ผลของแบคเทอริโอซินและระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสในการผลิตนมพาสเจอร์ไรส์

Effect of Bacteriocin and Lactoperoxidase System in Pasteurized Milk Production

น้อมจิตต์ อ่อนแก้ว

Nomchit Onkaew

ก
หมู่ SF259 น๓๑ ๒๕๔๔ ก.๒
Key 212901
๒๘ ส.ค. 2544

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biotechnology
Prince of Songkla University
2544

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของแบคเทอริโอซินและระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสในการผลิตนมพาสเจอร์ไรส์

ผู้เขียน นางสาวน้อมจิตต์ อ่อนแก้ว

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

คณะกรรมการที่ปรึกษา

.....ประธานกรรมการ
(ดร. สุกัญญา จันทะชุม)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรัญ หันพงศ์กิตติกูล)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(ดร. สุกัญญา จันทะชุม)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรัญ หันพงศ์กิตติกูล)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล)

.....กรรมการ
(ดร. ทิพรัตน์ หงภัทรคีรี)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. ปิติ ทฤษฎิคุณ)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

นิสุดา กุณเพชรัตนะ ยรรยงระวีสุนทร
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
จันทนพรัตนโกษา
ผู้รับรอง
บัณฑิตวิทยาลัย ๒๐
วันที่ ๑๓ เดือน ๒ พ.ศ. ๒๕๕๓

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของแบคเทอริโอซินและระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสในการผลิตนมพาสเจอร์ไรส์

ผู้เขียน นางสาวน้อมจิตต์ อ่อนแก้ว

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2543

บทคัดย่อ

สกัดแยกแบคเทอริโอซินที่สร้างจาก *Lactobacillus casei ssp. rhamnosus* (SN11) ได้โดยการเหวี่ยงแยกเพื่อแยกเซลล์ออกแล้วกรองผ่าน Ultrafiltration ขนาด 100 kDa ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต แบบ 2 ขั้นตอนที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 40 และ 80 กรองผ่าน Ultrafiltration ขนาด 10 kDa แล้วกำจัดเกลือออกไปโดยการไดอะไลซิส ใช้ถุงไดอะไลซิสมีขนาดโมเลกุลผ่าน 3,500 Da แบคเทอริโอซินที่ได้มีขนาดอยู่ในช่วง 3,500-10,000 Da หลังจากทำแห้งโดยการ Freeze dry ได้แบคเทอริโอซินที่มีกิจกรรมการยับยั้ง 320 AU/mg ความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินเพิ่มขึ้น 14.22 เท่า นำแบคเทอริโอซินที่แยกได้มาใช้กับนมดิบ โดยการหาปริมาณการใช้ที่เหมาะสมกับนมดิบ พบว่าปริมาณแบคเทอริโอซิน 80 AU/ml เพียงพอต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ในนมดิบได้ โดยสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทั้งหมดในนมดิบที่เก็บที่อุณหภูมิห้องได้นาน 6 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 6 วัน และพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ *Bacillus cereus* จำนวน 10^5 CFU/ml ที่เติมลงไปในนมดิบที่เก็บที่อุณหภูมิห้องได้นาน 6 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 6 วัน โดยพบว่าความคงตัวของกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินที่อุณหภูมิห้องลดลงเหลือ 10 AU/ml ในชั่วโมงที่ 24 แต่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส กิจกรรมการยับยั้งลดลงเหลือ 40 AU/ml ในวันที่ 15 ของการเก็บ การศึกษาการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส (Lactoperoxidase : LPS) ในนมดิบโดยหาปริมาณการใช้ไธโอไซยาเนต (SCN^-) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่เหมาะสมเพียงพอในการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสเพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ พบว่าปริมาณที่เหมาะสมคือ ใช้ SCN^- 10 ppm และ H_2O_2 8 ppm โดยสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งหมดในนมดิบที่เก็บที่อุณหภูมิห้องได้นาน 6 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 4 วัน และพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* จำนวน 10^5 CFU/ml ที่เติมลงไปในนมดิบที่เก็บที่อุณหภูมิห้องได้นาน 6 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 7 วัน โดยพบว่า

การกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสไม่มีผลกับการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดสที่มีอยู่เดิมในนมดิบ ระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสมีความคงตัวสมบูรณ์อยู่ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ประมาณ 3 วัน เมื่อศึกษาผลของการใช้แบคเทอริโอซินร่วมกับการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสในนมดิบ พบว่าการใช้ทั้ง 2 วิธี สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งหมดและ *B. cereus* ได้นานกว่าการใช้แบคเทอริโอซินหรือการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสอย่างใดอย่างหนึ่งเพียงอย่างเดียว และพบว่าการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสก่อนเติมแบคเทอริโอซินเป็นเวลา 2 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพยับยั้งจุลินทรีย์ดีกว่าการเติมแบคเทอริโอซินก่อนกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสและการเติมแบคเทอริโอซินพร้อมกับกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส เมื่อนำนมดิบที่มีการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสแล้วเติมแบคเทอริโอซินมาพาสเจอร์ไรส์ โดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่าสามารถเก็บนมพาสเจอร์ไรส์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้มากกว่า 18 วัน แต่นมพาสเจอร์ไรส์ชุดควบคุมที่ไม่มีทั้งการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสและไม่เติมแบคเทอริโอซินเก็บได้นาน 7 วัน และพบว่าการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสและเติมแบคเทอริโอซินสามารถลดจำนวน *B. cereus* และ *Bacillus stearothermophilus* ในนมดิบและยับยั้งการเจริญในนมพาสเจอร์ไรส์ได้ โดยที่กิจกรรมการยับยั้งของระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสในนมพาสเจอร์ไรส์ยังคงมีอยู่ในช่วง 3 วันแรกของการเก็บเท่านั้น ส่วนกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินซึ่งยังคงมีอยู่ในนมพาสเจอร์ไรส์ยิ่งลดลงเมื่อเก็บนมพาสเจอรไรส์ไว้เป็นเวลานานขึ้น โดยพบว่ากิจกรรมลดลงเหลือ 10 AU/ml หลังจากเก็บนมพาสเจอร์ไรส์ไว้ 18 วัน

Thesis Title	Effect of Bacteriocin and Lactoperoxidase System in Pasteurized Milk Production
Author	Miss Nomchit Onkaew
Major Program	Biotechnology
Academic Year	2000

Abstract

Bacteriocin from *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* (SN11) was produced and partially purified by centrifugation, ultrafiltration and two steps of ammonium sulfate precipitation, respectively. Several concentrations of partially purified bacteriocin were used for a raw milk preservation. It was found that 80 AU/ml of bacteriocin gave the lowest amount of total viable count (TVC) and *Bacillus cereus* count. Bacteriocin provided maximum bactericidal activity to microorganism in TVC for 6 hours at room temperature and 6 days at 4 $^{\circ}$C. Whereas it provided maximum bactericidal activity to *B. cereus*, innoculated to raw milk abount 10^5 CFU/ml, for 6 hours at room temperature and 6 days at 4 $^{\circ}$C. Stability of bacteriocin activity decreased from 80 AU/ml to 10 AU/ml after storage at room temperature for 24 hours and decreased from 80 AU/ml to 40 AU/ml after storage at 4 $^{\circ}$C for 15 days. Activation of the lactoperoxidase system in raw milk was performed by adding NaSCN 10 ppm and H_2O_2 8 ppm. The lactoperoxidase system gave maximum bactericidal activity to TVC for 6 hours and 4 days at room temperature and 4 $^{\circ}$C, respectively. While giving maximum bactericidal activity to *B. cereus* for 6 hours and 7 days at room temperature and 4 $^{\circ}$C, respectively. An activated lactoperoxidase system in raw milk was not affected to lactoperoxidase activity. Stability of the lactoperoxidase system in raw milk was stable for 3 hours at room temperature and 3 days at 4 $^{\circ}$C. Activation of the lactoperoxidase system for 2 hour before adding bacteriocin was greater than adding bacteriocin before activating the lactoperoxidase system and

activation of the lactoperoxidase system and adding bacteriocin in the same time. The milk which activated lactoperoxidase system and added bacteriocin were pasteurized at 63 °C for 30 minutes and stored at 4 °C. Shelf-life of the pasteurized milk sample was 18 days compared to 7 days of a pasteurized milk which no activated lactoperoxidase system and no added bacteriocin. The combination of bacteriocin and activated the lactoperoxidase system in pasteurized milk gave more effective effect on decreasing of *B. cereus* and *Bacillus stearothermophilus* count compared to normal pasteurization. Activity of the lactoperoxidase system was not found in stored-pasteurized milk at 4 °C. Anyway, bacteriocin still remain activity was 10 AU/ml for 18 days.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ดร. สุกัญญา จันทะชุม ประธานกรรมการที่ปรึกษาที่กรุณาให้คำแนะนำในการทำวิจัย การค้นคว้าและการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรัญ หันพงศ์กิตติกูล กรรมการที่ปรึกษาร่วมที่ให้คำแนะนำต่าง ๆ ในการทำวิจัย รองศาสตราจารย์ วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล กรรมการผู้แทนคณะอุตสาหกรรมเกษตร และ ดร. ทิพรัตน์ หงภัทรคีรี กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณบัณฑิตวิยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้เงินทุนสนับสนุนในการทำวิทยานิพนธ์ และขอขอบคุณฟาร์มโคนม ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติและโรงงานโชติวัฒน์อุตสาหกรรมการผลิตที่ให้วัตถุดิบในการทำวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่ชาย น้องชาย ที่ให้กำลังใจและกำลังทรัพย์ในการศึกษามาโดยตลอด ขอขอบคุณ พี่ ๆ น้อง ๆ เพื่อน ๆ เจ้าหน้าที่คณะอุตสาหกรรมเกษตรทุกท่านที่มีส่วนช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ และสุดท้ายขอขอบคุณทุกกำลังใจ ที่มีส่วนให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ด้วยดี

น้อมจิตต์ อ่อนแก้ว

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบาญ	(8)
รายการตาราง	(10)
รายการภาพ	(12)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	2
1. แบคเทอริโอซิน	2
2. ระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส	13
3. การเน่าเสียของนม	25
วัตถุประสงค์	27
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	28
วัสดุ	28
อุปกรณ์	29
การวิเคราะห์	30
วิธีการ	34
3. ผลและวิจารณ์	41
การผลิตแบคเทอริโอซิน	41
การใช้แบคเทอริโอซินกับนมดิบ	49
การกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในนมดิบ	60
ผลของการใช้แบคเทอริโอซินร่วมกับการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสในนมดิบ	72

สารบาญ (ต่อ)

	หน้า
ศึกษาประสิทธิภาพการใช้แบคเทอริโอซินร่วมกับการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสในการประยุกต์ใช้กับการผลิตนมพาสเจอร์ไรส์	78
4. สรุป	88
เอกสารอ้างอิง	92
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	99
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมีและวิธีวิเคราะห์	102
ภาคผนวก ค มาตรฐานที่เกี่ยวข้องกับน้ำนม	106
ประวัติผู้เขียน	108

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	กลุ่มของแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลกติกกลุ่ม *Lactobacillus*	4
2	ตัวอย่างแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติกกลุ่ม *Lactobacillus*	5
3	ตัวอย่างการทำบริสุทธิ์แบคเทอริโอซินที่ได้จากแบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus*	10
4	การใช้ไนซินในผลิตภัณฑ์นม	13
5	กิจกรรมของเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดสในน้ำนมของสัตว์ชนิดต่าง ๆ	15
6	ปริมาณไธโอไซยาเนต (SCN^-) ในส่วนต่าง ๆ ของร่างกายมนุษย์และโค	17
7	ปริมาณโปรตีนและประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของแบคเทอริโอซิน	46
8	กิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ *B. cereus* ของแบคเทอริโอซินที่แยกได้ในแต่ละขั้นตอนการสกัด	47
9	กิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ *B. cereus* ของแบคเทอริโอซินที่แยกได้กับไนซินทางการค้า	48
10	คุณภาพและลักษณะเบื้องต้นของนมดิบจากฟาร์มโคนม ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ	49
11	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (TVC)ในนมดิบเมื่อเติมแบคเทอริโอซินลงในนมดิบในปริมาณต่าง ๆ แล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง	51
12	พีเอช (pH) ของนมดิบเมื่อเติมแบคเทอริโอซินลงในนมดิบในปริมาณต่าง ๆ แล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง	52
13	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (TVC)ในนมดิบเมื่อเติมแบคเทอริโอซินลงในนมดิบในปริมาณต่าง ๆ แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	52
14	พีเอช (pH) ของนมดิบเมื่อเติมแบคเทอริโอซินลงในนมดิบในปริมาณต่าง ๆ แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	53
15	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (TVC) และพีเอช (pH) ของนมดิบเมื่อกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสแล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง	61

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
16	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (TVC) และพีเอช (pH) ของนมดิบเมื่อกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสแล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	61
17	คุณลักษณะของนมพาสเจอร์ไรส์ที่ได้จากการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสแล้วเติมแบคเทอริโอซินในนมดิบก่อนพาสเจอร์ไรส์	79
18	มาตรฐานของนมดิบทางด้านจุลินทรีย์	106
19	มาตรฐานของนมพาสเจอร์ไรส์ทางด้านจุลินทรีย์	107
20	การแบ่งชั้นน้ำนมโดยการทดสอบด้วยเมทธิลีนบลู	107

รายการภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การเจริญเติบโตของ *L. casei* ssp. *rhamnosus* (SN11) และการผลิตแบคเทอริโอซิน ณ เวลาต่าง ๆ	42
2	การเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (TVC) และพีเอช (pH) ของนมดิบที่เติมแบคเทอริโอซิน 80 AU/ml ระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิห้อง (A) และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (B)	55
3	การเปลี่ยนแปลงจำนวนของ *B. cereus* ในนมดิบที่เติมแบคเทอริโอซิน 80 AU/ml ระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิห้อง (A) และอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (B)	57
4	กิจกรรมการยับยั้ง *B. cereus* ของแบคเทอริโอซินในนมดิบที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง (A) และอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (B)	59
5	การเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (TVC) และพีเอช (pH) ของนมดิบที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิห้อง (A) และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (B)	65
6	การเปลี่ยนแปลงจำนวนของ *B. cereus* ในนมดิบที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิห้อง (A) และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (B)	68
7	การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดสและปริมาณ SCN^- ในนมดิบที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง (A) และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (B)	71
8	การเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (A) และ *B. cereus* (B) ในนมดิบที่เติมแบคเทอริโอซิน กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส (LPS) และใช้ทั้งสองวิธีร่วมกันในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิห้อง	74
9	การเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทีย์ทั้งหมด (A) และ *B. cereus* (B) ในนมดิบที่เติมแบคเทอริโอซินก่อนกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส (LPS) กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสก่อนเติมแบคเทอริโอซิน และใช้ทั้งสองวิธีพร้อมกันในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิห้อง	77

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
10	การเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในนมพาสเจอร์ไรส์ที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส (LPS) แล้วเติมแบคเทอริโอซินในนมดิบก่อนพาสเจอร์ไรส์	80
11	การเปลี่ยนแปลงจำนวน *B. cereus* ในนมพาสเจอร์ไรส์ที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส (LPS) แล้วเติมแบคเทอริโอซินในนมดิบก่อนพาสเจอร์ไรส์	82
12	การเปลี่ยนแปลงจำนวน *B. stearothermophilus* ในนมพาสเจอร์ไรส์ที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส (LPS) แล้วเติมแบคเทอริโอซินในนมดิบก่อนพาสเจอร์ไรส์	84
13	การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของแบคเทอริโอซิน กิจกรรมของเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดส และปริมาณ SCN^- ในนมพาสเจอร์ไรส์ที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	87
14	กราฟมาตรฐานโปรตีน	103
15	กราฟมาตรฐานไธโอซัลเฟต	103

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

น้ำนมเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง เกิดการเสื่อมเสียเนื่องจากจุลินทรีย์ได้หลายชนิดอีกทั้งส่วนประกอบทางเคมีของน้ำนมเกิดการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากอิทธิพลของกรรมวิธีการแปรรูปได้ง่าย ปัญหาสำคัญที่ทำให้นมพาสเจอร์ไรส์เสื่อมเสียง่าย มีอายุการเก็บสั้น ทั้งที่เก็บรักษาไว้อย่างถูกต้องที่อุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส เนื่องมาจากจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนลงไปในน้ำนมนั่นเอง โดยเฉพาะแบคทีเรียเป็นตัวการสำคัญที่ทำให้นมพาสเจอร์ไรส์มีคุณภาพต่ำ เกิดการเน่าเสียหรือเปลี่ยนแปลงไปในทางที่ไม่ต้องการ นอกจากนี้อาจมีจุลินทรีย์บางชนิดในน้ำนมก่อให้เกิดโรคได้ (ชูรัฐ แปลกสงวนศรี, 2534) ดังนั้นในกระบวนการแปรรูปนมดิบสำหรับดื่มหรือผลิตผลิตภัณฑ์จำเป็นต้องมีการควบคุมให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ถูกสุขลักษณะและมีคุณภาพเป็นที่ยอมรับ วิธีการใช้สารที่ผลิตจากธรรมชาติและการกระตุ้นระบบป้องกันโดยธรรมชาติในนมดิบ (Natural protection) ให้มีกิจกรรมสูงขึ้นเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในนมดิบและผลิตภัณฑ์เป็นวิธีหนึ่งที่มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคสูง และสามารถปรับปรุงกระบวนการแปรรูปให้ดียิ่งขึ้น จึงเป็นวิธีที่น่าสนใจและควรได้รับการพัฒนาเพื่อการใช้ประโยชน์มากยิ่งขึ้น

แบคเทอริโอซินเป็นสารประกอบโปรตีนสร้างจากจุลินทรีย์ได้หลายชนิดมีผลยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ทำให้อาหารเสียรวมทั้งชนิดที่ทำให้อาหารเป็นพิษ (Brink *et al.*,1994) พบว่าแบคเทอริโอซินยังใช้ได้ดีกับกระบวนการแปรรูปที่ใช้ความร้อนกับอาหารที่มีปริมาณน้ำอิสระสูงและมีความเป็นกรดต่ำ จึงมีประโยชน์ในการถนอมอาหาร เพราะสามารถประหยัดพลังงานความร้อนและได้ผลิตภัณฑ์คุณภาพดีอีกทั้งเป็นวิธีการที่ใช้สารที่ได้จากธรรมชาติ (Gould, 1996) ส่วนระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสเป็นระบบป้องกันการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติซึ่งโดยปกติจะพบในน้ำนมดิบ (Zapico *et al.*, 1998) โดยที่เอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดสจะกระตุ้นปฏิกิริยาออกซิเดชันของไธโอไซยาเนต (SCN^-) โดยมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ได้เป็นไฮโปไธโอไซยาเนต ($OSCN^-$) ซึ่งจะมีฤทธิ์ทำลายหรือยับยั้งเซลล์แบคทีเรียและจุลินทรีย์อื่น ๆ ได้หลายชนิด จึงมีประสิทธิภาพในการเก็บรักษานมดิบได้ การนำแบคเทอริโอซินและระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสมาใช้ร่วมกันเป็นเทคโนโลยีร่วม (Hurdle Technology) ในการยับยั้งการเจริญของ

จุลินทรีย์ ช่วยในการยืดอายุการเก็บรักษานมดิบและผลิตภัณฑ์ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ตรวจเอกสาร

1. แบคเทอริโอซิน

1.1 ความหมายของแบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซิน คือ สารเปปไทด์หรือสารประกอบโปรตีนที่สร้างจากแบคทีเรีย มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอื่นที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกับแบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซิน (Brink *et al.*,1994; Samelis *et al.*, 1994; Parente and Hill, 1992) หรือสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่มีความไวต่อแบคเทอริโอซินหรือที่มีฤทธิ์ต่อต้านแบคทีเรียในสกุลเดียวกัน แบคเทอริโอซินที่แบคทีเรียแกรมลบสร้างขึ้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ และแบคเทอริโอซินที่แกรมบวกสร้างขึ้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก (Kawai *et al.*, 1994; Barefoot and Klaenhammer, 1983) Montville และ Kaiser (1993) รายงานว่า แบคเทอริโอซินเป็นสารประกอบโปรตีนที่ต่อต้านจุลินทรีย์ที่ใช้ในอาหารแต่สารปฏิชีวนะจะใช้ในทางการแพทย์กับการรักษาโรค แต่ De Vuyst และ Vandamme (1994) กล่าวว่าแบคเทอริโอซินจะมีความแตกต่างกับสารปฏิชีวนะในการออกฤทธิ์ยับยั้ง โดยที่แบคเทอริโอซินซึ่งผลิตจากแบคทีเรียแกรมลบจะมีฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียแกรมลบ ส่วนแบคเทอริโอซินซึ่งผลิตจากแบคทีเรียแกรมบวกจะมีฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก ในขณะที่สารปฏิชีวนะคือสารที่ผลิตโดยสิ่งมีชีวิตทั้งพวกโปรคาริโอต (Procaryotes) และ ยูคาริโอต (Eucaryotes) ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นทั้งพวกโปรคาริโอตและยูคาริโอตโดยใช้เพียงระดับความเข้มข้นต่ำแต่ไม่ยับยั้งตัวมันเอง

1.2 แบคทีเรีย *L. casei* ssp. *rhamnosus* (SN11) และแบคเทอริโอซินที่สร้าง

L. casei ssp. *rhamnosus* (SN11) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เซลล์รูปร่างเป็นท่อน ไม่สร้างสปอร์ เป็นพวก Homofermentative แยกได้จากอาหารหมักประเภทส้มฟัก สามารถเจริญและสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ดีเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS พีเอชเริ่มต้นของอาหารที่ 5.5 สามารถเจริญและผลิตแบคเทอริโอซินได้ทั้งอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ 35 องศาเซลเซียส แบคเทอริโอซินที่เชื้อสร้างขึ้นสามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส

ได้นาน 45 นาที และทนต่อสภาวะเป็นกรดได้โดยยังคงมีกิจกรรมที่พีเอช 5 ถูกยับยั้งกิจกรรมได้ด้วยเอนไซม์ โปรเนส อี (Pronase-E) โปรตีเนส เค (Proteinase-K) ทริปซิน (Trypsin) และอัลฟา-ไคโมทริปซิน (α-Chymotrypsin) แต่ทนต่อเอนไซม์คะตะเลส (Catalase) เมื่อนำ *L. casei* ssp. *rhamnosus* (SN11) มาเพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้แก่ *Staphylococcus aureus* *Lactobacillus sake* *Escherichia coli* *Eschericia coli* 0157:H7 *Lactobacillus plantarum* *Listeria monocytogen* 018 และ *Carnobacterium* sp. M 114-25 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอช 5.5 เป็นเวลา 18 ชั่วโมง พบว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้สูงถึงร้อยละ 89-99 (ศิรินาถ หนูเอก, 2540)

1.3 ชนิดของแบคเทอริโอซิน

Klaenhammer (1988) แบ่งแบคเทอริโอซินตามความสามารถในการยับยั้งเป็น 2 ชนิด คือ

1. แบคเทอริโอซินที่มีการยับยั้งในช่วงแคบ (Narrow inhibitory spectrum) เป็นแบคเทอริโอซินที่มีความสามารถในการยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียในจีนัส (Genus) เดียวกัน เช่น Lactocin 27 ที่ผลิตโดย *Lactobacillus helveticus* LP27 ยับยั้งเฉพาะ *Lactobacilli* Diplococcin ที่ผลิตโดย *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* 346 ยับยั้งเฉพาะ *Lactococci* Caseicin 80 ที่ผลิตโดย *Lactobacillus casei* B80 ยับยั้ง *Lactobacillus casei* B109 หรือยับยั้งแบคทีเรียในจีนัสอื่นได้เล็กน้อย เช่น Lactacin F ยับยั้ง *Lactobacilli* และ *Enterococcus faecalis*

2. แบคเทอริโอซินที่มีการยับยั้งในช่วงกว้าง (Broad inhibitory spectrum) เป็นแบคเทอริโอซินที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกอื่น ๆ เช่น ไนซิน (Nisin) จากเชื้อ *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก และ Pediocin AcH จากเชื้อ *Pediococcus acidilactici* ยับยั้ง *Pediococci* *Lactobacilli* *Leuconostocs* *Bacilli* *Enterococci* *Staphylococci* *Listeriae* และ *Clostridia*

Klaenhammer และคณะ (1993) ได้แบ่งชนิดของแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลกติกกลุ่ม *Lactobacillus* ไว้ดังตารางที่ 1 และตัวอย่างแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลกติกกลุ่ม *Lactobacillus* ไว้ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 1 กลุ่มของแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลกติกกลุ่ม *Lactobacillus*

กลุ่ม	คุณลักษณะและตัวอย่างแบคเทอริโอซินในกลุ่ม
I Lantibiotics	โมเลกุลมีขนาดเล็ก ทนความร้อนสูง - Lactocin S ..... 3.7 kDa (33 aa) - Carnocin U 149..... 4.6 kDa (35-37 aa)
II Small hydrophobic peptides	ขนาดโมเลกุลน้อยกว่า 13 kDa ทนความร้อนได้ปานกลาง (> 30 นาที ที่ 100 องศาเซลเซียส หรือ 15 นาที ที่ 121 องศาเซลเซียส) - 100 องศาเซลเซียส Lactocin 27..... 12.4 kDa Carnobacteriocins...4.9 kDa Lactacin B..... 6.3 kDa - 121 องศาเซลเซียส Lactacin F ..... 6.3 kDa (57 aa) Brevicin 37
III Large heat-labile proteins	ขนาดโมเลกุลใหญ่ ทำลายได้ง่ายด้วยความร้อน (10-15 นาทีที่อุณหภูมิ 60-100 องศาเซลเซียส) - Helveticin J .....37 kDa (334 aa) - Acidophilucin A - Lacticin A & B

ที่มา : Klaenhammer และคณะ (1993)

ตารางที่ 2 ตัวอย่างแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติกกลุ่ม *Lactobacillus*

แบคทีเรียแลกติก	แบคเทอริโอซิน	คุณลักษณะ
Lactobacillus acidophilus	- Lactacin B	- มวลโมเลกุลสูง ประมาณ 6.3 kDa
	- Lactacin F	- มวลโมเลกุลสูง (6.3 kDa) มีกรดอะมิโน 57 ตัว ทนความร้อนสูง (121 องศาเซลเซียส 15 นาที)
	- Acidophilucin A	- เป็นสารประกอบโปรตีนถูกยับยั้งด้วยเอนไซม์ทริปซินและแอกติเนส ทนความร้อนปานกลาง (60 องศาเซลเซียส 10 นาที)
Lactobacillus casei	- Caseicin 80	- มวลโมเลกุล 40 kDa pI เท่ากับ 4.5 ทนความร้อนปานกลาง (60 องศาเซลเซียส 10 นาที) ทำงานได้ที่พีเอช 3-9
Lactobacillus brevis	- Brevicin 37	- เป็นสารประกอบโปรตีนทนความสูง (121 องศาเซลเซียส 60 นาที) ทำงานได้ที่พีเอช 2-10 ถูกยับยั้งโดยคลอโรฟอร์ม
Lactobacillus carnis	- Bacteriocin(s)	- เป็นสารประกอบโปรตีนทนความร้อนปานกลาง (60 องศาเซลเซียส 10 นาที) ทำงานได้ที่พีเอช 2-11
	- Carnocin U 149	- เป็น Lanthionine มวลโมเลกุล 4.6 KDa ทนความร้อนปานกลาง
Lactobacillus delbrueckii	- Lacticin A	- เป็นสารประกอบโปรตีนทนความร้อนปานกลาง (60 องศาเซลเซียส 10 นาที)
	- Lacticin B	- เป็นสารประกอบโปรตีนทนความร้อนปานกลาง (60 องศาเซลเซียส 10 นาที)

ตารางที่ 2 (ต่อ)

แบคทีเรียแลกติก	แบคเทอริโอซิน	คุณลักษณะ
Lactobacillus fermentii	- Bacteriocin	- เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของลิโปคาร์โบไฮเดรต
Lactobacillus gasserii	- Gasserricin A	- เป็นสารประกอบโปรตีนถูกยับยั้งโดยเอนไซม์ทริปซิน ทนความร้อน 120 องศาเซลเซียส 20 นาที
Lactobacillus helveticusi	- Lactocin 27	- เป็นสารประกอบโปรตีน (protein-lipo polysaccharide) มวลโมเลกุล 12 kDa
	- Helveticin J	- มวลโมเลกุล 37 kDa
Lactobacillus plantarum	- Plantaricin A	- เป็นสารประกอบโปรตีนคงตัวที่ 100 องศาเซลเซียส 30 นาที ทำงานได้ที่พีเอช 4-6.5
	- Lacticin B	- เป็นสารประกอบโปรตีน
Lactobacillus delbrueckii	- SakacinA	- เป็นสารประกอบโปรตีน
	- Lactocin S	- เป็น Lanthionine มีกรดอะมิโน 33 ตัว ทำงานได้ที่พีเอช 4.5-7.5 มีด้านไม่มีขั้วร้อยละ 50

ที่มา : ดัดแปลงจาก Klaenhammer และคณะ (1993)

1.4 กลไกการทำลายจุลินทรีย์ของแบคเทอริโอซิน (Mode of action)

แบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียต่างชนิดกันจะมีคุณสมบัติทางเคมีต่างกัน และมีความสามารถในการยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ต่างกันด้วย กลไกการออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซิน (Ennaher *et al.*, 1999; Kaise and Montville, 1996; Broughton, 1990) มีดังนี้

1. ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ ผนังเซลล์เป็นส่วนที่อยู่นอกสุดของเซลล์ มีความแข็งแรงทำหน้าที่ป้องกันสิ่งที่อยู่ในเซลล์ โดยแบคเทอริโอซินจะไปยับยั้งการสังเคราะห์เปปติโดไกลแคน (Peptidoglycan) ซึ่งเป็นส่วนประกอบผนังเซลล์ของแบคทีเรีย

2. รบกวนหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ เช่น มีผลต่อ Proton motive force ของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ความสมดุลของ K^+ ของเซลล์เปลี่ยนแปลงไป โดยมีการผ่านเข้าไปในเซลล์มากขึ้น เกิดการสะสมทำให้แรงดันในเซลล์ไม่สมดุล เซลล์จะแตกและตายในที่สุด

3. ยับยั้งการสร้างกรดนิวคลีอิก ทั้ง Deoxyribonucreic acid (DNA) และRibonucreic acid (RNA)

4. ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน แต่พบว่ากระบวนการสังเคราะห์โปรตีนหลายขั้นตอนที่แบคเทอริโอซินยับยั้งได้นั้น สามารถกลับคืนสู่สภาพเดิมได้เมื่อความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินลดลง

1.5 การทำแบคเทอริโอซินให้บริสุทธิ์

การทำแบคเทอริโอซินให้บริสุทธิ์ประกอบด้วยหลายกระบวนการ ทั้งนี้เพื่อแยกเอาสารที่ไม่ต้องการออกไป

1. การกรองโดยใช้ความดัน (Ultrafiltration)

เป็นการกรองสารโดยใช้ความดันช่วยในการกรองผ่านเพื่อให้สามารถกรองสารขนาดโมเลกุลที่ต้องการได้รวดเร็วขึ้น ช่วยแยกโปรตีนที่ไม่ต้องการออกไป และเป็นการเพิ่มความเข้มข้นสารได้ด้วย Holo และคณะ (1991) ได้เพิ่มความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่แยกได้จาก *Lactobacillus acidophilus* LF221 โดยการนำน้ำหมักที่ได้หลังจากแยกเซลล์ออกแล้วมากรองด้วยกระดาษกรอง (Millipore) โดยมีขนาดกระดาษ 10 kDa สามารถเพิ่มความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินได้ 20 เท่า

2. การตกตะกอนโปรตีน (Protein precipitation)

การตกตะกอนเป็นวิธีหนึ่งที่จะแยกโปรตีนออกมาโดยอาศัยคุณสมบัติในการละลายของโปรตีน สารละลายที่ใช้ในการตกตะกอนอาจเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น แฮลกอออล์ อีเทอร์ อะซิโตน หรือสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต การเติมเกลือลงไปในปริมาณเล็กน้อยเพื่อทำให้โปรตีนละลายได้ดียิ่งขึ้น เพราะเกลือจะเกาะกับโปรตีนแล้วรวมกับน้ำได้ดี กระบวนการนี้ เรียกว่า Salting in ในขณะเดียวกันการเติมเกลือในปริมาณที่มากเพื่อให้โปรตีนตกตะกอน เรียกว่า Salting out (Klaenhammer *et al.*, 1993)

การตกตะกอนแบคเทอริโอซินส่วนใหญ่มักใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต เนื่องจาก

1. เป็นการเพิ่มการไม่ละลายระหว่างโปรตีนกับโปรตีน (Hydrophobic protein – protein interaction)

2. การมีทั้งส่วนที่ละลายน้ำได้และไม่ได้ จะทำให้โปรตีนจำเพาะตกตะกอนในช่วงความเข้มข้นเกลือในช่วงแคบ

3. ละลายได้สูง (ประมาณ 4 โมล สารละลายจะอิ่มตัว 100 เปอร์เซนต์)

4. ความร้อนมีผลเล็กน้อยต่อการละลาย

5. สารละลายอิ่มตัวมีความหนืดต่ำและมีความหนาแน่นต่ำ ทำให้แยกตะกอนโดยการหมุนเหวี่ยงออกได้ง่าย

6. เป็นวิธีการที่ง่าย มีประสิทธิภาพสูง

เมื่อโปรตีนตกตะกอนแล้วสามารถแยกโปรตีนออกจากสารละลายได้โดยการกรองหรือเหวี่ยงแยกเอาตะกอนออก แบคเทอริโอซินที่ได้จะมีความบริสุทธิ์เล็กน้อย จำเป็นต้องนำมาผ่านกระบวนการอื่นต่อไป

