บทที่ 2
เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการรับซื้อน้ำนมดิบของโรงงานอุตสาหกรรมนม จะมีการตรวจสอบคุณภาพน้ำนมดิบก่อนการรับซื้อ เพื่อกำหนดราคารับซื้อและแยกเกรดในการนำไปแปรรูปผลิตภัณฑ์ ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การตรวจสอบผงตะกอนในน้ำนมดิบ การตรวจหาจำนวนของแบคทีเรียทั้งหมดด้วยวิธี Total Plate Count การหาความถ่วงจำเพาะของน้ำนมดิบ หาปริมาณไขมันในน้ำนมดิบ และตรวจเยี่ยมดูความสะอาดของโรงเรือนเลี้ยงแม่วัว (ศูนย์ถ่ายทอดเทคโนโลยี, 2530) วิธีที่โรงงานอุตสาหกรรมนมนิยมใช้ในการตรวจสอบคุณภาพก่อนการรับซื้อก็คือ การตรวจสอบคุณภาพทางสุขศาสตร์ (hygiene quality test) ของน้ำนมดิบ คือ การสังเกตลักษณะปกติของน้ำนมดิบ เช่น สี ตะกอน ฝุ่นผงในน้ำนม หาระยะเวลาในการเปลี่ยนสีของเมทธีลีนบลู (methylene blue reduction test) (อ.ส.ค. แห่งประเทศไทย, 2539) การตกตะกอนของนมด้วยการต้ม (clot on boiling test) และการตกตะกอนโปรตีนในนมกับแอลกอฮอล์ (alcohol test) (FAO, 1999) ซึ่งวิธีนี้มีการใช้อย่างแพร่หลาย เพราะเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว ค่าใช้จ่ายถูก และให้ผลดีเชื่อถือได้ การตกตะกอนโปรตีนในนมกับแอลกอฮอล์เป็นข้อบ่งชี้ได้ว่ามีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์จำนวนมาก ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้น้ำนมดิบไม่ได้มาตรฐาน

ตามกฎระเบียบ อ.ส.ค. ปี 2543 ได้กำหนดให้ใช้ค่า Methylene Blue Reduction Test (MBR) เป็นเกณฑ์ในการพิจารณาแบ่งเกรดของน้ำนมเพื่อนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์นม และเป็นเกณฑ์ในการรับซื้อน้ำนมดิบ โดยจะรับซื้อน้ำนมดิบที่ให้ค่า MBR ตั้งแต่ 3 ชั่วโมงขึ้นไป ค่า MRB บ่งบอกถึงคุณภาพทางจุลชีววิทยา โดยอาศัยหลักการที่ว่าเมื่อมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์กลุ่มที่ต้องการใช้ออกซิเจน (aerobic bacteria) ในน้ำนมจะมีการใช้ออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารและที่อยู่ในภาชนะเหนือผิวหน้าอาหาร การลดลงของออกซิเจนจึงเป็นปฏิภาคโดยตรงกับจำนวนจุลินทรีย์ในอาหาร ซึ่งเมื่อตัวอย่างอาหารมีจุลินทรีย์อยู่ในปริมาณมากก็จะทำให้ศักยภาพการรีดิวส์ (redox potential; Eh) ของอาหารลดลงมีค่าไปในทางลบมากขึ้น เมื่อบ่มอาหารที่เติมสารสีเมทิลีนบลู (methylene blue) ซึ่งเป็นสารดัชนีการรีดิวส์ (redox indicator) ที่มีคุณสมบัติในการเปลี่ยนสีได้ตามระดับของศักยภาพการรีดิวส์ (Eh) ที่เปลี่ยนแปลงไป โดยปกติแล้วเมทิลีนบลูที่อยู่ในรูปของออกซิไดส์ (oxidized form) จะมีสีน้ำเงิน และเมื่อถูกรีดิวส์ (reduced form) จะไม่มีสี การเปลี่ยนสีของสารดัชนีการรีดิวส์ขึ้นอยู่กับจำนวนของแบคทีเรียที่อยู่ในน้ำนม การวัดผลขึ้นอยู่กับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กิจกรรมเมตาบอลิค (metabolic activity) ของแบคทีเรีย เมื่อแบคทีเรียเจริญเติบโตจะมีการใช้ออกซิเจนที่อยู่ในน้ำนม การเปลี่ยนสีที่เกิดขึ้นจึงขึ้นอยู่กับจำนวนแบคทีเรีย อัตราการเจริญเติบโต และอัตราการใช้ออกซิเจน ดังนั้นการเปลี่ยนสีของสารดัชนีการรีดิวส์ จึงเป็นเครื่องบ่งชี้ให้เห็นได้ว่าตัวอย่างอาหารมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์อยู่มากน้อยเพียงไร การใช้วิธีการนี้ในการตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำนมดิบให้ผลดีพอสมควร ง่ายต่อการตรวจวิเคราะห์ สะดวก และรวดเร็ว ในประเทศอังกฤษใช้การตรวจ methylene blue reduction test แทนการตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (Standard Plate Count) ในการตรวจสอบคุณภาพน้ำนมดิบ (ไพโรจน์, 2545)

จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดเป็นค่าที่ทำให้ทราบถึงคุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำนมดิบที่ถูกต้องและแม่นยำมากกว่าค่า MBR แต่ต้องเวลาในการตรวจวิเคราะห์นาน ต้องใช้ผู้ที่มีความรู้ความชำนาญ และวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ค่อนข้างยุ่งยากมากกว่าการหาค่า MBR ในการรับซื้อน้ำนมดิบของสหกรณ์โคนมและโรงงานอุตสาหกรรมนมจึงทำการสุ่มตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดของสมาชิกเดือนละ 2 ครั้ง หรือตรวจซ้ำเพื่อยืนยันผลในกรณีที่พบว่าค่า MBR มีปัญหาต่ำกว่าเกณฑ์ที่กำหนด จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดใช้เป็นเกณฑ์ในการพิจารณาแบ่งเกรดกำหนดราคาการรับซื้อน้ำนมดิบ โดยจะตัดราคารับซื้อลงกิโลกรัมละ 10 สตางค์ถ้าน้ำนมดิบมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดมากกว่า $6.0X10^5$ - $8.0X10^5$ cfu/ml และถ้ามากกว่า $8.0X10^5$ cfu/ml จะตัดราคารับซื้อลงกิโลกรัมละ 20 สตางค์ (อ.ส.ค., 2543)

2.1 น้ำนม

น้ำนมวัวมีสีขาวออกเหลือง ความเข้มของสีขึ้นอยู่กับอาหารของแม่วัว มีค่าพีเอชอยู่ระหว่าง 6.4-6.8 และมีจุดเยือกแข็ง (freezing point) ที่ –0.53 ถึง –0.55 องศาเซลเซียส มีความถ่วงจำเพาะวัดที่ 15 องศาเซลเซียส หรือ 20 องศาเซลเซียส เป็น 1.028-1.033 กิโลกรัม/ลิตร (FAO, 1993) น้ำนมวัวมีองค์ประกอบที่สำคัญแสดงในตารางที่ 2.1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของน้ำนมดิบ

องค์ประกอบ	ปริมาณเฉลี่ยในน้ำนม (%w/w)	ช่วง (range) (%w/w)	ปริมาณเฉลี่ยในน้ำหนักแห้ง (%w/w)
น้ำ	87.1	85.3-88.7	
ของแข็งไม่รวมไขมัน (solids-not-fat)	8.9	7.9-10.0	
ไขมันในรูปน้ำหนักแห้ง (fat in dry matter)	31	22.38	
แลคโตส	4.6	3.8-5.3	36
ไขมัน	4.0	2.5-5.5	31
โปรตีน	6.25	2.3-4.4	25
เคซีน	2.6	1.7-3.5	20
เกลือแร่	0.7	0.57-0.83	5.4
กรดอินทรีย์ (organic acids)	0.17	0.12-0.21	1.3
อื่นๆ	0.15		1.2

ที่มา : Walstra *et al.* (1999)

นอกจากองค์ประกอบที่กล่าวถึงในตารางที่ 2.1 แล้วยังมีส่วนประกอบของเอนไซม์นมมากกว่า 60 ชนิด ซึ่งได้จากน้ำนมและแบคทีเรียในน้ำนม แหล่งที่พบเอนไซม์ ค่าพีเอช และอุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum temperature) และการหยุดกิจกรรมของเอนไซม์ (inactivation) แสดงในตารางที่ 2.2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2.2 เอนไซม์ในน้ำนมดิบ

ชื่อ	EC number	pH ที่เหมาะสม (optimum pH)	อุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum temperature) °ซ	แหล่งที่พบ	การหยุดยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ (inactivation)
แซนธิน ออกซิเดส (Xanthine oxidase)	1.1.3.22	~8	37	Fat globule membrane	73°ซ 7 นาที
ซัลฟ์ไฮดริว ออกซิเดส (Sulfhydryl oxidase)	1.8?	~7	~45	Plasma	73°ซ 3 นาที
คาตาเลส (Catalase)	1.11.1.6	7	37?	Leukocytes	73°ซ 2 นาที
แลคโตเปอร์ออกซิเดส (Lactoperoxidase)	1.11.1.7	6.5	20	Serum	73°ซ 10 นาที
ซุปเปอร์ออกไซด์ ดิสมูเตส (Superoxide dismutase)	1.15.1.1	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	Plasma	76°ซ 70 นาที
ไลโปโปรตีน ไลเปส (Lipoprotein lipase)	3.1.1.34	~9	33	Casein micelles	73°ซ 30 วินาที
อัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส (Alkaline phosphatase)	3.1.3.1	~9	37	Fat globule membrane	73°ซ 20 วินาที
ไรโบนิวคลีเอส (Ribonuclease)	3.1.27.5	7.5	37	Serum	ไม่มีข้อมูล
พลาสมิน (Plasmin)	3.4.21.7	8	37	Casein micelles	73°ซ 40 นาที

ที่มา : Walstra *et al.* (1999)

เอนไซม์มีความจำเพาะในการเกิดปฏิกิริยา ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ก็คืออุณหภูมิและพีเอช โดยทั่วไปอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์อยู่ระหว่าง 25-50 องศาเซลเซียส และเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงจนไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ (inactivate) ซึ่งอุณหภูมิจะอยู่ในช่วง 50-120 องศาเซลเซียสขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ สารละลายที่มีพีเอชเป็นกรดจะเหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยามากกว่าสารละลายที่เป็นด่าง (FAO, 1993)

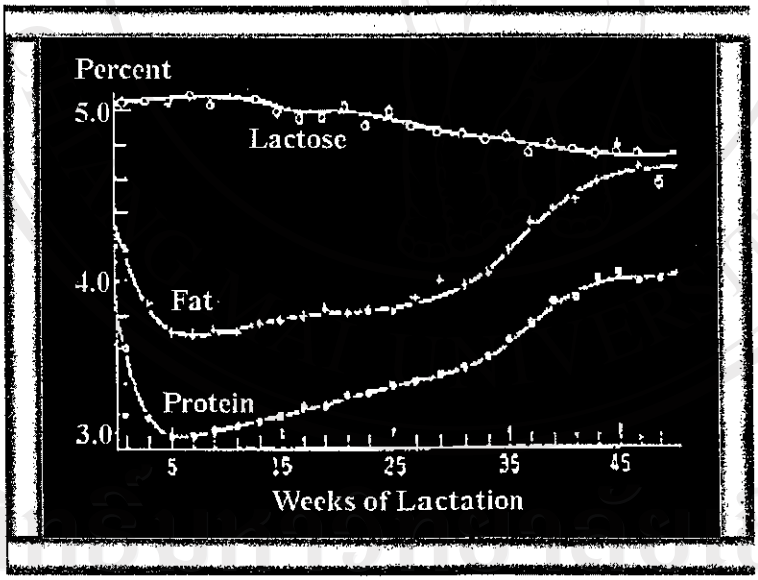
จากองค์ประกอบของนมทำให้น้ำนมเป็นแหล่งของพลังงาน โปรตีน วิตามิน และเกลือแร่ที่สำคัญ น้ำนมของสัตว์แต่ละชนิดมีองค์ประกอบที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตาราง 2.3 และยังขึ้นอยู่กับระยะการให้นม ดังรูปที่ 2.1 จำนวนครั้งของการให้นม (number of lactation) และอาหารที่ใช้เลี้ยงสัตว์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบของน้ำนมของสัตว์ต่างชนิดกัน

ชนิด	ไขมัน	ของแข็งไม่รวมไขมัน	โปรตีน (NX6.38)	แลคโตส	แคลเซียม	พลังงาน (แคลอรี่/100กรัม)
คน	4.62	8.97	1.23	6.94	0.03	73
วัว	3.5	8.65	3.25	4.60	0.115	62
พันธุ์ Friesian	4.65	9.10	3.65	4.70	0.13	75
พันธุ์ Guernsey	7.45	9.32	3.78	4.90	0.19	100
ควาย	4.50	8.70	3.30	4.40	0.13	71
พันธุ์ Indian	7.50	10.90	5.60	4.40	0.20	105
แพะ	1.60	8.50	2.20	6.00	0.09	47
แกะ	1.50	8.60	2.10	6.20	0.08	46
ม้า	4.20	8.70	3.70	4.10	-	70
ลา	7.00	10.90	5.20	4.60	-	100
อูฐ	3.20	10.30	3.90	5.30	-	65
วัวป่า (Yak)	22.50	14.20	10.30	2.40	-	250

ที่มา : FAO (1993)



ภาพที่ 2.1 องค์ประกอบของน้ำนมที่แตกต่างกันในช่วงระยะเวลาการให้นม (lactation period)
ที่มา : FAO (1993)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2 จุลินทรีย์ในน้ำนมดิบ

เชื้อจุลินทรีย์ในน้ำนมดิบแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ (Walstra และคณะ, 1999) คือ

1. เชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการให้พบในน้ำนม (Undesirable microoganisms) เนื่องจากจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้สามารถทำให้เกิดโรค (pathogenic) หรือผลิตเอนไซม์ที่ทำให้น้ำนมคุณภาพเปลี่ยนแปลงไป
   1.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค (pathogenic microoganisms) เชื้อปนเปื้อนเข้าไปในน้ำนมทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) และโรคติดเชื้อ (food infection) กับคนและสัตว์ได้
   1.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ทำให้เกิดโรค (non-pathogenic microoganisms) เชื้อจุลินทรีย์ไม่สามารถทำให้เกิดโรคได้แต่จะผลิตเอนไซม์ขึ้นมาย่อยสารอาหารในน้ำนมทำให้เกิดกลิ่นรสที่ไม่ดี (off flavour)
2. เชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้น้ำนมดิบเน่าเสีย (Spoilage microorganisms) ได้แก่
   2.1 แลคติคแบคทีเรีย เชื้อสามารถย่อยสลายน้ำตาลแลคโตสในน้ำนมได้กรดแลคติคขึ้นมาทำให้น้ำนมมีรสเปรี้ยว ได้แก่แบคทีเรียในจีนัส *Lactococcus* และ *Lactobacillus* เช่น เชื้อ *Lactococcus lactis* spp. และ *L. cremoris* สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วในน้ำนมที่เก็บที่อุณหภูมิสูงกว่า 20 องศาเซลเซียส
   2.2 แบคทีเรียโคลิฟอร์ม เป็นจุลินทรีย์ในกลุ่ม Enterobacteriaceae เช่น *Escherichia coli* และ *Aerobacter aerogenes* ซึ่งพบได้ทั่วไปและในระบบย่อยอาหารของคน เชื้อสามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิสูงกว่า 20 องศาเซลเซียส ทำให้น้ำนมเกิดกลิ่นเน่าเสียและเกิดแกสขึ้น
   2.3 ไซโครโทรปแบคทีเรีย (psychrotrophs bacteria) ได้แก่เชื้อพวก *Pseudomonas* และแบคทีเรียกรัมลบ เซลล์เป็นท่อน (gram-negative rod) เชื้อสามารถเจริญที่อุณหภูมิต่ำกว่า 15 องศาเซลเซียส และสร้างเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสขึ้นมาย่อยโปรตีนและไขมันในนมทำให้เกิดกลิ่นเหม็นหืน (rancid off-flavours) และกลิ่นเหม็นเน่า (putrid)
   2.4 แบคทีเรียที่ทนร้อน (heat-resistant bacteria) ได้แก่
      2.4.1 แบคทีเรียที่ไม่สร้างสปอร์ ได้แก่เชื้อ *Microbacterium lacticum*, thermophilic Streptococci และ *Micrococcus* sp. เชื้อสามารถทนต่ออุณหภูมิในการพาสเจอร์ไรส์ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาทีได้
      2.4.2 แบคทีเรียที่สร้างสปอร์ ได้แก่เชื้อ *Bacillus* และ *Clostridium* เชื้อสามารถทนต่ออุณหภูมิในการพาสเจอร์ไรส์ได้ ทำให้นมพาสเจอร์ไรส์เน่าเสีย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แบคทีเรียในน้ำนมส่วนมากจะปนเปื้อนมาจากภาชนะ เช่น ถังใส่นม หรืออุปกรณ์การรีดนม ผู้รีดนม ตลอดจนสุขาภิบาลของคอกวัว เป็นต้น แบคทีเรียที่พบในน้ำนมได้แก่แบคทีเรียในกลุ่ม Lactobacillaceae และ Micrococcaceae สำหรับแบคทีเรียประจำถิ่นที่มักพบได้*แก่ Lactobacillus casei, L. acidophilus, L. plantarum, L. brevis, Streptococcus lactis* และ *S. cremoris* แบคทีเรียเหล่านี้ไม่ทำให้เกิดโรค แต่จะหมักน้ำตาลแลคโตสในน้ำนมแล้วให้กรดแลคติคและกรดอื่นๆ ทำให้พีเอชของน้ำนมลดลง นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียอื่นๆ เช่น *Micrococcus, Staphylococcus, Pseudomonas, Bacillus, E. coli* และแบคทีเรียโคลิฟอร์ม ถ้าแบคทีเรียเหล่านี้เจริญเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วจะทำให้น้ำนมมีคุณภาพเปลี่ยนไป เช่น *S. cremoris* ทำให้น้ำนมมีรสเปรี้ยว เชื้อ *Pseudomonas syncyanea* ทำให้น้ำนมเป็นสีน้ำเงิน และ *Enterobacter aerogenes* ทำให้น้ำนมเป็นเมือก

เนื่องจากน้ำนมเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางอาหารสูง จึงเหมาะกับการเจริญของจุลินทรีย์ต่างๆ เป็นผลให้คุณภาพของนมเปลี่ยนแปลงไป ดังนั้นการเก็บรักษาน้ำนมดิบไว้ที่อุณหภูมิต่ำจะช่วยป้องกันหรือลดการสูญเสียคุณภาพของน้ำนมดิบเนื่องจากจุลินทรีย์ลงได้ สำหรับอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำนมดิบแต่ละช่วงนั้น จะพบเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดที่เจริญได้ดีแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 เชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีในน้ำนมดิบเก็บที่อุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิที่เก็บน้ำนมดิบ (องศาเซลเซียส)	เชื้อจุลินทรีย์
0-5	*Pseudomonas* spp.
5-10	*Pseudomonas* spp., *Proteus vulgaris, Micrococcus sp., Alcaligenes viscolactis* และ *A. marshallii*
10-15	*Streptococcus* หลายชนิด ได้แก่ *S. lactis, S. acidominimus, S. faecalis, S. agalactiae, S. durans, S. dysagalactiae* และ *S. uberis*
15-30	พบพวก *S. lactis*
30-40	*Aerobacter aerogenes, E. coli* และ *Lactobacillus* หลายชนิด ได้แก่ *L. bulgaricus, L. casei, L. brevis, L. caucasicus, L. fermenti, L. lactis, L.helveticus, L.plantarum, L.thermophilus* และ *L. leichmannii*
40-50	*Lactobacillus* หลายชนิด ได้แก่ *L. lactis, L. fermenti, L.helveticus, L. bulgaricus, L. caucasicus, L.thermophilus* นอกจากนี้ยังพบ *S. faecalis, S. thermophilus* และยีสต์

ที่มา: บัญญัติ (2534)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Heddeghem และ Vlaemynck (1992) รายงานการพบเชื้อแบคทีเรียที่เป็นปัญหากับคุณภาพของน้ำนมดิบคือ *Bacillus cereus* ซึ่งเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถทนต่อความร้อนได้ดี และยังสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ สามารถป้องกันแบคทีเรียชนิดนี้ได้ด้วยกระบวนการรีดนมและกระบวนการผลิตที่ถูกต้องตามหลักสุขาภิบาล จุลินทรีย์ที่มักพบในน้ำนมดิบเป็นแบคทีเรียพวกไซโครโทรป (psychrotrophs) เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ ถึงแม้เชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้จะสามารถทำลายได้ง่ายด้วยการพาสเจอร์ไรส์ แต่เอนไซม์โปรตีเอส (proteases) และไลเปส (lipases) ที่เชื้อสร้างขึ้นยังคงหลงเหลืออยู่ในน้ำนมและทำให้กลิ่น รส ของน้ำนมเสียไป เช่น เชื้อ *Pseudomonas* (Cousin, 1982) แบคทีเรียกลุ่มมีโซไฟล์ (mesophiles) ทำให้คุณภาพของน้ำนมดิบลดลงเมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน หรือระหว่างการขนส่งไปยังโรงงานนมหรือศูนย์รับนมโดยที่ไม่ได้แช่เย็น (ชูรัฐ, 2531) นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียกลุ่มเทอร์โมดิวริค (thermodurics), แบคทีเรียกลุ่มเทอร์โมไฟล์ (thermophiles), แบคทีเรียโคลิฟอร์ม (coliform) รวมทั้งพวกที่ทำให้เกิดโรค (pathogens) เช่น *Listeria*, *Campylobacter* และ *Escherichia coli* O157:H7

2.3 การเก็บรักษาคุณภาพน้ำนมดิบ (FAO, 1993)

ในขบวนการเก็บรักษาคุณภาพน้ำนมดิบให้ยาวนานนั้น ขึ้นอยู่กับความสะอาดของน้ำนมดิบ อุณหภูมิหรือความเย็นของนม และได้รับการขนส่งทันทีหลังการรีดนม นอกจากนี้ยังต้องมีการลดอุณหภูมิน้ำนมให้เย็นลงเพื่อป้องกันการบูดหรือเน่าเสีย หรือใช้วิธีการให้ความร้อนหรือการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์นม และการใช้สารเคมีในการเก็บรักษาน้ำนม ซึ่งวิธีนี้ต้องได้รับคำแนะนำจากเจ้าหน้าที่ส่งเสริมหรือเจ้าหน้าที่จากศูนย์รวมน้ำนม อายุการเก็บน้ำนมดิบขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ดังนี้

1. อุณหภูมิ และสุขลักษณะของน้ำนม (hygiene) คุณภาพของน้ำนมจะแตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 2.5
2. การเก็บน้ำนมไว้ในที่ร่มหรือในที่มืดและมีระบบการถ่ายเทอากาศดี
3. การลดอุณหภูมิของน้ำนม เช่น ลดอุณหภูมิโดยวิธี cooling tank

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2.5 คุณภาพของน้ำนมดิบและการเก็บรักษาในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน

องศาเซลเซียส	น้ำนมดิบที่สะอาดมาก (very clean milk)	น้ำนมดิบที่สะอาด (clean milk)	น้ำนมดิบที่สกปรก (dirty milk)
4	คุณภาพดี	คุณภาพดี	คุณภาพต่ำ (poor quality)
10	คุณภาพดี	คุณภาพไม่ดี (bad quality)	เน่าเสีย (very bad quality)
20	คุณภาพต่ำ	เริ่มเสีย (Turned bad)	เริ่มเสีย
35	คุณภาพไม่ดี	เริ่มเสีย	เริ่มเสีย

ที่มา: FAO (1993)

อุณหภูมิต่ำสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ เนื่องจากไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในเซลล์แบคทีเรีย โดยทำให้เอนไซม์ทำงานได้ช้าลงส่งผลให้กิจกรรมของเซลล์ลดลงด้วย และทำให้โปรตีนภายในเซลล์มีความหนืดเพิ่มมากขึ้น จึงมีผลต่อระบบคอลลอยด์ของโปรโตพลาสซึม ทำให้เมตาบอลิซึมของเซลล์ลดลงหรือถูกทำลาย เซลล์ไม่สามารถขับสารพิษที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ทำให้เกิดการสะสมสารพิษเป็นอันตรายต่อเซลล์ในที่สุด เชื้อจุลินทรีย์จะตายอย่างช้าๆ และถ้าใช้อุณหภูมิต่ำจนเกิดผลึกน้ำแข็งขึ้นภายในเซลล์เชื้อจุลินทรีย์จะถูกทำลายได้ เพราะเซลล์เกิดการฉีกขาด (บัญญัติ, 2534 ; Ingraham และ Ingraham, 2000)

2.4 โปรตีนที่ทำหน้าที่ป้องกันเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำนม (antimicrobial protein in milk)

ในน้ำนมมีโปรตีนที่ทำหน้าที่ป้องกันการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ตามธรรมชาติให้กับลูกที่เกิดมาใหม่ ได้แก่ แลคโตเฟอร์ริน (lactoferrin) แลคโตเปอร์ออกซิเดส (lactoperoxidase) ไลโซไซม์ (lysozyme) และ เอ็น-อะซีทิล-เบต้า-ดี- กลูโคซามินิเดส (N-acetyl-β-D-glucosaminidase, NAGase) น้ำนมของสัตว์ต่างชนิดกัน มีปริมาณของโปรตีนที่ทำหน้าที่ยับยั้งการเจริญเชื้อจุลินทรีย์แตกต่างกัน ในน้ำนมวัวมีแลคโตเปอร์ออกซิเดสในปริมาณที่สูง แต่มีแลคโตเฟอร์รินและไลโซไซม์ต่ำ ในขณะที่ในน้ำนมคนจะมีแลคโตเฟอร์รินและไลโซไซม์ในปริมาณสูงกว่าแลคโตเปอร์ออกซิเดส (Losnedahl และคณะ, 1996)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แลคโตเฟอร์ริน (lactoferrin)

แลคโตเฟอร์รินเป็นไกลโคโปรตีนที่เชื่อมต่ออยู่กับเหล็ก (iron-biding glycoprotein) น้ำหนัก 80 kDa พบในน้ำคัดหลั่งของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น น้ำนม น้ำตา น้ำลาย และบางส่วนของเซลล์เม็ดเลือดขาว ในนมน้ำเหลืองวัวมีแลคโตเฟอร์ริน 0.5-1 กรัมต่อลิตร และน้ำนมวัวมีแลคโตเฟอร์รินเฉลี่ยประมาณ 0.2 กรัมต่อลิตร น้ำนมและนมน้ำเหลืองของคนมี 2-4 และ 6-8 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แลคโตเฟอร์รินทำหน้าที่เป็นสารต่อต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ป้องกันการติดเชื้อในลำไส้ ส่งเสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันและโปรตีนต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ตัวอื่นๆ

แลคโตเฟอร์รินยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้โดยการแย่งธาตุเหล็กที่จำเป็นในการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อขึ้นอยู่กับความต้องการธาตุเหล็กของเชื้อ ปริมาณของธาตุเหล็กที่มีอยู่ และระดับความอิ่มตัวของธาตุเหล็กของแลคโตเฟอร์ริน

แลคโตเฟอร์รินสามารถยับยั้งการเจริญ (bacteriostatic) ของแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งเป็นเชื้อที่ต้องการธาตุเหล็กในปริมาณที่สูงได้ดี เช่น แบคทีเรียโคลิฟอร์ม และยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกบางตัว เช่น *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* sp. และ *Listeria monocytogenes* แลคโตเฟอร์รินไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแลคติคเอซิดแบคทีเรียในกระเพาะและลำไส้ได้ เนื่องจากเป็นเชื้อที่มีความต้องการธาตุเหล็กต่ำ และยังเป็นตัวการที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อ *Streptococus* sp. และ *Vibrio cholerae* (Losnedahl และคณะ, 1996)

แลคโตเปอร์ออกซิเดส (Lactoperoxidase)

เอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (oxidation) พบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในน้ำลาย น้ำตา ในหลอดลม (bronchial) ช่องจมูก น้ำคัดหลั่งจากลำไส้เล็ก (intestinal secretion) และน้ำนม เรียกเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในน้ำนมว่า **เอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส** โดยปกติแล้วในน้ำนมวัวมีเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสประมาณ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ในนมน้ำเหลืองมีเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสในปริมาณที่ต่ำมากและจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังคลอดลูก 4-5 วัน ในน้ำนมคนเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ (enzyme activity) ต่ำกว่าน้ำนมวัวประมาณ 20 เท่า ปริมาณเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสในน้ำนมขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของวัว อายุ ระยะการให้นม (lactation stage) อาหาร และสุขภาพของแม่วัว (Korhonen และคณะ, 1977) ลำพังเพียงเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสเพียงอย่างเดียวไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ จะต้องทำงานร่วมกับไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์และไธโอไซยาเนตเกิดเป็นระบบยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียตามธรรมชาติเรียกว่า **"ระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส**

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(lactoperoxidase system)" ตามธรรมชาติจะพบไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์และไธโอไซยาเนตในเนื้อเยื่อของสัตว์และคนในปริมาณที่ต่ำมาก ปริมาณของสารไธโอไซยาเนตในน้ำนมนั้นมีความผันแปรมากขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของสัตว์ ชนิดของสัตว์ สุขภาพของเต้านม (udder health) อายุของแม่วัว ระยะการให้นม (lactation stage) และชนิดของอาหารที่ใช้เลี้ยงแม่โค (Heuvelink และคณะ, 2002; Korhonen และคณะ, 1977) การให้อาหารประเภทหญ้า พืชตระกูลกระหล่ำ (Brassica) (FAO, 1999, Kussendrager, 2000) พืชตระกูลถั่วบางชนิด (clover) ซึ่งเป็นอาหารสัตว์ที่มีสารประกอบซัลเฟอร์สูง และมันสำปะหลังตากแห้ง (cassava hay) ช่วยเพิ่มปริมาณของไธโอไซยาเนตในน้ำนมดิบให้มากขึ้นได้ จากงานทดลองของ Wanapat และคณะ (2001) พบว่าการเลี้ยงวัวนมด้วยมันสำปะหลังตากแห้งนานหนึ่งสัปดาห์ก่อนการรีดนมทำให้น้ำนมมีปริมาณของไธโอไซยาเนตเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในน้ำนมดิบของวัวตามธรรมชาติมีปริมาณของไธโอไซยาเนตอยู่ประมาณ 4-5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งน้อยกว่าที่พบในเลือดถึง 20 เท่า (Korhonen และคณะ, 1977) พบในน้ำลายของคน 50-300 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำย่อยของคน 40-50 มิลลิกรัมต่อลิตร ฉะนั้นจะเห็นว่าในน้ำนมดิบนั้นมีปริมาณของไธโอไซยาเนตอยู่น้อยมาก ส่วนไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์จะพบเพียงเล็กน้อยในน้ำนมดิบที่รีดเสร็จใหม่ๆ โดยได้จากกระบวนการฟาโกไซโตซิส (phagocytosis) และการเจริญของเชื้อ lactobacilli, lactococci และ streptococci ในสภาวะที่มีออกซิเจน (Reiter และ Perraudin, 1991 อ้างโดย Kussendrager และ Hooijdonk, 2000)

Fonteh และคณะ (2001) ได้ศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลกระทบต่อความผันแปรของเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส พบว่าปัจจัยที่มีผลกระทบต่อความผันแปรของเอนไซม์ ได้แก่ ระยะเวลาที่เก็บรักษาน้ำนมดิบ ฤดูกาล ระยะเวลาการให้นม (lactation) และชนิดของสัตว์ให้นม โดยได้ทดลองหาค่ากิจกรรม (activity) ของเอนไซม์ในน้ำนมดิบที่เก็บในฤดูหนาวเปรียบเทียบกับฤดูร้อน เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 วัน พบว่าน้ำนมวัวในฤดูหนาวมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นและลดลงเป็นวงจร (cyclic nature of the LP-system) โดยค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากเก็บน้ำนมวัวดิบในตู้เย็นนาน 2 วัน แต่เมื่อเก็บไว้นาน 4 วัน ค่ากิจกรรมเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและจะลดลงอีกครั้งหลังเก็บน้ำนมนาน 7 วัน ขณะที่น้ำนมดิบที่เก็บในฤดูร้อนมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

น้ำนมวัวในฤดูร้อนมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงกว่าน้ำนมในฤดูหนาวมากโดยน้ำนมดิบในฤดูร้อนมีค่ากิจกรรม 2.5 units/ml และในฤดูหนาว 0.5 units/ml เนื่องจากเกษตรกรมีระบบการให้อาหารที่แตกต่างกัน โดยในฤดูร้อนให้อาหารแม่โคด้วยการปล่อยให้เล็มหญ้าในทุ่งหญ้า ซึ่งในฤดูหนาวไม่สามารถทำได้ จากอาหารที่ใช้เลี้ยงแม่โคที่แตกต่างกันทำให้ปริมาณของไธโอไซยาเนตในน้ำนมแตกต่างกันและส่งผลกระทบต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในที่สุด และพบว่าชนิดของสัตว์ให้นมก็มีผลต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสด้วยโดยน้ำนมของวัวมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าน้ำนมแพะมากคือ 2.09 และ 0.15 units/ml ตามลำดับ

Fonteh และคณะ (2002) ได้รายงานความแปรปรวนของค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสในน้ำนมวัวและแพะ และหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไธโอไซยาเนตกับค่ากิจกรรมเอนไซม์ในน้ำนมดิบ พบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ และปริมาณของไธโอไซยาเนตในน้ำนมดิบมีความแปรปรวนสูงแม้จะเป็นน้ำนมที่ได้จากวัวตัวเดิม ปัจจัยที่ทำให้เกิดความแปรปรวนของค่ากิจกรรมเอนไซม์และปริมาณของไธโอไซยาเนตก็คือ วัวแต่ละตัว ชนิดของสัตว์ อาหารที่ใช้เลี้ยง และระยะของการให้นม (stage of lactation) โดยเฉลี่ยแล้วน้ำนมวัวมีค่ากิจกรรมเอนไซม์และปริมาณไธโอไซยาเนตเป็น 2.3±1.0 units/ml และ 8.5±5.1 μg/ml ตามลำดับ ในน้ำนมแพะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์และปริมาณไธโอไซยาเนตเป็น 0.1±0.06 units/ml และ 7.0±2.59 μg/ml ตามลำดับ และพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันระหว่างปริมาณของไธโอไซยาเนตกับค่ากิจกรรมเอนไซม์ทั้งในน้ำนมวัวและน้ำนมแพะ

Zapico และคณะ (1991) ได้ศึกษาอิทธิพลของพันธุ์สัตว์ ชนิดของสัตว์ และวันที่ให้น้ำนมในช่วงแลคเตชั่น (day of lactation) ที่มีต่อองค์ประกอบของระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสในน้ำนมแพะ โดยวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสและปริมาณของไธโอไซยาเนตตลอดระยะการให้นม 5 เดือน พบว่าแพะพันธุ์วีราตะ (Verata) มีค่ากิจกรรมเอนไซม์โดยเฉลี่ยต่ำกว่าพันธุ์เมอเซียโน-กรานาดินา (Murciano-Grandina) คือ 0.95 และ 2.15 units/ml ตามลำดับ โดยแพะทั้ง 2 พันธุ์มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ต่ำสุดในช่วง 24 ชั่วโมงแรกหลังจากคลอดลูก น้ำนมแพะพันธุ์วีราตะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดในช่วงวันที่ 135-150 ของการให้นม ขณะที่แพะพันธุ์เมอเซียโน-กรานาดินามีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดในช่วงวันที่ 60-75 ของการให้นม น้ำนมแพะพันธุ์วีราตะและเมอเซียโน-กรานาดินามีปริมาณไธโอไซยาเนตโดยเฉลี่ยเป็น 5.76 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 3.20 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยน้ำนมแพะพันธุ์เมอเซียโน-กรานาดินาจะมีปริมาณไธโอไซยาเนตสูงที่สุดในช่วงสุดท้ายของระยะการให้นม (final lactation stage)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Shoos และคณะ (1999) ได้รายงานความสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบของระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสในน้ำนมแพะ พบว่า น้ำนมแพะมีค่ากิจกรรมที่สูงถึง 4.45±1.94 units/ml มีปริมาณไธโอไซยาเนต 10.29±4.76 μg/ml และไฮโปไธโอไซยาไนต์แอนไอออน (OSCN) 1.11±0.84 μg/ml โดยพบว่า ระยะของการให้นม อายุของแพะ และองค์ประกอบของนมไม่มีผลกระทบกับค่ากิจกรรมเอนไซม์ แต่ปริมาณของไธโอไซยาเนตในน้ำนมขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารที่ใช้เลี้ยงและระยะการให้นมของแพะ โดยจะมีปริมาณไธโอไซยาเนตสูงที่สุดในช่วงเดือนแรกของการให้นมจากนั้นจะค่อยๆ ลดลงและจะเพิ่มขึ้นอีกครั้งในเดือนที่ 5 และลดลงจนต่ำสุดในเดือนที่ 7 ของการให้นม ค่ากิจกรรมเอนไซม์มีความสัมพันธ์แบบผกผันกับปริมาณของไธโอไซยาเนต แต่มีความสัมพันธ์แบบตามกัน (positive) กับปริมาณของไฮโปไธโอไซยาไนต์แอนไอออน นั่นคือเมื่อมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงจะเกิดการออกซิไดส์ไธโอไซยาเนตได้เร็วมากขึ้นทำให้ปริมาณของไธโอไซยาเนตลดลงและเกิดไฮโปไธโอไซยาไนต์แอนไอออนเพิ่มมากขึ้นด้วย

Althaus และคณะ (2001) รายงานอิทธิพลของเวลาและระยะการให้น้ำนมที่มีต่อองค์ประกอบของระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสในน้ำนมแกะ พบว่าการเก็บรักษาน้ำนมดิบไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในระยะเวลาที่แตกต่างกันมีผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ ปริมาณไธโอไซยาเนต และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ โดยค่ากิจกรรมเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นหลังจากเก็บน้ำนมไว้นาน 12-24 ชั่วโมง หลังจาก 48 ชั่วโมงค่ากิจกรรมจะลดลงอย่างรวดเร็ว สำหรับปริมาณไธโอไซยาเนตและไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์นั้นจะลดลงอย่างต่อเนื่องหลังจากเก็บน้ำนมนาน 6-48 ชั่วโมง และวันที่ของการให้นมในช่วงแลคเตชั่น (day of lactation) ก็มีผลต่อความแปรปรวนของค่ากิจกรรมเอนไซม์ ปริมาณไธโอไซยาเนต และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในน้ำนมดิบ

ไลโซไซม์ (Lysozyme)

ไลโซไซม์เป็นเอนไซม์ที่พบในน้ำนมของสัตว์บางชนิดโดยเฉพาะอย่างยิ่งในน้ำนมคนและไข่ขาว ไลโซไซม์มีอยู่ 2 ชนิด ชนิดแรกคือไลโซไซม์ที่พบได้ในส่วนของไข่ขาวของไข่ไก่ เรียกว่า chicken-type หรือ c-lysozyme อีกชนิดหนึ่งพบในไข่ขาวของห่าน เรียกว่า goose-type หรือ g-lysozyme เอนไซม์ไลโซไซม์ที่พบในคนและม้าเป็นชนิด c-lysozyme ในน้ำนมวัวพบได้ทั้ง c- และ g-lysozyme เนื่องจากเอนไซม์ไลโซไซม์ทั้ง 2 ชนิดพบได้ในของเหลวในร่างกายและเนื้อเยื่อของกระเพาะอาหาร เอนไซม์ไลโซไซม์สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้โดยการทำลายพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) ระหว่างโมเลกุลของเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ในส่วนของผนังเซลล์ (cell wall) ของแบคทีเรีย (Losnedahl และคณะ, 1996)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์ในน้ำนมวัวต่ำมากเมื่อเทียบกับน้ำนมคนซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์สูงถึง 0.12 กรัมต่อลิตร โดยนมน้ำเหลืองของคนมีปริมาณของเอนไซม์ไลโซไซม์สูงที่สุด คือ 0.14-0.7 มิลลิกรัมต่อลิตร และพบในน้ำนม 0.07-0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร (Korhenen, 1977) ในน้ำนมวัวค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์ถูกจำกัดด้วยการเป็นเต้านมอักเสบ (mastitis) และมีปริมาณโซมาติคเซลล์สูง (somatic cell) การให้ความร้อนที่ 75 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที กับน้ำนมวัวจะทำลายค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์ลงร้อยละ 25 เอนไซม์ไลโซไซม์ในน้ำนมคนมีความทนทานต่อความร้อนมากกว่าน้ำนมวัว โดยปกติแล้วเอนไซม์ไลโซไซม์มักอยู่รวมกับแลคโตเฟอร์ริน (lactoferrin) หรืออิมมูโนกลอบูลิน (immunoglobulin) เอนไซม์ไลโซไซม์ยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* โดยการทำงานร่วมกับอิมมูโนกลอบูลิน เอ และเมื่อรวมตัวกับแอสคอร์เบท (ascorbate) และเปอร์ออกไซด์ (peroxide) จะฆ่าเชื้อ *Salmonella* ในน้ำนมได้

เอ็น-อะซีทิล-เบต้า-ดี- กลูโคซามินิเดส (N-acetyl-β-D-glucosaminidase, NAGase)

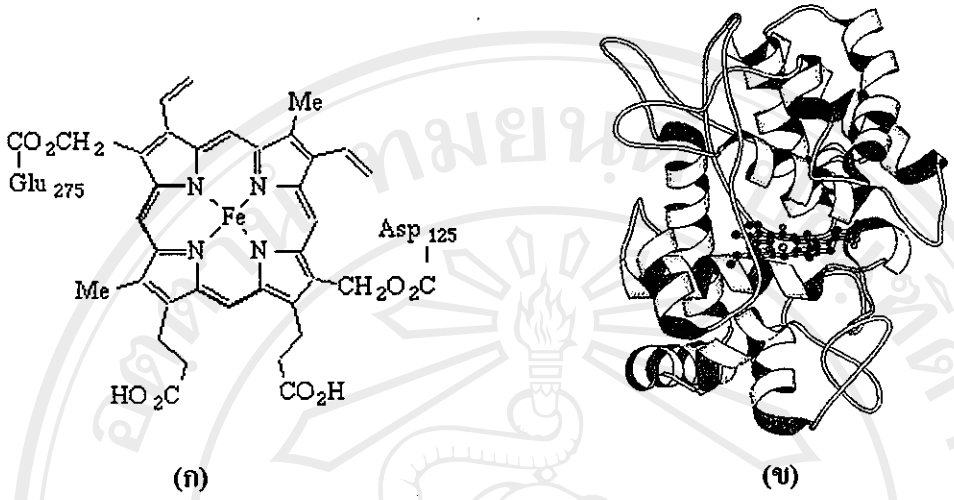
มีการหลั่งเอนไซม์เอ็น-อะซีทิล-เบต้า-ดี- กลูโคซามินิเดส เมื่อมีการอักเสบของเนื้อเยื่อจึงมักใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงการอักเสบของเนื้อเยื่อเนื่องจากโรคเต้านมอักเสบ นอกจากนี้ยังพบในน้ำคัดหลั่งอื่นๆ ของวัว เอนไซม์ NAGase พบในน้ำนมวัวในปริมาณต่ำ จะทำงานได้ดีขึ้นเมื่ออยู่ร่วมกับแลคโตเฟอร์ริน มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคเต้านมอักเสบ ได้แก่ *Actinomyces pyrogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalatiae* และ *Pseudomonas aeroginosa* แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* และ *Enterobacter aerogenes*

- **ลักษณะของเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส**

เอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสเป็นเอนไซม์ในกลุ่มออกซิโดรีดักเทส E.C 1.11.1.7 เป็นไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ที่ประกอบด้วยโพลีเปบไทด์สายเดี่ยว (single strand polypeptide) มีกรดอะมิโน 612 residues น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 78 kDa เชื่อมอยู่กับฮีม (heme) ด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (prosthetic heme group) มีเหล็กรวมอยู่ด้วย 1 โมเลกุลต่อโมลของเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส และมีส่วนของคาร์โบไฮเดรทอยู่ประมาณร้อยละ 10 ดังแสดงในภาพที่ 2.2 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับพีเอชของน้ำนม (แสดงในภาพที่ 2.3) ที่พีเอชต่ำกว่า 4 อาจทำให้เอนไซม์เสื่อมสภาพ (denature) ได้ โดยพีเอชที่เหมาะสมกับการเกิดปฏิกิริยามากที่สุด (optimum pH) คือ 6.7 มีค่า isoelectric point 9.6 ทำให้ไม่สามารถทำปฏิกิริยาที่พีเอชสูงกว่า 10 (Blel และคณะ, 2001) ทนต่ออุณหภูมิการพาสเจอร์ไรส์ที่ 63 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หรือ

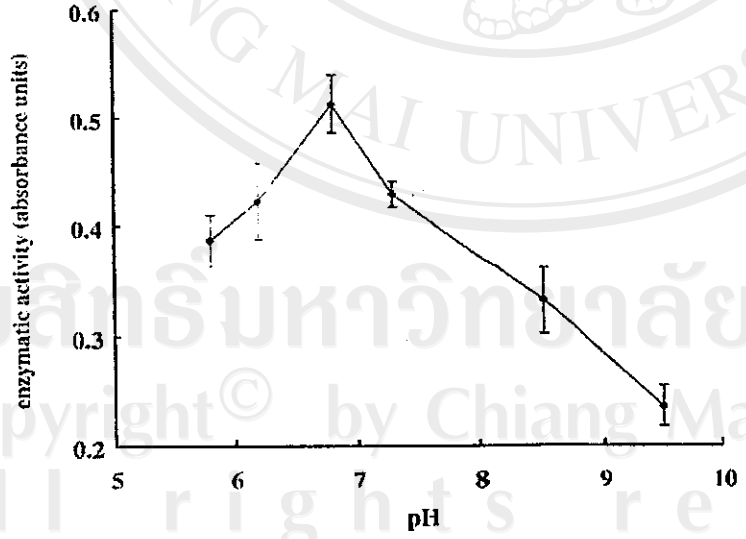
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

72 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที ถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 2.5 วินาที (Walstra และคณะ, 1999)



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างของเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสที่มีส่วนของ prosthetic group เชื่อมอยู่กับส่วนของโปรตีน (ก) สูตรโครงสร้าง (ข) โครงสร้าง 3 มิติ

ที่มา: http://metallo.scripps.edu/PROMISE/2CYP.htm



ภาพที่ 2.3 ผลของพีเอชต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส

ที่มา: Althaus *et al.* (2001)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.5 การเกิดปฏิกิริยาของระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส

เอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสมีฮีมเป็นองค์ประกอบ ใช้ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์เป็นตัวรับอิเล็กตรอน (electron acceptor) ระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสเกิดจากเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสไปเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (oxidation) ของสารไธโอไซยาเนต (SCN^-) ด้วยไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ทำให้เกิดระบบป้องกันเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำนม (Thomas, 1981) ดังสมการ

$$H_2O_2 + 2SCN^- + 2H^+ \xrightarrow{\text{peroxidase}} 2H_2O + (SCN)_2 \quad \text{.....(1)}$$

$$(SCN)_2 + H_2O \longrightarrow HOSCN + H^+ + SCN^- \quad \text{.....(2)}$$

$$HOSCN \rightleftharpoons OSCN^- + H^+ \quad \text{.....(3)}$$

สมการรวม คือ

$$H_2O_2 + SCN^- \longrightarrow OSCN^- + H_2O \quad \text{..... (4)}$$

จากปฏิกิริยาของเอนไซม์ในสมการที่ (1) จะได้ไธโอไซยาโนเจน (thiocyanogen ; $(SCN)_2$) เกิดขึ้นแต่สารนี้ไม่เสถียร (non-stable) จึงถูกไฮโดรไลส์ (hydrolyzed) ได้เป็นกรดไฮโปไธโอไซยานัส (hypothiocyanous acid; HOSCN) และไธโอไซยาเนต (thiocyanate; SCN^-) ดังสมการที่ (2) การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของไธโอไซยาเนตในสภาวะที่พีเอชเป็นกลางจะได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นไฮโปไธโอไซยาไนต์ ไอออน (hypothiocyanite ion; $OSCN^-$) ดังแสดงในสมการที่ 4

Thomas (1981) ศึกษาการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของไธโอไซยาเนตด้วยไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ของเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสในช่วงพีเอช 5-8 พบว่าสารที่ได้ส่วนใหญ่เป็นไฮโปไธโอไซยาไนต์ ไอออน หรือกรดไฮโปไธโอไซยานัส (hypothiocyanous acid; HOSCN) โดยสารทั้ง 2 สามารถเปลี่ยนรูปไป-กลับได้อย่างสมดุลโดยมีค่า p*Ka* เป็น 5.3 ดังสมการที่ (3) ดังนั้นปริมาณของกรดไฮโปไธโอไซยานัสจึงขึ้นอยู่กับพีเอชของสารละลาย โดยจะพบกรดไฮโปไธโอไซยานัสมากถึงร้อยละ 67 ในสารละลายที่มีค่าพีเอช 5 และมีปริมาณลดลงเมื่อค่าพีเอชเพิ่มมากขึ้น ที่พีเอช 6 พบกรดไฮโปไธโอไซยานัสร้อยละ 17 ที่พีเอช 7 พบกรดไฮโปไธโอไซยานัสร้อยละ 2 และที่พีเอช 8 จะพบกรดไฮโปไธโอไซยานัสเพียงร้อยละ 0.2 เท่านั้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทั้งไฮโปไธโอไซยาไนต์แอนไอออน และกรดไฮโปไธโอไซยานัสมีคุณสมบัติเป็นรีดิวซิงเอเจนท์ (reducing agent) ทำหน้าที่หลักในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ โดยจะไปทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับหมู่ซัลฟ์ไฮดริล (SH-group) ของเมมเบรนและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ metabolic ของแบคทีเรีย ดังสมการที่ (5) และ (6) ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ เกิดการรั่ว (leaking) ของโปแตสเซียมไอออน กรดอะมิโน และเปปไทด์ แบคทีเรียสูญเสียความสามารถในการลำเลียงกลูโคส กรดอะมิโน เพียวรีน (purines) ไพริมิดีน (pyrimidines) จึงไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีน ดีเอ็นเอ และอาร์เอนเอขึ้นภายในเซลล์ได้ ทำให้แบคทีเรียตายหรือไม่สามารถแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวนได้ (Thomas, 1981 ; Modi, 1991 ; Kussendrager และ Hooijdonk, 2000)

$$OSCN^- + \text{protein-SH} \longrightarrow \text{protein-S-SCN} + OH^- \quad \ldots\ldots\ldots\ldots (5)$$

$$HOSCN + \text{protein-SH} \longrightarrow \text{protein-S-SCN} + H_2O \quad \ldots\ldots\ldots\ldots (6)$$

กรดไฮโปไธโอไซยานัสจะทำหน้าที่ในการเข้าทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีกว่าไฮโปไธโอไซยาไนต์ไอออน เนื่องจากกรดไฮโปไธโอไซยานัสไม่มีประจุ ทำให้สามารถซึมผ่านชั้นของเมมเบรนที่มีคุณสมบัติเป็นไฮโดรโฟบิคได้ดีกว่าและไม่เกิดการผลักกันของประจุ (charge repulsion) ในขณะที่เข้าทำปฏิกิริยากับโปรตีนและสารชีวภาพ (biological material) อื่นๆ ภายในเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ ขณะที่ไฮโปไธโอไซยาไนต์แอนไอออนมีข้อจำกัดในการผ่านชั้นของเมมเบรนเข้าไปภายในเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ เนื่องมีประจุลบ ซึ่งเมมเบรนของเชื้อจะไม่ยอมให้สารที่มีประจุเป็นลบผ่านเข้าไปในเซลล์นอกจากสารตั้งต้น (substrate) ของระบบลำเลียงขนส่งเฉพาะ (specific transport system) เท่านั้น

Tenovuo และคณะ (1986) รายงานการพบสารผสมของกรดไฮโปไธโอไซยานัสและไฮโปไธโอไซยาไนต์ไอออน (HOSCN/OSCN) จากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสโดยพบสารผสมของกรดไฮโปไธโอไซยานัส และไฮโปไธโอไซยาไนต์ ไอออน มากที่สุดในสภาวะพีเอช $\leq$ 6 และจะมีปริมาณลดลงเมื่อพีเอชเพิ่มขึ้นจนถึงพีเอช 8 เนื่องจากไธโอไซยาเนตจะสามารถจับกับเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสได้ในสภาวะที่เป็นกรด (พีเอช < 6) เท่านั้น จะพบกรดไฮโปไธโอไซยานัสมากที่สุดและมีความคงตัวที่พีเอช 3 สามารถดูดกลืนแสงมากที่สุดที่ความยาวคลื่น 240 นาโนเมตร ขณะที่ไฮโปไธโอไซยาไนต์ ไอออน จะเกิดขึ้นมากที่สุดและมี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

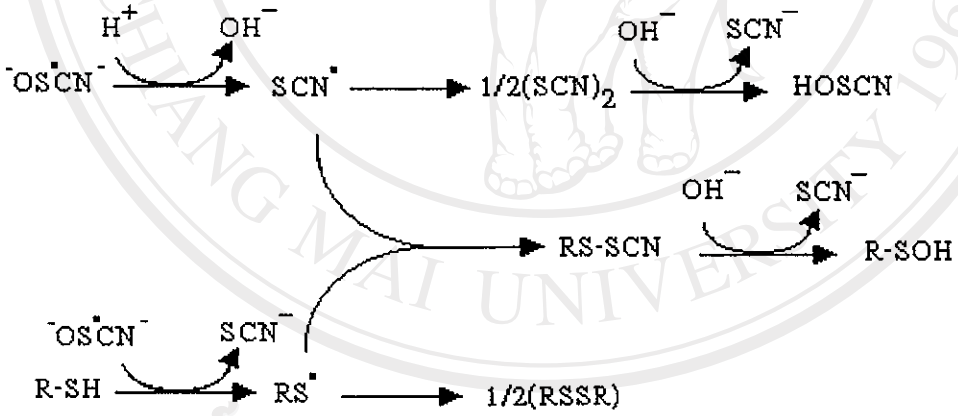
ความคงตัวที่พีเอช 8 สามารถดูดกลืนแสงมากที่สุดที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร และสารผสมของกรดไฮโปไธโอไซยานัส และไฮโปไธโอไซยาไนต์ ไอออนจะดูดกลืนแสงได้มากที่สุดที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร จะเกิดสารผสมของกรดไฮโปไธโอไซยานัสและไฮโปไธโอไซยาไนต์ ไอออน ($HOSCN/OSCN^-$) เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นภายในเวลา 1 นาที และจะค่อยๆ ลดลงเมื่อปล่อยให้เกิดปฏิกิริยานานเกิน 1 นาที

Modi และคณะ (1991) ศึกษาการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของไธโอไซยาเนตโดยไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ของเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสโดยใช้ไนโตรเจนไอโซโทรป 15 นิวเคลียร์แมกนีติกเรโซแนนส์ (^{15}N Nuclear Magnetic Resonance) และออฟติคอลสเปกตรัล (Optical Spectral) หาความเข้มข้นของไธโอไซยาเนตและไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในสภาวะที่มีพีเอชแตกต่างกัน โดยพบว่าสารที่ได้จากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสก็คือไฮโปไธโอไซยาไนต์ ไอออน (hypothiocyanite ion; $OSCN^-$) และพบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของไฮโปไธโอไซยาไนต์ ไอออน กับปริมาณของไธโอไซยาเนตและไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ โดยพบว่าจะมีปริมาณของไฮโปไธโอไซยาไนต์ ไอออนมากที่สุด เมื่อใช้ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์และไธโอไซยาเนตในปริมาณโมล่าห์เท่ากัน ($[H_2O_2]/[SCN^-] = 1$) ที่สภาวะพีเอชน้อยกว่า 6 และไฮโปไธโอไซยาไนต์ ไอออน จะสลายตัวกลับไปเป็นไธโอไซยาเนตได้อย่างช้าๆ แต่ถ้าใช้ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์และไธโอไซยาเนตในอัตราส่วนที่มากกว่า 2 ($[H_2O_2]/[SCN^-] > 2$) จะพบสารไซยาไนด์ (cyanide; CN^-) เกิดขึ้นภายในเวลา 2-3 นาที และไซยาไนด์สามารถจับกับเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส (LPO-CN) แล้วทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสได้ (catalytically inactive) และในสภาวะพีเอชมากกว่า 8 จะไม่เกิดปฏิกิริยาของระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส เนื่องจากไธโอไซยาเนตไม่สามารถจับกับเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสได้ ซึ่งในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของไธโอไซยาเนตด้วยไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์นั้น จะต้องมีการจับกันของไธโอไซยาเนตกับเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส (enzyme-bound oxidizable substrate (SCN^-)) ขึ้นมาก่อน จึงจะสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของไธโอไซยาเนตได้ และได้ศึกษาถึงความสามารถในการฆ่าเชื้อ *Streptococcus cremoris* 972 ของระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส โดยวัดปริมาณของสารต้านแบคทีเรียด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร และวัดปริมาณของออกซิเจนที่เชื้อแบคทีเรียนำไปใช้ (oxygen uptake) ด้วยอิเลคโทรดออกซิเจน (oxygen electrode) พบว่าสารไฮโปไธโอไซยาไนต์ ไอออนจะเปลี่ยนกลับไปเป็นไธโอไซยาเนตได้ในสภาวะที่เชื้อแบคทีเรียอยู่ด้วยและจะเกิดการยับยั้งการใช้ออกซิเจน (inhibition of oxygen uptake)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ของเชื้อ *S. cremoris* ได้มากที่สุด เมื่อใช้ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์และไธโอไซยาเนตในอัตราส่วนโมล่าห์เท่ากัน (equimolar) ในสภาวะพีเอชต่ำกว่า 6 เมื่อพีเอชเพิ่มสูงขึ้นการยับยั้งการใช้ออกซิเจนโดยเชื้อจะลดลง และจะไม่พบการยับยั้งการใช้ออกซิเจนของเชื้อที่พีเอช 8 และเมื่อใช้ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์มากกว่าไธโอไซยาเนต สารที่ทำหน้าที่ในการยับยั้งการใช้ออกซิเจนของเชื้อก็คือกรดไฮโปไธโอไซยานัสและไฮโปไธโอไซยาไนต์ ไอออน (HOSCN/OSCN$^-$) และพบว่าไซยาไนด์และไธโอไซยาเนตมีผลในการยับยั้งการใช้ออกซิเจนของเชื้อได้น้อยมาก

กรดไฮโปไธโอไซยานัสและไฮโปไธโอไซยาไนต์ ไอออน (HOSCN/OSCN$^-$) สามารถสลายตัวกลับเป็นไธโอไซยาเนต (SCN$^-$) ได้เนื่องจากการทำปฏิกิริยากับเชื้อแบคทีเรีย และการเกิดปฏิกิริยาออโตรีดักชั่น (autoreduction) สารไฮโปไธโอไซยาไนต์แอนไอออนที่เหลือจากการเข้าทำปฏิกิริยากับแบคทีเรียจะถูกเปลี่ยนกลับไปเป็นไธโอไซยาเนตภายในเวลา 2-3 ชั่วโมง (Thomas, 1981 ; Modi และคณะ, 1991) ดังภาพที่ 2.4 ขณะที่ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์จะเข้าทำปฏิกิริยาจนหมดอย่างรวดเร็ว

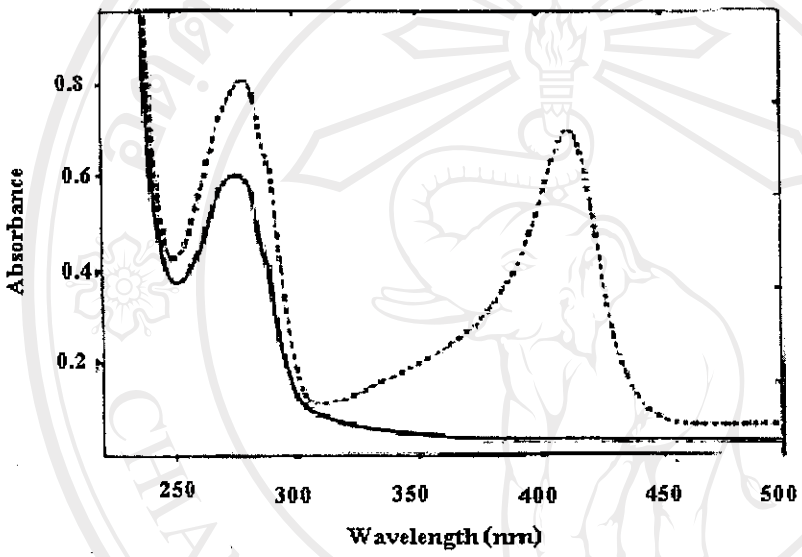


ภาพที่ 2.4 การเปลี่ยนสารไฮโปไธโอไซยาไนต์แอนไอออน (OSCN$^-$) กลับไปเป็นสารไธโอไซยาเนต (SCN$^-$)

ที่มา: Ott (2001)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสสกัดแยกได้จากน้ำนมดิบ เช่น ในน้ำนมวัว 20 ลิตร สามารถสกัดแยกเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสได้ประมาณ 0.13-0.27 กรัม ซึ่งยืนยัน (confirmation) การเป็นเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสได้โดยใช้ UV/Vis Spectroscopy วัดสเปกตรัมการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 408 และ 280 นาโนเมตร (A_{408}/A_{280}) เนื่องจากฮีม (heme) ดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 408 นาโนเมตร และ aromatic protein backbone ของเอนไซม์ ดูดกลืนแสงได้ดีที่ 280 นาโนเมตร (Ott, 2001) ลักษณะของสเปกตรัมที่ได้แสดงในภาพที่ 2.5



ภาพที่ 2.5 ลักษณะสเปกตรัมของเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสที่ A_{408}/A_{280}

ที่มา: Ott (2001)

2.6 การใช้ระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส ในการเก็บรักษาน้ำนมดิบ

มีการศึกษาประสิทธิภาพของระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสในการชะลอหรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในน้ำนมดิบเป็นจำนวนมาก พบว่าระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบได้ดีกว่าแกรมบวก ลักษณะของการควบคุมและยับยั้งการเจริญเชื้อจุลินทรีย์มี 2 ลักษณะ คือ สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด (bactericidal effect) ส่วนใหญ่แล้วจะเป็นแบคทีเรียแกรมลบ และแบคทีเรียที่ให้ผลคาตาเลสเป็นบวก (catalase positive bacteria) เช่น coliform, *Salmonella* และ *Pseudomonas* (FAO, 1999 ; Wolfson และ Sumner, 1993) และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้เพียงบางส่วนเท่านั้น เชื้อที่หลงเหลืออยู่จะสามารถกลับมาเจริญได้อีกครั้ง (bacteriostatic effect) เช่น *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* และ *Lactobacilli* (Nichol และคณะ , 1995) ระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเป็นแบบ bacteriostatic เป็นหลัก ดังนั้น จึงไม่ได้เป็นปกปิดหรือเปลี่ยนแปลงคุณภาพของน้ำนมที่ไม่ดีให้มีคุณภาพที่ดีขึ้นได้ เมื่อทำการตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาก็จะทราบถึงคุณภาพที่แท้จริงของน้ำนมดิบได้อย่างถูกต้อง (Joint FAO/WHO, 1991)

มีงานทดลองเติมสารไธโอไซยาเนตและ/หรือไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์จากภายนอกเพิ่มลงไปในน้ำนมดิบ เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเชื้อจุลินทรีย์ของระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส ดังนี้

