องค์ความรู้เรื่อง การวิเคราะห์ค่าทางเคมีของน้ำนมดิบ และผลิตภัณฑ์นม

ผู้ให้ความรู้ ผศ.ดร.สุภาวดี ศรีแย้ม

วันที่ถอดองค์ความรู้ 29 สิงหาคม 2559

ผู้บันทึกและถอดองค์ความรู้ นางอุมาพร เจริญธนากุล (เจ้าหน้าที่บริหารงานทั่วไป)

บริษัท เชียงใหม่เฟรชมิลค์ จำกัด ส่วนใหญ่จะผลิตนมโรงเรียนเป็นผลิตภัณฑ์หลัก ตามนโยบายของรัฐบาลเพื่อจ่ายตามโรงเรียนต่างๆ โดยมีจุดรับน้ำนมดิบที่ส่งให้กับบริษัท เชียงใหม่เฟรชมิลค์ จำกัด ดังนี้

(1) ศูนย์รับน้ำนมดิบ 6 ศูนย์
- ศูนย์รับน้ำนมดิบ อำเภอแม่ทา
- ศูนย์รับน้ำนมดิบ อำเภอแม่ออน
- ศูนย์รับน้ำนมดิบ อำเภอสันป่าตอง
- ศูนย์รับน้ำนมดิบ บ้านโฮ้ง
- ศูนย์รับน้ำนมดิบ แม่โจ้
- ศูนย์รับน้ำนมดิบ บ้านธิ 2515

(2) สหกรณ์ 13 ที่

(3) เกษตรกร

จำนวนแทงค์เก็บน้ำนมได้ทั้งหมด 196 ตัน ขนาด 30 ตัน จำนวน 3 ถัง ขนาด 36 ตัน จำนวน 1 ถัง ขนาด 20 ตัน จำนวน 3 ถัง และ ขนาด 10 ตัน จำนวน 1 ถัง นอกจากนี้ ทางบริษัทได้ผลิตนำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนม เชียงใหม่เฟรชมิลค์ อำเภอป่าซาง จังหวัดลำพูน จัดเป็นน้ำนมดิบ เกรด premium (ชั้นดีมาก) มีปริมาณไขมัน น้ำนม เท่ากับ 4.0% และมีปริมาณ somatic cell ในปริมาณที่ต่ำ 100,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยน้ำนมดิบนี้ จะถูกส่งไปให้บริษัทดัชมิลค์ เพื่อผลิตต่อไป

คุณภาพน้ำนมทางด้านความสะอาดของน้ำนมดิบและการปราศจากยาปฏิชีวนะและสารเคมีตกค้าง ความสะอาดของน้ำนมดิบสามารถตรวจสอบได้โดยตรง จากจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในน้ำนมดิบ โดยทำการนับหรืออาจวัดโดยทางอ้อมจากปริมาณโซมาติกเซลล์ (Somatic cell Count) ถ้าปริมาณโซมาติกเซลล์มาก แสดงถึงสุขภาพแม่โคอาจจะเป็นโรคเต้านมอักเสบ ดังนั้นก่อนการนำน้ำนมดิบมาผ่านกระบวนการผลิตทางบริษัท จึงจำเป็นต้องมีการตรวจสอบคุณภาพน้ำนมดิบเบื้องต้นก่อนการผลิต

การตรวจสอบคุณภาพน้ำนมดิบเบื้องต้น ส่วนรับวัตถุดิบหน้าโรงงาน

- การตรวจด้วยน้ำยา california mastitis test (C.M.T) การตรวจคุณภาพน้ำนมเบื้องต้น เป็นวิธีการประเมินปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวในน้ำนมด้วยการเติมสารลดการตึงผิว ซึ่งจะทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวแตกแล้วเกิดสารลักษณะคล้ายวุ้นขึ้น

<u>วิธีการ</u> ก่อนการตรวจต้องกวนน้ำนมดิบในถังให้ทั่ว แล้วตักตัวอย่างน้ำนมปริมมตร 2 มิลลิลิตร ผสมรวมกับน้ำยา C.M.T ปริมาตรเท่ากัน ลงบนจานตรวจ เอียงจานตรวจไปมา ถ้ามีลักษณะเป็นเมือกแสดงว่า ผลเป็น Positive แต่ถ้ามีลักษณะไม่เปลี่ยนแปลง ผลเป็น Negative ดังแสดงในภาพที่ 1

ภาพที่ 1 การตรวจด้วยน้ำยา california mastitis test (CMT)

- การตรวจสอบด้วย alcohol-alizarin test (68 % alcohol)

เป็นการทดสอบเบื้องต้นโดยที่สี alizarin จะเปลี่ยนไปตามสภาพความเป็นกรด-ด่างของตัวอย่างน้ำนมดิบ ทำให้เห็นการเปลี่ยนแปลงได้ชัดเจน (ภาพที่ 2)

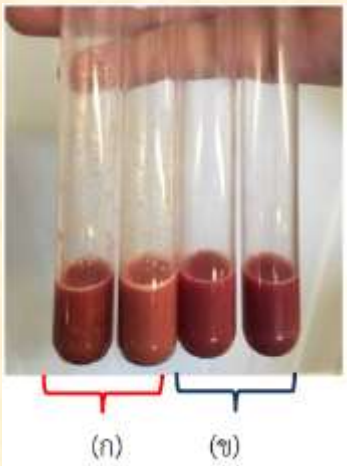
<u>วิธีการ</u> ปิเปตตัวอย่างน้ำนมดิบและ น้ำยา alizarin ในปริมาตร เท่ากัน อัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากัน

การอ่านผล น้ำนมปกติ จะให้สีน้ำตาลแดง และไม่เกิดตะกอนหรือลิ่ม (negative)

น้ำนมเป็นกรดเล็กน้อย จะมีสีน้ำตาลออกเหลือง ไม่เกิดตะกอน หรือ ลิ่ม

น้ำนมเป็นกรดมาก จะให้สีเหลืองและเกิดตะกอนหรือเป็นลิ่ม

น้ำนมเป็นด่าง จะให้สีม่วงและเกิดตะกอน อาจเป็นน้ำนมที่ได้จากโคที่เป็นเต้านมอักเสบ



ภาพที่ 2 ตัวอย่างน้ำนมดิบที่ตรวจสอบด้วย alizarin alcohol test

น้ำนมมีความเป็นกรดเล็กน้อย(ก) และ น้ำนมปกติ (ข)

<u>การตรวจคุณภาพน้ำนมดิบทางเคมีในห้องปฏิบัติการ</u>

(1) การตรวจหาส่วนประกอบน้ำนม โดยใช้เครื่อง Milkoscan™Minor ภาพที่ 3 ได้แก่ วิเคราะห์ปริมาณไขมันน้ำนม (milk fat) โปรตีน (protein) ของแข็งทั้งหมดในน้ำนม (total solid; TS) ของแข็งไม่รวมไขมันนม (solid not fat; SNF) น้ำตาลแลคโตส (lactose) และค่าจุดเยือกแข็งของน้ำนม (freezing point)

(ก) (ข)

ภาพที่ 3 เครื่อง Milkoscan™Minor สำหรับตรวจวิเคราะห์ส่วนประกอบน้ำนม (ก) และหน้าจอแสดงผลการวิเคราะห์ (ข)

(2) การตรวจวิเคราะห์ไขมันน้ำนม โดยวิธี Gerber butterfat ใช้ butyrometer วิธีนี้ใช้ตรวจวิเคราะห์ครีม ที่แยกได้จากน้ำนมดิบ กรณีที่ตรวจปริมาณไขมันน้ำนม มากกว่า 3.85% และ ผลิตภัณฑ์นมปรุงแต่งรสชอคโกแลต รสสตรอเบอรี่ เป็นต้น วิธีการ (ภาพที่ 4) ปิเปต 90% กรดซัลฟูริก ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในหลอด butyrometer (ขนาด 0-50% สำหรับครีม หรือ 0-10% สำหรับผลิตภัณฑ์นมปรุงแต่ง) จากนั้นนใส่ตัวอย่างน้ำนม ปริมาตร 10.75 มิลลิลิตร ค่อยๆ รินลงในหลอดที่บรรจุกรดซัลฟูริก เติม 1 มิลลิลิตร ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (isoamyl alcohol) ปิดจุกให้แน่น เขย่าให้เข้ากัน และใส่เครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 1,100 รอบต่อนาที นาน 4 นาที อ่านตัวเลขส่วนใสที่ก้าน butyrometer บันทึกผล

ภาพที่ 4 การวิเคราะห์ไขมันน้ำนมด้วยวิธี Gerber method

(3) ตรวจวัดอุณหภูมิของน้ำนม (temperature test)

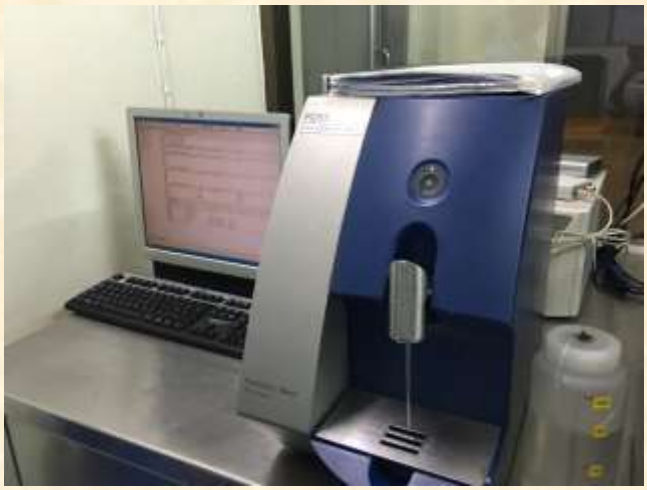
(4) ตรวจวัดค่า ความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้เครื่อง pH meter น้ำนมดิบปกติจะมีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.40-6.80

(5) ตรวจวัดความถ่างจำเพาะของน้ำนม (determination of specific gravity) โดยใช้ lactometer หรือ lactodensitometer ค่าความถ่วงจำเพาะของน้ำนมดิบปกติมีค่า 1.028-1.034 หลักการ น้ำนมที่มีเนื้อนมต่ำกว่าปกติหรือเติมน้ำ จะมีค่าความถ่วงจำเพาะลดลง หรือหากแยกไขมันออก จะได้ค่าความถ่วงจำเพาะเพิ่มขึ้น

<u>วิธีการ</u> เตรียมตัวอย่างน้ำนม ประมาณ 150-200 มิลลิลิตร อุ่นตัวอย่างน้ำนมที่ 20 องศาเซลเซียส เทตัวอย่างน้ำนมลงในกระบอกตวง แล้วค่อยๆ จุ่ม lactometer ระวังอย่าให้ lactometer ติดข้างกระบอก จากนั้นอ่านตัวเลขตรงขีดบนของระดับน้ำนม ดังภาพที่ 5

ภาพที่ 5 การวัดค่ำความถ่วงจำเพาะโดยใช้ lactodensitometer หรือ lactometer

(6) การตรวจ somatic cell โดยใช้เครื่อง Fossomatic™ Minor (ภาพที่ 6) เพื่อตรวจดูระดับที่ได้ควรน้อยกว่า $5x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร แต่บางมาตรฐานจะตั้งค่าไว้ที่ประมาณ $2x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 6 เครื่อง Fossomatic™Minor สำหรับตรวจปริมาณ somatic cell

(7) ตรวจสอบ จุดเยือกแข็งของน้ำนม (freezing point) ด้วยเครื่อง Cryoscope model 4250 (ภาพที่ 7) เพื่อตรวจสอบคุณภาพ ของน้ำนมดิบว่ามีการปนน้ำหรือไม่ เพราะน้ำนมดิบมีของแข็งที่ละลายได้ (milk solid not fat)เช่น น้ำตาลแลคโตส (lactose)โปรตีน เกลือแร่ วิตามิน ไม่ต่ำกว่า 8.25 % ทำให้จุดเยือกแข็ง (freezing point) ของน้ำนมต่ำกว่าน้ำบริสุทธิ์ (freezing point depression) การเติมน้ำลงในน้ำนม ทำให้จุดเยือกแข็งสูงขึ้นใกล้จุดเยือกแข็งของน้ำ น้ำนมดิบที่มีคุณภาพที่ดีควรมีค่าจุดเยือกแข็งไม่ต่ำกว่า (-0.510 องศาเซลเซียส)

<u>วิธีการ</u> ตัวอย่างน้ำนมดิบอุณหภูมิห้องปริมาตร 2.0-2.5 ลงใน sample tube แล้วนำไปวางที่ช่องใส่เครื่องวิเคราะห์ผล

ภาพที่ 7 เครื่อง Cryoscope model 4250 ใช้ตรวจจุดเยือกแข็งในน้ำนม

(8) ตรวจปริมาณกรดในน้ำนม โดยการไตเตรท (titration method)

น้ำนมที่มีคุณภาพดีจะมีค่าความเป็นกรดอยู่ระหว่าง 0.16-0.18% หรือ pH 6.60-6.80 หากพบว่ามีค่าความเป็นกรดสูงกว่าปกติ จะมีผลต่อความสามารถในการทนความร้อนเมื่อนำน้ำนมที่เป็นกรดสูงไปผ่านขบวนการความร้อนโปรตีนนมถูกทำลายได้ง่ายและจะจับตัวกันเป็นก้อน

<u>วิธีการ</u> ปิเปตตัวอย่างน้ำนมปริมาตร 9 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร หยด 1% phenophtalein 3 หยด (เป็นอินดิเคเตอร์) นำไปไตเตรทกับสารละลาย 0.1N NaOH ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนที่ใส่ในบิวเรต บันทึกปริมาตรสารละลาย 0.1 N NaOH ที่ใช้เมื่อถึงจุดยุติ (สีชมพูอ่อน) คำนวณ % lactic acid จากสูตร % lactic acid = ปริมาตร 0.1 N NaOH (มิลลิลิตร) x 0.1 ค่าปกติที่ได้ควรอยู่ระหว่าง 0.14-0.16 %

(9) ตรวจเสถียรภาพของโปรตีนในน้ำนม ได้แก่ การตรวจการตกตะกอนของน้ำนมด้วย การตรวจวัดความเป็นกรดของน้ำนม (acidity test) 68, 70, 75 และ 80% alcohol

เป็นการทดสอบเสถียรภาพของโปรตีนในน้ำนม น้ำนมที่เป็นกรดเมื่อทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์จะเกิดการตกตะกอน (precipitation) ถือว่าให้ผลบวก (positive) แต่ถ้านมมีคุณภาพดีจะไม่เกิดการตกตะกอนถือว่าให้ผลลบ (negative)

<u>วิธีการ</u> ตัวอย่างน้ำนมดิบ 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มี alcohol 2 มิลลิลิตร (หรือในอัตราส่วนการตรวจคุณภาพ 1: 1 ของน้ำนมดิบกับ alcohol) บันทึกผลใน รายงานการตรวจสอบคุณภาพน้ำนมดิบ

10) การตรวจหาของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ (^{o}Brix)

- โดยเครื่อง Digital Refractometer เป็นการวัด ดัชนีหักเหของแสง (refractive index)

<u>วิธีการ</u> นำตัวอย่างที่ผสมรวมกันแล้ว หยดตัวอย่างให้ท่วมบนผิวหน้า prism รอประมาณ 30 วินาที - 1 นาที กดปุ่ม Start หน้าจอจะแสดงค่า (^{o}Brix) ของตัวอย่างที่วัดได้

<u>การตรวจหาจำนวนแบคทีเรียทางอ้อมและการตกค้างของยาปฏิชีวนะในน้ำนม</u>

การตรวจจำนวนแบคทีเรียทางอ้อมที่นิยมใช้กันมากคือการใช้สีเป็นตัวบ่งชี้ (dye reduction test)

