การระบุอัตลักษณ์ทางชีวโมเลกุลของน้ำนมโคอินทรีย์ด้วยเทคโนโลยีเมตาโบโลมิกส์

น.ส.ธนิตาภรณ์ เผื่อนพงษ์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2564

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MOLECULAR AUTHENTICATION OF ORGANIC BOVINE MILK USING METABOLOMICS TECHNOLOGY

Miss Thanitaporn Phuenpong

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Food Technology
Department of Food Technology
FACULTY OF SCIENCE
Chulalongkorn University
Academic Year 2021
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การระบุอัตลักษณ์ทางชีวโมเลกุลของน้ำนมโคอินทรีย์ด้วยเทคโนโลยีเมตาโบโลมิกส์
โดย	น.ส.ธนิตาภรณ์ เผื่อนพงษ์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศานต์ เศรษฐชัยมงคล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เกียรติศักดิ์ ดวงมาลย์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

-- คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

-- ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร.อุบลรัตน์ สิริภัทราวรรณ)

-- อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศานต์ เศรษฐชัยมงคล)

-- อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เกียรติศักดิ์ ดวงมาลย์)

-- กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐธิดา โชติช่วง)

-- กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กฤษกมล ณ จอม)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ธนิตาภรณ์ เผื่อนพงษ์ : การระบุอัตลักษณ์ทางชีวโมเลกุลของน้ำนมโคอินทรีย์ด้วยเทคโนโลยีเมตาโบโลมิกส์. (MOLECULAR AUTHENTICATION OF ORGANIC BOVINE MILK USING METABOLOMICS TECHNOLOGY) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ผศ. ดร.ศานต์ เศรษฐชัยมงคล, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. ดร.เกียรติศักดิ์ ดวงมาลย์

จากกระแสความนิยมของกลุ่มผู้บริโภคที่ใส่ใจต่อสุขภาพและคำนึงสิ่งแวดล้อมในปัจจุบัน ส่งผลให้แนวโน้มการตลาดของผลิตภัณฑ์เกษตรและอาหารอินทรีย์มีการเติบโตอย่างต่อเนื่อง น้ำนมที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ซึ่งเน้นรูปแบบการเลี้ยงที่เป็นธรรมชาติ ปลอดจากการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะ จัดเป็นหนึ่งกลุ่มสินค้าเกษตรที่มีมูลค่าสูง ส่งผลให้มีความต้องการพัฒนาวิธีการตรวจสอบคุณภาพ โดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบทางเคมีในน้ำนมที่เป็นผลมาจากกระบวนการจัดการฟาร์มแบบอินทรีย์ เพื่อใช้ระบุอัตลักษณ์ของผลิตภัณฑ์กลุ่มดังกล่าว เมตาโบโลมิกส์ (metabolomics) นับเป็นเทคนิคทางเคมีวิเคราะห์สมัยใหม่ที่สามารถนำมาใช้เพื่อตรวจสอบอัตลักษณ์ทางชีวโมเลกุลของผลิตภัณฑ์อาหาร อย่างไรก็ตาม การนำเทคโนโลยีดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของน้ำนมและผลิตภัณฑ์นมในประเทศไทยยังมีอยู่อย่างจำกัด ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ วิเคราะห์และเปรียบเทียบข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากและข้อมูลกรดไขมันของน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป โดยใช้เทคนิค ^{1}H-NMR และ GC-MS ร่วมกับการวิเคราะห์ทางสถิติพหุตัวแปร พร้อมทั้งติดตามอิทธิพลของฤดูกาลต่อการเปลี่ยนแปลงข้อมูลดังกล่าวในน้ำนมดิบ ผลการวิจัยพบว่าสามารถระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากและกรดไขมันในน้ำนมดิบได้ทั้งหมด 35 และ 32 ชนิดตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ทางสถิติพหุตัวแปรแสดงให้เห็นว่า สามารถแยกความแตกต่างของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากและข้อมูลกรดไขมันของกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ออกจากฟาร์มโคนมทั่วไปได้ โดยสามารถใช้ปริมาณสัมพัทธ์ของสารเมตาบอไลต์ carnitine, *N*-acetylglucosamine, lactate, glycerophosphocholine, 1,3 dihydroxyacetone,1,6-anhydro-β-D-glucose และกรดไขมันชนิด stearic acid และ linolenic acid เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อระบุอัตลักษณ์ทางชีวโมเลกุลของน้ำนมโคอินทรีย์ได้ นอกจากนี้อิทธิพลของความแตกต่างระหว่างฤดูแล้งและฤดูฝนยังส่งผลต่อความผันแปรของปริมาณสารเมตาบอไลต์ acetoacetate, glucose, histidine, choline และกรดไขมันชนิด lauric acid, myristic acid, palmitic acid, margaric acid, saturated fatty acid (SFA), monounsaturated fatty acid (MUFA), polyunsaturated fatty acid (PUFA), elaidic acid, linolelaidic acid, conjugated linoleic acid (CLA) และ behenic acid ผลการวิจัยดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเมตาโบโลมิกส์ในการวิเคราะห์อัตลักษณ์ทางชีวโมเลกุลของน้ำนมโคอินทรีย์ รวมทั้งอิทธิพลของฤดูกาลต่อความผันแปรของข้อมูลดังกล่าวได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร	ลายมือชื่อนิสิต ....
ปีการศึกษา	2564	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก ....
		ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม ....

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

6270049223 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEYWORD: dairy, organic milk, molecular food authentication, metabolomics, chemometrics

Thanitaporn Phuenpong : MOLECULAR AUTHENTICATION OF ORGANIC BOVINE MILK USING METABOLOMICS TECHNOLOGY. Advisor: Asst. Prof. Sarn Settachaimongkon, Ph.D. Co-advisor: Asst. Prof. KIATTISAK DUANGMAL, Ph.D.

The popularity of organic milk and dairy products has increased towards trends in healthy food consumption and environmental concerns. It is well acknowledged that farming practices, animal feeds as well as health status of the cows influenced by different seasons of the year could provide significant impact on milk composition. In this study, a metabolomics approach was applied to investigate the influence of (i) organic dairy farming system and (ii) seasonal variation on biomolecular profiles of bovine milk produced in central Thailand. Raw milk samples were collected from conventional vs. organic dairy farms in rainy and dry season periods. Non-volatile polar metabolites and fatty acid profiles of milk were characterized using ^{1}H-NMR and GC-MS, respectively. Finally, metabolomics data were analyzed and compared by means of chemometric analysis. Results showed that a total of 35 non-volatile metabolites and 32 fatty acids present in milk were successfully identified and quantified in this study. Chemometric analysis demonstrated the impact of organic dairy farming as well as seasonal variation on the non-volatile metabolite and fatty acid profiles of raw milk. Variations in the concentration of carnitine, *N*-acetylglucosamine, lactate, glycerophosphocholine, 1,3 dihydroxyacetone, 1,6-anhydro-β-D-glucose, stearic acid and linolenic acid were statistically suggested as potential biomarkers accountable for the authentication of organic milk. In addition to this, factors related to the differences between rainy and dry seasons could provide significant influences on the concentration of acetoacetate, glucose, histidine, choline, lauric acid, myristic acid, palmitic acid, margaric acid, saturated fatty acid (SFA), monounsaturated fatty acid (MUFA), polyunsaturated fatty acid (PUFA), elaidic acid, linolelaidic acid, conjugated linoleic acid (CLA) and behenic acid in raw milk. After a proper validation, this information could be further applied for quality monitoring, traceability and molecular authentication of organically produced milk and dairy products in the future.

Field of Study:	Food Technology	Student's Signature ....
Academic Year:	2021	Advisor's Signature ....
		Co-advisor's Signature ....

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดีโดยได้รับการสนับสนุนและคำแนะนำต่างๆอย่างดียิ่งจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศานต์ เศรษฐชัยมงคล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เกียรติศักดิ์ ดวงมาลย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้สละเวลาอันมีค่าในการให้ความรู้ แนะนำ ชี้แนะแนวทางการแก้ปัญหาและอุปสรรคต่างๆ ให้การสนับสนุนและช่วยเหลือ พร้อมทั้งให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมา ทำให้การเขียนวิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วง

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบโครงร่างวิทยานิพนธ์ และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ประกอบด้วย ศาสตราจารย์ ดร. อุบลรัตน์ สิริภัทราวรรณ (ประธานกรรมการ) ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐธิดา โชติช่วง (กรรมการ) และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กฤษกมล ณ จอม (กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย) ที่ให้ความรู้ พร้อมทั้งข้อเสนอแนะต่างๆ อันเป็นประโยชน์เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ คุณนวนน จันทรประสาร, เจ้าหน้าที่แผนกวิชาการโคนมและพี่ๆเจ้าหน้าที่รีดนมจากองค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย (อ.ส.ค.) อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี และคุณสุชาติ สุวรรณทอง เจ้าของฟาร์มโคนมทั่วไป และเจ้าหน้าที่สหกรณ์โคนมไทย-เดนมาร์ค (มิตรภาพ) จำกัด ที่ให้คำแนะนำและให้การช่วยเหลือเป็นอย่างดีในการลงพื้นที่เก็บตัวอย่างน้ำนมดิบอันเป็นประโยชน์ในการทำวิจัยเป็นอย่างมาก

ขอขอบพระคุณ คุณธรา จันท์ทะธรรม เจ้าหน้าที่ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในการอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง

ขอขอบพระคุณ คุณวรรณวิมล เมฆบุญส่งลาภ เจ้าหน้าที่บริการวิทยาศาสตร์ ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ คุณคุณาภรณ์ หอมยก เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการโภชนศาสตร์สัตว์ ศูนย์ตรวจวินิจฉัยทางการสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ในการอำนวยความสะดวก ให้ข้อมูลและคำแนะนำต่างๆอันเป็นประโยชน์ในการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำนมดิบ

ขอขอบพระคุณ “ทุนส่งเสริมและสนับสนุนหน่วยปฏิบัติการวิจัย กระบวนการผลิตเพื่อออกแบบสมบัติเชิงหน้าที่ของอาหาร” จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในการสนับสนุนทุนสำหรับใช้ในการดำเนินงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ นางสาวมาริสา คงบุญเกิด และนายปิติกร ซุ้นอื้อ นิสิตในที่ปรึกษาของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศานต์ เศรษฐชัยมงคล ที่คอยให้คำแนะนำในการปฏิบัติการต่างๆในงานวิจัยนี้และให้กำลังใจเสมอมา

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณครอบครัว เพื่อนสนิท และเพื่อนๆระดับปริญญาบัณฑิตของผู้วิจัยที่คอยอยู่เคียงข้าง สนับสนุนและเป็นกำลังใจที่สำคัญของผู้วิจัยส่งผลให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ธนิตาภรณ์ เผื่อนพงษ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ค

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ง

กิตติกรรมประกาศ ..... จ

สารบัญ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ฒ

สารบัญรูปภาพ ..... ด

บทที่ 1 บทนำ 21

1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงการ 21

1.2 สมมติฐานของการวิจัย 23

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 24

1.4 ขอบเขตของการวิจัย 24

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย 25

บทที่ 2 วารสารปริทัศน์ 26

2.1 เกษตรอินทรีย์ในประเทศไทย 26

2.1.1 นิยามและหลักการของเกษตรอินทรีย์ 26

2.1.2 การรับรองมาตรฐานเกษตรอินทรีย์ในประเทศไทย 26

2.2 ฟาร์มโคนมอินทรีย์ 27

2.2.1 พื้นที่เลี้ยงสัตว์ 28

2.2.2 การปรับเปลี่ยนฝูงโค 28

2.2.3 แหล่งที่มาของสัตว์ 28

2.2.4 การจัดการฟาร์มทั่วไป 29

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.2.5 อาหารสัตว์ 29
2.2.6 การจัดการที่อยู่อาศัย 34
2.2.7 การจัดการด้านสุขภาพสัตว์ 35
2.2.8 การจัดการรีดนมและน้ำนม 35
2.2.9 การจัดการของเสีย 35
2.2.10 การจัดการด้านเอกสาร 36
2.3 น้ำนมดิบ 37
2.3.1 ความหมายและข้อมูลทั่วไปของน้ำนมโคดิบ (raw cow milk) 37
2.3.2 องค์ประกอบทางเคมีหลักของน้ำนม (major chemical composition of milk) 38
2.3.2.1 ไขมันนม หรือมันเนย (fat) 38
2.3.2.2 โปรตีน (protein) 40
2.3.2.3 น้ำตาลแลคโตส (lactose) 41
2.3.2.4 วิตามิน (vitamins) 42
2.3.2.5 แร่ธาตุ และเกลือแร่ (minerals and salts) 42
2.3.2.6 สารประกอบอินทรีย์อื่นๆ 42
2.4 อิทธิพลที่เกี่ยวข้องกับการจัดการฟาร์มโคนมที่ส่งผลต่อองค์ประกอบทางเคมีและคุณภาพของน้ำนม 43
2.4.1 สายพันธุ์ (cow breeds) 43
2.4.2 อายุ (age) และระยะของการให้น้ำนม (stage of lactation) 43
2.4.3 ชนิดของอาหาร (types of feed) 44
2.4.4 สุขภาพของแม่โค (health status of the cows) 44
2.4.5 ฤดูกาล (season) 44
2.5 อิทธิพลของการจัดการฟาร์มโคนมอินทรีย์ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบทางเคมีหลักในน้ำนม 46

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.6 เทคโนโลยีเมตาโบโลมิกส์ (metabolomic technology) 49
2.6.1 การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเมตาโบโลมิกส์ในการศึกษาองค์ประกอบทางชีวเคมีในน้ำนมและผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์ 49
2.7 การวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากในน้ำนมด้วยเทคนิค Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) 52
2.8 การวิเคราะห์ข้อมูลกรดไขมันในน้ำนมด้วยเทคนิค Gas chromatography-mass spectroscopy (GC-MS) 56
2.9 การประมวลผลด้วยเทคนิคทางเคโมเมตริกซ์ (chemometrics) 60
2.9.1 การวิเคราะห์กลุ่ม (cluster analysis) 60
2.9.2 การวิเคราะห์จำแนกกลุ่มด้วยการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุด (Partial least square-discriminant analysis; PLS-DA) และ การวิเคราะห์จำแนกกลุ่มแบบโครงสร้างเชิงตั้งฉากด้วยการถดถอยวิธีกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (Orthogonal partial least squares discriminant analysis; OPLS-DA) 61
2.9.3 การวิเคราะห์วิถีเมตาบอลิซึมของสารเมตาบอไลต์และกรดไขมัน (metabolic pathway analyses) 62
2.10 ช่องว่างทางวิชาการและสมมติฐานในงานวิจัย 64
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินงานวิจัย 65
3.1 วัตถุดิบ อุปกรณ์ และสารเคมี 65
3.1.1 วัตถุดิบ 65
3.1.2 อุปกรณ์ 66
3.1.3 สารเคมี 68
3.2 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย 69
3.2.1 ภาพรวมของวิธีการดำเนินงานวิจัย 69
3.2.2 การทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์ 72

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.2.2.1 การทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากด้วย ^{1}H-NMR โดยใช้ตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์ทางการค้าในประเทศไทย 72

3.2.2.2 การตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมีหลักในผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์ทางการค้า 72

3.2.2.3 การตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่างในผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์ทางการค้า 73

3.2.3 การคัดเลือกตัวอย่างน้ำนมดิบจากแม่โคที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ และฟาร์มโคนมทั่วไป ในเขตพื้นที่อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี 73

3.2.3.1 การคัดเลือกน้ำนมดิบจากแม่โคสุขภาพดี โดยประเมินปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบเบื้องต้นด้วยน้ำยา California mastitis test (CMT) 76

3.2.3.2 การเก็บตัวอย่างน้ำนมดิบ 77

3.2.3.3 เก็บตัวอย่างอาหารสัตว์สำหรับการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของอาหารด้วยวิธี Proximate analysis 80

3.2.3.4 การตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมีหลักและปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบ 80

3.2.3.5 การตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำนมดิบ และปริมาณกรดทั้งหมดในน้ำนมดิบ 81

3.2.4 การเตรียมตัวอย่างน้ำนมสำหรับการวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยาก (non-volatile metabolite profile) ในน้ำนมดิบโดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ด้วย Proton nuclear magnetic resonance (^{1}H-NMR) 82

3.2.4.1 การเตรียมตัวอย่างน้ำนมก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR 82

3.2.4.2 การเตรียมตัวอย่างน้ำนมเพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR 85

3.2.4.3 การประมวลข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR 85

3.2.5 การเตรียมตัวอย่างน้ำนมดิบสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลกรดไขมัน (fatty acid profile) ด้วยเทคนิค Gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS) 86

3.2.5.1 การเตรียมตัวอย่างน้ำนมดิบเพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย GC-MS (FAME esterification) 86

3.2.5.2 การวิเคราะห์ข้อมูลกรดไขมันในน้ำนมดิบด้วย GC-MS 87

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

3.2.6 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ 87

3.2.6.1 การวิเคราะห์ทางสถิติแบบตัวแปรเดียว (univariate statistical analysis) . 87

3.2.6.2 การวิเคราะห์ทางสถิติพหุตัวแปร (multivariate statistical analysis)..... 88

3.2.6.3 การวิเคราะห์วิถีเมตาบอลิซึม (pathway analysis)..... 90

3.2.7 วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง 91

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ 92

4.1 การทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากด้วย ^{1}H-NMR โดยใช้ตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์ทางการค้าในประเทศไทย 92

4.1.1 การตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมีหลักในผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์ทางการค้า..... 92

4.1.2 การตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่างในผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์ทางการค้า 94

4.1.3 การประมวลข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างน้ำนมอินทรีย์พาสเจอไรส์โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ทางเมตาโบโลมิกส์..... 95

4.1.3.1 การประมวลผล spectra ของ ^{1}H-NMR และการระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ spectra ของตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์ทางการค้าที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR..... 95

4.1.3.2 การเปรียบเทียบข้อมูลของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากของตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์ทางการค้า (*n*=32) ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR โดยเทคนิค heat-map visualization และ hierarchical cluster analysis (HCA)..... 99

4.1.3.3 การเปรียบเทียบข้อมูลของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากของผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์ทางการค้า (*n*=32) ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR โดยการวิเคราะห์จำแนกกลุ่มด้วยการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุด (Partial least square-discriminant analysis; PLS-DA)..... 101

4.2 การคัดเลือกตัวอย่างน้ำนมดิบจากแม่โคที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ และฟาร์มโคนมทั่วไป ในเขตพื้นที่อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี 103

4.2.1 การคัดเลือกน้ำนมดิบจากแม่โคสุขภาพดี โดยประเมินปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบเบื้องต้นด้วยน้ำยา California mastitis test (CMT)..... 104

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.2.2 การเก็บตัวอย่างอาหารสัตว์สำหรับการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของอาหารด้วยวิธี Proximate analysis 105

4.2.3 การตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมีหลักและปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบ 109

4.2.4 การตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำนมดิบ และปริมาณกรดทั้งหมดในน้ำนมดิบ 114

4.3 การวิเคราะห์ข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากในน้ำนมดิบโดยใช้เทคนิค ^{1}H-NMR 114

4.3.1 การประมวลผล spectra ของ ^{1}H-NMR และการระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากของน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปที่เก็บในช่วงฤดูกาลที่แตกต่างกัน (*n*=60) 114

4.3.2 การเปรียบเทียบข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากของตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูกาลที่แตกต่างกัน (*n* = 60) จากการวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR โดยเทคนิค Heat-map visualization และ hierarchical cluster analysis (HCA) 119

4.3.3 การเปรียบเทียบข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากของตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูกาลที่แตกต่างกัน (*n* = 60) จากการวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR โดยการวิเคราะห์จำแนกกลุ่มด้วยการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุด (Partial least square-discriminant analysis; PLS-DA) 121

4.3.4 การเปรียบเทียบข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากของตัวอย่างน้ำนมดิบ (*n* = 60) เพื่อศึกษาอิทธิพลของฤดูกาลในการเก็บตัวอย่างที่แตกต่างกัน ระหว่างฤดูฝน (กันยายน - ตุลาคม 2563) และฤดูแล้ง (มีนาคม - เมษายน 2564) จากการวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR โดยการวิเคราะห์จำแนกกลุ่มแบบโครงสร้างเชิงตั้งฉากด้วยการถดถอยวิธีกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (Orthogonal partial least squares discriminant analysis; OPLS-DA) 123

4.3.5 การเปรียบเทียบข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากของตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป (*n* = 60) เพื่อศึกษาอิทธิพลของระบบการจัดการฟาร์มที่แตกต่างกัน จากการวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR โดยการวิเคราะห์จำแนกกลุ่มแบบโครงสร้างเชิงตั้งฉากด้วยการถดถอยวิธีกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (Orthogonal partial least squares discriminant analysis; OPLS-DA) 128

4.3.6 การวิเคราะห์หาวิถีเมตาบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับความผันแปรของข้อมูลปริมาณสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากจากอิทธิพลของการจัดการฟาร์มแบบเกษตรอินทรีย์และปัจจัยจากฤดูกาลที่เก็บตัวอย่างด้วย MetaboAnalyst pathway analysis 134

4.3.6.1 การวิเคราะห์หาวิถีเมตาบอลิซึมที่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนทั่วไป (*n*=60) 134

4.3.6.2 การวิเคราะห์หาวิถีเมตาบอลิซึมที่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูฝนและฤดูแล้ง (*n*=60).. 135

4.3.7 การวิเคราะห์ระบุตำแหน่งสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่ออิทธิพลของการจัดการฟาร์มแบบเกษตรอินทรีย์และปัจจัยจากฤดูกาลที่เก็บตัวอย่างด้วย KEGG’s pathway analysis... 137

4.3.7.1 การวิเคราะห์ระบุตำแหน่งสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากที่เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อแยกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป (*n*=60) 137

4.3.7.2 การวิเคราะห์ระบุตำแหน่งสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากที่เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อแยกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูฝนและฤดูแล้ง (*n*=60).. 139

4.4 การวิเคราะห์ข้อมูลกรดไขมันในน้ำนมดิบโดยใช้เทคนิค GC-MS 141

4.4.1 การประมวลผล spectra ของ GC-MS และการระบุชนิดของกรดไขมันของน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปที่เก็บในช่วงฤดูกาลที่แตกต่างกัน (*n*=60)... 141

4.4.2 การเปรียบเทียบข้อมูลกรดไขมันของตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูกาลที่แตกต่างกัน (*n* = 60) จากการวิเคราะห์ด้วย GC-MS โดยเทคนิค Heat-map visualization และ hierarchical cluster analysis (HCA) 144

4.4.3 การเปรียบเทียบข้อมูลกรดไขมันของตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปในในช่วงฤดูกาลที่แตกต่างกัน (*n* = 60) จากการวิเคราะห์ด้วย GC-MS โดยการวิเคราะห์จำแนกกลุ่มด้วยการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุด (Partial least square-discriminant analysis; PLS-DA) 146

4.4.4 การเปรียบเทียบข้อมูลกรดไขมันของตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป (*n* = 60) เพื่อศึกษาอิทธิพลของระบบการจัดการฟาร์มที่แตกต่างกันจากการวิเคราะห์ด้วย GC-MS โดยการวิเคราะห์จำแนกกลุ่มแบบโครงสร้างเชิงตั้งฉากด้วยการถดถอยวิธีกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (Orthogonal partial least squares discriminant analysis; OPLS-DA) 148

4.4.5 การเปรียบเทียบข้อมูลกรดไขมันของตัวอย่างน้ำนมดิบ (*n* = 60) เพื่อศึกษาอิทธิพลของฤดูกาลในการเก็บตัวอย่างที่แตกต่างกัน ระหว่างฤดูฝน (กันยายน - ตุลาคม 2563) และฤดูแล้ง (มีนาคม - เมษายน 2564) จากการวิเคราะห์ด้วย GC-MS โดยการวิเคราะห์จำแนกกลุ่มแบบโครงสร้างเชิงตั้งฉากด้วยการถดถอยวิธีกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (Orthogonal partial least squares discriminant analysis; OPLS-DA) 153

4.4.6 การวิเคราะห์หาวิถีเมตาบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับความผันแปรของข้อมูลกรดไขมันจากอิทธิพลของการจัดการฟาร์มแบบเกษตรอินทรีย์และปัจจัยจากฤดูกาลที่เก็บตัวอย่างด้วย MetaboAnalyst pathway analysis 159

4.4.6.1 การวิเคราะห์หาวิถีเมตาบอลิซึมที่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนทั่วไป (*n*=60) 159

4.4.6.2 การวิเคราะห์หาวิถีเมตาบอลิซึมที่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูฝนและฤดูแล้ง (*n*=60) 160

4.4.7 การวิเคราะห์ระบุตำแหน่งกรดไขมันที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่ออิทธิพลของการจัดการฟาร์มแบบเกษตรอินทรีย์และปัจจัยจากฤดูกาลที่เก็บตัวอย่างด้วย KEGG’s pathway analysis 162

4.4.7.1 การวิเคราะห์ระบุตำแหน่งกรดไขมันที่เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อแยกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป (*n*=60) 162

4.4.7.2 การวิเคราะห์ระบุตำแหน่งกรดไขมันที่เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อแยกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูฝนและฤดูแล้ง (*n*=60) 163

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 166

5.1 สรุปผลการทดลอง 166

5.2 ข้อเสนอแนะ 169

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บรรณานุกรม..170

ภาคผนวก...194

ภาคผนวก ก 195

ภาคผนวก ข 197

ภาคผนวก ค 199

ภาคผนวก ง...214

ประวัติผู้เขียน 223

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 2.1 การแบ่งชั้นคุณภาพน้ำนมดิบตามคุณลักษณะ 37

ตาราง 2.2 ตัวอย่างการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเมตาโลโลมิกส์ในน้ำนมและผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์ 50

ตาราง 2.3 ตัวอย่างการใช้ NMR ในการวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ในน้ำนมและผลิตภัณฑ์นม 53

ตาราง 2.4 ชนิดของกรดไขมันในน้ำนมโค 58

ตาราง 2.5 ตัวอย่างการใช้ GC-MS ในการวิเคราะห์ข้อมูลกรดไขมันในน้ำนมและผลิตภัณฑ์นม 59

ตาราง 3.1 รายละเอียดฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป 74

ตาราง 3.2 ข้อมูลสถิติภูมิอากาศในเขตอำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี 77

ตาราง 3.3 การออกแบบการทดลองเพื่อสรุปการเก็บตัวอย่างน้ำนมดิบในแต่ละฟาร์ม 79

ตาราง 4.1 องค์ประกอบทางเคมีหลักของผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์ทางการค้าที่ใช้ในงานวิจัยนี้....... 93

ตาราง 4.2 ค่า chemical shift (ppm) ที่ใช้ระบุตำแหน่งสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากที่พบในตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์ทางการค้าในงานวิจัยนี้ทั้งหมด 45 สารเมตาบอไลต์ 97

ตาราง 4.3 ข้อมูลสถิติภูมิอากาศในฤดูกาลที่เก็บตัวอย่างในเขตอำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี 106

ตาราง 4.4 คุณค่าทางโภชนาการของอาหารสัตว์จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูกาลที่แตกต่างกัน โดยการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธี Proximate analysis ตามวิธีการของ AOAC (1990) 108

ตาราง 4.5 องค์ประกอบทางเคมีหลักในน้ำนมดิบ ปริมาณโซมาติกเซลล์ ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณกรดทั้งหมดในน้ำนมดิบจากแม่โคที่มีสุขภาพดีจากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูกาลที่แตกต่างกัน 110

ตาราง 4.6 สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากที่พบในตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป ทั้งหมด 35 สารเมตาบอไลต์ 117

ตาราง 4.7 กรดไขมันที่พบในตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปทั้งหมด 32 ชนิด 142

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตาราง ง.1 ปริมาณสัมพัทธ์จาก log $_{10}$ peak area (arbitrary unit) ของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากในน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูฝน (กันยายน - ตุลาคม 2563) และฤดูแล้ง (มีนาคม - เมษายน 2564)....214

ตาราง ง.2 ความเข้มข้น (mM) ของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากในน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูฝน (กันยายน - ตุลาคม 2563) และฤดูแล้ง (มีนาคม - เมษายน 2564) 217

ตาราง ง.3 ความเข้มข้นของกรดไขมัน (mg/100g fat) ในน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูฝน (กันยายน - ตุลาคม 2563) และฤดูแล้ง (มีนาคม - เมษายน 2564)220

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 2.1 ตราสัญลักษณ์ Organic Thailand 27

รูปที่ 2.2 องค์ประกอบทางเคมีในอาหารสัตว์ 31

รูปที่ 2.3 องค์ประกอบทางเคมีหลักในน้ำนม 38

รูปที่ 2.4 โครงสร้างพื้นฐานของไตรกลีเซอไรด์ 38

รูปที่ 2.5 การสังเคราะห์ไขมันในน้ำนม 40

รูปที่ 2.6 โมเลกุลน้ำตาลแลคโตส 41

รูปที่ 2.7 แผนผังแสดงการทำงานของ NMR 53

รูปที่ 2.8 การทำงานของ Gas chromatography - mass spectroscopy (MS) 57

รูปที่ 3.1 ภาพรวมของวิธีการดำเนินงานในงานวิจัยนี้ 71

รูปที่ 3.2 (ก) อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการประเมินปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบ (ข) ตัวอย่างน้ำนมดิบหลังทำปฏิกิริยากับน้ำยา CMT 76

รูปที่ 3.3 สรุปขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างน้ำนม สำหรับการวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR spectrometer 84

รูปที่ 4.1 แผนผังแสดงจำนวน bin ของ ^{1}H-NMR spectrum สำหรับนำไปใช้ในการวิเคราะห์ทางสถิติพหุตัวแปร 95

รูปที่ 4.2 (ก) การระบุตำแหน่งข้อมูลของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR ของตัวอย่างน้ำนมอินทรีย์พาสเจอไรส์ (ข) ภาพขยายในช่วง Aliphatic region (0.01-3.00 ppm) (ค) ภาพขยายในช่วง Sugar region (3.00-6.00 ppm) และ (ง) ภาพขยายในช่วง Aromatic region (6.50-10.00 ppm) 96

รูปที่ 4.3 การวิเคราะห์โดยการจัดกลุ่มด้วยเทคนิค heat-map visualization และ hierarchical cluster analysis (HCA) ของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR ของตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์ทางการค้า 100

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 4.4 PLS-DA 2D score plot (ก.) และ VIP score (ข.) ของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากที่ได้จากวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR ของตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์พาสเจอร์ไรส์ 102

รูปที่ 4.5 ลักษณะของส่วนผสมระหว่างน้ำนมดิบกับน้ำยา CMT จากการประเมินปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบที่ได้จากโคที่ปกติและเป็นโรคเต้านมอักเสบ 105

รูปที่ 4.6 แผนผังแสดงจำนวน bin ของ ^{1}H-NMR spectrum สำหรับนำไปใช้ในการวิเคราะห์ทางสถิติพหุตัวแปร 115

รูปที่ 4.7 (ก) การระบุตำแหน่งข้อมูลของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR ของตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป (ข) ภาพขยายในช่วง Aliphatic region (0.01-3.00 ppm) (ค) ภาพขยายในช่วง Sugar region (3.00-6.00 ppm) และ (ง) ภาพขยายในช่วง Aromatic region (6.50-10.00 ppm).. 116

รูปที่ 4.8 การวิเคราะห์โดยการจัดกลุ่มด้วยเทคนิค heat-map visualization และ hierarchical cluster analysis (HCA) ของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR ของตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปที่เก็บในฤดูกาลต่างกัน 120

รูปที่ 4.9 PLS-DA 2D score plot ของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากที่ได้จากวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR ของตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปที่เก็บในฤดูกาลต่างกัน... 122

รูปที่ 4.10 OPLS-DA 2D score plot (ก.) และ VIP score (ข.) ของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากจากการวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR ของตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บในฤดูฝนและฤดูแล้งจากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป 124

รูปที่ 4.11 OPLS-DA 2D score plot (ก,ค) และ VIP score (ข,ง) ของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากจากการวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR ของตัวอย่างน้ำนมดิบ แบบแยกเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ในช่วงฤดูฝนและช่วงฤดูแล้ง (ก,ข) และเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูฝนและช่วงฤดูแล้ง (ค,ง)............ 126

รูปที่ 4.12 OPLS-DA 2D score plot (ก.) และ VIP score (ข.) ของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากจากการวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR ของตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปที่เก็บในฤดูกาลต่างกัน.. 129

CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 4.13 OPLS-DA 2D score plot (ก,ค) และ VIP score (ข,ง) ของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากที่ได้จากวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR ของตัวอย่างน้ำนมดิบ แบบแยกเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูฝน (ก,ข) และเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป ในช่วงฤดูแล้ง (ค,ง) 131

รูปที่ 4.14 การวิเคราะห์วิถีเมตาบอลิซึม (pathway analysis) ของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากที่แตกต่างกันระหว่างตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป (ก.) และตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูฝนและฤดูแล้ง (ข.) 136

รูปที่ 4.15 KEGG’s pathway analysis 138

รูปที่ 4.16 KEGG’s pathway analysis 140

รูปที่ 4.17 ตัวอย่างโครมาโตแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปด้วยเทคนิค GC-MS 141

รูปที่ 4.18 การวิเคราะห์โดยการจัดกลุ่มด้วยเทคนิค heat-map visualization และ hierarchical cluster analysis (HCA) ของข้อมูลกรดไขมันที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย GC-MS ของตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปที่เก็บในฤดูกาลต่างกัน 145

รูปที่ 4.19 PLS-DA 2D score plot ของข้อมูลกรดไขมันที่ได้จากวิเคราะห์ด้วย GC-MS ของตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปที่เก็บในฤดูกาลต่างกัน 147

รูปที่ 4.20 OPLS-DA 2D score plot (ก.) และ VIP score (ข.) ของข้อมูลกรดไขมันจากการวิเคราะห์ด้วย GC-MS ของตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปที่เก็บในฤดูกาลต่างกัน 149

รูปที่ 4.21 OPLS-DA 2D score plot (ก,ค) และ VIP score (ข,ง) ของข้อมูลกรดไขมันที่ได้จากวิเคราะห์ด้วย GC-MS ของตัวอย่างน้ำนมดิบ แบบแยกเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูฝน (ก,ข) และเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป ในช่วงฤดูแล้ง (ค,ง) 151

รูปที่ 4.22 OPLS-DA 2D score plot (ก.) และ VIP score (ข.) ของข้อมูลกรดไขมันจากการวิเคราะห์ด้วย GC-MS ของตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูฝนและฤดูแล้งจากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป 155

รูปที่ 4.23 OPLS-DA 2D score plot (ก) และ VIP score (ข) ของข้อมูลกรดไขมันจากการวิเคราะห์ด้วย GC-MS ของตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ที่เก็บในช่วงฤดูฝนและฤดูแล้ง....... 156

รูปที่ 4.24 การวิเคราะห์วิถีเมตาบอลิซึม (pathway analysis) ของกรดไขมันที่แตกต่างกันระหว่างตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป (ก.) และตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูฝนและฤดูแล้ง (ข.)........ 161

รูปที่ 4.25 KEGG’s pathway analysis........ 164

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงการ

การเลี้ยงโคนมแบบอินทรีย์ เป็นรูปแบบการเลี้ยงที่เป็นธรรมชาติ เลี้ยงโคด้วยพืชอาหารสัตว์ที่เป็นอาหารหยาบมากขึ้น ปลอดการใช้สารเคมีและการใช้ยาปฏิชีวนะ ดังนั้น การทำฟาร์มโคนมอินทรีย์จึงเป็นการผลิตที่มุ่งเน้นถึงคุณภาพของน้ำนมเป็นหลัก ทั้งยังส่งเสริมความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและสวัสดิภาพสัตว์ (องค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย, 2562) ซึ่งคุณภาพของน้ำนมดิบนั้นสามารถพิจารณาได้จากสมบัติทางกายภาพ องค์ประกอบทางเคมี และสุขลักษณะทางจุลินทรีย์ โดยองค์ประกอบดังกล่าวจะเป็นตัวกำหนดราคาที่ศูนย์รับน้ำนมใช้ประเมินเพื่อรับซื้อน้ำนมดิบจากเกษตรกร (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2558) เมื่อพิจารณาองค์ประกอบทางเคมี น้ำนมดิบจัดเป็นของเหลวทางชีวภาพ (biological fluid) ประกอบด้วย น้ำ ไขมันนม และของแข็งที่ไม่รวมไขมันนม ได้แก่ โปรตีน แลคโตส แร่ธาตุ วิตามิน และสารประกอบอินทรีย์อื่นๆ (Walstra *et al*., 2005) โดยองค์ประกอบเหล่านี้จะผันแปรขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น สายพันธุ์ อายุ ระยะการให้นม สุขภาวะของแม่โค อาหารสัตว์ รูปแบบการจัดการฟาร์ม รวมถึงฤดูกาลที่แตกต่างกัน (Liu *et al.,* 2020) มีงานวิจัยพบว่าองค์ประกอบทางเคมีของน้ำนมโคอินทรีย์มีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่าหนึ่งตำแหน่งมีคุณค่าทางอาหารสูง เช่น conjugated linoleic acid (CLA) และยังพบกรดไขมันชนิดโอเมก้า 3 และ 6 ในปริมาณที่สูงกว่าน้ำนมโคทั่วไป (Butler *et al.,* 2011) ปัจจุบันมีการนำเทคโนโลยีเมตาโบโลมิกส์ (metabolomics) มาประยุกต์ใช้ในทางด้านการเกษตรและนำมาใช้ในการวิเคราะห์จำแนกข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุล (biomolecular profile) ของระบบอาหาร โดยมีการนำเทคโนโลยีดังกล่าวมาใช้ในการตรวจสอบอัตลักษณ์ทางชีวโมเลกุลและระบุข้อมูลสารเมตาบอไลต์ที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของน้ำนมที่ได้จากกระบวนการจัดการฟาร์มแบบอินทรีย์ (Schwendel *et al.,* 2015, Tsiafoulis *et al.*, 2019)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

เมตาโบโลมิกส์ (metabolomics) หรือการวิเคราะห์ข้อมูลสารเมตาบอไลต์ (metabolite analysis) รวมถึงการรวบรวมข้อมูลสารเมตาบอไลต์ (metabolite profiling) เป็นศาสตร์หนึ่งในวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีโอมิกส์ ที่เน้นการศึกษาสารชีวโมเลกุลขนาดเล็ก (โดยทั่วไปมีขนาดต่ำกว่า 1.5 กิโลดาลตัน) เช่น กรดนิวคลีอิค กรดอะมิโน กรดไขมัน น้ำตาล สารประกอบคาร์บอนิล เป็นต้น โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อรวบรวมข้อมูลในรูปแบบการวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ทั้งหมด หรือเมตาโบโลม (metabolome) ซึ่งเปรียบเสมือนลายพิมพ์ระดับโมเลกุล เพื่อให้เกิดความเข้าใจแบบองค์รวม (holistic approach) และใช้ความก้าวหน้าของเทคโนโลยีเคมีวิเคราะห์ในปัจจุบันช่วยจำแนกชนิด (identification) และตรวจหาปริมาณ (quantification) สารเมตาบอไลต์เหล่านั้น ซึ่งเทคนิคทางเคมีวิเคราะห์ที่นิยมนำมาใช้ศึกษาทางเมตาโบโลมิกส์ ได้แก่ นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy) และ แมสสเปกโทรเมตรี (mass spectrometry: MS) ซึ่งนิยมใช้ร่วมกับเทคนิคการแยกสาร เช่น แก๊สโครมาโตกราฟฟี/แมสสเปกโทรเมตรี (gas chromatography/mass spectrometry: GC/MS) หรือ ลิควิดโครมาโตกราฟฟี/แมสสเปกโทรเมตรี (liquid chromatography/mass spectrometry: LC/MS) (ศานต์ เศรษฐชัยมงคล, 2560) โดยเทคนิคทางเคมีวิเคราะห์ดังกล่าวสามารถนำมาใช้ศึกษาระบุความแตกต่างขององค์ประกอบทางชีวเคมีในผลิตภัณฑ์สินค้าเกษตรและอาหารอินทรีย์ได้ (Vallverdú-Queralt and Lamuela-Raventós, 2016)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สืบเนื่องจากงานวิจัยก่อนหน้าโดย มาริสา คงบุญเกิด (2562) พบว่าข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลในน้ำนมดิบมีความสัมพันธ์กับระบบการจัดการฟาร์มโคนมและอาหารสัตว์ที่แตกต่างกัน โดยสามารถแยกข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยาก (non-volatile metabolite profile) และข้อมูลกรดไขมัน (fatty acid profile) ระหว่างกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ออกจากฟาร์มโคนมทั่วไปได้อย่างชัดเจนและสามารถระบุตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) เพื่อแยกความแตกต่างกันของน้ำนมดิบทั้ง 2 กลุ่มได้ด้วยการวิเคราะห์ทางสถิติพหุตัวแปร อย่างไรก็ตาม Liu *et al.* (2020) พบว่านอกจากอิทธิพลของระบบการจัดการฟาร์มและอาหารสัตว์ที่แตกต่างกันระหว่างฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปแล้ว ช่วง

ฤดูกาลที่แตกต่างกันในรอบปียังส่งผลต่อปริมาณกรดไขมัน CLA และ PUFA (polyunsaturated fatty acid) ในน้ำนมอินทรีย์ โดยจะพบกรดไขมันดังกล่าวปริมาณสูงในช่วงฤดูร้อนเมื่อเทียบกับช่วงฤดูหนาวอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ Yeamkong *et al.* (2010) ได้ศึกษาอิทธิพลของฤดูกาลต่อปริมาณและคุณภาพของน้ำนมดิบที่ผลิตในประเทศไทย พบว่า ปริมาณไขมัน โปรตีน และแลคโตสของน้ำนมดิบในช่วงฤดูฝนมีปริมาณสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับฤดูร้อนและฤดูหนาว เนื่องจากชนิดและคุณภาพของอาหารสัตว์รวมทั้งสุขภาวะของแม่โคมีความสัมพันธ์กับช่วงฤดูกาลที่แตกต่างกัน

จนถึงปัจจุบัน พบว่างานวิจัยที่ประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเมตาโบโลมิกส์ในการเปรียบเทียบข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของน้ำนมโคอินทรีย์และน้ำนมทั่วไปในประเทศไทยมีอยู่อย่างจำกัด (Kongboonkird, 2018, มาริสา คงบุญเกิด, 2562) ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์และเปรียบเทียบข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากและข้อมูลกรดไขมันของน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปโดยใช้เทคโนโลยีเมตาโบโลมิกส์ พร้อมทั้งติดตามอิทธิพลของฤดูกาลต่อการเปลี่ยนแปลงข้อมูลดังกล่าวในระยะเวลา 1 ปี เพื่อวิเคราะห์ระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากและกรดไขมันที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของน้ำนมดิบที่ได้จากกระบวนการจัดการฟาร์มแบบอินทรีย์ได้ โดยการวิจัยในครั้งนี้จะยังคงดำเนินการภายใต้ความร่วมมือกับฝ่ายวิจัยและพัฒนาการเลี้ยงโคนม องค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย (อ.ส.ค.) และสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ จ.สระบุรี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

1.2 สมมติฐานของการวิจัย

สามารถประยุกต์ใช้การวิเคราะห์ทางเมตาโบโลมิกส์ด้วยเทคนิค Proton Nuclear Magnetic Resonance (^{1}H-NMR) เพื่อศึกษาข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากของน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป และเทคนิค Gas Chromatography-mass spectroscopy (GC-MS) เพื่อศึกษาข้อมูลกรดไขมันในน้ำนมดิบ ร่วมกับการประมวลผลข้อมูลดังกล่าวด้วยการวิเคราะห์ทางสถิติพหุตัวแปร (multivariate statistics) เพื่อระบุอัตลักษณ์ของข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลในน้ำนมดิบ และระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากและชนิดของกรดไขมันที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อแยก

ความแตกต่างระหว่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมที่มีระบบการจัดการฟาร์มที่แตกต่างกันและอิทธิพลของฤดูกาลต่อความผันแปรขององค์ประกอบชีวเคมีในน้ำนมดิบได้

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อวิเคราะห์และเปรียบเทียบข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากและข้อมูลกรดไขมันของน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปโดยใช้เทคโนโลยีเมตาโบโลมิกส์ พร้อมทั้งติดตามอิทธิพลของฤดูกาลต่อการเปลี่ยนแปลงข้อมูลดังกล่าว
2. ระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากและกรดไขมันที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อระบุความแตกต่างระหว่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปได้

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

1. วิเคราะห์และเปรียบเทียบข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากของผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์ทางการค้าในประเทศไทย จากการวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR ร่วมกับวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติพหุตัวแปรเพื่อทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์
2. วิเคราะห์ข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากของน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปโดยใช้เทคนิค ^{1}H-NMR และ วิเคราะห์ข้อมูลกรดไขมันของน้ำนมดิบโดยใช้เทคนิค GC-MS
3. วิเคราะห์และเปรียบเทียบข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากและข้อมูลกรดไขมันของน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปโดยใช้เทคโนโลยีเมตาโบโลมิกส์ร่วมกับวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติพหุตัวแปร พร้อมทั้งระบุตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อแยกความแตกต่างระหว่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปได้และอิทธิพลของฤดูกาลต่อความผันแปรขององค์ประกอบชีวเคมีในน้ำนมดิบ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

1. ทราบข้อมูลองค์ประกอบสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากของผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์ทางการค้าในประเทศไทย โดยใช้เทคโนโลยีเมตาโบโลมิกส์ พร้อมทั้งอิทธิพลของฤดูกาลต่อการเปลี่ยนแปลงข้อมูลดังกล่าว
2. สามารถระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากและชนิดของกรดไขมันที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อระบุความแตกต่างระหว่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป
3. สามารถนำองค์ความรู้ที่ได้มาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบอัตลักษณ์ของน้ำนมที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ เพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตและเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์ในประเทศไทยได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 2
วารสารปริทัศน์

2.1 เกษตรอินทรีย์ในประเทศไทย

2.1.1 นิยามและหลักการของเกษตรอินทรีย์

"เกษตรอินทรีย์" ตามมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ หมายถึง ระบบจัดการการผลิตด้านการเกษตรแบบองค์รวม ที่เกื้อหนุนต่อระบบนิเวศ รวมถึงความหลากหลายทางชีวภาพ วงจรชีวภาพ โดยเน้นการใช้วัสดุธรรมชาติ หลีกเลี่ยงการใช้วัตถุดิบจากการสังเคราะห์และไม่ใช้ พืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์ที่ได้มาจากเทคนิคการดัดแปรพันธุกรรม (genetic modification) มีการจัดการกับผลิตภัณฑ์โดยเน้นการแปรรูปด้วยความระมัดระวัง เพื่อรักษาสภาพการเป็นเกษตรอินทรีย์และคุณภาพที่สำคัญของผลิตภัณฑ์ในทุกขั้นตอน (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2557)

2.1.2 การรับรองมาตรฐานเกษตรอินทรีย์ในประเทศไทย

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช.) กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ได้ดำเนินการจัดทำมาตรฐานเกษตรอินทรีย์และการรับรองมาตรฐานสินค้าเกษตรอินทรีย์ของไทยตามมาตรฐานสินค้าเกษตร (มกษ.) โดยตรวจสอบและรับรองกระบวนการผลิตทุกขั้นตอนจากฟาร์มจนถึงมือผู้บริโภค ตั้งแต่ระบบการผลิต การแปรรูป การบรรจุ การแสดงฉลาก และการจำหน่าย เพื่อให้เป็นที่น่าเชื่อถือและยอมรับในระดับสากล และเมื่อวันที่ 10 กรกฎาคม ปีพ.ศ. 2555 คณะรัฐมนตรีมีมติอนุมัติกฎกระทรวงว่าด้วยการกำหนดลักษณะของเครื่องหมาย การใช้เครื่องหมาย และการแสดงเครื่องหมายรับรองมาตรฐานกับสินค้าเกษตรอินทรีย์ และได้ประกาศใช้เครื่องหมาย Organic Thailand เพื่อให้สินค้าเกษตรอินทรีย์ที่ได้รับการตรวจรับรองตามมาตรฐานเกษตรอินทรีย์ระดับประเทศ สามารถใช้ตรารับรองมาตรฐานแบบเดียวกัน (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2557) ดังแสดงในรูปที่ 2.1

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูปที่ 2.1 ตราสัญลักษณ์ Organic Thailand
ที่มา : http://www.greennet.or.th/news/1324

จากข้อมูลของกองนโยบายและแผนพัฒนาการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ในปี 2562 ประเทศไทยมีเกษตรกรที่ผ่านการรับรองมาตรฐานเกษตรอินทรีย์จานวน 40,774 ราย โดยสินค้าเกษตรอินทรีย์ส่งออกที่สำคัญของไทย ได้แก่ ข้าว มะพร้าวอ่อน มังคุด ทุเรียน ใบชาเขียว และกะทิสำเร็จรูป (Office of Agricultural Economics, 2019) นอกจากนี้ สินค้าเกษตรอินทรีย์อื่นๆ ยังได้รับความนิยมและกระแสตอบรับจากผู้บริโภคต่อเนื่อง รวมไปถึงกลุ่มสินค้าจากน้ำนมและผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์ ทำให้เกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมหันมาสนใจที่จะปรับเปลี่ยนวิธีการเลี้ยงโคนมเป็นแบบระบบอินทรีย์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

2.2 ฟาร์มโคนมอินทรีย์

การเลี้ยงโคนมในระบบฟาร์มโคนมอินทรีย์ได้ริเริ่มขึ้น โดยฝ่ายวิจัยและพัฒนาการเลี้ยงโคนมขององค์กรส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย (อ.ส.ค.) เมื่อวันที่ 6 มิถุนายน 2554 จนถึงปัจจุบัน เพื่อเป็นต้นแบบให้แก่เกษตรกรได้เข้ามาศึกษาเรียนรู้ รวมทั้งส่งเสริมและสนับสนุนการ พัฒนาระบบการผลิตให้ได้ตามมาตรฐานโคนมอินทรีย์ ทั้งยังมีตลาดรองรับน้ำนมดิบอินทรีย์เพื่อผลิตเป็นนมพร้อมดื่มและผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์ (องค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย, 2562) ในปัจจุบันประเทศไทยมีฟาร์มโคนมที่ได้รับการรับรองปศุสัตว์อินทรีย์ จากกรมปศุสัตว์ ทั้งสิ้น 11 ฟาร์ม ในเขตพื้นที่จังหวัดสระบุรีและนครราชสีมา โดยมีแม่โคจากฟาร์มโคนมอินทรีย์รวมทั้งสิ้นประมาณ 1,000 ตัว ซึ่งให้ปริมาณน้ำนมรวมทั้งสิ้นประมาณ 800

ตัน/ปี (สำนักงานพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าปศุสัตว์, 2563) การเลี้ยงโคนมในระบบฟาร์มโคนมอินทรีย์ต้องอาศัยหลักการของเกษตรอินทรีย์เพื่อที่จะได้ผลผลิตเป็นน้ำนมอินทรีย์ ซึ่งต้องมาจากมาตรฐานปศุสัตว์อินทรีย์ของกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ โดยมีหลักการทั่วไปของการผลิตโคนมและน้ำนมอินทรีย์ (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2561) ดังนี้

2.2.1 พื้นที่เลี้ยงสัตว์

การเลือกพื้นที่ทำฟาร์มโคนมอินทรีย์ พื้นที่นั้นต้องได้รับการรับรองเป็นพื้นที่เกษตรอินทรีย์ โดยต้องทราบประวัติและข้อมูลการใช้ประโยชน์ของพื้นที่โดยเฉพาะด้านการเกษตรและต้องไม่มีการไม่ใช้สารเคมีในพื้นที่อย่างน้อย 1 ปี เพื่อลดความเสี่ยงต่อการเกิดการตกค้างของสารเคมี ตลอดจนมีพื้นที่ในการปลูกพืชอาหารสัตว์สำหรับเลี้ยงโคนมและเพียงพอสำหรับการปล่อยสัตว์แทะเล็ม (กรองแก้ว บริสุทธิ์สวัสดิ์, 2561)

2.2.2 การปรับเปลี่ยนฝูงโค

ฟาร์มหรือพื้นที่ที่ได้รับการรับรองเป็นเกษตรอินทรีย์ เมื่อมีการนำสัตว์จากฟาร์มที่ไม่ได้รับการรับรองปศุสัตว์อินทรีย์มาใช้ในการผลิต ผลิตผลและผลิตภัณฑ์ที่วางขายเป็นอินทรีย์ได้ ต้องมีการปรับเปลี่ยนเข้าสู่ระบบปศุสัตว์อินทรีย์พร้อมกันทั้งโคนม พื้นที่เลี้ยงสัตว์ รวมถึงพื้นที่เพาะปลูก โดยระยะการปรับเปลี่ยนนับเริ่มตั้งแต่ได้นำมาตรฐานเกษตรอินทรีย์และปศุสัตว์อินทรีย์มาใช้และสมัครขอรับการรับรองต่อหน่วยรับรอง พร้อมทั้งดำเนินการตามที่กำหนดใน มกษ. 9000 ตามมาตรฐานเกษตรอินทรีย์และปศุสัตว์อินทรีย์ (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2561)

2.2.3 แหล่งที่มาของสัตว์

การเลือกใช้ชนิด พันธุ์ สายพันธุ์ปศุสัตว์และเทคนิคการขยายพันธุ์ปศุสัตว์ให้เป็นไปตามหลักการเกษตรอินทรีย์ (กรองแก้ว บริสุทธิ์สวัสดิ์, 2561) ดังนี้

- ความสามารถในการปรับตัวของสัตว์ในสภาพแวดล้อมการผลิต
- ความสามารถในการต้านทานโรค โดยการเลือกชนิด พันธุ์ สายพันธุ์ปศุสัตว์ ที่มีลักษณะทางพันธุ์กรรมที่ทนทานต่อโรค
- สัตว์ที่ใช้สำหรับการผลิตปศุสัตว์อินทรีย์ต้องเกิดในฟาร์มที่มีการจัดการตามระบบการเกษตรอินทรีย์ และเกิดจากพ่อแม่พันธุ์ที่มีการจัดการตามระบบเกษตรอินทรีย์
- สัตว์ต้องถูกเลี้ยงในระบบอินทรีย์ตลอดช่วงชีวิต และไม่เปลี่ยนรูปแบบการเลี้ยงสัตว์ไปมาระหว่างการเลี้ยงระบบอินทรีย์และระบบที่ไม่ใช่อินทรีย์
- ห้ามใช้ยาปฏิชีวนะในระบบการผลิตปศุสัตว์อินทรีย์
- ห้ามใช้ฮอร์โมนสังเคราะห์และการย้ายฝากตัวอ่อน

2.2.4 การจัดการฟาร์มทั่วไป

การจัดการฟาร์มในระบบการผลิตปศุสัตว์อินทรีย์ ต้องคำนึงถึงหลัก สวัสดิภาพของสัตว์ (Animal Welfare) เป็นการดูแลการเลี้ยงสัตว์อย่างเอาใจใส่ มีอาหารอินทรีย์ที่มีคุณภาพและปริมาณที่เพียงพอต่อสัตว์ตลอดทั้งปี จำนวนโคนมที่เลี้ยงต้องสมดุลกับแหล่งพืชอาหารสัตว์ โดยพิจารณาความหนาแน่นของโคนมกับพื้นที่ภายในฟาร์มที่ไม่มีผลกระทบต่อดินและแหล่งน้ำ เพื่อให้ความสุขสบายทั้งร่างกายและจิตใจของสัตว์ โดยแผนการจัดการฟาร์ม ต้องประกอบด้วย การวางแผนป้องกันสารปนเปื้อน, การวางแผนการเลี้ยงโคนมอินทรีย์, การวางแผนผังฟาร์มและโรงเรือน และ การวางแผนการผลิตพืชอาหารสัตว์ (กรองแก้ว บริสุทธิ์สวัสดิ์, 2561)

2.2.5 อาหารสัตว์

อาหารสัตว์เป็นสิ่งสำคัญและจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของสัตว์เป็นอย่างมาก เมื่อแม่โคได้รับคุณค่าทางอาหารตามความต้องการอย่างครบถ้วนจะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตและให้ผล

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ผลิตได้อย่างเต็มที่ โดยอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงโคนมสามารถจำแนกออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ดังนี้ (Pattaraporn Tatsapong, 2013)

- อาหารหยาบ (roughages) หมายถึง วัตถุดิบที่มีเยื่อใยสูงกว่า 18 เปอร์เซ็นต์ (Pattaraporn Tatsapong, 2013) แบ่งออกเป็น 3 พวก คือ
    - อาหารหยาบสด (green roughages หรือ green forages) อาหารหยาบที่อยู่ในสภาพสด มี ความชื้นสูง 70 – 85 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ พืชที่ตัดสดมาให้สัตว์กิน (soilage) และพืชอาหารสัตว์ในทุ่งที่สัตว์เข้าไปแทะเล็ม (pasture)
    - อาหารหยาบแห้ง (dry roughages หรือ dry forages) อยู่ในรูปที่มีความชื้นไม่เกิน 15 เปอร์เซ็นต์ เพื่อจุดประสงค์ในการเก็บรักษาไว้ใช้ในยามขาดแคลนอาหาร ตัวอย่างของอาหารหยาบแห้ง ได้แก่ พืชแห้ง (hay) ฟางข้าว (rice straws) ต้นแห้งของถั่วต่างๆ เปลือกหรือฟักข้าวโพด อีกด้วย
    - อาหารหยาบหมัก (ensile roughages หรือ ensile forages) อยู่ในรูปที่มีความชื้น 70 – 75 เปอร์เซ็นต์ ระดับ pH ประมาณ 4.2 ในหลุมหมักที่มีสภาพไร้ออกซิเจนเพื่อจุดประสงค์ในการเก็บรักษาไว้ ใช้ในยามขาดแคลนอาหาร ตัวอย่างอาหารหยาบหมัก ได้แก่ พืชหมัก (silage) แต่ถ้าใช้อาหารหยาบสดที่มีความชื้น 55 – 60 เปอร์เซ็นต์มาทำการหมัก เรียกว่า พืชหมักแห้ง (haylages)
- อาหารข้น (concentrate) หมายถึง วัตถุดิบที่มีความเข้มข้นของโภชนะต่อหน่วยน้ำหนักสูง มีเยื่อใยต่ำกว่า 18 เปอร์เซ็นต์ (Pattaraporn Tatsapong, 2013) แบ่งออกเป็น 2 พวก ได้แก่
    - อาหารหลักหรืออาหารพลังงาน (basal feed หรือ energy feed) คือ วัตถุดิบที่มีพลังงานสูงหรือ มีคาร์โบไฮเดรตมาก มีโปรตีนต่ำกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ ที่เรียกว่า

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

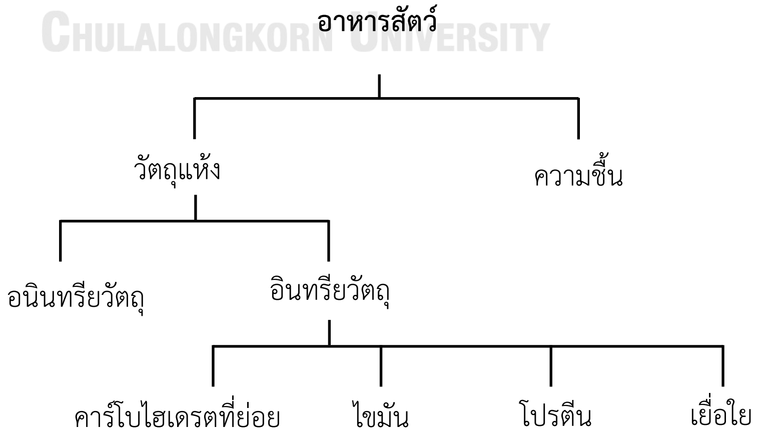
"อาหารหลัก" เพราะเป็นวัตถุดิบที่ใช้ใน ปริมาณมากถึง 50 – 80 เปอร์เซ็นต์ในการประกอบสูตรอาหารสัตว์

- อาหารเสริม (supplements) คือ วัตถุดิบที่เสริมลงไปในอาหารหลักในการประกอบสูตรอาหาร สัตว์เพื่อให้มีโภชนะครบสมบูรณ์ตามความต้องการของสัตว์

● อาหารผสมครบส่วน (total mixed ration, TMR) หรืออาหารผสมสำเร็จรูปที่ผลิตขึ้นมาจากการนำอาหารหยาบและอาหารข้นมาผสมกันในอัตราส่วนที่เหมาะสม โดยต้องคำนวณสัดส่วนของอาหารทั้ง 2 ชนิด จากน้ำหนักแห้งให้ได้ตามต้องการของโคแล้วนำไปเลี้ยงโคนม-โคเนื้อ แทนการเลี้ยงแบบเดิม (Pattaraporn Tatsapong, 2013)

อาหารสัตว์เป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อคุณภาพของน้ำนม ดังนั้นผู้เลี้ยงสัตว์จึงให้ความสำคัญในการตรวจวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการทั้งวัตถุดิบที่นำมาผลิตอาหารสัตว์และอาหารสัตว์ ซึ่งการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของอาหารสัตว์โดยทั่วไปจะใช้วิธีวิเคราะห์แบบ Proximate analysis โดยการใช้เครื่องมือเฉพาะเพื่อให้ทราบปริมาณโภชนะแต่ละชนิดในตัวอย่างอาหาร (วราพันธุ์ จินตณวิชญ์, 2559, วรรณี ชิวปรีชา, 2563) ในการวิเคราะห์จะแบ่งส่วนประกอบอาหารออกเป็น ทั้งหมด 6 ส่วน ประกอบไปด้วย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



รูปที่ 2.2 องค์ประกอบทางเคมีในอาหารสัตว์

- ความชื้น (moisture)

วัตถุดิบ/อาหารสัตว์ในสภาพทั่วไปจะมีความชื้นอยู่เสมอ หากอยู่ในสภาพแห้งต้องมีความชื้นไม่เกิน 14 เปอร์เซ็นต์จึงจะสามารถเก็บไว้ได้โดยไม่เกิดปัญหาจากเชื้อรา (วราพันธุ์ จินตณวิชญ์, 2559)

- โปรตีนรวม (crude protein)

โปรตีนคือกรดอะมิโนที่ต่อกันเป็นสายยาว ซึ่งในกรดอะมิโนมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ในการวิเคราะห์โปรตีนในอาหารสัตว์นั้น จะวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนและคำนวณกลับไปเป็นโปรตีนโดยใช้ปริมาณไนโตรเจนคูณด้วยแฟคเตอร์ (ค่าแฟคเตอร์ของโปรตีนในอาหารสัตว์เฉลี่ยเท่ากับ 6.25) ดังนั้นโปรตีนที่วิเคราะห์ได้อาจเป็นไนโตรเจนที่มาจากกรดอะมิโน ซึ่งถือว่าเป็นโปรตีนแท้ และไนโตรเจนที่ไม่ได้มาจากกรดอะมิโนนั้น ซึ่งเรียกว่า ไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน (non-protein nitrogen, NPN) (วราพันธุ์ จินตณวิชญ์, 2559, วรรณี ชิวปรีชา, 2563)

- ไขมัน (crude lipid, ether extract)

เป็นกลุ่มสารอินทรีย์ที่ละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น ปิโตรเลียมอีเธอร์ ไดคลอโรมีเทน ซึ่งสารที่สกัดได้ประกอบไปด้วยไขมัน น้ำมัน วิตามินที่ละลายได้ในไขมัน สารสี ขี้ผึ้ง กรดที่ระเหยง่าย เป็นต้น ค่าที่วิเคราะห์ได้จึงเรียกว่า สารสกัดอีเทอร์ (ether extract) หรือ ไขมันรวม (crude lipid) (วรรณี ชิวปรีชา, 2563)

- เยื่อใย (crude fiber)

เป็นสารอินทรีย์กลุ่มคาร์โบไฮเดรตที่มีองค์ประกอบส่วนใหญ่ประกอบไปด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิก ซึ่งเยื่อใยเป็นส่วนที่สัตว์กระเพาะเดี่ยวไม่สามารถย่อยและใช้ประโยชน์ได้แต่มีความสำคัญต่อการขับถ่ายของสัตว์ (วราพันธุ์ จินตณวิชญ์, 2559)

- เถ้า (ash)

ในส่วนของวัตถุแห้งจะประกอบไปด้วยสาร 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ สารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ ส่วนที่เป็นสารอินทรีย์ที่มีไฮโดรคาร์บอนเป็นองค์ประกอบสามารถสลายตัวเป็นไอน้ำและแก็สคาร์บอนไดออกไซด์ได้ ส่วนที่เหลือเป็นสารอนินทรีย์หรือเถ้ารวม ประกอบด้วยแร่ธาตุต่างๆ กับสารอนินทรีย์อื่นๆที่ปนเปื้อนในตัวอย่าง เช่น ทราย เป็นต้น (วรรณี ชิวปรีชา, 2563)

- คาร์โบไฮเดรตที่ย่อยได้ง่าย (nitrogen free extract : NFE)

คาร์โบไฮเดรตที่ย่อยได้ง่ายหมายถึงส่วนของแป้งและน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ ซึ่งเป็นค่าที่ไม่ได้จากการวิเคราะห์ แต่ได้จากการนำค่าต่างๆที่วิเคราะห์ได้จากข้างต้นทั้งหมดหักออกจากค่าวัตถุดิบแห้ง คือ NFE = 100 – moisture - ash - crude protein - crude lipid – crude fiber (วราพันธุ์ จินตณวิชญ์, 2559)

สำหรับอาหารสัตว์ที่ใช้ในระบบปศุสัตว์แบบอินทรีย์ วัตถุดิบทุกชนิดต้องคำนึงถึงคุณภาพและผลิตตามข้อกำหนดของเกษตรอินทรีย์ โดยเป็นไปตามข้อกำหนด (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2561) ดังต่อไปนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

- ในระยะเริ่มดำเนินการปรับเปลี่ยน อาหารโคนมที่ใช้ต้องมีวัตถุดิบที่ผลิตในระบบเกษตรอินทรีย์ในปริมาณไม่ต่ำกว่าร้อยละ 70 ของวัตถุแห้ง (dry matter)
- สัตว์กินพืชต้องได้รับอาหารหยาบในรูปสด แห้ง หรือหมักก็ได้เป็นหลัก อย่างน้อยต้องมีอาหารหยาบไม่ต่ำกว่าร้อยละ 60 ของวัตถุแห้งของอาหารต่อวัน
- สารเสริมในหญ้าหมักและสารช่วยกรรมวิธีการผลิต ต้องไม่เป็นสารที่ได้มาจากสิ่งมีชีวิตดัดแปรพันธุกรรม

- ห้ามใช้วัตถุดิบอาหารสัตว์ที่มาจากผลพลอยได้จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น เนื้อป่น กระดูกป่น เพื่อเป็นอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง ยกเว้น นมและผลิตภัณฑ์นม
- ห้ามใช้สารประกอบไนโตรเจนสังเคราะห์ หรือสารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน (non-protein nitrogen; NPN)
- วัตถุดิบอาหารสัตว์ที่ใช้เป็นแหล่งแร่ธาตุ วิตามิน หรือสารตั้งต้นของวิตามิน (provitamin) ในสูตรอาหาร ต้องมีแหล่งกำเนิดจากธรรมชาติ
- วัตถุที่เติมในอาหารสัตว์และสารช่วยกรรมวิธีการผลิต (feed additives and processing aids) เช่น สารที่ช่วยในการอัดเม็ด สารกันหืน สารปรุงแต่งสี กลิ่น รส และสารกระตุ้นความอยากอาหาร ต้องมาจากธรรมชาติ สารถนอมอาหารต้องมาจากกรดธรรมชาติ
- สามารถใช้สารเสริมชีวนะ (probiotics) เอนไซม์ และจุลินทรีย์ได้
- ห้ามใช้ยาปฏิชีวนะ ยากันบิด ยาแผนปัจจุบัน สารเร่งการเจริญเติบโต หรือสารอื่นใดในอาหารสัตว์เพื่อวัตถุประสงค์ในการเร่งการเจริญเติบโตหรือเพิ่มผลผลิต

2.2.6 การจัดการที่อยู่อาศัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การจัดการที่อยู่อาศัยต้องคำนึงถึงความเหมาะสมกับพฤติกรรมของสัตว์และสภาพภูมิอากาศ โรงเรือนเลี้ยงสัตว์ต้องมีลักษณะที่เหมาะสม สามารถกันแดด กันฝน มีแสงสว่างและการระบายอากาศตามธรรมชาติ พื้นที่เพียงพอไม่หนาแน่น รวมถึงสามารถเข้าถึงน้ำและอาหารได้ง่าย เพื่อให้สัตว์อยู่สบายและมีอิสระในการแสดงพฤติกรรมตามธรรมชาติ ระบบการเลี้ยงห้ามใช้คอกขังเดี่ยวหรือต้องปล่อยให้แม่โคยืนโรงตลอดเวลา ยกเว้นได้รับอนุญาตจากหน่วยรับรอง (กรองแก้ว บริสุทธิ์สวัสดิ์, 2561)

2.2.7 การจัดการด้านสุขภาพสัตว์

ในการเลี้ยงปศุสัตว์อินทรีย์เน้นการป้องกันโรคและการดูแลสุขภาพสัตว์ให้มีสุขภาพแข็งแรงและมีภูมิต้านทานโรคด้วยธรรมชาติ โดยเลือกสายพันธุ์โคที่เหมาะสมกับสภาพแวดล้อม ให้อาหารที่มีคุณภาพเพียงพอ รวมถึงการจัดการสวัสดิภาพสัตว์และความเป็นอยู่ที่ดีของสัตว์อย่างเหมาะสมและหมั่นตรวจสุขภาพสัตว์เป็นประจำด้วยการดู Body score ตามเกณฑ์มาตรฐาน 3.5 – 4 เพื่อส่งเสริมให้สัตว์มีสุขอนามัยที่ดี แข็งแรง และทนทานต่อโรค (ศูนย์ปศุสัตว์อินทรีย์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2553) หากในกรณีที่สัตว์เจ็บป่วยหรือได้รับบาดเจ็บต้องให้การรักษาโดยทันทีถ้าจำเป็นให้แยกสัตว์ป่วยออกจากฝูงและจัดให้อยู่ในโรงเรือนที่เหมาะสมและผู้ผลิตต้องจดบันทึกการรักษาอย่างละเอียดถึงชนิดของยา การใช้ยา และการปฏิบัติระยะหยุดยา รวมถึงวิธีการรักษา (กรองแก้ว บริสุทธิ์สวัสดิ์, 2561)

2.2.8 การจัดการรีดนมและน้ำนม

ต้องรักษาความเป็นอินทรีย์ตลอดทุกช่วงกระบวนการผลิต โดยโรงรีดนมและอุปกรณ์การรีดนม ต้องสะอาดและถูกสุขลักษณะ มีการใช้สารทำความสะอาดที่อนุญาตให้ใช้ได้ตามมาตรฐาน ถังบรรจุน้ำนมต้องระบุคำว่า “น้ำนมอินทรีย์” และคุณภาพของน้ำนมดิบ ต้องเป็นไปตามมาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 6003-2553 : น้ำนมดิบ (ศูนย์ปศุสัตว์อินทรีย์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2553)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.2.9 การจัดการของเสีย

การจัดการของเสียบริเวณที่ใช้เลี้ยงสัตว์ ต้องมีหลักการ ดังนี้ (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2561)

- ต้องไม่ทำลายทรัพยากรดินและน้ำ
- ไม่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนของไนเตรตและแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในดินและน้ำ

- ก่อให้เกิดการหมุนเวียนของธาตุอาหารในดินที่เหมาะสม
- หลีกเลี่ยงการเผาทำลายของเสีย ยกเว้นการเผาทำลายซากเพื่อควบคุมโรค
- พื้นที่ในการจัดเก็บของเสีย เช่น บ่อหมัก ควรออกแบบให้สามารถป้องกันการปนเปื้อนสู่ดินและแหล่งน้ำได้

2.2.10 การจัดการด้านเอกสาร

เอกสารและการบันทึกข้อมูลมีความสำคัญในการจัดการฟาร์ม เพื่อสามารถนำมาประมวลผล ประเมินสถานภาพการผลิตของฟาร์ม ทำให้การจัดการต่าง ๆ เป็นไปอย่างมีระบบและสามารถแก้ไขปัญหาและข้อบกพร่องในการตรวจรับรองมาตรฐานเกษตรอินทรีย์ได้อย่างถูกต้อง (กรองแก้ว บริสุทธิ์สวัสดิ์, 2561) โดยเอกสารประกอบไปด้วยข้อมูล ดังต่อไปนี้

- ผู้ผลิตต้องทำแผนการผลิตโคนมอินทรีย์ ซึ่งประกอบด้วย แผนผังฟาร์ม แปลงหญ้า หมายเลขแปลงหญ้าที่ชัดเจนและอธิบายวิธีการปฏิบัติ ขั้นตอนการปฏิบัติในการเลี้ยงโคนมอินทรีย์ และการรักษาความเป็นอินทรีย์ตลอดการผลิต
- มีฐานข้อมูลฝูงโคนม ทะเบียนประวัติ สัตว์ทุกตัวต้องมีหมายเลขประจำตัว
- มีเอกสารปัจจัยการผลิต แหล่งที่มา จำนวนที่นำเข้า เช่น ใบนำส่ง ใบเสร็จรับเงิน ใบรับรองความเป็นอินทรีย์
- มีเอกสารการดูแลสุขภาพสัตว์
- มีเอกสารการให้ผลผลิตน้ำนมและการจำหน่ายน้ำนมดิบ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จากหลักการข้างต้นจะเห็นได้ว่า ระบบการจัดการฟาร์มโคนมแบบเกษตรอินทรีย์มีกำหนดที่ค่อนข้างรัดกุมและมีความซับซ้อนในการจัดการขั้นตอนการผลิต ซึ่งทำให้น้ำนมที่ได้จากระบบการจัดการ

ฟาร์มโคนมอินทรีย์มีต้นทุนการผลิตที่ค่อนข้างสูง จึงจัดอยู่ในกลุ่มผลิตภัณฑ์ "พรีเมี่ยม (premium)" ที่มีมูลค่าและราคาสูงกว่าน้ำนมโคทั่วไป

2.3 น้ำนมดิบ

2.3.1 ความหมายและข้อมูลทั่วไปของน้ำนมโคดิบ (raw cow milk)

น้ำนมโคดิบ ตามมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ หมายถึง น้ำนมที่ได้จากแม่โคหลังคลอดลูกแล้วไม่น้อยกว่า 3 วัน ต้องไม่มีน้ำนมเหลือง (colostrum) ปน ไม่ผ่านการแยกองค์ประกอบอย่างใดอย่างหนึ่งของน้ำนมออก หรือเติมสารอื่นใด และไม่ผ่านกรรมวิธีใดๆ ยกเว้นการทำให้เย็น ซึ่งในมาตรฐานนี้จะใช้คำว่า น้ำนมดิบ (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2553) น้ำนมดิบสามารถแบ่งเป็นออกเป็น 3 ชั้นคุณภาพ (quality grade) ตามจำนวนจุลินทรีย์ เซลล์โซมาติก โปรตีน ไขมันและเนื้อนมทั้งหมด คือ ชั้นดีมาก (premium) ชั้นดี (good) และชั้นมาตรฐาน (standard) ดังแสดงในตาราง 2.1 โดยใช้เป็นแนวทางในการกำหนดเกณฑ์การซื้อขายน้ำนมดิบตามชั้นคุณภาพ

ตาราง 2.1 การแบ่งชั้นคุณภาพน้ำนมดิบตามคุณลักษณะ

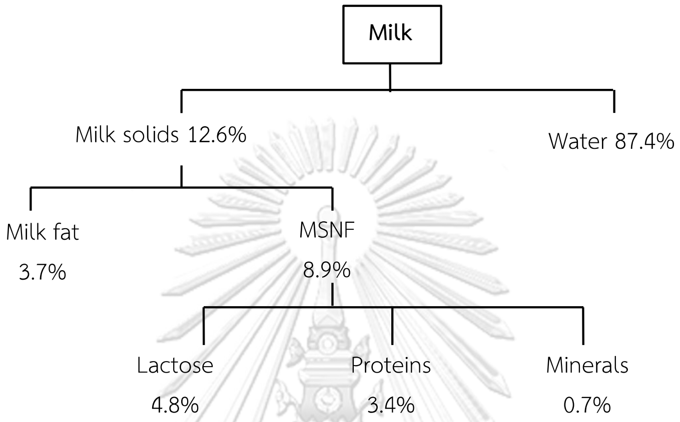
ที่มา : ประกาศสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2548 และประกาศสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2553

ชั้นคุณภาพ / **คุณลักษณะ**	**ชั้นดีมาก (premium)**	**ชั้นดี (good)**	**ชั้นมาตรฐาน (standard)**
1. จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (standard plate count)	< 200,000 colony/mL	200,000 ถึง < 400,000 colony/mL	400,000 ถึง 600,000 colony/mL
2. เซลล์โซมาติก (somatic cell)	< 200,000 cell/mL	200,000 ถึง < 350,000 cell/mL	350,000 ถึง 500,000 cell/mL
3. โปรตีน (protein)	> 3.4 %	> 3.2 ถึง 3.4 %	3.0 ถึง 3.2 %
4. ไขมัน (fat)	> 4.0 %	> 3.6 ถึง 4 %	3.2 ถึง 3.6 %
5. เนื้อนมทั้งหมด (total solid)	> 12.7 %	> 12.5 ถึง 12.7 %	12.3 ถึง 12.5 %

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.3.2 องค์ประกอบทางเคมีหลักของน้ำนม (major chemical composition of milk)

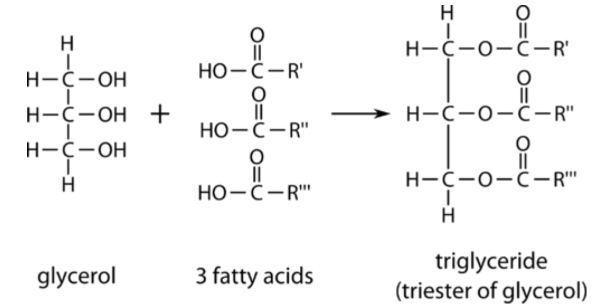
องค์ประกอบทางเคมีหลักในน้ำนม ประกอบด้วยน้ำ (87.4%) ไขมันนมหรือมันเนย (3.7%) และของแข็งในนมที่ไม่รวมไขมัน (8.9%) ซึ่งของแข็งในนมที่ไม่รวมไขมัน ประกอบด้วยแลคโตส (4.8%) โปรตีน (3.4%) แร่ธาตุ กรดอินทรีย์ และสารประกอบอินทรีย์อื่นๆ (0.7%) (Walstra *et al.,* 2005) ดังแสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 องค์ประกอบทางเคมีหลักในน้ำนม
ที่มา : Walstra et al. (2005)

2.3.2.1 ไขมันนม หรือมันเนย (fat)

ไขมันถูกสังเคราะห์จากสารอาหารหลายชนิด โดยมีลักษณะเป็นเม็ดไขมันขนาดเล็กกระจายอยู่ในน้ำนม น้ำนมส่วนใหญ่มีไขมันนมประมาณ ร้อยละ 3.5 – 5.0 ไขมันนมประกอบไปด้วยไตรกลีเซอไรด์ โดยโครงสร้างพื้นฐานของไตรกลีเซอไรด์จะประกอบไปด้วยกลีเซอรอลจำนวน 1 โมเลกุลและกรดไขมันจำนวน 3 โมเลกุล แสดงดังรูปที่ 2.4 (ดร.ปิยวรรณ ศุภวิทิตพัฒนา, 2556)



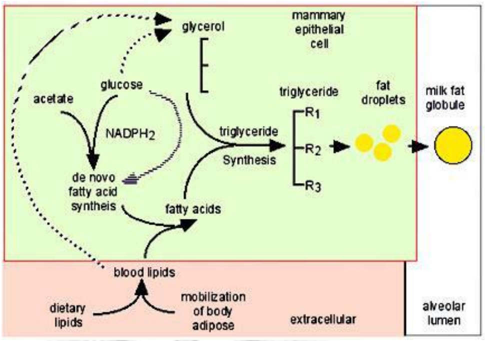
รูปที่ 2.4 โครงสร้างพื้นฐานของไตรกลีเซอไรด์
ที่มา : https://chem.libretexts.org/Triglycerides

กรดไขมันในไตรกลีเซอไรด์มีจำนวนคาร์บอนเป็นเลขคู่พบทั้งกรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัว กรดไขมันอิ่มตัวจะมีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 4 - 26 อะตอม ประมาณ 60% ของกรดไขมันทั้งหมด ส่วนกรดไขมันไม่อิ่มตัวมีประมาณ 40% แบ่งออกเป็น (i) กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หนึ่งตำแหน่ง (monounsaturated fatty acid) และ (ii) กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่าหนึ่งตำแหน่ง (polyunsaturated fatty acid) ประมาณ 2% ของกรดไขมันทั้งหมด (อรพิน ชัยประสพ, 2547) โดยชนิดของกรดไขมันในนมขึ้นอยู่กับชนิดของกรดไขมันในอาหาร ซึ่งสัดส่วนของกรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัวในน้ำนมมีผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพของไขมันและการเปลี่ยนแปลงของกลิ่นและรสของน้ำนมได้

การสังเคราะห์ไขมันนมในสัตว์เคี้ยวเอื้อง มีสารตั้งต้นมาจาก 2 แหล่ง คือ (i) อาหารที่โคกินเข้าไป แล้วย่อยสลายสารอาหารให้กลายเป็น volatile fatty acid (VFA) ที่สำคัญสองตัวคือ acetic และ β-hydroxy-butyric acids (BHBA) โดย BHBA จะนำมาใช้สังเคราะห์กรดไขมันสายสั้นๆ ใน secretory cell ส่วน acetic acid จะนำมาใช้สร้างกรดไขมันสายสั้น (C4-C14) และ (ii) เป็นไขมันโดยตรงที่มาจากอาหารหรือจากจุลินทรีย์สร้างขึ้น ซึ่งจะได้รับการดูดซึมที่ลำไส้ในรูปไตรกลีเซอไรด์และพบในกระแสเลือด จากนั้นจะถูก hydrolyze ที่ผนังเส้นเลือดฝอยกลายเป็นกรดไขมัน, กลีเซอรอล และโมโนเอซิลกลีเซอรอล นอกจากนี้ ร่างกายโคยังสามารถสลายเนื้อเยื่อไขมัน (adipose tissue) เผาผลาญให้ได้เป็นกรดไขมันอิสระเข้าสู่กระแสเลือดได้ด้วย secretory cell ซึ่งจะใช้กรดไขมันเหล่านี้มาสังเคราะห์เป็นกรดไขมันสายยาวในน้ำนม (มีจำนวนคาร์บอนมากกว่า C14) โดยจะพบในรูป C18 มากที่สุดและ C16 ประมาณหนึ่งในสามของไขมันน้ำนมทั้งหมด (ธนวัฒน์ ผลเกิด, 2560) การสังเคราะห์ของกรดไขมันและกลีเซอรอลอาจจะเกิดใน mitochondria แต่ส่วนใหญ่จะเกิดใน cytoplasm แล้วรวมกันเป็นไตรกลีเซอไรด์ ที่ rough endoplasmic recticulum (RER) จากการรวมตัวระหว่างกรดไขมัน 3 โมเลกุลกับกลีเซอรอล 1 โมเลกุล จากนั้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ไตรกลีเซอไรด์จะรวมกันเป็นอณูเล็กที่เรียกว่า fat globule ซึ่งเป็นลักษณะของเม็ดไขมันที่ถูกหุ้มด้วยเยื่อบางๆ เม็ดไขมันเหล่านี้จะเคลื่อนตัวต่อไปยังผิวเซลล์และหลุดออกจากเซลล์เข้าไปในช่องของกระเปาะถุงเก็บนม (alveolus) ดังแสดงในรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 การสังเคราะห์ไขมันในน้ำนม

ที่มา: http://sutir.sut.ac.th:8080/sutir/bitstream/123456789/7472/2/Fulltext.pdf

2.3.2.2 โปรตีน (protein)

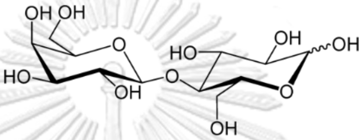
น้ำนมมีโปรตีนประมาณร้อยละ 3-4 ปริมาณโปรตีนจะผันแปรขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมต่างๆ เช่น อาหาร และ ฤดูกาล เป็นต้น โปรตีนในน้ำนมแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ เคซีน (casien) และโปรตีนเวย์ (whey protein) โดยเคซีนจัดเป็นฟอสโฟโปรตีนมีประมาณร้อยละ 80 ของโปรตีนทั้งหมดในน้ำนม และเมื่อแยกเคซีนออกส่วนที่เหลือ เรียกว่า เวย์ ซึ่งมีประมาณร้อยละ 20 ของโปรตีนทั้งหมด (ดร.ปิยวรรณ ศุภวิทิตพัฒนา, 2556) การสังเคราะห์โปรตีนในน้ำนมจะเกิดขึ้นภายในเซลล์ โดยร่างกายจะนำกรดอะมิโนในเลือดมาเป็นสารตั้งต้นเพื่อสังเคราะห์เป็นโปรตีนนมชนิดต่างๆที่ secretory cell สารที่ได้จะถูกส่งผ่านไปยัง golgi apparatus จากนั้น โปรตีนนมที่สร้างทั้งหมดจะถูกเก็บรวมเป็นถุงที่เรียกว่า micelles ซึ่งจะเคลื่อนที่จากกลางเซลล์ ไปยังผิวของ secretory cell และแตกออกเพื่อปลดปล่อยให้โปรตีนไหลเข้าไปในกระเปาะนมเก็บนม (alveolus) จากนั้น โปรตีนและน้ำตาลแลคโตสในน้ำนมจะถูกขนส่งไปที่ส่วน apical membrane ของเซลล์ ผ่านทาง secretory vesicles โดยที่เยื่อหุ้มของ secretory vesicles จะ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

เชื่อมรวมต่อกันกับพื้นผิวด้านในของ apical membrane ทำให้ของเหลวสามารถผ่านไปสู่โพรงของ alveoli ได้สะดวกยิ่งขึ้น (ธนวัฒน์ ผลเกิด, 2560)

2.3.2.3 น้ำตาลแลคโตส (lactose)

น้ำตาลแลคโตสเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ที่พบได้ในน้ำนมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยเกิดจากน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 2 ชนิด คือ น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลกาแลคโตส มาต่อกันด้วยพันธะ 1,4 β-galactoside ดังแสดงในรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 โมเลกุลน้ำตาลแลคโตส
ที่มา : https://th.wikipedia.org/wiki/แลคโตส

การสังเคราะห์แลคโตสเกิดขึ้นจากสารตั้งต้นในเลือด คือ กลูโคส เป็นการสังเคราะห์ที่ golgi apparatus ภายในเซลล์ โดยอาศัยปริมาณกลูโคสจากเลือดถึง 80% ซึ่งการสังเคราะห์เริ่มต้นจาก น้ำย่อยที่อยู่ในรูป galactosyltransferase จะมาเป็นตัวย้าย galactosyl group ไปยังน้ำตาลกลูโคสทำให้ได้เป็นน้ำตาลแลคโตส จากนั้นน้ำตาลแลคโตสที่สังเคราะห์ได้จะมีการเคลื่อนที่ผ่านเซลล์เข้าไปในภายในกระเปาะนม (alveolus) โดยกระบวนการ osmotic pressure จากบริเวณที่มีความเข้มข้นสูงในเซลล์ไปยังบริเวณที่มีความเข้มข้นต่ำภายในกระเปาะนม ซึ่งอัตราการสังเคราะห์น้ำตาลแลคโตสจะขึ้นกับโปรตีนเฉพาะชื่อ α-lactalbumin ที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ lactose synthase โดยจะทำหน้าที่ไปกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาการรวมตัวกันระหว่างกลูโคสกับกาแลคโตส (ธนวัฒน์ ผลเกิด, 2560)

CHULALONGKORN UNIVERSITY

2.3.2.4 วิตามิน (vitamins)

- วิตามินที่ละลายได้ในไขมัน (fat soluble vitamin) ได้แก่ วิตามิน A, วิตามิน D และ วิตามิน E พบมากในส่วนไขมันเนย (butter fat) (ดร.ปิยวรรณ ศุภวิทิตพัฒนา, 2556)
- วิตามินที่ละลายได้ในน้ำ (water soluble vitamin) ได้แก่ วิตามิน B; วิตามิน B1, วิตามิน B2, วิตามิน B6 และ วิตามิน B12 และวิตามินซี (ascorbic acid) วิตามินซีมีอยู่ในน้ำนม ไม่มากนักเมื่อเทียบกับผักผลไม้ทั้งยังสูญเสียไปในกระบวนการ เช่น กระบวนการพาสเจอร์ไรส์ ประมาณ 20% และกระบวนการสเตอริไลส์ ประมาณ 50% เป็นต้น (อรพิน ชัยประสพ, 2547)

2.3.2.5 แร่ธาตุ และเกลือแร่ (minerals and salts)

น้ำนมเป็นอาหารที่มีแร่ธาตุชนิดต่าง ๆ เป็นส่วนประกอบมากที่สุด ซึ่งเป็นสารอาหารที่สำคัญและจำเป็นต่อร่างกาย ปริมาณแร่ธาตุทั้งหมดในน้ำนมที่อยู่ในรูปของเถ้ามีประมาณร้อยละ 0.7 ปริมาณแร่ธาตุในน้ำนมผันแปรได้ตามปัจจัยต่างๆ ได้แก่ อาหาร ฤดูกาล สายพันธุ์ และระยะการหลั่งน้ำนม โดยปริมาณแร่ธาตุจะเพิ่มขึ้นในช่วงของการให้น้ำนมในระยะท้ายๆ (ดร.ปิยวรรณ ศุภวิทิตพัฒนา, 2556)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

2.3.2.6 สารประกอบอินทรีย์อื่นๆ

นอกจากองค์ประกอบทางเคมีหลักที่พบในน้ำนมแล้วยังพบองค์ประกอบย่อยหรือสารประกอบอินทรีย์ที่พบในน้ำนม โดยปกติจะได้จากการสังเคราะห์จากเซลล์กลั่นน้ำนมและบางส่วนเกิดจากการทำงานของแบคทีเรียหรือเอนไซม์ที่แบคทีเรียสร้าง ทำให้เกิดสารประกอบอินทรีย์ขึ้น (Walstra *et al.*, 2005) สารประกอบที่แปรสภาพมาจากอาหารสัตว์ สารประกอบที่เกิดจากกระบวนการสังเคราะห์น้ำนม เช่น กรดอะมิโน ครีเอติน รวมทั้งแอมโมเนีย ตลอดจนสารที่ได้จากการย่อยสลายเอนไซม์ ได้แก่ ซัลไฟด์ และสารประกอบคาร์บอนิล

2.4 อิทธิพลที่เกี่ยวข้องกับการจัดการฟาร์มโคนมที่ส่งผลต่อองค์ประกอบทางเคมีและคุณภาพของน้ำนม

การจัดการฟาร์มโคนมที่ดีตามมาตรฐานจะส่งผลต่อคุณภาพและองค์ประกอบทางเคมีในน้ำนมดิบ เกษตรกรจึงจำเป็นต้องมีระบบการจัดการฟาร์มที่ดี เพื่อพัฒนาคุณภาพของน้ำนมดิบและเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตน้ำนม โดยองค์ประกอบทางเคมีและคุณภาพของน้ำนมจะผันแปรขึ้นอยู่กับอิทธิพลหลากหลายด้าน ดังต่อไปนี้

2.4.1 สายพันธุ์ (cow breeds)

โคนมในแต่ละสายพันธุ์จะมีลักษณะการให้น้ำนมที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน เช่น โคนมสายพันธุ์โฮลสไตล์ฟรีเชี่ยนเป็นโคนมที่ให้ผลผลิตน้ำนมในปริมาณสูงกว่าโคทุกสายพันธุ์แต่ปริมาณของไขมันในน้ำนมต่ำ (3.7%) ส่วนโคนมพันธุ์เจอร์ซี่เป็นโคนมสายพันธุ์เล็กให้ปริมาณน้ำนมปานกลางแต่ปริมาณของไขมันในน้ำนมสูง (4.9%) (รัฐกร มิรัตนไพร, 2555) รวมถึงลักษณะทางสรีรวิทยาและกรรมพันธุ์ของโคแต่ละตัวมีความแตกต่างกันเลยเป็นผลให้แม่โคสายพันธุ์เดียวกันแต่คนละตัวอาจมีองค์ประกอบทางเคมีในน้ำนมแตกต่างกันได้ (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2557)

2.4.2 อายุ (age) และระยะของการให้น้ำนม (stage of lactation)

โคสาวจะสามารถเริ่มให้น้ำนมได้เมื่ออายุประมาณ 2-3 ปี ซึ่งร่างกายและอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบการสร้างน้ำนมยังเจริญเติบโตไม่เต็มที่ ดังนั้นปริมาณน้ำนมที่โคสาวให้จะต่ำกว่าโคที่เจริญเติบโตมากกว่าและน้ำนมจะเพิ่มมากขึ้นจนสูงสุดเมื่อมีอายุประมาณ 6-7 ปี จากนั้นปริมาณน้ำนม, ร้อยละของไขมันนมและร้อยละของของแข็งไม่รวมไขมันจะลดลง (รัฐกร มิรัตนไพร, 2555) และแม่โคที่ตั้งท้องจะมีผลทำให้ปริมาณผลผลิตของน้ำนมลดลงได้ถึง 20% โดยเฉพาะในช่วงปลายของการตั้งท้อง (5 เดือนขึ้นไป) เนื่องจากโภชนะบางส่วนถูกนำไปใช้เพื่อพัฒนาการเจริญเติบโตของตัวอ่อนและหลังจากแม่โคคลอดลูกปริมาณของน้ำนมที่ได้จะเพิ่มขึ้นจนกระทั่งถึงระยะที่ให้น้ำนมสูงสุด (peak of lactation) ช่วงประมาณ 3-6

สัปดาห์หลังจากคลอดลูก และหลังจากนั้นผลผลิตของน้ำนมของโคจะลดลง แต่ปริมาณไขมันจะเพิ่มสูงขึ้น (อรพิน ชัยประสพ, 2547)

2.4.3 ชนิดของอาหาร (types of feed)

โภชนะที่ใช้ในการสร้างน้ำนมมาจาก 2 แหล่ง คือ (i) อาหารที่กินและ (ii) อาหารที่สะสมในร่างกาย ทั้งสองแหล่งจะมีผลต่อปริมาณสารอาหารที่ใช้ในการสังเคราะห์น้ำนม จากรูปแบบของการให้น้ำนมโคตลอดช่วงของการรีดนมนั้นจะต้องมีการปรับความต้องการอาหารของโคให้สอดคล้องกับระยะของการให้ผลผลิต เพื่อให้โคนมได้รับอาหารอย่างเพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย เนื่องจากปริมาณน้ำนมที่ได้มีผลมาจากระดับของโภชนะที่ได้รับ ถ้าได้รับโภชนะต่ำกว่าปกติจะมีผลทำให้ปริมาณน้ำนมที่ได้และน้ำตาลแลคโตสในน้ำนมลดลงอย่างชัดเจน (รัฐกร มิรัตนไพร, 2555) นอกจากนี้ ลักษณะของอาหารก็มีผลต่อองค์ประกอบของน้ำนมด้วย ถ้าสัตว์ได้รับอาหารที่มีสารเยื่อใยต่ำหรือได้รับอาหารหยาบน้อยจะมีผลทำให้ปริมาณไขมันในน้ำนมลดลงแต่จะไม่มีผลต่อปริมาณของน้ำนมถ้าได้รับอาหารข้นเพียงพอ (อรพิน ชัยประสพ, 2547)

2.4.4 สุขภาพของแม่โค (health status of the cows)

โรคเต้านมอักเสบเป็นโรคที่ทำให้แม่โคให้น้ำนมลดลง โดยเกิดจากการติดเชื้อ เช่น *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringen* และ *Staphylococcus aureus* เป็นต้น ผลของโรคเต้านมอักเสบทำให้ปริมาณไขมันและ potassium ลดลง ส่วน blood serum albumin, immunoglobulins, sodium และ chloride เพิ่มขึ้น รวมทั้งปริมาณ somatic cell count (SCC) ก็เพิ่มขึ้นด้วย (อรพิน ชัยประสพ, 2547)

2.4.5 ฤดูกาล (season)

ฤดูกาลที่แตกต่างกันส่งผลให้สภาพแวดล้อมและสภาพภูมิอากาศเกิดการเปลี่ยนแปลง เช่น อุณหภูมิ ปริมาณน้ำฝน ความชื้นสัมพัทธ์ เป็นต้น ซึ่งข้อมูลดังกล่าวมีความสัมพันธ์ต่อชนิดของอาหารสัตว์ สุขภาพของแม่โค รวมถึงปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบทางเคมีในน้ำนมด้วย (Alhussien and Dang, 2018) โดยมีตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาอิทธิพลของฤดูกาลที่ส่งผลต่อคุณภาพของน้ำนม เช่น งานวิจัยของ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Umam *et al*. (2017) รายงานว่า ปริมาณไขมันและน้ำตาลแลคโตสลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ในช่วงฤดูร้อน ในขณะที่ปริมาณ somatic cell ในช่วงฤดูร้อนจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) เมื่อเทียบกับช่วงฤดูหนาว (Umam *et al.,* 2017) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Maciuc *et al*. (2017) รายงานว่า ปริมาณไขมันและโปรตีนในช่วงฤดูร้อนจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) เมื่อเทียบกับช่วงฤดูหนาว ซึ่งเป็นผลมาจากความผันแปรของฤดูกาลและการจัดการฟาร์มโคนมที่ส่งผลต่อสุขภาพของแม่โคและองค์ประกอบทางเคมีในน้ำนม (Maciuc *et al.*, 2017) สำหรับในประเทศไทย งานวิจัยของ Yeamkong *et al*. (2010) ได้ศึกษาอิทธิพลของฤดูกาลต่อปริมาณและคุณภาพของน้ำนมดิบที่ผลิตในประเทศไทย รายงานว่า ปริมาณไขมัน โปรตีน และแลคโตสของน้ำนมดิบในช่วงฤดูฝนมีปริมาณสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับฤดูร้อนและฤดูหนาว เนื่องจากชนิดและคุณภาพของอาหารสัตว์ รวมทั้งสุขภาวะของแม่โคมีความสัมพันธ์กับช่วงฤดูกาลที่แตกต่างกัน (Yeamkong *et al.,* 2010) นอกจากนี้ งานวิจัยของ Parmar *et al*. (2020) รายงานว่า น้ำนมดิบในช่วงฤดูร้อนมีปริมาณกรดไขมันสูงกว่าน้ำนมในฤดูกาลอื่นๆ เนื่องจากอิทธิพลของฤดูกาลที่แตกต่างกันจะส่งผลต่อชนิดและคุณภาพอาหารสัตว์เป็นอย่างมาก โดยในช่วงฤดูร้อนโคนมมีแหล่งอาหารเป็นหญ้าสดเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งอุดมไปด้วยกรดไขมันที่จำเป็นและสารอาหารสำหรับจุลินทรีย์ก่อให้เกิดกระบวนการหมักในกระเพาะอาหารของโคนม (Parmar *et al.,* 2020) งานวิจัยของ Liu *et al*. (2020) พบว่า อิทธิพลของระบบการจัดการฟาร์มและอาหารสัตว์ที่แตกต่างกัน ในช่วงฤดูกาลที่แตกต่างกันในรอบปียังส่งผลต่อปริมาณกรดไขมัน CLA และ PUFA (polyunsaturated fatty acid) ในน้ำนม โดยจะพบกรดไขมันดังกล่าวปริมาณสูงในช่วงฤดูร้อนเมื่อเทียบกับช่วงฤดูหนาวอย่างมีนัยสำคัญ (Liu *et al.,* 2020) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Collumb *et al*. (2008) ที่พบว่า ในช่วงฤดูร้อนปริมาณกรดไขมัน MUFA (monounsaturated fatty acid), PUFA (polyunsaturated fatty acid) และ CLA ในน้ำนมจะมีปริมาณสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับช่วงฤดูหนาว (Collomb *et al.,* 2008)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.5 อิทธิพลของการจัดการฟาร์มโคนมอินทรีย์ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบทางเคมีหลักในน้ำนม

งานวิจัยส่วนใหญ่รายงานว่า น้ำนมที่ได้จากการจัดการฟาร์มโคนมอินทรีย์ (organic dairy farming) จะมีการเปลี่ยนแปลงทั้งองค์ประกอบทางเคมีหลักแตกต่างไปจากเลี้ยงแบบทั่วไป (Boudonck *et al.,* 2009, Schwendel *et al.,* 2015, Liu *et al.*, 2020) ดังต่อไปนี้

- ไขมัน

งานวิจัยที่เกี่ยวกับปริมาณไขมันในน้ำนมที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปมีผลไม่สม่ำเสมอในแต่ละงานวิจัย (Schwendel *et al.,* 2015) กล่าวคือ งานวิจัยของ Hanus *et al.* (2008) และ Kuczysnka *et al.* (2012) รายงานว่าน้ำนมที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไปมีปริมาณไขมันมากกว่าน้ำนมที่ได้จากฟาร์มโคนอินทรีย์ เนื่องจากความแตกต่างของการจัดการด้านอาหารสัตว์ระหว่างฟาร์มทั้งสองรูปแบบ (Hanuš *et al.,* 2008, Kuczyńska *et al.,* 2012) ในขณะที่งานวิจัยของ Anacker *et al.* (2007) รายงานว่าน้ำนมที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์มีปริมาณไขมันมากกว่าน้ำนมที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไป โดยพบว่า ปริมาณอาหารหยาบแบบสดที่เพิ่มขึ้นในอาหารสัตว์และปริมาณหญ้าหมักที่เพิ่มขึ้นในช่วงฤดูร้อนส่งผลต่อคุณภาพและปริมาณกรดไขมันในน้ำนม (Anacker, 2007) ต่อมา Butler *et al.* (2011) พบว่า น้ำนมที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์มีกรดไขมันโอเมก้า 3 และ 6 มากกว่าน้ำนมที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไป (Butler *et al.,* 2011) เป็นผลมาจากความแตกต่างอาหารสัตว์มีความแตกต่างกัน นอกจากนี้ งานวิจัยของ Slots *et al.* (2009) และ Tunick *et al.* (2016) พบว่าน้ำนมที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์มีปริมาณกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่าหนึ่งตำแหน่งที่มีประโยชน์ในเชิงสุขภาพ เช่น conjugated linoleic acid (CLA, 18:2 c-9, t-11) (Slots *et al.,* 2009, Tunick *et al.,* 2016)

- โปรตีน

งานวิจัยที่เกี่ยวกับปริมาณโปรตีนในน้ำนมส่วนใหญ่จะไม่ผันแปรจากปัจจัยการจัดการฟาร์ม (Walker *et al.,* 2004) แต่จะผันแปรตามสายพันธุ์ของโคและระยะการให้น้ำนมอย่างมีนัยสำคัญ (Maurice-Van Eijndhoven *et al.,* 2011) งานวิจัยของ Vicini *et al.* (2008) และ Anacker (2007) รายงานว่าปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ในน้ำนมที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำนมที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไป (Anacker, 2007, Vicini *et al.,* 2008) อย่างไรก็ตาม งานวิจัยของ Kuczynska *et al.* (2012), Bilik and Lopuszanska-Rusek (2010), Sundberg *et al.* (2010) และ Hanus *et al.* (2008) รายงานว่าน้ำนมที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไปมีปริมาณโปรตีนสูงกว่าน้ำนมที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยเป็นผลมาจากความแตกต่างของ สายพันธุ์แม่โค การจัดการด้านอาหารสัตว์ รวมถึงสมดุลพลังงานที่ดีภายในตัวแม่โคและกระบวนการหมักที่แตกต่างกันในกระเพาะรูเมนของแม่โค (Hanuš *et al.,* 2008b, Bilik and Łopuszańska-Rusek, 2010, Müller and Sauerwein, 2010, Kuczyńska *et al.,* 2012)

- แลคโตส

งานวิจัยส่วนใหญ่ที่ศึกษาเกี่ยวกับปริมาณแลคโตส มีรายงานว่าไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ของปริมาณแลคโตสระหว่างฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป (Nauta *et al.,* 2006, Bilik and Łopuszańska-Rusek, 2010) อย่างไรก็ตาม งานวิจัยของ Kourimska *et al.* (2014) พบว่า น้ำนมที่ได้จากการเลี้ยงแบบทั่วไปมีปริมาณโปรตีนและแลคโตสสูงกว่าเมื่อเทียบกับการเลี้ยงแบบอินทรีย์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) เป็นผลมาจากปริมาณน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในอาหารสัตว์มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น (KouřimsKá *et al.,* 2014) ในขณะที่ งานวิจัยของ Zagorska และ Ciprovica (2008) รายงานว่าน้ำนมที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์มีปริมาณน้ำตาลแลคโตสสูงกว่าน้ำนมที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ซึ่งการแปรผัน

ของปริมาณแลคโตสน่าจะมีผลมาจากการจัดการฟาร์มและอาหารสัตว์ที่แตกต่างกัน (Zagorska and Ciprovica, 2008)

- วิตามินและแร่ธาตุ

งานวิจัยส่วนใหญ่ที่ศึกษาเกี่ยวกับวิตามินในน้ำนมจะให้ความสนใจกับปริมาณของ β-carotene และ α-tocopherol เนื่องจากเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งปริมาณวิตามินดังกล่าวจะมีปริมาณสูงในหญ้าสด (Swensson and Lindmark-Mansson, 2007, Mogensen *et al.*, 2012) Butler *et al.* (2008) และ Slots *et al.* (2008) รายงานว่า ปริมาณ β-carotene และ α-tocopherol ในน้ำนมที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์มีปริมาณสูงกว่าน้ำนมที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) เป็นอิทธิพลมาจากอาหารสัตว์ที่ส่งผลต่อปริมาณวิตามินในน้ำนม (Butler *et al.,* 2008, Slots *et al.,* 2009) ส่วนปริมาณแร่ธาตุในน้ำนมนั้น มีรายงานว่าจะขึ้นอยู่กับอิทธิพลจากพันธุกรรมของวัวแต่ละตัว (van Hulzen *et al.,* 2009) การจัดการฟาร์มโคนมและสภาพแวดล้อมโดยรอบ (Gabryszuk *et al.,* 2008)

นอกจากความผันแปรขององค์ประกอบทางเคมีหลักในน้ำนมที่ได้รับอิทธิพลจากระบบการจัดฟาร์มโคนมที่แตกต่างกันแล้ว ยังมีรายงานพบว่าการจัดการฟารม์โคนมแบบเกษตรอินทรีย์ส่งผลต่อสารเมตาบอไลต์ที่เป็นองค์ประกอบย่อยในน้ำนมด้วยเช่นกัน ปัจจุบันมีประยุกต์ใช้เทคนิคเคมีวิเคราะห์ขั้นสูงเพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบคุณภาพ โดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบทางเคมีในน้ำนมที่เป็นผลมาจากกระบวนการจัดการฟาร์มแบบอินทรีย์ เพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพและระบุอัตลักษณ์ของผลิตภัณฑ์กลุ่มดังกล่าว ซึ่งเทคโนโลยีเมตาโบโลมิกส์ถือเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่นำมาประยุกต์ใช้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของอาหารแทนวิธีการวิเคราะห์แบบดั้งเดิม (Schwendel *et al.,* 2015, Vallverdú-Queralt and Lamuela-Raventós, 2016, Smigic *et al.,* 2017)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.6 เทคโนโลยีเมตาโบโลมิกส์ (metabolomic technology)

เมตาโบโลมิกส์ หรืองานวิจัยบางส่วนใช้คำว่าการวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์หรือการรวบรวมข้อมูลสารเมตาบอไลต์เป็นศาสตร์หนึ่งในวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีโอมิกส์ที่เน้นการศึกษาสารชีวโมเลกุลขนาดเล็ก ซึ่งโดยทั่วไปมีขนาดต่ำกว่า 1.5 กิโลดาลตัน เช่น กรดนิวคลีอิค นิวคลีโอไทด์ กรดอะมิโน เพปไทด์สายสั้น กรดไขมัน น้ำตาล โอลิโกแซคคาไรด์ วิตามิน สารประกอบแอลกอฮอล์สารประกอบคาร์บอนิล กรดอินทรีย์ สารประกอบซัลเฟอร์ สารประกอบฟีนอลิก สารประกอบอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน ฯลฯ ที่สังเคราะห์โดยสิ่งมีชีวิตหรือเป็นองค์ประกอบของระบบชีวภาพชนิดใดชนิดหนึ่งโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อรวบรวมข้อมูลชนิดและปริมาณของสารเมตาบอไลต์ทั้งหมดหรือเมตาโบโลม ทั้งสารที่สังเคราะห์อยู่ภายในเซลล์ (intracellular) และสารที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular) ซึ่งเป็นผลผลิตจากวิถีเมตาบอลิซึม (metabolic pathway) เพื่อให้เกิดความเข้าใจแบบองค์รวม (holistic approach) ของระบบชีวภาพนั้นๆ โดยเป็นผลมาจากการแสดงออกทางพันธุกรรมร่วมกับการปรับตัวเพื่อตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อม (ศานต์ เศรษฐชัยมงคล, 2560) ในปัจจุบันเทคโนโลยีเมตาโบโลมิกส์มีการประยุกต์ใช้กันอย่างแพร่หลาย นอกจากจะใช้ศึกษาองค์ประกอบต่างๆในอาหารทั่วไปแล้ว ยังสามารถประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลต่างๆ ในน้ำนมและผลิตภัณฑ์นมได้

2.6.1 การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเมตาโบโลมิกส์ในการศึกษาองค์ประกอบทางชีวเคมีในน้ำนมและผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์

ปัจจุบันเทคโนโลยีเมตาโบโลมิกส์มีการนำมาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลในน้ำนมและผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์ เช่น การวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยาก (non-volatile metabolite) (Boudonck *et al.,* 2009, Rocchetti *et al.,* 2020, Sundekilde *et al.,* 2013) ข้อมูลกรดไขมัน (fatty acid profiles) (Tsiafoulis *et al.,* 2019, Liu *et al.*, 2020) และข้อมูลวิตามินในน้ำนม (Chung *et al.*, 2018) เป็นต้น ซึ่งความผันแปรของข้อมูลดังกล่าวที่สัมพันธ์กับอิทธิพลของระบบการจัดการฟาร์มแบบเกษตรอินทรีย์สามารถใช้ในการหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อระบุอัตลักษณ์ของน้ำนมโคอินทรีย์ได้

ตัวอย่างการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเมตาโบโลมิกส์ในน้ำนมและผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์ แสดงดังตาราง 2.2 โดยในงานวิจัยนี้จะสนใจการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากและข้อมูลกรดไขมันในน้ำนมอันเนื่องมาจากอิทธิพลของระบบการจัดการฟาร์มแบบเกษตรอินทรีย์

ตาราง 2.2 ตัวอย่างการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเมตาโลโลมิกส์ในน้ำนมและผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์

ข้อมูลที่ศึกษา	วัตถุประสงค์	เทคนิคที่ใช้วิเคราะห์	แหล่งที่มา
สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยาก	- ศึกษาข้อมูลสารเมตาบอไลต์เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างน้ำนมโคอินทรีย์และน้ำนมทั่วไป	^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR	Erich *et al.* (2015)
	- ศึกษาข้อมูลสารเมตาบอไลต์ในน้ำนมดิบจากฟาร์มที่ระบบการจัดการที่แตกต่างกัน	^{1}H-NMR	Tenori *et al.* (2018)
	- ศึกษาอิทธิพลของระบบการจัดการฟาร์มที่แตกต่างต่อข้อมูลสารเมตาบอไลต์ของของเหลวในกะเพราะรูเมนและน้ำนมดิบ	^{1}H-NMR	O’Callaghan *et al.* (2018)
	- ศึกษาข้อมูลสารเมตาบอไลต์จากผลิตภัณฑ์นมที่มีตราสินค้า, ระบบการจัดการฟาร์ม, ชนิดแพคเกจและวันหมดอายุที่แตกต่างกัน	GC-MS, LC-MS	Boudonck et al. (2009)
	- ศึกษาข้อมูลสารเมตาบอไลต์ในน้ำนมโคพาสเจอร์ไรส์เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างน้ำนมที่ได้จากระบบการจัดการฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป	^{1}H-NMR	Phuenpong *et al.* (2021)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ข้อมูลที่ศึกษา	วัตถุประสงค์	เทคนิคที่ใช้วิเคราะห์	แหล่งที่มา
	- ศึกษาข้อมูลสารเมตาบอไลต์และข้อมูลกรดไขมันของน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป	^{1}H-NMR	มาริสา คงบุญเกิด (2562)
กรดไขมัน	- ศึกษาข้อมูลกรดไขมันของน้ำนมโคพาสเจอร์ไรส์เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป	^{1}H-NMR	Tsiafoulis *et al.* (2019)
	- ศึกษาอิทธิพลของฤดูกาลต่อการเปลี่ยนแปลงข้อมูลกรดไขมันในน้ำนมดิบและอาหารสัตว์จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มทั่วไป	GC-FID	Liu *et al.* (2020)
	- ศึกษาข้อมูลกรดไขมันในน้ำนมโคอินทรีย์และน้ำนมโคทั่วไป	GC-MS	O’Donnell *et al.* (2010)
	- ศึกษาอิทธิพลของฤดูกาลและช่วงเวลารีดนมต่อการเปลี่ยนแปลงของข้อมูลกรดไขมันในน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มทั่วไป	GC-FID	Schwendel *et al.* (2015)
	- ศึกษาข้อมูลกรดไขมันในน้ำนมดิบที่ได้จากระบบการจัดการฟาร์มโคนมอินทรีย์และการเลี้ยงแบบปล่อยแปลง	GC-FID	Capuano *et al.* (2014)
	- ศึกษาอิทธิพลของระบบการจัดฟาร์มโคและฤดูกาลที่แตกต่างกันต่อข้อมูลกรดไขมันในน้ำนมที่ได้จากโคนม แกะ และแพะ	GC-MS	Tzamaloukas *et al.* (2021)

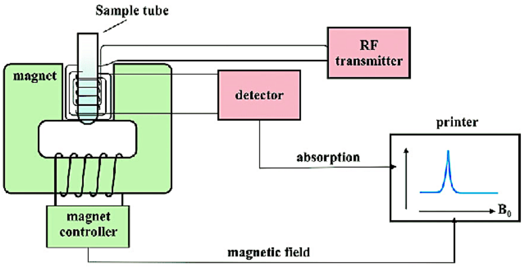
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ข้อมูลที่ศึกษา	วัตถุประสงค์	เทคนิคที่ใช้วิเคราะห์	แหล่งที่มา
วิตามิน	- ศึกษาปริมาณวิตามิน E และข้อมูลกรดไขมันในน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป	IRMS	Chung *et al.* (2018)

2.7 การวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากในน้ำนมด้วยเทคนิค Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR)

นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี ถือเป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการศึกษาด้านเมตาโบโลมิกส์ เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายในการเตรียมตัวอย่างและวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็วสามารถ พร้อมทั้งสามารถวิเคราะห์สารได้ในปริมาณมาก และเทคนิค NMR ยังสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้ในหลายสถานะทั้งที่เป็นของแข็ง, ของเหลวและเจล รวมถึงไม่ทำลายสมบัติทางธรรมชาติของสาร (Emwas *et al.,* 2019) ปัจจุบันเทคนิค NMR ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในการควบคุมคุณภาพและการวิจัยทางด้านวิทยาศาสตร์การอาหาร โดยสามารถ ระบุชนิดกลุ่มของสารที่เป็นองค์ประกอบทางเคมี รวมถึงวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารเมตาบอไลต์ที่เป็นองค์ประกอบในระบบอาหารที่สนใจได้ (PARlAk and Güzeler, 2016) เทคนิค NMR เป็นเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับการวัดระดับพลังงานที่แตกต่างกันของนิวเคลียสที่อยู่ภายใต้อิทธิพลของสนามแม่เหล็ก โดยมีหลักการ คือ เมื่อโมเลกุลของสารอยู่ในสนามแม่เหล็ก ระดับพลังงานของนิวเคลียสของธาตุซึ่งมีคุณสมบัติทางแม่เหล็กจะเปลี่ยนจากที่เดิมที่เท่ากันเป็นไม่เป็นเท่ากัน เมื่อมีการให้พลังงานช่วงความถี่ของคลื่นวิทยุที่เหมาะสม แต่ละนิวเคลียสจะดูดกลืนพลังงานที่ความถี่หนึ่งโดยเฉพาะ แล้วเปลี่ยนระดับพลังงานไปสู่พลังงานสูงขึ้น การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเรียกว่า การเกิดเรโซแนนซ์ (resonance) หลังจากนั้นนิวเคลียสจะคายพลังงานออกและลดไปสู่ระดับพลังงานที่ต่ำ ทำให้สามารถบันทึกสเปกตรัมของการดูดกลืนพลังงานที่ความถี่ต่าง ๆ กันของนิวเคลียสเหล่านั้นได้ แผนผังแสดงการทำงานของ NMR ดังแสดงในรูปที่ 2.7 (Zia *et al.,* 2019)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 2.7 แผนผังแสดงการทำงานของ NMR

ที่มา: Zia *et al.* (2019)

จากหลักการของ NMR ทำให้เทคนิคนี้มีประโยชน์ในการนำมาประยุกต์ใช้ในเคมีอินทรีย์และชีวเคมี เพื่อระบุ สารประกอบอินทรีย์และวิเคราะห์โครงสร้าง biopolymers (Hu *et al.*, 2004) ทำให้ในปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้เทคโนโลยี NMR based metabolomic ในการศึกษาองค์ประกอบทางชีวเคมีในผลิตภัณฑ์อาหารและผลิตภัณฑ์นมกันอย่างแพร่หลายมากขึ้น

เนื่องจากในน้ำนมมีองค์ประกอบทางชีวโมเลกุลที่ค่อนข้างซับซ้อน เทคนิค NMR สามารถวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ในน้ำนมชนิดที่ระเหยยาก (non-volatile) เช่น กรดอะมิโน กรดอินทรีย์ สารประกอบคาร์บอนิล สารประกอบอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน เป็นต้น (Boudonck *et al.*, 2009, Klein *et al.*, 2010, Rocchetti *et al.*, 2020) แม้ว่าองค์ประกอบเหล่านี้จะมีอยู่ในปริมาณเล็กน้อย แต่ก็มีความจำเป็นที่ต้องศึกษา เนื่องจากองค์ประกอบนี้มีความสัมพันธ์โดยตรงกับองค์ประกอบทางชีวเคมีและคุณภาพของประสาทสัมผัสของน้ำนมและผลิตภัณฑ์นม (ศานต์ เศรษฐชัยมงคล และมยุรี เหลืองวิลัย, 2560) ปัจจุบันมีการศึกษาข้อมูลสารเมตาบอไลต์ในน้ำนมและผลิตภัณฑ์นมด้วยเทคนิค NMR ดังแสดงในตาราง 2.3

ตาราง 2.3 ตัวอย่างการใช้ NMR ในการวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ในน้ำนมและผลิตภัณฑ์นม

ชนิดของตัวอย่าง	**วัตถุประสงค์ของการศึกษา**	**เทคนิคที่ใช้**	**แหล่งที่มา**
น้ำนมโค	- ศึกษาข้อมูลสารเมตาบอไลต์ในน้ำนมที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป	^{1}H-NMR	Erich *et al.* (2015)

ชนิดของตัวอย่าง	วัตถุประสงค์ของการศึกษา	เทคนิคที่ใช้	แหล่งที่มา
น้ำนมโค	- ศึกษาผลของอุณหภูมิและระยะเวลาในการเก็บรักษาของน้ำนมพาสเจอร์ไรส์ต่อการเปลี่ยนแปลงข้อมูลสารเมตาบอไลต์	NMR	Edwards *et al.* (2021)
	- ศึกษาข้อมูลสารเมตาบอไลต์ในน้ำนมจากฟาร์มที่ระบบการจัดการที่แตกต่างกัน	^{1}H-NMR	Tenori *et al.* (2018)
	- ศึกษาข้อมูลสารเมตาบอไลต์ในน้ำนมจากปัจจัยของอาหารที่แตกต่างกัน	^{1}H-NMR, FTIR	Sundekilde *et al.* (2015)
	- ศึกษาข้อมูลสารเมตาบอไลต์ในน้ำนมดิบที่ได้แม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการและไม่แสดงอาการ	^{1}H-NMR	Luangwilai *et al.* (2021)
น้ำนมเหลือง	- ศึกษาเปรียบเทียบข้อมูลสารเมตาบอไลต์ระหว่างน้ำนมเหลืองและน้ำนมโคในระยะเริ่มให้น้ำนม	^{1}H-NMR	O'Callaghan *et al.* (2021)
	- ศึกษาข้อมูลสารเมตาบอไลต์ในน้ำนมเหลืองของโค	^{1}H-NMR	Settachaimongkon *et al.* (2021)
น้ำนมแพะ	- ศึกษาข้อมูลสารเมตาบอไลต์เพื่อระบุอัตลักษณ์ของน้ำนมแพะ	^{1}H-NMR	Sanchez *et al.* (2021)
น้ำนมกระบือ	- ศึกษาข้อมูลสารเมตาบอไลต์ในน้ำนมกระบือจากปัจจัยด้านอาหารและการจัดการฟาร์มที่แตกต่างกัน	^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, ^{31}P-NMR	Mazzei and Piccolo (2018)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ชนิดของตัวอย่าง	วัตถุประสงค์ของการศึกษา	เทคนิคที่ใช้	แหล่งที่มา
น้ำนมโคและสัตว์อื่นๆ	- ศึกษาข้อมูลสารเมตาบอไลต์ในน้ำนมพันธุ์โฮลสไตล์และน้ำนมจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมชนิดอื่นๆ	^{1}H-NMR, LC-MS	Yang *et al.* (2016)
น้ำนมถั่วเหลือง	- ศึกษาข้อมูลสารเมตาบอไลต์ของน้ำนมถั่วเหลืองที่ทำการหมักด้วยจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Bacillus subtilis BSNK-5*	^{1}H-NMR	Gao *et al.* (2020)
โยเกิร์ตคงตัว	- ศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์ *S. thermophilus* ต่างสายพันธุ์กับ *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* จากสารเมตาบอไลต์ในโยเกิร์ตคงตัว	SPME-GC/MS, ^{1}H NMR	Settachaimongkon *et al.* (2014)
เนยแข็ง	- ศึกษาและระบุตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อวิเคราะห์คุณภาพของเนยแข็งที่มีระยะการบ่มแตกต่างกัน	^{1}H-NMR	Chen *et al.* (2021)

ในปัจจุบันมีการศึกษาข้อมูลสารเมตาบอไลต์ในน้ำนมโคอินทรีย์ด้วยเทคนิค NMR เช่น งานวิจัยของ O'Callaghan *et al.* (2018) ได้ศึกษาและวิเคราะห์ความแตกต่างข้อมูลสารเมตาบอไลต์ของน้ำนมดิบระหว่างระบบการจัดการฟาร์มแบบปล่อยสัตว์แทะเล็มทุ่งหญ้าและฟาร์มแบบทั่วไป โดยพบว่า ปริมาณของ acetone, acetylcarnitine, butyrate, capric acid, capryric acid, choline, creatinine, *D*-glucose, dimethyl sulfone, fumaric acid, hippuric acid, *L*-carnitine, methanol, *p*-cresol, propionate, orotic acid และ urea ที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์กับชนิดและคุณภาพของอาหารสัตว์ รวมถึงการจัดการฟาร์มที่แตกต่างกัน (O'Callaghan *et al.,* 2018) สำหรับประเทศไทย มาริสา คงบุญเกิด (2562) ได้ศึกษาข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลในน้ำนมดิบ พบว่าข้อมูลดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับระบบการจัดการฟาร์มโคนมและอาหารสัตว์ที่แตกต่างกัน โดยสามารถใช้ปริมาณสัมพัทธ์ของ 1,6-Anhydro-β-D-glucose, betaine,

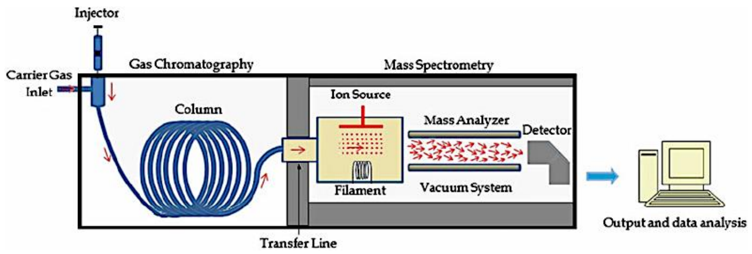
formate และ acetylcarnitine เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อแยกความแตกต่างระหว่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปได้ (มาริสา คงบุญเกิด, 2562)

2.8 การวิเคราะห์ข้อมูลกรดไขมันในน้ำนมด้วยเทคนิค Gas chromatography-mass spectroscopy (GC-MS)

Gas chromatography - mass spectroscopy (GC-MS) เป็นเทคนิคการแยกสารที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง เพราะมีความสามารถในการแยกและวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีความซับซ้อนได้ สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งในเชิงปริมาณ (quantitative analysis) และเชิงคุณภาพ (qualitative analysis) ได้อย่างถูกต้อง โดยอาศัยหลักการทางโครมาโตกราฟี (chromatography) จากความแตกต่างระหว่างการกระจายตัวของสารต่างๆ ระหว่างวัฏภาค (phase) 2 วัฏภาค ประกอบไปด้วย วัฏภาคคงที่ (stationary phase) ซึ่งอาจเป็นของเหลวหรือของแข็ง และวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ซึ่งเป็นแก๊สเฉื่อย ในการวิเคราะห์ตัวอย่างจะถูกนำเข้าสู่ระบบผ่านทาง injection port ซึ่งอยู่ภายในห้องควบคุมอุณหภูมิ ภายใต้อุณหภูมิสูงของ injection port ตัวอย่างจะถูกนำเข้าสู่คอลัมน์โดยอาศัยการพาไปของ carrier gas จากนั้นองค์ประกอบใดที่ถูกแยกออกมาจากคอลัมน์ก่อนก็จะผ่านเข้าไปในส่วนของเครื่อง MS ซึ่งมีสภาวะเป็นสุญญากาศก่อนและจะถูกทำให้แตกตัวด้วยอิเล็กตรอนที่ยิงมาจาก ion source ทำหน้าที่ไอออไนซ์โมเลกุลที่ผ่านเข้ามาให้กลายเป็นประจุ ประจุเหล่านั้นจะเดินทางผ่านเครื่องคัดเลือกและแยกแยะขนาดของประจุ (mass analyzer) เพื่อดูว่าประจุเหล่านั้นประกอบไปด้วย ขนาดมวลเท่าใดบ้าง ก่อนที่จะเดินทางเข้าสู่ตัววัดสัญญาณ (detector) โดยสารแต่ละตัวจะมีรูปแบบการแตกตัวที่จำเพาะ จึงสามารถบอกชนิดสารที่วิเคราะห์ได้ออกมาเป็นเลขมวล (mass number) เทียบกับข้อมูลอ้างอิงแล้วแปลผลออกมาเป็นชื่อขององค์ประกอบในสารตัวอย่างได้ (เสาวภาคย์ เบียซิน, 2553) แสดงดังรูปที่ 2.8 ในปัจจุบันเครื่อง GC-MS เป็นเครื่องมือที่ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลกรดไขมันในน้ำนมอย่างแพร่หลาย เพราะเป็นเครื่องมือที่มีความแม่นยำและ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สามารถวิเคราะห์แยกความหลากหลายของไอโซเมอร์แต่ละตัวเพื่อบ่งชี้ถึงชนิดและองค์ประกอบที่มีอยู่ในสารตัวอย่างนั้นได้ (Firl *et al.,* 2014)



รูปที่ 2.8 การทำงานของ Gas chromatography - mass spectroscopy (MS)

ที่มา: Emwas *et al.* (2015)

ปัจจุบันมีงานวิจัยจำนวนมากที่ศึกษาข้อมูลกรดไขมันในน้ำนมและผลิตภัณฑ์นม โดยตัวอย่างชนิดของกรดไขมันในน้ำนมโค แสดงในตาราง 2.4 และสามารถจำแนกกลุ่มของกรดไขมันได้เป็นกรดไขมันชนิดอิ่มตัว (saturated fatty acid: SFA) กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่ 1 ตำแหน่ง (monounsaturated fatty acid: MUFA) และกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หลายตำแหน่ง (polyunsaturated fatty acid: PUFA) โดยมีรายงานว่า การผันแปรของกรดไขมันเป็นผลมาจากชนิดของอาหารสัตว์ สุขภาวะของแม่โค ระบบการจัดการฟาร์ม รวมถึงฤดูกาลที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตาราง 2.5 ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของข้อมูลดังกล่าวสามารถใช้ในการระบุอัตลักษณ์ของน้ำนมได้ (Schwendel *et al.,* 2015)

ตาราง 2.4 ชนิดของกรดไขมันในน้ำนมโค

ที่มา : Månsson (2008)

ชนิดของกรดไขมัน	ปริมาณ (ร้อยละโดยน้ำหนัก)
กรดไขมันชนิดอิ่มตัว	
Butyric acid	4.4
Caproic acid	2.4
Caprylic acid	1.4
Capric acid	2.7
Lauric acid	3.3
Myristic acid	10.9
Palmitic acid	30.6
Stearic acid	12.2
กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวพันธะคู่ 1 ตำแหน่ง	
Myristoleic acid	0.8
Palmitoleic acid	1
Oleic acid	22.8
กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวพันธะคู่ 1 ตำแหน่ง	
Linoleic acid	1.6
Linolenic acid	0.7
CLA	0.4

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตาราง 2.5 ตัวอย่างการใช้ GC-MS ในการวิเคราะห์ข้อมูลกรดไขมันในน้ำนมและผลิตภัณฑ์นม

ปัจจัยที่ศึกษา	วัตถุประสงค์การศึกษา	ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ	เทคนิคที่ใช้	แหล่งที่มา
อาหารสัตว์	- ศึกษาข้อมูลกรดไขมันในน้ำนมโคอินทรีย์และน้ำนมโคทั่วไป	CLA, total n-3 fatty acid, total n-6 fatty acid, C15:0, C17:0, EPA และ alpha-ALA	GC, GC-MS	O'Donnell *et al.* (2010)
เขตพื้นที่ภูมิศาสตร์	- ศึกษาข้อมูลกรดไขมันในน้ำนมระหว่างพื้นที่เหนือและใต้ของนิวซีแลนด์	Butyric, myristic, palmitic และ oleic acid	GC-MS และ IR-MS	Ehtesham *et al.* (2013)
	- ศึกษาข้อมูลกรดไขมันในน้ำนมและเนยแข็งในเขตพื้นที่ยุโรป	branched-chain FA, long-chain PUFA และ MUFA	GC-FID, GC-MS	Eisenstecken *et al.* (2021)
สายพันธุ์โคนม	- ศึกษาข้อมูลกรดไขมันในแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ	palmitoleic(C16:1)	GC-MS	Chang *et al.* (2011)
กระบวนการแปรรูปน้ำนม	- ศึกษาข้อมูลกรดไขมันในน้ำนมที่ผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรส์	SCFA, UFA, MUFA และ PUFA	GC-MS	Zhu *et al.* (2020)
	- ศึกษาข้อมูลกรดไขมันในผลิตภัณฑ์นมที่หลากหลายในท้องตลาด	C18:2n-6 and C18:1 (cis-9)	GC-MS	Jariyasopit *et al.* (2021)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

งานวิจัยที่ศึกษาข้อมูลกรดไขมันในน้ำนมโคอินทรีย์ เช่น Slots *et al.* (2009) และ Tunick *et al.* (2016) พบว่าน้ำนมที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์มีปริมาณกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่าหนึ่งตำแหน่งที่มีประโยชน์ในเชิงสุขภาพ เช่น conjugated linoleic acid (CLA, 18:2 c-9, t-11) (Slots *et al.,* 2009, Tunick *et al.,* 2016) ต่อมา Butler *et al.* (2011) พบว่า น้ำนมที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์มีกรดไขมันโอเมก้า 3 และ 6 มากกว่าน้ำนมที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไป (Butler *et al.,* 2011) เป็นผลมาจากความ

แตกต่างอาหารสัตว์มีความแตกต่างกัน สำหรับประเทศไทย มาริสา คงบุญเกิด (2562) พบว่าระบบการจัดการฟาร์มโคนมและอาหารสัตว์ที่แตกต่างกันจะส่งผลต่อข้อมูลกรดไขมัน stearic acid, linolenic acid, undecanoic acid, myristoleic acid, caprylic acid, capric acid และ tridecanoic acid ที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อแยกความแตกต่างกันระหว่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปได้ (มาริสา คงบุญเกิด, 2562)

2.9 การประมวลผลด้วยเทคนิคทางเคโมเมตริกซ์ (chemometrics)

เคโมเมตริกซ์ คือ วิธีการวิเคราะห์และประมวลผลข้อมูลทางเคมี ชีวเคมี และชีวโมเลกุลที่มีความซับซ้อน โดยการประยุกต์ใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ วิธีการวิเคราะห์ทางสถิติทั้งแบบตัวแปรเดียวและพหุตัวแปร ร่วมกับวิทยาการคอมพิวเตอร์ เพื่อวิเคราะห์หารูปแบบและเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างข้อมูลชีวภาพที่ได้จากกลุ่มตัวอย่างที่สนใจ โดยวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติพหุตัวแปร (multivariate statistical analysis) ที่นิยมนำมาประยุกต์ใช้เพื่อประมวลผลข้อมูลทางเมตาโบโลมิกส์ ได้แก่ การวิเคราะห์กลุ่ม (cluster analysis: CA) การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal component analysis; PCA) การวิเคราะห์จำแนกกลุ่มด้วยการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุด (partial least square-discriminant analysis; PLS-DA) และ การวิเคราะห์จำแนกกลุ่มแบบโครงสร้างเชิงตั้งฉากด้วยการถดถอยวิธีกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (orthogonal partial least squares discriminant analysis; OPLS-DA) (Ebbels *et al*., 2011, Russolillo, 2009)

2.9.1 การวิเคราะห์กลุ่ม (cluster analysis)

การวิเคราะห์กลุ่ม เป็นเทคนิคการแบ่งกลุ่มหน่วยข้อมูล ออกเป็นกลุ่มย่อยอย่างน้อย 2 กลุ่ม โดยมีหลักเกณฑ์ในการแบ่ง คือ ให้หน่วยที่อยู่กลุ่มเดียวกันมีลักษณะที่สนใจเหมือนกันหรือคล้ายกัน แต่หน่วยที่อยู่ต่างกลุ่มกันจะมีลักษณะที่สนใจต่างกัน การวิเคราะห์กลุ่มสามารถแบ่งประเภทหรือเทคนิคได้ 2 ประเภท คือ 1) การวิเคราะห์กลุ่มแบบขั้นตอน (hierarchical cluster analysis) และ 2) การวิเคราะห์กลุ่มแบบไม่เป็น

ขั้นตอน (nonhierarchical cluster analysis หรือ K – Means Cluster Analysis) (กัลยา วานิชย์บัญชา, 2552) สำหรับในงานวิจัยนี้จะใช้การวิเคราะห์แบบ hierarchical cluster analysis (HCA) ซึ่งเป็นการจัดกลุ่มข้อมูลที่มีลักษณะเหมือนกันเข้าด้วยกัน และแสดงผลการรวมกลุ่มและแยกกลุ่มในแต่ละขั้นตอนด้วยเดนโดรแกรม (dendrogram) ตามระยะของ linkage โดยพิจารณาค่าเฉลี่ยระยะห่างของแต่ละกลุ่มมาเป็นเกณฑ์ ทำให้สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างออกจากกันได้ (Abonyi and Feil, 2007, กัลยา วานิชย์บัญชา, 2552) พร้อมทั้งหาความสัมพันธ์ของข้อมูลด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แพร์สัน (Pearson correlation) ซึ่งจะมีค่าอยู่ระหว่าง - 1 ถึง + 1 ถ้า เข้าใกล้ ± 1 หมายความว่า ตัวแปรทั้งสองมีความสัมพันธ์กันอยู่ในระดับมาก ถ้าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มีค่าเข้าใกล้ 0 หมายความว่า ตัวแปรทั้งสองมีความสัมพันธ์กันในระดับน้อยหรือไม่สัมพันธ์กัน (Hauke and Kossowski, 2011, Wang, 2012)

2.9.2 การวิเคราะห์จำแนกกลุ่มด้วยการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุด (Partial least square-discriminant analysis; PLS-DA) และ การวิเคราะห์จำแนกกลุ่มแบบโครงสร้างเชิงตั้งฉากด้วยการถดถอยวิธีกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (Orthogonal partial least squares discriminant analysis; OPLS-DA)

การวิเคราะห์จำแนกกลุ่มด้วยการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดและการวิเคราะห์จำแนกกลุ่มแบบโครงสร้างเชิงตั้งฉากด้วยการถดถอยวิธีกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน เป็นวิธีการวิเคราะห์ข้อมูลแบบพหุตัวแปร เพื่อใช้ในการแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่าง โดยสร้างตัวแบบความสัมพันธ์เชิงเส้นในเชิงพยากรณ์ระหว่างกลุ่มตัวแปรสองกลุ่ม (กลุ่มตัวแปรตามและกลุ่มตัวแปรทำนาย) ทั้งสองวิธีวิเคราะห์จะช่วยลดมิติของข้อมูลและสามารถสร้างตัวแปรแฝงภายนอกที่ทำหน้าที่เป็นตัวแปรทำนายผลข้อมูล และตัวแปรแฝงภายในที่ทำหน้าที่เป็นตัวแปรตามจากผลรวมเชิงเส้นของตัวแปรเดิมที่ทำให้ความแปรปรวนร่วมระหว่างตัวแปรแฝงทั้งสองนี้มีค่าสูงสุด (Johansson *et al.*, 2003, Hilario and Kalousis, 2008) ซึ่งการวิเคราะห์แบบ OPLS-DA จะมีประสิทธิภาพมากกว่า PLS-DA เนื่องจากมีการประยุกต์ใช้เทคนิค PLS ร่วมกับเทคนิค Orthogonal signal correction (OSC) เพื่อลดความผันแปรที่ไม่สัมพันธ์กับกลุ่มตัวอย่างออก นอกจากนี้ยังมีการสร้างตัวแปรแฝงภายในกลุ่มตัวอย่างเพิ่มขึ้น ทำให้ปัจจัยมีความชัดเจนและง่ายต่อการตีความมากขึ้น

(Bylesjö *et al.,* 2006, Worley and Powers, 2016) โดยค่าความน่าเชื่อถือของผลข้อมูลของการวิเคราะห์ PLS-DA จะพิจารณาจากค่า R^2 และ Q^2 โดย R^2 คือ ค่าความผันแปรที่สามารถอธิบายได้ (model's ability) และ Q^2 คือ ค่าบ่งบอกความสามารถว่าตัวแปรมีผลในการช่วยชี้วัดผลมากน้อยแค่ไหน (model's predictive ability) ส่วน OPLS-DA จะพิจารณาความเสถียรภาพของการวิเคราะห์จากค่า R^2Y และ Q^2 โดย R^2Y คือ ค่าความผันแปรของตัวแปรตาม (y) ที่สามารถอธิบายได้ (variance of the dependent variable) (Zhang *et al.,* 2015, Li *et al., 2021)* และ Q^2 คือ ค่าบ่งบอกความสามารถว่าตัวแปรมีผลในการช่วยชี้วัดผลมากน้อยแค่ไหน (model's predictive ability) (Worley and Powers, 2016) โดยค่า R^2, R^2Y และ Q^2 ที่ไม่น้อยกว่า 0.50 หมายความว่า การทำนายผลนั้นมีความน่าเชื่อถือยอมรับได้ (Yang *et al.,* 2016, Li *et al.,* 2021) และเมื่อพิจารณาร่วมกับ Variable Importance for the Projection (VIP score) จะสามารถใช้ในการวิเคราะห์หาตัวแปรที่มีอิทธิพลในการแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างได้ โดยค่า VIP score เป็นดัชนีวัดความสำคัญของตัวแปรที่มีต่อการทำนายตัวแปรตามที่รวมความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรทำนายด้วยกันซึ่งอาศัยพารามิเตอร์ของ OPLS-DA ในการคำนวณค่า ตัวแปรที่มีค่า VIP สูงแสดงถึงความสำคัญของตัวแปรนั้นได้มากกว่า และเนื่องจากค่าเฉลี่ยของกำลังสองของ VIP เท่ากับ 1.0 ดังนั้นมักใช้เกณฑ์มากกว่า 1.0 เป็นเกณฑ์จุดตัดสำหรับการคัดเลือกความสำคัญของตัวแปร โดยในงานวิจัยนี้จะนำมาใช้ในการระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ที่เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในการแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างน้ำนมที่สนใจได้ (Yang *et al.*, 2016)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

2.9.3 การวิเคราะห์วิถีเมตาบอลิซึมของสารเมตาบอไลต์และกรดไขมัน (metabolic pathway analyses)

การวิเคราะห์วิถีเมตาบอลิซึม (pathway analysis) เป็นการค้นหาวิถีเมตาบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับความผันแปรของปริมาณสารเมตาบอลไลต์อันเป็นผลมาจากอิทธิพลของปัจจัยที่ต้องการศึกษา และระบุตำแหน่งของสารเมตาบอไลต์ที่สนใจในวิถีเมตาบอลิซึมดังกล่าว โดยการระบุชนิดและรายละเอียดของสารเมตาบอไลต์จะอ้างอิงจากฐานข้อมูล Bovine Metabolome Database (www.bovinedb.ca),

Livestock metabolome database (www.lmdb.ca), Milk Composition Database (www.mcdb.ca) ซึ่งข้อมูลดังกล่าวจะถูกนำมาวิเคราะห์หาวิถีเมตาบอลิซึมที่เกี่ยวข้องด้วย MetaboAnalyst v.5.0 software (https://www.metaboanalyst.ca) (Wu *et al.*, 2021) จากนั้นนำมาระบุตำแหน่งของสารเมตาบอไลต์นั้นๆ ในวิถีเมตาบอลิซึมด้วย KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) pathway database (https://www.genome.jp/kegg/pathway.html) ซึ่ง ปัจจุบัน มีข้อมูล pathway และยีนของโคนม (*Bos taurus*) อยู่ 877 pathways และ 21,880 ยีน (https://www.genome.jp/kegg/pathway.html) โดยในงานวิจัยนี้จะนำมาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ระบุตำแหน่งของสารเมตาบอไลต์และกรดไขมันที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพและระบุวิถีเมตาบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์สารในกลุ่มดังกล่าวที่ได้รับอิทธิพลมาจากระบบการจัดการฟาร์มแบบเกษตรอินทรีย์และความผันแปรของฤดูกาลที่เก็บตัวอย่าง (Qi *et al.,* 2018, Velásquez-Valle *et al.*, 2020)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.10 ช่องว่างทางวิชาการและสมมติฐานในงานวิจัย

จากที่กล่าวมาข้างต้น จะเห็นได้ว่าอิทธิพลของระบบการจัดการฟาร์มโคนมแบบเกษตรอินทรีย์ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบทางชีวเคมีในน้ำนม ซึ่งองค์ประกอบเหล่านี้มีความสัมพันธ์โดยตรงกับคุณภาพ คุณค่าทางโภชนาการ และอัตลักษณ์ทางชีวโมเลกุลของน้ำนมโคอินทรีย์ ปัจจุบันมีการนำเทคโนโลยีเมตาโบโลมิกส์ซึ่งเป็นเทคโนโลยีทางเคมีวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือขั้นสูง มาประยุกต์ใช้ร่วมกับการประมวลผลด้วยเทคนิคทางเคโมเมตริกซ์ เพื่อใช้ในการระบุอัตลักษณ์และตรวจสอบความแตกต่างระหว่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป อย่างไรก็ตาม งานวิจัยที่ประยุกต์ใช้เทคโนโลยีดังกล่าวในการศึกษาข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของน้ำนมโคอินทรีย์ที่ผลิตในประเทศไทยยังมีอยู่อย่างจำกัด ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์และเปรียบเทียบข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากและข้อมูลกรดไขมันของน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปโดยใช้เทคโนโลยีเมตาโบโลมิกส์ พร้อมทั้งติดตามอิทธิพลของฤดูกาลต่อการเปลี่ยนแปลงของข้อมูลดังกล่าวในระยะเวลา 1 ปี โดยคัดเลือกตัวอย่างน้ำนมดิบจากฟาร์มโคนมที่ได้รับการรับรองมาตรฐานจากกรมปศุสัตว์ในเขตพื้นที่อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี ระหว่างฤดูฝน (กันยายน - ตุลาคม 2563) และฤดูแล้ง (มีนาคม - เมษายน 2564) จากนั้นเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยการประมวลผลข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากและข้อมูลของกรดไขมันในน้ำนมดิบด้วยวิธีทางสถิติพหุตัวแปร เพื่อวิเคราะห์ระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์และกรดไขมันที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของน้ำนมดิบที่ได้จากระบบการจัดการฟาร์มแบบเกษตรอินทรีย์ ตลอดจนอิทธิพลของฤดูกาลต่อความผันแปรของข้อมูลดังกล่าวได้ โดยการวิจัยในครั้งนี้จะยังคงดำเนินการภายใต้ความร่วมมือกับฝ่ายวิจัยและพัฒนาการเลี้ยงโคนม องค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย (อ.ส.ค.) เจ้าหน้าที่จากสหกรณ์โคนมไทย – เดนมาร์ค (มิตรภาพ) และสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ จ. สระบุรี

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัตถุดิบ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 วัตถุดิบ

รายการ	ที่มา
ผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์ทางการค้าพาสเจอร์ไรส์	ซุปเปอร์มาร์เก็ตในจังหวัดกรุงเทพมหานคร, ประเทศไทย
น้ำนมดิบ	ฟาร์มโคนมอินทรีย์ขององค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย (อ.ส.ค.) อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี และฟาร์มโคนมทั่วไปของเกษตรกรในเขตพื้นที่ใกล้เคียงโดยมีระยะห่างจากฟาร์มโคนมอินทรีย์ประมาณ 5 กิโลเมตร เพื่อลดปัจจัยด้านภูมิศาสตร์ที่อาจส่งผลต่อองค์ประกอบทางเคมีหลักและคุณภาพของน้ำนม ภายใต้การให้คำปรึกษาจากผู้เชี่ยวชาญด้านการส่งเสริมการเลี้ยงโคนมจากองค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย และเจ้าหน้าที่จากสหกรณ์โคนมไทย – เดนมาร์ค (มิตรภาพ)
อาหารสัตว์ ประกอบไปด้วย อาหารข้น อาหารหยาบ และอาหารผสมแบบสำเร็จรูป (total mixed ration; TMR	ฟาร์มโคนมอินทรีย์ขององค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย (อ.ส.ค.) และฟาร์มโคนมทั่วไปของเกษตรกร ในเขตพื้นที่ อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.1.2 อุปกรณ์

รายการ	**ที่มา**
เครื่อง MilkoScan™ FT+ analyzer	Hilleroed, Denmark
เครื่อง Fossomatic™ FC	Hilleroed, Denmark
Refrigerated centrifuge, model Z36HK	Hermle Labortechnik, Wehingen, Germany
ตู้แช่เยือกแข็ง Sanyo MDF-236 (-25°C)	Sanyo, Sakata Oizumi-Machi, Japan
เครื่องปั่นเหวี่ยง ultra-centrifuge Optima™ L-100 XL Ultracentrifuge	Beckman Coulter, Inc., USA
เครื่อง NMR spectrometer ความถี่ 500 Hz	Bruker, Rheinstetten, Germany
เครื่องปั่นเหวี่ยง Centrifuge	Kubotaa corporation, Japan
LP vortex mixer	Thermo Fisher Scientific, China
เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง ML240	Mettler Toledo, Switzerland
เครื่อง pH meter EUTECH, pH2700 Bench	บริษัท เวิลด์ไวด์ เทรด ไทย จำกัด, กทม.
บิวเรต (Bullet) 50 มิลลิลิตร grade B	Witeg, Germany
ขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร	Axygen Scientific, Inc., China
ขวดวัดปริมาตร ขนาด 100, 250,1000 มิลลิลิตร	Schott, Germany
บีกเกอร์ ขนาด 50, 100, 250, 500 มิลลิลิตร	Schott, Germany
เครื่องดูดจ่ายสารปริมาณต่ำ (Micropipette)	Pipetman®, Starter-kit, Gilson Co., Ltd., Middletown, USA
หลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาด 50 ml	Nunc™, Thermo Fisher Scientic, USA
หลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาด 15 ml	Nunc™, Thermo Fisher Scientic, USA

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รายการ	**ที่มา**
หลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาด 10.4 ml (Centrifuge bottles with cap assemblies)	Beckman Coulter, Inc., USA
Nanosep centrifugal device with omega membrane MWCO 3 kDA	Pall life Science, Ann Arbor, MI, USA
ปิเปต (Pipette) ขนาด 10 มิลลิลิตร	Schott, Germany
Pasture pipette	Schott, Germany
ไมโครทูป (Microtube) ขนาด 2 มิลลิลิตร	Axygen Scientific, Inc., China
หลอดดูดจ่ายสารปริมาณต่ำ (Micropipette tip) PK 113-G-Q ขนาด 1000 ไมโครลิตร	Thermo Fisher Sciencetific Inc., Mexico
ถุงมือป้องกันสารเคมี (Nitrile power free)	บริษัท สยามเซมเพร์เมด จำกัด, สงขลา
หน้ากากอนามัย (Nexcare earloop mask)	3M Science. Applied to life. TM, USA
ถาดหลุมสำหรับตรวจเต้านมอักเสบ	สหกรณ์โคนมไทย – เดนมาร์ค (มิตรภาพ) อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.1.3 สารเคมี

รายการ	**ที่มา**
น้ำยา california mastitis test (CMT)	สหกรณ์โคนมไทย – เดนมาร์ค (มิตรภาพ) อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี
น้ำ Milli-Q	ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กทม.
น้ำกลั่น (Distillated water)	ห้องปฏิบัติการเคมีอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กทม.
Dichloromethane (CH_2Cl_2)	RCI Labscan Co., Ltd, Bangkok, Thailand
Sodium Chloride (NaCl)	Merck, Darmstadt, Germany
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt, Germany
3-Trimethylilyl-2,2,3,3-tetradeuteropropionate (TSP)	Merck, Darmstadt, Germany
Sodium Hydroxide (NaOH)	บริษัท ทีทีเคซายเอนซ์จำกัด, กทม.
Deuterium oxide (D_2O)	Cambridge Isotope Laboratories Inc., USA

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.2 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.2.1 ภาพรวมของวิธีการดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของน้ำนมดิบจากแม่โคที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ และฟาร์มโคนมทั่วไป เพื่อศึกษาอิทธิพลของการจัดการฟาร์มโคนมที่แตกต่างกันและปัจจัยจากฤดูกาลที่เก็บตัวอย่างต่อการเปลี่ยนแปลงข้อมูลสารเมตาบอไลต์ ด้วยเทคนิค proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (^{1}H-NMR) และข้อมูลกรดไขมันในน้ำนมดิบด้วย เทคนิค gas chromatography - mass spectrometer (GC-MS) โดยงานวิจัยนี้จะแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ (i) การทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากในน้ำนมโคอินทรีย์ทางการค้าด้วยเทคนิค ^{1}H-NMR และ (ii) การศึกษาข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ และฟาร์มโคนมทั่วไป ในช่วงฤดูกาลที่แตกต่างกัน

โดยงานวิจัยในส่วนที่ 1 เป็นการทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์โดยศึกษาเปรียบเทียบข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากในน้ำนมโคอินทรีย์ด้วยเทคนิค ^{1}H-NMR ผู้วิจัยจะนำตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์ทางการค้าภายในประเทศไทย 3 ตราสินค้า จำนวน 4 ผลิตภัณฑ์ ได้แก่ ผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์พาสเจอร์ไรส์ ชนิด ก. ผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์พาสเจอร์ไรส์ ชนิด ข. ผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์พาสเจอร์ไรส์ ชนิด ค. และผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์พาสเจอร์ไรส์ ชนิด ง. มาศึกษาข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์ที่มีความหลากหลายในท้องตลาด ด้วยเทคนิค ^{1}H-NMR และเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติพหุตัวแปร โดยอ้างอิงตามขั้นตอนในงานวิจัยของ Luangwilai *et al.* (2021) และ (มาริสา คงบุญเกิด, 2562)

สำหรับงานวิจัยในส่วนที่ 2 เป็นการศึกษาเปรียบเทียบข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของน้ำนมดิบจากแม่โคที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป พร้อมทั้งติดตามอิทธิพลของฤดูกาลต่อการเปลี่ยนแปลงของข้อมูลดังกล่าว โดยดำเนินการคัดเลือกตัวอย่างฟาร์มเพื่อเก็บตัวอย่างน้ำนมดิบจากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปมาทำการศึกษาข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลภายใต้การให้คำปรึกษาจาก

ผู้เชี่ยวชาญด้านการเลี้ยงโคนมจากองค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี และเจ้าหน้าที่จากสหกรณ์โคนมไทย – เดนมาร์ค (มิตรภาพ) อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี โดยพิจารณาคัดเลือกน้ำนมดิบจากแม่โคที่มีสุขภาพดี จากการประเมินปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบเบื้องต้นด้วยน้ำยา California mastitis test (CMT) และนำไปตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ค่าปริมาณกรดทั้งหมด ค่าองค์ประกอบทางเคมีหลักและปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบอีกครั้งในห้องปฏิบัติการ จากนั้นเตรียมตัวอย่างน้ำนมดิบและนำไปวิเคราะห์ข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากด้วย ^{1}H-NMR และวิเคราะห์ข้อมูลของกรดไขมันด้วยเทคนิค GC-MS แล้วคำนวณหาปริมาณสัมพัทธ์ของข้อมูลจาก spectra โดย MestreNova 14.2 (Mestrelab Research,Santiago de Compostela, Spain) และแปลผลข้อมูลโดยทำการระบุชนิดสารเมตาบอไลต์ จากฐานข้อมูล Chenomx NMR suite 7.5 library (Chenomx Inc., Alberta, Canada), Milk Composition Database (www.mcdb.ca), Livestock metabolome database (www.lmdb.ca), Bovine Metabolome Database (www.bovinedb.ca) และจากงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง จากนั้นเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลที่ได้ด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติพหุตัวแปร เช่นเดียวกับการทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างในส่วนที่หนึ่ง และขั้นตอนสุดท้าย คือนำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาแปลผลข้อมูลทางชีววิทยา (biological interpretation) เพื่อเปรียบเทียบข้อมูลสารเมตาบอไลต์และข้อมูลกรดไขมันของน้ำนมดิบจากฟาร์มโคนมอินทรีย์ และฟาร์มโคนมทั่วไป ระบุสารเมตาบอไลต์และกรดไขมันที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ รวมทั้งคำนวณหาวิถีเมตาบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์สารในกลุ่มดังกล่าว ที่ได้รับอิทธิพลจากระบบการจัดการฟาร์มโคนมและฤดูกาลในการเก็บตัวอย่างที่แตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 3.1

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

งานวิจัยส่วนที่ 1 การทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์ข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากด้วยเทคนิค ^{1}H-NMR

↓

การเปรียบเทียบข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์ทางการค้าในประเทศไทย โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ^{1}H-NMR

งานวิจัยส่วนที่ 2 การเปรียบเทียบข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูกาลที่แตกต่างกัน

- คัดเลือกฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปที่ได้รับการรับรองจากกรมปศุสัตว์ในเขตพื้นที่ จังหวัดสระบุรี ภายใต้การให้คำปรึกษาจากผู้เชี่ยวชาญด้านการเลี้ยงโคนมจากองค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย
- การเก็บตัวอย่างอาหารสัตว์สำหรับการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของอาหารด้วยวิธี Proximate analysis
- การพิจารณาปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบ
  - ตรวจวัดเบื้องต้นด้วยวิธี CMT
  - ตรวจยืนยันด้วยเครื่อง Fossomatic™ FC
- การตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมีหลักในน้ำนม ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณกรดทั้งหมด
  - ตรวจวัดด้วยเครื่อง MilkoScan™ FT + analyzer
  - ตรวจวัดความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่อง pH meter
  - ตรวจวัดปริมาณกรดทั้งหมดด้วยวิธี Titratable acidity โดยอ้างอิงตามวิธีของ ISO 11869 | IDF 150 (2009)
- เตรียมตัวอย่างน้ำนม สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากในน้ำนมด้วยเทคนิค Proton nuclear magnetic resonance (^{1}H-NMR) และตัวอย่างน้ำนมดิบ สำหรับวิเคราะห์ข้อมูลกรดไขมันในน้ำนมดิบด้วยเทคนิค Gas Chromatography-Mass Spectrometer (GC-MS)
- การระบุชนิดและปริมาณของข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของน้ำนมโดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ทางเมตาโบโลมิกส์และวิเคราะห์ผลทางสถิติ (p<0.05)
- การแปลผลข้อมูลทางชีววิทยา (Biological interpretation)

รูปที่ 3.1 ภาพรวมของวิธีการดำเนินงานในงานวิจัยนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

3.2.2 การทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์

3.2.2.1 การทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยาก ด้วย ^{1}H-NMR โดยใช้ตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์ทางการค้าในประเทศไทย

ผู้วิจัยจะนำตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์ทางการค้าภายในประเทศไทย 3 ตราสินค้า จำนวน 4 ผลิตภัณฑ์ ได้แก่ ผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์พาสเจอร์ไรส์ ชนิด ก. ผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์พาสเจอร์ไรส์ ชนิด ข. ผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์พาสเจอร์ไรส์ ชนิด ค. และผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์พาสเจอร์ไรส์ ชนิด ง. ที่ซื้อจากร้านซุปเปอร์มาร์เก็ตในเขตจังหวัดกรุงเทพมหานคร ในระหว่างเดือนกรกฎาคม - สิงหาคม 2563 มาศึกษาข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์ทางการค้าของแต่ละตราสินค้าที่มีระบบการจัดการฟาร์มโคนมอินทรีย์ที่แตกต่างกัน และเพื่อให้ได้จำนวนตัวอย่างเหมาะสม (n > 30) สำหรับการประมวลผลด้วยเทคนิคทางเคโมเมตริกซ์ จึงดำเนินการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ละ 8 ตัวอย่าง ในช่วงวันหมดอายุที่ใกล้เคียงกัน รวมทั้งหมด 32 ตัวอย่าง โดยแบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 ส่วน คือ (i) สำหรับตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมีหลัก และค่าความเป็นกรด-ด่าง ตัวอย่างละ 50 มิลลิลิตร และ (ii) สำหรับการวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากด้วยเทคนิค ^{1}H-NMR ตัวอย่างละ 50 มิลลิลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.2.2.2 การตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมีหลักในผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์ทางการค้า

โดยตรวจวัดค่าปริมาณร้อยละโดยน้ำหนัก (%) ขององค์ประกอบทางเคมีหลักในน้ำนม ได้แก่ ไขมัน (fat) โปรตีน (protein) แลคโตส (lactose) ของแข็งไม่รวมไขมันนม (solid not fat) และของแข็งทั้งหมด (total solids) ด้วยเครื่อง MilkoScan™ FT+ analyzer โดยใช้เทคนิค Fourier transform infrared (FTIR) (ภาคผนวก ก) ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมทางการค้า 4 ผลิตภัณฑ์ ผลิตภัณฑ์ละ 8 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 32 ตัวอย่าง ภายใต้คำแนะนำของเจ้าหน้าที่กลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม (สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ตำบลบางกะดี อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี)

3.2.2.3 การตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่างในผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์ทางการค้า

นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมทางการค้า 4 ผลิตภัณฑ์ ผลิตภัณฑ์ละ 8 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 32 ตัวอย่าง เทใส่บีกเกอร์ ตัวอย่างละ 20 มิลลิลิตร นำไปตรวจวัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter และบันทึกผลสำหรับขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างน้ำนมและการวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากด้วยเทคนิค ^{1}H-NMR แสดงดังข้อ 3.2.4 และ 3.2.6

3.2.3 การคัดเลือกตัวอย่างน้ำนมดิบจากแม่โคที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ และฟาร์มโคนมทั่วไป ในเขตพื้นที่อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี

คัดเลือกตัวอย่างน้ำนมดิบอินทรีย์จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ขององค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี ซึ่งได้การรับรองมาตรฐานปศุสัตว์อินทรีย์จากกรมปศุสัตว์ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2554 และได้รับการรับรองมาตรฐาน Organic Thailand จากกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ และตัวอย่างน้ำนมดิบทั่วไปจากฟาร์มโคนมของเกษตรกร อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี ในเขตพื้นที่ใกล้เคียงโดยมีระยะห่างจากฟาร์มโคนมอินทรีย์ประมาณ 5 กิโลเมตร เพื่อลดปัจจัยด้านภูมิศาสตร์ที่อาจส่งผลต่อองค์ประกอบทางเคมีหลักและคุณภาพของน้ำนม แสดงดังตาราง 3.1 การคัดเลือกตัวอย่างน้ำนมดิบจะแบ่งออกเป็น 2 ฤดูกาล คือ ฤดูฝน (กันยายน - ตุลาคม 2563) และ ฤดูแล้ง (มีนาคม - เมษายน 2564) เพื่อใช้ในการศึกษาอิทธิพลของการจัดการฟาร์มโคนมที่แตกต่างกัน และปัจจัยจากฤดูกาลที่เก็บตัวอย่างต่อการเปลี่ยนแปลงสารเมตาบอไลต์ในน้ำนมดิบ โดยเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของน้ำนมดิบจากแม่โคที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ และฟาร์มโคนมทั่วไปด้วยเทคนิค ^{1}H-NMR และ GC-MS ภายใต้การให้คำปรึกษาจากผู้เชี่ยวชาญด้านการเลี้ยงโคนมจากองค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี และเจ้าหน้าที่จากสหกรณ์โคนมไทย – เดนมาร์ค (มิตรภาพ) อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี ซึ่งได้มีการจัดทำข้อตกลงทางวิชาการ (Memorandum of Understanding : MOU) ระหว่างองค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย และคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตาราง 3.1 รายละเอียดฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป

ข้อมูล	ฟาร์มโคนมอินทรีย์	ฟาร์มโคนมทั่วไป
ชื่อฟาร์ม	ฟาร์มอินทรีย์ อ.ส.ค (ได้การรับรองจากกรมปศุสัตว์ ตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2554)	สุชาติ ฟาร์ม
ชื่อเจ้าของฟาร์ม	องค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย	นายสุชาติ สุวรรณทอง
ที่อยู่ฟาร์ม	160 หมู่ 1 ต.มิตรภาพ อ.มวกเหล็ก จ.สระบุรี 18180	20/1 ม.5 ต.มิตรภาพ อ.มวกเหล็ก จ.สระบุรี 18180
จำนวนโคทั้งหมด	339 ตัว	95 ตัว
จำนวนโครีดนม	82 ตัว	60 ตัว
ปริมาณน้ำนมดิบ	1000 กิโลกรัม/วัน	900-1000 กิโลกรัม/วัน
ชนิดของอาหาร		
- ฤดูฝน (กันยายน – ตุลาคม 2563)	วัตถุดิบอาหารสัตว์ ได้แก่ อาหารข้น เศษขาเห็ดเข็มทอง มันสำปะหลัง หญ้าสด และหญ้าหมัก	วัตถุดิบอาหารสัตว์ ได้แก่ อาหารข้นสูตรโปรตีน 17% ข้าวโพดหมักและฟางข้าว
- ฤดูแล้ง (มีนาคม – เมษายน 2564)	วัตถุดิบอาหารสัตว์ ได้แก่ อาหารข้น เมล็ดถั่วเหลืองอินทรีย์บด ข้าวโพดบดอินทรีย์ ข้าวบดอินทรีย์ หญ้ากินีสดและหญ้าหมัก	วัตถุดิบอาหารสัตว์ ได้แก่ อาหารข้นสูตรโปรตีน 17% ข้าวโพดหมักแบบผสม TMR และฟางข้าว
สัดส่วนปริมาณที่ใช้	ผสม TMR โดยใช้สัดส่วนอาหารหยาบ 40% ต่ออาหารข้น 60% ประมาณ 30 กิโลกรัม/ตัว/วัน	อาหารหยาบ 30 กิโลกรัม/ตัว/วัน และ อาหารข้น 10-12 กิโลกรัม/ตัว/วัน
จำนวนครั้งการให้อาหาร	2 มื้อ (มื้อเช้าและมื้อบ่าย)	2 มื้อ (มื้อเช้าและมื้อบ่าย)
ช่วงเวลาในการรีดนม	**รอบเช้า** : 05.00 - 06.30 น. **รอบบ่าย** : 15.00 - 16.30 น.	**รอบเช้า** : 05.00 - 07.00 น. **รอบบ่าย** : 14.00 - 16.00 น.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตาราง 3.1 รายละเอียดฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป (ต่อ)

องค์ประกอบทางเคมีหลัก	ฟาร์มโคนมอินทรีย์		ฟาร์มโคนมทั่วไป	
	ฤดูฝน**	ฤดูแล้ง**	ฤดูฝน**	ฤดูแล้ง**
Fat (%) *	3.83	4.25	3.86	3.76
Protein (%) *	2.92	3.01	3.39	3.29
Lactose (%) *	4.41	4.59	4.61	4.53
SnF (%) *	8.18	8.45	8.68	8.63
TS (%) *	11.79	12.69	12.52	12.34
SCC (cells/mL) *	304,333	288,597	769,867	665,250

* ค่าองค์ประกอบทางเคมีหลักในน้ำนมเฉลี่ยในรอบ 3 เดือนก่อนเก็บตัวอย่าง

** ฤดูฝน = เดือนกันยายน - ตุลาคม 2563 และ ฤดูแล้ง = เดือนมีนาคม - เมษายน 2564

ค่ามาตรฐานน้ำนมโคดิบ (มาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ.น้ำนมโคดิบ); Fat (%wt./wt) ≥3.35, Protein (%wt./wt.) ≥3.00, SNF (%wt./wt.) ≥8.25, SCCx1000 (cells/mL) ≤500

โดยคัดเลือกจากฟาร์มที่มีแม่โคนมพันธุ์ลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน (ร้อยละ 85) ช่วงการให้นม (lactation) ที่ 2 - 4 และอยู่ในระยะกลาง (mid lactation) ของการให้นม ประมาณ 100 - 200 วัน แม่โคในแต่ละฟาร์มถูกเลี้ยงแบบปล่อยอิสระในโรงเรือน ภายในโรงเรือนมีอากาศถ่ายเท มีการเก็บกวาดมูลโคออกจากพื้นโรงเลี้ยงอย่างสม่ำเสมอ และมีองค์ประกอบทางเคมีหลักในน้ำนม เป็นไปตามมาตรฐานน้ำนมโคดิบ (มาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ.น้ำนมโคดิบ) โดยกำหนดไว้ว่า ในน้ำนมดิบต้องมีปริมาณไขมัน ไม่น้อยกว่า 3.35%, ปริมาณโปรตีน ไม่น้อยกว่า 3.00 %, ปริมาณน้ำตาลแลคโตส ไม่น้อยกว่า 4.50 %, ปริมาณของแข็งไม่รวมไขมันนม ไม่น้อยกว่า 8.25 %, ปริมาณของแข็งทั้งหมด ไม่น้อยกว่า 12 % และมีปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบเฉลี่ยในรอบ 3 เดือน น้อยกว่า 500,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เพื่อแสดงว่าแม่โคนมมีสุขภาพดี

3.2.3.1 การคัดเลือกน้ำนมดิบจากแม่โคสุขภาพดี โดยประเมินปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบเบื้องต้นด้วยน้ำยา California mastitis test (CMT)

การประเมินปริมาณโซมาติกเซลล์ ด้วยน้ำยา CMT เป็นวิธีการประเมินปริมาณโซมาติกเซลล์เบื้องต้นในน้ำนมดิบ ด้วยน้ำยา CMT โดยเริ่มจากการทำความสะอาดบริเวณเต้านม เพื่อขจัดสิ่งสกปรกออกและรีดนมน้ำนมส่วนต้นทิ้งไป จากนั้นรีดน้ำนมลงในถาดหลุมทั้ง 4 เต้า และปรับปริมาตรน้ำนมในหลุมให้เท่ากันประมาณ 2-3 มิลลิลิตร โดยสังเกตขีดบอกปริมาตรที่ติดอยู่พื้นถาดหลุม และเทน้ำยา CMT ใส่ในถาดหลุม ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) จากนั้นหมุนวนถาดหลุมเป็นวงกลมช้าๆ เพื่อให้น้ำนมดิบและน้ำยา CMT เข้ากัน โดยหากส่วนผสมระหว่างน้ำนมดิบและน้ำยา CMT มีลักษณะข้นหนืด เคลื่อนที่ช้า แสดงว่า เป็น positive (โรคเต้านมอักเสบ) และหากส่วนผสมระหว่างสารดังกล่าว มีลักษณะใส เคลื่อนที่เร็ว แสดงว่า เป็น negative (ปกติ) แสดงดังรูปภาพ 3.2 ข ซึ่งสามารถเทียบปริมาณโซมาติกเซลล์ได้จาก CMT score โดยหากมีค่าเป็น negative แสดงว่าน้ำนมดิบปกติ (< 500,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) และหากมีค่าเป็นค่าเป็น positive แสดงว่าน้ำนมดิบมาจากเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ (1,200,000-5,000,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) หรือ แบบแสดงอาการ (> 5,000,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ขึ้นอยู่กับลักษณะของส่วนผสมที่เกิดขึ้น (Swinkels *et al.*, 2021) โดยตัวอย่างนมที่ทำการคัดเลือกมานั้น หลังจากประเมินปริมาณโซมาติกเซลล์ ด้วยน้ำยา CMT แล้ว ต้องมีค่าเป็น negative และปริมาณโซมาติกเซลล์ต้องน้อยกว่า 500,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เพื่อบ่งบอกว่า น้ำนมดิบอยู่ในเกณฑ์ปกติ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 3.2 (ก) อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการประเมินปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบ

(ข) ตัวอย่างน้ำนมดิบหลังทำปฏิกิริยากับน้ำยา CMT

3.2.3.2 การเก็บตัวอย่างน้ำนมดิบ

หลังจากที่คัดเลือกฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปแล้ว การเก็บตัวอย่างน้ำนมดิบจะแบ่งออกเป็น 2 ฤดูกาล คือ ฤดูฝน (กันยายน - ตุลาคม 2563) และ ฤดูแล้ง (มีนาคม - เมษายน 2564) โดยมีอุณหภูมิเฉลี่ย ปริมาณน้ำฝน และความชื้นสัมพัทธ์ ในแต่ละฤดูกาล แสดงดังตาราง 3.2

ตาราง 3.2 ข้อมูลสถิติภูมิอากาศในเขตอำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี

ที่มา : ศูนย์ภูมิอากาศ กรมอุตุนิยมวิทยา

ข้อมูลสถิติภูมิอากาศ	ฤดูฝน**	ฤดูแล้ง**
อุณหภูมิเฉลี่ย (องศาเซลเซียส)*	25.8	27.7
ปริมาณน้ำฝน (มิลลิเมตร)*	192.1	86.8
ความชื้นสัมพัทธ์ (%)*	82.0	68.1

* ข้อมูลสถิติภูมิอากาศเฉลี่ยในรอบ 5 ปีย้อนหลัง

** ฤดูฝน = เดือนกันยายน - ตุลาคม และ ฤดูแล้ง = เดือนมีนาคม - เมษายน

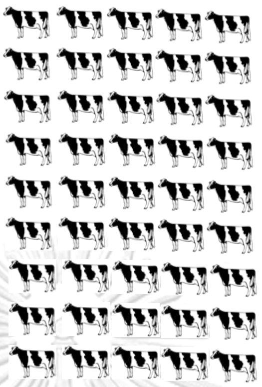
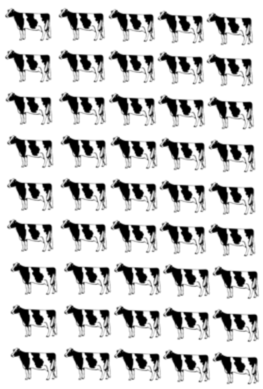
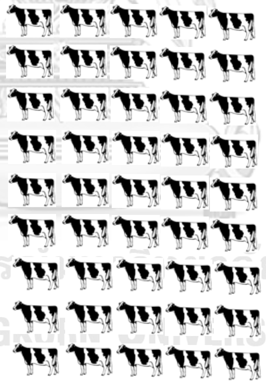
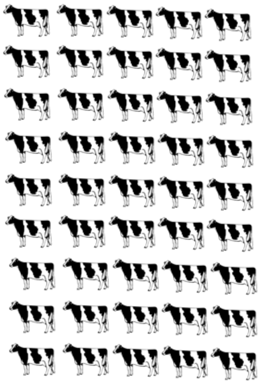
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ในแต่ละฤดูกาลจะเก็บน้ำนมดิบจากฟาร์มโคนมอินทรีย์ และฟาร์มโคนมทั่วไป ทั้งรอบเช้าและรอบบ่ายจากแม่โครายตัว (individual cow milk) ที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์จำนวน 45 ตัว และแม่โคที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไปจำนวน 45 ตัว ร่วมกับการประเมินปริมาณโซมาติกเซลล์เบื้องต้น ด้วยน้ำยา CMT จากนั้นจะนำน้ำนมดิบรอบเช้าและรอบบ่ายจากแม่โคตัวเดียวกันมารวมกันเพื่อเป็นตัวแทนน้ำนมดิบรวมจากแม่โคแต่ละตัว ดังนั้นในแต่ละฤดูกาลจะได้ตัวอย่างน้ำนมดิบจากแม่โครวมทั้งสิ้น 90 ตัว (45 ตัว x 2 ฟาร์ม) โดยเก็บตัวอย่างทั้งหมด 2 ฤดูกาล ดังนั้น จะได้ตัวอย่างน้ำนมดิบจากแม่โครวมทั้งสิ้น 180 ตัว แบ่งเป็นจากฟาร์มโคนมอินทรีย์ 90 ตัว และจากฟาร์มโคนมทั่วไป 90 ตัว แสดงดังตาราง 3.3 โดยขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง จะเริ่มจากการทำความสะอาดมือผู้รีดและทำความสะอาดเต้านม หัวนมและรูเปิดหัวนม เพื่อขจัดสิ่งสกปรกออก และ

ประเมินปริมาณโซมาติกเซลล์เบื้องต้นในน้ำนมดิบ ด้วยน้ำยา CMT หลังจากนั้นจะทำการเก็บตัวอย่างน้ำนมดิบโดยรีดตัวอย่างละ 50 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเก็บตัวอย่างพลาสติกที่เขียนป้ายกำกับไว้แล้วและนำตัวอย่างน้ำนมดิบมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสทันทีโดยการใส่ถังน้ำแข็งที่เตรียมไว้ เพื่อรักษาอุณหภูมิให้อยู่ในระหว่างการขนส่ง (2-3 ชั่วโมง) หลังจากเก็บตัวอย่างน้ำนมดิบดังกล่าว จะนำน้ำนมดิบที่เก็บจากฟาร์มเดียวกันและฤดูกาลเดียวกันจำนวน 3 ตัวอย่างมารวมกัน (pooled milk) เพื่อทำเป็น 1 ซ้ำการทดลอง (Pellattiero *et al.,* 2015) โดยในแต่ละฤดูกาลจะเก็บน้ำนมดิบจากฟาร์มโคนมอินทรีย์มาจำนวน 45 ตัวอย่าง และจากฟาร์มโคนมทั่วไปจำนวน 45 ตัวอย่างเช่นกัน ดังนั้น ในแต่ละฤดูกาลจะได้ตัวอย่างน้ำนมดิบฟาร์มละ 15 ซ้ำการทดลอง ดำเนินการเก็บจำนวน 2 ฟาร์ม เก็บตัวอย่างทั้งสิ้น 2 ฤดูกาล ดังนั้น จะได้ตัวอย่างน้ำนมดิบทั้งสิ้นรวม 60 ตัวอย่าง (15 ตัวอย่าง x 2 ฟาร์ม x 2 ฤดูกาล) จากนั้นจะแบ่งปริมาณตัวอย่างน้ำนมดิบแต่ละตัวอย่างออกเป็น 3 ส่วนและเก็บรักษาที่อุณหภูมิแตกต่างกัน ได้แก่ ส่วนที่ 1 สำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีหลักในน้ำนมและปริมาณโซมาติกเซลล์ แสดงดังข้อ 3.2.3.4 และวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณกรดทั้งหมด แสดงดังข้อ 3.2.3.5 ปริมาณ 50 มิลลิลิตร จะทำการเก็บรักษาตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่วนที่ 2 สำหรับการวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากในน้ำนมดิบด้วยเทคนิค ^{1}H-NMR ปริมาณ 50 มิลลิลิตร แสดงดังข้อ 3.2.4 และ ส่วนที่ 3 สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลกรดไขมันในน้ำนมดิบด้วยเทคนิค GC-MS ปริมาณ 50 มิลลิลิตร แสดงดังข้อ 3.2.5 โดยทั้งสองส่วนจะนำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียสเพื่อรอดำเนินการวิเคราะห์ต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตาราง 3.3 การออกแบบการทดลองเพื่อสรุปการเก็บตัวอย่างน้ำนมดิบในแต่ละฟาร์ม

รูปแบบการจัดการฟาร์ม	**ฤดูกาล**		*N*
	ฤดูฝน (กันยายน - ตุลาคม)	**ฤดูแล้ง (มีนาคม - เมษายน)**	
ฟาร์มโคนมอินทรีย์			
	แม่โคจากฟาร์มโคนมอินทรีย์ 45 ตัว	แม่โคจากฟาร์มโคนมอินทรีย์ 45 ตัว	90 ตัว
ฟาร์มโคนมทั่วไป			
	แม่โคจากฟาร์มโคนมทั่วไป 45 ตัว	แม่โคจากฟาร์มโคนมทั่วไป 45 ตัว	90 ตัว
		รวม	**180 ตัว**

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

3.2.3.3 เก็บตัวอย่างอาหารสัตว์สำหรับการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของอาหารด้วยวิธี Proximate analysis

อาหารสัตว์ที่ใช้ในฟาร์มโคนมอินทรีย์ และฟาร์มโคนมทั่วไป จะประกอบไปด้วย อาหารข้น อาหารหยาบ และอาหารแบบผสมสำเร็จรูป (TMR) โดยการสุ่มเก็บตัวอย่างจะแบ่งออกเป็น 2 ฤดูกาล คือ ฤดูฝน (กันยายน - ตุลาคม 2563) และ ฤดูแล้ง (มีนาคม - เมษายน 2564) ในช่วงวันและเวลาที่ดำเนินการเก็บตัวอย่างน้ำนมดิบ พร้อมทั้งบันทึกข้อมูลอุณหภูมิและปริมาณน้ำฝนในแต่ละช่วงฤดูกาลของพื้นที่ดังกล่าว การสุ่มเก็บตัวอย่างอาหารสัตว์ เริ่มจากการสุ่มตัวอย่างอาหารสัตว์ที่มีลักษณะแห้งไม่เปียกน้ำ จากรางอาหารหรือถุงอาหารสัตว์ โดยบรรจุอาหารสัตว์ใส่ในถุงสุญญากาศ เป็นจำนวน 1 กิโลกรัมโดยประมาณ ภายใต้การให้คำปรึกษาจากผู้เชี่ยวชาญด้านการเลี้ยงโคนมจากองค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย จากนั้นนำตัวอย่างอาหารสัตว์ไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมงหรือจนกว่าจะแห้ง บันทึกน้ำหนักหลังอบแห้งแล้วบดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร เพื่อใช้สำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธี Proximate analysis ตามวิธีการของ AOAC (1990) ได้แก่ วัตถุแห้ง (dry matter) โปรตีน (crude Protein) เถ้า (ash) ไขมัน (crude fat) เยื่อใย (crude fiber) และ คาร์โบไฮเดรต (nitrogen free extract) (ฉลอง วชิราภากร, 2016, ปณัท สุขสร้อย, 2020) ภายใต้คำแนะนำของเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์นครราชสีมา สำนักงานอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา

3.2.3.4 การตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมีหลักและปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบ

นำตัวอย่างทั้งหมด 60 ตัวอย่าง มาตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมีหลักและปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบ ด้วยเครื่อง CombiFoss^{TM} FT+ ซึ่งประกอบด้วย 2 เครื่องหลัก ได้แก่ (i) สำหรับการตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมีหลัก ได้แก่ ไขมัน โปรตีน แลคโตส ของแข็งไม่รวมไขมันนม และของแข็งทั้งหมด ตรวจวัดด้วยเครื่อง MilkoScan^{TM} FT+ analyzer โดยใช้เทคนิค Fourier

ransform infrared และ (ii) สำหรับการตรวจวัดปริมาณโซมาติกเซลล์ ตรวจวัดด้วยเครื่อง FossomaticTM FC โดยใช้เทคนิค flow cytometry ภายใต้คำแนะนำของเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ อ.ทับกวาง จ.สระบุรี

3.2.3.5 การตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำนมดิบ และปริมาณกรดทั้งหมดในน้ำนมดิบ

1. การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ อ้างอิงตามวิธีของ ISO 11869 | IDF 150 (2009) ทำให้อุณหภูมิของตัวอย่างเป็น 22 ± 2 องศาเซลเซียส เขย่าตัวอย่างช้าๆในลักษณะกลับให้ตัวอย่างที่อยู่ด้านล่างของหลอดเก็บตัวอย่างขึ้นไปบนผิวหน้าจนผสมเข้ากันเป็นอย่างดี
2. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่เตรียมประมาณ 10 ± 0.01 กรัม ด้วยเครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 3 ตำแหน่ง ในบีกเกอร์ 50 มิลลิลิตร เติมน้ำลงไปประมาณ 10 มิลลิลิตรแล้วผสมให้เข้ากัน
3. นำ electrode ของเครื่อง pH meter ใส่ลงในตัวอย่างและใช้ NaOH ความเข้มข้น 0.1 N ไทเทรตลงในบีกเกอร์ขณะที่กวนผสมตัวอย่างให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนสาร จน pH มีค่าคงที่ที่ 8.30 ± 0.01 เป็นเวลา 4 - 5 วินาที
4. คำนวณหาค่าความเป็นกรดจากการไทเทรต โดยสมการ

$$W = \frac{(V \times 0.9)}{M}$$

โดยที่ W คือ กรัมของกรดแลกติด ต่อ 100 กรัมตัวอย่าง (% lactic acid)

V คือ ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของ 0.1 N NaOH ที่ใช้ในการไทเทรต

M คือ น้ำหนัก (กรัม) ของตัวอย่าง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

3.2.4 การเตรียมตัวอย่างน้ำนมสำหรับการวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยาก (non-volatile metabolite profile) ในน้ำนมดิบโดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ด้วย Proton nuclear magnetic resonance (^{1}H-NMR)

โดยใช้วิธีของ มาริสา คงบุญเกิด (2562) ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Settachaimongkon *et al.* (2014) และ Luangwilai *et al.* (2021) ดังแสดงในรูปที่ 3.3

3.2.4.1 การเตรียมตัวอย่างน้ำนมก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR

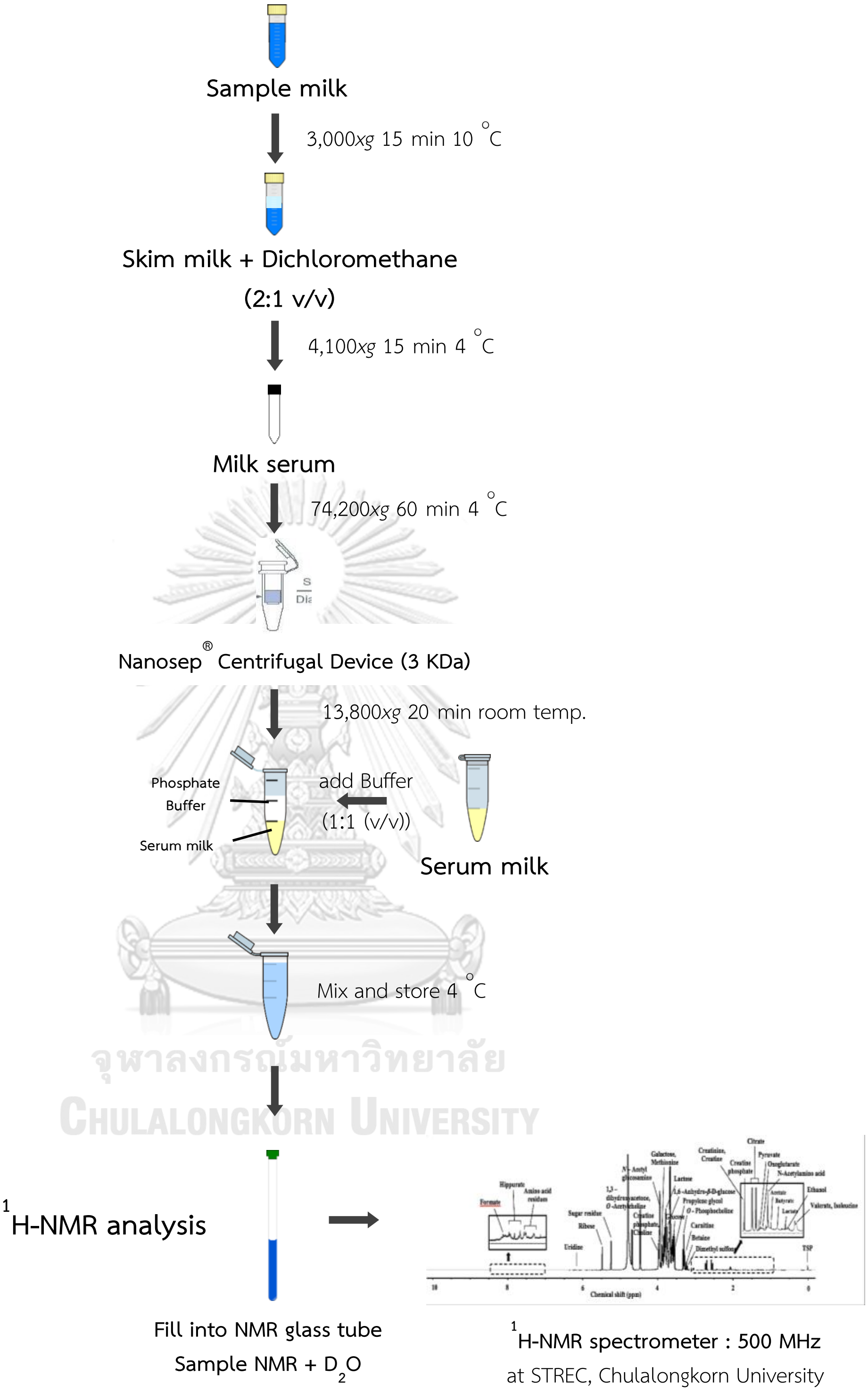
1. นำตัวอย่างน้ำนมดิบปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่หลอด centrifuge นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge (Kubota corporation, Japan) ที่ 3,000 x *g* ณ อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกไขมันนมออก หลังจากปั่นเหวี่ยง พบว่า ชั้นไขมันนมอยู่ด้านบนและหางนม (skim milk) อยู่ด้านล่าง จากนั้นถ่ายของเหลวในส่วนที่เป็นหางนมใส่หลอด centrifuge หลอดใหม่
2. สกัดไขมันที่เหลือออกด้วย dichloromethane extraction โดยนำตัวอย่างหางนมมาเจือจางกับ dichloromethane ในอัตราส่วน 2:1 (v/v) ในการศึกษานี้จะใช้ตัวอย่างหางนมปริมาตร 20 มิลลิลิตรและ dichloromethane 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง LP Vortex mixer (Thermo Fisher Scientific, China) เป็นเวลา 60 วินาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,100 x *g* ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากปั่นเหวี่ยง พบว่า ซีรั่มนม (clear milk serum) อยู่ด้านบน ส่วนชั้นไขมันนมที่เหลือและ dichloromethane อยู่ด้านล่างตามลำดับ จากนั้นถ่ายของเหลวในส่วนที่เป็นซีรั่มนมใส่หลอด centrifuge หลอดใหม่
3. นำซีรั่มนมที่ได้ใส่หลอด centrifuge สำหรับ ultra-centrifuged เพื่อแยกโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ออก โดยใช้ตัวอย่างละ 9 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง ultra-centrifuge Opima^{TM} L-100 XL ultracentrifuge (Beckman Coulter, Inc., USA) ที่

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

74,200 x *g* ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เพื่อแยกโปรตีนที่มีโมเลกุลใหญ่ออก หลังจากปั่นเหวี่ยงพบว่า ซีรั่ม (serum) อยู่ด้านบน ส่วนตะกอนของโปรตีนนมอยู่ด้านล่าง จากนั้นถ่ายของเหลวในส่วนที่เป็นซีรั่มใส่หลอด centrifuge หลอดใหม่

4. เตรียม Nanosep® centrifugal device (Pall life sciences, Ann Arbor, MI, USA) ที่มีรูกรองอนุภาคขนาด 3 กิโลดาลตัน ให้พร้อมใช้งาน (ภาคผนวก ข) จากนั้นนำซีรั่มนมใส่ใน Nanosep® centrifugal device ตัวอย่างละ 500 ไมโครลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge (Hermle Labortechnik GmbH, Germany) เพื่อกำจัดตะกอนสุดท้าย โดยปั่นเหวี่ยงที่ 13,800 x *g* ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นถ่ายของเหลวที่กรองได้ (filtrate serum) ใส่หลอด microcentrifuge หลอดใหม่
5. นำตัวอย่างที่กรองได้มาผสมกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เตรียมไว้ (pH6.0, 300 มิลลิโมลาร์ของ KH_2PO_4 10% (w/w), D_2O และ 1 มิลลิโมลาร์ของ 3-(Trimethylsilyl) propionic-2,2,3,3-d_4 acid sodium salt (TSP) เป็นสารมาตรฐานภายใน (internal standard) ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) ซึ่งในการศึกษานี้จะใช้ตัวอย่าง ปริมาตร 300 ไมโครลิตรและฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ^{1}H-NMR ภายใน 24 ชั่วโมง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 3.3 สรุปขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างน้ำนม สำหรับการวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR spectrometer

ที่มา: มาริสา คงบุญเกิด (2562)

3.2.4.2 การเตรียมตัวอย่างน้ำนมเพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR

นำตัวอย่างที่ได้ย้ายลงในหลอด NMR ขนาด 5 มิลลิเมตร ด้วย micropipette ปริมาณ 400 ไมโครลิตร และเติม D_2O เพิ่มอีก 200 ไมโครลิตร เพื่อช่วยในการจับสัญญาณแม่เหล็กไฟฟ้า (Hu *et al.,* 2004) จากนั้นนำตัวอย่างไปวัดด้วย ^{1}H-NMR (Bruker, Rheinstetten, Germany) ที่ความถี่ 500 เมกะเฮิร์ต อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ด้วย broadband observe (BBO) probe และมีการกด peak น้ำ ที่ค่า chemical shift เท่ากับ 4.80 (δ = 4.80) ซึ่งเหมาะกับตัวอย่างที่มีน้ำเป็นส่วนประกอบ โดยใช้ระยะเวลาประมาณ 30 นาทีต่อการวิเคราะห์ 1 ตัวอย่าง ภายใต้คำแนะนำของเจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.4.3 การประมวลข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR

ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ NMR เรียกว่า NMR spectra โดย NMR spectra จะอ้างอิงจากสารอ้างอิงมาตรฐาน (Internal standard) ซึ่งในการศึกษานี้ใช้ 3-(Trimethylsilyl) propionic-2,2,3,3-d_4 acid sodium salt (TSP) ช่วง chemical shifts ของโปรตอนในสารประกอบมีค่าระหว่าง 0.00–10.00 ppm โดยจะแบ่งออก (binning) เป็น 0.02 ppm (Anderson *et al*., 2011) จะได้ทั้งหมด 500 bin ซึ่งจะคำนวณหาปริมาณสัมพัทธ์ของข้อมูลจาก spectra ได้จากโปรแกรม MestreNova 14.2 (Mestrelab Research,Santiago de Compostela, Spain) โดย bin ที่มีช่วงตรงกับน้ำ (δ = 4.73 – 4.99 ppm) จะไม่นำมาวิเคราะห์ หลังจากนั้นทำการระบุชนิดสารเมตาบอไลต์จากฐานข้อมูล Chenomx NMR suite 7.5 library (Chenomx Inc., Alberta, Canada), Milk Composition Database (www.mcdb.ca), Livestock metabolome database (www.lmdb.ca), Bovine Metabolome Database (www.bovinedb.ca) และจากงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Settachaimongkon *et al.,* 2014, Schwendel *et al.,* 2015, O'Callaghan *et al.,* 2018, Liu *et al.,* 2020, Luangwilai *et al.*, 2021, Settachaimongkon *et al.*, 2021, มาริสา คงบุญเกิด, 2562) จากนั้นนำข้อมูลปริมาณ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สัมพัทธ์ของสารเมตาบอไลต์ที่ระบุเป็นสารชนิดเดียวกันในทุกตำแหน่ง bin มารวมกันด้วยโปรแกรม Microsoft Excel 2017 จะได้ sum bin ของสารเมตาบอไลต์ชนิดนั้นๆ ในตัวอย่าง เพื่อเป็นจำนวนตัวแปรรวมทั้งหมด (variable) ก่อนนำไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ

3.2.5 การเตรียมตัวอย่างน้ำนมดิบสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลกรดไขมัน (fatty acid profile) ด้วยเทคนิค Gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS)

ภายใต้คำแนะนำของเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการโภชนศาสตร์สัตว์ ศูนย์ตรวจวินิจฉัยทางการสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล จังหวัดนครปฐม ในขั้นตอนนี้จะนำตัวอย่างน้ำนมดิบทั้งหมด 60 ตัวอย่าง มาวิเคราะห์ตามวิธีของ O'Fallon *et al.* (2007)

3.2.5.1 การเตรียมตัวอย่างน้ำนมดิบเพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย GC-MS (FAME esterification)

1. ชั่งตัวอย่างน้ำนมดิบตัวอย่างละ 1 กรัม ลงใน screw-cap Pyrex culture tube
2. เติม C13:0 สารอ้างอิงมาตรฐาน 1 มิลลิลิตร (internal standard) (0.5 mg of C13:0/mL of MeOH) และ เติม 10 N KOH ลงในน้ำปริมาตร 0.7 มิลลิลิตร และเมทานอล 5.3 มิลลิลิตร จากนั้นให้ความร้อนกับตัวอย่างในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที โดยเขย่าหลอดตัวอย่างเป็นเวลา 5 วินาที ทุก ๆ 20 นาที เพื่อเพิ่มความสามารถในการละลายและไฮโดรไลต์ได้อย่างสมบูรณ์ แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
3. เติม 24 N H_2SO_4 0.58 มิลลิลิตร และให้ความร้อนกับตัวอย่างในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที โดยเขย่าหลอดตัวอย่างเป็นเวลา 5 วินาที ทุก ๆ 20 นาที
4. หลังจากการวิเคราะห์กรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ (fatty acid methyl ester; FAME) นำหลอดตัวอย่างมาทำให้อุณหภูมิลดลงด้วยน้ำประปา
5. เติมเฮกเซน 3 มิลลิลิตรในตัวอย่างและผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex-mixer เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำหลอดตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ 3000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกชั้นเฮกเซน

6. เทชั้นเฮกเซนที่มี FAME ลงในขวด GC พร้อมปิดฝาขวดทันทีและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสก่อน นำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC

3.2.5.2 การวิเคราะห์ข้อมูลกรดไขมันในน้ำนมดิบด้วย GC-MS

ฉีด Fatty acid methyl esters (FAMEs) ในเครื่อง GC-MS โดยฉีดตัวอย่างแบบ split mode มีค่าอัตราส่วน split ratio 100 : 1 ที่อุณหภูมิ injector และ detector 260 องศาเซลเซียส สารจะถูกแยกด้วยแคปิลารีคอลัมน์ SP-2560 ขนาด 100 เมตร × 0.25 มิลลิเมตร × 0.2 ไมครอน โดยใช้แก๊สฮีเลียมเป็น carrier gas (แก็สตัวพา) อัตราการไหลเท่ากับ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาทีที่ head column มีความดัน 280 กิโลปาสคาล จากนั้น ทำการตั้งอุณหภูมิของคอลัมน์ ดังนี้ อุณหภูมิเริ่มต้น 140 องศาเซลเซียส คงไว้ 5 นาที แล้วทำการเพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตรา 4 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 260 องศาเซลเซียส คงไว้เป็นเวลา 20 นาที ระบุข้อมูลกรดไขมันจากค่า retention time ตามมาตรฐาน ของ FAME standard mixture โดยตัวอย่างทั้งหมดจะนำมาวิเคราะห์ 3 ซ้ำการทดลอง และแสดงผลเป็นค่า normalized peak area (%) ภายใต้คำแนะนำของเจ้าหน้าที่ ห้องปฏิบัติการโภชนศาสตร์สัตว์ ศูนย์ตรวจวินิจฉัยทางการสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล จังหวัดนครปฐม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.2.6 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

3.2.6.1 การวิเคราะห์ทางสถิติแบบตัวแปรเดียว (univariate statistical analysis)

บันทึกข้อมูลด้วยโปรแกรม Microsoft Excel 2017 และนำข้อมูลที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีหลักในน้ำนมดิบจากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป มาวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติแบบตัวแปรเดียว (univariate statistical analysis) การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และทำการทดสอบหลังการวิเคราะห์ (post hoc test) โดยวิธีการเปรียบเทียบพหุคูณ (multiple comparison) ด้วยวิธี Turkey's test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p<0.05) และศึกษาผลการคำนวณอิทธิพลของปัจจัยต่างๆ ด้วยค่า *p*-value ที่ระดับ

ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (*p*<0.05) เพื่อตรวจสอบอิทธิพลของการจัดการฟาร์มโคนมที่แตกต่างกัน อิทธิพลของฤดูกาลที่แตกต่างกัน และอิทธิพลร่วมระหว่างการจัดการฟาร์มโคนมและฤดูกาลที่ส่งผลต่อองค์ประกอบทางเคมีหลักและข้อมูลสารชีวโมเลกุลในน้ำนมดิบ โดยใช้โปรแกรม SPSS version 22.0 (SPSS Inc., Chicago, USA)

3.2.6.2 การวิเคราะห์ทางสถิติพหุตัวแปร (multivariate statistical analysis)

1. นำปริมาณสัมพัทธ์ของข้อมูลจาก spectra ที่ได้จากโปรแกรม MestreNova 14.2 (Mestrelab Research,Santiago de Compostela, Spain) มาวิเคราะห์ข้อมูล จะต้องทำการแปลงข้อมูลให้อยู่ในรูปแบบที่ง่ายต่อการนำไปวิเคราะห์ (normalize) ด้วยค่ามัธยฐาน (median) ของข้อมูล โดยการนำค่า bin ของแต่ละตัวอย่างหารด้วยค่า median ของแต่ละ bin และนำข้อมูลที่ได้มาหาค่าลอการิทึมฐาน 2 (log_2-scaling) จะได้ข้อมูลที่ใช้สำหรับโปรแกรมสำเร็จรูป MetaboAnalyst version 5.0 เพื่อวิเคราะห์ข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างน้ำนม สำหรับ bin ที่ไม่สามารถระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ได้ จะนำค่าที่ได้จากโปรแกรม MestreNova 14.2 (Mestrelab Research,Santiago de Compostela, Spain) มาวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลโดยใช้ analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (*p*<0.05) และเลือก bin ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (*p*<0.05) รวมกับ bin ที่สามารถระบุชนิดของสารได้ เพื่อนำไปประมวลในขั้นตอนถัดไป (Settachaimongkon *et al.*, 2021, มาริสา คงบุญเกิด, 2562)
2. นำปริมาณสัมพัทธ์ของข้อมูลจากพื้นที่ใต้กราฟได้จากการวิเคราะห์กรดไขมันในน้ำนมดิบด้วย GC-MS มาวิเคราะห์ข้อมูล โดยแปลงข้อมูลที่ได้ให้อยู่ในรูปแบบที่ง่ายต่อการนำไปวิเคราะห์ (normalize) ด้วยค่ามัธยฐาน (median) ของข้อมูล พื้นที่ใต้กราฟของสารบางชนิดที่ไม่พบในทุกตัวอย่างจะถูกแทนที่ด้วยค่าที่ได้จากการประมาณค่าด้วยค่ามัธยฐานของสารชนิดนั้นๆ นำข้อมูลที่ได้มาหาค่าลอการิทึมฐาน 2 (log_2-scaling) จะได้ข้อมูลที่ใช้สำหรับโปรแกรมสำเร็จรูป

MetaboAnalyst version 5.0 (Chong *et al.,* 2018) เพื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบข้อมูลกรดไขมันของตัวอย่างน้ำนมดิบ

3. ประมวลผลข้อมูลเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติพหุตัวแปร (multivariate statistical analysis) (Skov *et al*., 2014) ได้แก่ การวิเคราะห์การจัดกลุ่มด้วยเทคนิค heat-map visualization และ hierarchical cluster analysis (HCA) ซึ่งเทคนิค heat-map visualization จะเปรียบเทียบความเข้มข้นสัมพัทธ์ (relative abundance) ของสารเมตาบอไลต์ชนิดเดียวกันในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง โดยสีแดง หมายถึง มีสารเมตาบอไลต์ชนิดนั้นมาก และสีเขียว หมายถึง มีสารเมตาบอไลต์ชนิดนั้นน้อย การวิเคราะห์ข้อมูลด้วย HCA โดยหลักการในการทำ cluster ก็คือ การจัดกลุ่มข้อมูลที่มีลักษณะเหมือนกันเข้าด้วยกัน พร้อมทั้งหาความสัมพันธ์ของข้อมูลด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แพร์สัน (pearson correlation) นอกจากนี้ ยังมีการวิเคราะห์จำแนกกลุ่มด้วยการถดถอยวิธีกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (partial least square-discriminant analysis; PLS-DA) และการวิเคราะห์จำแนกกลุ่มแบบโครงสร้างเชิงตั้งฉากด้วยการถดถอยวิธีกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (orthogonal partial least squares discriminant analysis; OPLS-DA) เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่าง โดยเสถียรภาพของการวิเคราะห์ผลด้วย PLS-DA จะพิจารณาจากค่า R^2 และ Q^2 โดย R^2 คือ ค่าความผันแปรที่สามารถอธิบายได้ (model's ability) และ Q^2 คือ ค่าบ่งบอกความสามารถว่าตัวแปรมีผลในการช่วยชี้วัดผลมากน้อยแค่ไหน (model's predictive ability) (Cui *et al.,* 2019) และ OPLS-DA จะพิจารณาความเสถียรภาพของการวิเคราะห์จากค่า R^2Y และ Q^2 โดย R^2Y คือ ค่าความผันแปรของตัวแปรตาม (y) ที่สามารถอธิบายได้ (variance of the dependent variable) (Zhang *et al.,* 2015, Li *et al*., 2021) และ Q^2 คือ ค่าบ่งบอกความสามารถว่าตัวแปรมีผลในการช่วยชี้วัดผลมากน้อยแค่ไหน (model's predictive ability) (Worley and Powers, 2016) โดย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ค่า R^2, R^2Y และ Q^2 ที่ไม่น้อยกว่า 0.50 หมายความว่า การทำนายผลนั้นมีความน่าเชื่อถือยอมรับได้ (Yang *et al.,* 2016, Li *et al.,* 2021) และสามารถใช้ในการวิเคราะห์หาชนิดของสารเมตาบอไลต์ที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในตัวอย่างได้จากค่า VIP score มากกว่า 1.00

3.2.6.3 การวิเคราะห์วิถีเมตาบอลิซึม (pathway analysis)

นำปริมาณสัมพัทธ์ของข้อมูลจาก spectra ที่ได้จากโปรแกรม MestreNova 14.2 (Mestrelab Research,Santiago de Compostela, Spain) มาทำการแปลงข้อมูลให้อยู่ในรูปแบบที่ง่ายต่อการนำไปวิเคราะห์ (normalize) ด้วยค่ามัธยฐาน (median) ของข้อมูล โดยการนำค่า bin ของแต่ละตัวอย่างหารด้วยค่า median ของแต่ละ bin และนำข้อมูลที่ได้มาหาค่าลอการิทึมฐาน 2 (log_2-scaling) เพื่อนำไปวิเคราะห์หาสารเมตาบอไลต์ที่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มตัวอย่างจากวิถีเมตาบอลิซึมของสารเมตาบอไลต์ จากข้อมูล complete genome sequencing ของโคนม (*Bos taurus*) ด้วย pathway analysis จาก MetaboAnalyst version 5.0 software (https://www.metaboanlyst.ca) และวิเคราะห์หาตำแหน่งของสารเมตาบอไลต์ที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพและวิถีเมตาบอลิซึ่มที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์สารในกลุ่มดังกล่าว ที่ได้รับอิทธิพลจากระบบการจัดการฟาร์มโคนมและฤดูกาลในการเก็บตัวอย่างที่แตกต่างกัน ด้วย KEGG's pathway analysis (https://www.genome.jp/kegg/pathway.html)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.2.7 วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

อธิบายผลการทดลองที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากในน้ำนมดิบด้วยเทคนิค ^{1}H-NMR และการวิเคราะห์ข้อมูลของกรดไขมันด้วยเทคนิค GC-MS เปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากและข้อมูลของกรดไขมันในน้ำนมดิบด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติพหุตัวแปร และนำไปเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลสารเมตาบอไลต์ในตัวอย่างที่สอดคล้องกับอิทธิพลของการจัดการฟาร์มโคนมและฤดูกาลในการเก็บตัวอย่างที่แตกต่างกันต่อการเปลี่ยนแปลงข้อมูลสารเมตาบอไลต์และข้อมูลกรดไขมันในน้ำนมดิบ โดยเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของน้ำนมดิบจากแม่โคที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ และฟาร์มโคนมทั่วไป รวมทั้งวิเคราะห์หาชนิดของสารเมตาบอไลต์และกรดไขมันที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อแยกความแตกต่างระหว่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมที่มีระบบการจัดการฟาร์มที่แตกต่างกันและอิทธิพลของฤดูกาลต่อความผันแปรขององค์ประกอบชีวเคมีในน้ำนมดิบ พร้อมทั้งวิเคราะห์หาตำแหน่งของสารเมตาบอไลต์จากวิถีเมตาบอลิซึมที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพและวิถีเมตาบอลิซึ่มที่เกี่ยวข้องกับอิทธิพลของระบบการจัดการฟาร์มแบบเกษตรอินทรีย์และฤดูกาลที่แตกต่างกัน และสรุปผลการทดลอง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากด้วย ^{1}H-NMR โดยใช้ตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์ทางการค้าในประเทศไทย

งานวิจัยในขั้นตอนนี้จะนำตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์ทางการค้าในประเทศไทย 3 ตราสินค้า จำนวน 4 ผลิตภัณฑ์ ได้แก่ ผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์พาสเจอร์ไรส์ ชนิด ก. ผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์พาสเจอร์ไรส์ ชนิด ข. ผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์พาสเจอร์ไรส์ ชนิด ค. และผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์พาสเจอร์ไรส์ ชนิด ง. มาศึกษาเปรียบเทียบข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์ที่มีความหลากหลายในท้องตลาด โดยดำเนินการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ละ 8 ตัวอย่าง ในช่วงวันหมดอายุที่ใกล้เคียงกัน รวมทั้งหมด 32 ตัวอย่าง

4.1.1 การตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมีหลักในผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์ทางการค้า

การศึกษาในขั้นตอนนี้จะตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมีหลักของตัวอย่างน้ำนมทางการค้าทั้ง 3 ตราสินค้า จำนวน 4 ผลิตภัณฑ์ ซึ่งประกอบไปด้วยไขมัน โปรตีน แลคโตส ของแข็งไม่รวมไขมันนม และของแข็งทั้งหมด โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีหลักของผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์ทางการค้าที่มีความหลากหลายในท้องตลาด และนำไปเปรียบเทียบข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างน้ำนมจากการวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR และเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติพหุตัวแปร

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีหลักของตัวอย่างน้ำนมทางการค้าด้วยเครื่อง MilkoScan^{TM} FT+ analyzer โดยใช้เทคนิค Fourier Transform Infrared (FTIR) ดังแสดงในตาราง 4.1 พบว่าปริมาณไขมัน โปรตีน แลคโตส ในตัวอย่างน้ำนมมีค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 3.44–4.48, 3.02-3.07 และ 3.72-4.03 ตามลำดับ ซึ่งเป็นไปตามมาตรฐานของประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 350) พ.ศ. 2556 เรื่องนมโค ที่บัญญัติว่าน้ำนมโคสดหรือน้ำนมโคต้องมีปริมาณไขมันไม่น้อยกว่าร้อยละ 3.2 โดยน้ำหนัก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

(สำหรับน้ำนมโคสดและน้ำนมโคชนิดเต็มมันเนย), ปริมาณโปรตีนนมไม่น้อยกว่าร้อยละ 2.8 โดยน้ำหนัก (กระทรวงสาธารณสุข, 2556)

ตาราง 4.1 องค์ประกอบทางเคมีหลักของผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์ทางการค้าที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ตราสินค้า	**องค์ประกอบทางเคมีหลัก**					
	Fat (%)	Protein (%)	Lactose (%)	SnF (%)	TS (%)	pH
นมอินทรีย์พาสเจอร์ไรส์ ชนิด ก.	3.55±0.04^{c}	3.03±0.02^{ab}	3.99±0.02^{a}	7.04±0.02^{a}	10.57±0.03^{c}	6.69±0.01^{a}
นมอินทรีย์พาสเจอร์ไรส์ชนิด ข.	4.48±0.02^{a}	3.02±0.02^{b}	3.72±0.03^{c}	6.75±0.04^{c}	11.23±0.03^{a}	6.69±0.01^{a}
นมอินทรีย์พาสเจอร์ไรส์ชนิด ค.	3.96±0.05^{b}	3.07±0.02^{a}	3.87±0.03^{b}	6.95±0.04^{b}	10.91±0.02^{b}	6.67±0.01^{ab}
นมอินทรีย์พาสเจอร์ไรส์ชนิด ง.	3.44±0.01^{d}	3.04±0.02^{ab}	4.03±0.02^{a}	7.08±0.03^{a}	10.51±0.03^{c}	6.67±0.02^{b}

เมื่อพิจารณาปริมาณไขมันในตัวอย่างน้ำนมพบว่าน้ำนมอินทรีย์พาสเจอร์ไรส์ ชนิด ข. มีปริมาณไขมันในน้ำนมมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำนมอินทรีย์ชนิดอื่น โดยรายงานของ Capuano *et al.* (2015) พบว่า อิทธิพลของอาหารสัตว์และการเลี้ยงแบบปล่อยสัตว์แทะเล็มในทุ่งหญ้าธรรมชาติมีผลต่อปริมาณไขมันและกรดไขมันน้ำนม (Capuano *et al.*, 2015) ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลของผลิตภัณฑ์ ที่ว่า น้ำนมอินทรีย์พาสเจอร์ไรส์ ชนิด ข. ได้มาจากแม่โคที่ถูกเลี้ยงแบบปล่อยสัตว์แทะเล็มในทุ่งหญ้าเป็นเวลาหลายวันมากกว่าน้ำนมอินทรีย์ตราสินค้าอื่น

เมื่อพิจารณาปริมาณโปรตีนในตัวอย่างน้ำนมพบว่าน้ำนมอินทรีย์พาสเจอร์ไรส์ในแต่ละชนิดมีความใกล้เคียงกัน โดยมีรายงานว่า ปริมาณโปรตีนในน้ำนมส่วนใหญ่จะไม่ผันแปรจากปัจจัยการจัดการฟาร์ม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

(Walker *et al.*, 2004) แต่จะผันแปรตามสายพันธุ์ของโคและระยะการให้น้ำนมอย่างมีนัยสำคัญ (Maurice-Van Eijindhoven *et al.,* 2011)

เมื่อพิจารณาปริมาณแลคโตสในตัวอย่างน้ำนมพบว่าน้ำนมอินทรีย์พาสเจอร์ไรส์ชนิด ก. และน้ำนมอินทรีย์พาสเจอร์ไรส์ ชนิด ค. มีปริมาณแลคโตสสูงกว่าน้ำนมอินทรีย์ชนิดอื่น โดยมีรายงานของ Zagorska and Ciprovica (2008) และ KouřimsKá *et al.* (2014) พบว่า การแปรผันของปริมาณแลคโตสน่าจะมีผลมาจากปริมาณน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในอาหารสัตว์มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น (Zagorska and Ciprovica, 2008, KouřimsKá *et al.*, 2014)

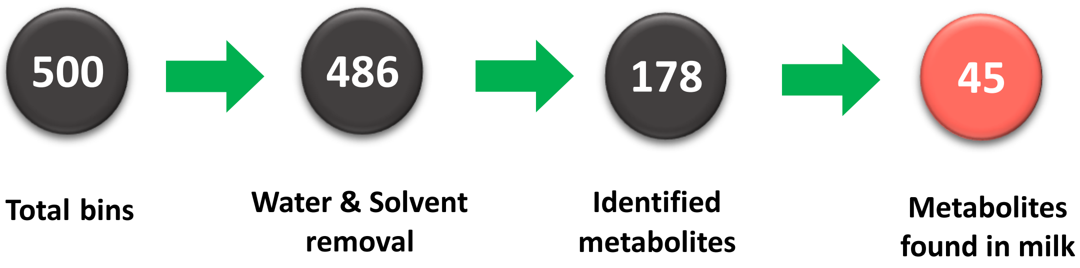
4.1.2 การตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่างในผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์ทางการค้า

ตามมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติระบุว่าค่าความเป็นกรดด่างของน้ำนมโคดิบควรอยู่ในช่วง 6.6-6.8 (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2553) จากการวัดค่าความเป็นกรดด่างของตัวอย่างน้ำนมอินทรีย์พาสเจอไรส์พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวอย่างอยู่ในเกณฑ์ปกติ และเป็นไปตามมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงสมบัติทางเคมีกายภาพที่ดีของตัวอย่างน้ำนมอินทรีย์พาสเจอไรส์ และไม่มีความผิดปกติจากการเสื่อมเสียเนื่องจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ในกลุ่มที่สร้างกรดแลคติก (lactic acid fermentation) ได้แก่ *Lactobacillus spp., Streptococcus spp., Lactococcus spp.,* และ *Leuconostoc spp.* ซึ่งหากจุลินทรีย์มีการหมักน้ำตาลแลคโตสจะได้กรดแลคติกในผลิตภัณฑ์นม ส่งผลให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำนมลดลง เกิดรสเปรี้ยว และเกิดการแยกชั้น เนื่องจากการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน (protein denaturation) (Caplice and Fitzgerald, 1999)

4.1.3 การประมวลข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างน้ำนมอินทรีย์พาสเจอไรส์โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ทางเมตาโบโลมิกส์

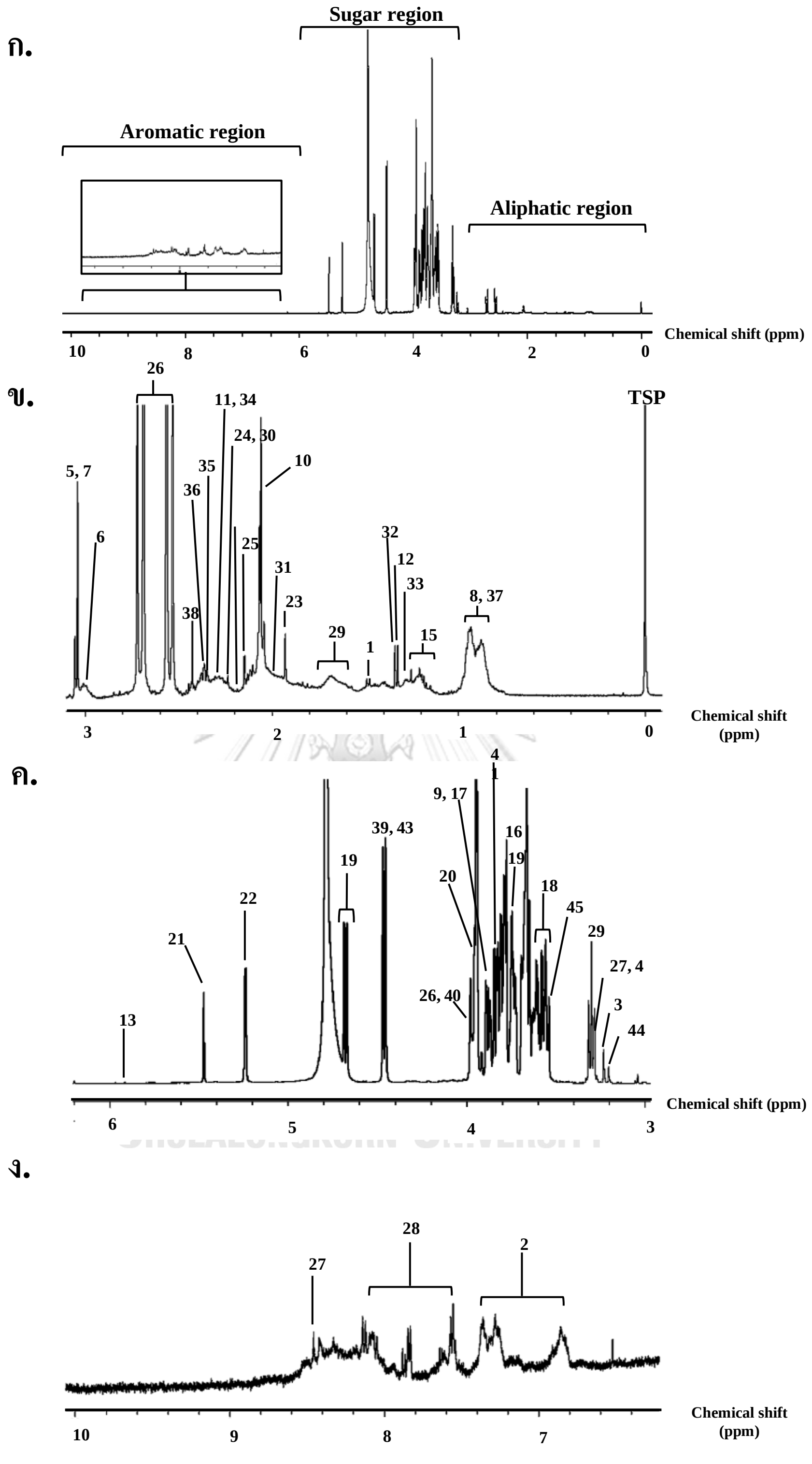
4.1.3.1 การประมวลผล spectra ของ ^{1}H-NMR และการระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ spectra ของตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์ทางการค้าที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR

หลังจากการประมวลผล ^{1}H-NMR spectra ในช่วง chemical shifts (δ) ระหว่าง 0.00–10.00 ppm (แสดงดังขั้นตอนที่ 3.2.4.3) ได้ทั้งหมด 500 bin และจะนำมาระบุชนิดสารเมตาบอไลต์ โดยเปรียบเทียบจากฐานข้อมูล Chenomx NMR suite 8.6 library (Chenomx Inc., Alberta, Canada), Milk Composition Database (www.mcdb.ca), Livestock Metabolome Database version 1.0 (www.lmdb.ca), Bovine Metabolome Database (www.bovinedb.ca) และจากงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Settachaimongkon *et al.,* 2014, Schwendel *et al.,* 2015, O'Callaghan *et al.,* 2018, Liu *et al.*, 2020, Luangwilai *et al.,* 2021, Settachaimongkon *et al.,* 2021, มาริสา คงบุญเกิด, 2562) โดยสามารถระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ในตัวอย่างน้ำนมอินทรีย์พาสเจอไรส์ทางการค้าได้ทั้งหมด 178 bin และเมื่อนำสารเมตาบอไลต์ที่ได้มาจัดกลุ่มจะได้สารทั้งหมด 45 เมตาบอไลต์ แสดงดังรูปที่ 4.1 โดยเป็นสารในกลุ่มของ กรดอะมิโนและอนุพันธ์ แอลกอฮอล์ คาร์โบไฮเดรตและอนุพันธ์ อนุพันธ์ของไขมัน สารประกอบคาร์บอนิล และอื่นๆ สามารถระบุตำแหน่งบนสเปกตรัมดังแสดงในรูปที่ 4.2 และตาราง 4.2



รูปที่ 4.1 แผนผังแสดงจำนวน bin ของ ^{1}H-NMR spectrum สำหรับนำไปใช้ในการวิเคราะห์ทางสถิติพหุตัวแปร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



รูปที่ 4.2 (ก) การระบุตำแหน่งข้อมูลของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR ของตัวอย่างน้ำนมอินทรีย์พาสเจอไรส์ (ข) ภาพขยายในช่วง Aliphatic region (0.01-3.00 ppm) (ค) ภาพขยายในช่วง Sugar region (3.00-6.00 ppm) และ (ง) ภาพขยายในช่วง Aromatic region (6.50-10.00 ppm)

ตาราง 4.2 ค่า chemical shift (ppm) ที่ใช้ระบุตำแหน่งสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากที่พบในตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์ทางการค้าในงานวิจัยนี้ทั้งหมด 45 สารเมตาบอไลต์

กลุ่มสารประกอบเคมี	ลำดับ	สารเมตาบอไลต์	^{1}H chemical shift, ppm[a]
กรดอะมิโนและอนุพันธ์	1	Alanine	3.83 (m)- 3.79 (m), 1.49 (d)-1.47 (d)
	2	Amino acid residues	8.37 (m) – 8.09 (m), 7.27 (m) – 7.31 (m), 6.85 (d) – 6.87 (s)
	3	Betaine	3.27 (s)
	4	Carnitine	3.21 (d)- 3.23 (d)
	5	Creatine	3.97 (s)- 3.93(s), 3.05 (s)-3.03(s)
	6	Creatine phosphate	3.95 (s)
	7	Creatinine	4.07 (s), 3.05 (s)- 3.03 (s)
	8	Isoleucine	0.99 (d), 0.93 (t)
	9	Methionine	2.15 (m)
	10	*N*-Acetylamino acid	2.05 (d)- 2.07(d), 2.13 (s)
	11	Proline	3.45 (m)- 3.41 (m), 3.37 (m)-3.31 (m), 2.37(m)- 2.33(m), 2.07(m)- 1.99(m)
	12	Threonine	4.27(m)- 4.29 (m)
	13	Uridine	4.25 (m)- 4.27 (m)
	14	Valine	2.27(m)- 2.25 (m), 1.05 (d)-0.99(d)
แอลกอฮอล์	15	Ethanol	1.21 (t)- 1.17 (t)
คาร์โบไฮเดรตและอนุพันธ์	16	1,6-anhydro-*β*-*D*-glucose	3.69 (s), 3.75 (m)-3.79 (m), 4.07 (d)-4.09 (d), 4.61 (d)-4.63 (d), 5.47 (s)
	17	Galactose	5.29 (d)- 5.27 (d), 4.59 (d), , 4.11 (m)- 4.07 (m), 3.99 (m)-3.63 (m), 3.53 (m)- 3.47 (m)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

กลุ่มสารประกอบเคมี	ลำดับ	สารเมตาบอไลต์	[1]H chemical shift, ppm[a]
คาร์โบไฮเดรตและอนุพันธ์	18	Glucose	5.25 (m)- 5.23 (m), 4.65 (d), 3.97 (m)- 3.71 (m), 3.55 (m)- 3.25 (m)
	19	Lactose	4.69 (d)- 4.67 (d), 4.47 (d)- 4.45 (d), 3.99 (m)- 3.93 (m), 3.89 (m)- 3.53 (m), .31 (m)- 3.29 (m)
	20	*N* - Acetylglucosamine	8.07 (d)- 8.05 (d), 3.53 (m)- 3.49 (m), 2.07 (s)- 2.03 (s)
	21	Ribose	5.39 (m) -5.41(m)
	22	Sugar residues	5.45 (m), 5.39(m)-5.37 (m)
กรดอินทรีย์	23	Acetate	1.93 (s)
	24	Acetoacetate	2.27 (m)
	25	Butyrate	2.19-2.15, 15.3 (m)– 1.59 (m), 0.91 (t)– 0.87 (t)
	26	Citrate	2.73/2.71 (d)– 2.69 (d), 25.7 (d)– 2.53 (d)
	27	Formate	8.45 (s)
	28	Hippurate	3.95(d)- 3.97 (d)
	29	β - Hydroxybutyrate	3.57 (m)– 3.53 (m), 1.37 (s)
	30	Hydroxyisovalerate	0.83(d)-0.85(d), 1.99(m)- 2.07(m), 1.25(d)- 1.27(d)
	31	Isovalerate	2.35 (s)
	32	Lactate	4.15 (m)– 4.12 (m), 1.35 (d)– 1.33 (d)
	33	2-octenoate	1.31 (m)
	34	2-Oxoglutarate	3.03 (t)– 3.01 (t), 2.45 (t)
	35	Pyruvate	2.37 (s)
	36	Succinate	2.43 (s)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

กลุ่มสารประกอบเคมี	ลำดับ	สารเมตาบอไลต์	^{1}H chemical shift, ppm[a]
อนุพันธ์ของไขมัน	37	Valerate	3.85 (m), 2.37 (s), 2.07 (m)– 1.99 (m), 1.29 (s)– 1.27 (s), 0.93 (t)- 0.91 (t), 0.89 (t)- 0.83 (t)
	38	Acetyl carnitine	2.15 (s)
	39	*O* - Acetylcholine	3.75 (m), 3.21 (s), 2.15 (s)
	40	Choline	3.21 (s)- 3.23 (s)
	41	Glycerophosphocholine	4.33 (m)- 4.31 (m), 3.61 (m), 3.23 (s)
	42	*O* - Phosphocholine	4.23 (m)- 4.17 (m)
สารประกอบคาร์บอนิล	43	1,3-dihydroxyacetone	4.43 (s)
อื่นๆ	44	Dimethyl sulfone	3.15 (s)
	45	Propylene glycol	1.13 (d)- 1.15 (d), 3.43 (m)- 3.47 (m)

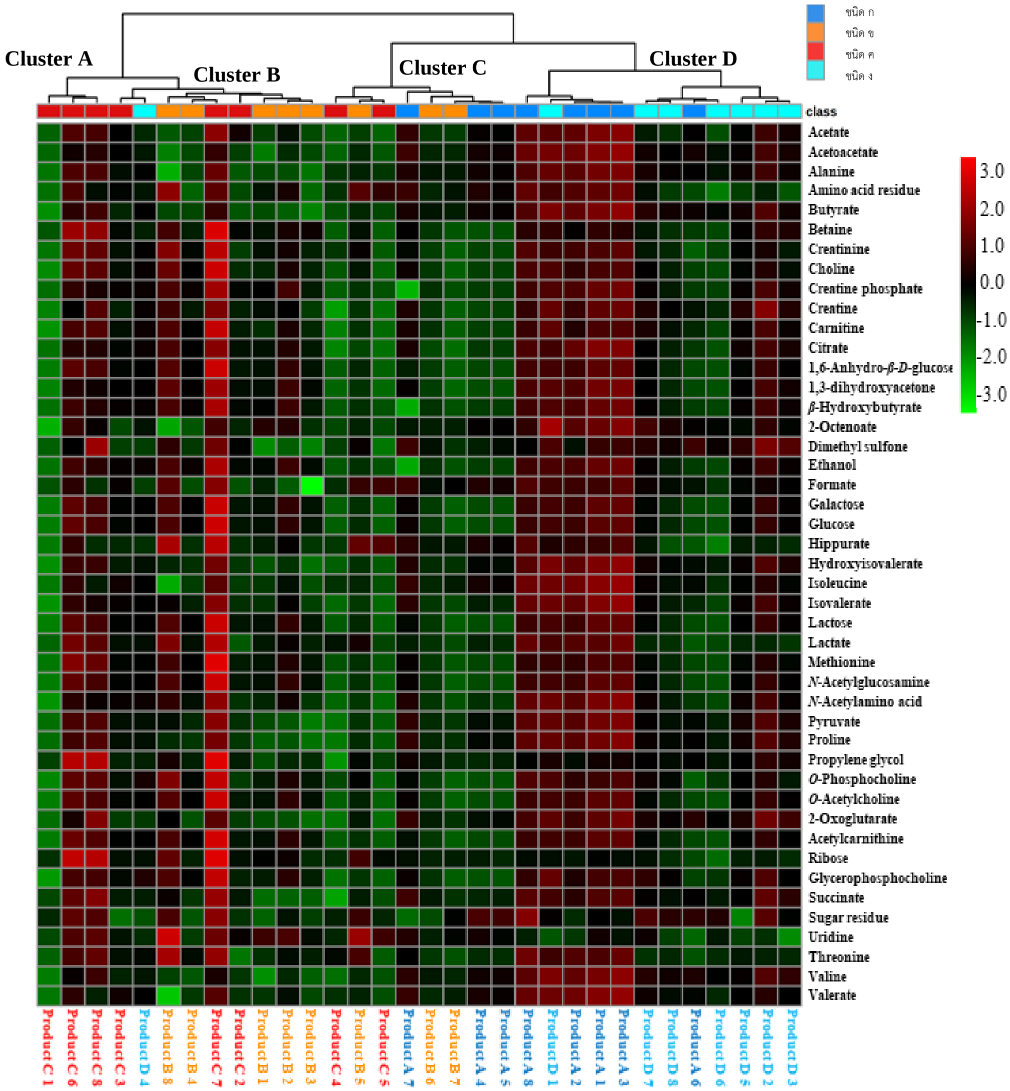
[a] Chemical shift values are referenced to TSP signal (0.00 ppm) at pH 6.00

4.1.3.2 การเปรียบเทียบข้อมูลของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากของตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์ทางการค้า (*n*=32) ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR โดยเทคนิค heat-map visualization และ hierarchical cluster analysis (HCA)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จากข้อมูลที่ได้จากการประมวลผล ^{1}H-NMR spectra สามารถระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์ทางการค้า (*n*=32) ได้ทั้งหมด 178 bin จากนั้นนำปริมาณสัมพัทธ์ของข้อมูลจาก spectra ในแต่ละ bin มาแปลงข้อมูลให้อยู่ในรูปแบบที่ง่ายต่อการนำไปประมวลผล (normalized data) เพื่อวิเคราะห์การจัดกลุ่มโดยอาศัยเทคนิค heat-map visualization และ HCA โดยโปรแกรมสำเร็จรูป Metaboanalyst version5.0 จากการนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์โดยการจัดกลุ่ม ด้วยเทคนิค heat-map visualization จะเป็นการเปรียบเทียบความเข้มข้นสัมพัทธ์ (relative abundance) ของสารเมตาบอไลต์ชนิดเดียวกันในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง โดยสีแดง หมายถึง มีสารเมตาบอไลต์ชนิดนั้นมาก และสีเขียว หมายถึง มีสารเมตาบอไลต์ชนิดนั้นน้อย และวิเคราะห์ข้อมูลด้วย HCA ซึ่งหลักการในการทำ cluster ก็คือ

การจัดกลุ่มข้อมูลที่มีลักษณะเหมือนกันเข้าด้วยกัน และหาความสัมพันธ์ของด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แพร์สัน (pearson’s correlation) จากผลการวิเคราะห์ พบว่าสามารถแยกกลุ่มตัวอย่างน้ำนมอินทรีย์พาสเจอไรส์ในแต่ละตราสินค้าออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ (i) กลุ่มผลิตภัณฑ์น้ำนมอินทรีย์พาสเจอไรส์ ชนิด ก. และ ชนิด ง. (cluster D) (ii) กลุ่มผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์พาสเจอร์ไรส์ ชนิด ข. และ ชนิด ค. (cluster A, B และ C) ดังแสดงในรูปที่ 4.3



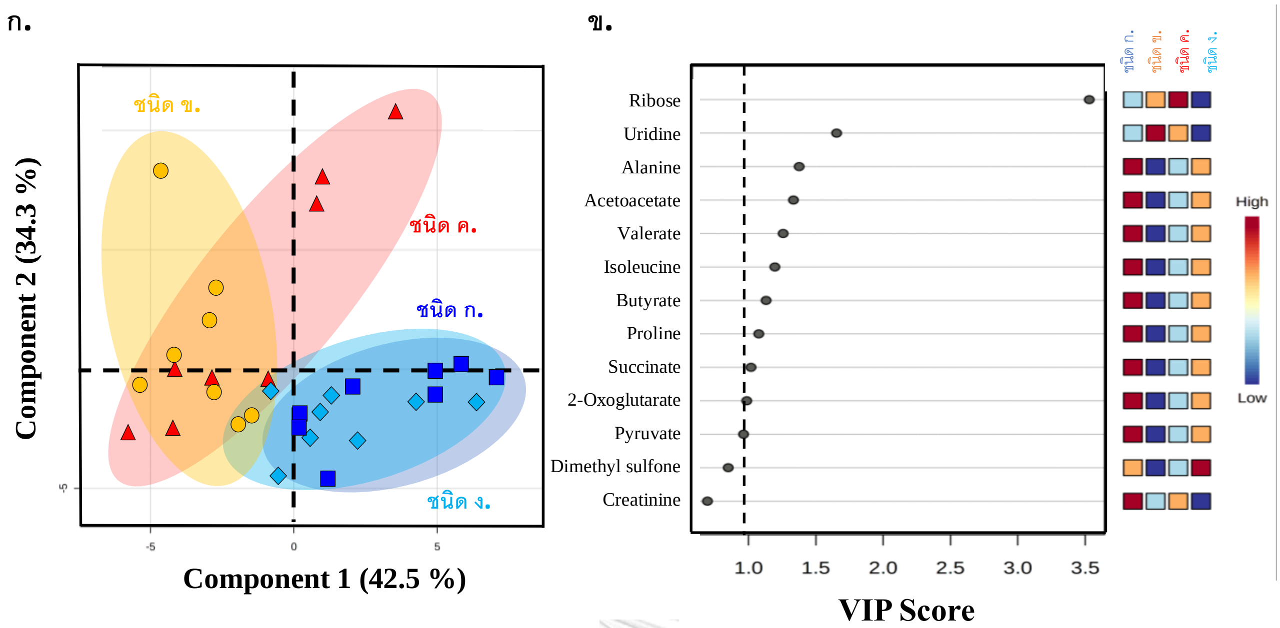
รูปที่ 4.3 การวิเคราะห์โดยการจัดกลุ่มด้วยเทคนิค heat-map visualization และ hierarchical cluster analysis (HCA) ของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR ของตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์ทางการค้า

หมายเหตุ : ผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์พาสเจอร์ไรส์ ชนิด ก. (■) ชนิด ข. (■) ชนิด ค. (■) และชนิด ง. (□)

4.1.3.3 การเปรียบเทียบข้อมูลของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากของผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์ทางการค้า (*n*=32) ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR โดยการวิเคราะห์จำแนกกลุ่มด้วยการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุด (Partial least square-discriminant analysis; PLS-DA)

ในขั้นตอนนี้จะนำข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากของกลุ่มตัวอย่างน้ำนมอินทรีย์ทางการค้า (*n*=32) มาจัดกลุ่มโดยการวิเคราะห์ PLS-DA หรือการวิเคราะห์จำแนกกลุ่มด้วยการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุด พบว่า มีความแปรปรวนของตัวแปรรวมร้อยละ 76.8 โดย component 1 สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ร้อยละ 42.5 และ component 2 สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ ร้อยละ 34.3 (รูปที่ 4.4 ก) โดยการวิเคราะห์จำแนกกลุ่มด้วยการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดจะประกอบไปด้วยข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากของกลุ่มตัวอย่างน้ำนมอินทรีย์ ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างระหว่างนมอินทรีย์พาสเจอร์ไรส์ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ (i) กลุ่มนมอินทรีย์พาสเจอร์ไรส์ ชนิด ก. และ ชนิด ง. และ (ii) กลุ่มนมอินทรีย์พาสเจอร์ไรส์ ชนิด ข. และ ชนิด ค. โดยมีค่า accuracy ร้อยละ 78.13, ค่า R^2 เท่ากับ 0.578 และ Q^2 เท่ากับ 0.452 ซึ่งผลที่กล่าวมานี้สอดคล้องกับผลจาก heat-map visualization และ hierarchical cluster analysis (HCA) ดังแสดงในรูปที่ 4.3 ข้างต้น เนื่องจากกลุ่มนมอินทรีย์พาสเจอร์ไรส์ ชนิด ก. และ ชนิด ง. รับน้ำนมดิบมาจากองค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทยเช่นเดียวกัน จึงทำให้น้ำนมจากสองตราสินค้ามีความคล้ายคลึงกัน ในขณะที่กลุ่มนมอินทรีย์พาสเจอร์ไรส์ ชนิด ข. และ ชนิด ค. เป็นผลิตภัณฑ์ภายใต้ตราสินค้าเดียวกัน แต่ก็ยังมีความแตกต่างกัน เนื่องจากน้ำนมอินทรีย์พาสเจอร์ไรส์ ชนิด ข. เป็นน้ำนมอินทรีย์ที่ได้จากการเลี้ยงโคด้วยอาหารอินทรีย์ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 90 ของวัตถุแห้ง โดยเน้นหญ้าสดเป็นอาหารหลักและมีการเลี้ยงแบบปล่อยสัตว์แทะเล็มทุ่งหญ้าตลอดทั้งปี (365 วัน) ในขณะที่น้ำนมอินทรีย์พาสเจอร์ไรส์ ชนิด ค. เป็นน้ำนมอินทรีย์ที่มีการเลี้ยงแม่โคด้วยอาหารอินทรีย์ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 70 ของวัตถุแห้งและมีการเลี้ยงแบบปล่อยสัตว์แทะเล็มทุ่งหญ้าอย่างน้อยปีละ 120-150 วันที่เป็นไปตามมาตรฐานเกษตรอินทรีย์และปศุสัตว์อินทรีย์ที่กำหนด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



รูปที่ 4.4 PLS-DA 2D score plot (ก.) และ VIP score (ข.) ของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากที่ได้จากวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR ของตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์พาสเจอร์ไรส์

หมายเหตุ : ผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์พาสเจอร์ไรส์ ชนิด ก. (■) ชนิด ข. (●) ชนิด ค. (▲) และชนิด ง. (◇)

จากนั้นนำข้อมูลมาพิจารณาค่าน้ำหนักองค์ประกอบเพื่อหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อกลุ่มตัวอย่างของผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์ในแต่ละตราสินค้า จาก VIP score ซึ่งผลการวิเคราะห์ แสดงให้เห็นว่าได้สารเมตาบอไลต์ที่เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของน้ำนมอินทรีย์พาสเจอร์ไรส์ทั้งหมด 10 สารเมตาบอไลต์ ได้แก่ acetoacetate, alanine, butyrate, isoleucine, 2-oxoglutarate, proline, ribose, succinate, uridine และ valerate และพบว่าสารเมตาบอไลต์ที่เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของกลุ่มนมอินทรีย์พาสเจอร์ไรส์ ชนิด ก. และ ชนิด ง. ได้แก่ acetoacetate, alanine, butyrate, isoleucine, 2-oxoglutarate, proline, succinate และ valerate และ สารเมตาบอไลต์ที่เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของกลุ่มนมอินทรีย์พาสเจอร์ไรส์ ชนิด ข. และ ชนิด ค. ได้แก่ ribose และ uridine ดังแสดงในรูปที่ 4.4 ข โดยสารเมตาบอไลต์ที่พบสอดคล้องกับรายงานของ Schwendel *et al*. (2015) ที่กล่าวว่า ความแปรผันของปริมาณของสารเมตาบอไลต์ขึ้นอยู่กับความแตกต่างของอาหารสัตว์ และสุขภาพของแม่วัวจากการจัดการฟาร์มแบบอินทรีย์ (Schwendel *et al*., 2015) และ พบว่าสารเมตาบอไลต์กลุ่มกรดอะมิโนอิสระที่พบมากในกลุ่มนมอินทรีย์พาสเจอร์ไรส์ ชนิด ก. และ ชนิด ง. ได้แก่ isoleucine และ proline สอดคล้องกับรายงานของ Boudonck

et al. (2009) และ Sun *et al*. (2015) และ การเพิ่มขึ้นของ butyrate และ 2-oxoglutarate เป็นกรดไขมันสายสั้นที่สัมพันธ์กับกระบวนการหมักของคาร์โบไฮเดรตที่แตกต่างกันในกระเพาะรูเมนของแม่โค (Klebling *et al.,* 2002) นอกจากนี้ ยังมีสารเมตาบอไลต์ที่พบมากในกลุ่มนมอินทรีย์พาสเจอร์ไรส์ ชนิด ข. และ ชนิด ค. ได้แก่ ribose และ uridine ที่สัมพันธ์กับการจัดการฟาร์มโคนมอินทรีย์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Boudonck *et al*. (2009), O'Donnell-Megaro *et al*. (2011) และ Sun *et al*. (2015) จากผลการวิจัยดังกล่าวสรุปได้ว่า ผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์ทางการค้าในประเทศไทย 3 ตราสินค้า จำนวน 4 ผลิตภัณฑ์ สามารถจำแนกความแตกต่างของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ (i) กลุ่มนมอินทรีย์พาสเจอร์ไรส์ ชนิด ก. และ ชนิด ง. และ (ii) กลุ่มนมอินทรีย์พาสเจอร์ไรส์ ชนิด ข. และ ชนิด ค. โดยสามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างได้ตามแหล่งที่มาของน้ำนมดิบและผู้ผลิตในแต่ละตราสินค้า

4.2 การคัดเลือกตัวอย่างน้ำนมดิบจากแม่โคที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ และฟาร์มโคนมทั่วไป ในเขตพื้นที่อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี

งานวิจัยในขั้นตอนนี้ครอบคลุมการคัดเลือกตัวอย่างน้ำนมดิบจากแม่โคที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป ในเขตพื้นที่อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี โดยแบ่งการเก็บตัวอย่างน้ำนมดิบออกเป็น 2 ฤดูกาล คือ ฤดูฝน (กันยายน - ตุลาคม 2563) และ ฤดูแล้ง (มีนาคม - เมษายน 2564) เพื่อใช้ในการศึกษาอิทธิพลของการจัดการฟาร์มโคนมที่แตกต่างกัน และปัจจัยจากฤดูกาลที่เก็บตัวอย่างต่อการเปลี่ยนแปลงข้อมูลสารเมตาบอไลต์และข้อมูลกรดไขมันในน้ำนมดิบ โดยการประเมินปริมาณโซมาติกเซลล์เบื้องต้นในน้ำนมด้วยน้ำยา CMT เพื่อพิจารณาคัดเลือกน้ำนมดิบจากแม่โคที่มีเต้านมสุขภาพดี ภายใต้การให้คำปรึกษาจากผู้เชี่ยวชาญด้านการเลี้ยงโคนมจากองค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย (อ.ส.ค.) และเจ้าหน้าที่จากสหกรณ์โคนมไทย – เดนมาร์ค (มิตรภาพ) อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี จากนั้นนำตัวอย่างน้ำนมดิบมาตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมีหลักด้วยเครื่อง MilkoScan^{TM} FT+ analyzer (FOSS, Hilleroed, Denmark) โดยใช้เทคนิค Fourier Transform Infrared (FTIR) ตรวจวัดปริมาณโซมาติกเซลล์ด้วยเครื่อง Fossomatic^{TM} FC (FOSS, Hilleroed, Denmark) โดยใช้เทคนิค flow cytometry ตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ค่าปริมาณกรดทั้งหมดและนำตัวอย่างมาเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างข้อมูลแบบแผนทางชีว

โมเลกุลของน้ำนมดิบจากแม่โคที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปด้วยเทคนิค ^{1}H-NMR และ GC-MS และเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลดังกล่าวด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติพหุตัวแปร (multivariate statistical analysis) ได้แก่ การวิเคราะห์การจัดกลุ่มด้วยเทคนิค heat-map visualization และ hierarchical cluster analysis (HCA) หาความสัมพันธ์ของตัวอย่างด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แพร์สัน (pearson's correlation) การหารูปแบบความแตกต่างของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากและกรดไขมันระหว่างตัวอย่างด้วยการวิเคราะห์จำแนกกลุ่มด้วยการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุด (partial least square-discriminant analysis; PLS-DA) และ การวิเคราะห์จำแนกกลุ่มแบบโครงสร้างเชิงตั้งฉากด้วยการถดถอยวิธีกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (orthogonal partial least squares discriminant analysis; OPLS-DA) พร้อมทั้งวิเคราะห์หาชนิดของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากและกรดไขมันที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (potential biomarker metabolites) จากค่า VIP scores และระบุตำแหน่งของสารเมตาบอไลต์และกรดไขมันที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในวิถีเมตาบอลิซึมที่เกี่ยวข้องด้วย KEGG's pathway analysis

4.2.1 การคัดเลือกน้ำนมดิบจากแม่โคสุขภาพดี โดยประเมินปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบเบื้องต้นด้วยน้ำยา California mastitis test (CMT)

การวิเคราะห์ขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพิจารณาคัดเลือกน้ำนมดิบจากแม่โคที่มีเต้านมสุขภาพดีจากทั้งฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปเพื่อลดปัจจัยในด้านสุขภาพของแม่วัวที่อาจส่งผลต่อองค์ประกอบทางเคมีหลักและคุณภาพของน้ำนม (มยุรี เหลืองวิลัย, 2561) น้ำยา California mastitis test (CMT) จะมีส่วนผสมของสารลดแรงตึงผิว (3% sodium lauryl sulphate) ซึ่งทำหน้าที่ทำลายผนังของโซมาติกเซลล์ทำให้สารพันธุกรรม (DNA) ออกมานอกเซลล์ จึงส่งผลให้น้ำนมดิบที่ปริมาณโซมาติกเซลล์มากจะมีลักษณะเป็นเมือกข้นหนืด (gel-like) (Viguier *et al.,* 2009, Mansor, 2012) โดยมาตรฐานคุณภาพน้ำนมดิบได้กำหนดให้ น้ำนมดิบมีปริมาณโซมาติกเซลล์ไม่เกิน 500,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2553) หากมีปริมาณโซมาติกเซลล์สูงกว่าค่ามาตรฐานจะสามารถบ่งบอกได้ว่าแม่โคมีแนวโน้มติดเชื้อในเต้านมหรือเป็นโรคเต้านมอักเสบ (Swinkels *et al.,* 2021) ซึ่งข้อดีของการประเมินปริมาณโซมาติกเซลล์ด้วยน้ำยา CMT คือ มีความถูกต้องเป็นที่ยอมรับและมีความสะดวกรวดเร็วในการแปลผล ราคาถูก และใช้อุปกรณ์ไม่ยุ่งยาก ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคเต้านมอักเสบเบื้องต้นที่

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ระดับฟาร์มตามคำแนะนำของกรมปศุสัตว์ จากการลงพื้นที่เพื่อคัดเลือกตัวอย่างน้ำนมดิบจากแม่โคสุขภาพดีที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปในเขตพื้นที่อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี พบว่า ในแม่โคหนึ่งตัวสามารถพบได้ทั้งเต้านมปกติและเต้านมอักเสบ โดยสังเกตจากเมื่อผสมน้ำนมกับน้ำยา CMT ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) น้ำนมดิบบางเต้าไม่ทำปฏิกิริยากับน้ำยา CMT ส่วนผสมที่ได้มีลักษณะเหลว แสดงว่ามีปริมาณโซมาติกเซลล์น้อยหรือเต้านมปกติ (negative result) บางเต้าทำปฏิกิริยาทันทีในขณะที่ทำการหมุนวนถาดหลุม ส่วนผสมที่ได้มีลักษณะเป็นเมือกข้นและมีความหนืดมาก แสดงว่าปริมาณโซมาติกเซลล์มากหรือเต้านมมีการอักเสบ (positive result) ดังแสดงในรูปที่ 4.5 ซึ่งในงานวิจัยนี้จะเก็บตัวอย่างน้ำนมดิบที่มีคะแนน CMT เท่ากับ 0 (ลบ) หรือ T (เล็กน้อย) เท่านั้น ซึ่งแสดงว่าเป็นน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่มีเต้านมสุขภาพดี (Swinkels *et al.*, 2021) อย่างไรก็ตามการประเมินปริมาณโซมาติกเซลล์ด้วยน้ำยา CMT เป็นเพียงการประเมินเบื้องต้นเท่านั้น ดังนั้นจึงต้องนำตัวอย่างน้ำนมดิบไปวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการเพื่อการยืนยันผลที่ถูกต้องอีกครั้ง

รูปที่ 4.5 ลักษณะของส่วนผสมระหว่างน้ำนมดิบกับน้ำยา CMT จากการประเมินปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบที่ได้จากโคที่ปกติและเป็นโรคเต้านมอักเสบ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.2.2 การเก็บตัวอย่างอาหารสัตว์สำหรับการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของอาหารด้วยวิธี Proximate analysis

การศึกษาในขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของอาหารสัตว์ที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป ซึ่งคุณค่าทางโภชนาการเหล่านี้อาจส่งผลต่อองค์ประกอบทางเคมีและคุณภาพของน้ำนมได้ อาหารสัตว์ที่ใช้ในฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป ประกอบไปด้วยอาหารข้น อาหารหยาบ และอาหารแบบผสมสำเร็จรูป (TMR) การสุ่มเก็บตัวอย่างอาหารสัตว์สำหรับการ

วิเคราะห์จะแบ่งออกเป็น ฤดูฝน (กันยายน - ตุลาคม 2563) และ ฤดูแล้ง (มีนาคม - เมษายน 2564) แสดงดังตาราง 4.3

ตาราง 4.3 ข้อมูลสถิติภูมิอากาศในฤดูกาลที่เก็บตัวอย่างในเขตอำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี

ที่มา : ศูนย์ภูมิอากาศ กรมอุตุนิยมวิทยา

ข้อมูลสถิติภูมิอากาศ	**ฤดูฝน***	**ฤดูแล้ง***
อุณหภูมิเฉลี่ย (องศาเซลเซียส)*	25.1	28.3
ปริมาณน้ำฝน (มิลลิเมตร)*	289.5	132.4
ความชื้นสัมพัทธ์ (%)*	85.0	75.0

* ฤดูฝน = เดือนกันยายน – ตุลาคม 2563 และ ฤดูแล้ง = เดือนมีนาคม - เมษายน 2564

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารสัตว์ด้วยวิธี Proximate analysis ตามวิธีการของ AOAC (1990) ได้แก่ วัตถุแห้ง (dry matter) โปรตีน (crude Protein) เถ้า (ash) ไขมัน (crude fat) เยื่อใย (crude fiber) และ คาร์โบไฮเดรต (nitrogen free extract) แสดงดังตาราง 4.4 สำหรับระบบการจัดการฟาร์มโคนมอินทรีย์ พบว่า มีการเลี้ยงแม่โคด้วยอาหารผสมสำเร็จรูป TMR เป็นอาหารหลัก โดยใช้สัดส่วนอาหารหยาบต่ออาหารข้น (40:60) ซึ่งอาหารผสมสำเร็จรูป TMR ในช่วงฤดูฝนจะประกอบด้วยอาหารข้น เศษขาเห็ดเข็มทอง มันสำปะหลังและหญ้าหมัก ส่วนช่วงฤดูแล้งจะประกอบด้วย อาหารข้น เมล็ดถั่วเหลืองบด ข้าวโพดบด ข้าวบดอินทรีย์ และหญ้าหมัก นอกจากนี้ แม่โคในฟาร์มโคนมอินทรีย์ยังได้รับหญ้าสดจากการเลี้ยงแบบปล่อยสัตว์แทะเล็มในทุ่งหญ้าธรรมชาติ โดยมาตรฐานเกษตรอินทรีย์และปศุสัตว์อินทรีย์กำหนดไว้ว่า ต้องมีการเลี้ยงแบบปล่อยสัตว์แทะเล็มในทุ่งหญ้าธรรมชาติ อย่างน้อยปีละ 120-150 วัน สำหรับระบบการจัดการฟาร์มโคนมทั่วไป พบว่า ในช่วงฤดูฝนจะมีการเลี้ยงแม่โคด้วยอาหารข้นสำเร็จรูปผสมกับอาหารหยาบ ซึ่งประกอบไปด้วย ข้าวโพดหมักและฟางข้าว ส่วนในช่วงฤดูแล้งเลี้ยงด้วยอาหารข้นสำเร็จรูปผสมกับอาหารผสมสำเร็จรูป TMR โดยใช้สัดส่วนอาหารหยาบต่ออาหารข้น (44 : 56) ทดแทนข้าวโพดหมักและมีการให้อาหารหยาบด้วยฟางข้าวเช่นเดียวกับในช่วงฤดูฝน จะเห็นได้ว่า ชนิดของอาหารสัตว์จะผันแปรไปตามฤดูกาล ซึ่งสภาพอากาศถือเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืชที่ใช้เลี้ยงสัตว์ โดยมีรายงานว่า ในช่วงฤดูฝนอาหารหยาบจำพวกหญ้าและข้าวโพดจะมีผลผลิตปริมาณมาก เนื่องจากมีปริมาณน้ำฝนและความชื้นเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืชและส่งผลให้คุณค่าทางโภชนาการสูงขึ้นด้วย เกษตรกรจึงมีแหล่งอาหารหยาบคุณภาพดีใช้เลี้ยงโคนมได้อย่างเพียงพอ (Rhone *et al.,* 2007, Yeamkong

et al., 2010) ในทางตรงกันข้าม ในช่วงฤดูแล้งการเจริญเติบโตและคุณภาพของพืชอาหารหยาบจะต่ำลง ส่งผลให้แม่โคกินอาหารได้น้อย คุณค่าทางโภชนาการที่แม่โคได้รับไม่เพียงพอ (ปณัท สุขสร้อย, 2563) อย่างไรก็ตาม เพื่อให้แม่โคได้รับคุณค่าทางโภชนาการอย่างครบถ้วน เกษตรกรส่วนใหญ่จึงต้องหาแหล่งอาหารหยาบชนิดอื่นๆที่มีคุณค่าทางโภชนาการเทียบเท่ากับในช่วงฤดูฝนมาทดแทน เช่น พืชหมักหรือวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรอื่นๆ (ปณัท สุขสร้อย, 2563) ซึ่งสอดคล้องกับตารางแสดงคุณค่าทางโภชนาการของอาหารสัตว์ (ตาราง 4.4) และแบบสอบถามของคณะผู้วิจัย (ภาคผนวก ค.) ที่พบว่า เกษตรกรจะใช้ฟางข้าวและมันเส้นมาทดแทนข้าวโพดหมักที่ขาดแคลนในช่วงฤดูแล้ง จากที่กล่าวมาข้างต้น จึงสรุปได้ว่า ความผันแปรของสภาพอากาศจะส่งผลต่อชนิดและคุณภาพอาหารสัตว์ที่แตกต่างกันในทั้งสอง
ฤดูกาล

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตาราง 4.4 คุณค่าทางโภชนาการของอาหารสัตว์จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูกาลที่แตกต่างกัน โดยการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธี Proximate analysis ตามวิธีการของ AOAC (1990)

ระบบการจัดการฟาร์มโคนม	ฤดูกาล	รายละเอียด	วัตถุแห้ง (%)	Proximate Analysis on dry basis				
				โปรตีน (%)	ไขมัน (%)	เยื่อใย (%)	เถ้า (%)	คาร์โบไฮเดรต (%)
ฟาร์มโคนมอินทรีย์	ฤดูฝน *	อาหารผสม TMR **	52.71	13.57	2.08	23.62	5.03	55.70
		หญ้าสด	37.69	4.88	0.93	38.30	6.88	49.01
	ฤดูแล้ง *	อาหารผสม TMR ***	49.53	18.79	3.40	22.24	4.26	51.31
		หญ้าสด	23.74	11.73	1.3	33.6	7.77	45.60
ฟาร์มโคนมทั่วไป	ฤดูฝน *	อาหารข้น	8.96	19.04	3.34	10.83	7.73	59.06
		ฟางข้าว	92.91	7.37	1.10	38.06	6.59	46.88
		ข้าวโพดหมัก	29.67	8.39	2.13	37.99	7.23	44.26
	ฤดูแล้ง *	อาหารข้น	8.96	19.04	3.34	10.83	7.73	59.06
		ฟางข้าว	90.04	6.75	1.11	37.82	6.76	47.56
		อาหารผสม TMR ****	61.98	20.17	2.54	21.66	6.39	49.24

* ฤดูฝน = เดือนกันยายน – ตุลาคม 2563 และ ฤดูแล้ง = เดือนมีนาคม - เมษายน 2564

** อาหารผสม TMR ของฟาร์มโคนมอินทรีย์ ช่วงฤดูฝน สัดส่วนอาหารหยาบต่ออาหารข้น (40 : 60) ประกอบไปด้วย อาหารข้น เศษขาเห็ดเข็มทอง มันสำปะหลัง และหญ้าหมัก

*** อาหารผสม TMR ของฟาร์มโคนมอินทรีย์ ช่วงฤดูแล้ง สัดส่วนอาหารหยาบต่ออาหารข้น (40 : 60) ประกอบไปด้วย อาหารข้น ถั่วเหลืองบด ข้าวโพดบด ข้าวบด และหญ้าหมัก

**** อาหารผสม TMR ของฟาร์มโคนมทั่วไป ช่วงฤดูแล้ง สัดส่วนอาหารหยาบต่ออาหารข้น (44 : 56) ประกอบไปด้วย อาหารข้น ข้าวโพดหมัก ฟางข้าว และมันเส้น

4.2.3 การตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมีหลักและปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบ

การศึกษาในขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมีหลักและปริมาณโซมาติกเซลล์ในตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปเพื่อยืนยันผลจากการประเมินปริมาณโซมาติกเซลล์ด้วยน้ำยา CMT ในข้อ 4.2.1 การตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ไขมัน โปรตีน แลคโตส ของแข็งไม่รวมไขมันนม และของแข็งทั้งหมด ด้วยเครื่อง MilkoScan^{TM} FT+ analyzer (FOSS, Hilleroed, Denmark) โดยใช้เทคนิค fourier transform infrared (FTIR) ปริมาณโซมาติกเซลล์ตรวจวัดด้วยเครื่อง Fossomatic^{TM} FC (FOSS, Hilleroed, Denmark) โดยใช้เทคนิค flow cytometry ในน้ำนมดิบจากแม่โคสุขภาพดีที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป ในเขตพื้นที่อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี ที่เก็บในช่วงฤดูฝน (กันยายน - ตุลาคม 2563) และ ฤดูแล้ง (มีนาคม - เมษายน 2564) ดังแสดงในตาราง 4.5

จากผลการตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมีหลักในตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปตลอดทั้ง 2 ฤดูกาล พบว่า องค์ประกอบทางเคมีหลักในน้ำนมดิบเป็นไปตามมาตรฐานของประกาศสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (2553) เรื่อง น้ำนมโคดิบ ที่กำหนดไว้ว่า น้ำนมโคดิบชั้นมาตรฐานต้องมีปริมาณไขมัน ไม่น้อยกว่าร้อยละ 3.35 โดยน้ำหนัก, ปริมาณโปรตีน ไม่น้อยกว่าร้อยละ 3.00 โดยน้ำหนัก, ปริมาณน้ำตาลแลคโตส ไม่น้อยกว่าร้อยละ 4.50 โดยน้ำหนัก, ปริมาณของแข็งไม่รวมไขมันนม ไม่น้อยกว่าร้อยละ 8.25 โดยน้ำหนัก, ปริมาณของแข็งทั้งหมด ไม่น้อยกว่าร้อยละ 12 โดยน้ำหนัก และผลจากการตรวจวัดปริมาณโซมาติกเซลล์ในตัวอย่างน้ำนมดิบ พบว่า ปริมาณโซมาติกเซลล์ในตัวอย่างน้ำนมดิบมีจำนวนเซลล์โซมาติกหรือเซลล์ร่างกาย (somatic cell) ไม่เกิน 500,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นไปตามมาตรฐานของประกาศสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (2553)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตาราง 4.5 องค์ประกอบทางเคมีหลักในน้ำนมดิบ ปริมาณโซมาติกเซลล์ ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณกรดทั้งหมดในน้ำนมดิบจากแม่โคที่มีสุขภาพดีจากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูกาลที่แตกต่างกัน

องค์ประกอบทางเคมีหลัก	ฟาร์มโคนมอินทรีย์		ฟาร์มโคนมทั่วไป		Test significant between effects		
	ฤดูฝน	ฤดูแล้ง	ฤดูฝน	ฤดูแล้ง	Farm	Season	Farm x season
Fat (%)	3.84±0.81 [b]	3.97±0.58 [ab]	4.56±0.52 [a]	3.74±0.64 [b]	$p > 0.05$	$p = 0.036$	$p = 0.004$
Protein (%)	3.24±0.27 [bc]	3.08±0.18 [c]	3.55±0.30 [a]	3.51±0.52 [ab]	$p = 0.000$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
Lactose (%)	4.75±0.14 [ab]	4.83±0.14 [a]	4.63±0.14 [b]	4.67±0.12 [b]	$p = 0.000$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
SnF (%)	8.63±0.23 [ab]	8.57±0.13 [b]	8.92±0.25 [a]	8.91±0.52 [a]	$p = 0.000$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
TS (%)	12.44±0.80 [b]	12.52±0.63 [b]	13.41±0.70 [a]	12.62±1.05 [b]	$p = 0.010$	$p > 0.05$	$p = 0.033$
SCC (x1000 cells/mL)	321.89±186.66 [a]	136.53±154.59 [b]	430.56±187.23 [a]	404.53±125.10 [a]	$p = 0.013$	$p = 0.000$	$p > 0.05$
pH	6.62±0.04 [a]	6.64±0.03 [a]	6.62±0.04 [a]	6.63±0.03 [a]	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
TTA (%LA)	0.16±0.01[a]	0.16±0.02 [a]	0.15±0.01[a]	0.16±0.01[a]	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$

หมายเหตุ : a, b และ c ในแนวนอนเดียวกัน แสดงค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานขององค์ประกอบทางเคมีมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สำหรับผลการวิเคราะห์ปริมาณไขมันในน้ำนมดิบ ดังแสดงในตาราง 4.5 พบว่า ค่าเฉลี่ยของปริมาณไขมันในน้ำนมดิบจากฟาร์มโคนมอินทรีย์อยู่ในช่วงร้อยละ 3.84 - 3.97 และปริมาณไขมันในน้ำนมดิบจากฟาร์มโคนมทั่วไปอยู่ในช่วงร้อยละ 3.74 – 4.56 เมื่อพิจารณาปริมาณไขมันในตัวอย่างน้ำนมดิบจากอิทธิพลของการจัดการฟาร์มโคนมที่แตกต่างกัน พบว่า น้ำนมดิบจากแม่โคที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) และเมื่อพิจารณาอิทธิพลของฤดูกาลในการเก็บตัวอย่างที่แตกต่างกัน พบว่า ปริมาณไขมันในน้ำนมดิบจากแม่โคที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ในช่วงฤดูฝนและช่วงฤดูแล้งมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) ในขณะที่ ปริมาณไขมันในน้ำนมดิบจากแม่โคที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูฝนมีปริมาณไขมันสูงกว่าในช่วงฤดูแล้งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยปริมาณไขมันในตัวอย่างน้ำนมดิบจากแม่โคที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไปที่เก็บในช่วงฤดูฝนจะสูงกว่าฤดูแล้งนั้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Rhone *et al.* (2007) และ Yeamkong *et al*. (2010) ที่รายงานว่า น้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูฝนจะมีปริมาณไขมันสูงกว่าน้ำนมดิบที่ในช่วงฤดูแล้ง เนื่องจากฤดูฝนอาหารหยาบที่มีเยื่อใยสูงโดยเฉพาะหญ้าสดและข้าวโพดหมักจะมีผลผลิตออกมาปริมาณมากและราคาต่ำกว่าในฤดูกาลอื่น เกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมส่วนใหญ่จึงมีแหล่งอาหารหยาบคุณภาพดีที่ใช้ในการเลี้ยงโคนมได้อย่างเพียงพอ โดยแม่โคที่ได้รับอาหารหยาบมากจะทำให้จุลินทรีย์ในกระเพาะสัตว์ย่อยเป็นกรดอะซิติกและกรดบิวทีริก ซึ่งใช้เป็นแหล่งพลังงานและเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ไขมัน จึงส่งผลให้ปริมาณไขมันในน้ำนมสูงขึ้นตามไปด้วย (Pattaraporn, 2013, Rhone *et al.,* 2007, Yeamkong *et al.,* 2010) ซึ่งสอดคล้องกับตารางแสดงคุณค่าทางโภชนาการของอาหารสัตว์จากฟาร์มโคนมทั่วไป (ตาราง 4.4) ที่พบว่า ในช่วงฤดูฝนจะมีการเลี้ยงแม่โคด้วยข้าวโพดหมักในปริมาณที่มากกว่าในช่วงฤดูแล้ง นอกจากนี้ ยังพบว่าปริมาณไขมันของน้ำนมดิบจากฟาร์มโคนมอินทรีย์ที่เก็บในช่วงฤดูฝนและฤดูแล้งมีปริมาณไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีรายงานของ Jaruwat *et al.* (2020) พบว่า การให้อาหารสัตว์แบบผสมสำเร็จรูป TMR จะทำให้แม่โคได้รับคุณค่าทางโภชนาการตามความต้องการอย่างเหมาะสม จึงส่งผลให้สามารถสังเคราะห์องค์ประกอบในน้ำนมได้อย่างมีประสิทธิภาพและสามารถรักษาระดับปริมาณไขมันในน้ำนมได้ (Jaruwat *et al.,* 2020) ซึ่งสอดคล้องกับตารางแสดงคุณค่าทางโภชนาการของอาหารสัตว์จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ (ตาราง 4.4) ที่พบว่าฟาร์มโคนมอินทรีย์มีการเลี้ยงแม่โคโดยให้อาหารผสมสำเร็จรูป TMR ตลอดทั้งปี จึงส่งผลให้แม่โคได้รับคุณค่าทางโภชนาการอย่างครบถ้วนสม่ำเสมอ ปริมาณไขมันในน้ำนมจึงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในทั้ง 2 ฤดูกาล

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สำหรับผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ดังแสดงในตาราง 4.5 พบว่า ค่าเฉลี่ยของปริมาณโปรตีนในน้ำนมดิบจากฟาร์มโคนมอินทรีย์อยู่ในช่วงร้อยละ 3.08 - 3.24 และปริมาณโปรตีนในน้ำนมดิบจากฟาร์มโคนมทั่วไปอยู่ในช่วงร้อยละ 3.51 - 3.55 เมื่อพิจารณาปริมาณโปรตีนในตัวอย่างน้ำนมดิบจากอิทธิพลของการจัดการฟาร์มที่แตกต่างกัน พบว่า น้ำนมดิบจากแม่โคที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์มีปริมาณโปรตีนต่ำกว่าน้ำนมดิบจากแม่โคที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และเมื่อพิจารณาอิทธิพลของฤดูกาลในการเก็บตัวอย่างที่แตกต่างกันพบว่า ปริมาณโปรตีนในน้ำนมดิบจากทั้ง 2 ฤดูกาลของฟาร์มโคนมที่มีการจัดการฟาร์มรูปแบบเดียวกันมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) โดยปริมาณโปรตีนในตัวอย่างน้ำนมดิบจากแม่โคที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ต่ำกว่าน้ำนมดิบจากแม่โคที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไปนั้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Bilik and Lopuszanska-Rusek (2010), Sundberg *et al.* (2009) และ Hanus *et al.* (2008) ที่รายงานว่า น้ำนมโคนมอินทรีย์มีปริมาณโปรตีนต่ำกว่าน้ำนมโคนมทั่วไป เป็นผลมาจากความแตกต่างของสมดุลพลังงานที่ดีภายในตัวแม่โคและกระบวนการหมักที่แตกต่างกันในกระเพาะรูเมนของแม่โค รวมถึงการจัดการด้านอาหารสัตว์ในฟาร์มโคนมแบบอินทรีย์ที่มีการใช้อาหารข้นเป็นแหล่งโปรตีนของอาหารสัตว์ในปริมาณที่น้อยกว่าฟาร์มโคนมทั่วไป (Hanuš *et al.,* 2008, Bilik and Lopuszanska-Rusek, 2010, Müller and Sauerwein, 2010) ซึ่งสอดคล้องกับตารางแสดงคุณค่าทางโภชนาการของอาหารสัตว์จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป (ตาราง 4.4) ที่พบว่า ในฟาร์มโคนมอินทรีย์มีการให้อาหารแม่โคแบบอาหารผสมสำเร็จรูป TMR โดยมีสัดส่วนอาหารหยาบต่ออาหารข้น (40 : 60) ทำให้อาหารข้นจะถูกใช้ในปริมาณที่จำกัดตามสูตรอาหารที่กำหนดเลยส่งผลให้ปริมาณโปรตีนในน้ำนมโคอินทรีย์มีปริมาณต่ำกว่าน้ำนมที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไปที่มีการใช้อาหารข้นเป็นแหล่งโปรตีนหลัก

สำหรับผลการวิเคราะห์ปริมาณแลคโตส ดังแสดงในตาราง 4.5 พบว่า ค่าเฉลี่ยของปริมาณแลคโตสในน้ำนมดิบจากฟาร์มโคนมอินทรีย์อยู่ในช่วงร้อยละ 4.75 – 4.83 และปริมาณแลคโตสในน้ำนมดิบจากฟาร์มโคนมทั่วไปอยู่ในช่วงร้อยละ 4.63 – 4.67 เมื่อพิจารณาปริมาณแลคโตสในตัวอย่างน้ำนมดิบจากอิทธิพลของการจัดการฟาร์มโคนมที่แตกต่างกัน พบว่า น้ำนมดิบจากแม่โคที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์มีปริมาณแลคโตสสูงกว่าน้ำนมดิบจากแม่โคที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และเมื่อพิจารณาอิทธิพลของฤดูกาลในการเก็บตัวอย่างที่แตกต่างกันพบว่า ปริมาณแลคโตสในน้ำนมดิบจากทั้ง 2 ฤดูกาลของฟาร์มโคนมที่มีการจัดการฟาร์มรูปแบบเดียวกันมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) โดยปริมาณแลคโตสในตัวอย่างน้ำนมดิบจากแม่โคที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ที่สูงกว่าน้ำนมดิบ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จากแม่โคที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไปนั้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Zagorska and Ciprovica (2008) และ Olivo (2005) ที่รายงานว่า ปริมาณแลคโตสมีผลมาจากน้ำตาลในพืชอาหารสัตว์ที่ใช้ในฟาร์มโคนมอินทรีย์ โดยแม่โคจะได้รับคาร์โบไฮเดรตประเภทแป้งและน้ำตาลจากพืชที่ใช้เป็นวัตถุดิบในอาหารสัตว์และคาร์โบไฮเดรตเหล่านั้นจะถูกย่อยด้วยจุลินทรีย์ในกระเพาะวัวให้เปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคส ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์น้ำตาลแลคโตสในน้ำนม (สุทธิเนตร ทิพย์เที่ยงแท้, 2559) ซึ่งสอดคล้องกับตารางแสดงคุณค่าทางโภชนาการของอาหารสัตว์จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ (ตาราง 4.4) ที่พบว่า ฟาร์มโคนมอินทรีย์มีการเลี้ยงแม่โคด้วยข้าวโพดสด ซึ่งข้าวโพดถือเป็นอาหารหยาบที่ดีสำหรับการเลี้ยงโคนมเนื่องจากมีพลังงานที่ได้จากคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ น้ำตาลและแป้งสูง (กรองแก้ว บริสุทธิ์สวัสดิ์, 2561, Puppel *et al.,* 2017)

สำหรับผลการวิเคราะห์ปริมาณโซมาติกเซลล์ (SCC) ดังแสดงในตาราง 4.5 พบว่า ค่าเฉลี่ยของปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบจากฟาร์มโคนมอินทรีย์อยู่ในช่วง 136.53 - 321.89 (x1000 cells/mL) และปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบจากฟาร์มโคนมทั่วไปอยู่ในช่วง 404.53 – 430.56 (x1000 cells/mL) เมื่อพิจารณาปริมาณโซมาติกเซลล์ในตัวอย่างน้ำนมดิบจากอิทธิพลของการจัดการฟาร์มโคนมที่แตกต่างกันพบว่าน้ำนมดิบจากแม่โคที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์มีปริมาณโซมาติกเซลล์ต่ำกว่าน้ำนมดิบจากแม่โคที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ellis *et al.* (2007), Čuboň *et al.* (2008) และ Garmo *et al.* (2010) ที่รายงานว่า ปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมโคนมอินทรีย์ที่ต่ำกว่าน้ำนมโคนมทั่วไปนั้นเป็นผลจากการจัดการฟาร์มแบบอินทรีย์ที่มีการจัดการโรงเรือนและมีการป้องกันการปนเปื้อนในคอก เพื่อลดความเสี่ยงจากการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียและลดภาวะการเกิดโรคเต้านมอักเสบได้ (Ellis *et al*., 2007, Čuboň *et al*., 2008, Garmo *et al*., 2010) ซึ่งสอดคล้องกับแบบสอบถามจากฟาร์มโคนมอินทรีย์ของคณะผู้วิจัย (ภาคผนวก ค.) ที่พบว่า ในฟาร์มโคนมอินทรีย์มีการวางแผนป้องกันการปนเปื้อนไม่ว่าจะเป็นทางดิน น้ำ และอากาศ มีระบบการกำจัดของเสีย และมีการจัดการฟาร์มและโรงเรือนไม่ให้มีน้ำขังหรือพื้นคอกชื้นแฉะอันเป็นแหล่งสะสมของเชื้อแบคทีเรียที่จะทำให้ปริมาณโซมาติกเซลล์สูงขึ้นได้ และเมื่อพิจารณาอิทธิพลของฤดูกาลในการเก็บตัวอย่างที่แตกต่างกัน พบว่าปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบในช่วงฤดูแล้งมีปริมาณต่ำกว่าในช่วงฤดูฝนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ทั้งในฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yeamkong *et al.* (2010) ที่รายงานว่า ช่วงฤดูฝนมีลักษณะชื้นแฉะมากกว่าในช่วงอื่นๆ ทำให้การจัดการโรงเรือนและการป้องกันการปนเปื้อนใน

คอกทำได้ยากกว่าในช่วงฤดูแล้งและโอกาสที่จะเกิดการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรียจึงมากขึ้นเลยส่งผลต่อปริมาณโซมาติกเซลล์ให้สูงขึ้นได้ (Yeamkong *et al.,* 2010)

4.2.4 การตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำนมดิบ และปริมาณกรดทั้งหมดในน้ำนมดิบ

จากผลการตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณกรดทั้งหมดในตัวอย่างน้ำนมดิบทั้งในฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูฝนและฤดูแล้ง พบว่าค่าความเป็นกรดด่างของตัวอย่างน้ำนมโคดิบอยู่ในช่วง 6.62-6.64 และปริมาณกรดทั้งหมดในตัวอย่างน้ำนมดิบอยู่ในช่วงร้อยละ 0.15-0.16 (%LA) ดังแสดงในตาราง 4.5 ซึ่งเป็นไปตามมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (2553) ที่ระบุว่าค่าความเป็นกรดด่างของน้ำนมโคดิบควรอยู่ในช่วง 6.6-6.8 (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2553) เมื่อพิจารณาอิทธิพลของการจัดการฟาร์มโคนมและฤดูกาลที่แตกต่างกัน พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) จึงสรุปได้ว่า อิทธิพลของการจัดฟาร์มโคนมที่แตกต่างกันและความผันแปรของฤดูกาลไม่มีผลต่อค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณกรดทั้งหมดในน้ำนมดิบ

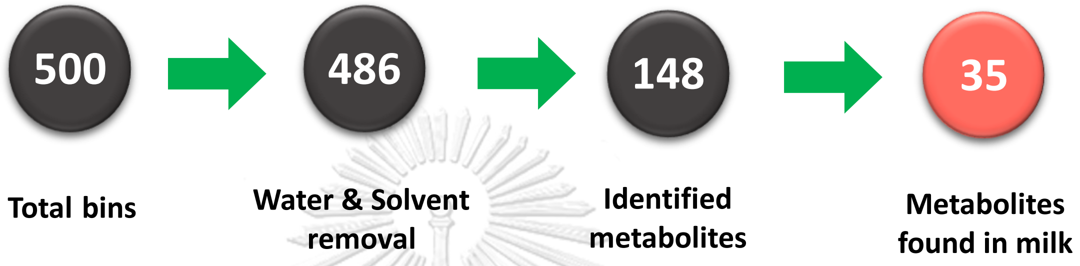
4.3 การวิเคราะห์ข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากในน้ำนมดิบโดยใช้เทคนิค ^{1}H-NMR

4.3.1 การประมวลผล spectra ของ ^{1}H-NMR และการระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากของน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปที่เก็บในช่วงฤดูกาลที่แตกต่างกัน (n=60)

CHULALONGKORN UNIVERSITY

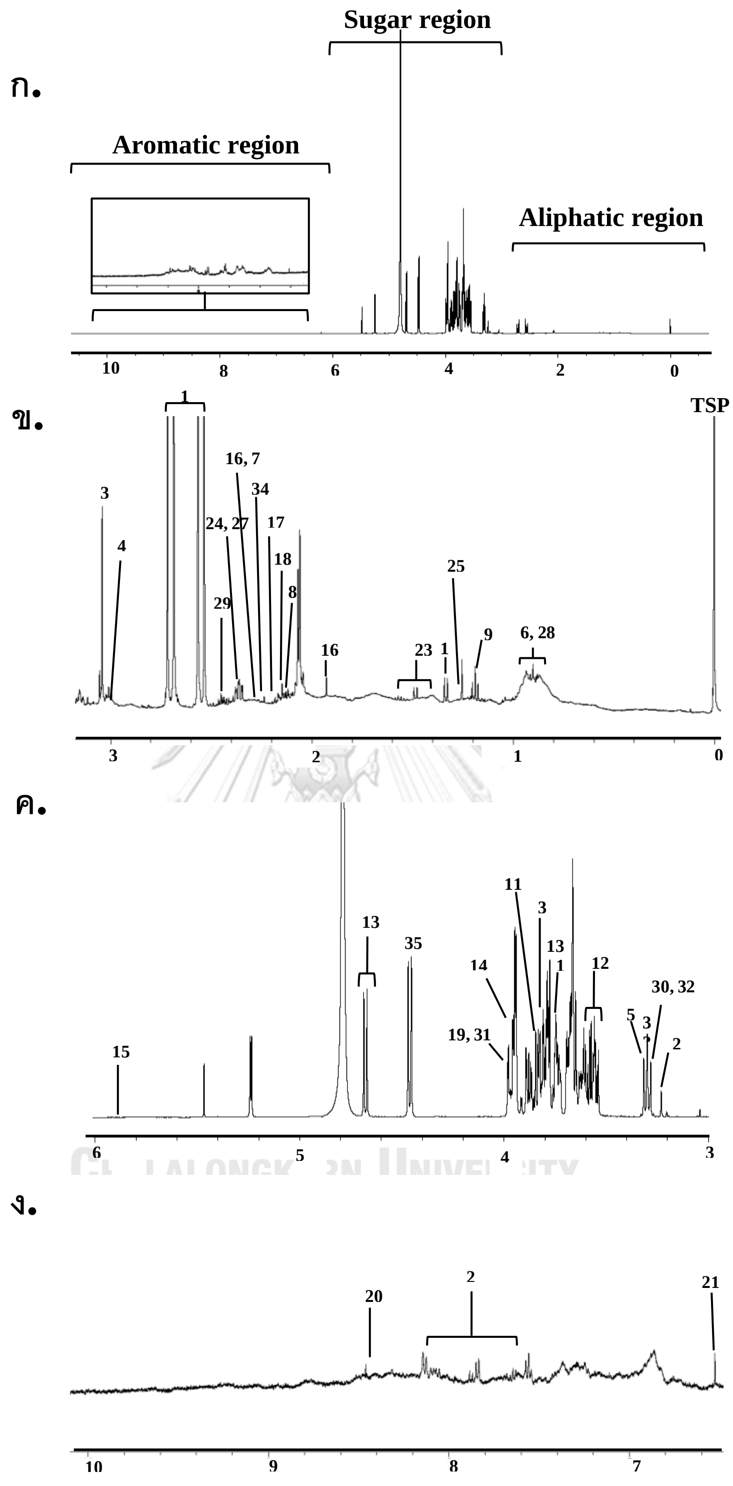
หลังจากประมวลผลของ ^{1}H-NMR spectra ในช่วง chemical shifts (δ) ระหว่าง 0.00–10.00 ppm (ดังแสดงในขั้นตอนที่ 3.2.6) ได้ทั้งหมด 500 bin จะนำมาระบุชนิดสารเมตาบอไลต์โดยเปรียบเทียบจากฐานข้อมูล Chenomx NMR suite 8.6 library (Chenomx Inc., Alberta, Canada), Milk Composition Database (www.mcdb.ca), Livestock Metabolome Database version 1.0 (www.lmdb.ca), Bovine Metabolome Database (www.bovinedb.ca) และจากงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (มาริสา คงบุญเกิด, 2562, Liu *et al*., 2020, Luangwilai *et al.*, 2021, O'Callaghan *et al.,* 2018, Schwendel *et al.,* 2015, Settachaimongkon *et al.,* 2014, Settachaimongkon *et al.,* 2021) พบว่าสามารถระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ในตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป

ได้ทั้งหมด 148 bin และเมื่อนำสารเมตาบอไลต์ที่ได้มาจัดกลุ่มจะได้สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากทั้งหมด 35 สาร แสดงดังรูปที่ 4.6 โดยเป็นสารประกอบในกลุ่มของ กรดอะมิโนและอนุพันธ์ แอลกอฮอล์ คาร์โบไฮเดรตและอนุพันธ์ อนุพันธ์ของไขมัน สารประกอบคาร์บอนิล และอื่นๆ โดยสามารถระบุตำแหน่งบนสเปกตรัมดังแสดงในรูปที่ 4.7 และตาราง 4.6



รูปที่ 4.6 แผนผังแสดงจำนวน bin ของ ^{1}H-NMR spectrum สำหรับนำไปใช้ในการวิเคราะห์ทางสถิติพหุตัวแปร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



รูปที่ 4.7 (ก) การระบุตำแหน่งข้อมูลของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR ของตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป (ข) ภาพขยายในช่วง Aliphatic region (0.01-3.00 ppm) (ค) ภาพขยายในช่วง Sugar region (3.00-6.00 ppm) และ (ง) ภาพขยายในช่วง Aromatic region (6.50-10.00 ppm)

ตาราง 4.6 สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากที่พบในตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป ทั้งหมด 35 สารเมตาบอไลต์

กลุ่มสารประกอบเคมี	ลำดับ	สารเมตาบอไลต์	^{1}H chemical shift, ppm[a]
กรดอะมิโนและอนุพันธ์	1	Alanine	3.83 (m)- 3.79 (m), 1.49 (d)- 1.47 (d)
	2	Betaine	3.27 (s)
	3	Creatine	3.97 (s)- 3.93(s), 3.05 (s)-3.03(s)
	4	Creatine phosphate	3.95 (s)
	5	Histidine	8.41 (s)
	6	Isoleucine	0.99 (d), 0.93 (t)
	7	Proline	3.45 (m)- 3.41 (m), 3.37 (m)- 3.31 (m), 2.37(m)- 2.33(m), 2.07(m)- 1.99(m)
	8	Valine	2.27(m)- 2.25 (m), 1.05 (d)- 0.99(d)
แอลกอฮอล์	9	Ethanol	1.21 (t)- 1.17 (t)
คาร์โบไฮเดรตและอนุพันธ์	10	1,6-anhydro-β-D-glucose	3.69 (s), 3.75 (m)-3.79 (m), 4.07 (d)-4.09 (d), 4.61 (d)-4.63 (d), 5.47 (s)
	11	Galactose	5.29 (d)- 5.27 (d), 4.59 (d), , 4.11 (m)-4.07 (m), 3.99 (m)- 3.63 (m), 3.53 (m)-3.47 (m)
	12	Glucose	5.25 (m)- 5.23 (m), 4.65 (d), 3.97 (m)-3.71 (m), 3.55 (m)- 3.25 (m)
	13	Lactose	4.69 (d)- 4.67 (d), 4.47 (d)- 4.45 (d), 3.99 (m)- 3.93 (m), 3.89 (m)- 3.53 (m), 3.31 (m)- 3.29 (m)
	14	*N*-acetylglucosamine	8.07 (d)- 8.05 (d), 3.53 (m)- 3.49 (m), 2.07 (s)- 2.03 (s)
	15	Uridine	3.79 (d)- 3.81 (d), 3.91 (m)- 3.93 (m), 4.11 (m)- 4.13 (m), 4.21 (t) – 4.25(t), 4.35 (m)- 4.37 (m), 5.89 (m)- 5.91 (m)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

กลุ่มสารประกอบเคมี	ลำดับ	สารเมตาบอไลต์	^{1}H chemical shift, ppm[a]
กรดอินทรีย์	16	Acetate	1.93 (s)
	17	Acetoacetate	2.27 (m)
	18	Butyrate	2.19-2.15, 15.3 (m)– 1.59 (m), 0.91 (t)– 0.87 (t)
	19	Citrate	2.73/2.71 (d)– 2.69 (d), 25.7 (d)– 2.53 (d)
	20	Formate	8.45 (s)
	21	Fumarate	6.53 (s)
	22	Hippurate	3.95(d)- 3.97 (d)
	23	2-hydroxybutyrate	3.57 (m)– 3.53 (m), 1.37 (s)
	24	Isobutyrate	2.35 (m)– 2.33 (m), 1.05 (d)– 1.03 (d)
	25	Lactate	4.15 (m)– 4.12 (m), 1.35 (d)– 1.33 (d)
	26	Oxoglutarate	3.03 (t)– 3.01 (t), 2.45 (t)
	27	Succinate	2.43 (s)
	28	Valerate derivatives	3.85 (m), 2.37 (s), 2.07 (m)– 1.99 (m), 1.29 (s)– 1.27 (s), 0.93 (t)- 0.91 (t), 0.89 (t)- 0.83 (t)
ไขมันและอนุพันธ์	29	Acetylcarnitine	2.15 (s)
	30	Carnitine	3.23 (s)
	31	Choline derivatives	3.21 (s)- 3.23 (s), 3.19 (s)
	32	Glycerophosphocholine	4.33 (m)- 4.31 (m), 3.61 (m), 3.23 (s)
	33	Phosphocholine	4.23 (m)- 4.17 (m)
สารประกอบคาร์บอนิล	34	Acetone	2.23 (s)
	35	1,3-dihydroxyacetone	4.43 (s)

[a] Chemical shift values are referenced to TSP signal (0.00 ppm) at pH 6.00.

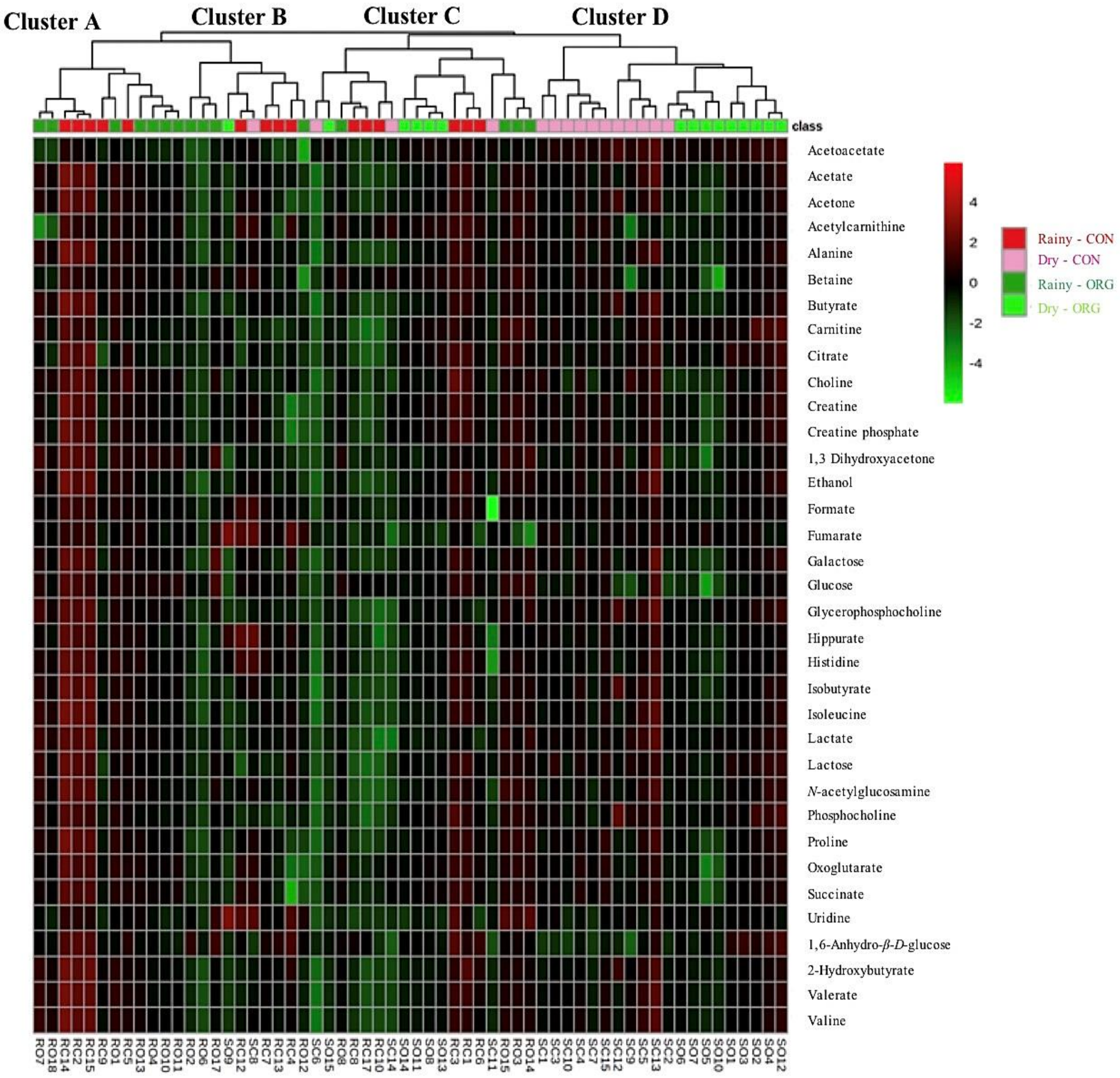
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จากนั้นสารเมตาบอไลต์ในตัวอย่างน้ำนมดิบทั้งหมด 148 bin (35 metabolite) จะถูกนำมาประมวลผลตามขั้นตอนที่ 3.2.6 เพื่อเปรียบเทียบข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากของตัวอย่างน้ำนมดิบ และศึกษาอิทธิพลของระบบการจัดฟาร์มที่แตกต่างกันระหว่างฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปและอิทธิพลของฤดูกาลในการเก็บตัวอย่าง

4.3.2 การเปรียบเทียบข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากของตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูกาลที่แตกต่างกัน (*n* = 60) จากการวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR โดยเทคนิค Heat-map visualization และ hierarchical cluster analysis (HCA)

การจัดกลุ่มด้วยเทคนิค heat-map visualization และ HCA โดยโปรแกรมสำเร็จรูป Metaboanalyst version 5.0 จากผลการวิเคราะห์ พบว่า สามารถแยกความแตกต่างของกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบจากอิทธิพลของฤดูกาลในการเก็บตัวอย่าง ออกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้ (i) น้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูฝน (cluster A, B, C) และ (ii) น้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูแล้ง (cluster D) ในขณะที่ อิทธิพลของระบบการจัดฟาร์มระหว่างฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปยังไม่สามารถแยกความแตกต่างได้อย่างชัดเจน แสดงดังรูปที่ 4.8 เพื่อให้เห็นความแตกต่างระหว่างอิทธิพลของระบบการจัดฟาร์มและฤดูกาลที่แตกต่างกันต่อข้อมูลสารเมตาบอไลต์ จึงนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์จำแนกกลุ่มแบบ PLS-DA ซึ่งเป็นเทคนิคการจัดกลุ่มข้อมูลแบบ supervised pattern recognition โดยใช้หลักการลดมิติของข้อมูลและสร้างตัวแบบความสัมพันธ์เชิงเส้นในเชิงพยากรณ์ระหว่างกลุ่มตัวแปร ทำให้สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างได้อย่างชัดเจนมากขึ้น (Johansson *et al.,* 2003, Hilario and Kalousis, 2008)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



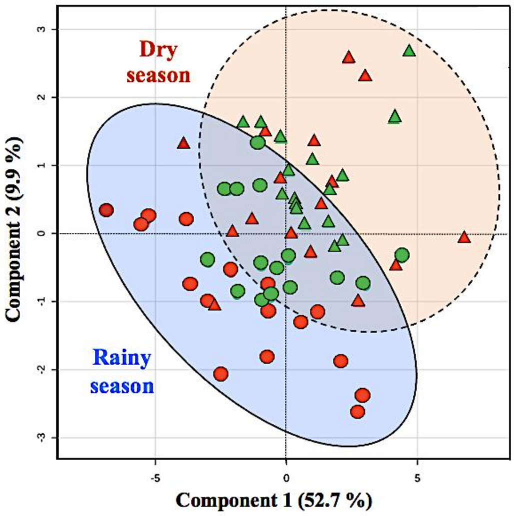
รูปที่ 4.8 การวิเคราะห์โดยการจัดกลุ่มด้วยเทคนิค heat-map visualization และ hierarchical cluster analysis (HCA) ของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR ของตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปที่เก็บในฤดูกาลต่างกัน

หมายเหตุ : น้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ในช่วงฤดูฝน (●) น้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ในช่วงฤดูแล้ง (●) น้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูฝน (●) และน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูแล้ง (●)

4.3.3 การเปรียบเทียบข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากของตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูกาลที่แตกต่างกัน (*n* = 60) จากการวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR โดยการวิเคราะห์จำแนกกลุ่มด้วยการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุด (Partial least square-discriminant analysis; PLS-DA)

ข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากของตัวอย่างน้ำนมดิบทั้งหมด (*n* = 60) ซึ่งถูกจัดแบ่งกลุ่มเป็น (i) น้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ในช่วงฤดูฝน (*n*=15) (ii) น้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ในช่วงฤดูแล้ง (*n*=15) (iii) น้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูฝน (*n*=15) และ (iv) น้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูแล้ง (*n*=15) จะถูกนำมาวิเคราะห์จำแนกกลุ่มด้วย PLS-DA ผลการวิเคราะห์พบว่า มีความแปรปรวนของตัวแปรรวมร้อยละ 62.6 โดย component 1 สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ร้อยละ 52.7 และ component 2 สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ ร้อยละ 9.9 (รูปที่ 4.9) ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบออกเป็น 2 กลุ่มตามแนว Component 1 คือ (i) น้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูฝน และ (ii) น้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูแล้ง โดยมีค่า accuracy ร้อยละ 78.13, ค่า R^2 เท่ากับ 0.637 และ Q^2 เท่ากับ 0.388 ในเบื้องต้นจึงสรุปได้ว่าอิทธิพลของฤดูกาลส่งผลต่อข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากของตัวอย่างน้ำนมดิบมากกว่าอิทธิพลของระบบการจัดการฟาร์มโคนม โดยผลที่ได้มีความสอดคล้องกับผลจาก heat-map visualization และ HCA แสดงดังรูปที่ 4.8

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 4.9 PLS-DA 2D score plot ของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากที่ได้จากวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR ของตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปที่เก็บในฤดูกาลต่างกัน

หมายเหตุ : น้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ในช่วงฤดูฝน (●) น้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ในช่วงฤดูแล้ง (▲) น้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูฝน (●) และน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูแล้ง (▲)

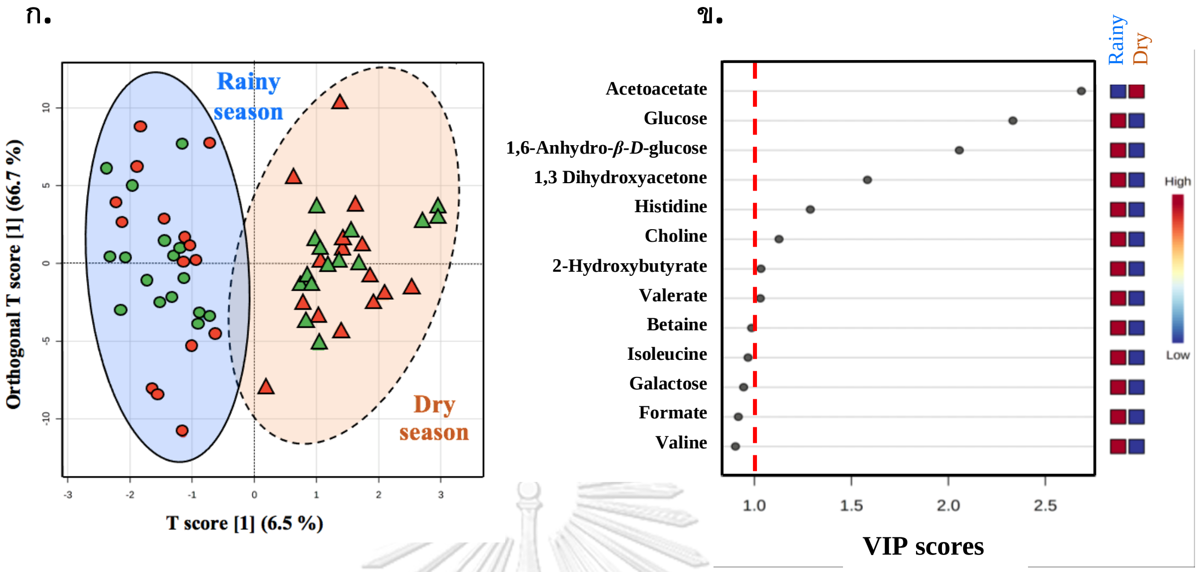
เพื่อแสดงให้เห็นอิทธิพลของฤดูกาลและอิทธิพลของระบบการจัดการฟาร์มโคนมที่แตกต่างกันต่อข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากได้อย่างชัดเจนมากขึ้น พร้อมทั้งระบุตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่าง ขั้นตอนต่อไปจึงทำการแยกเปรียบเทียบกลุ่มตัวอย่างของน้ำนมดิบตาม (i) อิทธิพลของฤดูกาล (ขั้นตอนที่ 4.3.4) และ (ii) อิทธิพลของระบบการจัดการฟาร์มโคนมที่แตกต่างกัน (ขั้นตอนที่ 4.3.5) และนำข้อมูลที่ได้มาจัดกลุ่มโดยการวิเคราะห์จำแนกกลุ่มแบบ OPLS-DA ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพมากกว่า PLS-DA เนื่องจากมีการประยุกต์ใช้เทคนิค PLS ร่วมกับเทคนิค Orthogonal signal correction (OSC) เพื่อลดความผันแปรที่ไม่สัมพันธ์กับกลุ่มตัวอย่างออก นอกจากนี้ยังมีการสร้างตัวแปรแฝงภายในกลุ่มตัวอย่างเพิ่มขึ้น ทำให้ปัจจัยมีความชัดเจนและง่ายต่อการตีความมากขึ้น (Bylesjö *et al.*, 2006, Worley and Powers, 2016)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.3.4 การเปรียบเทียบข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากของตัวอย่างน้ำนมดิบ (*n* = 60) เพื่อศึกษาอิทธิพลของฤดูกาลในการเก็บตัวอย่างที่แตกต่างกัน ระหว่างฤดูฝน (กันยายน - ตุลาคม 2563) และฤดูแล้ง (มีนาคม - เมษายน 2564) จากการวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR โดยการวิเคราะห์จำแนกกลุ่มแบบโครงสร้างเชิงตั้งฉากด้วยการถดถอยวิธีกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (Orthogonal partial least squares discriminant analysis; OPLS-DA)

ขั้นตอนนี้จะนำข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากของตัวอย่างน้ำนมดิบ (*n*=60) ซึ่งถูกจัดแบ่งกลุ่มเป็น (i) น้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูฝน (*n*=30) และ (ii) น้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูแล้ง (*n*=30) มาวิเคราะห์โดยโปรแกรมสำเร็จรูป MetaboAnalyst v.5.0 เมื่อนำข้อมูลมาจัดกลุ่มโดยการวิเคราะห์ด้วย OPLS-DA (รูปที่ 4.10 ก.) พบว่า มีความแปรปรวนของตัวแปรรวมร้อยละ 73.2 ซึ่ง T score [1] สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ร้อยละ 6.5 และ Orthogonal component T score [1] สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ ร้อยละ 66.7 ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบตามแนว T score [1] ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ (i) กลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูฝน และ (ii) กลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูแล้ง โดยมีค่า R^2Y เท่ากับ 0.851 และ Q^2 เท่ากับ 0.800 และเมื่อพิจารณาค่าจาก VIP score ที่มากกว่า 1.0 จาก T score [1] (รูปที่ 4.10 ข.) พบว่าสามารถใช้ปริมาณสารสัมพัทธ์ของ glucose, 1,6-anhydro-β-*D*-glucose, 1,3 dihydroxyacetone, histidine, choline, 2-hydroxyacetone และ valerate ที่มีปริมาณสารสัมพัทธ์สูงในกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูฝน และปริมาณสารสัมพัทธ์ของ acetoacetate ที่มีปริมาณสารสัมพัทธ์สูงในกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูแล้ง เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อแยกความแตกต่างของน้ำนมดิบที่เก็บในทั้ง 2 ฤดูกาลได้ และเพื่อให้ได้ข้อสรุปเกี่ยวกับอิทธิพลของฤดูกาลต่อข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากในน้ำนมที่ชัดเจนยิ่งขึ้น จึงดำเนินการแยกวิเคราะห์กลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากระบบการจัดการฟาร์มโคนมแบบเดียวกันด้วย OPLS-DA ในขั้นตอนถัดไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



รูปที่ 4.10 OPLS-DA 2D score plot (ก.) และ VIP score (ข.) ของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากจากการวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR ของตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บในฤดูฝนและฤดูแล้งจากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป

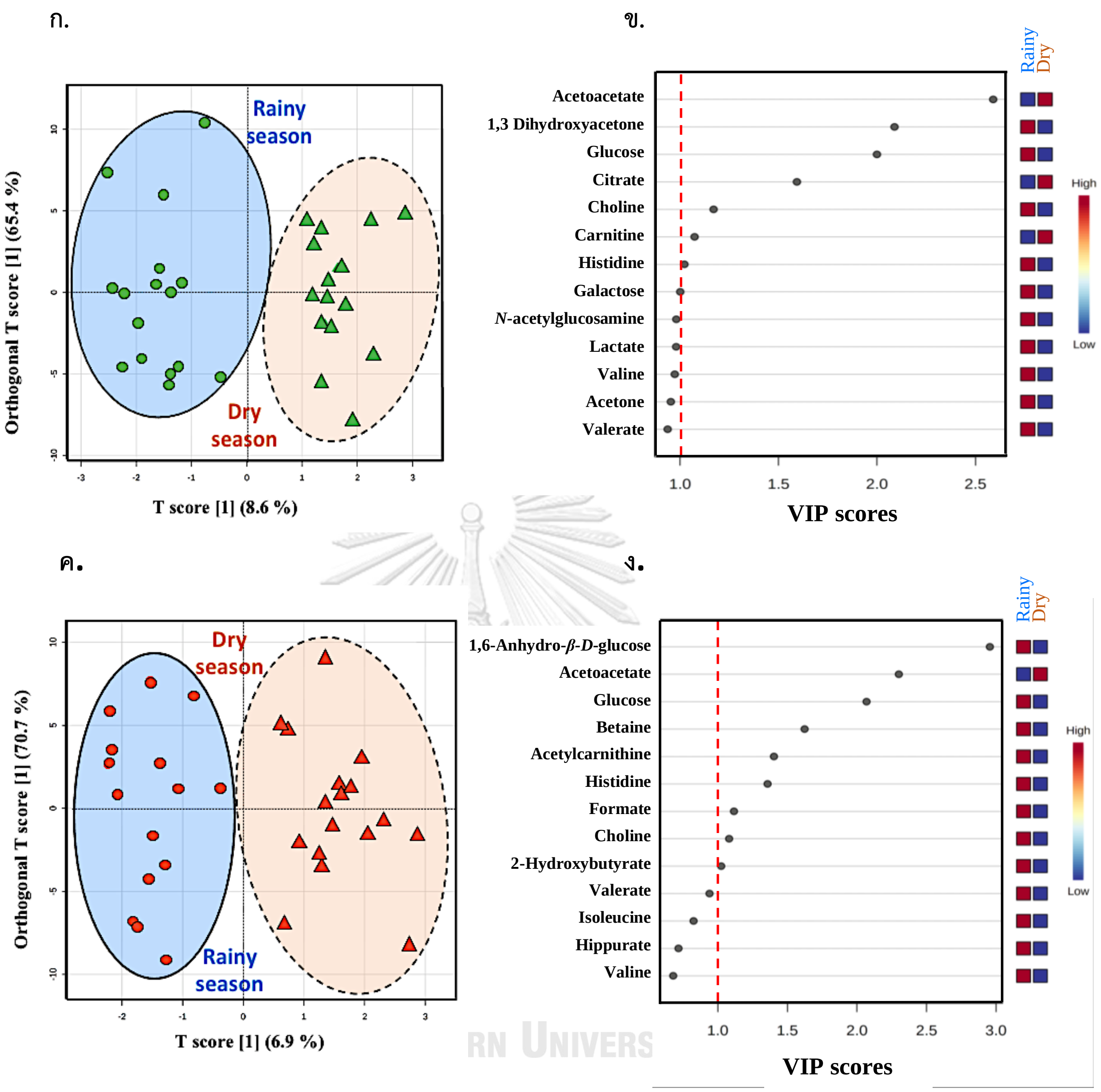
หมายเหตุ : น้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ในช่วงฤดูฝน (●) น้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูฝน (●) น้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ในช่วงฤดูแล้ง (▲) และน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูแล้ง (▲)

เมื่อเปรียบเทียบกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ (n = 30) ระหว่างน้ำนมที่เก็บในช่วงฤดูฝน (กันยายน - ตุลาคม 2563) และช่วงฤดูแล้ง (มีนาคม - เมษายน 2564) (รูปที่ 4.11 ก.) พบว่ามีความแปรปรวนของตัวแปรรวมร้อยละ 74.0 โดย T score [1] สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ร้อยละ 8.6 และ Orthogonal component T score [1] สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ ร้อยละ 65.4 ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างได้ตามแนว T score [1] ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ (i) กลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูฝน และ (ii) กลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูแล้ง โดยมีค่า R^2Y เท่ากับ 0.908 และ Q^2 เท่ากับ 0.826 เมื่อพิจารณาค่าจาก VIP score ที่มากกว่า 1.0 จาก T score [1] (รูปที่ 4.11 ข.) พบว่า สามารถใช้ปริมาณสารสัมพัทธ์ของ 1,3 dihydroxyacetone, glucose, choline, histidine และ galactose ที่มีปริมาณสารสัมพัทธ์สูงในกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ในช่วงฤดูฝน และ

ปริมาณสารสัมพัทธ์ของ acetoacetate, citrate และ carnitine ที่มีปริมาณสารสัมพัทธ์สูงในกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ในช่วงฤดูแล้ง เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อแยกความแตกต่างของน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์จากทั้ง 2 ฤดูกาลได้

เมื่อเปรียบเทียบกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไป (n = 30) ระหว่างน้ำนมที่เก็บในช่วงฤดูฝน (กันยายน - ตุลาคม 2563) และช่วงฤดูแล้ง (มีนาคม - เมษายน 2564) (รูปที่ 4.11 ค.) พบว่ามีความแปรปรวนของตัวแปรรวมร้อยละ 77.3 โดย T score [1] สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ร้อยละ 6.9 และ Orthogonal component T score [1] สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ ร้อยละ 70.7 ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างได้ตามแนว T score [1] ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ (i) กลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูฝน และ (ii) กลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูแล้ง โดยมีค่า R^2Yเท่ากับ 0.927 และ Q^2 เท่ากับ 0.798 เมื่อพิจารณาค่าจาก VIP score ที่มากกว่า 1.0 จาก T score [1] (รูปที่ 4.11 ง.) พบว่า สามารถใช้ปริมาณสารสัมพัทธ์ของ 1,6-anhydro-β-*D*-glucose, glucose, betaine, acethylcarnitine, histidine, formate, choline และ 2-hydroxybutyrate ที่มีปริมาณสารสัมพัทธ์สูงในกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูฝน และปริมาณสารสัมพัทธ์ของ acetoacetate ที่มีปริมาณสารสัมพัทธ์สูงในกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูแล้ง เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อแยกความแตกต่างของน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไปจากทั้ง 2 ฤดูกาลได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 4.11 OPLS-DA 2D score plot (ก,ค) และ VIP score (ข,ง) ของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากจากการวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR ของตัวอย่างน้ำนมดิบ แบบแยกเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ในช่วงฤดูฝนและช่วงฤดูแล้ง (ก,ข) และเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูฝนและช่วงฤดูแล้ง (ค,ง)

หมายเหตุ : น้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ในช่วงฤดูฝน (●) และช่วงฤดูแล้ง (▲) น้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูฝน (●) และช่วงฤดูแล้ง (▲)

เมื่อพิจารณาความสำคัญของสารเมตาบอไลต์ที่เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูแล้ง พบว่า ปริมาณสัมพัทธ์ที่สูงขึ้นของ acetoacetate มีความสัมพันธ์กับความเครียดเนื่องมาจากความร้อนในแม่โค (heat stress) (Fan *et al.,* 2018) ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลสถิติภูมิอากาศในเขตพื้นที่อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี (ตาราง 4.3) ที่รายงานว่า ในช่วงฤดูฝน (กันยายน – ตุลาคม, 2563) มีอุณหภูมิเฉลี่ย 25.1 องศาเซลเซียส ในขณะที่ ฤดูแล้ง (มีนาคม – เมษายน, 2564) มีอุณหภูมิเฉลี่ย 28.3 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นอาจเป็นสาเหตุหนึ่งของความเครียดที่ส่งผลต่อสุขภาพของแม่โค และเมื่อพิจารณาสารเมตาบอไลต์ที่เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูฝน พบว่า glucose จัดเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นแหล่งพลังงานสำหรับแม่โคและเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์น้ำตาลแลคโตสในน้ำนม (Lin *et al.,* 2016) โดยอาหารหยาบจำพวกหญ้าชนิดต่างๆและข้าวโพดจะเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ปริมาณของ glucose เพิ่มมากขึ้น (Vantahalo *et al.,* 2003) ซึ่งสอดคล้องกับตารางแสดงคุณค่าทางโภชนาการของอาหารสัตว์จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป (ตาราง 4.4) ที่พบว่าในช่วงฤดูฝนเกษตรกรจะเลี้ยงแม่โคด้วยข้าวโพดหมักปริมาณมากกว่าในช่วงฤดูแล้ง เนื่องจากมีผลผลิตมากและมีปริมาณเยื่อใยและคาร์โบไฮเดรตสูงกว่าในฤดูกาลอื่น ส่วน histidine ที่มีปริมาณสารสัมพัทธ์สูงในช่วงฤดูฝน งานวิจัยของ Luangwilai *et al.* (2021) พบว่า histidine จะเพิ่มขึ้นในน้ำนมดิบที่มีปริมาณโซมาติกเซลล์สูงโดยเป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรียในเต้านม (Caggiano *et al.,* 2019, Larsen *et al.,* 2010, Luangwilai *et al.,* 2021) ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณโซมาติกเซลล์ในตัวอย่างน้ำนมดิบ (ตาราง 4.5) ที่พบว่า ในช่วงฤดูฝนจะปริมาณโซมาติกเซลล์สูงขึ้น เนื่องจากโรงเรือนและพื้นที่โดยรอบมีลักษณะชื้นแฉะมากกว่าในฤดูกาลอื่นทำให้เกิดโอกาสปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรียเพิ่มมากขึ้น (Yeamkong *et al.,* 2010) สำหรับปริมาณสัมพัทธ์ของ choline ที่สูงขึ้นในช่วงฤดูฝน งานวิจัยของ Xu *et al.* 2020 พบว่า ปริมาณ choline ที่เพิ่มขึ้นเกี่ยวข้องกับสมดุลพลังงานที่ดีในแม่โค (Xu *et al.,* 2020) โดยแม่โคที่ได้รับอาหารหยาบคุณภาพดีอย่างเพียงพอในช่วงฤดูฝนถือเป็นหนึ่งปัจจัยที่ส่งผลต่อสมดุลพลังงานที่ดี (กรมปศุสัตว์, 2562) นอกจากนี้ สารดังกล่าวยังเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารเมตาบอไลต์อื่นๆ เช่น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

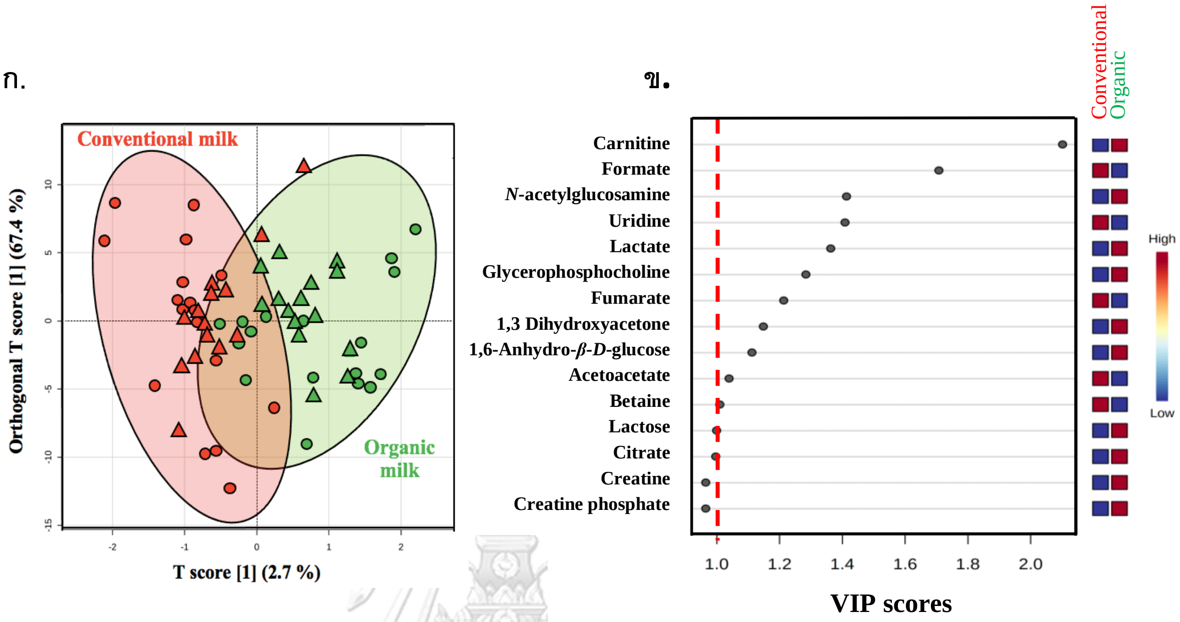
acetylcholine (สารสื่อประสาท), betaine และจำเป็นต่อการสร้าง phospholipids ในน้ำนม (Zeisel *et al.,* 1991, O'Callaghan *et al.,* 2018)

4.3.5 การเปรียบเทียบข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากของตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป (*n* = 60) เพื่อศึกษาอิทธิพลของระบบการจัดการฟาร์มที่แตกต่างกัน จากการวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR โดยการวิเคราะห์จำแนกกลุ่มแบบโครงสร้างเชิงตั้งฉากด้วยการถดถอยวิธีกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (Orthogonal partial least squares discriminant analysis; OPLS-DA)

ขั้นตอนนี้จะนำข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากของตัวอย่างน้ำนมดิบ (*n*=60) ซึ่งถูกจัดแบ่งกลุ่มเป็น (i) น้ำนมดิบที่ได้ฟาร์มโคนมอินทรีย์ (*n*=30) และ (ii) น้ำนมดิบที่ได้ฟาร์มโคนมทั่วไป (*n*=30) มาวิเคราะห์โดยโปรแกรมสำเร็จรูป MetaboAnalyst v.5.0 เมื่อนำข้อมูลมาจัดกลุ่มโดยการวิเคราะห์ด้วย OPLS-DA (รูปที่ 4.12 ก.) พบว่า มีความแปรปรวนของตัวแปรรวมร้อยละ 70.1 โดย T score [1] สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ร้อยละ 2.7 และ Orthogonal component T score [1] สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ ร้อยละ 67.4 ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบตามแนว T score [1] ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ (i) กลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ และ (ii) กลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไป โดยมีค่า R^2Y เท่ากับ 0.622 และ Q^2 เท่ากับ 0.354 และเมื่อพิจารณาค่าจาก VIP score ที่มากกว่า 1.0 จาก T score [1] (รูปที่ 4.12 ข.) พบว่าสามารถใช้ปริมาณสารสัมพัทธ์ของ carnitine, *N*-acetylglucosamine, lactate, glycerophosphocholine, 1,3 dihydroxyacetone และ 1,6-anhydro-β-*D*-glucose ที่มีปริมาณสารสัมพัทธ์สูงในกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ และปริมาณสารสัมพัทธ์ของ formate, uridine, fumarate, acetoacetate และ betaine ที่มีปริมาณสารสัมพัทธ์สูงในกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไป เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อแยกความแตกต่างของน้ำนมดิบทั้ง 2 กลุ่มได้ และเพื่อให้ได้ข้อสรุปเกี่ยวกับอิทธิพลของระบบการจัดการฟาร์มโคนมต่อข้อมูล

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากในน้ำนมที่ชัดเจนยิ่งขึ้น จึงดำเนินการแยกวิเคราะห์กลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูกาลเดียวกันด้วย OPLS-DA ในขั้นตอนถัดไป



รูปที่ 4.12 OPLS-DA 2D score plot (ก.) และ VIP score (ข.) ของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากจากการวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR ของตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปที่เก็บในฤดูกาลต่างกัน

หมายเหตุ : น้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ในช่วงฤดูฝน (●) น้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ในช่วงฤดูแล้ง (▲) น้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูฝน (●) และน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูแล้ง (▲)

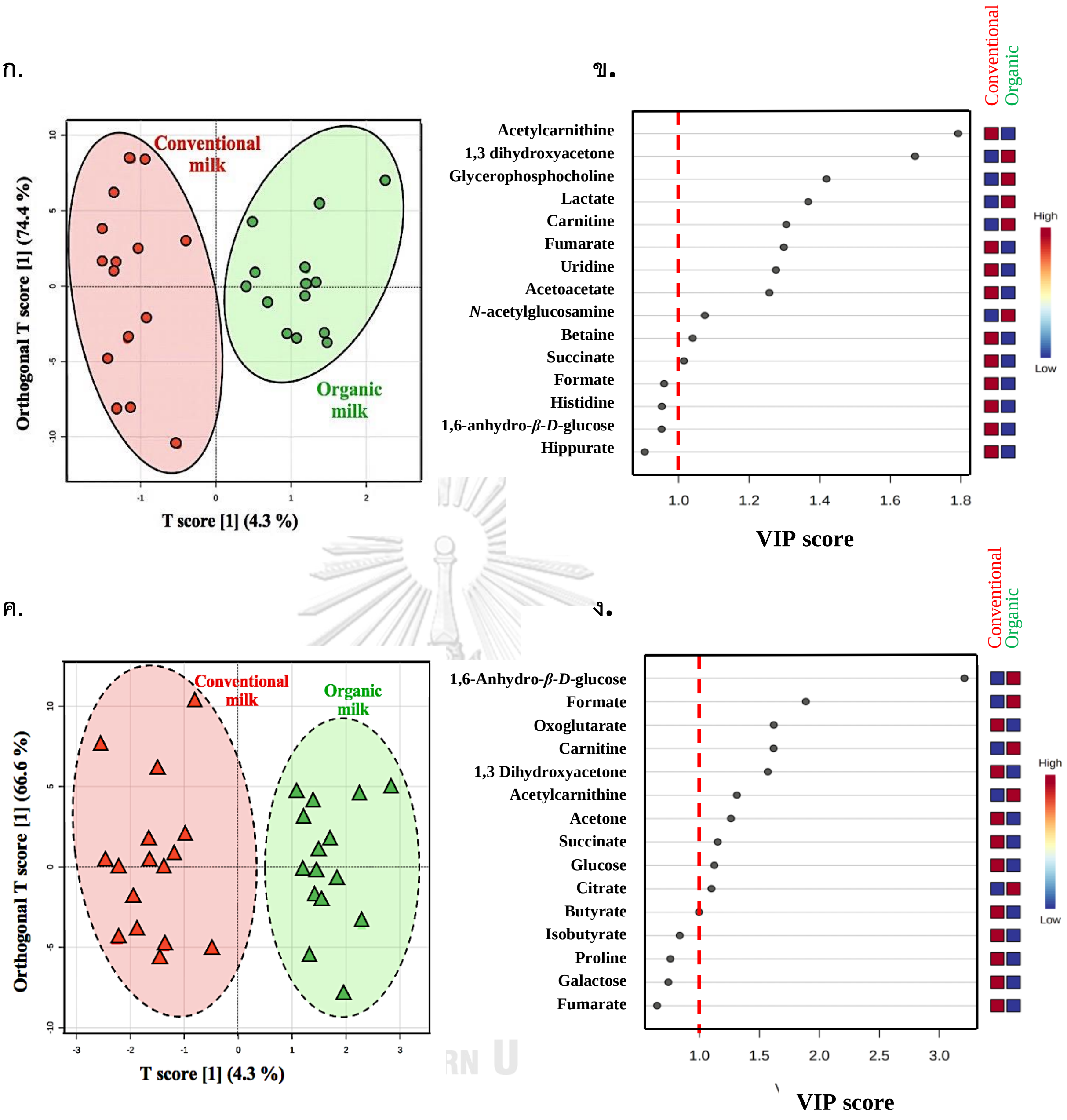
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปที่เก็บในช่วงฤดูฝน (กันยายน - ตุลาคม 2563) (n=30) (รูปที่ 4.13 ก.) พบว่า มีความแปรปรวนของตัวแปรรวมร้อยละ 78.7 โดย T score [1] สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ร้อยละ 4.3 และ Orthogonal component T score [1] สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ ร้อยละ 74.4 ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างได้ตามแนว T score [1] ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ (i) กลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ และ (ii) กลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไป โดยมีค่า R^2Y เท่ากับ 0.890 และ Q^2 เท่ากับ 0.704 และเมื่อพิจารณาค่าจาก VIP score ที่มากกว่า 1.0 จาก T score [1] (รูปที่ 4.13 ข.) พบว่า

สามารถใช้ปริมาณสารสัมพัทธ์ของ 1,3 dihydroxyacetone, glycerophosphocholine, carnitine, lactate และ *N*-acethylglucosamine ที่มีปริมาณสารสัมพัทธ์สูงในกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ และปริมาณสารสัมพัทธ์ของ acetylcarnitine, uridine, fumarate, acetoacetate, betaine และ succinate ที่มีปริมาณสารสัมพัทธ์สูงในกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไป เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อแยกความแตกต่างของน้ำนมดิบทั้ง 2 กลุ่มในช่วงฤดูฝนได้

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปที่เก็บในช่วงฤดูแล้ง (มีนาคม - เมษายน 2564) (*n*=30) (รูปที่ 4.13 ค.) พบว่า มีความแปรปรวนของตัวแปรรวมร้อยละ 70.9 โดย T score [1] สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ร้อยละ 4.3 และ Orthogonal component T score [1] สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ ร้อยละ 66.6 ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างได้ตามแนว T score [1] ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ (i) กลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ และ (ii) กลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไป โดยมีค่า R^2Y เท่ากับ 0.778 และ Q^2 เท่ากับ 0.526 และเมื่อพิจารณาค่าจาก VIP score ที่มากกว่า 1.0 จาก T score [1] (รูปที่ 4.13 ง.) พบว่าสามารถใช้ปริมาณสารสัมพัทธ์ของ 1,6-anhydro-*β*-*D*-glucose, formate, carnitine, acetylcarnitine และ citrate ที่มีปริมาณสารสัมพัทธ์สูงในกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ และปริมาณสารสัมพัทธ์ของ oxoglutarate, 1,3 dihydroxyacetone, acetone, succinate, glucose และ butyrate ที่มีปริมาณสารสัมพัทธ์สูงในกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไป เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อแยกความแตกต่างของน้ำนมดิบทั้ง 2 กลุ่มในช่วงฤดูแล้งได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 4.13 OPLS-DA 2D score plot (ก,ค) และ VIP score (ข,ง) ของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากที่ได้จากวิเคราะห์ด้วย [1]H-NMR ของตัวอย่างน้ำนมดิบ แบบแยกเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูฝน (ก,ข) และเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป ในช่วงฤดูแล้ง (ค,ง)

หมายเหตุ : น้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ (●) และฟาร์มโคนมทั่วไป (●) ที่เก็บในช่วงฤดูฝน และน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ (▲) และฟาร์มโคนมทั่วไป (▲) ที่เก็บในช่วงฤดูแล้ง

เมื่อพิจารณาความสำคัญของสารเมตาบอไลต์ที่เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ พบว่า ปริมาณสัมพัทธ์ของ carnitine มีค่าสูงทั้งในช่วงฤดูฝนและฤดูแล้ง โดยปริมาณ carnitine ในน้ำนมจะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในแม่โคที่มีสมดุลพลังงานที่ดี (Meyer *et al.,* 2020, Lu *et al.,* 2013) ซึ่งการจัดการอาหารหยาบที่ดีและเพียงพอ ถือเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ส่งผลต่อสมดุลพลังงานของแม่โค (กรมปศุสัตว์, 2562) สอดคล้องกับแบบสอบถามจากฟาร์มโคนมอินทรีย์ของคณะผู้วิจัย (ภาคผนวก ค) ที่พบว่า โคนมในฟาร์มโคนมอินทรีย์จะได้รับอาหารหยาบจำพวกหญ้าและข้าวโพดสดเป็นหลักไม่ต่ำกว่าร้อยละ 60 ของวัตถุแห้งของอาหารต่อวัน นอกจากนี้ ยังพบสารเมตาบอไลต์อื่นๆที่เกี่ยวข้องกับสมดุลของพลังงานที่ดี เช่น *N*-acetylglucosamine, glycerophosphocholine และ 1,3 dihydroxyacetone (Eom *et al.,* 2021, Lu *et al.,* 2013, Schwendel *et al.,* 2015, Xu *et al.,* 2020) ส่วน lactate ที่มีปริมาณสัมพัทธ์สูงในน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ที่เก็บในช่วงฤดูฝนสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kongboonkird *et al.* (2018) ที่ระบุว่า lactate เป็นหนึ่งในตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของน้ำนมโคอินทรีย์พาสเจอร์ไรส์ โดยมีรายงานว่า ปริมาณ lactate ที่สูงขึ้นมีความสัมพันธ์กับปริมาณอาหารหยาบที่แม่โคได้รับจากฟาร์มโคนมแบบอินทรีย์มากกว่าฟาร์มโคนมทั่วไปซึ่งส่งผลต่อกระบวนการหมักของจุลินทรีย์ในกระเพาะแม่โค (Kongboonkird *et al.,* 2018, Santos *et al.*, 2013) สำหรับปริมาณสัมพัทธ์ที่สูงขึ้นของ 1,6-anhydro-β-*D*-glucose หรือ levoglucosan ในน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ที่เก็บในช่วงฤดูแล้งจัดเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่ได้จากการสลายตัวของคาร์โบไฮเดรตด้วยความร้อน เช่น แป้งและเซลลูโลส (Lakshmanan *et al.,* 2004) โดยอาหารสัตว์จำพวกหญ้าชนิดต่างๆเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ปริมาณ 1,6-anhydro-β-*D*-glucose เพิ่มมากขึ้น (Choi *et al.*, 2011) สอดคล้องกับตารางแสดงคุณค่าทางโภชนาการของอาหารสัตว์จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป (ตาราง 4.4) ที่พบว่า ฟาร์มโคนมอินทรีย์มีการเลี้ยงแม่โคด้วยหญ้าและข้าวโพดสดในปริมาณมากกว่าฟาร์มโคนมทั่วไปที่เลี้ยงด้วยข้าวโพดหมักและฟางข้าวเป็นอาหารหยาบเท่านั้น นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาสารเมตาบอไลต์ที่เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไป พบว่า ปริมาณสัมพัทธ์ของ acetoacetate และ uridine ที่เพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับ

ความเครียดเนื่องมาจากความร้อนในแม่โค (Fan *et al.,* 2018) ซึ่งสอดคล้องกับแบบสอบถามจากฟาร์มโคนมทั่วไปของคณะผู้วิจัย (ภาคผนวก ค) ที่รายงานว่า ฟาร์มโคนมทั่วไปมีประชากรแม่โคจำนวนมากอยู่รวมกันในพื้นที่จำกัด ภายใต้สภาพอากาศร้อนชื้นของประเทศไทย ทำให้การจัดการด้านที่อยู่อาศัยและการระบายอากาศของโรงเรือนได้ไม่ดีนัก จึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งของความเครียดในแม่โคที่เพิ่มขึ้น ในส่วนของ betaine ที่มีปริมาณสัมพัทธ์สูงในน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไป งานวิจัยของ Shah *et al.* 2020 รายงานว่า betaine เป็นสารเมตาบอไลต์ที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในอาหารสัตว์เพื่อปรับปรุงคุณภาพในการผลิตน้ำนม (Shah *et al.,* 2020) โดยสารดังกล่าวจะถูกย่อยในกระเพาะสัตว์เพื่อใช้สำหรับสังเคราะห์กรดไขมันในน้ำนม (Peterson *et al.,* 2012) และงานวิจัยของ O'Callaghan *et al.* (2018) พบว่า ระบบการจัดการฟาร์มโคนมแบบเลี้ยงแม่โคในคอกด้วยอาหารผสมสำเร็จรูป TMR (indoor feeding system) จะมีปริมาณสารสัมพัทธ์ของ betaine ในน้ำนมที่สูงกว่าระบบการจัดการฟาร์มโคนมแบบปล่อยแปลงหญ้าสด (pasture feeding system) (O'Callaghan *et al.,* 2018) ซึ่งความผันแปรของปริมาณ betaine ในน้ำนมมีสาเหตุมาจากแหล่งอาหารสัตว์ที่แตกต่างกัน (Magan *et al.,* 2019)

อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้ต่อเนื่องมาจากงานวิจัยของ มาริสา คงบุญเกิด, (2562) ที่ศึกษาอิทธิพลของระบบการจัดการฟาร์มโคนมอินทรีย์ที่ส่งผลต่อข้อมูลแบบแผนชีวโมเลกุลในน้ำนมโคอินทรีย์ที่เก็บในช่วงฤดูแล้ง (ธันวาคม 2561 – กุมภาพันธ์ 2562) โดยพบว่าสามารถใช้ปริมาณสัมพัทธ์ของ 1,6-anhydro-β-D-glucose เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อระบุอัตลักษณ์ทางชีวโมเลกุลของน้ำนมโคนมอินทรีย์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยในครั้งนี้ที่พบสารดังกล่าวเพิ่มขึ้นในน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูแล้งเช่นกัน ในขณะที่สามารถใช้ปริมาณสัมพัทธ์ของ acetoacetate เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไป ซึ่งมีความขัดแย้งกับผลการวิจัยในครั้งนี้ที่พบว่าสารดังกล่าวจะเพิ่มขึ้นเฉพาะในช่วงฤดูฝนเท่านั้น นอกจากนี้ ปริมาณสัมพันธ์ของ carnitine, *N*-acethylglucosamine, glycerophosphocholine, lactate, 1,3 dihydroxyacetone, fumarate และ uridine ที่พบเพิ่มเติมในงานวิจัยนี้ยังสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อระบุอัตลักษณ์ทางชีวโมเลกุลระหว่างน้ำนมโคอินทรีย์และน้ำนมโคนมทั่วไปได้เช่นกัน และ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

อิทธิพลของฤดูกาลยังส่งผลต่อความผันแปรของปริมาณ acetoacetate, glucose, histidine และ choline ในตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูฝนและฤดูแล้ง ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR แสดงให้เห็นว่าข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากที่ได้มีความสัมพันธ์กับความแตกต่างของชนิดอาหารสัตว์ ความเครียดเนื่องจากความร้อน และสุขภาวะของแม่โค ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ล้วนเกี่ยวข้องกับอิทธิพลของระบบการจัดการฟาร์มโคนมและอิทธิพลของฤดูกาลที่แตกต่างกัน ในขั้นตอนถัดไปจะนำข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากของตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปในแต่ละช่วงฤดูกาลมาวิเคราะห์หาวิถีเมตาบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับความผันแปรของข้อมูลปริมาณสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากจากอิทธิพลของการจัดการฟาร์มแบบเกษตรอินทรีย์และปัจจัยจากฤดูกาลที่เก็บตัวอย่างด้วย MetaboAnalyst pathway analysis และวิเคราะห์ระบุตำแหน่งสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่ออิทธิพลของการจัดการฟาร์มแบบเกษตรอินทรีย์และปัจจัยจากฤดูกาลที่เก็บตัวอย่างด้วย KEGG’s pathway analysis

4.3.6 การวิเคราะห์หาวิถีเมตาบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับความผันแปรของข้อมูลปริมาณสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากจากอิทธิพลของการจัดการฟาร์มแบบเกษตรอินทรีย์และปัจจัยจากฤดูกาลที่เก็บตัวอย่างด้วย MetaboAnalyst pathway analysis

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3.6.1 การวิเคราะห์หาวิถีเมตาบอลิซึมที่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนทั่วไป (*n*=60)

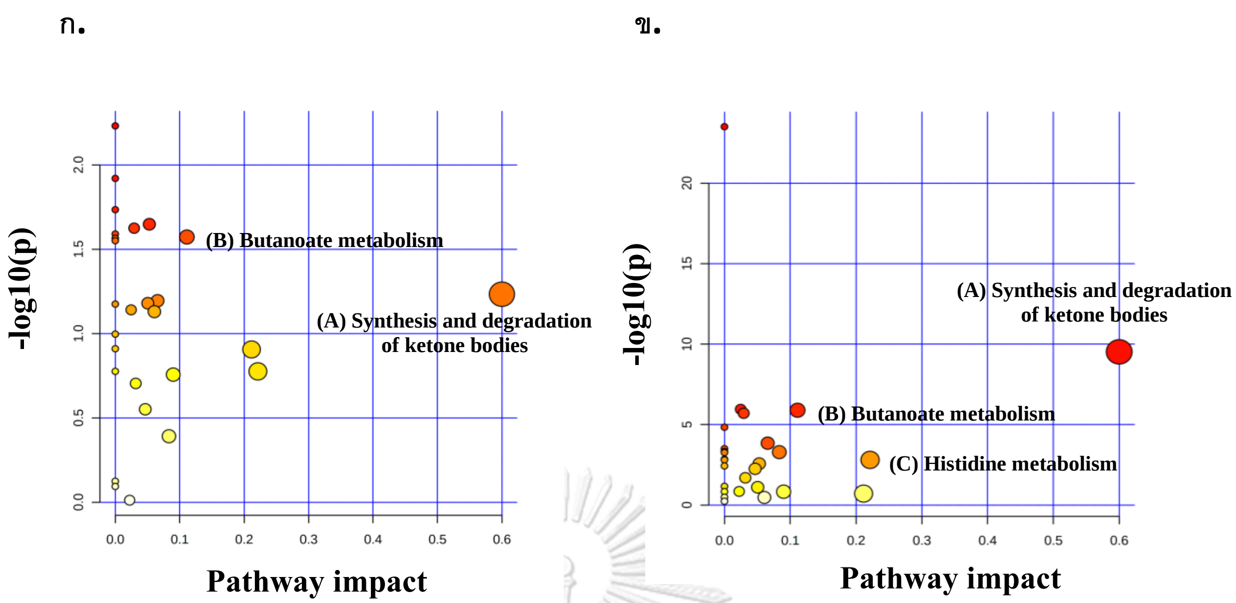
จากข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากของตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป (*n*=60) เมื่อนำมาวิเคราะห์หาสารเมตาบอไลต์ที่แตกต่างกันจากวิถีเมตาบอลิซึมของสารเมตาบอไลต์นั้นด้วย MetaboAnalyst pathway analysis พบว่า มีวิถีเมตาบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับสารเมตาบอไลต์ที่แตกต่างกันระหว่างตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปที่ $p<0.05$ และ pathway impact > 0.1 ได้แก่ (A) butanoate metabolism และ (B) synthesis and degradation

of ketone bodies ดังแสดงในรูปที่ 4.14 ก. โดยวิถีเมตาบอลิซึม butanoate metabolism มี butyrate เป็นสารในวิถีเมตาบอลิซึมนี้ และวิถีการสร้างและสลายตัว synthesis and degradation of ketone bodies โดยมี acetoacetate เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในวิถีเมตาบอลิซึมนี้

4.3.6.2 การวิเคราะห์หาวิถีเมตาบอลิซึมที่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูฝนและฤดูแล้ง (*n*=60)

จากข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากของตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูฝนและฤดูแล้ง (n= 60) เมื่อนำมาวิเคราะห์หาสารเมตาบอไลต์ที่แตกต่างกันจากวิถีเมตาบอลิซึมของสารเมตาบอไลต์นั้นด้วย MetaboAnalyst pathway analysis พบว่า มีวิถีเมตาบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับสารเมตาบอไลต์ที่แตกต่างกันระหว่างตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูฝนและฤดูแล้งที่ $p<0.05$ และ pathway impact > 0.1 ได้แก่ (A) synthesis and degradation of ketone bodies (B) butanoate metabolism และ (C) histidine metabolism ดังแสดงในรูปที่ 4.14 ข. โดยวิถีการสร้างและสลายตัว synthesis and degradation of ketone bodies มี acetoacetate เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในวิถีเมตาบอลิซึมนี้ วิถีเมตาบอลิซึม butanoate metabolism มี butyrate เป็นสารในวิถีเมตาบอลิซึมนี้ และวิถีเมตาบอลิซึม histidine metabolism โดยมี histidine เป็นสารตั้งต้นในวิถีเมตาบอลิซึมนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



รูปที่ 4.14 การวิเคราะห์วิถีเมตาบอลิซึม (pathway analysis) ของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากที่แตกต่างกันระหว่างตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป (ก.) และตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูฝนและฤดูแล้ง (ข.)

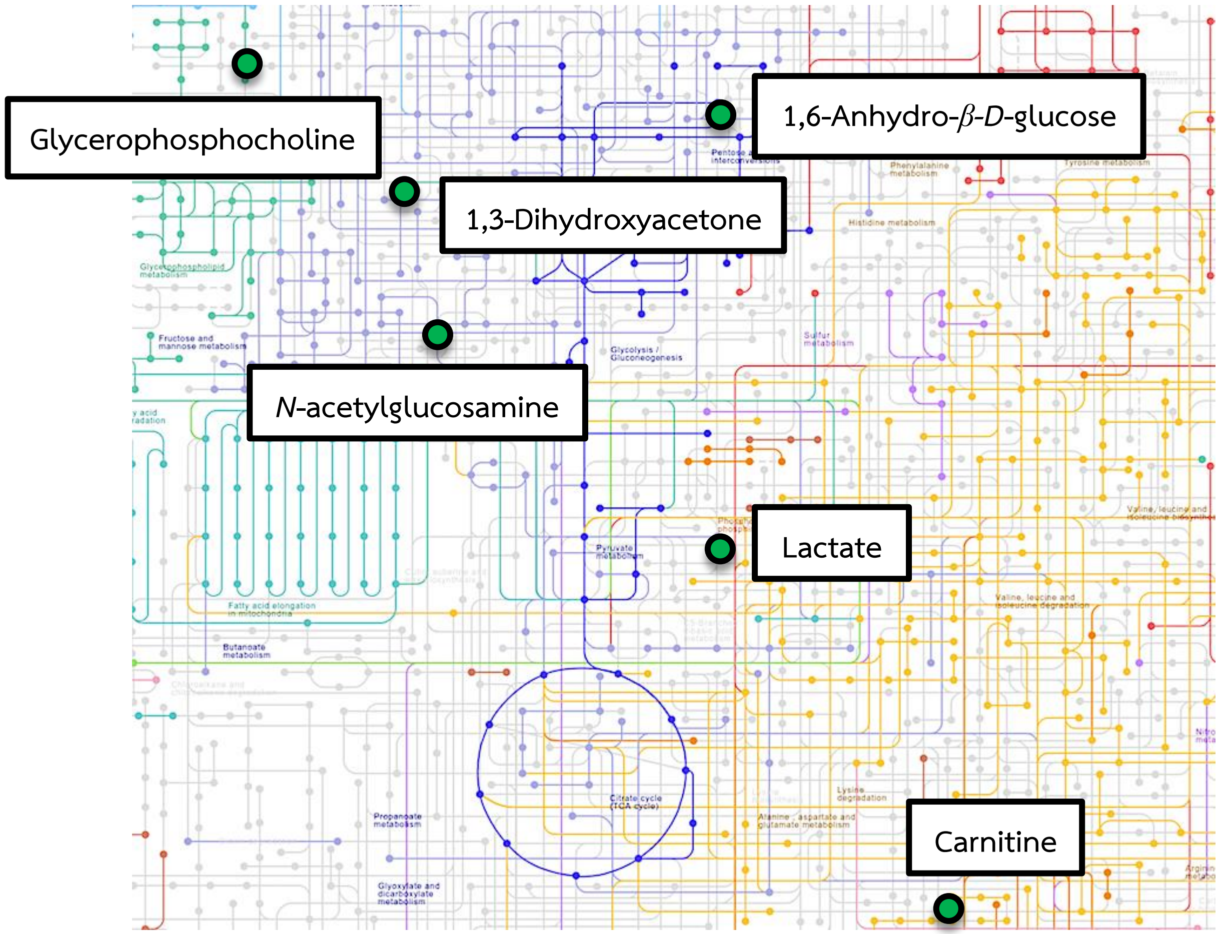
เมื่อพิจารณาวิถีเมตาบอลิซึม butanoate metabolism โดยมี butyrate เป็นสารในวิถีเมตาบอลิซึมนี้ พบว่า butyrate เกิดจากกระบวนการหมักเยื่อใยของพืชในกระเพาะสัตว์เพื่อใช้สังเคราะห์กรดไขมันในน้ำนม โดยปริมาณ butyrate จะเพิ่มขึ้นเมื่อแม่โคได้รับอาหารที่มีเยื่อใยสูง เช่น หญ้าสด ข้าวโพด เป็นต้น (Klebling *et al.*, 2002, O'Donnell *et al.*, 2010, Schwendel *et al.*, 2015) สำหรับวิถีการสร้างและสลายตัว synthesis and degradation of ketone bodies มี acetoacetate เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในวิถีเมตาบอลิซึมนี้ซึ่งสัมพันธ์กับความเครียดเนื่องมาจากความร้อน (heat stress) โดยการจัดการด้านที่อยู่อาศัยและอุณหภูมิที่แตกต่างกันในแต่ละฤดูกาลถือเป็นสาเหตุของการเกิดความเครียดในตัวแม่โค (Fan *et al.*, 2018) ซึ่งสอดคล้องกับค่า VIP score ในหัวข้อ 4.3.4 ที่พบว่า acetoacetate เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูแล้ง และวิถีเมตาบอลิซึม histidine metabolism โดยมี histidine เป็นสารตั้งต้นในวิถีเมตาบอลิซึมนี้ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณโซมาติกเซลล์ที่สูงขึ้นในน้ำนมโดยเป็นผลมาจากการ

ทำงานของเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรียในเต้านม ผลที่ได้สอดคล้องกับค่า VIP score ในหัวข้อ 4.3.4 ที่พบว่า histidine เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูฝน เนื่องจากฤดูฝนมีลักษณะชื้นแฉะทำให้โอกาสการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรียจึงมากขึ้นเลยส่งผลต่อปริมาณโซมาติกเซลล์ให้สูงขึ้นได้ (Caggiano *et al.,* 2019, Larsen *et al.,* 2010, Luangwilai *et al.,* 2021, Yeamkong *et al.,* 2010)

4.3.7 การวิเคราะห์ระบุตำแหน่งสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่ออิทธิพลของการจัดการฟาร์มแบบเกษตรอินทรีย์และปัจจัยจากฤดูกาลที่เก็บตัวอย่างด้วย KEGG's pathway analysis

4.3.7.1 การวิเคราะห์ระบุตำแหน่งสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากที่เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อแยกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป (*n*=60)

เมื่อพิจารณาข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากของกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป จากค่าของ VIP score ที่มากกว่า 1.0 ที่ได้จากการวิเคราะห์ OPLS-DA พบว่าสามารถใช้ค่าการเปลี่ยนแปลงปริมาณสัมพัทธ์ของ carnitine, N-acetylglucosamine, lactate, glycerophosphocholine, 1,3 dihydroxyacetone และ 1,6-anhydro-β-D-glucose เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อแยกความแตกต่างของกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ได้ โดยเมื่อนำข้อมูลสารเมตาบอไลต์ที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพดังกล่าวมาวิเคราะห์ตำแหน่งในวิถีเมตาบอลิซึมจากข้อมูล complete genome sequencing ของโคนม (*Bos taurus*) ด้วย KEGG's pathway analysis (https://www.metaboanalyst.ca) สามารถพบวิถีเมตาบอลิซึม ดังนี้ carnitine ในวิถีการสลายตัวของ Lysine degradation, lactate ในวิถีเมตาบอลิซึมของ pyruvate metabolism, *N*-acetylglucosamine และ 1,6-anhydro-β-*D*-glucose ในวิถีเมตาบอลิซึมของ carbohydrate metabolism, 1,3 dihydroxyacetone ในวิถีเมตาบอลิซึมของ glycerolipid metabolism และ glycerophosphocholine ในวิถีเมตาบอลิซึมของ glycerophospholipid metabolism ดังแสดงในรูปที่ 4.15



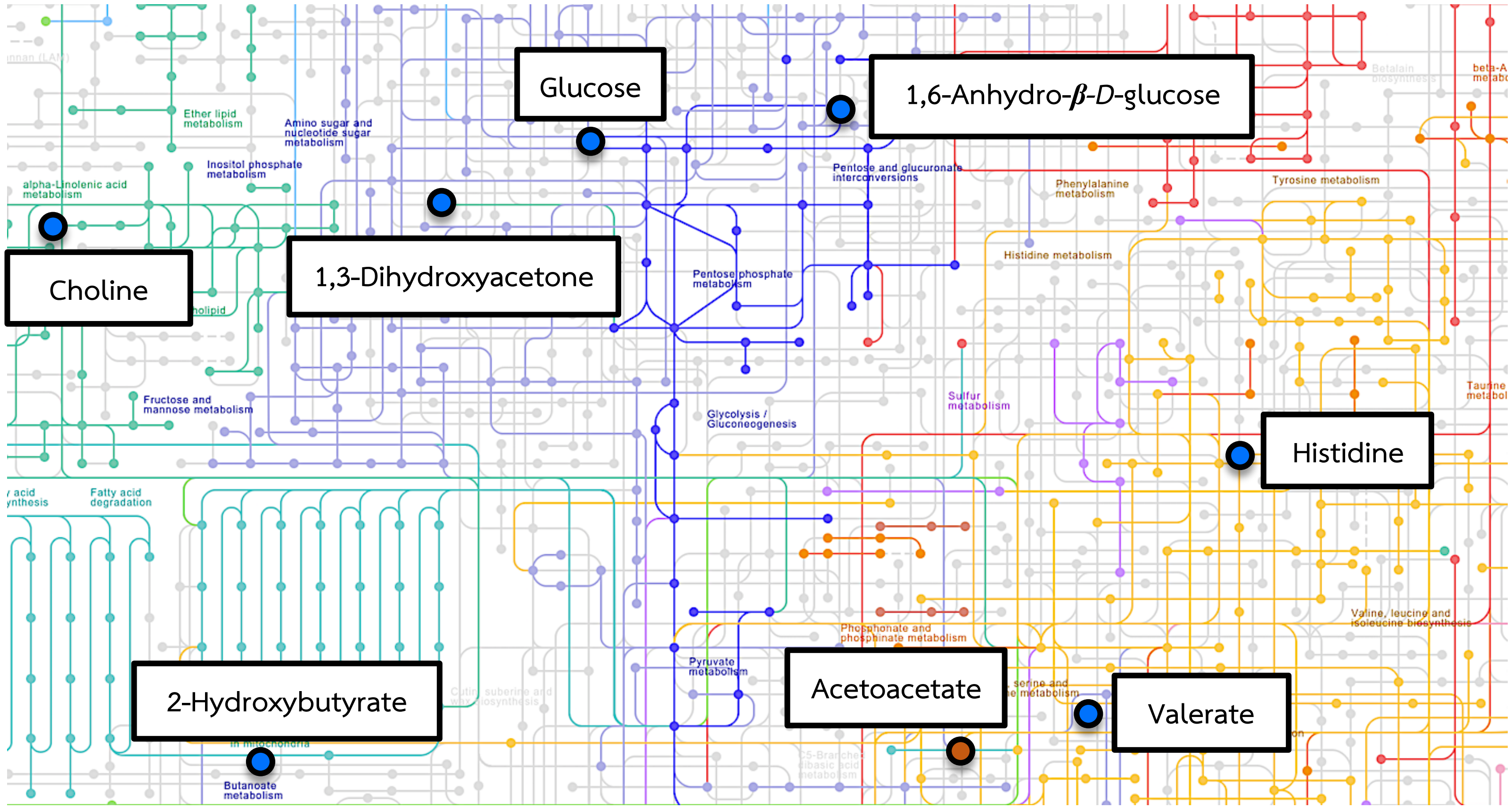
รูปที่ 4.15 KEGG’s pathway analysis

ดัดแปลงจาก : https://www.genome.jp/kegg/ หมายเหตุ: ● หมายถึง สารเมตาบอไลต์ที่พบมากในน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์

4.3.7.2 การวิเคราะห์ระบุตำแหน่งสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากที่เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อแยกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูฝนและฤดูแล้ง (*n*=60)

เมื่อพิจารณาข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากของกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูฝนและฤดูแล้ง จากค่าของ VIP score ที่มากกว่า 1.0 ที่ได้จากการวิเคราะห์ OPLS-DA พบว่า สามารถใช้ค่าการเปลี่ยนแปลงปริมาณสัมพัทธ์ของ glucose, 1,6-anhydro-*β-D*-glucose, 1,3 dihydroxyacetone, histidine, choline, 2-hydroxybutyrate และ valerate เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูฝน และสามารถใช้ค่าการเปลี่ยนแปลงปริมาณสัมพัทธ์ของ acetoacetate เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูแล้งได้ โดยเมื่อนำข้อมูลสารเมตาบอไลต์ที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพดังกล่าวมาวิเคราะห์ตำแหน่งในวิถีเมตาบอลิซึมจากข้อมูล complete genome sequencing ของโคนม (*Bos taurus*) ด้วย KEGG’s pathway analysis (https://www.metaboanalyst.ca) สามารถพบวิถีเมตาบอลิซึม ดังนี้ glucose และ 1,6-anhydro-*β-D*-glucose ในวิถีเมตาบอลิซึมของ carbohydrate metabolism, 1,3 dihydroxyacetone ในวิถีเมตาบอลิซึมของ glycerolipid metabolism, histidine ในวิถีเมตาบอลิซึมของ histidine metabolism, choline ในวิถีเมตาบอลิซึมของ glycerophospholipid metabolism, 2-hydroxybutyrate ในวิถีเมตาบอลิของ butanoate metabolism, valerate ในวิถีการสลายตัวของ valine, leucine and isoleucine degradation และ acetoacetate ในวิถีการสร้างและสลายตัวของ ketone body biosynthesis ดังแสดงในรูปที่ 4.16 ซึ่งจะเห็นได้ว่าวิถีเมตาบอลิซึมของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากที่พบใน KEGG’s pathway ข้างต้นสอดคล้องวิถีเมตาบอลิซึมของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากที่แสดงใน pathway analysis หัวข้อที่ 4.3.6

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 4.16 KEGG's pathway analysis

ดัดแปลงจาก : https://www.genome.jp/kegg/

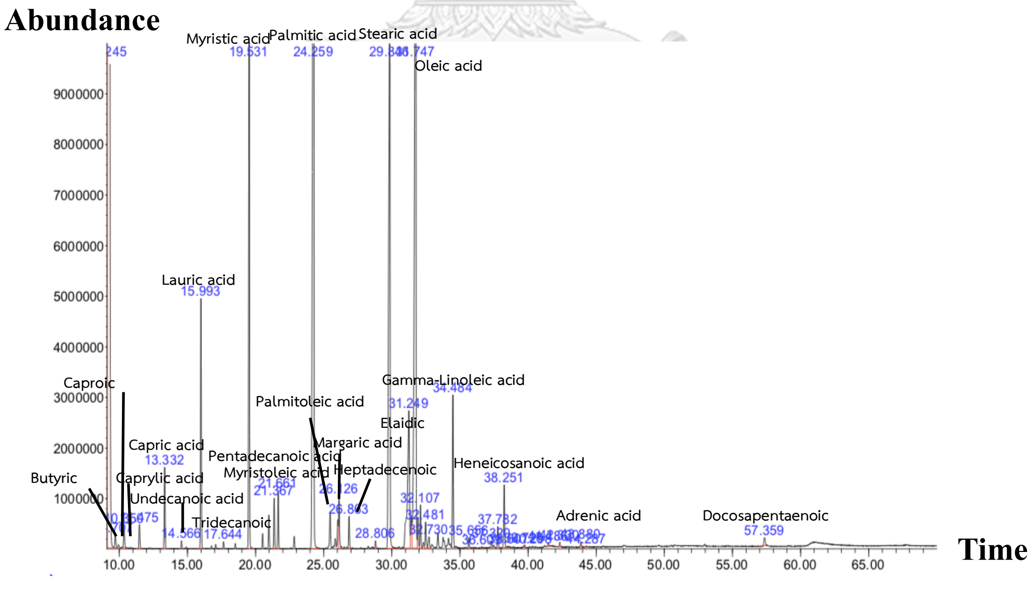
หมายเหตุ: 🔵 หมายถึง สารเมตาบอไลต์ที่พบมากในน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูฝน

และ 🟠 หมายถึง สารเมตาบอไลต์ที่พบมากในน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูแล้ง

4.4 การวิเคราะห์ข้อมูลกรดไขมันในน้ำนมดิบโดยใช้เทคนิค GC-MS

4.4.1 การประมวลผล spectra ของ GC-MS และการระบุชนิดของกรดไขมันของน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปที่เก็บในช่วงฤดูกาลที่แตกต่างกัน (*n*=60)

การวิจัยขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์ข้อมูลกรดไขมันในน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปที่เก็บในช่วงฤดูกาลที่แตกต่างกัน โดยจะระบุชนิดและเปรียบเทียบข้อมูลกรดไขมันในตัวอย่างน้ำนมดิบด้วยเทคนิค GC-MS ด้วยการระบุข้อมูลกรดไขมันอ้างอิงจากฐานข้อมูลจำนวน 37 สาร จากการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำนมดิบทั้งหมดจำนวน 60 ตัวอย่าง พบว่ามีข้อมูลกรดไขมันอยู่ในตัวอย่างน้ำนมดิบทั้งหมด 32 สาร ซึ่งเป็นสารในกลุ่มของกรดไขมันชนิดอิ่มตัว (saturated fatty acid: SFA) กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่ 1 ตำแหน่ง (monounsaturated fatty acid: MUFA) และกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หลายตำแหน่ง (polyunsaturated fatty acid: PUFA) โดยสามารถระบุตำแหน่งของกรดไขมันต่างๆบนโครมาโตแกรมของตัวอย่าง แสดงดังรูปที่ 4.17 และตาราง 4.7



รูปที่ 4.17 ตัวอย่างโครมาโตแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปด้วยเทคนิค GC-MS

ตาราง 4.7 กรดไขมันที่พบในตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปทั้งหมด 32 ชนิด

ประเภทกลุ่มของกรดไขมัน	ลำดับที่	ค่า retention time (min)	กรดไขมัน	สูตรเคมี
กรดไขมันชนิดอิ่มตัว	1	9.705	Butyric acid	C4:0
	2	10.347	Caproic acid	C6:0
	3	11.474	Caprylic acid	C8:0
	4	13.331	Capric acid	C10:0
	5	14.566	Undecanoic acid	C11:0
	6	15.993	Lauric acid	C12:0
	7	17.640	Tridecanoic acid	C13:0
	8	19.535	Myristic acid	C14:0
	9	21.662	Pentadecanoic acid	C15:0
	10	24.293	Palmitic acid	C16:0
	11	26.868	Margaric acid	C17:0
	12	29.931	Stearic acid	C18:0
	13	32.733	Arachidic acid	C20:0
	14	38.253	Heneicosanoic acid	C21:0
	15	39.727	Behenic acid	C22:0
	16	43.879	Lignoceric acid	C24:0
กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวพันธะคู่ 1 ตำแหน่ง	17	21.365	Myristoleic acid	C14:1
	18	26.128	Palmitoleic acid	C16:1
	19	28.806	Heptadecenoic acid	C17:1
	20	31.278	Elaidic acid	C18:1n9t
	21	31.787	Oleic acid	C18:1n9c
	22	35.664	Eicosenoic acid	C20:1n9

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประเภทกลุ่มของกรดไขมัน	ลำดับที่	ค่า retention time (min)	กรดไขมัน	สูตรเคมี
กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวพันธะคู่หลายตำแหน่ง	23	32.123	Linolelaidic acid	C18:2n6t
	24	32.489	Linoleic acid	C18:2n6c
	25	34.492	Gamma-Linoleic acid	C18:3n6
	26	37.326	Linolenic acid	C18:3n3
	27	37.782	Conjugated linoleic acid	c9,t11
	28	38.508	Ecosadienoic acid	C20:2
	29	41.490	Dihomo-gamma-linolenic acid	C20:3n6
	30	42.327	Arachidonic acid	C20:4n6
	31	47.001	Adrenic acid	C22:4n6
	32	57.358	Docosapentaenoic acid	C22:5n3

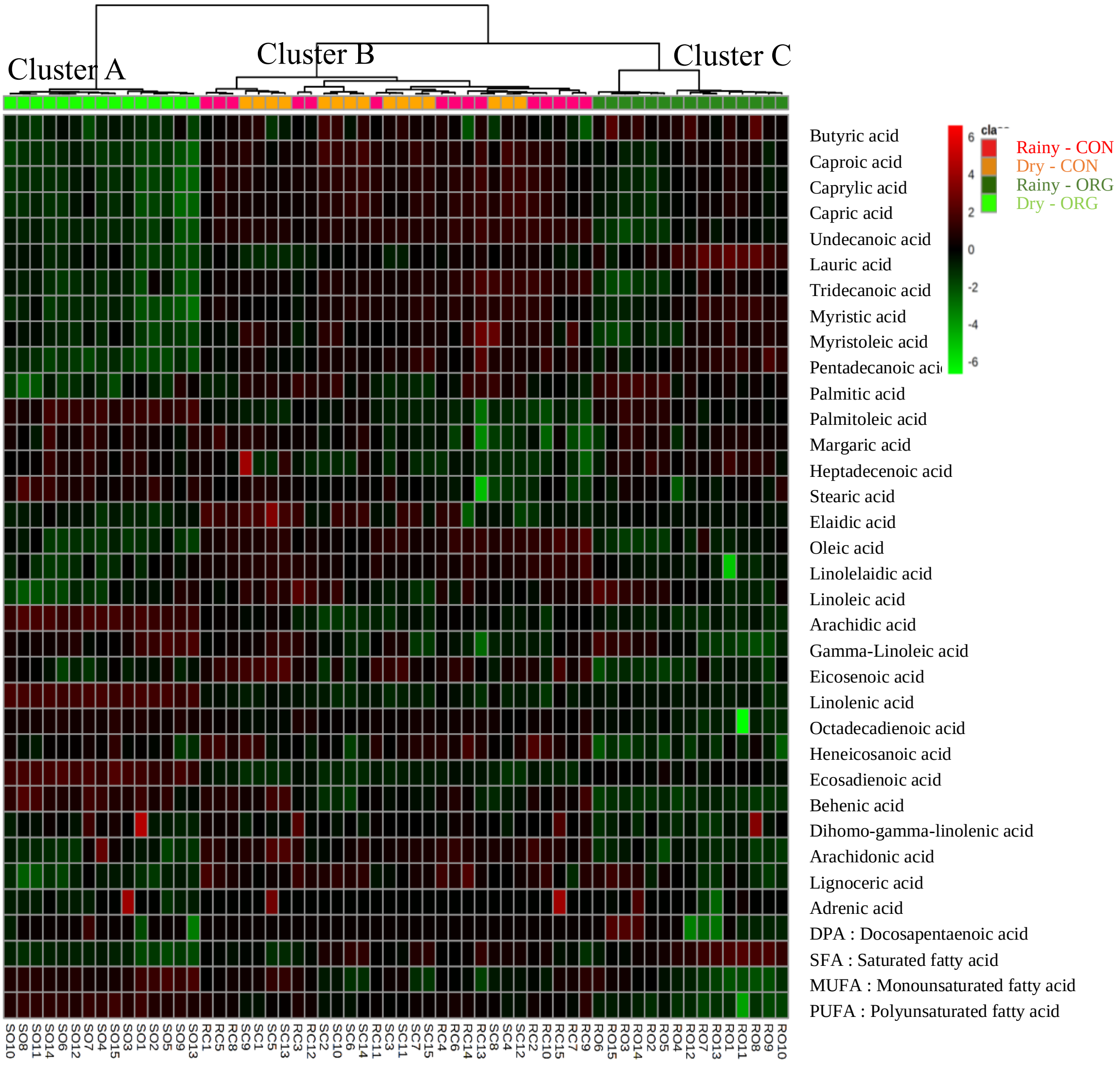
นอกจากนี้ ยังนำผลรวมของกรดไขมันชนิดอิ่มตัวทั้งหมดมาจัดอยู่ในกลุ่ม saturated fatty acid (SFA) ผลรวมของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่ 1 ตำแหน่งอยู่ในกลุ่ม monounsaturated fatty acid (MUFA) และผลรวมของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หลายตำแหน่งอยู่ในกลุ่ม polyunsaturated fatty acid (PUFA) จากนั้นกรดไขมันในตัวอย่างน้ำนมดิบทั้งหมด 35 ชนิดจะถูกนำมาประมวลผลตามขั้นตอนที่ 3.2.6 เพื่อเปรียบเทียบข้อมูลกรดไขมันของตัวอย่างน้ำนมดิบและศึกษาอิทธิพลของระบบการจัดฟาร์มโคนมระหว่างฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปและอิทธิพลของฤดูกาลในการเก็บตัวอย่าง

CHULALONGKORN UNIVERSITY

4.4.2 การเปรียบเทียบข้อมูลกรดไขมันของตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูกาลที่แตกต่างกัน (*n* = 60) จากการวิเคราะห์ด้วย GC-MS โดยเทคนิค Heat-map visualization และ hierarchical cluster analysis (HCA)

ข้อมูลที่ได้จากการประมวลผลด้วย GC-MS สามารถระบุชนิดของข้อมูลกรดไขมันในตัวอย่างน้ำนมดิบได้ทั้งหมด 32 สาร จากนั้นนำปริมาณสัมพัทธ์ของข้อมูลจาก peak ของแต่ละสารในโครมาโตแกรม มาแปลงข้อมูลให้อยู่ในรูปแบบที่ง่ายต่อการนำไปประมวลผล (normalize) เพื่อวิเคราะห์การจัดกลุ่มโดยอาศัยเทคนิค heat-map visualization และ hierarchical cluster analysis (HCA) โดยโปรแกรมสำเร็จรูป Metaboanalyst version 5.0 จากผลการวิเคราะห์ พบว่า สามารถแยกความแตกต่างของกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบจากอิทธิพลของระบบการจัดฟาร์มโคนม ออกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้ (i) น้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ (cluster A, C) และ (ii) น้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไป (cluster B) นอกจากนี้ ยังพบว่าในกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์สามารถแยกความแตกต่างระหว่างน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูฝน (cluster C) และช่วงฤดูแล้ง (cluster A) ได้อย่างชัดเจน ในขณะที่ กลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไปไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างฤดูกาลในการเก็บตัวอย่างได้ แสดงดังรูปที่ 4.18 เพื่อให้เห็นความแตกต่างระหว่างอิทธิพลของระบบการจัดฟาร์มโคนมและฤดูกาลที่แตกต่างกันต่อข้อมูลกรดไขมันจึงนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์จำแนกกลุ่มแบบ PLS-DA โดยใช้หลักการลดมิติของข้อมูลและสร้างตัวแบบความสัมพันธ์เชิงเส้นในเชิงพยากรณ์ระหว่างกลุ่มตัวแปร ทำให้สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างได้อย่างชัดเจนมากขึ้น (Johansson *et al.,* 2003, Hilario and Kalousis, 2008)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



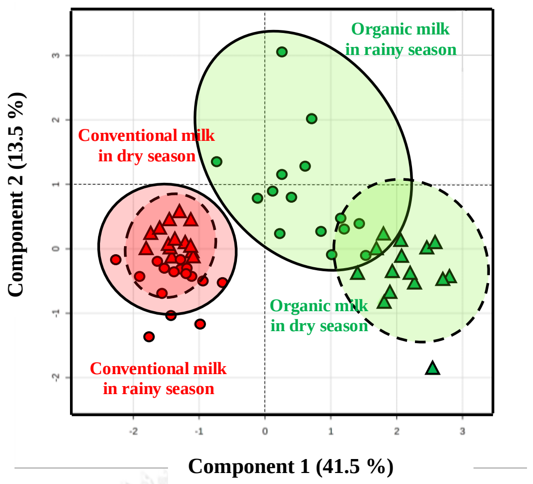
รูปที่ 4.18 การวิเคราะห์โดยการจัดกลุ่มด้วยเทคนิค heat-map visualization และ hierarchical cluster analysis (HCA) ของข้อมูลกรดไขมันที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย GC-MS ของตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปที่เก็บในฤดูกาลต่างกัน

หมายเหตุ : น้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ในช่วงฤดูฝน (●) น้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ในช่วงฤดูแล้ง (●) น้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูฝน (●) และน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูแล้ง (●)

4.4.3 การเปรียบเทียบข้อมูลกรดไขมันของตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปในในช่วงฤดูกาลที่แตกต่างกัน (*n* = 60) จากการวิเคราะห์ด้วย GC-MS โดยการวิเคราะห์จำแนกกลุ่มด้วยการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุด (Partial least square-discriminant analysis; PLS-DA)

ข้อมูลกรดไขมันของตัวอย่างน้ำนมดิบทั้งหมด (*n* = 60) ซึ่งถูกจัดแบ่งกลุ่มเป็น (i) น้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ในช่วงฤดูฝน (*n*=15) (ii) น้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ในช่วงฤดูแล้ง (*n*=15) (iii) น้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูฝน (*n*=15) และ (iv) น้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูแล้ง (*n*=15) จะถูกนำมาวิเคราะห์จำแนกกลุ่มด้วย PLS-DA ผลการวิเคราะห์พบว่า มีความแปรปรวนของตัวแปรรวมร้อยละ 55.0 โดย component 1 สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ร้อยละ 41.5 และ component 2 สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ ร้อยละ 13.5 (รูปที่ 4.19) ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบออกเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้ (i) น้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ในช่วงฤดูฝน (ii) น้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ในช่วงฤดูแล้ง (iii) น้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูฝน และ (iv) น้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูแล้ง โดยมีค่า accuracy ร้อยละ 75.00 , ค่า R^2 เท่ากับ 0.859 และ Q^2 เท่ากับ 0.821 นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาอิทธิพลของระบบการจัดการฟาร์มระหว่างฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปพบว่าสามารถแยกออกจากกันได้อย่างชัดเจนตามแนว Component 1 ในขณะที่อิทธิพลของฤดูกาลมีแนวโน้มแยกออกจากกันเฉพาะในกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ ในเบื้องต้น จึงสรุปได้ว่า อิทธิพลของระบบการจัดการฟาร์มโคนมส่งผลต่อข้อมูลกรดไขมันของตัวอย่างน้ำนมดิบมากกว่าอิทธิพลของฤดูกาลและอิทธิพลของฤดูกาลจะส่งผลต่อข้อมูลกรดไขมันของตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์เท่านั้น ซึ่งผลที่ได้มีความสอดคล้องกับผลจาก heat-map visualization และ HCA แสดงดังรูปที่ 4.18

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



รูปที่ 4.19 PLS-DA 2D score plot ของข้อมูลกรดไขมันที่ได้จากวิเคราะห์ด้วย GC-MS ของตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปที่เก็บในฤดูกาลต่างกัน

หมายเหตุ : น้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ในช่วงฤดูฝน (●) น้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ในช่วงฤดูแล้ง (▲) น้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูฝน (●) และน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูแล้ง (▲)

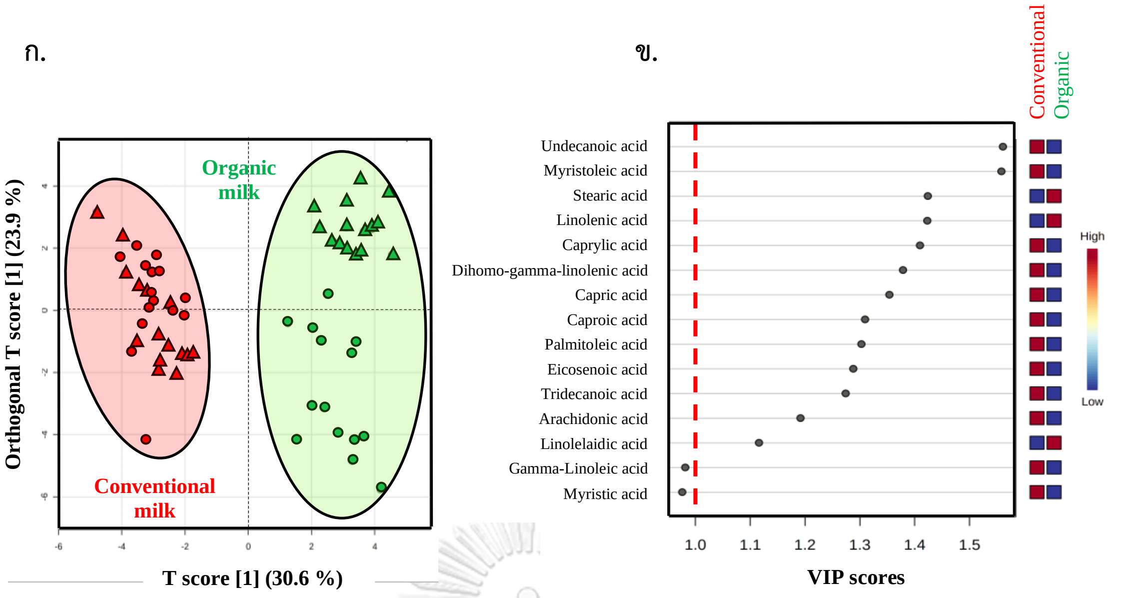
เพื่อแสดงให้เห็นอิทธิพลของระบบการจัดการฟาร์มโคนมและอิทธิพลของฤดูกาลที่แตกต่างกันต่อข้อมูลกรดไขมันได้อย่างชัดเจนมากขึ้น พร้อมทั้งสามารถระบุกรดไขมันที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างได้ ขั้นตอนต่อไปจึงทำการแยกเปรียบเทียบกลุ่มตัวอย่างของน้ำนมดิบตาม (i) อิทธิพลของระบบการจัดการฟาร์มโคนม (ขั้นตอนที่ 4.4.4) และ (ii) อิทธิพลของฤดูกาลที่แตกต่างกัน (ขั้นตอนที่ 4.4.5) และนำข้อมูลที่ได้มาจัดกลุ่มโดยการวิเคราะห์จำแนกกลุ่มแบบ OPLS-DA ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพมากกว่า PLS-DA เนื่องจากมีการประยุกต์ใช้เทคนิค PLS ร่วมกับเทคนิค Orthogonal signal correction (OSC) เพื่อลดความผันแปรที่ไม่สัมพันธ์กับกลุ่มตัวอย่างออก นอกจากนี้ยังมีการสร้างตัวแปรแฝงภายในกลุ่มตัวอย่างเพิ่มขึ้น ทำให้ปัจจัยมีความชัดเจนและง่ายต่อการตีความมากขึ้น (Bylesjö *et al.*, 2006, Worley and Powers, 2016)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.4.4 การเปรียบเทียบข้อมูลกรดไขมันของตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป (*n* = 60) เพื่อศึกษาอิทธิพลของระบบการจัดการฟาร์มที่แตกต่างกัน จากการวิเคราะห์ด้วย GC-MS โดยการวิเคราะห์จำแนกกลุ่มแบบโครงสร้างเชิงตั้งฉากด้วยการถดถอยวิธีกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (Orthogonal partial least squares discriminant analysis; OPLS-DA)

ขั้นตอนนี้จะนำข้อมูลกรดไขมันของตัวอย่างน้ำนมดิบ (*n*=60) ซึ่งถูกจัดแบ่งกลุ่มเป็น (i) น้ำนมดิบที่ได้ฟาร์มโคนมอินทรีย์ (*n*=30) และ (ii) น้ำนมดิบที่ได้ฟาร์มโคนมทั่วไป (*n*=30) มาวิเคราะห์โดยโปรแกรมสำเร็จรูป MetaboAnalyst v.5.0 เมื่อนำข้อมูลมาจัดกลุ่มโดยการวิเคราะห์ด้วย OPLS-DA (รูปที่ 4.20 ก.) พบว่า มีความแปรปรวนของตัวแปรรวมร้อยละ 54.5 โดย T score [1] สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ร้อยละ 30.6 และ Orthogonal component T score [1] สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ร้อยละ 23.9 ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบตามแนว T score [1] ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ (i) กลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ และ (ii) กลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไป โดยมีค่า R^2Y เท่ากับ 0.939 และ Q^2 เท่ากับ 0.917 และเมื่อพิจารณาค่าจาก VIP score ที่มากกว่า 1.0 จาก T score [1] (รูปที่ 4.20 ข.) พบว่าสามารถใช้ปริมาณสัมพัทธ์ของกรดไขมัน stearic acid, linolenic acid และ linolelaidic acid ที่มีปริมาณสัมพัทธ์สูงในกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ และปริมาณสัมพัทธ์ของกรดไขมัน undecanoic acid, myristoleic acid, caprylic acid, dihomo-gamma-linolenic acid, capric acid, caproic acid, palmitoleic acid, eicosenoic acid, tridecanoic acid และ arachidonic acid ที่มีปริมาณสัมพัทธ์สูงในกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไป เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อแยกความแตกต่างของน้ำนมดิบทั้ง 2 กลุ่มได้ และเพื่อให้ได้ข้อสรุปเกี่ยวกับอิทธิพลของระบบการจัดการฟาร์มโคนมต่อข้อมูลกรดไขมันในน้ำนมที่ชัดเจนยิ่งขึ้น จึงดำเนินการแยกวิเคราะห์กลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูกาลเดียวกันด้วย OPLS-DA ในขั้นตอนถัดไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



รูปที่ 4.20 OPLS-DA 2D score plot (ก.) และ VIP score (ข.) ของข้อมูลกรดไขมันจากการวิเคราะห์ด้วย GC-MS ของตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปที่เก็บในฤดูกาลต่างกัน

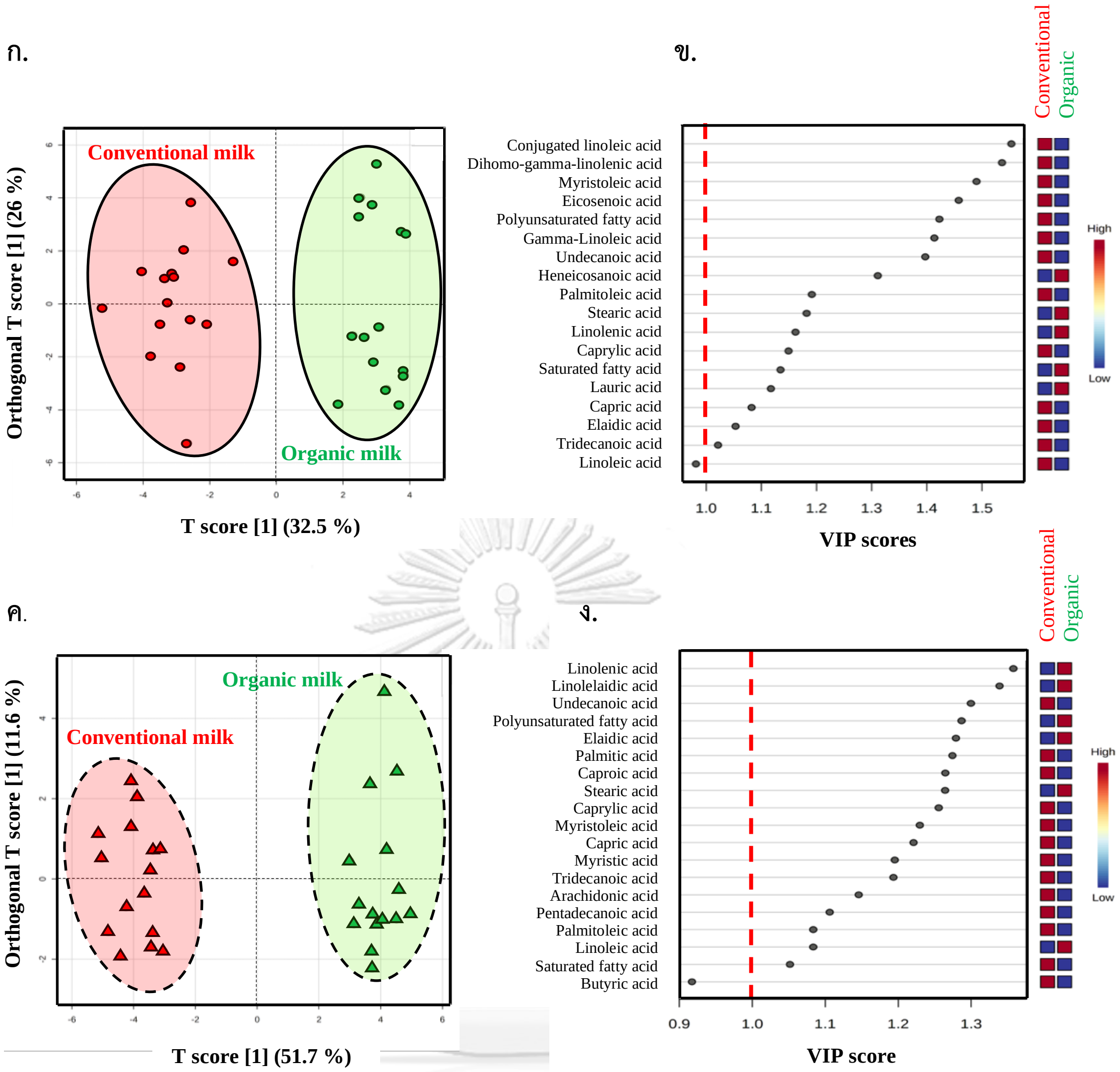
หมายเหตุ : น้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ในช่วงฤดูฝน (●) น้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ในช่วงฤดูแล้ง (▲) น้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูฝน (●) และน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูแล้ง (▲)

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปที่เก็บในช่วงฤดูฝน (กันยายน - ตุลาคม 2563) (*n*=30) (รูปที่ 4.21 ก.) พบว่า มีความแปรปรวนของตัวแปรรวมร้อยละ 48.5 โดย T score [1] สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ร้อยละ 32.5 และ Orthogonal component T score [1] สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ ร้อยละ 26.0 ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างได้ตามแนว T score [1] ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ (i) กลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ และ (ii) กลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไป โดยมีค่า R^2Y เท่ากับ 0.944 และ Q^2 เท่ากับ 0.929 และเมื่อพิจารณาค่าจาก VIP score ที่มากกว่า 1.0 จาก T score [1] (รูปที่ 4.21 ข.) พบว่าสามารถใช้ปริมาณสัมพัทธ์ของกรดไขมัน heneicosanoic acid, stearic acid, linolenic acid, saturated fatty acid และ lauric acid ที่มีปริมาณสัมพัทธ์สูงในกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ และปริมาณสัมพัทธ์ของกรดไขมัน conjugated linoleic acid, dihomo-gamma-linolenic acid,

myristoleic acid, eicosenoic acid, polyunsaturated fatty acid, gamma-linoleic acid, undecanoic acid, palmitoleic acid, caprylic acid, capric acid, elaidic acid และ tridecanoic acid ที่มีปริมาณสัมพัทธ์สูงในกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไป เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อแยกความแตกต่างของน้ำนมดิบทั้ง 2 กลุ่มในช่วงฤดูฝนได้

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปที่เก็บในช่วงฤดูแล้ง (มีนาคม - เมษายน 2564) (*n*=30) (รูปที่ 4.21 ค.) พบว่า มีความแปรปรวนของตัวแปรรวมร้อยละ 63.3 โดย T score [1] สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ร้อยละ 51.7 และ Orthogonal component T score [1] สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ ร้อยละ 11.6 ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างได้ตามแนว T score [1] ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ (i) กลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ และ (ii) กลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไป โดยมีค่า R^2Y เท่ากับ 0.977 และ Q^2 เท่ากับ 0.963 และเมื่อพิจารณาค่าจาก VIP score ที่มากกว่า 1.0 จาก T score [1] (รูปที่ 4.21 ง.) พบว่าสามารถใช้ปริมาณสัมพัทธ์ของกรดไขมัน linolenic acid, linolelaidic acid, polyunsaturated fatty acid, elaidic acid, stearic acid และ linoleic acid ที่มีปริมาณสัมพัทธ์สูงในกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ และปริมาณสัมพัทธ์ของกรดไขมัน undecanoic acid, palmitic acid, caproic acid, caprylic acid, myristoleic acid, capric acid, tridecanoic acid, myristic acid, arachidonic acid, pentadecanoic acid, palmitoleic acid และ saturated fatty acid ที่มีปริมาณสัมพัทธ์สูงในกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไป เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อแยกความแตกต่างของน้ำนมดิบทั้ง 2 กลุ่มในช่วงฤดูแล้งได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูปที่ 4.21 OPLS-DA 2D score plot (ก,ค) และ VIP score (ข,ง) ของข้อมูลกรดไขมันที่ได้จากวิเคราะห์ด้วย GC-MS ของตัวอย่างน้ำนมดิบ แบบแยกเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูฝน (ก,ข) และเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป ในช่วงฤดูแล้ง (ค,ง)

หมายเหตุ : น้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ (●) และฟาร์มโคนมทั่วไป (●) ที่เก็บในช่วงฤดูฝน และน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ (▲) และฟาร์มโคนมทั่วไป (▲) ที่เก็บในช่วงฤดูแล้ง

เมื่อพิจารณาความสำคัญของกรดไขมันที่เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ พบว่า ปริมาณสัมพัทธ์ที่สูงขึ้นของกรดไขมัน stearic acid และ linolenic acid (กรดไขมันโอเมก้า 3) สอดคล้องกับงานวิจัยของ มาริสา คงบุญเกิด, (2562), Anacker (2007) และ Bloksma *et al.* (2008) ที่รายงานว่า กรดไขมัน stearic acid และ linolenic acid ที่เพิ่มขึ้นในน้ำนมเป็นผลมาจากแม่โคในฟาร์มโคนมอินทรีย์ได้รับอาหารหยาบและหญ้าสดมากกว่าแม่โคในฟาร์มโคนมทั่วไป ซึ่งเยื่อใยจากอาหารหยาบจะส่งผลต่อองค์ประกอบของจุลินทรีย์ในกระเพาะของแม่โคที่ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์กรดไขมันในน้ำนม (มาริสา คงบุญเกิด, 2562, Anacker, 2007, Bloksma *et al.,* 2008) สอดคล้องกับตารางแสดงคุณค่าทางโภชนาการ (ตาราง 4.4) และแบบสอบถามจากฟาร์มโคนมอินทรีย์ของคณะผู้วิจัย (ภาคผนวก ค) ที่พบว่า ในฟาร์มโคนมอินทรีย์มีการเลี้ยงแบบปล่อยแปลงหญ้าสดให้แม่โคออกไปแทะเล็มทุ่งหญ้าตามธรรมชาติอย่างน้อย 120-150 วันต่อปี (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2561) และมีการให้หญ้าหมักและข้าวโพดเป็นอาหารหยาบสำหรับใช้เลี้ยงโคนมอินทรีย์ซึ่งแตกต่างจากฟาร์มโคนมทั่วไปที่ให้ข้าวโพดหมักและฟางข้าวเป็นอาหารหยาบสำหรับเลี้ยงโคนมเท่านั้น และเมื่อพิจารณาความสำคัญของกรดไขมันที่เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไป พบว่า ปริมาณสัมพัทธ์ที่สูงขึ้นของกรดไขมัน undecanoic acid, caprylic acid, capric acid และ tridecanoic acid สอดคล้องกับงานวิจัยของ มาริสา คงบุญเกิด, (2562), Ellis *et al.* (2007) และ Elgersma, (2015) ที่รายงานว่า เมื่อแม่โคได้รับอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตสูงจะส่งผลให้กระบวนการ de novo synthesis ที่สังเคราะห์กรดไขมันในต่อมน้ำนมสูงขึ้นเลยเป็นผลให้กรดไขมันอิ่มตัว (SFA) เช่น C4:0–C14:0 เพิ่มมากขึ้น (Elgersma, 2015, Kalač and Samková, 2010) ซึ่งสอดคล้องกับตารางแสดงคุณค่าทางโภชนาการ (ตารางที่ 4.4) ที่พบว่า ในฟาร์มโคนมทั่วไปจะเลี้ยงแม่โคด้วยอาหารข้นสำเร็จรูปและข้าวโพดหมักที่มีพลังงานจากคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ น้ำตาลและแป้งในปริมาณสูง (Yang *et al.,* 2019) สำหรับปริมาณสัมพัทธ์ที่เพิ่มขึ้นของกรดไขมัน myristoleic acid ในน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไปสอดคล้องกับงานวิจัยของ มาริสา คงบุญเกิด, (2562), Collomb *et al.* (2008) และ O'Donnell *et al.* (2010) โดยงานวิจัยของ Kraiprom *et al.* (2013) รายงานว่า การ

ให้ฟางข้าวและวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรเป็นแหล่งอาหารหยาบสำหรับแม่โคจะส่งผลให้ปริมาณ myristoleic acid ในน้ำนมเพิ่มขึ้น (Kraiprom *et al*., 2013) ซึ่งสอดคล้องกับตารางแสดงคุณค่าทางโภชนาการ (ตาราง 4.4) และแบบสอบถามของคณะผู้วิจัย (ภาคผนวก ค.) ที่พบว่า ในฟาร์มโคนมทั่วไปเกษตรกรจะเลี้ยงแม่โคด้วยฟางข้าวเป็นอาหารหยาบหลัก เนื่องจากราคาถูกและหาได้ง่ายในทุกช่วงฤดูกาล ส่วนปริมาณสัมพัทธ์ที่สูงขึ้นของกรดไขมัน palmitoleic acid ในน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไปพบว่าสัมพันธ์กับปริมาณอาหารข้นที่เพิ่มขึ้นในอาหารสัตว์ (Marin *et al*., 2017) ซึ่งสอดคล้องกับตารางแสดงคุณค่าทางโภชนาการ (ตาราง 4.4) และแบบสอบถามของคณะผู้วิจัย (ภาคผนวก ค.) ที่พบว่า ในฟาร์มโคนมทั่วไปเกษตรกรจะให้อาหารข้นสำเร็จรูปที่ใช้เป็นแหล่งโปรตีนของอาหารสัตว์ในปริมาณมากกว่าฟาร์มโคนมอินทรีย์ (Hanuš *et al.,* 2008, Bilik and Lopuszanska-Rusek, 2010, Müller and Sauerwein, 2010)

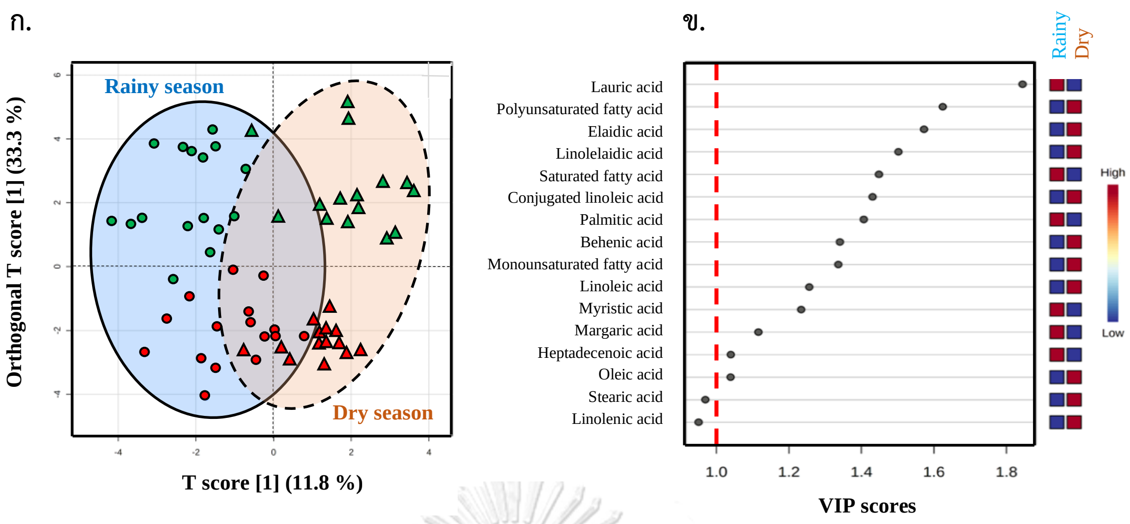
4.4.5 การเปรียบเทียบข้อมูลกรดไขมันของตัวอย่างน้ำนมดิบ (*n* = 60) เพื่อศึกษาอิทธิพลของฤดูกาลในการเก็บตัวอย่างที่แตกต่างกัน ระหว่างฤดูฝน (กันยายน - ตุลาคม 2563) และฤดูแล้ง (มีนาคม - เมษายน 2564) จากการวิเคราะห์ด้วย GC-MS โดยการวิเคราะห์จำแนกกลุ่มแบบโครงสร้างเชิงตั้งฉากด้วยการถดถอยวิธีกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (Orthogonal partial least squares discriminant analysis; OPLS-DA)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ขั้นตอนนี้จะนำข้อมูลกรดไขมันของตัวอย่างน้ำนมดิบ (*n*=60) ซึ่งถูกจัดแบ่งกลุ่มเป็น (i) น้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูฝน (*n*=30) และ (ii) น้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูแล้ง (*n*=30) มาวิเคราะห์โดยโปรแกรมสำเร็จรูป MetaboAnalyst v.5.0 เมื่อนำข้อมูลมาจัดกลุ่มโดยการวิเคราะห์ด้วย OPLS-DA (รูปที่ 4.22 ก.) พบว่า มีความแปรปรวนของตัวแปรรวมร้อยละ 45.1 ซึ่ง T score [1] สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ร้อยละ 11.8 และ Orthogonal component T score [1] สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ ร้อยละ 33.3 ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบตามแนว T score [1] ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ (i) กลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูฝน และ (ii) กลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูแล้ง โดยมีค่า R^2Y เท่ากับ

0.673 และ Q^2 เท่ากับ 0.428 และเมื่อพิจารณาค่าจาก VIP score ที่มากกว่า 1.0 จาก T score [1] (รูปที่ 4.22 ข.) พบว่าสามารถใช้ปริมาณสัมพัทธ์ของกรดไขมัน lauric acid, saturated fatty acid, palmitic acid, myristic acid, margaric acid และ heptadecenoic acid ที่มีปริมาณสัมพัทธ์สูงในกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูฝน และปริมาณสัมพัทธ์ของกรดไขมัน polyunsaturated fatty acid, elaidic acid, linolelaidic acid, conjugated linoleic acid, behenic acid, monounsaturated fatty acid, linoleic acid และ oleic acid ที่มีปริมาณสัมพัทธ์สูงในกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูแล้ง เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อแยกความแตกต่างของน้ำนมดิบที่เก็บในทั้ง 2 ฤดูกาลได้ อย่างไรก็ตาม ผลจากการวิเคราะห์และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างด้วย HCA (หัวข้อที่ 4.4.2) และ PLS-DA (หัวข้อที่ 4.4.3) พบว่า อิทธิพลของฤดูกาลสามารถแยกความแตกต่างของกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ที่เก็บในช่วงฤดูฝนและฤดูแล้งได้อย่างชัดเจน และเพื่อให้ได้ข้อสรุปเกี่ยวกับอิทธิพลของฤดูกาลต่อข้อมูลกรดไขมันในน้ำนมที่ชัดเจนยิ่งขึ้น พร้อมทั้งระบุตัวบ่งชี้ทางชีวภาพระหว่างกลุ่มตัวอย่างได้จึงดำเนินการวิเคราะห์เฉพาะกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ด้วย OPLS-DA ในขั้นตอนถัดไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



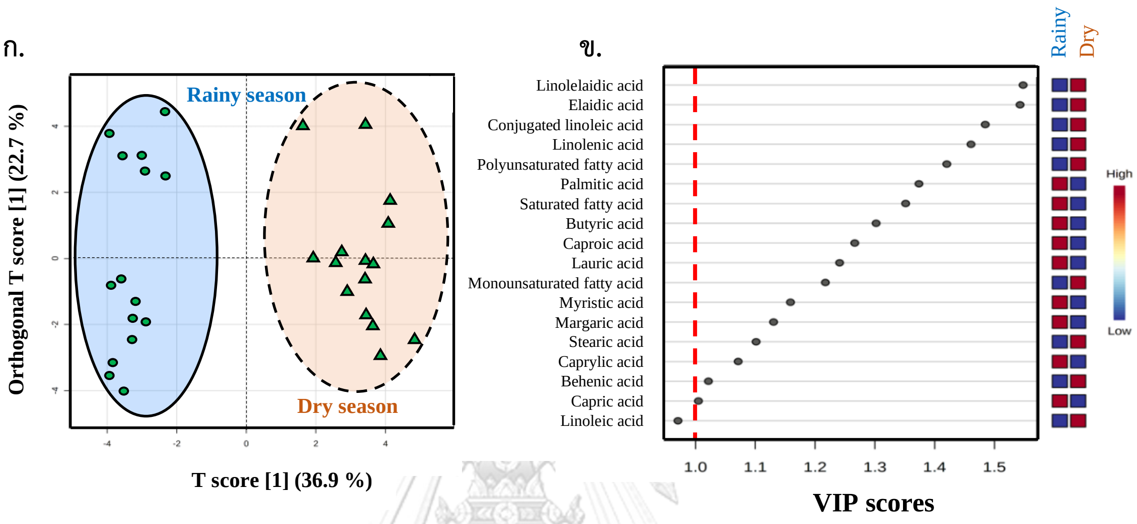
รูปที่ 4.22 OPLS-DA 2D score plot (ก.) และ VIP score (ข.) ของข้อมูลกรดไขมันจากการวิเคราะห์ด้วย GC-MS ของตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูฝนและฤดูแล้งจากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป

หมายเหตุ : น้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ในช่วงฤดูฝน (●) น้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูฝน (●) น้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ในช่วงฤดูแล้ง (▲) และน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูแล้ง (▲)

เมื่อเปรียบเทียบกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ (*n* = 30) ระหว่างน้ำนมที่เก็บในช่วงฤดูฝน (กันยายน - ตุลาคม 2563) และช่วงฤดูแล้ง (มีนาคม - เมษายน 2564) (รูปที่ 4.23 ก.) พบว่ามีความแปรปรวนของตัวแปรรวมร้อยละ 59.6 โดย T score [1] สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ร้อยละ 36.9 และ Orthogonal component T score [1] สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ ร้อยละ 22.7 ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างได้ตามแนว T score [1] ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ (i) กลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูฝน และ (ii) กลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูแล้ง โดยมีค่า R^2Y เท่ากับ 0.960 และ Q^2 เท่ากับ 0.947 เมื่อพิจารณาค่าจาก VIP score ที่มากกว่า 1.0 จาก T score [1] (รูปที่ 4.23 ข.) พบว่า สามารถใช้ปริมาณสัมพัทธ์ของกรดไขมัน palmitic acid, saturated fatty acid, butyric acid, caproic acid, lauric acid, myristic acid, margaric acid, caprylic acid และ capric acid ที่มีปริมาณสัมพัทธ์สูงในกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ในช่วงฤดูฝน และปริมาณสัมพัทธ์ของกรด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ไขมัน linolelaidic acid, elaidic acid, conjugated linoleic acid, linolenic acid, polyunsaturated fatty acid, monounsaturated fatty acid, stearic acid และ behenic acid ที่มีปริมาณสัมพัทธ์สูงในกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ในช่วงฤดูแล้ง เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อแยกความแตกต่างของน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์จากทั้ง 2 ฤดูกาลได้



รูปที่ 4.23 OPLS-DA 2D score plot (ก) และ VIP score (ข) ของข้อมูลกรดไขมันจากการวิเคราะห์ด้วย GC-MS ของตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ที่เก็บในช่วงฤดูฝนและฤดูแล้ง

หมายเหตุ : น้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ ในช่วงฤดูฝน (●) และช่วงฤดูแล้ง (▲)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

เมื่อพิจารณาความสำคัญของกรดไขมันที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูแล้ง พบว่า ปริมาณสัมพัทธ์ของกรดไขมันในกลุ่ม monounsaturated fatty acid (MUFA), polyunsaturated fatty acid (PUFA) และกรดไขมัน conjugated linoleic acid (CLA) เพิ่มสูงขึ้น โดยเฉพาะในกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ozcan *et al.* (2015), Marin *et al.* (2017) และ Salamon *et al.* (2006) ที่รายงานว่า ปริมาณสัมพัทธ์ที่เพิ่มขึ้นของกรดไขมันข้างต้นสัมพันธ์กับการเลี้ยงแม่โคแบบปล่อยแปลงหญ้าสดตามธรรมชาติ (pasture grazing farming) เนื่องจากการเลี้ยงแบบปล่อยแปลงหญ้าสดจะทำให้แม่โคได้รับกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเพิ่มขึ้นซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นใน

กระบวนการ biohydrogenation ของกรดไขมันในกระเพาะรูเมน โดยกระบวนดังกล่าวมีต่อการสังเคราะห์กรดไขมัน MUFA, PUFA และ CLA ในน้ำนม (Marin *et al.,* 2017, Ozcan *et al.,* 2015) ซึ่งสอดคล้องกับแบบสอบถามของคณะผู้วิจัย (ภาคผนวก ค.) ที่พบว่า ในช่วงฤดูแล้งแม่โคในฟาร์มโคนมอินทรีย์จะถูกเลี้ยงแบบปล่อยแปลงหญ้าสดเป็นเวลาหลายวันมากกว่าในช่วงฤดูฝน เนื่องจากช่วงฤดูฝนพื้นที่โดยรอบมีลักษณะชื้นแฉะทำให้แม่โคมีโอกาสเกิดอันตรายในขณะปล่อยแปลงและติดโรคจากเห็บที่อยู่ตามทุ่งหญ้าได้ง่าย ดังนั้นเกษตรกรจึงไม่นิยมเลี้ยงแม่โคแบบปล่อยแปลงในฤดูกาลดังกล่าว สำหรับผลด้านคุณค่าทางโภชนาการของน้ำนม พบว่ากรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หลายตำแหน่ง (PUFA) ได้แก่ linolenic acid (กรดไขมันโอเมก้า 3) และ CLA มีประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภค (มาริสา คงบุญเกิด, 2562, Nagpal *et al.,* 2007, van Valenberg *et al*., 2013) โดยกรดไขมันโอเมก้า 3 สามารถช่วยลดระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือดและป้องกันการเกิดโรคหัวใจขาดเลือดฉับพลันและ CLA ช่วยป้องกันการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจและลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งได้ (Bhattacharya *et al*., 2006) นอกจากนี้ งานวิจัยของ Capuano *et al.* (2014) และ O’Callaghan *et al.* (2016) ยังพบว่าการเลี้ยงแม่โคแบบปล่อยแปลงหญ้าสดยังส่งผลต่อปริมาณสัมพันธ์ของกรดไขมัน elaidic acid และ linolelaidic acid ที่เพิ่มขึ้นในช่วงฤดูแล้งเช่นกัน (Capuano *et al.,* 2014, O’Callaghan *et al.,* 2016) ส่วนปริมาณสัมพัทธ์ที่เพิ่มขึ้นในช่วงฤดูแล้งของกรดไขมัน behenic acid งานวิจัยของ O’Callaghan *et al.* (2016) พบว่า ความผันแปรของปริมาณ behenic acid ในน้ำนมมีสาเหตุมาจากความแตกต่างของวัตถุดิบที่ใช้เลี้ยงอาหารสัตว์ โดยแม่โคที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสำเร็จรูป TMR ที่ประกอบด้วยข้าวโพดและธัญพืชจะมีปริมาณกรดไขมัน behenic acid ในน้ำนมสูงกว่าแม่โคที่เลี้ยงด้วยวัตถุดิบอื่น (O’Callaghan *et al.,* 2016) ซึ่งสอดคล้องกับตารางแสดงคุณค่าทางโภชนาการ (ตาราง 4.4) ที่พบว่า ในช่วงฤดูแล้งวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่ใช้เลี้ยงแม่โคจะประกอบไปด้วยข้าวโพดและถั่วเหลืองบดซึ่งแตกต่างกับช่วงฤดูฝนที่เลี้ยงแม่โคด้วยเศษขาเห็ดเข็มทองและมันสำปะหลัง สำหรับกรดไขมันที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูฝน พบว่าปริมาณสัมพัทธ์ของกรดไขมันในกลุ่ม saturated fatty acid (SFA) จะมีค่าสูงขึ้น เช่น กรดไขมัน lauric acid และ myristic acid งานวิจัยของ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

Randolph and Erwin, (1973) รายงานว่า ปริมาณโซมาติกเซลล์ที่สูงขึ้นในน้ำนมดิบจะส่งผลให้กรดไขมันอิ่มตัวสายสั้น เช่น lauric acid และ myristic acid ในน้ำนมเพิ่มขึ้นโดยเป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์ไลเพสในต่อมน้ำนม (lipase activity) (Randolph and Erwin,1973) ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณโซมาติกเซลล์ในตัวอย่างน้ำนมดิบ (ตาราง 4.5) ที่พบว่า ในช่วงฤดูฝนจะปริมาณโซมาติกเซลล์สูง เนื่องจากโรงเรือนและพื้นที่โดยรอบมีลักษณะชื้นแฉะมากกว่าในฤดูกาลอื่นทำให้เกิดโอกาสปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรียเพิ่มมากขึ้น (Yeamkong *et al.,* 2010) ส่วนกรดไขมัน palmitic acid ที่เพิ่มขึ้นในช่วงฤดูฝน งานวิจัยของ Loften *et al.* (2014) รายงานว่า palmitic acid เป็นกรดไขมันที่ใช้เป็นส่วนผสมเสริมในอาหารสัตว์เพื่อเป็นแหล่งพลังงานสำหรับแม่โคที่กำลังให้นม (Loften *et al.,* 2014) และมีรายงานว่า palmitic acid เป็นกรดไขมันหลักที่พบในพืชจำพวกมันสำปะหลัง (EZEALA, 1985) ซึ่งสอดคล้องกับตารางแสดงคุณค่าทางโภชนาการ (ตาราง 4.4) ที่พบว่า ในช่วงฤดูฝนจะมีมันสำปะหลังเป็นส่วนประกอบในอาหารสัตว์เลยอาจเป็นผลให้ปริมาณกรดไขมัน palmitic acid เพิ่มขึ้นในน้ำนมได้ และกรดไขมัน margaric acid ที่เพิ่มขึ้นในช่วงฤดูฝน งานวิจัยของ Gomez-Cortes *et al*. (2019) รายงานว่า กรดไขมัน margaric acid ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากกรดไขมัน propionic acid ที่ได้จากกระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรตในกระเพาะรูเมนของแม่โค (Gomez-Cortes *et al*., 2019) ซึ่งสอดคล้องกับตารางแสดงคุณค่าทางโภชนาการ (ตาราง 4.4) ที่พบว่า ในช่วงฤดูฝนอาหารสำเร็จรูป TMR มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงกว่าในช่วงฤดูแล้งเลยส่งผลให้กระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน propionic acid และ margaric acid ในน้ำนมเพิ่มขึ้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

อย่างไรก็ตาม งานวิจัยก่อนหน้าของ มาริสา คงบุญเกิด, (2562) พบว่า อิทธิพลของระบบการจัดการฟาร์มโคนมที่แตกต่างกันจะส่งผลต่อกรดไขมัน stearic acid, linolenic acid, undecanoic acid, myristoleic acid, caprylic acid, capric acid และ tridecanoic acid ที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพระหว่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปที่เก็บในช่วงฤดูแล้งได้ ซึ่งงานวิจัยในครั้งนี้ให้ผลยืนยันเพิ่มเติมว่ากรดไขมันดังกล่าวจะมีปริมาณสัมพัทธ์เพิ่มขึ้นทั้งในช่วงฤดูฝนและฤดูแล้ง นอกจากนี้ปริมาณสัมพันธ์ของกรดไขมัน palmitoleic acid ที่พบเพิ่มเติมในงานวิจัยนี้ยังสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทาง

ชีวภาพเพื่อระบุอัตลักษณ์ทางชีวโมเลกุลระหว่างน้ำนมโคอินทรีย์และน้ำนมโคนมทั่วไปได้เช่นกัน และอิทธิพลของฤดูกาลยังส่งผลต่อความผันแปรของกรดไขมัน lauric acid, myristic acid, palmitic acid, margaric acid, saturated fatty acid (SFA), monounsaturated fatty acid (MUFA), polyunsaturated fatty acid (PUFA), elaidic acid, linolelaidic acid, conjugated linoleic acid (CLA) และ behenic acid ในตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูฝนและฤดูแล้ง ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย GC-MS แสดงให้เห็นว่าข้อมูลกรดไขมันที่ได้มีความสัมพันธ์กับความแตกต่างของชนิดอาหารสัตว์ ความเครียดเนื่องจากความร้อนและสุขภาวะของแม่โค ซึ่งปัจจัยเหล่านี้เกี่ยวข้องกับอิทธิพลของระบบการจัดการฟาร์มโคนมและอิทธิพลของฤดูกาลที่แตกต่างกัน ในขั้นตอนถัดไปจะนำข้อมูลกรดไขมันของตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปในแต่ละช่วงฤดูกาลมาวิเคราะห์หาวิถีเมตาบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับความผันแปรของข้อมูลกรดไขมันจากอิทธิพลของการจัดการฟาร์มแบบเกษตรอินทรีย์และปัจจัยจากฤดูกาลที่เก็บตัวอย่างด้วย MetaboAnalyst pathway analysis และวิเคราะห์ระบุตำแหน่งกรดไขมันที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่ออิทธิพลของการจัดการฟาร์มแบบเกษตรอินทรีย์และปัจจัยจากฤดูกาลที่เก็บตัวอย่างด้วย KEGG's pathway analysis

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.4.6 การวิเคราะห์หาวิถีเมตาบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับความผันแปรของข้อมูลกรดไขมันจากอิทธิพลของการจัดการฟาร์มแบบเกษตรอินทรีย์และปัจจัยจากฤดูกาลที่เก็บตัวอย่างด้วย MetaboAnalyst pathway analysis

4.4.6.1 การวิเคราะห์หาวิถีเมตาบอลิซึมที่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนทั่วไป (*n*=60)

จากข้อมูลกรดไขมันของตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป (*n*=60) เมื่อนำมาวิเคราะห์หากรดไขมันที่แตกต่างกันจากวิถีเมตาบอลิซึมของกรดไขมันนั้นด้วย MetaboAnalyst pathway analysis พบว่า มีวิถีเมตาบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับกรดไขมันที่แตกต่างกัน

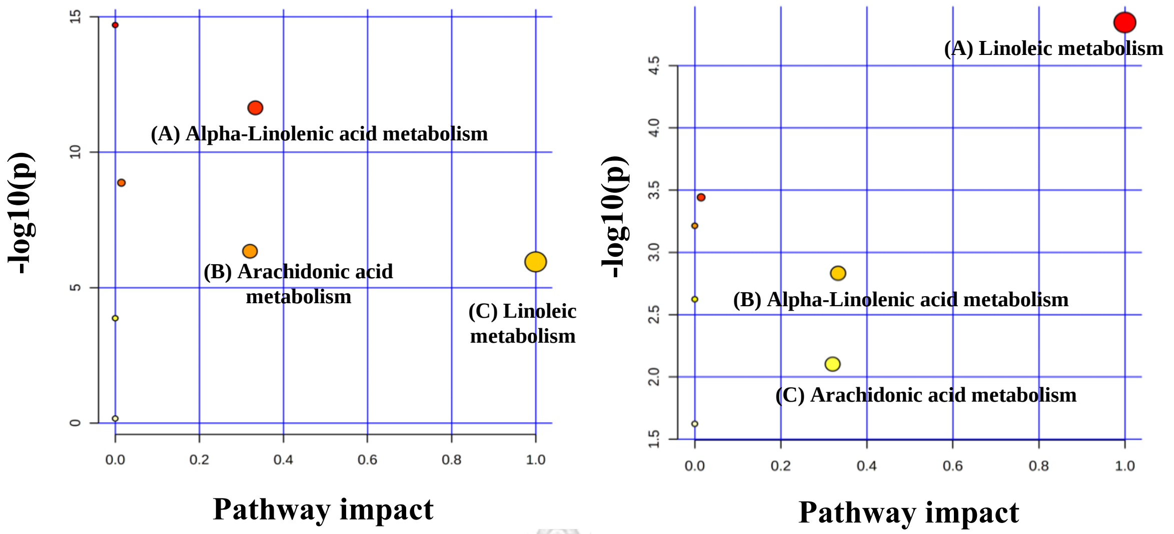
ระหว่างตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปที่ $p<0.05$ และ pathway impact > 0.1 ได้แก่ (A) alpha-linolenic acid metabolism (B) arachidonic acid metabolism และ (C) linoleic metabolism ดังแสดงในรูปที่ 4.24 ก. โดย alpha-linolenic acid metabolism มี linolenic acid เป็นกรดไขมันในวิถีเมตาบอลิซึม, arachidonic acid metabolism มี arachidonic acid เป็นกรดไขมันตั้งต้นในวิถีเมตาบอลิซึม และ linoleic metabolism มี linoleic เป็นกรดไขมันตั้งต้นในวิถีเมตาบอลิซึมนี้

4.4.6.2 การวิเคราะห์หาวิถีเมตาบอลิซึมที่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูฝนและฤดูแล้ง (*n*=60)

จากข้อมูลกรดไขมันของตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูฝนและฤดูแล้ง (*n*=60) เมื่อนำมาวิเคราะห์หากรดไขมันที่แตกต่างกันจากวิถีเมตาบอลิซึมของกรดไขมันนั้นด้วย MetaboAnalyst pathway analysis พบว่า มีวิถีเมตาบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับกรดไขมันที่แตกต่างกันระหว่างตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูฝนและฤดูแล้งที่ $p<0.05$ และ pathway impact > 0.1 ได้แก่ (A) linoleic metabolism (B) alpha-linolenic acid metabolism และ (C) arachidonic acid metabolism ดังแสดงในรูปที่ 4.24 ข. โดย linoleic metabolism มี linoleic เป็นกรดไขมันตั้งต้นในวิถีเมตาบอลิซึมนี้, alpha-linolenic acid metabolism มี linolenic acid เป็นกรดไขมันตั้งต้นในวิถีเมตาบอลิซึมนี้ และ arachidonic acid metabolism มี arachidonic acid เป็นกรดไขมันในวิถีเมตาบอลิซึมนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ก. ข.



รูปที่ 4.24 การวิเคราะห์วิถีเมตาบอลิซึม (pathway analysis) ของกรดไขมันที่แตกต่างกันระหว่างตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป (ก.) และตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูฝนและฤดูแล้ง (ข.)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

เมื่อพิจารณาวิถีเมตาบอลิซึมของ alpha-linolenic acid metabolism มี linolenic acid เป็นกรดไขมันในวิถีเมตาบอลิซึมนี้ ซึ่งปริมาณกรดไขมัน linolenic acid ที่เพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับปริมาณอาหารหยาบและหญ้าสดที่แม่โคได้รับในระบบการจัดฟาร์มโคนมที่แตกต่างกัน (Bloksma *et al.,* 2008, Elgersma, 2015) ซึ่งสอดคล้องกับค่า VIP score ในหัวข้อ 4.4.4 ที่พบว่ากรดไขมัน linolenic acid เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ เนื่องจากแม่โคอินทรีย์มีการให้หญ้าสดหญ้าหมักและข้าวโพดเป็นอาหารหยาบมากกว่าแม่โคในฟาร์มโคนมทั่วไปที่ให้ข้าวโพดหมักและฟางข้าวเท่านั้น ส่วน linoleic metabolism มี linoleic acid เป็นกรดไขมันตั้งต้นในวิถีเมตาบอลิซึมสัมพันธ์กับความเครียดเนื่องมาจากความร้อน (heat stress) โดยอุณหภูมิที่แตกต่างกันในแต่ละฤดูกาลถือเป็นสาเหตุของการเกิดความเครียดในตัวแม่โค (Fan *et al.,* 2018) และวิถีเมตาบอลิซึมของ arachidonic acid

metabolism มี arachidonic acid เป็นกรดไขมันในวิถีเมตาบอลิซึมนี้ งานวิจัยของ van Valenberg *et al.* (2013) รายงานว่า กรดไขมัน linoleic acid ที่พบในอาหารสัตว์เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดไขมัน arachidonic acid (van Valenberg *et al.,* 2013) ซึ่งสอดคล้องกับตารางแสดงคุณค่าทางโภชนาการ (ตารางท 4.4) ที่พบว่า ฟาร์มโคนมอินทรีย์จะเลี้ยงแม่โคด้วยกากถั่วเหลืองและเศษขาเห็ดเข็มทองซึ่งเป็นแหล่งอุดมไปด้วยกรดไขมัน linoleic acid เลยอาจเป็นผลให้เกิดการสังเคราะห์กรดไขมัน arachidonic acid ในน้ำนมเพิ่มมากขึ้น

4.4.7 การวิเคราะห์ระบุตำแหน่งกรดไขมันที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่ออิทธิพลของการจัดการฟาร์มแบบเกษตรอินทรีย์และปัจจัยจากฤดูกาลที่เก็บตัวอย่างด้วย KEGG’s pathway analysis

4.4.7.1 การวิเคราะห์ระบุตำแหน่งกรดไขมันที่เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อแยกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป (*n*=60)

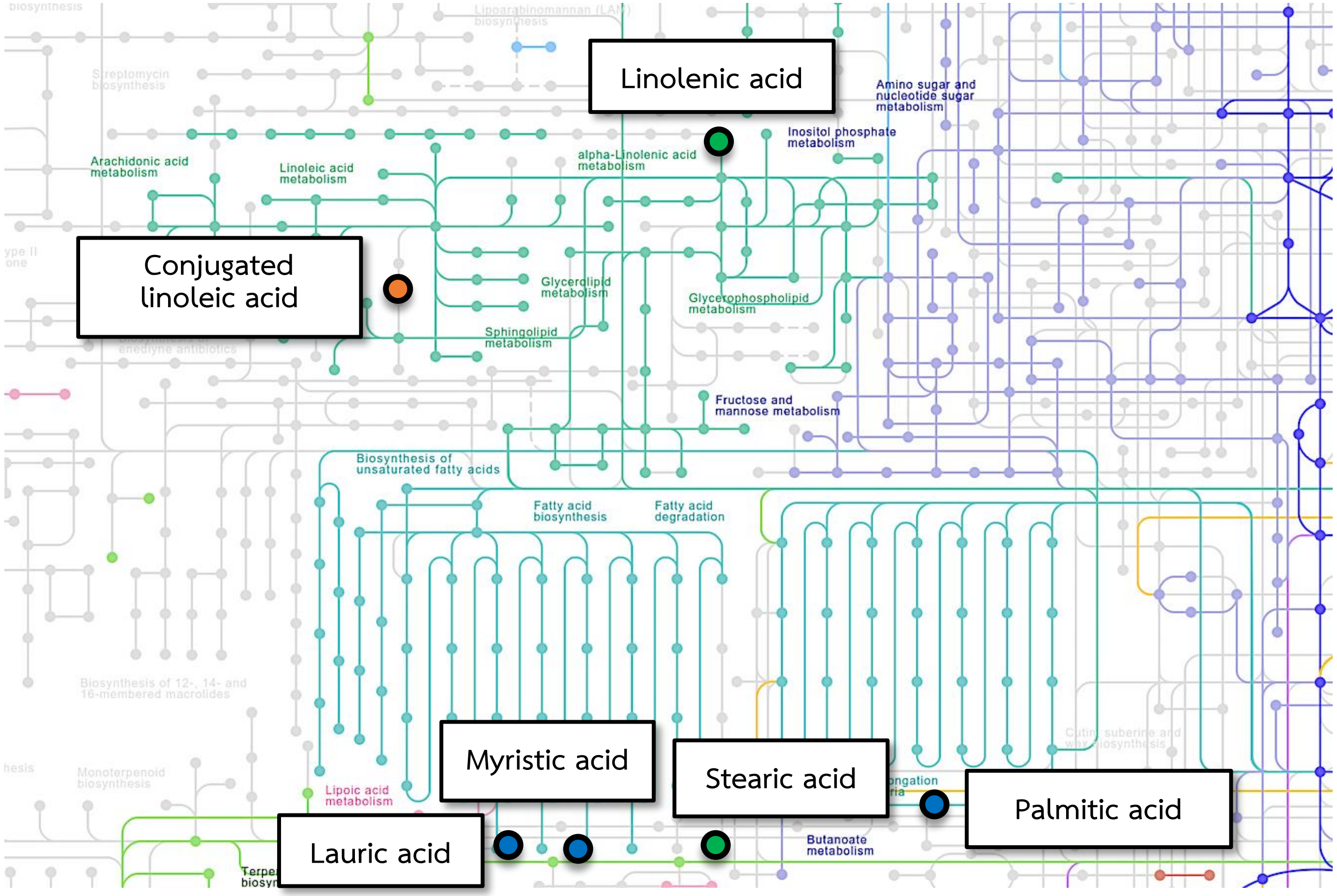
เมื่อพิจารณาข้อมูลกรดไขมันของกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป จากค่าของ VIP score ที่มากกว่า 1.0 ที่ได้จากการวิเคราะห์ OPLS-DA พบว่า สามารถใช้ค่าการเปลี่ยนแปลงปริมาณสัมพัทธ์ของ stearic acid และ linolenic acid เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อแยกความแตกต่างของกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ได้ โดยเมื่อนำข้อมูลกรดไขมันที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพดังกล่าวมาวิเคราะห์ตำแหน่งในวิถีเมตาบอลิซึมจากข้อมูล complete genome sequencing ของโคนม (*Bos taurus*) ด้วย KEGG’s pathway analysis (https://www.metaboanalyst.ca) สามารถพบวิถีเมตาบอลิซึม ดังนี้ stearic acid ในวิถีสังเคราะห์ fatty acid biosynthesis และ linolenic acid ในวิถีเมตาบอลิซึมของ alpha-linolenic acid metabolism ดังแสดงในรูปที่ 4.25

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.4.7.2 การวิเคราะห์ระบุตำแหน่งกรดไขมันที่เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อแยกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูฝนและฤดูแล้ง (*n*=60)

เมื่อพิจารณาข้อมูลกรดไขมันของกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูฝนและฤดูแล้ง จากค่าของ VIP score ที่มากกว่า 1.0 ที่ได้จากการวิเคราะห์ OPLS-DA พบว่า สามารถใช้ค่าการเปลี่ยนแปลงปริมาณสัมพัทธ์ของ elaidic acid, linolelaidic acid, conjugated linoleic acid และ behenic acid เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูแล้งและสามารถใช้ค่าการเปลี่ยนแปลงปริมาณสัมพัทธ์ของ lauric acid, palmitic acid, myristic acid และ margaric acid เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูฝนได้ โดยเมื่อนำข้อมูลกรดไขมันที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพดังกล่าวมาวิเคราะห์ตำแหน่งในวิถีเมตาบอลิซึมจากข้อมูล complete genome sequencing ของโคนม (*Bos taurus*) ด้วย KEGG's pathway analysis (https://www.metaboanalyst.ca) สามารถพบวิถีเมตาบอลิซึม ดังนี้ lauric acid, palmitic acid และ myristic acid ในวิถีสังเคราะห์ fatty acid biosynthesis, conjugated linoleic acid ในวิถีเมตาบอลิซึมของ linoleic acid metabolism ดังแสดงในรูปที่ 4.25 ซึ่งจะเห็นได้ว่าวิถีเมตาบอลิซึมของ alpha-linolenic acid metabolism ที่พบใน KEGG's pathway ข้างต้นสอดคล้องวิถีเมตาบอลิซึมของกรดไขมันที่แสดงใน pathway analysis หัวข้อที่ 4.4.6

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



รูปที่ 4.25 KEGG's pathway analysis

ดัดแปลงจาก : https://www.genome.jp/kegg/

หมายเหตุ: ● หมายถึง กรดไขมันที่พบมากในน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์
● หมายถึง กรดไขมันที่พบมากในน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูฝน
● หมายถึง กรดไขมันที่พบมากในน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูแล้ง

จากการศึกษาในงานวิจัยนี้ พบว่าสามารถวิเคราะห์และเปรียบเทียบข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากและข้อมูลกรดไขมันของน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปในเขตพื้นที่อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี ระหว่างช่วงฤดูฝน (เดือนกันยายน-ตุลาคม 2563) และฤดูแล้ง (เดือนมีนาคม-เมษายน 2564) ด้วยเทคโนโลยีเมตาโบโลมิกส์ร่วมกับการเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติพหุตัวแปรได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยการวิเคราะห์ข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากในน้ำนมดิบด้วยเทคนิค ^{1}H-NMR แสดงให้เห็นว่าอิทธิพลของฤดูกาลในการเก็บตัวอย่างส่งผลต่อความแตกต่างของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ได้ชัดเจนกว่าอิทธิพลของระบบการจัดการฟาร์มโคนมที่แตกต่างกัน ซึ่งแตกต่างจากผลการวิเคราะห์ข้อมูลกรดไขมันในน้ำนมดิบด้วยเทคนิค GC-MS ที่พบว่าอิทธิพลของระบบการจัดการฟาร์มโคนมระหว่างฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปส่งผลต่อความแตกต่างของข้อมูลกรดไขมันได้ชัดเจนกว่าอิทธิพลของฤดูกาลในการเก็บตัวอย่าง อีกทั้งความผันแปรของฤดูกาลจะส่งผล อย่างชัดเจนต่อข้อมูลกรดไขมันของน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ จากข้อมูลดังกล่าวทำให้ได้มาซึ่งชนิดของสารเมตาบอไลต์และกรดไขมันที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อระบุอัตลักษณ์ทางชีวโมเลกุลของน้ำนม โดยความผันแปรของปริมาณสารเมตาบอไลต์และกรดไขมันดังกล่าวเป็นผลมาจากชนิดของอาหารสัตว์และสุขภาวะของแม่โคที่แตกต่างกันจากอิทธิพลของระบบการจัดการฟาร์มและความผันแปรของฤดูกาล นอกจากนี้ ยังพบว่าน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์จะมีกรดไขมันที่มีความสำคัญทางโภชนาการและเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภคโดยเฉพาะกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หลายตำแหน่ง (PUFA) ได้แก่ กรดไขมัน linolenic acid และกรดไขมัน conjugated linoleic acid (CLA) ที่เพิ่มขึ้นในช่วงฤดูแล้ง ซึ่งเป็นผลมาจากการเลี้ยงแบบปล่อยแปลงหญ้าสดของระบบการจัดการฟาร์มโคนมอินทรีย์ที่ส่งผลให้แม่โคได้รับอาหารหยาบที่มีคุณภาพและปริมาณมากกว่าฟาร์มโคนมทั่วไป โดยข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยในครั้งนี้สามารถนำไปใช้เป็นองค์ความรู้ในการวิจัยและพัฒนาสร้างแบบจำลองเชิงทำนาย (predictive modeling) สำหรับพัฒนาเป็นวิธีทดสอบเพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพและระบุอัตลักษณ์ (traceability and authentication) ของน้ำนมและผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์ต่อไปได้ในอนาคต

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์และเปรียบเทียบข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากและข้อมูลกรดไขมันของน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปในเขตพื้นที่อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรีด้วยเทคโนโลยีเมตาโบโลมิกส์ พร้อมทั้งติดตามอิทธิพลของฤดูกาลในการเก็บตัวอย่างต่อความผันแปรของข้อมูลดังกล่าว โดยงานวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ได้แก่ ส่วนที่ 1 การทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์ข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากด้วยเทคนิค ^{1}H-NMR โดยใช้ตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์ทางการค้าในประเทศไทย และส่วนที่ 2 การคัดเลือกตัวอย่างน้ำนมดิบจากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูฝน (กันยายน - ตุลาคม 2563) และฤดูแล้ง (มีนาคม - เมษายน 2564) เพื่อนำมาวิเคราะห์ข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากและข้อมูลกรดไขมันของน้ำนมดิบด้วยเทคนิค ^{1}H-NMR และ GC-MS ร่วมกับการเปรียบเทียบข้อมูลดังกล่าวด้วยวิธีทางสถิติพหุตัวแปร โดยมีข้อสรุปที่ได้จากงานวิจัย ดังนี้

ส่วนที่ 1 การทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากด้วย ^{1}H-NMR โดยใช้ตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์ทางการค้าในประเทศไทย 3 ตราสินค้า จำนวน 4 ผลิตภัณฑ์ ได้แก่ ผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์พาสเจอร์ไรส์ ชนิด ก. ผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์พาสเจอร์ไรส์ ชนิด ข. ผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์พาสเจอร์ไรส์ ชนิด ค. และผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์พาสเจอร์ไรส์ ชนิด ง. ผลการวิเคราะห์พบว่า เทคนิค ^{1}H-NMR สามารถใช้ศึกษาข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากในผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์ทางการค้าได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยสามารถระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมได้ทั้งหมด 45 ชนิด ครอบคลุมสารในกลุ่มของกรดอะมิโนและอนุพันธ์ แอลกอฮอล์ คาร์โบไฮเดรตและอนุพันธ์ อนุพันธ์ของไขมัน กรดอินทรีย์ สารประกอบคาร์บอนิลและอื่นๆ และเมื่อนำไปเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากในกลุ่มตัวอย่างน้ำนมอินทรีย์ด้วยเทคนิค HCA และ PLSDA พบว่า สามารถ

แยกความแตกต่างระหว่างนมอินทรีย์พาสเจอร์ไรส์ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ (i) กลุ่มนมอินทรีย์พาสเจอร์ไรส์ ชนิด ก. และ ชนิด ง. และ (ii) กลุ่มนมอินทรีย์พาสเจอร์ไรส์ ชนิด ข. และ ชนิด ค. โดยจำแนกความแตกต่างได้ตามแหล่งที่มาของน้ำนมดิบและผู้ผลิตในแต่ละตราสินค้าที่แตกต่างกัน ซึ่งสามารถใช้ปริมาณสัมพัทธ์ของ acetoacetate, alanine, butyrate, isoleucine, 2-oxoglutarate, proline, succinate และ valerate เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของกลุ่มนมอินทรีย์พาสเจอร์ไรส์ ชนิด ก. และ ชนิด ง. และ ribose และ uridine เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของกลุ่มนมอินทรีย์พาสเจอร์ไรส์ ชนิด ข. และ ชนิด ค. ได้

ส่วนที่ 2 การคัดเลือกตัวอย่างน้ำนมดิบจากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปในเขตพื้นที่อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี ระหว่างฤดูฝน (กันยายน - ตุลาคม 2563) และฤดูแล้ง (มีนาคม - เมษายน 2564) เพื่อศึกษาอิทธิพลของระบบการจัดการฟาร์มโคนมที่แตกต่างกันและความผันแปรของฤดูกาลที่ส่งผลต่อองค์ประกอบทางชีวเคมีในน้ำนมดิบ โดยข้อสรุปที่ได้จากงานวิจัยในส่วนที่ 2 ประกอบไปด้วย 3 ส่วน ดังนี้

(i) ผลจากการวิเคราะห์ค่าองค์ประกอบทางเคมีหลักและปริมาณโซมาติกเซลล์ พบว่าอิทธิพลของการจัดการฟาร์มโคนมที่แตกต่างกันมีผลต่อปริมาณโปรตีน, แลคโตส และปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และอิทธิพลของฤดูกาลในการเก็บตัวอย่างมีผลต่อปริมาณไขมันและปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนผลจากการวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณกรดทั้งหมดในน้ำนมดิบ พบว่าอิทธิพลของการจัดการฟาร์มโคนมที่แตกต่างกันและความผันแปรของฤดูกาลไม่มีผลต่อค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณกรดทั้งหมดในน้ำนมดิบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

(ii) ผลจากการวิเคราะห์ข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากในตัวอย่างน้ำนมดิบโดยใช้เทคนิค ^{1}H-NMR พบว่าสามารถระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากได้ทั้งหมด 35 ชนิด ครอบคลุมสารในกลุ่มของกรดอะมิโนและอนุพันธ์ แอลกอฮอล์ คาร์โบไฮเดรตและอนุพันธ์ อนุพันธ์ของไขมัน กรดอินทรีย์ สารประกอบคาร์บอนิลและอื่นๆ ผลจากการวิเคราะห์ข้อมูลดังกล่าวด้วยเทคนิค HCA, PLSDA และ OPLS-DA พบว่าอิทธิพลของฤดูกาลในการเก็บตัวอย่างสามารถแยกความแตกต่างของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิด

ระเหยยากได้ชัดเจนกว่าอิทธิพลของการจัดการฟาร์มโคนมที่แตกต่างกัน โดยสามารถใช้ปริมาณสัมพัทธ์ของ acetoacetate, glucose, histidine และ choline เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูฝนและฤดูแล้ง และปริมาณสัมพัทธ์ของ carnitine, *N*-acethylglucosamine, glycerophosphocholine, lactate, 1,3 dihydroxyacetone และ 1,6-anhydro-β-*D*-glucose เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อระบุอัตลักษณ์ทางชีวโมเลกุลของน้ำนมโคอินทรีย์ได้

(iii) ผลจากการวิเคราะห์ข้อมูลกรดไขมันในตัวอย่างน้ำนมดิบโดยใช้เทคนิค GC-MS พบว่าสามารถระบุชนิดกรดไขมันได้ทั้งหมด 32 สาร ซึ่งเป็นสารในกลุ่มของกรดไขมันชนิดอิ่มตัว กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่ 1 ตำแหน่ง และกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หลายตำแหน่ง ผลจากการวิเคราะห์ข้อมูลดังกล่าวด้วยเทคนิค HCA, PLSDA และ OPLS-DA พบว่าอิทธิพลของระบบการจัดการฟาร์มโคนมระหว่างฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปสามารถแยกความแตกต่างของข้อมูลกรดไขมันได้ชัดเจนกว่าอิทธิพลของฤดูกาลในการเก็บตัวอย่างและความผันแปรของฤดูกาลจะส่งผลอย่างชัดเจนต่อข้อมูลกรดไขมันของน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ โดยสามารถใช้ปริมาณสัมพัทธ์ของกรดไขมัน stearic acid และ linolenic acid เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อระบุอัตลักษณ์ทางชีวโมเลกุลของน้ำนมโคอินทรีย์ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ปริมาณสัมพัทธ์ของกรดไขมัน lauric acid, myristic acid, palmitic acid, margaric acid, saturated fatty acid (SFA), monounsaturated fatty acid (MUFA), polyunsaturated fatty acid (PUFA), elaidic acid, linolelaidic acid, conjugated linoleic acid (CLA) และ behenic acid เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อแยกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บในช่วงฤดูฝนและฤดูแล้งได้ โดยพบว่าปริมาณกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หลายตำแหน่ง (PUFA) ได้แก่ linolenic acid และ conjugated linoleic acid (CLA) ที่เพิ่มขึ้นในน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์ที่เก็บในช่วงฤดูแล้งน่าจะส่งผลต่อคุณค่าทางโภชนาการของน้ำนมดังกล่าว

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ผลการศึกษาที่ได้จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการประยุกต์ใช้เทคนิคทางเคมีวิเคราะห์ขั้นสูงด้วยเทคนิค ^{1}H-NMR และ GC-MS ร่วมกับการประมวลผลทางเคโมเมตริกซ์ (chemometrics) เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของข้อมูลแบบแผนสารชีวโมเลกุลและระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากและกรดไขมันที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของน้ำนมดิบที่ได้จากระบบการจัดการฟาร์มแบบเกษตรอินทรีย์ ตลอดจนอิทธิพลของฤดูกาลต่อความผันแปรของข้อมูลดังกล่าวได้อย่างมีประสิทธิภาพ

5.2 ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากงานวิจัยในปัจจุบันของประเทศไทยที่มีการนำเทคโนโลยีเมตาโบโลมิกส์มาใช้ในการศึกษาข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของน้ำนมและผลิตภัณฑ์นมยังมีอยู่อย่างจำกัด จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากและกรดไขมันด้วยเทคโนโลยีดังกล่าวสามารถระบุอัตลักษณ์ทางชีวโมเลกุลของน้ำนมโคอินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในอนาคตอาจมีการพัฒนาข้อมูลโดยการขยายฐานข้อมูลของน้ำนมดิบ เช่น การขยายขอบเขตแหล่งทำเลที่ตั้งทางภูมิศาสตร์ของฟาร์มและเพิ่มจำนวนปีที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างน้ำนมดิบ เพื่อตรวจสอบความเที่ยงตรงและความถูกต้องของผลการทดลอง รวมถึงการขยายฐานข้อมูลของน้ำนมดิบให้มีความหลากหลาย เช่น การเปรียบเทียบข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลระหว่างน้ำนมดิบที่ได้ฟาร์มโคนมอินทรีย์ (organic dairy farming) ฟาร์มโคนมทั่วไป (conventional dairy farming) และฟาร์มโคนมที่ผสมผสานระหว่างระบบการจัดการฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไป (pasture dairy farming) นอกจากนี้ อาจขยายขอบเขตของการประยุกต์ใช้เทคนิคในงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาผลของปัจจัยอื่น เช่น อาหาร สายพันธุ์ อายุและระยะการให้น้ำนมของแม่โคที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลในน้ำนมดิบ โดยข้อมูลที่ได้จะสามารถนำไปพัฒนาสร้างแบบจำลองเชิงทำนาย (predictive modeling) ด้วยวิธีการทางคณิตศาสตร์และสถิติ สำหรับพัฒนาเป็นวิธีทดสอบเพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพและระบุอัตลักษณ์ (traceability and authentication) ของน้ำนมและผลิตภัณฑ์นมอินทรีย์ที่ผลิตในประเทศไทยต่อไปได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บรรณานุกรม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

กรองแก้ว บริสุทธิ์สวัสดิ์. 2561. การเลี้ยงโคนมอินทรีย์. No. พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด สาขาที่ 4, นนทบุรี

กรมปศุสัตว์. สำนักงานพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าปศุสัตว์. ฟาร์มปศุสัตว์อินทรีย์ที่ได้รับการรับรอง(2562) [ออนไลน์]. 2562. แหล่งที่มา: http://certify.dld.go.th/certify/index.php/th/2016-05-16-03-34-50/153-2016-05-27-07-58-07 [10 ตุลาคม 2564]

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2558. มาตรฐานการรับซื้อน้ำนมโค [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.dpo.go.th/wpcontent/uploads/2013/12/Announcedpurchaserawmilk2015.pdf [18 มิถุนายน 2563]

กัลยา วานิชย์บัญชา. 2552. การวิเคราะห์ข้อมูลหลายตัวแปร, หน้า 1-589. พิมพ์ครั้งที่ 4. ภาควิชาสถิติคณะพาณิชยศาสตร์และการบัญชีเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

เกษตรและสหกรณ์, กระทรวง. สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. มกษ. 6003-2553. มาตรฐานสินค้าเกษตร เรื่อง น้ำนมโคดิบ [ออนไลน์]. 2553. แหล่งที่มา: http://www.acfs.go.th/standard/download/raw_cow_milk.pdf [10 ตุลาคม 2564]

เกษตรและสหกรณ์, กระทรวง. สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. มกษ. 9000-2561 [ออนไลน์]. 2561. แหล่งที่มา: https://www.acfs.go.th/standard/download/ORGANIC-PART-2_LIVESTOCK_2561.pdf [10 ตุลาคม 2564]

เกษตรและสหกรณ์, กระทรวง. สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. แนวปฏิบัติการใช้มาตรฐานสินค้าเกษตร [ออนไลน์]. 2557. แหล่งที่มา: http://www.acfs.go.th/standard/download/GUIDANCE_ORGANIC-PART-1_PRODUCTS-FROM-ORGANIC.pdf [10 ตุลาคม 2564]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จตุพร วุฒิกนกกาญจน์. บทที่ 2 การวิเคราะห์พอลิเมอร์ด้วยเทคนิคทางสเปคโตรสโคปี [ออนไลน์]. 2555. แหล่งที่มา: http://www.seem.kmutt.ac.th/research/pentec/download/MTT656-Chapter%202%20Polymer%20Spectroscopy.pdf [30 กันยายน 2564]

ฉลอง วชิราภากร, จ. น. ร. ว. เ., อนุสรณ์ เชิดทอง และ กันยา พลแสน, . 2016. ผลของกากเอทานอล แห้งในสูตรอาหารผสมสำเร็จต่อปริมาณการกินได้การย่อยได้ผลผลิตและองค์ประกอบน้ำนมในโคให้นม. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 32(2): 247-259.

ดร.ปิยวรรณ ศุภวิทิตพัฒนา. 2556. เทคโนโลยีนมและผลิตภัณฑ์.

ธนวัฒน์ ผลเกิด. 2560. การเปลี่ยนแปลงกรดไขมันในน้ำนมจากการเสริม calcium salt of palm oil fatty acid ในโคให้นม. in สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ Vol. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

นิธิยา รัตนาปนนท์. 2557. เคมีนมและผลิตภัณฑ์นม. โอเดียนสโตร์, กรุงเทพมหานคร:.

ปณัท สุขสร้อย. 2020. การประเมินคุณภาพอาหารหยาบและเศษเหลือทางการเกษตรสำหรับเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในจังหวัดสระแก้ว. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 38(3): 376-381.

มยุรี เหลืองวิลัย. 2561. การเปรียบเทียบโพรไฟล์ทางชีวโมเลกุลของน้ำนมดิบที่ได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการและไม่แสดงอาการโดยใช้เทคโนโลยีเมตาโบโลมิกส์. in ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์. Vol. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

มาริสา คงบุญเกิด. 2562. การเปรียบเทียบข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลระหว่างน้ำนมโคอินทรีย์กับน้ำนมโคทั่วไปโดยใช้เทคโนโลยีเมตาโบโลมิกส์. in ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์. Vol. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

รัฐกร มิรัตนไพร. 2555. ผลของการเสริม linseed oil ต่อผลผลิตน้ำนม และสัดส่วนของกรดไขมันในน้ำนมของโคนม. in สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์. Vol. ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

วรรณี ชิวปรีชา. 2563. การวิเคราะห์วัตถุดิบและอาหารสัตว์. No. พิมพ์ครั้งที่ 1. ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม.

วราพันธุ์ จินตณวิชญ์. 2559. ข้อควรรู้ในการส่งตัวอย่างตรวจวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนะของวัตถุดิบ/อาหารสัตว์, ศูนย์ค้นคว้าและพัฒนาวิชาการอาหารสัตว์ สถาบันสุวรรณวาจกกสิกิจฯ.

ศานต์ เศรษฐชัยมงคล และ มยุรี เหลืองวิลัย 2560. การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเมตาโบโลมิกส์ในการศึกษาข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของน้ำนมและผลิตภัณฑ์นม.วารสารเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม ปีที่ 12 ฉบับที่ 1 มกราคม – ธันวาคม 2560.

ศูนย์ปศุสัตว์อินทรีย์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2553. การปรับเปลี่ยนการเลี้ยงโคนมสู่มาตรฐานปศุสัตว์อินทรีย์. ศูนย์ปศุสัตว์อินทรีย์ กองบำรุงพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์, กรุงเทพ.

สาธารณสุข, กระทรวง. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข. ฉบับที่ 350. นมโค [ออนไลน์]. 2556. แหล่งที่มา: http://food.fda.moph.go.th/law/data/announ_moph/P350.pdf [10 ตุลาคม 2564]

สาธารณสุข, กระทรวง. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข. ฉบับที่ 366. การแสดงข้อความ “พรีเมียม” บนฉลากน้ำนมโคสด และน้ำนมโคชนิดเต็มมันเนยที่ผ่านกรรมวิธีพาสเจอร์ไรส์ [ออนไลน์]. 2556. แหล่งที่มา: http://food.fda.moph.go.th/law/data/announ_moph/P366.pdf [10 ตุลาคม 2564]

เสาวภาคย์ เบียชิน. 2553. ความหลากหลายของ amino acid และ lipid ที่เป็นองค์ประกอบของลายนิ้วมือแฝง.

องค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย, 2562. การจัดการฟาร์มโคนมอินทรีย์ ตามมาตรฐานปศุสัตว์อินทรีย์ [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.dpo.go.th/wp-content/uploads/2019/03/โคนมอินทรีย์-อ.ส.ค.-1.pdf [3 มิถุนายน 2563]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

อรพิน ชัยประสพ. 2547. เทคโนโลยีของผลิตภัณฑ์นม แหล่งที่มา: http://elearning2.utcc.ac.th/officialtcu/econtent/SF411/lecture2.pdf [10 ตุลาคม 2564]

Abonyi, J. and B. Feil. 2007. Cluster analysis for data mining and system identification. Springer Science & Business Media.

Alhussien, M. N. and A. K. Dang. 2018. Impact of different seasons on the milk somatic and differential cell counts, milk cortisol and neutrophils functionality of three Indian native breeds of cattle. Journal of Thermal Biology 78:27-35.

Anacker, G. 2007. Differences between composition of organic milk and conventional milk. Lebensmitt. Milchwirtsch 128:17-25.

Bilik, K. and M. Łopuszańska-Rusek. 2010. Effect of organic and conventional feeding of Red-and-White cows on productivity and milk composition. Annals of Animal Science 10(4):441-458.

Bhattacharya, A., J. Banu, M. Rahman, J. Causey, and G. Fernandes. 2006. Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. Journal of Nutritional Biochemistry 17(12):789-810.

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

Bloksma, J., R. Adriaansen-Tennekes, M. Huber, L. P. L. van de Vijver, T. Baars, and J. de Wit. 2008. Comparison of organic and conventional raw milk quality in the Netherlands. Biological Agriculture and Horticulture 26(1):69-83.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Butler, G., J. H. Nielsen, T. Slots, C. Seal, M. D. Eyre, R. Sanderson, and C. Leifert. 2008. Fatty acid and fat-soluble antioxidant concentrations in milk from high- and low-input conventional and organic systems: seasonal variation. Journal of the Science of Food and Agriculture 88(8):1431-1441.

Butler, G., S. Stergiadis, C. Seal, M. Eyre, and C. Leifert. 2011. Fat composition of organic and conventional retail milk in northeast England. Journal of Dairy Science 94(1):24-36.

Bylesjö, M., M. Rantalainen, O. Cloarec, J. K. Nicholson, E. Holmes, and J. Trygg. 2006. OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. Journal of Chemometrics 20(8-10):341-351.

Caggiano, N., Smirnoff, A. L., Bottini, J. and De Simone, E. 2019. Protease activity and protein profile in milk from healthy dairy cows and cows with different types of mastitis. International Dairy Journal 89: 1-5.

Capuano, E., G. van der Veer, R. Boerrigter-Eenling, A. Elgersma, J. Rademaker, A. Sterian, and S. M. van Ruth. 2014. Verification of fresh grass feeding, pasture grazing and organic farming by cows farm milk fatty acid profile. Food Chemistry 164:234-241.

Capuano, E., Gravink, R., Boerrigter-Eenling, R. and van Ruth, S. M. 2015. Fatty acid and triglycerides profiling of retail organic, conventional and pasture milk: Implications for health and authenticity. International Dairy Journal 42: 58-63.

Chang, L.-l., Z.-p. Yang, H.-t. Wu, Y. Chen, X.-k. Shi, Y.-j. Mao, N. Cen, X.-h. Liang, and Z.-h. Yin. 2011. Comparative study on fatty acid composition between normal milk and subclinical mastitis milk of dairy cow. Chines J Anim Vet Sci 43:44-47.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Chen, Y., W. MacNaughtan, P. Jones, Q. Yang, H. Williams, and T. Foster. 2021. Selection of potential molecular markers for cheese ripening and quality prediction by NMR spectroscopy. LWT 136:110306.

Chong, J., Soufan, O., Li, C., Caraus, I., Li, S., Bourque, G., Wishart, D. S. and Xia, J. 2018. MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. Nucleic Acids Research 46: W486-W494.

Choi, S. S., M. C. Kim, and Y. K. Kim. 2011. Influence of silica on formation of levoglucosan from carbohydrates by pyrolysis. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis 90(1):56-62.

Chung, I.-M., J.-K. Kim, K.-J. Lee, N.-Y. Son, M.-J. An, J.-H. Lee, Y.-J. An, and S.-H. Kim. 2018. Discrimination of organic milk by stable isotope ratio, vitamin E, and fatty acid profiling combined with multivariate analysis: A case study of monthly and seasonal variation in Korea for 2016–2017. Food Chemistry 261:112-123.

Collomb, M., W. Bisig, U. Bütikofer, R. Sieber, M. Bregy, and L. Etter. 2008. Seasonal variation in the fatty acid composition of milk supplied to dairies in the mountain regions of Switzerland. Dairy Sci. Technol. 88(6):631-647.

Cubon, J., V. Foltys, P. Hašcík, M. Kacániová, I. Ubrežiová, S. Krácmar, and K. Vavrišínová. 2008. The raw milk quality from organic and conventional agriculture Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis. 56:25–30.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

Cui, J., Zhu, D., Su, M., Tan, D., Zhang, X., Jia, M. and Chen, G. 2019. The combined use of ^{1}H and ^{2}D NMR-based metabolomics and chemometrics for non-targeted screening of biomarkers and identification of reconstituted milk. Journal of the Science of Food and Agriculture 99: 6455-6461.

Edwards, K. M., A. Badiger, D. R. Heldman, and M. S. Klein. 2021. Metabolomic Markers of Storage Temperature and Time in Pasteurized Milk. Metabolites 11(7):419.

Ehtesham, E., A. R. Hayman, K. A. McComb, R. Van Hale, and R. D. Frew. 2013. Correlation of Geographical Location with Stable Isotope Values of Hydrogen and Carbon of Fatty Acids from New Zealand Milk and Bulk Milk Powder. Journal of Agricultural and Food Chemistry 61(37):8914-8923.

Eisenstecken, D., J. Stanstrup, P. Robatscher, C. W. Huck, and M. Oberhuber. 2021. Fatty acid profiling of bovine milk and cheese from six European areas by GC-FID and GC-MS. International Journal of Dairy Technology 74(1):215-224.

Elgersma, A. 2015. Grazing increases the unsaturated fatty acid concentration of milk from grass-fed cows: A review of the contributing factors, challenges and future perspectives. European Journal of Lipid Science and Technology 117, 1345-1369.

Ellis, K. A., Monteiro, A., Innocent, G. T., Grove-White, D., Cripps, P., Graham McLean, W., Howard, C. V. and Mihm, M. 2007. Investigation of the vitamins A and E and β-carotene content in milk from UK organic and conventional dairy farms. Journal of Dairy Research 74: 484-491.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

Emwas, A.-H., R. Roy, R. T. McKay, L. Tenori, E. Saccenti, G. Gowda, D. Raftery, F. Alahmari, L. Jaremko, and M. Jaremko. 2019. NMR spectroscopy for metabolomics research. Metabolites 9(7):123.

Emwas, A.-H. M., Z. A. Al-Talla, Y. Yang, and N. M. Kharbatia. 2015. Gas chromatography–mass spectrometry of biofluids and extracts. Pages 91-112 in Metabonomics. Springer.

Eom, J. S., Kim, E. T., Kim, H. S., Choi, Y. Y., Lee, S. J., Lee, S. S., Kim, S. H. and Lee, S. S. 2021. Metabolomics comparison of rumen fluid and milk in dairy cattle using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. Animal bioscience 34: 213.

Erich, S., S. Schill, E. Annweiler, H.-U. Waiblinger, T. Kuballa, D. W. Lachenmeier, and Y. B. Monakhova. 2015. Combined chemometric analysis of ^{1}H NMR, ^{13}C NMR and stable isotope data to differentiate organic and conventional milk. Food Chemistry 188:1-7.

EZEALA, D. O. 1985. Effect of fermentation on the fatty acid content and composition of cassava tuber meal. Journal of Food Biochemistry 9: 249-254.

Fan, C., D. Su, H. Tian, X. Li, Y. Li, L. Ran, R. Hu, and J. Cheng. 2018. Liver metabolic perturbations of heat-stressed lactating dairy cows. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 31(8):1244-1251.

Firl, N., H. Kienberger, and M. Rychlik. 2014. Validation of the sensitive and accurate quantitation of the fatty acid distribution in bovine milk. International Dairy Journal 35(2):139-144.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Gabryszuk, M., K. Słoniewski, and T. Sakowski. 2008. Macro-and microelements in milk and hair of cows from conventional vs. organic farms. Animal Science Papers and Reports 26(3):199-209.

Gao, Y. X., B. Xu, H. R. Fan, M. R. Zhang, L. J. Zhang, C. Lu, N. N. Zhang, B. Fan, F. Z. Wang, and S. Li. 2020. ^{1}H NMR-based chemometric metabolomics characterization of soymilk fermented by Bacillus subtilis BSNK-5. Food Research International 138:109686.

Garmo, R. T., S. Waage, S. Sviland, B. I. F. Henriksen, O. Østerås, and O. Reksen. 2010. Reproductive performance, udder health, and antibiotic resistance in mastitis bacteria isolated from Norwegian Red cows in conventional and organic farming. Acta Veterinaria Scandinavica. 52

Gómez-Cortés, P., Juárez, M. and de la Fuente, M. A. 2018. Milk fatty acids and potential health benefits: An updated vision. Trends in Food Science & Technology 81: 1-9.

Hanuš, O., J. Brychtova, V. Gencurova, J. Pesl, I. Hulova, M. Vyletelova, R. Jedelska, and J. Kopecky. 2008a. Effect of conversion from conventional to organic dairy farm on milk quality and health of dairy cows. Folia Veterinaria 52:140-148.

Hanuš, O., Z. Vorlíček, K. Sojková, R. Rozsypal, M. Vyletělová, P. Roubal, V. Genčurová, J. Pozdíšek, and H. Landová. 2008b. A comparison of selected milk indicators in organic herds with conventional herd as reference. Folia Veterinaria 52(3-4):155-159.

Hauke, J. and T. Kossowski. 2011. Comparison of values of Pearson's and Spearman's correlation coefficient on the same sets of data.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

Hilario, M. and A. Kalousis. 2008. Approaches to dimensionality reduction in proteomic biomarker studies. Briefings in bioinformatics 9(2):102-118.

Hu, F., K. Furihata, M. Ito-Ishida, S. Kaminogawa, and M. Tanokura. 2004. Nondestructive Observation of Bovine Milk by NMR Spectroscopy: Analysis of Existing States of Compounds and Detection of New Compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52(16):4969-4974.

Jariyasopit, N., S. Khamsaeng, A. Panya, P. Vinaisuratern, P. Metem, W. Asawalertpanich, W. Visessanguan, V. Sirivatanauksorn, and S. Khoomrung. 2021. Quantitative analysis of nutrient metabolite compositions of retail cow's milk and milk alternatives in Thailand using GC-MS. Journal of Food Composition and Analysis 97:103785.

Jaruwat Nutdechanan, P. P., 2020. The study of Total Mixed Ration (TMR) management by pilot milk collecting center on farmer's milk production efficiency Case study: Thaimilk Dairy Cooperative Ltd. แหล่งที่มา: http://extension.dld.go.th/th1/images/stories/63/วิชาการ/TMR%20ล่าสุด.pdf [3 ตุลาคม 2564]

Johansson, D., P. Lindgren, and A. Berglund. 2003. A multivariate approach applied to microarray data for identification of genes with cell cycle-coupled transcription. Bioinformatics 19(4):467-473.

Kalač, P. and E. Samková. 2010. The effects of feeding various forages on fatty acid composition of bovine milk fat: A review. Czech Journal of Animal Science 55(12):521-537.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

Klein, M. S., M. F. Almstetter, G. Schlamberger, N. Nürnberger, K. Dettmer, P. J. Oefner, H. H. D. Meyer, S. Wiedemann, and W. Gronwald. 2010. Nuclear magnetic resonance and mass spectrometry-based milk metabolomics in dairy cows during early and late lactation. Journal of Dairy Science 93(4):1539-1550.

Klebling G., Schneider J., and Jahreis G. Long-term consumption of fermented dairy products over 6 months increases HDL cholesterol. European Journal of Clinical Nutrition 56 (September 2002) : 843–849

Kongboonkird, M., Duangmal, K., Chantaprasan, N. and Settachaimongkon, S. 2018. Molecular authentication of pasteurized organic milk products in Thailand using 1H-NMR-based metabolomics approach. In Proceeding of the 30th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference (TSB2018), CSB-P-03-1-11. November 22-23, 2018. Bangkok, Thailand.

Kraiprom, T., Prasanpanich, S., Kungmun, P., Sivijchai, S. and Tumwasorn, S. 2013. Effect of fermented by-product and rice straw on milk yield and fatty acid composition in dairy cows. Agriculture and Natural Resources 47: 217-227.

KouřimsKá, L., V. Legarová, Z. Panovská, and J. Pánek. 2014. Quality of cows' milk from organic and conventional farming. Czech Journal of Food Sciences 32(4):398-405.

Kuczyńska, B., K. Puppel, M. Gołębiewski, E. Metera, T. Sakowski, and K. Słoniewski. 2012. Differences in whey protein content between cow's milk collected in late pasture and early indoor feeding season from conventional and organic farms in Poland. Journal of the Science of Food and Agriculture 92(14):2899-2904.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Lakshmanan, C. M., B. Gal-Or, and H. E. Hoelscher. 1970. Production of Levoglucosan by Pyrolysis of Carbohydrates. Starch - Stärke 22(7):221-227.

Larsen, M. K., Nielsen, J. H., Butler, G., Leifert, C., Slots, T., Kristiansen, G. H. and Gustafsson, A. H., 2010. Milk quality as affected by feeding regimens in a country with climatic variation. Journal of Dairy Science 93(7): 2863-2873.

Li, J., X. Li, X. Liu, X. Wang, J. Li, K. Lin, S. Sun, H. Yue, and Y. Dai. 2021. Metabolomic Study of Acute Exacerbation of Pediatric Asthma Via HPLC-Q-Orbitrap-MS. Available at SSRN 3880862.

Lin, Y., Sun, X., Hou, X., Qu, B., Gao, X. and Li, Q. 2016. Effects of glucose on lactose synthesis in mammary epithelial cells from dairy cow. BMC Veterinary Research 12: 81.

Liu, N., A. M. Pustjens, S. W. Erasmus, Y. Yang, K. Hettinga, and S. M. van Ruth. 2020. Dairy farming system markers: The correlation of forage and milk fatty acid profiles from organic, pasture and conventional systems in the Netherlands. Food Chemistry 314:126153.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Loften, J. R., J. G. Linn, J. K. Drackley, T. C. Jenkins, C. G. Soderholm, and A. F. Kertz. 2014. Invited review: Palmitic and stearic acid metabolism in lactating dairy cows. Journal of Dairy Science 97:4661–4674.

Luangwilai, M., K. Duangmal, N. Chantaprasarn, and S. Settachaimongkon. 2021. Comparative metabolite profiling of raw milk from subclinical and clinical mastitis cows using ^{1}H-NMR combined with chemometric analysis. International Journal of Food Science & Technology 56(1):493-503.

Lu, J., Antunes Fernandes, E., Páez Cano, A. E., Vinitwatanakhun, J., Boeren, S., van Hooijdonk, T., van Knegsel, A., Vervoort, J. and Hettinga, K. A. 2013. Changes in Milk Proteome and Metabolome Associated with Dry Period Length, Energy Balance, and Lactation Stage in Postparturient Dairy Cows. Journal of Proteome Research 12: 3288-3296.

Maciuc, V., C. G. Radu-Rusu, E. C. Popescu, R. M. Radu-Rusu, and E. C. Jurco. 2017. Influence of season and cows farming system on milk physical, chemical and hygienic traits. Romanian Biotechnological Letters 22(6):13108-13119.

Magan, J. B., O'Callaghan, T. F., Zheng, J., Zhang, L., Mandal, R., Hennessy, D., Fenelon, M. A., Wishart, D. S., Kelly, A. L. and McCarthy, N. A. 2019. Impact of bovine diet on metabolomic profile of skim milk and whey protein ingredients. Metabolites 9: 305.

Mansor, R., 2012. Proteomic and metabolomic studies on milk during bovine mastitis. PhD Thesis. Institute of Infection Immunity and Inflammation Life Sciences, College of Medical, Veterinary & Life Sciences, University of Glasgow, UK.

Månsson, H. L. 2008. Fatty acids in bovine milk fat. Food Nutr Res 52:10.3402/fnr.v345i3400. 1821

Marín, M., Meléndez, P., Aranda, P. and Ríos, C. 2018. Conjugated linoleic acid content and fatty acids profile of milk from grazing dairy cows in southern Chile fed varying amounts of concentrate. Journal of Applied Animal Research 46: 150-154.

Marti, G. E., Stetler-Stevenson, M., Bleesing, J.J. and Fleisher, T. A. 2001. Introduction to Flow Cytometry. Sem Hematology 38 (2): 93-9.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Maurice-Van Eijndhoven, M. H. T., S. J. Hiemstra, and M. P. L. Calus. 2011. Short communication: Milk fat composition of 4 cattle breeds in the Netherlands. Journal of Dairy Science 94(2):1021-1025.

Mazzei, P. and A. Piccolo. 2018. NMR-based metabolomics of water-buffalo milk after conventional or biological feeding. Chemical and Biological Technologies in Agriculture 5(1):3.

Meyer, J., Daniels, S. U., Grindler, S., Tröscher-Mußotter, J., Alaedin, M., Frahm, J., Hüther, L., Kluess, J., Kersten, S. and von Soosten, D. 2020. Effects of a dietary L-carnitine supplementation on performance, energy metabolism and recovery from calving in dairy cows. Animals 10: 342.

Mogensen, L., T. Kristensen, K. Søegaard, S. K. Jensen, and J. Sehested. 2012. Alfa-tocopherol and beta-carotene in roughages and milk in organic dairy herds. Livestock Science 145(1):44-54.

Müller, U. and H. Sauerwein. 2010. A comparison of somatic cell count between organic and conventional dairy cow herds in West Germany stressing dry period related changes. Livestock Science 127(1):30-37.

Nauta, W. J., R. F. Veerkamp, E. W. Brascamp, and H. Bovenhuis. 2006. Genotype by Environment Interaction for Milk Production Traits Between Organic and Conventional Dairy Cattle Production in The Netherlands. Journal of Dairy Science 89(7):2729-2737.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Nagpal, R., H. Yadav, A. K. Puniya, K. Singh, S. Jain, and F. Marotta. 2007. Conjugated linoleic acid: Sources, synthesis and potential health benefits—An overview. Current Topics in Nutraceutical Research 5:55–65.

Nunez, R., 2001. Introduction to the Field of Cytometry and its Importance in Biomedicine. Current Issues in Molecular Biology 3 (2): 37-38.

O'Callaghan, T. F., M. O'Donovan, J. P. Murphy, K. Sugrue, J. T. Tobin, A. E. McNamara, X. Yin, G. Sundaramoorthy, and L. Brennan. 2021. The bovine colostrum and milk metabolome at the onset of lactation as determined by ^{1}H-NMR. International Dairy Journal 113:104881.

O’Callaghan, T. F., R. Vázquez-Fresno, A. Serra-Cayuela, E. Dong, R. Mandal, D. Hennessy, S. McAuliffe, P. Dillon, D. S. Wishart, and C. Stanton. 2018. Pasture feeding changes the bovine rumen and milk metabolome. Metabolites 8(2):27.

O'Callaghan, T. F., D. Hennessy, S. McAuliffe, K. N. Kilcawley, M. O'Donovan, P. Dillon, R. P. Ross, and C. Stanton. 2018. Corrigendum to “Effect of pasture versus indoor feeding systems on raw milk composition and quality over an entire lactation” (Journal of Dairy Science (2016) 99(12) (9424–9440), (S0022030216306671) (10.3168/jds.2016-10985)). Journal of Dairy Science 101(9):8615.

O’Donnell-Megaro, A. M., Barbano, D. M. and Bauman, D. E. 2011. Survey of the fatty acid composition of retail milk in the United States including regional and seasonal variations. Journal of Dairy Science 94: 59-65.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

O'Fallon, J. V., Busboom, J. R., Nelson, M. L. and Gaskins, C. T. 2007. A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: Application to wet meat tissues, oils, and feedstuffs. Journal of Animal Science 85: 1511-1521.

Olivo, C. J., L. I. Beck, A. M. Gabbi, P. Santini Charão, M. F. Sobczak, L. F. Gomes Uberty, J. W. Dürr, and R. Araújo Filho. 2005. Composition and somatic cell count of milk in conventional and agro-ecological farms: A comparative study in Depressão Central, Rio Grande do Sul state, Brazil. Livestock Research for Rural Development 17(6).

Office of Agricultural Economics. 2019. Annual report of the office of agricultural economics 2019. Vol. 2021, Ministry of Agriculture and Cooperatives.

Ozcan, T., Yaslioglu, E., Kilic, I. and Simsek, E. 2015. The influence of the season and milking time on the properties and the fatty acid composition of the milk in different dairy cattle farms. Mljekarstvo/Dairy 65.

PARlAk, Y. and N. Güzeler. 2016. Nuclear magnetic resonance spectroscopy applications in foods. Curr. Res. Nutr. Food Sci 4:161-168.

Parmar, P., N. Lopez-Villalobos, J. T. Tobin, E. Murphy, A. McDonagh, S. V. Crowley, A. L. Kelly, and L. Shalloo. 2020. The effect of compositional changes due to seasonal variation on milk density and the determination of season-based density conversion factors for use in the dairy industry. Foods 9(8):1004.

Pattaraporn Tatsapong. 2013. บทที่ 6 อาหารและความต้องการอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Pellattiero, E., Cecchinato, A., Tagliapietra, F., Schiavon, S. and Bittante, G. 2015. The use of 2-dimensional gas chromatography to investigate the effect of rumen-protected conjugated linoleic acid, breed, and lactation stage on the fatty acid profile of sheep milk. Journal of Dairy Science 98: 2088-2102.

Peterson, S. E., Rezamand, P., Williams, J. E., Price, W., Chahine, M. and McGuire, M. A. (2012). Effects of dietary betaine on milk yield and milk composition of mid-lactation Holstein dairy cows. J Dairy Sci 95: 6557-6562.

Puppel, K., T. Sakowski, B. Kuczyńska, G. Grodkowski, M. Gołębiewski, J. Barszczewski, B. Wróbel, A. Budziński, A. Kapusta, and M. Balcerak. 2017. Degrees of Antioxidant Protection: A 2-Year Study of the Bioactive Properties of Organic Milk in Poland. Journal of Food Science 82(2):523-528.

Qi, Y., X. Zhao, D. Huang, X. Pan, Y. Yang, H. Zhao, H. Hu, and G. Cheng. 2018. Exploration of the Relationship between Intestinal Colostrum or Milk, and Serum Metabolites in Neonatal Calves by Metabolomics Analysis. Journal of Agricultural and Food Chemistry 66(27):7200-7208.

Randolph, H. and Erwin, R. 1974. Influence of mastitis on properties of milk. X. Fatty acid composition. Journal of Dairy Science 57: 865-868.

Rhone, J., Koonawootrittriron, S. and Elzo, M. 2008. Factors affecting milk yield, milk fat, bacterial score, and bulk tank somatic cell count of dairy farms in the central region of Thailand. Tropical animal health and production 40: 147-153.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Rocchetti, G., A. Gallo, M. Nocetti, L. Lucini, and F. Masoero. 2020. Milk metabolomics based on ultra-high-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry to discriminate different cows feeding regimens. Food Research International 134:109279.

Sanchez, L. J., D. Zhu, R. Frew, and B. Kebede. 2021. Optimization of nuclear magnetic resonance and gas chromatography-mass spectrometry-based fingerprinting methods to characterize goat milk powder. Journal of Dairy Science 104(1):102-111.

Santos, E. M., Silva, T., Macedo, C. H. O. and Campos, F. S. 2013. Lactic acid bacteria in tropical grass silages. Lactic acid bacteria. R & D for Food, Health and Livestock Purposes. London: InTech: 335-362.

Salamon, R., Varga-Visi, É., Sára, P., Csapó-Kiss, Z. and Csapó, J. 2006. The influence of the season on the fatty acid composition and conjugated linolic acid content of the milk. Krmiva: Časopis hranidbi životinja, proizvodnji i tehnologiji krme 48: 193-200.

Schwendel, B. H., T. J. Wester, P. C. H. Morel, M. H. Tavendale, C. Deadman, N. M. Shadbolt, and D. E. Otter. 2015. Invited review: Organic and conventionally produced milk—An evaluation of factors influencing milk composition. Journal of Dairy Science 98(2):721-746.

Settachaimongkon, S., M. J. R. Nout, E. C. Antunes Fernandes, K. A. Hettinga, J. M. Vervoort, T. C. M. van Hooijdonk, M. H. Zwietering, E. J. Smid, and H. J. F. van Valenberg. 2014. Influence of different proteolytic strains of Streptococcus thermophilus in co-culture with Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus on the metabolite profile of set-yoghurt. International Journal of Food Microbiology 177:29-36.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Settachaimongkon, S., N. Wannakajeepiboon, P. Arunpunporn, W. Mekboonsonglarp, and D. Makarapong. 2021. Changes in Bovine Colostrum Metabolites during Early Postpartum Period Revealed by 1H-NMR Metabolomics Approach. Tropical Animal Science Journal 44(2):229-239.

Slots, T., G. Butler, C. Leifert, T. Kristensen, L. H. Skibsted, and J. H. Nielsen. 2009. Potentials to differentiate milk composition by different feeding strategies. Journal of Dairy Science 92(5):2057-2066.

Shah, A. M., J. Ma, Z. Wang, H. Zou, R. Hu, and Q. Peng. 2020. Betaine supplementation improves the production performance, rumen fermentation, and antioxidant profile of dairy cows in heat stress. Animals 10(4).

Skov, T., Honoré, A. H., Jensen, H. M., Næs, T. and Engelsen, S. B. 2014. Chemometrics in foodomics: Handling data structures from multiple analytical platforms. TrAC Trends in Analytical Chemistry 60: 71-79.

Smigic, N., I. Djekic, I. Tomasevic, N. Stanisic, A. Nedeljkovic, V. Lukovic, and J. Miocinovic. 2017. Organic and conventional milk–insight on potential differences. British Food Journal.

Sundekilde, U., M. Clausen, J. Lejonklev, M. Weisbjerg, M. Larsen, and H. Bertram. 2015. Addition of Essential Oils to Cows' Feed Alters the Milk Metabolome-NMR Spectroscopic Studies of “Nature's Perfect Food”. Pages 161-170 in Magnetic Resonance in Food Science.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Sun, H.-Z., Wang, D.-M., Wang, B., Wang, J.-K., Liu, H.-Y., Guan, L. L. and Liu, J.-X. 2015. Metabolomics of Four Biofluids from Dairy Cows: Potential Biomarkers for Milk Production and Quality. Journal of Proteome Research 14: 1287-1298.

Sundberg, T., B. Berglund, L. Rydhmer, and E. Strandberg. 2009. Fertility, somatic cell count and milk production in Swedish organic and conventional dairy herds. Livestock Science. 126:176–182.

Swensson, C. and H. Lindmark-Mansson. 2007. The prospect of obtaining beneficial mineral and vitamin contents in cow's milk through feed. Journal of Animal and Feed Sciences 16(1):21-41.

Swinkels, J. M., Leach, K. A., Breen, J. E., Payne, B., White, V., Green, M. J. and Bradley, A. J. 2021. Randomized controlled field trial comparing quarter and cow level selective dry cow treatment using the California Mastitis Test. Journal of Dairy Science 104: 9063-9081.

Tenori, L., C. Santucci, G. Meoni, V. Morrocchi, G. Matteucci, and C. Luchinat. 2018. NMR metabolomic fingerprinting distinguishes milk from different farms. Food Research International 113:131-139.

Tsiafoulis, C. G., C. Papaemmanouil, D. Alivertis, O. Tzamaloukas, D. Miltiadou, S. Balayssac, M. Malet-Martino, and I. P. Gerothanassis. 2019. NMR-based metabolomics of the lipid fraction of organic and conventional bovine milk. Molecules 24(6):1067.

Tunick, M. H., D. L. Van Hekken, M. Paul, E. R. Ingham, and H. J. Karreman. 2016. Case study: Comparison of milk composition from adjacent organic and conventional farms in the USA. International Journal of Dairy Technology 69(1):137-142.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Vallverdú-Queralt, A. and R. M. Lamuela-Raventós. 2016. Foodomics: A new tool to differentiate between organic and conventional foods. ELECTROPHORESIS 37(13):1784-1794.

van Hulzen, K. J. E., R. C. Sprong, R. van der Meer, and J. A. M. van Arendonk. 2009. Genetic and nongenetic variation in concentration of selenium, calcium, potassium, zinc, magnesium, and phosphorus in milk of Dutch Holstein-Friesian cows. Journal of Dairy Science 92(11):5754-5759.

van Valenberg, H. J. F., Hettinga, K. A., Dijkstra, J., Bovenhuis, H. and Feskens, E. J. M. 2013. Concentrations of n-3 and n-6 fatty acids in Dutch bovine milk fat and their contribution to human dietary intake. Journal of Dairy Science 96: 4173-4181.

Vanhatalo, A., Varvikko, T. and Huhtanen, P. 2003. Effects of Casein and Glucose on Responses of Cows Fed Diets Based on Restrictively Fermented Grass Silage. Journal of Dairy Science 86: 3260-3270.

Velásquez-Valle, R., N. Villa-Ruano, D. Hidalgo-Martínez, L. G. Zepeda-Vallejo, N. Pérez-Hernández, C. A. Reyes-López, E. Reyes-Cervantes, D. L. Medina-Melchor, and E. Becerra-Martínez. 2020. Revealing the ^{1}H NMR metabolome of mirasol chili peppers (Capsicum annuum) infected by Candidatus Phytoplasma trifolii. Food Research International 131:108863.

Vicini, J., T. Etherton, P. Kris-Etherton, J. Ballam, S. Denham, R. Staub, D. Goldstein, R. Cady, M. McGrath, and M. Lucy. 2008. Survey of Retail Milk Composition as Affected by Label Claims Regarding Farm-Management Practices. Journal of the American Dietetic Association 108(7):1198-1203.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Viguier, C., Arora, S., Gilmartin, N., Welbeck, K. and O'Kennedy, R. 2009. Mastitis detection: current trends and future perspectives. Trends in Biotechnology 27 (8): 486–493.

Walker, G. P., F. R. Dunshea, and P. T. Doyle. 2004. Effects of nutrition and management on the production and composition of milk fat and protein: a review. Australian Journal of Agricultural Research 55(10):1009-1028.

Walstra, P., P. Walstra, J. T. Wouters, and T. J. Geurts. 2005. Dairy science and technology. CRC press.

Wang, J. 2012. On the relationship between Pearson correlation coefficient and Kendall's tau under bivariate homogeneous shock model. International Scholarly Research Notices 2012.

Worley, B. and R. Powers. 2016. PCA as a practical indicator of OPLS-DA model reliability. Current Metabolomics 4(2):97-103.

Wu, R., J. Chen, L. Zhang, X. Wang, Y. Yang, and X. Ren. 2021. LC/MS-based metabolomics to evaluate the milk composition of human, horse, goat and cow from China. European Food Research and Technology 247(3):663-675.

Xu, W., A. Van Knegsel, E. Saccenti, R. Van Hoeij, B. Kemp, & J. Vervoort. 2020. Metabolomics of milk reflects a negative energy balance in cows. J. Proteome Res. 19:2942-2949. https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00706

Yang, Y., N. Zheng, X. Zhao, Y. Zhang, R. Han, J. Yang, S. Zhao, S. Li, T. Guo, C. Zang, and J. Wang. 2016. Metabolomic biomarkers identify differences in milk produced by Holstein cows and other minor dairy animals. Journal of Proteomics 136:174-182.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

Yeamkong, S., S. Koonawootrittriron, M. Elzo, and T. Suwanasopee. 2010. Milk quantity, quality and revenue in dairy farms supported by a private organization in Central Thailand. Livestock research for rural development 22.

Zagorska, J. and I. Ciprovica. 2008. The chemical composition of organic and conventional milk in Latvia. Pages 10-14 in Proc. 3rd Baltic Conference on Food Science and Technology FOODBALT-2008. Conference Proceedings. Jelgava, LLU.

Zeisel, S. H., Da Costa, K. A., Franklin, P. D., Alexander, E. A., Lamont, J. T., Sheard, N. F. and Beiser, A. 1991. Choline, an essential nutrient for humans. Faseb j 5: 2093-2098.

Zhang, L., M. Li, L. Zhan, X. Lu, L. Liang, B. Su, H. Sui, Z. Gao, Y. Li, and Y. Liu. 2015. Plasma metabolomic profiling of patients with diabetes-associated cognitive decline. PloS one 10(5):e0126952.

Zhu, D., B. Kebede, G. Chen, K. McComb, and R. Frew. 2020. Effects of the vat pasteurization process and refrigerated storage on the bovine milk metabolome. Journal of Dairy Science 103(3):2077-2088.

Zia, K., T. Siddiqui, S. Ali, I. Farooq, M. S. Zafar, and Z. Khurshid. 2019. Nuclear magnetic resonance spectroscopy for medical and dental applications: a comprehensive review. European journal of dentistry 13(01):124-128.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ก
การตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมีและปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบ

นำตัวอย่างน้ำนมดิบทั้งหมด 60 ตัวอย่าง มาตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมีและปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบ ด้วยเครื่อง CombiFoss^{TM} FT+ (FOSS, Hilleroed, Denmark) จะประกอบด้วย 2 เครื่องหลัก คือ เครื่อง MilkoScan^{TM} FT+ analyzer และ FossomaticTM FC ภายใต้คำแนะนำของเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ อ.ทับกวาง จ.สระบุรี

ก1 การตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมี

องค์ประกอบทางเคมีในน้ำนม ได้แก่ ไขมัน โปรตีน แลคโตส ของแข็งไม่รวมไขมันนม และของแข็งทั้งหมด ตรวจวัดด้วยเครื่อง MilkoScanTM FT+ analyzer โดยใช้เทคนิค Fourier Transform Infrared (FTIR) ซึ่งเป็นเทคนิคการกระตุ้นสารด้วยพลังงานแสงช่วงแสงอินฟราเรด (infrared light) โดยอาศัยหลักการของการดูดกลืนคลื่นรังสีช่วงกลางอินฟราเรด (middle infrared region) ประมาณ 1,000-5000 cm^{-1} เป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่สามารถบอกหมู่ฟังก์ชันในสาร (Zhang *et al.,* 2015) โดยทำการตรวจวัดการดูดกลืนรังสีอินฟาเรดของตัวอย่างที่ความถี่ต่างๆ ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของแต่ละพันธะ นิยมใช้เป็นเทคนิคสำหรับหาเกี่ยวกับโครงสร้างของสารอินทรีย์ โดยส่วนประกอบของเครื่องประกอบด้วย แหล่งกำเนิดรังสีอินฟราเรด moving mirror และ fixed mirror เป็นกระจกเงาที่สามารถสะท้อนรังสีอินฟราเรด beam splitter เป็นส่วนที่จะทำการแยกอินฟราเรดที่ผ่านเข้ามาให้เป็นสองส่วนคือ สามารถให้แสงทะลุผ่านได้ร้อยละ 50 และจะสะท้อนกลับร้อยละ 50 เมื่อแสงกระทบตัวอย่าง จะมี detector ใช้วัดความเข้มแสงที่เหลือจากการดูดกลืนของตัวอย่าง (จตุพร วุฒิกนกกาญจน์, 2555)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ก2 การตรวจวัดปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบ

การตรวจวัดปริมาณโซมาติกเซลล์ในห้องปฏิบัติการ เป็นการยืนยันจำนวนโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบ หลังจากผ่านการประเมินด้วย น้ำยา CMT เนื่องจากการตรวจวัดปริมาณโซมาติกเซลล์ในน้ำนมดิบด้วยน้ำยา CMT เป็นเพียงแค่การประเมินเบื้องต้นเท่านั้น ในงานวิจัยนี้จะตรวจวัดปริมาณโซมาติกเซลล์ ด้วยเครื่อง FossomaticTM FC โดยใช้เทคนิค flow cytometry ซึ่งเป็นการส่งผ่านตัวอย่างน้ำนมดิบในลักษณะเป็น thin string โดยมี sheath liquid เป็นตัวพาทำให้โซมาติกเซลล์ถูกเรียงตัวเป็นระเบียบก่อนที่จะส่งผ่านไปยัง flow cell โดยน้ำนมจะถูกย้อมด้วย ethidium bromide ซึ่งจะย้อมโมเลกุล DNA ในโซมาติกเซลล์ (Marti *et al.,* 2001) เมื่อตัวอย่างน้ำนมไหลผ่านลำแสงเลเซอร์แสงที่กระทบตัวอย่างน้ำนมจะเกิดการหักเหเป็น 2 ทิศทาง ในตัวเครื่องจะมีตัวมารับการหักเหของแสงเรียกว่า "detector" ซึ่งจะวัดค่าการหักเหของแสงเป็นมุมแคบทางด้านหน้าทำให้สามารถหาขนาดของเซลล์ได้ (Forward scatter, FSC) และวัดค่าการหักเหของแสงที่สะท้อนออกจากเซลล์ซึ่งจะทำให้สามารถวัดส่วนประกอบภายในเซลล์ได้ (Side scatter, SSC) โมเลกุลที่ถูกย้อม เมื่อกระทบเข้ากับแสงเลเซอร์ก็จะดูดซับพลังงานจากแสงเลเซอร์และเกิดการเปล่งแสงออกมาเป็นแสงต่างๆ เรียกว่า fluorescence (FL) จากนั้นเครื่องก็จะเปลี่ยนสัญญาณแสงให้กลายเป็นสัญญาณไฟฟ้าและส่งข้อมูลไปยังเครื่องคอมพิวเตอร์เพื่อประมวลผลออกมา ซึ่งการทำงานของเครื่อง fossomatic สามารถวัดได้ถึง 500 ตัวอย่างต่อชั่วโมง ดังนั้น เทคนิค flow cytometry มีข้อดีเมื่อเปรียบเทียบกับกล้องจุลทรรศน์แบบดั้งเดิม คือ ช่วยให้สามารถวิเคราะห์จำนวนเซลล์ได้มากขึ้นในเวลาอันสั้นสามารถให้จำนวนเซลล์โซมาติกที่แม่นยำและรวดเร็วสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคเต้านมอักเสบ (Nunez, 2001) แต่มีราคาแพงมาก จึงไม่เป็นที่นิยมในระบบบรีดนมออนไลน์

ภาคผนวก ข
การเตรียมตัวอย่างน้ำนมดิบก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR

ข 1 การเตรียมความพร้อมก่อนการใช้งานของ microcentrifuge (Nanosep® Centrifugal Device)

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

ข 2 การเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer)

ข 2.1 ส่วนประกอบของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ปริมาตร 10 มิลลิลิตร)

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

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

การคำนวณปริมาณของ 10 mM TSP

น้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) ของ TSP คือ 172.27 กรัมต่อโมล

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

จะได้ 10 mM ในปริมาตร 10 mL = 10 x 0.00172 = 0.0172 กรัม

การคำนวณปริมาณของ 300 mM KH_2PO_4

น้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) ของ KH_2PO_4 คือ 136.086 กรัมต่อโมล

1 mM in 10 mL	=	$\frac{\mathbf{0.13608 \times 10}}{\mathbf{1000}}$	= 0.0013608 กรัม
จะได้ 300 mM in 10 mL	=	300 x 0.0013608	= 0.4083 กรัม

ข 2.2 วิธีเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์

1. ชั่ง TSP 0.0172 กรัมผสมกับน้ำ milli-Q 10 มิลลิลิตรตามที่คำนวณได้เตรียมไว้ จะได้ 10 mM TSP 10 มิลลิลิตร
2. ชั่ง 300 mM KH_2PO_4 0.4083 กรัม ที่ได้จากการคำนวณ และ D_2O 1 กรัม
3. ใส่ TSP ที่เตรียมไว้ 1 มิลลิลิตร และน้ำ milli-Q 1 มิลลิลิตร เพื่อช่วยในการละลาย
4. ปรับ pH ด้วย 0.1 M NaOH ให้ได้ pH 6.0
5. ปรับปริมาตรฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) ด้วยน้ำ Milli-Q ให้ได้ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
6. เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืนเพื่อให้บัฟเฟอร์เสถียรและมีประสิทธิภาพในการทำงาน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ค

แบบสำรวจข้อมูลฟาร์มและการผลิตน้ำนมดิบในฟาร์มโคนมอินทรีย์

1. ข้อมูลทั่วไป *

1.1 ชื่อเจ้าของฟาร์ม: องค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย (อ.ส.ค.)

1.2 ระยะเวลาที่เลี้ยงโคนม: 56 ปี

1.3 ที่อยู่: 160 ม. 1 ต.มิตรภาพ อ.มวกเหล็ก จ.สระบุรี 18180

1.4 โทร: 081-9893015

1.5 ศูนย์รับน้ำนม: สำนักงาน อ.ส.ค. ภาคกลาง

1.6 เบอร์ถังนม: -

2. ข้อมูลประชากรโค จำนวนโคทั้งหมดในฟาร์ม 339 ตัว *

2.1 แม่โค 2.1.1 โครีดนม 82 ตัว แบ่งเป็น โครีดนมท้อง 4 ตัว และโครีดนมไม่ท้อง 78 ตัว

2.1.2 โคหยุดรีดนม 101 ตัว แบ่งเป็น โคหยุดรีดนมท้อง 45 ตัว และโคหยุดรีดนมไม่ท้อง 56 ตัว

2.2 โคสาว 2.2.1 อายุ 15 เดือน ขึ้นไป ท้อง 27 ตัว

2.2.2 อายุ 15 เดือน ขึ้นไป ไม่ท้อง 15 ตัว

2.3 โครุ่น โคอายุ 4-15 เดือน 89 ตัว

2.4 ลูกโคเพศเมีย โคอายุต่ำกว่า 4 เดือน 25 ตัว

3. **การนำเข้าแม่โคหรือโคสาวจากฟาร์มอื่นเข้ามาเลี้ยงในรอบ 6 เดือนที่ผ่านมา** ☐ มี ☑ ไม่มี

ลำดับที่	ชื่อโค	สถานภาพการให้ผลผลิต
1		
2		
3		
4		

4. **การคัดทิ้งโคในฟาร์มในรอบ 6 เดือนที่ผ่านมา** ☑ เคย ☐ ไม่เคย

ลำดับที่	ชื่อโค	สาเหตุที่คัดทิ้ง
1	TD 570025	โคหมดสภาพ
2	TD 610075	โคหมดสภาพ
3	TD 610047	โคหมดสภาพ
4	TD 610074	โคหมดสภาพ
5	TD 580037	โคหมดสภาพ
6	TD 580049	โคหมดสภาพ
7	TD 540016	โคหมดสภาพ
8	TD 560064	โคหมดสภาพ
9	TD 570032	โคหมดสภาพ
10	TD 590032	โคหมดสภาพ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

11	TD 560039	โคหมดสภาพ
12	TD 570022	โคหมดสภาพ
13	TD 580018	โคหมดสภาพ
14	TD 610069	โคหมดสภาพ
15	TD 620005	โคหมดสภาพ
16	TD 550087	โคหมดสภาพ
17	TD 560071	โคหมดสภาพ
18	TD 580016	โคหมดสภาพ
19	TD600002	โคหมดสภาพ
20	TD590052	โคหมดสภาพ
21	TD550061	โคหมดสภาพ
22	TD580050	โคหมดสภาพ
23	TD560060	โคหมดสภาพ
24	TD570043	โคหมดสภาพ
25	TD600049	โคหมดสภาพ
26	TD530045	โคหมดสภาพ
27	TD 600027	โคหมดสภาพ
28	TD 590036	โคหมดสภาพ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

5. **ข้อมูลการผลิตน้ำนม ***

เวลารีดนม	**เริ่มรีดนมเวลา**	**รีดนมแม่โคตัวสุดท้ายเสร็จเวลา**
มื้อเช้า	05.00 น.	07.00 น.
มื้อเย็น	15.00 น.	16.00 น.
ปริมาณน้ำนมรวม 1,000	กิโลกรัม/วัน	จำนวนวันรีดนมเฉลี่ย (Average days in milk) 162 วัน
ปริมาณน้ำนมเฉลี่ย 12	กิโลกรัม/ตัว/วัน	จำนวนรอบการให้นมเฉลี่ย (Average lactation NO.) = 2

6. **คุณภาพน้ำนมดิบ ***

6.1 วิธีการตรวจคุณภาพในฟาร์ม ☐ ไม่มี ☑ CMT ☐ แอลกอฮอล์ (68%) ☐ อื่นๆ โปรดระบุ

6.2 ข้อมูลผลการตรวจองค์ประกอบทางเคมีในน้ำนม (ISO 9622: 2013) และปริมาณ Somatic Cell Count (APHA 17th ed. 2004) ที่ศูนย์รับน้ำนมในรอบ 6 เดือนที่ผ่านมา จากสหกรณ์หรือศูนย์รับน้ำนมดิบ

วันที่	Fat (%)	Protein (%)	Lactose (%)	SNF (%)	TS (%)	SCCx1000 เฉลี่ย (cells/ml)
ก.ค. 63	4.32	3.05	4.94	8.29	12.03	1,754,000
ส.ค. 63	4.41	3.11	4.91	8.43	12.70	579,000
ก.ย. 63	5.06	2.55	4.85	7.89	12.96	249,000
ม.ค. 64	4.04	3.20	4.81	8.66	13.08	379,625
ก.พ. 64	4.61	2.98	4.94	8.35	12.89	351,625
มี.ค. 64	3.98	3.06	4.92	8.46	12.44	309,705

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

7. **ข้อมูลการจัดการอาหาร ***

7.1 วัตถุดิบอาหารข้น

ลำดับที่	ฤดูกาล	ชื่อวัตถุดิบ	วิธีการให้
1	ฤดูฝน	เศษขาเห็ดเข็มทอง	ผสม TMR
2	ฤดูฝน	มันสำปะหลัง	ผสม TMR
3	ฤดูฝน	อาหารข้น	ผสม TMR
3	ฤดูแล้ง	ถั่วเหลืองบด	ผสม TMR
4	ฤดูแล้ง	ข้าวบด	ผสม TMR
5	ฤดูแล้ง	อาหารข้น	ผสม TMR

7.2 วัตถุดิบอาหารหยาบ

ลำดับที่	ฤดูกาล	ชื่อวัตถุดิบ	แหล่งที่มา	วิธีการให้
1	ฤดูฝน	หญ้าหมัก	ผลิตเอง	ผสม TMR
2	ฤดูฝน	หญ้าสด	ผลิตเอง	ปล่อยแปลงหญ้า
4	ฤดูแล้ง	หญ้าหมัก	ผลิตเอง	ผสม TMR
5	ฤดูแล้ง	หญ้าสด	ผลิตเอง	ปล่อยแปลงหญ้า
6	ฤดูแล้ง	ข้าวโพด	ผลิตเอง	ผสม TMR

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

8. **ข้อมูลการจัดการในฟาร์มโคนม ตามหลักการทั่วไปของการผลิตโคนมและน้ำนมอินทรีย์ * (โปรด√ ในช่องระดับความคิดเห็นของคุณ)**

หลักการสำคัญของการผลิตปศุสัตว์อินทรีย์		ระดับของความคิดเห็น				
		ใช่มากที่สุด	ใช่มาก	ใช่ปานกลาง	ใช่น้อย	ใช่น้อยที่สุด
1.	โคนมมีความสามารถในการปรับตัวในสภาพแวดล้อมการผลิต และสามารถต้านทานโรค		/			
2.	โคนมเกิดในฟาร์มที่มีการจัดการตามระบบเกษตรอินทรีย์		/			
3.	โคนมถูกเลี้ยงในระบบอินทรีย์ตลอดช่วงชีวิตของโค	/				
4.	พื้นที่ไม่ใช้ปุ๋ยเคมี ยากำจัดศัตรูพืชและยาฆ่าหญ้า	/				
5.	พื้นที่ปลูกพืชและพืชอาหารสัตว์ มีระยะปรับเปลี่ยนสำหรับพืชล้มลุก 12 เดือน และพืชยืนต้น 18 เดือน	/				
6.	ใช้วัตถุดิบอาหารสัตว์ที่ผลิตจากฟาร์มตนเอง			/		
7.	ใช้วัตถุดิบที่ผลิตในระบบเกษตรอินทรีย์ในปริมาณไม่ต่ำกว่า 90% ของวัตถุแห้ง	/				
8.	วัตถุดิบอาหารสัตว์ที่ใช้เป็นแร่ธาตุ วิตามิน มีแหล่งกำเนิดจากธรรมชาติ		/			
9.	มีน้ำสะอาดให้สัตว์กินอย่างเพียงพอ	/				
10.	ไม่ใช้ยาปฏิชีวนะ ยากันบิด ยาแผนปัจจุบัน สารเร่งการเจริญเติบโต ยูเรีย			/		

หลักการสำคัญของการผลิตปศุสัตว์อินทรีย์		ระดับของความคิดเห็น				
		ใช่มากที่สุด	ใช่มาก	ใช่ปานกลาง	ใช่น้อย	ใช่น้อยที่สุด
11.	มีการจัดระบบป้องกันความปลอดภัยทางชีวภาพอย่างเหมาะสม เช่น การทำวัคซีน กักแยกโคนมที่ป่วย การกักกันโคนมก่อนนำเข้าฝูงใหม่		/			
12.	เลือกใช้สมุนไพรก่อนใช้ยาแผนปัจจุบันหรือยาปฏิชีวนะภายใต้การดูแลของสัตวแพทย์กรณีที่รักษาโคนมที่เจ็บป่วยหรือได้รับบาดเจ็บ		/			
13.	ไม่ใช้วิธีย้ายฝากตัวอ่อนและฮอร์โมนในการขยายพันธุ์โคนม		/			
14.	ไม่ใช้วิธีทางพันธุวิศวกรรมในการดัดแปรพันธุกรรมโคนม		/			
15.	ไม่ใช้เครื่องกระตุ้นไฟฟ้าหรือยากล่อมประสาท	/				
16.	ใช้สารเคมีที่อนุญาตให้ใช้ในระบบปศุสัตว์อินทรีย์		/			
17.	พื้นที่ภายในโรงเรือนไม่น้อยกว่า 4 ตร.ม./ตัว	/				
18.	พื้นที่ภายนอกสำหรับออกกำลัง(ไม่รวมทุ่งเลี้ยงสัตว์) ไม่น้อยกว่า 4.5 ตร.ม./ตัว	/				
19.	มีการจัดการของเสียไม่ทำลายทรัพยากรดินและน้ำ ไม่ทำให้เกิดการปนเปื้อนของไนเตรตและแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในดินและน้ำ		/			
20.	มีหลีกเลี่ยงการเผาทำลายของเสีย ยกเว้นการเผาทำลายซากเพื่อควบคุมโรค	/				

หลักการสำคัญของการผลิตปศุสัตว์อินทรีย์		ระดับของความคิดเห็น				
		ใช่มากที่สุด	ใช่มาก	ใช่ปานกลาง	ใช่น้อย	ใช่น้อยที่สุด
21.	มีการออกแบบการจัดเก็บของเสียที่ไม่ปนเปื้อนสู่ดินและแหล่งน้ำได้		/			
22.	มีการจัดเก็บข้อมูลอย่างครบถ้วนและทันเหตุการณ์ เช่น ทะเบียนโคนมในฟาร์ม แหล่งที่นำเข้าโคนม แหล่งที่นำเข้าอาหารสัตว์และการให้อาหารสัตว์ การดูแลสุขภาพสัตว์ การรักษาสัตว์ การให้ผลผลิตน้ำนมดิบ เป็นต้น	/				
23.	น้ำนมดิบไม่ผ่านการฉายรังสีเพื่อจุดมุ่งหมายในการควบคุมศัตรูพืชและสัตว์ การถนอมอาหาร และการกำจัดจุลินทรีย์ก่อโรคหรือการสุขาภิบาล	/				
24.	ในระหว่างการเก็บรักษา ขนส่ง แปรรูป หรือบรรจุหีบห่อ มีการบ่งชี้ว่าคำว่าน้ำนมดิบอย่างชัดเจน	/				

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

แบบสำรวจข้อมูลฟาร์มและการผลิตน้ำนมดิบในฟาร์มโคนมทั่วไป

1. ข้อมูลทั่วไป *

1.1 ชื่อเจ้าของฟาร์ม: นายสุชาติ สุวรรณทอง

1.2 ระยะเวลาที่เลี้ยงโคนม: 26 ปี

1.3 ที่อยู่: 20/1 ม. 5 ต.มิตรภาพ อ.มวกเหล็ก จ.สระบุรี 18180

1.4 โทร: 083-9839420

1.5 ศูนย์รับน้ำนม: สหกรณ์ไทย-เดนมาร์ก มิตรภาพ

1.6 เบอร์ถังนม: 218

2. ข้อมูลประชากรโค จำนวนโคทั้งหมดในฟาร์ม 99 ตัว *

2.1 แม่โค 2.1.1 โครีดนม 52 ตัว แบ่งเป็น โครีดนมท้อง 15 ตัว และโครีดนมไม่ท้อง 37 ตัว

2.1.2 โคหยุดรีดนม 9 ตัว แบ่งเป็น โคหยุดรีดนมท้อง 8 ตัว และโคหยุดรีดนมไม่ท้อง 1 ตัว

2.2 โคสาว 2.2.1 อายุ 15 เดือน ขึ้นไป ท้อง 18 ตัว

2.2.2 อายุ 15 เดือน ขึ้นไป ไม่ท้อง 8 ตัว

2.3 โครุ่น โคอายุ 4-15 เดือน 9 ตัว

2.4 ลูกโคเพศเมีย โคอายุต่ำกว่า 4 เดือน - ตัว

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

3. **การนำเข้าแม่โคหรือโคสาวจากฟาร์มอื่นเข้ามาเลี้ยงในรอบ 6 เดือนที่ผ่านมา** ☐ มี ☑ ไม่มี

ลำดับที่	**ชื่อโค**	**สถานภาพการให้ผลผลิต**
1		
2		
3		

4. **การคัดทิ้งโคในฟาร์มในรอบ 6 เดือนที่ผ่านมา** ☐ เคย ☑ ไม่เคย

ลำดับที่	**ชื่อโค**	**สาเหตุที่คัดทิ้ง**

5. **ข้อมูลการผลิตน้ำนม** *

เวลารีดนม	**เริ่มรีดนมเวลา**	**รีดนมแม่โคตัวสุดท้ายเสร็จเวลา**
มื้อเช้า	05.00น.	07.30น.
มื้อเย็น	14.00น.	16.00น.
ปริมาณน้ำนมรวม 900-1000	กิโลกรัม/วัน	จำนวนวันรีดนมเฉลี่ย (Average days in milk) 162 วัน
ปริมาณน้ำนมเฉลี่ย 15.5	กิโลกรัม/ตัว/วัน	จำนวนรอบการให้นมเฉลี่ย (Average lactation NO.) = 2

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

6. **คุณภาพน้ำนมดิบ ***

6.1 วิธีการตรวจคุณภาพในฟาร์ม ☐ ไม่มี ☑ CMT ☐ แอลกอฮอล์ (68%) ☐ อื่นๆ โปรดระบุ

6.2 ข้อมูลผลการตรวจองค์ประกอบทางเคมีในน้ำนม (ISO 9622: 2013) และปริมาณ Somatic Cell Count (APHA 17th ed. 2004) ที่ศูนย์รับน้ำนมในรอบ 6 เดือนที่ผ่านมา จากสหกรณ์หรือศูนย์รับน้ำนมดิบ

วันที่	Fat (%)	Protein (%)	Lactose (%)	SNF (%)	TS (%)	SCCx1000 เฉลี่ย (cells/ml)
ก.ค. 63	3.80	3.35	4.61	8.65	12.44	1,112,849
ส.ค. 63	3.89	3.46	4.64	8.76	12.65	908,333
ก.ย. 63	3.88	3.35	4.57	8.63	12.43	825,133
ม.ค. 64	3.72	3.36	4.47	8.66	12.31	1,180,083
ก.พ. 64	3.74	3.27	4.57	8.51	12.10	795,333
มี.ค. 64	3.81	3.24	4.56	8.72	12.17	681,750

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

7. **ข้อมูลการจัดการอาหาร ***

7.1 วัตถุดิบอาหารข้น

ลำดับที่	ฤดูกาล	ชื่อวัตถุดิบ	ส่วนผสม	วิธีการให้
1	ฤดูฝน, ฤดูแล้ง	อาหารข้นสำเร็จรูปโปรตีน 21%	อาหารข้นสำเร็จรูปโปรตีน 17%	ผสมกับอาหารหยาบและให้ขณะรีดนม
2	ฤดูแล้ง	อาหารผสมสำเร็จรูป TMR	ใช้สัดส่วนอาหารข้นต่ออาหารหยาบ เท่ากับ 44 : 56 ประกอบไปด้วย อาหารข้น, ข้าวโพดหมัก, ฟางข้าว และมันเส้น	ผสมกับอาหารข้นสำเร็จรูป

7.2 วัตถุดิบอาหารหยาบ

ลำดับที่	ฤดูกาล	ชื่อวัตถุดิบ	แหล่งที่มา	วิธีการให้
1	ฤดูฝน	ข้าวโพดหมัก ฟางข้าว	ผลิตเอง	ข้าวโพดหมัก : ผสมกับอาหารข้นสำเร็จรูป ฟางข้าว : เสริมให้วัวหลังจากกินอาหารข้นแล้ว
2	ฤดูแล้ง	ฟางข้าว	ผลิตเอง	เสริมให้วัวหลังจากกินอาหารข้นแล้ว

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

8. **ข้อมูลการจัดการในฟาร์มโคนม ตามหลักการทั่วไปของการผลิตโคนมและน้ำนมอินทรีย์ * (โปรด√ ในช่องระดับความคิดเห็นของคุณ)**

หลักการสำคัญของการผลิตปศุสัตว์อินทรีย์		ระดับของความคิดเห็น				
		ใช่มากที่สุด	ใช่มาก	ใช่ปานกลาง	ใช่น้อย	ใช่น้อยที่สุด
1.	โคนมมีความสามารถในการปรับตัวในสภาพแวดล้อมการผลิต และสามารถต้านทานโรค				/	
2.	โคนมเกิดในฟาร์มที่มีการจัดการตามระบบเกษตรอินทรีย์				/	
3.	โคนมถูกเลี้ยงในระบบอินทรีย์ตลอดช่วงชีวิตของโค					/
4.	พื้นที่ไม่ใช้ปุ๋ยเคมี ยากำจัดศัตรูพืชและยาฆ่าหญ้า	/				
5.	พื้นที่ปลูกพืชและพืชอาหารสัตว์ มีระยะปรับเปลี่ยนสำหรับพืชล้มลุก 12 เดือน และพืชยืนต้น 18 เดือน					/
6.	ใช้วัตถุดิบอาหารสัตว์ที่ผลิตจากฟาร์มตนเอง				/	
7.	ใช้วัตถุดิบที่ผลิตในระบบเกษตรอินทรีย์ในปริมาณไม่ต่ำกว่า 90% ของวัตถุแห้ง					/
8.	วัตถุดิบอาหารสัตว์ที่ใช้เป็นแร่ธาตุ วิตามิน มีแหล่งกำเนิดจากธรรมชาติ					/
9.	มีน้ำสะอาดให้สัตว์กินอย่างเพียงพอ		/			
10.	ไม่ใช้ยาปฏิชีวนะ ยากันบิด ยาแผนปัจจุบัน สารเร่งการเจริญเติบโต ยูเรีย					/

หลักการสำคัญของการผลิตปศุสัตว์อินทรีย์		ระดับของความคิดเห็น				
		ใช่มากที่สุด	ใช่มาก	ใช่ปานกลาง	ใช่น้อย	ใช่น้อยที่สุด
11.	มีการจัดระบบป้องกันความปลอดภัยทางชีวภาพอย่างเหมาะสม เช่น การทำวัคซีน กักแยกโคนมที่ป่วย การกักกันโคนมก่อนนำเข้าฝูงใหม่		/			
12.	เลือกใช้สมุนไพรก่อนใช้ยาแผนปัจจุบันหรือยาปฏิชีวนะภายใต้การดูแลของสัตวแพทย์กรณีที่รักษาโคนมที่เจ็บป่วยหรือได้รับบาดเจ็บ					/
13.	ไม่ใช้วิธีย้ายฝากตัวอ่อนและฮอร์โมนในการขยายพันธุ์โคนม	/				
14.	ไม่ใช้วิธีทางพันธุวิศวกรรมในการดัดแปรพันธุกรรมโคนม	/				
15.	ไม่ใช้เครื่องกระตุ้นไฟฟ้าหรือยากล่อมประสาท	/				
16.	ใช้สารเคมีที่อนุญาตให้ใช้ในระบบปศุสัตว์อินทรีย์					/
17.	พื้นที่ภายในโรงเรือนไม่น้อยกว่า 4 ตร.ม./ตัว					/
18.	พื้นที่ภายนอกสำหรับออกกำลัง (ไม่รวมทุ่งเลี้ยงสัตว์) ไม่น้อยกว่า 4.5 ตร.ม./ตัว					/
19.	มีการจัดการของเสียไม่ทำลายทรัพยากรดินและน้ำ ไม่ทำให้เกิดการปนเปื้อนของไนเตรตและแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในดินและน้ำ			/		
20.	มีหลีกเลี่ยงการเผาทำลายของเสีย ยกเว้นการเผาทำลายซากเพื่อควบคุมโรค			/		

หลักการสำคัญของการผลิตปศุสัตว์อินทรีย์		ระดับของความคิดเห็น				
		ใช่มากที่สุด	ใช่มาก	ใช่ปานกลาง	ใช่น้อย	ใช่น้อยที่สุด
21.	มีการออกแบบการจัดเก็บของเสียที่ไม่ปนเปื้อนสู่ดินและแหล่งน้ำได้					/
22.	มีการจัดเก็บข้อมูลอย่างครบถ้วนและทันเหตุการณ์ เช่น ทะเบียนโคนมในฟาร์ม แหล่งที่นำเข้าโคนม แหล่งที่นำเข้าอาหารสัตว์และการให้อาหารสัตว์ การดูแลสุขภาพสัตว์ การรักษาสัตว์ การให้ผลผลิตน้ำนมดิบ เป็นต้น			/		
23.	น้ำนมดิบไม่ผ่านการฉายรังสีเพื่อจุดมุ่งหมายในการควบคุมศัตรูพืชและสัตว์ การถนอมอาหาร และการกำจัดจุลินทรีย์ก่อโรคหรือการสุขาภิบาล	/				
24.	ในระหว่างการเก็บรักษา ขนส่ง แปรรูป หรือบรรจุหีบห่อ มีการบ่งชี้ว่าคำว่าน้ำนมดิบอย่างชัดเจน					/

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ง

การประมวลข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยาก

ตาราง ง.1 ปริมาณสัมพัทธ์จาก $\log_{10}$ peak area (arbitrary unit) ของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากในน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูฝน (กันยายน - ตุลาคม 2563) และฤดูแล้ง (มีนาคม - เมษายน 2564)

กลุ่มสารประกอบเคมี	สารเมตาบอไลต์	ฟาร์มโคนมทั่วไป		ฟาร์มโคนมอินทรีย์		Test significant between effects		
		ฤดูฝน	ฤดูแล้ง	ฤดูฝน	ฤดูแล้ง	Farm	Season	Farm x Season
กรดอะมิโนและอนุพันธ์	Alanine	7.28 ± 0.23^{a}	7.21 ± 0.18^{a}	7.23 ± 0.14^{a}	7.18 ± 0.11^{a}	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
	Betaine	6.90 ± 0.23^{a}	6.66 ± 0.34^{a}	6.78 ± 0.40^{a}	6.64 ± 0.44^{a}	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
	Creatine	7.53 ± 0.25^{a}	7.52 ± 0.13^{a}	7.53 ± 0.14^{a}	7.52 ± 0.13^{a}	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
	Creatine phosphate	7.53 ± 0.24^{a}	7.52 ± 0.12^{a}	7.53 ± 0.14^{a}	7.52 ± 0.13^{a}	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
	Histidine	6.34 ± 0.28^{a}	6.11 ± 0.34^{b}	6.21 ± 0.18^{ab}	6.13 ± 0.12^{b}	$p > 0.05$	$p = 0.020$	$p > 0.05$
	Isoleucine	7.56 ± 0.24^{a}	7.46 ± 0.19^{a}	7.51 ± 0.14^{a}	7.44 ± 0.11^{a}	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
	Proline	7.53 ± 0.25^{a}	7.48 ± 0.17^{a}	7.50 ± 0.16^{a}	7.43 ± 0.13^{a}	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
	Valine	7.32 ± 0.24^{a}	7.24 ± 0.19^{a}	7.28 ± 0.14^{a}	7.22 ± 0.11^{a}	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

กลุ่มสารประกอบเคมี	สารเมตาบอไลต์	ฟาร์มโคนมทั่วไป		ฟาร์มโคนมอินทรีย์		Test significant between effects		
		ฤดูฝน	ฤดูแล้ง	ฤดูฝน	ฤดูแล้ง	Farm	Season	Farm x Season
คาร์โบไฮเดรตและอนุพันธ์	1,6-Anhydro-β-D-glucose	8.23 ± 0.14^{a}	7.92 ± 0.12^{c}	8.11 ± 0.10^{b}	8.12 ± 0.13^{b}	$p > 0.05$	$p = 0.000$	$p = 0.00$
	Galactose	7.99 ± 0.20^{a}	7.95 ± 0.16^{a}	7.97 ± 0.14^{a}	7.91 ± 0.12^{a}	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
	Glucose	7.99 ± 0.16^{a}	7.78 ± 0.22^{b}	7.99 ± 0.17^{a}	7.71 ± 0.23^{b}	$p > 0.05$	$p = 0.00$	$p > 0.05$
	Lactose	10.15 ± 0.20^{a}	10.17 ± 0.11^{a}	10.18 ± 0.07^{a}	10.15 ± 0.20^{a}	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
	N-acetylglucosamine	7.76 ± 0.23^{a}	7.70 ± 0.16^{a}	7.78 ± 0.11^{a}	7.72 ± 0.10^{a}	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
	Uridine	6.66 ± 0.38^{a}	6.55 ± 0.29^{a}	6.67 ± 0.31^{a}	6.58 ± 0.30^{a}	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
สารประกอบคาร์บอนิล	Acetone	6.81 ± 0.26^{a}	6.77 ± 0.20^{a}	6.78 ± 0.18^{a}	6.69 ± 0.14^{a}	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
	1,3-Dihydroxyacetone	7.20 ± 0.22^{ab}	7.16 ± 0.18^{ab}	7.31 ± 0.16^{a}	7.06 ± 0.17^{b}	$p > 0.05$	$p = 0.003$	$p = 0.046$
กรดอินทรีย์	Acetoacetate	7.32 ± 0.22^{b}	7.61 ± 0.20^{a}	7.14 ± 0.30^{c}	7.58 ± 0.11^{a}	$p > 0.05$	$p = 0.000$	$p > 0.05$
	Acetate	7.07 ± 0.23^{a}	7.01 ± 0.18^{a}	7.01 ± 0.15^{a}	6.98 ± 0.11^{a}	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
	Butyrate	7.06 ± 0.25^{a}	7.01 ± 0.20^{a}	7.02 ± 0.16^{a}	6.95 ± 0.12^{a}	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
	Citrate	8.38 ± 0.23^{a}	8.37 ± 0.11^{a}	8.34 ± 0.10^{a}	8.43 ± 0.08^{a}	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
	Formate	6.53 ± 0.29^{a}	6.26 ± 0.61^{b}	6.40 ± 0.17^{ab}	6.37 ± 0.12^{ab}	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
	Fumarate	5.90 ± 0.38^{a}	5.83 ± 0.36^{a}	5.72 ± 0.39^{a}	5.79 ± 0.35^{a}	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

กลุ่มสารประกอบเคมี	สารเมตาบอไลต์	ฟาร์มโคนมทั่วไป		ฟาร์มโคนมอินทรีย์		Test significant between effects		
		ฤดูฝน	ฤดูแล้ง	ฤดูฝน	ฤดูแล้ง	Farm	Season	Farm x Season
	Hippurate	7.14 ± 0.32 [a]	7.03 ± 0.31 [a]	7.03 ± 0.14 [a]	7.02 ± 0.13 [a]	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
	Hydroxybutyrate	7.42 ± 0.25 [a]	7.29 ± 0.20 [ab]	7.32 ± 0.14 [ab]	7.26 ± 0.10 [b]	$p > 0.05$	$p = 0.045$	$p > 0.05$
	Isobutyrate	7.14 ± 0.23 [a]	7.10 ± 0.22 [a]	7.11 ± 0.13 [a]	7.05 ± 0.10 [a]	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
	Lactate	7.63 ± 0.27 [a]	7.65 ± 0.20 [a]	7.70 ± 0.13 [a]	7.63 ± 0.12 [a]	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
	Oxoglutarate	7.19 ± 0.29 [a]	7.13 ± 0.18 [a]	7.15 ± 0.23 [a]	7.04 ± 0.23 [a]	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
	Succinate	6.69 ± 0.35 [a]	6.67 ± 0.16 [a]	6.68± 0.18 [a]	6.60 ± 0.18 [a]	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
	Valerate	7.88 ± 0.24 [a]	7.78 ± 0.19 [a]	7.82 ± 0.14 [a]	7.76 ± 0.11 [a]	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
อนุพันธ์ของไขมัน	Acetylcarnithine	6.67 ± 0.30 [a]	6.42 ± 0.37 [b]	6.41 ± 0.43 [b]	6.50 ± 0.18 [ab]	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
	Carnitine	7.83 ± 0.19 [b]	7.88 ± 0.11 [ab]	7.91± 0.11 [ab]	7.97 ± 0.09 [a]	$p = 0.016$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
	Choline	7.74 ± 0.21 [a]	7.62 ± 0.18 [a]	7.70 ± 0.11 [a]	7.62 ± 0.13 [a]	$p > 0.05$	$p = 0.023$	$p > 0.05$
	Glycerophosphocholine	7.53 ± 0.25 [a]	7.61 ± 0.20 [a]	7.61 ± 0.14 [a]	7.58 ± 0.11 [a]	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
	Phosphocholine	8.00 ± 0.19 [a]	8.02± 0.15 [a]	8.03 ± 0.10 [a]	8.05 ± 0.09 [a]	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
แอลกฮอลล์	Ethanol	7.44 ± 0.23 [a]	7.40 ± 0.18 [a]	7.38 ± 0.15 [a]	7.37 ± 0.10 [a]	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$

หมายเหตุ : a และ b แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตาราง ง.2 ความเข้มข้น (mM) ของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากในน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูฝน (กันยายน - ตุลาคม 2563) และฤดูแล้ง (มีนาคม - เมษายน 2564)

กลุ่มสารประกอบเคมี	สารเมตาบอไลต์	ฟาร์มโคนมทั่วไป		ฟาร์มโคนมอินทรีย์		Test significant between effects		
		ฤดูฝน	ฤดูแล้ง	ฤดูฝน	ฤดูแล้ง	Farm	Season	Farm x Season
กรดอะมิโนและอนุพันธ์	Alanine	0.13 ± 0.05 [a]	0.12 ± 0.03 [a]	0.11 ± 0.03 [a]	0.10 ± 0.02 [a]	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
	Betaine	1.16 ± 0.34 [a]	1.12 ± 0.19 [a]	1.21 ± 0.23 [a]	1.15 ± 0.22 [a]	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
	Creatine	0.44 ± 0.13 [a]	0.40 ± 0.07 [a]	0.43 ± 0.11 [a]	0.46 ± 0.07 [a]	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
	Creatine phosphate	0.52 ± 0.15 [a]	0.46 ± 0.08 [a]	0.51 ± 0.12 [a]	0.54 ± 0.08 [a]	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
	Histidine	0.09 ± 0.03 [a]	0.08 ± 0.03 [a]	0.09 ± 0.03 [a]	0.08 ± 0.01 [a]	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
	Isoleucine	0.10 ± 0.05 [a]	0.09 ± 0.03 [a]	0.09 ± 0.03 [a]	0.08 ± 0.01 [a]	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
	Proline	0.44 ± 0.19 [a]	0.39 ± 0.17 [a]	0.44 ± 0.15 [a]	0.41 ± 0.10 [a]	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
	Valine	0.08 ± 0.03 [a]	0.07 ± 0.03 [a]	0.07 ± 0.02 [a]	0.06 ± 0.01 [a]	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
คาร์โบไฮเดรตและอนุพันธ์	1,6-Anhydro-β-D-glucose	0.79 ± 0.36 [a]	0.76 ± 0.34 [a]	0.85 ± 0.22 [a]	0.75 ± 0.16 [a]	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
	Galactose	0.55 ± 0.16 [a]	0.52 ± 0.25 [ab]	0.40 ± 0.19 [b]	0.46 ± 0.14 [ab]	$p = 0.033$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
	Glucose	0.63 ± 0.25 [a]	0.55 ± 0.24 [a]	0.55 ± 0.21 [a]	0.56 ± 0.16 [a]	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

กลุ่มสารประกอบเคมี	สารเมตาบอไลต์	ฟาร์มโคนมทั่วไป		ฟาร์มโคนมอินทรีย์		Test significant between effects		
		ฤดูฝน	ฤดูแล้ง	ฤดูฝน	ฤดูแล้ง	Farm	Season	Farm x Season
	Lactose	61.34±15.03 [a]	51.84±9.50 [b]	66.71±11.33 [a]	59.22±8.77 [ab]	p = 0.035	p = 0.006	p > 0.05
	N-acetylglucosamine	0.75 ± 0.27 [a]	0.65 ± 0.22 [a]	0.60 ± 0.20 [a]	0.60 ± 0.16 [a]	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05
	Uridine	0.05 ± 0.08 [ab]	0.03 ± 0.02 [b]	0.12 ± 0.19 [a]	0.03 ± 0.01 [b]	p > 0.05	p = 0.042	p > 0.05
สารประกอบคาร์บอนิล	Acetone	0.03 ± 0.01 [a]	0.03 ± 0.00 [a]	0.03 ± 0.01 [a]	0.02 ± 0.00 [a]	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05
	1,3-Dihydroxyacetone	0.54 ± 0.21 [a]	0.72 ± 0.42 [a]	0.58 ± 0.14 [a]	0.53 ± 0.22 [a]	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05
กรดอินทรีย์	Acetoacetate	0.11 ± 0.04 [a]	0.09 ± 0.10 [a]	0.07 ± 0.05 [a]	0.05 ± 0.01 [a]	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05
	Acetate	0.10 ± 0.05 [ab]	0.11 ± 0.03 [a]	0.09 ± 0.03 [b]	0.10 ± 0.03 [ab]	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05
	Butyrate	0.32 ± 0.18 [a]	0.20 ± 0.06 [b]	0.23 ± 0.06 [b]	0.20 ± 0.03 [b]	p > 0.05	p = 0.005	p > 0.05
	Citrate	5.65 ± 2.18 [ab]	4.57 ± 0.72 [b]	4.62 ± 1.82 [b]	6.11 ± 0.83 [a]	p > 0.05	p > 0.05	p = 0.002
	Formate	0.04 ± 0.02 [a]	0.04 ± 0.02 [a]	0.03 ± 0.01 [a]	0.03 ± 0.00 [a]	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05
	Fumarate	0.02 ± 0.00 [a]	0.02 ± 0.01 [ab]	0.02 ± 0.00 [ab]	0.01 ± 0.01 [b]	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05
	Hippurate	0.06 ± 0.02 [a]	0.06 ± 0.02 [ab]	0.05 ± 0.01 [ab]	0.05 ± 0.01 [b]	p = 0.049	p > 0.05	p > 0.05
	Hydroxybutyrate	0.42 ± 0.23 [a]	0.25 ± 0.09 [b]	0.26 ± 0.10 [b]	0.24 ± 0.05 [b]	p = 0.033	p = 0.008	p = 0.048
	Isobutyrate	0.03 ± 0.02 [a]	0.03 ± 0.01 [a]	0.03 ± 0.00 [a]	0.03 ± 0.00 [a]	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

กลุ่มสารประกอบเคมี	สารเมตาบอไลต์	ฟาร์มโคนมทั่วไป		ฟาร์มโคนมอินทรีย์		Test significant between effects		
		ฤดูฝน	ฤดูแล้ง	ฤดูฝน	ฤดูแล้ง	Farm	Season	Farm x Season
	Lactate	0.15 ± 0.06^{a}	0.15 ± 0.05^{a}	0.14 ± 0.06^{ab}	0.10 ± 0.02^{b}	$p = 0.025$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
	Oxoglutarate	0.14 ± 0.06^{a}	0.12 ± 0.02^{ab}	0.14 ± 0.04^{a}	0.11 ± 0.03^{b}	$p > 0.05$	$p = 0.019$	$p > 0.05$
	Succinate	0.03 ± 0.02^{a}	0.03 ± 0.01^{ab}	0.03 ± 0.01^{ab}	0.02 ± 0.00^{b}	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
	Valerate	0.31 ± 0.21^{a}	0.14 ± 0.03^{b}	0.20 ± 0.06^{b}	0.15 ± 0.04^{b}	$p > 0.05$	$p = 0.001$	$p > 0.05$
อนุพันธ์ของไขมัน	Acetylcarnithine	0.09 ± 0.05^{a}	0.06 ± 0.02^{b}	0.09 ± 0.04^{a}	0.09 ± 0.02^{a}	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
	Carnitine	0.22 ± 0.09^{a}	0.19 ± 0.05^{a}	0.21 ± 0.07^{a}	0.18 ± 0.04^{a}	$p > 0.05$	$p = 0.041$	$p > 0.05$
	Choline	0.32 ± 0.11^{a}	0.21 ± 0.12^{bc}	0.27 ± 0.07^{ab}	0.18 ± 0.05^{c}	$p > 0.05$	$p = 0.000$	$p > 0.05$
	Glycerophosphocholine	0.69 ± 0.18^{b}	0.71 ± 0.14^{b}	0.75 ± 0.19^{b}	0.90 ± 0.15^{a}	$p = 0.007$	$p = 0.046$	$p > 0.05$
	Phosphocholine	0.32 ± 0.21^{b}	0.32 ± 0.11^{b}	0.49 ± 0.15^{a}	0.35 ± 0.12^{b}	$p = 0.015$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
แอลกอฮอลล์	Ethanol	0.15 ± 0.07^{b}	0.25 ± 0.05^{a}	0.14 ± 0.05^{b}	0.23 ± 0.03^{a}	$p > 0.05$	$p = 0.000$	$p > 0.05$

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

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตาราง ง.3 ความเข้มข้นของกรดไขมัน (mg/100g fat) ในน้ำนมดิบที่ได้จากฟาร์มโคนมอินทรีย์และฟาร์มโคนมทั่วไปในช่วงฤดูฝน (กันยายน - ตุลาคม 2563) และฤดูแล้ง (มีนาคม - เมษายน 2564)

ประเภทกลุ่มของกรดไขมัน	ข้อมูลกรดไขมัน	ฟาร์มโคนมทั่วไป		ฟาร์มโคนมอินทรีย์		Test significant between effects		
		ฤดูฝน	ฤดูแล้ง	ฤดูฝน	ฤดูแล้ง	Farm	Season	Farm x Season
กรดไขมันชนิดอิ่มตัว	Butyric acid	0.32 ± 0.02^{b}	0.33 ± 0.02^{ab}	0.35 ± 0.02^{a}	0.30 ± 0.01^{c}	*p*>0.05	*p*=0.007	*p*=0.000
	Caproic acid	0.68 ± 0.05^{b}	0.73 ± 0.07^{a}	0.62 ± 0.06^{c}	0.50 ± 0.04^{d}	*p*=0.000	*p*=0.008	*p*=0.000
	Caprylic acid	0.75 ± 0.07^{a}	0.77 ± 0.07^{a}	0.60 ± 0.08^{b}	0.47 ± 0.07^{c}	*p*=0.000	*p*=0.006	*p*=0.00
	Capric acid	2.19 ± 0.26^{a}	2.28 ± 0.29^{a}	1.73 ± 0.30^{b}	1.30 ± 0.26^{b}	*p*=0.000	*p*=0.022	*p*=0.001
	Undecanoic acid	0.28 ± 0.05^{a}	0.27 ± 0.02^{a}	0.14 ± 0.04^{b}	0.11 ± 0.02^{c}	*p*=0.000	*p*>0.05	*p*>0.05
	Lauric acid	4.10 ± 0.39^{b}	3.96 ± 0.46^{bc}	5.45 ± 1.04^{a}	3.55 ± 0.45^{c}	*p*=0.006	*p*=0.000	*p*=0.000
	Tridecanoic acid	0.19 ± 0.04^{a}	0.19 ± 0.03^{a}	0.14 ± 0.04^{b}	0.10 ± 0.03^{c}	*p*=0.000	*p*=0.026	*p*>0.05
	Myristic acid	11.80 ± 0.77^{a}	12.02 ± 0.66^{a}	11.57 ± 1.37^{a}	9.10 ± 0.91^{b}	*p*=0.000	*p*=0.000	*p*=0.000
	Pentadecanoic acid	1.07 ± 0.18^{ab}	1.12 ± 0.13^{a}	0.98 ± 0.16^{bc}	0.88 ± 0.09^{c}	*p*=0.000	*p*>0.05	*p*=0.042
	Palmitic acid	30.68 ± 2.24^{a}	31.17 ± 1.25^{a}	31.01 ± 2.40^{a}	25.35 ± 1.02^{b}	*p*=0.000	*p*=0.000	*p*=0.000
	Margaric acid	0.71 ± 0.05^{b}	0.73 ± 0.05^{ab}	0.75 ± 0.05^{a}	0.66 ± 0.05^{c}	*p*>0.05	*p*=0.005	*p*=0.000
	Stearic acid	12.88 ± 2.03^{c}	13.48 ± 1.26^{c}	16.29 ± 1.82^{b}	19.46 ± 1.51^{a}	*p*=0.000	*p*=0.000	*p*=0.005

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประเภทกลุ่มของกรดไขมัน	ข้อมูลกรดไขมัน	ฟาร์มโคนมทั่วไป		ฟาร์มโคนมอินทรีย์		Test significant between effects		
		ฤดูฝน	ฤดูแล้ง	ฤดูฝน	ฤดูแล้ง	Farm	Season	Farm x Season
	Arachidic acid	0.20 ± 0.04 [c]	0.21 ± 0.02 [bc]	0.22 ± 0.02 [ab]	0.23 ± 0.02 [a]	*p*=0.004	*p*>0.05	*p*>0.05
	Heneicosanoic acid	0.01 ± 0.00 [b]	0.01 ± 0.01 [b]	0.02 ± 0.00 [a]	0.02 ± 0.00 [a]	*p*=0.000	*p*>0.05	*p*>0.05
	Behenic acid	0.05 ± 0.02 [c]	0.06 ± 0.01 [b]	0.05 ± 0.02 [bc]	0.07 ± 0.01 [a]	*p*=0.033	*p*=0.000	*p*>0.05
	Lignoceric acid	0.03 ± 0.03 [ab]	0.05 ± 0.05 [a]	0.01 ± 0.01 [b]	0.01 ± 0.01 [b]	*p*=0.002	*p*>0.05	*p*>0.05
กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว พันธะคู่ 1 ตำแหน่ง	Myristoleic acid	1.32 ± 0.30 [a]	1.14 ± 0.18 [a]	0.66 ± 0.21 [b]	0.57 ± 0.14 [b]	*p*=0.000	*p*=0.017	*p*>0.05
	Palmitoleic acid	2.46 ± 0.36 [a]	2.11 ± 0.29 [b]	1.35 ± 0.37 [c]	1.35 ± 0.37 [c]	*p*=0.000	*p*>0.05	*p*>0.05
	Heptadecenoic acid	0.22 ± 0.03 [a]	0.21 ± 0.03 [a]	0.22 ± 0.04 [a]	0.17 ± 0.05 [b]	*p*=0.013	*p*=0.006	*p*>0.05
	Elaidic acid	2.65 ± 0.43 [b]	2.22 ± 0.54 [bc]	2.15 ± 0.25 [c]	5.38 ± 0.56 [a]	*p*=0.000	*p*=0.000	*p*=0.000
	Oleic acid	22.74 ±1.77 [b]	22.77± 1.95 [b]	22.56 ± 2.77 [b]	24.99 ± 1.74 [a]	*p*>0.05	*p*=0.027	*p*=0.030
	Eicosenoic acid	0.18 ± 0.03 [a]	0.18 ± 0.05 [a]	0.11 ± 0.02 [b]	0.13 ± 0.02 [b]	*p*=0.000	*p*>0.05	*p*>0.05
กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว พันธะคู่หลายตำแหน่ง	Linolelaidic acid	0.28 ± 0.03 [b]	0.26 ± 0.03 [b]	0.28 ± 0.02 [b]	0.57 ± 0.03 [a]	*p*=0.000	*p*=0.000	*p*=0.000
	Linoleic acid	2.78 ± 0.26 [a]	2.45 ± 0.29 [b]	1.69 ± 0.52 [c]	3.03 ± 0.25 [a]	*p*>0.05	*p*=0.000	*p*=0.000
	gamma-Linoleic acid	0.03 ± 0.01 [a]	0.03 ± 0.01 [a]	0.02 ± 0.00 [b]	0.02 ± 0.01 [b]	*p*=0.000	*p*>0.05	*p*>0.05
	Linolenic acid	0.16 ± 0.02 [c]	0.13 ± 0.01 [d]	0.19 ± 0.02 [b]	0.38 ± 0.04 [a]	*p*=0.000	*p*=0.000	*p*=0.000

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประเภทกลุ่มของกรดไขมัน	ข้อมูลกรดไขมัน	ฟาร์มโคนมทั่วไป		ฟาร์มโคนมอินทรีย์		Test significant between effects		
		ฤดูฝน	ฤดูแล้ง	ฤดูฝน	ฤดูแล้ง	Farm	Season	Farm x Season
	CLA	0.84 ± 0.16 [b]	0.67 ± 0.29 [c]	0.51 ± 0.04 [d]	1.00 ± 0.19 [a]	*p*>0.05	*p*=0.002	*p*=0.000
	Eicosadienoic acid	0.02 ± 0.01 [ab]	0.01 ± 0.01 [b]	0.02 ± 0.02 [ab]	0.03 ± 0.04 [a]	*p*>0.05	*p*>0.05	*p*>0.05
	Dihomo-gamma-linolenic acid	0.14 ± 0.02 [a]	0.14 ± 0.02 [a]	0.09 ± 0.01 [b]	0.10 ± 0.04 [b]	*p*=0.000	*p*>0.05	*p*>0.05
	Arachidonic acid	0.20 ± 0.03 [a]	0.18 ± 0.02 [ab]	0.17 ± 0.03 [b]	0.14 ± 0.02 [c]	*p*=0.000	*p*=0.001	*p*>0.05
	Adrenic acid	0.00 ± 0.01 [a]	0.00 ± 0.01 [a]	0.01 ± 0.02 [a]	0.01 ± 0.02 [a]	*p*>0.05	*p*>0.05	*p*>0.05
	DPA : Docosapentaenoic acid	0.00 ± 0.00 [b]	0.00 ± 0.00 [b]	0.02 ± 0.03 [a]	0.01± 0.02 [ab]	*p*=0.000	*p*>0.05	*p*>0.05
	SFA	65.96 ±2.08 [b]	67.38 ± 2.78 [b]	69.96 ± 3.37 [a]	62.14 ± 1.59 [c]	*p*>0.05	*p*=0.000	*p*=0.000
	MUFA	29.58 ±1.91 [b]	28.74 ±2.66 [bc]	27.05 ± 2.99 [c]	32.60 ± 1.70 [a]	*p*>0.05	*p*=0.000	*p*=0.000
	PUFA	4.54 ± 0.34 [b]	4.04 ± 0.28 [c]	3.06 ± 0.54 [d]	5.35 ± 0.35 [a]	*p*>0.05	*p*=0.000	*p*=0.000

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

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ธนิตาภรณ์ เผื่อนพงษ์
วัน เดือน ปี เกิด	13 กันยายน 2539
สถานที่เกิด	นครราชสีมา
วุฒิการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีวเคมี ภาคชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ที่อยู่ปัจจุบัน	45/136 หมู่บ้าน Villagio รังสิต คลอง 2 ตำบลคลองสอง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120
ผลงานตีพิมพ์	1. Phuenpong T., Duangmal K., Mekboonsonglarp W., Chantaprasarn N., Settachaimongkon S. (2021). Molecular signatures of organic liquid milk products in Thailand revealed by 1H-NMR metabolomics approach. Proceedings of the 23rd Food Innovation Asia Conference 2021, June 17-18, 2021, BITEC, Bangkok, Thailand. pp. 2-10. 2. Phuenpong T., Kongboonkird M., Duangmal K., Lerdvorasap W., Suksawwawimon M., Mekboonsonglarp W., Nuamchit J., Chantaprasarn N., Settachaimongkon S. (2021). Molecular discrimination between organic and conventional liquid milk products in Thailand using 1H-NMR metabolomics approach. Tropical Animal Science Journal, 44(4), 478-488.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY