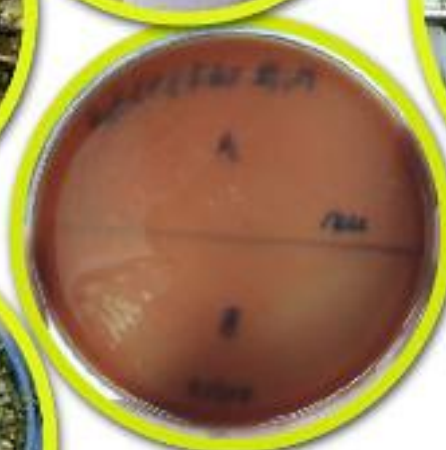




ระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดส และการใช้ประโยชน์

Lactoperoxidase system
and application



ISBN (E-BOOK) 978-616-619-255-1

น.สพ. ดร. วงศ์อนันต์ ณรงค์วานิชการ
สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์



ระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดสและการใช้ประโยชน์ Lactoperoxidase and application

เรียบเรียงโดย

น.สพ. ดร. วงศ์อนันต์ ณรงค์วานิชการ

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900
กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

พิมพ์ครั้งที่ 1 จำนวน เล่ม

ปีที่พิมพ์ : พ.ศ. 2567

ข้อมูลทางบรรณานุกรม

จัดทำโดย น.สพ. ดร. วงศ์อนันต์ ณรงค์วานิชการ

เรื่อง ระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดสและการใช้ประโยชน์ Lactoperoxidase system and application -กรุงเทพฯ

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2567, 29 หน้า

1.ระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดส 2. การใช้ประโยชน์

ISBN (e-book) 978-616-619-255-1

สงวนลิขสิทธิ์ ห้ามคัดลอก จัดพิมพ์ หรือทำซ้ำรวมทั้งดัดแปลงเป็นสื่ออื่น ๆ ก่อนได้รับอนุญาต



ระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดสและการใช้ประโยชน์

Lactoperoxidase and application

โดย

น.สพ. ดร. วงศ์อนันต์ ณรงค์วานิชการ

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ

กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

Wonganun Narongwanichgarn, D.V.M., M.P.H., Ph. D

National Institute of Animal Health

Department of Livestock Development

Ministry of Agriculture and Cooperatives

คำนำ

เป็นที่ทราบกันดีว่า ระบบป้องกันตัวที่ทำหน้าที่ยับยั้งหรือกำจัดเชื้อโรคที่เข้าสู่ร่างกายของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม ได้แก่ ระบบภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำที่เกิดจากการได้รับวัคซีน และระบบเซลล์จำพวกเม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆในร่างกาย ในโอกาสนี้ ผู้เขียนได้นำเสนอ ระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดส (lactoperoxidase) ซึ่งเป็นระบบป้องกันตัวตามธรรมชาติอีกชนิดหนึ่งที่ออกฤทธิ์ยับยั้งหรือทำลายเชื้อโรคแบบไม่จำเพาะ แต่พบได้ในสารคัดหลั่งต่างๆ เช่น น้ำนม น้ำลาย น้ำตา สารคัดหลั่งอื่นๆ ของร่างกาย และปัสสาวะ โดยรวบรวมวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องและผลงานวิจัยที่ได้ทำการศึกษาแนะนำเสนอในคู่มือฉบับนี้ หวังว่าจะเป็นประโยชน์ต่อบุคลากรที่ทำงานทั้งทางสัตวแพทย์ และนักวิชาการทั่วไป ได้มีความรู้ ความเข้าใจ และเกิดแนวคิดในการนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ทั้งเชิงการแพทย์ สัตวแพทย์ อย่างเป็นรูปธรรม และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงการผลิตน้ำนมดิบให้มีคุณภาพดีขึ้น เพื่อสุขภาพที่ดีของผู้บริโภคได้

วงศ์อนันต์ ณรงค์วานิชการ

สารบัญ

	หน้า
บทที่ 1 ระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดส	1
1.1 เอนไซม์แลคโตเพอร์ออกซิเดส	1
1.2 ไฮโอไซยานต	3
1.3 ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์	6
กลไกการทำงานของระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดส	7
บทที่ 2 การเพิ่มประสิทธิภาพระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดสในนํ้านมดิบ	10
ปริมาณเอนไซม์แลคโตเพอร์ออกซิเดสและไฮโอไซยานตในนํ้านมดิบ	11
การเพิ่มประสิทธิภาพของระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดส	11
- โดยการเติมสารเคมีลงในนํ้านมดิบ	11
- โดยการใช้ไบมันสำปะหลังแห้งเป็นอาหารโคนม	12
ผลของการเพิ่มประสิทธิภาพระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดสต่อคุณภาพนํ้านมดิบ	
ทางจุลชีววิทยา	13
ผลของการเพิ่มประสิทธิภาพระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดสต่อปริมาณโซมาติกเซลล์	14
ผลของการเพิ่มประสิทธิภาพระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดสต่อความถูกต้องของการ	15
ตรวจยาปฏิชีวนะตกค้างในนํ้านมดิบโดยชุดทดสอบ	
บทที่ 3 การตรวจวิเคราะห์สารไฮโอไซยานตในนํ้านมดิบ	16
การตรวจวิเคราะห์ปริมาณไฮโอไซยานตในนํ้านมด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์	16
การตรวจวิเคราะห์ปริมาณไฮโอไซยานตในนํ้านมด้วยกระดาษทดสอบ	19
บรรณานุกรม	22

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 คุณลักษณะของเอนไซม์แลคโตเพอร์ออกซิเดสในน้ำนมโค	2
ตารางที่ 2 ระดับความเป็นพิษของไซยาไนด์ที่ทำให้สัตว์ทดลองตาย 50% (LD ₅₀)	4
ตารางที่ 3 ปริมาณไฮโดรไซยานตในสารคัดหลั่งต่างๆ ของคนและโค	6
ตารางที่ 4 ประสิทธิภาพของระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดสในการรักษาคุณภาพ น้ำนมดิบที่อุณหภูมิต่างๆ	9
ตารางที่ 5 ผลของการนำระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดสไปใช้ประโยชน์	13
ตารางที่ 6 จำนวนโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบ ($\times 10^3$ เซลล์/มล.)	15
ตารางที่ 7 การเตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ	18

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคโตเพอร์ออกซิเดสที่เวลาต่างๆของน้ำนมดิบและน้ำนมที่ต้มที่อุณหภูมิต่างกัน	3
รูปที่ 2 การสังเคราะห์ไฮยาไนด์จากลินามาริน	4
รูปที่ 3 Pathways in the lactoperoxidase – catalyzed reaction mechanism	7
รูปที่ 4 เปรียบเทียบคุณภาพน้ำนมดิบที่ได้รับและไม่ได้กระตุ้นระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดสที่เวลา (ชั่วโมง) ขณะเก็บรักษาที่ 37°C	14
รูปที่ 5 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณไฮโอไฮยาเนตในน้ำนมด้วยกระดาษทดสอบ	20
รูปที่ 6 การเปลี่ยนแปลงของสีกระดาษ picrate ในแต่ละความเข้มข้นของไฮโอไฮยาเนตในตัวอย่าง	21

บทที่ 1

ระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดส

ระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดส (Lactoperoxidase system; LPS) คือระบบภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติชนิดหนึ่งในร่างกายของคนและสัตว์ พบได้ในซีรัมและสารคัดหลั่งต่างๆ เช่น น้ำนม น้ำตา น้ำลาย และปัสสาวะ ระบบนี้ประกอบด้วย เอนไซม์แลคโตเพอร์ออกซิเดส (Lactoperoxidase enzyme, LP) ไธโอไซยาเนต (Thiocyanate, SCN^-) และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (Hydrogenperoxide, H_2O_2) สารทั้งสามชนิดนี้จะทำปฏิกิริยากันได้สารไฮโปไธโอไซยาเนต (Hypothiocyanate, OSCN^-) (Ryoba et al., 2003; International Dairy Federation, 2013) ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งหรือทำลายเชื้อโรคแบบไม่จำเพาะ โดยมีรายงานยืนยันผลการยับยั้งหรือทำลายเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดที่ปนเปื้อนในน้ำนม เช่น *Streptococcus* sp. (Bjorck, 1978) Coliform (Zajac et al., 1983) *Salmonella* sp. (Wray and McLaren, 1987) *Staphylococcus aureus* (Kamau et al., 1990) *Listeria monocytogenes* (Gaya et al., 1991) รวมถึงกลุ่มแบคทีเรียที่เจริญได้ในอุณหภูมิระหว่าง 55 – 65°C (Thermophilic bacteria) (Wolfson and Sumner, 1993) เป็นต้น นอกจากนี้ มีรายงานการทำลายเชื้อไวรัสหลายชนิด เช่น Influenza virus type A และ B (Sugita et al., 2018) Herpes Simplex Virus type 1 (El-Fakharany et al., 2017) Respiratory syncytial virus and echovirus type 11 (Mikola et al., 1995) รายละเอียดองค์ประกอบของระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดสแต่ละชนิด มีดังต่อไปนี้

1.1 เอนไซม์แลคโตเพอร์ออกซิเดส (Lactoperoxidase enzyme, LP)

เป็นเอนไซม์ธรรมชาติชนิดหนึ่งพบได้ในต่อมต่างๆ ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม (Hogg and Jago, 1970) แหล่งผลิตของเอนไซม์นี้คือเซลล์เยื่อบุผิวภายในต่อมต่างๆ และพบว่าในเซลล์เยื่อบุผิวเต้านมมีเอนไซม์นี้ช่วยควบคุมการสร้างเอนไซม์นี้ (Cals et al., 1994) Korhonen (1977) รายงานการพบเอนไซม์นี้ปริมาณ 11 – 45 ppm ในนมแม่เหลือง และ 13 - 30 ppm ในน้ำนมของโค หรือเท่ากับ 1% ของโปรตีนในน้ำนมหรือ Whey (Reiter, 1985) เอนไซม์นี้จัดอยู่ในกลุ่มเพอร์ออกซิเดส มีองค์ประกอบคือไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ซึ่งเป็นโพลีเปปไทด์สายเดี่ยว (single strand polypeptide) ที่มีกรดอะมิโนอยู่ 612 หน่วย เหล็กที่อยู่ในฮีม (heme) ในรูปของ Protoporphyrin

