

การเปรียบเทียบโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดง
อาการและไม่แสดงอาการโดยใช้เทคโนโลยีเมตาโบลอมิกส์



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2560
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

COMPARISON OF BIOMOLECULAR PROFILE OF RAW MILK FROM CLINICAL AND SUBCLINICAL MASTITIS COWS USING METABOLOMICS TECHNOLOGY



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

Department of Food Technology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2017

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเปรียบเทียบโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการและไม่แสดงอาการโดยใช้เทคโนโลยีเมตาโบลอมิกส์
โดย	นางสาวมยุรี เหลืองวิลัย
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อ. ดร.ศานต์ เศรษฐชัยมงคล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เกียรติศักดิ์ ดวงมัลย์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวงนิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.อุบลรัตน์ สิริภัทราวรรณ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อ. ดร.ศานต์ เศรษฐชัยมงคล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เกียรติศักดิ์ ดวงมัลย์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาลีดา บรมพิชัยชาติกุล)

มยุรี เหลืองวิลัย : การเปรียบเทียบโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการและไม่แสดงอาการโดยใช้เทคโนโลยีเมตาโบลอมิกส์ (COMPARISON OF BIOMOLECULAR PROFILE OF RAW MILK FROM CLINICAL AND SUBCLINICAL MASTITIS COWS USING METABOLOMICS TECHNOLOGY) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ. ดร.ศานต์ เศรษฐชัยมงคล, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร.เกียรติศักดิ์ ดวงมาลย์, หน้า.

โรคเต้านมอักเสบ (mastitis) เป็นปัญหาที่สำคัญในอุตสาหกรรมการเลี้ยงโคนม เนื่องจากส่งผลโดยตรงต่อสุขภาพเต้านมของแม่โคทำให้คุณภาพและปริมาณน้ำนมดิบที่ผลิตได้ลดลง เมื่อพิจารณาลักษณะทางพยาธิวิทยาสามารถแบ่งโรคเต้านมอักเสบได้เป็น 2 ลักษณะคือ แบบแสดงอาการ (clinical) และแบบไม่แสดงอาการ (subclinical) โดยพบว่าการเกิดโรคเต้านมอักเสบส่งผลให้องค์ประกอบหลักทางเคมีในน้ำนมดิบหลายชนิดเปลี่ยนแปลงไปจากปกติ เทคโนโลยีเมตาโบลอมิกส์ (metabolomics) นั้นสามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อวิเคราะห์สารชีวโมเลกุลขนาดเล็ก (metabolite) ที่เป็นองค์ประกอบย่อยในน้ำนมดิบได้ ปัจจุบันยังไม่มีงานวิจัยที่ใช้เทคโนโลยีเมตาโบลอมิกส์เพื่อศึกษาโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของน้ำนมดิบในประเทศไทย ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างข้อมูลโพรไฟล์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยาก (non-volatile metabolite profile) ของน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบทั้งแบบที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการกับแม่โคที่มีสุขภาพปกติ รวมทั้งวิเคราะห์ระบุชนิดและปริมาณสัมพันธ์ของสารเมตาบอไลต์ที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) ต่อลักษณะทางพยาธิวิทยาดังกล่าว โดยใช้เทคนิค proton nuclear magnetic resonance ($^1\text{H-NMR}$) ความถี่สูง (500 MHz.) ในงานวิจัยนี้สามารถวิเคราะห์ระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ในน้ำนมดิบได้ทั้งหมด 46 สาร ผลจากการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal component analysis) และการวิเคราะห์แบบจัดกลุ่ม (cluster analysis) แสดงให้เห็นว่าข้อมูลโพรไฟล์สารเมตาบอไลต์ในน้ำนมดิบทั้ง 3 กลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนทางสถิติ โดยสามารถใช้ปริมาณสัมพันธ์ของ acetacetate, phenylalanine, threonine, isoleucine, leucine, hippurate, lactate, fumarate และ N-acetylglucosamine เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อแยกความแตกต่างระหว่างน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการและไม่แสดงอาการออกจากน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่มีสุขภาพปกติได้ ผลการวิจัยดังกล่าวสรุปได้ว่าการวิเคราะห์ข้อมูลโพรไฟล์สารเมตาบอไลต์ในน้ำนมดิบด้วย $^1\text{H-NMR}$ ร่วมกับการประมวลผลทางเคมิเมตริกซ์ (chemometrics) สามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อระบุอัตลักษณ์ทางชีวโมเลกุลของน้ำนมดิบสัมพันธ์กับลักษณะทางพยาธิวิทยาของโรคเต้านมอักเสบได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ภาควิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร	ลายมือชื่อนิสิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก
ปีการศึกษา	2560	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5872123523 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEYWORDS: CHEMOMETRICS/ DAIRY/ FOOD AUTHENTICATION/ METABOLITE PROFILE/
METABOLOMICS

MAYUREE LUANGWILAI: COMPARISON OF BIOMOLECULAR PROFILE OF RAW MILK FROM CLINICAL AND SUBCLINICAL MASTITIS COWS USING METABOLOMICS TECHNOLOGY. ADVISOR: SARN SETTACHAIMONGKON, Ph.D., CO-ADVISOR: ASST. PROF.KIATTISAK DUANGMAL, Ph.D., pp.

Mastitis is one of the most common diseases in dairy cows, causing a mild (subclinical infection) and serious infection (clinical symptoms) in the mammary glands. This pathogenicity results in a significant decrease in milk yield and provides negative influences on physical, chemical and microbiological properties of raw milk. 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 approach 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 raw milk collected from healthy, subclinical and clinical mastitis cows from selected farms in the central part of Thailand. After fat and proteins removal, milk 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. Results demonstrated that a total of 46 metabolites were presumptively identified in this study. Principal component analysis and hierarchical clustering allowed discriminating raw milk from healthy cows and cows associated with different mastitis status according to their $^1\text{H-NMR}$ metabolite profiles. Changes in the concentration of acetoacetate, phenylalanine, threonine, isoleucine, leucine, hippurate, lactate, fumarate and N-acetylglucosamine 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 authentication of Thai dairy product.

Department: Food Technology

Student's Signature

Field of Study: Food Technology

Advisor's Signature

Academic Year: 2017

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดีโดยความกรุณาและการสนับสนุนอย่างดียิ่งจาก อาจารย์ ดร. ศานต์ เศรษฐชัยมงคล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เกียรติศักดิ์ ดวงมาลัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้สละเวลาอันมีค่าในการชี้แนะแนวทางการแก้ปัญหาและอุปสรรค ให้การสนับสนุนและความช่วยเหลือตลอดมา รวมถึงให้คำแนะนำในการเขียนวิทยานิพนธ์จนสำเร็จจุลวง ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบโครงร่างวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ประกอบด้วย รองศาสตราจารย์ ดร. อุบลรัตน์ สิริภัทราวรรณ (ประธานคณะกรรมการสอบโครงร่างวิทยานิพนธ์) ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาลีตา บรมพิชัยชาติกุล (กรรมการสอบโครงร่างวิทยานิพนธ์) และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กฤษกมล ณ จอมกรรมการสอบโครงร่างวิทยานิพนธ์จากภายนอกมหาวิทยาลัย) ที่ให้ความรู้ พร้อมทั้งข้อเสนอแนะต่างๆ อันเป็นประโยชน์เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ คุณนวนน จันทรประสาร และเจ้าหน้าที่แผนกวิชาการโคนมจากองค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย (อ.ส.ค.) อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี และคุณรพีภัค กลั่นจันทร์ หัวหน้าแผนกส่งเสริมการเลี้ยงโคนม จากสหกรณ์โคนมไทย - เดนมาร์ก (มิตรภาพ) อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี ที่ให้คำแนะนำและให้การช่วยเหลือเป็นอย่างดีในการลงพื้นที่เก็บตัวอย่างน้ำนมดิบในฟาร์มของเกษตรกร อันเป็นประโยชน์ในการทำวิจัยเป็นอย่างมาก ขอขอบพระคุณ คุณธรา จันทรทะธรรม เจ้าหน้าที่ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ในการอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง ขอขอบพระคุณ คุณวรรณวิมล เมฆบุญส่งลาภ เจ้าหน้าที่บริการวิทยาศาสตร์ ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในการอำนวยความสะดวก ให้ข้อมูลและให้คำแนะนำ อันเป็นประโยชน์ในการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำนมดิบด้วย NMR spectroscopy และขอขอบพระคุณกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในการสนับสนุนทุนส่วนหนึ่งสำหรับช่วยในการดำเนินงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณรุ่นพี่ รุ่นน้องและเพื่อนนิสิตภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารที่ให้คำแนะนำและให้ความช่วยเหลือตลอดมา สุดท้ายขอขอบพระคุณครอบครัวและญาติ สำหรับกำลังใจและการสนับสนุนมาตลอด ส่งผลให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จจุลวง

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ณ
สารบัญภาพ	ต
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 สมมติฐานงานวิจัย	2
1.3 วัตถุประสงค์	2
1.4 ขอบเขตงานวิจัย.....	3
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์.....	4
2.1 น้ํานมดิบ (raw milk).....	4
2.1.1 สรีรวิทยาของเต้านมโค (physiology of mammary gland).....	4
2.1.2 การสังเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในน้ํานมดิบ	5
2.1.2.1 การสังเคราะห์โปรตีน (protein).....	6
2.1.2.2 การสังเคราะห์ไขมันนม (milk fat).....	7
2.1.2.3 การสังเคราะห์แลคโตส (lactose).....	7
2.1.2.4 การสังเคราะห์วิตามิน (vitamins) และแร่ธาตุ (minerals).....	8
2.1.3 ปริมาณองค์ประกอบทางเคมีในน้ํานมดิบ	9
2.1.3.1 น้ํ.....	9
2.1.3.2 ไขมัน.....	10

2.1.3.3 โพรตีน.....	10
2.1.3.4 แลคโตส	10
2.1.3.5 แร่ธาตุ.....	11
2.1.3.6 วิตามิน.....	11
2.1.3.7 สารประกอบอินทรีย์.....	11
2.2 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อความแปรผันของปริมาณน้ำนมดิบและองค์ประกอบทางเคมีน้ำนมใน น้ำนมดิบ	13
2.2.1 ชนิดของพันธุ์ (breed).....	13
2.2.2 ช่วงการให้น้ำนม (lactation period)	14
2.2.4 สภาพแวดล้อมและภูมิอากาศ.....	16
2.2.5 ปัจจัยทางด้านอาหาร.....	17
2.2.6 สุขภาวะของแม่โค.....	17
2.3 สถานการณ์และคุณภาพมาตรฐานของน้ำนมดิบในประเทศไทย.....	18
2.3.1 สถานการณ์	18
2.3.2 คุณภาพมาตรฐานของน้ำนมดิบในประเทศไทย.....	20
2.4 โรคเต้านมอักเสบ (mastitis).....	22
2.4.1 ความหมายของโรคเต้านมอักเสบ	22
2.4.2 เต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ (subclinical mastitis).....	24
2.4.3 เต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ (clinical mastitis).....	24
2.4.3.1 ชนิดเฉียบพลัน (acute mastitis)	25
2.4.3.2 ชนิดรุนแรงและเฉียบพลัน (per acute mastitis).....	25
2.4.3.3 ชนิดไม่รุนแรง (sub acute mastitis)	25
2.5 ปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรคเต้านมอักเสบ.....	25

2.5.1	ปัจจัยทางด้านสุขภาพของแม่โค	25
2.5.2	ปัจจัยของช่วงระยะหยุดพักรีดนม.....	26
2.5.3	ปัจจัยทางด้านการรีดนมและการทำความสะอาด.....	26
2.5.4	ปัจจัยทางด้านสภาพแวดล้อม	26
2.5.5	ปัจจัยทางด้านจุลินทรีย์	27
2.5.5.1	เชื้อก่อโรคที่ติดต่อกับเต้านมสู่เต้านม (contagious bacteria)	27
2.5.5.2	เชื้อก่อโรคที่พบตามสิ่งแวดล้อม (environmental bacteria).....	27
2.5.5.3	เชื้อก่อโรคที่พบน้อย (rare cause bacteria).....	28
2.6	การวินิจฉัยโรคเต้านมอักเสบ.....	30
2.6.1	การคลำเต้านม (palpation).....	30
2.6.2	ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของน้ำนม.....	30
2.6.3	การประเมินปริมาณโซมาติกเซลล์ ด้วยน้ำยา califonia mastitis test (CMT)	31
2.6.4	การตรวจปริมาณโซมาติกเซลล์ทางห้องปฏิบัติการ.....	31
2.7	ความสูญเสียจากเต้านมอักเสบ	32
2.7.1	ผลกระทบของน้ำนมดิบจากเต้านมอักเสบ.....	32
2.7.2	ผลกระทบของน้ำนมจากเต้านมอักเสบต่อผลิตภัณฑ์นม.....	33
2.8	วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีโอมิกส์ (omics sciences).....	34
2.9	เทคโนโลยีเมตาโบลอมิกส์ (metabolomics)	36
2.9.1	ข้อดีและข้อจำกัดเทคนิคทางเคมีวิเคราะห์ในการศึกษาทางเมตาโบลอมิกส์	36
2.9.1.1	Gas chromatography/mass spectrometry: GC/ MS.....	36
2.9.1.2	Liquid chromatography/mass spectrometry: LC/ MS.....	37
2.9.1.3	Nuclear magnetic resonance: NMR.....	37

2.9.2 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (nuclear magnetic resonance: NMR).....	38
2.9.2.1 หลักการของ nuclear magnetic resonance.....	39
2.9.2.2 หน่วยของค่าการเลื่อนทางเคมี (chemical shift: δ).....	40
2.9.2.3 สารมาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบในการวิเคราะห์ NMR (reference standard).....	41
2.10 การประมวลผลด้วยเทคนิคทางเคมิเมตริกซ์ (chemometrics).....	43
2.10.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal component analysis: PCA).....	43
2.10.2 การวิเคราะห์แบบจัดกลุ่ม (cluster analysis).....	44
2.11 การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเมตาโบลอมิกส์ในการศึกษาองค์ประกอบทางชีวเคมีในสินค้าเกษตรและอาหาร.....	44
2.12 การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเมตาโบลอมิกส์ในการศึกษาองค์ประกอบทางชีวเคมีในน้ำนม.....	48
2.13 ช่องว่างทางวิชาการและสมมติฐานในงานวิจัย.....	57
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินงานวิจัย.....	58
3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี.....	58
3.1.1 วัสดุ.....	58
3.1.2 อุปกรณ์.....	59
3.1.3 สารเคมี.....	61
3.2 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย.....	62
3.2.1 ภาพรวมของวิธีการดำเนินงานวิจัย.....	62
3.2.2 การทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์ (validation of methods).....	65
3.2.2.1 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารเคมีในการสกัดไขมันและความทนทานของหลอด centrifuge.....	65

3.2.2.2 การทดสอบจากสารตัวอย่างมาตรฐาน	66
3.2.2.3 การทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์ในผลิตภัณฑ์ นมทางการค้าในประเทศไทย	67
3.2.2.3.1 การตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมีในผลิตภัณฑ์นมทางการค้า	67
3.2.2.3.2 การตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ต่าง (pH) ในผลิตภัณฑ์นมทาง การค้า	67
3.2.3 การคัดเลือกตัวอย่างน้ำนมดิบในเขตพื้นที่อำเภอวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี และ อำเภอ ปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา	68
3.2.3.1 การเก็บตัวอย่างน้ำนมดิบ	69
3.2.3.2 การคัดเลือกตัวอย่างโดยการประเมินปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบ ด้วยน้ำยา california mastitis test (CMT)	71
3.2.3.3 การตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมีและปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบ	72
3.2.3.4 การตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ต่างของน้ำนมดิบ (pH) ในน้ำนมดิบ	73
3.2.4 การเตรียมตัวอย่างน้ำนมสำหรับการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ด้วย proton nuclear magnetic resonance (¹ H-NMR)	73
3.2.4.1 การเตรียมตัวอย่างน้ำนมก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย ¹ H-NMR	73
3.2.4.2 การเตรียมตัวอย่างน้ำนมเพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย ¹ H-NMR	75
3.2.5 การประมวลผลไฟล์ทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างน้ำนม โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ ทาง เมตาโบลอมิกส์	76
3.2.6 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ	76
3.2.7 วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง	77
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์การทดลอง	78
4.1 การทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์ (validation of methods)	78

4.1.1 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารเคมีในการสกัดไขมันและความทนทานของ หลอด centrifuge	78
4.1.2 การทดสอบจากสารตัวอย่างมาตรฐาน.....	83
4.1.3 การทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์ในผลิตภัณฑ์นมทาง การค้าในประเทศไทย.....	84
4.1.3.1 การตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมีในผลิตภัณฑ์นมทางการค้า.....	85
4.1.3.2 การตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำนม (pH) ในผลิตภัณฑ์นมทาง การค้า.....	86
4.1.3.3 การประมวลผลโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างน้ำนม โดยใช้เทคนิคการ วิเคราะห์ทางเมตาโบลอมิกส์.....	89
4.1.3.3.1 การประมวลผล spectra ของ $^1\text{H-NMR}$ และการระบุชนิดของ สารเมตาบอไลต์	89
4.1.3.3.2 การเปรียบเทียบโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างผลิตภัณฑ์ นมพาสเจอร์ไรส์ นมยูเอชที นมออร์แกนิก นมพรีเมียมและนมฮ อกโกโดที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ โดยเทคนิค heat- map visualization และ hierarchical cluster analysis (HCA).....	90
4.1.3.3.3 การเปรียบเทียบโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างผลิตภัณฑ์ นมพาสเจอร์ไรส์ นมยูเอชที นมออร์แกนิก นมพรีเมียมและนมฮ อกโกโดที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ โดยการวิเคราะห์ องค์ประกอบหลัก (principal component analysis: PCA).....	93
4.1.3.3.4 การเปรียบเทียบ NMR spectra ของตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมพาส เจอร์ไรส์ นมยูเอชที นมออร์แกนิก นมพรีเมียมและนมฮอกโก โดที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$	95

4.1.3.3.5 การเปรียบเทียบโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมพาสเจอร์ไรส์ นมยูเอชที นมออร์แกนิกของตราสินค้า A ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ¹ H-NMR โดยการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal component analysis: PCA).....	96
4.1.3.3.6 การเปรียบเทียบ NMR spectra ของตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมพาสเจอร์ไรส์ นมยูเอชที นมออร์แกนิกของตราสินค้า A ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ¹ H-NMR.....	98
4.2 การคัดเลือกตัวอย่างน้ำนมดิบในเขตพื้นที่อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี และอำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา	99
4.2.1 การคัดเลือกตัวอย่างโดยการประเมินปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบ ด้วยน้ำยา california mastitis test (CMT).....	100
4.2.2 การตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมีและปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบ	105
4.2.3 การตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในน้ำนมดิบ.....	110
4.2.4 การประมวลโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างน้ำนมดิบ โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ทางเมตาโบลอมิกส์	111
4.2.4.1 การประมวลผล spectra ของ ¹ H-NMR และการระบุสารเมตาบอไลต์.....	111
4.2.4.2 การเปรียบเทียบโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างน้ำนมดิบจากแม่โคปกติ แม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการและแบบแสดงอาการที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ¹ H-NMR โดยเทคนิค heat- map visualization และ hierarchical cluster analysis (HCA)	114
4.2.4.3 การเปรียบเทียบโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างน้ำนมดิบจากแม่โคปกติ แม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการและแบบแสดงอาการที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ¹ H-NMR โดยการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal component analysis: PCA).....	117
4.2.4.3.1 การเปรียบเทียบโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างน้ำนมดิบจากแม่โคปกติ แม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการและแบบแสดงอาการ.....	117

4.2.4.3.2 การเปรียบเทียบโพर्फิรทางชีวโมเลกุลระหว่างตัวอย่างน้ำนม ดิบจากแม่โคปกติกับแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดง อาการ	119
4.2.4.3.3 การเปรียบเทียบโพर्फิรทางชีวโมเลกุลระหว่างตัวอย่างน้ำนม ดิบจากแม่โคปกติกับ แม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดง อาการ	120
4.2.4.3.4 การเปรียบเทียบโพर्फิรทางชีวโมเลกุลระหว่างตัวอย่างน้ำนม ดิบจากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการกับ แบบแสดงอาการ	122
4.2.4.4 การเปรียบเทียบ NMR spectra ของตัวอย่างน้ำนมดิบจากแม่โคปกติ แม่ โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการและแบบแสดงอาการที่ได้ จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$	123
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	129
5.1 สรุปผลการทดลอง	129
5.2 ข้อเสนอแนะ	131
รายการอ้างอิง	132
ภาคผนวก ก	150
ภาคผนวก ข	153
ภาคผนวก ค	156
ภาคผนวก ง	158
ภาคผนวก จ	160
ภาคผนวก ฉ	161
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	169

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันที่ได้จากโคพันธุ์ต่างๆ	13
ตารางที่ 2.2 จำนวนโคนม ณ วันที่ 1 มกราคม และปริมาณการผลิตน้ำมันดิบ รายภาค ปี 2557-2559	19
ตารางที่ 2.3 สรุปลักษณะที่เรียที่ก่อให้เกิดโรคเต้านมอักเสบ	29
ตารางที่ 2.4 การเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีระหว่างในน้ำมันปกติกับในน้ำมันที่มีปริมาณโซมาติกเซลล์สูง.....	33
ตารางที่ 2.5 ข้อดีและข้อจำกัดของเทคนิคทางเคมีวิเคราะห์ระหว่าง mass spectrometry (MS) และ nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy.....	38
ตารางที่ 2.6 ตัวอย่างงานวิจัยที่ได้ประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเมตาโบลอมิกส์ในการศึกษาองค์ประกอบทางชีวเคมีในสินค้าเกษตรและอาหาร	45
ตารางที่ 2.7 ตัวอย่างสารเมตาบอไลต์ในน้ำมัน ทั้งชนิดที่ระเหยง่าย (volatile) และชนิดที่ระเหยยาก (non-volatile)	49
ตารางที่ 2.8 ตัวอย่างงานวิจัยที่ได้ประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเมตาโบลอมิกส์ในการศึกษาองค์ประกอบทางชีวเคมีในน้ำมัน	53
ตารางที่ 3.1 การเปรียบเทียบตัวอย่างเพื่อทดสอบความทนทานของหลอด centrifuge และประสิทธิภาพของสารเคมีในการสกัดไขมัน	65
ตารางที่ 3.2 รายละเอียดฟาร์มโคนมของเกษตรกร (ภาคผนวก ง)	68
ตารางที่ 3.3 สรุปลักษณะตัวอย่างน้ำมันดิบในแต่ละฟาร์ม	70
ตารางที่ 4 .1 อันตรายของ chloroform (RCI Labscan Co.,Ltd, Bangkok, Thailand) และ dichloromethane (RCI Labscan Co., Ltd, Bangkok, Thailand) จากเอกสารข้อมูลความปลอดภัย (SDS).....	79
ตารางที่ 4.2 องค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันดิบ จากการวิเคราะห์ด้วย เครื่อง MilkoScanTM FT+ analyzer (FOSS, Hilleroed, Denmark) โดยใช้เทคนิค Fourier Transform Infrared	

(FTIR) และค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์ นมยูเอชที นมออร์แกนิก นมพรีเมียมและนมฮอกไกโด	88
ตารางที่ 4.3 สารเมตาบอไลต์ที่พบในตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์ นมยูเอชที นมออร์แกนิก นมพรีเมียมและนมฮอกไกโดในงานวิจัยนี้ (ภาคผนวก ฉ).....	89
ตารางที่ 4.4 ผลของปฏิกริยาระหว่างน้ำนมดิบกับน้ำยา CMT.....	104
ตารางที่ 4.5 องค์ประกอบทางเคมีในน้ำนมดิบ จากการวิเคราะห์ด้วย เครื่อง MilkoScan TM FT+ analyzer (FOSS, Hilleroed, Denmark) โดยใช้เทคนิค fourier transform infrared (FTIR) ปริมาณโซมาติกเซลล์ ตรวจวัดด้วยเครื่อง Fossomatic TM FC (FOSS, Hilleroed, Denmark) โดยใช้เทคนิค flow cytometry และค่าความเป็นกรด-ด่างในน้ำนมดิบจากแม่โคปกติ แม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการและแบบแสดงอาการ	106
ตารางที่ 4.6 สารเมตาบอไลต์ (metabolite profile) ที่พบในน้ำนมดิบจากแม่โคปกติ แม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการและแบบแสดงอาการในงานวิจัยนี้ (ภาคผนวก ฉ)	113
ตารางที่ จ1 แสดงข้อมูลโภชนาการของผลิตภัณฑ์นมทางการค้าในประเทศไทย คือ นมพาสเจอร์ไรส์ นมยูเอชที นมออร์แกนิก ของตราสินค้า A นมพาสเจอร์ไรส์ นมยูเอชที และนมพรีเมียม ของตราสินค้า B และปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของนมฮอกไกโดของตราสินค้า C	160
ตารางที่ ฉ 1 ปริมาณสัมพัทธ์ของสารเมตาบอไลต์ของผลิตภัณฑ์นมทางการค้าในประเทศไทย 7 ตัวอย่าง.....	162
ตารางที่ ฉ 2 ปริมาณสัมพัทธ์ของสารเมตาบอไลต์ในน้ำนมดิบจากแม่โคปกติ แม่โคเป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ และแบบแสดงอาการ	166

สารบัญภาพ

ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของเต้านมแม่โค 4

ภาพที่ 2.2 (ก) เต้านมของโค และ (ข) กระเปาะสร้างน้ำนม 5

ภาพที่ 2.3 วิธีการนำสารตั้งต้นเข้าสู่เซลล์ทั้ง 5 วิธี โดย i) คือ exocytosis ii) คือ lipid iii) คือ apical transport iv) คือ transcytosis และ v) คือ paracellular pathway 6

ภาพที่ 2.4 โครงสร้างโมเลกุลของแลคโตส 8

ภาพที่ 2.5 การเคลื่อนผ่านรอยต่อระหว่างเซลล์ (paracellular pathway) และการเคลื่อนผ่านเซลล์โดยตรง (transcellular pathway) 9

ภาพที่ 2.6 องค์ประกอบและโครงสร้างของน้ำนม (น้ำนมดิบ 1 กิโลกรัม) 12

ภาพที่ 2.7 การผลิตน้ำนมของแม่โค 15

ภาพที่ 2.8 สมดุลพลังงานของร่างกายแม่โค 18

ภาพที่ 2.9 แหล่งผลิตโคนมของประเทศไทย 20

ภาพที่ 2.10 การทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวเมื่อมีเชื้อโรคเข้าสู่เซลล์ 23

ภาพที่ 2.11 แผนภาพ "omics" แสดงภาพรวมของวิธีการผสมผสานที่ครบวงจร ได้แก่ genomics, transcriptomics, proteomics และ metabolomics 35

ภาพที่ 2.12 การจัดวางตัวของสนามแม่เหล็กของนิวเคลียสระหว่างไม่มีสนามแม่เหล็กภายนอก B_0 (no field) กับ มีสนามแม่เหล็กภายนอก B_0 (with field) 39

ภาพที่ 3.1 ภาพรวมของวิธีการดำเนินงานในงานวิจัยนี้ 64

ภาพที่ 3.2 (ก) อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการประเมินปริมาณไขมันในน้ำนมดิบ (ข) ตัวอย่างน้ำนมดิบหลังทำปฏิกิริยากับน้ำยา CMT 72

ภาพที่ 3.3 สรุptionขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างน้ำนม สำหรับการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ spectrometer ในงานวิจัยนี้ 74

ภาพที่ 4.1 NMR spectra อ่างอิงของตัวอย่างน้ำนมพาสเจอร์ไรส์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ 81

ภาพที่ 4.2 เปรียบเทียบ NMR spectra ของตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์ที่สกัดไขมันจากหลอด centrifuge ที่ผลิตจาก PP และใช้ dichloromethane ในการสกัดไขมัน (■) สกัดไขมันจากหลอด centrifuge ที่ผลิตจาก FEP และใช้ dichloromethane ในการสกัดไขมัน (■) สกัดไขมันจากหลอด centrifuge ที่ผลิตจาก PP และใช้ chloroform ในการสกัดไขมัน (■) และสกัดไขมันจากหลอด centrifuge ที่ผลิตจาก FEP และใช้ chloroform ในการสกัดไขมัน (■).....82

ภาพที่ 4.3 NMR spectra ของตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์ของตราสินค้า A ผสมกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (■) เปรียบเทียบกับตัวอย่างสารมาตรฐานผสมกับตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์ของตราสินค้า A และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (■) และตัวอย่างสารมาตรฐานผสมกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (■) จากการวิเคราะห์ด้วย ¹H-NMR.....84

ภาพที่ 4.4 แผนผังแสดงจำนวน bin จากการประมวลผลด้วยวิธีทางสถิติเพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร.....90

ภาพที่ 4.5 แผนภาพความร้อน (heat map) และการวิเคราะห์ HCA ของโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ¹H-NMR จากตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์ (■) นมยูเอชที (■) นมออร์แกนิก (■) ของตราสินค้า A นมพาสเจอร์ไรส์ (■) นมยูเอชที (■) นมพรีเมียม (■) ของตราสินค้า B และนมฮอกไกโดของตราสินค้า C (■).....92

ภาพที่ 4.6 PCA score plot (ก) และ PC loading (ข) ของโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ¹H-NMR จากตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์ (●) นมยูเอชที (◆) นมออร์แกนิก (■) ของตราสินค้า A นมพาสเจอร์ไรส์ (✕) นมยูเอชที (◆) นมพรีเมียม (★) ของตราสินค้า B และนมฮอกไกโดของตราสินค้า C (▲).....94

ภาพที่ 4.7 NMR spectra ของตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์ (■) นมยูเอชที (■) นมออร์แกนิก (■) ของตราสินค้า A นมพาสเจอร์ไรส์ (■) นมยูเอชที (■) นมพรีเมียม (■) ของตราสินค้า B และนมฮอกไกโดของตราสินค้า C (■) ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ¹H-NMR.....96

ภาพที่ 4.8 PCA score plot (ก) และ PC loading (ข) ของโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ¹H-NMR จากตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์ (●) นมยูเอชที (◆) นมออร์แกนิก (■) ของตราสินค้า A.....97

ภาพที่ 4.9 NMR spectra ของตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์ (■) นมยูเอชที (■) นมออร์แกนิก (■) ของตราสินค้า A ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ¹H-NMR.....99

ภาพที่ 4.10 ลักษณะที่สังเกตเห็นได้ คือ (ก) เต้านมบวม (swelling) (ข) น้ำนมมีสีเหลือง (yellowish milk) และ (ค) มีลิ่ม (clot) ในน้ำนมดิบจากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ.....101

ภาพที่ 4.11 ลักษณะของส่วนผสมระหว่างน้ำนมดิบกับน้ำยา CMT จากการประเมินปริมาณโซมาติกเซลล์ใน (ก) น้ำนมดิบที่ได้จากโคที่ปกติ เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการและแบบแสดงอาการ (ข) น้ำนมดิบที่ได้จากโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ.....103

ภาพที่ 4.12 การเปรียบเทียบปริมาณแลคโตสของน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคปกติ (■) แม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ (■) และแบบแสดงอาการ (■).....107

ภาพที่ 4.13 การเปรียบเทียบปริมาณโซมาติกเซลล์ของน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคปกติ (■) แม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ (■) และแบบแสดงอาการ (■).....109

ภาพที่ 4.14 การเปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคปกติ (■) แม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ (■) และแบบแสดงอาการ (■).....111

ภาพที่ 4.15 แผนผังแสดงจำนวน bin จากการประมวลผลด้วยวิธีทางสถิติเพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร.....114

ภาพที่ 4.16 วิเคราะห์โดยการจัดกลุ่ม ด้วยเทคนิค heat-map visualization และ hierarchical cluster analysis (HCA) ของโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ¹H-NMR จากตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคปกติ (■) แม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ (■) และแบบแสดงอาการ (■).....116

ภาพที่ 4.17 PCA score plot (ก) และ PC loading (ข) ของโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ¹H-NMR จากตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคปกติ (■) แม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ (■) และแบบแสดงอาการ (■).....118

ภาพที่ 4.18 PCA score plot (ก) และ PC loading (ข) ของโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ¹H-NMR จากตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคปกติ (■) แม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ (■).....120

ภาพที่ 4.19 PCA score plot (ก) และ PC loading (ข) ของโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ¹H-NMR จากตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคปกติ (■) และแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ (■).....121

ภาพที่ 4.20 PCA score plot (ก) และ PC loading (ข) ของโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ จากตัวอย่างน้ำมันดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ (■) และแบบแสดงอาการ (■).....	123
ภาพที่ 4.21 เปรียบเทียบ NMR spectra ของตัวอย่างน้ำมันดิบที่ได้จากแม่โคปกติ (■) แม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ (■) และแบบแสดงอาการ (■) ที่ได้รับการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$	124
ภาพที่ 4.22 การใช้ประโยชน์จากโครงสร้างบอนจากกรดอะมิโน.....	126
ภาพที่ 4.23 แผนภาพเวนน (Venn Diagram) ของสารเมตาบอไลต์ในตัวอย่างน้ำมันดิบที่ได้จากแม่โคปกติ (■) แม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ (■) และแบบแสดงอาการ (■).....	128
ภาพที่ ก1.1 หลักการ fourier transform infrared spectrometer (FTIR).....	151
ภาพที่ ก1.2 หลักการของเทคนิค flow cytometry.....	152
ภาพที่ ข1.1 (ก) หลอด centrifuge ผลิตจาก polypropylene (PP) และ (ข) fluorinated ethylene propylene (FEP).....	153
ภาพที่ ค2.1 อุปกรณ์เตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร.....	157
ภาพที่ ฉ1 การระบุตำแหน่งข้อมูลของสารเมตาบอไลต์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ ของผลิตภัณฑ์นมทางการค้าในประเทศไทย (ก) ภาพขยายในช่วง Aliphatic region (ข), ภาพขยายในช่วง Sugar region (ค), และภาพขยายในช่วง Aromatic region (ค).....	161
ภาพที่ ฉ2 การระบุตำแหน่งข้อมูลของสารเมตาบอไลต์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ ในน้ำมันดิบจากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ (ก) ภาพขยายในช่วง Aliphatic region (ข), ภาพขยายในช่วง Sugar region (ค), และภาพขยายในช่วง Aromatic region (ค).....	165

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

อุตสาหกรรมการเลี้ยงโคนม เป็นหนึ่งในอาชีพที่มีความสำคัญต่อคนไทยเป็นอย่างมาก เนื่องจากเป็นอาชีพพระราชทานและสร้างรายได้ให้กับเกษตรกรได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตาม น้ำนมโคดิบของประเทศไทยในปัจจุบันยังคงประสบกับปัญหาคุณภาพที่ไม่สม่ำเสมอ โดยคุณภาพของน้ำนมดิบนั้นสามารถพิจารณาได้จากสมบัติทางกายภาพ องค์ประกอบทางเคมี และสุขลักษณะทางจุลินทรีย์ของน้ำนมดิบ ซึ่งใช้ในการประเมินราคาซื้อขายน้ำนมดิบของเกษตรกร หากพิจารณาเฉพาะองค์ประกอบทางเคมี น้ำนมดิบนั้นประกอบด้วยองค์ประกอบหลัก คือ โปรตีน ไขมัน แลคโตส วิตามิน แร่ธาตุ และน้ำ ซึ่งองค์ประกอบเหล่านี้จะผันแปรโดยขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น สายพันธุ์ อายุ สุขภาวะของแม่โค อาหาร ฤดูกาล ความถี่ในการรีดนม และระยะเวลาในการให้นม ตลอดจนสุขอนามัยและวิธีปฏิบัติในการจัดการฟาร์มโคนม

โรคเต้านมอักเสบ (mastitis) เป็นปัญหาสำคัญที่สร้างความสูญเสียต่อผลผลิตน้ำนมดิบ โดยโรคเต้านมอักเสบสามารถแบ่งได้เป็น 2 ลักษณะคือ i) แบบแสดงอาการ จะมีการเปลี่ยนแปลงที่บริเวณเต้านม เช่น เต้านมแข็ง บวม และน้ำนมดิบ เช่น มีตะกอน และ ii) แบบไม่แสดงอาการ แม่โคมีลักษณะปกติ และไม่มีการเปลี่ยนแปลงให้เห็น แต่มีการติดเชื้อแฝงและมีปริมาณโซมาติกเซลล์เพิ่มขึ้น น้ำนมดิบที่ได้จะมีปริมาณลดลง นอกจากนี้โรคเต้านมอักเสบยังส่งผลให้องค์ประกอบหลักทางเคมีในน้ำนมดิบลดลง เช่น ไขมัน และแลคโตส เป็นต้น ส่งผลให้คุณภาพของน้ำนมดิบต่ำลง รวมทั้งยังมีการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบย่อยทางเคมีในน้ำนมดิบ ซึ่งส่งผลต่อคุณภาพของน้ำนมดิบเช่นกัน ปัจจุบันได้มีการนำเทคโนโลยีสมัยใหม่ เช่น เทคโนโลยีเมตาโบลอมิกส์ มาศึกษาการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบย่อยทางเคมีในน้ำนมดิบจากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ

เทคโนโลยีเมตาโบลอมิกส์ (metabolomics) เป็นหนึ่งในเทคโนโลยีโอมิกส์ สามารถใช้วิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ (metabolite) ที่เป็นองค์ประกอบในระบบอาหาร โดยข้อมูลที่ได้จะเรียกว่า เมตาโบลอม และเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลเมตาโบลอมด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร (multivariate statistical analysis) ข้อมูลที่ได้จะช่วยให้เข้าใจถึงโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุล

(biomolecular profile) และกลไกการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบในระบบอาหารได้ ปัจจุบันยังไม่มีงานวิจัยที่ใช้เทคโนโลยีเมตาโบลอมิกส์เพื่อศึกษาโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของน้ำนมดิบในประเทศไทย งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสภาวะของแม่โคต่อการเปลี่ยนแปลงสารเมตาโบไลต์ในน้ำนมดิบ โดยเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบทั้งแบบที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการกับแม่โคปกติ รวมทั้งวิเคราะห์ชนิดของสารเมตาโบไลต์ที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อลักษณะทางพยาธิวิทยาดังกล่าว

1.2 สมมติฐานงานวิจัย

1. สามารถหาโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบทั้งแบบที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการ และแม่โคปกติ จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ ได้
2. สามารถบอกความแตกต่างระหว่างโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบทั้งแบบที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการกับแม่โคปกติ ด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปรได้
3. สามารถหาชนิดของสารเมตาโบไลต์ที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อลักษณะทางพยาธิวิทยาของแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบทั้งแบบที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการได้

1.3 วัตถุประสงค์

1. วิเคราะห์และเปรียบเทียบโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการและไม่แสดงอาการกับแม่โคปกติ โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ทางเมตาโบลอมิกส์
2. วิเคราะห์ชนิดของสารเมตาโบไลต์ที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อลักษณะทางพยาธิวิทยาดังกล่าว

1.4 ขอบเขตงานวิจัย

1. วิเคราะห์และเปรียบเทียบโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของผลิตภัณฑ์นมทางการค้าในประเทศไทย จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ ร่วมกับวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร เพื่อทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์
2. วิเคราะห์ชนิดของสารเมตาโบไลต์ที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อปัจจัยการผลิตที่แตกต่างกัน คือ ทรายสิ่นค้ำ กระบวนการให้ความร้อน และการผลิตในระบบเกษตรอินทรีย์
3. วิเคราะห์และเปรียบเทียบโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการและแสดงอาการกับแม่โคปกติ จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ ร่วมกับวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร
4. วิเคราะห์ชนิดของสารเมตาโบไลต์ที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อลักษณะทางพยาธิวิทยาของโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการและแสดงอาการ

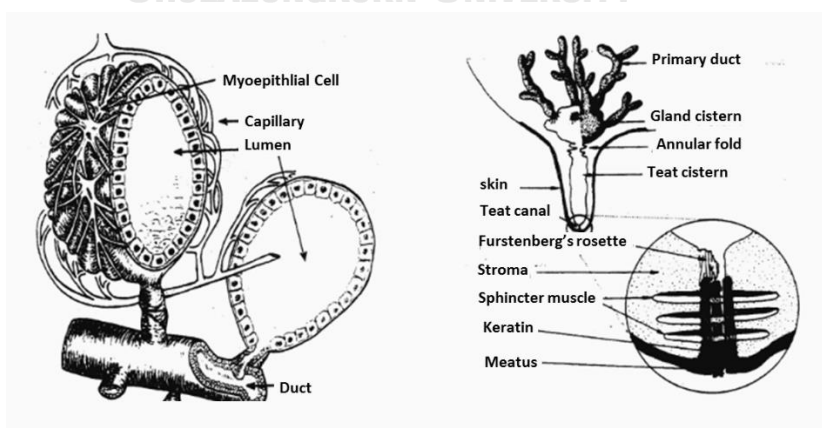
บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 น้ำนมดิบ (raw milk)

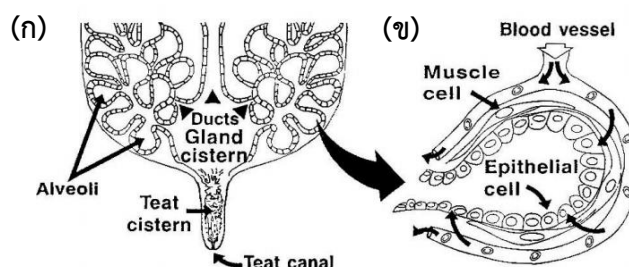
2.1.1 สรีรวิทยาของเต้านมโค (physiology of mammary gland)

เต้านมจัดเป็นอวัยวะในการกลั่นสร้างน้ำนมของโค โดยเต้านมโคจะมีทั้งหมด 4 เต้า แต่ละเต้าแยกออกจากกันโดยอิสระเป็น ซ้าย-ขวา และหน้า-หลัง น้ำนมดิบที่ได้มาจากหัวนมหนึ่งก็จะได้จากการผลิตของเนื้อเยื่อในเต้านั้น น้ำนมดิบที่ผลิตได้ไม่สามารถไหลเวียนไปยังเต้านมอื่นๆ ได้ ทำให้เกษตรกรสามารถรีดน้ำนมดิบจากเต้านมที่ปกติของแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบเพียงบางเต้าได้ (วิทยา สุริยาสถาพร, 2559) เต้านมโคแต่ละเต้าประกอบด้วย กระจเปาะนม (alveoli) จะอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม มีลักษณะคล้ายผลองุ่น ภายในมีกลุ่มเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ (myoepithelial cell) ทำหน้าที่นำสารอาหารออกจากกระแสเลือดมาผลิตน้ำนม เรียกว่า กาแลคโตโพไลซิส (Galactopolesis) คือการเปลี่ยนสารอาหารไปเป็นนมโดยพลังงานที่ใช้ส่วนใหญ่มาจากกลูโคสที่สร้างจากกรดโพธิโอนิก (Wattiaux, 2011) น้ำนมที่สร้างได้จากเซลล์สร้างน้ำนมจะไหลผ่านท่อเข้าสู่โพรงเก็บน้ำนม (gland cistern) แล้วต่อไปยังท่อหัวนม (teat cistern) (Hennighausen and Robinson, 2005; Bloise et al., 2010) (ภาพที่ 2.1 และ 2.2)



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของเต้านมแม่โค

ที่มา : Larson (1985)



ภาพที่ 2.2 (ก) เต้านมของโค และ (ข) กระจาเปาะสร้างน้ำนม

ที่มา : Harding (1995)

การหลั่งน้ำนมเกิดขึ้นได้เนื่องจาก ที่ alveoli จะมีเส้นเลือดฝอยรอบๆ และมี myoepithelial cell ซึ่งมีความไวต่อฮอร์โมนออกซิโตซิน (oxytocin) การหลั่งฮอร์โมนออกซิโตซิน จะหลั่งเมื่อมีการกระตุ้น เช่น การเช็ดเต้า การให้อาหารชั้น เป็นต้น ทำให้ต่อมได้สมองส่วนหลังหลั่ง ฮอร์โมนออกซิโตซินในระยะเวลาอันสั้น โดยเข้ามาในกระแสเลือดทำให้ myoepithelial cell เกิด การหดตัว ทำให้บีบน้ำนมไหลออกมายังโพรงเก็บน้ำนม ก่อนที่จะหลั่งน้ำนมออกมภายนอก โดยจะมี น้ำนมที่อยู่ในโพรงเก็บน้ำนมและท่อหัวนมประมาณร้อยละ 40 ที่เหลืออีกร้อยละ 60 อยู่ในท่อเล็ก และภายในกระจาเปาะนม (Nickerson, 1995)

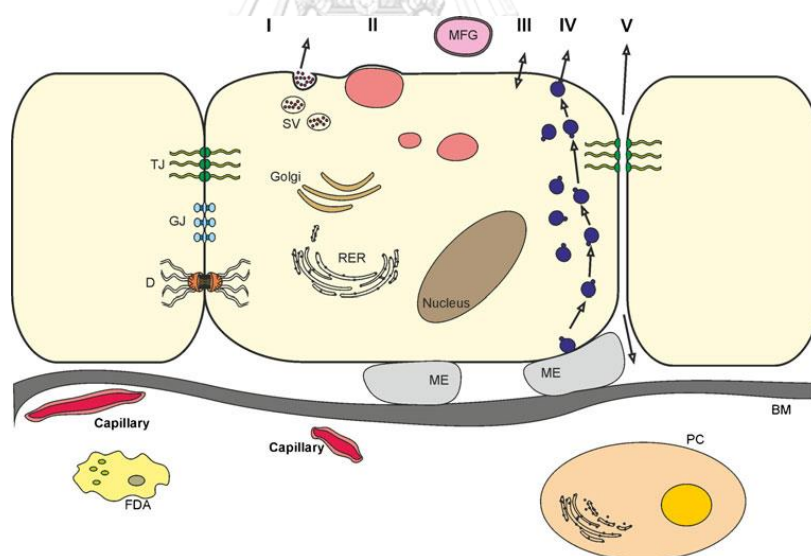
2.1.2 การสังเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในน้ำนมดิบ

น้ำนมดิบ (raw milk) คือ ของเหลวสะอาดบริสุทธิ์ ที่กลั่นจากเต้านม ซึ่งได้จากการรีดออกมา จากเต้านมของแม่โค ควาย แพะ หรือแกะ ที่มีสุขภาพสมบูรณ์และแข็งแรง ส่วนน้ำนมโคดิบ (raw cow milk) หมายถึง น้ำนมที่ได้จากแม่โคหลังคลอดลูกแล้วไม่น้อยกว่า 3 วัน ต้องไม่มีน้ำนมเหลือง (colostrum) ปน ไม่ผ่านการแยกองค์ประกอบอย่างใดอย่างหนึ่งของน้ำนมออกหรือเติมสารอื่นใด และไม่ผ่านกรรมวิธีใดๆ ยกเว้นการทำให้เย็น และจะต้องมีสีขาวหรือสีขาวนวล กลิ่น รส ตาม ธรรมชาติ และต้องสะอาด ปราศจากสิ่งแปลกปลอม (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหาร แห่งชาติ, 2553) โดยน้ำนมมีองค์ประกอบค่อนข้างซับซ้อน ประกอบด้วย น้ำ โปรตีน ไขมัน แลคโตส วิตามิน และแร่ธาตุ (Walstra et al., 2005)

การสร้างองค์ประกอบทางเคมีของน้ำนมดิบนั้นเกิดขึ้นจากการที่แม่โคได้รับสารอาหารเข้าไป สารอาหารดูดซึมผ่านทางระบบเลือด และเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์น้ำนม หลังจากโคมีการคลอด ลูกแล้วกระบวนการหลังน้ำนมก็จะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ (McManaman and Margaret, 2003)

2.1.2.1 การสังเคราะห์โปรตีน (protein)

โปรตีนในน้ำนมดิบประกอบด้วยเคซีน (casein), α -lactoalbumin และ β -lactoglobulin โดยจะถูกสังเคราะห์จากกรดอะมิโนในเซลล์ของ ribosome ที่อยู่บน rough endoplasmic reticulum (RER) ของเซลล์ (Strucken et al., 2015) โปรตีนที่ถูกสังเคราะห์บน RER จะเคลื่อนย้ายไปที่กอลจิแอปพาราตัส (golgi apparatus) เพื่อเก็บรวบรวมและสร้างเป็นถุงเล็กๆ เรียกว่า เวสิเคิล (vesicle) จากนั้นเวสิเคิลจะเคลื่อนที่ไปที่ผิวเซลล์ เมื่อสัมผัสกับเยื่อหุ้มเซลล์ เยื่อของเวสิเคิลจะรวมตัวกับเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้โปรตีนภายในเวสิเคิลถูกปล่อยออกไปนอกเซลล์ (Casado et al., 2009) (ภาพที่ 2.3)



ภาพที่ 2.3 วิธีการนำสารตั้งต้นเข้าสู่เซลล์ทั้ง 5 วิธี โดย i) คือ exocytosis ii) คือ lipid iii) คือ apical transport iv) คือ transcytosis และ v) คือ paracellular pathway
ที่มา: Mobasheri and Barrett-Jolley (2014)

2.1.2.2 การสังเคราะห์ไขมันนม (milk fat)

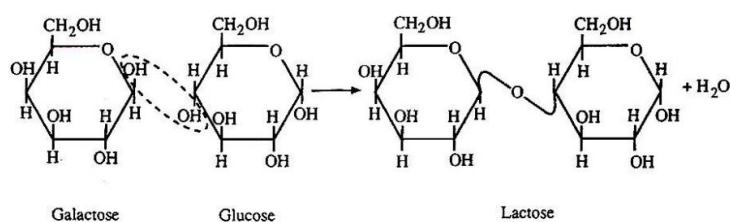
ไขมันในน้ำนมดิบจะถูกสังเคราะห์โดยสารตั้งต้น คือ acetate และ β -hydroxybutyrate สารเหล่านี้จะถูกดูดซึมผ่าน basolateral membrane และเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์ triglyceride ในน้ำนมที่ smooth endoplasmic reticulum (SER) ของเซลล์ ซึ่ง triglycerides นี้ ประกอบด้วย glycerol และกรดไขมัน (fatty acids) จำนวน 3 ตัว (McManaman and Margaret, 2003) กรดไขมันจะได้มาจาก 2 ทาง คือ i) กรดไขมันที่ได้จากอาหาร ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นกรดไขมันสายสั้น ในกลุ่มกรดไขมันระเหยง่าย (volatile fatty acids; VFA) เช่น acetate และ β -hydroxybutyrate ถูกสังเคราะห์ในลำไส้เล็ก (วิทยา สุริยาสถาพร, 2559) และ ii) กรดไขมันที่ได้จากร่างกาย จากการเผาผลาญและสลายไขมันในร่างกาย ถูกสังเคราะห์ที่ตับได้เป็นกรดไขมันสายยาวและถูกลำเลียงผ่านจากกระแสเลือดแล้วนำเข้าสู่เซลล์สร้างน้ำนมเพื่อการสังเคราะห์เป็นไขมันในน้ำนมต่อไป (Bionaz and Looor, 2008) โดยในเซลล์สร้างน้ำนมจะประกอบด้วย desaturase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการเปลี่ยน stearic acid (C18:0) ไปเป็น oleic acid (C18:1) (Walstra et al., 2005)

ไขมันที่ได้จากการสังเคราะห์จะอยู่ใน small droplets และรวมตัวกันจนมีขนาดใหญ่ขึ้น จากนั้นเคลื่อนที่ไปยัง apical membrane และเคลื่อนที่ออกจากเซลล์ โดยจะเรียกว่า milk fat globule ซึ่งเป็นไขมันนมที่มีผนังเซลล์ของ epithelial cell ล้อมรอบอยู่ (ภาพที่ 2.3)

2.1.2.3 การสังเคราะห์แลคโตส (lactose)

เป็นคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญของน้ำนม โดยการสังเคราะห์แลคโตสนั้นเกิดขึ้นที่ส่วน golgi apparatus ของเซลล์สร้างน้ำนม (Walstra et al., 2005) โดยสารตั้งต้นในการสร้างแลคโตส คือ กลูโคสและกาแลคโตส (McManaman and Margaret, 2003) (ภาพที่ 2.3) ดังนั้นในการที่สัตว์ได้รับอาหารที่มีกลูโคสสูงก็จะช่วยให้สัตว์สามารถสร้างแลคโตสได้มากขึ้น และกรดโพธิโอนิกในกระเพาะรูเมน ที่ได้จากการหมักโดยจุลินทรีย์ในกระเพาะหมักและกรดอะมิโนที่จะถูกดูดซึมได้จากระบบทางเดินอาหารก็เป็นส่วนสำคัญที่จะนำมาใช้ในการสร้างแลคโตสด้วย (Zhao and Keating, 2007) ดังนั้นการกินอาหารจึงมีผลต่อปริมาณการสร้างน้ำนม เนื่องจากอาหารที่แม่โคได้รับมีผลต่อการผลิต

กรดโพธิโอนิกในกระเพาะรูเมน และการสังเคราะห์กลูโคสในตับ ซึ่งกลูโคสจะทำให้เกิดการสังเคราะห์แลคโตสในเซลล์สร้างน้ำนม (วิทยา สุนิยาสาพร, 2559) (ภาพที่ 2.4)



ภาพที่ 2.4 โครงสร้างโมเลกุลของแลคโตส

ที่มา : Harding (1995)

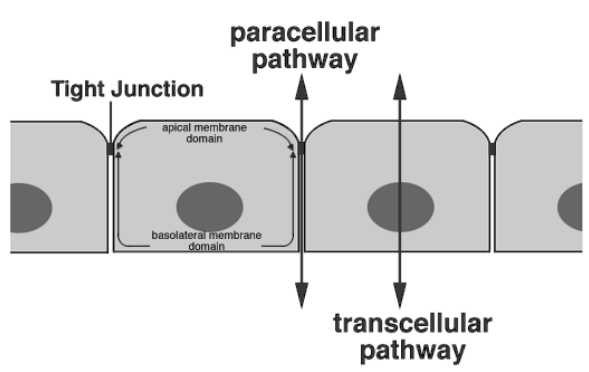
2.1.2.4 การสังเคราะห์วิตามิน (vitamins) และแร่ธาตุ (minerals)

วิตามินเป็นสารที่ทำหน้าที่ควบคุมการเผาผลาญและทำให้การใช้ไขมัน โปรตีน และคาร์โบไฮเดรตในร่างกายเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งเซลล์กลั่นสร้างน้ำนมไม่สามารถสร้างวิตามินเองได้ ต้องได้รับมาจากอาหารโดยผ่านทางกระแสเลือด น้ำนมโคมีวิตามินทั้งชนิดที่ละลายในไขมัน ได้แก่ A, D, E และ K และชนิดที่ละลายได้ในน้ำ ได้แก่ C, B1 และ B3 สำหรับแร่ธาตุ เซลล์กลั่นสร้างน้ำนมไม่สามารถสร้างแร่ธาตุเองได้ ต้องได้รับมาจากอาหารโดยผ่านทางกระแสเลือดเช่นเดียวกับวิตามิน ในน้ำนมโคมีแร่ธาตุที่สำคัญและจำเป็นต่อร่างกาย ได้แก่ แคลเซียม แมกนีเซียม โซเดียม ไอโอดีน และคลอรีน (Jeness and Patton, 1959; Walstra et al., 2005)

นอกจากนี้แล้วปริมาณของแลคโตสและแร่ธาตุในน้ำนมยังมีผลต่อแรงดันออสโมติกของน้ำนมด้วย เนื่องจากความเข้มข้นจากสารละลายในแต่ละข้างของเซลล์สร้างน้ำนมถูกทำให้สมดุลโดยการดึงน้ำและแร่ธาตุจากกระแสเลือดมาผสมกับแลคโตส (Strucken et al., 2015) ถ้าความเข้มข้นของแร่ธาตุมากจะเกิดการดึงน้ำตามเข้ามาในน้ำนม ทำให้ปริมาณผลผลิตน้ำนมเพิ่มขึ้นด้วย (Casado et al., 2009)

แร่ธาตุยังสามารถบ่งบอกการเป็นโรคเต้านมอักเสบในแม่โคได้ เนื่องจาก tight junction เป็นโครงสร้างที่เกิดจากเยื่อหุ้มเซลล์ที่อยู่ติดกันเกิดการรวมตัวกัน เพื่อป้องกันการรั่วไหลระหว่างของเหลวภายในเซลล์และนอกเซลล์ จึงทำให้ไม่มีการเคลื่อนที่สารระหว่างรอยเชื่อมต่อระหว่าง

epithelial cell ด้วยกันเอง ยกเว้น น้ำและไอออนบางชนิด การเคลื่อนที่ของสารผ่านทาง tight junction จะเรียกว่า paracellular pathway (ภาพที่ 2.5) เมื่อเต้านมเกิดการอักเสบ tight junction จะเปิด จะเกิดการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของน้ำนม ปริมาณแลคโตส จากการไหลของ แลคโตสหรือโพแทสเซียมจาก lumen เข้าไปยังช่องว่างภายในเซลล์ สำหรับโซเดียมและคลอไรด์จะ เคลื่อนที่จากช่องว่างภายในเซลล์เข้าไปยัง lumen (Claeys et al., 2014; Neville, 1995) เป็น สาเหตุทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความนำไฟฟ้าในน้ำนม น้ำนมจะนำกระแสไฟฟ้าได้ดีขึ้น (Neville, 1995) ดังนั้นจึงสามารถตรวจหาเต้านมอักเสบได้โดยใช้เครื่องมือตรวจสอบหาความสามารถนำ กระแสไฟฟ้าของน้ำนมทั้ง 4 เต้า ถ้าพบว่าเต้าใดมีความสามารถนำกระแสไฟฟ้าได้ดีกว่าเต้าอื่นๆ แสดงว่าเต้านั้นเกิดการอักเสบขึ้น (กรมปศุสัตว์, 2550)



ภาพที่ 2.5 การเคลื่อนผ่านรอยต่อระหว่างเซลล์ (paracellular pathway) และการเคลื่อนผ่านเซลล์ โดยตรง (transcellular pathway)
ที่มา: Madara (1988)

2.1.3 ปริมาณองค์ประกอบทางเคมีในน้ำนมดิบ

น้ำนมมีองค์ประกอบค่อนข้างซับซ้อน ประกอบด้วย น้ำ ไขมัน แลคโตส โปรตีน วิตามิน และ แร่ธาตุ (Walstra et al., 2005) (ภาพที่ 2.6)

2.1.3.1 น้ำ

มีประมาณร้อยละ 87 น้ำที่มีอยู่ในน้ำนมทำหน้าที่เป็นตัวละลาย เพื่อให้ส่วนประกอบที่เป็น ของแข็งละลายหรือแพร่กระจายตัว (suspension) นอกจากนั้นน้ำบางส่วนอยู่ในรูปไฮเดรตกับเกลือ และแลคโตส และบางส่วนจับอยู่กับโมเลกุลโปรตีน (Walstra et al., 1984)

2.1.3.2 ไขมัน

ไขมันในน้ำนมอยู่ในรูปของไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ซึ่งมีความผันแปรมากกว่าส่วนประกอบอื่นๆ ซึ่งปัจจัยหลัก คือ สายพันธุ์ และปริมาณไขมันยังมีความสำคัญในแง่เศรษฐกิจ เพราะการซื้อขายน้ำนมหรือผลิตภัณฑ์นมใน ไขมันนมเป็นแหล่งสำคัญของกรดไขมันที่จำเป็น เช่น linoleic acid และวิตามินที่ละลายในไขมัน ได้แก่ วิตามิน A, D, E และ K (Walstra et al., 2005) มีบทบาทสำคัญต่อโครงสร้าง รสชาติ ความรู้สึกเมื่ออาหารอยู่ในปาก และความคงตัวของผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ เช่น เนย ผลิตภัณฑ์นม และอาหารที่มีน้ำนมและผลิตภัณฑ์นมเป็นส่วนผสม

2.1.3.3 โปรตีน

โดยทั่วไปในน้ำนมจะมีโปรตีนเป็นส่วนประกอบร้อยละ 3.5 ประกอบด้วยเคซีน (casein), α -lactalbumin, β -lactoglobulin และโปรตีนชนิดอื่นๆ เช่น เอนไซม์ และบางส่วนของโปรตีนในน้ำนม เช่น immunoglobulin จะได้รับจากกระแสเลือดโดยตรง และภายในน้ำนมยังมีกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกาย (essential amino acid) ครบทั้ง 9 ชนิด คือ valine, leucine, isoleucine, threonine, methionine, phenylalanine, tryptophane, lysine และ histidine (Walstra et al., 2005)

2.1.3.4 แลคโตส

แลคโตสเป็นคาร์โบไฮเดรตหลักในน้ำนม นอกจากนี้ยังมีน้ำตาลชนิดอื่นที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในน้ำนมบ้างเล็กน้อย เช่น glucose และ fructose (Walstra et al., 1984) โดยปกติปริมาณแลคโตสค่อนข้างคงที่ การเพิ่มขึ้นหรือลดลงของแลคโตส มักจะขึ้นอยู่กับ การเพิ่มขึ้นหรือลดลงของสารประกอบอื่นๆ เช่น คลอไรด์ และปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อปริมาณแลคโตสในน้ำนม คือ สภาวะของเต้านมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ (mastitis) จะมีผลทำให้ปริมาณคลอไรด์ในน้ำนมเพิ่มขึ้นและปริมาณแลคโตสลดลง (McManaman et al., 2006; Jenness and Patton, 1959) นอกจากนี้แลคโตสยังมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมของผลิตภัณฑ์นม เช่น นมข้น ไอศกรีม เป็นอย่างมากเนื่องจากมีผลต่อเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ ในผลิตภัณฑ์ที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนน้ำตาลจะมีผลต่อสีและกลิ่นรส

รวมทั้งอุตสาหกรรมนมหมัก เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria) จะใช้แลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน และได้เป็นกรดแลคติก (Walstra et al., 2005)

2.1.3.5 แร่ธาตุ

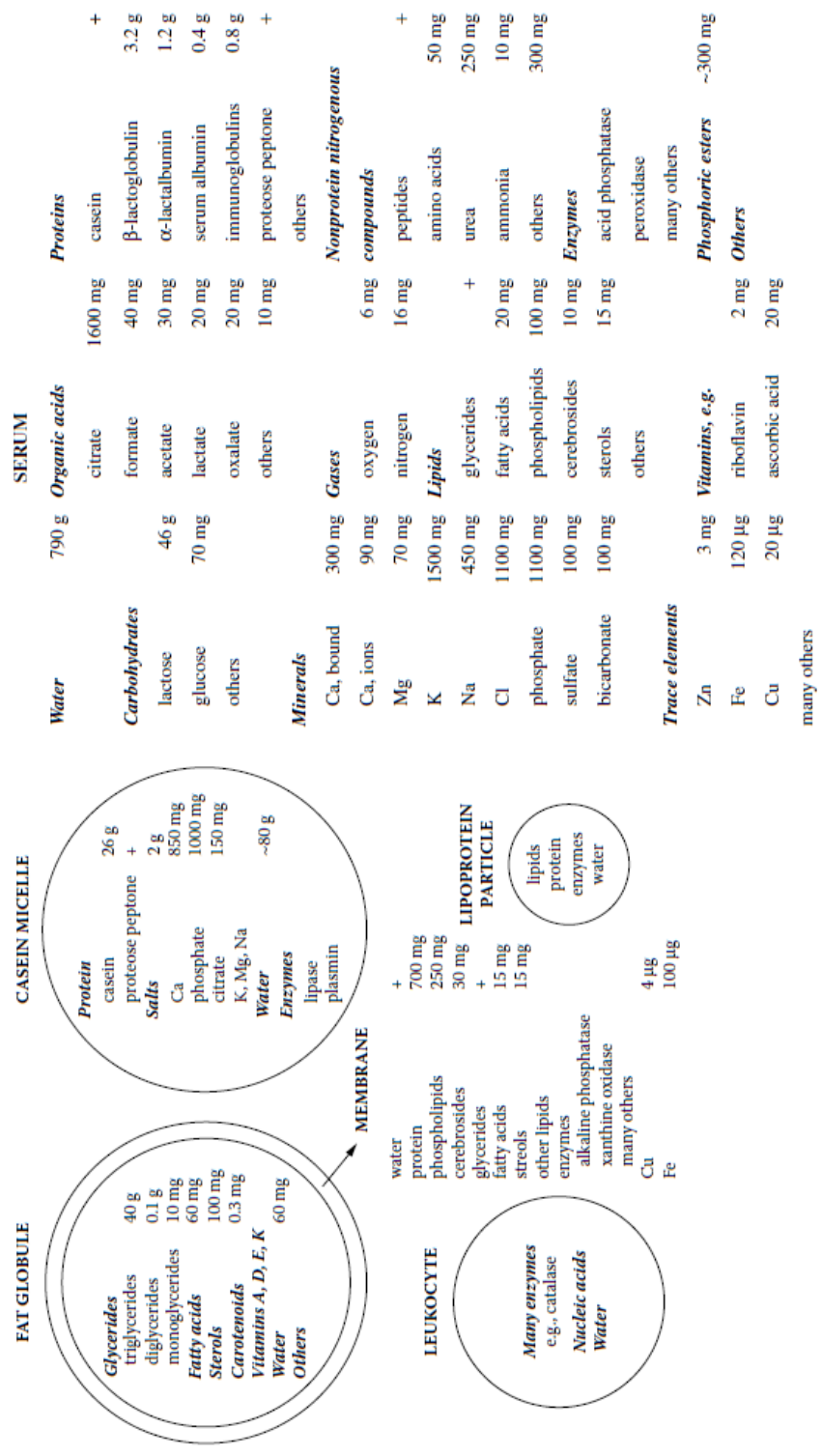
ในน้ำนมมีแร่ธาตุต่างๆ จำนวนมาก ซึ่งเป็นสารอาหารที่สำคัญและจำเป็นต่อร่างกาย แร่ธาตุที่มีปริมาณค่อนข้างมากในน้ำนม ได้แก่ แคลเซียม ฟอสฟอรัส ซึ่งมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเด็กหรือตัวอ่อน เพื่อสร้างกระดูกและฟัน แมกนีเซียม โปแตสเซียม โซเดียม คลอไรด์ และกำมะถัน (Jenness and Patton, 1959; Walstra et al., 1984)

2.1.3.6 วิตามิน

น้ำนมโคเป็นแหล่งของวิตามินที่สำคัญ ทำหน้าที่ในการควบคุมการเผาผลาญและทำให้การใช้ไขมัน โปรตีน และคาร์โบไฮเดรตในร่างกายเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งในน้ำนมโคมีวิตามินทั้งชนิดที่ละลายในไขมัน ได้แก่ A, D, E และ K และชนิดที่ละลายได้ในน้ำ ได้แก่ B1, B3 และ C โดยพบว่าจะมีสัดส่วนของวิตามิน A และ B มากที่สุด (Walstra et al., 2005) นอกจากนี้วิตามินบางตัวยังส่งผลต่อน้ำนมและผลิตภัณฑ์นม เช่น carotenes เป็นผลทำให้ไขมันนมมีสีเหลือง และ tocopherols เป็นสารต้านอนุมูลอิสระและช่วยลดการเกิดกลิ่นรสที่ผิดปกติ เช่น กลิ่นหืน ในน้ำนมได้ (Walstra et al., 2005) สัตว์ที่ได้รับอาหารจำพวกโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และน้ำครบถ้วน แต่ขาดวิตามินก็จะทำให้ร่างกายเกิดโรคได้ (Jenness and Patton, 1959; Walstra et al., 1984)

2.1.3.7 สารประกอบอินทรีย์

นอกจากองค์ประกอบทางเคมีหลักที่พบในน้ำนมแล้ว ยังพบองค์ประกอบย่อยหรือสารประกอบอินทรีย์ที่พบในน้ำนม โดยปกติจะได้รับการสังเคราะห์จากเซลล์กลั่นน้ำนม และบางส่วนเกิดจากการการทำงานของแบคทีเรียหรือเอนไซม์ที่แบคทีเรียสร้างขึ้น ทำให้เกิดสารประกอบอินทรีย์ขึ้น (Walstra et al., 2005) สารประกอบที่แปรสภาพมาจากอาหารสัตว์ สารประกอบที่เกิดจากกระบวนการสังเคราะห์น้ำนม เช่น กรดอะมิโน กรูเทตินิน รวมทั้งแอมโมเนีย ตลอดจนสารที่ได้จากการย่อยสลายเอนไซม์ ได้แก่ ซัลไฟด์ และสารประกอบคาร์บอนิล



ภาพที่ 2.6 องค์ประกอบและโครงสร้างของน้ำนม (น้ำนมดิบ 1 กิโลกรัม)

ที่มา: Walstra et al. (2005)

2.2 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อความแปรผันของปริมาณน้ำนมดิบและองค์ประกอบทางเคมีน้ำนมดิบ

องค์ประกอบของนมจะแตกต่างกันไปตามปัจจัยต่างๆ ดังนี้

2.2.1 ชนิดของพันธุ์ (breed)

โคนมแต่ละสายพันธุ์ให้ผลผลิตน้ำนมแตกต่างกันชัดเจน (ตารางที่ 2.1) โดยโคนมพันธุ์โฮลสไตน์ฟริเซียนเป็นโคที่ให้ผลผลิตน้ำนมสูงสุดแต่ให้องค์ประกอบน้ำนมทั้งปริมาณไขมัน โปรตีน SNF และ TS ต่ำที่สุด ในขณะที่โคนมพันธุ์เจอร์ซีเป็นโคนมที่ให้ปริมาณน้ำนมต่ำกว่าสายพันธุ์อื่นในบรรดาสายพันธุ์โคยุโรป แต่น้ำนมมีเปอร์เซ็นต์ไขมัน โปรตีน SNF และ TS สูงสุด (Johnson, 1983)

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำนมที่ได้จากโคพันธุ์ต่างๆ

ที่มา: Johnson (1983)

ชื่อพันธุ์	องค์ประกอบทางเคมีของน้ำนม (%)						
	น้ำ	ไขมัน	โปรตีน	แลคโตส	เถ้า	SNF	TS
Holstein Friesian	87.72	3.41	3.32	4.87	0.68	8.87	12.28
Jersey	85.47	5.05	3.78	5.00	0.70	9.48	14.53
Ayrshire	86.97	4.03	3.51	4.81	0.68	9.00	13.03
Brown swiss	86.87	3.85	3.48	5.08	0.72	9.28	13.13
Shorthorn	87.43	3.63	3.32	4.89	0.73	8.94	12.57

โคนมแต่ละพันธุ์มีความสามารถในการให้นมได้ต่างกันแล้วแต่จุดประสงค์ของการปรับปรุงพันธุ์ เช่น พันธุ์โฮลสไตน์ฟริเซียนมีความสามารถในการให้นมได้สูง เมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์เจอร์ซีซึ่งปริมาณการให้นมมีช่วงค่อนข้างกว้างมาก

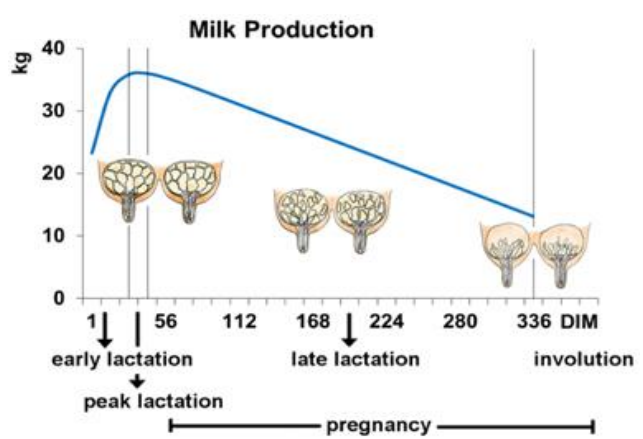
พันธุ์โคนมที่เลี้ยงในประเทศไทย (กลุ่มวิจัยและพัฒนาโคนม, กรมปศุสัตว์) คือ พันธุ์ไทยฟริเซียน (Thai Friesian) เป็นโคนมพันธุ์ผสมที่มีเลือดโคนมพันธุ์โฮลสไตน์ฟริเซียนสูงกว่าร้อยละ

75 หรือที่เกษตรกรทั่วไปเรียกว่า โคนมเลือดสูง เหมาะสมกับเกษตรกรที่มีประสบการณ์การเลี้ยง โคนมมาแล้ว ภายใต้ระบบการเลี้ยงดูที่มีระดับการจัดการอาหารที่ดี สามารถให้ผลผลิตน้ำนมสูงต่อ ระยะเวลาให้นมและที่สำคัญสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมของประเทศได้ และโคนมพันธุ์ ที เอ็ม แซด (Thai Milking Zebu) เป็นโคนมที่สร้างขึ้นมาเพื่อให้เหมาะสมกับเกษตรกรรายย่อยเป็น โคนมที่ปรับปรุงเพื่อวัตถุประสงค์ในการผลิตโคนมพันธุ์ดีใช้ในประเทศ และทดแทนการนำเข้าโคนม จากต่างประเทศ เกษตรกรทั่วไปเรียกว่า โคนมเลือด 75 หมายถึง โคนมลูกผสมที่มีเลือดโคนมพันธุ์ โฮลส์ไตน์ฟรีเชียนร้อยละ 75 ส่วนสายเลือดที่เหลือร้อยละ 25 เป็นโคพันธุ์ซิมูและพื้นเมือง โคพันธุ์นี้ สามารถเลี้ยงได้ดี ให้ผลผลิตน้ำนมปานกลางและความสมบูรณ์พันธุ์สูง ทนทานต่อโรคและแมลง เหมาะกับสภาพแวดล้อมของประเทศ

2.2.2 ช่วงการให้น้ำนม (lactation period)

หลังจากแม่โคคลอดลูก เต้านมจะสร้างส่วนที่ใช้ในการกลั่นสร้างน้ำนมมากขึ้น การผลิตน้ำนม ของแม่โคมีลักษณะเป็นเส้นโค้งแบบไดนามิก แสดงดังภาพที่ 2.7 น้ำนมของโคจะเพิ่มขึ้น จนถึงระยะที่ โคนให้นมสูงสุด (peak of lactation) (Cervantes et al., 2006) น้ำนมที่หลั่งออกมาในช่วงแรก เรียกว่า น้ำนมเหลือง (colostrum) ความเข้มข้นของเนื้อมนมจะมีอยู่สูงมาก มี high carotene ซึ่งเป็น สาเหตุทำให้น้ำนมมีสีเหลือง ปริมาณของไขมันและโปรตีนและวิตามินจะมีความเข้มข้นสูง ส่วน แลคโตสจะค่อยๆ เพิ่มขึ้น หลังจากนั้นน้ำนมจะเปลี่ยนเป็นสีขาวนวลขึ้น รวมถึงองค์ประกอบภายในก็ เปลี่ยนแปลงตามด้วย ปริมาณไขมันนมและโปรตีนจะลดลงและลดต่ำสุด ณ จุดสูงสุดของการให้น้ำนม (Strucken et al., 2015) ส่วนปริมาณของแลคโตสและโซเดียมจะยังคงสูงคงที่ไปจนถึงระยะกลาง ใน ระยะกลางการให้นมหรือหลังจากผ่านจุดสูงสุดของการให้น้ำนมของโคแล้วปริมาณน้ำนมรวมจะลดลง ความเข้มข้นของแลคโตสและโปแตสเซียมจะค่อยๆ ลดลง แต่ความเข้มข้นของไขมันนม โปรตีน โซเดียม คลอไรด์ จะค่อยๆ เพิ่มขึ้น การเพิ่มขึ้นของโปรตีนเกิดจากปริมาณ casein ที่มีมากขึ้น ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของโปรตีนในเลือดด้วย ในระยะปลายการให้น้ำนมปริมาณน้ำนมรวมจะ ลดลง สำหรับแลคโตสจะลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องจากอัตราการสังเคราะห์ลดลงและแลคโตสกับ โปแตสเซียมสามารถซึมกลับออกมาจากรอยต่อระหว่างเซลล์ได้ความเข้มข้นจึงลดลงและเซลล์ที่ใช้ใน

การกลั่นสร้างน้ำนมก็จะลดลงเนื่องจากอัตราการสูญเสียเซลล์หลังเกินอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ ปริมาณน้ำนมจะเริ่มลดลง (Capuco and Akers, 1999) (ภาพที่ 2.7)



ภาพที่ 2.7 การผลิตน้ำนมของแม่โค

ที่มา: Strucken et al., 2015

หลังจากรีดน้ำนมออก ทำให้ความดันภายในเต้านมจะลดลง และเป็นผลให้กระบวนการสร้างน้ำนมจะเริ่มต้นสัปดาห์แรก น้ำนมขึ้นมาใหม่อีกรอบหนึ่ง เต้านมของโคที่คลอดลูกตัวแรก จะยังคงขยายตัวและเพิ่มจำนวนเซลล์สร้างน้ำนม (secretory cell) ไปเรื่อยๆ ในระยะช่วงแรกของการให้น้ำนมจะมีเซลล์สร้างน้ำนม ทั้งเจริญขึ้นมาใหม่ และเสื่อมสภาพสลายตัวหลุดออกมาในน้ำนม แต่ในช่วงแรกของการรีดนม อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ใหม่มีมากกว่าเซลล์เก่า จนถึงช่วงที่โคให้นมสูงสุด อัตราการสร้างเซลล์ใหม่กับเซลล์เก่าเสื่อมจะอยู่ในอัตราเดียวกัน เมื่อเลยช่วงแม่โคให้นมสูงสุดไปแล้วปริมาณน้ำนมของโคนมก็จะเริ่มลดลงเรื่อยๆ (Strucken et al., 2015)

การให้น้ำนมของโคจะแบ่งออกได้เป็น 4 ระยะ คือ

1. ระยะแรกการให้นม (early lactation) 0- 60 วันหลังคลอด เป็นช่วงให้น้ำนมสูงสุด
2. ระยะรักษาระดับให้นม (maintain lactation) คือช่วง 60- 100 วัน
3. ระยะกลางการให้นม (mid lactation) ประมาณ 100- 200 วัน จะให้น้ำนมเริ่มลดลงและเป็นช่วงที่โคจะตั้งท้อง
4. ระยะปลายการให้นม (late lactation) ช่วง 200- 305 วัน

2.2.3 ช่วงระยะเวลาระหว่างการรีดนม (time of milking)

ความถี่ในการรีดน้ำนม โดยทั่วไปผู้เลี้ยงจะรีดน้ำนมโควันละ 2 ครั้ง ช่วงห่างของการรีดนม ควรห่างกันประมาณ 12 ชั่วโมง คือ รีดนมในตอนเช้านี้ และตอนเย็น เพราะการรีดน้ำนมบ่อยครั้ง จนเกินไป จะเป็นการรบกวนโคมากทำให้โคไม่มีเวลากินอาหารและพักผ่อนเพียงพอ เกิดความเครียด มาก ทำให้ผลผลิตน้ำนมลดลง (องค์การส่งเสริมกิจการ โคนมแห่งประเทศไทย, 2552) และเมื่อ เปรียบเทียบในลำดับของการรีดน้ำนม ปริมาณน้ำนมที่รีดได้ในครั้งแรกๆ จะมีความใสและไขมันต่ำ (fore milk) และน้ำนมที่รีดได้ช่วงท้ายๆ จะมีความเข้มข้นของไขมันมากขึ้น เพราะไขมันจะคง สะสมอยู่ในชั้นของท่อนม และ alveoli การรีดน้ำนม จึงควรรีดออกมาให้ได้มากที่สุด ภายในเวลาที่ กำหนด ไม่เช่นนั้นจะมีนมค้างอยู่ภายในเต้านมมาก (สุทธิศักดิ์ แก้วแกมจันทร์, 2546; Heinrichs et al., 1996) และข้อดีคือ ถ้ารีดนมแต่ละครั้งได้เกือบหมดเต้า จะทำให้องค์ประกอบน้ำนมมีความ สม่ำเสมอมากขึ้น

อย่างไรก็ตามช่วงที่มีผลต่อการให้น้ำนมคือ ช่วงพักการรีดนม (dry period) ในกรณีที่ไม่มี การหยุดพักรีดนมเลย จนแม่โคคลอดลูกครั้งใหม่ ทั้งปริมาณและความคงทนของการให้นมจะไม่ดี เพราะเต้านมไม่มีการหยุดพัก เพื่อสร้างเซลล์น้ำนมขึ้นมาใหม่ให้เพียงพอ แม่โคจะต้องมีจำนวนวันพัก รีดนมอย่างน้อย 60 วัน จึงจะเพียงพอสำหรับระยะเวลาการซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอ และเวลาสำหรับการ สร้างเซลล์น้ำนมขึ้นมาใหม่ (Heinrichs et al., 1996; Watson et al., 2011)

2.2.4 สภาพแวดล้อมและภูมิอากาศ

สภาพแวดล้อมมีอิทธิพลที่ส่งผลกระทบต่อตัวสัตว์ เพราะสภาพแวดล้อมมีผลทั้ง การให้ผล ผลิต การสืบพันธุ์ และสุขภาพของสัตว์ มีผลโดยตรงต่อขบวนการเมตาบอลิซึม ปริมาณอาหารที่กิน ความต้องการสารอาหารเพื่อการดำรงชีพ (สุทธิศักดิ์ แก้วแกมจันทร์, 2546) สภาพโรงเรือนที่แออัด มี การระบายอากาศที่ไม่ดี มีกลิ่นเหม็นจะสร้างความอึดอัดให้กับโคหรือสภาพคอกพักหรือแปลงหญ้าที่ ไม่มีร่มเงาหรือขาดการระบายที่ตีปล่อยให้แฉะแฉะสิ่งเหล่านี้ล้วนก่อให้เกิดความอึดอัดรำคาญต่อตัว โค ส่งผลถึงสุขภาพของแม่โคและทำให้ปริมาณน้ำนมลดลง ขณะเดียวกันหากการจัดการแม่โคไม่ดี ทำให้แม่โคเกิดความเครียด (stress) ระบบประสาทก็จะสั่งการให้ต่อมหมวกไต (adrenal medulla)

หลังฮอร์โมน epinephrine เข้ามาในกระแสเลือด ฮอร์โมน epinephrine จะมาออกฤทธิ์ทำให้ myoepithelium cell หยุดการทำงาน ทำให้หยุดการหลั่งน้ำนม หรือแม่โคเกิดการอั้นน้ำนมขึ้นมา ดังนั้นในขณะรีดนม ต้องทำให้บรรยากาศในการรีดไม่มีความเครียดต่อแม่โค แม่โคจะต้องสบายหรือสถานที่รีดนมต้องห่างจากจุดสนใจต่างๆ ของแม่โค หรือห่างจากบริเวณที่มีผู้คนเดินไปมา

สำหรับภูมิอากาศ ในสภาพอากาศเย็นแม่โคจะกินอาหารได้มากทำให้สร้างน้ำนมได้มาก แต่หากสภาพอากาศร้อนจัดจะทำให้แม่โคกินอาหารน้อยลงเป็นผลให้ปริมาณน้ำนมที่ได้ลดลงเช่นกัน

2.2.5 ปัจจัยทางด้านอาหาร

อาหารนับเป็นปัจจัยสำคัญที่มีอิทธิพลต่อปริมาณและองค์ประกอบน้ำนม เซลล์สร้างน้ำนม ต้องการสารอาหารที่เพียงพอต่อการสังเคราะห์นมที่มาจากกระแสเลือด ได้แก่ กลูโคส, acetate, β -hydroxybutyrate, amino acid, fatty acid และแร่ธาตุ มีการศึกษาเผยว่าองค์ประกอบและรูปแบบการกินอาหารและการให้อาหารแบบจำกัดหรือสูงทำให้มีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบภายในน้ำนม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปัจจัยเหล่านี้มีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์และการหลั่งของน้ำนมในเซลล์สร้างน้ำนม (Li et al., 2015; Daniels et al., 2006)

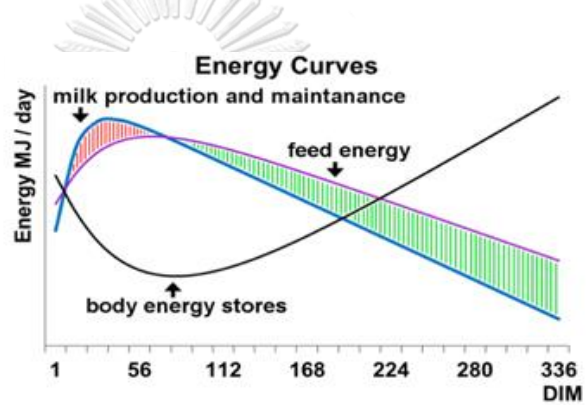
แม่โคที่ได้รับอาหารเพียงพอทั้งปริมาณและคุณภาพ จะทำให้ปริมาณน้ำนมจะเพิ่มขึ้นและมี ส่วนประกอบเป็นปกติ ซึ่งอาหารที่ใช้เลี้ยงสัตว์ประเภทนี้จะมี 2 ชนิดคือ อาหารหยาก เช่น หญ้า ถั่ว อาหารสัตว์ ฟางข้าว และอาหารข้น เช่น อาหารผสม นอกจากนั้นหญ้าบางชนิดที่แม่โคกินเป็นอาหาร อาจจะมีสารที่ระเหยได้ปนอยู่ด้วย ส่งผลให้น้ำนมมีกลิ่นด้วย ซึ่งมีผลต่อคุณภาพของน้ำนมและผลิตภัณฑ์นม ทำให้ไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค (สุทธิศักดิ์ แก้วแกมจันทร์, 2546; Allen, 2000)

2.2.6 สุขภาวะของแม่โค

สภาพร่างกายหรือสภาพความสมบูรณ์ของร่างกายแม่โคเป็นตัวสะท้อนให้ทราบถึงระดับพลังงานที่ร่างกายแม่โคเก็บสะสมไว้ในรูปของไขมัน และมีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพการให้ผลผลิตน้ำนม แม่โคที่ได้รับการเลี้ยงดูสมบูรณ์ดีเมื่อคลอดลูกแล้วจะสามารถให้น้ำนมได้อย่างเต็มที่ แม่โคที่ให้ผลผลิตน้ำนมสูง ในช่วงหลังคลอดสมดุลพลังงานของร่างกายแม่โคเป็นลบ (ภาพที่ 2.8)

เนื่องจากแม่โคกินอาหารได้น้อยกว่าความต้องการในการสร้างน้ำนม โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารพลังงาน จึงมีการสลายพลังงานที่เก็บสะสมไว้ในรูปเนื้อเยื่อไขมันมาใช้ (Strucken et al., 2015) แม่โคจึงมีการสูญเสียน้ำหนักตัวหลังคลอดซึ่งมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับการจัดการด้านอาหารของเกษตรกร หากให้อาหารไม่เพียงพอกับความต้องกลแล้วย่อมส่งผลให้เกิดการสูญเสียน้ำหนักตัวหลังคลอดมาก และมีผลกระทบต่อทำให้ผลผลิตน้ำนมลดลง (สุทธิศักดิ์ แก้วแกมจันทร์, 2546)

นอกจากนี้แม่โคที่ไม่สมบูรณ์ก็มีโอกาสที่จะเจ็บป่วยง่ายกว่า ซึ่งหากแม่โคเกิดเจ็บป่วยในช่วงของการให้นมแล้วการให้นมจะลดลงอย่างรวดเร็วและใช้เวลานานกว่าที่จะให้นมได้ตามปกติ



ภาพที่ 2.8 สมดุลพลังงานของร่างกายแม่โค
ที่มา: Strucken et al., 2015

2.3 สถานการณ์และคุณภาพมาตรฐานของน้ำนมดิบในประเทศไทย

2.3.1 สถานการณ์

อุตสาหกรรมการเลี้ยงโคนม นั้นเป็นอาชีพที่มีความสำคัญต่อคนไทยเป็นอย่างมาก เนื่องจากเป็นอาชีพพระราชทานและสร้างรายได้ให้กับเกษตรกรได้เป็นอย่างดี (ชมรมนมสร้างชาติ, 2550) โดยจุดสำคัญของพัฒนาการการเลี้ยงโคนมในประเทศไทย เกิดขึ้นตั้งแต่แผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 6 (พ.ศ. 2530-2534) เป็นต้นมา เมื่อรัฐบาลส่งเสริมการเลี้ยงโคนมอย่างเต็มที่ ประกอบกับปริมาณน้ำนมดิบที่ผลิตได้ในประเทศยังมีไม่เพียงพอต่อความต้องการ จึงเกิดแรงจูงใจให้

เกษตรกรและภาคเอกชนหันมาประกอบอาชีพการเลี้ยงโคนมเพิ่มขึ้น มีการพัฒนาสายพันธุ์ และจัดระบบการเลี้ยงเป็นเชิงอุตสาหกรรม จนทำให้สามารถเพิ่มผลผลิตได้สูงขึ้น

โดยสถิติการเกษตรของประเทศไทย ได้สรุปปริมาณการผลิตนํ้านมดิบ ปี 2559 รวมทั้งประเทศ 1,161,102 ตัน หากพิจารณารายภาค พบว่า ภาคเหนือ 134,082 ตัน ตะวันออกเฉียงเหนือ 285,871 ตัน กลาง 734,825 ตัน และภาคใต้ 6,324 ตัน (ตารางที่ 2.2)

จังหวัดที่มีปริมาณนํ้านมดิบมากที่สุด ในปี 2559 คือ สระบุรี (253, 265 ตัน) รองลงมาคือ นครราชสีมา (177,594 ตัน) และลพบุรี (120,197 ตัน) ตามลำดับ (สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปี 2559, สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร) โดยภาพที่ 2.9 แสดงแหล่งผลิตโคนมของประเทศไทยที่มีปริมาณการเลี้ยงโคนม มากกว่า 20,000 ตัว

ตารางที่ 2.2 จำนวนโคนม ณ วันที่ 1 มกราคม และปริมาณการผลิตนํ้านมดิบ รายภาค ปี 2557-2559

ที่มา: สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปี 2559, สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร

ภาค/ปี	จำนวนโคนม (ตัว)			ปริมาณนํ้านมดิบ (ตัน)		
	2557	2558	2559	2557	2558	2559
รวมทั้งประเทศ	591,642	600,563	622,892	1,111,481	1,157,493	1,161,102
เหนือ	69,933	72,158	75,315	131,293	135,643	134,082
ตะวันออกเฉียงเหนือ	133,632	134,289	142,451	269,748	276,745	285,871
กลาง	384,309	390,187	400,952	704,159	739,299	734,825
ใต้	3,768	3,929	4,174	6,280	5,806	6,324



ภาพที่ 2.9 แหล่งผลิตโคนมของประเทศไทย

ที่มา: เอกสารสถิติการเกษตรรายสินค้า ปี 2559, สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร

2.3.2 คุณภาพมาตรฐานของน้ำนมดิบในประเทศไทย

จากมาตรฐานคุณภาพน้ำนมของสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ พ.ศ. 2553 น้ำนมโคดิบต้องมีคุณลักษณะดังต่อไปนี้

2.3.2.1 มีสีขาวหรือสีขาวนวล กลิ่น รส ตามธรรมชาติ

2.3.2.2 ต้องสะอาด ปราศจากสิ่งแปลกปลอม

2.3.2.3 ไม่มีการตกตะกอนของโปรตีน เมื่อทดสอบขั้นต้น ด้วยการทำปฏิกิริยาของน้ำนมดิบกับเอทิล

แอลกอฮอล์ที่เข้มข้นร้อยละ 70 ถ้าไม่ผ่านให้ตรวจยืนยันด้วยวิธีทำให้ร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เพื่อดูการจับกันเป็นก้อน (clot on boiling test)

- 2.3.2.4 มีค่าความเป็นกรด (titratable acid) ไม่เกินร้อยละ 0.16 และมีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) อยู่ ในช่วง 6.6 - 6.8
- 2.3.2.5 มีจุดเยือกแข็งไม่สูงกว่า -0.520 องศาเซลเซียส
- 2.3.2.6 มีความถ่วงจำเพาะไม่ต่ำกว่า 1.028 ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส
- 2.3.2.7 ใช้เวลาการเปลี่ยนสีของเมทิลีนบลู (methylene blue) มากกว่า 4 ชั่วโมง หรือมีการเปลี่ยนสีของริซาซูลิน (resazurin) ที่ 1 ชั่วโมง ไม่น้อยกว่า เกรด 4.5
- 2.3.2.8 มีจำนวนโซมาติกเซลล์หรือเซลล์ร่างกาย ไม่เกิน 500,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร
- 2.3.2.9 ปริมาณโปรตีน ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 3.00 โดยน้ำหนัก
- 2.3.2.10 ปริมาณไขมัน ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 3.35 โดยน้ำหนัก
- 2.3.2.11 ปริมาณเนื้อมันรวมไขมันเนยหรือของแข็งไม่รวมไขมันนม ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 8.25 โดยน้ำหนัก

อย่างไรก็ตามน้ำนมโคดิบของประเทศไทยในปัจจุบัน ยังคงประสบกับปัญหาคุณภาพไม่สม่ำเสมอ โดยพบว่าน้ำนมดิบบางส่วนที่ผลิตในประเทศไทย ปริมาณโปรตีนและไขมันมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่อง และจำนวนโซมาติกเซลล์สูงเกินกว่าเกณฑ์มาตรฐาน (สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์, 2556) ซึ่งองค์ประกอบหลักเหล่านั้นจะผันแปรโดยขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น สายพันธุ์ อายุ สุขภาวะของแม่โค อาหาร ฤดูกาล และความถี่ในการรีดนม (Kalyankar et al., 2016) ตลอดจนสุขอนามัยและวิธีปฏิบัติในการจัดการฟาร์มโคนม (Yeamkong et al., 2008) นอกจากนี้ น้ำนมดิบจะต้องได้มาจากกระบวนการรีดนมที่สะอาดทำให้มีการปนเปื้อนเชื้อโรคน้อยที่สุดแล้ว น้ำนมดิบต้องมาจากเต้านมที่มีสุขภาพดีและปราศจากสารปนเปื้อน เช่น ยาปฏิชีวนะตกค้างและสารพิษประเภทอะฟลาท็อกซิน เป็นต้น เมื่อพิจารณาการเลี้ยงโคนมในประเทศไทย พบว่า ยังขาดแคลนแม่พันธุ์โคนมที่มีคุณภาพ ขาดแคลนแหล่งอาหารที่มีคุณภาพ และระบบการจัดการฟาร์มเลี้ยงโคนมที่ยังไม่ได้มาตรฐาน เนื่องจากเกษตรกรยังขาดความเข้าใจและการถ่ายทอดทางด้านเทคโนโลยีอย่างต่อเนื่อง (ชมรมนมสร้างชาติ, 2554)

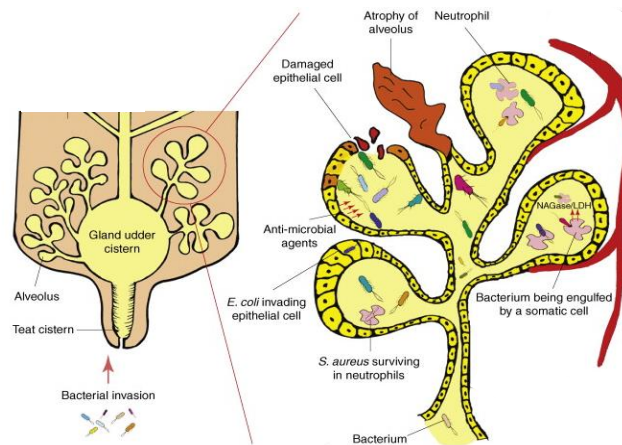
2.4 โรคเต้านมอักเสบ (mastitis)

โรคเต้านมอักเสบเป็นปัญหาที่สำคัญในการเลี้ยงโคนม (Bhushan, 2000; Gomes et al., 2016; Viguier et al., 2009) เนื่องจากทำให้ทั้งปริมาณน้ำนมและคุณภาพน้ำนมลดลง หากพิจารณาในแง่ของคุณภาพน้ำนมแล้ว น้ำนมจากแม่โคที่เป็นเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ ทำให้เกิดปัญหาคุณภาพน้ำนมอย่างมาก เนื่องจากไม่สามารถสังเกตความผิดปกติได้ด้วยตาเปล่า แต่องค์ประกอบภายในของน้ำนมมีคุณสมบัติที่เปลี่ยนแปลงไป (วิทยา สุริยาสถาพร, 2559) เป็นผลให้เกษตรกรขาดรายได้จากการจำหน่ายน้ำนม รวมทั้งยังต้องเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาแม่โคอย่างต่อเนื่อง และถ้ามีการติดเชื้อที่รุนแรง จะนำความสูญเสียต่อตัวแม่โค คือแม่โคไม่สามารถผลิตน้ำนมได้ มีอาการป่วยเรื้อรัง (Barlett et al., 1990) ซึ่งก็จะส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจต่อเกษตรกรผู้เลี้ยงอย่างมาก (Halasa et al., 2007; Geary et al., 2012)

2.4.1 ความหมายของโรคเต้านมอักเสบ

โรคเต้านมอักเสบ หมายถึง การอักเสบที่เกิดกับเนื้อเยื่อของต่อมน้ำนม (mammary gland) ส่วนใหญ่มีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรีย (Santos et al., 2003; Sharma et al., 2007) ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli* กลุ่มเชื้อโรค Coagulase negative staphylococcus) โดยเชื้อเหล่านี้สามารถเข้าสู่เต้านมได้เมื่อมีการเปิดของรูหัวนม โดยเฉพาะจากการรีดนม ทำให้เชื้อแบคทีเรียที่อาศัยในเต้านมทำลายเนื้อเยื่อของเต้านม ร่างกายของแม่โคตอบสนอง โดยกระบวนการต่อต้านเชื้อโรคของเม็ดเลือดขาว ซึ่งเข้าไปทำลายเชื้อโรคที่เข้าสู่เต้านม อันมีผลทำให้โซมาติกเซลล์มีปริมาณสูงขึ้น (Plastridge, 2013; Harmon, 2001) ซึ่งโซมาติกเซลล์ (somatic cell) คือ เซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีอยู่ในน้ำนม ประกอบด้วยเซลล์เยอบุผิว, neutrophils, macrophages และ lymphocytes (Auld and Hubble, 1998; Sundekilde et al., 2013) การที่เต้านมเกิดการติดเชื้อ ร่างกายจะมีกลไกป้องกันการติดเชื้อ เมื่อเกิดการติดเชื้อแบคทีเรียเข้าไปภายในเต้านมจะทำให้ macrophages ตอบสนองโดยเริ่มต้นกระบวนการอักเสบ โดยการส่งสัญญาณเรียกเม็ดเลือดขาว

โดยเฉพาะพวก polymorphonuclear cells เข้ามาภายในเต้านมเพื่อเก็บกิน และทำลายเชื้อแบคทีเรียที่เข้ามาทำให้ระดับของโซมาติกเซลล์เพิ่มสูงขึ้น (Harmon, 2001) (ภาพที่ 2.10)



ภาพที่ 2.10 การทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวเมื่อมีเชื้อโรคเข้าสู่เซลล์

ที่มา : Viguier et al. (2009)

ปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบที่จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบจะมีปริมาณสูงขึ้นไปประมาณ 1,000,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (Plastridge, 2013; Bytyqi et al., 2010) ซึ่งเต้านมที่ปกติไม่ควรจะมีโซมาติกเซลล์ในน้ำนมเกิน 500,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (มกษ. 6003-2553; สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2553) และจากมาตรฐานของสหพันธ์ผลิตภัณฑ์นมระหว่างประเทศ (International Dairy Federation: IDF, 2005) ได้กำหนดให้น้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ ควรมีปริมาณโซมาติกเซลล์ที่ยอมรับได้ ไม่เกิน 200,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และจากมาตรฐานของ Directive 92/46/EEC ซึ่งเป็นข้อกำหนดที่ใช้เพื่อควบคุมการปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์นม (dairy products) ของกฎหมายของสหภาพยุโรป กำหนดว่า น้ำนมที่มีปริมาณโซมาติกเซลล์มากกว่า 400,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จะไม่สามารถนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์นมเพื่อการบริโภคของมนุษย์ได้ (Atasever et al., 2010)

นอกจากนี้โรคเต้านมอักเสบยังมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำนม (Moyes et al., 2009; Khan, 2006) โดยน้ำนมจะมีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทำให้สีน้ำนมผิดปกติไป เช่น เป็น

สีเหลือง น้ำนมใส หรือมีเลือดปนออกมากับน้ำนม น้ำนมเป็นก้อน เป็นลิ่ม และน้ำนมที่ได้มีปริมาณลดลง (Shuster et al., 1991) และยังส่งผลให้สารเมตาบอไลต์ภายในน้ำนมเปลี่ยนแปลง (Batavani et al., 2007; Le Maréchal et al., 2011; Sundekilde et al., 2013) ซึ่งสามารถแยกชนิดของโรคเต้านมอักเสบได้ดังนี้ คือ

2.4.2 เต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ (subclinical mastitis)

หมายถึง การอักเสบของเต้านมที่ไม่สามารถสังเกตความผิดปกติได้ทางสายตา ทั้งเต้านมและน้ำนม เช่น ไม่มีลักษณะบวมแดง หรือน้ำนมมีสีปกติ ไม่มีตะกอนปนภายในน้ำนม (Batavani and Asri, 2007) แต่น้ำนมที่ได้จะมีปริมาณลดลง เนื่องจากประสิทธิภาพในการสร้างน้ำนมลดลง (วิทยาศาสตร์, 2559; Kitchen, 1981) และองค์ประกอบทางเคมีภายในน้ำนมเปลี่ยนไป (Swinkels et al., 2005; Halasa et al., 2007) จากความเสียหายเนื้อเยื่อภายในเต้านม ทำให้โปรตีน ไขมันและแลคโตสในน้ำนมลดลง ซึ่งการอักเสบของเต้านมแบบไม่แสดงอาการเป็นรูปแบบที่เกิดมากที่สุดประมาณร้อยละ 70 ของการเกิดโรคเต้านมอักเสบในแม่โค โดยส่วนใหญ่แล้วเกิดจากเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มของ *Staphylococcus aureus* และ *Streptococcus agalactiae* (Kirk, 2000) และจะมีปริมาณโซมาติกเซลล์สูงในน้ำนม (Guha et al., 2012) สามารถตรวจเบื้องต้นได้โดยใช้น้ำนยาคalifornia mastitis test (CMT) (Whyte, 2005)

2.4.3 เต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ (clinical mastitis)

หมายถึง การอักเสบของเต้านมที่ปรากฏให้เห็น มีอาการแสดงออกให้เห็นได้ชัดเจน ซึ่งจะทำให้สามารถทำการรักษาได้ทัน สาเหตุของการเกิดโรคเต้านมอักเสบชนิดแสดงอาการนี้ ส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียชนิด *Escherichia coli* โดยแบคทีเรียชนิดนี้สามารถปล่อย สารพิษ endotoxin ออกมา ส่งผลให้แม่โคมีการแสดงอาการที่รุนแรง (Abdou, 1999; Plastringe, 2013) อาการของโรคเต้านมอักเสบสามารถแสดงให้เห็นได้ 2 ลักษณะ คือความผิดปกติของเต้านม เช่น เต้านมแข็ง บวมแดง พร้อมด้วยภาวะซึมเศร้าและอาการเบื่ออาหารเป็นต้น (Batavani and Asri, 2007; Akram et al., 2013; Thomas, 2015) และคุณภาพน้ำนมเปลี่ยนไปเช่น น้ำนมมีตะกอน มีหนองหรือมีเลือด

ปนออกมากับน้ำนม เป็นต้น (Batavani and Asri, 2007; Moyes et al., 2009; Khan, 2006) และน้ำนมที่ได้มีปริมาณลดลง เต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ แบ่งออกได้อีกเป็น 3 ชนิด (กรมปศุสัตว์, 2550) คือ

2.4.3.1 ชนิดเฉียบพลัน (acute mastitis)

มีอาการอักเสบที่เต้านมอย่างเด่นชัดและรุนแรง เช่น มีการบวม แดง ร้อน และเจ็บปวดที่เต้านม พร้อมทั้งมีอาการทางร่างกาย เช่น มีไข้สูง ซึม ไม่กินอาหาร ที่รุนแรง

2.4.3.2 ชนิดรุนแรงและเฉียบพลัน (per acute mastitis)

มีอาการอักเสบที่เต้านมอย่างเด่นชัด เช่น มีการบวม แดง ร้อน และเจ็บปวดที่เต้านม แต่มีอาการทางร่างกาย เช่น มีไข้ ซึม ไม่กินอาหาร ที่ไม่ค่อยรุนแรง

2.4.3.3 ชนิดไม่รุนแรง (sub acute mastitis)

เป็นชนิดที่พบมากที่สุดของเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ คือมีอาการอักเสบที่เต้านมไม่ค่อยเด่นชัด และไม่มีอาการทางร่างกาย แต่จะมีความผิดปกติของน้ำนมให้เห็นได้บ้าง

2.5 ปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรคเต้านมอักเสบ

2.5.1 ปัจจัยทางด้านสุขภาพของแม่โค

แม่โคที่มีอายุมากขึ้นนั้นมีแนวโน้มที่จะมีจำนวนโซมาติกเซลล์ในน้ำนมมากขึ้น เนื่องจากผ่านระยะการให้นมมานานอาจทำให้เกิดการเสียหายที่บริเวณรูของหัวนม ทำให้เชื้อโรคสามารถผ่านเข้าไปในเต้านมได้ง่าย รวมทั้งการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของแม่โคที่อายุอาจจะไม่ตีจึงไม่สามารถกำจัดเชื้อออกจากเต้านมได้ (Plastridge, 2013)

2.5.2 ปัจจัยของช่วงระยะหยุดพักริดนม

ในช่วงที่มีการหยุดพักริดนม แมโคจะไม่ได้เข้าริดนมแล้วก็ตาม แต่การกลั่นน้ำนมของแมโคก็ยังมี การกลั่นและสร้างน้ำนมขึ้นอีก แต่เมื่อไม่มีการรีดน้ำนมออกไป ระบบร่างกายจะทำการดูดซึม น้ำนมที่มีการสร้างกลับไป และในช่วงที่มีการสร้างน้ำนม แต่ไม่มีการรีดน้ำนมออกนี้จึงเป็นช่วงที่เสี่ยง ต่อการเกิดโรคเต้านมอักเสบเป็นอย่างยิ่ง หากมีเชื้อแบคทีเรียหลงเหลืออยู่ในเต้านมไม่ว่าจะเกิดจาก การล้างเต้านมก่อนที่จะมีการหยุดพักริดนมที่ไม่สะอาดจะส่งผลให้แบคทีเรียใช้น้ำนมที่เหลือค้าง ภายในเต้านมเป็นอาหาร จะมีการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว จึงเป็นสาเหตุให้เกิด โรคเต้านมอักเสบขึ้น (Hogan and Smith, 1998; Bradley and Green, 2000; Green et al., 2002) ดังนั้นเมื่อแมโคเกิดเป็นโรคเต้านมอักเสบในช่วงที่มีการหยุดพักริดนมนี้ จะส่งผลให้เซลล์ที่ทำ หน้าที่สร้างน้ำนมสูญเสียไป เช่น เกิดการอักเสบของเยื่อบุเซลล์

2.5.3 ปัจจัยทางด้านการริดนมและการทำความสะอาด

ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมเป็นปัจจัยที่สำคัญ หากมีการจัดการฟาร์มและกระบวนการริดนมที่ไม่ เหมาะสม จะส่งผลให้แมโคเป็นโรคเต้านมอักเสบได้ง่าย (Schukken et al., 2009) อย่างเช่น การไม่ ใช้น้ำยาฆ่าเชื้อเต้านมหลังริดนมเป็นประจำ นั้นทำให้แมโคมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเต้านมอักเสบแบบ ไม่แสดงอาการในฟาร์มที่มีความชุกของโรคสูง เนื่องจากแมโคสามารถติดเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคเต้านมอักเสบจากแมโคที่เคยเป็นโรคเต้านมอักเสบยังคงมีเชื้อที่ก่อโรคหลงเหลืออยู่ภายในเต้านม ซึ่ง สามารถติดต่อกับเต้านมสู่เต้านมได้ โดยการสัมผัสกับเชื้อโดยตรงของคนริดนม ผ้าเช็ดเต้านมและชุด หัวริดนม หรือสภาพโรงเรือนสกปรก อับชื้น ทำให้เกิดการสะสมแหล่งเชื้อโรค (Olde Riekerink et al., 2007; Dufour et al., 2011)

2.5.4 ปัจจัยทางด้านสภาพแวดล้อม

ปริมาณโซมาติกเซลล์จะต่ำสุดในช่วงฤดูหนาวและสูงสุดในช่วงฤดูร้อน (Khatte and Yadav, 2010) เนื่องจากในช่วงฤดูร้อน มีอุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ทำให้มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเต้านมอักเสบได้มากกว่าในช่วงฤดูหนาว (Harmon, 1994)

2.5.5 ปัจจัยทางด้านจุลินทรีย์

2.5.5.1 เชื้อก่อโรคที่ติดต่อจากเต้านมสู่เต้านม (contagious bacteria)

ได้แก่เชื้อ *Streptococcus agalactiae* เชื้อนี้มักทำลายผนังท่อน้ำนม ทำให้ผนังท่อน้ำนมเกิดการอักเสบ และเกิดการหนาตัวขึ้น และมีการเพิ่มจำนวนของโซมาติกเซลล์ (Parker et al., 2008) การอักเสบเนื่องจากการติดเชื้อ *Streptococcus agalactiae* นี้ อาการมักไม่ค่อยรุนแรง แต่จะทำให้ท่อน้ำนมอุดตัน ส่งผลให้เซลล์สร้างน้ำนมหยุดการสร้างน้ำนม ส่งผลให้เซลล์สร้างน้ำนมเสียไป ปริมาณน้ำนมในระยะการให้นมต่อไปจึงลดลง และเชื้อ *Staphylococcus aureus* เชื้อกลุ่มนี้จะสร้างสารพิษ ซึ่งทำอันตรายต่อเซลล์สังเคราะห์และสร้างน้ำนม (Eberhart, 1986; Dingwell et al., 2003) โดยเชื้อจะเริ่มทำลายจากเนื้อเยื่อที่บุโพรงน้ำนม และเคลื่อนไปทำลายท่อน้ำนมและติดต่อไปสู่เต้านมแม่โคตัวอื่นๆ จากอุปกรณ์การรีดนมที่ไม่สะอาด เช่น เครื่องรีดนม ผ้าเช็ดเต้านม และมือของผู้รีดนม (Eberhart, 1986; Hillerton and Berry, 2005)

ซึ่งการติดเชื้อจากเต้านมสู่เต้านมนั้นจะผลกระทบทางเศรษฐกิจมากกว่าโรคติดเชื้อแบบอื่น เนื่องจากการติดเชื้อจากเต้านมสู่เต้านมนั้น ส่งผลให้ความสามารถในการผลิตเซลล์สร้างน้ำนมลดลง (Barbano and Santos, 2006)

2.5.5.2 เชื้อก่อโรคที่พบตามสิ่งแวดล้อม (environmental bacteria)

ได้แก่ เชื้อ *Streptococcus uberis* เชื้อ *Streptococcus dysgalactiae* และ แบคทีเรียกลุ่ม Coliform เช่น ได้แก่ เชื้อ *Escherichia coli* ซึ่งเป็นเชื้อที่เจริญได้เร็ว และจะสร้างสารพิษ เรียกว่า endotoxin ซึ่งสารพิษจะหลั่งออกมาเมื่อเชื้อมีตาย (Abdou, 1999) สารพิษที่ถูกสร้างขึ้น จะดึงดูดให้เม็ดเลือดขาว เดินทางมาที่เต้านมอย่างรวดเร็ว จนสามารถทำลายเชื้อได้ ดังนั้นเต้านมอักเสบที่เกิดจากเชื้อ *Escherichia coli* มักเกิดในช่วงต้นของระยะการให้นม อาการที่พบคือ แม่โคมักจะมีไข้สูง เนื่องจากเชื้อสร้างสารพิษ ร่างกายจะอ่อนเพลีย น้ำนมจะใสเป็นน้ำ มีสีเหลือง และมีก้อนหรือขึ้นหนองปนออกมา ปริมาณน้ำนมจะลดลงอย่างมาก และเชื้อ *Enterobacter spp.* (Eberhart, 1986; Schukken et al., 2009) เชื้อเหล่านี้จะอยู่ในสิ่งแวดล้อมรอบๆ ตัวแม่โค เช่น คอก โรงเรือน พื้น ใน

อุจจาระแมโค ในดิน ในพืชอาหารสัตว์ และสามารถติดต่อเข้าสู่เต้านมทำให้เกิดเต้านมอักเสบ จึงเป็นการยากที่จะกำจัดเชื้อเหล่านี้ให้หมดไป ซึ่งเชื้อเหล่านี้ถ้าติดเข้าสู่เต้านมแล้ว จะมีโอกาสติดต่อจากเต้านมสู่เต้านมได้ด้วย ดังนั้นการป้องกันเต้านมอักเสบจากการติดเชื้อมันนี้ จึงควรที่จะรักษาความสะอาดของคอก โรงเรือน ฟัน และมีการเช็ดล้างทำความสะอาดเต้านม และหัวนมก่อนการรีดนมทุกครั้ง

2.5.5.3 เชื้อก่อโรคที่พบน้อย (rare cause bacteria)

เชื้อมันนี้พบน้อย แต่ทำให้เกิดการอักเสบที่รุนแรง ซึ่งได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium pyogenes*, *Clostridium perfringens*, *Mycoplasma* spp., รา และยีสต์ (Philpot and Nickerson, 1991)

เชื้อแบคทีเรียดังกล่าวนี้สามารถก่อให้เกิดโรคเต้านมอักเสบทั้งที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการ โดยเชื้อแต่ละชนิดจะมีแหล่งที่มาที่แตกต่างกัน แสดงดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 สรุปเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคเต้านมอักเสบ

ที่มา: Eberhart (1986); Abdou (1999); Parker et al. (2008); Baskaran et al. (2009)

เชื้อแบคทีเรีย	ที่มา	การติดเชื้อ
- <i>Streptococcus agalactiae</i>	ในเต้านมที่มีการติดเชื้อ ต่อมนทอนซิล มดลูก ผิวหนัง	เป็นสาเหตุถึงร้อยละ 90 ของการเกิดโรคเต้านม
- <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	มูลสัตว์	อักเสบชนิดไม่แสดงอาการ
- <i>Streptococcus uberis</i>		
- <i>Staphylococcus aureus</i>		
- <i>Escherichia coli</i>	มูลสัตว์ น้ำที่มีการปนเปื้อน	เป็นโรครายตัว พบน้อย
- <i>Exterobacter spp.</i>	เชื้อโรค ดิน สิ่งปฏองนอน	อาจกระจายอยู่ภายในฝูง
- <i>Klegsiella spp.</i>		เดียว
- <i>Corynebacterium spp.</i>	โคที่มีการติดเชื้อ แมลง ดิน	พบน้อยอาจกระจายอยู่ใน
- <i>Peptococcus indiocus</i>		ฝูงในบางท้องที่
- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
- <i>Clostridium perfringens</i>	ดิน มูลสัตว์หญ้าหมัก โคที่ติด	พบน้อย
- <i>Mycoplasma spp.</i>	เชื้อ ดิน ฟันคอก	
- Yeast และ Molds		

2.6 การวินิจฉัยโรคเต้านมอักเสบ

การวินิจฉัยโรคเต้านมอักเสบจากการสังเกตความผิดปกติของแม่มโคเบื้องต้นที่แสดงถึงอาการของการเป็นโรคเต้านมอักเสบ เช่น แม่มโคใช้ขาหลังซ้ายที่บริเวณเต้านม ไม่กินอาหาร ผลผลิตน้ำนมลดลง ซึม เป็นต้น (กรมปศุสัตว์, 2550) จากนั้นจึงเข้าสู่การตรวจโรคเต้านมอักเสบ โดยอาศัยการตรวจพิเศษหรือการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อการวินิจฉัย โดยทั่วไปแล้วการวินิจฉัยเต้านมอักเสบแบบเป็น 3 ลักษณะ คือ การตรวจจากอาการที่เต้านมและน้ำนม การตรวจที่ตัวแม่มโคสำหรับเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการโดยใช้น้ำยา CMT และการตรวจทางห้องปฏิบัติการโดยมีวิธีการดังนี้

2.6.1 การคลำเต้านม (palpation)

ควรทำภายหลังจากรีดนมออกหมดแล้ว เต้านมหลังรีดนมจะแฟบ ทำให้ทำตรวจคลำได้ง่าย การคลำควรคลำทั้ง 4 เต้า ดูว่ามีการบวมอักเสบหรือไม่ แม่มโคเจ็บปวดขณะคลำหรือไม่ เต้านมมีรูปร่างผิดปกติหรือไม่ หรือเป็นก้อนแข็งภายในเต้านมหรือไม่ ซึ่งถ้าพบว่าเต้านมมีการบวมอักเสบ คลำแล้วแม่มโคเจ็บ เต้านมมีรูปร่างผิดปกติ หรือมีลักษณะแข็งเป็นไตภายใน คาดได้ว่าเต้านมเกิดการอักเสบ (กรมปศุสัตว์, 2550)

2.6.2 ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของน้ำนม

การตรวจความเป็นกรด-ด่างของน้ำนม สามารถบอกได้ว่าแม่มโคเป็นเต้านมอักเสบหรือไม่ เพราะปกติ pH ของน้ำนมอยู่ในช่วงที่ 6.60-6.68 (Wielosz-Groth and Groth, 2003) การที่ pH ของน้ำนมเพิ่มขึ้นนั้น เนื่องจากการแลกเปลี่ยนประจุของสารโซเดียม (sodium) คลอไรด์ (chloride) และโพแทสเซียม (potassium) กล่าวคือระดับความเข้มข้นของโซเดียม และคลอไรด์สูงขึ้น ในทางตรงกันข้าม ความเข้มข้นของโพแทสเซียมกลับลดลง (Vijayalakshmi et al., 2001; Bruckmaier et al., 2004; Khan, 2006) จึงมีผลให้น้ำนมที่เป็นเต้านมอักเสบมีฤทธิ์เป็นด่าง

2.6.3 การประเมินปริมาณโซมาติกเซลล์ ด้วยน้ำยา califonia mastitis test (CMT)

การตรวจด้วยน้ำยา CMT เป็นวิธีตรวจเพื่อประเมินปริมาณโซมาติกเซลล์ (somatic cell count) ในทางอ้อมและเป็นวิธีที่ง่ายที่สุด (Thomas, 2015) โดยน้ำยา CMT เป็นสารเคมีที่มีคุณสมบัติเฉพาะ เนื่องจากมีส่วนประกอบของสารลดแรงตึงผิว (3% w/v sodium lauryl sulfate) และ bromocresol purple (Thomas, 2015) โดยสารลดแรงตึงผิว มีคุณสมบัติเฉพาะในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและการนำไฟฟ้าของเยื่อหุ้มเซลล์และนิวเคลียสของเซลล์ นอกจากนั้นยังไปรบกวนสมดุลออสโมซิสและกระตุ้นเอนไซม์โปรติเอส ส่งผลให้เซลล์เม็ดเลือดขาวแตกออกแล้วปล่อยสารพันธุกรรม (DNA) ออกมานอกเซลล์ ทำให้น้ำนมมีลักษณะข้นหนืดขึ้น (gel-like) (Sargeant et al., 2001; Middleton et al., 2004) โดยที่ความเข้มข้นของ DNA และจำนวนเม็ดเลือดขาวหรือโซมาติกเซลล์ในน้ำนมมีความสัมพันธ์กันโดยตรง (Viguiet et al., 2009) และความหนืดนี้จะมากขึ้นกับปริมาณเม็ดเลือดขาวหรือโซมาติกเซลล์ในน้ำนม โดยในน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบจะมีปริมาณโซมาติกเซลล์จะมากกว่าน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคปกติ (Whyte, 2005) นอกจากนี้ น้ำนมที่ได้จากการอักเสบของเต้านมจะเป็นต่าง การเติม bromocresol purple ซึ่งเป็นสารที่สามารถเปลี่ยนสีได้ในสภาวะที่เป็นต่าง ส่วนผสมจะมีสีเข้มขึ้น ลงในน้ำยา CMT จะช่วยแสดงผลการเกิดปฏิกิริยาได้ชัดเจนมากขึ้น ดังนั้นเมื่อเม็ดเลือดขาวหรือโซมาติกเซลล์มีปริมาณมากทำให้ส่วนผสมมีความข้นหนืดมาก และมีสีม่วงเข้ม (Mellenberger and Corol, 2000; Schalm et al., 1971) ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่ยอมรับของกรมปศุสัตว์ในการประเมินแนวโน้มการเกิดโรคเต้านมอักเสบในแม่โคเบื้องต้น (กรมปศุสัตว์, 2550) อย่างไรก็ตามจะต้องมีการตรวจปริมาณโซมาติกเซลล์ทางห้องปฏิบัติเพื่อยืนยันผลที่ถูกต้อง (Kitchen, 1981)

2.6.4 การตรวจปริมาณโซมาติกเซลล์ทางห้องปฏิบัติการ

การตรวจปริมาณโซมาติกเซลล์ในห้องปฏิบัติการเป็นวิธีที่ใช้น้ำนมในการชี้วัดคุณภาพน้ำนมและสุขภาพของเต้านม โดยอาศัยเครื่องมือเฉพาะ (วิทยา สุริยาสถาพร, 2559) เช่น เครื่องฟอสโซมาติกเซลล์ เคานเตอร์ (Fossomatic cell counter) เป็นการตรวจนับปริมาณโซมาติกเซลล์ด้วยเครื่องนับเซลล์อัตโนมัติ ซึ่งวิธีการที่ดีที่สุดในการตรวจนับปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนม แต่เครื่องมือมีราคา

แพ่ง เหมาะสำหรับการตรวจปริมาณโซมาติกเซลล์ในตัวอย่างน้ำนมจำนวนมาก (Wu et al., 2005) (ภาคผนวก ก) และการตรวจนับด้วยกล้องจุลทรรศน์ เป็นวิธีการที่มีการย้อมสีน้ำนมแล้วตรวจนับปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนม วิธีการนี้สามารถนำมาใช้ตรวจในระดับศูนย์รวบรวมน้ำนม แต่ไม่เหมาะสำหรับการตรวจตัวอย่างคราวละมากๆ เนื่องจากใช้เวลาในการเตรียมสไลด์และอ่านผลตัวอย่างค่อนข้างนาน และต้องอาศัยความชำนาญของผู้อ่านผลด้วยเช่นกัน ซึ่งการที่น้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคมีปริมาณโซมาติกเซลล์ระดับสูงสามารถใช้วัดการเกิดเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการรวมทั้งสามารถใช้สำหรับการเฝ้าระวังปัญหาเต้านมอักเสบในระดับฟาร์มโคนมได้ด้วย (วิทยา สุรียาสถาพร, 2559)

2.7 ความสูญเสียจากเต้านมอักเสบ

2.7.1 ผลกระทบของน้ำนมดิบจากเต้านมอักเสบ

โรคเต้านมอักเสบนั้นส่งผลให้เกิดความสูญเสียมากที่สุดในอุตสาหกรรมผู้เลี้ยงโคนม (Viguer et al., 2009; Gomes et al., 2016) เนื่องจากโรคเต้านมอักเสบนั้นส่งผลให้น้ำนมที่ได้มีปริมาณลดลง และยังมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำนม (Harmon, 1994; Khan, 2006) โดยน้ำนมจะมีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทำให้สีน้ำนมผิดปกติไป เช่น เป็นสีเหลือง น้ำนมใส หรือมีเลือดปนออกมากับน้ำนม น้ำนมเป็นก้อน เป็นลิ่ม (Philpot, 2003) นอกจากนี้การเพิ่มขึ้นของปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนม ยังส่งผลให้องค์ประกอบภายในของน้ำนมเปลี่ยนแปลงไป จากความเสียหายเนื้อเยื่อภายในเต้านม ทำให้ประสิทธิภาพในการสร้างน้ำนมลดลง (วิทยา สุรียาสถาพร, 2559; Kitchen, 1981) และยังส่งผลให้โปรตีน ไชมันและแลคโตสในน้ำนมลดลง เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้น (Ballou et al., 1995) (ตารางที่ 2.4) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ว่าน้ำนมที่มีปริมาณโซมาติกเซลล์สูงจะส่งผลให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน (proteolytic enzymes) ที่สูงขึ้น ซึ่งเป็นสาเหตุของการย่อยสลายเคซีนในน้ำนม (Considine et al., 2004; Murphy et al., 2016) ส่งผลให้โปรตีนในน้ำนมลดลง อีกทั้งยังส่งผลให้สารเมตาบอไลต์ภายในน้ำนมเปลี่ยนแปลง (Batavani et al., 2007; Le Maréchal et al., 2011) เช่น ในน้ำนมที่มีปริมาณ

โซมาติกเซลล์สูงจะมี lactate, butyrate, isoleucine, acetate และ β -hydroxybutyrate เพิ่มขึ้น ในขณะที่ hippurate และ fumarate ลดลง (Sundekilde et al., 2013)

ตารางที่ 2.4 การเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีระหว่างในน้ำนมปกติกับในน้ำนมที่มีปริมาณโซมาติกเซลล์สูง
ดัดแปลงจาก Kitchen, 1981

องค์ประกอบทางเคมี	น้ำนมปกติ (%)	น้ำนมที่มีปริมาณโซมาติกเซลล์สูง (%)	เปอร์เซ็นต์จากน้ำนมปกติ
ของแข็งไม่รวมไขมัน	8.90	8.80	99.00
ไขมัน	3.50	3.20	91.00
แลคโตส	4.90	4.40	90.00
โปรตีนทั้งหมด	3.61	3.56	99.00

2.7.2 ผลกระทบของน้ำนมจากเต้านมอีกเสบต่อผลิตภัณฑ์นม

ปริมาณโซมาติกเซลล์ที่สูงขึ้นในน้ำนมดิบมีผลต่อคุณภาพของน้ำนมและผลิตภัณฑ์นม โดยเฉพาะในเรื่องของกลิ่นและรสชาติ และอายุการเก็บรักษา การลดคุณสมบัติลักษณะการฟูของครีมนมและคุณลักษณะของฟองนม และปริมาณเนยแข็งที่ได้ลดลง (Politis et al., 1988; Barbano et al., 1991) การสลายไขมัน (lipolysis) ของนมทำให้เกิดการสร้างกรดไขมันอิสระ ซึ่งมีลักษณะเป็น foam depressant ซึ่งกดลักษณะการฟูของครีมและคุณสมบัติของน้ำนมและอายุการเก็บ (Munro et al., 1984) โดยน้ำนมที่มีปริมาณโซมาติกเซลล์สูงในผลิตภัณฑ์นมพาสเจอร์ไรส์จะมีรสชาติขมและมีกลิ่นหืน (Ma et al., 2000) เนื่องจากการลดลงของการสร้าง diacetyl ซึ่งทำให้เกิดกลิ่นและรสชาติเฉพาะของผลิตภัณฑ์นม นอกจากนี้ยังพบการเพิ่มของกรดไขมันอิสระในโยเกิร์ตที่ผลิตจากน้ำนมดิบที่มีปริมาณโซมาติกเซลล์สูง เมื่อมีการเก็บไว้ในตู้เย็น (Fernandes et al., 2007) รสชาติและกลิ่นหืนนั้นเกิดจากการเพิ่มกระบวนการสลายไขมันซึ่งมีสาเหตุมาจากกรดไขมันอิสระสายสั้น (Choi et al.,

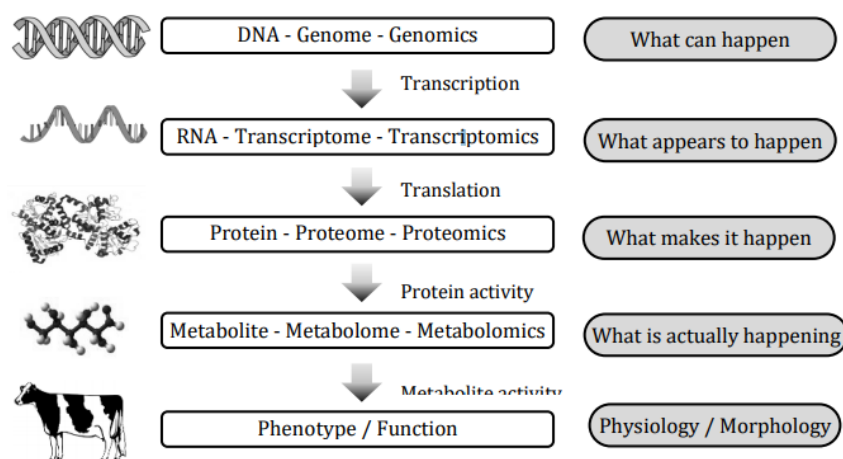
1993) ทำให้น้ำนมที่มีปริมาณโซมาติกเซลล์สูงมีรสชาติเปลี่ยนไปตั้งแต่ช่วงต้นของอายุการเก็บ (Santos et al., 2003)

จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่า การเกิดโรคด้านนมอักเสบยังส่งผลทำให้องค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญต่างๆ ในน้ำนมดิบลดลง เช่น แลคโตส โพรตีน และไขมัน เป็นต้น (Philpot et al., 1991) ซึ่งทำให้คุณภาพของน้ำนมดิบต่ำลงด้วย รวมทั้งองค์ประกอบย่อยทางเคมีในน้ำนมดิบก็ส่งผลต่อคุณภาพของน้ำนมดิบเช่นกัน ปัจจุบันได้มีการนำเทคโนโลยีสมัยใหม่ เช่น เทคโนโลยีโอมิกส์ มาศึกษาการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบย่อยทางเคมีในน้ำนมดิบจากแม่โคที่เป็นโรคด้านนมอักเสบ (Mansor, 2012; Sundekilde et al., 2013)

2.8 วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีโอมิกส์ (omics sciences)

วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีโอมิกส์ (omics sciences) เป็นส่วนหนึ่งของชีววิทยาระบบ (systems biology) โดยคำว่า “โอมิกส์” (~omics) มีรากศัพท์มาจากคำในภาษาละติน “~omne” ซึ่งหมายถึง ลักษณะโดยรวมหรือองค์ประกอบทั้งหมด ซึ่งได้ถูกนำมาใช้เป็นคำต่อท้ายในภาษาอังกฤษ (suffix) ของเทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาองค์ประกอบโดยรวมของสารชีวโมเลกุล (biomolecule) ตั้งแต่ระดับข้อมูลทางพันธุกรรม (gene) การแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอ (transcript) การสังเคราะห์โปรตีน (protein) รวมถึงการวิเคราะห์หาสารเมตาโบไลต์ (metabolite) ทั้งหมดในสิ่งมีชีวิตหรือระบบชีวภาพ (सानต์ เศรษฐชัยมงคล และมยุรี เหลืองวิสัย, 2560; Mozzi et al., 2013) โดยผลการศึกษาที่ได้จะอยู่ในรูปโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุล (biomolecular profile) ได้แก่ ข้อมูลรหัสพันธุกรรมทั้งหมด (genome) เป็นการมุ่งเน้นค้นคว้าหากลุ่มยีนหรือพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตเพื่อหารูปแบบการจัดเรียงตัวและการทำงานของยีน ข้อมูลการแสดงออกหรือการถอดรหัสของยีนเป็นเอ็มอาร์เอ็นเอทั้งหมด (transcriptome) ข้อมูลการสังเคราะห์โปรตีน (proteome) เป็นการศึกษาโปรตีนทั้งในด้านลักษณะ และหน้าที่การทำงาน รวมถึงบริเวณที่พบโปรตีนนั้นๆ ด้วย และสารเมตาโบไลต์ทั้งหมด (metabolome) ของสิ่งมีชีวิตหรือระบบชีวภาพชนิดใดชนิดหนึ่ง ภายใต้สภาวะใดสภาวะหนึ่ง (Mozzi et al., 2013; Zhao, 2013) (ภาพที่ 2.11) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้เกิดความเข้าใจในกลไกเชิงหน้าที่และอันตรกิริยาระหว่างสารชีวโมเลกุลเหล่านั้น รวมทั้งหา

ความสัมพันธ์ระหว่างโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลดังกล่าวต่อลักษณะปรากฏ (phenotype) หรือคุณลักษณะเฉพาะ (characteristics) ของสิ่งมีชีวิตหรือระบบชีวภาพนั้นๆ ภายใต้สภาวะที่สนใจ



ภาพที่ 2.11 แผนภาพ "omics" แสดงภาพรวมของวิธีการผสมผสานที่ครบวงจร ได้แก่ genomics, transcriptomics, proteomics และ metabolomics
ที่มา: ศานต์ เศรษฐชัยมงคล และมยุรี เหลืองวิทย์ (2560)

ปัจจุบันได้มีการนำเทคโนโลยีเมตาโบลอมิกส์มาประยุกต์ใช้ในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของอาหาร และผลที่ได้จะอยู่ในรูปแบบข้อมูลการวิเคราะห์สารเมตาโบลิต์โดยรวม เรียกว่า “เมตาโบลอม” เปรียบเสมือนลายพิมพ์ระดับโมเลกุล (molecular fingerprint) ของตัวอย่างนั้น (Wishart et al., 2008) โดยข้อมูลที่ได้จะช่วยพัฒนาองค์ความรู้ใหม่ เพื่อให้เกิดความเข้าใจถึงโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุล (biomolecular profile) ของผลิตภัณฑ์อาหาร และกลไกการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเหล่านั้นในระหว่างกระบวนการผลิต การแปรรูป การเก็บรักษา ซึ่งเกี่ยวข้องกับสมบัติเชิงหน้าที่ (functionality) และคุณภาพทางประสาทสัมผัส (organoleptic property) ของผลิตภัณฑ์ (Capozzi and Trimigno, 2015)

2.9 เทคโนโลยีเมตาโบลอมิกส์ (metabolomics)

เมตาโบลอมิกส์ หรือ การวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ (metabolite analysis) เป็นหนึ่งในวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีโอมิกส์ ซึ่งใช้ศึกษาเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมี สามารถวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ หรือสารชีวโมเลกุลขนาดเล็ก (โดยทั่วไปมีขนาดต่ำกว่า 1.5 กิโลดาลตัน) (Wishart et al., 2008) เช่น กรดนิวคลีอิก นิวคลีโอไทด์ กรดอะมิโน เพปไทด์สายสั้น กรดไขมัน น้ำตาล โอลิโกแซคคาไรด์ วิตามิน สารประกอบแอลกอฮอล์ สารประกอบคาร์บอนิล กรดอินทรีย์ สารประกอบซัลเฟอร์ สารประกอบฟีนอลิก สารประกอบอะโรมาติก ไฮโดรคาร์บอน ฯลฯ ที่สังเคราะห์โดยสิ่งมีชีวิตหรือเป็นองค์ประกอบของระบบชีวภาพชนิดใดชนิดหนึ่ง (Cevallos-Cevallos et al., 2009) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อรวบรวมข้อมูลชนิดและปริมาณของสารเมตาบอไลต์ทั้งหมด หรือเมตาโบลอม ทั้งสารที่สังเคราะห์อยู่ภายในเซลล์ (intracellular) และสารที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular) ซึ่งเป็นผลผลิตจากวิถีเมตาบอลิซึม (metabolic pathway) เพื่อให้เกิดความเข้าใจแบบองค์รวม (holistic approach) ของระบบชีวภาพนั้นๆ โดย เป็นผลมาจากการแสดงออกทางพันธุกรรมร่วมกับการปรับตัวเพื่อตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อม (ศานต์ เศรษฐชัยมงคล และมยุรี เหลืองวิสัย, 2560; Nicholson and Lindon, 2008) โดยเทคนิคทางเคมีวิเคราะห์ที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาทางเมตาโบลอมิกส์ ได้แก่ mass spectrometry (MS) ซึ่งนิยมใช้ร่วมกับเทคนิคการแยกสาร เช่น gas chromatography/ mass spectrometry (GC/MS) หรือ liquid chromatography/ mass spectrometry (LC/MS) (Castro-Puyana and Herrero, 2013; Herrero et al., 2012) และ nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy (Trimigno et al., 2015; Laghi et al., 2014)

2.9.1 ข้อดีและข้อจำกัดเทคนิคทางเคมีวิเคราะห์ในการศึกษาทางเมตาโบลอมิกส์

2.9.1.1 Gas chromatography/mass spectrometry: GC/ MS

เป็นเทคนิคที่รวมการวิเคราะห์ gas chromatography และ mass spectrometry ไว้ด้วยกัน ซึ่งเป็นหนึ่งในเทคนิคการแยกสารที่ใช้อย่างแพร่หลายในงานวิจัยด้านอาหาร (Karoui and De

Baerdemaeker, 2007) เนื่องจากสามารถวิเคราะห์สารที่ระเหยได้ โดยใช้ตรวจสอบอาหารจำพวกยาฆ่าแมลงและสารระเหยต่างๆ ข้อดีของ GC/ MS คือ การวิเคราะห์ที่มีความไวและความแม่นยำสูง รวมทั้งมี libraries ซึ่งใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์และระบุชนิดของสารที่วิเคราะห์ได้ โดยไม่ต้องอาศัยสารมาตรฐานร่วมในการวิเคราะห์ (Putri et al., 2013)

2.9.1.2 Liquid chromatography/mass spectrometry: LC/ MS

เป็นเทคนิคที่รวมการวิเคราะห์ liquid chromatography และ mass spectrometry ไว้ด้วยกัน (Putri et al., 2013) เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างแพร่หลายสำหรับการศึกษาเมตาโบโลมิกส์ เนื่องจากมีความไวในการวิเคราะห์ และสามารถวิเคราะห์สารที่มีมวลโมเลกุลที่กว้างกว่าการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC/ MS เทคนิคที่นิยมใช้มากที่สุด คือ high-performance liquid chromatography (HPLC) เป็นหนึ่งในเทคนิคการวิเคราะห์สำหรับการแยก เพื่อระบุและหาปริมาณของส่วนประกอบภายในตัวอย่าง ซึ่งจะขึ้นอยู่กับชนิดของ stationary phase โดยส่วนประกอบต่างๆ จะถูกแยกออกจากกัน ตามลักษณะทางเคมี เช่น มวลโมเลกุล ประจุ เป็นต้น (Karoui and De Baerdemaeker, 2007)

2.9.1.3 Nuclear magnetic resonance: NMR

เป็นเทคนิคที่นิยมใช้โดยทั่วไปในการศึกษาด้านเมตาโบโลมิกส์ มีข้อดีในการวิเคราะห์คือ ใช้เวลาในการวิเคราะห์เร็ว ไม่ต้องมีการเตรียมตัวอย่าง และในระหว่างการวิเคราะห์ตัวอย่างไม่มีการสูญสลายไป (nondestructive) ดังนั้นจึงสามารถนำตัวอย่างที่วิเคราะห์เสร็จแล้วไปวิเคราะห์ต่อได้ นอกจากนี้เทคนิค NMR ยังสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างทั้งที่เป็นของแข็งและของเหลวได้ (Emwas, 2013; Emwas, 2015; Silva, 2003)

ข้อดีและข้อจำกัดเทคนิคทางเคมีวิเคราะห์ในการศึกษาทางเมตาโบโลมิกส์ มีแตกต่างกันไป โดยขึ้นอยู่กับตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ สรุปได้ดังตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 ข้อดีและข้อจำกัดของเทคนิคทางเคมีวิเคราะห์ระหว่าง mass spectrometry (MS) และ nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy

ที่มา : Wishart et al. (2008); Emwas (2015); Karoui and De Baerdemaeker, (2007)

เทคนิคทางเคมีวิเคราะห์	ข้อดี (advantages)	ข้อจำกัด (disadvantages)
mass spectrometry	<ul style="list-style-type: none"> - ความไวและความแม่นยำสูง - สามารถทำซ้ำได้หลายรอบ (high reproducibility) - สามารถวัดสารได้หลายสารภายในเวลาเดียวกัน 	<ul style="list-style-type: none"> - มีราคาแพง - มีการทำลายตัวอย่าง ควรใช้ตัวอย่างเพียงเล็กน้อย - ใช้เวลานาน - มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างมาก และต้องใช้คอลัมน์ที่จำเพาะ
nmr spectroscopy	<ul style="list-style-type: none"> - วิเคราะห์ได้ในปริมาณมาก - ไม่ทำลายตัวอย่าง - รวดเร็ว - ไม่ต้องใช้ เทคนิค derivitization - ใช้งานได้ทั้งของเหลวและของแข็ง - มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างน้อย 	<ul style="list-style-type: none"> - ไม่ไวต่อสิ่งกระตุ้น (sensitivity) - มีราคาแพง - ความไวต่ำเมื่อเทียบกับ spectroscopy อื่น ๆ

2.9.2 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (nuclear magnetic resonance: NMR)

NMR เป็นหนึ่งในเทคนิคที่ถูกนำมาประยุกต์ใช้กันอย่างกว้างขวางในเคมีอินทรีย์และชีวเคมี เพื่อระบุสารประกอบอินทรีย์และวิเคราะห์โครงสร้าง biopolymers (Hu et al., 2004) มีความจำเพาะสูง และเป็นการวิเคราะห์ที่ไม่ทำลายตัวอย่าง มีประโยชน์มากแม้จะมีความไวต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับบางวิธีการทางสเปกโตรสโกปี (Josefina and Mercedes, 1999; Beckonert et al.,

2007; Lindon, 2017) สำหรับการศึกษาทางชีวเคมี nuclide ที่ศึกษากันมากที่สุด คือ ไฮโดรเจนหรือโปรตอน (^1H) (Lindon, 2017)

NMR เป็นคำย่อของ nuclear magnetic resonance โดยที่ nuclear คือ นิวเคลียส (รวมทั้งโปรตอนและนิวตรอนที่อยู่ในนิวเคลียสด้วย) magnetic คือ สนามแม่เหล็กภายนอก (external magnetic field) และ resonance คือ ปรากฏการณ์เรโซแนนซ์ (resonance effect)

2.9.2.1 หลักการของ nuclear magnetic resonance

เทคนิค NMR เกี่ยวข้องกับการวัดระดับพลังงานที่แตกต่างกันของนิวเคลียสที่อยู่ภายใต้อิทธิพลของสนามแม่เหล็ก (ธีรยุทธ์ วิไลวัลย์ และคณะ, 2552) ในทางฟิสิกส์อนุภาคที่มีประจุ จะหมุนรอบตัวเองทำให้เกิดสนามแม่เหล็กขึ้น ดังนั้นอะตอมซึ่งประกอบด้วยอิเล็กตรอนมีประจุลบเคลื่อนที่อยู่รอบๆ นิวเคลียส ส่วนภายในนิวเคลียสประกอบด้วยโปรตอนมีประจุบวกกับนิวตรอนที่เป็นกลาง (เย็นหทัย แ่นนหนา, 2549) ในขณะที่อะตอมอยู่อย่างอิสระไม่มีแรงจากสนามแม่เหล็กภายนอก B_0 มากระทำสนามแม่เหล็กของนิวเคลียสจะวางตัวอย่างอิสระ แต่เมื่อในสนามแม่เหล็กภายนอก B_0 เข้าไป การจัดวางตัวของแม่เหล็กนิวเคลียสจะเปลี่ยนไปเป็นแบบมีระเบียบ แสดงดังภาพที่ 2.12



ภาพที่ 2.12 การจัดวางตัวของสนามแม่เหล็กของนิวเคลียสระหว่างไม่มีสนามแม่เหล็กภายนอก B_0 (no field) กับ มีสนามแม่เหล็กภายนอก B_0 (with field)
ที่มา: Ellis et al. (2012)

นิวเคลียสจะมีสมบัติอย่างหนึ่งเรียกว่าเลขควอนตัมสปิน หรือ เลขสปิน (spin number หรือ l) ซึ่งการวางตัวของสนามแม่เหล็กนิวเคลียส ในสนามแม่เหล็กภายนอกมีทิศทางเฉพาะได้ $2l+1$ ทิศทาง (เย็นหทัย แน่นหนา, 2549) โดยโปรตอน (H^1) จะมีเลขสปิน คือ $\frac{1}{2}$

$$\begin{aligned} \text{เมื่อ } l &= \frac{1}{2} \text{ จำนวนทิศทางวางตัวของสนามแม่เหล็กของนิวเคลียส} = 2l+1 \\ &= (2 \times \frac{1}{2}) + 1 \\ &= 2 \text{ ทิศทาง} \end{aligned}$$

ดังนั้นเมื่อนำสารไปวางเรียงอยู่ในสนามแม่เหล็ก (external magnetic field) นิวเคลียสที่เคยหมุนตัวแบบสุ่ม จะหมุนเรียงตัวใหม่แบบสองทิศทาง ได้แก่ นิวเคลียสที่มีสปิน $+\frac{1}{2}$ จะวางตัวในแนวขนานและมีทิศทางเดียวกับแม่เหล็ก ซึ่งเป็นสถานะที่มีพลังงานต่ำ ส่วนนิวเคลียสที่มีสปิน $-\frac{1}{2}$ จะวางตัวในแนวขนานกับแม่เหล็ก แต่มีทิศทางตรงข้าม โดยอยู่ในสถานะที่มีพลังงานสูงกว่า (Atkins, 1998)

ดังนั้นเมื่อนำสารตัวอย่างที่มีนิวเคลียสไปวางในสนามแม่เหล็กพร้อมกับให้พลังงานในช่วงที่มีความถี่คลื่นวิทยุที่เหมาะสม จะทำให้นิวเคลียสเกิดการเปลี่ยนแปลง คือ นิวเคลียสที่มีระดับพลังงานต่ำจะถูกกระตุ้นให้ดูดกลืนพลังงานเข้าไป แล้วเปลี่ยนขึ้นไปอยู่ในระดับที่พลังงานสูงกว่า ในทำนองเดียวกัน นิวเคลียสที่มีระดับพลังงานสูงจะเปลี่ยนแปลง โดยการคายพลังงานออกมา แล้วลงไปอยู่ในระดับที่พลังงานต่ำกว่า ซึ่งเรียกการเปลี่ยนแปลงนี้ว่า “เรโซแนนซ์ (resonance)” (Bovey, 1988)

2.9.2.2 หน่วยของค่าการเลื่อนทางเคมี (chemical shift: δ)

เนื่องจากความถี่ทำให้เกิดเรโซแนนซ์แปรผันโดยตรงกับขนาดของแม่เหล็ก ดังนั้นหากมีการเพิ่มสนามแม่เหล็กจะทำให้ความถี่ของการเกิดเรโซแนนซ์เปลี่ยนแปลงไป ทำให้การบอกหน่วย chemical shift เป็นหน่วย Hz เปลี่ยนไปด้วยตามขนาดของแม่เหล็ก ใน NMR สเปคตรัมที่มีความถี่ต่างกัน ค่า chemical shifts ที่มีหน่วย เฮิร์ตซ์ (Hz) จะมีค่าแตกต่างกัน เช่น chemical shift ของโปรตอนในหมู่เมทิล ของ $C_6H_5CH_3$ ที่วัดด้วยเครื่อง 60 เมกะเฮิร์ตซ์ มีค่าเป็น 138 เฮิร์ตซ์ แต่ถ้าวัด

ด้วยเครื่อง 300 เมกะเฮิร์ตซ์ มีค่าเป็น 690 เฮิร์ตซ์ ดังนั้นการวัด spectra ทุกครั้ง ต้องบอกความเข้มของสนามแม่เหล็กที่ใช้ด้วย จึงลดปัญหาที่จะเกิดขึ้นโดยการใช้ chemical shift แทน (เย็นหทัย แน่นหนา, 2549)

ดังนั้นจึงมีการกำหนดหน่วย chemical shift เป็น ppm เพื่อปรับหน่วยการวัดของ chemical shift ให้เท่ากัน โดยอาศัยสารมาตรฐานอ้างอิงในการคำนวณ มีสูตรการคำนวณดังนี้

$$\text{chemical shift } (\delta) = \frac{\text{ระยะห่างของสารที่พิจารณาจากสารอ้างอิง (Hz)}}{\text{ความถี่ของ NMR spectrometer (MHz)}} \text{ มีหน่วยเป็น ppm}$$

ทำให้การวัด spectra ด้วยเครื่อง NMR ที่มีความถี่ต่างกันตำแหน่งสัญญาณของโปรตอนชนิดเดียวกัน จะปรากฏที่ค่า chemical shifts เดิมเสมอ (เย็นหทัย แน่นหนา, 2549) chemical shifts ที่มีค่ามาก แสดงว่ามีความถี่ที่เกิดจากการดูดกลืนคลื่นวิทยุมีค่าสูง ส่วน chemical shift ที่มีค่าน้อย ความถี่ที่เกิดจากการดูดกลืนคลื่นวิทยุมีค่าต่ำ (แมน อมรสิทธิ์และคณะ, 2552; ธีรยุทธ วิไลวัลย์และคณะ, 2552)

2.9.2.3 สารมาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบในการวิเคราะห์ NMR (reference standard)

การบอกค่า chemical shift ทั่วไป มักใช้เทียบกับสารมาตรฐาน ซึ่งสารมาตรฐานที่นิยมใช้ได้แก่ tetramethyl silane (TMS), 4 4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid (DSS) และ sodium 3-(trimethylsilyl)-[2,2,3,3-d4]-1-propionate (TSP) เนื่องจากโครงสร้างของสารดังกล่าวมีหมู่เมทิล (CH₃) ทั้งหมดที่สามารถทำให้เกิดเรโซแนนซ์ที่เดียวกัน และการเกิดของสารห่างจาก peak โปรตอนส่วนใหญ่ อีกทั้งสารดังกล่าวเป็นสารเฉื่อย ไม่ทำปฏิกิริยากับสารตัวอื่นและสามารถกำจัดออกได้ง่าย ซึ่ง TSP มักใช้สำหรับตัวอย่างที่ละลายใน deuterium oxide (D₂O) (Emwas, 2015)

2.9.2.4 องค์ประกอบหลักของ NMR (เย็นหทัย แนนหนา, 2549)

2.9.2.4.1 แม่เหล็กที่ให้ความเข้มสนามแม่เหล็กภายนอก (B_0)

ต้องเป็นแม่เหล็กที่ให้ความเข้มสนามแม่เหล็กแรงและสม่ำเสมอ เพราะเครื่อง NMR จะแยกสัญญาณได้ดีหรือไม่ ขึ้นอยู่กับความแรงและคุณภาพของสนามแม่เหล็ก แม่เหล็กที่ใช้มีหลายแบบ คือ แม่เหล็กถาวร แม่เหล็กไฟฟ้า และแม่เหล็กที่ทำจากขดลวดตัวนำยิ่งยวด แม่เหล็กถาวรให้ความเข้มของสนามแม่เหล็กน้อยและไวต่ออุณหภูมิ ส่วนแม่เหล็กไฟฟ้าให้ความเข้มของสนามแม่เหล็กสูงกว่าและไม่ไวต่ออุณหภูมิ แม่เหล็กที่ทำจากขดลวดตัวนำยิ่งยวด ให้ความเข้มของสนามแม่เหล็กสูงที่สุดแต่ราคาแพง

2.9.2.4.2 เครื่อง sweep generator

เป็นขดลวดคู่ทำหน้าที่เปลี่ยนความเข้มของสนามแม่เหล็กภายนอกให้เปลี่ยนไปในช่วงแคบๆ

2.9.2.4.3 แหล่งกำเนิดความถี่วิทยุ (radio frequency transmitter)

เป็นขดลวดที่อยู่ในแนวตั้งฉากกับเครื่อง sweep generator ใช้ผลิตสนามแม่เหล็ก B_1 ที่มีความถี่คงที่

2.9.2.4.4 เครื่องรับความถี่วิทยุ (radio frequency receiver)

เป็นขดลวดที่ล้อมรอบสารตัวอย่าง ทำหน้าที่รับสัญญาณการดูดกลืนพลังงานของแม่เหล็กไฟฟ้าช่วงคลื่นวิทยุจากสารตัวอย่าง

2.9.2.4.5 เครื่องบันทึกสัญญาณ

หลักจากได้ข้อมูลจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค NMR จะประมวลผลด้วยเทคนิคทางเคมีเมตริกซ์ (chemometrics) (Skov et al., 2014; Ren et al., 2015) เพื่อวิเคราะห์หารูปแบบ

ความสัมพันธ์และเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลเมตาโบโลมระหว่างกลุ่มตัวอย่าง ด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร เช่น การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal component analysis: PCA) หรือการวิเคราะห์แบบจัดกลุ่ม (cluster analysis) (Ebbels et al., 2011) จะทำให้สามารถเข้าใจกระบวนการเมตาบอลิซึมของสิ่งมีชีวิตหรือระบบชีวภาพ ภายใต้การเปลี่ยนแปลงในสภาวะใดสภาวะหนึ่ง

2.10 การประมวลผลด้วยเทคนิคทางเคโมเมตริกซ์ (chemometrics)

เคโมเมตริกซ์ คือ สาขาวิชาทางเคมีที่ใช้คณิตศาสตร์ สถิติและหลักตรรกศาสตร์เพื่อออกแบบหรือเลือกกระบวนการทดลองที่เหมาะสม และเพื่อเตรียมองค์ความรู้ทางเคมีที่มีความสัมพันธ์กันมากที่สุดสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลทางเคมี (Frank and Friedman, 1993) ซึ่งจะใช้ในการวิเคราะห์หารูปแบบและเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลเมตาโบโลมระหว่างตัวอย่างด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร (multivariate statistical analysis) (Ren et al., 2015; Skov et al., 2014; ศานต์ เศรษฐชัยมงคล และมยุรี เหลืองวิสัย, 2560) เช่น การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (PCA) หรือการวิเคราะห์แบบจัดกลุ่ม (cluster analysis) (Ebbels and De, 2011)

2.10.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal component analysis: PCA)

วิเคราะห์องค์ประกอบหลัก ใช้เพื่อลดมิติของตัวแปร โดยการรวมตัวแปรที่มีความสัมพันธ์กันเข้าเป็นตัวแปรใหม่ โดยยังคงความแปรปรวนรวมของตัวแปรเดิม และเรียกตัวแปรใหม่ว่า องค์ประกอบหลัก (กัลยา วานิชย์บัญชา, 2551; Brotzman et al., 2015) อย่างไรก็ตาม หากปัจจัยที่ได้ยากต่อการตีความ การหมุนปัจจัยเป็นวิธีการที่จะทำให้ปัจจัยมีความหมายมากขึ้น การหมุนปัจจัยร่วมให้ตั้งฉากกัน (orthogonal rotation) ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมเพื่อลดมิติของข้อมูลจากการพิจารณาค่าน้ำหนักองค์ประกอบ (loading หรือ factor loading) ซึ่งเป็นค่าชี้ถึงระดับหรือปริมาณความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรแต่ละตัว (Kim and Mueller, 1978; ยุทธ ไกรวรรณ, 2551) การวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้เป็นวิธีที่สะดวกและง่าย เพราะพิจารณาจากค่า loading ของตัวแปรที่มีค่าสูงเท่านั้น เพื่อให้ตัวแปรสัมพันธ์กับองค์ประกอบในลักษณะที่ชัดเจนขึ้นแล้วจึงคัดเลือกตัวแปรที่มีค่า loading ตั้งแต่ 0.3 ขึ้น

ไป (ยุทธร ไกรวรรณ, 2551) และทำให้ได้องค์ประกอบจำนวนน้อยที่อธิบายความแปรปรวนของตัวแปรสังเกตได้มากที่สุด (สุภมาส อังศุโชติ และคณะ, 2551)

2.10.2 การวิเคราะห์แบบจัดกลุ่ม (cluster analysis)

การวิเคราะห์กลุ่ม เป็นเทคนิคการแบ่งกลุ่มหน่วยข้อมูลออกเป็นกลุ่มย่อยอย่างน้อย 2 กลุ่ม โดยมีหลักเกณฑ์ในการแบ่งดังนี้ ให้นำหน่วยที่อยู่กลุ่มเดียวกันมีลักษณะที่สนใจเหมือนกันหรือคล้ายกัน แต่หน่วยที่อยู่ต่างกลุ่มกันจะมีลักษณะที่สนใจต่างกัน (กัลยา วานิชย์บัญชา, 2552) โดยประเภทของการวิเคราะห์กลุ่ม จะพิจารณาจากขั้นตอนในการรวมกลุ่ม วิธีการหรือหลักเกณฑ์ในการรวมกลุ่ม ประเภทที่นิยมใช้มาก มี 2 ประเภท คือ i) การวิเคราะห์กลุ่มแบบขั้นตอน (hierarchical cluster analysis) และ ii) การวิเคราะห์กลุ่มแบบไม่เป็นขั้นตอน (nonhierarchical cluster analysis) (Karadžić et al., 2017; กัลยา วานิชย์บัญชา, 2552) การวิเคราะห์นิยมแสดงการรวมกลุ่มในแต่ละขั้นตอน ด้วยเดนไดรแกรม (dendrogram) เพราะสะดวกต่อการจัดแบ่งกลุ่ม

2.11 การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเมตาโบลอมิกส์ในการศึกษาองค์ประกอบทางชีวเคมีในสินค้าเกษตรและอาหาร

ในปัจจุบันการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเมตาโบลอมิกส์ได้ขยายขอบเขตครอบคลุมไปยังศาสตร์สาขาอื่นๆ รวมทั้งการวิจัยด้านเกษตรศาสตร์ วิทยาศาสตร์การอาหาร และโภชนาการ เป็นต้น (Kim et al., 2016) โดยเฉพาะทางอาหาร เนื่องจากมีความสัมพันธ์กับสุขภาพของมนุษย์ (Capozzi and Bordoni, 2013; Josic and Giacometti, 2013) เนื่องจากสารเมตาบอไลต์ของอาหารแต่ละชนิดอาจมีความแตกต่างกันไป เช่น แหล่งกำเนิดทางภูมิศาสตร์ที่ต่างกัน ซึ่งปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเมตาโบลอมิกส์ในการพิจารณาความถูกต้องและการตรวจสอบย้อนกลับของอาหารนั้นๆ ได้ (Kim et al., 2016; Lee et al., 2015; Teixeira et al., 2014) แสดงดังตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 ตัวอย่างงานวิจัยที่ได้ประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเมตาโบลอมิกส์ในการศึกษาองค์ประกอบทางชีวเคมีในสินค้าเกษตรและอาหาร

อาหาร	วัตถุประสงค์	เทคนิคทางเคมีวิเคราะห์	สารบ่งชี้ทางชีวภาพ	แหล่งที่มา
ชาดำ	ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอาหารที่อุดมไปด้วยสาร polyphenol และการยับยั้งการประกอบ phenol ทางปัสสาวะและหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของอาหารนั้นๆ	- HPLC-electrospray ionisation-MS-MS	- gallic acid - 4-o-methylgallic acid - epicatechin - kaempferol	- Mennen et al., 2007 - Ito et al., 2007 - Brantsaeter et al., 2007
ไวน์	ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอาหารที่อุดมไปด้วยสาร polyphenol และการยับยั้งการประกอบ phenol ทางปัสสาวะและหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของอาหารนั้นๆ	- HPLC-electrospray ionisation-MS/MS	- gallic acid - 4-o-methylgallic acid	- Mennen et al., 2007
กาแฟ	ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอาหารที่อุดมไปด้วยสาร polyphenol และการยับยั้งการประกอบ phenol ทางปัสสาวะและหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของอาหารนั้นๆ	- HPLC-electrospray ionisation-MS/MS	- caffeic acid - chlorogenic acid	- Mennen et al., 2007

อาหาร	วัตถุประสงค์	เทคนิคทางเคมีวิเคราะห์	สารบ่งชี้ทางชีวภาพ	แหล่งที่มา
เบียร์	ศึกษาความแตกต่างของข้อมูลเมตาโบโลมระหว่างเบียร์ที่มีสถานที่ผลิตแตกต่างกัน	- ¹ H NMR	- adenosine/inosine - uridine - tyrosine/tyrosol - 2-phenylethanol	Almeida et al., 2006
ส้ม	ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอาหารที่อุดมไปด้วยสาร polyphenol และการขับสารประกอบ phenol ทางปัสสาวะ และหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของอาหารนั้นๆ	- HPLC-electrospray ionisation-MS/MS	- hesperetin	Mennen et al., 2007
แอปเปิ้ล	ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอาหารที่อุดมไปด้วยสาร polyphenol และการขับสารประกอบ phenol ทางปัสสาวะ และหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของอาหารนั้นๆ	- HPLC-electrospray ionisation-MS/MS	- phloretin	Mennen et al., 2007

อาหาร	วัตถุประสงค์	เทคนิคทางเคมีวิเคราะห์	สารบ่งชี้ทางชีวภาพ	แหล่งที่มา
กระเทียม	เพื่อตรวจสอบการสะสมของ allylmercapturic acid (ALMA) ใน ปัสสาวะของมนุษย์ที่บริโภคกระเทียม	- GC/MS	- allylmercapturic acid	- De et al., 1996
ปลา	เพื่อศึกษาการเพิ่มขึ้นของ methylamines ในตัวอย่างปัสสาวะ	- ¹ H NMR	- trimethylamine - trimethylamine-oxide	- Lee et al., 2006



2.12 การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเมตาโบลอมิกส์ในการศึกษาองค์ประกอบทางชีวเคมีในนํ้านม

เนื่องจากในนํ้านมดิบมีองค์ประกอบทางเคมีค่อนข้างซับซ้อน ซึ่งเทคโนโลยีเมตาโบลอมิกส์สามารถวิเคราะห์องค์ประกอบย่อยหรือสารเมตาบอไลต์ในนํ้านม ทั้งชนิดที่ระเหยง่าย (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 ได้ถึงประมาณ 200 ชนิด (Boudonck et al., 2009; Klein et al., 2010; Sundekilde et al., 2013) (ตารางที่ 2.7) ซึ่งถึงแม้ว่าจะเป็นองค์ประกอบเหล่านี้จะมีอยู่ในปริมาณเล็กน้อย แต่ก็มีผลต่อรสชาติ จำเป็นที่จะต้องศึกษา เพราะมีผลโดยตรงต่อองค์ประกอบทางชีวเคมีและคุณภาพทางประสาทสัมผัสของนํ้านม และผลิตภัณฑ์นม ซึ่งปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้ข้อมูลดังกล่าวในการตรวจสอบสุขภาวะของแม่โคและคุณภาพของนํ้านมดิบ แสดงดังตารางที่ 2.8

ตารางที่ 2.7 ตัวอย่างสารเมตาบอไลต์ในนม ทั้งชนิดที่ระเหยง่าย (volatile) และชนิดที่ระเหยยาก (non-volatile)

ที่มา : Boudonck et al., 2009

วิถีหลักของกระบวนการ	กระบวนการที่เกิดขึ้นภายในเซลล์	สารเมตาบอไลต์
amino acid	<ul style="list-style-type: none"> - glycine, serine และ threonine metabolism - alanine และ aspartate metabolism - glutamate metabolism - histidine metabolism - lysine metabolism lysine - phenylalanine & tyrosine metabolism - valine, leucine และ isoleucine metabolism - urea cycle; arginine-, proline-, metabolism - creatine metabolism - glutathione metabolism 	<ul style="list-style-type: none"> - glycine - 2-hydroxyhippurate (salicylurate) - threonine - aspartate - glutamine - histidine - p-cresol sulfate - phenylacetyl glycine - valine - urea - trans- 4- hydroxyproline - creatinine - 5-oxoproline
peptides	<ul style="list-style-type: none"> - bovine casein peptides 	<ul style="list-style-type: none"> - releelnyvgea (β- casein precursor) - sektmplwa (alpha- S1- casein precursor)

วิถีหลักของกระบวนการ	กระบวนการที่เกิดขึ้นภายในเซลล์	สารเมตาบอไลต์
carbohydrate	<ul style="list-style-type: none"> - aminosugars metabolism - fructose, mannose, galactose, starch, และ sucrose metabolism - glycolysis, gluconeogenesis, pyruvate metabolism 	<ul style="list-style-type: none"> - N- acetylglucosamine - N- acetylneuraminate - galactose - maltotetraose - glucose- 6- phosphate (G6P) - glucose - glucuronate
nucleotide	<ul style="list-style-type: none"> - purine metabolism, adenine containing - purine metabolism, guanine containing - purine metabolism, urate metabolism - pyrimidine metabolism, cytidine containing - pyrimidine metabolism, uracil containing 	<ul style="list-style-type: none"> - adenosine - adenosine 30,50-cyclic monophosphate - 1-methylguanosine - urate - cytidine - cytidine 50-monophosphate - uracil

วิธีหลักของกระบวนการ	กระบวนการที่เกิดขึ้นภายในเซลล์	สารเมตาบอไลต์
lipid	<ul style="list-style-type: none"> - fatty acid, saturated (C - เลขคู่) - fatty acid, monoene - fatty acid, monoene (C - เลขคี่) - fatty acid, polyene 	<ul style="list-style-type: none"> - caproate (6: 0) - caprylate (8: 0) - laurate (12: 0) - myristate (14: 0) - palmitate (16: 0) - myristoleate (14: 1 (n- 5)) - palmitoleate (16: 1 (n- 7)) - eicosenoate [9 หรือ 11, cis หรือ trans] - 10- heptadecenoate (17: 1 (n - 7)) - linoleate (18: 2 (n - 6)) - linolenate [alpha หรือ gamma; (18: 3 (n - 3 หรือ 6))] - dihom-alpha-linolenate (20: 3 (n - 3)) arachidonate (20: 4 (n - 6)) - carnitine - acetylcarnitine - propionylcarnitine - isobutyrylcarnitine

วิธีหลักของกระบวนการ	กระบวนการที่เกิดขึ้นภายในเซลล์	สารเมตาบอไลต์
	<ul style="list-style-type: none"> - inositol metabolism - diacylglycerol - bile acid metabolism - ketone bodies 	<ul style="list-style-type: none"> - myo-inositol - 1, 2- dipalmitoylglycerol (DAG) - cholate - 3- hydroxybutyrate (BHBA)
energy	<ul style="list-style-type: none"> - krebs cycle 	<ul style="list-style-type: none"> - citrate - cis-aconitaea - alpha-ketoglutarate - succinate - fumarate - malate
cofactors และ vitamins	<ul style="list-style-type: none"> - ascorbate และ aldarate metabolism - nicotinate และ nicotinamide metabolism - pantothenate และ coa metabolism - pyridoxal metabolism 	<ul style="list-style-type: none"> - threonate - nicotinamide ribosidea - pantothenate - pyridoxal

ตารางที่ 2.8 ตัวอย่างงานวิจัยที่ได้ประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเมตาโบลอมิกส์ในการศึกษาองค์ประกอบทางชีวเคมีในน้ำมัน

ปัจจัยที่ศึกษา	วัตถุประสงค์	เทคนิคทางเคมีวิเคราะห์	สารบ่งชี้ทางชีวภาพ	แหล่งที่มา
สายพันธุ์	ศึกษาข้อมูลเมตาโบลอมของน้ำมันดิบที่ได้จากสัตว์เคี้ยวเอื้อง (ruminants) ต่างชนิดและสายพันธุ์ ได้แก่ โคพันธุ์ไฮลส์ตัน โคพันธุ์เจอร์ซี ควาย จากัวร์ และแพะ	LC/MS และ ¹ H-NMR	choline, capric acid, succinic acid, citrate, valine, capric acid, succinic acid, carnitine, 3- (uracil-1-yl)- L-alanine และ uridine	Yang et al., 2016
ความแปรผันทางพันธุกรรม ในยีน DGAT1	ศึกษาผลของความแปรผันทางพันธุกรรม (genetic variation) ในยีน DGAT1 ต่อชนิดและปริมาณสาร เมตาบอไลต์ในน้ำมันดิบ	¹ H-NMR	stomatin, sphingomyelin, choline และ carnitine	Lu et al., 2015
อาหารสัตว์	UV-absorbing compounds (UAC) ในน้ำมันโค ใช้ในการติดตามอาหารสัตว์และส่งผลกระทบต่อคุณภาพน้ำมัน	HPLC/ DAD/ HRMS, ESI-HPLC/ DAD/ HRMS, ESI+ และ ¹ H-NMR	N-cinnamoylglycine, 2,4-, 2,6-, 2,8-quinolinediols และ 1-methyl-3-carboxy-beta-carboline	Rouge et al., 2013

ปัจจัยที่ศึกษา	วัตถุประสงค์	เทคนิคทางเคมีวิเคราะห์	สารบ่งชี้ทางชีวภาพ	แหล่งที่มา
นมเกษตรอินทรีย์ (organic dairy farming)	ข้อมูลเมตาโบโลมของน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมเกษตรอินทรีย์ และฟาร์มโคนมแบบทั่วไป	LC/ MS/ MS และ GC/ MS	tyrosine, isoleucine, mannose, glycerate, ribose, carnitine, butyrylcarnitine และ hippurate	Boudonck et al., 2009
	ศึกษาความแตกต่างของข้อมูลเมตาโบโลมระหว่างน้ำนมปกติและน้ำนมออร์แกนิก	¹ H-NMR และ ¹³ C-NMR	linolenic acid content	Erich et al., 2015
	ศึกษาความแตกต่างของข้อมูลเมตาโบโลมระหว่างน้ำนมปกติและน้ำนมออร์แกนิก	GC/ MS และ LC/ MS	hippurate และ ribose 5-phosphate	Kurt et al., 2009
การเก็บรักษา	การเปลี่ยนแปลงสารเมตาโบไลต์ในน้ำนมระหว่างการให้นม (lactation) 1 เดือน	mass spectrometry analyses	citrate, lactose, phosphorylated saccharide และ phosphatidylcholine	Ilves et al., 2012
การนำไปแปรรูป	ความสัมพันธ์ของปริมาณองค์ประกอบโปรตีนนม และคุณสมบัติการตกตะกอนในผลิตภัณฑ์ชีส	¹ H-NMR	creatinine และ choline	Sundekilde et al., 2014

ปัจจัยที่ศึกษา	วัตถุประสงค์	เทคนิคทางเคมีวิเคราะห์	สารบ่งชี้ทางชีวภาพ	แหล่งที่มา
สุขภาพของแม่โค	ภาวะคีโตซิส (ketosis)	¹ H-NMR	acetoacetate, BHBA, acetone, และ gluconeogenic	Sun et al., 2014
	ภาวะคีโตซิส	¹ H-NMR	glycerophosphocholine (GPC), acetone และ BHBA	Klein et al., 2012
	ไข้้นนม (milk fever: MF)	¹ H-NMR	glucose, glycerol, alanine, GABA, phosphocreatine, pyruvate, ketones, และ lysine	Sun et al., 2014
	ข้อมูลเมตาโบโลมของน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ	UPLC-Q-TOF/ MS	D-glycerol- 1-phosphate, l-carnitine, 5-methoxytryptophan และ Indolyacryloylglycine	Xi et al, 2017
	สารระเหยที่ระเหยได้ในตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ	solid-phase microextraction และ GC/ MS	acetaldehyde และ 2-methylbutyrate	Hettinga et al., 2008

ปัจจัยที่ศึกษา	วัตถุประสงค์	เทคนิคทางเคมีวิเคราะห์	สารบ่งชี้ทางชีวภาพ	แหล่งที่มา
	การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบใน น้ำนม ที่บ่งชี้ถึงซึ่งในการติดเชื้อโรค เต้านมอักเสบ	¹ H-NMR และ LC-MS	- ปริมาณของ lactate, β -hydroxybutyrate, butyrate, isoleucine และ acetate เพิ่มขึ้น - ปริมาณของ hippurate และ fumarate ลดลง ใน น้ำนมที่มีปริมาณไขมันเต้านม เซลล์สูง	Sundekilde et al., 2013



2.13 ช่องว่างทางวิชาการและสมมติฐานในงานวิจัย

จนถึงปัจจุบันยังไม่มีงานวิจัยที่ใช้เทคโนโลยีเมตาโบลอมิกส์เพื่อศึกษาโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของน้ำนมดิบในประเทศไทย โครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสุขภาพของแม่โคต่อการเปลี่ยนแปลงสารเมตาโบไลต์ในน้ำนมดิบ ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ โดยคัดเลือกตัวอย่างจากฟาร์มของเกษตรกรในเขตพื้นที่ จ.สระบุรี และจ.นครราชสีมา ภายใต้การให้คำปรึกษาจากผู้เชี่ยวชาญด้านการส่งเสริมการเลี้ยงโคนมจากองค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย (อ.ส.ค.) อ.มวกเหล็ก จ.สระบุรี เพื่อนำมาเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างข้อมูลเมตาโบลอมของน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบทั้งแบบที่แสดงอาการ และไม่แสดงอาการกับแม่โคปกติ รวมทั้งวิเคราะห์ชนิดของสารเมตาโบไลต์ที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อลักษณะทางพยาธิวิทยาดังกล่าว ร่วมกับการประมวลผลทางเคโมเมตริกซ์ (chemometrics) โดยวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร (multivariate statistical analysis) ได้แก่ การหารูปแบบความแตกต่างระหว่างตัวอย่างด้วยการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (PCA) การวิเคราะห์การจัดกลุ่มด้วยเทคนิค heat-map visualization และ hierarchical cluster analysis (HCA) และหาความสัมพันธ์ของด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน (Pearson correlation) ซึ่งข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญ สำหรับการบ่งชี้ความแตกต่างของน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบในอนาคตเพิ่มเติมได้ ร่วมกับการประเมินคุณภาพน้ำนมดิบ

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 วัสดุดิบ

รายการ

ที่มา

น้ำมันดิบได้จากแม่โคปกติ แม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ และแสดงอาการ

ฟาร์มโคนมของเกษตรกรในเขตพื้นที่ อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี และอำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา จำนวน 3 ฟาร์ม ภายใต้การให้คำปรึกษาจากผู้เชี่ยวชาญด้านการส่งเสริมการเลี้ยงโคนมจากองค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย (อ.ส.ค.) อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี และเจ้าหน้าที่จากสหกรณ์โคนมไทย - เดนมาร์ก (มิตรภาพ) อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี

3.1.2 อุปกรณ์

รายการ	ที่มา
Refrigerated centrifuge, model Z36HK	Hermle Labortechnik, Wehingen, Germany
ตู้แช่เยือกแข็ง Sanyo MDF-236 (-25°C)	Sanyo, Sakata Oizumi-Machi, Japan
LP Vortex mixer	Thermo Fisher Scientific, China
เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 2 ตำแหน่ง ML1602	Mettler Toledo, Switzerland
เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง ML204	Mettler Toledo, Switzerland
Parafilm [®]	Pechiney Plastic Packaging, Inc., USA
เครื่องดูดจ่ายสารปริมาณต่ำ (micropipette)	Pipetman [®] , Starter-kit, Gilson Co., Ltd., Middletown, USA
เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)	Mettler Toledo, Switzerland
บีกเกอร์ (beaker) ขนาด 30, 100, 150 mL	Schott, Germany
ปิเปต (pipette) ขนาด 1, 5, 10 mL	Schott, Germany
เครื่องปั่นเหวี่ยง centrifuge	Hermle Labortechnik GmbH, Germany
เครื่องปั่นเหวี่ยง ultra-centrifuge Optima [™]	Beckman Coulter, Inc., USA
L-100 XL Ultracentrifuge	
หลอดสำหรับปั่นเหวี่ยง ขนาด 50 mL (conical centrifuge tube)	Nunc [™] , Thermo Fisher Scientific, USA
หลอดสำหรับปั่นเหวี่ยง ขนาด 15 mL (conical centrifuge tube)	Nunc [™] , Thermo Fisher Scientific, USA

รายการ	ที่มา
หลอดสำหรับปั่นเหวี่ยง ขนาด 10.4 mL (centrifuge bottles with cap assemblies)	Beckman Coulter , Inc., USA
Nanosep centrifugal device with Omega membrane MWCO 3 kDa	Pall Life Sciences, Ann Arbor, MI, USA
pasture pipette	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Germany
หลอดดูดจ่ายสารปริมาณต่ำ (micropipette tip) PK 113-G-Q ขนาด 1000 µL	Thermo Fisher Scientific Inc., Mexico
หลอดดูดจ่ายสารปริมาณต่ำ (micropipette tip) PK 113-G-Q ขนาด 200 µL	QSP Liquid Handling Products, Thermo Fisher Scientific Inc., Mexico
ไมโครทูป (microtube) ขนาด 2 mL แบบใส	Axygen Scientific, Inc., China
ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 25 mL	Axygen Scientific, Inc., China
ภาชนะสำหรับการตรวจวัดตรวจเต้านมอักเสบ	องค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย (อ.ส.ค.) อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี
ถุงมือป้องกันสารเคมีไนไตรล์ สีฟ้า (nitrile power free)	บริษัท สยามเซมเพอร์เมต จำกัด, สงขลา
เครื่อง NMR spectrometer ความถี่ 500 Hz	Bruker, Rheinstetten, Germany
เครื่อง MilkoScan TM FT+ analyzer	Hilleroed, Denmark
เครื่อง Fossomatic TM FC	Hilleroed, Denmark

3.1.3 สารเคมี

รายการ	ที่มา
น้ำยา california mastitis test (CMT)	องค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย (อ.ส.ค.) อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี
น้ำ Milli-Q	ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการ	ที่มา
Dichloromethane (CH_2Cl_2)	RCI Labscan Co.,Ltd, Bangkok, Thailand
Deuterium oxide (D_2O)	Cambridge Isotope Laboratories Inc., USA
3-Trimethylsilyl-2, 2, 3, 3-tetraduteropropionate (TSP)	Merck, Darmstadt, Germany
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt, Germany
Citric acid ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)	Ajax Finechem, Australia
Sodium acetate (CH_3COONa)	Ajax Finechem, Australia
Lactic acid ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$)	Ajax Finechem, Australia
Formic acid (HCOOH)	Ajax Finechem, Australia
L-Glutamine ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$)	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
L-Tryptophan ($\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$)	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
L-4-Hydroxyproline ($\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_3$)	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
L-Norvaline ($\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2$)	Agilent Technologies, Santa Clara, USA

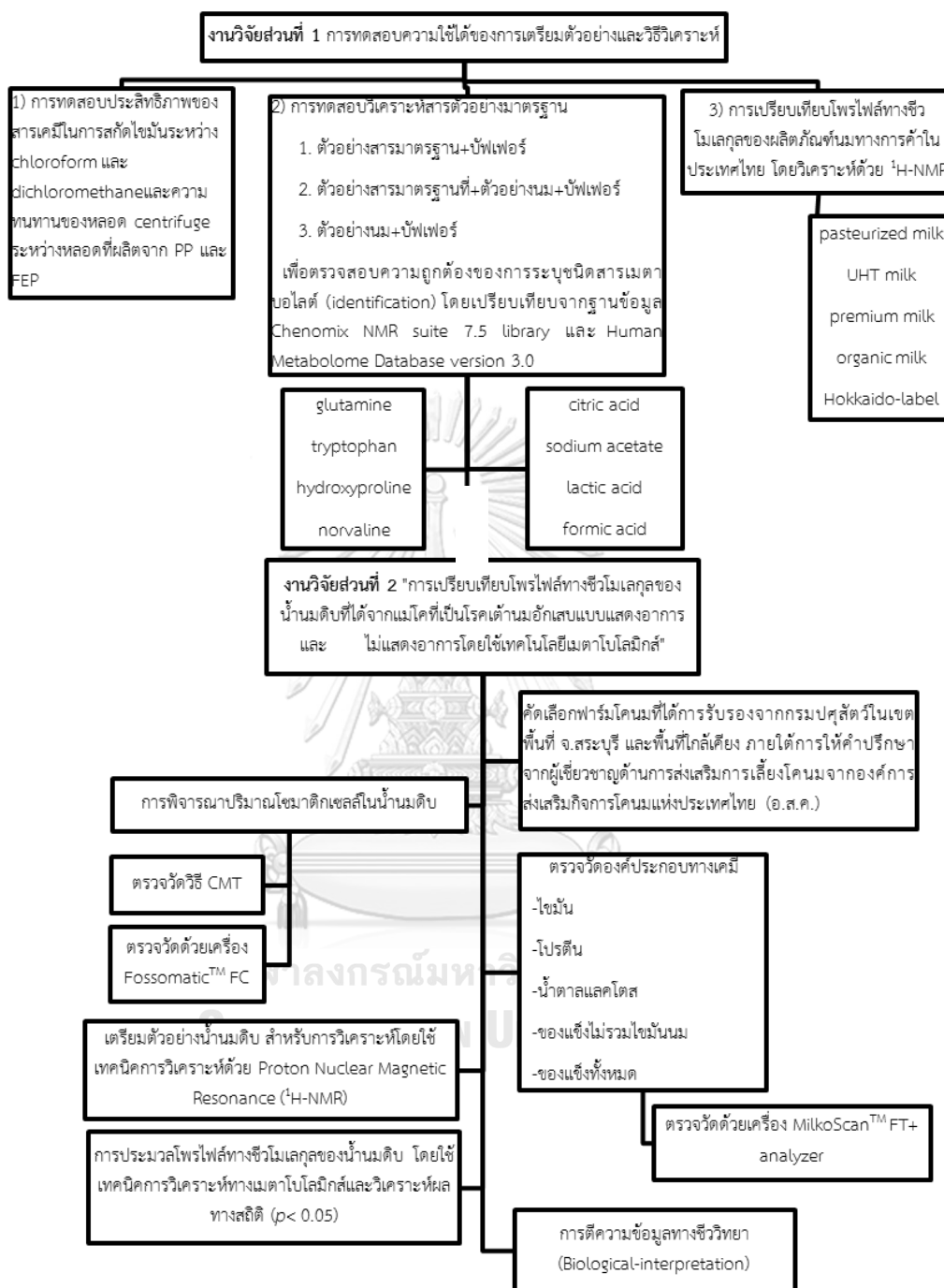
3.2 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.2.1 ภาพรวมของวิธีการดำเนินงานวิจัย

โครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสุขภาพของแม่โคต่อการเปลี่ยนแปลงสารเมตาบอไลต์ในน้ำนมดิบ โดยเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของน้ำนมดิบจากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบทั้งแบบที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการกับแม่โคปกติ ด้วยเทคนิค proton nuclear magnetic resonance ($^1\text{H-NMR}$) โดยงานวิจัยนี้จะแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ การทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์และการศึกษาโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของน้ำนมดิบจากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ

โดยส่วนที่ 1 การทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์ มี 3 ขั้นตอน ในขั้นตอนแรกผู้วิจัยจะทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารเคมีระหว่าง chloroform (RCI Labscan Co.,Ltd, Bangkok, Thailand) และ dichloromethane (RCI Labscan Co.,Ltd, Bangkok, Thailand) และความทนทานของหลอด centrifuge ระหว่างหลอดที่ผลิตจาก PP (Polypropylene) (Nunc™, Thermo Fisher Scientific, USA) และ FEP (Fluorinated ethylene propylene) (Nalgene®, Thermo Scientific, USA) ในขั้นตอนการสกัดไขมัน ขั้นตอนที่ 2 ตรวจสอบความถูกต้องของการระบุชนิดสารเมตาบอไลต์ (identification) โดยการนำสารตัวอย่างมาตรฐาน จำนวน 8 สาร ได้แก่ citric acid, sodium acetate, lactic acid, formic acid, glutamine, tryptophan, hydroxyproline และ norvaline ไปวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ spectrometer และแปลผลข้อมูลโดยทำการระบุชนิดสารเมตาบอไลต์ จากฐานข้อมูล Chenomx NMR suite 7.5 library (Chenomx Inc., Alberta, Canada), Human Metabolome Database version 3.0 (Wishart et al., 2013) และจากงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และขั้นตอนที่ 3 ผู้วิจัยจะนำตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมทางการค้าภายในประเทศไทย ได้แก่ นมพาสเจอร์ไรส์ (pasteurized milk) นมยูเอชที (UHT milk) นมออร์แกนิก (organic milk) นมพรีเมียม (premium milk) และนมฮอกไกโด (Hokkaido-label milk) มาศึกษาโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของผลิตภัณฑ์นมที่มีกระบวนการผลิตที่แตกต่างกัน จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ spectrometer และเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูล ด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร

สำหรับส่วนที่ 2 การศึกษาโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของน้ำนมดิบจากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ ผู้วิจัยจะทำการคัดเลือกตัวอย่างฟาร์มโคนม เพื่อเก็บน้ำนมดิบจากแม่โคปกติ แม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบทั้งแบบที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการ มาทำการศึกษาโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุล ภายใต้การให้คำปรึกษาจากผู้เชี่ยวชาญด้านการเลี้ยงโคนมจากองค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย (อ.ส.ค.) อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี และเจ้าหน้าที่จากสหกรณ์โคนมไทย – เดนมาร์ก (มิตรภาพ) อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี จากนั้นพิจารณาคัดเลือกน้ำนมดิบเบื้องต้นด้วยการทดสอบ น้ายา CMT และนำไปตรวจวัดค่า pH ตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมีและปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบอีกครั้งในห้องปฏิบัติการ จากนั้นเตรียมตัวอย่างน้ำนมดิบและนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ คำนวณหาปริมาณสัมพันธ์ของข้อมูลจาก spectra โดย Bruker TopSpin software (Bruker, Rheinstetten, Germany) และแปลผลข้อมูลโดยทำการระบุชนิดสารเมตาบอไลต์ จากฐานข้อมูล Chenomx NMR suite 7.5 library (Chenomx Inc., Alberta, Canada), Human Metabolome Database version 3.0 (Wishart et al., 2013) และจากงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูล ด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปรเช่นเดียวกับการทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์ดังที่กล่าวข้างต้น และขั้นตอนสุดท้าย คือนำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาการตีความข้อมูลทางชีววิทยา (Biological-interpretation) เพื่อหาความสัมพันธ์ของข้อมูลโพรไฟล์สารเมตาบอไลต์ของน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบทั้งแบบแสดงอาการและไม่แสดงอาการกับแม่โคปกติ รวมทั้งหาปริมาณสัมพันธ์ของสารเมตาบอไลต์ที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) ต่อลักษณะทางพยาธิวิทยาดังกล่าว ดังแสดงในภาพที่ 3.1



ภาพที่ 3.1 ภาพรวมของวิธีการดำเนินงานในงานวิจัยนี้

3.2.2 การทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์ (validation of methods)

3.2.2.1 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารเคมีในการสกัดไขมันและความทนทานของหลอด centrifuge

เตรียมตัวอย่างที่ใช้การเปรียบเทียบสารเคมีในการสกัดไขมันระหว่าง chloroform (RCI Labscan Co., Ltd, Bangkok, Thailand) และ dichloromethane (RCI Labscan Co., Ltd, Bangkok, Thailand) และการเปรียบเทียบความทนทานของหลอด centrifuge ระหว่างหลอดที่ผลิตจาก polypropylene (PP) (Nunc™, Thermo Fisher Scientific, USA) และ fluorinated ethylene propylene (FEP) (Nalgene®, Thermo Scientific, USA) (ภาคผนวก ข) ซึ่งจะทำการเปรียบเทียบโดยใช้นมพาสเจอร์ไรส์ของตราสินค้า A ซึ่งมีค่าปริมาณไขมันร้อยละ 3.27 โปรตีนร้อยละ 2.83 ได้ตัวอย่างทั้งหมด 4 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 การเปรียบเทียบตัวอย่างเพื่อทดสอบความทนทานของหลอด centrifuge และประสิทธิภาพของสารเคมีในการสกัดไขมัน

ลำดับที่	หลอด centrifuge	สารเคมีในการสกัดไขมัน
1	PP (polypropylene)	dichloromethane
2	PP (polypropylene)	chloroform
3	FEP (fluorinated ethylene propylene)	dichloromethane
4	FEP (fluorinated ethylene propylene)	chloroform

หลังจากนั้นจะนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ (Bruker, Rheinstetten, Germany) ที่ความถี่ 500 เมกะเฮิร์ต อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ด้วย broadband observe (BBO) probe ภายใต้คำแนะนำของเจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และพิจารณา NMR spectra ที่ได้จากตัวอย่าง

3.2.2.2 การทดสอบจากสารตัวอย่างมาตรฐาน

ขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของการระบุชนิดสารเมตาบอไลต์ (identification) เนื่องจากโครงสร้างของสารจะส่งผลให้มีค่าการดูดกลืนพลังงานที่ต่างกัน ส่งผลให้สารแต่ละตัวเกิดขึ้นในตำแหน่งบน NMR spectra ที่ต่างกันที่ chemical shifts (δ) ระหว่าง 0.00–10.00 ppm แบ่งได้เป็น 3 ช่วง ได้แก่ Aliphatic region ($\delta = 0.00-3.00$), Sugar region ($\delta = 3.00-5.00$) และ Aromatic region ($\delta = 5.00-10.00$) (Settachaimongkon et al., 2014) พบว่า citric acid ($\delta = 2.53-2.73$), sodium acetate ($\delta = 1.90$), lactic acid ($\delta = 1.33$), glutamine ($\delta = 2.13-2.45$), hydroxyproline ($\delta = 2.11-2.18, 2.39-2.45, 4.32-4.36$) และ norvaline ($\delta = 0.96$) ซึ่งจะอยู่ในช่วง Aliphatic region และ formic acid ($\delta = 8.45$) และ tryptophan ($\delta = 7.19-7.72$) ซึ่งจะอยู่ในช่วง Aromatic region โดยเปรียบเทียบจากฐานข้อมูล Chenomx NMR suite 7.5 library (Chenomx Inc., Alberta, Canada) และ Human Metabolome Database version 3.0 (Wishart et al., 2013) จึงเติมสารตัวอย่างมาตรฐานเหล่านี้ลงไปในการผลิตภัณฑนมพาสเจอร์ไรส์ของตราสินค้า A โดยใส่สารตัวอย่างมาตรฐานที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ โดยคำนวณตาม molecular weight ของสารแต่ละตัว (ภาคผนวก ข) โดยจะเปรียบเทียบตัวอย่าง 3 ตัวอย่าง คือ i) ตัวอย่างสารมาตรฐานผสมกับฟอสเฟตบัพเฟอร์ ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) ii) ตัวอย่างสารมาตรฐานผสมกับตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์ของตราสินค้า A และฟอสเฟตบัพเฟอร์ ในอัตราส่วน 1:1:2 (v/v) และ iii) ตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์ของตราสินค้า A ผสมกับฟอสเฟตบัพเฟอร์ ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) และนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ และแปลผลข้อมูล โดยทำการระบุชนิดสารเมตาบอไลต์ จากฐานข้อมูล Chenomx NMR suite 7.5 library (Chenomx

Inc., Alberta, Canada), Human Metabolome Database version 3.0 (Wishart et al., 2013) และจากงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

3.2.2.3 การทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์ในผลิตภัณฑ์นมทางการค้าในประเทศไทย

โดยการนำตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมทางการค้าในประเทศไทย 3 ตราสินค้า มาศึกษาโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของผลิตภัณฑ์นมที่มีกระบวนการผลิตที่แตกต่างกัน ได้แก่ นมพาสเจอร์ไรส์ (pasteurized milk) นมยูเอชที (UHT milk) นมพาสเจอร์ไรส์พรีเมียม (premium milk) และนมพาสเจอร์ไรส์ออร์แกนิก (organic milk) จะได้ 7 ผลิตภัณฑ์ ดำเนินการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ละ 3 ตัวอย่าง ในช่วงวันหมดอายุที่ใกล้เคียงกัน รวมทั้งหมด 21 ตัวอย่าง โดยแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ สำหรับตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมี ตัวอย่างละ 50 มิลลิลิตร และสำหรับการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิควิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ ตัวอย่างละ 50 มิลลิลิตร

3.2.2.3.1 การตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมีในผลิตภัณฑ์นมทางการค้า

โดยตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ไขมัน (fat) โปรตีน (protein) แลคโตส (lactose) ของแข็งไม่รวมไขมันนม (solid not fat) และของแข็งทั้งหมด (total solids) ด้วยเครื่อง MilkoScanTM FT+ analyzer โดยใช้เทคนิค Fourier Transform Infrared (FTIR) ภายใต้คำแนะนำของเจ้าหน้าที่กลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม (สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ตำบลบางกะดี อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี) ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมทางการค้า 7 ผลิตภัณฑ์ ผลิตภัณฑ์ละ 3 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 21 ตัวอย่าง

3.2.2.3.2 การตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในผลิตภัณฑ์นมทางการค้า

นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมทางการค้า 7 ผลิตภัณฑ์ ผลิตภัณฑ์ละ 3 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 21 ตัวอย่าง เทใส่บีกเกอร์ ตัวอย่างละ 20 มิลลิลิตร นำไปตรวจวัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter และบันทึกผล

สำหรับขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างน้ำนมสำหรับการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ และการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วย $^1\text{H-NMR}$ แสดงดังข้อ 3.2.4 - 3.2.6

3.2.3 การคัดเลือกตัวอย่างน้ำนมดิบในเขตพื้นที่อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี และอำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา

คัดเลือกตัวอย่างน้ำนมดิบจากฟาร์มโคนมของเกษตรกรในเขตพื้นที่อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี และอำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา เพื่อใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสุขภาพของแม่โคต่อการเปลี่ยนแปลงสารเมตาบอไลต์ในน้ำนมดิบ ภายใต้การให้คำปรึกษาจากผู้เชี่ยวชาญด้านการเลี้ยงโคนมจากองค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย (อ.ส.ค.) อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี และเจ้าหน้าที่จากสหกรณ์โคนมไทย - เดนมาร์ก (มิตรภาพ) อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี ซึ่งได้มีการจัดทำข้อตกลงทางวิชาการ (Memorandum of Understanding : MOU) ระหว่างองค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย (อ.ส.ค.) กับคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดยเก็บตัวอย่างน้ำนมดิบจากฟาร์มโคนมทั้งหมด 3 ฟาร์ม ในเขตพื้นที่อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี 2 ฟาร์มและอำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา 1 ฟาร์ม แสดงดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 รายละเอียดฟาร์มโคนมของเกษตรกร (ภาคผนวก ง)





























































ฟาร์มที่	ชื่อฟาร์ม	เจ้าของฟาร์ม	ที่อยู่ฟาร์ม	จำนวนโคทั้งหมด	จำนวนแม่รีด	ปริมาณน้ำนมดิบ
1	สุชาติฟาร์ม	นายสุชาติ สุวรรณทอง	20 หมู่ 5 ต.มิตรภาพ อ.มวกเหล็ก จ.สระบุรี 18180	122 ตัว	65 ตัว	769 กิโลกรัม/วัน
2	คำแพงฟาร์ม	นางแพง คำภีระ	72 หมู่ 5 ต.มิตรภาพ อ.มวกเหล็ก จ.สระบุรี 18180	86 ตัว	44 ตัว	639 กิโลกรัม/วัน
3	เกิดศิริฟาร์ม	นางทวี เกิดศิริ	44/3 หมู่ 4 ต.พญาเย็น อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30320	47 ตัว	25 ตัว	325 กิโลกรัม/วัน

โดยคัดเลือกจากฟาร์มที่มีแม่โคนมพันธุ์ลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเซียน (ร้อยละ 85) ช่วงการให้นม (lactation) ที่ 2 - 4 วัน และอยู่ในระยะกลาง (mid lactation) ของการให้นม ประมาณ 100 - 200 วัน แม่โคในแต่ละฟาร์มถูกเลี้ยงแบบปล่อยอิสระในโรงเรือน ภายในโรงเรือนมีอากาศถ่ายเท มีการเก็บกวาดมูลโคออกจากพื้นโรงเลี้ยงอย่างสม่ำเสมอ และอาหารที่แม่โคได้รับ คืออาหารหยาบและอาหารข้นผสมกัน โดยแม่โคจะได้รับเป็นอาหารข้นสำเร็จรูป ประกอบไปด้วย รำ กากถั่วเหลือง กากถั่วลิสง ใบกระถินแห้ง มีโปรตีนร้อยละ 18 - 22 และอาหารหยาบ เช่น ต้นข้าวโพดสด ต้นข้าวโพดหมัก ฟาง ข้าว และหญ้าสด เป็นต้น และมีน้ำให้กินตลอดเวลา สำหรับการรีดนม จะใช้ระบบการรีดนมแบบถังรีด โดยมีการรีดนมเช้า (06:00 - 08:00 น.) และเย็น (15:00 - 17:00 น.)

3.2.3.1 การเก็บตัวอย่างน้ำนมดิบ

หลังจากที่คัดเลือกฟาร์มได้ทั้งหมด 3 ฟาร์ม การเก็บตัวอย่างน้ำนมดิบจะแบ่งการเก็บออกเป็น 3 สัปดาห์ โดยสัปดาห์ที่ 1 เก็บตัวอย่างจากฟาร์มที่ 1 สัปดาห์ที่ 2 เก็บตัวอย่างจากฟาร์มที่ 2 และสัปดาห์ที่ 3 เก็บตัวอย่างจากฟาร์มที่ 3 ตามลำดับ การเก็บตัวอย่างจากฟาร์มที่ 1 จะเก็บตัวอย่างทั้งหมด 3 วัน (วันเว้นวัน) ซึ่งคือจำนวนซ้ำของการทดลอง (replicate) ในช่วงเย็น (15.00 - 17.00 น.) วันที่ 1 จะแบ่งกลุ่มแม่โคออกเป็น 3 กลุ่ม คือ แม่โคปกติ แม่โคเป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ และแบบแสดงอาการ จากการประเมินปริมาณโซมาติกเซลล์เบื้องต้น ด้วยน้ำยา CMT จะได้แม่โคทั้งหมด 9 ตัว ในวันที่ 2 และวันที่ 3 จะเก็บตัวอย่างน้ำนมดิบจากแม่โค 9 ตัวเดิม รวมจำนวนตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มที่ 1 คือ 27 ตัวอย่าง การเก็บตัวอย่างจากฟาร์มที่ 2 จะเก็บตัวอย่างเช่นเดียวกับฟาร์มที่ 1 คือ แบ่งกลุ่มแม่โคในแต่ละฟาร์มออกเป็น 3 กลุ่ม จากการประเมินปริมาณโซมาติกเซลล์เบื้องต้น ด้วยน้ำยา CMT จะได้แม่โคทั้งหมด 9 ตัว ในวันที่ 2 และวันที่ 3 จะเก็บตัวอย่างน้ำนมดิบจากแม่โค 9 ตัวเดิม รวมจำนวนตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มที่ 2 คือ 27 ตัวอย่าง และการเก็บตัวอย่างจากฟาร์มที่ 3 จะเก็บตัวอย่างเช่นเดียวกับฟาร์มที่ 1 และ 2 คือ แบ่งกลุ่มแม่โคในแต่ละฟาร์มออกเป็น 3 กลุ่ม จากการประเมินปริมาณโซมาติกเซลล์เบื้องต้น ด้วยน้ำยา CMT จะได้แม่โคทั้งหมด 9 ตัว วันที่ 2 และวันที่ 3 จะเก็บตัวอย่างน้ำนมดิบจากแม่โค 9 ตัวเดิม รวมจำนวนตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มที่ 3 คือ 27 ตัวอย่าง แสดงดังตารางที่ 3.3

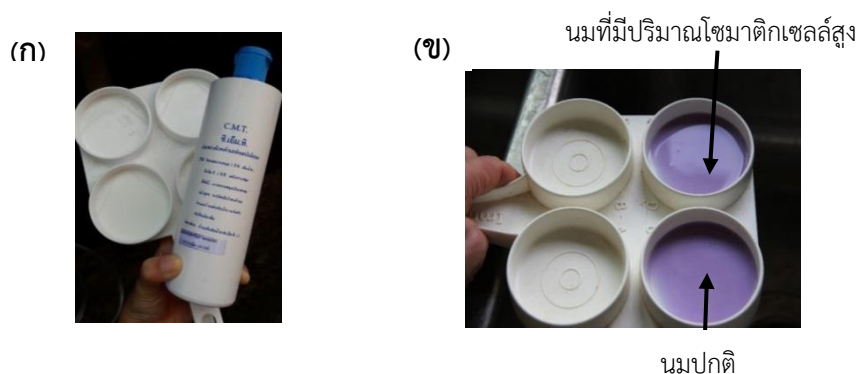
ตารางที่ 3.3 สรุปการเก็บตัวอย่างน้ำนมดิบในแต่ละฟาร์ม

	สัปดาห์ 1			สัปดาห์ 2			สัปดาห์ 3			รวม N = 9
	ฟาร์ม 1			ฟาร์ม 2			ฟาร์ม 3			
จำนวนซ้ำ (replicate)	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
ปกติ (control)										
										
	แม่โค 3 ตัว	แม่โคตัวเดิม		แม่โค 3 ตัว	แม่โคตัวเดิม		แม่โค 3 ตัว	แม่โคตัวเดิม		
โรคเต้านมอักเสบ แบบไม่แสดง อาการ (subclinical mastitis)										
										
	แม่โค 3 ตัว	แม่โคตัวเดิม		แม่โค 3 ตัว	แม่โคตัวเดิม		แม่โค 3 ตัว	แม่โคตัวเดิม		
โรคเต้านมอักเสบ แบบแสดงอาการ (clinical mastitis)										
										
	แม่โค 3 ตัว	แม่โคตัวเดิม		แม่โค 3 ตัว	แม่โคตัวเดิม		แม่โค 3 ตัว	แม่โคตัวเดิม		
รวม										รวม 27 ตัว

โดยขั้นตอนการคัดเลือกแม่โคและการเก็บตัวอย่าง จะเริ่มจากการทำความสะอาดมือผู้รีด และทำความสะอาดเต้านม หัวนมและรูเปิดหัวนม เพื่อขจัดสิ่งสกปรกออก เช็ดด้วยผ้าสะอาดชุบน้ำ และเช็ดด้วยผ้าสะอาดให้เต้านมแห้ง จากนั้นรีดน้ำนมส่วนต้นทิ้งไป ประมาณ 3-4 ครั้ง และรีดนมใส่ ถาดหลุมสำหรับประเมินปริมาณโซมาติกเซลล์ จากการสูมจากแม่โคทั้งหมดในฟาร์ม หลังจากนั้นจะ ทำการเก็บตัวอย่างน้ำนมในแต่ละกลุ่ม โดยรีดตัวอย่างละ 50 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเก็บตัวอย่าง พลาสติก (greiner tube) ที่เขียนป้ายกำกับไว้แล้ว จากนั้นเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสทันที โดยการใส่ถ้ำน้ำแข็งที่เตรียมไว้เพื่อรักษาอุณหภูมิให้อยู่ในระหว่างการขนส่ง (2-3 ชั่วโมง) และนำมา เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส เพื่อรอนำไปวิเคราะห์

3.2.3.2 การคัดเลือกตัวอย่างโดยการประเมินปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบ ด้วยน้ำยา california mastitis test (CMT)

การประเมินปริมาณโซมาติกเซลล์ ด้วยน้ำยา CMT เป็นวิธีการประเมินปริมาณโซมาติกเซลล์ เบื้องต้นในน้ำนมดิบ ด้วยน้ำยา CMT โดยหลังจากรีดนมน้ำนมส่วนต้นทิ้งไปแล้ว จะรีดน้ำนมลงใน ถาดหลุมทั้ง 4 เต้า และปรับปริมาตรน้ำนมในหลุมให้เท่ากันประมาณ 2-3 มิลลิลิตร โดยสังเกตขีด บอกริมาตรที่ติดอยู่บนถาดหลุม และเทน้ำยา CMT ใส่ในถาดหลุม ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) จากนั้น หมุนวนถาดหลุมเป็นวงกลมช้าๆ เพื่อให้น้ำนมดิบและน้ำยา CMT เข้ากัน โดยหากส่วนผสมระหว่าง น้ำนมดิบและน้ำยา CMT มีลักษณะขุ่นหนืด เคลื่อนที่ช้า แสดงว่า เป็น positive (โรคเต้านมอักเสบ) หากส่วนผสมระหว่างน้ำนมดิบและน้ำยา CMT มีลักษณะใส เคลื่อนที่เร็ว แสดงว่า เป็น negative (ปกติ) แสดงดังรูป 3.2 ข ซึ่งสามารถเทียบปริมาณโซมาติกเซลล์ได้จาก CMT score โดยหากมีค่าเป็น negative แสดงว่าน้ำนมดิบปกติ (< 200,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) และหากมีค่าเป็นค่าเป็น positive แสดงว่าน้ำนมดิบมาจากเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ (1,200,000-5,000,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) หรือ แบบแสดงอาการ (> 5,000,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) (Mellenberger and Corol, 2000) ขึ้นอยู่ กับลักษณะของส่วนผสมที่เกิดขึ้น



ภาพที่ 3.2 (ก) อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการประเมินปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบ (ข) ตัวอย่างน้ำนมดิบหลังทำปฏิกิริยากับน้ำยา CMT
ที่มา: Caldwell (2012)

นำตัวอย่างน้ำนมดิบจากแม่โครายตัว (individual cow milk) หลังจากการการประเมินปริมาณโซมาติกเซลล์ จำนวน 3 ตัวอย่าง ที่เก็บภายในสัปดาห์เดียวกัน มารวมกัน (pool milk) เพื่อทำเป็น 1 ซ้ำการทดลอง จะได้ตัวอย่างน้ำนมดิบทั้งหมด 9 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ รวมทั้งหมด 27 ตัวอย่าง โดยแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ สำหรับตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมีและปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบ ตัวอย่างละ 50 มิลลิลิตร และสำหรับการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิควิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ ตัวอย่างละ 50 มิลลิลิตร

3.2.3.3 การตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมีและปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบ

นำตัวอย่างทั้งหมด 27 ตัวอย่าง มาตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมีและปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบ ด้วยเครื่อง CombiFossTM FT+ (FOSS, Hilleroed, Denmark) ซึ่งประกอบด้วย 2 เครื่องหลัก สำหรับการตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ไขมัน โปรตีน แลคโตส ของแข็งไม่รวมไขมันนม และของแข็งทั้งหมด ตรวจวัดด้วยเครื่อง MilkoScanTM FT+ analyzer โดยใช้เทคนิค Fourier Transform Infrared (FTIR) (ภาคผนวก ก) และสำหรับการตรวจวัดปริมาณโซมาติกเซลล์ ตรวจวัดด้วยเครื่อง FossomaticTM FC โดยใช้เทคนิค Flow cytometry (ภาคผนวก ก) ภายใต

คำแนะนำของเจ้าหน้าที่กลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม (สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ตำบลบางกะดี อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี)

3.2.3.4 การตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำนมดิบ (pH) ในน้ำนมดิบ

นำตัวอย่างน้ำนมดิบทั้งหมด 9 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ รวมทั้งหมด 21 ตัวอย่าง เทใส่ปิกรเกอร์ ตัวอย่างละ 20 มิลลิลิตร นำไปตรวจวัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter และบันทึกผล

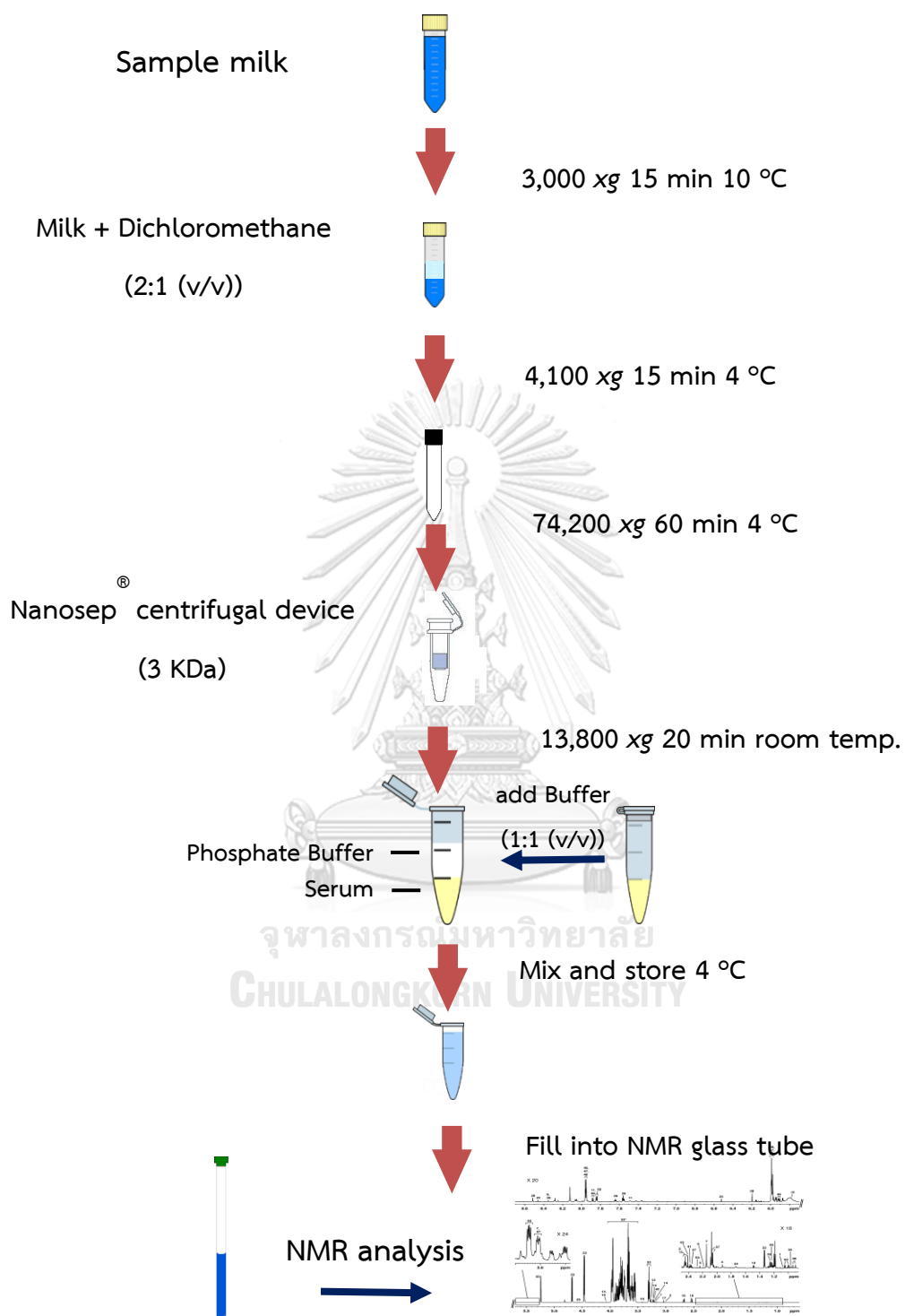
3.2.4 การเตรียมตัวอย่างน้ำนมสำหรับการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ด้วย proton nuclear magnetic resonance ($^1\text{H-NMR}$)

โดยดัดแปลงจากวิธีของ Settachaimongkon และคณะ (2014) และ Lu และคณะ (2013) ดังแสดงในภาพที่ 3.3

3.2.4.1 การเตรียมตัวอย่างน้ำนมก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$

3.2.4.1.1 นำตัวอย่างน้ำนมใส่หลอด centrifuge เพื่อแยกไขมันนมออก โดยการนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 $\times g$ ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากปั่นเหวี่ยง จะพบว่าชั้นไขมันนมอยู่ด้านบน และหางนม (skim milk) อยู่ด้านล่าง จากนั้นถ่ายของเหลวในส่วนที่เป็นหางนมใส่หลอด centrifuge หลอดใหม่

3.2.4.1.2 นำตัวอย่างหางนมมาสกัดไขมันที่เหลือออกด้วย dichloromethane extraction โดยนำตัวอย่างหางนมผสมกับ dichloromethane ในอัตราส่วน 2:1 (v/v) โดยการศึกษานี้จะใช้ตัวอย่างหางนม 20 มิลลิลิตรและ dichloromethane 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer ประมาณ 20 วินาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,100 $\times g$ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากปั่นเหวี่ยงจะพบว่า ซีรัมนม (clear milk serum) อยู่ด้านบน ส่วนชั้นไขมันนมที่เหลือและ dichloromethane อยู่ด้านล่างตามลำดับ จากนั้นถ่ายของเหลวในส่วนที่เป็นซีรัมนมใส่หลอด centrifuge หลอดใหม่



ภาพที่ 3.3 สรุปขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างน้ำนม สำหรับการวิเคราะห์ด้วย ¹H-NMR spectrometer
ในงานวิจัยนี้

3.2.4.1.3 นำซีรัมนมที่ได้ใส่หลอด centrifuge สำหรับ ultra-centrifuged ตัวอย่างละ 9 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ออก โดยปั่นเหวี่ยงที่ 74,200 xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที หลังจากปั่นเหวี่ยงจะพบว่า ซีรัม (serum) อยู่ด้านบน ส่วนตะกอนของโปรตีนจมอยู่ด้านล่าง โดยถ่ายของเหลวในส่วนที่เป็นซีรัมใส่หลอด centrifuge หลอดใหม่

3.2.4.1.4 เตรียม Nanosep[®] centrifugal device (Pall life sciences, Ann Arbor, MI, USA) มีผ่านรูกรองขนาดอนุภาค 3 กิโลดาลตัน ให้พร้อมใช้งาน (ภาคผนวก ค) จากนั้นนำซีรัมนมใส่ใน Nanosep[®] centrifugal device ตัวอย่างละ 500 ไมโครลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อกำจัดตะกอนสุดท้าย โดยปั่นเหวี่ยงที่ 13,800 xg ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นถ่ายของเหลวที่กรองได้ (filtrate serum) ใส่หลอด microcentrifuge หลอดใหม่

3.2.4.1.5 นำตัวอย่างที่กรองได้มาผสมกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เตรียมไว้ (ภาคผนวก ค) ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) ซึ่งในการศึกษานี้จะใช้ตัวอย่าง ปริมาตร 400 ไมโครลิตรและฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย ¹H-NMR ภายใน 24 ชั่วโมง

3.2.4.2 การเตรียมตัวอย่างนมเพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย ¹H-NMR

นำตัวอย่างที่ได้ ย้ายลงในหลอด NMR ขนาด 5 มิลลิเมตร ด้วย micropipette ปริมาณ 400 ไมโครลิตร และเติม D₂O เพิ่มอีก 200 ไมโครลิตร เพื่อช่วยในการจับสัญญาณแม่เหล็กไฟฟ้า (Hu et al., 2004) จากนั้นนำตัวอย่างไปวัดด้วย ¹H-NMR (Bruker, Rheinstetten, Germany) ที่ความถี่ 500 เมกะเฮิร์ต อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ด้วย broadband observe (BBO) probe และมีการกด peak น้ำ (H₂O) ที่ค่า chemical shift เท่ากับ 4.80 ($\delta = 4.80$) ซึ่งเหมาะกับตัวอย่างที่มีน้ำเป็นส่วนประกอบ โดยใช้ระยะเวลาประมาณ 30 นาทีต่อการวิเคราะห์ 1 ตัวอย่าง ภายใต้คำแนะนำของเจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.5 การประมวลโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างน้ำนม โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ทางเมตาโบลอมิกส์

3.2.5.1 ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ NMR เรียกว่า NMR spectra โดย NMR spectra จะอ้างอิงจากสารอ้างอิงมาตรฐาน (Internal standard) ซึ่งในการศึกษานี้ใช้ 3-trimethylsilyl-2,2,3,3-tetradeuteriopropionate (TSP) ช่วง chemical shifts (δ) ของโปรตอนในสารประกอบมีค่าระหว่าง 0.00–10.00 ppm โดยจะแบ่งออก (binning) เป็น 0.02 ppm (Anderson et al., 2011) จะได้ทั้งหมด 500 bin ซึ่งจะคำนวณหาปริมาณสัมพัทธ์ของข้อมูลจาก spectra ได้จาก Bruker TopSpin software (Bruker, Rheinstetten, Germany) โดย bin ที่มีช่วงตรงกับน้ำ ($\delta = 4.73 - 4.99$ ppm) จะไม่นำมาวิเคราะห์

3.2.5.2 ทำการระบุชนิดสารเมตาบอไลต์ จากฐานข้อมูล Chenomx NMR, Human Metabolome Database (Wishart et al., 2013) และจากงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Boudonck et al., 2009; Klein et al., 2010; Settachaimongkon et al., 2014)

3.2.6 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

3.2.6.1 บันทึกข้อมูลด้วยโปรแกรม Microsoft Excel 2013 และนำข้อมูลที่ได้จากการการตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมีในผลิตภัณฑ์นมทางการค้าและน้ำนมดิบ และปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบ มาวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติแบบตัวแปรเดียว (univariate statistical analysis) ด้วยวิธี Duncan's test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) โดยใช้โปรแกรม SPSS version 16.0 (SPSS Inc., Chicago, USA)

3.2.6.2 นำปริมาณสัมพัทธ์ของข้อมูลจาก spectra ที่ได้จาก Bruker TopSpin software (Bruker, Rheinstetten, Germany) มาวิเคราะห์ข้อมูล จะต้องทำการแปลงข้อมูลให้อยู่ในรูปแบบที่ง่ายต่อการนำไปวิเคราะห์ (normalize) ก่อน ด้วยค่ามัธยฐาน (median) ของข้อมูล โดยการนำค่า bin ของแต่ละตัวอย่างหารด้วยค่า median ของแต่ละ bin และนำข้อมูลที่ได้มาหาค่าลอการิทึมฐาน 2 (\log_2 -scaling) จะได้ข้อมูลที่ใช้สำหรับโปรแกรมสำเร็จรูป Multi-Experiment Viewer (MeV) version 4.9 เพื่อวิเคราะห์โพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างน้ำนม สำหรับ bin ที่ไม่สามารถระบุชนิดของ

สารเมตาบอไลต์ได้ จะนำค่าที่ได้จาก Bruker TopSpin software มาวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลโดยใช้ analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) และเลือก bin ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ร่วมกับ bin ที่สามารถระบุชนิดของสารได้ เพื่อนำไปประมวลผลในขั้นตอนถัดไป (Settachaimongkon et al., 2014)

3.2.6.3 ประมวลผลข้อมูลเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่าง ด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร (multivariate statistical analysis) (Skov et al., 2014) ได้แก่ การวิเคราะห์การจัดกลุ่ม ด้วยเทคนิค heat-map visualization และ hierarchical cluster analysis (HCA) ซึ่งเทคนิค heat-map visualization จะเปรียบเทียบความเข้มข้นสัมพัทธ์ (relative abundance) ของสารเมตาบอไลต์ชนิดเดียวกันในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง โดยสีแดง หมายถึง มีสารเมตาบอไลต์มาก และสีเขียว หมายถึง มีสารเมตาบอไลต์น้อย การวิเคราะห์ข้อมูลด้วย HCA โดยหลักการในการทำ cluster ก็คือการจัดกลุ่มข้อมูลที่มีลักษณะเหมือนกันเข้าด้วยกัน และหาความสัมพันธ์ของด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน (Pearson correlation) และการหารูปแบบความแตกต่างของโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลระหว่างตัวอย่างด้วยการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (PCA) และพิจารณาค่าน้ำหนักองค์ประกอบ (loading หรือ factor loading) ในการยืนยันผลของ PCA ซึ่งค่า loading เป็นค่าที่ชี้ถึงระดับหรือปริมาณความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรแต่ละตัว (Kim and Mueller, 1978; ยุทธไกรวรรณ, 2551) เพื่อให้ตัวแปรสัมพันธ์กับองค์ประกอบในลักษณะที่ชัดเจนขึ้นทำให้ได้องค์ประกอบจำนวนน้อยที่อธิบายความแปรปรวนของตัวแปรสังเกตได้มากที่สุด (สุภมาศ อังศุโชติ และคณะ, 2551) ซึ่งสามารถใช้ในการวิเคราะห์หาชนิดของสารเมตาโบไลต์ที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (potential biomarker) ในตัวอย่างได้

3.2.7 วิจัยและสรุปผลการทดลอง

อธิบายผลการทดลองที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ spectrometer และเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูล ด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร โดยเทียบกับงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง เพื่อหาความสัมพันธ์ของสารเมตาบอไลต์ในตัวอย่าง รวมทั้งวิเคราะห์หาชนิดของสารเมตาโบไลต์ที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อแยกความแตกต่างระหว่างน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการและไม่แสดงอาการออกจากน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคปกติ และสรุปผลการทดลอง

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์การทดลอง

4.1 การทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์ (validation of methods)

การวิจัยขั้นตอนนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$

4.1.1 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารเคมีในการสกัดไขมันและความทนทานของหลอด centrifuge

เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพของสารเคมีในการสกัดไขมัน ระหว่าง chloroform (RCI Labscan Co., Ltd, Bangkok, Thailand) และ dichloromethane (RCI Labscan Co., Ltd, Bangkok, Thailand) เนื่องจากมีการศึกษาหลายงานวิจัย (He et al., 2011; Stefanov et al., 2010; Verardo et al., 2017) ที่ใช้ chloroform และ dichloromethane ในการสกัดไขมัน แต่เมื่อพิจารณาความเป็นอันตรายของ chloroform และ dichloromethane จากเอกสารข้อมูลความปลอดภัย (SDS) แสดงให้เห็นว่า chloroform มีความอันตรายมากกว่าและเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมมากกว่า dichloromethane (Olson et al., 2004) (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4 .1 อันตรายของ chloroform (RCI Labscan Co.,Ltd, Bangkok, Thailand) และ dichloromethane (RCI Labscan Co., Ltd, Bangkok, Thailand) จากเอกสาร ข้อมูลความปลอดภัย (SDS) ที่มา: www.chemtrack.org/sds-intro.asp

สารเคมี	chloroform (CHCl ₃)	dichloromethane (CH ₂ Cl ₂)
CAS No.	67-66-3	75-09-2
ความเป็นพิษเฉียบพลัน	LDLO (หายใจ, คน) : 124.1 mg/ V 5 min LC ₅₀ (หายใจ, หนู) : > 47.7 mg/ V 4h	LDLO (ปาก, คน) : 357 mg/ kg LC ₅₀ (หายใจ, หนู) : > 88 mg/V 30 min
ความเป็นพิษทางปาก เฉียบพลัน	เมื่อดูดซึมเข้าสู่ร่างกายทำให้มีอาการคลื่นไส้ อาเจียน	
ความเป็นพิษเฉียบพลัน เมื่อสูดดม	เมื่อดูดซึมเข้าสู่ร่างกายทำให้มีอาการไอ, หายใจลำบาก	เมื่อดูดซึมเข้าสู่ร่างกายทำให้มีอาการระคายเคืองต่อเยื่อเมือก
การกัดกร่อน/การ ระคายเคืองต่อผิวหนัง	เกิดการระคายทำให้ผิวหนังเกิดการสูญเสียน้ำมีผลทำให้ผิวหนังแห้งและแฉะกร้าน	เกิดการระคายทำให้ผิวหนังเกิดการสูญเสียน้ำมีผลทำให้เกิดการอักเสบตามมา
ความสามารถในการ ย่อยสลายทางชีวภาพ	ไม่สามารถย่อยสลายตัวในน้ำ	ย่อยสลายตัวทางชีวภาพได้ยาก
ผลกระทบทางชีวภาพ	เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยในน้ำ ทำให้แหล่งน้ำดื่มเป็นพิษหากปล่อยลงสู่พื้นดินหรือแหล่งน้ำใน ปริมาณมาก	

หากพิจารณาถึงความทนทานของหลอด centrifuge หลอดที่ผลิตด้วย polypropylene (PP) (Nunc™, Thermo Fisher Scientific, USA) มีความแข็งแรงน้อยกว่าหลอดที่ผลิตด้วย fluorinated ethylene propylene (FEP) (Nalgene®, Thermo Scientific, USA) แต่มีน้ำหนักเบา มีความทนทานต่อการขีดข่วน คงตัว ไม่เสียรูปง่าย ทนความร้อนได้สูงถึง 120 องศาเซลเซียส

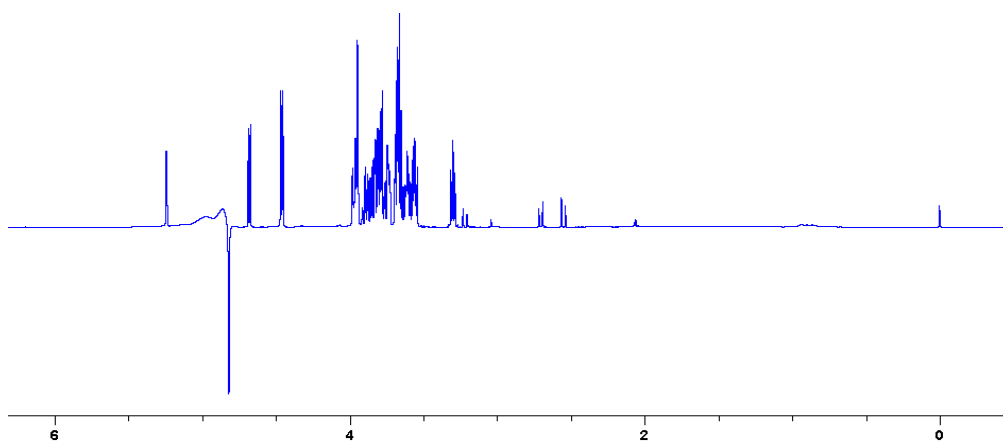
และทนทานต่อสารเคมีส่วนมาก ได้แก่ กรด ต่าง แอลกอฮอล์ ตัวทำละลายอินทรีย์ และสำหรับหลอดที่ผลิตด้วย FEP มีสีขุ่นใส มีความแข็งแรง ทนความร้อนได้สูงถึง 204 องศาเซลเซียส ทนปฏิกิริยาเคมีได้ดี และสารเคมีได้ทุกชนิด แต่มีราคาค่อนข้างแพงกว่าหลอดที่ผลิตด้วย PP (ภาคผนวก ข) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องนำทั้ง 2 หลอดมาทำการวิเคราะห์ เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการทนทานสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยนี้

การวิจัยขั้นตอนนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีในการสกัดไขมันและคัดเลือกหลอด centrifuge ระหว่าง PP และ FEP ที่สามารถทนทานต่อสารเคมีที่ใช้ในการสกัดไขมันได้ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างน้ำมันดิบก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ (Bruker, Rheinstetten, Germany) ที่ความถี่ 500 เมกะเฮิร์ต

จากขั้นตอนการทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์ พบปัญหาที่เกิดขึ้นในขั้นตอนก่อนการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วย $^1\text{H-NMR}$ (Bruker, Rheinstetten, Germany) ที่ความถี่ 500 เมกะเฮิร์ต คือ ปริมาณที่พอเหมาะสำหรับการตรวจวิเคราะห์ คือ 500 – 600 ไมโครลิตร ตามคำแนะนำของเจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (STREC) คือ ตามแผนการทดลองจะทำการเตรียมตัวอย่างใส่หลอด NMR tube ปริมาณ 400 ไมโครลิตร ซึ่งมีปริมาณตัวอย่างมีน้อยเกินไปสำหรับการวิเคราะห์ และในขั้นตอนการวิเคราะห์ตัวอย่าง พบว่า $^1\text{H-NMR}$ ไม่สามารถ lock สัญญาณของแม่เหล็กไฟฟ้าในสนามแม่เหล็กกับตัวอย่างได้ เจ้าหน้าที่จึงแนะนำให้เติมสาร D_2O เพิ่ม 200 ไมโครลิตร เนื่องจากจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการ lock สัญญาณของแม่เหล็กไฟฟ้าให้ดีขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Hu et al., 2004 ว่าการเติมสาร D_2O เพิ่ม จะช่วยในการ lock สัญญาณของแม่เหล็กไฟฟ้าให้ดีขึ้น และทำให้ตัวอย่างมีปริมาณที่เหมาะสม คือ 600 ไมโครลิตร สำหรับการตรวจวัดด้วย $^1\text{H-NMR}$ (Bruker, Rheinstetten, Germany)

ผลการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ จากตัวอย่างทั้ง 4 ตัวอย่าง คือ i.) สกัดไขมันจากหลอด centrifuge ที่ผลิตจาก PP และใช้ chloroform ในการสกัดไขมัน ii.) สกัดไขมันจากหลอด centrifuge ที่ผลิตจาก PP และใช้ dichloromethane ในการสกัดไขมัน iii.) สกัดไขมันจากหลอด centrifuge ที่ผลิตจาก FEP และใช้ chloroform ในการสกัดไขมัน และ iv.) สกัดไขมันจากหลอด

centrifuge ที่ผลิตจาก FEP และใช้ dichloromethane ในการสกัดไขมัน (ตารางที่ 3.1) เมื่อพิจารณาสารเคมีที่ใช้ในการสกัดไขมัน ระหว่าง chloroform และ dichloromethane โดยเปรียบเทียบ NMR spectra อ้างอิงของตัวอย่างของน้ำมันพาสเจอร์ไรส์ (ภาพที่ 4.1)

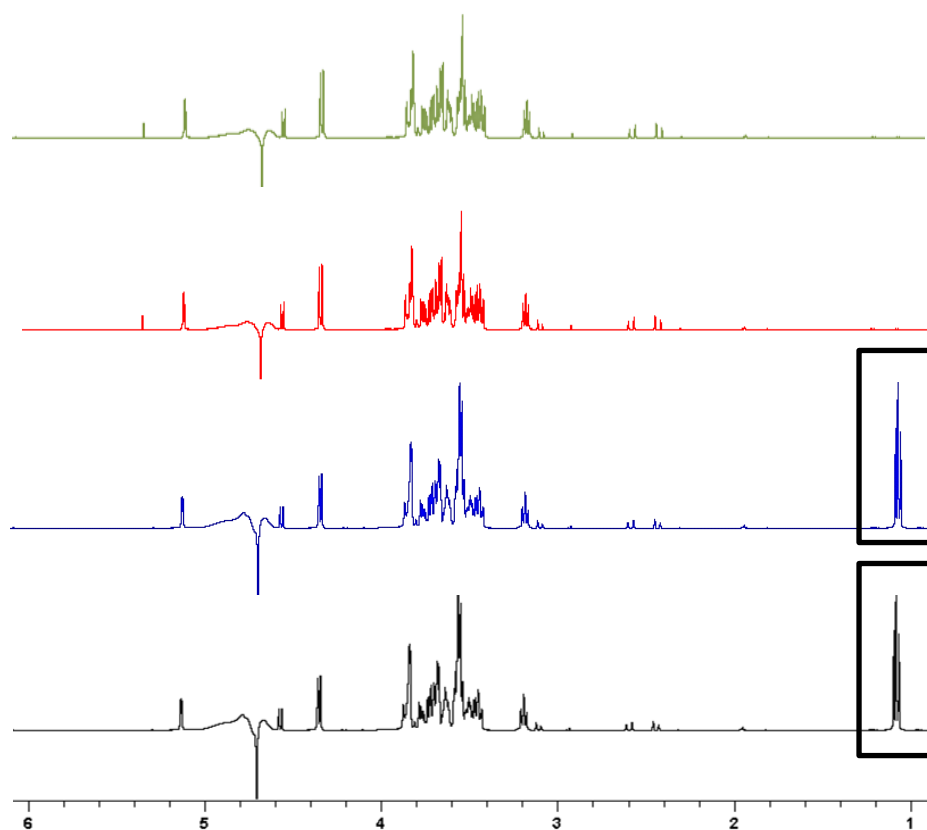


ภาพที่ 4.1 NMR spectra อ้างอิงของตัวอย่างน้ำมันพาสเจอร์ไรส์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย

$^1\text{H-NMR}$

ที่มา: Settachaimongkon et al. (2014)

พบว่า NMR spectra ของตัวอย่างน้ำมันที่ใช้ chloroform ในการสกัดไขมัน ไม่สอดคล้องกับ NMR spectra อ้างอิงของตัวอย่างของน้ำมันพาสเจอร์ไรส์ เนื่องจาก พบความสัญญาณตำแหน่งที่ $\delta = 1.1$ ในตัวอย่างน้ำมันพาสเจอร์ไรส์ที่ใช้ chloroform ในการสกัดไขมัน (ภาพที่ 4.2) ซึ่งอาจจะมีสาเหตุมาจากสารเมตาบอไลต์ที่ได้จาก chloroform ซึ่งสัญญาณตำแหน่งนี้มีความเข้มของสัญญาณที่สูงและอาจจะไปรบกวนสัญญาณในตำแหน่งอื่นๆภายในตัวอย่าง แต่ NMR spectra ของตัวอย่างน้ำมันที่ใช้ dichloromethane ในการสกัดไขมัน เมื่อเปรียบเทียบกับ NMR spectra อ้างอิงของตัวอย่างน้ำมันพาสเจอร์ไรส์ พบว่ามีความสอดคล้องกัน ดังนั้นในขั้นตอนนี้จึงเลือกใช้ dichloromethane ในขั้นตอนการสกัดไขมัน สำหรับการเตรียมตัวอย่างน้ำมันดิบก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ (Bruker, Rheinstetten, Germany) ที่ความถี่ 500 เมกะเฮิร์ต



ภาพที่ 4.2 เปรียบเทียบ NMR spectra ของตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์ที่สกัดไขมันจากหลอด centrifuge ที่ผลิตจาก PP และใช้ dichloromethane ในการสกัดไขมัน (■) สกัดไขมันจากหลอด centrifuge ที่ผลิตจาก FEP และใช้ dichloromethane ในการสกัดไขมัน (■) สกัดไขมันจากหลอด centrifuge ที่ผลิตจาก PP และใช้ chloroform ในการสกัดไขมัน (■) และสกัดไขมันจากหลอด centrifuge ที่ผลิตจาก FEP และใช้ chloroform ในการสกัดไขมัน (■)

เมื่อพิจารณาการเปรียบเทียบของหลอด centrifuge ระหว่างที่ผลิตจาก PP และ FEP ในขั้นตอนการสกัดไขมัน โดยใช้สารเคมีที่ใช้ในการสกัดไขมันชนิดเดียวกัน พบว่า NMR spectra จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ ที่ได้ ไม่มีความแตกต่างกัน (ภาพที่ 4.2) แสดงให้เห็นว่าทั้งสองหลอดสามารถทนต่อการกัดกร่อนได้ดีเท่ากัน ดังนั้นจึงเลือกใช้หลอด centrifuge ระหว่างที่ผลิตจาก PP เนื่องจากมีราคาที่เหมาะสม

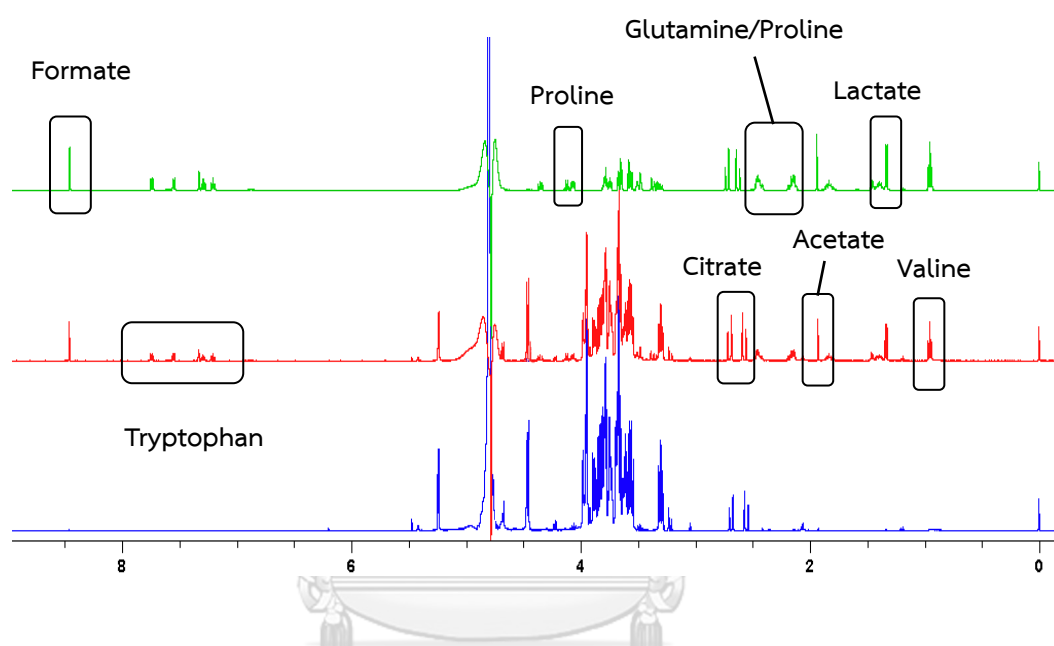
ดังนั้นจากผลการวิเคราะห์ที่กล่าวมาข้างต้นจึงสรุปได้ว่า การใช้ dichloromethane และ หลอด centrifuge ที่ผลิตจาก PP ในขั้นตอนการสกัดไขมันมีความเหมาะสม สำหรับการเตรียม ตัวอย่างน้ำมันดิบก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ (Bruker, Rheinstetten, Germany) ที่ความถี่ 500 เมกะเฮิร์ต

4.1.2 การทดสอบจากสารตัวอย่างมาตรฐาน

เนื่องจากงานวิจัยนี้ เป็นงานวิจัยที่เปรียบเทียบโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของน้ำมันดิบที่ได้จาก แมคโคที่เป็นโรคด้านมออักเสบแบบแสดงอาการและไม่แสดงอาการ จากการวิเคราะห์โดย $^1\text{H-NMR}$ spectrometer ดังนั้นการทดสอบจากสารมาตรฐานจึงเป็นสิ่งสำคัญที่จะทำให้ทราบถึง ประสิทธิภาพของวิธีการระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ (identification) ได้อย่างชัดเจน

จากการทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์ โดยการเติมสารมาตรฐาน (spike sample) ลงไปในตัวอย่าง ทั้งหมด 8 สาร ในช่วง chemical shifts (δ) ระหว่าง 0.00 - 10.00 ppm แบ่งได้เป็น 3 ช่วง ได้แก่ Aliphatic region ($\delta = 0.00-3.00$), Sugar region ($\delta = 3.00-5.00$) และ Aromatic region ($\delta = 5.00-10.00$) โดยพบว่า citric acid ($\delta = 2.53-2.73$), sodium acetate ($\delta = 1.90$), lactic acid ($\delta = 1.33$), glutamine ($\delta = 2.13-2.45$), hydroxyproline ($\delta = 2.11-2.18, 2.39-2.45, 4.32-4.36$) และ norvaline ($\delta = 0.96$) ซึ่งจะอยู่ในช่วง Aliphatic region และ formic acid ($\delta = 8.45$) และ tryptophan ($\delta = 7.19-7.72$) ซึ่งจะอยู่ในช่วง Aromatic region โดยเปรียบเทียบจากฐานข้อมูล Chenomx NMR suite 7.5 library (Chenomx Inc., Alberta, Canada) และ Human Metabolome Database version 3.0 (Settachaimongkon et al., 2014; Wishart et al., 2013) การเติมสารเหล่านี้ลงไปจะทำให้สามารถตรวจสอบประสิทธิภาพของการระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ได้อย่างชัดเจน จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ ของ 3 ตัวอย่าง คือ i) ตัวอย่างสารมาตรฐานผสมกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ii) ตัวอย่างสารมาตรฐานผสมกับตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์ของตราสินค้า A และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และ iii) ตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์ของตราสินค้า A ผสมกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พบว่า สามารถสังเกตเห็นสาร ตัวอย่างมาตรฐานที่เพิ่มลงไปได้อย่างชัดเจน โดยเปรียบเทียบจากฐานข้อมูล Chenomx

NMR suite 7.5 library (Chenomx Inc., Alberta, Canada) และ Human Metabolome Database version 3.0 (Wishart et al., 2013) (ภาพที่ 4.3) ซึ่งเป็นการยืนยันได้ว่า การทดสอบการระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์จากสารตัวอย่างมาตรฐานนี้ มีความน่าเชื่อถือ เพียงพอต่อการศึกษาในขั้นตอนต่อไปได้



ภาพที่ 4.3 NMR spectra ของตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์ของตราสินค้า A ผสมกับฟอสเฟตบัพเฟอร์ (■) เปรียบเทียบกับตัวอย่างสารมาตรฐานผสมกับตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์ของตราสินค้า A และฟอสเฟตบัพเฟอร์ (■) และตัวอย่างสารมาตรฐานผสมกับฟอสเฟตบัพเฟอร์ (■) จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$

4.1.3 การทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์ในผลิตภัณฑ์นมทางการค้าในประเทศไทย

โดยขั้นตอนนี้จะนำตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมทางการค้าในประเทศไทย 3 ตราสินค้า มาศึกษาโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของผลิตภัณฑ์นมที่มีกระบวนการผลิตที่แตกต่างกัน ได้แก่ นมพาสเจอร์ไรส์ (pasteurized milk) นมยูเอชที (UHT milk) นมออร์แกนิก (organic milk) นมพรีเมียม (premium

milk) และนมฮอกไกโด (Hokkaido-labeled milk) จะได้ 7 ผลิตภัณฑ์ ผลิตภัณฑ์ละ 3 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 21 ตัวอย่าง โดยแสดงข้อมูลผลลากโภชนาการของแต่ละตัวอย่างในภาคผนวก จ

4.1.3.1 การตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมีในผลิตภัณฑ์นมทางการค้า

การศึกษาในขั้นตอนนี้ จากการตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมีในผลิตภัณฑ์นมทางการค้า ซึ่งประกอบด้วย ไขมัน โปรตีน แลคโตส ของแข็งไม่รวมไขมันนม และของแข็งทั้งหมด โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีในน้ำนมที่เปลี่ยนแปลงไป จากปัจจัยการผลิตที่แตกต่างกัน คือ ตราสินค้า กระบวนการให้ความร้อน การผลิตในระบบเกษตรอินทรีย์ และนำไปเปรียบเทียบโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมจากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ และเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร

ผลของการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญ ได้แก่ ไขมัน โปรตีน แลคโตส ของแข็งไม่รวมไขมันนม และของแข็งทั้งหมด ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมจากการวิเคราะห์ด้วย เครื่อง MilkoScanTM FT⁺ analyzer โดยใช้เทคนิค Fourier Transform Infrared (FTIR) พบว่า ตัวอย่างน้ำนมมีปริมาณโปรตีนและไขมัน ตามมาตรฐานคุณภาพของน้ำนมโคสดหรือน้ำนมโคและน้ำนมพรีเมียม โดยนมพรีเมียมของตราสินค้า B จะมีปริมาณไขมัน โปรตีน และแลคโตส สูงกว่าน้ำนมปกติในตราสินค้าเดียวกัน คือ นมพาสเจอร์ไรส์และนมยูเอชทีของตราสินค้า B ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงดังตารางที่ 4.2 นอกจากนี้ยังพบว่า น้ำนมออร์แกนิกของตราสินค้า A มีปริมาณแลคโตส สูงกว่าในน้ำนมตราสินค้าเดียวกัน คือ นมพาสเจอร์ไรส์ และนมยูเอชทีของตราสินค้า A ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงดังตารางที่ 4.2 เนื่องจากนมออร์แกนิก คือนมที่ได้จากแม่โคที่ผ่านการเลี้ยงดู การพัฒนากระบวนการผลิตน้ำนมออร์แกนิกนั้น สามารถกระทำได้โดยผู้เลี้ยงโคนมจะต้องมุ่งเน้นการพัฒนากระบวนการเลี้ยงที่ใส่ใจต่อสิ่งแวดล้อมและสวัสดิภาพสัตว์ (animal welfare) เพื่อให้สัตว์มีความเครียดน้อยที่สุด ซึ่งจะส่งผลให้สัตว์มีสุขภาพแข็งแรงและมีภูมิต้านทานโรค และมีการจัดการฟาร์มที่ดี โดยการจัดการเลี้ยงไม่หนาแน่นพอเหมาะกับพื้นที่มีคอกพัก ปลอดภัย สะอาด มีพื้นที่กลางแจ้งออกกำลัง ทุกขั้นตอนการเลี้ยงดูและการรีดนม หลีกเลี่ยงการใช้สารเคมี (ศูนย์ปศุสัตว์อินทรีย์, กรมปศุสัตว์, 2553) ส่งผลให้องค์ประกอบทางเคมีระหว่างน้ำนมออร์แกนิกและน้ำนมปกติมีความแตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับ

งานวิจัยก่อนหน้านี้ที่แสดงให้เห็นว่า การเพิ่มขึ้นของปริมาณแลคโตสในนมนั้นมีความสัมพันธ์มาจากอาหารที่แม่โคได้รับ (Zagorska and Ciprovica, 2008) สำหรับน้ำนมฮอกไกโดที่ได้มาจากแม่โคที่ได้รับการเลี้ยงดูที่ดี อยู่ท่ามกลางธรรมชาติ ทำให้แม่โคไม่เกิดความเครียด ส่งผลให้น้ำนมมีคุณภาพสูงขึ้น (www.hokkaidomilk.com) ผลการวิเคราะห์พบว่า น้ำนมฮอกไกโดของตราสินค้า C มีปริมาณไขมันและโปรตีนสูงกว่าในน้ำนมปกติทั้งสองตราสินค้า แต่น้อยกว่าน้ำนมพรีเมียม ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงดังตารางที่ 4.2

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมเปรียบเทียบกับมาตรฐานคุณภาพของน้ำนมโคสดหรือน้ำนมโค ซึ่งคือน้ำนมที่ผ่านกรรมวิธีฆ่าเชื้อ ได้แก่ พาสเจอร์ไรส์ ยูเอชที และสเตอริไลส์ อย่างใดอย่างหนึ่ง ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 350), (2556) ได้กำหนดให้ มีโปรตีน ไม่น้อยกว่าร้อยละ 2.8 ของน้ำหนัก ไขมัน ไม่น้อยกว่า ร้อยละ 3.2 ของน้ำหนัก และของแข็งไม่รวมไขมันนม ไม่น้อยกว่าร้อยละ 8.25 ของน้ำหนัก พบว่าตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมพาสเจอร์ไรส์ ยูเอชที มีปริมาณไขมันและโปรตีนตามมาตรฐานคุณภาพ แต่มีปริมาณของแข็งไม่รวมไขมันนมต่ำกว่าร้อยละ 8.25 ของน้ำหนัก ทั้ง 2 ตราสินค้า และมาตรฐานคุณภาพของน้ำนมพรีเมียม ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 366), (2556) ได้กำหนดให้ มีปริมาณโปรตีนไม่น้อยกว่าร้อยละ 3.1 ของน้ำหนัก มีปริมาณไขมัน ไม่น้อยกว่าร้อยละ 4.0 ของน้ำหนัก มีปริมาณของแข็งไม่รวมไขมันนม ไม่น้อยกว่าร้อยละ 8.5 ของน้ำหนัก พบว่าตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมมีองค์ประกอบทางเคมีสอดคล้องตามมาตรฐานคุณภาพ

4.1.3.2 การตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ต่างของน้ำนม (pH) ในผลิตภัณฑ์นมทางการค้า

โดยค่าความเป็นกรด-ต่างของน้ำนม ปกติจะอยู่ในช่วง 6.6-6.8 (สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้า ปศุสัตว์) ซึ่งจากการตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ต่างของตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์ นมยูเอชที นมออร์แกนิก นมพรีเมียมและนมฮอกไกโด พบว่า ค่าความเป็นกรด-ต่างของตัวอย่าง คือ 6.67-6.71 และไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 4.2) ซึ่งสอดคล้องกับค่าความเป็นกรด-ต่างของน้ำนมปกติ แสดงให้เห็นว่า ตัวอย่างนมที่นำมาวิเคราะห์ไม่มีการเสื่อมเสียจากจุลินทรีย์ในกลุ่มที่สร้างกรดแลคติก (lactic acid fermentation) ได้แก่ *Lactobacillus* spp., *Streptococcus*

spp., *Lactococcus* spp., และ *Leuconostoc* spp. ซึ่งหากจุลินทรีย์มีการหมักน้ำตาลแลคโตสจะ
ได้กรดแลคติกในผลิตภัณฑ์นม ส่งผลให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของนํ้านมลดลง เกิดรสเปรี้ยว และเกิด
การแยกชั้น เนื่องจากการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน (protein denaturation) (Caplice
and Fitzgerald, 1999)



ตารางที่ 4.2 องค์ประกอบทางเคมีในน้ำนมดิบ จากการวิเคราะห์ด้วย เครื่อง MilkoScanTM FT+ analyzer (FOSS, Hilleroed, Denmark) โดยใช้เทคนิค Fourier Transform Infrared (FTIR) และค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์ นมยูเอชที นมออร์แกนิก นมพรีเมียมและนมโฮกไกโด

องค์ประกอบ	ตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมทางการค้าในประเทศไทย					
	pasteurized A	UHT A	organic A	pasteurized B	UHT B	premium B Hokkaido-labeled C
ไขมัน	3.27±0.06 ^a	4.10±0.10 ^d	3.43±0.12 ^b	4.03±0.06 ^d	3.60±0.10 ^c	4.47±0.06 ^f
โปรตีน	2.83±0.06 ^a	4.03±0.06 ^d	3.03±0.06 ^b	3.03±0.01 ^b	3.07±0.06 ^b	3.43±0.12 ^c
แลคโตส	3.27±0.06 ^b	2.77±0.06 ^a	4.47±0.06 ^c	4.47±0.06 ^c	4.37±0.06 ^c	5.47±0.06 ^e
SnF	6.13±0.06 ^a	6.83±0.06 ^b	7.47±0.06 ^c	7.53±0.06 ^{cd}	7.63±0.06 ^d	9.03±0.15 ^f
TS	9.33±0.12 ^a	10.73±0.06 ^b	11.07±0.12 ^c	11.47±0.06 ^d	11.10±0.10 ^c	13.33±0.21 ^e
pH ^{ns}	6.67±0.02	6.68±0.01	6.69±0.01	6.71±0.06	6.67±0.01	6.68±0.01

หมายเหตุ : a, b, c, d, e และ f ในแนวนอนเดียวกัน แสดงค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานขององค์ประกอบทางเคมีมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และ ns แสดงค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

4.1.3.3 การประมวลผลไฟล์ทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างน้ำนม โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ทางเมตาโบโลมิกส์

4.1.3.3.1 การประมวลผล spectra ของ $^1\text{H-NMR}$ และการระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์

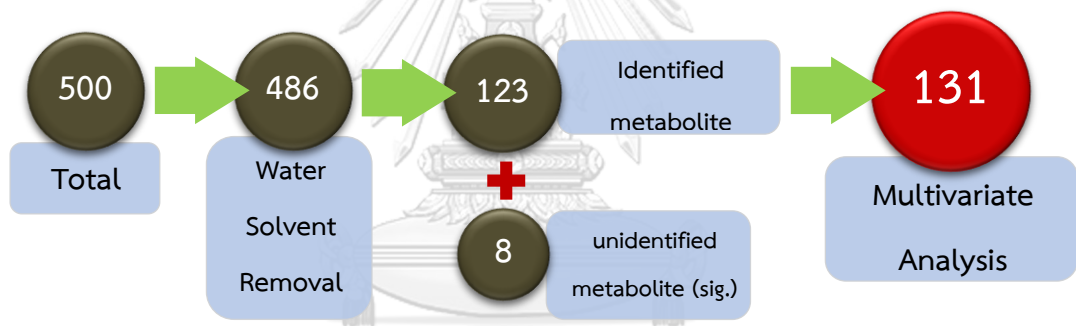
spectra ของตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ หลังจากการประมวลผล spectra ในช่วง chemical shifts (δ) ระหว่าง 0.00–10.00 ppm ดั้งชั้นตอนที่ 3.2.6 ได้ทั้งหมด 500 bin จะนำมาระบุชนิดสารเมตาบอไลต์ โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Chenomx NMR suite 7.5 library (Chenomx Inc., Alberta, Canada) Human Metabolome Database version 3.0 (Wishart et al., 2013) และจากงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Boudonck et al., 2009; Klein et al., 2010; Settachaimongkon et al., 2014) พบว่า สามารถระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมได้ ทั้งหมด 123 bin และเมื่อนำมาจัดกลุ่มของสารเมตาบอไลต์ จะได้ทั้งหมด 37 เมตาบอไลต์ ซึ่งประกอบด้วย กรดอะมิโน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และสารอินทรีย์ ที่สามารถระบุชนิดของสารได้ (ตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.3 สารเมตาบอไลต์ที่พบในตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์ นมยูเอชที นมออร์แกนิก นมพรีเมียม และนมช็อกโกโตนงานวิจัยนี้ (ภาคผนวก ฉ)

กลุ่มสารประกอบเคมี	สารเมตาบอไลต์
แอลกอฮอล์	(1) Ethanol
กรดอะมิโนและอนุพันธ์	(2) Alanine, (3) Betaine, (4) Creatine and Creatinine, (5) Glycine, (6) Isoleucine, (7) Leucine, (8) N-acetylamino acid, (9) N-acetylglucosamine, (10) Proline, (11) Threonine, (12) Valine, (13) Amino acid residue
คาร์โบไฮเดรตและอนุพันธ์	(14) Galactose, (15) Glucose, (16) Lactose, (17) Sucrose, (18) Sugar residue
สารประกอบคาร์บอนิล	(19) Acetone

กลุ่มสารประกอบเคมี	สารเมตาบอไลต์
กรดอินทรีย์	(20) Acetate, (21) Acetoacetate, (22) Ascobate, (23) Butyrate, (24) Citrate, (25) Formate, (26) Hippurate, (27) Hydroxybutyrate, (28) Lactate, (29) Oxoglutarate, (30) Pyruvate, (31) Succinate, (32) Valerate derivatives
ไขมันและอนุพันธ์	(33) Choline and derivatives, (34) Glycerophosphocholine
อื่นๆ	(35) Dimethyl sulfone, (36) Maleate, (37) Propylene glycol

สำหรับ bin ที่ไม่สามารถระบุชนิดของสารได้ หลังจากนำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้ analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) ได้ทั้งหมด 8 bin ผลการวิเคราะห์จะได้ bin รวมทั้งหมด 131 bin (ภาพที่ 4.4)

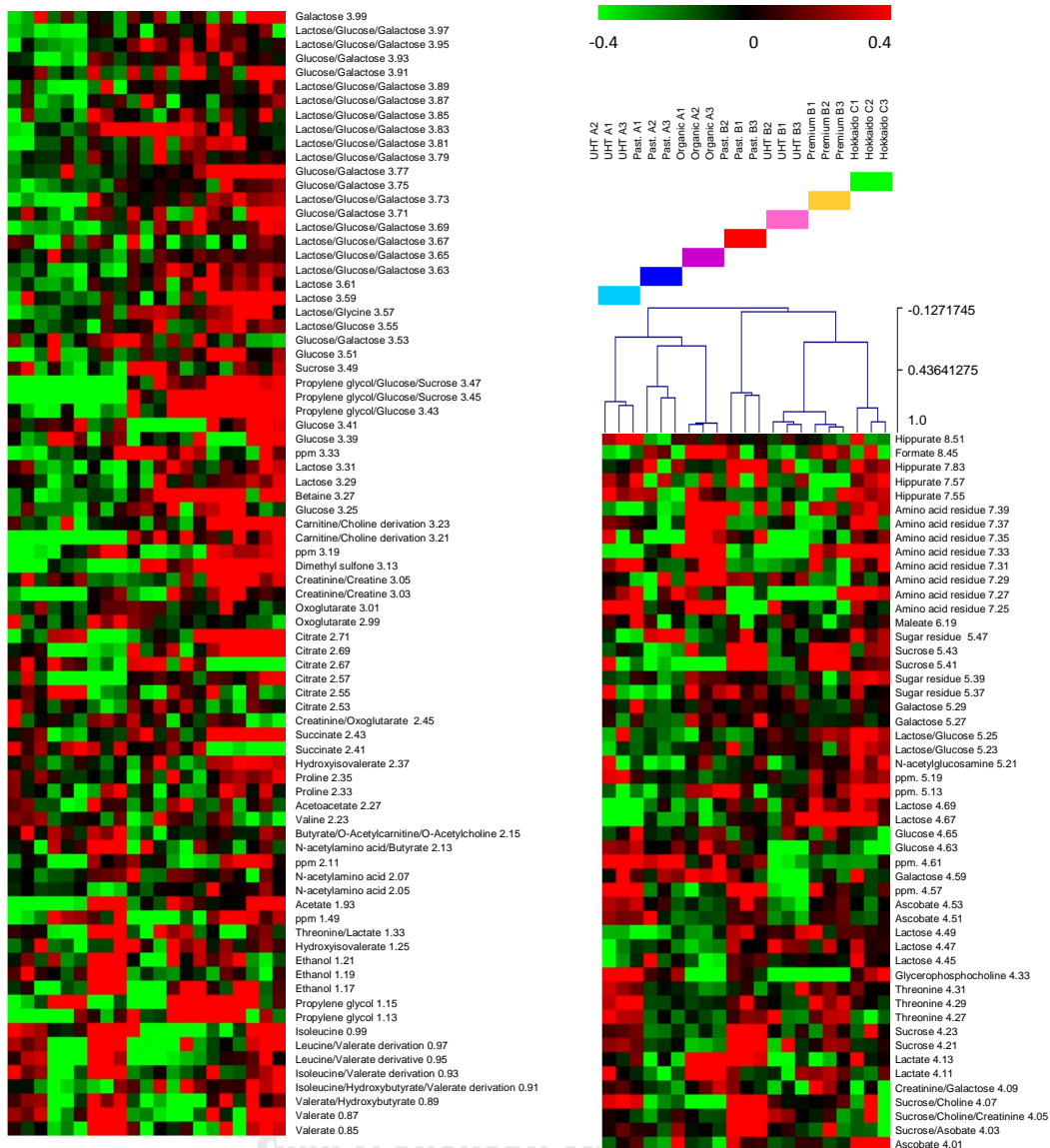


ภาพที่ 4.4 แผนผังแสดงจำนวน bin จากการประมวลผลด้วยวิธีทางสถิติเพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร

4.1.3.3.2 การเปรียบเทียบโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมพาสเจอร์ไรส์ นมยูเอชที นมออร์แกนิก นมพรีเมียมและนมฮอกไกโดที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ¹H-NMR โดยเทคนิค heat-map visualization และ hierarchical cluster analysis (HCA)

จากขั้นตอนการประมวลผล spectra ของ ¹H-NMR และการระบุสารเมตาบอไลต์สามารถระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมได้ทั้งหมด 131 bin จากนั้นนำมาประมวลผลตั้งขั้นตอนที่ 3.2.7 เพื่อวิเคราะห์โดยการจัดกลุ่ม ด้วยเทคนิค heat-map visualization และ HCA โดยโปรแกรมสำเร็จรูป Multi-Experiment Viewer (MeV) version 4.9 ซึ่งจากการนำข้อมูลที่ได้มา

วิเคราะห์โดยการจัดกลุ่ม ด้วยเทคนิค heat-map visualization โดยจะเปรียบเทียบความเข้มข้นสัมพัทธ์ (relative abundance) ของสารเมตาบอไลต์ชนิดเดียวกันในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง โดยสีแดง หมายถึง มีสารเมตาบอไลต์มาก และสีเขียว หมายถึง มีสารเมตาบอไลต์น้อย และวิเคราะห์ข้อมูลด้วย HCA ซึ่งหลักการในการทำ cluster ก็คือ การจัดกลุ่มข้อมูลที่มีลักษณะเหมือนกันเข้าด้วยกัน และหาความสัมพันธ์ของด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน (Pearson correlation) ผลการวิเคราะห์ด้วย HCA พบว่า กลุ่มตัวอย่างสามารถจัดจำแนกกลุ่มตัวอย่างได้อย่างชัดเจนตามความเหมือนกันของความเข้มข้นสัมพัทธ์ ในแต่ละสารเมตาบอไลต์ในตัวอย่าง โดยตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์ นมยูเอชที และนมออร์แกนิกของตราสินค้า A มีโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลที่เหมือนกันจัดอยู่ในกลุ่มสีน้ำเงิน (■) สีฟ้า (■) และสีม่วง (■) ตามลำดับ นมพาสเจอร์ไรส์ นมยูเอชที และนมพรีเมียมของตราสินค้า B มีโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลที่เหมือนกันจัดอยู่ในกลุ่มสีแดง (■) สีชมพู (■) และสีเหลือง (■) ตามลำดับ และนมฮอกไกโดของตราสินค้า C มีโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลที่เหมือนกันจัดอยู่ในกลุ่มสีเขียว (■) แสดงดังภาพที่ 4.5



ภาพที่ 4.5 แผนภาพความร้อน (heat map) และการวิเคราะห์ HCA ของโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลที่ได้

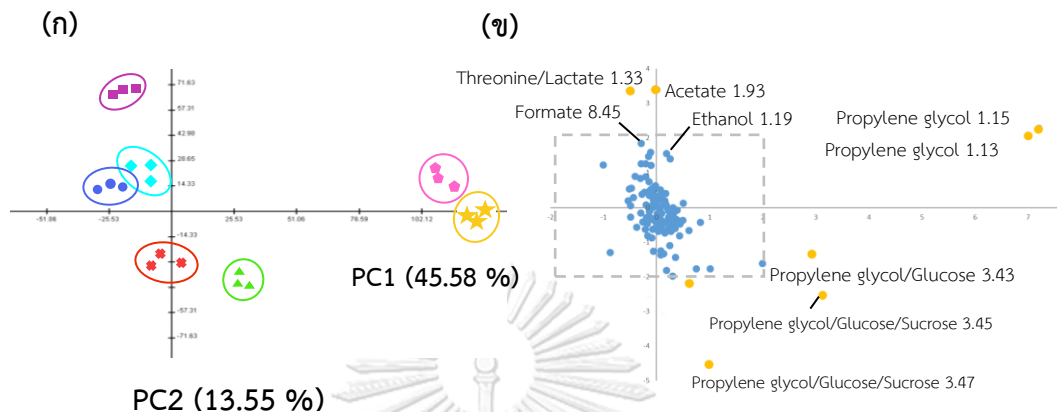
จากการวิเคราะห์ด้วย ¹H-NMR จากตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์ (■) นมยูเอชที (■) นมออร์แกนิก (■) ของตราสินค้า A นมพาสเจอร์ไรส์ (■) นมยูเอชที (■) นมพรีเมียม (■) ของตราสินค้า B และนมฮอกไกโดของตราสินค้า C (■)

4.1.3.3.3 การเปรียบเทียบโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมพาสเจอร์ไรส์ นมยูเอชที นมออร์แกนิก นมพรีเมียมและนมฮอกไกโดที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ โดยการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal component analysis: PCA)

ในขั้นตอนนี้จะนำข้อมูลที่ได้มาจัดกลุ่มโดยการวิเคราะห์ PCA ซึ่งการจัดกลุ่มด้วยการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก สามารถจำแนกกลุ่มของตัวอย่างได้เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ข้อมูลด้วย HCA โดยพิจารณาจากรูปแบบการกระจายตัวของข้อมูลบนกราฟ เมื่อนำองค์ประกอบหลักสร้างเป็นกราฟประกอบด้วยองค์ประกอบหลักที่ 1 (PC1) และองค์ประกอบหลักที่ 2 (PC2) พบว่า มีความแปรปรวนของตัวแปรรวมร้อยละ 59.13 โดย PC1 สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ร้อยละ 45.58 และ PC2 สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ร้อยละ 13.55 โดยองค์ประกอบหลักนี้จะประกอบด้วย โพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบภายในผลิตภัณฑ์นมที่เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อกลุ่มตัวอย่างของผลิตภัณฑ์นมที่ได้จากนมพาสเจอร์ไรส์ (●) นมยูเอชที (◆) นมออร์แกนิก (■) ของตราสินค้า A นมพาสเจอร์ไรส์ (✕) นมยูเอชที (◆) นมพรีเมียม (★) ของตราสินค้า B และนมฮอกไกโดของตราสินค้า C (▲) จะเห็นว่า ตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ทั้ง 7 ผลิตภัณฑ์ สามารถแยกออกเป็น 4 กลุ่มหลัก คือ i.) ผลิตภัณฑ์นมในกลุ่มของตราสินค้า A ii.) ผลิตภัณฑ์นมพาสเจอร์ไรส์ของตราสินค้า B iii.) ผลิตภัณฑ์นมยูเอชที และผลิตภัณฑ์นมพรีเมียมของตราสินค้า B และ iv.) ผลิตภัณฑ์นมฮอกไกโดของตราสินค้า C โดยเมื่อพิจารณาผลิตภัณฑ์นมในกลุ่มของตราสินค้า A พบว่า โพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลในผลิตภัณฑ์นมออร์แกนิกมีความแตกต่างจากผลิตภัณฑ์นมพาสเจอร์ไรส์และนมยูเอชที ส่วนผลิตภัณฑ์นมในกลุ่มของตราสินค้า B พบว่า โพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลในผลิตภัณฑ์นมพาสเจอร์ไรส์มีความแตกต่างจากผลิตภัณฑ์นมยูเอชที และผลิตภัณฑ์นมพรีเมียมอย่างชัดเจน (ภาพที่ 4.6ก) จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางสถิติระหว่างตัวแปรด้วยวิธี PCA ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างได้ออกเป็น 7 กลุ่ม คือ นมพาสเจอร์ไรส์ นมยูเอชที นมออร์แกนิก ของตราสินค้า A นมพาสเจอร์ไรส์ นมยูเอชที นมพรีเมียม ของตราสินค้า B และนมฮอกไกโดของตราสินค้า C โดยผลที่ได้นี้สอดคล้องกับผลจาก HCA ที่แสดงดังภาพที่ 4.5

ในขั้นตอนนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อกลุ่มตัวอย่างของผลิตภัณฑ์นมแต่ละกลุ่มตัวอย่างจาก loading plots ผลการวิเคราะห์ แสดงให้เห็นว่า มีสารเมตาบอไลต์ที่ถูกระบุว่าเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อกลุ่มตัวอย่างของผลิตภัณฑ์นมแต่ละกลุ่มตัวอย่าง สาร threonine,

lactate, acetate และ formate แสดงให้เห็นว่าเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์อินทรีย์ของตราสินค้า A (ภาพที่ 4.6 ข) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ศึกษาก่อนหน้านี้ (Antunes-Fernandes et al., 2015; Gueguen and Pascal, 2010; Linn, 1988; Sun et al., 2015)



ภาพที่ 4.6 PCA score plot (ก) และ PC loading (ข) ของโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ จากตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์ (●) นมยูเอชที (◆) นมออร์แกนิก (■) ของตราสินค้า A นมพาสเจอร์ไรส์ (×) นมยูเอชที (◆) นมพรีเมียม (★) ของตราสินค้า B และนมชอกโกโดของตราสินค้า C (▲)

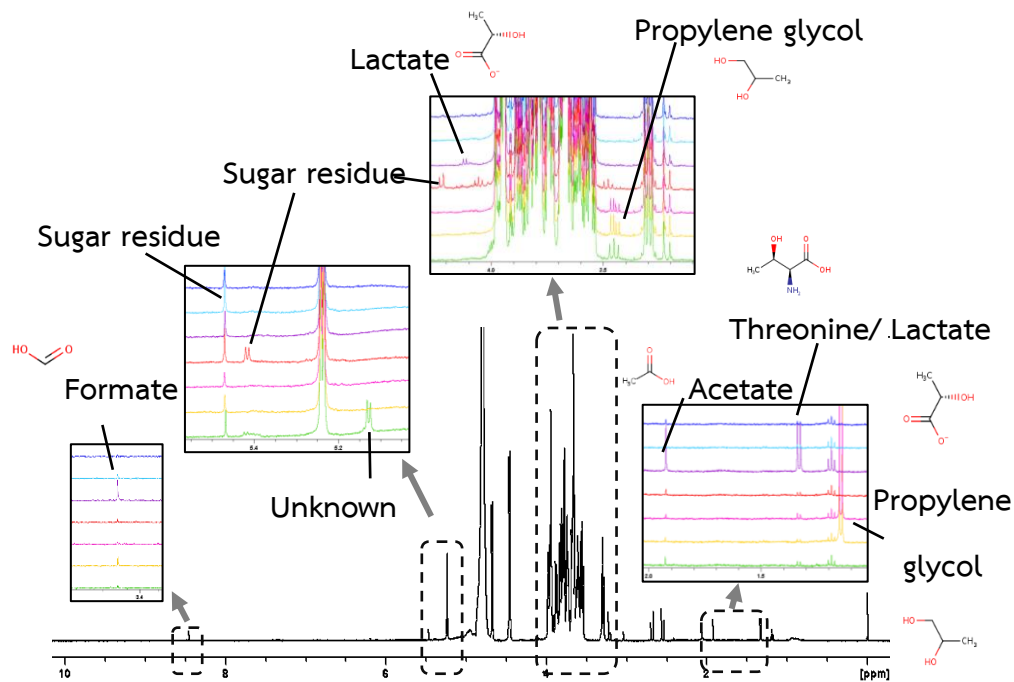
หมายเหตุ: ภาพ ข ● หมายถึง สารเมตาบอไลต์ที่มีค่า loading ไม่ถึง 2 และ ● หมายถึง สารเมตาบอไลต์ที่มีค่า loading ตั้งแต่ 2 ขึ้นไป

จากศึกษาพบว่า โพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลในผลิตภัณฑ์นมที่แตกต่างกัน อาจจะมีผลมาจากแหล่งที่มาของน้ำนมโคดิบ สภาพแวดล้อมและการดูแลจัดการฟาร์ม ภูมิอากาศ รวมทั้งกระบวนการแปรรูปที่แตกต่างกัน ซึ่งปัจจัยต่างๆเหล่านี้ มีผลต่อองค์ประกอบทางเคมีของน้ำนมดิบ (สุทธิศักดิ์ แก้วแกมจันทร์, 2546; Li et al., 2015; Daniels et al., 2006) และมีการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า สาร threonine, lactate, acetate และ formate มีผลมาจากความแตกต่างของอาหาร สถานะสุขภาพสัตว์ และคุณภาพของจุลินทรีย์ในน้ำนม ที่ได้รับผลกระทบจากการเลี้ยงโคนมระบบเกษตรอินทรีย์ (Schwendel et al., 2015) โดยจะอธิบายในหัวข้อถัดไป และพบ propylene glycol ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมยูเอชที และนมพรีเมียมของตราสินค้า B โดยมีการศึกษาพบว่า propylene glycol เป็น

สารประกอบในยาที่ใช้ในการรักษาโรคคีโตซิสในโคนม ซึ่งอาจจะเกิดการตกค้างในน้ำนม (Bjerre-Harpoth et al., 2016)

4.1.3.3.4 การเปรียบเทียบ NMR spectra ของตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมพาสเจอร์ไรส์ นมยูเอชที นมออร์แกนิก นมพรีเมียมและนมฮอกไกโดที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$

การวิเคราะห์ในขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อตรวจสอบสารเมตาบอไลต์ที่เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง ใน spectra ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ โดยภาพที่ 4.7 แสดงให้เห็นว่า acetate, lactate, formate และ threonine ใน spectra ของน้ำนมที่ได้จากผลิตภัณฑ์นมออร์แกนิก (■) สูงมาก เมื่อเทียบกับ NMR spectra ของน้ำนมที่ได้จากนมพาสเจอร์ไรส์ (■) นมยูเอชที (■) ของตราสินค้า A และ propylene glycol ใน NMR spectra ของน้ำนมที่ได้จากผลิตภัณฑ์นมยูเอชที (■) นมพรีเมียม (■) เมื่อเทียบกับ spectra ของน้ำนมที่ได้จากนมพาสเจอร์ไรส์ (■) ของตราสินค้า B ซึ่งสอดคล้องกับผลการเปรียบเทียบสารเมตาบอไลต์ในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง ด้วย PCA



ภาพที่ 4.7 NMR spectra ของตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์ (■) นมยูเอชที (■) นมออร์แกนิก (■) ของตราสินค้า A นมพาสเจอร์ไรส์ (■) นมยูเอชที (■) นมพรีเมียม (■) ของตราสินค้า B และนมฮอกไกโดของตราสินค้า C (■) ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$

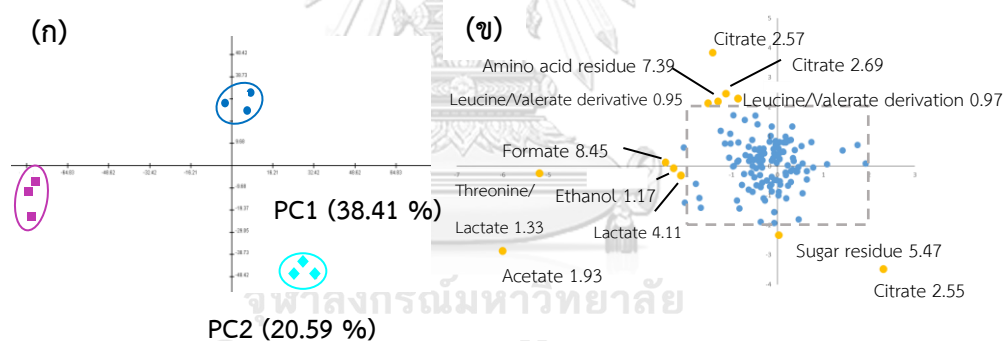
หากพิจารณาจากผลการวิเคราะห์จาก PCA ของผลิตภัณฑ์นมตราสินค้า A ในข้อ 4.1.3.4 พบว่า นมออร์แกนิกสามารถแยกออกมาจากนมพาสเจอร์ไรส์และนมยูเอชทีได้อย่างชัดเจน แต่ความแตกต่างระหว่างนมพาสเจอร์ไรส์และนมยูเอชทียังคงไม่ชัดเจน (ภาพที่ 4.6 ก) ดังนั้นขั้นตอนต่อไปจึงนำผลิตภัณฑ์นมตราสินค้า A มาวิเคราะห์ PCA เพื่อความชัดเจนในการหาความแตกต่างของโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของผลิตภัณฑ์นมตราสินค้า A

4.1.3.3.5 การเปรียบเทียบโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมพาสเจอร์ไรส์ นมยูเอชที นมออร์แกนิกของตราสินค้า A ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ โดยการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal component analysis: PCA)

ในขั้นตอนนี้จะนำข้อมูลของตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมพาสเจอร์ไรส์ นมยูเอชที นมออร์แกนิกของตราสินค้า A มาจัดกลุ่มโดยการวิเคราะห์ PCA เพื่อทำให้เห็นความแตกต่างระหว่าง

นมพาสเจอร์ไรส์ นมยูเอชที นมออร์แกนิกของตราสินค้า A ได้ชัดเจนขึ้น พบว่า มีความแปรปรวนของตัวแปรรวมร้อยละ 59.00 โดย PC1 สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ร้อยละ 38.41 และ PC2 สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ ร้อยละ 20.59 โดยองค์ประกอบหลักนี้จะประกอบด้วยสารเมตาบอไลต์ที่เป็นองค์ประกอบภายในผลิตภัณฑ์นมที่เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อกลุ่มตัวอย่างของผลิตภัณฑ์นมที่ได้จากนมพาสเจอร์ไรส์ (●) นมยูเอชที (◆) นมออร์แกนิก (■) ของตราสินค้า A จะเห็นว่า เมื่อพิจารณาผลิตภัณฑ์นมในกลุ่มของตราสินค้า A พบว่า สารเมตาบอไลต์ในผลิตภัณฑ์นมออร์แกนิกมีความแตกต่างจากผลิตภัณฑ์นมพาสเจอร์ไรส์และนมยูเอชที (ภาพที่ 4.8 ก) จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางสถิติระหว่างตัวแปรด้วยวิธี PCA ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างได้ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ นมพาสเจอร์ไรส์ นมยูเอชที และนมออร์แกนิกของตราสินค้า A

เมื่อพิจารณาค่าน้ำหนักขององค์ประกอบเพื่อหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อกลุ่มตัวอย่างของผลิตภัณฑ์นมแต่ละกลุ่มตัวอย่าง สาร acetate, threonine, lactate และ formate แสดงให้เห็นว่าเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อกลุ่มตัวอย่างในผลิตภัณฑ์อินทรีย์ (ภาพที่ 4.8 ข)



ภาพที่ 4.8 PCA score plot (ก) และ PC loading (ข) ของโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ จากตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์ (●) นมยูเอชที (◆) นมออร์แกนิก (■) ของตราสินค้า A

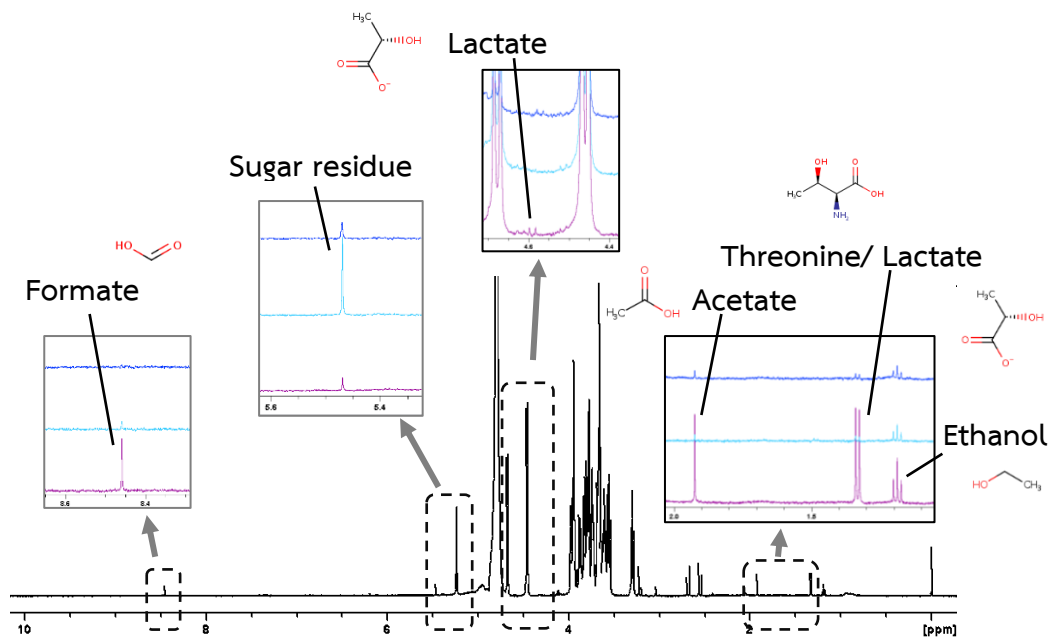
หมายเหตุ: ภาพ ข ● หมายถึง สารเมตาบอไลต์ที่มีค่า loading ไม่ถึง 2 และ ● หมายถึง สารเมตาบอไลต์ที่มีค่า loading ตั้งแต่ 2 ขึ้นไป

ซึ่งมีการศึกษาวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า formate มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับอาหารที่แม่โคได้รับ ในขณะที่ citrate และ lactate เป็นส่วนประกอบของ acetyl-CoA ใน TCA cycle ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเผาผลาญอาหารของแม่โค (Antunes-Fernandes et al., 2015) และเมื่อพิจารณา

การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ acetate มีความเกี่ยวข้องกับปริมาณและชนิดของอาหารที่แมโคได้รับ ส่งผลให้ acetate สูงขึ้นและปริมาณไขมันนมสูงด้วยเนื่องจากไขมันนมถูกสังเคราะห์จาก acetate ภายในเซลล์เต้านม (Linn, 1988) และ threonine มีการศึกษาว่า ซึ่งกรดอะมิโนภายในร่างกายจะถูกสลายเพื่อนำมาใช้เป็นพลังงานได้ โดยเปลี่ยนเป็น acetyl Co A ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของ citrate ในกระบวนการ Krebs Cycle ใน mitochondria ของเซลล์ตับ (Bremer et al., 1974) โดยปริมาณที่เพิ่มขึ้นของ citrate เป็นตัวบ่งชี้ที่ดีในด้านความสมดุลของพลังงานในร่างกาย (Baticz et al., 2002) แสดงให้เห็นว่า แมโคที่อยู่ในฟาร์มโคนมออร์แกนิก ส่งผลระบบเผาผลาญอาหารในร่างกาย ระบบสมดุลพลังงานดีขึ้น โดยมีสารเมตาบอไลต์ดังกล่าวเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของผลผลิตนมที่สูงขึ้น และคุณภาพโปรตีนในน้ำนมที่ดีขึ้น (Sun et al., 2015) เนื่องจากฟาร์มโคนมออร์แกนิกนั้นเป็นรูปแบบการเลี้ยงแบบธรรมชาติ เลี้ยงโคด้วยอาหารสัตว์ ปลอดภัยใช้สารเคมีและการใช้ยาปฏิชีวนะ จึงผลให้มีผลผลิตที่สูงและมีคุณภาพของน้ำนมที่ดี (Gueguen and Pascal, 2010)

4.1.3.3.6 การเปรียบเทียบ NMR spectra ของตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมพาสเจอร์ไรส์ นมยูเอชที นมออร์แกนิกของตราสินค้า A ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$

การวิเคราะห์ในขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อตรวจสอบสารเมตาบอไลต์ที่เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง ใน spectra ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ โดยภาพที่ 4.9 แสดงให้เห็นว่า acetate, lactate, formate และ threonine ใน spectra ของน้ำนมที่ได้จากผลิตภัณฑ์นมออร์แกนิก (■) สูงมาก เมื่อเปรียบเทียบกับ NMR spectra ของน้ำนมที่ได้จากนมพาสเจอร์ไรส์ (■) นมยูเอชที (■) ของตราสินค้า A ซึ่งสอดคล้องกับผลการเปรียบเทียบโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง ด้วย PCA



ภาพที่ 4.9 NMR spectra ของตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์ (■) นมยูเอชที (■) นมออร์แกนิก (■) ของตราสินค้า A ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$

ดังนั้นผลจากการวิจัยในขั้นตอนนี้แสดงให้เห็นว่า สามารถแยกความแตกต่างของโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลรวมทั้งทราบชนิดของสารเมตาโบไลต์ที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมทางการค้าในประเทศไทย 3 ตัวอย่างการผลิตที่แตกต่างกัน คือ ตราสินค้า กระบวนการให้ความร้อนและการผลิตในระบบเกษตรอินทรีย์ จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ ร่วมกับวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปรได้

4.2 การคัดเลือกตัวอย่างน้ำนมดิบในเขตพื้นที่อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี และอำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา

โรคเต้านมอักเสบเป็นปัญหาที่สำคัญต่อเกษตรกรเป็นอย่างมากเพราะส่งผลกระทบต่อปริมาณและคุณภาพของน้ำนมดิบ (Bhushan, 2000) ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรียเป็นส่วนใหญ่ โดยจะส่งผลให้เซลล์เยื่อบุผิวภายในเต้านมได้รับความเสียหาย ทำให้การสังเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี เช่น โปรตีน ไขมันและแลคโตส ในน้ำนมดิบลดลง (วิทยา สุริยาสถาพร, 2559; Kitchen 1981) โดยประมาณร้อยละ 70-80 ของความสูญเสียจากผลกระทบนี้ เกิดจากการที่แม่โคเป็นโรคเต้านม

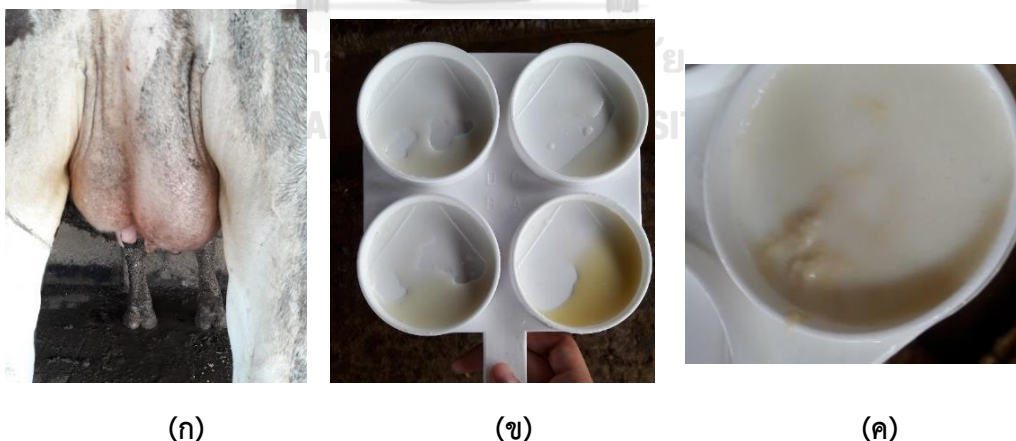
อีกเสบแบบไม่แสดงอาการ (Gurbulak et al., 2009) งานวิจัยนี้จึงทำการคัดเลือกตัวอย่างน้ำนมดิบจากฟาร์มโคนมของเกษตรกรในเขตพื้นที่อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี และอำเภอบางบาล จังหวัดนครราชสีมา โดยแบ่งกลุ่มตัวอย่างของแม่โคในแต่ละฟาร์มออกเป็น 3 กลุ่ม คือ แม่โคปกติ แม่โคเป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ และแบบแสดงอาการ จากการประเมินปริมาณโซมาติกเซลล์เบื้องต้น ด้วยน้ำยา CMT ภายใต้การให้คำปรึกษาจากผู้เชี่ยวชาญด้านการเลี้ยงโคนมจากองค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย (อ.ส.ค.) และเจ้าหน้าที่จากสหกรณ์โคนมไทย - เดนมาร์ก (มิตรภาพ) อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี เนื่องจากโรคเต้านมอักเสบนั้น มีผลทำให้ปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบสูงขึ้นจากการติดเชื้อจากแบคทีเรีย และส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของน้ำนมดิบอีกด้วย (Henri et al., 2003) โดยนำตัวอย่างน้ำนมดิบมาตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมี ด้วยเครื่อง MilkoScanTM^{FT} + analyzer (FOSS, Hilleroed, Denmark) โดยใช้เทคนิค Fourier Transform Infrared (FTIR) ตรวจวัดปริมาณโซมาติกเซลล์ด้วยเครื่อง FossomaticTM FC (FOSS, Hilleroed, Denmark) โดยใช้เทคนิค flow cytometry และนำตัวอย่างน้ำนมดิบมาศึกษาวิเคราะห์และเปรียบเทียบโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุล ด้วย ¹H-NMR และเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูล ด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร (multivariate statistical analysis) (Skov et al., 2014) ได้แก่ การหารูปแบบความแตกต่างระหว่างตัวอย่างด้วยการวิเคราะห์ PCA การวิเคราะห์การจัดกลุ่ม ด้วยเทคนิค heat-map visualization และ HCA และหาความสัมพันธ์ของด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน (Pearson correlation)

4.2.1 การคัดเลือกตัวอย่างโดยการประเมินปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบ ด้วยน้ำยา california mastitis test (CMT)

การศึกษาขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกแม่โคปกติ แม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ และแบบแสดงอาการ ในการเก็บตัวอย่างน้ำนมดิบสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ ¹H-NMR โดยการประเมินเบื้องต้นจากปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบ เนื่องจากปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบนั้นเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญในการติดเชื้อภายในเต้านม (Schukken et al., 2003; Le Maréchal et al., 2011; Murphy et al., 2016) น้ำยา CMT นั้นจะมีส่วนผสมของสารลดแรงตึงผิว (3% sodium lauryl sulphate) ซึ่งจะทำหน้าที่ทำลายผนังของโซมาติกเซลล์ทำให้สารพันธุกรรม

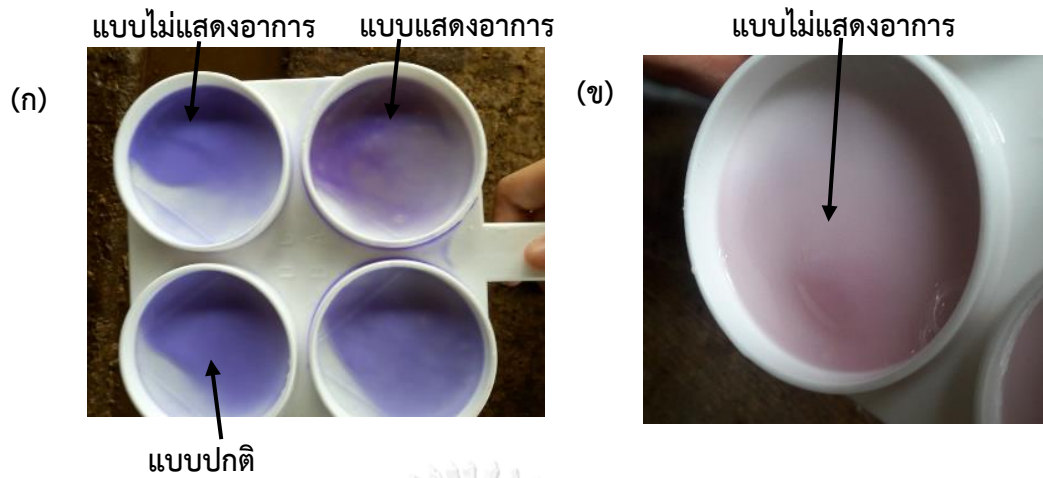
(DNA) ออกมานอกเซลล์ ส่งผลให้ส่วนผสมในน้ำนมมีลักษณะเป็นเมือกข้น (gel-like) (Viguiet et al., 2009; Mansor, 2012) ดังนั้นหากน้ำนมดิบมีปริมาณโซมาติกเซลล์มาก ก็จะมีความข้นหนืดมาก โดยมาตรฐานคุณภาพน้ำนมดิบ (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2553) ได้กำหนดให้น้ำนมดิบมีปริมาณโซมาติกเซลล์ไม่เกิน 500,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หากมีปริมาณโซมาติกเซลล์สูงกว่าค่ามาตรฐาน ปริมาณโซมาติกเซลล์จะสามารถบ่งบอกได้ว่า แม่โคป่วยเป็นโรคเต้านมอักเสบ (Dürr et al., 2008) ซึ่งข้อดีของการประเมินปริมาณโซมาติกเซลล์ด้วยน้ำยา CMT คือมีความถูกต้องที่รับได้และมีความจำเพาะสูง ราคาถูก และใช้อุปกรณ์ขนาดเล็ก ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคเต้านมอักเสบเบื้องต้นตามคำแนะนำของกรมปศุสัตว์ (กรมปศุสัตว์, 2550)

จากการลงพื้นที่เพื่อคัดเลือกแม่โคจากฟาร์มของเกษตรกรในเขตพื้นที่จังหวัดสระบุรี และนครราชสีมา พบว่า มีแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ สามารถสังเกตอาการได้ด้วยตาเปล่า (clinical signs) ซึ่งจะเกิดขึ้นเฉพาะบางเต้านมเท่านั้น คือ เต้านมบวม (swelling) น้ำนมมีสีเหลือง (yellowish milk) และมีลิ่ม (clot) ในน้ำนมดิบ (ภาพที่ 4.10) ซึ่งอาการที่ปรากฏนี้สามารถบ่งบอกได้ว่า แม่โคนั้นป่วยเป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ (Batavani and Asri, 2007; Moyes et al., 2009; Khan, 2006) โดยได้รับคำแนะนำจากผู้เชี่ยวชาญด้านการเลี้ยงโคนมจากองค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย (อ.ส.ค.) และเจ้าหน้าที่จากสหกรณ์โคนมไทย - เดนมาร์ก (มิตรภาพ) อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี



ภาพที่ 4.10 ลักษณะที่สังเกตได้ คือ (ก) เต้านมบวม (swelling) (ข) น้ำนมมีสีเหลือง (yellowish milk) และ (ค) มีลิ่ม (clot) ในน้ำนมดิบจากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ

จากนั้นประเมินปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบด้วยน้ำยา CMT อีกครั้ง ในแม่โคที่แสดงอาการให้ถือว่าเป็นโรคเต้านมอักเสบ เนื่องจากน้ำยา CMT มีส่วนประกอบของสารลดแรงตึงผิว (3% w/v sodium lauryl sulfate) และ bromocresol purple (Thomas, 2015) โดยสารลดแรงตึงผิว มีคุณสมบัติเฉพาะในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์และนิวเคลียสของเซลล์ ส่งผลให้เซลล์เม็ดเลือดขาวแตกออกแล้วปล่อยสารพันธุกรรม (DNA) ออกมานอกเซลล์ ทำให้น้ำนมมีลักษณะข้นหนืดขึ้น (gel-like) (Sargeant et al., 2001; Middleton et al., 2004) จากการประเมิน พบว่าในแม่โคหนึ่งตัวสามารถพบได้ทั้งเต้านมปกติ เต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการและแบบแสดงอาการ โดยพิจารณาจากส่วนผสมระหว่างน้ำนมดิบและน้ำยา CMT น้ำนมดิบบางตัวไม่ทำปฏิกิริยากับน้ำยา CMT ส่วนผสมที่ได้มีลักษณะเหลว แสดงว่ามีปริมาณโซมาติกเซลล์น้อยหรือเต้านมปกติ บางตัวทำปฏิกิริยาทันทีในขณะที่ทำการหมุนวนภาดหลุม ส่วนผสมที่ได้มีลักษณะเป็นเมือกข้นและมีความหนืดมาก แสดงว่าปริมาณโซมาติกเซลล์มากหรือเต้านมมีการอักเสบ หลังจากการประเมินด้วยน้ำยา CMT พบว่า ส่วนผสมระหว่างน้ำนมดิบจากเต้านมอักเสบกับน้ำยา CMT มีสีเข้มขึ้น (ภาพที่ 4.11ก) เนื่องจากในน้ำยา CMT มีสาร bromocresol purple ซึ่งเป็นสารที่สามารถเปลี่ยนสีได้ในสถานะที่เป็นต่าง จะช่วยแสดงผลการเกิดปฏิกิริยาได้ชัดเจนมากขึ้น ดังนั้นเมื่อโซมาติกเซลล์มีปริมาณมากทำให้ส่วนผสมมีความข้นหนืดมาก และมีสีม่วงเข้ม (Mellenberger and Corol, 2000) แสดงว่า น้ำนมดิบที่ได้จากเต้านมอักเสบจะมี pH สูง (ต่าง) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาว่าน้ำนมดิบที่ได้จากการอักเสบจะมีระดับความเข้มข้นของโซเดียม และคลอไรด์สูงขึ้น แต่ระดับความเข้มข้นของโปรแตสเซียมลดลง (Vijayalakshmi et al., 2001; Bruckmaier et al., 2004; Khan, 2006) จึงมีผลให้น้ำนมดิบที่ได้จากเต้านมอักเสบมีฤทธิ์เป็นต่าง



ภาพที่ 4. 11 ลักษณะของส่วนผสมระหว่างน้ำนมดิบกับน้ำยา CMT จากการประเมินปริมาณโซมาติกเซลล์ใน (ก) น้ำนมดิบที่ได้จากโคที่ปกติ เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการและแบบแสดงอาการ (ข) น้ำนมดิบที่ได้จากโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ
หมายเหตุ: ความต่างของสีที่เกิดขึ้นระหว่างภาพ (ก) และ (ข) เกิดจากการที่ใช้น้ำยา CMT ต่างตราสินค้ากัน

สำหรับแม่โคที่ไม่สามารถสังเกตอาการได้ด้วยตาเปล่า หลังจากประเมินปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบ ด้วยน้ำยา CMT พบว่า น้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคปกติ จะไม่ทำปฏิกิริยากับน้ำยา CMT ส่วนผสมที่ได้ส่วนผสมจะมีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน และสามารถเคลื่อนที่ได้เร็ว ส่วนน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ จะทำปฏิกิริยากับน้ำยา CMT ส่วนผสมที่ได้ลักษณะเป็นเมือกและมีความหนืด ซึ่งแม่โคที่ป่วยเป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการจะมีปริมาณโซมาติกเซลล์ที่มากกว่าไม่แสดงอาการทำให้ส่วนผสมมีความข้นหนืดมากกว่า (ภาพที่ 4.11 ข) ดังนั้น การประเมินระดับความรุนแรงของอาการเบื้องต้นจะขึ้นอยู่กับความข้นหนืดของส่วนผสมภายในภาดหลุม ซึ่งสังเกตได้จากลักษณะความข้นหนืดของส่วนผสมที่เกิดขึ้นในขณะที่ทำการหมุนวนภาดหลุม เปรียบเทียบกับตารางคะแนน CMT ที่แสดงดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ผลของปฏิกริยาระหว่างน้ำนมดิบกับน้ำยา CMT

ที่มา : Mellenberger and Corol (2000)

คุณภาพของน้ำนม	คะแนน CMT	ผลของปฏิกริยา
ปกติ, ดีมาก ($< 200,000$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	0 (ลบ)	ส่วนผสมเป็นเนื้อเดียวกัน เคลื่อนที่เร็ว สีม่วงจาง
ปกติ, ดี ($200,000- 400,000$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	T (เล็กน้อย)	ส่วนผสมเป็นเมือก ชั้นเป็นสาย แล้วหายไป เคลื่อนที่เร็ว สีม่วงจาง
ปกติ, ดีพอใช้ ($400,000- 1,200,000$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	1 (สงสัย)	ส่วนผสมเป็นเมือก มีความหนืดขึ้น เป็นสาย เคลื่อนที่ช้า สีม่วงเข้มขึ้น
อักษบ, แบบไม่แสดงอาการ ($1,200,000- 5,000,000$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	2 (บวก)	ส่วนผสมเป็นเมือกชั้น มีความหนืดเคลื่อนที่ ช้ามาก สีม่วงเข้ม
อักษบ, แบบแสดงอาการ ($> 5,000,000$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	3 (บวก)	ส่วนผสมเป็นเมือกชั้น มีความหนืดมาก ไม่เคลื่อนที่ สีม่วงเข้ม มีความผิดปกติที่มองเห็นได้

จากการประเมินปริมาณโซมาติกเซลล์ด้วยน้ำยา CMT ในแต่ละฟาร์มทำให้ได้กลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบทั้งหมด 3 กลุ่ม คือ น้ำนมที่ได้จากแม่โคปกติ น้ำนมที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักษบแบบไม่แสดงอาการและแสดงอาการ โดยน้ำนมดิบที่อยู่ในกลุ่มปกติ มีผลของปฏิกริยาสอดคล้องกับคะแนน CMT คือ 0 (ลบ) หรือ T (เล็กน้อย) น้ำนมดิบที่อยู่ในกลุ่มเต้านมอักษบแบบไม่แสดงอาการมีผลของปฏิกริยาสอดคล้องกับคะแนน CMT คือ 2 (บวก) และน้ำนมดิบที่อยู่ในกลุ่มเต้านมอักษบแบบแสดงอาการมีผลของปฏิกริยาสอดคล้องกับคะแนน CMT คือ 3 (บวก)

อย่างไรก็ตามการประเมินปริมาณโซมาติกเซลล์ด้วยน้ำยา CMT เป็นเพียงการประเมินเบื้องต้น ดังนั้นจึงต้องนำตัวอย่างน้ำนมดิบไปวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการเพื่อการยืนยันผลที่ถูกต้อง (วิทยา สุริยาสถาพร, 2559)

4.2.2 การตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมีและปริมาณไขมันในน้ำนมดิบ

การศึกษาในขั้นตอนนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมีและปริมาณไขมันในน้ำนมดิบที่ได้รับผลกระทบจากโรคเต้านมอักเสบเปรียบเทียบกับน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคปกติ เพื่อยืนยันผลจากการประเมินปริมาณไขมันด้วยน้ำยา CMT ในข้อ 4.2.1.1 การตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ไขมัน โปรตีน แลคโตส ของแข็งไม่รวมไขมันนม และของแข็งทั้งหมด ด้วยเครื่อง MilkoScanTM^{FT} + analyzer (FOSS, Hilleroed, Denmark) โดยใช้เทคนิค Fourier Transform Infrared (FTIR) และตรวจวัดปริมาณไขมันด้วยเครื่อง FossomaticTM FC (FOSS, Hilleroed, Denmark) โดยใช้เทคนิค Flow cytometry ในน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการและแสดงอาการเปรียบเทียบกับแม่โคปกติ จากฟาร์มโคนมของเกษตรกรในเขตพื้นที่ อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี และอำเภอบางบาล จังหวัดนครราชสีมา จำนวน 3 ฟาร์ม แสดงผลดังตารางที่ 4.5

ผลการตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมีในตัวอย่างน้ำนมดิบในแต่ละฟาร์มทั้ง 3 กลุ่มตัวอย่าง พบว่า น้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการและแบบแสดงอาการ มีปริมาณไขมันลดลง แต่มีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้น แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำนมที่ได้จากแม่โคปกติ (ตารางที่ 4.5) ซึ่งมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับปริมาณไขมันลดลงในน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบว่า สาเหตุที่ทำให้ไขมันในน้ำนมดิบลดลง เกิดจากการที่เซลล์เยื่อหุ้มภายในเต้านมได้รับความเสียหาย เนื่องจากการสังเคราะห์ไขมันนั้นเกิดขึ้นในส่วน Smooth Endoplasmic Reticulum (SER) ของเซลล์ (McManaman and Margaret, 2003) ทำให้ความสามารถในการสังเคราะห์ไขมันลดลง (Forsbäck et al., 2009; Maréchal et al., 2011) และปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นในน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบว่า เกิดจากการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอส (proteolytic enzyme) ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียอยู่ในเต้านม ส่งผลให้มีปริมาณกรดอะมิโนอิสระเพิ่มขึ้น (Moussaoui et al., 2002; Larsen et al., 2010) หากพิจารณาปริมาณแลคโตสในน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคปกติ แม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการและแบบแสดงอาการ พบว่า ฟาร์มที่ 1 น้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการและแบบแสดงอาการมีปริมาณแลคโตสลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

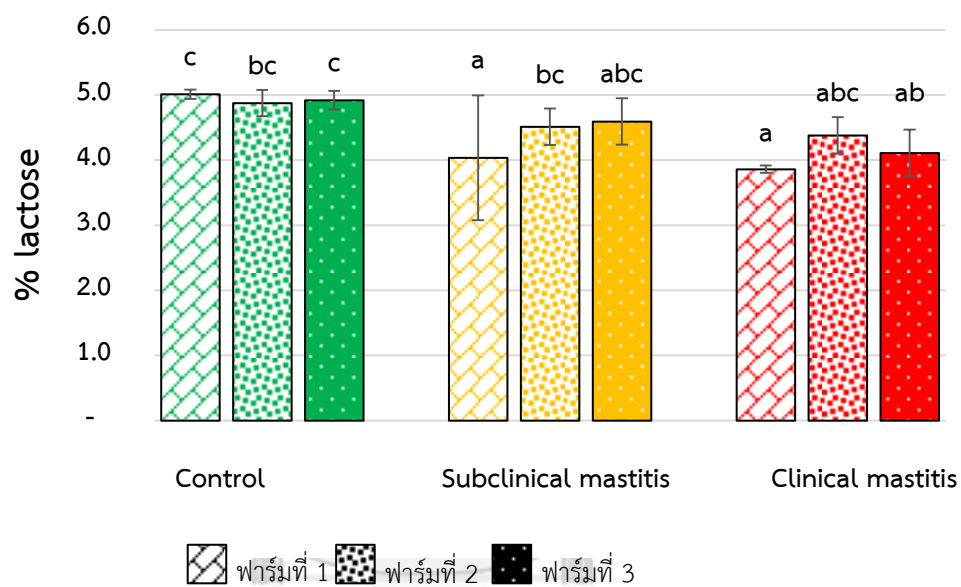
ตารางที่ 4.5 องค์ประกอบทางเคมีในน้ำนมดิบ จากการวิเคราะห์ด้วย เครื่อง MilkoScan™ FT+ analyzer (FOSS, Hilleroed, Denmark) โดยใช้เทคนิค fourier transform infrared (FTIR) ปริมาณโซมาติกเซลล์ ตรวจวัดด้วยเครื่อง Fossomatic™ FC (FOSS, Hilleroed, Denmark) โดยใช้เทคนิค flow cytometry และค่าความเข้มข้นนมดิบจากแม่โคปกติ แมโคที่เป็นโรครด้นนมอีกเสบแบบไม่แสดงอาการและแบบแสดงอาการ

องค์ประกอบ ในน้ำนมดิบ	ปกติ			โรคด้นนมอีกเสบแบบไม่แสดงอาการ			โรคด้นนมอีกเสบแบบแสดงอาการ		
	พาร์มที่ 1	พาร์มที่ 2	พาร์มที่ 3	พาร์มที่ 1	พาร์มที่ 2	พาร์มที่ 3	พาร์มที่ 1	พาร์มที่ 2	พาร์มที่ 3
ไขมัน	3.48±0.43 ^{bc}	3.71±0.10 ^c	2.46±0.96 ^{ab}	3.32±0.64 ^{bc}	3.24±0.21 ^{bc}	2.10±0.39 ^a	3.17±0.22 ^{bc}	3.40±0.74 ^{bc}	2.13±0.41 ^a
โปรตีน	3.58±0.12 ^c	3.53±0.32 ^{bc}	3.11±0.18 ^a	3.76±0.43 ^c	3.69±0.20 ^c	3.12±0.10 ^{ab}	3.53±0.00 ^{bc}	3.74±0.07 ^c	3.33±0.15 ^{abc}
แลคโตส	5.01±0.07 ^c	4.88±0.20 ^{bc}	4.92±0.14 ^c	4.04±0.96 ^a	4.51±0.28a ^{bc}	4.60±0.36 ^{abc}	3.86±0.06 ^a	4.38±0.28 ^{abc}	4.11±0.36 ^{ab}
SnF	9.25±0.24 ^b	9.11±0.54 ^{ab}	8.71±0.09 ^{ab}	8.57±1.34 ^{ab}	8.96±0.05 ^{ab}	8.43±0.33 ^{ab}	8.13±0.06 ^a	8.88±0.17 ^{ab}	8.20±0.16 ^{ab}
TS	12.61±0.60 ^{cd}	12.73±0.41 ^d	11.12±0.91 ^{abc}	12.01±1.75 ^{bcd}	12.17±0.18 ^{cd}	10.52±0.42 ^{ab}	11.39±0.25 ^{abcd}	12.29±0.72 ^{cd}	10.39±0.29 ^a
SCC									
(*1000)									
เซลล์/ มิลลิลิตร	40.00±28.35 ^a	123.00±46.16 ^{ab}	361.00±129.29 ^{abc}	2,926.00±1,155.53 ^{cde}	1,852.67 ^{bcd}	754.14 ^{abcd}	4,667.00±96.17 ^e	5,293.00±2,624.26 ^e	4,494.30±2,038.72 ^{de}
pH	6.66±0.02 ^a	6.62±0.01 ^a	6.63±0.02 ^a	6.84±0.20 ^{bc}	6.63±0.01 ^a	6.73±0.04 ^{ab}	7.03±0.04 ^d	6.80±0.02 ^{bc}	6.88±0.03 ^c

หมายเหตุ : a, b, c, d และ e ในแนวนอนเดียวกัน แสดงค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานขององค์ประกอบทางเคมีที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ทางสถิติ ($p < 0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบน้ำนมที่ได้จากแม่โคปกติ ฟาร์มที่ 2 น้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการและแบบแสดงอาการมีปริมาณแลคโตสลดลงแต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบน้ำนมที่ได้จากแม่โคปกติ และฟาร์มที่ 3 น้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการจากฟาร์มที่ 3 มีปริมาณแลคโตสลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบน้ำนมที่ได้จากแม่โคปกติและแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ แสดงดังภาพที่ 4.12



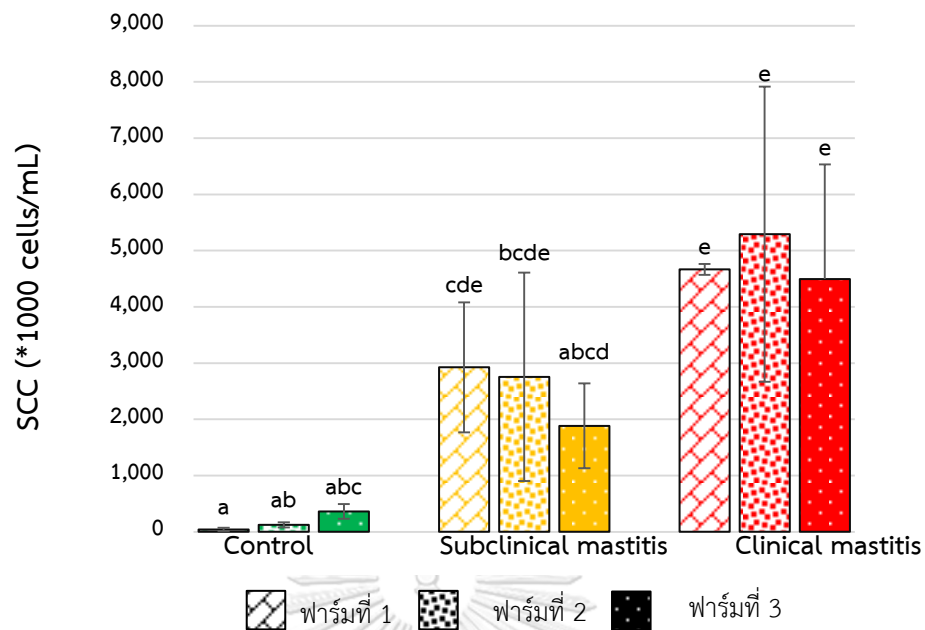
ภาพที่ 4.12 การเปรียบเทียบปริมาณแลคโตสของน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคปกติ (■) แม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ (■) และแบบแสดงอาการ (■)

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

โดยมีการศึกษาหลายงานวิจัยที่แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของการลดความเข้มข้นของแลคโตสกับโรคเต้านมอักเสบ โดยบทบาทของแลคโตส คือมีหน้าที่รักษาระดับของแรงดันออสโมติกในน้ำนม การที่แลคโตสลดลงนั้นเกิดจากการที่เซลล์เยื่อบุผิวภายในเต้านมได้รับความเสียหาย จึงไม่เพียงแต่จะทำให้ความสามารถในการสังเคราะห์แลคโตสลดลง แต่ยังส่งผลให้สารอิเล็กโทรไลต์ต่างภายนอกเซลล์ เช่น โซเดียม คลอไรด์ เข้าสู่ภายในเซลล์ (Caboni et al., 2017) และน้ำจะถูกดูดเข้าไปในเซลล์เพื่อรักษาสมดุลของออสโมซิส ส่งผลให้เกิดการรั่วซึมของแลคโตสออกจากนมผ่านทาง paracellular pathways ส่งผลให้แลคโตสในน้ำนมดิบลดลง (Auld et al., 1995; Auld et al., 1995)

Hubble, 1998; Bruckmaier et al., 2004; Thomas, 2015) เช่นเดียวกับการศึกษาของเด่นพงษ์ สาข้อง และคณะ (2554) แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มของปริมาณเซลล์ไขมันในน้ำมันดิบมีผลให้ เปอร์เซ็นต์แลคโตสลดลง ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญให้ผลผลิตน้ำมันลดลงด้วย

จากการตรวจวัดปริมาณไขมันในเซลล์ด้วยเครื่อง FossomaticTM FC (FOSS, Hilleroed, Denmark) ในตัวอย่างน้ำมันดิบที่ได้จากแม่โคปกติ แม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ และแสดงอาการ ทั้งหมด 9 ตัวอย่าง พบว่า น้ำมันดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการและแบบแสดงอาการ มีปริมาณไขมันในเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณไขมันในเซลล์ในน้ำมันที่ได้จากแม่โคปกติ แสดงผลดังตารางที่ 4.5 และ ภาพที่ 4.13 ซึ่งมีผลที่สอดคล้องกับการประเมินปริมาณไขมันในเซลล์เบื้องต้นด้วยน้ำยา CMT ใน ข้อ 4.2. คือ กลุ่มตัวอย่างน้ำมันดิบที่ได้จากแม่โคปกติ ส่วนผสมระหว่างน้ำมันดิบกับน้ำยา CMT จะมีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน แสดงให้เห็นว่ามีปริมาณไขมันในเซลล์ต่ำ กลุ่มตัวอย่างน้ำมันดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ ส่วนผสมระหว่างน้ำมันดิบกับน้ำยา CMT จะมีลักษณะเป็นเมือก ชั้นหนืด ยังมีปริมาณไขมันในเซลล์สูงจะมีความข้นหนืดมาก ซึ่งสอดคล้องกับค่าที่วัดได้จากเครื่อง FossomaticTM FC (FOSS, Hilleroed, Denmark)



ภาพที่ 4.13 การเปรียบเทียบปริมาณโซมาติกเซลล์ของน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคปกติ (■) แม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ (■) และแบบแสดงอาการ (■)
 หมายเหตุ : a, b, c, d และ e แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

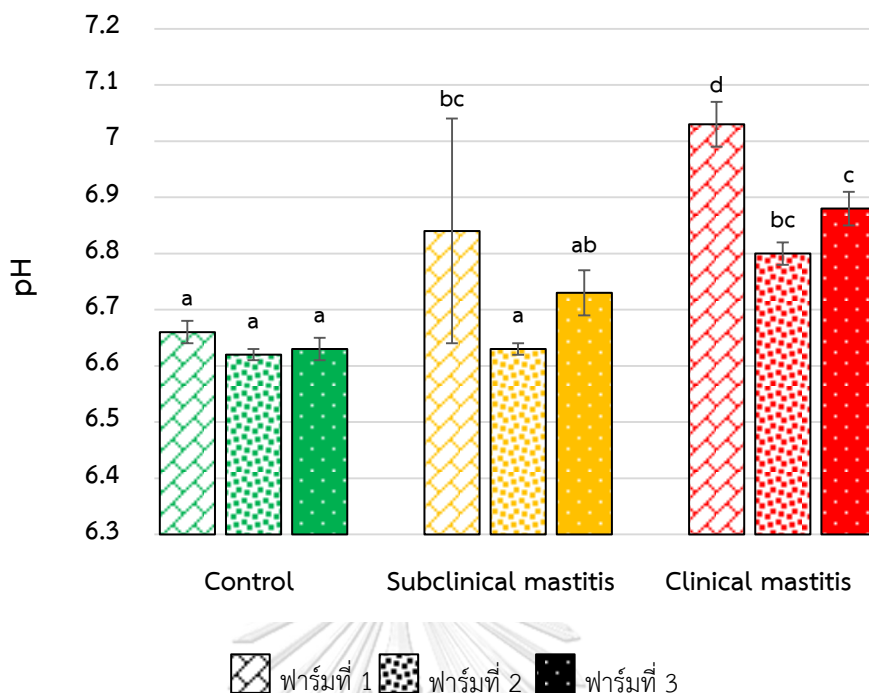
ซึ่งปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบสามารถเป็นตัวบ่งชี้ได้ว่าเต้านมของแม่โคมีการติดเชื้อแบคทีเรีย โดยที่ระบบภูมิคุ้มกันร่างกายของแม่โคจะสร้างโซมาติกเซลล์ ชนิด neutrophils basophils และ eosinophils ขึ้นมาเพื่อต่อต้านและทำลายเชื้อแบคทีเรียที่เข้ามาทำให้ระดับของเซลล์โซมาติกเพิ่มสูงขึ้น (Harmon, 2001; Wren, 2010) และนอกจากนี้ยังมีปัจจัยที่มีผลกระทบต่อปริมาณเซลล์โซมาติกในน้ำนมดิบ เช่น ช่วงของการให้นม อายุโค ผลผลิตน้ำนม ความเครียด และฤดูกาล (Harmon, 1994) ดังนั้นจึงส่งผลให้มีความแปรปรวนของปริมาณโซมาติกเซลล์ภายในกลุ่มตัวอย่างจากฟาร์มที่ต่างกัน แต่พบว่าปัจจัยหลักที่ทำให้ค่าเซลล์โซมาติกเพิ่มสูงขึ้นคือ การติดเชื้อภายในเต้านม (Harmon, 1990; Ivanov et al., 2016; Riekerink et al., 2007) แสดงให้เห็นดังภาพที่ 4.13 พบว่า กลุ่มตัวอย่างเดียวกันในฟาร์มที่ต่างกัน มีค่าปริมาณโซมาติกเซลล์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

เมื่อพิจารณาจากปริมาณองค์ประกอบทางเคมีในน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบที่ลดลง เนื่องจากเซลล์เยื่อหุ้มผิวภายในเต้านมได้รับความเสียหาย ส่งผลให้น้ำนมดิบที่ได้มีคุณภาพต่ำเมื่อเทียบกับน้ำนมที่ได้จากแม่โคปกติ

4.2.3 การตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในน้ำนมดิบ

การตรวจวัดค่า pH นั้นเป็นวิธีทางอ้อม ที่ใช้ในการวินิจฉัยโรคเต้านมอักเสบ เนื่องจากเป็นการประหยัด ง่ายและรวดเร็ว (Sena and Sahmani, 2001; WielgoszGroth and Groth, 2003) ซึ่งน้ำนมปกติจะมีฤทธิ์เป็นกรดเล็กน้อย ค่า pH อยู่ที่ 6.6- 6.7 (Baskaran et al., 2009) ผลการตรวจวัดค่า pH ของตัวอย่างน้ำนมดิบ พบว่า น้ำนมดิบจากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ มีค่า pH สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำนมดิบจากแม่โคปกติ แสดงผลดังตารางที่ 4.5 และภาพที่ 4.14

การเพิ่มขึ้นของ pH ในน้ำนมดิบ สามารถอธิบายได้ว่า เกิดจากการแลกเปลี่ยนประจุทำให้สารโซเดียมและคลอไรด์ มีปริมาณสูงขึ้น และในทางตรงกันข้ามโปรแตสเซียมมีปริมาณลดลง จึงส่งผลให้น้ำนมที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบมี pH สูง (Fernando et al., 1985; Vijayalakshmi et al., 2001; Bruckmaier et al., 2004) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Coulon และคณะ (2002) อธิบายว่า การติดเชื้อมาในเต้านม ทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์เยื่อหุ้ม ทำให้การเปิดรอยต่อ (tight junctions) ระหว่างเซลล์ ส่งผลให้ความสามารถในการซึมผ่านของเลือดเข้าสู่เต้านมเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นโซเดียมและคลอไรด์ ซึ่งมีปริมาณสูงในของเหลวที่อยู่นอกเซลล์ไหลเข้าสู่เซลล์ เพื่อรักษาระดับของแรงดันออสโมติก (Cunha et al., 2008; Sharif et al., 2008; Yves Le et al., 2003) จึงมีผลให้น้ำนมที่เป็นเต้านมอักเสบมี pH สูงขึ้น



ภาพที่ 4.14 การเปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคปกติ (■) แม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ (■) และแบบแสดงอาการ (■)
 หมายเหตุ : a, b, c และ d แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

4.2.4 การประมวลผลสเปกตรัมทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างน้ำนมดิบ โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ทางเมตาโบลอมิกส์

4.2.4.1 การประมวลผล spectra ของ $^1\text{H-NMR}$ และการระบุสารเมตาบอไลต์

spectra ของตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้แม่โคปกติ แม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการและแบบแสดงอาการจากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ หลังจากการประมวลผล spectra ดังขั้นตอนที่ 3.2.5 จะนำมาระบุชนิดสารเมตาบอไลต์ โดยเปรียบเทียบจากฐานข้อมูล Chenomx NMR suite 7.5 library (Chenomx Inc., Alberta, Canada) Human Metabolome Database version 3.0 (Wishart et al., 2013) และจากงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Boudonck et al., 2009; Klein et al., 2010; Settachaimongkon et al., 2014) เช่นเดียวกับข้อ 4.1.3.3.1 พบว่า สามารถระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ในตัวอย่างน้ำนมดิบได้ ทั้งหมด 169 bin และเมื่อนำมาจัดกลุ่มของสารเมตา

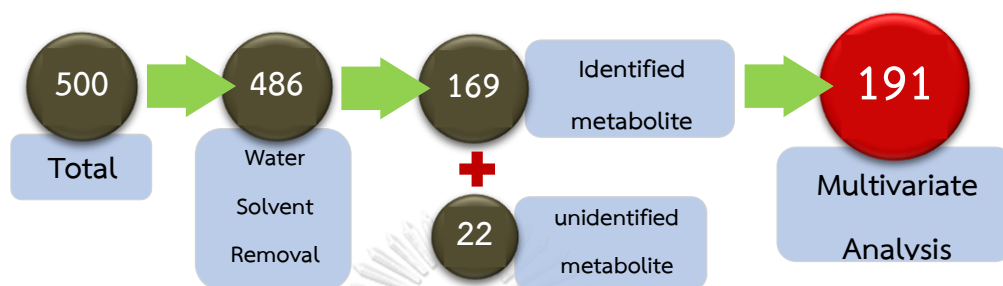
บอไลต์ (metabolite profile) จะได้ทั้งหมด 46 เมตาบอไลต์ ซึ่งประกอบด้วย กรดอะมิโน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และสารอินทรีย์ ที่สามารถระบุชนิดของสารได้ (ตารางที่ 4.6) พบว่ามี 1,6-Anhydro- β -D-glucose, acetylcarnithine, benzoate, carnitine, dihydroxyacetone, fumarate, histidine, Isobutyrate, N-acetylglucosamine, orotate, phenylalanine และ tyrosine เพิ่มขึ้นในน้ำนมดิบ เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่าง และวิธีวิเคราะห์ในผลิตภัณฑ์นมทางการค้าภายในประเทศไทย (ตารางที่ 4.6)



ตารางที่ 4.6 สารเมตาบอไลต์ (metabolite profile) ที่พบในน้ำนมดิบจากแม่โคปกติ แม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการและแบบแสดงอาการในงานวิจัยนี้ (ภาคผนวก ฉ)

กลุ่มสารประกอบเคมี	สารเมตาบอไลต์
แอลกอฮอล์	(1) Ethanol
กรดอะมิโนและอนุพันธ์	(2) Alanine, (3) Amino acid residue, (4) Betaine, (5) Creatine and Creatinine, (6) Glycine, (7) Histidine, (8) Isoleucine, (9) Leucine, (10) N-acetylamino acid, (11) Phenylalanine, (12) Proline, (13) Threonine, (14) Tyrosine, (15) Valine
คาร์โบไฮเดรตและอนุพันธ์	(16) 1,6-Anhydro- β -D-glucose, (17) Galactose, (18) Glucose, (19) Lactose, (20) N-acetylglucosamine, (21) Sugar residue
สารประกอบคาร์บอนิล	(22) Acetone, (23) Dihydroxyacetone
ไขมันและอนุพันธ์	(24) Acetylcarnithine, (25) Carnitine, (26) Choline and derivatives, (27) Glycerophosphocholine
กรดอินทรีย์	(28) Acetate, (29) Acetoacetate, (30) Ascobate, (31) Benzoate, (32) Butyrate, (33) Citrate, (34) Formate, (35) Fumarate, (36) Hippurate, (37) Hydroxybutyrate, (38) Isobutyrate, (39) Lactate, (40) Orotate, (41) Oxoglutarate, (42) Pyruvate, (43) Succinate, (44) Valerate and derivative
อื่นๆ	(45) Dimethyl sulfone, (46) Maleate

สำหรับ bin ที่ไม่สามารถระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ได้ หลังจากนำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้ analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) ได้ทั้งหมด 22 bin ผลการวิเคราะห์จะได้ bin รวมทั้งหมด 191 bin (ภาพที่ 4.15)

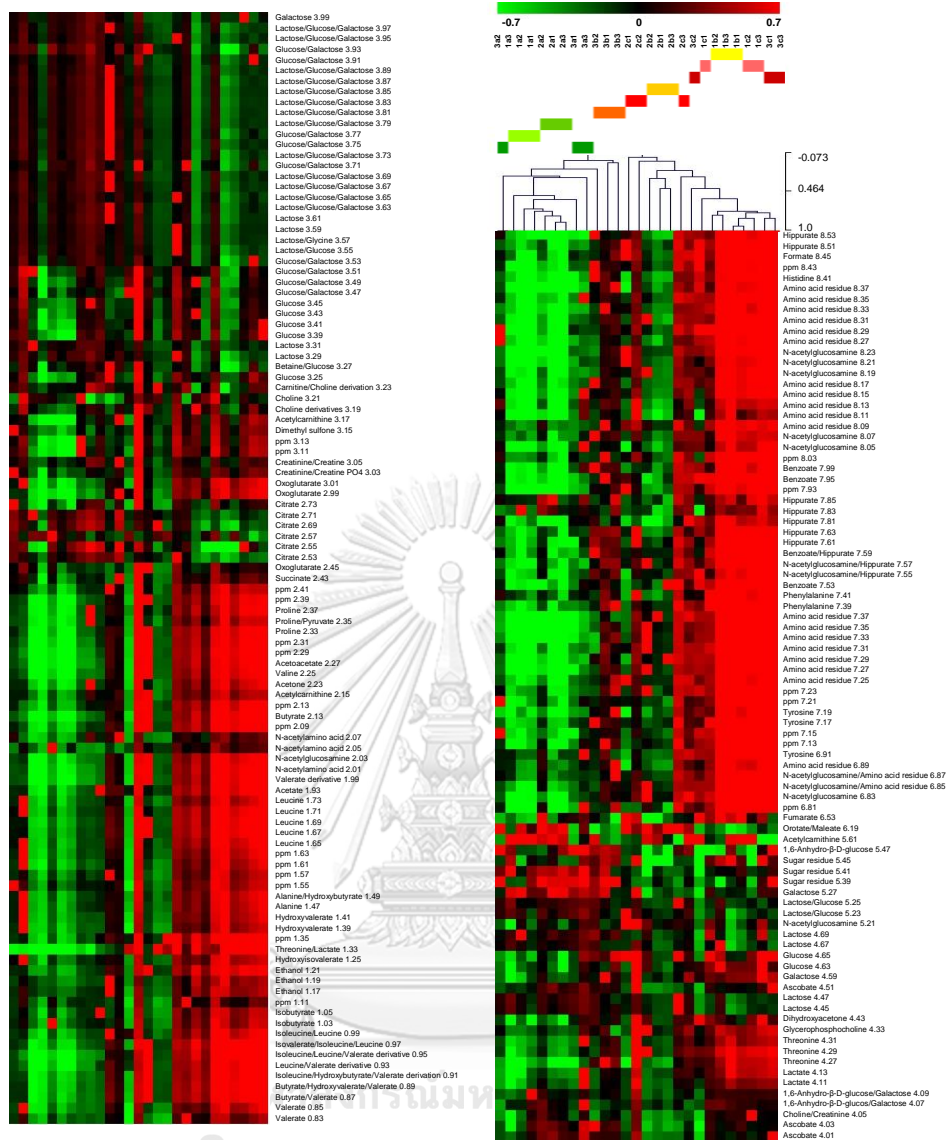


ภาพที่ 4.15 แผนผังแสดงจำนวน bin จากการประมวลผลด้วยวิธีทางสถิติเพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร

4.2.4.2 การเปรียบเทียบโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างน้ำนมดิบจากแม่โคปกติ แม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการและแบบแสดงอาการที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ โดยเทคนิค heat-map visualization และ hierarchical cluster analysis (HCA)

จากขั้นตอนการประมวลผล spectra ของ $^1\text{H-NMR}$ และการระบุสารเมตาบอไลต์สามารถระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ในตัวอย่างน้ำนมดิบจากแม่โคปกติ แม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการและแบบแสดงอาการได้ทั้งหมด 191 bin จากนั้นนำปริมาณสัมพัทธ์ของข้อมูลจาก spectra ในแต่ละ bin มาทำการแปลงข้อมูลให้อยู่ในรูปแบบที่ง่ายต่อการนำไปประมวลผล (normalize) ดังขั้นตอนที่ 3.2.6.2 เพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์โดยการจัดกลุ่ม ด้วยเทคนิค heat-map visualization และ HCA โดยโปรแกรมสำเร็จรูป Multi-Experiment Viewer (MeV) version 4.9 จากผลการวิเคราะห์ด้วย heat-map visualization แสดงให้เห็นว่า โดยในช่วงของกรดอะมิโน ($\delta = 6.83-8.37$) ในน้ำดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบจะมีสีแดง แต่ในน้ำดิบที่ได้จากแม่โคปกติจะมีสีเขียว ซึ่งแสดงให้เห็นว่า น้ำนมที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ มีสัดส่วนของกรดอะมิโนที่มากกว่า และในช่วงของน้ำตาล ($\delta = 3.39-3.99$) ในน้ำดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบจะมีสีเขียว แต่ในน้ำดิบที่ได้จากแม่โคปกติจะมีสีแดง ซึ่งแสดงให้เห็นว่า น้ำนมที่ได้จากแม่โคที่

เป็นโรคเต้านมอักเสบ มีสัดส่วนของน้ำตาสที่น้อยกว่า ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในน้ำนมดิบในข้อ 4.2.1.2 และผลการวิเคราะห์กลุ่มด้วย HCA พบว่า สารในน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคปกติในแต่ละฟาร์ม มีความใกล้เคียงกันทั้ง 3 ฟาร์ม จึงถูกจัดให้ตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคปกติอยู่ใกล้กัน สังเกตได้ในกลุ่มสีเขียว (■) เช่นเดียวกับน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ พบว่า โพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลในน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงการในฟาร์ม 2 และ 3 มีความใกล้เคียงกัน จึงถูกจัดให้ตัวอย่างน้ำนมดิบที่อยู่ใกล้กัน สังเกตได้ในกลุ่มสีเหลือง (■) แต่ฟาร์ม 1 มีโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลที่ใกล้เคียงกับโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลในน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงการในฟาร์ม 1 และ 3 จึงถูกจัดให้ตัวอย่างน้ำนมดิบที่อยู่ใกล้กัน สังเกตได้ในกลุ่มสีแดง (■) แสดงดังภาพที่ 4.16 ซึ่งจากการวิเคราะห์ HCA ในขั้นตอนนี้ ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มของตัวอย่างน้ำนมดิบได้โพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลในน้ำนมดิบ



ภาพที่ 4.16 วิเคราะห์โดยการจัดกลุ่ม ด้วยเทคนิค heat-map visualization และ hierarchical cluster analysis (HCA) ของโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ¹H-NMR จากตัวอย่างน้ำมันดิบที่ได้จากแม่โคปกติ (■) แม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ (■) และแบบแสดงอาการ (■)

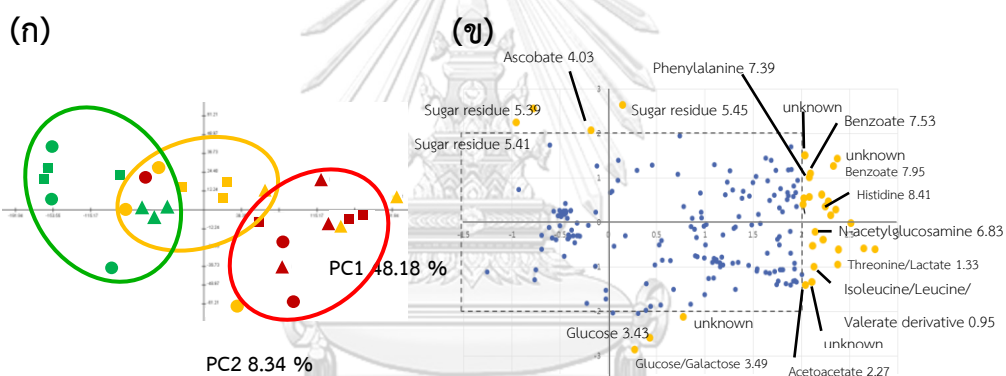
4.2.4.3 การเปรียบเทียบโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างน้ำนมดิบจากแม่โคปกติ แม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการและแบบแสดงอาการที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ โดยการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal component analysis: PCA)

4.2.4.3.1 การเปรียบเทียบโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างน้ำนมดิบจากแม่โคปกติ แม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการและแบบแสดงอาการ

ในขั้นตอนนี้จะนำข้อมูลที่ได้มาจัดกลุ่มโดยการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (PCA) ซึ่งการจัดกลุ่มด้วยการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก พบว่า มีความแปรปรวนของตัวแปรรวมร้อยละ 56.51 โดย PC1 สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ร้อยละ 48.18 และ PC2 สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ร้อยละ 8.33 โดยองค์ประกอบหลักนี้จะประกอบด้วยโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบภายในน้ำนมดิบที่เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อกลุ่มตัวอย่างทำให้สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างได้ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบจากแม่โคปกติ แม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการและแบบไม่แสดงอาการ โดยผลที่ได้นี้สอดคล้องกับผลจาก HCA ที่แสดงดังภาพที่ 4.16 จะเห็นว่าโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลในน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ (■) แตกต่างจากโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลในน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคปกติ (■) อย่างชัดเจน แต่โพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลในน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ (■) กับจากโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลในน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคปกติ (■) แตกต่างกันไม่มากนัก (ภาพที่ 4.17ก) นอกจากนี้เมื่อพิจารณาจากภาพที่ 4.17ก ในแต่ละกลุ่มตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่ม พบว่า มีความแปรปรวนที่เกิดขึ้นภายในกลุ่มตัวอย่าง เนื่องจากความแตกต่างของฟาร์มแต่ละฟาร์ม ส่งผลให้โพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลภายในน้ำนมมีความแปรปรวน โดยนอกจากปัจจัยที่เกิดจากการที่แม่โคเป็นโรคเต้านมอักเสบแล้วยังเกิดจากปัจจัยอื่นที่สามารถส่งผลต่อองค์ประกอบหลักทางเคมีในน้ำนมเช่นเดียวกัน เช่น สภาพแวดล้อมมีอิทธิพลที่ส่งผลกระทบต่อตัวแม่โคและมีผลโดยตรงต่อขบวนการเผาผลาญอาหารภายในร่างกาย ปริมาณอาหารที่กิน ซึ่งอาหารนับเป็นปัจจัยสำคัญที่มีอิทธิพลต่อปริมาณและองค์ประกอบน้ำนม เนื่องจากเซลล์สร้างน้ำนมต้องการสารอาหารที่เพียงพอต่อการสังเคราะห์น้ำนมที่มาจากเลือด ได้แก่ glucose, acetate, amino acid, fatty acid และแร่ธาตุ และนอกจากนี้ยังมีปัจจัยทางด้านการจัดการฟาร์มที่มีผลกระทบต่อองค์ประกอบน้ำนมที่สำคัญ เช่น การรีดนม การรีด

นมไม่ตีทำให้ได้น้ำมันที่มีปริมาณเปอร์เซ็นต์ไขมันต่ำกว่าน้ำมันที่ได้จากการรีดตามปกติ (สุทธิศักดิ์ แก้วแกมจันทร์, 2546)

จากนั้นนำข้อมูลมาพิจารณาค่าน้ำหนักองค์ประกอบเพื่อหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อกลุ่มตัวอย่างของน้ำมันดิบแต่ละกลุ่มตัวอย่างจาก loading plots และเป็นการยืนยันผลจาก PCA ที่ได้จากภาพที่ 4.17ก ผลการวิเคราะห์ แสดงให้เห็นว่า มีโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลที่ถูกระบุว่าเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อกลุ่มตัวอย่างของน้ำมันดิบแต่ละกลุ่มตัวอย่าง โดยสาร benzoate, threonine, lactate, histidine, leucine, isoleucine, acetoacetate และ phenylalanine แสดงให้เห็นว่าเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อกลุ่มตัวอย่างของน้ำมันดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ (ภาพที่ 4.17ข) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย Sundekilde และคณะ (2013), Thomas และคณะ (2016) และ Davis และคณะ (2004) โดยจะอธิบายในหัวข้อถัดไป



ภาพที่ 4.17 PCA score plot (ก) และ PC loading (ข) ของโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ จากตัวอย่างน้ำมันดิบที่ได้จากแม่โคปกติ (■) แม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ (■) และแบบแสดงอาการ (■)

โดย ● หมายถึง ฟาร์มที่ 1 ■ หมายถึง ฟาร์มที่ 2 และ ▲ หมายถึง ฟาร์มที่ 3

หมายเหตุ: ภาพ ข ● หมายถึง สารเมตาบอไลต์ที่มีค่า loading ไม่ถึง 2 และ ● หมายถึง สารเมตาบอไลต์ที่มีค่า loading ตั้งแต่ 2 ขึ้นไป

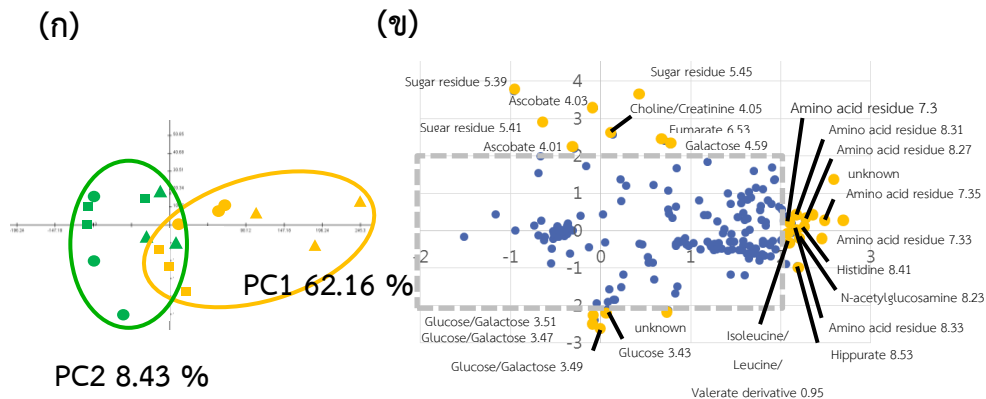
จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ และเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร สามารถแยกโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างน้ำมันดิบทั้ง 3 กลุ่ม และหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อกลุ่มตัวอย่างของน้ำมันดิบ ดังนั้นขั้นตอนต่อไปจึงทำการเปรียบเทียบ

โพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของน้ำนมดิบที่ละ 2 ตัวอย่าง เพื่อหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อกลุ่มตัวอย่างของน้ำนมดิบในแต่ละกลุ่มตัวอย่างได้ชัดเจนขึ้น

4.2.4.3.2 การเปรียบเทียบโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลระหว่างตัวอย่างน้ำนมดิบจากแม่โคปกติกับแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ

ในขั้นตอนนี้จะนำข้อมูลที่ได้จากตัวอย่างน้ำนมดิบจากแม่โคปกติกับแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ มาจัดกลุ่มโดยการวิเคราะห์ PCA เพื่อทำให้เห็นความแตกต่างระหว่างตัวอย่างได้ชัดเจนขึ้น พบว่า มีความแปรปรวนของตัวแปรรวมร้อยละ 70.59 โดย PC1 สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ร้อยละ 62.16 และ PC2 สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ร้อยละ 8.43 โดยองค์ประกอบหลักนี้จะประกอบด้วยโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบภายในน้ำนมดิบที่เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อกลุ่มตัวอย่างของน้ำนมดิบ สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างได้ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบจากแม่โคปกติ แม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ จะเห็นว่าโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลในน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ (■) กับจากโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลในน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคปกติ (■) แตกต่างกันค่อนข้างชัดเจน (ภาพที่ 4.18 ก)

จากนั้นนำข้อมูลมาพิจารณาค่าน้ำหนักองค์ประกอบเพื่อหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อกลุ่มตัวอย่างของน้ำนมดิบแต่ละกลุ่มตัวอย่างจาก loading plots และเป็นการยืนยันผลจาก PCA ที่ได้จากภาพที่ 4.18 ก ผลการวิเคราะห์ แสดงให้เห็นว่า มีโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลที่ถูกระบุว่าเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อกลุ่มตัวอย่างของน้ำนมดิบแต่ละกลุ่มตัวอย่าง โดยสาร histidine, N-acetylglucosamine, hippurate, Isoleucine, leucine, และ fumarate แสดงให้เห็นว่าเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อกลุ่มตัวอย่างของน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ (ภาพที่ 4.18 ข) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย Sundekilde และคณะ (2013), Thomas และคณะ (2016) และ Davis และคณะ (2004) โดยจะอธิบายในหัวข้อถัดไป



ภาพที่ 4.18 PCA score plot (ก) และ PC loading (ข) ของโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ จากตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคปกติ (■) แม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ (■)

โดย ● หมายถึง ฟาร์มที่ 1 ■ หมายถึง ฟาร์มที่ 2 และ ▲ หมายถึง ฟาร์มที่ 3

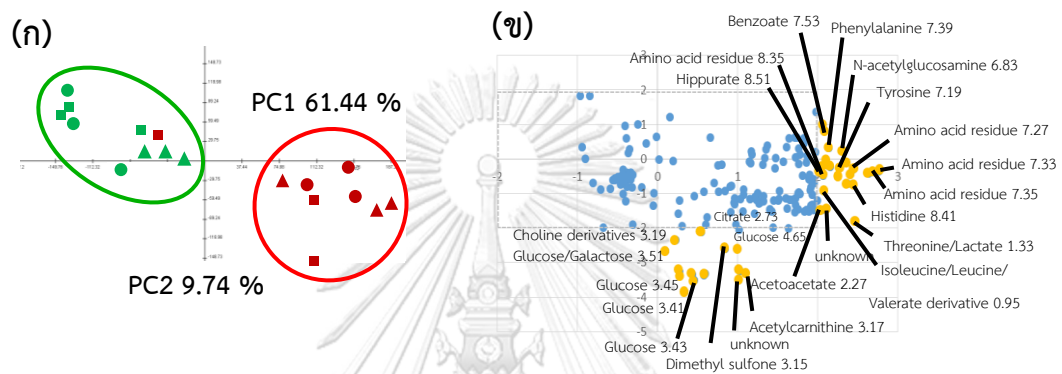
หมายเหตุ: ภาพ ข ● หมายถึง สารเมตาบอไลต์ที่มีค่า loading ไม่ถึง 2 และ ● หมายถึง สารเมตาบอไลต์ที่มีค่า loading ตั้งแต่ 2 ขึ้นไป

4.2.4.3.3 การเปรียบเทียบโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลระหว่างตัวอย่างน้ำนมดิบจากแม่โคปกติกับแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ

ในขั้นตอนนี้จะนำข้อมูลที่ได้จากตัวอย่างน้ำนมดิบจากแม่โคปกติกับแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ มาจัดกลุ่มโดยการวิเคราะห์ PCA เพื่อให้เห็นความแตกต่างระหว่างตัวอย่างได้ชัดเจนขึ้น พบว่า มีความแปรปรวนของตัวแปรรวมร้อยละ 71.18 โดย PC1 สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ร้อยละ 61.44 และ PC2 สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ร้อยละ 9.74 โดยองค์ประกอบหลักนี้จะประกอบด้วยโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบภายในน้ำนมดิบที่เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อกลุ่มตัวอย่าง จากการศึกษาสามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างได้ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบจากแม่โคปกติ แม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ จะเห็นว่า โพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลในน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ (■) แตกต่างจากโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลในน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคปกติ (■) อย่างชัดเจน (ภาพที่ 4.19 ก)

จากนั้นนำข้อมูลมาพิจารณาค่าน้ำหนักองค์ประกอบเพื่อหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อกลุ่มตัวอย่างของน้ำนมดิบแต่ละกลุ่มตัวอย่างจาก loading plots และเป็นการยืนยันผลจาก PCA ที่ได้

จากภาพที่ 4.19 ก พบว่า มีสารเมตาบอไลต์ที่ถูกระบุว่าเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อกลุ่มตัวอย่างของน้ำนมดิบแต่ละกลุ่มตัวอย่าง โดยสาร threonine, lactate, histidine, tyrosine, N-acetylglucosamine, Isoleucine, leucine, phenylalanine, benzoate, hippurate และ acetoacetate แสดงให้เห็นว่าเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อกลุ่มตัวอย่างของน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ (ภาพที่ 4.19 ข) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย Thomas และคณะ (2016) และ Berning และคณะ (1992) โดยจะอธิบายในหัวข้อถัดไป

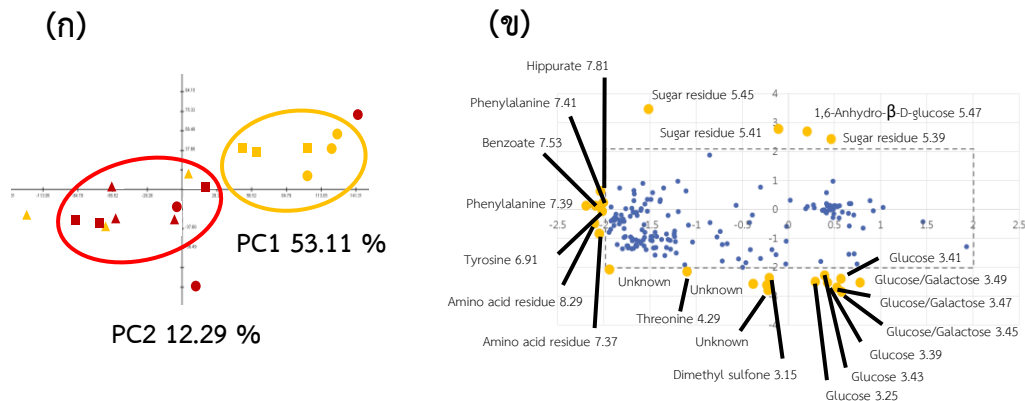


ภาพที่ 4.19 PCA score plot (ก) และ PC loading (ข) ของโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ จากตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคปกติ (■) และแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ (■) โดย ● หมายถึง ฟาร์มที่ 1 ■ หมายถึง ฟาร์มที่ 2 และ ▲ หมายถึง ฟาร์มที่ 3
หมายเหตุ: ภาพ ข ● หมายถึง สารเมตาบอไลต์ที่มีค่า loading ไม่ถึง 2 และ ● หมายถึง สารเมตาบอไลต์ที่มีค่า loading ตั้งแต่ 2 ขึ้นไป

4.2.4.3.4 การเปรียบเทียบโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลระหว่างตัวอย่างน้ำนมดิบจากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการกับแบบแสดงอาการ

ในขั้นตอนนี้จะนำข้อมูลที่ได้จากตัวอย่างน้ำนมดิบจากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการกับแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ มาจัดกลุ่มโดยการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (PCA) เพื่อทำให้เห็นความแตกต่างระหว่างตัวอย่างน้ำนมดิบจากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการและแบบแสดงอาการได้ชัดเจนขึ้น พบว่า มีความแปรปรวนของตัวแปรรวมร้อยละ 65.40 โดย PC1 สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ร้อยละ 53.11 PC2 สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ร้อยละ 12.29 โดยองค์ประกอบหลักนี้จะประกอบด้วยโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบภายในน้ำนมดิบที่เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อกลุ่มตัวอย่างของน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการและแบบแสดงอาการ จะเห็นว่า โพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลในน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ (■) แตกต่างจากโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลในน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ (■) อย่างชัดเจน (ภาพที่ 4.20 ก) จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางสถิติระหว่างตัวแปรด้วยวิธี PCA ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างได้ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบจากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการและแบบแสดงอาการ

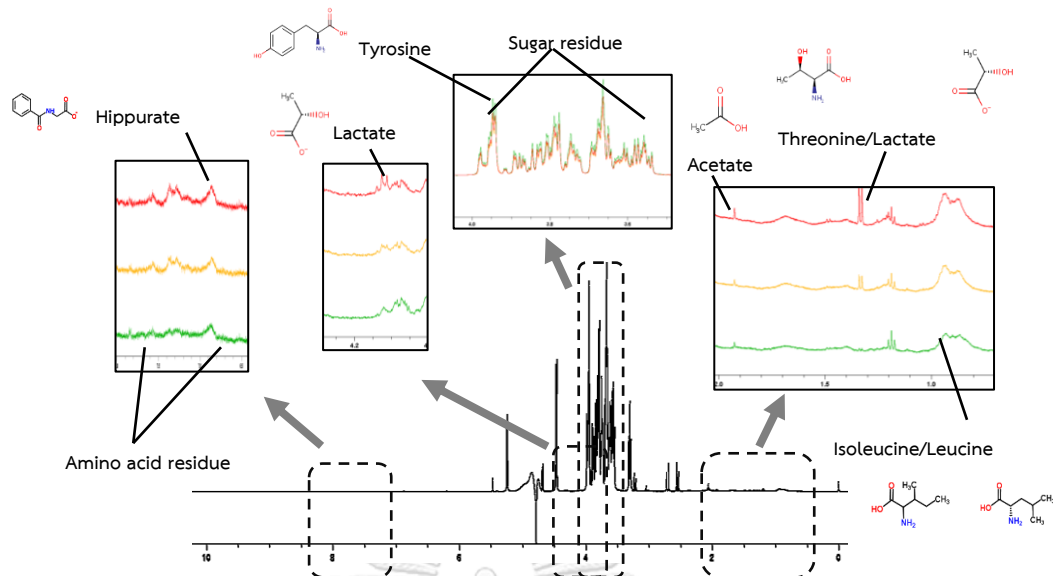
เมื่อพิจารณาค่าน้ำหนักองค์ประกอบเพื่อหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อกลุ่มตัวอย่างของน้ำนมดิบแต่ละกลุ่มตัวอย่างจาก loading plots ผลการวิเคราะห์ แสดงให้เห็นว่า มีสารเมตาบอไลต์ที่ถูกระบุว่าเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อกลุ่มตัวอย่างของน้ำนมดิบแต่ละกลุ่มตัวอย่าง โดยสาร phenylalanine, benzoate, tyrosine, hippurate และ threonine แสดงให้เห็นว่าเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อกลุ่มตัวอย่างของน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ (ภาพที่ 4.20 ข) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย Sundekilde และคณะ (2013) และ Thomas และคณะ (2016)



ภาพที่ 4.20 PCA score plot (ก) และ PC loading (ข) ของโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ จากตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ (■) และแบบแสดงอาการ (■) โดย ● หมายถึง ฟาร์มที่ 1 ■ หมายถึง ฟาร์มที่ 2 และ ▲ หมายถึง ฟาร์มที่ 3
หมายเหตุ: ภาพ ข ● หมายถึง สารเมตาบอไลต์ที่มีค่า loading ไม่ถึง 2 และ ● หมายถึง สารเมตาบอไลต์ที่มีค่า loading ตั้งแต่ 2 ขึ้นไป

4.2.4.4 การเปรียบเทียบ NMR spectra ของตัวอย่างน้ำนมดิบจากแม่โคปกติ แม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการและแบบแสดงอาการที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$

การวิเคราะห์ในขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อตรวจสอบสารเมตาบอไลต์ที่เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง ใน spectra ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ โดยภาพที่ 4.21 แสดงให้เห็นว่า acetate lactate และ threonine ใน spectra ของน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ(■) สูงมาก เมื่อเทียบกับ spectra ของน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคปกติ (■) และแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ (■) ซึ่งสอดคล้องกับผลการเปรียบเทียบสารเมตาบอไลต์ในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง ด้วย PCA ที่แสดงให้เห็นว่า acetate lactate และ threonine เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อกลุ่มตัวอย่างของน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ



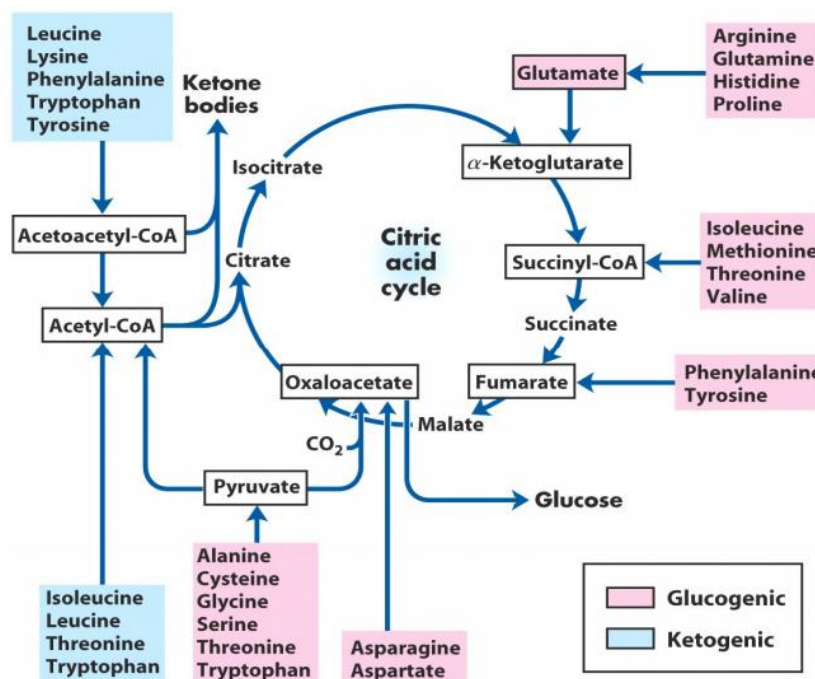
ภาพที่ 4.21 เปรียบเทียบ NMR spectra ของตัวอย่างน้ำมดืบที่ได้จากแม่โคปกติ (■) แม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ (■) และแบบแสดงอาการ (■) ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$

จากผลการเปรียบเทียบโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างน้ำมดืบจากแม่โคปกติ แม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการและแบบแสดงอาการ พบว่า สาร benzoate, tyrosine และ phenylalanine เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อกลุ่มตัวอย่างของน้ำมดืบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ สาร fumarate เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อกลุ่มตัวอย่างของน้ำมดืบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ และสาร threonine, lactate, histidine, N-acetylglucosamine, leucine, isoleucine, hippurate และ acetoacetate เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อกลุ่มตัวอย่างของน้ำมดืบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการและแสดงอาการ

โดยระดับ acetate และ lactate ที่เพิ่มขึ้นในน้ำมดืบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบนั้น แสดงให้เห็นว่า มีการเผาผลาญอาหารของเชื้อแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด โดยการศึกษาของ Hettinga et al., 2008 ได้อธิบายว่า การที่ acetate เพิ่มขึ้นในน้ำมดืบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ เกิดจากการเผาผลาญอาหารของเชื้อ *Staphylococcus aureus* หรือ *E. coli* ซึ่งได้ acetate เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย และ lactate นั้นโดยปกติจะถูกสร้างจากเผาผลาญอาหารของเชื้อ

แบคทีเรียเช่นเดียวกับ acetate ไม่ได้ถูกสร้างจากเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Davis et al., 2004; Thomas 2015; Hettinga et al., 2009) และ benzoic acid เป็นสารตั้งต้นของ hippurate สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ (Knarreborg et al., 2002) ดังนั้นปริมาณ benzoic acid และ hippurate ที่เพิ่มขึ้นในน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ แสดงถึงการมีส่วนร่วมในการช่วยป้องกันการบุกรุกของเชื้อแบคทีเรียที่เข้าสู่เต้านมได้

จากการที่แม่โคเป็นโรคเต้านมอักเสบนั้น จะส่งผลให้สมดุลพลังงานในรายการลดลง ซึ่งกรดอะมิโนภายในร่างกายจะถูกสลายเพื่อนำมาใช้เป็นพลังงานได้ เช่น phenylalanine และ tyrosine จะถูกเปลี่ยนเป็น acetoacetate และเปลี่ยนต่อเป็น acetyl Co A เรียกว่า ketogenic amino acid เพื่อนำไปสังเคราะห์เป็นสาร ketone ได้ และเป็นสารตั้งต้นของ citrate ในกระบวนการ Krebs Cycle ใน mitochondria ของเซลล์ตับ เรียกว่า glucogenic amino (Bremer et al., 1974) และสามารถเปลี่ยนเป็น fumarate ได้เช่นกันจึงเป็นทั้ง ketogenic และ glucogenic amino acid แสดงดังภาพที่ 4.22 เนื่องจากกรดอะมิโนภายในร่างกายสามารถถูกสลายเพื่อนำมาใช้เป็นพลังงานได้ ซึ่งในร่างกายของแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบจะมีการพลังงานลดลง ดังนั้นจึงต้องสร้างพลังงานขึ้นมาเพื่อทดแทนพลังงานที่ลดลง ส่งผลให้ในน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ จึงมีปริมาณของ acetoacetate, phenylalanine และ tyrosine สูงกว่าเมื่อเทียบกับน้ำนมที่ได้จากแม่โคปกติ



ภาพที่ 4.22 การใช้ประโยชน์จากโครงสร้างคาร์บอนจากกรดอะมิโน

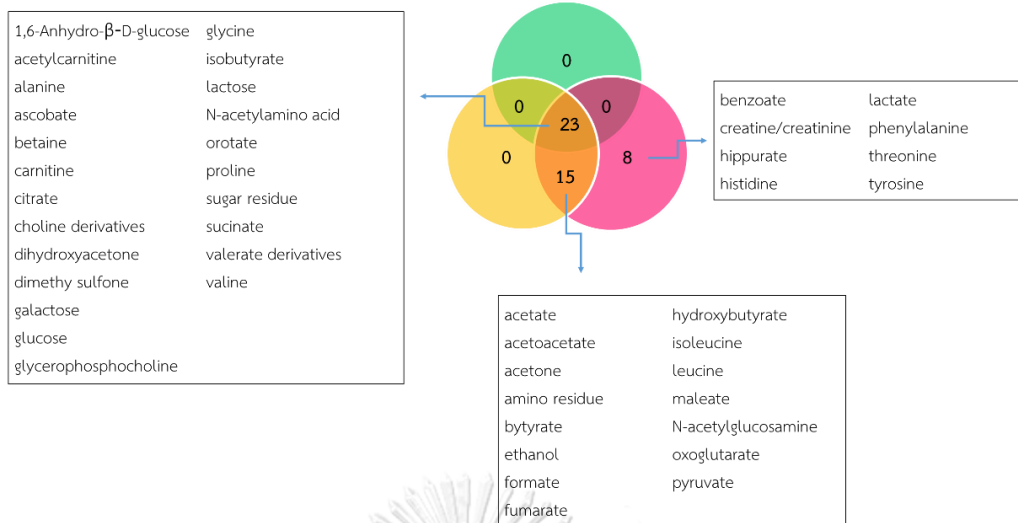
ที่มา: Lehninger et al. (2008)

ซึ่งมีผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Sundekilde และคณะ (2013) รายงานว่า สารเมตาบอไลต์ที่เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในน้ำนมที่มีปริมาณไขมันอิ่มตัวสูงหรือภาวะเต้านมอักเสบ คือ acetate (Davis et al., 2004), lactose (Berning et al., 1992) และ lactate (Davis et al., 2004)

นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบ NMR spectra ของตัวอย่างน้ำนมดิบจากแม่โคปกติ แม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการและแบบแสดงอาการ (ภาพที่ 4.21) แสดงให้เห็นว่า น้ำนมดิบจากแม่โคที่จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ มีปริมาณกรดอะมิโนเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคปกติ โดยการศึกษาของ Thomas และคณะ (2016) ได้อธิบายว่า การเพิ่มขึ้นของกลุ่มกรดอะมิโนในน้ำนมที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ ซึ่งเกิดจากการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอส (proteolytic enzyme) ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียที่อยู่ในเต้านม (Moussaoui et al., 2002; Larsen et al., 2010) ซึ่งเอนไซม์โปรตีเอสนั้นส่งผลทำให้เกิดความหลากหลายของกลุ่มกรดอะมิโนในน้ำนมดิบจากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ นอกจากนี้ยังพบ กรดอะมิโน เช่น arginine, valine, isoleucine และ proline ในน้ำนมดิบจากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับในน้ำนมปกติ

อีกด้วย ซึ่งการศึกษาของ Sundekilde และคณะ (2013) อธิบายว่า ปริมาณของ isoleucine สูงขึ้น ในน้ำนมดิบที่มีปริมาณโซมาติกเซลล์สูง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเกิดจากกิจกรรมของแบคทีเรียที่ส่งผลทำให้เกิดโรคทั้งกระบวนการหมักและการย่อยสลายโปรตีน

จากการประมวลผลโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลและระบุสารเมตาบอไลต์ในตัวอย่างน้ำนมดิบจากแม่โคปกติ แม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการกับแบบแสดงอาการ พบว่า ได้สารเมตาบอไลต์ทั้งหมด 46 เมตาบอไลต์ ซึ่งประกอบด้วย กรดอะมิโน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และสารอินทรีย์ โดยมีสารเมตาบอไลต์ที่มีปริมาณสัมพันธ์ที่ใกล้เคียงกันใน 3 กลุ่มตัวอย่าง 23 สารเมตาบอไลต์ ได้แก่ 1,6-Anhydro- β -D-glucose, acetylcarnitine, alanine, ascorbate, betaine, carnitine, citrate, choline derivatives, dihydroxyacetone, dimethyl sulfone, galactose, glucose, glycerophosphocholine, glycine, isobutyrate, lactose, N-acetylamino acid, orotate, proline, sugar residue, succinate, valerate derivatives และ valine มีปริมาณสัมพันธ์สูงในกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบจากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ 8 สารเมตาบอไลต์ ได้แก่ benzoate, creatine/creatinine, hippurate, histidine, lactate, phenylalanine, threonine และ tyrosine และมีปริมาณสัมพันธ์สูงในกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบจากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการและแสดงอาการ 15 สารเมตาบอไลต์ ได้แก่ acetate, acetoacetate, acetone, amino residue, butyrate, ethanol, formate, fumarate, hydroxybutyrate, isoleucine, leucine, maleate, N-acetylglucosamine, oxoglutarate และ pyruvate (ภาพที่ 4.23)



ภาพที่ 4.23 แผนภาพเวนน์ (Venn Diagram) ของสารเมตาบอไลต์ในตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จาก

แม่โคปกติ (■) แม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ (■) และแบบแสดงอาการ (■)

จากการศึกษาในงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า การวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ ร่วมกับการเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร สามารถเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลในตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคปกติกับแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการและแบบแสดงอาการ รวมทั้งสามารถวิเคราะห์หาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของแต่ละกลุ่มตัวอย่างได้ ซึ่งข้อมูลที่ได้เป็นสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการหาความสัมพันธ์การเปลี่ยนแปลงของสารเมตาบอไลต์ในน้ำนมดิบต่อการเกิดโรคเต้านมอักเสบในแม่โคได้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสภาวะของแม่โคต่อการเปลี่ยนแปลงสารเมตาบอไลต์ในน้ำนมดิบ โดยเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างข้อมูลเมตาโบโลมของน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบทั้งแบบที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการกับแม่โคปกติ รวมทั้งวิเคราะห์ชนิดของสารเมตาโบไลต์ที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อลักษณะทางพยาธิวิทยาดังกล่าว ด้วย $^1\text{H-NMR}$ และเปรียบเทียบความแตกต่าง โดยวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร โดยงานวิจัยนี้จะแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ การทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์ และการศึกษาโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของน้ำนมดิบจากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ

งานวิจัยส่วนที่ 1 การทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์ โดยการนำตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมทางการค้าในประเทศไทย 3 ตราสินค้า มาศึกษาโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของผลิตภัณฑ์นมได้แก่ นมพาสเจอร์ไรส์ (pasteurized milk) นมยูเอชที (UHT milk) นมออร์แกนิก (organic milk) นมพรีเมียม (premium milk) และนมฮอกไกโด (Hokkaido-labeled milk) จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ และประมวลผลโดยการระบุชนิดสารเมตาบอไลต์ของตัวอย่างแต่ละผลิตภัณฑ์นม พบว่า สามารถระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมได้ทั้งหมด 37 สารเมตาบอไลต์ ซึ่งประกอบด้วย กรดอะมิโน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และสารอินทรีย์ และเปรียบเทียบความแตกต่างของโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างผลิตภัณฑ์นม โดยการจับกลุ่มด้วยเทคนิค heat-map visualization และ HCA พบว่า สามารถจับกลุ่มตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมได้ตามโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลที่เหมือนกันอย่างชัดเจน จากนั้นใช้เทคนิค PCA เพื่อใช้จับกลุ่มตัวอย่างผลิตภัณฑ์ โดยจะพิจารณาจากโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลที่ต่างกัน ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างผลิตภัณฑ์ได้ออกเป็น 7 กลุ่ม คือ นมพาสเจอร์ไรส์ นมยูเอชที นมออร์แกนิกของตราสินค้า A นมพาสเจอร์ไรส์ นมยูเอชที นมพรีเมียมของตราสินค้า B และนมฮอกไกโดของตราสินค้า C โดยผลที่ได้นี้สอดคล้องกับผลจาก HCA นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้พบว่า ผลิตภัณฑ์อินทรีย์ของตราสินค้า A สามารถแยกออกจากผลิตภัณฑ์นมพาสเจอร์ไรส์และนมยูเอชทีในตราสินค้าเดียวกันได้อย่างชัดเจน โดยมี acetate, lactate, formate และ threonine เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์อินทรีย์ของตราสินค้า A

และผลิตภัณฑ์นมพาสเจอร์ไรส์สามารถแยกออกจากผลิตภัณฑ์นมยูเอชที และผลิตภัณฑ์นมพรีเมียมได้ อย่างชัดเจน โดยมี propylene glycol เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์นมยูเอชที และนมพรีเมียมของตราสินค้า B

สำหรับงานวิจัยส่วนที่ 2 การศึกษาโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลในน้ำนมดิบ โดยนำตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคปกติ แม่โคเป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการและแบบแสดงอาการ ทั้งหมด 3 ฟาร์ม มาศึกษาโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุล ด้วย $^1\text{H-NMR}$ โดยการประเมินปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบ เพื่อคัดเลือกกลุ่มตัวอย่าง โดยพบว่า ปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ ($2,520,780 \pm 559.6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) และแบบแสดงอาการ ($4,818,110 \pm 420.23$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับในน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคปกติ ($174,670 \pm 166.6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) และพบว่ามีความแตกต่างและมีการเพิ่มขึ้นของ pH ในน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการและแบบแสดงอาการเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคปกติ จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ และระบุชนิดสารเมตาบอไลต์ของแต่ละตัวอย่างน้ำนมดิบ พบว่า สามารถระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ในตัวอย่างน้ำนมดิบได้ ทั้งหมด 46 สารเมตาบอไลต์ ซึ่งประกอบด้วย กรดอะมิโน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และสารอินทรีย์ และเปรียบเทียบโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างน้ำนมดิบด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร โดยการจัดกลุ่มด้วยเทคนิค heat-map visualization และ HCA ผลการวิเคราะห์ พบว่า สามารถจัดกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบตามโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลที่เหมือนกันได้อย่างชัดเจน จากนั้นใช้เทคนิค PCA เพื่อใช้จัดกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบ ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มได้ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ ตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคปกติ แม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการและแบบแสดงอาการ โดยผลที่ได้นี้สอดคล้องกับผลจาก HCA นอกจากนั้น

จากการศึกษาในงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า การวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ ร่วมกับการเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร สามารถเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลในตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคปกติกับแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการและแบบแสดงอาการ รวมทั้งสามารถวิเคราะห์หาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของแต่ละกลุ่มตัวอย่างได้ โดยสาร threonine, lactate, histidine, N-acetylglucosamine, leucine, isoleucine, hippurate และ acetoacetate เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่แยกความแตกต่างระหว่างน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการและไม่แสดงอาการออกจาก

น้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคปกติได้ ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการหาความสัมพันธ์การเปลี่ยนแปลงของสารเมตาบอไลต์ในน้ำนมดิบต่อการเกิดโรคเต้านมอักเสบในแม่โคได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากในปัจจุบันประเทศไทยยังไม่มี การนำเทคโนโลยีเมตาโบลอมิกส์มาใช้ศึกษาโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของน้ำนม ในงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า การวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ในตัวอย่างน้ำนมดิบด้วย $^1\text{H-NMR}$ และเปรียบเทียบโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปรสามารถแยกความแตกต่างระหว่างน้ำนมดิบปกติกับน้ำนมที่ได้จากเต้านมอักเสบได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในอนาคตอาจจะมีการพัฒนาข้อมูล โดยการเพิ่มจำนวนตัวอย่างในงานวิจัย สำหรับแม่โคแต่ละกลุ่ม เพื่อนำไปพัฒนารูปแบบความสัมพันธ์ (model) เพื่อทำนายความแตกต่างของโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลในกลุ่มแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบได้ หรือเพิ่มพื้นที่ในการเก็บตัวอย่าง โดยเริ่มจากแหล่งพื้นที่ใกล้เคียง เพื่อลดความแตกต่างของปัจจัยทางด้านอื่นๆ เช่น อาหาร หรือการจัดการฟาร์ม หรือนำวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวไปประยุกต์ใช้เพื่อหาผลของปัจจัย เช่น อาหาร สายพันธุ์การผลิตแบบอินทรีย์ หรือสุขภาวะด้านอื่นๆ ของแม่โค ที่ส่งผลให้โปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลในน้ำนมดิบเปลี่ยนไป นอกจากนี้จะนำไปประยุกต์ใช้เพื่อศึกษาความแตกต่างของโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลในน้ำนมดิบจากสัตว์ชนิดอื่น เช่น แพะ แกะ และควาย เป็นต้น รวมถึงการปลอมปนในน้ำนม หรือศึกษาความแตกต่างของโปรไฟล์ทางชีวโมเลกุลในอาหารประเภทอื่นๆ ได้ เพื่อใช้ในการระบุอัตลักษณ์ของอาหาร

รายการอ้างอิง



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รายการอ้างอิง

- กัลยา วานิชย์บัญชา, 2552. การวิเคราะห์ข้อมูลหลายตัวแปร, หน้า 182-337. กรุงเทพฯ: คณะ
พาณิชยศาสตร์และการบัญชี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- เกษตรและสหกรณ์, กระทรวง. มาตรฐานการรับซื้อน้ำนมโค [ออนไลน์]. 2558. แหล่งที่มา:
[http://www.dpo.go.th/wp-
content/uploads/2013/12/Announcedpurchaserawmilk2015.pdf](http://www.dpo.go.th/wp-content/uploads/2013/12/Announcedpurchaserawmilk2015.pdf) [24 พฤษภาคม
2560]
- เกษตรและสหกรณ์, กระทรวง. กรมปศุสัตว์. เต้านมอักเสบ [ออนไลน์]. 2550. แหล่งที่มา:
<http://www.dld.go.th> [10 พฤษภาคม 2560]
- เกษตรและสหกรณ์, กระทรวง. กรมปศุสัตว์. มาตรฐานวิธีตรวจคุณภาพน้ำนมดิบ [ออนไลน์]. 2553.
แหล่งที่มา:
[http://km.dld.go.th/th/images/stories/document/division/qcontrol/documents
/std_chkmilk.pdf](http://km.dld.go.th/th/images/stories/document/division/qcontrol/documents/std_chkmilk.pdf) [17 พฤษภาคม 2560]
- เกษตรและสหกรณ์, กระทรวง. กรมปศุสัตว์. ศูนย์ปศุสัตว์อินทรีย์, 2553. การปรับเปลี่ยนการเลี้ยงโคนมสู่มาตรฐานปศุสัตว์อินทรีย์: 1-26.
- เกษตรและสหกรณ์, กระทรวง. สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. มกษ. 6003-
2553. มาตรฐานสินค้าเกษตร เรื่อง น้ำนมโคดิบ [ออนไลน์]. 2553. แหล่งที่มา:
http://www.acfs.go.th/standard/download/raw_cow_milk.pdf [9 มิถุนายน 2560]
- เกษตรและสหกรณ์, กระทรวง. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและ
แนวโน้มปี 2558 [ออนไลน์]. 2557. แหล่งที่มา:
<http://foodfti.com/Files/Name/CONTENT194225255881.pdf> [12 พฤษภาคม
2560]
- เกษตรและสหกรณ์, กระทรวง. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2559. สถิติการเกษตรของประเทศ
ไทย ปี 2559: 114-115.
- เกษตรและสหกรณ์, กระทรวง. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2559. สารสนเทศเศรษฐกิจ
การเกษตรรายสินค้า ปี 2559, เอกสารสถิติการเกษตรเลขที่ 402: 84

จตุพร วุฒิกนกกาญจน์. บทที่ 2 การวิเคราะห์พอลิเมอร์ด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโคปี [ออนไลน์].

2555. แหล่งที่มา:

<http://www.seem.kmutt.ac.th/research/pentec/download/MTT656-Chapter%20%20Polymer%20Spectroscopy.pdf> [25 ธันวาคม 2560]

ชมรมนมสร้างชาติ. ความมั่นคงด้านอาหารและโภชนาการ [ออนไลน์]. 2554. แหล่งที่มา:

<http://www.nutritionthailand.or.th/upload/docpath/Sym%207.3-วิเชียร%20ผลวิฒนสุข.pdf> [12 ธันวาคม 2559]

ชมรมนมสร้างชาติ. สถานการณ์กิจการโคนมไทย อดีต-ปี 2550 [ออนไลน์]. 2550. แหล่งที่มา:

<http://www.milkforthai.org/product/event.html> [18 มิถุนายน 2560]

เด่นพงษ์ สาข์อง, นัฐฐา ศิริเจริญไชย, ยุภา โอภาส และอุดม เจือจันทร์, 2554. ความสัมพันธ์ระหว่างฤดูกาล เซลล์โซมาติกและองค์ประกอบน้ำนมดิบในเขตพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างของประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ.2544-2552. จดหมายข่าวศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง ปีที่ 8 ฉบับพิเศษ (เดือนกุมภาพันธ์ 2554).

ทัศนีย์ ชมพูนันท์ และมนัสนันท์ ประสิทธิ์รัตน์, 2539. ใน มนยา เอกทัต, คู่มือการดูแลสุขภาพโคนม. สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ: ฟันนี้พับบลิจิง.

ธีรพงศ์ ธีรภัทรสกุล, 2542. การทบทวนเอกสารด้านสุขภาพเต้านมในโคนม โรคเต้านมอักเสบและการควบคุมคุณภาพน้ำนม. ประมวลสถานภาพองค์ความรู้ด้านสุขภาพโคนม. แนวทางการวิจัยและพัฒนาในอนาคต. กรุงเทพฯ: สำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย.

ธีรยุทธ วิไลวัลย์, วรวรรณ พันธมนาวิน. นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี [ออนไลน์].

2549. แหล่งที่มา:

http://www.chemistry.sc.chula.ac.th/crouse_info/2302265_04_TV/nmr-265.pdf [20 มิถุนายน 2560]

กลุ่มวิจัยและพัฒนาโคนม, สำนักพัฒนาพันธุ์สัตว์. กรมปศุสัตว์, 2553. พันธุ์โคนม [ออนไลน์].

แหล่งที่มา:<http://breeding.dld.go.th/dairy/index.php/dairy-breed>) [14 กรกฎาคม 2560]

- แม่น อมรสิทธิ์, อมร เพชรสม, ยูวดี เชี่ยววัฒนา, อทิตยา ศิริภิญญานนท์, ศรวิไล โอมอภิญญาณ และ อุมาร สุขม่วง, 2552. ใน หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ, นิวเคลียร์แมกโนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี, หน้า 206-308. กรุงเทพฯ: ชวนพิมพ์
- ยุทธ ไกรวรรณ, 2551. วิเคราะห์ข้อมูลวิจัย 4, หน้า 71. พิมพ์ครั้งที่ 1. ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ: บริษัทพิมพ์ดี จำกัด.
- เย็นหทัย แน่นหนา, 2549. สเปกโทรสโกปี สำหรับเคมีอินทรีย์, หน้า 175-326. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- วิทยา สุริยาสถาพร, 2559. สุขภาพฝูงโคนม การผลิตน้ำนมอย่างมีคุณภาพ. พิมพ์ครั้งที่ 1. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ศานต์ เศรษฐชัยมงคล และมยุรี เหลืองวิสัย, 2560. การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเมตาโบโลมิกส์ในการศึกษาข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของน้ำนมและผลิตภัณฑ์นม. วารสารเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม ปีที่ 12 ฉบับที่ 1 (มกราคม – ธันวาคม 2560).
- สุภมาส อังศุโชติ, สมถวิล วิจิตรวรรณ และ รัชนิกุล ภิญโญภาณุวัฒน์, 2551. สถิติวิเคราะห์สำหรับการวิจัยทางสังคมศาสตร์และพฤติกรรมศาสตร์เทคนิค การใช้โปรแกรม LISREL, หน้า 39-49. กรุงเทพฯ: มิสชั่น มีเดีย
- อ.ส.ค. (องค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย), 2552. คู่มือการเลี้ยงโคนม, หน้า 166. ศูนย์ถ่ายทอดเทคโนโลยี สำนักเทคโนโลยีการเลี้ยงโคนม อ.ส.ค.
- Akaram, N., Azhar, H., Chaudhary, Ahmad, S., Ghuman, M. A., Nawaz, G. and Hussain, S., 2013. Isolation of bacteria from mastitis affected bovine milk and their antibiogram. European Journal of Veterinary Medicine 2 (1): 38-46.
- Allen, M. S., 2000. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. Journal of Dairy Science 83: 1598-1624.
- Almeida, C., Duarte, I. F., Barros, A., Rodrigues, J., Spraul, M. and Gil, A. M., 2006. Composition of beer by ¹H NMR spectroscopy: effects of brewing site and date of production. Journal of Agriculture and Food Chemistry 54: 700-706.

- Atasever, S., Erdem, H. and Altop, A., 2010. Relationships between milk somatic cell count and pH in dairy cows. Journal of Animal and Veterinary Advances 9: 1575–1577.
- Atkins, P.W., 1998. Physical Chemistry (6th edn.), New York: Oxford University Press.
- Ballou, L. U., Pasquini, M., Bremel, R. D., Everson, T. and Dean, Somme, R. D., 1995. Factors affecting herd milk composition and milk plasmin at four levels of somatic cell counts. Journal of Dairy Science 78: 2186–2195.
- Barbano, D. M., Ma, Y. and Santos, M. V., 2006. Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life. Journal of Dairy Science 89: E15–E19.
- Barbano, D. M., Rasmussen, R. R. and Lynch, J. M., 1991. Influence of milk somatic-cell count and milk age on cheese yield. Journal of Dairy Science 74: 369–388
- Batavani, R. A., Asri, S. and Naebzadeh, H., 2007. The effect of subclinical mastitis on milk composition in dairy cows. Iranian Journal of Veterinary Research 8: 205–211.
- Beckonert, O., Keun, H. C., Ebbels, T. M., Bundy, J., Holmes, E., Lindon, J. C. and Nicholson, J. K., 2007. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. Nature Protocols 2: 2692–2703.
- Berning, L. M. and Shook, G. E., 1992. Prediction of Mastitis Using Milk Somatic Cell Count, N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase, and Lactose. Journal of Dairy Science 75: 1840–1848.
- Bhushan, J., 2000. Bovine Mastitis. Department of Veterinary Science Pennsylvania State University. USA.
- Bionaz, M. and Loor, J. J., 2008. Gene networks driving bovine milk fat synthesis during the lactation cycle. BMC Genomics 9: 366.
- Bloise, E., Cassali, G. D., Ferreira, M. C., Ciarmela, P., Petraglia, F. and Reis, F. M., 2010. Activin-related proteins in bovine mammary gland: localization and

- differential expression during gestational development and differentiation. Journal of Dairy Science 93: 4592–4601.
- Bogin, E. and Ziv, G., 1973. Enzymes and minerals in normal and mastitic milk. Cornell University College of Veterinary Medicine 63: 666-676.
- Bovey, F.A., 1988. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (2nd edn.), San Diego, California: Academic Press.
- Brantsaeter, A. L., Haugen, M., Rasmussen, S. E., Alexander, J., Samuelson, S. O., and Meltzer, H. M., 2007. Urine flavonoids and plasma carotenoids in the validation of fruit, vegetable and tea intake during pregnancy in the Norwegian Mother and Child Cohort Study (MoBa). Public Health and Nutrition 10: 838-847.
- Brotzman, R. L., Cook, N. B., Nordlund, K., Bennett, T. B., Rivas, A. G. and Doepfer, D., 2015. Cluster analysis of Dairy Herd Improvement data to discover trends in performance characteristics in large Upper Midwest dairy herds. Journal of Dairy Science 98: 3059–3070.
- Bruckmaier, R. M., Ontsouka, C. E. and Blum, J. W., 2004. Fractionized milk composition in dairy cows with subclinical mastitis. Journal of Veterinary Medicine 49: 283-290.
- Bytyqi, H., Zaugg, U., Sherifi, K., Hamidi, A., Gjonbalaj, M., Muji, S. and Mehmeti, H., 2010. Influence of management and physiological factors on somatic cell count in raw milk in Kosova. Veterinarski Archiv 80 (2): 173-183.
- Caplice, E. and Fitzgerald, G. F., 1999. Food fermentation: role of microorganisms in food production and preservation. International Journal of Food Microbiology 50: 131-149.
- Capozzi, F. and Bordoni, A., 2013. Foodomics: a new comprehensive approach to food and nutrition. Genes and Nutrition 8: 1–4.
- Capuco, A. V. and Akers, R. M., 1999. Mammary involution in dairy animals. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia 4: 137–144.

- Casado, B., Affolter, M. and Kussmann, M., 2009. OMICS-rooted studies of milk proteins, oligosaccharides and lipids. Journal of Proteomics 73: 196-208.
- Cervantes, A. P., Fernández, L. and Ponce, C. P., 2006. Characterization of lactation curves in production and major components of milk in different breeds and crosses in Mexican tropical conditions. Review of Cuba Sa. Animal 28 (2): 90–95.
- Choi, I. W. and I. J. Jeon., 1993. Patterns of Fatty Acids Released from Milk Fat by Residual Lipase During Storage of Ultra-High Temperature Processed Milk. Journal of Dairy Science 76: 78-85.
- Claeys, W. L., Verraes, C., Cardoen, S., De Block, J., Huyghebaert, A., Raes, K., Dewettinck, K. and Herman, L., 2014. Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits. Food Control 42: 188–201.
- Considine, T., Healy, A., Kelly, A. L. and McSweeney, P. L. H., 2004. Hydrolysis of bovine caseins by cathepsin B, a cysteine proteinase indigenous to milk. International Dairy Journal 14: 117–124.
- Coulon, J. B., Gasqui, P., Barnouin, J., Ollier, A., Pradel, P. and Pomies, D., 2002. Effect of mastitis and related-germ on milk yield and composition during naturally-occurring udder infections in dairy cows. Journal of Applied Animal Research 51: 383-393.
- Cunha, R. P. L., Molina, L. R., Carvalho, A. U., Facury, Filho, E. J., Ferreira, P. M. and Gentilini, M. B., 2008. Subclinical mastitis and relationship between somatic cell count with number of lactations, production and chemical composition of milk. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterináriae Zootecnia 60: 19–24.
- Daniels, K. M., Webb, K. E. J., McGilliard, M. L., Meyer, M. J., van Amburgh, M. E. and Akers, R. M., 2006. Effects of body weight and nutrition on mammary protein expression profiles in Holstein heifers. Journal of Dairy Science 89: 4276–4288.

- Davis, S. R., Farr, V. C., Prosser, C. G., Nicholas, G. D., Turner, S. A., Lee, J. and Hart, A. L., 2004. Milk L-lactate concentration is increased during mastitis. Journal of Dairy Research 71: 175–181.
- Dufour, S., Dohoo, I. R., Barkema, H. W., Des, Coteaux, L., Devries, T. J., Reyher, K. K., Roy, J. P., Scholl, D. T., 2012. Manageable risk factors associated with the lactational incidence, elimination, and prevalence of *Staphylococcus aureus* intramammary infections in dairy cows. Journal of Dairy Science 95: 1283-300.
- Dufour, S., Fréchette, A., Barkema, H. W., Mussell, A. and Scholl, D. T., 2011. Invited review: effect of udder health management practices on herd somatic cell count. Journal of Dairy Science 94: 563-79.
- Dürr, J. W., Cue, R. I., Monardes, H. G., Moro-Méndez, J. and Wade, K. M., 2008. Milk losses associated with somatic cell counts per breed, parity and stage of lactation in Canadian dairy cattle. Livestock Science 117: 225- 232.
- Ebbels, T. M. D. and De Iorio, M., 2011. Statistical data analysis in metabolomics. In Handbook of Statistical Systems Biology, John Wiley and Sons, Ltd: West Sussex, 163-180.
- Emwas, A. -H. M. S., 2015. The Strengths and Weaknesses of NMR Spectroscopy and Mass Spectrometry with Particular Focus on Metabolomics Research. In Metabonomics: Methods and Protocols. Bjerrum, J. T., ed. 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.
- Fernandes, A. M., Oliveira, C. A. F. and Lima, C.G., 2007. Effects of somatic cell counts in milk on physical and chemical characteristics of yoghurt. International Dairy Journal 17: 111-115.

- Fernando, R. S., Spahr, S. l. and Jaster, E. H., 1985. Comparison of electrical conductivity of milk with other indirect methods for detection of subclinical mastitis. Journal of Dairy Science 68: 449- 456.
- Forsbäck, L., Lindmark-Mansson, H., Andrén, A. and Svennersten-Sjaunja, K., 2009. Evaluation of quality changes in udder quarter milk from cows with low to moderate somatic cell count. Animal 4: 617–626.
- Frank, I. E. and Friedman, J. H., 1993. A statistical view of chemometrics regression tools. Technometrics 35: 109–148.
- Gueguen, L. and Pascal, G., 2010. An update on the nutritional and health value of organic foods. Cahiers de Nutrition et de Dietetique 45: 130–143
- Guha, A., Gera, S. and Sharma, A., 2012. Evaluation of milk trace elements, lactate dehydrogenase, alkaline phosphatase and aspartate aminotransferase activity of subclinical mastitis as and indicator of subclinical mastitis in riverine buffalo (*Bubalus bubalis*). Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 25: 353-360.
- Gunasekera, T. S., Veal, I. D. A. and Attfield, P. V., 2003. Potential for broad applications of flow cytometry and fluorescence techniques in microbiological and somatic cell analyses of milk. International Journal of Food Microbiology 85: 269-279.
- Gurbulak, K., Canooglu, E., Abay, M., Atabay, O. and Bekyurek, T., 2009. Determination of subclinical mastitis in dairy cows by different methods. Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, Kafkas University 15: 765-770.
- Halasa, T., Huijps, K., Osteras, O. and Hogeveen, H., 2007. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. Veterinary Quarterly 29: 18–31.
- Harding, F., 1995. Milk Quality. Blackie Academic and Professional; Chapman and Hall. Glasgow, UK. : 40-59.
- Harmon, R. J., 1994. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. Journal of Dairy Science 77: 2103-2112.

- Harmon, R. J., 2001. Somatic cell counts: A primer. In: Proc. National Mastitis Council Annual Meeting. Nevada State Journal: 11-14.
- Harmon, R. J., Eberhart, R. J., Jasper, D. E., Langlois, B. E., and Wilson, R. A., 1990. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection. National Mastitis Council.
- He, S., Ma, Y., Wang, J., Li, Q., Yang, X., Tang, S. and Li, H., 2011. Milk fat chemical composition of yak breeds in China. Journal of Food Composition and Analysis 24(2): 223-230.
- Hennighausen, L. and Robinson, G. W., 2005. Information networks in the mammary gland. Nature Reviews Molecular Cell Biology 6: 715-725.
- Henri, S., Christine, F., and François, B., 2003. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. Veterinary Research. 34(5): 475-491.
- 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.
- International Dairy Federation (IDF), 2005. Diagnostic potential of California Mastitis Test to detect subclinical mastitis 26. Maastricht, Netherlands: 15-19.
- Ito, H., Gonthier, M. P., Manach, C., Morand, C., Mennen, L., Remesy, C., and Scalbert, A., 2007. Polyphenol levels in human urine after intake of six different polyphenol-rich beverages. British Journal of Nutrition 94: 500-509.
- Ivanov, G. Y., Bilgucu, E., Ivanova, I. V., Uzatici, A. and Balabanova, T. B., 2016. Monitoring of the Somatic Cells Count for Improving Milk and Dairy Products Quality. Scientific Works of University of Food Technologies 63: 90-97.

- Jain, B., Tewari, A., Bhandari, B. B. and Jhala, M. K., 2012. Antibiotic resistance and virulence genes in *Streptococcus agalactiae* isolated from cases of bovine subclinical mastitis. Veterinarski arhiv 82: 423-432.
- Jenness, R. and Patton, S., 1959. Lactose, In Principles of Dairy Chemistry, John Wiley and Son, New York: 73-100.
- Josic, D. and Giacometti, J., 2013. Foodomics-use of integrated omics in nutrition, food technology and biotechnology. Journal of Data Mining in Genomics and Proteomics 4: 106.
- Karadžić, M. Ž., Jevrić, L. R., Mandić, A. I., Markov, S. L., Podunavac-Kuzmanović, S. O., Kovačević, S. Z., Nikolić, A. R., Oklješa, A. M., Sakač, M. N. and Penov-Gaši, K. M., 2017. Chemometrics Approach Based on Chromatographic Behavior, in Silico Characterization and Molecular Docking Study of Steroid Analogs with Biomedical Importance. European Journal of Pharmaceutical Sciences 105: 71-81.
- Karoui, R. and De Baerdemaeker, J., 2007. A review of the analytical methods coupled with chemometric tools for the determination of the quality and identity of dairy products. Food Chemistry 102: 621-640.
- Khan, M. Z. and Khan, A., 2006. Basic facts of mastitis in dairy animals: A review. Pakistan Veterinary Journal 26 (4): 204-208.
- Khate, K. and Yadav, B. R., 2010. Incidence of mastitis in Sahiwal cattle and Murrah buffaloes of a closed organized herd. Indian Journal of Animal Sciences 80 (5): 467-469.
- Kim, J. O. and Mueller, C. W., 1978. Factor Analysis: statistical methods and practical issues. Thousand Oaks (CA): Sage Publications
- Kitchen, B. J., 1981. Review of progress of dairy science: bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. Journal of Dairy Research 48: 167-188.

- Larsen, M. K., Nielsen, J. H., Butler, G., Leifert, C., Slots, T., Kristiansen, G. H. and Gustafsson, A. H., 2010. Milk quality as affected by feeding regimens in a country with climatic variation. Journal of Dairy Science 93(7): 2863-2873.
- 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 $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy as an analytical tool for methylamine metabolites in urine. Clinica Chimica Acta 365: 264-269.
- Li, S. S., Shen, J. S., Ren, D. X. and Liu, J. X., 2015. Effects of the processing methods of corn grain and soybean meal on milk protein expression profiles in dairy cows. Animal 9: 267-274.
- Lindon, J. C., 2017. NMR Spectrometers, In Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (2nd edn.), pp. 224-231. Oxford: Academic Press.
- Ma, Y., Ryan, C., Barbano, D. M., Galton, D. M., Rudan, M. and Boor, K., 2000. Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. Journal of Dairy Science 83: 264-274.
- Madara, J. L., 1988. Tight junction dynamics: Is paracellular transport regulated? Cell 53: 497-498.
- Mansor, R., 2012. Proteomic and metabolomic studies on milk during bovine mastitis. PhD Thesis. Institute of Infection Immunity and Inflammation Life Sciences, College of Medical, Veterinary & Life Sciences, University of Glasgow, UK.
- Marti, G. E., Stetler-Stevenson, M., Blessing, J. J. and Fleisher, T. A., 2001. Introduction to Flow Cytometry. Sem Hematology 38 (2): 93-9.
- McManaman, J. L. and Neville, M. C., 2003. Mammary physiology and milk secretion. Advanced Drug Delivery Reviews 55 (5): 629-641.

- McManaman, J. L., Reyland M. E. and Thrower E. C., 2006. Secretion and fluid transport mechanisms in the mammary gland: comparisons with the exocrine pancreas and the salivary gland. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia 11 (3–4): 249–68.
- Mennen, L. I., Sapinho, D., Ito, H., Bertrais, S., Galan, P., and Hercberg, S., 2007. Urinary flavonoids and phenolic acids as biomarkers of intake for polyphenol-rich foods. British Journal of Nutrition 96: 191-198.
- Middleton, J. R., Luby, C.D., Viera, L., Tyler, J.W. and Casteel, S., 2004. Short communication: Influence of *Staphylococcus aureus* intramammary infection on serum copper, zinc and iron concentrations. Journal of Dairy Science 87: 976-979.
- Mobasher A. and Barrett-Jolley R., 2014. Aquaporin water channels in the mammary gland: from physiology to pathophysiology and neoplasia. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia 19: 91–102.
- Moyes, K. M., Larsen, T., Friggens, N. C., Drackley, J. K. and Ingvarsen, K. L., 2009. Identification of potential markers in blood for the development of subclinical and clinical mastitis in dairy cattle at parturition and during early lactation. Journal of Dairy Science 92: 5419–5428.
- Munro, G. L., Grieve, P. A. and Kitchen, B. J., 1984. Effects of mastitis on milk yield, milk composition, processing properties and yield and quality of milk products. Australian Journal of Dairy Technology 39: 7-16
- Murphy, S. C., Martin, N. H., Barbano, D. M. and Wiedmann, M., 2016. Influence of raw milk quality on processed dairy products: How do raw milk quality test results relate to product quality and yield? Journal of Dairy Science 99: 10128–10149.
- Neville, M. C., 1995. Sampling and storage of human milk. In: Jensen RG, editor. Handbook of Milk Composition, pp. 63–79. San Diego: Academic Press.
- Nunez, R., 2001. Introduction to the Field of Cytometry and its Importance in Biomedicine. Current Issues in Molecular Biology 3 (2): 37-38.

- Olde Riekerink, R. G. M., Barkema H. W. and Stryhn H. W., 2007. The effect of season on somatic cell count and the incidence of clinical mastitis. Journal of Dairy Science 90: 1704-1715.
- Olde Riekerink, R. G. M., Barkema, H. W., Veenstra, W., Berg, F. E., Stryhn, H. and Zadoks R. N., 2007. Somatic cell count during and between milkings. Journal of Dairy Science 90, 3733-3741.
- Olson, K. R., Anderson, I. B., Benowitz, N. L., Blanc, P. D., Clark, R. F., Kearney, T. E., Kim-Katz, S. Y. and Wu, A. H. B., 2004. Poisoning & drug overdose. The California Poison Control System (5th edn.), New York: McGraw-Hill.
- Owens, M. A. and Loken, M. R., 1995. Flow Cytometry: Principles for Clinical Laboratory Practice, pp. 288. New York: Wiley-Liss.
- Philpot, W. N., 2003. A backward glance- A forward look. In: Proc. 42nd The National Mastitis Council, Inc., Annual Meeting, pp. 144-155. Texas: USA
- Politis, I., and Ng-Kwai-Hang, K. F., 1988. Effects of somatic cell count on milk composition and cheese making efficiency. Journal of Dairy Science 71: 1711-1719
- Putri, S. P., Yamamoto, S., Tsugawa, H., and Fukusaki, E., 2013. Current metabolomics: technological advances. Journal of Bioscience and Bioengineering 116: 9-16.
- Ren, S., Hinzman, A. A., Kang, E. L., Szczesniak, R. D., and Lu, L. J., 2015. Computational and statistical analysis of metabolomics data. Metabolomics 11(6): 1492-1513.
- Santos, M. V., Ma, Y. and Barbano, D. M., 2003. Effect of somatic cell count on proteolysis and lipolysis in pasteurized fluid milk during shelf-life storage. Journal of Dairy Science 86: 2491-2503.
- Sargeant, J. M., Leslie, K. E., Shirley, J. E., Pulkrabek, B. J. and Lim, G. H., 2001. Sensitivity and specificity of somatic cell count and California mastitis test for

- identifying intramammary infection in early lactation. Journal of Dairy Science 84: 2018–2024.
- Schalm, O. W. and Noorlander, D., 1957. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. Journal of the American Veterinary Medical Association 130: 199–204.
- Schukken, Y. H., González, R. N., Tikofsky, L. L., Schulte, H. F., Santisteban, C. G., Welcome, F. L., Bennett, G. J., Zurakowski, M. J. and Zadoks, R. N., 2009. CNS mastitis: nothing to worry about? Veterinary Microbiology 134: 9-14.
- Sena, D. S. and Sahmani, M. S., 2001. pH as an indicator for detecting mastitis in camels. Indian Journal of Animal Sciences 71: 442-443.
- 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.
- Sharif, A. and Muhammad, G., 2008. Somatic cell count as an indicator of udder health status under modern dairy production: a review. Pakistan Veterinary Journal 28: 194–200
- 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.
- Stefanov, I., Vlaeminck, B. and Fievez, V., 2010. A novel procedure for routine milk fat extraction based on dichloromethane. Journal of Food Composition and Analysis 23: 852-855.

- 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.
- Sun, H. Z., Shi, K., Wu, X. H., Xue, M. Y., Wei, Z. H., Liu, J. X., and Liu, H. Y., 2017. Lactation-related metabolic mechanism investigated based on mammary gland metabolomics and 4 biofluids' metabolomics relationships in dairy cows. BMC Genomics 18:936
- Sundekilde, U. K., Larsen, L. B. and Bertram, H. C., 2013. NMR-Based Milk Metabolomics. Metabolites 3: 204-222.
- Sundekilde, U. K., Poulsen, N., Larsen, L. B. and Bertram, H. C., 2013. Nuclear magnetic resonance metabolomics reveals strong association between milk metabolites and somatic cell count in bovine milk. Journal of Dairy Science 96: 290–299.
- 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.
- Thomas, F. C., 2015. Acute phase proteins, proteomics and metabolomics in the diagnosis of bovine mastitis. PhD Thesis, Institute of Biodiversity, Animal Health and Comparative Medicine, College of Veterinary, Medical and Life Sciences, University of Glasgow, UK.
- Verardo, V., Gómez-Caravaca, A. M., Arráez-Román, D. and Hettinga, K., 2017. Recent Advances in Phospholipids from Colostrum, Milk and Dairy By-Products. International Journal of Molecular Sciences 18 (1): 173.
- Viguier, C., Arora, S., Gilmartin, N., Welbeck, K. and O’Kennedy, R., 2009. Mastitis detection: current trends and future perspectives. Trends in Biotechnology 27 (8): 486-493.

- Vijayalakshmi, P., Prathaban, S. and Dhanapalan, P., 2001. Comparative study on the efficacy of diagnostic tests in the field diagnosis of bovine mastitis. Indian Veterinary Journal 78: 4-6.
- Walstra, P., Jenness, R. and Badings, H. T., 1984. Dairy Chemistry and Physics, pp. 279–289. Wiley, New York.
- Walstra, P., Wouters, J. T. M. and Geurts, T. J., 2005. Dairy Science and Technology. Boca Raton, FL, USA: CRC Press: 497-512.
- Wang, Y., Gao, Y., Xia, C., Zhang, H., Qian, W. and Cao, Y., 2016. Pathway analysis of plasma different metabolites for dairy cow ketosis. Italian Journal of Animal Science 15 (3): 545-51.
- Watson, C. J. and Khaled, W. T., 2008. Mammary development in the embryo and adult: a journey of morphogenesis and commitment. Development 135: 995–1003.
- Wattiaux, M. A., 1996. Milk secretion in the udder of a dairy cow. Dairy Essentials 77–80. Available from:
http://babcock.wisc.edu/sites/default/files/de/en/de_20.en.pdf [2016, June 6]
- Whyte, D., Walmsley, M., Liew, A., Claycomb, R. and Mein, G., 2005. Chemical and rheological aspects of gel formation in the California Mastitis Test. Journal of Dairy Research 72: 115–121.
- Wu, J. Y., Delwiche, M. J., Cullor, J. and Smith, W., 2005. Deoxyribonucleic Acid Sensor for the Detection of Somatic Cells in Bovine Milk. Biosystems Engineering 90 (2): 143-151.
- 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.

- Yi, L., Dong, N., Yun, Y., Deng, B., Ren, D., Liu, S., and Liang, Y., 2016. Chemometric methods in data processing of mass spectrometry-based metabolomics: A review. *Analytica Chimica Acta* 914: 17-34.
- Yves Le, R., François, L. and Fatima, M., 2003. Polymorphonuclear proteolytic activity and milk composition change. *Veterinary Research* 34(5): 629-645.
- Zagorska, J. and Ciprovica, I., 2008. The chemical composition of organic and conventional milk in Latvia. Proc. 3rd Baltic Conference on Food Science and Technology. (FOODBALT-2008). Latvia University of Agriculture Faculty of Food Technology: 10-14.
- Zhang, J., Liu, L., Mu J., Yang, T., Zheng, N. and Dong, H., 2015. Chemical Analysis in the Corpus Callosum Following Traumatic Axonal Injury using Fourier Transform Infrared Microspectroscopy: A Pilot Study. *Journal of Forensic Sciences* 60: 3268–3275.
- Zhao, F. Q. and Keating, A. F., 2007. Expression and regulation of glucose transporters in the bovine mammary gland. *Journal of Dairy Science* 90 (Suppl. 1): E76–E86.





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

การตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมีและปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบ

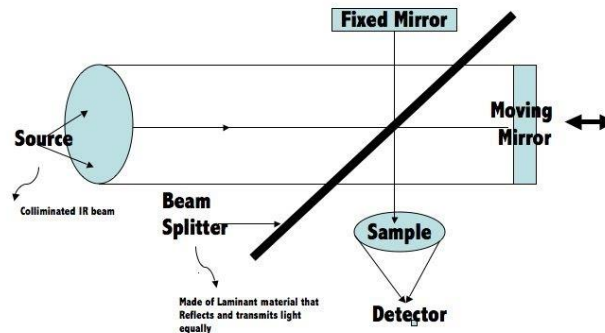
นำตัวอย่างน้ำนมดิบทั้งหมด 9 ตัวอย่าง มาตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมีและปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบ ด้วยเครื่อง CombiFoss™ FT+ (FOSS, Hilleroed, Denmark) จะประกอบด้วย 2 เครื่องหลัก คือ เครื่อง MilkoScan™ FT+ analyzer และ Fossomatic™ FC ภายใต้คำแนะนำของเจ้าหน้าที่กลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม (สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ จ.ปทุมธานี)

ก1 การตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมี

องค์ประกอบทางเคมีในน้ำนม ได้แก่ ไขมัน โปรตีน แลคโตส ของแข็งไม่รวมไขมันนม และของแข็งทั้งหมด ตรวจวัดด้วยเครื่อง MilkoScan™ FT+ analyzer โดยใช้เทคนิค fourier transform infrared (FTIR)

หลักการ fourier transform infrared spectrometer (ftir) เป็นเทคนิคการกระตุ่นสารด้วยพลังงานแสงช่วงแสงอินฟราเรด (infrared light) โดยอาศัยหลักการของการดูดกลืนคลื่นรังสีช่วงกลางอินฟราเรด (middle infrared region) ประมาณ $1,000-5000 \text{ cm}^{-1}$ เป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่สามารถบอกหมู่ฟังก์ชันในสาร (Zhang et al., 2015) โดยทำการตรวจวัดการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดของตัวอย่างที่มีความถี่ต่างๆ ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของแต่ละพันธะ นิยมใช้เป็นเทคนิคสำหรับหาเกี่ยวกับโครงสร้างของสารอินทรีย์ (Karoui and De Baerdemaeker, 2007) โดยส่วนประกอบของเครื่องประกอบด้วย แหล่งกำเนิดรังสีอินฟราเรด moving mirror และ fixed mirror เป็นกระจกเงาที่สามารถสะท้อนรังสีอินฟราเรด beam splitter เป็นส่วนที่จะทำการแยกอินฟราเรดที่ผ่านเข้ามาให้เป็นสองส่วนคือ สามารถให้แสงทะลุผ่านได้ร้อยละ 50 และจะสะท้อนกลับร้อยละ 50 เมื่อแสงกระทบตัวอย่าง จะมี detector ใช้อัดความเข้มแสงที่เหลือจากการดูดกลืนของตัวอย่าง (จตุพร วุฒิกนกกาญจน์, 2555)

Fourier-Infrared Spectroscopy



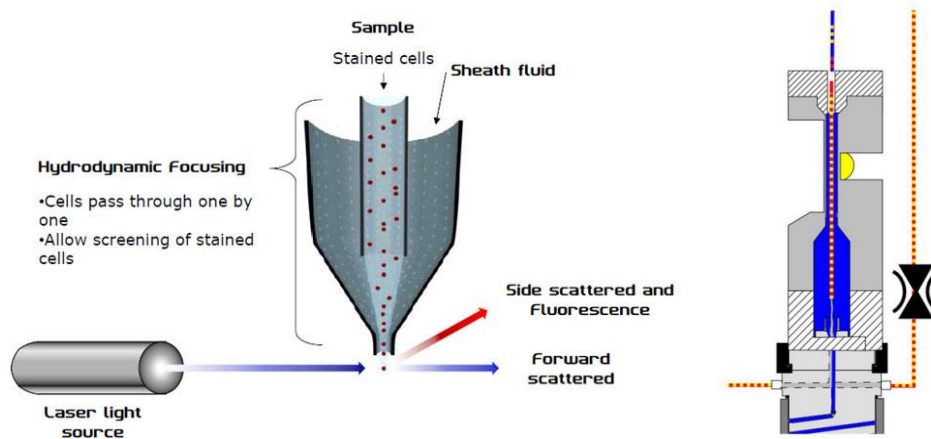
ภาพที่ ก1.1 หลักการ fourier transform infrared spectrometer (FTIR)

ก2 การตรวจวัดปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบ

การตรวจวัดปริมาณโซมาติกเซลล์ในห้องปฏิบัติการ เป็นการยืนยันจำนวนโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบ หลังจากผ่านการประเมินด้วย น้ายา CMT เนื่องจากการตรวจวัดปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบด้วย น้ายา CMT เป็นเพียงแค่การประเมินเบื้องต้นเท่านั้น ในงานวิจัยนี้จะตรวจวัดปริมาณโซมาติกเซลล์ ด้วยเครื่อง FossomaticTM FC โดยใช้เทคนิค flow cytometry (Owens and Loken, 1995)

หลักการของเทคนิค flow cytometry คือ การส่งผ่านตัวอย่างน้ำนมดิบในลักษณะเป็น thin string โดยมี sheath liquid เป็นตัวพาทำให้โซมาติกเซลล์ถูกเรียงตัวเป็นระเบียบก่อนที่จะส่งผ่านไปยัง flow cell โดยน้ำนมจะถูกย้อมด้วย ethidium bromide ซึ่งจะย้อมโมเลกุล DNA ในโซมาติกเซลล์ (Marti et al., 2001; Gunasekera et al., 2003) เมื่อตัวอย่างน้ำนมไหลผ่านลำแสงเลเซอร์ แสงที่กระทบตัวอย่างน้ำนมจะเกิดการหักเหเป็น 2 ทิศทาง ในตัวเครื่องจะมีตัวรับการหักเหของแสงเรียกว่า "detector" ซึ่งจะวัดค่าการหักเหของแสงเป็นมุมแคบทางด้านหน้าทำให้สามารถหาขนาดของเซลล์ได้ (forward scatter, fsc) และวัดค่าการหักเหของแสงที่สะท้อนออกจากเซลล์ซึ่งจะทำให้สามารถวัดส่วนประกอบภายในเซลล์ได้ (side scatter, SSC) โมเลกุลที่ถูกย้อม เมื่อกระทบเข้ากับแสงเลเซอร์ก็จะดูดซับพลังงานจากแสงเลเซอร์และเกิดการเปล่งแสงออกมาเป็นสีต่างๆ เรียกว่า fluorescence (FL) จากนั้นเครื่องก็จะเปลี่ยนสัญญาณแสงให้กลายเป็นสัญญาณไฟฟ้าและส่งข้อมูลไปยังเครื่องคอมพิวเตอร์เพื่อประมวลผลออกมา ซึ่งการทำงานของเครื่อง fossomatic สามารถวัดได้

ถึง 500 ตัวอย่างต่อชั่วโมง ดังนั้น เทคนิค flow cytometry มีข้อดีเมื่อเทียบกับกล้องจุลทรรศน์แบบดั้งเดิม คือ ช่วยให้สามารถวิเคราะห์จำนวนเซลล์ได้มากขึ้นในเวลาอันสั้น สามารถให้จำนวนเซลล์โชมaticที่แม่นยำและรวดเร็วสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคต้านมะเร็ง (Nunez, 2001) แต่มีราคาแพงมาก จึงไม่เป็นที่นิยมในระบบบริดนมออนไลน์ (Wu et al., 2005)

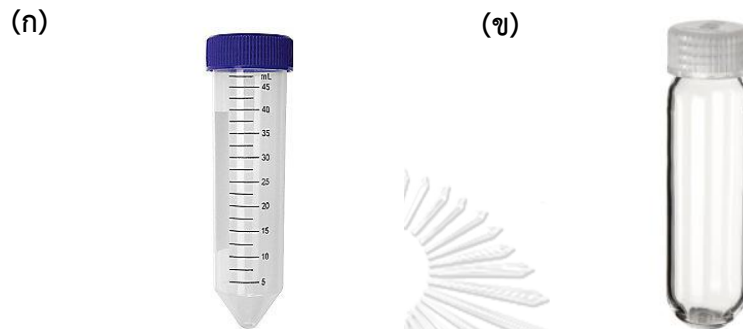


ภาพที่ ก1.2 หลักการของเทคนิค flow cytometry

ภาคผนวก ข

การทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์ (validation of methods)

ข1 การทดสอบความทนทานของหลอด centrifuge ระหว่าง หลอดที่ผลิตจาก polypropylene (PP) และ fluorinated ethylene propylene (FEP)



ภาพที่ ข1.1 (ก) หลอด centrifuge ผลิตจาก polypropylene (PP) และ (ข) fluorinated ethylene propylene (FEP)

ก) หลอดที่ผลิตจาก polypropylene (PP) (Nunc™, Thermo Fisher Scientific, USA) ขนาด 50 มิลลิลิตร มีค่าแรงเหวี่ยงสัมพัทธ์ (relative centrifugal force: RCF) สูงสุดคือ 17,000 xg

ข) หลอดที่ผลิตจาก fluorinated ethylene propylene (FEP) (Nalgene®, Thermo Scientific, USA) ขนาด 50 มิลลิลิตร มีค่าแรงเหวี่ยงสัมพัทธ์ (relative centrifugal force: RCF) สูงสุดคือ 50,000 xg

ข2 การทดสอบวิเคราะห์สารตัวอย่างมาตรฐาน

ข2.1 การคำนวณความเข้มข้นของสารตัวอย่างมาตรฐาน ให้มีความเข้มข้น 10 mM ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

- Citric acid ($C_6H_8O_7$)

มีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) = 192.123 กรัมต่อโมล

$$1 \text{ mM in } 10 \text{ mL} = \frac{0.192 \times 10}{1000} = 0.00192 \text{ กรัม}$$

$$\text{จะได้ } 10 \text{ mM in } 10 \text{ mL} = 10 \times 0.00192 = 0.0192 \text{ กรัม}$$

- Sodium acetate ($C_2H_3NaO_2$)

มีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) = 82.034 กรัมต่อโมล

$$1 \text{ mM in } 10 \text{ mL} = \frac{0.082 \times 10}{1000} = 0.00082 \text{ กรัม}$$

$$\text{จะได้ } 10 \text{ mM in } 10 \text{ mL} = 10 \times 0.00082 = 0.0082 \text{ กรัม}$$

- Lactic acid ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$)

มีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) = 90.08 กรัมต่อโมล

$$1 \text{ mM in } 10 \text{ mL} = \frac{0.090 \times 10}{1000} = 0.0009 \text{ กรัม}$$

$$\text{จะได้ } 10 \text{ mM in } 10 \text{ mL} = 10 \times 0.0009 = 0.009 \text{ กรัม}$$

- Formic acid (CH_2O_2)

มีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) = 46.025 กรัมต่อโมล

$$1 \text{ mM in } 10 \text{ mL} = \frac{0.046 \times 10}{1000} = 0.00046 \text{ กรัม}$$

$$\text{จะได้ } 10 \text{ mM in } 10 \text{ mL} = 10 \times 0.00046 = 0.0046 \text{ กรัม}$$

- Glutamine ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$)

มีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) = 146.15 กรัมต่อโมล

$$1 \text{ mM in } 10 \text{ mL} = \frac{0.146 \times 10}{1000} = 0.00146 \text{ กรัม}$$

$$\text{จะได้ } 10 \text{ mM in } 10 \text{ mL} = 10 \times 0.00146 = 0.0146 \text{ กรัม}$$

- Tryptophan ($\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$)

มีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) = 204.229 กรัมต่อโมล

$$1 \text{ mM in } 10 \text{ mL} = \frac{0.204 \times 10}{1000} = 0.00204 \text{ กรัม}$$

$$\text{จะได้ } 10 \text{ mM in } 10 \text{ mL} = 10 \times 0.00204 = 0.0204 \text{ กรัม}$$

- Hydroxyproline ($\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_3$)

มีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) = 131.131 กรัมต่อโมล

$$1 \text{ mM in } 10 \text{ mL} = \frac{0.131 \times 10}{1000} = 0.00131 \text{ กรัม}$$

$$\text{จะได้ } 10 \text{ mM in } 10 \text{ mL} = 10 \times 0.00131 = 0.0131 \text{ กรัม}$$

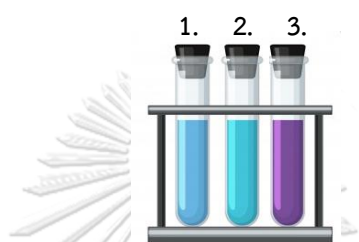
- Norvaline ($\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2$)

มีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) = 117.148 กรัมต่อโมล

$$1 \text{ mM in } 10 \text{ mL} = \frac{0.117 \times 10}{1000} = 0.00117 \text{ กรัม}$$

$$\text{จะได้ } 10 \text{ mM in } 10 \text{ mL} = 10 \times 0.00117 = 0.0117 \text{ กรัม}$$

ข.2.2 การเตรียมตัวอย่างสารตัวอย่างมาตรฐานก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย proton nuclear magnetic resonance ($^1\text{H-NMR}$)



โดยในการศึกษานี้ แบ่งออกเป็น 3 ตัวอย่าง คือ

ตัวอย่างที่ 1 คือ ฟอสเฟตบัพเฟอร์ ปริมาตร 800 ไมโครลิตร

ตัวอย่างที่ 2 คือ ตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากการเตรียมตัวอย่างผสมกับฟอสเฟตบัพเฟอร์ที่เตรียมไว้ ในอัตราส่วน 1: 1 (v/v) ซึ่งในการศึกษานี้จะใช้ตัวอย่างปริมาตร 400 ไมโครลิตรและฟอสเฟตบัพเฟอร์ 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

ตัวอย่างที่ 3 คือ ตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากการเตรียมตัวอย่างผสมกับสารละลายของสารตัวอย่างมาตรฐานและฟอสเฟตบัพเฟอร์ที่เตรียมไว้ ในอัตราส่วน 1:1:2 (v/v) ซึ่งในการศึกษานี้จะใช้ตัวอย่างปริมาตร 200 ไมโครลิตร สารละลายของสารตัวอย่างมาตรฐาน 200 ไมโครลิตร และฟอสเฟตบัพเฟอร์ 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

ภาคผนวก ค

การเตรียมตัวอย่างน้ำนมดิบก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$

ค1 การเตรียมความพร้อมก่อนการใช้งานของ microcentrifuge (Nanosep® Centrifugal Device)

นำ microcentrifuge (Nanosep® Centrifugal Device) มีผ่านรุกรองขนาดอนุภาค 3 กิโลดาลตัน มาเตรียมความพร้อมก่อนการใช้งาน เนื่องจากบริเวณรุกรองอาจจะมี glycerin เคลือบอยู่ โดยจะใส่ น้ำ Milli-Q 500 ไมโครลิตร และปั่นเหวี่ยงที่ 13,800 $\times g$ จำนวน 5 ครั้ง โดยครั้งที่ 1-4 จะปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และครั้งสุดท้ายจะปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเปิด 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

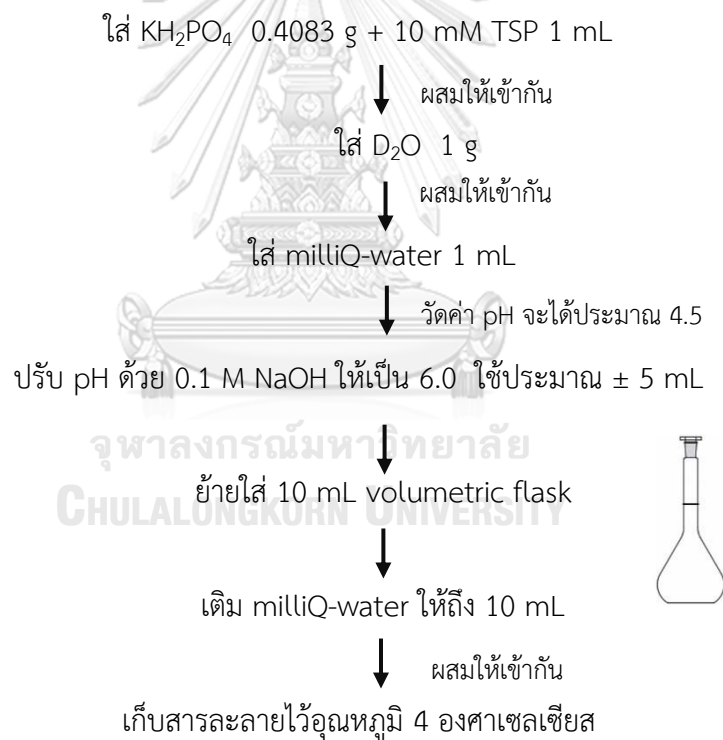
น้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) ของ KH_2PO_4 คือ 136.086 กรัมต่อโมล

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

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

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. ใส่ 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
การเก็บตัวอย่างน้ำนมดิบ

ฟาร์มโคนมของเกษตรกร

ภายใต้การให้คำปรึกษาจากผู้เชี่ยวชาญด้านการส่งเสริมการเลี้ยงโคนมจากองค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย (อ.ส.ค.) และเจ้าหน้าที่สหกรณ์โคนมไทย – เดนมาร์ก (มิตรภาพ)

ง1 ฟาร์มที่ 1 สุขชาติฟาร์ม

เจ้าของฟาร์ม นายสุชาติ สุวรรณทอง

ที่อยู่ 20 หมู่ 5 ต.มิตรภาพ อ.มวกเหล็ก จ.สระบุรี 18180



ง2 ฟาร์มที่ 2 คำแพงฟาร์ม

เจ้าของฟาร์ม นางแพง คำภีระ

ที่อยู่ 72 หมู่ 5 ต.มิตรภาพ อ.มวกเหล็ก จ.สระบุรี 18180



ง3 ฟาร์มที่ 3 เกิดศิริฟาร์ม

เจ้าของฟาร์ม นางทวี เกิดศิริ

ที่อยู่ 44/3 หมู่ 4 ต.พญาเย็น อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30320



ภาคผนวก จ

ข้อมูลโภชนาการ (nutrition facts) ของผลิตภัณฑ์นมทางการค้าในประเทศไทย

ตารางที่ จ1 แสดงข้อมูลโภชนาการของผลิตภัณฑ์นมทางการค้าในประเทศไทย คือ นมพาสเจอร์ไรส์ นมยูเอชที นมออร์แกนิก ของตราสินค้า A นมพาสเจอร์ไรส์ นมยูเอชที และนมพรีเมียม ของตราสินค้า B และปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของนมฮอกไกโดของตราสินค้า C

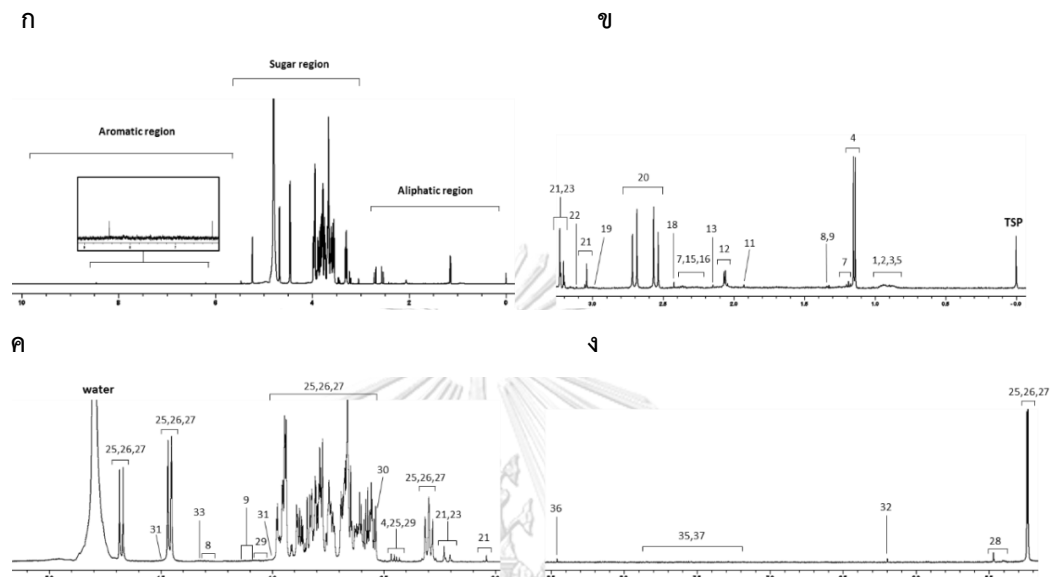
ตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์นม	ตราสินค้า A			ตราสินค้า B			ตราสินค้า C
	พาสเจอร์ไรส์ (pasteurized)	ยูเอชที (UHT)	ออร์แกนิก (organic)	พาสเจอร์ไรส์ (pasteurized)	ยูเอชที (UHT)	พรีเมียม (premium)	นมฮอกไกโด (Hokkaido- labeled milk)*
ไขมันทั้งหมด	6 ก.	10 ก.	7 ก.	8 ก.	8 ก.	9 ก.	4.30±0.10 %
ไขมันอิ่มตัว	6 ก.	6 ก.	4 ก.	5 ก.	6 ก.	5 ก.	
โคเลสเตอรอล	15 มก.	35 มก.	25 มก.	25 มก.	25 มก.	30 มก.	
โปรตีน	5 ก.	10 ก.	6 ก.	6 ก.	7 ก.	7 ก.	3.03±0.06 %
คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด	9 ก.	9 ก.	9 ก.	10 ก.	11 ก.	11 ก.	
ใยอาหาร	0 ก.	2 ก.	0 ก.	0 ก.	0 ก.	0 ก.	
น้ำตาล	6 ก.	7 ก.	9 ก.	9 ก.	10 ก.	11 ก.	5.03±0.15 %
โซเดียม	65 มก.	100 มก.	80 มก.	130 มก.	95 มก.	105 มก.	

หมายเหตุ : * หมายถึง แสดงค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานขององค์ประกอบทางเคมีของนมฮอกไกโดของตราสินค้า C จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MilkoScan™ FT+ analyzer (FOSS, Hilleroed, Denmark)

ภาคผนวก ฉ

การประมวลผลโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุล

ฉ1 การประมวลผลโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของผลิตภัณฑ์นมทางการค้าในประเทศไทย



ภาพที่ ฉ1 การระบุตำแหน่งข้อมูลของสารเมตาบอไลต์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ ของผลิตภัณฑ์นมทางการค้าในประเทศไทย (ก) ภาพขยายในช่วง Aliphatic region (ข), ภาพขยายในช่วง Sugar region (ค), และภาพขยายในช่วง Aromatic region (ค)

, 1:Valerate and derivatives 2:Isoleucine 3:Hydroxybutyrate 4:Propylene glycol 5:Leucine 6:Valine 7:Ethanol 8:Threonine 9:Lactate 10:Alanine 11:Acetate 12:N-acetylglucosamine 13:Butyrate 14:Acetone 15:Acetoacetate 16:Proline 17:Pyruvate 18:Succinate 19:Oxoglutarate 20: Citrate 21:Creatinine and Creatine 22:Dimethyl sulfone 23: Choline and derivatives 24:Betaine 25:Glucose 26:Galactose 27:Lactose 28:Sugar residue 29:Sucrose 30:Glycine 31:Ascobate 32:Maleate 33:Glycerophosphocholine 34:N-acetylamino acid 35:Amino acid residue 36:Formate 37:Hippurate

ตารางที่ ๑ 1 ปริมาณสัมพัทธ์ของสารเมตาบอไลต์ของผลิตภัณฑ์นมทางการค้าในประเทศไทย 7 ตัวอย่าง

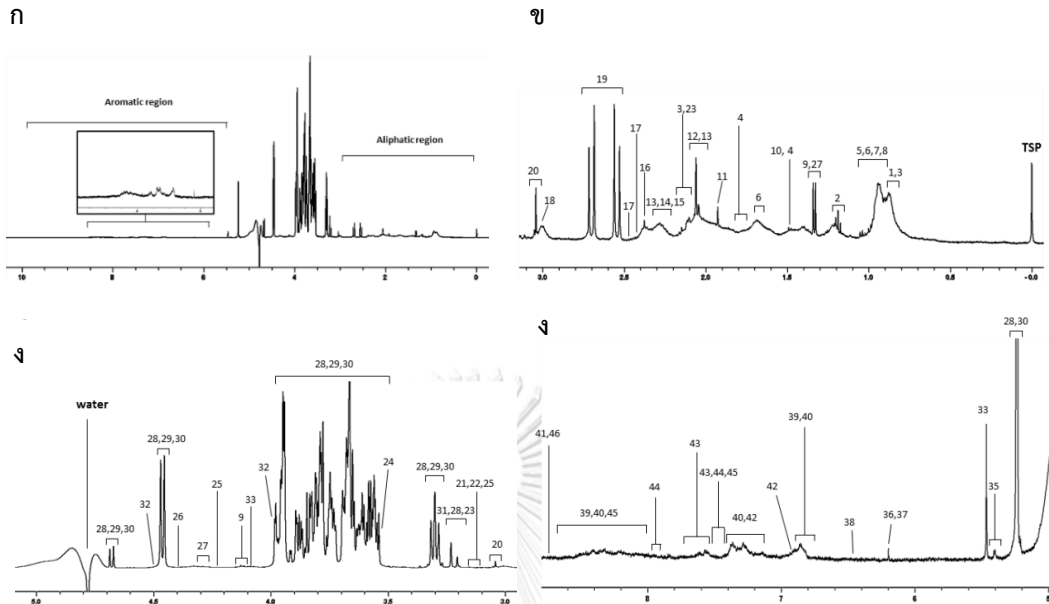
สารประกอบเคมี	กลุ่ม	สารเมตาบอไลต์	ผลิตภัณฑ์นมทางการค้า 7 ตัวอย่าง						
			Past. A	UHT A	Organic A	Past. B	UHT B	Premium B	Hokkaido-labeled C
กรดอะมิโนและอนุพันธ์		alanine	6.82±0.08 ^a	6.81±2.24 ^{ab}	6.89±0.02 ^{abc}	6.97±0.021 ^{abcd}	6.24±0.028 ^{bcd}	6.98±0.06 ^{cd}	7.08±0.06 ^d
		amino acid residue	7.44±0.08 ^c	7.39±2.40 ^b	7.62±0.06	7.34±0.01 ^{ab}	7.34±0.04 ^a	7.37±0.01 ^{ab}	7.46±0.09 ^c
		creatinine and creatinine	8.18±0.01 ^a	8.14±2.67 ^a	8.15±0.017 ^a	8.29±0.02 ^b	8.57±0.02 ^c	8.66±0.02 ^d	8.65±0.08 ^d
		isoleucine	7.67±0.00 ^d	7.47±2.51 ^{ab}	7.76±0.016 ^e	7.45±0.03 ^b	7.37±0.05 ^a	7.55±0.02 ^c	7.64±0.05 ^d
		leucine	7.68±0.02 ^d	7.39±2.50 ^a	7.77±0.034 ^d	7.45±0.01 ^b	7.49±0.02 ^b	7.59±0.02 ^c	7.55±0.02 ^c
		N-acetylamino acid ^{ns}	8.15±0.07	8.14±2.76	8.14±0.01	8.14±0.02	8.18±0.02	8.17±0.01	8.13±0.13
		phenylalanine	6.70±0.04 ^{ab}	6.68±2.21 ^{ab}	6.68±0.07 ^{ab}	6.70±0.03	6.66±0.04 ^{ab}	6.64±0.03 ^a	6.74±0.03 ^b
		proline	7.21±0.08 ^a	7.14±2.36 ^a	7.20±0.03 ^a	7.18±0.05 ^a	7.16±0.04 ^a	7.29±0.04 ^b	7.31±0.01 ^b
		threonine	7.26±0.00 ^c	7.07±2.38 ^a	8.20±0.03 ^d	7.24±0.02 ^c	7.31±0.02 ^c	7.17±0.08 ^b	7.24±0.03 ^c
		tyrosine	6.79±0.07 ^{cd}	6.78±2.24 ^{cd}	6.84±0.04 ^d	6.68±0.02 ^a	6.69±0.03 ^{ab}	6.76±0.05 ^{bc}	6.77±0.07 ^c
	valine	7.56±0.01 ^c	7.30±2.42 ^a	7.54±0.01c	7.31±0.05 ^a	7.43±0.04 ^{ab}	7.47±0.04 ^{bc}	7.54±0.05 ^c	
คาร์โบไฮเดรตและอนุพันธ์		acetone	6.51±0.10 ^a	6.49±2.14 ^{bc}	6.48±0.09 ^{bc}	6.38±0.09 ^{abc}	6.35±0.05 ^{ab}	6.26±0.16 ^a	6.56±0.09 ^c
		dihydroxyacetone	8.03±0.06 ^b	7.90±2.64 ^a	7.93±0.05a ^b	7.95±0.05 ^{ab}	7.99±0.05 ^{ab}	7.99±0.07 ^{ab}	8.04±0.02 ^b
		galactose	10.53±0.01 ^a	10.52±3.54 ^a	10.52±0.02 ^a	10.60±0.04 ^b	10.60±0.03 ^b	10.62±0.01 ^b	10.69±0.01 ^b

		ผลิตภัณฑ์นมทางการค้า 7 ตัวอย่าง						
กลุ่มสารประกอบเคมี	สารมาตรฐานไอโอดี	Hokkaido-labeled C					Premium B	Hokkaido-labeled C
		Past. A	UHT A	Organic A	Past. B	UHT B		
ไขมันและอนุพันธ์	glucose	10.56±0.02 ^a	10.55±3.51 ^a	10.55±0.02 ^a	10.62±0.03 ^b	10.62±0.028 ^b	10.65±0.01 ^b	10.66±0.01 ^b
	lactose	10.60±0.02 ^a	10.60±3.52 ^a	10.59±0.03 ^a	10.67±0.04 ^b	10.67±0.03 ^b	10.710±0.01 ^b	10.71±0.02 ^b
	N-acetylglucosamine	7.71±0.08 ^b	7.62±2.53 ^a	7.78±0.04 ^{bc}	7.76±0.03 ^{bc}	7.72±0.04 ^b	7.78±0.01 ^{bc}	7.84±0.04 ^c
	sugar residue	8.48±0.025 ^b	8.44±2.80 ^b	8.37±0.02 ^a	8.87±0.01 ^d	8.44±0.009 ^b	8.49±0.01 ^c	8.49±0.01 ^c
ไขมันและอนุพันธ์	acetylcamithine	7.76±0.02 ^a	7.78±2.58 ^a	7.74±0.02 ^a	8.01±0.04 ^b	7.96±0.06 ^b	7.96±0.08 ^b	7.95±0.04 ^b
	choline derivatives	8.29±0.04 ^a	8.22±2.74 ^a	8.29±0.01 ^a	8.28±0.06 ^a	8.26±0.05 ^a	8.47±0.03 ^b	8.45±0.02 ^b
	glycerophosphocholine	7.76±0.01 ^c	7.60±2.55 ^b	7.34±0.03 ^a	7.57±0.03 ^b	7.31±0.01 ^a	7.31±0.02 ^a	7.60±0.04 ^b
	phosphocholine ^{ns}	7.49±0.03	7.47±2.48 ⁵	7.47±0.03	7.43±0.02	7.48±0.04	7.45±0.03	7.51±0.05
สารประกอบคาร์บอนิล	hydroxybutyrate	7.49±0.024 ^{de}	7.27±2.457 ^{ab}	7.55±0.060 ^e	7.35±0.044 ^b	7.24±0.031 ^a	7.43±0.027 ^{cd}	7.49±0.054 ^{de}
กรดอินทรีย์	acetate	6.96±0.01 ^a	6.98±2.32 ^a	8.18±0.03 ^e	7.08±0.04 ^b	7.15±0.04 ^c	7.11±0.00 ^{bc}	7.38±0.03 ^d
	acetoacetate	6.72±0.02 ^b	6.61±2.21 ^a	6.59±0.01 ^a	6.63±0.07 ^a	6.61±0.04 ^a	6.62±0.04 ^a	6.57±0.02 ^a
	ascobate	8.38±0.01 ^{ab}	8.36±2.78 ^a	8.36±0.01 ^a	8.49±0.03 ^c	8.42±0.02 ^b	8.39±0.01 ^{ab}	8.71±0.04 ^d
	benzoate ^{ns}	6.89±0.01	6.94±2.30	6.88±0.01	6.89±0.05	6.91±0.03	6.93±0.02	6.95±0.03
	butyrate	7.41±0.02 ^{ab}	7.45±2.47 ^b	7.56±0.05 ^c	7.34±0.04 ^a	7.39±0.02 ^{ab}	7.41±0.02 ^{ab}	7.44±0.04 ^b

กลุ่ม สารประกอบเคมี	สารเมตาบอไลต์	ผลิตภัณฑ์นมทางการค้า 7 ตัวอย่าง						
		Past. A	UHT A	Organic A	Past. B	UHT B	Premium B	Hokkaido- labeled C
	citrate	8.93±0.05 ^c	8.87±2.95 ^b	8.77±0.00 ^a	8.96±0.01 ^c	8.93±0.08 ^c	8.94±0.03 ^c	9.04±0.01 ^d
	formate	6.83±0.07 ^a	6.93±2.27 ^{ab}	7.31±0.07 ^c	6.92±0.07 ^{ab}	6.84±0.03 ^a	7.05±0.03 ^b	6.90±0.07 ^{ab}
	fumarate ^{ns}	6.39±0.00	6.35±2.12	6.26±0.22	6.25±0.06	6.30±0.04	6.23±0.09	6.24±0.02
	hippurate	7.16±0.04 ^{bc}	7.15±2.37 ^{bc}	7.12±0.03 ^{ab}	7.10±0.00 ^a	7.12±0.06 ^{ab}	7.09±0.02 ^a	7.19±0.01 ^c
	isobutyrate	6.52±0.06 ^a	6.73±2.19 ^c	6.86±0.01 ^d	6.55±0.04 ^a	6.49±0.10 ^a	6.63±0.01 ^{bc}	6.91±0.07 ^d
	lactate	8.01±0.01 ^{bc}	7.88±2.64 ^a	8.38±0.03 ^d	8.08±0.05 ^c	7.99±0.05 ^b	8.04±0.03 ^{bc}	7.99±0.05 ^b
	maleate ^{ns}	7.06±0.018	7.02±2.34	7.02±0.03	7.03±0.08	7.06±0.04	6.99±0.06	7.07±0.02
	orotate ^{ns}	7.06±0.01	7.02±2.34	7.02±0.03	7.03±0.08	7.06±0.04	6.99±0.06	7.07±0.02
	oxoglutarate	6.87±0.04 ^a	6.85±2.27 ^a	6.93±0.05 ^{ab}	6.86±0.02 ^a	6.82±0.07 ^a	6.85±0.02 ^a	7.10±0.30 ^b
	pyruvate	7.02±0.07 ^a	6.98±2.31 ^a	7.02±0.03 ^a	7.02±0.06 ^a	6.98±0.02 ^a	7.15±0.04 ^b	7.14±0.03 ^b
	succinate	7.55±0.03 ^a	7.50±2.49 ^a	7.54±0.06 ^a	7.49±0.01 ^a	7.54±0.04 ^a	7.73±0.00 ^b	7.57±0.00 ^a
	valerate derivative	7.84±0.03 ^c	7.59±2.56 ^a	7.94±0.04 ^d	7.68±0.05 ^b	7.69±0.04 ^b	7.75±0.02 ^b	7.86±0.03 ^c
อื่นๆ	dimethyl sulfone	6.27±0.03 ^a	6.39±2.10 ^b	6.20±0.03 ^a	6.39±0.05 ^b	6.42±0.07 ^b	6.43±0.04 ^b	6.48±0.05 ^b
	uridine	7.00±0.15 ^b	6.87±2.26 ^{ab}	6.83±0.05 ^a	6.81±0.03 ^a	6.80±0.04 ^a	6.75±0.02 ^a	6.80±0.05 ^a

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

ฉ2 การประมวลผลโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของน้ำนมดิบ



ภาพที่ ฉ2 การระบุตำแหน่งข้อมูลของสารเมตาบอไลต์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ ในน้ำนมดิบจากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ (ก) ภาพขยายในช่วง Aliphatic region (ข), ภาพขยายในช่วง Sugar region (ค), และภาพขยายในช่วง Aromatic region (ง)

, 1:Valerate derivatives 2:Ethanol 3:Butyrate 4:Hydroxybutyrate 5:Isoleucine 6:Leucine 7:Valine 8:Isobutyrate 9:Lactate 10:Alanine 11:Acetate 12:N-acetylamino acid 13:Acetone 14:Acetoacetate 15:Proline 16:Pyruvate 17:Succinate 18:Oxoglutarate 19:Citrate 20:Creatine และ Creatinine 21:Dimethyl sulfone 22:Acetylcarnithine 23:Carnitine 24:Glycine 25:Choline derivatives 26: Dihydroxyacetone 27:Threonine 28:Glucose 29:Lactose 30:Galactose 31:Betaine 32:Ascobate 33:1,6-Anhydro- β -D-glucose 34: Glycerophosphocholine 35:Sugar residue 36:Orotate 37:Maleate 38:Fumarate 39:N-acetylglucosamine 40:Amino acid residue 41:Histidine 42:Tyrosine 43:Phenylalanine 44:Benzoate 45:Hippurate 46:Formate

ตารางที่ ๒ ปริมาณสัมพัทธ์ของสารเมตาบอไลต์ในน้ำนมดิบจากแม่โคปกติ แม่โคเป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ และแบบแสดงอาการ

กลุ่ม	สารเมตาบอไลต์			สุภาพะปกติ								
	1a	2a	3a	1b	2b	3b	1c	2c	3c			
สารประกอบเคมี	5.91±0.06 ^{ab}	5.85±0.03 ^a	5.91±0.01 ^{ab}	6.13±0.08 ^d	5.90±0.02 ^{ab}	5.96±0.03 ^{ab}	6.11±0.02 ^{cd}	6.00±0.14 ^b	6.09±0.05 ^{cd}			
แอลกอฮอล์	ethanol											
กรดอะมิโนและ	5.58±0.09 ^a	5.57±0.05 ^a	5.65±0.01 ^{ab}	5.86±0.09 ^d	5.61±0.03 ^{ab}	5.70±0.09 ^{ab}	5.83±0.02 ^{cd}	5.74±0.18 ^{bcd}	5.85±0.07 ^{cd}			
อนุพันธ์	alanine											
	5.82±0.04 ^a	5.85±0.08 ^{ab}	5.97±0.04 ^{bc}	6.31±0.10 ^f	6.00±0.02 ^{cd}	6.07±0.05 ^{bc}	6.25±0.074 ^{ef}	6.12±0.10 ^{de}	6.29±0.09 ^f			
	amino acid residue											
	6.15±0.06 ^a	6.18±0.03 ^{ab}	6.22±0.05 ^{ab}	6.24±0.05 ^{ab}	6.15±0.03 ^a	6.22±0.02 ^{ab}	6.23±0.04 ^{ab}	6.20±0.15 ^b	6.26±0.03 ^{ab}			
	creatine and creatinine											
	7.15±0.05 ^{bc}	7.15±0.01 ^{bc}	7.18±0.02 ^c	7.09±0.07 ^{ab}	7.09±0.01 ^{ab}	7.15±0.03 ^{bc}	7.04±0.03 ^a	7.15±0.48 ^{bc}	7.11±0.03 ^{abc}			
	glycine											
	4.43±0.11 ^{ab}	4.39±0.13 ^a	4.56±0.09 ^{abc}	4.92±0.08 ^{ef}	4.59±0.03 ^{bcd}	4.76±0.05 ^{de}	4.93±0.03 ^{ef}	4.71±0.15 ^{cd}	4.94±0.10			
	histidine											
	6.00±0.09 ^a	6.04±0.04 ^a	6.13±0.03 ^{ab}	6.44±0.12 ^c	6.17±0.03 ^{abc}	6.21±0.07 ^{bc}	6.49±0.02 ^d	6.30±0.12 ^{cd}	6.43±0.08 ^d			
	isoleucine											
	6.41±0.09 ^a	6.41±0.04 ^a	6.50±0.03 ^{ab}	6.79±0.12 ^c	6.52±0.03 ^{ab}	6.58±0.05 ^b	6.76±0.02 ^c	6.65±0.18 ^{bc}	6.78±0.08 ^c			
	leucine											
	6.20±0.06 ^a	6.22±0.05 ^a	6.25±0.03 ^{ab}	6.42±0.07 ^d	6.26±0.02 ^{ab}	6.27±0.08 ^{abc}	6.39±0.02 ^{cd}	6.35±0.12 ^{bcd}	6.40±0.04 ^d			
	N-acetylamino acid											
	4.70±0.02 ^a	4.73±0.06 ^{ab}	4.79±0.02 ^{ab}	5.15±0.08 ^d	4.79±0.02 ^{ab}	4.88±0.07 ^{abc}	5.05±0.11 ^{cd}	4.85±0.17 ^{bc}	5.10±0.14 ^d			
	phenylalanine											
	5.72±0.09 ^a	5.71±0.04 ^a	5.85±0.03 ^{ab}	6.07±0.12 ^c	5.85±0.04 ^{ab}	5.91±0.04 ^{abc}	6.07±0.03 ^{bc}	5.98±0.19 ^{bc}	6.08±0.07 ^d			
	proline											
	5.80±0.02 ^a	5.86±0.06 ^{ab}	5.92±0.03 ^{abc}	6.26±0.10 ^d	6.00±0.02 ^{bc}	6.03±0.06 ^c	6.19±0.04 ^d	6.20±0.20 ^{cd}	6.21±0.091 ^d			
	threonine											
	4.97±0.01 ^a	4.97±0.09 ^a	5.03±0.02 ^a	5.33±0.08 ^b	5.01±0.01 ^a	5.10±0.04 ^a	5.29±0.08 ^b	5.17±0.15 ^a	5.31±0.09 ^b			
	tyrosine											
	5.18±0.09 ^{ab}	5.14±0.04 ^a	5.28±0.05 ^{abc}	5.56±0.12 ^d	5.31±0.04 ^{abc}	5.36±0.07 ^{bc}	5.55±0.02 ^d	5.42±0.20 ^{cd}	5.51±0.08 ^d			
	valine											
คาร์โบไฮเดรต	6.04±0.03 ^{bc}	6.08±0.02 ^{cd}	6.15±0.01 ^d	6.07±0.05 ^{cd}	5.94±0.04 ^a	6.10±0.02 ^{cd}	5.97±0.10 ^{ab}	6.07±0.06 ^{cd}	6.08±0.00 ^{cd}			
และอนุพันธ์	1,6-anhydro-β-D-glucose											

กลุ่มสารประกอบเคมี	สุทธภาวะปกติ									
	1a	2a	3a	1b	2b	3b	1c	2c	3c	
สารเมตาบอไลต์	galactose	8.40±0.06 ^{bc}	8.42±0.01 ^{bc}	8.45±0.03 ^c	8.34±0.08 ^{ab}	8.34±0.01 ^{ab}	8.42±0.03 ^{bc}	8.31±0.04 ^a	8.41±0.04 ^{bc}	8.38±0.04 ^{abc}
	glucose	8.44±0.06 ^{bc}	8.45±0.01 ^{bc}	8.48±0.04 ^c	8.39±0.08 ^{ab}	8.37±0.01 ^{ab}	8.45±0.03 ^{bc}	8.34±0.04 ^a	8.44±0.04 ^{bc}	8.41±0.04 ^{abc}
	lactose	8.47±0.06 ^{bc}	8.49±0.01 ^{bc}	8.52±0.03 ^c	8.41±0.08 ^{ab}	8.41±0.01 ^{ab}	8.49±0.03 ^{bc}	8.38±0.04 ^a	8.46±0.044 ^{bc}	8.44±0.04 ^{abc}
สารประกอบ	n-acetylglucosamine	5.91±0.03 ^a	5.938±0.05 ^{ab}	6.00±0.02 ^{abc}	6.25±0.07 ^f	6.03±0.03 ^{bcd}	6.07±0.03 ^{cd}	6.21±0.04 ^f	6.15±0.14 ^{cd}	6.25±0.07 ^f
	sugar residue	5.16±0.08 ^{bcd}	5.28±0.00 ^d	5.32±0.09 ^d	5.16±0.03 ^{bcd}	4.97±0.10 ^a	5.28±0.06 ^d	5.00±0.20 ^{ab}	5.09±0.03 ^{abc}	5.19±0.06 ^{cd}
คาร์บอนิล	acetone	5.15±0.10 ^a	5.12±0.04 ^a	5.26±0.05 ^{ab}	5.46±0.11 ^c	5.22±0.05 ^{ab}	5.29±0.04 ^{abc}	5.44±0.02 ^c	5.34±0.20 ^c	5.44±0.07 ^c
	dihydroxyacetone	5.32±0.09 ^a	5.37±0.10 ^{ab}	5.51±0.05 ^{abc}	5.59±0.04 ^c	5.50±0.08 ^{abc}	5.55±0.03 ^{bc}	5.54±0.07 ^{bc}	5.65±0.24 ^c	5.64±0.10 ^c
ไขมันและอนุพันธ์	acetylcarnithine	5.51±0.10 ^a	5.46±0.04 ^a	5.61±0.02 ^{ab}	5.72±0.07 ^b	5.57±0.04 ^{ab}	5.62±0.02 ^{ab}	5.71±0.04 ^b	5.71±0.22 ^b	5.73±0.05 ^b
	carnitine	6.15±0.08 ^{ab}	6.15±0.00 ^{ab}	6.22±0.08 ^{ab}	6.12±0.18 ^{ab}	6.15±0.01 ^{ab}	6.22±0.06 ^{ab}	6.07±0.07 ^a	6.23±0.10 ^{ab}	6.25±0.03 ^b
การอินทรีย์	choline and derivatives ^{ns}	6.49±0.07	6.45±0.01	6.47±0.04	6.49±0.12	6.41±0.02	6.46±0.03	6.42±0.04	6.54±0.02	6.50±0.01
	glycerophosphocholine	5.40±0.06 ^a	5.44±0.04 ^{ab}	5.49±0.07 ^{abc}	5.62±0.04 ^{cd}	5.47±0.02 ^{abc}	5.47±0.11 ^{abc}	5.57±0.07 ^{bcd}	5.59±0.17 ^{bcd}	5.66±0.03 ^d
การอินทรีย์	acetate	5.32±0.10 ^a	5.37±0.05 ^a	5.46±0.02 ^{ab}	5.73±0.12 ^d	5.48±0.02 ^{ab}	5.56±0.04 ^{bc}	5.71±0.03 ^d	5.63±0.11 ^{cd}	5.73±0.08 ^d
	acetoacetate	5.23±0.10 ^{ab}	5.20±0.04 ^a	5.34±0.04 ^{abc}	5.65±0.12 ^d	5.40±0.04 ^{bc}	5.44±0.07 ^c	5.64±0.02 ^d	5.50±0.20 ^{cd}	5.66±0.08 ^d
	ascobate	5.93±0.07 ^{ab}	6.05±0.02 ^b	6.02±0.13 ^b	5.98±0.02 ^{ab}	5.86±0.01 ^a	6.06±0.00 ^b	5.91±0.11 ^{ab}	5.98±0.14 ^{ab}	5.98±0.05 ^{ab}
	benzoate	4.71±0.01 ^a	4.82±0.06 ^{ab}	4.95±0.06 ^{bc}	5.26±0.09 ^d	4.94±0.03 ^{bc}	5.04±0.07 ^c	5.21±0.06 ^d	5.05±0.12 ^c	5.23±0.09 ^d
	butyrate	6.08±0.09 ^a	6.06±0.0 ^{0a}	6.15±0.03 ^{ab}	6.46±0.12 ^d	6.18±0.03 ^{ab}	6.24±0.08 ^{ab}	6.43±0.02 ^{cb}	6.28±0.12 ^{bc}	6.44±0.08 ^d
citrate	6.71±0.07 ^{abc}	6.77±0.02 ^{cd}	6.84±0.02 ^d	6.62±0.05 ^a	6.72±0.02 ^{bc}	6.82±0.08 ^d	6.65±0.04 ^{ab}	6.75±0.04 ^{cd}	6.70±0.05 ^{abc}	

กลุ่มสารประกอบเคมี	สารเมตาบอไลต์			สุขภาพปกติ			เต็มอ็อกเสบแบบไม่แสดงอาการ			เต็มอ็อกเสบแบบแสดงอาการ		
	1a	2a	3a	1b	2b	3b	1c	2c	3c	1c	2c	3c
กรดอินทรีย์	formate	4.37±0.08 ^a	4.39±0.06 ^a	4.53±0.02 ^b	4.79±0.12 ^{de}	4.48±0.04 ^{ab}	4.52±0.07 ^{bc}	4.88±0.01 ^e	4.68±0.04 ^{cd}	4.79±0.04 ^{de}		
	fumarate	3.83±0.04 ^{ab}	4.00±0.16 ^{bc}	3.95±0.12 ^{bc}	4.18±0.10 ^c	3.66±0.27 ^a	3.86±0.14 ^{ab}	4.12±0.16 ^c	4.02±0.10 ^{bc}	3.91±0.10 ^{bc}		
	hippurate	5.31±0.02 ^a	5.34±0.13 ^a	5.40±0.02 ^{ab}	5.68±0.10 ^d	5.40±0.01 ^{ab}	5.57±0.03 ^{bc}	5.61±0.14 ^{cd}	5.51±0.17 ^{bc}	5.68±0.01 ^d		
กรดอินทรีย์	hydroxybutyrate	5.92±0.09 ^a	5.92±0.04 ^a	5.99±0.02 ^{ab}	6.26±0.10 ^c	6.00±0.03 ^{ab}	6.07±0.05 ^{ab}	6.23±0.02 ^c	6.11±0.18 ^{bc}	6.26±0.03 ^c		
	isobutyrate	5.45±0.09 ^a	5.44±0.09 ^a	5.49±0.00 ^{ab}	5.67±0.07 ^d	5.42±0.03 ^a	5.51±0.03 ^{abc}	5.61±0.01 ^{bcd}	5.57±0.17 ^{abcd}	5.61±0.07 ^{cd}		
	lactate	5.75±0.04 ^a	5.83±0.04 ^{ab}	5.84±0.08 ^{ab}	6.11±0.07 ^c	5.94±0.04 ^b	5.94±0.08 ^b	6.15±0.05 ^c	6.11±0.09 ^c	6.16±0.10 ^c		
	orotate	4.58±0.13 ^{bc}	4.84±0.10 ^c	4.50±0.13 ^{ab}	4.32±0.19 ^a	4.75±0.12 ^c	4.35±0.08 ^{ab}	4.36±0.03 ^{ab}	4.76±0.11 ^c	4.53±0.12 ^{ab}		
	oxoglutarate	5.70±0.13 ^a	5.66±0.06 ^a	5.75±0.04 ^a	5.93±0.10 ^b	5.78±0.05 ^a	5.80±0.04 ^{ab}	5.94±0.07 ^b	5.93±0.16 ^b	5.97±0.02 ^b		
	pyruvate	5.26±0.10 ^a	5.25±0.08 ^a	5.39±0.04 ^{ab}	5.53±0.11 ^c	5.37±0.04 ^{ab}	5.43±0.03 ^{bc}	5.58±0.06 ^c	5.50±0.18 ^{bc}	5.55±0.06 ^c		
	succinate ^{ns}	5.08±0.13	5.07±0.07	5.14±0.02	5.23±0.06	5.05±0.05	5.19±0.03	5.20±0.03	5.23±0.19	5.21±0.03		
	valerate and derivative	6.64±0.10 ^a	6.60±0.03 ^a	6.72±0.03 ^{ab}	7.01±0.11 ^c	6.74±0.03 ^{ab}	6.81±0.05 ^{ab}	6.90±0.04 ^c	6.86±0.16 ^{bc}	7.00±0.08 ^c		
	betaine	6.00±0.16 ^{ab}	6.02±0.03 ^{ab}	6.05±0.04 ^a	5.93±0.14 ^{ab}	5.99±0.04 ^{ab}	6.06±0.02 ^{ab}	5.90±0.02 ^{ab}	6.09±0.12 ^b	6.04±0.07 ^{ab}		
	maleate	4.54±0.13 ^{bc}	4.80±0.10 ^c	4.50±0.13 ^{ab}	4.36±0.18 ^a	4.75±0.12 ^c	4.36±0.08 ^{ab}	4.37±0.04 ^{ab}	4.77±0.11 ^c	4.53±0.12 ^{ac}		
อื่น	dimethyl sulfone	5.22±0.08 ^{ab}	5.13±0.03 ^a	5.23±0.06 ^{ab}	5.33±0.09 ^{bc}	5.24±0.04 ^{ab}	5.24±0.06 ^{ab}	5.33±0.03 ^{bc}	5.43±0.21 ^c	5.35±0.05 ^{bc}		

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

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวมยุรี เหลืองวิลัย เกิดวันที่ 15 กรกฎาคม พ.ศ. 2535 ที่จังหวัด ลพบุรี สำเร็จ การศึกษาระดับชั้นปริญญาตรี สาขา วิทยาศาสตร์ทางอาหารเพื่อสุขภาพ ภาควิชา โภชนวิทยา และการกำหนดอาหาร คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ปี พ.ศ. 2557 และได้จัดทำ โครงการวิจัยระดับปริญญาตรี เรื่อง “การพัฒนาขนมขบเคี้ยวชนิดแห้งจากผลิตภัณฑ์จาก กระบวนการสกัดน้ำมันถั่วดาวอินคา” และเข้าศึกษาต่อระดับชั้นปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีทาง อาหาร ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี พ.ศ. 2558 โดยมีผลงานตีพิมพ์ในลักษณะบทความวิชาการ (review article) และบทความวิจัยในรายงาน การประชุมวิชาการ (proceeding) ระดับนานาชาติ ซึ่งเป็นผลลัพธ์ส่วนหนึ่งที่ได้จากการจัดทำ วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ จำนวน 2 เรื่อง ได้แก่

ศานต์ เศรษฐชัยมงคล และมยุรี เหลืองวิลัย, 2560. การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเมตา โบโลมิกส์ในการศึกษาข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของน้ำมันและผลิตภัณฑ์นม. วารสาร เทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม. ปีที่ 12 ฉบับที่1 (มกราคม – ธันวาคม 2560).

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.



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY