

การคัดแยกและลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตดีเอชเอจากกุ้งเคยและกะปิ
ของไทย



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2565
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF DHA PRODUCING BACTERIA FROM KRILL AND
THAI SHRIMP PASTE (KAPI)



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biotechnology

FACULTY OF SCIENCE

Chulalongkorn University

Academic Year 2022

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดแยกและลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่มี ความสามารถในการผลิตดีเอสเอจากกุ่มเคยและกะปิของ ไทย
โดย	น.ส.ณิชภัทร วิเศษชลธาร
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชมภูนุช กลิ่นวงษ์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของ
การศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณะบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศน์ย์จิต)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชมภูนุช กลิ่นวงษ์)

..... กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณ์านุกุล)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป นภาธร)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.สุริษา สุวรรณรังษี)

ณิชาภัทร วิเศษชลธาร : การคัดแยกและลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่มีความสามารถ
ในการผลิตดีเอชเอจากกุ้งเคยและกะปิของไทย. (ISOLATION AND
CHARACTERIZATION OF DHA PRODUCING BACTERIA FROM KRILL AND THAI
SHRIMP PASTE (KAPI)) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ผศ. ดร.ชมภูษุช กลิ่นวงษ์

กรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หลายตำแหน่งในกลุ่มของโอเมก้า-3 เช่น ดีเอชเอ และอีพีเอ เป็นกรดอะมิโนจำเป็นต่อร่างกาย (essential amino acid) เนื่องจากในร่างกายมนุษย์ไม่มีเอนไซม์ที่สามารถสร้างพันธะคู่ตำแหน่ง ω -3 ได้ มีรายงานว่าเส้นทางการสังเคราะห์กรดไขมันผ่านวิถีทางชีวภาพ (FAS pathway) พบในแบคทีเรียจากทะเลบางสายพันธุ์เท่านั้น ในงานวิจัยนี้ทำการคัดแยกแบคทีเรียทางทะเลจากตัวอย่างกะปิซึ่งมีการตรวจสอบจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ว่ามีกลุ่มของกรดไขมันโอเมก้า-3, 6 และ 9 ผลการศึกษาสามารถคัดแยกแบคทีเรียสะสมไขมันสูง (oleaginous bacteria) ได้ 6 ไอโซเลต โดยเฉพาะ *Bacillus amyloliquefaciens* SR121 เมื่อทำการวิเคราะห์ whole genome พบยีน *FabF* (β -ketoacyl-ACP reductase), *FabG* (Ketoreductase), *FabZ* (Dehydratase) และ *FabI* (Enoyl reduction) ซึ่งเกี่ยวข้องกับ 4 กระบวนการสำคัญ ใน FAS pathway นอกจากนี้ *B. amyloliquefaciens* SR121 มีการผลิตกรดไขมันมากที่สุดร้อยละ 75.06 ± 2.05 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และเมื่อใช้อาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงที่มี pH5 พบปริมาณการผลิตไขมันเพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 89.46 ± 3.79 ของน้ำหนักเซลล์ สำหรับการปรับภาวะเพื่อผลิตกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 พบที่ 35 องศาเซลเซียส มีการผลิตมากที่สุดถึง 19.73% ของปริมาณกรดไขมันทั้งหมด หรือคิดเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว 92.97 มิลลิกรัม และมีการผลิตกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 มากที่สุดโดยปริมาณ 72 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักเซลล์ 1 กรัม

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2565

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

6370007023 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORD: Polyunsaturated fatty acids (PUFA), Omega-3, oleaginous bacteria, fatty acid biosynthesis (FAS pathway), shrimp pastes

Nichaphat Wisetchonlathan : ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF DHA PRODUCING BACTERIA FROM KRILL AND THAI SHRIMP PASTE (KAPI). Advisor: Asst. Prof. Dr. CHOMPUNUCH GLINWONG

Polyunsaturated fatty acids (PUFA) which are in the omega-3 group such as DHA and EPA that was essential amino acids because there are no enzymes in the human body capable of forming the ω -3 position double bond. Have reported that the fatty acid biosynthesis pathway (FAS pathway) was found only in some strains of marine bacteria. This research, isolated marine bacteria from shrimp paste samples, which had been identified in previous studies for omega-3, 6, and 9 fatty acid groups. The results of the study were able to identify 6 oleaginous bacteria, especially *Bacillus amyloliquefaciens* SR121. When analyzing the whole genome of this strain found *FabF* (β -ketoacyl-ACP reductase), *FabG* (Ketoreductase), *FabZ* (Dehydratase), and *FabI* (Enoyl reduction) which are key processes involved in the FAS pathway. In addition, *B. amyloliquefaciens* SR121 produced the highest fatty acid production of $75.06 \pm 2.05\%$ of CDW and when the culture medium adjusts to pH5, the lipid production was increased to $89.46 \pm 3.79\%$ of CDW. Adjustment of the condition of growth for omega-3, at culture temperature 35 °C produces PUFA up to 19.73% of the total fatty acid or 92.97 mg and the production of omega-3 fatty acids was the highest at 72 mg per 1 gram of cell weight.

Field of Study: Biotechnology

Student's Signature

Academic Year: 2022

Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับการสนับสนุนจากหลายภาคส่วน โดยเฉพาะผู้ช่วยศาสตราจารย์ชมภูณัฐ กลิ่นวงษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาในการทำวิทยานิพนธ์ ที่มีส่วนช่วยอย่างมากในการให้คำปรึกษา คำแนะนำในการพัฒนาและปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ดียิ่งขึ้น และคอยสนับสนุนให้มีโอกาสในการไปเผยแพร่ผลงาน ในหลาย ๆ ด้าน อีกทั้งยังช่วยตรวจและแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต ประธานกรรมการไซการสอบวิทยานิพนธ์ ศาสตราจารย์ ดร. วรุดมิ จุฬาลักษณ์านุกูล รองศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป นภาธร และ ดร.สุริษา สุวรรณรังสี กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้สละเวลามาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และให้คำแนะนำในการปรับปรุง วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์

ขอขอบคุณหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความช่วยเหลือ จากเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่มีส่วนช่วยในการดำเนินงานทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณหน่วยปฏิบัติการวิจัยการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ และภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในการสนับสนุนอุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในการทำปฏิบัติการวิจัย

ขอขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ ทุกคนที่ คอยเอาใจใส่และเข้าใจ คอยถามและเป็นห่วง คอยให้กำลังใจตลอดการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์ รวมถึงพี่ ๆ ในหน่วยปฏิบัติการวิจัยการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ สำหรับการให้คำปรึกษา ให้ความรู้ คำแนะนำ และประสบการณ์ต่าง ๆ ในการทำปฏิบัติการวิจัย ซึ่งเป็นส่วนช่วยอย่างมากที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณสิ่งศักดิ์สิทธิ์ทุกท่านที่อาจมีส่วนช่วยเหลือทั้งในทางด้านจิตใจ และในการทำวิจัย หรือการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงได้โดยมีสิ่งติดขัดน้อยที่สุด

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่เข้าใจและคอยให้กำลังใจ อีกทั้งยังให้คำปรึกษา คำแนะนำ คอยสนับสนุนตลอดการทำวิจัยฉบับนี้

สุดท้ายขอขอบคุณตัวเองที่มีความตั้งใจตลอดการทำงานวิจัยและวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ถึงแม้จะมีอุปสรรคบ้าง ท้อบ้างแต่ก็ไม่ได้ถอย ขอขอบคุณหนังทุกเรื่อง การ์ตูนทุกตอนที่ช่วยทำให้จิตใจเบิกบานขึ้น และมีกำลังใจในการทำงานจนสำเร็จลุล่วงเป็นวิทยานิพนธ์ฉบับสมบูรณ์นี้

ณิชาภัทร วิเศษชลธาร

สารบัญ

	หน้า
.....	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	1
สารบัญรูปภาพ.....	3
บทที่ 1 บทนำ	5
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย.....	5
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	8
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	8
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	8
1.5 ขั้นตอนการดำเนินงาน.....	8
บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	9
2.1 กรดไขมัน (fatty acids).....	9
2.1.1 กรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acids, SFAs).....	10
2.1.2 กรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acids)	10
2.1.2.1 โอเมก้า-3 (omega 3)	11
2.1.2.2 โอเมก้า-6 (omega 6)	11
2.2 จุลินทรีย์ในกะปิ.....	12
2.3 แบคทีเรียสายพันธุ์ที่คาดว่าจะผลิตดีเอสเอ	12

2.3.1	ประโยชน์ของดีเอชเอในแบคทีเรียจากทะเล	13
2.4	ยีนและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดไขมัน	13
2.5	การทดสอบที่เกี่ยวข้องกับปริมาณการผลิตกรดไขมัน	17
2.5.1	triphenyltetrazolium chloride (TTC).....	17
2.5.2	การย้อมไขมันด้วย Sudan Black B	17
2.6	ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณการผลิตดีเอชเอในแบคทีเรีย	18
2.6.1	อุณหภูมิ	18
2.6.2	ไนโตรเจนในอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยง	18
2.6.3	สัดส่วนคาร์บอนและไนโตรเจน (C/N ratio) ต่อการผลิตกรดไขมัน	19
2.6.4	ACP domain	19
บทที่ 3	วิธีการดำเนินงานวิจัย	21
3.1	วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	21
3.2	เคมีภัณฑ์.....	22
3.3	วิธีดำเนินงานวิจัย.....	23
บทที่ 4	ผลการดำเนินงาน	30
4.1	การคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างเคย และกะปิ.....	30
4.2	การคัดเลือกแบคทีเรียกลุ่มผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวเชิงซ้อน (PUFAs) โดยใช้การทดสอบทางชีวเคมี.....	32
4.2.1	การทดสอบด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H ₂ O ₂ plate assay).....	32
4.2.2	การทดสอบด้วย 0.1 % w/v 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC).....	32
4.2.3	การย้อมดูการสะสมน้ำมันด้วย Sudan Black B	34
4.3	ระบุชนิดแบคทีเรียด้วย 16S rDNA และตรวจวิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตโอเมก้า-3.....	34
4.4	ผลการวิเคราะห์กรดไขมันชนิดต่าง ๆ ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี.....	39

4.4 ผลวิเคราะห์ whole genome ในสายพันธุ์ <i>B. amyloliquefaciens</i> SR121	42
4.6 ทดสอบหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตดีเอชเอจากแบคทีเรียที่สามารถคัดแยกได้	45
4.6.1 ทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อปริมาณการผลิตกรดไขมันและองค์ประกอบของกรดไขมันใน <i>B. amyloliquefaciens</i> SR121	45
4.6.2 ทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการปรับอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio) ต่อปริมาณการผลิตกรดไขมันและองค์ประกอบของกรดไขมันใน <i>B. amyloliquefaciens</i> SR121	47
4.6.3 ทดสอบ pH ที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยง <i>B. amyloliquefaciens</i> SR121 ต่อปริมาณการผลิตกรดไขมันและองค์ประกอบของกรดไขมัน	49
บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง	51
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ	55
บรรณานุกรม	56
ภาคผนวก	61
ภาคผนวก ก	62
ภาคผนวก ข	63
ประวัติผู้เขียน	74

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ผลวิเคราะห์กรดไขมันชนิดต่างๆในตัวอย่างกะปิ.....	31
ตารางที่ 2 ผลการทดสอบไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.5 % และ 0.1 % w/v TTC ในไอโซเลตที่ทำการ คัดเลือกมาก โดยมีการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง.....	33
ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์ชนิดแบคทีเรียด้วยยีน <i>16S rDNA</i> จากแบคทีเรียที่ทำการคัดแยกมา.....	35
ตารางที่ 4 ชีวมวลและปริมาณการผลิตไขมันในแบคทีเรียที่มีการทดสอบทางชีวเคมีและคาดว่าจะมี ความสามารถในการผลิตกรดไขมันประเภทไม่อิ่มตัวสูง.....	40
ตารางที่ 5 ผลทางสถิติของ <i>B. amyloliquefaciens</i> SR121 จากการวิเคราะห์ transcriptome assembly.....	42
ตารางที่ 6 ข้อมูลเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดไขมันใน <i>B. amyloliquefaciens</i> SR121 ที่ได้ จากการวิเคราะห์ WGS.....	45
ตารางที่ 7 ชีวมวลและปริมาณการผลิตไขมันใน <i>B. amyloliquefaciens</i> SR121 ที่อุณหภูมิสำหรับ การเพาะเลี้ยงต่าง ๆ.....	46
ตารางที่ 8 ชีวมวลและปริมาณการผลิตไขมันใน <i>B. amyloliquefaciens</i> SR121 เพาะเลี้ยงด้วย สัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน.....	48
ตารางที่ 9 ชีวมวลและปริมาณการผลิตไขมันใน <i>B. amyloliquefaciens</i> SR121 ที่ปรับค่าความเป็น กรด-ด่างของอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงต่าง ๆ.....	50

ตารางที่ 10 ปริมาณของกรดไขมันแต่ละชนิดในแต่ละพารามิเตอร์ที่ทำการทดสอบ (มิลลิกรัม/กรัม)

.....54



สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 โครงสร้างฟอสโฟลิปิด (Phospholipid) ของเยื่อหุ้มเซลล์.....	9
ภาพที่ 2 วิถีทางชีวภาพในการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน ในกลุ่มของโอเมก้า-3, 6 และ 9	10
ภาพที่ 3 โครงสร้างของกรดไขมันไม่อิ่มตัวในกลุ่มของโอเมก้า-3 (Omega-3 unsaturated fatty acids).....	11
ภาพที่ 4 โครงสร้างของกรดไขมันไม่อิ่มตัวในกลุ่มของโอเมก้า-6 (Omega-6 unsaturated fatty acids).....	12
ภาพที่ 5 วิถีทางชีวภาพ fatty acid synthase (FAS) pathway ในการสังเคราะห์กรดไขมัน.....	15
ภาพที่ 6 วิถีการสังเคราะห์กรดไขมันผ่านทาง fatty acid synthase (FAS) pathway เชื่อมต่อกับ วิถีทางชีวภาพในการสังเคราะห์กรดไขมันผ่านเอนไซม์ desaturase และ elongase (a) และวิถีการสังเคราะห์กรดไขมันผ่านทาง polyketide synthase II (b).....	16
ภาพที่ 7 การจัดเรียงกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันอีพีเอและดีเอชเอ แสดงความ เหมือนและความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียในทะเล.....	20
ภาพที่ 8 ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่ทำการคัดแยกออกมาได้จากตัวอย่างกะปิทั้ง 8 ชนิด.....	31
ภาพที่ 9 ผลการทดสอบที่เป็นบวกสำหรับความเข้มข้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.5 %.....	32
ภาพที่ 10 ผลการทดสอบด้วย 0.1 % w/v TTC ในไอโซเลตที่มีผลการทดสอบเป็นบวกในไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์.....	33
ภาพที่ 11 การสะสมไขมันในแบคทีเรียทั้ง 10 ไอโซเลตที่ทำการคัดเลือกมา ด้วย Sudan Black B	34
ภาพที่ 12 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการแสดงโดย phylogenetics tree วิเคราะห์ยีน 16S rDNA โดย UPGMA method สำหรับทั้ง 10 ไอโซเลต.....	36

ภาพที่ 13 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน <i>D6 desaturase</i>	37
ภาพที่ 14 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน <i>D5 desaturase</i>	38
ภาพที่ 15 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน <i>fadD</i>	39
ภาพที่ 16 แผนที่จีโนมของสายพันธุ์ <i>B. amyloliquefaciens</i> SR121.....	43
ภาพที่ 17 การสังเคราะห์กรดไขมันสายยาวของ <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> 168.....	44



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

กรดไขมันโดโคซาเฮกซาโนอิก หรือดีเอชเอ (docosahexaenoic acid, DHA) เป็นกรดไขมันประเภทไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หลายตำแหน่ง (polyunsaturated fatty acids) ในกลุ่มโอเมก้า-3 ซึ่งเป็นกรดไขมันที่จำเป็นต่อร่างกาย (essential fatty acids) เนื่องจากในร่างกายมนุษย์ไม่มีเอนไซม์ที่สามารถสร้างพันธะคู่ในตำแหน่ง ω -3 และ ω -6 ได้ (ธัญญลักษณ์ พิทักษ์ และคณะ, 2563) ทั้งนี้ในร่างกายมนุษย์สามารถเปลี่ยนกรดแอลฟาไลโนเลอิก หรือเอแอลเอชเอ็นดีแอลฟา (n-3 alpha-linolenic acid, ALA) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่มีพันธะคู่ที่ตำแหน่ง ω -3 สังเคราะห์ได้เป็นกรดไขมันโอโคซาเพนทาโนอิก (Eicosapentaenoic acid, EPA) และดีเอชเอได้ แต่การเปลี่ยนแปลงนี้ไม่เพียงพอต่อความต้องการ (Siriwardhana และคณะ, 2012) เนื่องจากปริมาณจากการสังเคราะห์ได้น้อยกว่า 1% เมื่อเทียบกับปริมาณกรดไขมันแอลฟาไลโนเลอิกที่เป็นสารตั้งต้น ดังนั้นกลุ่มของกรดไขมันโอเมก้า-3 และโอเมก้า-6 (อัจนรา นิยมเดชา และคณะ, 2556), (Domenichiello และคณะ, 2015) จึงจำเป็นต้องได้รับเพิ่มเติมจากแหล่งอาหารภายนอก

ปลาทะเลบางชนิด เช่น ปลาทูน่า ปลาทะเลแมคเคอเรล และปลาแซลมอน เป็นแหล่งอาหารที่พบกรดไขมันประเภทโอเมก้า-3 ปริมาณสูง หรือน้ำมันปลาที่ได้จากปลาทะเลก็เป็นแหล่งอาหารเสริมที่นิยมรับประทานเพื่อให้ได้รับดีเอชเอ ในอุตสาหกรรมการผลิตดีเอชเอก็นิยมนำปลาทะเลมาใช้ในการกระบวนการผลิตเพื่อใช้เป็นอาหารเสริม แต่การใช้น้ำมันจากปลาทะเลในขั้นตอนของการผลิตดีเอชเอ นั้นมีต้นทุนในการผลิตที่สูง (Alagarsamy *et al.*, 2019) ในช่วงปี 1990-2018 มีการออกกฎหมายควบคุมโควตาการจับปลา (ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ๑๗๑ แห่งพระราชกำหนดการประมง พ.ศ.๒๕๕๘) จึงส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการประมง ทำให้มีการหันมาทำฟาร์มปลามากขึ้นที่ส่งผลให้การเพาะเลี้ยงปลามากขึ้น ซึ่งการเพาะเลี้ยงปลาที่มีต้นทุนการผลิตที่สูงนั้นทำให้ราคาของผลิตภัณฑ์ปลาเพิ่มสูงขึ้นในช่วงปีที่ผ่านมา ดังนั้นเพื่อส่งเสริมอุตสาหกรรมผลิตกรดไขมันประเภทโอเมก้า-3 จึงจำเป็นต้องศึกษาแหล่งผลิตทางเลือกเพิ่มเติมเพื่อเพิ่มแหล่งในการผลิตและการหาผลิตภัณฑ์จากปลาทะเลด้วยวิธีการใหม่เพื่อตอบสนองต่อความต้องการที่เพิ่มขึ้นของอุตสาหกรรมอาหารและโภชนาการ

มีงานวิจัยระบุว่า รา สาหร่าย และแบคทีเรียสามารถใช้เป็นแหล่งทางเลือกสำหรับการผลิตดีเอชเอได้ โดยในงานวิจัยของ Yano และคณะ ในปี 1994 ระบุว่าการใช้แบคทีเรียเป็นแหล่งในการ

ผลิตดีเอชเอนั้น ถึงแม้จะมีผลผลิตที่อาจจะต่ำกว่าในแหล่งอื่นแต่จะมีขั้นตอนที่ง่าย และมีประโยชน์ในการศึกษามากกว่าแหล่งอื่น ๆ กล่าวคือในส่วนของการนำมาสกัดสารดีเอชเอออกจากเซลล์ หรือในส่วนของการตัดแปลงสายพันธุ์แบคทีเรียจะมีขั้นตอนที่ง่ายกว่าในแหล่งผลิตอื่น นอกจากนี้การใช้แบคทีเรียเป็นแหล่งในการผลิตนั้นยังมีขั้นตอนในการเพาะเลี้ยงที่ง่าย ไม่ซับซ้อน ใช้พื้นที่ประหยัด รวมทั้งใช้ทรัพยากรในการเพาะเลี้ยงที่น้อยกว่า อีกทั้งแบคทีเรียยังใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่รวดเร็วและเป็นทางเลือกที่เหมาะสมกับกลุ่มคนที่ไม่รับประทานเนื้อสัตว์อีกด้วย (Finco และคณะ, 2017)

งานวิจัยส่วนหนึ่งได้ศึกษาจุลินทรีย์ในกะปิ มักมีการศึกษาโดยใช้วิธีการคัดแยกจุลินทรีย์เป็นไอโซเลทเดี่ยว และเริ่มมีการศึกษาทางด้านเมแทบอลิซึมเพื่อดูชนิดกลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีผลต่อการหมักในแต่ละขั้นตอน โดยพบว่าชนิดของจุลินทรีย์ที่มีความสัมพันธ์สอดคล้องกับปริมาณกรดอะมิโนในกะปิหมัก ซึ่งกรดอะมิโนเหล่านี้ส่งผลต่อกลิ่นและรสชาติของกะปิ (Helmi และคณะ, 2022) อย่างไรก็ตามในเรื่องของกรดไขมัน และข้อมูลกรดไขมันสายยาวที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ ยังไม่มีการศึกษาที่ให้ข้อมูลเชื่อมโยงชัดเจนระหว่างจุลินทรีย์และปริมาณไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว ตลอดจนกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความเกี่ยวข้องว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างไรแน่ชัด ในงานวิจัยก่อนหน้า Wisetchonlatan และคณะ ปี 2022 ผู้วิจัยได้ทำการศึกษามาเมแทบอลิซึมและชนิดของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับปริมาณดีเอชเอในผลิตภัณฑ์กะปิแสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์กะปิที่ทำการเก็บมาในแต่ละพื้นที่โดยเฉพาะหมู่บ้านชาวประมงบริเวณอ่าวไทย ซึ่งมีกระบวนการผลิตที่แตกต่างกันส่งผลให้ปริมาณดีเอชเอและสัดส่วนของชนิดแบคทีเรียที่ทำการตรวจสอบด้วยเมแทบอลิซึมในแต่ละตัวอย่างกะปิต่างกัน โดยพบแบคทีเรียที่มีความเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัว ได้แก่ *Lactobacillus* spp., *Lachnospiraceae* spp. และ *Bacteroidetes* spp. ขณะเดียวกันผลการศึกษาในส่วนของการคัดแยกแบคทีเรียด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา สามารถคัดแยกแบคทีเรียสกุล *Bacillus* โดยมีการตรวจสอบความสามารถในการสร้างกรดไขมันเบื้องต้นด้วยการทดสอบด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2 plate assay) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่ศึกษาข้อมูลเชื่อมโยงระหว่างชนิดของจุลินทรีย์และปริมาณไขมันสายยาว ตลอดจนกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความเกี่ยวข้องว่ามีความสัมพันธ์กัน โดยเฉพาะในแบคทีเรียที่มีบทบาทอย่างมากในกระบวนการหมักกะปิ ต่อเนื่องมาจากงานวิจัยที่ทำมาก่อนหน้า โดยนำกึ่งเคยและกะปิมาทำการคัดแยกแบคทีเรียที่คาดว่าจะมีความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวในกลุ่มโอเมก้า-3 โดยเฉพาะดีเอชเอ แบคทีเรียที่คัดแยกได้ก่อนหน้าพบว่ามีคุณลักษณะเฉพาะที่สอดคล้องกับรายงานวิจัยชนิดของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 โดยพบว่า ส่วนใหญ่จะเป็นแบคทีเรียในทะเลที่อาศัยอยู่บริเวณทะเลลึก ในภาวะที่มีอุณหภูมิต่ำและความดันสูง ทำให้แบคทีเรียเหล่านี้สามารถสังเคราะห์กรดไขมันกลุ่มไม่อิ่มตัวและ

เก็บสะสมไว้ที่เยื่อหุ้มเซลล์เพื่อทำให้เยื่อหุ้มเซลล์คงสมบัติความเป็นของไหล (fluidity) ได้แม้อยู่ในภาวะมีอุณหภูมิต่ำและความดันสูง (Estupiñán และคณะ, 2020) โดยมีความเป็นไปได้อย่างมากที่แบคทีเรียเหล่านี้จะติดมากับวัตถุคิบในการผลิตตามธรรมชาติของกะปิซึ่งก็คือกุ้งเคย มีรายงานว่ากุ้งเคยเป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถอาศัยอยู่ได้ตั้งแต่ระดับผิวน้ำจนถึงลึกลงไป 500-700 เมตรจากผิวน้ำทะเล ซึ่งกุ้งเคยมีหลายสปีชีส์ และมีถิ่นที่อยู่ของแต่ละสปีชีส์แตกต่างกันไปตามสภาพภูมิศาสตร์ (Roy และคณะ, 2019) ดังนั้นกุ้งเคยจึงเป็นแหล่งที่มีโอกาสนำแบคทีเรียจากบริเวณทะเลลึกขึ้นสู่ผิวน้ำได้ จึงเป็นสาเหตุให้งานวิจัยนี้สนใจนำกุ้งเคยและกะปิมาทำการคัดแยกแบคทีเรียและทำการตรวจสอบความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวกลุ่มโอเมก้า-3 ด้วย 0.1 % w/v 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) ยืนยันผลด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี (gas chromatography, GC) และการย้อมดูการสะสมไขมันด้วย Sudan Black B เพื่อให้ทราบถึงศักยภาพในการผลิตไขมันและกรดไขมันของแบคทีเรียชนิดที่ศึกษา จากนั้นทำการตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสในส่วนของยีน 16s *rDNA* เลือกแบคทีเรียที่คาดว่าจะเกี่ยวข้องกับการผลิตกลุ่มของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวเชิงซ้อนในกลุ่มของโอเมก้า-3 โดยเฉพาะดีเอชเอ มาตรวจหายีนสามยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันใน 2 วิธีเมแทบอลิซึม ได้แก่ วิธี Fatty acid synthesis type II (FAS II) คือเส้นทางการต่อสายคาร์บอนให้ยาวขึ้นโดยเริ่มจากการรวมของ acetyl-CoA เข้ากับ malonyl-CoA ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรดไขมันปาล์มิติก (palmitic, C16:0) ผ่านการตรวจสอบการปรากฏของยีน *pfaA* (Alagarsamy และคณะ, 2019) รวมถึงยีน *D6 desaturase* และ *D5 desaturase* ที่เกี่ยวข้องกัวิธีวิธีการสังเคราะห์ desaturation/elongation เนื่องจากเอนไซม์สองชนิดนี้สามารถสังเคราะห์กรดไขมันอีพีเอและดีเอชเอจากกรดไขมันแอแอลเอชนิดอัลฟาได้ (Hu และคณะ, 2011) และตรวจสอบหายีน *fadD* สำหรับเอนไซม์ long-chain fatty acyl-CoA ligase (EC 6.2.1.3) ที่เปลี่ยน exogenous long-chain fatty acids (LCFAs) เป็น acyl-CoA ในแบคทีเรีย เพื่อหาแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวในกลุ่มโอเมก้า-3 โดยเฉพาะดีเอชเอ และอีพีเอ จากกุ้งเคยและกะปิของไทย และเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสำหรับแบคทีเรียที่สามารถคัดแยกได้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อหาแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวในกลุ่มโอเมก้า-3 โดยเฉพาะกรดโดโคซาเฮกเซโนอิก (DHA) จากกุ้งเคยและกะปิของไทย
2. เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวจากแบคทีเรียที่สามารถคัดแยกได้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตกลุ่มของกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีประโยชน์ เช่นกลุ่มของโอเมก้า-3 อย่างอีพีเอ และดีเอชเอ และทำการทดสอบภาวะที่เหมาะสมในการเพาะไอโซเลตที่คัดแยกได้เพื่อเพิ่มศักยภาพในการผลิต โดยทำการทดสอบอุณหภูมิ สัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio) และการทดสอบผลของสภาพความเป็นกรดเบส (pH) ในอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงต่อปริมาณการผลิตกรดไขมันจากตัวอย่างแบคทีเรียที่ทำการคัดเลือกมา