โดยการวัดปฏิกิริยาของการได้รับหรือสูญเสียอิเลคตรอนในน้ำนม (Oxidation-Reduction potential) เนื่องจากการทำงานของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำนม กระบวนการหายใจของจุลินทรีย์จะใช้ออกซิเจนที่มีอยู่ในน้ำนม จึงทำให้ค่าoxidation-reduction potential ลดลง และวัดการลดลงได้จากการใช้สี (dye) เป็นอินดิเคเตอร์

Dye reduction test ที่บริษัทใช้ มี 2 วิธี คือ

- methyleneblue reduction test

เป็นวิธีที่สะดวกง่ายใช้ประเมินคุณภาพทางจุลินทรีย์ในน้ำนมดิบได้ ถ้าน้ำนมดิบที่มีคุณภาพต่ำจะเห็นผลได้อย่างรวดเร็ว หลักการปกติ methylene blue จะมีสีน้ำเงินนรูป oxidize form แต่เมื่ออยู่ในรูป reduce form จะไม่มีสี ซึ่งการเปลี่ยนแปลงสีของ methylene blue ขึ้นกับปริมาณการใช้ออกซิเจนของจุลินทรีย์ โดยจำนวนชั่วโมงในการเปลี่ยนสี methylene blue สามารถแบ่งเกรดคุณภาพน้ำนมดิบได้ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การแบ่งเกรดน้ำนมดิบจากการตรวจสอบด้วย methylene blue reduction test บริษัทเชียงใหม่เฟรชมิลค์ จำกัด

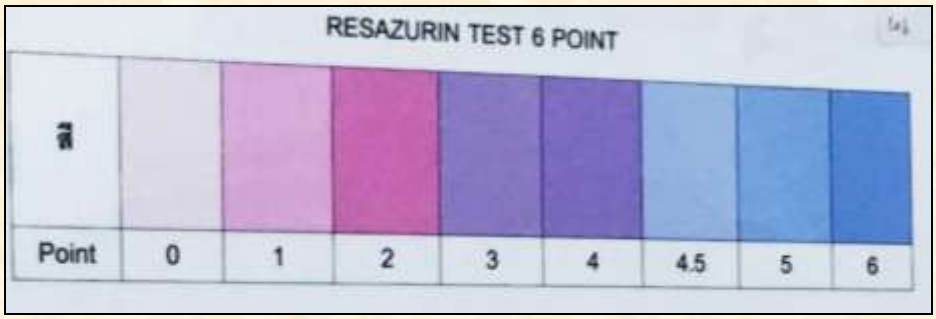
เกรด	จำนวนชั่วโมง
1	มากกว่า 6.00 ชั่วโมง
2	5.01-6.00 ชั่วโมง
3	4.01-5.00 ชั่วโมง
4	น้อยกว่าหรือเท่ากับ 4.00 ชั่วโมง

<u>วิธีการ</u> ปิเปตตัวอย่างน้ำนมดิบ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองที่มีฝาปิดแบบเกลียวและผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปิเปต methylene blue solution ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มใน water bath อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของตัวอย่างทุกๆ ครึ่งชั่วโมง เพื่อบันทึกเวลาการเปลี่ยนสี เทียบกับตาราง แบ่งเกรดคุณภาพน้ำนมดิบได้

- resazurin reduction test

<u>วิธีการ</u> ปิเปตตัวอย่างน้ำนมดิบ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองที่มีฝาปิดแบบเกลียวและผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปิเปต resazurin solution ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มใน water bath อุณหภูมิ 37

องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วอ่านผลการเปลี่ยนสี หลังจากบ่ม 1 ชั่วโมง แบ่งเกรดคุณภาพน้ำนมดิบโดยเทียบสีกับแผ่นเทียบสี(ภาพที่ 8) ให้คะแนน

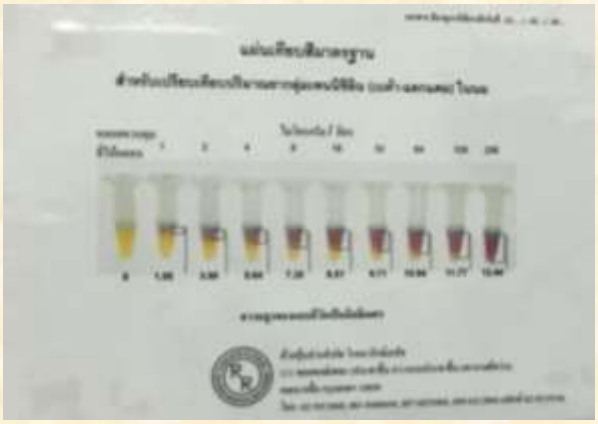


ภาพที่ 8 แผ่นเทียบสี resazurin test 6 point

การตรวจยาปฏิชีวนะและยาต้านจุลชีพที่ตกค้างในน้ำนม

ยาปฏิชีวนะและยาต้านจุลชีพ (ในที่นี้ใช้ชุดทดสอบของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ผลิตโดยห้างหุ้นส่วนโรจนารักษ์เภสัช) โดยใช้หลักการยับยั้งการแบ่งตัวของจุลินทรีย์คือวิธีการตรวจโดยใช้แบคทีเรีย ชนิดที่ไวต่อยาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพเป็นตัวทดสอบซึ่งชุดทดสอบนี้ใช้ *Bacillus stearothermophilus* เป็นตัวทดสอบและใช้ Bromocresol purple เป็นตัวบ่งชี้ (Indicator) ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเมื่อเกิดสภาพเป็นกรดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ

<u>วิธีการ</u> เทตัวอย่างน้ำนมดิบประมาณ 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองนำไปต้มใน Water bath ที่อุณหภูมิ 82± 2 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ดูดตัวอย่างทิ้ง 2-3 ครั้งด้วย Dropper แล้วหยดตัวอย่างนม 2-3 หยดในชุดทดสอบยาปฏิชีวนะแล้วจึงนำชุดทดสอบไปบ่มใน Water bath ที่อุณหภูมิ 64± 2 องศาเซลเซียส ให้อาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ใต้ระดับน้ำ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 45 นาที อ่านค่าตรวจวัดผลจากการวัดความสูงของแถบสีวัดเป็นมิลลิลิตรเทียบกับแผ่นเทียบสีมาตรฐาน ดังแสดงในภาพที่ 9 ถ้าสีของชุดตรวจสอบเปลี่ยนเป็นสีเหลืองทั้งหมดแสดงว่าตัวอย่างน้ำนมที่ทดสอบไม่มียาปฏิชีวนะตกค้าง และถ้าสีของชุดตรวจสอบเป็นสีม่วงแดงแสดงว่าตัวอย่างน้ำนมมียาปฏิชีวนะ แต่ถ้าสีของชุดตรวจสอบมีสีม่วงด้านบนและสีเหลืองด้านล่างแสดงว่าตัวอย่างน้ำนมมียาปฏิชีวนะตกค้างแต่พบในปริมาณที่ต่ำ



ภาพที่ 9 แผ่นเทียบสีมาตรฐาน สำหรับเปรียบเทียบปริมาณยากลุ่มแพนนิซิลิน (เบต้า-แลกแตม)ในนม

การตรวจสอบคุณภาพน้ำนมดิบ

1) การตรวจสอบปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (total plate count) โดยวิธี Pour plate บน 3M Petrifilm : Aerobic Count Plate (ภาพที่ 10)

<u>วิธีการ</u>

- ใช้ปิเปตดูดตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน Butterfield's Phosphate Buffered ปริมาณ 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer (ตัวอย่างถูกเจือจางลง 10 เท่า หรือเรียกว่าเป็น dilution 1:10 หรือ 10^{-1})

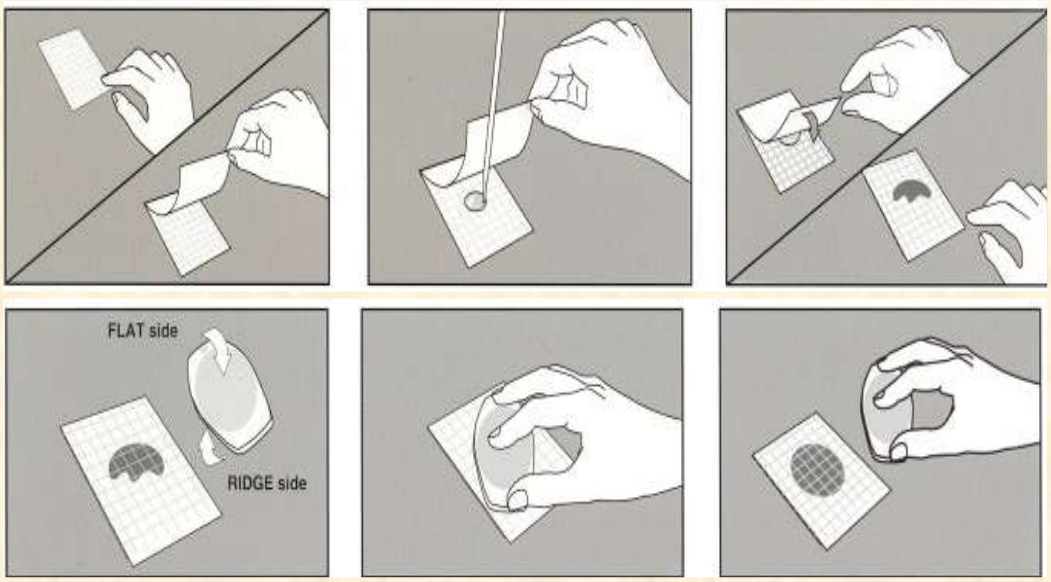
เจือจางตัวอย่างลงไปครั้งละ 10 เท่า จนได้ความเจือจาง (dilution) ที่ต้องการปกติในน้ำนมดิบจะทำที่ 10^{-3}-10^{-4}

- วางแผ่น 3M petrifilm : Aerobic Count Plate บนพื้นราบ เปิดแผ่นฟิล์มแผ่นบนขึ้น

- ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างจาก dilution ที่ต้องการมา 1 มิลลิลิตร หยดลงตรงกลางแผ่นฟิล์มแผ่นล่างให้ปิเปตตั้งฉากกับแผ่น 3M petrifilm : Aerobic Count Plate ค่อยๆ ปล่อยแผ่นฟิล์มแผ่นบนลงมา ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ วางตัวกด (Spreader) โดยให้ด้านที่มีขอบคว่ำหน้าลงสัมผัสแผ่นฟิล์มแผ่นบนให้ส่วนวงกลมครอบบริเวณที่หยดตัวอย่าง

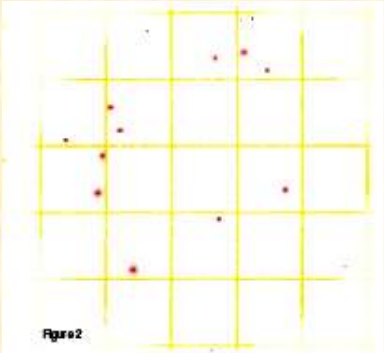
- นำแผ่น 3M petrifilm : Aerobic Count Plate บ่มที่อุณหภูมิ 35± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ±2 ชั่วโมง โดยให้ด้านใสอยู่ด้านบน สามารถซ้อนแผ่นได้ไม่เกิน 20 แผ่น

- โคโลนีถูกย้อมด้วยสีย้อมสีแดงในแผ่น นับจำนวนโคโลนีที่มีสีแดงทั้งหมด ไม่ว่าจะมีขนาดเล็กหรือใหญ่ สีเข้มหรือสีจางโดยจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 25-250 โคโลนี แล้วนำมาคำนวณรายงานผลเป็น cfu/ml (จำนวนโคโลนี × Dilution Factor) แสดงผลดังภาพ ที่ 11



ภาพที่ 10 ขั้นตอนการตรวจสอบจุลินทรีย์ด้วยใช้ 3M Petrifilm

(ก) ไม่มีโคโลนีของจุลินทรีย์



(ข) มีโคโลนีของแบคทีเรียขึ้นเล็กน้อย

ภาพที่ 11 ลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้น

2) การตรวจสอบปริมาณเชื้อ Coliform Bacteria

เนื่องจาก Coliform bacteria เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างแท่งสั้น ไม่สร้าง endospore ติดสีแกรมลบเป็น facultative anaerobe สามารถใช้น้ำตาล lactose ในกระบวนการหมัก แล้วให้กรดอินทรีย์ และก๊าซ (CO_2 และ H_2) ออกมา ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 24-48 ชั่วโมง Coliform bacteria แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ fecal coliform bacteria ซึ่งได้แก่ *Escherichia coli* และ non-fecal coliform bacteria ซึ่งได้แก่ *Enterobacter aerogenes*

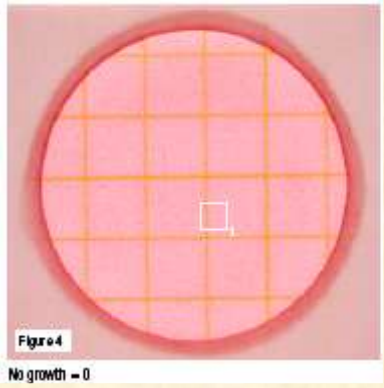
<u>วิธีการ</u> (1) เตรียม Plate ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บไว้ออกจากตู้เย็น ทำการเขย่าตัวอย่างไปมา ปิเปตดูดตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน Butterfield's Phosphate Buffered ปริมาณ 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer เจือจางตัวอย่าง จนได้ความเจือจาง (dilution) ที่ต้องการ

(2) ปิเปตตัวอย่างจาก Dilution ที่ต้องการมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในจานเพาะเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว

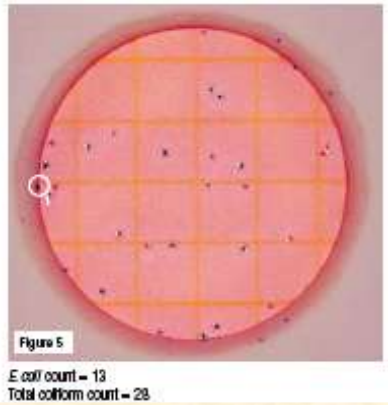
(3) นำอาหารเลี้ยงเชื้อ Violet red bile agar (VRB) ที่มีอุณหภูมิ 45-50 องศาสเซลเซียส มาเทลงในจานเพาะเชื้อที่ใส่ตัวอย่างจาก dilution ต่าง ๆ ไว้ จากนั้นผสมอาหารและตัวอย่างให้เข้ากันทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว แล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อ Violet red bile agar (VRB) ทับซ้ำอีกครั้ง ประมาณ 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว แล้วจึงกลับจานเพาะเชื้อแล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 $\pm$2 ชั่วโมง

(4) นับจำนวนโคโลนีที่มีสีแดงทั้งหมดโดยจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 15-150 โคโลนี แล้วนำมาคำนวณรายงานผลเป็น cfu/ml (จำนวนโคโลนี $\times$ Dilution Factor)

สำหรับในการตรวจสอบปริมาณ *E. coli*/Coliform count plate โดยวิธี Pour plate บน 3M Petrifilm: *E. coli*/Coliform count plate เป็นอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อไวโอเล็ตเรดไบล์ (VRB) สีย้อมเพื่อบ่งชี้ปฏิกิริยาจากเอ็นไซม์กลูคิวโรนิเดส (glucuronidase) และสีย้อมเพื่อช่วยในการนับจำนวนโคโลนี *E. coli* ส่วนมากผลิตเอ็นไซม์เบต้ากลูคิวโรนิเดส (beta-glucuronidase) ทำให้เกิดตะกอนสีน้ำเงินที่โคโลนีแผ่นฟิล์มแผ่นดักฟองก๊าซที่ผลิตโดยโคลิฟอร์มและอีโคไล จากปฏิกิริยาการหมักน้ำตาลแลคโตส (95%) ของ *E. coli* ผลิตฟองก๊าซ ลักษณะโคโลนีแสดงดังภาพที่ 12



(ก) ไม่พบการเจริญเติบโตของ *E. coli* และ coliform



(ข) โคโลนี *E. coli* และ coliform ที่พบ ไม่นับโคโลนีที่ขึ้นอยู่บนขอบโฟม

ภาพที่ 12 ลักษณะโคโลนี *E. coli* และ coliform

3) การตรวจสอบปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทนร้อน (LPC , Mesophile spore, Thermophile spore)

แบคทีเรียทนร้อน (thermoduric bacteria) หมายถึง แบคทีเรียที่ทนต่ออุณหภูมิสูง สามารถอยู่รอดได้ในสภาวะแวดล้อมที่มีอุณหภูมิค่อนข้างสูงได้ ถึงแม้จะใช่อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโต จึงเพิ่มจำนวนช้าในช่วงอุณหภูมิสูง แบคทีเรียกลุ่มนี้ สามารถอยู่รอดได้ที่อุณหภูมิ 60-80 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญคือ อุณหภูมิปานกลางในช่วง 15-37 องศาเซลเซียส ต่างจาก thermophilic bacteria ซึ่งชอบเจริญและขยายพันธุ์ที่อุณหภูมิสูง แบคทีเรียทนความร้อนที่พบปนเปื้อนในน้ำนมดิบ ได้แก่ Micrococcus, Microbacterium, Streptococcus, Lactobacillus, Bacillus, Clostridium และแบคทีเรียกลุ่ม Coryneform แบคทีเรียทนร้อนปนเปื้อนในน้ำนม มาจากเต้านมวัว อุปกรณ์ และเครื่องมือเครื่องใช้ที่ไม่สะอาด ผลต่ออาหาร แบคทีเรียทนร้อนเป็นสาเหตุการเสื่อมเสียของอาหาร (microbial spoilage) นอกจากนี้ ปริมาณจุลินทรีย์ทนความร้อนบ่งบอกถึงปฏิบัติการที่ไม่ถูกสุขลักษณะและใช้บ่งชี้ประสิทธิภาพในการทำความสะอาดเครื่องจักรและอุปกรณ์แปรรูปอาหาร

<u>วิธีการ</u> (1) ปิเปตดูดตัวอย่าง 6 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำหลอดตัวอย่าง ต้มใน water bath อุณหภูมิ 60±2 องศาเซลเซียส จับเวลา 30 นาที ตรวจสอบ LPC; อุณหภูมิ 80±2 องศาเซลเซียส จับเวลา 10 นาที ตรวจสอบ Mesophile spore (บ่ม 35 องศาเซลเซียส) ; อุณหภูมิ 100±2 องศาเซลเซียส จับเวลา 15 นาที ตรวจสอบ Thermophile spore (บ่ม 55 องศาเซลเซียส)

(2) นำหลอดตัวอย่างมา cooling ในน้ำแข็งทันที ให้อุณหภูมิลดลงถึง 4-8 องศาเซลเซียส จับเวลา 10 นาที

สำหรับการตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ทนร้อน Mesophile spore และ Thermophile spore ในตัวอย่าง โดยวิธี Pour plate ปิเปตดูดตัวอย่างที่ต้มและ cooling แล้วมาครั้งละ 1 มิลลิลิตร ใส่ในจานเพาะเชื้อ 35 องศาเซลเซียส และ 55 องศาเซลเซียส ที่เตรียมไว้ นำอาหารเลี้ยงเชื้อ Dextrose casein peptone agar ที่มีอุณหภูมิ 45–50 องศาเซลเซียส มาเทลงในจานเพาะเชื้อ โดยเทประมาณ 15-20 มิลลิลิตร จากนั้นผสมอาหารและตัวอย่างให้เข้ากัน ทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว แล้วจึงกลับจานเพาะเชื้อแล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อ Mesophile spore ที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส และ Thermophile spore ที่อุณหภูมิ 55 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ±2 ชั่วโมง.

- นับจำนวนโคโลนีสีเหลือง และสีม่วง จากจานเพาะเชื้อแล้วรายงานผลเป็น cfu/ml

4) การตรวจความสะอาดของเครื่องมือ อุปกรณ์ ท่อส่งน้ำนม ต่างๆ โดยวิธี Rapid Cleanliness testing :ATP Bioluminescence

เป็นการตรวจความสะอาดเบื้องต้นแบบ Real time อ่านผลได้ภายใน 30 วินาที ทำให้สามารถจัดการกับความสกปรกก่อนที่จะปนเปื้อนเข้าสู่ผลิตภัณฑ์ได้ การตรวจพบ ATP แสดงถึงการมีอยู่ของเซลล์สิ่งมีชีวิต ได้แก่ จุลินทรีย์ (แบคทีเรีย ยีสต์ รา) พืชและสัตว์ รวมทั้งคนด้วย

แสงที่ได้จากการที่ ATP ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ Luciferin และ Luciferae เครื่องอ่านค่าแสง Luminometer (ภาพที่ 13) จะทำการวัดแสงที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ค่าแสงที่ได้มีหน่วยเป็น Relative light unit (RLU)

ภาพที่ 13 เครื่อง Luminometer

5) การตรวจหาเชื้อ *E. coli* ในผลิตภัณฑ์นมยูเอชทีที่มีปัญหาและตัวอย่างน้ำ

<u>วิธีการ</u> โดย streak ตัวอย่างน้ำนมและตัวอย่างน้ำ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ EMB agar

<u>การประเมินผล</u> ถ้า streak ที่ขึ้นเป็นสีเขียวๆเรียกว่า metallic sheet คือมีสีเขียวเหมือนโลหะ คล้ายสีของปีกแมลงทับ แสดงว่าตรวจพบ *E. coli* (ภาพที่ 14)

ภาพที่ 14 ลักษณะโคโลนี metallic sheet ที่ตรวจพบ *E. coli*

การตรวจลักษณะกล่องนม UHT ระหว่างผลิต

การตรวจแนวเชื่อม LS seal ตรวจวิเคราะห์ด้วยหมึกแดง (1.5% erythosin ; ชั่งผง erythosin 1.5 กรัม ละลายใน Iso propanol 1000 มิลลิลิตร)

<u>วิธีการ</u> เตรียมบรรจภัณฑ์ ล้างด้วยน้ำและทำให้แห้ง ใช้เข็มฉีดยา ฉีด 1.5% erythosin เข้าไปในช่องอากาศ (air channel) เส้นผ่าศูนย์กลางของเข็มควรอยู่ในช่วง 0.4-0.5 มิลลิเมตร

<u>การประเมินผล</u> รอยเชื่อมที่ดี หมึกแดง erythosin เป็นเส้นตรงตลอดแนวของช่องอากาศโดยไม่มี deviation ดังภาพที่ 15

(ก)

(ข)

ภาพที่ 15 การตัดกล่องนม (ก) การตรวจรอยเชื่อมด้วย 1.5% erythosin (ข)

การตรวจกล่องที่บรรจุภัณฑ์นมโรงเรียนหารอยรั่ว โดยการวัดค่าการนำไฟฟ้า(package integrity by conductivity) ซึ่งสามารถตรวจสอบและสันนิษฐานได้ว่าบรรจุภัณฑ์ อาจมีรอยรั่วได้

<u>วิธีการ</u> ตัดครึ่งกล่อง (ภาพที่ 16 ก) โดยไม่ให้กล่องขาดออกจากกัน แล้วล้างน้ำให้สะอาด เช็ดให้แห้ง จากนั้นใส่สารละลาย 1% โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ลงไปในกล่องนม ภาพที่ 16 ข และอ่านค่าการตรวจวัด ถ้าพบว่ามีรอยรั่วบริเวณกล่องเข็มมิเตอร์จะขยับ (ภาพที่ 16 ค)

(ก)

(ข)

(ค)

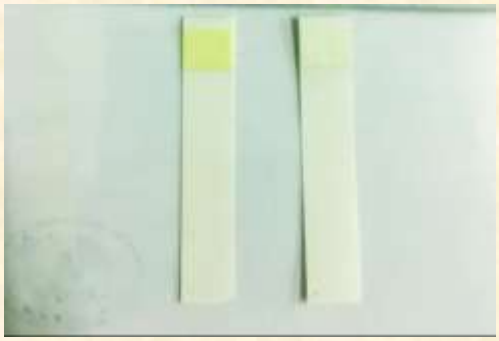
ภาพที่ 16 การตรวจค่าการนำไฟฟ้ากล่องบรรจุนม UHT

การตรวจสอบความสมบูรณ์ของการพาสเจอร์ไรซ์น้ำนม

หลักการตรวจสอบว่าความร้อนที่ใช้เพื่อการพาสเจอร์ไรซ์เพียงพอที่จะทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคตามที่กำหนดไว้หรือไม่ ใช้การทดสอบเอนไซม์ที่เหลืออยู่แทนการทดสอบหาจุลินทรีย์ เนื่องจากความร้อนที่ใช้ในการพาสเจอไรซ์ได้ทำลายเอนไซม์ ซึ่งเป็นโปรตีนให้เสียสภาพธรรมชาติ เช่นเดียวกับทำลายจุลินทรีย์ แต่การทดสอบหาเอนไซม์ใช้เวลารวดเร็วกว่าจุลินทรีย์ โดยเลือกตรวจหาเอนไซม์ที่พบในน้ำนมนั้น และมีความต้านทานความร้อนใกล้เคียงกับจุลินทรีย์ที่เป็นเป้าหมายที่ต้องการทำลาย บริษัทได้ตรวจสอบน้ำนมผ่านการพาสเจอไรซ์ โดยจะตรวจสอบหากิจกรรมของเอนไซม์ แอลลาไลน์ฟอสฟาเทส (alkaline phosphatase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบในน้ำนมดิบ จึงเรียกว่า phosphatase test เอนไซม์นี้ถูกทำลายด้วยความร้อน แถบทดสอบนี้จะช่วยให้การตรวจสอบที่เฉพาะเจาะจงของด่าง phosphatase ในนม ในอุตสาหกรรมนมการทดสอบจะใช้สำหรับการควบคุมคุณภาพที่ง่ายและรวดเร็วของนมพาสเจอร์ไรส์

<u>วิธีการ</u> นำ strip จุ่มลงไปในนมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ถ้ากระดาษยังคงขาวแสดงว่าการพาสเจอร์ไรซ์เสร็จ ดังแสดงในภาพที่ 17

(ก)



(ข)

ภาพที่ 17 กระดาษทดสอบ MI Phosphatesmo (ก); ผลการตรวจสอบอุณหภูมิในการพาสเจอร์ไรส์น้ำนม โดยกระดาษทดสอบ(ข)