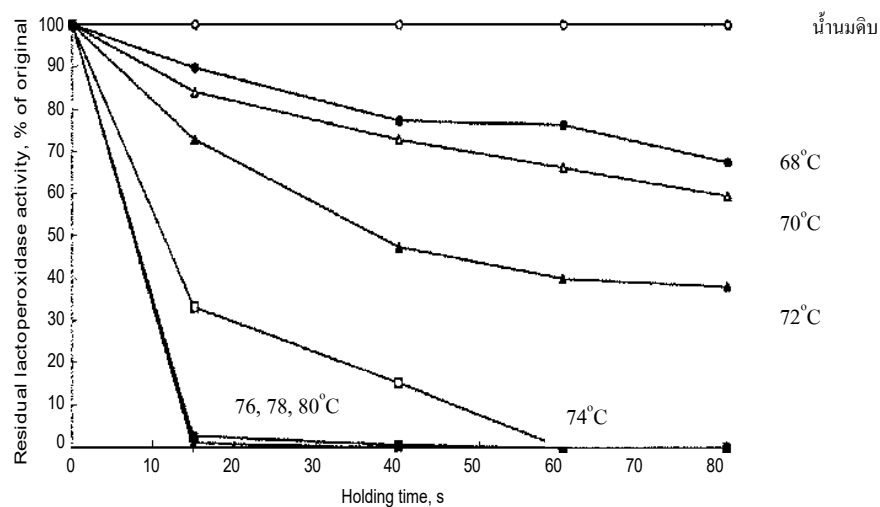
IX 1 อะตอม หรือเท่ากับ 0.07% และคาร์โบไฮเดรต 10% ทั้งนี้ ใน 1 โมเลกุลของเอนไซม์แลคโตเพอร์ออกซิเดส มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 78 kDa ค่า Isoelectric point เท่ากับ 9.6 (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 คุณสมบัติของเอนไซม์แลคโตเพอร์ออกซิเดสในน้ำนมโค

คุณลักษณะต่างๆ	ชนิดและปริมาณ
Molecular weight	78,431 Da
Amino acid residues	612
Half cystine residues	15
Carbohydrate content	10%
Iron content	0.07%
Prosthetic group	Heam: protoporphyrin IX
Iso-electric point	9.6
Secondary structure	23% α , 65% β , 12% unordered
Absorptivity $E_{412\text{ nm}}$	$112.3\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$
Absorptivity 280 nm	14.9-15.0, 1%, 1 cm
Redox potential E_m	-191 mV

ที่มา: Kussendrager and Van Hooijdonk (2000)

เนื่องจากเอนไซม์แลคโตเพอร์ออกซิเดสทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันไฮโดรไฮยานเตและไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ทำให้ได้ไฮโปไฮโดรไฮยานเตที่ออกฤทธิ์ทำลายเชื้อโรคในน้ำนมได้ Kussendrager and Van Hooijdonk (2000) พบว่า pH และอุณหภูมิของน้ำนมมีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์นี้ โดย pH ที่เหมาะสำหรับการเกิดปฏิกิริยามากที่สุด คือ 6.7 แต่ไม่สามารถทำปฏิกิริยาที่ pH สูงกว่า 10 และเอนไซม์จะเสื่อมสภาพได้ที่ pH ต่ำกว่า 4 และเมื่อพิจารณาอิทธิพลของอุณหภูมิระหว่าง 68°C - 80°C ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์จะลดลงเมื่อเวลาทำการทดสอบนานขึ้นจาก 15, 40, 60 และ 80 วินาที (Barrett et al., 1999) ดังแสดงในรูปที่ 1 พบว่า ที่ 72°C ค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงเหลือเพียง 70% ภายใน 15 วินาที และเมื่อเวลาผ่านไป 80 วินาที ค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงเหลือเพียง 40% ที่ 80°C ไม่สามารถตรวจพบค่ากิจกรรมของเอนไซม์เลย ในขณะที่ Walstra et al. (1999) รายงานว่า เอนไซม์แลคโตเพอร์ออกซิเดสทนต่ออุณหภูมิการพาสเจอร์ไรส์ที่ 63°C นาน 30 นาที หรือ 72°C นาน 15 วินาที และถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิ 80°C นาน 2.5 วินาที

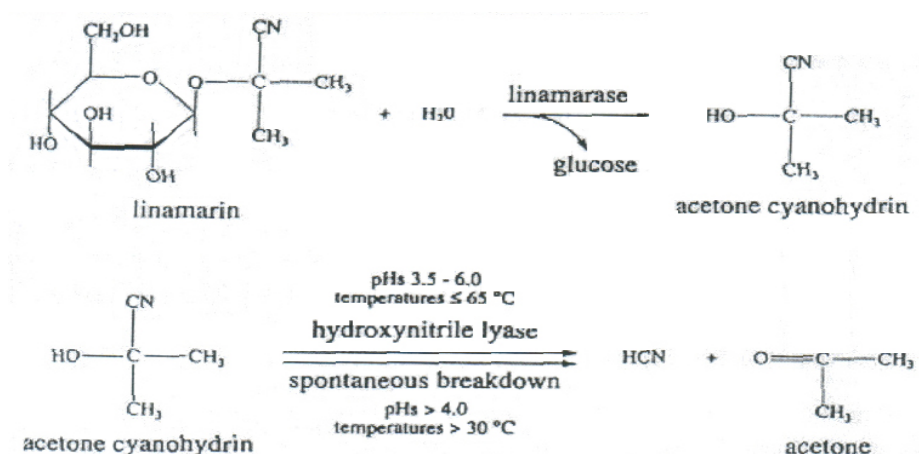


รูปที่ 1 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคโตเพอร์ออกซิเดสที่เวลาต่างๆของน้ำนมดิบ และ น้ำนมที่ต้มที่อุณหภูมิต่างกัน

ที่มา : Barrett et al., 1999

1.2 ไธโอไซยาเนต (Thiocyanate, SCN^-)

สารตั้งต้นของไธโอไซยาเนต คือ สารไซยาโนจีนิก กลูโคไซด์ (Cyanogenic glucoside) ที่มีอยู่ในพืชอาหารสัตว์บางชนิด เช่น มันสำปะหลัง ผือก หญ้าซอร์กัม ฝั่ แอปเปิ้ล เป็นต้น (Haque and Bradbury, 2002; Okafor, 2004) ซึ่ง ไซยาโนจีนิก กลูโคไซด์ ในพืช มีอยู่ 2 ชนิด คือ ลินามาริน (Linamarin) มีปริมาณมากถึง 95% และโลทอสตราลิน (Lotaustralin) มีอยู่เพียง 5% เมื่อแมคอกินพืชที่มีไซยาโนจีนิก กลูโคไซด์ เช่น ใบมันสำปะหลังเข้าไป เซลล์เนื้อเยื่อพืชจะถูกทำลายในระหว่างบดเคี้ยว และปลดปล่อยลินามารินออกมา จากนั้นเอนไซม์ลินามาเรส (Linamarase) ที่ผนังเซลล์ของพืชจะไฮโดรไลซ์ (Hydrolyze) ลินามาริน ได้กลูโคส และอะซิโตน ไธยาโนไฮดริน (Acetone cyanohydrin) ซึ่งไม่เสถียร และสลายเป็นอะซิโตน และกรดไฮโดรไซยานิก (HCN) ที่มีความเป็นพิษสูง (White et al., 1998) (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 การสังเคราะห์ไซยาไนด์จากลินามาริน

ที่มา: Ruffle (1998)

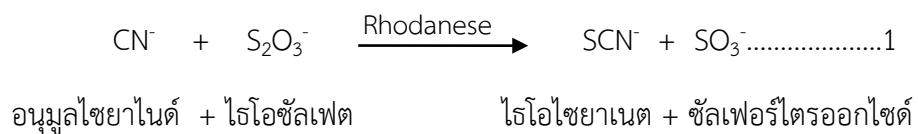
กรดไฮโดรไซยานิกจะแตกตัวให้อนุมูลไซยาไนด์ (CN⁻) ซึ่งยังคงมีความเป็นพิษสูง ในสัตว์เคี้ยวเอื้องจะได้รับพิษไซยาไนด์ได้เร็วกว่าสัตว์กระเพาะเดี่ยว เนื่องจากเอนไซม์ของจุลินทรีย์ในรูเมน และเอนไซม์ของพืชที่โคกินเข้าไป จะเร่งปฏิกิริยาการสลาย ไซยาโนจินิก ไกลโคไซด์ เกิดเป็นไซยาไนด์ และถูกดูดซึมได้อย่างรวดเร็ว ถ้าได้รับพิษในปริมาณมาก จะเกิดอาการเกร็ง กล้ามเนื้อหดตัวอย่างรุนแรง เจ็บปวด และตายภายในไม่กี่นาที ถ้าได้รับปริมาณน้อย จะค่อย ๆ แสดงอาการ เริ่มจากน้ำลายเป็นฟองตามมุมปาก อัตราการหายใจเร็วขึ้น ชีพจรเต้นเร็ว และอ่อนลง กล้ามเนื้อชักกระตุก และอาจตาย โดยจะมีการเกร็งก่อนตาย ระดับความเป็นพิษของไซยาไนด์ที่ทำให้โค และแกะตาย (Lethal dose) มีค่าเท่ากับ 2 mg/kg (bw) (Majak and Cheng, 1984) ส่วนระดับความเป็นพิษของไซยาไนด์ที่ทำให้สัตว์ทดลองชนิดต่างๆตาย 50% (LD₅₀) ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ระดับความเป็นพิษของไซยาไนด์ที่ทำให้สัตว์ทดลองตาย 50% (LD₅₀)

ชนิด	ช่องทางได้รับ	LD ₅₀ (mg/kg)	Adjusted LD (as CN)
แกะ	oral	4	15 mg/m ³
หนู Rat	oral	6.44	22 mg/m ³
หนู	oral	8	30 mg/m ³
สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม	oral	15	56 mg/m ³

ที่มา: <http://www.cdc.gov/niosh/idlh/cyanides.html>

เมื่อสารพิษไซยาไนด์เข้าสู่ร่างกาย ประมาณ 80% ของอนุมูลไซยาไนด์ (CN⁻) ทั้งหมด จะถูก ดูดซึมเข้าสู่กระแสโลหิต (Semionova and Fishbien, 2004) ความเป็นพิษจะถูกทำให้ลดลง โดยรวมกับไธโอซิสเตอีน (Thiocysteine, NO₂S₂⁻) หรือไธโอซัลเฟต (Thiosulphate, S₂O₃⁻) ที่แตกตัวจากกรดอะมิโนชนิดเมทไธโอนีนและซิสทีนที่มีอยู่ในอาหารที่กินเข้าไป โดยมีเอนไซม์โรดานีส (Rhodanese) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้สารไธโอไซยาเนตที่มีพิษลดน้อยลง (Montgomery, 1980; Bradbury and Holloway, 1988) ดังสมการที่ 1



ซึ่งปฏิกิริยานี้ เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อทุกชนิดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยเฉพาะในตับ ไต ต่อมหมวกไต ต่อมไทรอยด์ และตับอ่อน ทั้งนี้ปริมาณของไธโอไซยาเนตทั้งหมดจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับ ปริมาณของสารพิษไซยาไนด์ที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ของไซยาโนจินิก กลูโคไซด์ ในพืชที่สัตว์กินเข้าไป ไธโอไซยาเนตนี้พบกระจายอยู่ในเนื้อเยื่อสัตว์ ในซีรัม และสารคัดหลั่งต่างๆ และจะถูกขับออกทาง ปัสสาวะเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งอัตราการขับไธโอไซยาเนตออกจากร่างกายจะเพิ่มขึ้น ถ้าในเลือดมีความเข้มข้นของสารนี้เพิ่มขึ้น (Reiter and Harnulv, 1984) นอกจากนี้ สามารถตรวจพบไธโอไซยาเนตจากน้ำนม น้ำลาย น้ำตา ปัสสาวะ และน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร รวมทั้งของเหลวบริเวณเยื่อบุผิวของระบบทางเดินหายใจ (Ratner and Prince, 2000) ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในสารคัดหลั่งต่างๆ ของคนและโค

ชนิดสัตว์	ชนิดสารคัดหลั่ง	ปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (ppm)
คน	ซีรัม, ผู้ใหญ่	1.9 - 8.4
	น้ำลาย, ผู้ใหญ่	37 - 198
	น้ำลาย, ทารก	15 - 22
	น้ำย่อยในกระเพาะอาหาร, ผู้ใหญ่	22 - 64
	น้ำย่อยในกระเพาะอาหาร, ทารก	6.4
	น้ำตา	10.0
	ปัสสาวะ	14 - 39
	นม น้ำเหลือง	5.0
	น้ำนม	2.9
โค	ซีรัม	1.2 - 16.2
	น้ำนม	1.2 - 15.1

ที่มา: Kussendrager and Van Hooijdonk (2000)

ส่วน Yong et al. (2017) รายงานปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ตรวจพบในน้ำนมโคเท่ากับ 0.10-16.20 ppm ทั้งนี้ ปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในน้ำนมจะขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณพืชอาหารสัตว์ที่มีสารไซยาโนเจนิก กลูโคไซด์ ที่สัตว์กินเข้าไป ชนิดของสัตว์ พันธุ์สัตว์และระยะเวลาให้นม และฤดูกาลของแต่ละปี (Thomas, 1981; Zapico et al., 1991; Dabur et al., 1996; De Wit and Van Hooijdonk, 1996)

1.3 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide, H_2O_2)

เป็นสารออกซิแดนท์ที่สำคัญต่อระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดส พบได้น้อยในเซลล์ เนื้อเยื่อ และสารคัดหลั่งต่างๆ จะพบเพียงเล็กน้อยในน้ำนมดิบคุณภาพดีที่รีดเสร็จใหม่ๆ เท่านั้น ทั้งนี้ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในน้ำนมดิบ มีที่มาจากสามแหล่ง ดังนี้

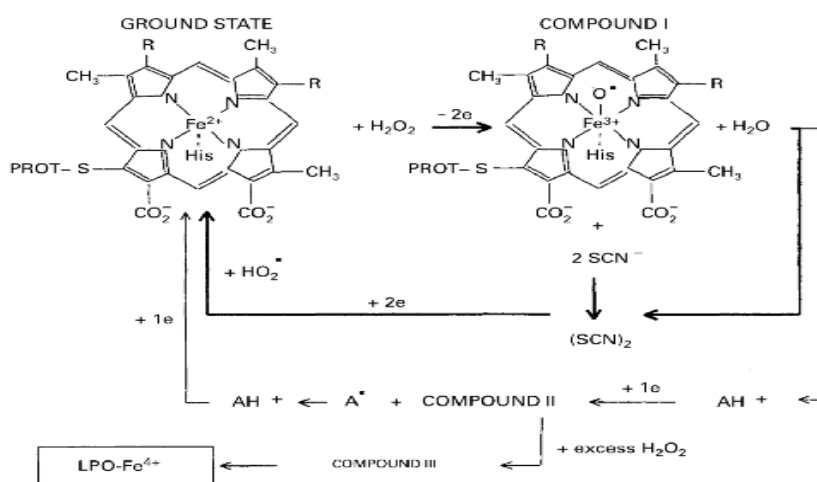
1. จากภายในร่างกาย โดยกลไกทางสรีรวิทยาหรือระบบต่างๆ ของร่างกาย ที่เรียกว่า H_2O_2 generator systems ทำให้ได้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ได้แก่

1.1 การเมตาโบไลต์กรดนิวคลีอิกชนิดพิวรีนโดยเอนไซม์ Xanthine oxidase (XOD) ซึ่งเป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่พบมากในน้ำนม (Fried et al., 1973)

1.2 การเกิดออกซิเดชันกรดนิวคลีอิกชนิดไพรีนโดยเอนไซม์ Peroxidase (Wolfson and Sumner, 1993)

- 1.3 การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ Ascorbic acid
- 1.4 การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของน้ำตาลกลูโคสโดยเอนไซม์ Glucose oxidase
2. จากสิ่งเร้าภายนอกที่เข้าสู่ร่างกาย
 - 2.1 จากกระบวนการฟาโกไซโตซิส (Phagocytosis) ของ Polymorphonuclear leukocytes (Korhonen and Reiter, 1983; De Wit and Van Hooijdonk, 1996)
 - 2.2 การเจริญของเชื้อแบคทีเรียบางชนิด เช่น Lactobacilli, Lactococci และ Streptococci ในสภาวะที่มีออกซิเจน (Pruitt et al., 1990; Reiter and Perraudin, 1991)
3. จากการเติมสารเคมีที่สามารถแตกตัวให้ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ เช่น Sodium percarbonate, Magnesium peroxide (Kussendrager and Van Hooijdonk, 2000)

กลไกการทำงานของระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดส

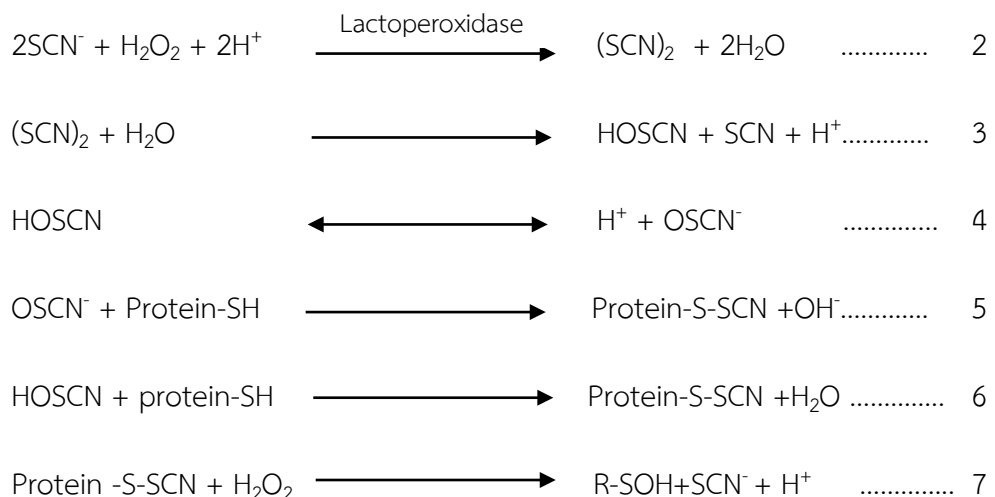


รูปที่ 3 Pathways in the lactoperoxidase – catalyzed reaction mechanism
ที่มา : Kussendrager and Van Hooijdonk (2000)

กลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดสถูกรายงานเป็นครั้งแรกโดย Hanssen (1924) โดยกลไกการทำงานของระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดส เริ่มต้นจากการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของเอนไซม์แลคโตเพอร์ออกซิเดส (รูปที่ 3) จากสภาวะพัก (Resting LP) ที่อยู่ในรูปของ Ground stage กลายเป็นสภาวะที่ถูกกระตุ้น (Active LP) ในรูป Compound I โดยการสูญเสียอิเล็กตรอนที่มีประจุลบออกไปให้ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ โดยปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นตลอดเวลาเพื่อให้ได้ปริมาณ Compound I เพิ่มขึ้น จากนั้น จะเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องสองช่องทาง ช่องทางที่หนึ่ง หากในปฏิกิริยามีไฮโอไซยานตปริมาณเพียงพอ Compound I จะออกซิ

ไดสไธโอไซยาเนต (SCN^-) โดยการรับอิเล็กตรอนเข้ามาและเปลี่ยนกลับไปเป็น Ground stage อย่างช้าๆ พร้อมกับ SCN^- จะถูกออกซิไดส์เปลี่ยนเป็น SCN และ Ground stage จะถูกรีดิวส์ กลับเป็น Compound I ส่วนช่องทางที่สองนั้น หากในปฏิกิริยามีไฮโอไซยาเนตปริมาณน้อย ($<3 \mu\text{M}$) Compound I จะรับหนึ่งอิเล็กตรอนจากโปรตีนหรือเปปไทด์อื่นๆ เปลี่ยนเป็น Compound II และถูกรีดิวส์ต่อเนื่องกลายเป็น Ground stage อย่างช้าๆ แต่ถ้าในปฏิกิริยามีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์มากพอ ($>0.5 \text{ mM}$) Compound II จะทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์กลายเป็น Compound III และในที่สุดเปลี่ยนเป็น Ferrylperoxidase (LPO-Fe^{4+})

เมื่อ SCN^- ถูกออกซิไดส์ให้เปลี่ยนเป็น SCN ดังรูปที่ 3 และสมการที่ 2 แล้วเพื่อให้ได้ไฮโปไธโอไซยาเนตที่ออกฤทธิ์ยับยั้งหรือทำลายเชื้อโรคแบบไม่จำเพาะนั้น SCN จะทำปฏิกิริยากับน้ำได้กรดไฮโปไธโอไซยานัส (HOSCN) ดังสมการที่ 3 จากนั้นกรดไฮโปไธโอไซยานัส จะแตกตัวกลายเป็นไฮโปไธโอไซยาเนต (OSCN^-) ดังสมการที่ 4 ทั้งนี้ ปฏิกิริยาดังกล่าวจะเสถียรที่สภาวะความเป็นกรด ($\text{pH} = 5.3$) ซึ่งกรดไฮโปไธโอไซยานัสและไฮโปไธโอไซยาเนตทั้งสองชนิดนี้จะออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยเฉพาะกรดไฮโปไธโอไซยานัสจะมีฤทธิ์ทำลายเชื้อแบคทีเรียที่แรงกว่า ส่วนไฮโปไธโอไซยาเนตจะมีความเสถียรและทนความร้อนดีกว่า จึงทำให้ไฮโปไธโอไซยาเนตเป็นสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ยับยั้งหรือทำลายเชื้อโรคแบบไม่จำเพาะของระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดส ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อความเสถียรของไฮโปไธโอไซยาเนต ได้แก่ สภาวะกรดและด่างของปฏิกิริยา แสงสว่าง อีออนของโลหะหนัก (เหล็ก นิเกิล มังกานีส เป็นต้น) (Thomas, 1985)



จากสมการที่ 5 และ 6 กรดไฮโปไธโอไซยานัส (HOSCN) และไฮโปไธโอไซยาเนต (OSCN^-) จะไปทำปฏิกิริยาออกซิไดส์อย่างจำเพาะกับหมู่ Sulphydryl (SH) ของโปรตีนหรือเอนไซม์ ให้เปลี่ยนเป็น disulphides โดยทั่วไปโปรตีนในน้ำนมมีหมู่ Sulphydryl น้อย แต่จะพบหมู่

Sulphydryl ในเซลล์แบคทีเรียเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรีย ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ แบคทีเรียสูญเสียความสามารถในการลำเลียงกลูโคส ทำให้ไม่สามารถแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวนได้ ปฏิริยาออกซิไดซ์ดังกล่าวจึงมีผลกระทบต่อเชื้อแบคทีเรียโดยตรง ทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญ การใช้ออกซิเจน และการสร้างกรดแลคติกของแบคทีเรีย ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Hexokinase glyceraldehyde-3P-dehydrogenase นอกจากนี้ยังเป็นอันตรายต่อโครงสร้างของไซโตพลาสซึมเมมเบรน ทำให้โปแตสเซียม กรดอะมิโน และโพลีเปปไทด์ (Polypeptide) รั่วออกจากเซลล์ และการใช้กลูโคส พิวรีน (Purine) ไพริมิดีน (Pyrimidine) และกรดอะมิโนในการสังเคราะห์โปรตีน DNA และ RNA ถูกยับยั้งด้วย (Wolfson and Sumner, 1993) Ratner and Prince (2000) รายงานว่าระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดสสามารถยับยั้งกระบวนการไกลโคไลซิส (Glycolysis) เช่น ปฏิริยาของ Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)/Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) ในแบคทีเรียได้ หลังจากนั้น Protein -S-SCN จะถูกไฮโดรไลต์ได้ไฮโอไซยานตมากกว่าที่จะเป็นไฮโปไฮโอไซยานต ดังสมการที่ 7 ส่วนไฮโปไฮโอไซยานตนั้นจะถูกออกซิไดส์ต่อไปเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย เช่น ซัลเฟต คาร์บอนไดออกไซด์ และแอมโมเนีย หรือถูกรีดิวซ์กลับไปเป็นไฮโอไซยานต ทั้งนี้มีรายงานผลของระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดสในน้ำนม ยับยั้งหรือทำลายเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดที่ปนเปื้อนในน้ำนมได้ (Seifu et al., 2005) จึงเท่ากับว่าระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดสช่วยรักษาน้ำนมดิบให้คงคุณภาพได้นานขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ประสิทธิภาพของระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดสในการรักษาคุณภาพน้ำนมดิบที่อุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิ (°C)	เวลา (ชั่วโมง)
31 - 35	4 - 7
30	7 - 8
25	11 - 12
20	16 - 17
15	24 - 26
4	5 - 6 วัน

ที่มา: FAO corporate document repository (2005)

บทที่ 2

การเพิ่มประสิทธิภาพของระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดสในนํ้านมดิบ

นํ้านม นอกจากจะเป็นอาหารที่อุดมไปด้วยคุณค่าทางโภชนาการสำหรับมนุษย์แล้ว ยังมีสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ หลายชนิด ในธุรกิจการซื้อขายนํ้านมดิบ จึงต้องมีการตรวจสอบคุณภาพของนํ้านมดิบก่อนการรับซื้อ เพื่อกำหนดราคาซื้อขาย ทั้งนี้ผู้ประกอบการทุกฝ่ายที่เกี่ยวข้อง ตั้งแต่เกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมซึ่งเป็นผู้ผลิตนํ้านมดิบ เจ้าหน้าที่สหกรณ์หรือศูนย์รับนํ้านมดิบที่ทำหน้าที่เป็นตัวกลางรวบรวมนํ้านมดิบจากสมาชิกเกษตรกรรายย่อย และบริษัทผู้ผลิตผลิตภัณฑ์นมชนิดต่างๆ ที่รับซื้อนํ้านมดิบจากศูนย์รวบรวมนํ้านมดิบต่างๆ ที่กระจายอยู่ทั่วประเทศมาแปรรูป จะต้องคำนึงถึงคุณภาพของนํ้านมดิบ และความสะดวกของกระบวนการผลิต เพราะการปนเปื้อนของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ในนํ้านมดิบนั้น สามารถเกิดขึ้นได้ในทุกขั้นตอนของกระบวนการผลิตตั้งแต่ภายในฟาร์มโคนม ศูนย์รวบรวมนํ้านมดิบ และโรงงานแปรรูป โดยทั่วไปสามารถแบ่งกลุ่มแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในนํ้านมดิบออกได้เป็นสามกลุ่มใหญ่ๆ ตามอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญดังนี้

1. Mesophilic bacteria เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีในอุณหภูมิ 30 - 40°C ไม่สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิในท้องเย็น เช่น Streptococci, Micrococci

2. Psychrotrophic bacteria เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีในอุณหภูมิ 20 - 30°C แต่สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิต่ำกว่า 7°C บางชนิดเจริญได้ในอุณหภูมิ 0°C เช่น *Pseudomonas* spp. (Cousin, 1982), *Enterobacter* spp., *Bacillus cereus* (Heddeghem and Vlaemynck, 1992) เป็นต้น

3. Thermophilic bacteria เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ในอุณหภูมิระหว่าง 55 - 65°C เช่น *Bacillus* และ *Lactobacillus* เป็นต้น นอกจากนี้มีแบคทีเรียบางชนิดที่สามารถทนความร้อนสูงสามารถรอดชีวิตได้ที่อุณหภูมิการพาสเจอร์ไรส์ คือ 60 - 80°C

ดังนั้น หากในนํ้านมดิบมีการปนเปื้อนแบคทีเรียต่างๆ เหล่านี้ในระหว่างการผลิตขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่ง ได้แก่ การปนเปื้อนที่ฟาร์มในช่วงระหว่างหรือภายหลังจากการรีดนม ระหว่างการขนส่งไปยังศูนย์รับนํ้านมซึ่งอยู่ในสภาวะอุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน หรือระหว่างเก็บรักษาในถังทำความเย็นที่ศูนย์รวบรวมนํ้านมดิบ เป็นต้น จะทำให้คุณภาพนํ้านมดิบลดลง ซึ่งมีคำแนะนำทั่วไปที่ให้แก่เกษตรกรปฏิบัติเพื่อการควบคุมหรือรักษานํ้านมดิบให้คงคุณภาพได้นานขึ้น ได้แก่ การจัดการฟาร์มที่ดี การจัดการรีดนมที่ถูกสุขลักษณะ ไม่นำนํ้านมดิบจากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบผสมลงไปในถังนมรวมฟาร์ม อุปกรณ์รีดนมและภาชนะบรรจุนํ้านมดิบต้องสะอาด และต้องรีบนำไปจำหน่ายที่ศูนย์

รวบรวมนมโดยเร็ว เป็นต้น ซึ่งบางครั้งเกษตรกรเองไม่สามารถปฏิบัติตามคำแนะนำดังกล่าวได้ ทำให้น้ำนมดิบที่ผลิตได้มีคุณภาพไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน และทำให้เกิดการปฏิเสธการรับซื้อน้ำนมดิบขึ้น ซึ่งนับเป็นความสูญเสียทางเศรษฐกิจ ทำให้เกษตรกรขาดรายได้ และเกิดความไม่เข้าใจกันระหว่างผู้ผลิตและผู้รับซื้อ และในบางโอกาส ปัญหาดังกล่าวอาจจะลุกลามจนกลายเป็นปัญหาระดับชาติได้

ปริมาณเอนไซม์แลคโตเพอร์ออกซิเดสและไลโอไซยานตในน้ำนมดิบ

เนื่องจากสารอาหารต่างๆในน้ำมนั้น นอกจากจะมีคุณค่าต่อร่างกายแล้ว ยังเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดีสำหรับเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ในน้ำนมจึงมีกลไกการป้องกันตัวที่สามารถยับยั้งหรือทำลายเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้ได้ โดยเฉพาะระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดส ซึ่งประกอบด้วย เอนไซม์แลคโตเพอร์ออกซิเดส ไลโอไซยานต และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ปริมาณเอนไซม์แลคโตเพอร์ออกซิเดสที่เพียงพอต่อปฏิกริยาการยับยั้งต่อต้านแบคทีเรียในน้ำนม คือ 1.44 U/mL (Marshall et al., 1986) และปริมาณไลโอไซยานตในน้ำนมโคดิบตามธรรมชาติจะมีอยู่ประมาณ 1 – 10 ppm (Wood, 1975) จากการศึกษาของ Fonteh et al. (2002) พบว่าเอนไซม์แลคโตเพอร์ออกซิเดสในน้ำนมดิบมีปริมาณ 0.05 – 5.60 U/mL ส่วนปริมาณไลโอไซยานตนั้นมีปริมาณ 6.0 – 10.2 µg/mL

การเพิ่มประสิทธิภาพของระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดส มี 2 วิธี ได้แก่

1. โดยการเติมสารเคมีลงในน้ำนมดิบ

เนื่องจากระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดสประกอบด้วยสารสำคัญสามชนิด ได้แก่ เอนไซม์แลคโตเพอร์ออกซิเดส ไลโอไซยานต และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ซึ่งสารทั้งสามชนิดนี้จะทำปฏิกริยากันได้ สารไฮโปไลโอไซยานต ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งหรือทำลายแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำนม ดังนั้น ในการประชุม Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additive (JECFA) ครั้งที่ 35 ปี 1989 และ Codex Alimentarius Commission ปี 1991 อนุญาตให้ประเทศที่ไม่มีระบบทำความเย็นในการเก็บรักษาน้ำนมดิบ กระตุ้นการทำงานของระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดสในการรักษาคุณภาพน้ำนมดิบด้วยวิธีการเติมสารเคมีลงไป โดยเติมโซเดียมไลโอไซยานตในรูปผง ปริมาณ 10 ppm ลงในน้ำนมดิบเพื่อเพิ่มปริมาณไลโอไซยานตให้อยู่ในระดับ 15 ppm ผสมให้เข้ากันประมาณ 30 วินาที จากนั้นเติมไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ในรูปของโซเดียมคาร์บอเนตเพอร์ออกไซด์ไฮเดรต (Sodium carbonate peroxyhydrate) ปริมาณ 8.5 ppm ซึ่งสามารถยืดอายุการเก็บรักษาน้ำนมดิบได้นานถึง 6 ชั่วโมงโดยไม่ต้องทำความเย็น (Lambert, 2001) และได้มีการศึกษาวิจัยในหลายๆ ประเทศให้ได้ข้อมูลเพิ่มเติมเพื่อนำระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดสไปใช้ประโยชน์ เช่น บราซิล (Silva et al., 2020) ซูดาน (Haddadin et al., 1996; El Zubeir et al., 2010) แคมเอรูน (Asaah et al., 2007)

2. โดยการใช้ไขมันสำปะหลังแห้งเป็นอาหารโคนม

ตามมาตรฐานสินค้าเกษตรสำหรับการปฏิบัติที่ดีสำหรับศูนย์รวบรวมนํ้านมดิบเป็นมาตรฐานบังคับ พ.ศ. 2560 กำหนดว่า นํ้านมดิบ หมายถึง นํ้านมที่รีดจากแม่โคหลังคลอดลูกแล้วไม่น้อยกว่า 3 วัน และต้องปราศจากนํ้านมเหลือง โดยมีได้แยกออกหรือเติมวัตถุอื่นใด และไม่ผ่านกรรมวิธีใดๆ ยกเว้นการทำให้เย็น (มกอช, 2560) ดังนั้น เกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมจึงไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดสโดยการเติมสารเคมีลงในนํ้านมดิบเพื่อรักษาคุณภาพตามคำแนะนำของ JECFA ได้ อย่างไรก็ตาม ยังมีแนวทางการกระตุ้นการทำงานของระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดสได้อีกวิธีหนึ่ง คือ การทำให้ปริมาณของไฮโดรไฮยานเตในนํ้านมเพิ่มขึ้น ซึ่งสามารถทำได้โดยการให้แม่โครีดนมกินพืชอาหารสัตว์ที่มีสารไฮยานโนนิก กรูโคไซด์ เพิ่มมากขึ้น เพราะเมื่อสัตว์กินพืชที่มีสารพิษนี้เข้าไปประมาณ 80% ของอนุมูลไฮยานโนนิกทั้งหมด จะเกิดปฏิกิริยาการรวมตัวของอนุมูลไฮยานโนนิกกับหมู่ไฮดรอกซิลเพื่อยลดความเป็นพิษของสารดังกล่าวลง กลายเป็นสารไฮโดรไฮยานเต (Montgomery, 1980; Bradbury and Holloway, 1988) Wanapat et al. (2000) ทดลองใช้ไขมันสำปะหลังตากแห้งหรือมันเฮย์เสริมทดแทนอาหารข้นในแม่โครีดนม พบว่า การเสริมมันเฮย์ให้แม่โคกินวันละ 1 และ 1.7 kg/d ปริมาณไฮโดรไฮยานเตในนํ้านมเพิ่มขึ้นจากปกติ 5.3 ppm เป็น 13.3 และ 17.8 ppm ส่วนสุรียรรณ และคณะ (2549 ก) ได้รายงานการเสริมมันเฮย์ให้แม่โคกินวันละ 0, 1, 2 และ 3 kg/d ตรวจพบปริมาณไฮโดรไฮยานเตในนํ้านมดิบเพิ่มขึ้นเท่ากับ 6.99 ± 0.33 , 13.57 ± 0.23 , 14.89 ± 0.23 และ 15.90 ± 0.12 ppm และปริมาณแลคโตเพอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้นเท่ากับ 10.56 ± 0.21 , 10.93 ± 0.29 , 11.31 ± 0.31 และ 11.56 ± 0.33 U/mL ตามลำดับ

ทั้งนี้ ได้มีการนำระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดสไปใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์หลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลของการนำระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดสไปใช้ประโยชน์

ผลิตภัณฑ์	แหล่ง LPS	ประโยชน์ที่ได้รับ
นํ้านมดิบ	ธรรมชาติ	เก็บที่ 4°C ได้นาน 4 วัน
นํ้านมดิบ	เติม SCN/H ₂ O ₂	เก็บที่ 10°C ได้นาน 3 วัน
นมพาสเจอร์ไรซ์	เติม SCN/H ₂ O ₂	เก็บที่ 10°C ได้นาน 21 วัน
ชีส	เติม SCN/H ₂ O ₂	เก็บที่ 4-7°C ได้นาน 8 วัน
โยเกิร์ต	ธรรมชาติ	เก็บที่ 20°C ได้นาน 14 วัน
อิมัลชัน	เติม LP/KI/GO	เก็บที่ 20°C ได้นาน 14 วัน
เครื่องสำอาง	เติม LP/KI/SCN/GO	เก็บได้นาน 2 - 4 เดือน
ยาสีฟัน	เติม LP/SCN/LYS/GO	ใช้ได้ทุกวัน
ยาหยอดตา	เติม LP/KI/SCN/GO	เก็บได้นาน 1 สัปดาห์

GO: glucose oxidase, H₂O₂: hydrogen peroxide, KI: potassium iodide, LP:

enzyme lactoperoxidase, LPS: lactoperoxidase system, LYS: lysozyme

ที่มา: De Wit and Van Hooydonk, 1996

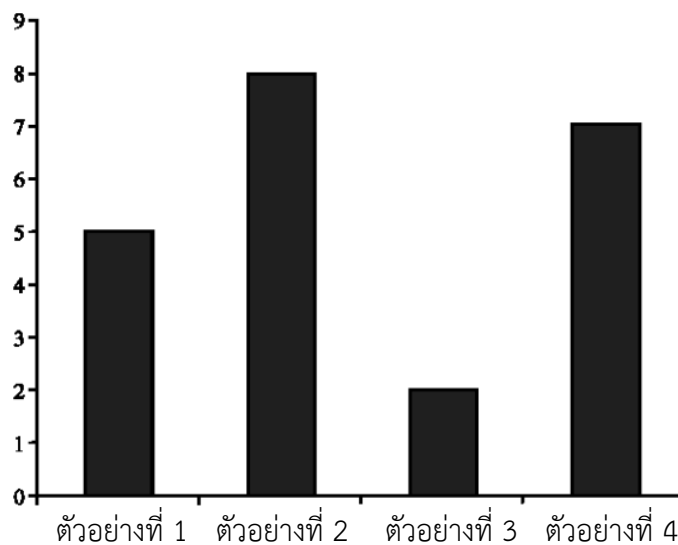
ผลของการเพิ่มประสิทธิภาพระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดสต่อคุณภาพนํ้านมดิบทางจุลชีววิทยา

เนื่องจากนํ้านมมีสารอาหารต่างๆที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้นํ้านมดิบเสื่อมคุณภาพได้ง่าย การเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดสจึงเป็นแนวทางหนึ่งในการรักษาคุณภาพนํ้านมดิบ จากการศึกษาเปรียบเทียบของ สุรีย์วรรณ และคณะ (2549 ข) ในนํ้านมดิบที่มีปริมาณไฮโดรไฮยาเนตต่างกันคือ 0, 5, 10 และ 15 ppm พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปในช่วงเวลาที่ 8 และ 10 ในนํ้านมดิบที่มีไฮโดรไฮยาเนต 10 และ 15 ppm จะมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด จำนวนโคไลฟอร์ม เชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในอุณหภูมิต่ำกว่า 7°C (Psychrotroph) เชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีในอุณหภูมิ 30 - 40°C (Mesophilic) และเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในอุณหภูมิระหว่าง 55 - 65°C (Thermophilic) มีจำนวนน้อยกว่านํ้านมดิบที่มีปริมาณไฮโดรไฮยาเนต 0 และ 5 ppm แสดงให้เห็นว่า การกระตุ้นระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดสสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนอยู่ในนํ้านมดิบได้

นอกจากนี้ Katekan et al. (2008) ได้รายงานประสิทธิภาพของการกระตุ้นระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดสในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ที่ปนเปื้อนในนํ้านมดิบ โดยการเติมโซเดียมไฮโดรไฮยาเนต 40 mg/L เพื่อเพิ่มปริมาณไฮโดรไฮยาเนต และโซเดียมเปอร์คาร์บอเนต 30 mg/L เพื่อเพิ่มปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ลงไปในนํ้านมดิบ พบว่า ระบบแลคโตเพอร์ออกซิ

เดสสามารถยืดอายุการเก็บรักษาน้ำนมดิบปกติได้นานขึ้น เมื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบในน้ำนมดิบที่เติมเชื้อ *E. coli* ลงไป พบว่า น้ำนมดิบที่กระตุ้นระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดสมีจำนวนแบคทีเรียลดลง 87% ยังสามารถคงคุณภาพได้นานกว่าน้ำนมดิบปกติที่เติมเชื้อ *E. coli* ดังแสดงในรูปที่ 4

คุณภาพน้ำนมดิบที่เวลา
(ชั่วโมง)



รูปที่ 4 เปรียบเทียบคุณภาพน้ำนมดิบที่ได้รับและไม่ได้กระตุ้นระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดสที่เวลา (ชั่วโมง) ขณะเก็บรักษาที่ 37°C

ตัวอย่างที่ 1 คือ น้ำนมดิบปกติ

ตัวอย่างที่ 2 คือ น้ำนมดิบที่กระตุ้นระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดส

ตัวอย่างที่ 3 คือ น้ำนมดิบที่เติมเชื้อ *E. coli*

ตัวอย่างที่ 4 คือ น้ำนมดิบที่เติมเชื้อ *E. coli* และกระตุ้นระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดส

ผลของการเพิ่มประสิทธิภาพระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดสต่อปริมาณโซมาติกเซลล์

จากการศึกษาการกระตุ้นระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดสโดยการเพิ่มปริมาณไฮโดรไฮยานเนตในน้ำนมดิบ พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนได้ และระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดสนั้นสามารถพบได้ในน้ำนม จึงมีการศึกษาต่อเนื่องถึงผลของการกระตุ้นระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดสต่อโรคเต้านมอักเสบที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อโรคเข้าไปในเต้านม โดยการใช้ปริมาณโซมาติกเซลล์หรือเม็ดเลือดขาวในน้ำนมเป็นดัชนีบ่งชี้ โดยนำไขมันสำปะหลังแปรรูปแห้งมาเสริมให้แม่โครีดนมกินในปริมาณต่างๆ กัน และติดตามจำนวนเม็ดเลือดขาวในน้ำนม ผลปรากฏว่าแม่โคที่ได้รับอาหารเสริม

ไขมันสำหรับหลังแห้งต่อเนื่องติดต่อกันทุก 4 เดือน จะมีจำนวนโซมาติกเซลล์น้อยกว่ากลุ่มที่ไม่ได้กิน (สุริยวรรณ และคณะ, 2549 ข) ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 จำนวนโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบ ($\times 10^3$ เซลล์/มล.)

กลุ่มแม่โครีดนม	เดือนที่ 1	เดือนที่ 2	เดือนที่ 3	เดือนที่ 4
กลุ่มควบคุม	259.25	629.00	452.75	334.50
เสริมไขมันแห้ง 1 กก./วัน	255.25	144.00	165.75	130.25
เสริมไขมันแห้ง 2 กก./วัน	214.75	117.75	123.00	121.75
เสริมไขมันแห้ง 3 กก./วัน	279.25	275.00	236.00	171.50

ผลของการเพิ่มประสิทธิภาพระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดสต่อความถูกต้องของการตรวจยา

ปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมดิบโดยชุดทดสอบ

เนื่องจากน้ำนมเป็นสารอาหารที่มีคุณค่าประโยชน์ นอกจากจะต้องได้จากแม่โคที่มีสุขภาพดี กระบวนการผลิตและขั้นตอนต่างๆ ตั้งแต่การรีดน้ำนมดิบจนถึงการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์นมต้องมีมาตรฐานแล้ว ยังจำเป็นต้องผ่านการตรวจสอบความปลอดภัยของอาหารอย่างเข้มงวดเช่นกัน ตั้งแต่ น้ำนมดิบจนถึงผลิตภัณฑ์นม เช่น การตรวจองค์ประกอบน้ำนม การปลอมปนน้ำ จำนวนและชนิดของจุลินทรีย์ จำนวนเซลล์โซมาติก รวมทั้งสารตกค้างต่างๆ ในน้ำนม เช่น สารปฏิชีวนะ เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ผลของระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดสซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งหรือทำลายเชื้อโรคแบบไม่จำเพาะ อาจมีผลกระทบต่อการตรวจยาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนม หากตรวจพบจะกระทบต่อเกษตรกร เพราะ สหกรณ์หรือศูนย์รับซื้อน้ำนมสามารถปฏิเสธการรับซื้อน้ำนมจากเกษตรกรผู้จำหน่ายน้ำนมดิบที่ปนเปื้อนสารปฏิชีวนะต่างๆ และจะต้องถูกลงโทษโดยการปรับเป็นเงินจำนวนหลายสิบล้านบาทของน้ำนมที่ส่งขายในขณะนั้น จึงได้มีการศึกษาเพื่อป้องกันปัญหาดังกล่าว โดยนำตัวอย่างน้ำนมดิบที่ทราบปริมาณไฮโดรไลยาเนตมาผ่านความร้อนก่อนนำไปทดสอบยาปฏิชีวนะตกค้างด้วยชุดทดสอบ เพื่อทำลายสารต้านจุลชีพตามธรรมชาติต่างๆ ในน้ำนมดิบ พบว่าระบบแลคโตเพอร์ออกซิเดสในน้ำนมดิบ ไม่มีผลต่อความถูกต้องของการตรวจยาปฏิชีวนะตกค้างด้วยชุดทดสอบ (วงศ์อนันต์ และคณะ, 2551) ถึงแม้ว่าไฮโดรไลยาเนตในน้ำนมดิบไม่สลายตัวด้วยความร้อน แต่เอนไซม์แลคโตเพอร์ออกซิเดสนั้นไวต่อความร้อน ที่ 72°C นาน 15 วินาที ประสิทธิภาพจะลดลงเหลือ 70% และที่ 80°C นาน 15 วินาที จะหมดประสิทธิภาพโดยสมบูรณ์ (Barrett et al., 1999)

บทที่ 3

การตรวจวิเคราะห์สารไฮโอไซยานตในน้ำนมดิบ

เนื่องจากการได้รับไฮโอไซยานตในปริมาณสูงติดต่อกันเป็นเวลานาน อาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพผู้บริโภคได้ ดังนั้น การตรวจหาปริมาณไฮโอไซยานตในน้ำนม จึงเป็นการปกป้องผู้บริโภค วิธีการตรวจหาไฮโอไซยานตนั้นมีหลายวิธีได้แก่ การใช้ Gas Chromatography Mass Spectrometry technique (GC-MS) (Bhandari et al., 2012) การใช้ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Bhandari et al., 2014) ซึ่งเครื่องมือทั้งสองชนิดดังกล่าวข้างต้นมีราคาแพงมาก มีวิธีใช้ที่ยุ่งยากซับซ้อน และผู้วิเคราะห์ต้องมีความชำนาญ ส่วนการใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่มีหลายแบบนั้น เป็นวิธีตรวจวัดความเข้มข้นของสีที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างสารไฮโอไซยานตกับธาตุต่างๆ หลายชนิด เช่น ไอออนของเหล็ก (Butts et al., 1974, Hovinen et al., 1999) โบรไมด์ (Keyvanfard et al., 2013) แมงกานีส (Ghaedi et al., 2006) และเบนซิดีน (Aldridge, 1944; 1945; Bark and Higson, 1964; Pettigrew and Fell, 1973) ซึ่งเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์นั้นส่วนใหญ่มักมีในห้องปฏิบัติการทั่วไป และมีราคาถูกกว่า อย่างไรก็ตาม ยังมีการใช้สารพิษในบางปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดสีขึ้น จึงจำเป็นต้องพิจารณาเลือกใช้

นอกจากการใช้เครื่องมือในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณไฮโอไซยานตแล้ว ในปัจจุบันได้มีการพัฒนากระดาษทดสอบในการตรวจหาไฮโอไซยานตในเชิงคุณภาพได้ (วงศ์อนันต์ และ อัจฉรา, 2549) ไม่ต้องใช้เครื่องมือราคาแพง โดยมีหลักการคือการออกซิไดซ์ไฮโอไซยานตให้กลับไปเป็นไฮยาไนด์ จากนั้นปล่อยให้ไฮยาไนด์ทำปฏิกิริยากับสาร Picric acid (2, 4, 6-Trinitrophenol) ซึ่งมีสีเหลือง จะถูกเปลี่ยนเป็นสารประกอบ 2,6-Dinitro-5-hydroxy-4-hydroxylamino-1, 3-dicyanobenzene หรือ Isopicric acid ($C_8H_3O_6N_5$) ซึ่งมีสีน้ำตาล (Williams and Edwards, 1980)

ในคู่มือนี้ นำเสนอการวิเคราะห์ไฮโอไซยานตในน้ำนมสองวิธี คือ การตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ตามวิธีของ Cosby and Sumner (1945) และการตรวจด้วยชุดทดสอบโดยมีรายละเอียด ดังนี้

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณไฮโอไซยานตในน้ำนมด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ตามวิธีของ Cosby and Sumner (1945)

หลักการคือ สกัดแยกสารละลายไซเดียมไฮโอไซยานตออกจากตัวอย่าง แล้วนำสารที่สกัดได้ไปทำปฏิกิริยากับสารละลาย $Fe(NO_3)_3$ ซึ่งไม่เป็นพิษ จากนั้นนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 460 nm ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ สามารถนำผลการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณไฮโอไซยานต

วิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณไอโอไซยาเนตเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ตามวิธีของ Cosby and Sumner (1945) มีดังนี้

การเตรียมสารเคมีที่ใช้

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานไอโอไซยาเนต (Sodium thiocyanate, NaSCN) ให้มี SCN⁻ เข้มข้น 100 พีพีเอ็ม ปริมาตร 100 mL

มวลโมเลกุล (MW) ของ NaSCN = 81.07 g/mol

มวลอะตอม (Atomic weight) ของ Na = 22.99 g/mol

ดังนั้น NaSCN 81.07 g ประกอบด้วย SCN = 81.07 – 22.99 = 58.08 g

NaSCN 81.07 mg ประกอบด้วย SCN = 58.08 mg

หรือ SCN 58.08 mg จะอยู่ใน NaSCN 81.07 mg

ต้องการ SCN 1 mg ต้องชั่ง NaSCN = (81.07*1)/58.08 = 1.395 mg

ทำการชั่งสาร NaSCN 13.95 mg (= SCN 10 mg) ใส่ลงใน Volumetric flask ขนาด 100 mL เติมน้ำกลั่นลงไป 100 mL จะได้สารละลายมาตรฐานไอโอไซยาเนตที่มีไอโอไซยาเนตเข้มข้น 100 ppm

ทำการเจือจางสารละลายมาตรฐานเข้มข้นที่ได้ด้วยน้ำนม ให้มีความเข้มข้นเป็น 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, และ 50 ppm ตามลำดับ จากการคำนวณ ($M_1V_1 = M_2V_2$) โดยใช้ Volumetric flask ขนาด 20 mL ให้แต่ละความเข้มข้นมีปริมาตรตัวอย่างละ 20 mL จะได้สัดส่วนดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 การเตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (ppm)	สารละลายมาตรฐาน SCN 100 ppm ที่ใช้ (mL)	ปริมาตรน้ำดื่มที่ใช้ (mL)
0	0.0	20.0
1	0.2	19.8
2	0.4	19.6
3	0.6	19.4
4	0.8	19.2
5	1.0	19.0
6	1.2	18.8
7	1.4	18.6
8	1.6	18.4
9	1.8	18.2
10	2.0	18.0
20	4.0	16.0
30	6.0	14.0
50	10.0	10.0

2. เตรียมสารละลายกรดไนตริกให้มีความเข้มข้น 2 M (Nitric acid, HNO_3) โดยเติม 65% HNO_3 13.85 mL ลงในน้ำกลั่นใน Volumetric flask ขนาด 100 mL ปรับปริมาตรจนได้ปริมาตรสุดท้าย 100 mL

3. เตรียมสารละลายเฟอร์ริกไนเตรด Ferric nitrate [$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$] ใน 2 M HNO_3 โดยชั่ง $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 16.0 g ละลายใน 2 M HNO_3 50 mL ใน Volumetric flask ขนาด 100 mL จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไปจนได้ปริมาตรครบ 100 mL เก็บสารละลายที่ได้ในที่มืดและเย็น

4. เตรียมสารละลาย 20% (w/v) ไตรคลอโรอะซิติก แอซิด (Trichloroacetic acid, TCA) โดยชั่ง TCA 20 g ละลายในน้ำกลั่นใน Volumetric flask ขนาด 100 mL จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไปจนได้ปริมาตรครบ 100 mL แล้วกรองผ่านกระดาษกรอง

การสกัดสารละลายมาตรฐานโรโอไฮยาเนตในน้ำนม

ทำการตกตะกอนโปรตีนในน้ำนมที่มีโรโอไฮยาเนต 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,

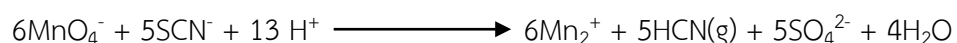
20, 30, 50 และ 100 ppm ที่เตรียมไว้ โดยใช้ปริมาณ 4 mL เติมด้วยสารละลาย 20% TCA 2 mL เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ก่อนกรองตะกอนผ่านกระดาษกรองเบอร์ 40 (ไม่แนะนำให้ใช้การปั่นเหวี่ยง เนื่องจากจะมีไขมันนมลอยอยู่ด้านบน) เก็บส่วนใสที่ได้สำหรับการทดลองต่อไป

วิธีตรวจวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานไฮโอไซยานเนตในนํ้านม

1. ดูดส่วนใสที่ได้จากการกรองตะกอนโปรตีนนํ้านมจากสารละลายมาตรฐานไฮโอไซยานเนตในนํ้านมที่เตรียมไว้ทุกความเข้มข้น และนำกลั่นซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมผลบอยอย่างละ 1.5 mL ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลาย $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ ปริมาตรเท่ากันลงไปผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 460 nm
2. บันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่ได้แล้วนำมาสร้างกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานนํ้านมที่ผ่านการตกตะกอนโปรตีนแล้ว
3. สร้างสมการเส้นตรงจากกราฟ โดยใช้ข้อมูลความเข้มข้นช่วงที่กราฟเป็นเส้นตรงเท่านั้น
4. ค่าสมการที่ได้ใช้คำนวณค่าความเข้มข้นของไฮโอไซยานเนตในตัวอย่างนํ้านมอื่นๆ ได้

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณไฮโอไซยานเนตในนํ้านมด้วยกระดาษทดสอบ โดยดัดแปลงจากวิธีของ Haque and Bradbury (1999)

หลักการคือ สกัดแยกสารละลายไซโตเคียมไฮโอไซยานเนตออกจากตัวอย่างโดยทำการตกตะกอนโปรตีนในนํ้านมก่อน จากนั้นนำส่วนใสที่ได้ซึ่งมีไฮโอไซยานเนตมาทำปฏิกิริยาออกซิไดซ์ในระบบปิดด้วยการเติมสารละลายโพตัสเซียมเปอร์มังกาเนตและกรดซัลฟูริก จะได้ก๊าซไซยาไนด์ (Haque and Bradbury, 1999) ดังสมการ



หลังจากนั้นปล่อยให้ก๊าซไฮโดรไซยาไนด์ (HCN) ทำปฏิกิริยากับสาร Picric acid (2, 4, 6-Trinitrophenol) ซึ่งมีสีเหลืองที่ซบติดกับกระดาษกรอง จะถูกเปลี่ยนเป็นสารประกอบ 2,6-Dinitro-5-hydroxy-4-hydroxylamino-1, 3-dicyanobenzene หรือ Isopicric acid ($\text{C}_8\text{H}_3\text{O}_6\text{N}_5$) ซึ่งมีสีน้ำตาล

การเตรียมสารเคมีที่ใช้

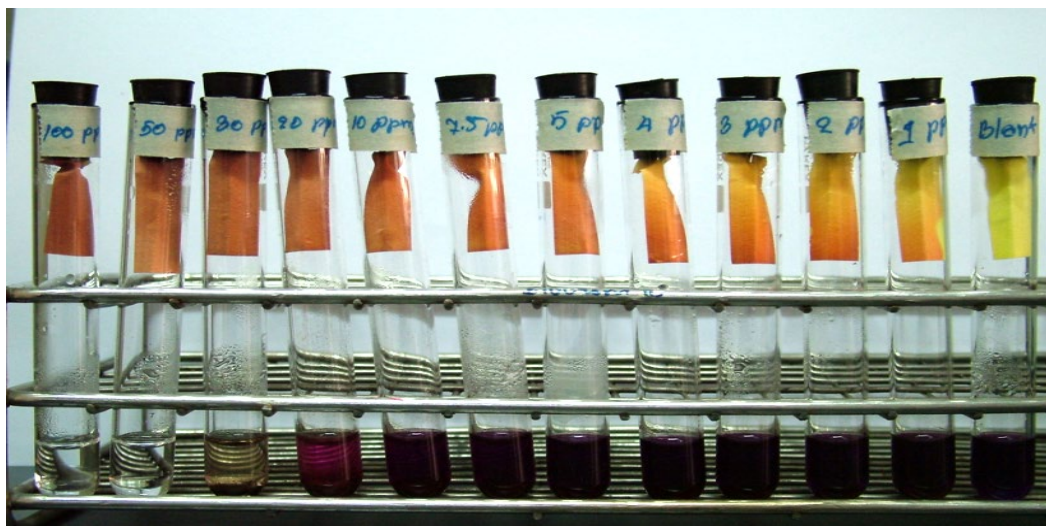
1. สารละลายมาตรฐานที่ใช้
 - 1.1 KMnO_4 0.1 M
 - 1.2 H_2SO_4 1 M
 - 1.3 20% Trichloroacetic acid (TCA)

2. การเตรียมสารละลาย Picric acid และกระดาษ Picrate

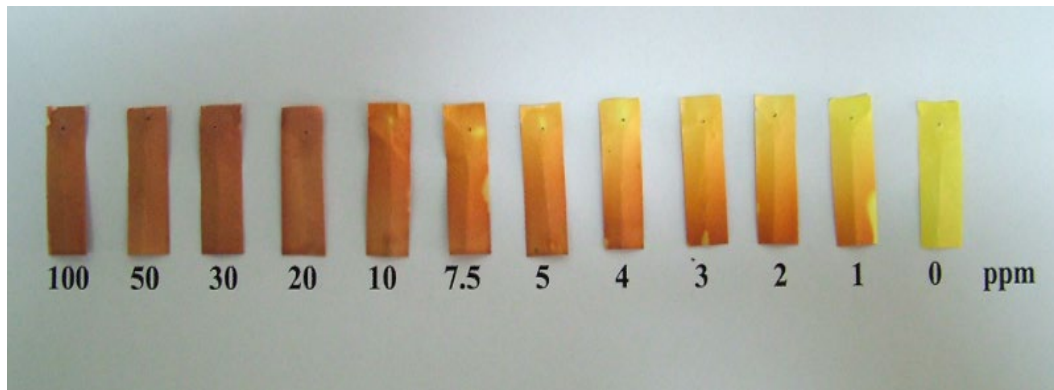
เตรียม 0.5% Picric acid ใน 2.5% (w/v) สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 100 mL จะได้สารละลายสีเหลือง จากนั้นนำกระดาษกรอง Whatman® เบอร์ 1 ตัดให้มีขนาด 3 × 1 cm ชุบสารละลายดังกล่าวให้ชุ่มแล้วตากให้แห้ง ห่อให้พ้นแสงแล้วนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 – 8 องศาเซลเซียส (Bradbury et al., 1999)

วิธีตรวจวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานไอโอไฮยานेतในน้ำนม

1. ทำการตกตะกอนโปรตีนในน้ำนมที่มีไอโอไฮยานेत 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7.5, 10, 20, 30, 50 และ 100 ppm ที่เตรียมไว้ โดยใช้ น้ำนม 4 mL เติมด้วยสารละลาย 20% TCA 2 mL เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ก่อนกรองตะกอนผ่านกระดาษกรองเบอร์ 40 (ไม่แนะนำให้ใช้การปั่นเหวี่ยง เนื่องจากจะมีไขมันนมลอยอยู่ด้านบน) เก็บส่วนใสที่ได้สำหรับการทดลองต่อไป
2. ดูดส่วนใสที่ได้จากการกรองตะกอนโปรตีนน้ำนมจากสารละลายมาตรฐานไอโอไฮยานेतในน้ำนมที่เตรียมไว้ทุกความเข้มข้น และน้ำกลั่นซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมผลบอยอย่างละ 1 mL ใส่ลงในหลอดทดลองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 ซม. ยาว 7 ซม.
3. เติม 0.1 M KMnO_4 และ 1 M H_2SO_4 อย่างละ 0.1 mL ลงไปในทุกหลอดผสมให้เข้ากันแล้ว รับประทานจากยงที่มีกระดาษ picrate 1 แผ่นติดอยู่ ปิดหลอดทันที
4. นำหลอดทดสอบวางแช่ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 75°C นาน 1 ชั่วโมง
5. บันทึกการเปลี่ยนแปลงของสีกระดาษ picrate ในแต่ละความเข้มข้นของตัวอย่างเพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบผล



รูปที่ 5 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณไอโอไฮยานेतในน้ำนมด้วยกระดาษทดสอบ



รูปที่ 6 การเปลี่ยนแปลงของสีกระดาษ picrate ในแต่ละความเข้มข้นของไฮโอไซยานตในตัวอย่าง

ทั้งนี้ สีเหลืองของ Picric acid บนกระดาษกรองจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลของสารประกอบ Isopurporic acid ซึ่งสีน้ำตาลที่เกิดขึ้นสามารถใช้แปลผลความเข้มข้นของไฮโอไซยานตในตัวอย่าง น้ำนมได้ โดยกระดาษทดสอบสามารถวัดความเข้มข้นของไฮโอไซยานตได้ตั้งแต่ 1- 10 ppm

บรรณานุกรม

- มกอช (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ). 2560. แนวปฏิบัติในการใช้มาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 6401(G)- 2560 การปฏิบัติที่ดีสำหรับศูนย์รวบรวมนํ้านมดิบ ประกาศในราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศและงานทั่วไป เล่ม 134 ตอนพิเศษ 170 ง วันที่ 27 มิ.ย. 2560 [Online]. Available: https://www.acfs.go.th/standard/download/GAP_MILK_COLLECTION_CENTER.pdf. [วันที่เข้าถึง 17 ก.ค. 2566]
- วงศ์อนันต์ ณรงค์วานิชการ และอัจฉรา ธีระพันธ์. 2549. การพัฒนาชุดทดสอบแบบรวดเร็วสำหรับตรวจหาสารไฮโอไซยาเนตในนํ้านมดิบ. วารสารสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ. [Online]. Available: <https://niah.dld.go.th/webnew/images/eJournal/v1/v01n1t01.pdf>. [วันที่เข้าถึง 17 ก.ค. 2566].
- วงศ์อนันต์ ณรงค์วานิชการ ละณี สุขถิ่นไทย และสุรียัวรรณ พันธันรา. 2551. ผลของปริมาณไฮโอไซยาเนตต่อความถูกต้องของการตรวจยาปฏิชีวนะตกค้างในนํ้านมดิบโดยชุดทดสอบ. วารสารจุลชีววิทยาและสุขอนามัยที่ 6. 3: 30-40.
- สุรียัวรรณ พันธันรา พรศรี ชัยรัตนยุทธ์ ประวีร์ วิชชุลดา สมจิต สุรพัฒน์ อุทัย คั่นโธ และวงศ์อนันต์ ณรงค์วานิชการ. 2549 ก. ผลของการใช้ไขมันสำปะหลังแห้งเป็นอาหารโคนมต่อจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและโคไลฟอร์มในนํ้านมดิบ. เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการครั้งที่ 44 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ระหว่างวันที่ 30 มกราคม-2 กุมภาพันธ์ 2549. หน้า 70-78.
- สุรียัวรรณ พันธันรา พรศรี ชัยรัตนยุทธ์ ประวีร์ วิชชุลดา สมจิต สุรพัฒน์ อุทัย คั่นโธ และวงศ์อนันต์ ณรงค์วานิชการ. 2549 ข. ผลของปริมาณไฮโอไซยาเนตในนํ้านมดิบต่อจำนวนจุลินทรีย์และการตรวจสอบสารปฏิชีวนะตกค้างในนํ้านมดิบโดยชุดทดสอบ. เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการโคนมครั้งที่ 20 คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ระหว่างวันที่ 21-22 สิงหาคม 2549.
- Aldridge, W.N. 1944. A new method for estimation of micro quantities of cyanide and thiocyanate. *Analyst (London)*. 69: 262-265.
- Asaah, N.O., Fonteh, F., Kamga, P., Mendi, S. and Imele, H. 2007. Activation of the lactoperoxidase system as a method of preserving raw milk in areas without cooling facilities. *AJFAND*. 2: 1-15.
- Bark, L.S. and Higson, H.G. 1964. Investigation of the reagents for the colorimetric determination of small amount of cyanide. *Talanta*. 11: 471-479, 621-631.

- Barrett, N.E., Grandison, A.S. and Lewis, M.J. 1999. Contribution of the lactoperoxidase system to the keeping quality of pasteurised milk. *J. Dairy Res.* 66: 73–80.
- Bhandari, R.K., Oda, R.P., Youso, S.L., Petrikovics, I., Bebarta, V.S. and Rockwood, G.A. 2012. Simultaneous determination of cyanide and thiocyanate in plasma by chemical ionization gas chromatography mass-spectrometry (CI-GC-MS). *Anal. Bioanal. Chem.* 404: 2287–2294.
- Bhandari, R.K., Manaadhar, E., Oda, R.P. and Rockwood, G.A. 2014. Simultaneous high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS-MS) analysis of cyanide and thiocyanate from swine plasma. *Anal. Bioanal. Chem.* 406: 727–734.
- Bjorck, L. 1978. Antibacterial effect of the lactoperoxidase system on psychrotrophic bacteria in milk. *J. Dairy Res.* 45: 109-118.
- Bradbury, J.H. and Holloway, W.D. 1988. Chemistry of tropical root crops: significance for nutrition and agriculture in the pacific. Australian Centre for International Agricultural Research. Canberra, Australia. 102 p.
- Bradbury, M.G., Egan, S.V. and Bradbury, J.H. 1999. Picrate paper kit for determination of total cyanogens in cassava roots and all forms of cyanogens in cassava products. *J. Sci. Food Agric.* 79: 593-601.
- Butts, W.C., Kuehneman, M. and Widdowson, G.M. 1974. Automated method for determining serum thiocyanate to distinguish smokers from nonsmokers. *Clin. Chem.* 20: 1344.
- Cals, M.M., Guillemot, M. and Martin, P. 1994. The gene encoding lactoperoxidase is expressed in epithelial cells of the goat lactating mammary gland. *Cell. Molec. Biol.* 40: 1143-l 150.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 1994. Documentation for Immediately Dangerous To Life or Health Concentrations (IDLHs). [Online]. Available: <http://www.cdc.gov/niosh/idlh/cyanides.html>. Accessed May 16, 2023.
- Cosby, E.L. and Sumner, J.B. 1945. Rhodanese. *Archives Biochem.* 7: 457-460.

- Cousin, M.A. 1982. Present and activity of psychotrophic microorganisms in milk and dairy product: A review. *J. Food Prot.* 45: 172-207.
- Dabur, R.S., Srivastava, D.N. and Kapoor, C.M. 1996. Effect of season, separation and heating temperatures on the residual thiocyanate levels in L.P. preserved buffalo milk. *J. Dairy Food Home Sci.* 15: 30-34.
- De Wit, J.N. and Van Hooydonk, A.C.M. 1996. Structure, functions and applications of lactoperoxidase in natural antimicrobial systems. *Netherlands milk and Dairy Journal.* 50: 227-244. In: Kussendrager, K. D. and van Hooijdonk, A. C. M. 2000. Lactoperoxidase: physico- chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. *British Journal of Nutrition.* 84: S19-S25.
- El-Fakharany, E.M., Uversky, V.N. and Redwan, E.M. 2017. Comparative Analysis of the Antiviral Activity of Camel, Bovine, and Human Lactoperoxidases Against Herpes Simplex Virus Type 1. [Online]. Available: https://digitalcommons.usf.edu/mme_facpub/324. Accessed May 16, 2023.
- El Zubeir, I.E.M., El Hassan, M.E.M. and Yagoub, S.O. 2010. Preservation of raw milk of Khartoum State (Sudan) by the lactoperoxidase system. *Inter. J. Dairy Sci.* 5: 327-332.
- FAO Corporate Document Repository. 2005. Benefits and potential risks of the lactoperoxidase system of raw milk preservation. Report of an FAO/WHO Technical Meeting FAO Headquarters, Rome, Italy, 28 November - 2 December. [Online]. Available: <http://www.fao.org/docrep/009/a0729e/a0729e00.htm>. Accessed May 16, 2023.
- Fonteh, A.F., Grandison, A.S. and Lewis, M.J. 2002. Variations of the lactoperoxidase activity and thiocyanate content in cows' and goats' milk throughout lactation. *J. Dairy Res.* 69: 401-409.
- Fried, R., Fried, L.W. and Babin, D.R. 1973. Biological role of xanthine oxidase and tetrazoliumreductase inhibitor. *Europ. J. Biochem.* 33: 439.

- Gaya, P., Medina, M. and Nunez, M. 1991. Effect of the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* behavior in raw milk at refrigeration temperatures. *Applied Environ. Microbiol.* 57: 3355-3360.
- Ghaedi, M., Parham, H., Moghadam, M. and Mortazavi, K. 2006. Solid phase extraction and spectrophotometric determination of trace amounts of thiocyanate in real samples. *Ann. Chim.* 96: 689 – 696. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17217173/>
- Haddadin, M.S., Ibrahim, S.A. and Robinson, R.K. 1996. Preservation of raw milk by activation of the lactoperoxidase systems. *Food Control.* 7: 149–152.
- Hanssen, F.S. 1924. *Br. J. Exp. Path.* 5: 271. In: Hogg, D.M. and JAGO, G.R. 1970. The antibacterial action of lactoperoxidase: The nature of the bacterial inhibitor. *Biochem. J.* 117: 779-790.
- Haque, M.R. and Bradbury, J.H. 2002. Total cyanide determination of plants and foods using the picrate and acid hydrolysis methods. *Food Chem.* 77: 107-114.
- Heddeghem, A.V. and Vlaemynck, G. 1992. Sources of contamination of milk with *B. cereus* on the farm and in the factory. *Dairy Sci.* 55: 138.
- Hogg, D.M. and Jago, G.R. 1970. The antibacterial action of lactoperoxidase. *Biochem. J.* 117: 779–790.
- Hovinen, J., Lahti, M. and Vilpo, J. 1999. Spectrophotometric determination of thiocyanate in human saliva. *J. Chem. Edu.* 76: 1,281. [Online]. Available: <https://pubs.acs.org/doi/epdf/10.1021/ed076p1281>
- International Dairy Federation. 2013. The lactoperoxidase system. IDF Factsheet. [Online]. Available: <https://www.fil-idf.org/wp-content/uploads/2016/04/Factsheet-SCMH-Lactoperoxidase.pdf>. Accessed May 16, 2023.
- Kamau, D.N., Doores, S. and Pruitt, K.M. 1990. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in milk. *J. Food Prot.* 55: 1010-1014.
- Katekan, D., Ekachai, C. and Arunee, A. 2008. Effect of lactoperoxidase system on keeping quality of raw cow's milk in Thailand. *Int. J. Dairy Sci.* 3: 112–116.

- Keyvanfard, M., Alizad, K. and Elahian, P. 2013. Determination of thiocyanate by kinetic spectrophotometric flow injection analysis. *J. Chem.* 2013: 1 – 5.
[Online]. Available: <https://www.hindawi.com/journals/jchem/2013/147364/>
- Korhonen, H. 1977. Antimicrobial factors in bovine Colostrum. *J. Sci. Agri. Soc. Finland.* 49: 434.
- Korhonen, H. and Reiter, B. 1983. Production of H₂O₂ by bovine blood and milk polymorphonuclear leucocytes. *Acta. Microbiol.* 32: 53–64.
- Kussendrager, K.D. and Van Hooijdonk, A.C.M. 2000. Lactoperoxidase: physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. *British J. Nutri.* 84: S19-S25.
- Lambert, J.C. 2001. Global lactoperoxidase programme: The lactoperoxidase system (LPS) of milk preservation. *Bull. Inter. Dairy Fed.* 365: 18-19.
- Majak, W. and Cheng, K.J. 1984. Cyanogenesis in bovine rumen fluid and pure cultures of rumen bacteria. *J. Anim. Sci.* 59: 784-790.
- 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.
- Mikola, H., Waris, M. and Tenovu, J. 1995. Inhibition of herpes simplex virus type 1, respiratory syncytial virus and echovirus type 11 by peroxidase-generated hypothiocyanite. *Antiviral Res.* 26 (2): 161-171. doi.org/10.1016/0166-3542(94)00073-H
- Montgomery, R.D. 1980. In: Toxic constituents of plant foodstuffs. Liener I.E., ed. New York, Academic Press, USA. p. 143-160.
- Okafor, P.N. 2004. Assessment of cyanide overload in cassava consuming populations of Nigeria and the cyanide content of some cassava base foods. *African J. Biotech.* 3: 358-361.
- Pettigrew, A.R. and Fell, G.S. 1973. Microdiffusion method for estimation of cyanide in whole blood and its application to the study of conversion of cyanide to thiocyanate. *Clin. Chem.* 19: 466-471.

- Pruitt, K.M., Kamau, D.N., Miller, K., Mansson-Rahemtulla, B. and Rahemtulla, F. 1990. Quantitative, standardized assays for determining the concentration of bovine lactoperoxidase, human salivary peroxide, and human myeloperoxidase. *Anal. Biochem.* 191: 278–286.
- Ratner, J. and Prince, A. 2000. Lactoperoxidase. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 22: 642-644.
- Reiter, B. 1985. The lactoperoxidase system of bovine milk. In: The lactoperoxidase system: chemistry and biological significance. Pruitt, K.M. and Tenovuo, J.O. ed. Immunol. Ser. 27, Marcel Dekker Inc., New York, pp. 123-141.
- Reiter, B. and Harnulv, G. 1984. Lactoperoxidase antibacterial system: natural occurrence, biological functions and practical applications. *J. Food Prot.* 47: 724-732.
- Reiter, B. and Perraudin, J.P. 1991. Lactoperoxidase: biological functions. In Peroxidases in Chemistry and Biology. Boca Raton: CRC Press. pp. 143-180.
- Ryoba, R., Kurwijila, L.R. and Bakuname, M. 2003. Potential Use of Lactoperoxidase Milk Preservation Method in Tanzania. [Online]. Available: <http://www.lhh.kvl.dk/htm/php/Tsap00/Ryoba1.htm>. Accessed December 1, 2003.
- Ruffle, S.V. 1998. Cassava research in the Sayre lab. [Online]. Available: <http://www.biosci.ohio-state.edu/~rsayre/CASSAVA.htm>. Accessed March 12, 2004.
- Seifu, E., Buys, E.M. and Donkin, E.F. 2005. Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its potential applications: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 16: 137–154.
- Semionova, F.P. and Fishbien, L. 2004. Hydrogen cyanide and cyanides: Human health aspects. In: Concise International Chemical Assessment Document 61. WHO.

- Silva, E., Oliveira, J., Silva, Y., Urbano, S., Sales, D., Moraes, E., Rangel, A. and Anaya, K. 2020. Lactoperoxidase system in the dairy industry: challenges and opportunities. *Czech J. Food Sci.* 38: 337–346.
- Sugita, C., Shin, K., Wakabayashi, H., Tsuhako, R., Yoshida, H., Watanabe, W. and Kurokawa, M. 2018. Antiviral activity of hypothiocyanite produced by lactoperoxidase against influenza A and B viruses and mode of its antiviral action. *Acta Virol.* 62: 401 -408.
- Thomas, E.L. 1981. Lactoperoxidase catalysed oxidation of thiocyanate: The equilibrium between oxidized forms of thiocyanate. *Biochemistry.* 20: 3273-3280.
- Thomas, E.L. 1985. Products of lactoperoxidase catalysed oxidation of thiocyanate and halides. Cited by: Kussendrager, K.D. and van Hooijdonk, A.C.M. 2000. Lactoperoxidase: physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. *British Journal of Nutrition.* 84: S19-S25.
- Walstra, P., Genurt, T.J., Noomen, A., Jellema, A. and Van Boekel, M.A.J.S. 1999. Dairy Technology. Department of food Science, Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.
- Wanapat, M., Petlum, A. and Pimpa, O. 2000. Supplementation of cassava hay to replace concentrate use in lactating holstein friesian crossbreds. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 13:600-604.
- White, W.L.B., Arias-Garzon, D.I., McMahon, J.M. and Sayre, R.T. 1998. Cyanogenesis in cassava, the role of hydroxynitrile lyase in root cyanide production. *Plant Physiol.* 116: 1219-1225.
- Williams, H.J. and Edwards, T.G. 1980. Estimation of cyanide with alkaline picrate. *J. Sci. Food Agri.* 31: 15-22.
- Wolfson, L.M. and Sumner, S.S. 1993. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system: A review. *J. Food Prot.* 56: 887-892.
- Wood, J.L. 1975. Biochemistry. In: Newman AA, editor. Chemistry and biochemistry of thiocyanic acid and its derivatives. London: Academic Press; p.156 – 221.

- Wray, C. and McLaren, I. 1987. A note on the effect of the lactoperoxidase systems on Salmonellas *In vitro* and *In vivo*. *J. Applied Bacteriol.* 62: 115-118.
- Yong, L., Wang, Y., Yang, D., Liu, Z., Abernethy, G. and Li, J. 2017. Investigation of concentration of thiocyanate ion in raw cow s milk from China, New Zealand and the Netherlands. *Food Chem.* 15: 61–66. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27542450/>.
- Zajac, M., Gladys, J., Skarzynska, M., Hanulv, G. and Bjorck, L. 1983. Changes in bacteriological quality of raw milk stabilized by activation of its lactoperoxidase system and stored at different temperatures. *J. Food Prot.* 46: 1065-1068.
- Zapico, P., Gaya, P., De Paz, M., Nunez, M. and Medina, M. 1991. Influence of breed, animal and days of lactation on lactoperoxidase system components in goat milk. *J. Dairy Sci.* 74: 783-787.