# การพัฒนากรรมวิธีการผลิตเนยแข็ง มอสซาเรลลา จากน้ำนมดิบที่เก็บรักษาด้วยระบบแล็กโทเพอร์ออกซิเดส (LP-system)

นาย จิระเดช มณีรัตน์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2549

# PROCESS DEVELOPMENT OF MOZZARELLA CHEESE MADE FROM RAW MILK PRESERVED BY LACTOPEROXIDASE SYSTEM (LP-system)

**Jiradech Maneerate**

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Food Technology**

**Suranaree University of Technology**

**Academic Year 2006**

**การพัฒนากรรมวิธีการผลิตเนยแข็ง มอสซาเรลา จากน้ำนมดิบที่เก็บรักษาด้วยระบบแล็กโทเพอร์ออกซิเดส (LP-system)**

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

_____

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะวรรณ กาสลัก)
ประธานกรรมการ

_____

(อาจารย์ ดร.มาโนชญ์ สุธีรวัฒนานนท์)
กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

_____

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรีลักษณ์ รอดทอง)
กรรมการ

_____

(รองศาสตราจารย์ ดร.เสาวณีย์ รัตนพานี)
รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

_____

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเวทย์ นิงสานนท์)
คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

จิระเดช มณีรัตน์ : การพัฒนากรรมวิธีการผลิตเนยแข็ง มอสซาเรลลา จากน้ำนมดิบที่เก็บรักษาด้วยระบบแล็กโทเพอร์ออกซิเดส (LP-system) (PROCESS DEVELOPMENT OF MOZZARELLA CHEESE MADE FROM RAW MILK PRESERVED BY LACTOPEROXIDASE SYSTEM (LP-system)) อาจารย์ที่ปรึกษา : ดร.มาโนชญ์ สุธีรวัฒนานนท์, 124 หน้า.

น้ำนมดิบโดยทั่วไปมีองค์ประกอบของระบบแล็กโทเพอร์ออกซิเดส (LP-system) อยู่ในระดับที่ต่ำหรือไม่พบเลย เมื่อนำน้ำนมดิบมาทำการกระตุ้น LP-system พบว่ามีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ใกล้เคียงกับน้ำนมดิบที่ผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรส์ อีกทั้งยังมีอายุการเก็บรักษานานกว่าน้ำนมดิบที่ผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรส์ และมีคุณภาพใกล้เคียงน้ำนมดิบปกติ ส่วนการทดสอบคุณภาพเวลาที่ใช้ในการตกตะกอนน้ำนม พบว่าความร้อนจากกระบวนการพาสเจอร์ไรส์มีผลกระทบต่อการตกตะกอนโปรตีนในน้ำนมมากกว่า LP-system ทำให้น้ำนมดิบที่ผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรส์ใช้เวลาในการตกตะกอนน้ำนมนานที่สุด เมื่อนำน้ำนมดิบ น้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system และน้ำนมดิบที่ผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรส์ มาผลิตเป็นเนยแข็งมอสซาเรลลาด้วยวิธีการเติมกรดแล็กทิกลงไปในน้ำนมโดยตรง แล้วนวดผสมและขึ้นรูปด้วยเครื่องอัดพองแบบสกรูคู่ ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีองค์ประกอบใกล้เคียงกับเนยแข็งมอสซาเรลลาทางการค้า ยกเว้นปริมาณคาร์โบไฮเดรตและไขมันที่มีค่าน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนสมบัติทางกายภาพ (การวัดค่าสี การละลาย การไหล การยืดขยาย สมบัติหลังการอบ และการทำเป็นพิซซ่า) ของเนยแข็งมอสซาเรลลาที่ผลิตจากน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system มีค่าใกล้เคียงกับเนยแข็งมอสซาเรลลาทางการค้า และมีปริมาณจุลินทรีย์อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของเนยแข็ง จากลักษณะโครงสร้างภายในของเนยแข็งมอสซาเรลลาเมื่อทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าโครงข่ายของโปรตีนที่แน่นกว่าเนยแข็งมอสซาเรลลาทางการค้า มีรูพรุนและการกระจายตัวของไขมันภายในโครงสร้างน้อย

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2549 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

JIRADECH MANEERATE : PROCESS DEVELOPMENT OF MOZZARELLA CHEESE MADE FROM RAW MILK PRESERVED BY LACTOPEROXIDASE SYSTEM (LP-system). THESIS ADVISOR : MANOTE SUTHEERAWATTANANONDA, Ph.D. 124 PP.

LACTOPEROXIDASE SYSTEM/RAW MILK/ LP-TREATED MILK/PASTEURIZED MILK/MOZZARELLA CHEESE/TWIN-SCREW EXTRUDER/DIRECT LACTIC ACIDIFICATION

The components of lactoperoxidase (LP) system (LP-system) in natural raw milk were low in level or none. Raw milk preserved by LP-system showed similar antimicrobial ability to pasteurized milk. The shelf life of LP-treated milk was longer than pasteurized milk. However, qualities of LP-treated milk were similar to those of raw milk. Heat treatment had more effect on protein coagulation in pasteurized milk than the LP-treated one. Consequently, the rennet clotting time for the pasteurized milk was the longest. Raw milk, LP-treated milk, and pasteurized milk were used for producing mozzarella cheese by direct lactic acidification. Cheese curds were kneaded and formed in a twin-screw extruder. Chemical compositions of these cheeses were similar to the commercial mozzarella cheese except that the levels of carbohydrate and fat were significantly lower. Physical properties of the cheese (cook color, meltability, flowability, stretchability, baking test and pizza baking test) made from LP-treated milk were similar to those of commercial mozzarella cheese. Microorganisms in these cheeses were within the standard level of mozzarella cheese.

Electron micrographs showed that the microstructures of these cheeses had tight protein networks with less fat distribution than the commercial mozzarella cheese.

School of Food Technology Student's Signature_____

Academic Year 2006 Advisor's Signature_____

# กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. มาโนชญ์ สุธีรวัฒนานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ ช่วยเหลือ อย่างดียิ่ง ทั้งในด้านวิชาการ และด้านการดำเนินงานวิจัย รวมถึงการแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสำเร็จ กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะวรรณ กาสลัก ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรีลักษณ์ รอดทอง กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ กราบขอบพระคุณอาจารย์ที่ไม่ได้กล่าวชื่อมา ณ ที่นี้ ที่ให้คำปรึกษาด้านการดำเนินงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ประจำอาคารศูนย์เครื่องมือ 1 และ 3 ที่ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในด้านอุปกรณ์ เครื่องมือต่างๆ ตลอดงานวิจัย ขอขอบคุณ นาย ประพันธ์ หรรษานุกรม ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านการศึกษาดูสายงานการผลิต และทดลองฝึกทำการผลิตเนยแข็งมอสซาเรลลาทางการค้า ขอบคุณ พี่ เพื่อน และน้องๆ ทุกคน ที่คอยให้ความช่วยเหลือ เป็นกำลังใจ และให้คำปรึกษาตลอดระยะการทำงานวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และพี่สาว ที่ให้การเลี้ยงดู อบรม และส่งเสริมการศึกษาเป็นอย่างดีตลอดมา

จิระเดช มณีรัตน์

# สารบัญ

**หน้า**


บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....ก

บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....ข

กิตติกรรมประกาศ.....ง

สารบัญ.....จ

สารบัญตาราง.....ช

สารบัญภาพ.....ซ

**บทที่**

**1. บทนำ**.....1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....6

1.3 สมมุติฐานการวิจัย.....7

1.4 ข้อตกลงเบื้องต้น.....7

1.5 ขอบเขตของการวิจัย.....7

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....8

**2. ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**.....9

2.1 ระบบป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในน้ำนมดิบ.....9

2.2 ระบบเอนไซม์แล็กโทเพอร์ออกซิเดส (lactoperoxidase system (LP-system))..10

2.3 การใช้ระบบเอนไซม์แล็กโทเพอร์ออกซิเดสในอุตสาหกรรมนม.....17

2.4 การเกิดออกซิเดชันของโปรตีน (protein oxidation).....23

2.5 เนยแข็งมอสซาเรลลา (mozzarella cheese).....25

2.6 การแปรรูปด้วยการอัดพอง (extrusion process).....28

**3.วัสดุและวิธีการ**.....30

3.1 การเตรียมวัตถุดิบ.....30

3.2 การวิเคราะห์หาองค์ประกอบของระบบเอนไซม์แล็กโทเพอร์ออกซิเดสในน้ำนมดิบ.30

3.3 การเตรียมน้ำนม.....31

# สารบัญ (ต่อ)

**หน้า**


3.4 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำนม....32

3.5 การผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เนยแข็งมอสซาเรลลา....34

3.6 การทดสอบคุณภาพของผลิตภัณฑ์....37

**4. ผลการทดลองและการวิจารณ์**....45

4.1 ผลการวิเคราะห์หาองค์ประกอบของระบบเอนไซม์แล็กโทเพอร์ออกซิเดส ในน้ำนมดิบ....45

4.2 ผลของการเตรียมตัวอย่างน้ำนม....46

4.3 ผลการศึกษาสภาวะการแปรรูปต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์....57

**5. สรุปและข้อเสนอแนะ**....73

5.1 บทสรุป....73

5.2 ข้อเสนอแนะ....74

รายการอ้างอิง....75

ภาคผนวก....92

ประวัติผู้เขียน....124

# สารบัญตาราง

**ตารางที่** **หน้า**


2.1 ผลกระทบของระบบเอนไซม์แล็กโทเพอร์ออกซิเดสต่อกล้าเชื้อผลิตภัณฑ์นมหมัก…….19

2.2 ผลกระทบของระบบเอนไซม์แล็กโทเพอร์ออกซิเดสต่อผลิตภัณฑ์นมหมัก.....20

2.3 ผลกระทบของระบบเอนไซม์แล็กโทเพอร์ออกซิเดสต่อผลิตภัณฑ์เนยแข็ง……..21

3.1 รูปแบบการจัดเรียงสกรู (จากทางป้อนวัตถุดิบถึงหน้าแปลน)……...36

4.1 ค่าเฉลี่ยขององค์ประกอบของระบบแล็กโทเพอร์ออกซิเดสในน้ำนมดิบ.....46

4.2 ค่าเฉลี่ยองค์ประกอบทางเคมีในน้ำนมของแต่ละตัวอย่างทดลอง.....48

4.3 ค่าเฉลี่ยคุณภาพทางเคมีในน้ำนมของแต่ละตัวอย่างทดลอง.....50

4.4 ค่าเฉลี่ยคุณภาพทางจุลชีววิทยาในน้ำนมของแต่ละตัวอย่างทดลอง.....52

4.5 ค่าเฉลี่ยการวิเคราะห์หาเวลาที่ใช้ในการตกตะกอนน้ำนม (Rennet clotting time, (RCT)) ในน้ำนมของแต่ละตัวอย่างทดลอง.....54

4.6 ค่าเฉลี่ยคุณภาพระหว่างการเก็บรักษาในน้ำนมของแต่ละตัวอย่างทดลอง.....56

4.7 ค่าเฉลี่ยองค์ประกอบทางเคมีของเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่างทดลอง.....60

4.8 ค่าเฉลี่ยคุณภาพทางเคมีของเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่างทดลอง.....61

4.9 ค่าเฉลี่ยการวิเคราะห์สีของเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่างทดลอง ก่อนและหลังการอบ.....63

4.10 ค่าเฉลี่ยคุณสมบัติทางกายภาพของเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่างทดลอง.....65

4.11 ค่าเฉลี่ยคุณภาพทางจุลชีววิทยาของเนยแข็งมอสซาเรลลา.....69

1ก กระบวนการให้ความร้อน.....95

1ข ชั้นและคุณภาพของนมจากการเปลี่ยนสีของ Methylene blue.....120

2ข คุณภาพของนมจากการเปลี่ยนสีของ Resazurin ภายในเวลา 1 ชั่วโมง.....121

# สารบัญภาพ

**ภาพที่** **หน้า**


2.1 ปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลุ่ม sulfhydryls (-SH).....15

4.1 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่างทดลอง โดยที่ผลิตจากน้ำนมดิบ (ก), น้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system (ข) และนมสดพาสเจอร์ไรส์ (ค) เปรียบเทียบกับเนยแข็งมอสซาเรลลาทางการค้า (ง).....57

4.2 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่างทดลอง หลังจากผ่านการอบ โดยที่ผลิตจากตัวอย่างน้ำนมดิบ (ก), ตัวอย่างน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system (ข) และตัวอย่างนมสดพาสเจอร์ไรส์ (ค) เปรียบเทียบกับเนยแข็งมอสซาเรลลาทางการค้า (ง).....66

4.3 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์พิซซ่าที่อุณหภูมิห้องโดยโรยหน้าด้วยเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่างทดลอง ของเนยแข็งมอสซาเรลลาทางการค้า (ก) เปรียบเทียบกับเนยแข็งที่ผลิตจากตัวอย่างน้ำนมดิบ (ข), ตัวอย่างน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system (ค) และตัวอย่างนมสดพาสเจอร์ไรส์ (ง).....68

4.4 การศึกษาโครงสร้างภายในด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (SEM) ของผลิตภัณฑ์เนยแข็งมอสซาเรลลาที่ผลิตจากตัวอย่างน้ำนมดิบ (ก), ตัวอย่างน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system (ข), ตัวอย่างนมสดพาสเจอร์ไรส์ (ค) และตัวอย่างเนยแข็งทางการค้า (ง) ที่กำลังขยาย 500 เท่า.....70

4.5 การศึกษาโครงสร้างภายในด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (SEM) ของผลิตภัณฑ์เนยแข็งมอสซาเรลลาที่ผลิตจากตัวอย่างน้ำนมดิบ (ก), ตัวอย่างน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system (ข), ตัวอย่างนมสดพาสเจอร์ไรส์ (ค) และตัวอย่างเนยแข็งทางการค้า (ง) ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า.....71

1ก แหล่งการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในน้ำนมจากฟาร์มโคนม.....98

2ก โครงสร้างของเอนไซม์แล็กโตเปอร์ออกซิเดส.....99

1ข Schreiber test.....119

# บทที่ 1
# บทนำ

## 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สถานการณ์การผลิตน้ำนมโคดิบในประเทศไทย พบว่ามีความต้องการน้ำนมดิบมากกว่าปริมาณการผลิตน้ำนมดิบภายในประเทศ จึงต้องนำเข้าเพิ่มจากต่างประเทศ โดยในปี พ.ศ. 2546 มีผลผลิตน้ำนมดิบ 731,923 ตัน มีความต้องการนมพร้อมดื่ม 703,510 ตัน แต่มีน้ำนมดิบที่ส่งเข้าโรงงาน 697,884 ตัน ทำให้มีน้ำนมดิบส่วนที่ขาดอยู่ถึง 5,626 ตัน (วิบูลวรรณ วรรณโมลี และ ณัทธร กสิบุตร, 2548a) อย่างไรก็ตามปริมาณน้ำนมดิบที่ผลิตได้ในประเทศนั้น คิดเป็นร้อยละ 30 ของปริมาณความต้องการน้ำนมดิบของโรงงานผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่มเท่านั้น ซึ่งปัญหาเรื่องน้ำนมดิบล้นตลาดนั้นเกิดขึ้นมากในช่วงโรงเรียนปิดภาคเรียน ทำให้โรงงานแปรรูปน้ำนมดิบไม่สามารถจำหน่ายน้ำนมที่ทำการผลิตในรูปของนมสดพาสเจอร์ไรส์ได้ จึงแก้ปัญหาโดยผลิตเป็นนมยู เอช ที แทนเนื่องจากเก็บได้นานกว่า โดยที่ธุรกิจนมพร้อมดื่มได้มีการนำนมผงมาผสมกับน้ำ แล้วผลิตเป็นนมพร้อมดื่มจำหน่าย มีผลให้ปริมาณการรับซื้อน้ำนมดิบภายในประเทศลดลงจนเกิดปัญหาน้ำนมดิบล้นตลาด (บริษัท ศูนย์วิจัยกสิกรไทย จำกัด, 2544) อีกทั้งประเทศไทยเป็นสมาชิกขององค์การการค้าโลก (WTO) โดยต้องเปิดตลาดนำเข้านมผงมากขึ้น และลดข้อกีดกันทางการค้าทางภาษีจนต้องเปิดตลาดเสรี (Perfect Liberalization) นำเข้านมผงและผลิตภัณฑ์นม ซึ่งในปี พ.ศ. 2548 ราคานมผงขาดมันเนย ที่ผลิตจากโรงงานนมผงขององค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย ในกิโลกรัมละ 130.00 บาท เมื่อเทียบกับราคานำเข้ากิโลกรัมละ 100.63 บาท (คณะรัฐมนตรี, 2548; สารกิจ ถวิลประวัติ, 2546)

การผลิตน้ำนมดิบในประเทศยังพบปัญหา ต้นทุนการผลิตสูง ผลผลิตน้ำนมต่ำ ขาดแคลนพื้นที่ปลูกหญ้า การรวบรวมและการจำหน่าย และน้ำนมดิบมีคุณภาพไม่ได้มาตรฐาน เป็นต้น โดยเฉพาะคุณภาพทางด้านจุลชีววิทยา ตามมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช. 6003-2548) เรื่อง น้ำนมดิบ ระบุว่า น้ำนมดิบมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ต้องไม่เกิน 600,000 โคโลนีต่อมิลลิลิตร จำนวนแบคทีเรียชนิดโคลิฟอร์ม ต้องไม่เกิน 10,000 โคโลนีต่อมิลลิลิตร และจำนวนแบคทีเรียชนิดทนร้อน ต้องไม่เกิน 1,000 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นปัญหาที่สำคัญมาก เนื่องจากมาตรฐานโคนมและการผลิตน้ำนมดิบของประเทศไทยนั้นยังเป็นแบบสมัครใจ เพราะเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมส่วนใหญ่เป็นเกษตรกรรายย่อย มีพื้นที่เลี้ยงขนาดเล็ก ทำให้การตรวจรับรอง

ฟาร์มโคนมและการผลิตน้ำนมดิบผ่านเพียงแค่บางฟาร์ม และยังมีฟาร์มโคนมจำนวนมากที่ต้องปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่อง เนื่องจากยังขาดความรู้ด้านการสุขอนามัยและการสุขาภิบาลทำให้โคนมมีปัญหาเรื่องสุขภาพ ส่งผลให้น้ำนมดิบที่ผลิตได้มีคุณภาพต่ำ อีกทั้งประเทศไทยมีอากาศร้อนทำให้น้ำนมดิบเน่าเสียง่ายและเร็ว ซึ่งเกษตรกรรายย่อยจะรวบรวมน้ำนมดิบในถังขนาดเล็ก แล้วใช้พาหนะของตนเองหรือ มีการจ้างส่งน้ำนมดิบไปยังศูนย์รวบรวมน้ำนมดิบในท้องถิ่นที่เกษตรกรเป็นสมาชิก หลังจากนั้นจึงขนส่งต่อไปยังโรงงานผลิตนมพร้อมดื่ม ซึ่งตาม มกอช. 6003-2548 เรื่อง น้ำนมดิบ ระบุว่า น้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมภายหลังการรีดนมควรขนส่งไปยังศูนย์รวบรวมน้ำนมดิบโดยเร็ว แต่ถ้าไม่ได้ส่งน้ำนมดิบควรเก็บรักษาที่อุณหภูมิไม่เกิน 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่เกิน 24 ชั่วโมง และน้ำนมดิบที่เก็บในถังของศูนย์รวบรวมน้ำนมดิบ ต้องเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิไม่เกิน 4 องศาเซลเซียส ตลอดระยะเวลาการขนส่งไปยังโรงงานแปรรูป จะเห็นได้ว่าถ้าเกษตรกรไม่สามารถขนส่งน้ำนมดิบเข้าศูนย์รวบรวมน้ำนมดิบได้ทัน จะเกิดปัญหาในการเก็บรักษาน้ำนมดิบเป็นอย่างมาก (วิบูลวรรณ วรรณโมลี และ ณัทธร กสิบุตร, 2548a; 2548b)

ดังนั้น แนวทางแก้ปัญหาซึ่งรัฐบาลได้จัดทำเป็นแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 9 (2545 – 2549) โดยนโยบายของรัฐบาลคือ การพยายามลดการนำเข้านมและผลิตภัณฑ์นม เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตภายในประเทศ สร้างระบบการตลาดภายในประเทศให้มั่นคง สร้างมาตรฐานและคุณภาพสินค้านมและผลิตภัณฑ์นม และพัฒนาคุณภาพน้ำนมโคและผลิตภัณฑ์นมเพื่อการส่งออก โดยมีการเพิ่มอัตราภาษีการนำเข้านมผงขาดมันเนย น้ำนมดิบ และนมพร้อมดื่มจากร้อยละ 5 เป็นร้อยละ 20 อีกทั้งยังมีการจัดตั้งโรงงานนมผงขนาดการรับน้ำนมดิบ 400 ตัน ต่อวัน จำนวน 1 แห่ง และส่งเสริมการส่งออกนมและผลิตภัณฑ์นมของไทย โดยระหว่างปี พ.ศ. 2544 – 2546 มีมูลค่าเฉลี่ย 4,572.5 ล้านบาท อีกทั้งยังมีการจัดตั้งโรงงานแปรรูปผลิตภัณฑ์นม เพื่อส่งเสริมให้มีการใช้น้ำนมดิบในการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์นมอื่นๆ นอกเหนือจากนมพร้อมดื่ม ซึ่งสิ่งเหล่านี้เป็นมาตรการบริหารจัดการนมทั้งระบบเพื่อแก้ไขปัญหาน้ำนมดิบล้นตลาด (กลุ่มวิเคราะห์ผลกระทบการเจรจา, 2547; คณะรัฐมนตรี, 2548; สารกิจ ถวิลประวัติ, 2546)

วิธีการเก็บรักษาน้ำนมดิบที่มีความสะดวก มีค่าใช้จ่ายต่ำ ซึ่งเหมาะสมกับสถานที่ที่มีอากาศร้อน และเป็นวิธีการที่ Codex แนะนำให้ใช้กันอย่างแพร่หลายคือ Lactoperoxidase system หรือ Lactoperoxidase/Thiocyanate/Hydrogen peroxide system (LP-system) (The Codex Alimentarius Commission, 1991) (CAC/GL 13-1991) ซึ่งในปี ค.ศ. 2005 Joint FAO/WHO Activities Contributing to the Provision of Scientific Advice to Codex Committee on Food Hygiene (CCFH) ระบุว่า LP-system สามารถใช้ได้กับน้ำนมดิบทุกชนิด ซึ่งระบบนี้สามารถเก็บรักษาน้ำนมดิบได้เป็นเวลานานโดยขึ้นอยู่กับอุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษา ถ้าเก็บน้ำนมดิบที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาได้นานประมาณ 7 – 8 ชั่วโมง และถ้า

ลดอุณหภูมิในการเก็บรักษาน้ำนมดิบให้ต่ำลง ก็จะทำให้มีอายุการเก็บน้ำนมดิบนานมากขึ้น โดยที่ LP-system นั้น ประกอบด้วยองค์ประกอบ 3 ส่วน คือ เอนไซม์แล็กโทเพอร์ออกซิเดส (lactoperoxidase, (LPO)) ไธโอไซยาเนท ($SCN^-$) และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ($H_2O_2$) ซึ่งระบบนี้จะถูกกระตุ้นโดย การเติมโซเดียมไธโอไซยาเนท (NaSCN) 14 มิลลิกรัม ต่อน้ำนมดิบ 1 กิโลกรัม ซึ่งจะแตกตัวเป็นสาร $SCN^-$ กวนนาน 1 นาที แล้วเติมโซเดียมเพอร์คาร์บอเนต ($2Na_2CO_3.3H_2O_2$) 30 มิลลิกรัม ต่อน้ำนมดิบ 1 กิโลกรัม ซึ่งจะแตกตัวเป็นสาร $H_2O_2$ กวนประมาณ 2 – 3 นาที ระบบนี้จะทำปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์ภายในเวลา 5 นาที การใช้ LP-system นี้ควรใช้หลังจากที่ทำการรีดน้ำนมดิบเสร็จภายในเวลา 2 – 3 ชั่วโมง โดยในปี ค.ศ. 2002 Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) ได้จัดฝึกอบรม LP-system นี้ให้กับประเทศในแถบเอเชีย ได้แก่ บังคลาเทศ ปากีสถาน ภูฐาน อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ และเวียดนาม เพื่อลดการเสื่อมเสียของน้ำนมดิบ อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มพื้นที่ในการเก็บรวบรวมน้ำนมดิบเข้าสู่ศูนย์รวบรวมน้ำนมดิบ ในขอบเขตระยะการเดินทางถึง 7 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับที่ไม่ได้ใช้ LP-system ซึ่งใช้ได้ในขอบเขตระยะการเดินทางเพียงแค่ 3 ชั่วโมงเท่านั้น และในปี พ.ศ. 2548 กระทรวงอุตสาหกรรมได้ออกมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (มอก. 22000-2548) เรื่อง ระบบการจัดการความปลอดภัยของอาหาร-ข้อกำหนดสำหรับองค์กรในห่วงโซ่อาหาร ซึ่งเป็นมาตรฐานเดียวกันกับ ISO 22000 : 2005 Food safety management systems-Requirements for organization in the food chain ซึ่งเป็นมาตรฐานระหว่างประเทศ มีการกำหนดให้ใช้ LP-system (CAC/GL 13-1991) โดยเป็นข้อกำหนดทั่วไป ซึ่งสามารถนำไปปรับใช้ได้กับทุกองค์กรในห่วงโซ่อาหารโดยไม่คำนึงถึงขนาดและความซับซ้อนขององค์กร ทั้งนี้เกี่ยวข้องเพียงขั้นตอนเดียวหรือหลายขั้นตอนในทางตรง ซึ่งรวมไปถึงองค์กรที่เกี่ยวข้องทางอ้อม

Law and Goodenough (1995) ระบุว่าการใช้ LP-system สามารถทำให้ได้น้ำนมดิบที่อยู่ในขั้น cold-sterilization โดยการนำน้ำนมดิบมาผ่านคอลัมน์ที่มีเอนไซม์เบตา-กาแล็กโทซิเดส (β-galactosidase) ซึ่งจะทำการเปลี่ยนน้ำตาลแล็กโทสที่มีอยู่ในน้ำนมดิบ ให้เป็นน้ำตาลกาแล็กโทสและน้ำตาลกลูโคส แล้วให้น้ำนมดิบผ่านคอลัมน์ที่มี เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase) ซึ่งจะทำการเปลี่ยนจากน้ำตาลกลูโคสไปเป็นสาร $H_2O_2$ แล้วทำปฏิกิริยากับสาร $SCN^-$ ที่เติมลงไปในน้ำนมดิบตั้งแต่เริ่มต้น และเอนไซม์ LPO ที่มีอยู่ในน้ำนมดิบ เปลี่ยนสาร $SCN^-$ เป็นสารไฮโปไธโอไซยาไนท์ ($OSCN^-$) ที่มีฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรีย ทำให้ได้น้ำนมดิบที่เป็น cold-sterilization ในที่สุด

น้ำนมดิบที่ผลิตได้ภายในประเทศทั้งหมด จะใช้ในการผลิตนมพร้อมดื่ม เช่น นมพาสเจอร์ไรส์ นมสเตอริไลส์ นมยู เอช ที นมเปรี้ยว และโยเกิร์ต ถึงร้อยละ 96 นอกจากนั้น น้ำนมดิบที่เหลือจึงนำไปใช้ประกอบในการผลิตนมผงขาดมันเนย หางนม เนย เนยแข็ง และผลิตภัณฑ์นมอื่นๆ

อย่างไรก็ตามประเทศไทยยังมีจำนวนการผลิตไม่มากเพราะต้นทุนในการดำเนินการสูง จึงมีการนำเข้าสินค้าดังกล่าวจากประเทศอื่น เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตผลิตภัณฑ์นมประเภทอื่นๆ โดยปี พ.ศ. 2546 ประเทศไทยมีการนำเข้าเนยและเนยแข็งคิดเป็นสัดส่วนเฉลี่ยร้อยละ 9 หรือ 16,554,568 กิโลกรัม จากผลิตภัณฑ์นมทั้งหมด และทำการส่งออก 639,944 กิโลกรัม โดยที่ประเทศไทยมีผู้ผลิตเนยแข็งประมาณ 7 – 8 ราย (ไม่รวมรายย่อย) ผลผลิตเนยแข็งรวม 7 – 8 รายประมาณ 3,000 ตัน ต่อปี ซึ่งเนยแข็งที่ผลิตได้ผลิตจากน้ำนมดิบเพียงอย่างเดียว ดังนั้นถ้านำน้ำนมดิบที่มีคุณภาพต่ำมาใช้ในการผลิต ก็จะส่งผลให้เนยแข็งที่ผลิตได้มีคุณภาพต่ำไปด้วย (กลุ่มวิเคราะห์ผลกระทบการเจรจา, 2547; วิบูลวรรณ วรรณโมลี และ ณัทธร กสิบุตร, 2548b)

เนยแข็งมอสซาเรลลา (mozzarella cheese) จัดเป็นเนยแข็งชนิดกึ่งแข็ง มีสีเหลืองอ่อน เนื้อสัมผัสค่อนข้างนิ่ม นิยมใช้เป็นส่วนประกอบในการทำพิซซ่า โดยเนยแข็งชนิดนี้ มีอายุการเก็บนาน 30 วัน เมื่อเก็บที่ 2 – 7 องศาเซลเซียส และสามารถเก็บได้นาน 12 เดือน เมื่อเก็บที่ -18 องศาเซลเซียส ประเทศสหรัฐอเมริกามีการส่งออกเนยแข็งชนิดนี้เป็นอันดับ 1 ของโลก โดยวิธีการผลิตเนยแข็งชนิดนี้จะคล้ายกับเนยแข็งทั่วไป เริ่มจากนำน้ำนมดิบมาผ่านกระบวนการปรับปริมาณไขมันให้ได้ตามมาตรฐาน (standardization) ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของเนยแข็ง ทำการพาสเจอร์ไรส์ลดอุณหภูมิลง แล้วจึงเติมกล้าเชื้อจุลินทรีย์และเอนไซม์เรนเนท (rennet) ลงไป เมื่อเกิดลิ่มน้ำนมหรือเคิร์ด (curd) แล้วทำการตัดและกวนเคิร์ดเพื่อให้หางนม (whey) ไหลออกมาจากก้อนเคิร์ด แล้วจึงปล่อยหางนมออก หลังจากนั้นตัดให้เป็นก้อน รอให้ค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) ลดลงเหลือประมาณ 5.20 – 5.30 แล้วนวดผสม ขึ้นรูป เติมเกลือ ทำให้แห้ง และบรรจุ หลังจากนั้นเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งเนยแข็งชนิดนี้มีกลิ่นรสที่ไม่แรง จึงทำการบ่มหรือไม่บ่มก็ได้ ขึ้นอยู่กับวิธีการผลิต การผลิตเนยแข็งนั้นจำเป็นต้องใช้น้ำนมปริมาณมาก เพราะน้ำนมมีปริมาณของแข็งทั้งหมดต่ำเพียงร้อยละ 11.50 โดยน้ำหนัก นั่นคือ จากน้ำนม 100 กิโลกรัม ผลิตเนยแข็งได้ 11.50 กิโลกรัมเท่านั้น ในประเทศไทยมีผู้ผลิตเนยแข็งชนิดนี้ที่ได้รับมาตรฐาน ISO 9001:2000 คือ บริษัทไมเนอร์ ชีส จำกัด และยังมีการนำเข้าเพิ่มจากต่างประเทศโดยส่วนใหญ่จะมาในรูปแช่แข็ง อย่างไรก็ตามอุตสาหกรรมนมและผลิตภัณฑ์นมในประเทศไทย ยังมีโอกาสในการขยายตัวได้เพิ่มขึ้น (Kosikowski and Mistry, 1997; http://app.tisi.go.th, 2006)

ในปี ค.ศ. 1989 Kumar and Mathur ผลิตเนยแข็งมอสซาเรลลาโดยใช้กล้าเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียกรดแล็กทิก จากน้ำนมที่ผ่าน LP-system พบว่า เวลาในการผลิตนานกว่าน้ำนมที่ไม่ผ่าน LP-system เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด (Titrable Acidity, TA) และค่า pH อย่างช้าๆ ซึ่งต้องได้ค่า TA เท่ากับร้อยละ 0.65 โดยน้ำหนัก จึงจะสิ้นสุดการผลิต และเมื่อนำเนยแข็งที่ได้ไปทำพิซซ่าพบว่ามีกลิ่นรส การละลาย ค่าการเคี้ยว (chewiness) สีและลักษณะปรากฏ ใกล้เคียงกับพิซซ่าที่ใช้เนยแข็งจากน้ำนมที่ไม่ผ่าน LP-system จากการศึกษาของ Seifu,

Buys and Donkin (2003) ถึงผลกระทบของ LP-system ที่มีต่อกล้าเชื้อที่เจริญได้ที่อุณหภูมิปานกลาง หรือ มีโซไฟล์ (mesophile) ในน้ำนมแพะ เพื่อใช้ในการผลิตเนยแข็ง โดยทำการศึกษากล้าเชื้อผสมหลายชนิด (ในกลุ่ม *Lactococcus sp.* และ *Leuconostoc sp.*) พบว่า จะมีเพียง *Leuconostoc sp.* เท่านั้นที่สามารถทนต่อ LP-system ได้ โดยใช้เวลาในการบ่มถึง 8 ชั่วโมง แต่ได้ปริมาณกรดแล็กทิกสูงสุดที่ร้อยละ 7 โดยน้ำหนัก เท่านั้น ซึ่งผลกระทบดังกล่าว ส่งผลไปถึงการผลิตเนยแข็งทั้งระยะเวลาและคุณภาพของเนยแข็งที่ได้ไม่เป็นไปตามข้อกำหนด

จะเห็นว่าการผลิตเนยแข็งโดยใช้กล้าเชื้อจุลินทรีย์จากน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system นั้น ไม่มีความเหมาะสม ดังนั้นวิธีการผลิตที่ไม่ใช้กล้าเชื้อที่ใช้กรดเติมลงไปในน้ำนมโดยตรง (direct acidification) ซึ่งกรดเหล่านี้ได้แก่ กรดอะซิติก กรดอะดิพิก กรดบิวทีริก กรดซิตริก กรดฟอสฟอริก กรดไฮโดรคลอริก กรดแล็กทิก และกรดโปรปิโอนิก เป็นต้น ซึ่งวิธีการใช้กรดนี้มีผลดีกว่าการใช้กล้าเชื้อ เนื่องจากกล้าเชื้อจำเป็นต้องนำเข้ามาจากต่างประเทศ จำเป็นต้องมีตู้แช่แข็งสำหรับการเก็บกล้าเชื้อ ปัญหาเรื่องการต่อเชื้อ (subculture) จะต้องมีห้องสำหรับเพาะกล้าเชื้อที่เป็นห้องปลอดเชื้อ และปัญหาเรื่องไวรัสของแบคทีเรีย (bacteriophage) เป็นต้น (McMahon and Oberg, 2000) วิธี direct acidification คือการปรับ pH ในน้ำนมให้ได้ประมาณ 5 – 6 อย่างช้าๆ วิธีการนี้เหมาะสมสำหรับทำเนยแข็งอิตาลีชนิดนิ่ม (soft Italian cheese) นั่นคือ เนยแข็งมอสซาเรลลา โดยที่กรดแล็กทิกจะมีผลต่อแคลเซียมในน้ำนมน้อยกว่ากรดชนิดอื่น ที่เกี่ยวข้องกับสมดุลของเกลือ ในปี ค.ศ. 1964 Breene, Price, and Ernstrom ศึกษาทำการผลิตเนยแข็งพิซซ่า (pizza cheese) ซึ่งไม่ใช้กล้าเชื้อแต่ใช้วิธี direct acidification โดยปรับ pH ในน้ำนมที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ซึ่งปรับ pH ที่อุณหภูมิ 40 องศาฟาเรนไฮต์ (4.44 องศาเซลเซียส) ให้ได้ pH เท่ากับ 5.60 ด้วย กรดแล็กทิก กรดอะซิติก หรือกรดไฮโดรคลอริก แล้วเพิ่มอุณหภูมิเป็น 98 – 100 องศาฟาเรนไฮต์ (36.67 – 37.78 องศาเซลเซียส) เพื่อเติมเอนไซม์เรนเนท ทำการตัดก้อนเคิร์ดที่ได้ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิเดิมเป็นเวลา 80 นาที หลังจากนั้นให้ความร้อนที่ 120 องศาฟาเรนไฮต์ (48.89 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 นาที แล้วระบายหางนมออก ขึ้นรูป และเติมเกลือ พบว่า pH ของเนยแข็งจะสูงกว่าวิธีการทำเนยแข็งโดยใช้กล้าเชื้อ ในส่วนคุณสมบัติการยืดขยาย การละลายหลังอบ พบว่ายังมีประสิทธิภาพดี การทำเนยแข็งไขมันต่ำจะให้คุณภาพดียิ่งขึ้นกว่าเดิม และพบว่ารสฝาด เผ็ดลิ้นจะหมดไป เมื่อใช้กรดแล็กทิกในการผลิตเนยแข็ง

การนวดและขึ้นรูปเนยแข็งมอสซาเรลลาด้วยกระบวนการอัดพอง (extrusion) นั้น เป็นการใช้เครื่องอัดพอง (extruder) แทนกระบวนการนวดผสมก้อนเคิร์ด ซึ่งสามารถควบคุมอุณหภูมิในแต่ละช่วงของผนังบาเรลได้ ทั้งยังปรับความเร็วของการนวดผสมโดยปรับความเร็วรอบของสกรูได้ ในระหว่างการแปรรูป ซึ่งข้อดีของกระบวนการอัดพองคือ สามารถนำเนยแข็งไปใช้ได้ทันทีและสามารถตัดเป็นก้อนๆ ได้ ทำให้ใช้ได้ง่ายยิ่งขึ้น หรือสามารถทำได้เป็นหลายขนาดตามต้องการ

ซึ่งในอุตสาหกรรมเนยแข็งชนิดนี้ จะมีค่าใช้จ่ายในการผลิตแต่ละครั้งในส่วนที่เป็นเครื่องจักรที่เกี่ยวข้องกับการผลิต แต่ถ้านำเครื่องอัดพองมาใช้ในการผลิต ก็ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องจักรในส่วนของการให้ความร้อนและการนวดผสม (stretching machine) (Mulvaney, Rong, Barbano and Yun, 1997; Ferrari et al., 2003) ในปี ค.ศ. 1999 Rizvi, Shukla and Srikiatden ผลิตเนยแข็งมอสซาเรลลาแปรรูป (processed mozzarella cheese) โดยเริ่มจาก นำน้ำนมดิบมาผ่านกระบวนการปรับมาตรฐานปริมาณไขมัน ฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรส์ หลังจากนั้นเติมกล้าเชื้อ เติมเอนไซม์เรนเนทและตัดเคิร์ด พร้อมเพิ่มอุณหภูมิ หลังจากนั้นจึงระบายหางนมออก แล้วเติมเกลือ ถ้าเป็นวิธีการตามปกติจะทำการให้ความร้อนและทำการนวด แล้วนำไปบ่ม 2 สัปดาห์ บรรจุ หลังจากนั้นจึงเก็บไว้ 2 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิต่ำจึงจะนำมาใช้ได้ ซึ่งถ้าใช้เครื่องอัดพองนั้น จะมีการเปลี่ยนแปลงขั้นตอนการผลิตโดยหลังจากเติมเกลือ แล้วลดขนาดของก้อนเคิร์ด และเติมโซเดียมซิเตรต (sodium citrate) ในช่วงร้อยละ 0.50 – 2.50 โดยน้ำหนัก ทำการขึ้นรูปโดยใช้เครื่องอัดพองเข้ามาแทนในขั้นตอนช่วงการให้ความร้อนและทำการนวด หรือแทนเครื่องนวดผสมนั่นเอง ทำการบรรจุซึ่งสามารถนำเนยแข็งไปใช้ได้ทันทีไม่ต้องบ่ม อีกทั้งยังสามารถเก็บได้ที่อุณหภูมิห้องได้นานถึง 3 เดือน

จะเห็นได้ว่าเมื่อนำน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system เพื่อยืดอายุการเก็บ แล้วใช้วิธีการปรับ pH โดยเติมกรดลงไปแทนการใช้กล้าเชื้อจะช่วยลดค่าใช้จ่าย และใช้กระบวนการอัดพองในการนวดผสมและขึ้นรูปเพื่อการแปรรูปเป็นเนยแข็งมอสซาเรลลา จะทำให้ระยะเวลาในการผลิตสั้นลง ได้ปริมาณเนยแข็งที่มากขึ้น มีกลิ่นรส รสชาติ คุณสมบัติต่างๆ ดีขึ้น อีกทั้งยังสามารถเก็บเนยแข็งไว้ได้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลานานได้ ถ้ามีการปรับสภาวะในการผลิตเนยแข็งให้เหมือนหรือใกล้เคียงกับวิธีการผลิตของ Rizvi et al. (1999) ใช้เครื่องอัดพอง โดยอัตราการป้อนวัตถุดิบ 200 กรัม ต่อนาที อุณหภูมิบาเรล 110 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที

## 1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาสมบัติทางเคมีและจุลชีววิทยาของน้ำนมดิบที่ผ่าน และไม่ผ่าน LP-system เปรียบเทียบกับนมสดพาสเจอร์ไรส์

1.2.2 เพื่อศึกษาหาวิธีขั้นตอนการผลิตที่มีความเหมาะสมเมื่อน้ำนมผ่าน LP-system ในการผลิตเป็นเนยแข็งมอสซาเรลลา

1.2.3 เพื่อศึกษาสมบัติทางเคมี กายภาพ และจุลชีววิทยาของเนยแข็งมอสซาเรลลาจากน้ำนมทั้ง 3 ชนิด เปรียบเทียบกับเนยแข็งมอสซาเรลลาทางการค้า

## 1.3 สมมุติฐานของการวิจัย

1.3.1 น้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system สามารถลดจำนวนจุลินทรีย์ และส่งผลให้เกิดออกซิเดชันของโปรตีน อีกทั้งมีคุณภาพใกล้เคียงกับนมสดพาสเจอร์ไรส์

1.3.2 น้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system จะไม่ส่งผลกระทบต่อการแปรรูปเป็นเนยแข็งมอสซาเรลลาด้วยวิธีการผลิตที่ไม่ใช้กล้าเชื้อ

1.3.3 เนยแข็งมอสซาเรลลาที่ผลิตจากน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system มีสมบัติทางกายภาพ (การยืดขยาย และการละลาย) ใกล้เคียงกับเนยแข็งที่ใช้น้ำนมดิบที่ไม่ผ่าน LP-system และเนยแข็งมอสซาเรลลาทางการค้า

## 1.4 ข้อตกลงเบื้องต้น

1.4.1 น้ำนมที่ใช้ในการทดลองมี 3 ชนิด คือ น้ำนมดิบ น้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system และน้ำนมดิบที่ผ่านการฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรส์ จากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1.4.2 เครื่องที่ใช้ในการนวดและขึ้นรูปในการทดลองนี้ คือ เครื่องอัดพองชนิดสกรูคู่แบบหมุนตามกันและซ้อนกัน (co-rotating and intermeshing twin screw extruder) ของบริษัท APV Baker รุ่น MPF อัตราส่วนระหว่างความยาวทั้งหมดเทียบกับเส้นผ่านศูนย์กลางของสกรู (L/D ratio) เท่ากับ 25 : 1 ซึ่งสกรูมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 19 มิลลิเมตร บาเรลสามารถแบ่งได้ 4 ช่วง และใช้หน้าแปลน (die) เป็นรูกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.0 มิลลิเมตรในการผลิต

## 1.5 ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้ใช้น้ำนมดิบจากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นำมาวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีและจุลชีววิทยา โดยทำการศึกษาน้ำนมดิบที่ผ่านและไม่ผ่าน LP-system และนมสดพาสเจอร์ไรส์ที่ไม่ผ่าน LP-system จากนั้น วิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำนม จากนั้นนำน้ำนมทั้ง 3 ชนิด มาทำการแปรรูปเป็นเนยแข็งมอสซาเรลลาแบบไม่ใช้กล้าเชื้อ แล้วขึ้นรูปด้วยเครื่องอัดพอง และทดสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้ว่า มีผลต่อสมบัติทางกายภาพโดยรวมไปถึงการทำเป็นพิซซ่า เคมีและจุลชีววิทยา

## 1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 เป็นแนวทางในการพัฒนา LP-system เพื่อลดปัญหาในเรื่องการควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงระหว่างการขนย้ายน้ำนมดิบในอุตสาหกรรมนม และการเก็บรักษาน้ำนมดิบก่อนการแปรรูปในอุตสาหกรรมนมได้

1.6.2 ทำให้ทราบประสิทธิภาพของ LP-system ที่มีผลกระทบต่อคุณภาพของน้ำนมดิบและผลิตภัณฑ์เนยแข็งมอสซาเรลลา

1.6.3 ทำให้ทราบถึงกระบวนการผลิตเนยแข็งมอสซาเรลลา ที่ผลิตด้วยวิธีที่ไม่ใช้กล้าเชื้อโดยใช้เครื่องอัดพอง

1.6.4 ทำให้ทราบถึงสภาวะของการอัดพอง ที่มีผลต่อการนวดผสมและขึ้นรูปของเนยแข็งมอสซาเรลลา

1.6.5 เกิดกรรมวิธีการผลิตเนยแข็งมอสซาเรลลาที่ไม่ใช้กล้าเชื้อแบบใหม่ขึ้น

# บทที่ 2
# ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

## 2.1 ระบบการป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในน้ำนมดิบ

น้ำนมดิบเป็นแหล่งอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ เนื่องจากน้ำนมดิบมีค่า pH ที่เป็นกลาง มีสารอาหาร และมีน้ำเป็นองค์ประกอบสูง นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่น ที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในน้ำนมดิบทำให้เกิดการเสื่อมเสียจากจุลินทรีย์ได้ง่าย อย่างไรก็ตามในน้ำนมดิบที่รีดเสร็จ จะมีระบบป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ เพื่อไม่ให้เกิดการติดเชื้อของเต้านม และทำให้น้ำนมดิบเสื่อมเสียช้าลง (อรพิน ชัยประสพ, 2544) ซึ่งระบบป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ดังกล่าว ประกอบด้วย

1) อิมมูโนโกลบูลิน (Immunoglobulin) มีสมบัติเป็นแอนตี้บอดี้ (antibody) ผลิตขึ้นในเต้านมแล้วเข้าสู่น้ำนมดิบโดยผ่านทางกระแสเลือดหน้าที่หลักคือ ป้องกันตัวอ่อน พบมากในส่วนของเยื่อหุ้มเม็ดไขมัน เป็นโปรตีนที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในน้ำนมดิบ อีกทั้งยังสามารถยับยั้งการเจริญ และฆ่าทำลายแบคทีเรียชนิดต่างๆ ได้ โดยเฉพาะแบคทีเรียโคลิฟอร์ม และแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค (Chambers, 2002; Marnila and Korhonen, 2003)

2) ฟลาโกไซโทซิส (Phagocytosis) เป็นกลไกที่ทำหน้าที่ป้องกันจุลินทรีย์ ที่ทำให้เกิดโรคเต้านมอักเสบ กลไกนี้เกิดโดย เซลล์ polymorphonuclear ในน้ำนม กลไกนี้ จะมีประสิทธิภาพน้อยกว่าในระบบเลือด เนื่องจากไขมันและเคซีนในน้ำนมดิบมีผลต่อระบบการทำงานของ เซลล์ polymorphonuclear (Chambers, 2002)

3) แล็กโทลิปิด (Lactolipids) ไขมันในน้ำนมดิบที่มีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ จะอยู่ในรูปสารประกอบสายสั้น โดยเฉพาะกรดไขมัน ได้แก่ arachidonic acid, linoleic acid, linolenic acid, oleic acid, lauric acid, palmitoleic acid, myristic acid, capric acid, caprylic acid, stearic acid, palmitic acid, caproic acid และ butyric acid เป็นต้น ซึ่งมีผลทำให้เนื้อเยื่อของแบคทีเรียไม่สามารถคงรูปไว้ได้ โดยถ้ากรดไขมันมีสายสั้นมากเท่าใดก็ยิ่งทำให้ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์มากขึ้นเท่านั้น (Isaacs and Lampe, 2000)

4) แล็กโทเฟอริน (Lactoferrin) เป็นไกโคลโปรตีน (glycoprotein) ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (bacteriostatic) โดยแล็กโทเฟอรินจะทำการแย่งจับธาตุเหล็กของจุลินทรีย์ ทั้งนี้ประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ของแล็กโทเฟอริน จะขึ้นอยู่กับความต้องการใช้ธาตุ

เหล็กในการเจริญของแบคทีเรีย เช่น แบคทีเรียโคลิฟอร์ม, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* species และ *Listeria monocytogenes* เป็นต้น แต่ประสิทธิภาพจะลดลงในภาวะที่มีความเข้มข้นของซิเตรตสูง และไบคาร์บอเนตต่ำ (Losnedahl, Wang, Aslam, Zou and Hurley, 2004)

5) เอนไซม์ไลโซไซม์ (Lysozyme, EC 3.2.1.17) หรือ muramidase (peptidoglycan *N*-acetylmuramoyl hydrolase) สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ในน้ำนมดิบได้ โดยยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากในผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก ประกอบด้วย peptidoglycan ร้อยละ 90 ซึ่ง เอนไซม์ไลโซไซม์ ทำให้เกิดการดูดซึมน้ำเข้าสู่เซลล์มากกว่าปกติ ส่งผลให้เซลล์แตกได้ แต่ผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวกบางชนิดมี *N*-acetyl-glucosamine ทำให้ทนต่อเอนไซม์ไลโซไซม์ ส่วนผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบประกอบด้วย peptidoglycan เพียงแค่ร้อยละ 5 – 10 เท่านั้น จึงทนต่อแอคติวิตี (activity) ของเอนไซม์ไลโซไซม์ ได้ (Losso, Nakai and Charter, 2000)

6) *N*-Acetyl-β-D-glucosaminidase (EC 3.2.1.30) เป็นเอนไซม์ มีความสามารถแบบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคเต้านมอักเสบ (*Actinomyces pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* และ *Pseudomonas aeroginosa*) แต่ไม่สามารถยับยั้ง *Escherichia coli* และ *Enterobacter aerogenes* ได้ (Losnedahl et al., 2004)

7) เอนไซม์แล็กโทเพอร์ออกซิเดส (Lactoperoxidase (LPO), EC 1.11.1.7) เป็นเอนไซม์อยู่ในกลุ่ม oxidoreductase สามารถยับยั้งการเจริญ และฆ่าทำลายจุลินทรีย์ด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยทำปฏิกิริยากับสาร $SCN^-$ และสาร $H_2O_2$ โดยในธรรมชาติสารทั้ง 2 ชนิดนี้มีปริมาณต่ำ ซึ่งจะทำปฏิกิริยาได้เป็นสาร $OSCN^-$ โดยหน้าที่หลักคือ ป้องกันตัวอ่อนของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจากโรคทางเดินอาหาร (อรพิน ชัยประสพ, 2544; Losnedahl et al., 2004)

## 2.2 ระบบเอนไซม์แล็กโทเพอร์ออกซิเดส (lactoperoxidase system (LP-system))

LP-system เป็นระบบการทำงานของ เอนไซม์ LPO ที่มีประสิทธิภาพสูงในการต่อต้านจุลินทรีย์ พบในธรรมชาติครั้งแรกในน้ำนมดิบ สามารถยับยั้งการเจริญ และทำลายจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น แบคทีเรีย ไวรัส เชื้อรา ยีสต์ ไมโครพลาสมา และ โพรโตซัว เป็นต้น ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ ค่า pH อุณหภูมิ ระยะเวลาในการบ่มเชื้อ และความหนาแน่นของเชื้อ โดยที่กลไกนี้สามารถทำการกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาขึ้นได้ อีกทั้งยังสามารถใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารชนิดอื่น และใช้ร่วมกับวิธีการอื่นๆ ได้ (Seifu et al., 2005)

### 2.2.1 องค์ประกอบของระบบเอนไซม์แล็กโทเพอร์ออกซิเดส

โดยทั่วไป LP-system มีองค์ประกอบ 3 ส่วน คือ เอนไซม์แล็กโทเพอร์ออกซิเดส (lactoperoxidase, LPO) ไธโอไซยาเนท (thiocyanate, $SCN^-$) และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide, $H_2O_2$) โดยที่เอนไซม์ LPO สามารถทำปฏิกิริยากับสารอนินทรีย์ได้หลายชนิด เช่น สาร $SCN^-$, $I^-$, $Br^-$, $F^-$, $NO_2^-$, $N_3^-$ และ $CN^-$ เป็นต้น โดยที่ให้ผลในการยับยั้งจุลินทรีย์เหมือนกันแต่จะมีประสิทธิภาพต่างกัน โดยสารอนินทรีย์ที่มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ คือ สาร $SCN^-$ เรียกว่า lactoperoxidase/thiocyanate/hydrogen peroxide system และสาร $I^-$ ว่า lactoperoxidase/iodide/hydrogen peroxide system ซึ่งระบบของสาร $SCN^-$ ได้รับการรับรอง และมีประสิทธิภาพดีกว่าระบบของสาร $I^-$ (Naidu, 2000)

นอกจากนี้ Jandal (1997, อ้างถึงใน ณัฏฐา วิศิษฏ์วิทยากร, 2548, หน้า 20) ได้คิดค้นกรรมวิธีในการเก็บรักษาน้ำนมดิบอื่นๆ เช่น lactoperoxidase/garlic extract/ethanol system (LGE) และ lactoperoxidase/anion extract/ ethanol system (LOE) ที่ให้ผลเช่นเดียวกับ LP-system

2.2.1.1 เอนไซม์แล็กโทเพอร์ออกซิเดส (lactoperoxidase (LPO), EC 1.11.1.7)

เอนไซม์ LPO มีอยู่ในน้ำนม ต่อมน้ำนม ต่อมน้ำตา ต่อมน้ำลาย และในสารคัดหลั่งของต่อมดังกล่าว ได้แก่ น้ำนม น้ำลาย และน้ำตา ในน้ำนมจะพบอยู่ในส่วนของหางนม มีอยู่ประมาณร้อยละ 1 หรือประมาณ 10 – 30 มิลลิกรัม ต่อกิโลกรัม (พีพีเอ็ม (ppm)) พบว่ามีปริมาณมากกว่าที่ใช้ใน LP-system ซึ่งอยู่ในช่วง 0.5 – 1.0 ppm โดยทั่วไป เอนไซม์ LPO นั้น มีแอคติวิตีประมาณ 1.20 – 19.40 ยูนิต ต่อมิลลิลิตร (unit/ml) แต่จะมีแอคติวิตีสูงที่สุดในช่วงน้ำนมน้ำเหลือง (colostrum) แต่จะลดลงอย่างรวดเร็วภายใน 2 – 3 วัน เอนไซม์ LPO ทำงานดีที่ pH 5 – 8 อุณหภูมิ 20 – 40 องศาเซลเซียส (Priutt, 2003; Rehman and Farkye, 2003) นอกจากสารตั้งต้น ($SCN^-$ และ $H_2O_2$) ของปฏิกิริยาแล้ว องค์ประกอบภายในน้ำนมก็มีผลกระทบต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ LPO ด้วยเช่นเดียวกัน จากการศึกษาของ Fonteh, Grandidon and Lewis (2005) พบว่า น้ำนมดิบที่เติมสารแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ แอคติวิตีของเอนไซม์ LPO จะสูงขึ้นกว่าน้ำนมปกติ ประมาณ 2 เท่า แต่น้ำนมดิบที่เติมเคซีน ลงไปร้อยละ 2.50 โดยน้ำหนัก มีผลให้แอคติวิตีของเอนไซม์ LPO นั้น ต่ำกว่าน้ำนมดิบปกติประมาณ 3 เท่า

2.2.1.2 ไธโอไซยาเนท (thiocyanate, $SCN^-$)

สาร $SCN^-$ พบได้ใน ต่อมน้ำลาย ต่อมไทรอยด์ ต่อมหมวกไต ในสารคัดหลั่งของต่อมดังกล่าว และในอวัยวะต่างๆ เช่น กระเพาะอาหาร ตับ ตับอ่อน ไต และในของเหลว (ไขข้อ, สมอง, คอ และน้ำเหลือง) เป็นต้น ส่วนใหญ่สาร $SCN^-$ จะถูกขับออกมากับปัสสาวะและในระบบไต โดยมีค่าครึ่งชีวิต (half-life) อยู่ที่ 2 – 5 วัน (Wolfson and Sumner,

1993) ในน้ำนมดิบความเข้มข้นของสาร $SCN^-$ ขึ้นอยู่กับ พันธุ์แม่โค สุขภาพแม่โค และ อาหารกับชนิดของอาหารที่ใช้เลี้ยงสัตว์ ซึ่งอยู่ในช่วงระหว่าง 1 – 15 ppm โดยปริมาณที่เหมาะสมสำหรับกระตุ้น LP-system อยู่ที่ 15 ppm แต่จะพบมีปริมาณสูงมากในช่วงที่มีจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวมากกว่าปกติ โดยแหล่งที่พบมาก มี 2 แหล่ง คือ glucosinolates พบในผักที่อยู่ในสกุล *Brassica* เช่น กะหล่ำปลี, กะหล่ำดอก และผักกาด เป็นต้น และ cyanogenic glucosides พบในมันสำปะหลัง, มันฝรั่ง, มันเทศ, ข้าวโพด, ข้าวฟ่าง, ต้นอ้อย และถั่ว เป็นต้น (Reiter and Harnulv, 1984; Seifu et al., 2005) นอกจากนี้ Fonteh et al. (2005) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสาร $SCN^-$ กับ เอนไซม์ LPO พบว่า น้ำนมที่เติมสาร $SCN^-$ เข้มข้นเพียงแค่ 6 มิลลิโมลาร์ ก็สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ LPO ได้อย่างสมบูรณ์แล้ว สุรีย์วรรณ พันธ์นรา และคณะ (2548) ศึกษาการใช้ใบมันสำปะหลังแห้งเป็นอาหารแม่โครีดนมในระดับ 2 และ 3 กิโลกรัม ต่อตัว ต่อวัน พบว่าใบมันสำปะหลังแห้งมีปริมาณสารไซยาไนด์ ($CN^-$) เฉลี่ยในระดับ 112.29 ppm ดังนั้นในน้ำนมดิบมีปริมาณสาร $SCN^-$ ในระดับ 14.89 และ 15.91 ppm ตามลำดับ ซึ่งการใช้ใบมันสำปะหลังแห้งในระดับดังกล่าว มีความปลอดภัยเพราะ แม่โคสามารถทนพิษสาร $CN^-$ ได้ถึง 2 ppm ของน้ำหนักตัวสัตว์ และการใช้ปริมาณในช่วงดังกล่าวมีความเพียงพอที่ใช้ในการกระตุ้น LP-system

2.2.1.3 ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide, $H_2O_2$)

สาร $H_2O_2$ โดยทั่วไปไม่พบในน้ำนมดิบ แต่ในบางครั้งพบได้ประมาณ 2 – 4 ppm โดยจะมาจากจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำนม (Wilkins and Board, 1989) ซึ่งการเพิ่มปริมาณหรือการผลิตสาร $H_2O_2$ นั้น สามารถทำได้โดย กระบวนการออกซิเดชันของน้ำตาลกลูโคสโดยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส กระบวนการออกซิเดชันของไฮโปแซนทีน (hypoxanthine) โดยเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส (xanthine oxidase) และกระบวนการออกซิเดชันของวิตามินซี เป็นต้น น้ำนมดิบสามารถเติมสาร $H_2O_2$ ในระดับความเข้มข้น 100 – 800 ppm ซึ่งเท่ากับ 2.9 – 23.5 มิลลิโมลาร์ ถ้าน้ำนมดิบมีสาร $SCN^-$ ในระดับที่ต่ำจะส่งผลให้เอนไซม์ LPO ถูกทำลายได้โดยสาร $H_2O_2$ ที่มีปริมาณมากได้ (Seifu et al., 2005; Wolfson and Sumner, 1993) นอกจากนี้ Fonteh et al. (2005) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสาร $H_2O_2$ กับเอนไซม์ LPO พบว่าน้ำนมดิบที่เติมสาร $H_2O_2$ เข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ สามารถเกิดแอคติวิตีของเอนไซม์ LPO สูงมากที่สุด และเมื่อเพิ่มปริมาณสาร $H_2O_2$ แอคติวิตีของเอนไซม์ LPO ก็จะลดลงตามไปด้วย

**2.2.2 ปฏิกิริยาของระบบเอนไซม์แล็กโทเพอร์ออกซิเดส**

ปฏิกิริยาของ LP-system เป็นการทำปฏิกิริยากันระหว่างสาร $SCN^-$ และ $H_2O_2$ โดยที่ เอนไซม์ LPO จะทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาการสลายตัวของสาร $H_2O_2$ และ

ปฏิกิริยาออกซิเดชันของสาร $SCN^-$ จนได้ ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นสาร ซัลเฟต ($SO_4^{2-}$) แอมโมเนีย ($NH_3$) และคาร์บอนไดออกไซด์ ($CO_2$) หรือปฏิกิริยาอาจย้อนกลับมาเป็นสาร $SCN^-$ ก็ได้ โดยสารที่เป็น intermediary oxidation product ที่สำคัญนั้นคือ สารไฮโปไธโอไซยาไนท์ (hypothiocyanite ($OSCN^-$)) (ณัฏฐา วิศิษฏ์วิทยากร, 2543) โดยปฏิกิริยาการเกิดสาร $OSCN^-$ นั้น มี 2 วิธี คือ (Seifu et al., 2005)

1) การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสาร $SCN^-$ ไปเป็นสาร thiocyanogen ($(SCN)_2$) จากนั้นจะถูกไฮโดรไลซ์ (hydrolyze) ไปเป็นสาร hypothiocyanous acid (HOSCN) หรือเป็นสาร $OSCN^-$ ดังสมการ

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

$$(SCN)_2 + 2H_2O \rightarrow HOSCN + SCN^- + H^+$$

$$HOSCN \quad (pKa = 5.30) \leftrightarrow H^+ + OSCN^-$$

2) การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสาร $SCN^-$ โดยตรงให้กลายเป็นสาร $OSCN^-$ ได้เลย ดังสมการ

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

โดยที่สาร $OSCN^-$ ส่วนใหญ่จะเกิดจากวิธีที่ 1 มากกว่าวิธีที่ 2 เนื่องจากวิธีที่ 1 ใช้พลังงานในการเกิดปฏิกิริยาน้อยกว่าวิธีที่ 2 ประมาณ 10 เท่า (Furtmuller et al., 2002) แต่ถ้าในระบบมีสาร $H_2O_2$ ในปริมาณที่มากพอ จะเกิดปฏิกิริยาตามวิธีที่ 2 นั่น คือทำให้เกิดสาร $OSCN^-$ โดยตรงเพื่อปรับระบบอยู่ในสภาวะสมดุลโดยเร็ว (Boots and Floris, 2006)

### 2.2.3 สารไฮโปไธโอไซยาไนท์ (hypothiocyanite, $OSCN^-$)

สาร $OSCN^-$ ไม่ใช่สาร intermediary oxidation product เพียงชนิดเดียวที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา ซึ่งยังมีสารชนิดอื่นๆ อีกซึ่งขึ้นอยู่กับสภาวะของปฏิกิริยา ได้แก่ สาร cyanogen thiocyanate (NC-SCN), thiocyanogen $(SCN)_2$, cyanosulphurous acid ($HO_2SCN$) และ cyanosulphuric acid ($HO_3SCN$) เป็นต้น แต่สารที่เกิดขึ้นมากที่สุดในสภาวะ pH ปกติของ

น้ำนมดิบคือ สาร $OSCN^-$ แต่ถ้าในระบบมีสาร $H_2O_2$ ในปริมาณที่มากพอ ที่ pH ปกติสาร $OSCN^-$ จะกลายเป็นสาร $HO_2SCN$ และ $HO_3SCN$ ดังสมการ

$$H_2O_2 + OSCN^- \rightarrow O_2SCN^- + H_2O$$

$$H_2O_2 + O_2SCN^- \rightarrow O_3SCN^- + H_2O$$

อีกทั้งสารทั้ง 2 ชนิด ยังมีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีกว่าสาร $OSCN^-$ (Pruitt, Tenovuo, Andrews and McKane, 1982) โดยสาร $OSCN^-$ มีความไวต่อแสง แต่มีความคงตัวที่ pH 7.5 และทนความร้อนสูง แต่ถ้ามีกลีเซอรอล แอมโนเนียมซัลเฟต และไอออนของโลหะ (Fe, Ni, Cu, Mn) จะทำให้ความคงตัวของสาร $OSCN^-$ ลดลง (Seifu et al., 2005; Wolfson and Sumner, 1993)

**2.2.4 กลไกการออกฤทธิ์ของระบบเอนไซม์แล็กโตเปอร์ออกซิเดส**

กลไกของ LP-system เริ่มจากเอนไซม์ LPO ไปกระตุ้นการรวมตัวกันของสาร $SCN^-$ กับโปรตีนกลุ่ม sulfhydryl (-SH) ที่เป็นสารตั้งต้น โดยการเกิดปฏิกิริยาของสาร $(SCN)_2$, $OSCN^-$ หรือ HOSCN กับโปรตีนกลุ่ม -SH นี้ และถูกออกซิไดส์ไปเป็นกลุ่ม sulphenyl thiocyanate (-S-SCN) ดังสมการ

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

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

แล้วกลุ่ม -S-SCN ก็เกิดปฏิกิริยาต่อไปเป็นกลุ่ม disulfide (-S-S) ได้ ดังสมการ

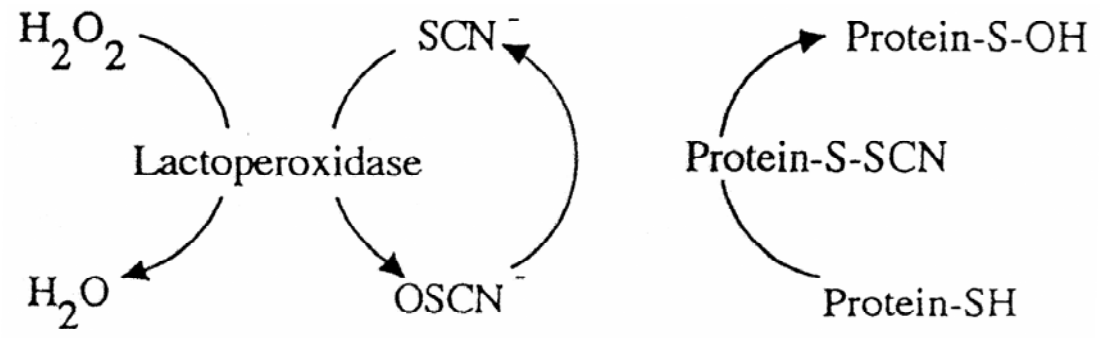
$$\text{Protein-S-SCN} + RSH \longrightarrow \text{Protein-S-S-R} + SCN^- + H^+$$

นอกจากนี้ กลุ่ม -S-SCN สามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสแบบผันกลับได้ ซึ่งจะกลายเป็นกลุ่ม sulphenic acid (-S-OH) ดังสมการ (Daeschel and Penner, 1992)

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

การเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของกลุ่ม -S-SCN นี้ เกิดจากการแตกพันธะของสาร $SCN^-$ เนื่องจากการปรับสภาวะให้สมดุล ของปฏิกิริยาการรวมตัวระหว่างกลุ่ม -S-OH กับสาร $SCN^-$ ที่มาจากปริมาณของสาร $SCN^-$ มีเพิ่มมากขึ้น (Aune and Thomas, 1978)

โปรตีนกลุ่ม -SH สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันอย่างช้าๆ จนกลายเป็นกลุ่ม -S-OH โดยที่สาร $SCN^-$ จำนวนครึ่งหนึ่ง สามารถถูกแทนที่ด้วยกลุ่ม -S-SCN โดยปฏิกิริยารีดักชันของสารประกอบกลุ่ม -SH การเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของกลุ่ม -S-SCN นั้น สามารถปลดปล่อยสาร $SCN^-$ ออกมาได้ ถึงแม้จะมีความเข้มข้นของสาร $SCN^-$ ต่ำ เมื่อได้สาร $SCN^-$ ออกมาแล้ว จะสามารถถูกออกซิไดส์เป็นสาร $OSCN^-$ และสามารถเข้าไปในปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลุ่ม -SH อื่นๆ ได้อีก ดังแสดงในภาพที่ 2.1 (ณัฏฐา วิศิษฏ์วิทยากร, 2543)




**ภาพที่ 2.1** ปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลุ่ม sulfhydryls (-SH)
แหล่งที่มา: Wolfson and Sumner (1993)

ปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลุ่ม -SH ไปเป็นกลุ่ม -S-OH นั้น จะไม่เกี่ยวข้องกับสาร $SCN^-$ เลย ดังนั้น ปริมาณกลุ่ม -SH ที่ถูกออกซิไดส์นั้น จึงไม่ได้ขึ้นอยู่กับปริมาณของสาร $SCN^-$ (Wolfson and Sumner, 1993)

สำหรับปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของกลุ่ม -SH ในเอนไซม์และในโปรตีนอื่นๆ นี้ ถือเป็นปฏิกิริยาที่สำคัญในการเกิดกระบวนการยับยั้งจุลินทรีย์ของ LP-system โดยการยับยั้งจะมีผลกับสารที่มีกลุ่ม -SH เช่น cysteine, glutathione, mercapto-ethanol, dithiothreitol และ sodium hydrosulphite โดยเข้าจับโดยตรงกับเอนไซม์ LPO ที่ haem group ซึ่งสาร HOSCN หรือ $OSCN^-$ ก็สามารถทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับโปรตีนในน้ำนมที่มีกลุ่ม -SH นั่นคือ เบต้า-แล็กโทโกลบูลิน (β-lactoglobulin) (Seifu et al., 2005)

**2.2.5 ประสิทธิภาพของระบบเอนไซม์แล็กโทเพอร์ออกซิเดส**

LP-system มีประสิทธิภาพในการทำลายหรือยับยั้งการเจริญ และในกระบวนการเมตาโบลิซึมของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลงระบบต่างๆ ของเซลล์ได้ เช่น เมมเบรนชั้นนอก (outer membrane) ผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์ ระบบขนส่ง (transport system) glycolytic enzyme และกรดนิวคลิอิก (nucleic acid) โดยขึ้นอยู่กับสภาวะของปฏิกิริยา เช่น มีความเข้มข้นของเอนไซม์ LPO เพียงพอ ชนิดของ electron donor ชนิดของตัวกลาง อุณหภูมิ (0 – 5 องศาเซลเซียส) และ pH (5 – 6 หรือต่ำกว่า) และเป็นต้น ซึ่งมีผลทำให้เกิดการรั่วไหลของไอออนโพแทสเซียม กรดอะมิโน และ polypeptides ไปสู่สารตัวกลาง หลังจากนั้นกระบวนการการดูดซึมกลูโคส กรดอะมิโน พิวรีน (purines) และไพริมิดีน (pyrimidines) เข้าสู่เซลล์ และการสังเคราะห์โปรตีนดีเอ็นเอ (DNA) และอาร์เอ็นเอ (RNA) ก็จะถูกยับยั้งไปด้วย (Seifu et al., 2005; Wolfson and Sumner, 1993)

LP-system เกิดก่อนที่จะถึงเซลล์เป้าหมายนั้น มีประสิทธิภาพสูงกว่าการที่ไปถึงเซลล์เป้าหมายก่อนแล้วจึงมาทำปฏิกิริยากัน โดยมีผลต่อเซลล์จุลินทรีย์ที่อยู่ในระยะ stationary phase มากกว่าจุลินทรีย์ที่อยู่ในระยะการเจริญ (growth phase) (ณัฏฐา วิศิษฎ์วิทยากร, 2543) นอกจากนี้ LP-system ยังมีผลต่อจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในสภาวะที่ไม่ใช้ออกซิเจน มากกว่าจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในสภาวะที่ใช้ออกซิเจน เนื่องจากจุลินทรีย์ในกลุ่มที่ไม่ใช้ออกซิเจนนั้น ไม่มีเอนไซม์ในกลุ่ม oxidoreductase ได้แก่ NADPH oxidase, NADH peroxidase, rubredoxin oxidoreductase, superoxidase dismutase, flavoprotein oxidase และ catalase เป็นต้น ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้ สามารถเกิดปฏิกิริยารีดักชันของสาร $OSCN^-$ ไปเป็นสาร $SCN^-$ ทำให้ไม่เป็นอันตรายต่อจุลินทรีย์ (Moat, Foster and Spector, 2002; Daeschel and Penner, 1992)

ทั้งนี้ LP-system มีผลกระทบต่อแบคทีเรียแกรมลบมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบนั้น มีความหนาน้อยกว่าแบคทีเรียแกรมบวก แต่มีส่วนประกอบทางเคมีและโครงสร้างซับซ้อนมากกว่า อีกทั้งผนังเซลล์สามารถแบ่งเป็น 2 ส่วน โดยขั้นกลางด้วยเปปไทด์ที่มีชื่อว่า เปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) หรือ ไกลโคซามิโนเปปไทด์ (glycosaminopeptide) หรือ มิวโคเปปไทด์ (mucopeptide) หรือ มิวรีน (murein) โดยในส่วน outer membrane นั้น จะมีโพริน (porin) ลิโพโปรตีน (lipoprotein) และโปรตีนชนิดต่างๆ เป็นส่วนประกอบ มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก เนื่องจากสาร $OSCN^-$ ทำปฏิกิริยากับโปรตีนเป็นหลัก จึงมีผลให้ถูกยับยั้งได้ดีกว่า (Moat et al., 2002; Seifu et al., 2005)

**2.2.6 จุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้งด้วยระบบเอนไซม์แล็กโทเพอร์ออกซิเดส** (ณัฏฐา วิศิษฎ์วิทยากร, 2543; Naidu, 2000; Seifu et al., 2005)

LP-system สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิด โดยแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

2.2.6.1 แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Baciilus cereus, B. megatherium, Campylobacter jejuni, Clostridium perfringens, Lactobacillus acidophilus, L. bulgaricus, L. casei, L. helvaticus, L. jugurti, L. plantarum, Listeria monocytogenes, L. pneumophila, Sarcina lutea, Staphylococcus albus, S. aureus, Streptococcus agalactiae, S. cremoris, S. fecalis, S. lactis, S. mitis, S. mutans, S. pyogenes, S. salivarius* และ *S. sanguis* เป็นต้น

2.2.6.2 แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Acinetobacter sp., Actinobacillus actinomycetemcomitans, Aeromonas hydropila, Enterobacter cloacae, Escherichia coli, Fusobacterium nucleatum, Haemophilus influenzae, Helicobacter pylori, Klebsiella pneumoniae, K. oxytoca, Leginella pneumophila, Neisseria sp., Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, P. loescheii, P. melaninogenica, Protus sp., Pseudomonas aeruginosa, P. fluorescens, Salmonella* Typhimurium, *Selenomonas sputigena, Serratia sp., Shigella sonnei, Wolinella recta* และ *Yesinia enterocolitica* เป็นต้น

2.2.6.3 ยีสต์ และรา ได้แก่ *Aspergillus niger, Byssochlamys fulva, Candida albicans, C. tropicalis, Rhodotorula rubra* และ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นต้น

2.2.6.4 ไวรัส ได้แก่ HIV-1, HSV-1, Immunodeficient virus, Polio virus, Respiratory syncytial virus และ Vaccinia virus เป็นต้น

## 2.3 การใช้ระบบเอนไซม์แล็กโทเพอร์ออกซิเดสในอุตสาหกรรมนม

### 2.3.1 ปริมาณที่ใช้ในการกระตุ้นระบบเอนไซม์แล็กโทเพอร์ออกซิเดส

LP-system สามารถใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารชนิดอื่นๆ ได้ นอกเหนือจากผลิตภัณฑ์นม โดยเฉพาะในประเทศออสเตรเลียและนิวซีแลนด์ (Food Standards Australia New Zealand (FSANZ), 2002) และ Codex (1991) นั้น อนุญาตให้ใช้ในอาหารประเภท เนื้อสัตว์ ปลา นม และผลิตภัณฑ์ โดยอนุญาตให้ใช้องค์ประกอบของ LP-system ในปริมาณที่กำหนด ดังนี้

1) เอนไซม์ LPO ในระดับ 800 – 2800 ยูนิต (U) ต่อกิโลกรัม

2) สาร $SCN^-$ ในรูปสาร NaSCN หรือสาร KSCN 30 – 40 มิลลิกรัม ต่อกิโลกรัม

3) สาร $H_2O_2$ โดยใช้ร่วมกันระหว่างเอนไซม์ glucose oxidase 150-300 ยูนิต ต่อกิโลกรัม กับน้ำตาลกลูโคส 120 – 160 มิลลิกรัม ต่อกิโลกรัม

ในปี พ.ศ. 2548 กระทรวงอุตสาหกรรมได้ออกมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (มอก. 22000-2548) เรื่อง ระบบการจัดการความปลอดภัยของอาหาร-ข้อกำหนดสำหรับองค์กรในห่วงโซ่อาหาร ซึ่งเป็นมาตรฐานเดียวกันกับ ISO ที่ออกมาตรฐานนี้ขึ้นมาในปี ค.ศ. 2005 นั่นคือ ISO 22000 : 2005 Food safety management systems-Requirements for organization in the food chain ซึ่งเป็นมาตรฐานระหว่างประเทศ มีการกำหนดให้ใช้ LP-system ตามวิธีของ Codex ในปี ค.ศ. 1991 เรื่อง Guidelines for the Preservation of Raw Milk by Use of the Lactoperoxidase System (CAC/GL 13-1991) ซึ่งเป็นข้อกำหนดที่ใช้เฉพาะในน้ำนมดิบเท่านั้น ซึ่งเป็นข้อกำหนดที่แคบกว่ามาตรฐานของ FSANZ โดยกำหนดวิธีการดังต่อไปนี้

1) เติมสาร NaSCN 14 มิลลิกรัม ต่อน้ำนมดิบ 1 กิโลกรัม จากนั้นทำการกวนนาน 1 นาที

2) เติมสาร $2Na_2CO_3.3H_2O_2$ 30 มิลลิกรัม ต่อน้ำนมดิบ 1 กิโลกรัม จากนั้นทำการกวนประมาณ 2 – 3 นาที

3) ปฏิกิริยาของเอนไซม์ LPO ในน้ำนมดิบเริ่มขึ้น เมื่อเติมสาร $H_2O_2$ ในรูป $2Na_2CO_3.3H_2O_2$ ซึ่งปฏิกิริยาสิ้นสุดภายใน 5 นาที หรือจนกว่าไม่มีสาร $H_2O_2$ ในน้ำนมดิบเหลืออยู่อีกเลย ซึ่งควรทำการกระตุ้นระบบนี้ภายใน 2 – 3 ชั่วโมง หลังจากการรีดนม

### 2.3.2 การใช้ระบบเอนไซม์แล็กโทเพอร์ออกซิเดสในน้ำนมและผลิตภัณฑ์นม

2.3.2.1 การใช้ระบบเอนไซม์แล็กโทเพอร์ออกซิเดสในน้ำนมดิบ

Garcia-Garibay, Luna-Salazar and Casas (1995) ศึกษา LP-system ในน้ำนมดิบ ซึ่งแหล่งที่ให้สาร $H_2O_2$ นั้น มาจากการใช้สาร $2Na_2CO_3.3H_2O_2$ หรือ น้ำตาลกลูโคส กับ เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส โดยใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึง 2 ชนิด คือ เอนไซม์แล็กเทส (lactase) และเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และที่ pH 6.60 เอนไซม์แล็กเทส จะไปย่อยน้ำตาลแล็กโทสในน้ำนม ให้ได้น้ำตาลกลูโคสและกาแล็กโทส จากนั้นเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส เข้าไปทำปฏิกิริยากับน้ำตาลกลูโคสจนได้สาร $H_2O_2$ ภายใน 3 นาที หลังจากนั้นเก็บรักษาน้ำนมดิบที่ 8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสามารถลดจำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์ม *Staphylococcus aureus*, ไซโครโทรฟ (psychrotroph) และเชื้อราได้ร้อยละ 79, 68, 91 และ 100 ตามลำดับ

2.3.2.2 การใช้ระบบเอนไซม์แล็กโทเพอร์ออกซิเดสในน้ำนมพาสเจอร์ไรส์

Barrett, Grandison and Lewis (1999) ศึกษาในน้ำนมดิบที่ผ่านและไม่ผ่าน LP-system มาฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรส์ ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที และเก็บที่ 8 องศาเซลเซียส พบว่าน้ำนมที่ผ่านและไม่ผ่าน LP-system มีอายุการเก็บประมาณ 19 – 23 และ 17 – 20 วัน ตามลำดับ และพาสเจอร์ไรส์ที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที โดยเก็บที่อุณหภูมิเดียวกัน พบว่า น้ำนมที่ผ่านและไม่ผ่าน LP-system มีอายุการเก็บประมาณ 16 – 19 และ 15 – 18 วัน ตามลำดับ สาเหตุที่น้ำนมพาสเจอร์ไรส์ที่ใช้อุณหภูมิต่ำเก็บได้นาน เพราะเอนไซม์ LPO นั้น ยังมีแอคติวิตีอยู่ถึงร้อยละ 70 ขณะที่พาสเจอร์ไรส์ที่ใช้อุณหภูมิสูงเอนไซม์ LPO ถูกยับยั้งจนสมบูรณ์ ทำให้เก็บได้นานกว่า จะเห็นได้ว่า LP-system นั้นสามารถช่วยในการยืดอายุของผลิตภัณฑ์ ซึ่งถ้ายังมีแอคติวิตีของ เอนไซม์ LPO อยู่ก็สามารถเก็บได้นานยิ่งขึ้น

2.3.2.3 ผลของระบบเอนไซม์แล็กโทเพอร์ออกซิเดสต่อกล้าเชื้อผลิตภัณฑ์นมหมัก

LP-system มีผลต่อจุลินทรีย์หลายชนิด ซึ่งส่งผลต่อกล้าเชื้อที่ใช้ในการผลิตและคุณภาพของผลิตภัณฑ์สุดท้ายด้วย ดังแสดงในตารางที่ 2.1 ถึงแม้ว่าจะมีการพัฒนาสายพันธุ์ของเชื้อสกุล lactococcus ที่ทนต่อไวรัสของแบคทีเรีย (phage) แต่ยังไม่สามารถทนต่อระบบนี้ได้ ทำให้ต้องใช้ระยะเวลาในการผลิตนานกว่าเดิม (Sarkar and Misra, 1994)

**ตารางที่ 2.1** ผลกระทบของระบบเอนไซม์แล็กโทเพอร์ออกซิเดสต่อกล้าเชื้อผลิตภัณฑ์นมหมัก

| **Starter cultures** | **Effect** |
|---|---|
| Lactic acid bacteria | Reduced rate of acid production |
| Thermophilic starters | Delay in coagulation time by 4.5 h when inoculated 2 h after lactoperoxidase activation |
| *Streptococcus thermophilus* + *Lactobacillus bulgalicus* | Reduced rate of acid production and delay in curding time 1 h 30 min. |
| *Lactobacillus acidophilus* | Reduced rate of acid production |
| Mesophilic cheese starter cultures | Inhibition of growth and acid production |

แหล่งที่มา: Seifu et al. (2005)

2.3.2.4 ผลของระบบเอนไซม์แล็กโทเพอร์ออกซิเดสต่อผลิตภัณฑ์นมหมัก

LP-system มีผลต่อผลิตภัณฑ์นมหมัก ดังแสดงในตารางที่ 2.2 โดยที่ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ชนิดของน้ำนมที่ใช้ ชนิดของกล้าเชื้อที่ใช้ ปริมาณของสาร $SCN^-$ และ $H_2O_2$ ที่ใช้ในการกระตุ้นระบบนี้ ปริมาณของสาร $SCN^-$ และ $H_2O_2$ ในน้ำนมดิบที่มีอยู่ตามธรรมชาติ อุณหภูมิที่ใช้ระหว่างการกระตุ้นระบบนี้ เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในระหว่างการบ่ม และอัตราการบ่มของกล้าเชื้อ (Seifu et al., 2005)

การแก้ปัญหาอาจทำได้หลายวิธี เช่น การยับยั้งเอนไซม์ LPO หลังจากทำการกระตุ้นระบบแล้ว การใช้ความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที สามารถทำลายสาร $OSCN^-$ ได้ เลือกใช้กล้าเชื้อจำพวกเทอร์โมฟิลิก (thermophilic) ในการผลิตแทน ใช้กล้าเชื้อที่ทนต่อ LP-system หรือ กล้าเชื้อที่ไม่สามารถสร้างสาร $H_2O_2$ ขึ้นเองได้ และทำการพัฒนาเทคโนโลยีในการคัดเลือกกล้าเชื้อที่สามารถทนต่อ LP-system ได้ (Sarkar and Misra, 1994)

**ตารางที่ 2.2** ผลกระทบของระบบเอนไซม์แล็กโทเพอร์ออกซิเดสต่อผลิตภัณฑ์นมหมัก

| **Products** | **Type of milk** | **Effect** |
|---|---|---|
| Dahi | Buffalo | Lower diacetyl and acetoin content and lower proteolytic activity |
| Acidophilus milk | Cow | Lower diacetyl and acetoin content and lower proteolytic activity |
| Cultured milk | Cow | No significant difference in the quality, longer rennet coagulation time |
| Yoghurt | Cow | No difference in chemical composition and organoleptic qualities |
| | Buffalo | A delay in curding time by 1 h 20 min, no effect no body and texture, lower flavour rating |

แหล่งที่มา: Seifu et al. (2005)

2.3.2.5 ผลของระบบเอนไซม์แล็กโทเพอร์ออกซิเดสต่อผลิตภัณฑ์เนยแข็ง

LP-system มีผลต่อผลิตภัณฑ์เนยแข็ง ดังแสดงในตารางที่ 2.3 Kumar and Mathur (1989) ศึกษาในน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system แล้วนำมาผลิตเนยแข็งมอสซาเรลลา พบว่า มีผลต่อการเจริญของกล้าเชื้อ ทำให้ใช้เวลาในการผลิตนานกว่าน้ำนมดิบที่ไม่ผ่านระบบนี้ ประมาณ 2 ชั่วโมง อีกทั้งยังมีผลทำให้ปริมาณความชื้น และเกลือ น้อยกว่าเนยแข็งที่ผลิตจากน้ำนมดิบที่ไม่ผ่านระบบนี้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ในปี ค.ศ. 2003 Seifu et al. ทำการศึกษา LP-system ที่มีผลต่อกล้าเชื้อในการผลิตเนยแข็งจากน้ำนมแพะ พบว่า LP-system มีผลต่อกล้าเชื้อที่ใช้ในการผลิตเนยแข็ง ถึงแม้ว่าการใช้จุลินทรีย์หลายชนิดรวมกันเป็นกล้าเชื้อแล้วก็ตาม และในปี ค.ศ. 2004 นำน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system มาผลิตเนยแข็ง Gouda จากน้ำนมแพะ พบว่า LP-system มีผลกระทบทางด้านชีวเคมี จุลชีววิทยา และทางประสาทสัมผัส โดยเนยแข็งจากน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system จะมีปริมาณจุลินทรีย์จำพวกโคลิฟอร์ม และ Staphylococci ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเนยแข็งที่ผลิตจากน้ำนมดิบที่ไม่ได้ผ่านระบบนี้ และพบว่ากลไกที่ทำให้เกิดกลิ่นรสอย่างการย่อยสลายไขมัน (lipolysis) ถูกยับยั้ง มีผลทำให้เกิดกลิ่นรสที่อ่อนลง แต่จะไม่มีผลต่อกลไกการย่อยสลายโปรตีน (proteolysis) และในปีเดียวกันยังได้มีการปรับปรุงเนยแข็ง Gouda ที่ผลิตจากน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system ให้มีกลิ่นรสที่ดีขึ้น โดยทำจากน้ำนมดิบที่ไม่ได้ผ่านการให้ความร้อน นั่นคือคัดเลือกกล้าเชื้อที่มีความเหมาะสม โดยสามารถทนต่อ LP-system มาใช้ในการผลิต

**ตารางที่ 2.3** ผลกระทบของระบบเอนไซม์แล็กโทเพอร์ออกซิเดสต่อผลิตภัณฑ์เนยแข็ง

| **Products** | **Type of milk** | **Effect** |
|---|---|---|
| Cheddar cheese | Cow | Delayed acid production, and longer manufacturing schedule (about 2 h), weak curd at cutting, dry and rubbery curd at cheddaring, lower yield, slower ripening of cheese |
| Cottage cheese | Cow | Taste and flavor of experimental cheese slightly different from the control, increased cheese yield |

**ตารางที่ 2.3** ผลกระทบของระบบเอนไซม์แล็กโทเพอร์ออกซิเดสต่อผลิตภัณฑ์เนยแข็ง (ต่อ)

| **Products** | **Type of milk** | **Effect** |
|---|---|---|
| Fresh cheese | Cow | Slow acid development, low moisture retention, satisfactory body and texture |
| Gouda cheese | Goat | Improves microbiological quality and flavor |
| Manchego cheese | Ewe | Prevents excessive proteolysis and softening |
| Mozzarella cheese | Buffalo | No difference in recovery of solids from milk, lower moisture retention, slow acid development, longer time (2 h) to reach stretching stage |
| Pickled cheese | Cow and Buffalo | Manufacture of pickled soft cheese from unsalted milk was possible, shorter processing time and economic utilization of whey, higher whey expulsion and lower yield<br>Increased cheese yield and coagulation time, decreased curd tension, increased moisture content and decreased acidity, satisfactory quality and ranked high scores |

แหล่งที่มา: Seifu et al. (2005)

2.3.2.6 การใช้ระบบเอนไซม์แล็กโทเพอร์ออกซิเดสร่วมกับกรรมวิธีการฆ่าเชื้อแบบอื่นๆ

LP-system สามารถใช้ร่วมกับกรรมวิธีการฆ่าเชื้อแบบอื่นๆ ได้ เพื่อลดจำนวนจุลินทรีย์ลง เช่น การใช้ร่วมกับความดันในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในนมพร่องมัน

เนย (Gracia-Graells, Valckx and Michiels, 2000) หรือใช้ร่วมกับ เอนไซม์ไลโซไซม์ มีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในนมพร่องมันเนย (Vannini, Lanciotti, Baldi and Guerzoni, 2004) หรือใช้ร่วมกับสารไนซิน (nisin) มีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในนมพร่องมันเนย (Boussouel, Mathieu, Revol-Junelles and Milliere, 1999) หรือใช้ร่วมกับสาร bacteriocin ที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแล็กทิก มีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในน้ำนมดิบ (Rodriguez, Tomillo, Nunez and Medina, 1997)

**2.3.3 บทบาทและข้อจำกัดของระบบเอนไซม์แล็กโทเพอร์ออกซิเดส** (FAO Headquarters, 2005)

2.3.3.1 ข้อดีของระบบเอนไซม์แล็กโทเพอร์ออกซิเดส

1) เป็นวิธีการที่มีความปลอดภัย และไม่เป็นอันตรายแก่ผู้บริโภค เนื่องจากไม่มีสารตกค้าง

2) สามารถใช้ได้กับน้ำนมดิบทุกชนิด เช่น วัว, ควาย, แพะ, แกะ และอูฐ อีกทั้งยังสามารถใช้ในอาหารประเภท เนื้อสัตว์ ปลา และผลิตภัณฑ์ เป็นต้น

3) สามารถลดการเน่าเสียของน้ำนมดิบเนื่องจากเก็บรักษาได้นานขึ้น โดยสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ทั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้น้ำนมเน่าเสีย และที่ก่อให้เกิดโรค

4) ลดค่าใช้จ่ายในการเก็บรักษาน้ำนมดิบ เนื่องจากไม่ต้องใช้เครื่องมือ หรือความร้อน แต่อย่างใด และเป็นระบบที่สามารถทำได้ง่าย

2.3.3.2 ข้อเสียของระบบเอนไซม์แล็กโทเพอร์ออกซิเดส

1) มีผลกระทบต่อกล้าเชื้อที่ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารหมัก

2) ในประเทศไทยยังไม่มีการอนุญาตให้ใช้

## 2.4 การเกิดออกซิเดชันของโปรตีน (protein oxidation)

### 2.4.1 การเกิดออกซิเดชันของโปรตีนในน้ำนม

LP-system มีผลต่อการเกิดออกซิเดชันของโปรตีนได้ โดยเอนไซม์ LPO จะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว ทำให้เกิดกลิ่นออกซิเดชันขึ้น โดยมีกลิ่นเหมือนโลหะ โดยถ้าสาร $OSCN^-$ ทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับโปรตีนในนมบริเวณที่เป็น histidine, tryptophan และ tyrosine เกิดเป็น protein sulfhydryls ทำให้ความสามารถการยับยั้งจุลินทรีย์ลดลง เนื่องจากปริมาณสาร $OSCN^-$ ที่ไปทำปฏิกิริยากับโปรตีนของจุลินทรีย์จะลดลง โดยปัจจัยที่มีผล ได้แก่ ปริมาณกรด ความเข้มข้นของโปรตีน และความสมดุลของเกลือต่างๆ เป็นต้น (อรพิน ชัยประสพ, 2544; Aune and Thomas, 1978)