3. การกำจัดเกลือ (Desalting)

การกำจัดเกลือหรือแยกสารอนุภาคเล็ก ๆ ที่ปะปนมาได้โดยวิธีไดอะไลซิส (Dialysis) ซึ่งเป็นการแยกสารโมเลกุลเล็กออกจากโมเลกุลใหญ่ โดยใช้ Semipermeable membrane

Lee และคณะ (1999) ได้ทำบริสุทธิ์แบคเทอริโอซินที่ได้จาก *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* H-S59 ซึ่งแยกได้จากกิมจิ โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 75 และกำจัดเกลือโดยการไดอะไลซิสข้ามคืน พบว่ากิจกรรมการยับยั้งจำเพาะเพิ่มขึ้นจาก 4.3 เท่า เป็น 5.3 เท่า และความบริสุทธิ์ของแบคเทอริโอซินเพิ่มขึ้น 1.2 เท่า

จากการทดลองของ Diaz และคณะ (1995) ซึ่งได้ทำบริสุทธิ์ Plantaricin S ที่ได้จาก *Lactobacillus plantarum* LPC 010 โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 80 เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่ากิจกรรมการยับยั้งจำเพาะเพิ่มขึ้นจาก 2.64 เป็น 1,714.4 AU/mg เมื่อทำบริสุทธิ์ Staphylococcin Bac R1 ที่ได้จาก *S. aureus* UT0007 โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 60 เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง พบว่ากิจกรรมการยับยั้งจำเพาะเพิ่มขึ้นจาก 152 AU/mg เป็น 1,259 AU/mg และความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเป็น 8.3 เท่า (Crupper *et al.*, 1997)

Matijasic และคณะ (1998) แยกแบคเทอริโอซิน 2 ชนิด คือ Acidocin LF221 A และ Acidocin LF221 B ได้จาก *Lactobacillus acidophilus* LF 221 โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 300 g/l เก็บเกี่ยวแบคเทอริโอซินได้ร้อยละ 80 แต่ Holo และคณะ (1991) ได้ทำบริสุทธิ์ Lactococcin A จาก *Lactococcs lactis* ssp. *cremoris* โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 280 g/l เก็บเกี่ยวแบคเทอริโอซินได้ร้อยละ 87

การทำแบคเทอริโอซินให้บริสุทธิ์ขึ้นต้องใช้วิธีการอีกหลายขั้นตอน ได้แก่ การใช้โครมาโตกราฟฟี เช่น Gel filtration Ion-exchange HPLC และการใช้ Gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Muariana and Luchansky, 1993) ตัวอย่างการทำบริสุทธิ์แบคเทอริโอซินที่ได้จากแบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* แสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ตัวอย่างการทำบริสุทธิ์แบคเทอริโอซินที่ได้จากแบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus*

เชื้อจุลินทรีย์	แบคเทอริโอซิน	ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
L. acidophilud 11088	Lactacin F	- ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต - Gel filtration - HPLC - SDS-PAGE	6.3
L. casei B80	Caseicin 80	- Ultrafiltration - Cation exchange - Gel filtration - FPLC	41
L. fermenti 466	ไม่ระบุชื่อ	- Ultrafiltration - ไดอะไลซิส - Gel filtration - Cation exchange	-
L. helveticus 481	Helveticin J	- ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต - Gel filtration - SDS-PAGE	37
L. plantarum C-11	PlantaricinA	- ไดอะไลซิส	-
L. reutei LA6	Reutericin6	- Ultrafiltration - ไดอะไลซิส	-
*L. sake*Lb706	SakacinA	- ไดอะไลซิส - Ultrafiltration	-
Lactobacillus sp.100-37	ไม่ระบุชื่อ	- ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต - ไดอะไลซิส	-

ที่มา : Muriana และ Luchansky (1993)

1.6 ไนซิน (Nisin)

ไนซินเป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Lactobacillus lactis* ssp. *lactis* มีมวลโมเลกุล 3.5 kDa มีความไวต่อเอนไซม์อัลฟาไคโมทริปซิน (α-Chymotrypsin) (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2537) และแพนครีเอติน (Pancreatin) (Broughton, 1990) แต่ทนต่อเอนไซม์โปรเนส (Pronase) ทริปซิน (Trypsin) (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2537) อีลาสเทส (Elastase) คาร์บอกซีเปปติเดส เอ (Carboxypeptidase A) เปปซิน (Pepsin) และ อิเลปซิน (Erepsin) (Broughton, 1990) และทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ภายใต้สภาวะที่เป็นกรด (Klaenhammer, 1988) ใช้ในอาหารครั้งแรกโดย Hirsch และคณะ ในปี ค.ศ. 1951 เพื่อป้องกันการเน่าเสียของเนยแข็งแบบสวิส (swiss-chees) จาก *Clostridium butyricum* ไนซินมีชื่อทางการค้าว่า Nisaplin (Aplin and Barrett, Ltd., England) (Dean and Zottola, 1996; Vandenbergh, 1993; Bell and Delacy, 1987) ต่อมาได้นำมาใช้ในอาหารอย่างกว้างขวาง เนื่องจากมีข้อดีหลายประการ คือ

1. ไม่มีพิษ
2. ทนทานต่อความร้อน
3. ถูกทำลายได้โดยเอนไซม์ในระบบย่อยอาหาร
4. ไม่ทำให้สี กลิ่น รสของผลิตภัณฑ์อาหารเปลี่ยนแปลง
5. มีความคงตัวในการเก็บรักษา
6. ผลิตโดยธรรมชาติโดยจุลินทรีย์

พีเอชที่เหมาะสมสำหรับไนซินคือ 6.0-6.5 ถ้าพีเอชสูงกว่านี้ไนซินจะไม่มีผลในการยับยั้ง *Clostridium sporogenes* ใช้ไนซินในอาหารได้หลายประเภท เช่น อาหารกระป๋อง ผัก ผลไม้ เนื้อ ปลา ซุป นม ครีมและเนยเหลว (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2537) ไนซินมีกิจกรรมการยับยั้งในช่วงกว้าง โดยจะยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกจำพวก *Lactococci Bacilli Micrococci S. aureus L. monocytogenes* และพวกสร้างสปอร์ เช่น *Clostridium botulinum* ในแถบเขตร้อนคุณภาพของนมดิบจะมีผลต่ออายุการเก็บของนมพาสเจอร์ไรส์มาก เนื่องจากเกิดปัญหาจากระยะทางการขนส่ง อุณหภูมิที่สูง การรักษาความเย็นไม่ทั่วถึง อายุการเก็บของนมจึงสั้น การใช้ไนซินมีส่วนช่วยแก้ปัญหาอายุการเก็บของนมได้ทั้งในการเก็บที่อุณหภูมิต่ำ ปานกลางหรืออุณหภูมิสูง โดยการใช้ไนซินในปริมาณ 30-50 IU/ml ก็อาจเพียงพอ ในปัจจุบันไนซินได้รับการยอมรับให้ใช้มากกว่า 47 ประเทศ (Broughton, 1990) เป็นแบคเทอริโอซิน

ชนิดเดียวที่มีการนำไปประยุกต์ใช้ในทางการค้าในอุตสาหกรรมอาหาร (Bring *et al.*, 1994) โดยองค์การอนามัยโลกและองค์การอาหารโลก (FAO/WHO) กำหนดให้บริโภคได้ไม่เกิน 30,000 IU ต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวันโดยไม่มีผลกระทบต่อความปลอดภัย (Daeschel, 1990) ไนซินจะถูกย่อยอย่างรวดเร็วโดยเอนไซม์ในลำไส้เล็ก และตรวจไม่พบไนซินในน้ำลายภายหลังจากให้สารละลายไนซินกับผู้ทดสอบไปแล้ว 10 นาที (Broughton, 1990)

1.7 การใช้แบคเทอริโอซินในน้ำนมและผลิตภัณฑ์

Giraffa และคณะ (1995) รายงานว่าการใช้เชื้อเริ่มต้น *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus delbluekii* ssp. *bulgaricus* หรือใช้เชื้อ *Enterococcus faecium* 7C5 สายพันธุ์ที่สร้างแบคเทอริโอซิน ในนมเพียงอย่างใดอย่างหนึ่ง ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria innocua* แต่ถ้ามีการใช้เชื้อเริ่มต้นร่วมกับเชื้อ *Enterococcus faecium* 7C5 จะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria innocua* ได้อย่างสมบูรณ์ ทั้งนี้เนื่องจากการเสริมฤทธิ์ (Synergistic) กันของแบคเทอริโอซินที่เชื้อสร้างขึ้นและพีเอชที่ลดลง

Dean และ Zottola (1996)ทดลองใช้ไนซินเพื่อยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* V7 ในไอศครีมที่มีไขมันร้อยละ 10 และไอศครีมที่ลดปริมาณไขมัน (ไขมันร้อยละ3) ที่เก็บที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน พบว่าในไอศครีมที่มีไขมันร้อยละ 10 นั้นจำนวน *L. monocytogenes* V7 จะลดลง ส่วนในไอศครีมที่มีปริมาณไขมันต่ำตรวจไม่พบเชื้อ *L. monocytogenes* V7 เลย

Hanlin และคณะ (1993) ศึกษาผลการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ร่วมกันของแบคเทอริโอซินที่ได้จากแบคทีเรียแลกติก 2 ชนิด คือ ไนซิน จาก *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 11454 และ Pediocin AcH จาก *Pediococcus acidilactici* H พบว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกรวมทั้งแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียและเป็นพิษบางชนิดได้อีกด้วย โดยจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงกว่าการใช้แบคเทอริโอซินเพียงชนิดเดียว จึงมีประโยชน์ในการใช้เป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหาร

Vandenbergh (1993) ได้รายงานถึงการใช้ไนซินในผลิตภัณฑ์นมไว้ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การใช้ไนซินในผลิตภัณฑ์นม

ผลิตภัณฑ์	ปริมาณไนซิน (IU/g หรือ ml)	ผลที่ได้
การแปรรูปเนยแข็ง	250-500	ให้ความยืดหยุ่นที่ดี
เนยแข็ง	200	ลดการเกิด blowing
นมชอคโกแลต	150	เพิ่มอายุการเก็บรักษาที่ 7 องศาเซลเซียส
นมพาสเจอร์ไรส์	30-50	เพิ่มอายุการเก็บรักษาที่ 15 และ 20 องศาเซลเซียส 6 และ 2 วันตามลำดับ
โยเกิร์ต	50-200	เพิ่มอายุการเก็บรักษาได้ 7 วันและไม่มีการแยกตัวของเวย์
cottage cheese	5	ยับยั้งการเจริญของ *Bacillus sp.* ได้สมบูรณ์

ที่มา : Vandenberg (1993)

2. ระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส

2.1 ความหมายของระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส

ระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสเป็นระบบของการควบคุมและยับยั้งแบคทีเรียในน้ำนมที่มีอยู่แล้วตามธรรมชาติ (Cousin, 1982) ในปี 1924 ได้มีรายงานว่าในนมดิบที่รีดเสร็จใหม่ ๆ มีสารบางชนิดที่มีคุณสมบัติป้องกันการเจริญของแบคทีเรียได้ ซึ่งน่าจะมีผลมาจากเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติเป็นตัวออกซิไดส์ได้ ต่อมาตรวจพบว่าเป็นเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดส ซึ่งจะมีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์กลุ่ม *Streptococci* ในเนยแข็งได้ ในนมประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิด เอนไซม์ที่มีปริมาณมากได้แก่ไลเปส โปรติเอส อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (Alkaline-phosphatase) แลกโตเปอร์ออกซิเดส คะตะเลส และ แซนทีนออกซิเดส (Xantein oxidase) เอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดสอยู่ในส่วนของโปรตีนเวย์ มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งจุลินทรีย์ (Harper and

Hall, 1981) ต่อมาพบว่าการเกิดประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์จะต้องมีองค์ประกอบของปฏิกิริยาอีก 2 ชนิด คือ ไฮโรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และอีกปัจจัยของปฏิกิริยา คือ ไธโอไซยาเนต (SCN^-) ซึ่งได้มาจากการตรวจสอบโดยใช้โครมาโตกราฟฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (Ion-exchange chromatography) และวิเคราะห์โดย IR spectroscopy (Reiter and Harnulv, 1984)

2.2 องค์ประกอบของระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส

ระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส (Lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide System : LPS) เป็นระบบที่ประกอบด้วยเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดส (EC 1.11.1.7) สาร SCN^- และ H_2O_2 ความสามารถในการยับยั้งและทำลายจุลินทรีย์ต้องอาศัยการทำงานร่วมกันขององค์ประกอบทั้ง 3 ส่วน (Zapico *et al.*,1995; Gaya *et al.*,1991; Bjorck *et al.*, 1975)

1. **เอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดส** (EC 1.11.1.7) เป็น Hemoprotein มีเหล็กเป็นองค์ประกอบร้อยละ 0.07 มีมวลโมเลกุล 77.5 kDa มีค่า Isoelectric point 9.2-9.9 (Chiu and Etzel, 1997) ในโมเลกุลสายโปลีเปปไทด์ของเอนไซม์พบกรดอะมิโนชนิด Leucine อยู่ที่ปลายด้าน N-terminal เป็นเอนไซม์ที่มีอยู่โดยปกติในน้ำนม ซึ่งจะอยู่ในส่วนของเวย์โปรตีนประมาณร้อยละ 1 ในน้ำนมโคมีประมาณ 0.87 Unit/ml หรือความเข้มข้น 1-7 ppm (Gaya *et al.*, 1991) หรือประมาณ 30 μg/ml. (Wit, 1998; Reiter, 1986) ปริมาณสูงสุดจะอยู่ในช่วง 3-4 วันหลังคลอดลูกวัว หลังจากนั้นปริมาณจะเริ่มลดลง มีคุณสมบัติทนต่อความร้อนได้สูง ทำงานได้ดีที่พีเอช 6.8 (Harper and Hall, 1981) พบว่าเอนไซม์นี้ทนต่อความเป็นกรดได้สูง (pH 3) ทนต่อน้ำย่อยในกระเพาะอาหารของมนุษย์ได้ด้วยและมีความคงตัวอยู่ได้ในกระเพาะของลูกวัวได้หลายชั่วโมง มีเอนไซม์เพียงบางส่วนที่ถูกยับยั้งกิจกรรมเมื่อให้ความร้อนสูงในเวลาสั้น เช่น การพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 74 องศาเซลเซียส (Reiter and Harnulv, 1984)

นอกจากนี้ยังพบเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดสในน้ำลาย น้ำตาและของเหลวอื่น ๆ ในร่างกาย ในน้ำนมและน้ำลายนั้นเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดสจะอยู่ในรูปที่ละลายได้ แต่ภายในเซลล์ของต่อมน้ำลายและต่อมน้ำนม เอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดสจะจับยึดอยู่กับโครงสร้างของเซลล์ ซึ่งจะมีผลต่อความจำเพาะเจาะจงกับสารตั้งต้นและอัตราการเกิดปฏิกิริยา (Reiter and Harnulv, 1984) กิจกรรมของเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดสในน้ำนมของสัตว์ชนิดต่าง ๆ แสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 กิจกรรมของเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดสในน้ำนมของสัตว์ชนิดต่าง ๆ

ชนิดของสัตว์	กิจกรรมของเอนไซม์ (U/ml)
โค	1.42
มนุษย์	
1 วันหลังคลอด	0.70
2-10 วันหลังคลอด	0.31
หนูตะเพา	22.00
แพะ	2.55
หนู	2.00
สุกร	1.70

ที่มา : Reiter และ Perraudin (1991)

เอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดสในน้ำลายของมนุษย์มีบทบาทเช่นเดียวกับในน้ำนม โดยพบว่าสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดฟันผุได้ ในเด็กแรกเกิดเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดสในต่อมน้ำลายจะเริ่มทำหน้าที่ตั้งแต่ 2-3 วันหลังคลอด (Reiter and Harnulv, 1984)

2. ไธโอไซยาเนต (SCN^-) โดยปกติ SCN^- จะกระจายอยู่ทั่วไปในเนื้อเยื่อและของเหลวภายในร่างกาย ในร่างกายมนุษย์จะพบ SCN^- ในของเหลวภายในร่างกายประมาณ 1-3 ppm และพบในน้ำลาย 10-20 ppm โดยความเข้มข้นของ SCN^- จะขึ้นอยู่กับอาหารและลักษณะนิสัย เช่น การสูบบุหรี่จะทำให้มีปริมาณ SCN^- สูงขึ้น ส่วนในนมโคสารนี้จะมากหรือน้อยขึ้นกับปริมาณและชนิดของอาหารที่มี SCN^- ที่แม่โคกินเข้าไป (Wolfson and Sumner, 1993; Reiter and Harnulv, 1984)

สาร SCN^- ถูกกำจัดออกทางปัสสาวะ โดยมีครึ่งชีวิต 2-5 วัน แหล่งอาหารซึ่งมี SCN^- ปริมาณสูง คือ Glucosinolates และ Cyanogenic glucosides ซึ่งพบได้ในพืชผักหลายชนิด เช่น กะหล่ำปลี กะหล่ำดอก ผักกาด เป็นพืชผักที่พบในกลุ่ม Glucosinolates ส่วนกลุ่ม

Cyanogenic glucosides จะพบในมันฝรั่ง ข้าวโพด ลูกเดือย ข้าวฟ่าง อ้อย ถั่ว และเปลือกผลไม้บางชนิด Cyanogenic glucoside เมื่อถูกย่อยสลายจะได้ไซยาไนด์ (Cyanide) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ SCN^- (ได้มาจากผลิตภัณฑ์สุดท้ายของ Sulfur amino acid) ทำให้สามารถกำจัดพิษของไซยาไนด์ออกไปได้โดยเปลี่ยนเป็น SCN^- (Reiter, 1986) โดยปกติในน้ำนมโคจะประกอบด้วย SCN^- 1-10 ppm ได้มีการศึกษาผลของ SCN^- ต่อการเกิดไนโตรซามีน (Nitrosamines) มีการทดลองพบว่า SCN^- จะเพิ่มอัตราการเกิดไนโตรซามีนเมื่อมีไนไตรต์ (Nitrites) และ เอมีน (Amines) แต่จะเกิดเมื่อมีระดับของพีเอชต่ำมาก ๆ เท่านั้น ที่พีเอชมากกว่า 3.5 แทบจะไม่มีผลกระทบ และเนื่องจากการดื่มนมเข้าไปทำให้พีเอชของน้ำย่อยในกระเพาะเพิ่มขึ้นจึงทำให้ไม่มีผลกระทบดังกล่าว (Reiter and Harnulv, 1984) ได้มีการทดลองให้คนดื่มนม 0.4 ลิตรทุกวันติดต่อกันเป็นเวลา 3 สัปดาห์ (ความเข้มข้น 20 ppm) พบว่าระดับ SCN^- ในซีรัมเพิ่มปริมาณสูงขึ้นและสูงสุดในสัปดาห์ที่ 4 แต่ก็พบว่ามีการกำจัดออกทางปัสสาวะในปริมาณสูงขึ้นเช่นกัน และต่อมาเมื่อหยุดการให้นม ปริมาณ SCN^- ในเลือดก็ลดลงเช่นกัน จึงไม่มีผลกับการทำงานของต่อมไธรอยด์ นอกจากนี้ในทางการแพทย์ได้ใช้ SCN^- ในการรักษาความดันโลหิตสูง ปริมาณ SCN^- ในช่วง 80 -120 ppm มีผลต่อการรักษา ไม่มีพิษกับร่างกาย (Reiter and Perraudin, 1991) ปริมาณ SCN^- ในส่วนต่าง ๆ ของร่างกายมนุษย์และโค แสดงดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ปริมาณ ไธโอไซยาเนต (SCN^-) ในส่วนต่าง ๆ ของร่างกายมนุษย์และโค

ชนิด	ปริมาณของ SCN^- (mM)
มนุษย์	
ซีรัม	0.034-0.05
น้ำลาย	
ปกติ	0.8-1.5
ถูกกระตุ้น	0.8-1.4
เด็กแรกเกิด	0.26
เด็ก (3-8 ปี)	0.38
Colostrum	0.09
น้ำนม	0.05
น้ำย่อยในกระเพาะอาหาร (ผู้ใหญ่)	0.38
น้ำย่อยในกระเพาะอาหาร (เด็ก)	0.11
โค	
ซีรัม	0.02-0.28
น้ำนม	0.02-0.26

ที่มา: Reiter และ Perraudin (1991)

3. **ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์** (H_2O_2) แม้ว่า H_2O_2 จะเป็นสาร Oxidizing agent อย่างแรงที่ระดับความเข้มข้นสูง แต่จะเกิดปฏิกิริยาอย่างช้า ๆ ในร่างกาย ปริมาณ H_2O_2 10-20 ppm สามารถทำลาย *E. coli* ได้ และพบว่า H_2O_2 0.01-0.02 mM สามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดสได้ ทำให้สามารถกระตุ้นปฏิกิริยาออกซิเดชันของ SCN^- Br^- และ I^- ได้ โดยปกติจะไม่พบ H_2O_2 ในนมดิบที่รีดเสร็จใหม่ ๆ หรืออาจพบน้อยมาก ทั้งนี้ปริมาณที่พบอาจเกิดขึ้นโดยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (Glucose oxidase) หรือ แซนทีนออกซิเดส (Xanthine oxidase) ที่มีอยู่ในน้ำนม (Reiter, 1986) และอาจเกิดจากเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียแลกติกบางชนิดที่ปนเปื้อนลงไปในน้ำนม เช่น *Lactobacilli* *Lactococci* และ *Streptococci* ซึ่งจะผลิต H_2O_2 ได้ในสภาวะมีอากาศ การกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส อาจเกิดขึ้นได้ใน

ระบบย่อยอาหารหรือในช่องปาก (Wolfson and Sumner, 1993; Reiter, 1986) แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อปริมาณ H_2O_2 สูงขึ้น ก็อาจจะมีผลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่สร้าง H_2O_2 ได้เช่นกัน ปริมาณ H_2O_2 อาจลดลงได้โดยเอนไซม์ NADPH-$OSCN^-$ - oxydase reductase และเอนไซม์คะตะเลส สามารถกำจัดเอนไซม์คะตะเลสโดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเนื่องจากเอนไซม์คะตะเลสในนมมีน้อยกว่าเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดส (Griffith, 1985; Reiter and Harnulv, 1984) ดังนั้นเอนไซม์คะตะเลสจึงมีผลต่อระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสน้อยด้วย เนื่องจาก H_2O_2 มีปฏิกิริยาในการเปลี่ยนแปลงรวดเร็วจึงวัดหาปริมาณได้ยาก (Reiter and Harnulv, 1984)

2.3 กลไกการทำงานของระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส

เอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดส สาร SCN^- และ H_2O_2 ทำงานร่วมกันโดยมี H_2O_2 เป็นตัวควบคุมการทำงานของระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส กลไกการทำงานเกิดจากเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดสกระตุ้นปฏิกิริยาออกซิเดชันของ SCN^- โดย H_2O_2 ได้กรดไฮโปไธโอไซยานัส (HOSCN) และ ไฮโปไธโอไซยาเนต ($OSCN^-$) ซึ่งผลที่ได้จะมีผลในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ โดยส่วนใหญ่จะเป็นแบคทีเรียแกรมลบและยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้บางชนิด (Chiu and Etzel, 1997; Earnshaw *et al.*, 1990; Marshall *et al.*, 1986) ทำให้ลดจำนวนแบคทีเรียก่อโรคในน้ำนมที่เก็บที่อุณหภูมิต่ำ

ไฮโปไธโอไซยาไนต์ ไอออน ($OSCN^-$) ได้มาจาก 2 ปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน คือ ปฏิกิริยาออกซิเดชันของ SCN^- จะได้ไธโอไซยาโนเจน $(SCN)_2$ ซึ่งจะสลายตัวอย่างรวดเร็วเป็น HOSCN หรือ $OSCN^-$

$$2\,SCN^- + H_2O_2 + 2\,H^+ \xrightarrow{LP} (SCN)_2 + 2\,H_2O$$

$$(SCN)_2 + H_2O \longrightarrow HOSCN + SCN^- + H^+$$

$$HOSCN \longrightarrow H^+ + OSCN^-$$

หรืออาจเกิดปฏิกิริยาจากการที่ SCN^- ถูกออกซิไดส์เป็น $OSCN^-$ ได้โดยตรง

$$SCN^- + H_2O_2 \xrightarrow{LP} OSCN^- + H_2O$$

ในกรณีที่มี H_2O_2 มากกว่าการสมมูลกับ SCN^- ก็จะเกิดสารตัวกลางอีก 2 ชนิด คือ กรดไซยาโนซัลฟูรัส (Cyanosulfurous acid) (HO_2SCN) และ กรดไซยาโนซัลฟูริก (Cyanosulfuric acid) (HO_3SCN) โดยสารตัวกลางเหล่านี้มีคุณสมบัติเป็น Oxidizing agent สูงกว่า $OSCN^-$ และมีผลทำลาย *E. coli* ในขณะที่ $OSCN^-$ อาจมีผลเพียงยับยั้งการเจริญเท่านั้น และพบว่าถ้า H_2O_2 ที่อยู่ในระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส เป็น H_2O_2 ที่เกิดจากกระบวนการเมตบอลิซึมของเซลล์หรือจากปฏิกิริยาที่ต่อเนื่องของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสจะมีประสิทธิภาพสูงกว่าการเติม H_2O_2 ลงไปโดยตรง การเกิดปฏิกิริยาในระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส เมื่อมี H_2O_2 ในปริมาณความเข้มข้นสูง (Reiter ,1986) แสดงดังปฏิกิริยาต่อไปนี้

$$H_2O_2 + SCN^- \xrightarrow{LP} OSCN^- + H_2O$$

$$H_2O_2 + OSCN^- \xrightarrow{LP} O_2SCN^- + H_2O$$

$$H_2O_2 + O_2SCN^- \xrightarrow{LP} O_3SCN^- + H_2O$$

ผลิตภัณฑ์สุดท้ายของปฏิกิริยา คือ SO_4^{2-} NH_4 CO_2 มีความเฉื่อยและไม่มีผลกับการยับยั้งจุลินทรีย์ แต่สารตัวกลางของปฏิกิริยา คือ $OSCN^-$ จะมีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ เมื่อถูกสังเคราะห์ขึ้นแล้วจะยับยั้งการสร้างกรดของแบคทีเรียแลกติกและการผลิตเอนไซม์หลายชนิด และพบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งหรือทำลายจะสูงถ้าให้แต่ละองค์ประกอบของระบบทำปฏิกิริยากันก่อนที่จะเติมลงไปในอาหารเพื่อยับยั้งจุลินทรีย์กลุ่มเป้าหมาย

คุณลักษณะของไฮโปไธโอไซยาไนต์ ไอออน ($OSCN^-$) (Walfson and Sumner, 1993)

1. มีความคงตัวที่พีเอช 7.5 มากกว่า 5.0
2. มีความไวต่อแสง
3. ทนความร้อนได้สูง
4. ความคงตัวจะลดลงเมื่อมีกลีเซอรอล แอมโมเนียมซัลเฟต และโลหะหนัก เช่น Fe Ni Cu Mn เป็นต้น เพราะสารเหล่านี้จะมีผลกับความคงตัวของเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดส
5. ในรูปอิออน ($OSCN^-$) มีความคงตัวมากกว่าอยู่ในรูปกรด (HOSCN)
6. ความคงตัวจะลดลงเมื่อกิจกรรมของเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดสลดลง

Central Library
Prince of Songkla Univer...

2.4 การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส

ระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้โดย

1. ยับยั้งการใช้ออกซิเจน
2. ยับยั้งการผลิตกรดแลกติก
3. ยับยั้งการผลิตเอนไซม์บางชนิดเช่น Hexokinase D- lactate dehydrogenase และ Glyceraldehyde - 3P- dehydrogenase
4. ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ K^+ กรดอะมิโน และ โพลีเปปไทด์ออกมานอกเซลล์
5. ยับยั้งการนำกลูโคส ไพรีน ไพริมิดีน และกรดอะมิโน มาใช้ทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีน RNA และ DNA ได้

เอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดสจะกระตุ้นปฏิกิริยาการรวมกันของ SCN^- กับ โปรตีนเริ่มต้น ปฏิกิริยาของ $(SCN)_2$ หรือ $OSCN^-$ กับโปรตีนจะทำให้โปรตีน Sulfhydryls เปลี่ยนเป็นอนุพันธ์ของ Sulfenyl thiocyanate

$$\text{protein-SH} + (SCN)_2 \longrightarrow \text{Protein-S-SCN} + SCN^- + H^+$$

$$\text{protein-SH} + OSCN^- \longrightarrow \text{Protein-S-SCN} + OH^-$$

อนุพันธ์ของ Sulfenyl thiocyanate สามารถจะเปลี่ยนแปลงต่อไป หรืออาจทำปฏิกิริยาย้อนกลับย่อยสลายเป็นกรด Sulfonic

$$\text{Protein-S-SCN} + H_2O \longleftrightarrow \text{Protein-S-OH} + SCN^- + H^+$$

อนุภาคของ SCN^- จะย้ายจาก Sulfenyl thiocyanate โดยทำปฏิกิริยารีดักชันกับสารประกอบ Sulfhydryl เช่น Ditiothreitol เมื่อโปรตีน Sulfhydryls ถูกออกซิไดส์โดย $(SCN)_2$ หรือ SCN^- จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกับกรดอะมิโน Tyrosine Tryptophan และ Histidine การปล่อย SCN^- ออกจาก Sulfenyl thiocyanate จะเกิดขึ้นเมื่อมีความเข้มข้นของ SCN^- ต่ำ เมื่อ SCN^- ถูกปล่อยออกมาจะถูกออกซิไดส์อีกครั้ง แล้วเข้าร่วมกับปฏิกิริยาออกซิเดชันของ Sulfhydryl ตัวอื่น ๆ (Walfson and Sumner, 1993)

2.5 ประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส

ประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส ขึ้นอยู่กับ

1. ปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดส สาร SCN^- และ H_2O_2 ผลของปริมาณความเข้มข้นของ ($OSCN^-$) ที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH 5.5 เมื่อใช้ความเข้มข้นของ $OSCN^-$ ในปริมาณต่าง ๆ กัน พบว่าจำนวนของเชื้อ *E. coli* ที่อยู่ในอาหารที่ไม่มี $OSCN^-$ จะมีจำนวนเพิ่มขึ้นเมื่อใช้เวลาในการบ่มนานขึ้นและเมื่อเพิ่มปริมาณของ $OSCN^-$ มากขึ้น ปริมาณของ *E. coli* จะยิ่งลดลงมากขึ้น ปริมาณความเข้มข้นของสาร SCN^- ในระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส ที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อ *E. coli* 0101 พบว่าเมื่อใช้ปริมาณความเข้มข้น ของ SCN^- 0.3 mM จำนวนเซลล์ของ *E. coli* 0101 จะมีน้อยกว่าการใช้ SCN^- 0.15 mM (Reiter, 1986, Reiter and Harnulv, 1984)

2. ชนิด ปริมาณ และ สภาวะการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น อาหาร อากาศ อุณหภูมิ พีเอช เมื่อใช้ปริมาณความเข้มข้นของ SCN^- 0.15 mM เท่ากัน จะยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดแตกต่างกัน พบว่า SCN^- จะยับยั้งเชื้อ *E. coli* 010 ได้มากกว่า *S. typhimurium* และ *P. aeruginosa* ตามลำดับ (Reiter, 1986) พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ในช่วงระยะการเจริญคงที่ (Stationary phase) มีความไวในการถูกทำลายมากกว่าเซลล์ในระยะเจริญเติบโต และพบว่าแบคทีเรียที่เจริญภายใต้สภาวะไร้อากาศจะมีความไวต่อระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสมากกว่าการเจริญภายใต้สภาวะมีอากาศ (Walfson and Sumner, 1993)

3. ระยะเวลาที่น้ำนมถูกตั้งทิ้งไว้ แบคทีเรียที่ถูกควบคุมและยับยั้งโดยระบบนี้ได้เป็นอย่างดีได้แก่พวกแบคทีเรียสร้างกรด เช่น *Streptococci* (Cousin, 1982) และแบคทีเรียแกรมลบรูปกลม โดยเฉพาะเชื้อ *Pseudomonas Coliform Salmonella* และ *Shigella* ดังนั้นจึงเป็นระบบที่มีความสำคัญในการทำให้น้ำนมดิบเก็บรักษาให้เป็นปกติยาวนานออกไป เนื่องจากไปยับยั้งเชื้อที่เป็นพวกชอบอุณหภูมิต่ำ (Reiter and Perraudin, 1991)

4. ระดับอุณหภูมิของน้ำนม โดยปกติระบบนี้คงอยู่ในนมดิบนานประมาณ 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หรือนานประมาณ 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส และจะถูกทำลายที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ดังนั้นจะไม่พบระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสในนมพาสเจอร์ไรส์เลย แต่จากการศึกษาทดลองของ Bjorck และคณะ (1979) พบว่าระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสนี้มีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้นาน 7-8 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ยับยั้งได้นาน 11-12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 16-17 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และยับยั้งได้นานถึง 24-26 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส

2.6 การกระตุ้นการทำงานของระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสและการใช้กับนมดิบและผลิตภัณฑ์

การกระตุ้นการทำงานของระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสสามารถช่วยยับยั้งการทวีจำนวนของจุลินทรีย์ในนมดิบได้ เมื่อนำไปทำผลิตภัณฑ์นมทำให้มีคุณภาพดี อายุการเก็บนานออกไป มีรายงานว่าในการรักษาคุณภาพนมดิบทั้งนมที่เก็บและไม่เก็บที่อุณหภูมิต่ำ ถ้าเพิ่มปริมาณ SCN^- และ H_2O_2 ลงไปในนมดิบปริมาณเล็กน้อยเพียง 12 และ 8 ppm ตามลำดับ สามารถรักษาคุณภาพนมไว้ได้ (Reiter and Harnulv, 1984) Zajac และคณะ (1983) พบว่าการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสที่มีอยู่ในนมดิบโดยเติมโซเดียมไธโอไซยาเนต (NaSCN) และโซเดียมเปอร์คาร์บอเนตลงไปในปริมาณที่เหมาะสมจะทำให้นมดิบที่รีดได้มีคุณภาพดี มีอายุการเก็บนานมากขึ้นกว่าปกติ แต่ทั้งนี้ต้องขึ้นอยู่กับจำนวนจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในนมดิบด้วย และเมื่อมีการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสโดยเติมโปแตสเซียมไธโอไซยาเนต (KSCN) จำนวนเท่าเดิมแต่ถ้าเพิ่มความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่เติมลงไปให้มีความเข้มข้นเป็น 25 หรือ 35 ppm แล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 48 ชั่วโมง เมื่อนำไปทดสอบปรากฏว่าอายุการเก็บของนมดิบดีขึ้น และเมื่อใช้โปแตสเซียมไธโอไซยาเนตจำนวนเท่าเดิม แต่เพิ่มความเข้มข้นของ H_2O_2 ในน้ำนมเป็น 240-280 ppm แล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ปรากฏว่ามีผลทำให้นมดิบมีอายุการเก็บเพิ่มมากขึ้นเช่นกัน ซึ่งเหมาะสมที่จะเติมลงไปในนมดิบที่ไม่ได้ลดอุณหภูมิลงก่อนนำส่งโรงงานหรือศูนย์รวมนม (Ewis *et al.*, 1985)

จากการทดลองของ Kamau และ Kroger (1984) พบว่าการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสในนมดิบโดยเติมสารประกอบพวก SCN^- ลงไปในนมดิบให้มีความเข้มข้นเป็น 10 ppm ร่วมกับ H_2O_2 ที่เติมลงไปให้มีความเข้มข้นเป็น 8.5 ppm เมื่อเปรียบเทียบกับการเติม H_2O_2 เพียงอย่างเดียวที่เติมลงไปให้มีความเข้มข้นเป็น 400 ppm ปรากฏว่าวิธีเติม H_2O_2 ลงไปเพียงอย่างเดียวจะมีประสิทธิภาพดีกว่าวิธีใช้สารประกอบไธโอไซยาเนตร่วมกับ H_2O_2

Earnshaw และคณะ (1990) ศึกษาการยับยั้ง *Salmonella typhimurium* และ *E. coli* ในนมผงของทารก โดยการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส ทำการทดลอง 2 ชุด คือชุดแรกเติมเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดส โปตัสเซียมไธโอไซยาเนต กลูโคส และ เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส อีกชุดการทดลองเติมเหมือนชุดแรกแต่เพิ่มยูเรียเปอร์ออกไซด์ พบว่าการเติมยูเรียเปอร์ออกไซด์ลงไปในน้ำนมด้วยสามารถลดจำนวนเชื้อเริ่มต้นและอัตราการเจริญของ *S. typhimurium* ได้ และขยายเวลาช่วง Lag phase ของ *E. coli* ได้ดีกว่าชุดแรก

Joo และคณะ (1984) พบว่านมดิบที่นำมาทดลองมีความเข้มข้นของ SCN^- ประมาณ 3.0±1.5 ppm เมื่อเติม SCN^- ลงไปให้มีความเข้มข้นเป็น 13-15 ppm แล้วเติม H_2O_2 ให้มีความเข้มข้นเป็น 8.5 ppm พบว่านมดิบร้อยละ 74 ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 18-20 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง ผ่านการทดสอบด้วยรีซาซูริน (Resazurin) แสดงว่านมมีคุณภาพดีขึ้นเพราะจำนวนจุลินทรีย์ลดลง

Zapico และ คณะ (1993) ศึกษาการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสในนมแพะเพื่อยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* 3 สายพันธุ์ ทำการกระตุ้นระบบโดยการเติม NaSCN เข้มข้น 25 mM ปริมาณ 1 มิลลิลิตร และ H_2O_2 เข้มข้น 25 mM ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงไปในนมดิบ 100 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 8 และ 20 องศาเซลเซียส พบว่าจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในนมที่มีการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสมีจำนวนน้อยกว่านมที่ไม่มีการกระตุ้นระบบ โดยในนมดิบก่อนถูกกระตุ้นระบบมีกิจกรรมเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดส 0.81 ABTS unit/ml และปริมาณ SCN^- 4.51 ppm หลังกระตุ้นระบบแล้วปริมาณ SCN^- จะเพิ่มเป็น 20.27 ppm เมื่อเก็บนมไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะมีผลลดการเจริญของ *L. monocytogenes* สายพันธุ์ Scott A 5069 และ NCTC 11994 ได้ 9 วัน 9 วัน และ 3 วันตามลำดับ เมื่อเก็บนมที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส จะมีผลลดการเจริญของสายพันธุ์ Scott A 5069 และ NCTC 11994 ได้ 7 วัน 3 วัน และ 1 วันตามลำดับ

Zapico และคณะ (1995) ศึกษาการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสของนมแพะเพื่อยับยั้งเชื้อ *P. fluorescenes* และ *E. coli* ที่อุณหภูมิต่ำโดยการเติม NaSCN เข้มข้น 25 mM ปริมาณ 1 มิลลิลิตร และ H_2O_2 เข้มข้น 25 mM ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงไปในนม 100 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 และ 8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากการศึกษาพบว่า *P. fluorescenes* จะลดลง 1.69 Log unit ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ 1.85 Log unit ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ใน 24 ชั่วโมงแรก และพบว่าจำนวนจะน้อยกว่าปริมาณเชื้อเริ่มต้นเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน และที่ 8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ส่วน *E. coli* จะไม่เจริญในนมดิบที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส พบว่า *E. coli* ในนมที่มีการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสมีช่วง Lag phase 2 วัน แต่จะเจริญอย่างรวดเร็วไม่มีช่วง Lag phase ในนมที่ไม่มีการกระตุ้นระบบ

Kamau และคณะ (1990) ได้ศึกษาปฏิกิริยาการยับยั้ง *L. monocytogenes* และ *S. aureus* โดยระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสในนมดิบ โดยเติม NaSCN และ H_2O_2 ลงไป

ในนมดิบเพื่อกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส จากผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้ NaSCN 2.4 mM และ H_2O_2 0.6 mM เชื้อ *L. monocytogenes* ต้องใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนให้ได้ครึ่งหนึ่งของที่มีอยู่เดิม 326 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส และ 6.3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และเมื่อใช้ NaSCN 1.2 mM และ H_2O_2 0.3 mM พบว่า *S. aureus* ต้องใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนให้ได้ครึ่งหนึ่งของที่มีอยู่เดิม 36 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส และ 2.4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

Zapico และคณะ (1998) ศึกษาผลการเสริมฤทธิ์กันของไนซินและระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส ในการยับยั้ง *L. monocytogenes* ในหางนม โดยพบว่าการเพิ่มไนซินลงในนม UHT 10-100 IU/ml หลังจากเก็บนมไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะไม่มีผลกับ *L. monocytogenes* เลย ในขณะที่การกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส โดยการเติมเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดสลงไปในนมดิบเพื่อให้มีกิจกรรมของเอนไซม์ในนมดิบ 0.2 และ 0.8 ABTS Unit และเพิ่ม NaSCN เข้มข้น 50 mM ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร กับ H_2O_2 เข้มข้น 50 mM ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในน้ำนมดิบด้วย พบว่าจะทำให้ *L. monocytogenes* ลดลง 3 Log unit แต่ถ้าเพิ่มทั้งไนซินและกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส เชื้อ *L. monocytogenes* จะลดลง 5.6 Log unit โดยการเกิดผลร่วมกันสังเกตได้ตั้งแต่ 2 ชั่วโมงแรก

Rodriguez และคณะ (1997) ศึกษาผลการยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ในนมดิบแช่เย็นโดยใช้แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติกร่วมกับการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส จากการทดลองพบว่าหลังจากเก็บนมดิบไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน จำนวนของ *L. monocytogenes* ในนมดิบซึ่งเติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 11454 *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ESI 515 หรือ *Enterococcus faecalis* INIA 4 ลดลง 0.21-0.24 Log unit และพบว่าการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส ไม่มีผลต่อการยับยั้งหลังจากบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน จำนวนของ *L. monocytogenes* ในนมดิบที่ไม่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส แต่มีแบคเทอริโอซินลดลง 1.87 1.54 และ 1.11 Log unit ในขณะที่นมดิบที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสด้วยลดลง 1.99 2.10 และ 1.06 Log unit ตามลำดับ

3. การเน่าเสียของนม

3.1 การเน่าเสียของนมดิบ

จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนไปในนมดิบอาจมาจากฟาร์ม มาจากตัววัวบริเวณผิว และเต้านม ภาชนะบรรจุนม คนรีดนม ซึ่งอาจมาจากการไอหรือจาม เสื้อผ้า ผิวหนังและอาจมีเชื้อโรคที่อาจติดมาทางนมดิบ นอกจากจุลินทรีย์จะมาจากฟาร์มแล้ว อาจมาจากการขนส่ง กระบวนการผลิต โดยมาจากภาชนะบรรจุ เครื่องมือเครื่องใช้ต่างๆ ที่ใช้ในการผลิต ซึ่งทำให้เกิดการปนเปื้อนลงสู่ผลิตภัณฑ์นมได้

ชนิดของจุลินทรีย์ที่พบในนมดิบ

1. แบคทีเรียแกรมลบ

แบคทีเรียแกรมลบที่พบบ่อยในนมดิบ ได้แก่ *Pseudomonas* นอกจากนี้มีอีกหลายสกุล ได้แก่ *Achromobacter Acinetobacter Aeromonas Alcaligenes Chromobacterium Citrobacter Enterobacter Escherichia Flavobacterium Klebsiella Pseudomonas* และ *Serratia* แบคทีเรียเหล่านี้สามารถเพิ่มจำนวนได้ในขณะเก็บที่อุณหภูมิต่ำและทำให้นมดิบเน่าเสียในที่สุด แบคทีเรียพวก *Enterobacter* และ *Klebsiella* พบได้บ่อยในนมดิบแช่เย็น (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2537; Cousin, 1982)

2. แบคทีเรียแกรมบวก

แบคทีเรียแกรมบวกที่แยกได้จากนมดิบมักมีจำนวนน้อยกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ชนิดที่พบบ่อยได้แก่ *Bacillus Micrococcus* และ *Arthrobacter* นอกจากนี้มีอีกหลายสกุล เช่น *Arthrobacter Clostridium Corynebacterium Microbacterium Micrococcus Staphylococcus Streptococcus* และ *Lactobacillus* สำหรับชนิดของ *Bacillus* ที่พบในนมได้แก่ *B. cereus B. circulans B. coagulans B. firmis B. lentus B. licheniformis B. macerans B. megaterium B. pantothenticus B. polymyxa B. pumilus* และ *B. subtilis* (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2537)

3. แบคทีเรียก่อโรค

แบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคที่พบในนมดิบได้แก่ *Mycobacterium tuberculosis Coxiella burnetti L. monocytogenes Yersinia enterocolitica B. cereus S. aureus* และ *E. coli* (ชูรัฐ แปลกสงวนศรี, 2534; วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2537)

3.2 การเน่าเสียของนมพาสเจอร์ไรส์

นมพาสเจอร์ไรส์ คือ นมที่ผ่านกรรมวิธีการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนไม่ต่ำกว่า 63 องศาเซลเซียส และคงที่อยู่ที่อุณหภูมินี้ไม่ต่ำกว่า 30 นาที หรือทำให้ร้อนไม่ต่ำกว่า 72 องศาเซลเซียส และคงที่อยู่ที่อุณหภูมินี้ไม่น้อยกว่า 16 วินาที แล้วจึงทำให้เย็นลงทันทีที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่า (กระทรวงสาธารณสุข, 2522 อ้างโดย ชูรัฐ แปลกสงวนศรี, 2534) การพาสเจอร์ไรส์นมมีวัตถุประสงค์เพื่อทำลายเชื้อโรคที่มีอยู่ในนมและอาจถ่ายทอดไปสู่ผู้บริโภคได้ นอกจากนี้ยังช่วยรักษาคุณภาพของนมได้อีกด้วย เพราะนมสามารถเปลี่ยนแปลงได้ง่ายเมื่อถูกความร้อน การใช้ความร้อนระดับพาสเจอไรส์ช่วยให้นมมีรสชาติดีขึ้น ลักษณะทางโภชนาการและอื่น ๆ ไม่เปลี่ยนแปลงไปมากนัก นอกจากนี้ความร้อนที่ใช้ยังทำลายจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการได้บางส่วนอีกด้วย ประสิทธิภาพของการพาสเจอร์ไรส์นมหรือเปอร์เซนต์การลดลงของจุลินทรีย์ในนมขึ้นกับอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด จำนวนแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ หรือแบคทีเรียที่ทนต่อความร้อน (ชูรัฐ แปลกสงวนศรี, 2534)

ชนิดของจุลินทรีย์ที่พบในนมพาสเจอร์ไรส์

ความร้อนที่ใช้ในการพาสเจอร์ไรส์สามารถฆ่ายีสต์ ราทั้งหมด และแบคทีเรียส่วนใหญ่ได้ แบคทีเรียที่เหลือรอดจากการพาสเจอร์ไรส์เป็นพวกทนความร้อน (Thermoduric) ซึ่งได้แก่พวกไม่สร้างสปอร์ เช่นแบคทีเรียแลกติกที่ทนความร้อน ได้แก่ *Streptococcus thermophilus Lactobacillus bulgalicus Lactococcus lactis* ซึ่งพวกนี้เป็นทั้งพวกที่ชอบความร้อนและทนความร้อน นอกจากนี้เป็นพวก *Micrococcus* (ชูรัฐ แปลกสงวนศรี, 2534) ส่วนพวกสร้างสปอร์ได้แก่ *Bacillus* เช่น *B. cereus B. licheniformis B. subtilis B. coagulans B. polymyxa* และ *Clostridium* เช่น *C. butyricum* และ *C. sporogenes* (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2537)

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาผลของการใช้แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติก และการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส ในการลดจำนวนจุลินทรีย์ในนมดิบและนมพาสเจอร์ไรส์

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

1. จุลินทรีย์
   1.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตแบคเทอริโอซิน
   Lactobacilllus casei ssp. *rhamnosus* (SN11) ซึ่งแยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารหมักประเภทส้มฟัก (ศิรินาถ หนูเอก, 2540)
   1.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซิน
   1.2.1 *Staphylococcus aureus*
   1.2.2 *Escherichia coli*
   1.2.3 *Bacillus cereus*
   จากห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์ผลิตผลเกษตร คณะอุตสาหกรรมเกษตร
   1.2.4 *Bacillus stearothermophilus* TISTR 329
   จากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

2. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา (รายละเอียดในภาคผนวก ก)
   2.1 De Man Rogosar and Sharpe (MRS) (บริษัท Merck) สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* (SN11)
   2.2 Baird Parker Agar (บริษัท Merck) สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ *S. aureus*
   2.3 Violet Red Bile Lactose Agar (บริษัท Difco) สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli*
   2.4 Mannitol Egg Yolk-Polymyxin Agar (บริษัท Merck) สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. cereus*
   2.5 Plate count agar (PCA) (บริษัท Merck) สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด
   2.6 Dextrose Casein-peptone Agar (บริษัท Merck) สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. stearothermophilus*
   2.7 Nutrient Agar (บริษัท Merck) สำหรับเทรองพื้นจานเพาะเชื้อในการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซิน

3. สารเคมี

3.1 Ammonium sulfate (บริษัท Merck)

3.2 Sodium thiocyanate (บริษัท Carlo erba)

3.3 Sodium chloride (บริษัท Carlo erba)

3.4 Chloroform (บริษัท Lab-scan)

3.5 Ferric nitrate (บริษัท Carlo erba)

3.6 Trichloroacetic acid (บริษัท Merck)

3.7 Sodium hydroxide (บริษัท Merck)

3.8 2,2'-Azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) (บริษัท Sigma)

4. น้ำนมดิบจากคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

5. น้ำนึ่งปลาทูน่าจากโรงงานโชติวัฒน์อุตสาหกรรมการผลิต

อุปกรณ์

1. เครื่องแก้ววิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา
2. อุปกรณ์เขี่ยเชื้อ (Loop และ Needle)
3. กล้องจุลทรรศน์ บริษัท Olympus Optical Co,. LTD
4. ตู้บ่มเชื้อ Type B50 บริษัท Memmert Co,. LTD
5. ตู้ปลอดเชื้อ (Larminar airflow carbinet) ยี่ห้อ ISSCO บริษัท S.V. Medico Co., LTD.
6. เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ Type SCR 20 บริษัท Hitachi KOKI, CO,. LTD
7. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง รุ่น 320 บริษัท Metttler Teledo, CO,. LTD
8. เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์รุ่น U-2000 บริษัท Hitachi KOKI, CO,. LTD
9. เครื่อง Freeze dryer รุ่น D.W. 10-110 บริษัท Heto-Holton
10. หม้อนึ่งความดัน (Autoclave) รุ่น 5S-320 บริษัท Tomy, CO,. LTD
11. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) รุ่น 350 บริษัท Memmert Co,. LTD
12. เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer) รุ่น 1297 บริษัท Lab-line Instruments
13. เครื่องกวนผสม (Magnetic stirrer) ยี่ห้อ IKA
14. ถังหมัก รุ่น MDL-301 บริษัท B.E.Marubishi, CO,. LTD
15. ปั๊ม Peristaltic รุ่น LP-1A บริษัท Amicon

16. ชุดกรอง Ultrafiltration รุ่น Pellicon XL ยี่ห้อ Millipore
17. ชุดกรองเชื้อ Sterile รุ่น FP 025/1 บริษัท Schleicher & Schuell
18. เครื่อง Homoginizer รุ่น Golder 2F mill บริษัท APV Gautin inc.
19. อุปกรณ์ในการพาสเจอร์ไรส์นม
20. เครื่องปิดผนึกถุง

การวิเคราะห์

1. **ค่าพีเอช**

วัดค่าพีเอชโดยใช้เครื่องวัดพีเอช

2. **วิธีทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซิน**

ทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซิน ในหน่วย Arbitary Unit (AU/ml) โดยวิธี Agar well diffusion ตามวิธีของ Parente และ Hill (1992) โดยเตรียมจานอาหารแข็ง NA 20 มิลลิลิตร แล้วเททับด้วยอาหารกึ่งแข็งที่มีวุ้นร้อยละ 0.7 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ประมาณ 10^5 CFU/ml เป่าให้แห้งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในตู้ปลอดเชื้อ แล้วทำการเจาะหลุมลงในอาหารแข็งโดยใช้เครื่องเจาะวุ้น (Cork borror) ให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ใช้แบคเทอริโอซิน (พีเอช 6.5) ที่ปรับระดับความเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว (Serial two fold dilution) ปริมาตร 100 µl หยดในหลุม นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำไปบ่มเป็นเวลา 12 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ *S. aureus* และ *E. coli* บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แบคทีเรีย *B. cereus* บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส แบคทีเรีย *B. stearothermophilus* บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส สังเกตการเกิดวงใสรอบ ๆ หลุม แล้วหาค่ากิจกรรมการยับยั้งจากค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้เกิดวงใส โดยคำนวณจากส่วนกลับของค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้เกิดวงใส (A) คูณกับ 1,000 µl หารด้วยปริมาตรส่วนใสที่หยด (B) (ภัทรพล จันทราภรณ์, 2543)

$$\text{กิจกรรมการยับยั้ง (AU/ml)} = \frac{1{,}000\ \mu l \times A}{B\ \mu l}$$

3. **ความคงตัวของแบคเทอริโอซินในน้ำนม**

นำตัวอย่างนมที่มีการเติมแบคเทอริโอซินมาเหวี่ยงแยก ที่ 4,000 x *g* เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ปรับพีเอชเป็น 4.2 ด้วย HCl 5 M และเหวี่ยงแยกอีกครั้งที่ 20,000 x *g* เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำสารละลายส่วนใสมากรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 μm แล้วปรับพีเอชเป็น 6.5 ด้วย NaOH 2 M จากนั้นนำส่วนใสที่ได้มาหากิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 2 (Rodriguez *et al.*, 1997)

4. **กิจกรรมของเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดสในน้ำนม**

เติม 2,2'-Azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) 1 mM ปริมาตร 2.95 มิลลิลิตร ซึ่งละลายด้วยอะซิเตตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 M (pH 4.5) จากนั้นเติมน้ำนมปริมาตร 30 μl ลงไปทันทีใน Cuvett (เจือจางจนมีระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยอะซิเตตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 M) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 412 nm ปรับค่าให้เป็นศูนย์ เติม H_2O_2 10 mM ซึ่งละลายในอะซิเตตบัฟเฟอร์ลงไป 30 μl ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 412 nm (1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่ต้องใช้ในการย่อยสลาย 1 mol ของ ABTS/นาที โดยที่ ABTS มีค่า Molar extinction coefficient เท่ากับ 32400 x10^3) (Marshall *et al.*,1986)

กิจกรรมของเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดส คำนวณจากสูตร

$$C = \frac{A}{Eb}$$

เมื่อ C คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์

A คือ ค่าการดูดกลืนแสง

E คือ Extinction coefficient

b คือ ระยะทางที่แสงผ่าน

5. ปริมาณไธโอไซยาเนต (SCN^-) ในน้ำนม

นำตัวอย่างน้ำนมมา 4 มิลลิลิตร กำจัดโปรตีนออกไปโดยการเติมกรดไตรคลอโรอะซิติก เข้มข้นร้อยละ 60 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วกำจัดไขมันออกไปโดยการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายส่วนใส (2 มิลลิลิตร) มาผสมกับเฟอริกไนเตรต รีเอเจนต์ เข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 460 nm คำนวณปริมาณ โดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ค ภาพที่ 15) (Marshall *et al.*,1986)

6. ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Viable Count)

ปิเปตน้ำนมปริมาตร 11 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายเกลือแกง (NaCl) เข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 99 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและเจือจางต่อไปโดยใช้สารละลายเกลือแกงปริมาตร 9 มิลลิลิตร ตรวจนับจุลินทรีย์โดยใช้วิธี pour plate ใช้อาหาร PCA เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทำระดับความเจือจางละ 2 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน (Messer *et al.*, 1985)

7. ปริมาณแบคทีเรีย *B. cereus*

ปิเปตน้ำนมปริมาตร 11 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายเกลือแกง เข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 99 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและเจือจางต่อไปโดยใช้สารละลายเกลือแกง ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ตรวจนับจุลินทรีย์โดยใช้วิธี spread plate ใช้อาหาร Mannitol Egg Yolk-Polymyxin Agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทำระดับความเจือจางละ 2 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส นาน 18-40 ชั่วโมง ลักษณะโคโลนีขอบไม่เรียบ โคโลนีสีเหลืองไม่มีสีแดง รอบ ๆ โคโลนีสีขาวขุ่น (Beuchat *et al.*, 1997; Merck, 1996)

8. ปริมาณแบคทีเรีย *B. stearothermophillus*

ปิเปตน้ำนมปริมาตร 11 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายเกลือแกง เข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 99 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและเจือจางต่อไปโดยใช้สารละลายเกลือแกง ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ตรวจนับจุลินทรีย์โดยใช้วิธี pour plate ใช้อาหาร Dextrose Casein-peptone Agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทำระดับความเจือจางละ 2 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ลักษณะโคโลนีขอบเรียบ ขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร กลางโคโลนีขุ่นเข้ม รอบ ๆ โคโลนีสีเหลือง (Merck, 1996)

9. การทดสอบหา *E. coli* ในน้ำนม

ปิเปตน้ำนมปริมาตร 11 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายเกลือแกง เข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 99 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและเจือจางต่อไปโดยใช้ NaCl ร้อยละ 0.85 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ตรวจนับจุลินทรีย์โดยใช้วิธี pour plate ใช้อาหาร Violet Red bile Agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทำระดับความเจือจางละ 2 ซ้ำ ทิ้งให้วุ้นแข็งแล้วเททับด้วยอาหารนี้ปริมาณ 5 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง ลักษณะโคโลนีสีแดงเข้ม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 มิลลิเมตร เกิดตะกอนสีแดงเรื่อของ bile salt รอบ ๆ โคโลนี (Merck, 1996; Earnshaw *et al.*, 1990)

10. การทดสอบหา *S. aureus* ในน้ำนม

ปิเปตน้ำนมปริมาตร 11 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายเกลือแกง เข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 99 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและเจือจางต่อไปโดยใช้สารละลายเกลือแกง ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ตรวจนับจุลินทรีย์โดยใช้วิธี spread plate ใช้อาหาร Baird Parker Agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทำระดับความเจือจางละ 2 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ลักษณะโคโลนีขอบเรียบ นูน สีดำแวววาว มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-5 มิลลิเมตร รอบ ๆ โคโลนีสีขาว มี Clear zone (Merck, 1996; Kamau *et al.*, 1990)

11. ปริมาณแบคทีเรียแลกติก

ปิเปตน้ำนมปริมาตร 11 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายเกลือแกง เข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 99 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและเจือจางต่อไปโดยใช้สารละลายเกลือแกง ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ตรวจนับจุลินทรีย์โดยใช้วิธี pour plate ใช้อาหาร MRS โดยทำระดับความเจือจางละ 2 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง นับลักษณะโคลีนีที่มี Clear zone สีเหลืองใส โคโลนีรูปกระสวย (Messer *et al.*, 1985)

12. ปริมาณแบคทีเรียชอบอุณหภูมิต่ำ (Psychrophile)

ปิเปตน้ำนมปริมาตร 11 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายเกลือแกง เข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 99 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและเจือจางต่อไปโดยใช้สารละลายเกลือแกง ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ตรวจนับจุลินทรีย์โดยวิธี pour plate ใช้อาหาร PCA เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำระดับความเจือจางละ 2 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส นาน 10 วัน (Harrigan and Maccance, 1976)

วิธีการ

1. การผลิตแบคเทอริโอซิน

1.1 เลี้ยงเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* (SN11) ตามสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างแบคเทอริโอซิน โดยใช้อาหารเหลวน้ำนึ่งปลาทูน่าสูตรทดแทน MRS (ภาคผนวก ก) ทำการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นโดยการนำเชื้อแบคทีเรีย *L. casei* ssp. *rhamnosus* (SN11) จำนวน 2 Loop เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำนึ่งปลาทูน่าสูตรทดแทน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง ถ่ายโอนเชื้อปริมาตรร้อยละ 5 ลงในอาหารเหลว 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง แล้วจึงถ่ายโอนเชื้อปริมาตรร้อยละ 5 ลงในถังหมักซึ่งมีอาหารสูตรทดแทนปริมาตร 2 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิขณะเลี้ยงที่ 35 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 150 รอบ/นาที ให้อาหารมีพีเอชเริ่มต้นที่ 5.5 เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลาประมาณ 8 ชั่วโมง พีเอชของอาหารลดลงถึง 4.5 ควบคุมพีเอชให้คงที่ไว้โดยใช้ 6 N NaOH เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงทำการสกัดแยกแบคเทอริโอซินที่ได้ (ภัทรพล จันทราภรณ์, 2543)

1.2 สกัดแยกแบคเทอริโอซินที่ได้ (Partial purification) โดยการเหวี่ยงแยกที่ระดับความเร็ว 4,500 x *g* เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อแยกเซลล์ออก จากนั้นจึงนำสารละลายส่วนใสที่ได้มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต กวนผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนผสมที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วจึงแยกตะกอนโปรตีนโดยการเหวี่ยงแยกที่ระดับความเร็ว 20,000 x *g* เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนตะกอนมาละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 6.5 แล้วนำไปกำจัดเกลือออกโดยการไดอะไลซิส โดยใส่ในถุงไดอะไลซิส ผูกถุงให้แน่นและแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 6.5 โดยมีสัดส่วน คือ สารละลายในถุง 1 ส่วนต่อสารละลายบัฟเฟอร์ 50 ส่วน ทิ้งค้างคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยกวนสารละลายบัฟเฟอร์ตลอดเวลาด้วยเครื่องกวนผสม และเปลี่ยนบัฟเฟอร์ 2 ครั้ง (Matijasic *et al.*, 1998) จากนั้นนำสารละลายในถุงไดอะไลซิสที่ได้ไปทำให้เข้มข้นโดยการทำแห้งสารละลาย (Freeze drying) นำแบคเทอริโอซินที่แยกได้จากแต่ละส่วนในขั้นตอนการสกัดมาหากิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ หาปริมาณโปรตีนตามวิธีการของ Lowep และ Thomas (1996) (ภาคผนวก ข)

และคำนวณหาปริมาณแบคเทอริโอซินที่แยกได้ (เปอร์เซนต์ yield) เมื่อกำหนดให้กิจกรรมการยับยั้งของส่วนใสหลังแยกเซลล์ออกไปเป็นร้อยเปอร์เซนต์

1.3 ทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของแบคเทอริโอซินที่แยกได้เปรียบเทียบกับไนซินทางการค้า ในปริมาณความเข้มข้น 1 mg/ml (ไนซินละลายใน HCl 0.02 N พีเอช 2 เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Stevens *et al.*, 1991)

2. ศึกษาการใช้แบคเทอริโอซินกับนมดิบ

2.1 ศึกษาคุณภาพและลักษณะเบื้องต้นของนมดิบจากฟาร์มโคนมภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ โดยสุ่มตัวอย่างนมดิบที่รีดได้มา 1 ลิตรใส่ขวดแล้วแช่ไว้ในลังโฟมที่มีน้ำแข็ง กำหนดเวลาที่เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ 3 ครั้ง นำมาวิเคราะห์ค่าต่าง ๆ ดังนี้

2.1.1 Methylene blue (Edmondson *et al.*,1985) (ภาคผนวก ข)

2.1.2 กิจกรรมของเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดสเริ่มต้นในนมดิบ

2.1.3 ปริมาณ SCN^- เริ่มต้นในนมดิบ

2.1.4 ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด

2.1.5 ปริมาณแบคทีเรียแลกติก

2.1.6 แบคทีเรียที่ใช้เป็นอินดิเคเตอร์ ได้แก่

S. aureus *E. coli* *B. cereus* และ *B. stearothermophilus*

2.1.7 คุณภาพทางประสาทสัมผัส เช่น สี กลิ่น

2.1.8 พีเอช โดยใช้ pH meter

2.2 หาปริมาณแบคเทอริโอซินที่เหมาะสมในการใช้กับนมดิบ โดยเติมแบคเทอริโอซินลงไปในนมดิบให้มีปริมาณ 0 40 60 80 และ 100 AU/ml แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุด ชุดแรกเก็บที่อุณหภูมิห้อง ชุดที่ 2 เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างมาหาปริมาณเชื้อทั้งหมดและค่าพีเอช โดยที่อุณหภูมิห้องเก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 0 6 12 และ 24 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างในวันที่ 0 3 6 และ 12 วิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบความแตกต่างของจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดและพีเอชในนมดิบที่ใช้แบคเทอริโอซินเติมลงไปใน

ปริมาณต่าง ๆ เพื่อหาปริมาณแบคเทอริโอซินที่น้อยที่สุดที่ให้ค่าประสิทธิภาพการยับยั้งไม่แตกต่างทางสถิติ

2.3 หาระยะเวลาที่นมดิบสามารถตั้งทิ้งไว้ได้โดยเชื้อจุลินทรีย์ยังอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ ($5x10^4$ CFU/ml หรือ 4.7 Log CFU/ml) โดยเติมแบคเทอริโอซินลงไปในนมดิบในปริมาณที่ได้จากข้อ 2.2 เก็บที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ประสิทธิภาพการยับยั้งโดยพิจารณาจากปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและค่าพีเอชของนมดิบ เปรียบเทียบกับปริมาณ จุลินทรีย์ทั้งหมดและค่าพีเอชของนมดิบที่ไม่เติมแบคเทอริโอซิน ที่อุณหภูมิห้องเก็บตัวอย่างในทุก 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างในทุก 2 วัน เป็นเวลา 14 วัน

2.4 ทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค โดยเติมเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ใช้เป็นอินดิเคเตอร์ คือ *B. cereus* ลงในนมดิบให้มีปริมาณ 10^5 CFU/ml จากนั้นเติมแบคเทอริโอซินในปริมาณที่ได้จากข้อ 2.2 ลงไปในนมดิบเก็บที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างในทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทุก 3 วัน เป็นเวลา 18 วัน ตามลำดับ วิเคราะห์ประสิทธิภาพการยับยั้งโดยพิจารณาจากปริมาณ *B. cereus* ที่รอดชีวิตเปรียบเทียบกับนมดิบที่เติม *B. cereus* แต่ไม่เติมแบคเทอริโอซิน

2.5 หาความคงตัวของแบคเทอริโอซินในนมดิบ ทดสอบโดยเก็บตัวอย่างนมดิบที่เก็บที่อุณหภูมิห้องมาหากิจกรรมการยับยั้ง *B. cereus* ที่เหลืออยู่ในชั่วโมงที่ 0 3 6 12 และ 24 ตัวอย่างนมดิบเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ในวันที่ 0 3 6 9 12 และ 15

3. ศึกษาการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสในนมดิบ

3.1 หาปริมาณการใช้ SCN^- และปริมาณ H_2O_2 ที่เหมาะสมเพียงพอในการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส โดยนำนมดิบที่ต้องการทดสอบมาวัดกิจกรรมของเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดส และปริมาณ SCN^- เริ่มต้นจากนั้นเติมโซเดียมไธโอไซยาเนต (NaSCN) ลงในนมเพื่อให้มี SCN^- ความเข้มข้น 5 7 10 และ 15 ppm และ เติม H_2O_2 เพื่อให้มีความเข้มข้น 0 4 8 และ 10 ppm เปรียบเทียบการเก็บนมดิบที่อุณหภูมิต่างกัน โดยแบ่งนมดิบที่มีการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส ดังกล่าวออกเป็น 2 ชุด ชุดแรกเก็บที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างใน

ชั่วโมงที่ 0 6 12 และ 24 ชุดที่ 2 เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 0 24 48 และ 72 วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของปริมาณเชื้อทั้งหมด (TVC) และค่าพีเอชของนมดิบที่ได้จากการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส โดยคำนึงถึงข้อกำหนดของจำนวนจุลินทรีย์ที่มีในนมดิบ ($5x10^4$ CFU/ml หรือ 4.7 Log CFU/ml) เพื่อหาปริมาณการใช้ SCN^- และ H_2O_2 ที่น้อยที่สุดในการกระตุ้นระบบโดยพิจารณาจากประสิทธิภาพการยับยั้งที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

3.2 หาระยะเวลาที่นมดิบสามารถตั้งทิ้งไว้ได้โดยเชื้อจุลินทรีย์ยังอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ ($5x10^4$ CFU/ml หรือ 4.7 Log CFU/ml) นำนมดิบมากระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส โดยเติม SCN^- และ H_2O_2 ลงไปในนมดิบในปริมาณที่ได้จากข้อ 3.1 เก็บที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทุก 2 วัน เป็นเวลา 14 วัน ตามลำดับ วิเคราะห์ประสิทธิภาพการยับยั้งโดยพิจารณาจากปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและค่าพีเอชของนมดิบ เปรียบเทียบกับนมดิบชุดควบคุมที่ไม่มีการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส

3.3 ทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค โดยเติมเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ใช้เป็นอินดิเคเตอร์ คือ *B. cereus* ลงในนมดิบให้มีปริมาณ 10^5 CFU/ml จากนั้นเติม SCN^- และ H_2O_2 ในปริมาณที่ได้จากข้อ 3.1 เก็บที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทุก 3 วัน เป็นเวลา 18 วัน ตามลำดับ วิเคราะห์ประสิทธิภาพการยับยั้งโดยพิจารณาจากปริมาณ *B. cereus* ที่รอดชีวิตเปรียบเทียบกับนมดิบชุดควบคุมที่เติม *B. cereus* แต่ไม่มีการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส

3.4 ศึกษาความคงตัวของระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส โดยพิจารณาจากกิจกรรมของเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดส และปริมาณ SCN^- ที่ลดลงในตัวอย่างนมดิบที่เก็บที่อุณหภูมิห้องในชั่วโมงที่ 0 3 6 12 และ 24 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในวันที่ 0 3 6 9 12 และ 15

4. **ศึกษาผลของการใช้แบคเทอริโอซินร่วมกับการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส ในนมดิบ**

4.1 ศึกษาผลของการเติมแบคเทอริโอซินและการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และ *B. cereus* โดยนำนมดิบที่ต้องการทดสอบมาหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด หากิจกรรมของเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดส และปริมาณ SCN^- เริ่มต้นที่มีอยู่ในนมดิบ จากนั้นแบ่งนมดิบที่ต้องการทดสอบออกเป็น 4 ชุด ชุดแรกเป็นชุดควบคุม ชุดที่ 2 เติมแบคเทอริโอซินลงไปในนมดิบในปริมาณที่ได้จากข้อ 2.1 ชุดที่ 3 เติมโซเดียมไธโอไซยาเนต และ H_2O_2 ลงในน้ำนมเพื่อให้มี SCN^- และ H_2O_2 ความเข้มข้นที่เหมาะสมตามข้อ 3.1 ชุดที่ 4 เติมทั้งแบคเทอริโอซินและกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส เก็บนมดิบที่อุณหภูมิห้อง แล้วเก็บตัวอย่างในทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ประสิทธิภาพการยับยั้งโดยพิจารณาจากปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดที่รอดชีวิตเปรียบเทียบกับนมดิบชุดควบคุม และวิเคราะห์ประสิทธิภาพการยับยั้ง *B. cereus* ที่เติมลงไปในนมดิบให้มีปริมาณ 10^5 CFU/ml โดยแบ่งนมดิบออกเป็น 4 ชุด และทดสอบแบบเดียวกัน

4.2 ศึกษาเปรียบเทียบวิธีการเติมแบคเทอริโอซินกับการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสร่วมกัน โดยนำนมดิบที่ต้องการทดสอบมาวัดหากิจกรรมของเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดส และปริมาณ SCN^- เริ่มต้น จากนั้นแบ่งนมดิบที่ต้องการทดสอบออกเป็น 3 ชุด ชุดที่ 1 เติมแบคเทอริโอซินลงในนมดิบในปริมาณที่ได้จากข้อ 2.1 ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จึงกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส ตามข้อ 3.1 ชุดที่ 2 กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสแล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จึงเติมแบคเทอริโอซิน ชุดที่ 3 เติมแบคเทอริโอซินและกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสพร้อมกัน เก็บนมดิบที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างในทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ประสิทธิภาพการยับยั้งโดยพิจารณาจากปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในนมดิบเปรียบเทียบกัน อีกชุดการทดลองทดสอบการยับยั้ง *B. cereus* ที่เติมลงในนมดิบให้มีปริมาณ 10^5 CFU/ml จากนั้นกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสและเติมแบคเทอริโอซินลงในนมดิบแบบเดียวกัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างในทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ประสิทธิภาพการยับยั้งของแต่ละวิธีโดยพิจารณาจากปริมาณ *B. cereus* ที่รอดชีวิต

5. **ศึกษาประสิทธิภาพของการใช้แบคเทอริโอซินและการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสในการประยุกต์ใช้กับการผลิตนมพาสเจอร์ไรส์**

5.1 ศึกษาคุณภาพและอายุการเก็บของนมพาสเจอร์ไรส์ นำนมดิบที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสและเติมแบคเทอริโอซิน ในปริมาณและวิธีการที่ได้ตามข้อ 4.2 ไปอุ่นให้ร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วโฮโมจีไนส์ที่ความดัน 2,000 ปอนด์/ตารางนิ้ว จากนั้นนำไปพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ศึกษาคุณลักษณะของนมพาสเจอร์ไรส์ที่ได้ดังนี้

5.1.1 ปริมาณเชื้อทั้งหมด (Total Viable Count)

5.1.2 แบคทีเรียที่ใช้เป็นอินดิเคเตอร์ ได้แก่

S. aureus *E. coli* *B. cereus* และ *B. stearothermophilus*

5.1.3 ปริมาณแบคทีเรียชอบอุณหภูมิต่ำ (Psychrophile)

5.1.4 คุณภาพทางประสาทสัมผัส เช่น สี กลิ่น

5.1.5 พีเอช โดยใช้ pH meter

5.1.6 เปอร์เซนต์กรด

5.1.7 อายุการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยพิจารณาจากปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดและค่าพีเอช เก็บตัวอย่างทุก 3 วัน เป็นเวลา 18 วัน

5.2 ทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคโดยเติมเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ใช้เป็นอินดิเคเตอร์ คือ *B. cereus* ลงในนมดิบให้มีปริมาณ 10^5 CFU/ml จากนั้นกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสและเติมแบคเทอริโอซินลงในนมดิบ นำไปพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เก็บนมพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 3 วัน เป็นเวลา 18 วัน วิเคราะห์ประสิทธิภาพการยับยั้งโดยพิจารณาจากปริมาณ *B. cereus* ที่รอดชีวิตก่อนและหลังการพาสเจอร์ไรส์นม เปรียบเทียบกับนมชุดควบคุมที่เติม *B. cereus* แต่ไม่มีทั้งการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสและไม่เติมแบคเทอริโอซิน

5.3 ทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียที่ทนอุณหภูมิสูง โดยเติมเชื้อจุลินทรีย์ทนอุณหภูมิสูงที่ใช้เป็นอินดิเคเตอร์ คือ *B. stearothermophilus* ลงในนมดิบให้มีปริมาณ 10^5 CFU/ml จากนั้นกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสและเติมแบคเทอริโอซินลงในนมดิบ นำไปพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เก็บนมพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 4 องศา

เซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 3 วัน เป็นเวลา 18 วัน วิเคราะห์ประสิทธิภาพการยับยั้งโดยพิจารณาจากปริมาณ *B. stearothermophilus* ที่รอดชีวิตก่อนและหลังการพาสเจอร์ไรส์ เปรียบเทียบกับนมชุดควบคุมที่เติม *B. stearothermophilus* แต่ไม่มีทั้งการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสและไม่เติมแบคเทอริโอซิน

5.4 ศึกษาความคงตัวของแบคเทอริโอซิน กิจกรรมของเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดส และปริมาณ SCN^- ในนมหลังการพาสเจอร์ไรส์ เมื่อเก็บนมพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 3 วัน เป็นเวลา 18 วัน

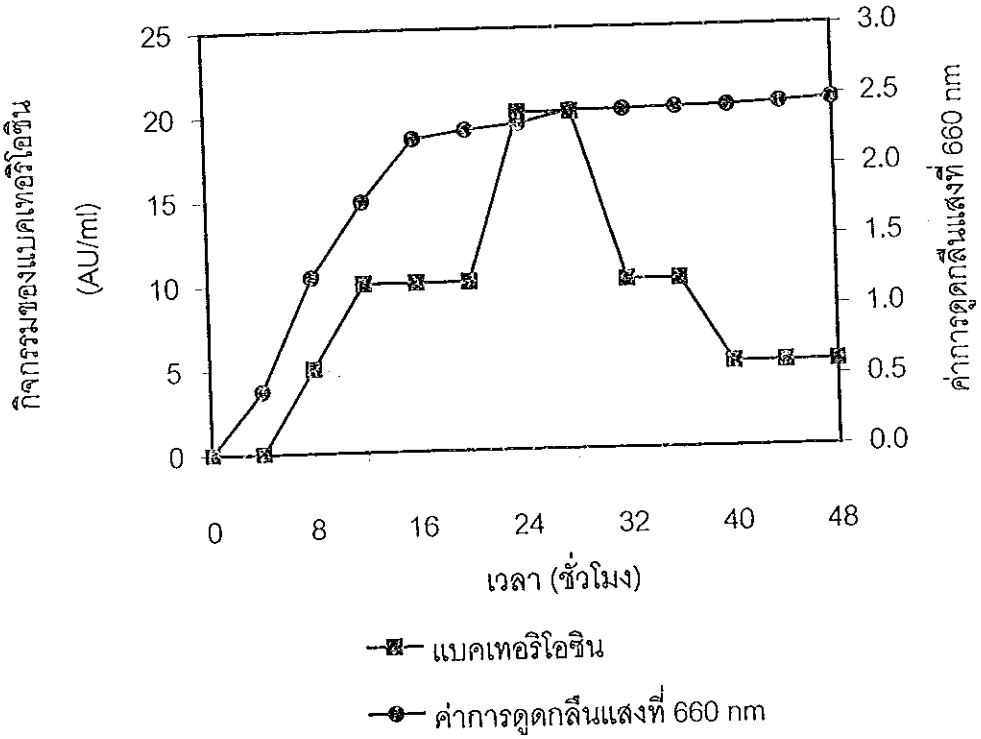
บทที่ 3

ผลและวิจารณ์

1. การผลิตแบคเทอริโอซิน

1.1 ศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* (SN11) ตามสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างแบคเทอริโอซิน (ภัทรพล จันทราภรณ์, 2543)

ทดสอบการผลิตแบคเทอริโอซินของเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* (SN11) โดยการนำน้ำหมักมาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ *B. cereus* และวัดการเจริญของเชื้อโดยการวัดความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อในทุก 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 1 จากผลการทดลองพบว่าการผลิตแบคเทอริโอซินของเชื้อสูงสุดในชั่วโมงที่ 24 โดยมีกิจกรรมการยับยั้ง 20 AU/ml แต่หลังจากผ่านไป 32 ชั่วโมง กิจกรรมการยับยั้งจะลดลงเหลือ 10 AU/ml เมื่อถึงชั่วโมงที่ 48 กิจกรรมการยับยั้งเหลือ 5 AU/ml จากผลการทดลองของภัทรพล จันทราภรณ์ (2543) พบว่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินสูงสุดในชั่วโมงที่ 24 โดยมีกิจกรรมการยับยั้ง 30 AU/ml แต่หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 36 ชั่วโมง กิจกรรมการยับยั้งลดลงเหลือ 20 AU/ml การที่กิจกรรมการยับยั้งลดลงอาจเกิดจากสภาพแวดล้อมของการเลี้ยงเชื้อที่พีเอชลดลงทำให้มีผลกับความคงตัวของโปรตีน หรืออาจเกิดจากการดูดซับของแบคเทอริโอซินที่ผลิตได้กับตัวเซลล์จุลินทรีย์ทั้งที่มีและไม่มีชีวิตและดูดซับกับโปรตีนในอาหาร (Parente *et al.*, 1994) และอาจเกิดจากการย่อยสลายแบคเทอริโอซินโดยเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน ซึ่ง Law และ Kolstad (1983 อ้างโดย ภัทรพล จันทราภรณ์, 2543) รายงานว่าการลดลงของไนซิน หลังจากเชื้อจุลินทรีย์เข้าสู่ระยะคงที่เกิดจากการปลดปล่อยเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนที่ไม่มีความจำเพาะในระหว่างที่เชื้อเกิดการไลซิส (lysis) ทำให้มีกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนเพิ่มขึ้นในช่วงปลายของการหมัก



ภาพที่ 1 การเจริญเติบโตของ *L. casei* ssp. *rhamnosus* (SN11) และการผลิตแบคเทอริโอซิน ณ เวลาต่าง ๆ

1.2 การสกัดแยกแบคเทอริโอซินที่ได้ (Partial purification)

สกัดแยกแบคเทอริโอซินที่ได้โดยการนำน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยง *L. casei* ssp. *rhamnosus* (SN11) ในอาหารเหลวสูตรน้ำนึ่งปลาทูน่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาเหวี่ยงแยกที่ 4,500x *g* เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อแยกเซลล์ออก ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ปรับพีเอชของสารละลายส่วนใสให้เป็น 6.5 วัดปริมาตรส่วนใสที่แยกได้ จากนั้นนำสารละลายส่วนใสที่ได้มาศึกษาขั้นตอนการแยกสกัดป

1.2.1 แยกโปรตีนโมเลกุลใหญ่ออกจากน้ำหมัก นำสารละลายส่วนใสที่ได้มาผ่าน Ultrafiltration ซึ่งมีขนาดแผ่นกรอง 100 kDa พบว่าช่วยให้สีของน้ำหมักจางลง และไม่พบกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินในส่วนที่ไม่ผ่านแผ่นกรอง แต่ในส่วนที่ผ่านแผ่นกรองกิจกรรมการยับยั้งยังคงเดิม แสดงว่าแบคเทอริโอซินที่ได้มีขนาดโมเลกุลต่ำกว่า 100 kDa

1.2.2 ตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 40 กวนผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนผสม ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเหวี่ยงแยกที่ 10,000 x g เป็นเวลา 20 นาที นำมาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งพบว่าในส่วนตะกอนไม่มีกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์เลย และตะกอนที่ได้จะมีลักษณะแข็งตัวคล้ายเจลเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นลักษณะของโปรตีนจากเนื้อปลา แต่ในส่วนใสยังคงมีกิจกรรมการยับยั้ง 20 AU/ml นำส่วนใสที่ได้ไปตกตะกอนต่อด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตให้เป็นร้อยละ 80 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่ากิจกรรมการยับยั้งในส่วนตะกอนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 80 สูงขึ้นเป็น 160 AU/ml

1.2.3 กรองผ่าน Ultrafiltration ซึ่งมีขนาดโมเลกุลผ่าน 10,000 Da โดยนำส่วนตะกอนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 80 มาละลายกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.5 แล้วกรองผ่าน Ultrafiltration นำส่วนที่ผ่านและไม่ผ่านแผ่นกรองมาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งพบว่าในส่วนที่ผ่านแผ่นกรองได้ซึ่งมีขนาดโมเลกุลเล็กกว่า 10,000 Da มีกิจกรรมการยับยั้ง 160 AU/ml แต่ในส่วนที่ผ่านไม่ได้ซึ่งมีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่า 10,000 Da ไม่พบกิจกรรมการยับยั้ง แสดงว่าแบคเทอริโอซินที่ต้องการมีขนาดเล็กกว่า 10,000 Da

1.2.4 การกำจัดเกลือโดยการใช้วิธีไดอะไลซิส นำสารละลายแบคเทอริโอซินที่ผ่าน Ultrafiltration ซึ่งมีขนาดโมกุลเล็กกว่า 10,000 Da ใส่ในถุงไดอะไลซิส ซึ่งมีขนาดโมเลกุลผ่าน 3,500 Da แช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.5 ทิ้งค้างคืนไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยทำการเปลี่ยนบัฟเฟอร์ 2 ครั้ง ทดสอบกิจกรรมการยับยั้งพบว่าสารละลายแบคเทอริโอซินภายในถุงไดอะไลซิสมีกิจกรรมการยับยั้ง 80 AU/ml แสดงว่าแบคเทอริโอซินที่

ผลิตจาก *L. casei* ssp. *rhamnosus* (SN11) เป็นแบคเทอริโอซินขนาดเล็ก มีขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วง 3,500-10,000 Da ศิรินาถ หนูเอก (2540) ได้ทดสอบพบว่าเป็นแบคเทอริโอซินที่ทนความร้อนสูง โดยสามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ได้นาน 45 นาที ดังนั้นแบคเทอริโอซินที่ได้จึงจัดอยู่ในกลุ่ม Lantibiotics (Klaenhammer *et al.*,1993)

1.2.5 การทำแห้งแบคเทอริโอซินโดยใช้วิธี Freeze dry นำสารละลายแบคเทอริโอซินปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่ได้จากการกำจัดเกลือไปทำแห้ง พบว่าได้แบคเทอริโอซินแห้ง 0.5 กรัม มีลักษณะสีเหลืองแกมน้ำตาล เมื่อนำแบคเทอริโอซินไปละลายกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.5 ปริมาณ 1 mg/ml พบว่ามีกิจกรรมการยับยั้ง 320 AU/mg

1.2.6 หาปริมาณโปรตีนและทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของแบคเทอริโอซินที่แยกได้ในแต่ละขั้นตอนของการสกัดโดยใช้ *E. coli* *B. cereus* และ *S. aureus* เป็นแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ จากผลการทดลอง (ตารางที่ 7) พบว่าปริมาณโปรตีนและกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินที่มีต่อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ทั้ง 3 ชนิด ไม่เท่ากัน ทั้งนี้เนื่องมาจากกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ด้วย (Brink *et al.*, 1994; Parente and Hill, 1992; Barefoot and Klaenhammer, 1983) De Vuyst และ Vandamme (1994) กล่าวว่าแบคเทอริโอซินซึ่งผลิตจากแบคทีเรียแกรมลบมีฤทธิ์ในการยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียแกรมลบ ส่วนแบคเทอริโอซินซึ่งผลิตจากแบคทีเรียแกรมบวกมีฤทธิ์ในการยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก เชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* (SN11) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ โครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกมีเปปติโดไกลแคนเป็นส่วนประกอบมากกว่าของแบคทีเรียแกรมลบ แต่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบมีหลายชั้นมากกว่าและมีส่วนผนังชั้นนอกซึ่งสามารถป้องกันการผ่านเข้าออกของสาร เช่น สารเคมี และเอนไซม์ภายนอกไม่ให้เข้ามาทำลายเซลล์ (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2533) แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแกรมบวกเข้าสู่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกง่ายกว่าจึงทำลายเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ และการที่กิจกรรมการยับยั้งไม่เท่ากันก็อาจเกิดจากความไวต่อแบคเทอริโอซินของเชื้อด้วย เนื่องจากมีองค์ประกอบของผนังเซลล์ที่แตกต่างกัน (Kawai *et al.*, 1994; Nettles and Barefoot, 1993; Barefoot and Klaenhammer, 1983) กิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินที่แยกได้ในแต่ละขั้นตอนการสกัดแสดงดังตารางที่ 8 จากผลการทดลองพบว่าหลังจากนำแบคเทอริโอซินไปทำแห้งโดยการ Freeze dry แล้วแบคเทอริโอซินที่ได้มีกิจกรรมการยับยั้ง *B. cereus* 320 AU/mg ผลการทำบริสุทธิ์บางส่วน (Partial purification) ของแบคเทอริโอซินที่ได้จาก *L. casei* ssp. *rhamnosus* (SN11) พบว่า

ขนาดโมเลกุลของแบคเทอริโอซินอยู่ในช่วง 3,500-10,000 Da สามารถแยกแบคเทอริโอซินได้ 14.22 เท่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากแยกเซลล์ออกแล้วปริมาตร 1 ลิตร สามารถแยกแบคเทอริโอซินและทำแห้งได้ปริมาณ 0.5 กรัม การแยกสกัดแบคเทอริโอซินบางส่วนโดย Hastings และ Stiles (1991) พบว่าสามารถแยกแบคเทอริโอซินที่ได้จาก *Leuconostoc gelidum* โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 60 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และกำจัดเกลือโดยการไดอะไลซิสด้วยถุงไดอะไลซิสที่มีขนาดโมเลกุลผ่าน 6,000-8,000 Da พบว่าสามารถเพิ่มความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินได้ 8 เท่า ส่วน Lee และคณะ (1999) ได้แยกแบคเทอริโอซินบางส่วนที่ได้จาก *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* H-S59 ซึ่งแยกได้จากกิมจิ โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 75 และกำจัดเกลือโดยการไดอะไลซิสข้ามคืน พบว่ากิจกรรมการยับยั้งจำเพาะของแบคเทอริโอซินเพิ่มขึ้นจาก 4.3 เท่า เป็น 5.3 เท่า และความบริสุทธิ์ของแบคเทอริโอซินเพิ่มขึ้น 1.2 เท่า

ตารางที่ 7 ปริมาณโปรตีนและกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของแบคเทอริโอซินที่แยกได้จาก *L. casei* ssp. *rhamnosus* (SN11) ในแต่ละขั้นตอนการสกัด

ขั้นตอนการสกัด	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)	กิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (AU/ml)		
		E. coli	*B. cereus*	*S. aureus*
ส่วนใสหลังแยกเซลล์ออก	8.87	10	20	20
ไม่ผ่านแผ่นกรอง UF (100 kDa)	5.37	0	0	0
ผ่านแผ่นกรอง UF (100 kDa)	3.01	10	20	20
ตะกอนหลังการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 40	14.99	0	0	0
ส่วนใสหลังการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 40	2.35	10	20	20
ตะกอนหลังการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 80	13.81	80	160	160
ส่วนใสหลังการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 80	0.41	0	5	10
ไม่ผ่านแผ่นกรอง UF (10 kDa)	4.61	0	0	0
ผ่านแผ่นกรอง UF (10 kDa)	8.58	80	160	160
สารละลายหลังการกำจัดเกลือ	3.40	40	80	80
แบคเทอริโอซินหลังการ Freeze dry (ละลาย 1 mg/ml)	0.25	160	320	320

หมายเหตุ : UF = Ultrafiltration

ตารางที่ 8 กิจกรรมการยับยั้ง *B. cereus* ของแบคเทอริโอซินที่แยกได้จาก *L. casei* ssp. *rhamnosus* (SN11) ในแต่ละขั้นตอนการสกัด

ขั้นตอนการสกัด	ปริมาตร (ml)	ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (mg)	กิจกรรมการยับยั้งทั้งหมด (AU)	Specific Activity (AU/mg โปรตีน)	Yield (%)	Fold
ส่วนใสหลังแยกเซลล์ออก	1,000	8,870	20,000	2.25	100	1.00
ไม่ผ่านแผ่นกรอง UF (100 kDa)	200	1,074	0	0	0	0
ผ่านแผ่นกรอง UF (100 kDa)	800	2,408	16,000	6.64	80	2.95
ตะกอนหลังการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 40	20	299.8	0	0	0	0
ส่วนใสหลังการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 40	780	1,833	15,600	8.51	78	3.78
ตะกอนหลังการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 80	20	276.2	3,200	11.58	16	5.15
ส่วนใสหลังการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 80	760	311.6	0	0	0	0
ไม่ผ่านแผ่นกรอง UF (10 kDa)	5	28.05	0	0	0	0
ผ่านแผ่นกรอง UF (10 kDa)	15	128.70	2,400	18.65	12	8.29
สารละลายหลังการกำจัดเกลือ	30	102	2,400	23.53	12	10.46
แบคเทอริโอซินหลังการ Freeze Dry	0.5 กรัม	125	1,600	32.00	8	14.22

หมายเหตุ : UF = Ultrafiltration

1.3 ทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของแบคเทอริโอซินที่แยกได้หลังการ Freeze dry เปรียบเทียบกับไนซินทางการค้า โดยใช้แบคทีเรีย *E. coli* *B. cereus* *S. aureus* และ *B. stearothermophilus* เป็นแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ นำแบคเทอริโอซินมาละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.5 ที่ฆ่าเชื้อแล้วในปริมาณ 1 mg/ml และนำไนซินมาละลายใน 0.02 N HCl ปริมาณ 1 mg/ml จากนั้นนำมาเจือจางเพื่อทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบบ Agar well diffusion method ผลการทดสอบดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 กิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของแบคเทอริโอซินที่แยกได้กับไนซินทางการค้า

แบคเทอริโอซิน	กิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (AU/mg)			
	E. coli	*B. cereus*	*S. aureus*	*B. stearothermophilus*
ไนซิน	40	1,280	2,560	1,280
แบคเทอริโอซินที่แยกได้	160	320	320	320

ผลการทดสอบจากตารางที่ 9 เมื่อนำไนซินมาทดสอบเปรียบเทียบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ทั้ง 4 ชนิด กับแบคเทอริโอซินที่แยกได้ พบว่าไนซินซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินทางการค้าและมีความบริสุทธิ์สูงกว่าแบคเทอริโอซินที่แยกได้ มีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ *B. cereus* *S. aureus* และ *B. stearothermophilus* สูงกว่าของแบคเทอริโอซินที่แยกได้ แต่มีกิจกรรมการยับยั้ง *E. coli* น้อยกว่า เนื่องจากไนซินสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ (Dean and Zottola, 1996; Broughton, 1990) จึงมีกิจกรรมการยับยั้ง *E. coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบได้น้อย จากผลการทดลองแสดงว่าแบคเทอริโอซินที่แยกได้สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบเช่นเดียวกับไนซิน แต่สามารถยับยั้ง *E. coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบได้ดีกว่าไนซิน

2. การใช้แบคเทอริโอซินกับนมดิบเพื่อหาปริมาณแบคเทอริโอซินที่เหมาะสมและศึกษากิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ในนมดิบ

2.1 ศึกษาคุณภาพและลักษณะเบื้องต้นของนมดิบจากฟาร์มโคนมภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ ผลการทดลองดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 คุณภาพและลักษณะเบื้องต้นของนมดิบจากฟาร์มโคนม ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ

การวิเคราะห์	ผลการทดสอบ
1. Methylene blue test	มากกว่า 7 ชั่วโมง
2. กิจกรรมของเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดส	0.55-1.21U/ ml
3. ปริมาณ SCN^-	2-8 ppm
4. ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด	$1.5 \times 10^4 - 4.9 \times 10^4$ CFU/ml
5. ปริมาณแบคทีเรียแลกติก	$25 - 1 \times 10^4$ CFU/ml
6. แบคทีเรียที่ใช้เป็นอินดิเคเตอร์	
S. aureus	ไม่พบ
E. coli	ไม่พบ
B. cereus	ไม่พบ
B. stearothermophilus	ไม่พบ
7. คุณภาพทางประสาทสัมผัส	น้ำนมมีสีขาวขุ่น มีกลิ่นหอมของนมดิบ ไม่มีตะกอน ไม่ข้นหนืด
8. พีเอช	6.51-6.68

ผลการทดสอบเมธิลีนบลูของนมดิบพบว่าผ่านการทดสอบมากกว่า 7 ชั่วโมง แสดงว่าเป็นนมที่มีคุณภาพดี จัดอยู่ในเกรด A (กระทรวงสาธารณสุข, 2522 อ้างโดย ชูรัฐ แปลกสงวนศรี, 2534) กิจกรรมของเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดสโดยเฉลี่ยที่พบในนมดิบอยู่ในช่วง 0.55-1.21 U/ml ซึ่งโดยปกติมีรายงานว่ามีเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดสอยู่ในนมดิบ 0.87 U/ml หรือความเข้มข้นประมาณ 1-7 ppm (Gaya *et al.*, 1991) หรือประมาณ 30 µg/ml ทั้งนี้ปริมาณสูงสุดจะอยู่ในช่วง 3-4 วันหลังคลอดลูกวัว (Wit, 1998; Reiter, 1986) พบปริมาณ SCN^- ในนมดิบอยู่ในช่วง 2-8 ppm ซึ่งโดยปกติแล้วปริมาณที่พบในนมจะมีประมาณ 1-10 ppm ทั้งนี้ขึ้นกับลักษณะนิสัยการกินอาหารของวัวและชนิดของอาหารที่วัวได้รับ (Reiter and Hamulv, 1984)

พบปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดอยู่ในช่วง $1.5x10^4$-$4.9x10^4$ CFU/ml จัดว่าเป็นนมที่มีคุณภาพดี ทั้งนี้มาตรฐานของนมดิบกำหนดให้มีแบคทีเรียทั้งหมดไม่เกิน $5x10^4$ CFU/ml (Robinson, 1981 อ้างโดย ชูรัฐ แปลกสงวนศรี, 2534)

ปริมาณแบคทีเรียแลกติกในนมดิบที่นำมาวิเคราะห์อยู่ในช่วง $25\text{-}1x10^4$ CFU/ml จัดเป็นลักษณะของน้ำนมปกติที่อาจมีแบคทีเรียแลกติกปะปนอยู่ได้ (วรรณา ตั้งชัยเจริญ, 2538)

การตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียก่อโรคที่ใช้เป็นอินดิเคเตอร์ในการทดสอบ พบว่าตรวจไม่พบทั้ง *S. aureus* *E. coli* และ *B. cereus* และตรวจไม่พบแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูง *B. stearothermophilus* ทั้งนี้แสดงว่าสุขลักษณะในการรีดนมอยู่ในเกณฑ์ดี จึงไม่มีการปนเปื้อนแบคทีเรียก่อโรคในนมดิบที่รีดเสร็จใหม่ ๆ ข้อกำหนดของกระทรวงสาธารณสุข (2522 อ้างโดย ชูรัฐ แปลกสงวนศรี, 2534) กำหนดว่าต้องไม่พบ *E. coli* (faecal type) ในนม 0.1 มิลลิลิตร และต้องไม่พบจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อโรคในนมดิบเลย

การทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของนมดิบ โดยการดูสี ดูลักษณะปรากฏ และดมกลิ่น พบว่านมดิบที่นำมาทดสอบมีลักษณะสีขาวขุ่น มีกลิ่นหอมของนมดิบ ไม่มีตะกอน ไม่ข้นหนืด ซึ่งบ่งบอกถึงลักษณะของนมดิบที่ดี (ชูรัฐ แปลกสงวนศรี, 2537)

พีเอชของนมดิบอยู่ในช่วง 6.51-6.68 นมดิบที่มีคุณภาพดีจะมีความเป็นกรดเล็กน้อย (พีเอช 6.6) (วรรณา ตั้งชัยเจริญ, 2538; ชูรัฐ แปลกสงวนศรี, 2537) และมีเปอร์เซนต์ความเป็นกรดซึ่งวัดจากปริมาณกรดแลกติกอยู่ในช่วง 0.16-0.18 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์จะมีการเปลี่ยนแลกโตสบางส่วนไปเป็นกรดแลกติกทำให้พีเอชของนมลดลง (วรรณา ตั้งชัยเจริญ, 2538)

2.2 การหาปริมาณการใช้แบคเทอริโอซินที่เหมาะสมกับนมดิบ

ทดลองโดยใช้แบคเทอริโอซินเติมลงไปในนมดิบให้มีปริมาณความเข้มข้น 0 40 60 80 และ 100 AU/ml แล้วเก็บตัวอย่างนมดิบที่อุณหภูมิห้อง (ตารางที่ 11 และ 12) และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 13 และ 14) เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและค่าพีเอชของนมดิบ นำผลการทดลองที่ได้มาเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติเพื่อหาปริมาณแบคเทอริโอซินที่เหมาะสมที่สุดในการเติมลงในนมดิบ

ตารางที่ 11 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในนมดิบเมื่อเติมแบคเทอริโอซินลงในนมดิบในปริมาณต่าง ๆ แล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

ปริมาณแบคเทอริโอซิน (AU/ml)	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (Log CFU/ml) ณ เวลาต่าง ๆ (ชั่วโมง)			
	0	6	12	24
0	4.83 a	5.30 a	8.17 a	9.39 a
40	4.83 a	5.00 b	6.39 b	8.87 b
60	4.83 a	4.95 b	6.33 b	8.75 b
80	4.83 a	4.89 c	6.29 b	8.36 b
100	4.83 a	4.84 c	5.48 c	7.22 c

หมายเหตุ : a b c ในแนวตั้งแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 12 พีเอชของนมดิบเมื่อเติมแบคเทอริโอซินลงในนมดิบในปริมาณต่าง ๆ แล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

ปริมาณแบคเทอริโอซิน (AU/ml)	พีเอชของนมดิบ ณ เวลาต่าง ๆ (ชั่วโมง)			
	0	6	12	24
0	6.80 a	6.70 a	6.58 a	5.70 a
40	6.80 a	6.74 ab	6.62 ab	5.90 b
60	6.80 a	6.75 b	6.64 b	5.97 b
80	6.80 a	6.75 b	6.65 bc	6.14 bc
100	6.80 a	6.78 b	6.70 c	6.26 c

หมายเหตุ : a b c ในแนวตั้งแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 13 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในนมดิบเมื่อเติมแบคเทอริโอซินลงในนมดิบในปริมาณต่าง ๆ แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ปริมาณแบคเทอริโอซิน (AU/ml)	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (Log CFU/ml) ณ เวลาต่าง ๆ (วัน)						
	0	2	4	6	8	10	12
0	4.84 a	5.00 a	5.30 a	5.66 a	5.81 a	6.25 a	7.02 a
40	4.84 a	4.95 ab	4.99 b	5.22 b	5.64 b	6.00 b	6.62 b
60	4.84 a	4.92 b	4.98 b	5.20 b	5.61 b	6.06 b	6.60 b
80	4.84 a	4.88 bc	4.95bc	5.16 b	5.51bc	5.94 bc	6.55 bc
100	4.84 a	4.86 c	4.90 c	5.00 c	5.38 c	5.83 c	6.22 c

หมายเหตุ : a b c ในแนวตั้งแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 14 พีเอชของนมดิบเมื่อเติมแบคเทอริโอซินลงในนมดิบในปริมาณต่าง ๆ แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ปริมาณแบคเทอริโอซิน (AU/ml)	พีเอชของนมดิบ ณ เวลาต่าง ๆ (วัน)						
	0	2	4	6	8	10	12
0	6.70 a	6.68 a	6.61 a	6.52 a	6.42 a	6.01 a	5.68 a
40	6.70 a	6.68 a	6.62 a	6.62 b	6.52 b	6.00 a	5.69 a
60	6.70 a	6.68 a	6.64ab	6.61 b	6.55 b	6.22 b	5.89 b
80	6.70 a	6.70 a	6.66 b	6.60 b	6.58bc	6.34 c	5.95bc
100	6.70 a	6.70 a	6.69 b	6.61 b	6.60 c	6.40 c	5.99 c

หมายเหตุ : a b c ในแนวตั้งแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

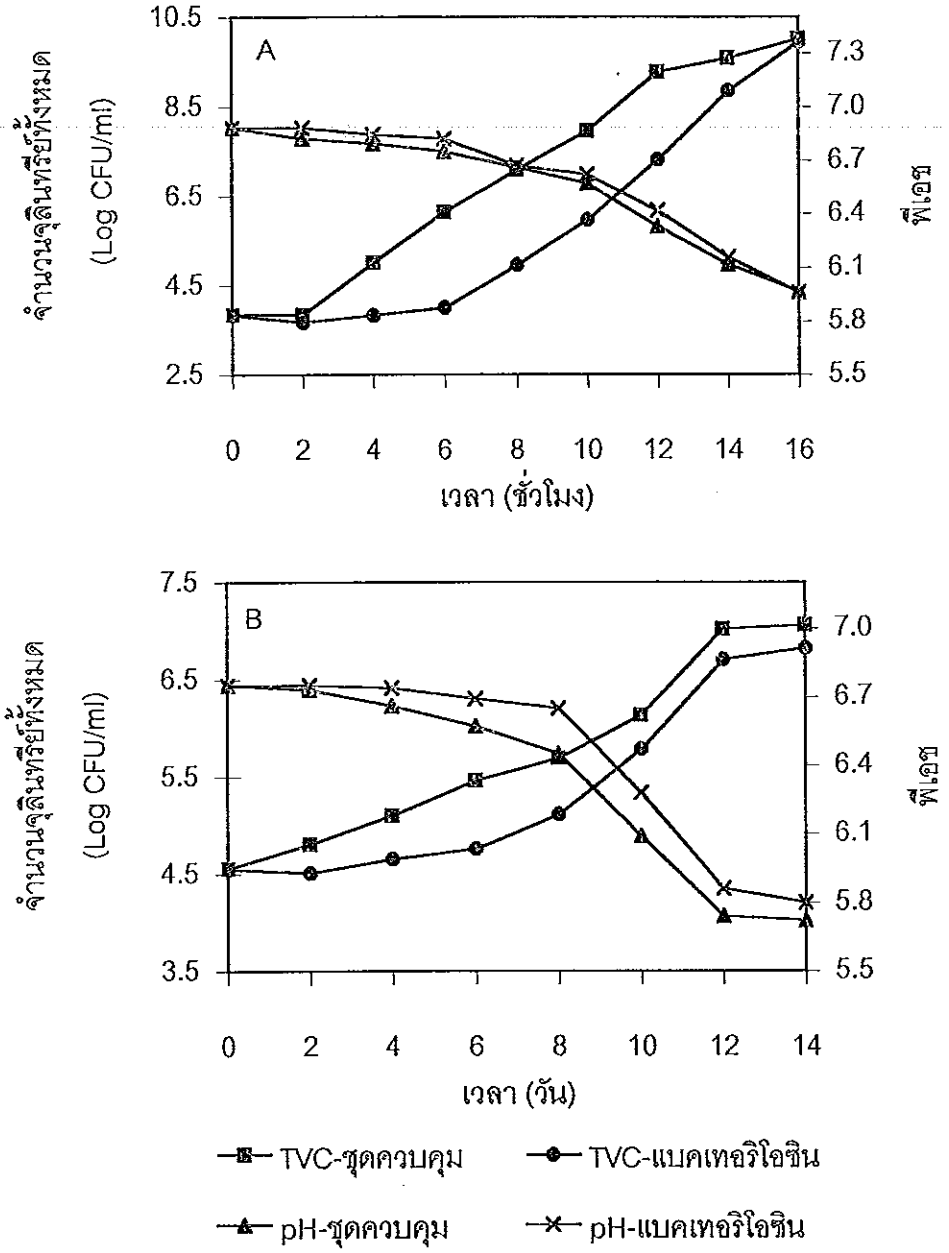
จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (ตารางที่ 11 และ 13) เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการเก็บนมดิบนานขึ้น โดยนมดิบชุดที่ไม่เติมแบคเทอริโอซินนั้นเชื้อจุลินทรีย์จะเพิ่มขึ้นเร็วกว่าในนมดิบชุดที่เติมแบคเทอริโอซิน จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่าเมื่อใช้แบคเทอริโอซินความเข้มข้น 80 AU/ml ให้ผลการยับยั้งจุลินทรีย์แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการใช้ปริมาณ 0 40 และ 60 AU/ml แต่ไม่แตกต่างกับการใช้ปริมาณ 100 AU/ml เช่น จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในนมดิบที่ใช้ปริมาณ 80 AU/ml และ 100 AU/ml ไม่แตกต่างกันที่อุณหภูมิห้องในชั่วโมงที่ 6 ส่วนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จำนวนจุลินทรีย์ไม่แตกต่างกันในวันที่ 2 และ 4 จึงเลือกใช้แบคเทอริโอซินที่ระดับความเข้มข้น 80 AU/ml ในการทดลองขั้นต่อไป

เมื่อเก็บนมดิบไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ตารางที่ 12) และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 14) พีเอชที่ลดลงเกิดจากการที่แบคทีเรียแลกติกผลิตกรดแลกติกออกมาจากการใช้น้ำตาลแลกโตสที่มีอยู่ในนม เป็นผลให้พีเอชของนมดิบลดต่ำลง การใช้แบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งการผลิตกรดแลกติกของแบคทีเรียได้ (Daeschel, 1993) ดังนั้นพีเอชของนมดิบชุดที่เติมแบคเทอริโอซินจึงลดลงช้ากว่านมดิบชุดควบคุม

2.3 หาระยะเวลาที่น้ำนมสามารถตั้งทิ้งไว้โดยเชื้อจุลินทรีย์ยังอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

การหาระยะเวลาที่สามารถตั้งนมดิบทิ้งไว้หรือระยะเวลารอการแปรรูป (Delay) โดยที่จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ไม่เพิ่มจำนวนขึ้นจนไม่สามารถนำไปแปรรูปได้อีก หรือไม่เกินจากข้อกำหนดของจำนวนจุลินทรีย์ที่มีในนมดิบ ($5x10^4$ CFU/ml หรือ 4.7 Log CFU/ml) ระยะเวลาที่นมดิบสามารถตั้งทิ้งไว้ได้บ่งบอกถึงประสิทธิภาพการยับยั้งของแบคเทอริโอซินที่ยังคงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ไม่ให้เพิ่มจำนวนจากเดิม ทำให้ทราบว่าเมื่อเติมแบคเทอริโอซินลงไปในนมแล้วสามารถทิ้งนมดิบไว้ระหว่างรอการแปรรูปได้นานเท่าไหร่คุณภาพของนมดิบทางจุลินทรีย์จึงยังคงเดิม ผลการทดลองเติมแบคเทอริโอซินในปริมาณที่ได้จากข้อ 2.2 คือ 80 AU/ml ลงไปในนมดิบเก็บที่อุณหภูมิห้อง (ภาพที่ 2A) และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 2B) พบว่าปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในนมดิบชุดควบคุมจะค่อย ๆ เพิ่มสูงขึ้นในระยะแรกและเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในเวลาต่อมา แต่ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในนมดิบชุดที่เติมแบคเทอริโอซินจะลดจำนวนลงในระยะแรกและต่ำสุดในชั่วโมงที่ 2 หลังจากนั้นจุลินทรีย์จะค่อย ๆ เพิ่มสูงขึ้น ระยะการเจริญเริ่มต้น (Lag phase) นานกว่าจุลินทรีย์ในนมดิบชุดควบคุม ที่อุณหภูมิห้อง จุลินทรีย์ในนมดิบชุดที่เติมแบคเทอริโอซินเพิ่มสูงขึ้นจนมีจำนวนใกล้เคียงกับจำนวนจุลินทรีย์ในนมดิบชุดควบคุมในชั่วโมงที่ 16 และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จำนวนจุลินทรีย์ใกล้เคียงกันเมื่อเก็บนมดิบไว้ 12 วัน

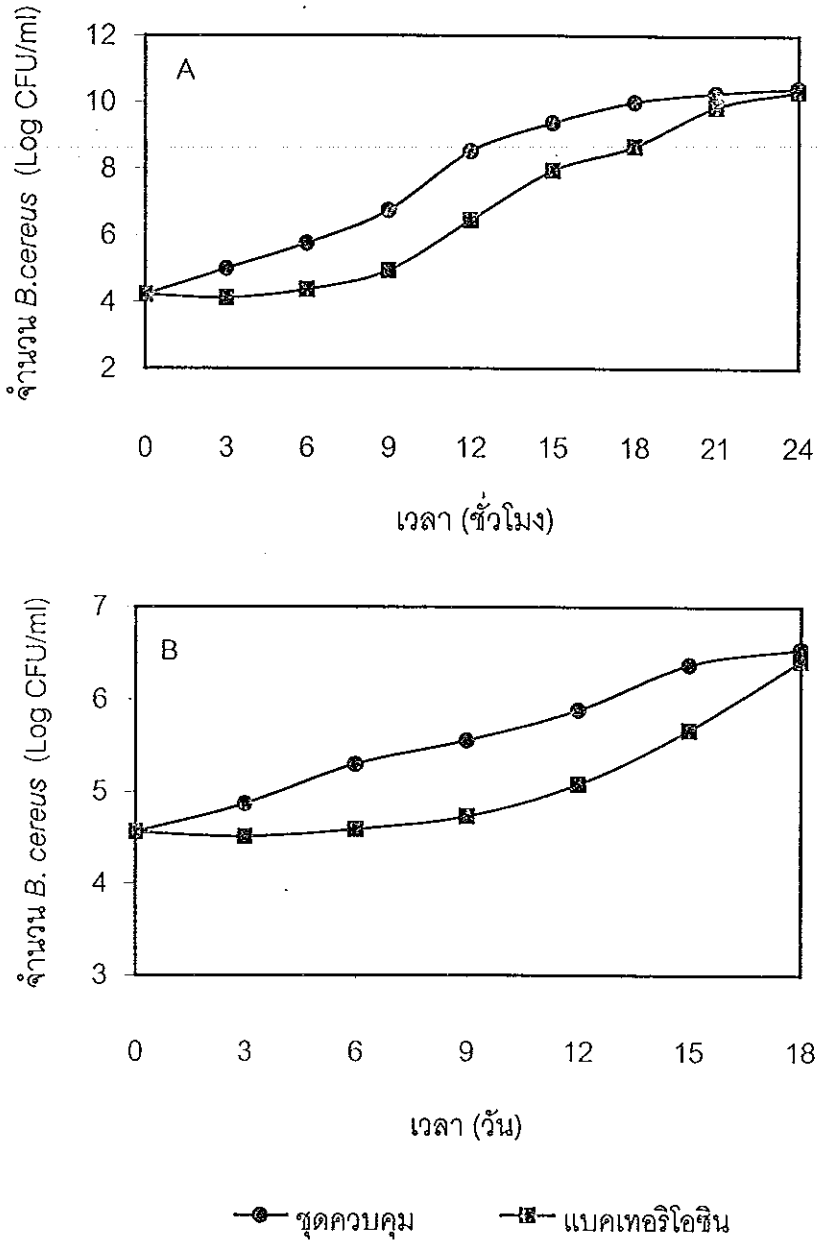
พีเอชของนมดิบชุดควบคุมจะลดต่ำลงอย่างรวดเร็ว ส่วนพีเอชของนมดิบชุดที่เติมแบคเทอริโอซิน 80 AU/ml ค่อนข้างคงที่ในระยะแรก (พีเอชประมาณ 6.8) หลังจากเวลาผ่านไป 8 ชั่วโมง (อุณหภูมิห้อง) และ 8 วัน (อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) พีเอชจึงค่อย ๆ ลดต่ำลง จากผลการทดลองแสดงว่าสามารถตั้งทิ้งนมดิบไว้โดยการเติมแบคเทอริโอซินลงไปในนมดิบเพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์รักษาคุณภาพของนมดิบไว้ในระหว่างรอการแปรรูปโดยที่จำนวนจุลินทรีย์ไม่เกินจากข้อกำหนดที่อุณหภูมิห้องได้ 6 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้ 6 วัน แต่ถ้าต้องการแปรรูปนมดิบในขณะที่จำนวนจุลินทรีย์ลดลงต่ำสุดก็ทำได้โดยเติมแบคเทอริโอซินลงในนมดิบแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพราะแบคเทอริโอซินทำลายจุลินทรีย์ทำให้จำนวนลดลงจากเดิมมากที่สุดในชั่วโมงที่ 2



ภาพที่ 2 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (TVC) และพีเอช (pH) ของนมดิบที่เติมแบคเทอริโอซิน 80 AU/ml ในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิห้อง (A) และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (B)

2.4 ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *B. cereus*

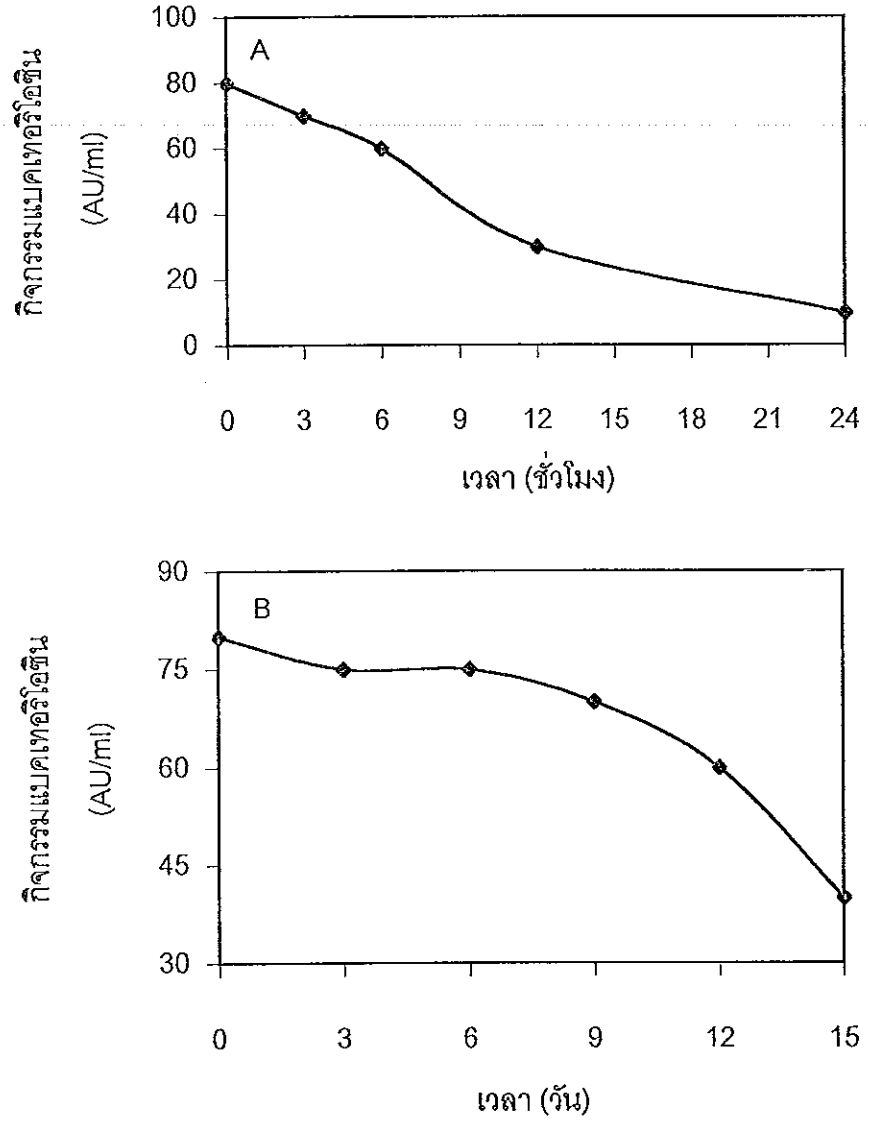
จากผลการทดสอบพบว่าจำนวนของ *B. cereus* ในนมดิบชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมแบคเทอริโอซินทั้งที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ภาพที่ 3A) และที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 3B) เพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วทั้ง 2 ชุดอุณหภูมิ เมื่อเก็บนมดิบไว้ที่อุณหภูมิห้อง เชื้อ *B. cereus* เพิ่มจาก 4.22 Log CFU/ml เป็น 10.43 Log CFU/ml เมื่อถึงชั่วโมงที่ 24 และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เชื้อ *B. cereus* เพิ่มจาก 4.56 Log CFU/ml เป็น 6.55 Log CFU/ml เมื่อเก็บนมดิบไว้ 18 วัน แต่พบว่าที่อุณหภูมิห้องจำนวน *B. cereus* ในนมดิบชุดที่เติมแบคเทอริโอซินเพิ่มจาก 4.22 Log CFU/ml เป็น 10.33 Log CFU/ml ในชั่วโมงที่ 24 และ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เชื้อ *B. cereus* เพิ่มจาก 4.56 Log CFU/ml เป็น 6.42 Log CFU/ml หลังจากเก็บไว้เป็นเวลา 18 วัน เมื่อพิจารณากราฟแสดงจำนวนของ *B. cereus* และข้อกำหนดจำนวนจุลินทรีย์ในนมดิบ ($5x10^4$ CFU/ml หรือ 4.7 Log CFU/ml) พบว่าที่อุณหภูมิห้อง (ภาพที่ 3A) ช่วงระยะ Lag phase ของ *B. cereus* ในนมดิบชุดที่เติมแบคเทอริโอซินนานกว่าในชุดควบคุมประมาณ 6 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 3B) ประมาณ 6 วัน ดังนั้นแสดงว่าแบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* ในนมดิบได้ มีรายงานว่าไนซินปริมาณ 1 μg/ml สามารถยับยั้งการเจริญและการผลิต Enterotoxin ของ *B. cereus* ในน้ำเกรวี่ที่เก็บที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส (Beuchat *et al.*, 1997) และสามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* ในไส้กรอกได้ (Nielson and Zeuthen, 1985) แต่ Broughton (1990) รายงานว่าปริมาณไนซิน 75-100 IU/ml สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* ได้



ภาพที่ 3 การเปลี่ยนแปลงจำนวนของ *B. cereus* ในนมดิบที่เติมแบคเทอริโอซิน 80 AU/ml ในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิห้อง (A) และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (B)

2.5 การศึกษาความคงตัวของแบคเทอริโอซินในน้ำนม

การทดสอบหากิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของแบคเทอริโอซินในตัวอย่างนมดิบที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง (ภาพที่ 4 A) และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 4 B) ในระยะเวลาต่าง ๆ กัน โดยใช้ *B. cereus* เป็นแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ พบว่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินในตัวอย่างนมดิบที่เก็บที่อุณหภูมิห้องลดลงอย่างรวดเร็วและตรวจพบกิจกรรมในชั่วโมงที่ 24 เพียง 10 AU/ml เมื่อเก็บนมดิบไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในระยะแรกกิจกรรมของแบคเทอริโอซินจะลดลงอย่างช้า ๆ แต่หลังจากเก็บไว้ 6 วัน กิจกรรมการยับยั้งจะลดลงอย่างรวดเร็ว ตรวจพบกิจกรรมของแบคเทอริโอซิน 40 AU/ml ในวันที่ 15 ทั้งนี้ความคงตัวของแบคเทอริโอซินลดลงอาจเนื่องจากการที่พีเอชลดลง กรดที่เกิดขึ้นอาจย่อยแบคเทอริโอซินและอาจเกิดจากการย่อยสลายตัวเองของแบคเทอริโอซิน (Autolysis) (De Vuyst and Vandamme, 1994) และมีรายงานว่าอุณหภูมิสูงทำให้แบคเทอริโอซินเสื่อมสภาพง่ายกว่าอุณหภูมิต่ำ (ภัทรพล จันทราภรณ์, 2543) กิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินที่อุณหภูมิห้องจึงลดลงเร็วกว่าที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของแบคเทอริโอซินลดลงก็จะมีผลให้เชื้อจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนขึ้นได้ จากผลการทดลองที่ผ่านมาพบว่าในระยะแรกของการเก็บนมดิบ จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (ภาพที่ 2A และ 2B) และจำนวน *B. cereus* (ภาพที่ 3A และ 3B) ค่อนข้างคงที่เพราะแบคเทอริโอซินยังคงมีกิจกรรมการยับยั้งแต่เมื่อเก็บนมดิบไว้เป็นเวลานานขึ้น กิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินจะยิ่งลดลง เชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดและ *B. cereus* จึงเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว มีรายงานว่ากิจกรรมการยับยั้งของไนซินต่อ *L. monocytogenes* ในน้ำนมขึ้นอยู่กับปริมาณไขมันในนมด้วย ถ้าในนมมีปริมาณไขมันยิ่งสูงกิจกรรมการยับยั้งก็จะยิ่งลดลง โดยไนซินอาจจะถูกดูดซับอยู่กับเม็ดไขมันทำให้ไนซินมีกิจกรรมที่จะยับยั้งจุลินทรีย์ในนมน้อยลง (Daeschel, 1993) และมีรายงานอีกว่ากิจกรรมการยับยั้ง *B. cereus* โดยไนซินในน้ำเกรวี่ย์ลดลงได้ เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 8 และ 15 องศาเซลเซียส เนื่องจาก *B. cereus* สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนออกมาทำลายไนซินได้ และการลดลงของกิจกรรมการยับยั้งของไนซินยังขึ้นอยู่กับกระบวนการให้ความร้อน พีเอช ชนิดของอาหาร อุณหภูมิ และระยะเวลาของการเก็บด้วย (Broughton, 1990)



ภาพที่ 4 กิจกรรมของแบคเทอริโอซินในนมดิบที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง (A) และอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (B)

3. ศึกษาการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในนมดิบ

3.1 หาปริมาณการใช้ไธโอไซยาเนต (SCN^-) และปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่เหมาะสมในการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส

การหาปริมาณการใช้ SCN^- และปริมาณ H_2O_2 ที่เหมาะสมในการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส โดยนำนมดิบที่ต้องการทดสอบมาหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด วัดหากิจกรรมของเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดส พบว่ามี 0.87 U/ml และปริมาณ SCN^- เริ่มต้นที่มีอยู่ในนมดิบ พบว่ามี SCN^- 5 ppm จากนั้นเติมโซเดียมไธโอไซยาเนตลงในนมเพื่อให้มี SCN^- ความเข้มข้น 5 7 10 และ 15 ppm และเติม H_2O_2 เพื่อให้มีความเข้มข้น 0 4 8 และ 10 ppm ผลการทดลองดังตารางที่ 15 และ 16

ตารางที่ 15 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและพีเอชของนมดิบเมื่อกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสแล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

ปริมาณ	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (Log CFU/ml) และพีเอชของนมดิบ ณ เวลาต่าง ๆ (ชั่วโมง)							
$SCN^- : H_2O_2$	0		6		12		24	
(ppm)	TVC	pH	TVC	pH	TVC	pH	TVC	pH
5 : 0	4.47a	6.68a	5.12a	6.52a	6.88a	6.01a	8.68a	5.35a
5 : 4	4.47a	6.68a	5.12a	6.58b	6.52b	6.03a	8.62ab	5.36a
5 : 8	4.47a	6.68a	5.01a	6.62bc	6.54b	6.00a	8.62ab	5.32a
5 :10	4.47a	6.68a	5.02a	6.61b	6.20c	6.22c	8.61b	5.36a
7 : 0	4.47a	6.68a	5.02a	6.60b	6.45b	6.02a	8.65a	5.34a
7 : 4	4.47a	6.68a	4.86b	6.61b	6.22c	6.19bc	8.62a	5.37ab
7 : 8	4.47a	6.68a	4.75b	6.65c	6.21c	6.12b	8.58b	5.40b
7 : 10	4.47a	6.68a	4.51b	6.61b	6.23c	6.07a	8.57b	5.38b
10 : 0	4.47a	6.68a	5.02a	6.59b	6.45b	6.04a	8.58b	5.40b
10 : 4	4.47a	6.68a	4.40b	6.60b	6.29c	6.13b	8.56bc	5.40b
10 : 8	4.47a	6.68a	4.04c	6.67c	6.00c	6.28c	8.52c	5.45c
10 : 10	4.47a	6.68a	4.10c	6.65c	6.05c	6.25c	8.52c	5.46c
15 : 0	4.47a	6.68a	5.06a	6.58b	6.31bc	6.13b	8.59b	5.39b
15 : 4	4.47a	6.68a	4.38b	6.59b	6.24c	6.12b	8.62ab	5.40b
15 : 8	4.47a	6.68a	4.00c	6.64c	6.01c	6.21c	8.51c	5.42bc
15 : 10	4.47a	6.68a	4.01c	6.66c	6.00c	6.25c	8.53c	5.45c

หมายเหตุ : a b c ในแนวตั้งแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 16 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและพีเอชของนมดิบเมื่อกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสแล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ปริมาณ $SCN^- : H_2O_2$ (ppm)	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (Log CFU/ml) และพีเอชของนมดิบ ณ เวลาต่าง ๆ (ชั่วโมง)							
	0		24		48		72	
	TVC	pH	TVC	pH	TVC	pH	TVC	pH
5 : 0	4.45a	6.65a	4.52a	6.59a	4.79a	6.21a	5.00a	5.85a
5 : 4	4.45a	6.65a	4.53a	6.62ab	4.78a	6.20a	5.02a	5.86a
5 : 8	4.45a	6.65a	4.52a	6.61a	4.76a	6.21a	5.00a	5.84a
5 : 10	4.45a	6.65a	4.51a	6.62ab	4.56c	6.25a	4.98a	5.92b
7 : 0	4.45a	6.65a	4.50ab	6.60a	4.78a	6.21a	5.06a	5.87a
7 : 4	4.45a	6.65a	4.54a	6.61a	4.76a	6.25a	5.02a	5.88a
7 : 8	4.45a	6.65a	4.49b	6.64b	4.65b	6.23a	5.00a	5.92b
7 : 10	4.45a	6.65a	4.48b	6.62ab	4.54c	6.28ab	4.92b	5.90ab
10 : 0	4.45a	6.65a	4.55a	6.58a	4.72a	6.28ab	4.99a	5.88a
10 : 4	4.45a	6.65a	4.42c	6.62ab	4.65b	6.35b	4.85b	5.93b
10 : 8	4.45a	6.65a	4.40c	6.65b	4.50c	6.48c	4.71c	6.00c
10 : 10	4.45a	6.65a	4.42c	6.65b	4.50c	6.47c	4.70c	6.01c
15 : 0	4.45a	6.65a	4.50ab	6.61a	4.69ab	6.29b	4.81bc	5.89a
15 : 4	4.45a	6.65a	4.45bc	6.60a	4.62b	6.32b	4.82b	5.93b
15 : 8	4.45a	6.65a	4.41c	6.64b	4.52c	6.48c	4.72c	5.99c
15 : 10	4.45a	6.65a	4.40c	6.65b	4.50c	6.47c	4.70c	6.02c

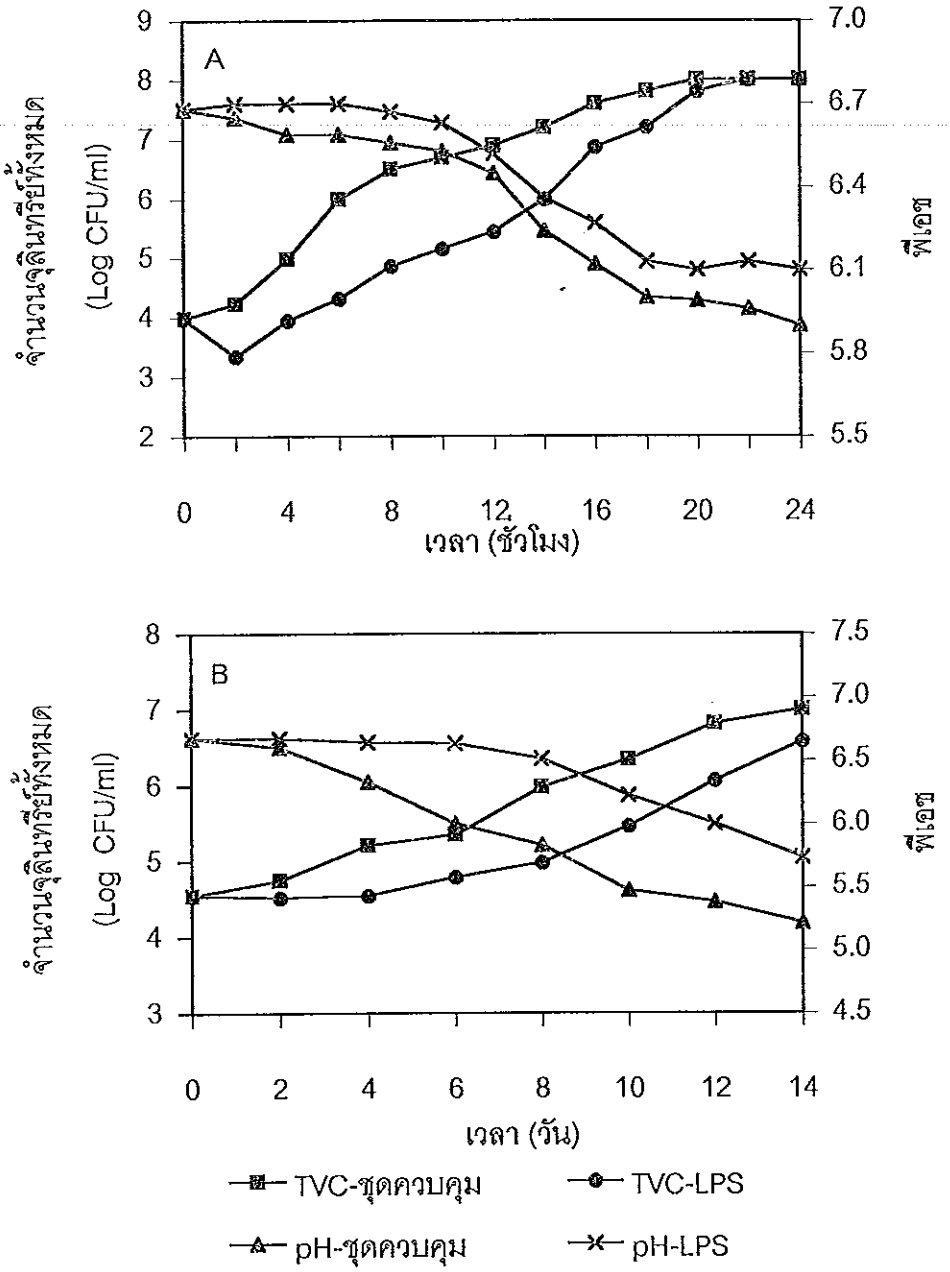
หมายเหตุ : a b c ในแนวตั้งแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

จากผลการทดลองการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส โดยใช้ SCN^- และ H_2O_2 เติมลงไปในนมดิบเพื่อให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าที่การเติม SCN^- และ H_2O_2 ปริมาณเดียวกัน จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดเพิ่มขึ้นและค่าพีเอชของนมดิบลดลงเมื่อระยะเวลาในการเก็บนานขึ้น (ตารางที่ 15 และ ตารางที่ 16) แต่เมื่อเติม SCN^- และ H_2O_2 ปริมาณมากขึ้น เชื้อจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นน้อยกว่าและค่าพีเอชลดลงน้อยกว่า (ที่ระดับปริมาณ SCN^- : H_2O_2 = 15:10 เชื้อจุลินทรีย์น้อยกว่าและพีเอชมากกว่า SCN^- :H_2O_2 = 5:4) เมื่อพิจารณาจากข้อกำหนดของมาตรฐานนมดิบที่ให้มีจำนวนจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดไม่เกิน $5x10^4$CFU/ml (4.7 Log CFU/ml) พบว่าที่อุณหภูมิห้องจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดไม่เกินจากข้อกำหนดในชั่วโมงที่ 6 เมื่อใช้ SCN^-: H_2O_2 เติมลงไปในปริมาณ 7:10 10:4 10:8 10:10 15:4 15:8 และ 15:10 ส่วนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจำนวนจุลินทรีย์ไม่เกินจากข้อกำหนดตลอดจนถึงชั่วโมงที่ 72 เมื่อใช้ SCN^-: H_2O_2 เติมลงในนมดิบปริมาณ 10:8 10:10 15:8 และ 15:10 เมื่อพิจารณาร่วมกับผลการวิเคราะห์ทางสถิติ ($P<0.05$) พบว่าปริมาณ SCN^- และ H_2O_2 ที่เหมาะสมที่สุดและเพียงพอในการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสในนมดิบ คือปริมาณ 10:8 ppm ทั้งนี้ Walfson และ Sumner (1993) รายงานว่าประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสขึ้นอยู่กับปริมาณความเข้มข้นขององค์ประกอบของระบบด้วย และมีรายงานว่าการใช้ SCN^- และ H_2O_2 เติมลงไปในนมดิบในปริมาณที่น้อยที่สุดแต่เพียงพอในการยับยั้งจุลินทรีย์ก็เพื่อลดการสิ้นเปลือง มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและไม่มีผลกับกลิ่นรสของนม แต่ทั้งนี้ปริมาณการใช้จะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิที่เก็บนม ช่วงเวลาระหว่างการรีดนมและกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส จำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นในนมดิบ ความบริสุทธิ์ของสารที่ใช้กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส และชนิดของอาหาร (Ridley and Shalo, 1990; Denis and Ramet, 1989) ส่วน Reiter และ Harnulv (1984) รายงานว่าปริมาณ SCN^- 12 ppm และ H_2O_2 8 ppm เพียงพอในการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสในนมดิบ Kamau และคณะ (1990) ได้ทดลองพบว่าถ้าเติม H_2O_2 ลงไปในนมให้มีความเข้มข้น 0.6 mM และเติมเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดสให้มีปริมาณ 9.2 µg/ml จะให้ผลการยับยั้ง *L. monocytogenes* Scott A เพียงเล็กน้อย แต่ถ้าเติม SCN^- ลงไปให้มีความเข้มข้น 2.4 mM พบว่าจะให้ผลการยับยั้ง *L. monocytogenes* Scott A เพิ่มขึ้น โดยจะขยายระยะเวลาการเจริญเริ่มต้นออกไปอีก 8 ชั่วโมง แสดงว่าการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสให้ได้ผลดีนั้นต้องมีองค์ประกอบของระบบครบทั้ง 3 ส่วนอย่างเพียงพอ

3.2 การหาระยะเวลาที่สามารถตั้งทิ้งนมดิบไว้ได้โดยเชื้อจุลินทรีย์ยังอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

ผลการทดสอบเมื่อกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสโดยเติม SCN^- 10 ppm และ H_2O_2 8 ppm ลงไปในนมดิบ พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในนมดิบชุดควบคุมที่ไม่ได้กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสทั้งที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ภาพที่ 5A) และที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 5B) เพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วทั้ง 2 ชุดการทดลอง เมื่อเก็บนมดิบไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อจุลินทรีย์ในชุดควบคุมเพิ่มขึ้นจาก 3.98 Log CFU/ml เป็น 8 Log CFU/ml แต่จำนวนจุลินทรีย์ในชุดที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสลดลงจาก 4.55 Log CFU/ml เป็น 4.52 Log CFU/ml ในชั่วโมงที่ 2 ของการเก็บ หลังจากนั้นจำนวนจุลินทรีย์จะค่อย ๆ เพิ่มสูงขึ้นจนมีจำนวนใกล้เคียงกับจำนวนในชุดควบคุมในชั่วโมงที่ 18 เมื่อเก็บนมดิบไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน เชื้อจุลินทรีย์ในชุดควบคุมเพิ่มจาก 4.55 Log CFU/ml เป็น 7 Log CFU/ml แต่ในชุดที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส จำนวนจุลินทรีย์ค่อนข้างคงที่อยู่จนถึงวันที่ 4 ของการเก็บ หลังจากนั้นจำนวนจึงค่อย ๆ เพิ่มสูงขึ้น เมื่อพิจารณาพีเอชของนมดิบทั้ง 2 ชุดการทดลอง พบว่าพีเอชของนมดิบชุดควบคุมทั้งที่เก็บที่อุณหภูมิห้องและที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ลดต่ำลงตั้งแต่วันแรกของการเก็บ แต่พีเอชของนมดิบชุดที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสค่อนข้างคงที่ในระยะแรกของการเก็บ หลังจากนั้นจึงค่อย ๆ ลดต่ำลง โดยที่อุณหภูมิห้องพีเอชค่อนข้างคงที่ประมาณ 8 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พีเอชค่อนข้างคงที่ประมาณ 6 วัน

จากผลการทดลองที่ได้เมื่อพิจารณาจากจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดพบว่าสามารถเก็บนมดิบที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นาน 6 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้นาน 4 วัน โดยที่เชื้อจุลินทรีย์ยังไม่เพิ่มขึ้นจากเดิมมากนักและไม่เกินจากข้อกำหนด ($5x10^4$CFU/ml หรือ 4.7 Log CFU/ml) เช่นเดียวกับรายงานของ Barrett และคณะ (1999) ซึ่งได้ทดลองพบว่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในนมดิบที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้นมากกว่า 10^7 CFU/ml หลังจากเก็บนมดิบไว้ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน แต่ในนมชุดควบคุมใช้เวลาเพียง 3 วัน และพีเอชของนมดิบชุดที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสลดลงต่ำกว่า 6.5 หลังจากเก็บไว้ 8 วัน แต่ในชุดควบคุมใช้เวลาเพียง 5 วัน อายุการเก็บโดยเฉลี่ยของนมดิบที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสประมาณ 7 วัน แต่นมดิบชุดควบคุมมีอายุ 4 วัน การรักษาคุณภาพของนมดิบในระหว่างการขนส่งถึงโรงงานผลิตเป็นสิ่งสำคัญ ถ้าได้มีการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสทันทีก่อนการแปรรูปก็จะช่วยยืดอายุการเก็บนมดิบและผลิตภัณฑ์ออกไปได้นานขึ้น (Jacob *et al.*, 2000)



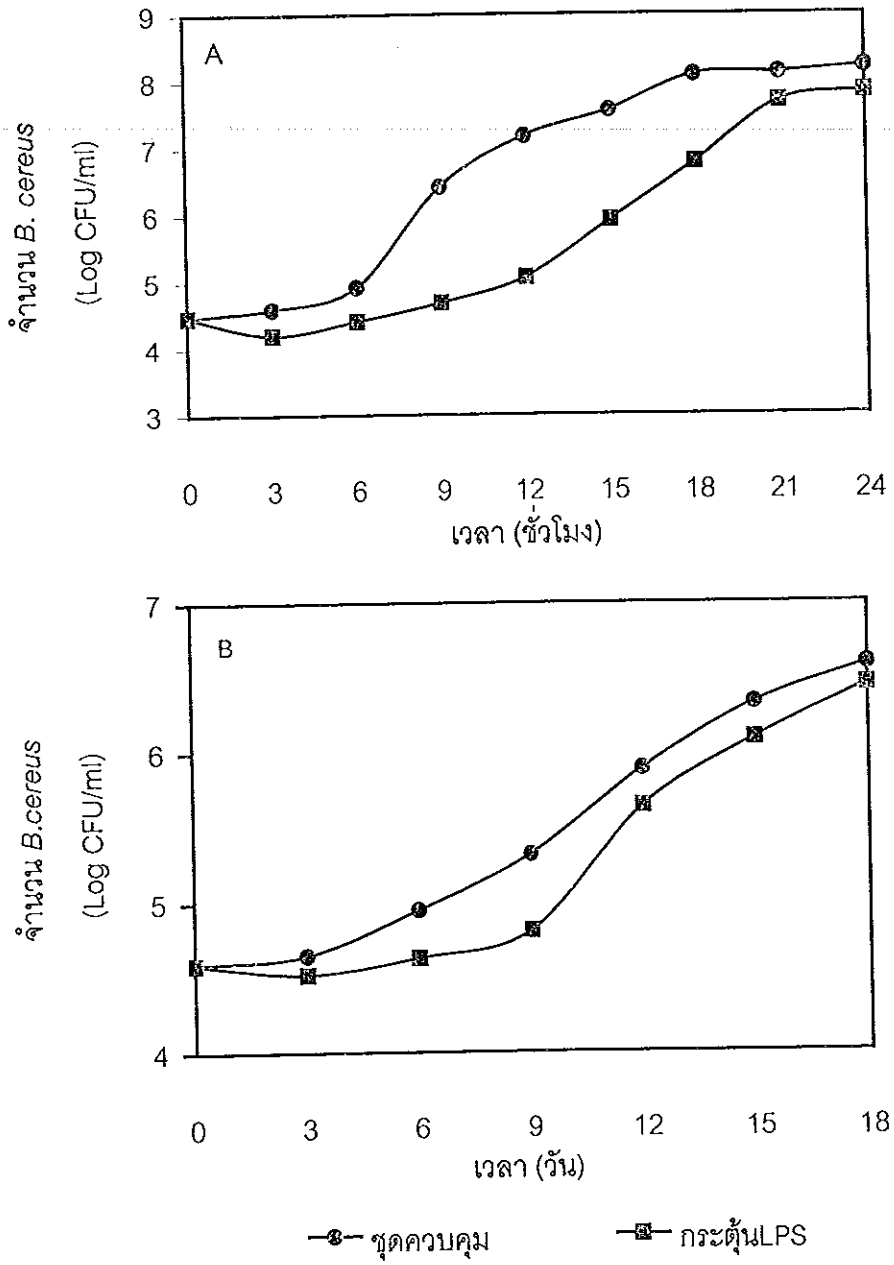
ภาพที่ 5 การเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (TVC) และพีเอช (pH) ของนมดิบที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส (LPS) ในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิห้อง (A) และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (B)

3.3 ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *B. cereus*

ผลการทดสอบพบว่าจำนวนของ *B. cereus* ในนมดิบชุดควบคุมที่ไม่ได้กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส ทั้งที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ภาพที่ 6A) และที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 6B) เพิ่มสูงขึ้นเร็วกว่า *B. cereus* ในนมดิบชุดที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส ทั้ง 2 ชุดอุณหภูมิ พบว่าที่อุณหภูมิห้องเชื้อ *B. cereus* ในนมดิบชุดควบคุมจะเพิ่มจาก 4.47 Log CFU/ml เป็น 8.21 Log CFU/ml เมื่อถึงชั่วโมงที่ 24 โดยมีช่วงระยะการเจริญเริ่มต้น (Lag phase) ประมาณ 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นจำนวน *B. cereus* เพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่จำนวน *B. cereus* ในนมดิบชุดที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสเพิ่มจาก 4.47 Log CFU/ml เป็น 7.83 Log CFU/ml ในชั่วโมงที่ 24 แต่ทั้งนี้จำนวนจะลดลงเป็น 4.2 Log CFU/ml ในชั่วโมงที่ 3 และมีช่วงระยะ Lag phase ประมาณ 6 ชั่วโมง

เมื่อเก็บนมดิบไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 วัน เชื้อ *B. cereus* ในนมดิบชุดควบคุมเพิ่มจาก 4.59 Log CFU/ml เป็น 6.59 Log CFU/ml แต่ในนมดิบชุดที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส เชื้อ *B. cereus* เพิ่มจาก 4.59 Log CFU/ml เป็น 6.45 Log CFU/ml ผลการทดลองจากภาพที่ 6B พบว่าในระยะแรกของการเก็บ (ประมาณ 7 วัน) เชื้อ *B. cereus* มีจำนวนค่อนข้างคงที่ หลังจากนั้นจำนวนจึงค่อย ๆ เพิ่มสูงขึ้นจนใกล้เคียงกับจำนวนในชุดควบคุม *B. cereus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก สร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ สามารถเจริญที่อุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส และเจริญที่อุณหภูมิ 15 และ 35 องศาเซลเซียส อีกทั้งสปอร์สามารถเจริญที่อุณหภูมิต่ำได้ด้วย จึงเป็นแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญในอาหาร (Cousin, 1982) Siragusa และคณะ (1989) ได้ทดสอบพบว่า *L. monocytogenes* ไม่ถูกยับยั้งโดย H_2O_2 เนื่องจาก *L. monocytogenes* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก สร้างเอนไซม์คะตะเลสและซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส มาสลาย H_2O_2 ได้ แต่จะถูกยับยั้งโดยระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส โดย H_2O_2 ที่เติมลงไปในระบบจะทำปฏิกิริยากับ SCN^- โดยเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดสได้เร็วกว่าก่อนที่จะถูกสลายโดยคะตะเลส หรือ ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส จึงเกิดเป็น $OSCN^-$ สามารถยับยั้ง *L. monocytogenes* อีกทั้งมีรายงานว่าในนมดิบมีปริมาณเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดสมากกว่าเอนไซม์คะตะเลส (Reiter and Harnulv, 1984) โดยในนมดิบมีเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดส 0.73 ± 0.14 U/ml แต่เอนไซม์คะตะเลสมีเพียง 0.0065 ± 0.001 U/ml (Griffiths, 1985) ดังนั้นกิจกรรมของเอนไซม์คะตะเลสที่เชื้อจุลินทรีย์สร้างขึ้นหรือที่มีอยู่แล้วในนมดิบจึงไม่มีผลกับระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสมากนัก มีการทดลองพบว่าการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสสามารถยับยั้ง *L. monocytogenes* ในนมได้โดยขยายระยะเวลา Lag phase ของ

L. monocytogenes ที่อุณหภูมิ 35 และ 10 องศาเซลเซียส เป็น 8 และ 70 ชั่วโมง ตามลำดับ และสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ โดย *S. aureus* ต้องใช้เวลา 14 ชั่วโมง ในการเพิ่มจำนวนให้เท่ากับจำนวนในชุดควบคุมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และขยายเวลา Lag phase ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ออกไปมากกว่าเดิม 72 ชั่วโมง (Kamau *et al.*, 1990) จากผลการทดลองที่ได้เมื่อพิจารณาจากข้อกำหนดจำนวนจุลินทรีย์ในนมดิบ ($5x10^4$ CFU/ml หรือ 4.7 Log CFU/ml) พบว่าการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส โดยการเติม SCN^- และ H_2O_2 ในปริมาณ 10 และ 8 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* ที่อุณหภูมิห้องได้นาน 6 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้นาน 7 วัน



ภาพที่ 6 การเปลี่ยนแปลงจำนวน *B. cereus* ในนมดิบที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส (LPS)ในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิห้อง (A) และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (B)

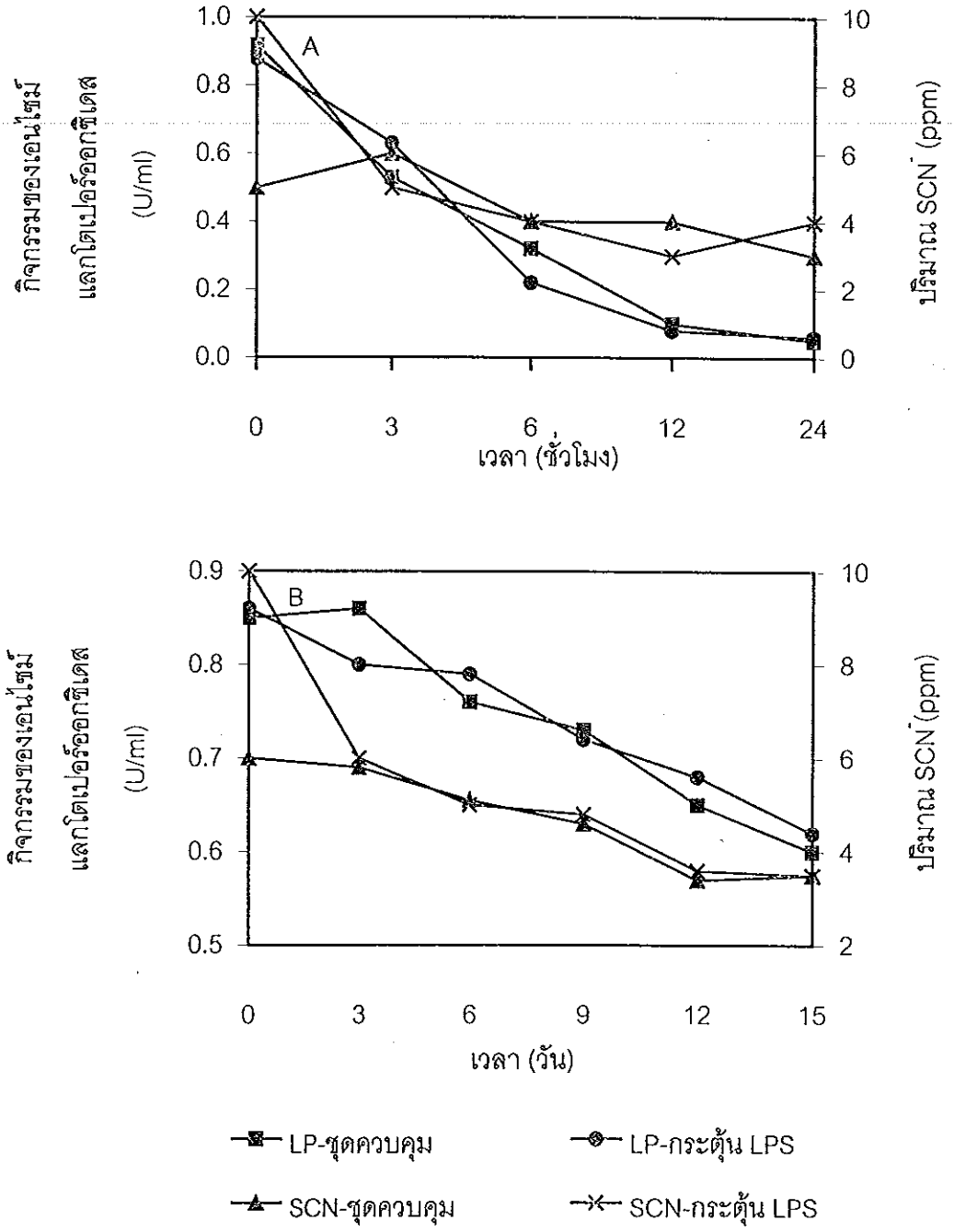
3.4 ศึกษาความคงตัวของระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสในนมดิบ

การศึกษาความคงตัวของระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสในนมดิบที่อุณหภูมิห้อง และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยพิจารณาจากกิจกรรมของเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดส และปริมาณ SCN^- ในนมดิบที่ลดลง เมื่อเก็บนมดิบไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 7A) พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดสในนมดิบชุดควบคุมจะลดลงจาก 0.916 U/ml เหลือ 0.050 U/ml ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ในนมดิบชุดที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสลดลงจาก 0.878 U/ml เหลือ 0.060 U/ml แสดงว่าเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดส คงตัวอยู่ได้ที่อุณหภูมิห้องไม่เกิน 24 ชั่วโมง และเมื่อเก็บนมดิบไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน กิจกรรมของเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดสทั้งในนมดิบชุดควบคุมและในนมดิบชุดที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสลดลงเล็กน้อยเล็กน้อยเช่นเดียวกัน โดยในนมดิบชุดควบคุมกิจกรรมของเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดสลดลงจาก 0.85 U/ml เหลือ 0.6 U/ml และในนมดิบชุดที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงจาก 0.86 U/ml เหลือ 0.62 U/ml แสดงว่าเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดสคงตัวอยู่ได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดีกว่าที่อุณหภูมิห้อง และเมื่อพิจารณาจากผลการวัดกิจกรรมของเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดส ในนมดิบชุดควบคุมและนมดิบชุดที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส ทั้ง 2 อุณหภูมิ (ภาพที่ 7A และ 7 B) พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดสในนมดิบชุดควบคุมและนมดิบชุดที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสที่เวลาต่าง ๆ ไม่แตกต่างกัน แสดงว่าการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสในนมดิบไม่มีผลกับการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดสที่มีอยู่เดิมในนมดิบ

การวัดหาปริมาณ SCN^- ในนมดิบเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ภาพที่ 7A) พบว่าปริมาณ SCN^- เริ่มต้นในนมดิบชุดควบคุมมี 5 ppm และในนมดิบชุดที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสแล้วมี 10 ppm เมื่อเก็บนมดิบทั้ง 2 ชุดไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าในชุดควบคุมมี SCN^- เหลืออยู่ 3 ppm แต่ในชุดที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสเหลืออยู่ 4 ppm แต่ทั้งนี้ปริมาณ SCN^- ในชุดที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสลดลงจาก 10 ppm เหลือ 5 ppm ในชั่วโมงที่ 3 หลังจากนั้นปริมาณจะลดลงใกล้เคียงกับปริมาณในชุดควบคุม เมื่อเก็บนมดิบไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 7B) วัดปริมาณ SCN^- เริ่มต้นในชุดควบคุมมี 6 ppm และในชุดที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสแล้วมี 10 ppm เมื่อเก็บนมดิบทั้ง 2 ชุดไว้เป็นเวลา 15 วัน พบว่าปริมาณ SCN^- ในนมดิบทั้ง 2 ชุด ลดลงเหลือ 3.5 ppm เท่ากัน แต่ในชุดที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส ปริมาณ SCN^- จะลดลงจาก 10 ppm เหลือ 6

ppm ในวันที่ 3 ของการเก็บ แสดงว่า SCN^- ถูกใช้ไปในการทำปฏิกิริยาร่วมกับ H_2O_2 ในการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส จึงทำให้ปริมาณ SCN^- ลดลง

จากผลการทดลองที่ได้แสดงว่าระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสมีความคงตัวสมบูรณ์อยู่ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ประมาณ 3 วัน มีรายงานว่า Barrett และคณะ (1999) ได้ทดลองพบว่าที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดสค่อนข้างคงที่ และมีปริมาณใกล้เคียงกันทั้งในชุดควบคุมและชุดที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสโดยการเติม SCN^- 10 mg/l และ H_2O_2 10 µl/l และพบว่าปริมาณ $OSCN^-$ ในชุดที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสสูงกว่าในชุดควบคุมเล็กน้อยในวันแรก แต่หลังจากเก็บนมดิบไว้ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ปริมาณ $OSCN^-$ ในนมดิบทั้ง 2 ชุดลดลงเท่ากัน ส่วนสาเหตุของการลดลงนั้นมีรายงานว่า กิจกรรมของเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดสในนมจะลดลงเมื่อจำนวนจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น (Griffiths, 1985) และในนมดิบส่วนใหญ่มีเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ทนร้อน หรืออาจมีแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ได้ปะปนอยู่ (Cousin, 1982) ดังนั้นจึงอาจมีผลให้กิจกรรมของเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดสลดลงได้เช่นกัน



ภาพที่ 7 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดส และปริมาณ SCN^- ในนมดิบที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง (A) และอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (B)

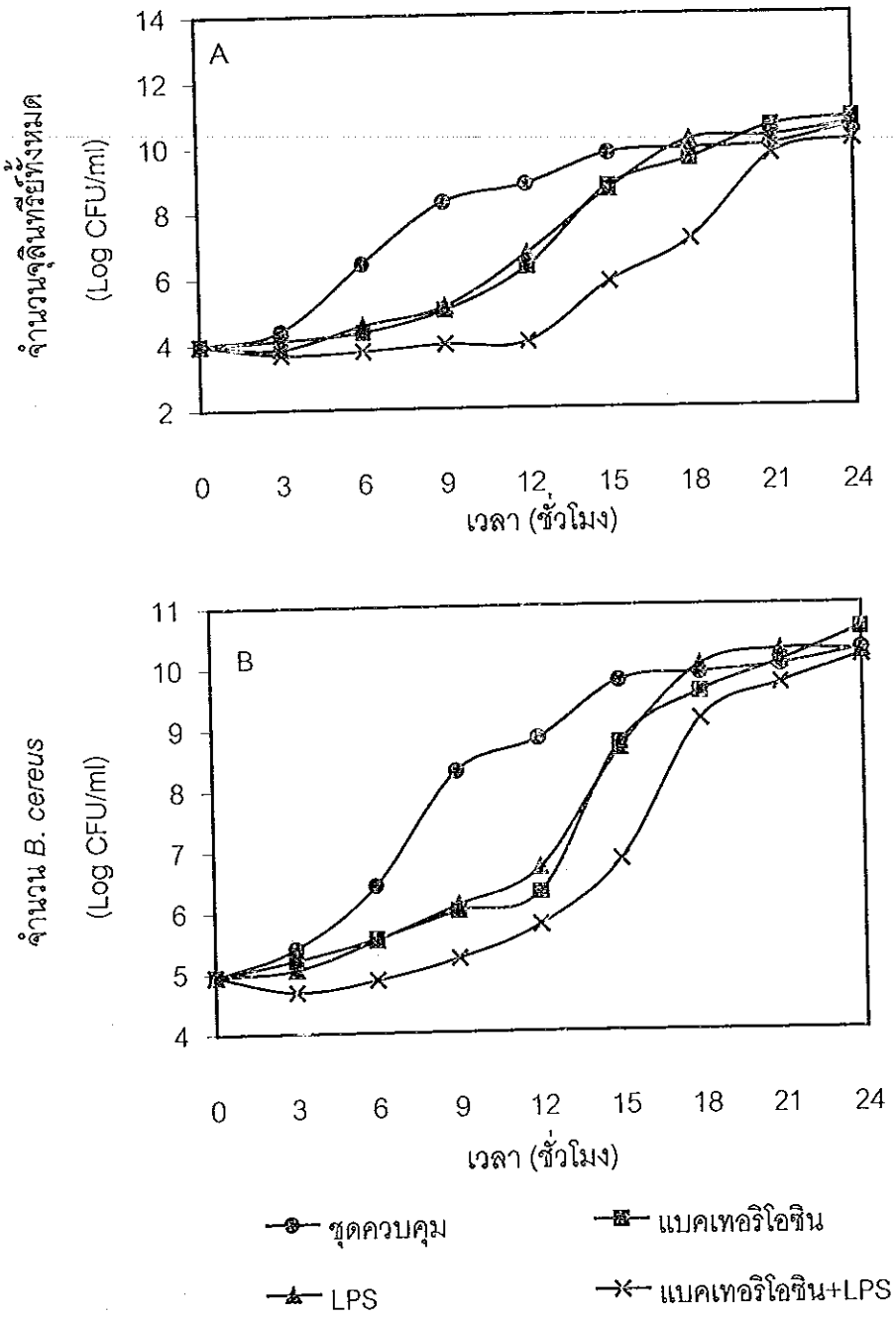
4. ศึกษาผลของการใช้แบคเทอริโอซินร่วมกับการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส ในนมดิบ

4.1 ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และแบคทีเรียก่อโรค *B. cereus*

ผลการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ทั้งหมด (ภาพที่ 8A) พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในชุดควบคุมเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจาก 3.97 Log CFU/ml เป็น 10.55 Log CFU/ml ในชั่วโมงที่ 24 โดยมีช่วง Lag phase ประมาณ 2 ชั่วโมง ส่วนในนมดิบชุดที่เติมแบคเทอริโอซินและชุดที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ค่อนข้างคงที่ในช่วงแรก ๆ ของการเก็บ โดยมีช่วง Lag phase ประมาณ 5 ชั่วโมง หลังจากนั้นจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกัน เมื่อถึงชั่วโมงที่ 24 จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในชุดที่เติมแบคเทอริโอซินมี 10.79 Log CFU/ml ในชุดที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส มี 10.62 Log CFU/ml ในชุดที่เติมทั้งแบคเทอริโอซินและกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสพร้อมกันมี 10.14 Log CFU/ml แต่จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในชุดที่เติมทั้งแบคเทอริโอซินและกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสพร้อมกันลดลงจาก 3.97 เป็น 3.68 3.77 และ 3.96 Log CFU/ml ในชั่วโมงที่ 3 6 และ 9 ตามลำดับ จากผลการทดลอง (ภาพที่ 8A) พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ในนมดิบชุดที่เติมทั้งแบคเทอริโอซินและกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส มีช่วง Lag phase นานกว่าจุลินทรีย์ในนมดิบชุดอื่น ๆ และพบว่าการเติมทั้งแบคเทอริโอซินและกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้นานประมาณ 12 ชั่วโมง

เมื่อทำการทดลองเช่นเดียวกันแต่เติมเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ใช้เป็นอินดิเคเตอร์ คือ *B. cereus* ลงในนมดิบให้มีปริมาณ 10^5 CFU/ml ผลการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้ง *B. cereus* (ภาพที่ 8 B) พบว่าจำนวน *B. cereus* ในชุดควบคุมเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจาก 4.95 Log CFU/ml เป็น 10.55 Log CFU/ml ในชั่วโมงที่ 24 โดยมีช่วง Lag phase ประมาณ 2 ชั่วโมง ส่วนชุดที่เติมแบคเทอริโอซิน เชื้อ *B. cereus* ค่อนข้างคงที่ มีช่วง Lag phase ประมาณ 5 ชั่วโมง ในชุดที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส จำนวน *B. cereus* ลดลงจาก 4.95 Log CFU/ml เป็น 4.85 Log CFU/ml ในชั่วโมงที่ 3 การเจริญค่อนข้างคงที่โดยมีช่วง Lag phase ประมาณ 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นจำนวน *B. cereus* เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วใกล้เคียงกับจำนวน *B. cereus* ในชุดที่เติมแบคเทอริโอซิน แต่ในนมดิบชุดที่เติมทั้งแบคเทอริโอซินและกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส จำนวน *B. cereus* ลดลงจาก 4.95 Log CFU/ml เป็น 4.68 และ 4.87 Log CFU/ml ในชั่วโมงที่ 3 และ 6 ตามลำดับ หลังจากนั้นจำนวนจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเป็น 10.14 Log CFU/ml ในชั่วโมงที่ 24 ของการเก็บ จากผลการทดลองแสดงว่าการ

เติมทั้งแบคเทอริโอซินและกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* ได้ดีกว่าการเติมแบคเทอริโอซินหรือกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสอย่างใดอย่างหนึ่งเพียงอย่างเดียว ถึงแม้กลไกการทำงานของแบคเทอริโอซินและระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสจะต่างกัน แต่มีรายงานว่าตำแหน่งเป้าหมายของการทำลายจะอยู่ที่ไซโตพลาสมิกเมมเบรนเหมือนกัน (Zapico *et al.*, 1998) มีรายงานว่าไนซินจะทำลายเซลล์โดยการจับกับเซลล์ที่ไซโตพลาสมิกเมมเบรน และทำให้เกิดสภาวะเสียสมดุลของการให้สารผ่านเข้าออกและสมดุลของประจุ เกิดการยับยั้งกระบวนการหายใจ กระบวนการเมตาบอลิซึม และการสร้าง ATP (Ennaher *et al.*, 1999; Kaiser and Montville, 1996; Broughton, 1990) ไซโตพลาสมิกเมมเบรนจะถูกทำลายอีกจากระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส โดยจะมีผลลดการขนถ่ายออกซิเจนยับยั้งการสร้างพลังงานซึ่งใช้ในการขนส่งกลูโคสและกรดอะมิโน และยังทำให้ K^+ ถูกปล่อยออกมานอกเซลล์ (Reiter, 1986; Reiter and Harnulv, 1984) ไซโตพลาสมิกเมมเบรนถูกทำลายจากทั้งแบคเทอริโอซินและระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส จึงทำให้จุลินทรีย์ถูกทำลายมากกว่าการใช้วิธีการเพียงอย่างใดอย่างหนึ่ง และมีรายงานว่าการใช้แบคเทอริโอซินอาจทำให้เซลล์จุลินทรีย์ซ่อมแซมกลับคืนสู่สภาพเดิมได้ (Broughton, 1990) ดังนั้นถ้ามีการทำลายโดยระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสร่วมด้วยทำให้เซลล์ถูกทำลายอย่างถาวรขึ้น

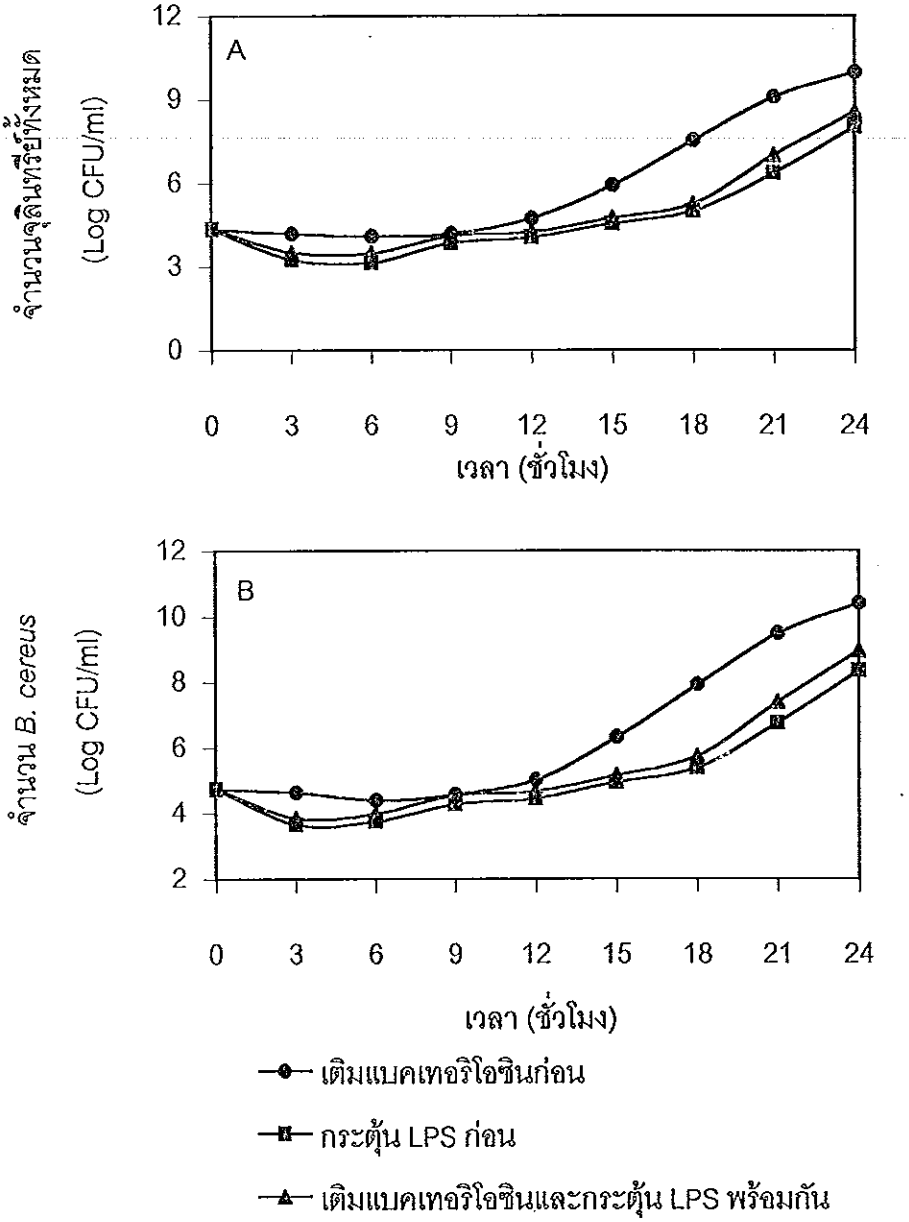


ภาพที่ 8 การเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (A) และ *B. cereus* (B)ในนมดิบที่เติมแบคเทอริโอซิน กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส (LPS) และใช้ทั้งสองวิธีร่วมกันในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิห้อง

4.2 ศึกษาเปรียบเทียบวิธีการเติมแบคเทอริโอซินกับการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส ร่วมกัน

จากผลการทดลอง (ภาพที่ 9 A) พบว่าจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดและ *B. cereus* ในชุดที่เติมแบคเทอริโอซินก่อนกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส มีจำนวนมากกว่าในชุดที่เติมแบคเทอริโอซินพร้อมกับกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส และชุดที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสก่อนเติมแบคเทอริโอซิน ตามลำดับ โดยพบว่าหลังจากเก็บนมดิบไว้ 6 ชั่วโมง จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในชุดที่เติมแบคเทอริโอซินก่อนลดลงจาก 4.35 Log CFU/ml เหลือ 4.10 Log CFU/ml แต่ในชุดที่เติมแบคเทอริโอซินและกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสพร้อมกัน ลดลงเหลือ 3.48 Log CFU/ml ชุดที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสก่อนเติมแบคเทอริโอซิน ลดลงเหลือ 3.15 Log CFU/ml โดยในแต่ละชุดการทดลองมีช่วงระยะ Lag phase ของจุลินทรีย์เป็น 9 12 และ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อเวลาในการเก็บนมดิบนานขึ้นจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในชุดที่เติมแบคเทอริโอซินก่อนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่ในชุดที่เติมแบคเทอริโอซินและกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสพร้อมกันและชุดที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสก่อนนั้น จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดจะเจริญอย่างช้า ๆ ใกล้เคียงกัน เช่นเดียวกับการเจริญของ *B. cereus* (ภาพที่ 9B) ในนมดิบชุดที่เติมแบคเทอริโอซินก่อน จำนวน *B. cereus* ลดลงต่ำสุดในชั่วโมงที่ 6 โดยลดลงจาก 4.75 Log CFU/ml เหลือ 4.42 Log CFU/ml แต่ในชุดที่เติมแบคเทอริโอซินและกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสพร้อมกันและชุดที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสก่อน จำนวน *B. cereus* ลดลงต่ำสุดในชั่วโมงที่ 3 โดยลดลงเหลือ 3.86 Log CFU/ml และ 3.65 Log CFU/ml ตามลำดับ เนื่องจากระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสเกิดปฏิกิริยาการยับยั้งรวดเร็วและสูญเสียกิจกรรมเร็วเช่นเดียวกัน (จากผลการทดลองข้อ 3.4) จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในนมดิบที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสลดลงต่ำสุดในชั่วโมงที่ 2 (จากผลการทดลองข้อ 3.2) เมื่อเติมแบคเทอริโอซินลงไปหลังจากกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสแล้ว จำนวนจุลินทรีย์ที่เหลืออยู่จำนวนน้อยจึงถูกยับยั้งโดยแบคเทอริโอซินต่อไปได้ง่าย และจากผลการทดลองข้อ 2.5 กิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินยังคงมีอยู่นานกว่าระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส และจากผลการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (ข้อ 1.3) พบว่าแบคเทอริโอซินที่ได้มีกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ แต่ระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสสามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ เมื่อเติมแบคเทอริโอซินลงไปก่อนจำนวนแบคทีเรียแกรมลบจึงยังคงมีอยู่ในนมดิบ แต่ถ้ากระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสก่อนจะไปมีผลทำลายทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ จำนวนจุลินทรีย์ที่เหลือรอดอยู่ในนมดิบจึงมีน้อยกว่า

ดังนั้นการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสก่อนเติมแบคเทอริโอซินจะมีประสิทธิภาพยับยั้งจุลินทรีย์ดีกว่าการเติมแบคเทอริโอซินก่อนกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส และเติมแบคเทอริโอซินและกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสพร้อมกัน ซึ่งจะให้ผลสอดคล้องกับการทดลองของ Zapico และคณะ (1998) ซึ่งทดลองกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสและเติมไนซินลงไปในหางนม พบว่าการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสก่อนเติมไนซินเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ให้ผลการยับยั้ง *L. monocytogenes* ช้ากว่าการเติมไนซินก่อนกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส แต่จำนวน *L. monocytogenes* ที่ถูกยับยั้งไม่เพิ่มจำนวนขึ้นตลอด 24 ชั่วโมง ส่วนการเติมไนซินก่อนนั้นกลับพบว่าหลังจากเก็บนมไว้นาน 8 ชั่วโมง จำนวนของ *L. monocytogenes* เพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว จากผลการทดลองที่ได้จึงเลือกวิธีการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสในนมดิบก่อนเติมแบคเทอริโอซินเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ไปใช้ในขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 9 การเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (A) และ *B. cereus* (B) ของนมดิบที่เติมแบคเทอริโอซินก่อนกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส (LPS) กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสก่อนเติมแบคเทอริโอซินและใช้ทั้งสองวิธีพร้อมกันในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิห้อง

5. ศึกษาประสิทธิภาพของการใช้แบคเทอริโอซินและการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสในการประยุกต์ใช้กับการผลิตนมพาสเจอร์ไรส์

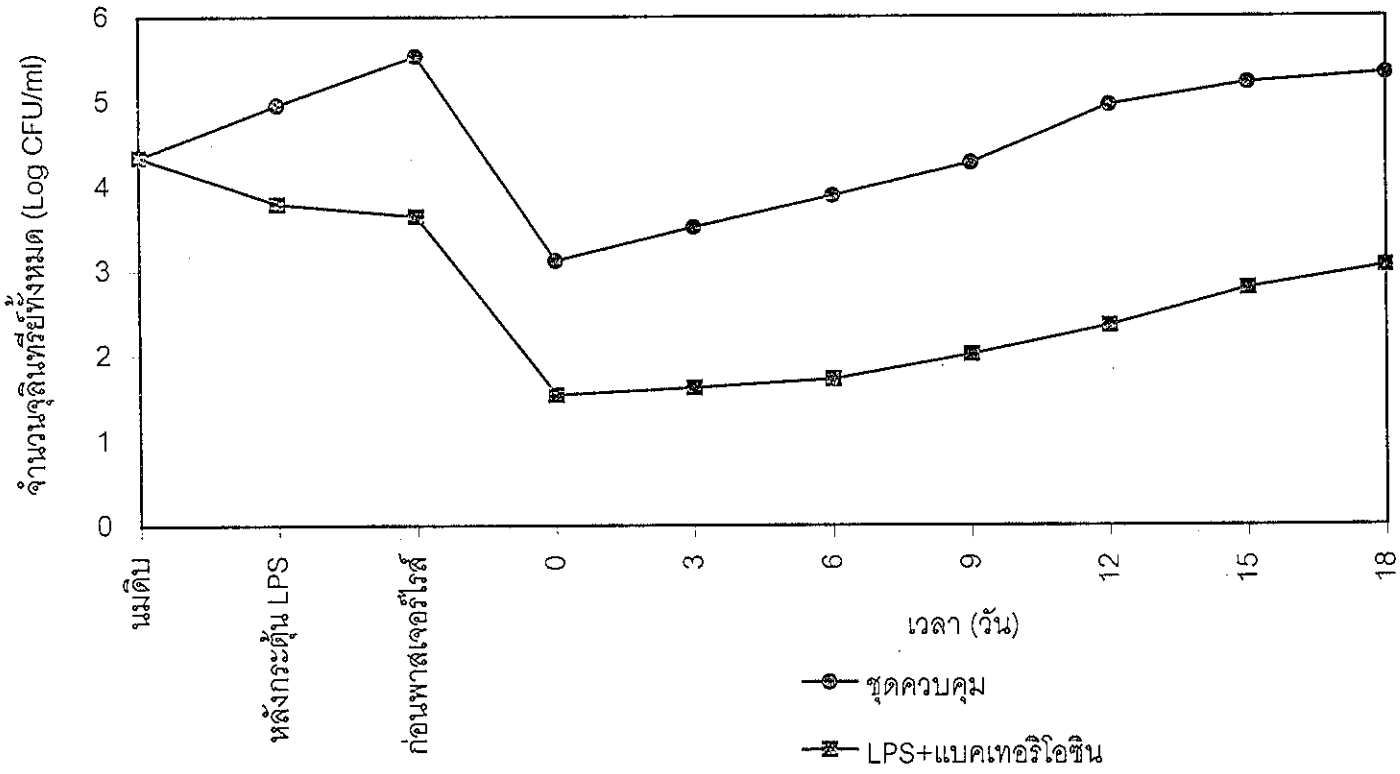
5.1 ศึกษาคุณภาพและอายุการเก็บของนมพาสเจอร์ไรส์

จากผลการทดลอง (ภาพที่ 10) พบว่าในนมดิบเริ่มต้นมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด 4.35 Log CFU/ml หลังจากกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสแล้วตั้งนมดิบทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง จำนวนจุลินทรีย์ลดลงเหลือ 3.79 Log CFU/ml แต่ในนมดิบชุดควบคุมจำนวนจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นเป็น 4.96 Log CFU/ml หลังจากเติมแบคเทอริโอซินแล้วตั้งนมดิบทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปพาสเจอร์ไรส์มีจำนวนจุลินทรีย์ 3.65 Log CFU/ml แต่ในนมดิบชุดควบคุมมี 5.54 Log CFU/ml หลังจากพาสเจอร์ไรส์แล้ว นมชุดที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสและเติมแบคเทอริโอซินมีจำนวนจุลินทรีย์ 1.54 Log CFU/ml แต่ในชุดควบคุมมี 3.12 Log CFU/ml หลังจากเก็บนมพาสเจอร์ไรส์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 วัน พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ในนมพาสเจอร์ไรส์ที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสและเติมแบคเทอริโอซินเพิ่มขึ้นช้ากว่าในชุดควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Barrett และคณะ (1999) ที่ได้ศึกษาอายุการเก็บของนมพาสเจอร์ไรส์แบบ HTST (72 องศาเซลเซียส 15 วินาที) พบว่า โดยเฉลี่ยนมชุดควบคุมมีอายุการเก็บ 16.5 วัน แต่นมชุดที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสมีอายุการเก็บ 18.5 วัน โดยที่ชุดควบคุมและชุดที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสมีจุลินทรีย์ทั้งหมดเพิ่มขึ้นมากกว่า 10^7 CFU/ml หลังจากเก็บนมไว้ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 13 และ 19 วันตามลำดับ และพีเอชลดลงต่ำกว่า 6.5 หลังจากเก็บนมไว้เป็นเวลา 15 และ 20 วัน ตามลำดับ เมื่อพิจารณาจากข้อกำหนดจำนวนจุลินทรีย์ในนมพาสเจอร์ไรส์ (ภาคผนวก ค) พบว่าสามารถเก็บนมพาสเจอรไรส์ชุดที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสและเติมแบคเทอรโอซินได้นานมากกว่า 18 วัน แต่เก็บนมพาสเจอร์ไรส์ชุดควบคุมได้ 7 วัน เมื่อทดสอบคุณภาพของนมพาสเจอร์ไรส์ที่ได้ (ตารางที่ 17) พบว่าตรวจไม่พบเชื้อแบคทีเรียที่ใช้เป็นอินดิเคเตอร์ในนมทั้ง 2 ชุด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแบคทีเรียเหล่านี้ไม่ได้ปนเปื้อนมากับนมดิบ ตรวจพบแบคทีเรียชอบอุณหภูมิต่ำและมีเปอร์เซนต์กรดในนมชุดควบคุมมากกว่าในนมชุดที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสและเติมแบคเทอริโอซิน ทั้งนี้เพราะก่อนพาสเจอร์ไรส์นั้นจุลินทรีย์ในชุดควบคุมเพิ่มจำนวนสูงขึ้นมากจึงผลิตกรดแลกติกมากกว่า มีรายงานว่าการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสและการเติมแบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งการผลิตกรดแลกติกของแบคทีเรียได้ (Daeschel, 1993) ดังนั้นนมชุดที่มีทั้งการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสและเติมแบคเทอริโอซินจึงมีพีเอชสูงกว่าและเปอร์เซนต์กรดต่ำกว่านมชุดควบคุม ส่วนคุณภาพทางประสาทสัมผัสของนมพาสเจอร์ไรส์

ทั้ง 2 ชุดไม่แตกต่างกัน แสดงว่าการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสและเติมแบคเทอริโอซินในนมดิบในปริมาณที่ใช้ไม่มีผลกับคุณภาพทางประสาทสัมผัสของนมพาสเจอร์ไรส์ที่ได้

ตารางที่ 17 คุณลักษณะของนมพาสเจอร์ไรส์ที่ได้จากการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสและเติมแบคเทอริโอซินลงในนมดิบ

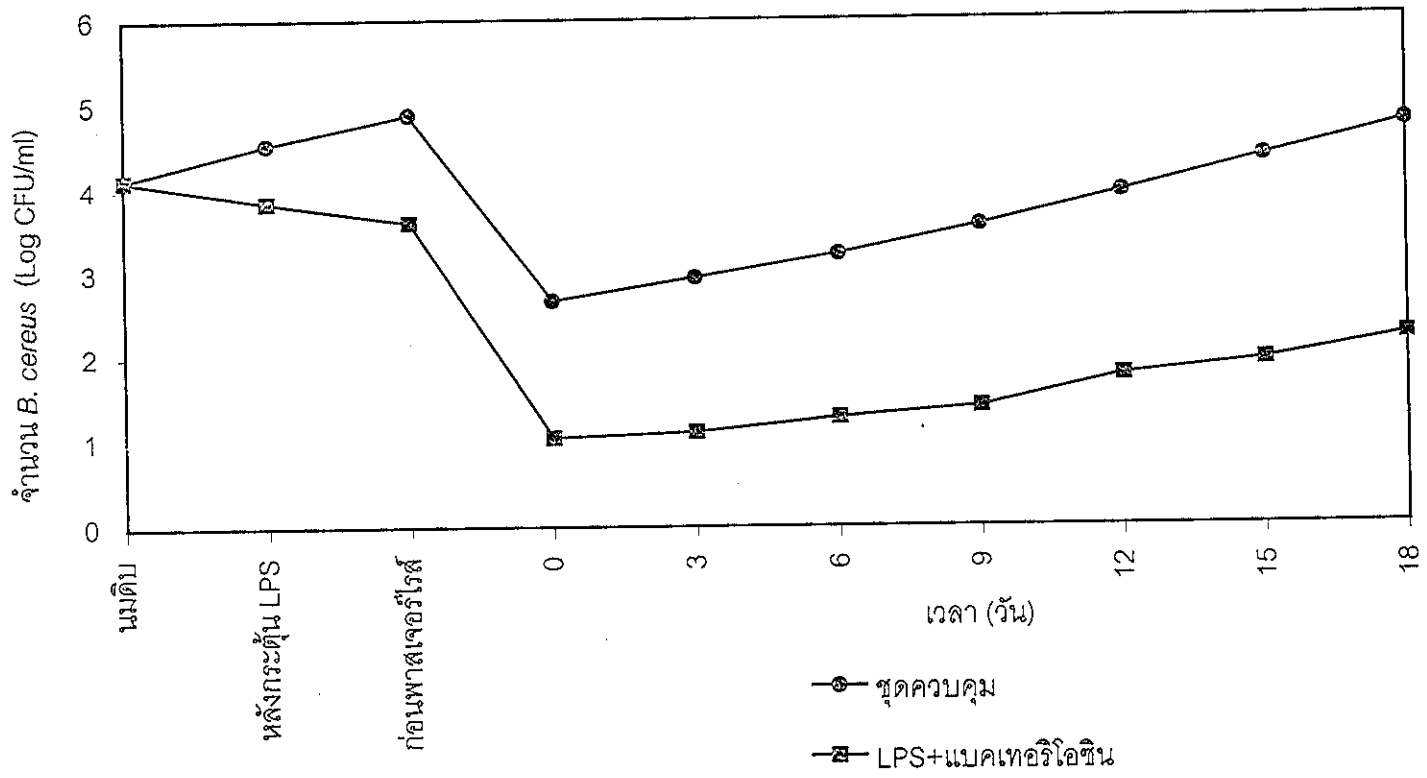
คุณลักษณะ	ผลการทดสอบ	
	ชุดควบคุม	ชุดที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสและเติมแบคเทอริโอซิน
ปริมาณเชื้อทั้งหมด	3.12 Log CFU/ml	1.54 Log CFU/ml
S. aureus	ไม่พบ	ไม่พบ
E. coli	ไม่พบ	ไม่พบ
B. cereus	ไม่พบ	ไม่พบ
B. stearothermophilus	ไม่พบ	ไม่พบ
แบคทีเรียชอบอุณหภูมิต่ำ	15 CFU/ml	2 CFU/ml
คุณภาพทางประสาทสัมผัส เช่น สี กลิ่น	นมมีสีขาวขุ่น ไม่มีตะกอน ไม่แยกชั้น ไม่ข้นหนืด มีกลิ่นหอมของนมพาสเจอร์ไรส์	นมมีสีขาวขุ่น ไม่มีตะกอน ไม่แยกชั้น ไม่ข้นหนืด มีกลิ่นหอมของนมพาสเจอร์ไรส์
พีเอช	6.61	6.68
ความเป็นกรด	0.22 เปอร์เซนต์	0.15 เปอร์เซนต์



ภาพที่ 10 การเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในนมพาสเจอร์ไรส์ที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส (LPS)แล้วเติมแบคเทอริโอซินในนมดิบก่อนพาสเจอร์ไรส์ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5.2 ทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *B. cereus*

จากผลการทดลอง (ภาพที่ 11) พบว่าในนมดิบเริ่มต้นมีจำนวน *B. cereus* 4.12 Log CFU/ml หลังจากกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสแล้วตั้งนมดิบทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง จำนวน *B. cereus* ลดลงเหลือ 3.85 Log CFU/ml แต่ในนมดิบชุดควบคุมจำนวน *B. cereus* เพิ่มขึ้นเป็น 4.55 Log CFU/ml หลังจากเติมแบคเทอริโอซินแล้วตั้งนมดิบทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ก่อนพาสเจอร์ไรส์ มีจำนวน *B. cereus* 3.61 Log CFU/ml แต่ในชุดควบคุมจำนวน *B. cereus* เพิ่มขึ้นเป็น 4.89 Log CFU/ml หลังจากพาสเจอร์ไรส์แล้ว ในชุดที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสและเติมแบคเทอริโอซินมีจำนวน *B. cereus* 1.04 Log CFU/ml แต่ในชุดควบคุมมี 2.68 Log CFU/ml หลังจากเก็บนมพาสเจอร์ไรส์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 วัน พบว่าในนมพาสเจอร์ไรส์ที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสและเติมแบคเทอริโอซินจำนวน *B. cereus* เพิ่มขึ้นช้ากว่าจุลินทรีย์ในชุดควบคุม แสดงว่าการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสและเติมแบคเทอริโอซินสามารถลดจำนวน *B. cereus* ในนมดิบได้และช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของ *B. cereus* ในนมพาสเจอร์ไรส์ไม่ให้เพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว มีรายงานว่า *B. cereus* สามารถผลิตสารพิษในนมพาสเจอร์ไรส์ได้เมื่อเก็บนมไว้ที่อุณหภูมิ 6-8 องศาเซลเซียส (Langeveld *et al.*, 1995) อีกทั้งยังเป็นสาเหตุให้เกิดรสขมและตะกอนในนมพาสเจอร์ไรส์ด้วย (Cousin, 1982) ดังนั้นจึงต้องมีการยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* ในนมพาสเจอร์ไรส์ อุณหภูมิของการพาสเจอร์ไรส์สามารถกระตุ้นการงอกของสปอร์ได้ (Cousin, 1982) ซึ่งจะเป็นผลดีต่อการทำลาย *B. cereus* และมีรายงานว่าความร้อนจะช่วยทำให้ *B. cereus* มีความไวต่อการถูกทำลายโดยไนซินด้วย (Beuchat *et al.*, 1997)



ภาพที่ 11 การเปลี่ยนแปลงจำนวน *B. cereus* ในนมพาสเจอร์ไรส์ที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส (LPS) แล้วเติมแบคเทอริโอซินในนมดิบก่อนพาสเจอร์ไรส์ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5.3 ทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียที่ทนอุณหภูมิสูง *B. stearothermophilus*

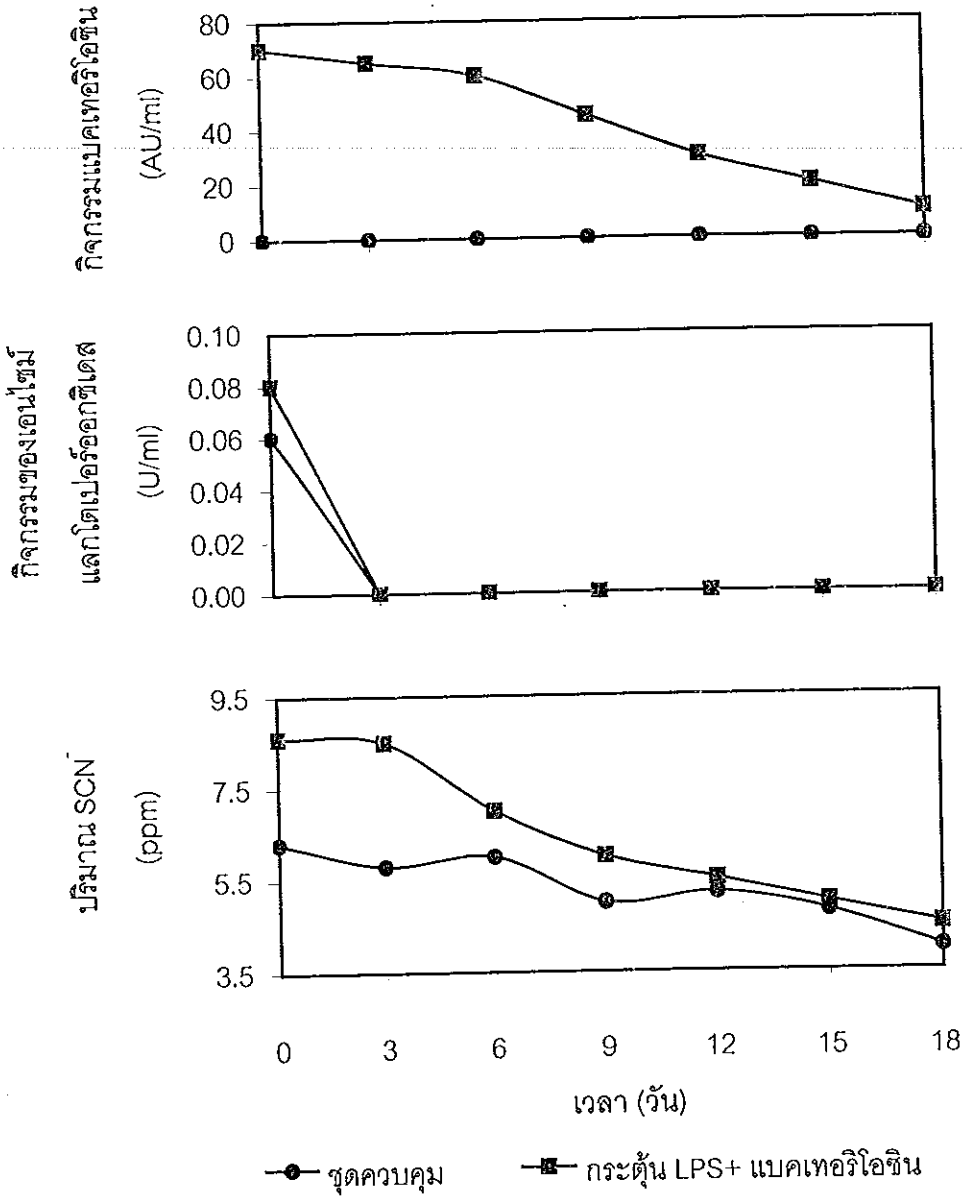
ผลการทดลองดังภาพที่ 12 พบว่าในนมดิบเริ่มต้นมีจำนวน *B. stearothermophilus* 4.55 Log CFU/ml หลังจากกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสแล้วตั้งนมดิบทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง จำนวน *B. stearothermophilus* ลดลงเหลือ 4.02 Log CFU/ml แต่ในนมดิบชุดควบคุมมีจำนวนเพิ่มขึ้นเป็น 4.89 Log CFU/ml หลังจากเติมแบคเทอริโอซินแล้วตั้งนมดิบทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ก่อนพาสเจอร์ไรส์มีจำนวน *B. stearothermophilus* 3.86 Log CFU/ml ในนมดิบชุดควบคุมมี 5.12 Log CFU/ml หลังจากพาสเจอร์ไรส์แล้ว *B. stearothermophilus* ในชุดที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสและเติมแบคเทอริโอซินมีจำนวนจุลินทรีย์ 2.80 Log CFU/ml แต่ในชุดควบคุมมี 5.00 Log CFU/ml หลังจากเก็บนมพาสเจอร์ไรส์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 วัน พบว่าในนมพาสเจอร์ไรส์ชุดที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสและเติมแบคเทอริโอซินจำนวน *B. stearothermophilus* เพิ่มขึ้นช้ากว่าจุลินทรีย์ในชุดควบคุม แสดงว่าความร้อนจากการพาสเจอร์ไรส์ (63 องศาเซลเซียส 30 นาที) ทำลายเชื้อ *B. stearothermophilus* ได้ไม่มากนักแต่การกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสและเติมแบคเทอริโอซินลงในนมดิบ มีผลยับยั้ง *B. stearothermophilus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงได้ชัดเจนกว่า มีรายงานว่าการใช้ไนซินปริมาณ 100-200 IU/g สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูง เช่น *Clostridium thermosacchrolyticum* และ *B. stearothermophilus* ในอุตสาหกรรมอาหารกระป๋องได้ (Broughton, 1990) เนื่องจากความร้อนที่ใช้ในกระบวนการผลิตอาจไม่สามารถทำลายแบคทีเรียที่ทนอุณหภูมิสูงได้ ดังนั้นการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสร่วมกับการใช้แบคเทอริโอซินจึงมีประโยชน์ในการใช้ยับยั้งหรือทำลายแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่อาจปนเปื้อนอยู่ในน้ำนมซึ่งจะเป็นผลดีต่อการผลิตผลิตภัณฑ์

ภาพที่ 12 การเปลี่ยนแปลงจำนวน *B. stearothermophilus* ในนมพาสเจอร์ไรส์ที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส (LPS) แล้วเติมแบคเทอริโอซินในนมดิบก่อนพาสเจอร์ไรส์ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5.4 ศึกษาความคงตัวของแบคเทอริโอซิน กิจกรรมของเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดส และปริมาณ SCN^- ในน้ำนมหลังการพาสเจอร์ไรส์

ผลการทดลอง (ภาพที่ 13) พบว่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินในนมหลังพาสเจอร์ไรส์ลดลงจาก 70 AU/ml เหลือ 65 60 45 30 20 และ 10 AU/ml ตามลำดับ แสดงว่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอรโอซินยังคงอยู่ในนมหลังพาสเจอร์ไรส์ แต่ยิ่งลดลงเมื่อเก็บนมพาสเจอร์ไรส์ไว้นานขึ้น ศิรินาถ หนูเอก (2540) รายงานว่าแบคเทอริโอซินที่ได้จาก *L. casei* ssp. *rhamnosus* (SN11) เป็นแบคเทอริโอซินที่ทนความร้อนได้สูง กิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินไม่ถูกทำลายด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดสในนมพาสเจอร์ไรส์ทั้งในชุดควบคุมและชุดที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสลดลงอย่างรวดเร็ว และตรวจไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ในนมทั้ง 2 ชุดเลยในวันที่ 3 ของการเก็บ แสดงว่าความร้อนจากการพาสเจอร์ไรส์สามารถทำลายกิจกรรมของเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดสได้ เมื่อทดสอบหาปริมาณ SCN^- ในนมพาสเจอร์ไรส์ พบว่าในชุดที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสและเติมแบคเทอริโอซินมีปริมาณ SCN^- 8.6 ppm ในวันที่ 3 มี 8.5 ppm หลังจากนั้นปริมาณลดลงมากขึ้น ในวันที่ 18 ของการเก็บมี SCN^- เหลือ 4 ppm ส่วนในชุดควบคุมปริมาณ SCN^- ลดลงเล็กน้อย เมื่อเก็บนมไว้ 18 วัน มีปริมาณ SCN^- อยู่ 4.5 ppm ซึ่งไม่แตกต่างกับนมชุดที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสมากนัก จากผลการทดลองภาพที่ 13 แสดงว่ากิจกรรมการยับยั้งของระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสยังคงมีอยู่ในช่วง 3 วันแรกของการเก็บ หลังจากนั้นการยับยั้งจุลินทรีย์ในนมพาสเจอร์ไรส์อาจเกิดจากแบคเทอริโอซินซึ่งยังคงมีกิจกรรมเหลืออยู่ แสดงว่าสามารถใช้การกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสและเติมแบคเทอริโอซินกับการผลิตนมพาสเจอร์ไรส์ได้ เพราะนอกจากสามารถยับยั้งและทำลายจุลินทรีย์เริ่มต้นในนมดิบแล้ว ยังมีผลยับยั้งจุลินทรีย์ในนมพาสเจอร์ไรส์ด้วย มีรายงานว่า Barrett และคณะ (1999) ได้ทดสอบหาความคงตัวของระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสในนมพาสเจอร์ไรส์ พบว่าเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที เอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดสสูญเสียกิจกรรมไปร้อยละ 70 แต่ถ้าให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ตรวจไม่พบกิจกรรมเอนไซม์เลยทั้งในนมชุดควบคุมและชุดที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส แต่ Griffiths (1985) ศึกษาพบว่าเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 วินาที และที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที เอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดสสูญเสียกิจกรรมอย่างสมบูรณ์ และพบว่าปริมาณ $OSCN^-$ ในนมชุดที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสลดลงหลังจากให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส

มากกว่าที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเพราะเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดสสูญเสียกิจกรรมหลังให้ความร้อนดังนั้น $OSCN^-$ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของระบบจึงน้อยลง และพบว่าปริมาณ $OSCN^-$ ในนมพาสเจอร์ไรส์ชุดควบคุมซึ่งเดิมมีน้อยกว่านมชุดที่กระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส แต่เมื่อเก็บนมพาสเจอร์ไรส์ไว้ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ปริมาณ $OSCN^-$ จะลดลงในทุกชุดการทดลองเช่นเดียวกัน จากผลการทดลองที่ได้แสดงว่ากิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสในนมพาสเจอร์ไรส์ยังมีอยู่ในช่วง 3 วันแรกเท่านั้น แต่หลังจากนั้นการยับยั้งจุลินทรีย์เกิดจากผลของแบคเทอริโอซินซึ่งยังคงมีอยู่หลังจากพาสเจอร์ไรส์นมแล้ว แต่ทั้งนี้กิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ยิ่งลดลงเมื่อเก็บนมพาสเจอร์ไรส์ไว้เป็นเวลานานขึ้น



ภาพที่ 13 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของแบคเทอริโอซิน กิจกรรมของเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดส และ ปริมาณ SCN^- ในนมพาสเจอร์ไรส์ที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

บทที่ 4

สรุปผล

1. สกัดแยกแบคเทอริโอซินที่สร้างจาก *L. casei ssp. rhamnosus* (SN11) ได้โดยการเหวี่ยงแยกเซลล์ออกแล้วกรองผ่าน Ultrafiltration ขนาด 100 kDa ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต แบบ 2 ขั้นตอนที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 40 และ 80 แล้วกรองผ่าน Ultrafiltration ขนาด 10 kDa กำจัดเกลือออกไปโดยการใช้ไดอะไลซิส ใช้ถุงไดอะไลซิสมีขนาดโมเลกุลผ่าน 3,500 Da แบคเทอริโอซินที่ได้มีขนาดอยู่ในช่วง 3,500-10,000 Da หลังจากทำแห้งโดยการ Freeze dry ได้แบคเทอริโอซินที่มีกิจกรรมการยับยั้ง 320 AU/mg เพิ่มความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินได้ 14.22 เท่า

2. ปริมาณการใช้แบคเทอริโอซินที่เหมาะสมกับนมดิบ คือ 80 AU/ml เพียงพอต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ในนมดิบได้ โดยสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทั้งหมดในนมดิบที่เก็บที่อุณหภูมิห้องได้ 6 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้ 6 วัน และพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* จำนวน 10^5 CFU/ml ที่เติมลงไปในนมดิบที่เก็บที่อุณหภูมิห้องได้นาน 6 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้ 6 วัน โดยพบว่าความคงตัวของกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินที่อุณหภูมิห้องลดลงเหลือ 10 AU/ml ในชั่วโมงที่ 24 แต่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส กิจกรรมการยับยั้งลดลงเหลือ 40 AU/ml ในวันที่ 15 ของการเก็บ

3. ปริมาณไธโอไซยาเนต (SCN^-) และ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่เหมาะสมเพียงพอในการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสในนมดิบเพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ คือ 10 และ 8 ppm ตามลำดับ โดยสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งหมดในนมดิบที่เก็บที่อุณหภูมิห้องได้ 6 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้ 4 วัน และพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* จำนวน 10^5 CFU/ml ที่เติมลงไปในนมดิบที่เก็บที่อุณหภูมิห้องได้นาน 6 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้ 7 วัน โดยพบว่าการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสไม่มีผลกับการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดสที่มีอยู่เดิมในนมดิบ ระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสมีความคงตัวสมบูรณ์อยู่ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ประมาณ 3 วัน

4. การใช้แบคเทอริโอซินร่วมกับการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสในนมดิบ สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งหมดและ *B. cereus* ได้นานกว่าการใช้แบคเทอริโอซินหรือการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสอย่างใดอย่างหนึ่งเพียงอย่างเดียว และพบว่าการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสก่อนเติมแบคเทอริโอซินเป็นเวลา 2 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพยับยั้งจุลินทรีย์ดีกว่าการเติมแบคเทอริโอซินก่อนกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส และการเติมแบคเทอริโอซินพร้อมกับกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส

5. เมื่อนำนมดิบที่มีการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสแล้วเติมแบคเทอริโอซินมาพาสเจอร์ไรส์โดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่าสามารถเก็บนมพาสเจอร์ไรส์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้นานกว่า 18 วัน แต่นมพาสเจอร์ไรส์ชุดควบคุมที่ไม่มีทั้งการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสและไม่เติมแบคเทอริโอซิน เก็บได้นาน 7 วัน และพบว่าการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสและเติมแบคเทอริโอซินสามารถลดจำนวน *B. cereus* และ *B. stearothermophilus* ในนมดิบและยับยั้งการเจริญในนมพาสเจอร์ไรส์ได้ โดยที่กิจกรรมการยับยั้งของระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสในนมพาสเจอร์ไรส์มีอยู่ในช่วง 3 วันแรกของการเก็บเท่านั้น ส่วนกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินซึ่งยังคงมีอยู่ในนมพาสเจอร์ไรส์ลดลงเหลือ 10 AU/ml หลังจากเก็บนมพาสเจอร์ไรส์ไว้ 18 วัน

เอกสารอ้างอิง

ชูรัฐ แปลกสงวนศรี. 2534. การเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์กลุ่มต่าง ๆ ในน้ำนมพาสเจอร์ไรส์ที่มีอายุการเก็บต่างกัน. รายงานการวิจัย. วิทยาลัยเกษตรกรรมเชียงราย.

ชูรัฐ แปลกสงวนศรี. 2537. คุณภาพน้ำนมวิทยาลัยเกษตรกรรมลพบุรี. รายงานการวิจัย. วิทยาลัยเกษตรกรรมลพบุรี.

ภัทรพล จันทราภรณ์. 2543. สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซินโดย *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* (SN11) ที่ถูกตรึง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วรรณา ตั้งชัยเจริญ. 2538. ปฏิบัติการตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม. รั้วเขียว. กรุงเทพฯ

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2533. ชีววิทยาของแบคทีเรีย. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2537. การเน่าเสียของอาหารและการป้องกัน. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ศิรินาถ หนูเอก. 2540. การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่สร้างแบคเทอริโอซินในอาหารหมัก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Barefoot. S.F. and Klaenhammer, T.R. 1983. Detection and activity of lactacin B a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Appl. Environ. Microbiol. 45 : 1808-1815.

Barrett, N.E., Grandison, A.S. and Lewis, M.J. 1999. Contribution of the lactoperoxidase system to the keeping quality of pasteurized milk. J. Dairy Research. 66 : 73-80.

Bell, R.G. and Delacy, K.M. 1987. The efficacy of nisin, sorbic acid and monolaurin as preservatives in pasteurized cured meat products. 1987. Food Microbiol. 4 : 277-283.

Beuchat, L.R., Clavero, M.R. and Jaquette, C.B. 1997. Effect of nisin and temperature on survival, growth and enterotoxin production characteristics of psychrotrophic *Bacillus cereus* in beef gravy. Appl. Environ. Microbiol. 63 : 1953-1958.

Bjorck, L., Claessen, O. and Schulthess, W. 1979. The lactoperoxidase/thiocyanate-hydrogen peroxide system as a temporary preservative for raw milk in developing countries. Milchwissenschaft. 34 : 726-729.

Bjorck, L., Rosen, C.G., Marshall, V. and Reiter, B. 1975. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system in milk against *Pseudomonads* and other gram negative bacteria. Appl. Microbiol. 30 : 199-204.

Brink, B.T., Minekus, M., Vander V. J., Lee, R.J. and Hulis in't Veld, J.H.J. 1994. Antimicrobial activity of lactobacilli preliminary characterization and optimization of Acidocin B, a novel baceriocin produced by *Lactobacillus* M46. J. Appl. Bacteriol. 77 : 140-148.

Broughton, J.D. 1990. Nisin and its uses as a food preservative. Food Technol. 55 : 100-117.

Chiu, C.K. and Etzel, M.R. 1997. Fractionation of lactoperoxidase and lactoferrin from bovine whey using a cation exchange membrane. J. Food Sci. 62 : 996-1000.

Cousin, M.A. 1982. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy product : A review. J. Food Prot. 45 : 172-207.

Crupper, S.S., Gies, A.J. and landolo, J.J. 1997. Purification and characterization of Stapphylococcin Bac R1, a broad-spectrum bacteriocin. Appl. Environ. Microbiol. 63 (11) : 4185-4190.

Daeschel, M.A. 1990. Application of Bacteriocins in Food System. *In* Biotechnology and Food Safety. (Bill, D.D. and Kung, S.D., ed.). p. 91-104. Butterwort-Heinemann. Boston.

Daeschel, M.A. 1993. Application and Interactions of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria in Foods and Beverages. *In* Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. (Hoover, D.G. and Steenson, L.R., ed.). p. 63-91. Academic Press. California.

Dean, J.P. and Zottola, E.A. 1996. Use of nisin in ice cream and effect on the survival of *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot. 59 : 476-480.

Denis, F. and Ramet, J.P. 1989. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* in trypticase soy broth, UHT milk and french soft cheese. J. Food Prot. 52 (10) : 706-711.

De Vuyst, L. and Vandamme, E.J. 1994. Bacteriocin of Lactic Acid Bacteria Microbiology, Genetics and Application. Chapman & Hall. London.

Diaz, R.J., Barba, J.L., Cathcart, D.P., Holo, H., Nes, I.F., Sletten, K.H. and Warner, P.J. 1995. Purification and partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO 010, the activity of which depends on the complementary action of two peptided. Appl. Environ. Microbiol. 61 (12) : 4459-4463.

Earnshaw, R. G., Banks, J. G., Francotte, C. and Defrise, D. 1990. Inhibition of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* in an infant milk formula by an activated lactoperoxidase system. J. Food Prot. 58 : 170-172.

Edmondson, J.E., Golden, R. and Wedle, D.B. 1985. Reduction Methods. *In* Stadard Methods for the Examination of Dairy Products 15th ed. (Richardson, G.H., ed.). p.259-264. American Publis Health Association. New York.

Ennahar, S., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. 1999. Class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria : antibacterial activity and food preservation. J. Biosci. Bioen. 87 (6) : 705-716.

Ewis, S.M., Hefnawy, S.A. and Salam, M. 1985. Utilization of lactoperoxidase system in preservation of raw milk under local conditions. J. Dairy Sci. Abst. 47 (10) : 721.

Gaya, P., Medina, M. and Nunez, M. 1991. Effect of the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* behavior in raw milk at refrigeration temperature. Appl. Environ. Microbiol : 355-3360.

Giraffa, G., Carminati, D., and Tarelli, G.T. 1995. Inhibition of *Listeria innocua* in milk by bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* 7C5. J. Food Prot. 58 : 621-623.

Gould, G.W. 1996. Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitiors for food application. J. Food Prot. 56 : 82-86.

Griffiths, M.W. 1985. Use of milk enzyme as indices of heat treatment. J. Food Prot. 44(9) : 696-705.

Hanlin, M. B., Kalchayanand, N., Ray, P. and Ray, B. 1993. Bacteriocins of lactic acid bacteria in combination have greater antibacterial activity. J. Food Prot. 56 (3) : 252-255.

Harper, W.J. and Hall, C.W. 1981. Milk Components and Their Characteristics. *In* Dairy Technology and Engineering. (Harper, W.J., ed.). p. 18-74. AVI Publishing. Connecticut.

Harrigan, W.F. and Maccance, M.E. 1976. Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology. p. 119-242. Academic Press. New York

Hastings, J.W. and Stiles, M.E. 1991. Antibiosis of *Leuconostoc gelidum* isolated from meat. J. Appl. Bacteriol. 70 : 127-134.

Holo, H., Nilssen, O. and Nes, I. F. 1991. Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* : isolation and characterization of the protein and its gene. J. Bacteriol. 173 (12) : 3879-3887.

Jacob, B.M., Antony, E.K., Sreekumar, B. and Haridas, M. 2000. Thiocyanate mediated antifungal and antibacterial property of goat milk lactoperoxidase. Life Sci. 66 (25) : 2433-2439.

Joo, Y.S., Lee, W.C., Park, Y.H. and Park, J.M. 1984. Prolonging the storage time of raw milk by activation of the lactoperoxidase system. J. Dairy Sci. Abst. 48 (4) : 243.

Kaiser, A.L. and Montville, T.J. 1996. Purification of the bacteriocin bavaricin MN and characterization of its mode of action against *Listeria monocytogenes* Scott A cell and lipid vescicles. Appl. Environ. Microbiol. 62 (12) : 4529-4535.

Kamau, N.D. and Kroger, M. 1984. Preservation of raw milk by treatment with hydrogen peroxide and by activation of the lactoperoxidase system. Milchwissenschaft. 39 : 658-661.

Kamau, N.D., Doores, S. and Prutt, K. 1990. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in milk. J. Food Prot. 53 (12) : 1010-1014.

Kawai, Y, Saito, T., Samant, S.K. and Itoh, T. 1994. Isolation and characterization of a highly hydrophobic new bacteriocin (Gassericin A) from *Lactobacillus gasseri* LA 39. J. Biosci. Biotech. Biochem. 58 : 1218-1221.

Klaenhammer, T.R. 1988. Bacteriocin of lactic acid bacteria. J. Biochimie. 70 : 337-349.

Klaenhammer, T.R., Fremaux, C., Ahn, C. and Milton, K. 1993. Molecular Biology of Bacteriocins Produced by *Lactobacillus*. *In* Bacteriocins of Lactic Acid Bacterial (Hoover, D.G. and Steenson, L.R., ed.). p. 151-180. Academic Press. California.

Langeveld, L.P., Van Spronson, W.A., Van Beresteijn, E.C. and Notermans, S.H. 1995. Consumption by healthy adults of pasteurized milk with a high concentration of *Bacillus cereus* : A double-blind study. J. Food Prot. 59 (7) : 723-726.

Lee, H. J., Joo, Y. J., Park, C.S., Kim, S.H., Hwang, I.K., Ahn, J.S. and Mheen, T.I. 1999. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* H-559 isolated from Kimchi. J. Biosci Bioeng. 88 (2) : 153-159.

Lowep, C.R. and Thomas, J.A. 1996. Purification and Analysis of Enzyme Preparations. *In* Enzymology : Labfax. (Engel, P.C., ed.). p. 9-76. Academic Press. Guildford.

Marshall, V., Cole, W.M. and Bramley, A.J. 1986. Influence of the lactoperoxidase system on susceptibility of the udder to *Streptococcus uberis* infection. J. Dairy Res. 53 : 507-514.

Matijasic, B.T., Rogelj, I., Nes, I.F. and Holo, H. 1998. Isolation and characterization of two bacteriocins of *Lactobacillus acidophilus* LF221. Appl. Microbiol. Biotechnol. 49 : 606-612.

Merck. 1996. Cultivation of Specific Microorganism. *In* Microbiology Manual 2000. p. 37-41. Merck KGaA. Darmstadt.

Messer, J.W., Behney, H.M. and Leudecke, L.O. 1985. Microbiological Count Method. *In* Stadard Methods for The Examination of Dairy Products (15th Ed.) (Richardson, G.H., ed.). p.259-264. American Publis Health Association. New York.

Montville, T.J. and Kaiser, A.L. 1993. Antimicrobial Proteins : Classification, Nomenclature, Diversity and Relationship. *In* Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria (Hoover, D.G. and Steenson, L.R., ed.). p. 1-22. Academic Press. California.

Muariana, P.M. and Luchansky, J.B. 1993. Biochemical Methods for Purification of Bacteriocins. *In* Bacteriocins of Lactic Acid Bacterial (Hoover, D.G. and Steenson, L.R., ed.). p. 151-180. Academic Press. California.

Nettles, C.G. and Barefoot, S.F. 1993. Biochemical and genetic charactics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. J. Food Prot. 56 (4) : 338-356.

Nielson, H.J. and Zeuthen, P. 1985. Influence of lactic acid bacteria and the overall flora on development of pathogenic bacteria in vacuum-packed, cooked emulsion-style sausage. J. Food Prot. 48 : 28-34.

Parente, E. and Hill, C. 1992. Characterization of Enterocin 1146, a bacteriocin from *Enterococcus faecium* inhibitory to *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot. 55 : 197-502.

Parente, E., Ricciardi, A. and Addario, G. 1994. Influence of pH on growth and bacteriocin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 140 NWC during batch fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 41 : 388-394.

Reiter, B. 1986. The Biological Significance of The Non-Immunoglobulin Protective Proteins in Milk : Lysozyme, Lactoferrin, Lactoperoxidase. *In* Developments in Dairy Chemistry V3: Lactose and Minor Constituents. (Fox, P.F., ed.). p. 239-279. Elsevier Applied Science Publishers. New York.

Reiter, B. and Harnulv, G. 1984. Lactoperoxidase antibacterial system : natural occurrence, biological functions and practical application. J. Food Prot. 47 : 724-732.

Reiter, B. and Perraudin, J.P. 1991. Lactoperoxidase : Biological Function. *In* Peroxidase in Chemistry and Biology V.1. (Johannes, E., ed.). p. 143-180. FlaCRC Press. Bocaton.

Ridley, S.C. and Shalo, P.L. 1990. Farm application of lactoperoxidase treatment and evaporative cooling for the intermediate preservation of unprocessed milk in Kenya. J. Food Prot. 53 (7) : 592-597.

Rodriguez, E., Tomillo, J., Nunez, M. and Medina, M. 1997. Combind effect of bacteriocin-producing lactic acid bacteria and lactoperoxidase system activation on *Listeria monocytogenes* in refrigerated raw milk. J. Appl. Microbiol. 83 : 389-395.

Samelis, J., Roller, S. and Metaxopoulos, J. 1994. Sakacin B. a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* isolated from Greek dry fermented sausage. J. Appl. Bacteriol. 76 : 475-486.

Siragusa, G.R. and Johnson, M.G. 1989. Inhibition of *L. monocytogenes* growth by the lactoperoxidase-thiocyanate-H_2O_2 antimicrobial system. Appl. Environ. Microbiol. 55 (19) : 2802-2805.

Stevens, K.A., Shelden, B.W., Klapes, N.A. and Klaenhammer, T.R. 1991. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 57 : 3613-3615.

Vandenbergh, P.A. 1993. Lactic acid bacteria, their metabolic product and interference with microbial growth. FEMS. Microbiol. Rew. 12 : 221-238.

Walfson, L.M. and Sumner, S.S. 1993. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system : A review. J. Food Prot. 56 : 887-892.

Wit, J.N. 1998. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. J. Dairy Sci. 81 : 597-608.

Zajac, M., Gladys, J., Skarzynska, M., Harnulv, G. and Bjorck, L. 1983. Changes in bateriological quality of raw milk stabilized by activation of its lactoperoxidase system and store at different temperatures. J. Food Prot. 46 : 1065-1068.

Zapico, P., Gaya, P., Nunez, M. and Medina, M. 1993. Goats' milk lactoperoxidase system against *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot. 56 (11) : 988-990.

Zapico, P. Gaya, P. Nunez, M. and Medina, M. 1995. Activity of Goats' milk lactoperoxidase system on *Pseudomonas flurescens* and *Escherichia coli* at refrigeration temperatures. J. Food Prot. 58 : 1136-1138.

Zapico, P., Medina, M., Gaya, P. and Nunez, M. 1998. Synergistic effect of nisin and the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* in skim milk. J. Food Microbiol. 40 : 35-42.

ภาคผนวก ก
วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. De Man Rogosa and Sharpe (MRS) ประกอบด้วย

Proteose peptone No.3	10.0	กรัม
Beef extract	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม
Tween 80	1.0	มิลลิลิตร
Ammonium citrate	2.0	กรัม
Sodium acetate	5.0	กรัม
Magnesium sulfate	0.1	กรัม
Manganese sulfate	0.05	กรัม
Dipotassium phosphate	2.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลายส่วนประกอบข้างต้นในน้ำกลั่น ปรับให้มีพีเอช 6.5 ด้วย 6 N NaOH และ 6 N HCl นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

2. อาหารเหลว MRS (สูตรทดแทนด้วยน้ำนึ่งปลาทูน่า) ประกอบด้วย

Sucrose	1.0	กรัม
Tween 80	1.0	มิลลิลิตร
Ammonium citrate	2.0	กรัม
Sodium acetate	5.0	กรัม
Dipotassium phosphate	2.0	กรัม
Distilled water	500	มิลลิลิตร
น้ำนึ่งปลาทูน่า	500	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลายส่วนประกอบข้างต้นในน้ำกลั่น ปรับให้มีพีเอช 5.5 ด้วย 6 N NaOH และ 6 N HCl นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

วิธีเตรียมน้ำนึ่งปลาทูน่า

นำน้ำนึ่งปลาทูน่ามากรองด้วยผ้าขาวบาง ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 1 คืน ตักไขมันที่ผิวหน้าทิ้ง นำมาปรับพีเอชเป็น 5.5 ตกตะกอนโปรตีนโดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วกรองแยกตะกอนออก บรรจุขวด เก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

3. Nutrient Agar (NA) **ประกอบด้วย**

Peptone	5.0	กรัม
Beef extract	3.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร
PH	7.0	

วิธีเตรียม

ละลายส่วนประกอบข้างต้นในน้ำกลั่น (ยกเว้น Agar) ปรับให้มีพีเอช 7.0 ด้วย 6 N NaOH และ 6 N HCl จึงใส่วุ้นลงไป หลอมละลายด้วยความร้อน นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

4. Dextrose-Peptone Bromocresol Purple Agar **ประกอบด้วย**

Tryptone or Trypticase	10	กรัม
Dextrose	5	กรัม
Bromocresol purple 2% ethanol solution	2	มิลลิกรัม
Agar	12	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลายส่วนประกอบข้างต้นในน้ำกลั่น (ยกเว้น Agar) ปรับให้มี พีเอช 6.7 ด้วย 6 N NaOH และ 6 N HCl จึงใส่วุ้นลงไป หลอมละลายด้วยความร้อน นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

5. Plate Count Agar (PCA) (Standard Methods Agar) **ประกอบด้วย**

Tryptone	5	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Glucose	1	กรัม
Agar	15	กรัม

วิธีเตรียม

ละลายส่วนประกอบข้างต้นในน้ำกลั่น (ยกเว้น Agar) ปรับให้มี พีเอช 7.1 ด้วย 6 N NaOH และ 6 N HCl จึงใส่วุ้นลงไป หลอมละลายด้วยความร้อน นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา15 นาที

6. Phenol-Red Egg-Yolk Polymyxin Agar **หรือ** Mannitol Egg-Yolk Phenol red polymyxin Agar **ประกอบด้วย**

Meat extract	1	กรัม
Peptone	10	กรัม
D-mannitol	10	กรัม
Sodium chloride	10	กรัม
Phenol red	0.025	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร
pH	7.0	

วิธีเตรียม

ต้มอาหารให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน กรอกอาหารใส่ขวดปริมาตร 90 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

Egg yolk emulsion

ล้างไข่ให้สะอาด แช่ใน Mercuric chloride 0.1% เจาะไข่ด้านป้านเพื่อเอาไข่ขาวออกให้หมด เทไข่แดงใส่กระบอกตวงที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เติม 0.85 % NaCl ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วลงไปให้เท่ากับปริมาตรของไข่แดง ใช้ปิเปตคนให้เป็นเนื้อเดียวกัน

Polymyxin B sulphate 0.1%

ละลาย Polymyxin B sulphate 50 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำสารละลายกรองผ่านเครื่องบัคเตรี

7. Baird Parker medium ประกอบด้วย

Tryptone	10	กรัม
Meat extract	5	กรัม
Yeast extract	1	กรัม
Lithium chloride	5	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น 1 ลิตร คนให้เข้ากัน ต้มจนสารละลายเดือด ปรับพีเอชให้ได้ 6.8 แบ่งใส่ขวด ๆ ละ 90 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วทิ้งให้เย็นลงประมาณ 50 องศาเซลเซียส เติมสารละลายต่อไปนี้ฆ่าเชื้อด้วยการกรองผ่านเครื่องกรองแบคทีเรีย

Glycine 20%	6.3	มิลลิลิตร
Potassium tellurite 1%	1	มิลลิลิตร
Sodium pyruvate 20%	5	มิลลิลิตร
Egg Yolk emulsion	5	มิลลิลิตร

เมื่อผสมแล้วต้องใช้ทันที

8. Violet Red Bile Agar (VRBA) ประกอบด้วย

Yeast extract	3	กรัม
Peptone หรือ Gelysate	7	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Bile salts หรือ Bile salts No.3	1.5	กรัม
Lactose	10	กรัม
Neutral red	0.03	กรัม
Crystal violet	0.002	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ปรับพีเอชเป็น 7.4 ต้มให้วุ้นละลาย (ไม่ต้องฆ่าเชื้อโดยความดันไอน้ำ) ทำให้อุณหภูมิอาหารเป็น 45 องศาเซลเซียส แล้วจึงเท plate ทิ้งให้อาหารแข็ง เติมตัวอย่างที่จะทดสอบลงไปแล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ทับอีกครั้ง

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมีและวิธีวิเคราะห์

1. **การวิเคราะห์โปรตีน ตามวิธี** (Lowep and Thomas, 1996)

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

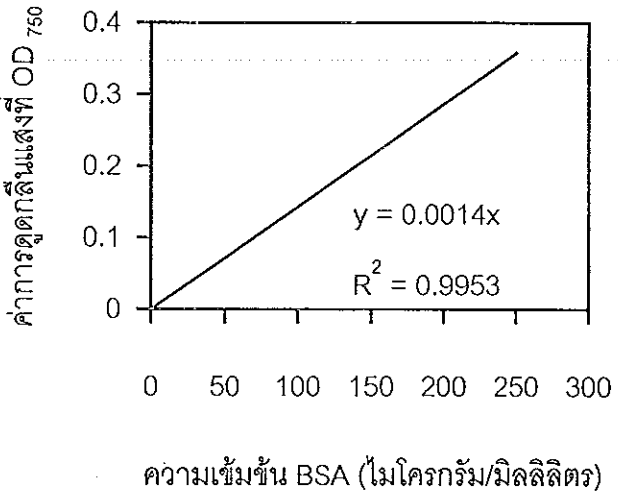
1. สารละลาย A : 1% (w/v) $CuSO_4.5H_2O$ ในน้ำกลั่น
2. สารละลาย B : 1% (w/v) Sodium Potassium tartrate. $4H_2O$ ในน้ำกลั่น
3. สารละลาย C : 2% (W/V) Na_2CO_3 ใน 0.1 M NaOH
4. สารละลาย D : ผสม A และ B ในอัตราส่วน 1 : 1 (v/v) ส่วน แล้วเติมสาร C 98 ส่วน
5. เจือจาง Folin-Ciocalteau reagent ด้วยน้ำในอัตราส่วน 1 : 1 (V/V)

วิธีการวิเคราะห์

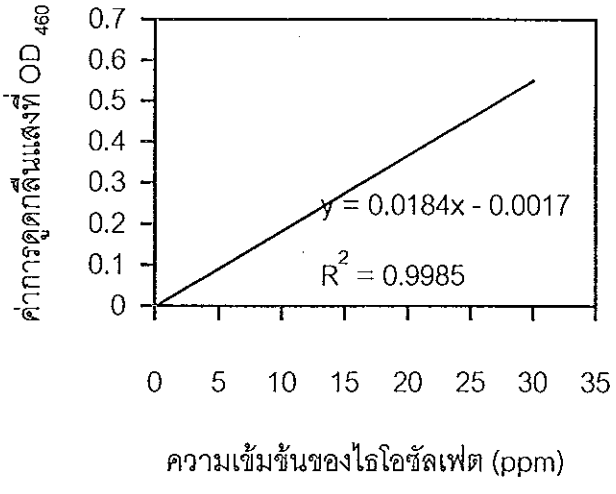
1. ใช้สารตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณโปรตีน 0.2 มิลลิลิตร เติมสารละลาย E 2.1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้นาน 10 นาที
2. ใส่สารละลาย F 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้นาน 30 นาที
3. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นที่มีการเตรียมเหมือนตัวอย่างเป็น blank
4. เตรียมกราฟโปรตีนมาตรฐานโดยใช้โบวินซีรัมอัลบูมิน (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน
5. นำข้อมูลมาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างการดูดกลืนแสงกับปริมาณโปรตีน (BSA) ดังแสดงในภาพที่ 14

การเตรียมกราฟมาตรฐานโปรตีน

1. ละลายโบวินซีรัมอัลบูมิน 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร จะได้ Stock solution ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
2. เจือจางสารละลายโบวินซีรัมอัลบูมินให้ได้ความเข้มข้น 0 50 100 150 200 และ 250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยนำ Stock solution ปริมาตร 0 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น
3. หาปริมาณโปรตีนของแต่ละความเข้มข้นตามวิธีการข้างต้น
4. เขียนกราฟมาตรฐานโปรตีนของโบวินซีรัมอัลบูมินระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร กับความเข้มข้น



ภาพที่ 14 กราฟมาตรฐานโปรตีน



ภาพที่ 15 กราฟมาตรฐานไธโอซัลเฟต

2. **การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 mM พีเอช 6.5**

สารเคมี

สารละลาย A : สารละลายโมโนโซเดียมฟอสเฟต ความเข้มข้น 50 mM

($NaH_2PO_4.2H_2O$ 6.899 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย B : สารละลายไดโซเดียมฟอสเฟต ความเข้มข้น 50 mM

($Na_2HPO_4.2H_2O$ 8.902 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

วิธีการ

โดยผสมสารละลาย A และ B ให้ได้พีเอช 6.5 โดยการวัดด้วยเครื่องวัดพีเอช

3. **การเตรียมสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 M พีเอช 4.5**

สารเคมี

สารละลาย A : สารละลายกรดอะซิติก ความเข้มข้น 0.1 M

(กรดอะซิติก 5.755 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย B : ละลาย $C_2H_3O_2Na$ 8.2 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร (ความเข้มข้น 0.1M)

วิธีการ

โดยผสมสารละลาย A และ B ให้ได้พีเอช 4.5 โดยการวัดด้วยเครื่องวัดพีเอช

4. **การหาเปอร์เซ็นต์กรดทั้งหมด (วรรณา ตั้งชัยเจริญ, 2538)**

สารเคมี

1. สารละลายมาตรฐาน NaOH 0.1 นอร์มอล
2. ฟีนอฟทาลีน อินดิเคเตอร์ เตรียมโดยการชั่ง ผลึกฟีนอฟทาลีน 1 กรัม ละลายในแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

วิธีการ

นำตัวอย่างน้ำนมที่ผสมกันดีแล้วมา 17.6 มิลลิลิตร (18 กรัม) ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นลงไป 17.6 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกันใส่ฟีนอฟทาลีนลงไป 0.5 มิลลิลิตร ทำการไตเตรตกับ 0.1 นอร์มัล NaOH จนถึงจุดยุติ ซึ่งจะให้สีชมพูคงทนอยู่เป็นเวลา 30 วินาที บันทึกปริมาตร NaOH ที่ใช้ นำไปคำนวณหาเปอร์เซนต์กรดแลกติกจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์กรดแลกติก} = \frac{0.9 \times \text{ปริมาตร NaOH ที่ใช้ไป}}{\text{น้ำหนักของน้ำนม}}$$

5. **การตรวจหาระยะเวลาในการเปลี่ยนสีของ** Methylene blue (Edmondson *et al.*,1985)

วิธีเตรียม

1. Methylene blue thiocyanate 1 เม็ด
2. น้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร

นำ Methylene blue thiocyanate ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อและทิ้งให้เย็นใหม่ ๆ แล้วบรรจุใส่ภาชนะ เก็บไว้ในที่เย็น

วิธีการ

เติมสารละลาย methylene blue thiocyanate ลงในหลอดทดสอบฝาเกลียวที่ฆ่าเชื้อแล้ว 1 มิลลิลิตร ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ จากนั้นเติมตัวอย่างน้ำนมที่แช่เย็นไว้ ลงในหลอดทดสอบดังกล่าวปริมาตร 10 มิลลิลิตร. หลังจากปิดฝาหลอดแน่นแล้ว ให้กลับหลอดทดสอบอย่างช้า ๆ 3 ครั้ง เพื่อให้ตัวอย่างและสีผสมเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วบ่มหลอดทดสอบที่บรรจุตัวอย่างลงในหม้อนึ่งไอน้ำที่คุมอุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส เริ่มจับเวลาที่ตัวอย่างเกิดการเปลี่ยนแปลงจากสีน้ำเงินเป็นขาว เมื่อครบ 30 นาทีแรก และต่อ ๆ ไปทุกชั่วโมง

ภาคผนวก ค
มาตรฐานที่เกี่ยวข้องกับน้ำนม

ตารางที่ 18 มาตรฐานของนมดิบทางด้านจุลินทรีย์

การทดสอบ	ผลการทดสอบ
จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด	น้อยกว่า 50,000 CFU/ml
โคลิฟอร์ม	น้อยกว่า 100 CFU/ml
E. coli (faecal type)	ไม่พบในนม 0.01 ml
Thermoduric count	น้อยกว่า 1,000 CFU/ml
สปอร์	น้อยกว่า 10 CFU/ml
B. cereus (สปอร์)	น้อยกว่า 1 CFU/ml
S. aureus	น้อยกว่า 10 CFU/ml
Methylene blue reduction time	ไม่ต่ำกว่า 5 ชั่วโมง
3-h Resazurin test	ไม่ต่ำกว่า 3 ชั่วโมง
Somatic cell count	น้อยกว่า 750,000 Cell/ml
Psychrotrope count	น้อยกว่า 10,000 CFU/ml

ที่มา : Robinson (1981) อ้างโดย ชูรัฐ แปลกสงวนศรี (2537)

ตารางที่ 19 มาตรฐานของน้ำนมพาสเจอร์ไรส์ทางด้านจุลินทรีย์

ชนิดและสารจากจุลินทรีย์	ผลการทดสอบ
ของต่างประเทศ	น้อยกว่า 50,000 CFU/ml
จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด	
โคลิฟอร์ม	น้อยกว่า 1 CFU/ml
E. coli (faecal type)	ไม่พบในนม 10 ml
ของประเทศไทย	
จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด	น้อยกว่า 50,000 CFU/ml
E. coli	ไม่พบในนม 0.1 ml
จุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อโรค	ต้องไม่มี
สารพิษจากจุลินทรีย์	ไม่มีในปริมาณที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ

ที่มา : กระทรวงสาธารณสุข (2522 อ้างโดย ชูรัฐ แปลกสงวนศรี ,2534)

ตารางที่ 20 การแบ่งชั้นน้ำนมโดยการทดสอบด้วยเมทธิลีนบลู

ชั้นของนม	เวลาที่มีหายไป	ประมาณจำนวนแบคทีเรียต่อมิลลิลิตร
ดี	มากกว่า 8 ชั่วโมง	น้อยกว่า 5×10^5
ดีพอใช้	มากกว่า 6 ชั่วโมง และน้อยกว่า 8 ชั่วโมง	$1 \times 10^6 - 4 \times 10^6$
พอใช้	มากกว่า 2 ชั่วโมง และน้อยกว่า 6 ชั่วโมง	$4 \times 10^6 - 2 \times 10^7$
ใช้ไม่ได้	น้อยกว่า 2 ชั่วโมง	มากกว่า 2×10^7

ที่มา : ประกาย จิตรกร (2526 อ้างโดย ชูรัฐ แปลกสงวนศรี, 2534)

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวน้อมจิตต์ อ่อนแก้ว

วันเดือนปีเกิด 21 กุมภาพันธ์ 2519

วุฒิ	**สถาบัน**	**ปีที่สำเร็จการศึกษา**
วิทยาศาสตรบัณฑิต (อุตสาหกรรมเกษตร)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2541

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับระหว่างการศึกษา) ทุนผู้ช่วยสอน