การประชุมวิชาการ
พันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 19

"พันธุศาสตร์และจีโนมิกส์: จากการศึกษาระดับโมเลกุลสู่การประยุกต์"

National Genetics Conference 2015 (NGC2015)
"Genetics and Genomics: from Molecular Studies to Applications"

15 - 17 กรกฎาคม 2558

โรงแรมเซ็นทาราแอนคอนเวนชันเซนเตอร์ขอนแก่น จ. ขอนแก่น

www.ngc2015.kku.ac.th

การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 19
National Genetics Conference 2015 (NGC2015)

จัดพิมพ์โดย มหาวิทยาลัยขอนแก่น และสมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย
พิมพ์ครั้งที่ 1 กรกฎาคม 2558
จำนวนพิมพ์ 300 เล่ม
พิมพ์ที่ โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น
123 ถนนมิตรภาพ ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40002

ข้อมูลทางบรรณานุกรม

มหาวิทยาลัยขอนแก่น และสมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย,

การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 19.--ขอนแก่น: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2558, 428 หน้า

1. พันธุศาสตร์. 2. Genetics--วิทยาศาสตร์. I. =เรื่อง

ISBN 978-616-223-520-7

กำหนดการ

การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 19
National Genetics Conference 2015 (NGC2015)
ในหัวข้อ "พันธุศาสตร์และจีโนมิกส์: จากการศึกษาระดับโมเลกุลสู่การประยุกต์"
(Genetics and Genomics: from Molecular Studies to Applications)

วันพุธ ที่ 15 กรกฎาคม 2558 ณ ห้องคอนเวนชัน 3

08.00 – 09.00 น.	**ลงทะเบียน**
09.00 – 09.50 น.	**พิธีเปิด**
	กล่าวรายงาน โดย **นายกสมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย**
	กล่าวเปิดงาน โดย **ฯพณฯ อำพล เสนาณรงค์ องคมนตรี**
	กล่าวต้อนรับ โดย **อธิการบดีมหาวิทยาลัยขอนแก่น**
	มอบโล่เชิดชูเกียรติ โดย **ฯพณฯ อำพล เสนาณรงค์ องคมนตรี**
09.50 – 10.40 น.	**บรรยายพิเศษ** เรื่อง "พันธุศาสตร์กับความหลากหลายทางชีวภาพ"
	โดย **ศ.ดร. ละออศรี เสนาะเมือง** คณะวิทยาศาสตร์ ม. ขอนแก่น
10.40 – 11.00 น.	**—— พักรับประทานอาหารว่าง ——**
11.00 – 11.50 น.	**บรรยายพิเศษ** เรื่อง "พันธุศาสตร์ของไวรัสอีโบล่า"
	โดย **ศ.นพ. ยง ภู่วรวรรณ** คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
12.00 – 13.00 น.	**—— พักรับประทานอาหารกลางวัน ——**
13.00 – 14.30 น.	**อภิปรายกลุ่ม** เรื่อง "มะเร็งท่อน้ำดี: ผลกระทบด้านพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม"
	โดย **ศ.ดร. โสพิศ วงศ์คำ** คณะแพทยศาสตร์ ม. ขอนแก่น (ผู้ดำเนินการอภิปราย)
	รศ.นพ. ชวลิต ไพโรจน์กุล คณะแพทยศาสตร์ ม. ขอนแก่น
	อ.ดร. ชุติมา ตลับนิล สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ ม. เทคโนโลยีสุรนารี
14.30 – 14.50 น.	**—— พักรับประทานอาหารว่าง ——**
14.50 – 16.30 น.	**อภิปรายกลุ่ม** เรื่อง "พันธุศาสตร์และจีโนมิกส์กับการปรับปรุงพันธุ์พืช"
	โดย **รศ.ดร. สุวิทย์ เลาหศิริวงศ์** คณะเกษตรศาสตร์ ม. ขอนแก่น (ผู้ดำเนินการอภิปราย)
	รศ.ดร. อภิชาติ วรรณวิจิตร คณะเกษตร ม. เกษตรศาสตร์
	รศ.ดร. กมล เลิศรัตน์ คณะเกษตรศาสตร์ ม. ขอนแก่น
	รศ.ดร. วัลลา ดิฐพงษ์พิชญ์ นักวิชาการอิสระ
16.30 – 18.00 น.	ประชุมสามัญสมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย
18.00 – 22.00 น.	งานเลี้ยงรับรอง ณ ห้องคอนเวนชัน 1

วันพฤหัสบดี ที่ 16 กรกฎาคม 2558
สาขามนุษยพันธุศาสตร์ (ห้องราชพฤกษ์ 1-3)

08.30 – 09.00 น.	**บรรยายรับเชิญ** เรื่อง "การใช้เทคโนโลยีจีโนมและสเต็มเซลล์เพื่อการดูแลรักษาโรคในมนุษย์" โดย **ศ.นพ. วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์** คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
09.00 – 09.30 น.	**บรรยายรับเชิญ** เรื่อง "โรคพันธุกรรม: การกลายพันธุ์กับการตรวจกรองโรคและรักษา" โดย **ศ.พญ. ดวงฤดี วัฒนศิริชัยกุล** คณะแพทยศาสตร์ รพ. รามาธิบดี
09.30 – 10.00 น.	**บรรยายรับเชิญ** เรื่อง "การตรวจกรองกลุ่มอาการดาวน์: จากห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์สู่การประยุกต์ใช้ทางคลินิก" โดย **รศ.นพ. ถวัลย์วงศ์ รัตนสิริ** คณะแพทยศาสตร์ ม. ขอนแก่น
10.00 – 10.30 น.	**บรรยายรับเชิญ เรื่อง** "ดูหนัง ดูละคร แล้วย้อนดูพันธุศาสตร์" โดย **รศ.ดร.นพ. พรพรต ลิ้มประเสริฐ** คณะแพทยศาสตร์ ม. สงขลานครินทร์
10.30 – 10.50 น.	**—— พักรับประทานอาหารว่าง ——**
10.50 – 12.00 น.	**การนำเสนอผลงานวิจัยแบบโปสเตอร์**
12.00 – 13.00 น.	**—— พักรับประทานอาหารกลางวัน ——**
13.00 – 14.30 น.	**การนำเสนอผลงานวิจัยแบบบรรยายสาขามนุษยพันธุศาสตร์** **ประธาน** **อ.ดร.นพ. วีรยุทธ ประพันธ์พจน์** ศูนย์วิจัยพันธุศาสตร์การแพทย์ สถาบันราชานุกูล **ประธานร่วม** **รศ.ดร. บุษบา ฤกษ์อำนวยโชค** คณะแพทยศาสตร์ รพ. รามาธิบดี ม. มหิดล
13.00 – 13.15 น.	"การวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรชาวไทยอีสาน จังหวัดบุรีรัมย์ด้วยไมโครแซเทลไลท์บนออโตโซม" โดย **น.ส. กนกพร ศรีทองแดง** ม. ขอนแก่น
13.15 – 13.30 น.	"การตรวจคัดกรองตัวอ่อนด้วยเทคนิค CGH-PCR ใน เบต้า ธาลัสซีเมีย" โดย **นาย ธนรัตน์ ก. จันทราภานนท์** ศูนย์ซูพีเรีย เอ.อาร์.ที. กรุงเทพฯ
13.30 – 13.45 น.	"Functional Study of Possible Pathogenic Mutation of Hepatocyte Nuclear Factor-1α Identified in a Thai MODY Family" โดย **น.ส. ธนิตา ธัญญผล** ม. มหิดล
13.45 – 14.00 น.	"Analysis of Transmembrane Protein 120B Gene Mutation in Northeastern Thai Patients with Kidney Stone Disease" โดย **น.ส. กมลภัทร์ สุภิมล** ม. มหิดล
14.00 – 14.15 น.	"Rapid Chromosomal Abnormality Testing in Products of Conception Using BACs-on-Beads Technology" โดย **น.ส. ปรียาภรณ์ อ่อนสด** ม. มหิดล
14.15 – 14.30 น.	"Evaluation of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) as: a Potential Biomarker for Acute Kidney Injury and a Key Factor Reflecting Progression of Acute Kidney Injury" โดย **ผศ.ดร. จิราภรณ์ เตชะอุดมเดช** ม. เชียงใหม่
14.30 – 14.50 น.	**—— พักรับประทานอาหารว่าง ——**

14.50 – 15.20 น.	**บรรยายรับเชิญ** เรื่อง "ฮีโมโกลบินผิดปกติในประเทศไทย: พันธุศาสตร์โมเลกุลและการตรวจวินิจฉัย" โดย **รศ.ดร. สุพรรณ ฟู่เจริญ** คณะเทคนิคการแพทย์ ม. ขอนแก่น
15.20 – 15.50 น.	**บรรยายรับเชิญ** เรื่อง "ชีวสารสนเทศกับการศึกษาความสัมพันธ์ของยีนกับลักษณะทางพันธุกรรมแบบทั้งจีโนม" โดย **ดร. ศิษเฎศ ทองสิมา** ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
15.50 – 16.20 น.	**บรรยายรับเชิญ** เรื่อง "การศึกษาวิจัยโรคพันธุกรรมทางโลหิตวิทยาโดยใช้เซลล์ต้นกำเนิด iPSCs" โดย **ดร. เมธิจิต วัฒนพานิช** คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ม. มหิดล
16.20 – 16.35 น.	**มอบรางวัลสำหรับการนำเสนอผลงานวิจัยแบบบรรยายและโปสเตอร์ (ณ ห้องราชพฤกษ์ 1-3)**

วันพฤหัสบดี ที่ 16 กรกฎาคม 2558
สาขาพันธุศาสตร์ของพืช สัตว์ จุลินทรีย์ และอื่นๆ (ห้องราชพฤกษ์ 4-6)

08.30 – 09.00 น.	**บรรยายรับเชิญ** เรื่อง "พันธุศาสตร์สู่พัฒนาการด้านประมง" โดย **ศ.ดร. อุทัยรัตน์ ณ นคร** คณะประมง ม. เกษตรศาสตร์
09.00 – 09.30 น.	**บรรยายรับเชิญ** เรื่อง "การประยุกต์ใช้จีโนมิกส์ในการปรับปรุงพันธุ์สัตว์บก" โดย **รศ.ดร. มนต์ชัย ดวงจินดา** คณะเกษตรศาสตร์ ม. ขอนแก่น
09.30 – 10.00 น.	**บรรยายรับเชิญ** เรื่อง "จีโนมแบคเทอริโอเฟจของ *Burkholderia pseudomallei* และการนำไปใช้ประโยชน์" โดย **รศ.ดร. รศนา วงศ์รัตนชีวิน** คณะแพทยศาสตร์ ม. ขอนแก่น
10.00 – 10.30 น.	**บรรยายรับเชิญ** เรื่อง "เทคโนโลยีจีโนมิกส์เพื่อการศึกษาพันธุศาสตร์ในพืช" โดย **ดร. สิทธิโชค ตั้งภัสสรเรือง** สถาบันจีโนม ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
10.30 – 10.50 น.	**—— พักรับประทานอาหารว่าง ——**
10.50 – 12.00 น.	**การนำเสนอผลงานวิจัยแบบโปสเตอร์**
12.00 – 13.00 น.	**—— พักรับประทานอาหารกลางวัน ——**
13.00 – 14.30 น.	**การนำเสนอผลงานวิจัยแบบบรรยายสาขาพืช สัตว์ จุลินทรีย์ และอื่นๆ** **ประธาน** **รศ.ดร. กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ** คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ม. ธรรมศาสตร์ **ประธานร่วม** **รศ.ดร. สุภาวดี พุ่มพวง** คณะประมง ม. เกษตรศาสตร์
13.00 – 13.15 น.	"การพัฒนาเครื่องหมาย ILP จากยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์น้ำตาลซูโครสในอ้อย และการศึกษาโครงสร้างพันธุกรรมอ้อย" โดย **นาย ณัฐภัทร พงศ์ศิริพัฒน์** ม.ธรรมศาสตร์
13.15 – 13.30 น.	"การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *Cellulose synthase* และ ยีน *Phenylalanine ammonia-lyase* ในหญ้าเนเปียร์ (*Pennisetum* spp.)" โดย **อ.ดร. ศรัณยพร มากทรัพย์** ม.ศิลปากร
13.30 – 13.45 น.	"Cloning and Characterization of *OSB1* Gene Controlling Anthocyanin Biosynthesis from Thai Black Rice" โดย **ผศ.ดร. ช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์** ม. แม่โจ้
13.45 – 14.00 น.	"การประยุกต์ใช้เทคนิคมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์สำหรับการระบุชนิดของเนื้อสัตว์ 5 ชนิดในอาหาร" โดย **น.ส. จิราภา เดชนัครินทร์** ม.สงขลานครินทร์
14.00 – 14.15 น.	"Cytogenetics Study and Characterization of Microsatellites $d(CGG)_{10}$, $d(CA)_{15}$ and Telomeric Regions in the Genome of Blacktail Snapper, *Lutjanus fulvus* (Perciformes, Lutjanidae)" โดย **ว่าที่ร.ต.หญิง สุมาลี พิมพันธุ์** ม. ขอนแก่น
14.15 – 14.30 น.	"Anti-biofilm producing marine actinomycetes against *Escherichia coli*" โดย **นาย กันตินันท์ ลีธนศักดิ์สกุล** ม. เกษตรศาสตร์
14.30 – 14.50 น.	**—— พักรับประทานอาหารว่าง ——**

14.50 – 15.20 น.	**บรรยายรับเชิญ** เรื่อง "จีโนมิกส์เพื่อชีวิตที่ดีกว่า" โดย **รศ.ดร. วีระพงศ์ ลุลิตานนท์** คณะแพทยศาสตร์ ม. ขอนแก่น
15.20 – 15.50 น.	**บรรยายรับเชิญ** เรื่อง "การประยุกต์ใช้พันธุศาสตร์กับการศึกษานิเวศวิทยา" โดย **รศ.ดร. ไพโรจน์ ประมวล** คณะวิทยาศาสตร์ ม. มหาสารคาม
15.50 – 16.20 น.	**บรรยายรับเชิญ** เรื่อง "พันธุศาสตร์ของยุงก้นปล่องในประเทศไทย" โดย **อ.ดร. อติพร แซ่อึ้ง** คณะแพทยศาสตร์ ม. เชียงใหม่
16.20 – 16.35 น.	**มอบรางวัลสำหรับการนำเสนอผลงานวิจัยแบบบรรยายและโปสเตอร์** **(ณ ห้องราชพฤกษ์ 1-3)**

วันศุกร์ที่ 17 กรกฎาคม 2558
โปรแกรมวิชาการพันธุศาสตร์สัญจร

08.00 – 10.30 น.	เดินทางไปพิพิธภัณฑ์สิรินธร จ. กาฬสินธุ์
10.30 – 12.00 น.	เยี่ยมชมพิพิธภัณฑ์สิรินธร จ. กาฬสินธุ์
12.00 – 13.00 น.	------- รับประทานอาหารกลางวัน -------
13.00 – 14.00 น.	เดินทางไปศูนย์วัฒนธรรมภูไท ผ้าไหมแพรวา จ. กาฬสินธุ์
14.00 – 16.00 น.	เยี่ยมชมศูนย์วัฒนธรรมภูไท ผ้าไหมแพรวา จ. กาฬสินธุ์
16.00 – 19.00 น.	เดินทางกลับ จ. ขอนแก่น

ความหลากหลายของแบคทีเรียในลูกแป้งเหล้า
Bacterial Diversity of Traditional Fermentation Starters for Rice Wine

นิภาพร ก้านทอง
Nipaporn Kanthong

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก ชลบุรี
**Corresponding author; e-mail: nipaporn.kanthong@gmail.com*

บทคัดย่อ ลูกแป้งเหล้าเป็นหัวเชื้อตั้งต้นในการผลิตสุราหมักพื้นบ้าน มีแบคทีเรียปะปนอยู่ในลูกแป้งหลายชนิด ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้เพื่อจำแนกชนิดแบคทีเรียในลูกแป้งของแต่ละท้องถิ่น โดยเก็บลูกแป้งตามแหล่งผลิตจากสี่ภาคของประเทศไทย จำนวน 43 ตัวอย่าง นำลูกแป้งมาสกัดดีเอ็นเอ แล้วหาความแตกต่างของลำดับเบสของยีนตรงบริเวณยีน 16S rDNA ด้วยวิธี PCR-DHPLC ผลการวิจัยพบว่าสามารถจำแนกแบคทีเรียจากลูกแป้งเหล้าได้จำนวน 25 ชนิด ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม Lactic acid ซึ่งแบคทีเรีย *Pediococcus acidilactici* และ *Pediococcus pentosaceus* เป็นแบคทีเรียหลักที่พบในตัวอย่างจากทุกภาค แต่ในบางตัวอย่างพบจุลินทรีย์กลุ่มที่มีจำนวนน้อยและเพาะเลี้ยงทางจุลชีววิทยาได้ยาก ซึ่งกลุ่มนี้อาจเป็นตัวกำหนดรสชาติและคุณภาพของเหล้าหมักที่เป็นเอกลักษณ์ได้ ผลที่ได้จากรายงานนี้สามารถจัดทำรูปแบบกลุ่มแบคทีเรียในลูกแป้งเหล้าที่พบในประเทศไทย แล้วสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาและควบคุมกระบวนการผลิตสุราหมักของชุมชนได้ต่อไป

ABSTRACT Luk paeng is traditional Thai alcohol fermentation starter for rice wine. In this study, the microbial compositions especially bacteria associated with this fermentation starter were investigated. The molecular technique for analysis of bacterial species and complex bacterial population based on the separation PCR-amplified 16S rDNA by DHPLC. From 43 starter samples, 25 species of bacteria were identified. The bacterial microflora of starters was highly variable in species composition and dominated by lactic acid bacteria (LAB). The major LAB that have been found were *Pediococcus acidilactici and Pediococcus pentosaceus*. Uncultured bacteria were also detected in some starter samples. These groups might be play an important role in distinguished flavor and quality of rice wine. These findings of bacterial compositions in Luk paeng could be used as a database to further develop a more controlled fermentation process of Luk paeng conducted in local Thai community

คำสำคัญ: ลูกแป้งเหล้า, 16S rDNA, ความหลากหลายของแบคทีเรีย
Keywords: alcohol fermentation starter, 16S rDNA, bacterial diversity

บทนำ

ลูกแป้งเหล้าเป็นหัวเชื้อตั้งต้นในการผลิตสุราพื้นบ้าน จำพวกสุราแช่พื้นเมือง เช่น น้ำขาว อุ และ สาโท กับสุรากลั่น เช่น เหล้า ไทยมีสูตรในการทำลูกแป้งที่แตกต่างและเป็นความลับกันตามท้องถิ่น ส่วนผสมหลักเป็นแป้งข้าวเจ้าผสมกับสมุนไพร เชื่อกันว่าความแตกต่างกันของปริมาณและชนิดของสมุนไพรที่ใช้ในสูตรการทำลูกแป้ง ทำให้รสชาติและคุณภาพของเหล้าหมักที่ได้แตกต่างกันด้วย

ลูกแป้งเหล้าของไทย มีจุลินทรีย์อยู่สองกลุ่มหลักที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ คือ กลุ่มเชื้อราและยีสต์และมีกลุ่มแบคทีเรีย โดยในระหว่างกระบวนการผลิตลูกแป้งอาจมีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ได้จากสภาพแวดล้อม กลิ่นและรสของเหล้าที่เป็นผลพลอยได้จากการหมัก โดยกลิ่นและรสที่พิเศษมักพบในการหมักด้วยลูกแป้งตามธรรมชาติ จึงทำให้ลูกแป้งเหล้าที่ผลิตชุมชนยังคงมีศักยภาพในการผลิตเหล้าพื้นเมืองที่แสดงเอกลักษณ์ของแต่ละท้องถิ่น

การจำแนกจุลินทรีย์ด้วยการเพาะเลี้ยง เป็นวิธีพื้นฐานที่นิยมใช้กันมานาน แต่วิธีนี้มีข้อจำกัดจากปริมาณของจุลินทรีย์ที่ปะปนและการเลือกใช้อาหารคัดเลือก เพราะผลที่จำแนกได้จะเป็นจุลินทรีย์ชนิดที่มีมาก หรือจุลินทรีย์ที่คาดหวัง จนมีการพัฒนาเทคนิคด้านอณูพันธุศาสตร์ มีการประยุกต์เทคนิค PCR-RFLP, RAPD, DGGE [1-5] และ PCR-DHPLC [6-8] ทำให้ได้ข้อมูลด้านพันธุกรรมที่สามารถจำแนกสายพันธุ์ที่มีรูปร่างลักษณะใกล้เคียงกัน ตรวจพบการกลายพันธุ์และความหลากหลายของจุลินทรีย์ สามารถพบแบคทีเรียหรือจุลินทรีย์กลุ่มที่ปะปนในจำนวนน้อย หรือกลุ่มที่เจริญได้ดีในบางสภาวะและเพาะเลี้ยงด้วยทางจุลชีววิทยาได้ยาก

ดังนั้นการศึกษานี้เพื่อหาความหลากหลายและจำแนกชนิดของแบคทีเรียในลูกแป้งของแต่ละท้องถิ่นด้วยเทคนิคและวิธีด้านอณูพันธุศาสตร์ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาและควบคุมกระบวนการผลิตลูกแป้งของไทยต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างลูกแป้งเหล้า

เก็บตัวอย่างลูกแป้งเหล้าจากแหล่งที่ผลิต หรือ โรงงานสุราชุมชน จากภาคเหนือ กลาง ตะวันออกเฉียงเหนือ และตะวันออก เก็บลูกแป้งไว้ในถุงพลาสติกที่ปิดสนิท แล้วรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

2. การจำแนกชนิดจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค PCR-DHPLC

2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากลูกแป้งเหล้า

นำตัวอย่างลูกแป้งมาบดให้ละเอียด ชั่งลูกแป้งที่ป่นแล้วจำนวน 1 กรัมนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุด Soil DNA isolation kit (Favorgen Biotech Corporation, Taiwan) ตามวิธีที่บริษัทแนะนำ เก็บดีเอ็นเอที่สกัดไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

สำหรับการความหลากหลายและจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่อยู่ในลูกแป้ง ใช้วิธีการหาความแตกต่างของยีน V3 ของ 16S rRNA ทำ PCR รอบแรกด้วยไพรเมอร์ 27F (5' –AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') กับ 1492R (5'–GGCTACCTTGTTACGACTT-3') แล้วนำ PCR product มาเจือจาง 100 เท่า เพื่อใช้เป็น แม่แบบสำหรับ Nested PCR ด้วยไพรเมอร์ 338f(F)$^{+}$ (5'–CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3') และ 518r(R) (5'–ATTACCGCGGCTGCTGG-3') [1] แล้วนำ PCR products ไปแยกความแตกต่างด้วยเทคนิค DHPLC

2.3 การแยกความแตกต่าง PCR product โดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC)

การวิเคราะห์ความแตกต่างของ PCR product โดย DHPLC (WAVE™ Nucleic Acid Fragment Analysis System; Transgenomic Inc., CA, USA) ใช้หลักการของ ion-pairing reverse phase chromatography โดยมี stationary phase เป็น DNASep® HT cartridge (cat. no. DNA-99-3710, Transgenomic) นำ PCR products ของแต่ละตัวอย่างจำนวน 5 µL ฉีดเข้าเครื่อง โดยใช้ ACN gradient เป็น buffer B (0.1 M TEAA, 25% ACN) จากน้อยไปมากตั้งแต่ 40 ถึง 70% ผสมกับ buffer A (0.1 M TEAA) ตามส่วน โดยใช้เวลาในการผสมสารละลายเพื่อแยกสาย 8 นาที จากนั้นทำความสะอาดคอลัมน์ด้วย 100% solution D (75% ACN) เป็นเวลา 0.5 นาที แล้ว equilibrate ระบบเพื่อเตรียมฉีด PCR product ใหม่ด้วย 35% buffer B เป็นเวลา 0.5 นาที โดยตั้งค่า flow rate ไว้ที่ 0.9 มล./นาที และอุณหภูมิของ oven กำหนดไว้ที่ 61.1 และ 65°C

ผลที่ได้จากการวิเคราะห์รอบแรกนำมาใช้เป็นข้อมูลในการคัดเลือกตำแหน่งของ peak ที่สามารถใช้เป็นตัวแทนของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง แล้วนำตัวอย่างที่ถูกคัดเลือกมาแยกความแตกต่างซ้ำด้วยวิธี DHPLC เช่นเดิมโดยฉีดในปริมาตรที่มากขึ้น เก็บ fraction ของ peak ต่างๆ ที่สนใจโดยอาศัย Fragment Collector FCW-200 (Transgenomic, USA) แล้วจึงนำ fraction ไปทำให้แห้งด้วย Savant SPD1010 SpeedVac Concentrator (Thermo electron, USA) ก่อนนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

2.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจาก peak ที่สนใจและการหาลำดับเบส

เมื่อเลือก DNA fraction จาก Peak ที่สนใจ ใช้น้ำ หรือ TE ละลายตะกอน เพื่อใช้เป็นแม่แบบสำหรับการทำ PCR อีกครั้ง ซึ่งรอบนี้ใช้ไพรเมอร์ที่เป็นชุดที่ลำดับเบสแบบเดียวกับชุด Nested PCR แต่ต่างตรงไพรเมอร์ไม่มีการเพิ่ม GC เมื่อได้ PCR product แล้วจึงส่งไปหาลำดับเบส (Macrogen, Korea) จากนั้นเปรียบเทียบลำดับเบสกับฐานข้อมูลพันธุกรรมของ NCBI เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียต่อไป

ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

ความหลากหลายของแบคทีเรียในลูกแป้งเหล้าทั้งหมดที่ใช้ในการทดลองนี้ จำแนกด้วยวิธีการหาความแตกต่างของยีนช่วง V3 ของ 16S rRNA เลือกการทำแบบ Nested PCR เนื่องจากวิธีนี้เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะและเหมาะสมกับตัวอย่างที่มีจำนวนของดีเอ็นเอน้อย หรือมีความหลากหลายของยีนในช่วงที่สนใจ[9] ส่วนการใช้วิธี PCR-DHPLC เพื่อจำแนกจุลินทรีย์จากตัวอย่างในธรรมชาตินั้นเปรียบเทียบผลการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ทางจุลชีววิทยา และ PCR-DGGE พบว่าเป็นวิธีที่มีความไวในการตรวจสอบและได้ผลที่ถูกต้องและรวดเร็วกว่า [6-8]

ผลการทดลอง พบว่าจากลูกแป้งจำนวน 49 ตัวอย่าง สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ PCR product มีขนาดยาวประมาณ 200 bp ไม่พบความแตกต่างเมื่อแยก PCR product ด้วย 1% Agarose gel

เมื่อนำ PCR product เหล่านี้ไปแยกความแตกต่างของลำดับเบสในสายดีเอ็นเอด้วยเครื่อง DHPLC พบว่าเมื่อใช้อุณหภูมิของ oven ที่ 61.1°C ตัวอย่างส่วนใหญ่แยกความแตกต่างได้ จัดกลุ่ม peak ที่แตกต่างกันได้ 23 กลุ่มตัวอย่าง โดยแต่ละภาคมีรูปแบบของ peak ที่คล้ายคลึงและยังพบว่ามีรูปแบบที่พบซ้ำกันในทุกภาค เมื่อเปลี่ยนอุณหภูมิเป็น 65°C พบว่าสามารถแยกบางตัวอย่างได้ชัดเจนขึ้น จึงเลือก peak ที่อุณหภูมิ 61.1°C จำนวน 39 peak และที่อุณหภูมิ 65°C จำนวน 21 peak เป็นตัวแทนสำหรับศึกษาต่อไป

การหาลำดับเบสจาก peak ที่เป็นตัวแทนกลุ่มแล้วนำไปเทียบกับข้อมูลพันธุกรรม พบว่าลำดับเบสที่ได้มีความคล้ายคลึงกับลำดับเบสของแบคทีเรียในฐานข้อมูล ส่วนใหญ่มีความเหมือน (Identity) ถึง 79-100%

สามารถจำแนกแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ 22 ชนิดและแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงไม่ได้ 3 ชนิด ตัวอย่างดังตารางที่ 1 โดยมีแบคทีเรีย *Pediococcus acidilactici* พบมากที่สุด แบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม lactic acid bacteria และมักพบในอาหารหมักเช่น *Lactobacillus plantarum, Pediococcus pentosaceus Weissella koreensis* และ *Weissella cibaria* บางชนิดเป็นแบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนแอลกอฮอล์เป็นกรด acetic เช่น *Gluconobacter oxydans* และ *Gluconobacter morbifer* พบแบคทีเรียที่มักปะปนในสภาพแวดล้อม เช่น *Bacillus subtilis, Staphylococcus kloosii* และ *Ralstonia pickettii* ซึ่งบางตัวเป็นแบคทีเรียก่อโรค เช่น *Enterobacter cloacae* และ *Klebsiella pneumoniae* แต่กลุ่มนี้พบน้อยมาก

ตารางที่ 1 ชนิดของแบคทีเรียที่จำแนกจากลูกแป้งด้วยวิธี PCR-DHPLC

ตัวอย่าง	จังหวัด	ชนิดของแบคทีเรีย	% identity
1	ตราด	*Lactobacillus plantarum*	96
		Pediococcus pentosaceus	88
		Pediococcus acidilactici	96
		Gluconobacter oxydans	98
16	นครราชสีมา	*Weissella koreensis*	97
		Pediococcus acidilactici	94
23	เชียงราย	*Pediococcus acidilactici*	95
		Pediococcus pentosaces	89
		Enterobacter cloacae	96
32	ตาก	*Weissella koreensis*	98
		Pediococcus pentosaceus	90
44	น่าน	*Lactobacillus plantarum*	97
		Lactococcus lactis	88
45	น่าน	*Lactococcus lactis*	97
47	น่าน	*Pediococcus pentosaceus*	95

แบคทีเรีย *Pediococcus acidilactici* และ *Pediococcus pentosaceus* เป็นแบคทีเรียหลักที่พบในตัวอย่างจากทุกภาค ส่วน *Lactobacillus* sp. เป็นอีกกลุ่มที่พบได้ทั้งภาคเหนือและตะวันออก เมื่อเทียบความหลากหลายของแบคทีเรียกับลูกแป้งเหล้าในมลรัฐฝูโจว ประเทศจีน พบว่าลูกแป้งของจีนมี *Bacillus* sp.เป็นแบคทีเรียกลุ่มหลัก และพบ *Pediococcus* sp. ในบางตัวอย่างเท่านั้น [1] จึงแตกต่างกับลูกแป้งในไทย เมื่อเทียบกับหัวเชื้อการผลิต mill*et al*cohol ซึ่งเป็นเหล้าพื้นเมืองของไต้หวัน พบแบคทีเรียประเภท Lactic acid จำนวน 38 ชนิด โดยมี *Pediococcus pentosaceus* เป็นตัวหลัก [5] ซึ่งเป็นกลุ่มที่คล้ายคลึงกับในรายงานนี้ เมื่อเปรียบเทียบกับประเทศที่อยู่ใกล้เคียงกัน พบว่าลูกแป้งจากทางใต้ของเวียดนาม มีแบคทีเรียประเภท Lactic acid จำนวน 15 ชนิด [10] แต่เนื่องจากวิธีการจำแนกแตกต่างกัน จึงไม่สามารถสรุปได้ว่าลูกแป้งเหล้าของไทยมีความหลากหลายของแบคทีเรียมากกว่า

อย่างไรก็ตาม กลุ่มความหลากหลายของแบคทีเรียในลูกแป้งเหล้าของไทยมีน้อย โดยตัวอย่างของเชียงรายมีกลุ่มแบคทีเรียที่คล้ายคลึงกับตัวอย่างที่ได้มาจากภาคอีสาน หรือตัวอย่างที่มาจากจังหวัดเดียวกัน

เช่น ตาก ตราด และน่าน นั้นพบว่ามีความคล้ายคลึงกันเช่นกัน ความหลากหลายของกลุ่มแบคทีเรียที่ลดลงอาจเนื่องมาจากกระบวนการทำลูกแป้งมีการใช้ลูกแป้งเก่ามาต่อเชื้อจึงเป็นการเก็บรักษา การคัดเลือกและต่อขยายเชื้อชนิดเดิม นอกจากนั้นการอพยพและเคลื่อนย้ายแรงงาน ทำให้มีการนำลูกแป้งจากภาคหนึ่งมาต่อเชื้อสำหรับการทำลูกแป้งในอีกภาคหนึ่งซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้พบลักษณะที่คล้ายคลึงกันระหว่างภาคได้ ส่วนการใส่สมุนไพรจำพวกกระเทียมและพริกลงไปในลูกแป้ง อาจเป็นตัวการในการควบคุมชนิดและปริมาณได้ เนื่องจากสมุนไพรเหล่านี้มีรายงานว่ามีฤทธิ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้หลายชนิด [11-13]

กลุ่มแบคทีเรียที่พบในลูกแป้งของไทยยังเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ได้มาจากธรรมชาติ ยังไม่พบการเติมหัวเชื้อที่เพาะเลี้ยงสำหรับการค้า ในการศึกษานี้พบแบคทีเรียหลายชนิดที่มีในลูกแป้งเหล้ามีส่วนเพิ่มรสเปรี้ยวและสร้างกลิ่นแก่เหล้าหมัก ซึ่งการคัดเลือกชนิดและจำนวนของแบคทีเรียนั้นต้องมีการศึกษาต่อไป

สรุปผลการวิจัย

การหาความหลากหลายและจำแนกชนิดแบคทีเรียในลูกแป้งเหล้าด้วยวิธี PCR-DHPLC โดยมีลูกแป้งเหล้าจำนวน 43 ตัวอย่างจากภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลางและภาคตะวันออก พบว่าจำแนกชนิดของแบคทีเรียได้ 25 ชนิด ส่วนใหญ่เป็นกลุ่มที่ผลิต lactic acid แล้วยังพบแบคทีเรียในกลุ่มที่ผลิต acetic acid ชนิดของแบคทีเรีย ที่พบนั้นในแต่ละภาคมีความคล้ายคลึงกัน ไม่มีความแตกต่างที่สามารถใช้เป็นเอกลักษณ์ประจำถิ่นได้ โดยแบคทีเรียทั้งหมดที่พบเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีอยู่ตามธรรมชาติ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนวิจัยจากสำนักบริหารโครงการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักคณะกรรมการการอุดมศึกษา ผู้วิจัยขอขอบคุณ ดร.วรรณา ทองนพคุณ หน่วยอณูพันธุศาสตร์ สถานส่งเสริมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาลและหน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้การสนับสนุนอุปกรณ์และเครื่องมือและสถานที่ในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. Lv, X.-C., et al., *Microbial diversity of traditional fermentation starters for Hong Qu glutinous rice wine as determined by PCR-mediated DGGE.* Food Control, 2012. 28(2): p. 426-434.
2. Thanh, V.N., L.T. Mai, and D.A. Tuan, *Microbial diversity of traditional Vietnamese alcohol fermentation starters (banh men) as determined by PCR-mediated DGGE.* International Journal of Food Microbiology, 2008. 128(2): p. 268-273.
3. Jung, M.-J., et al., *Unexpected convergence of fungal and bacterial communities during fermentation of traditional Korean alcoholic beverages inoculated with various natural starters.* Food Microbiology, 2012. 30(1): p. 112-123.
4. Lv, X.-C., et al., *Yeast diversity of traditional alcohol fermentation starters for Hong Qu glutinous rice wine brewing, revealed by culture-dependent and culture-independent methods.* Food Control, 2013. 34(1): p. 183-190.
5. Chao, S.-H., et al., *The diversity of lactic acid bacteria in a traditional Taiwanese millet alcoholic beverage during fermentation.* LWT - Food Science and Technology, 2013. 51(1): p. 135-142.

6. Delavenne, E., et al., *Fungal diversity in cow, goat and ewe milk.* International Journal of Food Microbiology, 2011. 151(2): p. 247-251.
7. Chen, R., et al., *Combination of multiplex PCR with denaturing high-performance liquid chromatography for rapid detection of Mycobacterium genus and simultaneous identification of the Mycobacterium tuberculosis complex.* Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2013. 77(1): p. 53-57.
8. Barlaan, E.A., et al., *Profiling and monitoring of microbial populations by denaturing high-performance liquid chromatography.* Journal of Microbiological Methods, 2005. 61(3): p. 399-412.
9. Green, M.R. and J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition)* 4ed, ed. f. Edition. 2012, New York city, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2028.
10. Dung, N.T.P., F.M. Rombouts, and M.J.R. Nout, *Characteristics of some traditional Vietnamese starch-based rice wine fermentation starters (men).* LWT - Food Science and Technology, 2007. 40(1): p. 130-135.
11. Nadoushan, M.J., S.A. Nadoushan, and P. Owlia, *PP-014 Evaluation of in-vivo antibacterial effects of garlic aqueous extract on Salmonella typhimurium-infected Rabbits.* International Journal of Infectious Diseases, 2011. 15, Supplement 1(0): p. S49.
12. Kallel, F., et al., *Garlic (Allium sativum L.) husk waste as a potential source of phenolic compounds: Influence of extracting solvents on its antimicrobial and antioxidant properties.* Industrial Crops and Products, 2014. 62(0): p. 34-41.
13. Karuppiah, P. and S. Rajaram, *Antibacterial effect of Allium sativum cloves and Zingiber officinale rhizomes against multiple-drug resistant clinical pathogens.* Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2012. 2(8): p. 597-601.