สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การตรวจสอบน้ำนมวัวที่ปลอมปนในน้ำนมและผลิตภัณฑ์น้ำนมจากกระบือ

Detection of adulteration in buffalo milk and dairy products with cow's milk

สุรชัย ใหญ่เย็น
วรรณา ตั้งเจริญชัย

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

สมหมู่.....
เลขทะเบียน 137859
รับ เดือน ปี 13 ส.ค. 2558

b 12701282
i.....

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2556
คณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ชื่อโครงการ การตรวจสอบน้ำนมวัวที่ปลอมปนในน้ำนมจากกระบือ

แหล่งเงิน งบประมาณเงินรายได้ คณะอุตสาหกรรมเกษตร

ประจำปีงบประมาณ 2556 **จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน** 60,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2556 ถึง กันยายน 2557

หัวหน้าโครงการวิจัย ดร. สุรชัย ใหญ่เย็น

ผู้ร่วมวิจัย รศ. ดร. วรรณา ตั้งเจริญชัย

บทคัดย่อ

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการใช้เทคนิค Duplex PCR และ Multiplex PCR ในการตรวจสอบการปลอมปนน้ำนมโคและน้ำนมแพะในน้ำนมกระบือ โดยใช้ไพรเมอร์ที่มาจากยีนไมโตคอนเดรีย 12s และ 16s rRNA ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงกับน้ำนมสัตว์แต่ละชนิด โดยน้ำนมกระบือ มีดีเอ็นเอขนาด 220 bp และน้ำนมโคมีดีเอ็นเอขนาด 356 bp ผลการ ทดลองสรุปได้ว่าสามารถใช้เทคนิค Duplex PCR และ Multiplex PCR ในการตรวจสอบการปลอมปน น้ำนมโคและน้ำนมแพะในน้ำนมกระบือและตรวจการปลอมปนได้ที่ระดับต่ำสุด 0.1 เปอร์เซ็นต์

คำสำคัญ : น้ำนมกระบือ, พีซีอาร์, การปลอมปน

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ชื่อโครงการ การตรวจสอบน้ำนมวัวที่ปลอมปนในน้ำนมจากกระบือ

แหล่งเงิน งบประมาณเงินรายได้ คณะอุตสาหกรรมเกษตร

ประจำปีงบประมาณ 2556 **จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน** 60,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2556 ถึง กันยายน 2557

หัวหน้าโครงการวิจัย ดร. สุรชัย ใหญ่เย็น

ผู้ร่วมวิจัย รศ. ดร. วรรณา ตั้งเจริญชัย

ABSTRACT

This study was to investigate the accuracy of the duplex PCR and multiplex PCR techniques in detecting the adulteration of buffalo milk with cow and goat milk. The specific primers were designed in the mitochondrial 12s and 16s rRNA genes that were specific for individual animal species. The specific fragments were 220 bp and 356 bp for buffalo and cattle, respectively. The result showed that duplex PCR and multiplex PCR techniques could detect the addition of cow and goat milk in buffalo with the sensitivity threshold of 0.1%

Keyword : buffalo milk, PCR, Adulteration

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจากเงินวิจัยรายได้ของ คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบัง และ หน่วยวิจัยแป้งและไซโคลเดกซ์ทริน ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
1.3. ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 นมกระบือ	3
2.2 องค์ประกอบในน้ำนมกระบือ	3
2.2.1 ไขมัน	4
2.2.2 โปรตีน (Protein)	5
2.2.3 น้ำตาลแลคโตส (Lactose)	5
2.3 ผลิตภัณฑ์และการแปรรูปของนมกระบือ	5
2.4 การตรวจสอบโดยเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุล	6
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	9
3.1 การเก็บและเตรียมตัวอย่าง	9
3.2 การสกัดดีเอ็นเอจากน้ำนมโค และน้ำนมกระบือ	9
3.3–การออกแบบไพรเมอร์	9
3.4 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	10
3.5 การตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอ	10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

	หน้า
บทที่ 4 ผลการวิจัย	11
4.1 ผลของการทำพีซีอาร์โดยใช้ยีน 12S rRNA ที่จำเพาะต่อโคในตัวอย่างน้ำนมโค	11
4.2 ผลของการทำพีซีอาร์โดยใช้ยีน 12S rRNA ที่จำเพาะต่อกระบือในตัวอย่างน้ำนมกระบือ	12
4.3 ผลของการทำพีซีอาร์โดยใช้ยีน 12S rRNA ที่จำเพาะต่อโคในตัวอย่างน้ำนมผสม	13
4.4 การตรจการปลอมปนโดยการทำพีซีอาร์ในตัวอย่างน้ำนมผสม	14
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย	15
บทที่ 6 สรุปผลผลิตที่ได้จากงานวิจัย	16
เอกสารอ้างอิง	17
ข้อมูลประวัติคณะผู้วิจัย	18

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 องค์ประกอบน้ำนมเฉลี่ยของสัตว์แต่ละชนิด	3
2 แสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ออกแบบจาก 12s rRNA ในไมโตคอนเดรีย	10

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 แสดงแถบดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน 12 rRNA ที่จำเพาะต่อโคกับดีเอ็นเอที่ได้จากน้ำนมโค	11
2 แสดงแถบดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน 12 rRNA ที่จำเพาะต่อกระบือกับดีเอ็นเอที่ได้จากน้ำนมกระบือ	12
3 แสดงแถบดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน 12 rRNA ที่จำเพาะต่อโคกับดีเอ็นเอที่ได้จากน้ำนมผสม	13
4 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ duplex PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน 12 rRNA ที่จำเพาะต่อโคกับกระบือกับดีเอ็นเอที่ได้จากน้ำนมผสม	14

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

1.
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยสามารถผลิตและแปรรูปผลิตภัณฑ์นมได้จากน้ำนมดิบในปริมาณที่ไม่เพียงพอความต้องการของตลาดจึงได้นำเข้านมผงเพื่อการผลิตผลิตภัณฑ์นมคืนรูป ผลิตภัณฑ์นมที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง เช่น ชีส ที่ต้องอาศัยกระบวนการหมักในกระบวนการผลิตยังต้องอาศัยการนำเข้าจากต่างประเทศมากกว่าการผลิตภายในประเทศ อีกทั้งผลิตภัณฑ์ดังกล่าวจำเป็นต้องผลิตจากนมสด ปัจจุบันประเทศไทยมีความต้องการบริโภคชีสสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง มอสซาเรลลาชีส (Mozzarella Cheese) ต้องนำเข้าจากต่างประเทศเป็นจำนวนมาก เป็นที่ทราบกันดีว่ามอสซาเรลลาชีสที่มีคุณภาพดีเป็นที่ต้องการของผู้บริโภคในตลาดในยุโรป และ สหรัฐอเมริกานั้นผลิตจากน้ำนมกระบือ โดยเปรียบเทียบเชิงคุณภาพขององค์ประกอบทางเคมีแล้วน้ำนมกระบือมีปริมาณโปรตีนสูงกว่านมโคซึ่งสามารถผลิตชีสได้ปริมาณมากกว่าการโดยใช้ปริมาณที่เท่ากัน เช่นการผลิตชีส 1 กิโลกรัม จากนมโคต้องใช้นมประมาณ 8 กิโลกรัม แต่ใช้นมกระบือเพียง 5 กิโลกรัม เท่านั้น ส่วนการผลิตเนย 1 กิโลกรัม จะต้องใช้นมโคปริมาณ 14 กิโลกรัม ในขณะที่ใช้นมกระบือเพียง 10 กิโลกรัม เท่านั้น ซึ่งราคาน้ำนมกระบือมีราคาจำหน่ายในราคากิโลกรัมละ 80 บาท ในขณะที่น้ำนมโคมีราคาเพียงกิโลกรัมละ 18 บาท ด้วยราคาของน้ำนมที่แตกต่างกันมาก จึงเป็นสาเหตุทำให้มีการปลอมปนปริมาณของน้ำนมโคลงในน้ำนมกระบือเพื่อที่จะทำให้มีการลดต้นทุนในการผลิต มีผลทำให้คุณภาพของน้ำนมที่ได้เพื่อจะนำไปผลิตชีสนั้นมีคุณภาพที่ลดลงด้วยจึงเป็นเหตุผลสำคัญที่จำเป็นอย่างยิ่งในการตรวจสอบการปลอมปน (Adulteration) ในน้ำนม พบว่าจากความแตกต่างกันของลำดับเบสในหลายบริเวณของยีนต่างๆเช่นชุดยีนจากไมโตคอนเดรีย, ชุดยีนของ growth hormone และชุดยีนของโปรตีนที่พบในน้ำนม เช่น เบต้า-เคซีนเป็นต้น เมื่อใช้เทคนิคพีซีอาร์แล้วพบว่าสามารถใช้แยกความแตกต่างกันได้ระหว่างโคและกระบือได้นั้น จึงได้นำมาประยุกต์ใช้และปรับปรุงเพื่อตรวจหาการปลอมปนของน้ำนมโคในน้ำนมกระบือได้และได้มีการใช้จากหลายบริเวณของยีนเพื่อจะให้มีความถูกต้องแน่นอนมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ออกแบบ primer ไพรเมอร์ที่มาจากยีนไมโตคอนเดรีย 12s และ 16s rRNA ให้เหมาะสมเพื่อใช้ในการทำMultiplex-PCR
2. หาสภาวะที่เหมาะสม เช่น อุณหภูมิ, ความเข้มข้นของ Mg^{2+} และเวลาในการทำ Multiplex-PCR เพื่อให้ได้จำเพาะต่อโคและกระบือ

1.3. ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. เลือกยีนที่มีความแตกต่างกันในโคและกระบือ คือยีนไมโตคอนเดรีย 12s และ 16s rRNA และออกแบบ primer ตามลำดับเบสของยีนไมโตคอนเดรีย 12s และ 16s rRNA ในโคและกระบือ
2. นำ primer ที่ได้ออกแบบไว้ ทั้งหมดมาคัดเลือก และเปรียบเทียบความเหมาะสมกับเพื่อใช้ในการทำ Multiplex-PCR
3. เลือกสภาวะที่เหมาะสมในการทำ Multiplex-PCR และสามารถให้ความแตกต่างระหว่างโคและกระบือได้

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

บทที่ 2
แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 นมกระบือ

ปัจจุบันการบริโภคน้ำนมและผลิตภัณฑ์นมเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของประชากรโลก และพฤติกรรมการบริโภคที่เปลี่ยนไป ในต่างประเทศพบว่ามีการบริโภคน้ำนมกระบือมากเป็นอันดับสองของโลกรองจากน้ำนมโค (Olivia *et al., 2010*) เนื่องจากน้ำนมกระบือมีคุณค่าทางโภชนาการสูงเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำนมโค

น้ำนมกระบือมีปริมาณไขมันและแร่ธาตุน้ำนมทั้งหมดสูง ทำให้น้ำนมมีรสชาติดีประชาชนโดยทั่วไปชอบดื่มนมกระบือมากกว่านมโค แม้ว่าจะต้องซื้อในราคาที่แพงกว่ายกตัวอย่าง เช่น ในประเทศอียิปต์ ลูกกระบือมีอัตราการตายสูงมาก เนื่องมาจากประชาชนชาวอียิปต์นิยมบริโภคน้ำนมกระบือ ผู้เลี้ยงกระบือจึงรีดนมเพื่อจำหน่ายในปริมาณสูงมาก (BSTID, 1981)

นมคือของเหลวสีขาวสะอาดสดเป็นปกติ ซึ่งได้จากการรีดจากเต้านมของสัตว์ให้นมต่าง ๆที่มีสุขภาพดี เช่น โค กระบือ แพะ แกะ ฯลฯ โดยจะสามารถนำไปใช้บริโภคได้ในช่วงเวลาอย่างน้อย 3 วัน ภายหลังคลอดลูก หรือจนกว่าจะปราศจากนมเหลือง (รุ่งอรุณ, 2549) น้ำนมมี องค์ประกอบหลัก คือ น้ำ ไขมัน โปรตีน น้ำตาลแลคโตส แร่ธาตุ และวิตามิน สัดส่วนขององค์ประกอบในน้ำนมมีความแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของสิ่งมีชีวิต สายพันธุ์ และความสามารถของสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวในพันธุ์เดียวกันดังตารางที่ *1*

ตารางที่ 1 องค์ประกอบน้ำนมเฉลี่ยของสัตว์แต่ละชนิด

องค์ประกอบน้ำนม	กระบือ	โค	แกะ	แพะ	มนุษย์
ไขมัน	7.0	4.3	6.0	4.5	3.5
โปรตีน	4.0	3.4	4.8	3.8	1.9
แลคโตส	5.1	4.8	5.0	4.7	6.5

2.2 องค์ประกอบในน้ำนมกระบือ

เมื่อเปรียบเทียบน้ำนมกระบือกับน้ำนมโค น้ำนมกระบือมีส่วนประกอบของน้ำน้อยกว่ามีเนื้อนมทั้งหมด ไขมัน แลคโตส และโปรตีนมากกว่าน้ำนมโค น้ำนมกระบือมีไขมันเนยสูง จึงให้คุณค่าทางพลังงานมากกว่านมโค แม้ว่าไขมันเนยในน้ำนมกระบือจะมีมากกว่าน้ำนมโคแต่กลับมีฟอสโฟลิปิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

(phospholipid) และโคเลสเตอรอล (cholesterol) น้อยกว่าน้ำนมโค โปรตีนในนมกระบือมีส่วนประกอบของเคซีน อัลบูมิน และโกลบูลินมากกว่านมโค ส่วนประกอบแร่ธาตุต่างๆใกล้เคียงกับน้ำนมโค ยกเว้นฟอสฟอรัสในน้ำนมกระบือจะมีมากกว่าประมาณ 2 เท่าและมีเกลือต่ำกว่า (BSTID, 1981 ; ประสบ, 2531) น้ำนมกระบือขาดสารแคโรทีนที่เป็นเม็ดสีเหลือง จึงทำให้นมกระบือมีสีขาวแตกต่างไปจากนมโค แม้ว่านมกระบือไม่มีสารแคโรทีน แต่ปริมาณไวตามินเอและซีในน้ำนมกระบือก็สูงกว่าน้ำนมโค นมกระบือประกอบไปด้วยของแข็งทั้งหมดสูง ซึ่งใช้ในการแปรรูปได้หลายชนิดเช่นเดียวกับนมโค เช่น ชีส โยเกิร์ต ไอศกรีม อีกทั้งมีโภชนะต่างๆสูงเหมาะแก่การแปรรูปทำผลิตภัณฑ์เนยแข็งที่ทำจากนมกระบือมีสีขาวบริสุทธิ์เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค และไขมันในน้ำนมกระบือนิยมใช้ทำเนยแข็งชนิดอ่อน (Mozzarella Cheese) ในอิตาลีที่มีคุณภาพดีมาก และน้ำนมกระบือใช้ทำกี (ghee) ในอินเดีย หรือเซ็มนา (semna)ในอียิปต์ ที่มีคุณภาพดีกว่าผลิตภัณฑ์ที่ทำจากนมโค

2.2.1 ไขมัน

ไขมันส่วนใหญ่ในน้ำนมจะอยู่ในรูปของ triglyceride โดยกรดไขมันซึ่งเป็นส่วนประกอบของ triglyceride จะเป็นกรดไขมันอิ่มตัวมีจำนวนคาร์บอน 4-18 ตัว ยกเว้น oleic acid ที่เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวเพียงตัวเดียว สายกรดไขมันขนาดกลางนี้พบได้เฉพาะในน้ำนม และไม่พบไขมันแบบนี้ในส่วนอื่นๆของร่างกาย เต้านมมีการพัฒนาความสามารถในการผลิตสายกรดไขมันขนาดกลางระหว่างช่วงกลางของการตั้งท้อง ซึ่งมักจะพบเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์กรดไขมันได้ในเนื้อเยื่อของเต้านม สารตั้งต้นในการสร้างกรดไขมันในโคและแพะได้จาการแตกตัวของ triglyceride ที่อยู่ในกระแสโลหิต เซลล์ต่อมน้ำนมจะใช้ acetate และ hydroxybutyrate ในการสร้างกรดไขมันขนาดกลาง ในสัตว์เคี้ยวเอื้องการสังเคราะห์กรดไขมันจากกลูโคสเกิดขึ้นน้อยมากซึ่งต่างจากสัตว์กระเพาะเดี่ยวที่ใช้กลูโคสเป็นวัตถุดิบในการสร้างกรดไขมัน กลีเซอรอล ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ triglyceride ได้จากการเปลี่ยนแปลงของกลูโคสและจากกลีเซอรอลในกระแสโลหิต (ทัศนีย์, 2548) นมกระบือมีไขมันมากกว่านมโคประมาณ 2 เท่า แม้ว่าลักษณะทางกายภาพของสัตว์ ช่วงการให้นม ฤดูกาล อาหาร พันธุ์ เวลา และความถี่ในการรีดนม เป็นปัจจัยที่มีมีผลต่อไขมันในน้ำนมกระบือ ซึ่งเป็นปัจจัยที่เหมือนกันในสัตว์ให้นม เม็ดไขมัน (fat globule) ในน้ำนมกระบือมีลักษณะหยาบละเอียด นมกระบือ 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วยเม็ดไขมัน 2.7 ล้านเม็ดประมาณ 60 % มีขนาดระหว่าง 3.5-7.5 μ อีกทั้งฤดูกาล ช่วงการให้นม และขั้นตอนการรีด เป็นปัจจัยหลักที่มีผลกระทบต่อขนาดเม็ดไขมันในนมกระบือ (Akhundov,1958) ระดับคลอเรสเตอรอลในไขมันน้ำนมกระบือทั้งคลอเรสเตอรอลทั้งหมด และคลอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

เรสเตอรอลอิสระต่ำกว่านมโค (275 และ 212 มิลลิกรัม/100 กรัม เมื่อเทียบกับนมโค 330 และ 280 มิลลิกรัม/100 กรัม ตามลำดับ)

2.2.2 โปรตีน (Protein)

เคซีน (casein) เป็นสารประกอบโปรตีนส่วนใหญ่ในน้ำนมซึ่งมีทั้งหมด 4 ชนิด คือ a-casein, k-casein, b-casein และ r-casein เคซีนจะเกาะกลุ่มแขวนลอยในของเหลวโดยไม่ละลาย โปรตีนอื่นๆที่พบได้แก่ b-lactoglobulin และ a-lactoalbumin ซึ่งอยู่ในรูปละลายน้ำ โปรตีนจะถูกสร้างโดยอาศัยการทำหน้าที่ของไรโบโซม และกอลจิแอพพาราตัสภายในเซลล์ต่อมน้ำนม immunoglobulin เป็นสารที่ให้ภูมิคุ้มกันโรคแก่ลูกสัตว์ และพบมากในนมน้ำเหลือง ลูกสัตว์จะ สามารถดูดซึมโปรตีนชนิดนี้ผ่านผนังลำไส้ได้โดยไม่ถูกย่อยสลายในช่วงอายุ 1-2 วันแรกเท่านั้นจึงให้ลูกสัตว์ได้กินนมน้ำเหลืองใน ช่วงแรกเกิด เพื่อเพิ่มภูมิต้านทานให้แก่ร่างกาย (ทัศนีย์, 2548) โปรตีนในน้ำนมกระบือมีมากกว่านมโค โดย 80 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนทั้งหมดเป็น casein และโปรตีนเกือบทั้งหมดอยู่ในรูปเม็ดโปรตีนเกาะกันเป็นกลุ่ม (90-95 เปอร์เซ็นต์ ในนมโค) (Ganguli, 1973) ขนาดของเม็ดโปรตีนในนมกระบืออยู่ระหว่าง 80-250 นาโนเมตร โดยส่วนใหญ่อยู่ระหว่าง 110-160 นาโนเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับนมโคซึ่งมีขนาดเพียง 70-110 นาโนเมตร (Sarswat, 1985) ปริมาตรกลุ่มของเคซีน (casein micelle) ของนมกระบือมีประมาณ 2.7-3.7 มิลลิลิตร/กรัม ในช่วงอุณหภูมิ 25-37 องศาเซลเซียส (Sood *et.al*, 1976)

2.2.3 น้ำตาลแลคโตส (Lactose)

แลคโตส (lactose) เป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตส่วนใหญ่ในน้ำนม และไม่พบในอวัยวะอื่นของร่างกาย รวมทั้งในกระแสโลหิต แลคโตสเป็นสาร disaccharide เกิดจากการรวมตัวของกลูโคสและกาแลคโตส อย่างละ 1 โมเลกุล โดยอาศัยเอนไซม์ lactose synthetase ในการเกิดปฏิกิริยา แหล่งของกลูโคสได้จากกระแสโลหิต ส่วนกาแลคโตสได้จากการเปลี่ยนกลูโคสในกระแสโลหิตเป็น กาแลคโตส เอนไซม์ lactose synthetase ประกอบด้วยโปรตีน 2 ชนิด คือ galactosyltransferase และ a-lactoalbumin แลคโตสเป็นตัวควบคุมแรงดันออสโมติค และควบคุมปริมาณน้ำในน้ำนม โดยดึงน้ำ และโซเดียมจากกระแสเลือดไปยังน้ำนม

2.3 ผลิตภัณฑ์และการแปรรูปของนมกระบือ

น้ำนมพร้อมดื่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

น้ำนมกระบือมูร่าห์มีสีขาวบริสุทธิ์ ให้ความเข้มข้นสูง รับประทานง่าย รสชาติของน้ำนมกระบือมีความหอม มันเข้มข้น และไร้กลิ่นคาว อุดมไปด้วยสารอาหารที่ร่างกายต้องการ โดยเฉพาะโปรตีน แคลเซียม และไขมัน แต่กลับมีปริมาณคอเลสเตอรอลต่ำกว่าน้ำนมจากสัตว์ชนิดอื่น ทั้งยังประกอบด้วยแร่ธาตุ วิตามิน และสารต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าน้ำนมโค รวมถึงองค์ประกอบในน้ำนมกระบือแตกต่างไปจากน้ำนมโค ทำให้ผู้ที่แพ้น้ำนมโครับประทานได้ จึงเหมาะสำหรับผู้ที่แพ้น้ำนมโค ผู้รักสุขภาพ เด็กในวัยเจริญเติบโต หรือผู้สูงอายุที่ต้องการแคลเซียมเสริม

เนยแข็งมอสซาเรลลา และเนยแข็งรีคอตตา

เนยแข็งมอสซาเรลลาเป็นเนยแข็งสายพันธุ์อิตาเลียนที่ต้องผลิตจากน้ำนมกระบือเท่านั้น ซึ่งจะให้รสชาติดีที่สุดในช่วงหนึ่งถึงสามวันหลังผลิต นำมาประกอบอาหารได้หลากหลาย เช่น หั่นใส่ในสลัดรับประทานสด ๆ หรือทำเป็นคา-ปรีเซ่สลัด โดยหั่นเป็นแว่นแกล้มกับมะเขือเทศ ใบโหระพาอิตาเลียน รับประทานกับน้ำมันมะกอกหรือน้ำส้มสายชูดำ เป็นต้น

โยเกิร์ต

โยเกิร์ตนมมูร่าห์เป็นอาหารสุขภาพที่ใช้น้ำนมบริสุทธิ์ปราศจากสารพิษจากยาหรือฮอร์โมน ไร้สารกันบูด น้ำตาลหรือกลิ่นรสสังเคราะห์ในกระบวนการผลิต อุดมด้วยสารอาหารสำคัญ เช่น โปรตีน แคลเซียม และจุลินทรีย์โปรไบโอติก เมื่อรับประทานเป็นประจำจะช่วยปรับสมดุลในระบบย่อยอาหารและระบบขับถ่าย สำหรับผู้ที่มีปัญหาในการย่อยน้ำนม โยเกิร์ตจึงเป็นทางเลือกหนึ่ง ในการบริโภคสารอาหารที่ได้จากน้ำนม

น้ำมันกีห์

น้ำมันเนยอินเดีย หรือกีห์ (Ghee) เป็นผลิตภัณฑ์จากครีมน้ำนมกระบือมูร่าห์ ซึ่งนำมาเคี่ยวจนหอม เป็นน้ำมันที่ใช้กันในทุกครัวเรือนของประเทศอินเดีย มีจุดเดือดสูงกว่าน้ำมันทั่วไป ทำให้ไม่เกิดสารพิษเมื่อโดนความร้อนสูงเหมือนน้ำมันพืชทั่วไป จึงเหมาะอย่างยิ่งต่อการนำไปประกอบอาหาร

2.4 การตรวจสอบโดยเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุล

สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (2553) รายงานว่า Polymerase Chain Reaction หรือ PCR ถูกคิดค้นขึ้นเป็นครั้งแรกโดย Kary Mullis *et al.*นักวิทยาศาสตร์ชาวอเมริกัน ในปี ค.ศ.1985 และได้รับรางวัลโนเบลสาขาเคมี ในปี ค.ศ.1993 เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ แบบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

วงจรในหลอดทดลอง โดยอาศัยหลักการ DNA Replication ซึ่งเป็นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบในหลอดทดลองภายในระยะเวลาอันสั้นและได้ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้นเป็นล้านเท่า และได้รับการยอมรับว่าเป็นเทคโนโลยีที่สาคัญมากต่องานด้านอณูชีวโมเลกุล สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งกับงานวิจัยทางชีวโมเลกุลและพันธุวิศวกรรม เช่น การเพิ่มปริมาณยีน (gene cloning) การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน (gene sequencing) การสร้างดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe) เป็นต้น โดยใช้หลักการพื้นฐานในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ จากสายต้นแบบหนึ่งสายด้วยเอนไซม์ DNA poloymerase ซึ่งมีคุณสมบัติพิเศษ คือทนต่ออุณหภูมิสูงได้เป็นเวลานาน จึงเป็นที่นิยมใช้ทั่วไปในการติดฉลากดีเอ็นเอ และการศึกษาวิเคราะห์ลาดับเบส แต่ PCR สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้คราวละ 2 สายพร้อมกัน โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) 1 คู่ โดยปฏิกิริยา PCR มี 3 ขั้นตอน และหมุนเวียน ต่อเนื่องกันไป ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน ในขั้นแรก เรียกว่า denaturing เป็นการแยกสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ ให้เป็นเส้นเดี่ยว โดยความร้อนจะทาให้พันธะไฮโดรเจนระหว่างเบสที่เป็น complementary ถูกทำลายที่อุณหภูมิ 92-95°C ต่อมาขั้นที่สองเรียกว่า annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงและจัดให้ไพรเมอร์ ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆที่มีลาดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจับคู่กัน นิยมใช้อุณหภูมิในช่วง 37 – 60 °C และขั้นที่ 3 เรียกว่า extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 5' ของไพรเมอร์ ตามข้อมูลบนดีเอ็นเอ ที่เป็นต้นแบบแต่ละสายโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งเอ็นไซม์นี้สามารถทางานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72-75 °C และทำการแปลผลโดยวิธี gel electrophoresis ซึ่งย้อมด้วย Ethidium bromide ตลอดจนตรวจสอบด้วยเครื่อง UV transilluminator (ดังภาพที่ 4) โดยองค์ประกอบที่สำคัญของปฏิกิริยาลูกโซ่ polymerase ได้แก่ DNA template เป็นดีเอ็นเอต้นแบบที่ได้มาจากเนื้อเยื่อของสัตว์, primer (Oligonucleotide) มีขนาดประมาณ 20-30 เบส โดยทั่วไปจะมีสายเรียกว่า forward primer และ reverse primer, Deoxynucleotide triphosphate (dNTP) ได้แก่ A T C และ G, DNA polymerase เป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติพิเศษต่างจากเอนไซม์ทั่วไป คือสามารถทนต่ออุณหภูมิสูงเป็นเวลานานๆ ได้ทาหน้าที่ในการสังเคราะห์ DNA สายใหม่ โดยนิยมใช้ Taq Enzyme DNA polymerase, MgCl2 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาของ Enzyme DNA polymerase และสารละลายบัฟเฟอร์ที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ โดยปัจจุบันในการพัฒนาเทคนิค PCR เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องและรวดเร็วตามวัตถุประสงค์ของงานวิจัย การดัดแปลงจากเทคนิค PCR พื้นฐานก่อให้เกิดเทคนิคชั้นสูงจานวนมากที่สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพและลดปัญหาอุปสรรคต่างๆของปฏิกิริยา PCR เทคนิคชั้นสูงที่สาคัญ ได้แก่ เทคนิค Nested PCR ซึ่งเทคนิคนั้นมีหลักการและประโยชน์ในการประยุกต์ใช้ที่แตกต่างจากเดิม จุดเด่นของวิธีทางอณูชีววิทยา คือมีความไว (sensitivity) สูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase chain reaction, PCR) เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอซึ่งใช้เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดหนึ่งที่นิยมใช้ในการตรวจสอบการปลอมปนในน้ำนม เนื่องจากเป็นวิธีการที่สะดวกและรวดเร็ว โดยจะใช้เซลล์ร่างกาย (somatic cells) เช่น เซลล์เม็ดเลือดขาว (leukocytes) หรือเซลล์เยื่อบุนม (epithelial mammary cells) เป็นแหล่งของดีเอ็นเอที่ใช้ตรวจสอบ (Abdel and Ahmed, 2007) และออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ (specific) กับเซลล์หรือยีน (gene) ของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการตรวจสอบ

Duplex PCR เป็นเทคนิคพีซีอาร์ที่ใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ ส่วนเทคนิค Multiplex PCR จะใช้ไพรเมอร์มากกว่า 2 คู่ขึ้นไปในการทำปฏิกิริยาพร้อมๆ กัน โดยไพรเมอร์แต่ละคู่จะได้รับการออกแบบให้จำเพาะต่อดีเอ็นเอเป้าหมายแต่ละตัวและไม่มีเบสคู่สมกลับมาจับกันเอง เทคนิค duplex PCR และ multiplex PCR จะต้องปรับสภาวะของปฏิกิริยาให้เหมาะสมเพื่อให้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ทุกตัวที่ใส่ลงไป Bottero *et al.* (2003) ใช้เทคนิค multiplex PCR จำแนกผลิตภัณฑ์เนยแข็ง (cheese) ที่ทำจากน้ำนมโค น้ำนมแพะ และน้ำนมแกะ โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับยีนไมโตคอนเดรีย 12s และ16s rRNA พบว่าสามารถตรวจการปลอมปนได้ที่ระดับ 0.5% Lopez-Calleja *et al.* (2005a) ใช้เทคนิคพีซีอารในการตรวจสอบการ ปลอมปนน้ำนมแพะในน้ำนมแกะทั้งน้ำนมดิบ และน้ำนมที่ผ่านความร้อนโดยกำหนดไพรเมอร์เป้าหมายที่จำเพาะกับยีนไมโตคอนเดรีย 12s rRNA ซึ่งจะแสดงแถบดีเอ็นเอของน้ำนมแพะขนาด 122 bp และเทคนิคนี้สามารถตรวจสอบการปลอมปนน้ำนมแพะได้ที่ระดับ 0.1% จากรายงานของ Mafra *et al.* (2007) ใช้เทคนิค ในการตรวจสอบน้ำนมโคในเนย แข็งที่ทำจากน้ำนมแพะ โดยใช้ไพรเมอร์ที่มาจากยีนไมโตคอนเดรีย 12sRNA สามารถพบในช่วง 1-60% และนำไปประยุกต์ใช้ ตรวจสอบเนยแข้งนมแพะ 17 ตัวอย่าง และ นำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบเนยแข็งนมแพะพบว่ามีการปลอมปนของนมโคถึง 15 ตัวอย่าง และ Sachinandan *et al.* (2011) ใช้เทคนิค simplex PCR และ duplex PCR ในการจำแนกชนิดโคและกระบือและเนยแข็งที่ทำจากน้ำนมกระบือโดยใช้ยีนจากไมโตคอนเดรีย ดีเอ็นเอของส่วน D-loop สามารถทำให้ได้ขนาดของดีเอ็นเอในน้ำนมโค และ กระบือได้ 126 bp และ 226 bp ตามลำดับ การศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งหวังที่จะศึกษา ประสิทธิภาพการใช้เทคนิค duplex PCR และ multiplex PCR ในการตรวจสอบการปลอมปนน้ำนมโคและน้ำนมแพะในน้ำนมกระบือเพื่อเป็นประโยชน์ของข้อมูลทางวิชาการสามารถนำไป ประยุกต์ให้เกิดงานวิจัยชิ้นใหม่ๆ ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเก็บและเตรียมตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างน้ำนมจากแหล่งผลิตที่แตกต่างกันซึ่งประกอบด้วยน้ำนมดิบและน้ำนมที่ผ่านการทำพาสเจอร์ไรซ์ของโคและกระบือ (ได้รับความอนุเคราะห์จาก มูราห์ฟาร์ม) นำมาเก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส จนกระทั่งทดลอง จากนั้นทำการผสมระหว่างน้ำนมโคและน้ำนมกระบือ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยใช้อัตราส่วน 20, 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.4, 0.2 และ 0.1 เปอร์เซนต์ของนมโคในน้ำนมกระบือ

3.2 การสกัดดีเอ็นเอจากน้ำนมโค และน้ำนมกระบือ

ในการสกัดดีเอ็นเอจากน้ำนมดิบจากโคและกระบือ ทำโดย นำ ตัวอย่างนม 10 มิลลิลิตร มาปั่นที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำเก็บส่วนตะกอนที่ได้นำไป เติมด้วย TENS buffer 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติม proteinase K ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำไปปั่นเพื่อแยกตะกอนออก นำส่วนใสที่ได้ เติม phenol :chloroform (1:1) จากนั้นนำไปปั่นแยก phenol :chloroform ออก นำส่นใสที่ได้ เติม 3 M Sodium Acetate ลงไป 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติม isopropanol เป็นจำนวน 0.8 เท่าของปริมาตร เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ และนำไปปั่นแยกเพื่อเกบดีเอ็นเอที่ได้ นำไปละลายด้วยน้ำกลั่น นำดีเอ็นเอที่ได้ไปวัดปริมาณโดยใช้ ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบความ เข้ มข้นด้วยเทคนิคอิเล็คโตรโฟรีซีส (electrophoresis) โดยผสมดีเอ็นเอ 2 ไมโครลิตร กับ TE dye 2 ไมโครลิตร ให้เข้ากัน และนำไปตรวจสอบพร้อม กับ ดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น 3 ไมโครลิตร โดยผ่านตัวกลาง คือ 0.8% อะกาโรส ใน 0.5X TBE buffer (40 mM Tris base, 20 mM acetate, 2 mM EDTA, pH 8) ผ่านสนามไฟฟ้า ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และความเข้มข้นของดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน คือ lambda 20 ng/µl

3.3 การออกแบบไพรเมอร์

จากลำดับเบสจากข้อมูลใน GenBank ของไมโตรคอนเดรีย 12s rRNA จากโค, ควาย, แกะ และแพะ พบว่าสามารถออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อโค และ กระบือได้ดังตารางที่ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ตารางที่ 2 แสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ออกแบบจาก 12s rRNA ในไมโตคอนเดรีย

ชนิด	ลำดับเบสของไพรเมอร์
กระบือ	12SM-FW : 5' CTA GAG GAG CCT GTT CTA TAA TCG ATA A 3' BUF-REV2 : 5' TTC ATA ATA ACT TTC GTG TTG GGT GT 3'
โค	C-FW : 5' GTA CTA CTA GCA ACA GCT TA 3' C-RW 5' GCT TGA TTC TCT TGG TGT AGA G 3'

3.4 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

นำดีเอ็นเอตัวอย่างน้ำนมที่สกัดได้มาทำ การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการโดยใช้ไพรเมอร์ที่มาจากยีนไมโตคอนเดรียของโค และกระบือ (ตารางที่ 3) โดยปฏิกิริยาประกอบด้วยดีเอ็นเอจากตัวอย่าง 60 ng 1 µl, 1 mM primer (forward และ reverse) 0.5 µl ,10X Taq buffer (20 mM buffer + KCL) 1 µl, 25mM MgCl2 1 µl, 1 mM dNTP 2 µl, Taq DNA polymerase (5U/µl) 0.4 µl และ dH2O ปริมาตรรวม 10 µl หลังจากนั้นนำไปเข้าเครื่องพีซีอาร์ โดยในแต่ละขั้นตอน คือ initail denaturation 95 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที, denaturation 94 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที, annealing 62 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที, extension 72 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที และ final extension 72องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที ทำปฏิกิริยาจำนวน 35 รอบ

3.5 การตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอ

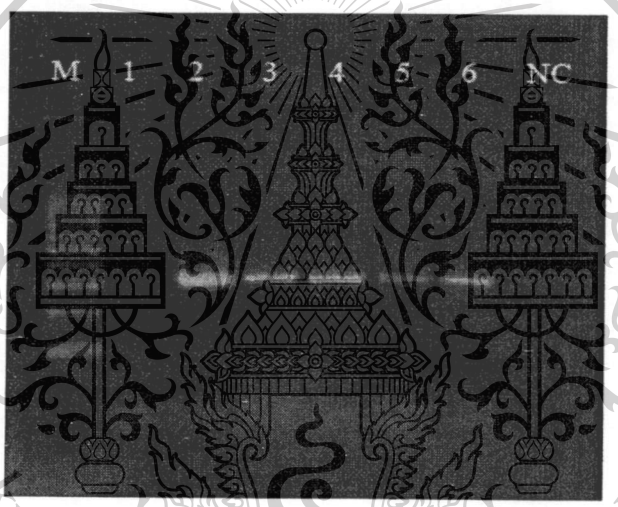
หลังจากเสร็จสิ้นปฏิกิริยาพีซีอาร์ผสมดี เอ็นเอกับ sequencing dye (10 mM EDTA pH 8.0, 98% formamide, 0.025% bromophenol blue และ 0.025% xylene cyanol) 2 µl ให้เข้า กัน แล้วนำไปตรวจสอบขนาดพร้อมกับดีเอ็นเอ มาตรฐานที่ทราบขนาดแล้ว โดยในแต่ละ lane จะใช้ ดีเอ็นเอปริมาตร 5 µl โดยผ่านตัวกลาง คือ 2% อะกาโรสเจล ใน 0.5X TBE buffer ผ่านสนามไฟฟ้า ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที จากนั้นแช่แผ่นเจลในสารละลาย etidium bromide นาน 10 นาที และแช่ในน้ำ 10 นาที เพื่อล้าง etidium bromide ส่วนเกินออก จากนั้นถ่ายรูปเพื่อนำไปประมาณขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ผลของการทำพีซีอาร์โดยใช้ยีน 12S rRNA ที่จำเพาะต่อโคในตัวอย่างน้ำนมโค

จากรูป พบว่า เมื่อได้ใช้คู่ไพรเมอร์ของยีน 12 rRNA ที่มีความจำเพาะต่อโค คือ 12SM-FW : 5' CTA GAG GAG CCT GTT CTA TAA TCG ATA A 3' กับ C-FW : 5' GTA CTA CTA GCA ACA GCT TA 3' และ C-RW 5' GCT TGA TTC TCT TGG TGT AGA G 3' ทำปฏิกริยา duplex-PCR ในตัวอย่างน้ำนมโค พบว่าได้แถบของดีเอ็นเอขนาด 356 bp ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงถบดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน 12 rRNA ที่จำเพาะต่อโคกับดีเอ็นเอที่ได้จากน้ำนมโค

M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน ขนาด 100 bp

1 = ดีเอ็นเอจากน้ำนมกระบือ

2-6 = ดีเอ็นเอจากน้ำนมโค

NC = ชุดควบคุมที่ไม่เติมดีเอ็นเอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

4.2 ผลของการทำพีซีอาร์โดยใช้ยีน 12S rRNA ที่จำเพาะต่อกระบือในตัวอย่างน้ำนมกระบือ

จากรูป พบว่า เมื่อได้ใช้คู่ไพรเมอร์ของยีน 12 rRNA ที่มีความจำเพาะต่อโคคือ 12SM-FW : 5' CTA GAG GAG CCT GTT CTA TAA TCG ATA A 3' กับ BUF-REV2 : 5' TTC ATA ATA ACT TTC GTG TTG GGT GT 3' ทำปฏิกริยา duplex-PCR ในตัวอย่างน้ำนมกระบือ พบว่าได้แถบของดีเอ็นเอขนาด 220 bp ดังรูปที่ 2

รูปที่ 2 แสดงแถบดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน 12 rRNA ที่จำเพาะต่อกระบือกับดีเอ็นเอที่ได้จากน้ำนมกระบือ

M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน ขนาด 100 bp
1 = ดีเอ็นเอจากน้ำนมโค
2-6 = ดีเอ็นเอจากน้ำนมกระบือ
NC = ชุดควบคุมที่ไม่เติมดีเอ็นเอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

4.3 ผลของการทำพีซีอาร์โดยใช้ยีน 12S rRNA ที่จำเพาะต่อโคในตัวอย่างน้ำนมผสม

นำดีเอ็นเอจากตัวอย่างน้ำนมผสมระหว่างน้ำนมโคและน้ำนมกระบือ ในอัตราส่วน 75, 50, 20, 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.4, 0.2 และ 0.1 เปอร์เซนต์ของนมโคในน้ำนมกระบือ ทำปฏิกริยา duplex-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ของ ของยีน 12 rRNA ที่มีความจำเพาะต่อโค คือ 12SM-FW : 5' CTA GAG GAG CCT GTT CTA TAA TCG ATA A 3' กับ C-FW : 5' GTA CTA CTA GCA ACA GCT TA 3' และ C-RW 5' GCT TGA TTC TCT TGG TGT AGA G 3' พบว่าสามารถที่จะตรวจวัดหาการปลอมปนของน้ำนมโคได้โดยจะให้พบว่าได้แถบของดีเอ็นเอขนาด 356 bp ดังรูปที่ 3

รูปที่ 3 แสดงแถบดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน 12 rRNA ที่จำเพาะต่อโคกับดีเอ็นเอที่ได้จากน้ำนมผสม

M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน ขนาด 100 bp

1 = ดีเอ็นเอจากน้ำนมกระบือ

2 = ดีเอ็นเอจากน้ำนมโค

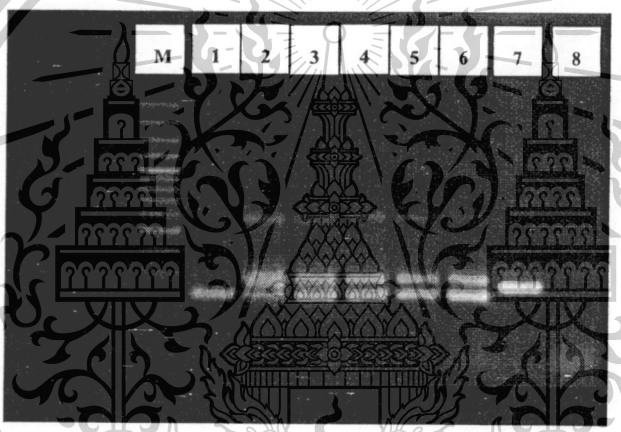
3-14 = ดีเอ็นเอจากน้ำนมผสมระหว่างน้ำนมโคและน้ำนมกระบือ ในอัตราส่วน 75, 50, 20, 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.4, 0.2 และ 0.1

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

4.4 การตรจการปลอมปนโดยการทำพีซีอาร์ในตัวอย่างน้ำนมผสม

แสดงการตรวจสอบการปลอมปน น้ำนมโคในน้ำนมกระบือด้วยเทคนิค multiplex PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มาจากยีนไมโตคอนเดรีย ของโคและกระบือ ใน lane ที่ 1 คือ น้ำนมกระบือ 100% มีดีเอ็นเอขนาด 220 bp และ lane ที่ 7 คือ น้ำนมโค 100% มีดีเอ็นเอ ขนาด 256 bp ส่วน lane ที่ 2-6 คือ น้ำนมกระบือผสมกับน้ำนมโคที่ระดับปริมาณที่ต่างกัน คือ 50, 10, 1, 0.5 และ 0.1% ตามลำดับ ทำให้ ความเข้มของแถบดีเอ็นเอทั้งสองแตกต่างกันไป.ตามระดับปริมาณน้ำนมโคที่ผสมลงไป โดย lane 2 จะมีความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอทั้งสองใกล้เคียงน้ำนมกระบือและน้ำนมโค 100% ส่วน lane 6 จะพบว่าแถบดีเอ็นเอของน้ำนมโค (แถบ บน) จางเมื่อเทียบกับน้ำนมโค 100% (lane 7) เนื่องจากใน lane 6 จะมีการผสมน้ำนมโคลงไป ในน้ำนมกระบือเพียง 0.1%



รูปที่ 4 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ duplex PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน 12 rRNA ที่จำเพาะต่อโคกับกระบือกับดีเอ็นเอที่ได้จากน้ำนมผสม

M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน ขนาด 100 bp

1 = ดีเอ็นเอจากน้ำนมกระบือ

2-6 = ดีเอ็นเอจากน้ำนมผสมระหว่างน้ำนมโคและน้ำนมกระบือ 50, 10, 1, 0.5 และ 0.1% ของปริมาตรน้ำนมกระบือ

7 = ดีเอ็นเอจากน้ำนมโค

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย

จากผลการทดลองจะพบแถบดีเอ็นเอ บริเวณด้านบนแถบดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ ใน lane 2-6 ขนาดประมาณ 600 bp อาจจะ เนื่องมาจากไพรเมอร์ 2 คู่เกิดการจับกันเอง ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอมากกว่า 1 แถบ หรืออาจจะ เกิดจากไพรเมอร์ที่ใช้กับน้ำนมกระบือ คือ 12SM-FW ซึ่งเป็นยีนที่พบได้ไมโตคอนเดรีย ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมทุกชนิด อาจเป็นไปได้ว่านอกจากไพรเมอร์จะจับกับดีเอ็นเอของน้ำนม กระบือแล้วยังจับกับดีเอ็นเอบางส่วนของน้ำนมโคอีกด้วย นอกจากนี้อุณหภูมิในขั้นตอนการ annealing ของการทำปฏิกิริยา PCR ยังมีผลใน การเข้าจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ โดย ในปฏิกิริยา PCR นั้นหากใช้อุณหภูมิต่ำไพรเมอร์จะเข้ากับกับดีเอ็นเอต้นแบบแบบไม่จำเพาะเจาะจง คือถึงแม้ว่าไพรเมอร์มีลำดับเบสไม่เหมือนกันกับดีเอ็นเอต้นแบบทั้งหมดก็ยังสามารถเข้าจับได้ แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นก็จะทำให้ไพรเมอร์ที่จะเข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบต้องมีความเหมือนกันหรือความจำเพาะเจาะจงกันมาก จึงจะสามารถจับกับดีเอ็นเอต้นแบบและสามารถเพิ่มปริมาณได้ และจากผลการทดลองสามารถตรวจสอบการปลอมปนน้ำนมโคในน้ำนมกระบือได้ที่ระดับ 0.1% เทคนิค duplex PCR สามารถตรวจสอบการปลอมปนน้ำนมโค ในน้ำนมกระบือได้ที่ระดับการ ปลอมปน 0.1%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

บทที่ 6
สรุปผลผลิตที่ได้จากงานวิจัย

1. สามารถใช้เทคนิค duplex PCR สามารถตรวจสอบการปลอมปนน้ำนมโค ในน้ำนมกระบือ
2. รอการตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

เอกสารอ้างอิง

วัชรี อัตถทิพพหลคุณ และมนตรี อัตถทิพพหลคุณ. 2536. ทฤษฎีการประยุกต์ใช้ ประโยชน์ PCR Technology. คณะ เทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ. 208 น.

อรรัตน์ มงคลพร. 2548. เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช.จรัลสนิทวงศ์ การพิมพ์, กรุงเทพฯ. 95 น.

Abdel-Rahman, S.M. and M.M.M. Ahmed. 2007. Rapid and sensitive identification of buffalo's, cattle's and sheep's milk using species-specific PCR and PCR–RFLP techniqnes. Food Control. 18 : 1246–1249.

Bottero, M.T., T. Civera, D. Nucera, S. Rosati, P. Sacchi and R.M. Turi. 2003. A multiplex polymerase chain reaction for the identification of cows', goats' and sheep's milk in dairy products. International Dairy Journal. 13 : 277–282

Lopez-Calleja, I. Gonzalez, V. Fajardo, I. Martin, P. E. Hernandez, T. Garcia, and R. Martin. 2005a. Application of Polymerase Chain Reaction to Detect Adulteration of Sheep's Milk with Goats' Milk. Journal of Dairy Science. 88 : 3115–3120.

Lopez-Calleja, I. Gonzalea, V. Fajardo, M.A. Rodriguez, P.E. Hernandez, T. Garcia and R. Martin. 2005b. PCR detection of cows' milk in water buffalo milk and mozzarella cheese. International Dairy Journal. 15 : 1122-1129.

Lopez-Calleja, I. Gonzalez, V. Fajardo, I. Martin, P.E. Hernandez, T. Garcia and R. Martin. 2007. Real-time TaqMan PCR for quantitative detection of cows' milk in ewes' milk mixtures. International Dairy Journal. 17 : 729–736.

Mafra, I., A. Roxo, I.M.P.L.V.O. Ferreira and M.B.P.P. Oliveira. 2007. A duplex polymerase chain reaction for the quantitative detection of cows' milk in goats' milk cheese. International Dairy Journal. 17 : 1132–1138.

Olivia, M., S. Ahmad, F. Rousseau, V. Briard-Bion, F. Gaucheron and C. Lopez. 2010. Buffalo vs. cow milk fat globules: Size distribution, zeta-potential compositions in total fatty acids, and in polar lipids from the milk fat globule membrane. Food Chemistry. 120 : 544–551.

Sachinandan D., B. Brahma, S. Polley, A. Mukherjee, D. Banerjee, M. Gohaina, K. P. Singh, R. Singh, T. K. Datta and S. L. Goswami. 2011. Simplex and duplex PCR assays for species specific identification of cattle and buffalo milk and cheese. Food Control. 22 : 690-696.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

137859

ข้อมูลประวัติคณะผู้วิจัย

ประวัติส่วนตัว

ชื่อ-สกุล นาย สุรชัย ใหญ่เย็น

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ สาขาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร

ประวัติการศึกษา

ชื่อย่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีที่จบ
วท.ด.	**เทคโนโลยีชีวภาพ**	**จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**	**2553**
วท.ม.	**ชีวเคมี**	**จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**	**2547**
วท.บ.	**เทคโนโลยีชีวภาพ**	**มหาวิทยาลัยรามคำแหง**	**2542**

สาขาวิจัยที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)

- กระบวนการสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรต
- เอนไซม์เทคโนโลยี

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์ที่ตีพิมพ์เผยแพร่ (ระดับชาติและนานาชาติ)

Jongmevasana W., **Yaiyen S.** and Prousoontorn H. M. (2013) "Cassava (*Manihot esculenta* Crantz of cv. KU50) peroxidase and its potential for the detection of some thiol compounds based on the inhibitory effect of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine oxidation." Process of Biochemistry : 48 1516-1523.

Yaiyen, S., Netrphan., S and Limpaseni, T. (2010) "Characterization of two recombinant starch branching enzymes cloned from cDNA of two cassava *sbe* genes" *Proceeding and Oral*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

presentation of International Conference of Biotechnology: The 22ndAnnual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. 20-22 October 2010, Prince of Songkla University, Trang Thailand.

Yaiyen, S., Netrphan., S and Limpaseni, T. (2009) "Cloning and expression of *sbe1* gene from cassava *Manihot esculenta* Crantz. *In poster presentation 21st IUBMB International Congress and 12th FAOBMB Congress of Biochemistry and Molecular Biology*,2-7 August 2009, Shanghai, China.

Yaiyen, S., Netrphan., S and Limpaseni, T. (2009) "Characterization and cloning of starch branching enzyme genes from cassava *Manihot esculenta* Crantz. Cultivar KU 50. *In poster presentation. Asia Pacific Biochemical Engineering Conference 2009.*, 24-28 November 2009 Kobe Japan.

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

รหัสโครงการ/รหัสสัญญา 2556-02-07005

แบบรายงานการใช้จ่ายเงินโครงการวิจัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

รายงานความก้าวหน้าครั้งที่ 2 รอบ12เดือน ประจำปีงบประมาณ 2556

☐ แหล่งงบประมาณแผนดิน(แบบปกติ) ☑ แหล่งเงินรายได้

ชื่อโครงการ การตรวจสอบน้ำนมวัวที่ปลอมปนในน้ำนมและผลิตภัณฑ์น้ำนมจากกระบือ

Detection of adulteration in buffalo milk and dairy products with cow's milk

ชื่อ-สกุลหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน/ผู้วิจัย (อ./ดร./ผศ./รศ./ศ.) อ.ดร. สุรชัย ใหญ่เย็น

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2556 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2557

ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี เดือนตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2556 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2557

ข้อมูลการรายงานค่าใช้จ่ายงบประมาณโครงการวิจัย

1. การเบิกจ่ายงบประมาณ (กรณีการจ่ายเงินถ้าจ่ายงวดเดียวให้ลบข้อที่ไม่เกี่ยวข้องออก)

งวดที่ 1 70,000 บาท ..... % วันที่ได้รับอนุมัติให้เบิกจ่ายเงิน (ป/ด/ว) .....

งวดที่ 2 ..... บาท ..... % วันที่ได้รับอนุมัติให้เบิกจ่ายเงิน (ป/ด/ว) .....

2. สรุปงบประมาณค่าใช้จ่ายที่ใช้นับตั้งแต่เริ่มทำการวิจัยถึงปัจจุบัน (จำแนกตามหมวดค่าใช้จ่าย(

หมวดค่าใช้จ่าย	งบประมาณรวมทั้งโครงการ	ค่าใช้จ่าย (บาท)	คงเหลือ (หรือเกิน
งบบุคลากร:ค่าจ้างชั่วคราว			
งบดำเนินงาน			
ค่าตอบแทน			
ค่าใช้สอย			
ค่าวัสดุ	70,000	70,000	0
ค่าสาธารณูปโภค			
งบลงทุน: ค่าครุภัณฑ์			
รวม	70,000	70,000	0

.....

(.....)

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

...../...../.....

.....

(.....)

ลงนามเจ้าหน้าที่การเงิน/เจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้อง

...../...../.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

หมายเหตุ : นักวิจัยหรือเจ้าหน้าการเงินสามารถปรับหรือเปลี่ยนแปลงเพิ่มเติมข้อความได้ตามความเหมาะสมและสอดคล้องกับการดำเนินงาน อาทิเช่น นักวิจัยอยู่ระหว่างการดำเนินการเคลียร์ด้านเอกสารทางการเงิน หรือข้อความอื่นๆ