



โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การวิเคราะห์สารเมตาบอลิต์ชนิดระเหยยากในผลิตภัณฑ์
น้ำมันเหลืองของโคด้วยเทคนิคโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติก
เรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี

ชื่อนิสิต นางสาวน้ำทิพย์ วรรณชวีพิบูลย์
นางสาวพัชรีชญาณ์ อรัญพัณกรณ์

ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร

ปีการศึกษา 2561

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the senior project authors' files submitted through the faculty.

การวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากในผลิตภัณฑ์น้ำมันเมล็ดของโค
ด้วยเทคนิคโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี

โดย

นางสาวน้ำทิพย์ วรรณขจีพิบูลย์

นางสาวพัชริญาณ์ อรัญพัฒนภรณ์

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ ดร. ศานต์ เศรษฐชัยมงคล

รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประจำปีการศึกษา 2561

ANALYSIS OF NON-VOLATILE METABOLITES IN BOVINE COLOSTRUM

USING $^1\text{H-NMR}$ SPECTROSCOPY

Namthip Wannakajeebiboon

Phatchiya Arunpunporn

Project Advisor

Sarn Settachaimongkon, Ph.D.

A Report Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Bachelor of Science Program in Food Technology

Department of Food Technology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2017

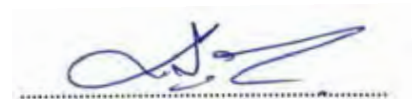
หัวข้องานวิจัย การวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากในน้ำมันเหลืองของโคด้วยเทคนิคโปรตอนนิวเคลียร์
แมกเนติกเรโซแนนซ์ สเปกโทรสโกปี
โดย นางสาว น้ำทิพย์ วรรณขจีพิบูลย์
นางสาว พัชรีญาณ์ อรัญพัฒนภรณ์
สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ ดร.ศานต์ เศรษฐชัยมงคล
ปีการศึกษา 2561

ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
อนุมัติให้รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
ประจำปีการศึกษา 2561



(รองศาสตราจารย์ ดร.ชนิษฐา ธานานวงศ์)

หัวหน้าภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร



อาจารย์ ดร.ศานต์ เศรษฐชัยมงคล

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

หัวข้องานวิจัย	การวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากในน้ำนมเหลืองของโคด้วยเทคนิคโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ สเปกโทรสโกปี
โดย	นางสาว น้ำทิพย์ วรรณขจีพิบูลย์ นางสาว พัชรีญาณ์ อรัญพัฒนภรณ์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร.ศานต์ เศรษฐชัยมงคล
ปีการศึกษา	2561

บทคัดย่อ

น้ำนมเหลือง (colostrum) เป็นน้ำนมที่แม่โคหลั่งออกมาหลังการคลอดลูกในช่วง 24-72 ชั่วโมงแรก มีลักษณะเป็นของเหลวสีเหลืองข้น จัดเป็นแหล่งอาหารแรกสุดที่อุดมไปด้วยคุณค่าทางโภชนาการและสารแอนติบอดีที่ช่วยเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันให้แก่ลูกโคแรกเกิด จากประโยชน์ดังกล่าวจึงมีการนำน้ำนมเหลืองมาใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์กลุ่มอาหารเชิงหน้าที่ (functional food) เพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการและมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์ ดังนั้น การศึกษาสารชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบในน้ำนมเหลืองรวมทั้งความผันแปรขององค์ประกอบดังกล่าว จึงเป็นปัจจัยสำคัญเบื้องต้นเพื่อให้เกิดความรู้ความเข้าใจและสามารถนำน้ำนมเหลืองมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ได้อย่างเหมาะสม ปัจจุบันมีการนำเทคโนโลยีเมตาโบลอมิกส์ (metabolomics) มาใช้เพื่อวิเคราะห์ข้อมูลสารชีวโมเลกุลขนาดเล็ก (<1.5 kDa) ที่เป็นองค์ประกอบในระบบอาหารอย่างกว้างขวาง อย่างไรก็ตาม การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีดังกล่าวเพื่อศึกษาข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของน้ำนมและผลิตภัณฑ์นมในประเทศไทยยังมีอยู่อย่างจำกัด ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ (i) วิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพและข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากในน้ำนมเหลืองของโคที่ผลิตได้ในประเทศไทย โดยใช้เทคนิคโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี ($^1\text{H-NMR}$) (ii) เปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลดังกล่าวในน้ำนมเหลืองที่ได้จากฟาร์มในเขตพื้นที่ต่างกัน (นครราชสีมา และ ชัยภูมิ) และจากแม่โคที่มีระยะเวลาในการให้น้ำนมเหลืองต่างกัน (วันที่ 1 และ 3 ภายหลังการคลอดลูก) ด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร (multivariate statistics) และ (iii) วิเคราะห์ชนิดของสารเมตาบอไลต์ที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (potential biomarker) ต่อคุณลักษณะและความผันแปรของน้ำนมเหลืองจากแม่โคกลุ่มที่สนใจ ผลจากการวิเคราะห์น้ำนมเหลืองของโคจำนวน 32 ตัวอย่าง แสดงให้เห็นว่าระยะเวลาหลังการคลอดลูก (post-parturition) มีผลต่อสมบัติทางเคมีกายภาพและข้อมูลสารชีวโมเลกุลในน้ำนมเหลืองชัดเจนกว่าอิทธิพลจากฟาร์ม โดยพบว่ามีปริมาณกรดทั้งหมดที่ได้จากการไทเทรต (9% lactic acid) ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ ($^{\circ}\text{Brix}$) ปริมาณโปรตีน (9% w/w) และค่าความหนืด (cP) ของตัวอย่างลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในวันที่ 3 ภายหลังการคลอดลูก จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ สามารถระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์กลุ่มกรดอะมิโนและอนุพันธ์ของกรดอะมิโน น้ำตาลและอนุพันธ์ของน้ำตาล สารประกอบคาร์บอนิล กรดอินทรีย์และอนุพันธ์ของกรดดังกล่าว อนุพันธ์ของไขมัน และสารประกอบอินทรีย์อื่นๆ ในตัวอย่างได้ทั้งหมด 53 สาร ผลจากการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal component analysis) และการวิเคราะห์แบบจัดกลุ่ม (cluster analysis) แสดงให้เห็นว่าข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากในน้ำนมเหลืองวันที่ 1 และ 3 ภายหลังการคลอดลูกมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนทางสถิติ โดยพบว่าปริมาณสัมพัทธ์ของสารเมตาบอไลต์ส่วนมากมีค่าลดลงในตัวอย่างที่เก็บในวันที่ 3 ภายหลังการคลอดลูก โดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงของ isoleucine, tyrosine, butyrate, threonine และ ethanol สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อแยกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่มได้ ผลการวิจัยดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงการประยุกต์ใช้เทคนิคทางเคมีวิเคราะห์ขั้นสูงด้วย $^1\text{H-NMR}$ ร่วมกับการประมวลผลทางเคมีเมตริกซ์ (chemometrics) ในการศึกษาข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลในน้ำนมเหลืองของโคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Project Title	Analysis of non-volatile metabolites in bovine colostrum using $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy
Student	Namthip Wannakajeepon Phatchiya Arunpunporn
Study Program	Bachelor of Science in Food Technology
Advisor	Sarn Settachaimongkon, Ph.D.
Academic Year	2018

Abstract

Colostrum is the viscous fluid mammary secretion obtained during the initial three days after parturition and precedes the production of common raw milk. Nowadays, bovine colostrum has become popular as a functional food ingredient due to its abundance in minerals, antibodies and bioactive peptides. It is well documented that the major chemical composition of colostrum differs markedly from the mature milk. However, low molecular weight substances present in colostrum could also provide significant influence on its biochemical characteristics. Metabolomics is an emerging field of -omics approaches that focuses on comprehensive characterization of the overall small molecular weight metabolites (<1.5 kDa) present in a biological system. Recently, this analytical platform has been well acknowledged in food and dairy research. Still, the application of metabolomics for molecular investigation of Thai dairy products is rather limited. Therefore, the aims of this study were to characterize and compare non-volatile metabolite profiles of colostrum collected at different parturition periods (day 1 and day 3) from two selected dairy farms located in northeastern Thailand. After fat and proteins removal, the serum was analyzed using a high-resolution proton nuclear magnetic resonance spectroscopy ($^1\text{H-NMR}$ at 500 MHz). $^1\text{H-NMR}$ derived data were analyzed and compared by means of multivariate statistics. A total of 53 metabolites were presumptively identified in this study. The main effect from post-parturition period provided a significant impact on physiochemical properties and the metabolome of colostrum while variations between farms were less pronounced. Results demonstrated that titratable acidity, total soluble solid content, protein content and viscosity of samples significantly decreased ($p < 0.05$) along with extended days after parturition. PCA and cluster analysis revealed a clear distinction between the metabolome of colostrum collected on the first and the third day after parturition. Decreases in the concentration of isoleucine, tyrosine, butyrate, threonine and ethanol were identified as potential biomarkers accountable for discrimination. This study demonstrates a very promising application of $^1\text{H-NMR}$ combined with chemometrics to provide new insights on the molecular investigation of bovine colostrum produced in Thailand.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของการเรียนการสอนในระดับปริญญาตรีของภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งงานวิจัยนี้จะไม่สำเร็จลงได้ด้วยดีหากมิได้รับความช่วยเหลือจากหลายๆ ฝ่าย ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบุคคลต่างๆ ที่ได้กรุณาให้ความอนุเคราะห์ดังต่อไปนี้

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.ศานต์ เศรษฐชัยมงคล อาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัย ซึ่งคอยให้คำแนะนำตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษาและวิจัย เพื่อให้แต่ละขั้นตอนเป็นไปอย่างราบรื่น ตลอดจนให้คำปรึกษาในการแก้ไขปัญหาและอุปสรรคต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างงานวิจัย และตรวจแก้ไขให้เป็นรูปเล่มรายงานที่สมบูรณ์ในที่สุด

ขอขอบพระคุณ คุณเดวิด มกรพงศ์ ที่ให้ความช่วยเหลือ ประสานงานกับทางฟาร์มและจัดหาตัวอย่างน้ำนมเหลืองมาสับสับจนตลอดงานวิจัยนี้

คุณอำเภอ เขตสำลี หัวหน้าห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาที่กรุณาอนุญาตให้ใช้เครื่องมือ อุปกรณ์ในการศึกษาและคำแนะนำในการใช้เครื่องมือต่างๆในห้องปฏิบัติการ

ขอขอบพระคุณ คุณธรา จันทร์ทะธรรม เจ้าหน้าที่ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ในการอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง

ขอขอบพระคุณ คุณวรรณวิมล เมฆบุญส่งลาภ เจ้าหน้าที่บริการวิทยาศาสตร์ ศูนย์เครื่องมือวิจัย วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในการอำนวยความสะดวก ให้ข้อมูลและคำแนะนำอันเป็นประโยชน์ในการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำนมเหลืองด้วย NMR-spectroscopy

ขอขอบคุณ นางสาว อัญชิสา กุลทวีสุข และ นางสาว มาริสรา คงบุญเกิด นิสิตปริญญาโทมหาบัณฑิตในที่ปรึกษาของอาจารย์ ดร.ศานต์ เศรษฐชัยมงคล คอยให้คำแนะนำในปฏิบัติการต่าง ๆ ในงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณรุ่นพี่ รุ่นน้อง และเพื่อนนิสิตภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารที่ให้คำแนะนำและให้ความช่วยเหลือตลอดมา

ขอขอบพระคุณครอบครัวและญาติ สำหรับกำลังใจและการสนับสนุน ส่งผลให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วง

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ คณะกรรมการโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ฝายวิชาการ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้สนับสนุนเงินทุนสำหรับโครงการนี้ และคณะผู้วิจัยหวังอย่างยิ่งว่า ผลงานวิจัยชิ้นนี้จะเป็นประโยชน์แก่บุคคลที่สนใจและสามารถนำไปพัฒนาในงานวิจัยอื่นๆต่อไป

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงการ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย	2
บทที่ 2 แนวคิดทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 น้่านมโค	3
2.2 องค์ประกอบทางเคมีของนมโค	4
2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อองค์ประกอบทางเคมีและคุณภาพของนมดิบ	12
2.4 น้่านมเหลือง	15
2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อองค์ประกอบทางเคมีของน้่านมเหลือง	27
2.6 ประโยชน์ของน้่านมเหลือง (colostrum)	30
2.7 เทคโนโลยีเมตาโบโลมิกส์	32
2.8 เทคนิคทางเคมีวิเคราะห์ขั้นสูงด้วยนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (nuclear magnetic resonance spectroscopy: NMR)	36
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย	
3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี	41
3.2 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย	44
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์การทดลอง	
4.1 การทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างและการวิเคราะห์ (validation of methods)	60
4.2 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพในตัวอย่างน้่านม	66
4.3 การประมวลผลโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างน้่านมเหลืองของโค โดยใช้เทคนิค การวิเคราะห์ทางเมตาโบโลมิกส์	76
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	
5.1 สรุปผลการทดลอง	95
5.2 ข้อเสนอแนะ	97

	หน้า
เอกสารอ้างอิง	98
ภาคผนวก ก	109
ภาคผนวก ข	110
ภาคผนวก ค	111
ภาคผนวก ง	113
ภาคผนวก จ	114
ภาคผนวก ฉ	123
ประวัติผู้วิจัย	128

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การแบ่งชั้นคุณภาพนํ้านมดิบตามคุณลักษณะ	3
2	ชนิดของกรดไขมันในนํ้านมของโค	6
3	ชนิดของโปรตีนในนํ้านม	8
4	ปริมาณแร่ธาตุและเถ้าในนํ้านม	10
5	ค่าเฉลี่ยสัดส่วนขององค์ประกอบทางเคมีของนํ้านมที่ได้จากสัตว์ชนิดต่าง ๆ (%w/w)	12
6	องค์ประกอบทางเคมีของนํ้านมที่ได้จากโคแต่ละสายพันธุ์ (%w/w)	13
7	การเปรียบเทียบข้อมูลทางโภชนาการของนํ้านมเหลืองในโค และ มนุษย์	17
8	การเปรียบเทียบข้อมูลทางโภชนาการของนํ้านมเหลืองของโค และ มนุษย์	18
9	ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนในนํ้านมเหลืองของโค	19
10	ปริมาณของน้ำตาลแลคโตสในนํ้านมเหลืองของโค	20
11	ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนในนํ้านมเหลืองของโค	21
12	ชนิดและหน้าที่ของวิตามินในนํ้านมเหลืองของโค	22
13	ชนิด ปริมาณ และ หน้าที่ของอิมมูโนโกลบูลินในนํ้านมเหลืองของโค	23
14	สัดส่วนองค์ประกอบทางเคมีของนํ้านมเหลืองในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม 19 ชนิด	27
15	สัดส่วนองค์ประกอบทางเคมีของนํ้านมเหลืองของโคต่างสายพันธุ์	28
16	สัดส่วนองค์ประกอบทางเคมีของนํ้านมเหลืองของโค	28
17	ความแตกต่างขององค์ประกอบทางเคมีในนํ้านมเหลืองของโคที่แปรผันตามจำนวนครั้งที่คลอดลูก	29
18	ความแตกต่างขององค์ประกอบทางเคมีในนํ้านมเหลืองของโคที่แปรผันตามอาหาร	29
19	ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้เทคโนโลยีเมตาโบโลมิกส์ในผลิตภัณฑ์นม	33
20	ตัวอย่างสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายและสารเมตาบอไลต์ระเหยยากในนํ้านมโค	35
21	เลขสปีนควอนตัม	37
22	ค่าคงที่ gyromagnetic ratio ของตัวอย่างธาตุ	38
23	รายละเอียดฟาร์มโคนมของเกษตรกร	51
24	สรุปการเก็บตัวอย่างนํ้านมเหลืองในแต่ละฟาร์ม	52
25	ปริมาณโปรตีนที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมทางการค้าในประเทศไทย	60
26	ปริมาณโปรตีนที่หาได้จากตัวอย่างนํ้านมเหลืองของโค	61
27	แสดงน้ำหนักตัวอย่างที่ใช้เมื่อมีปริมาณไนโตรเจน หรือ โปรตีนที่แตกต่างกัน	62
28	ผลการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพของนํ้านมเหลืองของโค	69
29	ภาพถ่ายสีของตัวอย่างนํ้านมเหลืองของโคภายหลังการคลอดลูก ทั้ง 32 ตัวอย่าง	72

ตารางที่		หน้า
30	สารเมตาบอไลต์ 53 เมตาบอไลต์ที่พบในตัวอย่งน้ำนมเหลืองของโคในงานวิจัยนี้	77
จ1	ตำแหน่งสารเมตาบอไลต์ทั้งหมดที่พบในงานวิจัยนี้	107
จ2	ปริมาตรสัมพัทธ์ของสารเมตาบอไลต์ในน้ำนมเหลืองของโควันที่ 1 และวันที่ 3 หลังการคลอด	114

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	องค์ประกอบทางเคมีในน้ำนมดิบ	4
2	โครงสร้างทางเคมีของน้ำตาลแลคโตส	4
3	ลักษณะเม็ดไขมันในน้ำนม	5
4	ระบบของเม็ดไขมันนม	7
5	เคซีนไมเซลล์	9
6	องค์ประกอบทางเคมีในน้ำนมเหลืองในคน	16
7	อัตราส่วนของ Casein แต่ละชนิดที่เปลี่ยนไปตามระยะเวลาภายหลังการคลอดลูกในน้ำนมเหลืองของโคสายพันธุ์ Polish Holstein-Friesian	18
8	อิมมูโนโกลบูลินชนิดต่าง ๆ	24
9	สเปกตรัมของอิมมูโนโกลบูลินแต่ละชนิดต่อปัจจัยด้านจำนวนครั้งในการตั้งครรภ์	24
10	ปริมาณของแลคโตเฟอรินแปรผันตามระยะเวลาในการให้น้ำนม	25
11	ปริมาณของบีตาแลคโตโกลบูลินแปรผันตามระยะเวลาในการให้น้ำนม	26
12	ปริมาณของแอลฟาแลคตับูมินแปรผันตามระยะเวลาในการให้น้ำนม	26
13	การเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียสเมื่อได้รับพลังงานกระตุ้นในระดับที่เหมาะสม	37
14	ระดับพลังงาน	37
15	ภาพรวมของวิธีการดำเนินงานวิจัยนี้	45
16	สรุปขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างน้ำนมโค สำหรับการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ spectrometer	50
17	สรุปขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโค สำหรับการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ spectrometer ในงานวิจัยนี้	57
18	ของเหลวที่แยกไขมันออกเรียบร้อยแล้ว	63
19	ตัวอย่างไม่สามารถแยกชั้นไขมันออกมาได้	63
20	หลอดขนาด 10.4 มิลลิลิตรเกิดความเสียหาย	64
21	ตัวอย่างที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง ultracentrifuge	64
22	ของเหลวหลังการกรอง	64
23	การเปรียบเทียบสเปกตรัมน้ำนมเหลืองของโคที่ได้จากการทดลองกับสเปกตรัมมาตรฐานน้ำนมดิบ	65
24	การเปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่างที่ได้จากแม่โคทั้ง 2 ฟาร์ม	67
25	การเปรียบเทียบปริมาณกรดทั้งหมดที่ได้จากแม่โคทั้ง 2 ฟาร์ม	68
26	การเปรียบเทียบปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดที่ได้จากแม่โคทั้ง 2 ฟาร์ม	70

ภาพที่		หน้า
27	การเปรียบเทียบค่าความหนืดที่ได้จากแมโครทั้ง 2 พาร์ม	74
28	การเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่ได้จากแมโครทั้ง 2 พาร์ม	75
29	การระบุตำแหน่งข้อมูลของสารเมตาบอไลต์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ ของ น้ำนมเหลืองของโค	77
30	แผนผังแสดงจำนวน bin จากการประมวลผลด้วยวิธีทางสถิติ เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ ทางสถิติหลายตัวแปร	79
31	วิเคราะห์โดยการจัดกลุ่ม ด้วยเทคนิค heat-map visualization และ hierarchical cluster analysis (HCA) ของโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ จากตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโค	81
32	PCA 2D score plot (ก), PCA 3D score plot (ข), PC loading (ค) และ VIP score (ง) ของโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลที่ได้จากการ วิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ จากตัวอย่างน้ำนมเหลือง ของโคทั้งหมด	83
33	heat-map visualization และ hierarchical cluster analysis (HCA) (ก), PCA 2D score plot (ข) และ PC loading (ค) ของโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลที่ได้จากการ วิเคราะห์ ด้วย $^1\text{H-NMR}$ จากตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโควันที่ 1	85
34	heat-map visualization และ hierarchical cluster analysis (HCA) (ก), PCA 2D score plot (ข) และ PC loading (ค) ของโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลที่ได้จากการ วิเคราะห์ ด้วย $^1\text{H-NMR}$ จากตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโควันที่ 3	87
35	การวิเคราะห์วิถีเมตาบอลิซึม (pathway analysis) ของสารเมตาบอไลต์ที่แตกต่างกัน ระหว่างน้ำนมเหลืองของโควันที่ 1 และวันที่ 3 หลังการคลอด	89
36	KEGG's pathway analysis	90
37	เปรียบเทียบ NMR spectra น้ำนมเหลืองของโควันที่ 1 และวันที่ 3 หลังการคลอด	92
38	แผนภาพเวนน์ (Venn Diagram) ของสารเมตาบอไลต์ที่พบในตัวอย่างน้ำนมดิบ, น้ำนม เหลืองของโค และทั้งสองตัวอย่าง	93
ข1	ใบรับรองของกรมวิทยาศาสตร์บริการ	103
ค2.1	สรุปการเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร	104
ง1	การแปลงข้อมูลให้อยู่ในรูปแบบที่ง่ายต่อการนำไปวิเคราะห์	106
ฉ1	ความสัมพันธ์ระหว่าง isoleucine กับสารเมตาบอไลต์อื่น ๆ ในน้ำนมเหลืองของโค	117
ฉ2	ความสัมพันธ์ระหว่าง threonine กับสารเมตาบอไลต์อื่น ๆ ในน้ำนมเหลืองของโค	118
ฉ3	ความสัมพันธ์ระหว่าง tyrosine กับสารเมตาบอไลต์อื่น ๆ ในน้ำนมเหลืองของโค	119
ฉ4	ความสัมพันธ์ระหว่าง butyrate กับสารเมตาบอไลต์อื่น ๆ ในน้ำนมเหลืองของโค	120
ฉ5	ความสัมพันธ์ระหว่าง ethanol กับสารเมตาบอไลต์อื่น ๆ ในน้ำนมเหลืองของโค	121

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงการ

น้ำนมเหลือง (colostrum) เป็นน้ำนมที่ได้จากแม่โคหลังคลอดลูกไปแล้วไม่เกิน 3 วัน จัดเป็นแหล่งอาหารแรกของลูกโคที่เพิ่งคลอด ซึ่งอุดมไปด้วยสารอาหารที่จำเป็นได้แก่ โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต วิตามินและแร่ธาตุ รวมถึงมีองค์ประกอบที่เป็นสารสร้างภูมิคุ้มกันตามทานและ growth factor เช่น แอลฟาแลกตาบูมิน (alpha-lactalbumin), แอลบูมิน (albumin), อิมมูโนโกลบูลิน (Immunoglobulin) เป็นต้น จากคุณค่าทางโภชนาการและประโยชน์ในการส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันดังกล่าว จึงมีการนำน้ำนมเหลืองมาใช้เป็นส่วนประกอบทั้งในผลิตภัณฑ์กลุ่มอาหารสัตว์และผลิตภัณฑ์เสริมอาหารของคน เพื่อเสริมคุณค่าทางโภชนาการและเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ดังนั้น การศึกษาองค์ประกอบของน้ำนมเหลืองจึงเป็นปัจจัยสำคัญเบื้องต้นที่จะทำให้ทราบถึงประเภทของสารชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบในน้ำนมเหลือง รวมทั้งความผันแปรขององค์ประกอบดังกล่าวอันเนื่องมาจากปัจจัยต่าง ๆ ในระหว่างกระบวนการผลิต เพื่อให้เกิดความรู้ความเข้าใจและสามารถนำน้ำนมเหลืองมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารได้อย่างเหมาะสมและคงไว้ซึ่งประโยชน์สูงสุดต่อผู้บริโภค ซึ่งปัจจุบันได้มีการนำเทคโนโลยีเมตาโบโลมิกส์ (metabolomics) มาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์สารชีวโมเลกุลขนาดเล็ก หรือสารเมตาบอไลต์ (metabolite) ที่เป็นองค์ประกอบย่อยในน้ำนมเหลืองของโค ซึ่งในปัจจุบันมีการใช้เทคโนโลยีเมตาโบโลมิกส์ (metabolomics) ในการวิเคราะห์เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางชีวเคมีในระบบอาหารแบบองค์รวม (holistic approach) เพื่อให้เกิดความเข้าใจถึงกลไกการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบทางชีวเคมีโดยรวมในระหว่างกระบวนการผลิต การแปรรูป และการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ อย่างไรก็ตาม งานวิจัยที่ใช้เทคโนโลยีเมตาโบโลมิกส์ในการศึกษาข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของน้ำนมและผลิตภัณฑ์นมในประเทศไทยยังมีอยู่อย่างจำกัด ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ (i) ศึกษาข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของน้ำนมเหลืองของโคจากฟาร์มในเขตพื้นที่ภาคกลางของประเทศไทย และ (ii) เปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลดังกล่าวในน้ำนมเหลืองที่ได้จากแม่โคที่เลี้ยงโดยมีระบบการให้อาหารและอิทธิพลจากฟาร์มที่แตกต่างกัน โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี ($^1\text{H-NMR}$) ที่เป็นหนึ่งในเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์สารชีวโมเลกุลขนาดเล็กหรือสารเมตาบอไลต์แบบไม่จำเพาะเจาะจง (non-targeted analysis) และสามารถวิเคราะห์ข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยาก (non-volatile metabolite profile) ในตัวอย่างน้ำนมได้รวดเร็วและมีความละเอียดสูง อีกทั้งยังสามารถวิเคราะห์สารซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญที่มีปริมาณน้อยในตัวอย่างน้ำนมได้ จากนั้นเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยการประมวลผลข้อมูลจากการวิเคราะห์จัดกลุ่มตัวอย่างด้วยเทคนิค heat-map visualization ร่วมกับ hierarchical cluster analysis (HCA) และใช้เทคนิค principle component analysis (PCA) ในการหารูปแบบความแตกต่างระหว่างตัวอย่างด้วยการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก รวมถึงวิเคราะห์ระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (potential biomarker) ต่อคุณลักษณะและความผันแปรของน้ำนมเหลืองจากแม่โคกลุ่มที่สนใจได้

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของน้ำนมเหลืองจากโค โดยใช้เทคนิค $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy
2. เพื่อเปรียบเทียบความผันแปรของข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลระหว่างน้ำนมเหลืองที่ได้จากแม่โคที่มีระยะเวลาในการให้น้ำนมเหลืองแตกต่างกัน
3. เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลระหว่างน้ำนมเหลืองของแม่โคที่เลี้ยงโดยมีระบบการให้อาหารและอิทธิพลจากฟาร์มต่างกัน
4. เพื่อวิเคราะห์ชนิดของสารเมตาบอไลต์ที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อคุณลักษณะและความผันแปรของน้ำนมเหลืองจากแม่โคกลุ่มที่สนใจได้

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาชนิดและปริมาณของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากที่มีอยู่ในน้ำนมเหลืองของโคจากฟาร์มในเขตพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดชัยภูมิ และจังหวัดนครราชสีมา
2. เปรียบเทียบข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของน้ำนมเหลืองของโคจากฟาร์มทั้งสองจังหวัดและระยะเวลาในการให้น้ำนมเหลือง ด้วยวิธีวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร
3. ศึกษาวิเคราะห์ชนิดสารเมตาบอไลต์ที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของน้ำนมเหลืองจากโคโดยใช้เทคนิค $^1\text{H-NMR}$ ร่วมกับการประมวลผลทางเคโมเมตริกซ์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ได้ข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของน้ำนมเหลืองจากโค โดยใช้เทคนิค $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy
2. ได้ข้อมูลความผันแปรของข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลระหว่างน้ำนมเหลืองที่ได้จากแม่โคที่มีระยะเวลาในการให้น้ำนมเหลืองแตกต่างกัน
3. ได้ข้อมูลความแตกต่างของข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลระหว่างน้ำนมเหลืองที่ได้จากแม่โคที่เลี้ยงโดยมีระบบการให้อาหารและอิทธิพลจากฟาร์มต่างกัน
4. สามารถระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อคุณลักษณะและความผันแปรของน้ำนมเหลืองจากแม่โคกลุ่มที่สนใจได้

บทที่ 2

แนวคิดทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 น้ํานมโค

2.1.1 น้ํานมโคดิบ

น้ํานมโคดิบ หมายถึง น้ํานมที่ได้จากแม่โคหลังจากคลอดลูกแล้วไม่น้อยกว่า 3 วัน ต้องไม่มีน้ํานมเหลือง (colostrum) ปน ไม่ผ่านการแยกองค์ประกอบอย่างใดอย่างหนึ่งของน้ํานมออกหรือเติมสารอื่นใด และไม่ได้ผ่านกรรมวิธีใด ๆ ยกเว้นการทำให้เย็น (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2553)

2.1.2 น้ํานมโค

น้ํานมโค หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำน้ํานมโคดิบมาผ่านกรรมวิธีการฆ่าเชื้อที่ไม่เข้าลักษณะเป็นน้ํานมโคสด และมีได้แยกหรือเติมเข้าไปซึ่งวัตถุอื่นใด เว้นแต่การแยกหรือเติมมันเนยหรือปรับปริมาณเนื่อนมด้วยนมผงไม่เกินร้อยละ 1 ของน้ำหนัก (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2553) โดยสามารถแบ่งน้ํานมโคออกเป็น 3 ชั้นคุณภาพ (quality grade) ตามจำนวนจุลินทรีย์ เซลล์โซมาติก โปรตีน ไขมันและเนื่อนมทั้งหมด คือ ชั้นดีมาก (premium) ชั้นดี (good) และชั้นมาตรฐาน (standard) ดังตารางที่ 1 โดยใช้เป็นแนวทางในการกำหนดเกณฑ์การซื้อขายน้ํานมดิบตามชั้นคุณภาพ

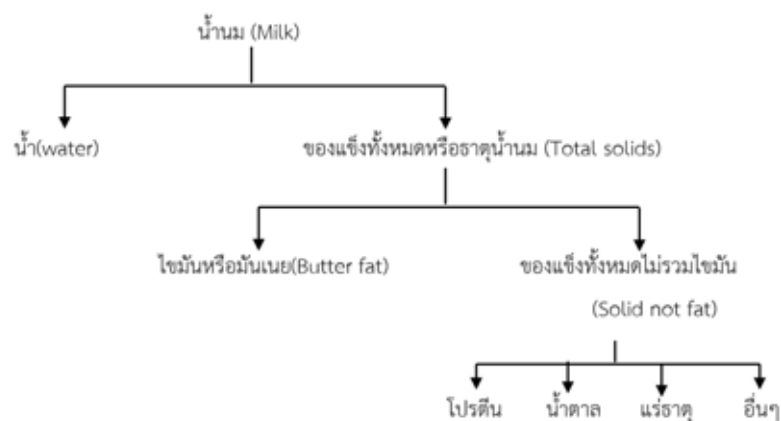
ตารางที่ 1 แสดงการแบ่งชั้นคุณภาพน้ํานมดิบตามคุณลักษณะ

ที่มา : ประกาศสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2553

ชั้นคุณภาพ	ชั้นดีมาก	ชั้นดี	ชั้นมาตรฐาน
คุณลักษณะ	(premium)	(good)	(standard)
จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด(standard plate count) (colony/ml)	< 200,000	200,000 ถึง < 400,000	<500,000
เซลล์โซมาติก (somatic cell) (cell/ml)	< 200,000	200,000 ถึง < 350,000	< 500,000
โปรตีน (protein) (%)	> 3.4	> 3.2 ถึง 3.4	>3.0
ไขมัน (fat) (%)	> 4	> 3.6 ถึง 4	>3.5
เนื่อนมทั้งหมด (total solid) (%)	> 12.7	> 12.5 ถึง 12.7	>11.6

2.2 องค์ประกอบทางเคมีของนมโค

องค์ประกอบทางเคมีของน้ำนม แบ่งออกเป็นสองส่วนหลักๆ ได้แก่ น้ำ และ ของแข็งทั้งหมด โดยของแข็งทั้งหมดจะแบ่งออกเป็น ส่วนของไขมัน (Butter fat) และของแข็งที่ไม่รวมไขมัน (Solid not fat) และสำหรับของแข็งที่ไม่รวมกับไขมันจะแบ่งออกเป็น 4 ส่วนหลักได้แก่ โปรตีน น้ำตาล แร่ธาตุ และอื่น ๆ โดยแสดงดังภาพที่ 1



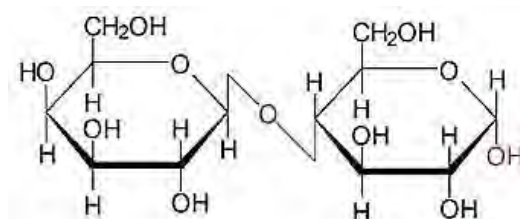
ภาพที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีในน้ำนมดิบ ที่มา: สมชาย ศรีพูล (2555)

2.2.1 น้ำ (water)

น้ำเป็นส่วนประกอบหลักของน้ำนม น้ำนมมีน้ำเป็นส่วนประกอบมากกว่า 85% โดยปกติจะอยู่ระหว่างร้อยละ 86-88 โดยปริมาตร น้ำเป็นตัวกลางให้โปรตีน ไขมันนม กระจายตัวอยู่ เกิดลักษณะเป็นอิมัลชัน (emulsion) ชนิด oil in-water emulsion และน้ำเป็นตัวทำละลายน้ำตาลในนมและวิตามินที่ละลายในน้ำและแร่ธาตุต่าง ๆ ในนม (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ นิธิยา รัตนานนท์, 2559) เป็นตัวกลางให้สารอาหารหลายชนิดละลายอยู่ หรือบางชนิดเมื่อรวมกับน้ำแล้วกลายเป็นสารแขวนลอย (นิธิยา รัตนานนท์, 2541)

2.2.2 น้ำตาลแลคโตส (lactose)

เป็นน้ำตาล disaccharide ประกอบด้วยกลูโคส (glucose) และกาแลคโตส (galactose) ดังแสดงในภาพที่ 2 โดยน้ำตาลแลคโตสจะมี 2 isomers คือ α และ β ซึ่งมีสมบัติทางกายภาพแตกต่างกัน



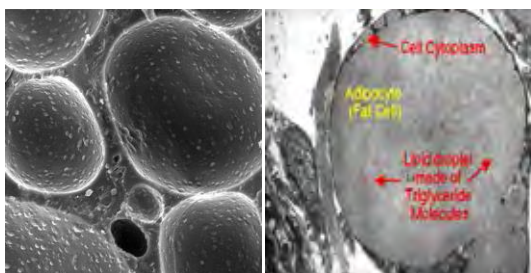
ภาพที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของน้ำตาลแลคโตส ที่มา: Ganzel และคณะ (2008)

ปกติ α -lactose มี solubility ที่ 25°C เท่ากับ 17.8 % และใน supersaturated solution จะตกผลึกอยู่ในรูป α -hydrate (มีน้ำ 1 โมเลกุล) เมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า 93°C ผลึกมีความแข็งมาก และมีขนาดใหญ่ ซึ่งมักจะพบในผลิตภัณฑ์นมที่ผ่านกรรมวิธีระเหยน้ำหรือทำให้เข้มข้น อาจรู้สึกเหมือนเป็นทราย (sandiness) เมื่อรับประทาน และบางครั้งอาจพบลักษณะเช่นนี้ในผลิตภัณฑ์ที่มีแลคโตสสูงและเก็บไว้ในที่อุณหภูมิต่ำ อีกรูปหนึ่งของน้ำตาลแลคโตส คือ β -lactose ในรูปผลึกของ anhydrous β -lactose เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 93°C โดยที่อุณหภูมิห้อง β -lactose จะละลายได้ดีกว่า α -lactose ถึง 7 เท่า (อรพิน ชัยประสพ, 2547) น้ำตาลแลคโตสมีความหวานน้อยกว่าน้ำตาลชนิดอื่น และละลายน้ำได้น้อยกว่าน้ำตาลชนิดอื่นด้วย โดยจะละลายน้อยลงในอุณหภูมิต่ำ ๆ และเนื่องจากน้ำตาลแลคโตสสามารถตกผลึกได้ง่าย ซึ่งมักพบในกระบวนการระเหยน้ำในผลิตภัณฑ์นม หรือการทำให้เกิดความเข้มข้น โดยลักษณะนี้จะเกิดขึ้นเมื่อผลิตภัณฑ์มีปริมาณน้ำตาลแลคโตสอยู่มาก ซึ่งสามารถนับได้ว่า อุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการละลายของน้ำตาลแลคโตส รวมถึงอัตราส่วนระหว่างโครงสร้างแอลฟา กับ เบตาของน้ำตาลแลคโตสอีกด้วย (วรรณ และวิบูลย์ศักดิ์, 2531)

โดยปกติปริมาณแลคโตสค่อนข้างคงที่ การเพิ่มขึ้นหรือลดลงของแลคโตส มักจะขึ้นอยู่กับ การเพิ่มขึ้นหรือลดลงของสารประกอบอื่น ๆ เช่น คลอไรด์ เป็นต้น นอกจากนี้ แลคโตสยังมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมของผลิตภัณฑ์นมเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีผลต่อเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ ในผลิตภัณฑ์ที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อน น้ำตาลจะมีผลต่อสีและกลิ่นรส รวมทั้งอุตสาหกรรมนมหมัก เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria) จะใช้แลคโตส เป็นแหล่งคาร์บอน และได้เป็นกรดแลคติก (Walstra และคณะ, 2006)

2.2.3 ลิปิด (lipid)

ไขมันจากนํ้านมมักเรียกว่า ไขมันเนย (milk fat) ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญที่สุดของนํ้านม ทั้งทางด้านโภชนาการและทางด้านเศรษฐกิจ โดยไขมันเนยนี้จะเป็นแหล่งพลังงานสำคัญของนํ้านม โดย 1 กรัม ให้พลังงาน 9 แคลอรี และยังเป็นตัวทำละลายสารอาหารต่าง ๆ โดยลักษณะของเม็ดไขมันในนํ้านมแสดงดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 ลักษณะเม็ดไขมันในนํ้านม

ที่มา: www.food-info.net/images/caseinmicelle.jpg

ไขมันในน้ำมันจะอยู่ในรูปของไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ซึ่งมีความผันแปร มากกว่าส่วนประกอบอื่น ๆ ซึ่งปัจจัยหลัก คือ สายพันธุ์ และปริมาณไขมันยังมีความสำคัญในทางเศรษฐกิจ เพราะการซื้อขายน้ำมันหรือผลิตภัณฑ์นมใน ไขมันนมเป็นแหล่งสำคัญของกรดไขมันที่จำเป็น เช่น linoleic acid และวิตามินที่ละลายในไขมัน ได้แก่ วิตามิน A, D, E และ K (Walstra และคณะ, 2006) มีบทบาทสำคัญต่อโครงสร้าง รสชาติ ความรู้สึกเมื่ออาหารอยู่ในปาก และความคงตัว ของผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ เช่น เนย ผลิตภัณฑ์นม และอาหารที่มีน้ำมันและผลิตภัณฑ์นมเป็นส่วนผสม

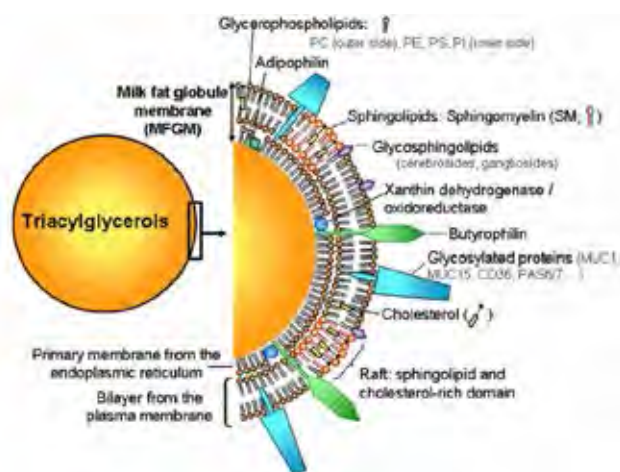
กรดไขมันชนิดอิ่มตัวที่พบมาก คือ กรดปาล์มมิติก (palmitic acid) กรดสเตียริก (stearic acid) และกรดไมริสติก (myristic acid) มีอยู่ประมาณ 72–78% ของกรดไขมันชนิดอิ่มตัวทั้งหมด กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่มีปริมาณมากที่สุดคือ กรดโอเลอิก (oleic acid) ซึ่งจัดเป็นกรดไขมันชนิด monounsaturated ประมาณ 30 % ของกรดไขมันทั้งหมด ส่วนกรดไขมันชนิด polyunsaturated มีประมาณ 3–5% ของกรดไขมันทั้งหมด (อรพิน ชัยประสพ, 2547) โดยขนาดของกรดไขมันในน้ำมันโค แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ชนิดของกรดไขมันในน้ำมันของโค ที่มา : Bylund (1995)

กรดไขมัน	ปริมาณ (ร้อยละโดยน้ำหนัก)
ไขมันชนิดอิ่มตัว	
บิวทีริก (butyric)	3.0 - 4.5
คาโปรอิก (caproic)	1.3 - 2.2
คาพริลลิก (capric)	0.8 - 2.5
คาพริก (capric)	1.8 - 3.8
ลอริก (lauric)	2.0 - 5.0
ไมริสติก (myristic)	7.0 - 11.0
ปาล์มมิติก (palmitic)	25.0 - 29.0
สเตียริก (stearic)	7.0 - 3.0
ไขมันชนิดไม่อิ่มตัว	
โอลีนิก (oleic)	30.0 - 40.0
ลิโนลีนิก (linoleic)	2.0 - 3.0
ลิโนลีนิก (linolenic)	สูงถึง 1.0
อะราชีโดนิก (arachidonic)	สูงถึง 1.0

2.2.3.1 ระบบของเม็ดไขมันนม (milk-fat globules system)

โมเลกุลของไขมันในน้ำนมมีลักษณะทรงกลมดังแสดงในภาพที่ 4 เรียกว่า Milk-fat globule อยู่ในสภาพของอิมัลชันในน้ำนม เม็ดไขมันนมมีขนาดเล็กตั้งแต่ 0.1 ไมครอน จนถึง 22 ไมครอน โดยเฉลี่ยแล้วประมาณ 2-4 ไมครอน เม็ดไขมันนมสามารถกระจายตัวอยู่ในน้ำนมได้ เนื่องจากเม็ดไขมันนมมีสารประกอบประเภทคอลลอยด์เคลือบอยู่ด้านนอกเป็นชั้น เรียกว่า เยื่อหุ้มเม็ดไขมัน (milk fat globule membrane, MFGM) ซึ่งประกอบด้วย โปรตีน ไขมัน ฟอสโฟลิปิด คอเลสเตอรอล เอนไซม์ (เช่น alkaline phosphatase และ xanthine oxidase) และเกลือแร่ต่าง ๆ (อรพิน ชัยประสพ, 2547)



ภาพที่ 4 ระบบของเม็ดไขมันนม

ที่มา: www.dolcera.com/wiki/images/MFGM_STR.gif

2.2.4 โปรตีน (proteins)

โดยทั่วไปในน้ำนมจะมีโปรตีนเป็นส่วนประกอบร้อยละ 3.5 ประกอบด้วยเคซีน (casein), alpha-lactalbumin, beta-lactoglobulin และโปรตีนชนิดอื่น ๆ เช่น เอนไซม์ และบางส่วนของโปรตีนใน น้ำนม เช่น immunoglobulin จะได้รับจากกระแสเลือดโดยตรง และภายในน้ำนมยังมีกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกาย (essential amino acid) ครบทั้ง 9 ชนิด คือ valine, leucine, isoleucine, threonine, methionine, phenylalanine, tryptophane, lysine และ histidine (Walstra และคณะ, 2006) โดยชนิดของโปรตีนในน้ำนมแสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ชนิดของโปรตีนในน้ำนม ที่มา : Swaisgood (1996)

ชนิดของโปรตีน	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	ร้อยละโดยน้ำหนัก
เคซีน	24 - 28	80
แอลฟา - เคซีน	15 -19	
α_{s1} - เคซีน	12 -15	34
α_{s2} - เคซีน	3 - 4	8
บีต้า - เคซีน	9 - 11	25
แคปป่า - เคซีน	3 - 4	9
แกรมมา - เคซีน	1 - 2	4
เวย์โปรตีน	5 - 7	20
บีต้า - แลคโตโกลบูลิน	2 - 4	9
แอลฟา - แลคโตโกลบูลิน	1.0 - 1.5	4
โปรตีนเอส - เปปโตน	0.6 - 1.8	4
โปรตีนจากเลือด (blood protein)		
ซีรัมแอลบูมิน	0.1 - 0.4	1
อิมมูโนโกลบูลิน	0.6 - 0.1	2
โปรตีนทั้งหมด		100

โปรตีนนมแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

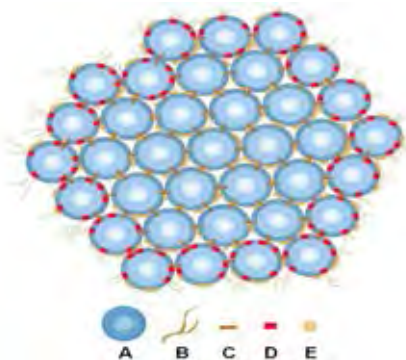
2.2.4.1 เคซีน (casein)

เคซีนเป็นโปรตีนที่มีประมาณ 85% ของโปรตีนนมทั้งหมด เคซีนอยู่ในสภาพของไมเซลล์ (micelles) แต่ ละไมเซลล์ประกอบด้วยเคซีนชนิดต่าง ๆ ในจำนวนที่แตกต่างกันไป

เคซีนประกอบด้วย

- Alpha_{s1} (α_{s1})-Casein 38 %
- Alpha_{s2} (α_{s2})-Casein 10 %
- Beta (β)-Casein 36 %
- Gamma (γ)-Casein 3 %
- Kappa (K)- Casein 13 %

เคซีนไมเซลลินน้ำนมมีสมบัติเป็นคอลลอยด์ที่มีลักษณะเป็น globular particles และ อยู่ในสภาพของเกลือแคลเซียม เรียกว่า แคลเซียมเคซีเนต (calcium caseinate) โดยจะอยู่รวมกันกับแคลเซียมฟอสเฟต (casein-calcium phosphate combination) ขนาดของไมเซลล์มีตั้งแต่น้อยกว่า 10 มิลลิไมครอน (m μ) จนถึง 780 m μ ซึ่งโดยเฉลี่ยแล้วมีขนาดประมาณ 85.3 (อรพิน ชัยประสพ, 2547) โดยโครงสร้างของเคซีนไมเซลล์แสดงดังภาพที่ 5

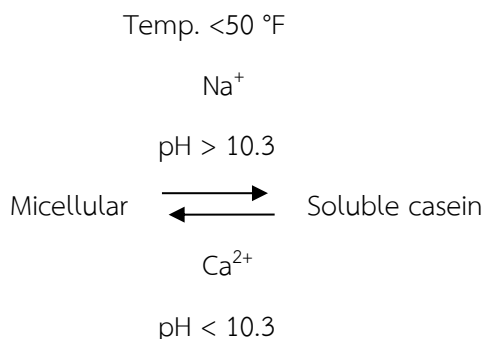


ภาพที่ 5 เคซีนไมเซลล์

A: a submicelle; B: protruding chain; C: Calcium phosphate; D: K-casein; E: phosphate groups

ที่มา: www.food-info.net/images/caseinmicelle.jpg

ในทางเคมีแล้วระบบเคซีน (casein system) เป็น glycoposphoprotein ไมเซลล์ของเคซีนจะอยู่ในสภาพที่สมดุลกับเคซีนที่ละลายได้ดังนี้



สมบัติที่สำคัญของเคซีน คือ ตกตะกอนด้วยกรด (ที่ pH 4.6) หรือ Rennet เคซีนบริสุทธิ์จะไม่ตกตะกอนด้วยความร้อน แต่ในน้ำนมถ้าให้ความร้อนสูง 100°C เป็นเวลานาน 12 ชั่วโมงหรือมากกว่า หรือให้ความร้อนถึง 120 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันจะทำให้ เคซีนตกตะกอน (อรพิน ชัยประสพ, 2547)

2.2.4.2 โปรตีนเวย์ (whey protein)

โปรตีนเวย์เป็นโปรตีนที่มีความทนต่อกรด แต่ไม่ทนต่อความร้อน ในการ พาสเจอร์ไรส์น้ำนมจะทำให้โปรตีนเวย์เสียสภาพธรรมชาติ (denatured) ไปบางส่วน ดังนั้นโปรตีนเวย์ที่ประกอบด้วยหมู่ซัลเฟอร์เมื่อได้รับความร้อนถึงจุดเดือดจะเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ ทำให้นมมีรสชาติที่เรียกว่า cooked flavor โดยโปรตีนเวย์ ประกอบด้วย

2.2.4.2.1 β -lactoglobulin (7-12% ของโปรตีนนม หรือ 50-66% ของโปรตีนเวย์)

เป็นโปรตีนเวย์ที่อยู่ในสภาพของไดเมอร์ (dimer) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 36,000 (น้ำหนักโมเลกุลของ monomer 18,000) แต่ละเส้นเปปไทด์จะมีกรดอะมิโนอยู่ประมาณ 136 หน่วย แต่ละไดเมอร์จะมีลักษณะเป็นทรงกลมสองลูกติดกัน ไดเมอร์ไม่ละลายในน้ำกลั่นแต่ละลายได้ในสารละลายเกลือเจือจาง สามารถตกตะกอนได้ด้วยแมกนีเซียมซัลเฟตและแอมโมเนียมซัลเฟต โปรตีนนี้มีลักษณะเป็นคอลลอยด์เสถียรสภาพด้วยความร้อนได้ง่าย

2.2.4.2.2 α -lactalbumin (2-5 % ของโปรตีนนม หรือ 12-22% ของโปรตีนเวย์)

เป็นโปรตีนที่มีซัลเฟอร์ประกอบอยู่มากกว่าในเคซีนถึง 2.5 เท่า สามารถตกตะกอนได้ด้วยความร้อนในสภาวะที่เป็นกรด pH 4.5 ไม่พบว่ามีโพแทสเซียมประกอบอยู่เหมือนในเคซีนมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 14,000

2.2.4.2.3 Immunoglobulins (1.5-3.5 % ของโปรตีนนม หรือ 10% ของโปรตีนเวย์)

แบ่งออกเป็น IgM, IgA, IgG1 และ IgG2 โดยพบ IgG1 และ IgG2 ในปริมาณค่อนข้างสูงในน้ำนมเหลือง (colostrum) Immunoglobulins มีคุณสมบัติ antibody พบมากในส่วนของเยื่อหุ้มเม็ดไขมัน เป็นโปรตีนที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในน้ำนมดิบ

2.2.4.2.4 Serum albumin (0.7 – 1.3 % ของโปรตีนนม หรือ 1.4 % ของโปรตีนเวย์) มีลักษณะคล้าย blood serum albumin มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 63,000

2.2.5 แร่ธาตุและเกลือแร่ (minerals and salts)

ในน้ำนมมีแร่ธาตุต่าง ๆ จำนวนมาก ซึ่งเป็นสารอาหารที่สำคัญและจำเป็นต่อร่างกาย แร่ธาตุ ที่มีปริมาณค่อนข้างมากในน้ำนม ได้แก่ แคลเซียม ฟอสฟอรัส ซึ่งมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของ เด็กหรือตัวอ่อน เพื่อสร้างกระดูกและฟัน แมกนีเซียม โพแทสเซียม โซเดียม คลอไรด์ และกำมะถัน (Jenness และ Patton, 1959; Walstra และ Jenness, 1984) ซึ่งปริมาณแร่ธาตุและเถ้าในน้ำนม แสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ปริมาณแร่ธาตุและเถ้าในน้ำนม ที่มา : จิตธนา แจ่มเมฆ, 2549

แร่ธาตุ (minerals)	% ในน้ำนม	% ในเถ้าของน้ำนม
โพแทสเซียม (potassium)	0.14	20.0
แคลเซียม (calcium)	0.12	17.4
คลอไรด์ (chloride)	0.10	14.5
ฟอสฟอรัส (phosphorus)	0.09	13.2
โซเดียม (sodium)	0.05	7.4
แมกนีเซียม (magnesium)	0.01	1.5
กำมะถัน (sulfer)	0.025	3.6

องค์ประกอบของเกลือแร่ในน้ำนมอยู่ในรูปของ

2.2.5.1 Cationic ได้แก่ sodium, potassium, calcium, magnesium, และ amines

2.2.5.2 Anionic ได้แก่ phosphorus (ในรูป inorganic phosphate (Pi) และ ester), chloride, citrate, carbonate, sulfate และ organic acids

โดยแร่ธาตุทั้งหมดกระจายตัวอยู่ใน 2 ส่วน คือ ส่วนที่ละลาย (soluble phase) และส่วนคอลลอยด์ (colloidal phase) ซึ่งแคลเซียมและฟอสฟอรัสส่วนใหญ่กระจายตัวอยู่ในส่วนคอลลอยด์ นอกจากนี้ยังประกอบด้วยแร่ธาตุที่มีปริมาณน้อย (trace elements) อื่น ๆ เช่น โมลิบดีนัม โคบอลต์ ฟลูออไรด์ โบรไมน์ อะลูมิเนียม โบรอน สังกะสี แมงกานีส และ ซีลีคอน (อรพิน ชัยประสพ, 2547)

2.2.6 วิตามิน (vitamins)

2.2.6.1 วิตามินที่ละลายในไขมัน (fat-soluble vitamins)

ได้แก่ วิตามินเอ (รวมถึง β -carotene ซึ่งร่างกายสามารถเปลี่ยนเป็นวิตามินเอได้) วิตามินดี และวิตามินอี (ส่วนใหญ่อยู่ในรูปของ α -tocopherol) ส่วนวิตามินเคมีอยู่ในน้ำนมในปริมาณน้อยมาก (อรพิน ชัยประสพ, 2547)

2.2.6.2 วิตามินที่ละลายในน้ำ (water-soluble vitamins)

ได้แก่ วิตามินบี ซึ่งได้แก่ B1, B2, B6 และ B12 รวมถึง niacin (nicotinic acid), pantothenic acid, biotin และ folic acid และวิตามินซี (ascorbic acid) ไบโอฟลาวินเป็นสารประกอบสำคัญที่ทำให้เวย์หรือหางเนยแข็งมีสีเหลืองอมเขียว รวมทั้งในน้ำนมเหลือง ซึ่งจะมีปริมาณของไบโอฟลาวินมากกว่าในน้ำนมปกติ วิตามินซีมีอยู่ในน้ำนมไม่มากนักเมื่อเทียบกับผักผลไม้ ทั้งยังสูญเสียไปในกระบวนการ เช่น กระบวนการพาสเจอร์ไรส์ ประมาณ 20% และกระบวนการสเตอริไลส์ ประมาณ 50% เป็นต้น (อรพิน ชัยประสพ, 2547)

2.2.7 สารประกอบอินทรีย์

นอกจากองค์ประกอบทางเคมีหลักที่พบในน้ำนมแล้ว ยังพบองค์ประกอบย่อยหรือสารประกอบอินทรีย์ที่พบในน้ำนม โดยปกติจะได้รับการสังเคราะห์จากเซลล์กลั่นน้ำนม และบางส่วนเกิดจากการทำงานของแบคทีเรียหรือเอนไซม์ที่แบคทีเรียสร้าง ทำให้เกิดสารประกอบอินทรีย์ขึ้น (Walstra และคณะ, 2006) สารประกอบที่แปรสภาพมาจากอาหารสัตว์ สารประกอบที่เกิดจากกระบวนการสังเคราะห์น้ำนม เช่น กรดอะมิโน ครีเอติน รวมทั้งแอมโมเนีย ตลอดจนสารที่ได้จากการย่อยสลายเอนไซม์ ได้แก่ ซัลไฟด์ และสารประกอบคาร์บอนิล

2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อองค์ประกอบทางเคมีและคุณภาพของนมดิบ

องค์ประกอบทางเคมีของน้ำนมอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้

2.3.1 ปัจจัยที่มีผลต่อองค์ประกอบทางเคมีและคุณภาพของน้ำนมดิบ

2.3.1.1 ชนิดของสัตว์

สัตว์แต่ละชนิดจะให้ผลผลิตและองค์ประกอบของน้ำนมที่แตกต่างกัน จากตารางจะพบว่าน้ำนมจากควางเรนเดียร์ น้ำนมจากกระบือ และ น้ำนมจากแกะ มีปริมาณไขมันที่สูงกว่าสัตว์ชนิดอื่น ๆ เป็นต้น (Walstra และคณะ, 2006) ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าชนิดของสัตว์มีผลต่อองค์ประกอบทางเคมีของน้ำนม ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ค่าเฉลี่ยสัดส่วนขององค์ประกอบทางเคมีของน้ำนมที่ได้จากสัตว์ชนิดต่าง ๆ (%w/w)

ที่มา : Walstra และคณะ (2006)

Animal	Genus/Species	Dry Matter	Fat	Casein	Serum Protein	Carbohydrates	Ash
Donkey	Equus asinus	10.8	1.5	1.0	1.0	6.7	0.5
Horse	Equus caballus	11.0	1.7	1.3	1.2	6.2	0.5
Camel	Camelus dromedaries	13.4	4.5	2.7	0.9	4.5	0.8
Reindeer	Rangifer tarandus	35	18.0	8.5	2.0	2.6	1.5
Cow	Bos taurus	12.8	3.9	2.7	0.6	4.6	0.7
Zebu	Bos indicus	13.5	4.7	2.6	0.6	4.7	0.7
Yak	Bos grunniens	17.7	6.7	N/A	N/A	4.6	0.9
Buffalo	Bubalus	17.2	7.4	3.3	0.6	4.8	0.8
Goat	Capra hircus	13.3	4.5	3.0	0.6	4.3	0.8
Sheep	Ovis aries	18.6	7.5	4.5	0.8	4.6	1.0

2.3.1.2 สายพันธุ์

โคนมแต่ละสายพันธุ์ให้ผลผลิตน้ำนมแตกต่างกันชัดเจน (ตารางที่ 6) โดยโคนมพันธุ์โฮลสไตล์ฟรีเซียนเป็นโคที่ให้ผลผลิตน้ำนมสูงสุด แต่ให้องค์ประกอบน้ำนมทั้งปริมาณไขมัน โปรตีน SNF และ TS ต่ำที่สุด ในขณะที่โคนมพันธุ์เจอร์ซี่เป็นโคนมที่ให้ปริมาณน้ำนมต่ำกว่าสายพันธุ์อื่น ในบรรดาสายพันธุ์โคยุโรป แต่น้ำนมมีเปอร์เซ็นต์ไขมัน โปรตีน SNF และ TS สูงสุด (Varner และ Johnson, 1983)

ตารางที่ 6 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำนมที่ได้จากโคแต่ละสายพันธุ์ (%w/w)

ที่มา : Walstra และคณะ (2006)

Breed	Dry Matter	Fat	Crude Protein	Lactose	Ash
Holstein Friesian (in the Neterlands)	13.4	4.4	3.5	4.6	0.75
Holstein Friesian (other souces)	12.4	3.6	3.3	4.6	0.75
Brown Swiss	12.9	4.0	3.3	4.7	0.72
Jersey	15.1	5.3	4.0	4.9	0.72

โคนมแต่ละพันธุ์มีความสามารถในการให้นมได้ต่างกันแล้วแต่จุดประสงค์ของการปรับปรุงพันธุ์ เช่น พันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเซียนมีความสามารถในการให้นมได้สูง เมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์เจอร์ซี่ซึ่งปริมาณการให้น้ำนมมีช่วงค่อนข้างกว้างมาก

พันธุ์โคนมที่เลี้ยงในประเทศไทย (กลุ่มวิจัยและพัฒนาโคนม, 2553) คือ พันธุ์ไทยฟรีเซียน (Thai Friesian) เป็นโคนมพันธุ์ผสมที่มีเลือดโคนมพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเซียนสูงกว่าร้อยละ 75 หรือที่เกษตรกรทั่วไปเรียกว่า โคนมเลือดสูง เหมาะสมกับเกษตรกรที่มีประสบการณ์การเลี้ยงโคนมมาแล้ว ภายใต้ระบบการเลี้ยงดูที่มีระดับการจัดการอาหารที่ดี สามารถให้ผลผลิตน้ำนมสูงต่อ ระยะการให้นมและที่สำคัญสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมของประเทศได้ และโคนมพันธุ์ที่ เอ็ม แซด (Thai Milking Zebu) เป็นโคนมที่สร้างขึ้นมาเพื่อให้เหมาะสมกับเกษตรกรรายย่อยเป็นโคนมที่ปรับปรุงเพื่อวัตถุประสงค์ในการผลิตโคนมพันธุ์ดีใช้ในประเทศ และทดแทนการนำเข้าโคนมจากต่างประเทศ เกษตรกรทั่วไปเรียกว่า โคเลือด 75 หมายถึง โคนมลูกผสมที่มีเลือดโคนมพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเซียน ร้อยละ 75 ส่วนสายเลือดที่เหลือ ร้อยละ 25 เป็นโคพันธุ์ซิมูและพื้นเมือง โคพันธุ์นี้ สามารถเลี้ยงได้ดี ให้ผลผลิตน้ำนมปานกลางและความสมบูรณ์พันธุ์สูง ทนทานต่อโรคและแมลง เหมาะกับสภาพแวดล้อมของประเทศ

2.3.1.3 ระยะของการให้น้ำนม (stage of lactation)

น้ำนมที่หลั่งออกมาในช่วงแรก เรียกว่า น้ำนมเหลือง (colostrum) ความเข้มข้นของเนื้อมนมจะมีอยู่สูงมาก มี high carotene ซึ่งเป็น สาเหตุทำให้น้ำนมมีสีเหลือง ปริมาณของโปรตีนและวิตามินจะมีความเข้มข้นสูง ส่วนแลคโตสจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้น หลังจากนั้นน้ำนมจะเปลี่ยนเป็นสีขาวนวลขึ้น รวมถึงองค์ประกอบภายในก็ เปลี่ยนแปลงตามด้วย ปริมาณโปรตีนจะลดลงและลดต่ำสุด ณ จุดสูงสุดของการให้น้ำนม (Strucken และคณะ, 2015) ส่วนปริมาณของแลคโตสและโซเดียมจะยังสูงคงที่ไปจนถึงระยะกลาง ในระยะกลางการให้นมหรือหลังจากผ่านจุดสูงสุดของการให้น้ำนมของโคแล้วปริมาณน้ำนมรวมจะลดลง ความเข้มข้นของแลคโตสและโปแตสเซียมจะค่อย ๆ ลดลง แต่ความเข้มข้นของไขมันนม โซเดียม คลอไรด์ จะค่อย ๆ เพิ่มขึ้น (Capuco และ Akers, 1999)

2.3.1.4 การตั้งท้อง (pregnancy หรือ gestation)

ปริมาณน้ำนมจะลดลงอย่างมากในช่วงระหว่างตั้งท้อง เนื่องจากสารอาหารถูกใช้ไปในการพัฒนาและการเจริญของลูกโค โดย MSNF ในน้ำนมจะลดลงมากในระหว่างเดือนที่ 4 และ 5 ของการตั้งท้อง (อรพิน ชัยประสพ, 2547)

2.3.1.5 ความแปรผันเฉพาะตัว

แม่โคพันธุ์เดียวกันแต่เป็นโคคนละตัวทำให้เปอร์เซ็นต์ของไขมันนมแตกต่างกัน สาเหตุอาจมาจากลักษณะทางสรีรวิทยาและกรรมพันธุ์ของโคแต่ละตัว (นิธิยา รัตนานนท์, 2557)

2.3.1.6 อายุ (age)

แม่โคสาวที่ยังโตไม่เต็มวัย การให้น้ำนมในแต่ละครั้งของระยะการให้น้ำนม (lactation) จะให้น้ำมน้อยกว่าแม่โคที่โตเต็มที่แล้ว ทั้งนี้เพราะความเจริญเติบโตและขนาดของร่างกายสัตว์ไม่เท่ากัน แต่ถ้าโคมีอายุมากขึ้นผลผลิตของน้ำนมก็จะลดลง ดังนี้ การให้นมครั้งที่ 1 แม่โคอายุ 24 เดือน ให้น้ำนม 75% ของโคที่โตเต็มที่ การให้นมครั้งที่ 2 แม่โคอายุ 3 ปี ให้น้ำนม 85% ของโคที่โตเต็มที่ การให้นมครั้งที่ 3 แม่โคอายุ 4 ปี ให้น้ำนม 92% ของโคที่โตเต็มที่ การให้นมครั้งที่ 4 แม่โคอายุ 5 ปี ให้น้ำนม 98% ของโคที่โตเต็มที่ การให้นมครั้งที่ 5 แม่โคอายุ 6 ปี ให้น้ำนม 100% ของโคที่โตเต็มที่ (อรพิน ชัยประสพ, 2547)

2.3.1.7 การให้อาหาร (nutrition)

สัตว์ที่ได้รับอาหารมากเพียงพอกับความต้องการของร่างกายจะให้น้ำนมสูง ถ้าโคได้รับอาหารในระดับต่ำกว่าปกติมีผลทำให้ปริมาณน้ำนมลดลง นอกจากปริมาณของอาหารที่สัตว์ได้รับแล้ว ลักษณะของอาหารก็มีผลต่อองค์ประกอบของน้ำนมด้วย ถ้าสัตว์ได้รับอาหารที่มีสารเยื่อใยต่ำ หรือได้รับอาหารหยาบน้อย จะมีผลทำให้ปริมาณไขมันในน้ำนมลดลง แต่จะไม่มีผลต่อปริมาณของน้ำนมถ้าได้รับอาหารชั้นเพียงพอ (อรพิน ชัยประสพ, 2547) อีกทั้งมีงานวิจัยพบว่า หากมีการเสริมเมล็ดฝ้ายทดแทนอาหารชั้นแกโคโคนมลูกผสมไฮลสไตน์ฟรีเซียนจะสามารถทำให้เพิ่มผลผลิตน้ำนมมากขึ้น (กฤตพล และคณะ, 2542)

2.3.1.8 ฤดูกาล (season)

ความแตกต่างของอุณหภูมิมีผลต่อองค์ประกอบและผลผลิตของน้ำนม กล่าวคือ อุณหภูมิที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 10-20°C โดยถ้าอุณหภูมิต่ำกว่า 4°C โคจะกินน้ำน้อย และกินอาหารได้มากเพื่อทดแทนพลังงานที่ใช้ไป ทำให้ปริมาณไขมัน MSNF และ total solid เพิ่มขึ้น แต่ในทางตรงข้ามถ้าอุณหภูมิสูงกว่า 20°C โคจะกินน้ำมาก กินอาหารได้ลดลงมีอุณหภูมิร่างกายและอัตราการหายใจสูงขึ้นทำให้ปริมาณน้ำนมลดลง ปริมาณไขมัน MSNF น้ำตาลแล็กโทส และ total solid ลดลง และปริมาณ chloride เพิ่มขึ้น (อรพิน ชัยประสพ, 2547)

2.3.1.9 สุขภาพของแม่โค (illness of the cow)

โรคเต้านมอักเสบเป็นโรคที่ทำให้แม่โคให้น้ำนมลดลง และถ้าเป็นมาก ๆ จะไม่สามารถสร้างน้ำนมได้เลย เต้านมอักเสบเกิดจากการติดเชื้อ เช่น *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* และ *Staphylococcus aureus* เป็นต้น ผลของโรคเต้านมอักเสบทำให้ปริมาณไขมัน MSNF และ potassium ลดลง ส่วน blood serum albumin, immunoglobulins, sodium และ chloride เพิ่มขึ้น รวมทั้ง somatic cell count (scc) ก็เพิ่มขึ้นด้วย (อรพิน ชัยประสพ, 2547)

2.3.1.10 การรีดนม (method of milking)

2.3.1.10.1 ในขณะที่รีดนม (within milking)

ปริมาณไขมันเพิ่มขึ้นในระหว่างการรีด เพราะไขมันลอยตัวขึ้นสะสมใน alveoli ด้านบน

2.3.1.10.2 ระยะเวลาระหว่างการรีดนม (between milkings)

ปริมาณน้ำนมจะมากขึ้นเมื่อความถี่ของการรีดมากขึ้น เช่น รีดน้ำนม 3 ครั้งต่อวันจะให้ปริมาณน้ำนมมากกว่ารีดน้ำนม 2 ครั้งต่อวัน โดยระยะเวลาการรีดเมื่อห่างมากขึ้นจะทำให้ปริมาณน้ำนมมากขึ้น ส่วนปริมาณไขมันลดลง แต่ถ้านานมากกว่า 15 ชั่วโมง ปริมาณ MSNF น้ำตาลแล็กโทส และ potassium ลดลง ส่วนปริมาณไขมัน โปรตีนเวย์ sodium และ chloride เพิ่มขึ้น (อรพิน ชัยประสพ, 2547)

จากข้อมูลดังกล่าวมาข้างต้น มีหลายปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของน้ำนมโค ทั้งนี้ปัจจัยดังกล่าวบางปัจจัย เช่น การให้อาหาร และ ระยะเวลาของการรีดนม ก็เป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของน้ำนมเหลืองของโคเช่นกัน ซึ่งในปัจจุบันมีการนำน้ำนมเหลืองของโคมาประยุกต์ใช้เป็น functional ingredient ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร โดยมักใช้ในผลิตภัณฑ์กลุ่มนมผงเด็ก ผู้สูงอายุ (Su และ Chiang, 2003) ดังนั้น การศึกษาสารชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบในน้ำนมเหลืองรวมทั้งความผันแปรขององค์ประกอบดังกล่าว จึงเป็นปัจจัยสำคัญเบื้องต้นเพื่อให้เกิดความรู้ความเข้าใจและสามารถนำน้ำนมเหลืองมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ได้อย่างเหมาะสม

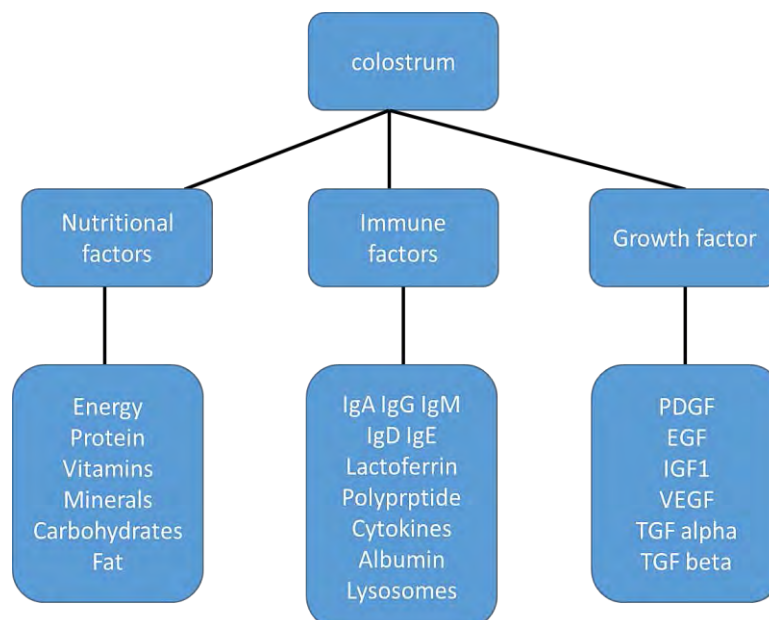
2.4 น้ำนมเหลือง

น้ำนมเหลือง หมายถึง น้ำนมที่แม่โคหลั่งออกมาหลังการคลอดลูกในช่วง 24-36 ชั่วโมงแรก มีลักษณะเป็นของเหลวสีเหลืองขุ่น (McGrath และคณะ, 2016) ใช้เป็นอาหารแรกของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่เพิ่งคลอด โดยน้ำนมเหลืองจะเริ่มสะสมในต่อมน้ำนมในตอนท้ายของการตั้งครรภ์ ซึ่งอุดมไปด้วยสารอาหารต่าง ๆ เช่น โปรตีน ไขมัน สารอาหาร วิตามิน รวมถึงสารภูมิคุ้มกันที่สำคัญ เช่น อิมมูโนโกลบูลิน ชนิด G, A เป็นต้น (Scammell, 2001; Zachwieja และคณะ, 2007; Heinrichs และ Jones, 2011; Abd El-Fattach และคณะ, 2012) สารอาหารเหล่านี้มีมากกว่าน้ำนมปกติจึงเป็นปัจจัยส่งผลให้สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่เพิ่งคลอดมีภูมิคุ้มกันต้านทาน และป้องกันการติดเชื้อในระหว่างวันแรกหลังการคลอด อีกทั้งยังกระตุ้นการเจริญเติบโตทั้งร่างกายและระบบต่าง ๆ ภายในร่างกาย นอกจากนี้

ยังย่อยง่าย และสามารถดูดซึมได้ดีในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมระยะแรกเกิด (Tomov, 1984; Medvezki, 1989; Iliev และ Tomov, 1992; Blum และ Hammon, 2000; Playford และคณะ, 2000; Georgiev, 2008) โดยน้ำนมเหลืองของโคจะคิดเป็น 0.5% ของน้ำนมโคทั้งหมดที่หลั่งออกมาจากเต้านมต่อการตั้งครรรภ์ 1 ครั้ง (Scammell, 2001)

2.4.1 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำนมเหลือง

องค์ประกอบของน้ำนมเหลืองขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น อาหารที่แม่ได้รับประทาน ระยะเวลาในการให้น้ำนม ภายหลังจากคลอด จำนวนครั้งในการตั้งครรรภ์ สุขภาพแม่โค เป็นต้น (Moody และคณะ, 1951) โดยองค์ประกอบของน้ำนมเหลืองประกอบด้วยสามกลุ่มหลัก ๆ ได้แก่ องค์ประกอบทางด้านโภชนาการ สารสร้างภูมิคุ้มกัน และ สารที่ช่วยในการเจริญเติบโตของลูกโค ซึ่งโดยปกติแล้วน้ำนมเหลืองจะมีปริมาณโปรตีน ไขมัน วิตามิน เกลือแร่ โกรทแฟคเตอร์ ในปริมาณที่มากกว่านมทั่วไป (Uruakpa และคณะ, 2002) โดยเฉพาะปริมาณอิมมูโนโกลบูลินที่มากกว่าน้ำนมปกติ เนื่องจากอิมมูโนโกลบูลินมีความสำคัญเป็นอย่างมากต่อการพัฒนา และเจริญเติบโตของลูกโค เนื่องจากเป็นสารสร้างภูมิคุ้มกัน (Stelwagen และคณะ, 2009) ซึ่งองค์ประกอบต่าง ๆ ในน้ำนมเหลืองแสดงดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6 องค์ประกอบทางเคมีในน้ำนมเหลืองในคน ที่มา: Godhia and Patel (2006)

หมายเหตุ PDGF: platelet derived growth factor, EGF: epidermal growth factor, IGF1: insulin like growth factor, VEGF: vascular endothelial growth factor, TGF alpha: transforming growth factor alpha, TGF beta: transforming growth factor beta

2.4.1.1 ข้อมูลทางโภชนาการ

ข้อมูลทางโภชนาการของน้ำนมเหลือง ได้แก่ พลังงาน โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และ ไขมัน โดยข้อมูลทางโภชนาการของน้ำนมเหลืองของโคเมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลทางโภชนาการของน้ำนมเหลืองของมนุษย์ แสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 การเปรียบเทียบข้อมูลทางโภชนาการของน้ำนมเหลืองของโค และ มนุษย์

ที่มา : Godhia และ Patel (2006)

Nutritional factor	Bovine Colostrum	Human Colostrum
Energy (kcal)	~130	58
Protein (g)	~14.9	3.7
Lactose (g)	~2.6	5.3
Fat (g)	~6.7	2.9

*per 100 ml of colostrum

Sources: Guthrie AH. (1989)³ and Kehoe, S. I., A. J. Heinrichs, et al. (2007)³⁶

2.4.1.1.1 โปรตีน (protein)

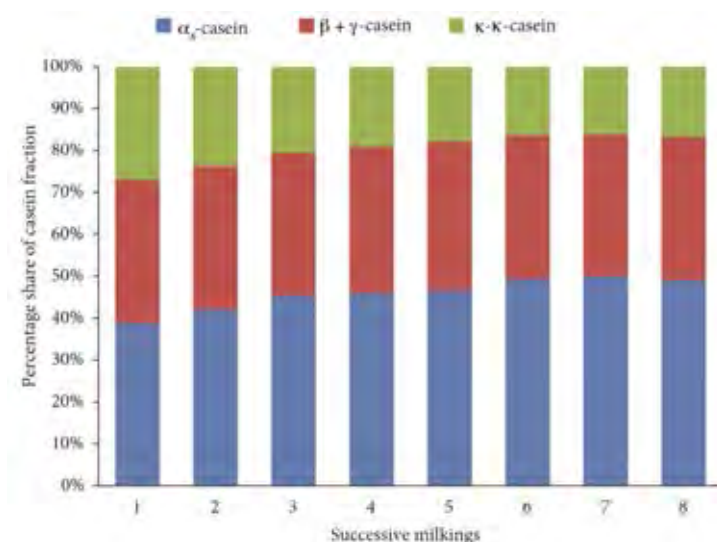
โปรตีนในน้ำนมเหลืองของโคอยู่ในช่วง $16.21 \pm 1.73\%$ ถึง $20.71 \pm 2.52\%$ (Klimes และคณะ, 1984) โดยโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบหลัก ได้แก่ โปรตีนเคซีน (~ 80%) และโปรตีนเวย์ (~ 20%) (Nissen, 2017) ภายในน้ำนมเหลืองยังมีกรดอะมิโนทั้งจำเป็นครบทั้ง 8 ชนิด ซึ่งได้แก่ valine, leucine, isoleucine, threonine, methionine, phenylalanine, tryptophan และ lysine รวมถึง histidine ที่เป็นกรดอะมิโนจำเป็นเฉพาะในลูกโคแรกเกิด (Christiansen และคณะ, 2010)

2.4.1.1.1.1 เคซีน (casein)

เคซีนในน้ำนมเหลืองของโคจะอยู่ในรูปของ casein micelle ในวันที่ 2 ภายหลังจากคลอดลูก (Guerin และคณะ, 1974) โดย Kappa-Casein จะเป็นตัวหลักในการเกิดโครงสร้าง casein micelle โดยปริมาณของ Casein ในน้ำนมเหลืองของโคจะมีประมาณ 80 % ของโปรตีนทั้งหมด โดย จะประกอบด้วย

- Alpha (α_2)-Casein
- Beta (β)-Casein
- Gamma (γ)-Casein
- Kappa (K)- Casein

อัตราส่วนของ Casein แต่ละชนิดที่เปลี่ยนไปตามระยะเวลาภายหลังจากคลอดลูกในน้ำนมเหลืองของโคสายพันธุ์ Polish Holstein-Friesian แสดงดังภาพที่ 7 โดย ในสามวันแรก Alpha (α_2)-Casein จะเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) และจะมีปริมาณคงที่ในวันถัดๆไป สำหรับปริมาณ Beta (β)-Casein รวมกับ Gamma (γ)-Casein จะมีปริมาณคงที่ และ Kappa (K)- Casein จะมีปริมาณลดลงในสามวันแรก อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) (Sobczuk-szul และคณะ, 2013)



ภาพที่ 7 อัตราส่วนของ Casein แต่ละชนิดที่เปลี่ยนไปตามระยะเวลาภายหลังการคลอดลูกในน้ำนมเหลืองของโคสายพันธุ์ Polish Holstein-Friesian ที่มา : Sobczuk-szul และคณะ, 2013

สำหรับ Kappa-Casein จะมีองค์ประกอบของ phosphorus, neutral sugars, amino sugars และ sialic acid ซึ่ง amino sugars จะแสดงในรูปของ N-acetyl glucosamine และ sialic acid แสดงในรูปของ N-acetylneuraminic acid โดยสัดส่วนขององค์ประกอบต่าง ๆ ในน้ำนมเหลืองของโค เปรียบเทียบกับน้ำนมปกติ ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 การเปรียบเทียบข้อมูลทางโภชนาการของน้ำนมเหลืองของโค และ มนุษย์
ที่มา : Guerin และคณะ (1974)

	น้ำนมเหลืองของโค (residues per mole)	น้ำนมโคปกติ (residues per mole)
Phosphorus	1.18	1.46
Neutral sugar	3.12	1.52
Amino sugar	1.77	0.69
Sialic acid	0.87	0.57

2.4.1.1.2 โปรตีนเวย์ (whey protein)

เป็นองค์ประกอบหนึ่งของโปรตีนในน้ำนมเหลืองของโค ส่วนมากจะเป็น bioactive protein ซึ่งประกอบไปด้วย α-lactalbumin (α-LA), β-lactoglobulin (β-LG), Immunoglobulin, lactoferrin (LF), Lactoperoxidase, Serum albumin, interleukin-1β (IL-1β), interleukin-6 (IL-6) และ tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญทางด้านโภชนาการและชีวภาพในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Cao และคณะ, 2019) โดยรายละเอียดในแต่ละองค์ประกอบจะกล่าวในหัวข้อที่ 2.4.1.2.1

2.4.1.1.1.3 กรดอะมิโน (amino acids)

เป็นหน่วยย่อยของโปรตีน โดยในน้ำนมเหลืองจะพบกรดอะมิโนทั้งหมด 18 ชนิด ได้แก่ valine, leucine, isoleucine, threonine, methionine, phenylalanine, tryptophan และ lysine ซึ่งเป็นกรดอะมิโนจำเป็น รวมถึง histidine ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นเฉพาะเด็กแรกเกิด และ aspartic acid, serine, glutamic acid, proline, glycine, alanine, tyrosine, arginine, cysteine ซึ่งเป็นกรดอะมิโนไม่จำเป็นรวมอยู่ด้วย โดยปริมาณกรดอะมิโนแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนในน้ำนมเหลืองของโค ที่มา : Christiansen และคณะ (2010)

ชนิดของกรดอะมิโน	ค่าเฉลี่ย (mg/100g)	ค่า SD
Aspartic acid	171	18.8
Threonine	90	10.4
Serine	112	9.9
Glutamic acid	475	41.7
Proline	233	18.6
Glycine	107.7	8.8
Alanine	103.6	3.8
Valine	320	21.6
Isoleucine	113	10.3
Leucine	188	17.1
Tyrosine	89.8	5.8
Phenylalanine	105	7.4
Lysine	147	11.1
Histidine	46.6	11.6
Arginine	160	19.8
Cysteine	17.2	3.1
Methionine	57.6	3.4
Tryptophane	34.9	6.6

2.4.1.1.2 คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate)

2.4.1.1.2.1 น้ำตาลแลคโตส

ปริมาณน้ำตาลแลคโตสในน้ำนมเหลืองของโค จะมีปริมาณต่ำในช่วงวันแรก และค่อย ๆ เพิ่มสูงขึ้นในวันถัดไป (Kehoe และ Heinrichs, 2007) น้ำตาลแลคโตสในน้ำนมเหลืองจะแปรผกผันกับปริมาณโพแทสเซียม เพื่อรักษาสมดุลออสโมติก แลคโตสจะควบคุมการแพร่ของน้ำในไซโตพลาสซึมของเซลล์เยื่อบุในต่อมน้ำนม กับเซลล์หลังน้ำนม ซึ่งปริมาณน้ำจะส่งผลต่อปริมาณน้ำนม และความหนืด โดยในน้ำนมเหลือง จะมีปริมาณแลคโตสน้อย ความดันออสโมติกจึงมีน้อย น้ำในไซโตพลาสซึมแพร่เข้ามาน้อย ส่งผลให้น้ำนมเหลืองมีความเข้มข้นสูงกว่าน้ำนมปกติ (Bleck และคณะ, 2010) และส่งผลให้มีปริมาณอิมมูโนโกลบูลินชนิด G น้อย โดยปริมาณน้ำตาลแลคโตสที่เปลี่ยนไปตามระยะเวลาภายหลังการคลอดลูก แสดงดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ปริมาณของน้ำตาลแลคโตสในน้ำนมเหลืองของโค ที่มา : Tsioulpas และคณะ (2007)

ระยะเวลาภายหลังการคลอด (วัน)	ปริมาณน้ำตาลแลคโตส (%)
1	2.69 ± 0.46
2	3.04 ± 1.23
3	3.52 ± 0.44
4	3.82 ± 0.19
5	4.15 ± 0.24
15	4.32 ± 0.14
30	4.54 ± 0.21
60	4.61 ± 0.12
90	4.70 ± 0.14

2.4.1.1.3 ไขมัน

ไขมันในน้ำมันเหลืองของโค ประกอบด้วยกรดไขมัน (fatty acid), ไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride), คอเลสเตอรอล (cholesterol) และ ฟอสโฟลิปิด (phospholipid) โดยไขมันในน้ำมันเหลืองเป็นทั้งตัวให้พลังงานแก่ลูกโค อีกทั้งเป็นตัวเพิ่มเมตาบอลิซึมในร่างกายลูกโค ปริมาณไขมันในน้ำมันเหลืองจะสูงสุดในวันที่สาม ภายหลังจากคลอดลูกแล้วค่อยลด ๆ ลง โดยปริมาณกรดไขมันสายสั้นจะเพิ่มขึ้น ในขณะที่ กรดไขมันสายยาวจะลดลงสำหรับอนุพันธ์ของกรดไลโนเลอิก และ กรดไขมันชนิดทรานส์จะเพิ่มขึ้นใน 5 วันแรก และจะมีปริมาณสูงสุดในวันที่ 5 ภายหลังจากการคลอดลูก (Contarini และคณะ, 2014)

สำหรับฟอสโฟลิปิดในน้ำมันเหลืองของโค จะประกอบด้วย กลีเซอโรฟอสโฟลิปิด และ สฟิงโกลิปิด เป็นหลัก โดยฟอสโฟลิปิดในน้ำมันเหลืองจะมีหน้าที่เป็นเยื่อหุ้มอนุภาคเม็ดไขมัน และใช้เป็นตัวห่อหุ้มสารอาหารที่ละลายได้ในไขมัน ซึ่งมีประโยชน์แก่ร่างกายลูกโค (Contarini และ Povolo, 2013) โดยปริมาณขององค์ประกอบต่าง ๆ ในไขมันแปรผันตามจำนวนครั้งในการตั้งท้อง และ ระยะเวลาภายหลังจากการคลอด แสดงดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนในน้ำมันเหลืองของโค ที่มา : Christiansen และคณะ (2010)

ชนิดของไขมัน	จำนวนครั้งในการคลอดลูก		ระยะเวลาภายหลังจากการคลอดลูก					
	ครั้งแรก (n=30)	มากกว่า 1 ครั้ง (n=30)	24 ชม. (n=10)	48 ชม. (n=10)	72 ชม. (n=10)	96 ชม. (n=10)	120 ชม. (n=10)	5 เดือน (n=10)
SFA	68.5	62.3	66.3	65.2	63.5	64.4	66.0	67.8
SCSFA	10.3	7.6	5.8	8.1	9.0	10.5	9.7	10.6
MCSFA	16.1	10.8	14.1	13.0	12.1	12.9	13.5	15.6
LCSFA	42.1	43.9	46.4	44.0	42.4	40.9	42.8	41.6
MUFA	26.7	33.1	28.4	30.1	31.9	31.1	29.8	27.5
PUFA	4.6	4.4	5.1	4.5	4.4	4.4	4.1	4.6
CLA	0.43	0.29	0.23	0.27	0.33	0.37	0.41	0.53
Trans FA	2.7	2.1	1.5	1.8	2.3	2.5	2.8	3.7

หมายเหตุ : SFA = Saturated fatty acid; SCSFA = short-chain SFA; MCSFA = medium-chain SFA

LCSFA = long-chain SFA.

2.4.1.1.4 วิตามิน และ แร่ธาตุ

วิตามินที่พบในน้ำมันเหลืองของโค ได้แก่ วิตามิน A, B1, B2, B6, B12, D และ E โดยวิตามินที่ละลายในไขมันได้แก่ A D และ E ส่วน B1 B2 B6 B12 เป็นวิตามินที่ละลายได้ในน้ำ สำหรับแร่ธาตุที่พบในน้ำมันเหลืองของโค ได้แก่ โซเดียม คลอไรด์ โพแทสเซียม แคลเซียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม และ ซัลเฟอร์ (Buttar และคณะ, 2017; Elfstrand และคณะ, 2002) สำหรับประโยชน์ของวิตามิน และแร่ธาตุในน้ำมันเหลืองแต่ละชนิด แสดงดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ชนิดและหน้าที่ของวิตามินในน้ำมันเหลืองของโค ที่มา : Buttar และคณะ (2017)

ชนิดของวิตามิน และ แร่ธาตุ	หน้าที่ของวิตามินในน้ำมันเหลืองของโค
A	เสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกัน
B1	} ช่วยในการเผาผลาญไขมัน และ ย่อยโปรตีน
B2	
B6	
D	ช่วยในการดูดแคลเซียมและแร่ธาตุอื่นๆในลำไส้เล็ก
B12	บำรุงระบบประสาทและเซลล์เม็ดเลือดแดงให้แข็งแรง
E	บำรุงสมองและระบบประสาท
โซเดียม	รักษาสมดุลของเหลวส่งผ่านในระบบประสาท และ เกี่ยวข้องกับการหดตัวของกล้ามเนื้อ
คลอไรด์	เกี่ยวกับการหลังกรดในกระเพาะอาหาร
โพแทสเซียม	เกี่ยวกับการส่งผ่านของระบบประสาท
แคลเซียม	เกี่ยวกับการสร้างกระดูกและฟัน การทำงานของ กล้ามเนื้อ และเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันของลูกโค
ฟอสฟอรัส	เสริมสร้างกระดูกและฟัน รักษาสมดุลกรด-ด่าง ใน ร่างกาย
แมกนีเซียม	เกี่ยวกับการสังเคราะห์โปรตีน และ การสร้างระบบ ภูมิคุ้มกัน
ซัลเฟอร์	เกี่ยวกับการเจริญเติบโตของทารกแรกเกิด

2.4.1.2 สารประกอบที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ได้แก่ สารสร้างภูมิคุ้มกัน (immune factors) และ สารที่มีผลต่อการเจริญเติบโต (growth factors)

2.4.1.2.1 สารสร้างภูมิคุ้มกัน

ได้แก่ immunoglobulins, lactoferrin, α -lactalbumin, β -lactoglobulin, lysozyme และ lactoperoxidase

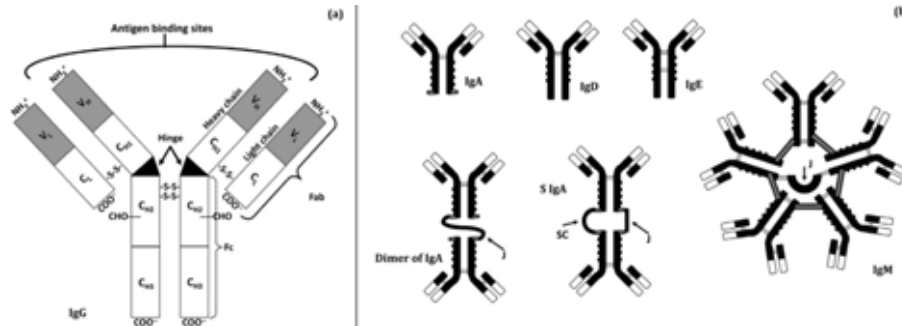
2.4.1.2.1.1 อิมมูโกลบูลิน (immunoglobulins: Igs)

อิมมูโกลบูลินจัดเป็นโปรตีนประเภทหนึ่งที่มีส่วนช่วยในการสร้างภูมิคุ้มกันให้แก่ทารก โดยในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะพบ อิมมูโกลบูลินทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ IgG, IgA, IgM, IgD และ IgE แต่ในน้ำนมเหลืองของโคนั้น จะพบเฉพาะ IgG, IgA และ IgM (Borad และ Singh, 2018) ซึ่งอิมมูโกลบูลินทั้ง 3 ชนิดจะแตกต่างกันที่โครงสร้าง (ภาพที่ 8) และ หน้าที่ (ตารางที่ 13) โดย Ig ต่าง ๆ นิยมตรวจด้วยวิธี ELISA ซึ่ง IgG เป็นอิมมูโกลบูลินหลักในน้ำนมเหลืองของโค โดยมีการหาสเปกตรัมการเรืองแสงของอิมมูโกลบูลินแต่ละชนิดในน้ำนมเหลืองของโค (ภาพที่ 9) (Abdel-Salam และคณะ, 2014) สำหรับปริมาณของอิมมูโกลบูลินในน้ำนมเหลืองของโค แสดงดังตารางที่ 13 (Borad และ Singh, 2018) ซึ่งปริมาณของอิมมูโกลบูลินจะขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น อายุแม่โค ฤดูกาลที่ตั้งท้อง ระยะเวลาภายหลังการคลอดลูก (Devery-Pocius และ Larson, 1983) นอกจากนี้ แม่โคที่โตเต็มที่แล้วมีสุขภาพดีจะให้ น้ำนมเหลืองที่มีปริมาณอิมมูโกลบูลินมากกว่าในน้ำนมเหลืองของแม่โคท้องแรกที่ยังเจริญเติบโตไม่เต็มที่ แสดงให้เห็นว่าปัจจัยจากการสุขภาพแม่โคมีผลกระทบต่อปริมาณอิมมูโกลบูลินมากกว่าปัจจัยจากครั้งในการตั้งครรภ์ (Tyler และคณะ, 1999) นอกจากนี้ IgG ส่วนมากจะถูกถ่ายโอนจากเลือดสู่เต้านมโดย FcRn-receptor transcytosis (Cervenak และ Kacs Kovics, 2008; Liu และคณะ, 2009; Baumrucker และคณะ, 2010) สำหรับ IgA จะถูกถ่ายโอนโดยตัวรับ Ig ชนิด pIgR (De Groot และคณะ, 2000; Ostensson และ Lun, 2008) และสำหรับ IgM ผลิตโดยเซลล์พลาสมาในน้ำเลือด (Moore และคณะ, 2005) และเนื่องจาก IgG มีปริมาณมากในน้ำนมเหลืองของโค จึงมีการนำ IgG มาประยุกต์ใช้เป็น functional ingredient ในอุตสาหกรรมอาหารเป็นจำนวนมากในหลายๆประเทศ เช่น นิวซีแลนด์ ออสเตรเลีย ฝรั่งเศส เป็นต้น จึงมีการพัฒนาการสกัด IgG ในวิธีต่าง ๆ เพื่อให้ได้ yield สูงสุด เช่น reverse micelles (Su และ Chiang, 2003), ion-exchange chromatography (Hahn และคณะ, 1998; Bai และคณะ, 2000; Doultani และคณะ, 2004; Wongchuphan และคณะ, 2011) เป็นต้น

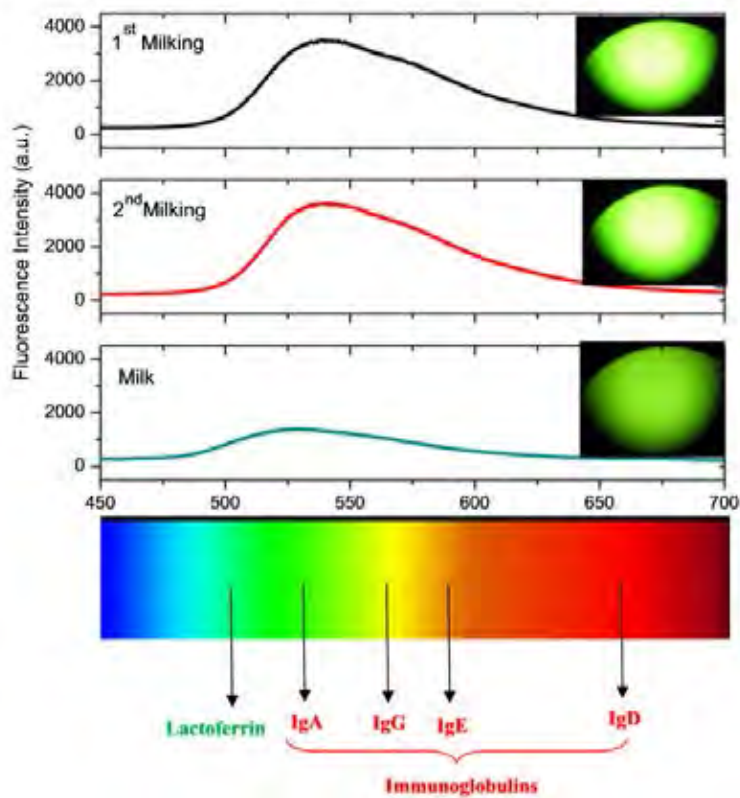
ตารางที่ 13 ชนิด ปริมาณ และ หน้าที่ของอิมมูโกลบูลินในน้ำนมเหลืองของโค ที่มา : Borad และ Singh (2018)

อิมมูโกลบูลิน	ปริมาณ (mg/ml)	หน้าที่
IgG1	35	กำจัดสารพิษจากจุลินทรีย์ในน้ำเหลืองและระบบไหลเวียนโลหิต
IgG2	16	
IgA	1.7	ฆ่าเชื้อแบคทีเรียในระบบทางเดินหายใจ และไวรัส
IgM	4.3	ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย

โดยปริมาณของ IgG คิดเป็น 80% ของอิมมูโกลบูลินทั้งหมด และสำหรับ IgA กับ IgM คิดเป็น 10-15% ของอิมมูโกลบูลินทั้งหมดในน้ำนมเหลืองของโค



ภาพที่ 8 อิมมูโกลบูลินชนิดต่าง ๆ ที่มา : Borad และ Singh, 2018

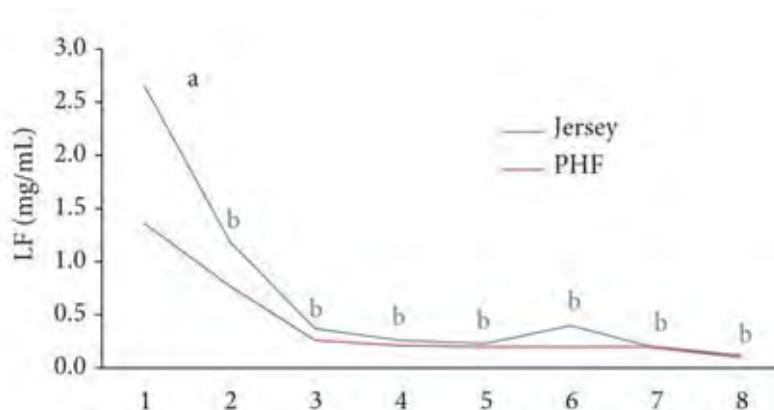


ภาพที่ 9 สเปกตรัมของอิมมูโกลบูลินแต่ละชนิดต่อปัจจัยด้านจำนวนครั้งในการตั้งครรภ์

ที่มา : Abdel-Salam และคณะ, 2014

2.4.1.2.1.2 แลคโตเฟอริน (lactoferrin)

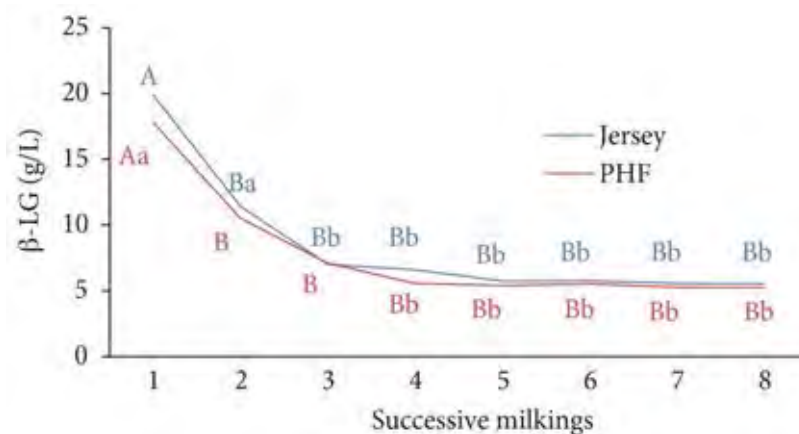
เป็นหนึ่งในสารสร้างภูมิคุ้มกัน ซึ่งเป็นไกลโคโปรตีนที่จับอยู่กับเหล็ก สามารถพบได้ในน้ำนมเหลืองของโค และสารคัดหลั่งในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Borad และ Singh, 2018) โดยแลคโตเฟอรินทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นตัวยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย อีกทั้งเป็นสารต้านการอักเสบ โดยปริมาณของแลคโตเฟอรินจะมากในวันแรกและจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยปริมาณของแลคโตเฟอรินที่แปรผันตามระยะเวลาในการให้น้ำนม แสดงดังภาพที่ 10



ภาพที่ 10 ปริมาณของแลคโตเฟอรินแปรผันตามระยะเวลาในการให้น้ำนม ที่มา: Sobczuk-szul และคณะ, 2013

2.4.1.2.1.3 บีตาแลคโตโกลบูลิน (β -lactoglobulin)

สำหรับ บีตาแลคโตโกลบูลิน เป็นโปรตีนเวย์ชนิดหนึ่งที่พบมากในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แต่ไม่พบในมนุษย์และสัตว์กัดแทะ มีปริมาณประมาณ 2-3 g/L ในช่วงแรกของการคลอดลูก ปริมาณเบตาแลคโตโกลบูลินในน้ำนมเหลืองของโคมีค่าเฉลี่ยที่ $14 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ในเวลาถัดมาจะมีปริมาณลดลงเหลือ $8 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ และหลังจากคลอดลูกได้ 16 วัน ปริมาณเบตาแลคโตโกลบูลินจะลดลงเหลือ $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Sobczuk-Szul และคณะ, 2013) (ภาพที่ 11) มีขนาด 18-kDa โดยบีตาแลคโตโกลบูลินจะมี 2 ชนิด ได้แก่ชนิด A และ B ซึ่งขึ้นอยู่กับรหัสพันธุกรรมของสัตว์ โดยบีตาแลคโตโกลบูลินเป็นสารต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค โดยเฉพาะ *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis* แต่ไม่สามารถยับยั้ง *E. Coli* ได้ (Chaneton และคณะ, 2011) สำหรับชิ้นส่วนของบีตาแลคโตโกลบูลินที่เกิดจากการไฮโดรไลซ์ทริปซิน จะเป็นสารต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (Pellegrini และคณะ, 2001) นอกจากนี้ บีตาแลคโตโกลบูลินยังเป็นสารต้านไวรัส (Neurath และคณะ, 1997) สารต้านมะเร็ง (Nakajima และคณะ, 1997) และเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Elias และคณะ, 2005) อีกทั้งเป็นสารที่ช่วยในการเผาผลาญไขมันในลูกโค (Pérez และ Calvo, 1995) รวมถึงช่วยควบคุมการถ่ายโอนภูมิคุ้มกันแบบพาสซีฟ (Ouweland และคณะ, 1997) สำหรับการหาปริมาณบีตาแลคโตโกลบูลิน สามารถทำได้โดยวิธี ELISA (Fleming และคณะ, 2016)

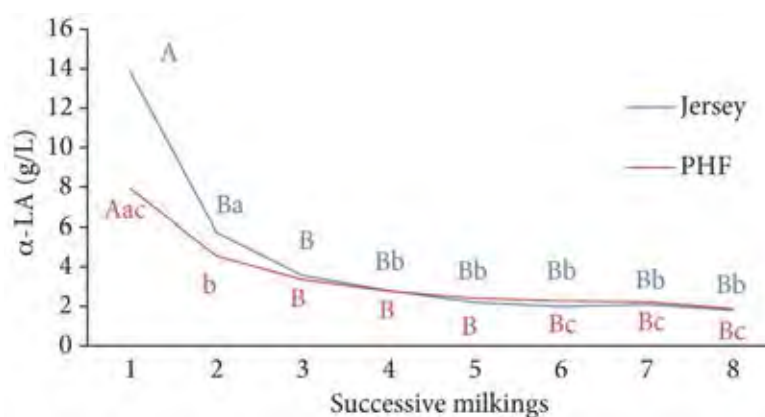


ภาพที่ 11 ปริมาณของบีตาแลคโตโกลบูลินแปรผันตามระยะเวลาในการให้น้ำนม

โดยแกน x หมายถึง ระยะเวลาภายหลังการคลอดลูก (วัน) ที่มา: Sobczuk-szul และคณะ, 2013

2.4.1.2.1.3 แอลฟาแลคตัลบูมิน (α -lactalbumin)

เป็นโปรตีนเวย์ชนิดหนึ่งที่จับกับแคลเซียมไอออน มีความเป็นกรดเล็กน้อย และประกอบด้วยกรดอะมิโน 123 ตัว พบมากในน้ำนมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เป็นองค์ประกอบหลักในโปรตีนเวย์ในน้ำนมเหลืองของโค โดยจะมีโครงสร้างเป็น “molten globule” (Permyakov และ Berliner, 2000) แอลฟาแลคตัลบูมิน มีคุณค่าทางโภชนาการสูงต่อทารกแรกเกิด เนื่องจากเป็นแหล่งที่ดีของกรดอะมิโน เช่น ทริปโตเฟน และซิสเตอีน (Chatterton และคณะ, 2006) โคนแอลฟาแลคตัลบูมิน จะช่วยกำจัดเชื้อแบคทีเรีย ช่วยในการดูดซึมแร่ธาตุในลำไส้ และช่วยการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน (Lonnerdal และ Lien, 2003) โดยปริมาณของแอลฟาแลคตูมินในช่วงแรกจะมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ และจะลดลงเหลือ $1.4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ในวันที่ 5 หลังการคลอดลูก (Levieux และ Ollier, 1999) นอกจากนี้ปริมาณแอลฟาแลคตาบูมินยังขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของโค โดยมีรายงานจาก Sobczuk-Szul และคณะ (2013) ว่า โคสายพันธุ์เจอร์ซี่จะมีปริมาณแอลฟาแลคตาบูมิน $13.82 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ และสายพันธุ์โฮลสไตน์ฟิเชียนมีปริมาณแอลฟาแลคตาบูมิน $7.91 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 12 ปริมาณของแอลฟาแลคตัลบูมินแปรผันตามระยะเวลาในการให้น้ำนม

โดยแกน x หมายถึง ระยะเวลาภายหลังการคลอดลูก (วัน) ที่มา : Sobczuk-szul และคณะ, 2013

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อองค์ประกอบทางเคมีของน้ำนมเหลือง

2.5.1 ชนิดของสัตว์

ปริมาณองค์ประกอบทางด้านโภชนาการของน้ำนมเหลืองขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของสัตว์ โดยในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมแต่ละชนิดจะมีปริมาณองค์ประกอบที่แตกต่างกันออกไป แสดงดังตารางที่ 14

ตารางที่ 14 สัดส่วนองค์ประกอบทางเคมีของน้ำนมเหลืองในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม 19 ชนิด

ที่มา : Godhia และ Patel (2006)

ชนิด	โปรตีน	ไขมัน	คาร์โบไฮเดรต (แลคโตส)	หน่วย	อ้างอิง
มนุษย์	22.9	29.5	57	g/l	Documenta และ Geigy (1969)
บาบูน	2.3	5.1	6.8	g/100 ml	Buss (1968)
หมา	138.0	78.0	27.0	g/kg	Meyer และ Kamphues (1990)
แมว	4.0	3.4	3.6	%	Keen และคณะ (1982)
ปลาวาฬ	86.6	4.9	6.3	%	Harms (1993)
ช้าง	21.0	56.0	61.8	g/kg	Osthoff และคณะ (2005)
ม้า	191.0	7.0	46.0	g/kg	Meyer และ Kamphues (1990)
หมู	180.0	72.0	24.0	g/kg	Meyer และ Kamphues (1990)
อูฐ	19.2	0.3	5.9	%	ELAgamy (2006)
ลามะ	16.5	1.0	6.3	%	Rosenberg (2006)
กวาง	95.2	87.0	11.1	g/dl	Fernandez และคณะ (1999)
โค	130.0	36.0	31.0	g/kg	Meyer และ Kamphues (1990)
แกะ	130.0	124.0	34.0	g/kg	Meyer และ Kamphues (1990)
แพะ	80.0	90.0	25.0	g/kg	Meyer และ Kamphues (1990)
หนู	8.9	14.7	2.5	%	Keen และคณะ (1981)
กระต่าย	135.0	147.0	16.0	g/kg	Meyer และ Kamphues (1990)

ในงานวิจัยนี้เราพิจารณาเฉพาะองค์ประกอบทางเคมีของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดเดียวเท่านั้น คือ โค ซึ่ง สัดส่วนองค์ประกอบข้อมูลทางโภชนาการในน้ำนมเหลืองของโคแต่ละสายพันธุ์แสดงดังตารางที่ 15

2.5.2 สายพันธุ์

โคนมแต่ละสายพันธุ์ให้ผลผลิตน้ำนมแตกต่างกัน (ตารางที่ 15) แต่จะไม่เห็นเด่นชัดเท่าที่น้ำนมปกติ โดยความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์จะเห็นเด่นชัดหลังจากวันที่ 3 ภายหลังจากการคลอดลูก

ตารางที่ 15 สัดส่วนองค์ประกอบทางเคมีของน้ำนมเหลืองของโคต่างสายพันธุ์ ที่มา : Duplessis และคณะ (2018)

Breed	Fat (%)	Crude Protein (%)	Lactose (%)	Fatty acids (%)
Holstein Friesian (in the Neterlands)	3.99	3.12	4.61	0.28
Ayrshire	3.96	3.19	4.67	0.26
Jersey	4.02	3.16	4.69	0.30

2.5.3 ระยะเวลาภายหลังการคลอดลูก

ปริมาณองค์ประกอบต่าง ๆ ในน้ำนมเหลืองของโค จะมีมากในช่วงแรกภายหลังการคลอด และ จะลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นภายหลังการคลอด ดังแสดงในตารางที่ 16

ตารางที่ 16 สัดส่วนองค์ประกอบทางเคมีของน้ำนมเหลืองของโค ที่มา : Christiansen และคณะ (2010)

องค์ประกอบ	ระยะเวลาภายหลังการคลอด			
	1 ชม.	8 ชม.	3 วัน	5 วัน
ไขมัน(%)	7.12±0.25	6.75±0.18	5.90±0.18	5.34±0.12
โปรตีน(%)	15.13±0.34	9.19±0.30	4.15±0.007	4.12±0.01
แลคโตส(%)	2.77±0.01	3.57±0.02	3.94±0.01	4.17±0.01
กรดไขมันอิสระ	33.99±4.74	24.34±4.09	12.48±1.79	9.59±1.72
อิมมูโนโกลบูลินชนิด G (g/L)	76.80±7.02	41.44±7.71	2.13±0.73	1.16±0.16

2.5.4 จำนวนครั้งในการคลอดลูก

องค์ประกอบและคุณสมบัติทางเคมีในน้ำนมเหลืองของโคจะมีปริมาณแตกต่างกันไปขึ้นกับจำนวนครั้งในการคลอดลูก โดยจะมีปริมาณกรดแลคติก ไขมัน โปรตีน มากในช่วงแรกภายหลังการคลอดลูก และลดลงในครั้งถัด ๆ ไป ในทางกลับกัน ค่าความเป็นกรดต่างจะมีค่าต่ำในครั้งแรก และสูงขึ้นในครั้งถัดไป ดังแสดงในตารางที่ 17

ตารางที่ 17 ความแตกต่างขององค์ประกอบทางเคมีในน้ำนมเหลืองของโคที่แปรผันตามจำนวนครั้งที่คลอดลูก
ที่มา : Tsioulpas และคณะ (2007)

องค์ประกอบทางเคมีกายภาพ	จำนวนครั้งในการคลอดลูก			
	1	2	3	4
ความถ่วงจำเพาะ	1.056	1.040	1.035	1.033
pH	6.17	6.28	6.28	6.38
% กรดแลคติก	0.46	0.28	0.25	0.23
%ไขมัน	6.7	5.4	3.9	4.4
%โปรตีน	14.0	8.4	5.1	4.2
%แลคโตส	2.7	3.9	4.4	4.6
%เถ้า	1.11	0.95	0.87	0.82

2.5.5 อาหาร

อาหารเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ส่งผลต่อปริมาณองค์ประกอบต่าง ๆ ในน้ำนมเหลืองของโค โดยพบว่า ฟางข้าว เป็นอาหารที่สามารถทำให้มีปริมาณ IgG ในน้ำนมเหลืองของโคได้มากที่สุด ส่วนหญ้าหมักเป็นอาหารที่ทำให้ปริมาณโปรตีนในน้ำนมเหลืองของโคได้มากที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 18

ตารางที่ 18 ความแตกต่างขององค์ประกอบทางเคมีในน้ำนมเหลืองของโคที่แปรผันตามอาหาร
ที่มา : Dunn และคณะ (2017)

องค์ประกอบทางเคมีกายภาพ	อาหาร		
	หญ้าหมัก	อาหารเหลือสกัดเข้มข้น	ฟางข้าว
%ไขมัน	6.6	6.8	6.8
%โปรตีน	13.7	13.6	13.6
%แลคโตส	2.7	2.8	2.7
IgG (g/l)	54.7	53.5	55.1

2.6 ประโยชน์ของน้ำนมเหลือง

จากองค์ประกอบของน้ำนมเหลืองที่มีสารอาหาร แร่ธาตุ โพรตีน immune factor, growth factor และสารต้านการอักเสบ (anti-inflammatory factors) จึงช่วยเสริมสร้างภูมิคุ้มกันและส่งเสริมการเจริญเติบโตของเด็กหรือลูกสัตว์แรกเกิดได้ ทั้งยังนำมาทำเป็นอาหารเสริมเพื่อเสริมสร้างภูมิคุ้มกันและป้องกันการอักเสบได้

2.6.1 การใช้ น้ำนมเหลืองของโคในการสร้างระบบภูมิคุ้มกันในทารกและอาการผิดปกติในทารกหรือลูกสัตว์แรกเกิด

ในน้ำนมเหลืองของโคมีปริมาณสารอาหาร growth factor และ Immune factor สูงมากกว่าคน (Uruakpa และคณะ, 2002) และยังมีองค์ประกอบของ immunoglobulin A (IgA), immunoglobulin G (IgG) และ lactoferrin ที่เป็นสารภูมิคุ้มกัน ทำให้มีความสามารถในการจับกับเชื้อโรคที่ก่ออันตรายกับร่างกาย ส่งผลให้ร่างกายต้านการอักเสบได้ (Cakebread และคณะ, 2015; Hill และ Newburg, 2015) จากงานวิจัยของ Korhonen และคณะ (1995) ทำให้ทราบว่าสารต้านภูมิคุ้มกันในน้ำนมเหลืองของโคสามารถป้องกันการเจ็บป่วยที่เกิดจากแบคทีเรีย *Helicobacter pylori* ได้ ซึ่งคล้ายกับอีกงานวิจัยที่ทำให้ทราบว่าผู้ทดลองที่ได้รับสารต้านภูมิคุ้มกันจากน้ำนมเหลืองของโคจะสามารถต้านทานเชื้อ *Shigella* ได้ (Tacket และคณะ, 1992) และอีกงานวิจัยที่มีการทำการทดลองในสัตว์ทดลอง พบว่าสัตว์ทดลองที่ได้รับน้ำนมเหลืองของโคสามารถต้านการอักเสบได้ (Yadav และคณะ, 2016) นอกจากนี้ในน้ำนมเหลืองของโคยังมี growth factor เช่น Insulin-like growth factors (IGF-1 และ IGF-2) ที่เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการเจริญเติบโตในสิ่งมีชีวิต (Pakkanen และ Aalto, 1997) จากประโยชน์ที่กล่าวมาทำให้มีการนำน้ำนมเหลืองของโคไปทำเป็นอาหารเสริมเพื่อช่วยสร้างเสริมภูมิคุ้มกันและกระตุ้นการเจริญเติบโต และงานวิจัยของ Murata และคณะ (2014) แสดงให้เห็นผลทดสอบของ lactoferrin ที่สามารถช่วยปกป้องผิวหนังจากรังสี UVB ในหนูทดลองได้

สำหรับทารกแรกเกิดที่มีระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง เช่น ภูมิไวเกินส่งผลต่อระบบภูมิคุ้มกันทำให้เกิดอาการแพ้ และในบางกรณีอาจทำให้เกิดภาวะภูมิแพ้และเสียชีวิตได้ ความผิดปกติของภูมิคุ้มกันเนื้อเยื่อเป็นสาเหตุหลักของภาวะภูมิไวเกินในทารก ซึ่งต่อมไทมัสเป็นอวัยวะสำคัญของระบบภูมิคุ้มกันและมีหน้าที่ในการพัฒนาของ T-lymphocytes ที่ยังไม่เจริญเต็มที่หรือที่รู้จักในชื่อ thymocytes ซึ่งผลิตโดยต่อมไทมัสนั้นหน้าที่ในการกำจัดเซลล์ภูมิคุ้มกันที่ตอบสนองด้วยตนเอง การเลี้ยงลูกด้วยนมแม่มีบทบาทสำคัญในการพัฒนาต่อมไทมัสในทารกแรกเกิด (Jackson และ Nazar, 2006) โดย Proline-rich polypeptide (PRP) ที่มีอยู่ในน้ำนมเหลืองของโค ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของต่อมไทมัส และยังช่วยบรรเทาอาการปวดการอักเสบและบวมที่เกิดจากเซลล์เม็ดเลือดขาวและ T-cell overproduction เนื่องจากโรคภูมิแพ้และภูมิคุ้มกันผิดปกติ ดังนั้นการรักษาด้วยผลิตภัณฑ์นม น้ำเหลือง อาจเป็นประโยชน์ในการกระตุ้นการทำงานของต่อมไทมัส (Hasselbalch และคณะ, 1996)

การเปลี่ยนแปลงภูมิคุ้มกันต้านทานเป็นหนึ่งในสาเหตุสำคัญของโรคหลอดเลือดตีตันและโรคหลอดเลือดหัวใจ หนองในเทียม หรือภาวะภูมิไวต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจนของหัวใจสามารถก่อให้เกิดเนื้อเยื่อของหลอดเลือดและโรคหลอดเลือดหัวใจหรือโรคหลอดเลือดสมอง (Rona, 1998) การมี Proline-rich polypeptide (PRP) ใน น้ำนมเหลืองของโคอาจป้องกันการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดได้ เนื่องจากช่วยในการป้องกันโรครวมแพ้และโรครวมต้านทานผิดปกติอื่น ๆ อีกทั้งในน้ำนมเหลืองยังมีสารที่ช่วยในการเจริญเติบโต (IGF-1) ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณไลโปโปรตีนความหนาแน่นสูง (HDL) ในระบบเลือด และลดระดับของไลโปโปรตีนความหนาแน่นต่ำ (LDL) ในระบบเลือด และช่วยป้องกันการก่อตัวของหลอดเลือดแดง ซึ่งสารที่ช่วยในการเจริญเติบโตที่มีอยู่ในน้ำนมเหลืองอาจช่วยซ่อมแซมกล้ามเนื้อหัวใจที่เสียหายและส่งเสริมการสร้างเส้นเลือดใหม่ (Rona, 1998)

มีศึกษาเพื่อประเมินผลกระทบ cardioprotective ของน้ำนมเหลืองของโค กับ กล้ามเนื้อหัวใจตายไอโซโพรเทอโนลที่เกิดขึ้นในหนู ผลการศึกษาพบว่ากินน้ำนมเหลืองของโค 500 มก./กก. ทำให้ความเสียหายต่อระบบหัวใจและหลอดเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากน้ำนมเหลืองของโคมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและความสามารถในการขับสารอนุมูลอิสระรวมถึงการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation (Kaur และคณะ, 2014) Kwon และคณะ (2010) รายงานว่า หนูที่มีลำไส้ขาดเลือด เมื่อได้รับน้ำนมเหลืองของโค หนูจะมีอาการขาดเลือดในลำไส้ลดลง โดย lactoferrin ที่มีอยู่ในน้ำนมเหลืองของโค จะช่วยรักษาระบบลำไส้

มีการใช้น้ำนมเหลืองของโคคู่กับยาต้านการอักเสบ Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) ซึ่งเป็นยาแก้ปวดที่ดี แต่มีแนวโน้มที่จะทำให้เกิดการบาดเจ็บของระบบทางเดินอาหาร จึงมีการตั้งข้อสังเกตว่าน้ำนมเหลืองของโคสามารถลดการซึมผ่านของลำไส้และดังนั้นจึงสามารถใช้ในการรักษาเสริมด้วย NSAIDs สำหรับการรักษาอาการบาดเจ็บที่กระเพาะอาหาร พบว่าน้ำนมเหลืองของโคสามารถใช้เป็นวิธีการรักษาแบบใหม่ในการรักษาความเสียหายของระบบทางเดินอาหารที่เกิดจากยา (Playford และคณะ, 2001)

2.6.2 การใช้น้ำนมเหลืองของโคเป็น functional ingredient ในอาหารเสริม (food supplement)

มีการใช้น้ำนมเหลืองในผลิตภัณฑ์นม เพื่อป้องกันอาการท้องเสียในเด็กเล็กจากโรต้าไวรัส (rotavirus), PR, O-IMMUNE™99 เป็นผลิตภัณฑ์ที่ป้องกันอาการท้องร่วงในลูกโคจากเชื้ออี โคไล (*E. coli*) (Pakkanen และ Aalto, 1997) จากบทความวิชาการของ Shing และคณะ (2009) การใช้น้ำนมเหลืองของโคเป็นอาหารเสริมจะช่วยฟื้นฟูร่างกายหลังจากการออกกำลังกายอย่างหนักได้ดีกว่าอาหารเสริมอื่น และยังสามารถใช้ลดการติดเชื้อภายในระบบทางเดินอาหารของเด็กแรกเกิด รวมทั้งรักษาและป้องกันการบาดเจ็บในระบบทางเดินอาหารของผู้ใหญ่ ยิ่งไปกว่านั้น หากรับประทาน NSAIDs เป็นระยะเวลาสั้นจะช่วยบรรเทาอาการของโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบของระบบทางเดินอาหารได้ (Playford และคณะ, 1999) มีงานวิจัยที่เปิดเผยว่าคุณสมบัติของ lactoferrin ในน้ำนมเหลืองของโค มีคุณสมบัติในทางยาและอาหารเสริมได้ (Giansanti และคณะ, 2016) อีกทั้งจากงานวิจัยของ Kshirsagar และคณะ (2015) ผลการวิจัยได้พบว่า colostrum power dressing มีความปลอดภัยและสามารถช่วยรักษาแผลลึกได้ และ

ผลงานวิจัยที่ใช้น้ำมันเมล็ดของโคเป็น supplement ในผู้ป่วยโรคเบาหวานเพื่อช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ (Jahantigh และคณะ, 2011)

จากประโยชนดังกล่าวจึงมีการนำน้ำมันเมล็ดมาใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์กลุ่มอาหารเชิงหน้าที่ (functional food) เพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการและมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์ ดังนั้น การศึกษาสารชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันเมล็ดรวมทั้งความผันแปรขององค์ประกอบดังกล่าว จึงเป็นปัจจัยสำคัญเบื้องต้นเพื่อให้เกิดความรู้ความเข้าใจและสามารถนำน้ำมันเมล็ดมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ได้อย่างเหมาะสม ปัจจุบันมีการนำเทคโนโลยีเมตาโบลอมิกส์ (metabolomics) มาใช้เพื่อวิเคราะห์ข้อมูลสารชีวโมเลกุลขนาดเล็กที่เป็นองค์ประกอบในระบบอาหารอย่างกว้างขวาง อย่างไรก็ตาม การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีดังกล่าวเพื่อศึกษาข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของน้ำมันเมล็ดและผลิตภัณฑ์นมในประเทศไทยยังมีอยู่อย่างจำกัด ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพและข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากในน้ำมันเมล็ดของโคที่ผลิตได้ในประเทศไทย โดยใช้เทคนิคโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี

2.7 เทคโนโลยีเมตาโบลอมิกส์

จากบทความทางวิชาการของ คานต์ เศรษฐชัยมงคล และมยุรี เหลืองวิลัย (2560) ได้เรียบเรียงไว้ว่า “เมตาโบลอมิกส์ หรืองานวิจัยบางส่วนใช้คำว่า การวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ (metabolite analysis) หรือ การรวบรวมข้อมูลสารเมตาบอไลต์ (metabolite profiling) เป็นศาสตร์หนึ่งในวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีโอมิกส์ ที่เน้นการศึกษาสารชีวโมเลกุลขนาดเล็ก (โดยทั่วไปมีขนาดไม่ต่ำกว่า 1.5 กิโลดาลตัน) เช่น กรดนิวคลีอิก นิวคลีโอไทด์ กรดอะมิโน เพปไทด์สายสั้น กรดไขมัน น้ำตาลโอลิแซคคาไรด์ วิตามิน สารประกอบแอลกอฮอล์ สารประกอบคาร์บอนิล กรดอินทรีย์ สารประกอบซัลเฟอร์ สารประกอบฟีนอลิก สารประกอบอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน ฯลฯ ที่สังเคราะห์โดยสิ่งมีชีวิต หรือเป็นองค์ประกอบของระบบชีวภาพชนิดใดชนิดหนึ่ง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อรวบรวมข้อมูลชนิดและปริมาณของสารเมตาบอไลต์ทั้งหมด หรือ เมตาโบลอม ทั้งสารที่สังเคราะห์อยู่ภายในเซลล์ (intracellular) และสารที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular) ซึ่งเป็นผลจากวิถีเมตาบอลิซึม (metabolic pathway) เพื่อให้เกิดความเข้าใจแบบองค์รวม (holistic approach) ของระบบชีวภาพนั้น ๆ โดยเป็นผลมาจากการแสดงออกทางพันธุกรรม ร่วมกับการปรับตัวเพื่อตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อม”

เทคโนโลยีเมตาโบลอมิกส์นี้ มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน ทั้งการประยุกต์ใช้ศึกษาองค์ประกอบต่าง ๆ ในอาหารทั่วไปและยังสามารถประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์นมได้

2.7.1 การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเมตาโบลอมิกส์ในอาหารทั่วไป

ในปัจจุบันมีการนำเทคโนโลยีเมตาโบลอมิกส์มาประยุกต์ใช้ในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ของอาหาร และแสดงโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุล (biomolecular profile) ของผลิตภัณฑ์อาหาร รวมถึงกลไกการเปลี่ยนแปลง ขององค์ประกอบที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการผลิต การแปรรูป การเก็บรักษา ซึ่งเกี่ยวข้องกับ สมบัติเชิงหน้าที่ (functionality) และคุณภาพทางประสาทสัมผัส (organoleptic property) ของผลิตภัณฑ์ ผลที่ได้จะอยู่ในรูปแบบ ข้อมูลการวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์โดยรวม เรียกว่า “เมตาโบลอม” ซึ่งเปรียบเสมือนลายพิมพ์ระดับโมเลกุล (molecular fingerprint) ของตัวอย่างนั้น (Wishart, 2008; Capozzi และ Trimigno, 2015; มยุรี เหลืองวิสัย, 2560)

2.7.2 การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีในผลิตภัณฑ์นม

การประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ในน้ำนม สามารถวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ในน้ำนมได้ทั้ง ชนิดที่ระเหยง่าย (volatile) และ ชนิดที่ระเหยยาก (non-volatile) ได้ถึง 200 ชนิด (Boudonck และคณะ, 2009; Klein และคณะ, 2010; Sundekilde และคณะ, 2013) แม้จะมีปริมาณน้อยแต่เป็นสิ่งที่ผลกระทบต่อองค์ประกอบทั้ง ชีวเคมีและคุณภาพทางประสาทสัมผัสของน้ำนม จึงต้องทำการศึกษาและนำข้อมูลไปใช้ในการตรวจสอบคุณภาพ น้ำนม ตัวอย่างการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเมตาโบลอมิกส์ในน้ำนมแสดงดังตารางที่ 19

ตารางที่ 19 ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้เทคโนโลยีเมตาโบลอมิกส์ในผลิตภัณฑ์นม

ปัจจัยที่ศึกษา	วัตถุประสงค์	เทคนิคทางเคมีวิเคราะห์	ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ	แหล่งที่มา
ชนิดของสิ่งมีชีวิต	ศึกษาการแยกความแตกต่างของสารเมตาบอไลต์เฉพาะจากแต่ละกลุ่ม และ ร่วมกันของ 2 กลุ่ม	GC/MS	Goat milk: Valine and glycine Bovine milk: talose and malic acid	Scano และคณะ, 2014
ระยะเวลาการให้นม	ศึกษาการบ่งชี้และ ความสัมพันธ์ของ ส่วนประกอบในน้ำนมกับ สภาพการเผาผลาญอาหารของโค	NMR/MS	acetone and β -hydroxybutyrate	Klein และคณะ, 2010

ปัจจัยที่ศึกษา	วัตถุประสงค์	เทคนิคทางเคมีวิเคราะห์	ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ	แหล่งที่มา
ตัวแปรทางพันธุกรรม	การประเมินตัวแปรทางพันธุกรรมและ การตรวจหาตำแหน่งของยีนที่ควบคุมเชิงปริมาณ (quantitative trait loci) สำหรับสารเมตาบอไลต์ในน้ำนมโค	¹ H-NMR	Carnitine	Buitenhuis และคณะ, 2013
กระบวนการผลิต	เพื่อเข้าถึงอิทธิพลของกระบวนการให้ความร้อนต่อส่วนประกอบและคุณภาพทางโภชนาการของน้ำนม	UPLC	9-hydroxydecanoic acid, 12-hydroxydodecanoic acid, 2-hydroxymyristic acid, 3-hydroxytetradecanoic acid, 5-hydroxyeicosatetraenoic acid, 3-hydroxyhexadecanoic acid, and 10-hydroxyoctadecanoic acid and LysoPE, hexadecanoyl-lysophosphatidylethanolamine	Zhang และคณะ, 2018
Mastitis	ศึกษาเปรียบเทียบโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการและไม่แสดงอาการ	¹ H-NMR	threonine, lactate, histidine, N-acetylglucosamine, leucine, isoleucine, hippurate และ acetoacetate	มยุรี เหลืองวิสัย, 2560

2.7.2.1 สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่าย (volatile metabolite)

สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่าย ประกอบด้วยสารประกอบอินทรีย์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ตัวอย่างสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายในน้ำนม เช่น acetaldehyde, dimethyl sulfide เป็นต้น (सानต์ เศรษฐชัยมงคล และมยุรี เหลืองวิสัย, 2560) สารระเหยได้มีความสำคัญกับอาหาร เพราะมีความเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของอาหารและมีผลต่อคุณภาพทางประสาทสัมผัส (กลิ่นและรสชาติ) ตัวอย่างเช่น การเปลี่ยนแปลงของผลไม้ระหว่างการสุก เนื่องจากการระเหยของสารเมตาบอไลต์สามารถเกิดได้เองอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นจึงประยุกต์ใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพได้ โดยสามารถตรวจติดตามอย่างสะดวกรวดเร็ว (Rowan, 2011)

2.7.2.2 สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยาก (non-volatile metabolite)

สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยาก หรือ สารเมตาบอไลต์ที่ไม่สามารถระเหยได้ เช่น สารประกอบคาร์บอนิล กรดอินทรีย์ สารประกอบโรรมาติกไฮโดรคาร์บอน สารประกอบแอลกอฮอล์ กรดอะมิโน สารประกอบเอสเทอร์ สารประกอบไนโตรเจน สารประกอบซัลเฟอร์ เป็นต้น (Cevallos-Cevallos, 2009; Panighel และ Flamini, 2014) โดยตัวอย่างสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายและสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากที่ตรวจพบได้ในน้ำนมโค แสดงดังตารางที่ 20

ตารางที่ 20 ตัวอย่างสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายและสารเมตาบอไลต์ระเหยยากในน้ำนมโค

ข้อมูลดัดแปลงจาก Boudonck และคณะ, 2009; มยุรี เหลืองวิสัย, 2560

วิธีหลักของกระบวนการ	กระบวนการที่เกิดขึ้นภายในเซลล์	สารเมตาบอไลต์
Amino acid	- glycine, serine และ threonine metabolism	- glycine - threonine
	- phenylalanine & tyrosine metabolism	-phenylacetylglycine
	- valine, leucine และ isoleucine metabolism	- valine
peptides	- bovine casein peptides	- releelnvpgea (β - casein precursor) - sekttmplwa (alpha- S1- casein precursor)
carbohydrate	- aminosugars metabolism	- N- acetylglucosamine - N- acetylneuraminate
	- fructose, mannose, galactose, starch, และ sucrose metabolism	- galactose - maltotetraose
	- glycolysis, gluconeogenesis, pyruvate metabolism	- glucose- 6- phosphate (G6P) - glucose

วิธีหลักของกระบวนการ	กระบวนการที่เกิดขึ้นภายในเซลล์	สารเมตาบอไลต์
nucleotide	- purine metabolism, guanine containing - purine metabolism, urate metabolism	- 1-methylguanosine - urate
Lipid	- fatty acid, monoene (C – เลขคี่) - bile acid metabolism - ketone bodies	- 10- heptadecenoate (17: 1 (n - 7)) - cholate - 3- hydroxybutyrate (BHBA)
energy	- krebs cycle	- citrate - succinate - fumarate - malate
cofactors และ vitamins	- ascorbate และ aldarate metabolism - nicotinate และ nicotinamide metabolism	- threonate - nicotinamide ribosidea

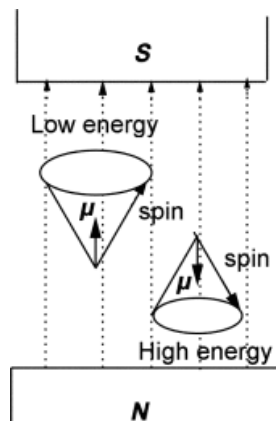
ในการตรวจวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ที่กล่าวไปข้างต้นนั้น จำเป็นต้องใช้เทคนิคทางเคมีวิเคราะห์มาศึกษา โดย nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ทั่วไปในการศึกษาเมตาโบโลมิกส์ วิธีหนึ่ง (Mantle และคณะ, 2011)

2.8 เทคนิคทางเคมีวิเคราะห์ขั้นสูงด้วยนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (nuclear magnetic resonance spectroscopy: NMR)

นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี เป็นเทคนิคที่นิยมใช้โดยทั่วไปในการศึกษาด้านเมตาโบโลมิกส์ เนื่องจากเป็นวิธีที่เรียบง่ายและวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็ว (Kim และคณะ, 2011) สามารถวิเคราะห์สารได้ในปริมาณมาก โดยที่ขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างน้อย (Krishnan และคณะ, 2005; Kruger และคณะ, 2008) สัญญาณ หรือ สเปกตรัมที่ได้ เป็นสัดส่วนต่อความเข้มข้นในหน่วยโมลาร์ของสารประกอบชนิดนั้น ซึ่งสามารถเทียบได้โดยตรงกับความเข้มข้นของสารประกอบนั้น ๆ โดยไม่ต้องใช้กราฟมาตรฐาน (Kim และคณะ, 2010) ความเข้มข้นที่แน่นอนของสารเมตาบอไลต์ทั้งหมดในตัวอย่าง สามารถคำนวณได้จากความเข้มข้นสูงสุด (peak intensity) ของสารตั้งต้นมาตรฐาน (internal standard) และมีกลุ่มซอฟต์แวร์ขนาดใหญ่ รวมทั้งฐานข้อมูลสำหรับรองรับการระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ที่ตรวจพบในตัวอย่าง (Johanningsmeier และคณะ, 2016) นอกจากนี้ เทคนิค NMR ยังสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างทั้งที่เป็นของแข็งและของเหลวได้ (Emwas, 2013; Emwas, 2015; Silva, 2003)

2.8.1 หลักการของ nuclear magnetic resonance

เป็นเทคนิคที่เกี่ยวกับการวัดระดับพลังงานที่แตกต่างกันของนิวเคลียสภายใต้สนามแม่เหล็ก ซึ่งนิวเคลียสของธาตุบางชนิดมีสมบัติของแม่เหล็กเช่น ^1H , ^{13}C นิวเคลียสเหล่านี้จะมีการหมุนตลอดเวลาจากการที่มีประจุ ทำให้มีโมเมนต์แม่เหล็กของตัวเอง (nuclear magnetic moment) ซึ่งเมื่อให้พลังงานในช่วงความถี่ของคลื่นวิทยุที่เหมาะสม นิวเคลียสจะดูดกลืนพลังงานเข้าไปและเปลี่ยนแปลงไปสู่ระดับพลังงานที่สูงขึ้น เรียกว่า การเกิดเรโซแนนซ์ (resonance) หลังจากนั้นจะคลายพลังงานออกและกลับสู่ระดับพลังงานต่ำ มีเพียงนิวเคลียสที่ค่าสปินไม่เป็นศูนย์เท่านั้นจึงจะสามารถเกิดการดูดกลืนคลื่นวิทยุได้ (ธนวิทย์ โพธิ์ศรี, 2540)

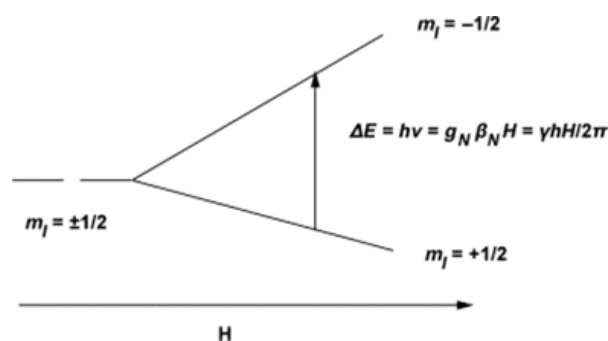


ภาพที่ 13 การเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียสเมื่อได้รับพลังงานกระตุ้นในระดับที่เหมาะสม ที่มา: Sridharan (2016)

ตารางที่ 21 เลขสปินควอนตัม ที่มา: Sridharan (2016)

Mass No.	Atomic No.	Spin-Quantum No.
Odd	Odd or Even	$1/2, 3/2, 5/2\dots$
Even	Even	0
Even	Odd	1, 2, 3...

ตัวอย่างเช่น ^1H มีเลขสปินควอนตัมเป็น $1/2$ และมีค่าที่เป็นไปได้เพียง 2 ค่า คือ $+1/2$ และ $-1/2$ เมื่อให้สนามแม่เหล็กภายนอก (external หรือ applied magnetic field, B_0) แก่นิวเคลียส สปินจะจัดเรียงตัวใหม่ และจะมีนิวเคลียร์แมกเนติกโมเมนต์ที่เป็นไปได้จะมีเพียงสองแบบ คือ นิวเคลียสที่มีเลขสปิน $+1/2$ จะวางตัวในแนวขนานกับแนวของ B_0 แต่มีทิศทางตรงข้ามกับ B_0 และจะมีพลังงานสูงกว่า



ภาพที่ 14 ระดับพลังงาน ที่มา: Sridharan (2016)

เมื่อนิวเคลียสที่ระดับพลังงานต่ำได้พลังงานที่เหมาะสมแล้ว เท่ากับ ΔE นิวเคลียสสปินก็จะเปลี่ยนและขึ้นไปอยู่ระดับพลังงานที่สูง ส่วนนิวเคลียสที่ระดับพลังงานสูงนิวเคลียสสปินก็สามารถเปลี่ยนเป็นตรงกันข้ามและคายพลังงานออกมาที่มีปริมาณเท่ากับ ΔE ได้ ความแตกต่างของพลังงานสองระดับนี้เขียนเป็นความสัมพันธ์กับความแรงสนามแม่เหล็กได้ตามสมการ

$$\Delta E = \frac{h\gamma}{2\pi} B_0 \text{-----} (*)$$

เมื่อ h คือ ค่าคงที่ของพลังค์ (Planck's constant)

B_0 คือ ความแรงของสนามแม่เหล็กภายใน หน่วยเป็นเทสลา (T)

γ คือ ค่าคงที่ gyromagnetic ratio (ตารางที่ 21)

ซึ่ง γ เป็นค่าเฉพาะตัวของนิวเคลียสแต่ละชนิด โดยโปรตอนจะมีค่า $2.675 \times 10^8 \text{ T}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ จากความสัมพันธ์ดังสมการจะเห็นได้ว่าความแตกต่างของระดับพลังงานทั้งสองระดับนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของนิวเคลียสและความแรงของสนามแม่เหล็กภายใน หากความแรงของสนามแม่เหล็กเพิ่มขึ้น ความแตกต่างของระดับพลังงานสองระดับพลังงานจะเพิ่มขึ้นด้วย (ธีรยุทธ วิไลวัลย์ และวรวรรณ พันธุมนาวิน, 2548)

ตารางที่ 22 ค่าคงที่ gyromagnetic ratio ของตัวอย่างธาตุ ที่มา: Sridharan (2016)

Nucleus	γ ($10^6 \text{ radS}^{-1} \cdot \text{T}^{-1}$)	$\gamma/2\pi$ (MHzT ⁻¹)
¹ H	267.513	42.576
² H	41.065	6.536
³ He	203.789	32.434
¹³ C	67.262	10.705
¹⁴ N	19.331	3.077

จากหลักการของ NMR ทำให้เทคนิคนี้มีประโยชน์ในการนำมาประยุกต์ใช้ในเคมีอินทรีย์และชีวเคมี เพื่อระบุสารประกอบอินทรีย์และวิเคราะห์โครงสร้าง biopolymers (Hu และคณะ, 2004) โดยการวิเคราะห์ด้วย NMR สามารถได้วิเคราะห์ตัวอย่างได้ทั้งของเหลวและของแข็ง (Pranitha และคณะ, 2011) ทำให้ในปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้เทคโนโลยี NMR based metabolomic ในการศึกษาองค์ประกอบทางชีวเคมีในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เป็นจำนวนมาก เช่น ผลิตภัณฑ์อาหาร และ ผลิตภัณฑ์นม เป็นต้น

2.8.2 การประยุกต์ใช้ nuclear magnetic resonance spectroscopy ในการศึกษาองค์ประกอบทางชีวเคมีในผลิตภัณฑ์อาหาร

เนื่องจากสารเมตาบอไลต์ของอาหารแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันไป เช่น ทำเลที่ตั้งทางภูมิศาสตร์ของแหล่งผลิต (geographic identity) กระบวนการผลิต และแหล่งที่มาของส่วนผสม (traceability) เป็นต้น (Cubero-Leon และคณะ, 2014; Danezis และคณะ, 2016) ซึ่งปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเมตาโบโลมิกส์ในการพิจารณาความถูกต้องและการตรวจสอบย้อนกลับของอาหารนั้น ๆ ได้ (Lee และคณะ, 2015; Teixeira และคณะ, 2014) รวมทั้ง ประยุกต์ใช้เทคนิค $^1\text{H-NMR}$ ในการวิเคราะห์หาสารเมตาบอไลต์เพื่อระบุอัตลักษณ์ของอาหาร ตัวอย่างงานวิจัยที่ได้ประยุกต์ใช้เทคนิค NMR ในการศึกษาองค์ประกอบทางชีวเคมีในผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น ศึกษาความแตกต่างของข้อมูลเมตาโบโลม ระหว่างเปียร์ที่มีสถานที่ผลิตแตกต่างกัน (Almeidia และคณะ, 2006), ศึกษาการเพิ่มขึ้นของ methylamines ในตัวอย่างปัสสาวะของปลา (Lee และคณะ, 2006), การหาสารเมตาบอไลต์ของไวน์ที่มาจากต่างชนิด (*Vitis vinifera*, Sangiovese) (Picone และคณะ, 2016) และการหาสารเมตาบอไลต์ในเมล็ดโกโก้ในพื้นที่เพาะปลูกต่างกัน (Marseglia และคณะ, 2016) เป็นต้น

2.8.3 การประยุกต์ใช้ nuclear magnetic resonance spectroscopy ในการศึกษาองค์ประกอบทางชีวเคมีในผลิตภัณฑ์นม (dairy product)

เนื่องจากในน้ำนมโคมีองค์ประกอบทางเคมีค่อนข้างซับซ้อน ซึ่งเทคนิค NMR สามารถวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ในน้ำนม ทั้งชนิดที่ระเหยง่าย (volatile) และชนิดที่ระเหยยาก (non-volatile) เช่น alcohols, carbonyl compound, organic acids, sulfur compound และ heterocyclic compound เป็นต้น และชนิดที่ระเหยยาก (non-volatile) เช่น amino acids, carbohydrates, lipid derivatives, carbonyl compound, sulfur compound และ nucleoside เป็นต้น ได้ถึง ประมาณ 200 ชนิด (Boudonck และคณะ, 2009; Klein และคณะ, 2010; Sundekilde และคณะ, 2013) ถึงแม้ว่าองค์ประกอบเหล่านี้ จะมียอยู่ในปริมาณเล็กน้อย แต่ก็มีความจำเป็นที่ต้องศึกษา เพราะมีผลโดยตรงต่อองค์ประกอบทางชีวเคมีและคุณภาพทางประสาทสัมผัสของน้ำนม และผลิตภัณฑ์นม ซึ่งปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้เทคนิค NMR ในการศึกษาองค์ประกอบทางชีวเคมีในน้ำนมหรือผลิตภัณฑ์นมอย่างกว้างขวาง เช่น ตัวอย่างงานวิจัยของ Klein และคณะ (2010) ที่ใช้เทคนิค NMR/MS ศึกษาเมตาโบโลมิกส์ในน้ำนมของแม่โคตลอดช่วงระยะเวลาก่อนและหลังการให้นม, ศึกษาองค์ประกอบของน้ำนมคน (Wu และคณะ, 2016), ศึกษาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพด้วยเมตาโบโลมิกส์เพื่อระบุความแตกต่างในน้ำนมที่ผลิตโดยโคพันธุ์ Holstein และกลุ่มอื่น (Yang และคณะ, 2016), ศึกษาความแตกต่างของน้ำนมที่มาจากฟาร์มที่แตกต่างกัน (Tenori และคณะ, 2018), การเปรียบเทียบโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการและไม่แสดงอาการด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ (มยุรี เหลืองวิสัย, 2560) และ ศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณองค์ประกอบโปรตีนและคุณสมบัติการตกตะกอนในผลิตภัณฑ์ชีส (Sundekilde และคณะ, 2013) เป็นต้น

2.8.3 การประยุกต์ใช้ nuclear magnetic resonance spectroscopy ในการศึกษาองค์ประกอบทางชีวเคมีในนํ้านมเหลือง

เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีของนํ้านมเหลืองมีความใกล้เคียงกับนํ้านมโค ในปัจจุบันจึงมีการศึกษาองค์ประกอบทางชีวเคมีด้วยเทคนิค NMR ในนํ้านมเหลือง เช่น งานวิจัยของ Bechtel (2002) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบในนํ้านมและนํ้านมเหลืองของคนตลอดระยะเวลาการตั้งครรภ์และภายหลังการคลอด และ งานวิจัยของ Picone และคณะ (2018) ได้ศึกษาเมตาโบลอมิกส์ในนํ้านมเหลืองของหนู และอิทธิพลต่อการอยู่รอดของลูกหนูและอัตราการเจริญของคอก

จากข้อมูลดังกล่าวไว้ข้างต้น จะพบว่า มีหลายปัจจัยที่ส่งผลต่อชนิด, ปริมาณสารเมตาบอไลต์, องค์ประกอบทางเคมี และ คุณสมบัติของนํ้านมและนํ้านมเหลือง เช่น ชนิดของสัตว์, การตั้งท้อง, อาหารที่ได้รับ, เวลาการเก็บนํ้านม จากคุณค่าทางโภชนาการและประโยชน์ในการส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันดังกล่าว ปัจจุบันจึงมีการนำนํ้านมเหลืองมาใช้เป็นส่วนประกอบทั้งในผลิตภัณฑ์กลุ่มอาหารสัตว์และผลิตภัณฑ์เสริมอาหารของคน เพื่อเสริมคุณค่าทางโภชนาการและเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ดังนั้น การศึกษาองค์ประกอบของนํ้านมเหลืองจึงเป็นปัจจัยสำคัญเบื้องต้นที่จะทำให้ทราบถึงประเภทของสารชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบในนํ้านมเหลือง รวมทั้งความผันแปรขององค์ประกอบดังกล่าวอันเนื่องมาจากปัจจัยต่างๆ ในระหว่างกระบวนการผลิต เพื่อให้เกิดความรู้ความเข้าใจและสามารถนำนํ้านมเหลืองมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารได้อย่างเหมาะสม และคงไว้ซึ่งประโยชน์สูงสุดต่อผู้บริโภค ในปัจจุบันมีการนำเทคโนโลยีเมตาโบลอมิกส์ ในการวิเคราะห์เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางชีวเคมีในระบบอาหารแบบองค์รวม (holistic approach) เพื่อให้เกิดความเข้าใจถึงกลไกการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบทางชีวเคมีโดยรวมในระหว่างกระบวนการผลิต การแปรรูป และการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ อย่างไรก็ตาม งานวิจัยที่ใช้เทคโนโลยีเมตาโบลอมิกส์ในการศึกษาข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของนํ้านมและผลิตภัณฑ์นมในประเทศไทยยังมีอยู่อย่างจำกัด ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ (i) ศึกษาข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของนํ้านมเหลืองของโคจากฟาร์มในเขตพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย และ (ii) เปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลดังกล่าวในนํ้านมเหลืองที่ได้จากแม่โคที่เลี้ยงโดยมีระบบการให้อาหารและอิทธิพลฟาร์มที่แตกต่างกัน โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี ($^1\text{H-NMR}$) ที่เป็นหนึ่งในเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์สารชีวโมเลกุลขนาดเล็กหรือสารเมตาบอไลต์แบบไม่จำเพาะเจาะจง (non-targeted analysis) และสามารถวิเคราะห์ข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยาก (non-volatile metabolite profile) ในตัวอย่างนํ้านมได้รวดเร็วและมีความละเอียดสูง อีกทั้งยังสามารถวิเคราะห์สารซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญที่มีปริมาณน้อยในตัวอย่างนํ้านมได้ จากนั้นเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยการประมวลผลข้อมูลจากการวิเคราะห์จัดกลุ่มตัวอย่างด้วยเทคนิค heat-map visualization ร่วมกับ hierarchical cluster analysis (HCA) และใช้เทคนิค principle component analysis (PCA) ในการหารูปแบบความแตกต่างระหว่างตัวอย่างด้วยการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก รวมถึงวิเคราะห์ระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (potential biomarker) ต่อคุณลักษณะและความผันแปรของนํ้านมเหลืองจากแม่โคกลุ่มที่สนใจได้

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 วัตถุดิบ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 วัตถุดิบ

รายการ

น้ำนมเหลืองของโค

ที่มา

ฟาร์มโคนมของเกษตรกรในเขตพื้นที่ อำเภอบำเหน็จณรงค์ จังหวัดชัยภูมิ และ อำเภอบางบาล จังหวัดนครราชสีมา จำนวน 2 ฟาร์ม จากแม่โคฟาร์มละ 8 ตัว แม่โค 1 ตัว จะเก็บน้ำนมวันที่ 1 และวันที่ 3 ภายหลังจากการคลอดลูก รวมทั้งสิ้นจำนวน 32 ตัวอย่าง ($n=32$)

3.1.2 วัสดุ อุปกรณ์

รายการ

ตู้แช่เยือกแข็ง Sanyo MDF-236 (-21 °C)

เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) EUTECH, pH2700 Bench

เครื่องกวนสาร (Magnetic stirrer) C-MAG HS 7

เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 3 ตำแหน่ง

บิวเรต (Burette) 50 ml grade B, 50 ml

ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 10 ml

ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 100, 250, 1000 ml

บีกเกอร์ (beaker) ขนาด 50, 100, 250, 500 ml

ปิเปต (pipette) ขนาด 10 ml

Pasture pipette และ จุกยาง

เครื่อง abbe refractometer

กระดาษเช็ดเลนส์

Chroma meter CR-400/410

white calibration plate CR-A43

light projection tube CR-A33c

Data Processor DP-400

Measuring head CR410

ที่มา

Sanyo, Sakata Oizumi-Machi, Japan

บริษัท เวิลด์ไวด์ เทรต ไทย จำกัด, กรุงเทพมหานคร

IKA®

Mettler Toledo, Switzerland

Witeg, Germany

Axygen Scientific, Inc., China

Schott, Germany

Schott, Germany

Schott, Germany

Hirschmann Laborgräte

GmbH & Co. KG, Germany

Atago, Japan

Double Rings, China

Konica Minolta, Japan

Konica Minolta, Japan

Konica Minolta, Japan

Konica Minolta, Japan

Konica Minolta, Japan

รายการ

Glass light Projection Tube CR-A33e
 หลอดทดลองพร้อมฝาปิด
 เครื่องวัดความหนืด (viscometer) Alpha
 Emission Thermometer 53008
 เครื่องย่อยโปรตีน (Digester) K-424
 เครื่องดักจับไอกรด (Scrubber) B-414
 เครื่องกลั่นไนโตรเจน (Distillation Unit) K-355
 เครื่องทำความเย็น (cooling unit) EYTLA
 ขวดรูปกรวย Erlenmeyer flask 250, 500 ml
 บิวเรต (Bullet) 50 ml grade B, 50 ml
 เครื่องกวนสาร (Magnetic stirrer) C-MAG HS 7
 เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Sartorius)
 เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Sartorius)
 เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง ML204
 Refrigerated centrifuge, model Z36HK
 LP Vortex mixer
 Parafilm®
 เครื่องดูดจ่ายสารปริมาณต่ำ (micropipette)
 หลอดสำหรับปั่นเหวี่ยง ขนาด 50 ml (conical
 centrifuge tube)
 หลอดสำหรับปั่นเหวี่ยง ขนาด 15 ml (conical
 centrifuge tube)
 หลอดสำหรับปั่นเหวี่ยง ขนาด 10.4 ml (centrifuge
 bottles with cap assemblies)
 Nanosep centrifugal device with Omega
 membrane MWCO 3 kDa
 Pasture pipette
 ไมโครทูป (microtube) ขนาด 2 ml แบบใส
 หลอดดูดจ่ายสารปริมาณต่ำ (micropipette tip) PK
 113-G-Q ขนาด 1000 µL
 ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 10, 100
 ml

ที่มา

Konica Minolta, Japan
 Schott, Germany
 FUNGILAB, S.A., Spain
 YOKOGAWA, Japan
 BUCHI, Switzerland
 BUCHI, Switzerland
 BUCHI, Switzerland
 TOKYO RIKAKIKAI CO., LTD, Japan
 Schott, Germany
 Witeg, Germany
 IKA®
 บริษัท ไชแอนติฟิค โปรโมชั่น จำกัด, กรุงเทพมหานคร
 บริษัท ไชแอนติฟิค โปรโมชั่น จำกัด, กรุงเทพมหานคร
 Mettler Toledo, Switzerland
 Hermle Labortechnik, Wehingen, Germany
 Thermo Fisher Scientific, China
 Pechiney Plastic Packaging, Inc., USA
 Pipetman®, Starter- kit, Gilson Co. , Ltd. ,
 Middletown, USA
 Nunc™, Thermo Fisher Scientific, USA
 Nunc™, Thermo Fisher Scientific, USA
 Beckman Coulter, Inc., USA
 Pall life Science, Ann Arbor, MI, USA
 Hirschmann Laborgräte GmbH & Co. KG,
 Germany
 Axygen Scientific, Inc., China
 Thermo Fisher Scientific Inc., Mexico
 Axygen Scientific, Inc., China

รายการ

ถุงมือป้องกันสารเคมีไนไตร สีสีฟ้า (nitrile power free)
 หน้ากากอนามัย (Nexcare earloop mask)
 เครื่องปั่นเหวี่ยง centrifuge
 เครื่องปั่นเหวี่ยง centrifuge
 เครื่องปั่นเหวี่ยง ultra-centrifuge Opima™
 L-100 XL ultracentrifuge
 เครื่อง NMR spectrometer ความถี่ 500 Hz

ที่มา

บริษัท สยามเซมเพอร์เมต จำกัด, สงขลา
 3M Science. Applied to Life.™, USA
 Kubotaa corporation, Japan
 Hermle Labortechnik GmbH, Germany
 Beckman Coulter, Inc., USA
 Bruker, Rheinstetten, Germany

3.1.3 สารเคมี**รายการ**

น้ำกลั่น (Distillated water)
 Sodium Hydroxide (NaOH)
 แอลกอฮอล์ (Ethanol)
 Kjeldahl catalyst tablets (Missouri)
 เมทิลเรด (Methyl Red)
 โบรโมครีซอสกรีน (Bromocresol green)
 กรดบอริก (Boric acid)
 กรดซัลฟิวริก (Sulphuric acid, H₂SO₄)
 โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium Carbonate Anhydrous)
 กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid, HCl)
 Sodium Hydroxide (NaOH)
 น้ำ Milli-Q
 Dichloromethane (CH₂Cl₂)
 Deuterium oxide (D₂O)
 3-Trimethylilyl-2,2,3,3- tetradeuteropropionate
 (TSP)
 Potassium dihydrogen phosphate (KH₂PO₄)

ที่มา

ห้องปฏิบัติการเคมีอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์
 มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร
 Mallinckrodt, Sweden
 RCI Labscan, Thailand
 BUCHI, Switzerland
 Panreac, Europe
 Fisher Scientific, UK
 Fisher Scientific, UK
 QReC, New Zealand
 Ajax Finechem, Australia
 Merck KGaA, Germany
 บริษัท ทีทีเค ซายเอนซ์ จำกัด, กรุงเทพมหานคร
 ห้องปฏิบัติการวิจันและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร
 RCI Labscan Co., Ltd, Bangkok, Thailand
 Cambridge Isotope Laboratories Inc., USA
 Merck, Darmstadt, Germany
 Merck, Darmstadt, Germany

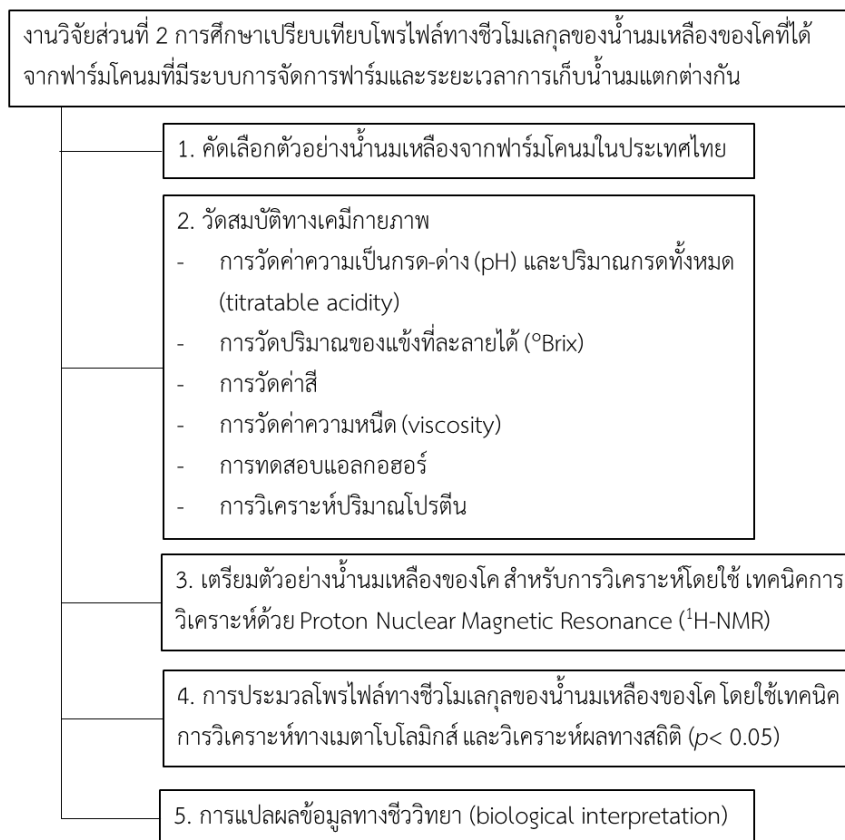
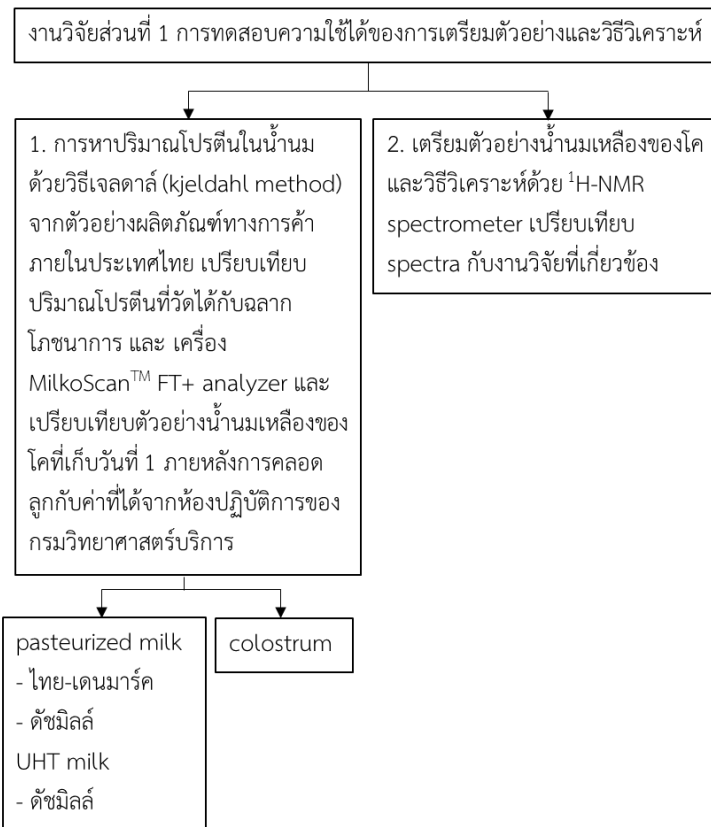
3.2 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.2.1 ภาพรวมของวิธีการดำเนินงานวิจัย

โครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของน้ำนมเหลืองของโค เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลระหว่างน้ำนมเหลืองของแม่โคที่มีอิทธิพลจากฟาร์มแตกต่างกัน ได้แก่ เขตที่ตั้งของฟาร์ม คุณภาพของอาหารเบื้องต้น และ ระยะเวลาในการเก็บน้ำนมแตกต่างกัน ได้แก่ น้ำนมเหลืองของโควันที่ 1 และ วันที่ 3 หลังการคลอดลูกด้วยเทคนิค proton nuclear magnetic resonance ($^1\text{H-NMR}$) โดยงานวิจัยนี้จะแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ การทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์ และการศึกษาโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของน้ำนมเหลืองของโค

โดยส่วนที่ 1 การทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์ แบ่งเป็น 2 รายการ ได้แก่ (1) ทดสอบวิธีวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำนมด้วยวิธีเจลดาล์ (Kjeldahl method) โดยผู้วิจัยจะนำตัวอย่างผลิตภัณฑ์ทางการค้าภายในประเทศไทย ได้แก่ นมพาสเจอร์ไรส์ (pasteurized milk) และ นมยูเอชที (UHT milk) มาศึกษาเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่วัดได้จากกลไกของการและเครื่อง MilkoScan™ FT+ analyzer และ นำตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโคภายหลังการคลอดลูกวันที่ 1 มาศึกษาเปรียบเทียบกับค่าจากการส่งวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการของกรมวิทยาศาสตร์บริการ และ (2) ทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ spectrometer โดยจะนำน้ำนมเหลืองของโคภายหลังการคลอดลูกวันที่ 1 มาทดสอบวิธีวิเคราะห์และเปรียบเทียบความใช้ได้กับสเปกตรัมมาตรฐานน้ำนมดิบ และ ระบุสารเมตาบอไลต์จากฐานข้อมูลและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ส่วนที่ 2 การศึกษาโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของน้ำนมเหลืองของโค โดยการคัดเลือกตัวอย่างจากฟาร์มโคนมที่มีอิทธิพลจากฟาร์มและระยะเวลาการเก็บน้ำนมแตกต่างกัน จากนั้นวัดทางสมบัติทางเคมีกายภาพ และเตรียมตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์ $^1\text{H-NMR}$ คำนวณหาปริมาณสัมพัทธ์ของข้อมูลจาก spectra โดย Bruker TopSpin software (Bruker, Rheinstetten, Germany) และแปลผลข้อมูลโดยทำการระบุชนิดสารเมตาบอไลต์ จากฐานข้อมูล Chenomx NMR suite 7.5 library (Chenomx Inc., Alberta, Canada), human metabolome database, livestock metabolome database, milk metabolome database และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง จากนั้นเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูล ด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปรเช่น เดียวกับการทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวข้างต้น ขั้นตอนสุดท้าย คือ การนำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาแปลผลข้อมูลทางชีววิทยา (biological interpretation) เพื่อหาความสัมพันธ์ของข้อมูลโปรไฟล์สารเมตาบอไลต์ ระบุสารเมตาบอไลต์ที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) รวมทั้งคำนวณหาวิถีเมตาบอลิซึมที่เกี่ยวข้องของน้ำนมเหลืองของโคที่ได้จากฟาร์ม และ ระยะเวลาการเก็บแตกต่างกัน ดังแสดงในภาพที่ 15



ภาพที่ 15 ภาพรวมของวิธีการดำเนินงานวิจัยนี้

3.2.2 การทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างและการวิเคราะห์ (validation of methods)

3.2.2.1 การเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในนํ้านมด้วยวิธีเจลดทาล์ (Kjeldahl method)

3.2.2.1.1 การเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในผลิตภัณฑ์นมทางการค้าในประเทศไทย

นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมทางการค้าในประเทศไทย 3 ผลิตภัณฑ์ มาหาปริมาณโปรตีน ได้แก่ นมพาสเจอร์ไรส์ ตราไทย-เดนมาร์ค นมพาสเจอร์ไรส์ ตรา ดัชมิลล์ และนมยูเอชที ตรา ดัชมิลล์ ดำเนินการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ละ 3 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 9 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 2 กรัม และวิเคราะห์โดยใช้วิธีเจลดทาล์ จากการดัดแปลงวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (กระทรวงสาธารณสุข, 2557) และ วิธีตามคู่มือการใช้งาน (application note No. K-438-K-360-002) ของบริษัท BUCHI ประเทศไทย จำกัด ดังวิธีต่อไปนี้

1. ชั่งตัวอย่างประมาณ 0.1-5 g ด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Sartorius) โดยใส่ลงใน digestion tube ที่มี Kjeldahl catalyst tablets จำนวน 2 เม็ด เติม H_2SO_4 20 มิลลิลิตร (หรือตามคำแนะนำของผู้ผลิต) และวิเคราะห์ blank โดยใช้ H_2O แทนตัวอย่าง
2. นำ digestion tube วางลงใน tube rack วาง heat shields แล้วสวม exhaust manifold ลงบนปากของ digestion tube ปิดให้พอดีกับวางบน digestion block 180-230°C (เลข 8) (Digester; K-424, BUCHI, Switzerland) เปิดระบบดูดควันของเครื่องดักจับไอกรด (Scrubber; B-414, BUCHI, Switzerland) ย่อยจนกระทั่งเกิดควันสีขาว (ประมาณ 30 นาที) เพิ่มอุณหภูมิของ digestion block 410-430°C (เลข 9) ย่อยจนได้ตัวอย่างสีเขียวอมฟ้าจาง ๆ และใส (clear with light blue-green color) และย่อยตัวอย่างให้เดือดต่ออีกประมาณ 1 ชั่วโมง (เวลาที่ใช้ในการย่อยทั้งหมดประมาณ 1.75-2.5 ชั่วโมง)
3. ยก tube rack ออกจากเครื่องย่อย โดยยังมี exhaust manifold สวมอยู่ ตั้งหลอดย่อย ให้เย็นลงถึงอุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25 นาที) เติม H_2O 50 มิลลิลิตร แกว่งเบา ๆ เพื่อให้สาร ในหลอดย่อยผสมกัน ต้องพักให้เย็นก่อนนำไปกลั่น
4. วางหลอดย่อยในเครื่องกลั่น เติม 35% NaOH 65 มิลลิลิตร ทำการกลั่น ด้วยเครื่องกลั่นไนโตรเจน (Distillation Unit; K-355, BUCHI, Switzerland) เก็บ distillate ใน distillation titration flask ที่มี H_3BO_3 50 มิลลิลิตร กลั่นจนได้ distillate ประมาณ 150 มิลลิลิตร (รวมปริมาตรทั้งหมด 200 มิลลิลิตร)
5. ไทเทรต distillate ที่ได้ด้วย 0.1000 M HCl ถึงจุดยุติเห็นเป็นสีชมพู บันทึกปริมาตร ของ HCl
6. คำนวณและรายงานผล

- คำนวณปริมาณไนโตรเจนจากสูตร

$$\text{ไนโตรเจน (g/100g)} = \frac{14.007 \times M \times (VA - VB) \times 100}{1000 \times W}$$

โดย VA = ปริมาตรของ HCl ที่ใช้ในการไทเทรตตัวอย่าง (ml)

VB = ปริมาตรของ HCl ที่ใช้ในการไทเทรต blank (ml)

M = Molarity ของ HCl solution

W = น้ำหนักของตัวอย่าง (g)

- คำนวณปริมาณโปรตีนจากสูตร

$$\text{โปรตีน (g/100 g)} = \text{ไนโตรเจน} \times 6.38$$

โดย 6.38 = factor ในการคำนวณปริมาณไนโตรเจนเป็นปริมาณโปรตีนทั้งหมด
ในตัวอย่างนม และผลิตภัณฑ์นม

จากนั้นนำปริมาณโปรตีนที่หาได้มาพิจารณาเปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีนที่ฉลากโภชนาการของผลิตภัณฑ์ และเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย เครื่อง MilkoScan™ FT + analyzer (FOSS, Hilleroed, Denmark)

3.2.2.1.2 การเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโควันที่ 1 ภายหลังจากคลอดลูก

นำตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโคภายหลังการคลอดลูกวันที่ 1 จำนวน 1 ตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน 3 ซ้ำ น้ำหนักซ้ละ 1 กรัม ตามคำแนะนำในคู่มือการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน แบบ boric acid titration ของบริษัท BUCHI ประเทศไทย จำกัด วิธีการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในน้ำนมเหลืองของโค โดยการดัดแปลงจาก ข้อ 3.2.2.1.1 เพื่อให้เหมาะสมกับการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำนมเหลืองซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ได้แล้ว ดังวิธีต่อไปนี้

1. ชั่งตัวอย่างประมาณ 1 กรัม ด้วยเครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Sartorius) (บริษัท ไฮแอนติพิค โปรโมชั่น จำกัด, กรุงเทพมหานคร) โดยใส่ลงใน digestion tube ที่มี Kjeldahl catalyst tablets จำนวน 2 เม็ด เติม H₂SO₄ 20 มิลลิลิตร และวิเคราะห์ blank โดยใช้ H₂O แทนตัวอย่าง
2. นำ digestion tube วางลงใน tube rack วาง heat shields แล้วสวม exhaust manifold ลงบนปากของ digestion tube ปิดให้พอดี rack ไปวางบน digestion block ปรับอุณหภูมิไปที่หมายเลข 8 (Digester; K-424, BUCHI, Switzerland) เปิดระบบดูดควันของเครื่องดักจับไอกรด (Scrubber; B-414, BUCHI, Switzerland) ย่อยเป็นเวลา 30 นาที เพิ่มอุณหภูมิของ digestion block ปรับอุณหภูมิไปที่หมายเลข 9 ย่อยจนได้ตัวอย่างสีเขียวอมฟ้าจาง ๆ และใส (clear with light blue-green color) และย่อยตัวอย่างให้เดือดต่ออีก 1 ชั่วโมง (เวลาที่ใช้ในการย่อยทั้งหมด 1 ชั่วโมง 30 นาที)
3. ยก tube rack ออกจากเครื่องย่อย โดยยังมี exhaust manifold สวมอยู่ ตั้งหลอดย่อย ให้เย็นลงถึงอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เติม H₂O 50 มิลลิลิตร แกว่งเบา ๆ เพื่อให้สาร ในหลอดย่อยผสมกัน ต้องทิ้งให้เย็นก่อนนำไปกลั่น
4. วางหลอดย่อยในเครื่องกลั่น เติม 35% NaOH จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ทำการกลั่น ด้วยเครื่องกลั่นไนโตรเจน (Distillation Unit; K-355, BUCHI, Switzerland) เก็บ distillate ใน distillation titration

flask ที่มี H_3BO_3 50 มิลลิลิตร และ indicator กลั่นจนครบเวลาที่ตั้งค่าเครื่องเอาไว้ (ภาคผนวก ก การตั้งค่าเครื่องกลั่นไนโตรเจน (Distillation Unit) K-355)

5. ไทเทรต distillate ที่ได้ด้วย 0.1 M HCl ถึงจุดยุติเห็นเป็นสีชมพู บันทึกปริมาตร ของ HCl
6. คำนวณและรายงานผล

- คำนวณปริมาณไนโตรเจนจากสูตร

$$\text{ไนโตรเจน (g/100g)} = \frac{14.007 \times M \times (VA - VB) \times 100}{1000 \times W}$$

โดย VA = ปริมาตรของ HCl ที่ใช้ในการไทเทรตตัวอย่าง (ml)

VB = ปริมาตรของ HCl ที่ใช้ในการไทเทรต blank (ml)

M = Molarity ของ HCl solution

W = น้ำหนักของตัวอย่าง (g)

- คำนวณปริมาณโปรตีนจากสูตร

$$\text{โปรตีน (g/100 g)} = \text{ไนโตรเจน} \times 6.38$$

โดย 6.38 = factor ในการคำนวณปริมาณไนโตรเจนเป็นปริมาณโปรตีนทั้งหมด
ในตัวอย่างนม และผลิตภัณฑ์นม

จากนั้นนำปริมาณโปรตีนที่หาได้มาพิจารณาเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากการตรวจวัดจากปริมาณโปรตีนใน
น้ำนมเหลืองของแม่โคตัวเดียวกันนี้ จากการส่งวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการของกรมวิทยาศาสตร์บริการ (ภาคผนวก ข)

3.2.2.2 การทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโคและวิธีวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$

วัตถุประสงค์ของขั้นตอนนี้ เพื่อหาวิธีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์น้ำนมเหลืองของโคด้วย
 $^1\text{H-NMR}$ โดยนำตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโคภายหลังการคลอดลูกวันที่ 1 ของแม่โคจากฟาร์ม A 1 ตัวอย่าง และฟาร์ม
B 1 ตัวอย่าง (ตารางที่ 19) รวมเป็น 2 ตัวอย่าง มาทดสอบ โดยดัดแปลงจากวิธีของ Settachaimongkon และคณะ
(2014), Lu และคณะ (2013) และ มยุรี เหลืองวิสัย (2560) วิธีดังแสดงในภาพที่ 16 และทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง
ด้วย $^1\text{H-NMR}$ พิจารณา NMR spectra ที่ได้จากตัวอย่างเทียบกับเสปคตรัมมาตรฐานน้ำนมดิบ และทดสอบการระบุ
สารเมตาบอไลต์เบื้องต้นจากฐานข้อมูล Chemomx NMR suite 7.5 library (Chemomx Inc., Alberta, Canada)
และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (วิธีที่ใช้ได้แล้วอยู่ในข้อที่ 3.2.5)

3.2.2.2.1 การเตรียมตัวอย่างน้ำนมเหลืองก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$

1. ปรับ pH ของทุกตัวอย่างด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 0.1 M ให้ค่า pH อยู่ในช่วง 6.0 – 6.2
2. นำตัวอย่างน้ำนมเหลืองปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่หลอด centrifuge นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง
centrifuge (Kubotaa corporation, Japan) ที่ 3,000 xg อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

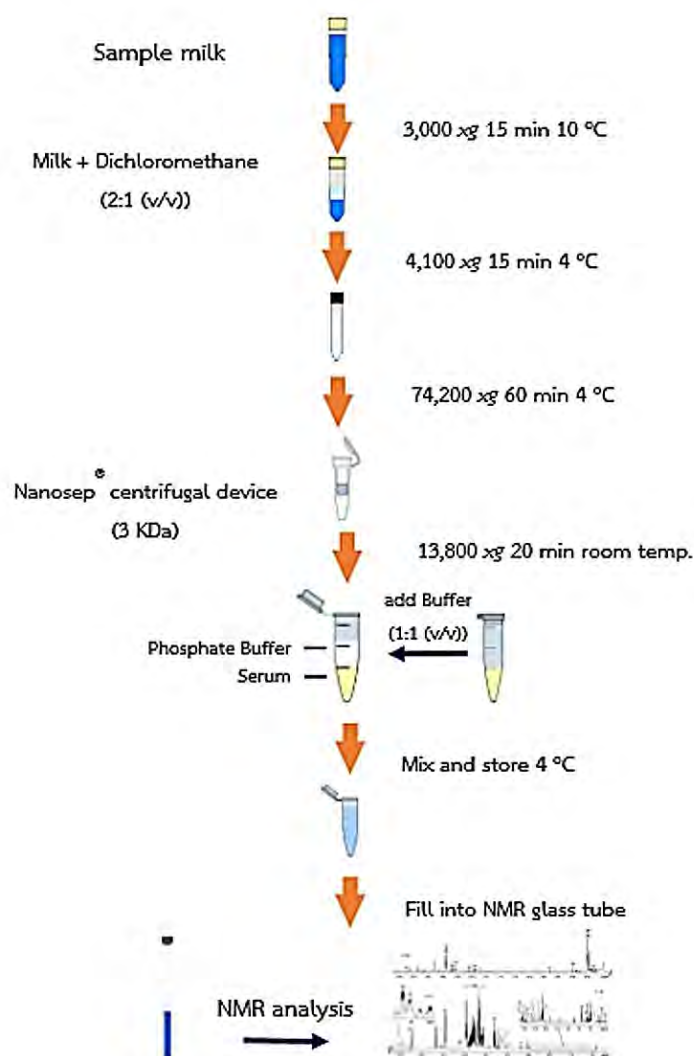
เพื่อแยกไขมันนมออก หลังจากปั่นเหวี่ยงจะพบว่าชั้นไขมันนมอยู่ด้านบน และ หางนม (skim milk) อยู่ด้านล่าง จากนั้นถ่ายของเหลวในส่วนที่เป็นหางนมใส่หลอด centrifuge หลอดใหม่

3. สกัดไขมันที่เหลือออกด้วย dichloromethane extraction โดยนำตัวอย่างมาเจือจางกับ dichloromethane ในอัตราส่วน 2:1 (w/w) โดยการศึกษาจะใช้ตัวอย่างหางนม 20 มิลลิลิตรและ dichloromethane 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง LP Vortex mixer (Thermo Fisher Scientific, China) ประมาณ 20 วินาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,100 g เป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากปั่น เหวี่ยงจะพบว่า ซีรัมนม (clear milk serum) อยู่ด้านบน ส่วนชั้นไขมันนมที่เหลือและ dichloromethane อยู่ด้านล่างตามลำดับ จากนั้นถ่ายของเหลวในส่วนที่เป็นซีรัมนมใส่หลอด centrifuge หลอดใหม่
4. นำตัวอย่างใส่หลอด centrifuge สำหรับ ultra-centrifuged ตัวอย่างละ 9 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ultra-centrifuge Opima™ L-100 XL Ultracentrifuge (Beckman Coulter, Inc., USA) ที่ 74,200 xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เพื่อแยกโปรตีนที่มีโมเลกุลใหญ่ออกจากปั่นเหวี่ยงจะพบว่า ซีรัม (serum) อยู่ด้านบน ส่วนตะกอนโปรตีนนมอยู่ด้านล่าง โดยถ่ายของเหลวที่เป็นซีรัมใส่หลอด centrifuge หลอดใหม่
5. เตรียม Nanosep® centrifugal device (Pall life sciences, Ann Arbor, MI, USA) ที่มี รูกรองขนาดอนุภาค 3 กิโลเมตรตันให้พร้อมใช้งาน (ภาคผนวก ค) จากนั้นนำซีรัมนมบรรจุใส่ Nanosep® centrifugal device ตัวอย่างละ 500 ไมโครลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง centrifuge (Hermle Labortechnik GmbH, Germany) ที่ 14,000 xg อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นถ่ายของเหลวที่กรองได้ (filtrate serum) ใส่หลอด microcentrifuge หลอดใหม่
6. นำตัวอย่างที่กรองได้มาผสมกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.0, 300 มิลลิโมลของ KH_2PO_4 10% (w/w) D_2O และ 1 มิลลิโมลของ 3-trimethylsilyl-2,2,3,3-tetradeuteropropionate (TSP)) เป็นสารมาตรฐานภายใน (internal standard) ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) โดยในการศึกษาจะใช้ตัวอย่างปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันกับบัฟเฟอร์ 300 ไมโครลิตร จากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำไปวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ ภายใน 24 ชั่วโมง

3.2.2.2 การเตรียมตัวอย่างน้ำมันเหลืองเพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$

นำตัวอย่างที่ได้ย้ายลงในหลอด NMR ขนาด 5 มิลลิเมตรด้วย micropipette ปริมาณ 400 ไมโครลิตร และเติม D_2O เพิ่มอีก 200 ไมโครลิตร เพื่อช่วยในการจับสัญญาณแม่เหล็กไฟฟ้า (Hu และคณะ, 2004) จากนั้นนำตัวอย่างไปวัดด้วย $^1\text{H-NMR}$ (Bruker, Rheinstetten, Germany) ที่ความถี่ 500 เมกะเฮิร์ต อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ด้วย broadband observe (BBO) probe และมีการกด peak น้ำ (H_2O) ที่ค่า chemical shift เท่ากับ 4.80 ($\delta=4.80$)

ซึ่งเหมาะกับตัวอย่างที่มีน้ำเป็นส่วนประกอบ โดยใช้ระยะเวลาประมาณ 40 นาทีต่อการวิเคราะห์ 1 ตัวอย่าง ภายใต้คำแนะนำของเจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือวิจัย วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 16 สรุปขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างน้ำนมโค สำหรับการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ spectrometer
ที่มา: มยุรี เหลืองวิลัย (2560)

3.2.3 การคัดเลือกตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโคในเขตพื้นที่อำเภอบำเหน็จณรงค์ จังหวัดชัยภูมิ และอำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา

ในงานวิจัยนี้ ทำการคัดเลือกตัวอย่างคัดเลือกตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโคจากฟาร์มโคนม 2 ฟาร์มในพื้นที่ต่างกัน ได้แก่ กาลครั้งหนึ่งฟาร์ม อำเภอบำเหน็จณรงค์ จังหวัดชัยภูมิ และ อำพันฟาร์ม อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา แสดงดังตารางที่ 23 เพื่อใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ของอิทธิพลจากฟาร์มและระยะเวลาการเก็บน้ำนมที่แตกต่างกัน กับสารเมตาบอไลต์ในน้ำนมเหลืองของโค

ตารางที่ 23 รายละเอียดฟาร์มโคนมของเกษตรกร

ข้อมูล	ฟาร์ม A	ฟาร์ม B
ชื่อฟาร์ม	กาลครั้งหนึ่งฟาร์ม	อำพันฟาร์ม
ชื่อเจ้าของฟาร์ม	นางสาวรสิตา จรดล	นายที้ โดดสูงเนิน
ที่อยู่ฟาร์ม	299 ม.17 ต.บ้านเพชร อ.บำเหน็จณรงค์ จ.ชัยภูมิ 36160	27 ม. 14 บ้านหนองไผ่ล้อม ต.หนองสำหรับ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130
จำนวนโคทั้งหมด	65 ตัว	88 ตัว
จำนวนแม่รีด	31 ตัว	43 ตัว
ปริมาณน้ำนมดิบ	450 กิโลกรัม/วัน	750 กิโลกรัม/วัน
ชนิดของอาหารเบื้องต้น	อาหารชั้น: กากถั่วเหลือง (10%), DDGS (8%), แร่ธาตุ (0.7%), พรีเม็กซ์ (0.7%), ไขมันผง (1.6%), ไขมัน (7%) อาหารหยาบ: ต้นข้าวโพดพร้อมฝัก (59%), พางข้าว (13%)	อาหารชั้น: กากถั่วเหลือง, ไขมันเส้น, แร่ธาตุ อาหารหยาบ: ข้าวโพดหมัก, พางข้าว
ช่วงเวลาในการรีดนม	ช่วงเช้า: 4.00 – 6.30 น. ช่วงเย็น: 14.00 – 15.30 น.	ช่วงเช้า: 6.00 น. ช่วงเย็น: 15.20 น.
Fat (%) (> 3.5%)*	3.72	3.54
Protein (%) (> 3.00%)*	3.02	3.54
Total solid not fat (%) (> 8.25%)*	8.38	9.53
Somatic cell count (cells/ml) (< 500,000 cells/ml)*	171,000	135,000

*ค่ามาตรฐานน้ำนมดิบ สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (2553)

การเก็บตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโคจากฟาร์ม 2 ฟาร์ม แต่ละฟาร์มเก็บน้ำนมเหลือง 2 รอบ โดยฟาร์ม A เก็บรอบที่ 1 ในช่วงเดือนธันวาคม รอบที่ 2 ในช่วงเดือนมกราคม และ ฟาร์ม B เก็บรอบที่ 1 ในช่วงเดือนพฤศจิกายน รอบที่ 2 ในช่วงเดือนมกราคม แต่ละรอบเก็บจากแม่โคจำนวน 4 ตัว ซึ่งคือจำนวนซ้ำในการทดลอง (biological replicate) ของแต่ละฟาร์ม โดยจากแม่โค 1 ตัว จะแบ่งการเก็บน้ำนมเหลืองออกเป็น 2 ครั้ง คือ วันที่ 1 และวันที่ 3 ภายหลังจากคลอดลูก ดังนั้นจำนวนตัวอย่างต่อหนึ่งฟาร์ม คือ 16 ตัวอย่าง และจำนวนตัวอย่างรวมทั้งสิ้น คือ 32 ตัวอย่าง สรุปรูป $n = 32$ (4 ตัว \times 2 ฟาร์ม \times 2 เดือน \times 2 ช่วงระยะเวลา (วันหลังการคลอด)) โดยปริมาณการเก็บต่อหนึ่งตัวอย่างมีปริมาตร 150 มิลลิลิตร แบ่งเป็น 3 หลอดเก็บตัวอย่าง ตัวอย่างละ 50 มิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 24 โดยตัวอย่างที่เก็บมาจะถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ระหว่างรอดำเนินการวิเคราะห์

ตารางที่ 24 สรุปการเก็บตัวอย่างน้ำนมเหลืองในแต่ละฟาร์ม

ฟาร์ม	โคตัวที่	เก็บวันที่ 1 ภายหลังการคลอดลูก			เก็บวันที่ 3 ภายหลังการคลอดลูก			รวม n=32
		หลอต 1*	หลอต 2*	หลอต 3**	หลอต 1*	หลอต 2*	หลอต 3**	
A1	1	A1-1-1-O	A1-1-1-O	A1-1-1-P	A1-3-1-O	A1-3-1-O	A1-3-1-P	
	2	A1-1-2-O	A1-1-2-O	A1-1-2-P	A1-3-2-O	A1-3-2-O	A1-3-2-P	
	3	A1-1-3-O	A1-1-3-O	A1-1-3-P	A1-3-3-O	A1-3-3-O	A1-3-3-P	
	4	A1-1-4-O	A1-1-4-O	A1-1-4-P	A1-3-4-O	A1-3-4-O	A1-3-4-P	
A2	1	A2-1-1-O	A2-1-1-O	A2-1-1-P	A2-3-1-O	A2-3-1-O	A2-3-1-P	
	2	A2-1-2-O	A2-1-2-O	A2-1-2-P	A2-3-2-O	A2-3-2-O	A2-3-2-P	
	3	A2-1-3-O	A2-1-3-O	A2-1-3-P	A2-3-3-O	A2-3-3-O	A2-3-3-P	
	4	A2-1-4-O	A2-1-4-O	A2-1-4-P	A2-3-4-O	A2-3-4-O	A2-3-4-P	
B1	1	B1-1-1-O	B1-1-1-O	B1-1-1-P	B1-3-1-O	B1-3-1-O	B1-3-1-P	
	2	B1-1-2-O	B1-1-2-O	B1-1-2-P	B1-3-2-O	B1-3-2-O	B1-3-2-P	
	3	B1-1-3-O	B1-1-3-O	B1-1-3-P	B1-3-3-O	B1-3-3-O	B1-3-3-P	
	4	B1-1-4-O	B1-1-4-O	B1-1-4-P	B1-3-4-O	B1-3-4-O	B1-3-4-P	
B2	1	B2-1-1-O	B2-1-1-O	B2-1-1-P	B2-3-1-O	B2-3-1-O	B2-3-1-P	
	2	B2-1-2-O	B2-1-2-O	B2-1-2-P	B2-3-2-O	B2-3-2-O	B2-3-2-P	
	3	B2-1-3-O	B2-1-3-O	B2-1-3-P	B2-3-3-O	B2-3-3-O	B2-3-3-P	
	4	B2-1-4-O	B2-1-4-O	B2-1-4-P	B2-3-4-O	B2-3-4-O	B2-3-4-P	

หมายเหตุ: * ตัวอย่างปริมาณ 50 ml ใช้ในการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพ

** ตัวอย่างปริมาณ 50 ml ใช้ในการวิเคราะห์ $^1\text{H-NMR}$

3.2.4 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพ

นำตัวอย่างน้ำนมเหลืองทั้งหมด 32 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ รวมทั้งหมด 64 ตัวอย่าง มาวิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพตามขั้นตอนดังแสดง

3.2.4.1 การวัดค่าความเป็นกรด-ต่าง (pH) และปริมาณกรดทั้งหมด (titratable acidity)

1. การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ อ้างอิงตามวิธีของ ISO 11869 | IDF 150 (2009) ทำให้อุณหภูมิตัวอย่างเป็น 22 ± 2 องศาเซลเซียส เขย่าตัวอย่างช้า ๆ ในลักษณะกลับให้ตัวอย่างที่อยู่ด้านล่างของหลอดของเก็บตัวอย่างขึ้นไปบนผิวหน้าจนผสมเข้ากันเป็นอย่างดี
2. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่เตรียม ประมาณ 10 ± 0.01 g ด้วยเครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Mettler Toledo, Switzerland) ในบีกเกอร์ 50 มิลลิลิตร เติมน้ำลงไปประมาณ 10 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน
3. นำ electrode ของเครื่องวัดความเป็นกรด-ต่าง (pH meter) EUTECH, pH2700 Bench (บริษัท เวลด์ไวด์ เทรต ไทย จำกัด, กรุงเทพมหานคร) ใส่ลงในตัวอย่าง และใช้ Sodium Hydroxide (NaOH) ความเข้มข้น 0.1 ± 0.002 mol/l ไทเทรต ลงในบีกเกอร์ขณะที่กวนผสมตัวอย่างให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนสาร (magnetic stirrer) C-MAG HS 7 (IKA®) จน pH มีค่าคงที่ที่ 8.30 ± 0.01 เป็นเวลา 4 - 5 วินาที
4. คำนวณหาค่าความเป็นกรดจากการไทเทรต โดยสมการ $W = \frac{V \times 0.9}{M}$
 โดยที่ W คือ กรัมของกรดแลคติก ต่อ 100 กรัมตัวอย่าง (% lactic acid)
 V คือ ปริมาตร (ml) ของ NaOH ที่ใช้ในการไทเทรต
 M คือ น้ำหนัก (g) ของตัวอย่าง
5. แสดงผลโดยใช้ทศนิยมสองตำแหน่งเป็นค่าร้อยละของกรดแลคติก

3.2.4.2 การวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (°Brix)

ในขั้นตอนนี้ จะทำการ calibrate เครื่องและวัดค่าปริกซ์ของตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโคตามคู่มือการใช้งานของเครื่อง abbe refractometer (Atago, Japan)

1. ทำการ calibrate เครื่อง abbe refractometer (Atago, Japan) ด้วยน้ำกลั่น โดยเปิด secondary prism แล้วหยดน้ำกลั่น 2-3 หยดบริเวณตรงกลางของผิวด้านบนของ main prism แล้วค่อย ๆ ปิด secondary prism จากนั้นหมุน lock เพื่อให้ prism แนบสนิทน้ำและกระจายเป็นฟิล์มบาง ๆ มองผ่าน eyepiece และหมุน measurement knob อย่างช้า ๆ จนกระทั่งมองเห็น boundary line ปรากฏใน refraction field จากนั้นทำการปรับ fine measurement scale knob ให้ได้ค่า RI = 1.333
2. วัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (°Brix) ของตัวอย่าง โดยหยดตัวอย่าง 2-3 หยด ลงบนผิวของ main prism แล้วปิด secondary prism หมุน lock เพื่อให้ prism แนบสนิทและตัวอย่างเกิดฟิล์มบาง ๆ อยู่ระหว่าง main prism และ secondary prism มองผ่าน eyepiece และหมุน measurement knob อย่างช้า ๆ จนกระทั่งมองเห็น boundary line ปรากฏใน refraction field จากนั้นทำการปรับ fine measurement scale knob ให้ boundary line คมชัด อ่านค่า refractive index ของตัวอย่างที่ปรากฏและบันทึก
3. เมื่อใช้งานเสร็จเรียบร้อยแล้ว หรือระหว่างการเปลี่ยนตัวอย่าง ให้นำน้ำกลั่นมาหยดเพื่อล้าง แล้วเช็ดด้วยกระดาษเช็ดเลนส์

3.2.4.3 วัดค่าสี (color measurement)

ในขั้นตอนนี้ จะทำการ calibrate เครื่องและวัดค่าสีของตัวอย่างน้ำมันเหลืองของโคตามคู่มือการใช้งานของเครื่อง Chroma meter CR-400/410 (Konica Minolta, Japan)

1. ทำการ calibrate เครื่อง Chroma meter CR-400/410 (Konica Minolta, Japan) กับแผ่น white calibration plate CR-A43 (Konica Minolta, Japan) ก่อนการใช้งาน โดยการ กดปุ่ม Calibrate ที่หน้าจอจะโชว์ค่า Xy ให้ใส่ค่าจากด้านบนของ white calibration plate CR-A43 ลงไป และกดวัดค่า จะเกิดแสงแฟรชขึ้นมา หน้าจอจะขึ้น Now Calibrate
1. วัดสีตัวอย่าง โดยใส่ตัวอย่างลงใน Glass light Projection Tube CR-A33e (Konica Minolta, Japan) ให้ถึงบริเวณที่มีขีดกำหนด ใส่ Glass light Projection Tube CR-A33e ลงใน Measuring head CR410 (Konica Minolta, Japan) และกดวัดค่า
2. อ่านและบันทึกค่า L^* a^* b^* ที่ปรากฏ

3.2.4.4 การวัดค่าความหนืด (viscosity)

ในขั้นตอนนี้จะทำการวัดค่าความหนืดตามคู่มือการใช้งานของเครื่องวัดความหนืด รุ่น Alpha (FUNGILAB, S.A., Spain)

1. เตรียมตัวอย่างน้ำมันเหลืองประมาณ 30 มิลลิลิตร ในหลอด 50 มิลลิลิตร ตั้งให้อยู่นิ่งบนที่วางหลอด
2. เลือกหัววัดที่เหมาะสมกับความหนืดของตัวอย่าง
3. วัดอุณหภูมิตัวอย่างด้วยเครื่อง Emission Thermometer 53008 (YOKOGAWA, Japan) ให้อุณหภูมิของตัวอย่างอยู่ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
4. เลือกที่หน้าจอของเครื่องวัดความหนืด โดยใช้เครื่องหมาย '>' ไปที่ตำแหน่ง Measurements แล้วกด 'ENTER'
5. ใช้ 'TAB' เพื่อเลื่อนไปยังค่าที่ต้องการจะตั้ง กดที่ลูกศรขึ้น หรือ ลง เพื่อเพิ่มลดค่า แล้วกด 'ENTER'

โดยที่	SP	คือ หัวเข็มที่เลือกใช้ในการวัด (ขนาด L1-L3)
	RPM	คือ ความเร็วในการทำงาน (100 ppm)
	d	คือ ความหนาแน่นของตัวอย่าง
	Max	คือ ความหนืดสูงสุดที่สามารถวัดได้จากความเร็วและหัววัดที่เลือก
6. เมื่อยืนยันการตั้งค่าเรียบร้อยแล้ว ให้กด 'ON' เพื่อให้เครื่องเริ่มทำการวัด และแสดงผลบนหน้าจอ
7. อ่านค่าที่ได้จากการวัดในเวลา 2 นาที ใช้เวลาเท่ากันในทุกตัวอย่าง และบันทึก

โดยที่	V	คือ ค่าความหนืดที่วัดได้ มีหน่วยเป็น Centipoise (cP)
	%	คือ เปอร์เซ็นต์ที่แน่นอนของสเกลพื้นฐาน

8. ควบคุมให้ % ทอร์ก (torque) ให้อยู่ในช่วง 15-100% เนื่องจากเมื่อเปอร์เซ็นต์ที่แน่นอนที่ค่าน้อยกว่า 15% หรือมากกว่า 100% เครื่องจะไม่สามารถวัดค่าที่ถูกต้องได้ และจะส่งเสียงร้องเตือนออกมา
9. กด 'ON' เพื่อหยุดการทำงานชั่วคราว หน้าจอจะแสดง Motor stop และเมื่อต้องการเริ่มการทำงานของการวัดใหม่อีกครั้ง โดยใช้การตั้งค่าเดิมให้กด 'ON'
10. หากกดคำว่า 'QUIT' จะเป็นการออกจากการวัด และกลับสู่หน้าจอหลัก

3.2.4.5 การทดสอบแอลกอฮอล์

วัตถุประสงค์เพื่อทดสอบเสถียรภาพของโปรตีนในน้ำนม น้ำนมที่มีคุณภาพดีจะมีโปรตีนที่มีเสถียรภาพหรือมีความคงตัวสูง ไม่ถูกทำลายหรือทำให้ตกตะกอนได้ง่ายด้วยความร้อนหรือความเป็นกรด จากหนังสือการตรวจคุณภาพน้ำนมและผลิตภัณฑ์นม (รุ่งทิพย์ ขวนชื่น และ อลงกร อรมศิลป์, 2550) ดังแสดง

1. เขย่าตัวอย่างน้ำนมให้เข้ากันดี ปิเปตตัวอย่างน้ำนม 3 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง
2. ปิเปตแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 68% ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างน้ำนมเหลืองอย่างช้า ๆ
3. ปิดหลอดทดลองและกลับหลอดทดลองไปมาช้า ๆ ห้ามเขย่าโดยแรง
4. สังเกตการเกิดตะกอนโปรตีน

3.2.4.6 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในน้ำนมเหลืองของโค ด้วยวิธีเจลดาร์ลที่ปรับให้เหมาะสมกับตัวอย่างน้ำนมเหลืองแล้ว ดังที่กล่าวไว้ในข้อ 3.2.2.1.2

3.2.5 การเตรียมตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโคสำหรับการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ด้วย proton nuclear magnetic resonance ($^1\text{H-NMR}$)

นำตัวอย่างน้ำนมเหลืองทั้งหมด 32 ตัวอย่าง มาวิเคราะห์ โดยดัดแปลงจากวิธีของ Settachaimongkon และคณะ (2014), Lu และคณะ (2013), มยุรี เหลืองวิสัย (2560) ในข้อ 3.2.2.2 และ Picone และคณะ (2018) เพื่อให้ได้วิธีที่เหมาะสมกับตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโค ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ได้แล้ว ดังแสดงในภาพที่ 17

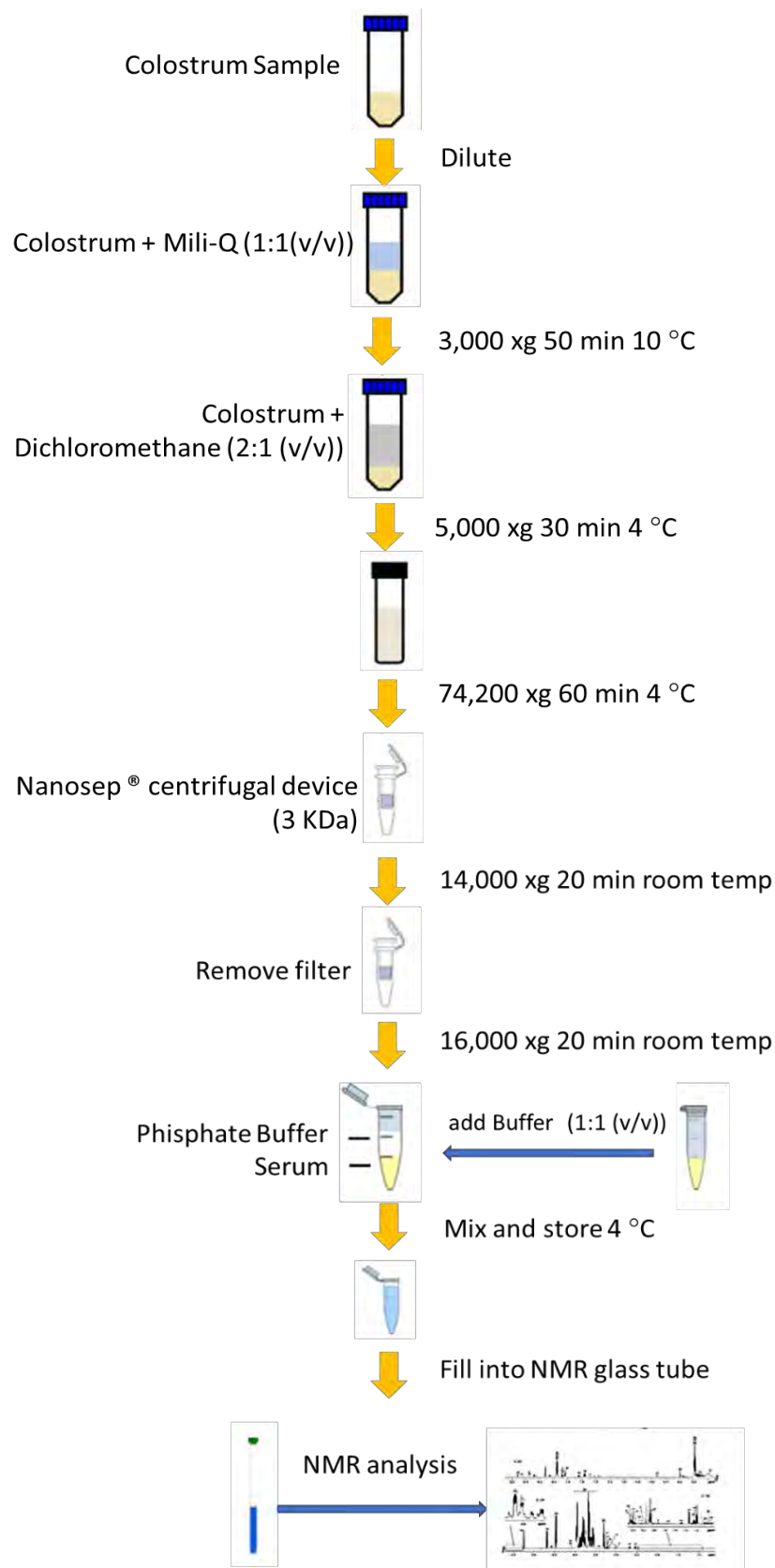
3.2.5.1 การเตรียมตัวอย่างน้ำนมเหลืองก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$

1. ปรับ pH ของทุกตัวอย่างด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 0.1 M ให้ค่า pH อยู่ในช่วง 6.0 – 6.2
2. แบ่งตัวอย่างปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่หลอด centrifuge เจือจางด้วยน้ำ Milli-Q ในอัตราส่วน 1:1 นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง centrifuge (Kubotaa corporation, Japan) ที่ 3,000 xg อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50 นาที เพื่อแยกไขมันนมออก หลังจากปั่นเหวี่ยงจะพบว่าชั้นไขมันนมอยู่ด้านบน และหางนม (skim milk) อยู่ด้านล่าง จากนั้นถ่ายของเหลวในส่วนที่เป็นหางนมใส่หลอด centrifuge หลอดใหม่

3. สกัดไขมันที่เหลื้อออกด้วย dichloromethane extraction โดยนำตัวอย่างมาเจือจางกับ dichloromethane ในอัตราส่วน 2:1 (w/w) โดยการศึกษานี้จะใช้ตัวอย่างหางนม 20 มิลลิลิตรและ dichloromethane 10 มิลลิลิตร เขย่าพอประมาณ และผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง LP Vortex mixer (Thermo Fisher Scientific, China) ประมาณ 30 วินาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง centrifuge (Kubotaa corporation, Japan) ที่ 5,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที หลังจากปั่นเหวี่ยงจะพบว่า ซีรัมนม (clear milk serum) อยู่ด้านบน ส่วนชั้นไขมันนมที่เหลื้อและ dichloromethane อยู่ด้านล่างตามลำดับ จากนั้นถ่ายของเหลวในส่วนที่เป็นซีรัมนมใส้หลอด centrifuge หลอดใหม่
4. นำตัวอย่างใส้หลอด centrifuge สำหรับ ultra-centrifuged ตัวอย่างละ 9 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ultra-centrifuge Opima™ L-100 XL Ultracentrifuge (Beckman Coulter, Inc., USA) ที่ 74,200 xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เพื่อแยกโปรตีนที่มีโมเลกุลใหญ่ออกหลังจากปั่นเหวี่ยงจะพบว่า ซีรัม (serum) อยู่ด้านบน ส่วนตะกอนโปรตีนนมอยู่ด้านล่าง โดยถ่ายของเหลวที่เป็นซีรัมใส้หลอด centrifuge หลอดใหม่
5. เตรียม Nanosep® centrifugal device (Pall life sciences, Ann Arbor, MI, USA) ที่มี รูกรองขนาดอนุภาค 3 กิโลดาลตันให้พร้อมใช้งาน (ภาคผนวก ค) จากนั้นนำซีรัมนมบรรจุใส้ Nanosep® centrifugal device ตัวอย่างละ 500 ไมโครลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง centrifuge (Hermle Labortechnik GmbH, Germany) ที่ 14,000 xg อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที นำใส้กรองออกและปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ด้วย 16,000 xg ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นถ่ายของเหลวที่กรองได้ (filtrate serum) ใส้หลอด microcentrifuge หลอดใหม่
6. นำตัวอย่างที่กรองได้มาผสมกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.0, 300 มิลลิโมลของ KH_2PO_4 10% (w/w) D_2O และ 1 มิลลิโมลของ 3-trimethylsilyl-2,2,3,3-tetradeuteropropionate (TSP)) เป็นสารมาตรฐานภายใน (internal standard) ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) โดยในการศึกษานี้จะใช้ตัวอย่างปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันกับบัฟเฟอร์ 300 ไมโครลิตร จากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำไปวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ ภายใน 24 ชั่วโมง

3.2.5.2 การเตรียมตัวอย่างน้ำมันเหลืองเพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$

นำตัวอย่างที่ได้ย้ายลงในหลอด NMR ขนาด 5 มิลลิเมตรด้วย micropipette ปริมาณ 400 ไมโครลิตร และเติม D_2O เพิ่มอีก 200 ไมโครลิตร เพื่อช่วยในการจับสัญญาณแม่เหล็กไฟฟ้า (Hu และคณะ, 2004) จากนั้นนำตัวอย่างไปวัดด้วย $^1\text{H-NMR}$ (Bruker, Rheinstetten, Germany) ที่ความถี่ 500 เมกะเฮิร์ต อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ด้วย broadband observe (BBO) probe และมีการกด peak น้ำ (H_2O) ที่ค่า chemical shift เท่ากับ 4.80 ($\delta=4.80$) ซึ่งเหมาะกับตัวอย่างที่มีน้ำเป็นส่วนประกอบ โดยใช้ระยะเวลาประมาณ 40 นาทีต่อการวิเคราะห์ 1 ตัวอย่าง ภายใต้คำแนะนำของเจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือวิจัย วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 17 สรุปขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโค สำหรับการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ spectrometer ในงานวิจัยนี้ ดัดแปลงจาก มยุรี เหลืองวิสัย, 2560; วิลาสินี เลิศวาททรัพย์ และเมธาวี สุขเสาววิมล, 2560

3.2.6 การประมวลผลไฟล์ทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโค โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ทางเมตาโบลอมิกส์

3.2.6.1 ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ NMR เรียกว่า NMR spectra โดย NMR spectra จะอ้างอิงจาก สารอ้างอิงมาตรฐาน (Internal standard) ซึ่งในการศึกษานี้ ใช้ 3-trimethylsilyl-2,2,3,3 tetradeuteriopropionate (TSP) ช่วง chemical shifts (δ) ของโปรตอนในสารประกอบมีค่า ระหว่าง 0.00–10.00 ppm โดยจะแบ่งออก (binning) เป็น 0.02 ppm (Anderson และคณะ, 2011) จะได้ทั้งหมด 500 bin ซึ่งจะคำนวณหาปริมาณสัมพัทธ์ของข้อมูลจาก spectra ได้จาก Bruker TopSpin software (Bruker, Rheinstetten, Germany) โดย bin ที่มีช่วงตรงกับน้ำ ($\delta = 4.73 - 4.99$ ppm) จะไม่นำมาวิเคราะห์

3.2.6.2 ทำการระบุชนิดสารเมตาบอไลต์จากฐานข้อมูล Chenomx NMR, human metabolome database (<http://www.hmdb.ca/>), livestock metabolome database (<http://lmdb.ca/>), milk metabolome database (<http://www.mcdb.ca>) และจากงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Boudonck และคณะ, 2009; Klein และคณะ, 2010; Picone และคณะ, 2018; Settachaimongkon และคณะ, 2014; Wishart และคณะ, 2013; มยุรี เหลืองวิสัย, 2560)

3.2.6.3 นำข้อมูลปริมาณสัมพัทธ์ของสารเมตาบอไลต์ที่ระบุเป็นสารชนิดเดียวกันในทุกตำแหน่ง bin มารวมกันด้วยโปรแกรม Microsoft Excel 2017 จะได้ sum bin ของสารเมตาบอไลต์ชนิดนั้น ๆ ในตัวอย่าง และนำมาพร้อมกับตำแหน่งสารเมตาบอไลต์ที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ เพื่อเป็นจำนวนตัวแปรทั้งหมด (variable) ก่อนนำไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ

3.2.7 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

3.2.7.1 บันทึกข้อมูลด้วยโปรแกรม Microsoft Excel 2017 และนำข้อมูลที่ได้จากการการตรวจวิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพในน้ำนมเหลืองของโค มาวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติแบบตัวแปรเดียว (univariate statistical analysis) ด้วยวิธี Duncan's test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) โดยใช้โปรแกรม SPSS version 22.0 (SPSS Inc., Chicago, USA)

3.2.7.2 นำปริมาณสัมพัทธ์ของ variable ทั้งหมดในข้อ 3.2.6.3 มาวิเคราะห์ข้อมูล จะต้องทำการแปลงข้อมูลให้อยู่ในรูปแบบที่ง่ายต่อการนำไปวิเคราะห์ (normalize) (ภาคผนวก ง) ก่อน ด้วยค่ามัธยฐาน (median) ของข้อมูล โดยการนำค่า bin ของ แต่ละตัวอย่างหารด้วยค่า median ของแต่ละ bin และนำข้อมูลที่ได้มาหาค่าลอการิทึมฐาน 2 (\log_2 -scaling) จะได้ข้อมูลที่ใช้สำหรับโปรแกรมสำเร็จรูป Multi-Experiment Viewer (MeV) version 4.9 เพื่อวิเคราะห์ไฟล์ทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างน้ำนมเหลือง สำหรับ bin ที่ไม่สามารถระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ได้ จะนำค่าที่ได้จาก Bruker TopSpin software มาวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล โดยใช้ analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) และเลือก bin ที่ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) รวมกับ bin ที่สามารถระบุชนิดของสารได้ เพื่อนำไปประมวลผลในขั้นตอนถัดไป (Settachaimongkon และคณะ, 2014)

3.2.7.3 ประมวลผลข้อมูลเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่าง ด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร (multivariate statistical analysis) (Skov และคณะ, 2014) ได้แก่ การวิเคราะห์การจัดกลุ่ม ด้วย เทคนิค heat-map visualization และ hierarchical cluster analysis (HCA) ซึ่งเทคนิค heatmap visualization จะเปรียบเทียบความเข้มข้นสัมพัทธ์ (relative abundance) ของสารเมตาบอไลต์ชนิดเดียวกันในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง โดยสีแดง หมายถึง มีสารเมตาบอไลต์มาก และสีเขียว หมายถึง มีสารเมตาบอไลต์น้อย การวิเคราะห์ข้อมูลด้วย HCA โดยหลักการในการทำ cluster ก็คือ การจัดกลุ่มข้อมูลที่มีลักษณะเหมือนกันเข้าด้วยกัน และหาความสัมพันธ์ของด้วยค่าสัมประสิทธิ์ สหสัมพันธ์เพียร์สัน (pearson correlation) และการหารูปแบบความแตกต่างของโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลระหว่างตัวอย่างด้วยการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (PCA) และพิจารณาค่าน้ำหนักองค์ประกอบ (loading หรือ factor loading) ในการยืนยันผลของ PCA ซึ่งค่า loading เป็นค่าที่ชี้ถึงระดับหรือปริมาณความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรแต่ละตัว (Kim and Mueller, 1978; ยุทธ ไกรวรรณ, 2551) เพื่อให้ตัวแปรสัมพันธ์กับองค์ประกอบในลักษณะที่ชัดเจนขึ้นทำให้ได้ องค์ประกอบจำนวนน้อยที่อธิบายความแปรปรวนของตัวแปรสังเกตได้มากที่สุด (สุภมาส อังศุโชติ และคณะ, 2551) และ ค่าจาก VIP score สามารถใช้ในการระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (potential biomarker) ในตัวอย่างได้ สุดท้าย วิเคราะห์หาสารเมตาบอไลต์ที่แตกต่างกันระหว่างสองกลุ่มตัวอย่างจากวิถีเมตาบอลิซึมของสารเมตาบอไลต์นั้นด้วย pathway analysis จาก MetaboAnalyst v.3.0 software (<https://www.metaboanalyst.ca>) และวิเคราะห์ตำแหน่งของสารเมตาบอไลต์ที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในวิถีเมตาบอลิซึมที่เกี่ยวข้องด้วย KEGG's pathway analysis (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>)

3.2.8 วิจัยและสรุปผลการทดลอง

อธิบายผลการทดลองที่ได้จากการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพ และ อธิบายผลการทดลองที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ spectrometer นำมาเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลจากการวิเคราะห์สมบัติเคมีกายภาพ ได้แก่ การวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และปริมาณกรดทั้งหมด (titratable acidity), การวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ ($^{\circ}\text{Brix}$), การวัดค่าสี, การวัดค่าความหนืด (viscosity) และ การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (protein) และความแตกต่างของข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำนมเหลืองด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ ด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร โดยเทียบกับงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง เพื่อหาความสัมพันธ์ของสารเมตาบอไลต์ในตัวอย่างน้ำนมเหลืองที่สอดคล้องกับอิทธิพลจากฟาร์มและระยะเวลาการเก็บน้ำนมที่แตกต่างกัน รวมทั้งวิเคราะห์หาชนิดของสารเมตาบอไลต์ที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อแยกความแตกต่างระหว่างน้ำนมเหลืองจากแม่โคที่ได้จากฟาร์มที่มีอิทธิพลจากฟาร์ม และระยะเวลาการเก็บน้ำนมที่แตกต่างกัน และสรุปผลการทดลอง

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลการทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างและการวิเคราะห์ (validation of methods)

การวิจัยในขั้นตอนนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความใช้ได้ของการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำนมเหลืองของโคด้วยวิธีเจลดาคัล และ การเตรียมตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโคและวิธีวิเคราะห์ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$

4.1.1 ผลการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในน้ำนมด้วยวิธีเจลดาคัล (Kjeldahl method)

4.1.1.1 ผลการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในผลิตภัณฑ์นมทางการค้าในประเทศไทย

การวิจัยในขั้นตอนนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความใช้ได้และความเหมาะสมของวิธี ในการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในผลิตภัณฑ์นมทางการค้าในประเทศไทยด้วยวิธีเจลดาคัล จากผลการเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้จากการดำเนินงาน กับ ค่าที่วัดจากเครื่อง MilkoScanTM (มยรี เหลืองวิสัย, 2560)

ผลการวิเคราะห์จากผลิตภัณฑ์นมทางการค้าในประเทศไทย 3 ผลิตภัณฑ์ ได้แก่ นมพาสเจอร์ไรส์ ตรา ดัช มิลล์, นมพาสเจอร์ไรส์ ตรา ไทย-เดนมาร์ค และ นมยูเอชที ตรา ไทย-เดนมาร์ค เมื่อพิจารณาปริมาณโปรตีนที่วิเคราะห์ได้ พบว่า ปริมาณโปรตีนที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีเจลดาคัล กับ ข้อมูลปริมาณโปรตีนที่ได้จากเครื่อง MilkoScanTM ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) และมีค่าใกล้เคียงกับฉลากโภชนาการของผลิตภัณฑ์นั้น แสดงดังตารางที่ 25

ตารางที่ 25 ปริมาณโปรตีนที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมทางการค้าในประเทศไทย

ตัวอย่าง	ปริมาณโปรตีน (%)	เครื่อง MilkoScan TM	ฉลากโภชนาการ
นมพาสเจอร์ไรส์ ตรา ดัช มิลล์	3.10 ± 0.06	3.03 ± 0.01	3.00
นมพาสเจอร์ไรส์ ตรา ไทย-เดนมาร์ค	3.03 ± 0.08	2.83 ± 0.06	2.70
นมยูเอชที ตรา ดัช มิลล์	2.98 ± 0.05	3.07 ± 0.06	3.11

จากขั้นตอนการทดสอบความใช้ได้ของการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีเจลดาคัลในผลิตภัณฑ์นมทางการค้าในประเทศไทย พบปัญหาที่เกิดขึ้นในขั้นตอนการกลั่นตัวอย่าง เนื่องจากปริมาณ NaOH ที่ใช้มากเกินไป ทำให้ปริมาณโปรตีนที่คำนวณได้มากกว่าความเป็นจริง ดังนั้น จึงลดปริมาณ NaOH ลง ให้ปริมาตรรวมภายในหลอด digestion tube มีประมาณ 300 ml หลังจากการแก้ไข ปริมาณโปรตีนที่ได้จากการทดลองอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้และสอดคล้องกับข้อมูลปริมาณโปรตีนที่ได้จากเครื่อง MilkoScanTM

4.1.1.2 ผลการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโควันที่ 1 ภายหลังจากคลอดลูก

ในขั้นตอนนี้มีจุดประสงค์เพื่อทดสอบวิธีวิเคราะห์ที่ได้จากการปรับปรุงหาวิธีที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโคจากวิธีมาตรฐานของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (กระทรวงสาธารณสุข, 2557) โดยจะนำตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโควันที่ 1 ภายหลังจากคลอดลูกจากแม่โค 1 ตัวมาทดสอบหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีเจลดาล์ลจำนวน 3 ซ้ำ และเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีเจลดาล์ล กับปริมาณโปรตีนที่ได้รับการทดสอบจากห้องปฏิบัติการของกรมวิทยาศาสตร์บริการ ของน้ำนมเหลืองจากแม่โคตัวเดียวกัน

ผลที่ได้จากการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีเจลดาล์ล ได้ปริมาณโปรตีนเฉลี่ย $19.10 \pm 0.83\%$ ดังตารางที่ 26 เมื่อเทียบกับค่าที่ได้รับการทดสอบจากกรมวิทยาศาสตร์บริการ มีปริมาณโปรตีน 20.0% ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ตารางที่ 26 ปริมาณโปรตีนที่หาได้จากตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโค

ตัวอย่าง	ปริมาณโปรตีน (%)	การวิเคราะห์ (กรมวิทยาศาสตร์บริการ)	ค่าการวิเคราะห์ (g/100g)
วัดซ้ำที่ 1	20.06	ไขมัน	4.30
วัดซ้ำที่ 2	19.60	โปรตีน	20.0
วัดซ้ำที่ 3	19.65	ของแข็งทั้งหมด	29.2
เฉลี่ย	19.77 ± 0.25		

จากขั้นตอนการทดสอบนี้พบปัญหา การใช้ปริมาณน้ำนมเหลืองในการวิเคราะห์มากเกินไป ทำให้การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยเจลดาล์ลไม่สามารถหาปริมาณโปรตีนที่เกินช่วงได้ เนื่องจากปริมาณโปรตีนในน้ำนมเหลืองวันที่ 1 ภายหลังจากคลอดลูกอยู่ในช่วง 14.00-20.00 % (Klimes และคณะ, 1984; Elfstrand และคณะ, 2002; Tsioulpas และคณะ, 2007) ซึ่งมากกว่าน้ำนมดิบ จึงต้องมีการปรับเปลี่ยนปริมาณตัวอย่างน้ำนมเหลืองในการวิเคราะห์ จาก 2 กรัม เป็น 1 กรัม ตามคำแนะนำจากคู่มือของ บริษัท BUCHI ประเทศไทย จำกัด ดังตารางที่ 27 เมื่อทำการทดลองซ้ำอีกครั้ง พบว่า ปริมาณโปรตีนที่ได้อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้และสอดคล้องกับค่าที่ได้รับการทดสอบจากกรมวิทยาศาสตร์บริการ จึงสามารถสรุปได้ว่า การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีเจลดาล์ลมีความใช้ได้

ตารางที่ 27 แสดงน้ำหนักตัวอย่างที่ใช้เมื่อมีปริมาณไนโตรเจน หรือ โปรตีนที่แตกต่างกัน

ที่มา: Buchi (Thailand), Ltd.

ปริมาณ ไนโตรเจน (%)	ปริมาณ โปรตีน (%)	น้ำหนัก ตัวอย่าง (กรัม)	สารเคมีที่ใช้ทดสอบ			
			คะตะลิสต์ (กรัม)	กรดซัลฟูริก (ml)	ความเข้มข้น titrant (mol/L)	ปริมาณ titrant ที่ใช้ กับตัวอย่าง (ml)
0.001-0.01	0.006-0.06	5-10	15	25-30	0.005	>13
0.01-0.1	0.06-0.6	2-5	10	20	0.01	>8
0.1-1	0.6-6	1-2	10	20	0.1	1.5-15
1-5	6-30	0.5-1	10	20	0.5	2-10
5-15	30-100	<0.5	5	10	0.5	2-10

4.1.2 ผลการทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างน้ำมันเหลืองของโคและวิธีวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$

4.1.2.1 ผลการเตรียมตัวอย่างน้ำมันเหลืองก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$

ในขั้นตอนนี้มีจุดประสงค์เพื่อทดสอบการเตรียมตัวอย่างน้ำมันเหลืองของโค เพื่อหาวิธีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำมันเหลืองของโค โดยดัดแปลงจากวิธีของ Settachaimongkon และคณะ (2014), Lu และคณะ (2013) และ มยุรี เหลืองวิสัย (2560) ดังที่กล่าวไว้ในข้อ 3.2.2.2.1 เมื่อนำตัวอย่างน้ำมันเหลืองของโควันที่ 1 ภายหลังจากคลออดลูก จากแม่โคฟาร์ม A1 ตัวอย่าง และฟาร์ม B1 ตัวอย่าง รวมเป็น 2 ตัวอย่าง มาทดสอบการเตรียมตัวอย่าง จากผลการทดสอบ พบปัญหาที่เกิดขึ้นดังต่อไปนี้

- เมื่อใช้สภาวะในการปั่นเหวี่ยงน้ำมันเหลืองเพื่อแยกไขมันและโปรตีนออกที่ 3000xg ที่อุณหภูมิ 10°C เป็นระยะเวลา 15 นาที พบว่า สามารถแยกไขมันออกมาได้ปริมาณน้อย ดังภาพที่ 18 ทางนมที่แยกออกมา ยังคงมีความขุ่นอย่างเห็นได้ชัด เนื่องจากน้ำมันเหลืองมีความข้นหนืดมากทำให้การปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกไขมันและโปรตีนเกิดขึ้นได้ยาก จึงต้องเจือจางตัวอย่างด้วยน้ำ Milli-Q ในอัตราส่วน 1:1 ให้ได้ปริมาณรวม 50 มิลลิลิตร (25:25) และปรับสภาวะในการปั่นเหวี่ยงเป็น 3000xg ที่อุณหภูมิ 10°C เป็นระยะเวลา 50 นาที เมื่อปรับสภาวะที่ใช้ในการปั่นเหวี่ยง พบว่า ทางนมที่แยกออกมา มีความใส แยกกับชั้นไขมันและโปรตีนได้อย่างชัดเจน จึงสรุปได้ว่า สามารถใช้สภาวะนี้ในการแยกไขมันและโปรตีนออกจากตัวอย่างน้ำมันเหลืองของโคได้



ภาพที่ 18 ของเหลวที่แยกไขมันออกเรียบร้อยแล้ว

2. ในขั้นตอนของการเติมไดคลอโรมีเทนเพื่อสกัดไขมันที่เหลื้อออกมา พบว่า ไดคลอโรมีเทนไม่รวมตัวกับน้ำมันเหลือง จึงต้องมีการเขย่าและเพิ่มเวลาในการผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง LP Vortex mixer เป็นระยะเวลา 30 วินาที หลังจากการเพิ่มเวลาในการผสมแล้ว พบว่า ไดคลอโรมีเทนสามารถรวมตัวกับน้ำมันเหลืองของโคได้ ทำให้ประสิทธิภาพในการสกัดไขมันที่เหลื้อเกิดได้ดีขึ้น
3. ในขั้นตอนการเติมไดคลอโรมีเทน และทำการปั่นเหวี่ยงแยกไขมันที่เหลื้ออยู่ ออก พบว่า ตัวอย่างหลังจากการปั่นเหวี่ยงด้วยสภาวะ 4,100xg ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นระยะเวลา 15 นาที ไม่สามารถทำให้ซีรัมนมแยกชั้นกับไดคลอโรมีเทนได้ ดังภาพที่ 19 จึงต้องมีการปรับสภาวะเป็น 5000xg อุณหภูมิ 4°C เป็นระยะเวลา 30 นาที เพื่อให้ชั้นไดคลอโรมีเทนแยกออกจากชั้นซีรัมนม หลังจากการปรับสภาวะแล้ว พบว่า สามารถแยกชั้นซีรัมที่มีความใสออกจากชั้นไดคลอโรมีเทนได้



ภาพที่ 19 ตัวอย่างไม่สามารถแยกชั้นไขมันออกมาได้

4. ในขั้นตอนของการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Ultracentrifuge พบว่า หากนำตัวอย่างที่ไม่สามารถแยกชั้นไขมันและชั้นไดคลอโรมีเทน ดังตัวอย่างในข้อ 3 ไปปั่นเหวี่ยง ไดคลอโรมีเทนที่อยู่ภายในตัวอย่างจะทำให้หลุดสำหรับปั่นเหวี่ยง ขนาด 10.4 มิลลิลิตรเกิดการแตกรั่ว ดังภาพที่ 20 และซีรัมที่ได้หลังจากการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Ultracentrifuge ยังมีลักษณะเช่นดังภาพที่ 21 แก้ไขได้ด้วยการเจือจางตัวอย่างด้วยน้ำ Mili-Q

ในอัตราส่วน 1:1 ตั้งแต่ขั้นตอนแรก จะทำให้สามารถแยกชั้นไดคลอโรมีเทนออกไปได้ ไม่ทำให้หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 10.4 มิลลิลิตรเสียหาย หลังจากการแก้ไข พบว่า หลอดสำหรับปั่นเหวี่ยง ขนาด 10.4 มิลลิลิตร ยังอยู่ในสภาพดีและซีรั่มที่ได้จะมีลักษณะใส พร้อมนำไปกรองต่อด้วย Nanosep® centrifugal device



ภาพที่ 20 หลอดขนาด 10.4 มิลลิลิตรเกิดความเสียหาย



ภาพที่ 21 ตัวอย่างที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Ultracentrifuge

5. ในขั้นตอนของการปั่นเหวี่ยงด้วย Nanosep® centrifugal device มี รูกรองขนาดอนุภาค 3 กิโลดาลตัน ที่สภาวะ 14,000 xg ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที เพื่อนำอนุภาคที่ใหญ่กว่า 3 กิโลดาลตันออก พบว่าของเหลวหลังจากการกรองนั้น ยังมีความขุ่น ดังภาพที่ 22 แก้ไขปัญหาด้วยการเจือจางตัวอย่างในอัตราส่วน 1:1 ตั้งแต่ขั้นตอนแรก และปั่นเหวี่ยงด้วยสภาวะ 14000 xg ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นนำตัวกรองออกแล้วนำตัวอย่างไปปั่นต่อที่สภาวะ 16000 xg ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที หลังจากการแก้ไข พบว่า ของเหลวที่ได้มีความใสสามารถนำไปวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ ได้

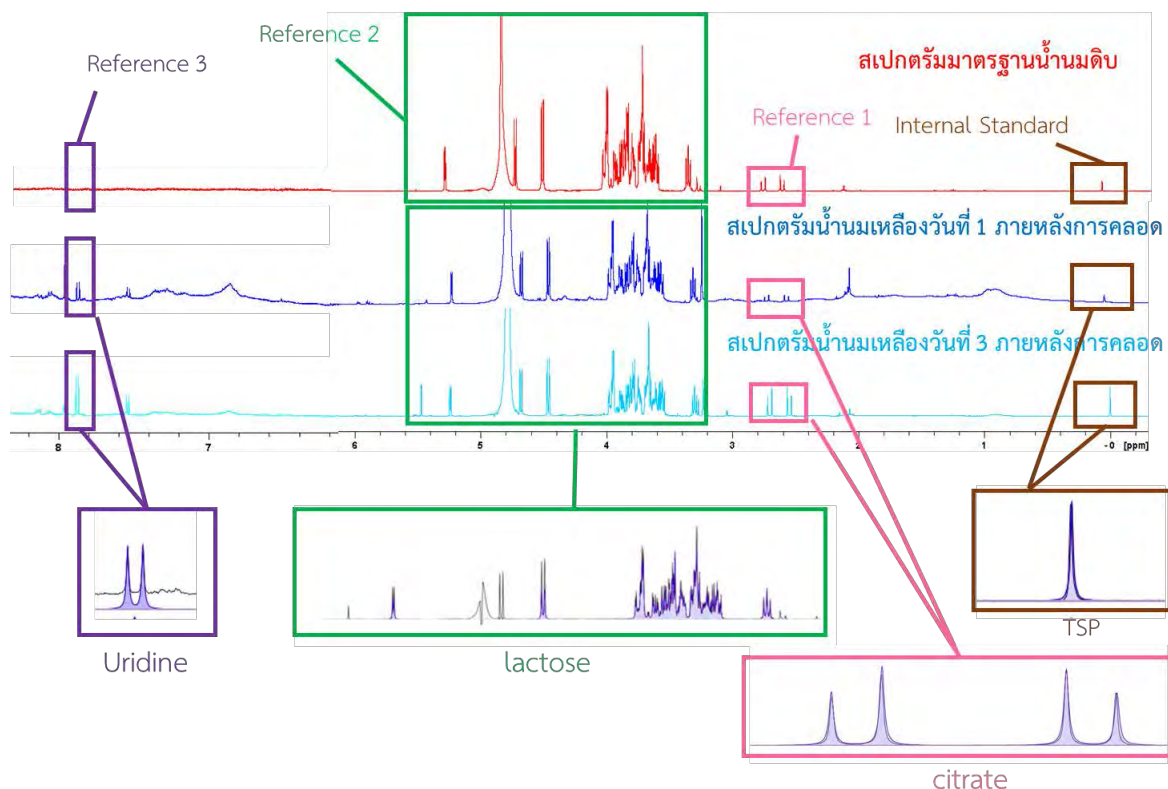


ภาพที่ 22 ของเหลวหลังการกรอง

เมื่อทำการปรับขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ได้แก่ เจือจางตัวอย่างตั้งแต่ขั้นตอนแรกก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงแยกไขมันด้วยน้ำ Milli-Q ในอัตราส่วน 1:1 เพิ่มเวลาในการผสมตัวอย่างกับไดคลอโรมีเทน ปรับสภาวะในการปั่นเหวี่ยง และปรับสภาวะการกรอง จะทำให้ตัวอย่างมีความใสเพียงพอต่อการนำไปวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ ได้ ตามวิธีที่ปรับปรุงแล้วสำหรับการเตรียมตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโคในข้อ 3.2.5.1

4.1.2.2 ผลการเตรียมตัวอย่างน้ำนมเหลืองเพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$

จากการนำตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโควันที่ 1 และวันที่ 3 ภายหลังจากคลอตุก อย่างละ 1 ตัวอย่าง ไปวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ จะได้ NMR spectra ออกมา เมื่อพิจารณาเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้าที่แสดง NMR spectra มาตรฐานของน้ำนมดิบ (Luangwilai และคณะ, 2017) พบว่า รูปแบบของสเปกตรัมที่มีความสอดคล้องกับสเปกตรัมมาตรฐานน้ำนมดิบ พีคของ NMR spectra มีความชัดเจน ตำแหน่งของ internal standard (TSP) ที่ ppm 0.00 ตรงกัน แต่ค่า base line ของตัวอย่างทั้ง 2 ตัวอย่าง มีความไม่สม่ำเสมอเล็กน้อยในช่วง 0.00 – 2.00 ppm แสดงให้เห็นว่า การเตรียมตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโคในงานวิจัยมีความใช้ได้ และเมื่อทดสอบการระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ของสเปกตรัมน้ำนมเหลือง ด้วยฐานข้อมูล Chenomx NMR suite 7.5 library (Chenomx Inc., Alberta, Canada) พบว่า สามารถระบุสารเมตาบอไลต์ได้ถูกต้องตรงตามฐานข้อมูล ตัวอย่างเช่น ในช่วงต้น 2.53 – 2.73 ppm สามารถระบุชนิดสารเมตาบอไลต์เป็น citrate, ในช่วงกลาง 3.27 – 4.69 ppm สามารถระบุชนิดสารเมตาบอไลต์เป็น lactose และในช่วงปลาย 7.87 – 7.91 ppm สามารถระบุชนิดสารเมตาบอไลต์เป็น uridine ได้ แสดงดังภาพที่ 23



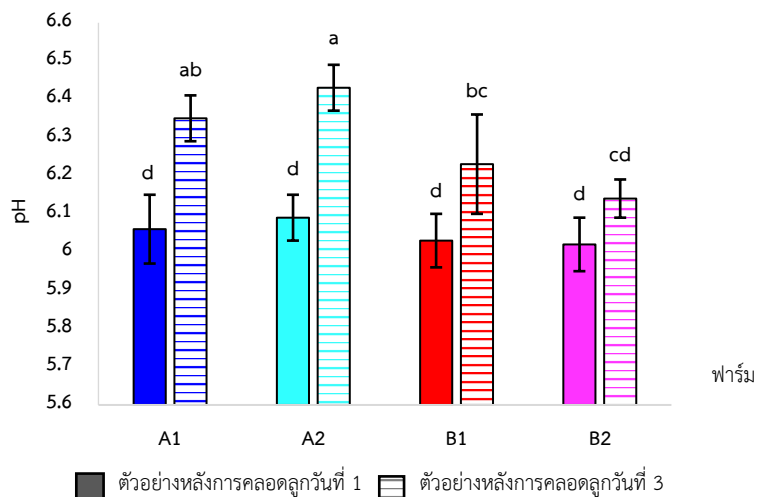
ภาพที่ 23 การเปรียบเทียบสเปกตรัมน้ำนมเหลืองของโคที่ได้จากการทดลองกับสเปกตรัมมาตรฐานน้ำนมดิบ

4.2 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพในตัวอย่างน้ำนม

4.2.1 การตรวจวัดค่าความเป็นกรด - ด่าง (pH) และปริมาณกรดทั้งหมด (titrable acidity)

การทดลองส่วนนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าความเป็นกรด - ด่าง (pH) และปริมาณกรดทั้งหมด (titrable acidity) ในตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโคทั้ง 32 ตัวอย่าง (n=32 ทำทั้งหมด 2 ซ้ำของการทดลอง) ประกอบไปด้วย น้ำนมเหลืองของโคภายหลังการคลอดลูกวันที่ 1 ทั้งหมด 16 ตัวอย่าง (n=16 ทำทั้งหมด 2 ซ้ำของการทดลอง) และ น้ำนมเหลืองของโคภายหลังการคลอดลูกวันที่ 3 ทั้งหมด 16 ตัวอย่าง (n=16 ทำทั้งหมด 2 ซ้ำของการทดลอง) และเปรียบเทียบระหว่างฟาร์มโคนมในประเทศไทยทั้ง 2 ฟาร์ม

สำหรับผลการวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด - ด่าง (pH) ดังตารางที่ 28 พบว่า ค่าเฉลี่ยของค่าความเป็นกรด - ด่าง (pH) ในน้ำนมเหลืองของโคภายหลังการคลอดลูกวันที่ 1 อยู่ในช่วง 6.02 ± 0.07 ถึง 6.09 ± 0.06 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Tsioulpas และคณะ (2007) ได้รายงานค่าความเป็นกรด - ด่าง (pH) ของน้ำนมเหลืองของโคภายหลังการคลอดลูกวันที่ 1 อยู่ในช่วง 6.17 ± 0.11 นอกจากนี้ยังมีรายงานจากงานวิจัยของ McIntyre และคณะ (1952) ที่ได้ทำการวัดค่าความเป็นกรด - ด่างของน้ำนมเหลืองของโคในวันที่ 1 ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 6.00 - 6.32 และสำหรับผลการวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด - ด่าง น้ำนมเหลืองของโคภายหลังการคลอดลูกวันที่ 3 มีค่าอยู่ในช่วง 6.14 ± 0.22 ถึง 6.43 ± 0.12 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Borad และ Singh (2018) รายงานไว้ว่า ค่า pH ของน้ำนมเหลืองภายหลังการคลอดลูกวันที่ 3 มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 6.28 นอกจากนี้ Tsioulpas และคณะ (2007) ได้รายงานไว้ว่า ค่าเฉลี่ยของ pH ของน้ำนมเหลืองภายหลังการคลอดลูกวันที่ 3 อยู่ที่ 6.28 ± 0.09 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ เมื่อเปรียบเทียบอิทธิพลจากระยะเวลาภายหลังการคลอด พบว่า ค่า pH ของทุกตัวอย่าง เพิ่มขึ้นในวันที่ 3 อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และ เมื่อเปรียบเทียบอิทธิพลจากฟาร์ม พบว่า ค่าความเป็นกรด - ด่าง (pH) ในน้ำนมเหลืองของโคภายหลังการคลอดลูกวันที่ 1 จากทั้ง 2 ฟาร์ม ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) แต่เมื่อเปรียบเทียบค่าความเป็นกรด - ด่าง (pH) ในน้ำนมเหลืองของโคภายหลังการคลอดลูกวันที่ 3 จากทั้ง 2 ฟาร์ม พบว่า ค่าความเป็นกรด - ด่าง (pH) จากฟาร์ม A มีค่าสูงกว่า ฟาร์ม B อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 24)



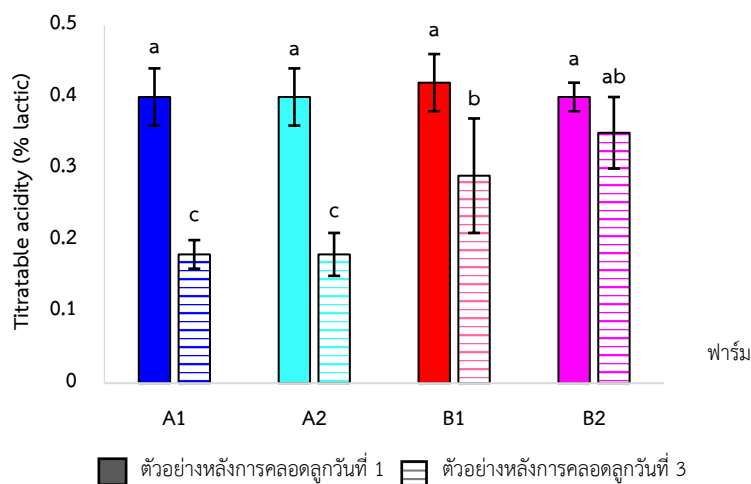
ภาพที่ 24 การเปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่างที่ได้จากแม่โคฟาร์ม A รอบที่ 1 (■), ฟาร์ม A รอบที่ 2 (■), ฟาร์ม B รอบที่ 1 (■) และ ฟาร์ม B รอบที่ 2 (■)

หมายเหตุ: a, b, c และ d แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

การเพิ่มขึ้นของค่าความเป็นกรด - ด่าง (pH) ในวันที่ 3 ภายหลังจากการคลอด สามารถอธิบายได้จากปริมาณโปรตีน และ อิมมูโนโกลบูลินที่ลดลง ทำให้ความสามารถในการทนต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (buffering capacity) ลดลง ส่งผลให้ค่าความเป็นกรด-ด่างในน้ำนมเหลืองสูงขึ้น เข้าใกล้ค่าปกติของน้ำนม (pH = 6.6 - 6.8) (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2553; Sebela และ Klicnik, 1977)

สำหรับผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด (titrable acidity) ดังตารางที่ 28 พบว่า ค่าเฉลี่ยของปริมาณกรดทั้งหมด (titrable acidity) ในน้ำนมเหลืองของโคภายหลังจากการคลอดลูกวันที่ 1 อยู่ในช่วง 0.40 ± 0.02 ถึง 0.42 ± 0.04 ซึ่งมีค่าน้อยกว่างานวิจัยของ Tsioulpas และคณะ (2007) ซึ่งได้รายงานค่า ปริมาณกรดทั้งหมดของน้ำนมเหลืองของโคภายหลังจากการคลอดลูกวันที่ 1 อยู่ในช่วง 0.461 ± 0.05 อาจเป็นผลมาจากการเก็บรักษาน้ำนมเหลืองของโค วัไที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานาน โดยมีรายงานจากงานวิจัยของ Cummins และคณะ (2017) กล่าวว่า ค่า TTA จะลดลงเมื่อเก็บเป็นระยะเวลานานที่อุณหภูมิต่ำ และสำหรับค่าปริมาณกรดทั้งหมดในน้ำนมเหลืองของโคภายหลังจากการคลอดลูกวันที่ 3 มีค่าอยู่ในช่วง 0.18 ± 0.02 ถึง 0.35 ± 0.05 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Tsioulpas และคณะ (2007) ได้รายงานปริมาณกรดทั้งหมดในน้ำนมเหลืองของโคภายหลังจากการคลอดลูกวันที่ 3 วัไที่ 0.253 ± 0.03 เมื่อเปรียบเทียบบัพติพลจากระยะเวลาภายหลังจากการคลอด พบว่า ค่าปริมาณกรดทั้งหมดของทุกตัวอย่าง ลดลงในวันที่ 3 อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และ เมื่อเปรียบเทียบบัพติพลจากฟาร์ม พบว่า ค่าปริมาณกรดทั้งหมด ในน้ำนมเหลืองของโคภายหลังจากการคลอดลูกวันที่ 1 จากทั้ง 2 ฟาร์ม ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) แต่เมื่อเปรียบเทียบค่าปริมาณกรดทั้งหมดในน้ำนมเหลืองของโคภายหลังจากการคลอดลูกวันที่ 3 จากทั้ง 2

ฟาร์ม พบว่า ค่าปริมาณกรดทั้งหมดจากฟาร์ม A มีค่าต่ำกว่า ฟาร์ม B ซึ่งสอดคล้องกับค่า pH ของฟาร์ม A ที่มีค่าสูงกว่า ฟาร์ม B อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังภาพที่ 25



ภาพที่ 25 การเปรียบเทียบปริมาณกรดทั้งหมดที่ได้จากแม่โคฟาร์ม A รอบที่ 1 (■), ฟาร์ม A รอบที่ 2 (■), ฟาร์ม B รอบที่ 1 (■) และ ฟาร์ม B รอบที่ 2 (■)

หมายเหตุ: a, b และ c แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

การลดลงของค่าปริมาณกรดทั้งหมดในวันที่ 3 ภายหลังจากการคลอด สามารถอธิบายได้จาก ความสามารถในการทนต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (buffering capacity) ของน้ำนมเหลืองที่ลดลง ส่งผลให้ค่าปริมาณกรดทั้งหมดในน้ำนมเหลืองลดลง (Tsioulpas และคณะ, 2007) ดังนั้น ค่า pH จึงเพิ่มสูงขึ้นเข้าใกล้ค่าปกติของน้ำนม ($pH = 6.6 - 6.9$) (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2553)

ตารางที่ 28 ผลการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพของน้ำนมเหลืองของโค

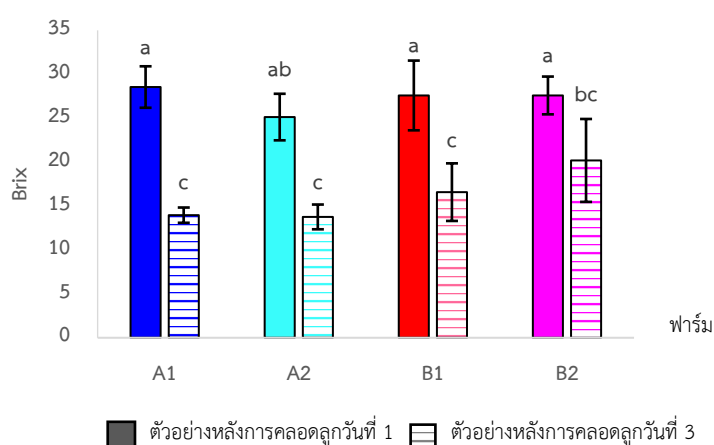
วันที่เก็บน้ำนม	วันที่ 1 หลังการคลอดลูก				วันที่ 3 หลังการคลอดลูก				test significant between effects		
	ฟาร์ม A1	ฟาร์ม A2	ฟาร์ม B1	ฟาร์ม B2	ฟาร์ม A1	ฟาร์ม A2	ฟาร์ม B1	ฟาร์ม B2	farm	day	Farm*day
ค่าทางเคมีและกายภาพ											
pH	6.06±0.09 ^d	6.09±0.06 ^d	6.03±0.07 ^d	6.02±0.07 ^d	6.35±0.06 ^{ab}	6.43±0.06 ^a	6.23±0.13 ^{bc}	6.14±0.05 ^{cd}	<i>P</i> =0.001	<i>P</i> =0.000	<i>P</i> >0.05
TTA (กรัม)	0.40±0.04 ^a	0.40±0.04 ^a	0.42±0.04 ^a	0.40±0.02 ^a	0.18±0.02 ^c	0.18±0.03 ^c	0.29±0.08 ^b	0.35±0.05 ^{ab}	<i>P</i> =0.014	<i>P</i> <0.000	<i>P</i> =0.020
°Brix	28.55±2.36 ^a	25.13±2.65 ^{ab}	27.59±3.97 ^a	27.59±2.15 ^a	13.96±0.87 ^c	13.76±1.41 ^c	16.58±3.28 ^c	20.19±4.72 ^{bc}	<i>P</i> <0.05	<i>P</i> =0.000	<i>P</i> >0.05
ความหนืด (cP)	139.98±54.17 ^{ab}	87.23±55.11 ^{ab}	124.19±39.75 ^{ab}	216.11±27.78 ^a	7.81±3.85 ^c	20.63±14.63 ^c	89.18±5.5 ^b	165.54±49.25 ^a	<i>P</i> =0.012	<i>P</i> =0.022	<i>P</i> >0.05
โปรตีน (%)	20.71±2.52 ^a	16.21±1.73 ^{ab}	19.10±3.05 ^a	19.29±1.89 ^a	4.25±0.50 ^e	5.33±1.85 ^{de}	9.52±5.76 ^{cd}	13.84±2.37 ^{bc}	<i>P</i> =0.005	<i>P</i> =0.000	<i>P</i> =0.011
ดัชนีความขาว (L*)	60.60±15.00 ^b	71.19±13.69 ^a	70.65±4.94 ^a	71.98±2.88 ^a	74.21±4.82 ^a	74.30±7.69 ^a	72.56±6.26 ^a	75.30±2.07 ^a	<i>P</i> >0.05	<i>P</i> =0.012	<i>P</i> >0.05
ดัชนีความแดง (a*)	-2.22±0.87 ^a	-3.60±0.49 ^{ab}	-2.28±0.87 ^{ab}	-1.62±0.34 ^{ab}	-3.22±0.78 ^b	-2.83±0.55 ^b	-2.31±0.57 ^{ab}	-2.54±0.48 ^{ab}	<i>P</i> >0.05	<i>P</i> >0.05	<i>P</i> >0.05
ดัชนีความเหลือง (b*)	15.32±4.59 ^b	14.27±2.70 ^b	25.06±3.41 ^a	24.93±5.48 ^a	5.50±1.66 ^c	6.14±2.67 ^c	15.04±3.02 ^b	19.71±4.81 ^{ab}	<i>P</i> =0.000	<i>P</i> =0.000	<i>P</i> >0.05

หมายเหตุ : a, b, c, d และ e ในแนวนอนเดียวกัน แสดงค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของสมบัติทางเคมีกายภาพ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*p*<0.05)

4.2.2 การตรวจวัดปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ ($^{\circ}$ Brix)

การทดลองส่วนนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ ($^{\circ}$ Brix) ในตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโคทั้ง 32 ตัวอย่าง ($n=32$ ทำทั้งหมด 2 ซ้ำของการทดลอง) ประกอบไปด้วย น้ำนมเหลืองของโคภายหลังการคลอดลูกวันที่ 1 ทั้งหมด 16 ตัวอย่าง ($n=16$ ทำทั้งหมด 2 ซ้ำของการทดลอง) และ น้ำนมเหลืองของโคภายหลังการคลอดลูกวันที่ 3 ทั้งหมด 16 ตัวอย่าง ($n=16$ ทำทั้งหมด 2 ซ้ำของการทดลอง) และ เปรียบเทียบระหว่างฟาร์มโคนมในประเทศไทยทั้ง 2 ฟาร์ม

สำหรับผลการทดลองปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ดังตารางที่ 28 พบว่า ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ของน้ำนมเหลืองของโคภายหลังการคลอดลูกวันที่ 1 อยู่ในช่วง 25.13 ± 2.65 ถึง 28.55 ± 2.36 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Silva-del-rio และคณะ (2017) ได้รายงานไว้ว่า ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ของน้ำนมเหลืองของโคภายหลังการคลอดลูกวันที่ 1 มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 25.4 ± 4.4 นอกจากนี้ยังมีกรกล่าวรายงานจากงานวิจัยของ Biemann และคณะ (2010) กล่าวว่า น้ำนมเหลืองของโคที่มีคุณภาพดีจะต้องมีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้มากกว่า 22% ซึ่งหากเปรียบเทียบกับค่าในงานวิจัยนี้ น้ำนมเหลืองของโคภายหลังการคลอดลูกวันที่ 1 มีค่ามากกว่า 22% ทั้งหมด สำหรับปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ของน้ำนมเหลืองของโคภายหลังการคลอดลูกวันที่ 3 มีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วงของ 13.76 ± 1.41 ถึง 20.19 ± 4.72 ซึ่งผลงานวิจัยที่ได้นี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Quigley และคณะ (2013) ได้รายงานปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้อยู่ในช่วง 12.0 - 32.0 โดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 3.5 เมื่อเปรียบเทียบอิทธิพลจากระยะเวลาภายหลังการคลอด พบว่า ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ของทุกตัวอย่างไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) และ เมื่อเปรียบเทียบอิทธิพลจากฟาร์ม พบว่า ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ ($^{\circ}$ Brix) ในน้ำนมเหลืองของโคภายหลังการคลอดลูกวันที่ 1 และ 3 จากทั้ง 2 ฟาร์ม ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ดังภาพที่ 26



ภาพที่ 26 การเปรียบเทียบปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดที่ได้จากแม่โคฟาร์ม A รอบที่ 1 (■), ฟาร์ม A รอบที่ 2 (■), ฟาร์ม B รอบที่ 1 (■) และ ฟาร์ม B รอบที่ 2 (■)
หมายเหตุ: a, b และ c แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

จากงานวิจัยของ Quigley และคณะ (2013) รายงานว่า ค่าปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ มีความสัมพันธ์กับ ปริมาณอิมมูโนโกลบูลินชนิด G เนื่องจากอิมมูโนโกลบูลินชนิด G เป็นของแข็งที่ละลายได้ในน้ำนมเหลือง และของแข็งส่วนมากที่พบในน้ำนมเหลืองนั้น 60% คือ อิมมูโนโกลบูลิน จึงทำให้สามารถใช้ค่าปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้หาปริมาณอิมมูโนโกลบูลิน (Bielmann และคณะ, 2010) แต่วิธีนี้เป็นเพียงแค่การวัดทางอ้อม หากต้องการวัดปริมาณอิมมูโนโกลบูลินโดยตรง อาจจะใช้วิธี ELISA (Verweij และคณะ, 2014) หรือใช้ Lazer fluorescence (Abdel-Salam และคณะ, 2014) ได้ โดยหากมีปริมาณอิมมูโนโกลบูลินมาก จะทำให้ค่าปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้สูง และ Abdel-Salam และคณะ (2014) รายงานว่า ปริมาณอิมมูโนโกลบูลินในน้ำนมเหลืองของโคจะมีปริมาณสูงในวันแรก และมีปริมาณลดลงในวันถัด ๆ ไป จากงานวิจัยทั้ง 2 ที่กล่าวมาข้างต้น สามารถอธิบายการลดลงของปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ในตัวอย่างน้ำนมเหลืองในวันที่ 3 ในงานวิจัยนี้ได้ นอกจากนี้ งานวิจัยของ Salehi และคณะ (2016) กล่าวว่า อาหารมีผลต่อปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ในน้ำนมเหลือง โดยน้ำนมเหลืองที่ได้จากแม่โคที่กินดอกคาโนล่า จะมีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ต่ำกว่า น้ำนมเหลืองที่ได้จากแม่โคที่กินดอกทานตะวัน


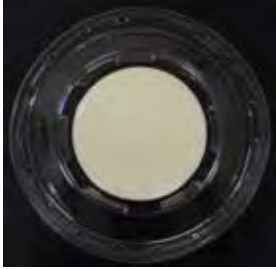














4.2.3 การวัดค่าสี

การทดลองส่วนนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของสี ในตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโคทั้ง 32 ตัวอย่าง (n=32 ทำทั้งหมด 2 ซ้ำของการทดลอง) ประกอบไปด้วย น้ำนมเหลืองของโคภายหลังการคลอดลูกวันที่ 1 ทั้งหมด 16 ตัวอย่าง (n=16 ทำทั้งหมด 2 ซ้ำของการทดลอง) และ น้ำนมเหลืองของโคภายหลังการคลอดลูกวันที่ 3 ทั้งหมด 16 ตัวอย่าง (n=16 ทำทั้งหมด 2 ซ้ำของการทดลอง) และเปรียบเทียบระหว่างฟาร์มโคนมในประเทศไทยทั้ง 2 ฟาร์ม

เมื่อสังเกตภาพด้วยตาเปล่าดังแสดงในตารางที่ 29 จะพบว่า สีของน้ำนมเหลืองในวันที่ 3 หลังการคลอดลูกมีสีเหลืองลดลงจากวันที่ 1 หลังการคลอดลูกเมื่อเปรียบเทียบตัวอย่างที่ได้จากแม่โคตัวเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับค่าการตรวจวัดสีในตารางที่ 28 เมื่อเปรียบเทียบอิทธิพลจากระยะเวลาภายหลังการคลอด พบว่า ดัชนีความเหลือง (b^*) ในทุกตัวอย่าง ลดลงในวันที่ 3 อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และ เมื่อเปรียบเทียบอิทธิพลจากฟาร์ม พบว่า ดัชนีความเหลือง (b^*) จากฟาร์ม B มีค่าสูงกว่าฟาร์ม A อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบในวันเดียวกัน ($p > 0.05$) จากงานวิจัยของ Gross และคณะ (2014) กล่าวว่า ปริมาณอิมมูโนโกลบูลินชนิด G ส่งผลต่อดัชนีความขาว (L^*) อย่างมีนัยสำคัญ โดยถ้ามีปริมาณอิมมูโนโกลบูลินชนิด G ลดลง ทำให้สีของน้ำนมมีความขาวเพิ่มขึ้น ปริมาณไขมันและปริมาณโปรตีนส่งผลต่อดัชนีความขาวและดัชนีความเหลืองอย่างมีนัยสำคัญ โดยถ้ามีปริมาณไขมันและปริมาณโปรตีนลดลงจะส่งผลให้สีของน้ำนมมีความขาวเพิ่มขึ้นและความเหลืองลดลง และปริมาณน้ำตาลแลคโตส ส่งผลต่อดัชนีความเหลืองอย่างมีนัยสำคัญ โดยปริมาณน้ำตาลแลคโตสเพิ่มขึ้นจะส่งผลให้สีของน้ำนมมีความเหลืองเพิ่มขึ้น แต่จากงานวิจัยนี้ ผลของปริมาณโปรตีนและไขมันมีอิทธิพลต่อสีเหลืองของน้ำนมมากกว่าปริมาณแลคโตส จึงทำให้ตัวอย่างในวันที่ 3 มีดัชนีความเหลืองลดลง นอกจากนี้งานวิจัยของ Solah และคณะ (2007) กล่าวว่า ปริมาณเลือด และ องค์ประกอบใน

อาหารที่แม่โคกิน (เช่น ปืตาแคโรทีน) ส่งผลต่อสีเหลืองของน้ำนมเช่นกัน และ จากรายงานของ Olives และคณะ (2013) ได้รายงานว่า สีแดงในน้ำนมเหลืองของโค อาจเกิดมาจากแตกของเส้นเลือดฝอยที่บริเวณเต้านมของแม่โค ระหว่างกระบวนการรีดน้ำนม จึงทำให้ตัวอย่างในงานวิจัยนี้บางตัวอย่างมีสีแดง

ตารางที่ 29 ภาพถ่ายสีของตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโคภายหลังการคลอดลูก ทั้ง 32 ตัวอย่าง

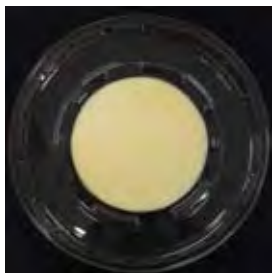
ฟาร์ม	ตัวอย่างวันที่ 1 หลังการคลอดลูก		ตัวอย่างวันที่ 3 หลังการคลอดลูก		
A1					
	A111	A112	A131	A132	
					
	A113	A114	A133	A134	
	A2				
		A211	A212	A231	A232
					
		A213	A214	A233	A234

ฟาร์ม

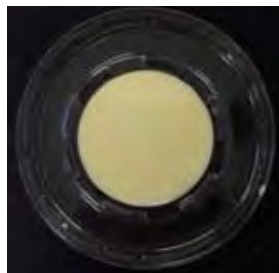
ตัวอย่างวันที่ 1 หลังการคลอดลูก

ตัวอย่างวันที่ 3 หลังการคลอดลูก

B1



B111



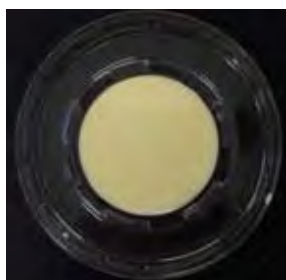
B112



B131



B132



B113



B114

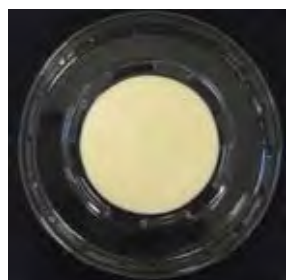


B133



B134

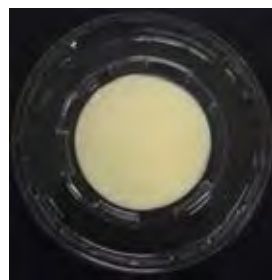
B2



B211



B212



B231



B232



B213



B214



B233

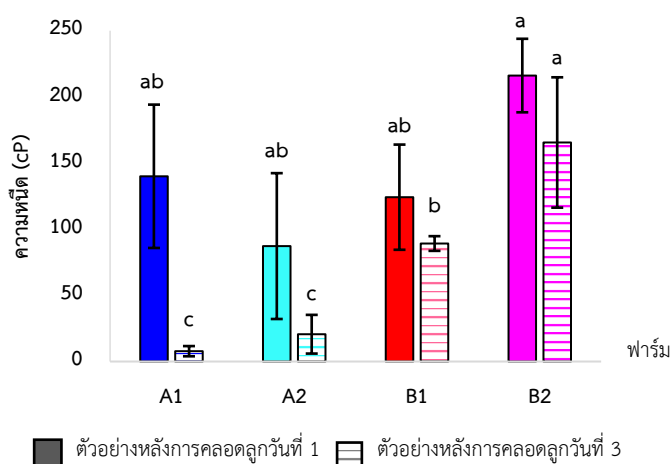


B234

4.2.4 การวัดค่าความหนืด

การทดลองส่วนนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าความหนืด ในตัวอย่างน้ำมันเหลืองของโคทั้ง 32 ตัวอย่าง ($n=32$ ทำทั้งหมด 2 ซ้ำของการทดลอง) ประกอบไปด้วย น้ำมันเหลืองของโคภายหลังการคลอดลูกวันที่ 1 ทั้งหมด 16 ตัวอย่าง ($n=16$ ทำทั้งหมด 2 ซ้ำของการทดลอง) และ น้ำมันเหลืองของโคภายหลังการคลอดลูกวันที่ 3 ทั้งหมด 16 ตัวอย่าง ($n=16$ ทำทั้งหมด 2 ซ้ำของการทดลอง) และเปรียบเทียบระหว่างฟาร์มโคนมในประเทศไทยทั้ง 2 ฟาร์ม

สำหรับผลการทดลองการวัดค่าความหนืดดังตารางที่ 28 พบว่า ความหนืดของน้ำมันเหลืองของโคภายหลังการคลอดลูกวันที่ 1 อยู่ในช่วง 87.23 ± 55.11 ถึง 216.11 ± 27.78 และค่าความหนืดของน้ำมันเหลืองของโคภายหลังการคลอดลูกวันที่ 3 อยู่ในช่วง 7.81 ± 3.85 ถึง 165.54 ± 49.25 เมื่อเปรียบเทียบอิทธิพลจากระยะเวลาภายหลังการคลอด พบว่า ค่าความหนืดของทุกตัวอย่างจากฟาร์ม A ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 3 ภายหลังการคลอด ($p<0.05$) และ เมื่อเปรียบเทียบอิทธิพลจากฟาร์ม พบว่า ค่าความหนืดในน้ำมันเหลืองของโคภายหลังการคลอดลูกวันที่ 3 จากฟาร์ม B มีค่าสูงกว่า ฟาร์ม A อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ดังภาพที่ 27



ภาพที่ 27 การเปรียบเทียบค่าความหนืดที่ได้จากแม่โคฟาร์ม A รอบที่ 1 (■), ฟาร์ม A รอบที่ 2 (■), ฟาร์ม B รอบที่ 1 (■) และ ฟาร์ม B รอบที่ 2 (■)

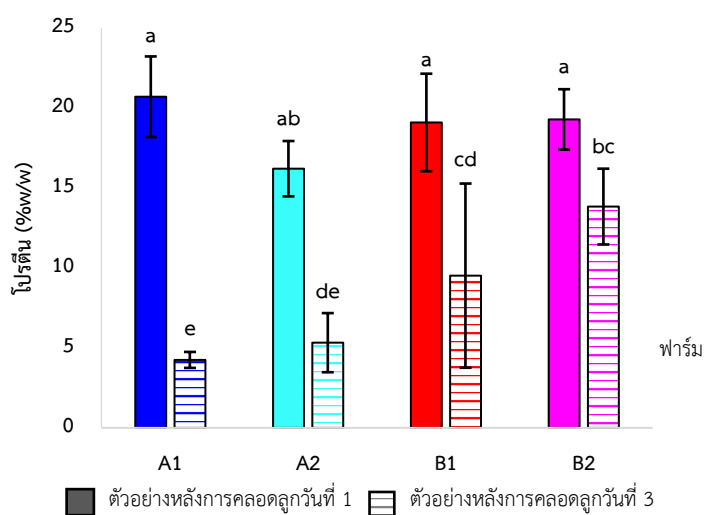
หมายเหตุ: a, b และ c แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

จากงานวิจัยของ Moody (1947) ได้วัดค่าความหนืดของน้ำมันโคที่อุณหภูมิตั้งแต่ 20 องศาเซลเซียส รายงานว่า ค่าความหนืดสัมพันธ์กับปริมาณโปรตีนและไขมันในน้ำมันเหลืองของโค โดยปริมาณโปรตีนและไขมันลดลง ส่งผลให้ค่าความหนืดลดลง นอกจากนี้ยังรายงานว่า น้ำมันเหลืองของโคภายหลังการคลอดลูกวันที่ 1 จะมีค่าความหนืดสูงสุด และลดลงเรื่อย ๆ ตามจำนวนวันที่เพิ่มขึ้น และจากงานวิจัยของ Bateman และ Sharp (1928) ได้วัดค่าความหนืดที่อุณหภูมิตั้งแต่ 20 องศาเซลเซียส กล่าวว่า น้ำมันเหลืองของโคภายหลังการคลอดลูกวันที่ 1 มีค่าความหนืดสูง และ ลดลงตามระยะเวลาภายหลังการคลอดลูก ซึ่งสอดคล้องกับค่าความหนืดที่วัดได้ในงานวิจัยนี้

4.2.5 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

การทดลองส่วนนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณโปรตีนในตัวอย่งน้ำนมเหลืองของโคทั้ง 32 ตัวอย่าง ($n=32$ ทำทั้งหมด 2 ซ้ำของการทดลอง) ประกอบไปด้วย น้ำนมเหลืองของโคภายหลังการคลอดลูกวันที่ 1 ทั้งหมด 16 ตัวอย่าง ($n=16$ ทำทั้งหมด 2 ซ้ำของการทดลอง) และ น้ำนมเหลืองของโคภายหลังการคลอดลูกวันที่ 3 ทั้งหมด 16 ตัวอย่าง ($n=16$ ทำทั้งหมด 2 ซ้ำของการทดลอง) และเปรียบเทียบระหว่างฟาร์มโคนมในประเทศไทยทั้ง 2 ฟาร์ม

สำหรับผลการทดลองปริมาณโปรตีน ดังตารางที่ 28 พบว่า ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ของน้ำนมเหลืองของโคภายหลังการคลอดลูกวันที่ 1 อยู่ในช่วง 16.21 ± 1.73 ถึง 20.71 ± 2.52 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Klimes และคณะ (1984) รายงานค่าโปรตีนในน้ำนมเหลืองของโคภายหลังการคลอดลูกวันที่ 1 มีค่าอยู่ที่ 16.96 ± 3.23 นอกจากนั้นงานวิจัยของ Tsioulpas และคณะ (2007) รายงานค่าโปรตีนของน้ำนมเหลืองของโคภายหลังการคลอดลูกวันที่ 1 มีค่าเฉลี่ย เท่ากับ 16.12 ± 1.64 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ และสำหรับผลการวิเคราะห์ค่าโปรตีนในน้ำนมเหลืองของโคภายหลังการคลอดลูกวันที่ 3 อยู่ในช่วง 4.25 ± 0.50 ถึง 13.84 ± 2.37 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Foley และ Otterby (1978) ได้รายงาน ปริมาณโปรตีนในน้ำนมเหลืองภายหลังการคลอดลูกวันที่ 3 ว่า มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 5.1 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ เมื่อเปรียบเทียบอิทธิพลจากระยะเวลาภายหลังการคลอด พบว่า ปริมาณโปรตีนลดลงในวันที่ 3 อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) และ เมื่อเปรียบเทียบอิทธิพลจากฟาร์ม พบว่าปริมาณโปรตีนในน้ำนมเหลืองของโคภายหลังการคลอดลูกวันที่ 3 จากฟาร์ม A มีค่าสูงกว่าฟาร์ม B อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ดังภาพที่ 28 โดยปริมาณโปรตีนในน้ำนมเหลืองของโคที่เปลี่ยนไปมีผลต่อค่า pH, Brix, สี และความหนืด ดังแสดงก่อนหน้า



ภาพที่ 28 การเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่ได้จากแม่โคฟาร์ม A รอบที่ 1 (■), ฟาร์ม A รอบที่ 2 (■), ฟาร์ม B รอบที่ 1 (■) และ ฟาร์ม B รอบที่ 2 (■)

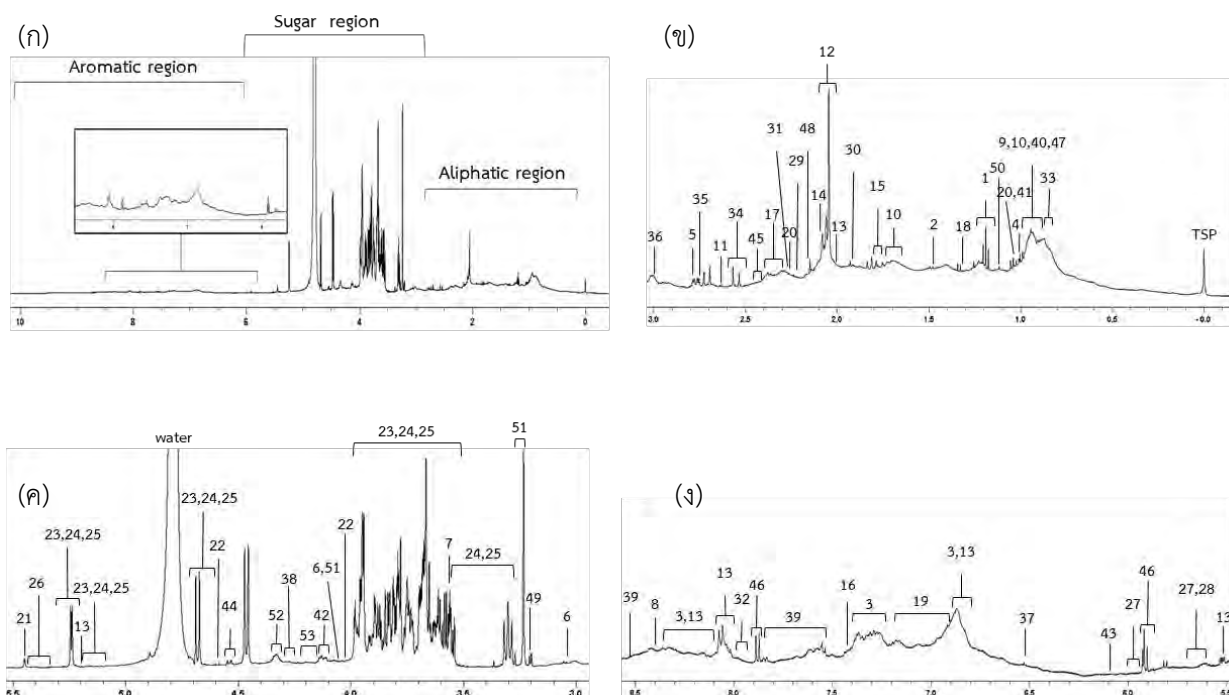
หมายเหตุ: a, b, c, d และ e แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

จากงานวิจัยของ Larson (1992) กล่าวว่า 70-80% ของโปรตีนในน้ำนมเหลืองของโค คือ อิมมูโกลบูลินชนิด G, A และ M และ จากงานวิจัยของ Korohnen และคณะ (2000) รายงานว่า ปริมาณอิมมูโกลบูลินชนิด G ในน้ำนมเหลืองของโคจะมีปริมาณสูงในวันแรก เพื่อเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันของลูกโคแรกเกิด และลดลงในวันถัดไปอย่างรวดเร็ว ซึ่งผลของงานวิจัยนี้ สอดคล้องกับงานวิจัยทั้งสองที่กล่าวมาข้างต้น นอกจากนี้ ยังมีรายงานจาก Sobczuk-Szul และคณะ (2013) กล่าวว่า ปริมาณโปรตีนในน้ำนม ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์แม่โค โดยแม่โคสายพันธุ์ Jersey จะมีปริมาณโปรตีนในน้ำนมเหลืองสูงกว่าแม่โคสายพันธุ์ Polish Holstein-Friesian

4.3 การประมวลผลโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโค โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ทางเมตาโบโลมิกส์

4.3.1 การประมวลผล spectra ของ $^1\text{H-NMR}$ และการระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ของตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโคทั้งหมด ($n=32$)

Spectra ของตัวอย่างน้ำนมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ หลังจากการประมวลผล spectra ในช่วง chemical shifts (δ) ระหว่าง 0.00-10.00 ppm ดังขั้นตอนที่ 3.2.6 ได้ทั้งหมด 500 bin จะนำมา ระบุชนิดสารเมตาบอไลต์โดยเปรียบเทียบจากฐานข้อมูล Chenomx NMR suite 7.5 library (Chenomx Inc., Alberta, Canada), Human Metabolome Database version 3.0 (Wishart และคณะ, 2013), Livestock Metabolome Database (<http://lmdb.ca/>), Milk Metabolome Database (<http://www.mcdb.ca>) และจากงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง พบว่า สามารถระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ในตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโคได้ทั้งหมด 196 bin และเมื่อนำมาจัดกลุ่มของสารเมตาบอไลต์จะได้ทั้งหมด 53 สารเมตาบอไลต์ ดังแสดงในตารางที่ 30 ซึ่งประกอบด้วย กรดอะมิโนและอนุพันธ์ กรดอะมิโน คาร์โบไฮเดรตและอนุพันธ์ของน้ำตาล สารประกอบคาร์บอนิล กรดอินทรีย์ และอนุพันธ์ของไขมัน สามารถระบุตำแหน่งบนสเปกตรัมดังแสดงในภาพที่ 29



ภาพที่ 29 การระบุตำแหน่งข้อมูลของสารเมตาบอไลต์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ ของน้ำนมเหลืองของโค (ก), ภาพขยายในช่วง Aliphatic region (0.01-3.00 ppm) (ข), ภาพขยายในช่วง Sugar region (3.00-6.00 ppm) (ค), และภาพขยายในช่วง Aromatic region (6.00-10.00 ppm) (ง) ลำดับสารที่ 1-46 ดังตารางที่ 30

ตารางที่ 30 สารเมตาบอไลต์ 53 เมตาบอไลต์ที่พบในตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโคในงานวิจัยนี้

กลุ่มสารประกอบเคมี	ลำดับ	สารเมตาบอไลต์	^1H chemical shift, ppm ^a
แอลกอฮอล์	1	Ethanol	1.21 (t) - 1.17 (t)
กรดอะมิโนและอนุพันธ์	2	Alanine	1.49 (d) - 1.47 (d)
	3	Amino acid residue	8.37 (m), 8.35 (m), 8.27 (m), 8.17 (m) - 8.09 (m), 7.39 (m) - 7.25 (m), 6.89 (m)-6.85 (d)
	4	2-Aminobutyrate	1.01 (t)
	5	Aspartate	2.79 (d)
	6	Creatine and Creatinine	4.05 (m), 3.05 (s)- 3.03 (s)
	7	Glycine	3.57 (m)
	8	Histidine	8.41 (s)
	9	Isoleucine	0.99 (d)- 0.95 (t), 0.91 (t)- 0.89 (t)
	10	Leucine	1.73 (m)- 1.65 (m), 0.97 (t)-0.95 (t), 0.93 (t)
	11	Methionine	2.65 (t)- 2.63 (t)
	12	N-acetylamino acid	2.07 (m)- 2.05 (m)

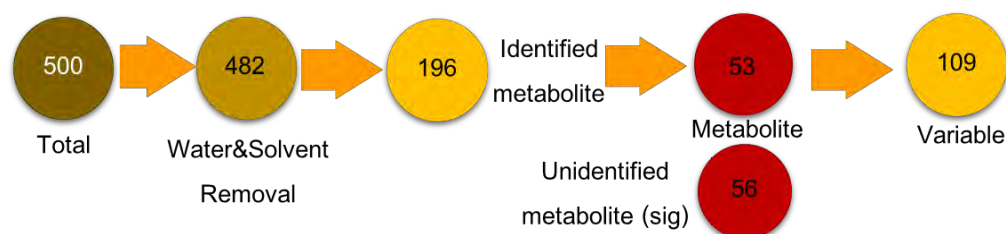
กลุ่มสารประกอบเคมี	ลำดับ	สารเมตาบอไลต์	¹ H chemical shift, ppm ^a
	13	N-acetylglucosamine	8.23 (m), 8.21 (m), 8.19 (m), 8.07 (d) - 8.03 (d), 6.87 (d) - 6.83 (d), 5.53 (d)- 5.51 (d), 5.21 (d), 2.03 (s)
	14	N-acetylglutamate	2.09 (s)
	15	Ornithine	1.79 (m)- 1.75 (m)
	16	Phenylalanine	7.43 (t)-7.41 (t)
	17	Proline	2.39 (m)- 2.33 (m)
	18	Threonine	1.33 (d)
	19	Tyrosine	7.19 (d)-7.17 (d), 6.91 (d)
	20	Valine	2.25 (m), 1.05 (d)
คาร์โบไฮเดรตและอนุพันธ์	21	1,6-Anhydro-beta-D-glucose	5.47 (s)
	22	Ascorbate	4.51 (m), 4.03 (m)- 4.01 (m)
	23	Galactose	5.29 (d)- 5.27 (d), 4.61 (d)- 4.59 (d), 4.09 (m)- 4.07 (m), 3.99 (m)- 3.63 (m), 3.53 (m)- 3.47 (m)
	24	Glucose	5.25 (m)- 5.23 (m), 4.65 (d)- 4.63 (d), 3.97 (m)- 3.63 (m), 3.55 (m)- 3.25 (m)
	25	Lactose	4.69 (d)- 4.67 (d), 4.47 (d)- 4.45 (d), 5.25 (m)- 5.23 (m), 3.97 (m)- 3.95 (m), 3.89 (m)- 3.79 (m), 3.73 (m), 3.69 (m)- 3.55 (m), 3.31 (m)- 3.27 (m)
	26	Sugar residue	5.45 (m)- 5.37 (m)
	27	UDP-galactose	5.99 (m) - 5.95 (m), 5.67 (m)
	28	UDP-glucose	5.63 (m) - 5.59 (m)
สารประกอบคาร์บอนิล	29	Acetone	2.23 (s)
กรดอินทรีย์	30	Acetate	1.93 (s)
	31	Acetoacetate	2.27 (s)
	32	Benzoate	7.99 (m), 7.95 (m)
	33	Butyrate	0.89 (t)- 0.87 (t)
	34	Citrate	2.73 (d)- 2.69 (d), 2.59 (d)- 2.53 (d)
	35	5,6-Dihydrothymine	2.77 (m)- 2.75 (m)
	36	Ethylmalonate	2.99 (t)
	37	Fumarate	6.53 (s)

กลุ่มสารประกอบเคมี	ลำดับ	สารเมตาบอไลต์	¹ H chemical shift, ppm ^a
	38	Glycylproline	4.29 (m)- 4.25 (m)
	39	Hippurate	8.51 (s), 7.85 (d) - 7.81 (d), 7.63 (t)-7.61 (t), 7.57 (t) - 7.53 (t)
	40	4-Hydroxybutyrate	1.83 (d)- 1.81 (d)
	41	Isobutyrate	1.05 (d)- 1.03 (d)
	42	Lactate	4.13 (m)- 4.11 (m)
	43	Orotate	6.19 (s)
	44	2-Phosphoglycerate	4.55 (m)- 4.53 (m)
	45	Succinate	2.43 (s)- 2.41 (s)
	46	Uridine	7.91 (d)-7.89 (d), 7.87 (d), 5.93 (t) - 5.87 (t)
	47	Valerate and derivatives	0.83 (t) - 0.95 (t)
ไขมันและอนุพันธ์	48	Acetylcarnitine	2.15 (s)
	49	Carnitine	3.23 (s)
	50	Cholate	1.15 (m)
	51	Choline and derivatives	4.05 (m), 3.23 (s) - 3.19 (s)
	52	Glycerophosphocholine	4.35 (m)- 4.33 (m)
	53	O-phosphocholine	4.23 (m)- 4.17 (m)

หมายเหตุ: ทำการทดลองที่ pH 6.0-6.2 และ สามารถฐานที่ใช้ คือ TSP ที่ตำแหน่ง 0.00 ppm

^as=singlet; d=doublet; t=triplet; m=multiplet

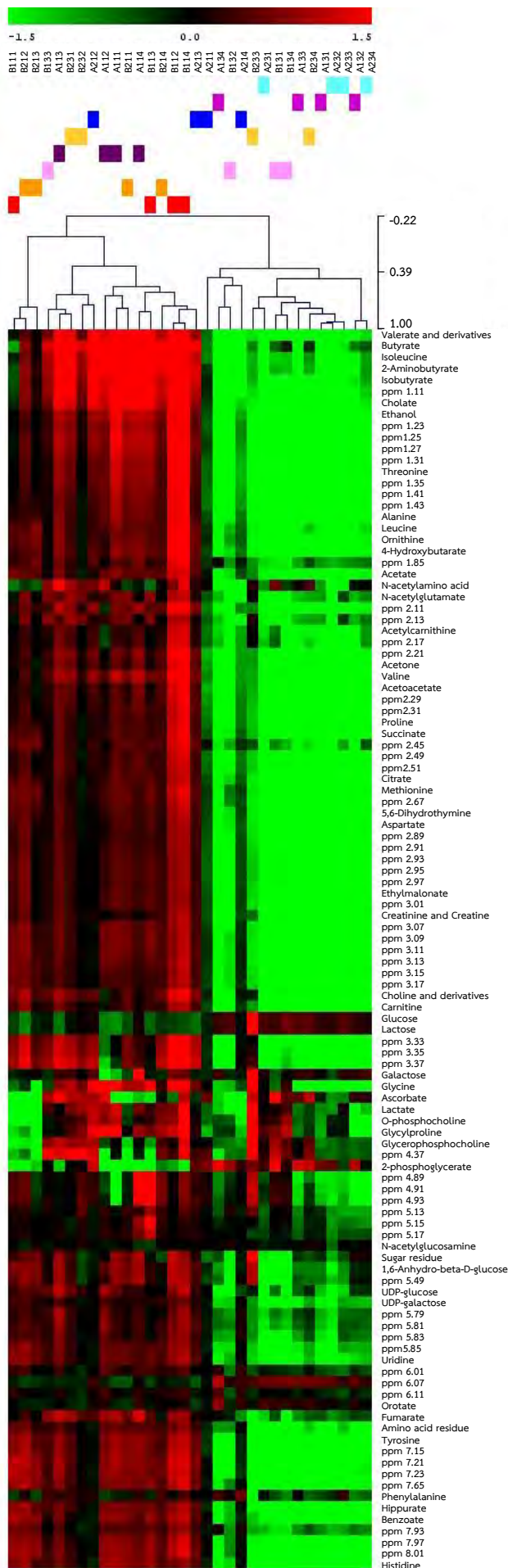
สำหรับ bin ที่ไม่สามารถระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ได้ หลังจากนำข้อมูลมาวิเคราะห์ ความแปรปรวนโดยใช้ analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) ได้ทั้งหมด 56 bin ผลการวิเคราะห์จะได้ตัวแปร (variable) รวมทั้งหมด 109 ตัวแปร เพื่อนำไปสู่ขั้นตอนการวิเคราะห์ผลทางสถิติต่อไป (ภาพที่ 30)



ภาพที่ 30 แผนผังแสดงจำนวน bin จากการประมวลผลด้วยวิธีทางสถิติ เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร

4.3.2 การเปรียบเทียบโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโคทั้งหมด ($n=32$) จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ โดย heat-map visualization และ hierarchical cluster analysis (HCA)

จากขั้นตอนการประมวลผล spectra ของ $^1\text{H-NMR}$ และการระบุสารเมตาบอไลต์ ผลการวิเคราะห์จะได้ตัวแปร (variable) รวมทั้งหมด 109 ตัวแปร จากนั้นนำข้อมูลมาประมวลผลดัง ขั้นตอนที 3.2.7.3 เพื่อวิเคราะห์โดยการจัดกลุ่ม ด้วยเทคนิค heat-map visualization และ HCA โดยโปรแกรมสำเร็จรูป Multi-Experiment Viewer (MeV) version 4.9 ซึ่งจากการนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์โดยการจัดกลุ่ม ด้วยเทคนิค heat-map visualization โดยจะเปรียบเทียบความเข้มข้นสัมพัทธ์ (relative abundance) ของสารเมตาบอไลต์ชนิดเดียวกันในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง โดยสีแดง หมายถึง มีสารเมตาบอไลต์มาก และสีเขียว หมายถึง มีสารเมตาบอไลต์น้อย และวิเคราะห์ข้อมูลด้วย HCA ซึ่งหลักการในการทำ cluster ก็คือ การจัดกลุ่มข้อมูลที่มีลักษณะเหมือนกันเข้าด้วยกัน และหาความสัมพันธ์ของตัวแปรค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน (Pearson correlation) ผลการวิเคราะห์ด้วย HCA พบว่า ตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโควันที่ 1 หลังการคลอดจะมีสีแดง และตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโควันที่ 3 หลังการคลอดจะมีสีเขียว ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสารเมตาบอไลต์ส่วนมากจะมีค่าสูงในตัวอย่างวันที่ 1 และลดลงในวันที่ 3 หลังการคลอด ยกเว้น glucose และ lactose จะมีแดงในตัวอย่างวันที่ 3 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า สารเมตาบอไลต์เหล่านี้มีปริมาณที่สูงขึ้นเมื่อระยะเวลาในการให้น้ำนมภายหลังการคลอดลูกเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์จัดกลุ่มด้วย HCA พบว่า สารในน้ำนมเหลืองของโควันที่ 1 หลังการคลอดลูกของทั้ง 2 ฟาร์ม มีความใกล้เคียงกัน จึงถูกจัดกลุ่มให้อยู่ใกล้กัน สังเกตได้จากกลุ่มตัวอย่างสีแดง (■), สีส้มเข้ม (■), สีม่วงเข้ม (■) และสีน้ำเงิน (■) และสารในน้ำนมเหลืองของโควันที่ 3 หลังการคลอดลูกของทั้ง 2 ฟาร์ม มีความใกล้เคียงกัน จึงถูกจัดกลุ่มให้อยู่ใกล้กัน สังเกตได้จากกลุ่มตัวอย่างสีชมพู (■), สีส้มอ่อน (■), สีม่วงอ่อน (■) และสีฟ้า (■) แสดงดังภาพที่ 31 ซึ่งจากการวิเคราะห์ heat-map visualization และ HCA ในขั้นตอนนี้ ทำให้สามารถจำแนกกลุ่มของน้ำนมเหลืองในวันที่ 1 และวันที่ 3 หลังการคลอดลูกออกจากกันได้อย่างชัดเจน



ภาพที่ 31 วิเคราะห์โดยการจัดกลุ่ม ด้วยเทคนิค heat-map visualization และ hierarchical cluster analysis (HCA) ของโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ จากตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโค

■ ฟาร์ม A รอบที่ 1 เก็บวันที่ 1

■ ฟาร์ม A รอบที่ 2 เก็บวันที่ 1

■ ฟาร์ม B รอบที่ 1 เก็บวันที่ 1

■ ฟาร์ม B รอบที่ 2 เก็บวันที่ 1

■ ฟาร์ม A รอบที่ 1 เก็บวันที่ 3

■ ฟาร์ม A รอบที่ 2 เก็บวันที่ 3

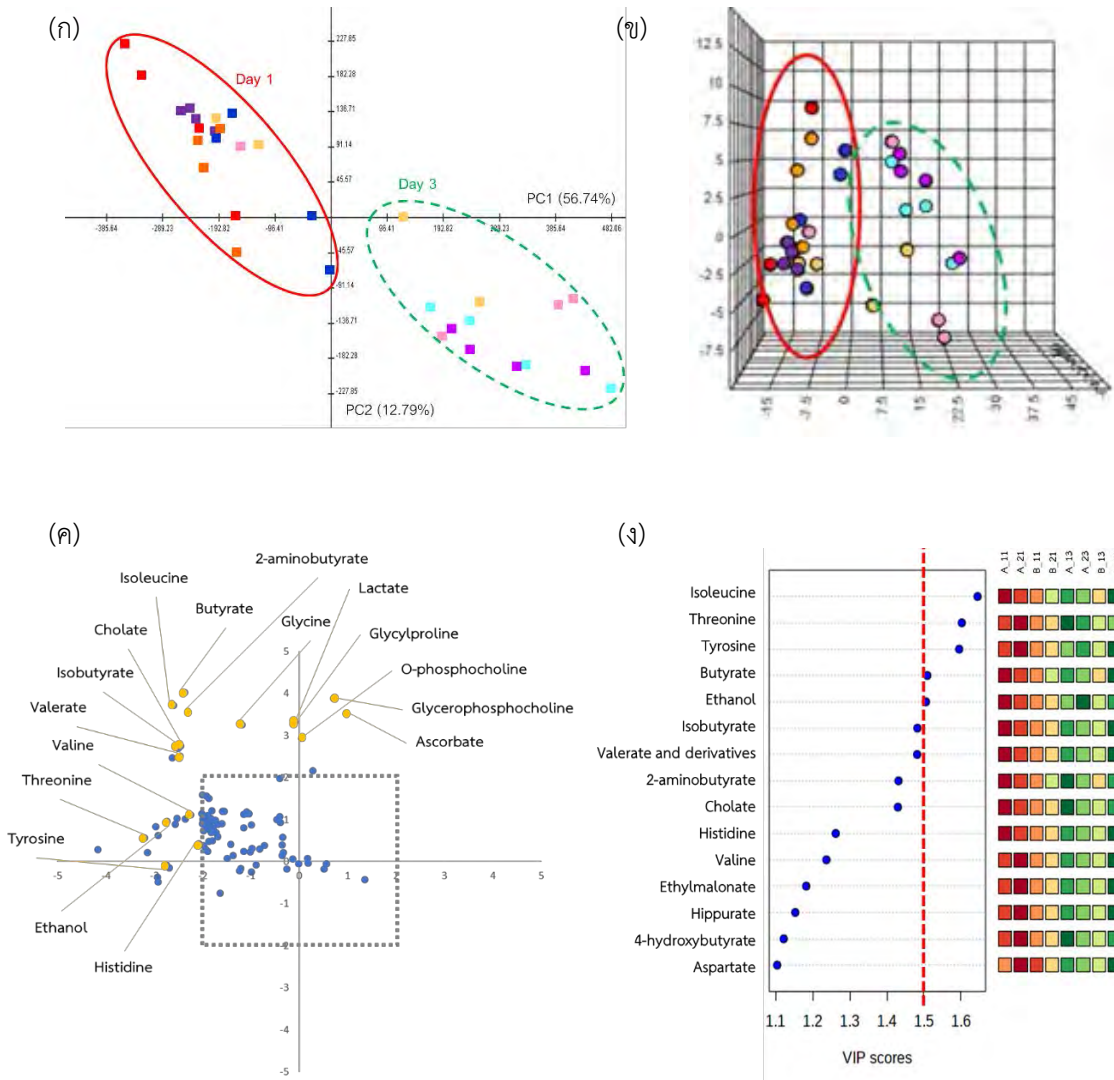
■ ฟาร์ม B รอบที่ 1 เก็บวันที่ 3 และ

■ ฟาร์ม B รอบที่ 2 เก็บวันที่ 3

4.3.3 การเปรียบเทียบโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโคทั้งหมด ($n=32$) จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ โดยการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal component analysis: PCA)

ในขั้นตอนนี้จะนำข้อมูลที่ได้มาจัดกลุ่มโดยการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (PCA) ซึ่งการจัดกลุ่มด้วยการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก พบว่า มีความแปรปรวนของตัวแปรรวมร้อยละ 69.53 โดย PC1 สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ร้อยละ 56.74 และ PC2 สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ ร้อยละ 12.79 โดยองค์ประกอบหลักนี้ จะประกอบด้วยโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบภายในน้ำนมเหลืองของโคที่เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อกลุ่มตัวอย่างทำให้สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างได้ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโควันที่ 1 หลังการคลอดลูก และ กลุ่มตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโควันที่ 3 หลังการคลอดลูก โดยผลที่ได้นี้สอดคล้องกับผลจาก HCA ที่แสดงดังภาพที่ 31 จะเห็นว่า โพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลในน้ำนมเหลืองของโควันที่ 1 หลังการคลอดลูก แตกต่างจากโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลในน้ำนมเหลืองของโควันที่ 3 หลังการคลอดลูกอย่างชัดเจน (ภาพที่ 32ก) นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาจากภาพที่ 32ก ในแต่ละกลุ่มตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่ม พบว่า มีความแปรปรวนที่เกิดขึ้นภายในกลุ่มตัวอย่าง เนื่องจากความแตกต่างของฟาร์มแต่ละฟาร์ม ส่งผลให้โพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลภายในน้ำนมเหลืองของโคมีความแปรปรวน โดยนอกจากปัจจัยระยะเวลาการให้น้ำนมภายหลังการคลอดลูกแล้ว ยังเกิดจากปัจจัยอื่นที่สามารถส่งผลต่อองค์ประกอบหลักทางเคมีในน้ำนมเช่นเดียวกัน เช่น ปริมาณของอาหารที่แม่โคกิน จะส่งผลต่อปริมาณและองค์ประกอบของน้ำนม (สุทธิศักดิ์ แก้วแกมจันทร์, 2546) รวมทั้ง ชนิดของอาหารที่แตกต่างกัน ส่งผลให้ปริมาณอิมมูโนโกลบูลินชนิด G และปริมาณไขมันในน้ำนมเหลืองแตกต่างกัน โคที่กินฟางข้าวจะให้ปริมาณอิมมูโนโกลบูลินชนิด G และปริมาณไขมันมากกว่าโคที่กินหญ้า (Dunn และคณะ, 2017)

จากนั้นนำข้อมูลมาพิจารณาค่าน้ำหนักองค์ประกอบของน้ำนมเหลืองแต่ละกลุ่มตัวอย่างจาก loading plots เป็นการยืนยันผลจาก PCA ที่ได้จากภาพที่ 32ก เพื่อหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อกลุ่มตัวอย่างจากผลการวิเคราะห์ แสดงให้เห็นว่า สารเมตาบอไลต์ดังภาพที่ 32ค ได้แก่ 2-aminobutyrate, ascorbate, butyrate, cholate, ethanol, glycine, glycerophosphocholone, glycyproline, histidine, isobutyrate, isoleucine, threonine, tyrosine, valine และ valerate มีปริมาณสัมพันธ์สูงในกลุ่มตัวอย่างน้ำนมเหลืองวันที่ 1 หลังการคลอด (ภาคผนวก จ ตารางที่ จ 2) และเมื่อพิจารณาค่าจาก VIP score พบว่า สามารถใช้ปริมาณสัมพันธ์ของ isoleucine, threonine, tyrosine, butyrate และ ethanol ที่มีปริมาณสัมพันธ์สูงในกลุ่มตัวอย่างน้ำนมเหลืองวันที่ 1 หลังการคลอด เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ เพื่อแยกความแตกต่างของตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่มได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Christiansen และคณะ (2010) และ Smith และคณะ (2018) ที่พบว่าปริมาณสัมพันธ์ของสารเหล่านี้สูงในน้ำนมเหลืองวันที่ 1 หลังการคลอดด้วยเช่นกัน



ภาพที่ 32 PCA 2D score plot (ก), PCA 3D score plot (ข), PC loading (ค) และ VIP score (ง) ของโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ จากตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโค (■) ฟาร์ม A รอบที่ 1 เก็บวันที่ 1, (■) ฟาร์ม A รอบที่ 2 เก็บวันที่ 1, (■) ฟาร์ม B รอบที่ 1 เก็บวันที่ 1, (■) ฟาร์ม B รอบที่ 2 เก็บวันที่ 1, (■) ฟาร์ม A รอบที่ 1 เก็บวันที่ 3, (■) ฟาร์ม A รอบที่ 2 เก็บวันที่ 3, (■) ฟาร์ม B รอบที่ 1 เก็บวันที่ 3 และ (■) ฟาร์ม B รอบที่ 2 เก็บวันที่ 3

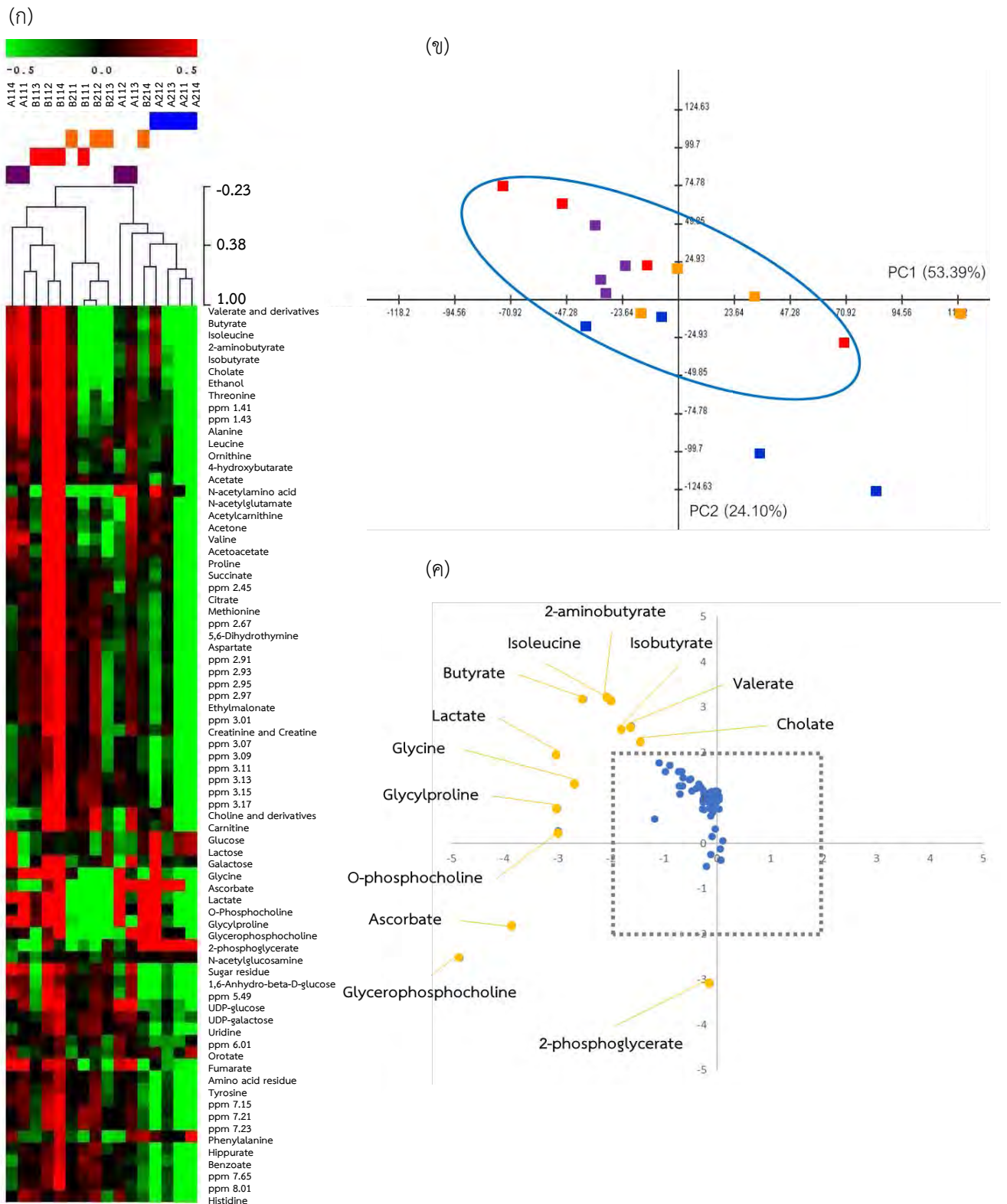
หมายเหตุ: ภาพ ค ● หมายถึง สารเมตาบอไลต์ที่มีค่า loading ไม่ถึง 2 และ unidentified metabolites

● หมายถึง สารเมตาบอไลต์ที่มีค่า loading ตั้งแต่ 2 ขึ้นไป

จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ และเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร สามารถแยกโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างน้ำนมเหลืองวันที่ 1 และวันที่ 3 หลังการคลอดได้ และหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อกลุ่มตัวอย่างของน้ำนมเหลืองที่มีระยะเวลาการให้น้ำนมภายหลังการคลอดแตกต่างกันได้ แต่อย่างไรก็ตาม เพื่อให้เห็นอิทธิพลจากปัจจัยฟาร์มชัดเจนขึ้น จึงนำตัวอย่างน้ำนมเหลืองที่เก็บในวันเดียวกันมาดำเนินการวิเคราะห์แยกอีกครั้ง

4.3.3.1 การเปรียบเทียบโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโควันที่ 1 ภายหลังจากการคลอดลูก ($n=16$) จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ โดย heat-map visualization และ hierarchical cluster analysis (HCA) และวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal component analysis: PCA)

ในขั้นตอนนี้จะนำข้อมูลที่ได้จากตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโควันที่ 1 หลังการคลอด มาวิเคราะห์โดยการจัดกลุ่มด้วยเทคนิค heatmap visualization และ HCA โดยโปรแกรมสำเร็จรูป Multi-Experiment Viewer (MeV) version 4.9 จากผลการวิเคราะห์ด้วย heat-map visualization (ภาพที่ 33ก) พบว่า น้ำนมเหลืองของโคที่มาจากฟาร์ม A รอบที่ 1 (■) และ B รอบที่ 1 (■) จะมีสีแดง และนมเหลืองของโคที่มาจากฟาร์ม A รอบที่ 2 (■) และ B รอบที่ 2 (■) จะมีสีเขียว ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นสัมพันธ์ของสารเมตาบอไลต์ส่วนมากจะมีค่าสูงในตัวอย่างรอบที่ 1 และลดลงในรอบที่ 2 และผลการวิเคราะห์กลุ่มด้วย HCA พบว่า สารในน้ำนมเหลืองที่ได้ มีความใกล้เคียงกันทั้ง 2 ฟาร์ม เมื่อนำข้อมูลมาจัดกลุ่มโดยการวิเคราะห์ PCA เพื่อทำให้เห็นความแตกต่างระหว่างตัวอย่างได้ชัดเจนขึ้น (ภาพที่ 33ข) พบว่า มีความแปรปรวนของตัวแปรรวมร้อยละ 77.48 โดย PC1 สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ร้อยละ 53.39 และ PC2 สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ร้อยละ 24.10 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า โพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบภายในน้ำนมเหลืองของกลุ่มตัวอย่างมีความใกล้เคียงกัน สอดคล้องกับผลวิเคราะห์สมบัติทางเคมีในภาพในข้อ 4.2 จากนั้นนำข้อมูลมาพิจารณาค่าน้ำหนักองค์ประกอบเพื่อหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อกลุ่มตัวอย่างของน้ำนมเหลืองแต่ละกลุ่มตัวอย่างจาก loading plots (ภาพที่ 33ค) แสดงให้เห็นว่า สารเมตาบอไลต์ ได้แก่ 2-aminobutyrate, butyrate, cholate, glycine, glycyproline, isobutyrate, isoleucine, o-phosphocholine และ valerate มีปริมาณสัมพันธ์สูงในตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโคที่มาจากฟาร์ม A รอบที่ 1 และ ฟาร์ม B รอบที่ 1

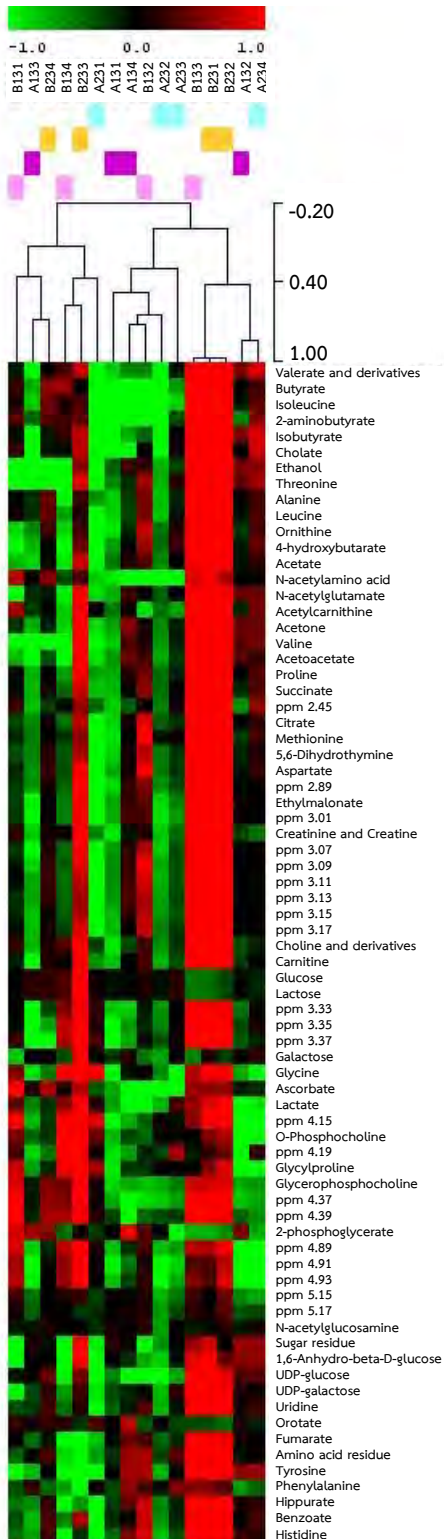


ภาพที่ 33 heat-map visualization และ hierarchical cluster analysis (HCA) (ก), PCA 2D score plot (ข) และ PC loading (ค) ของโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลที่ได้จากการ วิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ จากตัวอย่าง น้ำนมเหลืองของโควันที่ 1 จาก (■) ฟาร์ม A รอบที่ 1, (■) ฟาร์ม A รอบที่ 2, (■) ฟาร์ม B รอบที่ 1 และ (■) ฟาร์ม B รอบที่ 2 หมายถึง: ภาพ ค ● หมายถึง สารเมตาบอไลต์ที่มีค่า loading ไม่ถึง 2 และ unidentified metabolites และ ● หมายถึง สารเมตาบอไลต์ที่มีค่า loading ตั้งแต่ 2 ขึ้นไป

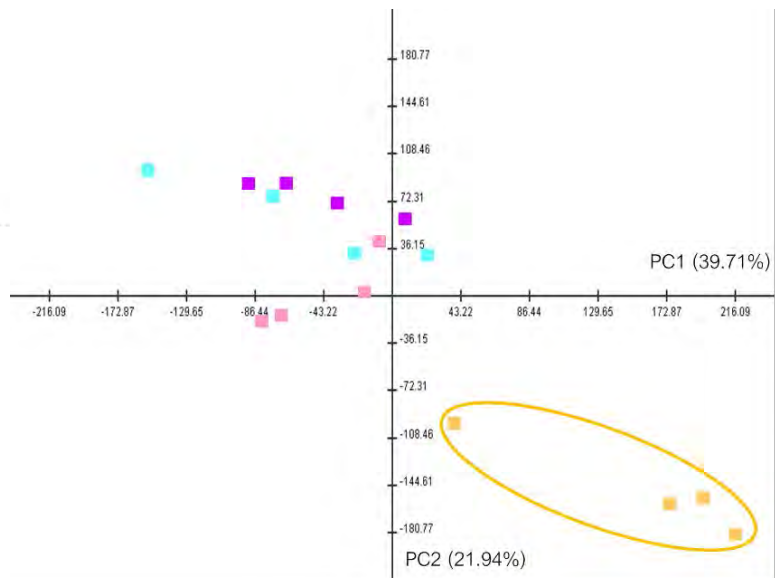
4.3.3.2 การเปรียบเทียบโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโควันที่ 3 ภายหลังจากคลอดลูก ($n=16$) จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ โดย heat-map visualization และ hierarchical cluster analysis (HCA) และวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal component analysis: PCA)

ในขั้นตอนนี้จะนำข้อมูลที่ได้จากตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโควันที่ 3 หลังการคลอด มาวิเคราะห์โดยการจัดกลุ่มด้วยเทคนิค heatmap visualization และ HCA โดยโปรแกรมสำเร็จรูป Multi-Experiment Viewer (MeV) version 4.9 จากผลการวิเคราะห์ด้วย heat-map visualization (ภาพที่ 34ก) พบว่า น้ำนมเหลืองของโคที่มาจากฟาร์ม B รอบที่ 1 (■) และรอบที่ 2 (■) จะมีสีแดง ส่วนตัวอย่างจากฟาร์ม A จะมีสีเขียว ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นสัมพันธ์ของสารเมตาบอไลต์ส่วนมากจะมีค่าสูงในตัวอย่างฟาร์ม B และผลการวิเคราะห์กลุ่มด้วย HCA พบว่า สารในน้ำนมเหลืองที่ได้ มีความใกล้เคียงกันทั้ง 2 ฟาร์ม เมื่อนำข้อมูลมาจัดกลุ่มโดยการวิเคราะห์ PCA เพื่อให้เห็นความแตกต่างระหว่างตัวอย่างได้ชัดเจนขึ้น (ภาพที่ 34ข) พบว่า มีความแปรปรวนของตัวแปรรวมร้อยละ 61.65 โดย PC1 สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ร้อยละ 39.71 และ PC2 สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ร้อยละ 21.94 พบว่า โพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบภายในน้ำนมเหลืองของกลุ่มตัวอย่างจากฟาร์ม B รอบที่ 2 (■) มีความแตกต่างจากตัวอย่างอื่น ๆ อย่างชัดเจน ซึ่งสัมพันธ์กับค่าความหนืดจากผลวิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพในข้อ 4.2.5 จากนั้นนำข้อมูลมาพิจารณาค่าน้ำหนักองค์ประกอบเพื่อหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อกลุ่มตัวอย่างของน้ำนมเหลืองแต่ละกลุ่มตัวอย่างจาก loading plots (ภาพที่ 34ข) แสดงให้เห็นว่า สารเมตาบอไลต์ ได้แก่ 2-aminobutyrate, ascorbate, butyrate, cholate, ethanol, histidine, isobutyrate, isoleucine, valine และ valerate มีปริมาณสัมพันธ์สูงในกลุ่มตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโคที่มาจากฟาร์ม B รอบที่ 2

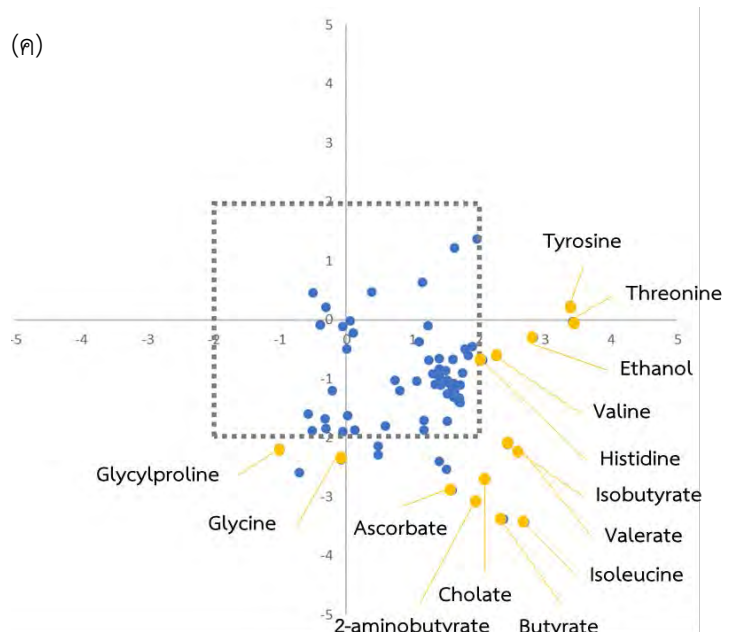
(ก)



(ข)



(ค)

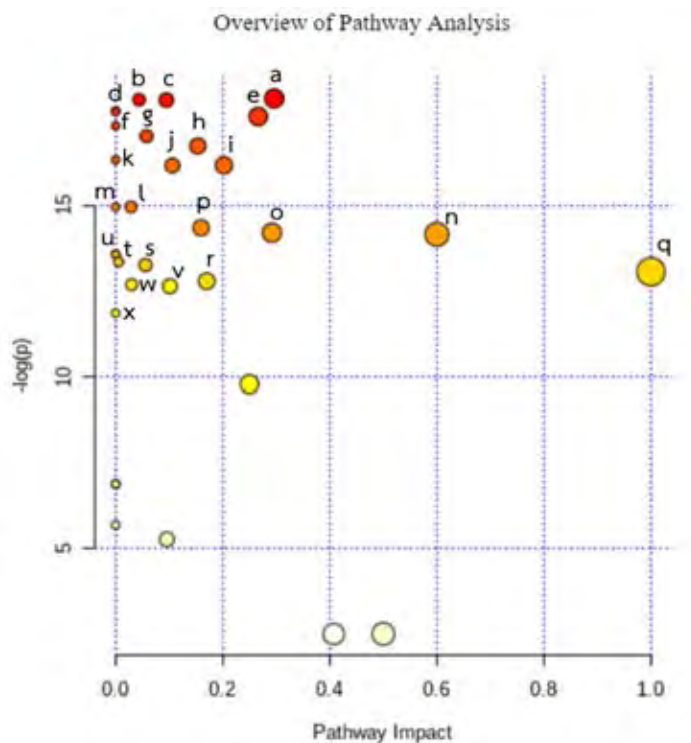


ภาพที่ 34 heat-map visualization และ hierarchical cluster analysis (HCA) (ก), PCA 2D score plot (ข) และ PC loading (ค) ของโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลที่ได้จากการ วิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ จากตัวอย่าง น้ำนมเหลืองของโควันที 3 จาก (■) ฟาร์ม A รอบที่ 1, (■) ฟาร์ม A รอบที่ 2, (■) ฟาร์ม B รอบที่ 1 และ (■) ฟาร์ม B รอบที่ 2 หมายเหตุ: ภาพ ค ● หมายถึง สารเมตาบอไลต์ที่มีค่า loading ไม่ถึง 2 และ unidentified metabolites และ ● หมายถึง สารเมตาบอไลต์ที่มีค่า loading ตั้งแต่ 2 ขึ้นไป

จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ และเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างน้ำมันเหลืองด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร แสดงให้เห็นว่า อิทธิพลจากปัจจัยระยะเวลาหลังการคลอดมีอิทธิพลต่อข้อมูลเมตาโบโลมของน้ำมันเหลืองเด่นชัดว่าปัจจัยจากฟาร์ม ดังนั้น จึงนำข้อมูลโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างน้ำมันเหลืองวันที่ 1 และวันที่ 3 หลังการคลอด มาวิเคราะห์หาสารที่แตกต่างกันระหว่างสองกลุ่มตัวอย่างจากวิถีเมตาบอลิซึมของสารเมตาบอไลต์นั้นด้วย pathway analysis และวิเคราะห์ตำแหน่งของสารเมตาบอไลต์ที่สามารถเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในวิถีเมตาบอลิซึมที่เกี่ยวข้องด้วย KEGG's pathway analysis

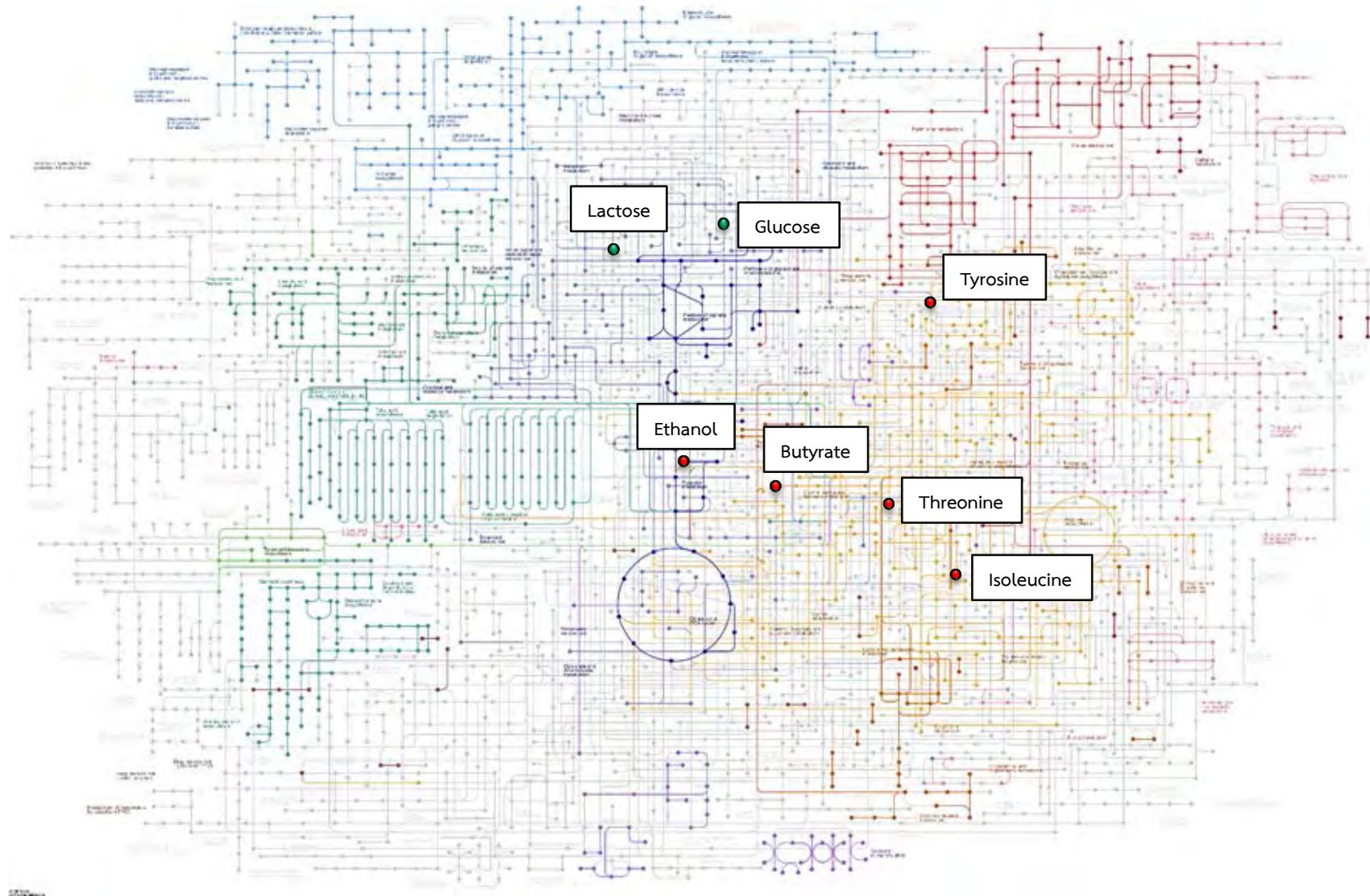
4.3.4 การวิเคราะห์หาสารเมตาบอไลต์ที่แตกต่างกันระหว่างสองกลุ่มตัวอย่างจากวิถีเมตาบอลิซึมของสารเมตาบอไลต์นั้นด้วย pathway analysis และ การคำนวณวิถีเมตาบอลิซึมที่เกี่ยวข้องด้วย KEGG's pathway analysis

จากข้อมูลโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของน้ำมันเหลืองของโควันที่ 1 และวันที่ 3 หลังการคลอด เมื่อนำมาวิเคราะห์หาสารเมตาบอไลต์ที่แตกต่างกันจากวิถีเมตาบอลิซึมของสารเมตาบอไลต์นั้นด้วย pathway analysis แสดงดังภาพที่ 35 พบว่า มีวิถีเมตาบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับสารเมตาบอไลต์ที่แตกต่างกันระหว่างน้ำมันเหลืองของโควันที่ 1 และวันที่ 3 หลังคลอด ได้แก่ (a) glyoxylate and dicarboxylate metabolism, (b) pyrimidine metabolism, (c) cysteine and methionine metabolism, (d) selenoamino acid metabolism, (e) histidine metabolism, (f) beta-alanine metabolism, (g) galactose metabolism, (h) alanine, aspartate and glutamate metabolism, (i) arginine and proline metabolism, (j) citrate cycle (TCA cycle), (k) aminoacyl-tRNA biosynthesis, (l) glycolysis or gluconeogenesis, (m) nitrogen metabolism, (n) synthesis and degradation of ketone bodies, (o) glycine, serine and threonine metabolism, (p) amino sugar and nucleotide sugar metabolism, (q) valine, leucine and isoleucine biosynthesis, (r) starch and sucrose metabolism, (s) pyruvate metabolism, (t) glutathione metabolism, (u) pantothenate and CoA biosynthesis, (v) butanoate metabolism, (w) primary bile acid biosynthesis and (x) tyrosine metabolism ดังภาพที่ 19



ภาพที่ 35 การวิเคราะห์วิถีเมตาบอลิซึม (pathway analysis) ของสารเมตาบอไลต์ที่แตกต่างกันระหว่าง น้ำนมเหลืองของโควันที่ 1 และวันที่ 3 หลังการคลอด

จากการตรวจสอบสารเมตาบอไลต์ที่เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในแต่ละกลุ่มตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโคที่มีระยะเวลาการให้น้ำนมแตกต่างกันจากค่าของ VIP score จะนำข้อมูลสารเมตาบอไลต์ที่ใช้สามารถเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพจากตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโค ได้แก่ isoleucine, threonine, tyrosine, butyrate และ ethanol มาวิเคราะห์ตำแหน่งในวิถีเมตาบอลิซึมจากข้อมูล complete genome sequencing ของโคนม ด้วย KEGG's pathway analysis (<https://www.metaboanalyst.ca>) (ภาพที่ 36) โดย isoleucine, threonine, tyrosine และ butyrate พบได้ในวิถีเมตาบอลิซึมของกรดอะมิโน (amino acid metabolism) และ ethanol พบได้ในวิถีเมตาบอลิซึมของกรดไพรูวิก (pyruvate metabolism) และสำหรับ lactose และ glucose ซึ่งมีปริมาณสัมพัทธ์สูงในตัวอย่างที่ได้จากวันที่ 3 พบได้ในวิถีเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate metabolism)



ภาพที่ 36 KEGG's pathway analysis ที่มา : <https://www.genome.jp/kegg/>

เมื่อพิจารณาถึงความสำคัญของสารแต่ละตัวพบว่า isoleucine อยู่ใน valine, leucine and isoleucine biosynthesis โดยในน้ำนมเหลืองของโคจะมีปริมาณ isoleucine เท่ากับ $18071.33 \pm 954.55 \mu\text{g/L}$ ซึ่งมีปริมาณมากเมื่อเทียบกับกรดอะมิโนตัวอื่น และในน้ำนมเหลืองของคนจะมีปริมาณ isoleucine เท่ากับ $1178.33 \pm 85.85 \mu\text{g/L}$ ซึ่งมีน้อยกว่าน้ำนมเหลืองของโคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (liang และคณะ, 2018) ซึ่ง isoleucine เป็นกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของร่างกาย อีกทั้งช่วยเพิ่มความแข็งแรงของกล้ามเนื้อ และสร้างพลังงานให้แก่ลูกโค (Zhao และคณะ, 2018)

สำหรับ threonine และ butyrate เป็นกรดอะมิโนที่อยู่ในวิถีเมตาบอลิซึมของ ไกลซีน เซอรีน และ ทรีโอนีน โดยปริมาณ threonine ในน้ำนมเหลืองของโคเท่ากับ $1685.33 \pm 131.70 \mu\text{g/L}$ และ ปริมาณ threonine ในน้ำนมเหลืองของคนเท่ากับ $9595.67 \pm 1241.55 \mu\text{g/L}$ ซึ่งมีมากกว่าน้ำนมเหลืองของโคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (liang และคณะ, 2018) โดย threonine เป็นกรดอะมิโนจำเป็น ที่พบมากในอิมมูโกลบูลินชนิด G ซึ่งเป็นสารสร้างภูมิคุ้มกัน ดังนั้น threonine จึงมีส่วนช่วยในการพัฒนาระบบภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้ ยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับการพัฒนาระบบประสาทส่วนกลางของลูกโคแรกเกิด (Smith และคณะ, 2018) และสำหรับ butyrate ในน้ำนมเหลืองของโค จะพบอยู่ในรูปแบบของ Butyric acid ซึ่งจะอยู่ใน 3 รูปแบบ คือ gamma-aminobutyric acid, alpha-aminobutyric acid และ beta-amino butyric acid โดยทั้ง 3 ตัวนี้มีปริมาณในน้ำนมเหลืองของโคเท่ากับ $521.00 \pm 52.00 \mu\text{g/L}$, $683.33 \pm 54.60 \mu\text{g/L}$ และ $146.33 \pm 14.51 \mu\text{g/L}$ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับน้ำนมเหลืองของคน จะมีปริมาณ gamma-aminobutyric acid, alpha-aminobutyric acid และ beta-amino butyric acid เท่ากับ $903.00 \pm 65.34 \mu\text{g/L}$, $1911.00 \pm 86.71 \mu\text{g/L}$ และ $96.00 \pm 10.00 \mu\text{g/L}$ ตามลำดับ ซึ่งหากนำปริมาณของสารทั้ง 3 ตัวมาคิดความแตกต่างทางสถิติจะพบว่า alpha-aminobutyric acid มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วน gamma-aminobutyric acid และ beta-aminobutyric acid ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างน้ำนมเหลืองของโค และน้ำนมเหลืองของคน (liang และคณะ, 2018) โดย butyrate เป็นกรดอะมิโนที่ช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตหลังลูกโคคลอด นอกจากนี้ ยังช่วยส่งเสริมการทำงานของระบบขับถ่ายในลูกโค (Jendrossek และคณะ, 1964)

สำหรับ tyrosine เป็นกรดอะมิโนที่อยู่ใน tyrosine metabolism ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ $1903.00 \pm 53.45 \mu\text{g/L}$ ในน้ำนมเหลืองของโค และมีปริมาณเท่ากับ $2208.33 \pm 139.41 \mu\text{g/L}$ ในน้ำนมเหลืองของคน เมื่อนำมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติจะพบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (liang และคณะ, 2018) โดย tyrosine จะเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของวิถีเมตาบอลิซึมของไทโรซีน ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของวิถีเมตาบอลิซึมของกรดไพรูวิกที่ใช้สร้างพลังงานให้กับร่างกาย นอกจากนี้ tyrosine ยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับการสร้างสารสื่อประสาท และ การพัฒนาการของสมองลูกโค (Zhang และคณะ, 2017)

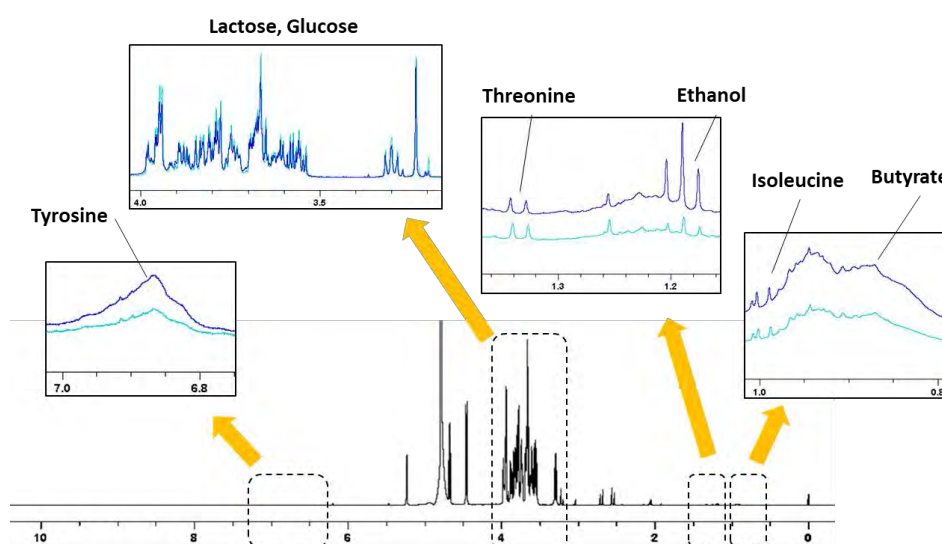
สำหรับ lactose และ glucose พบได้ในวิถีเมตาบอลิซึมของกาแลคโตส โดยจะมีปริมาณมากในวันที่ 3 ซึ่งเป็นช่วงเปลี่ยนผ่านของน้ำนม (transition milk) โดยปริมาณ lactose ในน้ำนมเหลืองของโคคิดเป็น 2.7% และในน้ำนมปกติของโคคิดเป็น 4.4% จากงานวิจัยของ Scheuer และคณะ (2006) กล่าวว่า ในช่วงเปลี่ยนผ่านของน้ำนม

ลูกโคแรกเกิดจะมีการใช้พลังงานมากในการสร้างสารสำคัญต่าง ๆ ซึ่ง lactose และ glucose เป็นสารตั้งต้นในการสร้างพลังงานให้กับลูกโค

จากสารเมตาบอไลต์ที่เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพดังที่กล่าวมาข้างต้น จะนำรูปแบบสเปกตรัมของตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโควันที่ 1 และวันที่ 3 หลังการคลอดลูกมาเปรียบเทียบกัน เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างในเชิงปริมาณที่ชัดเจนมากขึ้น รวมทั้ง เปรียบเทียบความแตกต่างในเชิงคุณภาพของสารเมตาบอไลต์ในน้ำนมดิบกับน้ำนมเหลืองของโคจากโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างน้ำนมดิบกับโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโค

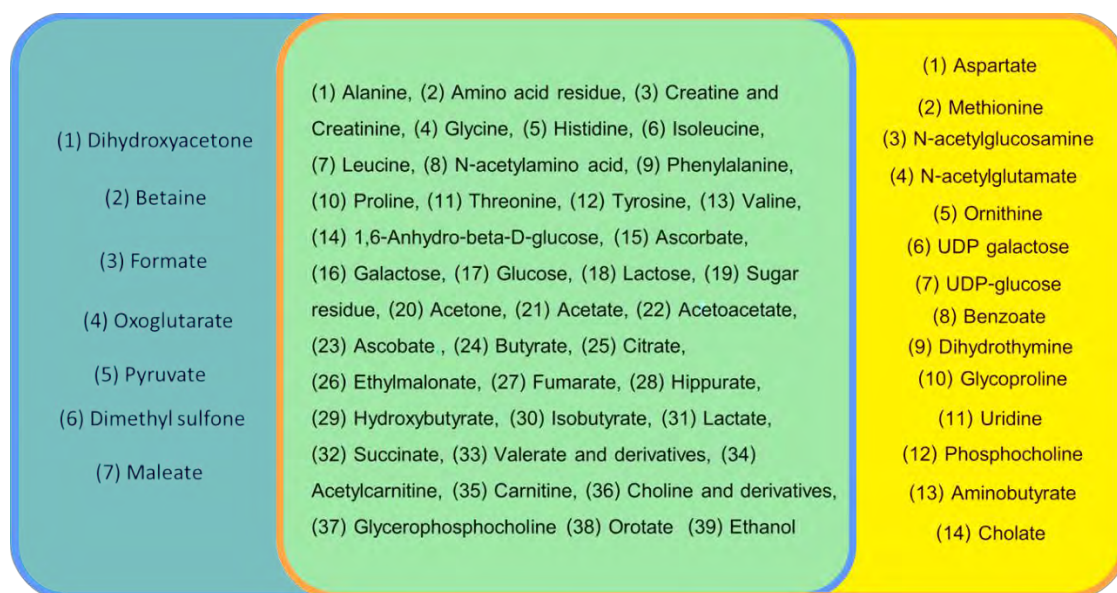
4.3.5 การเปรียบเทียบ NMR spectra ของตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโควันที่ 1 และวันที่ 3 หลังการคลอดลูกที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ และการเปรียบเทียบสารเมตาบอไลต์ระหว่างน้ำนมดิบกับน้ำนมเหลืองของโค

การวิเคราะห์ในขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของสารเมตาบอไลต์ที่เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในแต่ละกลุ่มตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโคที่มีระยะเวลาการให้น้ำนมแตกต่างกันให้มีความชัดเจนมากขึ้นในเชิงปริมาณ (ภาคผนวก จ ตารางที่ จ2) จากสเปกตรัมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ โดยภาพที่ 37 แสดงให้เห็นว่า เมื่อเปรียบเทียบสเปกตรัมน้ำนมเหลืองของโควันที่ 1 และ 3 หลังการคลอด isoleucine, threonine, tyrosine, butyrate และ ethanol ใน spectra ของน้ำนมเหลืองของโควันที่ 1 สูงมากกว่าวันที่ 3 หลังการคลอด ซึ่งสอดคล้องกับการเปรียบเทียบสารเมตาบอไลต์ในแต่ละกลุ่มตัวอย่างด้วย PCA ในข้อ 4.3.3 ที่แสดงให้เห็นว่า สารตั้งที่กล่าวมาข้างต้น เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อกลุ่มตัวอย่างของน้ำนมเหลืองวันที่ 1 หลังการคลอด และจากระดับสารเมตาบอไลต์ของ glucose และ lactose ใน spectra ของน้ำนมเหลืองของโควันที่ 3 สูงมากกว่าวันที่ 1 หลังการคลอด ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ด้วย heat-map visualization และ HCA ในข้อ 4.3.2



ภาพที่ 37 เปรียบเทียบ NMR spectra น้ำนมเหลืองของโควันที่ 1 (■) และวันที่ 3 (■) หลังการคลอด

นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบในเชิงคุณภาพระหว่างโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างน้ำนมดิบกับโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโค (ภาพที่ 38) พบว่า มีสารเมตาบอไลต์จำนวน 8 เมตาบอไลต์ ที่พบได้เฉพาะในน้ำนมดิบ ได้แก่ betanine, dihydroxyacetone, dimethyl sulfone, formate, maleate, oxoglutarate, propylene glycol และ pyruvate สารเมตาบอไลต์จำนวน 15 เมตาบอไลต์ที่พบได้เฉพาะในน้ำนมเหลืองของโค ได้แก่ 2-aminobutyrate, aspartate, benzoate, cholate, dihydrothymine, glycylproline, histidine, methionine, N-acetylglucosamine, N-acetylglutamate, O-phosphocholine, ornithine, UDP-galactose, UDP-glucose และ uridine และมีสารเมตาบอไลต์ที่สามารถพบได้ทั้งในน้ำนมดิบและน้ำนมเหลืองของโค 38 เมตาบอไลต์ ได้แก่ alanine, amino acid residue, creatine and creatinine, glycine, histidine, isoleucine, leucine, N-acetylamino acid, phenylalanine, proline, threonine, tyrosine, valine, 1,6-Anhydro-beta-D-glucose, ascorbate, galactose, glucose, lactose, sugar residue, acetone, acetate, acetoacetate, ascobate, butyrate, citrate, ethylmalonate, fumarate, hippurate, hydroxybutyrate, isobutyrate, lactate, succinate, valerate and derivatives, acetylcarnitine, carnitine, choline and derivatives, glycerophosphocholine, orotate และ ethanol แสดงให้เห็นว่า สารเมตาบอไลต์ในน้ำนมเหลืองของโคมีมากกว่าในน้ำนมดิบ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบสารเมตาบอไลต์ในน้ำนมเหลืองของโคมากกว่าน้ำนมดิบ (Ilves และคณะ, 2012) หากต้องการเปรียบเทียบในเชิงปริมาณจะตื่อนำค่า dilution factor มาคำนวณ จากการเจือจางตัวอย่างน้ำนมเหลืองในงานวิจัยนี้ตามที่กล่าวไว้ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างตั้งข้อ 3.2.5.1



ภาพที่ 38 แผนภาพเวนน์ (Venn Diagram) ของสารเมตาบอไลต์ที่พบในตัวอย่างน้ำนมดิบ (■), น้ำนมเหลืองของโค (■) และทั้งสองตัวอย่าง (■)

จากการศึกษาในงานวิจัยนี้ แสดงให้เห็นว่า การวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ ร่วมกับการเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร สามารถวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากในน้ำนมเหลืองของโคได้ทั้งหมด 53 สารเมตาบอไลต์ และมี 14 สารเมตาบอไลต์ที่พบเฉพาะในน้ำนมในน้ำนมเหลืองของโค ซึ่งมีมากกว่าในน้ำนมดิบ จากการวิเคราะห์ด้วย PCA และ hierarchical cluster analysis แสดงให้เห็นว่า เมื่อเปรียบเทียบอพิทพลจากฟาร์ม โพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของน้ำนมเหลืองของโควันที่ 1 หลังการคลอดมีความใกล้เคียงกันทั้ง 2 ฟาร์ม สอดคล้องกับผลวิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพ ได้แก่ ปริมาณกรดทั้งหมดที่ได้จากการไทเทรต, ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้, ดัชนีความเหลือง, ค่าความหนืด และ ปริมาณโปรตีน และโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของน้ำนมเหลืองของโควันที่ 3 หลังการคลอดกลุ่มตัวอย่างจากฟาร์ม B รอบที่ 2 มีความแตกต่างจากตัวอย่างอื่น ๆ อย่างชัดเจน สอดคล้องกับผลวิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพ ที่ตัวอย่างน้ำนมเหลืองในวันที่ 3 ของฟาร์ม B มีค่าสูงกว่าฟาร์ม A อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และ เมื่อเปรียบเทียบจากระยะเวลาในการให้น้ำนมเหลือง สารเมตาบอไลต์ของกลุ่มตัวอย่างน้ำนมเหลืองวันที่ 1 จะมีปริมาณสัมพัทธ์สูงกว่า วันที่ 3 หลังการคลอด ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพ ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่า ระยะเวลาในการให้น้ำนมเหลืองหลังการคลอดลูก (post-parturition) มีผลต่อสมบัติทางเคมีกายภาพและข้อมูลสารชีวโมเลกุลในน้ำนมเหลืองชัดเจนกว่าปัจจัยจากฟาร์ม ดังนั้น จากข้อมูลในงานวิจัยนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรมในอนาคตที่มีการนำน้ำนมเหลืองของโคไปประยุกต์ใช้เพื่อเป็น functional ingredient ในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ได้ เช่น การเพิ่มปริมาณโปรตีนจากน้ำนมเหลืองในผลิตภัณฑ์กลุ่มนมผงเด็ก, ผลิตภัณฑ์เสริมโปรตีนสำหรับผู้สูงอายุ รวมถึง การประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์ประเภทเครื่องสำอาง โดยแสดงให้เห็นว่าคุณภาพและองค์ประกอบของน้ำนมเหลืองในวันแรกจากฟาร์มทั้งสองแห่งมีความใกล้เคียงกัน จึงสามารถควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบน้ำนมเหลืองที่จะนำมาใช้ในอุตสาหกรรมได้ เนื่องจาก คุณภาพของน้ำนมเหลืองจะลดลงเมื่อระยะเวลาผ่านไป หากอุตสาหกรรมต้องการรับซื้อ จะสามารถประเมินราคาและตรวจสอบคุณภาพได้จากการตรวจสอบองค์ประกอบของน้ำนม จากการวิเคราะห์ด้วยสมบัติทางเคมีกายภาพและการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ รวมทั้ง สามารถนำสารเมตาบอไลต์ที่เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ ซึ่งได้แก่ isoleucine, threonine, tyrosine, butyrate และ ethanol มาเป็นตัวช่วยควบคุมคุณภาพเพื่อแยกความแตกต่างระหว่างน้ำนมเหลืองที่ได้จากวันที่ 1 และวันที่ 3 หลังการคลอดลูกได้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ (i) ศึกษาข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของน้ำนมเหลืองจากโค โดยใช้เทคนิค $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy, (ii) เปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลระหว่างน้ำนมเหลืองของแม่โคที่เลี้ยงโดยมีระบบการให้อาหารและอิทธิพลจากฟาร์มต่างกัน, (iii) เปรียบเทียบความผันแปรของข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลระหว่างน้ำนมเหลืองที่ได้จากแม่โคที่มีระยะเวลาในการให้น้ำนมเหลืองแตกต่างกัน และ (iv) วิเคราะห์ชนิดของสารเมตาบอไลต์ที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (potential biomarker) ต่อคุณลักษณะและความผันแปรของน้ำนมเหลืองจากแม่โคกลุ่มที่สนใจได้ โดยงานวิจัยนี้ใช้ตัวอย่างน้ำนมเหลืองจากฟาร์มโคนมในเขตพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยทั้งหมด 2 ฟาร์ม โดยแต่ละฟาร์มจะเก็บน้ำนมเหลือง 2 รอบ แต่ละรอบเก็บมาจากแม่โค 4 ตัว และแต่ละตัวจะเก็บ 2 ครั้ง คือ วันที่ 1 และ วันที่ 3 หลังจากการคลอดลูก คิดเป็นจำนวนทั้งหมด 32 ตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างจะแบ่งออกเป็น 2 ส่วน สำหรับการตรวจวิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพ และ สำหรับการตรวจวิเคราะห์ข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของน้ำนมเหลืองของโคโดยใช้เทคนิค $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy

(i) ผลจากการวิเคราะห์น้ำนมเหลืองของโค โดยใช้เทคนิค $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy แสดงให้เห็นว่าเทคนิคดังกล่าวสามารถใช้ศึกษาสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากในน้ำนมเหลืองของโคได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยสามารถระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ในน้ำนมเหลืองของโคได้ทั้งหมด 53 สาร ครอบคลุมสารประกอบในกลุ่มกรดอะมิโนและอนุพันธ์ของกรดอะมิโน น้ำตาลและอนุพันธ์ของน้ำตาล สารประกอบคาร์บอนิล กรดอินทรีย์ และอนุพันธ์ของกรดดังกล่าว อนุพันธ์ของไขมัน และสารประกอบอินทรีย์อื่น ๆ และเมื่อนำข้อมูลสารเมตาบอไลต์ที่ตรวจพบมาเปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ในตัวอย่างน้ำนมดิบจากงานวิจัยของ มยุรี เหลืองวิสัย (2560) พบว่า มี 7 สารเมตาบอไลต์ที่พบเฉพาะในน้ำนมดิบ 14 สารเมตาบอไลต์ที่พบเฉพาะในน้ำนมในน้ำนมเหลืองของโค และ 38 สารเมตาบอไลต์ที่พบได้ในน้ำนมทั้งสองชนิด ซึ่งแสดงให้เห็นว่า มีสารเมตาบอไลต์ที่พบได้ในน้ำนมเหลืองมากกว่าน้ำนมดิบ

(ii) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลระหว่างน้ำนมเหลืองของแม่โคที่เลี้ยงโดยมีระบบการให้อาหารและอิทธิพลจากฟาร์มต่างกัน พบว่า ความแตกต่างระหว่างฟาร์มในกลุ่มตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโควันที่ 1 หลังการคลอด มีโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบภายในน้ำนมเหลืองใกล้เคียงกัน ซึ่งสอดคล้องกับผลวิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพ ซึ่งได้แก่ ผลการวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และปริมาณกรดทั้งหมดที่ได้จากการไทเทรต (titratable acidity), ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ ($^{\circ}\text{Brix}$), ค่าสี, ค่าความหนืด (viscosity) และ ปริมาณโปรตีน ที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

แต่เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างฟาร์มในกลุ่มตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโควันที่ 3 หลังการคลอด พบว่า โพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบภายในน้ำนมเหลืองของกลุ่มตัวอย่างจากฟาร์ม B รอบที่ 2 มีความแตกต่างจากตัวอย่างอื่น ๆ อย่างชัดเจน และสำหรับผลการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพ แสดงให้เห็นว่า ปริมาณกรดทั้งหมดที่ได้จากการไทเทรต, ดัชนีความเหลือง, ค่าความหนืด และ ปริมาณโปรตีน ของตัวอย่างน้ำนมเหลืองในวันที่ 3 ของฟาร์ม B มีค่าสูงกว่าฟาร์ม A อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

(iii) เมื่อเปรียบเทียบความผันแปรของข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลระหว่างน้ำนมเหลืองที่ได้จากแม่โคที่มีระยะเวลาในการให้น้ำนมเหลืองแตกต่างกัน พบว่า สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างได้ออกเป็น 2 กลุ่มได้อย่างชัดเจน คือ กลุ่มตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโควันที่ 1 และ กลุ่มตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโควันที่ 3 หลังการคลอด ลูก โดยผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCA ร่วมกับ loading plot แสดงให้เห็นว่า สารเมตาบอไลต์ส่วนมากจะมีปริมาณสัมพันธ์สูงในกลุ่มตัวอย่างน้ำนมเหลืองวันที่ 1 หลังการคลอด ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพที่แสดงให้เห็นว่า ปริมาณกรดทั้งหมดที่ได้จากการไทเทรต, ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้, ดัชนีความเหลือง, ค่าความหนืด และ ปริมาณโปรตีน ของตัวอย่างน้ำนมเหลืองวันที่ 1 สูงกว่าวันที่ 3 หลังการคลอด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และจากผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค heat-map visualization และ HCA แสดงให้เห็นว่า สารเมตาบอไลต์ในกลุ่มน้ำตาลและอนุพันธ์ของน้ำตาล เช่น น้ำตาลแลคโตส และน้ำตาลกลูโคส มีปริมาณสัมพันธ์สูงในกลุ่มตัวอย่างน้ำนมเหลืองวันที่ 3 หลังการคลอด

(iv) ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่า ระยะเวลาในการให้น้ำนมเหลืองหลังการคลอดลูก (post-parturition) มีผลต่อสมบัติทางเคมีกายภาพและข้อมูลสารชีวโมเลกุลในน้ำนมเหลืองชัดเจนกว่าปัจจัยจากฟาร์ม ดังนั้น และสามารถใช้อัตราสัมพันธ์ของ isoleucine, threonine, tyrosine, butyrate และ ethanol ที่มีปริมาณสัมพันธ์สูงในกลุ่มตัวอย่างน้ำนมเหลืองวันที่ 1 หลังการคลอด เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อแยกความแตกต่างระหว่างน้ำนมเหลืองที่ได้จากวันที่ 1 และวันที่ 3 หลังการคลอดลูกได้

จากผลการศึกษาทั้งหมดในงานวิจัยนี้ แสดงให้เห็นว่า การประยุกต์ใช้เทคนิคทางเคมีวิเคราะห์ขั้นสูงด้วย $^1\text{H-NMR}$ ร่วมกับการประมวลผลทางเคโมเมตริกซ์ (chemometrics) สามารถใช้ในการศึกษาข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลในน้ำนมเหลืองของโคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

5.2 ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากงานวิจัยในปัจจุบันของประเทศไทยที่มีการนำเทคโนโลยีเมตาโบโลมิกส์มาใช้ในการศึกษาข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของน้ำนมและน้ำนมเหลืองยังมีอยู่อย่างจำกัด จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า การวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ในตัวอย่างน้ำนมเหลืองของโคด้วย $^1\text{H-NMR}$ และเปรียบเทียบข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร สามารถแยกความแตกต่างของน้ำนมเหลืองของโคกลุ่มที่สนใจได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในอนาคตอาจจะมีการพัฒนาข้อมูล โดยการเปรียบเทียบข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลระหว่างน้ำนมเหลืองกับน้ำนมดิบของโคที่มาจากฟาร์มเดียวกัน เพิ่มจำนวนตัวอย่างน้ำนมเหลืองที่นำมาใช้ในการทดลองและขยายการทดสอบไปยังกลุ่มตัวอย่างที่มาจากฟาร์มในเขตพื้นที่อื่น ๆ เช่น ฟาร์มในเขตพื้นที่ภาคกลาง, ฟาร์มในเขตพื้นที่ภาคใต้ เป็นต้น เพื่อตรวจสอบความใช้ได้ของผลการวิเคราะห์ และ อาจจะนำวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวไปประยุกต์ใช้เพื่อศึกษาผลของปัจจัยอื่น ๆ เช่น สายพันธุ์ อาหาร ระยะเวลาให้นม ฤดูกาล หรือสุขภาวะด้านอื่น ๆ ของแม่โค ที่ส่งผลให้ข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลในน้ำนมเหลืองเปลี่ยนไป นอกจากนี้ อาจนำเทคนิคในงานวิจัยนี้ไปประยุกต์ใช้เพื่อศึกษาความแตกต่างของโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลในน้ำนมเหลืองจากสัตว์ชนิดอื่น ๆ เช่น หมู แพะ แกะ และกระบือ เป็นต้น รวมถึง ศึกษาความแตกต่างของโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลผลิตภัณฑ์นม หรือผลิตภัณฑ์อาหารประเภทอื่น ๆ เพื่อใช้ในการระบุอัตลักษณ์ของผลิตภัณฑ์เหล่านั้น

เอกสารอ้างอิง

- กลุ่มวิจัยและพัฒนาโคนม, สำนักพัฒนาพันธุ์สัตว์. กรมปศุสัตว์, 2553. พันธุ์โคนม [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://breeding.dld.go.th/dairy/index.php/dairy-breed> [14 มกราคม 2562]
- กฤตพล, นิโรจน์ และคณะ. ผลของการเสริมเมล็ดฝ้ายทดแทนอาหารชั้นในโครีตนม [ออฟไลน์]. 2542. แหล่งที่มา: http://resjournal.kku.ac.th/article/4_2_37.pdf [18 กันยายน 2561]
- เกษตรและสหกรณ์, กระทรวง. สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. มกษ. 60032553. มาตรฐานสินค้าเกษตร เรื่อง น้ํานมโคดิบ [ออนไลน์]. 2553. แหล่งที่มา: http://www.acfs.go.th/standard/download/raw_cow_milk.pdf [11 ตุลาคม 2561]
- เกษตรและสหกรณ์, กระทรวง. กรมปศุสัตว์. มาตรฐานวิธีตรวจคุณภาพน้ํานมดิบ [ออนไลน์]. 2553. แหล่งที่มา: http://km.dld.go.th/th/images/stories/document/division/qcontrol/documents/std_chkmilk.pdf [20 มกราคม 2560]
- จิตธนา แจ่มเมฆ. 2549. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร, คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ธนวิทย์ โพธิ์ศรี. 2540. นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี. MTEC (มกราคม-มีนาคม 2540): 67-70.
- ธีรยุทธ วิไลวัลย์ และวรวรรณ พันธมนำวิน. นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ สเปกโทรสโกปี [ออฟไลน์]. 2548. แหล่งที่มา: www.chemistry.sc.chula.ac.th/course_info/2302275/ir265.pdf [2 กันยายน 2561]
- นิธิยา รัตนาปนนท์. 2541. เคมีนัมและผลิตภัณฑ์นม. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร, คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- นิธิยา รัตนาปนนท์. เคมีนัมและผลิตภัณฑ์นม. กรุงเทพมหานคร: โอเดียนสโตร์, 2557.
- บริษัท BUCHI ประเทศไทย จำกัด. Nitrogen and protein determination in milk, Kjeldahl method. 2007. application note No. K-438-K-360-002
- ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่องนมโค ฉบับที่ 350 2556 ประกาศ ณ วันที่ 24 กรกฎาคม พ.ศ. 2556. คัดจากราชกิจจานุเบกษา เล่ม 130 ตอนพิเศษ 87 ง วันที่ 24 กรกฎาคม พ.ศ. 2556.
- พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ นิธิยา รัตนาปนนท์. ส่วนประกอบของน้ํานม [ออนไลน์]. 2559. แหล่งที่มา: <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/2954/ส่วนประกอบของน้ํานม> [7 กันยายน 2561]
- มยุรี เหลืองวิไล. 2560. การเปรียบเทียบโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของน้ํานมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการและไม่แสดงอาการโดยใช้เทคโนโลยีเมตาโบลอมิกส์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ยุทธ ไกรวรรณ. 2551. วิเคราะห์ข้อมูลวิจัย 4, หน้า 71. พิมพ์ครั้งที่ 1. ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ: บริษัท พิมพ์ดี จำกัด.
- รุ่งทิพย์ ขวนชื่น และ อลงกร อรมศิลป์. หนังสือชุดอาหารปลอดภัย: การตรวจสอบคุณภาพน้ํานมและผลิตภัณฑ์นม. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: ห้างหุ้นส่วนสามัญนิติบุคคล ปอยน์ กราฟิค, 2550.
- วิลาสินี เลิศวรทรัพย์ และเมธาวี สุขเสาวิมล. 2560. การวิเคราะห์สารเมตาโบไลต์ชนิดระเหยยากในน้ํานมอินทรีย์พาสเจอร์ส์ ด้วยเทคนิคโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี. วิทยานิพนธ์บัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ศานต์ เศรษฐชัยมงคล และมยุรี เหลืองวิไล. 2560. การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเมตาโบลอมิกส์ในการศึกษาข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของน้ํานมและผลิตภัณฑ์นม. วารสารเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม 12: 1-16.
- สมชาย ศรีฟู. 2555. ผลผลิตและผลิตภัณฑ์จากสัตว์. คณะเทคโนโลยีการเกษตรและเทคโนโลยีอุตสาหกรรม, มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์. วันที่ค้นข้อมูล 7 สิงหาคม 2561, เข้าถึงได้จาก <http://www.nsr.ac.th/e-learning/animals/edit.php>
- สุภมาส อังสุโชติ, สมถวิล วิจิตรวรรณ และ รัชนีกุล ภิญโญภาณุวัฒน์. 2551. สถิติวิเคราะห์สำหรับ การวิจัยทางสังคมศาสตร์และพฤติกรรมศาสตร์ เทคนิค การใช้โปรแกรม LISREL, หน้า 3949. กรุงเทพฯ: มิสชั่น มีเดี

สาธารณสุข, กระทรวง. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร. [ออนไลน์]. 2557. แหล่งที่มา:

<http://www.dmsc.moph.go.th/> [18 ธันวาคม 2561]

อรพิน ชัยประสพ. เทคโนโลยีของผลิตภัณฑ์นม [ออฟไลน์]. 2547. แหล่งที่มา:

<http://elearning2.utcc.ac.th/officialtcu/econtent/SF411/lecture2.pdf> [7 กันยายน 2561]

Abd El-Fattah, A.M., Abd Rabo, F.H.R., El-Dieb, S.M. and El-Kashef, H.A. 2012. Changes in composition of colostrum of Egyptian buffaloes and Holstein cows. BMC Veterinary Research 8:19.

Abdel-Salam, Z. A., Abdel-Salam, S. A. M., Abdel-Mageed, I. I. and Harith, M. A. 2018. Evaluation of proteins in sheep colostrum via laser-induced breakdown spectroscopy and multivariate analysis. Journal of Advanced Research

Abdel-Salam, Z., Ghany, S. A., and Harith, M. A. 2014. Evaluation of immunoglobulins in bovine colostrum using laser induced fluorescence. Talanta 129: 15-19.

Adams, J.J., Anderson, B.F., Norris, G.E., Creamer, L.K. and Jameson, G.B. 2006. Structure of bovine β -lactoglobulin (variant A) at very low ionic strength. Journal of Structural Biology. 154(3): 246-54.

Almeida, C., Duarte, I. F., Barros, A., Rodrigues, J., Spraul, M., and Gil, A. M. 2006. Composition of beer by $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy: effects of brewing site and date of production. Journal of Agriculture and Food Chemistry 54: 700-706.

Bai, L., Burman, S. and Gledhill, L. 2000. Development of ion exchange chromatography methods for monoclonal antibodies. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 22: 605–611.

Baumrucker, C., Burkett, A. M., Macrina, A., and Dechow, C. D. 2010. Colostrum: Mass transfer of immunoglobulin G1 into colostrum, Vol. 93.

Bateman, G. and Sharp, P. 1928. "A study of the apparent viscosity of milk as influenced by some physical factors." Journal of Agricultural Research 3: 647–74.

Bechtel, B.S. 2002. The use of nuclear magnetic resonance for assessment of time variation in composition of human milk and colostrum: a case study during pregnancy and post-partum. Indian Journal of Physiology Pharmacology 46(3): 279-86.

Bielmann, V., Gillan, J., Perkins, N., Skidmore, A., Godden, S., and E Leslie, K. 2010. An evaluation of Brix refractometry instruments for measurement of colostrum quality in dairy cattle, Vol. 93.

Bleck, G.T., Wheeler, M.B., Hansen, L.B., Chester-Jones, H. and Miller, D.J. 2010. Lactose synthase components in milk: concentration of alpha-lactalbumin and beta 1,4-galactotransferase in milk of cows from several breeds at various stages of lactation. Reproduction in Domestic Animals 44:241–247

Blum, J.W. and Hammon, H.M. 2000. Colostrum—more than just an immunoglobulin supplier. Schweiz Arch Tierh 142:221–228.

Borad, S.G. and Singh, A.K. 2018. Colostrum immunoglobulins: Processing, preservation and application aspects. International Dairy Journal 85: 201-10.

Boudonck, K., Mitchell, M., Wulff, J. and Ryals, J. 2009. Characterization of the biochemical variability of bovine milk using metabolomics. Metabolomics 5(4): 375-386

Buitenhuis, A. J., Sundekilde, U. K., Poulsen, N. A., Bertram, H. C., Larsen, L. B. and Sørensen, P. 2013. Estimation of genetic parameters and detection of quantitative trait loci for metabolites in Danish Holstein milk. Journal of Dairy Science 96(5): 3285-3295.

Buttar, H. S., Bagwe, S. M., Bhullar, S. K. and Kaur, G. Health Benefits of Bovine Colostrum in Children and Adults. In R. R. Watson, R. J. Collier and V. R. Preedy (eds), Dairy in Human Health and Disease Across the Lifespan, pp.3-20. Academic Press, 2017.

- Bylund, G. 1995. Dairy Processing Handbook. Tetra Pak Processing Systems AB, Lund, Sweden.
- Cakebread, J. A., Humphrey, R., Hodgkinson, A. J. 2015. Immunoglobulin A in Bovine Milk: A potential functional food? Journal of Agricultural and Food Chemistry 63(33): 7311-7316.
- Cao, X., Yang, M., Yang, N., Liang, X., Tao, D., Liu, B., Wu, J., and Yue, X. 2019. Characterization and comparison of whey N-glycoproteomes from human and bovine colostrum and mature milk. Food Chemistry 276: 266-273.
- Capozzi, F. and Trimigno, A. Using metabolomics to describe food in detail. In L. Brennan and J.L. Sebedio (eds.). Metabolomics as a tool in nutrition research pp. 204-229. Woodhead Publishing, 2015.
- Capuco, A., and Akers, R. 1999. Mammary Involution in Dairy Animals, Vol. 4.
- Cervenak, J., and Kacs Kovics, I. 2008. The neonatal Fc receptor plays a crucial role in the metabolism of IgG in livestock animals, Vol. 128.
- Cevallos-Cevallos, J. M., Reyes-DeCorcuera, J. I., Etxeberria, E., Danyluk, M. D. and Rodrick, G. E. 2009. Metabolomic analysis in food science: a review. Trends in Food Science and Technology 20(11-12): 557-566.
- Chaneton, L., Pérez Sáez, J. M. and Bussmann, L. E. 2011. Antimicrobial activity of bovine β -lactoglobulin against mastitis-causing bacteria. Journal of Dairy Science 94(1): 138-145.
- Chatterton, D. E. W., Smithers, G., Roupas, P. and Brodtkorb, A. 2006. Bioactivity of β -lactoglobulin and α -lactalbumin- Technological implications for processing. International Dairy Journal 16(11): 1229-1240.
- Christiansen, S., Guo, M. and Kjelden, D. 2010. Chemical composition and nutrient profile of low molecular weight fraction of bovine colostrum. International Dairy Journal 20(9): 630-636.
- Contarini, G. and Povolo, M. 2013. Phospholipids in milk fat: composition, biological and technological significance, and analytical strategies. International journal of molecular sciences 14(2): 2808-2831.
- Contarini, G., Povolo, M., Pelizzola, V., Monti, L., Bruni, A., Passolungo, L., Abeni, F. and Degano, L. 2014. Bovine colostrum: Changes in lipid constituents in the first 5 days after parturition. Journal of Dairy Science 97: 5065-5072.
- Cubero-Leon, E., Penalver, R. and Maquet, A. 2014. Review on metabolomics for food authentication. Food Research International 60: 95-107.
- Cummins, C., Berry, D. P., Murphy, J. P., Lorenz, I. and Kennedy, E. 2017. The effect of colostrum storage conditions on dairy heifer calf serum immunoglobulin G concentration and preweaning health and growth rate. Journal of Dairy Science 100(1): 525-535.
- Danezis, G.P., Tsagkaris, A.S., Brusica, V. and Georgiou, C.A. 2016. Food authentication: state of the art and prospects. Current Opinion in Food Science 10: 22-31.
- Devery-Pocius, J.E. and Larson, B.L. 1983. Age and Previous Lactations as Factors in the Amount of Bovine Colostral Immunoglobulins. Journal of Dairy Science 66: 221-226.
- Doultani, S., Turhan, K. and Etzel, M. 2004. Fractionation of proteins from whey using cation exchange chromatography, Vol. 39.
- Dunn, A., Ashfield, A., Earley, B., Welsh, M., Gordon, A. and Morrison, S. J. 2017. Evaluation of factors associated with immunoglobulin G, fat, protein, and lactose concentrations in bovine colostrum and colostrum management practices in grassland-based dairy systems in Northern Ireland. Journal of Dairy Science 100(3): 2068-2079.
- Dunn, A., Ashfield, A., Earley, B., Welsh, M., Gordon, A., McGee, M. and Morrison, S. J. 2017. Effect of concentrate supplementation during the dry period on colostrum quality and effect of colostrum feeding regimen on passive transfer of immunity, calf health, and performance. Journal of Dairy Science 100(1): 357-370.

- Duplessis, M., Cue, R. I., Santschi, D. E., Lefebvre, D. M. and Girard, C. L. 2018. Short communication: Relationships among plasma and milk vitamin B 12, plasma free fatty acids, and blood β -hydroxybutyrate concentrations in early lactation dairy cows. *Journal of Dairy Science* 101(9): 8559-8565.
- Elfstrand, L., Lindmark-Mansson, H., Paulsson, M., Nyberg, L. and Akesson, B. 2002. Immunoglobulins, growth factors and growth hormone in bovine colostrum and the effects of processing. *International Dairy Journal* 12: 879-887.
- Elias, R. J., McClements, D. J. and Decker, E. A. 2005. Antioxidant Activity of Cysteine, Tryptophan, and Methionine Residues in Continuous Phase β -Lactoglobulin in Oil-in-Water Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(26): 10248-10253.
- Emwas, A.-H. M. S., 2015. The Strengths and Weaknesses of NMR Spectroscopy and Mass Spectrometry with Particular Focus on Metabolomics Research. In J. T., Bjerrum, ed. *Metabonomics: Methods and Protocols*. Springer New York, New York: 161-193.
- Emwas, A.-H. M. S., Salek, R. M., Griffin, J. L. and Merzaban, J., 2013. NMR-based metabolomics in human disease diagnosis: applications, limitations, and recommendations. *Metabolomics* 9: 1048-1072.
- Fleming, K., Thompson-Crispi, K. A., Hodgins, D. C., Miglior, F., Corredig, M. and Mallard, B. A. 2016. Short communication: Variation of total immunoglobulin G and β -lactoglobulin concentrations in colostrum and milk from Canadian Holsteins classified as high, average, or low immune responders. *Journal of Dairy Science* 99(3): 2358-2363.
- Foley, J. A. and Otterby, D. E. 1978. Availability, Storage, Treatment, Composition, and Feeding Value of Surplus Colostrum: A Review¹, 2. *Journal of Dairy Science* 61(8): 1033-1060.
- Ganzle, M., Haase, G. and Jelen, P. 2008. Lactose crystallization: hydrolysis and value added derivatives. *International Dairy Journal* 18: 685-694.
- Georgiev, I. 2008. Differences in chemical composition between cow colostrum and milk, Vol. 11.
- Giansanti, F., Panella, G., Leboffe, L. and Antonini, G. 2016. Lactoferrin from Milk: Nutraceutical and Pharmacological Properties. *Pharmaceuticals (Basel)* 9(4).
- Godhia M.L. and Patel N. 2013. Colostrum- its Composition, Benefits as a Nutraceutical – A Review. *Current Research Nutrition and Food Science* 1(1): 37-47.
- De Groot, N., Van Kuik-Romeijn, P., Lee, S. H. and De Boer, H. A. 2000. Increased immunoglobulin A levels in milk by over-expressing the murine polymeric immunoglobulin receptor gene in the mammary gland epithelial cells of transgenic mice. *Immunology* 101(2): 218-224.
- Gross, J. J., Kessler, E. C. and Bruckmaier, R. M. 2014. Colour measurement of colostrum for estimation of colostral IgG and colostrum composition in dairy cows. *Journal of Dairy Research* 81: 440-444.
- Guérin, J., Alais, C., Jollès, J. and Jollès, P. 1974. κ -Casein from bovine colostrum, Vol. 351.
- Hahn, R., Schulz, P.M., Schaupp, C. and Jungbauer, A. 1998. Bovine whey fractionation based on cation-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A* 795:277-287.
- Hasselbalch, H., Jeppesen, D.L., Engelmann, M.D., Michaelsen, K.F. and Nielsen, M.B., 1996. Decreased thymus size in formula-fed infants compared with breastfed infants. *Acta Paediatrica* 85 (9): 1029-1032.
- Heinrichs, J. and Jones, C. 2011. Composition and Hygiene of Colostrum on Modern Pennsylvania Dairy Farms. Reviewed by: Sandy Costello and Virginia Ishler. *Penn State Dairy and Animal Science (DAS)* 11 (171):1 – 6.
- Hill, D. R. and Newburg, D. S. 2015. Clinical applications of bioactive milk components. *Nutrition Reviews* 73(7): 463-476.
- Hu, F.Y., Furihata, K., Ito-Ishida, M., Kaminogawa, S. and Tanokura, M., 2004. Nondestructive observation of bovine milk by NMR spectroscopy: Analysis of existing states of compounds and detection of new compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 4969-4974.

- Ilves, A., Harzia, H., Ling, K., Ots, M., Soomets, U. and Kilk, K. 2012. Alterations in milk and blood metabolomes during the first months of lactation in dairy cows. Journal of Dairy Science 95(10): 5788-5797.
- Iliev, Y. I. and Tomov, T. 1992. Lysozyme as prophylactic and medicinal formulation in animal husbandry. Agricultural Science (Sofia) 30: 88–96.
- ISO/PDTS 11869 | IDF/DRM 150. 2009. Fermented milks — Determination of titratable acidity – Potentiometric method
- Jackson, K. M., and Nazar, A. M. 2006. Breastfeeding, the immune response, and long-term health. Journal of the American Osteopathic Association 106(4): 203-207.
- Jahantigh, M., Atyabi, N., Pourkabir, M., JebelliJavan, A. and Afshari, M. 2011. The effect of dietary bovine colostrum supplementation on serum malondialdehyde levels and antioxidant activity in alloxan-induced diabetic rats. International Journal of Veterinary Research 5(1): 63-67.
- Jenness, R. and Patton, S. 1959. Principles of dairy chemistry. John Wiley: New York.
- Johanningsmeier, S.D., Harris, G.K. and Klevorn, C.M. 2016. Metabolomic Technologies for Improving the Quality of Food: Practice and Promise. Food Science Technology 7: 413–38.
- Kaur, G., Somaiya, R., Wasim, M. and Buttar, H.S., 2014. Cardioprotective effects of bovine colostrum against isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. Journal of Pharmacology and Toxicology 9: 37–45.
- Kehoe, S. I. and Heinrichs, A. J. 2007. Bovine colostrum nutrient composition. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science. Nutrition and Natural Resources 2.
- Kim, H.K., Choi, Y.H. and Verpoorte, R. 2010. NMR-based metabolomic analysis of plants. Nature. Protocol 5:536–49
- Kim, H.K., Choi, Y.H. and Verpoorte, R. 2011. NMR-based plant metabolomics: Where do we stand, where do we go? Trends Biotechnol 29:267–75
- Kim, J. O. and Mueller, C. W., 1978. Factor Analysis: statistical methods and practical issues. Thousand Oaks (CA): Sage Publications.
- Klein, M. S., Almstetter, M. F., Schlamberger, G., Nürnberger, N., Dettmer, K., Oefner, P. J. Meyer, H. H. D., Wiedemann, S. and Gronwald, W. 2010. Nuclear magnetic resonance and mass spectrometry-based milk metabolomics in dairy cows during early and late lactation. Journal of Dairy Science 93(4): 1539-1550.
- Klimes, J., Jagos, P., Bouda, J. and Gajdusek, S. 1984. Basic qualitative parameters of cow colostrum and their dependence on season and post-partum time. Acta Veterinaria Brno 55:23–39.
- Korhonen, H., Syvaaja, E. L., Ahola-Luttila, H., Sivela, S., Kopola, S., Husu, J. and Kosunen, T. U. 1995. Bactericidal effect of bovine normal and immune serum, colostrum and milk against *Helicobacter pylori*. Journal of applied bacteriology 78(6): 655-662.
- Korhonen, H., Marnila, P. and Gill, H.S. 2000. Milk immunoglobulins and complement factors. British Journal of Nutrition 84: 75–80.
- Korhonen, H. J. 2011. Bioactive milk proteins, peptides and lipids and other functional components derived from milk and bovine colostrum. Functional Foods: Concept to Product: Second Edition: 471-511.
- Krishnan, P., Kruger, N.J. and Ratcliffe, R.G. 2005. Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR. Journal of Experimental Botany 56:255–65
- Kruger, N.J., Troncoso-Ponce, M.A. and Ratcliffe, R.G. 2008. ¹H-NMR metabolite fingerprinting and metabolomic analysis of perchloric acid extracts from plant tissues. Nature. Protocol 3:1001–12
- Kshirsagar, A. Y., Vekariya, M. A., Gupta, V., Pednekar, A. S., Mahna, A., Patankar, R., Shaikh, A. and Nagur, B. 2015. A Comparative Study of Colostrum Dressing Versus Conventional Dressing in Deep Wounds. Clinical and Diagnostic Research 9(4): PC01-PC044 4.

- Kurtz, F.E., Webb, B.H., Johnson, A.H. and Alford, J.A. 1983. *The Lipid of Milk: Composition and Properties in fundamentals of dairy chemistry*. The AVI Publishing Company, Inc., Westport, Connecticut.
- Kwon, O.Y., Lee, J.S., Choi, H.S., Hong, H.P., Jang, K.-H. and Paek, J.H. 2010. Antioxidant and anticytokine effects of bovine colostrum in intestinal ischemia/reperfusion injured rat model. *Food Science and Biotechnology* 19: 1295–1301.
- Larson, B.L. 1992. Immunoglobulins of the mammary secretions. In P.F. Fox (ed). *Advanced dairy chemistry, volume 1: proteins*. Elsevier Science Publishers: Barking.
- Levieux, D. and Ollier, A. 1999. Bovine immunoglobulin G, beta-lactoglobulin, alpha-lactalbumin and serum albumin in colostrum and milk during the early post-partum period. *Journal of Dairy Research* 66:421–430.
- Lee, J. E., Lee, B. J., Chung, J. O., Kim, H. N., Kim, E. H., Jung, S., Lee, H., Lee, S.J. and Hong, Y. S. 2015. Metabolomic unveiling of a diverse range of green tea (*Camellia sinensis*) metabolites dependent on geography. *Food Chemistry* 174: 452-459.
- Lee, M. B., Storer, M. K., Blunt, J. W. and Lever, M. 2006. Validation of ¹H-NMR spectroscopy as an analytical tool for methylamine metabolites in urine. *Clinica Chimica Acta* 365: 264-269.
- Liang, X., Han, H., Zhao, X., Cao, X., Yang, M., Tao, D., Wu, R. and Yue, X. 2018. Quantitative analysis of amino acids in human and bovine colostrum milk samples through iTRAQ labeling. *Journal of Science Food and Agriculture* 98: 5157–5163.
- Liu, G. L., Wang, J. Q., Bu, D. P., Cheng, J. B., Zhang, C. G., Wei, H. Y., Zhou, L. Y., Zhou, Z. F., Hu, H. and Dong, X. L. 2009. Factors affecting the transfer of immunoglobulin G1 into the milk of Holstein cows. *Veterinary Journal* 182(1): 79-85.
- Lonnerdal, B. and Lien, E. 2003. Nutritional and physiologic significance of alpha-lactalbumin in infants, Vol. 61.
- Luangwilai, M., Duangmal, K. and Settachaimongkon, S., 2017. Comparative metabolomic profiling of liquid milk products in Thailand using ¹H-NMR technique. Proceeding of the 29th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference. 23th Nov 2017. Swissôtel Le Concorde, Bangkok, Thailand.
- Lu, J., Antunes Fernandes, E., Paez Cano, A.E., Vinitwatanakhun, J., Boeren, S., Hooijdonk, T., Knegsel, A., Vervoort, J. and Hettinga, K.A. 2013. Changes in milk proteome and metabolome associated with dry period length, energy balance, and lactation stage in postparturient dairy cows. *Journal Proteome Research*: 3288-3296
- Lu, J., Boeren, S., van Hooijdonk, T., Vervoort, J. and Hettinga, K. 2015. Effect of the DGAT1 K232A genotype of dairy cows on the milk metabolome and proteome. *Journal of Dairy Science* 98(5): 3460-3469.
- Mantle, P. G., Nicholls, A. W. and Shockcor, J. P. 2011. ¹H-NMR Spectroscopy-Based Metabolomic Assessment of Uremic Toxicity, with Toxicological Outcomes, in Male Rats Following an Acute, Mid-Life Insult from Ochratoxin A. *Toxins*: 504-519.
- Marnila, P. and Korhonen, H. 2011. Milk: Colostrum. *Encyclopedia of Dairy Sciences: Second Edition*.
- Marseglia, A., Acquotti, D., Consonni, R., Cagliani, L.R., Palla, G. and Caligiani, A. 2016. HR MAS ¹H-NMR and chemometrics as useful tool to assess the geographical origin of cocoa beans - Comparison with HR ¹H-NMR. *Food Research International* 85: 273-281.
- McGrath, B. A., Fox, P. F., McSweeney, P. L. H. and Kelly, A. L. 2016. Composition and properties of bovine colostrum: a review. *Dairy Science and Technology* 96: 133-158.
- McIntyre, R. T., Parrish, D. B. and Fountaine, F. C. 1952. Properties of the Colostrum of the Dairy Cow. VII. pH, Buffer Capacity and Osmotic Pressure¹. *Journal of Dairy Science* 35(4): 356-362.
- Medvezki, D. 1989. *The Rearing of Calves*. Zemizdat, Sofia.

- Morrill, K.M., Conrad, E., Lago, A., Campbell, J., Quigley, J. and Tyler, H. 2012. Nationwide evaluation of quality and composition of colostrum on dairy farms in the United States. *Journal of Dairy Science* 95(7):3997-4005.
- Moody, E.G. 1947. Relation of certain factors to cream volume and viscosity of colostrum from dairy cows. Publisher Kansas State College of Agriculture and Applied Science Collection kansasstate university librariestheses.
- Moody, E.G., Wise, G.H., Parrish, D.B. and Atkeson, W. 1951. Properties of the colostrum of the dairy cow. VI. Creaming and rate of flow. *Journal of Dairy Science* 34:106-115.
- Moore, M., Tyler, J.W., Chigerwe, M., Dawes, M.E. and Middleton, J.R. 2005. Effect of delayed colostrum collection on colostrum IgG concentration in dairy cows. *Journal of American Veterinary Medical Association* 226:1375-1377.
- Murata, M., Satoh, T., Wakabayashi, H., Yamauchi, K., Abe, F. and Nomura, Y. 2014. Oral administration of bovine lactoferrin attenuates ultraviolet B-induced skin photodamage in hairless mice. *Journal of Dairy Science* 97(2): 651-658.
- Nakajima, M., Shinoda, I., Mikogami, T., Iwamoto, H., Hashimoto, S.-I., Miyauchi, H., Fukuwatari, Y. and Hayasawa, H. 1997. β -Lactoglobulin Suppresses Melanogenesis in Cultured Human Melanocytes. *Pigment Cell Research* 10(6): 410-413.
- Neurath, A., Debnath, A., Strick, N., Li, Y. Y., Lin, K. and Jiang, S. 1997. 3-hydroxyphthaloyl- β -lactoglobulin. I. Optimization of production and comparison with other compounds considered for chemoprophylaxis of mucosally transmitted human immunodeficiency virus type 1. *Antivir. Chem. Chemotherapy* 8:131-139.
- Neurath, A., Debnath, A., Strick, N., Li, Y. Y., Lin, K. and Jiang, S. 1997. 3-hydroxyphthaloyl- β -lactoglobulin. II. Anti-human immunodeficiency virus type 1 activity in vitro environments relevant to prevention of sexual transmission of the virus. *Antivir. Chem. Chemotherapy* 8:141-148.
- Nissen, A., Andersen, P.H., Bendixen, E., Ingvarsen, K.L. and Røntved, C.M. 2017. Colostrum and milk protein rankings and ratios of importance to neonatal calf health using a proteomics approach. *Journal of Dairy Science* 100(4): 2711-28.
- De Olives, A.M., Diaz, J.R., Molina, M.P. and Peris, C. 2013. Quantification of milk yield and composition changes as affected by subclinical mastitis during the current lactation in sheep. *Journal of Dairy Science* 96:7698-7707.
- Östensson, K. and Lun, S. 2008. Transfer of immunoglobulins through the mammary endothelium and epithelium and in the local lymph node of cows during the initial response after intramammary challenge with E. coli endotoxin. *Acta Veterinaria Scandinavica* 50(1): 26.
- Ouweland, A., Salminen, S., Skurnik, M. and L. Conway, P. 1997. Inhibition of pathogen adhesion by β -Lactoglobulin, Vol. 7.
- Pakkanen, R. and Aalto, J. 1997. Growth factors and antimicrobial factors of bovine colostrum. *International Dairy Journal* 7(5): 285-297.
- Panighel, A. and Flamini, R. 2014. Applications of Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography/Mass Spectrometry (SPME-GC/MS) in the Study of Grape and Wine Volatile Compounds. *Molecules* 19: 21291-21309.
- Pellegrini, A., Dettling, C., Thomas, U. and Hunziker, P. 2001. Identification and characterization of four bactericidal domains in bovine β -lactoglobulin molecule. *Biochimica et Biophysica Acta* 1526:131-140.
- Pérez, M. D. and Calvo, M. 1995. Interaction of β -Lactoglobulin with Retinol and Fatty Acids and Its Role as a Possible Biological Function for This Protein: A Review. *Journal of Dairy Science* 78(5): 978-988.
- Permyakov, E. A. and Berliner, L. J. 2000. α -Lactalbumin: structure and function. *FEBS Letters* 473(3): 269-274.
- Picone, G., Trimigno, A., Tessarin, P., Donnono, S., Rombola, A.D. and Capozzi, F. 2016. ¹H-NMR foodomics reveals that the biodynamic and the organic cultivation managements produce different grape berries (*Vitis vinifera* L. cv. Sangiovese). *Food chemistry* 213: 187-195.

- Picone, G., Zappaterra, M., Luise, D., Trimigno, A., Capozzi, F., Motta, V., Davoli, R., Nanni Costa, L., Bosi, P. and Trevisi, P. 2018. Metabolomics characterization of colostrum in three sow breeds and its influences on piglets' survival and litter growth rates. Journal of Animal Science and Biotechnology 9: 23.
- Playford, R., Floyd, D., Macdonald, C., Calnan, D., Adenekan, R., Johnson, W., Goodlad, R. and Marchbank, T. 1999. Bovine colostrum is a health food supplement which prevents NSAID induced gut damage. Gut 44(5): 653-658.
- Playford, R.J. 2001. Peptide therapy and the gastroenterologist: colostrum and milk-derived growth factors. Clinical Nutrition 20: 101-106.
- Playford, R.J., MacDonald, C.E. and Johnson, W.S. 2000. Colostrum and milk-derived peptide growth factors for the treatment of gastrointestinal disorders. American Journal of Clinical Nutrition 72:5-14.
- Pranitha D., Parthaiban, N., Sathis kumard, D., Somsubhra, G., David, B. and Saikiran. 2011. Solid State Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research: 9-14.
- Quigley, J. D., Lago, A., Chapman, C., Erickson, P. and Polo, J. 2013. Evaluation of the Brix refractometer to estimate immunoglobulin G concentration in bovine colostrum. Journal of Dairy Science 96(2): 1148-1155.
- Rona, Z., 1998. Bovine colostrum emerges as immune system modulator. American Journal of Natural Medicine 5 (2):19-23.
- Rowan, D. D. Volatile Metabolites [online]. 2011. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4012514/> [2018, September 2]
- Salehi, R., Ambrose, D. J. and Oba, M. 2016. Short communication: Effects of prepartum diets supplemented with rolled oilseeds on Brix values and fatty acid profile of colostrum. Journal of Dairy Science 99(5): 3598-3601.
- Silva-del-Río, N., Rolle, D., Garcia-Muñoz, A., Rodríguez-Jiménez, S., Valldecabres, A., Lago, A. and Pandey, P. 2017. Colostrum immunoglobulin G concentration of multiparous Jersey cows at first and second milking is associated with parity, colostrum yield, and time of first milking, and can be estimated with Brix refractometry. Journal of Dairy Science 100(7): 5774-5781.
- Scammell, A.W. 2001. Production and uses of colostrum. Australian Journal of Dairy Technology 56:74-82.
- Scano, P., Murgia, A., Pirisi, F. M. and Caboni, P. 2014. A gas chromatography-mass spectrometry-based metabolomic approach for the characterization of goat milk compared with cow milk. Journal of Dairy Science 97(10): 6057-6066.
- Scheuer, B. H., Zbinden, Y., Schneiter, P., Tappy, L., Blum, J. W. and Hammon, H. M. 2006. Effects of colostrum feeding and glucocorticoid administration on insulin-dependent glucose metabolism in neonatal calves. Domestic Animal Endocrinology 31(3): 227-245.
- Sebela, F. and Klicnik, V. 1977. The relationship between milk acidity after milking and cow's age. Czech Journal of Animal Science 22:161-170.
- Settachaimongkon, S., Nout, M. J., Antunes, Fernandes, E. C., Hettinga, K. A., Vervoort, J. M., van Hooijdonk, T. C., Zwietering, M. H., Smid, E. J. and van Valenberg, H. J. 2014. Influence of different proteolytic strains of *Streptococcus thermophilus* in co-culture with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* on the metabolite profile of set-yoghurt. International Journal of Food Microbiology 177: 29-36.
- Shing, C. M., Hunter, D. C. and Stevenson, L. M. 2009. Bovine colostrum supplementation and exercise performance: Potential mechanisms. Sports Medicine 39(12): 1033-1054.
- Silva Elipe, M. V. 2003. Advantages and disadvantages of nuclear magnetic resonance spectroscopy as a hyphenated technique. Analytica Chimica Acta 497(1): 1-25.
- Skov, T., Honoré, A. H., Jensen, H. M., Næs, T. and Engelsen, S. B., 2014. Chemometrics in foodomics: Handling data structures from multiple analytical platforms. TrAC - Trends in Analytical Chemistry 60: 71-79.

- Smith, G. W. and Foster, D. M. 2007. Short Communication: Absorption of Protein and Immunoglobulin G in Calves Fed a Colostrum Replacer. Journal of Dairy Science 90(6): 2905-2908.
- Sobczuk-Szul, M., Wielgosz-Groth, Z., Wronski, M. and Rzemieniewski, A. 2013. Changes in the bioactive protein concentrations in the bovine colostrum of Jersey and Polish Holstein-Friesian cows. Turkish Journal of Veterinary Animal Science 37:43-49.
- Solah, V.A., Staines, V., Honda, S. and Limley, H.A. 2007. Measurement of milk color and composition: effect of dietary intervention on Western Australian Holstein-Friesian cow's milk quality. Journal of Food Science 72: S560-S566.
- Sridharan, K. NMR Spectroscopy. 2016. In K. Sridharan (ed.), Spectral Methods in Transition Metal Complexes, Elsevier: pp.135-176.
- Stelwagen, K., Carpenter, E., Haigh, B., Hodgkinson, A. and Wheeler, T. T. 2009. Immune components of bovine colostrum and milk1. Journal of Animal Science 87: 3-9.
- Strucken, E. M., Laurenson, Y. C. S. M. and Brockmann, G. A. 2015. Go with the flow—biology and genetics of the lactation cycle. Frontiers in Genetics 6: 118.
- Su, C.-K. and Chiang, B. H. 2003. Extraction of Immunoglobulin-G from Colostral Whey by Reverse Micelles. Journal of Dairy Science 86(5): 1639-1645.
- Sundekilde, U. K., Larsen, L. B. and Bertram, H. C. 2013. NMR-based milk metabolomics. Metabolites 3(2): 204222.
- Swaisgood, H.E., 1996. Characteristics of milk. In: Fennema, O. (Ed.), Food Chemistry, third ed. Maecel Dekker Inc., New York: 842-878.
- Tacket, C. O., Binion, S. B., Bostwick, E., Losonsky, G., Roy, M. J. and Edelman, R. 1992. Efficacy of bovine milk immunoglobulin concentrate in preventing illness after *Shigella flexneri* challenge. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 47(3): 276-283.
- Tacoma, R., Gelsinger, S.L., Lam, Y.W., Scuderi, R.A., Ebenstein, D.B. and Heinrichs, A.J. 2017. Exploration of the bovine colostrum proteome and effects of heat treatment time on colostrum protein profile. Journal of Dairy Science 100: 92-401.
- Teixeira, A., Martins, V., Noronha, H., Eiras-Dias, J. and Geros, H., 2014. The First Insight into the Metabolite Profiling of Grapes from Three *Vitis vinifera* L. Cultivars of Two Controlled Appellation (DOC) Regions. International Journal of Molecular Sciences 15: 4237-4254.
- Tenori, L., Santucci, C., Meoni, G., Morrocchi, V., Matteucci, G.a and Luchinat, C. 2018. NMR metabolomic fingerprinting distinguishes milk from different farms. Food Research International 113: 131-139.
- Tomov, T. A. 1984. The Basis of Lactation in Ruminants. Zemizdat, Sofia.
- Tsioulpas, A., Grandison, A. S. and Lewis, M. J. 2007. Changes in Physical Properties of Bovine Milk from the Colostrum Period to Early Lactation. Journal of Dairy Science 90(11): 5012-5017.
- Tyler, J. W., Steevens, B. J., Hostetler, D. E., Holle, J. M. and Denbigh, J. L., Jr. 1999. Colostral immunoglobulin concentrations in Holstein and Guernsey cows. American Journal Veterinary Research 60(9): 1136-1139.
- Uruakpa, F. O., Ismond, M. A. H. and Akobundu, E. N. T. 2002. Colostrum and its benefits: a review. Nutrition Research 22(6): 755-767.
- Varner, M. A. and Johnson, B. H. 1983. Influence of Adrenocorticotropin upon Milk Production, Milk Constituents, and Endocrine Measures of Dairy Cows1. Journal of Dairy Science 66(3): 458-465.
- Verweij, J. J., Koets, A. P. and Eisenberg, S. W. F. 2014. Effect of continuous milking on immunoglobulin concentrations in bovine colostrum. Veterinary Immunology and Immunopathology 160(3): 225-229.
- Walstra, P. and Jenness, R. 1984. Dairy chemistry and physics. John Wiley and Sons, Inc., New York.

- Walstra, P., Wouters, J. T. M. and Geurts, T. J. 2006. Dairy Science and Technology. New York: CRC press: 3-106.
- Wishart, D. S. 2008. Metabolomics: applications to food science and nutrition research. Trends in Food Science and Technology 19(9): 482-493.
- Wishart, D.S., Jewison, T., Guo, A.C., Wilson, M., Knox, C. and Liu, Y. 2013. HMDB 3.0: The human metabolome database in 2013. Nucleic Acids Research 41(D1): D801D807.
- Wongchuphan, R., Tey, B. T., Tan, W. S., Subramanian, S. K., Taip, F. S. and Ling, T. C. 2011. Purification of rabbit polyclonal immunoglobulin G using anion exchangers. Process Biochemistry 46:101–107.
- Wu, J., Domellöf, M., Zivkovic, A. M., Larsson, G., Öhman, A. and Nording, M. L. 2016. NMR-based metabolite profiling of human milk: a pilot study of methods for investigating compositional changes during lactation. Biochemical and Biophysical Research Communications 469(3): 626-632.
- Yadav, R., Angolkar, T., Kaur, G. and Buttar, H. S. 2016. Antibacterial and Antiinflammatory Properties of Bovine Colostrum. Recent Patents on Inflammation and Allergy Drug Discovery 10(1): 49-53.
- Yang, Y., Zheng, N., Zhao, X., Zhang, Y., Han, R., Yang, J., Zhao, S., Li, S., Guo, T., Zang, C. and Wang, J. 2016. Metabolomic biomarkers identify differences in milk produced by Holstein cows and other minor dairy animals. Journal of Proteomics 136: 174-182.
- Zachwieja, A., Szulc, T., Potkański, A., Mikula, R., Kruszyński, W. and Dobicki, A. 2007. Effect of different fat supplements used during dry period of cows on colostrum physicochemical properties, 23.
- Zanton, G.I. and Heinrichs, A.J. 2007. The Effects of Controlled Feeding of a High-Forage or High-Concentrate Ration on Heifer Growth and First-Lactation Milk Production1. Journal of Dairy Science 90(7): 3388-96.
- Zhang, L., van Dijk, A. D. J. and Hettinga, K. 2017. An interactomics overview of the human and bovine milk proteome over lactation. Proteome science 15: 1-1.
- Zhang, F., Qi, X., Zou, M. and Li, J. 2012. Analysis of alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin from the rehydration of bovine colostrum powder using cloud point extraction and mass spectrometry. Journal of analytical methods in chemistry 2012: 816180-816180.
- Zhang, Y. D., Li, P., Zheng, N., Jia, Z. W., Meruva, N., Ladak, A., Cleland, G., Wen, F., Li, S. L., Zhao, S. G. and Wang, J. Q. 2018. A metabolomics approach to characterize raw, pasteurized, and ultra-high temperature milk using ultra-performance liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry and multivariate data analysis. Journal of Dairy Science.
- Zhao, X. W., Qi, Y. X., Huang, D. W., Pan, X. C., Cheng, G. L., Zhao, H. L. and Yang, Y. X. 2018. Changes in serum metabolites in response to ingested colostrum and milk in neonatal calves, measured by nuclear magnetic resonance-based metabolomics analysis. Journal of Dairy Science 101(8): 7168-7181.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การตั้งค่าการใช้งานเครื่องกลั่นไนโตรเจน (Distillation Unit) K-355

ขั้นตอนการใช้งานเครื่องและการตั้งค่าการใช้งานของเครื่องกลั่นไนโตรเจน มีดังต่อไปนี้

1. เปิดเครื่องกลั่นไนโตรเจน รอให้สัญลักษณ์ที่ H ที่จอแสดงผลหายไปจึงเริ่มต้นการ pre-heat
2. นำหลอดเปล่า (Kjeldahl tube) ใส่ไปในเครื่อง ทำการ pre-heat โดยการกดลูกศรลง ให้นำจอแสดงสัญลักษณ์ P- ตั้งค่า stream เป็น 100 ระยะเวลาเป็น 2 นาทีและกด start
3. นำสาย reagent2 ของเครื่องกลั่น ไปใส่ในขวด 35% NaOH ที่เตรียมไว้ เปลี่ยนหลอดเปล่าหลอดใหม่เพื่อทำการเติม 35% NaOH เข้าเครื่องกลั่น โดยกดปุ่ม reagent2 ค้างไว้ให้ปริมาตร NaOH ประมาณ 300 มิลลิลิตร กดลูกศรลง ให้นำจอแสดงสัญลักษณ์ P- ตั้งค่า stream เป็น 100 ระยะเวลาเป็น 5 นาทีและกด start
4. เมื่อเติม NaOH เข้าเครื่องกลั่นเรียบร้อยแล้ว เปลี่ยนหลอดเป็นหลอดที่บรรจุตัวอย่างในการทดลอง พร้อมกลั่นตัวอย่าง โดยการกด reagent2 เพื่อเติม NaOH สังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงของสี หยุดการเติมเมื่อสารละลายเปลี่ยนเป็นสีดำ กดลูกศรขึ้น ให้นำจอแสดงสัญลักษณ์ P1 ตั้งค่า stream เป็น 100 ระยะเวลาเป็น 5 นาทีและกด start
5. เมื่อกลิ้น 1 ตัวอย่างเสร็จเรียบร้อยแล้ว ต้องทำการล้างบริเวณที่กลั่นทุกครั้ง ก่อนนำตัวอย่างใหม่มากลั่น เพื่อไม่ให้เกิดการปนกันของสารที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบระหว่างตัวอย่าง โดยการ กดเติม reagent1 H₂O ประมาณ 300 มิลลิลิตร กดลูกศรลง ให้นำจอแสดงสัญลักษณ์ P- ตั้งค่า stream เป็น 100 ระยะเวลาเป็น 5 นาทีและกด start
6. เมื่อกลิ้นครบทุกตัวอย่างเรียบร้อยแล้ว ทำการล้างเครื่องกลั่น โดยการนำสาย NaOH กลับเข้าถังน้ำกลั่น กด reagent1 H₂O ประมาณ 100 มิลลิลิตร และ reagent2 NaOH ประมาณ 300 มิลลิลิตร กดลูกศรลง ให้นำจอแสดงสัญลักษณ์ P- ตั้งค่า stream เป็น 100 ระยะเวลาเป็น 2 นาทีและกด start ทำซ้ำขั้นตอนนี้ 3 ครั้ง เพื่อไม่ให้ 35% NaOH ค้างภายในเครื่องกลั่น ป้องกันการเสื่อมสภาพของเครื่องกลั่นไนโตรเจน
7. ล้างครั้งสุดท้าย ด้วยการ กด reagent1 H₂O ประมาณ 300 มิลลิลิตร กดลูกศรลง ให้นำจอแสดงสัญลักษณ์ P- ตั้งค่า stream เป็น 100 ระยะเวลาเป็น 5 นาทีและกด start

ภาคผนวก ข

ใบรับรองของกรมวิทยาศาสตร์บริการ

รายงานค่าการทดสอบของน้ำมันเหลืองของโคจากการส่งวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการของกรมวิทยาศาสตร์
บริการ โดยทางบริษัท เดวิดเอ็นเตอร์ไพรส์ แอนด์ ดีวีลอปเม้นท์ จำกัด เป็นผู้ดำเนินการ

แบบ ๖๕.1



รายงานการทดสอบ

ชื่อวัตถุตัวอย่าง	เครื่องหมาย / ตรา	หมายเลขปฏิบัติการ
นมข้นเหลืองดิบ		L61/00282.1

ผลการทดสอบ

ไขมัน	กรัม/100 กรัม	4.30
โปรตีน (Nx6.38)	กรัม/100 กรัม	20.0
ของแข็งทั้งหมด	กรัม/100 กรัม	29.2

ชื่อผู้ให้บริการ	บริษัท เดวิด เอ็นเตอร์ไพรส์ แอนด์ ดีวีลอปเม้นท์ จำกัด
ที่อยู่ผู้ให้บริการ	เลขที่ 222/9 ถนนรัชดา-รามอินทรา แขวงคลองจั่น เขตบึงกุ่ม กรุงเทพฯ 10230
ลักษณะตัวอย่าง	เป็นของเหลวสีเหลืองอ่อน
วันที่ทดสอบ	15 - 18 มกราคม 2561
วิธีทดสอบ	In-house methods based on AOAC (2016) 989.05, 990.19 and 991.20

ผู้รับรอง

(นายมนโนวิช เรืองดิษฐ์)
นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการพิเศษ

ผู้รายงาน

(นางสาวนิภาพร ชนงคช)
นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการ

ภาพ ข1 ใบรับรองของกรมวิทยาศาสตร์บริการ

ที่มา: บริษัท เดวิดเอ็นเตอร์ไพรส์ แอนด์ ดีวีลอปเม้นท์ จำกัด

ภาคผนวก ค

การเตรียมตัวอย่างน้ำนมเหลืองก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ ค1 การเตรียมความพร้อมก่อนการใช้งานของ microcentrifuge (Nanosep[®] Centrifugal Device)

นำ microcentrifuge (Nanosep[®] Centrifugal Device) มีผ่านรูกรองขนาดอนุภาค 3 กิโลดาลตัน มาเตรียมความพร้อมก่อนการใช้งาน เนื่องจากบริเวณรูกรองอาจจะมี glycerin เคลือบอยู่ โดยจะใส่น้ำ Milli-Q 500 ไมโครลิตร และปั่นเหวี่ยงที่ 13,800 xg จำนวน 5 ครั้ง โดยครั้งที่ 1-4 จะปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และครั้งสุดท้ายจะปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นปิด microcentrifuge ด้วยพาราฟิล์ม และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้งาน

ค2 การเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer)

ค2.1 ส่วนประกอบของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ปริมาตร 10 มิลลิลิตร)

10 mM 3-trimethylsilyl-2,2,3,3-tetradeuteropropionate (TSP)	1 มิลลิลิตร
300 mM KH_2PO_4	0.4083 กรัม
D_2O	1 กรัม
0.1 M NaOH	± 5 มิลลิลิตร
น้ำ Milli-Q	

การคำนวณปริมาณของ 10 mM TSP

น้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) ของ TSP คือ 172.27 กรัมต่อโมล

$$1 \text{ mM in } 10 \text{ mL} = \frac{0.172 \times 10}{1000} = 0.00172 \text{ กรัม}$$

$$\text{จะได้ } 10 \text{ mM ในปริมาตร } 10 \text{ mL} = 10 \times 0.00172 = 0.0172 \text{ กรัม}$$

การคำนวณปริมาณของ 300 mM KH_2PO_4

น้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) ของ KH_2PO_4 คือ 136.086 กรัมต่อโมล

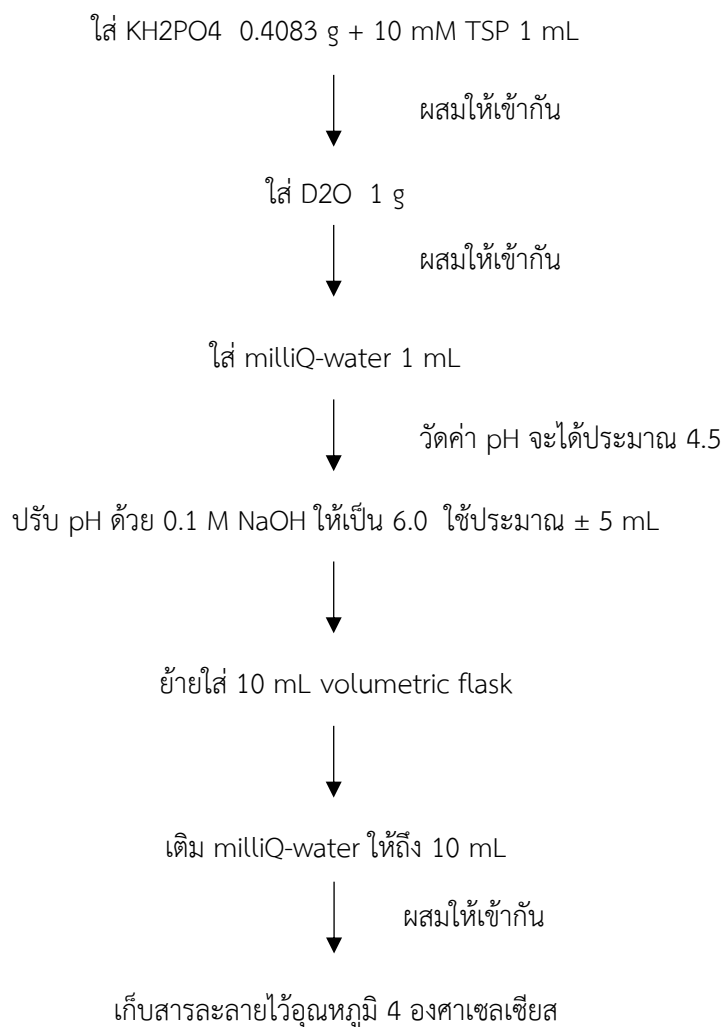
$$1 \text{ mM in } 10 \text{ mL} = \frac{0.13608 \times 10}{1000} = 0.0013608 \text{ กรัม}$$

$$\text{จะได้ } 300 \text{ mM in } 10 \text{ mL} = 300 \times 0.0013608 = 0.4083 \text{ กรัม}$$

ค2.2 วิธีเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์

1. ชั่ง TSP 0.0172 กรัม ผสมกับน้ำ Milli-Q 10 มิลลิลิตร ตามที่คำนวณได้เตรียมไว้ จะได้ 10 mM TSP 10 มิลลิลิตร
2. ชั่ง 300 mM KH_2PO_4 0.4083 กรัม ที่ได้จากการคำนวณ และ D_2O 1 กรัม
3. ใส่น้ำ TSP ที่เตรียมไว้ 1 มิลลิลิตร และน้ำ Milli-Q 1 มิลลิลิตร เพื่อช่วยในการละลาย

4. ปรับ pH ด้วย 0.1 M NaOH ให้ได้ pH 6.0
5. ปรับปริมาตรฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) ด้วยน้ำ Milli-Q ให้ได้ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
6. เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน เพื่อให้บัฟเฟอร์เสถียรและมีประสิทธิภาพในการทำงาน

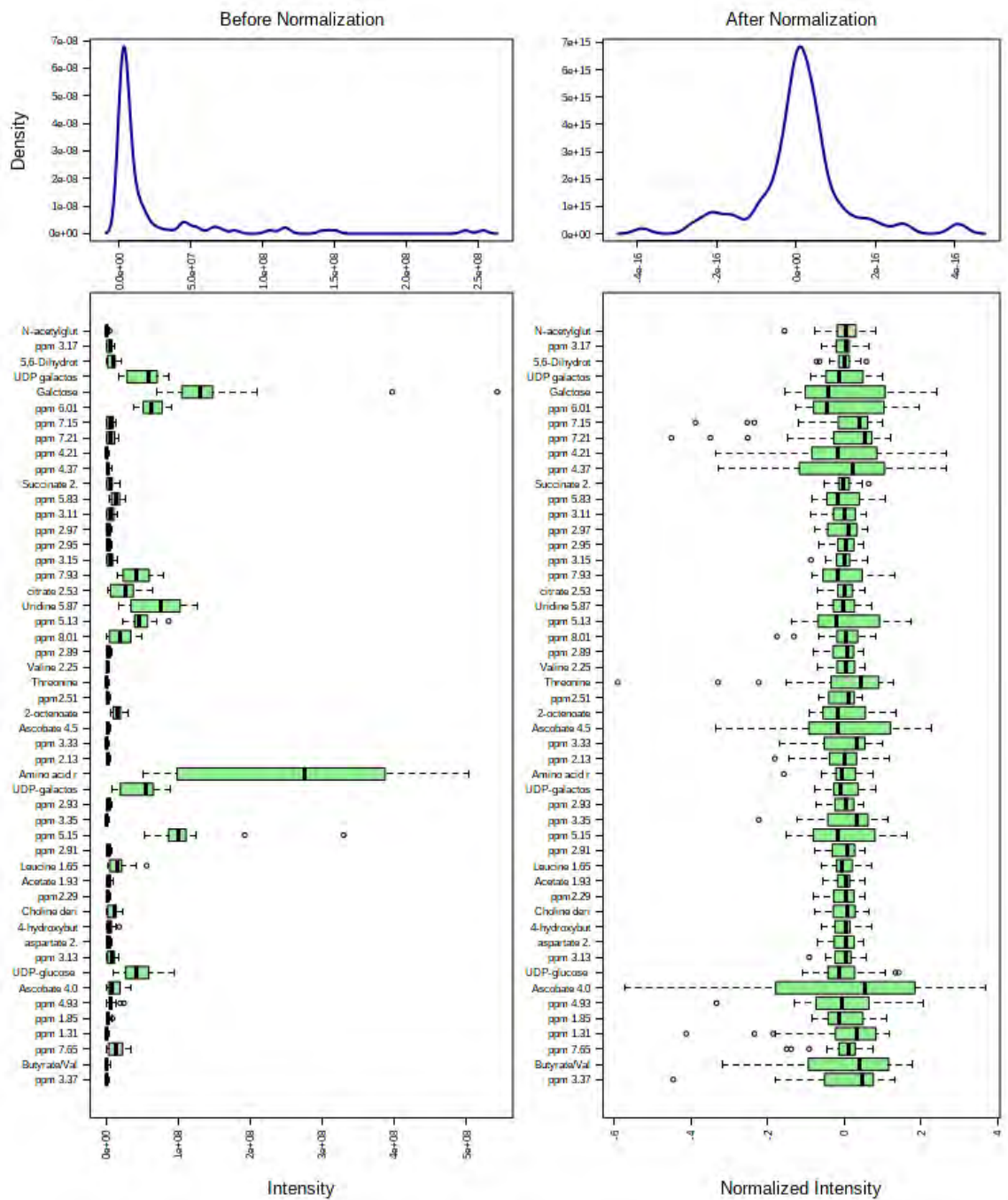


ภาพที่ ค2.1 สรุปการเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ง

การแปลงข้อมูลให้อยู่ในรูปแบบที่ง่ายต่อการนำไปวิเคราะห์ (normalize)

นำข้อมูลไปแปลงให้อยู่ในรูปแบบที่ง่ายต่อการนำไปวิเคราะห์ จากภาพที่ ง1 ทางด้านซ้าย แสดงข้อมูลก่อนที่จำนำไป normalize ส่วนภาพทางด้านขวา เป็นข้อมูลที่ถูกลบแปลงเรียบร้อยแล้ว



ภาพที่ ง1 การแปลงข้อมูลให้อยู่ในรูปแบบที่ง่ายต่อการนำไปวิเคราะห์

ที่มา: <https://www.metaboanalyst.ca>

ภาคผนวก จ

ตารางแสดงตำแหน่งและปริมาณสัมพัทธ์ของสารเมตาบอไลต์ที่พบทั้งหมดในงานวิจัยนี้

ตารางที่ จ1 ตำแหน่งสารเมตาบอไลต์ทั้งหมดที่พบในงานวิจัยนี้

ลำดับที่	ppm	สารเมตาบอไลต์
1	8.51 (s)	Hippurate
2	8.41 (s)	Histidine
3	8.37 (m)	Amino acid residue
4	8.35 (m)	Amino acid residue
5	8.27 (m)	Amino acid residue
6	8.23 (m)	N-acetylglucosamine
7	8.21 (m)	N-acetylglucosamine
8	8.19 (m)	N-acetylglucosamine
9	8.17 (m)	Amino acid residue
10	8.15 (m)	Amino acid residue
11	8.13 (m)	Amino acid residue
12	8.11 (m)	Amino acid residue
13	8.09 (m)	Amino acid residue
14	8.07 (d)	N-acetylglucosamine
15	8.05 (d)	N-acetylglucosamine
16	8.03 (d)	N-acetylglucosamine
17	7.99 (m)	Benzoate
18	7.95 (m)	Benzoate
19	7.91 (d)	Uridine
20	7.89 (d)	Uridine
21	7.87 (d)	Uridine
22	7.85 (d)	Hippurate
23	7.83 (d)	Hippurate
24	7.81 (d)	Hippurate
25	7.63 (t)	Hippurate
26	7.61 (t)	Hippurate
27	7.57 (t)	Hippurate
28	7.55 (t)	Hippurate
29	7.53 (t)	Hippurate
30	7.43 (t)	Phenylalanine
31	7.41 (t)	Phenylalanine

ลำดับที่	ppm	สารเมตาบอไลต์
32	7.39 (m)	Amino acid residue
33	7.37 (m)	Amino acid residue
34	7.35 (m)	Amino acid residue
35	7.33 (m)	Amino acid residue
36	7.31 (m)	Amino acid residue
37	7.29 (m)	Amino acid residue
38	7.27 (m)	Amino acid residue
39	7.25 (m)	Amino acid residue
40	7.19 (d)	Tyrosine
41	7.17 (d)	Tyrosine
42	6.91 (d)	Tyrosine
43	6.89 (m)	Amino acid residue
44	6.87 (d)	N-acetylglucosamine/Amino acid residue
45	6.85 (d)	N-acetylglucosamine/Amino acid residue
46	6.83 (d)	N-acetylglucosamine
47	6.53 (s)	Fumarate
48	6.19 (s)	Orotate
49	5.99 (m)	UDP galactose
50	5.97 (m)	UDP galactose
51	5.95 (m)	UDP galactose
52	5.93 (t)	Uridine
53	5.91 (t)	Uridine
54	5.89 (t)	Uridine
55	5.87 (t)	Uridine
56	5.67 (m)	UDP-galactose
57	5.65 (m)	UDP-galactose
58	5.63 (m)	UDP-glucose
59	5.61 (m)	UDP-glucose
60	5.59 (m)	UDP-glucose
61	5.53 (d)	N-acetylglucosamine
62	5.51 (d)	N-acetylglucosamine
63	5.47 (s)	1,6-Anhydro- β -D-glucose
64	5.45 (m)	Sugar residue
65	5.43 (m)	Sugar residue
66	5.41 (m)	Sugar residue

ลำดับที่	ppm	สารเมตาบอไลต์
67	5.39 (m)	Sugar residue
68	5.37 (m)	Sugar residue
69	5.29 (d)	Galactose
70	5.27 (d)	Galactose
71	5.25 (m)	Lactose/Glucose
72	5.23 (m)	Lactose/Glucose
73	5.21 (d)	N-acetylglucosamine
74	4.69 (d)	Lactose
75	4.67 (d)	Lactose
76	4.65 (d)	Glucose
77	4.63 (d)	Glucose
78	4.61 (d)	Galactose
79	4.59 (d)	Galactose
80	4.55 (m)	2-phosphoglycerate
81	4.53 (m)	2-phosphoglycerate
82	4.51 (m)	Ascorbate
83	4.47 (d)	Lactose
84	4.45 (d)	Lactose
85	4.35 (m)	Glycerophosphocholine
86	4.33 (m)	Glycerophosphocholine
87	4.29 (m)	Glycylproline
88	4.27 (m)	Glycylproline
89	4.25 (m)	Glycylproline
90	4.23 (m)	O-phosphocholine
91	4.21 (m)	Phosphocholine
92	4.17 (m)	Phosphocholine
93	4.13 (m)	Lactate
94	4.11 (m)	Lactate
95	4.09 (m)	Galactose
96	4.07 (m)	Galactose
97	4.05 (m)	Choline/Creatinine
98	4.03 (m)	Ascorbate
99	4.01 (m)	Ascorbate
100	3.99 (m)	Galactose
101	3.97 (m)	Lactose/Glucose/Galactose
102	3.95 (m)	Lactose/Glucose/Galactose

ลำดับที่	ppm	สารเมตาบอไลต์
103	3.93 (m)	Glucose/Galactose
104	3.91 (m)	Glucose/Galactose
105	3.89 (m)	Lactose/Glucose/Galactose
106	3.87 (m)	Lactose/Glucose/Galactose
107	3.85 (m)	Lactose/Glucose/Galactose
108	3.83 (m)	Lactose/Glucose/Galactose
109	3.81 (m)	Lactose/Glucose/Galactose
110	3.79 (m)	Lactose/Glucose/Galactose
111	3.77 (m)	Glucose/Galactose
112	3.75 (m)	Glucose/Galactose
113	3.73 (m)	Lactose/Glucose/Galactose
114	3.71 (m)	Glucose/Galactose
115	3.69 (m)	Lactose/Glucose/Galactose
116	3.67 (m)	Lactose/Glucose/Galactose
117	3.65 (m)	Lactose/Glucose/Galactose
118	3.63 (m)	Lactose/Glucose/Galactose
119	3.61 (m)	Lactose
120	3.59 (m)	Lactose
121	3.57 (m)	Lactose/Glycine
122	3.55 (m)	Lactose/Glucose
123	3.53 (m)	Glucose/Galactose
124	3.51 (m)	Glucose/Galactose
125	3.49 (m)	Glucose/Galactose
126	3.47 (m)	Glucose/Galactose
127	3.45 (m)	Glucose
128	3.43 (m)	Glucose
129	3.41 (m)	Glucose
130	3.39 (m)	Glucose
131	3.31 (m)	Lactose
132	3.29 (m)	Lactose
133	3.27 (m)	Lactose
134	3.25 (m)	Glucose
135	3.23 (s)	Carnitine/Choline derivation
136	3.21 (s)	Choline
137	3.19 (s)	Choline derivatives
138	3.05 (s)	Creatinine/Creatine

ลำดับที่	ppm	สารเมตาบอไลต์
139	3.03 (s)	Creatinine/Creatine phosphate
140	2.99 (t)	Ethylmalonate
141	2.79 (d)	Aspartate
142	2.77 (m)	5,6-Dihydrothymine
143	2.75 (m)	5,6-Dihydrothymine
144	2.73 (d)	Citrate
145	2.71 (d)	Citrate
146	2.69 (d)	Citrate
147	2.65 (t)	Methionine
148	2.63 (t)	Methionine
149	2.59 (d)	Citrate
150	2.57 (d)	Citrate
151	2.55 (d)	Citrate
152	2.53 (d)	Citrate
153	2.43 (s)	Succinate
154	2.41 (s)	Succinate
155	2.39 (m)	Proline
156	2.37 (m)	Proline
157	2.35 (m)	Proline
158	2.33 (m)	Proline
159	2.27 (s)	Acetoacetate
160	2.25 (m)	Valine
161	2.23 (s)	Acetone
162	2.15 (s)	Acetylcarnithine
163	2.09 (s)	N-acetylglutamate
164	2.07 (m)	N-acetylamino acid
165	2.05 (m)	N-acetylamino acid
166	2.03 (s)	N-acetylglucosamine
167	1.93 (s)	Acetate
168	1.83 (d)	4-hydroxybutarate
169	1.81 (d)	4-hydroxybutarate
170	1.79 (m)	Ornithine
171	1.77 (m)	Ornithine
172	1.75 (m)	Ornithine
173	1.73 (m)	Leucine
174	1.71 (m)	Leucine

ลำดับที่	ppm	สารเมตาบอไลต์
175	1.69 (m)	Leucine
176	1.67 (m)	Leucine
177	1.65 (m)	Leucine
178	1.49 (d)	Alanine
179	1.47 (d)	Alanine
180	1.33 (d)	Threonine
181	1.21 (t)	Ethanol
182	1.19 (t)	Ethanol
183	1.17 (t)	Ethanol
184	1.15 (m)	Cholate
185	1.05 (d)	Valine/Isobutyrate
186	1.03 (d)	Isobutyrate
187	1.01 (t)	2-aminobutyrate
188	0.99 (d)	Isoleucine
189	0.97 (t)	Valerate/Isoleucine/Leucine
190	0.95 (t)	Isoleucine/Leucine/Valerate derivative
191	0.93 (t)	Leucine/Valerate derivative
192	0.91 (t)	Isoleucine/Hydroxybutyrate/Valerate derivation
193	0.89 (t)	Butyrate/Valerate
194	0.87 (t)	Butyrate/Valerate
195	0.85 (t)	Valerate
196	0.83 (t)	Valerate

ตารางที่ จ2 ปริมาณสัมพัทธ์ของสารเมตาบอไลต์ในน้ำนมเหลืองของโควันที่ 1 และวันที่ 3 หลังการคลอด

กลุ่ม สารประกอบเคมี	สารเมตาบอไลต์	วันที่ 1 หลังการคลอด				วันที่ 3 หลังการคลอด			
		A11	A21	B11	B21	A13	A23	B13	B23
แอลกอฮอล์	Ethanol	6.89±0.09 ^a	6.54±0.27 ^{ab}	6.89±0.27 ^a	6.71±0.13 ^{ab}	5.72±0.37 ^c	5.72±0.26 ^c	5.71±0.77 ^c	6.13±0.78 ^{bc}
กรดอะมิโนและ อนุพันธ์	Alanine	6.90±0.05 ^a	6.65±0.17 ^{ab}	6.97±0.20 ^a	6.81±0.03 ^a	6.01±0.11 ^d	6.00±0.14 ^d	6.19±0.41 ^{cd}	6.46±0.31 ^{bc}
	Amino acid residue	8.64±0.02 ^a	8.47±0.08 ^{ab}	8.67±0.05 ^a	8.61±0.05 ^a	8.04±0.11 ^c	7.98±0.13 ^c	8.11±0.36 ^c	8.21±0.38 ^{bc}
	2-aminobutyrate	6.25±0.13 ^a	5.65±0.63 ^{ab}	6.17±0.49 ^a	5.96±0.22 ^{ab}	4.77±0.39 ^c	4.86±0.44 ^c	5.31±0.48 ^{bc}	5.67±0.44 ^{ab}
	Aspartate	6.73±0.05 ^a	6.58±0.14 ^{ab}	6.83±0.09 ^a	6.74±0.07 ^a	5.80±0.11 ^d	5.77±0.18 ^d	6.13±0.40 ^c	6.36±0.34 ^{bc}
	Creatinine and Creatine	7.07±0.08 ^{ab}	6.98±0.14 ^{ab}	7.21±0.13 ^a	7.11±0.08 ^{ab}	6.24±0.12 ^d	6.23±0.05 ^d	6.60±0.32 ^c	6.84±0.31 ^{bc}
	Glycine	6.14±0.30 ^a	5.76±0.32 ^{ab}	6.12±0.49 ^a	5.51±0.42 ^{bc}	5.05±0.13 ^c	5.03±0.44 ^c	5.46±0.18 ^{bc}	5.75±0.46 ^{ab}
	Histidine	7.52±0.05 ^a	7.28±0.11 ^{ab}	7.52±0.03 ^a	7.47±0.07 ^a	6.60±0.16 ^{cd}	6.39±0.32 ^d	6.77±0.48 ^{cd}	6.99±0.41 ^{bc}
	Isoleucine	6.87±0.12 ^a	6.24±0.58 ^{ab}	6.80±0.44 ^a	6.55±0.24 ^a	5.46±0.29 ^{bc}	5.23±0.80 ^c	5.69±0.87 ^{bc}	6.29±0.43 ^{ab}
	Leucine	7.41±0.0 ^{ab}	7.21±0.17 ^{bc}	7.54±0.22 ^a	7.37±0.05 ^{ab}	6.62±0.10 ^e	6.58±0.23 ^e	6.85±0.29 ^{de}	7.03±0.26 ^{cd}
	Methionine	7.12±0.03 ^a	6.98±0.13 ^{ab}	7.27±0.12 ^a	7.15±0.04 ^a	6.27±0.12 ^d	6.31±0.21 ^d	6.61±0.34 ^c	6.74±0.31 ^{bc}
	N-acetylamino acid	6.96±0.23 ^a	6.71±0.30 ^{ab}	6.82±0.32 ^{ab}	6.67±0.08 ^{ab}	6.54±0.28 ^{ab}	6.46±0.22 ^b	6.66±0.47 ^{ab}	6.93±0.09 ^a
	N-acetylglucosamine	10.34±0.04 ^a	10.38±0.01 ^a	10.34±0.05 ^a	10.37±0.04 ^a	10.37±0.03 ^a	10.32±0.10 ^a	10.37±0.04 ^a	10.40±0.03 ^a
	N-acetylglutamate	6.30±0.18 ^{ab}	6.11±0.28 ^{ab}	6.45±0.26 ^a	6.27±0.05 ^{ab}	5.53±0.15 ^c	5.49±0.16 ^c	5.52±0.52 ^c	5.99±0.37 ^b
	Ornithine	7.07±0.08 ^a	6.91±0.17 ^{ab}	7.22±0.21 ^a	7.07±0.04 ^a	6.23±0.10 ^d	6.24±0.27 ^d	6.41±0.40 ^{cd}	6.68±0.28 ^{bc}
	Phenylalanine	7.55±0.10 ^a	7.62±0.09 ^a	7.54±0.11 ^a	7.55±0.11 ^a	7.49±0.15 ^a	7.51±0.11 ^a	7.49±0.17 ^a	7.37±0.35 ^a
	Proline	7.18±0.06 ^a	6.98±0.18 ^{ab}	7.28±0.18 ^a	7.14±0.03 ^a	6.31±0.14 ^d	6.33±0.13 ^d	6.55±0.37 ^{cd}	6.81±0.33 ^{bc}
Threonine	6.46±0.07 ^a	6.14±0.25 ^a	6.49±0.23 ^a	6.32±0.11 ^a	5.07±0.53 ^b	5.26±0.29 ^b	5.07±1.13 ^b	5.76±0.69 ^{ab}	
Tyrosine	7.57±0.03 ^a	7.33±0.13 ^{abc}	7.59±0.06 ^a	7.53±0.07 ^{ab}	6.64±0.19 ^{cd}	6.23±0.75 ^d	6.55±0.74 ^d	6.83±0.72 ^{bcd}	
Valine	6.66±0.09 ^a	6.37±0.29 ^a	6.70±0.26 ^a	6.51±0.11 ^a	5.66±0.26 ^b	5.66±0.22 ^b	5.69±0.63 ^b	6.13±0.58 ^{ab}	

กลุ่มสารประกอบเคมี	สารเมตาบอไลต์	วันที่ 1 หลังการคลอด				วันที่ 3 หลังการคลอด			
		A11	A21	B11	B21	A13	A23	B13	B23
คาร์โบไฮเดรตและอนุพันธ์	1,6-Anhydro-beta-D-glucose	7.30±0.06 ^a	7.05±0.11 ^a	7.28±0.11 ^a	7.23±0.10 ^a	6.85±0.09 ^a	6.71±0.23 ^{ab}	6.18±1.02 ^b	7.07±0.24 ^a
	Ascorbate	7.02±0.59 ^{ab}	6.98±0.44 ^{ab}	6.58±0.83 ^{ab}	6.28±0.64 ^b	7.02±0.24 ^{ab}	6.97±0.18 ^{ab}	7.14±0.50 ^a	7.39±0.03 ^a
	Galactose	7.84±0.60 ^a	8.00±0.10 ^a	8.09±0.15 ^a	7.96±0.07 ^a	8.09±0.05 ^a	8.05±0.11 ^a	7.92±0.06 ^a	8.24±0.33 ^a
	Lactose	9.19±0.14 ^c	9.29±0.10 ^{bc}	9.21±0.03 ^c	9.21±0.08 ^c	9.45±0.03 ^{ab}	9.45±0.04 ^{ab}	9.45±0.10 ^{ab}	9.50±0.22 ^a
	Glucose	9.18±0.14 ^c	9.29±0.10 ^{bc}	9.21±0.03 ^c	9.21±0.08 ^c	9.45±0.03 ^{ab}	9.45±0.04 ^{ab}	9.45±0.10 ^{ab}	9.50±0.22 ^a
	Sugar residue	7.91±0.13 ^a	7.64±0.11 ^{ab}	7.86±0.16 ^{ab}	7.80±0.16 ^{ab}	7.63±0.08 ^{ab}	7.49±0.20 ^b	7.14±0.46 ^c	7.77±0.29 ^{ab}
	UDP-galactose	8.16±0.04 ^a	8.07±0.04 ^{ab}	8.18±0.06 ^a	8.14±0.04 ^a	7.66±0.06 ^c	7.60±0.17 ^c	7.68±0.31 ^c	7.92±0.17 ^b
	UDP-glucose	7.85±0.11 ^a	7.62±0.09 ^{ab}	7.80±0.16 ^a	7.72±0.07 ^a	7.35±0.18 ^{bc}	7.21±0.25 ^c	7.35±0.35 ^{bc}	7.66±0.12 ^a
สารประกอบคาร์บอนิล	Acetone	6.41±0.09 ^{ab}	6.18±0.26 ^{ab}	6.49±0.24 ^a	6.32±0.08 ^{ab}	5.56±0.20 ^d	5.50±0.16 ^d	5.71±0.44 ^{cd}	6.06±0.39 ^{bc}
กรดอินทรีย์	Acetate	6.78±0.03 ^a	6.59±0.12 ^{ab}	6.87±0.11 ^a	6.75±0.01 ^a	5.99±0.13 ^c	5.97±0.18 ^c	6.11±0.37 ^c	6.40±0.25 ^b
	Acetoacetate	6.45±0.07 ^{ab}	6.22±0.25 ^{ab}	6.52±0.22 ^a	6.37±0.08 ^{ab}	5.60±0.22 ^d	5.55±0.14 ^d	5.73±0.45 ^{cd}	6.08±0.40 ^{bc}
	Benzoate	8.11±0.05 ^a	7.93±0.10 ^{ab}	8.21±0.04 ^a	8.13±0.04 ^a	7.27±0.11 ^{de}	7.19±0.24 ^e	7.50±0.36 ^{cd}	7.70±0.25 ^{bc}
	Butyrate	6.51±0.13 ^a	5.86±0.60 ^{ab}	6.35±0.64 ^a	6.11±0.31 ^{ab}	5.06±0.39 ^c	4.94±0.64 ^c	5.45±0.69 ^{bc}	5.91±0.44 ^{ab}
	Citrate	7.59±0.04 ^a	7.41±0.14 ^{ab}	7.69±0.11 ^a	7.58±0.05 ^a	6.70±0.13 ^d	6.69±0.17 ^d	6.98±0.37 ^{cd}	7.19±0.33 ^{bc}
	5,6-Dihydrothymine	7.10±0.03 ^a	6.95±0.12 ^{ab}	7.21±0.11 ^a	7.11±0.04 ^a	6.25±0.13 ^{de}	6.20±0.20 ^e	6.52±0.37 ^{cd}	6.74±0.32 ^{bc}
	Ethylmalonate	6.75±0.04 ^a	6.57±0.13 ^{ab}	6.81±0.08 ^a	6.73±0.09 ^a	5.78±0.18 ^{de}	5.70±0.14 ^e	6.05±0.43 ^{cd}	6.36±0.38 ^{bc}
	Fumarate	7.00±0.05 ^a	6.66±0.17 ^{ab}	6.85±0.14 ^{ab}	6.74±0.10 ^{ab}	6.54±0.10 ^{ab}	6.44±0.10 ^{ab}	6.29±0.83 ^b	6.46±0.63 ^{ab}
	Glycylproline	6.75±0.25 ^a	6.38±0.37 ^{ab}	6.63±0.42 ^a	6.14±0.64 ^{ab}	5.92±0.59 ^b	6.27±0.39 ^{ab}	6.53±0.20 ^{ab}	6.64±0.28 ^a
	Hippurate	8.28±0.02 ^a	8.08±0.11 ^{ab}	8.33±0.05 ^a	8.27±0.06 ^a	7.47±0.12 ^{cd}	7.31±0.28 ^d	7.60±0.48 ^{cd}	7.79±0.42 ^{bc}
	4-hydroxybutarate	6.98±0.08 ^a	6.77±0.20 ^{ab}	7.09±0.23 ^a	6.93±0.03 ^a	6.08±0.11 ^d	6.10±0.24 ^d	6.19±0.48 ^{cd}	6.54±0.33 ^{bc}

กลุ่มสารประกอบเคมี	สารเมตาบอไลต์	วันที่ 1 หลังการคลอด				วันที่ 3 หลังการคลอด			
		A11	A21	B11	B21	A13	A23	B13	B23
กรดอินทรีย์	Isobutyrate	6.56±0.13 ^a	6.09±0.48 ^{ab}	6.51±0.45 ^a	6.30±0.21 ^a	5.23±0.26 ^c	5.14±0.61 ^c	5.63±0.43 ^{bc}	5.95±0.50 ^{ab}
	Lactate	6.60±0.16 ^a	6.11±0.67 ^a	6.36±0.59 ^a	6.08±0.43 ^a	6.04±0.15 ^a	6.24±0.19 ^a	6.34±0.29 ^a	6.59±0.25 ^a
	Orotate	8.29±0.06 ^{ab}	8.28±0.09 ^{ab}	8.27±0.03 ^{ab}	8.23±0.05 ^b	8.38±0.10 ^a	8.30±0.07 ^{ab}	8.29±0.09 ^{ab}	8.25±0.08 ^b
	2-phosphoglycerate	7.17±0.21 ^b	7.94±0.12 ^a	7.15±0.34 ^b	7.24±0.23 ^b	8.07±0.11 ^a	7.77±0.13 ^a	7.92±0.21 ^a	7.86±0.17 ^a
	Succinate	6.95±0.04 ^{ab}	6.78±0.15 ^{bc}	7.08±0.18 ^a	6.95±0.02 ^{ab}	6.10±0.12 ^e	6.15±0.15 ^e	6.38±0.33 ^{de}	6.60±0.29 ^{cd}
	Uridine	8.32±0.04 ^a	8.17±0.09 ^{ab}	8.39±0.06 ^a	8.33±0.05 ^a	7.68±0.06 ^d	7.59±0.19 ^d	7.82±0.30 ^{cd}	7.99±0.23 ^{bc}
	Valerate and derivatives	7.30±0.11 ^a	6.80±0.46 ^{abc}	7.27±0.37 ^{ab}	7.04±0.19 ^{ab}	5.99±0.21 ^d	5.91±0.48 ^d	6.33±0.46 ^{cd}	6.69±0.50 ^{bc}
ไขมันและอนุพันธ์	Acetylcarnithine	6.40±0.13 ^a	6.24±0.21 ^{ab}	6.52±0.22 ^a	6.38±0.04 ^a	5.84±0.07 ^c	5.86±0.15 ^c	5.95±0.37 ^{bc}	6.25±0.25 ^{ab}
	Carnitine	6.60±0.11 ^{ab}	6.51±0.13 ^{ab}	6.74±0.11 ^a	6.66±0.09 ^{ab}	5.64±0.14 ^d	5.67±0.10 ^d	6.01±0.40 ^c	6.32±0.36 ^{bc}
	Cholate	6.33±0.11 ^a	5.90±0.38 ^{abc}	6.30±0.37 ^a	6.11±0.17 ^{ab}	4.76±0.45 ^e	5.07±0.31 ^{de}	5.41±0.42 ^{cd}	5.71±0.51 ^{bc}
	Choline and derivatives	7.04±0.15 ^{ab}	7.05±0.15 ^{ab}	7.26±0.17 ^a	7.17±0.08 ^{ab}	6.24±0.09 ^d	6.32±0.06 ^d	6.65±0.32 ^c	6.91±0.33 ^{bc}
	Glycerophosphocholine	6.64±0.20 ^a	6.59±0.24 ^a	6.45±0.46 ^{ab}	5.65±1.45 ^b	6.42±0.10 ^{ab}	6.47±0.11 ^{ab}	6.70±0.23 ^a	6.87±0.11 ^a
	O-phosphocholine	6.72±0.15 ^a	6.49±0.33 ^a	6.63±0.44 ^a	6.15±0.63 ^a	6.20±0.30 ^a	6.42±0.24 ^a	6.58±0.19 ^a	6.69±0.23 ^a

หมายเหตุ : a, b, c, d และ e แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ภาคผนวก ฉ

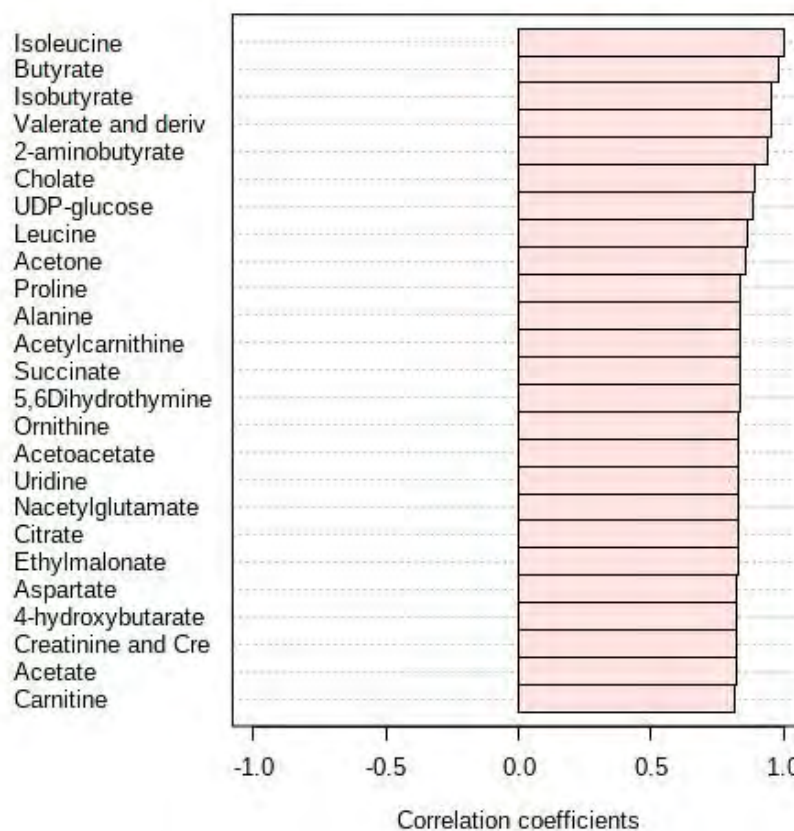
ความสัมพันธ์ระหว่างสารที่เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพกับสารเมตาบอไลต์อื่น ๆ ในน้ำนมเหลืองของโค

สารเมตาบอไลต์ที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) เพื่อจำแนกความแตกต่างระหว่างน้ำนมเหลืองที่ได้จากวันที่ 1 และวันที่ 3 หลังการคลอด ได้แก่ isoleucine, threonine, tyrosine, butyrate และ ethanol ซึ่งมีความสัมพันธ์กับสารเมตาบอไลต์อื่น ๆ ในน้ำนมเหลืองของโค สามารถวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของสารที่เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) กับสารเมตาบอไลต์อื่น ๆ ใน 25 ลำดับแรกได้จาก PatternHunter (<https://www.metaboanalyst.ca>) แสดงดังต่อไปนี้

ฉ1 ความสัมพันธ์ระหว่าง isoleucine กับสารเมตาบอไลต์อื่น ๆ ในน้ำนมเหลืองของโค

isoleucine มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับ butyrate, isobutyrate, valerate และ สารเมตาบอไลต์อื่น ๆ ดังภาพที่ ฉ1 กล่าวคือ เมื่อ isoleucine มีปริมาณเพิ่มขึ้น butyrate, isobutyrate, valerate และ สารเมตาบอไลต์อื่น ๆ จะเพิ่มขึ้นเช่นกัน โดย butyrate จะได้รับอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงของ isoleucine มากที่สุด

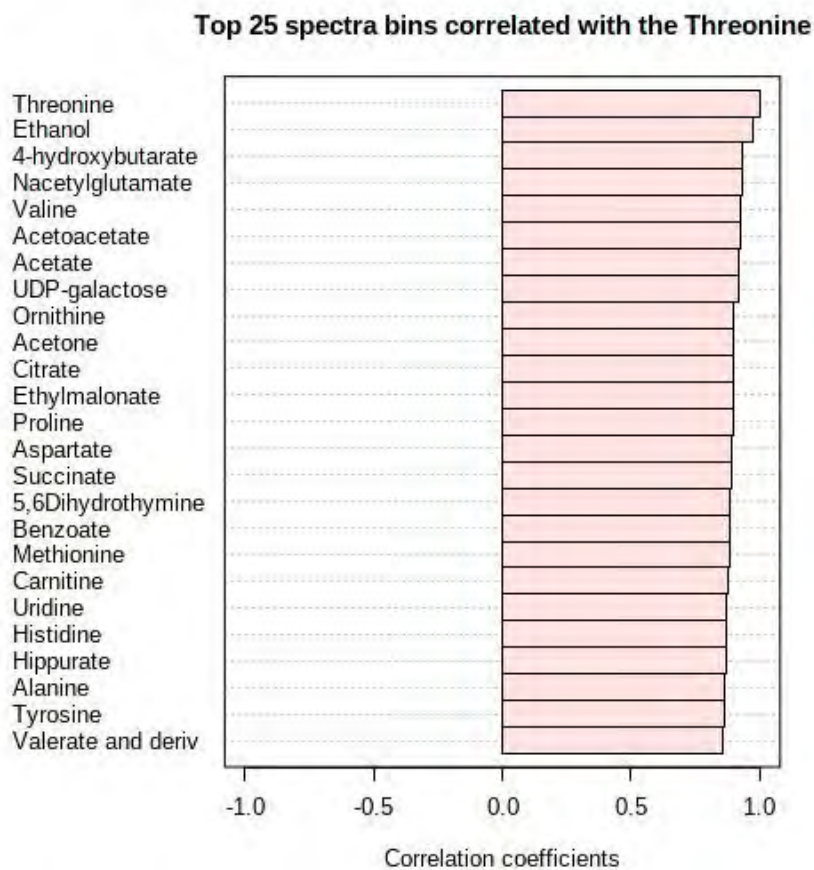
Top 25 spectra bins correlated with the Isoleucine



ภาพที่ ฉ1 ความสัมพันธ์ระหว่าง isoleucine กับสารเมตาบอไลต์อื่น ๆ ในน้ำนมเหลืองของโค

ฉ2 ความสัมพันธ์ระหว่าง Threonine กับสารเมตาบอไลต์อื่น ๆ ในน้ำนมเหลืองของโค

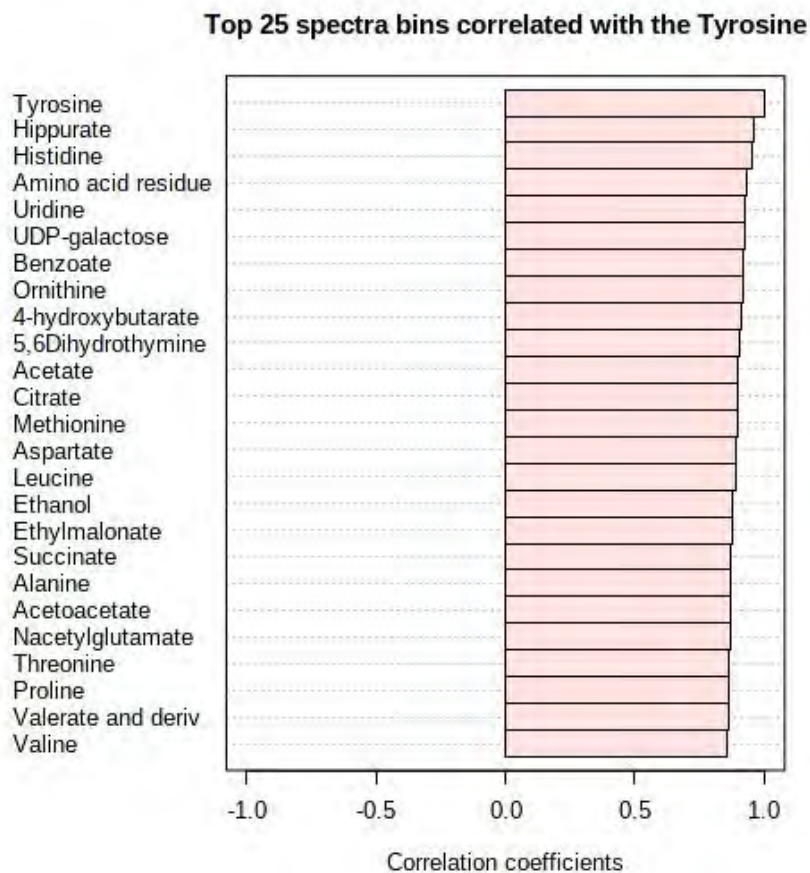
threonine มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับ ethanol, 4-hydroxybutyrate, N-acetylglucosamine และสารเมตาบอไลต์อื่น ๆ ดังภาพที่ ฉ2 กล่าวคือ เมื่อ threonine มีปริมาณเพิ่มขึ้น ethanol, 4-hydroxybutyrate, N-acetylglucosamine และ สารเมตาบอไลต์อื่น ๆ จะเพิ่มขึ้นเช่นกัน โดย ethanol จะได้รับอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงของ threonine มากที่สุด



ภาพที่ ฉ2 ความสัมพันธ์ระหว่าง threonine กับสารเมตาบอไลต์อื่น ๆ ในน้ำนมเหลืองของโค

ฉ3 ความสัมพันธ์ระหว่าง tyrosine กับสารเมตาบอไลต์อื่น ๆ ในน้ำนมเหลืองของโค

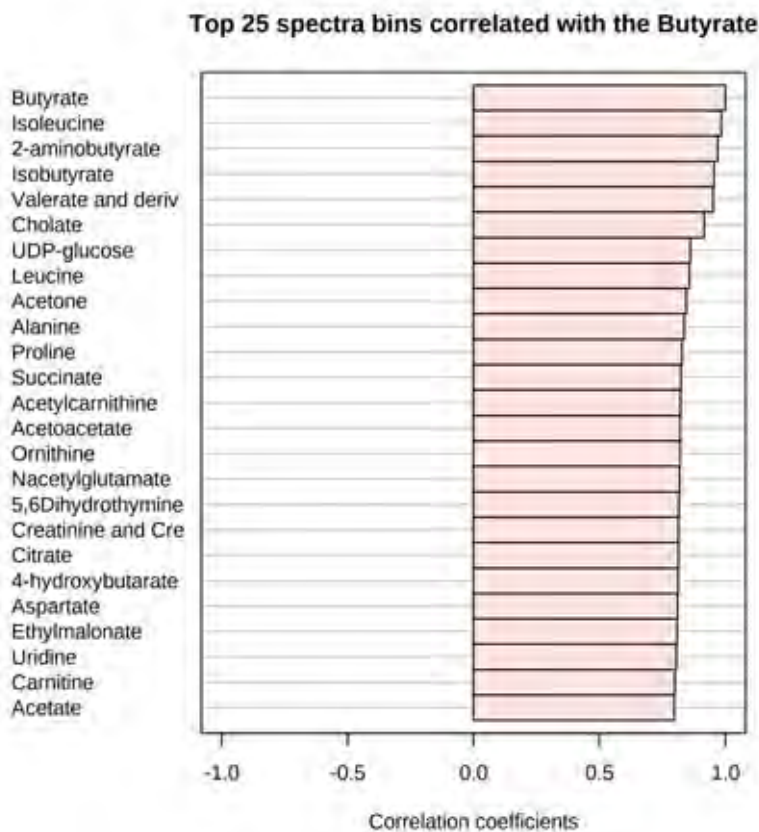
tyrosine มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับ hippurate, histidine, amino acid residue และ สารเมตาบอไลต์อื่น ๆ ดังภาพที่ ฉ3 กล่าวคือ เมื่อ tyrosine มีปริมาณเพิ่มขึ้น hippurate, histidine, amino acid residue และ สารเมตาบอไลต์อื่น ๆ จะเพิ่มขึ้นเช่นกัน โดย hippurate จะได้รับอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงของ tyrosine มากที่สุด



ภาพที่ ฉ3 ความสัมพันธ์ระหว่าง tyrosine กับสารเมตาบอไลต์อื่น ๆ ในน้ำนมเหลืองของโค

ฉ4 ความสัมพันธ์ระหว่าง butyrate กับสารเมตาบอไลต์อื่น ๆ ในน้ำนมเหลืองของโค

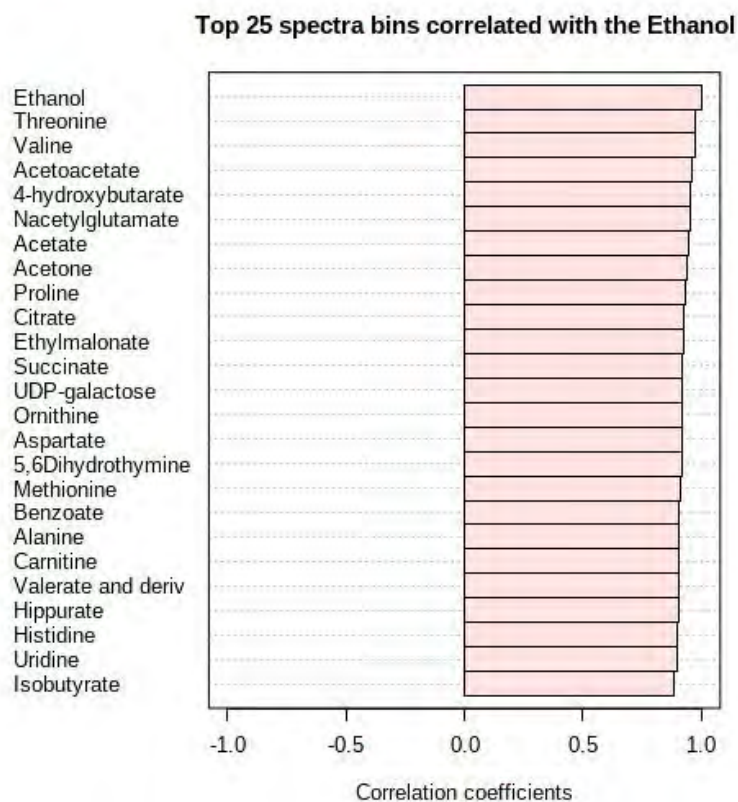
butyrate มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับ isoleucine, 2-aminobutyrate, isobutyrate และ สารเมตาบอไลต์อื่น ๆ ดังภาพที่ ฉ4 กล่าวคือ เมื่อ butyrate มีปริมาณเพิ่มขึ้น isoleucine, 2-aminobutyrate, isobutyrate และ สารเมตาบอไลต์อื่น ๆ จะเพิ่มขึ้นเช่นกัน โดย isoleucine จะได้รับอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงของ butyrate มากที่สุด



ภาพที่ ฉ4 ความสัมพันธ์ระหว่าง butyrate กับสารเมตาบอไลต์อื่น ๆ ในน้ำนมเหลืองของโค

ฉ5 ความสัมพันธ์ระหว่าง ethanol กับสารเมตาบอไลต์อื่น ๆ ในน้ำนมเหลืองของโค

ethanol มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับ threonine, valine, acetoacetate และ สารเมตาบอไลต์อื่น ๆ ดังภาพที่ ฉ5 กล่าวคือ เมื่อ ethanol มีปริมาณเพิ่มขึ้น threonine, valine, acetoacetate และ สารเมตาบอไลต์อื่น ๆ จะเพิ่มขึ้นเช่นกัน โดย threonine จะได้รับอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงของ ethanol มากที่สุด



ภาพที่ ฉ5 ความสัมพันธ์ระหว่าง ethanol กับสารเมตาบอไลต์อื่น ๆ ในน้ำนมเหลืองของโค

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาวน้ำทิพย์ วรรณขจีพิบูลย์
ตำแหน่ง	หัวหน้าโครงการ
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.)
ภาควิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีที่สำเร็จการศึกษา	2561
โทรศัพท์	082-3237581
E-mail	up_punpii@hotmail.com



ชื่อ-สกุล	นางสาวพัชชีญาณ์ อรัญพัฒนภรณ์
ตำแหน่ง	ผู้ร่วมวิจัย
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.)
ภาควิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีที่สำเร็จการศึกษา	2561
โทรศัพท์	093-4161562
E-mail	phatchiya-love@hotmail.co.th