โดยทั่วไปกรดอะมิโนในน้ำนมที่เกิดออกซิเดชันของโปรตีนได้ ได้แก่ histidine, cysteine, methionine, tryptophan และ tyrosine ในน้ำนมดิบมีประมาณ 0.99, 0.26, 1.02, 0.53 และ 2.00 กรัม ต่อน้ำนมดิบ 1 ลิตร ตามลำดับ (Swaisgood, 1995; Damodaran, 1996) โดยกรดอะมิโนทั้ง 5 ชนิด มีปริมาณที่ไม่สูงมาก โดย histidine เกิดจากปฏิกิริยา photooxidation ในส่วน cysteine เกิดในสภาวะที่เป็นกรดได้เป็น cysteic acid ซึ่งมีผลต่อความคงตัวของเคซีน ในส่วน methionine เกิดจากสาร $H_2O_2$ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ได้ methionine sulfoxide โดยเกิดออกซิเดชันอีกเป็น methionine sulfones มีผลต่อความคงตัวของเคซีน ประมาณร้อยละ 10 ในส่วน tryptophan เกิดในสภาวะที่เป็นกรดได้เป็น kynurenine มีผลทำให้สูญเสียวิตามิน $B_{12}$ (riboflavin) ไป โดยทำปฏิกิริยากันจนได้ photoadduct (โครงสร้างของสาร tryptophan และ riboflavin ที่เกิดการเคลื่อนย้ายของไอออนอิสระที่อยู่ด้านนอก ย้ายเข้ามาสู่แกนกลางของโครงสร้างของสารทั้ง 2 ชนิด) ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ และ tyrosine ทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสาร $H_2O_2$ เปลี่ยนเป็น dityrosine (Damodaran, 1996) ซึ่งถ้าสาร $OSCN^-$ ทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับโปรตีนในนมส่วนที่กรดอะมิโนดังกล่าว จะมีทำให้ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ลดลง (Aune and Thomas, 1978)

จะเห็นว่าเมื่อเกิดออกซิเดชันของโปรตีนในน้ำนมดิบ จะส่งผลให้นมมีกลิ่นผิดปกติ แต่ถ้านำน้ำนมดิบมาผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรส์ มีผลให้สารประกอบหมู่ sulfhydryls ในเบต้า-แล็กโทโกลบูลิน และพันธะ disulphide bond ในแคปป้า-เคซีน (κ-casein) เกิดการแตกตัว ซึ่งหมู่ซัลเฟอร์มีความไวต่อความร้อนมีคุณสมบัติเป็น strong antioxidant ที่ดี ดังนั้น สารประกอบซัลเฟอร์ซึ่งเกิดจากความร้อนนั้น มีผลในการลดศักย์ของปฏิกิริยา oxidation-reduction ทำให้น้ำนมที่ผ่านความร้อนจะไม่ค่อยเกิดออกซิเดชันของโปรตีน (อรพิน ชัยประสพ, 2544)

การเกิดออกซิเดชันของโปรตีนในน้ำนมดิบ มีผลต่อความคงตัวของน้ำนมดิบ ซึ่งปัจจัยที่มีผลได้แก่ ปริมาณกรด ความเข้มข้นของโปรตีน และความสมดุลของเกลือต่างๆ ซึ่งความคงตัวจะลดลงเมื่อความเป็นกรดมากขึ้น ในปี ค.ศ. 1999 Barrett et al. ศึกษาในน้ำนมดิบที่ผ่านและไม่ผ่าน LP-system โดยใช้วิธี Clot-on-boiling และ Alcohol precipitation พบว่า น้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system มีตะกอนมากกว่าน้ำนมดิบที่ไม่ผ่าน LP-system เล็กน้อย แต่เมื่อเปรียบเทียบกับค่า TA พบว่า ไม่มีความแตกต่างกัน ดังนั้น น้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system ยังสามารถนำไปแปรรูปได้ ต่อมาในปี ค.ศ. 2000 Ostdal, Bjerrium, Pedersen and Andersen ศึกษาการเกิดออกซิเดชันของโปรตีนในน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system พบว่าในระบบที่เติมสาร $H_2O_2$ ลงไป ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ นั้น จะมีผลต่อเคซีนมากที่สุด โดยที่ เบต้า-แล็กโทโกลบูลิน และ bovine serium albumin (BSA) มีผลกระทบน้อยกว่า แต่ใน LP-system จะทำ

การเติมสาร $H_2O_2$ ลงไปเพียงแค่ 10 ppm เท่านั้น ดังนั้นสาร $H_2O_2$ ใน LP-system จึงไม่มีผลต่อความคงตัวของโปรตีนในน้ำนมดิบ

**2.4.2 การเกิดออกซิเดชันของโปรตีนในผลิตภัณฑ์นมหมัก**

การเกิดออกซิเดชันของโปรตีนในผลิตภัณฑ์นมหมัก ซึ่งได้แก่ โยเกิร์ต และเนยแข็ง เป็นหลัก ในปี ค.ศ. 1996 Nakada, Dosako, Hirano, Oooka and Nakajima ศึกษาผลกระทบของเอนไซม์ LPO ในโยเกิร์ตระหว่างการเก็บรักษาที่ 10 องศาเซลเซียส พบว่า มีผลต่อการเจริญของกล้าเชื้อ ทำให้เกิดกรดอย่างช้าๆ ซึ่งจะส่งผลทำให้ยืดอายุการเก็บโยเกิร์ตได้นานขึ้น แต่อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม (41 องศาเซลเซียส) หรืออุณหภูมิระหว่างการเก็บรักษา (10 องศาเซลเซียส) ไม่เหมาะสมต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ LPO จึงมีแอคติวิตีของเอนไซม์ไม่มากนัก ในปี ค.ศ. 1998 Hirano et al. ศึกษาผลกระทบของเอนไซม์ LPO ที่มีต่อคุณสมบัติของโยเกิร์ต พบว่า มีความข้นหนืดลดลง เมื่อมีเอนไซม์มากขึ้น และโยเกิร์ตจะเกิดเจลที่ค่า pH สูงกว่าปกติ เมื่อมีปริมาณของเอนไซม์ และสาร $OSCN^-$ มากขึ้น

**2.4.3 การเกิดออกซิเดชันของโปรตีนในเนยแข็ง**

ปี ค.ศ. 2001 Fedele and Bergamo ศึกษาการเกิดออกซิเดชันของโปรตีนในเนยแข็งพบว่า ถ้ากระบวนการผลิตมีขั้นตอนมากขึ้น อุณหภูมิที่ใช้ในการพาสเจอร์ไรส์สูงขึ้น ระยะเวลาในการบ่มที่นานขึ้น จะทำให้เกิดออกซิเดชันของโปรตีนมากขึ้น โดยวัดปริมาณออกซิเดชันของโปรตีนจากค่า protein-bound carbonyls (PC) ซึ่งมีหน่วยที่คิดเป็นความเข้มข้นของ carbonyl เป็น มิลลิโมล ต่อมิลลิกรัมของโปรตีน เนื่องจากการเกิดออกซิเดชันของโปรตีนเกิดขึ้นที่บริเวณหมู่ sulfhydryls และพันธะ carbonyl ซึ่งเมื่อน้ำนมผ่านการให้ความร้อน การเกิดออกซิเดชันของโปรตีนจะเกิดจากพันธะ carbonyl เป็นหลัก (Damodaran, 1996) โดยใช้อุณหภูมิในการพาสเจอร์ไรส์ที่ 58, 68 และ 72 องศาเซลเซียส แล้วพบว่าที่ 72 องศาเซลเซียส มีค่ามากที่สุดและ 58 องศาเซลเซียส จะต่ำที่สุด ในส่วนของเวลาที่ใช้ในการบ่ม ได้แก่ 0, 2, 5, 7, 10, 14, 17 และ 24 เดือน พบว่าเนยแข็งที่บ่มไว้ 24 เดือน จะให้ค่า PC สูงขึ้นเป็น 2 เท่า เมื่อเทียบกับที่ไม่ได้บ่ม และในส่วนของกระบวนการผลิตในขั้นตอน curding และ stretching ซึ่งถ้าใช้เวลานานจะส่งผลให้ค่า PC นั้นสูงขึ้น

## 2.5 เนยแข็งมอสซาเรลลา (mozzarella cheese)

เนยแข็งมอสซาเรลลาเป็นเนยแข็งที่มีต้นกำเนิดในประเทศอิตาลีมีเนื้อสัมผัสนุ่ม กลิ่นรสอ่อน สีขาวธรรมชาติจนถึงสีครีมสว่าง จัดอยู่ในกลุ่ม pasta-filata ซึ่งหมายถึง ความร้อนและ

การยืด เนยแข็งที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ ได้แก่ Boccacini, Caciocavallo, Kashkaval, Ragusano และ String cheese เป็นต้น โดยมีปริมาณความชื้นอยู่ในช่วงร้อยละ 45 – 60 โดยน้ำหนัก ปริมาณไขมันอยู่ในช่วงที่ไม่น้อยกว่าร้อยละ 30 โดยน้ำหนัก ส่วน pH อยู่ในช่วงระหว่าง 5.0 – 5.4 และปริมาณเกลืออยู่ในช่วงระหว่างร้อยละ 1.2 – 1.8 โดยน้ำหนัก สามารถเก็บรักษาได้เป็นเวลานานกว่า 90 วัน ที่อุณหภูมิอยู่ในช่วง 1.7 – 5.6 องศาเซลเซียส และเก็บรักษาได้เป็นเวลานานกว่า 12 เดือน ที่อุณหภูมิ – 18 องศาเซลเซียส ในส่วนของคุณสมบัติหลังการอบที่ 232 องศาเซลเซียส หรือ 450 องศาฟาเรนไฮต์ เป็นเวลา 10 นาที จะเกิดการละลายและยืดได้อย่างน้อยที่สุด 3 นิ้ว (Kindstedt, Caric and Milanovic, 2004; United States Department of Agriculture (USDA), 1980; 2001)

**2.5.1 กระบวนการผลิต**

กระบวนการผลิตเนยแข็งมอสซาเรลลานั้น เริ่มต้นจากการปรับมาตรฐานของน้ำนมดิบ ให้มีปริมาณไขมันอยู่ในช่วงร้อยละ 3.0 โดยน้ำหนัก แล้วทำการให้ความร้อนเพื่อลดจำนวนจุลินทรีย์ ซึ่งมีผลทำให้เนยแข็งใช้เวลาในการบ่มนานขึ้น ต้องใช้ปริมาณกล้าเชื้อเพิ่มขึ้น เนื่องจากกล้าเชื้อตามธรรมชาติของน้ำนมดิบถูกทำลาย และมีผลทำให้การทำงานของเอนไซม์เรนเนทลดลง เนื่องจากเกลือแคลเซียมที่กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์จะตกตะกอนทำให้ได้เคิร์ดที่ไม่ดีและยากแก่การไล่ความชื้น เป็นต้น (Robinson and Wilbey, 1998) หลังจากนั้นเติมกล้าเชื้อลงไป แล้วจึงเติม แคลเซียมคลอไรด์ ประมาณ 5 – 20 กรัม ต่อ น้ำนม 100 กิโลกรัม เป็นการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการตกตะกอน แต่ถ้าใส่มากเกินไปจะทำให้แข็งเกินไป ทำการตัดได้ยากขึ้น แล้วเติมสารเคมีที่ให้สี โดยปกติสีของเนยแข็งจะมาจากไขมันในน้ำนม ซึ่งมีสีเหลืองอ่อน หรือเหลืองเข้ม ขึ้นอยู่กับฤดูกาล จึงมีการเติมสีเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีสม่ำเสมอ หลังจากนั้นจึงเติมเอนไซม์ ไคโมซิน (chymosin, EC 3.4.23.4) เพื่อตกตะกอนน้ำนม เมื่อได้ตะกอนมีลักษณะที่แน่น จะทำการตัดเคิร์ด จากนั้นทำการกวนเคิร์ด เพื่อให้เกิดการกระจายตัวของก้อนเคิร์ด แล้วจึงทำการเพิ่มอุณหภูมิของเคิร์ดอยู่ในช่วงระหว่าง 40 – 45 องศาเซลเซียส เพื่อลดความชื้นในเคิร์ด เมื่อให้ความร้อนแก่เคิร์ด ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 20 – 30 นาที แล้วทำการแยกหางนมออก แล้วให้ความร้อนต่อเพื่อให้เคิร์ดปล่อยหางนมออกมาอีก เมื่อก้อนเคิร์ดมี pH อยู่ในช่วง 4.9 – 5.4 จึงนำไปใส่ในน้ำร้อนโดยดึงหรือนวดก้อนเคิร์ด ทำการนวดจนกว่าจะได้เนื้อที่เนียน เหนียวและไม่เป็นก้อน จึงนำไปขึ้นรูป ส่วนใหญ่พิมพ์จะเป็นทรงกระบอกสี่เหลี่ยมผืนผ้า แล้วจึงเก็บรักษาที่อุณหภูมิในช่วง 1.7 – 5.6 องศาเซลเซียส หรือ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ – 18 องศาเซลเซียส (นรินทร์ ทองศิริ, 2531; อรพิน ชัยประสพ, 2544; Kosikowski and Mistry, 1997)

**2.5.2 วิธีการปรับกรดโดยตรง (direct acidification)**

วิธีการปรับกรดโดยตรง คือ การใช้กรดเติมลงไปในน้ำนมโดยตรง ซึ่ง Codex (The Codex Alimentarius Commission, 2004) แนะนำกรดที่สามารถนำมาใช้ในการปรับกรดได้โดยตรง ซึ่งได้แก่ กรดอะซิติก กรดซิตริก กรดแล็กทิก (L-,D- และ DL-) กรดมาลิก (DL-) กรดฟอสฟอริก และ กรดไฮโดรคลอริก ในการทำให้เคซีนตกตะกอน โดยกรดแต่ละชนิดจะส่งผลกระทบต่อผลิตภัณฑ์แตกต่างกัน ซึ่งจากการศึกษาของ Keller, Olson and Richardson (1974) ที่ทำการผลิตเนยแข็งมอสซาเรลลาด้วยวิธีการปรับกรดโดยตรง โดยใช้ กรดฟอสฟอริก กรดไฮโดรคลอริก กรดอะซิติก กรดมาลิก และ กรดซิตริก พบว่า ส่งผลกระทบต่อการสูญเสียปริมาณแคลเซียมในเนยแข็งที่ใช้กรดทุกชนิดในการทดลอง โดยที่กรดซิตริกมีผลให้เกิดการสูญเสียปริมาณแคลเซียมมากที่สุด และในเนยแข็งที่ทำการปรับกรดจนมีค่า pH ที่ต่ำทำให้เกิดการสูญเสียปริมาณแคลเซียมมากมากกว่าในเนยแข็งที่ทำการปรับกรดจนมีค่า pH ที่สูง โดยที่มีการสูญเสียปริมาณแคลเซียมมากกว่าร้อยละ 50 ของปริมาณแคลเซียมทั้งหมด

ในปี ค.ศ. 2000 Metzger, Barbano, Rudan and kindstedt และปี ค.ศ. 2001 Metzger et al. และ Metzger, Barbano, kindstedt and Guo ทำการทดลองโดยการใช้กรด กรดอะซิติก หรือ กรดซิตริก ในการผลิตเนยแข็งมอสซาเรลลาไขมันต่ำ (มีปริมาณไขมันไม่เกินร้อยละ 8 โดยน้ำหนัก) โดยปรับจนมีค่า pH เท่ากับ 6.0 และ 5.8 โดยการใช้กรดแต่ละชนิด พบว่าองค์ประกอบทางเคมีจะมีความคล้ายคลึงกันโดยเทียบกับเนยแข็งที่ไม่ได้ปรับกรดโดยตรง ยกเว้นปริมาณแคลเซียม ซึ่งในเนยแข็งที่ใช้กรดอะซิติกในการปรับจนได้ค่า pH เท่ากับ 5.8 ส่งผลให้มีปริมาณแคลเซียมน้อยกว่า เนยแข็งที่ใช้กรดอะซิติกในการปรับจนได้ค่า pH เท่ากับ 6.0 ในส่วนของเนยแข็งที่ใช้กรดซิตริกในการผลิตนั้นมีปริมาณโปรตีนน้อยกว่าเนยแข็งที่ใช้กรดอะซิติกในการผลิต ในส่วนของปริมาณผลผลิตพบว่า เนยแข็งที่ผลิตจากกรดทั้ง 2 ชนิด มีปริมาณลดลงเมื่อเทียบเนยแข็งที่ไม่ได้ใช้วิธีการปรับกรดโดยตรง อีกทั้ง เนยแข็งที่ปรับจนมีค่า pH เท่ากับ 5.8 จะมีปริมาณผลผลิตน้อยกว่า pH เท่ากับ 6.0 และในส่วนของคุณสมบัติทางกายภาพของเนยแข็งทั้งก่อนและหลังการอบ พบว่า ในเนยแข็งที่ใช้กรดซิตริกในการปรับจนได้ค่า pH เท่ากับ 5.8 จะมีคุณภาพด้อยมากที่สุด

จะเห็นว่ากรดที่มีความเหมาะสมใช้ในการผลิตคือ กรดแล็กทิก เนื่องจากเป็นกรดชนิดเดียวกันกับกรดที่ได้จากกล้าเชื้อ โดยจากการศึกษาของ Guinee, Feeney, Auty, and Fox (2002) ที่ผลิตเนยแข็งโดยใช้กรดแล็กทิก และกลูโคโน-เดลตา-แล็กโทน (glucono-delta-lactone,GDL) ในการผลิต พบว่า ปริมาณแคลเซียมไม่มีความแตกต่างกันกับเนยแข็งที่ใช้กล้าเชื้อในการผลิต

## 2.6 การแปรรูปด้วยการอัดพอง (extrusion process)

การอัดพอง เป็นกระบวนการแปรรูปที่มีการรวมหลายหน่วยกระบวนการเข้าด้วยกัน ได้แก่ การผสม การทำให้สุก การนวด การเฉือน การขึ้นรูปและการทำให้เกิดรูปร่าง โดยกระบวนการอัดพองนี้ จัดเป็นกระบวนการที่ใช้อุณหภูมิสูงเวลาสั้น (high temperature short time; HTST) (นิติยา รัตนาปนนท์, 2544)

การอัดพองจัดเป็นกระบวนการเพิ่มขนาด แล้วทำให้เกิดรูปร่างตามที่ต้องการโดยการบังคับสารที่อ่อนตัวหรือหลอมเหลวผ่านรูเปิดของหน้าแปลน (die) ด้วยความดัน ปัจจัยที่สำคัญคือ สภาวะการทำงานของเครื่องอัดพอง (อุณหภูมิ ความดัน เส้นผ่าศูนย์กลางของหน้าแปลน และอัตราการเฉือน (การออกแบบภายในของสกรู ความเร็วและรูปร่างของสกรู)) และคุณสมบัติการไหล (rheological property) ของอาหาร ชนิดของวัตถุดิบมีผลต่อลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่ได้ ปัจจัยที่สำคัญคือ ปริมาณความชื้น ขนาดของสาร สภาพทางกายภาพของส่วนผสม และองค์ประกอบทางเคมี (โปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต) (นิติยา รัตนาปนนท์, 2544)

### 2.6.1 เทคโนโลยีการอัดพองในอุตสาหกรรมนม

ในอุตสาหกรรมการอัดพอง ในระยะแรกจะใช้เพียงแค่เป็นส่วนประกอบในการผลิตผลิตภัณฑ์เท่านั้น ซึ่งมักเติมลงผลิตภัณฑ์นมในรูปของนมผงเพื่อเพิ่มรสชาติ เนื้อสัมผัส และการเกิดสีน้ำตาล ให้แก่ผลิตภัณฑ์ เช่น เติมนมผงประมาณร้อยละ 3 – 4 โดยน้ำหนัก ในการทำขนมปังกรอบ อาหารเช้า เป็นต้น (Mil_Auer, Wiedmann and Strobel, 1984) ในปี 1990 Berg and van Mill ได้นำมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์นมเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความหลากหลายดังนี้

2.6.1.1 ผลิตภัณฑ์อาหารว่าง โดยองค์ประกอบของนมที่ใช้ในการผลิตคือ นมผง พร่องมันเนย นมผง โซเดียมเคซิเนท และเคซีน ประมาณร้อยละ 15 โดยน้ำหนัก ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่ไวต่อความร้อน ทำให้ต้องใช้เครื่องอัดพองแบบสกรูคู่ในการผลิตเนื่องจากสามารถควบคุมอุณหภูมิได้ดี นมผงจะส่งผลให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีโครงสร้างที่แน่น และมีรูพรุนน้อย เมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นจะช่วยให้โครงสร้างของผลิตภัณฑ์ดีขึ้นเล็กน้อย สำหรับโซเดียมเคซิเนท และนมผงพร่องมันเนยส่งผลให้ผลิตภัณฑ์ที่มีโครงสร้างเป็นรูพรุน และแตกง่าย แต่แข็งเล็กน้อย เมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น ช่วยให้เกิดการแผ่ขยาย (expansion) และแตกง่าย แต่มีรสชาติดียิ่งขึ้น ในส่วนของเคซีนพบว่าโครงสร้างมีรูพรุนขนาดใหญ่

2.6.1.2 ผลิตภัณฑ์อาหารเช้า โดยองค์ประกอบของนมที่ใช้คือ นมผง เคซีน และนมผงพร่องมันเนย พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้ มีการแผ่ขยายมากขึ้น โดยที่รสชาติ และเนื้อสัมผัสขึ้นอยู่กับชนิดของนมที่ใช้

2.6.1.3 เนยแข็งแปรรูป เครื่องอัดพองที่ใช้ส่วนใหญ่จะเป็นแบบสกรูคู่ ซึ่งสามารถผลิตเนยแข็งได้หลากหลายชนิด เช่น เนยแข็ง Gouda และเนยแข็งมอสซาเรลลา เป็นต้น

**2.6.2 การใช้เครื่องอัดพองในการผลิตเนยแข็ง**

กระบวนการนวดและขึ้นรูปเนยแข็งโดยใช้เครื่องอัดพอง โดยเฉพาะอย่างยิ่งเนยแข็งมอสซาเรลลา สามารถใช้เครื่องอัดพองได้ทั้งแบบสกรูเดี่ยวและสกรูคู่ ร่วมกับการปรับสภาวะในการผลิตให้เหมาะสม (อุณหภูมิ ความเร็วรอบของสกรู และอัตราการป้อนวัตถุดิบ) รูปร่างของเนยแข็งที่ได้จากกระบวนการแปรรูปนี้จะขึ้นอยู่กับรูเปิดของหน้าแปลน (Yu and Gunasekaran, 2005a) โดยในปี ค.ศ. 1997 Renda, Barbano, Yun, Kindsted and Mulvaney ศึกษาผลกระทบของความเร็วรอบสกรูที่ใช้ในการผลิตเนยแข็งมอสซาเรลา พบว่า เมื่อใช้ความเร็วที่ต่ำจะมีผลให้ไขมันที่อยู่ในเนยแข็งไหลออกมามาก ตลอดไปจนถึงในช่วงการเก็บรักษา

ในปี ค.ศ. 2003 Ferrari et al. ศึกษา การผลิตเนยแข็งมอสซาเรลลาโดยใช้เครื่องอัดพองเปรียบเทียบกับวิธีการผลิตปกติพบว่า การใช้เครื่องอัดพองในการผลิตเนยแข็งสามารถลดเวลาในการผลิตได้ประมาณ 1 ชั่วโมง และสามารถลดค่าใช้จ่ายในการผลิตได้ลงได้ประมาณร้อยละ 20 – 24 อีกทั้งยังสามารถลดขั้นตอนในการผลิตลงได้ เนื่องจากเครื่องอัดพอง สามารถทำการนวดผสม และขึ้นรูปได้ในเครื่องเดียวกัน นอกจากนี้ Cole, Adhikari, Gruen and Heymann (2004) ศึกษาการผลิตเนยแข็งแปรรูป (processed cheese) ด้วยเครื่องอัดพอง พบว่า สามารถลดเวลาในการผลิต อีกทั้งยังสามารถทำการผลิตได้อย่างต่อเนื่อง โดยสามารถผลิตได้ทั้งความชื้นต่ำและสูง แต่พบว่ามีปัญหาทางด้านประสาทสัมผัส ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาต่อ เพื่อทำการพัฒนาต่อไป

ในปี ค.ศ. 2004 Yu and Gunasekaran ศึกษาระบบการทำงานของเครื่องอัดพองในการผลิตเนยแข็ง เพื่อหาสภาวะสมดุลในการผลิตเนยแข็ง ทั้งในเครื่องอัดพองชนิดสกรูเดี่ยวและสกรูคู่ ในปีเดียวกันยังศึกษาเกี่ยวกับการถ่ายเทความร้อนในเครื่องอัดพองชนิดสกรูเดี่ยวในการผลิตเนยแข็ง และในปี ค.ศ. 2005(b) ศึกษาเครื่องอัดพองชนิดสกรูสกรูคู่ และระบบในการผลิตเนยแข็งมอสซาเรลลา พบว่ามีปัญหาเรื่องโครงสร้างภายในของเนยแข็ง โดยในสภาวะการผลิตที่อุณหภูมิสูง (72 องศาเซลเซียส) ซึ่งไม่ว่าจะใช้ความเร็วรอบสกรูต่ำหรือสูงมีผลทำให้โครงสร้างมีโพรงอากาศมากกว่าเนยแข็งปกติ แต่ในอุณหภูมิการผลิตที่ต่ำ (62 องศาเซลเซียส) โครงสร้างมีโพรงอากาศที่มีลักษณะใกล้เคียงกับเนยแข็งปกติ เนื่องจากการใช้อุณหภูมิสูงจะทำให้ไขมันที่อยู่ในเนยแข็งนั้น ไหลออกมาทำให้เกิดโพรงอากาศมากกว่าปกติ อย่างไรก็ตามการใช้เครื่องอัดพองทำให้ได้ผลผลิตที่สูงขึ้น เมื่อใช้สภาวะที่เหมาะสมในการผลิต โดยที่เนยแข็งยังมีคุณสมบัติทางกายภาพที่ดี

# บทที่ 3
# วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

## 3.1 การเตรียมวัตถุดิบ

น้ำนมดิบที่ใช้ในการทดลองมาจากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และเก็บรักษาในห้องเย็นที่อุณหภูมิ 4 – 7 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

## 3.2 การวิเคราะห์หาองค์ประกอบของระบบเอนไซม์แล็กโทเพอร์ออกซิเดสในน้ำนมดิบ

### 3.2.1 การหาปริมาณสารไธโอไซยาเนท ($SCN^-$)

การหาปริมาณสารไธโอไซยาเนท ($SCN^-$) ตามวิธีของ Codex (1991) ซึ่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 460 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) โดยใช้สารละลายโพแทสเซียมไธโอไซยาเนท (KSCN) ในการสร้างกราฟมาตรฐาน

### 3.2.2 การหาปริมาณสารไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ($H_2O_2$)

การหาปริมาณสารไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ($H_2O_2$) โดยดัดแปลงวิธีของ Bjorck (1978) และ Allen and Wrieden (1982) ซึ่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 436 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้สารละลาย $H_2O_2$ ในการสร้างกราฟมาตรฐาน

### 3.2.3 การวิเคราะห์หาเอนไซม์แล็กโทเพอร์ออกซิเดส (LPO)

การวิเคราะห์หาเอนไซม์แล็กโทเพอร์ออกซิเดส (LPO) ด้วยวิธี Peroxidase Test โดยดัดแปลงวิธีของ Health Protection Agency (HPA, 2004) และ USDA (2005)

1) ปิเปตตัวอย่างน้ำนมดิบปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง จากนั้น ปิเปตสารละลาย guaiacol เข้มข้นร้อยละ 0.50 โดยปริมาตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (ละลายในสารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 50 โดยปริมาตร) และเติมสารละลาย $H_2O_2$ เข้มข้นร้อยละ 0.08 โดยปริมาตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง

2) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม (Vortex) ถ้ามีเอนไซม์ LPO ในตัวอย่างน้ำนมดิบ จะเห็นสีน้ำตาลภายใน 30 วินาที

**3.2.4 การวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์แล็กโทเพอร์ออกซิเดส**

การวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์แล็กโทเพอร์ออกซิเดส (LPO) โดยดัดแปลงวิธีของ Allen and Wrieden (1982) และ Lali, Aruna, Roshnnie and Thaker (2000) ซึ่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 470 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ แล้วทำการคำนวณโดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์เท่ากับ 25.50 $mM^{-1}$ $cm^{-1}$ โดยแสดงผลในรูป Units/ml of enzyme โดยที่ 1 unit มีค่าเท่ากับ จำนวนเอนไซม์ที่ไปทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับ 1 ไมโครโมล ของ guaiacol ต่อ 1 นาที ต่อ 1 มิลลิลิตร

## 3.3 การเตรียมน้ำนม

ในการทดลองมีน้ำนมอยู่ 3 ชนิด โดยนำน้ำนมดิบแบ่งออกเป็น 3 ส่วน ดังนี้

**3.3.1 น้ำนมดิบ**

ตัวอย่างน้ำนมดิบ นำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 – 7 องศาเซลเซียส

**3.3.2 น้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system**

ทำการกระตุ้น LP-system ตามวิธีของ Codex (1991)

1) นำตัวอย่างน้ำนมดิบมาเติม KSCN ประมาณ 16.781 มิลลิกรัม ต่อน้ำนมดิบ 1 กิโลกรัม จากนั้น กวนประมาณ 1 นาที

2) เติมโซเดียมเพอร์คาร์บอเนต ($2Na_2CO_3.3H_2O_2$) ประมาณ 30 มิลลิกรัม ต่อน้ำนมดิบ 1 กิโลกรัม จากนั้น กวนประมาณ 2 – 3 นาที

3) ปฏิกิริยาของเอนไซม์ LPO จะเสร็จสิ้นภายใน 5 นาที หลังจากนั้น เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 – 7 องศาเซลเซียส

**3.3.3 น้ำนมดิบที่ผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรส์**

นำตัวอย่างน้ำนมดิบมาให้ความร้อนโดยใช้ระบบอุณหภูมิสูงเวลาสั้น (HTST) (ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 265) พ.ศ. 2545 เรื่อง นมโค ระบุว่า ต้องใช้อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 72 องศาเซลเซียส และคงอยู่ที่อุณหภูมินี้ไม่น้อยกว่า 15 วินาที) โดยใช้ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที จากนั้นทำการลดอุณหภูมิตัวอย่างน้ำนมลงทันทีจนเหลือ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้น เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 – 7 องศาเซลเซียส จะได้เป็นนมสดพาสเจอร์ไรส์

## 3.4 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำนม

### 3.4.1 การวิเคราะห์ทางเคมี (Chemical properties)

3.4.1.1 การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมด (Total solids) และความชื้น (Moisture)

3.4.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Total nitrogen)

3.4.1.3 การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (Fat)

3.4.1.4 การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (อยู่ในรูปน้ำตาลแล็กโทส (Lactose)) ซึ่งการวิเคราะห์ในข้อ 3.4.1.1 – 3.4.1.4 ใช้เครื่อง MilkoScan S 50 (FOSS Analytical A/S, Denmark) เหมือนกัน หลังจากการปรับเครื่องโดยให้ค่าที่เครื่องทำการวิเคราะห์ทุกค่ามีค่าเท่ากับ 0 (ศูนย์) ตามวิธีที่ระบุใน AOAC (2000)

3.4.1.5 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (Ash) ตามวิธีที่ระบุใน AOAC (2000)

3.4.1.6 การวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด (Titratable acidity, TA) ตามวิธีที่ระบุใน AOAC (2000)

3.4.1.7 การวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) โดยใช้เครื่อง pH meter (MP 220 pH Meter, Mettler-Toledo Gombh, CH-9603 schwerzenbach, Switzerland) หลังจากการปรับเทียบกับสารละลายบัฟเฟอร์มาตรฐาน pH 4.01 และ 7.00 ตามลำดับ ตามวิธีของ Bradley et al. (1993) โดยใช้ electrode จุ่มลงไปในตัวอย่างน้ำนมดิบโดยตรง ซึ่งวัดที่อุณหภูมิ 25 ± 3 องศาเซลเซียส

3.4.1.8 การวิเคราะห์หาออกซิเดชันของโปรตีน (Protein oxidation) ตามวิธีของ Fedele and Bergamo (2001) โดยใช้วิธีการวัดปริมาณ protein carbonyls (PC) ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 370 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ แล้วทำการคำนวณโดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์เท่ากับ 22.00 $mM^{-1}$ $cm^{-1}$ แล้วทำการหาความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford (1976) โดยใช้สารละลาย bovine serum albumin (BSA) ในการสร้างกราฟมาตรฐาน โดยที่ความเข้มข้นของ PC สุดท้ายแสดงผลในรูป nmoles/mg of proteins

3.4.1.9 การวิเคราะห์ปริมาณการย่อยสลายโปรตีน (Proteolysis) โดยทำการหาปริมาณไนโตรเจนด้วยกัน 2 วิธี คือ

1) ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่ละลายได้ (Total nitrogen soluble, TNS) ในสารละลาย trichloroacetic acid (TCA) เข้มข้นร้อยละ 12 โดยน้ำหนัก ตามวิธีของ Bynum and Barbano (1985)

ชั่งตัวอย่างน้ำนมให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนมา 1.50 กรัม จากนั้น ปิเปตสารละลาย TCA เข้มข้นร้อยละ 12 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เขย่าส่วนผสมด้วยเครื่อง

ปั่นผสม (Mixer) เป็นเวลา 30 วินาที กรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman No. 42) จากนั้น ล้างด้วยสารละลาย TCA เข้มข้นร้อยละ 12 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วยกระดาษกรองแผ่นเดิม นำส่วนใสที่ได้ทั้งหมด มาใส่ในหลอดย่อยโปรตีน หลังจากนั้น นำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Kjeldahl (AOAC, 2000)

2) ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่ละลายได้ (TNS) ในสารละลายอะซีเตตบัฟเฟอร์ (acetate buffer) pH 4.6 ตามวิธีของ Bynum and Barbano (1985)

ชั่งตัวอย่างน้ำนมให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนมา 0.75 กรัม จากนั้น ปิเปตสารละลายอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 4.6 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เขย่าส่วนผสมด้วยเครื่องปั่นผสม เป็นเวลา 30 วินาที กรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman No. 2V) จากนั้น ล้างด้วยสารละลายอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 4.6 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วยกระดาษกรองแผ่นเดิม นำส่วนใสที่ได้ทั้งหมด มาใส่ในหลอดย่อยโปรตีน หลังจากนั้น นำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Kjeldahl (AOAC, 2000)

**3.4.2 การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา (Microbiological properties)**

3.4.2.1 การตรวจหาจุลินทรีย์ด้วยวิธี Dye reduction test โดยมี 2 วิธีคือ

1) วิธี Methylene blue reduction เป็นการสังเกตการณ์เปลี่ยนสี เมื่อครบ 30 นาที และตรวจสอบผลทุกๆ ชั่วโมง และเทียบเกรดของน้ำนมในแต่ละตัวอย่างที่ได้ ตามวิธีของ International Dairy Federation (IDF, 1989)

2) วิธี Resazurin test เป็นการสังเกตการณ์เปลี่ยนสีทุกๆ 15 นาที ภายในเวลา 1 ชั่วโมง และเทียบเกรดของน้ำนมในแต่ละตัวอย่างที่ได้ ตามวิธีของ IDF (1989)

3.4.2.2 การวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ตามวิธีที่ระบุใน AOAC (2000)

3.4.2.3 การวิเคราะห์จำนวน *E. coli* และโคลิฟอร์ม ตามวิธีที่ระบุใน AOAC (2000)

3.4.2.4 การวิเคราะห์จำนวนยีสต์และรา ตามวิธีที่ระบุใน AOAC (2000)

**3.4.3 การวิเคราะห์หาเวลาที่ใช้ในการตกตะกอนน้ำนม (Rennet clotting time, (RCT))**

การวิเคราะห์หาเวลาที่ใช้ในการตกตะกอนของน้ำนม (RCT) ในแต่ละตัวอย่าง โดยดัดแปลงวิธีของ Bjorck (1978) และ Seifu et al. (2004)

1) ปิเปตตัวอย่างน้ำนมปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ในบีกเกอร์ ทำการอุ่นบนอ่างน้ำร้อนจนตัวอย่างน้ำนมมีอุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส

2) ปิเปตสารละลายเอนไซม์ไคโมซิน ที่ทำการเจือจางกับน้ำในอัตราส่วน 1 ต่อ 9 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกวนเป็นเวลา 30 วินาที

3) นำตัวอย่างน้ำนมหยดลงบนแผ่นสไลด์ที่ทำมุมเอียง 45 องศา กับระนาบพื้น สังเกตดูลักษณะของตัวอย่างน้ำนม จนกว่าตัวอย่างน้ำนมไม่สามารถไหลบนแผ่นสไลด์ หรือเริ่มมีลักษณะเป็นก้อน

4) บันทึกเวลาตั้งแต่เริ่มเติมเอนไซม์ลงไปจนตัวอย่างน้ำนมเริ่มมีลักษณะเป็นก้อน

### 3.4.4 การวิเคราะห์คุณภาพระหว่างการเก็บรักษา (Keeping quality)

การวิเคราะห์คุณภาพระหว่างการเก็บรักษาของน้ำนมในแต่ละตัวอย่าง ตามวิธีของ Barrett et al. (1999) ซึ่งทำการวิเคราะห์ทุกๆ 2 ชั่วโมง โดยทำการเก็บรักษาตัวอย่างน้ำนมที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ซึ่งทำการวัด 4 ค่า คือ

3.4.4.1 การวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) โดยใช้เครื่อง pH meter (MP 220 pH Meter, Mettler-Toledo Gombh, CH-9603 schwerzenbach, Switzerland) หลังจากการปรับเทียบกับสารละลายบัฟเฟอร์มาตรฐาน pH 4.01 และ 7.00 ตามลำดับ ตามวิธีของ Bradley et al. (1993) วัดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยหยุดวิเคราะห์เมื่อตัวอย่างน้ำนมมีค่า pH เท่ากับหรือน้อยกว่า 6.50

3.4.4.2 การวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด (TA) ตามวิธีที่ระบุใน AOAC (2000) โดยหยุดวิเคราะห์เมื่อตัวอย่างน้ำนมมีค่า TA เท่ากับหรือมากกว่าร้อยละ 0.18 โดยน้ำหนัก

3.4.4.3 วิธี Alcohol precipitation (Al) ตามวิธีของ Barrett et al. (1999)

ปิเปตตัวอย่างน้ำนมปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีฝาปิด หลังจากนั้น ปิเปตสารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 68 โดยปริมาตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง ทำการกลับหลอดขึ้น-ลง 2 – 3 ครั้ง สังเกตการเกิดตะกอนของโปรตีนนม โดยหยุดวิเคราะห์เมื่อตัวอย่างน้ำนมมีตะกอนเกิดขึ้น

3.4.4.4 วิธี Clot-on-boiling (COB) ตามวิธีของ Barrett et al. (1999)

ปิเปตตัวอย่างน้ำนมปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีฝาปิด วางลงในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที สังเกตตะกอนที่เกิดขึ้น โดยหยุดวิเคราะห์เมื่อตัวอย่างน้ำนมมีตะกอนเกิดขึ้น

### 3.5 การผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เนยแข็งมอสซาเรลลา

#### 3.5.1 การเตรียมก้อนเคิร์ด

นำน้ำนมในแต่ละตัวอย่าง จากข้อ 3.3 มาทำการผลิตเป็นเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่าง โดยดัดแปลงวิธีของ Rizvi et al. (1999) และ Guinee et al. (2002)

1) นำตัวอย่างน้ำนม มาทำการปรับมาตรฐานปริมาณไขมันให้ได้เป็นร้อยละ 3.50 โดยน้ำหนัก

2) อุ่นตัวอย่างน้ำนมจนมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 28 – 33 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นค่อยๆ เติมกรดแล็กทิก ลงไป จนตัวอย่างน้ำนมมีค่า pH เท่ากับ 5.70 ± 0.03

3) เพิ่มอุณหภูมิตัวอย่างน้ำนมเป็น 37 องศาเซลเซียส หลังจากนั้น เติมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.01 โดยคิดจากปริมาณตัวอย่างน้ำนม (ละลายในน้ำในอัตราส่วน 1 ต่อ 2) กวนเป็นเวลา 1 นาที

4) เติมสารละลายเอนไซม์ไคโมซิน เข้มข้นร้อยละ 0.03 โดยคิดจากปริมาณตัวอย่างน้ำนม (ละลายในน้ำในอัตราส่วน 1 ต่อ 40) กวนเป็นเวลา 30 วินาที ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลาประมาณ 5 – 7 นาที ที่อุณหภูมิเดิม ตัวอย่างน้ำนมจะกลายเป็นก้อนเคิร์ด

5) ทำการตัดและกวนก้อนเคิร์ดนาน 90 วินาที หลังจากนั้น จึงเพิ่มอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 41 – 47 องศาเซลเซียส ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลาประมาณ 25 – 30 นาที

6) ปล่อยหางนมออก หลังจากนั้นตั้งก้อนเคิร์ดทิ้งไว้ที่อุณหภูมิเดิม เป็นเวลาประมาณ 10 นาที

7) นำก้อนเคิร์ดที่ได้มาแช่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 4.90 สารละลายกลูโคลโนเดลตาแล็กโทน (GDL) เข้มข้นร้อยละ 6.20 สารละลายไตรโซเดียมฟอสเฟตเข้มข้นร้อยละ 2.90 และ สารละลายไตรโซเดียมซิเตรตเข้มข้นร้อยละ 2.80 โดยคิดตามน้ำหนักของก้อนเคิร์ด

8) นำก้อนเคิร์ดที่แช่สารละลายข้างต้น ไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 12 ชั่วโมง

#### 3.5.2 การศึกษาเบื้องต้น

ทำการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการนวดผสมและขึ้นรูปด้วยเครื่องอัดพอง คือ อุณหภูมิในแต่ละช่วงของบาเรล ความเร็วรอบของสกรู และรูปแบบการจัดเรียงสกรู ที่ทำให้เครื่องอัดพองสามารถดำเนินไปได้ด้วยสภาวะคงที่ และตรวจสอบลักษณะรูปร่างของเนยแข็งมอสซาเรลลาที่ได้ในแต่ละตัวอย่าง ซึ่งต้องสามารถคงรูปร่างไว้ได้

**3.5.3 การนวดผสมด้วยกระบวนการอัดพอง**

การทดลองในครั้งนี้ ใช้เครื่องอัดพองชนิดสกรูคู่แบบหมุนตามกัน (co-rotating intermeshing twin screw extruder, APV MPF 19:25, APV Baker, Inc., Grand Rapid, MI, USA) ในการนวดผสมและขึ้นรูปเป็นเนยแข็งมอสซาเรลลาของก้อนเคิร์ดที่ได้จากน้ำนมในแต่ละตัวอย่าง จากข้อ 3.3 ซึ่งเครื่องอัดพองประกอบด้วยสกรูที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 19 มิลลิเมตร อัตราส่วนความยาวเทียบกับเส้นผ่านศูนย์กลางของสกรู (L/D ratio) เท่ากับ 25 : 1 มิลลิเมตร มีรูปแบบการจัดเรียงสกรู (screw configuration) เป็นแบบผลิตภัณฑ์ชนิดไม่พองตัว (non expanded product) ดังแสดงในตารางที่ 3.1

**ตารางที่ 3.1** รูปแบบการจัดเรียงสกรู (จากทางป้อนวัตถุดิบถึงหน้าแปลน)

| Screw element type | No. of amount |
|---|---|
| 1.5 D Feed screw | 2 |
| 1.0 D Feed screw | 2 |
| 1.5 D Feed screw | 4 |
| 30° Forward paddle | 7 |
| 1.5 D Feed screw | 5 |
| 1.0 D Feed screw | 3 |
| 60° Forward paddle | 3 |
| 1.0 D Disch single lead screw | 1 |

ในกระบวนการแปรรูปใช้ความเร็วรอบของสกรูที่ระดับ 50 รอบต่อนาที ในขณะที่ผนังบาเรลมีหน่วยให้ความร้อนที่สามารถแบ่งการควบคุมอุณหภูมิได้ 4 ช่วง โดยในรอบที่ 1 ของการนวดผสมใช้อุณหภูมิของบาเรลในช่วงที่ 1 และ 2 – 4 ไว้ที่อุณหภูมิ 70 และ 75 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และในรอบที่ 2 ใช้อุณหภูมิของบาเรลในช่วงที่ 1 – 4 ไว้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส โดยที่ในรอบที่ 2 ทำการใส่หน้าแปลน ซึ่งหัวแปลนที่ใช้ในการขึ้นรูปผลิตภัณฑ์เนยแข็งมอสซาเรลลามีลักษณะเป็นรูกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร ตัดเนยแข็งมอสซาเรลลา

หลังออกมาจากหน้าแปลนของเครื่องอัดพองให้มีความยาวประมาณ 20 เซนติเมตร จากนั้นทำการบรรจุในภาชนะบรรจุแบบสุญญากาศแล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 – 7 องศาเซลเซียส เพื่อรอทำการทดลองในขั้นต่อไป

## 3.6 การทดสอบคุณภาพของผลิตภัณฑ์

### 3.6.1 การวิเคราะห์ทางเคมี (Chemical properties)

3.6.1.1 ปริมาณของแข็งทั้งหมด (Total solids) และความชื้น (Moisture**)** ตามวิธีที่ระบุใน AOAC (2000) เปรียบเทียบเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่าง กับเนยแข็งมอสซาเรลลาทางการค้า

3.6.1.2 ปริมาณโปรตีน (Total nitrogen) ตามวิธีที่ระบุใน AOAC (2000) เปรียบเทียบเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่าง กับเนยแข็งมอสซาเรลลาทางการค้า

3.6.1.3 ปริมาณไขมัน (Fat) ด้วยวิธี modified Babcock method ตามวิธีของ Kosikowski and Mistry (1997) เปรียบเทียบเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่าง กับเนยแข็งมอสซาเรลลาทางการค้า

3.6.1.4 ปริมาณเถ้า (Ash) ตามวิธีที่ระบุใน AOAC (2000) เปรียบเทียบเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่าง กับเนยแข็งมอสซาเรลลาทางการค้า

3.6.1.5 ปริมาณเกลือ (Salt) ด้วยวิธี modified Volhard ตามวิธีของ Kosikowski and Mistry (1997) เปรียบเทียบเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่าง กับเนยแข็งมอสซาเรลลาทางการค้า

3.6.1.6 ค่าความเป็นกรด (TA) ตามวิธีที่ระบุใน AOAC (2000) เปรียบเทียบเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่าง กับเนยแข็งมอสซาเรลลาทางการค้า

3.6.1.7 ค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH)โดยใช้เครื่อง pH meter (MP 220 pH Meter, Mettler-Toledo Gombh, CH-9603 schwerzenbach, Switzerland) หลังจากการปรับเทียบกับสารละลายบัฟเฟอร์มาตรฐาน pH 4.01 และ 7.00 ตามลำดับ ตามวิธีของ Bradley et al. (1993) โดยทำการลดขนาดเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่าง แล้วบรรจุตัวอย่างเนยแข็งมอสซาเรลลาใส่ภาชนะขนาดเล็ก ทำการอัดตัวอย่างให้แน่น แล้วใช้ electrode จิ้มลงไปในตัวอย่างเนยแข็งมอสซาเรลลา โดยให้ electrode สัมผัสตัวอย่างเนยแข็ง เป็นเวลาอย่างน้อย 45 วินาที แล้วค่อยอ่านค่าที่ได้ เพื่อให้ได้ผลที่ออกมามีค่าคงที่ โดยตรง ซึ่งวัดที่อุณหภูมิ 25 ± 3 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่าง กับเนยแข็งมอสซาเรลลาทางการค้า

3.6.1.8 การวิเคราะห์หาออกซิเดชันของโปรตีน (Protein oxidation) ตามวิธีของ Fedele and Bergamo (2001) โดยใช้วิธีการวัดปริมาณ PC ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 370

นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ แล้วทำการคำนวณโดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์เท่ากับ 22.00 $mM^{-1}$ $cm^{-1}$ แล้วทำการหาความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford (1976) โดยใช้สารละลาย BSA ในการสร้างกราฟมาตรฐานโดยที่ความเข้มข้นของ PC สุดท้ายแสดงผลในรูป nmoles/mg of proteins เปรียบเทียบเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่าง กับเนยแข็งมอสซาเรลลาทางการค้า

3.6.1.9 การวิเคราะห์ปริมาณการย่อยสลายโปรตีน (Proteolysis) โดยทำการหาปริมาณไนโตรเจนด้วยกัน 2 วิธี คือ

1) ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่ละลายได้ (TNS) ในสารละลาย TCA เข้มข้นร้อยละ 12 โดยน้ำหนัก ตามวิธีของ Bynum and Barbano (1985)

ลดขนาดเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่าง และชั่งให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนมา 1.50 กรัม จากนั้นปิเปตสารละลาย TCA เข้มข้นร้อยละ 12 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เขย่าส่วนผสมด้วยเครื่องปั่นผสม เป็นเวลา 30 วินาที กรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman No. 42) จากนั้น ล้างด้วยสารละลาย TCA เข้มข้นร้อยละ 12 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วยกระดาษกรองแผ่นเดิม นำส่วนใสที่ได้ทั้งหมดมาใส่ในหลอดย่อยโปรตีน หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Kjeldahl (AOAC, 2000) เปรียบเทียบเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่าง กับเนยแข็งมอสซาเรลลาทางการค้า

2) ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่ละลายได้ (TNS) ในสารละลายอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 4.6 ตามวิธีของ Bynum and Barbano (1985)

ลดขนาดเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่าง และชั่งให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนมา 0.75 กรัม จากนั้น ปิเปต สารละลายอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 4.6 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เขย่าส่วนผสมด้วยเครื่องปั่นผสม เป็นเวลา 30 วินาที กรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman No. 2V) จากนั้น ล้างด้วยสารละลายอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 4.6 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วยกระดาษกรองแผ่นเดิม นำส่วนใสที่ได้ทั้งหมดมาใส่ในหลอดย่อยโปรตีน หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Kjeldahl (AOAC, 2000) เปรียบเทียบเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่าง กับเนยแข็งมอสซาเรลลาทางการค้า

3.6.1.10 การวิเคราะห์หาเอนไซม์แล็กโทเพอร์ออกซิเดส (LPO) โดยดัดแปลงวิธีของ Chavarri, Santisteban, Virto and Renobales (1998), HPA (2004) และ USDA (2005)

1) ลดขนาดเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่าง และชั่งให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนมา 5.0 กรัม เติมสารละลาย pH 8.0 Tris-HCl เข้มข้น 0.12 โมลาร์ ปริมาตร 25.0 มิลลิลิตร ผสมเป็นเวลา 30 วินาที บนน้ำแข็ง

2) ทำการเหวี่ยงที่ 5,000×g เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman No. 1)

3) ดูดส่วนใสปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมสารละลาย guaiacol เข้มข้นร้อยละ 0.50 โดยปริมาตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (ละลายในสารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 50 โดยปริมาตร) และเติมสารละลาย $H_2O_2$ เข้มข้นร้อยละ 0.08 โดยปริมาตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

4) ผสมให้เข้ากัน ถ้ามีเอนไซม์ LPO ในตัวอย่างเนยแข็ง จะเห็นสีน้ำตาลภายใน 30 วินาที

### 3.6.2 การวิเคราะห์ทางกายภาพ (Physical properties)

3.6.2.1 การวัดสี (Cook color) โดยใช้หลักการสะท้อนแสงด้วยเครื่องวัดสี CR-300 Minolta (Minolta Camera Co., Osaka, Japan) โดยดัดแปลงวิธีของ Imm et al. (2003) และ USDA (1980; 2001)

ทำการรายงานผลในหน่วยของระบบสีตามระบบฮันเตอร์ (Hunter Color System) เป็นค่า L, a, และ b โดยแหล่งแสงที่ใช้เป็น Daylight (D65) ซึ่งก่อนทำการวัดค่าสีจะทำการหุ้มหัวที่ใช้ในการวัดด้วย film wrap (บริษัท เอ็ม เอ็ม พีแพ็คเก็จจิ้งกรุ๊พ จำกัด กรุงเทพฯ) โดยไม่ให้เกิดรอยย่นที่แผ่นฟิล์ม และทำการปรับเทียบมาตรฐาน (calibrate) หัววัดที่หุ้มด้วยฟิล์มกับแผ่นเทียบสีก่อนทำการวัดในครั้งแรก ในแต่ละชนิดของตัวอย่างเนยแข็งมอสซาเรลลา

โดยที่ตัวแปรทั้ง 3 ตัว คือ L, a, และ b ซึ่งมีความหมายดังนี้

**L** คือ ความสว่างของสีซึ่งมีค่าจาก 0 คือ สีดำ ถึง 100 คือ สีขาว

**a** คือ ค่าความเป็นสีเขียวและสีแดง โดยค่าที่ได้เป็นค่า – คือ สีเขียว และค่าที่ได้เป็น + คือ สีแดง

**b** คือ ค่าความเป็นสีเหลืองและสีน้ำเงิน โดยค่าที่ได้เป็นค่า – คือ สีน้ำเงิน และค่าที่ได้เป็น + คือ สีเหลือง

1) ลดขนาดเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่าง และชั่งมาประมาณ 300 กรัม ใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ โดยเกลี่ยให้มีความสม่ำเสมอ แล้วจึงทำการวัดสี จำนวน 3 จานเลี้ยงเชื้อต่อเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่าง

2) ทำการการอบด้วยเตาอบ (Electrolux EOD982B/W, ประเทศไทย) โดยทำการอบที่อุณหภูมิ 232 องศาเซลเซียส (450 องศาฟาเรนไฮต์) เป็นเวลา 10 นาที

3) ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงทำการวัดค่าสีจำนวน 3 จานเลี้ยงเชื้อต่อเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่างอีกครั้ง

4) เปรียบเทียบเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่าง กับเนยแข็งมอสซาเรลลาทางการค้า

3.6.2.2 ความสามารถในการละลาย (Meltability) โดยดัดแปลงวิธีของ Oberg, Merrill, Brown and Richardson (1992) และ Wang, Kindstedt, Gilmore and Guo (1998)

1) นำหลอดแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 40 มิลลิเมตร ยาว 300 มิลลิเมตร (Pyrex) โดยที่ปลายด้านหนึ่งเปิด และอีกด้านหนึ่งปิด พร้อมมีจุดปิด

2) ลดขนาดเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่าง และชั่งมาให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน 15 ± 0.05 กรัม ใส่ลงไปในหลอดแก้ว โดยตอกลงไปให้แน่นที่ก้นหลอด แล้วจึงปิดจุกให้แน่น

3) นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในลักษณะแนวดิ่ง โดยให้ด้านที่มีตัวอย่างอยู่ทางด้านล่าง

4) นำไปอบด้วยเตาอบ (Electrolux EOD982B/W, ประเทศไทย) ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที โดยวางในลักษณะแนวนอน

5) ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ทำการวัดระยะทางที่เกิดขึ้น จากตัวอย่างเนยแข็งมอสซาเรลลาที่เกิดการหลอมเหลว

6) เปรียบเทียบเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่าง กับเนยแข็งมอสซาเรลลาทางการค้า

3.6.2.3 ความสามารถในการไหล (Flowability) ด้วยวิธี Schreiber test โดยดัดแปลงวิธีของ Kosikowski and Mistry (1997), Park, Rosenau and Peleg (1984) และ USDA (1980; 2001)

3.6.2.4 ความสามารถในการยืดขยาย (Stretchability) ด้วยวิธี fork test โดยดัดแปลงวิธีของ Fife, McMahon and Oberg (2002); Mizuno and Lucey (2005) และ USDA (1980; 2001)

1) นำแป้งและซอสพิซซ่า (บริษัท เอลิฟองต์เบเกอรี่ จำกัด, สมุทรสาคร) มาทำให้อ่อนตัวที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้แป้งพิซซ่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 19 เซนติเมตร

2) ชั่งซอสพิซซ่ามาประมาณ 90 กรัม มาให้ทั่วผิวหน้าของแป้งพิซซ่า แล้วลดขนาดเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่าง และชั่งมาประมาณ 60 กรัม โรยให้ทั่วบนแป้งพิซซ่าที่ทำการทาซอสพิซซ่าเสร็จเรียบร้อยแล้ว

3) นำพิซซ่าไปอบด้วยเตาอบ (Electrolux EOD982B/W, ประเทศไทย) ที่อุณหภูมิ 232 องศาเซลเซียส (450 องศาฟาเรนไฮต์) เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที

4) นำช้อนส้อมมาสอดใต้ตัวอย่างเนยแข็งมอสซาเรลลาที่หลอมเหลว แล้วทำการดึงขึ้นในแนวดิ่ง จนกระทั่งตัวอย่างเนยแข็งขาด และบันทึกระยะทางที่ได้

5) เปรียบเทียบเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่าง กับเนยแข็งมอสซาเรลลาทางการค้า

3.6.2.5 น้ำมันอิสระในเนยแข็งที่หลอมเหลว (Free oil in melted cheese) ตามวิธีของ Kosikowski and Mistry (1997)

1) ลดขนาดเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่าง และชั่งให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนมา 18 กรัม ใส่ในขวด Babcock ชนิด paley

2) นำไปแช่ในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที หลังจากนั้นเติมน้ำที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

3) นำตัวอย่างเนยแข็งมอสซาเรลลาไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้น เติมสารละลายผสมระหว่าง น้ำกับเมทานอล ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ที่อุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียส เติมจนถึงระดับสเกลอ่านค่าในขีดบนสุด

4) ทำการเหวี่ยงเป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้น ทำการเขย่าเบาๆ โดยทำมุมเอียง 45 องศา เป็นเวลา 10 วินาที

5) ทำการทดลองตามข้อ 4 อีก 1 ครั้ง หลังจากนั้นนำไปแช่ในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำการอ่านค่าที่ได้จากสเกลของขวด Babcock

6) เปรียบเทียบเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่าง กับเนยแข็งมอสซาเรลลาทางการค้า

การคำนวณ

$$\text{ร้อยละของไขมันอิสระในเนยแข็งที่หลอมเหลว} = \frac{\text{ค่าที่อ่านได้จากสเกล}}{2}$$

$$\text{ร้อยละของไขมันอิสระโดยคิดจากไขมันทั้งหมด} = \frac{\text{ค่าที่อ่านได้จากสเกล} / 2}{\text{ร้อยละของไขมันทั้งหมดในเนยแข็ง}}$$

3.6.2.6 คุณสมบัติหลังการอบ (Baking test) โดยดัดแปลงวิธี Rizvi et al. (1999) และ USDA (1980; 2001)

1) ลดขนาดเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่าง และชั่งมาประมาณ 300 กรัม ใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ โดยเกลี่ยให้มีความสม่ำเสมอ

2) นำไปอบด้วยเตาอบ (Electrolux EOD982B/W, ประเทศไทย) ที่อุณหภูมิ 232 องศาเซลเซียส (450 องศาฟาเรนไฮต์) เป็นเวลา 10 นาที

3) ทำการสังเกตวิเคราะห์คุณลักษณะต่างๆ ดังนี้

- ตรวจสอบดูความสามารถในการละลาย (Meltability) โดยดูจากลักษณะการละลายของเนยแข็งมอสซาเรลลาว่าเป็นอย่างไร
- ตรวจสอบดูรอยพอง (Blister coverage) โดยดูจากร้อยไหม้ว่าครอบคลุมพื้นที่มากน้อยเพียงใด
- ตรวจสอบดูสีของรอยพอง (Blister color) โดยดูจากสีของรอยไหม้ว่ามีสีใด
- ตรวจสอบดูปริมาณของน้ำมันที่ไหลเยิ้มออกมา (Oiling out) โดยดูจากปริมาณน้ำมันที่เป็นของเหลวว่ามีมากน้อยขนาดไหน
- ตรวจสอบดูลักษณะการยืด (Stretchability) โดยดูว่าสามารถยืดได้เกิน 3 นิ้ว หรือไม่

4) เปรียบเทียบเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่าง กับเนยแข็งมอสซาเรลลาทางการค้า

3.6.2.7 การทำเป็นพิซซ่า (Pizza baking test) โดยดัดแปลงวิธี Rizvi et al. (1999) และ USDA (1980; 2001)

1) นำแป้งและซอสพิซซ่า (บริษัท เอลิฟองต์เบเกอรี่ จำกัด, สมุทรสาคร) มาทำให้อ่อนตัวที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้แป้งพิซซ่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 19 เซนติเมตร

2) ชั่งซอสพิซซ่ามาประมาณ 90 กรัม มาให้ทั่วผิวหน้าของแป้งพิซซ่า แล้วลดขนาดเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่าง และชั่งมาประมาณ 60 กรัม โรยให้ทั่วบนแป้งพิซซ่าที่ทำการทาซอสพิซซ่าเสร็จเรียบร้อยแล้ว

3) นำพิซซ่าไปอบด้วยเตาอบ (Electrolux EOD982B/W, ประเทศไทย) ที่อุณหภูมิ 232 องศาเซลเซียส (450 องศาฟาเรนไฮต์) เป็นเวลา 10 นาที

4) ทำการสังเกตวิเคราะห์คุณลักษณะต่างๆ ดังเช่นเดียวกับข้อ 3.6.1.6

5) เปรียบเทียบเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่าง กับเนยแข็งมอสซาเรลลาทางการค้า

**3.6.3 การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา (Microbiological properties)**

3.6.3.1 การวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ตามวิธีที่ระบุใน AOAC (2000)

3.6.3.2 การวิเคราะห์จำนวน *E. coli* และโคลิฟอร์ม ตามวิธีที่ระบุใน AOAC (2000)

3.6.3.3 การวิเคราะห์จำนวนยีสต์และรา ตามวิธีที่ระบุใน AOAC (2000)

**3.6.4 การวิเคราะห์โครงสร้างภายใน (Microstructure)**

การวิเคราะห์โครงสร้างภายในของเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่าง ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด (scanning electron microscope; SEM) โดยดัดแปลงวิธีของ Joshi, Muthukumarappan and Dave (2004)

1) ตัดเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่างให้เป็นแท่งสี่เหลี่ยม โดยมี ความกว้าง ความยาว และความสูงเป็น 1, 1 และ 10 มิลลิเมตร ตามลำดับ ด้วยใบมีดโกน แล้วแช่ในสารละลาย gluteraldehyde เข้มข้นร้อยละ 2.80 โดยปริมาตร เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 – 6 องศาเซลเซียส เพื่อคงสภาพธรรมชาติของตัวอย่างไว้

2) ล้างเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่าง ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 นอร์มอล จำนวน 3 ครั้ง เป็นเวลาครั้งละ 10 – 15 นาที

3) นำเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่าง ไปผ่านกระบวนการกำจัดน้ำออกจากโครงสร้างโดยการแทนที่ด้วยสารละลายเอทานอลที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ ความเข้มข้นร้อยละ 10, 20, 40, 60, 80, และ 90 โดยปริมาตร ตามลำดับ ความเข้มข้นละ 1 ครั้ง เป็นเวลาครั้งละ 10 นาที หลังจากนั้น แทนที่ด้วยเอทานอลบริสุทธิ์ จำนวน 2 ครั้ง เป็นเวลาครั้งละ 10 นาที

4) นำเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่าง ไปแช่ในครอโรฟอร์มบริสุทธิ์ จำนวน 3 ครั้ง เป็นเวลาครั้งละ 30 นาที และเก็บรักษาเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่าง ในเอทานอลบริสุทธิ์ โดยทำการเปลี่ยนเอทานอล ทุกสัปดาห์ในระหว่างการเก็บรักษา เพื่อรอการวิเคราะห์ขั้นต่อไป

5) นำเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่าง ไปแช่ไนโตรเจนเหลว เพื่อรักษาลักษณะของตัวอย่างเนยแข็งมอสซาเรลลา หลังจากนั้นนำไปแช่ในเอทานอลบริสุทธ์

6) นำเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่าง ไปทำแห้งด้วยวิธี critical point ด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหลว โดยใช้เครื่องมือ critical point dryer (SAMDRI/PVT-3B, U.S.A.)

7) นำเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่าง วางบนแท่นติดตัวอย่าง (aluminum stub) โดยใช้กาว (silver paint) แล้วเก็บไว้ในตู้ควบคุมความชื้นรอการวิเคราะห์ขั้นต่อไป

8) นำเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่างที่ติดบน stub และใส่ stub holder ไว้ในเครื่องสำหรับการฉาบไอออนทองคำ

9) เคลือบตัวอย่างด้วยไอออนทองคำให้มีความหนาประมาณ 10 ไมครอน ด้วยเครื่อง Ion sputter (Ion sputtering device JOEL/JFC-110 E, Japan) โดยใช้เวลาในการเคลือบ 4 นาที และใช้กระแสไฟฟ้า 10 มิลลิแอมแปร์

10) นำ stub ที่มีเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่างที่ผ่านขั้นตอนข้างต้นมาใส่ใน specimen holder หลังจากนั้นนำใส่เข้าไปในห้องใส่ตัวอย่าง ซึ่งอยู่ภายในคอลัมน์ของกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด

11) ศึกษาโครงสร้างภายในของเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่าง ตัวอย่างละ 3 ชิ้น ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด (JSM-6400, JEOL, Japan) ที่กำลังขยาย 500 และ 1,000 เท่า ในแต่ละตัวอย่าง โดยกำหนดค่าศักย์ไฟฟ้าที่ให้แก่แหล่งกำเนิดอิเล็กตรอนเป็น 1,000 กิโลโวลต์

12) บันทึกภาพโครงสร้างภายในของเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่าง ที่กำลังขยาย 500 และ 1,000 เท่า โดยชิ้นตัวอย่างละ 3 บริเวณ

13) เปรียบเทียบเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่าง กับเนยแข็งมอสซาเรลลาทางการค้า

# บทที่ 4
# ผลการทดลองและการวิจารณ์

## 4.1 ผลการวิเคราะห์หาองค์ประกอบของระบบเอนไซม์แล็กโทเพอร์ออกซิเดสในน้ำนมดิบ

เมื่อทำการทดสอบน้ำนมดิบ โดยวิเคราะห์หาองค์ประกอบของ LP-system ในน้ำนมดิบ เพื่อตรวจสอบว่าน้ำนมดิบที่ใช้มีความเหมาะสมหรือไม่ โดยหาปริมาณสาร $SCN^-$, $H_2O_2$ และเอนไซม์ LPO ดังแสดงในตารางที่ 4.1 พบว่า น้ำนมดิบที่ใช้ปกติ โดยมีสาร $SCN^-$ เท่ากับ 2.42 ppm (ตารางที่ 4.1) อยู่ในเกณฑ์ทั่วไปคือ อยู่ในช่วง 1 – 15 ppm แต่ปริมาณที่ต้องการคือ 15 ppm จึงจำเป็นต้องเพิ่มลงไป หรืออาจใช้วิธีให้แม่โคกินอาหารที่ทำให้เกิดสาร $SCN^-$ ในน้ำนมดิบแทนก็ได้ (Seifu et al., 2005) ส่วนสาร $H_2O_2$ พบว่าไม่มี (ตารางที่ 4.1) แสดงว่าน้ำนมดิบปกติ ไม่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรียจำพวก catalase-negative ซึ่งได้แก่ แบคทีเรียกรดแล็กทิกจำพวก lactobacilli, lactococci และ streptococci ที่สามารถผลิตสาร $H_2O_2$ ได้ในปริมาณที่เพียงพอภายใต้สภาวะการใช้ออกซิเจน แต่การเติมสาร $H_2O_2$ ลงไปในน้ำนมดิบโดยตรงให้ผลที่ดีกว่า เพราะรู้ปริมาณที่แน่นอนซึ่งถ้ามีปริมาณสาร $H_2O_2$ ที่มากเกินพอ มีผลให้กิจกรรมของ LP-system ต่ำ (Wilkins and Board, 1989)

ส่วนเอนไซม์ LPO พบว่า มีเอนไซม์นี้อยู่ในน้ำนมดิบ จากนั้นจึงทำการหาแอคติวิตีต่อ โดยที่น้ำนมดิบตามปกตินั้น มีแอคติวิตีอยู่ในช่วง 1.2 – 19.4 unit/ml (Priutt, 2003) แต่มีแอคติวิตีเพียงแค่ 1.44 unit/ml ก็สามารถเร่งปฏิกิริยา LP-system ได้ (Marshall, Cole and Bramley, 1986) โดยในการทดลองนี้ ทำการหาแอคติวิตีของเอนไซม์ LPO ตามปฏิกิริยาหลัก นั่นคือ peroxidatic reaction ซึ่งเป็นการทำปฏิกิริยากันระหว่างสาร $H_2O_2$ กับสารที่ทำหน้าที่เป็น hydrogen donors โดยที่ในการทดลองครั้งนี้ใช้สาร guaiacol จะเห็นว่านั่น สาร $H_2O_2$ เป็นสารตั้งต้นที่สำคัญในการเกิดปฏิกิริยาหลักของเอนไซม์ LPO (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2547) ซึ่งในการทดลองนี้ เติมสาร $H_2O_2$ ในรูปของ $2Na_2CO_3.3H_2O_2$ ในระดับที่ Codex (1991) แนะนำคือ 30 มิลลิกรัม พบว่ามีแอคติวิตีเท่ากับ 0.03 units/ml of enzyme (ตารางที่ 4.1) จะเห็นว่าการหาแอคติวิตีของเอนไซม์ LPOโดยเติมสาร $H_2O_2$ ในระดับที่ Codex (1991) แนะนำนั้น มีแอคติวิตีน้อยมากอย่างเห็นได้ชัดเจน

**ตารางที่ 4.1** ค่าเฉลี่ยขององค์ประกอบของระบบแล็กโทเพอร์ออกซิเดสในน้ำนมดิบ

| การวิเคราะห์ | ผลการวิเคราะห์ |
|---|---|
| ไธโอไซยาเนท ($SCN^-$) (ppm) | 2.42 |
| ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ($H_2O_2$) (ppm) | 0 |
| เอนไซม์แล็กโทเพอร์ออกซิเดส (LPO) | positive |
| แอคติวิตีของเอนไซม์ LPO (Units/ml of enzyme) | 0.03 |

จากการวิเคราะห์หาองค์ประกอบของ LP-system ในน้ำนมดิบ พบว่า โดยทั่วไปไม่เกิด LP-system เนื่องจากมีปริมาณสาร $SCN^-$ ต่ำกว่าปริมาณที่เหมาะสม เพราะสารนี้มาจากอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงแม่โคเป็นหลัก นั่นคือ อาหารที่ใช้มีสารอาหารที่เปลี่ยนเป็นสาร $SCN^-$ ในน้ำนมดิบในปริมาณที่ต่ำ อีกทั้งไม่มีสาร $H_2O_2$ แต่ถ้ามีแสดงว่าน้ำนมดิบนั้น อาจมาจากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบก็ได้ เนื่องจากแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคเหล่านั้น สามารถผลิตสาร $H_2O_2$ ได้ด้วย ได้แก่ *Staphylococcus aureus* และ *Streptococcus sp.* ซึ่งไม่เหมาะสมในการทดลอง เพราะมีปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำนมดิบมากกว่าปกติ (อรพิน ชัยประสพ, 2544) อีกทั้งระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำนมดิบยังมีผลต่อปริมาณองค์ประกอบของ LP-system เพราะปริมาณสารในองค์ประกอบจะลดลง เมื่อใช้ระยะเวลาในการเก็บนานขึ้น ซึ่งรวมไปถึงระยะการให้น้ำนมของแม่โค โดยในส่วนปริมาณสาร $SCN^-$ และเอนไซม์ LPO จะเปลี่ยนแปลงไปตลอดระยะการให้น้ำนมของแม่โค แต่ปริมาณสาร $H_2O_2$ นั้นค่อนข้างที่จะคงที่ เพราะสารนี้ส่วนใหญ่มาจากจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำนมดิบ ดังนั้นในน้ำนมดิบโดยทั่วไป LP-system จึงมีประสิทธิภาพไม่ดีเท่าที่ควร (Althaus, Molina, Rodriguez and Fernandez, 2001)

## 4.2 ผลของการเตรียมตัวอย่างน้ำนม

เมื่อนำน้ำนมดิบมาทำการวิเคราะห์หาองค์ประกอบของ LP-system เสร็จเรียบร้อยแล้ว จึงทำการเตรียมตัวอย่างน้ำนมซึ่งมี 3 ชนิดด้วยกัน คือ น้ำนมดิบ น้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system และน้ำนมดิบที่ผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรส์ ซึ่งใช้การฆ่าเชื้อแบบอุณหภูมิสูงเวลาสั้น (HTST) คือที่ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที จะได้เป็นนมสดพาสเจอร์ไรส์ ซึ่งตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 265) พ.ศ. 2545 เรื่อง นมโค ระบุว่า กรรมวิธีการฆ่าเชื้อด้วยวิธีพาสเจอร์ไรส์แบบ HTST ให้ใช้ อุณหภูมิที่ใช้ไม่ต่ำกว่า 72 องศาเซลเซียส คงอยู่ที่อุณหภูมินี้ไม่น้อยกว่า 15 วินาที ซึ่งการใช้อุณหภูมิสูงกว่า และเวลานานกว่าเล็กน้อย เนื่องจากในการทดลองนั้น ใช้วิธีการให้

ความร้อนแบบหม้อสองชั้น (jacket) ซึ่งเป็นระบบเปิด ดังนั้นเพื่อให้มีความมั่นใจว่าตัวอย่างน้ำนมได้รับความร้อนและระยะเวลาที่ไม่น้อยกว่าที่กำหนดไว้ ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 265) พ.ศ. 2545 เรื่อง นมโค จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 – 7 องศาเซลเซียส แล้วทำการศึกษาทางเคมี จุลชีววิทยา เวลาที่ใช้ในการตกตะกอนน้ำนม (RCT) และคุณภาพระหว่างการเก็บรักษา (keeping quality) ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.2 - 4.6

**4.2.1 การทดสอบทางเคมี**

การทดสอบทางเคมีของน้ำนมในแต่ละตัวอย่างทดลองมี 2 ส่วน คือ องค์ประกอบทางเคมี และคุณภาพทางเคมี โดยองค์ประกอบทางเคมี ที่ทำการศึกษาเปรียบเทียบ ได้แก่ ปริมาณของแข็งทั้งหมด ความชื้น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรตอยู่ในรูปของน้ำตาลแล็กโทส และเถ้า และคุณภาพทางเคมี ที่ทำการศึกษาเปรียบเทียบ ได้แก่ ค่า TA, pH, การเกิดออกซิเดชันของโปรตีน (protein oxidation) และการย่อยสลายโปรตีน (proteolysis) ดังแสดงในตารางที่ 4.2 และ 4.3 ตามลำดับ

องค์ประกอบทางเคมีของน้ำนมในแต่ละตัวอย่างทดลอง พบว่าองค์ประกอบที่ทำการวิเคราะห์ (ปริมาณของแข็ง ความชื้น โปรตีน ไขมัน น้ำตาลแล็กโทส และเถ้า) นั้น ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) (ตารางที่ 4.2) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับ มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช. 6003 – 2548) เรื่อง น้ำนมดิบ ระบุว่า ต้องมีปริมาณของแข็งทั้งหมดไม่น้อยกว่าร้อยละ 12.30 โดยน้ำหนัก ปริมาณโปรตีนไม่น้อยกว่าร้อยละ 3.00 โดยน้ำหนัก และปริมาณไขมันไม่น้อยกว่าร้อยละ 3.20 โดยน้ำหนัก และประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 265) พ.ศ. 2545 เรื่อง นมโค ระบุว่า ต้องมีปริมาณของแข็งทั้งหมดไม่น้อยกว่าร้อยละ 11.45 โดยน้ำหนัก ปริมาณโปรตีนไม่น้อยกว่าร้อยละ 2.80 โดยน้ำหนัก และปริมาณไขมันไม่น้อยกว่าร้อยละ 3.20 โดยน้ำหนัก

จากมาตรฐานน้ำนมทั้ง 2 จะเห็นว่า น้ำนมในแต่ละตัวอย่างทดลองไม่ผ่านเกณฑ์ใดๆ เลย โดยที่ตัวอย่างน้ำนมทั้ง 3 ชนิด มีปริมาณของแข็งทั้งหมดอยู่ในช่วงร้อยละ 11.72 - 11.90 โดยน้ำหนัก (ตารางที่ 4.2) ซึ่งผ่านเกณฑ์ของกระทรวงสาธารณสุขเท่านั้น ส่วนปริมาณความชื้นของตัวอย่างน้ำนมทั้ง 3 ชนิด อยู่ในช่วงร้อยละ 88.10 - 88.28 โดยน้ำหนัก (ตารางที่ 4.2) โดยปริมาณความชื้นกับปริมาณของแข็งทั้งหมดนั้น มีความสัมพันธ์แบบผกผันกันคือ เมื่อมีปริมาณของแข็งทั้งหมดสูงก็มีผลทำให้ปริมาณความชื้นต่ำ ดังนั้นจึงส่งผลให้ปริมาณความชื้นผ่านเฉพาะเกณฑ์กระทรวงสาธารณสุข ปริมาณความชื้นโดยทั่วไปอยู่ในช่วงร้อยละ 85.30 - 88.70 โดยน้ำหนัก ถือว่าปกติ (Walstra, Geurts, Noomen, Jellema and van Boekel, 1999) ส่วนปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วงร้อยละ 2.71 - 2.73 โดยน้ำหนัก (ตารางที่ 4.2) ไม่ผ่านเกณฑ์ทั้ง 2 ปกติปริมาณโปรตีนควร

มีประมาณร้อยละ 3.25 โดยน้ำหนัก เพราะปริมาณโปรตีนมีผลต่อปริมาณเคิร์ดที่ได้ในช่วงการทำเนยแข็ง เนื่องจากการตกตะกอนน้ำนมจนได้เคิร์ดนั้น มีองค์ประกอบของโปรตีนเป็นหลัก ซึ่งส่วนใหญ่คือ เคซีน ถ้ามีปริมาณโปรตีนน้อยก็ส่งผลให้มีปริมาณเคซีนน้อยลงด้วย โดยทั่วไปมีประมาณร้อยละ 80 ของปริมาณโปรตีนทั้งหมดในน้ำนม (Walstra et al., 1999)

**ตารางที่ 4.2** ค่าเฉลี่ยองค์ประกอบทางเคมีในน้ำนมของแต่ละตัวอย่างทดลอง

| ตัวอย่างทดลอง | องค์ประกอบทางเคมี (ร้อยละโดยน้ำหนัก) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ของแข็งทั้งหมด | ความชื้น | โปรตีน | ไขมัน | แล็กโทส | เถ้า |
| น้ำนมดิบ | 11.90[a] | 88.10[a] | 2.72[a] | 3.86[a] | 4.40[a] | 0.70[a] |
| น้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system | 11.72[a] | 88.28[a] | 2.71[a] | 3.77[a] | 4.32[a] | 0.71[a] |
| นมสดพาสเจอร์ไรส์ | 11.75[a] | 88.25[a] | 2.73[a] | 3.87[a] | 4.32[a] | 0.70[a] |

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้งหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$) โดยโปรแกรมสถิติ SAS

ส่วนปริมาณไขมันอยู่ในช่วงร้อยละ 3.77 - 3.87 โดยน้ำหนัก (ตารางที่ 4.2) มีค่ามากกว่าเกณฑ์ทั้ง 2 แต่ถือว่าปกติ ซึ่งทั่วไปอยู่ในช่วงร้อยละ 2.50 - 5.50 โดยน้ำหนัก (Walstra et al., 1999) แต่ในการทดลองต้องการเพียงแค่ร้อยละ 3.50 โดยน้ำหนัก เท่านั้น ปัจจัยที่มีผล ได้แก่ พันธุ์ของวัว อายุแม่โค สุขภาพของวัว ลักษณะของวัว ช่วงพักการรีดน้ำนม ระยะการให้น้ำนม ฤดูกาล และโภชนาการของอาหารและสัตว์ เป็นต้น (de Wit, 2003) ดังนั้น ถ้ามีปริมาณไขมันมากมีผลให้องค์ประกอบที่เหลือในน้ำนมจะลดลงตามสัดส่วน ในส่วนปริมาณน้ำตาลแล็กโทสอยู่ในช่วงร้อยละ 4.32 - 4.40 โดยน้ำหนัก (ตารางที่ 4.2) ถือว่าปกติ ซึ่งทั่วไปอยู่ในช่วงร้อยละ 3.80 - 5.30 โดยน้ำหนัก (Walstra et al., 1999) แต่น้ำตาลแล็กโทสมีการสูญเสียอย่างมากในช่วงการทำเป็นเคิร์ด ทำให้น้ำตาลแล็กโทสที่เหลือ มีผลต่อเนยแข็งทางด้านการเปลี่ยนสีหลังการอบเนยแข็งเสร็จ และส่วนปริมาณเถ้าอยู่ในช่วงร้อยละ 0.70 - 0.71 โดยน้ำหนัก (ตารางที่ 4.2) ถือว่าปกติ ซึ่งทั่วไปอยู่ในช่วงร้อยละ 0.57 – 0.83 โดยน้ำหนัก ซึ่งปริมาณเถ้าบอกถึงปริมาณแร่ธาตุในน้ำนม ได้แก่ แคลเซียม คลอไรด์ ฟอสเฟต โซเดียม และ โพแทสเซียม เป็นต้น โดยแร่ธาตุที่มีความสำคัญ

ในการผลิตเนยแข็งคือ แคลเซียม เพราะเป็นตัวที่ช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการตกตะกอนน้ำนม (Walstra et al., 1999)

ส่วนคุณภาพทางเคมีของน้ำนมในแต่ละตัวอย่างทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 4.3 พบว่าค่า TA ที่อยู่ในรูปของกรดแล็กทิกของตัวอย่างน้ำนมทั้ง 3 ชนิด มีค่าเท่ากันที่ร้อยละ 0.15 โดยน้ำหนัก (ตารางที่ 4.3) ถือว่าปกติ ซึ่งทั่วไปมีค่าร้อยละ 0.16 โดยน้ำหนัก จะเห็นว่ามีค่าใกล้เคียงกันมาก (อรพิน ชัยประสพ, 2544) ในส่วนของค่า pH ของตัวอย่างน้ำนมทั้ง 3 ชนิดนั้น ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) มีค่าอยู่ในช่วง 6.68 - 6.79 (ตารางที่ 4.3) ซึ่งตาม มกอช. 6003 – 2548 มีค่า pH ประมาณ 6.60 - 6.90 ถือว่าปกติ โดยที่ถ้ามีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ซึ่งสามารถเปลี่ยนน้ำตาลแล็กโทสเป็นกรดแล็กทิกได้ ทำให้มีปริมาณกรดเพิ่มขึ้น pH ลดต่ำลง จึงสามารถใช้ 2 ค่านี้ เป็นตัวบอกคุณภาพของน้ำนมได้ (อรพิน ชัยประสพ, 2544)

ส่วนของการเกิดออกซิเดชันของโปรตีน (protein oxidation) เพื่อเป็นการพิสูจน์ว่า LP-system เริ่มมีผลต่อปฏิกิริยาการเกิดออกซิเดชันของโปรตีนตั้งแต่เริ่มกระตุ้นน้ำนมดิบหรือไม่ ซึ่งการเกิดออกซิเดชันของโปรตีนวัดในรูปของปริมาณ PC มีหน่วยเป็น nmoles/mg of proteins โดยการเกิด carbonyls (กลุ่ม aldehydes และ ketones) นั้น เป็นผลิตภัณฑ์หลักของปฏิกิริยาออกซิเดชันของโปรตีน เพราะปริมาณกลุ่ม carbonyls นั้น วิเคราะห์ได้ง่าย อีกทั้งยังใช้ได้หลายสภาวะ โดยการเกิด PC มี 4 แบบ คือ การเกิดออกซิเดชันของกรดอะมิโนบริเวณรอบนอก การย่อยสลายสายเปปไทด์ในส่วนแกนกลาง การเกิดปฏิกิริยากับน้ำตาลที่เรียกว่า Millard reaction และการเกิดปฏิกิริยากับกลุ่ม carbonyls ที่ไม่ใช่โปรตีน (Xiong, 2000) ซึ่งจากการทดลองหาค่า PC ในตัวอย่างน้ำนมทั้ง 3 ชนิดนั้น ในนมสดพาสเจอร์ไรส์ มีค่ามากที่สุด ($p<0.05$) คือ 8.48 nmoles/mg of proteins (ตารางที่ 4.3) ซึ่งเกิดจากการเกิดออกซิเดชันของกรดอะมิโนบริเวณรอบนอก และ Millard reaction เป็นหลัก อีกทั้งความร้อนยังกระตุ้นให้เกิดออกซิเดชันของโปรตีน แต่ไม่สูงมาก เนื่องจาก กลุ่ม sulfhydryls ในน้ำนม เมื่อถูกความร้อนจะมีคุณสมบัติเป็น strong antioxidant มีผลในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของโปรตีนได้ (อรพิน ชัยประสพ, 2544) ขณะที่น้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system มีค่าเท่ากับ 4.51 nmoles/mg of proteins (ตารางที่ 4.3) สาเหตุที่ PC มีค่าต่ำ เพราะสภาวะของ LP-system ไม่มากพอที่กระตุ้นให้เกิดออกซิเดชันของโปรตีนอย่างที่ควรจะเป็น ซึ่งต้องเติมสารตั้งต้นโดยเฉพาะสาร $H_2O_2$ ให้มากขึ้น เพื่อที่ทำให้เกิดปฏิกิริยามากขึ้น อีกทั้งยังเกิดแบบปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดอะมิโนบริเวณรอบนอกเพียงอย่างเดียว ในส่วนน้ำนมดิบมีค่าเท่ากับ 1.55 nmoles/mg of proteins (ตารางที่ 4.3) เนื่องจาก เอนไซม์ LPO สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดออกซิเดชันของโปรตีนได้เช่นกัน แต่จะไม่มีมากเท่ากับน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system จึงมีค่าต่ำที่สุด ($p<0.05$) (Ostdal, Bjerrium, Pedersen and Andersen, 2000) ดังนั้นการเกิดออกซิเดชันของโปรตีนน่าจะเกิดในผลิตภัณฑ์นมมากกว่าในน้ำนม

**ตารางที่ 4.3** ค่าเฉลี่ยคุณภาพทางเคมีในน้ำนมของแต่ละตัวอย่างทดลอง

| ตัวอย่างทดลอง | TA (%) | pH | PC (nmol/mg) | Proteolysis (%) | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | TNS ใน TCA 12 % | TNS ใน pH 4.6 acetate buffer |
| น้ำนมดิบ | 0.15[a] | 6.68[a] | 1.55[c] | 0.17[a] | 0.58[a] |
| น้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system | 0.15[a] | 6.79[a] | 4.51[b] | 0.17[a] | 0.58[a] |
| นมสดพาสเจอร์ไรส์ | 0.15[a] | 6.78[a] | 8.48[a] | 0.14[b] | 0.58[a] |

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้งหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$) โดยโปรแกรมสถิติ SAS

ในส่วนปริมาณการย่อยสลายโปรตีน (proteolysis) มี 2 ส่วน คือ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่ละลายได้ (TNS) ในสารละลาย TCA เข้มข้นร้อยละ 12 โดยน้ำหนัก แสดงปริมาณเปปไทด์สายสั้น และกรดอะมิโน ที่เกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (proteases) กับเอนไซม์เปปทิเดส (peptidases) และปริมาณ TNS ในสารละลายอะซีเตตบัฟเฟอร์ (acetate buffer) pH 4.6 โดยแสดงปริมาณการแตกตัวของโปรตีนในเคซีนได้เปปไทด์สายสั้น โดยรวมถึงปริมาณของเปปไทด์สายยาวและสั้นที่เกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส และเอนไซม์เปปทิเดส (Rizvi et al., 1999) โดยปริมาณ TNS ในสารละลาย TCA เข้มข้นร้อยละ 12 โดยน้ำหนัก พบว่าในนมสดพาสเจอร์ไรส์มีค่าน้อยที่สุด ($p<0.05$) คือร้อยละ 0.14 โดยน้ำหนักของโปรตีน (ตารางที่ 4.3) โดยที่น้ำนมดิบที่ไม่ผ่าน และผ่าน LP-system มีค่าเท่ากันที่ร้อยละ 0.17 โดยน้ำหนักโปรตีน (ตารางที่ 4.3) ส่วนปริมาณ TNS ในสารละลายอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 4.6 ของตัวอย่างน้ำนมทั้ง 3 ชนิดมีค่าเท่ากันคือ ร้อยละ 0.58 โดยน้ำหนักโปรตีน (ตารางที่ 4.3) สาเหตุที่เกิดการย่อยสลายโปรตีนต่ำ เพราะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาตัวอย่างน้ำนมไม่นานพอ ที่ทำให้เอนไซม์โปรติเนส (proteinases) ของแบคทีเรียในน้ำนมมีกิจกรรม อีกทั้งอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาก็มีผล นั่นคือการใช้อุณหภูมิในการเก็บรักษาที่ต่ำ ส่งผลให้การเกิดการย่อยสลายโปรตีนต่ำตามไปด้วย (Santos, Ma and Barbano, 2003) ส่วนการให้ความร้อน ไม่มีผลต่อการเกิด การย่อยสลายโปรตีนเพราะเอนไซม์ในกลุ่มโปรติเนสนั้น สามารถทนความร้อนได้สูงกว่าระดับการพาสเจอร์ไรส์ (Spreer, 1998)

**4.2.2 การทดสอบทางจุลชีววิทยา**

การทดสอบทางจุลชีววิทยาของน้ำนมในแต่ละตัวอย่างทดลอง ที่ทำการประเมินได้แก่ Dye reduction test มี 2 วิธี คือ วิธี Methylene blue reduction และ วิธี Resazurin test จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด จำนวน *E. coli* และโคลิฟอร์ม และจำนวนยีสต์และรา ดังแสดงในตารางที่ 4.4 โดยเปรียบเทียบกับ มกอช. 6003 – 2548 ระบุว่า ค่า Methylene blue reduction นั้น มีชั่วโมงการเปลี่ยนสีเมทธิลีนบลูต้องมากกว่า 4 ชั่วโมง ค่า Resazurin test นั้น มีการเปลี่ยนสีรีซาซูรินที่ 1 ชั่วโมง ต้องไม่น้อยกว่าเกรด 4.5 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ต้องไม่เกิน 600,000 CFU ต่อมิลลิลิตร จำนวน *E. coli* และโคลิฟอร์ม ต้องไม่เกิน 10,000 CFU ต่อมิลลิลิตร และ จำนวนยีสต์และรา ต้องไม่เกิน 1,000 CFU ต่อมิลลิลิตร และประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 265) พ.ศ. 2545 เรื่อง นมโค จะระบุเฉพาะนมสดพาสเจอร์ไรส์เท่านั้น ซึ่งระบุว่า ไม่มีจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค จำนวนแบคทีเรียต้องไม่เกิน 10,000 CFU ต่อมิลลิลิตร ณ แหล่งผลิตและไม่เกิน 50,000 CFU ต่อมิลลิลิตร ตลอดระยะเวลาเมื่อออกจากแหล่งผลิตจนถึงวันหมดอายุที่ระบุบนฉลาก จำนวน *E. coli* ต้องตรวจไม่พบในตัวอย่างน้ำนม 0.1 มิลลิลิตร แบคทีเรียโคลิฟอร์ม ต้องไม่เกิน 100 CFU ในตัวอย่างน้ำนม 1 มิลลิลิตร ณ แหล่งผลิต

จากการทดลองพบว่าวิธี Dye reduction test ในส่วน Methylene blue reduction เปลี่ยนแปลงมากกว่า 4 ชั่วโมง ในตัวอย่างน้ำนมทั้ง 3 ชนิด (การตรวจสอบในภาคผนวก ข) และในส่วน Resazurin test พบว่าตัวอย่างน้ำนมทั้ง 3 ชนิด เปลี่ยนสีเป็นสีม่วง และสีน้ำเงิน ซึ่งบ่งบอกถึงคุณภาพของตัวอย่างน้ำนมทั้ง 3 ชนิด ว่าอยู่ในช่วง ดี - ดีเยี่ยม (การตรวจสอบในภาคผนวก ข) เห็นได้ว่า ตัวอย่างนมสดพาสเจอร์ไรส์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยวิธี Methylene blue reduction มีผลออกมาอยู่ในช่วง ดี ซึ่งอาจเกิดจากสภาพของจุลินทรีย์ในน้ำนมที่ใช้ในการตรวจสอบ เช่น ระยะการเจริญของจุลินทรีย์ (growth phase) ของแบคทีเรียขณะทดสอบและชนิดของแบคทีเรีย หรือมีการปนเปื้อนของเซลล์เม็ดเลือดขาว (leucocytes) ซึ่งก็สามารถเปลี่ยนสี Methylene blue ได้เช่นเดียวกัน (วรรณา ตั้งเจริญชัย, 2538)