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้สายพันธุ์แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตดีเอชเอหรือกลุ่มของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวที่สำคัญ ที่คัดแยกจากเคยบริเวณอ่าวไทย และกะปิพื้นเมืองของไทยทั้งในบริเวณอ่าวไทยตอนบนที่มีระยะใกล้เคียงกันและอ่าวไทยตอนล่างที่มีระยะห่างจากกันมากกว่า 500 กิโลเมตร รวมถึงภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวในกลุ่มของโอเมก้า-3 เช่น ดีเอชเอ ด้วยแบคทีเรียที่คัดแยกได้เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิต

1.5 ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. ศึกษาค้นคว้า และรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
2. รวบรวมตัวอย่างกะปิจากบริเวณหมู่บ้านชาวประมง ใน 3 พื้นที่ของประเทศไทย ได้แก่ อ่าวไทยตอนบนฝั่งตะวันตก อ่าวไทยตอนบนฝั่งตะวันออก และอ่าวไทยตอนล่าง
3. คัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างกะปิ และทำการตรวจสอบความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัว
4. คัดเลือกแบคทีเรีย ศึกษาและระบุชนิดในกะปิและกุ้งเคยด้วยเทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์และชีวเคมี
5. ทดสอบหาภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกมา เพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตกรดไขมันที่ศึกษา
6. วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผล นำเสนองานวิจัยในการประชุมวิชาการ และเขียนวิทยานิพนธ์

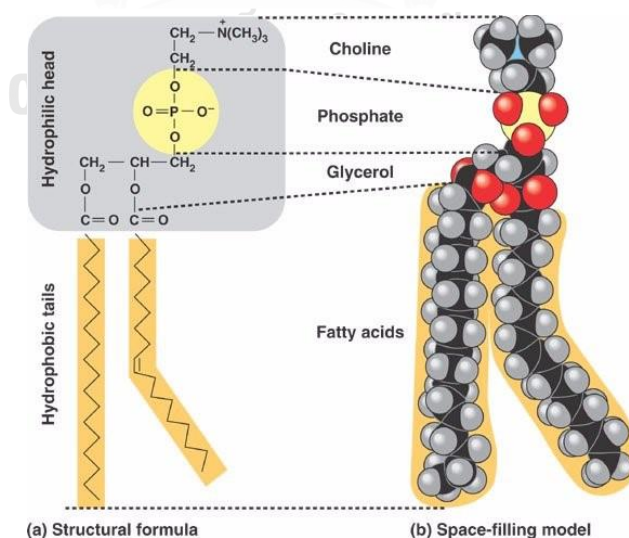
บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กรดไขมัน (fatty acids)

กรดไขมัน เป็นกรดอินทรีย์ประเภทหนึ่งที่มีโครงสร้างเป็นสายไฮโดรคาร์บอนที่ปลายด้านหนึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิล (carboxyl group) มีความยาวตั้งแต่ 4 คาร์บอนจนถึง 36 คาร์บอน ถูกจำแนกตามความยาวของสายไฮโดรคาร์บอนได้ดังนี้ กรดไขมันสายสั้น (short-chain fatty acids) มีความยาว 2-5 คาร์บอน กรดไขมันสายกลาง (medium-chain fatty acids) มีความยาวของคาร์บอน 6-13 ตำแหน่ง กรดไขมันสายยาว (long-chain fatty acids) มีความยาวคาร์บอนระหว่าง 14-18 ตำแหน่ง และ กรดไขมันสายยาวมาก (very-long-chain fatty acids) มีความยาวมากกว่า 18 คาร์บอนขึ้นไป

กรดไขมันจัดอยู่ในกลุ่มของลิพิดสะสมซึ่งใช้เป็นพลังงานหลักของสิ่งมีชีวิตทั้งหมด อย่างเช่นในยูคาริโอตจะมีการเก็บสะสมในรูปของหยดน้ำมัน (lipid droplet) โดยเกิดจากการรวมตัวของกรดไขมัน 3 ตัวจับกับกลีเซอรอล (glycerol) ด้วยพันธะเอสเทอร์เป็นไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) และสะสมไว้ในไซโตซอล (cytosol) ของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ เมื่อเซลล์ต้องการพลังงาน จะต้องอาศัยเอนไซม์ไลเปส (lipases) ในการตัดพันธะด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) นอกจากใช้เป็นพลังงานแล้วยังมีประโยชน์ในส่วนอื่นอีก เช่น ในแบคทีเรียจะมีกรดไขมันเป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ซึ่งอยู่ในโครงสร้างฟอสโฟลิพิด (phospholipid) ของเยื่อหุ้มเซลล์



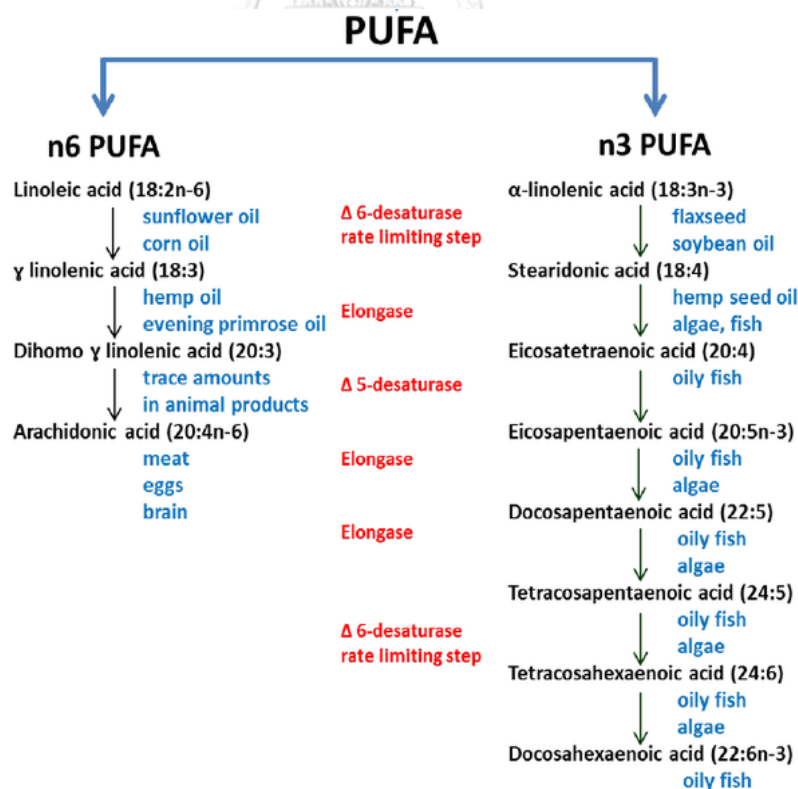
ภาพที่ 1 โครงสร้างฟอสโฟลิพิด (Phospholipid) ของเยื่อหุ้มเซลล์ (อติโรจน์ ปัทมน์เปรมสิริ, 2560 : ออนไลน์)

2.1.1 กรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acids, SFAs)

กรดไขมันอิ่มตัว คือ กรดคาร์บอกซิลิกที่เชื่อมต่อกับสายไฮโดรคาร์บอนโดยมีโครงสร้างเป็นโซ่ยาว ประกอบด้วยพันธะเดี่ยวทั้งหมดไม่มีพันธะคู่อยู่ในสาย มีสูตรทั่วไปคือ $C_nH_{2n}O_2$ และมีความเสถียร เนื่องจากกรดไขมันไม่อิ่มตัวไม่มีพันธะคู่อยู่ในสายจึงไม่ทำปฏิกิริยากับออกซิเจนส่งผลให้ไม่เกิดการเหม็นหืน (lipid oxidation) นอกจากนี้กรดไขมันอิ่มตัวจะมีจุดหลอมเหลว (melting point) สูงกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) ที่มีความยาวของสายคาร์บอนเท่ากัน

2.1.2 กรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acids)

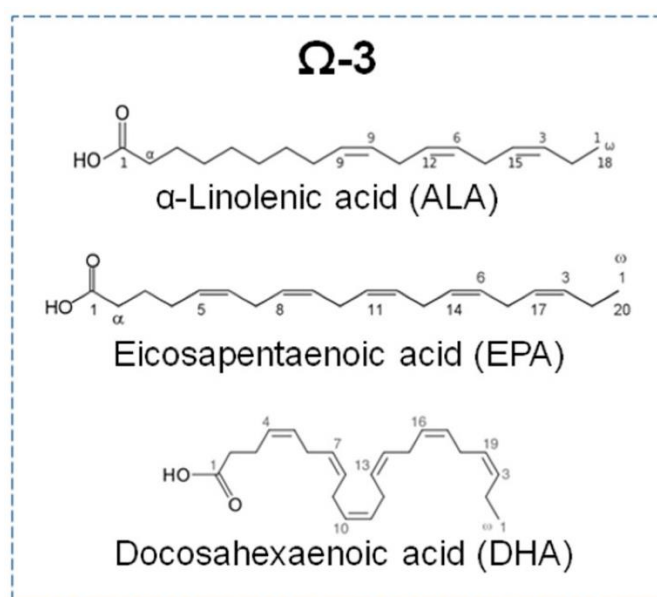
กรดไขมันไม่อิ่มตัว คือกรดคาร์บอกซิลิกที่เชื่อมต่อกับสายไฮโดรคาร์บอน โดยมีพันธะคู่อยู่ในสาย แบ่งกลุ่มได้ 2 ประเภทคือ ไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (polyunsaturated fatty acids, MUFAs) คือกรดไขมันที่ภายในโมเลกุลของสายไฮโดรคาร์บอนมีพันธะคู่อยู่ตำแหน่งเดียว และกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) คือกรดไขมันที่ภายในโมเลกุลของสายไฮโดรคาร์บอนมีพันธะคู่อยู่มากกว่าหนึ่งตำแหน่ง โดยกรดไขมันไม่อิ่มตัวกลุ่มที่สำคัญคือ โอเมก้า-3 และโอเมก้า-6 เป็นกรดไขมันที่ร่างกายไม่สามารถสร้างได้เอง



ภาพที่ 2 วิธีทางชีวภาพในการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน ในกลุ่มของโอเมก้า-3, 6 และ 9 (Bishop และ คณะ, 2015)

2.1.2.1 โอเมก้า-3 (omega 3)

โอเมก้า-3 คือกลุ่มของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนที่มีพันธะคู่หลายคู่ โดยตำแหน่งพันธะคู่แรกอยู่ระหว่างอะตอมคาร์บอนตำแหน่งที่สามนับจากปลายด้านเมทิล (methyl, $-CH_3$) ของสายไฮโดรคาร์บอน จึงเรียกว่า โอเมก้า (ω -) เช่น กรดไขมันลิโนเลนิกอัลฟา (α -linolenic acid, ALA) ที่พบในน้ำมันพืช, กรดไขมันไอโคซาเพนทาอีโนอิก (Eicosapentaenoic Acid, EPA) และ กรดไขมันโดโคซาเฮกซาอีโนอิก (docosahexaenoic acid, DHA)



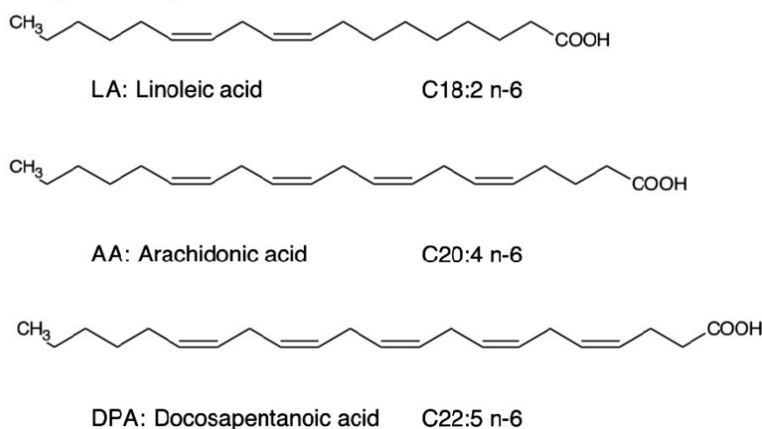
ภาพที่ 3 โครงสร้างของกรดไขมันไม่อิ่มตัวในกลุ่มของโอเมก้า-3 (Omega-3 unsaturated fatty acids) (Drenjančević และ Pitha, 2012)

CHULALONGKORN UNIVERSITY

2.1.2.2 โอเมก้า-6 (omega 6)

โอเมก้า-6 คือกลุ่มของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนที่มีพันธะคู่หลายคู่ โดยตำแหน่งพันธะคู่แรกอยู่ระหว่างอะตอมคาร์บอนตำแหน่งที่หกนับจากปลายด้านเมทิล เช่น กรดลิโนเลอิก (linoleic acid, LA) กรดอะราคิโดนิก (arachidonic acid, AA) และ กรดโดโคซาเพนตาอีโนอิก (docosapentaenoic acid, DPA)

Omega-6 fatty acids



ภาพที่ 4 โครงสร้างของกรดไขมันไม่อิ่มตัวในกลุ่มของโอเมก้า-6 (Omega-6 unsaturated fatty acids) (Kashiwagi และคณะ, 2012)

2.2 จุลินทรีย์ในกะปิ

กะปิเป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมัก ที่อาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์เพื่อช่วยในการหมัก ซึ่งจุลินทรีย์ที่พบในการหมักกะปิอาจเป็นจุลินทรีย์ที่ได้มาพร้อมกับวัตถุดิบ หรืออาจจะเกิดขึ้นใหม่จากกระบวนการหมักก็ได้ โดยส่วนใหญ่จุลินทรีย์ที่พบในกะปิเป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ทั้งที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobic bacteria) เช่น *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp., *Micrococcus* spp. (จิตต์ เรขา ทองมณี, 2544) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยหลายฉบับที่รายงานว่า *Lentibacillus* spp. เป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้ในกะปิพื้นบ้านของไทย อย่างไรก็ตามงานวิจัยของ Pakdeeto และคณะ (2007) ที่ทำการคัดแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างกะปิ พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Lentibacillus salaries* 96.5% ซึ่งจากการตรวจสอบลักษณะพื้นฐานของจุลินทรีย์และสัดส่วนของโมเลกุลจึงถูกเสนอให้เป็นสปีชีส์ใหม่ คือ *Lentibacillus kapialisp.* nov. หรืองานวิจัยของ Booncharoen และคณะ (2019) ที่ทำการคัดแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างกะปิ พบว่าจุลินทรีย์ที่ทำการคัดแยกได้มีความ ใกล้เคียงกับ *Lentibacillus juripiscarius* และ *L. halophilus* ที่ 98.7% และ 97.2 % ตามลำดับ ซึ่งจากพื้นฐานลักษณะของจุลินทรีย์ และลักษณะสัดส่วนของโมเลกุล จึงถูกเสนอให้เป็นสปีชีส์ใหม่

2.3 แบคทีเรียสายพันธุ์ที่คาดว่าจะผลิตดีเอสเอ

แบคทีเรียจากทะเลที่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวส่วนใหญ่จะอยู่ในกลุ่มแกมมาโปรทีโอแบคทีเรีย (Gammaproteobacteria) เช่น *Thraustochytrium* sp., *Collweria*

psycherythraea, *Moritella marina* (Robles และคณะ, 2018) *Shewanella* spp., และ *Photobacterium* sp. (Wan และคณะ, 2016) นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* ว่ามีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงการสังเคราะห์กรดไขมันที่จะไปสะสมในเยื่อหุ้มเซลล์ได้ตามภาวะแวดล้อม เช่น อาหาร อุณหภูมิ และความเป็นกรด-ด่าง (pH) ซึ่งสัดส่วนของกรดไขมันที่สังเคราะห์ได้นั้นจะมีรูปแบบที่แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสปีชีส์ จึงมีการจัดรูปแบบองค์ประกอบของกรดไขมันในเซลล์แบคทีเรีย และนำมาใช้เป็นเครื่องหมายชี้วัดทางชีวภาพ (Biomarker) เพื่อระบุสปีชีส์ของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* (Diomandé และคณะ, 2015)

2.3.1 ประโยชน์ของดีเอชเอในแบคทีเรียจากทะเล

แบคทีเรียจากทะเลที่มีความสามารถในการผลิตดีเอชเอ ส่วนใหญ่จะพบได้ในบริเวณทะเลลึก เนื่องจากด้วยสภาวะที่มีอุณหภูมิต่ำ และความดันที่สูงของบริเวณทะเลลึก แบคทีเรียบางชนิดจึงมีความสามารถในการปรับตัวโดยการปรับเปลี่ยนสัดส่วนในการผลิตพวกกรดไขมันไม่อิ่มตัว เช่น Eicosapentaenoic acid (EPA) และดีเอชเอ ให้มากขึ้นและสะสมไว้ที่เยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งความสามารถนี้จะทำให้เซลล์แบคทีเรียสามารถรักษาความเป็นของเหลว (fluidity) ในภาวะที่มีอุณหภูมิต่ำ และความดันที่สูงได้ และส่งผลให้เซลล์สามารถขนส่งสารอาหารและเจริญเติบโตต่อไปได้ (Moi และคณะ, 2018)

มีรายงานว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัว เช่น ดีเอชเอ อีพีเอ และ ลิโนเลอิก หรือเอแอลเอ ชนิดอัลฟา ที่สะสมในเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย สามารถออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่อปัจจัยภายนอกอย่างสารกลุ่ม reactive oxygen species (ROSs) เช่น H_2O_2 ได้ กล่าวคือ หากแบคทีเรียทางทะเลมีการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่กล่าวมาข้างต้น แบคทีเรียชนิดนี้จะสามารถอยู่รอดและเจริญเติบโตได้ดีเมื่อเซลล์อยู่ในภาวะที่มีอนุมูลอิสระ หรือสารกลุ่ม reactive oxygen species (ROSs) (Tilay and Annapure, 2012) ซึ่งในงานวิจัยส่วนใหญ่จึงใช้ประโยชน์จากคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระนี้เพื่อมาใช้ในการคัดแยกแบคทีเรียทางทะเลที่มีสมบัติในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัว

2.4 ยีนและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดไขมัน

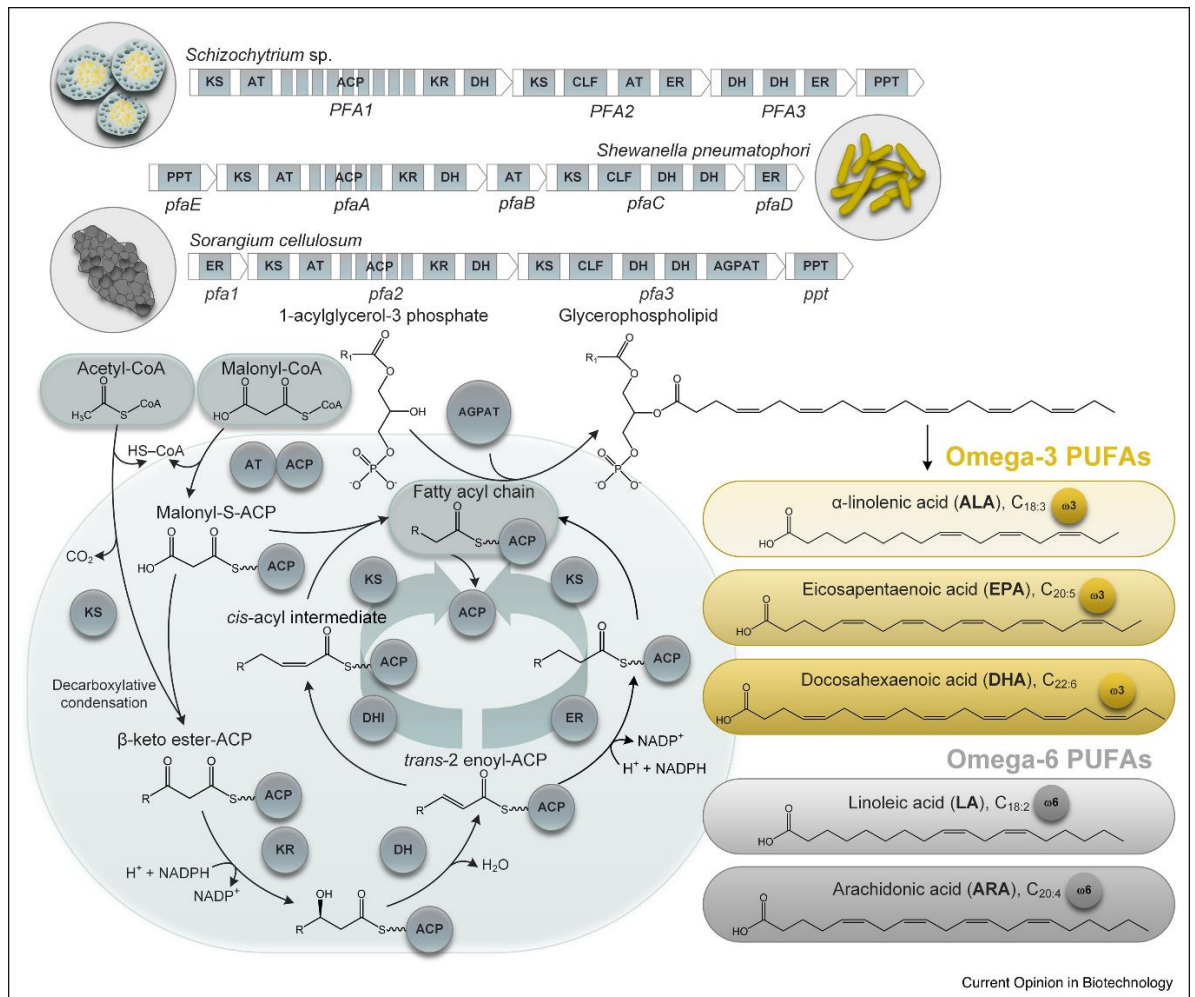
การสังเคราะห์กรดไขมันผ่าน 2 วิถีเมแทบอลิซึม ได้แก่ วิถี Fatty acid synthesis (FAS) คือเส้นทางการต่อสายคาร์บอนให้ยาวขึ้น โดยมีกระบวนการสำคัญ 4 กระบวนการ เริ่มจากการรวมของ acetyl-CoA เข้ากับ malonyl-CoA ในขั้นตอนของการรวมตัว (condensation) ถูกเร่งปฏิกิริยาด้วย

เอนไซม์ ketoacyl-ACP synthase (KS) ซึ่งถูกควบคุมด้วยยีน *fatty acid biosynthetic geneF* (*FabF*) หรือ *fatty acid biosynthetic geneB* (*FabB*) ขึ้นอยู่กับชนิดของสิ่งมีชีวิต โดยถอดรหัสได้ 3-ketoacyl-ACP synthase I และ 3-ketoacyl-ACP synthase II ตามลำดับ จากนั้นปฏิกิริยาจะเข้าสู่กระบวนการรีดักชัน (reduction) ของหมู่คาร์บอนิล ซึ่งถูกเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ ketoreduction (KR) ถูกควบคุมด้วยยีน *3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase* (*FabG*) ถัดมาคือกระบวนการปลดปล่อยน้ำออก (dehydration) ซึ่งจะถูกเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ hydroxyacyl-ACP dehydratase (DH) ซึ่งถูกควบคุมด้วยยีน *fabA* และ *fabZ* และกระบวนการสุดท้ายในวิถีสังเคราะห์แต่ละรอบคือการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของพันธะคู่ระหว่าง α และ β ด้วยเอนไซม์ enoyl-ACP reductase (ER) ซึ่งถูกควบคุมด้วยยีน enoyl-ACP reductase (*fabI*) (Meesapyodsuk และ Qiu, 2016)

ยีนที่เกี่ยวข้องกับการถอดรหัสเป็นเอนไซม์เหล่านี้มีการจัดเรียงตัวแตกต่างกันไปในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด โดยจะเกี่ยวข้องกับกลุ่มคลัสเตอร์ของยีน *polyunsaturated fatty acidA* (*pfaA*), *polyunsaturated fatty acidB* (*pfaB*), *polyunsaturated fatty acidC* (*pfaC*), *polyunsaturated fatty acidD* (*pfaD*), และ *polyunsaturated fatty acidE* (*pfaE*) ดังแสดงในภาพที่ 5 ในยีน *pfa* จะถอดรหัสและแปลรหัสได้ multifunction protein ประกอบด้วย KS, acyltransferase (AT), KR และ acyl carrier protein (ACP) ที่เป็นบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำ และ *pfaA* ถูกใช้เป็นเครื่องหมายทางโมเลกุลในการตรวจสอบหาจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดไขมัน (Alagarsamy และคณะ, 2019) เนื่องจากมีรายงานว่า multiple acyl carrier protein (ACP) domains ซึ่งเป็นลำดับเบสซ้ำ (tandem repeat) โดยมีความยาวของหน่วยซ้ำ (repeat unit) ประมาณ 2-9 ยูนิตขึ้นกับแต่ละสายพันธุ์แบคทีเรีย และจะสัมพันธ์กับความสามารถในการผลิตดีเอสเอ (Trujillo และคณะ, 2013)

ในกระบวนการสังเคราะห์แต่ละรอบจะทำให้มีการต่อสายคาร์บอนให้ยาวขึ้นรอบละ 2 อะตอม เมื่อขั้นตอนดำเนินไปจนได้กรดไขมันที่ต้องการแล้วปฏิกิริยาที่เร่งด้วยเอนไซม์ในกลุ่ม FAS จะหยุดลง และผลิตภัณฑ์จะถูกปลดปล่อยด้วยการเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ thioesterase (TE) ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรดไขมันปาล์มิติก (palmitic, C16:0) โดยในพืชและแบคทีเรียจะมี FAS ชนิดที่ 2 ซึ่งเป็นระบบที่เอนไซม์อยู่แยกจากกัน ดังนั้นในกระบวนการเร่งปฏิกิริยาให้เกิดสารตัวกลางขึ้นจึงเกิดอย่างอิสระ สารตัวกลางจะเข้าทำปฏิกิริยาที่เร่งด้วยเอนไซม์ในระบบตัวถัดไป หรืออาจเข้าทำปฏิกิริยาอื่น ทำให้ระบบวิถีทางชีวภาพในการสังเคราะห์นี้มีผลิตภัณฑ์ที่หลากหลาย เช่น กลุ่มของกรด

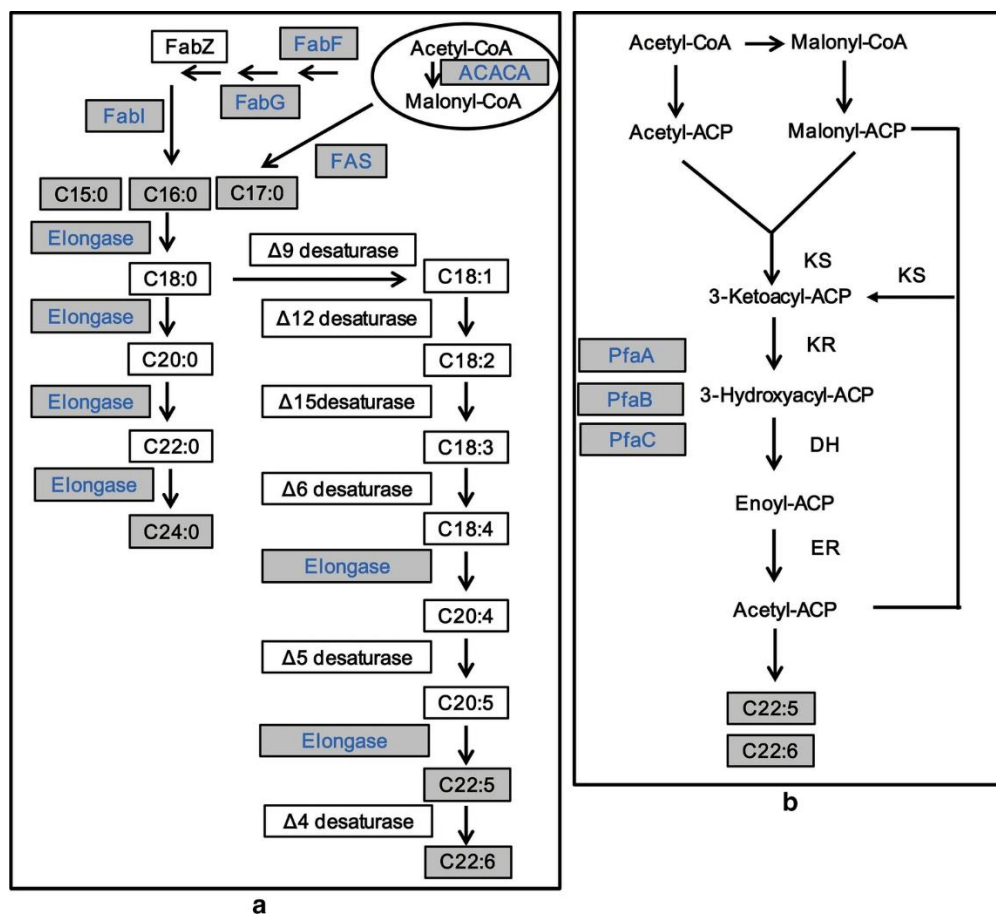
ไขมันไม่อิ่มตัวที่มีความยาวสายไฮโดรคาร์บอนที่แตกต่างกัน, กรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acids), กรดไขมันที่มีกิ่ง (branch chain) หรือหมู่ไฮดรอกซิลที่แตกต่างกัน ซึ่งกระบวนการที่เป็นขั้นตอนในการกำหนดอัตราเร็วของปฏิกิริยา (rate-limiting step) นี้คือ การสร้าง malonyl-CoA โดยเอนไซม์ acetyl CoA carboxylase (ACC)



ภาพที่ 5 วิถีทางชีวภาพ fatty acid synthase (FAS) pathway ในการสังเคราะห์กรดไขมัน (Jovanovic และคณะ, 2021)

อีกหนึ่งวิถีเมแทบอลิซึมสำหรับการสังเคราะห์กรดไขมันให้ยาวขึ้น (elongation) และกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัว (desaturation) โดยกระบวนการสังเคราะห์จะอาศัยกลุ่มของเอนไซม์ desaturase และ elongase ในการเร่งปฏิกิริยา มีเอนไซม์ที่สำคัญหลายชนิด เช่น $\Delta 6$ desaturase, $\Delta 5$ desaturase, $\Delta 4$ desaturase, $\Delta 9$ elongase, $\Delta 8$ desaturase และ $\Delta 5$ elongase ซึ่งจะทำงานโดยการเปลี่ยนโครงสร้างเพื่อให้สามารถผลิตกรดไขมันกลุ่ม VLCPUFAs ได้

สำเร็จ (Wan และคณะ., 2016) โดยเอนไซม์สำคัญในการสังเคราะห์ดีเอชเอผ่านกระบวนการเปลี่ยนโครงสร้างในเส้นทางการสังเคราะห์กลุ่มกรดไขมันโอเมก้า-3 และโอเมก้า-6 หลัก ๆ คือ $\Delta 6$ desaturase และ $\Delta 5$ desaturase (Hu และคณะ., 2011) ดังนั้นจึงมีงานวิจัยส่วนหนึ่งที่ใช้การตรวจสอบยีนที่ผลิต $\Delta 6$ desaturase และ $\Delta 5$ desaturase เพื่อใช้ในการยืนยันผลถึงกระบวนการในการผลิตกรดไขมันในสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ ผ่านเส้นทางการผลิตด้วยวิธีสังเคราะห์ desaturase/elongase



ภาพที่ 6 วิธีการสังเคราะห์กรดไขมันผ่านทาง fatty acid synthase (FAS) pathway เชื่อมต่อกับวิถีทางชีวภาพในการสังเคราะห์กรดไขมันผ่านเอนไซม์ desaturase และ elongase (a) และวิธีการสังเคราะห์กรดไขมันผ่านทาง polyketide synthase II (b) (Hu และคณะ., 2020)

งานวิจัยของ Wan และคณะ (2016) ได้ทำการพิสูจน์ถึงความสำคัญของกลุ่มคลัสเตอร์ยีน *pfa* ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตดีเอชเอ ประกอบด้วย *pfaA*, *pfaB*, *pfaC*, *pfaD* และ *pfaE* โดยทำการโคลน

ยีนในส่วนของ *pfaA*, *pfaB*, *pfaC*, *pfaD* และ *pfaE* เข้าสู่ *Escherichia coli* ผลการทดลองพบว่า ทำให้ *E. coli* มีความสามารถในการสังเคราะห์ดีเอสเอเอขึ้นมาได้

จากข้อมูลในปัจจุบันมีรายงานว่าเส้นทางการสังเคราะห์ดีเอสเอเอ ผ่าน fatty acid synthase (FAS) pathway นี้พบในแบคทีเรียจากทะเลบางสายพันธุ์เท่านั้น เช่น *Shewanella*, *Moritella*, *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aureispira* และ *Colwellia* ผ่าน 4 กระบวนการสำคัญในวิถีสังเคราะห์ทางชีวภาพ FAS ซึ่งในกระบวนการสังเคราะห์แต่ละรอบจะทำให้มีการต่อสายคาร์บอนให้ยาวขึ้น โดยอาศัยการทำงานของกลุ่มยีน *polyunsaturated fatty acid* (*pfa* gene cluster) ในการควบคุมการสังเคราะห์ดีเอสเอเอ แบบ de novo (Wan และคณะ, 2016)

2.5 การทดสอบที่เกี่ยวข้องกับปริมาณการผลิตกรดไขมัน

2.5.1 triphenyltetrazolium chloride (TTC)

2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) เป็นรีเอเจนต์ที่ส่วนใหญ่ใช้สำหรับการวิเคราะห์เฉพาะเพื่อบ่งชี้ถึงการหายใจของเซลล์ แต่มีรายงานการวิจัยจำนวนหนึ่งที่น่าสนใจในการคัดเลือกเบื้องต้นสำหรับการคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวในกลุ่ม PUFAs ร่วมกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography, GC) ซึ่งการทดสอบด้วย TTC นั้นยังไม่เป็นที่แน่ชัดว่าสัมพันธ์กับการผลิตดีเอสเอเอ แต่สามารถใช้เป็นขั้นตอนแรกสำหรับการคัดเลือกเพื่อลดจำนวนตัวอย่างได้ โดยในงานวิจัยของ Ryan และคณะ (2010) ระบุว่า เอนไซม์ $\Delta 5$ desaturase สามารถรีดิวซ์ TTC จากที่ไม่มีสีให้เปลี่ยนโครงสร้างเป็น triphenyl red formazan (TF) ที่มีสีแดงในจุลินทรีย์พวกสาหร่ายขนาดเล็กได้ และเนื่องจากเอนไซม์ $\Delta 5$ desaturase เป็นเอนไซม์สำคัญในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจสำหรับการใช้ TTC เป็นการทดสอบแบบปฐมภูมิเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตดีเอสเอเอเบื้องต้น

2.5.2 การย้อมไขมันด้วย Sudan Black B

Sudan Black B เป็นสีย้อมที่ละลายในไขมันได้ ในระหว่างขั้นตอนการย้อมสี สีย้อมจะออกจากตัวทำละลายที่เป็นเอทานอลและออกมาละลายในไขมันแทน เนื่องจากความสามารถในการละลายในไขมันสูงกว่าตัวทำละลายที่เป็นเอทานอล ดังนั้น ผลจากการทำปฏิกิริยาในการย้อมดูการสะสมไขมันของเซลล์ เมื่อทำการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ บริเวณที่มีการสะสมของหยดน้ำมันจะถูกเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้มถึงสีดำในระดับต่าง ๆ กันขึ้นอยู่กับความสามารถในการสะสมไขมันของเซลล์

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณการผลิตดีเอชเอในแบคทีเรีย

2.6.1 อุณหภูมิ

แบคทีเรียจากทะเลกลุ่มที่ทนต่ออุณหภูมิต่ำ (Psychrophilic bacteria) มีความสามารถในการปรับตัวเพื่อให้ทนและอยู่รอดได้ในภาวะที่อุณหภูมิต่ำอย่างสุดโต่ง โดยแบคทีเรียเหล่านี้จะมีความสามารถในการปรับเปลี่ยนสัดส่วนการผลิตพวงกรดไขมันไม่อิ่มตัวอย่างอีพีเอ และดีเอชเอ ให้มากขึ้นและสะสมไว้ที่เยื่อหุ้มเซลล์ได้ ซึ่งความสามารถนี้จะทำให้เซลล์แบคทีเรียสามารถรักษาความเป็นของเหลว (fluidity) ในภาวะที่อุณหภูมิต่ำและความดันที่สูง จึงเป็นเหตุผลให้แบคทีเรียที่มีความสามารถนี้ยังคงสามารถเจริญเติบโตได้ดีแม้ในภาวะสุดโต่ง (Moi และคณะ, 2018) ที่สำคัญคือ ดีเอชเอ และ อีพีเอ เป็นกรดไขมันที่จำเป็นสำหรับสิ่งมีชีวิต และเป็นกรดไขมันเบื้องต้นสำหรับการเจริญเติบโตสำหรับแบคทีเรียจากทะเลในกลุ่ม Psychrophilic ด้วยเหตุนี้อุณหภูมิจึงส่งผลต่อปริมาณการผลิตดีเอชเอ

2.6.2 ไนโตรเจนในอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยง

ไนโตรเจนเป็นส่วนสำคัญของการสังเคราะห์โปรตีน และ กรดนิวคลีอิก มีรายงานกล่าวถึงการจำกัดปริมาณอาหารในส่วนของไนโตรเจน (Nitrogen starvation) สำหรับจุลินทรีย์ที่ผลิตไขมันในปริมาณสูง (Oleaginous microorganisms) โดยเฉพาะในกลุ่มของยีสต์ และสิ่งมีชีวิตยูแคริโอตขนาดเล็กจำพวกสาหร่ายขนาดเล็กและไดอะตอม จะช่วยให้มีการเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึมอย่างรวดเร็ว (Patel และคณะ, 2020) โดยการจำกัดปริมาณไนโตรเจนนี้ ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงในวิถีเมแทบอลิซึม โดยพบว่าสารตัวกลางสำคัญจะมีการเปลี่ยนเส้นทางการผลิตสู่การผลิตไขมันเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน ดังนั้น การจำกัดไนโตรเจนในสิ่งมีชีวิตจำพวกนี้ จึงทำให้เกิดการสังเคราะห์กรดไขมันที่เพิ่มขึ้นได้ แต่ในส่วนของแบคทีเรียที่ผลิตไขมันได้นั้น มีรายงานผลการวิจัยของ Kautharapu และคณะ (2013) ที่ทำการทดลองเพื่อหาสัดส่วนของไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตดีเอชเอในแบคทีเรียจากทะเลสายพันธุ์ *Moritella marina* MP-1 พบว่าการเสริมด้วยไนโตรเจนอย่างยีสต์สกัดและทริปโทน ในอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงนี้เป็นไปในทางตรงกันข้ามกับปริมาณการผลิตกรดไขมันทั้งหมดที่จะเพิ่มขึ้นต่อเมื่อใช้สัดส่วนของไนโตรเจนที่น้อยกว่า กล่าวคือการเพิ่มไนโตรเจนจะส่งผลให้ปริมาณการผลิตดีเอชเอซึ่งเป็นกลุ่มของกรดไขมันไม่อิ่มตัวโดยรวมสูงขึ้น ดังนั้น ปริมาณไนโตรเจนจึงน่าจะเป็นหนึ่งในกลไกหลักที่ควบคุมการผลิตกลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัว รวมถึง ดีเอชเอในสิ่งมีชีวิต

นอกจากนี้ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ก็มีผลต่อการผลิตไขมันด้วย ดังเช่นในงานวิจัยของ Chaocheng Zheng (2019) ได้ทำการทดสอบปัจจัยต่าง ๆ

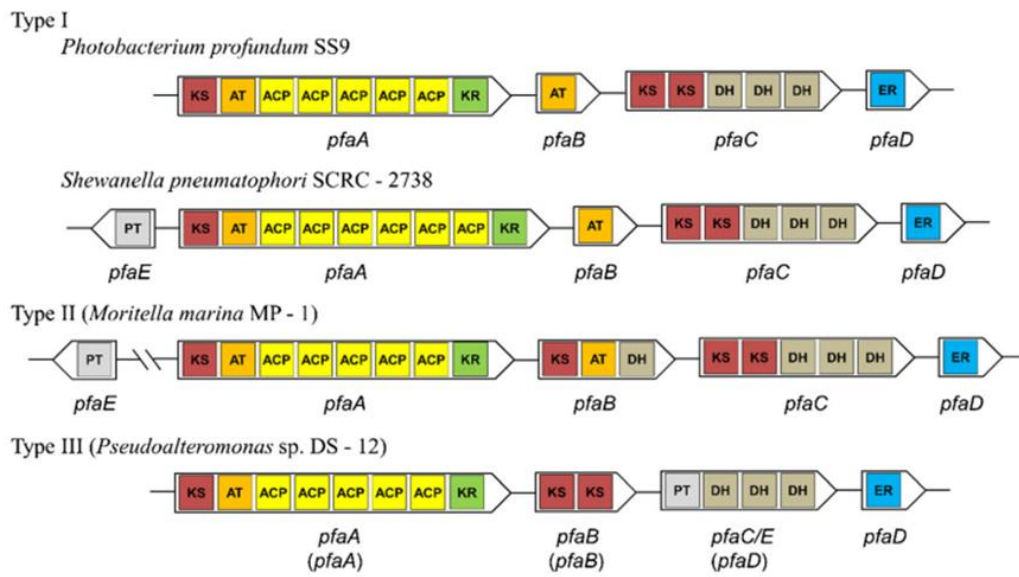
ที่มีผลต่อปริมาณการผลิตกรดไขมันรวมถึงชนิดของแหล่งไนโตรเจนในอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงพบว่าแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันก็ส่งผลต่อปริมาณการผลิตกรดไขมันทั้งหมดต่างต่างกันด้วย

2.6.3 สัดส่วนคาร์บอนและไนโตรเจน (C/N ratio) ต่อการผลิตกรดไขมัน

อัตราส่วน C/N มีผลต่อการผลิตไขมัน ดังนั้นเพื่อการผลิตไขมันจึงนิยมเลี้ยงในอัตราส่วน C/N ที่สูงในขั้นตอนการผลิตน้ำมันเพื่อสะสมไขมันให้มากขึ้น ซึ่งการจำกัดปริมาณไนโตรเจนและเสริมคาร์บอนจะส่งผลต่อทั้งชีวมวลของเชื้อ ปริมาณการผลิตไขมัน รวมถึงองค์ประกอบของกรดไขมันชนิดต่าง ๆ ด้วย ในงานวิจัยของ Yongmanitchai และ Limtong ในปี 2007 ได้ทำการทดลองภาวะต่าง ๆ รวมถึงอัตราส่วนของ C/N ที่ส่งผลต่อปริมาณการผลิตดีเอชเอ พบว่าใน *Schizochytrium limacinum* เมื่อทำการเพิ่มอัตราส่วนของ C/N ปริมาณดีเอชเอที่ผลิตได้และชีวมวลก็เพิ่มมากขึ้นด้วย งานวิจัยของ Chaocheng Zheng และคณะ (2019) แนะนำว่าสำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียจำเป็นต้องมีอัตราส่วน C/N ต่ำในการเพาะเลี้ยงช่วง prophase และเพิ่มอัตราส่วน C/N ให้สูงในขั้นตอนการผลิตน้ำมันเพื่อให้มีการสะสมไขมันมากขึ้น โดยการเติมสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้นเหมาะสมก่อนการเก็บเกี่ยวในระยะหลัง log phase ของการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย การเพิ่มความเข้มข้นของคาร์บอนในอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีนั้นสามารถช่วยเพิ่มการผลิตชีวมวลได้ แต่จะส่งผลไปในทางลบสำหรับการผลิตกลุ่มของกรดไขมันไม่อิ่มตัว เช่น ดีเอชเอ และ อีพีเอในเซลล์แบคทีเรีย กล่าวคือ ปริมาณการผลิตดีเอชเอนั้นจะลดลงเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของคาร์บอนเป็นเท่าตัว ดังนั้นจากผลการศึกษาก็แนะนำว่าการใช้ความเข้มข้นต่ำของคาร์บอนในอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงจะช่วยเสริมการผลิตกรดไขมันกลุ่ม PUFAs เช่น ดีเอชเอ และ อีพีเอ ได้เป็นอย่างดี (Kautharapu และคณะ, 2013)

2.6.4 ACP domain

Multiple acyl carrier protein (ACP) domains เป็นกลุ่มของยีนที่มีลำดับเบสซ้ำประมาณ 2-9 ยูนิตขึ้นกับแต่ละสายพันธุ์แบคทีเรีย และมีความสัมพันธ์โดยตรงกับความสามารถในการผลิตเอชเอ (Trujillo และคณะ., 2013) โดยคาดว่าสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีจำนวนหน่วยซ้ำ (repeat unit) ของ ACP domains มาก จะส่งผลให้แบคทีเรียชนิดนั้น ๆ มีความสามารถในการผลิตและสะสมกรดไขมันโดยเฉพาะกลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนได้มากขึ้น (Wan และคณะ, 2016)



ภาพที่ 7 การจัดเรียงกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันอีพีเอและดีเอชเอ แสดงความเหมือนและความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียจากทะเล (Moi และคณะ, 2018)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

กระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman No. 1)	(Whatman, England)
กล้องจุลทรรศน์ (Microscope; CH30RF200)	(Olympus, Japan)
เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography: GC-2010A)	(Shimadzu, Japan)
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Shaking incubator)	(Vision Scientific, Korea)
เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex mixer)	(Vision Scientific, Korea)
เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuges)	(Z36HK, Hermle)
เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (thermal cycler)	(Bio-Active, Thailand)
เครื่องแยกสารพันธุกรรมด้วยไฟฟ้า (gel electrophoresis)	(Bio-Active, Thailand)
เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)	(Satorious, Germany)
เครื่องวัดอุณหภูมิ (Thermometer)	(CT chemical, Thailand)
เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง	(Hettich, Germany)
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	(OHAUS, United States of America)
เครื่องควบคุมอุณหภูมิน้ำ (Water bath)	(Mettler, Germany)
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)	(ANTHOS Zenyth 200, USA)
ตู้ดูดควัน (Fume hood)	(Biobase, USA)
ตู้อบเชื้อ (incubator)	(Mettler, Germany)
ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow cabinet)	(Biobase, China)
ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven)	(Mettler, Germany)
หม้ออัดความดันไอน้ำแรงสูง (autoclave)	(Daihan Scientific, Korea)

Microplate reader	(BioTek, USA)
Microtubes	(Axygen, USA)
Plastic petri dishes	(Thermo Scientific, USA)
Pipette tips	(Axygen, USA)
96-well plates	(Thermo Scientific, USA)

3.2 เคมีภัณฑ์

กลีเซอรอล ($C_3H_8O_3$)	(CT chemical, Thailand)
กลูโคส ($C_6H_{12}O_6$)	(Kemaus, Australia)
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	(Lobachemie, India)
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	(Univar, Australia)
ทริปโตน (tryptone)	(CT chemical, Thailand)
ผงวุ้น (agar)	(CT chemical, Thailand)
สารละลายคริสตัลไวโอเลต (Crystal Violet)	(Merck, Germany)
สารละลายซาฟานินโอ (safranin O)	(Suvchem, India)
สารละลายไอโอดีน (iodine solution)	(Merck, Germany)
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	(Hi media, India)
สีย้อมซาฟานินโอ (Safranin O dye)	(Sigma-Aldrich, USA)
สีย้อมซูดาน แบล็ก บี (Sudan Black B)	(Sigma-Aldrich, USA)
อะกาโรส (agarose)	(Sigma-Aldrich, USA)
เอทานอล (ethanol)	(CT chemical, Thailand)

ไฮโดคลอริก (HCl)	(Lobachemie, India)
Marine Broth 2216 (Zobell Marine Broth)	(Himedia, India)
triphenyl tetrazolium chloride (C ₁₉ H ₁₅ ClN ₄)	(Sigma-Aldrich, USA)

3.3 วิธีดำเนินงานวิจัย

1. ศึกษาค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

2. รวบรวมตัวอย่างเคย และกะปิ

ทำการเก็บตัวอย่างเคยที่ใช้ทำกะปิ และกะปิพื้นเมืองทั้งหมดอย่างละ 8 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างจากจังหวัดสมุทรสงครามอย่างละ 2 ตัวอย่าง จังหวัดสมุทรสาครอย่างละ 1 ตัวอย่าง จังหวัดชลบุรีอย่างละ 3 ตัวอย่าง จังหวัดระยองอย่างละ 1 ตัวอย่าง และตัวอย่างจากจังหวัดสงขลาอย่างละ 1 ตัวอย่าง

3. คัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างเคย และกะปิ

คัดแยกแบคทีเรียจากกึ่งเคย และกะปิโดยการนำตัวอย่าง 1 มิลลิกรัมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ marine broth-2216 (Himedia, India) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นำมาเจือจางโดยการทำให้เจือจาง (serial dilution) ที่ 10⁻³ ถึง 10⁻⁴ และนำมาแยกจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทาบนอาหารเลี้ยง (spread-plate) บนอาหารชนิดแข็ง marine agar-2216 จากนั้นนำไปทำการคัดแยกแบคทีเรียเพื่อให้ได้ไอโซเลตเดี่ยวด้วยเทคนิค streak-plate และนำไปเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนด้วย marine broth-2216 บ่มในเครื่องเขย่าสาร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ด้วยรอบการเขย่า 170 rpm เพื่อทำการเพิ่มจำนวนไอโซเลตเดี่ยวในแต่ละตัวอย่าง

4. ตรวจสอบความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวในแบคทีเรีย และยืนยันผลด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี (gas chromatography)

4.1 ทดสอบด้วย 0.1 % w/v 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC)

นำแบคทีเรียไอโซเลตเดี่ยวที่คัดแยกได้ มาทำการทดสอบความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Polyunsaturated fatty acid) โดยใช้ 0.1 % w/v 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) เติมลงไปในการเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30

องศาเซลเซียสเป็นเวลาหนึ่งชั่วโมง หากพบมีการเปลี่ยนสีเป็นสีแดงแสดงว่า จุลินทรีย์ชนิดนั้นมีความสามารถในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Razak และคณะ., 2014)

4.2 ตรวจสอบชนิดกรดไขมันด้วยการวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี

เก็บเกี่ยวเซลล์ในช่วงระยะคงจำนวนเซลล์ (stationary phase) ของแบคทีเรียแต่ละชนิด นำเซลล์ที่ได้จากการเก็บเกี่ยวไปตรวจสอบดีเอชเอซึ่งเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ในกลุ่มของกรดไขมัน โดยนำอาหารที่ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มา 25 mL ทำการปั่นเหวี่ยงที่ 8300 rpm เป็นเวลา 5 นาทีเพื่อทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ และทำการสกัดไขมันด้วยวิธี modify Bligh and dyer (1959) โดยนำเซลล์ที่ทำการเก็บเกี่ยวแล้วมาล้างสองรอบด้วยน้ำกลั่น 25 mL จากนั้นนำเฉพาะตัวเซลล์มาเติมกรดไฮโดรคลอริก 5 mL ทำการบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมงสำหรับเพื่อให้เซลล์มีการแตกผนังของเยื่อหุ้มเซลล์และปลดปล่อยสารอย่างกรดไขมันออกมา จากนั้นเติมสารละลาย methanol: chloroform ในอัตราส่วน 1:1 แล้วนำไปบ่มในเครื่องเขย่าสารควบคุมอุณหภูมิ (shaker) ที่ 30 องศาเซลเซียส 170 rpm เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 6000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้สารเกิดการแยกส่วนกันโดยกรดไขมันละลายอยู่ในส่วนของ chloroform ซึ่งอยู่ชั้นล่าง จากนั้นทำการดูดในส่วนชั้นสารข้างล่างมาทำการระเหยตัวทำละลายที่ตู้ดูดควันจนได้น้ำมันสกัดมา และนำไขมันที่สกัดได้มาทำปฏิกิริยาเพื่อเปลี่ยนกรดไขมันให้เป็น fatty acid methyl esters (FAME) ตามวิธีของ MIDI-Microbial identification (Sasser, 1990) ทำการวิเคราะห์กรดไขมันด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี โดยใช้ Flame ionization detection (FID) เป็นอุปกรณ์วัดสัญญาณและแปลงค่าเป็นพื้นที่ใต้กราฟ และใช้ฮีเลียม (Helium) เป็น carrier gas (Estupiakán และคณะ, 2020)

4.3 ตรวจสอบการสะสมไขมันด้วยการย้อม Sudan Black B

นำแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบมาเพาะเลี้ยงในอาหาร LB broth ที่เพิ่มความเข้มข้นของ NaCl เป็น 1.5% ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 170 rpm เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทำการย้อมเพื่อดูการสะสมไขมันด้วย Sudan Black B ที่ละลายใน 70% เอทานอล โดยเกลี่ยตัวแบคทีเรียที่จะทำการย้อมบนสไลด์และรอให้สไลด์แห้งจากนั้นทำการยัดเซลล์ไว้กับสไลด์ (fix cell) ด้วยการผ่านความร้อน (นำสไลด์ผ่านไฟสองถึงสามครั้ง) จากนั้นหยดสารละลาย Sudan Black B ให้ทั่วบริเวณเซลล์ที่เกลี่ยและทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที และล้างออกด้วย 95% เอทานอลผ่านอย่างรวดเร็ว แล้วจึงล้างออกด้วยการผ่านน้ำกลั่น จากนั้นย้อมด้วยสีย้อมวาฟานินโอ (Safanin O) เป็นเวลา 5-10 วินาที และล้างออกด้วยน้ำกลั่น รอสไลด์แห้งส่งดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

5. ระบุชนิดแบคทีเรียด้วยยีน 16S rDNA และวิเคราะห์ไฟโลเจนี

ทำการสกัดดีเอ็นเอด้วย E.Z.N.A.® Bacterial DNA kit (Omega Bio-tek, USA) และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันในลำดับเบส 16S *rDNA* ด้วยการใช้ universal primer ได้แก่ 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' และ 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' (Turner และคณะ, 1999) โดยใช้ KOD-Plus-Neo (Pacific science, Thailand) เป็น Taq DNA polymerase ในขั้นตอนของ initial denature ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที 1 รอบ ปฏิกิริยา denature ใช้อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส 10 วินาทีต่อ 1 รอบ annealing ใช้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 30 วินาทีต่อ 1 รอบ และ extension ใช้อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส 30 วินาทีต่อ 1 รอบ ซึ่งกระบวนการ denature annealing และ extension 68 องศาเซลเซียส 30 วินาที จะดำเนินการปฏิกิริยาไปทั้งหมด 30 รอบปฏิกิริยา จากนั้นในขั้นตอน final extension ที่ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาทีจากนั้นเป็นอันเสร็จสิ้นปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน ทำการตรวจสอบคุณภาพของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 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/ μ l จึงจะยอมรับว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์ และสามารถส่งตรวจได้แล้วจึงนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S *rDNA* ที่บริษัท Pacific Science จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ในฐานข้อมูล Genbank โดยใช้โปรแกรม BLASTn (NCBI) (Altschul และคณะ., 1990) จากนั้นทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S *rDNA* ในแต่ละตัวอย่างของแบคทีเรียด้วยโปรแกรม ClustalW (Thompson และคณะ., 1994) และทำการวิเคราะห์ไฟโลเจนี ด้วยโปรแกรม ClustalOmega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)

6. ตรวจสอบวิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตโอเมก้า-3

ทำการสกัดดีเอ็นเอของจุลินทรีย์จากแต่ละไอโซเลตที่มีผลการทดสอบว่ามีการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวกลุ่มโอเมก้า-3 ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ E.Z.N.A.® Bacterial DNA kit (Omega Bio-tek, USA) แล้วทำการตรวจสอบยีนที่มีความเกี่ยวข้องในการผลิตโอเมก้า-3 และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันหรือพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR) ในส่วนของยีนสามยีน ได้แก่ ยีน $\Delta 6$ desaturase และ $\Delta 5$ desaturase (Hu และคณะ, 2011) โดยการใช้ไพรเมอร์ที่ทำ

การออกแบบจากข้อมูลของลำดับเบสในแบคทีเรียแต่ละชนิด และยีน *pfaA ketosynthase* ซึ่งเป็นเครื่องหมายทางโมเลกุลในการตรวจสอบหาจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดไขมัน (Alagarsamy และคณะ, 2019) จากนั้นทำการตรวจสอบคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำพีซีอาร์ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis)

6.1 $\Delta 6$ desaturase

จากการตรวจสอบสายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วยการวิเคราะห์ *16s rDNA* ทำให้สามารถออกแบบไพรเมอร์สำหรับการตรวจสอบหาพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ D6 desaturase จากการอาศัยฐานข้อมูลใน The National Center for Biotechnology (NCBI) สหรัฐอเมริกาได้ เพื่อการเพิ่มจำนวนในส่วนของ *D6 desaturase* ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ลำดับไพรเมอร์ส่วนหน้า (forward primer) คือ D6-F: 5'-GGTATGCAGCACGTGTATC-3' และ ไพรเมอร์ส่วนหลัง (reverse primer) คือ D6-R: 5'-GTTCCGGCCACATTTCTTT-3' เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพอลิเมอเรสในลำดับเบส *\Delta 6 desaturase* โดยใช้ i-Taq™ DNA Polymerase (INTRON, Jakarta) ขั้นตอนของ initial denature ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที 1 รอบ ปฏิกิริยา denature ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 20 วินาทีต่อ 1 รอบ annealing ใช้อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส 30 วินาทีต่อ 1 รอบ ในขั้นตอน extension ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาทีต่อ 1 รอบ ในขั้นตอน denature, annealing และ extension 68 องศาเซลเซียส 30 วินาที จะดำเนินปฏิกิริยาไปทั้งหมด 30 รอบปฏิกิริยา และเข้าสู่ final extension ที่ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเป็นอันเสร็จสิ้นปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพอลิเมอเรส ทำการตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (860 คู่เบส) ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ 1% agarose gel

6.2 $\Delta 5$ desaturase

เพิ่มจำนวนในส่วนของยีน *fadD* ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ลำดับไพรเมอร์ส่วนหน้า (forward primer) คือ D5-F: 5'-GCAGGAGGTCGCCAAGCACAAAC-3' และ ไพรเมอร์ส่วนหลัง (reverse primer) คือ D5-R: 5'-GACGTTTCGTGTAGATGTGGTGG-3' (Hu และคณะ, 2011) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพอลิเมอเรสโดยใช้ i-Taq™ DNA Polymerase (INTRON, Jakarta) ขั้นตอนของ initial denature ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที 1 รอบ ปฏิกิริยา denature ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 20 วินาทีต่อ 1 รอบ annealing ใช้อุณหภูมิ 61 องศาเซลเซียส 30 วินาทีต่อ 1 รอบ ในขั้นตอน extension ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 20 วินาทีต่อ 1 รอบ โดยในขั้นตอน denature, annealing และ extension 68 องศาเซลเซียส 30 วินาที จะ

ดำเนินการปฏิกิริยาไปทั้งหมด 30 รอบปฏิกิริยา และเข้าสู่ final extension ที่ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเป็นอันเสร็จสิ้นปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพอลิเมอร์ส ทำการตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (620 คู่เบส) ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ 1% agarose gel

6.3 *pfaA*

ทำการเพิ่มจำนวนเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในลำดับเบสของยีน *pfaA* ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ลำดับไพรเมอร์ คือ F: 5'- TGGGAAGARAAATCWTTC-3' และ R: 5'- GTRCCNGTRCCTGNGCTTC -3' (Alagarsamy และคณะ., 2019) ด้วยปฏิกิริยาพอลิเมอร์ส โดยใช้ WizPure™ Taq DNA Polymerase (WIZBIO, Korea) ขั้นตอนของ initial denature ใช้ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบปฏิกิริยา denature ใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 20 วินาทีต่อ 1 รอบ annealing ใช้อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส 30 วินาทีต่อ 1 รอบ และ extension ใช้ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 15 วินาทีต่อ 1 รอบ ซึ่งกระบวนการ denature, annealing และ extension จะดำเนินการปฏิกิริยาไปทั้งหมด 30 รอบปฏิกิริยา และเข้าสู่ final extension 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นเป็นอันเสร็จสิ้นปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพอลิเมอร์ส ทำการตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (520 คู่เบส) ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ 1% agarose gel

6.4 *fadD*

จากการตรวจสอบสายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วยการวิเคราะห์ *16s rDNA* ทำให้สามารถออกแบบไพรเมอร์สำหรับการตรวจสอบหายีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ long-chain fatty acyl-CoA ligase (EC 6.2.1.3) จากการอาศัยฐานข้อมูลใน The National Center for Biotechnology (NCBI) สหรัฐอเมริกาได้ เพื่อการเพิ่มจำนวนในส่วนของยีน *fadD* ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ลำดับไพรเมอร์ส่วนหน้า (forward primer) คือ F: 5'- AATCCATCCTGACAGACT-3' และ ไพรเมอร์ส่วนหลัง (reverse primer) คือ R: 5'- TTCCTGGATAACTTCATGTT-3' เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพอลิเมอร์สโดยใช้ WizPure™ Taq DNA Polymerase (WIZBIO, Korea) ขั้นตอนของ initial denature ใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบปฏิกิริยา denature ใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 20 วินาทีต่อ 1 รอบ annealing ใช้อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส 30 วินาทีต่อ 1 รอบ และ extension ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 45 วินาทีต่อ 1 รอบ ซึ่งกระบวนการ denature, annealing และ extension จะดำเนินการปฏิกิริยาไปทั้งหมด 30 รอบปฏิกิริยา จากนั้นจะเข้าสู่ final extension 72 องศาเซลเซียส 5

นาทีและเป็นอันเสร็จสิ้นปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพอลิเมอเรส ทำการตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (1350 คู่เบส) ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ 1% agarose gel

7. การวิเคราะห์ whole genome

ทำการคัดเลือกไอโซเลตที่มีผลการทดสอบเป็นบวกในทั้งการทดสอบทางไบโอเคมี และยีนที่เกี่ยวข้อง มาทำการวิเคราะห์ whole genome sequencing เพิ่มเติมที่ศูนย์วิทยาศาสตร์โอมิกส์ และชีวสารสนเทศ (คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ, ประเทศไทย) เตรียม Genomic DNA (gDNA) โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์หลังเพาะเลี้ยงในอาหาร LB ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 170 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้ bacterial DNA kit (OMEGA Bio-Tek, USA) ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอหลังสกัดด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรและค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Epoch micro plate spectrophotometer (BioTek, USA) ค่าที่ได้จะต้องมีค่า A260/A280 อยู่ระหว่าง 0.8-1.0 และมีค่าความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอในตัวอย่าง 20-200 ng/μl ในขั้นตอนการวิเคราะห์ gDNA 100 กรัม จะถูกนำมาทำ library preparation ด้วย QIASEQ FX kit (Qiagen, USA) และ gDNA จะถูกแยกส่วนเพื่อให้เป็นชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเล็ก ๆ (fragmented DNA) โดยใช้ปฏิกิริยาของ เอนไซม์ และทำความสะอาดด้วย magnetic beads จากนั้นจะเกิดการเชื่อม adapter index และ fragmented DNA ซึ่งสามารถตรวจวัดด้วย Agilent 2100 Bioanalyzer และ Denovix fluorometer โดยกระบวนการทั้งหมดวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Illumina HiSeq sequencer

การวิเคราะห์ผลและข้อมูลจากการทำ whole genome sequencing จะนำข้อมูลดิบที่ได้มา ตรวจสอบคุณภาพด้วย FASTQC software สำหรับ adaptors และข้อมูลที่ไม่ได้คุณภาพจะถูกกำจัด โดยใช้ Fastp ในส่วนของข้อมูลที่ได้คุณภาพและผ่านการตรวจสอบคัดกรองแล้วนำทำ genome assembly ด้วยโปรแกรม Unicycler สำหรับค่า ANI ถูกคำนวณและเปรียบเทียบโดยใช้โปรแกรม JSpeciesWS

8. ทดสอบหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตดีเอชเอจากแบคทีเรียที่สามารถคัดแยกได้

8.1 ทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิตดีเอชเอ

นำแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบมาเพาะเลี้ยงในอาหาร LB broth ที่เพิ่มความเข้มข้นของ โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เป็น 1.5% ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสโดยไม่มีการเสริมคาร์บอน โดยให้การเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นภาวะควบคุมสำหรับการทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสม สำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย ทำการทดสอบโดยเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิจากชุดควบคุมที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นที่ 15, 20, 25 และ 35 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมงด้วยการเขย่า 170

rpm จากนั้นนำเซลล์ไปทำการเก็บเกี่ยวและวัดปริมาณดีเอชเอด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี (Kautharapu และคณะ, 2013)

8.2 ทดสอบผลของระดับคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio) สำหรับการเลี้ยงแบคทีเรีย

ทำการทดสอบการปรับสารอาหารที่เป็นแหล่งไนโตรเจนจากเดิมชุดควบคุมเป็น LB ที่เพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เป็น 1.5% โดยเพิ่มสัดส่วนกลูโคสเข้าเป็นแหล่งคาร์บอนเสริม และเนื่องจากองค์ประกอบของอาหารใน 1 กรัมของทริปโตน (Tryptone) และ ยีสต์สกัด (Yeast extract) ซึ่งมีส่วนประกอบที่เป็นแหล่งไนโตรเจนอยู่ 0.12 กรัม และ 0.105 กรัม ตามลำดับ ดังนั้นสำหรับ C:N ที่จะใช้ในการทดสอบทั้งหมด 6 ความเข้มข้นได้แก่ 1:1, 8:1, 25:1, 50:1, 75:1 และ 100:1 จะทำการการเติมแหล่งคาร์บอนคือ กลูโคส เข้าไป 0.1125 กรัม, 0.9 กรัม, 2.8125 กรัม, 5.625 กรัม, 8.4375 กรัม และ 11.25 กรัม ตามลำดับ นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิที่ทำการคัดเลือกมาจากขั้นตอนก่อนหน้านี้ ด้วยการเขย่า 170 rpm เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ไปทำการเก็บเกี่ยว และวัดองค์ประกอบของกรดไขมันแต่ละชนิดด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี

8.3 ทดสอบผลของการเปลี่ยนค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) สำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยทำการเปลี่ยนภาวะของการทดสอบจากชุดควบคุมที่ใช้ค่าอุณหภูมิที่ดีที่สุด รวมถึงสัดส่วน C:N ratio ที่ดีที่สุดที่ทำการทดสอบแล้วในส่วนของ 8.1 และ 8.2 มาทำการทดสอบการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH) และกรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid, HCl) เพื่อหาภาวะเหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโดยทดสอบที่ pH 5, 6, 7 และ 8 ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ด้วยการเขย่า 170 rpm จากนั้นนำเซลล์ไปทำการเก็บเกี่ยวและวัดปริมาณดีเอชเอด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี

9. วิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลของปริมาณการผลิตกรดไขมันทั้งหมดที่ได้จากการทดสอบโดยรายงานผลเป็นค่า $\text{mean} \pm \text{SD}$ และวิเคราะห์ค่านัยสำคัญทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS

10. ทำการวิเคราะห์ข้อมูล สรุปผล เขียนบทความเผยแพร่ และเขียนวิทยานิพนธ์

บทที่ 4

ผลการดำเนินงาน

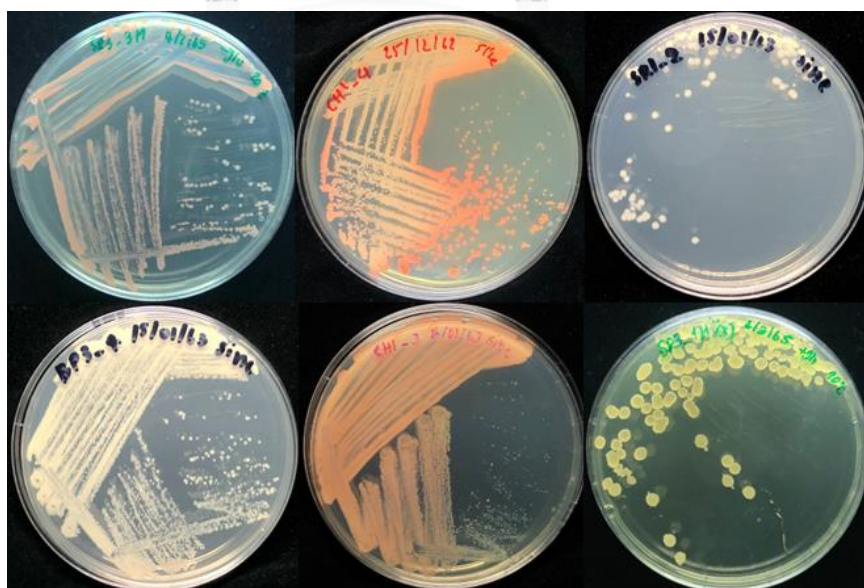
4.1 การคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างเคย และกะปิ

ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ (Wisetchonlathan และคณะ, 2022) ได้ทำการรวบรวมตัวอย่างเคย และกะปิพื้นเมืองทั้งหมดอย่างละ 7 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างจากจังหวัดสมุทรสงครามอย่างละ 2 ตัวอย่าง จังหวัดสมุทรสาครอย่างละ 1 ตัวอย่าง จังหวัดชลบุรีอย่างละ 3 ตัวอย่าง จังหวัดระยองอย่างละ 1 ตัวอย่าง และตัวอย่างจากจังหวัดสงขลาอย่างละ 1 ตัวอย่าง นำตัวอย่างกะปิมาทำการวิเคราะห์ปริมาณไขมันกลุ่มต่าง ๆ ในตัวอย่างทั้งหมด โดยปริมาตรไขมันในแต่ละตัวอย่างทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี in-house method (AOAC (2016) 2003.05) และปริมาณของกรดไขมันไม่อิ่มตัวแต่ละชนิด เช่น โอเมก้า-3, 6 และ 9 วัดด้วยวิธี in-house method (the Compendium of methods for food analysis, Thailand, 1st Edition. 2003) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงสัดส่วนของดีเอชเอ และกรดไขมันอื่น ๆ ในกะปิแต่ละตัวอย่าง (ตารางที่ 1) รวมถึงการวิเคราะห์สัดส่วนของแบคทีเรียต่อคุณค่าทางโภชนาการ ในกะปิผ่านการศึกษาเมแทจีโนม โดยจากผลการวิเคราะห์เมแทจีโนมพบว่า แบคทีเรียที่พบมากที่สุดคือกลุ่มของแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* และ *Lactobacillus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่นิยมนำมาใช้ประโยชน์เป็นโปรไบโอติก (probiotics) ในอุตสาหกรรมอาหารไม่ว่าจะเป็นทั้งของมนุษย์และสัตว์ อีกทั้งแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* มีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงการสังเคราะห์กรดไขมันได้ตั้งแต่กรดไขมันสายสั้นจนถึงกรดไขมันสายยาวตามภาวะแวดล้อม (Diomandé และคณะ, 2015) ผู้วิจัยจึงจะทำการวิจัยเพื่อต่อยอดผลการศึกษานี้ โดยนำตัวอย่างมาเพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่คาดว่าจะมีความสามารถในการผลิตกรดไขมันที่สำคัญได้ โดยงานวิจัยนี้ได้เพิ่มจำนวนตัวอย่างจากจังหวัดระยองเพิ่มอีก 1 ตัวอย่าง

ตารางที่ 1 ผลวิเคราะห์กรดไขมันชนิดต่าง ๆ ในตัวอย่างกะปิ

Shrimp paste samples	Fat content (g/100g)	Saturated fatty acid (g/100g)	Unsaturated fatty acid (g/100g)	Omega 3 (g/100g)			Omega 6 (g/100g)		Omega 9 (g/100g)
				ALA	EPA	DHA	LA	AA	OA
KK1	1.74	0.24	1.50	-	0.06	0.03	0.04	-	0.06
KK2	1.35	0.44	0.91	-	0.10	0.10	0.06	-	0.10
KK3	3.17	0.65	2.52	-	0.25	0.16	0.06	-	0.25
SR1	1.76	0.46	1.30	-	0.12	0.13	0.04	-	0.12
SR2	1.60	0.46	1.14	-	0.12	0.13	0.03	-	0.12
SR3	1.40	0.30	1.10	-	0.08	0.05	0.03	-	0.08
TP1	1.88	0.29	1.59	0.01	0.02	0.01	0.03	0.01	0.02

ตัวอย่างกะปิแต่ละชนิดมีปริมาณกรดไขมันที่สำคัญในกลุ่มโอเมก้า 3, 6 และ 9 ในทุก ๆ ตัวอย่าง จึงคาดว่าตัวอย่างจะมีศักยภาพในการนำมาคัดแยกแบคทีเรียที่อาจเกี่ยวข้องกับการผลิตกรดไขมันเหล่านี้ได้ โดยทำการคัดแยกแบคทีเรียจากกะปิ และกุ้งเคียว ด้วยอาหาร marine broth-2216 ซึ่งเป็น selective media ที่มีการใช้องค์ประกอบของแร่ธาตุต่าง ๆ เลียนแบบแร่ธาตุจากน้ำทะเล ซึ่งสามารถคัดแยกแบคทีเรียจากกะปิและเคียว ที่มีถิ่นฐานวิทยาแตกต่างกันในแต่ละตัวอย่างได้รวมทั้งหมด 192 ไอโซเลต

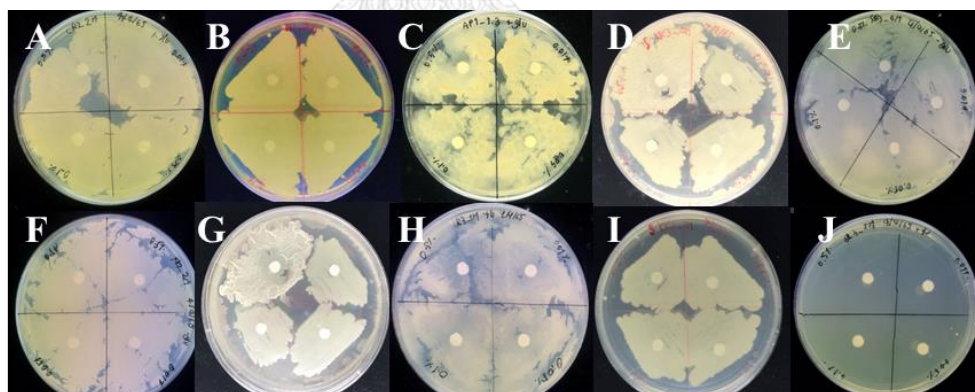


ภาพที่ 8 ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่ทำการคัดแยกออกมาได้จากตัวอย่างกะปิทั้ง 8 ชนิด

4.2 การคัดเลือกแบคทีเรียกลุ่มผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวเชิงซ้อน (PUFAs) โดยใช้การทดสอบทางชีวเคมี

4.2.1 การทดสอบด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2 plate assay)

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นสารกลุ่ม ROSs ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่สามารถทำปฏิกิริยากับกรดไขมันไม่อิ่มตัวได้ ดังนั้นแบคทีเรียที่มีรายงานว่าผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัว เช่น ดีเอสเอ อีพีเอ และเอแอลเอที่สะสมในเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย สามารถออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่อปัจจัยภายนอกนี้ได้ทำให้แบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้เมื่อเทียบกับแบคทีเรียที่ไม่ผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัว ดังภาพที่ 9 (J) ไอโซเลต CH12 จะเห็นว่าไม่มีการเจริญเติบโตเลยเมื่อทำการทดสอบด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทั้ง 4 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.01%, 0.05%, 0.1% และ 0.5 % จึงนำมาใช้เป็นชุดควบคุมลบ (negative control) สำหรับการทดสอบในลำดับถัดไป และผลการทดสอบการเจริญบนอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วยวิธีการ disc diffusion test ทั้ง 4 ความเข้มข้น พบว่ามีจำนวน 35 ไอโซเลตที่สามารถเจริญที่ความเข้มข้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.1% ขึ้นไป และมี 9 ไอโซเลตที่สามารถเจริญที่ความเข้มข้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.5 % แสดงผลการทดสอบดังภาพที่ 9

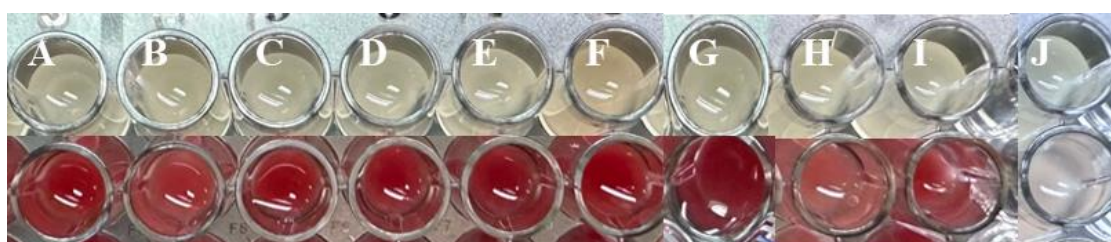


ภาพที่ 9 ผลการทดสอบที่เป็นบวกสำหรับความเข้มข้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.5 % โดย (A) CH13, (B) KK11, (C) KK13, (D) KK32, (E) KK34, (F) SR121, (G) SR14, (H) TP11 และ (I) CH12

4.2.2 การทดสอบด้วย 0.1 % w/v 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC)

2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) สามารถใช้เป็นสารในการทดสอบเพื่อคัดกรองเบื้องต้นสำหรับแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันอีพีเอ ซึ่งอยู่ในกลุ่มของกรดไขมันโอเมก้า-3 เมื่อนำแบคทีเรียที่คัดแยกมาทั้งหมด 192 ไอโซเลต หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา

36 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบ 19 ไอโซเลตเมื่อทำการทดสอบด้วย 0.1 % w/v TTC ผลการทดสอบพบว่าจากตัวอย่างทั้งหมด มีผลการทดสอบเป็นบวก หรือมีการเปลี่ยนสีจากไม่มีสีเป็นสีแดง และทั้ง 9 ไอโซเลตที่มีผลการทดสอบเป็นบวกในไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.5 % พบว่ามีการเปลี่ยนสีเมื่อทดสอบด้วย 0.1 % w/v TTC เช่นกัน (ภาพที่ 10) ได้แก่ CH12, CH13, KK11, KK13, KK32, KK34, SR121, SR14, SR22, และ TP11 ซึ่งมีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 485 นาโนเมตร สำหรับการวัดการเปลี่ยนโครงสร้างเป็น triphenyl red formazan (TF) รายงานผลดังตารางที่ 2



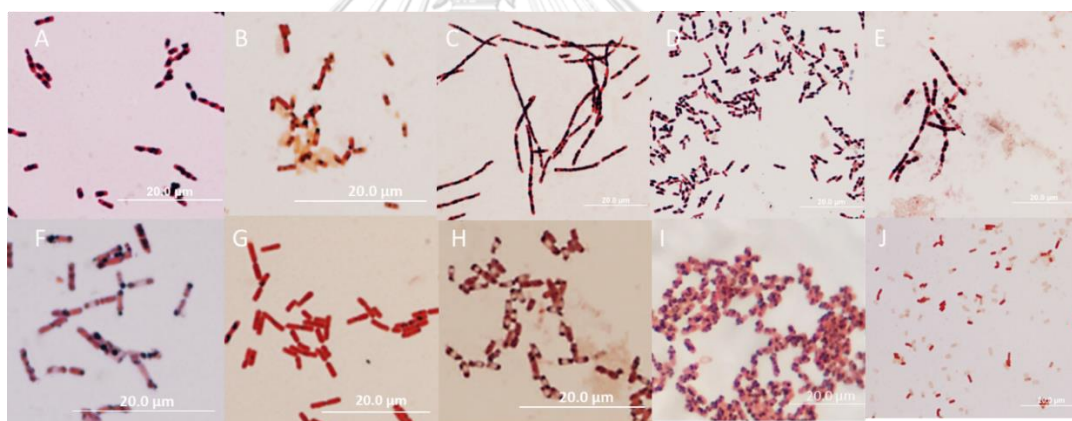
ภาพที่ 10 ผลการทดสอบด้วย 0.1 % w/v TTC ในไอโซเลตที่มีผลการทดสอบเป็นบวกในไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.5 % (A) CH13, (B) KK11, (C) KK13, (D) KK32, (E) KK34, (F) SR121, (G) SR14, (H) SR22, (I) TP11 และ (J) CH12 (negative control)

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.5 % และ 0.1 % w/v TTC ในไอโซเลตที่ทำการคัดเลือกมาก โดยมีการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง

ไอโซเลต	H ₂ O ₂ (%)				OD600	0.1% TTC (OD485)
	0.01	0.05	0.1	0.5		
CH12 (negative control)	-	-	-	-	1.392	0.015
CH13	+	+	+	+	0.826	0.475
KK11	+	+	+	+	1.478	0.146
KK13	+	+	+	+	0.997	0.297
KK32	+	+	+	+	1.116	0.329
KK34	+	+	+	+	1.035	0.303
SR121	+	+	+	+	1.656	0.481
SR14	+	+	+	+	0.874	0.412
SR22	+	+	+	+	1.246	0.257
TP11	+	+	+	+	1.469	0.518

4.2.3 การย้อมดูการสะสมน้ำมันด้วย Sudan Black B

จากผลการทดสอบไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.5 % และ 0.1 % w/v TTC มีเพียง 9 ไอโซเลต ที่มีผลการทดสอบเป็นบวกในทั้งสองการทดสอบ จึงนำทั้ง 9 ไอโซเลตมาย้อมดูการสะสมน้ำมันด้วย Sudan Black B หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง และนำแบคทีเรียไอโซเลตที่มีผลการทดสอบเป็นลบ (negative control) คือ CH12 มาทำการทดสอบร่วมด้วยเพื่อเปรียบเทียบผล พบว่าทั้ง 9 ไอโซเลต ได้แก่ CH13, KK11, KK13, KK32, KK34, SR121, SR14, และ TP11 มีการย้อมติดสีน้ำเงิน ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีการสะสมหยดน้ำมัน และบริเวณที่ไม่มีน้ำมันจะติดสีแดงซึ่งเป็นโครงสร้างของเซลล์ ดังแสดงในภาพที่ 11 และในไอโซเลต CH12 ที่ไม่แสดงการย้อมติดสีน้ำเงินเลยจึงแสดงให้เห็นว่า วิธีการทั้งสอง ได้แก่การทดสอบด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.5 % และ 0.1 % w/v TTC สามารถนำมาใช้ในการทดสอบเบื้องต้นในการคัดเลือกตัวอย่างที่มีความสามารถในการผลิตน้ำมันสูง เพื่อนำมาทำการวิเคราะห์ต่อในลำดับถัดไป



ภาพที่ 11 การสะสมไขมันในแบคทีเรียทั้ง 10 ไอโซเลตที่ทำการคัดเลือกมา ด้วย Sudan Black B ได้แก่ (A) CH13, (B) KK11, (C) KK13, (D) KK32, (E) KK34, (F) SR121, (G) SR22, (H) SR14, (I) TP11 และ (J) CH12 (negative control)

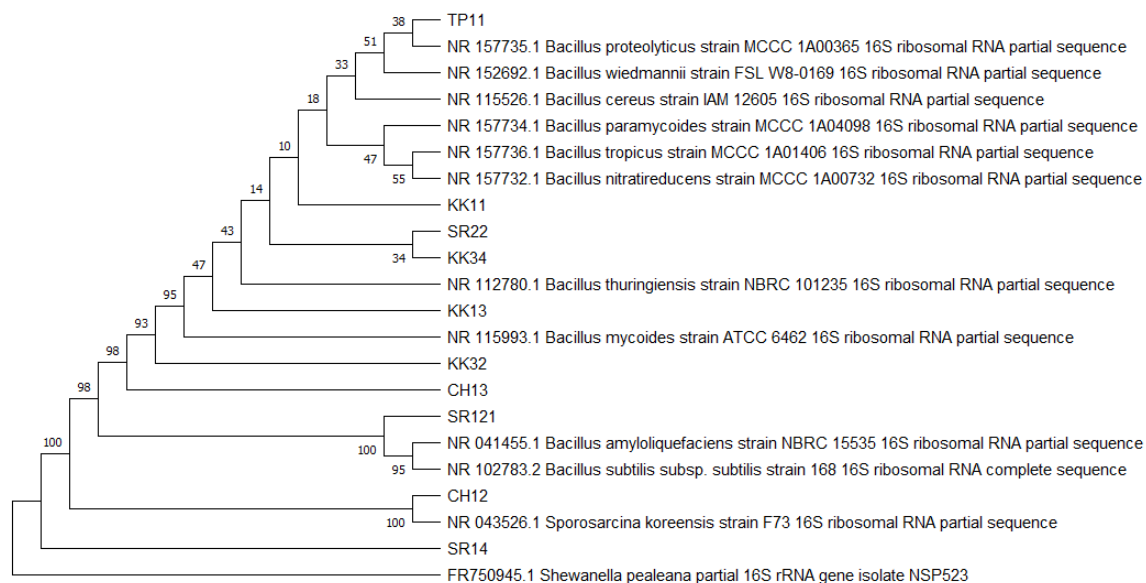
4.3 ระบุชนิดแบคทีเรียด้วย 16S rDNA และตรวจวิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตโอเมก้า-3

ทำการตรวจสอบแบคทีเรียทั้ง 9 ไอโซเลตที่มีผลการทดสอบเป็นบวก และอีก 1 ไอโซเลตนำมาเป็นชุดควบคุมเปรียบเทียบ พบว่าแบคทีเรียที่ทำการคัดแยกมาเป็นแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์เมแทจีโนมิกในการวิจัยก่อนหน้านี้ แสดงผลการวิเคราะห์ 10 ไอโซเลต พบว่ามีความแตกต่างที่วิเคราะห์ได้ทั้งหมด 6 สายพันธุ์ แสดงในตารางที่ 3 คือ *Bacillus tropicus* ในตัวอย่างไอโซเลต CH13 และ SR22 โดยมี % Identity เท่ากับ 99.49% และ 99.52% ตามลำดับ ลำดับถัดมาคือ *B. amyloliquefaciens* ในตัวอย่างไอโซเลต SR121 โดยมี % Identity เท่ากับ

97.37% สำหรับ *B. cereus* จาก SR14 โดยมี % Identity เท่ากับ 86.47% ถัดมาคือไอโซเลต KK11, KK14, KK32 และ KK34 ซึ่งเป็นไอโซเลตที่คัดแยกมาจากพื้นที่จังหวัดเดียวกัน และมีจุดเก็บใกล้เคียงกันไม่เกิน 100 กิโลเมตร ผลการวิเคราะห์ พบว่ามีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *B. paramycoides* โดยมี % Identity เท่ากับ 99.65%, 98.74%, 96.35%, และ 99.93% ตามลำดับ ซึ่งพบว่ามี ความใกล้เคียงกันสูง จึงทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยการทำ phylogenetics tree วิเคราะห์ยีน *16S rDNA* โดย UPGMA method สำหรับทั้ง 10 ไอโซเลต แสดงในภาพที่ 12

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์ชนิดแบคทีเรียด้วยยีน *16S rDNA* จากแบคทีเรียที่ทำการคัดแยกมา

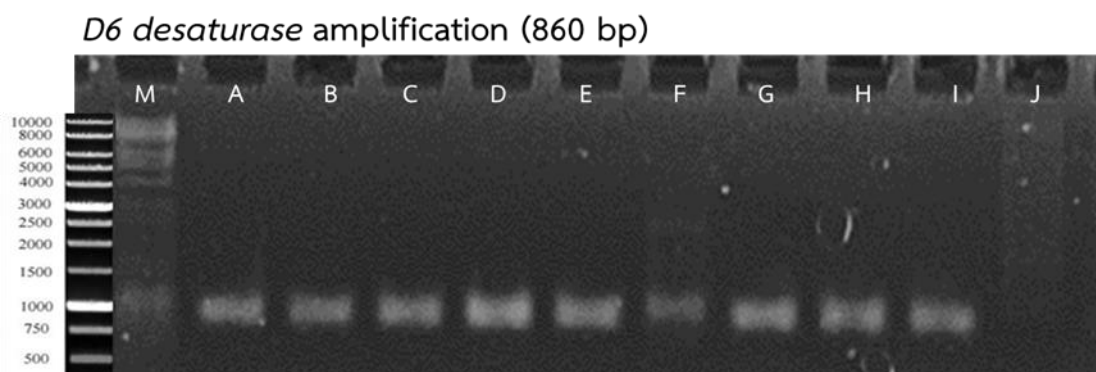
strain	Species identification	% Identity	Accession no.
CH13	<i>B. tropicus</i>	99.49%	NR_157736.1
KK11	<i>B. paramycoides</i>	99.65%	NR_157734.1
KK13	<i>B. paramycoides</i>	98.74%	NR_157734.1
KK32	<i>B. paramycoides</i>	96.35%	NR_157734.1
KK34	<i>B. paramycoides</i>	99.93%	NR_157734.1
SR121	<i>B. amyloliquefaciens</i>	97.37%	NR_041455.1
SR14	<i>B. cereus</i>	86.47%	NR_115526.1
SR22	<i>B. tropicus</i>	99.52%	NR_157736.1
TP11	<i>B. proteolyticus</i>	99.79%	NR_157735.1
CH12 (negative control)	<i>Sporosarcina koreensis</i>	97.98%	NR_043526.1



ภาพที่ 12 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการแสดงโดย phylogenetics tree วิเคราะห์ยีน *16S rDNA* โดย UPGMA method สำหรับทั้ง 10 ไอโซเลต

จากการตรวจสอบสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่เรียกว่าการวิเคราะห์ *16s rDNA* ทำให้สามารถออกแบบไพรเมอร์สำหรับการตรวจสอบหายีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ D6 desaturase จากการอาศัยฐานข้อมูลใน The National Center for Biotechnology (NCBI) สหรัฐอเมริกาได้ เพื่อการเพิ่มจำนวนในส่วนของ *D6 desaturase* ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ลำดับไพรเมอร์ส่วนหน้า (forward primer) คือ D6-F: 5'-GGTATGCAGCACGTGTATC-3' และไพรเมอร์ส่วนหลัง (reverse primer) คือ D6-R: 5'-GTTCCGGCCACATTTCTTT-3'

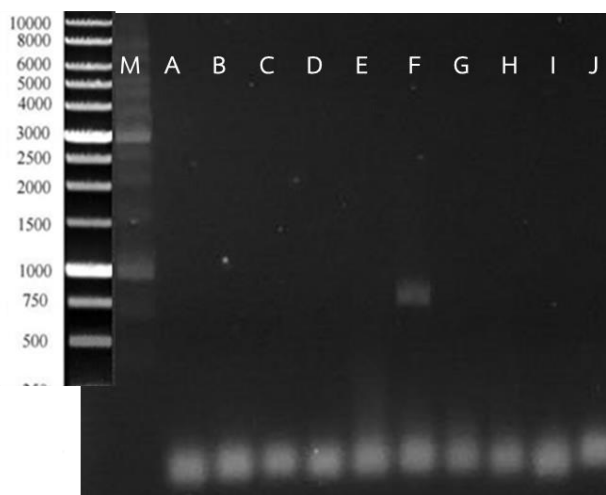
ผลของการเพิ่มจำนวน *D6 desaturase* ด้วยไพรเมอร์ที่กล่าวมาข้างต้นนี้มีขนาด 860 คู่เบสดังภาพที่ 13 และพบว่าสายพันธุ์ *S. koreensis* CH12 ที่มีผลทดสอบเป็นลบในทุกขั้นตอนการทดสอบ (negative control) เพื่อการคัดกรองแบคทีเรียที่มีความสามารถที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวก่อนหน้านี้ ในขณะที่สายพันธุ์อื่น ๆ ที่มีผลการทดสอบเป็นบวก ให้ผลการเพิ่มจำนวน *D6 desaturase* มีขนาดที่ใกล้เคียงกับขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากกระบวนการพีซีอาร์ (PCR product) ที่ออกแบบไว้



ภาพที่ 13 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *D6 desaturase*, (M) 1KB ladder, (A) *Bacillus tropicus* CH13, (B) *B. paramycooides* KK11, (C) *B. paramycooides* KK13, (D) *B. paramycooides* KK32, (E) *B. paramycooides* KK34, (F) *B. amyloliquefaciens* SR121, (G) *B. cereus* SR14, (H) *B. tropicus* SR22, (I) *B. proteolyticus* TP11 และ (J) *S. koreensis* CH12 (negative control)

สำหรับการเพิ่มจำนวนในลำดับเบสของยีน *D5 desaturase* ด้วยวิธี PCR ไม่สามารถออกแบบไพรเมอร์จากฐานข้อมูลได้เนื่องจากมีข้อมูลไม่เพียงพอ จึงทำการประยุกต์ใช้ไพรเมอร์จากงานวิจัยของ Hu และคณะ (2011) โดยใช้ลำดับไพรเมอร์ส่วนหน้าคือ และลำดับไพรเมอร์ส่วนหลัง คือ D5-F: 5'-GCAGGAGGTCGCCAAGCACAAAC-3' และ D5-R: 5'-GACGTTCGTGTAGATGTGGTGG-3' ตามลำดับ โดยขนาดของ pcr product คือ 620 bp ผลจากการวิเคราะห์พบว่า มีเพียงสายพันธุ์ *B. amyloliquefaciens* SR121 ที่แสดงแถบดีเอ็นเอ และมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากกระบวนการพีซีอาร์ (PCR product) เมื่อทำการตรวจสอบด้วย 1% agarose gel electrophoresis ดังแสดงในภาพที่ 14

D5 desaturase amplification (620 bp)

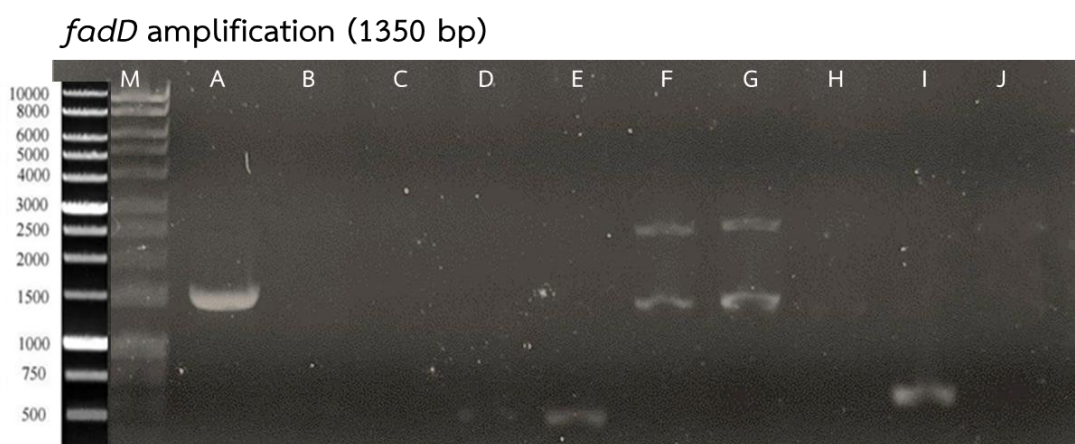


ภาพที่ 14 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *D5 desaturase*, (M) 1KB ladder, (A) *Bacillus tropicus* CH13, (B) *B. paramycooides* KK11, (C) *B. paramycooides* KK13, (D) *B. paramycooides* KK32, (E) *B. paramycooides* KK34, (F) *B. amyloliquefaciens* SR121, (G) *B. cereus* SR14, (H) *B. tropicus* SR22, (I) *B. proteolyticus* TP11 และ (J) *Sporosarcina koreensis* CH12 (negative control)

สำหรับการเพิ่มจำนวนในส่วนของยีน *pfaA* ใช้ลำดับไพรเมอร์ส่วนหน้า คือ F: 5'-AATCCATCCTGACAGACT-3' และ ไพรเมอร์ส่วนหลัง คือ R: 5'- TTCCTGGATAACTTCATGTT -3' ไม่สามารถนำมาใช้ในการเพิ่มจำนวนในทั้ง 10 ไอโซเลตที่คัดเลือกมาสำหรับงานวิจัยนี้ได้ ทั้งนี้ในงานวิจัยของ Alagarsamy และคณะ (2019) ได้ออกแบบไพรเมอร์คู่ที่กล่าวมา และสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในลำดับของยีน *pfaA* ใน *B. firmis* ได้ เนื่องจากการคัดแยกแบคทีเรียมาจากอ่าวเปอร์เซียในช่วงฤดูหนาว ซึ่งจะมีปัจจัยที่แตกต่างกันอย่างมากกับบริเวณอ่าวไทยที่ผู้วิจัยได้ทำการศึกษา ทั้งความแตกต่างทางด้านอุณหภูมิ ความเค็มของน้ำทะเล ความดันและความลึกของอ่าว ปัจจัยเหล่านี้อาจส่งผลกระทบต่อยีนและการทำงานของยีน ที่ถึงแม้จะเป็นแบคทีเรียสกุลเดียวกันแต่มีความแตกต่างของยีน *pfaA* จนไม่สามารถใช้ไพรเมอร์เดียวกันในการตรวจสอบได้ ผู้วิจัยจึงทำการวิเคราะห์หายีนเพิ่มเติมสำหรับการตรวจสอบโดย *Fatty acyl-CoA synthetase (fadD)* ซึ่งถอดรหัสและแปลรหัสได้เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนกรดไขมันสายยาวให้เข้าสู่กระบวนการ beta-oxidation ได้

ในส่วนของยีนออกแบบไพรเมอร์สำหรับการตรวจสอบหายีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ *Fatty acyl-CoA synthetase (fadD)* จากการตรวจสอบสายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วยการวิเคราะห์ *16s rDNA* ทำให้สามารถออกแบบไพรเมอร์สำหรับการตรวจสอบหายีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์

D6 desaturase จากการอาศัยฐานข้อมูลใน The National Center for Biotechnology (NCBI) สหรัฐอเมริกาได้ สามารถออกแบบไพรเมอร์สำหรับการตรวจสอบหายีนได้ดังนี้ ไพรเมอร์ส่วนหน้า คือ F: 5' - AATCCATCCTGACAGACT-3' และ ไพรเมอร์ส่วนหลัง คือ R: 5' - TTCCTGGATAACTTCATGTT -3' ผลการศึกษาพบ *B. tropicus* CH13, *B. amyloliquefaciens* SR121 และ *B. cereus* SR14 ที่แสดงแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis) ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับที่ทำการออกแบบไว้ คือ 1350 คู่เบส ดังแสดงในภาพที่ 15



ภาพที่ 15 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *fadD*, (M) 1KB ladder, (A) *Bacillus tropicus* CH13, (B) *B. paramycoides* KK11, (C) *B. paramycoides* KK13, (D) *B. paramycoides* KK32, (E) *B. paramycoides* KK34, (F) *B. amyloliquefaciens* SR121, (G) *B. cereus* SR14, (H) *B. tropicus* SR22, (I) *B. proteolyticus* TP11 และ (J) *Sporosarcina koreensis* CH12 (negative control)

4.4 ผลการวิเคราะห์กรดไขมันชนิดต่าง ๆ ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี

สายพันธุ์แบคทีเรียทั้งหมด 9 ชนิดได้แก่ *B. tropicus* CH13, *B. paramycoides* KK11, *B. paramycoides* KK13, *B. paramycoides* KK2, *B. paramycoides* KK4, *B. amyloliquefaciens* SR121, *B. tropicus* SR22, *B. cereus* SR14, และ *B. proteolyticus* TP11 แสดงผลการทดสอบด้วยวิธี H_2O_2 assay และ TTC assay มีผลการทดสอบทางชีวเคมีเป็นบวก จึงสันนิษฐานว่าแบคทีเรียอาจมีความสามารถในการผลิตกรดไขมันสายยาวได้ ผู้วิจัยจึงได้นำมาทำการวิเคราะห์สัดส่วนของกรดไขมันที่แต่ละตัวผลิตได้ โดยทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้ง 9 สายพันธุ์เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัดน้ำมันและวัดปริมาณน้ำมันที่สกัดได้ และนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี จากผลการสกัดน้ำมันพบว่า จากทั้งหมด 9 สายพันธุ์ที่ทำการคัดเลือกมานั้น มี

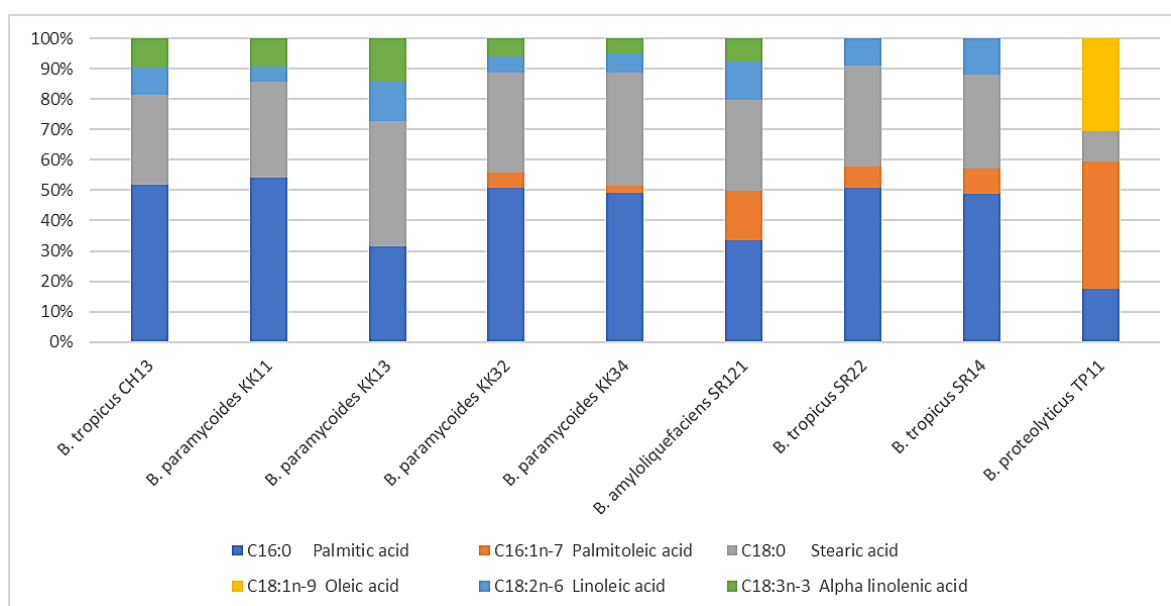
แบคทีเรียที่มีการผลิตไขมันสูงซึ่งสามารถผลิตและสะสมไขมันในเซลล์ได้มากกว่าร้อยละ 20 ของน้ำหนักเซลล์แห้งอยู่ 6 สายพันธุ์ได้แก่ *B. paramycoides* KK11 ($44.85 \pm 0.84\%$ (w/w)), *B. paramycoides* KK13 ($27.31 \pm 1.53\%$ (w/w)), *B. paramycoides* KK32 ($55.47 \pm 6.53\%$ (w/w)), *B. paramycoides* KK34 ($39.98 \pm 5.08\%$ (w/w)), *B. proteolyticus* TP11 ($48.75 \pm 1.47\%$ (w/w)) และสายพันธุ์ที่มีการผลิตสูงสุดคือ *B. amyloliquefaciens* SR121 ซึ่งสามารถผลิตได้ร้อยละ 75.06 ± 2.05 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ชีวมวลและปริมาณการผลิตไขมันในแบคทีเรียที่มีการทดสอบทางชีวเคมีและคาดว่าจะมีความสามารถในการผลิตกรดไขมันประเภทไม่อิ่มตัวสูง

Species identification	Cell dry weight (CDW) (g/L)	Lipid concentration (g/L)	Lipid content of CDW (% (w/w))
<i>B. tropicus</i> CH13	1.87 ± 0.29	0.30 ± 0.02	16.09 ± 2.33
<i>B. paramycoides</i> KK11	1.48 ± 0.25	0.66 ± 0.03	44.85 ± 0.84
<i>B. paramycoides</i> KK13	0.82 ± 0.05	0.22 ± 0.02	27.31 ± 1.53
<i>B. paramycoides</i> KK32	0.99 ± 0.29	0.49 ± 0.02	55.47 ± 6.53
<i>B. paramycoides</i> KK34	1.17 ± 0.18	0.46 ± 0.02	39.98 ± 5.08
<i>B. amyloliquefaciens</i> SR121	1.60 ± 0.08	1.20 ± 0.07	75.06 ± 2.05
<i>B. tropicus</i> SR22	6 ± 1.46	1.15 ± 0.19	19.01 ± 1.26
<i>B. cereus</i> SR14	5.71 ± 3.34	0.07 ± 0.01	15.94 ± 1.55
<i>B. proteolyticus</i> TP11	0.84 ± 0.36	0.41 ± 0.15	48.75 ± 1.47

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันแต่ละชนิด แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของกรดไขมันแต่ละชนิดที่แบคทีเรียแต่ละชนิดสามารถสังเคราะห์ได้ ทั้งนี้เมื่อวิเคราะห์ถึงสัดส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acids; UFA) ซึ่งประกอบไปด้วย C16:1n7 กรดปาล์มมิโตเลอิก (palmitoleic acid), C18:1n-9 กรดโอเลอิก (oleic acid), C18:2n-6 กรดไขมันลิโนเลอิก (linoleic

acid) และ C18:3n-3 กรดไขมันแอลฟาไลโนเลนิก (alpha-linolenic acid) พบว่า *B. proteolyticus* TP11 มีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวรวมมากที่สุด 42.04% ของปริมาณกรดไขมันทั้งหมด รองลงมาคือ 36.64% ของปริมาณกรดไขมันทั้งหมด นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกมา มีการสังเคราะห์กรดไขมันในกลุ่มโอเมก้า-3 (C18:3n-3, กรดไขมันแอลฟาไลโนเลนิก), โอเมก้า-6 (C18:2n-6, กรดไขมันลิโนเลนิก) และ โอเมก้า-9 (C18:1n-9, กรดโอเลอิก) ด้วยดังแสดงในกราฟที่ 1



กราฟที่ 1 องค์ประกอบของกรดไขมันแต่ละชนิดในแบคทีเรียที่ทำการคัดเลือกมา ผ่านการวิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี

สืบเนื่องจากผลวิเคราะห์ทางชีวเคมีและผลวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์ ทำให้ทางผู้วิจัยสนใจศึกษาต่อในแบคทีเรียสายพันธุ์ *B. amyloliquefaciens* SR121 ทั้งนี้ยังเป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิตไขมันได้มากที่สุดถึงร้อยละ 75.06 ± 2.05 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และยังมีการผลิตกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 และ 6 ทั้ง C18:3n-3 และ C18:2 n-6 ตามลำดับ ซึ่งสามารถใช้เป็นเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวชนิดอื่น เช่น การเปลี่ยนเป็นกรดไขมันอีพีเอ และดีเอชเอ โดยอาศัยการ Elongation และ เอนไซม์ Desaturase เพื่อให้มีการต่อสายที่ยาวขึ้น อีกทั้งในส่วนของ การวิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิต ใน *B. amyloliquefaciens* SR121 ยังเป็นที่น่าสนใจเนื่องจากการเพิ่มจำนวนในส่วนของทั้งสามยีนที่ตรวจสอบ ดังนั้นสำหรับงานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายที่จะทดสอบสายพันธุ์ *B. amyloliquefaciens* SR121 ในภาวะต่าง ๆ ดังนี้ ผลของอุณหภูมิต่อการสังเคราะห์กรดไขมัน ผลของสัดส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio) ในอาหารสำหรับการ

เพาะเลี้ยงต่อผลของการผลิตไขมันและองค์ประกอบของไขมัน สุดท้ายคือการทดสอบผลของความ เป็นกรดและต่าง (pH) ต่อการสังเคราะห์กรดไขมันในลำดับถัดไป

4.4 ผลวิเคราะห์ whole genome ในสายพันธุ์ *B. amyloliquefaciens* SR121

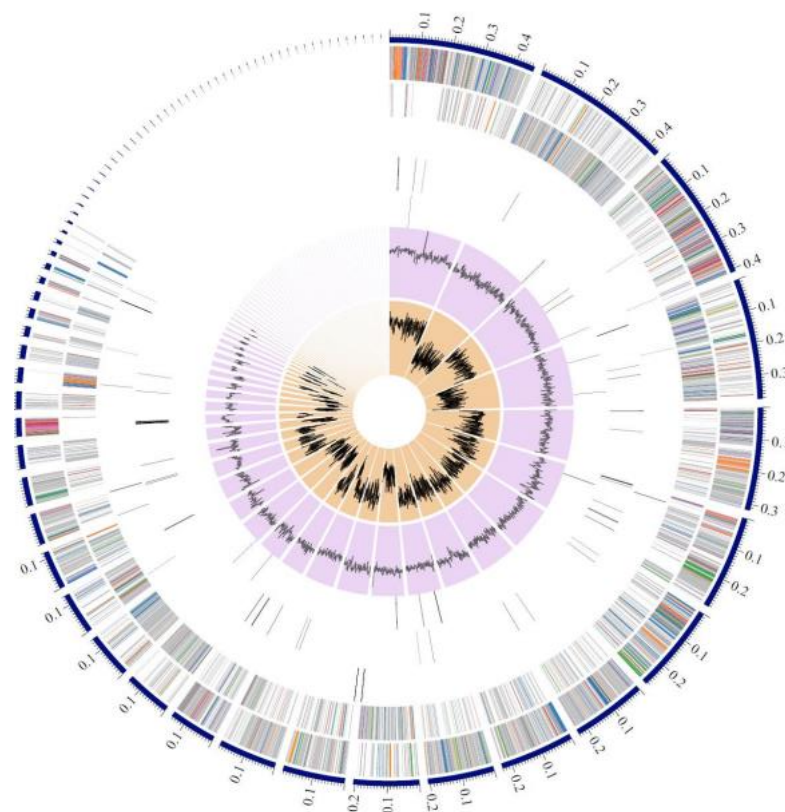
ทำการตรวจสอบสายพันธุ์ *B. amyloliquefaciens* SR121 โดยการส่งวิเคราะห์ whole genome sequencing (WGS) ผลการวิเคราะห์พบ 77 contigs โดยมีความยาวรวม 5,188,100 คู่เบส และมีค่าเฉลี่ย G+C content 35.23% (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ผลทางสถิติของ *B. amyloliquefaciens* SR121 จากการวิเคราะห์ transcriptome assembly

Assembly details	
Contigs	77
GC Content	35.23
Plasmids	0
Contig L50	8
Genome Length	5,188,100 bp
Contig N50	231,254
Chromosomes	0
CDS	5,414
tRNA	72
rRNA	5
Hypothetical proteins	1,239
Proteins with functional assignments	4,175
Proteins with EC number assignments	1,072
Proteins with GO assignments	903
Proteins with Pathway assignments	791
Hypothetical proteins	1,239

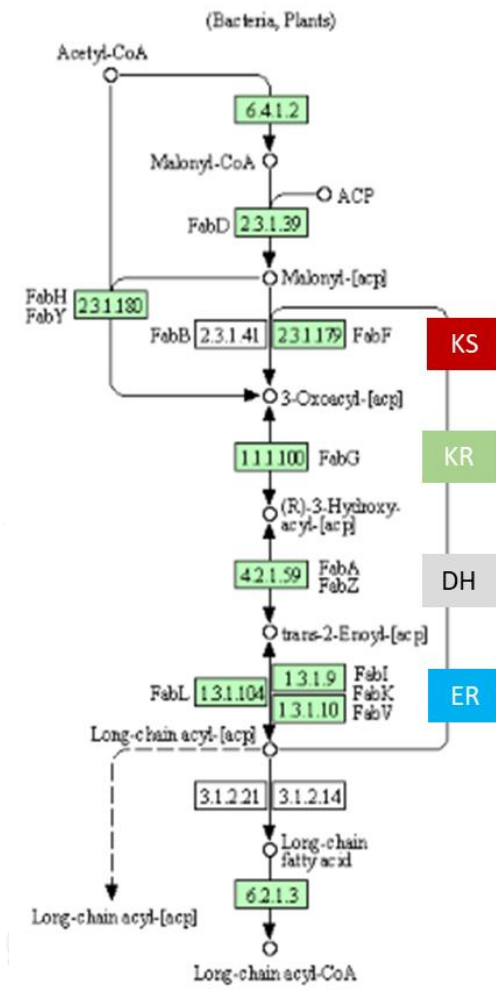
เมื่อทำการวิเคราะห์รูปแบบของแผนที่จีโนมใน *B. amyloliquefaciens* SR121 ภาพที่ 16 ประกอบด้วยการประกอบเรียงชิ้นลำดับเบสด้วย contigs, complete coding sequence (CDS) บนสาย forward strand, CDS บนสาย reverse strand, RNA genes, CDS ที่เป็น homology กับยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาของเชื้อโรค (antimicrobial resistance), CDS ที่เป็น homology กับยีนที่

เกี่ยวข้องกับอาการก่อโรค (virulence factors), GC content และ GC skew. โดยเรียงจากข้างนอกวงเข้าสู่ข้างในวง



ภาพที่ 16 แผนที่จีโนมของสายพันธุ์ *B. amyloliquefaciens* SR121

ทำการตรวจสอบสายพันธุ์ *B. amyloliquefaciens* SR121 โดยการส่งวิเคราะห์ whole genome พบว่ามียีนหลายยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัว โดยเฉพาะยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีเมแทบอลิซึมสำหรับการสังเคราะห์โพลีคีไทด์ (polyketide pathway; PKS) ซึ่งพบทั้ง 4 ยีน ที่เกี่ยวข้องได้แก่ *FabF* (3-oxoacyl- [acyl-carrier-protein] synthase, EC 2.3.1.179), *FabG* (3-oxoacyl- [acyl-carrier protein] reductase, EC 1.1.1.100), *FabZ* (3-hydroxyacyl- [acyl-carrier-protein] dehydratase, EC 4.2.1.59) และ *FabI* (Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH], EC 1.3.1.9) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ 4 กระบวนการสำคัญในการสังเคราะห์กรดไขมัน ได้แก่ ketoacyl-ACP synthase (KS), ketoreduction (KR), dehydration (DH), และ enoylreduction (ER) ตามลำดับ ดังแสดงวิธีการสังเคราะห์และยีนที่เกี่ยวข้องในภาพที่



ภาพที่ 17 การสังเคราะห์กรดไขมันสายยาวของ *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* 168

นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์อื่น ๆ ที่สำคัญด้วย ดังแสดงในตารางที่ 6 เช่น Fatty acid desaturase (EC 1.14.19.) ซึ่งเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่สามารถทำให้เกิดพันธะคู่ในสายไฮโดรคาร์บอนของกรดไขมันได้ แต่ข้อมูลของเอนไซม์ระบุถึงแค่กลุ่มย่อยของเอนไซม์ลำดับที่ 3 (sub-sub-class) ทั้งนี้ยังมีรายงานถึงเอนไซม์สองตัวที่พบและอยู่ในกลุ่ม sub-sub-class นี้ด้วย ได้แก่ Linoleoyl-CoA desaturase (EC 1.14.19.3) หรือ Delta6-desaturase ซึ่งสอดคล้องกับผลการคัดเลือกทางอนุพันธุศาสตร์ในการทดลองก่อนหน้านี้ที่สามารถเพิ่มจำนวนในส่วนของยีน D6-desaturase ใน *B. amyloliquefaciens* SR121 ได้และ carotene hydroxylase/sterol desaturase (EC 1.14.19.20) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถสังเคราะห์พันธะคู่ที่ตำแหน่งระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 5 และคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 บริเวณวงแหวนของ Delta7-sterols ได้เป็น Delta5,7-sterols

ตารางที่ 6 ข้อมูลเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดไขมันใน *B. amyloliquefaciens* SR121 ที่ได้จากการวิเคราะห์ WGS

EC CODE	ENZYME	NUMBER ENCODED IN GENOME
2.3.1.39	Malonyl CoA-acyl carrier protein trans acylase	1
2.3.1.179	3-oxoacyl- [acyl-carrier-protein] synthase, KASII	1
2.3.1.180	3-oxoacyl- [acyl-carrier-protein] synthase, KASIII	2
1.1.1.100	3-oxoacyl- [acyl-carrier protein] reductase	2
4.2.1.59	3-hydroxyacyl- [acyl-carrier-protein] dehydratase	2
1.3.1.9	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH]	1
6.2.1.3	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase	6
1.14.19.	Fatty acid desaturase	2
1.14.19.3	Linoleoyl-CoA desaturase	1
1.14.19.20	carotene hydroxylase/sterol desaturase	1
1.2.1.3	Aldehyde dehydrogenase	2
	Acyl-coenzyme A synthetases/AMP-(fatty) acid ligases	1
	Short-chain fatty acids transporter	1
	Fatty acid metabolism regulator protein family	1
2.1.1.79	Cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	1

4.6 ทดสอบหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตดีเอสจากแบคทีเรียที่สามารถคัดแยกได้

4.6.1 ทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อปริมาณการผลิตกรดไขมันและองค์ประกอบของกรดไขมันใน *B. amyloliquefaciens* SR121

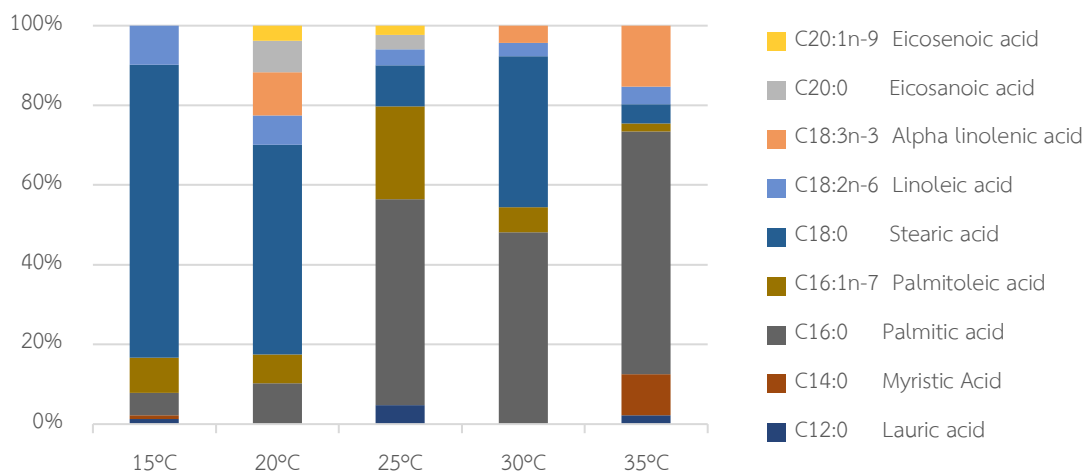
นำหัวเชื้อ *B. amyloliquefaciens* SR121 ลงอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB) broth ที่ใช้ปริมาณ NaCl เป็น 1.5% เพื่อให้เหมาะสมกับแบคทีเรียที่สกัดมาจากภาวะที่มีความเค็มสูง โดยทำการปรับให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากันในทุก ๆ การทดลอง นำมาเพาะเลี้ยงที่ 170 rpm อุณหภูมิแตกต่างกันดังนี้ 15, 20, 25, 30, และ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทำการวัดพารามิเตอร์ต่าง ๆ โดยที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ดีและมีชีวมวลสูงที่สุด 1.71 ± 0.07 กรัมต่อลิตร แต่

สำหรับปริมาณการผลิตและสะสมไขมันในเซลล์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสจะมีการผลิตสูงที่สุดโดยผลิตได้ร้อยละ 75.06 ± 2.05 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 ซิวมวลและปริมาณการผลิตไขมันใน *B. amyloliquefaciens* SR121 ที่อุณหภูมิสำหรับการเพาะเลี้ยงต่าง ๆ

Temperature (°C)	Cell dry weight (CDW) (g/L)	Lipid concentration (g/L)	Lipid content of CDW (% (w/w))
15	1.23 ± 0.06	0.73 ± 0.05	58.84 ± 2.55
20	1.24 ± 0.13	0.69 ± 0.01	55.69 ± 6.42
25	1.71 ± 0.07	0.53 ± 0.04	30.81 ± 1.72
30	1.60 ± 0.08	1.20 ± 0.07	75.06 ± 2.05
35	1.52 ± 0.04	0.72 ± 0.02	47.12 ± 1.02

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันแต่ละชนิด แสดงให้เห็นถึงโปรไฟล์ของกรดไขมันที่มีความแตกต่างกันในแต่ละอุณหภูมิ จากกราฟที่ 2 แสดงให้เห็นว่าเมื่อทำการลดอุณหภูมิลงจะมีการผลิตกรดไขมันสายยาวเช่นใน C20:1n-9 และ C20:0 ได้มากขึ้น ทั้งนี้เมื่อคำนวณผลรวมของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (PUFAs) ซึ่งประกอบไปด้วย C18:2n-6 กรดโอเลอิก และ C18:3n-3 กรดโอเลอิก พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนรวมมากที่สุด 19.73% ของปริมาณกรดไขมันทั้งหมด หรือคิดเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว 0.09 กรัม จากปริมาณกรดไขมันทั้งหมดที่ผลิตได้ 0.47 กรัมต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1 กรัม และยังมีปริมาณของกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 มากที่สุด 15.28% ของปริมาณกรดไขมันทั้งหมด หรือคิดเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว 0.07 กรัม จากปริมาณกรดไขมันทั้งหมดที่ผลิตได้ 0.47 กรัมต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1 กรัม



กราฟที่ 2 องค์ประกอบของกรดไขมันแต่ละชนิดใน *B. amyloliquefaciens* SR121 ที่อุณหภูมิต่างๆ สำหรับการเพาะเลี้ยงผ่านการวิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี

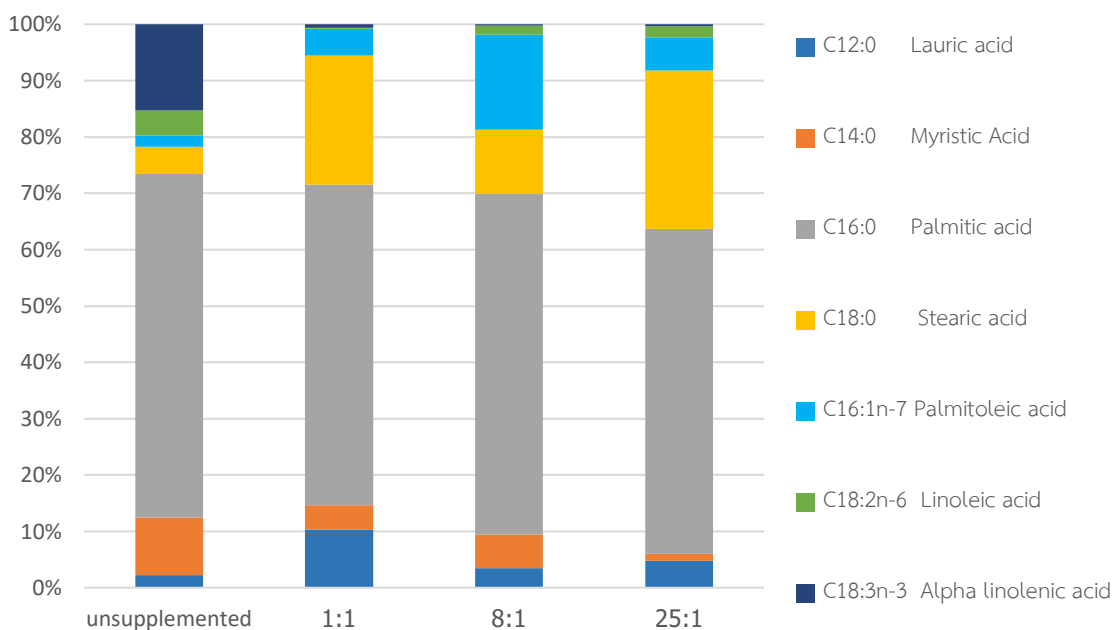
4.6.2 ทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการปรับอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio) ต่อปริมาณการผลิตกรดไขมันและองค์ประกอบของกรดไขมันใน *B. amyloliquefaciens* SR121

เพาะเลี้ยง *B. amyloliquefaciens* SR121 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ที่ใช้ปริมาณ NaCl เป็น 1.5% ที่ 170 rpm อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เนื่องจากองค์ประกอบของอาหารใน 1 กรัมทริปโตเนน (Tryptone) และ ยีสต์สกัด (Yeast extract) มีส่วนประกอบที่เป็นแหล่งไนโตรเจนอยู่ 0.12 กรัม และ 0.105 กรัมตามลำดับ ดังนั้นสำหรับขั้นตอนการศึกษานี้จะเสริมกลูโคสเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนเพิ่มเติมเข้าไปในอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยง โดยสัดส่วนของ C:N ที่จะใช้ในการทดสอบมีทั้งหมด 6 ความเข้มข้นได้แก่ 1:1, 8:1, 25:1, 50:1, 75:1 และ 100:1 จากนั้นนำมาทำการวัดพารามิเตอร์ต่าง ๆ ผลการศึกษาพบว่าที่สัดส่วนความเข้มข้น C:N ที่มากกว่า 25:1 *B. amyloliquefaciens* SR121 ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ แต่ในอัตราส่วน 8:1 มีการเจริญเติบโตได้ดี โดยสามารถวัดน้ำหนักเซลล์แห้งได้สูงที่สุดคือ 3.90 ± 0.68 กรัมต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเพิ่มขึ้นมากกว่าสองเท่าเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหาร LB ดั้งเดิมที่ไม่ได้เสริมแหล่งคาร์บอนเพิ่ม (ตารางที่ 8) ทั้งนี้ที่สัดส่วน C:N สำหรับการผลิตและสะสมไขมันในเซลล์ที่ 1:1 มีการผลิตสูงที่สุดโดยผลิตได้ร้อยละ 64.76 ± 1.70 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งเพิ่มขึ้นจากเดิมเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหาร LB ดั้งเดิมที่ไม่ได้เสริมแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ 8 ชีวมวลและปริมาณการผลิตไขมันใน *B. amyloliquefaciens* เพาะเลี้ยงด้วยสัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน

C:N ratio	Cell dry weight (CDW) (g/L)	Lipid concentration (g/L)	Lipid content of CDW (% (w/w))
unsupplemented	1.53 ± 0.04	0.72 ± 0.05	47.12 ± 2.55
1:1	1.56 ± 0.26	1.00 ± 0.05	64.76 ± 1.70
8:1	3.90 ± 0.68	0.95 ± 0.11	24.58 ± 1.40
25:1	2.31 ± 0.10	1.04 ± 0.04	45.18 ± 2.82

ทั้งนี้เมื่อทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันประเภทต่าง ๆ แล้วพบว่า สูตรอาหาร LB ที่ไม่ได้เสริมแหล่งคาร์บอนเข้าไปมีการผลิตกรดไขมันในกลุ่มโอเมก้า-3 ที่ต้องการมากกว่า โดยมี C18:3n-3 กรดไขมันอัลฟาไลโนเลอิกมากที่สุดถึง 15.28% ของปริมาณกรดไขมันทั้งหมด หรือคิดเป็น 0.10 กรัม จากปริมาณกรดไขมันทั้งหมดที่ผลิตได้ 0.65 กรัมต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1 กรัม และปริมาณจะลดลงไปตามสัดส่วนคาร์บอนที่เสริมเพิ่มขึ้นดังกราฟที่ 3 ทั้งนี้เมื่อคำนวณถึงสัดส่วนกรดไขมันไม่อิ่มตัวอื่นประกอบด้วย C16:1n-7 ปาล์มมิโตลิค (2.01% ของปริมาณกรดไขมันทั้งหมด), C18:2n-6 ลิโนเลอิก (4.45% ของปริมาณกรดไขมันทั้งหมด) และ C18:3n-3 อัลฟาไลโนเลอิก (15.28% ของปริมาณกรดไขมันทั้งหมด) เปรียบเทียบกับเมื่อทำการเพาะเลี้ยง *B. amyloliquefaciens* SR121 ในอาหารที่ไม่มีการเสริมด้วยคาร์บอนถึงแม้จะมีการผลิตไขมันน้อยกว่า แต่มีการผลิตกรดไขมันกลุ่มไม่อิ่มตัว และกลุ่มโอเมก้า-3 มากกว่า



กราฟที่ 3 องค์ประกอบของกรดไขมันแต่ละชนิดใน *B. amyloliquefaciens* SR121 ที่เพาะเลี้ยงด้วยสัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่าง ๆ ผ่านการวิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี

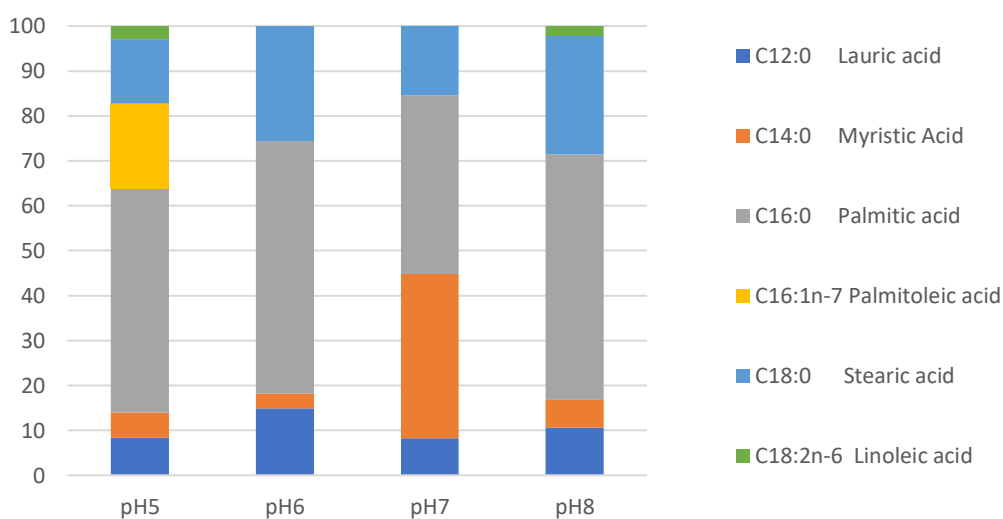
4.6.3 ทดสอบ pH ที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยง *B. amyloliquefaciens* SR121 ต่อปริมาณการผลิตกรดไขมันและองค์ประกอบของกรดไขมัน

เพาะเลี้ยง *B. amyloliquefaciens* SR121 ด้วยอาหารเลี้ยง LB broth ที่ใช้ปริมาณ NaCl เป็น 1.5% นำมาเพาะเลี้ยงที่ 170 rpm อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ไม่มีการเสริมด้วยแหล่งคาร์บอนเพิ่มเติม แต่มีการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้โซเดียม ไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH) และ กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid, HCl) ให้มีค่า pH เป็น 5, 6, 7 และ 8 ในแต่ละการทดลองทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทำการวัดพารามิเตอร์ต่าง ๆ แบบที่เรียสามารถเจริญเติบโตที่ pH8 โดยมีชีวมวลสูงที่สุด 1.52 ± 0.03 กรัมต่อลิตร และลดลงแปรผันตรงกับค่า pH ที่ลดลงด้วย แต่สำหรับการผลิตและสะสมไขมันในเซลล์ที่ pH5 มีการผลิตสูงที่สุดโดยผลิตได้ร้อยละ 89.46 ± 3.79 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (ตารางที่ 9) และลดลงแปรผันกับค่า pH โดยปริมาณไขมันที่ผลิตได้เมื่อปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น pH5 คิดเป็น 0.77 กรัมต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1 กรัม มากกว่า *B. amyloliquefaciens* SR121 ที่เพาะเลี้ยงที่ 35 องศาเซลเซียส และไม่มีการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างซึ่งผลิตไขมันได้คิดเป็น 0.34 กรัมต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1 กรัม ซึ่งมีปริมาณการผลิตเพิ่มขึ้นถึงสองเท่า

ตารางที่ 9 ชีวมวลและปริมาณการผลิตไขมันใน *B. amyloliquefaciens* SR121 ที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงต่าง ๆ

pH	Cell dry weight (CDW) (g/L)	Lipid concentration (g/L)	Lipid content of CDW (% (w/w))
5	0.96 ± 0.04	0.86 ± 0.01	89.46 ± 3.79
6	1.03 ± 0.09	0.82 ± 0.06	79.27 ± 1.55
7	1.14 ± 0.04	0.58 ± 0.51	76.97 ± 5.22
8	1.52 ± 0.03	0.86 ± 0.07	56.61 ± 0.19

เมื่อทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันชนิดต่าง ๆ ที่ *B. amyloliquefaciens* SR121 ผลิตได้เมื่อทำการเพาะเลี้ยงโดยปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ผลการวิเคราะห์แสดงในกราฟที่ 4 ไม่พบกรดไขมันประเภทโอเมก้า-3 หรือ C18:3n-3 กรดไขมันอัลฟาโอเลอิก ที่เคยตรวจสอบพบในการทดสอบก่อนหน้านี้ ทั้งนี้พบว่าในการปรับค่าความเป็นกรดและด่างด้วย NaOH และ HCl นั้นทำให้พบปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวลดลงเมื่อเทียบกับการทดสอบก่อนหน้านี้ซึ่งไม่พบเลยในอาหารที่มี pH6 และ pH7 แต่พบเฉพาะในอาหารที่มี pH5 และ pH8 โดยพบมากที่สุดคืออาหารที่ปรับเป็น pH5 ซึ่งมี C16:1n-7 ปาล์มมิโตลิก อยู่ 18.96% ของปริมาณกรดไขมันทั้งหมด หรือ 0.14 กรัม และ C18:2n-6 ลิโนเลอิก 2.89% ของปริมาณกรดไขมันทั้งหมด หรือ 0.02 กรัม



กราฟที่ 4 องค์ประกอบของกรดไขมันแต่ละชนิดใน *B. amyloliquefaciens* SR121 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่มีการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ผ่านการวิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี

บทที่ 5

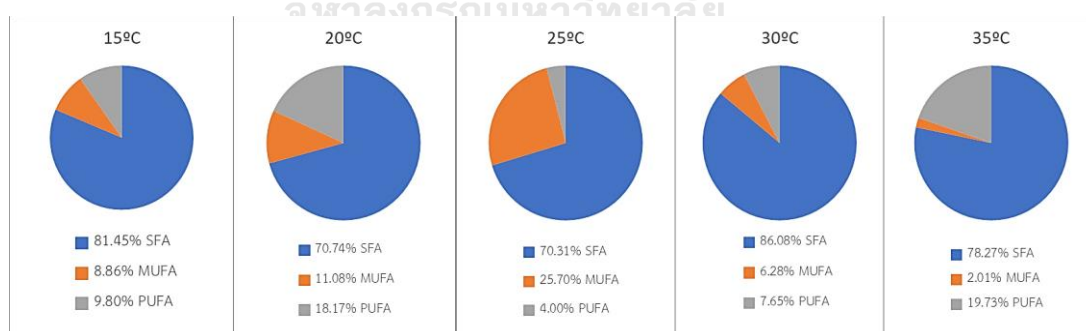
วิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการคัดเลือกแบคทีเรียกลุ่มที่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันกลุ่มไม่อิ่มตัวสายยาวเชิงซ้อน โดยใช้การทดสอบทั้งทางชีวเคมี อย่างการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และ 0.1% (w/v) TTC พบว่ากระบวนการทดสอบนี้สามารถใช้เพื่อการทดสอบอย่างง่ายในการตัดจำนวนตัวอย่างจาก 192 ตัวอย่างให้เหลือเพียง 9 ตัวอย่างได้ ทั้งนี้ตัวอย่างทั้งหมด 9 ตัวอย่างเมื่อทำการย้อมด้วย Sudan Black B เพื่อตรวจสอบการสะสมไขมันในรูปแบบหยดน้ำมันภายในเซลล์ยังพบว่า ทุกตัวอย่างให้ผลการย้อมเป็นบวกเช่นเดียวกัน และสืบเนื่องจากผลการทดสอบทางชีวเคมี และ อนุพันธุศาสตร์ในทั้งสามยีนของสายพันธุ์ *S. koreensis* CH12 เป็นลบ ทางผู้วิจัยจึงเลือกที่จะนำมาทำการทดสอบรวมด้วยเพื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบการสะสมไขมันในรูปแบบหยดน้ำมันภายในเซลล์ ทั้งนี้เมื่อทำการสกัดปริมาณน้ำมันหลังเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแต่ละชนิดเป็นเวลา 36 ชั่วโมงพบว่า มี 6 ตัวอย่างจาก 9 ตัวอย่างที่ทำการคัดเลือกมาด้วยวิธีการเหล่านี้ สามารถผลิตไขมันได้มากกว่าร้อยละ 20 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง กล่าวคือเป็น oleaginous bacteria ดังนั้นการทดสอบด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และ 0.1% (w/v) TTC มีประสิทธิภาพที่จะใช้ในการคัดเลือกตัวอย่างเบื้องต้นสำหรับแบคทีเรียที่ผลิตน้ำมันได้ เพื่อประหยัดเวลา และขั้นตอน รวมถึงลดจำนวนตัวอย่างที่จะนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีการ Gas chromatography ในส่วนถัดไปได้

B. amyloliquefaciens SR121 เป็นตัวอย่างที่มีการผลิตน้ำมันได้มากที่สุดร้อยละ 75.06 ± 2.05 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และยังมีการผลิตกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 และโอเมก้า-6 เช่น C18:2 n-6 และ C18:3n-3 ตามลำดับ ซึ่งสามารถใช้เป็นเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวชนิดอื่น เช่นการเปลี่ยนเป็นกรดไขมันอีพีเอ และดีเอชเอ โดยอาศัยการ Elongation และ เอนไซม์ Desaturase เพื่อให้มีการต่อสายที่ยาวขึ้น (ธัญลักษณ์ และคณะ, 2563) ทั้งนี้จากผลการตรวจสอบไม่พบการผลิตดีเอชเอในตัวอย่างแบคทีเรียใดเลย ดังนั้นงานวิจัยจะเน้นไปในกลุ่มของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวเชิงซ้อน โดยเฉพาะกลุ่มของโอเมก้า-3 เนื่องจากการศึกษาที่แบคทีเรียเหล่านี้สามารถสังเคราะห์กลุ่มของโอเมก้า-3 ได้แสดงว่ามีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพันธะคู่ในตำแหน่ง ω -3 ดังนั้นจึงมีโอกาสที่จะพัฒนาสายพันธุ์ต่อไปได้อีกในอนาคต ทั้งนี้การที่พบว่าแบคทีเรียเหล่านี้สามารถผลิตกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 และโอเมก้า-6 ได้ในปริมาณที่สูงก็ถือว่ามีประโยชน์ เนื่องจากกรดไขมันเหล่านี้ยังเป็นกรดไขมันที่จำเป็นต่อร่างกาย และนิยมนำมาทำเป็นอาหารเสริม โดยเฉพาะน้ำมันปลาที่มีส่วนผสมของ C18:2 n-6 และ C18:3n-3 รวมอยู่ด้วย

