ อุจจาระและปัสสาวะของตัวโคเอง ซึ่งส่วนใหญ่เป็นจุลินทรีย์พวก *E.coli*, *Campylobacter*, *Salmonella*, *Bacillus* และ *Clostridium* ได้แก่ *C. butyricum* และ *C. tyrobutyricum* ดังนั้นเพื่อลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ไปสู่เต้านมโคควรที่จะหมั่นเปลี่ยนฟางที่ใช้บ่อยๆ

ส่วนการศึกษาของ ชูรัฐ (2534) รายงานว่า เชื้อจุลินทรีย์ที่พบในน้ำนมส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียสามารถแบ่งได้เป็น 5 กลุ่ม ดังนี้

1. กลุ่มไซโครโทรฟ (Psychrotrophs) เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ ดังนั้นนมพาสเจอร์ไรส์ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส มีปริมาณเชื้อกลุ่มนี้เพิ่มมากขึ้น ซึ่งจะทำให้รสชาติของนมเปลี่ยนไป แหล่งที่มาคือ จากน้ำใช้ในฟาร์มที่ไม่สะอาด

2. กลุ่มเมโซไฟล์ (Mesophiles) เป็นกลุ่มที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส และเป็นสาเหตุที่ทำให้นมที่ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเกิดการเสื่อมเสียได้ จุลินทรีย์กลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่พบเป็นส่วนใหญ่จากการตรวจนับจุลินทรีย์ทั้งหมด แหล่งที่มาคือ สภาพแวดล้อมภายในโรงเรือนตามพื้นคอกรีดนม

3. กลุ่มเทอร์โมดิวริก (Thermotolerant) เป็นจุลินทรีย์ทนต่ออุณหภูมิสูงและไม่ถูกฆ่าเชื้อด้วยการพาสเจอร์ไรส์ ดังนั้นถ้าพบแบคทีเรียกลุ่มนี้ในน้ำนมดิบมาก ทำให้มีเชื้อหลงเหลือในนมพาสเจอร์ไรส์มากขึ้นด้วย แต่เชื้อจะไม่สามารถเจริญเติบโตได้ แหล่งที่มาคือ เครื่องมือที่ใช้รีดนมพวกท่อภายในโรงนม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. กลุ่มเทอร์โมไฟล์ (Thermophiles) เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ที่ระดับอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิพาสเจอร์ไรส์ด้วย แต่ถ้าอุณหภูมิสูงเกิน 70 องศาเซลเซียส แบคทีเรียกลุ่มนี้จะไม่สามารถเจริญได้ แหล่งที่มาคือ จากดินและอาหารสัตว์

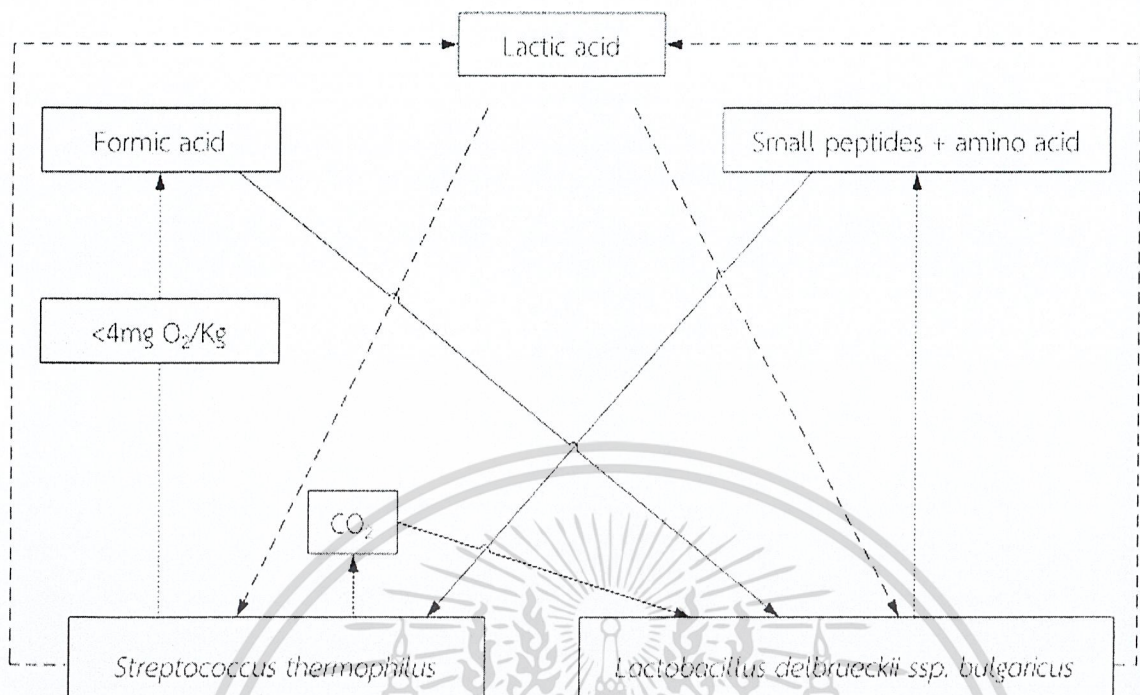
5. กลุ่มโคลิฟอร์ม (Coliforms) กลุ่มนี้จะเป็นดัชนีชี้ถึงสุขลักษณะการผลิต และการทำให้เกิดโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหาร การพบแบคทีเรียกลุ่มนี้แสดงให้เห็นถึงความผิดพลาดในกระบวนการผลิต เช่น ให้ความร้อนสำหรับการฆ่าเชื้อไม่เพียงพอ มีการปนเปื้อนขณะบรรจุแหล่งที่มา คือ อุจจาระของคน สัตว์ และอาจมาจากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบด้วย

การศึกษาของ Wolfson and Sumner (1993) รายงานว่า แหล่งโภชนาการที่พบ Thiocyanate คือ Glucosinolates และ Cyanogenic glycosides โดยเฉพาะ Glucosinolates พบมากใน Brassica napobrassica ส่วน Cyanogenic glycosides พบในมันสำปะหลัง มันฝรั่ง ข้าวโพด ข้าวฟ่าง และพืชตระกูลถั่ว โดยมีการ Hydrolysed glucoside จะมีการปลดปล่อย Cyanide ในปฏิกิริยา Thiosulphase ซึ่งเป็นการขจัดสารพิษ

White et al., (1998) พบว่าส่วนของไขมันสำปะหลังมีสารไซยาโนจีนิกไกลโคไซด์มากที่สุด ซึ่งระดับความเป็นพิษของไซยาโนเจนิกไกลโคไซด์ที่ทำให้โคและแกะตายมีค่าเท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เนื่องจากเอนไซม์ของจุลินทรีย์ในรูเมนของโคและเอนไซม์ของพืชที่โคกินเข้าไป จะเร่งปฏิกิริยาการสลายไซยาโนจีนิกไกลโคไซด์ในไขมันสำปะหลัง และในพืชหลายชนิด เกิดเป็นไซยาไนด์และถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายโค และจะถูกลดความเป็นพิษเมื่อรวมกับไฮโอซีสเตอิน หรือไฮโอซัลเฟตมีเอนไซม์โร-ดาเนียสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จะได้สารไฮโอไซยานเนต (Cosby and Sumner, 1945) ซึ่งไฮโอไซยานเนตที่ถูกขับออกทางน้ำนม จะเข้าสู่ระบบ Lactoperoxidase และทำปฏิกิริยากับ Hydrogenperoxide ในน้ำนม มีเอนไซม์ Lactoperoxidase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้สาร Hypothiocyanate เป็นสารที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ของแบคทีเรีย ระบบ Lactoperoxidase นี้เป็นระบบต่อต้านแบคทีเรียตามธรรมชาติที่มีศักยภาพช่วยยับยั้งการเจริญหรือทำลายแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำนม (Ryoba et al., 2004)

## กิจกรรมที่ 2 : ผลของระบบ Lactoperoxidase ในน้ำนมต่อคุณลักษณะของโยเกิร์ต

โยเกิร์ต คือผลิตภัณฑ์นมประเภทที่ได้จากหมัก กรด Lactic โดยจุลินทรีย์ *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus* หรือ *Streptococcus thermophilus* (Codex Alimentarius, 2001) หรือโดยใช้จุลินทรีย์ทั้งสองชนิดรวมกัน โดยการทำงานร่วมกันของจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดจะทำให้ได้ปริมาณกรดเพิ่มขึ้น กระบวนการหมักร่วมกันของจุลินทรีย์ทั้งสองชนิด แสดงในภาพ ที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 แสดงการกระตุ้นและการยับยั้งการทำงานของ *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus* และ *Streptococcus thermophilus* ในกระบวนการหมักโยเกิร์ต  
ดัดแปลงจาก : Walstra และคณะ (2006)

#### สารที่เกิดจากกระบวนการหมัก

1. กรด Lactic ได้จากการสลาย Glucose ในโยเกิร์ตมีปริมาณ กรด Lactic ประมาณ 0.7 – 0.9 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อน้ำหนัก ( 80 ถึง 100 มิลลิโมล)
2. Acetaldehyde (ethanol) เป็นองค์ประกอบที่ทำให้เกิดกลิ่น และรสเฉพาะของโยเกิร์ต มีประมาณ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ( 0.2 มิลลิโมล)
3. Diacetyl (  $\text{CH}_3\text{-CO-CO-CH}_3$  ) เนื่องจาก จุลินทรีย์ทั้งสองชนิด ไม่สามารถสลาย กรด Citric ดังนั้น Pyruvic acid ที่เกิดจากกระบวนการหมักน้ำตาลจึงทำให้เกิด Diacetyl มีประมาณ 0.8 – 1.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
4. Polysaccharides เป็นองค์ประกอบที่มีความสำคัญต่อความเหนียวแน่น (Consistency) ของเนื้อโยเกิร์ต

#### คุณสมบัติทางกายภาพ

pH

4.4

Viscosity(  $\text{m Pa}\cdot\text{m}^{-3}$  )

400

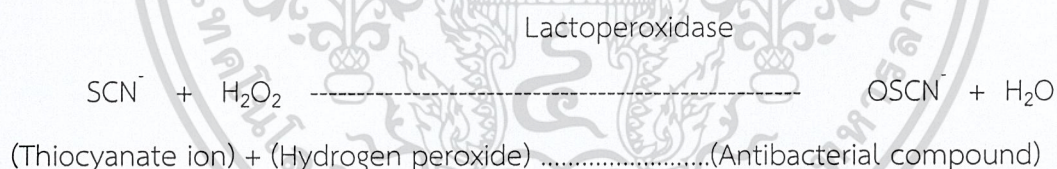
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับใช้ในงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Density ( $\text{kg m}^{-3}$ )	1031
องค์ประกอบทางเคมีของโยเกิร์ต (%w/w)	
Fat	3.50
Casein	2.50
Other protein	0.80
Lactose	3.70
Salts	0.85
Water	87.50

ที่มา : Walstra และคณะ (2006)

### ระบบ Lactoperoxidase

เอนไซม์ Lactoperoxidase เป็นเอนไซม์ที่พบโดยธรรมชาติในน้ำนมดิบ ซึ่งมีปริมาณประมาณ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ในน้ำนมโค ทำงานต้านหรือทำลายจุลินทรีย์โดยการออกซิไดซ์ Thiocyanate ในสภาพที่มี Hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ทำให้เกิดสารประกอบที่สามารถต่อต้านการเจริญเติบโต และทำลายจุลินทรีย์ในน้ำนม แสดงดังสมการ (FAO,2003)



โดยมีการนำไปใช้ในการเก็บรักษาน้ำนมดิบในพื้นที่ห่างไกล และขาดเทคโนโลยีในการทำ ความเย็น การทำงานของระบบ Lactoperoxidase ในน้ำนมมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรียและแกรมลบ (Seifu et al., 2005) จากการศึกษาของ Haddadin และคณะ (1996) พบว่าการกระตุ้นระบบ Lactoperoxidase ด้วยการเติม Sodium thiocyanate และ Sodium percarbonate เพื่อเป็นแหล่งของ  $\text{SCN}^-$  และ  $\text{H}_2\text{O}_2$  ในอัตราส่วน 15:10 มิลลิกรัมต่อลิตร จะสามารถยืดอายุการเก็บรักษาน้ำนมดิบที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้หลายวัน และสามารถเก็บที่อุณหภูมิห้องได้ 18 ชั่วโมง สอดคล้องกับ FAO (2003) ที่รายงานว่า ระบบ Lactoperoxidase สามารถยืดอายุการเก็บรักษาน้ำนมดิบได้ 7 – 8 ชั่วโมงระหว่างการขนส่งมายังโรงงานแปรรูป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง / ทบทวนวรรณกรรม

กิจกรรมที่ 1 : การศึกษาประสิทธิภาพของระบบ Lactoperoxidase ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคเต้านมอักเสบในโคนม เพื่อลดการใช้และการตกค้างของยาปฏิชีวนะในฟาร์มโคนม

### 1. คุณภาพน้ำนมดิบ

#### 1.1 มาตรฐานคุณภาพน้ำนมดิบ

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช.) (2548) ได้กำหนดนิยามของน้ำนมดิบ (Raw milk) หมายถึง น้ำนมที่รีดจากแม่โคหลังจากคลอดลูกแล้วไม่น้อยกว่า 3 วัน และต้องปราศจากน้ำนมเหลือง (Colostrums) โดยมีได้แยกออกหรือเติมวัตถุอื่นใด และไม่ได้ผ่านกรรมวิธีใดๆ ยกเว้นการทำให้เย็น และได้กำหนดให้น้ำนมดิบมีคุณสมบัติขั้นต่ำ ดังนี้

1. อยู่ในสภาพปกติ สะอาด มีสีขาวหรือสีขาวนวล
2. ปราศจากกลิ่นรสที่น่ารังเกียจ และสิ่งแปลกปลอม
3. ไม่มีการตกตะกอนของโปรตีน เมื่อทดสอบขั้นต้นด้วยการดูปฏิกิริยาของน้ำนมดิบกับ Ethyl alcohol ที่ความเข้มข้น 68 เปอร์เซ็นต์ ถ้าไม่ผ่านให้ตรวจซ้ำด้วยวิธีต้มเพื่อดูตะกอน (Clot on boiling test)
4. มีค่าความเป็นกรด ต่าง (pH) ระหว่าง 6.6 - 6.9
5. เนื้อมนมไม่รวมไขมันเนย (Solid not fat) ไม่น้อยกว่า ร้อยละ 8.25
6. จุดเยือกแข็งต้องมีค่าไม่สูงกว่า - 0.525 องศาเซลเซียส
7. ค่าความถ่วงจำเพาะที่ 20 องศาเซลเซียส ต้องมีค่าไม่ต่ำกว่า 1.028
8. ชั่วโมงการเปลี่ยนสีของเมทิลีนบลูต้องมากกว่า 4 ชั่วโมง
9. การเปลี่ยนสีของรีซาชูรินที่ 1 ชั่วโมงต้องไม่น้อยกว่า เกรด 4.5
10. ปราศจากจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคติดต่อระหว่างสัตว์และคน เช่น วัณโรค เป็นต้น
11. ปราศจากฮอร์โมน ยาต้านจุลชีพ ยาหล่อมประสาท
12. ปราศจากวัตถุเจือปนอาหาร

นอกจากนี้ มกอช. (2548) ยังได้แบ่งชั้นคุณภาพ น้ำนมดิบออกเป็น 3 ชั้นคุณภาพ (Quality grade) ตามจำนวนจุลินทรีย์ เซลล์โซมาติก โปรตีน ไขมัน และเนื้อมนมทั้งหมด คือ ชั้นดีมาก (Premium) ชั้นดี (Good) และชั้นมาตรฐาน (Standard) แสดงในตารางที่ 2.1 โดยใช้เป็นแนวทางในการกำหนดเกณฑ์การซื้อขายน้ำนมดิบตามชั้นคุณภาพ นั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 แสดงการแบ่งชั้นคุณภาพน้ำนมดิบตามคุณลักษณะ

คุณลักษณะ	ชั้นคุณภาพ		
	ชั้นดีมาก (Premium)	ชั้นดี (Good)	ชั้นมาตรฐาน (Standard)
1. จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (colony/ml)	< 200,000	200,000 ถึง < 400,000	400,000 ถึง < 600,000
2. เซลล์โซมาติก (cell/ml)	< 200,000	200,000 ถึง < 350,000	350,000 ถึง < 500,000
3. โพรตีน (เปอร์เซ็นต์)	> 3.4	> 3.2 ถึง 3.4	3.0 ถึง 3.2
4. ไขมัน (เปอร์เซ็นต์)	> 4	> 3.4 ถึง 4	3.2 ถึง 3.6
5. เนือนมทั้งหมด (เปอร์เซ็นต์)	> 12.7	> 12.5 ถึง 12.7	12.3 ถึง 12.5

ที่มา: สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (2548)

## 1.2 ดัชนีชี้วัดคุณภาพน้ำนมดิบ

การตรวจวัดคุณภาพน้ำนมดิบ เป็นการตรวจเพื่อรับ หรือปฏิเสธการรับน้ำนมดิบของศูนย์รวบรวมน้ำนมดิบ และเพื่อให้ราคาน้ำนมดิบกับเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนม หรือตรวจก่อนกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์นมของโรงงานผู้ผลิตผลิตภัณฑ์นม โดยทั่วไปมาตรฐานการกำหนดคุณภาพจะขึ้นอยู่กับผู้ซื้อ โดยอย่างน้อยมักเป็นไปตามคุณสมบัติขั้นต่ำของ มกอช. (2548)

คุณภาพน้ำนมดิบที่ดี เป็นจุดเริ่มต้นของผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพ ช่วยยืดอายุการเก็บรักษา โดยการตรวจสอบคุณภาพน้ำนมดิบทำได้หลายวิธีการ เพื่อบ่งชี้ปัญหาในขั้นตอนการผลิตน้ำนมดิบ เช่น การตรวจวัดจำนวน Somatic cell count (SCC) Standard plate count (SPC) และ Laboratory pasteurized count (LPC) เป็นต้น ในงานวิจัยของ Boor และคณะ (1998) ได้ตรวจสอบคุณภาพน้ำนมดิบในรัฐนิวยอร์ก ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยการตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาและทางเคมี ซึ่งในทางจุลชีววิทยา ทำการตรวจนับจำนวน Standard plate count (SPC), Laboratory pasteurized count (LPC), Coliform count, Heat - resistant spore - forming psychrotrophs (HRSP), HRSP ภายหลังการเก็บรักษาน้ำนมดิบ 10 วัน ที่ อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส (HRSP10), Aerobic spore count (จุลินทรีย์กลุ่ม Mesophilic), Rapid psychrotrophic count (RPC) และ Preliminary incubation count (PIC) ซึ่งผลการตรวจสอบดังกล่าวแสดงในตารางที่ 2.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 แสดงค่าเฉลี่ยของจำนวนจุลินทรีย์ตามวิธีวิเคราะห์ในรัฐนิวยอร์ก

สหกรณ์ หรือผู้ผลิต นม	จำนวน ฟาร์ม (no.)	ฟาร์มที่พบ SPC > 100,000 cfu/ml (เปอร์เซ็นต์)	SPC cfu/ml	LPC cfu/ ml	Coliform s cfu/ml	RPC cfu/ ml	PIC cfu/ml	HRSP cfu/ ml	Aerobic spores cfu/ml	HRSP 10 cfu/ ml
A	105	10.5	10,200	84	30	1,500	119,000	<1	32	68
B	74	9.5	17,800	137	64	4,300	104,000	1	63	376
C	130	3.1	8,900	68	14	2,100	94,000	1	39	91
D	119	2.5	10,900	132	34	2,100	50,000	<1	41	153
E	127	4.7	12,500	220	16	2,200	46,000	1	121	166
F	36	5.6	16,000	80	26	4,600	208,000	<1	29	627
G	18	0	8,300	371	60	900	13,000	<1	58	2,589
H	12	8.3	22,000	356	290	6,700	216,000	<1	89	329
I	173	5.8	12,100	156	54	2,400	105,000	1	34	163
J	31	2.2	10,500	212	45	2,100	125,000	1	81	79
K	30	3.3	6,400	105	18	1,400	39,000	<1	68	114
Mean		5	11,400	129	31	2,300	81,000	1	49	155
Standards according PMO <sup>2</sup>			100,000	...	...	...	...	...	...	

หมายเหตุ : SPC = Standard plate count, LPC = Laboratory-pasteurized count, RPC = Rapid psychrotrophic count, PIC = Preliminary incubation count, HRSP = Heat-resistant spore-forming psychrotrophs, HRSP10 = HRSP count after 10 d of holding at 7°C,

1 = No standard establish

2 = Pasteurized Milk Ordinance

ที่มา: ดัดแปลงจาก Boor และคณะ (1998)

1.2.1 Somatic cell count (SCC) เมื่อมีการติดเชื้อในเต้านมโค Polymorpho - nuclear neutrophil (PMN) leukocytes จะไหลเข้าสู่เต้านม โดยระหว่างที่มีการติดเชื้อนั้น PMN จะยึดเกาะกับ Endothelium ของหลอดเลือดขนาดเล็ก เข้าสู่เซลล์เต้านม เมื่อ PMN เพิ่มจำนวนมากขึ้น จะไปยัง Alveoli และสร้างความเสียหายในกระบวนการสังเคราะห์น้ำนม ซึ่ง PMN นี้สามารถเคลื่อนผ่าน Epithelial cells ไปยัง Lumen ของ Alveolus ผลของกระบวนการนี้ทำให้มีการเพิ่มจำนวนของ SCC ในน้ำนม โดยหน้าที่ของ PMN ในน้ำมนั้นเพื่อทำลายแบคทีเรีย แต่เมื่อเข้าสู่เต้านมแล้ว PMN จะมีส่วนทำลายองค์ประกอบอื่นๆ ด้วยเช่น ไขมัน และโปรตีน (Harmon, 1994)

น้ำนมที่มีจำนวน SCC สูง ส่งผลต่อองค์ประกอบน้ำนม ทั้งองค์ประกอบหลัก (Major) และองค์ประกอบย่อย (Minor) (Kitchen, 1981; Munro et al., 1984) ซึ่งในระหว่างที่โคเป็นเต้านมอักเสบเมื่อก่อนหน้านี้ อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การสังเคราะห์เคซีนและไขมันในต่อมน้ำนม (Mammary gland) จะลดลง (Kitchen, 1981) แต่จากการศึกษาของ Ma และคณะ (2000) พบการเพิ่มขึ้นของเปอร์เซ็นต์ Fat, Crude protein, Total protein และ Casein ในน้ำนมที่มาจากโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ การเพิ่มขึ้นนี้เป็นผลมาจากปริมาณน้ำนมในโคป่วยเป็นเต้านมอักเสบลดลงกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังทำให้มีการลดลงของปริมาณ Lactose และ  $\alpha$  - lactalbumin เนื่องจากองค์ประกอบทั้งสองจะไหลออกจาก Alveolus ระหว่าง Epithelial cells และสามารถตรวจพบได้ในเลือดและปัสสาวะของโคที่ป่วยเป็นเต้านมอักเสบ (Harmon, 1994) ดังแสดงในตารางที่ 2.3 เป็นตัวอย่างของการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบน้ำนมในน้ำนมที่มีจำนวน SCC สูง

ตารางที่ 2.3 แสดงการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบน้ำนมเนื่องจากจำนวน Somatic cell

องค์ประกอบนม	เปอร์เซ็นต์		ร้อยละของสภาพโคที่เป็นปกติ
	น้ำนมปกติ	น้ำนมที่มี SCC สูง	
SNF	8.9	8.8	99
Fat	3.5	3.2	91
Lactose	4.9	4.4	90
Total protein	3.61	3.56	99
Total casein	2.8	2.3	82
Whey protein	0.8	1.3	162
Serum albumin	0.02	0.07	350
Lactoferrin	0.02	0.10	500
Immunoglobulins	0.10	0.60	600
Sodium	0.057	0.105	184
Chloride	0.091	0.147	161
Potassium	0.173	0.157	91
Calcium	0.12	0.04	33

ที่มา: Harmon (1994)

Ma และคณะ (2000) รายงานด้วยว่า ปริมาณ Acid degree value (ADV) ที่ใช้เป็นดัชนีวัดปฏิกิริยา Lipolysis ในน้ำนมที่มีจำนวน SCC สูงจะมีปริมาณประมาณ 1.6 เท่าของน้ำนมที่มีจำนวน SCC ต่ำ ปกติค่าเฉลี่ยของ ADV ของฟาร์มโดยทั่วไปจะอยู่ที่ประมาณ 0.80 - 1.20 meq ต่อ 100 กรัมของไขมัน (Bandler, 1982) แต่หากทำให้น้ำนมเย็นลงอย่างรวดเร็ว ADV จะมีปริมาณต่ำประมาณ 0.27 และ 0.43 meq ต่อ 100 กรัมของไขมัน ซึ่งจากค่าเฉลี่ยของ ADV ที่สูงขึ้นนี้ จะทำให้มีปริมาณของ Free fatty acid เพิ่มขึ้น เป็นสาเหตุทำให้เกิดปฏิกิริยา Lipolysis ในน้ำนม (Bachman et al., 1988) ซึ่งสอดคล้องกับ Jurczak และ Sciubisz (1981) ที่สรุปว่าในน้ำนมที่มีจำนวน SCC สูงกว่า 1,000,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จะพบ Free fatty acids ในปริมาณมาก และในการทดลองของ Santos และคณะ (2003) พบว่าผู้ทำการทดสอบ สามารถรับรู้ได้ถึงรส Off - flavors ในนมพาสเจอร์ไรส์ที่มี Free fatty acids 0.25 meq ต่อกิโลกรัม

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในส่วนของผลต่อการเกิดปฏิกิริยา Proteolysis ซึ่งโดยส่วนมากเอนไซม์ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยา Proteolysis คือ Plasmin และ Plasmin จะยังคงเหลืออยู่หลังการพาสเจอร์ไรส์ และคาดว่าปฏิกิริยา Proteolysis ยังคงดำเนินอยู่หลังการพาสเจอร์ไรส์ ผลที่ตามมาของปฏิกิริยา Proteolysis คือพบ Hydrophobic peptides ในน้ำนม ที่เป็นสาเหตุของรสขมในน้ำนม และพบว่า น้ำนมที่จำนวนจุลินทรีย์ต่ำจะเกิดปฏิกิริยา Proteolysis ได้น้อยกว่า ในส่วนของน้ำนมที่จำนวน SCC สูง จะพบว่าที่อายุการเก็บรักษานม 21 วัน จะมีรสขมมากกว่าน้ำนมที่มีจำนวน SCC ต่ำ ซึ่งจะพบว่ามีปัญหากับผลิตภัณฑ์นมที่มีอายุการเก็บรักษานาน เช่น นม Ultra high temperature (UHT) (Barbano et al., 1991)

ประเทศต่างๆ มีข้อกำหนดจำนวน SCC ที่มีคุณภาพเหมาะสมสำหรับการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์นม เช่นในประเทศสหรัฐอเมริกา กำหนดใน Grade "A" Pasteurized Milk Ordinance ว่าจำนวน SCC ในน้ำนมดิบต้องไม่เกิน 750,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในสหภาพยุโรป นิวซีแลนด์ และออสเตรเลีย ต้องการน้ำนมดิบที่มีจำนวน SCC น้อยกว่า 400,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แคนาดาน้อยกว่า 500,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (Sargeant et al., 1998; Norman et al., 2000; Schaik et al., 2005)

1.2.2 Standard plate count (SPC) เป็นตัวบ่งชี้จำนวน Aerobic bacteria ทั้งหมดในน้ำนม โดยวิธีการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อและบ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง การเจริญของแบคทีเรียเป็นทั้งแบบเซลล์เดี่ยว หรือแบบกลุ่ม ซึ่งจะนับทั้งหมดเป็น Colony forming units (cfu) ต่อมิลลิลิตร ซึ่งหากเก็บตัวอย่างน้ำนมที่สะอาดและจากแม่โคที่สุขภาพดีจำนวน SPC ไม่ควรเกิน 1,000 cfu ต่อมิลลิลิตร หรือควรจะน้อยกว่า 5,000 cfu ต่อมิลลิลิตร การที่พบจำนวน SPC สูงในน้ำมนั้นมาจากหลายสาเหตุ แต่สาเหตุหลักคือสุขลักษณะที่ไม่ดีในการรีดนม เช่น อุปกรณ์การรีดนมที่สกปรก นอกจากนี้การปฏิบัติที่ดีในการรวบรวมน้ำนมดิบก็เป็นการควบคุมจำนวน SPC ไม่ให้เพิ่มสูงขึ้น เช่น การทำให้น้ำนมเย็นลงอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และน้ำนมจากโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบก็มักจะมีจำนวน SPC สูงด้วยเช่นกัน

SPC เป็นดัชนีชี้วัดความสะอาดระหว่างการผลิตน้ำนมและการเก็บรักษา ซึ่งน้ำนมที่มีคุณภาพดีควรมีจำนวน SPC น้อยกว่า 5,000 cfu ต่อมิลลิลิตร และไม่ควรมีเกิน 10,000 cfu ต่อมิลลิลิตร ในน้ำนมรวมถัง (Jayarao and Wolfgang, 2003 อ้างโดย Elmoslemany et al., 2009)

1.2.3 Laboratory pasteurized count (LPC) เป็นวิธีการตรวจสอบคุณภาพน้ำนมดิบ เพื่อตรวจวัดจำนวน Thermotolerant bacteria ในน้ำนม ซึ่งจุลินทรีย์กลุ่มนี้สามารถทนอุณหภูมิพาสเจอร์ไรส์ได้ แต่ไม่สามารถเจริญหรือขยายพันธุ์ได้ในอุณหภูมิพาสเจอร์ไรส์ โดยการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ภายหลังการพาสเจอร์ไรส์ ที่อุณหภูมิ 62.8 องศาเซลเซียส เป็นการคำนวณว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เวลา 30 นาที ด้วยวิธีการนี้จะเป็นการทำลายจุลินทรีย์ก่อโรคในน้ำนม แต่จะคงเหลือจุลินทรีย์ที่สามารถทนความร้อน โดยทั่วไปแล้วจำนวน LPC ไม่ควรเกิน 200 cfu ต่อมิลลิลิตร การปนเปื้อนเข้าสู่ น้ำนมได้โดยผ่านภาชนะที่ไม่สะอาด กระบวนการล้างเครื่องมือและอุปกรณ์ในการผลิตนมอาจมี ปัญหา เช่น มีการรั่วของปั้มน้ำนม รวมทั้งอุปกรณ์ส่วนที่เป็นยาง เช่นปะเก็นต่างๆ เสื่อมสภาพ (Wehr and Frank, 2004)

Thermotolerant bacteria เป็นพวกเจริญในนมได้ช้า ไม่สามารถเปลี่ยนสี เมททีลีนบลู และไม่สามารถสร้างกรดได้มาก จึงไม่ทำให้นมเสียแบบเปรี้ยว (Sour curding) แต่สามารถสร้าง Rennet - like - enzyme ซึ่งสามารถทำให้นมเสียแข็งตัวแต่ไม่เปรี้ยว (Sweet curding) ตัวอย่างเช่น พวกสร้างสปอร์ เช่น *Bacillus subtilis* และ *Bacillus cereus* นอกจากนี้ จะทำให้นมแข็งตัวแล้ว ยังอาจทำให้นมมีรสขม (Bitter flavors) ทั้งนี้เพราะสามารถ Hydrolyze โปรตีนเป็น Peptone ได้ Thermotolerant bacteria พบได้ 5 genera คือ

- Micrococcus เป็นเซลล์เดี่ยวหรือเซลล์คู่ กลมๆ ไม่เป็นเส้นยาว แต่เป็นเส้นสั้นๆ อาจต่อกันเพียง 2 เซลล์เท่านั้น มีบางชนิดที่โคโลนีเป็นสีชมพู เหลือง หรือสีขาว ขนาดใหญ่กว่าโคโลนีของแบคทีเรียที่สร้างกรด เช่น *Micrococcus varians* สร้างกรดได้เล็กน้อย *Micrococcus luteus* สร้างกรดเล็กน้อย และทำให้นมเป็นวุ้น (Gelation)
- Streptococci เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างกลมรูปไข่ จับกันเป็นคู่ หรือรูปโซ่สั้น เช่น *Streptococcus thermophilus* และ *Streptococcus bovis* เป็นต้น
- Bacillus เป็นพวกสร้างสปอร์ทนร้อนได้ และเป็น Aerobic spore forming rod ในกลุ่มนี้มีแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคที่สำคัญคือ *Bacillus anthracis* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคแอนแทรกซ์ และชนิดอื่นๆ เช่น *Bacillus subtilis* และ *Bacillus cereus* ซึ่งแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้เป็นพวกสร้างสปอร์ทนร้อน เป็นแบคทีเรียที่ Hydrolyze โปรตีนให้เป็น Peptone ที่มีรสขม (Bitter)
- Microbacterium เป็นแบคทีเรียขนาดเล็ก เซลล์เดี่ยว ยาวเพียง 1 ไมครอน เช่น *Microbacterium lactic*
- Gram negative rod เป็นพวก Non spore forming rod พวกที่ทนร้อนได้ดี ได้แก่ *Lactobacillus casei* เป็นแบคทีเรียที่มีประโยชน์ใช้เป็น Starter culture และพวก *Coli aerogenes* ซึ่งโดยปกติเป็นแบคทีเรียที่ไม่ทนร้อน แต่มีบาง Stain ที่ทนร้อนเป็น Thermotolerant bacteria มักจะ Ferment lactose ได้ Acetic acid, Lactic acid, Ethanal และ CO<sub>2</sub>

1.2.4 Preliminary incubation count (PIC) เป็นการประมาณการจำนวน Psychrotrophic ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีในอุณหภูมิต่ำ การตรวจวัด PIC นี้ ช่วยบ่งชี้การปฏิบัติต่อน้ำนมดิบในฟาร์ม และการเก็บรักษาน้ำนมของศูนย์รวมนม โดยวิธีการนำน้ำนมไปเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ก่อนนำมาเพาะเชื้อ (Wehr and Frank, 2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Psychrotrophic bacteria เจริญได้ในอุณหภูมิต่ำกว่า 15 องศาเซลเซียส และบางสายพันธุ์เจริญได้ในอุณหภูมิต่ำกว่า 4 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 20 ถึง 30 องศาเซลเซียส เป็นพวก Gram negative Non - spore forming rod ตามปกติเป็นพวกที่ไม่ทนความร้อน ส่วนใหญ่พบปนเปื้อนภายหลังการพาสเจอร์ไรส์ ปกติไม่สามารถสร้างกรดได้ (หรือสร้างได้น้อย) แต่สามารถสร้าง Rennet - like - enzyme ซึ่งทำให้นมแข็งตัว เสียแบบ Sweet curdling สามารถผลิต Proteases และ Lipases ทำลายโปรตีนและไขมัน ทำให้เกิด Taints ต่างๆ ในนมได้มาก เช่น กลิ่นหืน รสขม นอกจากนี้ยังสร้าง Enzymes ที่ทนร้อนเป็นสาเหตุให้เกิด Off - flavors และการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ในผลิตภัณฑ์นม UHT เช่นการ Hydrolyze โปรตีนทำให้เกิดรสขม (Bitter) จำนวน Psychrotrophic ที่มากกว่า  $5 \times 10^5$  cfu ต่อ มิลลิลิตร จะทำให้เกิดความผิดปกติในน้ำนม โดยเฉพาะในเขตร้อนหากระยะเวลาการขนส่งน้ำนมนานเกินไป ทำให้อุณหภูมิในการเก็บรักษาน้ำนมสูงขึ้น หากประกอบด้วยการปนเปื้อน เช่นจากน้ำ จะทำให้มีการเพิ่มจำนวนของ Gram negative อาจทำให้น้ำนมเน่าเสียแบบ Sweet curdling Psychrotrophic bacteria ที่สำคัญพบที่สำคัญ 4 Genera ได้แก่ (Walstra et al., 2006)

- Pseudomonas ผลิต Peptone จากการ Hydrolyze โปรตีน ทำให้น้ำนมและผลิตภัณฑ์นมมีรสขม
- Achromobacter เป็นพวก Hydrolyze ไขมันนมเกิดกลิ่นหืนเนื่องจากกรด Butyric กระจายออกมา เช่น *Achromobacter lipolyticum*
- Flavobacterium เป็นพวกชอบขึ้นที่ผิวของเนยเหลว ทำให้เกิดกลิ่นบูด (Putrid odor)
- Alcaligenes เป็นพวก Gram negative Rod shape non motile บางชนิดสร้างแคปซูล เจริญได้ดีในอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส มักทำให้นมเป็นฝ้า (Skin) ทำให้นมเสียแบบเป็นเส้นๆ (Ropiness) ทำให้เกิดชั้นของครีม (Cream layer) ทำให้นมมีฤทธิ์เป็นด่าง ตัวอย่างเช่น *Alcaligenes viscolactis*, *Alcaligenes viscosus* และ *Alcaligenes metalcaligenes*

1.2.5 Coliform count (CC) เป็นดัชนีชี้วัดการปนเปื้อนมูลโค หรือการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อม โดยวิธีการเพาะเลี้ยงใน Violet Red Bile agar หรือ MacConkey's agar และบ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งจำนวน Coliform ในน้ำนม เป็นการแสดงถึงกระบวนการผลิตมีสุขลักษณะที่ไม่ดี เพราะการปนเปื้อน Coliform ในน้ำนมมักเกิดจากความสกปรกของโค หรือการที่มีมูลโคปนเปื้อนลงในน้ำนมระหว่างการรีดนม จำนวน Coliform ที่มากกว่า 100 cfu ต่อ มิลลิลิตร แสดงให้เห็นถึงการปฏิบัติการการรีดนมที่ไม่ถูกต้อง เช่น เครื่องมืออุปกรณ์ไม่สะอาด มีการปนเปื้อนน้ำที่ใช้ในฟาร์ม หรือมีโคป่วยเป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ หรือแสดงอาการ โดยมีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Coliform (Walstra et al., 2006)

## 2. ความสัมพันธ์ระหว่างดัชนีชี้วัดคุณภาพน้ำนมดิบ กับการจัดการการรีดนม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิตน้ำนมดิบคุณภาพดีจากฟาร์มนั้น สิ่งสำคัญคือการทำให้อาจไม่มีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ และสารเคมีในน้ำนมดิบ ในส่วนของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำนมดิบนั้นมาจาก 3 แหล่งด้วยกัน คือ 1) จากสิ่งแวดล้อม 2) จากการติดเชื้อในเต้านมโค และ 3) จากจุลินทรีย์ที่พบเป็นปกติในเต้านมโค ซึ่งโดยส่วนมากจุลินทรีย์ในน้ำนมมักมาจากสิ่งแวดล้อม ซึ่งเกี่ยวข้องกับการปฏิบัติการการรีดนมของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมเอง เช่น เรื่องความสะอาดของเครื่องมือ อุปกรณ์ ขั้นตอนการรีดนม และการขนส่ง รวมทั้งการปฏิบัติต่อน้ำนมภายหลังการรีดนม (Murphy and Boor, 2000)

2.1 การกำหนดมาตรฐานของจำนวน SPC, LPC, PIC และ Coliform

การกำหนดมาตรฐานของจำนวน SPC, LPC, PIC และ Coliform ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์และความต้องการของผู้ที่จะนำน้ำมนั้นไปใช้ ทั้งนี้อาจนำมาตรฐานตามที่กฎหมายกำหนดมาใช้เป็นเบื้องต้น แต่ทั้งนี้การตรวจสอบคุณภาพน้ำนมอย่างสม่ำเสมอจะช่วยให้มีการนำไปใช้ในการพัฒนาการจัดการฟาร์มของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนม ตัวอย่างเช่นในประเทศสหรัฐอเมริกา ได้แนะนำการกำหนดมาตรฐานของดัชนีชี้วัดคุณภาพน้ำนมทางด้านชีววิทยาดังแสดงในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 แสดงการแนะนำมาตรฐานด้านจุลชีววิทยาสำหรับน้ำนมดิบเกรดดีมาก (Premiums) ในประเทศสหรัฐอเมริกา

วิธีวิเคราะห์	มาตรฐานที่แนะนำ <sup>1</sup>	มาตรฐานกฎหมาย <sup>1</sup>
Standard Plate Count	< 10,000	≤ 100,000
Laboratory Pasteurization Count	< 200 - 300	ไม่กำหนด
Preliminary Incubation Count	50,000 - 100,000	ไม่กำหนด
Coliform Bacteria Count	< 50	California (< 750)

หมายเหตุ: <sup>1</sup> จำนวนแบคทีเรียในหน่วย cfu ต่อมิลลิลิตร

ที่มา: Murphy และ Boor (2000)

2.2 สาเหตุของการปนเปื้อนแบคทีเรียในน้ำนมดิบ การปนเปื้อนแบคทีเรียในน้ำนมดิบ ส่วนมากเกิดจากสาเหตุดังต่อไปนี้

2.2.1 การปนเปื้อนของแบคทีเรียจากในเต้านมโค น้ำนมเมื่อรีดออกจากเต้านมโคที่สุขภาพดีนั้นจะมีจำนวนจุลินทรีย์ไม่เกิน 100 cfu ต่อมิลลิลิตร (Walstra et al., 2006) และในโคที่สุขภาพดีนี้แบคทีเรียที่บริเวณ Teat cistern และ Teat canal จะไม่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของจำนวน LPC, PIC และ Coliform ในระหว่างการเก็บรักษาน้ำนมดิบ และไม่ส่งผลให้น้ำนมรวมถึงมีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้น แต่ในโคที่ป่วยเป็นเต้านมอักเสบนั้นจะทำให้น้ำนมมีจำนวนแบคทีเรียสูง และพบแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบในน้ำนม ซึ่งขึ้นอยู่กับระยะของการติดเชื้อ และเปอร์เซ็นต์ของการติดเชื้อในฝูงโค โดยอาจทำให้น้ำนมมีจำนวนแบคทีเรียสูงถึง 10<sup>7</sup> cfu ต่อมิลลิลิตร เมื่อมีจำนวนโครีดนมที่มีจุลินทรีย์สูงอย่างน้อย 1 เปอร์เซ็นต์ในฝูง และนำน้ำมนั้นรวมกับน้ำนมทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของฟาร์มจะทำให้จำนวนรวมถึงมีจำนวนแบคทีเรียประมาณ  $10^5$  cfu ต่อมิลลิลิตร (Murphy and Boor, 2000)

**2.2.2 การติดเชื้อเต้านมอักเสบในโครีดนม** แบคทีเรียที่ก่อโรคเต้านมอักเสบที่พบบ่อยและทำให้จำนวนแบคทีเรียในน้ำนมดิบเพิ่มสูงขึ้น ได้แก่ กลุ่ม *Streptococcus spp.* เช่น *Streptococcus agalactiae* และ *Streptococcus uberis* (Jeffrey and Wilson, 1987) แต่ *Staphylococcus aureus* กลับไม่เป็นสาเหตุให้จำนวนแบคทีเรียในน้ำนมเพิ่มสูงขึ้น (Gonzalez et al., 1986) นอกจากนี้จุลินทรีย์ก่อโรคเต้านมอักเสบชนิดอื่นก็เป็นสาเหตุที่ทำให้จำนวนแบคทีเรียในน้ำนมรวมถึงเพิ่มสูงขึ้นด้วยเช่นกัน

การปนเปื้อนแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบจากสิ่งแวดล้อมนั้น มักมาจากโคที่สกปรก การดูแลเครื่องมือ อุปกรณ์ และการทำความสะอาดที่ไม่ดีพอ ในบางครั้งจำนวน SCC ที่สูงขึ้นก็ทำให้จำนวนแบคทีเรียในน้ำนมรวมถึงสูงขึ้นด้วย อย่างไรก็ตามการปนเปื้อนแบคทีเรียจากสิ่งแวดล้อมเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้จำนวนแบคทีเรียในน้ำนมเพิ่มสูงขึ้น (Bramley, 1982; Zehner et al., 1986) ตัวอย่างเช่น *Streptococcus agalactiae* และ *Streptococcus uberis* นั้นไม่สามารถเจริญบนคราบสกปรกของภาชนะที่ใช้ในการรีดนมได้หรือภายใต้สภาวะที่การทำความสะอาดไม่ดีพอ แต่การพบแบคทีเรียเหล่านี้ในน้ำนมแสดงให้เห็นว่าโคนั้นมีการติดเชื้อ (Gonzalez et al., 1986) ซึ่งโดยทั่วไปแล้ว จุลินทรีย์ที่ก่อโรคเต้านมอักเสบจะไม่ส่งผลต่อจำนวน LPC หรือ PIC ยกเว้นในบางกรณีที่เกิดโรคเต้านมอักเสบเกิดจากแบคทีเรียกลุ่ม Coliform ซึ่งจะทำให้การตรวจนับแบคทีเรีย Coliform ในน้ำนมเพิ่มสูงขึ้นได้

**2.2.3 การปนเปื้อนจากภายนอกเต้านมโค** ที่เต้านมโค หรือผิวหนังบริเวณหัวนมโคนั้นจะมีจุลินทรีย์อยู่ตามธรรมชาติ (Natural flora) เหมือนกับบริเวณอื่นที่พบได้ เช่น ในคอกพัก หรือคอกรีดนม แต่โดยทั่วไปแล้ว การปนเปื้อนของแบคทีเรียตามธรรมชาติเหล่านี้ลงในน้ำมนั้นไม่ส่งผลกระทบมากนัก และจุลินทรีย์เหล่านี้ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในน้ำนม แต่สิ่งที่สำคัญที่ทำให้แบคทีเรียจากเต้านมโคเป็นสาเหตุให้น้ำนมถึงรวมเพิ่มสูงขึ้น คือการที่เต้านมโคสกปรกจากมูลโค ดิน โคลน อาหาร หรือวัสดุที่รองนอนของโค

ความสกปรกของเต้านมโคเป็นสิ่งที่หลีกเลี่ยงได้ยาก โดยเฉพาะเมื่อโคนอนในบริเวณที่เป็นดิน หรือเป็นโคลน ซึ่งเป็นอาจพบแบคทีเรียจำนวนมากถึง  $10^8 - 10^{10}$  ต่อกรัม (Bramley, 1982; Hogan et al., 1989; Zehner et al., 1986) แบคทีเรียที่มักพบปนเปื้อนที่หัวนมและเต้านมโคจากวัสดุรองนอนคือ Streptococci, Staphylococci, Spore - formers, Coliforms และกลุ่ม Gram - negative ซึ่งจะพบทั้งกลุ่ม Thermotolerant และ Psychrotrophic ดังนั้นการปนเปื้อนแบคทีเรียจากเต้านมและหัวนมโคจะมีผลให้จำนวน LPC, PIC และ Coliform ในน้ำนมเพิ่มจำนวนขึ้นด้วย (Murphy and Boor, 2000) เอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สิ่งสกปรกที่ติดอยู่บริเวณเต้านมโค สามารถทำให้หมดไปได้โดยการล้างทำความสะอาดเต้านมโคก่อนการรีดนมด้วย การรีดนมต่างๆ ที่หัวนมยังมีสิ่งสกปรกติดอยู่ จะทำให้น้ำนมรวมมีแบคทีเรียเพิ่มขึ้นถึง  $10^4$  cfu ต่อมิลลิลิตร จากการศึกษาของนักวิจัยหลายท่าน พบว่าเทคนิคการปฏิบัติต่อเต้านมก่อนการรีดนมส่งผลต่อจำนวนแบคทีเรียในน้ำนมรวมถึง (Galton et al., 1984; McKinnon et al., 1990; Pankey, 1989) ซึ่งการทำความสะอาดเต้านมโคด้วยสารหรืออุปกรณ์ทำความสะอาด เช่น สเปรย์ ผ้าเปียก หรือการ Dip แล้วตามด้วยผ้าแห้งก็สามารถลดจำนวนแบคทีเรียลงได้ (Galton et al., 1984)

**2.2.4 การทำความสะอาด และฆ่าเชื้ออุปกรณ์** การทำความสะอาดและฆ่าเชื้อเครื่องมืออุปกรณ์ในการรีดนมส่งผลต่อจำนวนแบคทีเรียของน้ำนมรวมถึงเป็นอย่างมาก แต่ก็ไม่มากไปกว่าปัจจัยอื่น ควรจะหลีกเลี่ยงการให้นมสัมผัสกับสิ่งที่จะทำให้จำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้น ถึงแม้แบคทีเรียมีอยู่ตามธรรมชาติของเต้านมจะไม่สามารถเจริญเติบโตในน้ำนมได้ แต่สิ่งสกปรกที่ติดอยู่กับเต้านม และจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อโรคเต้านมอักเสบที่มีสาเหตุจากแบคทีเรียที่มาจากสิ่งแวดล้อม เช่น Coliforms นั้นสามารถเจริญเติบโตได้ดีในบริเวณพื้นผิวสัมผัส นอกจากนี้น้ำที่ใช้ในฟาร์มก็เป็นแหล่งของการปนเปื้อนแบคทีเรียที่สำคัญ โดยเฉพาะพวก Psychrotrophs ซึ่งสามารถตกค้างอยู่ตามภาชนะหรืออุปกรณ์การรีดนมได้ (Murphy and Boor, 2000)

วิธีการทำความสะอาดและฆ่าเชื้ออุปกรณ์ในการรีดมนั้น ควรพิจารณาถึงความเหมาะสมกับการเจริญของแบคทีเรียแต่ละกลุ่มด้วย เช่น จุลินทรีย์กลุ่ม Thermophilic นั้นเป็นจุลินทรีย์ที่ทนร้อน อาจปนเปื้อนในอุปกรณ์ที่ใช้การฆ่าเชื้อด้วยน้ำร้อน รวมถึงอุปกรณ์ส่วนที่เป็นยาง หากไม่ได้เปลี่ยนตามอายุการใช้งานจะเป็นที่สะสมของพวก Thermophilic ได้เช่นเดียวกัน ซึ่งเมื่อปล่อยให้เกิดการสะสมเป็นเวลานานจะเป็นสาเหตุที่ทำให้จำนวนจุลินทรีย์ในน้ำนมรวมถึงเพิ่มสูงขึ้นได้ และยังมีส่วนทำให้จำนวน LPC เพิ่มขึ้นด้วย การทำความสะอาดที่ไม่มีประสิทธิภาพ และการใช้อุณหภูมิในการฆ่าเชื้อที่ต่ำเกินไป จะยังเป็นการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตได้ดีในอุณหภูมิสูง โดยเฉพาะพวก Gram-negative rods (Coliforms และ Pseudomonads) และ Lactic streptococci (Murphy and Boor, 2000) ส่วนการใช้คลอรีน และไฮโดรเจน เพอร์ออกไซด์ อย่างมีประสิทธิภาพจะช่วยลดการปนเปื้อนจุลินทรีย์กลุ่ม Psychrotrophic (Jackson and Clegg, 1965)

**2.2.5 อุณหภูมิและระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำนมดิบ** การเก็บรักษาน้ำนมดิบโดยใช้ความเย็นนั้นจะช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่ม Non - psychrotrophic ดังนั้นการป้องกันการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์กลุ่ม Psychrotrophic ในระหว่างการเก็บรักษาน้ำนมดิบของนมรวมถึงคือการปฏิบัติดูแลอุปกรณ์เครื่องมือในการรีดนมไม่ให้สกปรก แต่โดยทั่วไปแล้วจุลินทรีย์กลุ่ม Psychrotrophic จะไม่ทนความร้อน และตายที่อุณหภูมิพาสเจอร์ไรส์ แต่การที่เก็บน้ำนมไว้นาน เช่น ประมาณ 5 วัน ก่อนเข้ากระบวนการผลิต จะเป็นการทำให้จำนวน Psychrotrophic เพิ่มจำนวนมากขึ้น โดยเฉพาะหากเก็บน้ำนมที่อุณหภูมิประมาณ 7.2 องศาเซลเซียส จะยังเป็นการเพิ่มจำนวน Psychrotrophic มากกว่าการไม่ทำการใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เก็บที่ 4.4 องศาเซลเซียส โดยปกติน้ำนมที่เก็บที่อุณหภูมิ 4.4 องศาเซลเซียส จะมีจำนวน Psychrotrophic น้อยกว่า 10 เพอร์เซ็นต์ แต่หากเก็บน้ำนมไว้ 2 - 3 วัน จะพบจุลินทรีย์กลุ่ม Psychrotrophic เป็นกลุ่มหลักในน้ำนม (Murphy and Boor, 2000)

ภายใต้การเก็บรักษาน้ำนมที่อุณหภูมิ 7.2 องศาเซลเซียส แบคทีเรียกลุ่มอื่นๆ อาจเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ซึ่งมักเกิดขึ้นในระหว่างการขนส่งน้ำนมดิบ ที่พบมากคือ การเพิ่มจำนวนของ Streptococci ซึ่งทำให้เกิดกรดในน้ำนม บางสายพันธุ์ ทำให้เกิดกลิ่นที่ผิดปกติประเภท "Malty defect" โดยเฉพาะหากอุณหภูมิการเก็บรักษาน้ำนมดิบสูงเกินกว่า 15 องศาเซลเซียส จะมีแนวโน้มการเกิดมากขึ้น (Murphy and Boor, 2000) จึงสรุปได้ว่าการทำความเย็นที่ไม่มีประสิทธิภาพจะทำให้มีการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่ม Non - psychrotrophic แต่ก็ไม่สามารถป้องกันการเจริญของ Psychrotrophic ได้ ดังนั้นประสิทธิภาพการทำความเย็นที่ไม่ดีจะทำให้จำนวนจุลินทรีย์ในน้ำนมรวมถึงเพิ่มสูงขึ้น (Murphy and Boor, 2000)

ตารางที่ 2.5 แสดงสาเหตุของการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในน้ำนมดิบตามวิธีวิเคราะห์

วิธีวิเคราะห์	จุลินทรีย์ตามธรรมชาติ	โรคเต้านมอักเสบ	โคที่สกปรก	อุปกรณ์ที่สกปรก	การขาดประสิทธิภาพของการทำความเย็น
SPC >10,000	อาจจะไม่	เป็นไปได้	เป็นไปได้	เป็นไปได้	เป็นไปได้
SPC >100,000	อาจจะไม่	เป็นไปได้ (น้อย)	อาจจะไม่	เป็นไปได้*	เป็นไปได้*
LPC >200 - 300	อาจจะไม่	อาจจะไม่	เป็นไปได้	เป็นไปได้*	อาจจะไม่
PIC สูง ร่วมกับ SPC	อาจจะไม่	อาจจะไม่	เป็นไปได้	เป็นไปได้*	เป็นไปได้*
SPC สูง แต่ไม่พบการเพิ่ม PIC	อาจจะไม่	เป็นไปได้	เป็นไปได้	เป็นไปได้	อาจจะไม่
Coliform Count สูง	อาจจะไม่	เป็นไปได้ (น้อย)	เป็นไปได้	แต่อาจจะไม่	แต่เป็นไปได้
				แต่อาจจะไม่	แต่เป็นไปได้
				เป็นไปได้	อาจจะไม่
					แต่เป็นไปได้

หมายเหตุ: \* แหล่งที่มาที่มีแนวโน้มมากขึ้น

ที่มา : Murphy และ Boor (2000)

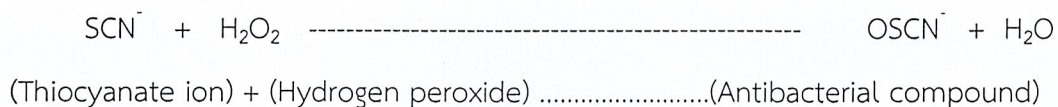
### 3. ระบบ Lactoperoxidase

#### 3.1 ระบบและการทำงานของ Lactorperoxidase

เอนไซม์ Lactoperoxidase เป็นเอนไซม์ที่พบโดยธรรมชาติในน้ำนมดิบ ซึ่งมีปริมาณประมาณ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ในน้ำนมโค ทำงานต้านหรือทำลายจุลินทรีย์โดยการออกซิไดซ์

Thiocyanate ในสภาพที่มี Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) ทำให้เกิดสารประกอบที่สามารถต่อต้านการเจริญเติบโต และทำลายจุลินทรีย์ในน้ำนม แสดงดังสมการ (FAO,2003)

#### Lactoperoxidase



โดยมีการนำไปใช้ในการเก็บรักษาน้ำนมดิบในพื้นที่ห่างไกล และขาดเทคโนโลยีในการทำ ความเย็น การทำงานของระบบ Lactoperoxidase ในน้ำนมมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ (Seifu et al., 2005) จากการศึกษาของ Haddadin และคณะ (1996) พบว่าการกระตุ้นระบบ Lactoperoxidase ด้วยการเติม Sodium thiocyanate และ Sodium percarbonate เพื่อเป็นแหล่งของ  $SCN^-$  และ  $H_2O_2$  ในอัตราส่วน 15:10 มิลลิกรัมต่อลิตร จะสามารถยืดอายุการเก็บรักษาน้ำนมดิบที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้หลายวัน และสามารถเก็บที่อุณหภูมิห้องได้ 18 ชั่วโมง สอดคล้องกับ FAO (2003) ที่รายงานว่า ระบบ Lactoperoxidase สามารถยืดอายุการเก็บรักษาน้ำนมดิบได้ 7 – 8 ชั่วโมงระหว่างการขนส่งมายังโรงงานแปรรูป

ได้มีการศึกษาวิจัยความสามารถในการลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ของระบบเอนไซม์ Lactoperoxidase ในน้ำนมที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นแตกต่างกัน และทดสอบว่าการลดลงของเชื้อจุลินทรีย์เกิดจากประสิทธิภาพของระบบเอนไซม์ Lactoperoxidase เท่านั้นไม่ใช่เกิดจากฤทธิ์ของสารเคมีที่เติมลงไป ในน้ำนมโดยใช้วิธีการทดลองการกระตุ้นระบบเอนไซม์ Lactoperoxidase เรณู และเกตุการ (2546) รายงานว่าระบบ Lactoperoxidase เป็นระบบการป้องกันการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำนมดิบตามธรรมชาติ เป็นการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ Lactoperoxidase, Thiocyanate และ Hydrogenperoxide โดยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่เจริญที่อุณหภูมิต่ำ

จากการศึกษาของเรณู และเกตุการ (2549) กล่าวว่า การกระตุ้นระบบเอนไซม์ Lactoperoxidase ในน้ำนมดิบที่อุณหภูมิ  $37 \pm 1$  องศาเซลเซียส สามารถลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียในน้ำนมดิบที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น  $5.56 \log \text{ cfu/ml}$  ลงได้ ทำให้สามารถเก็บน้ำนมดิบไว้ที่อุณหภูมิ  $37 \pm 1$  องศาเซลเซียส ได้นานมากขึ้นกว่าเดิมประมาณ 2 เท่า คือจากเดิม 2 ชั่วโมงเป็น 4 ชั่วโมง แต่ไม่สามารถลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ได้ในน้ำนมที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นสูง  $6.86 \log \text{ cfu/ml}$  การเพิ่ม Hydrogen peroxide ในน้ำนมช่วยยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียในน้ำนมได้ จึงต้องระมัดระวังในการใช้ คือใช้ในปริมาณต่ำที่เพียงพอต่อการกระตุ้นระบบเอนไซม์ Lactoperoxidase เท่านั้น

ถ้าใช้ปริมาณสูงการลดลงของเชื้ออาจเกิดจากสาร Hydrogen peroxide ไม่ได้เกิดจากระบบเอนไซม์ Lactoperoxidase และการเพิ่มปริมาณ Thiocyanate เพียงอย่างเดียวไม่ช่วยในการ

ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำนมดิบ รวมถึงการกระตุ้นระบบเอนไซม์ Lactoperoxidase ในน้ำนมที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นสูง คือ 6.86 log cfu/ml สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียได้โดย เชื้อจะเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างช้าๆ ดังนั้นการใช้ระบบ Lactoperoxidase ในการเก็บรักษาคุณภาพน้ำนมดิบที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นสูง คือ 6.86 log cfu/ml นั้นไม่ได้ทำให้คุณภาพน้ำนมดิบดีขึ้น เพราะปริมาณของเชื้อไม่ได้ลดลงจากเดิมระบบ Lactoperoxidase มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในน้ำนมที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่ำ คือ 5.56 log cfu/ml ได้ดีกว่าน้ำนมดิบที่มีเชื้อเริ่มต้นสูง คือ 6.86 log cfu/ml อาจเป็นผลมาจากเอนไซม์ Lactoperoxidase สามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้เพียงบางส่วนเท่านั้นจึงยังคงมีเชื้อจุลินทรีย์หลงเหลืออยู่เป็นจำนวนมาก และสามารถเพิ่มจำนวนได้

สาร Thiocyanate เป็นส่วนหนึ่งของระบบ Lactoperoxidase ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งหรือทำลายเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดที่ปนเปื้อนในน้ำนม และสามารถกระตุ้นประสิทธิภาพของระบบได้โดยการเพิ่มปริมาณของ Thiocyanate จึงได้ทำการศึกษาผลของปริมาณ Thiocyanate ต่อความถูกต้องของการตรวจยาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมดิบโดยชุดทดสอบ โดยทำการตรวจวัดปริมาณ Thiocyanate ในตัวอย่างน้ำมน้ำนม ผลปรากฏว่าก่อนการทดลองน้ำนมดิบทั้ง 3 ตัวอย่างมีปริมาณ Thiocyanate อยู่ในเกณฑ์ปกติไม่เกิน 5 ppm (Bjorck et al., 1978 อ้างโดย วงศ์อนันต์ และคณะ, 2549) การเติมสาร Sodium percarbonate ในน้ำนมสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้เนื่องจากการแตกตัวให้ Hydrogen peroxide ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น Oxidizing agent โดย Hydrogen peroxide แตกตัวเป็นน้ำและ Hydroxyl ion ( $\text{OH}^-$ ) เข้าไปทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนไอออนของโปรตีนของแบคทีเรียและยังทำให้เกิด Hydroxyl radical ขึ้นมาทำลายเซลล์ได้ (Tortora et al., 1995) และพบว่าการเติมสาร Sodium thiocyanate เพียงอย่างเดียว ไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำนมดิบได้เลย

### 3.2 การนำระบบ Lactoperoxidase ไปใช้ประโยชน์

จากการศึกษาของ Seifu และคณะ (2005) รายงานว่าระบบ Lactoperoxidase ที่ให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูง สามารถทำลายเชื้อ *L. monocytogenes* และ *S. aureus* สามารถฆ่าเชื้อที่ปรากฏขึ้นได้อย่างรวดเร็ว หลังจากให้ความร้อนจะทำให้เชื้อจุลินทรีย์สูญเสียสภาพการทำงาน ถ้าให้ความร้อนเพิ่มเกินขอบเขตจะทำให้เอนไซม์ในระบบ Lactoperoxidase สูญเสียสภาพการทำงาน ซึ่งจะมีผลทำให้เชื้อจุลินทรีย์ก่อเชื้อโรคขึ้นใหม่ได้ (จุลินทรีย์ที่ทนความร้อน) การใช้ประโยชน์จากระบบ Lactoperoxidase ได้ถูกแนะนำให้ใช้กันมากในการทำอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์นม ซึ่งระบบ Lactoperoxidase จะช่วยยืดอายุการเก็บรักษาน้ำนมดิบ โดยระบบ Lactoperoxidase จะถูกกระตุ้นให้เกิดการทำงานโดยการให้ความร้อน จะมีผลให้สามารถยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ได้นานขึ้น

Korhonen (1986) อ้างโดย Seifu และคณะ (2005) รายงานว่าระบบ Lactoperoxidase จะทำการรักษาคุณภาพน้ำนมในโค หลังจากการพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส 30 นาที หรือ 72 องศาเซลเซียส 15 วินาที และถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 1 นาที

เซลเซียส 2.5 วินาที เช่นเดียวกับการศึกษาของ Seifu และคณะ (2005) ที่เห็นด้วยกับข้อเท็จจริงนี้ และทำการพาสเจอร์ไรส์น้านมโคที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส พบว่าไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้หมด ในน้านม แต่หลังจากการพาสเจอร์ไรส์ Lactoperoxidase ที่เหลือยังมีบทบาทในการรักษาคุณภาพของ น้านม อย่างไรก็ตามการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 73 องศาเซลเซียส 25 วินาที สามารถยับยั้งเชื้อ แบคทีเรียในน้านมเบื้องต้นได้

ความเข้มข้นปกติของ Lactoperoxidase ในน้านมโค และแกะมีปริมาณสูงกว่าปริมาณ ขั้นต่ำที่ต้องการเพื่อดำเนินการทำงานของแบคทีเรีย สิ่งที่เป็นปัจจัยที่เป็นตัวกำหนดคือ Thiocyanate และ Hydrogen peroxide (Haddadin et al., 1996) ในบางกรณี Thiocyanate ที่มีในน้านมโคในระดับ ที่เพียงพอต่อการต้านทานเชื้อโรคมีสู่ถึง 15 mg/l (Reiter, 1985 อ้างโดย Haddadin et al., 1996) ในขณะที่ Medina และคณะ (1989) อ้างโดย Haddadin และคณะ (1996) รายงานว่า ในน้านมแกะระดับของ Thiocyanate สามารถลดลงถึง 0.4 mg/l ดังนั้นถ้าความเข้มข้นของ Thiocyanate และ Hydrogen peroxide ในน้านมมีค่าที่ได้มาตรฐานก็จะทำให้อายุการเก็บรักษาน้า น้านมได้ ถึงแม้ว่าจะเก็บในอุณหภูมิห้องแล้วก็ตาม

ได้มีการประเมินความสามารถของระบบ Lactoperoxidase ต่อการยืดอายุการเก็บรักษาน้า น้านมแกะ และน้านมแพะที่เก็บรักษาในตู้เย็น และในอุณหภูมิห้องแล้วโดยใช้สัดส่วนของ Thiocyanate ต่อ Hydrogen peroxide ที่แตกต่างกันออกไป และใช้สารตั้งต้นในสัดส่วนที่เหมือนกัน ในน้านมโคเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบกับ โดยภาพรวมจากการทดลองแสดงให้เห็นว่า การทำงานของ ระบบ Lactoperoxidase ในน้านมดิบช่วยในการเก็บรักษาน้านมโค และแพะที่อุณหภูมิ 4 องศา เซลเซียสได้หลายวัน ความเข้มข้นของ Sodiumthiocyanate และ Hydrogen peroxide ที่สูงขึ้นให้ เพียงประสิทธิภาพแค่นี้อีกกว่าระดับต่ำสุดที่ใช้ในการทดลอง และที่ระดับ Thiocyanate ที่สูงถึง 15 mg/l และ Hydrogen peroxide ที่ 10 mg/l ของน้านมจะเพียงพอในการยืดเวลาการเก็บรักษาน้า น้านมไม่ให้เสียก่อนการนำไปใช้ในขบวนการผลิต (Bjork, 1979 อ้างโดย Haddadin et al., 1996)

และได้มีการสังเกตประโยชน์หลักที่ได้รับในการเก็บรักษาน้านมโคที่อุณหภูมิสูงขึ้น และดูการ เพิ่มระดับความเป็นกรดซึ่งพบว่าได้ถูกยับยั้งภายใน 18 ชั่วโมง ส่วนในน้านมแพะ และแกะที่ Cell count ที่ จุดเริ่มต้นสูง มีแนวโน้มที่ระบบ Lactoperoxidase จะไม่มีผลต่อการเก็บรักษาที่อุณหภูมิสภาพแวดล้อม แต่การพัฒนาความเป็นกรดถูกควบคุมได้หลายชั่วโมงเมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุมเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และมีสัดส่วนเป็น 15:10 (mg/l) ของ Thiocyanate : Hydrogen peroxide เป็นสัดส่วนที่แนะนำในการควบคุมคุณภาพของน้านมแกะ และแพะ (Haddadin et al., 1996)

Wolfson and Sumner (1993) กล่าวว่าเอนไซม์ Lactoperoxidase เป็น องค์ประกอบในกลุ่ม Peroxidase ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นในกระบวนการ Oxidation และ Reduction เป็นในน้านมดิบและยังต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ในน้านมดิบ (Naidu, 2000 อ้างโดย Seifu และคณะ 2005) อย่างไรก็ตามทั้งนี้ทั้งนั้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และคณะ, 2005) ซึ่งพบได้น้ำนมโค น้ำลาย น้ำตา สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พบในน้ำนมโคเพียง 30 mg/l โดยจะไม่สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียได้หมดและเมื่อโดนความร้อนจะไม่เปลี่ยนแปลงสภาพการทำงานเอนไซม์ Lactoperoxidase จะทำงานร่วมกับการพาสเจอร์ไรส์ ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เอนไซม์ Lactoperoxidase บางส่วนจะเสียสภาพการทำงานจำเป็นต้องเสริมตัวเร่งปฏิกิริยา เพื่อให้ระบบ Lactoperoxidase ทำงานให้ต่อเนื่อง

Siragusa and Johnson (1989) รายงานว่าระบบ Lactoperoxidase ให้ผลต้านจุลินทรีย์ด้วย OSCN<sup>-</sup> mediated oxidation ของโปรตีนที่จำเป็นและเอนไซม์ในกลุ่ม Sulfhydryl groups ผลิตภัณฑ์อื่นจากปฏิกิริยานี้ที่มีการทำงานต้านจุลินทรีย์เป็น HO<sub>2</sub>SCN และ HO<sub>3</sub>SCN ในน้ำนมดิบจากโค องค์ประกอบของ Lactoperoxidase และ Thiocyanate ของระบบ Lactoperoxidase ปกติพบว่ามีเพียงพอในการยับยั้งแบคทีเรีย ส่วน Hydrogen peroxide ปกติไม่ได้เริ่มมีในน้ำนมแต่แบคทีเรียที่ผลิต กรดแลคติกที่เกิดจากการปนเปื้อนหรือเติม Starter culture ที่สามารถสร้าง Hydrogen peroxide เมื่อความเข้มข้นของ Thiocyanate และ Hydrogen peroxide ในน้ำนมดิบเพิ่มประมาณ 0.3 mM ระบบ Lactoperoxidase ถูกกระตุ้นให้ทำงาน และให้ผลในการยับยั้งอันเกิดจาก OSCN<sup>-</sup> โดยขึ้นอยู่กับอุณหภูมิที่เก็บ ความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณจุลินทรีย์ที่มีอยู่

Haddadin et al. (1996) การใช้ประโยชน์จากระบบ Lactoperoxidase ได้ถูกแนะนำให้ใช้กันมากในการทำอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์นม ซึ่งระบบ Lactoperoxidase จะช่วยยืดอายุการเก็บรักษาน้ำนมดิบ โดยระบบ Lactoperoxidase จะถูกกระตุ้นให้เกิดการทำงานโดยการให้ความร้อนจะมีผลให้สามารถยืดอายุการเก็บรักษาผลผลิตได้นานขึ้น ความเข้มข้นปกติของ Lactoperoxidase ในน้ำนมโค และแกะมีปริมาณเพียงพอเพื่อต้านการทำงานของแบคทีเรีย สารที่ต้องการเพิ่มในระบบคือ Thiocyanate และ Hydrogen peroxide

จากการศึกษาของ Ryoba และคณะ (2003) อ้างโดย วงศ์อนันต์ และคณะ (2549) รายงานว่า Thiocyanate เป็นสารประกอบชนิดหนึ่งที่เกิดจากการ Metabolite เพื่อลดความเป็นพิษของสารไซยาโนจินิกไกลโคไซด์ (Cyanogenic glycoside) ซึ่งเป็นพิษ Cyanye ชนิดหนึ่งในพืชอาหารสัตว์ เช่น มันสำปะหลังพบ หญ้า กะหล่ำปลี พืชตระกูลถั่วบางชนิด และมันสำปะหลังตากแห้งซึ่งเป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์โดย Thiocyanate จะทำปฏิกิริยากับ Hydrogenperoxide ที่ผลิตจากแบคทีเรียในน้ำนม และถูก Oxidise ด้วยเอนไซม์ Lactoperoxidase ที่ร่างกายสร้างขึ้นโดย Hypothiocyanate ที่จะออกฤทธิ์ยับยั้งหรือทำลายเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดที่ปนเปื้อนในน้ำนม นอกจากนี้ปริมาณสาร Thiocyanate ในน้ำนมขึ้นอยู่กับอาหารที่ใช้เลี้ยงแม่โค ซึ่งปกติในน้ำนมดิบของโคตามธรรมชาติมี Thiocyanate อยู่ประมาณ 4 – 5 ppm (FAO, 1999 อ้างโดย เรณู และเกตุการ, 2546)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Siritunga และ Sayre (2003) รายงานว่าในไขมันสำปะหลังสดมีสารไซยาไนด์ 200 – 1,300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักแห้ง การนำไขมันสำปะหลังมาผึ่งแดดจะช่วยลดปริมาณ Cyanide ลงได้ ในไขมันสำปะหลังแห้ง มีกรด Hydrocyanic ปริมาณ 30.50 ppm ระดับความเป็นพิษของ Cyanide ที่ทำให้โค และแกะตาย (lethal dose) มีค่าเท่ากับ 2 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัวสัตว์ เอนไซม์ของจุลินทรีย์ใน รูเมน และเอนไซม์ของพืชที่โคกินเข้าไป จะเร่งปฏิกิริยาการสลายสาร Cyanogenic glucosides ใน ไขมันสำปะหลัง และในพืชหลายชนิด เกิดเป็น Cyanide และถูกดูดซึมได้อย่างรวดเร็ว และ ปริมาณ Thiocyanate ในน้ำนมดิบของแม่โคที่ได้รับไขมันสำปะหลังแห้ง 0, 1, 2 และ 3 กิโลกรัม/วัน มี ค่าเท่ากับ  $6.99 \pm 0.33$ ,  $13.57 \pm 0.23$ ,  $14.89 \pm 0.23$  และ  $15.90 \pm 0.12$  ppm ตามลำดับ และพบว่า จำนวนจุลินทรีย์รวมและ Coliform ในน้ำนมดิบของแม่โคกลุ่มที่ได้รับไขมันสำปะหลังแห้งลดลงมากกว่า กลุ่มที่ไม่ได้รับไขมันสำปะหลังตากแห้ง (สุริยวรรณ และคณะ ,2549)

## กิจกรรมที่ 2 : ผลของระบบ Lactoperoxidase ในน้ำนมต่อคุณลักษณะของโยเกิร์ต

เอนไซม์ Lactoperoxidase มีส่วนของการไปไฮเดรทอยู่ประมาณร้อยละ 10 ค่ากิจกรรมของ เอนไซม์ Lactoperoxidase จะขึ้นอยู่กับค่า pH ของน้ำนม ซึ่งเอนไซม์จะเสียสภาพ ธรรมชาติ (Denature) เมื่อ pH ต่ำกว่า 4 โดย pH ที่เหมาะสมกับการเกิดปฏิกิริยามากที่สุด คือ 6.7 เอนไซม์ Lactoperoxidase สามารถทนต่ออุณหภูมิการพาสเจอร์ไรส์ที่ 63 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หรือ 72 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที และถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 2.5 วินาที (Korhonen, 1980) กระบวนการทำงานของระบบ Lactoperoxidase นั้นเริ่มต้นจากเอนไซม์ Lactoperoxidase ไปออกซิไดส์ Thiocyanate (SCN<sup>-</sup>) โดยที่มี Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) เป็น ตัวรับอิเล็กตรอน (Electron acceptor) ซึ่งทำให้เกิดสารที่ทำหน้าที่ป้องกันเชื้อแบคทีเรียในน้ำนมดิบ คือ Hypothiocyanous acid (HOSCN) และ Hypothiocyanite (OSCN) (Seifu et al., 2005)

## ผลของความร้อนต่อการทำงานของระบบ Lactoperoxidase

การพาสเจอร์ไรส์นมเป็นกระบวนการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในน้ำนม และสามารถยืดอายุการเก็บรักษาน้ำนมโดยที่ยังคงคุณค่าอาหารของนมไว้ได้ ซึ่งอุณหภูมิที่สามารถ ฆ่า เชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคได้ คือ 72 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที นอกจากนี้การพาสเจอร์ไรส์ยังสามารถ หยุดการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ ในน้ำนมได้อีกด้วย จากการรายงานของ Marks และคณะ (2001) ที่ได้ทดลองใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 15 วินาที และที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เวลา 15 วินาที ในการพาสเจอร์ไรส์นมที่กระตุ้นด้วยระบบ Lactoperoxidase ที่มีการเติมจุลินทรีย์ *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* และ *Streptococcus thermophilus* พบว่าน้ำนมที่กระตุ้นด้วยระบบ Lactoperoxidase แล้วพาสเจอร์ไรส์โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที จะมีอายุการเก็บรักษาน้ำนมที่ยาวนานกว่าการพาสเจอร์ไรส์โดยใช้ความ ร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที และกลุ่มควบคุม เนื่องจากระบบ Lactoperoxidase มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ยังสามารถทำงานได้ จึงยังมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโต ของเชื้อจุลินทรีย์ รวมถึงลดการปนเปื้อนหลังการพาสเจอร์ไรส์ (Post - pasteurization contaminate) ได้อีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Khalid และ Tairgi (2004) ศึกษาผลของ Lactoperoxidase โดยการเติม  $H_2O_2$  และ NaSCN ในน้ำนมที่นำมาผลิตโยเกิร์ต ในระดับต่างๆ พบว่าที่ระดับ 10 ppm คุณลักษณะของโยเกิร์ตดีกว่าในกลุ่มควบคุม ผลของระบบ Lactoperoxidase ต่อปริมาณกรดที่ผลิตจาก Starter cultures ที่มากกว่า 1 ชนิด จะมากกว่า การผลิตจาก Starter cultures ชนิดเดียว ซึ่งอาจเป็นไปได้จากองค์ประกอบที่จุลินทรีย์ในโยเกิร์ตแตกต่างกัน และเมื่อใช้อุณหภูมิในการบ่มที่สูงรวมทั้งที่ระดับ Lactoperoxidase สูง จะทำให้มีการเพิ่มขึ้นของ Gelation pH ซึ่งอาจเกิดจาก Hydrophobicity ของโปรตีนในนมสูงขึ้น โดย Hypothiocyanite (OSCN) ที่ได้จากระบบ Lactoperoxidase ซึ่งมีผลทำให้ Gelation pH สูงขึ้นด้วย (Hiraro et al.,1998)

Nakaola และคณะ (1996) ศึกษาการเติมเอนไซม์ Lactoperoxidase ใน Starter cultures สำหรับการผลิตโยเกิร์ต โดยใช้จุลินทรีย์ *Lactobacillus Bulgaricus* *Streptococcus thermophilus* และทั้งสองชนิดร่วมกัน พบว่าในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เปอร์เซ็นต์ของ Titratable acidity ของโยเกิร์ตที่เกิดจาก Starter cultures ชนิดเดียว น้อยกว่ากลุ่มควบคุม แต่ในขณะที่ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาจำนวน Viable cell counts ยังคงที่ ในขณะที่โยเกิร์ตที่ใช้ Starter cultures ทั้ง 2 ชนิดร่วมกัน เปอร์เซ็นต์ของ Titratable acidity น้อยกว่ากลุ่มควบคุมเช่นเดียวกัน แต่จำนวน Viable cell counts กลับลดลง และเมื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นของกรด Formic ในวันที่ 8 ของการเก็บรักษา พบ 1.4 มิลลิกรัม ในกลุ่มควบคุม และพบ 0.1 มิลลิกรัมในกลุ่มทดลอง แสดงให้เห็นว่านอกจากจะยับยั้งการผลิตกรด Lactic แล้ว เอนไซม์ Lactoperoxidase ยังสามารถยับยั้งการผลิต Formic acid จึงทำให้ Viable cell counts ของโยเกิร์ตที่ผลิตโดยใช้ Starter cultures ทั้ง 2 ชนิดร่วมกันลดลง ซึ่งเป็นผลดีเนื่องจากสอดคล้องกับกฎหมายผลิตภัณฑ์ในหลายประเทศ

การเกิด Curd ของโยเกิร์ตนั้นเกิดจาก Starter culture จะใช้น้ำตาลแลคโทสในน้ำนมเป็นแหล่งพลังงานในการเจริญเติบโต และเกิดกระบวนการหมักให้กรดแลคติกและสารประกอบอื่นๆ ออกมา ซึ่งกรดแลคติกที่ถูกผลิตขึ้นเรื่อยๆ นี้มีผลต่อสภาพความคงตัวของอนุภาคเคซีน (Casein micelles) และทำให้สารประกอบเชิงซ้อนของเวย์โปรตีนสูญเสียสภาพธรรมชาติไป จากนั้นจะเกิดการรวมตัวของ Casein micelles หรือกลุ่มของ Micelles ย่อยๆ เข้าด้วยกันและเกิดการตกตะกอนบางส่วนออกมา ในขณะที่ค่าความเป็นกรดต่างไกลจุด Isoelectric คือ ค่าความเป็นกรดอยู่ที่ 4.6-4.7 จากนั้นจะเกิดปฏิกิริยาระหว่าง  $\alpha$ -lactalbumin หรือ  $\beta$ -lactoglobulin กับเคซีนทำให้เกิด Casein micelles มีความคงตัวมากขึ้น ดังนั้นร่างแหของ Curd ในโยเกิร์ตที่ประกอบไปด้วยโครงสร้างนี้สามารถจับกับองค์ประกอบอื่นๆ ที่มีอยู่ในส่วนผสมที่ใช้เตรียมโยเกิร์ต รวมทั้งยึดจับน้ำให้อยู่ในโครงสร้างดังกล่าวด้วย (Puvanenthiran et al., 2002)

### คุณภาพของโยเกิร์ต

โยเกิร์ตที่มีคุณภาพดีต้องมีเนื้อละเอียด เนียนเป็นเนื้อเดียวกันไม่เกิดการแยกชั้น มีสีขาวหรือครีมเล็กน้อย รสชาติไม่เปรี้ยวมากเกินไป ไม่มีรสฝาด และมีกลิ่นเฉพาะตัวของกรดแลคติก ซึ่งไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนประกอบหลักของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตคือน้ำนม ดังนั้นองค์ประกอบหลักทางเคมีของโยเกิร์ต ได้แก่ โปรตีนเคซีน โปรตีนเวย์ ไขมันนม วิตามิน และแร่ธาตุต่างๆ จึงมีปริมาณใกล้เคียงกับที่มีในน้ำนม โดยบางองค์ประกอบอาจมีมากกว่า และบางองค์ประกอบอาจมีปริมาณลดลงภายหลังกระบวนการหมัก (Tamine and Robinson, 1999) ดังแสดงในตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของน้ำนมและผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต

องค์ประกอบ	น้ำนม		โยเกิร์ต		
	น้ำนมดิบ	หางนม	เต็มมันเนย	ไขมันต่ำ	ไขมันต่ำ/ รสผลไม้
น้ำ (กรัม)	87.8	91.1	81.9	84.9	77.0
โปรตีน (กรัม)	3.2	3.3	5.7	5.1	4.1
ไขมัน (กรัม)	3.9	0.1	3.0	0.8	0.7
คาร์โบไฮเดรต (กรัม)	4.8	5.1	7.8	7.5	17.9
แคลเซียม (มิลลิกรัม)	115.0	120.0	200.0	190.0	150.0
ฟอสฟอรัส (มิลลิกรัม)	92.0	95.0	170.0	160.0	120.0
โซเดียม (มิลลิกรัม)	55.0	55.0	80.0	83.0	64.0
โพแทสเซียม (มิลลิกรัม)	140.0	150.0	280.0	250.0	210.0
เหล็ก (มิลลิกรัม)	0.4	0.4	0.7	0.6	0.5

ที่มา : Tamine และ Robinson (1999)

การใช้ *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus bulgaricus* ในการผลิตโยเกิร์ต

การเจริญของจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดนี้มีความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยกัน โดย *Streptococcus thermophilus* จะสร้างกรดแลคติกได้ดีที่สุดที่เมื่อใช้อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส จะผลิต Diacetyl และสารประกอบคล้ายกันซึ่งมีผลต่อกลิ่นรสของครีมเนย การเจริญจะดำเนินต่อไปจนกระทั่งมีความเป็นกรดลดลงที่ 5.5 ซึ่งเป็นสภาวะและมีสารอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของ *Lactobacillus bulgaricus* ต่อไป โดย *Lactobacillus bulgaricus* นั้นมีอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญอยู่ที่ 45 องศาเซลเซียส และยังทำให้กรดแลคติกมากเพียงพอที่จะสร้างสารให้กลิ่นเฉพาะของโยเกิร์ต (Acetaldehyde) นอกจากนี้ยังสามารถย่อยโปรตีนในน้ำนมและให้ Valine, Glycine และ Histidine ออกมาซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญของ *Streptococcus thermophilus* อีกต่อหนึ่ง (Tamine and Robinson, 1999)

สัณฐานวิทยาของ *Lactobacillus bulgaricus*

เชื้อ *Lactobacillus bulgaricus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกเมื่อเจริญในน้ำนมจะเรียงตัวต่อกันเป็นสายสั้นประมาณ 3 - 4 เซลล์ มีลักษณะเป็นท่อนสั้นเซลล์หัวท้ายกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 - 0.8 ไมโครเมตร ความยาว 2.0 - 9.0 ไมโครเมตร ให้กรดแลคติกชนิด D (-) เป็นผลิตภัณฑ์หลักจากการหมักน้ำตาลแบบ Homofermentative มีอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญที่

ไม่ต่ำกว่า 40 องศาเซลเซียส และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

45 องศาเซลเซียส และยังให้ปริมาณกรดแลคติกที่มากพอที่จะสร้าง Acetaldehyde ซึ่งให้กลิ่นรสเฉพาะของโยเกิร์ตได้ (Goff, 1998)

### สัณฐานวิทยาของ *Streptococcus thermophilus*

เชื้อ *Streptococcus thermophilus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกมีลักษณะทรงกลม มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 – 0.9 ไมโครเมตร ในน้ำนมจะเจริญเติบโตเรียงต่อกันเป็นสายโซ่ยาวประมาณ 10 – 20 เซลล์ ให้ผลผลิตหลักจากการหมักน้ำตาลกลูโคสที่มีน้ำตาลแลคโทสเป็นสารตั้งต้น คือ กรดแลคติกชนิด L (+) ซึ่งสามารถย่อยสลายน้ำตาลกลูโคส ฟรุ็กโตส และแมนโนสได้ ส่วนใหญ่เจริญบนอาหารแข็งเป็นโคโลนี จะเจริญได้ดีบนอาหารผสมเลือดหรืออาหารที่มีเนื้อเยื่อผสมอยู่ (Goff, 1998)

### ผลของระบบ Lactoperoxidase ต่อกระบวนการผลิตโยเกิร์ต

Nakada และคณะ (1996) ได้ทำการทดลองโดยนำนมพาสเจอร์ไรส์มาผลิตเป็นโยเกิร์ต โดยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มทดลองตามชนิดของ Starter culture คือ กลุ่มที่ใช้ *Lactobacillus bulgaricus* กลุ่มที่ใช้ *Streptococcus thermophilus* และกลุ่มที่ใช้ Mix culture เมื่อนำไปบ่มแล้วจะเติม เอนไซม์ Lactoperoxidase 5 เปอร์เซ็นต์ ลงในแต่ละกลุ่มการทดลองจากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน โดยตรวจวัดปริมาณ Titratable acidity จำนวน Viable cell count, Lactoperoxidase, Hydrogen peroxide, Sodiumthiocyanate และกรด Formic ผลที่ได้คือ เอนไซม์ Lactoperoxidase จะยับยั้งการสร้างกรดจากจุลินทรีย์ในโยเกิร์ตเพื่อให้โยเกิร์ตไม่เปรี้ยวมากเกินไป และยังช่วยเก็บรักษาโยเกิร์ตได้มากกว่า 2 สัปดาห์

Kumar และ Mathur (1989) รายงานว่าระบบ Lactoperoxidase นั้นสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้เป็น Starter culture ในการผลิตโยเกิร์ตในช่วงเวลาของการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ ซึ่งมีประสบการณ์ปัญหาเรื่องปริมาณกรดที่มากเกินไป และในทางกลับกันการกระตุ้นระบบ Lactoperoxidase ในน้ำนมดิบที่นำมาผลิตเป็นโยเกิร์ตอาจทำให้ชั่วโมงในการบ่ม ผลิตภัณฑ์ยาวนานขึ้นหรืออาจส่งผลกระทบต่อคุณลักษณะอื่นๆ ของโยเกิร์ต

Khalid และ Masud (2004) ได้ทำการทดลองโดยใช้น้ำนมกระป๋องซึ่งเติมสาร Hydrogen peroxide และ Sodiumthiocyanate ที่ระดับ 10, 20 และ 30 ppm ตามลำดับ จากนั้นนำไปต้มเป็นเวลา 10 นาที แล้วรอให้อุณหภูมิลดลงเหลือ 40 องศาเซลเซียส จึงนำไปบ่มเป็นเวลา 10 ชั่วโมง ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์ที่ใช้เป็น Starter culture กลุ่ม Thermophilic ทำให้จุลินทรีย์สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว จากนั้นทำการวัดค่า pH และ Titratable acidity ทุกชั่วโมง โดยผลที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.7 และตารางที่ 2.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.7 แสดงค่า pH ในระยะการบ่มโยเกิร์ตที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง

ปริมาณ NaSCN และ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (ppm)	pH			
	ไม่เติม	10	20	30
ก่อนใส่ Starter culture	6.50	6.50	6.50	6.50
หลังใส่ Starter culture	6.25	6.30	6.40	6.50
ชั่วโมงที่ 1	5.58	5.87	6.32	6.46
ชั่วโมงที่ 2	4.70	5.66	6.25	6.39
ชั่วโมงที่ 3	4.34	5.36	6.18	6.27
ชั่วโมงที่ 4	4.16	5.08	6.10	6.20
ชั่วโมงที่ 5	-	4.73	5.76	6.11
ชั่วโมงที่ 6	-	4.45	5.64	5.86
ชั่วโมงที่ 7	-	4.22	5.45	5.70
ชั่วโมงที่ 8	-	-	5.26	5.56
ชั่วโมงที่ 9	-	-	4.70	5.48
ชั่วโมงที่ 10	-	-	4.49	5.30

หมายเหตุ : - หมายถึงยุติการบ่ม

ที่มา : Khalid และ Masud (2004)

จากตารางที่ 2.7 พบว่าโยเกิร์ตกลุ่มควบคุมจะเกิด Curd ในชั่วโมงที่ 5 แต่โยเกิร์ตที่เติมสาร Hydrogen peroxide และ Sodiumthiocyanate จะใช้เวลาบ่มนานกว่า ซึ่งเป็นผลมาจากการที่ Hydrogen peroxide และ Sodiumthiocyanate ส่งผลต่อจุลินทรีย์ที่ใช้เป็น Starter culture ทำให้จุลินทรีย์เจริญได้ช้าลง ซึ่งโยเกิร์ตที่เติมสาร Hydrogen peroxide และ Sodiumthiocyanate ที่ระดับ 20 และ 30 ppm แม้เวลาจะผ่านไป 10 ชั่วโมง โยเกิร์ตจากทั้ง 2 กลุ่มนี้ก็ยังไม่เกิด Curd ส่วนที่ระดับ 10 ppm นั้นจะเกิด Curd ในชั่วโมงที่ 7 แต่ลักษณะของเนื้อ สี กลิ่น และรสชาตินั้นดีกว่าโยเกิร์ตกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 2.8 แสดงค่า Titratable acidity ในช่วงเวลาการบ่มโยเกิร์ตที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง

ปริมาณ NaSCN และ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (ppm)	Titratable acidity (เปอร์เซ็นต์)			
	ไม่เติม	10	20	30
ก่อนใส่ Starter culture	0.21	0.21	0.21	0.21
หลังใส่ Starter culture	0.29	0.27	0.23	0.22
ชั่วโมงที่ 1	0.36	0.34	0.25	0.22
ชั่วโมงที่ 2	0.45	0.40	0.26	0.23
ชั่วโมงที่ 3	0.60	0.45	0.28	0.24
ชั่วโมงที่ 4	0.75	0.54	0.30	0.26
ชั่วโมงที่ 5	0.92	0.63	0.34	0.29
ชั่วโมงที่ 6	-	0.76	0.39	0.32
ชั่วโมงที่ 7	-	0.85	0.45	0.36
ชั่วโมงที่ 8	-	-	0.48	0.39
ชั่วโมงที่ 9	-	-	0.52	0.41
ชั่วโมงที่ 10	-	-	0.55	0.44

หมายเหตุ : - หมายถึงยุติการบ่ม  
ที่มา : Khalid และ Masud (2004)

จากตารางที่ 2.8 พบว่าโยเกิร์ตกลุ่มควบคุมจะมีค่าความเป็นกรดอยู่ในระดับเหมาะสมกับการผลิตโยเกิร์ต (0.85 – 0.95) ในชั่วโมงที่ 5 แต่โยเกิร์ตที่เติมสาร Hydrogen peroxide และ Sodiumthiocyanate ที่ระดับ 10 ppm จะใช้เวลานานกว่าจึงจะมีค่าความเป็นกรดในระดับเหมาะสม แต่ที่ระดับ 20 และ 30 ppm แม้เวลาจะผ่านไป 10 ชั่วโมง ค่ากรดก็ยังไม่อยู่ในระดับที่เหมาะสมกับการผลิตโยเกิร์ต ทำให้โยเกิร์ตไม่สามารถจับตัวเป็น Curd ได้

### บทที่ 3

## การศึกษาประสิทธิภาพของระบบ Lactoperoxidase ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคเต้านมอักเสบในโคนม เพื่อลดการใช้และการตกค้างยาปฏิชีวนะในฟาร์มโคนม

### 3.1 การสำรวจเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคเต้านมอักเสบในฟาร์มโคนมของเกษตรกรในพื้นที่จังหวัดชุมพร

#### วิธีดำเนินการวิจัย

ทำการสำรวจ และเก็บตัวอย่างกลุ่มเชื้อที่ก่อโรคเต้านมอักเสบจากฟาร์มโคนมของเกษตรกรในพื้นที่จังหวัดชุมพร ทดสอบประสิทธิภาพของระบบเอนไซม์แลคโตเพอร์ออกซิเดส ในการยับยั้งเชื้อที่ก่อโรคเต้านมอักเสบที่พบบ่อยในพื้นที่จังหวัดชุมพร เพื่อเป็นแนวทางในการควบคุมโรคเต้านมอักเสบ และลดการใช้ยาปฏิชีวนะในฟาร์มเกษตรกร

#### การเก็บตัวอย่างน้ำนม

ตัวอย่างน้ำนมเก็บรวบรวมจากฟาร์มโคนมใน ชุมโค อ.ปะทิว จ.ชุมพร เก็บแบบรายตัวแยกเต้า โดยทำการสำรวจฟาร์มโคนมทั้งหมด 18 ฟาร์ม ใน ต.ชุมโค อ.ปะทิว จ.ชุมพร โดยเลือกเก็บน้ำนมเฉพาะโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ โดยใช้ Strip cup ทดสอบนมเบื้องต้น และทำการตรวจด้วยน้ำยา CMT เมื่อพบโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแล้วก็ทำการเก็บตัวอย่างน้ำนม โดยแบ่งเป็น เต้าหน้าซ้าย (Front – Left : FL) เต้าหน้าขวา (Front – Right : FR) เต้าหลังซ้าย (Rear – Left : RL) เต้าหลังขวา (Rear –Right : RR)

#### การตรวจ California mastitis test (CMT)

การตรวจด้วยน้ำยา CMT (California mastitis test) เป็นวิธีการประเมินปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวในน้ำนมด้วยการเติมสารลดการตึงผิวซึ่งกระทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวแตก แล้วเกิดสารลักษณะคล้ายวุ้นขึ้น วิธีการตรวจก็โดยรีดน้ำนมทั้ง 4 เต้าลงบนจานตรวจซึ่งมีอยู่ 4 หลุมๆ ละ 1 เต้า เต้าละประมาณ 5 มิลลิลิตรแล้วเติมน้ำยาลดการตึงผิว CMT ลงไปในปริมาณเท่าๆ กัน เอียงจานตรวจไปมา ถ้าในน้ำนมมีปริมาณเม็ดเลือดขาวในน้ำนมมีมากขึ้นเท่าไร จะเกิดสารลักษณะคล้ายวุ้นขึ้นมากขึ้นเท่านั้น Gonzalez และ Carmenes (1995) ได้ทำการศึกษาวิธีการตรวจสอบการติดเชื้อเต้านมอักเสบในแกะเพศเมียที่อยู่ในช่วงระยะให้นม โดยการเปรียบเทียบระหว่างวิธีการตรวจสอบด้วยน้ำยา CMT และการนับจำนวนโซมาติกเซลล์ (SCC, Somatic cell count) พบว่าค่าความน่าเชื่อถือของการตรวจสอบด้วยน้ำยา CMT มีค่ามากกว่าการตรวจสอบด้วยการนับจำนวนโซมาติกเซลล์โดยมีค่าความน่าเชื่อถือสูงกว่า 70 เปอร์เซ็นต์สามารถอ่านผลการตรวจได้เป็น 4 ระดับ ดังตารางที่ 3.1

จากผลการศึกษสามารถสรุปได้ว่า Total Bacteria Count ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตั้งแต่วันที่ 1 ถึง 6 ระหว่างสิ่งทดลองควบคุมกับอัตราส่วนที่ 15:10, 100:50 และ 150:100 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าสิ่งทดลองควบคุมมีจำนวน Total Bacteria Count เท่ากับ  $6.3 \times 10^5$  CFU/ml ซึ่งไม่สามารถยอมรับเข้ากระบวนการผลิตได้ในวันที่ 5 ในขณะที่อัตราส่วน 15:10 สามารถยับยั้งปริมาณ Total Bacteria Count ที่ 4 องศาเซลเซียสได้นาน 6 วัน

ตารางที่ 4.4 แสดงจำนวน Total Bacteria Count ที่ 4 องศาเซลเซียส (CFU/ml)

Time/ratios Day	Ratio of Sodiumthiocyanate : Hydrogen peroxide			
	Control	15:10	100:50	150:100
0	$4.2 \times 10^3$ <sup>a</sup>	$2.7 \times 10^2$ <sup>b</sup>	$2.0 \times 10^2$ <sup>b</sup>	$2.0 \times 10^2$ <sup>b</sup>
1	$5.0 \times 10^4$ <sup>a</sup>	$4.8 \times 10^2$ <sup>b</sup>	$4.3 \times 10^2$ <sup>b</sup>	$2.0 \times 10^2$ <sup>c</sup>
2	$5.5 \times 10^4$ <sup>a</sup>	$5.5 \times 10^2$ <sup>b</sup>	$5.0 \times 10^2$ <sup>b</sup>	$4.8 \times 10^2$ <sup>b</sup>
3	$6.0 \times 10^4$ <sup>a</sup>	$2.7 \times 10^3$ <sup>b</sup>	$2.3 \times 10^3$ <sup>b</sup>	$1.2 \times 10^3$ <sup>c</sup>
4	$9.1 \times 10^4$ <sup>a</sup>	$4.0 \times 10^3$ <sup>b</sup>	$4.0 \times 10^3$ <sup>b</sup>	$2.6 \times 10^3$ <sup>c</sup>
5	$6.3 \times 10^5$ <sup>a</sup>	$6.1 \times 10^3$ <sup>b</sup>	$5.6 \times 10^3$ <sup>b</sup>	$4.2 \times 10^3$ <sup>c</sup>
6	$2.4 \times 10^6$ <sup>a</sup>	$9.0 \times 10^3$ <sup>b</sup>	$7.4 \times 10^3$ <sup>b</sup>	$6.4 \times 10^3$ <sup>c</sup>

หมายเหตุ a, b, c และ d เป็นอักษรเพื่อแสดงการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ ( $P < 0.01$ ) ตามแนวนอน

Gregory และคณะ (1989) ได้ทำการศึกษาระบบ Lactoperoxidase ทั้ง 2 ระบบในการยับยั้ง *Listeria monocytogenes* แบคทีเรียแกรมบวก และ Aerobic Bacteria ในน้ำนมดิบโดยระบบแรกเติม Sodiumthiocyanate และ Hydrogen peroxide ระบบที่สองทดลองเติมเพียง Hydrogen peroxide เพียงอย่างเดียว และสิ่งทดลองควบคุมเป็นน้ำนมดิบที่ไม่เติมสารใดๆ ทำการทดลองที่อุณหภูมิ 5, 10, 20 และ 30 องศาเซลเซียส สรุปผลการทดลองได้ว่าระบบ Lactoperoxidase ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด คือ Lactoperoxidase ที่เกิดจากการเติม Sodiumthiocyanate และ Hydrogen peroxide ซึ่งจะสามารถยับยั้ง *Listeria monocytogenes* แบคทีเรียแกรมบวก และ Aerobic Bacteria บางชนิดได้ผลดีที่สุดที่ 5 องศาเซลเซียสสามารถยับยั้งได้นานถึง 73 - 98 ชั่วโมง (4.5 วัน) ขณะที่ 10 องศาเซลเซียสสามารถยับยั้งได้นาน 22 - 32 ชั่วโมง ในส่วนที่ 20 องศาเซลเซียสสามารถยับยั้งได้นาน 8.9 ชั่วโมง และที่ 30 องศาเซลเซียสสามารถยับยั้งได้นาน 2.8 ชั่วโมง

จากผลการศึกษสามารถสรุปได้ว่า Coliform Count ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสพบระหว่างสิ่งทดลองควบคุมกับอัตราส่วนที่ 15:10, 100:50 และ 150:100 ในชั่วโมงที่ 0, 3, 6, 9, 12 และ 15 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ในส่วนของชั่วโมงที่ 0 และ 3 ระหว่างอัตราส่วนที่ 15:10 กับอัตราส่วนที่ 100:50 และ 150:100 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่าอัตราส่วนที่ 100:50 และ 150:100 มีปริมาณ Coliform Count เท่ากับ < 2.00 (Non detection) หรือไม่พบเชื้อจากการตรวจนับ

ตารางที่ 4.5 แสดงจำนวน Coliform Count ที่ 30 องศาเซลเซียส (CFU/ml)

Time/ratios Hr	Ratio of Sodiumthiocyanate : Hydrogen peroxide			
	Control	15:10	100:50	150:100
0	$1.2 \times 10^3$ <sup>a</sup>	$5.0 \times 10^2$ <sup>b</sup>	< 2.00 <sup>c</sup>	< 2.00 <sup>c</sup>
3	$1.8 \times 10^3$ <sup>a</sup>	$1.3 \times 10^3$ <sup>b</sup>	< 2.00 <sup>c</sup>	< 2.00 <sup>c</sup>
6	$1.4 \times 10^4$ <sup>a</sup>	$5.1 \times 10^3$ <sup>b</sup>	$5.8 \times 10^2$ <sup>c</sup>	$2.3 \times 10^2$ <sup>c</sup>
9	$1.8 \times 10^5$ <sup>a</sup>	$8.3 \times 10^3$ <sup>b</sup>	$2.4 \times 10^3$ <sup>b</sup>	$3.0 \times 10^2$ <sup>c</sup>
12	$3.0 \times 10^6$ <sup>a</sup>	$1.5 \times 10^4$ <sup>b</sup>	$5.5 \times 10^4$ <sup>b</sup>	$1.4 \times 10^3$ <sup>c</sup>
15	$2.4 \times 10^7$ <sup>a</sup>	$2.0 \times 10^5$ <sup>b</sup>	$7.7 \times 10^4$ <sup>c</sup>	$1.5 \times 10^4$ <sup>c</sup>

หมายเหตุ a, b, c และ d เป็นอักษรเพื่อแสดงการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ ( $P < 0.01$ ) ตามแนวนอน

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (2540) รายงานว่า Coliform Count มากกว่า 10,000 CFU/ml แสดงว่าคุณภาพน้ำนมดิบไม่สามารถยอมรับได้ในกระบวนการผลิตน้ำนม จากผลการทดลอง Coliform Count ที่ 30 องศาเซลเซียส สิ่งทดลองควบคุมในชั่วโมงที่ 6 มีจำนวน Coliform Count เท่ากับ  $1.4 \times 10^4$  CFU/ml ซึ่งมีปริมาณ Coliform Count สูงกว่ามาตรฐานจึงไม่สามารถยอมรับในกระบวนการผลิตน้ำนมได้ในขณะที่อัตราส่วน 15:10 ซึ่งเป็นระดับต่ำสุดสามารถยับยั้งการเพิ่มปริมาณ Coliform Count ไม่ให้เกินกว่ามาตรฐานได้ถึงชั่วโมงที่ 9 ของการทดลอง

Adamson และ Carlsson (1981) รายงานว่าระบบ Lactoperoxidase สามารถยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivai* และ *Streptococcus sanguis* จากปฏิกิริยาของ Hydrogen peroxide ในสภาพที่มีอากาศและอุณหภูมิห้อง นอกจากการยับยั้งเชื้อดังกล่าวได้แล้ว ยังพบว่าถ้ามีการควบคุมสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของระบบ Lactoperoxidase จะสามารถทำลายเชื้อ *Escherichia coli* เช่น ในสภาพที่มีอุณหภูมิต่ำ (ประมาณ 4 – 8 องศาเซลเซียส)

Eyassu และคณะ (2004) ทำการศึกษาการใช้ระบบ Lactoperoxidase ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในน้ำนมแพะพันธุ์ Saanen และพันธุ์พื้นเมือง จากการทดลองพบว่าระบบนี้สามารถยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* และ *Brucella melitensis* ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ในน้ำนมแพะทั้ง 2 พันธุ์ได้ นอกจากการยับยั้งแล้วยังพบว่าระบบ Lactoperoxidase สามารถทำลายเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* ในน้ำนมแพะทั้ง 2 พันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการศึกษสามารถสรุปได้ว่า Coliform Count ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสพบว่าตั้งแต่วันที่ 1 ถึง 6 ระหว่างสิ่งทดลองควบคุมกับอัตราส่วนที่ 15:10, 100:50 และ 150:100 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ซึ่งสิ่งทดลองควบคุมเก็บรักษาได้เพียง 4 วันเท่านั้น ในส่วนของอัตราส่วนที่ 15:10 ซึ่งเป็นระดับต่ำสุดสามารถยับยั้งปริมาณ Coliform Count ได้นานถึง 6 วันของการทดลอง

ตารางที่ 4.6 แสดงจำนวน Coliform Count ที่ 4 องศาเซลเซียส (CFU/ml)

Time/ratios	Ratio of Sodiumthiocyanate : Hydrogen peroxide			
	Control	15:10	100:50	150:100
0	$1.9 \times 10^3$ <sup>a</sup>	< 2.0 <sup>b</sup>	< 2.0 <sup>b</sup>	< 2.0 <sup>b</sup>
1	$2.7 \times 10^3$ <sup>a</sup>	< 2.0 <sup>b</sup>	< 2.0 <sup>b</sup>	< 2.0 <sup>b</sup>
2	$3.3 \times 10^3$ <sup>a</sup>	< 2.0 <sup>b</sup>	< 2.0 <sup>b</sup>	< 2.0 <sup>b</sup>
3	$4.3 \times 10^3$ <sup>a</sup>	< 2.0 <sup>b</sup>	< 2.0 <sup>b</sup>	< 2.0 <sup>b</sup>
4	$7.0 \times 10^3$ <sup>a</sup>	< 2.0 <sup>b</sup>	< 2.0 <sup>b</sup>	< 2.0 <sup>b</sup>
5	$1.0 \times 10^4$ <sup>a</sup>	< 2.0 <sup>b</sup>	< 2.0 <sup>b</sup>	< 2.0 <sup>b</sup>
6	$1.5 \times 10^4$ <sup>a</sup>	< 2.0 <sup>b</sup>	< 2.0 <sup>b</sup>	< 2.0 <sup>b</sup>

หมายเหตุ a, b, c และ d เป็นอักษรเพื่อแสดงการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ ( $P < 0.01$ ) ตามแนวนอน

Codex Alimentarius Commission (1991) รายงานว่าผลการต้านแบคทีเรียในน้ำนมดิบของระบบ Lactoperoxidase ขึ้นอยู่กับ Species และ Strains ของจุลินทรีย์ในน้ำนมดิบซึ่งมีอยู่หลายชนิด ระบบ Lactoperoxidase สามารถยับยั้ง Mesophilic Bacteria และแบคทีเรียแกรมลบบางตัว เช่น *Pseudomonades* และ *Escherichia coli* ได้ดีกว่าแบคทีเรีย Species และ Strains อื่นๆ

#### สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า น้ำนมดิบที่ได้รับ Sodiumthiocyanate และ Hydrogen peroxide ที่อัตราส่วนต่ำสุด คือ 15:10 ก็สามารถยืดอายุการเก็บรักษาได้นาน 6 - 9 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในขณะที่สิ่งทดลองควบคุมคุณภาพของน้ำนมดิบไม่สามารถยอมรับได้ในชั่วโมงที่ 6 ของการทดลองซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ในส่วนน้ำนมดิบที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสให้ผลเช่นเดียวกับที่ 30 องศาเซลเซียส ส่วนน้ำนมดิบที่ได้รับ Sodiumthiocyanate และ Hydrogen peroxide ที่อัตราส่วนต่ำสุดสามารถยืดอายุการเก็บรักษา น้ำนมดิบได้นานถึง 6 วัน ในขณะที่สิ่งทดลองควบคุมเก็บรักษาได้เพียง 4 วัน ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ดังนั้นจากการทดลองจะเห็นได้ว่าอัตราส่วนที่ 15:10 ซึ่งเป็นระดับต่ำสุดก็เพียงพอที่จะรักษาคุณภาพน้ำนมดิบที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิต่ำอย่างมีประสิทธิภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bennett (2000) กล่าวว่าจุดมุ่งหมายของการใช้ประโยชน์จากระบบ Lactoperoxidase คือใช้ยับยั้งปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำนมดิบในระหว่างการขนส่งน้ำนมดิบไปยังศูนย์รวมน้ำนมดิบ เพื่อไม่ให้ปริมาณจุลินทรีย์สูงเกินกว่ามาตรฐานของการรับซื้อน้ำนมดิบ ในพื้นที่ที่ไม่มีระบบทำความเย็นซึ่งเป็นการลดต้นทุนการผลิตได้อีกทางหนึ่ง นอกจากนี้มีการค้นพบว่าระบบ Lactoperoxidase ยังมีประโยชน์อีกหลายด้าน เช่น การถนอมอาหาร และกระบวนการแปรรูปอาหาร เช่น การทดลองของ Khalid และ Masud (2004) พบว่าระบบ Lactoperoxidase สามารถช่วยให้เกิดลักษณะเฉพาะที่มีคุณภาพใน yoghurt ได้ เช่น ความเป็นเนื้อเดียวกัน, ค่า pH, เปอร์เซ็นต์ Lactic acid และลักษณะของ Organoleptic Properties เนื่องจากระบบ Lactoperoxidase ช่วยยับยั้งการทำงานของแบคทีเรียแกรมบวกใน yoghurt เป็นผลให้ *S. thermophilus* และ *L. bulgaricus* ซึ่งเป็น Starter culture ทำงานมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นในขณะบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส จึงทำให้ yoghurt มีลักษณะเฉพาะที่มีคุณภาพเพิ่มขึ้น

Jacob และคณะ (2000) กล่าวว่าระบบ Lactoperoxidase ถูกนำไปใช้ประโยชน์ในกระบวนการผลิตอาหารและอุตสาหกรรมการผลิตนม ซึ่งส่วนมากใช้ในการเก็บรักษาคุณภาพน้ำนมดิบระหว่างการขนส่งน้ำนมดิบ นอกจากนี้พบว่าการกระตุ้นให้เกิดระบบ Lactoperoxidase ทันทีก่อนที่จะนำน้ำนมดิบเข้าสู่กระบวนการฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิสูงและการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์นม พบว่าอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์นมยาวนานขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามระบบนี้อาจสามารถลดอุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตให้ต่ำลง เพื่อลดการสูญเสียคุณค่าทางอาหารของน้ำนม และยังเป็นการลดต้นทุนการผลิตในส่วนของการความร้อนในการฆ่าเชื้อได้อีกวิธีหนึ่ง

Garcia – Graells และคณะ (2002) ได้แนะนำว่าการใช้ความดันสูงซึ่งเป็นเทคนิคในการทำพาสเจอร์ไรส์ และสเตอริไรส์ในอาหารร่วมกับการใช้ระบบ Lactoperoxidase ทำให้เกิดการยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับให้ความดันสูงหรือการใช้ระบบ Lactoperoxidase เพียงวิธีใดวิธีหนึ่งเท่านั้น

#### ผลของระบบ Lactoperoxidase ในน้ำนมต่อคุณลักษณะของโยเกิร์ต

ศึกษาวิจัยประสิทธิภาพของระบบ Lactoperoxidase ต่อ Lactic acid bacteria ที่ใช้เป็น Starter culture ในน้ำนมดิบ และ ที่นำมาผลิตโยเกิร์ตและศึกษาคุณลักษณะทั้งทางเคมี กายภาพ จุลชีววิทยา ลักษณะปรากฏ Sensory test รวมทั้งอายุการเก็บรักษาของโยเกิร์ต

#### วิธีการทดลอง

1. ใช้ น้ำนมดิบ ปริมาณ 8,000 มิลลิลิตร นำมาตรวจวิเคราะห์คุณภาพเบื้องต้น คือ TA, pH, Specific gravity, Fat, TS, Standard plate count และ SCN<sup>-</sup>
2. แบ่งตัวอย่างน้ำนมออกเป็น 4 กลุ่มการทดลอง โดยกลุ่มละ 2,000 มิลลิลิตร ประกอบไปด้วย
  - กลุ่มทดลองที่ 1 คือ กลุ่มควบคุม (Control)
  - กลุ่มทดลองที่ 2 คือ กลุ่มที่เติมสาร NaSCN ความเข้มข้น 10 ppm
  - กลุ่มทดลองที่ 3 คือ กลุ่มที่เติมสาร NaSCN ความเข้มข้น 20 ppm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มทดลองที่ 4 คือ กลุ่มที่เติมสาร NaSCN ความเข้มข้น 30 ppm

กวนให้เข้ากันทิ้งไว้ 30 นาที แล้วทำการตรวจวิเคราะห์หาสาร  $SCN^-$  ของทั้ง 4 กลุ่มการทดลองข้างต้น

- จากนั้นนำน้ำนมดิบในแต่ละกลุ่มทดลองมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมเชื้อ Thermophilic yoghurt culture 3 เปอร์เซ็นต์ (*Lactobacillus bulgaricus* และ *Streptococcus thermophilus*) แล้วนำมาตรวจวิเคราะห์ TA, pH และ  $SCN^-$
- จากนั้นนำตัวอย่างน้ำนมทั้ง 4 กลุ่มทดลองมาบรรจุใส่ถ้วยพลาสติก ถ้วยละ 80 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 4 ชั่วโมง โดยนำมาตรวจวิเคราะห์ TA และ pH ทุกชั่วโมง และยุติการบ่มเมื่อ TA ประมาณ 0.8 และ pH 4.4
- จากนั้นนำตัวอย่างมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน โดยนำมาตรวจวิเคราะห์  $SCN^-$  ทุก 3 วัน และส่งตัวอย่างให้สถาบันอาหาร วิเคราะห์ ค่าต่างๆ คือ  
 Aerobic Plate count : FDA-BAM Online, 2001 (Chater 3)  
 Coliform : FDA-BAM Online, 2002 (Chater 4)  
 Lactic acid bacteria : ISO 15214 : 1998, 1<sup>st</sup> ed.  
 Total Acid : In house method based on AOAC (2005), 942.15(B)  
 pH : pH Meter  
 Total Solid : AOAC(2005), 941.08  
 Protein : In house method based on AOAC(2005), 991.20(NFI T 927)  
 Fat : NFI T967 based on AOAC(2005), 995.19

การวิเคราะห์หา  $SCN^-$  ในน้ำนมดิบ (วงศ์อนันต์ และอัจฉรา, 2549)

สารเคมี

2 M  $HNO_3$

$Fe(NO_3)_3$  ใน 2 M  $HNO_3$

TCA 20 เปอร์เซ็นต์ (w/v)

วิธีการเตรียม

- เตรียมสารละลาย 2 M  $HNO_3$  โดยเติม 65 เปอร์เซ็นต์  $HNO_3$  13.85 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่นจนได้ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
- เตรียมสารละลาย Ferric nitrate [ $Fe(NO_3)_3$ ] ใน 2 M  $HNO_3$  โดยชั่ง  $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$  16.00 กรัม ละลายใน 2 M  $HNO_3$  50 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไปจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ได้ในที่มืดและเย็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. เตรียมสารละลาย TCA 20 เปอร์เซ็นต์ (w/v) โดยชั่ง TCA 20 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วกรองผ่านกระดาษกรอง

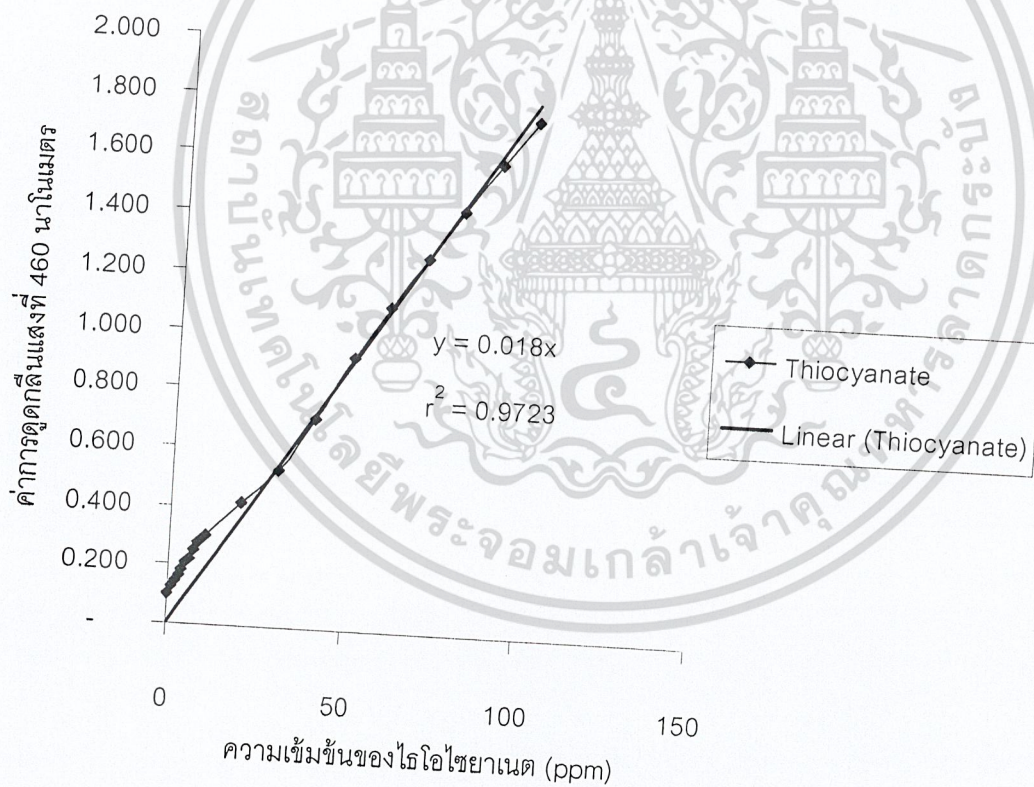
#### วิธีการทดลอง

##### การตกตะกอนโปรตีนนม

เติม TCA 20 เปอร์เซ็นต์ (w/v) 2 มิลลิลิตร ในน้ำนม 4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 30 นาที กรองตะกอนผ่านกระดาษกรอง เบอร์ 10 แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร

##### การวัดการดูดกลืนแสง

นำส่วนใสจากการตกตะกอนโปรตีนน้ำนมปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ลงใน Cuvette แล้วเติม  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  ใน 2 M  $\text{HNO}_3$  ในปริมาตรที่เท่ากัน ผสมให้เข้ากัน จากนั้นวัดการดูดกลืนแสงทันทีแล้ววัดค่าที่ได้ หาความเข้มข้นจากสมการเส้นตรงมาตรฐาน โดยกราฟเชิงเส้นของค่ามาตรฐานได้แสดงไว้ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 4.1 แสดงกราฟมาตรฐานของ  $\text{SCN}^-$  ในน้ำนมโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อเติมสารละลาย  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  ลงไปในส่วนใสจากการตกตะกอนโปรตีนน้ำนมสีที่ได้จะ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อน ซึ่งค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มีความสัมพันธ์โดยตรงกับความเข้มข้นของ  $\text{NaSCN}$  โดยมีค่าความสัมพันธ์ ( $r^2$ ) = 0.9723 และสมการสำหรับหาปริมาณของสาร  $\text{SCN}^-$  คือ

$$\text{ปริมาณของสาร } \text{SCN}^- = \text{ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้} \times 54.017$$

### ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

คุณภาพบางประการของโยเกิร์ตที่ผลิตจากน้ำนมโคที่กระตุ้นระบบ Lactoperoxidase โดยการเติม Sodium thiocyanate 3 ระดับ คือ 10, 20 และ 30 ppm เพื่อเป็นแหล่งของ  $\text{SCN}^-$  ซึ่งเป็นองค์ประกอบของระบบ Lactoperoxidase ก่อนให้ความร้อนแก่น้ำนมที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมเชื้อ Thermophilic yoghurt culture (Mixed culture ของ *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus bulgaricus*) 3 เปอร์เซ็นต์ แล้วบ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมง และเก็บรักษาในอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน ตรวจสอบคุณภาพโดยวัดค่า pH ปริมาณ Titratable acidity, Total solids และ Viable cell count ผลการทดลองพบว่าปริมาณ  $\text{SCN}^-$  ในน้ำนมก่อนและหลังให้ความร้อน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ในขณะที่การบ่มโยเกิร์ตค่า pH ลดลง และปริมาณ TA เพิ่มขึ้น จนยุติการบ่มที่ชั่วโมงที่ 4 ซึ่งค่า pH และ TA ของแต่ละกลุ่มการทดลองมีความแตกต่างกันทางสถิติ และในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน โยเกิร์ตทั้ง 4 กลุ่มทดลองมีค่า pH ลดลง เห็นได้ว่าการกระตุ้นระบบ Lactoperoxidase โดยการเติม Sodiumthiocyanate ไม่มีผลต่อการทำงานของ Starter culture ในระหว่างการบ่ม และไม่สามารถยับยั้งการสร้างกรดที่มากเกินไปของโยเกิร์ตในระหว่างการเก็บรักษา

สำหรับน้ำนมโคที่กระตุ้นระบบ Lactoperoxidase โดยการเติม Sodiumthiocyanate ( $\text{NaSCN}$ ) เพื่อเป็นแหล่งของ  $\text{SCN}^-$  3 ระดับ คือ 10, 20 และ 30 ppm หลังให้ความร้อนน้ำนมที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ในการผลิตโยเกิร์ต โดยใช้ Thermophilic starter culture (Mixed culture ของ *Streptococcus thermophilus*; *S. thermophilus* และ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*; *L. bulgaricus*) 3 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยตรวจวัดปริมาณ TA และ pH ทุกชั่วโมง และยุติการบ่มเมื่อ TA ประมาณ 0.8 เปอร์เซ็นต์ และ pH 4.4 และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน เพื่อทดสอบ pH, Titratable acidity, Total solids และ Viable cell count พบว่าค่า pH ของโยเกิร์ตระหว่างการบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ในแต่ละชั่วโมง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 ถึงชั่วโมงที่ 4 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้ง 4 กลุ่มทดลอง แต่อย่างไรก็ตามโยเกิร์ตทั้ง 4 กลุ่ม มีค่า pH ที่ลดต่ำลงจนเริ่มเกิด Curd ในชั่วโมงที่ 2 และสามารถยุติการบ่มได้ในชั่วโมงที่ 4 พร้อมกัน ปริมาณ TA เมื่อเริ่มทำการบ่มปริมาณ TA ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่เมื่อครบเวลาในชั่วโมงที่ 1, 2, 3 และ 4 ปริมาณ TA ของแต่ละกลุ่มทดลองมีความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งปริมาณ TA มีแนวโน้มที่น้อยลงตามปริมาณ  $\text{NaSCN}$  ที่เติมในน้ำนมในปริมาณที่มากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ยังพบว่าหลังจากบ่มโยเกิร์ตแล้วนำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน โดยนำมาตรวจวิเคราะห์ ปริมาณ TA, TS, pH และ Viable cell count ทุกวัน ผลการทดลองพบว่า TA, TS, pH และ Viable cell count ของทุกกลุ่ม ทดลองในวันที่ 15 แตกต่างจากวันที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 คุณภาพบางประการของโยเกิร์ตที่ผลิตจากนมโคที่กระตุ่นระบบ Lactoperoxidase โดยการเติม Sodium thiocyanate 3 ระดับ คือ 10, 20 และ 30 ppm

	วันที่ 1			วันที่ 3		
	10 ppm	20 ppm	30 ppm	10 ppm	20 ppm	30 ppm
Aerobic Plate Count	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Coliform	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
Lactic acid bacteria	420,000,000	310,000,000	460,000,000	430,000,000	420,000,000	500,000,000
Total Acid	9.79	8.74	8.14	9.79	9.49	8.29
pH	4.15	4.29	4.36	4.02	4.04	4.18
Total Solid	11.45	11.37	11	11.31	11.11	11.17
Protein	2.98	2.9	3.12	2.44	3.02	2.4
Fat	3.46	3.11	3.74	3.37	3.35	3.08

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 (ต่อ) คุณภาพบางประการของโยเกิร์ตที่ผลิตจากนํ้านมโคที่กระตุบระบบ Lactoperoxidase โดยการเติม Sodium thiocyanate 3 ระดับ คือ 10, 20 และ 30 ppm

	วันที่ 6			วันที่ 9		
	10 ppm	20 ppm	30 ppm	10 ppm	20 ppm	30 ppm
Aerobic Plate Count	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Coliform	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
Lactic acid bacteria	340,000,000	250,000,000	220,000,000	440,000,000	640,000,000	56,000,000
Total Acid	9.79	9.99	9.04	9.09	9.99	9.09
pH	4.08	4.00	4.11	4.1	4.04	4.17
Total Solid	11.12	11.14	11.07	11.3	11.26	11.41
Protein	2.22	2.55	2.74	2.88	2.7	2.83
Fat	3.04	3.29	3.34	3.34	3.32	3.44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.7 (ต่อ) คุณภาพบางประการของโยเกิร์ตที่ผลิตจากนมโคที่กระตุบระบบ Lactoperoxidase โดยการเติม Sodium thiocyanate 3 ระดับ คือ 10, 20 และ 30 ppm**

	วันที่ 12			วันที่ 15				
	กลุ่มควบคุม	10 ppm	20 ppm	30 ppm	กลุ่มควบคุม	10 ppm	20 ppm	30 ppm
Aerobic Plate								
Count	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Coliform	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
Lactic acid bacteria	32,000,000	74,000,000	330,000,000	54,000,000	38,000,000	120,000,000	10,000,000	53,000,000
Total Acid	10.28	9.70	9.1	8.35	10.25	9.78	8.9	8.2
pH	4.00	4.07	4.13	4.22	4.04	4.06	4.16	4.26
Total Solid	10.89	10.92	10.97	11.4	10.94	10.74	10.87	11.22
Protein	3.08	3.24	2.98	2.92	3.14	3.07	3.19	2.88
Fat	2.79	3.32	3.04	3.4	3.34	3.33	3.27	3.43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.7 (ต่อ) คุณภาพบางประการของเยลลี่ที่ผลิตจากน้ำนมโคที่กระตุบระบบ Lactoperoxidase โดยการเติม Sodium thiocyanate 3 ระดับ คือ 10, 20 และ 30 ppm**

	วันที่ 18			วันที่ 21				
	กลุ่มควบคุม	10 ppm	20 ppm	30 ppm	กลุ่มควบคุม	10 ppm	20 ppm	30 ppm
Aerobic Plate Count	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Coliform	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
Lactic acid bacteria	150,000,000	360,000,000	280,000,000	160,000,000	67,000,000	260,000,000	340,000,000	260,000,000
Total Acid	10.35	9.68	9.18	8.22	10.13	9.7	8.9	8.27
pH	4.00	4.06	4.13	4.23	4.03	4.04	4.17	4.21
Total Solid	11.19	10.86	11.16	11.25	11.22	10.92	11.15	11.33
Protein	2.96	2.44	2.51	2.96	2.74	2.36	2.64	2.25
Fat	3.26	3.13	3.27	3.39	3.32	3.14	3.24	3.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Elmoslemany, A.M., G.P. Keefe, I.R. Dohoo and R.T. Dingwell. 2009. Microbiological quality of bulk tank raw milk in Prince Edward Island dairy herds. *J. Dairy Sci.* 92: 4239 - 4248.
- Fonteh, F.A., A.S. Grandison, M.J. Lewis and A.T. Niba. 2005. The keeping quality of LPS – activated milk in the western highlands of Cameroon. *Livestock research for rural development.* 17 (114). <http://www.lrrd.org> (26 September 2009).
- Galton, D.M., L.G. Petersson and W.G. Merrill. 1984. Effects of premilking udder preparation on bacterial counts in milk and on teats. *J. Dairy Sci.* 69: 260 - 266.
- Goff, H.D. 1998. Dairy science and technology education series. <http://www.foodsci.uoguelph.ca/dairyedu/goff.html> (26 September 2009).
- Gonzalez, R.N., D.E. Jasper, R.B. Busnell and T.B. Farber. 1986. Relationship between mastitis pathogen numbers in bulk tank milk and bovine udder infections. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* 189: 442 - 445.
- Harmon, R.J. 1994. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J. Dairy Sci.* 77: 2103 - 2112.
- Hogan, J.S., K.L. Smith, K.H. Hoblet, D.A. Todhunter, P.S. Schoenberger, W.D. Hueston, D.E. Pritchard, G.L. Bowman, L.E. Heider, B.L. Brockett and H.R. Conrad. 1989. Bacterial counts in bedding materials used on nine commercial dairies. *J. Dairy Sci.* 72: 250 - 258.
- Jackson, H. and F.L. Clegg. 1965. Effect of preliminary incubation on the microflora of raw bulk tank milk with observation of the microflora of milking equipment. *J. Dairy Sci.* 48: 407 - 409.
- Jeffrey, D.C. and J. Wilson. 1987. Effect of mastitis-related bacteria on the total bacteria counts of bulk milk supplies. *J. Soc. Dairy Technol.* 40 (2): 23 - 26.
- Jurczak, M.E. and, A. Sciubisz. 1981. Studies on the lipolytic changes in milk from cows with mastitis. *Milchwissenschaft.* 36: 217 - 219.
- Khalid, S. and T. Masud. 2004. Effect of activated lactoperoxidase system on the quality characteristics of yoghurt. *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem.* 3 (6) : 777-783.
- Kitchen, B.J. 1981. Review of the progress of dairy science: Bovine mastitis: Milk compositional changes and related diagnostic tests. *J. Dairy Res.* 48: 167 - 188.
- Korhonen, H. 1980. A new method for preserving raw milk – the lactoperoxidase antibacterial system. *World Anim. Rev.* 35: 23 – 29.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Kumar, S. and B.N. Mathur. 1989. Studies on the manufacture of yoghurt and Mozzarella cheese from milk preserved by the LP – system. *Indian J. Dairy Sci.* 42 : 194 – 197.
- Ma, Y., C. Ryan, D.M. Barbano, D.M. Galton, M.A. Rudan, and K.J. Boor. 2000. Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. *J. Dairy Sci.* 83: 264 - 274.
- Marks, N.E., A.S. Grandison and M.J. Lewis. 2001. Challenge testing of the lactoperoxidase system in pasteurized milk. *J. Appl. Microbiol.* 91 : 735 – 741.
- McKinnon, C.H., G.J. Rowlands and A.J. Bramley. 1990. The effect of udder preparation before milking and contamination from the milking plant on the bacterial numbers in bulk milk of eight dairy herds. *J. Dairy Res.* 57: 307 - 318.
- Munro, G.L., P.A. Grieve and B.J. Kitchen. 1984. Effects of mastitis on milk yield, milk composition, processing properties and yield and quality of milk products. *Aust. J. Dairy Technol.* 39: 7 - 16.
- Murphy, S.C. and K.J. Boor. 2000. Trouble - shooting sources and causes of high bacteria counts in raw milk. *Dairy, Food and Environmental Sanitation.* 20: 606 - 611.
- Nakada M., S. Dosako, R. Hirano, M. Ooka and I. Nakajima. 1996. Lactoperoxidase suppresser acid production in yoghurt during storage under refrigeration. *Int. Dairy J.* 6 : 33 – 42.
- Norman, H.D., R.H. Miller, J.R. Wright and C.R. Wiggans. 2000. Herd and state means for somatic cell count from dairy herd improvement. *J. Dairy Sci.* 83: 2782 - 2788.
- Pankey, J.W. 1989. Premilking udder hygiene. *J. Dairy Sci.* 72: 1308 - 1312.
- Pantoja, J.C.F., D.J. Reinemann and P.L. Ruegg. 2009. Associations among milk quality indicators in raw bulk milk. *J. Dairy Sci.* 92: 4978 - 4987.
- Puvanenthiran, A., R.P.V. Williams and M.A. Augustin. 2002. Structure and visco – elastic properties of set yoghurt with altered casein to whey protein ratios. *Inter. Dairy J.* 12 : 383 – 391.
- Santos, M.V., Y. Ma, Z. Caplan and D.M. Barbano. 2003. Sensory threshold of off-flavors caused by proteolysis and lipolysis in milk. *J. Dairy Sci.* 86: 1601 - 1607.
- Sargeant, J.M., Y.H. Schukken and K.E. Leslie. 1998. Ontario bulk milk somatic cell count reduction program, progress and outlook. *J. Dairy Sci.* 81: 1545 - 1554.
- SAS. 1982. *SAS user's Guide : Statistics.* SAS Inst. Inc, Cary, North Carolina.

- Schaik, G.V., L.E. Green, D. Guzman, H. Esparza and N. Tadich. 2005. Risk factors for bulk milk somatic cell counts and total bacterial counts in smallholder dairy farm in the 10<sup>th</sup> region of Chile. *Prev. Vet. Medi.* 67: 1 - 17.
- Seifu, E., E.M. Buys and E.F. Donkin. 2005. Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its potential applications : a review. *Trends in Food Sci. Technol.* 16 : 137 - 154.
- Tamine, A.Y. and R.K. Robinson. 1999. *Tamine and Robinson's yoghurt science and technology.* 3<sup>rd</sup> ed. Woodhead publishing Ltd, Cambridge.
- Walstra P., J.T.M. Wouters and T.J. Geurts. 2006. *Dairy science and technology.* Second edition. Taylor and francis group, LLC; New York.
- Walstra P., J.T.M. Wouters and T.J. Geurts. 2006. *Dairy science and technology.* Second edition. Taylor and francis group, LLC; New York.
- Wehr, H.M. and J.F. Frank. 2004. *Standard methods for the examination of dairy products.* 17<sup>th</sup> ed. Am. Publ. Health Assoc., Washington, DC.
- Zehner, M.M., R.J. Farnsworth, R.D. Appleman, K. Larntz and J.A. Springer. 1986. Growth of environmental mastitis pathogens in various bedding materials. *J. Dairy Sci.* 69: 1932 - 1941.

## ภาคผนวก



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ประวัตินักวิจัย

- ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นายเทียมพบ ก้านเหลือง  
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Thiamphop Kanloug
- เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 37101001425010
- ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เทียบระดับ 8
- สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพร ตำบลชุมโค อำเภอปะทิว จังหวัดชุมพร 86160 โทรศัพท์/โทรสาร 0-7750-6426 thiamphop@gmail.com และ kktthiamp@kmitl.ac.th

### ประวัติการศึกษา

สถานศึกษา	วุฒิการศึกษา	ปี พ.ศ. ที่จบ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ร.บ.ม. (รัฐประศาสนศาสตร์)	2549
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วท.ม. (การปรับปรุงพันธุ์สัตว์)	2541
มหาวิทยาลัยขอนแก่น	วท.บ. (สัตวศาสตร์)	2537

### กำลังศึกษา

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปริญญาเอก สาขาการพัฒนาศาสตร์พยาบาลมนุษยและชุมชน พ.ศ. 2552 -

### ประสบการณ์การทำงานบริหาร

1 ส.ค. 2544 - 30 มิ.ย. 2547	ผู้ช่วยอธิการบดีฝ่ายวิชาการ ประจำวิทยาเขตชุมพร
23 ส.ค. 2547 - มี.ค. 2548	ผู้ช่วยอธิการบดีประจำวิทยาเขตชุมพรฝ่ายวิชาการ และ กิจการนักศึกษา
ต.ค. 2546 - ธ.ค. 2549	ที่ปรึกษาอาวุโส และหัวหน้ากลุ่มภารกิจติดตามประเมินผล และพัฒนาระบบ สำนักงานบริหารยุทธศาสตร์จังหวัดชุมพร

### ประวัติการทำงาน

4 พ.ศ. 2542 - ปัจจุบัน  
อาจารย์ประจำ สาขาเทคโนโลยีการเกษตร วิทยาเขตชุมพร  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

### การจัดการเรียนการสอน

- 05403202 การวางแผนการทดลองทางการเกษตร (Experimental design in agriculture)
- 04033171 คอมพิวเตอร์เพื่อการวิจัยและนำเสนอผลงานทางสัตวศาสตร์ (Computer for animal science research and presentation)
- 04034130 การปรับปรุงพันธุ์สัตว์ (Animal breeding)
- 05401100 สถิติเบื้องต้น (Elementary statistics)

### ผลงานทางวิชาการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
บทความวิชาการ  
ไม่วารสารใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เยี่ยมชม ก้านเหลือง, 2542. สถานภาพงานวิจัยโคนมในประเทศไทย (2526 - 2542) : เศรษฐกิจและสังคมของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนม. การประชุมวิชาการ เรื่อง วิจัยและพัฒนาเพื่ออนาคตโคนมไทย และการประชุมทางวิชาการโคนมและผลิตภัณฑ์ ครั้งที่ 3. 4 - 5 พฤศจิกายน 2542. โรงแรมเอเชีย ราชเทวี กรุงเทพมหานคร. หน้า 123 - 140.

#### งานวิจัย

- เยี่ยมชม ก้านเหลือง, จันทร์จรัส เรียวเดชะ, จุรีรัตน์ แสนโกชน์ และปรีฉัตร สุขโต. 2542. การประมาณค่าพารามิเตอร์ทางพันธุกรรมของโคนมภายใต้สภาพแวดล้อมประเทศไทย. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 37. 3 - 5 กุมภาพันธ์ 2542. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 150 - 158.
- เยี่ยมชม ก้านเหลือง, จันทร์จรัส เรียวเดชะ, จุรีรัตน์ แสนโกชน์ และปรีฉัตร สุขโต. 2542. การประเมินค่าการผสมพันธุ์พ่อพันธุ์โคนมภายใต้สภาพแวดล้อมประเทศไทย. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 37. 3 - 5 กุมภาพันธ์ 2542. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 143 - 150.
- เยี่ยมชม ก้านเหลือง สมศรี ภูเลี้ยง สมพงษ์ สมเสร็จ และวรลณี คงกระพันธ์. 2549. การศึกษาระบบควบคุมความปลอดภัย (หลักเกณฑ์และวิธีการที่ดี ในการผลิตอาหารตามแนวทางสากล) สำหรับโรงงานแปรรูปนมพาสเจอร์ไรส์ โรงนมกรมหลวงชุมพรเขตอุดมศักดิ์. การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 3. 6-7 ธันวาคม 2549. 582- 592.
- เยี่ยมชม ก้านเหลือง ขยุด คงกระพันธ์ สมพงษ์ สมเสร็จ วรชาติ ปิ่นเกตุ และธานี สุขตะ. 2549. การสำรวจสภาพการจัดการรีดนมของเกษตรกร ผู้เลี้ยงโคนมในจังหวัดชุมพร. การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 3. 6-7 ธันวาคม 2549. 593-602.
- เยี่ยมชม ก้านเหลือง วรลณี คงกระพันธ์ สมศรี ภูเลี้ยง กรรณิกา หิรัญสถิตย์ พรพรรณ พุ่มพวง ปิยพร สุขวานิช และกฤติยา เทียมหิรัญโสภิต. 2549. ศึกษาค่า pH และจำนวนแบคทีเรียในน้ำนมคุณภาพต่ำที่เติมกรดอะซิติก. การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 3. 6 -7 ธันวาคม 2549. 603 - 610.
- เยี่ยมชม ก้านเหลือง พรพรรณ พุ่มพวง สมศรี ภูเลี้ยง วรลณี คงกระพันธ์ ปรีศนา เนตตกุล และสุนิสา ศักดิ์สุวรรณ. 2550. การเก็บรักษาน้ำนมดิบโดยการทำงานของระบบ Lactoperoxidase. การประชุมสัมมนาวิชาการสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ครั้งที่ 3. 23 มกราคม 2550. 413 - 422.
- เยี่ยมชม ก้านเหลือง วรรณญา พริ้มจรัส สมพงษ์ สมเสร็จ วรลณี คงกระพันธ์ และสมศรี ภูเลี้ยง. 2551. การประเมินมาตรฐานการปฏิบัติตามหลักเกณฑ์วิธีการที่ดีในการผลิต และจุลชีววิทยาของศูนย์รวบรวมน้ำนมดิบสหกรณ์โคนมจังหวัดชุมพร จำกัด. การประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่ 4 “การรู้จักคืบของการผลิตพลังงานทดแทนต่อการผลิตปศุสัตว์” คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 31 มกราคม 2551. 362-366.
- เยี่ยมชม ก้านเหลือง วรชาติ ปิ่นเกตุ ขยุด คงกระพันธ์ สมพงษ์ สมเสร็จ และสมศรี ภูเลี้ยง. 2551. สมรรถภาพการเจริญเติบโตของลูกโคนมเพศผู้วัยอ่อนที่เลี้ยงด้วยนมคุณภาพต่ำเติมกรดอะซิติกและนมเทียม. การประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่ 4 “การรู้จักคืบของการผลิตพลังงานทดแทนต่อการผลิตปศุสัตว์” คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 31 มกราคม 2551. 376-379.
- เยี่ยมชม ก้านเหลือง ปรีศนา เนตตกุล วรลณี คงกระพันธ์ พรพรรณ พุ่มพวง และสมศรี ภูเลี้ยง. 2551. เปรียบเทียบประสิทธิภาพการเลี้ยงโคนมที่ใช้น้ำนมดิบที่เติมกรดอะซิติกกับการศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ค่าความเป็นกรด-ด่าง ไฮโดรไลซายานิคและอัตราส่วนที่เหมาะสมของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี การนำเอกสารนี้ไปใช้ในการค้าโดยไม่ได้รับอนุญาตถือว่าผิดกฎหมาย การนำเอกสารนี้ไปใช้โดยไม่ได้รับอนุญาตถือว่าผิดกฎหมาย

- ไบมันสำปะหลังหมักร่วมกับเปลือกสับประรดที่ระยะเวลา 15, 21 และ 30 วัน. การประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่ 4 “การรुकืบของการผลิตพลังงานทดแทนต่อการผลิตปศุสัตว์” คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 31 มกราคม 2551. 385-389.
- สมพงษ์ สมเสร็จ เทียมพบ ก้านเหลือง วราลี คงกระพันท์ พรพรรณ พุ่มพวง วรัญญา พริ้มจรัส และสมศรี ภูเลี้ยง. 2551. ศึกษาการตกค้างของยาปฏิชีวนะในน้ำนมดิบรายฟาร์มในจังหวัดชุมพร. การประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่ 4 “การรुकืบของการผลิตพลังงานทดแทนต่อการผลิตปศุสัตว์” คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 31 มกราคม 2551. 367-370.
- วราลี คงกระพันท์ เทียมพบ ก้านเหลือง ชยุต คงกระพันท์ และสมศรี ภูเลี้ยง. 2551. องค์ประกอบและสัสมพันธ์ของน้ำนมดิบรวมถึงในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์และชุมพร. การประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่ 4 “การรुकืบของการผลิตพลังงานทดแทนต่อการผลิตปศุสัตว์” คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 31 มกราคม 2551. 371-375.
- ชยุต คงกระพันท์ เทียมพบ ก้านเหลือง วรชาติ ปิ่นเกตุ สมพงษ์ สมเสร็จ และสมศรี ภูเลี้ยง. 2551. การศึกษาลักษณะซากของลูกโควัยอ่อนที่เลี้ยงด้วยน้ำนมคุณภาพต่ำเติมกรดอะซิติกและนมเทียม. การประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่ 4 “การรुकืบของการผลิตพลังงานทดแทนต่อการผลิตปศุสัตว์” คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 31 มกราคม 2551. 380-384.
- Kanloun, T., S. Somset, S. Phuleang, W. Konggrapan, P. Pumpuang and W. Primjarat. 2008. Antibiotic residues in the raw milk from individual farm in Chumphon and Prachuapkhirikhan provinces. The 13<sup>th</sup> Animal Science Congress of the Asian-Australasian Association of Animal Production Societies Theme : Animal Agriculture and the role of small holder farmers in a global economy. Hanoi – Vietnam. September 22 – 26, 2008.
- Kanloun, T., P. Pumpuang, S. Phuleang and W. Konggrapan. 2008. Raw milk preservative by Lactoperoxidase system and Sodium Thiocyanate breakdown at pasteurization temperature. The 13<sup>th</sup> Animal Science Congress of the Asian-Australasian Association of Animal Production Societies Theme : Animal Agriculture and the role of small holder farmers in a global economy. Hanoi – Vietnam. September 22 – 26, 2008.
- Kanloun, T., P. Nattagul, S. Somset, S. Phuleang and W. Konggrapan. 2010. Aflatoxin contamination in raw material for animal feed, mixed feed and commercial feed in beef at Tasae and Pathiu Districts at Chumphon province. The 14<sup>th</sup> Animal Science Congress of the Asian-Australasian Association of Animal Production Societies Pingtung, Taiwan, ROC. August 23 – 27, 2010.
- เทียมพบ ก้านเหลือง รวิวิธ สุตราม และเกษรภรณ์ เสียงดัง. 2551. ระดับความพึงพอใจ การมีส่วนร่วม และการรับรู้ของประชาชนต่อการบริหารงานขององค์กรปกครองส่วนท้องถิ่น จังหวัดชุมพร. การประชุมวิชาการและวิจัย ประจำปี 2551. สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยรามคำแหง. 440 – 447.
- เทียมพบ ก้านเหลือง ชยุต คงกระพันท์ สมพงษ์ สมเสร็จ สมศรี ภูเลี้ยง พรพรรณ พุ่มพวง และ วราลี คงกระพันท์. 2552. สมรรถภาพการเจริญเติบโตของโคนมเพศผู้ที่เลี้ยงด้วยอาหารชั้น ไบกระถินหมักร่วมกับมันเส้น และไบกระถินหมักร่วมกับเปลือกสับประรดหมัก. การสัมมนาวิชาการเกษตร ประจำปี 2552 คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 212 – 214.
- เทียมพบ ก้านเหลือง พรพรรณ พุ่มพวง วราลี คงกระพันท์ และสมศรี ภูเลี้ยง. 2552. ปัจจัยที่มีผลต่อองค์ประกอบและจำนวนไขมันในนมดิบ และสัสมพันธ์ของน้ำนมดิบรายฟาร์มของเกษตรกรใน
- เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และจังหวัดชุมพร. การสัมมนาวิชาการเกษตร ประจำปี 2552 คณะ  
เกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 215 - 217.

Kanloun, T., S. Nulsom, P. Pumpuang, W. Konggrapan and S. Phuleang. 2012. Beef  
production system in Chumphon and Prachuapkhirikhan rovinces. The 15<sup>th</sup> AAAP  
Animal Science Congress. 26 - 30 November 2012, Thammasat university, Rangsit  
campus, Thailand.

Kanloun, T., S. Nulsom, P. Pumpuang, W. Konggrapan and S. Phuleang. 2012. Supply chain  
of the cattle in Chumphon and Prachuap Khiri Khan provinces. The 15<sup>th</sup> AAAP Animal  
Science Congress. 26 - 30 November 2012, Thammasat university, Rangsit campus,  
Thailand.

Chullanandana, K. and T. Kanloun. 2012. Effect of cutting interval on chemical composition  
and rumen degradability of *Thysanostigma siamensis* J.B. Imla as feeds for ruminant.  
The 15<sup>th</sup> AAAP Animal Science Congress. 26 - 30 November 2012, Thammasat  
university, Rangsit campus, Thailand.

#### หนังสือ

เทียมพบ ก้านเหลือง. 2549. การวางแผนการทดลองทางการเกษตร (Experimental design in  
agriculture). โรงพิมพ์ตั้งเจริญ, ชุมพร.

#### การรับทำงานบริการ

1. เทียมพบ ก้านเหลือง และรวีร สุตราม. 2551. วิเคราะห์ประเด็นปัญหาสังคมและความมั่นคงของ  
มนุษย์ จังหวัดชุมพร. สำนักงานพัฒนาสังคมและความมั่นคงของมนุษย์จังหวัดชุมพร.
2. เทียมพบ ก้านเหลือง และรวีร สุตราม. 2551. วิเคราะห์ประเด็นปัญหาสังคมและความมั่นคงของ  
มนุษย์ จังหวัดระนอง. สำนักงานพัฒนาสังคมและความมั่นคงของมนุษย์จังหวัดระนอง.
3. เทียมพบ ก้านเหลือง และรวีร สุตราม. 2551. แผนปฏิบัติการการพัฒนาสังคม 4 ปี (พ.ศ. 2551 -  
2554) จังหวัดชุมพร. สำนักงานพัฒนาสังคมและความมั่นคงของมนุษย์จังหวัดชุมพร
4. เทียมพบ ก้านเหลือง และรวีร สุตราม. 2551. แผนปฏิบัติการการพัฒนาสังคม 4 ปี (พ.ศ. 2551 -  
2554) จังหวัดระนอง. สำนักงานพัฒนาสังคมและความมั่นคงของมนุษย์จังหวัดระนอง
5. เทียมพบ ก้านเหลือง สมศรี ภูเลี้ยง และรวีร สุตราม. 2550 - 2555. สำรองความพึงพอใจของ  
ผู้รับบริการขององค์การบริหารส่วนตำบล เทศบาลตำบล จังหวัดชุมพร ระนอง และ  
ประจวบคีรีขันธ์.
6. เทียมพบ ก้านเหลือง และรวีร สุตราม. 2550. การสำรวจความคิดเห็นของประชาชน โครงการ  
พัฒนาชุมชนเป็นพื้นที่แบบพึ่งพาตนเองและยั่งยืน อำเภอกระบุรี จังหวัดระนอง. โครงการ ADP  
ลำเลียง มูลนิธิศุภนิมิตแห่งประเทศไทย อำเภอกระบุรี จังหวัดระนอง.
7. เทียมพบ ก้านเหลือง และรวีร สุตราม. 2552. รายงานการวิจัยเชิงสำรวจปัจจัยการดื่ม เครื่องดื่มที่มี  
แอลกอฮอล์และการสูบบุหรี่ของเด็กและเยาวชนในจังหวัดชุมพร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2552.  
สำนักงานพัฒนาสังคมและความมั่นคงของมนุษย์จังหวัดชุมพร.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้