



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การพัฒนาเทคนิคสเปกโตรสโคปีอินฟราเรดย่านใกล้ในการตรวจสอบและ
ติดตามสฟิงโกไมอีลินสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในผลิตภัณฑ์นมหมัก
(Development of near infrared spectroscopy technique for detection and monitor
of sphingomyelin as immunnutritional substance in fermented milk product)

โดย

อาจารย์ ดร.ชัยวัฒน์ บรรดิเดช

ภายใต้แผนงานวิจัยชุดโครงการ

การพัฒนาวิธีตรวจสอบอย่างรวดเร็วเพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบสำคัญ
ในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพด้วยเทคนิคสเปกโตรสโคปีอินฟราเรดย่านใกล้
ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557-2558

ปีที่ดำเนินการเสร็จ พ.ศ. 2559

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อ ศึกษาแนวทางในการพัฒนาเทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ near-infrared spectroscopy (NIRS) ในงานทางด้านการตรวจวิเคราะห์สารชีวภัณฑ์ ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็วและไม่ยุ่งยาก ผู้วิจัยขอขอบคุณ สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่ได้สนับสนุนทุนการวิจัยครั้งนี้ ผู้ทรงคุณวุฒิที่รับมอบหมายให้ตรวจโครงการทุกท่านที่ไม่สามารถทราบรายนามได้ ที่ได้ให้คำปรึกษาและชี้แนะตรวจสอบข้อมูลในรายงาน

การดำเนินการวิจัยมีอาจสำเร็จลุล่วงไปได้หากปราศจากความร่วมมือของนักศึกษาในที่ปรึกษาของข้าพเจ้าที่ทำงานด้วยความเห็นดีเห็นงามและเต็มความสามารถที่มีในการเรียนรู้เทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ไปพร้อมกับข้าพเจ้าที่สนใจเรียนรู้เทคนิคใหม่นี้ ขอขอบคุณอย่างยิ่งกับนักศึกษาปริญญาโทของสาขาเทคโนโลยีอาหาร ของภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม โดยเฉพาะ คุณหทัยชนก พวงจันทร์ ที่ช่วยเป็นที่ปรึกษาให้ข้าพเจ้าและผู้ช่วยทำวิจัย จนโครงการนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบคุณอย่างยิ่งสำหรับคุณศิริพร เจนวิทย์อมรเวช คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ในการใช้เครื่องมือ microplate reader

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้การอุปการะอบรมเลี้ยงดู ตลอดจนส่งเสริมการศึกษา และให้กำลังใจเป็นอย่างดี อีกทั้งขอขอบคุณ ผศ.ดร.ปราโมทย์ คูวิจิตรจารุ หัวหน้าชุดโครงการและภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรมสำหรับความกรุณาให้เข้าใช้เครื่องมือและพื้นที่การทำงานในภาควิชาด้วยความเต็มใจยิ่ง ที่ให้การสนับสนุนและช่วยเหลือด้วยดีเสมอมา และขอขอบพระคุณเจ้าของเอกสารและงานวิจัยทุกท่าน ที่ผู้ศึกษาค้นคว้าได้นำมาอ้างอิงในการทำวิจัยจนกระทั่งงานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ทั้งนี้เป็นปกติของงานวิจัยที่อาจมีความผิดพลาด ความคลาดเคลื่อน การปรับเปลี่ยน การล่าช้าและการกระทบกระทั่งในขณะดำเนินงาน ข้าพเจ้าขอน้อมรับไว้แต่ผู้เดียวและขออภัยมา ณ ที่นี้

ชัยวัฒน์ บรรรโคเพ็ชร

บทคัดย่อ

ชื่อโครงการ	การพัฒนาเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ในการตรวจสอบและติดตามสฟิงโกไมอีลินสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในผลิตภัณฑ์นมหมัก		
ชื่อผู้วิจัย	อาจารย์ ดร. ชัยวัฒน์ บรรดิเดช	(หัวหน้าโครงการ)	
	คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร		
	อาจารย์ ดร. สมรักษ์ พันธุ์ผล	(ผู้ร่วมวิจัย)	
	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์		
	อาจารย์ ดร. สราวุฒ ภูไพจิตรกุล	(ผู้ร่วมวิจัย)	
	คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร		
แหล่งทุนอุดหนุนการวิจัย	งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2557-2558		
	สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร		
ปีที่เสร็จ	2559		
ประเภทการวิจัย	การวิจัยประยุกต์		
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ		

Sphingomyelin (Spm) เป็นสารจำพวก sphingolipid ที่พบในผนังเซลล์ไขมันของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นม ไข่ นม และ ถั่วเหลือง เป็นต้น Spm สามารถถูกย่อยสลายเป็นสาร ceramide ซึ่งมีประโยชน์ต่อระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ จึงถูกนำไปผสมในนมผงเลี้ยงทารก อาหารเสริมและอาหารนม เนื่องจากปริมาณที่น้อยและโครงสร้างที่ซับซ้อนของ Spm ทำให้ปกติต้องใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีและแมสสเปกโตรสโกปีที่ยุ่งยากและราคาแพง แต่อย่างไรก็ดี มีรายงานวิธีวิเคราะห์ทางเอนไซม์ที่จำเพาะต่อสารน่าสนใจ งานนี้มีจุดประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (NIRS) ในตรวจหา Spm และติดตามสารชีวภัณฑ์อื่นๆในการหมักโยเกิร์ต หลังการทำ cross validation เทคนิค NIRS ถูกใช้ในการตรวจวัดกรดแลคติกที่เกิดขึ้นเมื่อเทียบกับการไตเตรททางเคมี (ได้ผลเป็นค่าเชิงสถิติเป็นค่า R^2 เท่ากับ 96.49 RMSECV เท่ากับ 0.133% และ RPD เท่ากับ 5.34) สเปกตรัม NIRS ที่ความเข้มข้นของกรดต่ำๆมักจะถูกบดบังด้วยสเปกตรัมน้ำ ทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนได้ เทคนิค NIRS ยังใช้ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียแลคติกแอซิด (LAB) ได้เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีแบบ pour plate (R^2 เท่ากับ 90.12 RMSECV เท่ากับ 41.1 CFU/ml และ RPD เท่ากับ 3.19) ทั้งนี้เทคนิค pour plate ใช้ตรวจได้แต่เซลล์ที่มีชีวิตอยู่ขณะที่ NIRS สามารถใช้ตรวจได้ทั้งเซลล์ที่เป็นและตายจึงทำให้เกิดผลที่แตกต่างกันได้ สารสกัด Spm ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ถูกตรวจสอบด้วยเทคนิค NIRS เทียบกับการตรวจสอบด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ชนิดวัดค่าการเรืองแสง (ด้วยค่า R^2 เท่ากับ 93.43 RMSECV เท่ากับ 15.1 $\mu\text{g/ml}$ และ RPD เท่ากับ 3.91) ดังนั้นเทคนิค NIR สามารถนำมาใช้สำหรับวัดสารชีวภัณฑ์ได้ด้วยข้อดีในเรื่องการลดค่าตรวจสอบ ความยุ่งยากและลดขั้นตอนวิธีการวิเคราะห์และเครื่องมือพิเศษ.

คำสำคัญ เทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ สฟิงโกไมอีลิน การหมักโยเกิร์ต

Abstract

Research Title	Development of near infrared spectroscopy technique for detection and monitor of sphingomyelin as immunnutritional substance in fermented milk product.		
Researcher	Dr. Chaiwat Bandaiphet	(Project Leader)	
	Faculty of Engineering and Industrial Technology	Silpakorn University	
	Dr. Somrak Punpol	(Co-Researcher)	
	Faculty of Science	Prince of Songklha University	
	Dr. Sarawut Phupijitkul	(Co-Researcher)	
	Faculty of Engineering and Industrial Technology	Silpakorn University	
Research Grants	Fiscal Year 2014-2015, Research and Development Institute, Silpakorn University		
Year of completion	2016		
Type of research	Applied research		
Subjects	Biotechnology		

Sphingomyelin (Spm) is a sphingolipid that is found in mammalian lipid cell, egg, milk and soybean, etc. Spm can be hydrolysed into ceramide that has benefit on human immune system. So, it is mixed in baby milk powder and food supplements products. Since its low contents and complex structures, Spm has usually analyses by chromatography and mass spectroscopy techniques which are complicate and high cost. However, the enzymatic detection was reported interestingly as higher specific. This work aimed to develop the near-infrared spectroscopy (NIRS) technique for investigation of Spm and other bio-substances in yogurt fermentation. NIRS technique can be used for lactic acid evaluation when compared with chemical titration methods after cross validation ($R^2 = 96.49$, RMSECV 0.133% and RPD = 5.34). It was found that NIRS spectrum at low acid concentration was overlaid by water spectrum caused of error and using limitation. NIRS technique could determine the cell numbering when compared with pour plate microbiological method ($R^2 = 90.12$, RMSECV 41.1 CFU/ml and RPD = 3.19). Cell numbering by pour plate technique could check only living cell, while the NIRS could investigate both living and dead cells caused of different results. Then, Spm extract could investigated by NIRS technique compared to fluorescent spectrophotometry (with $R^2 = 93.43$, RMSECV = 15.1 $\mu\text{g/ml}$ and RPD = 3.91). Thus, NIRS technique can be applied to detect Spm and other bio-substances with the advantage on reduction of cost, complicate, and special instruments and analysis method.

Keywords : Sphingomyelin, near-infrared spectroscopy, yogurt fermentation

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	จ
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูป	จ
สารบัญตาราง	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 อุปกรณ์ เครื่องมือ สารเคมี และสารตัวอย่าง	15
บทที่ 4 วิธีการทดลอง	17
บทที่ 5 ผลการทดลอง	24
บทที่ 6 สรุปผลและวิจารณ์	61
เอกสารอ้างอิง	62
ภาคผนวก	64
ประวัติผู้วิจัย	74

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 ส่วนประกอบทางเคมีของน้ำมันโค	3
รูปที่ 2 ส่วนประกอบของไขมันเนยในน้ำมันโค	3
รูปที่ 3 โครงสร้างของสฟิงโกไมอีลิน	7
รูปที่ 4 ผลการวิเคราะห์สาร Sphingosine และ Sphinganine	8
รูปที่ 5 เครื่อง Near infrared spectroscopy รุ่น MPA ของบริษัท Bruker	21
รูปที่ 6 สรุปแผนดำเนินงาน	23
รูปที่ 7 ผลการหมักโยเกิร์ตที่เวลาต่างๆ จากนมสดพาสเจอร์ไรซ์ด้วยหัวเชื้อนมเปรี้ยวหมักที่ 37 องศาเซลเซียส	24
รูปที่ 8 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณ lactic acid bacteria (LAB) และค่ากรดแลกติกของตัวอย่างโยเกิร์ตที่ เวลาต่างๆ ในการหมักนมสดพาสเจอร์ไรซ์ด้วยหัวเชื้อนมเปรี้ยวที่ 37 องศาเซลเซียส	25
รูปที่ 9 เส้นสเปกตรัม NIRS ของตัวอย่างเชื้อ LAB มาตรฐานเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ 10^{-5} - 10^{-9} เท่า จากโยเกิร์ตหมักที่ 24 ชั่วโมง ด้วยหัวเชื้อนมเปรี้ยวในนมสดพาสเจอร์ไรซ์ ที่ 37 องศาเซลเซียส	27
รูปที่ 10 เส้นสเปกตรัม NIRS ของตัวอย่าง LAB ในโยเกิร์ตหมักที่เวลาต่างๆ จากการหมักนมสดพาสเจอร์ไรซ์ ด้วยหัวเชื้อนมเปรี้ยว ที่ 37 องศาเซลเซียส	29
รูปที่ 11 การทำอนุพันธ์อันดับหนึ่งและสอง (First and Second derivative) ของสเปกตรัม NIRS ของตัวอย่างเชื้อ LAB มาตรฐาน เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ 10^{-5} - 10^{-9} เท่า จากโยเกิร์ตหมักที่ 24 ชั่วโมง	30
รูปที่ 12 การทำอนุพันธ์อันดับหนึ่งและสอง (First and Second derivative) จากเส้นสเปกตรัม NIRS ของตัวอย่างเชื้อ LAB ที่ได้จากการหมักโยเกิร์ตที่เวลาต่างๆจากการหมักนมสดพาสเจอร์ไรซ์ ด้วยหัวเชื้อนมเปรี้ยวที่ 37 องศาเซลเซียส	31
รูปที่ 13 Calibration and Cross Validation เส้นสเปกตรัม NIR ของตัวอย่าง LAB ที่ได้จากการหมักโยเกิร์ตที่เวลาต่างๆเทียบกับวิธี Total pate count (วิเคราะห์ด้วยเทคนิค pour plate)	32
รูปที่ 14 เส้นสเปกตรัม NIR ของสารมาตรฐานกรดแลกติกที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ความเข้มข้นต่างๆ	34
รูปที่ 15 เส้นสเปกตรัม NIRS กรดแลกติกของโยเกิร์ตหมักที่เวลาต่างๆ ด้วยหัวเชื้อนมเปรี้ยว หมักที่ 37 องศาเซลเซียส	35
รูปที่ 16 การทำอนุพันธ์อันดับหนึ่งและสอง(First and Second derivative) จากเส้นสเปกตรัม NIRS ของสารมาตรฐานกรดแลกติกที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความต่างๆ	37
รูปที่ 17 การทำอนุพันธ์อันดับหนึ่งและสอง (First and Second derivative) จากเส้นสเปกตรัม NIRS ของกรดแลกติกในโยเกิร์ตที่เวลาต่างๆจากการหมักนมสดพาสเจอร์ไรซ์ด้วยหัวเชื้อนมเปรี้ยวที่ 37 องศาเซลเซียส	38

สารบัญรูป (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 18 Calibration และ Cross Validation ของเส้นสเปกตรัม NIRS ของกรดแลคติกในโยเกิร์ต หมักที่เวลาต่างๆ จากการเทียบวิเคราะห์ด้วยวิธีเคมี เทคนิคไตเตรท (titration)	39
รูปที่ 19 ค่าดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน Sphingomyelin ความเข้มข้น 180 $\mu\text{g/ml}$ ที่วัดด้วยเครื่อง Spectrophotometer ความยาวคลื่นช่วง 200-800 นาโนเมตร	40
รูปที่ 20 ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน Sphingomyelin ความเข้มข้นต่างๆ ที่ความยาวคลื่น 544 นาโนเมตร (a) และ 590 นาโนเมตร (b)	41
รูปที่ 21 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด Sphingomyelin สกัดจากโยเกิร์ตหมักชุดที่ 1 ที่เวลาต่างๆ	42
รูปที่ 22 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด Sphingomyelin สกัดจากโยเกิร์ตหมักชุดที่ 2 ที่เวลาต่างๆ	43
รูปที่ 23 สเปกตรัมของสารมาตรฐาน Sphingomyelin ความเข้มข้นต่างๆ ใน Chloroform	44
รูปที่ 24 เส้นสเปกตรัม NIRS ของสารสกัด Sphingomyelin ของตัวอย่างใน Chloroform	47
รูปที่ 25 การทำอนุพันธ์อันดับหนึ่งและสอง (First and Second derivative) จากเส้นสเปกตรัมของสาร มาตรฐาน Sphingomyelin ที่ความเข้มข้นต่างๆ	51
รูปที่ 26 การทำอนุพันธ์อันดับหนึ่งและสอง (First and Second derivative) จากเส้นสเปกตรัมของ สารสกัด Sphingomyelin ของโยเกิร์ตหมักที่เวลาต่างๆ	52
รูปที่ 27 Calibration model ของ Sphingomyelin ที่ความเข้มข้นต่างๆ เทียบกับสารมาตรฐาน Sphingomyelin	53
รูปที่ 28 Calibration และ Validation ของเส้นสเปกตรัมสารสกัด Sphingomyelin ของโยเกิร์ตหมัก ชุดที่ 1 และ 2 ที่ เวลาต่างๆ	54
รูปที่ 29 Cross Validation difference เส้นสเปกตรัมสารมาตรฐาน Sphingomyelin ความเข้มข้น ต่างๆและสารสกัด Sphingomyelin ของโยเกิร์ตหมักชุดที่ 1 และ 2 ที่เวลาต่างๆเทียบกับ Sphingomyelin มาตรฐาน	55
รูปที่ 30 ความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของสาร Sphingomyelin ($\mu\text{g/ml}$) กับค่า fluorescent intensity จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเอนไซม์	57
รูปที่ 31 ปริมาณ Sphingomyelin ในนมหมักในงานวิจัยนี้	58
รูปที่ 32 เส้นสเปกตรัมของสารสกัด Sphingomyelin ของตัวอย่างนมเทียบกับ Chloroform	59
รูปที่ 33 การเปรียบเทียบ Calibration และ Cross Validation ของสารสกัด Sphingomyelin	60

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 คุณลักษณะทางเคมีและจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวตามมาตรฐานอุตสาหกรรม	5
ตารางที่ 2 ผลวิเคราะห์สาร Sphingomyelin ของเวย์โปรตีน	9
ตารางที่ 3 ผลการหมักโยเกิร์ตจากนมสดพาสเจอร์ไรส์ด้วยหัวเชื้อนมเปรี้ยวหมักที่ 37 องศาเซลเซียส	24
ตารางที่ 4 ปริมาณ LAB ในโยเกิร์ตหมักโดยวิธีการตรวจนับจุลินทรีย์ โดยวิธี Total plate count เทคนิค pour plate CFU/ml)	26
ตารางที่ 5 ค่า Absorbance Units (cm^{-1}) ที่พบในเส้นสเปกตรัม NIRS ของตัวอย่างเชื้อ LAB มาตรฐาน เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ 10^{-5} - 10^{-9} เท่า จากโยเกิร์ตหมักที่เวลาต่างๆ ด้วยหัวเชื้อนมเปรี้ยวใน นมสดพาสเจอร์ไรส์หมักที่ 37 องศาเซลเซียส	28
ตารางที่ 6 ค่า Absorbance Units (cm^{-1}) บนสเปกตรัม NIRS ของตัวอย่างเชื้อ LAB จากการหมัก โยเกิร์ตที่ เวลาต่างๆ	29
ตารางที่ 7 ปริมาณกรดแลกติกในโยเกิร์ตที่หมักได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคการไทเตรท (titration)	33
ตารางที่ 8 ค่า Absorbance Units (cm^{-1}) ของสารมาตรฐานกรดแลกติกพบในเส้นสเปกตรัม NIRS	34
ตารางที่ 9 ค่า Absorbance Units (cm^{-1}) ที่พบในเส้นสเปกตรัม NIRS ของกรดแลกติกของโยเกิร์ต หมักที่เวลาต่างๆ	36
ตารางที่ 10 ค่า Absorbance Units (cm^{-1}) บนสเปกตรัม NIRS ของสารมาตรฐาน Sphingomyelin ที่ความเข้มข้นต่างๆ ใน Chloroform ($\mu\text{g/ml}$)	43
ตารางที่ 11 ค่า Absorbance Units (cm^{-1}) ของสเปกตรัม NIRS ของสารสกัด Sphingomyelin ที่สกัด ได้จากตัวอย่างโยเกิร์ตหมักที่เวลาต่างๆ	48
ตารางที่ 12 ค่า fluorescent intensity ของสารตัวอย่าง ในการวิเคราะห์ด้วยปฏิกิริยาทางเอนไซม์และวัด ค่าการดูดกลืนแสงของสารก่อนและหลังใส่ Amplex red Stop (A และ B)	56
ตารางที่ 13 ค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Sphingomyelin ($\mu\text{g/ml}$) กับค่าเฉลี่ย fluorescent intensity ด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ด้วยเอนไซม์	57
ตารางที่ 14 ปริมาณ Sphingomyelin ในนมหมัก จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางเอนไซม์ที่เวลา หมักต่างๆ	59
ตารางที่ 15 ผลการ Pour plate ของตัวอย่าง	67
ตารางที่ 16 ค่า Cfu/ml และจำนวนโคโลนีเฉลี่ยของตัวอย่าง	71

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของการวิจัย

ปัจจุบันผลิตภัณฑ์ที่ทำมาจากนมโคมีความหลากหลายและได้รับความนิยมในการบริโภคเป็นอย่างมาก เช่น นมสด นมผง นมเปรี้ยวพาสเจอร์ไรซ์ โยเกิร์ต เป็นต้น เนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการสูงจึงมีการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์เป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะในนมเปรี้ยวที่มีเชื้อแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย และในนมโคยังมีคุณค่าประโยชน์ของสารชีวโมเลกุลต่างๆมากมาย เช่น สาร Sphingomyelin ซึ่งเป็น sphingolipid ชนิดหนึ่งที่พบมากที่สุด พบที่เยื่อหุ้มเซลล์สัตว์และปลอกไมอีลินที่พบในเยื่อหุ้มเซลล์ประสาทและในเยื่อหุ้มของเม็ดไขมันนม ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์สมอง โมเลกุลของ sphingomyelin ประกอบด้วย phosphocholine polar head group และ sphingosine backbone Sphingomyelin ที่รับเข้าสู่ร่างกายทางปากจะเปลี่ยนไปเป็น ceramide หรือสารผลิตภัณฑ์อื่นๆ ในระบบลำไส้ ซึ่งถูกดูดซึมจากช่องท้องเข้าสู่ระบบหมุนเวียนเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลางผ่านทางเลือด Sphingomyelin ช่วยเพิ่มระดับ DHA ในเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงและเร่งกระบวนการ myelination ของบริเวณสมอง แต่ด้วยสารดังกล่าวมีปริมาณน้อย โครงสร้างโมเลกุลใหญ่ที่ต้องอาศัยเทคนิคการตรวจที่ต้องจำเพาะ ปกติจะเป็นเทคนิคทางเอนไซม์และการใช้เครื่องมือแยกส่วนเช่นเทคนิค TLC, HPLC และเทคนิคจำเพาะอื่นๆซึ่งเครื่องมือมีราคาสูงและการเตรียมดำเนินการที่ยุ่งยาก ต้องอาศัยความเชี่ยวชาญชำนาญและเวลานานในการตรวจวิเคราะห์ จึงเป็นที่น่าสนใจว่าจะมีเทคนิคที่ไม่ยุ่งยาก ใช้เวลาไม่นาน แต่ได้ค่าที่แม่นยำและถูกต้องมาทดแทน เทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (NIRS) เป็นเทคนิคที่ถูกนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารในผลิตภัณฑ์อาหารจำนวนมากเพื่อทดแทนการตรวจสอบแบบเดิม พบว่ามีข้อดีคือ รวดเร็ว ไม่ยุ่งยาก ที่สำคัญคือไม่ทำลายตัวอย่าง มีผู้รายงานการใช้เทคนิคนี้ในการตรวจหาสารในระหว่างการผลิตผลิตภัณฑ์นมบ้างแล้ว ผู้วิจัยจึงมีความสนใจเลือกนำเทคนิคนี้มาใช้ในการตรวจสอบหาปริมาณสาร sphingomyelin ในผลิตภัณฑ์นมหมักและระหว่างการหมักนม เนื่องจากเป็นเทคนิคที่การตรวจวิเคราะห์ไม่ต้องการทำลายตัวอย่างที่อยู่ในกระบวนการ เหมาะกับนำมาการใช้ตรวจหาและติดตามสารที่มีคุณค่าและสารชีวภัณฑ์อื่นโดยไม่ทำลายกระบวนการผลิตสารนั้นๆ

1.2 วัตถุประสงค์

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นหาแนวทางในการใช้และพัฒนาเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (NIRS) ตรวจสอบวิเคราะห์หาสาร Sphingomyelin ในโยเกิร์ตที่ได้จากการหมักนมโค และตรวจติดตามสารชีวภัณฑ์อื่นเช่น เชื้อมวลแบคทีเรีย lactic acid bacteria (LAB), กรดแลคติก เทียบกับเทคนิคทางจุลชีววิทยาเคมีและกายภาพอื่นที่ใช้กันทั่วไปเป็นปกติ เพื่อให้ได้วิธีการตรวจสอบที่ง่ายและถูกต้องแม่นยำและประเมิน

ความถูกต้องในการนำมาใช้ทดแทนด้วยการสร้าง calibration model แล้วเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าที่ได้จาก calibration และทำ validation ของเทคนิคการตรวจสอบแบบต่างๆ

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1.3.1 ศึกษาการหมักนมโคด้วยแบคทีเรียผลิตโยเกิร์ตธรรมชาติ แล้วติดตามการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในนมหมักดังกล่าว

1.3.2 ศึกษาเทคนิคการสกัดสาร sphingomyelin จากผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่หมักได้

1.3.3 ศึกษาการใช้เทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (NIRS) ตรวจสอบวิเคราะห์สาร Sphingomyelin ในโยเกิร์ตที่ได้จากการหมักนมโค เทียบกับเทคนิคทางเคมีและเอนไซม์ และตรวจติดตามสารชีวภัณฑ์อื่นเช่น แบคทีเรีย lactic acid bacteria (LAB) เทียบกับเทคนิคการนับจำนวนเซลล์ทางจุลชีววิทยา (วิธี total plate count โดยวิธี pour plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม), การหาปริมาณกรดแลคติกโดยเทียบกับเทคนิคการไตเตรดด้วยสารเคมี และกายภาพอื่นที่ใช้กันทั่วไปเป็นปกติ

1.3.4 ศึกษาการสร้าง calibration model แล้วเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าที่ได้จาก calibration และทำ cross validation ของเทคนิค (NIRS) เทียบกับเทคนิคการตรวจสอบแบบต่างๆ

1.3.5 ประเมินผลการพัฒนาการใช้เทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (NIRS) ในการวิเคราะห์สาร Sphingomyelin ในโยเกิร์ตที่ได้จากการหมักนมโคเทียบกับเทคนิคทางเคมีและเอนไซม์ และตรวจติดตามสารชีวภัณฑ์อื่น

คำสำคัญ เทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ สฟิงโกไมอีลิน การหมักโยเกิร์ต

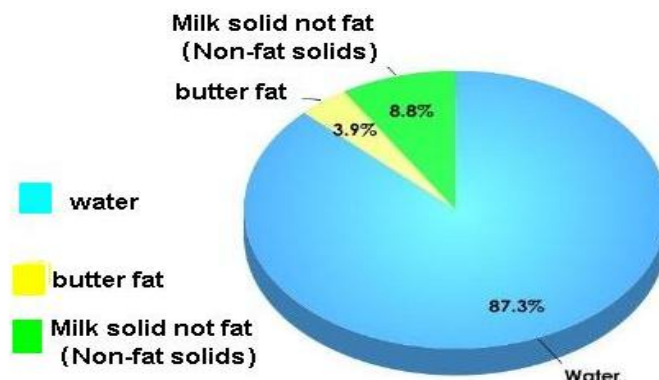
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 นํ้านมโค

ส่วนประกอบทางเคมีของนํ้านมโค ประกอบด้วย 3 ส่วนหลัก : Nielsen (2003) ดังรูปที่ 1 คือ

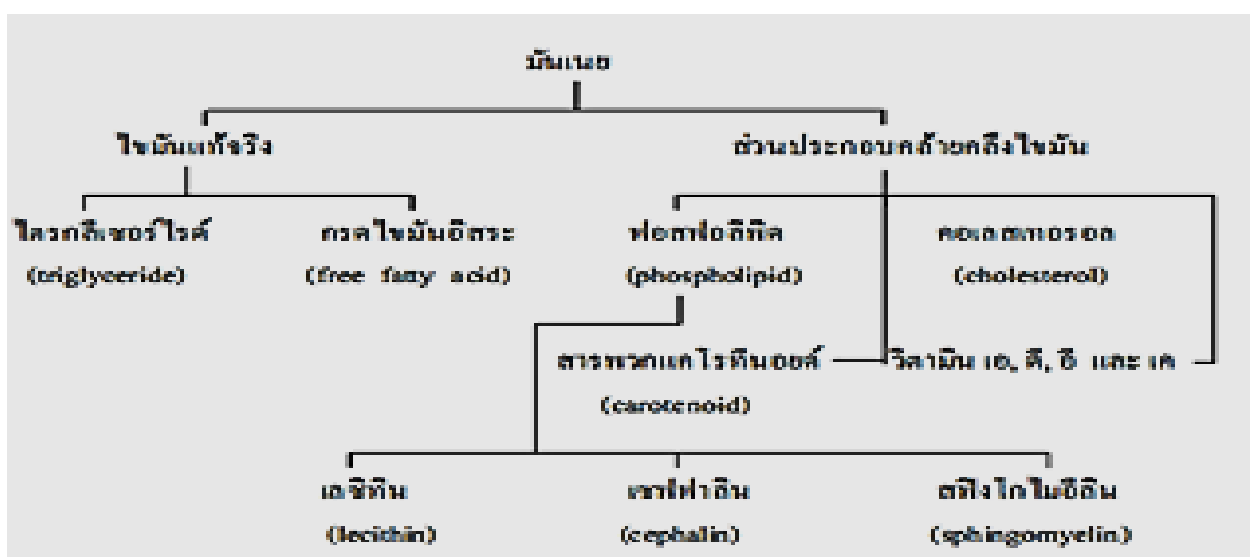
1. น้ำ: เป็นส่วนประกอบหลักช่วยในการกระจายตัวของไขมันและโปรตีนเกิดเป็นลักษณะอิมัลชัน และเป็นตัวทำละลายน้ำตาลในนม, วิตามินที่ละลายในน้ำ และแร่ธาตุต่างๆ
2. ไขมันเนย : ปกติจะอยู่ที่ 33-47 กรัมต่อลิตร อยู่ในรูปของอนุภาคเม็ดไขมัน ในสภาพอิมัลชัน ส่วนกลางของอนุภาคเม็ดไขมันเป็นไตรกลีเซอไรด์ร้อยละ 97-98 ที่ถูกล้อมรอบด้วยเมมเบรน



รูปที่ 1 ส่วนประกอบทางเคมีของนํ้านมโค

ที่มา : Kohut (2005)

3. ส่วนที่เหลือเป็นไขมันชนิดอื่นและวิตามินที่ละลายในไขมัน ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 ส่วนประกอบของไขมันเนยในนํ้านมโค

ที่มา : Nielsen (2003)

4. ของแข็งทั้งหมดที่ไม่รวมไขมันในน้ำนม
5. โปรตีน :มีประมาณ 3.25%ในน้ำนมวัว แบ่งเป็น 2 ประเภทหลักคือ โปรตีนเคซีนและโปรตีนเวย์ โดยโปรตีนเคซีนมีประมาณ80% ของโปรตีนทั้งหมดในน้ำนม ไม่มีสีและกลืนเป็นตัวที่ทำให้น้ำนมมีสีขาวจะกระจายตัวอยู่ในรูปเชิงเดี่ยวในน้ำนมเพียง 10% ส่วนใหญ่จะรวมตัวในรูปCasein micelle ที่มีประจุลบและกระจายตัวเป็นคอลลอยด์ในน้ำนมส่วนโปรตีนเวย์เป็นของเหลวส่วนที่เหลือหลังแยกเอาตะกอนโปรตีนเคซีนออก
6. น้ำตาลแล็กโทส (lactose):พบประมาณ 2.4-6.1%ในน้ำนมวัว เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ที่ประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล กับ น้ำตาลกาแล็กโทส 1 โมเลกุล รวมตัวกันด้วยพันธะ-1,4-glycosidic bond มีความหวานน้อยกว่าน้ำตาลชนิดอื่น ละลายน้ำได้ไม่ดี
7. วิตามิน และ แร่ธาตุ :มีมากมายหลายชนิด เช่น แคลเซียม, โพแทสเซียม และโซเดียม เป็นต้น

2.2 ผลิตภัณฑ์นมหมัก

นมเปรี้ยว หรือโยเกิร์ต (Yogurt) เกิดจากการหมักด้วยแบคทีเรีย *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus subsp. bulgaricus* หรือ *Lactobacillus subsp.* ชับสปีชีส์อื่น หรือได้จากการหมักด้วยจุลินทรีย์ นมเปรี้ยวชนิดที่แตกต่างหรือนอกเหนือจากที่กำหนดไว้ เช่น *Lactobacillus casei subsp. Shirota* หรือ *Bifidobacterium* ผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวที่มีจำหน่ายในท้องตลาดที่ได้นำไปผ่านการฆ่าเชื้อหลังการหมัก ต้องทำให้เป็นเนื้อเดียวกันและฆ่าเชื้อด้วยกรรมวิธีพาสเจอไรซ์ (pasteurization) โดยใช้อุณหภูมิและเวลาอย่างใดอย่างหนึ่ง เช่น ระบบ Low-Temperature Long-Time (LTLT) อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 63 องศาเซลเซียส และคงอยู่ที่อุณหภูมินี้ไม่น้อยกว่า 30 นาที แล้วทำให้เย็นลงทันทีที่ 5 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่า หรือใช้ระบบ High-Temperature Short-Time ด้วยระบบการพาสเจอไรซ์แบบต่อเนื่อง (in-line pasteurization) ใช้ อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 72 องศาเซลเซียส และคงอยู่ที่อุณหภูมินี้ไม่น้อยกว่า 15 วินาที แล้วทำให้เย็นลงทันทีที่ 5 องศาเซลเซียสหรือต่ำกว่า

ส่วนนมเปรี้ยวพร้อมดื่ม ยู เอช ที (UHT fermented milk drink หรือ pasteurized drinking yogurt) มีกรรมวิธีฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ ตั้งแต่ 100 องศาเซลเซียส ขึ้นไปและคงอยู่ที่อุณหภูมินี้ตามระยะเวลาที่เพียงพอจะทำลาย จุลินทรีย์ที่สามารถเพิ่มจำนวนเมื่อเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิปกติ แล้วบรรจุในภาชนะในสภาวะที่ปราศจากเชื้อ นอกจากนี้ การฆ่าเชื้อปนเปื้อนด้วยกรรมวิธีอย่างอื่นที่มีมาตรฐานเทียบเท่ากรรมวิธีตามที่ได้ได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการอาหารและยา

คุณลักษณะทางเคมีและจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวที่กำหนดตามมาตรฐานอุตสาหกรรม มีประกาศกำหนด (มาตรฐานอุตสาหกรรมนมเปรี้ยว, 2547) ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 คุณลักษณะทางเคมีและจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวตามมาตรฐานอุตสาหกรรม

รายการ	โยเกิร์ต	โยเกิร์ตปรุงแต่ง	นมเปรี้ยวพร้อมดื่ม	นมเปรี้ยวพร้อมดื่มพาสเจอร์ไรส์	นมเปรี้ยวพร้อมดื่มยูเอชที	วิธีวิเคราะห์ตาม
โปรตีน ไม่น้อยกว่า ร้อยละ	3	3	1.5	1.5	1.5	AOAC (2000) ข้อ 33.2.12
ความเป็นกรด ไม่น้อยกว่า ร้อยละ (คำนวณเป็นกรดแล็กติก)	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	AOAC (2000) ข้อ 33.2.06
จุลินทรีย์ทั้งหมดที่ทำให้เกิดกรด ไม่น้อยกว่า โคโลนีต่อกรัมหรือโคโลนีต่อลูกบาศก์เซนติเมตร *	10^7	10^7	10^7	10^4	น้อยกว่า 10	Standard Methods for the Examination of Dairy Products (1992) หน้า 277-280

ที่มา : มาตรฐานอุตสาหกรรมนมเปรี้ยว (2547)

การตกตะกอนแยกโปรตีนในนม

ตะกอนนมมีขนาดเล็กมากไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า โดยนํ้านมเป็นคอลลอยด์ชนิดอิมัลชันอยู่ในสถานะของเหลว กลไกการตกตะกอนคอลลอยด์ เกิดขึ้นเมื่ออนุภาคมีความเป็นกลางทางไฟฟ้า ทำให้อนุภาคต่างๆสามารถเข้าใกล้กันและเกิดการเกาะรวมตัวเป็นกลุ่มจนตกตะกอน ความเสถียรของอนุภาคคอลลอยด์เกิดจากการที่อนุภาคคอลลอยด์สามารถเกิดการรวมกลุ่มกันตกตะกอนและสามารถกลับสู่สภาพคอลลอยด์ได้ตลอดเวลาขึ้นอยู่กับแรงภายนอกที่มากระทำ

วิธีการตกตะกอนโปรตีนมีหลายวิธี ได้แก่การปรับ pH ของสารละลาย เมื่อปรับค่า pH ของสารละลายให้มีค่าเท่ากับ ค่า pI ของโปรตีนซึ่งเป็นจุดที่โปรตีนละลายได้น้อยที่สุดทำให้ความหนืดของสารละลายลดลง เนื่องจากที่จุดนี้ประจุรวมของกรดอะมิโนจะมีค่าเป็นศูนย์ทำให้อนุภาคของโปรตีนสามารถเคลื่อนที่เข้าหากันและรวมตัวกันตกตะกอน การตกตะกอนโปรตีนด้วย Neutral salt: เป็นการเพิ่มความแรงไอออนของสารละลาย เพื่อไปแย่งโมเลกุลของน้ำที่ล้อมรอบโมเลกุลของโปรตีนออกมาล้อมรอบโมเลกุลของเกลือเอง ทำให้อนุภาคโปรตีนจับตัวกันตกตะกอนลงมา (Lopez และคณะ, 2014)

การเติมตัวทำลายอินทรีย์ : ตัวทำลายอินทรีย์สามารถทำลายสภาพธรรมชาติของโปรตีนโดยไปทำลาย พันธะภายในของโปรตีนและพันธะระหว่างน้ำกับโปรตีนจนแรงดึงดูดระหว่างโปรตีนและโปรตีนเพิ่มขึ้นและตกตะกอนลงมา การทำลายสภาพธรรมชาติของโปรตีน เป็นการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติอื่นๆหรือโครงสร้างระดับที่ 2, 3 หรือ 4 ของโปรตีนซึ่งมีผลต่อการทำงานด้วยการเติมสารเคมีหรือโดยสภาวะบางอย่าง (Lopez และคณะ, 2014)

2.4 ไขมันนม

มีคุณสมบัติเป็น amphipathic แต่มีส่วนที่มีขั้วอยู่แต่มีในปริมาณที่น้อยกว่าส่วนที่ไม่มีขั้ว การเปลี่ยนแปลงทางเคมีของไขมันและน้ำมัน ปฏิกริยาไลโปไลซิส:เป็นการสลายของโมเลกุลของไขมัน ซึ่งอาจเกิดจากปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์หรือเร่งโดยความร้อนร่วมกับความชื้น(hydrolysis) ทำให้ได้กรดไขมันอิสระซึ่งกรดไขมันอิสระเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ง่าย ซึ่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสามารถเกิดได้ทั้งในสารละลายเบสและสารละลายกรดเมื่อให้ความร้อน (Contarini and Povolo, 2013).

ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในสารละลายเบส : เรียกว่า ปฏิกิริยาสะปอนนิฟิเคชันได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลีเซอรอลและเกลือสบู่ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น amphipathic โดยปฏิกิริยานี้จะไม่เกิดการผันกลับ

ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในสารละลายกรด:ได้กรดอินทรีย์และแอลกอฮอล์ และปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นปฏิกิริยาที่ผันกลับได้

ปฏิกิริยาไฮโดรจิเนชัน: เป็นการเติมไฮโดรเจนเข้าทำให้กรดไขมันไม่อิ่มตัวเพื่อเปลี่ยนเป็นกรดไขมันชนิดอิ่มตัว

ปฏิกิริยาออกซิเดชัน: เป็นปฏิกิริยาระหว่างกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวกับออกซิเจนเกิดกลิ่นรสที่ไม่พึงประสงค์หรือคุณค่าทางโภชนาการลดลง

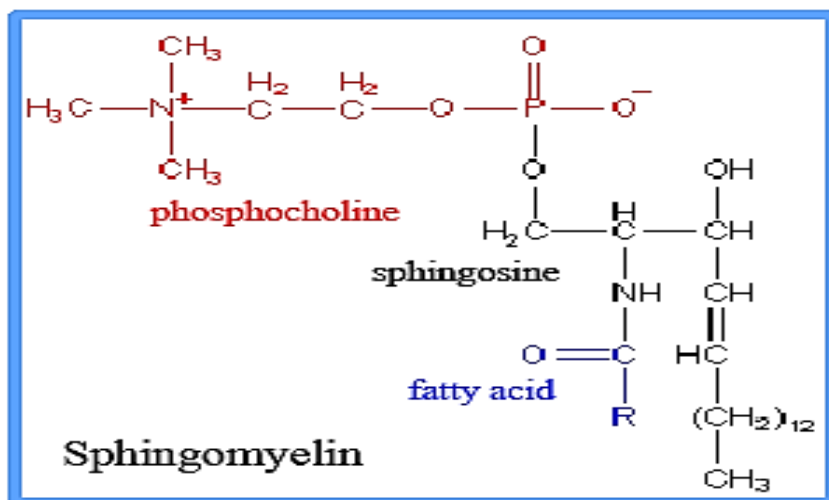
การสกัดด้วยตัวทำละลาย: เป็นการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมนำมาละลายสารที่ต้องการออกมาจากสารผสมประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก คือ 1. กำจัดสารรบกวน (Interference) 2.เพิ่มความเข้มข้น 3.การตรวจสอบติดตามการมีอยู่ของสารแบ่งได้ 3 วิธีหลัก คือ 1) Solid/Liquid Extraction 2) Liquid/ Liquid Extraction 3) Acid/Base Extraction (Contarini and Povolo, 2013).

2.5 สฟิงโกไมอีลิน (sphingomyelin)

สฟิงโกลิพิด (Sphingolipid) เป็นลิพิดเอสเทอร์ที่เกิดจากกรดไขมันกับสฟิงโกซีน พบมากเป็นอันดับสองรองจากกลีเซอโรฟอสโฟลิพิด ส่วนใหญ่พบในเยื่อเซลล์ ส่วนน้อยพบในไขมัน ส่วนสฟิงโกซีน (sphingosine) เป็นสารจำพวกอะมิโนแอลกอฮอล์ที่มี C 18 อะตอม มีโครงสร้าง 2 ส่วนคือส่วนหัวซึ่งเป็นส่วนที่มีขั้วประกอบด้วยหมู่ 10 ไฮดรอกซิล ($-CH_2-OH$) และส่วนหางซึ่งเป็นส่วนที่ไม่มีขั้วประกอบด้วยไฮโดรคาร์บอนสายยาวและมีหมู่อะมิโนอยู่ตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 หมู่อะมิโนของสฟิงโกซีนสามารถสร้างพันธะเอไมด์กับหมู่คาร์บอกซิลของกรดไขมันได้สารประกอบที่เรียกว่า เซอรามีไนด์ (ceramide) หมู่ไฮดรอกซิล ($-OH$) ที่อยู่ตรงส่วนหัวของเซอรามีไนด์สามารถสร้างพันธะเอสเทอร์กับสารประกอบอื่นๆได้หลายชนิด สฟิงโกลิพิดที่สำคัญได้แก่ สฟิงโกไมอีลิน กาแลกโทซิลเซอรามีไนด์และกลูโคซิลเซอรามีไนด์ เป็นต้น (Morita, และคณะ, 2004)

สฟิงโกไมอีลิน (sphingomyelin) เป็นสฟิงโกลิพิดที่พบมากที่สุด โครงสร้างดังรูปที่ 3 มีหมู่โคลีนฟอสเฟต (phosphocholine) จับกับไพรมารีไฮดรอกซิลของเซอรามีไนด์สฟิงโกไมอีลินพบที่เยื่อหุ้มเซลล์สัตว์และพลาสมาที่พบในเยื่อหุ้มเซลล์ประสาทในผลิตภัณฑ์นมหมักมีสารสฟิงโกไมอีลิน(fermented milk

sphingo-myelin, F-SpM) ที่มีองค์ประกอบของโมเลกุล SpMs ที่มีกรดไขมัน 4 แบบเป็นองค์ประกอบได้แก่ C21-, C22-,C23- และ C24-fatty acid (Morita, *et. al.* 2012)

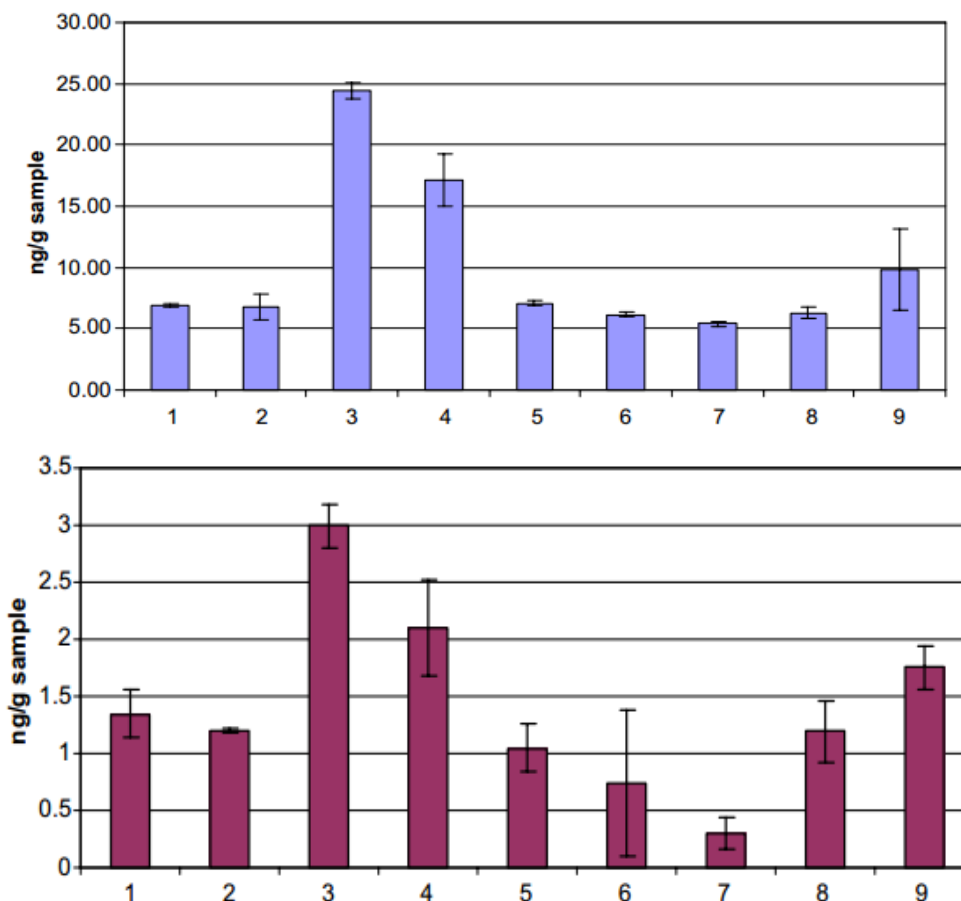


รูปที่ 3 โครงสร้างของสฟิงโกไมอีลิน

ที่มา : Kohut (2005)

สารสฟิงโกไมอีลินที่เป็นสฟิงโกลิพิดประเภทหนึ่งที่พบในอยู่ในสิ่งมีชีวิตประเภทยูคาริโอต โดยเฉพาะบริเวณผนังเซลล์ โดยสารตัวนี้เมื่อสลายตัวจะได้สารพวกเซราไมด์ซึ่งมีประโยชน์ต่อสุขภาพของคน โดยสารชนิดนี้เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของอาหาร พบได้ในอาหารปกติทั่วไป เช่น ไข่, นม และ ถั่วเหลือง เป็นต้น สารสฟิงโกลิพิดเนื่องจากเป็นสารที่มีประโยชน์ในการดูแลรักษาสุขภาพ ป้องกันการเกิดมะเร็ง สารชนิดนี้เป็นสารที่พบโดยทั่วไปในเซลล์ยูคาริโอตพบมากบริเวณผนังเซลล์, กอลจิ แอปพาราตัส และไลโซโซม ซึ่งโครงสร้างที่ซับซ้อนของสารดังกล่าวจะประกอบด้วยสารสฟิงกอยด์สายยาว

งานวิจัยของ Ribar และคณะ (2007) ได้สกัดสารสฟิงโกลิพิดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์สองชนิดคือ คลอโรฟอร์มและ เมทานอล แล้วตามด้วยกระบวนการย่อยด้วยเบสและกรดตามลำดับ ได้สารสฟิงโกซีนและสฟิงกานินในรูปอิสระ ซึ่งได้นำสารสกัดดังกล่าวไปตรวจหาปริมาณสารดังกล่าวด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ได้ดังรูปที่ 4 งานวิจัยนี้ได้ทำการตรวจติดตามสาร Sphingoid base ซึ่งเป็นแกนกลางของสารสฟิงโกไมอีลินในตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมหลากหลายชนิด โดยการนำตัวอย่างมาทำการ Extraction, Base hydrolysis และ Acid hydrolysis และนำสารสกัดที่ได้มาหาปริมาณสารดังกล่าวด้วยเทคนิค HPLC ซึ่งพบสารดังกล่าวในตัวอย่างทุกตัวโดยจะพบมากที่สุด ใน Sour cream และจากผลการทดลองพบปริมาณของ Sphingoid base ทั้งหมดมากกว่า Sphingoid base อิสระ แสดงให้เห็นว่า Sphingolipid ในผลิตภัณฑ์นมตัวอย่างมักจะอยู่ในรูปของ Complex



รูปที่ 4 ผลการวิเคราะห์สาร Sphingosine และ Sphinganine โดย 1. yogurt 3.2% 2. yogurt 2.8 % 3. Sour cream 20% 4.Sour cream 12% 5. Sour milk 3.2% 6.Kefir 3.2% 7.Acidophilusmilk 3.2% 8.Cow's cheese 9.Cow's milk

ที่มา: Ribar และคณะ (2007)

2.6 การสกัดหาสารสฟิงโกไมอีลิน (sphingomyelin)

จากรายงานของ Kohut (2005) ที่ทำการตรวจสอบสารสฟิงโกไมอีลิน (SpM) ในโปรตีนเวย์ (Whey protein) ด้วยเทคนิค HPTLC ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตชีสและผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับนมต่างๆ โดยมีการสกัดแยกสาร SpM ด้วยสารเคมีต่างๆซึ่งสามารถตรวจสอบเชิงคุณภาพและปริมาณออกมา พบว่ามีองค์ประกอบของโปรตีนอยู่สูง รวมทั้งกรดอะมิโนที่จำเป็นพื้นฐานต่อร่างกายที่ต้องการในแต่ละวัน โดยศึกษาในโปรตีนเวย์สองชนิดคือ Whey protein concentrate และ Whey protein isolates โดยเริ่มจากการสกัด, แยกส่วนและการวิเคราะห์ไขมันโดยนำตัวอย่างโปรตีนเวย์ทั้ง 2 ประเภทในสภาพของแข็งมาทำการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เพื่อให้ได้สารสกัดไขมัน จากนั้นนำสารสกัดไขมันที่ได้ไปแยกส่วนด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีที่มี Aminopropyl เป็นวัฏภาคนิ่งและมีตัวทำละลายอินทรีย์เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ แยกสารสกัดไขมันออกเป็น 5 ส่วน จากนั้นนำสารสกัดทั้ง 5 ส่วนไปเข้าสู่ขั้นตอนการวิเคราะห์ไขมันด้วย

เทคนิคทินเลร์โครมาโตกราฟีเทียบกับสารมาตรฐานสฟิงโกไมอีลินเพื่อหาสารสกัดไขมันที่มีสารสฟิงโกไมอีลินอยู่จากสารสกัดไขมันทั้ง 6 ส่วนแล้วนำไปตรวจวัดด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ซึ่งพบว่าปริมาณสารสฟิงโกไมอีลินแปรผันตามปริมาณของไขมันในตัวอย่างดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลวิเคราะห์สาร Sphingomyelin ของที่พบในเวย์โปรตีน

sample	total lipid content (%)	mg SM	% SM
894	0.3	0.00564	0.001538
895	0.3	0.203	0.019
60	17.59	1.482	0.01136
700	15	2.223	0.019275
6000	14.5	2.917	0.01365

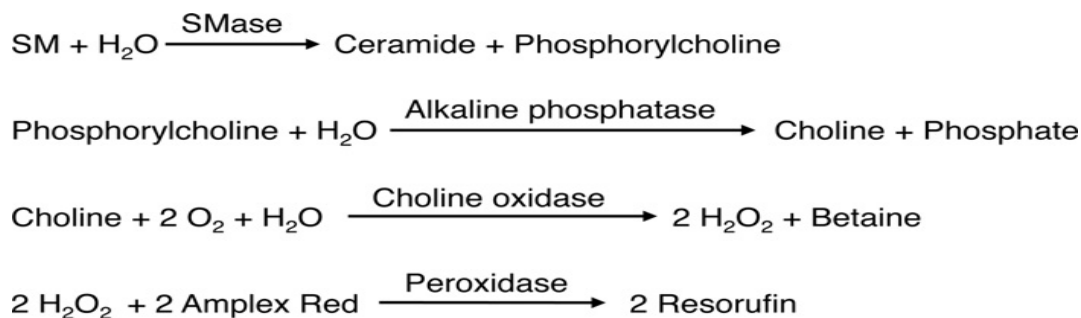
Table 3: Amount of SM (mg and %) found in samples compared to the total lipid content (%).

ที่มา Kohut (2005)

ด้วยโครงสร้างที่ซับซ้อนของ Sphingomyelin ทำให้การวิเคราะห์สารนี้มีความยุ่งยากมาก ต้องใช้เทคนิคร่วมกันระหว่างการใช้โครมาโตกราฟีแมสสเปกโตรสโกปีชนิด Fast atom bombardment mass spectrometry (FAB-MS) และ fast atom bombardment tandem mass spectrometry (FAB-MS/MS) ซึ่งเป็นเทคนิคขั้นสูงที่ต้องใช้เครื่องมือเฉพาะมีประสิทธิภาพสูง ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน ผู้วิเคราะห์ต้องมีความชำนาญในการเตรียมที่ยุ่งยากและใช้เครื่องมือพิเศษ (โสภารัตน์ ปิยะชาติปติ. 2555). รวมทั้งต้องใช้สารประกอบมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์เพื่อบ่งชี้ปริมาณ ส่งผลให้ราคาค่าวิเคราะห์จึงมีราคาสูงตามไปด้วย ด้วยเหตุนี้จึงมีความจำเป็นในการหาเครื่องมือหรือพัฒนาวิธีการที่ไม่ยุ่งยาก ราคาไม่สูงนักและใช้อุปกรณ์ที่ไม่ใช่อุปกรณ์พิเศษ เป็นอุปกรณ์พื้นฐานที่สามารถพบได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปหรือสามารถหาซื้อได้ทั่วไปในราคาไม่สูงมาก ในการช่วยตรวจสอบหาสารดังกล่าว

2.7 การหาปริมาณ sphingomyelin โดยเทคนิคทางเอนไซม์

มีงานวิจัยนี้เป็นการปรับปรุงความไวของเทคนิค enzymatic fluorometric สำหรับการหาปริมาณ SM ที่เป็นสารมาตรฐานและตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงและความถูกต้อง โดยนำ Sphingomyelin มาทำการเจือจางกับสารละลาย Triton X-100 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้กราฟมาตรฐานสำหรับนำมาเปรียบเทียบกับปริมาณ Sphingomyelin ที่ได้จากการทดสอบด้วยเทคนิคทางเอนไซม์มีหลักการตามปฏิกิริยาดังรูปที่ 5 Miura และคณะ (2012) ต่อไปนี้



รูปที่ 5 วิธีการวิเคราะห์หา Sphingomyelin โดยเทคนิคทางเอนไซม์

ที่มา : Miura และคณะ (2012)

จากรูปที่ 5 เอนไซม์ SMase ย่อยสลายไฮโดรไลซ์ SM ให้เป็น ceramide และ phosphorylcholine แล้วเอนไซม์ alkaline phosphatase เร่งปฏิกิริยาการเกิด choline จาก phosphorylcholine หลังจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของ choline ที่ถูกเร่งด้วยเอนไซม์ choline oxidase ซึ่งทำให้เกิด H_2O_2 สองโมเลกุล จากนั้น peroxidase และ Amplex Red ทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 ได้เป็น resorufin ที่มีค่าการเรืองแสง (fluorescent) สูง และสามารถวัดผลได้

การย่อยสลายสฟิงโกไมอีลินอาศัยการทำงานของเอนไซม์ sphingomyelinase ซึ่งพบอยู่ใน lysosome ได้ผลิตภัณฑ์เป็นซีราไมด์และ phosphorylcholine ซึ่งซีราไมด์ถูกย่อยต่อไปด้วยเอนไซม์ ceramidase ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็น sphingosine และ free fatty acid ซีราไมด์มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อภาวะเครียด (stress) ส่วน sphingosine ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของ protein kinase C โรคทางพันธุกรรมลักษณะ autosomal recessive ที่ชื่อว่า Niemann-Pick disease เป็นโรคที่เกิดจากความบกพร่องของเอนไซม์ sphingomyelinase มีผลทำให้เกิดการสะสมของไขมันที่ตับและม้ามในเด็กแรกเกิดพบว่า มีการสะสมของสฟิงโกไมอีลินที่บริเวณ Central Nervous System (CNS) ทำให้เกิดการเสื่อมของเซลล์ประสาท (neurodegeneration) และทำให้เสียชีวิตในวัยเด็ก

2.8 เทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (Near Infrared Spectroscopy: NIRS)

เทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (Near Infrared Spectroscopy: NIRS) เป็นเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับการวัดและวิเคราะห์รังสีแม่เหล็กไฟฟ้าช่วงอินฟราเรดย่านใกล้ (Near Infrared Spectroscopy: NIRS) ที่สามารถดูดกลืนเข้าไปหรือเปล่งออกมา โดยโมเลกุลแต่ละชนิดจะมีค่าเฉพาะในการดูดกลืนรังสีช่วง NIRS ซึ่งตรงกับความถี่ในการสั่นของโมเลกุลในสถานะพื้น โดยระดับของการดูดกลืนจะปรากฏใน NIR Spectrum (NIRs) ที่สามารถนำไปวิเคราะห์สารในเชิงปริมาณและคุณภาพคุณภาพและปริมาณ ข้อดีของเทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ เป็นวิธีที่ไม่ทำลายตัวอย่าง และการเตรียมตัวอย่างไม่ยุ่งยากและใช้ตัวอย่างในปริมาณน้อย รวดเร็วเชื่อถือได้โดยการวัดสเปกตรัมแต่ละครั้งสามารถนำมาวิเคราะห์เพื่อทำนายค่าต่างๆได้หลายค่าในเวลาเดียวกัน ไม่ใช้สารเคมีในการเตรียมตัวอย่างจึงปลอดภัยและเป็นมิตรต่อ

สิ่งแวดล้อม ใช้ทดแทนวิธีทางเคมีได้และในระยะยาวสามารถช่วยลดต้นทุนการผลิตได้ (วารุณี และศุมาพร เกษมสำราญ, 2552).

2.8.1 หลักการพื้นฐานของสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้

สเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้หรือ NIRS เป็นการศึกษาอันตรกิริยาระหว่างรังสีอินฟราเรด ย่าน ใกล้ กับสสารที่สามารถเกิดอันตรกิริยากับรังสีอินฟราเรดย่านใกล้ คือ สสารที่โมเลกุลประกอบด้วย พันธะไฮโดรเจน (X - H) อะตอม X ได้แก่ c, o, N, ร ฯลฯ อันตรกิริยาดังกล่าวคือการที่ โมเลกุลดูดกลืนรังสี อินฟราเรดย่านใกล้เข้าไป ซึ่งมีผลต่อการสั่นของพันธะต่าง ๆ ในโมเลกุล ระดับการ ดูดกลืนรังสีอินฟราเรด ย่านใกล้ของสสารที่ความยาวคลื่นต่างๆ ปรากฏในสเปกตรัม NIR เพื่อนำไป ประมวลผลในการวิเคราะห์เชิง ปริมาณและเชิงคุณภาพต่อไป (ศุมาพร, 2552)

รังสีอินฟราเรดย่านใกล้ หมายถึง รังสีแม่เหล็กไฟฟ้าที่จัดอยู่ในรังสีอินฟราเรด (IR radiation) โดย ช่วงคลื่นอินฟราเรด (IR spectrum) สามารถแบ่งออกเป็น 3 ช่วง คือ อินฟราเรดย่านใกล้ (NIR ความยาว คลื่น 800 - 2,500 nm) อินฟราเรดย่านกลาง (Mid IR ความยาวคลื่น 2,500 - 25,000 nm) และอินฟราเรด ย่านไกล (Far IR ความยาวคลื่น 25,000 - 100,000 nm) ตามลำดับ

จากทฤษฎีกลศาสตร์ควอนตัม อธิบายว่าโมเลกุลของสสารประกอบขึ้นด้วยอะตอมที่เชื่อมต่อกัน ด้วย การสร้างพันธะเคมี พันธะในโมเลกุลเกิดการสั่น (vibration) อยู่ตลอด เรียกการสั่นชนิดนี้ว่า การสั่นใน สถานะพื้น (vibrational ground state) ด้วยความถี่เชิงมีค่าเฉพาะ (quantized frequency) ถ้าโมเลกุลเกิดอันตร กิริยากับรังสี NIR จะดูดกลืนรังสีที่มีความถี่ตรงกับค่าเฉพาะ จนทำให้เกิดการสั่นในสถานะกระตุ้น (vibrational excited state) ระดับโอเวอร์โทน

โมเลกุลไม่สามารถอยู่ในสถานะ กระตุ้นได้จึงต้องคายพลังงานออกมาในรูปความร้อนเพื่อให้ กลับคืนสู่การสั่นในสถานะ พื้นตามเดิม เรียก ปรากฏการณ์นี้ว่าแทรนซิชัน (transition) เมื่อรังสีอินฟราเรด ย่านใกล้เดินทางผ่านเข้าไปยังสสาร เกิดอันตรกิริยา (interaction) กับอะตอม และ โมเลกุลของสสารนั้น รังสี บางส่วนจะถูกดูดกลืน (absorption) เอาไว้ บางส่วนจะผ่านออกมา (transmission) และบางส่วนเกิดการ สะท้อน (reflection) ปรากฏการณ์เหล่านี้จะเกิดเพียงอันใดอันหนึ่งหรือ เกิดพร้อม ๆ กันได้

ตัวแปรที่มีอิทธิพลต่อการวิเคราะห์ค่า NIRS ได้แก่ ลักษณะเครื่อง การใช้งาน สภาพการใช้งาน ความสะอาดความไม่ละเอียดถี่ถ้วน ข้อมูลผิดปกติ (outliers) คือ ผลการวิเคราะห์ที่แตกต่างไปจากกลุ่ม โดยมีค่ามากกว่าสามเท่าของค่า ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SEP) ปัจจัยสำคัญของการเกิดปัจจัยสำคัญที่ทำให้ เกิดความคลาดเคลื่อนได้แก่ ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับเครื่องมือ ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับตัวอย่าง และปัจจัยที่ เกี่ยวข้องกับการปฏิบัติงานของเจ้าหน้าที่ปัจจัยที่ยุงยากที่สุดที่เกิดความคลาดเคลื่อนดูเหมือนจะเป็นความไม่ คงที่ของเครื่องมือกับเครื่องมือที่มีความสัมพันธ์กับความยาวคลื่น การเลือกตัวอย่างสำหรับการทำสมการ การคัดเลือกตัวอย่าง หรือการสุ่ม ตัวอย่างเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ รวมทั้งการเตรียมตัวอย่าง การเลือกความ

ยาวคลื่น และการวิเคราะห์ค่า อ้างอิงจากห้องปฏิบัติการ แหล่งกำเนิดความคลาดเคลื่อนได้สรุปไป) ในตารางที่ 4.1 ปัจจัยที่มีเครื่องหมายดอก จันเป็นปัจจัยที่ระบุว่ามีผลกระทบต่อความแม่นยำถูกต้อง

โดยทั่วไปข้อมูลผิดปกติมี 2 แบบ คือ ข้อมูลผิดปกติเชิงสเปกตรัม (spectral outlier) และข้อมูลผิดปกติจากการวิเคราะห์เคมี (analytical outlier) ในกรณีที่ทำกรสร้างสมการแคลิเบรชันแล้วพบตัวอย่างที่มีค่าผิดพลาดสูง ก็ไม่ควรตัดสินใจว่าตัวอย่างนั้นเป็นข้อมูลผิดปกติวิธีการตรวจสอบที่ดีที่สุดคือ ตั้งสมมุติฐานว่าแล้วอย่างนั้นอาจจะเกิดข้อผิดพลาดขณะเตรียมตัวอย่างหรือวัดสเปกตรัม ปัจจัยที่ก่อให้เกิดข้อมูลผิดปกติ (outliers) ได้แก่ องค์ประกอบเคมี พันธะเคมีของส่วนประกอบ การเลือกความยาวคลื่น สภาพความชื้น แสง ลักษณะ รูปร่าง ขนาดและอนุภาค, ความหนาแน่น, เทคนิคการเตรียมตัวอย่าง ปริมาณเซลล์, อุณหภูมิ ตัวอย่าง, จำนวนความยาวคลื่นที่ใช้ในการทำมาตรฐาน calibration, การจัดการเชิงข้อมูลเชิงคณิตศาสตร์.

2.8.2 การประยุกต์ใช้สเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ ในนมและผลิตภัณฑ์นม

น้ำนมเป็นเครื่องดื่มที่ถือว่ามีคุณค่าทางอาหารมากมาย อุดมด้วยธาตุอาหารครบทุกหมู่ คือ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน วิตามิน และ เกลือแร่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำตาลนม หรือแลคโตส (lactose) แคลเซียมและโปรตีนชนิดเคซีน (casein) ซึ่งพบในน้ำนมเท่านั้น ส่วนนมเปรี้ยว คือ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากนมหมักด้วยจุลินทรีย์ที่ไม่ทำให้เกิดโรค หรือไม่ทำให้เกิดพิษ ที่ นิยมใช้คือจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติก (LactioAcid Bacteria; LAB) และปมให้เชื้อเจริญ โดยใช้ น้ำตาลแลคโตสในนมเปลี่ยนเป็นกรดแลคติกทำให้ นมมีรสเปรี้ยว และช่วยยืดอายุการเก็บนมให้นานขึ้น อาจมีการปรุง แต่งสี กลิ่นรสด้วย นมชนิดนี้เหมาะสำหรับผู้ที่ปัญหาท้องอืดไม่ได้เนื่องจากร่างกายไม่สามารถย่อยน้ำตาลแลคโตส (lactose intolerance) สามารถบริโภคนมเปรี้ยวได้ไม่มีปัญหาท้องเสียหรือเกิดก๊าซ ถ้านมเปรี้ยวนั้นผ่านการฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรส์ หรือบรรจุแบบปลอดเชื้อ (aseptic packaging) ผู้บริโภคจะได้รับ LAB ด้วย เรียกผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกส์ (probiotics) ซึ่งมีประโยชน์ต่อร่างกาย คือ ช่วยสร้างสภาวะเป็นกรดในทางเดินอาหาร ป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคเจริญและเพิ่มจำนวน นอกจากนั้นสารบางชนิดที่สร้างโดย LAB ยังมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรคได้อีกด้วย (ศุมาพร, 2552)

เทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (NIRS) ก็เป็นอีกเทคโนโลยีหนึ่งที่มีศักยภาพสูงสามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อตรวจสอบคุณภาพสินค้าทั้งทางด้านการเกษตรและอุตสาหกรรมต่างๆอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเทคโนโลยี NIRS มีคุณสมบัติพิเศษ คือ สามารถตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมีได้ โดยไม่ต้องทำลายตัวอย่าง สามารถตรวจวัดตัวอย่างในสภาพที่ตัวอย่างเป็นอยู่โดยไม่ต้องมีการเตรียมตัวอย่าง จึงตรวจวัดได้อย่างรวดเร็ว และแทบไม่ต้องใช้สารเคมีใดๆ เลย นอกจากนั้นเทคโนโลยีนี้ยังสามารถนำมาใช้ในการจำแนกตัวอย่างตามคุณสมบัติเชิงคุณภาพได้อีกด้วย และถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในผลิตภัณฑ์นมที่มีสถานะของแข็งและของเหลว ได้แก่ การศึกษาในน้ำนมดิบและผลิตภัณฑ์นม (วารุณี และศุมาพร เกษมสำราญ, 2552, ศุมาพร, 2552).

ตัวอย่างการประยุกต์ใช้ NIRS ในการวิเคราะห์องค์ประกอบไขมันของผลิตภัณฑ์นมผง ใช้เทคนิค NIRS ในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำ, โปรตีนและไขมันในหางนมผงที่มีขายในท้องตลาดและหางนมผงที่เตรียมเองในห้องปฏิบัติการ พบว่าการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคดังกล่าวให้ผลมีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงกับวิธีมาตรฐาน โดยเฉพาะตัวอย่างที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบอยู่ระหว่าง 2.85-9.70 % และสามารถนำเทคนิคนี้ในการทำนายองค์ประกอบทางเคมีได้ดีแม้ว่าตัวอย่างจะมีขนาดอนุภาคต่างกัน (ศุมาพร เกษมสำราญ, 2552)

ศุมาพร (2552) รายงานตามงานวิจัยของ Hall และ Chan เมื่อปี ค.ศ. 1993 ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน โปรตีน และแลคโตสในน้ำนมวัวดิบ ด้วยสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านไกลด้วยโปรแกรม NSAS ในการคำนวณปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธีอนุพันธ์อันดับที่สองและสร้างสมการมาตรฐานเชิงเส้นตรงแบบหลายตัวแปร (multiple linear regression; MLR) ทำนายปริมาณโปรตีนที่ให้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานความผิดพลาดในการทำนายชุดสร้างสมการ (SEC) เป็น 0.08% สำหรับสมการทำนายปริมาณไขมันจะมีความสอดคล้องกับข้อมูลสเปกตรัมในช่วงโอเวอร์โทนและคอมบินชันมาก ได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เป็น -0.998 เมื่อคำนวณโดยใช้ข้อมูลที่ตำแหน่ง 1724 นาโนเมตร และค่า SEC เป็น 0.12% ผลความผิดพลาดในการทำนายค่อนข้างสูงเนื่องจากอิทธิพลของเม็ดไขมันในน้ำนม ทำให้แสงที่ตกกระทบเกิดการกระเจิงได้ง่าย สามารถแก้ไขได้โดยคำนวณหาค่าการดูดกลืนแสงที่ตำแหน่ง 1724 นาโนเมตรด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่ ตำแหน่ง 1610 นาโนเมตร สมการใหม่ที่แก้ไขแล้วแสดงค่า SEC ลดลงเป็น 0.04% และ SEP เป็น 0.04%

จากรายงานวิจัยของ Burns และคณะเมื่อปี 2001 ซึ่งทำการวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน โปรตีน แลคโตส และปริมาณของแข็ง ทั้งหมดที่ละลายได้โดยใช้ที่ใส่ตัวอย่างออกแบบพิเศษด้วยหลักการวัดแสงที่ส่องผ่านตัวอย่างลงไปสะท้อนกับวัสดุที่เคลือบอยู่ด้านล่างแสงจะเดินทางกลับมาสตีมิเตอร์ (transflectance) ตัวอย่างน้ำมันถูกเก็บสดใหม่และควบคุมอุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียส จากนั้นนำน้ำมันมาผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ก่อนนำมาวัดสเปกตรัมอินฟราเรดย่านใกล้ สมการหาปริมาณองค์ประกอบให้ค่าทางสถิติที่ยอมรับได้ SEP สำหรับไขมัน โปรตีน และแลคโตส เป็น 0.034, 0.038 และ 0.043% ตามลำดับ (ศุมาพร, 2552)

เมื่อปี ค.ศ. 2002 Woo และคณะรายงานงานวิจัยการพัฒนาระบบการวัดวิเคราะห์องค์ประกอบในน้ำนมดิบ ได้แก่ ไขมัน แลคโตส และโปรตีน ใช้วิธี PLS ในการสร้างสมการมาตรฐาน (calibration model) และใช้วิธีปรับแต่งสเปกตรัมก่อนการสร้างสมการเพื่อลด อิทธิพลการกระเจิงของแสงอันเนื่องมาจากเม็ดไขมัน (fat globules) และอนุภาคเคซีน (casein micelles) วิธีปรับแต่งสเปกตรัมที่ใช้คือการปรับแก้การกระเจิงแสงเชิงพหุ (multiple scatter correction; MSC) และ อนุพันธ์อันดับที่สอง การใช้ MSC ผลให้ได้สมการมาตรฐานที่มีประสิทธิภาพดีในการทำนายปริมาณไขมันและโปรตีน SEP ของสมการทำนายไขมัน แลคโตส และโปรตีน เป็น 0.06, 0.10 และ 0.10% ตามลำดับ (ศุมาพร, 2552)

ขณะที่ Jankovska และคณะได้รายงานเมื่อปี ค.ศ. 2003 ถึงการใช้เทคนิคสเปกโตรสโกปี

อินฟราเรดย่านใกล้ในการหาปริมาณของแข็งทั้งหมด ไขมัน โปรตีน เคซีน ยูเรีย แลคโตสและเซลล์โซมาติก (somatic cell) ในน้ำนมวัว โดยเตรียมตัวอย่างทั้งหมด 50 ตัวอย่าง นำมาวัดสเปกตรัมด้วยเครื่อง FT-NIR สเปกโตรมิเตอร์ในช่วงความยาวคลื่น 4000 - 10000 cm^{-1} โดย 1 สเปกตรัมสแกนซ้ำด้วยระบบ FT ได้ 100 ครั้ง และวัดด้วยระบบแสงสะท้อน น้ำนมถูกวัดสเปกตรัม 3 ซ้ำ จากนั้นคำนวณหาสเปกตรัมเฉลี่ยเพื่อใช้ในการสร้างสมการมาตรฐานด้วยวิธี PLSR ต่อไป ผลทางสถิติของสมการให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของการวิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมด ไขมัน โปรตีน เคซีน ยูเรีย แลคโตสและเซลล์โซมาติกเป็น 0.928, 0.961, 0.985, 0.932, 0.906, 0.931 และ 0.872 ตามลำดับ (สุมาพร, 2552)

ในปี คศ. 1993 พบว่า Diaz-Carrillo และคณะใช้เทคนิค NIRS ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมด เคซีนทั้งหมด ส่วนประกอบเคซีน (แอลฟา เบต้า -1 และแกมมา - เคซีน) ไขมันและ แลคโตส ในนมแพะที่ได้จากแพะพันธุ์สเปนผสม (Spanish breed of goat) 3 ตัว โดยใช้วิธีมาตรฐาน คือ วิธีวิเคราะห์ดงเดิม วิธีอิเล็กโตรโฟเรซิส (electrophoresis) และวิธีหาความหนาแน่น (densitometric method) ผลการวิเคราะห์ได้ค่าที่ยอมรับได้ (สุมาพร, 2552) และในการวิเคราะห์องค์ประกอบไขมันของผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่มด้วยเทคนิค NIRS ในการตรวจสอบปริมาณไขมันในสายการผลิตโดยใช้อุปกรณ์ทางแสงขนาดเล็กที่สร้างจากเทคนิค LIGA ที่ช่วง NIR ตั้งแต่ 800-1100 nm พบว่าเครื่องสามารถตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไขมันได้ดีแต่ต้องควบคุมปัจจัยในเรื่องอุณหภูมิ การเกิดฟองและตำแหน่งของอุปกรณ์ใส่ตัวอย่าง

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี และตัวอย่าง

3.1 วัสดุอุปกรณ์

- | | |
|----------------------|---------------------------------------|
| 1. ปีกเกอร์ | 9. กระดาษทิชชู |
| 2. ปิเปต | 10. กระบอกน้ำกลั่น |
| 3. หลอดทดลอง | 11. จานอาหารเลี้ยงเชื้อปลอดจุลินทรีย์ |
| 4. Thermometer | 12. บิวเรต |
| 5. กระบอกตวง | 13. กรวยกรอง |
| 6. กระดาษกรองเบอร์ 1 | 14. หลอดหยด (Dropper) |
| 7. ขวดรูปชมพู่ | 15. ตะเกียงแอลกอฮอล์ |
| 8. หลอด centrifuge | |

3.2 เครื่องมือ

- | | |
|----------------------------------|--------------------|
| 1. เครื่องชั่ง | บริษัท OHAUS |
| 2. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะ | บริษัท E.S.D |
| 3. Water bath | บริษัท E.S.D |
| 4. เครื่อง microplate reader | บริษัท Packard |
| 5. เครื่อง NIRs | บริษัท Bruker |
| 6. ตู้บ่มจุลินทรีย์ | บริษัท Memmert |
| 7. เครื่อง Spectroscopy | บริษัท Genesys |
| 8. เครื่อง Autoclave | บริษัท Thaivictory |

3.3 สารเคมี

- | | |
|-----------------------|--------------------|
| 1. Chloroform | บริษัท RCI Labscan |
| 2. Methanol | บริษัท MERCK |
| 3. Ammonium hydroxide | บริษัท QRëC |
| 4. Hydrochloric acid | บริษัท MERCK |
| 5. Tris-HCl (pH 8) | บริษัท Vivantis |
| 6. Lactic acid | บริษัท QRëC |
| 7. Sodium Chloride | บริษัท RCI Labscan |
| 8. Magnesium Chloride | บริษัท RCI Labscan |

9. สารมาตรฐาน Sphingomyelin	บริษัท EMD Chemical
10. สารมาตรฐาน Sphingosine	บริษัท MP Biomedical
11. เอนไซม์ Sphingomyelinase	บริษัท SIGMA
12. เอนไซม์ Choline oxidase	บริษัท SIGMA
13. เอนไซม์ Alkaline phosphatase	บริษัท Oriental Yeast
14. เอนไซม์ Peroxidase	บริษัท Oriental Yeast
15. AmplexRed	บริษัท Life technologies
16. Potassium Bromide	บริษัท Fluka

3.4 ตัวอย่างนม

3.4.1 หัวเชื้อผลิตก้อนนมเปรี้ยว

- ยี่ห้อ Delight สูตรไขมันต่ำรสชาติจากบริษัทดัชมิลล์ จำกัด
- ยี่ห้อ Betagen สูตรน้ำตาล 2% จากบริษัทบีทาเกิน จำกัด
- ยี่ห้อ Yakult จากบริษัท ยาคูลท์ (ประเทศไทย) จำกัด

3.4.2 โยเกิร์ตหมักที่เตรียมขึ้นเองตามวิธีการในหัวข้อ 4.1 ในวิธีการทดลอง

3.5 การเตรียมอาหาร

3.5.1 อาหาร MRS ประกอบด้วย

เปปโตน	10	กรัม	บริษัท Lab M
Beef extract	10	กรัม	บริษัท Lab M
Yeast extract	4	กรัม	บริษัท Lab M
กลูโคส	20	กรัม	บริษัท Lab M
Tween 80	1	มิลลิลิตร	บริษัท Calbiochem
โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2	กรัม	บริษัท Ajex Finechem
โซเดียมอะซิเตต (CH_3COONa)	5	กรัม	บริษัท QRc
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.2	กรัม	บริษัท AjexFinechem
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$)	0.04	กรัม	บริษัท AjexFinechem
ผงวุ้น (Agar)	14	กรัม	บริษัท Himeia
น้ำกลั่น	1	ลิตร	

ผสมส่วนประกอบต่างๆเข้าด้วยกัน ยกเว้น agar ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 5.8 - 6.0 แล้วใส่ Agar ลงไปนำไปclave ด้วยเครื่อง autoclave แล้วทิ้งให้อุ่นหมักมิลดลงก่อนนำไป pour plate

บทที่ 4

วิธีการทดลอง

4.1 การหมักโยเกิร์ต

นํานมสดปริมาตร 2 ลิตร ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที แล้วทำให้เย็นที่ 33 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมจุลินทรีย์ในนมเปรี้ยวดีไลท์เป็นหัวเชื้อลงไปปริมาตร 240 มิลลิลิตร (12เปอร์เซ็นต์) คนให้เข้ากัน แบ่งใส่โหลๆละ 250 มิลลิลิตร 4 โหล บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเก็บตัวอย่างที่ 0, 6, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ ได้เป็นโยเกิร์ตที่ได้จากการหมักเก็บแช่เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส

เตรียมโยเกิร์ตหมักที่ได้ออกเป็น 3 ส่วน โดยกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ได้เป็นส่วนของน้ำใสและตะกอนโปรตีนแยกออกจากกัน และเก็บส่วนที่ยังไม่ผ่านการกรองไว้อีก 1 ส่วนสำหรับหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์เก็บแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

นำตัวอย่างนมไปวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อแบคทีเรียโดยเทคนิค Pour plate และวิเคราะห์หาปริมาณกรดแลคติกโดยวิธีไตเตรทนอกจากนี้นำตัวอย่างไปสกัดและวิเคราะห์สาร Sphingomyelin ต่อไป

4.2 การศึกษาการใช้เทคนิค NIRS ในการหาปริมาณ lactic acid bacteria (LAB) ในโยเกิร์ตหมัก

เพื่อศึกษาวิธีการและความเป็นไปได้ในการใช้เทคนิค NIR ในการวัดปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่มีอยู่ในโยเกิร์ตในระหว่างการหมัก โดยใช้เทคนิค NIRS เทียบกับเทคนิคจุลชีววิทยา คือการวิเคราะห์หาจำนวนแบคทีเรียในอาหารวุ้น โดยวิธี pour plate แล้วนับจำนวนโคโลนีทั้งหมดที่เกิดขึ้น (Total plate count)

4.2.1 การเตรียมสารละลายตัวอย่างโยเกิร์ต

ตัวอย่างโยเกิร์ตหมักที่ไม่ผ่านการกรอง โดยใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดโยเกิร์ตหมัก 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร ได้สารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 10^{-1} ผสมให้เข้ากัน แล้วใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดตัวอย่างจากหลอดทดลองที่ความเข้มข้น 10^{-1} ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในน้ำกลั่น ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร ได้ 10^{-2} จากนั้นทำต่อไปจนได้ 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} และ 10^{-9}

การตรวจนับเชื้อโดยเทคนิค Pour plate จากนั้นตรวจนับเชื้อโดยวิธี pour plate โดยใช้สารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 10^{-1} - 10^{-9} ทำความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ โดยใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดจากความเข้มข้นที่มากไปหาน้อย ดูดใส่จานละ 0.1 มิลลิลิตร แล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 15-20 มิลลิลิตร และ pour plate ที่จานอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยบ่ม 35±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น (ดังแสดงในภาคผนวก) คำนวณหาค่า CFU/ml ที่ได้

การเตรียมสารมาตรฐานเชื้อ ใช้โยเกิร์ตหมักที่ 24 ชั่วโมง ความเข้มข้น 10^{-5} - 10^{-9} เท่าเป็นมาตรฐานเชื้อ

4.2.2 การใช้เทคนิค NIRS ในการตรวจปริมาณเชื้อในนมหมัก

นำโยเกิร์ตหมักเจือจางที่ความเข้มข้น 10^{-1} - 10^{-9} มาวิเคราะห์โดยดูดตัวอย่างมาอย่างละ 1 มิลลิลิตรใส่ใน plate สำหรับวัดตัวอย่าง นำไปวางบนตำแหน่งวางตัวอย่างชนิด Transflectance แล้วนำแท่งโลหะมาวางทับบนตัวอย่างที่อยู่ใน plate แล้ววิเคราะห์ NIRS ตามหัวข้อ 4.5 ต่อไป

4.3 การศึกษาการใช้เทคนิค NIR ในการหาปริมาณกรดแลคติกในโยเกิร์ต

4.3.1 การตรวจหาเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกโดยวิธีเคมี

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง โดยใช้ปิเปตดูดโยเกิร์ตที่เวลาต่างๆ 5 มล. ใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 100 มล. เติม 1% Phenolphthalein 10 หยดนำไปไตเตรตด้วย 0.1 N NaOH จาก Burette โดยไตเตรตช้าๆทีละหยด จนเกิดเป็นสีชมพูอ่อนๆขึ้นบันทึกปริมาตร 0.1 N NaOH ที่ใช้ในการไตเตรต แล้วนำไปคำนวณหาค่า % กรดแลคติก

การเตรียมสารมาตรฐาน lactic acid โดยใช้สารมาตรฐาน lactic acid จากบริษัท Fluka เตรียมที่ความเข้มข้น 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ใช้ปิเปตดูดสารมาตรฐาน lactic acid 5 มล. ใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 100 มล. เติม 1% Phenolphthalein 10 หยดนำไปไตเตรตด้วย 0.1 N NaOH จาก Burette โดยไตเตรตช้าๆทีละหยด จนเกิดเป็นสีชมพูอ่อนๆขึ้นบันทึกปริมาตร 0.1 N NaOH ที่ใช้ในการไตเตรต แล้วนำไปคำนวณหาค่า % กรดแลคติก(ชาวิต และคณะ,2014)

4.3.2 การใช้เทคนิค NIRS ตรวจสอบปริมาณกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์นมเทียบกับวิธีไตเตรต

นำโยเกิร์ตที่ยังไม่ผ่านการกรองมาอย่างละ 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง ปิดฝาให้แน่น นำไปวัดด้วยเครื่องสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (NIRS) โดยดูดตัวอย่างมาอย่างละ 1 มิลลิลิตรใส่ใน plate สำหรับวัดตัวอย่าง นำไปวางบนตำแหน่งวางตัวอย่างชนิด Transflectance แล้วนำแท่งโลหะ มาวางทับบนตัวอย่างที่อยู่ใน plate แล้ววิเคราะห์ด้วยเทคนิค NIRS ต่อไป

4.4 การศึกษาการใช้เทคนิค NIRS ในการทำนายปริมาณสาร Sphingomyelin ในโยเกิร์ตหมัก

เพื่อตรวจสอบความเป็นไปได้ในการหาสารที่มีปริมาณน้อย โดยใช้เครื่องสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (NIRS) ในการวิเคราะห์หาปริมาณสาร Sphingomyelin ในโยเกิร์ต

4.4.1 การสกัดสาร Sphingomyelin ในโยเกิร์ต

Sphingomyelin เป็นสารประเภทไขมันที่มีในปริมาณน้อยมากในไขมันนมของผลิตภัณฑ์นม ซึ่งในไขมันนมมีองค์ประกอบทางเคมีที่หลากหลาย จึงจำเป็นต้องสกัดแยกเฉพาะสาร Sphingomyelin ออกมา โดยมีการสกัดตามขั้นตอน โดยวิธีของ Ribar และคณะ (2007) ดังนี้

การแยกโปรตีนจากตัวอย่างนม ตกตะกอนโปรตีนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ โดยการตวงตัวอย่างละ 100 มล. มาเติม Chloroform : Methanol solution (1 : 2 v/v) ปริมาตร 45 มล. และ 2N NH_4OH ปริมาตร 3 มล. ให้ความร้อนใน Water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เติมน้ำ Chloroform ปริมาตร 30 มล. กับ Alkaline water (น้ำด่าง) ปริมาตร 40 มล. จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 rpm นาน 20 นาที เก็บส่วนใสด้านล่างหลังการปั่นเหวี่ยงมาเติม Alkaline water ปริมาตร 30 มล. แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 rpm นาน 20 นาที แล้วเก็บส่วนใสด้านล่างมาทำในขั้นตอนต่อไป

การย่อยด้วยด่าง (Base hydrolysis) นำส่วนใสที่ได้จากขั้นตอน Extraction ในขั้นตอนการสกัดโปรตีนออกแล้วมาเติม 0.1M Methanol KOH : Chloroform (4 : 1 v/v) ปริมาตร 10 มล. จากนั้นเติม Alkaline water ปริมาตร 10 มล. แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 rpm นาน 20 นาที เก็บส่วนใสด้านล่างมาใส่บีกเกอร์ แล้วเติม Alkaline water ปริมาตร 20 มล. แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 rpm นาน 20 นาที แล้วเก็บส่วนใสด้านล่างมาระเหยงตัวทำละลายออกในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส

การย่อยด้วยกรด (Acid hydrolysis) นำส่วนใสที่ได้จากขั้นตอน Base hydrolysis ในขั้นตอนที่ 2 มาเติม Aqueous methanol HCL (1N HCL) ปริมาตร 5 มล. แล้วนำมาอุ่นสารในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 68 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม Saturated methanol KOH ปริมาตร 5 มล., Alkaline water ปริมาตร 5 มล. และ Chloroform ปริมาตร 6 มล. แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 rpm นาน 20 นาที จากนั้นเก็บส่วนใสด้านล่างมาเติม Alkaline water ปริมาตร 9 มล. แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 rpm นาน 20 นาที แล้วเก็บส่วนใสด้านล่างที่ได้นำไปวิเคราะห์หา Sphingomyelin ต่อไป

การเก็บรักษาสารสกัด นำสารสกัดที่เก็บในหลอดทดลองแล้วปิดฝาให้สนิท เก็บที่อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการดำเนินการในขั้นตอนต่อไป

การเตรียมสารมาตรฐาน Sphingomyelin ใช้สารมาตรฐาน Sphingomyelin ที่ความเข้มข้น 0, 120, 140, 160, 180 และ 200 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 5 มล. โดยใช้คลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลาย

4.4.2 การหาค่าความยาวคลื่นที่เหมาะสม (λ_{max}) ต่อการวัดสาร Sphingomyelin

นำสารมาตรฐาน Sphingomyelin ความเข้มข้น 180 $\mu\text{g/ml}$ ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 200-800 นาโนเมตร ใช้ quart cuvette ขนาด 1 เซนติเมตร ในการบรรจุสาร เพื่อหาค่าความยาวคลื่นที่เหมาะสม (λ_{max}) ในการตรวจหาสาร Sphingomyelin แล้วเลือกความยาวคลื่นนั้นไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างต่อไป

4.4.3 การตรวจสอบสาร Crude Sphingomyelin ในสารสกัดจากโยเกิร์ตด้วยเทคนิคเคมี

เตรียมสารมาตรฐาน Sphingomyelin ความเข้มข้น 0, 120, 140, 160, 180 และ 200 $\mu\text{g/ml}$ และสารสกัด Sphingomyelin ที่สกัดได้จากโยเกิร์ตไปตรวจสอบดังนี้ (โสภารัตน์, 2556)

เติมด่างแก่โปรตัสเซียมไฮดรอกไซด์ (3.0 M KOH) ลงไปสลายไตรกลีเซอไรด์ให้อยู่ในรูปของกรดไขมันอิสระ 3 โมเลกุล และ กลีเซอรอล 1 โมเลกุล หลังจากนั้นเติมกรด periodate ลงไปเพื่อให้กลีเซอรอลจะทำปฏิกิริยากับกรด periodate ได้เป็นกรดฟอร์มิก (formic acid) และฟอร์มัลดีไฮด์ (formaldehyde) จากนั้นเติม chromotropic acid ทำปฏิกิริยากับฟอร์มัลดีไฮด์ที่เกิดขึ้นได้เป็นสาร chromogen ที่มีสี แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectroscopy ที่ความยาวคลื่นที่ 544 นาโนเมตร

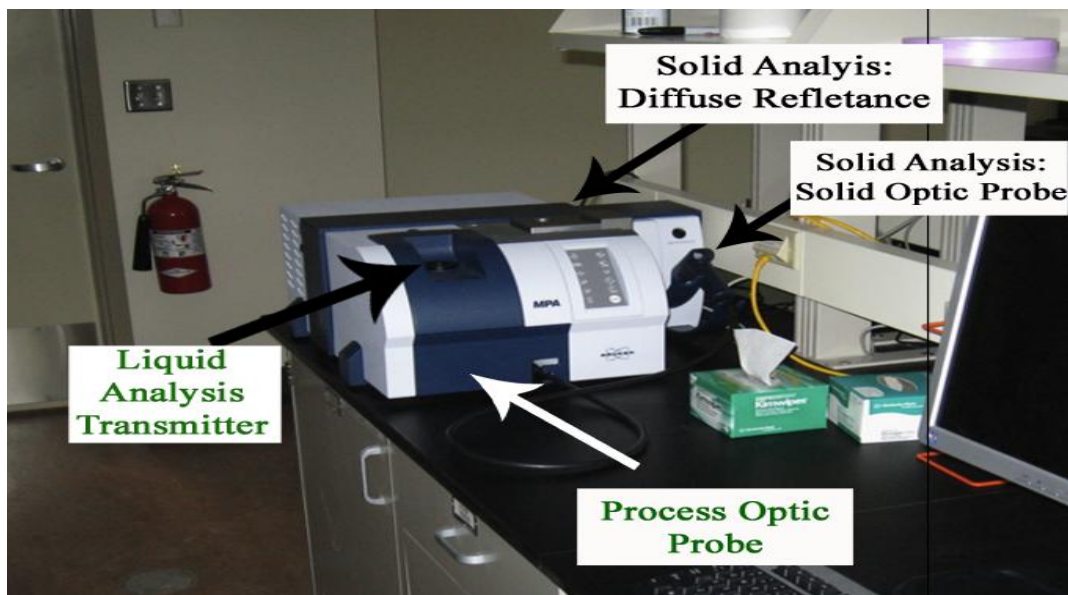
4.5 การตรวจสอบติดตามสาร Sphingomyelin ด้วยเทคนิคทางเอนไซม์

ใช้เทคนิคการหาปริมาณ Sphingomyelin โดยใช้ระบบ reagent 3 ตัว โดย Reagent M1 ประกอบด้วย 1 unit/ml SMase, 20 units/ml alkaline phosphatase, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, และ 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) Reagent M2 ประกอบด้วย 4 units/ml choline oxidase, 5 units/ml peroxidase, 300 μM Amplex Red, 0.2% Triton X-100, 50 mM NaCl, และ 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) Amplex Red Stop Reagent ที่ใช้ได้มาจากบริษัท Molecular Probes และละลายสารมาตรฐาน SM ในสารละลาย 1% Triton X-100 (Ribre, 2007)

เติมตัวอย่าง (10 μL) ลงใน Reagent M1 (40 μL) แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นจึงเติม Reagent M2 (50 μL) หลังจากบ่มไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เติม Amplex Red Stop Reagent (20 μL) แล้ววัดความเข้มของการเรืองแสงด้วยเทคนิค microplate แล้วอ่านค่าที่ความยาวคลื่นกระตุ้นและปลดปล่อยที่ 544 nm และ 590 nm ตามลำดับ นำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณ sphingomyelin ในตัวอย่างต่อไป ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาทำใน 96-well microplate และตรวจสอบด้วย microplate reader ชนิด fluorescent detector การกำหนดตัวอย่างสารที่จะวิเคราะห์ในแต่ละหลุมของ 96-well microplate การกำหนดตัวอย่างสารที่จะวิเคราะห์ในแต่ละหลุมของ 96-well microplate (จาริตและคณะ, 2556).

4.6 การวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเทคนิค NIRS

นำตัวอย่าง สารมาตรฐานและสารสกัด Sphingomyelin ของตัวอย่างนมไปวัดด้วยเครื่องสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (NIRS) โดยดูดตัวอย่างมาอย่างละ 1 มิลลิลิตรใส่ใน plate สำหรับวัดตัวอย่าง วางบนตำแหน่งวางตัวอย่างชนิด Transflectance แล้วนำแท่งโลหะมาวางทับบนตัวอย่างที่อยู่ใน plate แล้วทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง NIRS รุ่น MPA ของบริษัท Bruker ดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 5 เครื่อง Near infrared spectroscopy รุ่น MPA ของบริษัท Bruker
ติดตั้งอยู่ที่ภาคเทคโนโลยีอาหารคณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม
มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม

เพื่อแปรผลจากตัวอย่างที่ต้องการออกมาในรูปของสเปกตรัมของ NIRS สำหรับนำไปวิเคราะห์ โดยมีขั้นตอนดังนี้

นำตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ NIRS มาตรวจสอบสารด้วยเครื่อง NIRS ด้วยโปรแกรม Opus เทียบกับ สารมาตรฐาน (สารมาตรฐานเชื้อ LAB ,Lactic acid, และ Sphingomyelin) โดยวัดแบบ Transflectance ที่ Resolution 16 และ Scan time 32 ได้ NIR spectrum นำไปวิเคราะห์ต่อไป โดยสามารถปรับแต่งสเปกตรัม ให้เรียบ (smoothing) แล้วจึงนำไปทำอนุพันธ์เพื่อลดผลกระทบของตัวรบกวนและขยายจุดยอด (peak) ที่ถูก บดบังให้เด่นชัดมากขึ้น

4.6.1 การทำมาตรฐาน (Calibration) และการทวนสอบ (Validation) จาก NIR Spectrum

เพื่อตรวจสอบ Calibration model ว่ามีความสามารถเพียงพอต่อการทำนายตัวอย่างโดยดูจากค่าทางสถิติต่างๆ ซึ่งเป็นการทวนสอบ (Validation) แบบ Cross Validation

Validation คือการทวนสอบโดยมีจำนวนสารตัวอย่างที่ใช้ในการสร้าง Calibration model และมีตัวอย่างทวนสอบ (Validation) โดยใช้สารตัวอย่างจำนวนแน่นอน ในการสร้างสมการ Calibration จากนั้นก็นำเอาตัวอย่าง Validation มาทำการทวนสอบ Calibration model เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพ Calibration model ด้วยการหา Cross Validation (Valentina และคณะ, 2014).

Cross Validation คือการทวนสอบโดยนำสารตัวอย่างที่ใช้ในการสร้าง Calibration model มา ทวนสอบ (Validation) ตัวเองโดยความน่าเชื่อถืออาจไม่เท่าการ Validation แต่สามารถใช้ดูแนวโน้มความ

ถูกต้องของ Calibration model ได้ Cross Validation ใช้ในกรณีที่มีสารจำนวนน้อย สารตัวอย่างราคาแพง หรือเตรียมยาก

4.6.2 การทำอนุพันธ์ของสเปกตรัม

เมื่อได้เส้นสเปกตรัมแล้ว นำมาทำอนุพันธ์อันดับหนึ่งและอันดับสอง (First/Second derivative) ด้วยโปรแกรม Opus เพื่อวิเคราะห์สเปกตรัม และสร้างสมการมาตรฐาน (Calibration model) ก่อนนำผลที่ได้ไปทำการทวนสอบหา Validation Different ต่อไป

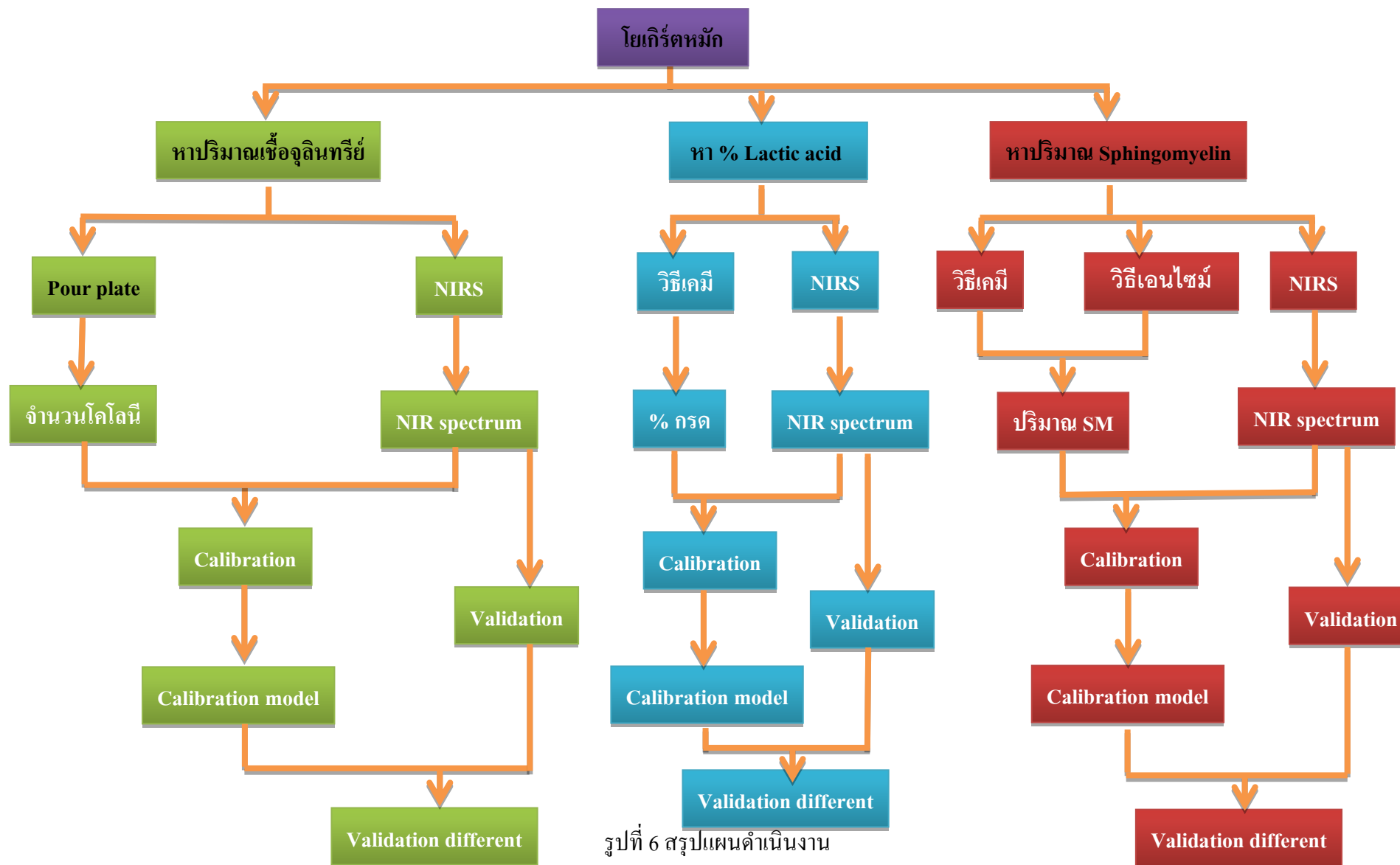
4.6.3 การทวนสอบหา Validation Different ด้วยการวิเคราะห์ทางสถิติ

เข้าโปรแกรม OPUS เลือก Setup Quant 2 method เลือก Spectra กด add spectrum เพื่อทำการโหลดเส้นสเปกตรัมที่ต้องการวิเคราะห์ เลือก components กด add component แล้วกดที่ spectra เพื่อใส่ค่าทางเคมีเข้าไป จากนั้นเลือก parameter เพื่อเลือกโหมดการวิเคราะห์เป็น second derivative แล้วเลือก validate กดที่ validate เพื่อให้โปรแกรมทำการวิเคราะห์เป็นค่าทางสถิติและกราฟ calibration and cross validation ออกมา

ค่าทางสถิติที่ใช้วิเคราะห์ตัวอย่างนม คือ ค่า R^2 -Squared (R^2), ค่า Relative percent difference (RPD) และ Root mean square error (RMSEE) โดยค่า R^2 เป็นค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ใช้ในการบ่งบอกถึงความน่าเชื่อถือในการทำนายซึ่งค่ายิ่งเข้าใกล้ 1 มากแสดงว่าค่ามีความน่าเชื่อถือมาก, ค่า RMSEE เป็นค่าที่บ่งบอกถึงความคลาดเคลื่อน (Error) ของสมการ และค่า RPD เป็นค่าการตัดสินใจว่าสมการ Calibration มีความสามารถในการทำนายหรือไม่ ซึ่งถ้าค่า RPD มากกว่า 2 แสดงว่าสมการ Calibration สามารถใช้ในการทำนายการวิเคราะห์สารได้อย่างน่าเชื่อถือ ค่าสถิติทั้งหมดที่ได้ยังสามารถนำไปวิจารณ์ถึงแนวโน้มการใช้เทคนิค NIRS ไป ทดแทนการตรวจวิเคราะห์โดยวิธีอื่นๆ ได้อย่างเหมาะสมเพียงใด (Teerachaichayut และคณะ, 2011).

รูปที่ 6 สรุปแผนภาพสรุปการทดลองใช้ NIRS ในการทดลองทำนายหาสารและเชื้อแบคทีเรียในโยเกิร์ต (ไขมันเปรี้ยวดีไลท์เป็นหัวเชื้อ) ซึ่งหมักในระยะเวลาที่ต้องการ แล้วนำโยเกิร์ตหมักมาวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อ lactic acid bacteria (LAB) โดยวิธี pour plate หาปริมาณกรดแลคติกโดยวิธีไตเตรท และตรวจหาสาร Sphingomyelin โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง จากนั้นตรวจสอบด้วยเครื่อง NIRS ได้เป็นเส้นสเปกตรัมของสารตัวอย่างแล้ววิเคราะห์กับค่าทางเคมีและการวัดค่าการดูดกลืนแสงได้เป็น Calibration Model ซึ่งได้ค่า Validation different อัตโนมัติเพื่อใช้ในการทำนายตัวอย่างต่อไป

สถานที่ทำการทดลอง คือ ห้องปฏิบัติการ ท 223 ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพและห้องเครื่องมือ NIRS ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร จังหวัดนครปฐม



บทที่ 5

ผลการทดลองและวิจารณ์

5.1 ผลของการหมักโยเกิร์ต

จากการทดลองหมักนมสดพาสเจอร์ไรส์ด้วยหัวเชื้อนมเปรี้ยวที่ 37 องศาเซลเซียส แล้วเก็บตัวอย่างโยเกิร์ตที่ได้ที่ 0, 6, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง เมื่อนำโยเกิร์ตมากรองแยกตะกอนโปรตีน (curd) ไปชั่งน้ำหนักเพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของการหมักที่เวลาต่างๆ ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 7



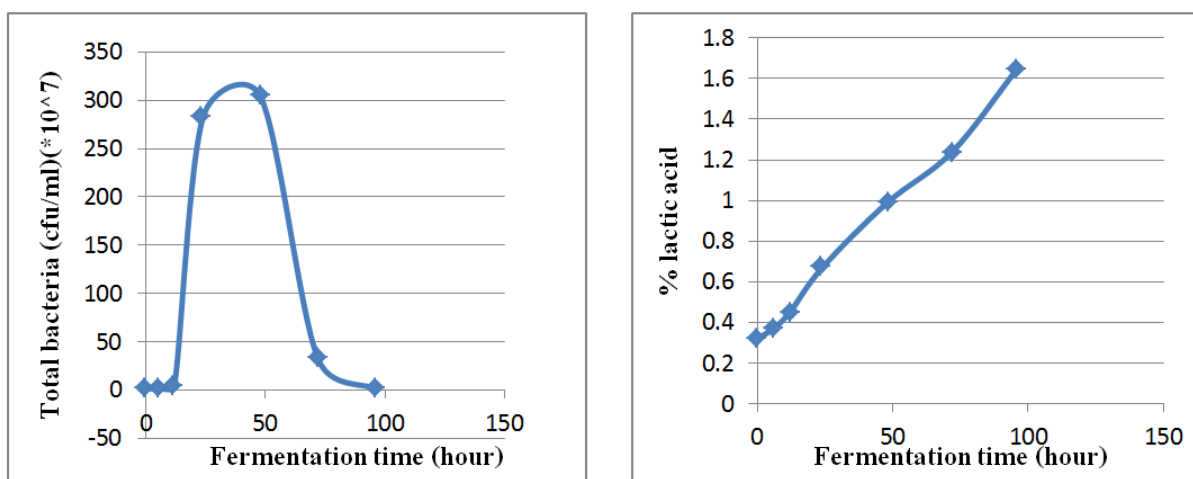
รูปที่ 7 ผลการหมักโยเกิร์ตที่เวลาต่างๆ จากนมสดพาสเจอร์ไรส์ด้วยหัวเชื้อนมเปรี้ยว หมักที่ 37 องศาเซลเซียส

จากรูปที่ 7 เป็นผลการหมักโยเกิร์ตที่ 0, 6, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง พบน้ำหนักตะกอนโปรตีน 0.00, 0.00, 0.00, 169.25, 240.15, 279.00 และ 97.85 กรัมตามลำดับตัวอย่างที่ 24 ชั่วโมง เริ่มเกิดตะกอนโปรตีนที่เรียกว่า เคิร์ด (curd) และเริ่มเกิดตะกอนโปรตีนมากขึ้นเมื่อหมักต่อในชั่วโมงที่ 48 – 72 ชั่วโมง จนเห็นการแยกชั้นของส่วนใสและตะกอนโปรตีนชัดเจนในเวลา 96 ชั่วโมงแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการหมักโยเกิร์ตจากนมสดพาสเจอร์ไรส์ด้วยหัวเชื้อนมเปรี้ยวหมักที่ 37 องศาเซลเซียส

Fermentation time (hour)	Curd (g)	pH	% Lactic acid (w/v)
0	0.00	6.30	0.32
6	0.00	6.32	0.37
12	0.00	6.02	0.45
24	169.25	5.20	0.67
48	240.15	4.18	0.99
72	279.00	3.97	1.24
96	97.85	3.80	1.65

จากรูปที่ 7 และตารางที่ 3 พบว่าที่ 0-72 ชั่วโมงค่า pH ลดลงสอดคล้องกับปริมาณกรดเพิ่มขึ้นตามเวลา ทำให้มีตะกอนโปรตีนขึ้นตามเวลา แต่ที่ชั่วโมงที่ 96 น้ำหนักตะกอนโปรตีนลดลงเนื่องจากกรดแลกติกมีปริมาณที่สูงมากโครงสร้างโมเลกุลของตะกอนโปรตีนถูกตัดเป็นสายสั้นๆ ทำให้น้ำหนักตะกอนโปรตีนที่ 96 ชั่วโมงลดลงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเชื้อ lactic acid bacteria (LAB), ค่ากรดแลกติก และค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างโยเกิร์ตที่ได้จากการหมักที่เวลาต่างๆ แสดงในรูปที่ 8



รูปที่ 8 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณ lactic acid bacteria (LAB) และค่ากรดแลกติกของตัวอย่างโยเกิร์ตที่เวลาต่างๆ ในการหมักนมสดพาสเจอร์ไรส์ด้วยหัวเชื้อนมเปรี้ยว ที่ 37 องศาเซลเซียส

จากรูปที่ 8 พบว่าที่ช่วงเวลา 0 – 12 ชั่วโมง (lag phase) ปริมาณเชื้อ LAB เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย ที่ช่วงเวลา 12-48 ชั่วโมง (log phase) ปริมาณเชื้อ LAB เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและเมื่อเข้าสู่ช่วงเวลา 72 – 96 ชั่วโมง (stationary phase) ปริมาณเชื้อ LAB ลดลงตามเวลา กรดแลกติกในช่วงที่เมื่อเริ่มการหมักมีค่าเริ่มต้นที่ 0.32% เมื่อเวลาผ่านไปค่าเพิ่มสูงขึ้นตามเวลาจนถึงที่ 96 ชั่วโมงพบค่ากรดแลกติกที่ 1.65 %

5.2 การศึกษาการใช้เทคนิค NIRS ในการหาปริมาณเชื้อ LAB ในโยเกิร์ต

ในการตรวจสอบความเป็นไปได้ในการหาปริมาณเชื้อ LAB โดยใช้เครื่องสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (NIRS) ในการวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อ LAB ในโยเกิร์ต โดยนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นก่อนนำมาวิเคราะห์ด้วย NIRS ซึ่งได้ผลการทดลองดังนี้

5.2.1 ผลการตรวจหาปริมาณ LAB ในโยเกิร์ต

เมื่อหมักนมในช่วงระยะเวลาที่ 0, 6, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส แล้วเจือจางแล้ววัดค่า Absorbance และตรวจหาปริมาณเชื้อ LAB โดยวิธี Total plate count ด้วยเทคนิค Pour plate ได้ผลดังตารางที่ 4

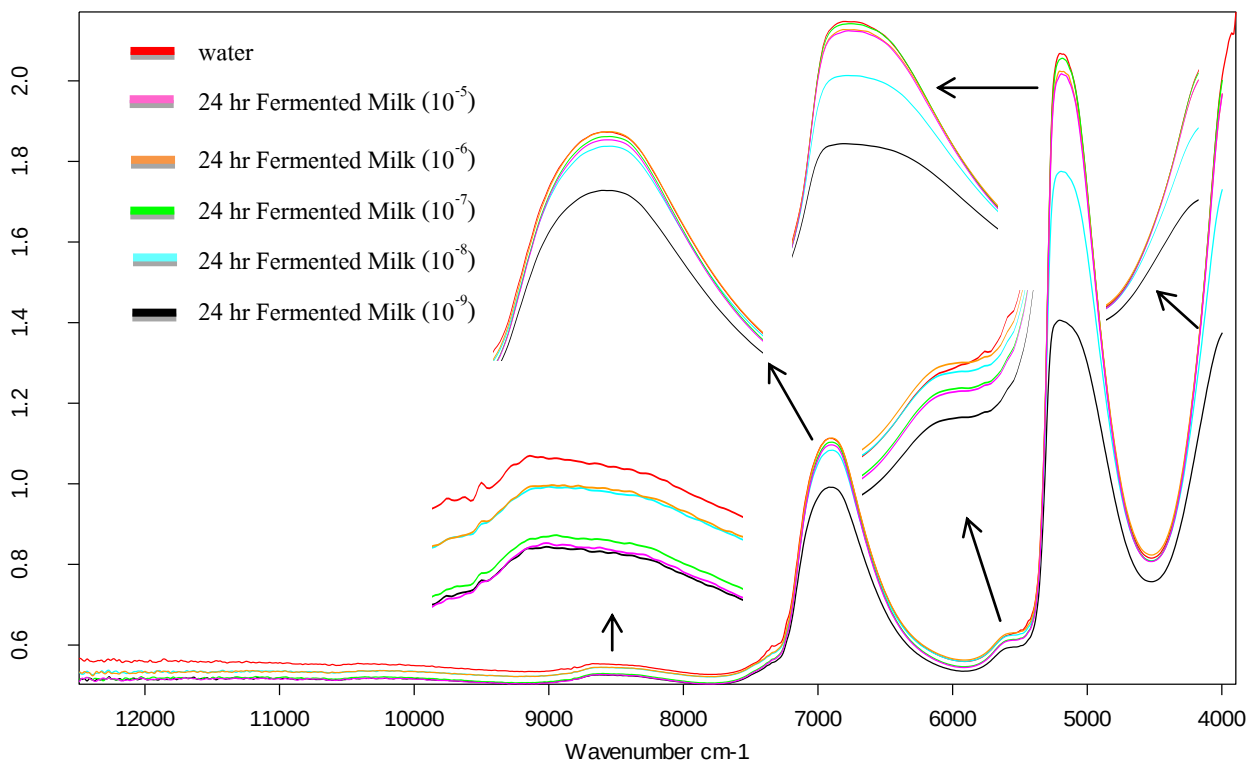
ตารางที่ 4 ปริมาณ LAB ในโยเกิร์ตหมักโดยวิธีการตรวจนับจุลินทรีย์ โดยวิธี Total plate count เทคนิค pour plate (CFU/ml)

Sample	Dilution	Total plate count (CFU/ml)	Average total Bacteria (CFU/ml)
0 hr Fermented Milk	10^{-4}	9.70×10^6	9.60×10^6
	10^{-5}	9.50×10^6	
6 hr Fermented Milk	10^{-4}	-	1.12×10^8
	10^{-5}	1.12×10^8	
12 hr Fermented Milk	10^{-4}	-	1.49×10^8
	10^{-5}	1.49×10^8	
24 hr Fermented Milk	10^{-5}	1.45×10^8	1.98×10^9
	10^{-6}	1.60×10^8	
	10^{-7}	1.60×10^9	
	10^{-8}	3.00×10^9	
	10^{-9}	5.00×10^9	
48 hr Fermented Milk	10^{-6}	-	2.75×10^{11}
	10^{-7}	3.12×10^{10}	
	10^{-8}	2.03×10^{11}	
	10^{-9}	1.45×10^{11}	
72 hr Fermented Milk	10^{-4}	-	3.23×10^8
	10^{-5}	2.05×10^8	
	10^{-6}	4.40×10^8	
96 hr Fermented Milk	10^{-5}	1.175×10^8	1.14×10^8
	10^{-6}	1.10×10^8	

จากตารางที่ 2 แสดงการนับจำนวนการตรวจนับจุลินทรีย์ (CFU/ml) ของนมหมักชั่วโมงต่างๆพบว่าในชั่วโมงที่ 48 มีค่าการตรวจนับจุลินทรีย์ (CFU/ml) มากที่สุดเนื่องจากระยะเวลาดังกล่าวเป็นช่วงที่เชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตมากที่สุด ในชั่วโมงที่ 72 และ 96 สังเกตได้ว่าจำนวนจุลินทรีย์มีปริมาณลดลงเนื่องจากมีอัตราการตายของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นจึงส่งผลต่อปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ด้วย

5.2.2 ผลการใช้เทคนิค NIRS ตรวจสอบปริมาณเชื้อ LAB ในโยเกิร์ตเทียบกับเทคนิค Pour plate

เมื่อนำโยเกิร์ตที่เวลาต่างๆของการหมักนมสดพาสเจอร์ไรส์ด้วยหัวเชื้อนมเปรี้ยวที่ 37 องศาเซลเซียส ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี (สภาวะการตรวจวัดด้วย NIRS คือวัดแบบ Transflectance ที่ Resolution 16 และ Scan time 32 wavenumber 4000-12000 cm^{-1}) เพื่อแปลผลให้ได้เป็นสเปกตรัมสำหรับนำมาวิเคราะห์หาเชื้อ LAB ในโยเกิร์ต ได้ผลดังรูปที่ 9 และตารางที่ 5



รูปที่ 9 เส้นสเปกตรัม NIRS ของตัวอย่างเชื้อ LAB มาตรฐานเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ 10^{-5} - 10^{-9} เท่า จากโยเกิร์ตหมักที่ 24 ชั่วโมง ด้วยหัวเชื้อนมเปรี้ยวในนมสดพาสเจอร์ไรส์ ที่ 37 องศาเซลเซียส

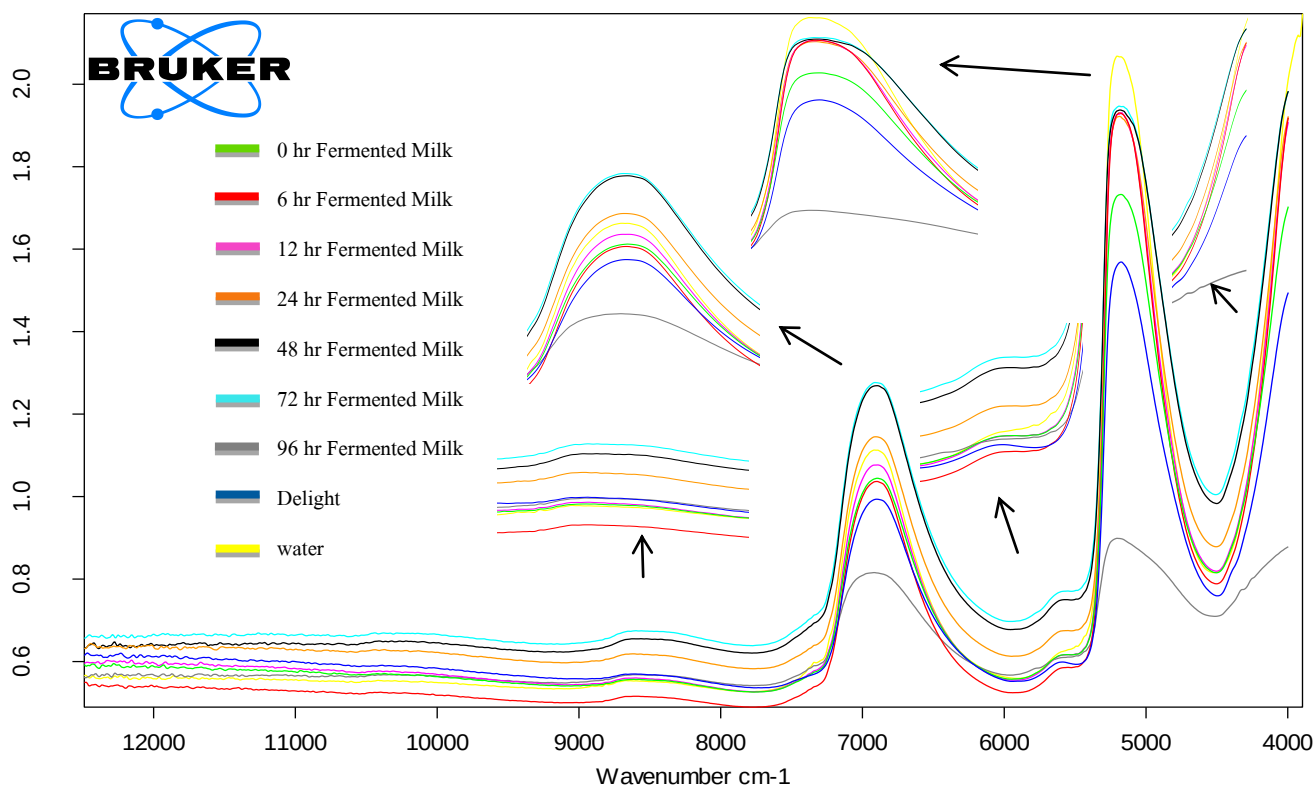
ตารางที่ 5 ค่า Absorbance Units (cm^{-1}) ที่พบในสเปกตรัม NIRS ของตัวอย่างเชื้อ LAB มาตรฐานเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ 10^{-5} - 10^{-9} เท่า จากโยเกิร์ตหมักที่เวลาต่างๆ ด้วยหัวเชื่อมมเปรี้ยวในนมสดพาสเจอร์ไรซ์หมักที่ 37 องศาเซลเซียส

Samples	Absorbance Unit (Peak Height) at Wavelength (cm^{-1})				
	8569 (C=O)	6910 (O-H)	5546 (C-H)	5178 (O-H)	3996 (C=O)
water	0.55245	1.11214	0.62863	2.0664	2.0129
24 hr Fermented Milk (10^{-5})	0.52613	1.09582	0.61153	2.0146	1.9646
24 hr Fermented Milk (10^{-6})	0.54458	1.11292	0.63019	2.0217	1.9646
24 hr Fermented Milk (10^{-7})	0.52883	1.10281	0.61386	2.0539	2.0022
24 hr Fermented Milk (10^{-8})	0.54395	1.08182	0.62397	1.7732	1.7304
24 hr Fermented Milk (10^{-9})	0.52537	0.99086	0.59598	1.4012	1.3745

จากสเปกตรัม NIRS ของตัวอย่างเชื้อ LAB มาตรฐาน เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ 10^{-5} - 10^{-9} เท่าที่ได้จากการวัด NIRS (รูปที่ 8 และตารางที่ 5) พบว่าสเปกตรัมที่ได้จากการสั่นของโมเลกุลโดยรวมของตัวอย่างโดยมีหมู่ต่างๆ คือที่ 8569 cm^{-1} เป็นการสั่นของ C=O ที่ 6910 cm^{-1} เป็นการสั่นของ O-H ที่ 5546 cm^{-1} เป็นการสั่นของ C-H ที่ 5178 cm^{-1} เป็นการสั่นของ O-H และที่ 3996 cm^{-1} เป็นการสั่นของ C=O จากข้อมูลพบการสั่นที่แสดงถึง C=O และ C-H ซึ่งอาจเป็นโมเลกุลของ lactose ของไขมันหรือโปรตีนในนม

เมื่อนำตัวอย่างเชื้อ LAB ที่ได้จากการหมักโยเกิร์ตที่เวลาต่างๆของการหมักนมสดพาสเจอร์ไรซ์ด้วยหัวเชื่อมมเปรี้ยวดีไลท์ที่ 37 องศาเซลเซียส ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี (สถานะการตรวจวัดด้วย NIRS คือวัดแบบ Transflectance ที่ Resolution 16 Scan time 32 และ wavenumber $4000-12000 \text{ cm}^{-1}$) เพื่อแปลผลให้ได้เป็นสเปกตรัมสำหรับนำมาวิเคราะห์หาเชื้อ LAB ในโยเกิร์ต ได้ผลดังรูปที่ 10 และตารางที่ 6

จากสเปกตรัมของ NIRS ของตัวอย่าง LAB ที่ได้จากการหมักโยเกิร์ตที่เวลาต่างๆจากการหมักนมสดพาสเจอร์ไรซ์ด้วยหัวเชื่อมมเปรี้ยวที่ 37 องศาเซลเซียส (รูปที่ 10 และตารางที่ 6) พบว่าสเปกตรัมที่ได้ ได้จากการสั่นของโมเลกุลโดยรวมของตัวอย่างโดยมีหมู่ต่างๆ คือที่ 8569 cm^{-1} เป็นการสั่นของ C=O ที่ 6910 cm^{-1} เป็นการสั่นของ O-H ที่ 5546 cm^{-1} เป็นการสั่นของ C-H ที่ 5178 cm^{-1} เป็นการสั่นของ O-H และที่ 3996 cm^{-1} เป็นการสั่นของ C=O จากข้อมูลพบการสั่นที่แสดงถึง C=O และ C-H ซึ่งแสดงโมเลกุลของ lactose ของไขมันหรือโปรตีนในนม



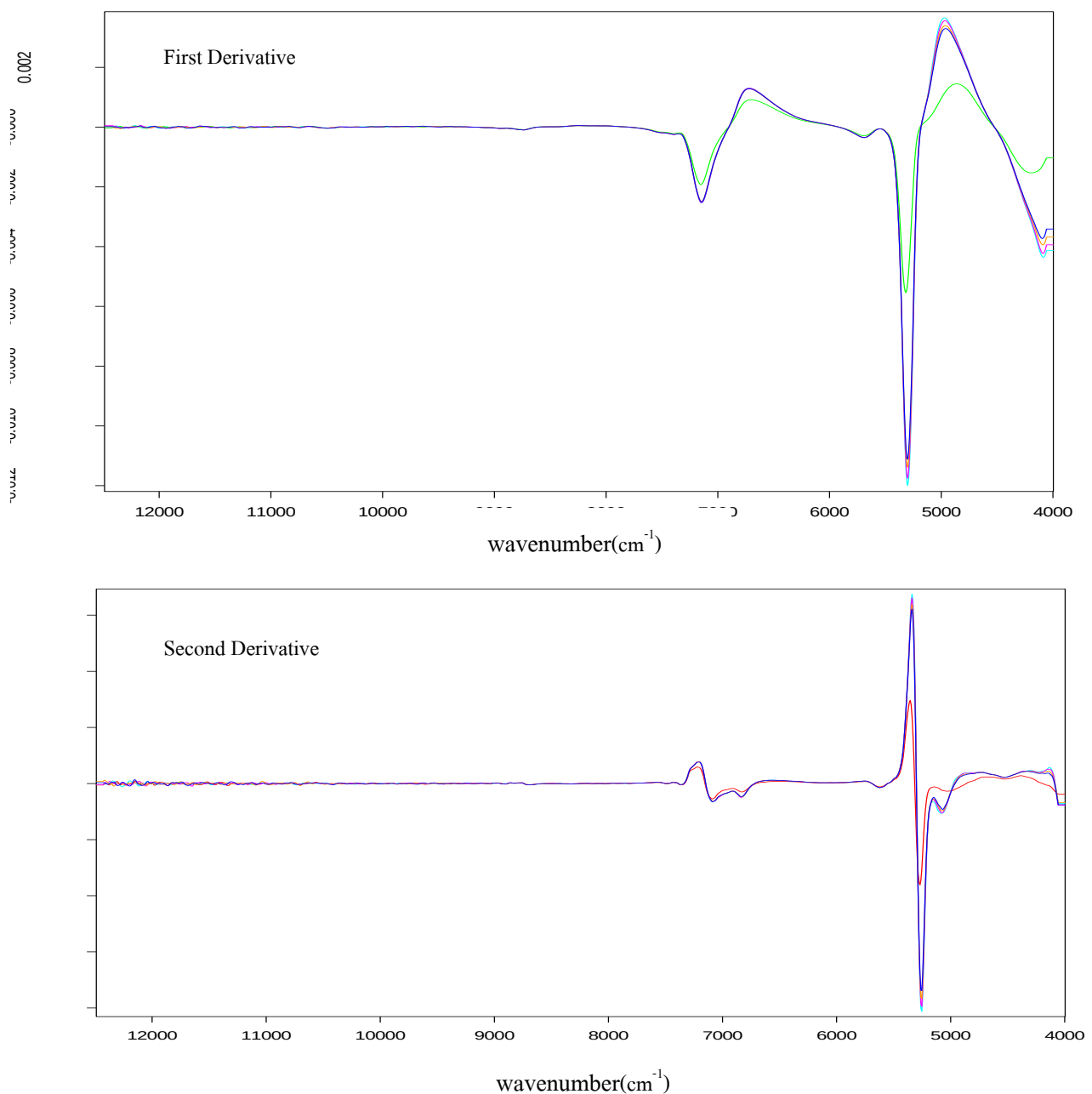
รูปที่ 10 เส้นสเปกตรัม NIRS ของตัวอย่าง LAB ในโยเกิร์ตหมักที่เวลาต่างๆ จากการหมักนมสดพาสเจอร์ไรซ์ ด้วยหัวเชื้อนมเปรี้ยว ที่ 37 องศาเซลเซียส (สภาวะการตรวจวัดด้วย NIRS คือวัดแบบ Transmittance ที่ Resolution 16 Scan time 32 และ wavenumber 4000-12000 cm^{-1})

ตารางที่ 6 ค่า Absorbance Units (cm^{-1}) บนสเปกตรัม NIRS ของตัวอย่างเชื้อ LAB จากการหมักโยเกิร์ตที่เวลาต่างๆ

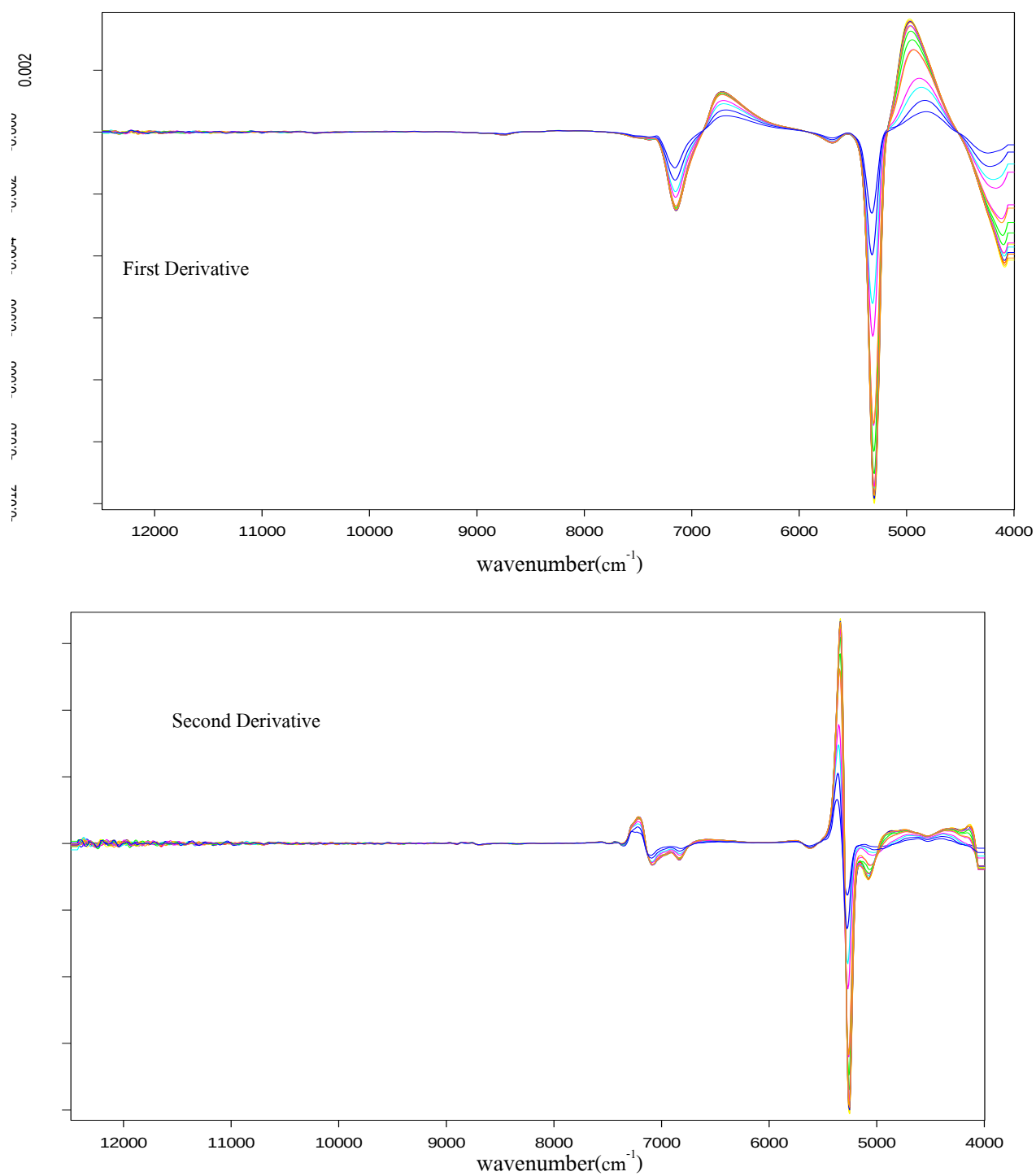
Sample	Code	Absorbance Units (Peak Height) at wavelength(cm^{-1})				
		8569 (C=O)	6910 (O-H)	5546 (C-H)	5178 (O-H)	3996 (C=O)
0 hr Fermented Milk	FM_0 hr	0.55737	1.04342	0.61613	1.73252	1.70095
6 hr Fermented Milk	FM_6 hr	0.51660	1.03623	0.58575	1.92918	1.91759
12 hr Fermented Milk	FM_12 hr	0.55977	1.07620	0.61613	1.92918	1.90720
24 hr Fermented Milk	FM_24 hr	0.61893	1.14495	0.67449	1.91959	1.92159
48 hr Fermented Milk	FM_48 hr	0.65490	1.26886	0.74963	1.93718	1.98234
72 hr Fermented Milk	FM_72 hr	0.67409	1.27525	0.77042	1.94517	1.98234
96 hr Fermented Milk	FM_96 hr	0.56784	0.81515	0.61083	0.89710	0.87700
inoculum	Delight_0.0	0.56916	0.99289	0.59558	1.56820	1.49160
water	Water_NO.0	0.55198	1.1117	0.62760	2.06520	2.01000

5.2.3 การทำอนุพันธ์ (First and Second derivative) ของสเปกตรัม NIRS ของเชื้อ LAB

จากเส้นสเปกตรัม NIRS ของตัวอย่างเชื้อ LAB มาตรฐานจากการหมักโยเกิร์ตที่ 24 ชั่วโมงมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ 10^{-5} - 10^{-9} เท่า (รูปที่ 11) และเส้นสเปกตรัม NIRS ของตัวอย่างเชื้อ LAB ที่ได้จากการหมักโยเกิร์ตที่เวลาต่างๆจากการหมักนมสดพาสเจอร์ไรส์ด้วยหัวเชื้อนมเปรี้ยวดีไลท์ที่ 37 องศาเซลเซียส (รูปที่ 9) นำมาทำอนุพันธ์อันดับหนึ่งและสอง (First/Second derivative) ได้ผลดังรูปที่ 11 และรูปที่ 12 ตามลำดับ

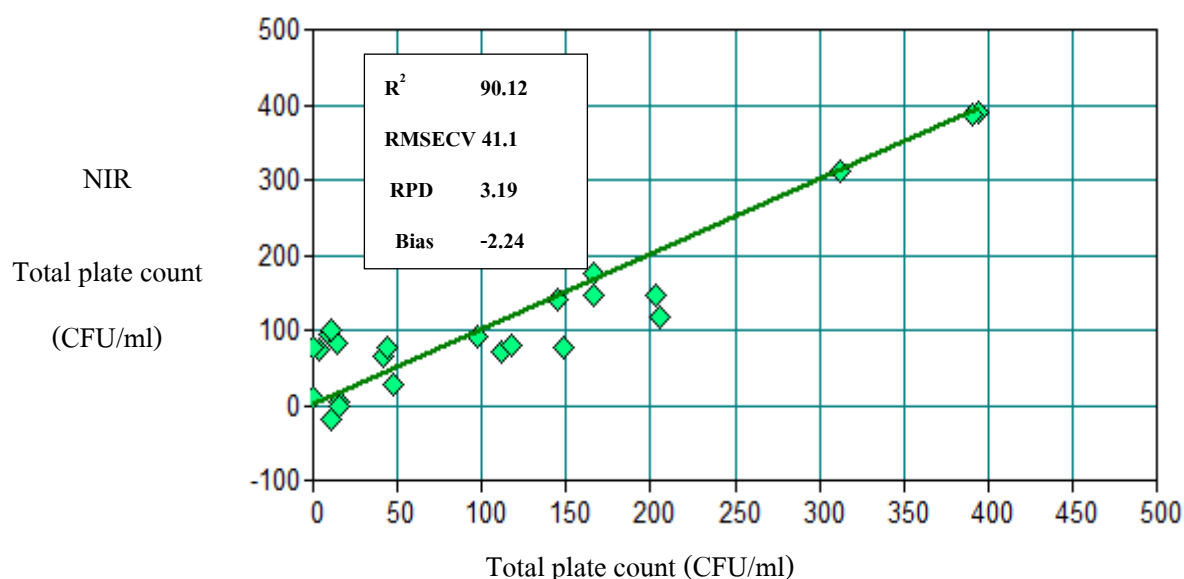


รูปที่ 11 การทำอนุพันธ์อันดับหนึ่งและสอง (First and Second derivative) ของสเปกตรัม NIRS ของตัวอย่างเชื้อ LAB มาตรฐาน เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ 10^{-5} - 10^{-9} เท่า จากโยเกิร์ตหมักที่ 24 ชั่วโมง



รูปที่ 12 การทำอนุพันธ์อันดับหนึ่งและสอง (First and Second derivative) จากเส้นสเปกตรัม NIRS ของตัวอย่างเชื้อ LAB ที่ได้จากการหมักโยเกิร์ตที่เวลาต่างๆจากนมสดพาสเจอร์ไรซ์ด้วยหัวเชื้อนมเปรี้ยว ที่ 37 องศาเซลเซียส

จากการทำอนุพันธ์อันดับหนึ่งและสอง (First and Second derivative) (รูปที่ 11 และรูปที่ 12) นำมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติ ได้ผลดังรูปที่ 13



รูปที่ 13 Calibration and Cross Validation เส้นสเปกตรัม NIRS ของตัวอย่าง LAB ที่ได้จากการหมักโยเกิร์ตที่เวลาต่างๆ เทียบวิธีวิเคราะห์ด้วยวิธี Total plate count (วิเคราะห์ด้วยเทคนิค pour plate)

จากรูปที่ 13 แสดงให้เห็นเป็นกราฟที่มีแนวโน้มเป็นเส้นตรง แต่ค่าที่ได้ค่อนข้างกระจาย ซึ่งมีค่า R^2 เท่ากับ 90.12 RMSECV เท่ากับ 41.1 CFU/ml RPD เท่ากับ 3.19 และ Bias เท่ากับ -2.24 จากผลที่ได้อยู่ในเกณฑ์ที่ค่อนข้างเสี่ยง จึงจำเป็นต้องทำซ้ำ เพื่อให้ค่ามีแนวโน้มใกล้เคียงเส้นตรงมากขึ้น ซึ่งในอนาคตอาจเป็นไปได้ที่จะนำเทคนิค NIRS มาใช้ในการตรวจวัดปริมาณเชื้อ LAB แทนวิธี pour plate ในโยเกิร์ตหมัก

5.3 ผลการใช้เทคนิค NIRS ในการหาปริมาณกรดแลคติกในโยเกิร์ต

ในอุตสาหกรรมการผลิตนมเปรี้ยว นั้นมีหลายสิ่งที่จะต้องวัด ซึ่งกรดแลคติกก็เป็นตัวบ่งบอกถึงว่านมหมักสามารถนำไปจำหน่ายได้แล้วหรือไม่ ซึ่งการวิเคราะห์หากรดแลคติกต้องทำโดยวิเคราะห์จากการไตเตรดซึ่งทำลายตัวอย่างและยุ่งยาก จึงมีการนำ NIRS มาใช้เพื่อเป็นตัวช่วยในการลดความยุ่งยากในการวิเคราะห์

5.3.1 ผลการตรวจหาเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกโดยวิธีเคมี (titration)

เมื่อตรวจหาปริมาณกรดแลคติกจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีเคมีเทคนิคการไตเตรท (titration) ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 7

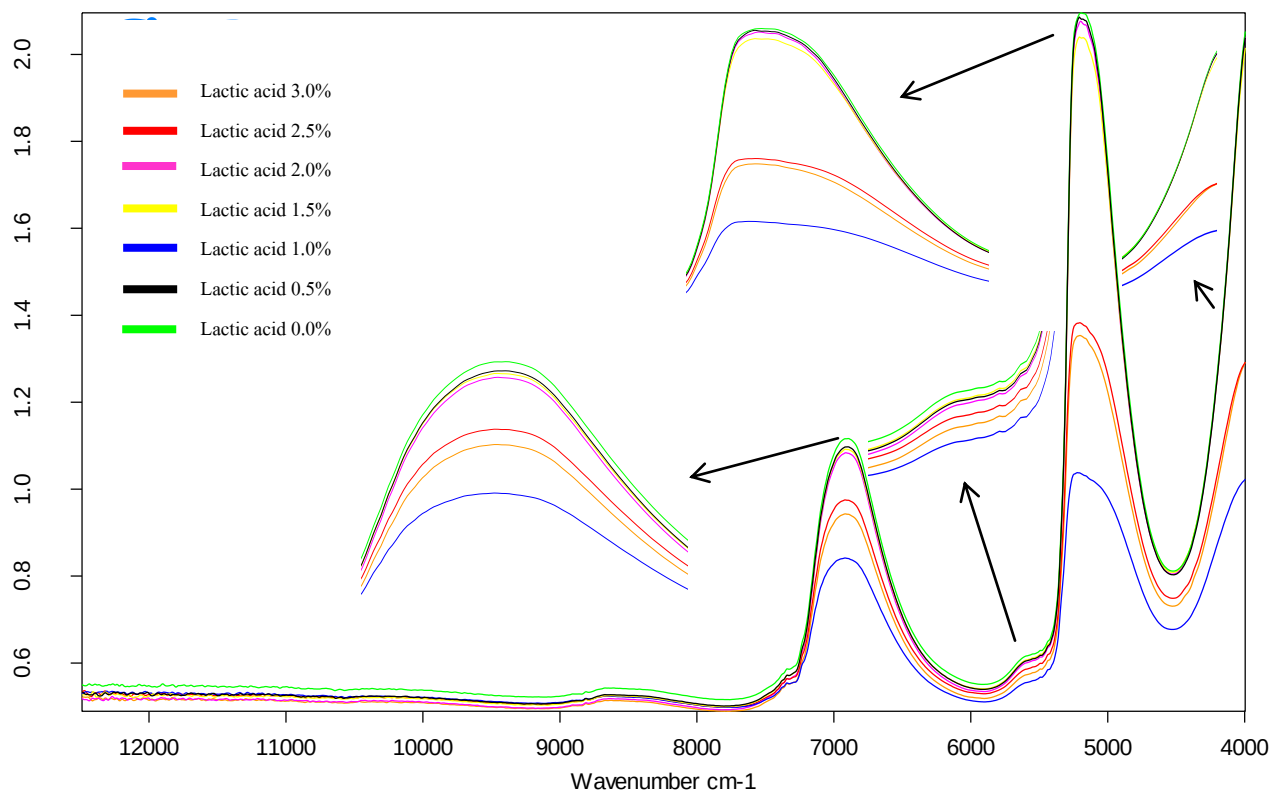
ตารางที่ 7 ปริมาณกรดแลกติกในโยเกิร์ตหมัก จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีเคมีเทคนิคการไทเตรต (titration)

Sample	Volume of NaOH (ml)	% Lactic acid (w/v)
0 hr Fermented Milk	1.70	0.32
6 hr Fermented Milk	2.00	0.37
12 hr Fermented Milk	2.40	0.45
24 hr Fermented Milk	3.55	0.67
48 hr Fermented Milk	5.30	0.99
72 hr Fermented Milk	6.60	1.24
96 hr Fermented Milk	8.80	1.65
inoculum	4.00	0.75

จากตารางที่ 7 พบว่า ค่ากรดแลกติกของโยเกิร์ตมีค่าเพิ่มขึ้นตามเวลาของการหมัก ซึ่งระยะเวลาในการหมัก 96 ชั่วโมง ให้ค่ากรดแลกติกสูงสุดที่ 1.65 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งโยเกิร์ตที่ได้มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (มอก.) มีความเป็นกรดไม่น้อยกว่า 0.6 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบในชุดข้อมูลพบว่าที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ได้ค่ากรดแลกติกเท่ากับ 0.67 ผ่านมาตรฐานที่ มอก. กำหนดไว้และมีค่าใกล้เคียงกับกลัเชื้อ (Inoculum) จากนมเปรี้ยวดีไลท์ ที่ใช้เป็นหัวเชื้อด้วยซึ่งมีค่ากรดแลกติก 0.75 %

5.3.2 ผลการใช้เทคนิค NIRS ในการตรวจหาปริมาณกรดแลกติกในโยเกิร์ตเทียบกับวิธีเคมี

เมื่อนำสารมาตรฐาน lactic acid ที่ความเข้มข้น 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี (สภาวะการตรวจวัดด้วย NIRS คือวัดแบบ Transflectance ที่ Resolution 16 Scan time 32 และ wavenumber 4000-12000 cm^{-1}) เพื่อแปรผลให้ได้เป็นสเปกตรัมสำหรับนำมาวิเคราะห์หาปริมาณกรดแลกติกในโยเกิร์ต ได้ผลดังรูปที่ 14 และตารางที่ 8



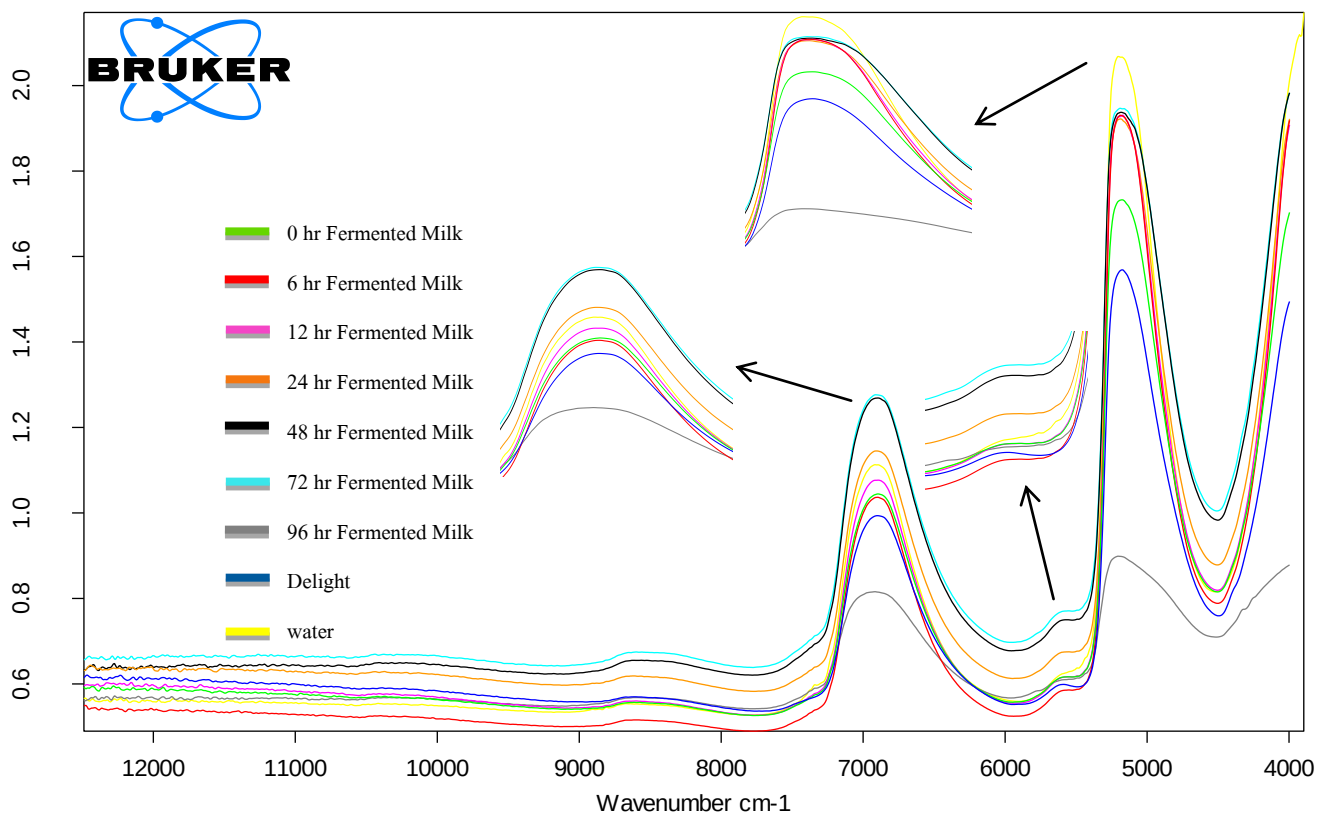
รูปที่ 14 เส้นสเปกตรัม NIRS ของสารมาตรฐานกรดแลกติกที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ความเข้มข้นต่างๆ

ตารางที่ 8 ค่า Absorbance Units (cm^{-1}) ของสารมาตรฐานกรดแลกติกที่พบในเส้นสเปกตรัม NIRS

Sample	Code	Absorbance Units (Peak Height) at wavelength (cm^{-1})			
		6910 (OH)	5546 (C-H)	5178 (OH)	3996 (C=O)
Lactic acid 0.0%(water)	LT_0	1.1160	0.6210	2.0959	2.0475
Lactic acid 0.5%	LT_0.5	1.0970	0.6094	2.0799	2.0395
Lactic acid 1.0%	LT_1	0.8412	0.5591	1.0298	1.0214
Lactic acid 1.5%	LT_1.5	1.0912	0.6119	2.0373	2.0129
Lactic acid 2.0%	LT_2	1.0830	0.6055	2.0666	2.0395
Lactic acid 2.5%	LT_2.5	0.9749	0.5900	1.3790	1.2906
Lactic acid 3.0%	LT_3	0.9427	0.5771	1.3496	1.2906

จากสเปกตรัมของสารมาตรฐานกรดแลกติก (รูปที่ 14 และตารางที่ 8) พบว่าสเปกตรัมที่ได้ ได้จากการสั่นของโมเลกุลโดยรวมของตัวอย่างโดยมีหมู่ต่างๆ คือที่ 8569 เป็นการสั่นของ C=O ที่ 6910 cm^{-1}

เป็นการสั่นของ O-H ที่ 5546 cm^{-1} เป็นการสั่นของ C-H ที่ 5178 cm^{-1} เป็นการสั่นของ O-H และที่ 3996 cm^{-1} เป็นการสั่นของ C=O จากกราฟยังไม่เห็นความแตกต่างระหว่างจุดยอดของน้ำกับจุดยอดของกรดแลคติก อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของแลคติกมีค่าที่น้อย จึงทำให้เกิดการบดบังจากจุดยอดของน้ำ เมื่อนำโยเกิร์ตที่เวลาต่างๆ ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี เพื่อแปลผลให้ได้เป็นสเปกตรัมสำหรับนำมาวิเคราะห์หาปริมาณกรดแลคติกในโยเกิร์ต ได้ผลดังรูปที่ 15 และตารางที่ 9



รูปที่ 15 เส้นสเปกตรัม NIRS กรดแลคติกของโยเกิร์ตหมักที่เวลาต่างๆ ด้วยหัวเชื่อมนมเปรี้ยว หมักที่ 37 องศาเซลเซียส (สภาวะการตรวจวัดด้วย NIRS คือแบบ Transflectance ที่ Resolution 16 Scan time 32 และ wavenumber $4000\text{-}12000\text{ cm}^{-1}$)

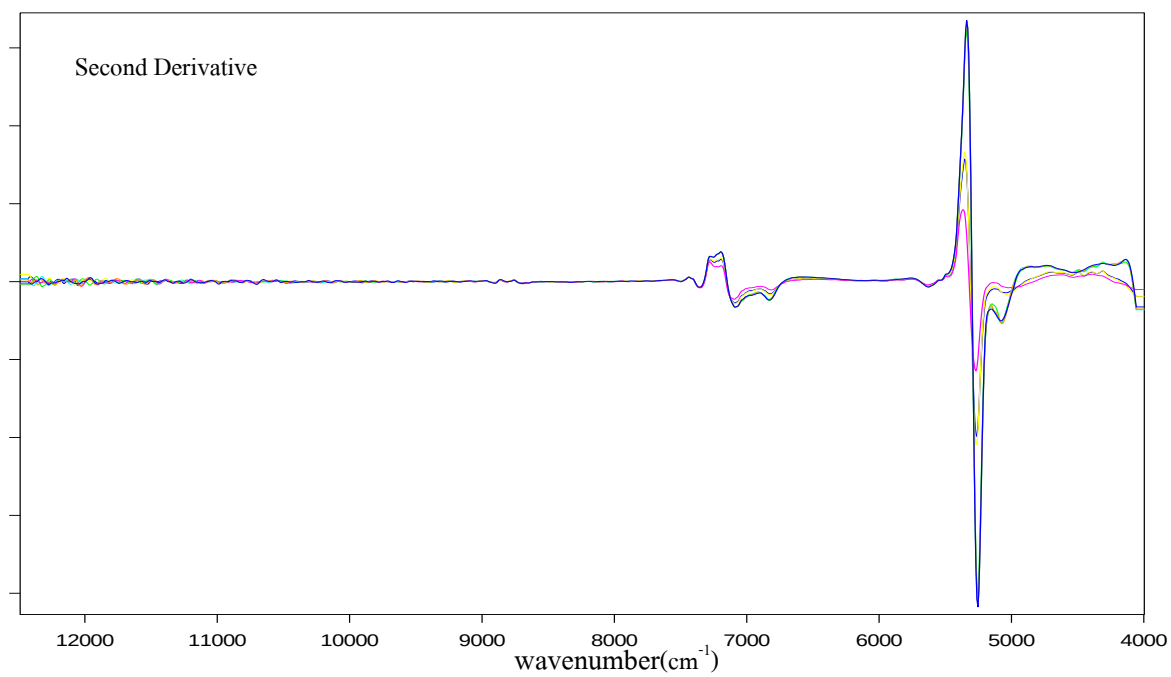
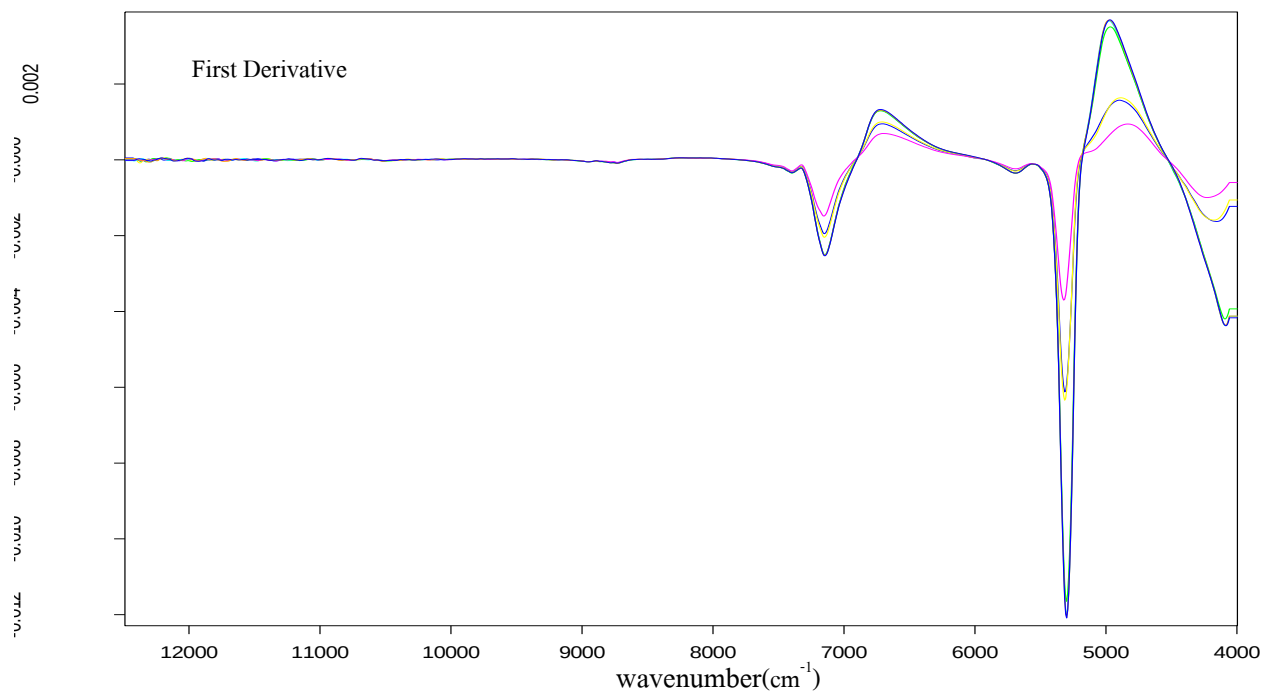
ตารางที่ 9 ค่า Absorbance Units (cm^{-1}) ที่พบในเส้นสเปกตรัม NIRS ของกรดแลคติกของโยเกิร์ตหมักที่เวลาต่างๆ

Sample	Code	Absorbance Units (Peak Height) at wavelength(cm^{-1})		
		6911 (O-H)	5600 (C-H)	5182 (O-H)
0 hr Fermented Milk	FM_0 hr	1.04342	0.6148	1.7301
6 hr Fermented Milk	FM_6 hr	1.03623	0.5835	1.9302
12 hr Fermented Milk	FM_12 hr	1.07620	0.6148	1.9273
24 hr Fermented Milk	FM_24 hr	1.14495	0.6750	1.9215
48 hr Fermented Milk	FM_48 hr	1.26886	0.7477	1.9360
72 hr Fermented Milk	FM_72 hr	1.27525	0.7690	1.9447
96 hr Fermented Milk	FM_96 hr	0.81515	0.6085	0.8980
inoculum	Delight_0.0	0.99289	0.5985	1.5678
water	Water_NO.0	1.1117	0.6223	2.0636

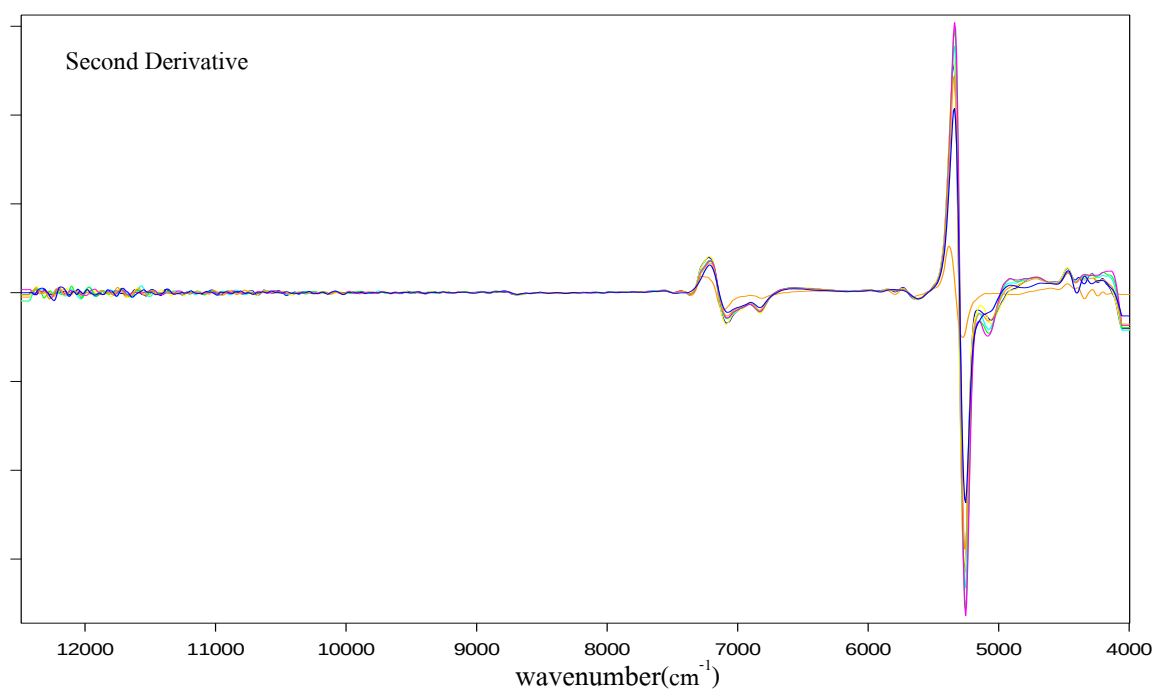
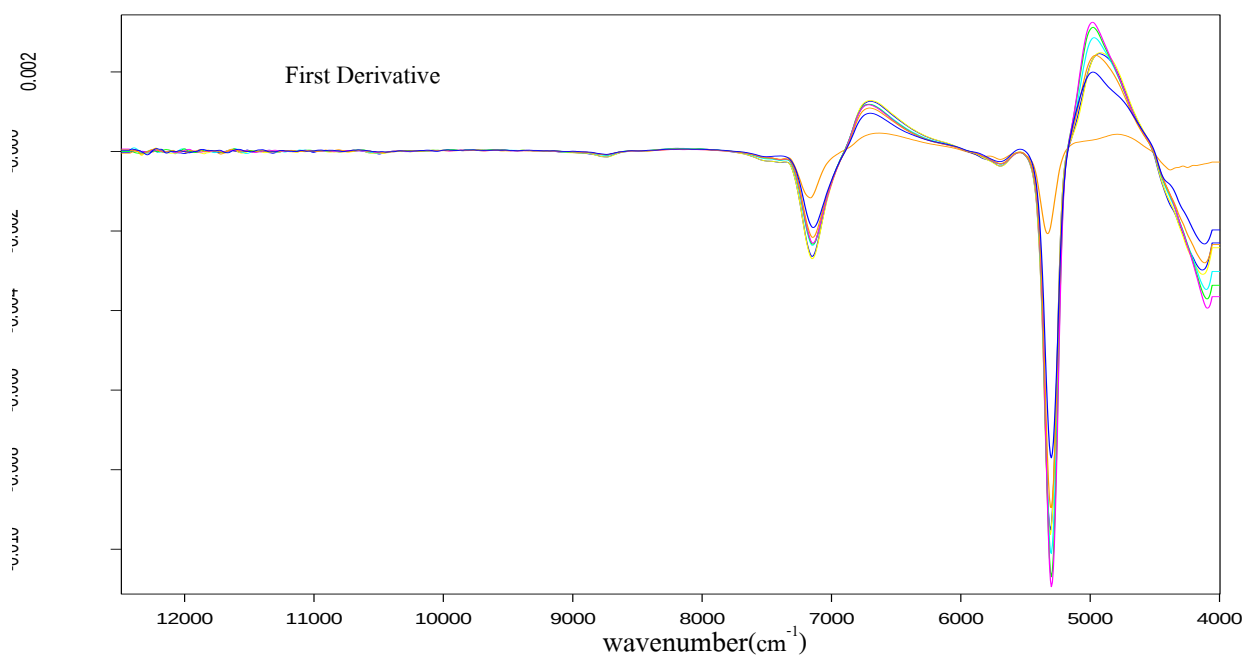
จากสเปกตรัม NIRS กรดแลคติกของโยเกิร์ตที่เวลาต่างๆจากการหมักนมสดพาสเจอร์ไรซ์ด้วยหัวเชื้อนมเปรี้ยวดีไลต์ (รูปที่ 15 และตารางที่ 9) พบว่าสเปกตรัมที่ได้ ได้จากการสั่นของโมเลกุลโดยรวมของตัวอย่างโดยมีหมู่ต่างๆ คือที่ 6911 cm^{-1} เป็นการสั่นของ O-H ที่ 5600 cm^{-1} เป็นการสั่นของ C-H และที่ 5182 cm^{-1} เป็นการสั่นของ O-H จากสเปกตรัมโดยรวมแล้วตรวจเห็นได้เพียงการสั่นของ O-H และ C-H เนื่องจากตัวอย่างมีความชื้นและมีสารหลายชนิดจึงทำให้ตรวจสอบได้เพียงจุดยอดของสารที่มีความเข้มข้นสูงซึ่งก็คือ น้ำและสารพวก Hydrocarbon เท่านั้น

5.3.3 การทำอนุพันธ์ (First and Second derivative) ของสเปกตรัมกรดแลคติก

จากเส้นสเปกตรัม NIRS ของสารมาตรฐานกรดแลคติกที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ 4 เส้นสเปกตรัม NIRS กรดแลคติกในโยเกิร์ตที่เวลาต่างๆจากการหมักนมสดพาสเจอร์ไรซ์ด้วยหัวเชื้อนมเปรี้ยวดีไลต์ที่ 37 องศาเซลเซียส (รูปที่ 15) นำมาทำอนุพันธ์อันดับหนึ่งและสอง (First/Second derivative) ได้ผลดังรูปที่ 16 และรูปที่ 17

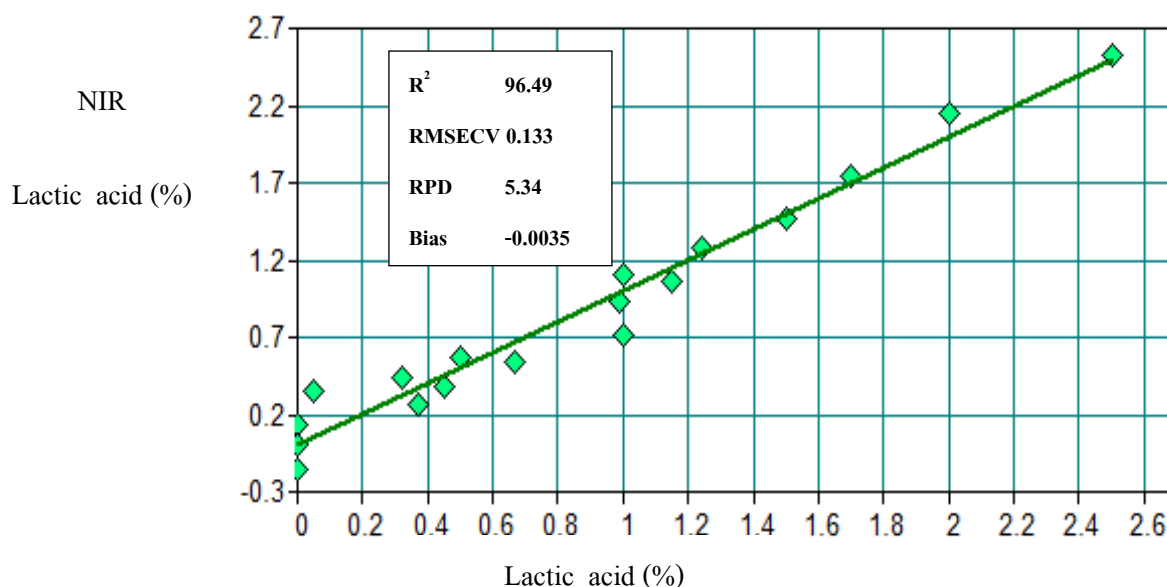


รูปที่ 16 การทำอนุพันธ์อันดับหนึ่งและสอง(First and Second derivative) จากเส้นสเปกตรัม NIRS ของ สารมาตรฐานกรดแลคติกที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความต่างๆ



รูปที่ 17 การทำอนุพันธ์อันดับหนึ่งและสอง (First and Second derivative) จากเส้นสเปกตรัม NIRS ของกรดแลกติกในโยเกิร์ตที่เวลาต่างๆจากการหมักนมสดพาสเจอร์ไรส์ด้วยหัวเชื้อนมเปรี้ยว ที่ 37 องศาเซลเซียส

จากการทำอนุพันธ์อันดับหนึ่งและสอง (First and Second derivative) นำมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติ ได้ผลดังรูปที่ 18 ดังนี้



รูปที่ 18 Calibration และ Cross Validation ของเส้นสเปกตรัม NIRS ของกรดแลคติกในโยเกิร์ตหมักที่เวลาต่างๆ จากการเทียบวิเคราะห์ด้วยวิธีเคมี เทคนิคไทเตรท (titration)

จากรูปที่ 18 การทำ Calibration and Cross Validation ของเส้นสเปกตรัม NIRS ของกรดแลคติกในโยเกิร์ตที่เวลาต่างๆ กับค่ากรดแลคติกจากการไทเตรท พบว่าข้อมูลมีแนวโน้มเป็นเส้นตรง มีค่า R^2 เท่ากับ 96.49 RMSECV เท่ากับ 0.133% RPD เท่ากับ 5.34 และ Bias เท่ากับ -0.0035 ซึ่งเป็นไปได้ว่าเทคนิค NIRS สามารถนำมาใช้ในการตรวจหากรดแลคติกได้ เพื่อข้อมูลที่มีความน่าเชื่อถือควรมีการทำหลายซ้ำ เพื่อเพิ่มชุดข้อมูลและดูแนวโน้มค่าทางสถิติต่อไป

5.4 ผลการใช้เทคนิค NIRS วิเคราะห์สาร Sphingomyelin ในสารสกัดจากโยเกิร์ต เทียบกับเทคนิคเคมี

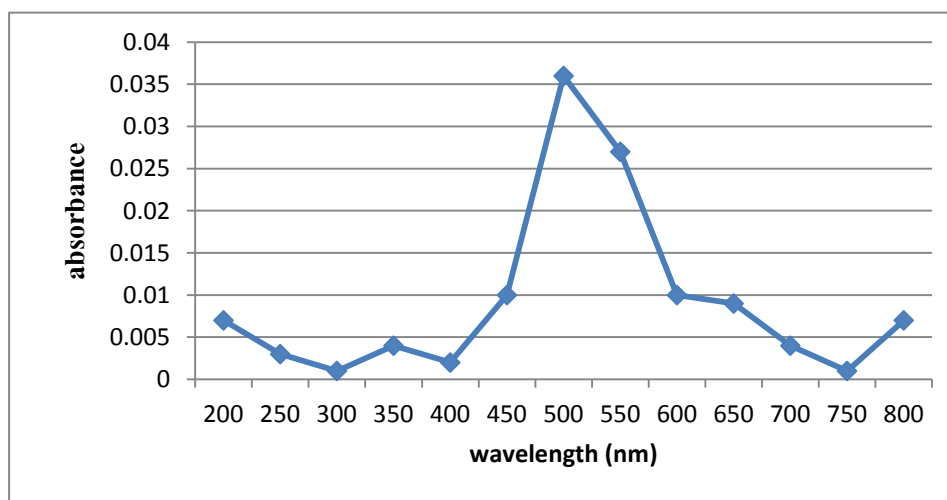
ในการตรวจสอบความเป็นไปได้ในการหาสารที่มีปริมาณน้อยโดยเทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (NIRs) ในการวิเคราะห์หาปริมาณสาร Sphingomyelin ในผลิตภัณฑ์นมโดยสกัดนมหมักก่อนวิเคราะห์ด้วย NIRS ซึ่งได้ผลการทดลองดังนี้

เมื่อหมักนมในช่วงระยะเวลาที่ 0, 6, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง แล้วนำมาสกัดโดยการแยกโปรตีน ด้วยด่างและกรด ได้เป็นสารสกัด Sphingomyelin ก่อนนำมาวิเคราะห์ NIRs ซึ่งได้ผลการสกัดสาร Sphingomyelin

สารสกัด Sphingomyelin ละลายในตัวทำละลายคลอโรฟอร์มที่สกัดได้จากนมหมักที่ 0, 6, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง โดยนมหมักที่ 0 และ 6 ชั่วโมงสกัดโดยที่ไม่ได้กรองแยกส่วนที่เป็นน้ำและตะกอนโปรตีนออกจากกัน และนมหมักที่ 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงผ่านการกรองเพื่อสกัดส่วนน้ำและตะกอนโปรตีนแยกกัน พบว่า นมหมักที่ 0, 6, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง มีปริมาณสารสกัด Sphingomyelin ที่มีปริมาณน้อยไปมากตามระยะเวลาในการหมัก เนื่องจากสาร Sphingomyelin ส่วนหนึ่งได้จากเชื้อแบคทีเรียในกระบวนการหมักโยเกิร์ตทำให้เมื่อเวลาผ่านไปพบว่าสารสกัดที่ได้มีปริมาณเพิ่มขึ้นเล็กน้อย

5.4.1 ผลการหาค่าความยาวคลื่นที่เหมาะสม ($\lambda_{\max}$) ต่อการวัดสาร Sphingomyelin

จากรายงานของ ชาริต และคณะ (2014) ใช้ความยาวคลื่น 544 นาโนเมตร และ 590 นาโนเมตร ในการตรวจหาสาร Sphingomyelin ด้วยเทคนิคเอนไซม์ จึงตรวจสอบว่าที่ความยาวคลื่น 544 นาโนเมตร และ 590 นาโนเมตร เป็นความยาวคลื่นที่เหมาะสมต่อการวัดสาร Sphingomyelin โดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยนำสารมาตรฐาน Sphingomyelin ความเข้มข้น 180 $\mu\text{g/ml}$ ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นในช่วง UV (200-400 นาโนเมตร) และช่วง visible (400-800 นาโนเมตร) โดยใช้ quartz cuvette ขนาด 1 เซนติเมตร ในการบรรจุสาร เพื่อหาค่าความยาวคลื่นที่เหมาะสม ($\lambda_{\max}$) ดังรูปที่ 19



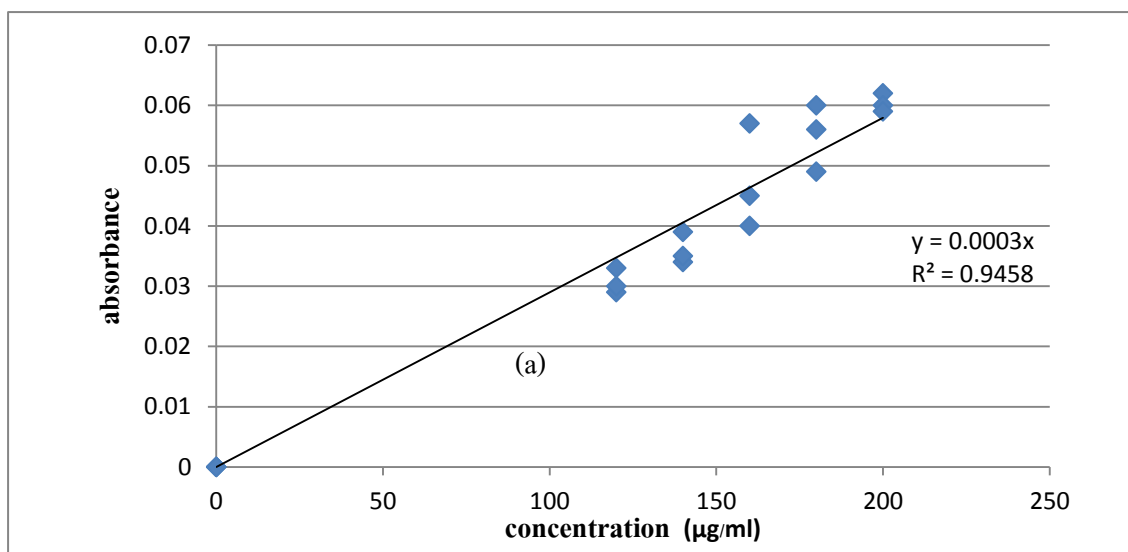
รูปที่ 19 ค่าดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน Sphingomyelin ความเข้มข้น 180 $\mu\text{g/ml}$ ที่วัดด้วยเครื่อง Spectrophotometer ความยาวคลื่นช่วง 200-800 นาโนเมตร

จากรูปที่ 19 ค่าความยาวคลื่นที่เหมาะสม ($\lambda_{\max}$) อยู่ในช่วง 450-600 นาโนเมตร ดังนั้นค่าความยาวคลื่นช่วง 544 และ 590 นาโนเมตร เหมาะสมต่อการดูดกลืนแสงของสาร Sphingomyelin

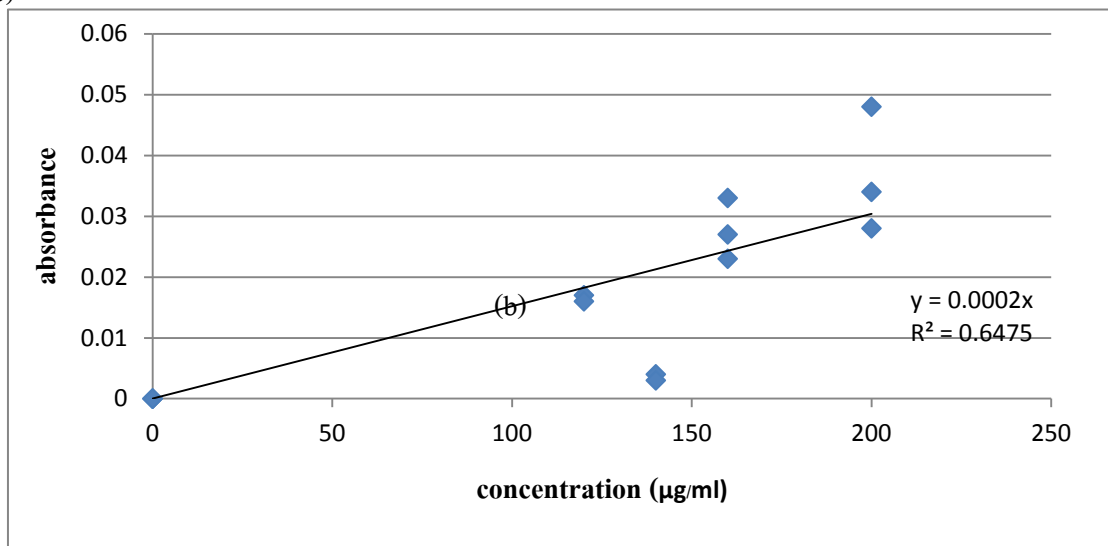
5.4.3 ผล การวัดปริมาณสารสกัด Sphingomyelin ในโยเกิร์ตด้วยเทคนิคเคมีและการวัดค่าการดูดกลืนแสง

เมื่อนำสารมาตรฐาน Sphingomyelin ความเข้มข้น 0, 120, 140, 160, 180 และ 200 $\mu\text{g/ml}$ ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 544 นาโนเมตร และ 590 นาโนเมตรด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยใช้ quartz cuvette ขนาด 1 เซนติเมตร ในการบรรจุสาร ดังรูปที่ 20

a)



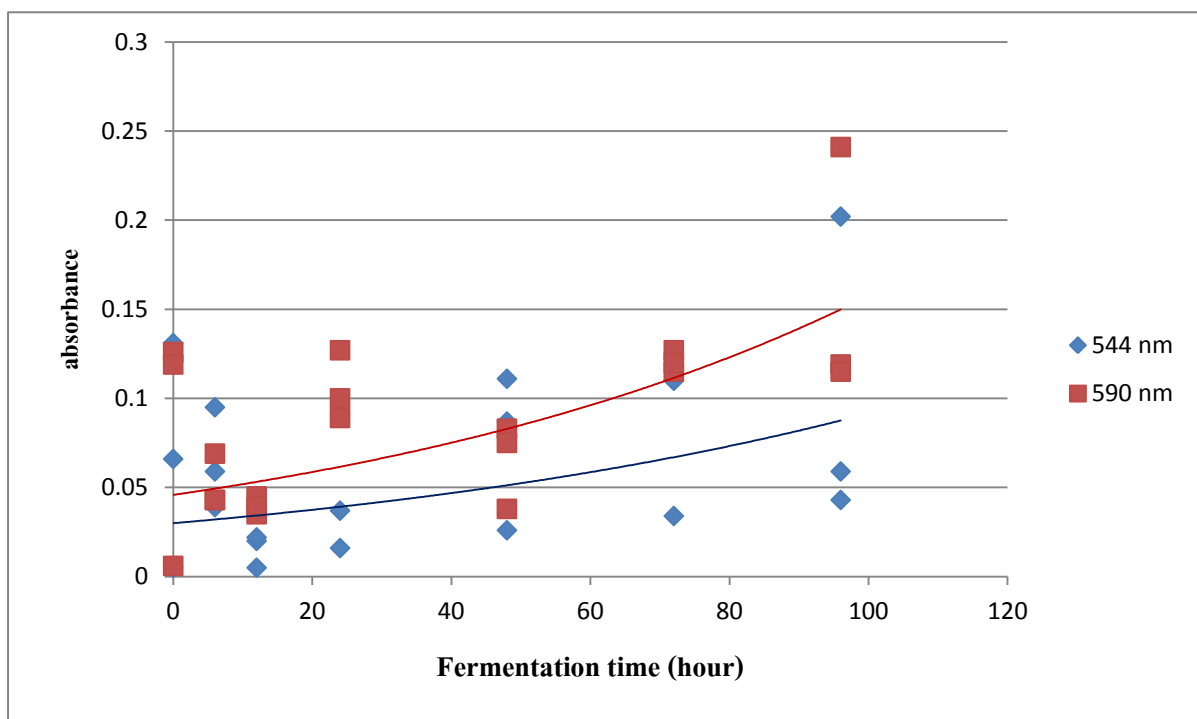
b)



รูปที่ 20 ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน Sphingomyelin ความ ต่างๆ ที่ความยาวคลื่น 544 (a) และ 590 นาโนเมตร (b)

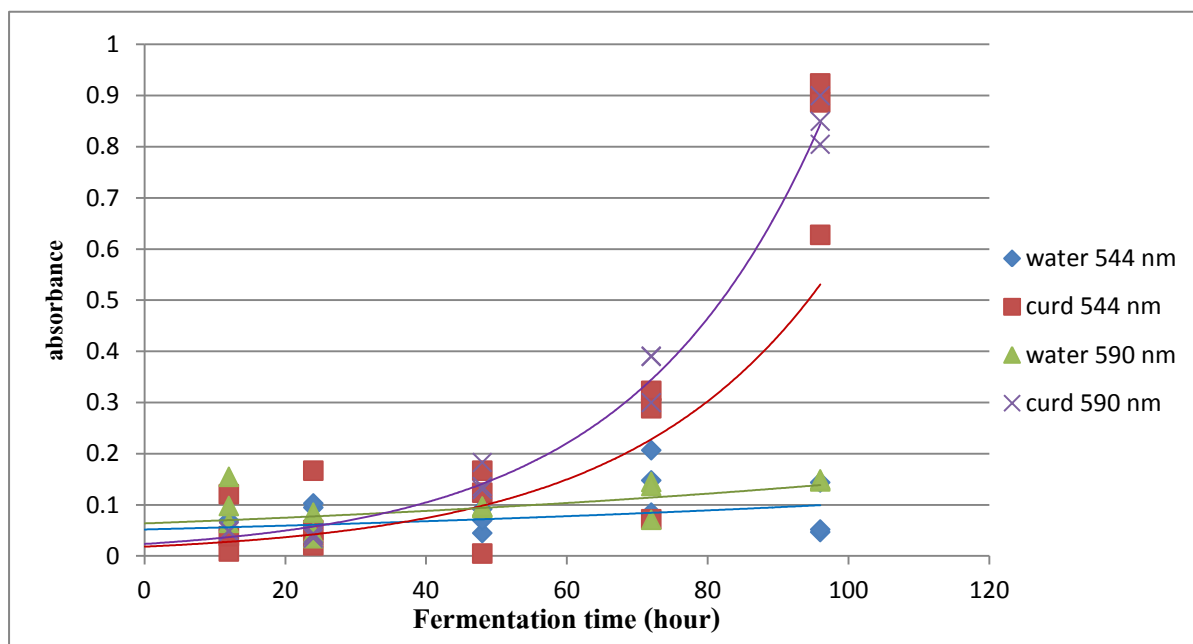
จากรูปที่ 20 กราฟมาตรฐานที่ได้จากการวัดที่ความยาวคลื่น 544 นาโนเมตรมีแนวโน้มเป็นเส้นตรง ค่า $R^2 = 0.9458$ ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้ สามารถนำกราฟมาตรฐานนี้ไปเทียบหาปริมาณสาร Sphingomyelin ได้ ควรทำซ้ำเพื่อความแม่นยำให้มากขึ้น ส่วนกราฟมาตรฐานจากการวัดที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตรไม่มีแนวโน้มเป็นเส้นตรง ค่า $R^2 = 0.6475$ ซึ่งมีความเสี่ยงหากนำไปเทียบหาปริมาณสาร Sphingomyelin

เมื่อนำสารสกัด Sphingomyelin ที่สกัดจากโยเกิร์ตหมักในเวลาต่างๆ มาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 544 นาโนเมตรและ 590 นาโนเมตร โดยใช้ quartz cuvette ขนาด 1 เซนติเมตร เพื่อตรวจสอบปริมาณ Sphingomyelin ของตัวอย่างโดยเทียบกับสารมาตรฐานเพื่อนำค่าที่ได้ไปใช้ในการทำอนุพันธ์ (derivative) ซึ่งจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ผลดังรูปที่ 21 และรูปที่ 22



รูปที่ 21 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด Sphingomyelin สกัดจากโยเกิร์ตหมักชุดที่ 1 ที่เวลาต่างๆ

◆ ค่าความยาวคลื่น 544 นาโนเมตร, ■ ค่าความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร)



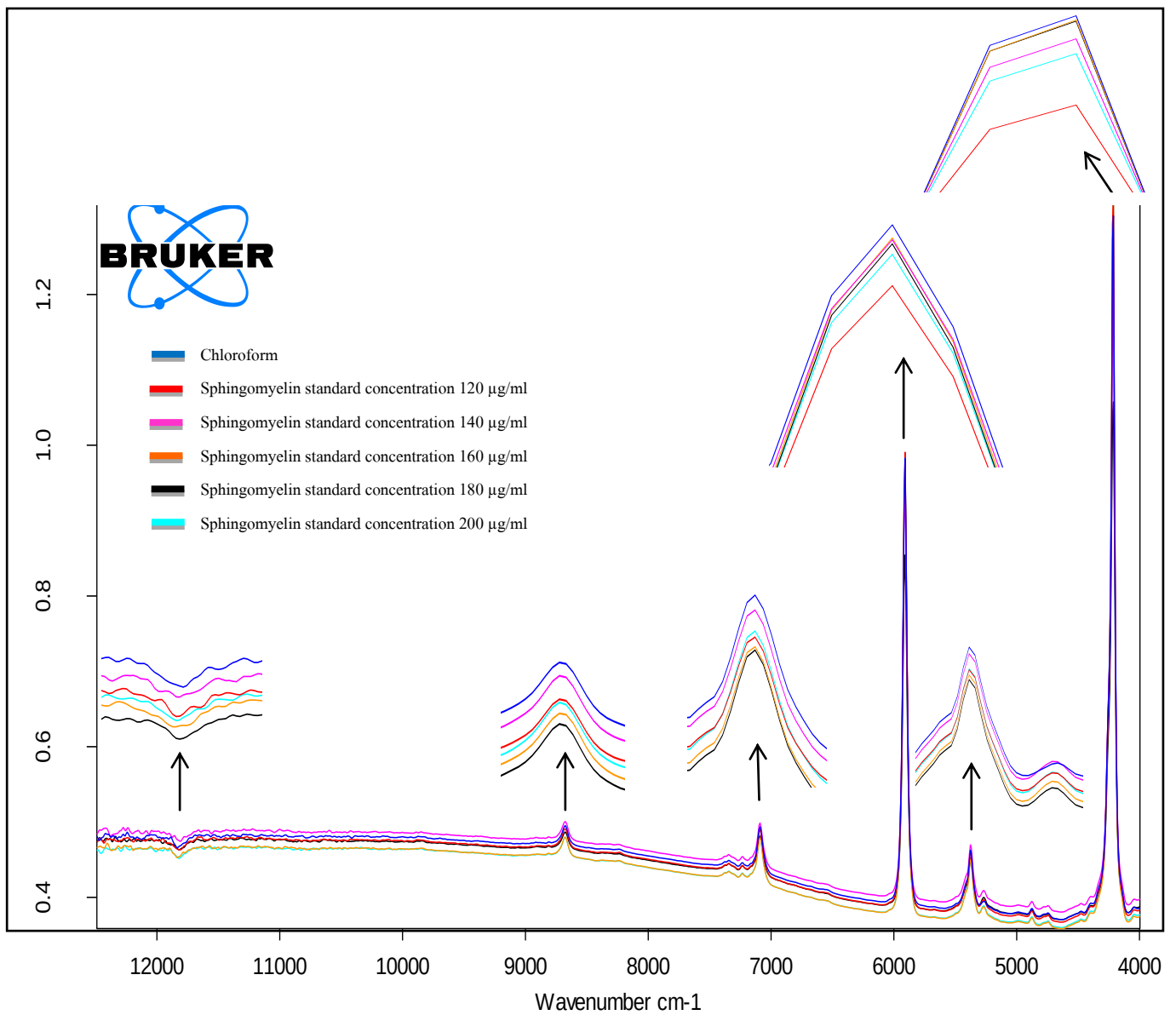
รูปที่ 22 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด Sphingomyelin สกัดจากโยเกิร์ตหมักชุดที่ 2 ที่เวลาต่างๆ

◆ (ค่าความยาวคลื่น 544 นาโนเมตร, ■ ค่าความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร)

จากรูปที่ 21 และรูปที่ 22 ค่าการดูดกลืนแสงมีแนวโน้มค่าสูงขึ้นเมื่อใช้เวลาในการหมักมากขึ้นจึงเป็นไปได้ว่า เมื่อใช้เวลาในการหมักโยเกิร์ตมากขึ้นทำให้มีสาร Sphingomyelin เพิ่มขึ้นตามเวลา และจากรูปที่ 21 สารสกัด Sphingomyelin จากโยเกิร์ตส่วนที่เป็นตะกอนโปรตีน มีค่าการดูดกลืนแสงสูงกว่าสารสกัด Sphingomyelin จากโยเกิร์ตส่วนที่เป็นน้ำใส จึงเป็นไปได้ว่าในตะกอนโปรตีนมีสาร Sphingomyelin อยู่มากกว่าส่วนที่เป็นน้ำใส

5.4.4 ผลการใช้เทคนิค NIRS ตรวจสอบสาร Sphingomyelin ในสารสกัดจากโยเกิร์ต

เมื่อนำสารมาตรฐานและสารสกัด Sphingomyelin ของโยเกิร์ตหมักที่เวลาต่างๆจากการหมักนมสดพาสเจอร์ไรส์ด้วยหัวเชื้อนมเปรี้ยวดีไลท์ที่ 37 องศาเซลเซียส ไปวัดด้วยเครื่องสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (NIRs) (สภาวะการตรวจวัดด้วย NIRS คือวัดแบบ Transflectance ที่ Resolution 16 Scan time 32 และ wavenumber $4000-12000\text{ cm}^{-1}$) ซึ่งได้ผลของสเปกตรัมดังรูปที่ 23 และ 24 และตารางที่ 10 และ 11 ดังนี้

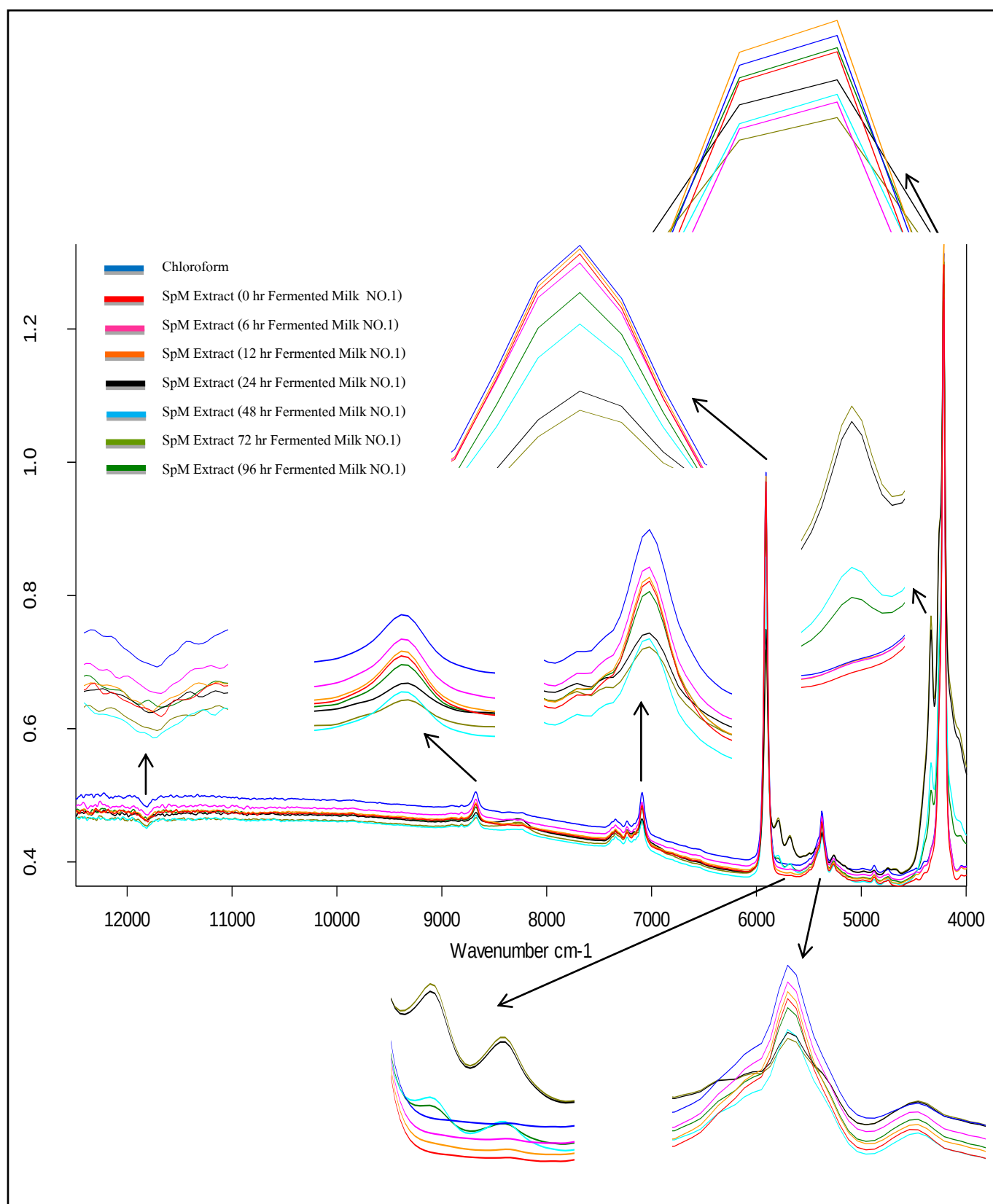


รูปที่ 23 สเปกตรัมของสารมาตรฐาน Sphingomyelin ความเข้มข้นต่างๆ ใน Chloroform (สภาวะการตรวจวัดด้วย NIRS คือวัดแบบ Transflectance ที่ Resolution 16 Scan time 32 และ wavenumber 4000-12000 cm^{-1})

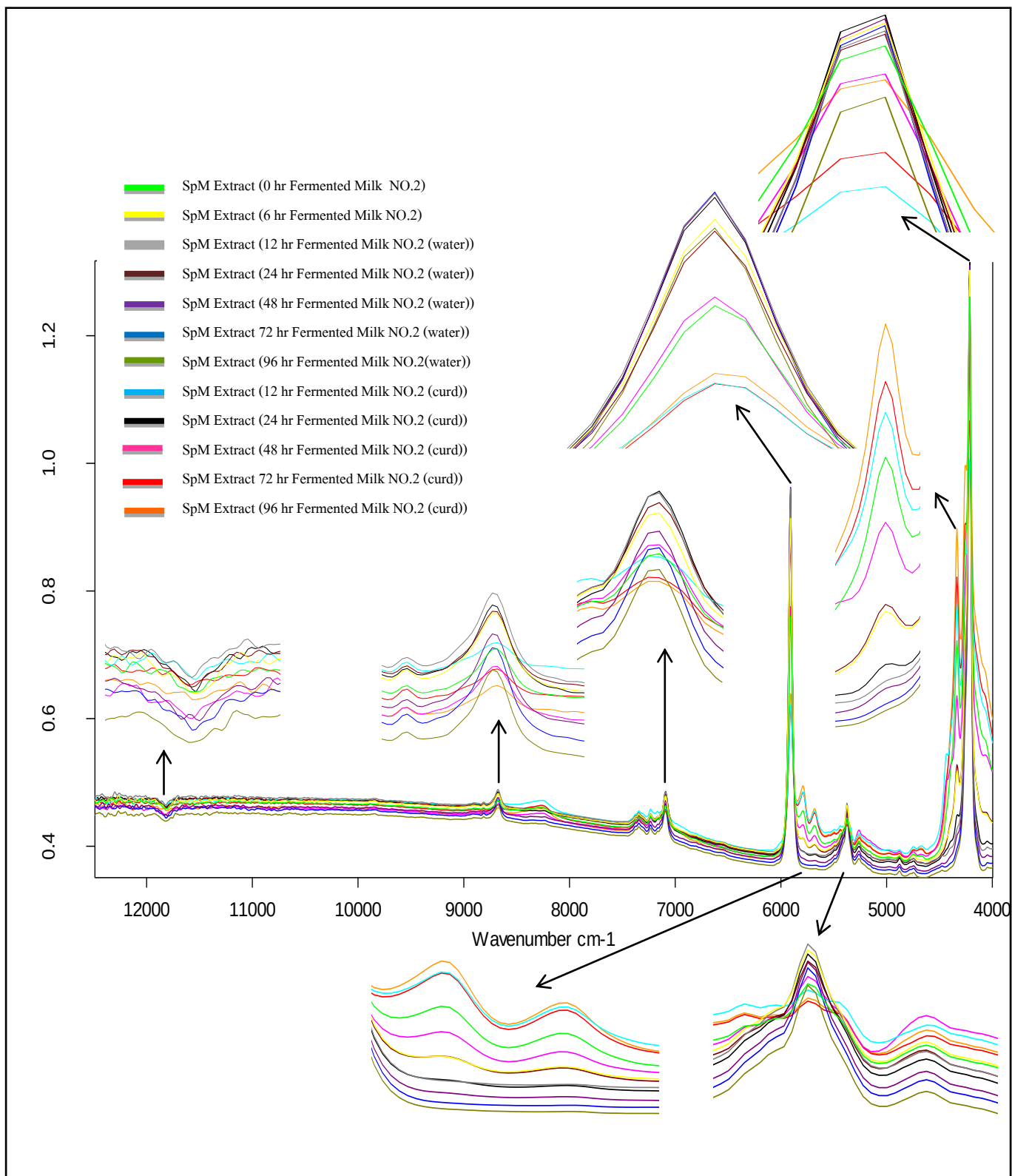
ตารางที่ 10 ค่า Absorbance Units (cm^{-1}) บนสเปกตรัม NIRS ของสารมาตรฐาน Sphingomyelin ที่ความเข้มข้นต่างๆ ใน Chloroform ($\mu\text{g/ml}$)

Sample	Code	Absorbance Units (Peak Height) at wavelength(cm^{-1})					
		11818 N-H	8677 C=C	7090 (C=O)	5909 C=C	5377, 5277 C-H	4212 C-H
Chloroform	std_0_2	0.46784	0.49488	0.49321	0.98258	0.46207,0.39360	1.30416
SpM Std. Conc. 120 $\mu\text{g/ml}$	std__120_2	0.46301	0.49110	0.48932	0.99035	0.45980,0.39576	1.32472
SpM Std. Conc. 140 $\mu\text{g/ml}$	std__140_2	0.47499	0.50054	0.49838	0.94719	0.46925,0.40763	1.22118
SpM Std. Conc. 160 $\mu\text{g/ml}$	std__160_2	0.45407	0.47977	0.47847	0.97870	0.44998,0.38626	1.32601
SpM Std. Conc. 180 $\mu\text{g/ml}$	std__180_2	0.46355	0.48651	0.48058	0.85336	0.45149,0.39813	1.05629
SpM Std. Conc. 200 $\mu\text{g/ml}$	std__200_2	0.45139	0.47977	0.47944	0.97870	0.45149,0.38777	1.32860

จากสเปกตรัมของสารมาตรฐาน Sphingomyelin ที่ความเข้มข้น 120, 140, 160, 180 และ 200 $\mu\text{g/ml}$ เทียบกับ Chloroform ที่ได้จากการวัด NIRS (รูปที่ 23 และตารางที่ 10) พบว่าสเปกตรัมของคลอโรฟอร์มที่ได้ ได้จากการสั่นของโมเลกุลโดยรวมของตัวอย่างโดยมีหมู่ต่างๆคือ ที่ 11818 cm^{-1} เป็นการสั่นของ N-H ที่ 8677 cm^{-1} เป็นการสั่นของ C=C ที่ 7090 เป็นการสั่นของ C=O ที่ 5909 cm^{-1} เป็นการสั่นของ C=C ที่ 5377 ,5277 cm^{-1} และที่ 4212 cm^{-1} เป็นการสั่นของ C-H และ SpM ที่ความเข้มข้น 120, 140, 160, 180 และ 200 $\mu\text{g/ml}$ มีการสั่นที่คล้ายคลึงกับคลอโรฟอร์มอาจเป็นเพราะสารมาตรฐาน SpM มีปริมาณน้อยมาก แต่มีความแตกต่างกันที่ความสูงของจุดยอด อาจเกิดจากการจับกันของสารมาตรฐาน SpM กับตัวทำละลาย ซึ่งเส้นสเปกตรัมของคลอโรฟอร์มมีค่าความสูงของจุดยอดมากที่สุดและสารมาตรฐาน Sphingomyelin ที่ความเข้มข้น 120 $\mu\text{g/ml}$ มีค่าความสูงของจุดยอดที่น้อยสุด



(a)



(b)

รูปที่ 24 เส้นสเปกตรัม NIRS ของสารสกัด Sphingomyelin ของตัวอย่างใน Chloroform

(a) สารสกัด Sphingomyelin ของโยเกิร์ตหมักชุดที่ 1

(b) สารสกัด Sphingomyelin ของโยเกิร์ตหมักชุดที่ 2

ตารางที่ 11 ค่า Absorbance Units (cm^{-1}) ของสเปกตรัม NIRS ในสารสกัด Spingomyelin ที่สกัดได้จากตัวอย่างโยเกิร์ตหมักที่เวลาต่างๆ

Sample	Code	Absorbance Units (Peak Height) at wavelength(cm^{-1})				
		11818 N-H	8677 C=C	7090 C=O	5909 C=C	5792, 5682 C-H
Chloroform	std_0_3	0.48327	0.50496	0.50400	0.98428	-
SpM Extract 1 (0 hr)	sm_0_no.1_3	0.46008	0.48606	0.48381	0.95550	0.38189,0.37931
SpM Extract 1 (6 hr)	sm_6_no.1_3	0.47059	0.49380	0.48961	0.95550	0.39155,0.38898
SpM Extract 1 (12 hr)	sm_12_no.1_3	0.46397	0.48843	0.48553	0.97891	0.38704,0.38318
SpM Extract 1 (24 hr)	sm_24_no.1_3	0.46264	0.47382	0.46469	0.74822	0.46115,0.43730
SpM Extract 1 (48 hr)	sm_48_no.1_3	0.45058	0.46995	0.46233	0.85648	0.40960,0.39735
SpM Extract 1 (72 hr)	sm_72_no.1_3	0.45325	0.46609	0.45889	0.71729	0.46566,0.43924
SpM Extract 1 (96 hr)	sm_96_no.1_3	0.46470	0.48241	0.48016	0.90781	0.40508,0.39606
SpM Extract 2 (0 hr)	sm_0_no.2_3	0.45881	0.47155	0.46317	0.75973	0.45527, 0.43210
SpM Extract 2 (6 hr)	sm_6_no.2_3	0.45849	0.48246	0.47784	0.91398	0.41207, 0.40351
SpM Extract 2 (12 hr) (water)	sm_12w_no.2_3	0.46429	0.48783	0.48509	0.95993	0.39142, 0.38808
SpM Extract 2 (24 hr) (water)	sm_24w_no.2_3	0.46091	0.40300	0.48139	0.89284	0.41270, 0.40238
SpM Extract 2 (48 hr) (water)	sm_48w_no.2_3	0.44978	0.47601	0.47123	0.95993	0.38110, 0.37755
SpM Extract 2 (72 hr) (water)	sm_72w_no.2_3	0.44398	0.47209	0.46526	0.96182	0.37271, 0.37002
SpM Extract 2 (96 hr) (water)	sm_96w_no.2_3	0.43930	0.46510	0.45752	0.89813	0.36691, 0.36476
SpM Extract 2 (12 hr) (curd)	sm_12c_no.2_3	0.46429	0.47386	0.46220	0.62204	0.48493, 0.45467
SpM Extract 2 (24 hr) (curd)	sm_24c_no.2_3	0.46026	0.48515	0.48574	0.95241	0.39206, 0.48695
SpM Extract 2 (48 hr) (curd)	sm_48c_no.2_3	0.44849	0.46618	0.46655	0.77505	0.43334, 0.41630
SpM Extract 2 (72 hr) (curd)	sm_72c_no.2_1	0.46188	0.46517	0.45462	0.62042	0.48364,0.45204
SpM Extract 2 (96 hr) (curd)	sm_96c_no.2_3	0.45591	0.45999	0.45333	0.63897	0.49461,0.45844

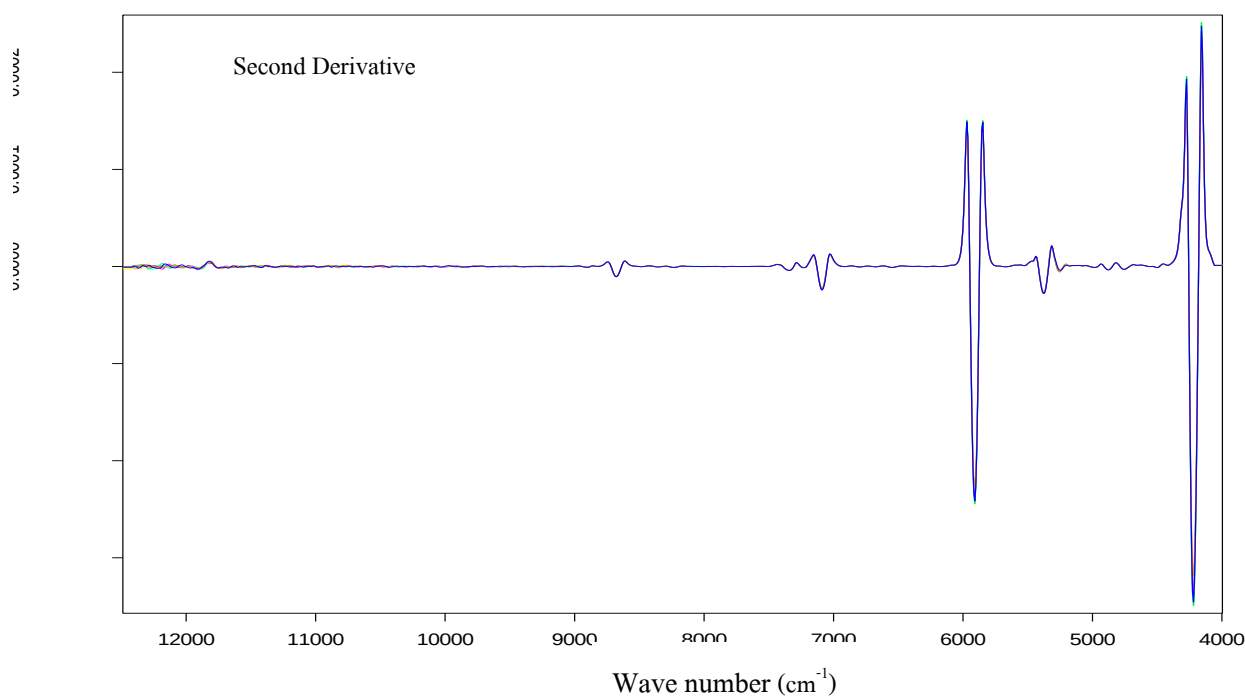
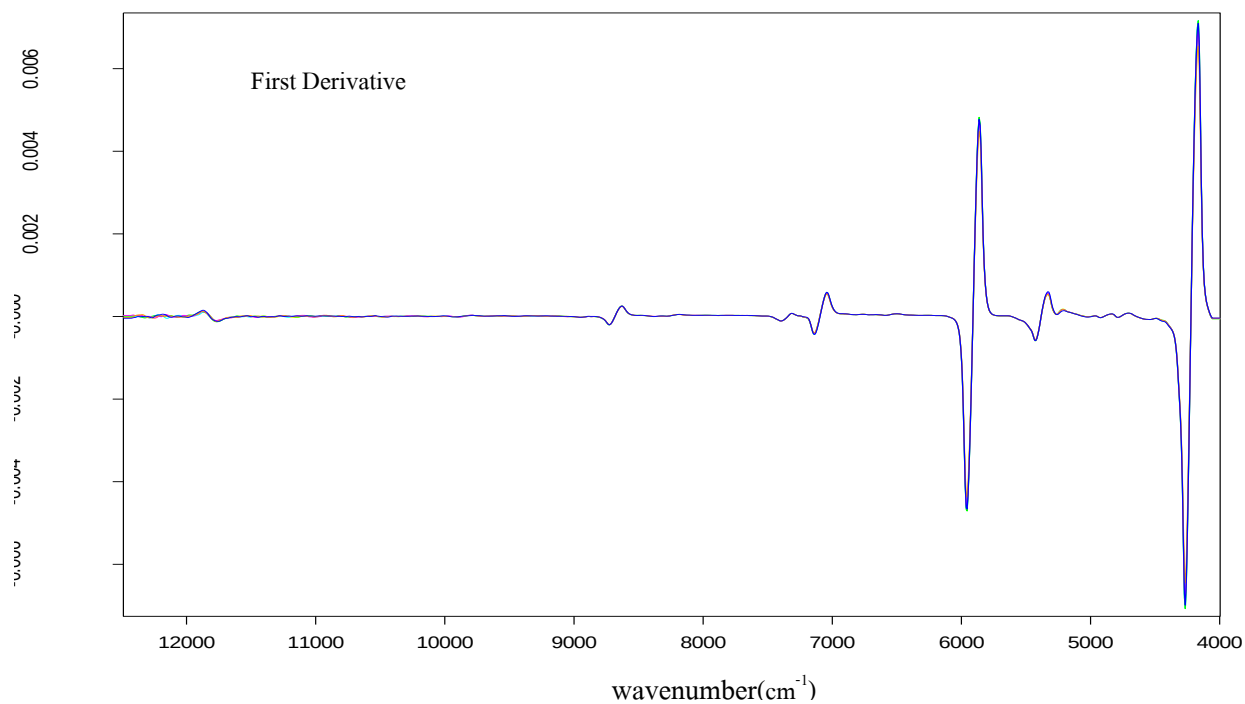
Sample	Code	Absorbance Units (Peak Height) at wavelength(cm^{-1})		
		5377, 5277 C-H	4335 C-H	4212 C-H
Chloroform	std_0_3	0.4753, 0.40670	-	1.31291
SpM Extract 1 (0 hr)	sm_0_no.1_3	0.4579, 0.39445	0.4038	1.29638
SpM Extract 1 (6 hr)	sm_6_no.1_3	0.4681, 0.40219	0.4167	0.24413
SpM Extract 1 (12 hr)	sm_12_no.1_3	0.4620, 0.39639	0.4167	1.32870
SpM Extract 1 (24 hr)	sm_24_no.1_3	0.4426, 0.40670	0.7466	1.26668
SpM Extract 1 (48 hr)	sm_48_no.1_3	0.4447, 0.39188	0.5468	1.25202
SpM Extract 1 (72 hr)	sm_72_no.1_3	0.4396, 0.40670	0.7672	1.22795
SpM Extract 1 (96 hr)	sm_96_no.1_3	0.4538, 0.39896	0.5069	1.30051
SpM Extract 2 (0 hr)	sm_0_no.2_3	0.44269, 0.49399	0.7210	1.2609
SpM Extract 2 (6 hr k)	sm_6_no.2_3	0.46300, 0.40593	0.5168	1.3012
SpM Extract 2 (12 hr) (water)	sm_12w_no.2_3	0.46687, 0.40061	0.4254	1.2878
SpM Extract 2 (24 hr) (water)	sm_24w_no.2_3	0.45672, 0.40206	0.5276	1.2797
SpM Extract 2 (48 hr) (water)	sm_48w_no.2_3	0.45527, 0.38900	0.4160	1.3093
SpM Extract 2 (72 hr) (water)	sm_72w_no.2_3	0.45140, 0.38368	0.3959	1.2972
SpM Extract 2 (96 hr) (water)	sm_96w_no.2_3	0.44124, 0.37690	0.3865	1.1667
SpM Extract 2 (12 hr) (curd)	sm_12c_no.2_3	0.43979, 0.41608	0.7788	1.0027
SpM Extract 2 (24 hr) (curd)	sm_24c_no.2_3	0.46095, 0.39577	0.4483	1.3173
SpM Extract 2 (48 hr k) (curd)	sm_48c_no.2_3	0.44704, 0.41995	0.6350	1.2098
SpM Extract 2 (72 hr) (curd)	sm_72c_no.2_1	0.43301, 0.40931	0.8205	1.0659
SpM Extract 2 (96 hr) (curd)	sm_96c_no.2_3	0.43959, 0.41222	0.8971	1.1976

จากรูปที่ 24 และตารางที่ 11 สารสกัด Sphingomyelin ที่ได้จากการสกัดโยเกิร์ตหมักที่ 0, 6, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง เทียบกับคลอโรฟอร์ม (Chloroform) พบว่าการสั่นโมเลกุลในโยเกิร์ตหมักที่เวลาต่างๆ มีลักษณะที่คล้ายกับการสั่นโมเลกุลของคลอโรฟอร์มเป็นอย่างมาก เนื่องจากคลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการทดลอง สเปกตรัมที่ได้ ได้จากการสั่นของโมเลกุลโดยรวมของตัวอย่างโดยมีหมู่ต่างๆ คือ ที่ 11818 cm^{-1} เป็นการสั่นของ N-H ที่ 8677 cm^{-1} เป็นการสั่นของ C=C ที่ 7090 cm^{-1} เป็นการสั่นของ C=O ที่ 5909 cm^{-1} เป็นการสั่นของ C=C ที่ $5377, 5277\text{ cm}^{-1}$ เป็นการสั่นของ C-H และที่ 4212 cm^{-1} เป็นการสั่นของ C-H แต่สเปกตรัมของสารสกัดจากโยเกิร์ตหมักที่เวลาต่างๆ เกิดการสั่นที่ 5792, 5682 เป็นการ

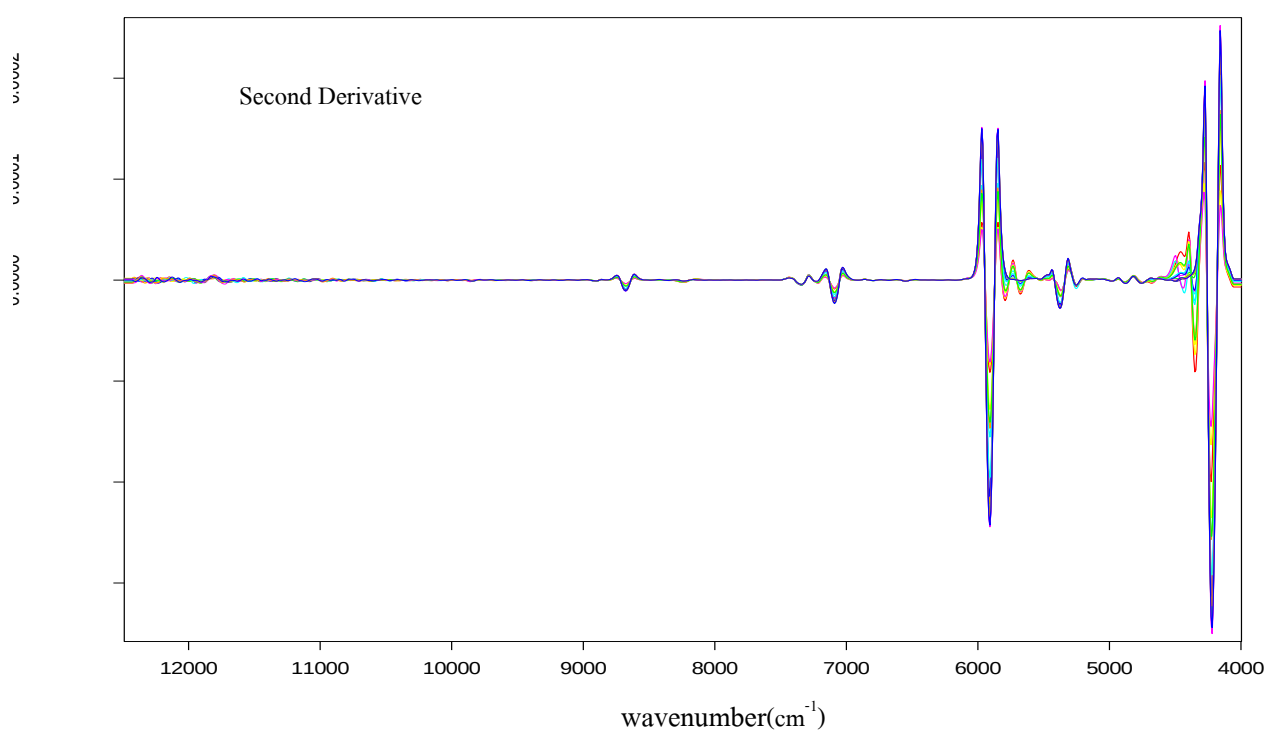
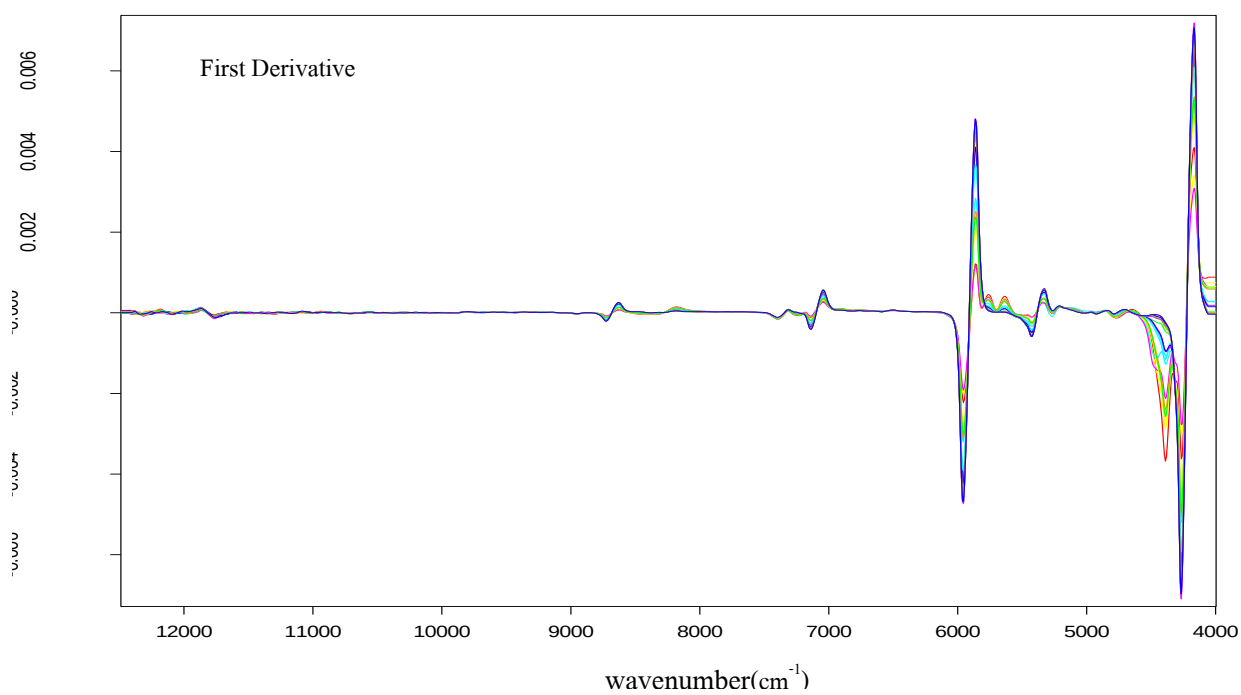
สั้นของ C-H และที่ 4335cm^{-1} เป็นการสั้นของ C-H ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าน่าจะเป็นการสั้นโมเลกุลของ Sphingomyelin เนื่องจากสูตรโครงสร้างของ Sphingomyelin ประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชันของ alkanes (C-H) เป็นหลัก ดังนั้นในสารสกัดจากโยเกิร์ตหมักจึงมีโอกาสมองค้ประกอบของ Sphingomyelin อยู่

5.4.5 การทำอนุพันธ์ (First and Second derivative) ของสเปกตรัมสารสกัด Sphingomyelin

จากเส้นสเปกตรัมของสารมาตรฐาน Sphingomyelin ความเข้มข้นที่ 120, 140, 160, 180 และ 200 $\mu\text{g/ml}$ ใน Chloroform (รูปที่ 23) และเส้นสเปกตรัมของสารสกัด Sphingomyelin ของตัวอย่างโยเกิร์ตใน Chloroform (รูปที่ 24) นำมาทำอนุพันธ์อันดับหนึ่งและสอง (First/Second derivative) ได้ผลดังรูปที่ 25 และ 26 ซึ่งแสดงการทำอนุพันธ์อันดับหนึ่งและสองของเส้นสเปกตรัมของสารสกัด Sphingomyelin ของโยเกิร์ตหมักที่เวลาต่างๆ พบว่าเส้นสเปกตรัมมีการขึ้นลงของจุดยอดในแนวโน้มที่ใกล้เคียงกันมาก จึงจำแนกได้เพียงปริมาณของคลอโรฟอร์มการทำ Second derivative จะสังเกตได้ถึงปริมาณคลอโรฟอร์มที่มาจากความสูงของพีคของคลอโรฟอร์ม ซึ่งหากมีจุดยอดที่สูงมากหมายถึงมีปริมาณคลอโรฟอร์มสูงและสารที่ละลายอยู่มีความเข้มข้นต่ำซึ่งในทางกลับกันหากมีจุดยอดต่ำหมายถึงมีปริมาณคลอโรฟอร์มต่ำและสารที่ละลายอยู่มีความเข้มข้นสูง

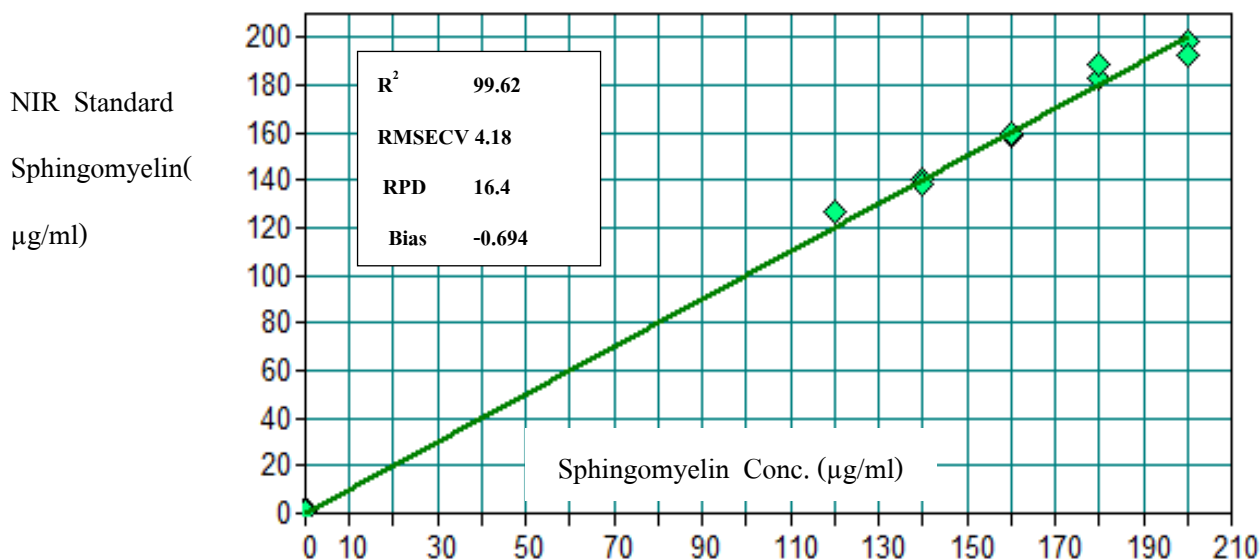


รูปที่ 25 การทำอนุพันธ์อันดับหนึ่งและสอง (First and Second derivative) จากเส้นสเปกตรัมของสารมาตรฐาน Sphingomyelin ที่ความเข้มข้นต่างๆ



รูปที่ 26 การทำอนุพันธ์อันดับหนึ่งและสอง (First and Second derivative) จากเส้นสเปกตรัมของสารสกัด Sphingomyelin ของโยเกิร์ตหมักที่เวลาต่างๆ

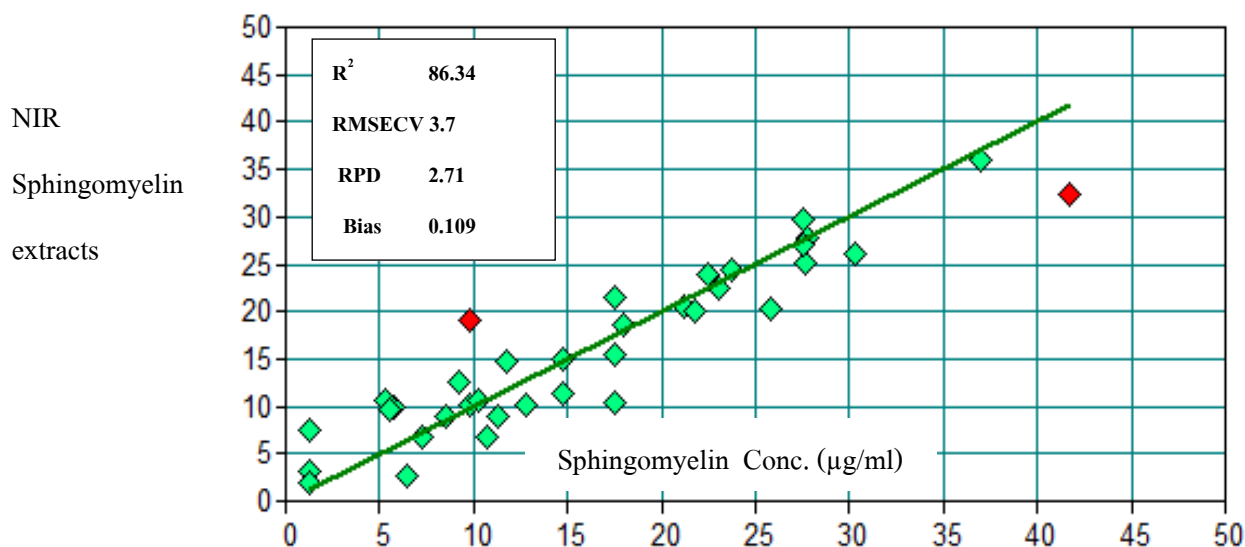
จากการทำอนุพันธ์อันดับหนึ่งและสองของเส้นสเปกตรัมของสารมาตรฐาน Sphingomyelin ความเข้มข้นที่ 120, 140, 160, 180 และ 200 $\mu\text{g/ml}$ เทียบกับ Chloroform นำมาแปรผลเป็นค่าทางสถิติ ซึ่งแสดงเป็นกราฟเส้นตรง ได้ผลดังรูปที่ 27



รูปที่ 27 Calibration model ของ Sphingomyelin ที่ความเข้มข้นต่างๆ เทียบกับสารมาตรฐาน

จากรูปที่ 27 การทำอนุพันธ์อันดับหนึ่งของเส้นสเปกตรัมสารมาตรฐาน Sphingomyelin ความเข้มข้นต่างๆ กับค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Sphingomyelin พบว่าข้อมูลมีแนวโน้มเป็นเส้นตรง มีค่า R^2 เท่ากับ 99.62 RMSECV เท่ากับ 4.18 $\mu\text{g/ml}$ RPD เท่ากับ 16.4 และ Bias เท่ากับ -0.694 ซึ่งเป็นไปได้ว่าเทคนิค NIRSสามารถนำมาใช้ในการตรวจหาสาร Sphingomyelin ได้ เพื่อข้อมูลที่มีความน่าเชื่อถือควรมีการทำหลายซ้ำ เพื่อเพิ่มชุดข้อมูลและดูแนวโน้มค่าทางสถิติต่อไป

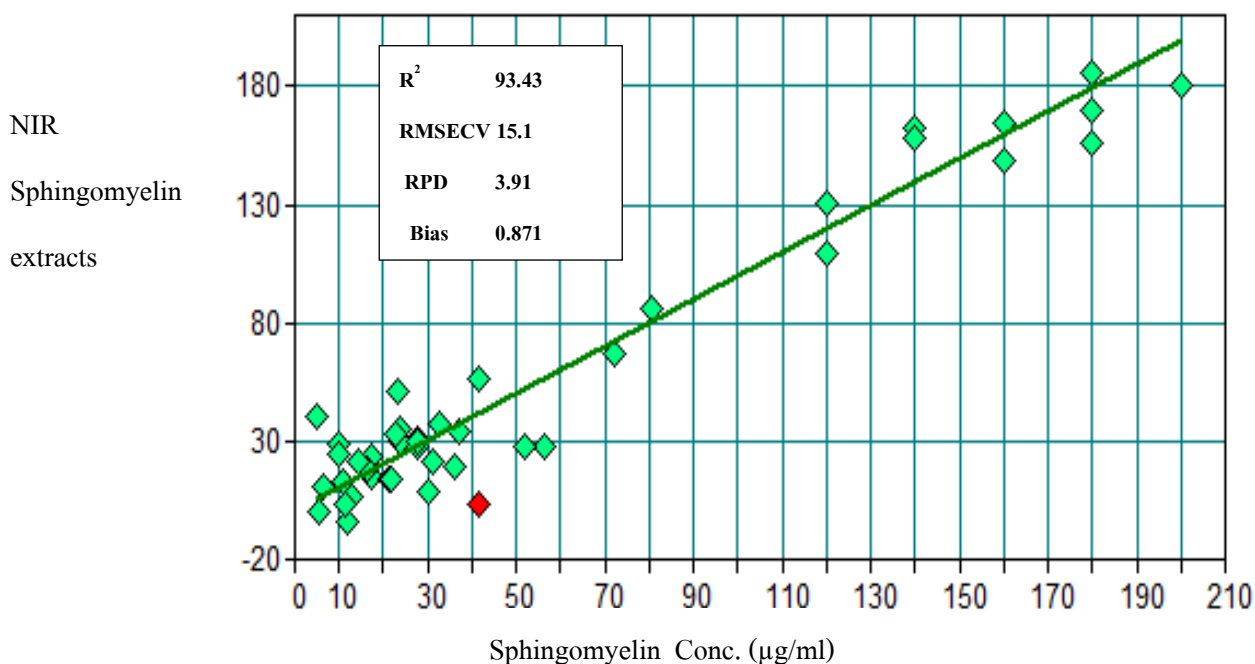
ส่วนการทำอนุพันธ์อันดับหนึ่งและสองของเส้นสเปกตรัมของสารสกัด Sphingomyelin ของโยเกิร์ตหมักชุดที่ 1 และ 2 ที่เวลาต่างๆ (รูปที่ 25 และ 26) นำมาแปรผลเป็นค่าทางสถิติ ได้เป็นกราฟดังรูปที่ 28



รูปที่ 28 Calibration และ Validation ของเส้นสเปกตรัมสารสกัด Sphingomyelin ของโยเกิร์ตหมักชุดที่ 1 และ 2 ที่ เวลาต่างๆ

จากรูปที่ 28 การทำอนุพันธ์อันดับหนึ่งของเส้นสเปกตรัมสารสกัด Sphingomyelin ของโยเกิร์ตหมักชุดที่ 1 และ 2 ที่เวลาต่างๆ กับปริมาณสาร Sphingomyelin ที่เทียบได้จากกราฟมาตรฐานสาร Sphingomyelin(calibration curve) และตัดข้อมูลที่มีปริมาณสาร Sphingomyelin มากกว่าสารมาตรฐานออกไป พบว่าข้อมูลมีแนวโน้มเป็นเส้นตรง มีค่า R^2 เท่ากับ 86.54 RMSECV เท่ากับ 3.7 $\mu\text{g/ml}$ RPD เท่ากับ 2.71 และ Bias เท่ากับ 0.109 ซึ่งเป็นไปได้ว่าเทคนิค NIRS สามารถนำมาใช้ในการตรวจหาสาร Sphingomyelin ได้ เพื่อข้อมูลที่มีความน่าเชื่อถือควรมีการทำหลายซ้ำ เพื่อเพิ่มชุดข้อมูลและดูแนวโน้มค่าทางสถิติต่อไป

หลังการทำอนุพันธ์อันดับหนึ่งและสองของเส้นสเปกตรัมของสารมาตรฐาน Sphingomyelin ความเข้มข้นต่างๆ และสารสกัด Sphingomyelin ของโยเกิร์ตหมักชุดที่ 1 และ 2 ที่เวลาต่างๆ นำมาแปรผลเป็นค่าทางสถิติ ซึ่งแสดงเป็นกราฟเส้นตรง ได้ผลดังรูปที่ 29



รูปที่ 29 Cross Validation difference ของสเปกตรัม NIRS ของสารมาตรฐาน Sphingomyelin ความเข้มข้น
ต่างๆและสารสกัด Sphingomyelin ของโยเกิร์ตหมักชุดที่ 1 และ 2 ที่เวลาต่างๆ

จากรูปที่ 29 การทำอนุพันธ์อันดับหนึ่งของเส้นสเปกตรัมสารมาตรฐาน Sphingomyelin ความเข้มข้นต่างๆและสารสกัด Sphingomyelin ของโยเกิร์ตหมักชุดที่ 1 และ 2 ที่เวลาต่างๆ กับปริมาณสาร Sphingomyelin ที่เทียบกับกราฟมาตรฐานสาร Sphingomyelin calibration curve และตัดข้อมูลที่มีปริมาณสาร Sphingomyelin มากกว่าสารมาตรฐานออกไป พบว่าข้อมูลมีแนวโน้มเป็นเส้นตรง มีค่า R^2 เท่ากับ 93.43 RMSECV เท่ากับ 15.1 µg/ml RPD เท่ากับ 3.91 และ Bias เท่ากับ 0.871 ซึ่งเป็นไปได้ว่า NIRS สามารถนำมาใช้ในการตรวจหาสาร Sphingomyelin ได้ เพื่อข้อมูลที่มีความน่าเชื่อถือควรมีการทำหลายซ้ำ เพื่อเพิ่มชุดข้อมูลและดูแนวโน้มค่าทางสถิติต่อไป

5.4.6 ผลการตรวจสอบปริมาณสาร Sphingomyelin ในผลิตภัณฑ์นมโดยวิธีทางเอนไซม์

ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเทคนิคทางเอนไซม์ของสารตัวอย่าง โดยเติมตัวอย่าง (10 µL) ลงใน Reagent M1 ใน 96-well microplate แล้วบ่มไว้ที่ 37 °C 30 นาที หลังจากนั้นจึงเติม Reagent M2 หลังจากบ่มไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เติม Amplex Red Stop Reagent แล้ววัดความเข้มของการเรืองแสงด้วยเทคนิค microplate แล้วอ่านค่าที่ความยาวคลื่นกระตุ้นและปลดปล่อยที่ 544 nm และ 590 nm ตามลำดับ ตรวจสอบด้วย microplate reader ชนิด fluorescent detector ได้ค่า fluorescent intensity ของสารตัวอย่างก่อนและหลังทำปฏิกิริยาเป็นดังตารางที่ 12 และ 13

ตารางที่ 12 ค่า fluorescent intensity ของสารตัวอย่าง ในการวิเคราะห์ด้วยปฏิกิริยาทางเอนไซม์และวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารก่อนและหลังใส่ Amplex red Stop (A และ B)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	230121	231658	231950	232086	232137	231782	232473	232475	232625	232674	232822	233009
B	224578	212645	153710	227732	231544	215211	233289	204616	219893	227368	189277	216797
C	164664	180257	7975	188183	223293	8295	207067	213215	7791	113630	124591	8418
D	234634	234974	234922	233192	235166	224833	235021	234364	233481	234763	234700	234387
E	232538	235165	232495	231487	235478	215169	216152	235704	235612	228982	235827	235710
F	231665	233479	233551	236039	231076	232134	236110	236016	235989	236007	235939	235880
G	236312	236182	236279	228544	144892	235859	236223	236300	236406	236399	236537	236424
H	8977	8146	8752	8056	8964	8782	9269	9811	9588	8826	8938	8971

(A) ค่า fluorescent intensity ก่อนใส่ Amplex red Stop

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	231357	231434	231484	231520	231542	231560	231582	231598	231615	231621	231634	231647
B	231717	231715	231709	231704	231702	231697	231690	231684	231678	231674	231665	231654
C	231722	231727	117967	231737	231740	123214	231752	231751	105834	231756	231758	143685
D	231786	231780	231780	231776	231766	231774	231772	231769	231767	231763	231761	231758
E	231783	231777	231779	231775	231776	231779	231783	231785	231784	231787	231781	231783
F	231783	231781	231782	231786	231791	231788	231786	231790	231793	231788	231788	231785
G	231783	231785	231781	231780	231780	231779	231778	231779	231774	231773	231776	231777
H	121898	97898	117789	123888	149489	125679	138711	146042	135624	117495	123733	134344

ซ้ำ 2 ครั้ง ชุดที่ 1

ซ้ำ 2 ครั้ง ชุดที่ 2

ซ้ำ 1 ครั้ง ชุดที่ 1

ซ้ำ 1 ครั้ง ชุดที่ 2

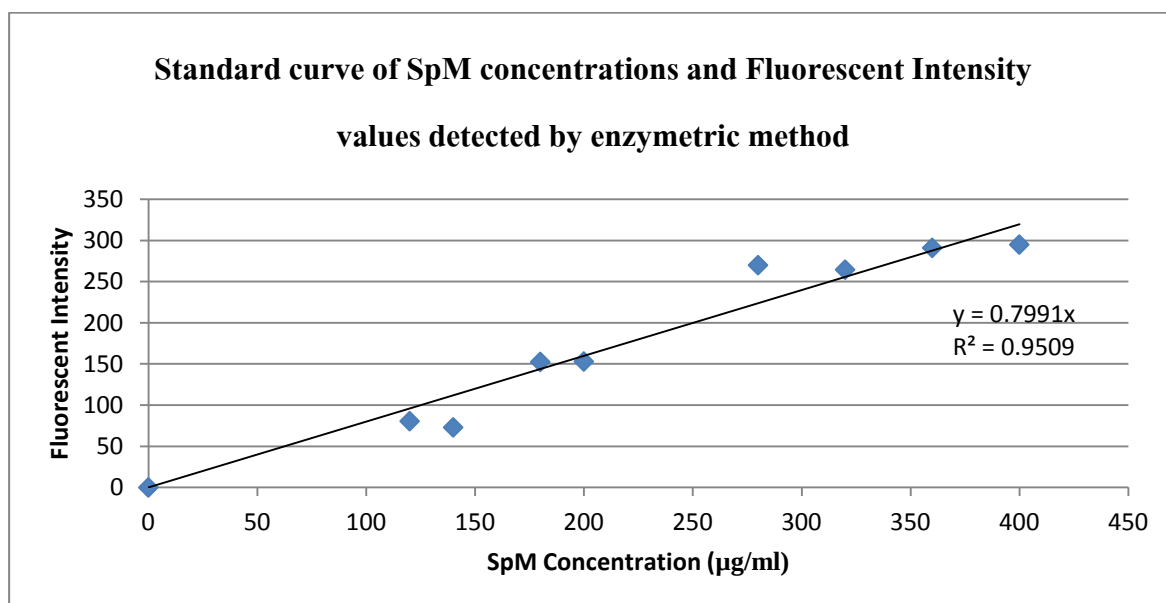
(B) ค่า fluorescent intensity หลังใส่ Amplex red Stop

หมายเหตุ สีฟ้า : สารมาตรฐาน Sphingomyelin สีเขียว : สารมาตรฐาน Sphingosine
 สีเหลือง : สารสกัด Sphingomyelin ที่ 0-96 ชั่วโมง สีส้ม : สารสกัดนมสด
 สีม่วง : สารสกัดนมเปรี้ยว

ผลของค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Sphingomyelin ($\mu\text{g/ml}$) กับค่าเฉลี่ย fluorescent intensity (ทำโดยนำค่า fluorescent intensity ของสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0-200 $\mu\text{g/ml}$ มาหาค่าเฉลี่ย แล้วจึงนำค่าเฉลี่ยที่ได้หักลบจากค่าของคลอโรฟอร์ม ได้ค่า fluorescent intensity ของสาร Sphingomyelin) แสดงในตารางที่ 12 จากนั้นนำค่าความเข้มข้นของสาร Sphingomyelin ($\mu\text{g/ml}$) กับค่า fluorescent intensity ของสาร Sphingomyelin ไปพลอตกราฟ ดังรูปที่ 30

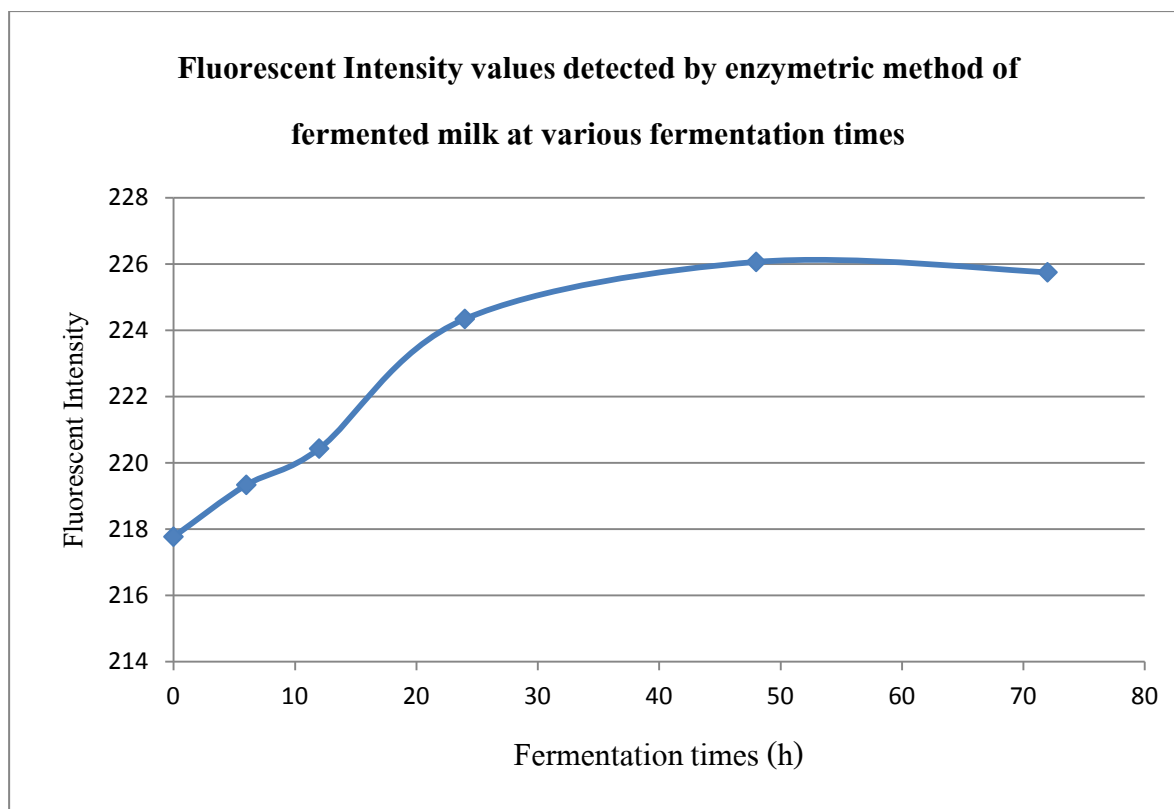
ตารางที่ 13 ค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Sphingomyelin ($\mu\text{g/ml}$) กับค่าเฉลี่ย fluorescent intensity จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ด้วยเอนไซม์

No.	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย	ความเข้มข้นของสาร Sphingomyelin ($\mu\text{g/ml}$)	ค่า fluorescent intensity ของสาร Sphingomyelin
1	231357	231520	231438.5	0	0
2	231690	231674	231682	120	80.5
3	231684	231665	231674.5	140	73
4	231752	231756	231754	180	152.5
5	231751	231758	231754.5	200	153
6	231715	231702	231708.5	280 (Conc. 140*2)	270
7	231709	231697	231703	320 (Conc. 160*2)	264.5
8	231722	231737	231729.5	360 (Conc. 180*2)	291
9	231727	231740	231733.5	400 (Conc. 200*2)	295



รูปที่ 30 ความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของสาร Sphingomyelin ($\mu\text{g/ml}$) กับค่า fluorescent intensity จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเอนไซม์

นำสมการเส้นตรง $y = 0.799x$ มาใช้หาค่าความเข้มข้นของสาร Sphingosine และสาร Sphingomyelin ที่ได้จากการสกัดตัวอย่างนมที่ 0-96 ชั่วโมง,นมสด และนมเปรี้ยวดีไลท์ โดยนำค่า fluorescent intensity ของสารสกัด Sphingomyelin ของตัวอย่าง มาหักล้างกับคลอโรฟอร์ม(ตัวทำละลาย) แล้วหารด้วย 0.799 ได้ค่า x ออกมา แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย ปริมาณ Sphingomyelin ในนมเปรี้ยวที่หมักขึ้นเอง จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางเอนไซม์ ตามช่วงเวลาหมักที่ 0-72 ชั่วโมง โดยที่ 0 คือ นมสดเริ่มต้น (นมที่ไม่ได้ผ่านการหมัก) แสดงในรูปที่ 31 ดังนี้



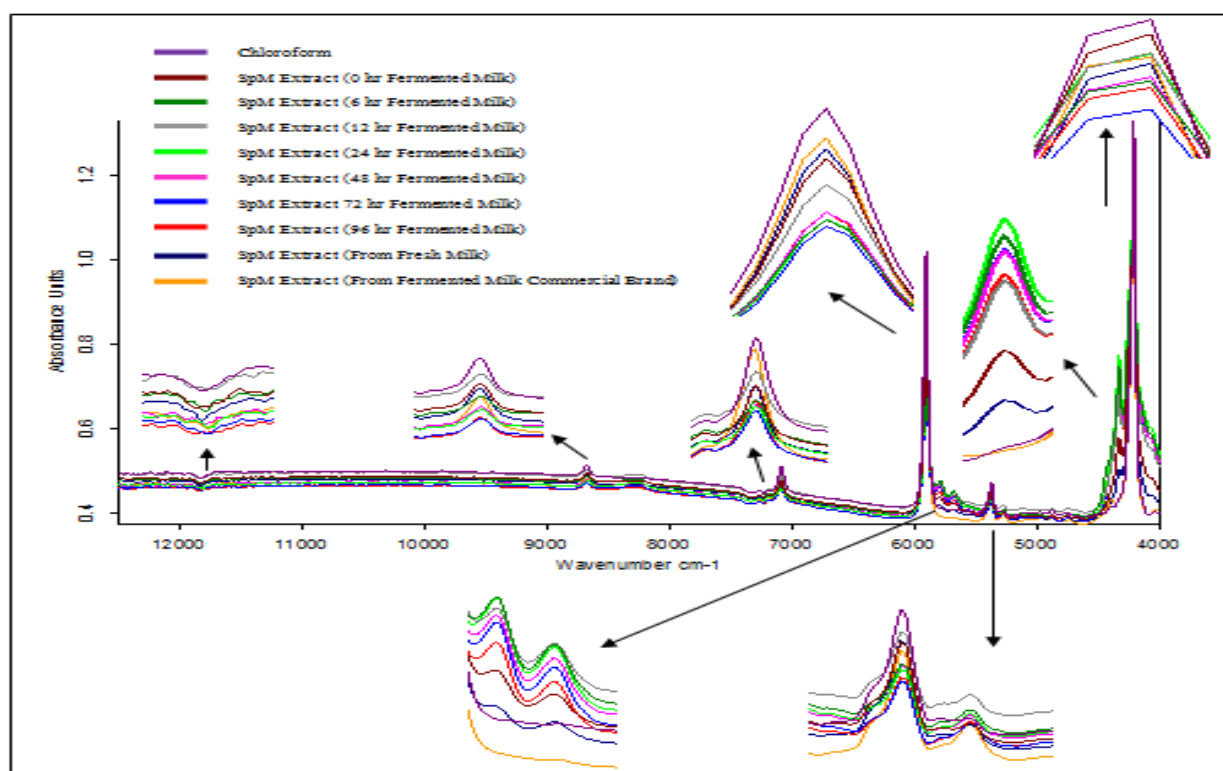
รูปที่ 31 ปริมาณ Sphingomyelin ในนมหมักในงานวิจัยนี้ จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเอนไซม์

จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางเอนไซม์ ตามช่วงเวลาหมักที่ 0-72 ชั่วโมง แต่ถ้านำค่า fluorescent intensity ของตัวอย่างนมหมักที่ 0-96 มาหักค่า fluorescent intensity ของนมสด เพื่อให้ได้ค่า fluorescent intensity ที่ได้มาจากการหมักโดยตรง ซึ่งได้ค่าดังตารางที่ 14

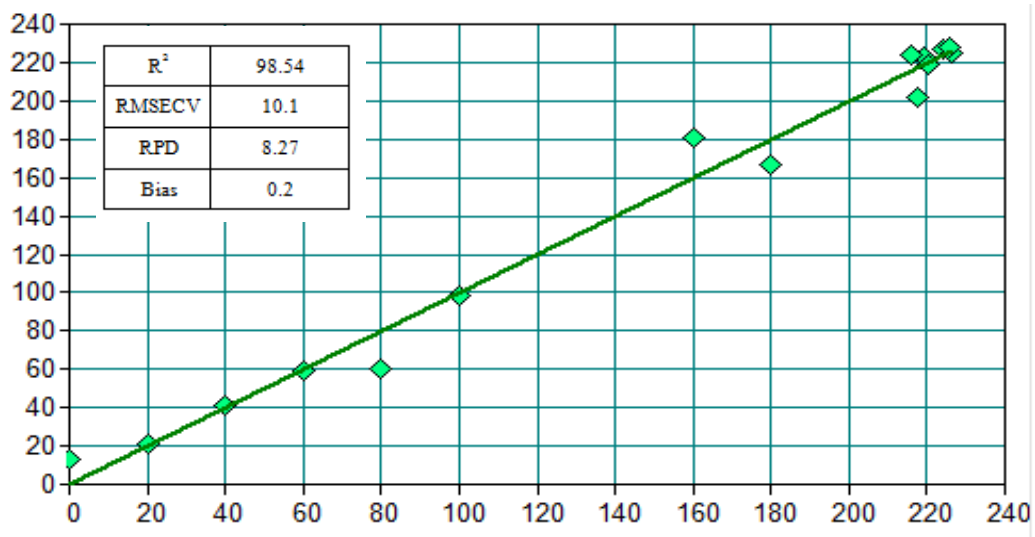
ตารางที่ 14 ปริมาณ Sphingomyelin ในนมหมัก จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางเอ็นไซม์ ที่เวลาหมักต่างๆ

Sample	Time (h)	ปริมาณ Sphingomyelin (Ug/ml)
นมหมัก	0	0
	6	1.564456
	12	2.659574
	24	6.570713
	48	8.291615
	72	7.978723
	96	11.56446

เมื่อนำสารสกัด sphingomyelin ที่วัดด้วยเทคนิค NIRS มาเทียบกับปริมาณสารที่ได้จากเทคนิคทางเอ็นไซม์ ได้ผลดังรูปที่ 32 ซึ่งแสดง เส้นสเปกตรัมของสารสกัด Sphingomyelin ของตัวอย่างนมเทียบกับ Chloroform และผลการทำอนุพันธ์อันดับหนึ่งและสอง (First and Second derivative) นำมาแปลผลเป็นค่าทางสถิติ ซึ่ง และการทำเปรียบเทียบ Calibration และ Cross Validation ของสาร Sphingomyelin แสดงเป็นกราฟเส้นตรง ได้ผลดังรูปที่ 33



รูปที่ 32 เส้นสเปกตรัมของสารสกัด Sphingomyelin ของตัวอย่างใน Chloroform



รูปที่ 33 การเปรียบเทียบ Calibration และ Cross Validation ของสาร Sphingomyelin

จากรูปที่ 33 เป็นการเปรียบเทียบ Calibration and Cross Validation ของสาร Sphingomyelin พบว่าค่าที่ได้ค่อนข้างมีแนวโน้มอยู่ในเส้นตรง มีค่า R^2 เท่ากับ 98.54 , ค่า RMSECV เท่ากับ 10.1 , ค่า RPD เท่ากับ 8.27 และ ค่า Bias เท่ากับ 0.2 แต่ด้วยค่า RMSECV ที่มีจำนวนสูงจึงทำให้ค่ามีความแตกต่างกันสูงมาก ดังนั้นอาจจะจำเป็นต้องทำหลายซ้ำเพื่อลดค่าความแตกต่างของกลุ่มและเพิ่มสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ซึ่งจากผลที่ได้บ่งบอกถึงความน่าเชื่อถือและ สามารถนำตรวจสอบสาร Sphingomyelin ได้ เมื่อเทียบกับเทคนิคทางเอ็นไอเอ็ม ดังนั้น จึงมีความเป็นไปได้ที่จะใช้ NIRS ในการทำนายสาร Sphingomyelin

บทที่ 6

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มีเป้าหมายเพื่อศึกษาและพัฒนาเทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (NIRS) ในการตรวจวัดและติดตามสาร sphingomyelin จากผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่ผลิตได้ โดยตรวจสอบสารนี้ในผลิตภัณฑ์นมหมักซึ่งใช้นมโคเป็นวัตถุดิบ เริ่มจากการหมักนมโคด้วยแบคทีเรียนมเปรี้ยวผลิตโยเกิร์ตธรรมชาติ แล้วติดตามการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในนมหมักดังกล่าว แล้วศึกษาเทคนิคการสกัดสาร sphingomyelin จากผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่หมักได้ จากนั้นติดตามการเปลี่ยนแปลงของสารนี้ในระหว่างการหมักนมด้วยแบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria; LAB) และสารชีวภัณฑ์อื่นเพิ่มเติม เทียบกับเทคนิคทางจุลชีววิทยา, เคมีและกายภาพอื่นที่ใช้อยู่ปกติ เช่น การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อแบคทีเรีย (LAB) (โดยวิธี pour plate), การหากรดแลคติก (โดยเทคนิคทางเคมี) ผลการทดลอง พบสเปกตรัม NIRS รูปแบบต่างๆของสารที่ต้องการตรวจวัดและสร้าง calibration model ของการตรวจวิเคราะห์สารชีวภัณฑ์แต่ละชนิด และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าที่ได้จาก calibration และ cross validation ของเทคนิคการตรวจสอบด้วย NIRS กับวิธีการตรวจแบบต่างๆ

จากการวิจัย พบว่า ค่าสถิติของการใช้เทคนิค NIRS สารมาตรฐาน Sphingomyelin และสารสกัด Sphingomyelin จากโยเกิร์ตหมัก เทียบกับเทคนิคทางเคมีและการวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ $R^2 = 94.10$ และเทียบกับเทคนิคเอนไซม์ มีค่า R^2 เท่ากับ 93.43 RMSECV เท่ากับ 15.1 $\mu\text{g/ml}$ และ RPD เท่ากับ 3.91 ส่วนค่าสถิติ ของการใช้เทคนิค NIRS ในการตรวจกรดแลคติกเทียบกับเทคนิคการไตเตรดด้วยสารเคมี มีค่า R^2 เท่ากับ 96.49 RMSECV เท่ากับ 0.133% และ RPD เท่ากับ 5.34 ส่วนค่าสถิติของการใช้เทคนิค NIRS การตรวจติดตามเชื้อแบคทีเรีย lactic acid bacteria (LAB) เทียบกับเทคนิคการนับจำนวนเซลล์ทางจุลชีววิทยา (ด้วยวิธี total plate count โดยวิธีการ pour plate) มีค่า R^2 เท่ากับ 90.12 RMSECV เท่ากับ 41.1 CFU/ml และ RPD เท่ากับ 3.19

จากการประเมินผลการใช้เทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (NIRS) ในการตรวจวิเคราะห์สาร Sphingomyelin ในโยเกิร์ตที่ได้จากการหมักนมโค เทียบกับเทคนิคทางเคมีและเอนไซม์ และตรวจติดตามสารชีวภัณฑ์อื่น เทคนิค NIRS มีความเหมาะสม คุ่มค่าการค่าวิเคราะห์ (เมื่อไม่คิดถึงราคาและค่าใช้จ่ายเครื่อง) มีราคาถูกกว่า เหมาะสมในการนำไปใช้ตรวจหาสารชีวภัณฑ์แทนเทคนิคต่างๆที่ยังยาก ใช้เวลานานในการวิเคราะห์ และทำให้ตัวอย่างเสียสภาพ ซึ่งเทคนิค NIRS นอกจากจะใช้เวลาในการวิเคราะห์ไม่นานแล้ว ตัวอย่างในการวิเคราะห์ยังไม่เสียสภาพ สามารถนำตัวอย่างไปใช้ต่อได้ ให้ค่าที่แม่นยำและถูกต้องในระดับหนึ่งที่ยอมรับได้ ดังนั้น จึงสรุปได้ว่าเทคนิค NIRS สามารถสร้าง calibration model แล้วนำมาใช้ตรวจสอบหาสารชีวภัณฑ์ในผลิตภัณฑ์นมหมักแทนเทคนิคอื่นที่ใช้ปกติ ซึ่งงานวิจัยนี้เป็นพื้นฐานการศึกษาที่ใช้เป็นแนวทางการพัฒนาเทคนิค NIRS เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในตรวจติดตามสารชีวภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในอุตสาหกรรมนมหมักหรืออื่นๆได้

เอกสารอ้างอิง

- มาตรฐานอุตสาหกรรมนมเปรี้ยว (Fermented Milk). (มอก. 2146-2546). 2547. ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรมที่ 3209. สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม. 5 หน้า.
- วารุณี ชนะแพสย์ และศุมาพร เกษมสำราญ. 2552. ตัวแปรที่มีอิทธิพลต่อการวิเคราะห์ NIRS. เทคโนโลยีอินฟราเรดย่านใกล้ในอุตสาหกรรมเกษตร. สถาบันคั้นคว่ำและพัฒนาผลผลิตทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ. 4-1 - 4-23.
- ชาวิต พลับขจร, สุวรรณา เขียรชัยแสน และหทัยกาญจน์ อินทาราม. 2556. การศึกษาการใช้เทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้สำหรับการตรวจและทวนสอบปริมาณสารชีวภัณฑ์ในนมหมัก. จุลนิพนธ์. วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ, มหาวิทยาลัยศิลปากร, นครปฐม. 72 หน้า.
- ศุมาพร เกษมสำราญ. 2552. หลักการพื้นฐานและการประยุกต์ใช้สเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้. เทคโนโลยีอินฟราเรดย่านใกล้ในอุตสาหกรรมเกษตร. สถาบันคั้นคว่ำและพัฒนาผลผลิตทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ. 2-1 -23., 8.1-1-24.
- สนธยา นุ่มท้วม และ ชะตะกะ ทาคาอะกิ. 2012. ความเป็นไปได้ของการใช้เนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปีในการทำนายปริมาณเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนในนํ้านมดิบ. ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร มหาวิทยาลัยนเรศวร. 182 หน้า.
- โสภารัตน์ ปิยะชาติบดี. 2555. การตรวจสอบสาร sphingomyelin ในผลิตภัณฑ์นมโคด้วยเทคนิค TLC และ NIRs. จุลนิพนธ์ปริญญาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม. มหาวิทยาลัยศิลปากร. จ.นครปฐม. 52 หน้า.
- Brennan, D., Alderman, J., Sattler, L., O'Connor, B. and C., O' Mathuna. 2003. Issues in development of NIR micro spectrometer system for on-line process monitoring of milk product. Measurement. 33 (1): 67-74.
- Contarini., G. and M., Povolito. 2013. Phospholipids in Milk Fat: Composition, Biological and Technological Significance, and Analytical Strategies. International Journal Molecular Science. 14(2): 2808-2831.
- Kohut, R.A. 2005. Qualitative and Quantitative Analysis of Sphingomyelin in Whey Protein. A senior honors thesis. Department of food science technology. The Ohio State University.

- Lopez, C., Briard-Bion, V., and O., Ménard. 2014. Polar lipids, sphingomyelin and long-chain unsaturated fatty acids from the milk fat globule membrane are increased in milks produced by cows fed fresh pasture based diet during spring. *Food Research International*. 58 : 59-68.
- Miura, Y., Gotoh, E., Nara, F., Nishijima, M., Hanada, K. 2012. Hydrolysis of sphingosylphosphocholine by neutral sphingomyelinases. *FEBS Letters*. 557:288-292.
- Morita, S.Y., Kawabe, M., Sakurai, A., Okuhira, K., Vertut-Doi, A., Nakano, M., Handa, T. 2004. Ceramide in lipid particles enhances heparin sulfate proteoglycan and low density lipoprotein receptor-related protein-mediated uptake by macrophages. *The journal of Biological Chemistry*. 279:24355-24361.
- Morita, S.Y., Soda, K., Teraoka, R., Kitagawa, S. and T., Terada. 2012. Specific and sensitive enzymatic measurement of sphingomyelin in cultured cells. *Chemistry and Physics of Lipids*. 165: 571-576.
- Nielsen, S. 2003. *Food Analysis* (3rd ed.) Kluwer Academic / Plenum publisher. (ISBN- 0-306-47498-6). London. 664 pp.
- Ribar, S., Karmelic, I. and M., Mesaric. 2007. Sphingoid bases in dairy products. *Food Research International*. 40: 848–854.
- Teerachaichayut, S. Terdwongworakul, A., Thanapase, W. and K., Kazuaki. 2011. Non-destructive prediction of hardening pericarp disorder in intact mangosteen by near infrared transmittance spectroscopy *Journal of Food Engineering*. 106(3): 206-211.

ภาคผนวก

ก. การเตรียมสารและการคำนวณสาร

- Sphingomyelin Standard Solution (0, 120, 140, 160, 180 และ 200 µg/ml)

ละลายสารมาตรฐาน Sphingomyelin 0.002 กรัม ในคลอโรฟอร์ม 10 มิลลิลิตร เก็บเป็น Stock แล้วเจือจางจนได้สารละลายมาตรฐาน Sphingomyelin ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ดังนี้

Concentration (µg/ml)	200	180	160	140	120	0
Stock 200 µg/ml	2	1.8	1.6	1.4	1.2	0
Chloroform (ml)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	2

- Lactic acid Standard Solution

เตรียมสารละลายมาตรฐาน Lactic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ดังนี้

Concentration (%)	3.0	2.5	2.0	1.5	1.0	0.5	0
Lactic acid (ml)	0.16	0.14	0.11	0.08	0.05	0.03	0.00
Water (ml)	4.84	4.86	4.89	4.92	4.95	4.97	5.00

- 2N NH₄OH ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (MW.= 35 ,assay 30% ,ความถ่วงจำเพาะ = 0.898)

equivalent weight = 35 กรัม

$$2N = \frac{2 \text{ equivalent of } \text{NH}_4\text{OH}}{1000 \text{ ml}}$$

สารละลาย 1000 มิลลิลิตร มี NH₄OH 2 equivalent

$$\text{สารละลาย 100 มิลลิลิตร มี } \text{NH}_4\text{OH} \frac{2 \times 100}{1000} = 0.2 \text{ equivalent}$$

จากสมการ

$$\text{equivalent of } \text{NH}_4\text{OH} = \frac{\text{mass of } \text{NH}_4\text{OH}}{\text{equivalent weight}}$$

$$\text{mass of } \text{NH}_4\text{OH} = \text{equivalent of } \text{NH}_4\text{OH} \times \text{equivalent weight}$$

$$= 0.2 \times 35 = 7 \text{ กรัม}$$

จาก assay 30%

ต้องการ NH₄OH 30 กรัม ต้องชั่ง NH₄OH มา 100 กรัม

$$\text{ต้องการ } \text{NH}_4\text{OH} 7 \text{ กรัม ต้องชั่ง } \text{NH}_4\text{OH} \text{ มา } \frac{7 \times 100}{30} = 23.33 \text{ กรัม}$$

จาก ความถ่วงจำเพาะ = 0.898

NH_4OH หนัก 0.898 กรัม อยู่ใน NH_4OH 1 มิลลิลิตร
 NH_4OH หนัก 23.33 กรัม อยู่ใน NH_4OH $\frac{23.33 \times 1}{0.898} = 25.98$ มิลลิลิตร
 ดังนั้น ปิเปต NH_4OH มา 25.98 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

- **Alkaline water 250 มิลลิลิตร**(ต้องเตรียมก่อนใช้งานทุกครั้ง)

ต้องผสม 2N NH_4OH ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร กับ น้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร

- **0.1 M methanol KOH ปริมาตร 100 มิลลิลิตร**(MW.=56, assay 85%)

สารละลาย 1000 มิลลิลิตร มี KOH 0.1×56 กรัม

สารละลาย 100 มิลลิลิตร มี KOH $\frac{0.1 \times 0.56 \times 100}{1000} = 0.56$ กรัม

ต้องการ NH_4OH 30 กรัม ต้องชั่ง NH_4OH มา 100 กรัม

ต้องการ NH_4OH 7 กรัม ต้องชั่ง NH_4OH มา $\frac{7 \times 100}{30} = 23.33$ กรัม

- **Saturated methanol KOH ปริมาตร 100 มิลลิลิตร**(MW.=56, assay 85%)

ละลาย KOH 30 กรัม ใน methanol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วยกระดาษกรองให้เหลือแต่ส่วนใส

- **Aqueous methanol HCl (1N HCl) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร** (MW.= 36.5 , assay 37% ,

ความถ่วงจำเพาะ = 1.19)

equivalent weight = 36.5 กรัม

$$1\text{N} = \frac{1 \text{ equivalent of HCl}}{1000 \text{ ml}}$$

สารละลาย 1000 มิลลิลิตร มี HCl 1 equivalent

สารละลาย 100 มิลลิลิตร มี HCl $\frac{1 \times 100}{1000} = 0.1$ equivalent

จากสมการ

$$\text{equivalent of HCl} = \frac{\text{mass of HCl}}{\text{equivalent weight}}$$

$$\text{mass of HCl} = \text{equivalent of HCl} \times \text{equivalent weight}$$

$$= 0.1 \times 36.5 = 3.65 \text{ กรัม}$$

จาก assay 37 %

ต้องการ HCl 37กรัม ต้องชั่ง HCl มา 100 กรัม

ต้องการ HCl 7 กรัม ต้องชั่ง HCl มา $\frac{3.65 \times 100}{37} = 9.86$ กรัม

จาก ความถ่วงจำเพาะ = 1.19

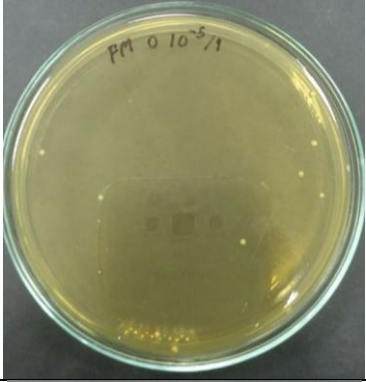
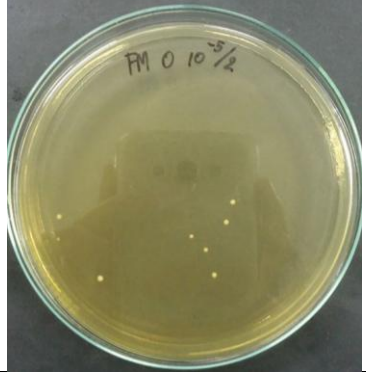
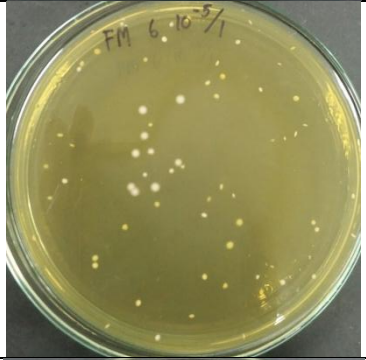
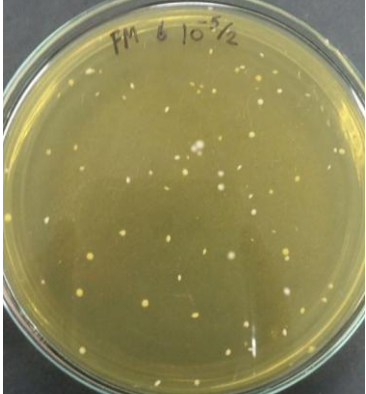
HCl หนัก 1.19 กรัม อยู่ใน HCl 1 มิลลิลิตร

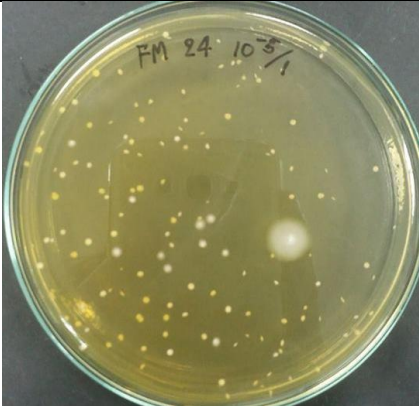
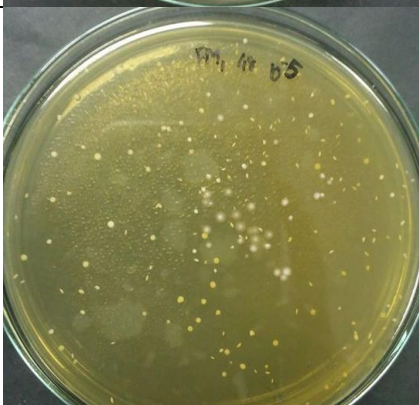
HCl หนัก 9.86 กรัม อยู่ใน HCl $\frac{9.86 \times 1}{1.19} = 8.29$ มิลลิลิตร

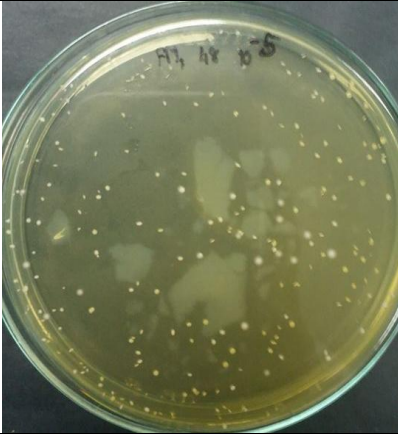
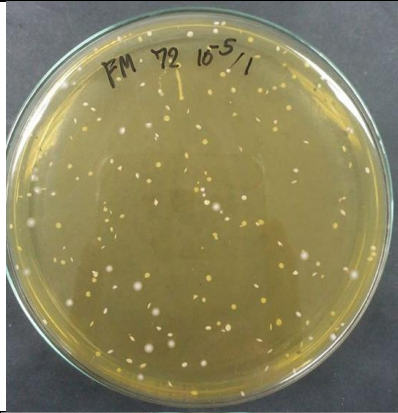
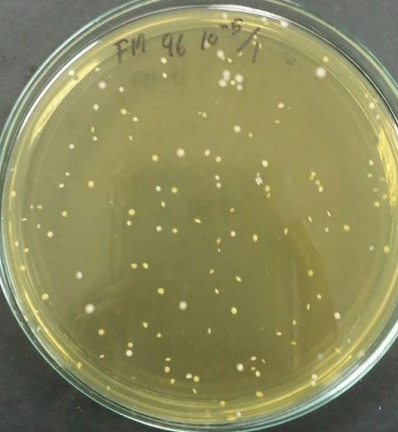
ดังนั้น ปิเปต HCl มา 8.29 มิลลิลิตร ละลายใน methanol และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

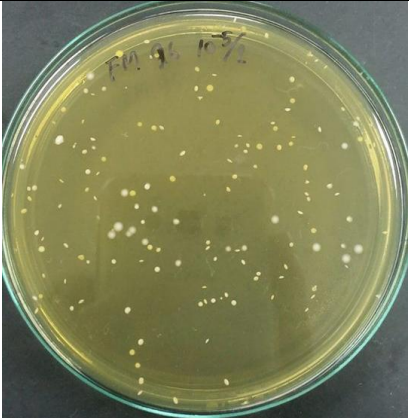
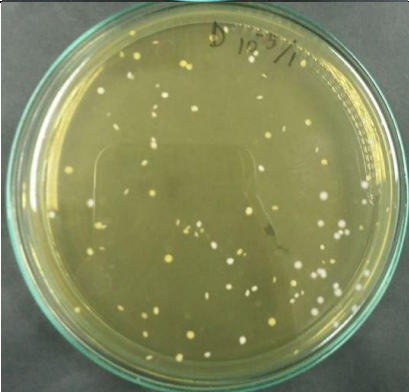
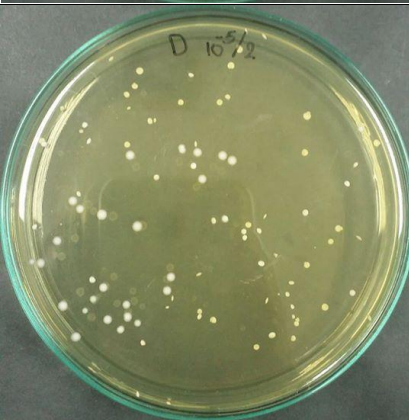
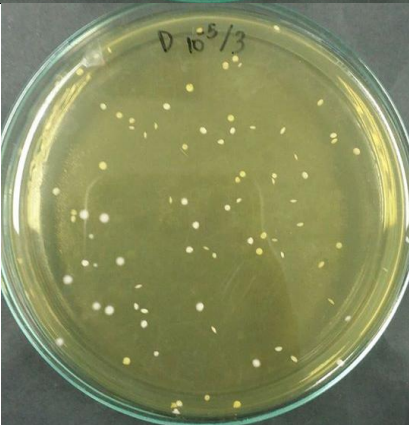
ข. ผลการ Pour plate

ตารางที่ 15 ผลการ Pour plate ของตัวอย่าง

Sample	Dilution	ลักษณะที่ปรากฏ	Average colony	รูปผลการทดลอง
FM_0 hr คือนมสดหมัก ชั่วโมงที่ 0/1	10^{-5}	เกิดโคโลนี กลมสีขาวขุ่น ขนาดเล็ก	10	
FM_0 hr คือนมสดหมัก ชั่วโมงที่ 0/2	10^{-5}	เกิดโคโลนี กลมสีขาวขุ่น ขนาดเล็ก	9	
FM_6hr คือนมสดหมัก ชั่วโมงที่ 0/1	10^{-5}	เกิดโคโลนี กลมสีขาวขุ่น ขนาดเล็ก	107	
FM_6hr คือนมสดหมัก ชั่วโมงที่ 0/2	10^{-5}	เกิดโคโลนี กลมสีขาวขุ่น ขนาดเล็ก	116	

Sample	Dilution	ลักษณะที่ปรากฏ	Average colony	รูปผลการทดลอง
FM_12hr คือนมสดหมัก ชั่วโมงที่ 12	10^{-5}	เกิดโคโลนี กลมสีขาวขุ่น ขนาดเล็ก	149	
FM_24hr คือนมสดหมัก ชั่วโมงที่ 24/1	10^{-5}	เกิดโคโลนี กลมสีขาวขุ่น ขนาดเล็ก	143	
FM_24hr คือนมสดหมัก ชั่วโมงที่ 24/2	10^{-5}	เกิดโคโลนี กลมสีขาวขุ่น ขนาดเล็ก	147	
FM_48hr คือนมสดหมัก ชั่วโมงที่ 48/1	10^{-5}	เกิดโคโลนี กลมสีขาวขุ่น ขนาดเล็ก	229	

Sample	Dilution	ลักษณะที่ปรากฏ	Average colony	รูปผลการทดลอง
FM_48hr คือนมสดหมัก ชั่วโมงที่ 48/2	10^{-5}	เกิดโคโลนี กลมสีขาวขุ่น ขนาดเล็ก	248	
FM_72hr คือนมสดหมัก ชั่วโมงที่ 72/1	10^{-5}	เกิดโคโลนี กลมสีขาวขุ่น ขนาดเล็ก	218	
FM_72hr คือนมสดหมัก ชั่วโมงที่ 72/2	10^{-5}	เกิดโคโลนี กลมสีขาวขุ่น ขนาดเล็ก	192	
FM_96hr คือนมสดหมัก ชั่วโมงที่ 96/1	10^{-5}	เกิดโคโลนี กลมสีขาวขุ่น ขนาดเล็ก	144	

Sample	Dilution	ลักษณะที่ปรากฏ	Average colony	รูปผลการทดลอง
FM_96hr คือนมสดหมัก ชั่วโมงที่ 96/2	10^{-5}	เกิดโคโลนี กลมสีขาวขุ่น ขนาดเล็ก	121	
Delight_-5.0 คือนมดีไลท์ /1	10^{-5}	เกิดโคโลนี กลมสีขาวขุ่น ขนาดเล็ก	106	
Delight_-5.0 คือนมดีไลท์ /2	10^{-5}	เกิดโคโลนี กลมสีขาวขุ่น ขนาดเล็ก	95	
Delight_-5.0 คือนมดีไลท์ /3	10^{-5}	เกิดโคโลนี กลมสีขาวขุ่น ขนาดเล็ก	91	

คำนวณจำนวนเชื้อจุลินทรีย์เป็น Colony forming unit / ml (CFU/ml)

จำนวนเซลล์มีชีวิต (cfu/ml) = (จำนวนโคโลนี/ปริมาณตัวอย่างที่ใส่ในอาหาร) x อัตราการเจือจาง

ตารางที่ 16 ค่า Cfu/ml และจำนวนโคโลนีเฉลี่ยของตัวอย่าง

Sample	Dilution	Average colony	Total Bacteria (CFU/ml)
FM_0_-5 (0 hr Fermented Milk)	10^{-5}	9.5	9.5×10^6
FM_6_-5 (6hr Fermented Milk)	10^{-5}	111.5	1.115×10^8
FM_12_-5 (12hr Fermented Milk)	10^{-5}	149	1.49×10^8
FM_24_-5 (24hr Fermented Milk)	10^{-5}	145	1.45×10^8
FM_48_-5 (48hr Fermented Milk)	10^{-5}	238.5	2.385×10^8
FM_72_-5 (72hr Fermented Milk)	10^{-5}	205	2.05×10^8
FM_96_-5 (96hr Fermented Milk)	10^{-5}	117.5	1.175×10^8
Delight_-5 (Delight)	10^{-5}	97.33	9.733×10^7

ประวัติส่วนตัวและผลงานทางวิชาการ

ชื่อผู้วิจัย อาจารย์ ดร.ชัยวัฒน์ บรรณโคเพ็ชร

สังกัด ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัย
ศิลปากร นครปฐม

โทรศัพท์/โทรสาร 034-219360

e-mail address chaiwat-ajsu@hotmail.com

การศึกษา

	คุณวุฒิ	ปี ที่จบ	ชื่อสถานศึกษาและประเทศ
1	ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	2550	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
2	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	2537	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
3	วิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา)	2530	มหาวิทยาลัยศิลปากร

งานวิจัย

ปริญญาโท Production of Citric Acid by Continuous Culture.

ปริญญาเอก Scale-Up and Some Characterisation of Biopolymer from *Enterobacter cloacae* WD7.

ประวัติการทำงาน

อาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร
รองคณบดีฝ่ายบริหารคณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรมมหาวิทยาลัยศิลปากร (พ.ศ. 2554-
2557)

หัวหน้าภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัย
ศิลปากร (พ.ศ. 2552 - 2553)

งานบริการทางวิชาการ

1. หัวหน้าโครงการสัมมนาวิชาการ เรื่อง “นวัตกรรมพอลิเมอร์ชีวภาพจากจุลินทรีย์”

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร
(พ.ศ. 2554)

2. วิทยากรบรรยายเรื่อง“พอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรีย” ในโครงการ “นวัตกรรมพอลิเมอร์ชีวภาพจากจุลินทรีย์” ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร (พ.ศ. 2554)
3. วิทยากรบรรยายเรื่อง“การผลิตเอทานอลจากแป้ง”ในโครงการสัมมนาเรื่อง“แป้งและเทคโนโลยีของแป้งสำหรับอุตสาหกรรมการหมักแอลกอฮอล์”โดย สำนักงานควบคุมการหมักสำ สำนักเทคนิคงานสุราและสิ่งแวดล้อม ผู้จัด บริษัทไทยเบฟ จำกัด (พ.ศ. 2555)

ผลงานวิจัย

1. Chaiwat Bandaiphet. 2014. “Bioelectricity generation using Water hyacinth root as oxygen provider in cathode of a sediment microbial fuel cell”. *In* Proceeding of the 2nd Seoul International Conference of Apply science and Engineering (SICASE2014).(poster presentation).On August 29th-31st, 2014. At Courtyard by Marriott Seoul Times Square, Seoul, Korea. Organized by Asia-Pacific Education & Research Association, Korea.
2. Chaiwat Bandaiphet. 2014. Using Vetivergrass as oxygen provider in sediment microbial fuel cell for bioelectricity generation. *In* Proceeding of the 2nd Nong Khai Campus International conference 2014. “Creative Economy: Research & Development to a Worthy Lifestyle”. (poster presentation). On July 3rd-4th, 2014. At KhonKaen University,NongKhai Campus, NongKhai, Thailand. Organized by KhonKaen University,NongKhai, Thailand.
3. Chaiwat Bandaiphet. 2012. Effect of electrode types and content ratio of mud used as anode on bioelectricity generated in single in single chambered microbial fuel cell. *In* Proceeding of the 24th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. “TSB2012: International Conference on Green Biotechnology: Renewable Energyand Global Care”. (poster presentation). On November 29th-30th, 2012.At Sunee Grand Hotel and Convention Center, Ubon Ratchathani, Thailand.Organized by Thai Society for Biotechnology (TSB).
- 4 Chaiwat Bandaiphet. 2012. Effect of glucose injection on bioelectricityproduction using mud as an anode in a single chambered microbial fuel cell. *In* Proceeding of the 1st Mae FahLuang University International Conference on the 'Future Challenges towards ASEAN Integration”

(poster presentation).On November 29th–December 12nd, 2012.At Police General Pao Sarasin Building (C5),Mae FahLuang University, Chiang Rai, Thailand. Organized by Mae Fah Luang University, Chiang Rai, Thailand.