ในส่วนของการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและองค์ประกอบของกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิที่ต่ำจะมีการผลิตไขมันกลุ่มไม่อิ่มตัวมากขึ้น รวมถึงจะมีการผลิตกรดไขมันสายที่ยาวขึ้นด้วยเช่นกัน สังเกตได้จากกราฟที่ 2 พบการผลิตกรดไขมัน C20:1n-9 และ C20:0 มากขึ้นตามอุณหภูมิที่ลดลง แต่ทั้งนี้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียสไม่พบกรดไขมันเหล่านี้สืบเนื่องจาก เมื่อทำการลดอุณหภูมิก็นำผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิดนั้น ๆ ด้วยการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ทำให้ *B. amyloliquefaciens* SR121 มีอัตราการเจริญได้ช้ากว่าการเจริญที่อุณหภูมิอื่น การผลิตกรดไขมันเหล่านี้จึงอาจจะต้องใช้เวลานานกว่าเช่นเดียวกัน ซึ่งก็เป็นไปตามทฤษฎีที่ว่า อุณหภูมิที่ต่ำจะมีการผลิตไขมันกลุ่มไม่อิ่มตัวและผลิตกรดไขมันสายที่ยาวได้มากกว่าอุณหภูมิที่สูง (Hu และคณะ, 2020)

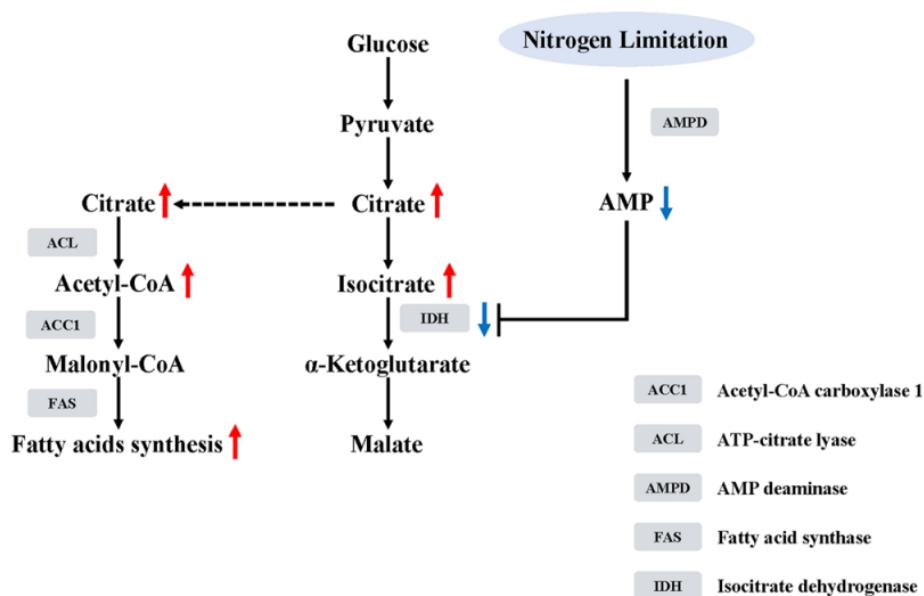
เป็นที่น่าสนใจเมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส พบมีการผลิตกรดไขมันทั้งโอเมก้า-3, 6 และ 9 ได้แก่ C18:3n-3 Alpha linolenic acid (60.59 มิลลิกรัม/กรัม), C18:2n-6 Linoleic acid (40.60 มิลลิกรัม/กรัม) และ C20:1n-9 Eicosenoic acid (21.00 มิลลิกรัม/กรัม) ตามลำดับ ทั้งนี้เมื่อทำการเปรียบเทียบเฉพาะกรดไขมันกลุ่มไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนที่สนใจคือกลุ่มโอเมก้า-3 สำหรับ *B. amyloliquefaciens* SR121 ที่คัดแยกมานี้พบว่า ที่ 35 องศาเซลเซียสซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ทางผู้วิจัยทำการคัดเลือก เนื่องจากมีการผลิตมากที่สุดถึง 19.73% ของปริมาณกรดไขมันทั้งหมด หรือคิดเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว 92.97 มิลลิกรัม (กราฟที่ 5) และมีการผลิตกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 มากที่สุดโดยปริมาณ 72 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1 กรัม (ตารางที่ 10)



กราฟที่ 5 สัดส่วนของกรดไขมันแต่ละประเภทจากการวิเคราะห์แก๊สโครมาโทกราฟีในไขมันที่สกัดได้จาก *B. amyloliquefaciens* SR121 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

สำหรับการเสริมด้วยกลูโคสในอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยง ถึงแม้ว่ากลูโคสจะเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต และผลิตกรดไขมันในแบคทีเรียหลายชนิด จากผลการ

ทดลองพบว่า การเสริมด้วยกลูโคสส่งผลให้ชีวมวลกับปริมาณการผลิตไขมันเพิ่มขึ้น แต่จะให้ผลตรงข้ามในส่วนของการเพิ่มปริมาณของกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 หรือกรดไขมันไม่อิ่มตัว โดยพบว่า ปริมาณการผลิตลดลง และมีการสังเคราะห์กรดไขมันกลุ่มอิ่มตัวสายสั้นเพิ่มขึ้น ซึ่งการจำกัดปริมาณไนโตรเจนในอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเมื่อมีสัดส่วนของไนโตรเจนที่น้อยจะส่งผลให้เมื่อเซลล์ใช้แหล่งไนโตรเจนจากภายนอกจนหมด เซลล์จะนำ adenosine monophosphate (AMP) มาใช้เพื่อผลิต inosine monophosphate (IMP) และแอมโมเนียมไอออน (NH_3^+) (Papanikolaou, 2011) ซึ่งจะถูกนำไปใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนสำรองสำหรับสร้างเซลล์ และเมื่อ AMP ต่ำ จะเกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ isocitrate dehydrogenase ทำให้ isocitrate เกิดการสะสมในรูปของ citrate มากขึ้นทำให้เกิดให้กระบวนการสังเคราะห์ acetyl-CoA เพิ่มขึ้นด้วย (Lulu และคณะ, 2019) ซึ่ง acetyl-CoA เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการผลิตกรดไขมัน ดังนั้นการจำกัดไนโตรเจนจึงส่งผลให้มีการผลิตกรดไขมันเพิ่มขึ้นได้



ภาพที่ 18 แบบจำลองวิถีการสังเคราะห์ที่เกี่ยวข้องกับการสะสมไขมันภายใต้การเพาะเลี้ยงแบบจำกัดไนโตรเจน (Lulu และคณะ, 2019)

ทั้งนี้การปรับค่าความเป็นกรด-ด่างก็เช่นเดียวกัน เมื่อใช้อาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงที่มี pH5 พบปริมาณการผลิตไขมันเพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 89.46 ± 3.79 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง คิดเป็น 770 มิลลิกรัมกรัมต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1 กรัม แต่ปริมาณของกรดไขมันไม่อิ่มตัวทั้งเชิงเดี่ยวและเชิงซ้อนกลับลดลง

ตารางที่ 10 ปริมาณของกรดไขมันแต่ละชนิดในแต่ละพารามิเตอร์ที่ทำการทดสอบ (มิลลิกรัม/กรัม)

		SFAs					MUFAs			PUFAs	
		C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C20:0	C16:1n-7	C20:1n-9	C18:2n-6	C18:3n-3	
Adjust temperature	15°C	7.24	6.06	32.72	433.24	-	52.13	-	57.66	-	
	20°C	-	-	56.92	292.82	44.22	40.71	21.00	40.60	60.59	
	25°C	14.76	-	159.26	31.49	11.12	71.88	7.30	12.32	-	
	30°C	-	-	361.19	284.93	-	47.14	-	25.45	31.98	
	35°C	10.65	48.06	287.48	22.62	-	9.47	-	20.97	72.00	
Glucose supplemented.	1:1	66.45	28.24	368.63	148.50	-	30.70	-	1.36	3.76	
(C:N ratio)	8:1	8.46	14.73	148.85	27.80	-	41.47	-	3.88	0.64	
*	25:1	21.46	5.78	260.62	126.88	-	26.66	-	8.77	1.67	
Adjust pH with NaOH	pH5	75.21	49.96	445.71	128.32	-	169.57	-	25.85	-	
and HCl	pH6	117.83	26.79	444.92	203.17	-	-	-	-	-	
**	pH7	63.44	281.94	305.99	118.28	-	-	-	-	-	
	pH8	60.26	34.95	309.40	148.73	-	-	-	12.79	-	

* เพาะเลี้ยงในอาหาร LB ที่เติม 1.5% NaCl ที่ 35°C 170 rpm เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

** เพาะเลี้ยงในอาหาร LB ที่เติม 1.5% NaCl ไม่มีการเสริมด้วยกลูโคสเพิ่มเติม ที่ 35°C 170 rpm เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้หลายชนิดที่มีความสัมพันธ์กับการผลิตกรดไขมันที่จำเป็นหรือมีมูลค่าในทางอุตสาหกรรมจากกะปิหมักชุมชนที่ซึ่งนิยมสำหรับประเทศไทย และเป็นผลิตภัณฑ์พื้นบ้านของไทย สำหรับอุตสาหกรรมชุมชนแสดงให้เห็นว่าสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องปรุงและพัฒนาคุณค่าทางโภชนาการได้อีกในอนาคต และสามารถคัดแยกแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* SR121 ซึ่งสามารถปรับให้มีการการผลิตไขมันเพิ่มขึ้นได้ถึงร้อยละ 89.46 ± 3.79 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง คิดเป็น 770 มิลลิกรัมกรัมต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1 กรัม โดยทำการเพาะเลี้ยงใช้เวลาเพียง 36 ชั่วโมงที่ 35 องศาเซลเซียสในอาหาร LB ที่เติม 1.5% NaCl และมีการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น pH5 ไม่มีการเสริมด้วยกลูโคสเพิ่มเติม ที่ 35°C 170 rpm แต่หากจะเน้นไปที่การผลิตกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 พบว่า การเพาะเลี้ยงที่ 35 องศาเซลเซียสในอาหาร LB ที่เติม 1.5% NaCl ไม่มีการเสริมด้วยกลูโคสเพิ่มเติมและไม่มีการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เลี้ยงที่ 35°C 170 rpm พบว่าจะมีการผลิตกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 สูงที่สุดที่ 72 มิลลิกรัมกรัมต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1 กรัม ซึ่งการที่ไม่ต้องเสริมอาหารเพาะเลี้ยงด้วยกลูโคสเพิ่มเติมก็จะเป็นประโยชน์มากขึ้นในทางอุตสาหกรรม ทั้งนี้แบคทีเรียสกุล *Bacillus* ยังเป็นที่นิยมในการนำมาทำเป็นโพรไบโอติกส์ (Probiotics) อย่างแพร่หลาย นิยมใช้เพื่อเป็นอาหารเสริมสำหรับสัตว์เพื่อปรับปรุงการเจริญหรือทำให้สัตว์มีภูมิคุ้มกันที่ดีขึ้น รวมถึงมีคุณลักษณะที่ดีขึ้นอีกด้วย เช่น ในงานวิจัยของ Bao และคณะ (2016) ใช้ในอาหารเพื่อปรับปรุงการเจริญเติบโตของไก่เนื้อโดยเพิ่มปริมาณการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวในเนื้อไก่ได้อย่างมีนัยสำคัญส่งผลให้เนื้อไก่มีคุณภาพที่ดีขึ้น

ทั้งนี้แบคทีเรียที่ทำการคัดแยกมาเป็นแบคทีเรียที่มีความทนเค็มสูง (Halophillic bacteria) ซึ่งได้ใช้อาหารเพาะเลี้ยง Marine broth ที่มีองค์ประกอบของแร่ธาตุหลักเหมือนแร่ธาตุจากทะเล ทางผู้วิจัยได้ทำการทดลองเพิ่มเติม พบว่า *B. amyloliquefaciens* SR121 สามารถเจริญเติบโตบนอาหารเพาะเลี้ยง Marine broth ได้ และมีการผลิตชีวมวล 1.46 กรัมต่อลิตรของอาหารเพาะเลี้ยง และผลิตน้ำมันได้ถึง 623.4 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1 กรัม ซึ่งเป็นที่น่าสนใจในอนาคตเพื่อลดต้นทุนการผลิตสำหรับการใช้น้ำทะเลเป็นตัวเลือกในการเพาะเลี้ยงแทนอาหารเพาะเลี้ยงอื่น ๆ

บรรณานุกรม

- จิตต์เรขา ทองมณี. 2544. จุลินทรีย์ในอาหารหมัก. วารสารกรมวิทยาศาสตร์บริการ. 157 (กันยายน) : 28-31
- ธัญลักษณ์ พิทักษ์, ชีระ ชีโวรินทร์, และ ภากร สกุลคู. 2563. ตำรา ชีวเคมีของลิติด. เชียงใหม่ : คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 171 หน้า. ISBN 978-616-398-501-9
- อติโรจน์ ปพัฒน์เปรมศิริ. 2560. เซลล์และองค์ประกอบของเซลล์ (Cell and cell components). [ออนไลน์]. 2560. แหล่งที่มา: <https://www.scimath.org/lesson-biology/item/7450-2017-08-11-07-37-33>. [31 พฤษภาคม 2566]
- อัจฉรา นิยมเดชา, สุรเสน ศรีริگانนท์, และ มงคล คงเสน. 2556. การใช้กรดไขมันโอเมก้าในการเพิ่มสมรรถภาพการผลิตและคุณภาพซากของสุกร. Princess of Naradhiwas University Journal,5(4). Retrieved from <https://li01.tci-thaijo.org/index.php/pnujr/article/view/53795>
- Alagarsamy, S., Sabeena, F. K., Fakhraldeen, S., Kooramattom, M. R., and Al-Yamani, F. (2019). Isolation of Gram-positive Firmibacteria as major eicosapentaenoic acid producers from subtropical marine sediments. *Letters in applied microbiology*, 69(2), 121-127.
- 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.
- Bao, C., Zhang, W., Wang, J., Liu, Y., Cao, H., Li, F., Liu, S., Shang, Z., Cao, Y., and Dong, B. 2022. The Effects of Dietary Bacillus amyloliquefaciens TL106 Supplementation, as an Alternative to Antibiotics, on Growth Performance, Intestinal Immunity, Epithelial Barrier Integrity, and Intestinal Microbiota in Broilers. *Animals (Basel)*. 9;12(22):3085.
- Bishop, K.S., Erdrich, S., Karunasinghe, N., Han, D.Y., Zhu, S., Jesuthasan, A., and Ferguson, L. 2015. An Investigation into the Association between DNA Damage and Dietary Fatty Acid in Men with Prostate Cancer. *Nutrients*. 7. 405-422. 10.3390/nu7010405.
- Bligh, E.G., and Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 37(8):911-7.
- Booncharoen, A., Visessanguan, W., Kuncharoen, N., Yiamsombut, S., Santiyanont, P., Mhuantong, W., Charoensri, S., Rojsitthisak, P., and Tanasupawat, S. 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.
- Diomandé, S.E., Nguyen-The, C., Guinebretière, M.H., Broussolle, V., and Brillard, J. 2015. Role of fatty acids in Bacillus environmental adaptation. Frontiers in Microbiology. 6:813.
- Domenichiello, A.F., Kitson, A.P., and Bazinet, R.P., 2015, Is docosahexaenoic acid synthesis from α -linolenic acid sufficient to supply the adult brain?, Prog Lipid Res. 59 : 54-66.
- Drenjančević, I., and Pitha, J. 2022. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids—Vascular and Cardiac Effects on the Cellular and Molecular Level (Narrative Review). International Journal of Molecular Sciences. 23, 2104.
- Estupiñán, M., et al. 2020. Novel *Vibrio* spp. strains producing omega-3 fatty acids isolated from coastal seawater. Marine Drugs 18(2)
- Finco, A.M.O., Mamani, L.D.G., Carvalho, J.C., Pereira, G.V., Thomaz-Soccol, V., and Soccol, C.R. 2017. Technological trends and market perspectives for production of microbial oils rich in omega-3. Critical Reviews in Biotechnology. 37(5):656-671.
- Helmi, H., Astuti, D.I., Putri, S.P., Sato, A., Laviña, W.A., Fukusaki, E., and Aditiawati, P. 2022. Dynamic Changes in the Bacterial Community and Metabolic Profile during Fermentation of Low-Salt Shrimp Paste (Terasi). Metabolites. 12, 118.
- Hu, F., Clevenger, A.L., Zheng, P., Huang, Q., and Wang, Z. 2020. Low-temperature effects on docosahexaenoic acid biosynthesis in Schizochytrium sp. TIO01 and its proposed underlying mechanism. Biotechnology for Biofuels. 13. 10.1186/s13068-020-01811-y.
- Hu, J.R., Zhou, P.P., Zhu, Y.M., Ren, L., and Yu, L.J. 2011. Isolation of eicosapentaenoic acid-producing fungi from soil based on polymerase chain reaction amplification. Bioscience 66: 429-433
- Jovanovic, S., Dietrich, D., Becker, J., Kohlstedt, M., and Wittmann, C. 2011. Microbial production of polyunsaturated fatty acids — high-value ingredients for aquafeed, superfoods, and pharmaceuticals. Current Opinion in Biotechnology. 69: 199-211,

- 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.
- Robles, G.L., Lazaro, B., De La Cruz, F., and Moncalian, G., 2018, *FabH* deletion increases DHA production in *Escherichia coli* expressing *Pfa* genes, Microbial Cell Factories. 17(1):88
- Trujillo, U., Vázquez-Rosa, E., Oyola, D., Stagg, L., Vassallo, D., Vega, I., Arold, S., and Baerga-Ortiz, A. 2013. Solution Structure of the Tandem Acyl Carrier Protein Domains from a Polyunsaturated Fatty Acid Synthase Reveals Beads-on-a-String Configuration. PLoS one. 8. e57859.
- 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.
- Kautharapu, K.B., Rathmacher, J., and Jarboe, L.R. 2013. Growth condition optimization for docosahexaenoic acid (DHA) production by *Moritella marina* MP-1. Applied Microbiology and Biotechnology 97: 2859-2866.
- Kashiwagi, S., and Huang, P. 2012. Dietary Supplements and Cardiovascular Disease: What is the Evidence and What Should We Recommend?. InTech. doi: 10.5772/31474
- Lulu, C., Xin, T., Hengqian, L., Hao, Z., Yong, Q.C, Haiqin, C., and Wei, C. 2019. Journal of Agricultural and Food Chemistry.67 (34), 9551-9559
- Meesapyodsuk, D., and Qiu, X. 2016. Biosynthetic mechanism of very long chain polyunsaturated fatty acids in *Thraustochytrium* sp. Journal of Lipid Research 57(10):1854-1864
- Moi, I.M., Leow, A.T.C., Ali, M.S.M., Rahman, R.N.Z.R.A., Salleh, A.B., and Sabri, S., 2018, polyunsaturated fatty acids in marine bacteria and strategies to enhance their production, Applied Microbiology and Biotechnology. 102(14):5811-5826.
- Patel, A., Karageorgou, D., Rova, E., Katapodis, P., Rova, U., Christakopoulos, P., and Matsakas, L. 2020. An Overview of Potential Oleaginous Microorganisms and Their Role in Biodiesel and Omega-3 Fatty Acid-Based Industries. Microorganisms 8(3).

- Razak, A.A.E., Ward, A.C., and Glassey, J. 2014. Screening of marine bacterial producers of polyunsaturated fatty acids and optimisation of production. Microbial Ecology 67: 454-464.
- Roy, B.J., Singha, N.K., Rahman, M.G., and Mohanta, S.K. 2019. Exploitation of sergestid shrimp (*Acetes* species) and its importance in the south-east part coastal region at Chattogram, Bangladesh. International Journal of Advanced Research in Biological Sciences. 6(3): 11-27
- Ryan, J., Farr, H., Visnovsky, S., Vyssotski, M., and Visnovsky, G. 2010. A rapid method for the isolation of eicosapentaenoic acid-producing marine bacteria. Journal of Microbiol Methods 82(1): 49-53.
- Sasser, M. 1990. Bacterial identification by gas chromatographic analysis of fatty acid methyl ester (GC-FAME). MIDI Technical Note 101: 1-7.
- Siriwardhana, N., Kalupahana, N.S., and Moussa, N.M. 2012. Health benefits of n-3 polyunsaturated fatty acids: eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. Advances in Food and Nutrition Research 65: 211-222.
- Tilay, A., and Annapure, U. 2012. Novel simplified and rapid method for screening and isolation of polyunsaturated fatty acids producing marine bacteria. Biotechnology Research International
- 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.
- Wan, X., Peng, Y.F., Zhou, X.R., Yang, M.G., Huang, F.H., and Moncalián, G., 2016, Effect of cerulenin on fatty acid composition and gene expression pattern of DHA-producing strain *Colwellia psychrerythraea* strain 34H, Microbial Cell Factories. 15:30.
- Wisetchonlathan, N., Pitaktrairat, M., and Glinwong, C. 2022. C21. Metadata and the Fatty Acids Content in Thai Shrimp Paste. Journal of Health Science and Alternative Medicine. 179-183.
- Yano, Y., Nakayama, A., Saito, H., and Ishihara, K. 1994. Production of docosahexaenoic acid by marine bacteria isolated from deep sea fish. Lipids 29(7): 527-528.

Zheng, Chaocheng. (2019). Optimization of fermentation conditions for oil production by strain 6-18. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 300. 052032. 10.1088/1755-1315/300/5/052032.





ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB) Broth (1 ลิตร)

ทริปโตน (tryptone) 10 กรัม

ยีสต์สกัด (yeast extract) 5 กรัม

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 15 กรัม

1.1 การปรับสัดส่วนของ C:N ratio (1 ลิตร)

สัดส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 1:1 เติมกลูโคส (glucose) 1.125 กรัม

สัดส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 8:1 เติมกลูโคส 9 กรัม

สัดส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 25:1 เติมกลูโคส 28.125 กรัม

สัดส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 50:1 เติมกลูโคส 56.25 กรัม

สัดส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 75:1 เติมกลูโคส 84.375 กรัม

สัดส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 100:1 เติมกลูโคส 112.25 กรัม

1.2 การปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ปรับค่าความเป็นกรดโดยใช้ ไฮโดรคลอริก (HCl)

ปรับค่าความเป็นด่างโดยใช้ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

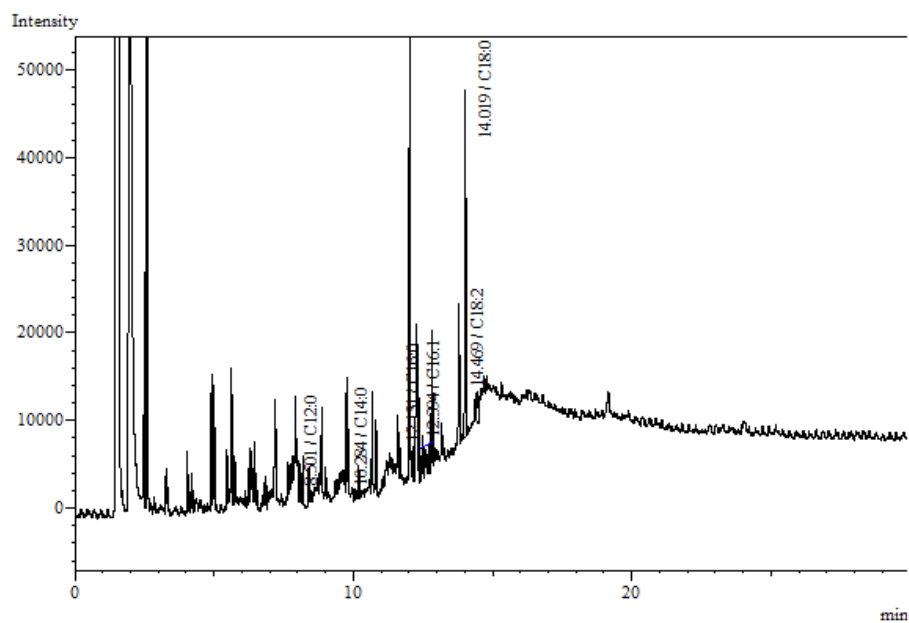
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Marine Broth 2216 (Zobell Marine Broth) (1 ลิตร)

Marine Broth 2216 40.25 กรัม

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์กรดไขมันด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี

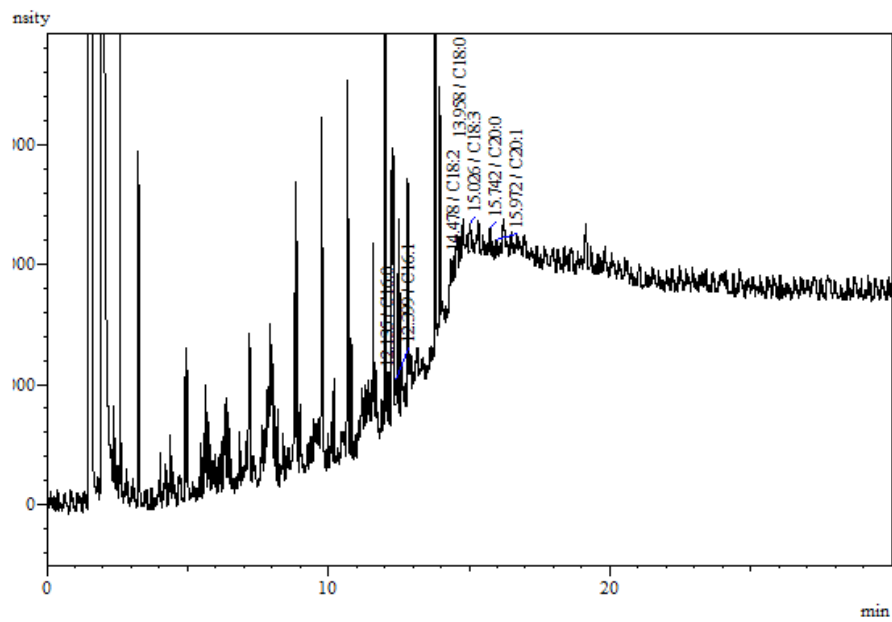
User Name : Admin
 Vial# : 2
 Sample Name : 15
 Sample ID :
 Sample Type : Unknown
 Injection Volume : 1.00
 ISTD Amount :
 Data Name : D:\Sine\test temp\15_edited.gcd
 Method Name : D:\mink\Fatty acid profiles used.gcm



Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Unit	MarkID#	Compd Name
1	8.501	1556	1033	1.228	%	1	C12:0
2	10.284	1304	737	1.029	%	2	C14:0
3	12.131	6916	3478	5.458	%	3	C16:0
4	12.394	11229	3818	8.862	%	4	C16:1
5	14.019	93298	38896	73.626	%	5	C18:0
6	14.469	12415	3473	9.797	%	7	C18:2
Total		126718	51435				

ภาพที่ ผ1 การทดสอบอนุกรมในการเพาะเลี้ยง *B. amyloliquefaciens* SR121 ที่ 15 องศาเซลเซียส

Analysis Date & Time : 31/03/2566 16:31:33
 User Name : Admin
 Vial# : 3
 Sample Name : 20
 Sample ID :
 Sample Type : Unknown
 Injection Volume : 1.00
 ISTD Amount :
 Data Name : D:\Sine\test temp\20_edited.gcd
 Method Name : D:\mink\Fatty acid profiles used.gcm

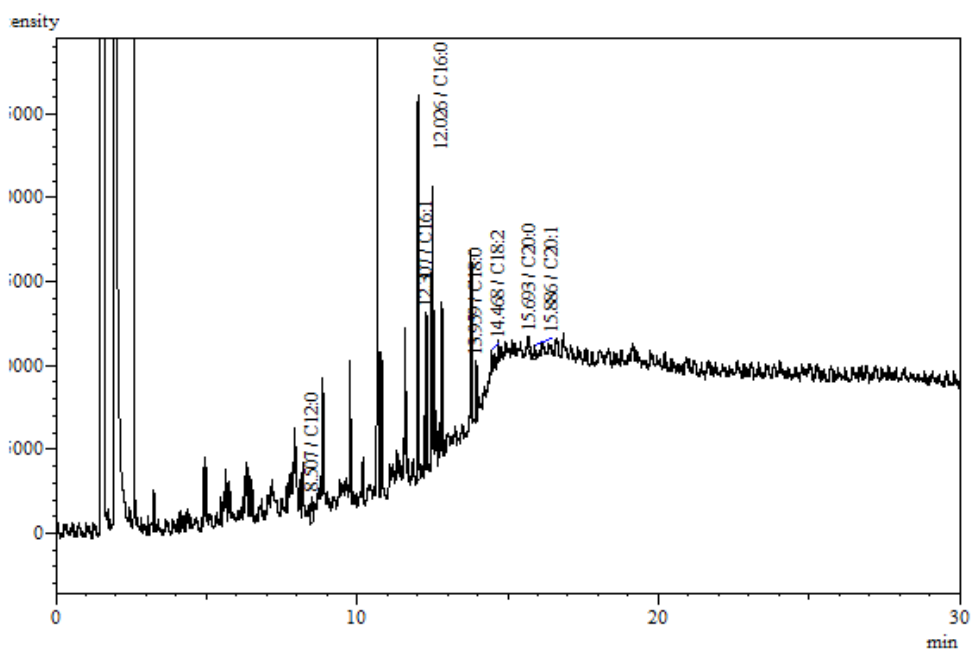


Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Unit	MarkID#	Cmpd Name
1	12.135	4439	2006	10.222	%	3	C16:0
2	12.399	3174	1031	7.308	%	4	C16:1
3	13.958	22836	9592	52.584	%	5	C18:0
4	14.478	3166	990	7.289	%	7	C18:2
5	15.026	4727	1158	10.884	%	8	C18:3
6	15.742	3449	1017	7.941	%	9	C20:0
7	15.972	1638	621	3.772	%	10	C20:1
Total		43429	16415				

ภาพที่ ผ2 การทดสอบอนุกรมในการเพาะเลี้ยง *B. amyloliquefaciens* SR121 ที่ 20 องศาเซลเซียส

User Name : Admin
 Vial# : 4
 Sample Name : 25
 Sample ID :
 Sample Type : Unknown
 Injection Volume : 1.00
 ISTD Amount :

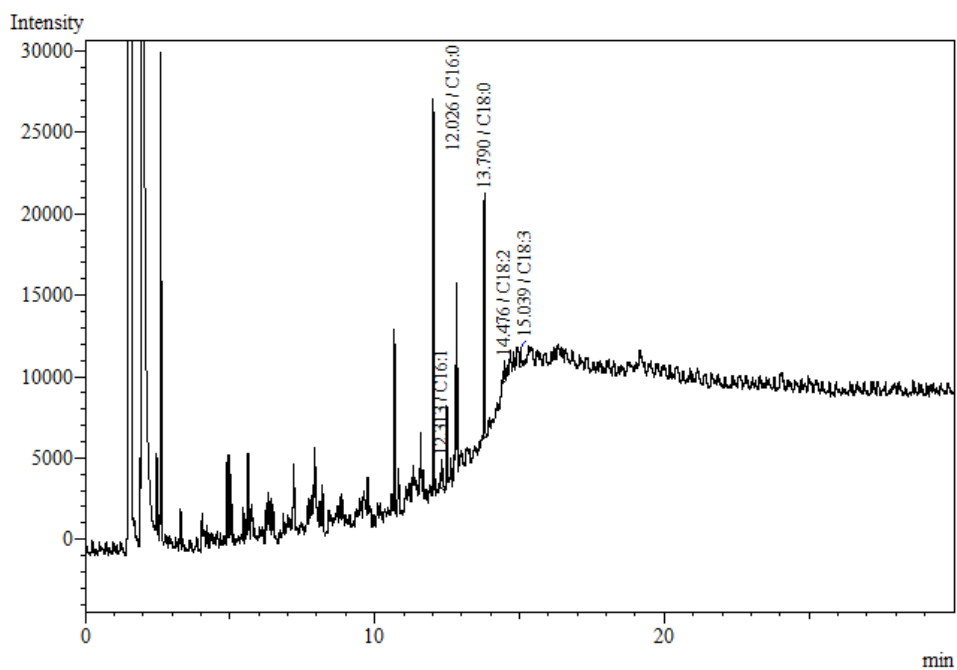
 Data Name : D:\Sine\test temp\25_edited.gcd
 Method Name : D:\mink\Fatty acid profiles used.gcm



Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark ID#	Cmpd Name
1	8.507	5064	1576	4.790	%	1	C12:0
2	12.026	54647	22807	51.692	%	3	C16:0
3	12.307	24664	9195	23.330	%	4	C16:1
4	13.959	10800	3645	10.216	%	5	C18:0
5	14.468	4226	1356	3.998	%	7	C18:2
6	15.693	3812	823	3.605	%	9	C20:0
7	15.886	2504	824	2.369	%	10	C20:1
Total		105717	40226				

ภาพที่ ผ3 การทดสอบอนุกรมในการเพาะเลี้ยง *B. amyloliquefaciens* SR121 ที่ 25 องศา
 เซลเซียส

User Name : Admin
 Vial# : 5
 Sample Name : 30
 Sample ID :
 Sample Type : Unknown
 Injection Volume : 1.00
 ISTD Amount :
 Data Name : D:\Sine\test temp\30_edited.gcd
 Method Name : D:\mink\Fatty acid profiles used.gcm

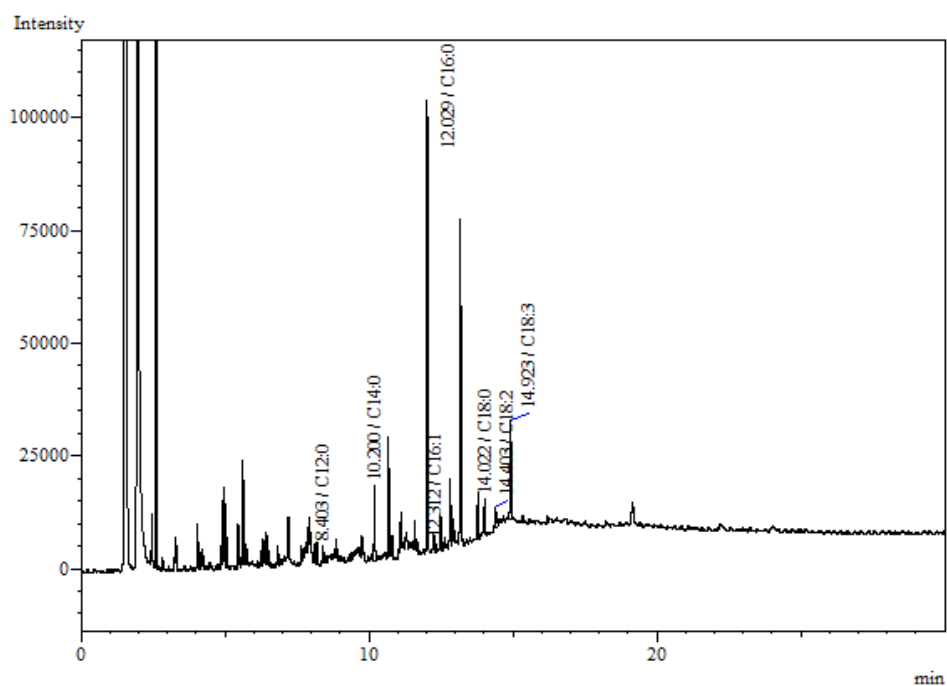


Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark ID#	Cmpd Name
1	12.026	45208	21677	48.118	%	3	C16:0
2	12.313	5899	1773	6.279	%	4	C16:1
3	13.790	35661	14881	37.957	%	5	C18:0
4	14.476	3187	1292	3.392	%	7	C18:2
5	15.039	3998	1209	4.255	%	8	C18:3
Total		93953	40832				

ภาพที่ ๗4 การทดสอบอนุกรมในการเพาะเลี้ยง *B. amyloliquefaciens* SR121 ที่ 30 องศาเซลเซียส

Analysis Date & Time : 31/03/2566 19:07:15
 User Name : Admin
 Vial# : 11
 Sample Name : 35
 Sample ID : 35
 Sample Type : Unknown
 Injection Volume : 1.00
 ISTD Amount :

Data Name : D:\Sine\test temp\35_edited.gcd
 Method Name : D:\mink\Fatty acid profiles used.gcm

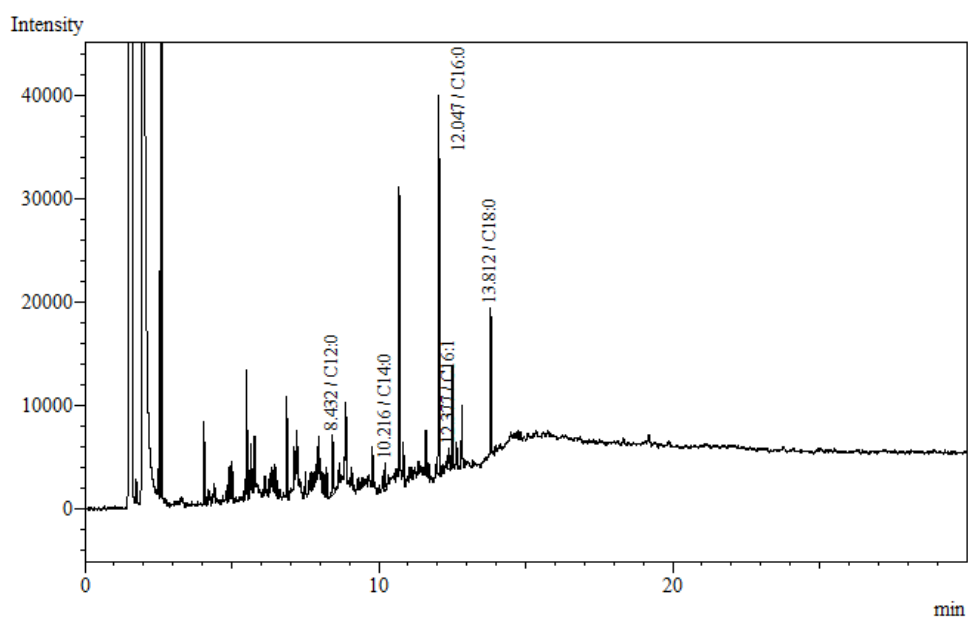


Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	8.403	8317	3542	2.256	%		1	C12:0
2	10.200	37597	16542	10.198	%	V	2	C14:0
3	12.029	224931	98450	61.008	%		3	C16:0
4	12.312	7402	2382	2.008	%		4	C16:1
5	14.022	17701	7848	4.801	%		5	C18:0
6	14.403	16401	4496	4.448	%		7	C18:2
7	14.923	56343	21837	15.282	%		8	C18:3
Total		368692	155097					

ภาพที่ ๗5 การทดสอบอนุกรมในการเพาะเลี้ยง *B. amyloliquefaciens* SR121 ที่ 35 องศาเซลเซียส

Analysis Date & Time : 13/05/2566 16:46:19
 User Name : Admin
 Vial# : 2
 Sample Name : glu1
 Sample ID :
 Sample Type : Unknown
 Injection Volume : 1.00
 ISTD Amount :

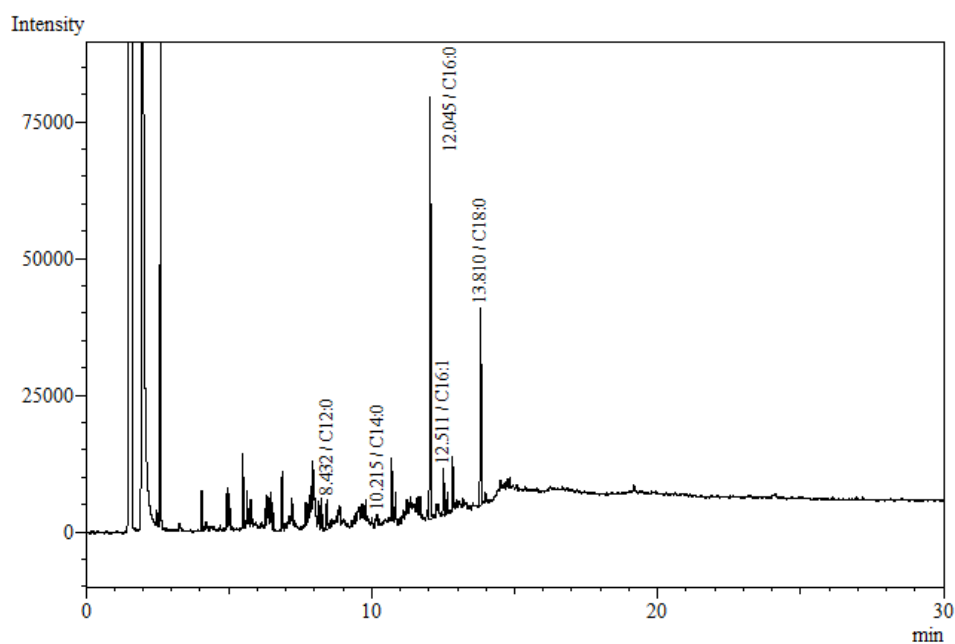
 Data Name : D:\Sine\CN\glu1_edited.gcd
 Method Name : D:\mink\Fatty acid profiles used.gcm



Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark ID#	Cmpd Name
1	8.432	15112	5750	10.346	%	1	C12:0
2	10.216	6424	2757	4.398	%	2	C14:0
3	12.047	83796	36459	57.369	%	3	C16:0
4	12.377	6982	2085	4.780	%	4	C16:1
5	13.812	33751	14117	23.107	%	5	C18:0
Total		146065	61168				

ภาพที่ ผ6 การทดสอบสัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน 1:1 ในการเพาะเลี้ยง
B. amyloliquefaciens SR121 ที่ 35 องศาเซลเซียส

Analysis Date & Time : 13/05/2566 17:23:44
 User Name : Admin
 Vial# : 3
 Sample Name : glu25
 Sample ID :
 Sample Type : Unknown
 Injection Volume : 1.00
 ISTD Amount :
 Data Name : D:\Sine\CN\glu25_edited.gcd
 Method Name : D:\mink\Fatty acid profiles used.gcm



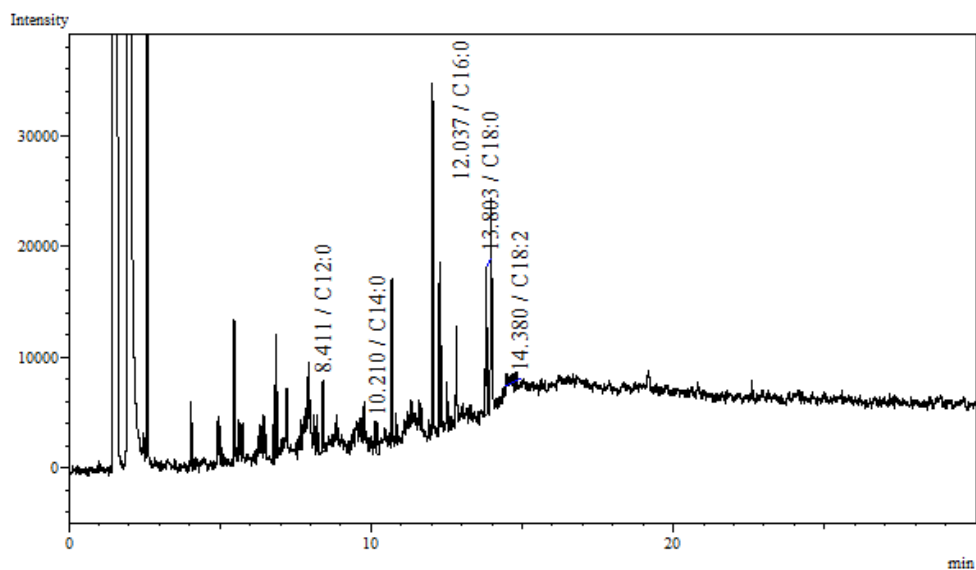
Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Unit Mark ID#	Cmpd Name
1	8.432	14647	5430	4.858 %	1	C12:0
2	10.215	3958	1843	1.313 %	2	C14:0
3	12.045	178002	76182	59.042 %	3	C16:0
4	12.511	18218	8188	6.043 %	4	C16:1
5	13.810	86658	35627	28.744 %	5	C18:0
Total		301483	127270			

ภาพที่ ผ7 การทดสอบสัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน 25:1 ในการเพาะเลี้ยง

B. amyloliquefaciens SR121 ที่ 35 องศาเซลเซียส

Analysis Date & Time : 03/06/2566 14:18:23
 User Name : Admin
 Vial# : 8
 Sample Name : un-35c-pH8
 Sample ID :
 Sample Type : Unknown
 Injection Volume : 1.00
 ISTD Amount :

Data Name : D:\Sine\pH\un-35c-pH8.gcd
 Method Name : D:\mink\Fatty acid profiles used.gcm

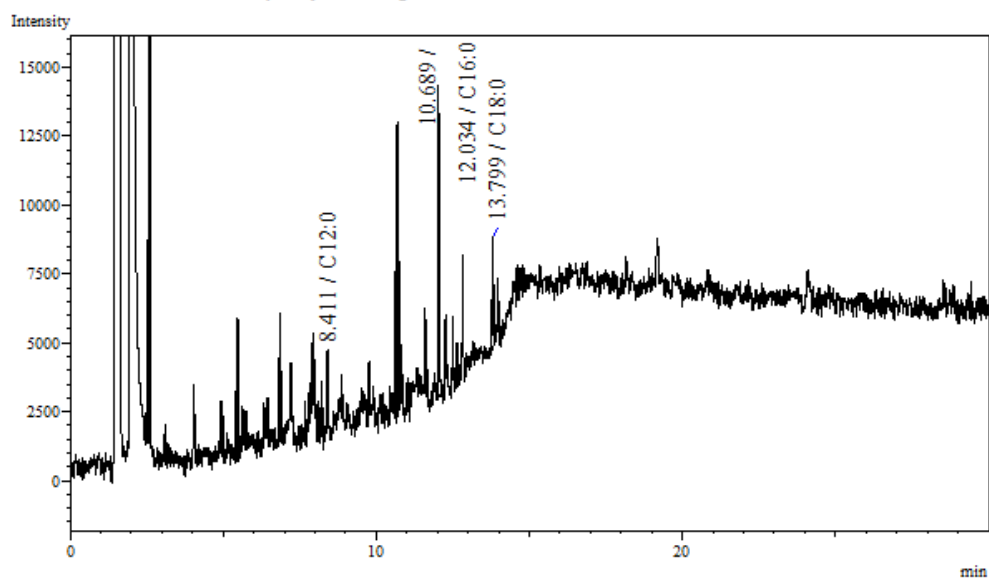


Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit Mark ID#	Cmpd Name
1	8.411	13792	6225	10.644	% 1	C12:0
2	10.210	8000	2796	6.174	% 2	C14:0
3	12.037	70813	31192	54.652	% 3	C16:0
4	13.803	34039	13251	26.271	% 5	C18:0
5	14.380	2927	892	2.259	% 7	C18:2
Total		129571	54356			

ภาพที่ ๗8 การทดสอบค่าความเป็นกรด-ด่างที่ pH8 ในอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยง

B. amyloliquefaciens SR121 ที่ 35 องศาเซลเซียส และไม่เสริมแหล่งคาร์บอน

Analysis Date & Time : 03/06/2566 13:41:00
 User Name : Admin
 Vial# : 6
 Sample Name : un-35c-pH7
 Sample ID :
 Sample Type : Unknown
 Injection Volume : 1.00
 ISTD Amount :
 Data Name : D:\Sine\pH\un-35c-pH7.gcd
 Method Name : D:\mink\Fatty acid profiles used.gcm



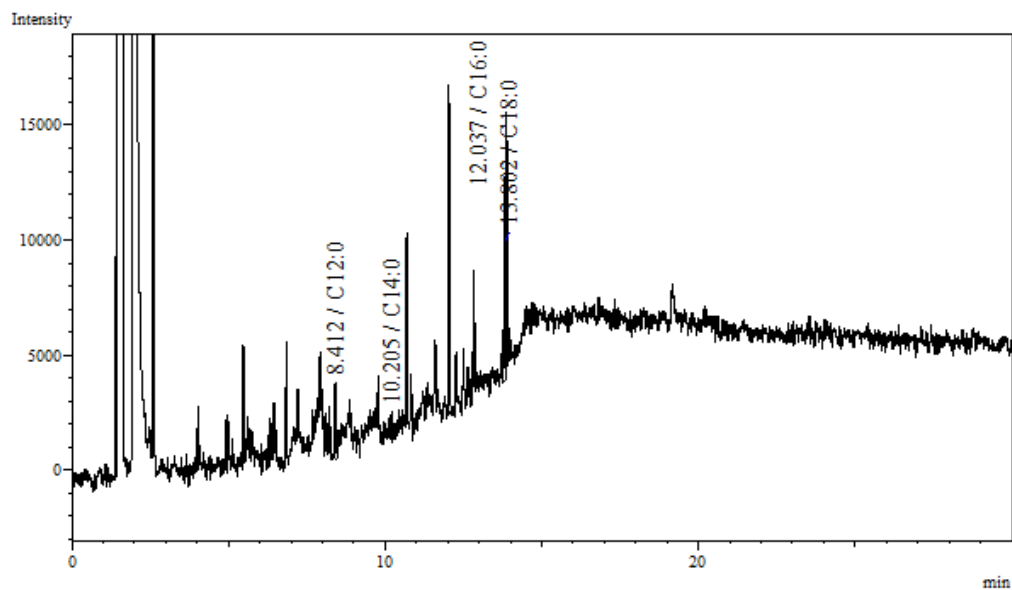
Peak#	Ret Time	Area	Height	Conc.	Unit Mark	ID#	Cmpd Name
1	8.411	5578	2777	8.242	%	1	C12:0
2	10.689	24790	10620	36.632			
3	12.034	26906	11099	39.757	%	3	C16:0
4	13.799	10400	4003	15.368	%	5	C18:0
Total		67674	28499				

ภาพที่ ๘9 การทดสอบค่าความเป็นกรด-ด่างที่ pH7 ในอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยง

B. amyloliquefaciens SR121 ที่ 35 องศาเซลเซียส และไม่เสริมแหล่งคาร์บอน

Analysis Date & Time : 03/06/2566 13:03:39
 User Name : Admin
 Vial# : 5
 Sample Name : un-35c-pH6
 Sample ID :
 Sample Type : Unknown
 Injection Volume : 1.00
 ISTD Amount :

Data Name : D:\Sine pH\un-35c-pH6.gcd
 Method Name : D:\mink\Fatty acid profiles used.gcm

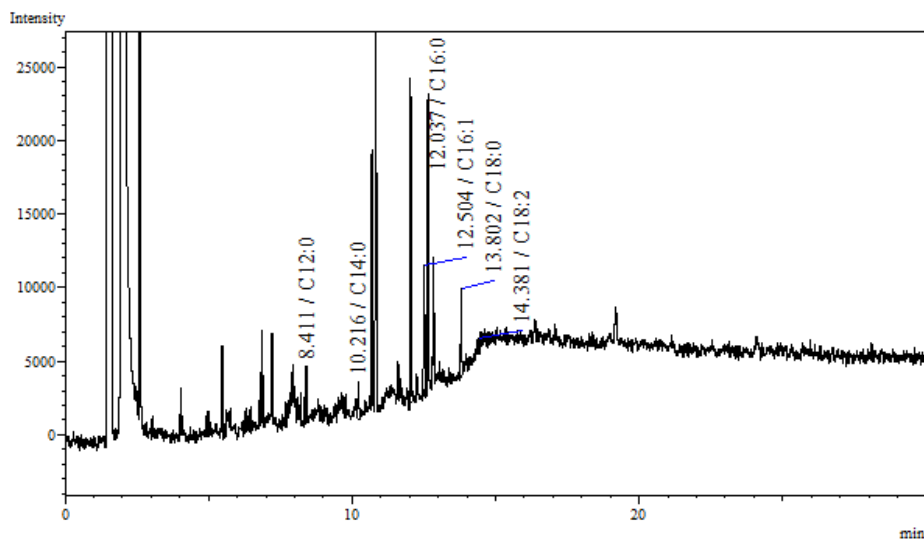


Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark ID#	Cmpd Name
1	8.412	8631	3252	14.864	%	1	C12:0
2	10.205	1963	1148	3.380	%	2	C14:0
3	12.037	32591	13925	56.126	%	3	C16:0
4	13.802	14883	5984	25.630	%	5	C18:0
Total		58068	24309				

ภาพที่ ๑๑๐ การทดสอบค่าความเป็นกรด-ด่างที่ pH6 ในอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยง

B. amyloliquefaciens SR121 ที่ 35 องศาเซลเซียส และไม่เสริมแหล่งคาร์บอน

Analysis Date & Time : 03/06/2566 12:26:17
 User Name : Admin
 Vial# : 4
 Sample Name : un-35c-pH5
 Sample ID :
 Sample Type : Unknown
 Injection Volume : 1.00
 ISTD Amount :
 Data Name : D:\Sine\pH\un-35c-pH5.gcd
 Method Name : D:\mink\Fatty acid profiles used.gcm



Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark ID#	Cmpd Name
1	8.411	8665	3774	8.407	%	1	C12:0
2	10.216	5754	2379	5.584	%	2	C14:0
3	12.037	51346	21656	49.821	%	3	C16:0
4	12.504	19535	8389	18.955	%	4	C16:1
5	13.802	14783	6003	14.344	%	5	C18:0
6	14.381	2977	947	2.889	%	7	C18:2
Total		103060	43148				

ภาพที่ ผ11 การทดสอบค่าความเป็นกรด-ด่างที่ pH5 ในอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยง
B. amyloliquefaciens SR121 ที่ 35 องศาเซลเซียส และไม่เสริมแหล่งคาร์บอน

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ณิชาภัทร วิเศษชลธาร
วัน เดือน ปี เกิด	15 กันยายน 2539
สถานที่เกิด	โรงพยาบาลร้อยเอ็ด จังหวัดร้อยเอ็ด
วุฒิการศึกษา	ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ที่อยู่ปัจจุบัน	195/1-2 หมู่ 11 ต.ขามใหญ่ อ.เมือง จ.อุบลราชธานี
ผลงานตีพิมพ์	<p>The 2nd International Conference in Integrative Medicine 2022 on Integrative Medicine (20 – 21 July 2022): Wisetchonlathan, N., Pitaktrairat, M. and Glinwong, C. 2022. C21. Metadata and the Fatty Acids Content in Thai Shrimp Paste. Journal of Health Science and Alternative Medicine. (Jul. 2022), 179–183.</p> <p>Wisetchonlathan, N., Glinwong, C. 2022. Gene and Biosynthesis of Docosahexaenoic Acid in <i>Moritella marina</i>. Thai Science and Technology Journal vol. 30 No. 4 (JulyAugust 2022): doi:10.14456/tstj.2022.40</p> <p>Wisetchonlathan, N, Pitaktrairat, M. and Glinwong, C. 2022. C21. Metadata and the Fatty Acids Content in Thai Shrimp Paste. Journal of Health Science and Alternative Medicine. (Jul. 2022), 179–183.</p>