Björck และคณะ (1975) ศึกษาการใช้ระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสควบคุมเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม psychrotroph และแบคทีเรียแกรมลบตัวอื่นๆ ด้วยการเพิ่มความเข้มข้นของไธโอไซยาเนตและไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ซึ่งได้จากการเติมกลูโคสร้อยละ 3 และเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (glucoseoxidase) 0.1 units/ml ในน้ำนม การเพิ่มความเข้มข้นของสารไธโอไซยาเนตเป็น 0.17 mM แล้วเก็บน้ำนมไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส สามารถลดปริมาณเชื้อ *Pseudomonas* ได้อย่างรวดเร็วในช่วง 4 ชั่วโมงแรก และลดปริมาณเชื้อจาก 6.5 log cfu/ml เป็น 3.0 log cfu/ml ภายในเวลา 6 ชั่วโมง หลังจากเก็บน้ำนมนาน 10 ชั่วโมง เชื้อจุลินทรีย์มีอัตราการเพิ่มขึ้นในอัตราเดียวกับชุดควบคุม และเมื่อเก็บรักษาน้ำนมที่เพิ่มความเข้มข้นของไธโอไซยาเนตแล้วที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ลดลงอย่างต่อเนื่องในช่วง 24 ชั่วโมง และปริมาณของสารไธโอไซยาเนตในน้ำนมจะลดลงอย่างรวดเร็วจาก 0.26 mM เป็น 0.02 mM ภายในเวลา 3 ชั่วโมง ระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้มากกว่าร้อยละ 91 ภายในเวลา 4 ชั่วโมง และสามารถทำลายฤทธิ์ของสารต้านแบคทีเรีย (antibacterial agent) ที่ได้จากปฏิกิริยาของระบบแลคโตเปอร์ออกซิเดสได้ด้วยการให้ความร้อน 60 องศาเซลเซียส 30 นาที หรือใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นรีดิวซิง เอเจนท์ (reducing reagent) เช่น ซีสติน (cysteine) และ โซเดียมไฮโดรซัลไฟต์ (sodium hydrosulfite)

Björck และคณะ (1978) ทดลองใช้ระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสควบคุมเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มไซโครโทรปในน้ำนมดิบที่เก็บในตู้เย็น (5 องศาเซลเซียส) พบว่าความเข้มข้นของเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสที่เหมาะสมจะต้องมากกว่า 0.5 µg/ml และควรใช้สารไธโอไซยาเนตและไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในสัดส่วนโมล่าร์ที่เท่ากัน (equimolar) จึงจะทำให้ระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสมีประสิทธิภาพที่ดีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* การใช้ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในปริมาณที่สูงจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส (Pickering และคณะ, 1962 อ้างโดย Björck และคณะ, 1978) และทดลองเก็บน้ำนมดิบที่เติมสารไธโอไซยาเนตและไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ อัตรา 0.25 mM : 0.25 µmole ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

พบว่าเชื้อจุลินทรีย์จะลดจำนวนลงในช่วง 2 ชั่วโมงแรก หลังจาก 4 ชั่วโมงเชื้อสามารถกลับมาเจริญได้ตามปกติ และเมื่อทดลองเก็บน้ำนมที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ตามปกติตลอดระยะการเก็บ 5 วัน โดยเชื้อจะลดลงประมาณ 1 log cfu/ml ในช่วง 2 วันแรก แล้วจะคงที่จนครบ 5 วัน และในวันที่ 6 เชื้อเริ่มมีการเพิ่มจำนวนขึ้นเล็กน้อย ระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสไม่มีผลกระทบต่อคุณภาพทางเคมีกายภาพ (physico-chemical) ของน้ำนม โดยพบว่าค่า renneting time ปริมาณของกรดไขมันอิสระ และความสามารถในการสร้างกรดของเชื้อ mix starter culture ไม่แตกต่างกับน้ำนมดิบชุดควบคุม ดังนั้นน้ำนมดิบที่เก็บรักษาด้วยระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส จึงสามารถนำไปผลิตหรือแปรรูปได้ตามปกติ

Gaya และคณะ (1991) กระตุ้นระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสโดยการเติมสารโซเดียมเปอร์คาร์บอเนต 0.25 mM ร่วมกับไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 0.25 mM ควบคุมเชื้อ *Listeria monocytogenes* 4 สายพันธุ์ และเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในน้ำนมดิบที่เก็บที่อุณหภูมิตู้เย็น (4-8 องศาเซลเซียส) พบว่าประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อขึ้นอยู่กับอุณหภูมิที่เก็บน้ำนมดิบ ระยะเวลาในการเก็บ และสายพันธุ์ของเชื้อ ค่ากิจกรรมเอนไซม์ในน้ำนมดิบชุดควบคุมและน้ำนมที่เติมสารกระตุ้นระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสจะค่อยๆ ลดลงตลอดระยะเวลาการเก็บ 7 วัน โดยน้ำนมดิบชุดควบคุมจะลดลงมากกว่าน้ำนมที่เติมสารกระตุ้นระบบเอนไซม์เก็บที่อุณหภูมิ 8 และ 4 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

Popper และ Knorr (1997) พบว่าระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Rhodutorula rubra*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Mucor rouxii*, *Aspergilus niger* และ *Byssochlamys fulva* ในสารละลายเกลือและน้ำแอปเปิ้ลได้ ปรับสารละลายเกลือให้เกิดระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสโดยเติมเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส 5 units/ml สารไธโอไซยาเนต 25 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร และเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส 0.5-1 unit/ml สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์และราทั้งหมดภายในเวลา 2 ชั่วโมง และเมื่อทดสอบในน้ำแอปเปิ้ลพบว่าเชื้อ *B. fulva* จะถูกยับยั้งการเจริญได้ภายในเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อใช้เอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส ปริมาณ 20 units/ml และ 1 units/ml ตามลำดับ ขณะที่เชื้อ *R. rubra* และ *S. cerevisiae* จะถูกยับยั้งเมื่อใช้เอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส 5 units/ml ร่วมกับกลูโคสออกซิเดส 1 units/ml

Jacop และคณะ (2000) ได้รายงานการใช้ระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (antifungal) เช่น *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Penicillium chrysogeum*, *Alternaria* sp., *Trichoderma* sp., *Corynespora cassicola*, *Phytopthora meadii*, *Claviceps* sp.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

และ *Corticium samonicolor* และการต้านการเจริญของแบคทีเรีย (antibacterial) ได้แก่เชื้อ *Aeromonas hydrophila*, *Citrobacter freundi*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeroginosa*, *Salmonella enteritidis* bioser *paratyphi A*, *S. schottmuelleri*, *S. thyphi*, *Serratia dysentriae*, *Shigella dysentriae*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *S. citreus* และ *Vibrio cholerae* ซึ่งส่วนมากเป็นแบคทีเรียแกรมลบ

Garcia-Garibay และคณะ (1995) ทดลองใช้เอนไซม์ตรึงของแลคเตส และกลูโคสออกซิเดส ในการผลิตไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์เพื่อกระตุ้นระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสในน้ำนมดิบ พบว่าสามารถลดปริมาณเชื้อโคลิฟอร์มได้ร้อยละ 79 ลดเชื้อ *Stapylococcus aureus* ได้ร้อยละ 68 ลดเชื้อในกลุ่มไซโครโทรปแบคทีเรียได้ร้อยละ 91 และลดเชื้อราลงร้อยละ 100

Rossi และ Oliveira (1993) ทดลองหาระดับความเข้มข้นของสารไธโอไซยาเนตที่เหมาะสมในการกระตุ้นการทำงานของระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส โดยทดลองเติมไธโอไซยาเนตตั้งแต่ 3.5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสจะมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มสารไธโอไซยาเนตในช่วง 3.5-12.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เท่านั้น

Rossi และคณะ (1995) ทดลองหาระดับความเข้มข้นของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่เหมาะสมในการกระตุ้นการทำงานของระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส โดยทดลองเติมไธโอไซยาเนต 12 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้นต่างๆ กัน พบว่าไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 8 มิลลิกรัมต่อลิตร กระตุ้นให้ระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อมากที่สุด และการใช้ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้นสูงมากกว่า 20 มิลลิกรัมต่อลิตร จะไปยับยั้งการทำงานของระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส

Gupta และคณะ (1986) ใช้ระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสเก็บรักษาคุณภาพน้ำนมวัวและควาย โดยพบว่าการเติมโปแตสเซียมไธโอไซยาเนต (KSCN) และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในน้ำนมวัว อัตรา 10:10 และ 25:10 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วยยืดอายุการเก็บรักษาน้ำนมวัว ที่อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียส ได้นาน 8 และ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ สำหรับน้ำนมควายจะต้องเติมโปแตสเซียมไธโอไซยาเนต (KSCN) และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในอัตราที่สูงกว่าน้ำนมวัวเล็กน้อยคือ 25:10 และ 25:15 จึงจะสามารถยืดอายุการเก็บได้นาน 8 และ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ

Kumar และ Mathur (1989) ใช้ระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสเก็บรักษาน้ำนมควาย โดยการใช้สารโปแตสเซียมไธโอไซยาเนต (KSCN) เป็นแหล่งของไธโอไซยาเนตและใช้สารโซเดียมเปอร์คาร์บอเนตเป็นแหล่งของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในอัตรา 25:15 และ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

70:30 มิลลิกรัมต่อลิตร เก็บน้ำนมที่อุณหภูมิ 30±0.5 องศาเซลเซียส พบว่าน้ำนมที่กระตุ้นให้เกิดระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสสามารถยืดอายุการเก็บรักษาได้นาน 12 และ 16 ชั่วโมง ตามลำดับ

Abd-El-Ghani และ Sayed (1997) ได้ทดลองหาปริมาณของสารไธโอไซยาเนตในน้ำนมควายที่รีดในตอนเช้าและเย็น พบว่ามีปริมาณของไธโอไซยาเนตแตกต่างกันคือ 5.9 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 8.94 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ การเติมสารไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ลงไปในน้ำนมจะทำให้ปริมาณของสารไธโอไซยาเนตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อทดลองเติมสารโซเดียมไธโอไซยาเนตหรือโปแตสเซียมไธโอไซยาเนต 0.35 mM และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในสัดส่วนโมล่าร์ที่เท่ากันจะช่วยรักษาคุณภาพของน้ำนมไว้ได้ เนื่องจากระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสช่วยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด และฆ่าเชื้อแบคทีเรียโคลิฟอร์มในน้ำนมดิบ

Kamau และคณะ (1990) ศึกษาประสิทธิภาพของระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* และ *Staphylococcus aureus* ในน้ำนมวัว พบว่าสัดส่วนของสารไธโอไซยาเนตและไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และชนิดของเชื้อจุลินทรีย์มีผลต่อประสิทธิภาพของระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *L. monocytogenes* และ *S. aureus* สัดส่วนของไธโอไซยาเนตและไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่เหมาะสมคือ 2.4:0.6 mM และ 1.2:0.3 mM ตามลำดับ ระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *L. monocytogenes* และ *S. aureus* ในน้ำนมดิบที่เก็บที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ได้ในช่วง 0-2 ชั่วโมงแรกเท่านั้น และหลังจากเก็บน้ำนมไว้นาน 8 ชั่วโมง เชื้อจะเพิ่มจำนวนได้ตามปกติ และสามารถยืดอายุการเก็บรักษาน้ำนมดิบที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ได้นานถึง 48 ชั่วโมง

Ridley และ Shalo (1990) ได้ทดลองใช้ระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสในการเก็บรักษาน้ำนมดิบในฟาร์มขนาดเล็กของประเทศเคนย่า โดยการเติมสารโซเดียมเปอร์คาร์บอเนตเพื่อเป็นแหล่งของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารโซเดียมไธโอไซยาเนต 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เก็บรักษาน้ำนมเป็นเวลา 20-22 ชั่วโมง และเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส โดยการเก็บน้ำนมดิบไว้ในตู้เย็น, เก็บรักษาน้ำนมดิบด้วยระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสเพียงอย่างเดียว (อุณหภูมิเฉลี่ย 19 องศาเซลเซียส) และการเก็บรักษาน้ำนมดิบด้วยระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสร่วมกับการทำให้เย็นแบบ evaporative cooling (อุณหภูมิเฉลี่ย 17.5 องศาเซลเซียส) พบว่าน้ำนมดิบที่เก็บรักษาด้วยระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสเพียงอย่างเดียวไม่สามารถเก็บไว้ได้นานถึง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

22 ชั่วโมง แต่ถ้าเก็บด้วยระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสร่วมกับการให้ความเย็นแบบ evaporative cooling จะช่วยให้น้ำนมดิบมีคุณภาพที่ดีเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค

Wolfson และ Sumner (1994) ได้ศึกษาการใช้ระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella typhimurium* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Broth แล้วปรับให้เกิดระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส 1 μg/ml, Potassium thiocyanate (KSCN) 5.9 mM และ hydrogen peroxide 2.5 mM พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ *Salmonella typhimurium* ได้ทั้งแบบชั่วคราว (bacteriostatic effect) และฆ่าเชื้อได้อย่างสมบูรณ์ (bactericidal effect) ขึ้นอยู่กับปริมาณของเชื้อเริ่มต้น โดยระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสสามารถฆ่าเชื้อจำนวน 10^3 cfu/ml และ 10^5 cfu/ml ได้ทั้งหมดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 5 และ 15 ชั่วโมง ตามลำดับ และมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง (bacteriostatic) การเจริญของเชื้อในระบบที่มีปริมาณของเชื้อเริ่มต้นสูง คือ 10^6-10^7 cfu/ml โดยสามารถลดปริมาณเชื้อลง 4 log cfu/ml ภายในเวลา 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นเชื้อจุลินทรีย์สามารถกลับมาเจริญได้อีก การยับยั้งการเจริญของเชื้อมี 2 ขั้นตอน คือการทำลายเชื้อของไฮโปไธโอไซยาไนต์แอนไอออนที่ได้จากระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์และการทำลายเชื้อของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่หลงเหลืออยู่ในน้ำนม และยังพบว่าเชื้อ *S. typhimurium* มีความทนทานต่อความร้อนได้น้อยลงเมื่อเพาะเลี้ยงในระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส โดยค่า $D_{50°C}$-value ลดลงจากมากกว่า 60 นาที เป็น 12 นาที ค่า $D_{52°C}$-value ลดลงจาก 20 นาที เป็น 7.5 นาที ค่า$D_{55°C}$-value ลดลงจาก 14 นาที เป็น 4 นาที ค่า $D_{58°C}$-value ลดลงจาก 5 นาที เป็น 2.5 นาที และค่า $D_{60°C}$-value ลดลงจาก 0.31 นาที เป็น 0.20 นาที

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ของระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสก็คือ ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ ความเข้มข้นของสารไธโอไซยาเนต ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และอุณหภูมิในการเก็บรักษาน้ำนมดิบ จากการศึกษาของ Bjorck และคณะ (1979) พบว่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้นาน 7-8 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ยับยั้งได้นาน 11-12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ยับยั้งได้นาน 16-17 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ยับยั้งได้นาน 24-26 ชั่วโมง นอกจากนี้ฤดูกาลก็มีผลต่อประสิทธิภาพของระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสด้วย โดยฤดูร้อนอุณหภูมิประมาณ 30-32 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาคุณภาพของน้ำนมกระบือได้น้อยกว่า 4 ชั่วโมง แต่เมื่อปรับปรุงระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสด้วยการเติม SCN:H_2O_2 ในอัตรา 25:15 พบว่าสามารถเก็บรักษาคุณภาพของน้ำนมดิบที่อุณหภูมิห้องไว้ได้นานมากขึ้นคือ 7-10 ชั่วโมง และเมื่อเติม SCN:H_2O_2 ในอัตรา 70:30 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถเก็บรักษาคุณภาพของน้ำนมดิบไว้ได้นาน 11-14 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในฤดูหนาวอุณหภูมิประมาณ 15-18 องศาเซลเซียส เมื่อปรับปรุงระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสด้วยการเติม SCN:H_2O_2 ในอัตรา 25:15 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถเก็บรักษาคุณภาพของน้ำนมดิบที่อุณหภูมิห้องได้นาน 19-22 ชั่วโมง 30 นาที และเมื่อเติม SCN:H_2O_2 ในอัตรา 70:30 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเก็บรักษาคุณภาพของน้ำนมดิบไว้ได้นานมากขึ้นเป็น 21-24 ชั่วโมง 40 นาที

Joint FAO/WHO (1991) และ FAO (1993) ได้แนะนำให้ใช้ระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสโดยเติมโซเดียมไธโอไซยาเนต (NaSCN) ความเข้มข้น 14 มิลลิกรัมต่อลิตร และโซเดียมเปอร์คาร์บอเนต ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ในน้ำนมดิบหลังจากที่รีดเสร็จ 2-3 ชั่วโมงแรก เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียระหว่างการเก็บรวบรวมและขนส่งไปยังโรงงานอุตสาหกรรมน้ำนมในพื้นที่ที่มีปัญหาเกี่ยวกับระบบทำความเย็นหรือมีระยะทางในการขนส่งไปยังโรงงานแปรรูปที่ห่างไกล โดยประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียขึ้นอยู่กับอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษา ดังแสดงในตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำนมดิบ หลังการกระตุ้นระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (ชั่วโมง)
25-30	8
20-25	12
15-20	18
10-15	30
4	48

ที่มา : FAO (1993)

Joint FAO/WHO (1991) ได้แนะนำให้ใช้ระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสควบคุมเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำนมดิบในประเทศปากีสถาน ฟิลิปปินส์ คิวบา และประเทศในแถบแอฟริกา เช่น อูกันดา เคนย่า และแทนซาเนีย FAO (1999) ได้ให้ความรู้และผลิตคู่มือการใช้ระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสภายใต้โครงการ Global Lactoperoxidase Programme ส่งเสริมให้ใช้ระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสป้องกันการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย (spoilage bacteria) ในน้ำนมดิบของวัว และควาย ณ ศูนย์รวมน้ำนมในระหว่างการรวบรวมน้ำนม และการขนส่งไปยังโรงงานผลิต และควรใช้ในพื้นที่ที่ไม่สามารถเก็บรักษาน้ำนมในตู้เย็นหรือในพื้นที่ที่ขาดแคลนระบบทำความเย็นโดยการเพิ่มปริมาณของไธโอไซยาเนตในน้ำนมดิบในรูปของโซเดียมไธโอไซยาเนต (sodium thiocyanate ; NaSCN) และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ซึ่งใช้ในรูปของโซเดียมเปอร์คาร์บอเนต (sodium percarbonate ; $2Na_2CO_3.3H_2O_2$) ในอัตราส่วน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

14:30 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการผลิตสารโซเดียมไธโอไซยาเนตและโซเดียมเปอร์คาร์บอเนตเป็นชุดสำเร็จรูป (Test Kit) พร้อมใช้งานกับน้ำนมดิบขนาด 50 ลิตร ขั้นตอนการใช้ต้องเติมโซเดียมไธโอไซยาเนตลงไปในน้ำนมดิบก่อนแล้วผสมให้เข้ากันจนเกิดการกระจายตัวของไธโอไซยาเนตจนทั่ว ซึ่งใช้เวลาประมาณ 1 นาที แล้วจึงเติมโซเดียมเปอร์คาร์บอเนตลงไปคนให้เข้ากันประมาณ 2-3 นาทีเพื่อให้เกิดการแตกตัวของสารได้เป็นไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์อย่างสมบูรณ์และกระจายอย่างทั่วถึง ปฏิกิริยาของเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสจะเริ่มเกิดขึ้นทันทีที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และปฏิกิริยาจะเกิดอย่างสมบูรณ์ภายในเวลาเพียง 5 นาที หลังจากนั้นจะไม่พบไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในน้ำนมดิบ การใช้ระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสต้องทำในน้ำนมปริมาณที่มากพอ เช่น 40-50 ลิตร และการเติมสารต้องใช้ผู้ที่มีความรู้เฉพาะด้านเพราะจะต้องมีการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณของไธโอไซยาเนตในน้ำนมก่อนที่จะเติมสารลงไป ซึ่งโดยปกติแล้วจะเติมไธโอไซยาเนตให้สูงกว่าธรรมชาติประมาณ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

Haddadin และคณะ (1996) พบว่าอัตราส่วนของ $SCN:H_2O_2$ ที่ 15:10 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมในการเก็บรักษาคุณภาพน้ำนมดิบของแกะ วัว และแพะ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บน้ำนมไว้ได้นานถึง 6 วัน เชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดเพิ่มจำนวนได้เพียงเล็กน้อยจาก $5.3X10^6$ cfu/ml เป็น $9.4X10^7$ cfu/ml สามารถลดปริมาณเชื้อ *E. coli* ลงได้ประมาณ 1 log cfu/ml และสามารถยืดอายุการเก็บน้ำนมที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส ได้นาน 18 ชั่วโมง การใช้อัตราส่วนของ $SCN:H_2O_2$ ในสัดส่วนที่สูงมีแนวโน้มให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีมากขึ้นด้วย

Heuvelink และคณะ (2002) ทดลองใช้ระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสควบคุมเชื้อ *Escherichia coli* O157 VTEC ในน้ำนมดิบ และน้ำนมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแบบยูเอชที (UHT-sterilized milk) และควบคุมเชื้อ *Escherichia coli* O157 STEC ในระหว่างการเก็บรักษาเนื้อที่อุณหภูมิต่ำ โดยใช้กลูโคสร้อยละ 0.3 และเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase) 0.1 units/ml เป็นแหล่งของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และเติมสารโซเดียมไธโอไซยาเนตความเข้มข้น 0.26 mM เป็นแหล่งของไธโอไซยาเนต ทำการเก็บรักษาน้ำนมที่อุณหภูมิ 7 และ 15 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถเก็บน้ำนมไว้ได้นานถึง 144 ชั่วโมง (6 วัน) ปริมาณเชื้อ *E. coli* O157:H7 ลดลงจาก 4 log cfu/ml เป็น 2 log cfu/ml หลังจากเก็บน้ำนมดิบที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส นาน 6 วัน และการเติมสารโซเดียมไธโอไซยาเนตเพียงอย่างเดียวไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* VTEC ได้ เชื้อสามารถเพิ่มจำนวนได้เหมือนกับน้ำนมดิบชุดควบคุมที่ไม่มีการเพิ่มปริมาณของไธโอไซยาเนตและไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Gardea และคณะ (2002) เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการรักษาคุณภาพน้ำนมดิบด้วยวิธีการฆ่าเชื้อด้วยการพาสเจอร์ไรส์ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที และการใช้ระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส โดยการเติมโซเดียมไธโอไซยาเนตและโซเดียมเปอร์คาร์บอเนตในอัตรา 0.173 : 0.19 mM เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส วัดการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์เป็นปริมาณความร้อน (isothermal) ที่จุลินทรีย์ปลดปล่อยออกมาระหว่างที่มีการเจริญ (metabolic heat rate) พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำนมเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วในช่วง 8 ชั่วโมงแรก แล้วจะค่อยๆ ลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมง และ 16 ชั่วโมง เนื่องจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ คือน้ำนมมีความเป็นกรดมากขึ้น สารอาหาร และออกซิเจนลดน้อยลงหรือหมดไป น้ำนมที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อจุลินทรีย์เพิ่มจำนวนขึ้นมากกว่าน้ำนมดิบที่ควบคุมด้วยระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสในช่วง 8 ชั่วโมงแรก แต่ในช่วง 12-16 ชั่วโมงปริมาณเชื้อจะค่อยๆ ลดต่ำลง เนื่องจากเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสในน้ำนมที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์แล้วยังสามารถทำงานได้ทำให้เกิดระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสขึ้นมาช่วยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ในภายหลังซึ่งตรงข้ามกับน้ำนมดิบที่ควบคุมด้วยระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสที่เก็บไว้นาน 12-16 ชั่วโมงที่เชื้อจุลินทรีย์เพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว

Barrett และคณะ (1999) พบว่าระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์หลังจากการพาสเจอร์ไรส์น้ำนมที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสยังคงเหลืออยู่ประมาณร้อยละ 70 และพบสารไฮโปไธโอไซยาไนต์ในปริมาณที่สูงกว่าน้ำนมที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เนื่องจากเกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสได้อย่างสมบูรณ์จึงไม่สามารถเกิดระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสขึ้นมาต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้ ทำให้น้ำนมที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที มีคุณภาพที่ดีและมีอายุการเก็บรักษาที่นานมากขึ้น

Dimitrov และคณะ (1995) ศึกษาผลกระทบของการใช้ระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสที่มีต่อจำนวนเชื้อแลคติคเอซิดแบคทีเรียใน White brine Cheese ทั้ง fresh และ ripened cheese พบว่าระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสไม่มีผลกระทบต่อการเจริญของเชื้อแลคติคเอซิดแบคทีเรียและคุณภาพของเนยแข็ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.7 การประยุกต์ใช้ระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส

มีการใช้ระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสในการรักษาคุณภาพของน้ำนมดิบ และใช้ลดจำนวนจุลินทรีย์ในน้ำนมสำหรับทำเนยแข็ง (Reiter, 1985a, 1995b อ้างโดย Harper, 2000) ใช้ควบคุมความเป็นกรดของโยเกิร์ตระหว่างการเก็บรักษาในตู้เย็น (Nakada และคณะ, 1996) ช่วยรักษาคุณภาพน้ำนมที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์แบบ HTST และรักษาความคงตัวของอิมัลชั่นเคซีน (caseinate stabilized emulsions) ที่อุณหภูมิห้อง (de Wit และ Hooydonk, 1996 อ้างโดย Harper, 2000) การประยุกต์ใช้ระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสแสดงในตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.7 การประยุกต์ใช้ระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส

ผลิตภัณฑ์	ระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส	หน้าที่	ผล
น้ำนมดิบ	ธรรมชาติ	preserving	4 วัน ที่ 4 องศาเซลเซียส
น้ำนมดิบ	SCN/hydrogen peroxide	shelf life	3 วัน ที่ 10 องศาเซลเซียส
นมพาสเจอร์ไรส์	SCN/hydrogen peroxide	shelf life	21 วัน ที่ 10 องศาเซลเซียส
นมที่ใช้ผลิตเนยแข็ง (cheese milk)	SCN/hydrogen peroxide	shelf life	8 วัน ที่ 4-7 องศาเซลเซียส
โยเกิร์ต	LPO	acidity control	14 วันที่ 20 องศาเซลเซียส
อิมัลชั่น	LPO/KI/GO	preserving	14 วันที่ 20 องศาเซลเซียส
เครื่องสำอาง	LPO/KI/SCN/GO	preserving	2-4 เดือน
ยาสีฟัน	LPO/SCN/LYS/GO	healing	ทุกวัน
น้ำยาเกี่ยวกับตา	LPO/KI/SCN/GO	ป้องกัน	1 สัปดาห์
ต้านเนื้องอก (anti-tumor)	LPO/GO/antibodies	healing	ตามเวลาที่กำหนด

ที่มา : Kussendrager and Hooijdonk (2000)

Wolfson และคณะ (1994) รายงานการใช้ระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสที่ประกอบด้วยเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส 1 μg/ml โปแทสเซียมไธโอไซยาเนต 5.9 mM และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 2.5 mM ในการลดปริมาณของเชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ที่ต้านทานต่อกรดนาลาดิซิกในเนื้อไก่ ซึ่งสามารถลดเชื้อได้ร้อยละ 80.6 เมื่อแช่ในน้ำที่ปรับให้เกิดระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที และยังสามารถควบคุมเชื้อไซโครโทรปแบคทีเรียได้ ทำให้สามารถเก็บรักษาคุณภาพของเนื้อไก่ไว้ได้นาน 48 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Godfrey และคณะ (1990) อ้างโดย Harper (2000) รายงานการที่ใช้เอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส ไอโอไดด์ และไธโอไซยาเนตร่วมกันในเครื่องสำอางเพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อยีสต์ รา แบคทีเรีย และไวรัส ทำให้สามารถรักษาคุณภาพของเครื่องสำอางไว้ได้นานถึง 4 เดือน และมีรายงานการใช้ระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสในน้ำยารักษาแผลและฟัน (dental and wound treatment) (Poulson , 1986 อ้างโดย Harper, 2000) ใช้ผสมในยาสีฟัน น้ำยาบ้วนปาก (mouthrinse) เพื่อลดกรดที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ในปาก (Hoogedoorn, 1985 อ้างโดย Harper, 2000) นอกจากนี้ยังมีการใช้เอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสร่วมกับเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสและโมโนโคลนัล แอนติบอดี (monoclonal antibody) ในการรักษาเนื้องอก (tumor therapy) (Stanilawski และคณะ, 1989 ; Lefkowitz และคณะ, 1990 อ้างโดย Harper, 2000) ช่วยลดการถ่ายทอดรหัสโปรตีนของเชื้อไวรัสเอชไอวี (transcription of human immunodeficiency virus (HIV)-code protein) (Pourtois และคณะ, 1990 อ้างโดย Harper, 2000)

น้อมจิตต์ (2544) ได้ทดลองใช้ระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส ที่มีไธโอไซยาเนต 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการรักษาคุณภาพน้ำนมดิบ พบว่าสามารถเก็บรักษาน้ำนมดิบที่อุณหภูมิห้องได้นาน 6 ชั่วโมง และเมื่อเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส จะเก็บไว้ได้นาน 4 วัน และยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus cereus* จำนวน 10^5 cfu/ml ที่เติมในน้ำนมดิบเก็บที่อุณหภูมิห้องได้นาน 6 ชั่วโมง และที่ 4 องศาเซลเซียสได้นาน 7 วัน และพบว่าการกระตุ้นระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสไม่มีผลต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสที่มีอยู่เดิมในน้ำนมดิบ และได้ทดลองใช้ระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสร่วมกับแบคทีริโอซิน (bacteriocin) ที่ได้จากเชื้อ *Lactobacillus casei ssp. rhamnosus* (SN 11) ในการรักษาคุณภาพนมพาสเจอร์ไรส์ พบว่าสามารถยืดอายุการเก็บนมพาสเจอร์ไรส์ไว้ได้มากกว่าเดิมกว่า 2 เท่า คือเพิ่มจาก 7 วันเป็น 18 วัน

เรณู และเกตุการ (2546) ได้ทดลองใช้ระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสที่มีโซเดียมไธโอไซยาเนตและโซเดียมเปอร์คาร์บอเนตในอัตรา 30 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นแหล่งของไธโอไซยาเนตและไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ตามลำดับ เก็บรักษาคุณภาพน้ำนมดิบที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5.56 log cfu/ml ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสสามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ร้อยละ 37 ภายในเวลา 2 ชั่วโมง ทำให้สามารถเก็บน้ำนมไว้ได้นานมากขึ้น คือ 4 ชั่วโมง โดยที่เชื้อจุลินทรีย์ยังไม่เพิ่มจำนวนขึ้นจนทำให้เกิดการเน่าเสียของน้ำนมดิบ และพบว่าการใช้สารโซเดียมเปอร์คาร์บอเนตเพียงอย่างเดียว ความเข้มข้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

40 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้น้อยมาก และการใช้สารโซเดียมไธโอไซยาเนต เพียงอย่างเดียว ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ

Zapico และคณะ (1998) ทดลองใช้สารไนซินปริมาณ 10 - 100 IU/ml ร่วมกับเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส 0.2 - 0.8 ABTS unit/ml ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* สายพันธุ์ Ohio และ Scott A ในนมพร่องมันเนยยูเอชที (UHT skim milk) พบว่าสารไนซินกับระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบบเสริมฤทธิ์กัน (synergistic effect) โดยสามารถฆ่าเชื้อ *L. monocytogenes* สายพันธุ์ Ohio ได้มากกว่าสายพันธุ์ Scott A การฆ่าเชื้อแบบเสริมฤทธิ์กันนี้จะเกิดขึ้นได้ดีที่สุดเมื่อเติมสารไนซินหลังจากการกระตุ้นให้เกิดระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสแล้ว 2 ชั่วโมง โดยสามารถลดปริมาณเชื้อได้มากถึง 5.6 log units เมื่อบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ซึ่งถ้าใช้ระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสเพียงอย่างเดียว จะลดปริมาณเชื้อได้เพียง 2.8-3.0 log units เท่านั้น ขณะที่การใช้ไนซินเพียงอย่างเดียวไม่สามารถฆ่าเชื้อได้

Boussouel และคณะ (2000) ทดลองใช้ระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสร่วมกับไนซิน (nisin) ควบคุมเชื้อ *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 ในนมผงพร่องมันเนย (skim milk) พบว่าการกระตุ้นให้เกิดระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสหลังการใช้ไนซิน 100 IU/ml และ 200 IU/ml แล้ว 4 ชั่วโมง จะสามารถฆ่าเชื้อ *L. monocytogenes* จำนวน $1X10^4$ cfu/ml ได้ทั้งหมดหลังเก็บน้ำนมที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 72 และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ

Garcia-Graells และคณะ (2000; 2002) รายงานการใช้ระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสร่วมกับการฆ่าเชื้อด้วยความดันสูง (high hydrostatic pressure) เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้านทานต่อการฆ่าเชื้อด้วยความดันสูง (pressure-resistance bacteria) ในน้ำนม คือ *Escherichia coli* บางสายพันธุ์ เช่น *E. coli* MG 1655 และ *E. coli* O157:H7, *Listeria innocua* บางสายพันธุ์ และ *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* และ *Lactobacillus plantarum* พบว่าระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสช่วยเสริมฤทธิ์ (synergistic effect) การฆ่าเชื้อด้วยความดันสูงได้ดีมากขึ้น

Mclay และคณะ (2002) รายงานการใช้ระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสร่วมกับโมโนลาวริน (monolaurin) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* O157:H7 และ *Staphylococcus aureus* โดยสามารถยับยั้งเชื้อในอาหารเหลวได้ดีกว่าในน้ำนม และเนื้อ ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Garcia-Graells และคณะ (2003) ใช้ระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสร่วมกับการฆ่าเชื้อด้วยความดันสูง (high hydrostatic pressure) เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในอาหาร ได้แก่เชื้อ *E. coli, S. typhymurium, P. fluoerscens, S. aureus, Enterococcus faecalis, Listeria innocua* และ *Lactobacillus plantarum* ในนมผงขาดมันเนย (skim milk)

2.8 ความปลอดภัยของระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส (ANZFA, 2002)

มีหลายประเทศที่ออกกฎหมายอนุญาตให้ใช้ระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคและทำให้เกิดการเน่าเสีย เช่น หน่วยงาน ANZFA (The Australia New Zealand Food Authority) ซึ่งเป็นหน่วยงานร่วมระหว่างรัฐบาลของออสเตรเลียและรัฐบาลของประเทศนิวซีแลนด์ ทำหน้าที่ในการออกกฎหมายคุ้มครองความปลอดภัยด้านสุขภาพของประชาชนในประเทศออสเตรเลียและนิวซีแลนด์ โดยเน้นที่ความปลอดภัยของอาหารเป็นหลัก ได้ออกกฎหมายควบคุมการใช้ระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อ ปลาและผลิตภัณฑ์จากปลา และน้ำนมและผลิตภัณฑ์จากนม โดยได้มีการประเมินทางพิษวิทยา (Toxicological Assessment) ของสารที่จะใช้ในระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อ ดังนี้

1) เอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส อนุญาตให้ใช้กับเนื้อได้ในอัตรา 1-20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมเนื้อ พบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส ในน้ำนมของคนและวัวตามธรรมชาติ และยังพบในน้ำลาย ต่อมไธรอยด์ และต่อมน้ำตา ปริมาณที่พบในน้ำนมโดยเฉลี่ยคือ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นปริมาณที่ใกล้เคียงหรือสูงกว่าปริมาณที่อนุญาตให้ใช้เติมในอาหารเล็กน้อย ดังนั้นจึงไม่มีความเสี่ยงทางพิษวิทยา (toxicological risk) แต่อาจทำให้เกิดอาการแพ้ (allergenic) ได้ในคนที่ไวต่อการแพ้โปรตีนนม

2) ไธโอไซยาเนต ไอออน อนุญาตให้ใช้ในรูปของโซเดียมไธโอไซยาเนตหรือโปแทสเซียมไธโอไซยาเนต ปริมาณที่อนุญาตให้ใช้ไธโอไซยาเนต ไอออน อยู่ระหว่าง 5-40 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมเนื้อ พบสารนี้ในเนื้อเยื่อของสัตว์ ในน้ำคัดหลั่ง ในเต้านม น้ำลาย ต่อมไธรอยด์ กระเพาะอาหารและไต นอกจากนี้ยังพบในอาหารหลายอย่าง ได้แก่พืชตระกูลกระหล่ำ (ได้จากกลูโคซิโนเลต (glucosinolate origin)) และถั่ว (ได้จากไกลโคไซด์ (glycoside)) ไธโอไซยาเนต ไอออนที่พบในอาหารเหล่านี้ มีปริมาณที่สูงกว่าที่อนุญาตให้ใช้ในระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส โดยในกระหล่ำจะพบได้มากถึง 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในของเหลวในร่างกายของคนพบในช่วง 10-200 มิลลิกรัมต่อลิตร (Reiter และ Harnulv, 1984 ; Farrag และ Marth, 1992 อ้างโดย ANZFA, 2002) และในน้ำนมวัวพบได้ตั้งแต่ 1-10 มิลลิกรัมต่อลิตร (Reiter และ Harnulv, 1984)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ไธโอไซยาเนต ไอออน ในปริมาณที่สูงทำให้เกิดพิษในร่างกายได้ โดยมีค่า LD_{50} dose ที่ 764 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทำให้เกิดความเป็นพิษอย่างเฉียบพลันกับหนูที่ทดลอง (IDF, 1988 อ้างโดย ANZFA, 2002) แต่ความเสี่ยงต่อความเป็นพิษในคนนั้นถือว่าน้อยมาก เพราะปริมาณที่เติมเพื่อกระตุ้นระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสนั้นน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณที่พบในร่างกาย และอาหารที่บริโภค

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additive (JFCFA) ได้กำหนดความบริสุทธิ์ของโซเดียมไธโอไซยาเนตที่จะนำมาใช้ปรับให้เกิดระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส โดยจะต้องมีโลหะหนักน้อยกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีซัลเฟตน้อยกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และต้องมีซัลไฟด์น้อยกว่า 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

3) ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ อนุญาตให้ใช้ในปริมาณ 5-50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมเนื้อ สารนี้จะแตกตัวให้ออกซิเจนและน้ำเมื่อสัมผัสกับเนื้อเยื่อ การสลายตัวของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์เกิดได้ด้วยการสลายตัวของมันเอง หรือถูกเอนไซม์แคตาไลส์ในส่วนของหนังชั้นนอก (epidermis) หรือเยื่อเมือกเมมเบรน (mucous membranes) ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์จะถูกรีดิวส์อย่างรวดเร็วในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาเอนไซม์เมติกออกซิเดชั่น (enzymatic oxidation) ของไธโอไซยาเนตได้ผลิตภัณฑ์เป็นไฮโปไธโอไซยาเนตไอออนและน้ำ ดังนั้นจึงถือว่าไม่มีความเสี่ยงทางพิษวิทยา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved