โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การจำแนกชนิดของกุ้งเคยสกุลอะซิเตสและสกุลมีโซโพดอพซิสในกะปิพื้นเมืองด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด

Identification of krill genera *Acetes* and *Mesopodopsis* in Thai local shrimp paste by DNA barcoding technique

ชื่อนิสิต นางสาวมุฑิตา พิทักษ์ตรัยรัตน์ **เลขประจำตัว** 5832139023

ภาควิชา พฤกษศาสตร์

ปีการศึกษา 2561

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the senior project authors' files submitted through the faculty.

การจำแนกชนิดของกุ้งเคยสกุลอะซิเตสและสกุลมีโซโพดอพซิสในกะปิพื้นเมืองไทยด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด

นางสาวมุฑิตา พิทักษ์ตรัยรัตน์

โครงงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2561

Identification of krill genera *Acetes* and *Mesopodopsis* in Thai local shrimp paste by DNA barcoding technique

Miss Muthita Pitaktrairat

A Senior Project Submitted in Partial Fulfillment of The Requirement

For the Degree of Bachelor of Science in Genetics

Department of Botany

Faculty of Science, Chulalongkorn University

Academic Year 2018

ชื่อเรื่อง	การจำแนกชนิดของกุ้งเคยสกุลอะซิเตสและสกุลมีโซโพดอพซิส ในกะปิพื้นเมืองไทยด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด Identification of krill genera *Acetes* and *Mesopodopsis* in Thai local shrimp paste by DNA barcoding technique
ชื่อนิสิต	นางสาวมุทิตา พิทักษ์ตรัยรัตน์
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชมภูนุช กลิ่นวงษ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล
ปีการศึกษา	2561

ภาควิชาพฤกษศาสตร์ อนุมัติให้โครงงานวิทยาศาสตร์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์

คณะกรรมการสอบโครงงานวิทยาศาสตร์

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชมภูนุช กลิ่นวงษ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีรดา หวังสมบูรณ์ดี)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง การจำแนกชนิดของกุ้งเคยสกุลอะซิเตสและสกุลมีโซโพดอพซิสในกะปีพื้นเมืองไทยด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด
ชื่อนิสิต นางสาวมุฑิตา พิทักษ์ตรัยรัตน์
ภาควิชา พฤกษศาสตร์
สาขาวิชา พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชมภูนุช กลิ่นวงษ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล
ปีการศึกษา 2561

บทคัดย่อ

กะปี เป็นอาหารหมักพื้นเมืองที่ใช้ปรุงแต่งอาหารให้เกิดรสชาติ ส่วนประกอบหลักที่ใช้ในการทำกะปีคือ กุ้งเคยกับเกลือ ซึ่งชนิดของกุ้งเคยที่นิยมนำมาทำกะปี แบ่งออกเป็น 2 สกุล ได้แก่ สกุลอะซิเตสและสกุลมีโซโพดอพซิส งานวิจัยนี้ได้สนใจทำการจำแนกชนิดของกุ้งเคยในกะปีทั้งหมด 8 ตัวอย่าง จาก 3 แหล่ง คือ กะปีคลองโคน (จังหวัดสมุทรสงคราม) และกะปีชลบุรี (จังหวัดชลบุรี) และกะปีเทพา (จังหวัดสงขลา) โดยใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดและใช้ยีน *cytochrome c oxidase subunit I* (*COI*) ในการระบุชนิดกุ้งเคย เนื่องจากยีน *COI* มีความแตกต่างมากเพียงพอที่จะสามารถระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันและต่างชนิดกันออกจากกันได้ รวมถึงได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ไขมันทั้งหมด โซเดียมคลอไรด์และโอเมก้า 3 ในกะปีด้วยวิธีมาตรฐาน AOAC จากผลการวิเคราะห์พบว่า กะปีคลองโคน (KK3) มีปริมาณโปรตีนและปริมาณไขมันทั้งหมดสูงที่สุด มีค่าเท่ากับร้อยละ 29.76 และ 3.17 ตามลำดับ กะปีเทพา (TP1) มีปริมาณโซเดียมสูงที่สุดเท่ากับร้อยละ 33.38 และกะปีชลบุรี (SR3) มีปริมาณโอเมก้า 3 สูงที่สุดเท่ากับร้อยละ 0.86 เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วพบว่า กุ้งเคยในกะปี KK3, TP1 และ SR3 คือ *Acetes japonicus* จากการทดลองอาจสรุปได้ว่า เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดมีความเหมาะสมที่จะใช้ในการระบุชนิดของกุ้งเคยอย่างรวดเร็วในผลิตภัณฑ์กะปี และพบว่ากะปีต่างชนิดที่มี *Acetes japonicus* เป็นส่วนประกอบ จะให้คุณค่าทางโภชนาการในปริมาณที่ต่างกัน ซึ่งอาจเป็นผลจากปริมาณกุ้งเคยและกระบวนการในการทำกะปีที่แตกต่างกันในแต่ละท้องถิ่น

คำสำคัญ : กะปี, เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด, ยีน *cytochrome c oxidase subunit I* (*COI*), กุ้งเคยสกุลอะซิเตสและกุ้งเคยสกุลมีโซโพดอพซิส

Title	Identification of krill genera *Acetes* and *Mesopodopsis* in Thai local shrimp paste by DNA barcoding technique
Name	Miss Muthita Pitaktrairat
Department	Botany
Program	Genetics
Advisor	Assist. Prof. Dr. Chompunuch Glinwong
Co-advisor	Assoc. Prof. Dr. Warawut Chulalaksananukul
Academic year	2018

Abstract

Shrimp paste is a traditional fermented food which is used to add flavor to food. The main components in shrimp paste are krill and salt. The type of krill that can make shrimp paste is divided into 2 genera: *Acetes* and *Mesopodopsis*. This research has identified 8 samples of krill in shrimp paste from 3 sources: Klong Kone shrimp paste (Samut Songkhram province), Chonburi shrimp paste (Chonburi province), and Tepa shrimp paste (Songkhla province). By using the DNA barcoding technique and the *cytochrome c oxidase subunit I* (*COI*) gene to identify krill species, because the *COI* gene has a large enough difference to be able to identify the same species and different species. Including analysis of protein content, total fat, sodium chloride and omega 3 in shrimp paste with AOAC standard method. From the results, it was found that Klong Kone shrimp paste (KK3) had the highest protein and total fat which is 29.76 and 3.17 percent respectively. Tepa shrimp paste (TP1) had the highest sodium, is 33.38 percent and Chonburi shrimp paste (SR3) had the highest omega 3, is equal to 0.86 percent. The analysis of nucleotide sequences indicated that the specie of krill in shrimp paste KK3, TP1 and SR3 is *Acetes japonicus*. From the experiment, it may be concluded that the DNA barcode technique is appropriate to applied for rapid krill species identification in shrimp paste products and found that different types of shrimp paste containing *Acetes japonicus* will provide different nutrients because it may be the effect from the quantities of krill and the process of making shrimp paste differentially in each locality.

Keywords: shrimp paste, DNA barcoding technique, *cytochrome c oxidase subunit I* (*COI*) gene, *Acetes, Mesopodopsis*

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชมภูนุช กลิ่นวงษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน และ รองศาสตราจารย์ ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานร่วม ที่กรุณาสั่งสอน อบรม และให้กำลังใจตลอดการทำโครงงานในครั้งนี้

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีรดา หวังสมบูรณ์ดี ที่ให้คำแนะนำ และข้อคิดเห็นในการปรับปรุงรายงานฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กรณ์รวี เอี่ยมสมบูรณ์ ที่ได้ให้คำปรึกษาแนะนำและให้ความรู้ในเรื่องการจำแนกทางสัณฐานวิทยาของกุ้งเคย ทำให้โครงงานนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอกราบขอบคุณห้องปฏิบัติการ 106 ห้องปฏิบัติการวิจัยเชื้อเพลิงชีวภาพด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสถานที่สำหรับการทำโครงงาน และขอขอบคุณ นางสาวสุพัตรา เลิศศรีวงษ์ นางสาวมนัสชยา เนื่องจุ้ย และสมาชิกในห้องปฏิบัติการทุกคนที่คอยให้คำปรึกษาและให้กำลังใจตลอดการทำโครงงาน

ขอกราบขอบคุณภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และอาจารย์ในภาควิชาทุกท่าน ที่คอยอบรมสั่งสอนและให้ความรู้โดยตลอดมา

ขอขอบคุณเงินทุนสนับสนุนโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา รวมทั้งเพื่อน ๆ พี่ ๆ และน้อง ๆ ทุกคน สำหรับกำลังใจและการสนับสนุนตลอดมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญกราฟ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูปภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การตรวจเอกสารของงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินการ	13
บทที่ 4 ผลการทดลอง	17
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผล	29
เอกสารอ้างอิง	31

สารบัญกราฟ

หน้า

กราฟที่ 1 ปริมาณโปรตีน ปริมาณไขมันทั้งหมด และปริมาณโซเดียมคลอไรด์
ในตัวอย่างกะปิทั้ง 8 ชนิด จากการทดสอบด้วยวิธีมาตรฐาน AOAC 23
กราฟที่ 2 ปริมาณโอเมก้า 3 ในตัวอย่างกะปิทั้ง 8 ชนิด
จากการทดสอบด้วยวิธีมาตรฐาน AOAC 23

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ลักษณะที่แตกต่างกันระหว่าง *Acetes erytraeus*, *Acetes indicus* และ *Acetes japonicus* 5

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์บริเวณที่มียีน *COI* 16

ตารางที่ 3 ตัวอย่างกะปิทั้ง 8 ชนิดที่รวบรวมได้จากทั้ง 3 จังหวัด 20

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยจากการวัดปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างกุ้งเคยและตัวอย่างกะปิด้วย Epoch microplate spectrophotometer 25

ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* จากตัวอย่างกะปิ 28

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1. ลักษณะของกุ้งเคยสกุล *Acetes* 4
รูปที่ 2. *Acetes erythraeus* 5
รูปที่ 3. *Acetes indicus* 6
รูปที่ 4. *Acetes japonicus* 6
รูปที่ 5. ลักษณะของกุ้งเคยสกุล *Mesopodopsis* 7
รูปที่ 6. กุ้งเคยที่ผ่านการทำความสะอาดเคยและคัดแยกสิ่งแปลกปลอมออก
โดยชาวบ้านจากหมู่บ้านชาวประมงอำเภอเทพา 9
รูปที่ 7. กุ้งเคยที่ผ่านการหมักเกลือแล้วนำมาตากแดด
โดยชาวบ้านจากหมู่บ้านชาวประมงอำเภอเทพา 10
รูปที่ 8. ลักษณะของกุ้งเคยที่จับได้โดยวิธีการดักเคย 17
รูปที่ 9. ลักษณะของ *Acetes erythraeus* 18
รูปที่ 10. ลักษณะของกุ้งเคยที่ได้จากการรุนเคย 18
รูปที่ 11. ลักษณะ apex of telson ของ *Acetes japonicus* 19
รูปที่ 12. ผลของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างกุ้งเคยและกะปิ
โดยการตรวจสอบด้วย 0.8% agarose gel 25
รูปที่ 13. ผลของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน COI จากตัวอย่างกะปิ
โดยการตรวจสอบด้วย 1.5% agarose gel 26
รูปที่ 14. ผลของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน COI จากตัวอย่างกุ้งเคย
โดยการตรวจสอบด้วย 1.5% agarose gel 27

บทที่ 1

บทนำ

กะปิ (shrimp paste) เป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักพื้นเมืองที่นิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลาย ทั้งในทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และทางตอนใต้ของประเทศจีน โดยใช้เป็นส่วนประกอบในการปรุงรสชาติอาหารให้ดีขึ้น แม้ปริมาณการบริโภคในแต่ละครั้งจะไม่มากนัก แต่ความต้องการบริโภคกะปิก็มีเพิ่มขึ้น มีการส่งออกไปยังประเทศต่างๆ โดยเฉพาะประเทศสหรัฐอเมริกา เพราะกะปิเป็นเครื่องปรุงที่เกี่ยวเนื่องกับการขยายตัวของธุรกิจร้านอาหารไทยในต่างประเทศ การบริโภคกะปิมี 2 แบบ ได้แก่ การบริโภคสด ในรูปของเครื่องปรุงน้ำพริก รับประทานกับผลไม้เปรี้ยว และการบริโภคหลังจากผ่านความร้อน โดยเป็นองค์ประกอบของเครื่องแกง กะปิหลน ข้าวคลุกกะปิ เป็นต้น (อุไรวรรณ วัฒนกุล และคณะ, 2554) ซึ่งนอกจากจะเพิ่มรสชาติให้แก่อาหารแล้ว กะปียังอุดมไปด้วยสาระสำคัญต่างๆ มากมาย ได้แก่ แคลเซียม วิตามินบี 12 วิตามินดี และโอเมก้า 3 (นวพร ศรีวงษ์ชัย, 2557 : ออนไลน์)

การผลิตกะปิ พบมากในบริเวณที่มีพื้นที่ติดกับทะเล รวมทั้งบริเวณปากอ่าวไทยแถบจังหวัดสมุทรสงคราม สมุทรปราการ สมุทรสาครและเพชรบุรี เป็นต้น เนื่องจากส่วนประกอบหลักของการผลิตกะปิคือ กุ้งเคย (สุรินทร์พร ยิ้มกัน, 2560 : ออนไลน์) กุ้งเคย จัดเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในกลุ่มครัสเตเชียนเช่นเดียวกับกุ้งและปู มีรูปร่างคล้ายกุ้ง แต่มีขนาดเล็กกว่า มีเปลือกที่บางและนิ่ม ที่บริเวณหัวไม่มีกรีแหลมๆเหมือนกุ้ง มักอยู่รวมกันเป็นฝูงที่บริเวณน้ำลึกไม่เกิน 2 เมตร ตามบริเวณชายฝั่งทะเล หรือบริเวณปากแม่น้ำ กุ้งเคยสามารถนำมาแปรรูปเป็นอาหารได้หลายอย่าง เนื่องจากกุ้งเคยมีสารอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงและมีประโยชน์ต่อร่างกาย ชนิดของกุ้งเคยที่นิยมนำมาผลิตกะปิ แบ่งออกเป็น 2 สกุล ได้แก่ กุ้งเคยในสกุลอะซีเตส (*Acetes*) ซึ่งจัดอยู่ในอันดับเดคาโพดา (Decapoda) หรือที่ชาวบ้านเรียกกันว่า เคยหางแดง กุ้งเคยชนิดนี้มีลักษณะที่สำคัญคือ ที่โคนหางจะมีจุดสีชมพูปนแดง ขนาดที่พบส่วนใหญ่ประมาณ 1-4 เซนติเมตร มักพบบริเวณชายทะเลที่มีหาดเป็นทราย และกุ้งเคยสกุลมีโซโพดอพซิส (*Mesopodopsis*) จัดอยู่ในอันดับไมสิดาเซีย (Mysidacea) หรือที่ชาวบ้านเรียกกันว่า เคยตาดำ มีลักษณะที่สำคัญคือ โคนแพนหางมีลักษณะคล้ายฟองอากาศ และมีถุงไข่ติดบริเวณท้องในเพศเมีย ขนาดที่พบส่วนใหญ่ประมาณ 0.6-1.2 เซนติเมตร มักพบบริเวณแหล่งน้ำกร่อยที่มีพื้นเป็นเลน โดยกุ้งเคยสกุลอะซีเตสมักจะถูกนำมาผลิตกะปิมากกว่าสกุลมีโซโพดอสซิส เนื่องจากมีขนาดที่ใหญ่กว่า โดยฤดูกาลจับ

เคยของแต่ละพื้นที่จะแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับสภาพอากาศและลมมรสุม (นงนุช ตั้งเกริกโอฬาร, 2554 : ออนไลน์)

สำหรับกรรมวิธีในการทำกะปินั้น เริ่มจากชาวประมงจะทำการรุนเคยขึ้นมาทำความสะอาด แล้วนำกุ้งเคยมาหมักด้วยด้วยเกลือสมุทร จากนั้นนำไปผึ่งแดดให้แห้งพอหมาด แล้วนำมาบดหรือตำให้ละเอียด อัดใส่ภาชนะให้แน่น แล้วหมักตามสูตรและระยะเวลาที่เหมาะสม (สุนทร ตรีนันทวัน, 2553 : ออนไลน์) กะปิแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกันทั้งในด้านของคุณภาพ วัตถุดิบ กรรมวิธีการผลิต ไปตามแต่ละท้องถิ่นนั้นๆ โดยชนิดของกุ้งเคยที่แตกต่างกันก็จะให้สารอาหารที่ต่างกันด้วย การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของกะปิสามารถทำได้ด้วยวิธีมาตรฐานของ Association Official of Analytical Chemist (AOAC, International) ส่วนการจำแนกชนิดของกุ้งเคยสามารถใช้เทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลมาใช้ในการตรวจสอบชนิด ซึ่งในปัจจุบันนิยมใช้ เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcoding technique) ซึ่งเป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ ยีนที่นิยมใช้ ได้แก่ ยีน *cytochrome c oxidase I* (*COI*) เป็นยีนที่อยู่บนไมโทคอนเดรียมีขนาดประมาณ 650 คู่เบส (ดุจฤดี ปานพรหมมินทร์ และนนทรี ปานพรหมมินทร์, 2557) สามารถเพิ่มปริมาณด้วย universal primer ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ครอบคลุมขอบเขตของความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในกลุ่มสัตว์ได้อย่างดี นอกจากนี้ลำดับดีเอ็นเอของยีน *COI* ยังให้ความแตกต่างในสัตว์ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากได้อีกด้วย ซึ่งดีเอ็นเอบาร์โค้ดมีข้อดีคือ เป็นวิธีที่ให้ผลรวดเร็ว ถูกต้อง แม่นยำสูง และเหมาะสำหรับบุคคลที่ไม่มีความรู้หรือเชี่ยวชาญด้านอนุกรมวิธานโดยเฉพาะ (พรณรงค์ สิริปิยะสิงห์ และอรุณรัตน์ ฉวีราช, 2554)

ดังนั้น โครงงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจในการใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจำแนกชนิดของกุ้งเคยในผลิตภัณฑ์กะปิ โดยสนใจศึกษากะปิจากสามแหล่ง คือ กะปิเทพาจากจังหวัดสงขลา ภาคใต้ กะปิคลองโคนจากจังหวัดสมุทรสงคราม ภาคกลาง และกะปิชลบุรีจากจังหวัดชลบุรี ภาคตะวันออก ซึ่งกะปิทั้งสามแหล่งได้รับการยอมรับทั่วไปว่าเป็นกะปิที่มีคุณภาพดี มีกลิ่นและรสชาติที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัว เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้รับการสนับสนุนจากโครงการหนึ่งตำบลหนึ่งผลิตภัณฑ์ของกลุ่มเครือข่ายวิสาหกิจชุมชน เพื่อสามารถนำไปใช้ในการเปรียบเทียบคุณค่าทางโภชนาการของกุ้งเคยแต่ละชนิดที่นำมาทำเป็นกะปิและเพื่อเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาคุณค่าทางโภชนาการของกะปิในแต่ละพื้นที่

วัตถุประสงค์

เพื่อใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจำแนกชนิดของกุ้งเคยในผลิตภัณฑ์กะปิ

บทที่ 2

การตรวจเอกสารของงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. กะปิพื้นเมือง

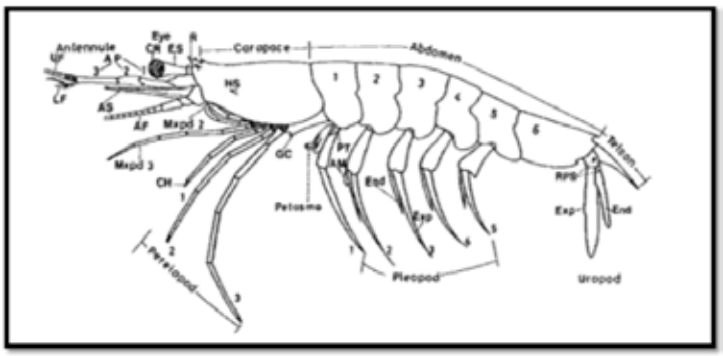
กะปิ เป็นคำที่ใช้เรียกเครื่องปรุงอาหารชนิดหนึ่งที่ชาวบ้านนิยมนำมาประกอบการปรุงอาหาร เกิดขึ้นจากภูมิปัญญาของบรรพบุรุษมานับพันปี เพื่อถนอมอาหารสัตว์น้ำทะเลที่หาได้จำนวนมากเอาไว้เป็นอาหารให้คงอยู่ได้นานขึ้นหรือจำหน่ายแจกจ่าย ปัจจุบันกะปิเป็นที่นิยมอย่างมากทั้งในทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และทางตอนใต้ของประเทศจีน ซึ่งแต่ละประเทศจะมีชื่อเรียกที่แตกต่างกันไป เช่น อินโดนีเซียเรียกเตอราซี มาเลเซียเรียกเบลาจัน ฟิลิปปินส์เรียกบาโกอุง เมียนมาร์เรียกงาปิ เซนซะ และไทยเรียกว่ากะปิ โดยส่วนใหญ่กะปิผลิตมาจากการหมักกุ้งเคยกับเกลือ ซึ่งมีคุณค่าทางโภชนาการสูงเป็นแหล่งที่ดีของโปรตีนและแคลเซียม (Chaijan and Panpipat, 2012)

ชนิดของกุ้งเคยที่ใช้ในการผลิตกะปิ

กุ้งเคยหรือเคย เป็นสัตว์น้ำขนาดเล็กที่นักวิทยาศาสตร์จัดให้อยู่ในจำพวกแพลงก์ตอน ซึ่งกำหนดไว้ว่าเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่ลอยอยู่ในน้ำ และถูกพัดพาไปตามกระแสน้ำ รวมทั้งสิ่งมีชีวิตขนาดใหญ่ที่ไม่สามารถเคลื่อนที่ทวนน้ำได้ ดังนั้น การแพร่กระจายของแพลงก์ตอนจึงขึ้นอยู่กับการไหลของมวลน้ำที่อาศัยอยู่ เคยจัดอยู่ในพวกแพลงก์ตอนสัตว์ เป็นพวก omnivorous หากินตามหน้าดิน กินอาหารพวกสาหร่าย ไรน้ำเค็ม และพวกครัสตาเชียนขนาดเล็ก มีบทบาทสำคัญในห่วงโซ่อาหารในทะเล โดยเป็นตัวเชื่อมระหว่างซากสิ่งมีชีวิตและสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กกับสัตว์น้ำ โดยประโยชน์ของเคยมีหลายด้าน ทั้งทางด้านการศึกษาทางเคมี หรือการใช้ประโยชน์เป็นองค์ประกอบของอาหารสัตว์น้ำ นอกจากนี้ยังเป็นทรัพยากรทางธรรมชาติทางทะเลที่สำคัญ เนื่องจากเคยสามารถนำมาประกอบอาหารได้ เช่น การนำเคยมาหมักทำเป็นกะปิ โดยกะปิที่หมักจากเคยในธรรมชาติส่วนใหญ่จะนิยมใช้เคยเพียง 2 ชนิดเท่านั้น ได้แก่

1. เคยหางแดง จัดอยู่ในอันดับเดคาโพดา (Decapoda) สกุลอะซีเตส (*Acetes*) มีชื่อเรียกด้วยกันหลายชื่อ เช่น เคยใหญ่ เคยหยาบ เคยโกร่ง เคยดอกเลา มีลักษณะคล้ายกุ้งขนาดเล็ก แต่ลำตัวแบน มีความยาวประมาณ 10-40 มิลลิเมตร รูปร่างที่เห็นได้ชัดคือส่วนของเปลือกที่คลุมหัวจะมีกรีสั้นหรือไม่มี มีจุดสีแดงจำนวนมากบริเวณส่วนหาง มีลำตัวที่โปร่งแสง โดยสีตัวขึ้นอยู่กับแหล่งที่อยู่ เช่น อยู่บนพื้นทรายตัวเคยพบมีสีชมพู หนวดยาวและมีสีชมพูปนแดง ถ้าอาศัยอยู่บน

พื้นที่เป็นโคลน ลำตัวมักมีสีขาว หนวดสีขาว ขาว่ายน้ำมีโคลนติด มีดวงตาสีดำหนึ่งคู่ (รูปที่ 1) เคยในสกุลนี้มีแหล่งอาศัยอยู่ทั้งในป่าชายเลนและแนวหญ้าทะเล จะพบได้ตั้งแต่ผิวน้ำจนถึงระดับความลึกประมาณ 20 เมตร และว่องไวในเวลากลางคืน กินอาหารพวกแพลงก์ตอนพืช และ dinoflaggellates เป็นหลัก เคยในสกุลอะซีเตสมีวงจรชีวิตสั้นเพียงแค่ประมาณ 3-10 เดือน และจะตายไปหลังจากวางไข่ได้ไม่นาน (จินตนา ชูเหล็ก, 2540)

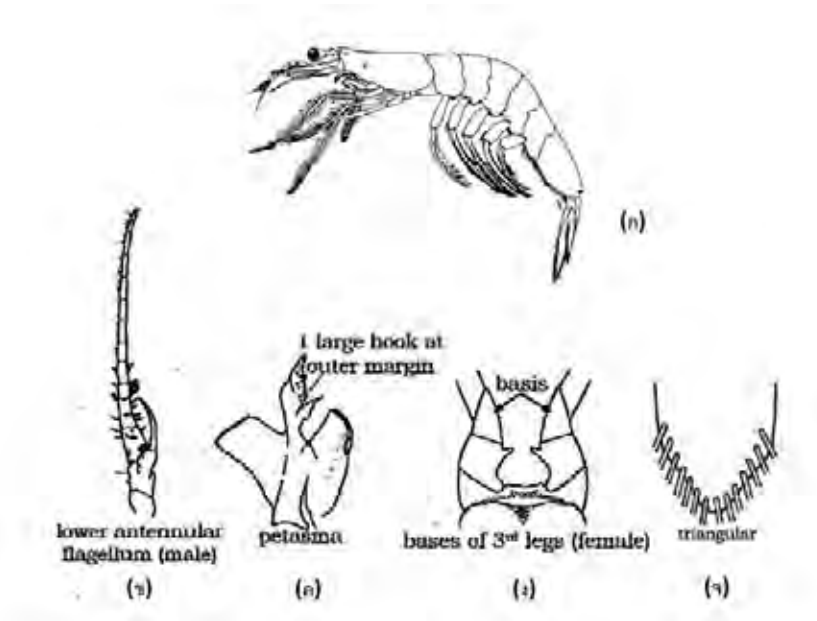


รูปที่ 1 ลักษณะของกุ้งเคยสกุล *Acetes* (Omori, 1975)

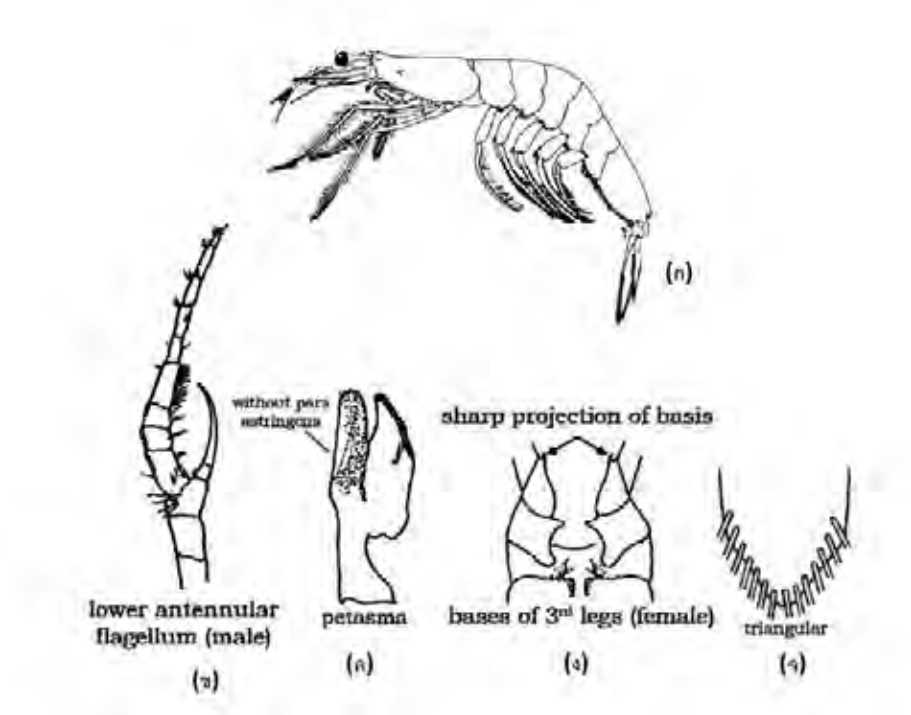
จากการศึกษาชนิดและการแพร่กระจายของกุ้งเคยสกุล *Acetes* บริเวณแหล่งหญ้าทะเลและคลองป่าชายเลน ฝั่งทะเลอันดามัน สามารถจำแนกชนิดของกุ้งเคยสกุล *Acetes* ออกได้เป็น 3 ชนิด คือ *Acetes erytraeus* (รูปที่ 2ก), *Acetes indicus* (รูปที่ 3ก) และ *Acetes japonicus* (รูปที่ 4ก) โดยกุ้งเคยแต่ละชนิด จะมีลักษณะหนวดคู่ล่าง petasma, thelycum และหางที่แตกต่างกัน ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1 (วีระชาติ เพ็งจำรัส และทิพามาศ อุปน้อย, 2548)

ตารางที่ 1 ลักษณะที่แตกต่างกันระหว่าง *Acetes erytraeus*, *Acetes indicus* และ *Acetes japonicus*

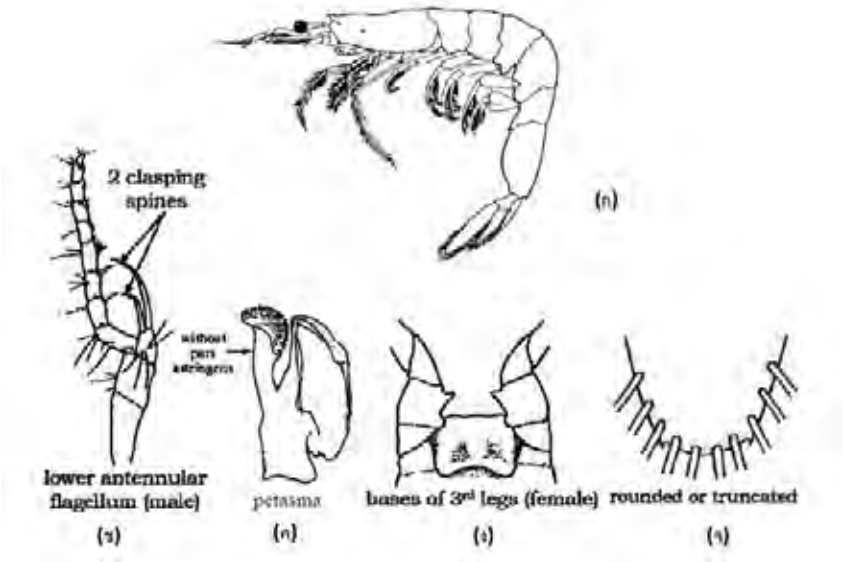
ลักษณะที่ใช้เปรียบเทียบ	*A. erytraeus*	*A. indicus*	*A. japonicus*
1. หนวดคู่ล่างlower antennular (♂)	มี clasping spine 1 อัน (รูปที่ 2ข)	มี clasping spine 1 อัน (รูปที่ 3ข)	มี clasping spine 2 อัน (รูปที่ 4ข)
2. Petasma (♂)	มี hook ขนาดใหญ่ 1 อัน (รูปที่ 2ค)	มีแผ่นด้านข้างเพียงด้านเดียว (รูปที่ 3ค)	มีแผ่นด้านข้างเพียงด้านเดียว (รูปที่ 4ค)
3. Thelycum และฐานขาเดินคู่ที่ 3 (♀)	โคนขาเรียบไม่มีติ่งร่องอกตื้น (รูปที่ 2ง)	โคนขามีติ่งแหลมร่องอกลึกเห็นได้ชัด (รูปที่ 3ง)	แผ่น thelycum ขนาดใหญ่ปิดทับเลยช่วงอก (รูปที่ 4ง)
4. หาง apex of telson (♂, ♀)	ปลายหางมีลักษณะเรียว ค่อนข้างแหลมเป็นรูปสามเหลี่ยม (รูปที่ 2จ)	ปลายหางมีลักษณะเรียว ค่อนข้างแหลมเป็นรูปสามเหลี่ยม (รูปที่ 3จ)	ปลายหางมีลักษณะกลมคล้ายรอยตัดตรงปลาย (รูปที่ 4จ)



รูปที่ 2 *Acetes erythraeus* (ก) whole body, (ข) lower antennular (male), (ค) petasma (male), (ง) thelycum (female), (จ) apex of telson (Chan ,1998)

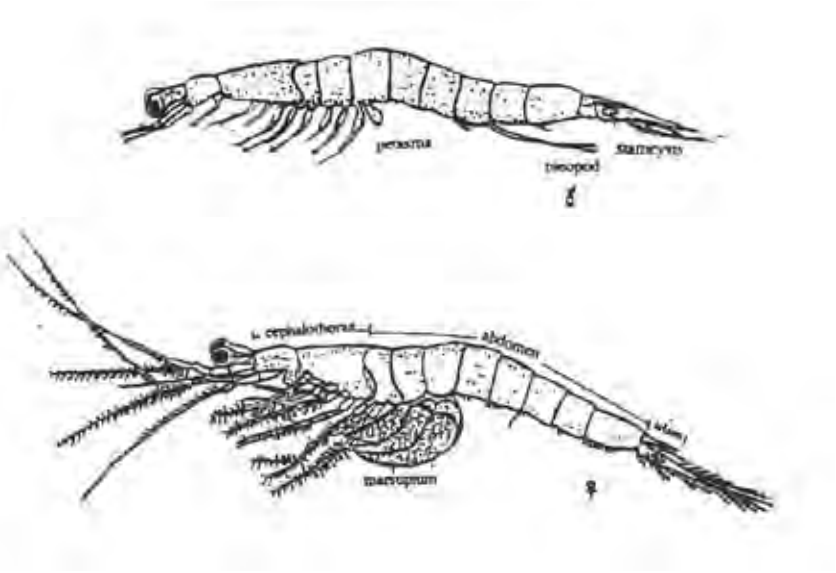


รูปที่ 3 *Acetes indicus* (ก) whole body, (ข) lower antennular (male), (ค) petasma (male), (ง) thelycum (female), (จ) apex of telson (Chan ,1998)



รูปที่ 4 *Acetes japonicus* (ก) whole body, (ข) lower antennular (male), (ค) petasma (male), (ง) thelycum (female), (จ) apex of telson (Chan ,1998)

2. เคยตาดำ จัดอยู่ในอันดับไมสิดาเซีย (Mysidacea) สกุลมีโซโพดอพซิส (*Mesopodopsis*) เคยชนิดนี้มีรูปร่างคล้ายกุ้งขนาดเล็ก มีทั้งขนาดตัวเล็กและขนาดตัวใหญ่ มีขนาดอยู่ระหว่าง 10-30 มิลลิเมตร มีลักษณะที่สำคัญคือ บริเวณโคนแพนหางจะมีลักษณะคล้ายฟองกาศ มิลลิเมตร ตาดำ หนวดยาว สีแดง 2 เส้น ลำตัวแบน มีทั้งใสและขุ่น ส่วนท้อง 5 ปล้องแรกมีขาว่ายน้ำ (pleopod) ปล้องละ 1 คู่ ปกติขาว่ายน้ำมีขนาดเล็ก โดยตัวผู้มีขาว่ายน้ำคู่ที่ 4 ยาวกว่าคู่อื่นๆ และเปลี่ยนรูปไปใช้ในการผสมพันธุ์ ปลายหางเรียกว่า telson สองข้างของปลายหางมีแผ่นแบนเรียกว่ายูโรพอด (uropod) ลักษณะเด่นอีกอย่างหนึ่งคือที่โคนฐานของยูโรพอดทั้ง 2 ข้าง มีอวัยวะที่เรียกว่าสเตโตซีสต์ (statocyst) ซึ่งมีลักษณะเป็นวงกลมขนาดเล็กคล้ายกับหยดน้ำมันภายในมีหินปูน (statolith) เป็นอวัยวะใช้ในการทรงตัว ตัวเมียมีถุงเก็บไข่อยู่ด้านท้องของส่วนอก 1 ถุง จึงมีชื่อเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า กุ้งโอปอสซั่ม (Opossum shrimp) (รูปที่ 5) (มาลินี ฉัตรมงคลกุล และชิดชัย จันทร์ตั้งสี, 2548) เคยชนิดนี้ชอบอยู่รวมกันเป็นกลุ่มในบริเวณชายฝั่งและเขตน้ำกร่อย ในช่วงเวลากลางวันจะอยู่ใต้พื้นทะเล ในช่วงเวลากลางคืนจะขึ้นสู่ผิวน้ำเพื่อการสืบพันธุ์ มีลักษณะพิเศษ คือ เมื่อนำมาหมักกับเกลือ ตัวเคยจะสลายเป็นเนื้อเดียวกัน เหลือแต่ตาสีดำๆอยู่ในเนื้อกะปิ เนื้อเคยจะมีความนุ่มนิ่มและมีกลิ่นหอมเป็นพิเศษ (Eusebio, Coloso, and Gapasin, 2010)



รูปที่ 5 ลักษณะของกุ้งเคยสกุล *Mesopodopsis* เพศผู้ (บน) และเพศเมีย (ล่าง) (Shirota, 1966)

การจับเคย

ฤดูกาลของการจับเคยจะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง ทั้งระดับความเค็มของน้ำ สภาพอากาศและลมมรสุม เนื่องจากเคยเป็นสัตว์น้ำขนาดเล็ก เมื่อถูกกระแสน้ำและกระแสลมมากระทบก็จะถูกพัดไปตามแรงคลื่นและแรงลม จากการศึกษาปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับการจับเคย พบว่ามีปัจจัยหลายชนิดที่ส่งผลต่อปริมาณกุ้งเคย โดยในช่วงที่น้ำมีความเค็มสูงจะมีปริมาณเคยมากกว่าช่วงที่น้ำมีความเค็มต่ำ และจะพบปริมาณเคยในช่วงฤดูแล้งมากกว่าฤดูฝน หากมีกระแสน้ำกร่อยไหลลงทะเลแรง เคยจะทิ้งตัวลงใกล้พื้นทะเล รอกระแสน้ำเพื่อลอยตัวเข้าสู่ป่าชายเลน และในแถบชายทะเลที่สภาพเป็นหาดเลน จะมีปริมาณอาหารให้เคยมากกว่าสภาพที่เป็นหาดทราย โดยฤดูกาลการจับเคยของแต่ละจังหวัดจะแตกต่างกันไปตามฤดูลมมรสุม เช่น จังหวัดชลบุรี ฉะเชิงเทรา สมุทรปราการ สมุทรสาคร และเพชรบุรี จะมีการทำการประมงเกือบตลอดทั้งปี จังหวัดนครศรีธรรมราชจนถึงจังหวัดนราธิวาส จะมีเคยชุกช่วงอยู่ระหว่างเดือนมกราคมถึงมีนาคม (นงนุช ตั้งเกริกโอฬาร, 2554 : ออนไลน์) วิธีที่นิยมใช้จับเคยมี 2 วิธี คือ การรุนเคย โดยเครื่องมือที่นิยมใช้ในการจับเคย ได้แก่ ละวะรุนเคย เป็นเครื่องมือขนาดเล็ก มีลักษณะคล้ายสวิงดักลูกปลา บริเวณปากเปิดกว้างเหมือนสวิง ลำตัวค่อยๆ รีลงไปเรื่อยๆ จนท้ายสุดปลายแหลมและเล็ก ในสมัยก่อนวัสดุที่นำมาใช้ทำละวะคือผ้ามุ้งเก่าๆนำมาตัดเย็บ แต่ในปัจจุบันมีการพัฒนานำใยสังเคราะห์เหนียวมาใช้แทนผ้ามุ้ง เนื่องจากมีทนทานมากกว่าเป็นอย่างมาก สามารถไถหรือรุนเคยด้วยคนเพียงคนเดียว เหมาะกับน้ำตื้น (สัจจภูมิ ละออ, 2561) และเครื่องมืออีกชนิดหนึ่งเรียกว่า อวนรุนเคย เป็นตาข่ายตาถี่ นำมาเย็บเป็นถุงหรือช้อนขนาดใหญ่ นิยมใช้มากในแถบภาคใต้ โดยใช้อวนตาถี่ใส่เรือออกไปวางอวนล้อมจับเคยในทะเลซึ่งไม่ไกลจากชายฝั่งทะเลมากนัก ส่วนอีกวิธีหนึ่ง คือ การรอเคย นิยมใช้เครื่องมือรอเคยที่ทำด้วยละวะปากกว้างประมาณ 4 เมตร ยาวประมาณ 6 เมตร ปักลงด้วยไม้ไผ่แล้วลงละวะกางขวางกระแสน้ำเพื่อดักเคย โดยผู้จับเคยด้วยวิธีนี้จะต้องมีความชำนาญในเรื่องการใช้เครื่องมือและเรื่องลักษณะของน้ำ (วีระ เทพกรณ์, 2558ก)

ขั้นตอนการหมักเคยเป็นกะปิ

การหมักเคยให้เป็นกะปิที่มีคุณภาพตามที่บรรพบุรุษถ่ายทอดองค์ความรู้นั้น โดยส่วนประกอบหลักของการทำกะปิคือ ตัวเคยและเกลือสมุทร ซึ่งกรรมวิธีการผลิตกะปิอาศัยหลักการเช่นเดียวกับการผลิตน้ำปลา โดยจะอาศัยเอนไซม์จากตัวกุ้ง ซึ่งจะเป็นตัวที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก การย่อยสลายโดยเอนไซม์โดยการย่อยโปรตีนและไขมัน ซึ่งเป็นผลทำให้เกิดสารประกอบที่ทำให้เกิดกลิ่น รส ของผลิตภัณฑ์ ขั้นตอนการ

ทำกะปิเริ่มจากการทำความสะอาดกุ้งเคย เพื่อให้สิ่งสกปรกต่างๆ หลุดออกมา โดยหลังจากชาวประมงจับกุ้งเคยได้แล้วจะใช้ตะแกรงตาถี่ๆ ร่อนตัวเคย ใช้น้ำทะเลทำความสะอาดเพื่อให้กุ้งเคยคงความสด และไม่เสียรสชาติที่ดีของกะปิ จากนั้นสะเด็ดน้ำออก (รูปที่ 6) แล้วนำเคยสดที่ได้มาผสมกับเกลือ โดยเกลือที่ใช้คือเกลือสมุทร หากใช้เกลืออื่นจะให้รสชาติเค็มจัด อัตราส่วนในการใส่เกลือนั้นก็จะแตกต่างกันไปในแต่ละท้องที่ โดยทั่วไปมักใช้อัตราส่วนเกลือ 1 ส่วนต่อกุ้งเคย 10 ส่วน เมื่อคลุกเคล้าเข้ากันดีแล้วจะทำการเกรอะ โดยนำกุ้งเคยที่หมักเกลือไปพักไว้โดยใส่ในภาชนะที่มีช่องระบาย เช่น ตะกร้าหรือห่อด้วยอวนตาถี่แล้วทับด้วยวัสดุหนักๆ เพื่อให้น้ำออกไปบางส่วนและปล่อยให้เคยสลายตัวผสมกับน้ำเกลือ ตั้งทิ้งไว้ 1-2 คืน ต่อมานำกะปิที่หมักไว้มาตากแดด (รูปที่ 7) โดยสามารถทำได้ 2 วิธี คือ การตากแห้ง จะใช้ตะแกรงถี่ๆ หรืออวนรองใต้เคย เพื่อให้น้ำหยดลงด้านล่างได้ และการตากเปียก จะนำกะปิไปตากบนผ้าพลาสติกหรือผ้ายาง ซึ่งวิธีการตากเปียกนี้คุณค่าทางอาหารของกุ้งเคยจะไม่สูญไปกับน้ำเหมือนการตากแห้ง (สยามกะปิ, 2560 : ออนไลน์) โดยการตากกะปิจะตากที่แดดจัดประมาณ 3 แดดติดต่อกัน จากนั้นนำกะปิที่ตากแดดมาตำหรือโขลกในครกไม้ให้ละเอียด วิธีนี้จะช่วยให้เนื้อกะปิเข้ากันมากขึ้น บรรจุกะปิลงภาชนะหมัก ซึ่งภาชนะที่นิยมใช้คือ ถังไม้หรือโอ่งเคลือบ โดยการบรรจุกะปิจะต้องอัดกะปิลงไปให้แน่นไม่ให้มีช่องว่าง เพื่อป้องกันการทำปฏิกิริยาระหว่างเนื้อกะปิกับอากาศ ซึ่งจะทำให้เกิดกลิ่นไม่พึงประสงค์ นอกจากนี้ยังป้องกันไม่ให้น้ำกะปิซึมออกมา ซึ่งเป็นการรักษาคุณภาพของเนื้อกะปิและรสชาติของกะปิเอาไว้ไม่ให้เปลี่ยนแปลง จากนั้นโรยเกลือเม็ดปิดหน้ากะปิ เพื่อช่วยรักษาผิวหน้าของกะปิเอาไว้ โดยสามารถเก็บกะปิไว้ได้นานกว่า 6-7 เดือน ปิดฝาภาชนะให้แน่นเพื่อป้องกันแมลงและหนอน หลังจากที่หมักกะปิได้ที่แล้ว จะนำเคยที่ได้มาบรรจุในภาชนะที่มีฝาปิดสนิทสามารถจำหน่ายและเก็บไว้ใช้ได้นาน โดยนำไปแช่เย็นหรือเก็บไว้ในที่ร่ม (Mantiri, Ohtsuka, and Sawamoto, 2012)

รูปที่ 6 กุ้งเคยที่ผ่านการทำความสะอาดและคัดแยกสิ่งแปลกปลอมออก
โดยชาวบ้านจากหมู่บ้านชาวประมงอำเภอเทพา

รูปที่ 7 กุ้งเคยที่ผ่านการหมักเกลือแล้วนำมาตากแดด
โดยชาวบ้านจากหมู่บ้านชาวประมงอำเภอเทพา

สารอาหารในผลิตภัณฑ์กะปิ

กะปิในแต่ละท้องถิ่นมีวิธีการผลิตที่แตกต่างกัน จึงทำให้ส่วนผสม รสชาติ ตลอดจนคุณค่าทางอาหารของกะปิเหล่านั้นแตกต่างกันออกไป โดยพบว่ากะปิแต่ละชนิดจะมีองค์ประกอบของโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน โซเดียมคลอไรด์ ความชื้น เถ้า และกากในปริมาณที่แตกต่างกัน (เพ็ญ ทองน้อย, 2533) ซึ่งในระหว่างกระบวนการการหมักกะปิ จะเกิดการย่อยสลายโปรตีนจากเนื้อกุ้งเคยออกมาเป็นกรดอะมิโนอิสระ โดยพบว่าองค์ประกอบของกรดอะมิโน Glu และ Asp เป็นส่วนประกอบสำคัญที่ส่งผลต่อรสชาติและกลิ่นของกะปิ โดยกรดกลูตามิกจะให้รสชาติอูมามิ (umami) ส่วนกรดแอสพาติกจะให้รสหวาน (Pongsetkul et al., 2015) นอกจากนี้ยังพบว่ากะปิมีส่วนประกอบของโอเมก้า 3 ซึ่งได้มาจากส่วนผสมกุ้งเคยในกะปิ (Glinwong et al., 2018) โดยโอเมก้า 3 เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว มีความจำเป็นต่อร่างกาย ซึ่งร่างกายไม่สามารถสร้างเองได้ มีส่วนช่วยในเรื่องของการป้องกันการสะสมตัวของไขมันอิ่มตัวหรือคอเลสเตอรอลอันเป็นสาเหตุให้เส้นเลือดอุดตันที่นำไปสู่โรคหัวใจและเส้นเลือดในสมองแตก (Wangein, 2018 : online)

2. ดีเอ็นเอบาร์โค้ด

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด เป็นวิธีการทางชีววิทยาระดับโมเลกุลที่มีการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอช่วงสั้นๆ เพื่อใช้ในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดภายในระยะเวลาอันรวดเร็ว ซึ่งสามารถช่วยระบุตัวอย่างที่ยังไม่ทราบชนิด ทำให้พบสิ่งมีชีวิตชนิดใหม่มากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่มีความซับซ้อน ยากต่อการระบุชนิดโดยสัณฐานวิทยา และเพื่อลดความผิดพลาดในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตต่างๆ โดยบริเวณที่ใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดจะต้องเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความแตกต่างมากพอที่จะทำให้แยกสิ่งมีชีวิตต่างชนิดออกจากกันได้ แต่ต้องมี

ความแตกต่างภายในชนิดเดียวกันต่ำมากหรือไม่มีเลย และเป็นดีเอ็นเอที่มีบริเวณอนุรักษ์ที่สามารถให้ไพร์เมอร์ที่เป็น universal primer เข้ามาจับเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณนั้นด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ ซึ่งการเลือกบริเวณที่จะนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดมีความสำคัญมาก หากเลือกบริเวณที่นำมาใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดได้เหมาะสมกับชนิดของสิ่งมีชีวิตที่จะศึกษาจะทำให้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดเป็นเทคนิคที่สามารถนำไปใช้ได้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว (Ivanova et al., 2007) โดยดีเอ็นเอบาร์โค้ดมีประโยชน์อย่างมากต่อนักอนุกรมวิธานและบุคคลทั่วไปที่ไม่มีความชำนาญทางด้านอนุกรมวิธานและสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับศาสตร์สาขาอื่นได้ เช่น การศึกษาทางด้านนิเวศวิทยา นิติวิทยาศาสตร์ และการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพและเภสัชภัณฑ์ เป็นต้น จากการศึกษาที่ผ่านมา มีการใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจำแนกชนิดของสัตว์หลากหลายชนิด เพื่อใช้จัดกลุ่มสิ่งมีชีวิตตามความสัมพันธ์ในเชิงวิวัฒนาการ เพื่อใช้ในการอนุรักษ์สัตว์ที่ใกล้สูญพันธุ์ หรือเพื่อเป็นประโยชน์ทางด้านสาธารณสุข เช่น ในการจำแนกชนิดของแมลงอันดับ Diptera ซึ่งเป็นแมลงที่ถูกจัดว่าเป็นพาหะนำเชื้อโรคมาติดต่อสู่คน สามารถก่อปัญหาทางด้านสาธารณสุขเป็นอย่างมาก จึงต้องมีการเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของแมลงกลุ่มนี้อยู่เสมอ โดยในการจำแนกชนิดของแมลงโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวไม่สามารถแยกความแตกต่างของแมลงบางชนิดได้อย่างชัดเจน เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดจึงถูกนำมาใช้ในการจำแนกชนิดของแมลง โดยสามารถแยกความแตกต่างของกลุ่มแมลงที่มีลักษณะทางสัณฐานแบบซับซ้อนได้ ซึ่งมีความสำคัญในการควบคุมการแพร่ระบาดของแมลงพาหะ และยังเป็นฐานข้อมูลเพื่อใช้ในการศึกษากลุ่มสิ่งมีชีวิตอื่นต่อไป (เกศรินทร์ ทิพย์เพ็ชร์, ณรงค์ จัตุรัส, และนพวรรณ บุญชู, 2561)

3. เครื่องหมายดีเอ็นเอ

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA Marker) คือ บริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอช่วงหนึ่งที่ใช้บ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต ซึ่งนอกจากจะสามารถใช้เพื่อศึกษาการจัดเรียงของดีเอ็นเอแล้วยังสามารถใช้ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมและศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตได้ โดยบริเวณของยีนที่อยู่บนดีเอ็นเอนั้นสามารถศึกษาได้ทั้งยีนที่อยู่บนดีเอ็นเอในนิวเคลียสและยีนที่อยู่บนดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย ซึ่งการศึกษาโดยใช้ยีนในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ พบว่ามีข้อดีคือ ยีนในไมโทคอนเดรียมีอัตราความผันแปรสูงมากกว่ายีนในนิวเคลียสประมาณ 10 เท่า เนื่องจากกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอและการตรวจสอบความผิดพลาดของสายดีเอ็นเอที่มีการสังเคราะห์ลำดับเบสผิดไม่ดีเท่าในนิวเคลียส เกิดอัตราการกลายพันธุ์ที่สูงในไมโทคอนเดรีย ทำให้เกิดความ

หลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ จึงเหมาะสมต่อการนำมาศึกษาวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตและการจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิต (สกล สุนันทราภรณ์, 2557)

4. เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ถูกใช้ในการระบุชนิดของสัตว์

สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดสามารถใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตได้ ซึ่งในการระบุชนิดของพืชและสัตว์จะมีความแตกต่างกันไป โดยในการทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อระบุชนิดของสัตว์ นิยมใช้ยีน *cytochrome c oxidase subunit I* (*COI* หรือ *CoxI*) เนื่องจากยีน *COI* มีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในสิ่งมีชีวิตเดียวกันต่ำ แต่มีความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตสูง และมีการแทรกเข้ามาและหลุดหายของลำดับนิวคลีโอไทด์น้อย (ทรรศิน ปณิธานะรักษ์ และคณะ, 2557) โดยยีน *COI* เป็นยีนที่อยู่ในไมโทคอนเดรีย มีขนาดไม่ใหญ่มาก โดยเฉลี่ยประมาณ 600-700 คู่เบส มีความสำคัญต่อกระบวนการหายใจ (aerobic metabolism) ทำหน้าที่กำหนดการสร้างโปรตีนซึ่งทำงานเป็นเอนไซม์ที่แทรกอยู่บนเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรีย บริเวณ complex IV ในกระบวนการ Electron Transport Chain ของกระบวนการ oxidative phosphorylation โดยยีนนี้สามารถทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ค่อนข้างง่าย และมีไพร์เมอร์ที่เป็น universal primers ซึ่งได้รับการออกแบบมาให้มีความจำเพาะสูง และสามารถใช้ได้กับสัตว์หลายกลุ่ม (ดุจฤดี ปานพรหมมินทร์, 2556) ใช้ในการศึกษาอัตราการกลายพันธุ์และวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตได้ดี เนื่องจากยีนในไมโทคอนเดรียนั้นมีอัตราการกลายพันธุ์สูง อีกทั้งยังเป็นยีนที่มีผู้ศึกษาเป็นจำนวนมากและมีลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ Genbank จากหลายๆ งานวิจัยในต่างประเทศสามารถใช้เปรียบเทียบและตรวจสอบผลการทดสอบได้ ทำให้ผลการทดลองที่ได้ออกมามีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น (Paul et.al., 2003) จากการศึกษาที่ผ่านมา มีการใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดโดยใช้ยีน *COI* ในการจำแนกชนิดของสัตว์หลากหลายชนิด ยกตัวอย่าง การใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดจำแนกชนิดของปลาในประเทศออสเตรเลีย พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณยีน *COI* ได้ในปลา 206 ชนิด จากทั้งหมด 207 ชนิด คิดเป็นร้อยละ 99.5 และพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีนดังกล่าวมีความเหมือนกันมากในปลาชนิดเดียวกัน แต่แตกต่างกันอย่างชัดเจนในปลาต่างชนิดกัน (Ward et.al., 2005)

บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินการ

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

1. ตัวอย่างกุ้งเคย เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุมบวกสำหรับตัวอย่างกะปิพื้นเมืองไทยที่ระบุว่ามีกุ้งเคยเป็นส่วนผสม
2. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์กะปิพื้นเมืองจาก 3 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดชลบุรี จังหวัดสมุทรสงคราม และจังหวัดสงขลา จำนวน 8 ตัวอย่าง

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1. ชุดสกัดสำเร็จรูป NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel, Germany)
2. ชุดสกัดสำเร็จรูป NucleoSpin® Soil (Macherey-Nagel, Germany)
3. ชุดสำเร็จรูป Nucleospin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Germany)
4. ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณเครื่องหมายดีเอ็นเอตำแหน่ง *COI*
5. เจลอะกาโรส (agarose gel)
6. หลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ (microcentrifuge tube)
7. ไมโครปิเปตต์ (micropipette)
8. ไมโครปิเปตต์ทิป (micropipette tip)
9. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Hettich, Germany)
10. เครื่องเขย่าสาร (Vision Scientific, Korea)
11. เครื่องชั่งแบบละเอียด 4 ตำแหน่ง
12. เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า
13. เครื่องถ่ายเจล
14. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Bio-Active, Thailand)
15. น้ำกลั่นที่ผ่านกระบวนการ autoclave
16. 5X Phusion HF Buffer (BioLabs, USA)
17. dNTP
18. Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (BioLabs, USA)
19. VC 1Kb DNA Ladder (Vivantis, Malaysia)

20. Quick-Load® 100 bp DNA Ladder (BioLabs, USA)

21. MaestroSafe Nucleic Acid Loading Dye (Maestrogen, Taiwan)

22. Epoch Microplate spectrophotometer (BioTek, USA)

วิธีการดำเนินงาน

1. การรวบรวมตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุมบวก ได้แก่ ตัวอย่างกุ้งเคยที่ใช้ทำกะปีจากอำเภอเทพา จังหวัดสงขลา จากนั้นเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และตัวอย่างกะปีพื้นเมืองจาก 3 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดชลบุรี จำนวน 4 ตัวอย่าง , จังหวัดสงขลา จำนวน 1 ตัวอย่าง และจังหวัดสมุทรสงคราม จำนวน 3 ตัวอย่าง รวมทั้งหมดเป็น 8 ตัวอย่างจากนั้นเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. การตรวจสอบปริมาณสารอาหารในกะปีด้วยวิธีมาตรฐาน (AOAC, 2016)

ทำการตักกะปีแต่ละชนิดจำนวน 50 กรัมใส่ในหลอดพลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตร ชนิดละ 2 หลอด และส่งตัวอย่างกะปีแต่ละชนิดตรวจสอบปริมาณโปรตีนด้วยวิธีมาตรฐาน AOAC (2016) 991.20 ตรวจสอบปริมาณไขมันด้วยวิธี In-house method based on AOAC (2016) 2003.05 และตรวจสอบปริมาณโอเมก้า 3 ด้วยวิธี In-house method TE-CH-208 based on AOAC (2016) 996.06 โดยส่งตัวอย่างตรวจ ณ สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และส่งตัวอย่างกะปีตรวจสอบปริมาณโซเดียมคลอไรด์ด้วยวิธีมาตรฐาน AOAC (2016) 937.09 โดยส่งตัวอย่างตรวจ ณ ศูนย์วิทยาศาสตร์โอมิกส์ (OMICS) จากนั้นทำการเปรียบเทียบปริมาณสารอาหารในตัวอย่างกะปีแต่ละชนิด

3. การสกัดดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างกุ้งเคยมาสกัดดีเอ็นเอ ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel, Germany) โดยใช้ตัวอย่างกุ้งเคย 25 มิลลิกรัมต่อหลอดไมโครเซ็นติฟิวจ์ ทำซ้ำตัวอย่างละ 5 ซ้ำ แล้วรวมตัวอย่างทั้ง 5 ซ้ำเข้าด้วยกันในขั้นตอน Bind DNA แล้วละลายดีเอ็นเอด้วย BE buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สกัดดีเอ็นเอของตัวอย่างกะปิด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป NucleoSpin® Soil (Macherey-Nagel, Germany) โดยใช้ตัวอย่างกะปิ 500 มิลลิกรัมต่อหลอด NucleoSpin Bead Tube Type A ทำซ้ำตัวอย่างละ 5 ซ้ำ แล้วรวมตัวอย่างทั้ง 5 ซ้ำเข้ากันในขั้นตอน Bind DNA โดยในขั้นตอนสุดท้ายจะละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4. การตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้

ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ 0.8% agarose gel และใช้ VC 1Kb DNA Ladder (Vivantis, Malaysia) เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานสำหรับการเปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอที่สกัดได้ และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร โดยใช้ Epoch microplate spectrophotometer

5. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณเครื่องหมายดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอของตัวอย่างกุ้งเคยและตัวอย่างกะปิที่สกัดได้ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณที่มียีน *COI* ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยมีปริมาณสาร Master Mix (1X) ประกอบด้วย dH_2O ปริมาตร 32.5 ไมโครลิตร, 5x Phusion HF Buffer ปริมาตร 10 ไมโครลิตร, forward primer ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร, reverse primer ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร, dNTP ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, Phusion DNA Polymerase ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอที่สกัดได้ ปริมาตร 3 ไมโครลิตร รวมปริมาตรสุทธิรวมทั้งหมดเท่ากับ 52 ไมโครลิตร โดยขั้นตอนในกระบวนการ PCR ประกอบไปด้วย ขั้น Pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที, ขั้น Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที, ขั้น Annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที, ขั้น extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และขั้น Final elongation ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที โดยในขั้น Denature, Annealing และ Extension จะมีสภาวะการทำงานทั้งหมด 35 รอบ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ universal primer (Shank et al., 1999) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์บริเวณที่มียีน *COI*

Primer names	Sequences from 5' to 3'
LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG
HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA

จากนั้นนำผลผลิตจากการทำ PCR ที่ได้ มาตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ โดยใช้ 1.5% agarose gel electrophoresis และใช้ Quick-Ladder® 100 bp DNA ladder (BioLabs, USA) เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานในการเปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอที่สกัดได้ แล้วทำการ Purify PCR product โดยใช้ชุดสำเร็จรูป Nucleospin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Germany)

6. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการเปรียบเทียบผล

ส่งตัวอย่าง PCR product ที่ได้ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท แปซิฟิค ไซเอ็นซ์ จำกัด จากนั้นเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank โดยใช้โปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Altschul et al., 1990)

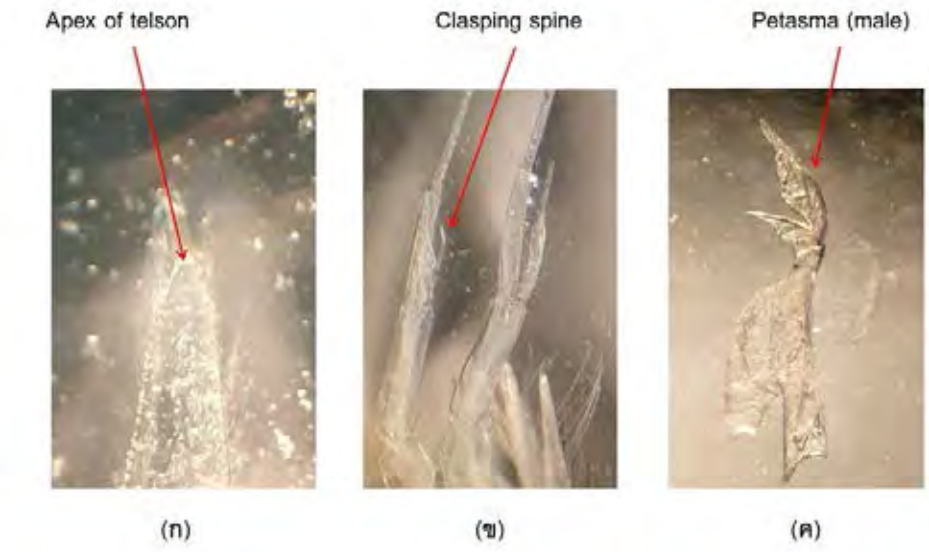
บทที่ 4

ผลการทดลอง

การรวบรวมตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

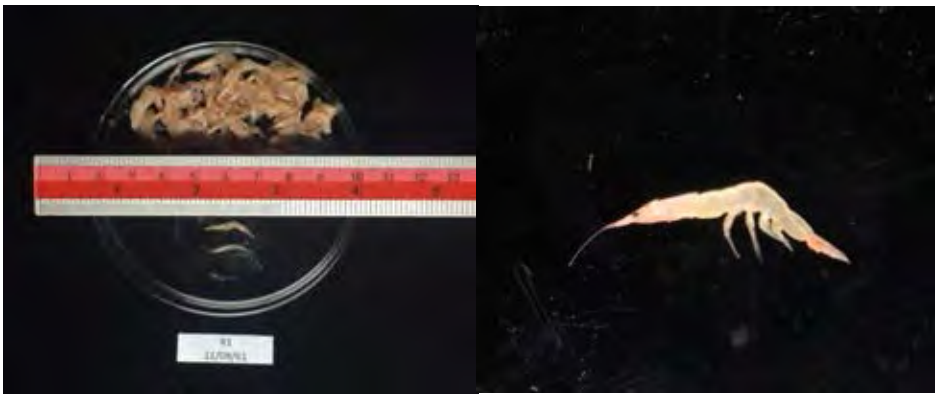
ตัวอย่างกุ้งเคยถูกเก็บมาจากอำเภอเทพา จังหวัดสงขลา โดยตัวอย่างกุ้งเคยที่เก็บได้มาจากการเก็บด้วยวิธีการดักเคยและการรุนเคย ได้ตัวอย่างกุ้งเคยปริมาณ 200 กรัม จากการจำแนกชนิดของกุ้งเคย โดยดูลักษณะสัณฐานวิทยาของกุ้งเคยที่ได้จากการดักเคยและรุนเคย ตามคู่มือการจำแนกชนิดของ Chan (1998) พบว่าตัวอย่างกุ้งเคยที่ได้จากการดักเคยมีขนาดเฉลี่ยประมาณ 2.5-3 เซนติเมตร (รูปที่ 8) และมีลักษณะตรงกับกุ้งเคย *Acetes erythraeus* แยกโดยปลายหางจะมีลักษณะเรียวค่อนข้างแหลมเป็นรูปสามเหลี่ยมทั้งในเพศผู้และเพศเมีย (รูปที่ 9ก) ส่วนของหนวดคู่ล่าง (lower antennular flagellum) จะมี clasping spine 1 อัน (รูปที่ 9ข) และที่ปลายอวัยวะเพศ (capitulum of petasma) มีลักษณะคล้ายเขี้ยวขนาดใหญ่ (hook) 1 อัน (รูปที่ 9ค)

รูปที่ 8 ลักษณะกุ้งเคยที่จับโดยใช้วิธีการดักเคย



รูปที่ 9 **ลักษณะของ** *Acetes erythraeus* (ก) apex of telson, (ข) clasping spine, (ค) petasma (male)

ส่วนตัวอย่างกุ้งเคยที่ได้จากการรุนเคยมีขนาดเฉลี่ยประมาณ 1-1.5 เซนติเมตร (รูปที่ 10) และมีลักษณะตรงกับกุ้งเคย *Acetes japonicus* แยกโดยปลายหาง (Telson) มีลักษณะกลมคล้ายรอยตัดทั้งในเพศผู้และเพศเมีย (รูปที่ 11)

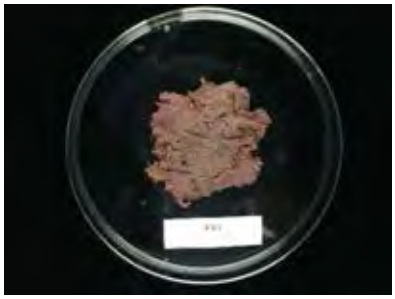
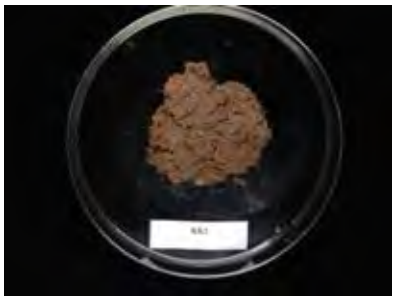
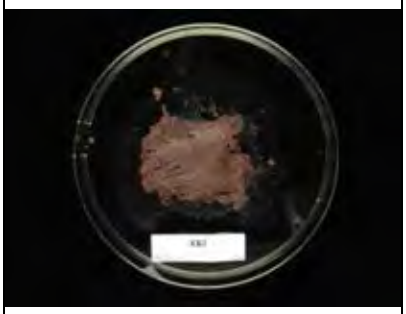


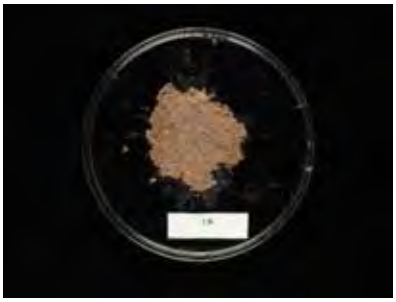
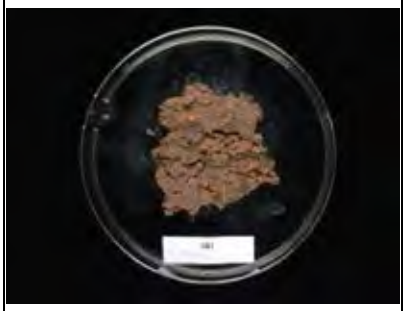
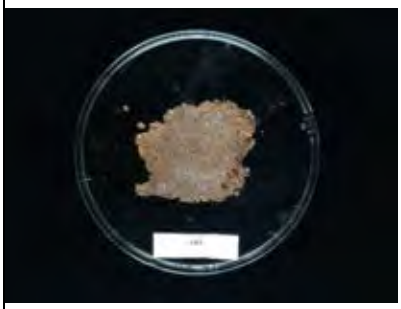
รูปที่ 10 ลักษณะกุ้งเคยที่จับโดยใช้วิธีการรุนเคย

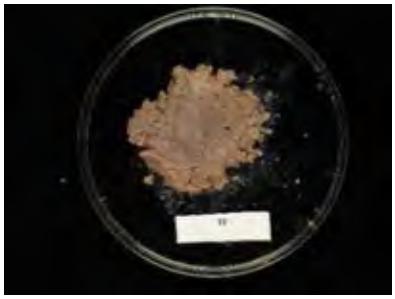
รูปที่ 11 ลักษณะ apex of telson ของ *Acetes japonicus*

ตัวอย่างกะปีถูกรวบรวมจากทั้ง 3 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดชลบุรี จำนวน 4 ตัวอย่าง , จังหวัดสงขลา จำนวน 1 ตัวอย่าง และจังหวัดสมุทรสงคราม จำนวน 3 ตัวอย่าง รวมทั้งหมดเป็น 8 ตัวอย่าง ซึ่งกะปีแต่ละชนิดจะมีลักษณะและสีที่แตกต่างกันไป โดยจากการสังเกตลักษณะภายนอกของกะปีพบว่า ตัวอย่างกะปี KK1, KK2, SR1, SR2, และ TP1 มีสีน้ำตาลคล้ำ เนื้อกะปีค่อนข้างเนียน มีจุดสีดำเล็กๆ จากส่วนตาของกุ้งเคยกระจายทั่วเนื้อกะปี ส่วนตัวอย่างกะปี SR3 มีสีน้ำตาลคล้ำเช่นเดียวกัน แต่เนื้อกะปีค่อนข้างแห้ง มีจุดสีดำเล็กๆ จากส่วนตาของกุ้งเคยกระจายทั่วเนื้อกะปี ส่วนตัวอย่างกะปี KK3 มีสีน้ำตาลเข้ม เนื้อกะปีเนียน และค่อนข้างเหนียว ไม่พบจุดสีดำจากตาของกุ้งเคย ตัวอย่างกะปี CH1 มีสีน้ำตาลคล้ำ เนื้อกะปีค่อนข้างแห้งมีเกลือก้อนเล็กๆ ผสมอยู่ มีจุดสีดำเล็กๆ จากส่วนตาของกุ้งเคยกระจายทั่วเนื้อกะปี และพบจุดสีแดงเข้มในบางจุดของเนื้อกะปี โดยมีรายละเอียดของตัวอย่างกะปีดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ตัวอย่างกะปิทั้ง 8 ชนิดที่รวบรวมได้จากทั้ง 3 จังหวัด

ตัวอย่าง	ข้อมูลของกะปิ	ลักษณะภายนอกของกะปิ
KK1	กะปิเคยตาดำ(คลองโคน) ตำบลคลองโคน อำเภอเมือง จังหวัด สมุทรสงคราม GPS location: 13.427913,99.979099 ลักษณะ : มีสีน้ำตาลคล้ำ เนื้อกะปิค่อนข้าง เนียนละเอียด มีจุดสีดำเล็กๆ จากส่วนตาของกุ้ง เคยกระจายทั่วเนื้อกะปิ	
KK2	กะปิคลองโคน ตำบลคลองโคน อำเภอเมือง จังหวัด สมุทรสงคราม GPS location: 13.563737,100.2540 ลักษณะ : มีสีน้ำตาลคล้ำ เนื้อกะปิค่อนข้าง เนียน มีจุดสีดำเล็กๆ จากส่วนตาของกุ้งเคย กระจายทั่วเนื้อกะปิ	
KK3	กะปิเคยตาดำ ตำบลคลองโคน อำเภอเมือง จังหวัด สมุทรสงคราม GPS location: 13.468371,100.20611 ลักษณะ : มีสีน้ำตาลเข้ม เนื้อกะปิเนียน และ ค่อนข้างเหนียว ไม่พบจุดสีดำจากตาของกุ้งเคย	

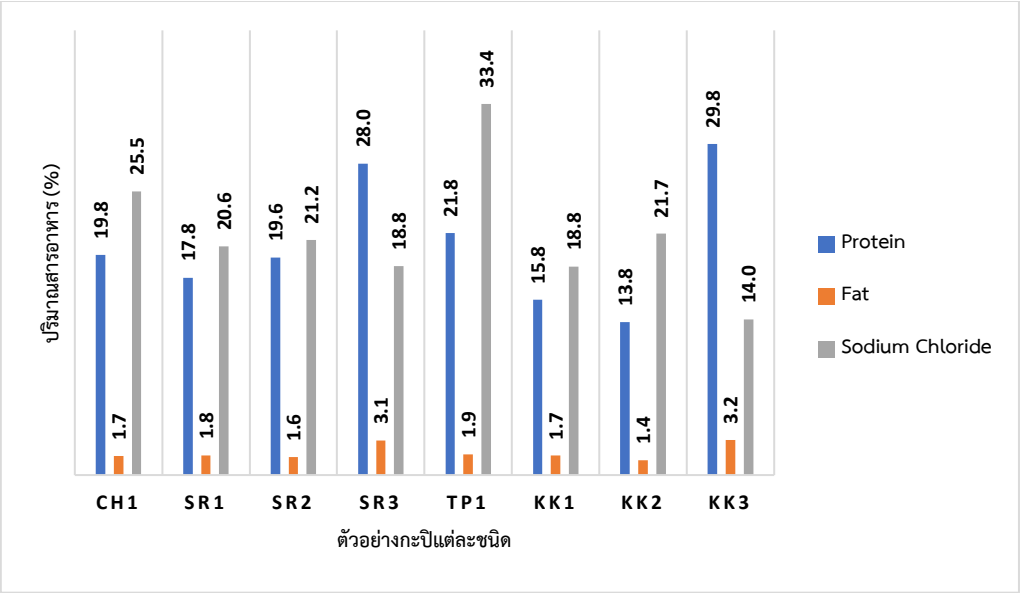
ตัวอย่าง	ข้อมูลของกะปิ	ลักษณะภายนอกของกะปิ
CH1	กะปิชลบุรี ตลาดหนองมน อำเภอเมืองชลบุรี จังหวัดชลบุรี GPS location: 13.281586,100.936356 ลักษณะ : มีสีน้ำตาลคล้ำ เนื้อกะปิค่อนข้างแห้ง มีเกลือก้อนเล็กๆ ผสมอยู่ มีจุดสีดำเล็กๆ จากส่วนตาของกุ้งเคยกระจายทั่วเนื้อกะปิ และพบจุดสีแดงเข้มในบางจุดของเนื้อกะปิ	
SR1	กะปิศรีราชา ตำบลบางพระ อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี GPS location: 13.16489, 100.9306 ลักษณะ : มีสีน้ำตาลคล้ำ เนื้อกะปิค่อนข้างเนียน มีจุดสีดำเล็กๆ จากส่วนตาของกุ้งเคยกระจายทั่วเนื้อกะปิ	
SR2	กะปิศรีราชา ตำบลบางพระ อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี GPS location: 13.16489, 100.9306 ลักษณะ : มีสีน้ำตาลคล้ำ เนื้อกะปิค่อนข้างเนียนละเอียด มีจุดสีดำเล็กๆ จากส่วนตาของกุ้งเคยกระจายทั่วเนื้อกะปิ	
SR3	กะปิศรีราชา ตำบลบางพระ อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี GPS location: 13.16489, 100.9306 ลักษณะ : มีสีน้ำตาลคล้ำ เนื้อกะปิค่อนข้างแห้ง มีจุดสีดำเล็กๆ จากส่วนตาของกุ้งเคยกระจายทั่วเนื้อกะปิ	

ตัวอย่าง	ข้อมูลของกะปิ	ลักษณะภายนอกของกะปิ
TP1	กะปิเทพา ตำบลเทพา อำเภอเทพา จังหวัดสงขลา GPS location: 6.8700960,100.9690240 ลักษณะ : มีสีน้ำตาลคล้ำ เนื้อกะปิค่อนข้างเนียน มีจุดสีดำเล็กๆ จากส่วนตาของกุ้งเคยกระจายทั่วเนื้อกะปิ	

นำตัวอย่างกะปิที่รวบรวมมาได้แบ่งออกเป็นสองส่วน ส่วนแรกนำไปตรวจสอบปริมาณสารอาหารในตัวอย่างกะปิด้วยวิธีมาตรฐาน AOAC และส่วนที่สองนำมาสกัดดีเอ็นเอ

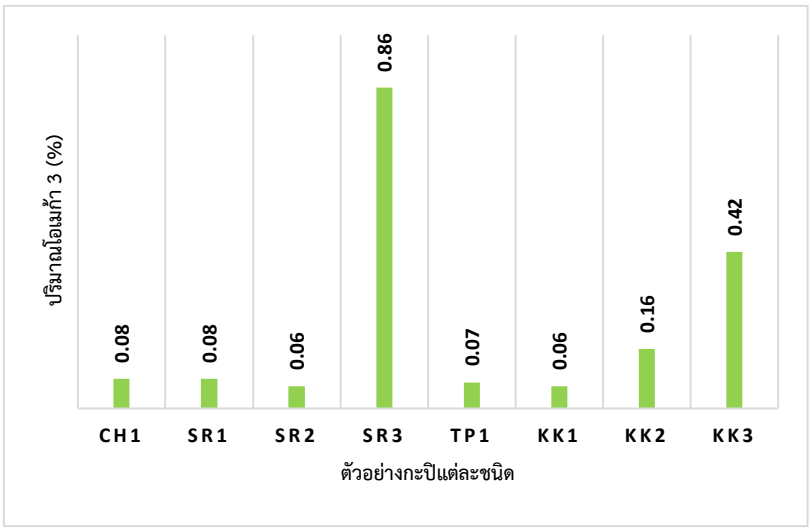
การตรวจสอบปริมาณสารอาหารในตัวอย่างกะปิด้วยวิธีมาตรฐาน AOAC

จากการส่งตัวอย่างกะปิทั้ง 8 ตัวอย่างตรวจสอบปริมาณสารอาหาร โดยทดสอบปริมาณโปรตีน ปริมาณไขมันทั้งหมด ปริมาณโอเมก้า 3 และปริมาณโซเดียมคลอไรด์พบว่า กะปิทั้ง 8 ชนิด มีปริมาณสารอาหารที่แตกต่างกัน โดยมีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 13.77-29.76 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณไขมันทั้งหมดอยู่ในช่วง 1.35 – 3.17 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณโซเดียมคลอไรด์อยู่ในช่วง 13.98-33.38 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและไขมันทั้งหมด พบว่ากะปิที่มีปริมาณโปรตีนและไขมันทั้งหมดสูงที่สุด คือ กะปิ KK3 ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณโซเดียมคลอไรด์พบว่ากะปิที่มีปริมาณโซเดียมคลอไรด์สูงที่สุดคือ กะปิ TP1 ดังกราฟที่ 1



กราฟที่ 1 ปริมาณโปรตีน ปริมาณไขมันทั้งหมด และปริมาณโซเดียมคลอไรด์ในตัวอย่างกะปีทั้ง 8 ชนิด จากการทดสอบด้วยวิธีมาตรฐาน AOAC

ส่วนการตรวจสอบปริมาณโอเมก้า 3 ได้ผลดังกราฟที่ 2 พบว่า มีปริมาณโอเมก้า 3 อยู่ในช่วง 0.06-0.86 เปอร์เซ็นต์ จากการวิเคราะห์ปริมาณโอเมก้า 3 พบว่ากะปีที่มีปริมาณโอเมก้า 3 สูงที่สุดคือ กะปี SR3 รองลงมาคือ กะปี KK3 และ KK2 ตามลำดับ



กราฟที่ 2 ปริมาณโอเมก้า 3 ในตัวอย่างกะปีทั้ง 8 ชนิดจากการทดสอบด้วยวิธีมาตรฐาน AOAC

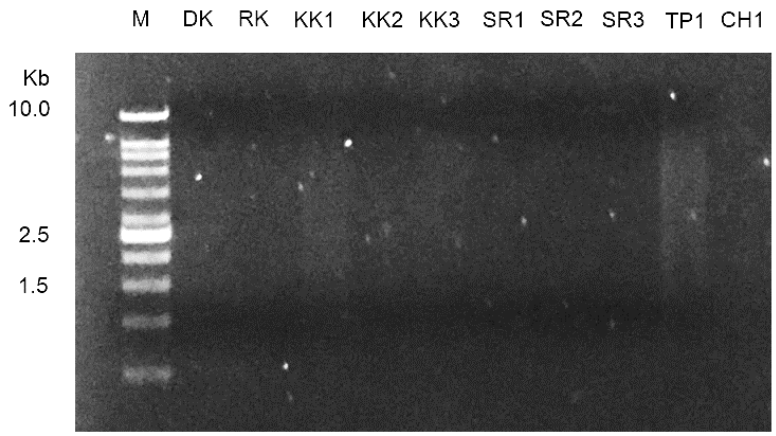
การสกัดดีเอ็นเอ

ทำการทดลองสกัดดีเอ็นเอของกุ้งเคย โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel, Germany) ตามข้อแนะนำการใช้ พบว่า ในขั้นตอน Pre-lyse sample ที่มีการบ่มด้วย buffer T1 และ Proteinase K เมื่อบ่มทิ้งไว้ข้ามคืนแล้วตัวอย่างยังคงมีชิ้นส่วนเล็กๆ ของบริเวณส่วนเปลือกของกุ้งเคยกระจายอยู่ในสารสารละลาย ไม่ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน จึงคาดว่าอาจส่งผลต่อการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างกุ้งเคย โดยปริมาณของเอนไซม์ Proteinase K อาจน้อยหรือเข้มข้นต่ำเกินไป ซึ่งทำให้เซลล์แตกไม่สมบูรณ์และจีโนมิกส์ดีเอ็นเอบางส่วนยังคงติดอยู่กับเซลล์หรืออาจยังมีโปรตีนเกาะอยู่ จึงทำให้ดีเอ็นเอที่สกัดออกมาได้มีปริมาณน้อยมากหรือไม่มีเลย และทำการทดลองสกัดดีเอ็นเอของตัวอย่างกะปิทั้ง 8 ชนิด โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป NucleoSpin® Soil (Macherey-Nagel, Germany) ตามข้อแนะนำการใช้

การตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้

1. การตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟริซิส

ผลการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าสามารถสกัดดีเอ็นเอได้เพียงแค่บางชนิด โดยลักษณะดีเอ็นเอของตัวอย่างกะปิ KK1 และ TP1 ที่สกัดได้มีลักษณะเป็นแถบต่อเนื่อง (smear band) ค่อนข้างจาง ส่วนตัวอย่างกุ้งเคย DK และ RK ซึ่งเป็นตัวควบคุมบวก และการสกัดดีเอ็นเอของตัวอย่างกะปิชนิดอื่น ไม่ปรากฏแถบของดีเอ็นเอ (รูปที่ 12) ซึ่งตัวอย่างกะปิที่ทำการทดลองได้ผ่านกระบวนการหมักเป็นระยะเวลานาน จึงอาจทำให้ดีเอ็นเอได้รับความเสียหาย อย่างไรก็ตาม จำเป็นต้องวัดปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างทั้งหมด เพื่อยืนยันผลการทดลองต่อไป



รูปที่ 12 ผลของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างกุ้งเคยและกะปี
โดยการตรวจสอบด้วย 0.8% agarose gel

(แถบดีเอ็นเอ M คือ 1Kb DNA ladder แถบดีเอ็นเอ DK คือตัวอย่างกุ้งเคยจากการดักเคย แถบดีเอ็นเอ RK คือตัวอย่างกุ้งเคยจากการรุนเคย และแถบดีเอ็นเอ KK1, KK2, KK3, SR1, SR2, SR3, TP1, CH1 คือ ตัวอย่างกะปีแต่ละชนิด)

2. การวัดปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วย Epoch microplate spectrophotometer

ในการวัดปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วย Epoch microplate spectrophotometer โดยใช้ดีเอ็นเอปริมาตร 4 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ทั้งหมด 3 ซ้ำแล้วหาค่าเฉลี่ย (ตารางที่ 4) พบว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอค่อนข้างต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟริซิสข้างต้น

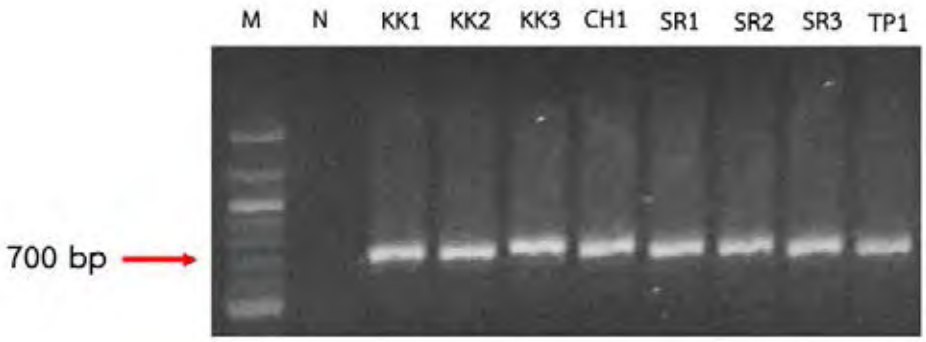
ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยจากการวัดปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างกุ้งเคยและตัวอย่างกะปีด้วย Epoch microplate spectrophotometer

ตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ย Abs_{260}	ค่าเฉลี่ย Abs_{280}	Abs_{260} ต่อ Abs_{280}	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/µL)
KK1	0.054	0.063	0.853	3.289
KK2	0.071	0.068	1.049	4.309
KK3	0.063	0.053	1.196	4.115
CH1	0.049	0.052	0.930	7.899
SR1	0.070	0.072	0.981	5.064

ตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ย Abs_{260}	ค่าเฉลี่ย Abs_{280}	Abs_{260} ต่อ Abs_{280}	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/µL)
SR2	0.058	0.049	1.169	2.814
SR3	0.069	0.069	1.005	10.102
TP1	0.049	0.042	1.165	2.037
DK	0.086	0.072	1.199	33.068
RK	0.112	0.099	1.131	47.600

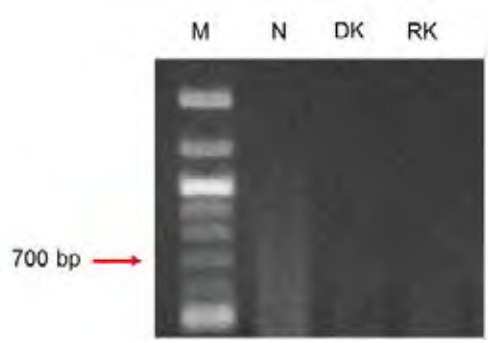
การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *COI*

ผลการตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *COI* โดยใช้ LCO1490 และ HCO2198 เป็น forward primer และ reverse primer ตามลำดับ ซึ่งเป็น universal primers ที่ได้มีการใช้ในการศึกษาการจำแนกชนิดของสัตว์ โดยมีขนาดของ PCR product เท่ากับ 700 bp พบว่า ตัวอย่างกะปิสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *COI* ได้ทั้งหมด 8 ชนิด จึงปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาด 700 bp ดังรูปที่ 13 ส่วนตัวอย่างกุ้งเคยที่ได้จากการอวนเคยและรุนเคยไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *COI* ได้ จึงไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาด 700 bp ดังรูปที่ 14



รูปที่ 13 ผลของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *COI* จากตัวอย่างกะปิ โดยการตรวจสอบด้วย 1.5% agarose gel

(แถบดีเอ็นเอ M คือ 100 bp DNA Ladder แถบ N คือ negative control และแถบดีเอ็นเอ KK1, KK2, KK3, CH1, SR1, SR2, SR3, TP1 คือ ตัวอย่างกะปิแต่ละชนิด)



รูปที่ 14 ผลของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *COI* จากตัวอย่างกุ้งเคย โดยการตรวจสอบด้วย 1.5% agarose gel

(แถบดีเอ็นเอ M คือ 100 bp DNA Ladder แถบ N คือ negative control และแถบดีเอ็นเอ DK และ RK คือ ตัวอย่างกุ้งเคยที่ได้จากการดักเคยและการรุนเคย)

การวิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล

จากการวิเคราะห์และเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* ของตัวอย่างกะปี จำนวน 8 ชนิดกับสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในฐานข้อมูล Genbank โดยพิจารณาจากค่า % Identity พบกุ้งเคยทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ กุ้งเคย *Mesopodopsis orientalis* (Accession number: AB451042.1) พบในกะปี KK1 จากจังหวัดสมุทรสงคราม โดยมีค่า % Identity เท่ากับ 99.78% ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลสูงสุด กุ้งเคย *Acetes sibogae* (Accession number: KX399434.1) พบในตัวอย่างกะปี CH1 จากจังหวัดชลบุรี โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับฐานข้อมูล 96.66% และกุ้งเคย *Acetes japonicus* (Accession number: KF977240.1) พบในตัวอย่างกะปี KK2, KK3, SR1, SR2, SR3 และ TP1 โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนของฐานข้อมูล อยู่ในช่วง 91.15-94.92% ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* จากตัวอย่างกะปิ

ตัวอย่าง	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล		
	ชนิด	Accession number	% Identity
KK1	*Mesopodopsis orientalis*	AB451042.1	99.78%
KK2	*Acetes japonicus*	KF977240.1	92.41%
KK3	*Acetes japonicus*	KF977240.1	91.15%
CH1	*Acetes sibogae*	KX399434.1	96.66%
SR1	*Acetes japonicus*	KF977240.1	94.21%
SR2	*Acetes japonicus*	KF977240.1	94.59%
SR3	*Acetes japonicus*	KF977240.1	91.82%
TP1	*Acetes japonicus*	KF977240.1	94.92%

บทที่ 5

อภิปรายผลและสรุปผลการดำเนินการ

จากการเก็บตัวอย่างกุ้งเคยจากอำเภอเทพา จังหวัดสงขลา ได้ตัวอย่างกุ้งเคยจากการจับด้วยวิธีการดักเคยและการรุนเคย เมื่อพิจารณาจากลักษณะรูปร่างภายนอกและการจำแนกทางสัณฐานวิทยาพบว่า กุ้งเคยที่จับได้จากการดักอวนมีขนาดใหญ่กว่ากุ้งเคยที่จับได้จากการรุนเคย ทั้งนี้เนื่องจากบริเวณที่ทำการเก็บตัวอย่างทั้ง 2 วิธีนี้มีระดับความลึกที่แตกต่างกัน ซึ่งวิธีการรุนเคยมักจะทำที่บริเวณน้ำที่ตื้นกว่า ส่วนการดักเคยมักจับที่บริเวณที่ไกลจากชายฝั่ง ซึ่งมีความลึกมากกว่าวิธีการรุนเคย นอกจากนี้อุปกรณ์ที่ใช้ในการจับก็แตกต่างกันด้วย ซึ่งขึ้นอยู่กับความถี่ของตาข่ายที่ใช้ ทำให้ขนาดของกุ้งเคยที่พบจากการจับกุ้งเคยด้วยวิธีการอวนเคยและรุนเคยแตกต่างกัน ส่วนการพิจารณาลักษณะสัณฐานวิทยาพบว่า กุ้งเคยที่ได้จากการดักเคยคือกุ้งเคย *Acetes erythraeus* ส่วนกุ้งเคยที่ได้จากการรุนเคยคือกุ้งเคย *Acetes japonicus* ซึ่งการกระจายตัวของกุ้งเคยทั้งสองชนิดนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาของสมนึก ใช้เทียมวงศ์ และพจนา บุญยเนตร (2521) ที่ได้ศึกษาแหล่งที่อยู่ของ *A. erythraeus* จากการทำประมงเคยในบริเวณหาดทรายมีการพบกุ้งเคยชนิดนี้ในทะเลอ่าวไทยในจังหวัดชุมพร ระนอง ตราด ชลบุรี ฉะเชิงเทรา สมุทรปราการ สมุทรสาคร ประจวบคีรีขันธ์ สงขลา เพชรบุรี นราธิวาส นครศรีธรรมราช และปัตตานี เช่นเดียวกับการศึกษาถึงแหล่งที่อยู่ของ *A. japonicus* จากการทำประมงในอ่าวไทย พบกุ้งเคยชนิดนี้ที่บริเวณจังหวัดตราด จันทบุรี ฉะเชิงเทรา สมุทรปราการ สมุทรสงคราม เพชรบุรี สงขลา นครศรีธรรมราช และปัตตานี ในทะเลอันดามันบริเวณเกาะไผ่ และคลองน้ำบ่อ จังหวัดพังงา (สมนึก ใช้เทียมวงศ์ และขวัญไชย อยู่ดี, 2522)

การตรวจสอบปริมาณสารอาหารของกะปิทั้ง 8 ตัวอย่าง เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์พบว่า ตัวอย่างกะปิ KK3 มีปริมาณโปรตีนและปริมาณไขมันทั้งหมดสูงที่สุด ส่วนตัวอย่างกะปิ TP1 มีปริมาณโซเดียมคลอไรด์สูงที่สุด และตัวอย่างกะปิ SR3 มีปริมาณโอเมก้า 3 สูงที่สุด โดยปริมาณสารอาหารที่แตกต่างกันนี้เป็นผลเนื่องมาจากส่วนประกอบที่สำคัญในการทำกะปิ คือ ปริมาณของกุ้งเคยและปริมาณเกลือที่ผสมลงไป นอกจากนี้ระยะเวลาในการหมัก และขั้นตอนการทำกะปิที่แตกต่างกันของแต่ละพื้นที่ จึงอาจส่งผลให้ปริมาณสารอาหารที่ได้แตกต่างกันด้วย จากงานวิจัยของ เพ็ญ ทองน้อย (2533) ได้รายงานว่าเกลือที่มีปริมาณโซเดียมคลอไรด์สูง จะส่งผลต่อความชื้นของกะปิ ทำให้ความชื้นของกะปิสูงขึ้น และความชื้นจะไปมีผลต่อปริมาณของโปรตีนและไขมัน โดยปริมาณความชื้นที่สูง จะส่งผลให้ปริมาณโปรตีนและปริมาณไขมันในกะปิต่ำ ซึ่ง

สอดคล้องกับผลการตรวจสอบปริมาณสารอาหารของกะปิ KK3 ที่มีปริมาณโปรตีนและปริมาณไขมันสูง แต่มีปริมาณโซเดียมคลอไรด์ต่ำ

จากการสกัดดีเอ็นเอของตัวอย่างกุ้งเคยและกะปิ เมื่อนำมาตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่า ตัวอย่างกุ้งเคยไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ เนื่องจากในขั้นตอน Pre-lyse sample ยังคงมีชิ้นส่วนของเปลือกกุ้งเคยกระจายอยู่ในสารละลาย ซึ่งอาจเกิดจากบดชิ้นเนื้อเยื่อได้ไม่ละเอียด หรือปริมาณของ Proteinase K อาจน้อยหรือเข้มข้นต่ำเกินไป ส่งผลให้เซลล์แตกไม่สมบูรณ์หรืออาจยังมีโปรตีนเกาะอยู่ ทำให้ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีค่าความบริสุทธิ์ค่อนข้างต่ำ ส่วนตัวอย่างกะปิสามารถสกัดได้เพียงแค่บางตัวอย่าง คือ กะปิ KK1 และ TP1 ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏมีลักษณะเป็นแถบต่อเนื่อง (smear band) ค่อนข้างจาง ซึ่งอาจเกิดจากการที่ตัวอย่างกะปิที่ได้ทำการทดลองนี้ผ่านกระบวนการหมักเป็นระยะเวลานาน ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อดีเอ็นเอของตัวอย่างกะปิ โดยทำให้ดีเอ็นเอเกิดการแตกหัก ส่งผลให้ไม่สามารถสกัดดีเอ็นเอของกะปิได้หรือมีปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้น้อยมากจนไม่สามารถตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอได้ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส จึงได้ทำการวัดปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่อง Epoch microplate spectrophotometer โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตรพบว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอค่อนข้างต่ำ อยู่ในช่วงประมาณ 2-48 (ng/µL) นอกจากนั้น อัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรต่อ 280 นาโนเมตรส่วนใหญ่มีค่าต่ำกว่า 1.8 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีการปนเปื้อนของโปรตีน

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *COI* ของตัวอย่างกะปิทั้ง 8 ชนิด เมื่อทำการวิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank พบว่าให้ผลการเปรียบเทียบตรงกับกุ้งเคย 3 ชนิด ได้แก่ *Acetes japonicus* และ *Acetes Sibogae* ซึ่งเป็นชนิดของกุ้งเคยสกุลอะซีเตส (*Acetes*) จัดอยู่ในอันดับเดคาโพดา (Decapoda) และ *Mesopodopsis orientalis* ซึ่งเป็นชนิดของกุ้งเคยสกุลมีโซโพดอพซิส (*Mesopodopsis*) จัดอยู่ในอันดับไมสิดาเซีย (Mysidacea)

จากการทำการทดลองพบว่า เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดมีความเหมาะสมที่จะใช้ในการระบุชนิดของกุ้งเคยอย่างรวดเร็วในผลิตภัณฑ์กะปิ และพบว่ากะปิต่างชนิดที่มี *Acetes japonicus* เป็นส่วนประกอบ จะให้คุณค่าทางโภชนาการในปริมาณที่ต่างกัน ซึ่งอาจเป็นผลจากปริมาณกุ้งเคยและกระบวนการในการทำกะปิ โดยปริมาณสารอาหารและคุณภาพของกะปิจะแตกต่างกันไปในแต่ละพื้นที่การผลิต

เอกสารอ้างอิง

เกศรินทร์ ทิพย์เพ็ชร์, ณรงค์ จัตุรัส, และนพวรรณ บุญชู. 2561. ดีเอ็นเอบาร์โค้ดสำหรับการระบุชนิดแมลงที่มีความสำคัญทางการแพทย์ของประเทศไทย. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 26 : 313-328.

จินตนา ชูเหล็ก. 2540. ความสำคัญทางเศรษฐกิจและการเปลี่ยนแปลงตามฤดูกาลของ *Acetes*, *Lucifer* และ *Mesopodopsis* ที่ตำบลคลองโคน จังหวัดสมุทรสงคราม. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีการบริหารสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

ดุจฤดี ปานพรหมมินทร์ และนนทรี ปานพรหมมินทร์. 2557. ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการจำแนกชนิดปลาวงศ์เสือตอ. วารสารแก่นเกษตร 42 : 742-748.

ดุจฤดี ปานพรหมมินทร์. 2556. ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในปลาและการประยุกต์ใช้. วารสารนเรศวรพะเยา 6 : 174-181.

ทรรศิน ปณิธานะรักษ์, ณัฐวุฒิ เหลืองอ่อน, อาวุธ หมั่นหาผล, สุพัตรา ตะเหลบ และวิรชา เจริญดี. 2557. การจำแนกชนิดของแมงกะพรุนหลากสีบริเวณชายฝั่งทะเล จังหวัดตราดโดยใช้เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์. ใน การประชุมวิทยาศาสตร์ทางทะเล ครั้งที่ 4, หน้า 287-296. 10-12 มิถุนายน 2557 ณ ศูนย์ประชุมนานาชาติฉลองสิริราชสมบัติครบ 60 ปี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จังหวัดสงขลา.

นงนุช ตั้งเกริกโอฬาร. 2554. มารู้จักกุ้งเคยที่ใช้ทำกะปิกันเถอะ. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา : http://www.uniserv.buu.ac.th/forum2/topic.asp?TOPIC_ID=4851 [6 เมษายน 2561]

นวพร ศรีวงษ์ชัย. 2557. ประโยชน์ของกะปิ. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา : https://nawaporn.wordpress.com/tag/ประโยชน์ของกะปิ/ [3 เมษายน 2561]

พรณรงค์ สิริปิยะสิงห์ และอรุณรัตน์ ฉวีราช. 2554. ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตกรณีศึกษายีน *cytochrome c oxidase I* (*COI*) ในสัตว์. วารสารมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม 2 : 205-210.

เพ็ญ ทองน้อย. 2533. ส่วนประกอบทางโภชนาการของกะปิ. วารสารกรมวิทยาศาสตร์บริการ. 2 : 85-89.

มาลินี ฉัตรมงคลกุล และชิดชัย จันทร์ตั้งสี. 2548. ใน แพลงก์ตอน, หน้า 272-298. กรุงเทพฯ : เวิร์ค สแควร์.

วีระ เทพกรณ์. 2558ก. การจับเคยและเลือกเคย. ใน กะปิ, หน้า 15-20. นนทบุรี : ดรีม พัลลิชชิ่ง.

วีระ เทพกรณ์. 2558ข. การดูคุณภาพกะปิ. ใน กะปิ, หน้า 34-35. นนทบุรี : ดรีม พัลลิชชิ่ง.

วีระชาติ เพ็งจำรัส และทิพามาศ อุปน้อย. 2547. ชนิดและการแพร่กระจายของกุ้งเคยสกุล *Acetes* บริเวณแหล่งหญ้าทะเลและคลองป่าชายเลน ฝั่งอันดามัน. กรุงเทพมหานคร : สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

สกล สุนันทราภรณ์. 2557. การวิเคราะห์ความแปรผันของยีน *cytochrome c oxidase subunit I* ในไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอของเหาศีรษะ (*Pediculus humanus capitis*) ในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สมนึก ใช้เทียมวงศ์ และขวัญไชย อยู่ดี. 2522. การประมงเคยในอ่าวไทย. หน้า 58. รายงานประจำปี 2522. หน่วยงานสัตว์น้ำอื่นๆ กองประมงทะเล กรมประมง.

สมนึก ใช้เทียมวงศ์ และพจนา บุญยเนตร. 2521. การประมงเคยในอ่าวไทย. หน้า 26. รายงานประจำปี 2521. หน่วยงานสัตว์น้ำอื่นๆ กองประมงทะเล กรมประมง.

สยามกะปิ. 2560. กะปิคืออะไรและวิธีการทำกะปิ. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา : https://www.siamkapi.com/category/สาระน่ารู้เกี่ยวกับกะปิ/ [29 มกราคม 2560]

สัจจภูมิ ละออ. 2561. ละวะ เครื่องมือจับเคย. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา : https://www.technologychaoban.com/folkways/article_69530 [12 ตุลาคม 2561]

สุนทร ตรีนันทวัน. 2553. กะปิแท้และกะปิใส่สี. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา : http://www.scimath.org/article-biology/item/496-shrimp-paste [3 เมษายน 2561]

สุรินทร์พร ยิ้มกัน. 2559. กว่าจะเป็นกะปิ. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา : http://www.fisheries.go.th/quality/ การผลิตกะปิไทย.pdf [2 เมษายน 2561]

อุไรวรรณ วัฒนกุล, ชุตินชุ สุจริต, เจนจิรา สุวรรณโณ และยุพดี ซุ้นซิ่ม. 2554. คุณภาพทางเคมีและกายภาพของกะปิในตลาดท้องถิ่น. ใน การพัฒนาอนาคตชนบทไทย : ฐานรากที่มั่นคงเพื่อการพัฒนาประเทศอย่างยั่งยืน, หน้า 780-783. 27-29 มกราคม 2554 ณ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology 215 : 403-410.

AOAC. 2016. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analysis Chemistry. 20th ed. Washington, D.C.

Chaijan, M., and Panpipat, W. 2012. Darkening prevention of fermented shrimp paste by pre-soaking whole shrimp with pyrophosphate. Asian Journal of Food and Agro-Industry 5 : 163-171.

Chan, T.Y. 1998. Shrimps and prawns. In Carpenter, K.E. and V.H. Niem (eds.), The living marine resources of the Western central pacific, pp. 851-865 Rome : Food and Agriculture Organization of the united nations.

Eusebio, P.S., Coloso, R.M., and Gapasin, R.S.J. 2010. Nutritional evaluation of mysids *Mesopodopsis orientalis* (Crustacea:Mysida) as live food for grouper *Epinephelus fuscoguttatus* larvae. Aquaculture 306 : 289-294.

Glinwong, C., Chulalaksananukul, W., Nuangjui, M., and Lertsriwong, S. 2018. Docosahexaenoic acid and protein in Thai shrimp paste from Thai gulf. In The International Bioscience Conference 2018. 2018, September 17-18. Krabi, Thailand.

Ivanova, N.V., Zemlak, T.S., Hanner, R.H., and Hebert, P.D.N. 2007. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. Molecular Ecology Notes 7 : 544-548.

Mantiri, O.S.E., Ohtsuka, S., and Sawamoto, S. 2012. Fisheries on *Mesopodopsis* (Mysida: Mysidae) and *Acetes* (Decapada: Sergestidae) in Indonesia. Kuroshio Science 5 : 137-146.

Omori, M. 1978. Zooplankton fisheries of the world: A Review. Marine Biology 48 : 199-205.

Paul, D.N.H., Alina, C., Shelly, L.B., and Jeremy, R.W. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London Serie B: Biological Sciences 270 : 313-321.

Pongsetkul, J., Benjakul, S., Sampavapol, P., Osako, K. and Faithong, N. 2015. Chemical compositions, sensory and antioxidative properties of salted shrimp paste (Ka-pi) in Thailand. International Food Research Journal. 22 : 1454-1465.

Shank, T.M., Black, M.B., Halanych, K.M., Lutz, R.A., and Vrijenhoek R.C., 1999. Miocene radiation of deep-sea hydrothermal vent shrimp (Caridea : Bresiliidae): evidence from mitochondrial cytochrome oxidase subunit I. Molecular Phylogenetics and Evolution 13 : 244-254.

Shirota, A. 1966. The plankton of South-Vietnam: Freshwater and marine plankton. Japan : Overseas Teachnical Cooperation Agency.

Wanggein, C. 2018. Omega 3 in sea fish. [Online]. Available from : https://www.thaihealth.or.th/Content/45349 [20 March 2019]

Ward, R.D., Zemlak, T.S., Innes, B.H., Last, P.R., and Hebert, P.D.N. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. Phiosophical Transactions of the Royal Society B 360 : 1-11.