โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ	การศึกษาเมตาจีโนม และชนิดของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับปริมาณ Docosahexaenoic acid ในผลิตภัณฑ์กะปีพื้นบ้านของไทย
ชื่อนิสิต	นางสาวณิชาภัทร วิเศษชลธาร
เลขประจำตัวนิสิต	5932118023
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
ปีการศึกษา	2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การศึกษาเมตาจีโนม และชนิดของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับปริมาณ Docosahexaenoic acid ในผลิตภัณฑ์กะปิพื้นบ้านของไทย

นางสาวณิชาภัทร วิเศษชลธาร

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2562

Metagenome and types of bacteria involved quantity of Docosahexaenoic acid in Thai shrimp paste (Kapi) production

Mrs. Nichaphat Wisetchonlathan

A Senior Project in Partial Fulfillment of the Requirements

For the Degree of Bachelor of Science in Genetics

Department of Botany

Faculty of Science, Chulalongkorn University

Academic Year 2019

ชื่อเรื่อง	การศึกษาเมตาจีโนม และชนิดของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับปริมาณ docosahexaenoic acid ในผลิตภัณฑ์กะปิพื้นบ้านของไทย
ชื่อนิสิต	ณิชาภัทร วิเศษชลธาร
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชมภูนุช กลิ่นวงษ์
ปีการศึกษา	2562

ภาควิชาพฤกษศาสตร์ อนุมัติให้โครงงานวิทยาศาสตร์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาพันธุศาสตร์

คณะกรรมการสอบโครงงานวิทยาศาสตร์

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

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนิตา ปาลิยะวุฒิ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เรืองวิทย์ บรรจงรัตน์)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง การศึกษาเมตาจีโนม และชนิดของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับปริมาณ docosahexaenoic acid ในผลิตภัณฑ์กะปิพื้นบ้านของไทย

ชื่อนิสิต ณิชาภัทร วิเศษชลธาร

ภาควิชา พฤกษศาสตร์

สาขาวิชา พันธุศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชมภูนุช กลิ่นวงษ์

ปีการศึกษา 2562

บทคัดย่อ

Docosahexaenoic acid (DHA) เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวโอเมก้า3 ที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์ กะปิเป็นเครื่องปรุงรสอาหารพื้นบ้านของไทยที่มีสัดส่วนของกรดไขมันนี้อยู่เช่นกัน สารอาหารในกะปิจะขึ้นอยู่กับกระบวนการหมักที่รับอิทธิพลจากวัตถุดิบและกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันไปในแต่ละพื้นที่ การศึกษานี้มีเป้าหมายเพื่อวิเคราะห์ความเกี่ยวข้องของชนิดของจุลินทรีย์ที่มีความสัมพันธ์กับกรดไขมันไม่อิ่มตัวในกะปิ จากกะปิ 7 ตัวอย่างใน 3 จังหวัดของประเทศไทย ได้แก่ สมุทรสงคราม ชลบุรี และสงขลา ทำการวิเคราะห์สัดส่วนของกรดไขมันในตัวอย่างกะปิทำด้วยวิธีมาตรฐานของ Association of Official Analytical Chemists (AOAC) จากนั้นทำการศึกษาชนิดของแบคทีเรียด้วยวิธีทางเมตาจีโนม และคัดแยกแบคทีเรียด้วยวิธีทางจุลชีววิทยาร่วมกับการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ผลการศึกษาพบว่า ตัวอย่างกะปิศรีราชา จังหวัดชลบุรี (SR2) มีปริมาณ DHA มากที่สุด คือ 8.32155% จากปริมาณกรดไขมันทั้งหมด การศึกษาชนิดของแบคทีเรียด้วยวิธีทางเมตาจีโนมในตัวอย่าง SR2 พบแบคทีเรียที่ปริมาณมากที่สุดคือแบคทีเรียสกุล *Lentibacillus* sp. ที่ค่าความถี่สัมพัทธ์ของชนิดแบคทีเรียในการวิเคราะห์เมตาจีโนมมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ และพบแบคทีเรียที่มีความเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัว ได้แก่ *Lactobacillus* spp. , *Lachnospiraceae* spp. และ *Bacteodidetes* spp. ในขณะเดียวกันผลการศึกษาในส่วนของการแยกเชื้อด้วยวิธีทางจุลชีววิทยาร่วมกับการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของแบคทีเรีย พบว่ามีแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวซึ่งอยู่ในสกุล *Bacillus*

คำสำคัญ: กะปิ, Docosahexaenoic acid (DHA), โอเมก้า3, กรดไขมันไม่อิ่มตัว, เมตาจีโนม, 16S rDNA

Title Metagenome and types of bacteria involved quantity of Docosahexaenoic acid in Thai shrimp paste (Kapi) production

Student name Nichaphat Wisetchonlathan

Program Genetics

Department Botany

Advisor Assist. Prof. Dr. Chompunuch Glinwong

Academic year 2019

Abstract

Docosahexaenoic acid (DHA) are omega 3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs), which provide significant health benefits for human. Shrimp pastes are a good supplied of PUFAs source. Shrimp paste (Kapi) is a traditional Thai fermented food seasoning that is found in high proportions of PUFAs. The proportion of nutrients in shrimp paste samples is diverse and depends on the fermentation process, influenced by raw materials and microbial activities. This objective is to identify marine bacteria associated with PUFAs in shrimp paste from 7 samples in three parts of Thailand: Samut Songkhram province, Chonburi province, and Songkhla province. Fatty acid profile analysis in shrimp paste was performed with the Association of Official Analytical Chemists (AOAC) standard method and then identify bacteria by using metagenome and conventional bacteria isolation and identification by 16SrDNA sequence. From the result, it was found that Sriracha shrimp paste (SR2 from Chonburi province) has the highest DHA content, which is 8.32155 percent per total fatty acid content. The DNA metagenome analysis of SR2 showed the mainly dominant bacteria is *Lentibacillus* sp. with a relative frequency of metagenomics analysis of bacterial species at more than 90 percent. Bacteria associated with PUFAs such as *Lactobacillus* spp., *Lachnospiraceae* spp. and *Bacteodidetes* spp. whereas analysis of 16S rDNA identify marine bacteria which PUFA-producing represent 5 species of the genus Bacillus.

Keywords: shrimp paste, docosahexaenoic acid (DHA), omega3, PUFAs, metagenome, 16S rDNA gene

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องด้วยความกรุณาของผู้ที่เกี่ยวข้องทุกฝ่าย ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชมภูนุช กลิ่นวงษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานวิทยาศาสตร์ที่กรุณาให้คำแนะนำสั่งสอน แนะแนวทางตลอดการปฏิบัติงาน ให้คำปรึกษาเกี่ยวกับการทำโครงงานวิทยาศาสตร์ และกรุณาช่วยเหลือเป็นอย่างดี

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนิตา ปาลิยะวุฒิ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ เรืองวิทย์ บรรจงรัตน์ ที่กรุณาเสียสละเวลาเป็นกรรมการสอบโครงงานวิทยาศาสตร์ พร้อมทั้งให้คำแนะนำช่วยตรวจสอบแก้ไขให้โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์

กราบขอบพระคุณ ดร.พินิตพล พรหมบุตร ผู้จัดการการศูนย์วิทยาศาสตร์โอมิกส์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ช่วยในการทำการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยการทำเมตาจีโนม และให้คำแนะนำในการศึกษาเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อประสบการณ์ของคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาสนับสนุนงานวิจัย

ขอขอบพระคุณนางสาวสุภัตรา เลิศศรีวงษ์ และพี่ๆในหน่วยปฏิบัติการเชื้อเพลิงชีวภาพ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาสอนการใช้อุปกรณ์และสถานที่สำหรับการศึกษาวิจัยในโครงงานวิทยาศาสตร์นี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านและผู้มีส่วนเกี่ยวข้องทุกคนที่กรุณาให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และเพื่อนๆ รวมถึงทุกๆคนที่คอยอยู่เคียงข้าง ให้ความช่วยเหลือในทุกด้านอย่างเต็มที่

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	จ
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
กิตกรรมประกาศ	ซ
สารบัญ	ฌ
สารบัญภาพ	ญ
สารบัญตาราง	ฏ
บทที่	
1 บทนำ	1
2 เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการ	14
4 ผลการทดลอง	19
5 อภิปรายผล	30
6 สรุปผลการศึกษา	33
เอกสารอ้างอิง	35
ภาคผนวก	40
ภาคผนวก ก (สูตรอาหาร)	41
ภาคผนวก ข (ผล gas chromatography)	43
ภาคผนวก ค (จุลินทรีย์ที่พบจากการวิเคราะห์เมตาจีโนม)	52

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
2.1	ลักษณะทั่วไปของเคย	4
2.2	อวนรุนโดยใช้เรือกล	6
2.3	การยกยอ	6
2.4	โครงสร้างของ ALA, EPA และ DHA	8
2.5	การสังเคราะห์ PUFAs โดยอาศัยออกซิเจน	9
2.6	การสังเคราะห์ PUFAs โดยไม่อาศัยออกซิเจนผ่าน PKS pathway	10
2.7	H_2O_2 plate assay	11
2.8	ผลจากการทดสอบ H_2O_2 plate assay	12
2.9	วิธีการสร้างและคัดเลือกเอนไซม์หรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก metagenomic Library	13
4.1	ตัวอย่างกะปิที่มีปริมาณ DHA จากสูงที่สุดไปต่ำที่สุด	21
4.2	ผลการวิเคราะห์เมตาจีโนมในกะปิตัวอย่าง SR2	23
4.3	แบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลตที่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัว ทดสอบด้วย H_2O_2 plate assay	26
4.4	เจลที่ได้จากการตรวจสอบ PCR product ของ 16S rDNA มีความยาวประมาณ 1500 bp	28

ภาคผนวกรูปภาพ

ผ.ข1	fatty acid profile ของตัวอย่างกะปิ KK1	44
ผ.ข2	fatty acid profile ของตัวอย่างกะปิ KK2	45

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่		หน้า
ผ.ข3	fatty acid profile ของตัวอย่างกะปี KK3	46
ผ.ข4	fatty acid profile ของตัวอย่างกะปี SR1	47
ผ.ข5	fatty acid profile ของตัวอย่างกะปี SR2	48
ผ.ข6	fatty acid profile ของตัวอย่างกะปี SR3	49

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	ตัวอย่างกะปิ 7 ชนิดที่ใช้ในการศึกษา	19
4.2	ข้อมูลทางโภชนาการในกะปิแต่ละชนิด	21
4.3	คุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป NucleoSpin® Soil kit	22
4.4	ผลการทดสอบความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวในกะปิที่เก็บบริเวณอ่าวไทยตอนบนฝั่งตะวันตก	24
4.5	ผลการทดสอบความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวในกะปิที่เก็บบริเวณอ่าวไทยตอนบนฝั่งตะวันออก	25
4.6	ผลการทดสอบความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวในกะปิที่เก็บบริเวณอ่าวไทยตอนล่าง	26
4.7	ปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Quantification) และความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (DNA purity) หลังสกัด	27
4.8	ปริมาณดีเอ็นเอ และความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ ของ PCR product	28
4.9	ผลการเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ของยีน 16S rDNA	29
6.1	fatty acid profile และชนิดของแบคทีเรียที่ตรวจสอบได้	34

ภาคผนวกตาราง

ผ.ค1	จุลินทรีย์ที่พบในกะปิ SR2 จากการวิเคราะห์เมตาจีโนม	51

บทที่ 1

บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

กะปิ (Shrimp paste) เป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักพื้นบ้านของไทยที่ใช้เป็นเครื่องปรุงรสชนิดให้ความเค็ม โดยการนำเคยมาถนอมอาหารผ่านกระบวนการแปรรูปที่ง่ายที่สุดคือ การหมัก ซึ่งความหลากหลายของกะปิจะขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่นำมาใช้ และกรรมวิธีในการผลิต โดยกรรมวิธีในการผลิตกะปิจะอาศัยการเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางกายภาพโดยอาศัยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ในธรรมชาติในกระบวนการหมัก (Cai et al., 2017)

กระบวนการที่เกิดจากการหมักนี้จะได้สารประกอบที่ทำให้กะปิแต่ละท้องที่มีกลิ่น รส และคุณค่าทางโภชนาการในกะปิที่แตกต่างกันไป การศึกษาของอรวรรณ คงพันธุ์ และวัชรี คงรัตน์ (2556) ได้ทำการสำรวจคุณลักษณะ และคุณภาพของกะปิพบว่า ในกะปินั้นมีปริมาณกรดไขมันที่สูงสูง ซึ่งเป็นกรดไขมันที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น กรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวในกลุ่มของโอเมก้า 3 เช่น eicosapentaenic acid (EPA) และ docosahexaenoic acid (DHA) ที่มีประโยชน์ในทางสุขภาพมาก ไม่ว่าจะเป็นบทบาทในการพัฒนาตัวอ่อน ช่วยลดการอักเสบแบบเฉียบพลันที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด ช่วยลดโอกาสที่จะเกิดโรคอัลไซเมอร์ และยังมีส่วนช่วยในระบบภูมิคุ้มกันอีกด้วย แต่ในทางอุตสาหกรรมการสังเคราะห์ DHA ให้บริสุทธิ์นั้นต้องใช้ค่าใช้จ่ายที่สูง อีกทั้งยังมีกลิ่นไม่พึงประสงค์ และมีโอกาสเจือปนสารจำพวกโลหะหนักได้ง่าย (Robles et al., 2018) ดังนั้นจึงมีการแนะนำให้ผู้บริโภครับประทานอาหารที่มีสัดส่วนของ DHA ร่วมอยู่ด้วย เพื่อให้ได้รับปริมาณสารอาหารอย่างเพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย

สัดส่วนของคุณค่าทางโภชนาการในอาหารที่แตกต่างกันออกไปนั้นขึ้นอยู่กับวัตถุดิบ และกรรมวิธีในการผลิตที่อาศัยจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันในกระบวนการหมัก จุลินทรีย์ที่พบในการหมักกะปิอาจเป็นจุลินทรีย์ที่ได้มาพร้อมกับวัตถุดิบ หรือได้จากขั้นตอนการหมัก ส่วนใหญ่จุลินทรีย์ในกะปิเป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ทั้งที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) เช่น *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp., *Micrococcus* spp. (จิตต์เรขา ทองมณี, 2544) เป็นต้น โดยแบคทีเรียเหล่านี้สามารถสร้างเอนไซม์ที่สามารถย่อยโปรตีนให้เป็นเพปไทด์สายสั้นๆ ที่มีผลต่อรสชาติของอาหาร และคุณค่าทางโภชนาการด้วย (Wong and Mine, 2004) ดังนั้นกระบวนการที่

อาศัยแบคทีเรียนี้จึงส่งผลต่อคุณภาพของกะปิในกะปิแต่ละท้องถิ่นแตกต่างกัน ปัจจุบันการศึกษาจุลินทรีย์ที่ส่งผลต่อคุณค่าทางโภชนาการในกะปิแต่ละท้องถิ่นนั้นยังมีข้อมูลไม่ชัดเจน เนื่องจากการคัดแยกจุลินทรีย์จากธรรมชาติร้อยละ 99 ไม่สามารถเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการได้ ทำให้การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์กับคุณค่าทางโภชนาการยังคงมีน้อย การศึกษาวิเคราะห์จีโนมของจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างธรรมชาติ จนสามารถทำได้โดยวิธีเมตาจีโนมิกส์ เป็นวิธีการสกัดดีเอ็นเออออกมาจากตัวอย่างที่ต้องการศึกษาโดยตรงไม่ต้องทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ และนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปใช้เป็นแม่แบบในการเพิ่มปริมาณในส่วนลำดับยีนที่ต้องการศึกษา ดีเอ็นเอที่สกัดได้จะถูกนำเข้าสู่เวคเตอร์พาหะที่เหมาะสม และนำเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน สร้างเป็น metagenomic library เพื่อนำไปใช้ศึกษาคุณสมบัติที่สนใจทั้งการบ่งชี้ลำดับวิวัฒนาการ และการค้นหาเอนไซม์ หรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ๆ (อัชฌา บุญมี, 2556) ซึ่งวิธีการนี้เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสูงในการศึกษาจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้

Glinwong และคณะ (2018) ได้ทำการศึกษาปริมาณ docosahexaenoic acid และตรวจสอบปริมาณโปรตีนในตัวอย่างกะปิพื้นบ้านของไทย ผลการตรวจสอบพบว่ากะปิเคยตาดำ (KK3) มีปริมาณโอเมก้า 3 มากที่สุด และกะปิเคยตาดำ (KK2) มีปริมาณโอเมก้า 3 น้อยที่สุด จากตัวอย่างกะปิทั้งสองแสดงถึงความหลากหลายของคุณค่าทางโภชนาการที่ต่างกัน ถึงแม้ว่าแหล่งผลิตจะอยู่ในพื้นที่จังหวัดสมุทรสงครามเหมือนกัน การศึกษาครั้งนี้จึงดำเนินการศึกษาเพิ่มเติมโดยทำการเปรียบเทียบคุณสมบัติในตัวอย่างผลิตภัณฑ์กะปิพื้นเมืองของไทย และทำการตรวจสอบปริมาณสารอาหารในกะปิอีกครั้ง จากนั้นทำการแยกเชื้อด้วยวิธีทางจุลชีววิทยาร่วมกับการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ซึ่งเป็นยีนในโพแคริโอติกเซลล์ที่มีความสำคัญ และได้รับการยอมรับเป็นสากลในการนำมาใช้ชี้เฉพาะชนิดของเชื้อแบคทีเรียได้อย่างแม่นยำและรวดเร็ว (Woo et al., 2008) เพื่อระบุชนิดของแบคทีเรียที่สำคัญในตัวอย่างที่ศึกษา รวมทั้งศึกษาชนิดของแบคทีเรียด้วยวิธีทางเมตาจีโนมิกส์ โดยการทำเมตาจีโนมด้วยเทคนิค 16S rDNA V3-V4 region amplicon analysis (Klindworth et al., 2013) และใช้เทคนิค next-generation sequencing (Illumina Miseq, US) ในการหาลำดับเบสในกะปิ แล้วทำการเปรียบเทียบคุณค่าทางโภชนาการกับชนิดของแบคทีเรียในกะปิกลุ่มที่สนใจศึกษา จากผลการศึกษาจะทราบชนิด และสกุลของแบคทีเรียที่สำคัญที่ส่งผลให้ในกะปิแต่ละชนิดมีคุณค่าทางโภชนาการต่างกัน เพื่อสามารถนำผลที่ได้มาพัฒนา และต่อยอดในการเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการในอุตสาหกรรมอาหาร

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อศึกษาชนิดและกลุ่มของแบคทีเรียที่มีผลต่อปริมาณ docosahexaenoic acid (DHA) ในผลิตภัณฑ์กะปิ ด้วยวิธีการคัดแยกเชื้อร่วมกับการวิเคราะห์เมตาจีโนมิกส์

บทที่ 2

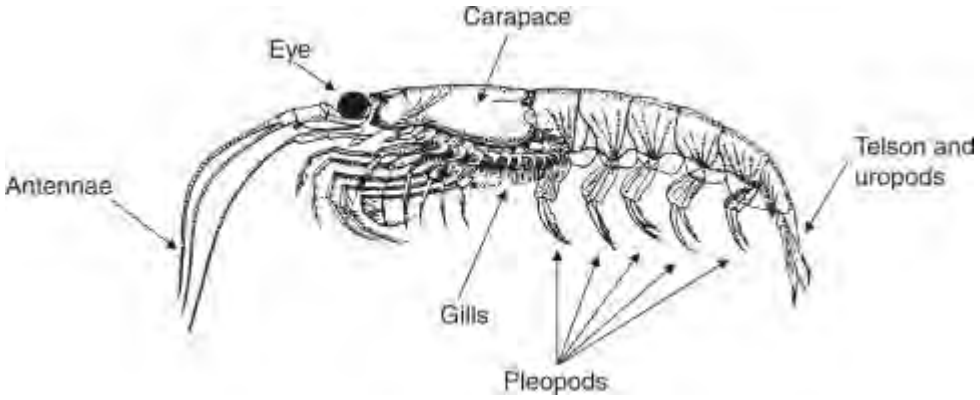
เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. กะปิพื้นเมือง

กะปิเป็นเครื่องปรุงรสชนิดหนึ่ง เป็นอาหารพื้นบ้านที่มักผลิตในครัวเรือน มีความนิยมในประเทศไทย และประเทศในแถบเอเชียใต้ ซึ่งการผลิตกะปินั้นได้จากการนำเคย กุ้ง หรือปลา มาหมักในประเทศไทยนิยมใช้เคยในการหมักกะปิ ซึ่งเคยจะพบมากตามแนวแถบชายฝั่งทะเล ดังนั้นการผลิตกะปิในครัวเรือนส่วนใหญ่จะผลิตในพื้นที่ที่ติดกับทะเล (สุรินทร์พร ยิ้มกัน, 2559: ออนไลน์) เอนไซม์จากจุลินทรีย์ในกะปิจะช่วยในกระบวนการหมักทำให้กะปิมีคุณค่าทางโภชนาการสูงโดยมีโปรตีนร้อยละ 45-65 ต่อน้ำหนักแห้งของกะปิ มีกรดอะมิโนและวิตามิน ทั้งนี้กระบวนการในการหมักกะปียังเป็นกระบวนการที่ชาวบ้านนำมาใช้ในการถนอมอาหาร เพราะเกลือที่ใช้ในการหมักกะปิจะเป็นส่วนช่วยป้องกันไม่ให้กะปิเกิดการเน่าเสียอีกด้วย (จิตต์เรขา ทองมณี, 2544)

2. ชนิดของเคยที่ใช้ในการผลิตกะปิ

เคย (รูปที่ 2.1) เป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังชนิดหนึ่งที่อาศัยอยู่รวมกันเป็นฝูงบริเวณผิวน้ำทะเล ตามชายทะเล หรือป่าชายเลน มีลักษณะรูปร่างคล้ายกุ้ง แต่มีขนาดประมาณ 1.5 เซนติเมตร เปลือกมีลักษณะนิ่ม และบาง (อุดมศักดิ์ ดารุมาศ, 2008: ออนไลน์)



รูปที่ 2.1 ลักษณะทั่วไปของเคย (Hewitt and Lipsky, 2009)

ภาคตะวันออกนิยมใช้เคยตาแดงสกุล *Acetes* sp. จับจากบริเวณจังหวัดระยองและชลบุรี ซึ่งเป็นเคยที่ใช้เป็นวัตถุดิบที่มีทั้งขนาดเล็ก และขนาดตัวใหญ่ ส่วนการผลิตกะปิในภาคกลางซึ่งรวม

จังหวัดสมุทรสาครด้วยนั้นนิยมใช้เคยตาดำสกุล *Mesopodopsis* sp. เป็นวัตถุดิบในการผลิตกะปิ (สุรินทร์พร ยิ้มกัน, 2559: ออนไลน์)

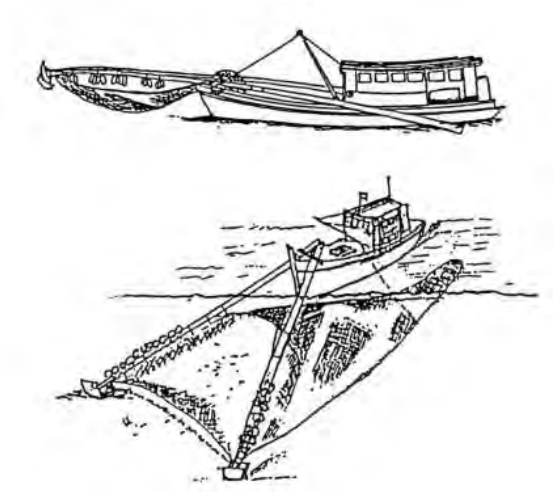
จากการศึกษาการแพร่กระจายของเคยสกุล *Acetes* sp. บริเวณแหล่งหญ้าทะเล และคลองป่าชายเลน ฝั่งทะเลอันดามัน สามารถจำแนกชนิดของเคยสกุล *Acetes* sp. ออกได้เป็น 3 ชนิด คือ *Acetes erytraeus*, *Acetes indicus และ Acetes japonicus* โดยเคยแต่ละชนิด จะมีลักษณะหนวดคู่ล่าง และหางที่แตกต่างกัน (วีระชาติ เพ็งจำรัส และทิพามาศ อุปน้อย, 2548) ซึ่งแหล่งที่อยู่อาศัยของเคยสกุล *Acetes* sp. จะพบได้ทั้งบริเวณป่าชายเลนและแนวหญ้าทะเล ซึ่งสามารถอาศัยอยู่ในระดับน้ำแต่บริเวณผิวน้ำไปจนถึงระดับน้ำที่ความลึก 20 เมตร (จินตนา ชูเหล็ก, 2540)

เคยสกุล *Mesopodopsis* sp. มักอาศัยอยู่รวมกันเป็นฝูงบริเวณชายฝั่ง และบริเวณที่เป็นน้ำกร่อย ในช่วงเวลากลางวันจะอาศัยอยู่ด้านล่างบริเวณพื้นทะเล กลางคืนจะขึ้นมาบริเวณผิวน้ำเพื่อการสืบพันธุ์ เคยชนิดนี้มีลักษณะพิเศษ คือ เมื่อนำมาใช้หมักกับเกลือตัวเคยจะสลายกลายเป็นเนื้อเดียว ทำให้กะปิมีเนื้อที่ละเอียด แต่จะหลงเหลือส่วนตาที่เป็นสีดำอยู่จึงสามารถสังเกตเห็นได้ชัดในเนื้อกะปิ (Eusebio, Coloso, and Gapasin, 2010)

3. การจับเคยเพื่อนำมาทำกะปิ

วิธีที่ใช้ในการจับเคยมีหลากหลายขึ้นอยู่กับช่วงฤดูในการจับเคย หรือบริเวณที่เคยเข้ามาอาศัย ซึ่งจะเริ่มตั้งแต่ประมาณเดือนมกราคมของทุกปีเป็นต้นไป การเก็บเคยจะแบ่งเป็นสามช่วง คือ ช่วงแรกจะอยู่ในเดือนมกราคม ในช่วงนี้จะใช้สวิงในการตักตัวเคยบริเวณผิวน้ำ ดังนั้นกะปิที่ผลิตในช่วงนี้จะมีความบริสุทธิ์สูง สะอาด และมักเป็นตัวเคยล้วนๆ ไม่มีสัตว์น้ำอื่นผสมอยู่

ช่วงที่สองอยู่ในช่วงประมาณเดือนกุมภาพันธ์ จะเป็นช่วงของการเก็บเคยบริเวณผิวดินใต้ทะเล ซึ่งจะเก็บเคยด้วยวิธีการรุนเคย โดยจะใช้อวนรุน (รูปที่ 2.2) ติดไว้ที่หัวเรือ ลักษณะปากอวนเปิดเป็นสามเหลี่ยมตามคันรุน โดยจะไสไปตามบริเวณที่เคยอยู่รวมกันเป็นฝูงในลักษณะเป็นแนวราบอย่างต่อเนื่อง จึงมักจะมีทรายปนมากับตัวเคยเพราะเป็นการรุนที่ผิวดิน และนอกจากนี้ยังมีลูกปลาอื่นๆ นอกเหนือจากตัวเคยติดมาด้วย



รูปที่ 2.2 อวนรุนโดยใช้เรือกล (วิชาญ ศิริชัยเอกวัฒน์, 2539)

ช่วงที่สามอยู่ในช่วงปลายเดือนมีนาคม จะใช้วิธีรุนเคยที่ผิวดินเช่นกัน แต่เคยที่เก็บได้จะมีขนาดใหญ่กว่า (อุดมศักดิ์ ดารุมาศ, 2008: ออนไลน์) นอกจากนี้ยังมีกรรมวิธีที่ใช้ในการจับเคยอีกวิธี คือ การยกยอ

การยกยอคือการใช้ยอเป็นเครื่องมือ โดยจะใช้ยอในการดักเคยบริเวณผิวดิน มักจะทำในบริเวณที่เป็นปากน้ำ คอยดักเคยที่ผ่านเข้ามา ซึ่งการยกยอบริเวณปากน้ำนั้นจะทำให้มีทรายปนเปื้อนจำนวนไม่มากเท่าการรุนเคย (รูปที่ 2.3) (ยุทธหัตถ์ อยู่สมบูรณ์, สัมภาษณ์, 19 ธันวาคม 2562)

รูปที่ 2.3 การยกยอ

4. ขั้นตอนการหมักเคยเป็นกะปิ

การหมักเคยให้เป็นกะปิที่มีคุณภาพนั้น ส่วนประกอบหลักของการทำกะปิคือ ตัวเคยและเกลือสมุทร ซึ่งกรรมวิธีการผลิตกะปิจะอาศัยหลักการเช่นเดียวกับการผลิตน้ำปลา โดยจะอาศัยเอนไซม์จากตัวกุ้งเป็นตัวที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก ทำให้เกิดการย่อยสลายโปรตีนและไขมันด้วยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นผลทำให้เกิดสารประกอบที่ทำให้เกิดกลิ่น และรสของผลิตภัณฑ์ ขั้นตอนการทำกะปิเริ่มจากการทำความสะอาดเคย โดยหลังจากชาวประมงจับเคยได้แล้วก็จะใช้ตะแกรงตาถี่ๆ ร่อนตัวเคย ใช้น้ำทะเลทำความสะอาดเพื่อให้เคยคงความสด และไม่เสียรสชาติที่ดีของกะปิ จากนั้นนำเคยสดที่ได้มาคลุกเคล้าให้เข้ากับเกลือ โดยเกลือที่ใช้คือเกลือสมุทร อัตราส่วนขึ้นอยู่กับแต่ละท้องที่ โดยทั่วไปหมักใช้อัตราส่วนเกลือ 1 ส่วนต่อเคย 10 ส่วน จากนั้นจะนำเคยที่หมักเกลือไปพักไว้โดยใส่ในภาชนะที่มีช่องระบาย เช่น ตะกร้า หรือห่อด้วยอวนตาถี่แล้วปิดทับด้วยวัสดุหนักๆ ปล่อยทิ้งไว้เพื่อให้น้ำระเหยออกไปจากเคย และปล่อยให้เคยหมักตัวผสมกับเกลือ โดยตั้งทิ้งไว้ 1-2 คืน ต่อมานำกะปิที่หมักไว้มาตากแดด แล้วนำมาตำหรือโขลกในครกไม้ให้ละเอียด วิธีนี้จะช่วยให้เนื้อกะปิเข้ากันมากขึ้น แล้วทำการบรรจุลงภาชนะหมัก ซึ่งภาชนะที่นิยมใช้คือ ถังไม้หรือโอ่งเคลือบ โดยการบรรจุกะปิจะต้องอัดกะปิลงไปให้แน่น ไม่ให้มีช่องว่าง เพื่อป้องกันการทำปฏิกิริยาระหว่างเนื้อกะปิกับอากาศ ซึ่งอาจจะทำให้เกิดกลิ่นไม่พึงประสงค์ขึ้น จากนั้นโรยเกลือเม็ดปิดหน้ากะปิ เพื่อช่วยรักษาผิวหน้าของกะปิเอาไว้ สามารถเก็บกะปิไว้ได้นานกว่า 6-7 เดือน (Mantiri, Ohtsuka, and Sawamoto, 2012)

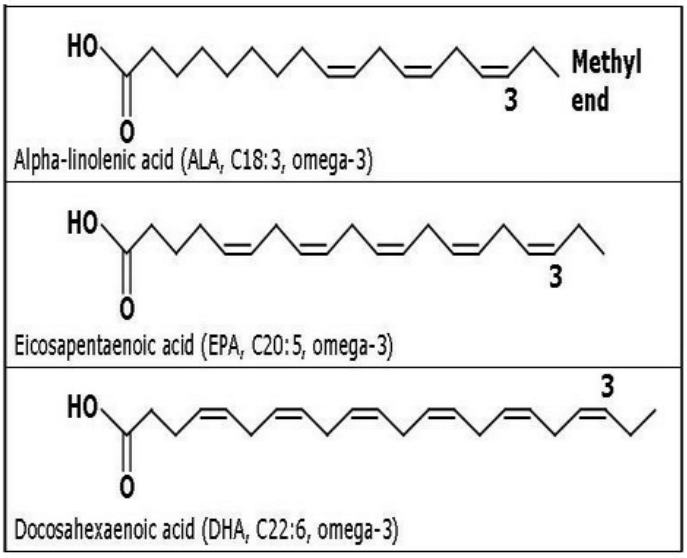
5. จุลินทรีย์ในกะปิ

กะปิคือผลิตภัณฑ์อาหารหมัก ที่อาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์เพื่อช่วยในการหมัก ซึ่งจุลินทรีย์ที่มักพบในการหมักกะปิอาจจะเป็นจุลินทรีย์ที่ได้มาพร้อมกับวัตถุดิบ หรืออาจจะเกิดขึ้นใหม่จากขั้นตอนการหมัก ส่วนใหญ่จุลินทรีย์ในกะปิเป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ทั้งที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) เช่น *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp., *Micrococcus* spp. (จิตต์เรขา ทองมณี, 2544) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยหลายฉบับที่รายงานว่า *Lentibacillus* spp. เป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้ในกะปิพื้นบ้านของไทย อย่างในงานวิจัยของ Pakdeeto และคณะ (2007) ที่ทำการคัดแยกเชื้อจากตัวอย่างกะปิและทำการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA แล้วพบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Lentibacillus salaries* 96.5% ซึ่งจากการตรวจสอบลักษณะพื้นฐานของจุลินทรีย์และสัดส่วนของโมเลกุลจึงถูกเสนอให้เป็นสปีชีส์ใหม่ คือ *Lentibacillus kapialis* sp. nov.หรืองานวิจัยของ Booncharoen และคณะ (2019) ที่ทำการคัดแยกเชื้อจาก

ตัวอย่างกะปิ และทำการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 16S rDNA ซึ่งพบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Lentibacillus juripiscarius* และ *Lentibacillus halophilus* ที่ 98.7% และ97.2% ตามลำดับ ซึ่งจากพื้นฐานของลักษณะของจุลินทรีย์ และ chemotaxonomic character จึงถูกเสนอให้เป็นสปีชีส์ใหม่ คือ *Lentibacillus lipolyticus* sp. nov. โดยแบคทีเรียเหล่านี้สามารถสร้างเอนไซม์ที่สามารถย่อยโปรตีนให้เป็นเพปไทด์สายสั้นๆ ที่มีผลต่อรสชาติของอาหาร และคุณค่าทางโภชนาการด้วย (Wong and Mine, 2004)

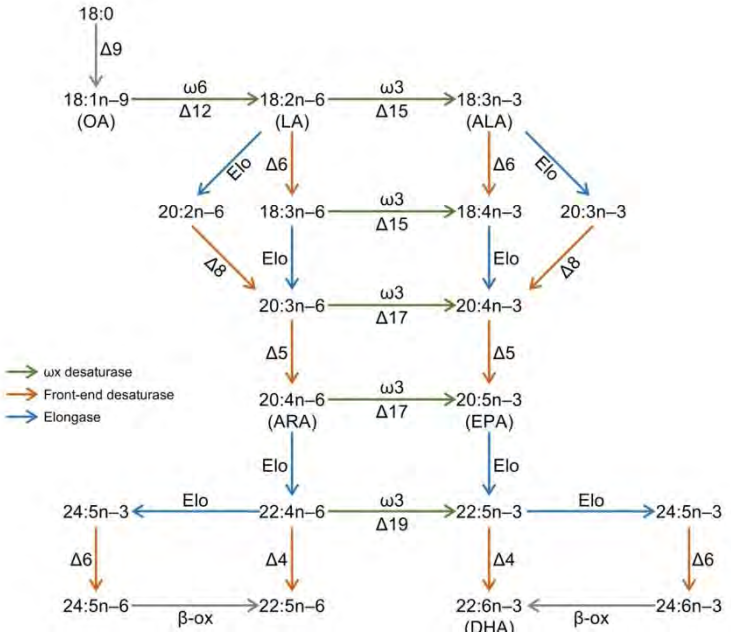
6. กรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวโอเมก้า3 (Omega3)

กรดไขมันโอเมก้า3 (Omega-3 Polyunsaturated fatty acid, ω-3 PUFAs, n-3 PUFAs) เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนที่มีพันธะคู่ตัวแรกอยู่ในตำแหน่งคาร์บอนตัวที่สามนับจากปลายด้าน methy กรดไขมันโอเมก้า3 ประกอบไปด้วยกรดไขมันที่สำคัญ 3 ชนิด ได้แก่ α-linoleic acid (ALA), eicosapentaenoic (EPA) และ docosahexaenoic acid (DHA) (ถนอมพงษ์ เสถียรลัคนา, 2561: ออนไลน์) ซึ่งมีโครงสร้างดังรูปที่ 2.4 เป็นกรดไขมันที่มนุษย์ไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นมาเองได้ ต้องได้จากการรับประทานเข้าไปเท่านั้น PUFAs สามารถพบได้ในสัตว์บางชนิด พืชบางชนิด รา สาหร่ายขนาดเล็ก (microalgea) และแบคทีเรียบางชนิด แต่อย่างไรก็ตามแหล่งอาหารที่สำคัญที่มีสารอาหารจำพวก DHA และ EPA อยู่ก็จะเป็นสัตว์พวกปลาทะเล รวมถึงสัตว์ทะเลที่รับประทานพวกสาหร่ายที่สร้าง PUFAs ได้เข้าไปแล้วสามารถเก็บสะสม PUFAs ไว้ในร่างกายของมันได้ (Guedes et al., 2011)



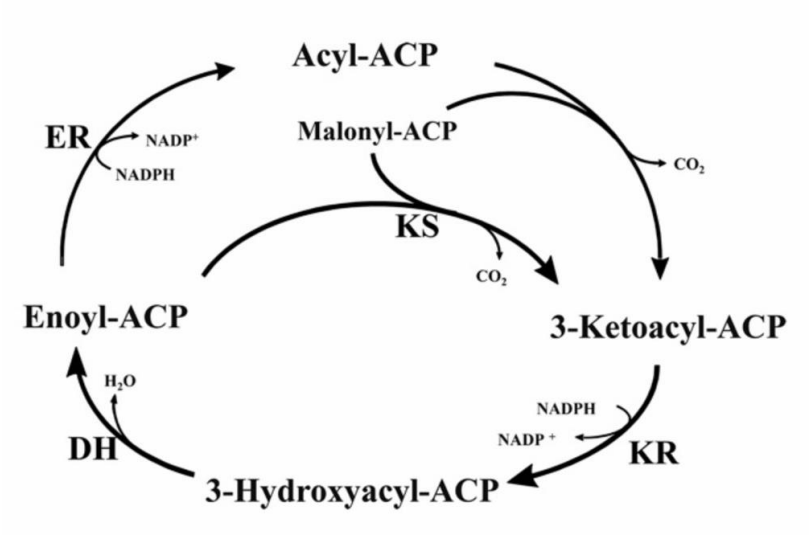
รูปที่ 2.4 โครงสร้างของ ALA, EPA และ DHA (Olgunoglu, 2017)

แบคทีเรียในทะเล (marine bacteria) บางชนิดมีความสามารถในการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว (Very-long-chain polyunsaturated fatty acids: VLCPUFAs) อย่าง EPA หรือ DHA ได้ด้วยกระบวนการ elongation และ desaturation ซึ่งเป็นกระบวนการที่อาศัยออกซิเจนโดยอาศัยเอนไซม์ในการสังเคราะห์ 3 ชนิดคือ **ω**-desaturase, front-end desaturase และ elogase (รูปที่ 2.5)



รูปที่ 2.5 การสังเคราะห์ PUFAs โดยอาศัยออกซิเจน (Monroig and Kabeya, 2018)

นอกจากนี้แบคทีเรียบางชนิด เช่น *shewanella* sp. และ *Vibrio* sp. สามารถสังเคราะห์ PUFAs ได้โดยไม่ใช้ออกซิเจนผ่านกระบวนการ polyketide synthase pathway (PKS pathway) (รูปที่ 2.6) โดยมีกระบวนการสำคัญ 4 กระบวนการได้แก่ ketoacyl-ACP synthase (KS), ketoreduction (KR), dehydration (DH), และ enoylreduction (ER) (Meesapyodsuk and Qiu, 2016)



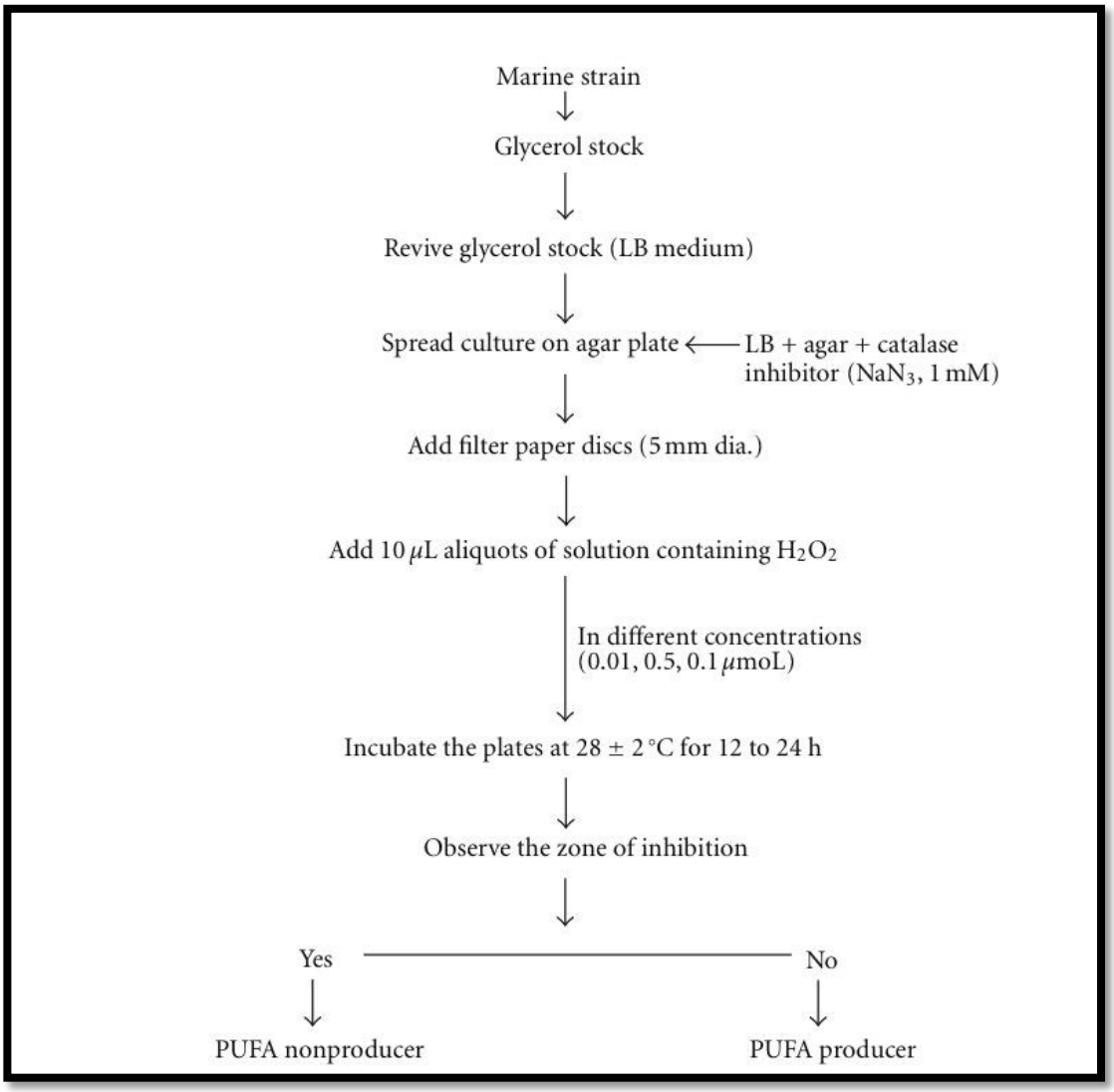
รูปที่ 2.6 การสังเคราะห์ PUFAs โดยไม่อาศัยออกซิเจนผ่าน PKS pathway (Meesapyodsuk and Qiu, 2016)

7. การตรวจสอบการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวในจุลินทรีย์

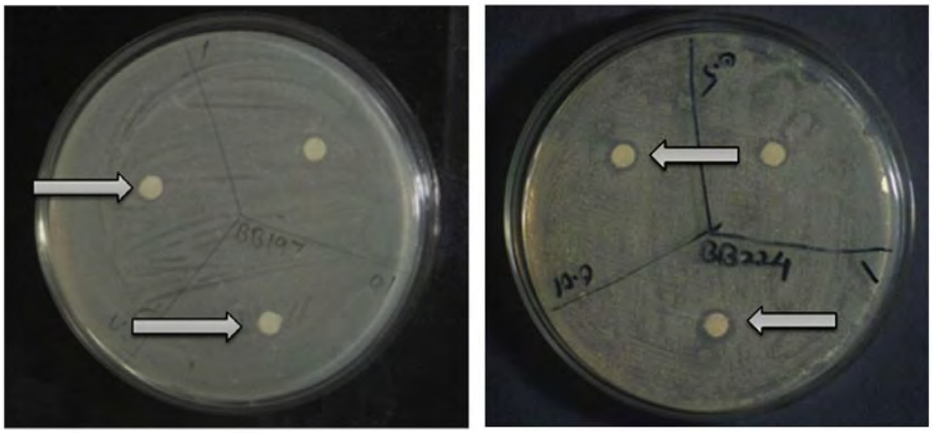
กรดไขมันไม่อิ่มตัวเป็นโมเลกุลที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับออกซิเจนและอนุพันธ์ของออกซิเจน (Reactive Oxygen Species, ROSs) หากเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัว ก็จะมีการสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวและสะสมไว้ที่บริเวณผนังเซลล์ ซึ่งเมื่อสัมผัสกับสารกลุ่มอนุมูลอิสระ (free radical) ก็จะเกิดปฏิกิริยาต่อกันทำให้ไม่มีโมเลกุลของอนุมูลอิสระที่เป็นพิษต่อเซลล์หลงเหลืออยู่ จุลินทรีย์จึงมีความสามารถในการอยู่รอดและเจริญเติบโตได้ ดังนั้น H_2O_2 plate assay จึงเป็นวิธีการตรวจสอบความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวในจุลินทรีย์ได้อย่างง่าย และสะดวกรวดเร็ว โดยอาศัยหลักในการต้านสารอนุมูลอิสระ (antioxidant) (ประดินันท์ เอี่ยมสะอาด, 2561)

H_2O_2 plate assay (รูปที่ 2.7) จะใช้โซเดียมเอไซด์เคลือบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อใช้ในการยับยั้งเอนไซม์คะตะเลส (catalase enzyme) ที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระชนิดหนึ่งที่พบได้ในเซลล์ของแบคทีเรีย เพื่อเป็นการยืนยันว่า จุลินทรีย์นี้มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัว และทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้จริง และใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นตัวแทนของอนุมูลอิสระในกลุ่มของ ROSs โดยการทดสอบนี้จะใช้ H_2O_2 ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันสามความเข้มข้นในการทดสอบ คือ 0.01% 0.1% และ 0.5% หากจุลินทรีย์มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวก็จะสามารถเจริญเติบโตได้ใน H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 0.01% และ 0.1% (no inhibition zone) ดังรูปที่ 2.8 (a) เนื่องจากที่ความเข้มข้นของ H_2O_2 0.5% อาจเป็นปริมาณที่เข้มข้นเกินไปจึงเป็นพิษกับ

แบคทีเรียทุกชนิดที่ใช้ทดสอบทำให้แบคทีเรียไม่สามารถเจริญเติบโตได้ จึงใช้เป็นตัวเทียบ inhibition zone (Tilay and Annapure, 2012)



รูปที่ 2.7 H_2O_2 plate assay (Tilay and Annapure, 2012)



(a) No zone of inhibition (PUFAs producer)

(b) Zone of inhibition (PUFAs non-producer)

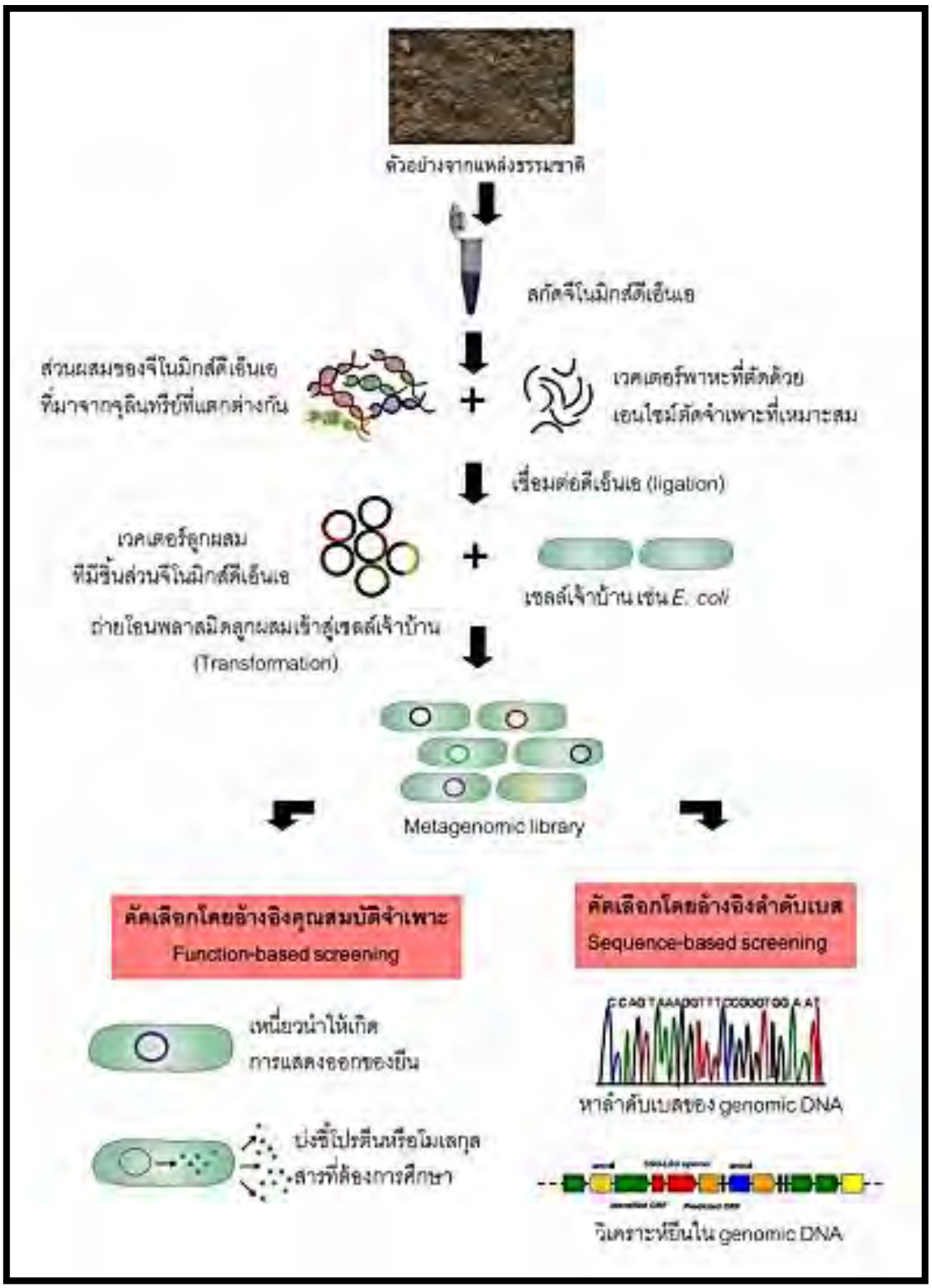
รูปที่ 2.8 ผลจากการทดสอบ H_2O_2 plate assay (Tilay and Annapure, 2012)

8. เมตาจีโนมิกส์

เมตาจีโนมิกส์ เป็นวิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุลที่ใช้ในการศึกษาจีโนมของจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างจากธรรมชาติที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ เนื่องจากอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์จะมีจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงได้จึงไม่ได้เป็นตัวแทนของชุมชีพจุลินทรีย์ ซึ่งพบว่า จุลินทรีย์กว่าร้อยละ 99 ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในห้องปฏิบัติการ จึงใช้วิธีการทางเมตาจีโนมิกส์ในการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างในธรรมชาติโดยตรง จากนั้นจึงวิเคราะห์ดีเอ็นเอเหล่านั้นโดยมุ่งเน้นไปที่การค้นหายีนในการถอดรหัสที่ต้องการ จากฐานข้อมูลเมตาจีโนม (metagenomic library)

แนวทางการศึกษาเมตาจีโนมิกส์

การศึกษาเมตาจีโนมนั้นเริ่มจากการสกัดดีเอ็นเอของจุลินทรีย์จากสิ่งแวดล้อมโดยตรง จากนั้นจะใช้วิธีวิเคราะห์ดีเอ็นเอเหล่านั้น ดังนี้ คือ แนวทางที่หนึ่ง เพิ่มจำนวนในส่วนลำดับเบสของยีน 16S rDNA หรือ 18S rDNA ด้วยวิธีการ polymerase chain reaction เพื่อศึกษาชนิดของจุลินทรีย์ในตัวอย่างนั้นๆ แนวทางที่สองคือ นำดีเอ็นเอที่สกัดได้เข้าสู่พาหะและนำเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านเพื่อสร้างเป็น metagenomic library ใช้สำหรับการศึกษาคุณสมบัติที่น่าสนใจของจุลินทรีย์ เช่น การบ่งชี้ลำดับวิวัฒนาการ หรือการค้นหาเอนไซม์ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประโยชน์ เป็นต้น และแนวทางสุดท้ายคือการวิเคราะห์เพื่อหาลำดับเบสทั้งหมดของเมตาจีโนมในจุลินทรีย์ (รูปที่ 2.9) (อัชฌา บุญมี, 2556)



รูปที่ 2.9 วิธีการสร้างและคัดเลือกเอนไซม์หรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

จากmetagenomic library (อัชฌา บุญมี, 2556)

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินการ

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

วัสดุอุปกรณ์

1. เครื่องเขย่าสาร (Vision Scientific, Korea)
2. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Bio-Active, Thailand)
3. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Hettich, Germany)
4. ชุดสกัดสำเร็จรูป E.Z.N.A.® Bacterial DNA kit (Omega Bio-tek, Georgia, USA)
5. ชุดสกัดสำเร็จรูป NucleoSpin® Soil kit (Macherey-Nagel, Germany)
6. เจลอะกาโรส (agarose gel)
7. ไมโครปิเปตต์ (micropipette)
8. ไมโครปิเปตต์ทิป (micropipette tip)

สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ
    1.1. Sodium chloride (NaCl)
    1.2. Tryptone
    1.3. Yeast extract
    1.4. Agar
2. สารเคมีที่ใช้การทดสอบความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัว
    2.1. Sodium azide (NaN_3)
    2.2. Hydrogen peroxide (H_2O_2)
3. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากกะปิ NucleoSpin® Soil kit (Macherey-Nagel, Germany)
    3.1. Lysis Buffer SL1
    3.2. Lysis Buffer SL2

3.3. Lysis Buffer SL3

3.4. Enhancer SX

3.5. Binding Buffer SB 10

3.6. Wash Buffer SW1

3.7. Wash Buffer SW2

3.8. น้ำกลั่นที่ผ่านกระบวนการ autoclave (ใช้แทน elution buffer SE)

4. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย E.Z.N.A.® Bacterial DNA kit (Omega Bio-tek, USA)

4.1. TE Buffer

4.2. BL Buffer

4.3. HBC Buffer

4.4. DNA Wash Buffer

4.5. Elution Buffer

4.6. Proteinase K Solution

4.7. RNase A

4.8. Lysozyme

5. สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR

5.1. 5x Phusion taq (BioLabs, USA)

5.2. dNTPs set

5.3. DNA template

5.4. 5X Phusion HF Buffer (BioLabs, USA)

5.5. น้ำกลั่นที่ผ่านกระบวนการ autoclave

5.6. 27F primer

5.7. 1492R primer

6. สารเคมีที่ใช้สำหรับการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

6.1. VC 1Kb DNA Ladder (Vivantis, Malaysia)

6.2. 1X TBE Buffer (Tris-borate-EDTA)

6.3. Agarose gel 1.0%

วิธีการดำเนินงาน

1. การรวบรวมตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างผลิตภัณฑ์กะปิพื้นเมืองของไทย รวบรวมจากบริเวณอ่าวไทย 3 บริเวณ คือ จังหวัดสมุทรสงคราม (อ่าวไทยตอนบนฝั่งตะวันตก) จังหวัดชลบุรี (อ่าวไทยตอนบนฝั่งตะวันออก) และจังหวัดสงขลา (อ่าวไทยตอนล่าง) นำตัวอย่างกะปิมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. การตรวจสอบปริมาณสารอาหารในกะปิด้วยวิธีมาตรฐาน

ส่งตัวอย่างกะปิไปตรวจสอบปริมาณสารอาหารในกะปิ อ้างอิงวิธีการตามมาตรฐาน Association of Official Analytical Chemists (AOAC) โดยวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต องค์ประกอบของไนโตรเจน และปริมาณกรดไขมัน ณ สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. การศึกษาเมตาจีโนมของตัวอย่างกะปิ

3.1. การสกัดดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างกะปิที่พบว่ามีปริมาณ DHA มากที่สุด และผลิตภัณฑ์กะปิที่มีปริมาณ DHA น้อยที่สุดที่ได้จากการวิเคราะห์ในข้อ 2 มาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป NucleoSpin® Soil (Macherey-Nagel, Germany) ทำการทดสอบเงื่อนไขในการสกัด โดยศึกษาเงื่อนไขการใช้ Lysis Buffer ในการสกัดระหว่าง Lysis Buffer SL1 และ Lysis Buffer SL2 รวมถึงการจะเลือกใช้ Enhancer SX ร่วมด้วยหรือไม่ เพื่อให้ได้เงื่อนไขที่ดีที่สุดที่จะใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากกะปิ จากนั้นเก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2. การตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้

ตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยวิธี 1.0% agarose gel electrophoresis วัดค่าดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Epoch micro plate spectrophotometer (BioTek, USA) ซึ่งค่าที่ได้จะต้องมีค่า A_{260} / A_{280} อยู่ระหว่าง 1.7-2.0 และมีค่าความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอในตัวอย่าง 20-200 ng/µl จึงจะยอมรับว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์

และสามารถส่งตรวจได้ตามมาตรฐานของศูนย์วิทยาศาสตร์โอมิกส์ และชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3. ส่งวิเคราะห์เมตาจีโนม

ทำการส่งดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่สกัดได้จากกะปิตัวอย่าง ที่ทำการตรวจสอบแล้วว่ามีคุณภาพ และมีความบริสุทธิ์ไปวิเคราะห์เมตาจีโนมด้วยเทคนิค 16S rDNA V3-V4 region amplicon analyses (Klindworth et al, 2013) และใช้เทคนิค next-generation sequencing (Illumina Miseq, US) ในการหาลำดับเบสที่ศูนย์วิทยาศาสตร์โอมิกส์ และชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. การคัดแยกเชื้อทางจุลชีววิทยาร่วมกับการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

4.1 การคัดแยกเชื้อทางจุลชีววิทยา

คัดแยกจุลินทรีย์จากกะปิทุกตัวอย่างที่ทำการเก็บมา โดยการนำสารละลายตัวอย่างกะปิใส่ใน LB broth บ่มในเครื่องเขย่าสาร (Vision Scientific, Korea) ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ด้วยรอบการเขย่า 170 rpm นำไป spread-plate บนอาหารชนิดแข็ง LB agar และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ทำการเลือกไอโซเลตจากแต่ละตัวอย่างมาตัวอย่างละ 5 ไอโซเลต และนำไปเลี้ยงใน LB broth บ่มในเครื่องเขย่าสาร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ด้วยรอบการเขย่า 170 rpm จากนั้นนำจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลตไปทดสอบความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวด้วย H_2O_2 plate assay method (Tilay and Annapure, 2012)

4.2 ระบุชนิดจุลินทรีย์ด้วยยีน 16S rDNA

นำโคโลนีเดี่ยวที่ผ่านการทดสอบแล้วว่ามีความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวมาทำการสกัดดีเอ็นเอด้วย E.Z.N.A.® Bacterial DNA kit (Omega Bio-tek, USA) และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพอลิเมอเรส (polymerase chain reaction: PCR) ในลำดับเบส 16S rDNA ด้วยการใช้ universal primer คือ 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' และ 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' (Turner et al, 1999) ทำการตรวจสอบคุณภาพของผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธี gel electrophoresis และวัดค่าดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรและค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

ด้วยเครื่อง Epoch micro plate spectrophotometer (BioTek, USA) ค่าที่ได้จะต้องมีค่า A_{260} / A_{280} อยู่ระหว่าง 0.8-1.0 และมีค่าความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอในตัวอย่าง 20-200 ng/µl จึงจะยอมรับว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์ และสามารถส่งตรวจได้แล้วจึงนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ที่บริษัท Pacific Science จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในฐานข้อมูล Genbank โดยใช้โปรแกรม BLASTn (NCBI) (Altschul et al, 1990) จากนั้นทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ด้วยโปรแกรม ClustalW (Thompson et al, 1994)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

การรวบรวมตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างกะปิถูกรวบรวมจาก 3 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดสมุทรสงคราม จำนวน 3 ตัวอย่าง ได้แก่ KK1, KK2 และ KK3 จังหวัดชลบุรี จำนวน 3 ตัวอย่าง ได้แก่ SR1, SR2, และ SR3 และจังหวัดสงขลา 1 ตัวอย่าง คือ TP1 รวมทั้งหมดเป็น 7 ตัวอย่าง โดยมีรายละเอียดดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ตัวอย่างกะปิ 7 ชนิดที่ใช้ในการศึกษา

บริเวณเก็บ	ตัวอย่าง	ข้อมูลของกะปิ	ลักษณะภายนอกของกะปิ
อ่าวไทยตอนบนฝั่งตะวันตก	KK1	กะปิเคยตาดำ (คลองโคน) ตำบลคลองโคน อำเภอเมืองจังหวัดสมุทรสงคราม GPS location: 13.427913,99.979099 ลักษณะ: มีสีน้ำตาลคล้ำ เนื้อกะปิค่อนข้างเนียนละเอียด มีจุดสีดำเล็กๆกระจายอยู่ทั่วเนื้อกะปิ	
	KK2	กะปิคลองโคน ตำบลคลองโคน อำเภอเมืองจังหวัดสมุทรสงคราม GPS location: 13.563737, 100.2540 ลักษณะ: มีสีน้ำตาลคล้ำ เนื้อกะปิค่อนข้างเนียนมีความหยาบเล็กน้อย มีจุดสีดำเล็กๆกระจายอยู่ทั่วเนื้อกะปิ	
	KK3	กะปิเคยตาดำ (คลองโคน) ตำบลคลองโคน อำเภอเมืองจังหวัดสมุทรสงคราม GPS location: 13.468371, 100.20611 ลักษณะ: มีสีน้ำตาลเข้ม เนื้อกะปิค่อนเนียน และมีความเหนียว	

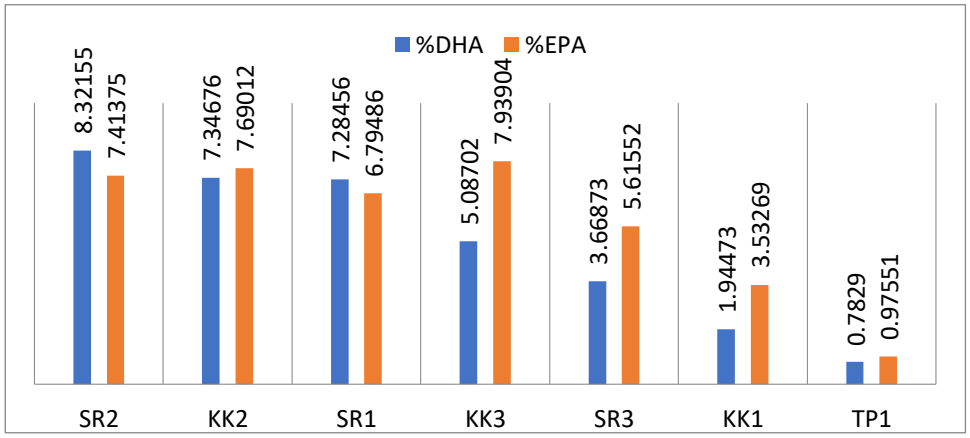
ตารางที่ 4.1(ต่อ) ตัวอย่างกะปิ 7 ชนิดที่ใช้ในการศึกษา

บริเวณเก็บ	ตัวอย่าง	ข้อมูลของกะปิ	ลักษณะภายนอกของกะปิ
อ่าวไทยตอนบนฝั่งตะวันออก	SR1	กะปิศรีราชา ตำบลบางพระ อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี GPS location: 13.16489, 100.9306 ลักษณะ: มีสำน้ำตาลเข้ม เนื้อกะปิมีความหยาบเล็กน้อย มีจุดสีดำเล็กๆกระจายทั่วเนื้อกะปิ	
	SR2	กะปิศรีราชา ตำบลบางพระ อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี GPS location: 13.16489, 100.9306 ลักษณะ: มีสำน้ำตาลเข้ม เนื้อกะปิเนียนละเอียดค่อนข้างละเอียด มีจุดสีดำเล็กๆกระจายทั่วเนื้อกะปิ	
	SR3	กะปิศรีราชา ตำบลบางพระ อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี GPS location: 13.16489, 100.9306 ลักษณะ: มีสำน้ำตาลเข้ม เนื้อกะปิค่อนข้างแห้ง มีจุดสีดำเล็กๆกระจายทั่วเนื้อกะปิ	
อ่าวไทยตอนล่าง	TP1	กะปิเทพา ตำบลเทพา อำเภอเทพา จังหวัดสงขลา GPS location: 6.8700960, 100.9690240 ลักษณะ: มีสีน้ำตาลคล้ำ เนื้อกะปิเนียนละเอียด มีจุดสีดำเล็กๆกระจายทั่วเนื้อกะปิ	

การตรวจสอบปริมาณสารอาหารในตัวอย่างกะปิด้วยวิธีมาตรฐาน AOAC

จากการส่งตัวอย่างกะปิทั้ง 7 ตัวอย่างดังนี้ KK1, KK2, KK3, SR1, SR2, SR3 และTP1 ไปตรวจสอบปริมาณสารอาหาร ทดสอบโดยวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตด้วยวิธี Analysis for Nutrition Labeling 1995 chapter 1,5 ปริมาณโปรตีนด้วย AOAC (2016) 991.20 และ

องค์ประกอบของกรดไขมันด้วย AOAC (2019) 996.06 พบว่าในกะปิทั้ง 7 ชนิดมีสัดส่วนของกรดไขมันอิ่มตัวมากกว่าไขมันไม่อิ่มตัว และจากการวิเคราะห์ปริมาณ DHA ในกะปิตัวอย่าง พบว่า กะปิ SR2 มีปริมาณ DHA สูงมากที่สุด คิดเป็น 8.32155% ของปริมาณกรดไขมันทั้งหมด และ ในกะปิ TP1 มีปริมาณ DHA น้อยที่สุด คิดเป็น 0.78290% ของปริมาณกรดไขมันทั้งหมด ดังรูปที่ 4.1 และตารางที่ 4.2



รูปที่ 4.1 ตัวอย่างกะปิที่มีปริมาณ DHA จากสูงที่สุดไปต่ำที่สุด

ตารางที่ 4.2 ข้อมูลทางโภชนาการในกะปิแต่ละชนิด

บริเวณที่เก็บตัวอย่าง	ตัวอย่างกะปิ	กรดไขมันอิ่มตัว (%)	กรดไขมันไม่อิ่มตัว (%)	โอเมก้า 3			โปรตีน g/100g	คาร์โบไฮเดรต g/100g
				ALA (%)	EPA (%)	DHA (%)		
อ่าวไทยตอนบนฝั่งตะวันตก	KK1	86.43451	13.56549	0.00000	3.53269	1.94473	15.75	-
	KK2	67.17482	32.8252	0.00000	7.69012	7.34676	28.17	6.89
	KK3	79.46222	20.53777	0.00000	7.93904	5.08702	14.40	14.16
อ่าวไทยตอนบนฝั่งตะวันออก	SR1	73.95424	26.04574	0.00000	6.79486	7.28456	26.67	3.80
	SR2	72.99434	28.6841	0.00000	7.41375	8.32155	27.04	4.80
	SR3	78.41428	21.58571	0.00000	5.61552	3.66873	-	-
อ่าวไทยตอนล่าง	TP1	84.38803	15.61197	0.76393	0.97551	0.78290	21.76	-

*- คือ ไม่มีข้อมูล

การศึกษาเมตาจีโนมของตัวอย่างกะปิ

นำตัวอย่างกะปิ SR2 และ TP1 ที่ทำการวิเคราะห์แล้วพบว่ามีปริมาณ DHA มากที่สุดและน้อยที่สุดตามลำดับ โดยมาสกัดดีเอ็นเอ และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยวัดค่าดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Epoch micro plate spectrophotometer (BioTek, USA) โดยศึกษาเงื่อนไขในการสกัด พบว่าเงื่อนไขที่ใช้ SL2 ร่วมกับ Enhancer SX ในการสกัดดีเอ็นเอเหมาะสมที่สุด คือมีค่าA_{260} / A_{280} อยู่ระหว่าง 1.7-2.0 และมีค่าความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอในตัวอย่าง 20-200 ng/µl โดยในกะปิ SR2 มีค่า A_{260} / A_{280} เท่ากับ 2.008 มีปริมาณดีเอ็นเอ 24.895 ng/µl และ ในกะปิ TP1 มีค่า A_{260} / A_{280} เท่ากับ 1.763 ปริมาณดีเอ็นเอ 7.026 ng/µl โดยเงื่อนไขนี้มีความใกล้เคียงกับเกณฑ์ในการพิจารณามากที่สุด และให้ปริมาณดีเอ็นเอมากที่สุด จึงเป็นเงื่อนไขที่จะใช้ในการสกัดดีเอ็นเอเพื่อศึกษาเมตาจีโนมในการศึกษาครั้งนี้ **ดังตารางที่ 4.3**

ตารางที่ 4.3 คุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป NucleoSpin® Soil kit

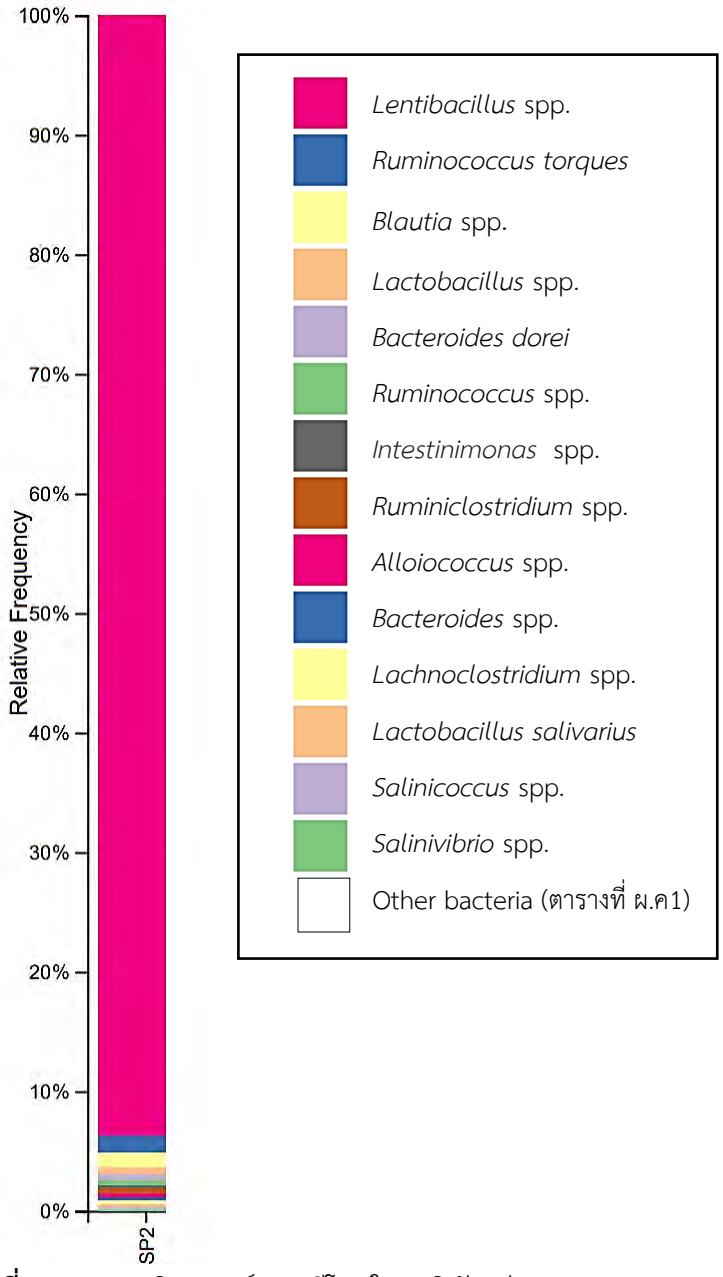
	ตัวอย่างกะปิ SR2				ตัวอย่างกะปิ TP1			
Buffer	SL1		SL2		SL1		SL2	
Enhancer SX	+	-	+	-	+	-	+	-
A260/A280	2.381	1.769	2.008	1.267	2.409	1.867	1.763	1.778
ปริมาณดีเอ็นเอ (ng/µl)	5.263	4.875	24.895	4.019	5.579	2.941	7.026	6.697

*เครื่องหมาย + คือเติม Enhancer SX และเครื่องหมาย – คือ ไม่เติม Enhancer SX

จากนั้นนำเงื่อนไขที่ได้มาทำการสกัดดีเอ็นเอในตัวอย่างกะปิทั้ง 2 เพื่อใช้ในการส่งวิเคราะห์เมตาจีโนม เมื่อสกัดได้แล้วทำการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยวัดค่าดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Epoch micro plate spectrophotometer (BioTek, USA) พบว่าในตัวอย่างกะปิ SR2 มีค่า A_{260} / A_{280}เท่ากับ 1.859 มีปริมาณดีเอ็นเอ 26.366 ng/µl และ ในกะปิ TP1 มีค่า A_{260} / A_{280} เท่ากับ 1.931 ปริมาณดีเอ็นเอ 5.895 ng/µl เก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสก่อนนำส่งไปวิเคราะห์เมตาจีโนม

ผลการส่งวิเคราะห์เมตาจีโนม

จากการส่งวิเคราะห์ทางเมตาจีโนมในกะปิตัวอย่าง SR2 และ TP1 ด้วยเทคนิค next-generation sequencing (Illumina Miseq, US) พบว่าตัวอย่างกะปิ TP1 ไม่สามารถทำการวิเคราะห์ผลได้ แต่ในตัวอย่างกะปิ SR2 สามารถวิเคราะห์ผลได้โดยพบแบคทีเรียที่ปริมาณมากที่สุดคือแบคทีเรียสกุล *Lentibacillus* spp. ที่ค่าความถี่สัมพัทธ์ของชนิดแบคทีเรียในการวิเคราะห์เมตาจีโนมมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ *Ruminococcus torques* และ *Blautia* sp. ตามลำดับ (รูปที่ 4.2)



รูปที่ 4.2 ผลการวิเคราะห์เมตาจีโนมในกะปิตัวอย่าง SR2

การคัดแยกเชื้อทางจุลชีววิทยาร่วมกับการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

นำกะปิทั้ง 7 ชนิดมาทำการคัดแยกเชื้อทางจุลินทรีย์ โดยในกะปิแต่ละชนิดทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์ออกมาชนิดละ 5 ไอโซเลต ได้ทั้งหมด 35 ไอโซเลต จากนั้นนำมาทำการตรวจสอบความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวในจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลต (H_2O_2 plate assay) ดังตารางที่ 4.4 – 4.6 พบว่า ในตัวอย่างกะปิทั้ง 7 ชนิดพบจุลินทรีย์ทั้งหมด 5 ไอโซเลตที่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัว ได้แก่ KK1-1, KK1-3, SR1-4, SR2-2 และ TP1-1 ดังรูปที่ 4.3

ตารางที่ 4.4 ผลการทดสอบความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวในกะปิที่เก็บบริเวณอ่าวไทยตอนบนฝั่งตะวันตก

ตัวอย่าง	Isolate	H_2O_2 (%)			PUFA
		0.01	0.1	0.5	+ve/-ve
KK1	KK1-1	+	+	-	+ve
	KK1-2	-	-	-	-ve
	KK1-3	+	+	-	+ve
	KK1-4	-	-	-	-ve
	KK1-5	-	-	-	-ve
KK2	KK2-1	-	-	-	-ve
	KK2-2	-	-	-	-ve
	KK2-3	-	-	-	-ve
	KK2-4	+	-	-	-ve
	KK2-5	-	-	-	-ve
KK3	KK3-1	+	-	-	-ve
	KK3-2	+	-	-	-ve
	KK3-3	+	-	-	-ve
	KK3-4	+	-	-	-ve
	KK3-5	+	-	-	-ve

*+คือมีการเจริญของจุลินทรีย์ (no inhibition zone), - คือไม่มีการเจริญของจุลินทรีย์ (inhibition zone), +ve คือจุลินทรีย์มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัว และ -ve คือจุลินทรีย์ไม่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัว

ตารางที่ 4.5 ผลการทดสอบความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวในกะปิที่เก็บบริเวณอ่าวไทยตอนบนฝั่งตะวันออก

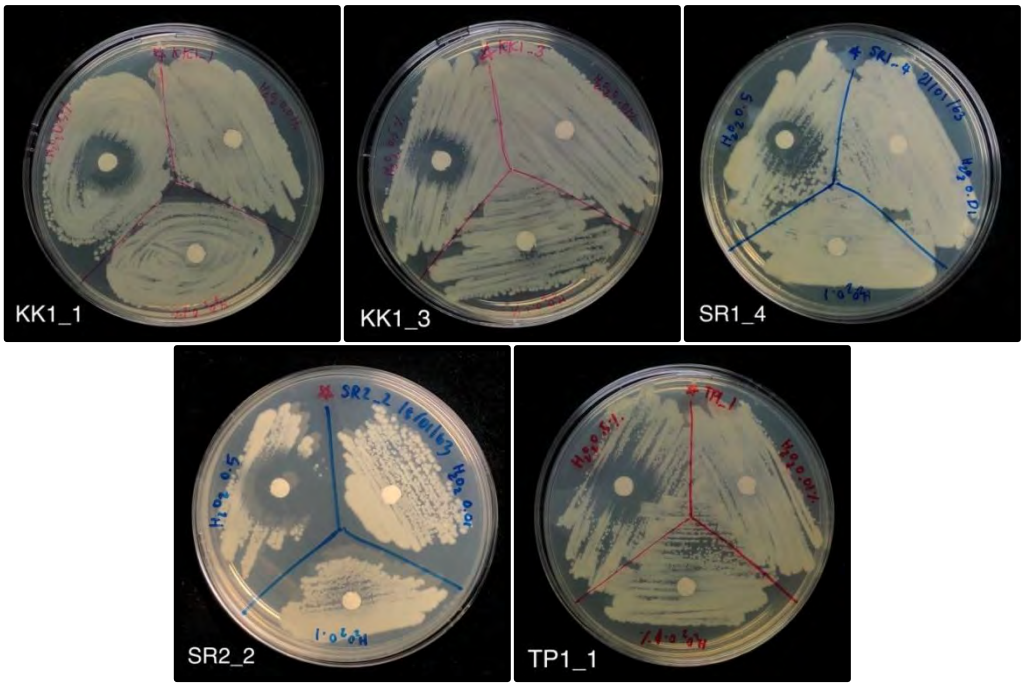
ตัวอย่าง	Isolate	H_2O_2 (%)			PUFA
		0.01	0.1	0.5	+ve/-ve
SR1	SR1-1	-	-	-	-ve
	SR1-2	-	-	-	-ve
	SR1-3	+	-	-	-ve
	SR1-4	+	+	-	+ve
	SR1-5	-	-	-	-ve
SR2	SR2-1	+	-	-	-ve
	SR2-2	+	+	-	+ve
	SR2-3	+	-	-	-ve
	SR2-4	+	-	-	-ve
	SR2-5	+	-	-	-ve
SR3	SR3-1	+	-	-	-ve
	SR3-2	+	-	-	-ve
	SR3-3	+	-	-	-ve
	SR3-4	+	-	-	-ve
	SR3-5	+	-	-	-ve

*+คือมีการเจริญของจุลินทรีย์ (no inhibition zone), - คือไม่มีการเจริญของจุลินทรีย์ (inhibition zone), +ve คือจุลินทรีย์มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัว และ -ve คือจุลินทรีย์ไม่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัว

ตารางที่ 4.6 การทดสอบความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวในกะปิที่เก็บบริเวณอ่าวไทยตอนล่าง

ตัวอย่าง	Isolate	H_2O_2 (%)			PUFA
		0.01	0.1	0.5	+ve/-ve
TP1	TP1-1	+	+	-	+ve
	TP1-2	-	-	-	-ve
	TP1-3	+	-	-	-ve
	TP1-4	-	-	-	-ve
	TP1-5	-	-	-	-ve

*+คือมีการเจริญของจุลินทรีย์ (no inhibition zone), - คือไม่มีการเจริญของจุลินทรีย์ (inhibition zone), +ve คือจุลินทรีย์มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัว และ -ve คือจุลินทรีย์ไม่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัว



รูปที่ 4.3 แบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลตที่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวทดสอบด้วย H_2O_2 plate assay

การระบุชนิดจุลินทรีย์ด้วยยีน 16S rDNA

นำโคโลนีเดี่ยวของทั้ง 5 ไอโซเลต ได้แก่ KK1_1, KK1_3, SR1_4, SR2_2 และ TP1_1 มาทำการสกัดดีเอ็นเอด้วย E.Z.N.A.® Bacterial DNA kit (Omega Bio-tek, Georgia, USA) หลังจากสกัดดีเอ็นเอแล้วจึงนำดีเอ็นมาตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Quantification) และตรวจความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (DNA purity) ด้วยเครื่อง nanodrop พบว่าในแต่ละไอโซเลตมีปริมาณดีเอ็นเอและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ดังตารางที่ 4.7 จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพอลิเมอเรส (polymerase chain reaction: PCR) ในลำดับเบส 16S rDNA

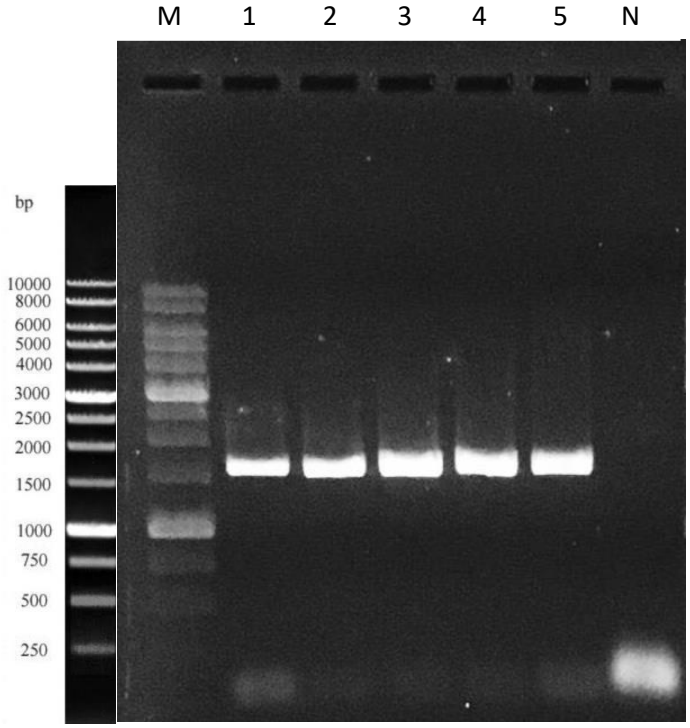
ตารางที่ 4.7 ปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Quantification) และความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (DNA purity) หลังสกัด

Isolate	A_{260}	A_{280}	A_{260} / A_{280}	ปริมาณดีเอ็นเอ (ng/µl)
KK1_1	0.028	0.008	3.275	27.521
KK1_3	0.034	0.011	3.075	34.186
SR1_4	0.030	0.009	3.393	39.824
SR2_2	0.059	0.026	2.226	58.707
TP1_1	0.029	0.008	3.443	28.632

ผลการตรวจสอบความถูกต้องของ PCR products ด้วย gel electrophoresis

หลังจากกระบวนการ PCR ในส่วนของยีน 16S rDNA แล้วจึงนำ PCR products มาตรวจสอบด้วย gel electrophoresis พบว่า PCR products เกิดแถบขึ้นบริเวณความยาว ประมาณ 1500 bp ทั้ง 5 ตัวอย่าง ดังรูปที่ 4.4 จากนั้นทำตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอ และตรวจความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอพบว่าค่า A_{260} / A_{280} อยู่ระหว่าง 0.8-1.0 และมีค่าความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอในตัวอย่างอยู่ในช่วง 20-200 ng/µl ดังตารางที่ 4.8 แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์ และ

สามารถส่งตรวจได้แล้วจึงนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ที่บริษัท Pacific Science ได้



M: 1kb ladder

1: KK1_1

2: KK1_3

3: SR1_4

4: SR2_2

5: TP1_1

N: negative control (ใช้น้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอที่สกัดได้)

รูปที่ 4.4 เจลที่ได้จากการตรวจสอบ PCR product ของ 16S rDNA มีความยาวประมาณ 1500 bp

ตารางที่ 4.8 ปริมาณดีเอ็นเอ และความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ ของ PCR products

Isolate	A_{260}	A_{280}	A_{260} / A_{280}	ปริมาณดีเอ็นเอ (ng/µl)
KK1_1	0.109	0.115	0.952	109.349
KK1_3	0.106	0.117	0.900	105.553
SR1_4	0.118	0.131	0.900	117.847
SR2_2	0.165	0.176	0.938	164.716
TP1_1	0.114	0.125	0.909	113.79

การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

นำลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์มาทำการเทียบกับฐานข้อมูล NCBI (BLASTn) ผลที่ได้คือ ไอโซเลต SR2_2 มีความใกล้เคียงกับ *Bacillus paramycoides* และ *Bacillus* albus 99.52% ไอโซเลต SR1_4 มีความใกล้เคียงกับ *Bacillus paramycoides* 86.47% ไอโซเลต TP1_1 มีความใกล้เคียงกับ *Bacillus proteolyticus* 99.53% ไอโซเลต KK1_1 มีความใกล้เคียงกับ *Bacillus paramycoides* 99.52% และไอโซเลต KK1_3 มีความใกล้เคียงกับ *Bacillus paramycoides* 99.18% (ตารางที่ 4.9)

ตารางที่ 4.9 ผลการเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ของยีน 16S rDNA

ตัวอย่างที่	Isolate	species	%identity	Total score	Accession no.
1	SR2_2	*B. paramycoides*	99.52	1910	NR_157734.1
		B. albus	99.52	1910	NR_157729.1
2	SR1_4	*B. paramycoides*	86.47	1339	NR_157734.1
3	TP1_1	*B. proteolyticus*	99.53	3865	NR_157735.1
4	KK1_1	*B. paramycoides*	99.52	3808	NR_157734.1
5	KK1_3	*B. paramycoides*	99.18	3876	NR_157734.1

บทที่ 5

อภิปรายผล

ปริมาณสารอาหารในตัวอย่างกะปิ

จากการตรวจสอบคุณค่าทางโภชนาการในกะปิทั้ง 7 ตัวอย่างที่ทำการศึกษา พบว่าตัวอย่างกะปิที่มีปริมาณ DHA เรียงจากมากที่สุดไปน้อยที่สุดเป็นดังนี้ SR2, KK2, SR1, KK3, SR3, KK1, และ TP1 นอกจากนี้ยังทำการตรวจสอบคุณค่าทางอาหารอื่นๆ อีก อย่างเช่น EPA ที่เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวในกลุ่มของโอดมก้า 3 อีกชนิดหนึ่ง โดยพบว่า ตัวอย่างกะปิที่มีปริมาณ EPA เรียงจากมากที่สุดไปน้อยที่สุดเป็นดังนี้ KK3, KK2, SR2, SR1, SR3, KK1, และ TP1 ดังตารางที่ 4.2 แสดงให้เห็นว่าแม้บริเวณที่ทำการเก็บตัวอย่างจะอยู่บริเวณเดียวกัน แต่คุณค่าทางโภชนาการที่วิเคราะห์ได้ก็แตกต่างกันออกไปโดยไม่ขึ้นอยู่กับบริเวณที่ทำการเก็บตัวอย่าง ซึ่งสัดส่วนของคุณค่าทางโภชนาการในอาหารที่แตกต่างกันออกไปนั้นขึ้นอยู่กับวัตถุดิบ และกรรมวิธีในการผลิตของแต่ละพื้นที่ ซึ่งจะทำให้ได้จุลินทรีย์ที่เกิดในขั้นตอนการหมักกะปิหรือที่ได้มาพร้อมกับวัตถุดิบนั้นแตกต่างกันไปด้วย (จิตต์เรขา ทองมณี, 2544) โดยจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถสร้างเอนไซม์ที่สามารถย่อยโปรตีนให้เป็นเพปไทด์สายสั้นๆ ที่มีผลต่อรสชาติของอาหาร และคุณค่าทางโภชนาการด้วย (Wong and Mine, 2004) ดังนั้นจึงส่งผลทำให้กะปิแต่ละท้องที่นั้นมีคุณภาพที่แตกต่างกัน

การศึกษาเมตาจีโนม

การวิเคราะห์เมตาจีโนมในตัวอย่างกะปิที่มีปริมาณ DHA มากที่สุด คือกะปิตัวอย่าง SR2 และน้อยที่สุด คือกะปิตัวอย่าง TP1 พบว่าในตัวอย่างกะปิ TP1 ไม่สามารถวิเคราะห์เมตาจีโนมได้ เนื่องจากไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพอลิเมอเรส (polymerase chain reaction: PCR) ในลำดับเบส 16S rDNA16S rDNA V3-V4 region ได้ การจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR นั้นความสำคัญอยู่ที่ความบริสุทธิ์ และปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นที่สกัดได้จากตัวอย่าง ซึ่งจำเป็นจะต้องใช้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพสูงในการนำมาทำ PCR (Sarkinen et al., 2012) จากตารางที่ 4.3 แสดงให้เห็นว่าเงื่อนไขที่ดีที่สุดของการใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป NucleoSpin® Soil kit ในการสกัดดีเอ็นเอของจุลินทรีย์จากกะปิในการศึกษานี้ คือ ใช้ SL2 เป็น lysis buffer ร่วมกับการใช้ enhancerX ซึ่งผลการสกัดดีเอ็นในกะปิ TP1 ที่ได้คือ มีค่า A_{260} / A_{280}เท่ากับ 1.931 ปริมาณดีเอ็นเอ 5.895 ng/µl และในกะปิ SR2 มีค่า A_{260} / A_{280} เท่ากับ 1.859 มีปริมาณดีเอ็นเอ 26.366 ng/µl จากนั้นจึงทำการ

ส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์วิทยาศาสตร์โอมิกส์ ซึ่งทางศูนย์ได้ทำการตรวจสอบความเข้มข้นของตัวอย่างก่อนนำเข้าไปเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR ผลปรากฏว่าปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอใน TP1 เหลือ 2.85 ng/µl และในกะปิ SR2 เหลือ 21.50 ng/µl จากคู่มือของเครื่อง Illumina Miseq 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (15044223 B) ระบุว่าปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นตัวอย่างที่ใช้ในแต่ละปฏิกิริยา ต้องมีความเข้มข้น 5 ng/µl ดังนั้นการที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ทำการสกัดได้มีปริมาณความเข้มข้นที่ต่ำจึงส่งผลต่อประสิทธิภาพในการทำ PCR ได้ (Demirhan, Ulca, and Senyuva, 2012)

ในผลิตภัณฑ์กะปินั้นมีส่วนผสมต่างๆมากมายโดยเฉพาะในผลิตภัณฑ์อาหารที่มีส่วนผสมของปลาและอาหารทะเลที่มีไขมันประกอบด้วย ซึ่งไขมันก็เป็นหนึ่งในปัจจัยที่มีผลต่อขั้นตอนในการสกัดดีเอ็นเอ ไขมันเหล่านี้ทำให้การสกัดดีเอ็นเอยุ่งยากขึ้น เนื่องจากต้องผ่านขั้นตอนในการการกำจัดไขมันออกไปเพื่อให้เหลือเพียงส่วนของดีเอ็นเอ ดังนั้นหากเป็นอาหารที่มีปริมาณไขมันจำนวนมากก็จะส่งผลต่อความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ (Krishnaswamy et al., 2006) และในการศึกษาของ Mafra และคณะ (2008) ที่ทำการศึกษาการเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากถั่วเหลือง ระบุว่าจำนวนขั้นตอนในการแปรรูปผลิตภัณฑ์นั้นมีผลอย่างมากต่อปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งหากผลิตภัณฑ์ผ่านขั้นตอนกรรมวิธีในการแปรรูปมากเกินไป เช่นการหมักในน้ำเกลือ การกลั่น หรือการใช้ความร้อนก็จะทำให้ปริมาณดีเอ็นเอในตัวอย่างถูกทำลายไป ซึ่งนำไปสู่ความล้มเหลวในกระบวนการ PCR ได้

ในส่วนของผลการวิเคราะห์เมตาจีโนมของกะปิ SR2 ที่สามารถวิเคราะห์ได้นั้น พบว่าปริมาณแบคทีเรียที่พบมากที่สุดสามอันดับแรกคือ *Lentibacillus* spp., *Ruminococcus torques* และ *Blautia* spp. รูปที่ 4.2 ซึ่ง *Lentibacillus* spp. ที่พบมากที่สุดนั้น เป็นแบคทีเรียทนเค็มและมีความสามารถในการผลิตกรดไขมัน (fatty acid) โดยเฉพาะ C14:0, C15:0, C16:0 และ C17:0 (Heyrman and Vos, 2015) จากผลของ gas chromatography ในภาคผนวก ข รูปที่ ผ.ข5 fatty acid profile ของ SR2 ก็แสดงให้เห็นว่ามีสัดส่วนของ C14:0, C15:0, C16:0 และ C17:0 โดยเฉพาะ C16:0 (Palmitic acid) ที่พบมากถึง 31.62906% ของปริมาณกรดไขมันทั้งหมด ซึ่งก็สอดคล้องกับผลของการวิเคราะห์เมตาจีโนมที่ว่าพบ *Lentibacillus* spp. ในปริมาณที่มากที่สุด มีงานวิจัยหลายฉบับรายงานว่า *Lentibacillus* spp. เป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้ในกะปิพื้นบ้านของไทย อย่างในงานวิจัยของ Pakdeeto และคณะ (2007) ที่ทำการคัดแยกเชื้อจากตัวอย่างกะปิและทำการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA แล้วพบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Lentibacillus salaries* 96.5% ซึ่งจากการตรวจสอบลักษณะพื้นฐานของจุลินทรีย์และสัดส่วนของโมเลกุลจึงถูกเสนอให้เป็นสปีชีส์ใหม่

คือ *Lentibacillus kapialis* sp. nov.หรืองานวิจัยของ Booncharoen และคณะ (2019) ที่ทำการคัดแยกเชื้อจากตัวอย่างกะปิ และทำการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 16S rDNA ซึ่งพบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Lentibacillus juripiscarius* ที่ 98.7% และ *Lentibacillus halophilus* และ 97.2% จากพื้นฐานลักษณะของจุลินทรีย์และchemotaxonomic character จึงถูกเสนอให้เป็นสปีชีส์ใหม่ คือ *Lentibacillus lipolyticus* sp. nov. ในส่วนของแบคทีเรียอื่นๆ ที่พบ (ตามตารางที่ ผ.ค1) มีสัดส่วนของปริมาณน้อยแต่ก็มีความสำคัญในการสร้างเอนไซม์ต่างๆ ที่มีผลต่อคุณค่าทางโภชนาการ อย่างเช่น *Vibrio spp.* ที่มีความสามารถในการสร้าง eicosapentaenoic acid (EPA) ซึ่งเป็นหนึ่งในกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวโอเมก้า 3 (Estupiñán et al., 2020) เนื่องจากแบคทีเรียสกุล *Vibrio* สามารถสร้างกลุ่มของเอนไซม์ที่ผลิต Polyunsaturated fatty acid (PUFA) ได้โดยอาศัย polyketide synthase pathway (PKS) ซึ่งเป็นกระบวนการที่ไม่ใช้ออกซิเจน (Monroig and Kabeya, 2018) และเป็นกระบวนการที่มีความสำคัญที่สามารถสังเคราะห์ docosahexaenoic acid (DHA) ได้เช่นกัน (Peng et al., 2016) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยบางส่วนที่กล่าวถึงผลของปริมาณโอเมก้า 3 ที่มีต่อแบคทีเรียบางสกุล อย่างในงานวิจัยของ Velasco และคณะ (2018) ที่กล่าวไว้ว่า PUFAs มีผลต่อการเปลี่ยนสัดส่วนของปริมาณจุลินทรีย์ในลำไส้ (gut microbiota) เช่นหากมีการเสริมโอเมก้า 3 เข้าไปจะมีผลต่อการเพิ่มปริมาณของ *Lactoibacillus* sp., *Lachnospiraceae* sp. และ *Bacteodidetes* sp. ซึ่งทั้งสามสกุลนี้พบในตัวอย่างกะปิ SR2 (รูปที่ 4.2)

การคัดแยกเชื้อทางจุลชีววิทยาร่วมกับการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

จากการคัดแยกเชื้อในตัวอย่างกะปิทั้ง 7 ตัวอย่างแล้วทำการทดสอบจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวเพื่อหาความสัมพันธ์กับการผลิต Docosahexaenoic acid (DHA) เนื่องจาก DHA เป็นหนึ่งในกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวในกลุ่มกรดไขมันโอเมก้า 3 (n-3 PUFAs) ซึ่งผลจากการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA พบว่าเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ *B. paramycoides, B. albus* และ *B. proteolyticus* เมื่อเปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์เมตาจีโนมที่สามารถตรวจสอบได้ในระดับสกุล ก็พบแบคทีเรียในกลุ่มของสกุล *Bacillus* เช่นกัน

การตรวจสอบการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวในจุลินทรีย์การคัดแยกเชื้อทางจุลชีววิทยา ด้วย H_2O_2 plate assay นั้นเป็นเพียงการทดสอบเบื้องต้น ไม่สามารถยืนยันผลได้อย่างชัดเจนว่าแบคทีเรียนั้นมีสามารถผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดใดได้ จึงต้องทำการตรวจสอบการผลิดกรดไขมันเพิ่มเติมด้วยการสกัดน้ำมันแล้วนำมาตรวจสอบชนิดของกรดไขมันด้วย Gas chromatography เพื่อเป็นการยืนยันผลอีกครั้ง (Tilay and Annapure, 2012)

บทที่ 6

สรุปผลการศึกษา

การศึกษาเมตาจีโนม และชนิดของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับปริมาณ Docosahexaenoic acid (DHA) ในผลิตภัณฑ์กะปิ 7 ตัวอย่าง จากจากบริเวณอ่าวไทย 3 บริเวณ คือ จังหวัดสมุทรสงคราม (อ่าวไทยตอนบนฝั่งตะวันตก) จังหวัดชลบุรี (อ่าวไทยตอนบนฝั่งตะวันออก) และจังหวัดสงขลา (อ่าวไทยตอนล่าง) ผลการศึกษาพบว่า กะปิที่มีปริมาณ DHA มากที่สุดคือ SR2 จากจังหวัดชลบุรี รองลงมาคือ KK2 SR1 KK3 SR3 KK1 และน้อยที่สุดคือ TP1 จากจังหวัดสงขลา และจากการทดลองผลการวิเคราะห์เมตาจีโนมพบว่าในกะปิ SR2 พบ *Lentibacillus* spp. มากที่สุดพบที่ค่าความถี่สัมพัทธ์ในการวิเคราะห์เมตาจีโนมมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบจุลินทรีย์สกุล *Vibro*, *Lactoibacillus*, *Lachnospiraceae* และ *Bacteodidetes* sp. ที่เกี่ยวข้องกับปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Polyunsaturated fatty acids: PUFAs) อย่างเช่น EPA หรือ DHA

การทดลองการคัดแยกเชื้อทางจุลชีววิทยาแล้วทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวโดยการทดสอบด้วยวิธี H_2O_2 plate assay และทำการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA พบจุลินทรีย์ 5 ไอโซเลตในตัวอย่างกะปิ SR1 จำนวน 1 ไอโซเลต มีความคล้ายคลึงกับ *Bacillus paramycoides* ที่ 86.47% ในตัวอย่างกะปิ SR2 จำนวน 1 ไอโซเลต มีความคล้ายคลึงกับ *Bacillus paramycoides* และ *Bacillus albus* ที่ 99.52% ในตัวอย่างกะปิ KK1 จำนวน 2 ไอโซเลต มีความคล้ายคลึงกับ *Bacillus paramycoides* ทั้งสองไอโซเลตที่ 99.52% และ 99.18% และในตัวอย่างกะปิ TP1 จำนวน 1 ไอโซเลต มีความคล้ายคลึงกับ *Bacillus pro*teolyticus ที่ 86.47%

สามารถสรุปผลของการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการที่สำคัญในกะปิอย่าง EPA DHA และ ALA ที่เป็นหนึ่งในกลุ่มของกรดไขมันโอเมก้า 3 กับจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ดังตารางที่ 6.1

ตารางที่ 6.1 fatty acid profile และชนิดของแบคทีเรียที่ตรวจสอบได้

ตัวอย่างกะปิ	กรดไขมันอิ่มตัว (%)	กรดไขมันไม่อิ่มตัว(%)	ALA (%)	EPA (%)	DHA (%)	จำนวนไอโซเลตที่ผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัว	Species
SR2	72.9943	28.6841	0	7.41375	8.32155	1	*B. paramycoides* or *B. albus*
KK2	67.1748	32.8252	0	7.69012	7.34676	0	-
SR1	73.9542	26.0457	0	6.79486	7.28456	1	*B. paramycoides*
KK3	79.4622	20.5378	0	7.93904	5.08702	0	-
SR3	78.4143	21.5857	0	5.61552	3.66873	0	-
KK1	86.4345	13.5655	0	3.53269	1.94473	2	*B. paramycoides* *B. paramycoides*
TP1	84.388	15.612	0.76393	0.97551	0.7829	1	*B. proteolyticus*

เอกสารอ้างอิง

จิตต์เรขา ทองมณี. 2544. จุลินทรีย์ในอาหารหมัก. วารสารกรมวิทยาศาสตร์บริการ 157 (กันยายน) : 28-31.

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

ถนอมพงษ์ เสถียรลัคนา. 2561. Role of Omega-3 Polyunsaturated fatty acid in Clinical Practice. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.wongkarnpat.com/upfilecpe/236CPE.pdf [19 เมษายน 2563]

ประดินันท์ เอี่ยมสะอาด. 2561. การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวด้วยวิธีอย่างง่าย. วารสารวิจัยและพัฒนา วไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ 13 (พฤษภาคม – เดือนสิงหาคม) : 12-20.

ยุทธหัตถ์ อยู่สมบูรณ์. เจ้าของธุรกิจกะปียุทธหัตถ์. สัมภาษณ์, 19 ธันวาคม 2562.

วิชาญ ศิริชัยเอกวัฒน์, 2539. ยุทธศาสตร์การประมงทะเลของไทย. กรุงเทพมหานคร : วิทยาลัยป้องกันราชอาณาจักร. (เอกสารไม่ตีพิมพ์)

วีระชาติ เพ็งจำรัส และทิพามาศ อุปน้อย, 2548. ชนิดและการแพร่กระจายของกุ้งเคยสกุล *Acetes* บริเวณแหล่งหญ้าทะเลและคลองป่าชายเลน ฝั่งอันดามัน. กรุงเทพมหานคร : สำนักงาน คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. (เอกสารไม่ตีพิมพ์)

สุรินทร์พร ยิ้มกัน. 2559. “กว่าจะเป็นกะปิ”. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: https://www.fisheries.go.th/qualityการผลิตกะปิไทย.pdf [26 กันยายน 2562]

อรวรรณ คงพันธุ์ และวัชรี คงรัตน์. 2556. กระบวนการหมักกะปิ และการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากกะปิ. วารสารการประมง 6 (พฤศจิกายน – ธันวาคม) : 551-564.

อัชฌา บุญมี. 2556. เมตาจีโนมิกส์: เปิดโลกแห่งจีโนมจุลินทรีย์ในธรรมชาติ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 21 (มกราคม – มีนาคม) : 71-82.

อุดมศักดิ์ ดารุมาศ. 2008. “กะปิเคย” กับภูมิปัญญาพื้นบ้าน. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www1a.biotec.or.th/BRT/index.php/2010-08-09-09-38-28/155-shrimp-sauce. [13 กุมภาพันธ์ 2563].

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.

Booncharoen, A. et al. 2019. *Lentibacillus lipolyticus* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from shrimp paste (Ka-pi). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 69 : 3529–3536.

Cai, L., Wang, Q., Dong, Z., Liu, S., Zhang, C., and Li, J. 2017. Biochemical, nutritional, and sensory quality of the low salt fermented shrimp paste. Journal of Aquatic Food Product Technology : 706-718.

Demirhan, Y., Ulca, P., and Senyuva, H.Z. 2012. Detection of porcine DNA in gelatine and gelatine-containing processed food products-Halal/Kosher authentication. Meat Science 90(3) : 686–689.

Estupiñán, M. et al. 2020. Novel *Vibrio* spp. strains producing omega-3 fatty acids isolated from coastal seawater. Marine Drugs 18(2).

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. September 17-18. Krabi, Thailand.

Guedes, A.C., Amaro, H.M., Barbosa, C.R., Pereira, R.D., and Malcata F.X. 2011. Fatty acid composition of several wild microalgae and cyanobacteria, with a focus

on eicosapentaenoic, docosahexaenoic and α-linolenic acids for eventual dietary uses. Food Research International 44 : 2721–2729.

Hewitt, R., and Lipsky, J.D. 2009. Krill and other plankton. Encyclopedia of Marine Mammals 2 : 657-664.

Heyrman, J., and Vos, P.D. 2015. *Lentibacillus*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 3 : 1-6.

Klindworth, A. et al. 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. Nucleic Acids Research 41 : e1.

Krishnaswamy, R., Pabst, G., Rappolt, M., Raghunathan, V.A., and Sood, A.K. 2006. Structure of DNA-CTAB-hexanol complexes. Physical Review E 73(3) : 1–8.

Mafra, I., Silva, S.A., Moreira, E.J.M.O., Silva, C.S.F., Beatriz, M., and Oliveira, P.P. 2008. Comparative study of DNA extraction methods for soybean derived food products. Food Control 19(12) : 1183–1190.

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.

Meesapyodsuk, D., and Qiu, X. 2016. Biosynthetic mechanism of very long chain polyunsaturated fatty acids in *Thraustochytrium* sp. 26185. Journal of Lipid Research 57(10) : 1854–1864.

Monroig, O., and Kabeya, N. 2018. Desaturases and elongases involved in polyunsaturated fatty acid biosynthesis in aquatic invertebrates: a comprehensive review. Fisheries Science 84 : 911–928.

Olgunoglu, I.A. 2017. Review on omega-3 (n-3) fatty acids in fish and seafood. Journal of Biology, Agriculture and Healthcare 7 : 37-45.

Pakdeeto, A., Tanasupawat, S., Thawai, C., Moonmangmee, S., Kudo, T., and Itoh, T. 2007. *Lentibacillus kapialis* sp. nov., from fermented shrimp paste in Thailand. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57 : 364-369.

Peng, Y.F., Chen, W.C., Xiao, K., Xu, L. , Wang, L., and Wan, X. 2016. DHA production in *Escherichia coli* by expressing reconstituted key genes of polyketide synthase pathway from marine bacteria. PLoS One 11(9) : e0162861.

Robles, L.G., Lázaro, B., Cruz, F., and Moncalián, G. 2018. *fabH* deletion increases DHA production in *Escherichia coli* expressing *Pfa* genes. Microbial Cell Factories. 17(1) : 88.

Sarkinen, T., Staats, M., Richardson, J.E., Cowan, R.S., and Bakker, F.T. 2012. How to open the treasure chest? optimising DNA extraction from herbarium specimens. PLoS ONE 7(8): e43808.

Thompson, J.D., Higgins, D.J., and Gibson, T.J. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research 22 : 4673-4680.

Tilay, A., and Annapure, U. 2012. Novel simplified and rapid method for screening and isolation of polyunsaturated fatty acids producing marine bacteria. Biotechnol Res Int.

Turner, S., Pryer, K.M., Miao, V.P., and Palmer, J.D. 1999. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. Journal of Eukaryotic Microbiology 46(4) : 327-38.

Velasco, P.D., Ferreira, A., Crovesy, L., Marine T., and Carmo, M.G.T. 2018. Fatty acids, gut microbiota, and the genesis of obesity. Biochemistry and Health Benefits of Fatty Acids.

Wong, A.H.K., and Mine, Y. 2004. Novel fibrinolytic enzyme in fermented shrimp paste, a traditional Asian fermented seasoning. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52 : 980-986.

Woo, P.C.Y., Lau, S.K.P., Teng, J.L.L., Tse, H., and Yuen, K.Y. 2008. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. Clinical Microbiology and Infection 14 : 908-934.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหาร

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ

LB broth ประกอบด้วย

Yeast extract	5 g/L
Tryptone	10 g/L
Sodium chloride	15 g/L

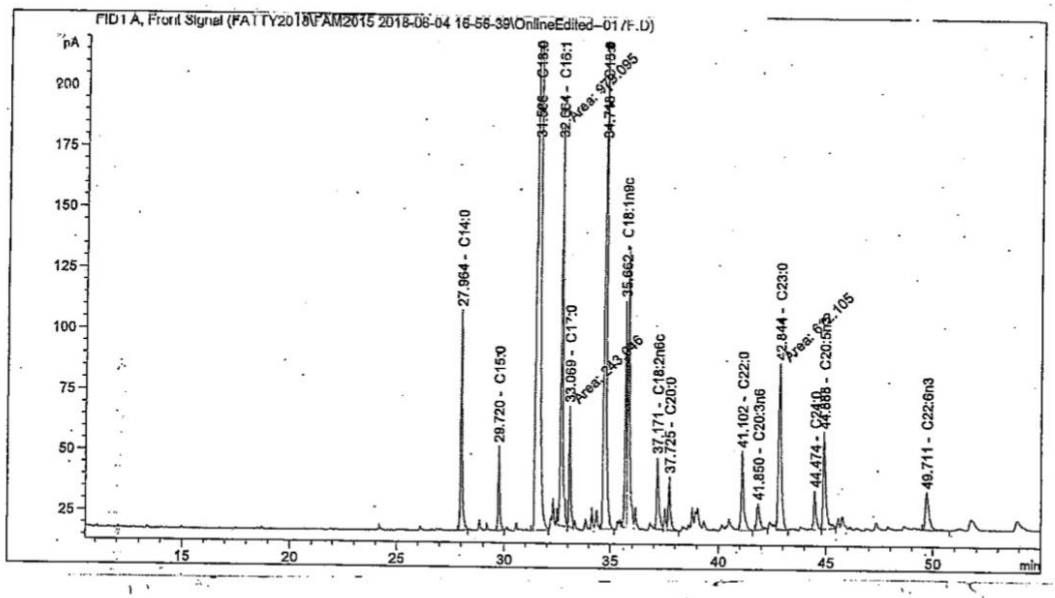
LB Agar ประกอบด้วย

Yeast extract	5 g/L
Tryptone	10 g/L
Sodium chloride	15 g/L
Agar	15 g/L

ภาคผนวก ข

ผล Gas Chromatography

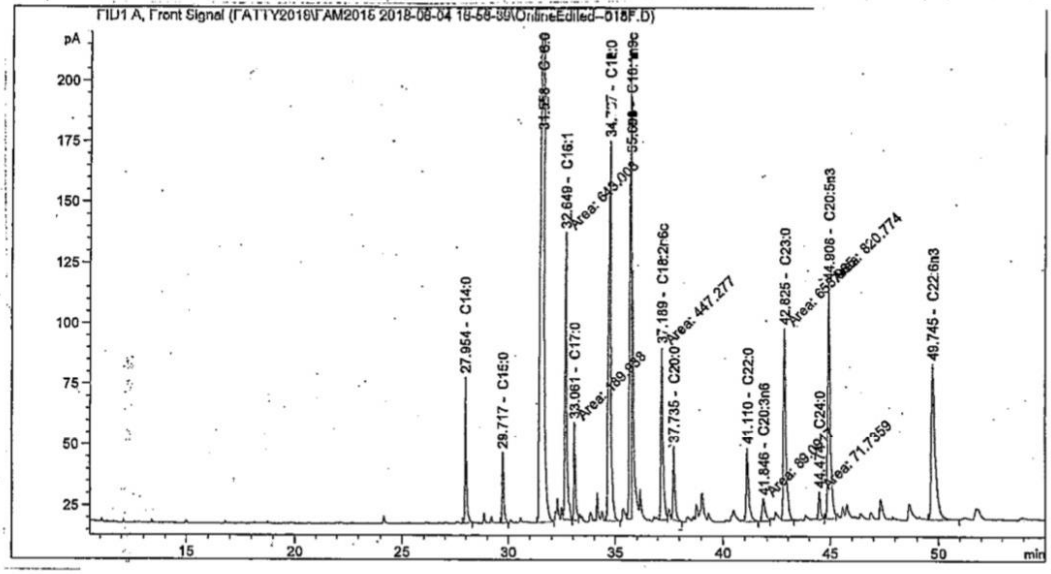
612407 KK1 (B)



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Area %	Name
1	10.728		0.0000	0.00000	0.00000	C4:0
2	12.858		0.0000	0.00000	0.00000	C6:0
3	16.117		0.0000	0.00000	0.00000	C8:0
4	20.074		0.0000	0.00000	0.00000	C10:0
5	22.107		0.0000	0.00000	0.00000	C11:0
6	24.100		0.0000	0.00000	0.00000	C12:0
7	26.026		0.0000	0.00000	0.00000	C13:0
8	27.964	BB	0.0698	451.54095	4.59194	C14:0
9	29.370		0.0000	0.00000	0.00000	C14:1
10	29.720	BB	0.0687	164.00806	1.66788	C15:0
11	31.104		0.0000	0.00000	0.00000	C15:1n10
12	31.566	BB	0.1075	3994.21729	40.61911	C16:0
13	32.664	FM	0.0980	979.09515	9.95689	C16:1
14	33.069	MF	0.0812	243.04576	2.47165	C17:0
15	34.137		0.0000	0.00000	0.00000	C17:1n10
16	34.718	BB	0.1021	1550.41309	15.76689	C18:0
17	35.239		0.0000	0.00000	0.00000	C18:1n9t
18	35.662	BV	0.0765	483.95465	4.92157	C18:1n9c
19	36.373		0.0000	0.00000	0.00000	C18:2n6t
20	37.171	BV	0.0980	208.67041	2.12207	C18:2n6c
21	37.725	VB	0.0868	133.53459	1.35798	C20:0
22	38.306		0.0000	0.00000	0.00000	C18:3n6
23	38.711		0.0000	0.00000	0.00000	C20:1n11
24	38.982		0.0000	0.00000	0.00000	C18:3n3
25	39.267		0.0000	0.00000	0.00000	C21:0
26	40.433		0.0000	0.00000	0.00000	C20:2
27	41.102	VB	0.1124	265.30594	2.69802	C22:0
28	41.850	BV R	0.1363	102.70226	1.04443	C20:3n6
29	42.129		0.0000	0.00000	0.00000	C22:1n9
30	42.424		0.0000	0.00000	0.00000	C20:3n3
31	42.540		0.0000	0.00000	0.00000	C20:4n6
32	42.844	FM I	0.1494	612.10510	6.22479	C23:0
33	43.841		0.0000	0.00000	0.00000	C22:2
34	44.474	BB	0.0962	106.13881	1.07938	C24:0
35	44.888	BV R	0.1206	347.38159	3.53269	C20:5n3
36	45.493		0.0000	0.00000	0.00000	C24:1n9
37	49.711	BV R	0.1716	191.23227	1.94473	C22:6n3
Totals :				9833.34592		

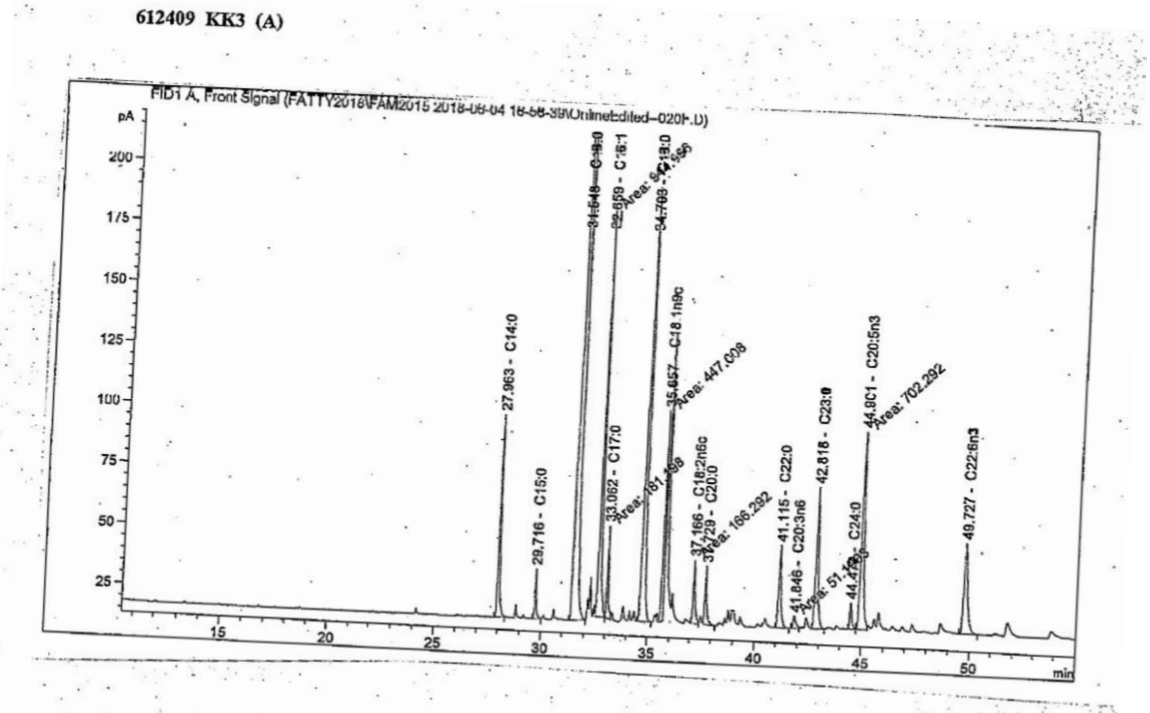
รูปที่ ผ.ข1 fatty acid profile ของตัวอย่างกะปิ KK1

612408 KK2



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Area %	Name
1	10.728		0.0000	0.00000	0.00000	C4:0
2	12.858		0.0000	0.00000	0.00000	C6:0
3	16.117		0.0000	0.00000	0.00000	C8:0
4	20.074		0.0000	0.00000	0.00000	C10:0
5	22.107		0.0000	0.00000	0.00000	C11:0
6	24.100		0.0000	0.00000	0.00000	C12:0
7	26.026		0.0000	0.00000	0.00000	C13:0
8	27.954	BB	0.0668	289.99249	2.71704	C14:0
9	29.370		0.0000	0.00000	0.00000	C14:1
10	29.717	BB	0.0670	134.50424	1.26022	C15:0
11	31.104		0.0000	0.00000	0.00000	C15:1n10
12	31.558	BB	0.1057	3667.91602	34.36600	C16:0
13	32.649	FM	0.0908	643.00769	6.02457	C16:1
14	33.061	MF	0.0794	189.93753	1.77959	C17:0
15	34.137		0.0000	0.00000	0.00000	C17:1n10
16	34.707	BB	0.0964	1098.56458	10.29284	C18:0
17	35.239		0.0000	0.00000	0.00000	C18:1n9t
18	35.698	BV	0.0847	1362.19531	12.76289	C18:1n9c
19	36.373		0.0000	0.00000	0.00000	C18:2n6t
20	37.189	MF	0.1053	447.27710	4.19070	C18:2n6c
21	37.735	BB	0.0859	178.11435	1.66882	C20:0
22	38.306		0.0000	0.00000	0.00000	C18:3n6
23	38.711		0.0000	0.00000	0.00000	C20:1n11
24	38.982		0.0000	0.00000	0.00000	C18:3n3
25	39.267		0.0000	0.00000	0.00000	C21:0
26	40.433		0.0000	0.00000	0.00000	C20:2
27	41.110	VB	0.1116	239.89439	2.24766	C22:0
28	41.846	MF	0.1653	89.09174	0.83473	C20:3n6
29	42.129		0.0000	0.00000	0.00000	C22:1n9
30	42.424		0.0000	0.00000	0.00000	C20:3n3
31	42.540		0.0000	0.00000	0.00000	C20:4n6
32	42.825	MM I	0.1387	655.96466	6.14596	C23:0
33	43.841		0.0000	0.00000	0.00000	C22:2
34	44.474	MF	0.1068	71.73586	0.67212	C24:0
35	44.908	FM	0.1420	820.77405	7.69012	C20:5n3
36	45.493		0.0000	0.00000	0.00000	C24:1n9
37	49.745	BB	0.1752	784.12653	7.34676	C22:6n3
Totals :				1.06731e4		

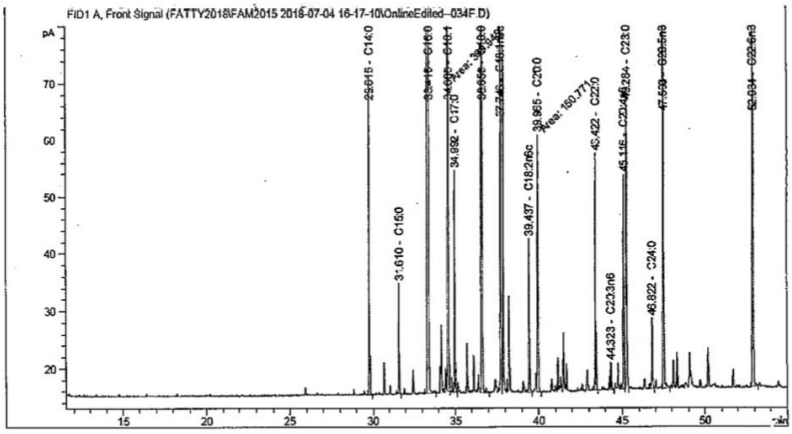
รูปที่ ผ.ข2 fatty acid profile ของตัวอย่างกะปิ KK2



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Area %	Name
1	10.728		0.0000	0.00000	0.00000	C4:0
2	12.858		0.0000	0.00000	0.00000	C6:0
3	16.117		0.0000	0.00000	0.00000	C8:0
4	20.074		0.0000	0.00000	0.00000	C10:0
5	22.107		0.0000	0.00000	0.00000	C11:0
6	24.100		0.0000	0.00000	0.00000	C12:0
7	26.026		0.0000	0.00000	0.00000	C13:0
8	27.963	BB	0.0705	413.59213	4.67544	C14:0
9	29.370		0.0000	0.00000	0.00000	C14:1
10	29.716	BB	0.0683	96.24406	1.08799	C15:0
11	31.104		0.0000	0.00000	0.00000	C15:1n10
12	31.540	VV	0.1033	3208.58813	36.27140	C16:0
13	32.659	FM	0.0941	944.99622	10.68269	C16:1
14	33.062	MF	0.0794	181.19824	2.04835	C17:0
15	34.137		0.0000	0.00000	0.00000	C17:1n10
16	34.703	BB	0.0901	1221.27844	13.80591	C18:0
17	35.239		0.0000	0.00000	0.00000	C18:1n9t
18	35.657	MM	0.0859	447.00830	5.05319	C18:1n9c
19	36.373		0.0000	0.00000	0.00000	C18:2n6t
20	37.166	MF	0.1059	166.29202	1.87984	C18:2n6c
21	37.729	VB	0.0863	148.59293	1.67976	C20:0
22	38.306		0.0000	0.00000	0.00000	C18:3n6
23	38.711		0.0000	0.00000	0.00000	C20:1n11
24	38.982		0.0000	0.00000	0.00000	C18:3n3
25	39.267		0.0000	0.00000	0.00000	C21:0
26	40.433		0.0000	0.00000	0.00000	C20:2
27	41.115	BB	0.1102	266.93286	3.01754	C22:0
28	41.846	MF	0.1660	51.19027	0.57858	C20:3n6
29	42.129		0.0000	0.00000	0.00000	C22:1n9
30	42.424		0.0000	0.00000	0.00000	C20:3n3
31	42.540		0.0000	0.00000	0.00000	C20:4n6
32	42.818	BB I	0.1190	474.59225	5.36502	C23:0
33	43.841		0.0000	0.00000	0.00000	C22:2
34	44.472	BV	0.0957	73.25603	0.82812	C24:0
35	44.901	MF	0.1435	702.29224	7.93904	C20:5n3
36	45.493		0.0000	0.00000	0.00000	C24:1n9
37	49.727	BB	0.1612	450.00031	5.08702	C22:6n3
Totals :				8846.05443		

รูปที่ ผ.ข3 fatty acid profile ของตัวอย่างกะปิ KK3

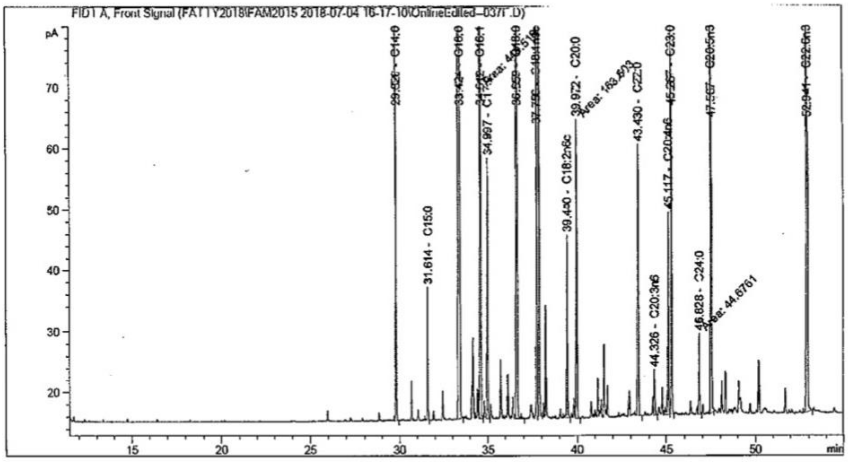
613007 SR1(A)



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Area %	Name
1	12.015		0.0000	0.00000	0.00000	C4:0
2	14.329		0.0000	0.00000	0.00000	C6:0
3	17.768		0.0000	0.00000	0.00000	C8:0
4	21.841		0.0000	0.00000	0.00000	C10:0
5	23.915		0.0000	0.00000	0.00000	C11:0
6	25.945		0.0000	0.00000	0.00000	C12:0
7	27.904		0.0000	0.00000	0.00000	C13:0
8	29.816	BB	0.0418	150.96307	3.69010	C14:0
9	31.352		0.0000	0.00000	0.00000	C14:1
10	31.610	VB R	0.0414	51.09709	1.24900	C15:0
11	33.102		0.0000	0.00000	0.00000	C15:1n10
12	33.416	BV R	0.0628	1322.01624	32.31501	C16:0
13	34.608	FM	0.0484	399.94171	9.77607	C16:1
14	34.992	VB	0.0405	102.83758	2.51373	C17:0
15	36.193		0.0000	0.00000	0.00000	C17:1n10
16	36.653	BV R	0.0556	503.49200	12.30722	C18:0
17	37.358		0.0000	0.00000	0.00000	C18:1n9t
18	37.746	VV R	0.0462	254.34875	6.21723	C18:1n9c
19	38.607		0.0000	0.00000	0.00000	C18:2n6t
20	39.437	VB R	0.0497	86.56806	2.11605	C18:2n6c
21	39.965	FM	0.0557	150.77126	3.68541	C20:0
22	40.768		0.0000	0.00000	0.00000	C18:3n6
23	41.136		0.0000	0.00000	0.00000	C20:1n11
24	41.478		0.0000	0.00000	0.00000	C18:3n3
25	41.657		0.0000	0.00000	0.00000	C21:0
26	42.917		0.0000	0.00000	0.00000	C20:2
27	43.422	BB	0.0531	140.15686	3.42596	C22:0
28	44.323	VB	0.0594	18.54515	0.45331	C20:3n6
29	44.572		0.0000	0.00000	0.00000	C22:1n9
30	44.936		0.0000	0.00000	0.00000	C20:3n3
31	45.116	VV R	0.0518	130.08371	3.17973	C20:4n6
32	45.284	VB I	0.0484	161.04381	3.93651	C23:0
33	46.338		0.0000	0.00000	0.00000	C22:2
34	46.822	VB R	0.0525	43.16970	1.05523	C24:0
35	47.503	BV R	0.0545	277.97971	6.79486	C20:5n3
36	48.083		0.0000	0.00000	0.00000	C24:1n9
37	52.934	BB	0.0664	298.01321	7.28456	C22:6n3
Totals :				4091.02791		

รูปที่ ผ.ข4 fatty acid profile ของตัวอย่างกะปิ SR1

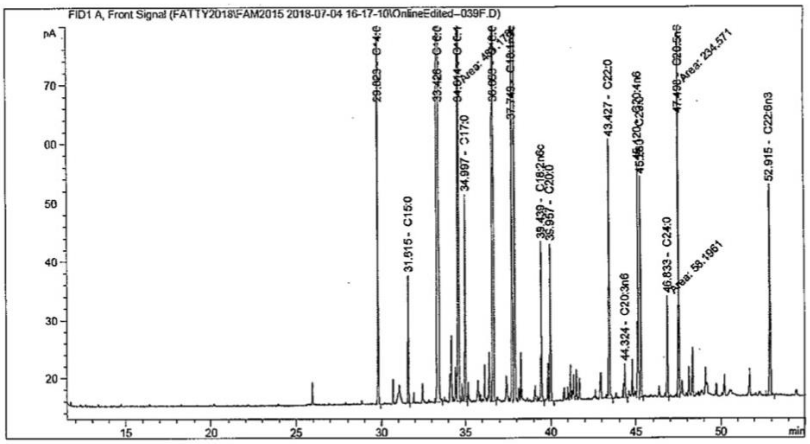
613008 SR2(A)



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Area %	Name
1	12.015		0.0000	0.00000	0.00000	C4:0
2	14.329		0.0000	0.00000	0.00000	C6:0
3	17.768		0.0000	0.00000	0.00000	C8:0
4	21.841		0.0000	0.00000	0.00000	C10:0
5	23.915		0.0000	0.00000	0.00000	C11:0
6	25.945		0.0000	0.00000	0.00000	C12:0
7	27.904		0.0000	0.00000	0.00000	C13:0
8	29.820	BB	0.0420	174.42917	3.78849	C14:0
9	31.352		0.0000	0.00000	0.00000	C14:1
10	31.614	VB R	0.0411	56.89737	1.23577	C15:0
11	33.102		0.0000	0.00000	0.00000	C15:1n10
12	33.424	BB	0.0634	1460.68604	31.72517	C16:0
13	34.612	FM	0.0495	449.51862	9.76326	C16:1
14	34.997	VB	0.0406	113.53613	2.46593	C17:0
15	36.193		0.0000	0.00000	0.00000	C17:1n10
16	36.659	BV R	0.0551	546.57056	11.87117	C18:0
17	37.358		0.0000	0.00000	0.00000	C18:1n9t
18	37.750	VV R	0.0484	278.89636	6.05745	C18:1n9c
19	38.607		0.0000	0.00000	0.00000	C18:2n6t
20	39.440	VB R	0.0493	95.63644	2.07716	C18:2n6c
21	39.972	FM	0.0558	163.80284	3.55769	C20:0
22	40.768		0.0000	0.00000	0.00000	C18:3n6
23	41.136		0.0000	0.00000	0.00000	C20:1n11
24	41.478		0.0000	0.00000	0.00000	C18:3n3
25	41.657		0.0000	0.00000	0.00000	C21:0
26	42.917		0.0000	0.00000	0.00000	C20:2
27	43.430	BB	0.0529	152.31813	3.30825	C22:0
28	44.326	VB	0.0618	30.10392	0.65384	C20:3n6
29	44.572		0.0000	0.00000	0.00000	C22:1n9
30	44.936		0.0000	0.00000	0.00000	C20:3n3
31	45.117	VV R	0.0512	114.27133	2.48190	C20:4n6
32	45.287	VB I	0.0479	198.36070	4.30827	C23:0
33	46.338		0.0000	0.00000	0.00000	C22:2
34	46.828	FM	0.0563	44.67614	0.97034	C24:0
35	47.507	BV R	0.0532	341.34308	7.41375	C20:5n3
36	48.083		0.0000	0.00000	0.00000	C24:1n9
37	52.941	BB	0.0691	383.13943	8.32155	C22:6n3
Totals :				4604.18626		

รูปที่ ผ.ข5 fatty acid profile ของตัวอย่างกะปิ SR2

613009 SR3(A)



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Area %	Name
1	12.015		0.0000	0.00000	0.00000	C4:0
2	14.329		0.0000	0.00000	0.00000	C6:0
3	17.768		0.0000	0.00000	0.00000	C8:0
4	21.841		0.0000	0.00000	0.00000	C10:0
5	23.915		0.0000	0.00000	0.00000	C11:0
6	25.945		0.0000	0.00000	0.00000	C12:0
7	27.904		0.0000	0.00000	0.00000	C13:0
8	29.823	BB	0.0425	182.49121	4.36876	C14:0
9	31.352		0.0000	0.00000	0.00000	C14:1
10	31.615	BB	0.0400	56.27874	1.34729	C15:0
11	33.102		0.0000	0.00000	0.00000	C15:1n10
12	33.426	BV R	0.0631	1470.81372	35.21066	C16:0
13	34.614	MF	0.0521	487.17773	11.66283	C16:1
14	34.997	BB	0.0411	93.00843	2.22658	C17:0
15	36.193		0.0000	0.00000	0.00000	C17:1n10
16	36.663	BB	0.0546	570.36053	13.65419	C18:0
17	37.358		0.0000	0.00000	0.00000	C18:1n9t
18	37.749	VV R	0.0492	262.20694	6.27712	C18:1n9c
19	38.607		0.0000	0.00000	0.00000	C18:2n6t
20	39.439	VB R	0.0507	90.93334	2.17691	C18:2n6c
21	39.957	VB	0.0483	83.84554	2.00723	C20:0
22	40.768		0.0000	0.00000	0.00000	C18:3n6
23	41.136		0.0000	0.00000	0.00000	C20:1n11
24	41.478		0.0000	0.00000	0.00000	C18:3n3
25	41.657		0.0000	0.00000	0.00000	C21:0
26	42.917		0.0000	0.00000	0.00000	C20:2
27	43.427	BB	0.0532	156.20825	3.73956	C22:0
28	44.324	VB	0.0614	23.59040	0.56474	C20:3n6
29	44.572		0.0000	0.00000	0.00000	C22:1n9
30	44.936		0.0000	0.00000	0.00000	C20:3n3
31	45.120	VV	0.0512	137.12416	3.28269	C20:4n6
32	45.280	VB I	0.0482	117.12788	2.80399	C23:0
33	46.338		0.0000	0.00000	0.00000	C22:2
34	46.833	FM	0.0559	58.19609	1.39319	C24:0
35	47.498	MF	0.0567	234.57071	5.61552	C20:5n3
36	48.083		0.0000	0.00000	0.00000	C24:1n9
37	52.915	BB	0.0655	153.24973	3.66873	C22:6n3
Totals :				4177.18342		

รูปที่ ผ.ข6 fatty acid profile ของตัวอย่างกะปิ SR3

ภาคผนวก ค

จุลินทรีย์ที่พบจากการวิเคราะห์เมตาจีโนม

ตารางที่ ผ.ค1 จุลินทรีย์ที่พบในกะปิ SR2 จากการวิเคราะห์เมตาจีโนม

Microorganism	Microorganism
Acinetobacter spp.	*Lachnoclostridium* spp.
Acinetobacter spp.	*Lachnospiraceae* spp.
Alistipes spp.	*Lactobacillus* spp.
Alkalibacterium spp.	*Lentibacillus* spp.
Alloiococcus spp.	*Merdibacter* spp.
Anaerofilum spp.	*Methanobrevibacter* spp.
Anaerotruncus spp.	*Negativibacillus* spp.
Bacillus spp.	*Oscillibacter spp.*
Bacteroides spp.	*Paraclostridium* spp.
Bilophila spp.	*Pir4 lineage* (uncultured organism)
Blautia spp.	*Planococcaceae* spp.
Butyricicoccus spp.	*Pontibacillus* spp.
Candidatus Arthromitus	*Ruminiclostridium* spp.
Caproiciproducens spp.	*Ruminococcus gauvreauii*
Christensenellaceae spp.	*Ruminococcus* spp.
Clostridium spp.	*Salinicoccus* spp.
Deinococcus spp.	*Salinivibrio* spp.
Eisenbergiella spp.	*Sellimonas* spp.
Erysipelatoclostridium spp.	*Shigella* spp.
Eubacterium coprostanoligenes group	*Shuttleworthia* spp.
Eubacterium hallii group	*Staphylococcus* spp.
Flavonifractor spp.	*Streptococcus* spp.
Fournierella spp.	*Subdoligranulum* spp.
Intestinimonas spp.	*Tyzzerella* spp.
Jeotgalicoccus spp.	*Vibrio* spp.