**ตารางที่ 4.4** ค่าเฉลี่ยคุณภาพทางจุลชีววิทยาในน้ำนมของแต่ละตัวอย่างทดลอง

| ตัวอย่างทดลอง | Methylene blue test | Resazurin test | จำนวนจุลินทรีย์ (CFU/ml) | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | จุลินทรีย์ทั้งหมด | *E. coli* และโคลิฟอร์ม | ยีสต์และรา |
| น้ำนมดิบ | Excellence | good | $4.03\times10^{5a}$ | $4.33\times10^{3a}$ | $15^{a}$ |
| น้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system | Excellence | excellence | $5.00\times10^{3b}$ | $1.67\times10^{2b}$ | $0^{b}$ |
| นมสดพาสเจอร์ไรส์ | Good | excellence | $2.00\times10^{3b}$ | $0.33\times10^{2b}$ | $0^{b}$ |

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้งหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$) โดยโปรแกรมสถิติ SAS

ในส่วนของการตรวจสอบจำนวนจุลินทรีย์ทั้ง 3 กลุ่ม พบว่า น้ำนมดิบมีค่าสูงที่สุด ($p<0.05$) ส่วนน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system กับนมสดพาสเจอร์ไรส์มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) โดยจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด มีค่าเท่ากับ $4.03\times10^5$, $5.00\times10^3$ และ $2.00\times10^3$ CFU ต่อมิลลิลิตร สำหรับน้ำนมดิบ น้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system และนมสดพาสเจอร์ไรส์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.4) ส่วนจำนวน *E. coli* และโคลิฟอร์ม มีค่าเท่ากับ $4.33\times10^3$, $1.67\times10^2$ และ $0.33\times10^2$ CFU ต่อมิลลิลิตร สำหรับน้ำนมดิบ น้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system และนมสดพาสเจอร์ไรส์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.4) และจำนวนยีสต์และรา ในตัวอย่างน้ำนมดิบมีค่าเท่ากับ 15 CFU ต่อมิลลิลิตร และไม่พบในตัวอย่างน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system และในตัวอย่างนมสดพาสเจอร์ไรส์ (ตารางที่ 4.4) จะเห็นว่า LP-system นั้น สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ใกล้เคียงกับการฆ่าเชื้อในระดับการพาสเจอร์ไรส์

โดย Jacob et al. (2000) อ้างถึงใน เทียบพบ ก้านเหลือง และคณะ (2550) แนะนำว่าการใช้ LP-system ร่วมกับกระบวนการฆ่าเชื้อและการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์นม ซึ่งช่วยให้ผลิตภัณฑ์นมมีอายุในการเก็บรักษานานยิ่งขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อีกทั้งยังสามารถลดอุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการฆ่าเชื้อ เพื่อลดการสูญเสียคุณค่าทางอาหารของน้ำนม และลดต้นทุนการผลิตในส่วนของกระบวนการฆ่าเชื้อได้อีกทางหนึ่ง

**4.2.3 การทดสอบคุณภาพเวลาที่ใช้ในการตกตะกอนน้ำนม (rennet clotting time, (RCT))**

การทดสอบคุณภาพเวลาที่ใช้ในการตกตะกอนน้ำนม (RCT) ในแต่ละตัวอย่างทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 4.5 ซึ่งใช้เอนไซม์ไคโมซินแทนเอนไซม์เรนเนท เนื่องจากเอนไซม์เรนเนทประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิด ซึ่งเอนไซม์ที่มีผลในการตกตะกอนน้ำนม คือเอนไซม์ไคโมซิน นอกจากนี้แล้วยังมีเอนไซม์เปปซิน (pepsin) อยู่ในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยขึ้นอยู่กับสภาวะของกระเพาะลูกวัว ทำให้ควบคุมคุณภาพเนยแข็งได้ยากกว่า ดังนั้นเนยแข็งที่ทำจากเอนไซม์ไคโมซินจะมีคุณภาพสม่ำเสมอมากกว่า (อรพิน ชัยประสพ, 2544) โดย Yun, Barbano and Kindstedt (1993) และ Yun, Kiely, Kindstedt and Barbano (1993) ทดลองใช้เอนไซม์ชนิดเดียวกันที่ผลิตจากจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน ในการผลิตเนยแข็งมอสซาเรลลาพบว่า เนยแข็งจากเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดมีความแตกต่างกัน ในส่วนของปริมาณไขมัน เกลือ แคลเซียม ปริมาณการย่อยสลายโปรตีน คุณภาพทางเนื้อสัมผัส และคุณสมบัติหลังการอบ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นั่นคือถึงแม้จะเป็นเอนไซม์ชนิดเดียวกัน แต่ถ้ามาจากต่างแหล่งยังให้มีผลทำให้ได้คุณภาพของเนยแข็งที่แตกต่างกันอีกด้วย ซึ่งพบว่า ในนมสดพาสเจอร์ไรส์ ใช้เวลานานที่สุด ($p<0.05$) คือ 7.17 นาที โดยน้ำนมดิบ กับน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system ใช้เวลาไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) นั่นคือ

5.41 และ 5.44 นาที ตามลำดับ (ตารางที่ 4.5) สาเหตุที่นมสดพาสเจอร์ไรส์ใช้เวลานาน เพราะความร้อนทำให้เกิดการจับตัวกันระหว่างเบต้า-แล็กโทโกลบูลิน กับ แคปป้า-เคซีน ด้วยพันธะ sulfhydryl (-SH) ซึ่งปฏิกิริยานี้จะยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไคโมซิน กับ เคซีน และมีผลให้แคลเซียมที่อยู่ในรูปสารละลายเกิดการตกตะกอน ทำให้ไม่สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไคโมซิน ยิ่งใช้อุณหภูมิการฆ่าเชื้อสูงมากขึ้น จะทำให้ค่า RCT นั้น ใช้เวลานานตามไปด้วย (อรพิน ชัยประสพ, 2544)

**ตารางที่ 4.5** ค่าเฉลี่ยการวิเคราะห์หาเวลาที่ใช้ในการตกตะกอนน้ำนมในน้ำนมของแต่ละตัวอย่างทดลอง

| ตัวอย่างทดลอง | Rennet clotting time (นาที) |
|---|---|
| น้ำนมดิบ | 5.41[b] |
| น้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system | 5.44[b] |
| นมสดพาสเจอร์ไรส์ | 7.17[a] |

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้งหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$) โดยโปรแกรมสถิติ SAS

Alloggio, Caponio, Pasqualone and Gomes (2000) ศึกษาค่า RCT ของน้ำนมดิบเปรียบเทียบกับ นมสดพาสเจอร์ไรส์ (อุณหภูมิที่ใช้ในการฆ่าเชื้อคือ 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส) พบว่า การใช้อุณหภูมิในการฆ่าเชื้อที่แตกต่างกัน ทำให้ค่า RCT มีค่าที่แตกต่างกันด้วย โดยใช้เวลานานขึ้นตามอุณหภูมิอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อใช้อุณหภูมิฆ่าเชื้อเท่ากันแต่ใช้เวลาในการฆ่าเชื้อต่างกัน พบว่าค่า RCT ก็มีความแตกต่างกัน นั่นคือเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อนานก็ทำให้ค่า RCT ใช้เวลานานตามไปด้วยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในส่วนของน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system นั้น ผลของสาร $SCN^-$ จะไปยับยั้งปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ไคโมซิน กับ เคซีน โดยที่สาร $SCN^-$ จะไปแย่งจับเคซีนก่อน มีผลให้ค่า RCT ใช้เวลานานกว่าน้ำนมดิบ แต่ปริมาณสาร $SCN^-$ ที่ใช้ใน LP-system ไม่เพียงพอที่จะยับยั้งปฏิกิริยา ทำให้ค่า RCT ต่างกันไม่มาก โดยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Seifu et al., 2004)

**4.2.4 การวิเคราะห์คุณภาพระหว่างการเก็บรักษา (keeping quality)**

การทดสอบคุณภาพระหว่างการเก็บรักษาของน้ำนมในแต่ละตัวอย่างทดลอง ซึ่งทำการวิเคราะห์ทุกๆ 2 ชั่วโมง โดยวิเคราะห์มี 4 ค่า คือ ค่า pH ซึ่งหยุดวิเคราะห์เมื่อตัวอย่างน้ำนมมีค่า pH เท่ากับหรือน้อยกว่า 6.50 ค่า TA ซึ่งหยุดวิเคราะห์เมื่อตัวอย่างน้ำนมมีค่า TA เท่ากับหรือมากกว่าร้อยละ 0.18 โดยน้ำหนัก วิธี Alcohol precipitation (Al) ซึ่งหยุดวิเคราะห์เมื่อตัวอย่างน้ำนมมีตะกอนเกิดขึ้น และวิธี Clot-on-boiling (COB) ซึ่งหยุดวิเคราะห์เมื่อตัวอย่างน้ำนมมีตะกอนเกิดขึ้น โดยน้ำนมในแต่ละตัวอย่างทดลองทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ดังแสดงในตารางที่ 4.6 พบว่าน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system มีอายุการเก็บนานที่สุด มีค่าเท่ากับ 14 ชั่วโมง ส่วนนมสดพาสเจอร์ไรส์ มีค่าเท่ากับ 12 ชั่วโมง และน้ำนมดิบ มีค่าเท่ากับ 10 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.6)

สาเหตุที่น้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system เก็บได้นานที่สุด เนื่องจาก LP-system นั้นสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ในกลุ่มที่ทนความร้อนในระดับการพาสเจอร์ไรส์ได้ มี 2 ชนิด คือ สายพันธุ์ที่สร้างสปอร์ และสายพันธุ์ที่ทนความร้อนสูง ได้แก่ *Bacillus sp. Clostridium sp. Microbacterium sp. Micrococcus sp. Enterococcus sp. Streptococcus sp.* และ *Lactobacillus sp.* เป็นต้น โดยปกติจุลินทรีย์ในกลุ่มดังกล่าวนี้ จะเจริญได้ช้ามากที่อุณหภูมิต่ำ เมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาสูงขึ้น จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ จึงมีบทบาทสำคัญที่ทำให้นมสดพาสเจอร์ไรส์เน่าเสียได้เร็วกว่าน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system (อรพิน ชัยประสพ, 2544) ซึ่งในการทดลองของ Sarkar and Misra (1994) เกี่ยวกับคุณภาพระหว่างการเก็บรักษาของน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system กับนมสดพาสเจอร์ไรส์ โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พบว่า คุณภาพของน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system ใกล้เคียงกับนมสดพาสเจอร์ไรส์ และเมื่อนำน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system มาทำการพาสเจอร์ไรส์ต่อ พบว่า มีคุณภาพดีที่สุด โดยที่เมื่อสิ้นสุดการทดลองซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลา 8 ชั่วโมง ยังไม่มีการเน่าเสียโดยที่สามารถเก็บรักษาต่อไปได้อีก นั่นคือการแปรรูปน้ำนมดิบโดยใช้ร่วมกัน 2 วิธี นั้น เป็นการช่วยเสริมกันและกันมีผลให้สามารถยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ได้นานยิ่งขึ้นกว่าเดิม

**ตารางที่ 4.6** ค่าเฉลี่ยคุณภาพระหว่างการเก็บรักษาในน้ำนมของแต่ละตัวอย่างทดลอง

| เวลา (hr) | น้ำนมดิบ | | | | น้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system | | | | นมสดพาสเจอร์ไรส์ | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | pH | TA (%) | Al | COB | pH | TA (%) | Al | COB | pH | TA (%) | Al | COB |
| 0 | $6.68^{a}$ | $0.15^{a}$ | N* | N | $6.79^{a}$ | $0.15^{a}$ | N | N | $6.78^{a}$ | $0.15^{a}$ | N | N |
| 2 | $6.65^{a}$ | $0.16^{a}$ | N | N | $6.72^{a}$ | $0.15^{a}$ | N | N | $6.65^{a}$ | $0.15^{a}$ | N | N |
| 4 | $6.63^{a}$ | $0.16^{a}$ | N | N | $6.69^{a}$ | $0.16^{a}$ | N | N | $6.65^{a}$ | $0.15^{a}$ | N | N |
| 6 | $6.62^{a}$ | $0.17^{a}$ | N | N | $6.68^{a}$ | $0.16^{a}$ | N | N | $6.63^{a}$ | $0.15^{a}$ | N | N |
| 8 | $6.55^{b}$ | $0.17^{a}$ | N | N | $6.66^{a}$ | $0.16^{b}$ | N | N | $6.63^{a}$ | $0.16^{b}$ | N | N |
| 10 | $6.19^{b}$ | $0.24^{a}$ | P** | P | $6.63^{a}$ | $0.16^{b}$ | N | N | $6.51^{a}$ | $0.18^{b}$ | N | N |
| 12 | - | - | - | - | $6.55^{a}$ | $0.17^{b}$ | N | N | $6.52^{a}$ | $0.19^{a}$ | P | P |
| 14 | - | - | - | - | 6.40 | 0.21 | P | P | - | - | - | - |

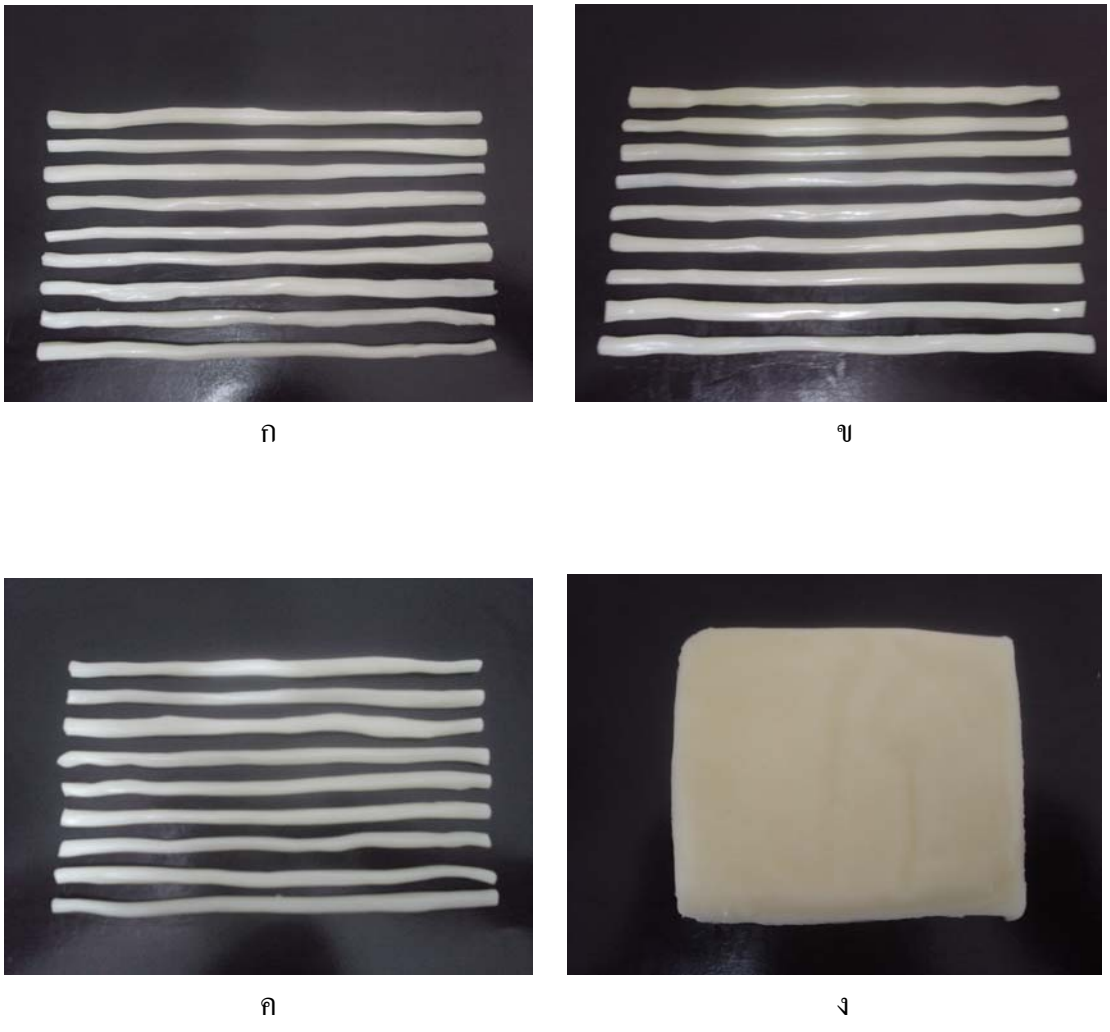
หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้งหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$) โดยโปรแกรมสถิติ SAS

*N คือ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของตัวอย่างน้ำนม (negative)

**P คือ มีการเปลี่ยนแปลงของตัวอย่างน้ำนม (positive)

## 4.3 ผลการศึกษาสภาวะการแปรรูปต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์

ลักษณะของเนยแข็งมอสซาเรลลาที่ได้ในแต่ละตัวอย่างทดลอง หลังจากออกมาจากเครื่องอัดพอง ดังแสดงในภาพที่ 4.1 พบว่า ลักษณะของเนยแข็งที่ได้มีลักษณะรูปร่างตามหัวแปลนที่ใช้ คือขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร แล้วทำการตัดให้เป็นท่อน แต่เนยแข็งที่ผลิตเสร็จใหม่ๆ นั้น มีลักษณะที่นิ่ม ไม่คงรูป อีกทั้งยังมีขนาดเล็ก ทำให้อ่อนตัวได้ง่าย และยังได้รับความร้อนจากเครื่องอัดพองทำให้มีรูปร่างที่ไม่สม่ำเสมอ เมื่อเปรียบเทียบกับเนยแข็งทางการค้า พบว่ามีลักษณะเป็นท่อนทำให้คงรูปร่างได้ดีกว่า แต่เมื่อทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องก็จะนิ่ม และไม่คงรูปเช่นเดียวกัน



ก ข

ค ง

**ภาพที่ 4.1** ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่างทดลอง โดยที่ผลิตจากน้ำนมดิบ (ก) น้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system (ข) และนมสดพาสเจอร์ไรส์ (ค) เปรียบเทียบกับเนยแข็งมอสซาเรลลาทางการค้า (ง)

เมื่อสังเกตสีของเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่างทดลอง เปรียบเทียบกับเนยแข็งมอสซาเรลลาทางการค้า พบว่า มีสีขาวออกเหลืองเล็กน้อย เนื่องจากองค์ประกอบที่อยู่ในไขมัน คือ เบต้า-แคโรทีน (β-carotene) ซึ่งสารชนิดนี้มีปริมาณที่เปลี่ยนแปลงไปตามฤดูกาล ทำให้เนยแข็งมอสซาเรลลาทางการค้ามีการเติมสีลงไปเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีสม่ำเสมอ นั่นคือ มีสีเหลืองอ่อน (Kosikowski and Mistry, 1997) ซึ่งสีที่ Codex (2004) แนะนำ ได้แก่ turmeric, riboflavin, chlorophyll, copper chlorophylls, carotenes, annatto extracts, paprika oleoresins, β-apo-8'-carotenal, β-apo-8'-carotenic acid (methyl และ ethyl ester) และ titanium dioxide เป็นต้น

หลังจากนั้น นำเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่างทดลอง มาทำการศึกษาสมบัติทางเคมี กายภาพ จุลชีววิทยา และลักษณะโครงสร้างภายใน โดยเปรียบเทียบกับเนยแข็งมอสซาเรลลาทางการค้า ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.7-4.11 และภาพที่ 4.2-4.5

**4.3.1 การทดสอบทางเคมี**

การทดสอบทางเคมีของเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่างทดลองมี 2 ส่วน คือ องค์ประกอบทางเคมี และคุณภาพทางเคมี โดยองค์ประกอบทางเคมี ที่ทำการศึกษาเปรียบเทียบได้แก่ ปริมาณความชื้น ไขมัน โปรตีน คาร์โบไฮเดรต เถ้า และเกลือ และคุณภาพทางเคมี ที่ทำการศึกษาเปรียบเทียบ ได้แก่ ค่า TA, pH, การเกิดออกซิเดชันของโปรตีน, การย่อยสลายโปรตีน และ การวิเคราะห์หาเอนไซม์ LPO ดังแสดงในตารางที่ 4.7 และ 4.8 ตามลำดับ

องค์ประกอบทางเคมีของเนยแข็งมอสซาเรลลานั้น สามารถใช้เป็นเกณฑ์แบ่งชนิดของเนยแข็งได้ ซึ่งแบ่งตามปริมาณความชื้น และปริมาณไขมัน โดยเฉพาะในมาตรฐานการส่งออกเนยแข็ง ซึ่งองค์ประกอบทางเคมีจะเป็นตัวกำหนดราคาของเนยแข็ง ซึ่งได้แก่ ปริมาณเกลือ ความชื้น และค่า pH เป็นต้น (USDA, 2006) เกณฑ์โดยทั่วไปของเนยแข็งชนิดนี้ตาม USDA (1980; 2001) คือ มีปริมาณความชื้นอยู่ในช่วงร้อยละ 45 – 60 โดยน้ำหนัก ปริมาณไขมันอยู่ในช่วงร้อยละ 30 – 45 โดยน้ำหนักฐานแห้ง ปริมาณเกลืออยู่ในช่วงร้อยละ 1.20 – 2.00 โดยน้ำหนัก และมีค่า pH อยู่ในช่วงระหว่าง 5.00 – 5.40 ซึ่งระหว่างการแปรรูปเป็นเนยแข็งนั้น องค์ประกอบในน้ำนมมีการเปลี่ยนแปลง โดยน้ำตาลแล็กโทส จะสูญเสียไปพร้อมกับหางนมมากถึงร้อยละ 90 โดยน้ำหนัก ในช่วงระหว่างการปล่อยหางนมออก (Fox, Guinee, Cogan and McSweeney, 2000) และในส่วนของไขมันจะสูญเสียไปในระหว่างการนวดผสมและการขึ้นรูปด้วยเครื่องอัดพอง ที่บริเวณหน้าแปลนในรูปของน้ำมัน ซึ่งมีผลให้ปริมาณไขมันและน้ำมันอิสระมีค่าที่ต่ำอย่างเห็นได้ชัด (Camire, 2000)

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่างทดลองและเนยแข็งมอสซาเรลลาทางการค้า ที่ทำการศึกษาเปรียบเทียบ ได้แก่ ปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต เถ้า และเกลือ ดังแสดงในตารางที่ 4.7 พบว่า องค์ประกอบที่ทำการวิเคราะห์ในทุกค่า แตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) โดยปริมาณความชื้นของตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบมีค่ามากที่สุด ($p<0.05$) คือร้อยละ 50.80 โดยน้ำหนัก ตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system มีค่าน้อยที่สุด ($p<0.05$) คือร้อยละ 45.38 โดยน้ำหนัก ตัวอย่างเนยแข็งจากนมสดพาสเจอร์ไรส์ คือร้อยละ 49.26 โดยน้ำหนัก และตัวอย่างเนยแข็งทางการค้า คือร้อยละ 46.28 โดยน้ำหนัก (ตารางที่ 4.7) ส่วนปริมาณไขมันของตัวอย่างเนยแข็งทางการค้ามีค่ามากที่สุด ($p<0.05$) คือร้อยละ 22.42 โดยน้ำหนัก ตัวอย่างเนยแข็งจากนมสดพาสเจอร์ไรส์มีค่าน้อยที่สุด ($p<0.05$) คือร้อยละ 14.83 โดยน้ำหนัก ตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบ คือร้อยละ 20.00 โดยน้ำหนัก และตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system คือร้อยละ 16.00 โดยน้ำหนัก (ตารางที่ 4.7) ส่วนปริมาณโปรตีนของตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system มีค่ามากที่สุด ($p<0.05$) คือร้อยละ 33.40 โดยน้ำหนัก และตัวอย่างเนยแข็งทางการค้ามีค่าน้อยที่สุด ($p<0.05$) คือร้อยละ 24.70 โดยน้ำหนัก ตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบ คือร้อยละ 24.80 โดยน้ำหนัก และตัวอย่างเนยแข็งจากนมสดพาสเจอร์ไรส์ คือร้อยละ 30.14 โดยน้ำหนัก (ตารางที่ 4.7)

ส่วนปริมาณคาร์โบไฮเดรตได้จาก ผลต่างขององค์ประกอบทางเคมีทั้งหมดกับร้อยละขององค์ประกอบทางเคมีในส่วนที่เหลือ ยกเว้นปริมาณเกลือ ซึ่งตัวอย่างเนยแข็งทางการค้ามีค่ามากที่สุด ($p<0.05$) คือร้อยละ 2.94 โดยน้ำหนัก ตัวอย่างเนยแข็งจากนมสดพาสเจอร์ไรส์มีค่าน้อยที่สุด ($p<0.05$) คือร้อยละ 1.45 โดยน้ำหนัก ตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบ คือร้อยละ 1.50 โดยน้ำหนัก และตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system คือร้อยละ 1.80 โดยน้ำหนัก (ตารางที่ 4.7) ส่วนปริมาณเถ้าของตัวอย่างเนยแข็งจากนมสดพาสเจอร์ไรส์มีค่ามากที่สุด ($p<0.05$) คือร้อยละ 4.32 โดยน้ำหนัก ตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบมีค่าน้อยที่สุด ($p<0.05$) คือร้อยละ 2.90 โดยน้ำหนัก ตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system คือร้อยละ 3.42 โดยน้ำหนัก และตัวอย่างเนยแข็งทางการค้า คือร้อยละ 3.58 โดยน้ำหนัก (ตารางที่ 4.7) และในส่วนปริมาณเกลือของตัวอย่างเนยแข็งจากนมสดพาสเจอร์ไรส์มีค่ามากที่สุด ($p<0.05$) คือร้อยละ 1.85 โดยน้ำหนัก ตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบมีค่าน้อยที่สุด ($p<0.05$) คือร้อยละ 1.39 โดยน้ำหนัก ตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system คือร้อยละ 1.58 โดยน้ำหนัก และตัวอย่างเนยแข็งทางการค้าเท่ากับร้อยละ 1.84 โดยน้ำหนัก (ตารางที่ 4.7)

**ตารางที่ 4.7** ค่าเฉลี่ยองค์ประกอบทางเคมีของเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่างทดลอง

| ตัวอย่างทดลอง | องค์ประกอบทางเคมี (%) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ความชื้น | ไขมัน | โปรตีน | คาร์โบไฮเดรต | เถ้า | เกลือ |
| น้ำนมดิบ | 50.80[a] | 20.00[b] | 24.80[c] | 1.50[c] | 2.90[d] | 1.39[d] |
| น้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system | 45.38[d] | 16.00[c] | 33.40[a] | 1.80[b] | 3.42[c] | 1.58[c] |
| นมสดพาสเจอร์ไรส์ | 49.26[b] | 14.83[d] | 30.14[b] | 1.45[d] | 4.32[a] | 1.85[a] |
| ทางการค้า | 46.28[c] | 22.42[a] | 24.70[d] | 2.94[a] | 3.58[b] | 1.84[b] |

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้งหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$) โดยโปรแกรมสถิติ SAS

ส่วนคุณภาพทางเคมีของเนยแข็งในแต่ละตัวอย่างทดลอง และเนยแข็งทางการค้า ที่ทำการศึกษาเปรียบเทียบ ได้แก่ ค่า TA, pH, การเกิดออกซิเดชันของโปรตีน, การย่อยสลายโปรตีน และ การวิเคราะห์หาเอนไซม์ LPO ดังแสดงในตารางที่ 4.8 พบว่า คุณภาพทางเคมีที่ทำการวิเคราะห์ในทุกค่า แตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) โดยค่า TA ของตัวอย่างเนยแข็งจากนมสดพาสเจอร์ไรส์มีค่ามากที่สุด ($p<0.05$) คือร้อยละ 0.07 โดยน้ำหนัก ตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system มีค่าน้อยที่สุด ($p<0.05$) คือร้อยละ 0.02 โดยน้ำหนัก ตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบ คือร้อยละ 0.05 โดยน้ำหนัก และตัวอย่างเนยแข็งทางการค้า คือร้อยละ 0.04 โดยน้ำหนัก (ตารางที่ 4.8) ส่วนค่า pH ของตัวอย่างเนยแข็งทางการค้ามีค่ามากที่สุด ($p<0.05$) เท่ากับ 5.68 ตัวอย่างเนยแข็งจากนมสดพาสเจอร์ไรส์มีน้อยที่สุด ($p<0.05$) เท่ากับ 5.46 โดยน้ำหนัก ตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบ มีค่าเท่ากับ 5.51 และตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system มีค่าเท่ากับ 5.61 (ตารางที่ 4.8) ส่วนการเกิดออกซิเดชันของโปรตีนที่วัดในรูปของค่า PC ของตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system และตัวอย่างเนยแข็งทางการค้ามีค่ามากกว่าตัวอย่างเนยแข็งอื่น โดยที่มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) เท่ากับ 1.45 และ 1.42 nmoles/mg of proteins ตามลำดับ ตัวอย่างเนยแข็งจากนมสดพาสเจอร์ไรส์มีค่าน้อยที่สุด ($p<0.05$) เท่ากับ 0.87 nmoles/mg of proteins และตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบ เท่ากับ 1.18 nmoles/mg of proteins (ตารางที่ 4.8)

ส่วนการย่อยสลายโปรตีนมี 2 ส่วน คือ ปริมาณ TNS ในสารละลาย TCA เข้มข้นร้อยละ 12 และปริมาณ TNS ในสารละลายอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 4.6 โดยที่ปริมาณ TNS ในสารละลาย TCA เข้มข้นร้อยละ 12 โดยน้ำหนัก ของตัวอย่างเนยแข็งทางการค้ามีค่ามากที่สุด ($p<0.05$) คือร้อยละ 1.36 โดยน้ำหนักของโปรตีน ตัวอย่างเนยแข็งจากนมสดพาสเจอร์ไรส์มีค่าน้อยที่สุด ($p<0.05$) คือร้อยละ 1.06 โดยน้ำหนักของโปรตีน ตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบ คือร้อยละ 1.16 โดยน้ำหนักของโปรตีน และตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system คือร้อยละ 1.18 โดยน้ำหนักของโปรตีน (ตารางที่ 4.8) ในส่วนปริมาณ TNS ในสารละลายอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 4.6 ของตัวอย่างเนยแข็งทางการค้ามีค่ามากที่สุด ($p<0.05$) คือร้อยละ 2.65 โดยน้ำหนักของโปรตีน ตัวอย่างเนยแข็งจากนมสดพาสเจอร์ไรส์มีค่าน้อยที่สุด ($p<0.05$) คือร้อยละ 2.34 โดยน้ำหนักของโปรตีน ตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบ คือร้อยละ 2.45 โดยน้ำหนักของโปรตีน และตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system คือร้อยละ 2.52 โดยน้ำหนักของโปรตีน (ตารางที่ 4.8)

**ตารางที่ 4.8** ค่าเฉลี่ยคุณภาพทางเคมีของเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่างทดลอง

| ตัวอย่างทดลอง | TA (%) | pH | PC (nmol/ mg) | Proteolysis (%) | | LPO |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | TNS ใน TCA 12 % | TNS ใน pH 4.6 acetate buffer | |
| น้ำนมดิบ | $0.05^{b}$ | $5.51^{c}$ | $1.18^{b}$ | $1.16^{bc}$ | $2.45^{c}$ | negative |
| น้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system | $0.02^{d}$ | $5.61^{b}$ | $1.45^{a}$ | $1.18^{b}$ | $2.52^{b}$ | negative |
| นมสดพาสเจอร์ไรส์ | $0.07^{a}$ | $5.46^{d}$ | $0.87^{c}$ | $1.06^{c}$ | $2.34^{d}$ | negative |
| ทางการค้า | $0.04^{c}$ | $5.68^{a}$ | $1.42^{a}$ | $1.36^{a}$ | $2.65^{a}$ | positive |

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้งหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$) โดยโปรแกรมสถิติ SAS

ในส่วนของการวิเคราะห์หาเอนไซม์ LPO พบว่าสามารถตรวจพบในตัวอย่างเนยแข็งทางการค้าได้เพียงแค่ตัวอย่างเดียวเท่านั้น (ตารางที่ 4.8) แสดงว่า ในเนยแข็งทางการค้าใช้อุณหภูมิในการฆ่าเชื้อต่ำกว่า 80 องศาเซลเซียส (Walstra et al., 1999) จึงทำให้ตรวจพบ แต่ตัวอย่าง

เนยแข็งในการทดลองนั้น ใช้เวลาในการนวดผสมและขึ้นรูปด้วยเครื่องอัดพองที่อุณหภูมิต่ำ (70 – 75 องศาเซลเซียส) แต่ใช้เวลาในการแปรรูปนาน จึงส่งผลให้เอนไซม์ LPO ถูกยับยั้งจนสมบูรณ์

**4.3.2 การทดสอบทางกายภาพ**

คุณสมบัติทางกายภาพของเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่างทดลอง โดยทำการเปรียบเทียบ ค่าการวัดสีระหว่างก่อนและหลังทำการอบ (cook color) ความสามารถในการละลาย (meltability) การไหล (flowability) การยืดขยาย (stretchability) น้ำมันอิสระในเนยแข็งที่หลอมเหลว (free oil in melted cheese) คุณสมบัติหลังการอบ (baking test) และ การทำเป็นพิซซ่า (pizza baking test) ดังแสดงในตารางที่ 4.9-4.10 และภาพที่ 4.2-4.3

ในการวัดคุณภาพทางด้านค่าสี ที่ทำการเปรียบเทียบก่อนและหลังทำการอบ ด้วยเครื่องวัดสี CR-300 Minolta และประเมินลักษณะสีตามระบบฮันเตอร์ (Hunter Color System) ดังแสดงในตารางที่ 4.9 พบว่าก่อนทำการอบ ค่าความสว่าง (L) ของตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบมีค่ามากที่สุด ($p<0.05$) เท่ากับ 85.46 โดยที่ตัวอย่างเนยแข็งจากนมสดพาสเจอร์ไรส์ กับตัวอย่างเนยแข็งทางการค้ามีค่าที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) อยู่ในช่วง 78.30 - 78.68 และตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system มีค่าน้อยที่สุด($p<0.05$) เท่ากับ 74.00 (ตารางที่ 4.9) ส่วนค่าความเป็นสีเขียวและสีแดง (a) ของเนยแข็ง พบว่า ตัวอย่างเนยแข็งทางการค้ามีความเป็นสีเขียวมากที่สุด ($p<0.05$) เท่ากับ -6.19 โดยตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบมีค่าเท่ากับ -4.80 และตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system กับตัวอย่างเนยแข็งจากนมสดพาสเจอร์ไรส์ มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) อยู่ในช่วง -4.09 - -4.24 (ตารางที่ 4.9) และในส่วนค่าความเป็นสีเหลืองและสีน้ำเงิน (b) ของเนยแข็ง พบว่าตัวอย่างเนยแข็งทางการค้ามีความเป็นสีเหลืองมากที่สุด ($p<0.05$) เท่ากับ 18.21 โดยตัวอย่างเนยแข็งจากนมสดพาสเจอร์ไรส์มีค่าความเป็นสีเหลืองใกล้เคียงกับตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบ และตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system ซึ่งมีค่าเท่ากับ 10.88, 10.21 และ 9.05 สำหรับตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบ ตัวอย่างเนยแข็งจากนมสดพาสเจอร์ไรส์ และตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system ตามลำดับ (ตารางที่ 4.9) ซึ่งบ่งบอกถึงเนยแข็งทางการค้าจะมีสีที่เข้มกว่าในเนยแข็งแต่ละตัวอย่างทดลอง เนื่องจากมีการเติมสีลงไป โดยที่ในเนยแข็งจากแต่ละตัวอย่างทดลองนั้น เป็นสีที่มาจากตัวอย่างน้ำนมดิบที่ใช้ในการผลิตโดยตรง

**ตารางที่ 4.9** ค่าเฉลี่ยการวิเคราะห์สีของเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่างทดลองก่อนและหลังการอบ

| ตัวอย่างทดลอง | ค่าวิเคราะห์สีตามระบบสีของฮันเตอร์ (L, a, b)* ของตัวอย่างก่อนการอบ | | | ค่าวิเคราะห์สีตามระบบสีของฮันเตอร์ (L, a, b)* ของตัวอย่างหลังการอบ | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | L | a | b | L | a | b |
| น้ำนมดิบ | $85.46^{a}$ | $-4.80^{b}$ | $10.88^{b}$ | $54.06^{a}$ | $2.08^{b}$ | $13.16^{ab}$ |
| น้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system | $74.00^{c}$ | $-4.24^{a}$ | $9.05^{c}$ | $60.71^{a}$ | $1.59^{b}$ | $13.76^{ab}$ |
| นมสดพาสเจอร์ไรส์ | $78.30^{b}$ | $-4.09^{a}$ | $10.21^{bc}$ | $61.68^{a}$ | $0.27^{b}$ | $18.03^{a}$ |
| ทางการค้า | $78.68^{b}$ | $-6.19^{c}$ | $18.21^{a}$ | $39.82^{b}$ | $7.89^{a}$ | $11.65^{b}$ |

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้งหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$) โดยโปรแกรมสถิติ SAS

*L คือ ความสว่างของสีซึ่งมีค่าจาก 0 คือ สีดำ ถึง 100 คือ สีขาว

a คือ ค่าความเป็นสีเขียวและสีแดง โดยค่า a- คือ สีเขียว และค่าที่ได้เป็น a+ คือ สีแดง

b คือ ค่าความเป็นสีเหลืองและสีน้ำเงิน โดยค่า b- คือ สีน้ำเงิน และค่าที่ได้เป็น b+ คือ สีเหลือง

เมื่อนำตัวอย่างเนยแข็งมาผ่านการอบ มีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของค่าที่วัดทั้ง 3 ค่า พบว่า ค่าความสว่าง (L) ของเนยแข็งในแต่ละตัวอย่างทดลองไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) เท่ากับ 54.06, 60.71 และ 61.68 สำหรับตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบ ตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system และตัวอย่างเนยแข็งจากนมสดพาสเจอร์ไรส์ ตามลำดับ โดยตัวอย่างเนยแข็งทางการค้ามีค่าน้อยที่สุด ($p<0.05$) เท่ากับ 39.82 (ตารางที่ 4.9) ส่วนค่าความเป็นสีเขียวและสีแดง (a) ของเนยแข็ง พบว่าตัวอย่างเนยแข็งทางการค้ามีความเป็นสีแดงมากที่สุด ($p<0.05$) เท่ากับ 7.89 โดยในเนยแข็งแต่ละตัวอย่างทดลองไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) เท่ากับ 2.08, 1.59 และ 0.27 สำหรับตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบ ตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system และตัวอย่างเนยแข็งจากนมสดพาสเจอร์ไรส์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.9) และในส่วนค่าความเป็นสีเหลืองและสีน้ำเงิน (b) ของเนยแข็ง พบว่าตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบ และตัวอย่างเนยแข็งจาก

น้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system มีค่าความเป็นสีเหลืองใกล้เคียงกันกับตัวอย่างนมเนยแข็งจากสดพาสเจอร์ไรส์ และตัวอย่างเนยแข็งทางการค้า เท่ากับ 13.16, 13.76, 18.03 และ 11.65 สำหรับตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบ ตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system ตัวอย่างเนยแข็งจากนมสดพาสเจอร์ไรส์ และตัวอย่างเนยแข็งทางการค้า ตามลำดับ (ตารางที่ 4.9) จะเห็นว่าเนยแข็งทางการค้ามีการเปลี่ยนแปลงค่าสีมากที่สุด เพราะเนยแข็งทางการค้ามีน้ำตาลเหลือมากกว่าในเนยแข็งแต่ละตัวอย่างทดลอง โดยที่ตัวอย่างทางการค้าใช้กล้าเชื้อในการผลิตซึ่งใช้น้ำตาลแล็กโทสโดยย่อยให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคสและกาแล็กโทส ซึ่งกล้าเชื้อส่วนใหญ่ใช้แต่น้ำตาลกลูโคสเปลี่ยนให้เป็นกรดแล็กทิกเท่านั้น ทำให้เหลือน้ำตาลกาแล็กโทสอยู่ โดยน้ำตาลชนิดนี้ทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนเกิดปฏิกิริยาที่เรียกว่า Millard reaction ทำให้มีสีน้ำตาลเกิดขึ้น (Kosikowski and Mistry, 1997)

ส่วนคุณสมบัติทางด้านความสามารถในการละลาย การไหล การยืดขยาย และน้ำมันอิสระในเนยแข็งที่หลอมเหลว ดังแสดงในตารางที่ 4.10 ส่วนความสามารถในการละลายเป็นการวัดแบบใช้หลอดทดลอง (tube method) เป็นวิธีที่คิดโดย Olson and Price เป็นการวัดระยะทางการไหลของเนยแข็ง (Gunasekaran and Ak, 2002) พบว่าเนยแข็งในแต่ละตัวอย่างทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบมีค่ามากที่สุด ($p<0.05$) เท่ากับ 16.00 เซนติเมตร ตัวอย่างเนยแข็งทางการค้ามีค่าน้อยที่สุด ($p<0.05$) เท่ากับ 11.27 เซนติเมตร ตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system และตัวอย่างเนยแข็งจากนมสดพาสเจอร์ไรส์ เท่ากับ 13.30 และ 11.67 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.10) โดยที่ปัจจัยที่มีผลคือระยะเวลาในการเก็บรักษา ซึ่งในช่วง 1 – 2 วันแรกของการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะมีค่ามากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หลังจากใช้เวลาในการเก็บรักษานานขึ้น ทำให้มีค่าลดต่ำลงเรื่อยๆ อีกทั้งเนยแข็งที่ผ่านการบ่ม จะมีค่าสูงกว่าในเนยแข็งที่ไม่ได้ผ่านการบ่ม (Wang et al., 1998)

ความสามารถในการไหลเป็นการวัดแบบ Schreiber test โดยที่ ค่าที่ได้จากการทดลองมีค่าเท่ากับหรือมากกว่า 4 สามารถยอมรับได้ พบว่าตัวอย่างเนยแข็งจากนมสดพาสเจอร์ไรส์มีค่าต่ำกว่าเกณฑ์คือ เท่ากับ 3.33 เท่านั้น ส่วนตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบ ตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system และตัวอย่างเนยแข็งทางการค้า มีค่าเท่ากับ 6.53, 5.94 และ 4.22 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.10) โดยในปี ค.ศ. 1999 Muthukumarappan, Wang and Gunasekaran ทำการพัฒนาวิธีนี้โดยเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ และภาชนะที่ใช้ในการทดลอง พบว่าการใช้อุณหภูมิต่ำกว่า 90 องศาเซลเซียส และใช้จานอลูมิเนียมใส่ตัวอย่างนั้น ให้ผลที่ดีกว่าวิธีการเดิม และในปี ค.ศ. 2005 Altan, Turhan and Gunasekaran นำฝามาปิดในระหว่างการอบ พบว่าการมีฝาปิดทำให้มีค่าที่ต่ำกว่าตัวอย่างที่ไม่ปิดฝา ถึงแม้จะมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองก็ตาม

ความสามารถในการยืดขยายเป็นการวัดด้วยวิธี fork test นั้น เป็นวิธีการแรกที่มีการใช้กัน เป็นวิธีการที่เหมาะสำหรับเปรียบเทียบตัวอย่างในการทดลองเดียวกันเท่านั้น เนื่องจากมีสภาวะการทดลองที่หลากหลายซึ่งขึ้นอยู่กับคนที่ทำการทดลอง (Gunasekaran and Ak, 2002) โดยในการทดลองนี้กำหนดน้ำหนักของตัวอย่างเนยแข็ง และซอส ตามขนาดของแป้งพิซซ่าที่ใช้ในการทดลอง ส่วนสภาวะในการอบใช้ตามมาตรฐานของ USDA (1980; 2001) พบว่าเนยแข็งในแต่ละตัวอย่างทดลอง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในส่วนตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system มีค่ามากที่สุด ($p<0.05$) เท่ากับ 36.17 เซนติเมตร ส่วนตัวอย่างเนยแข็งจากนมสดพาสเจอร์ไรส์มีค่าน้อยที่สุด ($p<0.05$) เท่ากับ 16.17 เซนติเมตร ส่วนตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบ และตัวอย่างเนยแข็งทางการค้า เท่ากับ 25.17 และ 34.83 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.10)

**ตารางที่ 4.10** ค่าเฉลี่ยคุณสมบัติทางกายภาพของเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่างทดลอง

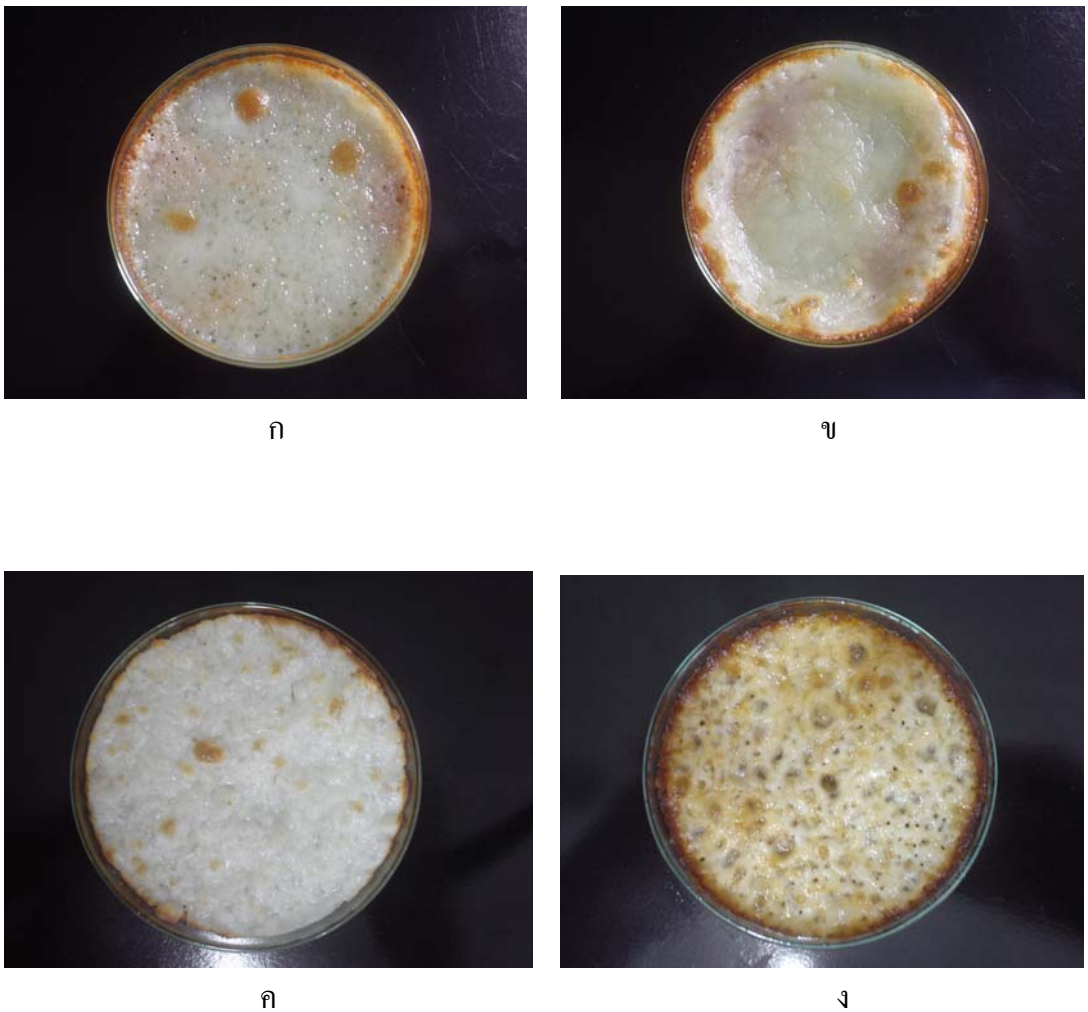
| ตัวอย่างทดลอง | Meltability (ซม.) | Flowability | Stretchability (ซม.) | Free oil (%) |
|---|---|---|---|---|
| น้ำนมดิบ | 16.00$^{a}$ | 6.53$^{a}$ | 25.17$^{c}$ | 18.75$^{b}$ |
| น้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system | 13.30$^{b}$ | 5.94$^{a}$ | 36.17$^{a}$ | 3.27$^{c}$ |
| นมสดพาสเจอร์ไรส์ | 11.67$^{c}$ | 3.33$^{b}$ | 16.17$^{d}$ | 3.13$^{c}$ |
| ทางการค้า | 11.27$^{d}$ | 4.22$^{ab}$ | 34.83$^{b}$ | 21.19$^{a}$ |

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้งหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$) โดยโปรแกรมสถิติ SAS

ส่วนของน้ำมันอิสระในเนยแข็งที่หลอมเหลว พบว่าตัวอย่างเนยแข็งทางการค้ามีค่ามากที่สุด ($p<0.05$) คือร้อยละ 21.19 โดยน้ำหนักของไขมันทั้งหมด ส่วนตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบ ตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system และตัวอย่างเนยแข็งจากนมสดพาสเจอร์ไรส์ คือร้อยละ 18.75, 3.27 และ 3.13 โดยน้ำหนักของไขมันทั้งหมด ตามลำดับ (ตารางที่ 4.10) สาเหตุที่ตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system และตัวอย่างเนยแข็งจากนมสดพาสเจอร์ไรส์มีค่าต่ำที่สุด ($p<0.05$) เนื่องจากมีปริมาณไขมันที่ต่ำ ส่งผลให้ปริมาณน้ำมันอิสระต่ำตามลงไปด้วย ซึ่งมาจากโครงสร้างของโปรตีนที่เกิดการเปลี่ยนแปลงมากกว่าในตัวอย่าง

อื่น นั่นคือ LP-system และการให้ความร้อน อีกทั้งในระหว่างการนวดผสมและขึ้นรูปด้วยเครื่องอัดพองยังได้รับความร้อนอีกครั้ง อีกทั้งยังเกิดเป็นสารเชิงซ้อนโดยที่ไขมันจะไปจับกับโปรตีน (Rowney, Roupas, Hickey and Everett, 2004)

ในส่วนคุณสมบัติหลังการอบของเนยแข็งในแต่ละตัวอย่าง เป็นการตรวจสอบคุณสมบัติทางด้าน ความสามารถในการละลาย รอยพอง สีของรอยพอง ปริมาณของน้ำมันอิสระ และลักษณะการยืดขยาย ดังแสดงในภาพที่ 4.2




**ภาพที่ 4.2** ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่างทดลอง หลังจากผ่านการอบ โดยที่ผลิตจากตัวอย่างน้ำนมดิบ (ก), ตัวอย่างน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system (ข) และตัวอย่างนมสดพาสเจอร์ไรส์ (ค) เปรียบเทียบกับเนยแข็งมอสซาเรลลาทางการค้า (ง)

ในตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบมีลักษณะหลอมละลายได้ดี แต่ยังเห็นลักษณะจุดกลมและยาวได้ มีรอยพองเล็กน้อยครอบคลุมประมาณร้อยละ 10 – 30 ของผิวหน้า ซึ่งรอยพองมีสีน้ำตาลทอง มีน้ำมันออกมาเล็กน้อยที่ผิวหน้า และสามารถยืดได้เกิน 3 นิ้ว ในส่วนตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system มีลักษณะหลอมละลายได้ดี แต่ยังเห็นลักษณะจุดกลมและยาวได้ มีรอยพองค่อนข้างมากครอบคลุมประมาณร้อยละ 30 – 50 ของผิวหน้า ซึ่งรอยพองมีสีน้ำตาลทอง มีน้ำมันออกมาน้อยมากที่ผิวหน้า และสามารถยืดได้เกิน 3 นิ้ว ในส่วนตัวอย่างเนยแข็งจากนมสดพาสเจอร์ไรส์มีลักษณะหลอมละลายได้ แต่ยังมองเห็นเป็นการแยกจากกัน มีรอยพองเล็กน้อยครอบคลุมประมาณร้อยละ 10 – 30 ของผิวหน้า ซึ่งรอยพองมีสีน้ำตาลทอง ไม่มีน้ำมันออกมา และสามารถยืดได้เกิน 3 นิ้ว และในส่วนตัวอย่างเนยแข็งทางการค้ามีลักษณะหลอมละลายได้ดีเป็นเนื้อเดียวกัน ซึ่งพบเฉพาะจุดกลม มีรอยพองมากครอบคลุมประมาณร้อยละ 70 ของผิวหน้า ซึ่งรอยพองมีสีน้ำตาลเข้ม มีน้ำมันออกมากที่ผิวหน้า และสามารถยืดได้เกิน 3 นิ้ว

ในส่วนคุณสมบัติของการทำเป็นพิซซ่าของเนยแข็งมอสเรลลาในแต่ละตัวอย่าง ซึ่งเป็นการดูลักษณะการนำไปใช้ของเนยแข็งชนิดนี้ ดังแสดงในภาพที่ 4.3 พบว่าเมื่อดูลักษณะโดยรวมของพิซซ่าแล้ว จะเห็นว่าตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system มีคุณภาพใกล้เคียงกับตัวอย่างเนยแข็งทางการค้า โดยดูจากลักษณะการหลอมละลายเป็นเนื้อเดียวกันของเนยแข็ง แต่จะมีสีที่อ่อนกว่าเนื่องจากในตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system มีปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ในเนยแข็งน้อยกว่าตัวอย่างเนยแข็งทางการค้า โดยที่ในส่วนของตัวอย่างเนยแข็งจากนมสดพาสเจอร์ไรส์ และตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบนั้น ยังคงให้ผลการทดลองเหมือนกันกับการทดสอบคุณสมบัติด้วยการอบ อีกทั้งในตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบนั้น มีคุณลักษณะที่ดีกว่าตัวอย่างเนยแข็งจากนมสดพาสเจอร์ไรส์ แต่คุณภาพยังด้อยกว่าตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system ซึ่งจากการทดลองนำมาทำเป็นพิซซ่านั้น พบว่าลักษณะโดยรวมของเนยแข็งในแต่ละตัวอย่างจะมีลักษณะที่ดีกว่าวิธีการตรวจสอบด้วยการอบ เนื่องจากในวิธีการตรวจสอบการทำเป็นพิชซ่านั้น จะมีเติมซอสใส่ลงไปด้วยจึงส่งผลให้ลักษณะของเนยแข็งในแต่ละตัวอย่าง มีลักษณะโดยรวมที่ดีขึ้นกว่าวิธีการทดสอบคุณสมบัติหลังการอบอย่างเห็นได้ชัด เพราะสีที่ได้จากการทดลองวิธีนี้ จะมีแป้งพิซซ่าและซอสมาช่วยเสริมทำให้มีสีที่เข้มขึ้นกว่าเดิม ซึ่งถ้าทำการผลิตเป็นพิซซ่าที่มีการใส่เครื่องลงไปด้วย อาจทำให้พิซซ่าที่ได้จากเนยแข็งในแต่ละตัวอย่าง ไม่สามารถบ่งบอกถึงความแตกต่างในแต่ละตัวอย่างได้อย่างชัดเจน

ก ข

ค ง

**ภาพที่ 4.3** ตัวอย่างผลิตภัณฑ์พิซซ่าที่อุณหภูมิห้องโดยโรยหน้าด้วยเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่างทดลอง ของเนยแข็งมอสซาเรลลาทางการค้า (ก) เปรียบเทียบกับตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบ (ข), ตัวอย่างเนยแข็งจากน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system (ค) และตัวอย่างเนยแข็งจากนมสดพาสเจอร์ไรส์ (ง)

**4.3.3 การทดสอบทางจุลชีววิทยา**

การทดสอบทางจุลชีววิทยาของเนยแข็งมอสซาเรลลาในแต่ละตัวอย่างทดลอง ยกเว้นในตัวอย่างเนยแข็งมอสซาเรลลาทางการค้า โดยทำการประเมิน จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด จำนวน *E. coli* และโคลิฟอร์ม และจำนวนยีสต์และรา ดังแสดงในตารางที่ 4.11 ซึ่งตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 209) พ.ศ. 2543 เรื่อง เนยแข็ง จะระบุเพียงแค่ว่า ต้องไม่มีจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค และไม่มีสารพิษจากจุลินทรีย์ในปริมาณที่อาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพเท่านั้น จะเห็นว่าข้อกำหนดของกระทรวงสาธารณสุขนั้น ไม่ได้ระบุเฉพาะลงไปในรายละเอียดของจุลินทรีย์ในแต่

ละชนิด ซึ่งต่างจากประกาศกระทรวงสาธารณสุข ในเรื่อง นมเปรี้ยว ที่ระบุไว้อย่างชัดเจน เนื่องจากการบริโภคผลิตภัณฑ์นมหมักภายในประเทศนั้น มีการบริโภค นมเปรี้ยวและ โยเกิร์ต มากกว่าเนยแข็ง หรือผลิตภัณฑ์นมหมักชนิดอื่น (วิบูลวรรณ วรรณโมลี และ ณัทธร กสิบุตร, 2548b) ซึ่งจากการทดสอบพบว่า คุณภาพทางจุลินทรีย์ของเนยแข็งมอสซาเรลาในแต่ละตัวอย่างทดลองอยู่ในระดับที่ปกติ นั่นคือจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดของตัวอย่างเนยแข็งทั้ง 3 ชนิด อยู่ในช่วง 520 – 540 CFU ต่อกรัม ส่วนจำนวน *E. coli* และโคลิฟอร์ม ไม่พบในตัวอย่างเนยแข็งทั้ง 3 ชนิด และจำนวนยีสต์และราของตัวอย่างเนยแข็งทั้ง 3 ชนิดนั้น มีค่าไม่เกิน 3 CFU ต่อกรัม โดยปัจจัยที่มีผลคือ ระยะเวลา และอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษา ซึ่งดูได้มาตรฐานของ USDA (1980) ระบุว่า เก็บได้นาน 14 - 21 วัน เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4 - 7 องศาเซลเซียส หลังจากที่นำเนยแข็งที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งมาทำให้อ่อนตัวที่อุณหภูมิ 4 - 7 องศาเซลเซียส ซึ่งแสดงให้เห็นว่า เป็นเนยแข็งที่มีอายุการเก็บที่สั้น เนื่องจากลักษณะโดยรวมของเนยแข็ง ถึงแม้ว่าจะมีปริมาณจำนวนจุลินทรีย์อยู่ในระดับต่ำก็ตาม

**ตารางที่ 4.11** ค่าเฉลี่ยคุณภาพทางจุลชีววิทยาของเนยแข็งมอสซาเรลลา

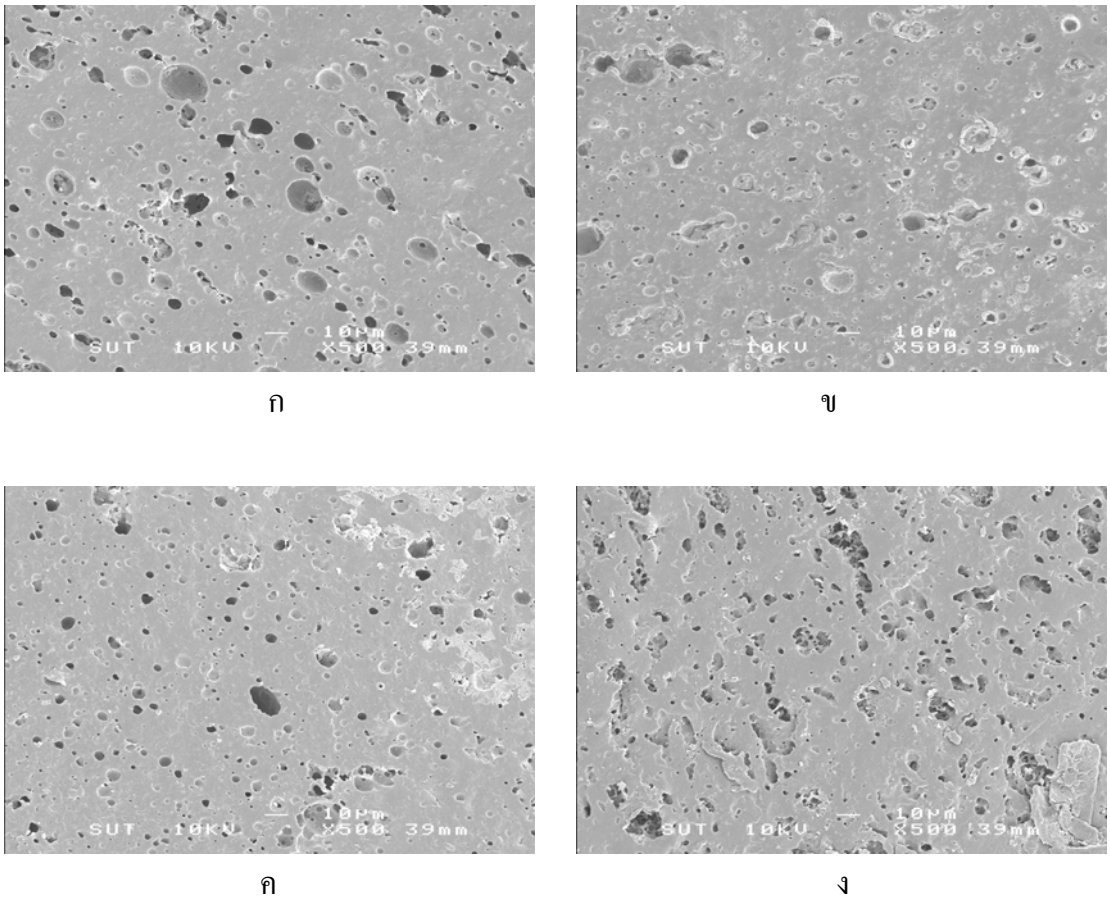
| ตัวอย่างทดลอง | จำนวนจุลินทรีย์ (CFU/g) | | |
|---|---|---|---|
| | จุลินทรีย์ทั้งหมด | *E. coli* และโคลิฟอร์ม | ยีสต์และรา |
| น้ำนมดิบ | 540[a] | 0[a] | 3[a] |
| น้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system | 520[c] | 0[a] | 2[b] |
| นมสดพาสเจอร์ไรส์ | 530[b] | 0[a] | 1[c] |

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้งหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$) โดยโปรแกรมสถิติ SAS

**4.3.4 การวิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างภายใน**

โครงสร้างภายในของเนยแข็งมอสซาเรลลาที่ทำการผลิตจาก ตัวอย่างน้ำนมดิบ ตัวอย่างน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system ตัวอย่างนมสดพาสเจอร์ไรส์ และตัวอย่างเนยแข็งมอสซาเรลลาทางการค้า ทำการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (SEM) และทำการ

บันทึกภาพลักษณะโครงสร้างภายในที่กำลังขยาย 500 และ 1,000 เท่า ดังแสดงในภาพที่ 4.4 – 4.5 ตามลำดับ



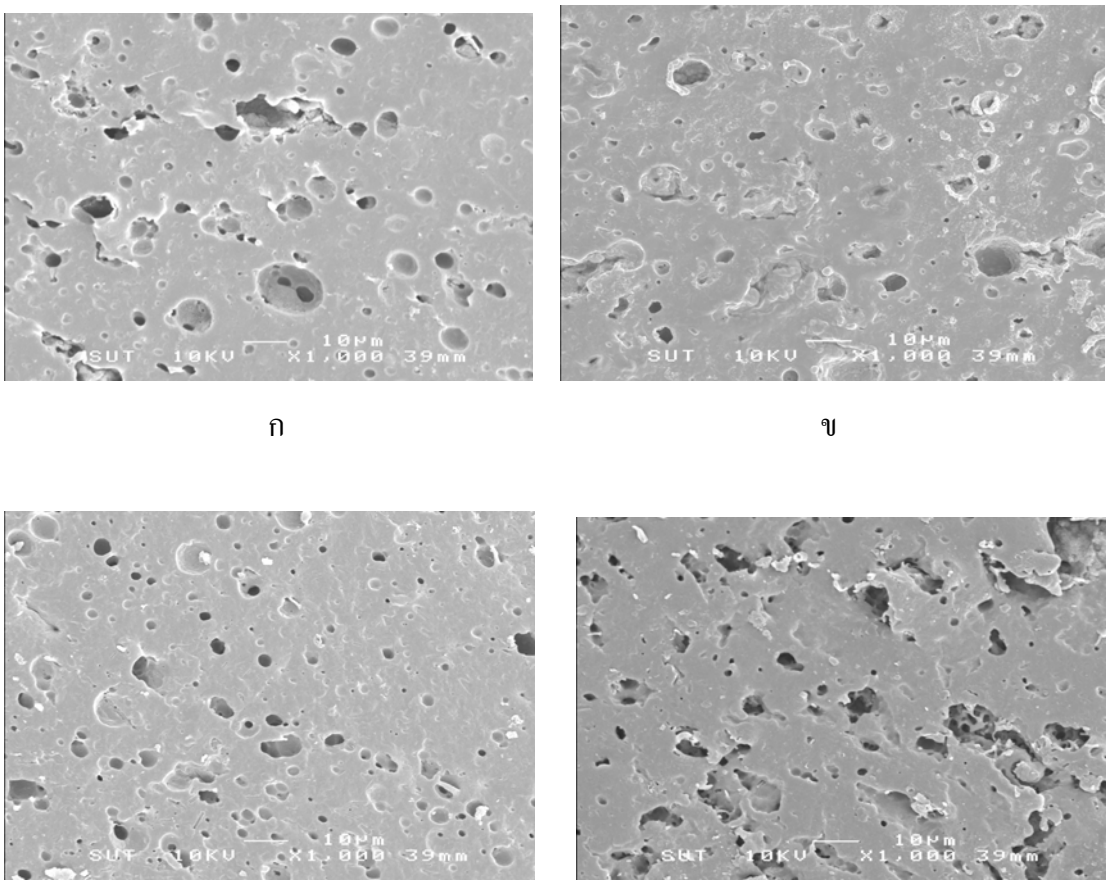

ก ข

ค ง

**ภาพที่ 4.4** การศึกษาโครงสร้างภายในด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (SEM) ของผลิตภัณฑ์เนยแข็งมอสซาเรลลาที่ผลิตจากตัวอย่างน้ำนมดิบ (ก), ตัวอย่างน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system (ข), ตัวอย่างนมสดพาสเจอร์ไรส์ (ค) และตัวอย่างเนยแข็งทางการค้า (ง) ที่กำลังขยาย 500 เท่า

จากภาพที่ 4.4 และ 4.5 พบว่าโครงสร้างภายในของเนยแข็งมอสซาเรลลานั้น มีลักษณะเป็นโครงข่ายของโปรตีนที่แน่น ซึ่งโครงสร้างนี้เกิดจากการจับตัวกันเป็นก้อนในการตกตะกอนน้ำนมในระหว่างการทำเนยแข็งของ พารา-เคซีน (*para*-casein) โดยที่รูพรุนที่พบในโครงสร้างจะเห็นว่ามีลักษณะคล้ายหลุมขนาดเล็กกระจายอยู่ทั่วโครงสร้างนั่นคือ ไขมันที่ไปแทรกตัวอยู่ในโครงข่ายของโปรตีน โดยที่ไขมันจะหลุดออกไปในช่วงของขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง โดยที่โครงสร้างของพารา-เคซีน นั้น จะเป็นตัวขัดขวางไม่ให้ไขมันมีการรวมตัวกันจนเกิดเป็น

โครงข่ายของไขมันเกิดขึ้น โดยที่เนยแข็งในแต่ละตัวอย่างทดลองมีการกระจายไขมันทำให้มีลักษณะกลม กระจายตัวได้ดี ซึ่งต่างจากเนยแข็งทางการค้าที่เป็นแบบซ้อนทับกัน (Kindstedt, Caric and Milanovic, 2004)




ก ข

ค ง

**ภาพที่ 4.5** การศึกษาโครงสร้างภายในด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (SEM) ของผลิตภัณฑ์เนยแข็งมอสซาเรลลาที่ผลิตจากตัวอย่างน้ำนมดิบ (ก), ตัวอย่างน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system (ข), ตัวอย่างนมสดพาสเจอร์ไรส์ (ค) และตัวอย่างเนยแข็งทางการค้า (ง) ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

ในส่วนลักษณะโครงสร้างภายในของเนยแข็งทางการค้า (ภาพที่ 4.4ง และ 4.5ง) มีลักษณะของโครงข่ายโปรตีนที่ซ้อนกันเป็นชั้นๆ และมีรูพรุนมากกว่าเนยแข็งในแต่ตัวอย่างทดลอง เนื่องจากเนยแข็งทางการค้ามีปริมาณไขมันและไขมันอิสระมากกว่า จึงทำให้ไขมันนั้นมีกระจายอยู่ในโครงข่ายโปรตีน ซึ่งการกระจายตัวของไขมันนี้จะมีผลกระทบต่อความสามารถในการละลาย

และการไหล เพราะการที่ไขมันอยู่รวมตัวกันในลักษณะที่เป็นโครงข่าย หรือมีลักษณะที่ใหญ่ จะมีผลให้การเกิดน้ำมันอิสระหลังการอบจะเกิดได้น้อย มีผลให้เนยแข็งมีการละลายและไหลน้อยตามลงไปด้วยเนื่องจาก ไม่มีสารที่ทำให้เกิดการหล่อลื่นในระหว่างการอบ (Kindstedt et al., 2004)

ในขณะที่โครงสร้างภายในของเนยแข็งในแต่ละตัวอย่างทดลอง (ภาพที่ 4.4ก,ข,ค และ 4.5ก,ข,ค) จะมีลักษณะโครงข่ายโปรตีนที่แน่นกว่า เนื่องจากเนยแข็งในแต่ละตัวอย่างนั้น มีการนวดผสมและการขึ้นรูปด้วยเครื่องอัดพอง ซึ่งโครงข่ายของโปรตีนนั้นจะเกิดการการปรับโครงสร้างจตุรภูมิของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป และได้สารที่มีลักษณะข้นหนืด หลังจากนั้นโปรตีนจะเกิดการรวมตัวกันเป็นพอลิเมอร์ เชื่อมต่อกันเป็นร่างแห (cross-linked) และเรียงตัวใหม่ (re-oriented) ได้เป็นโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นเส้นใย (fibrous structure) ที่แน่น (นิติยา รัตนาปนนท์, 2544) ทำให้เกิดเป็นโครงสร้างที่มีลักษณะการเกาะกันของโปรตีนที่หนาแน่นมากกว่าเนยแข็งทางการค้า

# บทที่ 5
# สรุปและข้อเสนอแนะ

## 5.1 บทสรุป

น้ำนมดิบโดยทั่วไปมีปริมาณสารตั้งต้นของ LP-system อยู่ในระดับที่ต่ำใกล้เคียงกัน ทำให้มีการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ต่ำ อีกทั้ง LP-system จะมีประสิทธิภาพที่ดีกับน้ำนมดิบที่เก็บมาไม่เกิน 3 ชั่วโมง โดยที่ LP-system ไม่มีผลต่อคุณภาพของน้ำนมดิบ โดยเฉพาะการตกตะกอนน้ำนม และสามารถเก็บน้ำนมได้นานกว่าน้ำนมดิบที่ผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรส์ เพราะ LP-system สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ในกลุ่มที่ทนความร้อนในระดับพาสเจอร์ไรเซชันได้ เมื่อนำเนยแข็งมอสซาเรลลา ที่ใช้น้ำนมดิบผลิตโดยวิธีการเติมกรดแล็กติกลงไปในน้ำนมโดยตรง แล้วขึ้นรูปด้วยเครื่องอัดพอง พบว่ามีองค์ประกอบทางเคมี มีความแตกต่างจากเนยแข็งทางการค้า โดยเฉพาะปริมาณคาร์โบไฮเดรต และปริมาณไขมัน การเกิดออกซิเดชันของโปรตีน และการเกิดการย่อยสลายโปรตีนในเนยแข็งทางการค้ามีค่าสูงกว่า เนื่องจากเอนไซม์ LPO ยังมีแอคติวิตีอยู่ทำให้มีกิจกรรมเกิดขึ้นตลอดช่วงอายุการเก็บ สมบัติทางกายภาพทางการวัดสี พบว่าเนยแข็งทางการค้าให้ผลที่ดีกว่า เนื่องจากมีปริมาณคาร์โบไฮเดรต และน้ำมันอิสระที่มากกว่าเนยแข็งในแต่ละตัวอย่างทดลอง คุณภาพทางด้านการละลาย การไหล การยืด ในเนยแข็งจากน้ำนมดิบที่ผ่าน LP-system มีคุณภาพที่ใกล้เคียงกับเนยแข็งทางการค้า สมบัติหลังจากการอบ และการผลิตเป็นพิซซ่า พบว่าเนยแข็งในแต่ละตัวอย่างทดลองมีคุณภาพที่ใกล้เคียงกับเนยแข็งทางการค้า

โครงสร้างภายในของเนยแข็งที่ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าลักษณะโครงข่ายของโปรตีนของเนยแข็งในแต่ละตัวอย่างทดลองมีลักษณะที่แน่นกว่าเนยแข็งทางการค้า และมีรูพรุนและการกระจายตัวที่น้อยกว่า ซึ่งรูพรุนดังกว่าเป็นตำแหน่งของไขมันที่หลุดออกในช่วงการเตรียมตัวอย่าง โดยที่ไขมันจะมีผลกระทบต่อคุณสมบัติทางกายภาพของผลิตภัณฑ์มากกว่าองค์ประกอบอื่น นั่นคือถ้ามีปริมาณไขมันน้อยเกินไปจะส่งผลต่อการละลาย คุณสมบัติหลังการอบ และถ้ามีการกระจายตัวของไขมันน้อยเกินไปจะส่งผลกระทบต่อ การละลาย การไหล และการยืด

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 การใช้ LP-system หลังจากทำการรีดน้ำนมดิบเสร็จทันที จะเป็นวิธีการที่ช่วยให้สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ในน้ำนมดิบอย่างมีประสิทธิภาพดีที่สุด

5.2.2 การใช้ LP-system ร่วมกับการฆ่าเชื้อในการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์นม ช่วยให้ผลิตภัณฑ์นมมีอายุในการเก็บรักษานานยิ่ง ซึ่งยังสามารถลดอุณหภูมิที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ เพื่อลดการสูญเสียคุณค่าทางอาหารของน้ำนม และลดต้นทุนการผลิตในส่วนของการฆ่าเชื้อได้อีกทางหนึ่ง

5.2.3 การใช้เครื่องอัดพองในการแปรรูปเป็นเนยแข็งมอสซาเรลลา มีผลกระทบต่อองค์ประกอบทางเคมี ซึ่งสามารถแก้ไขโดยการแปรรูปเป็นเนยแข็งไขมันต่ำแทน หรือทำการเพิ่มองค์ประกอบทางเคมีโดยเฉพาะไขมัน และคาร์โบไฮเดรต

5.2.4 การใช้เครื่องอัดพองมีผลต่อเนยแข็งที่ได้ จึงควรศึกษาปัจจัยของเครื่องอัดพองร่วมกับสภาวะของก้อนเคิร์ดก่อนการแปรรูป เพื่อให้ได้เนยแข็งมอสซาเรลลาที่มีคุณภาพตามต้องการ

# รายการอ้างอิง


กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2548). **มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ น้ำนมดิบ มกอช. 6003-2548.** สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ.

กระทรวงสาธารณสุข. (2543). **ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 209 เรื่อง เนยแข็ง.** กระทรวงสาธารณสุข. กรุงเทพฯ.

กระทรวงสาธารณสุข. (2545). **ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 265 เรื่อง นมโค.** กระทรวงสาธารณสุข. กรุงเทพฯ.

กระทรวงสาธารณสุข. (2547). **ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 282 เรื่อง นมโค (ฉบับที่ 2).** กระทรวงสาธารณสุข. กรุงเทพฯ.

กระทรวงอุตสาหกรรม. (2548). **ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่** 3441 **เรื่อง กำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม ระบบการจัดการความปลอดภัยของอาหาร-ข้อกำหนดสำหรับองค์กรในห่วงโซ่อาหาร มอก. 22000-2548.** กระทรวงอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ.

กล้าณรงค์ ศรีรอต และจุนธนี วีรเจตบดีธัช. (2545). **พจนานุกรม food additive.** บริษัท จาร์พา เท็คเซ็นเตอร์ จำกัด. กรุงเทพฯ.

กลุ่มวิเคราะห์ผลกระทบการเจราจา. (2547). **นมและผลิตภัณฑ์นม.** สำนักวิชาการด้านการวิเคราะห์และประเมินผลการเจรจา. [ออนไลน์]. ได้จาก: http://www.thaifta.com/pp-milk.pdf

คณะรัฐมนตรี. (วันที่ 29 พฤศจิกายน พ.ศ. 2548). การบริหารจัดการนมทั้งระบบ. ใน **สรุปผลการประชุมคณะรัฐมนตรี.** [ออนไลน์]. ได้จาก: http://www.thaigov.go.th

ณัฏฐา วิศิษฎ์วิทยากร. (2543). **การศึกษาประสิทธิภาพของ Lactoperoxidase ในการควบคุมแบคทีเรียสกุลวิบริโอในกุ้งกุลาดำ.** วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การประมง) ภาควิชาโครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ณัฏฐา วิศิษฎ์วิทยากร. (2548). การศึกษาประสิทธิภาพของ Lactoperoxidase ในการควบคุมแบคทีเรียสกุลวิบริโอในกุ้งกุลาดำ. **ว. วิทยาเขตหนองคาย.** 1 (1): 19-25.

นรินทร์ ทองศิริ. (2531). **เทคโนโลยีอาหารนม.** พิมพ์ครั้งที่ 2 ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.

นิธิยา รัตนาปนนท์. (2544). **หลักการแปรรูปอาหาร.** สำนักพิมพ์ โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ.

บริษัท ศูนย์วิจัยกสิกรไทย จำกัด. (2 กุมภาพันธ์ 2544). น้ำนมดิบล้นตลาด...ปัญหาที่ต้องเร่งแก้ไข. **มองเศรษฐกิจ: 7 (843).**

ปราณี อ่างเปรื่อง. (2547). **เอ็นไซม์ทางอาหาร.** พิมพ์ครั้งที่ 4 โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.

วรรณา ตั้งเจริญชัย. (2538). **ปฏิบัติการตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม.** พิมพ์ครั้งที่ 3 สำนักพิมพ์ รั้วเขียว. กรุงเทพฯ.

วิบูลวรรณ วรรณโมลี และณัทธร กสิบุตร. (2548a). **อุตสาหกรรมการเลี้ยงโคนม มาตรฐานและการตรวจรับรองฟาร์มโคนม.** สำนักรับรองมาตรฐานสินค้าและระบบคุณภาพ. สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ.

วิบูลวรรณ วรรณโมลี และณัทธร กสิบุตร. (2548b). **อุตสาหกรรมน้ำนมดิบ มาตรฐานและการตรวจรับรองน้ำนมดิบ.** สำนักรับรองมาตรฐานสินค้าและระบบคุณภาพ. สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ.

สารกิจ ถวิลประวัติ. (2546). บรรยายพิเศษ "นโยบายน้ำนมโคคุณภาพสู่ผู้บริโภคและการรองรับการค้าเสรี" ใน **เอกสารคำบรรยาย การประชุมวิชาการโคนม** (หน้า 1-10). ขอนแก่น: คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สุมาลี เหลืองสกุล. (2541). **จุลชีววิทยาทางอาหาร.** พิมพ์ครั้งที่ 4 โรงพิมพ์ชัยเจริญ. กรุงเทพฯ.

สุรีย์วรรณ พันธ์นรา พรศรี ชัยรัตนายุทธ์ ประวีร์ วิชชุลตา สมจิต สุรพัฒน์ อุทัย คันโธ และวงศ์อนันต์ ณรงค์วาณิชการ. (2548). ผลของการใช้ใบมันสำปะหลังแห้งเป็นอาหารโคนมต่อจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และโคไลฟอร์มในน้ำนมดิบ. [ออนไลน์]. ได้จาก: http://SUWAN.kps.ku.ac.th/center/feed/Data/Research/r05.pdf

อรพิน ชัยประสพ. (2544). **เทคโนโลยีของผลิตภัณฑ์นม.** สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง. กรุงเทพฯ.

Allen, J.C., and Wrieden, W.L. (1982). Influence of milk proteins on lipid oxidation in aqueous emulsion II. lactoperoxidase, lactoferrin, superoxide dismutase and xanthine oxidase. **J. Dairy Res.** 49: 249-263.

Alloggio, V., Caponio, F., Pasqualone, A., and Gomes, T. (2000). Effect of heat treatment on the rennet clotting time of goat and cow milk. **Food Chem.** 70: 51-55.

Altan, A., Turhan, M., and Gunasekaran, S. (2005). Comparison of covered and uncovered Schreiber test for cheese meltability evaluation. **J. Dairy Sci.** 88: 857-861.

Althaus, R.L., Molina, M.P., Rodriguez, M., and Fernandez, N. (2001). Analysis time and lactation stage influence on lactoperoxidase system components in dairy ewe milk. **J. Dairy Sci.** 84: 1829-1835.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (2000). **Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis.** ($17^{th}$ ed.). AOAC International, Guithersburg. MD, USA.

Aune, T.M., and Thomas, E.L. (1978). Oxidation of protein sulfhydryls by products of peroxidase-catalyzed oxidation of thiocyanate ion. **Biochemistry.** 17: 1005-1010.

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 Res.** 66: 73-80.

Berg, S.M., and van Mil, P.J.J.M. (1990). Extrusion for the dairy industry. pp. 368-372. In Zeuthen, P., Cheftel, J.C., Eriksson, C., Gormley, T.R., Linko, P., and Paulus, K. (eds.). **Processing and Quality of Foods.** Vol. 1 High Temperature/Short Time (HTST) Processing: Guarantee for High Quality Food with Long Shelflife. Elsevier Applied Science Publishers. London.

Bjorck, L. (1978). Antibacterial effect of the lactoperoxidase system on psychrotrophic bacteria in milk. **J. Dairy Res.** 45: 109-118.

Boots, J.-W., and Floris, R. (2006). Lactoperoxidase: from catalytic mechanism to practical applications. **Int. Dairy J.** 16: 1272-1276.

Borch, E., Wallentin, C., Rosen, M., and Bjorck, L. (1989). Antibacterial effect of the lactoperoxidase/thiocyanate/hydrogen peroxide System against strains of *Campylobacter* isolated from poultry. **J. Food Prot.** 52: 638-641.

Boussouel, N., Mathieu, F., Benoit, V., Linder, M., Revol-Junelles, A.–M., and Milliere, J.–B. (1999). Response surface methodology, an approach to predict the effects of a lactoperoxidase system, nisin, alone or in combination, on *Listeria monocytogenes* in skim milk. **J. Appl. Microbiol.** 86: 642-652.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72: 248-254.

Bradley, R.L., Jr., Arnold, E., Jr., Barbano, D.M., Semerad, R.G., Smith, D.E., and Vines, B.K. (1993). Chemical and physical methods. pp. 433-531. In Marshall, R.T. (ed.). **Standard Methods for the Examination of Dairy Products.** (16th ed.). American Public Health Association. Washington, DC.

Breene, W.M., Price, W.V., and Ernstrom, C.A. (1964). Manufacture of pizza cheese without starter. **J. Dairy Sci.** 47: 1173-1180.

Bynum, D.G., and Barbano, D.M. (1985). Whole milk reverses osmosis retentates for cheddar cheese manufacture: chemical changes during aging. **J. Dairy Sci.** 68: 1-10.

Camire, M.E. (2000). Chemical and nutritional changes in food during extrusion. pp. 127-147. In Riaz, M.N. (ed.). **Extruders in Food Applications.** Technomic publishing co., Inc. Lancaster.

Chambers, J.V. (2002). The microbiology of raw milk. pp. 39-90. In Robinson, R.K. (ed.). **Dairy Microbiology Handbook.** Wiley-Interscience, Inc. New York.

Chavarri, F., Santisteban, A., Virto, M., and de Renobales, M. (1998). Alkaline phosphatase, acid phosphatase, lactoperoxidase, and lipoprotein lipase activities in industry ewe's milk and cheese. **J. Agric. Food Chem.** 46: 2926-2932.

Cole, A.C., Adhikari, K.A., Gruen, I.U., and Heymann, H. (2004). Descriptive analysis of processed cheese manufactured by extrusion technology. **J. Dairy Sci.** 87 (suppl. 1): 418.

Daeschel, M.A., and Penner, M.H. (1992). Hydrogen peroxide, lactoperoxidase systems, and reuterin. pp. 155-175. In Ray, B., and Daeschel, M. (eds.). **Food Biopreservatives of Microbial Origin.** CRC Press, Inc. Washington, D.C.

Damodaran, S. (1996). Amino acids, peptides, and protein. pp. 321-429. In Fennema, O.R. (ed.). **Food Chemistry.** (3rd ed.). Marcel Dekker, Inc. New York.

de Wit, J.N. (2003). Dairy ingredients in non-dairy foods. pp. 718-727. In Roginski, H., Fuquay, J.W., and Fox, P.F. (eds.). **Encyclopedia of Dairy Sciences.** Volume 2. Academic Press. Amsterdam.

Elliot, R.M., McLay, J.C., Kennedy, M.J., and Simmonds, R.S. (2004). Inhibition of foodborne bacteria by the lactoperoxidase system in a beef cube system. **Int. J. Food Microbiol.** 91: 73-81.

Elotmani, F., and Assobhei, O. (2003). *In vitro* inhibition of microbial flora of fish by nisin and lactoperoxidase system. **Lett. Appl. Microbiol.** 38: 60-65.

FAO Headquarters. (2005). Benefits and potential risks of the lactoperoxidase system of raw milk preservation. In **Report of an FAO/Who technical meeting** (pp. 5-35) [on-line]. Available: http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/lactoperoxidase_en.pdf

Fedele, E., and Bergamo, P. (2001). Protein and lipid oxidative stresses during cheese manufacture. **J. Food Sci.** 66: 932-935.

Ferrari, E., Gamberi, M., Manzini, R., Pareschi, A., Persona, A., and Regattieri, A. (2003). Redesign of the mozzarella cheese production process through development of a micro-forming and stretching extruder system. **J. Food Eng.** 59: 13-23.

Fife, R.L., McMahon, D.J., and Oberg, C.J. (2002). Test for measuring the stretchability of melted cheese. **J. Dairy Sci.** 85: 3539-3545.

Fonteh, F.A., Grandison, A.S., and Lewis, M.J. (2005). Factors affecting lactoperoxidase activity. **Int. J. Dairy Tech.** 58: 233-236.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2002). **Regional Asia (Bangladesh, Bhutan, Indonesia, Pakistan, Philippines and Viet Nam) – National demonstrations on the lactoperoxidase system of milk preservation in selected South-eastern Asian countries.** [On-line]. Available: http://www.fao.or.th/Field_Operations/Countries/TCP_projects/RAS_TCP30001.html

Food Standards Australia New Zealand (FSANZ). (2002). **Final Assessment Report. Application A404. Lactoperoxidase system.** [On-line]. Available: http://www.foodstandards.gov.au

Fox, P.F. (2003). Indigenous enzymes in milk. pp. 467-471. In Fox, P.F., and McSweeney, P.L.H. (eds.). **Advanced Dairy Chemistry.** Volume 1: proteins. Part A. (3rd ed.). Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York.

Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M. and McSweeney P.L.M. (2000). **Fundamentals of Cheese Science.** Aspen Publishers, Inc. Maryland.

Fox, P.F. and Kelly, A.L. (2006). Indigenous enzymes in milk: overview and historical aspects-part 2. **Int. Dairy J.** 16: 517-532.

Frank, J.F. and Hassan, A.N. (2003). Microorganisms associated with milk. pp. 1786-1796. In Roginski, H., Fuquay, J.W., and Fox, P.F. (eds.). **Encyclopedia of Dairy Sciences.** Volume 3. Academic Press. Amsterdam.

Furtmuller, P.G., Jantschko, W., Regelsberger, G., Jakopitsch, C., Arnhold, J., and Obinger, C. (2002). Reaction of lactoperoxidase compound I with halides and thiocyanate. **Biochemistry.** 41: 11895-11900.

Garcia-Garibay, M., Luna-Salazar, A., and Casas, L.T. (1995). Antimicrobial effect of the lactoperoxidase system in milk activated by immobilized enzymes. **Food Biotechnol.** 9: 157-166.

Garcia-Graells, C., Valckx, C., and Michiels, C.W. (2000). Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in milk by combined treatment with high hydrostatic pressure and the lactoperoxidase system. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 4173-4179.

Guinee, T.P., Feeney, E.P., Auty, M.A.E., and Fox, P.F. (2002). Effect of pH and calcium concentration on some textural and functional properties of mozzarella cheese. **J. Dairy Sci.** 85: 1655-1669.

Gunasekaran, S., and Ak, M.M. (2002). **Cheese Rheology and Texture.** CRC Press, Inc. Washington, D.C.

Hardy, P. (2000). Water activity and cheese salting. pp. 60-81. In Eck, A., and Gillis, J.-C. (eds.). **Cheesemaking: From Science to Quality Assurance. (**2nd ed.). Lavoisier Publishing. Paris.

Health Protection Agency. (HPA) (2005). Determination of peroxidase activity (Storch test) in milk. **National Standard Method** D 6 Issue 2. [On-line serial]. Available: http://www.hpa-standardmethods.org.uk/pdf sops.asp

Hirano, R., Hirano, M., Oooka, M., Dosako, S., Nakajima, I., and Igoshi, K. (1998). Lactoperoxidase effects on rheological properties of yogurt. **J. Food Sci.** 63: 35-38.

http://app.tisi.go.th (2006). **List of certified companies in Thailand : ISO 9000.** [On-line].

Imm, J.Y., Oh, E.J., Han, K.S., Oh, S., Park, Y.W., and Kim, S.H. (2003). Functionality and physico-chemical characteristics of bovine and caprine mozzarella cheese during refrigerated storage. **J. Dairy Sci.** 86: 2790-2798.

International Dairy Federation (IDF). (1989). Metabolic activity as a measure of microbiological quality. In International Dairy Federation (IDF). (ed.). **Modern microbiological Methods for Dairy Products.** Special Issue 8901, May 1989.

International Dairy Federation (IDF). (1994). **Proceeding of IDF Seminar: Indigenous Antimicrobial agents of Milk.** Reference SI 9404, Brussels. Quoted in N.E. Marks, A.S. Grandison and M.J. Lewis. (2001). Use of hydrogen peroxide detection strips to determine the extent of pasteurization in whole milk. **Int. J. Dairy Tech.** 54: 20-22.

Isaacs, C.E., and Lampe, M.F. (2000). Natural food antimicrobial systems : Lactolipids. pp. 159-182. In Naidu, A.S. (ed.). **Natural Food Antimicrobial Systems.** CRC Press, Inc. Washington, D.C.

Jacob, B.M., Antony, K.E., Kumar, B.S., and Haridas, M. (2000). Thiocyanate metyhod antifungal and antibacterial property of goat milk lactoperoxidase. **Life Sci.** 66: 2433-2439. อ้างถึงใน เทียบพบ ก้านเหลือง และคณะ (2550). การเก็บรักษาน้ำนมดิบโดยการทำงานของระบบ Lactoperoxodase ใน **การประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่** 3 (หน้า 413-422). ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

Jandal, J.M. (1997). New methods for preserving raw milk. **Indian Dairyman.** 49: 21-24. อ้างถึงใน ณัฏฐา วิศิษฎ์วิทยากร. (2548). การศึกษาประสิทธิภาพของ Lactoperoxodase ในการควบคุมแบคทีเรียสกุลวิบริโอในกุ้งกุลาดำ. **ว. วิทยาเขตหนองคาย.** 1: 19-25.

Joint FAO/WHO Activities Contributing to the Provision of Scientific Advice to Codex (CCFH). (2005). **The lactoperoxidase system of raw milk preservation.** [On-line]. Available: http://www.fao.org/AG/AGAINFO/home/documents/dataLPS.pdf

Joshi, N.S., Muthukumarappan, K., and Dave, R.I. (2004). Effect of calcium on microstructure and meltability of part skim mozzarella cheese. **J. Dairy Sci.** 87: 1975-1985.

Keller, B., Olson, N.F., and Richardson, T. (1974). Mineral retention and rheological properties of mozzarella cheese made by direct acidification. **J. Dairy Sci.** 57: 174-180.

Kennedy, M., O'Rourke, A.L., McLay, J., and Simmonds, R. (2000). Use of a ground beef model to assess the effect of the lactoperoxidase system on the growth of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in red meat. **Int. J. Food Microbiol.** 57: 147-158.

Kindstedt, P., Caric, M., and Milanovic, S. (2004). Pasta-filata cheese. pp. 251-277. In Fox., P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M. and Guinee, T.P. (eds.). **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology.** Volume 2: Major Cheese Groups. (3rd ed.). Elsever Academic Press. Amsterdam.

Kosikowski, F.V., and Mistry, V.V. (1997). **Cheese and Fermented Milk Foods.** (vols. 1-2). (3rd ed.). F.V. Kowsikowski, LLC. Westport.

Kumar, S., and Mathur, B. N. (1989). Studies on the manufacture of yoghurt and mozzarella cheese from milk preserved by LP-system. **Indian. J. Dairy Sci.** 42: 194-197.

Lali, A., Aruna, N., Roshnnie, J. and Thaker, D. (2000). Reversible precipitation of protein on carboxymethyl cellulose. **Pro. Biochem.** 35: 777-785.

Law, B.A., and Goodenough, P.W. (1995). Enzymes in milk and cheese production. pp. 114-143. In Tucker, G.A. and Woods, L.F.J. (eds.). **Enzymes in Food Processing.** (2nd ed.). Chapman & Hall. New York.

Losnedahl, K.J., Wang, H., Aslam, M., Zou, S., and Hurley, W.L. (2004). **Antimicrobial Factors in Milk.** [On-line]. Available: http://www.aces.uiuc.edu/~ansystem/dairyrep96/Losnedahl.html

Losso, J.N., Nakai, S., and Charter, E.A. (2000). Natural food antimicrobial systems : Lysozyme. pp. 185-210. In Naidu, A.S. (ed.). **Natural Food Antimicrobial Systems.** CRC Press, Inc. Washington, D.C.

Marnila, P., and Korhonen, H. (2003). Immunoglobulins. pp. 1950-1956. In Roginski, H., Fuquay, J.W., and Fox, P.F. (eds.). **Encyclopedia of Dairy Sciences.** Volume 3. Academic Press. Amsterdam.

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

McMahon, D.J., and Oberg, C.J. (2000). Manufacture of lower-fat and fat-free pizza cheese. **US. Patent**, 6113953.

Metzger, L.E., Barbano, D.M., and kindstedt, P.S. (2001). Effect of milk preacidification on low fat mozzarella cheese. III. Post-melt chewiness and whiteness. **J. Dairy Sci.** 84: 1357-1366.

Metzger, L.E., Barbano, D.M., kindstedt, P.S., and Guo, M.R. (2001). Effect of milk preacidification on low fat mozzarella cheese. II. Chemical and functional properies during storage. **J. Dairy Sci.** 84: 1348-1356.

Metzger, L.E., Barbano, D.M., Rudan, M.A., and kindstedt, P.S. (2000). Effect of milk preacidification on low fat mozzarella cheese. I. Composition and yield. **J. Dairy Sci.** 83: 648-658.

Mil_Auer, C., Wiedmann, W. M., and Strobel, E. (1984). Extrusion cooking of dairy enriched products and modification of dairy proteins. pp. 137-144. In Zeuthen, P., Cheftel, J.C., Eriksson, C., Jul, M., Leniger, H., Linko, P., Varela, G., and Vos, G. (eds.). (eds.). **Thermal Processing and Quality of Foods.** Elsevier Applied Science Publishers. London.

Mizuno, R., and Lucey, J.A. (2005). Effects of two types of emulsifying salts on the functionality of nonfat pasta filata cheese. **J. Dairy Sci.** 88: 3411-3425.

Moat, A.G., Foster, J.W., and Spector, M.P. (2002). **Microbial physiology.** ($4^{th}$ ed.). Wiley-Liss, Inc. New York.

Mulvaney, S., Rong, S., Barbano, D.M., and Yun, J.J. (1997). Systems analysis of the plasticization and extrusion processing of mozzarella cheese. **J. Dairy Sci.** 80: 3030-3039.

Murthy, G.K., Kleyn, D.H., Richardson, T., and Rocco, R.M. (1993). Alkaline phosphatase methods. pp. 413-431. In Marshall, R.T. (ed.). **Standard Methods for the Examination of Dairy Products.** (16th ed.). American Public Health Association. Washington, DC.

Muthukumarappan, K., Wang, Y.-C., and Gunasekaran, S. (1999). Modified Schreiber test for evaluation of mozzarella cheese meltability. **J. Dairy Sci.** 82: 1068-1071.

Naidu, A. S. (2000). Natural food antimicrobial systems : Lactoperoxidase. pp. 103-132. In Naidu, A.S. (ed.). **Natural Food Antimicrobial Systems.** CRC Press, Inc. Washington, D.C.

Nakada, M., Dosako, S., Hirano, R., Oooka, M., and Nakajima, I. (1996). Lactoperoxidase suppresses acid production in yoghurt during storage under refrigeration. **Int. Dairy J.** 6: 33-42.

Oberg, C.J., Merrill, R.K., Brown, R.J., and Richardson, G.H. (1992). Effects of milk-clotting enzymes on physical properties of mozzarella cheese. **J. Dairy Sci.** 75: 1161-1166.

Ostdal, H., Bjerrium, M.J., Pedersen, J.A., and Andersen, H.J. (2000). Lactoperoxidase-induced protein oxidation in milk. **J. Agric. Food Chem.** 48: 3939-3944.

Park, J., Rosenau, J.R., and Peleg, M. (1984). Comparison of four procedures of cheese meltability evaluation. **J. Food Sci.** 49: 1158-1162.

Pruitt, K.M. (2003). Lactoperoxidase. pp. 467-471. In. Fox, P.F. and McSweeney, P.L.H. (eds.). **Advanced Dairy Chemistry.** Volume 1: proteins. Part A. (3rd ed.). Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York.

Pruitt, K.M., and Kamau, D.N. (1991). The lactoperoxidase systems of bovine and human milk. pp.133-174. In Robinson, D.S. and Eskin, N.A.M. (eds.). **Oxidative Enzymes in Food.** Elsevier Science Publishers, Ltd. London.

Pruitt, K.M., Tenovuo, J., Andrews, R.W., and McKane, T. (1982). Lactoperoxidase-catalyzed oxidation of thiocyanate: polarographic study of the oxidation products. **Biochemistry**. 21: 562-567.

Rehman, S.ur., and Farkye, N.Y. (2003). Lactoperoxidase. pp. 938-941. In Roginski, H., Fuquay, J.W., and Fox, P.F. (eds.). **Encyclopedia of Dairy Sciences.** Volume 2. Academic Press. Amsterdam.

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

Renda, A., Barbano, D.M., Yun, J.J., Kindstedt, P.S., and Mulvaney, S.J. (1997). Influence of screw speeds of the mixer at low temperature on characteristics of mozzarella cheese. **J. Dairy Sci.** 80: 1901-1907.

Rizvi, S.S.H., Shukla, A., and Srikiatden, J. (1999). Processed mozzarella cheese. **US. Patent**, 5925389.

Robinson, R.K. and Wilbey, R.A. (1998). **Cheesemaking Practice.** (3rd ed.). Aspen Publishers, Inc. Maryland.

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

Rowney, M.K., Roupas, P., Hickey, M.W., and Everett, D.W. (2004). Salt-induced structural changes in 1-day old mozzarella cheese and the impact upon free oil formation. **Int. Dairy J.** 14: 809-816.

Santos, M.V., Ma, Y., Barbano, D.M. (2003). Effect of somatic cell count on proteolysis and lipolysis in pasteurized milk during shelf-life storage. **J. Dairy Sci.** 86: 2491-2503.

Sarkar, S., and Misra, A.K. (1994). Role of lactoperoxidase system on preservation of milk: a review. **Indian J. Dairy Sci.** 47: 809-819.

Seifu, E., Buys, E.M., and Donkin, E.F. (2003). Effect of the lactoperoxidase system on the activity of mesophilic cheese starter cultures in goat milk. **Int. Dairy J**. 13: 953-959.

Seifu, E., Buys, E. M., and Donkin, E. F. (2004). Quality aspects of gouda cheese made from goat milk preserved by the lactoperoxidase system. **Int. Dairy J**. 14: 581-589.

Seifu, E., Buys, E.M., and Donkin, E.F. (2005). Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its potential: a review. **Trends Food Sci. Technol.** 16: 137-154.

Spreer, E. (1998). **Milk and Dairy Product Technology.** Marcel Dekker, Inc. New York.

Swaisgood, H.E. (1995). Protein and amino acid composition of bovine milk. pp. 464-468. In Jensen, R.G. (ed.). **Handbook of Milk Composition.** Academic Press. San Diego.

The Codex Alimentarius Commission. (1991). **Guidelines for the preservation of milk by use of the lactoperoxidase system.** (CAC/GL 13-1991). [On-line]. Available: http:// www.codexalimentarius.net/download/standard/29/CXG 013e.pdf

The Codex Alimentarius Commission. (2004). **Specific food additive listing for the Codex standard for fermented milk products.** [On-line]. Available: http:// ftp.fao.org/codex/ccmmp6/mm0410ae.pdf

Touch, V., Hayakawa, S., Yamada, S., and Kaneko, S. (2004). Effects of a lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide system on *Salmonella enteritidis* in animal or vegetable foods. **Int. J. Food Microbiol.** 93: 175-183.

United States Department of Agriculture (USDA). (1980). **USDA Specifications for Mozzarella Cheese.** [On-line]. Available: http://www.ams.usda.gov/dairy/mozz.pdf

United States Department of Agriculture (USDA). (2001). **USDA Specifications for Loaf and Shredded Lite Mozzarella Cheese.** [On-line]. Available: http://www.ams. usda.gov/dairy/shreddedlitemozz_03-01-2001.pdf

United States Department of Agriculture (USDA). (2005). **USDA Commodity Requirement WSM8 Wheat-soy milk for use in export programs.** [On-line]. Available: http://www.fsa.usda.gov/internet/fsa_file/wsm8.pdf

United States Department of Agriculture (USDA). (2006). **USDA Commodity requirements: MCD4 Mozzarella Cheese for use in domestic programs.** [On-line]. Available: http://www.fsa.usda.gov/ internet/fsa_file/mcd4.pdf

Vannini, L., Lanciotti, R., Baldi, D., and Guerzoni, M.E. (2004). Interactions between high pressure homogenization and antimicrobial activity of lyzyme and lactoperoxidase. **Int. J. Food Microbiol.** 94: 123-135.

Walstra, P., Geurts, T.J., Noomen, A., Jellema, A., and van Boekel, M.A.J.S. (1999). **Dairy Technology: Principles of Milk Properties and Processes.** Marcel Dekker, Inc. New York.

Wang, W., Kindstedt, P.S., Gilmore, J.A., and Guo, M.R. (1998). Changes in the composition and meltability of mozzarella cheese during contact with pizza sauce. **J. Dairy Sci.** 81: 609-614.

Wilkins, K.M., and Board, R.G. (1989). Natural antimicrobial systems. pp. 285-362. In Gould, G.W. (ed.). **Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures.** Elsevier Science Publishers, Ltd. London.

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

Xiong, Y.L. (2000). Protein oxidation and implications for muscle food quality. pp. 85-111. In Decker, E., Faustman, C, and Lopez-Bote, C.J. (eds.). **Antioxidants in Muscle Foods.** John Wiley & Sons, Inc. New York.

Yu, C. and Gunasekaran, S. (2004). Modeling of melt conveying in deep-channel single-screw cheese stretcher. **J. Food Prot.** 61: 241-251.

Yu, C. and Gunasekaran, S. (2005a). A system analysis of pasta filata process during mozzarella cheese making. **J. Food Prot.** 69: 399-408.

Yu, C. and Gunasekaran, S. (2005b). Modeling of melt conveying and heat transfer in a twin-screw cheese stretcher. **J. Food Prot.** 70: 245-252.

Yun, J.J., Barbano, D.M., and Kindstedt, P.S. (1993). Mozzarella cheese: impact of coagulant type on chemical composition and proteolysis. **J. Dairy Sci.** 76: 3648-3656.

Yun, J.J., Kiely, L.J., Kindstedt, P.S., and Barbano, D.M. (1993). Mozzarella cheese: impact of coagulant type on functional properties. **J. Dairy Sci.** 76: 3657-3663.

# ภาคผนวก ก
# ความรู้เกี่ยวกับน้ำนมและเนยแข็ง

**1. ความรู้เรื่องน้ำนมดิบ**

ความหมายของน้ำนมดิบตามมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ เรื่องน้ำนมดิบ (มกอช. 6003-2548) จะหมายถึง น้ำนมที่รีดจากแม่โคหลังจากคลอดลูกแล้วไม่น้อยกว่า 3 วัน และต้องปราศจากน้ำนมเหลือง โดยมิได้แยกออกหรือเติมวัตถุอื่นใด และไม่ได้ผ่านกรรมวิธีใดๆ ยกเว้นการทำให้เย็น ซึ่งถ้าตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 282 (พ.ศ. 2547) จะใช้คำว่า น้ำนมโค หรือนมสด แทนคำว่าน้ำนมดิบ เนื่องจากเริ่มมีน้ำนมที่ผลิตจากแพะออกจำหน่าย แต่องค์ประกอบโดยทั่วไปจะเหมือนกัน

**1.1 ส่วนประกอบของน้ำนม** ประกอบด้วย

1) โปรตีน ประกอบด้วย เคซีน ($\alpha_{S1}$-, $\alpha_{S2}$-, β-, γ- และ κ-casein) และ เวย์โปรตีน (α-, β-lactoglubulin, serum albumin, immunoglobulin, protease และ peptone) เป็นส่วนประกอบหลัก ซึ่งในน้ำนมมีโปรตีนอยู่ประมาณร้อยละ 3.60 โดยน้ำหนัก

2) คาร์โบไฮเดรต ในน้ำนมส่วนใหญ่เป็น น้ำตาลแล็กโทส โดยมีอยู่ประมาณร้อยละ 4.60 โดยน้ำหนัก

3) ไขมัน ประกอบด้วย กลีเซอไรด์ กรดไขมันอิสระ สเตอรอล และ ฟอสโฟลิปิด ซึ่งในน้ำนมมีไขมันอยู่ในช่วงประมาณร้อยละ 4.10 โดยน้ำหนัก

4) แร่ธาตุ ประกอบด้วย แคลเซียม คลอไรด์ โซเดียม โพแทสเซียม และฟอสเฟตเป็นหลัก ซึ่งในน้ำนมมีแร่ธาตุอยู่ประมาณร้อยละ 0.70 โดยน้ำหนัก

5) น้ำ อยู่ในช่วงประมาณร้อยละ 87.00 โดยน้ำหนัก

โดยปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของส่วนประกอบ ได้แก่ พันธุ์ของวัว อายุของแม่โค สุขภาพของวัว บุคลิกลักษณะของวัว ช่วงพักการรีดน้ำนม ระยะการให้น้ำนม ฤดูกาล และโภชนาการของอาหารและสัตว์ เป็นต้น (de Wit, 2003)

**2. เอนไซม์ในน้ำนมดิบ**

เอนไซม์เป็นกลุ่มโปรตีนที่สิ่งมีชีวิตสร้างขึ้น มีคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาเคมี โดยเอนไซม์ในน้ำนมดิบสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ เอนไซม์ที่มีอยู่แล้วในน้ำนมดิบตามธรรมชาติ และเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นจากจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในน้ำนมดิบ ซึ่งแหล่งกำเนิดเอนไซม์ในน้ำนม ได้แก่ เลือด เม็ดเลือดขาว เนื้อเยื่อเม็ดไขมันนม (milk fat globule membrane) เนื้อเยื่อเม็ดไขมัน (fat globule membrane) เคซีนไมเซลล์ (casein micelles) ซีรัม (milk serum) ไซโทพลาสซึม และเซลล์ในร่างกาย (somatic cells) โดยที่ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณและกิจกรรมของเอนไซม์ ได้แก่ พันธุ์ของแม่โค ลักษณะเฉพาะตัวของสัตว์ ระยะการให้น้ำนม สุขภาพของสัตว์ อายุ

ของสัตว์ และอาหารที่ใช้เลี้ยง โดยการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีความจำเพาะเจาะจงต่อชนิดของสารตั้งต้น หรือต่อพันธะในโมเลกุลของสารตั้งต้น และการทำงานของเอนไซม์ยังขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ pH ความเข้มข้นของเอนไซม์ และสารตั้งต้น เป็นต้น (อรพิน ชัยประสพ, 2544; Fox, 2003)

เอนไซม์ที่พบในน้ำนมโคนั้น มีจำนวนมากประมาณ 50 ชนิด แม้ว่าเอนไซม์จะมีอยู่ในปริมาณเล็กน้อยเมื่อเทียบกับส่วนประกอบหลักที่มีอยู่ในน้ำนม แต่มีความสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิกิริยาหลายๆ อย่างที่เกิดขึ้นในน้ำนม เช่น กลิ่นรสและความคงตัวของน้ำนมในระหว่างการเก็บรักษา โดยเอนไซม์ในน้ำนมสามารถจำแนกตามลักษณะของปฏิกิริยาทางเคมีได้ทั้ง 6 กลุ่ม ดังนี้ (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2547; Fox, 2003; Swaisgood, 1995)

1) เอนไซม์ในกลุ่ม oxidoreductases เป็นเอนไซม์ที่ออกซิไดส์หรือรีดิวซ์สารตั้งต้นโดยการถ่ายเทอิเล็กตรอน ได้แก่ catalase, lactoperoxidase และ xanthine oxidase เป็นต้น

2) เอนไซม์ในกลุ่ม transferases เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่สารใดๆ (ที่ไม่ใช่ ไฮโดรเจนอะตอม) จากตัวให้ไปตัวรับ ได้แก่ alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase และ lactose synthase เป็นต้น

3) เอนไซม์ในกลุ่ม hydrolases เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะเคมีในสารประกอบด้วยน้ำ ได้แก่ acid phosphatase, alkaline phosphatase และ plasmin เป็นต้น

4) เอนไซม์ในกลุ่ม lyases เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการตัดหมู่ใดหมู่หนึ่งออกจากสารตั้งต้น (ที่ไม่ใช่การไฮโดรไลซิส) ได้แก่ aldolase และ carbonate dehydratase เป็นต้น

5) เอนไซม์ในกลุ่ม isomerases เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนไอโซเมอร์ของสารตั้งต้น ได้แก่ glucose-6-phosphate isomerase เป็นต้น

6) เอนไซม์ในกลุ่ม ligases เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาที่มีการรวมตัวกันของ 2 โมเลกุลด้วยพันธะโคเวเลนต์ ด้วยการใช้พลังงานการสลายโมเลกุล ATP ได้แก่ acetyl-CoA carboxylase เป็นต้น

**2.1 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการให้ความร้อนในน้ำนม**

กระบวนการให้ความร้อนในน้ำนมสามารถแบ่งได้ตามอุณหภูมิที่ใช้ ตามตารางที่ 1ก โดยหลักๆ คือ การเทอร์ไมด์, การพาสเจอร์ไรส์, ยู เอช ที และการสเตอริไลส์ โดยเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง จะเป็นเอนไซม์ที่ทนความร้อนซึ่งใช้เป็นดัชนีว่า น้ำนมนั้นผ่านการให้ความร้อนมามากน้อยเพียงใด ซึ่งมีเอนไซม์อยู่หลายชนิดด้วยกัน เช่น *N*–acetyl-β-glucosidase, acid phosphatase, adenosine deaminase, alkaline phosphatase, catalase, α-fucosidase, γ-glutamyl-transferase, lactoperoxidase, lipoprotein lipase, α-mannosidase,

phosphohexo-isomerase, phosphidiesterase, superoxide dismutase และ xanthine oxidase เป็นต้น (Claeys, Van Loey, and Hendrickx, 2002) โดยที่เอนไซม์ที่นิยมใช้กันมาก มี 2 ชนิด ด้วยกัน คือ

**ตารางที่ 1ก กระบวนการให้ความร้อน**

| Type | Temperature Range in °C | Holding time for heat effect | | Probable inactivation effect in % | Confirmation method | Remarks |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Heating | Holding | | | |
| Thermization | 57 – 68 | min. 15 s | without | < 95 | phosphatase positive | thermization process for raw milk and cheese milk |
| Batch method | 62 – 65 | 8 – 12 s | 30 min | = 95 | phosphatase positive | batchwise heating |
| Short time | 71.7 – 74 | 8 – 12 s | > = 15 s | 99.5 | phosphatase negative peroxidase positive | pasteurization with indirect heat transfer |
| High heat | 85 – 90 | 8 – 15 s | without | 99.9 | peroxidase negative | pasteurization with indirect heat transfer |
| High pastruri-zation | ca. 125 | 0.71 s | without | up to 100 | peroxidase negative | high heat with direct steam injection in heating section |

**ตารางที่ 1ก กระบวนการให้ความร้อน (ต่อ)**

| Type | Temperature Range in °C | Holding time for heat effect | | Probable inactivation effect in % | Confirmation method | Remarks |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Heating | Holding | | | |
| Ultra-high heat | 135 – 150 | > = 1 s (2 – 8 sec) | without | up to 100 | peroxidase negative | with direct or indirect heat transfer |
| Sterilization | 109 – 115 | | 20 – 45 min | 100 | | indirect heat transfer |

แหล่งที่มา: Spreer (1998)

2.1.1 เอนไซม์ alkaline phosphatase (ALP, EC 3.1.3.1) (Fox and Kelly, 2006; Murthy, Kleyn, Richardson, and Rocco, 1993)

เอนไซม์ ALP เป็นเอนไซม์ที่ถูกทำลายด้วยสูงกว่าอุณหภูมิที่ใช้ทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรควัณโรคเพียงเล็กน้อย (*Mycobacterium tuberculosis*) นั่นคือ สามารถถูกทำลายอย่างสมบรูณ์ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 15 – 20 วินาที จึงนิยมใช้เป็นดัชนีในการตรวจสอบกระบวนการให้ความร้อน ซึ่งมีวิธีการตรวจสอบ 3 วิธีด้วยกันคือ

1) ใช้ ไดโซเดียมฟีนิลฟอสเฟตทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ ALP และน้ำ ซึ่งจะได้เป็น ฟีนอลและโซเดียมฟอสเฟตซึ่งมี pH 9.8 ± 0.2 หลังจากนั้น ฟีนอลที่ได้นำมาทำปฏิกิริยากับ 2,6-dichloroquione chloroimide (CQC) และ คอปเปอร์ซัลเฟต ได้ อินโดฟีนอล ซึ่งมีสีน้ำเงินและมี pH 9.3 – 9.4 ซึ่งเป็นปฏิกิริยาเคมีสำหรับวิธี scharer rapid phosphatase test และ rapid colorimetric phosphate test

2) ใช้ dicyclohexylamine phenolphthalein monophosphate ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ ALP และน้ำ ได้ ฟีนอฟทาลีน ซึ่งมีสีชมพู และมี pH 10.15 ซึ่งเป็นปฏิกิริยาเคมีสำหรับวิธี Rutgers phosphatase test

3) ใช้ fluorophs ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ ALPได้ fluoroyellow (fluorescent) และมี pH 10.00 ± 0.05 ซึ่งเป็นปฏิกิริยาเคมีสำหรับวิธี fluorophos alkaline phosphatase assay

การทดสอบเอนไซม์ ALP นี้ จะต้องทำทันทีหลังจากกระบวนการให้ความร้อน เพราะถ้าเก็บไว้เอนไซม์ที่เสียสภาพธรรมชาติ อาจกลับมามีกิจกรรมดังเดิม ทำให้ผลการทดสอบผิดพลาด (อรพิน ชัยประสพ, 2544)

2.1.2 เอนไซม์ lactoperoxidase (LPO, EC 1.11.1.7)

LPO เป็นเอนไซม์ทนความร้อนสูงมาก นิยมใช้เป็นดัชนีในการตรวจสอบกระบวนการให้ความร้อนในระดับสูง โดยที่ปฏิกิริยาหลักของ LPO เป็นแบบเพอร์ออกซิเดติก (peroxidatic reaction) นั่นคือ สามารถย้ายออกซิเจนจากไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ($H_2O_2$) ไปยังสารออกซิไดซ์ดังสมการ

$$H_2O_2 + AH_2 \longrightarrow 2H_2O + \text{polymerized product (HAAH)}$$

โดยสารที่ใช้เป็นสารออกซิไดซ์ ได้แก่ ไกลเอคอล (guaiacol), พารา-ครีซอล (ρ-cresol), ไพโรกัลลอล (pyrogallol), เมซิดีน (mesidine), ไซโทโครม ซี (cytochrome c), เรโซซินอล (resorcinol), ไดไฮดรอกซีฟีนิลอะลานีน (dihydroxyphenylalanine), กรดยูริก (uric acid), และ อะนิลีน (aniline) (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2547)

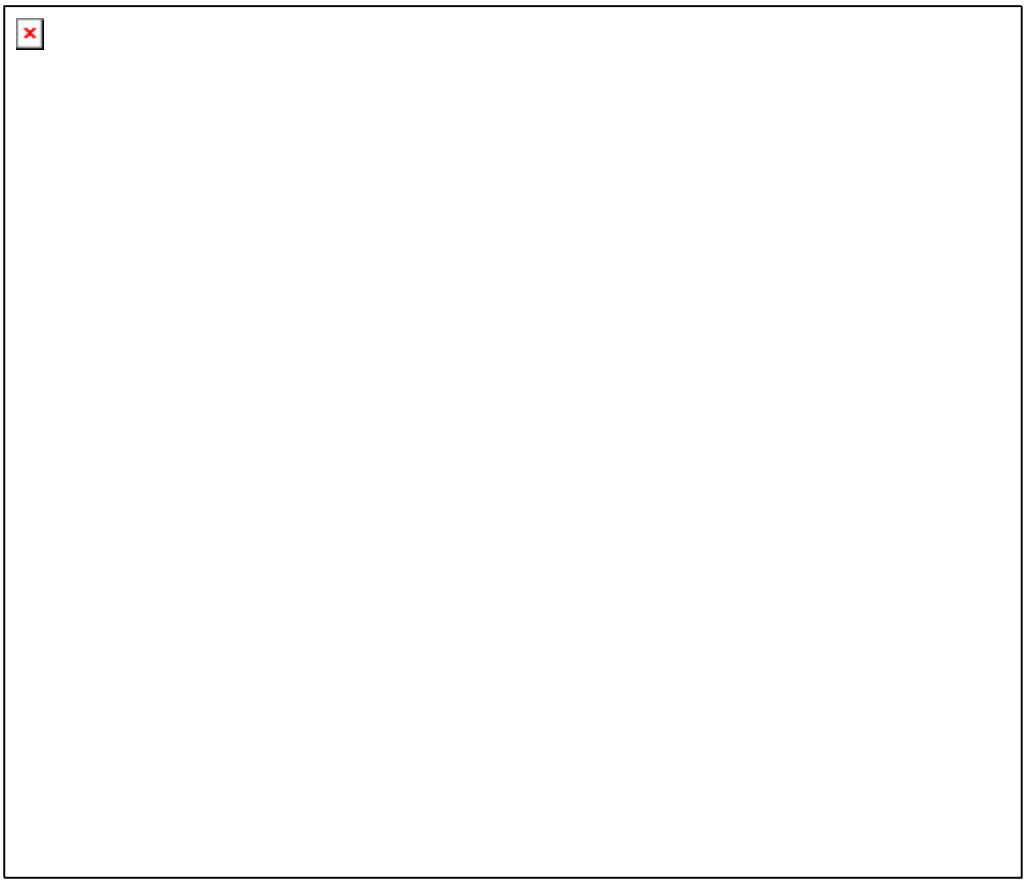
โดยตัวที่นิยมใช้กันมากคือ guaiacol เป็นมาตรฐานของ USDA ที่ใช้ในน้ำนมที่ทำจากพืช (USDA, 2005) ยังมีการใช้สาร 1,4-phenylenediamine โดยเรียกว่า Storch test (HPA, 2005) แต่สารที่นิยมใช้ในการวัดแอคติวิตีคือ 2,2 azinobis(3-ethylbenzothaizoline-6-sulphonic acid) (ABTS) (IDF, 1994, quoted in Mark, Grandison, and Lewis, 2001)

**3. การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในน้ำนมดิบ**

น้ำนมดิบเป็นอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ เนื่องจากน้ำนมดิบมี pH ที่เป็นกลาง มีสารอาหาร และมีน้ำเป็นองค์ประกอบสูง ซึ่งมีปัจจัยต่างๆ มากมาย ที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์เกิดขึ้นดังแสดงในภาพที่ 1ก โดยสามารถแบ่งปัจจัยต่างๆ ได้เป็น 2 ปัจจัยด้วยกัน คือ

3.1 จุลินทรีย์จากเต้านม จากแม่โคที่มีปัญหาสุขภาพ เช่น โรคเต้านมอักเสบ (matitis) ถึงแม้ว่าน้ำนมจะมาจากแม่โคที่มีสุขภาพดี ก็ยังมีจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในน้ำนมได้ ซึ่งมาจาก ภายในและภายนอกเต้านม หัวนม และท่อส่งน้ำนม เป็นต้น

3.2 การปนเปื้อนในระหว่างและหลังการรีดนม ซึ่งปัจจัยที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ แม่โค ดิน มูลสัตว์ อากาศ อาหารโค อุปกรณ์รีดนม น้ำใช้ โรงเรือนที่ใช้รีดนม การเก็บรักษา และคนรีดนม เป็นต้น

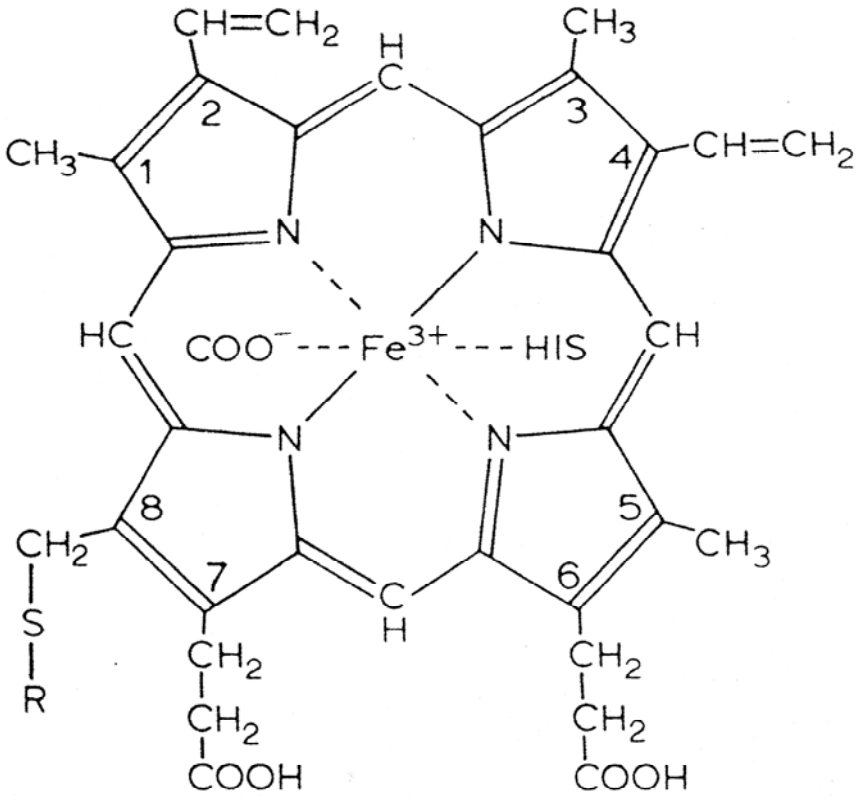


**ภาพที่ 1ก** แหล่งการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในน้ำนมดิบจากฟาร์มโคนม
แหล่งที่มา: Frank and Hassan (2003)

โดยปัจจัยต่างๆ เหล่านี้จะส่งผลต่อจำนวนของจุลินทรีย์ในน้ำนมดิบ ซึ่งสามารถเกิดการปนเปื้อนได้อีก ในระหว่างการขนส่งและขณะอยู่ในโรงงานแปรรูป ได้แก่ ถังเก็บรวบรวมนม ท่อส่งนม ซึ่งรวมไปถึงการปนเปื้อนระหว่างการแปรรูปนั่นคือ วัสดุอุปกรณ์ที่สัมผัสกับน้ำนม โดยรวมไปถึงภาชนะบรรจุต่างๆ ซึ่งจะมีการปนเปื้อนมากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับวิธีทำความสะอาดและสุขาภิบาลโรงงาน และในระหว่างการเก็บรักษา โดยเฉพาะภาชนะและอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษา ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้น้ำนมเสื่อมเสียได้ในระหว่างการเก็บรักษาหลังผ่านกระบวนการแปรรูปแล้ว (สุมาลี เหลืองสกุล, 2541; อรพิน ชัยประสพ, 2544; Frank and Hassan, 2003; Walstra et al., 1999)

**4. เอนไซม์แล็กโทเพอร์ออกซิเดส**

เอนไซม์ LPO มีมวลโมเลกุลประมาณ 72.5 – 88 kDa มีค่า pI เท่ากับ 9.60 เป็น glycoprotein โดยมีคาร์โบไฮเดรต ในรูปของ mannose, *N*-acetylglucosamine และ *N*-acetylgalactosamine อยู่ประมาณร้อยละ 9.9 – 10.2 และเป็น haem protein (protoheam 9) โดยในแต่ละโมเลกุลมีธาตุเหล็กอยู่ 1 อะตอม ในรูปของ protoporphyrin IX มีอยู่ประมาณร้อยละ 0.0680 – 0.0709 โดยที่ธาตุเหล็กจับกับไนโตรเจนทั้ง 4 พันธะ โดยอีก 2 พันธะจับกับ histidyl และไอออนของ carboxylate และมีกรดอะมิโนทั้งหมด 612 โมเลกุล ซึ่งโครงสร้างประกอบด้วย β - structure ร้อยละ 65, α - helix ร้อยละ 23 และโครงสร้างที่ไม่แน่นอนร้อยละ 12 เชื่อมกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ 8 พันธะ โดยที่โครงสร้างสามารถคงตัวอยู่ได้เนื่องจากมี $Ca^{2+}$ จับอยู่ด้วย โดยโครงสร้างของ LPO ดังแสดงในภาพที่ 2ก (Priutt, 2003; Pruitt and Kamau, 1991; Rehman and Farkye, 2003; Seifu et al., 2005)




**ภาพที่ 2ก** โครงสร้างของเอนไซม์แล็กโทเพอร์ออกซิเดส

แหล่งที่มา: Pruitt and Kamau (1991)

**5. กล้าเชื้อที่มีผลต่อระบบเอนไซม์แล็กโทเพอร์ออกซิเดส**

กล้าเชื้อที่มีผลต่อระบบนี้ได้ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ (Sarkar and Misra, 1994; Seifu et al., 2005)

5.1 กล้าเชื้อที่มีสามารถสร้าง $H_2O_2$ ขึ้นเองได้ ซึ่งได้แก่ *L. acidophilus* และเชื้อ 3 สายพันธุ์ของ *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (1373, 1489, LBr)

5.2 กล้าเชื้อที่มีผลกระทบต่อ LP-system แต่ไม่สามารถสร้าง $H_2O_2$ ขึ้นเองได้และต้องการจากแหล่งภายนอก ซึ่งได้แก่ *L. helveticus*, *S. thermophilus* และ *Lactobacillus* (3201)

5.3 กล้าเชื้อที่ทนต่อ LP-system ซึ่งได้แก่ *Enterococcus faecium*, *L. lactis* และ *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (1243)

**6. การใช้ระบบเอนไซม์แล็กโทเพอร์ออกซิเดสในผลิตภัณฑ์อาหาร**

LP-system สามารถใช้ได้ผลิตภัณฑ์อาหารหลายๆ ชนิดโดยมีการยอมรับให้สามารถใช้ได้ในเนื้อ ผลิตภัณฑ์เนื้อ ผลิตภัณฑ์จากสัตว์ปีก ปลา และผลิตภัณฑ์ปลา (FSANZ, 2002) โดยในเนื้อสัตว์ มีผลการศึกษาของ Kennedy, O'Rourke, McLay, and Simmonds (2000) ศึกษา LP-system ในเนื้อแดง ซึ่งมีผลต่อการยับยั้ง *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* และ *Staphylococcus aureus* โดยรวมไปถึงจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในเนื้อวัวด้วย โดยเก็บที่อุณหภูมิ 0, 6 และ 12 องศาเซลเซียส ซึ่งเก็บได้นานกว่า 15 วัน ในปี ค.ศ. 2004 Elliot, McLay, Kennedy, and Simmonds ศึกษา LP-system ในเนื้อวัวที่หั่นเป็นลูกเต๋า โดยสามารถยับยั้ง *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* และจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในเนื้อวัว โดยเก็บที่ 37 องศาเซลเซียส อยู่ได้นานถึง 24 ชั่วโมง และเก็บที่ 12 องศาเซลเซียส อยู่ได้นานถึง 7 วัน โดยในสัตว์ปีก มีผลการศึกษาของ Borch, Wallentin, Rosen, and Bjorck (1989) ศึกษา LP-system ในการยับยั้ง *Campylobacter jejuni* และ *C. coli* ที่แยกได้จากสัตว์ปีก โดยศึกษาที่ค่า pH ในช่วง 5 – 7 โดยพบว่าที่ 37 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้อย่างรวดเร็ว และ ประสิทธิภาพจะลดลงเมื่อ pH ต่ำ โดยในปลา มีผลการศึกษาของ Elotmani and Assobhei (2003) ศึกษา LP-system ร่วมกับ nisin ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในปลาซาดีน พบว่าสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้เน่าเสียได้ยกเว้น *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* และ *Vibrio alginolyticus* ในกุ้ง มีผลการศึกษาของณัฏฐา วิศิษฏ์วิทยากร (2548) ศึกษา LP-system ในการควบคุมแบคทีเรียในสกุลวิบริโอในกุ้งกุลาดำ พบว่าต้องใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ LPO อย่างน้อย 4,000 ppm จึงจะสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียสกุลนี้ได้ และในผลิตภัณฑ์อาหารจากสัตว์และพืช โดยมีผลการศึกษาของ

Touch, Hayakawa, Yamada, and Kaneko (2004) ศึกษา LP-system ในน้ำมะเขือเทศ นม น้ำแครอท ไข่ขาว และในเนื้อไก่ โดยสามารถยับยั้ง *Salmonella enteritidis* ได้ดีที่ pH ต่ำซึ่งยับยั้งได้ดีกว่ากว่า pH ในธรรมชาติของตัวอย่าง และที่อุณหภูมิสูงยับยั้งได้ดีกว่าอุณหภูมิต่ำ

**7. ความรู้เรื่องเนยแข็งมอสซาเรลลา**

โดยทั่วไปเมื่อกล่าวถึงเนยแข็งตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 209 (พ.ศ. 2543) หมายความว่า ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำนม ครีมบัตเตอร์มิลค์ (butter milk) หรือหางนม (whey) อย่างหนึ่งอย่างใดหรือหลายอย่างมาผสมกับเอนไซม์ หรือกรด หรือจุลินทรีย์ จนเกิดการรวมตัวเป็นก้อนแล้วแยกส่วนที่เป็นน้ำออก และจะนำมาใช้ในลักษณะสดหรือนำมาบ่มให้ได้ที่ก่อนใช้ อีกทั้งยังกำหนดให้เนยแข็งเป็นอาหารที่กำหนดคุณภาพหรือมาตรฐาน

เนยแข็งมีอยู่มากมายและสามารถจำแนกได้ด้วยลักษณะต่างๆ เช่น ลักษณะปรากฏ ลักษณะการบ่ม และส่วนประกอบทางเคมี ซึ่งทางกระทรวงสาธารณสุขแบ่งออกเป็น 5 ชนิด ดังต่อไปนี้

1) ครีมชีส (cream cheese) หมายความว่า เนยแข็งที่ใช้ครีมเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในการผลิต

2) โฮลมิลค์ชีส (whole milk cheese) หมายความว่า เนยแข็งที่ใช้นมเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในการผลิต

3) สกิมมิลค์ชีส (skimmed milk cheese) หมายความว่า เนยแข็งที่ใช้นมพร่องมันเนยหรือนมขาดมันเนย หรือบัตเตอร์มิลค์ หรือเวย์ เป็นส่วนประกอบที่สำคัญในการผลิต

4) โพรเซสชีส (processed cheese) หมายความว่า เนยแข็งซึ่งได้ผ่านกรรมวิธีทำให้เล็กลง เติมสารอีมัลซิฟาย และนำมาพาสเจอร์ไรส์ และจะแต่งสี กลิ่น รส หรือไม่ก็ได้

5) เนมชีส (named cheese) หมายความว่า เนยแข็งที่มีชื่อตามชนิดของเนยแข็ง หรือสถานที่ผลิต ซึ่งเป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปและมีกรรมวิธีการผลิตเฉพาะตามชนิดของเนยแข็งนั้น

โดยเนยแข็งมอสซาเรลลา (mozzarella cheese) เป็นเนมชีสซึ่งเป็นเนยแข็งของประเทศอิตาลี จัดอยู่ในกลุ่ม pasta-filata ซึ่งหมายถึง ความร้อนและการยืด โดยเนยแข็งที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ Boccacini, Caciocavallo, Kashkaval, Ragusano และ String cheese เป็นต้น (Kindstedt et al., 2004)

**7.1 เกณฑ์กำหนดของเนยแข็งมอสซาเรลลา**

เกณฑ์กำหนดของเนยแข็งมอสซาเรลลา ตาม USDA (1980; 2001) ซึ่งมีดังต่อไปนี้

7.1.1 ชนิดของเนยแข็งมอสซาเรลลา สามารถแบ่งได้ 4 ชนิด ดังนี้

1) เนยแข็งมอสซาเรลลา (mozzarella cheese) ที่มีความชื้นอยู่ในช่วงร้อยละ 52 – 60 โดยน้ำหนัก และมีไขมันนมคิดจากฐานของแห้งไม่น้อยกว่าร้อยละ 45 โดยน้ำหนัก

2) เนยแข็งมอสซาเรลลาชนิด low-moisture mozzarella cheese ที่มีความชื้นอยู่ในช่วงร้อยละ 45 - 52 โดยน้ำหนัก และมีไขมันนมคิดจากฐานของแห้งไม่น้อยกว่าร้อยละ 45 โดยน้ำหนัก

3) เนยแข็งมอสซาเรลลาชนิด part-skim mozzarella cheese ที่มีความชื้นอยู่ในช่วงร้อยละ 52 – 60 โดยน้ำหนัก และมีไขมันนมคิดจากฐานของแห้งอยู่ในช่วงร้อยละ 30 – 45 โดยน้ำหนัก

4) เนยแข็งมอสซาเรลลาชนิด low-moisture part-skim mozzarella cheese ที่มีความชื้นอยู่ในช่วงร้อยละ 45 - 52 โดยน้ำหนัก และมีไขมันนมคิดจากฐานของแห้งอยู่ในช่วงร้อยละ 30 – 45 โดยน้ำหนัก

7.1.2 ส่วนประกอบ นอกจากปริมาณความชื้นและไขมันแล้ว ยังมีค่า pH และปริมาณเกลือ ซึ่งจะต้องนำมาทำการพิจารณาด้วย โดย pH อยู่ในช่วงระหว่าง 5.0 – 5.4 และปริมาณเกลืออยู่ในช่วงระหว่างร้อยละ 1.20 – 1.80 โดยน้ำหนัก

7.1.3 รูปทรงของเนยแข็งมอสซาเรลลา สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 แบบ คือ เป็นแถวยาว (loaf) เป็นแผ่นบาง (slices) เป็นชิ้นเล็กชิ้นน้อย (shredded) และเป็นสี่เหลี่ยมลูกเต๋า (diced)

7.1.4 รูปแบบของเนยแข็งมอสซาเรลลา สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 แบบ คือ แบบสด (fresh) ซึ่งเก็บรักษาได้นานกว่า 90 วัน ที่อุณหภูมิอยู่ในช่วง 1.7 – 5.6 องศาเซลเซียส และแบบแช่แข็ง ซึ่งเก็บรักษาได้นานกว่า 12 เดือน ที่อุณหภูมิ - 18องศาเซลเซียส

7.1.5 คุณลักษณะของเนยแข็งมอสซาเรลลา โดยมีดังต่อไปนี้

1) กลิ่นรส (flavor) เนยแข็งมอสซาเรลลาทุกชนิดมีรสชาติที่อ่อน (mild) และอาจมีรสชาติที่เป็นกรด (acid) เล็กน้อย

2) เนื้อและโครงสร้าง (body และ texture) ซึ่งจะขึ้นอยู่กับรูปทรงของเนยแข็งมอสซาเรลลาว่าจะเป็นแบบไหน โดยรวมคือ มีความยืดหยุ่น ไม่มีรูก๊าซในเนื้อเนยแข็ง

3) สี (color) ควรจะมีสีขาวธรรมชาติจนถึงสีครีมสว่าง

7.1.6 คุณสมบัติหลังการอบ

คุณสมบัติหลังการอบเมื่อนำไปอบที่ 232 องศาเซลเซียส หรือ 450 องศาฟาเรนไฮต์ นาน 10 นาที ซึ่งมีคุณสมบัติดังต่อไปนี้

1) ความสามารถในการละลาย (meltability) เนยแข็งควรจะละลายอย่างสมบูรณ์

2) สี (color) นอกจากสีตามปกติของเนยแข็งแล้ว ควรมีสีเข้ม

3) ความสามารถในการยืด (stretchability) สามารถยืดได้อย่างน้อยที่สุด 3 นิ้ว โดยไม่ขาด

4) น้ำมันอิสระ (free oil) ไม่ควรมีน้ำมันอิสระออกมามากจนเกินไป

**7.2 ส่วนประกอบของน้ำนมที่มีผลต่อการผลิตเนยแข็ง**

น้ำนมที่ดีสามารถผลิตเนยแข็งที่มีคุณภาพและไม่มีคุณภาพ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับขั้นตอนกี่จัดการต่างๆ ในทางกลับกันน้ำนมที่ไม่ได้มาตรฐานจะผลิตได้แต่เนยแข็งที่ไม่มีคุณภาพ ซึ่งส่วนประกอบของน้ำนมที่มีผลต่อการผลิตเนยแข็ง ดังต่อไปนี้

7.2.1 น้ำ โดยที่น้ำในเนยแข็งจะทำหน้าที่เป็นตัวทำละลายให้สารอื่นๆ ทั้งในรูปสารละลายและสารแขวนลอย น้ำมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และรวมถึงการทำปฏิกิริยาทางเคมีที่เกิดระหว่างการผลิตเนยแข็ง อีกทั้งปริมาณน้ำในเนยแข้งยังส่งผลถึงความแข็งหรือความอ่อนของเนื้อเนยแข็ง และยังใช้เป็นตัวกำหนดชนิดของเนยแข็งได้อีกด้วย (Hardy, 2000)

7.2.2 คาร์โบไฮเดรต ในน้ำนมส่วนใหญ่จะเป็นน้ำตาลแล็กโทส ซึ่งจะสูญเสียไปพร้อมกับหางนมมากถึงร้อยละ 90 ซึ่งน้ำตาลแล็กโทสที่เหลือจะใช้เป็นแหล่งอาหารของกล้าเชื้อโดยเปลี่ยนน้ำตาลแล็กโทสให้เป็นกรดแลกทิก (Fox et al., 2000)

7.2.3 ไขมัน ในน้ำนมไขมันจะมีลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ (globule) และอยู่ในรูปของสารแขวนลอย ซึ่งลักษณะของส่วนประกอบที่ซับซ้อนนี้เรียกว่า กลีเซอไรด์ ซึ่งมีแคโรทีน โดยมีผลทำให้เนยแข็งมีสีเหลือง โดยไขมันในเนยแข็งทำหน้าที่เป็น plasticizer โดยส่งผลต่อเนื้อสัมผัสเนยแข็ง อีกทั้งยังเป็นแหล่งของกรดไขมันอิสระซึ่งสามารถเปลี่ยนเป็นสารที่ให้กลิ่นรส และทำหน้าที่เป็นตัวทำละลายให้กับสารที่ให้กลิ่นรส (Fox et a., 2000)

7.2.4 โปรตีน ในน้ำนมแบ่งออกเป็น 2 ส่วนหลัก คือ เคซีน และเวย์โปรตีน

1) เคซีน เป็นส่วนสำคัญในการตกตะกอนของน้ำนม ระหว่างที่ตกตะกอน เคซีนจะจัดเรียงตัวคล้ายเครือข่ายเส้นใย (fiber) ซึ่งจะดักจับส่วนประกอบอื่นๆ ไว้ภายในเนยแข็ง เคซีนในน้ำจะรวมตัวกับแคลเซียม และอยู่ในรูปของกลุ่มคอลลอยด์ (colloid) ที่เรียกว่า ไมเซลล์ (micelles) โดยเคซีนที่ตกตะกอนแล้วสามารถเก็บความชื้นได้เหมือนฟองน้ำ มันจะบีบตัว และ ไล่ความชื้นออกเมื่อมีอุณหภูมิและสภาพที่เป็นกรด ซึ่งเคซีนมีผลต่อความอยู่ตัวของเนยแข็งและเนื้อเนยแข็ง โดยที่มีปริมาณเคซีนยิ่งมาก เนื้อเนยแข็งจะยิ่งแข็ง เคซีนจะถูกย่อยโดยแบคทีเรียระหว่างการการบ่ม และการย่อยสลายของเคซีน ควบคู่กับการย่อยของไขมันนั่นเอง ทำให้เกิดกลิ่นรสเกิดขึ้น

2) เวย์โปรตีน ไม่ได้เกี่ยวข้องโดยตรงในการทำเนยแข็ง แต่มีผลโดยอ้อม เช่น เมื่อมีการให้ความร้อนแก่น้ำนมก่อนการตกตะกอนเวย์โปรตีนจะไปจับกับ κ - casein ซึ่งเป็นตัวขัดขวางการทำงานของเอนไซม์เรนเนทที่ใช้ในการตกตะกอน และเวย์โปรตีนจะเกิดการรวมตัวอยู่ภายในเนยแข็งเมื่อน้ำนมที่ใช้ผ่านกระบวนการทำให้เข้มข้น ด้วยอัลตราฟิวเทรชัน อีกทั้งยังสามารถกักเก็บความชื้น ทำให้เกิดกลิ่นรสขึ้นโดยการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

ในส่วนโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบรอง โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ ซึ่งมีผลในช่วงระหว่างการบ่ม ได้แก่ plasmin, xanthine oxidase, acid phosphatase และ lipase เป็นต้น ซึ่งทำให้เกิดกลิ่นรสเกิดขึ้น (Fox et al., 2000; Robinson and Wilbey, 1998)

7.2.5 เกลือแร่และสารประกอบอื่นๆ ถึงแม้สารเหล่านี้จะมีปริมาณน้อยแต่ก็มีความสำคัญในบางขั้นตอนการการผลิตเนยแข็งและการบ่ม ปริมาณเกลือแร่มีผลต่อลักษณะของก้อนเคิร์ด และการไล่ความชื้น (Fox et al., 2000; Robinson and Wilbey, 1998)

**7.3 การตกตะกอนและการเติมเกลือในกระบวนการผลิตเนยแข็ง**

7.3.1 การตกตะกอน

สารเคมีที่ใช้กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการตกตะกอน ซึ่งโดยปกติใช้ แคลเซียมคลอไรด์เติมประมาณ 5 – 20 กรัม ต่อน้ำนม 100 กิโลกรัม ช่วยให้การตกตะกอนดีขึ้น ถ้าใส่มากเกินไปจะทำให้แข็งเกินไป ทำการตัดได้ยากขึ้น ถ้าต้องการให้เคิร์ดแข็งมากขึ้นอาจจะเติม ไดโซเดียมฟอสเฟตในปริมาณ 10 – 20 กรัม ต่อน้ำนม 1 กิโลกรัม โดยเติมก่อนที่จะเติมแคลเซียมคลอไรด์ (นรินทร์ ทองศิริ, 2531; Robinson and Wilbey, 1998)

การตกตะกอนน้ำนมโดยใช้เอนไซม์ไคลโมซิน ในน้ำนมมีโปรตีนหลักอยู่ 2 ชนิด คือ เคซีนและเวย์โปรตีน โดยที่เมื่อ pH ถึง 4.6 เคซีนจะตกตะกอน แต่เวย์โปรตีนไม่ตกตะกอน ดังนั้น การตกตะกอนด้วยไคลโมซินจะไม่มีเวย์โปรตีนอยู่ในก้อนเคิร์ด โดยที่กลไลการตกตะกอนแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ เริ่มจาก ไคลโมซินจะทำการไฮโดรไลซ์แคปปา-เคซีน ทำให้พันธะเปปไทด์ระหว่าง $Phe_{105}$ – $Met_{106}$ แยกออก ทำให้เกิดเป็น พารา-แคปปา-เคซีนซึ่งมีคุณสมบัติเป็นด่าง และไกลโคมาโครเปปไทด์ซึ่งมีความเป็นกรดสูงและจะจับกับน้ำ ในขั้นตอนที่ 2 เมื่อพารา-แคปปา-เคซีนจะจับกับแคลเซียมไอออนทให้เกิดการตกตะกอนเกิดขึ้น โดยปัจจัยที่มีผลต่อการตกตะกอน คือ อุณหภูมิ ความเป็นกรด และปริมาณแคลเซียมไอออน เป็นต้น (นรินทร์ ทองศิริ, 2531; อรพิน ชัยประสพ, 2544)

7.3.2 การเติมเกลือ

เกลือที่ใช้มีอยู่ 4 ชนิด คือ (กล้าณรงค์ ศรีรอต และจุนธนี วีรเจตบดีธัช, 2545)

1) โซเดียมคลอไรด์ โดยเติมเพื่อเป็นวัตถุกันเสีย ปรับปรุงเนื้อสัมผัส และเพื่อปรับปรุงให้กลิ่นดีขึ้น

2) กลูโคโน-เดลต้า-แลกโตน โดยเติมเพื่อเป็นสาร acidulant โดยจะไฮโดรไลซ์เพื่อสร้าง gluconic acid ในสารละลายเพื่อให้ได้ pH ตามที่ต้องการ

3) ไตรโซเดียม ซิเตรท โดยเติมเพื่อทำให้โปรตีนในเนยแข็งนิ่มในระหว่างกระบวนการนวดผสม

4) ไตรโซเดียม ฟอสเฟต โดยเติมเพื่อทำหน้าที่เป็นสารอิมัลซิฟายเออร์ (emulsifier) เพื่อปรับปรุงเนื้อสัมผัสรักษาความหนืดในเนยแข็ง

**8. ผลกระทบของการอัดพองต่ออาหาร**

1) ลักษณะทางประสาทสัมผัส โดยกระบวนการอัดพองในสภาวะ HTST มีผลกระทบเพียงเล็กน้อยต่อกลิ่นรส และรสชาติตามธรรมชาติของอาหาร ส่วนสีของผลิตภัณฑ์ที่ได้จะขึ้นอยู่กับสีที่ใช้ ซึ่งโดยทั่วไปสีของผลิตภัณฑ์ที่ได้จะซีดลงเมื่อเทียบกับก่อนที่จะผ่านการอัดพอง หรือซีดลงเนื่องจากความร้อนที่เกิดขึ้นสูงหรือ เนื่องจากปฏิกิริยากับโปรตีนหรืออิออนของโลหะบางชนิด (นิติยา รัตนาปนนท์, 2544)

2) คุณค่าทางโภชนาการ จะขึ้นอยู่กับชนิดของอาหาร ปริมาณความชื้น อุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ในการแปรรูป (นิติยา รัตนาปนนท์, 2544)

3) คาร์โบไฮเดรต วัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการอัดพอง ที่มีส่วนประกอบของคาร์โบไฮเดรตเป็นหลัก คือ แป้ง โดยแป้งที่อยู่ในธรรมชาตินั้น โมเลกุลของแป้งเป็นผลึกและอยู่ในรูปของกรานูลทรงกลม แต่ถ้าความชื้นสูงขึ้น ขณะที่อุณหภูมิสูงขึ้นด้วย แป้งในกรานูลเหล่านี้จะขยายตัว ดูดซับ และจับโมเลกุลของน้ำไว้จำนวนมาก เกิดเป็นเจลขึ้น ทำให้โครงสร้างโมเลกุลของแป้งเปลี่ยนไป และเกิดเป็นสารที่มีลักษณะข้นหนืด (นิติยา รัตนาปนนท์, 2544)

4) โปรตีน วัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการอัดพองที่มีส่วนประกอบของโปรตีนเป็นหลัก คือ ถั่วเหลือง เมื่อวัตถุดิบที่ใช้มีโปรตีนเป็นหลัก พบว่าจะเกิดการปรับโครงสร้างจตุรภูมิของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป และได้สารที่มีลักษณะข้นหนืด หลังจากนั้นโปรตีนจะเกิดการรวมตัวกันเป็นพอลิเมอร์ เชื่อมต่อกันเป็นร่างแห (cross-linked) และเรียงตัวใหม่ (re-oriented) ได้เป็นโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นเส้นใย (fibrous structure) เป็นชั้นๆ ที่ต้านทานต่อการแตก เมื่อมีการให้ความร้อนต่อไป (นิติยา รัตนาปนนท์, 2544)

5) ไขมัน โดยปกติจะไม่มีวัตถุดิบที่มีปริมาณไขมันสูงในกระบวนการอัดพอง โดยทั่วไปประมาณร้อยละ 5 – 6 เนื่องจากไขมันมีผลต่อค่าทอร์ค ถ้าวัตถุดิบมีไขมันสูงทอร์คจะต่ำ เพราะไขมันจะทำหน้าที่เป็นสารหล่อลื่น และลดความหนืดภายในบาเรลลง ส่งผลต่อการขยายตัวของ

ผลิตภัณฑ์ โดยทั่วไปเมื่อนำวัตถุดิบผ่านการอัดพองพบว่าปริมาณไขมันจะลดลง เพราะไขมันบางส่วนจะสูญเสียไปที่บริเวณหน้าแปลนในรูปของน้ำมัน (free oil) ซึ่งจะพบในวัตถุดิบที่มีปริมาณไขมันสูง เช่น ถั่วเหลือง โดยทั่วไปปริมาณไขมันจะลดลงเนื่องจากเกิดเป็นสารเชิงซ้อนโดยไขมันจะไปจับกับอะมิโลสหรือโปรตีน (Camire, 2000)

# ภาคผนวก ข

## วิธีการวิเคราะห์ทางเคมี กายภาพ และจุลชีววิทยา ของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์

**1. การวิเคราะห์ปริมาณไธโอไซยาเนท ($SCN^-$)**

การหาปริมาณสารไธโอไซยาเนท ($SCN^-$) ตามวิธีของ Codex (1991) ซึ่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 460 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้สารละลายโพแทสเซียมไธโอไซยาเนท (KSCN) ในการสร้างกราฟมาตรฐาน

อุปกรณ์

เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)

วิธีการ

1) ปิเปตตัวอย่างน้ำนมปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย trichloroacetic acid (TCA) เข้มข้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

2) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม (Vortex) ทิ้งไว้อย่างน้อย 30 นาที จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman No.40)

3) ปิเปตส่วนใสปริมาตร 1.50 มิลลิลิตร ผสมกับ สารละลายเฟอร์ริก ไนเตรท ปริมาตร 1.50 มิลลิลิตร (ชั่ง $Fe(NO_3)_3.9H_2O$ มา 16.0 กรัม ละลายในสารละลายกรดไนตริก ($HNO_3$) เข้มข้น 2.0 โมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร)

4) วัดความเข้มข้นของสีด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์โดยอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร หลังปรับเครื่องด้วย blank ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0 (ศูนย์)

5) ทำ blank โดยใช้น้ำกลั่นปริมาตร 1.50 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายเฟอร์ริก ไนเตรท ปริมาตร 1.50 มิลลิลิตร

6) นำสารโพแทสเซียมไธโอไซยาเนท (KSCN) มาให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน 167.30 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทำให้สารละลายที่มีสาร $SCN^-$ อยู่ 100 ppm

7) ปิเปตสารละลาย KSCN ที่เตรียมได้มา 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 และ 16 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร ซึ่งเทียบเท่ากับปริมาณสาร $SCN^-$ อยู่ 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 และ 16 ppm ตามลำดับ

8) ทำการวิเคราะห์ตามข้อ 3 – 5 นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้กับปริมาณสาร $SCN^-$ ในสารละลายจากข้อ 7 มาเป็นเส้นกราฟมาตรฐาน ระหว่างความเข้มข้นของสาร $SCN^-$ กับค่าการดูดกลืนแสง

9) คำนวณปริมาณสาร $SCN^-$ จากการเปรียบเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐาน แล้วแสดงค่าเป็น ppm

**2. การวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ($H_2O_2$)**

การหาปริมาณสารไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ($H_2O_2$) โดยดัดแปลงวิธีของ Bjorck (1978) และ Allen and Wrieden (1982) ซึ่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 436 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้สารละลาย $H_2O_2$ ในการสร้างกราฟมาตรฐาน

อุปกรณ์

เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)

วิธีการ

1) ปิเปตตัวอย่างน้ำนมปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมกับสาร substrate ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร (horseradish peroxidase 5 ไมโครกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร และสารละลาย guaiacol เข้มข้น 0.01 โมลาร์ โดยละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 นอร์มอล ที่ pH 6.50)

2) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 20 – 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่เกิน 30 วินาที

3) วัดความเข้มข้นของสีด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์โดยอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร หลังปรับเครื่องด้วย blank ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0 (ศูนย์)

4) ปิเปตสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ เข้มข้นร้อยละ 30 โดยปริมาตร ปริมาตร 33.33 ไมโครลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตรทำให้สารละลายที่มีสารไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ อยู่ 100 ppm

5) ปิเปตสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่ได้ มา 1, 2, 4, 6, 8, และ 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร ซึ่งเทียบเท่ากับปริมาณสาร ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์อยู่ 1, 2, 4, 6, 8 และ 10 ppm ตามลำดับ

6) ทำการวิเคราะห์ตามข้อ 1 – 3 นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้กับปริมาณสารไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในสารละลายจากข้อ 5 มาเป็นเส้นกราฟมาตรฐาน ระหว่างความเข้มข้นของสาร ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์กับค่าการดูดกลืนแสง

7) คำนวณปริมาณสารไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ จากการเปรียบเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐาน แล้วแสดงค่าเป็น ppm

**3. การวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์แล็กโทเพอร์ออกซิเดส (LPO)**

การวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์แล็กโทเพอร์ออกซิเดส โดยดัดแปลงจากวิธีการทดสอบของ Allen and Wrieden (1982) และ Lali et al. (2000) ซึ่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 470 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ แล้วทำการคำนวณโดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์เท่ากับ 25.50 $mM^{-1}$ $cm^{-1}$ โดยแสดงผลในรูป Units/ml of enzyme โดยที่ 1 unit มีค่าเท่ากับ จำนวนเอนไซม์ที่ไปทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับ 1 ไมโครโมล ของ guaiacol ต่อ 1 นาที ต่อ 1 มิลลิลิตร

อุปกรณ์

เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)

วิธีการ

1) นำตัวอย่างน้ำนมดิบมา 1 กิโลกรัม มาทำการเหวี่ยงที่ 2,000 X g เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส แล้วแยกเอาส่วนที่เป็นไขมันนมออก

2) นำส่วนที่เหลือจากการแยกไขมันมาทำการเพิ่มอุณหภูมิเป็น 37 องศาเซลเซียส แล้วจึงเติมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ เข้มข้น 5.0 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร คนเป็นเวลา 1 นาที

3) เติม เอนไซม์ไคลโมซิน (chymosin) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (ละลายในน้ำโดยใช้เอนไซม์ 0.08 กรัม ต่อน้ำ 1มิลลิลิตร) คนเป็นเวลา 30 วินาที หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 2 – 3 นาที

4) ทำการเหวี่ยงที่ 1,500 X g เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำส่วนใสที่ได้ทั้งหมดมาเติมสารเติมโซเดียมเพอร์คาร์บอเนต 30 มิลลิกรัม แล้วคนเป็นเวลา 2 – 3 นาที

5) ปิเปตตัวอย่างส่วนใสปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมกับสาร substrate ปริมาตร 2.50 มิลลิลิตร (สารละลาย guaiacol เข้มข้น 0.01 โมลาร์ โดยละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 นอร์มอล ที่ pH 6.50)

6) วัดความเข้มข้นของสีด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์โดยอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร หลังปรับเครื่องด้วย blank ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0 (ศูนย์)

7) คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์จากสูตร

$$\text{Units/ml enzyme} = \frac{(\Delta A_{470} - \Delta A_{470}\ \text{blank})\ (2.75)\ (df)}{(25.50)\ (0.25)}$$

เมื่อ $\Delta A_{470}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

$\Delta A_{470}$ blank คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ blank

2.75 คือ ปริมาตรที่ใช้ในการวิเคราะห์ (มิลลิลิตร)

df คือ dilution factor

0.25 คือ ปริมาตรของเอนไซม์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ (มิลลิลิตร)

25.50 คือ ค่าสัมประสิทธิ์ของ guaiacol (millimolar extinction coefficient[6] of oxidized guaiacol at 470 nm)

**4. การวิเคราะห์หาออกซิเดชันของโปรตีน (protein oxidation)**

การวิเคราะห์หาออกซิเดชันของโปรตีน (Protein oxidation) ตามวิธีของ Fedele and Bergamo (2001) โดยใช้วิธีการวัดปริมาณ protein carbonyls (PC) ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 370 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ แล้วทำการคำนวณโดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์เท่ากับ 22.00 $mM^{-1}$ $cm^{-1}$ แล้วทำการหาความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford (1976) โดยใช้สารละลาย bovine serum albumin (BSA) ในการสร้างกราฟมาตรฐาน โดยที่ความเข้มข้นของ PC สุดท้ายแสดงผลในรูป nmoles/mg of proteins

อุปกรณ์

เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)

วิธีการ

1) ชั่งตัวอย่างน้ำนมหรือเนยแข็งให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนมา 2 กรัม เติมสารละลาย sodium citrate-NaOH เข้มข้น 0.20 โมลาร์ ที่ pH 8.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

2) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม (Vortex) หลังจากนั้นทำการเหวี่ยงที่ 10,000 X g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3) ปิเปตตัวอย่างส่วนใสมา 0.10 มิลลิลิตร เติมสารละลาย DNPH (ละลายในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2.50 โมลาร์) เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.30 มิลลิลิตร

4) ทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที แล้วเติมสารละลาย TCA (ที่นำไปแช่ในน้ำแข็ง) เข้มข้นร้อยละ 20 โดยปริมาตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

5) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม (Vortex) หลังจากนั้นทำการเหวี่ยงที่ 10,000 X g เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนที่ใสทิ้งไป

6) เติมสารละลาย TCA (ที่นำไปแช่ในน้ำแข็ง) เข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม (Vortex) แล้วทำการเหวี่ยงที่ 10,000 X g เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนที่ใสทิ้งไป

7) เติมสารผสมระหว่าง เอทานอล กับ เอทิลอะซิเตต (ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม (Vortex) แล้วทำการเหวี่ยงที่ 10,000 X g เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนที่ใสทิ้งไป ทำซ้ำเดิมอีก 2 ครั้ง

8) เติมสารละลาย guanidine HCl (ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 10.0 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 2.30) เข้มข้น 6.0 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

9) วัดความเข้มข้นของสีด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์โดยอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร หลังปรับเครื่องด้วย blank ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0 (ศูนย์)

10) ทำการเตรียม blank โดย ปิเปตตัวอย่างส่วนใสมา 0.10 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2.50 โมลาร์ ปริมาตร 0.30 มิลลิลิตร แล้วทำการวิเคราะห์ตามข้อ 4 – 8

11) คำนวณปริมาณ protein carbonyls (PC) จากสูตร

$$\text{protein carbonyls (PC)} = \frac{(\Delta A_{370} - \Delta A_{370}\ \text{blank})\ (1.00)\ (\text{df})}{(22.00)\ (0.1)}$$

เมื่อ $\Delta A_{370}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

$\Delta A_{370}$ blank คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ blank

1.00 คือ ปริมาตรที่ใช้ในการวิเคราะห์ (มิลลิลิตร)

df คือ dilution factor

22.00 คือ ค่าสัมประสิทธิ์ (millimolar extinction coefficient[6] at 370 nm)

0.25 คือ ปริมาตรของเอนไซม์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ (มิลลิลิตร)

<u>การหาความเข้มข้นของโปรตีน</u> (Bradford, 1976)

1) ชั่งตัวอย่างน้ำนมหรือเนยแข็งให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนมา 2 กรัม เติมสารละลาย sodium citrate-NaOH เข้มข้น 0.20 โมลาร์ ที่ pH 8.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

2) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม (Vortex) หลังจากนั้นทำการเหวี่ยงที่ 10,000 X g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3) ปิเปตตัวอย่างส่วนใสมา 1.0 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

4) เติมสารละลาย Bradford ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที

5) การเตรียม สารละลาย Bradford เริ่มจากชั่ง coomassie brilliant blue G-250 มา 100 กรัม ละลายสารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 โดยปริมาตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายกรดฟอสฟอริกข้นร้อยละ 85 โดยปริมาตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000 มิลลิลิตร หลังจากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman No.1)

6) วัดความเข้มข้นของสีด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์โดยอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร หลังปรับเครื่องด้วย blank ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0 (ศูนย์)

7) ชั่ง bovine serum albumin (BSA)ให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนมา 100 ไมโครกรัม ใส่ในขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตรทำให้สารละลายที่มีปริมาณโปรตีน อยู่ 100 ppm

8) ปิเปตสารละลาย BSA ที่ได้ มา 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร ซึ่งเทียบเท่ากับปริมาณโปรตีนอยู่ 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 ppm ตามลำดับ

9) ทำการวิเคราะห์ตามข้อ 3 – 6 นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้กับความเข้มข้นของโปรตีนจากข้อ 8 มาเป็นเส้นกราฟมาตรฐาน ระหว่างความเข้มข้นของโปรตีนกับค่าการดูดกลืนแสง

10) คำนวณหา protein carbonyls (PC) จากการเปรียบเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐาน แล้วแสดงค่าเป็น nmoles/mg of proteins

**5. การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (AOAC, 2000)**

วิธีการ

1) อบภาชนะที่ใช้สำหรับการหาความชื้นในตู้อบไฟฟ้าที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 – 3 ชั่วโมง แล้วปล่อยให้เย็นในตู้ดูดความชื้น

2) ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนมาโดยให้อยู่ในช่วง 2 – 3 กรัม ใส่ในภาชนะที่ใช้สำหรับการหาความชื้นที่ทราบน้ำหนักแล้ว

3) อบตัวอย่างที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หรือ จนกว่าน้ำหนักตัวอย่างคงที่

4) นำตัวอย่างออกจากตู้อบ แล้วปล่อยให้เย็นในตู้ดูดความชื้น หลังจากนั้นชั่งน้ำหนัก

5) คำนวณหาปริมาณความชื้นจากสูตร

$$\text{ปริมาณความชื้น (ร้อยละโดยน้ำหนัก)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ}} \times 100$$

**6. การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (AOAC, 2000)**

วิธีการ

1) เผาถ้วยกระเบื้องเคลือบที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ปิดเครื่องเผาเป็นเวลา 30 – 45 นาที เพื่อทำให้อุณหภูมิลดลง แล้วนำถ้วยกระเบื้องเคลือบใส่ในตู้ดูดความชื้นแล้วปล่อยให้เย็นในตู้ดูดความชื้น

2) ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนมาโดยให้อยู่ในช่วง 3 – 5 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้องเคลือบที่ทราบน้ำหนักแล้ว นำไปเผาในตู้ดูดควัน เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือจนกว่าควันหมด

3) นำไปเข้าเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 – 6 ชั่วโมง นำตัวอย่างออกจากเตาเผา แล้วปล่อยให้เย็นในตู้ดูดความชื้น หลังจากนั้นชั่งน้ำหนัก

4) คำนวณหาปริมาณเถ้าจากสูตร

$$\text{ปริมาณเถ้า (ร้อยละโดยน้ำหนัก)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนเผา} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังเผา} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนเผา}}$$

**7. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (AOAC, 2000)**

อุปกรณ์

1) เครื่องย่อยโปรตีน Kjeldatherm (Gerehardt)

2) เครื่องกลั่นไนโตรเจน Vapodest (Gerehardt)

วิธีการ

1) ชั่งตัวอย่างกระดาษกรองให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนมาประมาณ 2 กรัม ห่อให้มิดชิด แล้วใส่ลงไปในหลอดย่อย

2) เติมสารผสมระหว่าง คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) และโพแทสเซียมซัลเฟต ($K_2SO_4$) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 10 มา 5 กรัม เพื่อเร่งปฏิกิริยา

3) เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น ($H_2SO_4$) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร และหยดสารป้องกันการเกิดโฟม (anti-foaming agent) 4 – 5 หยด

4) ย่อยตัวอย่างบนเครื่องย่อยโปรตีนที่อุณหภูมิ 380 องศาเซลเซียส จนได้สารละลายที่ใสแล้วปล่อยไว้ให้เย็น

5) เตรียมอุปกรณ์ในการกลั่นของเครื่องกลั่นไนโตรเจน แล้วทำการอุ่นเครื่อง และเปิดน้ำหล่อเย็นเครื่องควบแน่น

6) นำขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยเติมสารละลายกรดบอริกที่ความเข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร และหยดอินดิเคเตอร์ 2 – 3 หยด ลงไป โดยใช้ในการรองรับของเหลวที่ได้จากการกลั่นได้โดยให้ส่วนปลายของอุปกรณ์ควบแน่นจุ่มลงไปในสารละลายกรดนี้

7) กำหนดให้เครื่องกลั่นไนโตรเจน เติมน้ำ และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 และทำการกลั่นประมาณ 7 นาที ล้างอุปกรณ์ควบแน่นด้วยน้ำกลั่นลงในขวดรองรับ

8) ไตเตรทสารละลายที่กลั่นได้กับกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้นแน่นอน 0.1 นอร์มาล จนกระทั่งสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วง

9) ทำ blank และปฏิบัติตามข้อ 1 – 8 โดยไม่เติมตัวอย่าง

10) คำนวณปริมาณโปรตีนจากสูตร

$$\text{ปริมาณโปรตีน (ร้อยละโดยน้ำหนัก)} = \frac{(A-B)N \times 1.4 \times F}{W}$$

เมื่อ A คือ ปริมาณกรดที่ใช้ไตเตรทกับตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

B คือ ปริมาณกรดที่ใช้ไตเตรทกับ blank (มิลลิลิตร)

N คือ ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก (นอร์มาล)

F คือ ค่าคงที่สำหรับผลิตภัณฑ์นมคือ 6.38

W คือ น้ำหนักของตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)

**8. การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน ด้วยวิธี modified babcock method (Kosikowski and Mistry, 1997)**

วิธีการ

1) ชั่งตัวอย่างเนยแข็งให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนมาประมาณ 9 กรัม ใส่ลงในขวดวิเคราะห์ (Paley-type Babcock) แล้วเติมน้ำอุ่นอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

2) ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นจนได้อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเติมกรดซัลฟูริก (ความถ่วงจำเพาะอยู่ในช่วง 1.835 – 1.840) ปริมาตร 15 มิลลิลิตร โดยทำการแบ่งใส่ในขวดวิเคราะห์ 3 ครั้ง

3) ผสมให้เข้ากัน จนกระทั่งโปรตีนถูกย่อยจนหมด หลังจากนั้นทำการปิดจุกขวดวิเคราะห์

4) นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเติมน้ำอุ่นอุณหภูมิ 77 องศาเซลเซียส จนเกือบถึงคอขวด

5) นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงต่ออีกเป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นเติมน้ำอุ่นจนระดับไขมันอยู่บนสเกลที่ก้านคอขวด

6) นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงต่ออีกเป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นนำขวดวิเคราะห์ตัวอย่างไปวางในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

7) อ่านปริมาณไขมันที่วิเคราะห์ได้เป็นร้อยละ

**9. การวิเคราะห์ปริมาณเกลือ ด้วยวิธี modified volhard (Kosikowski and Mistry, 1997)**

วิธีการ

1) ชั่งตัวอย่างเนยแข็งให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนมาประมาณ 3 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 300 มิลลิลิตร

2) เติมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท ($AgNO_3$) ที่มีความเข้มข้นแน่นอน 0.10 นอร์มาล ปริมาตร 25 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมกรดไนตริกเข้มข้น ($HNO_3$) ปริมาตร 10 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร

3) ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มให้เดือดในตู้ดูดควัน เมื่อตัวอย่างเดือดจึงการเติมสารละลายโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต ($KNO_4$) ร้อยละ 5 โดยปริมาตร ปริมาตร 15 มิลลิลิตร โดยทำการแบ่ง 3 ครั้ง ครั้งละ 5 มิลลิลิตร

4) ต้มตัวอย่างต่อไปจนกว่าชิ้นตัวอย่างเนยแข็งหายไป ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

5) เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน หลังจากนั้นทำการกรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman No.4) หลังจากนั้นทำการกลั้วขวดรูปชมพู่ที่ใช้ในการวิเคราะห์ อีก 2 ครั้ง โดยใช้น้ำกลั่นครั้งละ 100 มิลลิลิตร

6) เติมสารละลายอิ่มตัวเฟอริกแอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาตร 2 มิลลิลิตร โดยเป็นอินดิเคเตอร์

7) ไตเตรทสารละลายที่ได้กับสารละลายโพแทสเซียมไธโอไซยาเนท (KSCN) ที่มีความเข้มข้นแน่นอน 0.1 นอร์มาล จนกระทั่งสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีแดงอิฐ

8) ทำ blank โดยใช้น้ำกลั่น ปริมาตร 300 มิลลิลิตร แล้วทำตามข้อ 6 – 7

9) คำนวณปริมาณเกลือจากสูตร

$$\text{ปริมาณเกลือ (ร้อยละโดยน้ำหนัก)} = \frac{(25\ \text{ml} \times \text{N}\ AgNO_3 - \text{ml} \times \text{N KSCN}) \times 0.0058}{\text{W}} \times 100$$

เมื่อ 25 ml x N $AgNO_3$ คือ ความเข้มข้นของสารละลายซิลเวอร์ไนเตรทโดยใช้ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

ml x N KSCN คือ ความเข้มข้นของสารละลายโพแทสเซียมไทโอไซยาเนทและปริมาตรที่ได้หลังจากการไทเทรต

0.0058 คือ ค่าคงที่

W คือ น้ำหนักของตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)

**10. การวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด (AOAC, 2000)**

<u>วิธีการของน้ำนมดิบ</u>

1) ปิเปตตัวอย่างน้ำนมปริมาตร 9 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมสารละลายฟีนอฟทาลีนร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยเป็นอินดิเคเตอร์ ผสมให้เข้ากัน

2) ไตเตรทตัวอย่างกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ที่มีความเข้มข้นแน่นอน 0.1 นอร์มาล จนกระทั่งสีของสารละลายเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีชมพู

3) ทำ blank ทำตามข้อ 1 – 2 โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง

<u>วิธีการของเนยแข็ง</u>

1) ชั่งตัวอย่างเนยแข็งให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนมาประมาณ 10 กรัม หลังจากนั้นเติมน้ำอุ่นอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ปริมาตร 105 มิลลิลิตร

2) ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน หลังจากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman No.4)

3) ปิเปตส่วนใส่มา 25 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมสารละลายฟีนอฟทาลีนที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยเป็นอินดิเคเตอร์ ผสมให้เข้ากัน

4) ไตเตรทตัวอย่างกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ที่มีความเข้มข้นแน่นอน 0.1 นอร์มาล จนกระทั่งสีของสารละลายเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีชมพู

3) ทำ blank ทำตามข้อ 3 – 4 โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง

<u>วิธีการคำนวณ</u>

1) คำนวณปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดแลกทิก โดยปริมาตร 1 มิลลิลิตร ของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้นแน่นอน 0.1 นอร์มาล ที่ใช้เทียบเท่ากับปริมาณกรดแลกทิก 0.0090 กรัม จากสูตร

$$\text{ค่าความเป็นกรด (TA) (ร้อยละโดยน้ำหนัก)} = \frac{(A-B)N \times 1.4 \times 9}{W}$$

เมื่อ A คือ ปริมาณด่างที่ใช้ไตเตรทกับตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

B คือ ปริมาณด่างที่ใช้ไตเตรทกับ blank (มิลลิลิตร)

N คือ ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ (นอร์มาล)

W คือ น้ำหนักของตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)

**11. การวิเคราะห์หาความสามารถในการไหล**

การวิเคราะห์หาความสามารถในการไหล (Flowability) ด้วยวิธี Schreiber test โดยดัดแปลงวิธีของ Kosikowski and Mistry (1997), Park et al. (1984) และ USDA (1980; 2001)

วิธีการ

1) นำตัวอย่างเนยแข็งมาตัดให้ได้เป็นรูปทรงกระบอกโดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 41 มิลลิเมตร และหนา 4.80 มิลลิเมตร

2) นำจานเลี้ยงเชื้อมาทำการเทียบขนาดให้มีความใกล้เคียงกับภาพ Schreiber test ดังภาพที่ 1ข นั่นคือ ต้องมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 91 มิลลิเมตร

3) ทำการวางตัวอย่างเนยแข็งลงในจานเลี้ยงเชื้อ โดยให้ตัวอย่างเนยแข็งอยู่ตรงกึ่งกลางของจานเลี้ยงเชื้อโดยเทียบกับภาพ Schreiber test

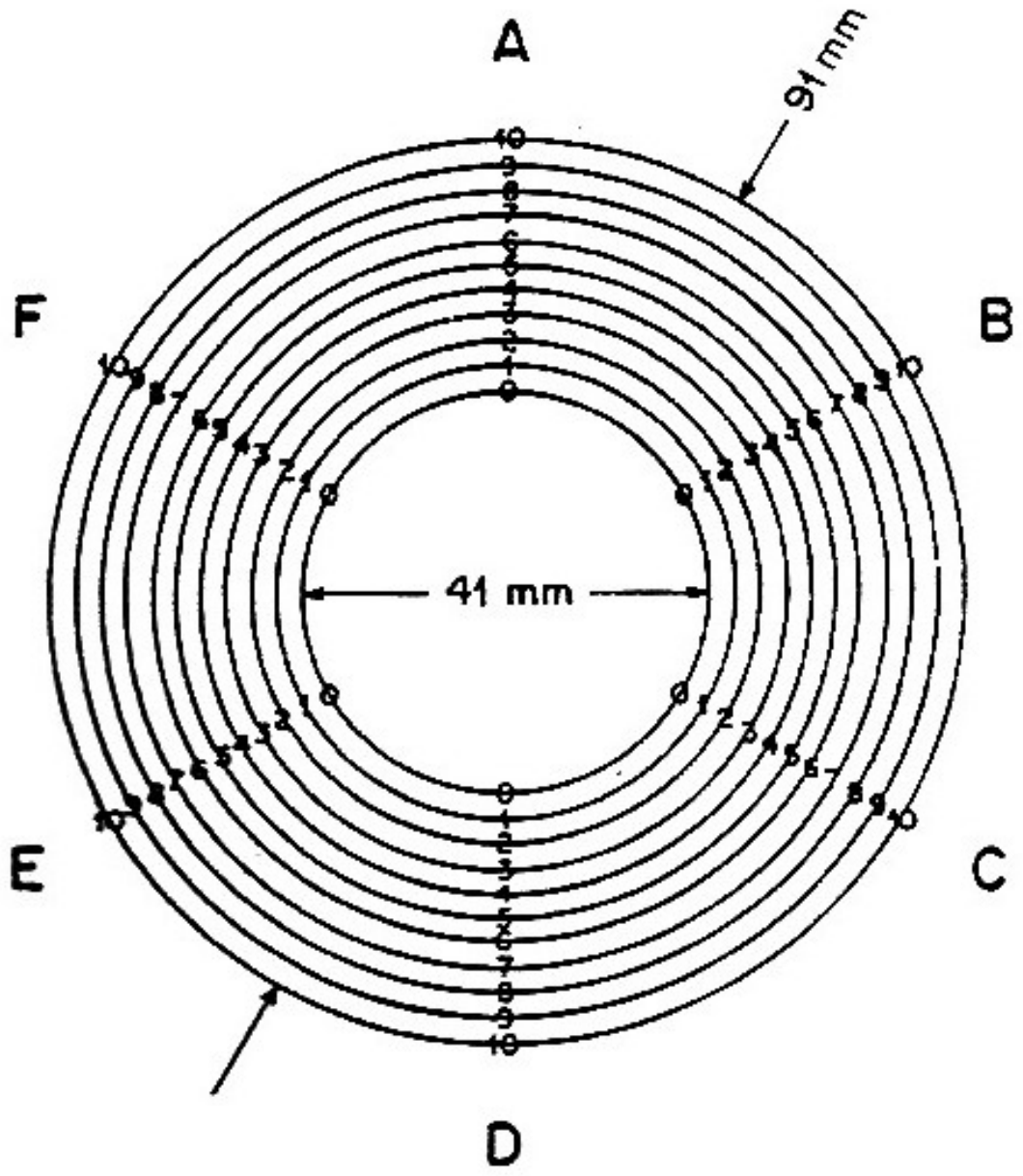
4) นำไปอบด้วยเตาอบ (Electrolux EOD982B/W, ประเทศไทย) ที่ 232 องศาเซลเซียส (450 องศาฟาเรนไฮต์) เป็นเวลา 10 นาที

5) วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที

6) ทำการวัดค่าการไหลทั้งหมด 6 จุด ตั้งแต่ A – F โดยในแต่ละจุดจะแบ่งเป็น 11 ช่วง ตั้งแต่ 0 – 10 โดยที่ในแต่ละช่วงจะห่างกัน 0.50 มิลลิเมตร

7) นำค่าที่ได้ทั้งหมด 6 จุด มาทำการหาค่าเฉลี่ย

8) ทำการเปรียบเทียบค่าที่ได้กับค่าตามมาตรฐานของเนยแข็ง โดยถ้าได้ค่าเท่ากับหรือมากกว่า 4 สามารถยอมรับได้




**ภาพที่ 1ข** Schreiber test

แหล่งที่มา: Park et al. (1984)

**12. การวิเคราะห์** Methylene blue reduction test

วิธี Methylene blue reduction เป็นการสังเกตการณ์เปลี่ยนสี เมื่อครบ 30 นาที และตรวจสอบผลทุกๆ ชั่วโมง และเทียบเกรดของน้ำนมในแต่ละตัวอย่างที่ได้ ตามวิธีของ International Dairy Federation (IDF, 1989)

วิธีการ

1) ปิเปตสี Methylene blue (ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อในอัตราส่วน 1 ต่อ 250) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีฝาเกลียวเปล่าปลอดเชื้อ

2) ปิเปตตัวอย่างน้ำนมปริมาตร 9 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดเดิม ปิดฝาหลอดและผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

3) แช่หลอดลงในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ทันที และทำการจับเวลาทันที

4) สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีเมื่อครบเวลา 30 นาทีแรก หลังจากนั้นตรวจผลทุกๆ ชั่วโมง และเทียบชั้นหรือเกรดของนมตามตารางที่ 1ข

**ตารางที่ 1ข ชั้นและคุณภาพของนมจากการเปลี่ยนสีของ Methylene blue**

| ชั้น | คุณภาพของนม | ระยะเวลาในการเปลี่ยนสี Methylene blue |
|---|---|---|
| I | ดีเยี่ยม (excellent) | Methylene blue ไม่เปลี่ยนสีในเวลา 8 ชั่วโมง |
| II | ดี (good) | Methylene blue เปลี่ยนสีระหว่าง 6 – 8 ชั่วโมง |
| III | พอใช้ (fair) | Methylene blue เปลี่ยนสีระหว่าง 2 – 6 ชั่วโมง |
| IV | ไม่ดี (poor) | Methylene blue เปลี่ยนสีในเวลาไม่เกิน 2 ชั่วโมง |

**13. การวิเคราะห์** Resazurin test

วิธี Resazurin test เป็นการสังเกตการณ์เปลี่ยนสีทุกๆ 15 นาที ภายในเวลา 1 ชั่วโมง และเทียบเกรดของน้ำนมในแต่ละตัวอย่างที่ได้ ตามวิธีของ IDF (1989)

วิธีการ

1) ปิเปตสี Resazurin (ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อในอัตราส่วน 1 ต่อ 400) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีฝาเกลียวเปล่าปลอดเชื้อ

2) ปิเปตตัวอย่างน้ำนมปริมาตร 9 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดเดิม ปิดฝาหลอดและผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

3) แช่หลอดลงในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ทันที และทำการจับเวลาทันที

4) สังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงสีทุกๆ 15 นาที ภายในเวลา 1 ชั่วโมง และเทียบชั้นหรือเกรดของนมตามตารางที่ 2ข

**ตารางที่ 2ข คุณภาพของนมจากการเปลี่ยนสีของ Resazurin ภายในเวลา 1 ชั่วโมง**

| **คุณภาพของนม** | **สี** |
|---|---|
| ดีเยี่ยม (excellent) | น้ำเงิน (blue) |
| ดี (good) | ม่วง (mauve) |
| พอใช้ (fair) | ชมพู-ม่วง (pink-purple) |
| ไม่ดี (poor) | ชมพู (pink) |
| เลว (bad) | ไม่มีสี (colorless) |

**14. การวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (AOAC, 2000)**

วิธีการ

1) ปิเปตตัวอย่างน้ำนมมาปริมาตร 25 มิลลิลิตร หรือตัวอย่างเนยแข็งมาประมาณ 25 กรัม มาเจือจางในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ให้ได้ระดับความเจือจางที่ 1: 10, 1: 100 และ 1: 1000 ตามลำดับ นั่นคือ เริ่มจากตัวอย่าง 25 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 25 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 1: 10 หลังจากนั้นปิเปตจากส่วนแรกนี้มา 1 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 9 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 1: 100 และจากนั้นปิเปตจากส่วนที่สองมา 1 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 9 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 1: 1000 ตามลำดับ

2) ปิเปตตัวอย่างในแต่ละระดับความเจือจาง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่บน Petrifilm™ ชนิด aerobic count (PAC) ตรงกลางด้านใน โดยเปิดแผ่นฟิล์มชั้นบนขึ้นมาก่อน

3) ปิดแผ่นฟิล์มลงแล้วใช้ที่เกลี่ย (spreader) ด้านเว้าเข้า วางบนตำแหน่งของตัวอย่างกดเบาๆ ลงบนตัวอย่าง

4) ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 32 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ± 3 ชั่วโมง

5) ตรวจนับจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์ที่พบ โดยรายงานผลเป็น CFU/ml

**15. การวิเคราะห์หาจำนวน *E. coli* และโคลิฟอร์ม (AOAC, 2000)**

วิธีการ

1) ปิเปตตัวอย่างน้ำนมมาปริมาตร 25 มิลลิลิตร หรือตัวอย่างเนยแข็งมาประมาณ 25 กรัม มาเจือจางในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ให้ได้ระดับความเจือจางที่ 1: 10, 1: 100 และ 1: 1000 ตามลำดับ นั่นคือ เริ่มจากตัวอย่าง 25 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 25 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 1: 10 หลังจากนั้นปิเปตจากส่วนแรกนี้มา 1 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 9 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 1: 100 และจากนั้นปิเปตจากส่วนที่สองมา 1 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 9 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 1: 1000 ตามลำดับ

2) ปิเปตตัวอย่างในแต่ละระดับความเจือจาง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่บน Petrifilm$^{TM}$ ชนิด coliforms count (PCC) ตรงกลางด้านใน โดยเปิดแผ่นฟิล์มชั้นบนขึ้นมาก่อน

3) ปิดแผ่นฟิล์มลงแล้วใช้ที่เกลี่ย (spreader) ด้านเรียบ วางบนตำแหน่งของตัวอย่างกดเบาๆ ลงบนตัวอย่าง

4) ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 32 ± 1องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง

5) ตรวจนับจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์ที่พบ โดยรายงานผลเป็น CFU/ml โดยโคโลนีสีแดงที่เกิดขึ้นพร้อมกับฟองอากาศเป็นโคลิฟอร์ม และโคโลนีสีน้ำเงินหรือม่วงที่มีฟองอากาศเป็น *E. coli*

**16. การวิเคราะห์หาจำนวนยีสต์และรา (AOAC, 2000)**

วิธีการ

1) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) โดยนำ Tryptone 5 กรัม Yeast extract 2.5 กรัม และ Dextrose 1.0 กรัม ไปละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1000 มิลลิลิตร ปรับ pH เท่ากับ 5.0 ± 0.1 ด้วยสาระลายกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 1 นอร์มาล แล้วจึงเติม Agar 15 กรัม หลอมให้ Agar ละลายด้วยความร้อน นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไปที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2) นำอาหารเลี้ยงเชื้อเทลงในจานเลี้ยงเชื้อประมาณ 15 – 20 มิลลิลิตร ทิ้งให้อาหารแข็งตัว

3) ปิเปตตัวอย่างน้ำนมมาปริมาตร 25 มิลลิลิตร หรือตัวอย่างเนยแข็งมาประมาณ 25 กรัม มาเจือจางในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ให้ได้ระดับความเจือจางที่ 1: 10, 1: 100 และ 1: 1000 ตามลำดับ โดยในตัวอย่างที่เป็นน้ำนมทั้ง 3 ชนิด จะใช้ ที่ไม่เจือจาง เจือจาง 1: 10 และ 1: 100

4) ปิเปตตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่แล้ว หลังจากนั้นทำการ spread โดยใช้แท่งแก้วสำหรับ spread

5) ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

6) ตรวจนับจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์ที่พบ โดยรายงานผลเป็น CFU/ml

# ประวัติผู้เขียน

นายจิระเดช มณีรัตน์ เกิดเมื่อวันที่ 14 สิงหาคม พ.ศ. 2523 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร เข้ารับการศึกษาในระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สำเร็จการศึกษาในปี พ.ศ. 2545 ภายหลังสำเร็จการศึกษาได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีในปีการศึกษา พ.ศ. 2545