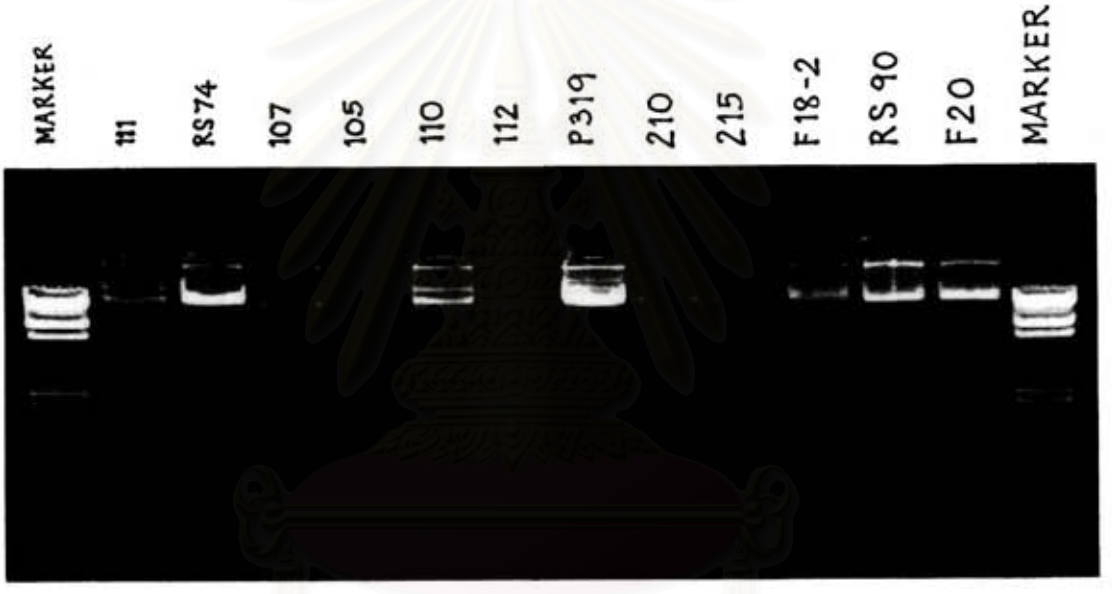
บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ผลการสกัด chromosomal DNA จากแบคทีเรียแลคติก

จากการสกัด genomic DNA จากแบคทีเรียแลคติกโดยใช้วิธีการที่ดัดแปลงมาจาก Ausubel และคณะ (1987) และ Dudley Ed (1995) ได้ผลดังรูปที่ 9 จากรูปจะสังเกตได้ว่าแถบ (band)



รูปที่ 9 Chromosomal DNA ของแบคทีเรียแลคติกstrain ต่างๆ ที่ได้จากการทำ gel electrophoresis โดยใช้ แรงดันไฟฟ้า 40 volts

ของดีเอ็นเอที่ปรากฏขึ้นของเชื้อแต่ละชนิดมีลักษณะเป็นแถบเดียวที่คมชัด (sharp band) แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอที่ได้มีลักษณะเป็นสายยาวไม่ฉีกขาดเป็นสายสั้นๆ โดยไม่มีลักษณะของการเกิด smear ให้เห็น ซึ่งการสกัดได้ chromosomal DNA ที่มีสายยาวไม่ฉีกขาดนี้มีโอกาสที่จะได้ยีนต่างๆที่อยู่บนจีโนมครอบคลุมครบทั้งจีโนมและดีเอ็นเอที่ได้นี้มีความสะอาด (clean) ซึ่งมีคุณภาพดีพอที่จะนำไปใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่ม โดยอาศัยปฏิกิริยา PCR ต่อไป

2. ภาวะและปฏิกิริยาที่เหมาะสมของ PCR ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี RAPD

2.1 ผลของปริมาณเอ็นไซม์ Taq DNA Polymerase, annealing temperature และจำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ที่มีต่อรูปแบบการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอที่ได้

จากการใช้ภาวะและปฏิกิริยาตั้งต้นที่ดัดแปลงมาจาก Hosaka (1994), Tailliez และคณะ (1996) และ Williams (1991) โดยแปรปริมาณเอ็นไซม์ Taq DNA Polymerase เป็น 5 ระดับคือ 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 unit ทั้ง 6 ภาวะของปฏิกิริยา PCR ได้ผลดังรูปที่ 10 และ 11 โดยรูปที่ 10 ก และ ข แสดงให้เห็นถึงรูปแบบการเคลื่อนที่ของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่ม โดยใช้ primer ตามการรายงานของ Tailliez และคณะ (5'-GTCCACACGG-3') โดยใช้อุณหภูมิในการ annealing ที่ 35 °C เป็นจำนวน 45 และ 35 รอบตามลำดับ จะเห็นได้ว่าการใช้จำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 45 รอบ สามารถให้รูปแบบการเคลื่อนที่ของชิ้นดีเอ็นเอของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์คือ type strain of *L. pentosus* DSM 20314, type strain of *L. plantarum* DSM 20174 และ type strain of *P. pentosaceus* DSM 20336 ที่ชัดเจนกว่าการใช้จำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 35 รอบ ที่ทุกๆ ระดับของปริมาณเอ็นไซม์ Taq DNA Polymerase (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 unit) โดยมีแนวโน้มที่ได้รูปแบบการเคลื่อนที่ที่ชัดขึ้นเมื่อปริมาณเอ็นไซม์เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ระดับ 0.6, 0.8 และ 1.0 unit จากรูป 8 ก พบว่า type strain of *L. pentosus* DSM 20314 ได้ตำแหน่ง molecular marker 3 ตำแหน่งคือ 1.9, 1.3 และ 0.9 kb type strain of *L. plantarum* DSM 20174 ได้ตำแหน่ง molecular marker 4 ตำแหน่งคือ 4.0, 2.3, 2.0 และ 1.5 kb ส่วน type strain of *P. pentosaceus* DSM 20336 ได้ตำแหน่ง molecular marker 1 ตำแหน่งคือ 2.2 kb ที่ระดับ Taq DNA Polymerase 1.0 unit เมื่อเปรียบเทียบกับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 35 รอบ (รูป 10 ข) พบว่าได้ตำแหน่ง molecular marker ไม่ชัดเจน ส่วนการใช้อุณหภูมิในการ annealing ที่ 50 °C (ดังรูปที่ 11 ก และ ข) พบว่าการใช้จำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 45 รอบ (รูป 11 ก) ไม่สามารถให้รูปแบบการเคลื่อนที่ของชิ้นดีเอ็นเอที่ชัดเจนได้ที่ทุกๆ ระดับปริมาณ Taq DNA Polymerase ส่วนการใช้จำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 35 รอบ ไม่ให้รูปแบบการเคลื่อนที่ของชิ้นดีเอ็นเอของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ (รูป 11 ข) เช่นเดียวกับการใช้อุณหภูมิในการ annealing ที่ 55 °C ซึ่งไม่ให้รูปแบบการเคลื่อนที่ของชิ้นดีเอ็นเอเช่นกันที่ทุกๆ ระดับปริมาณ Taq DNA Polymerase

จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มโดยใช้อุณหภูมิในการ annealing ที่ 35 °C เป็นจำนวน 45 รอบ โดยใช้ปริมาณ Taq DNA Polymerase 1.0 unit สามารถให้รูปแบบการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอที่ชัดเจนของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ แต่อย่างไรก็ตามการใช้ปริมาณ Taq DNA Polymerase ที่ 0.6 และ 0.8 unit ก็สามารถให้ตำแหน่งของ molecular marker ที่ชัดเจนได้เช่นกันแม้ว่าจะไม่เท่ากับที่ระดับ 1.0 unit ดังนั้นจึงนำภาวะที่ใช้เอ็นไซม์ปริมาณ 0.6, 0.8

รูปที่ 10 ผลของปริมาณ Taq DNA Polymerase 5 ระดับที่มีต่อรูปแบบการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอของเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน 3 สายพันธุ์ โดยใช้อุณหภูมิในการ annealing ที่ 35 °C

รูปที่ 11 ผลของปริมาณ Taq DNA Polymerase 5 ระดับที่มีต่อรูปแบบการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอของเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน 3 สายพันธุ์ โดยใช้อุณหภูมิในการ annealing ที่ 50 °C

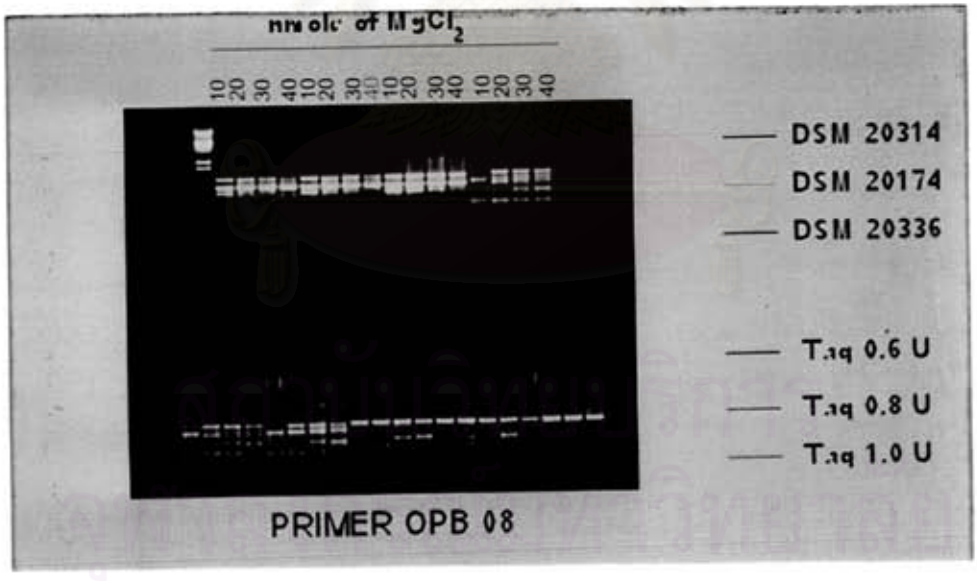
และ 1.0 unit ที่อุณหภูมิในการ annealing 35 °C โดยใช้จำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอนเอ 45 รอบมาศึกษาหาปริมาณ $MgCl_2$ เพื่อให้ได้ภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต่อไป

2.2 ผลของปริมาณ $MgCl_2$ ร่วมกับ Taq DNA Polymerase ที่มีต่อรูปแบบการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ

จากภาวะที่เหมาะสมในข้อ 2.1 นำมาศึกษาหาปริมาณ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมโดยแปรปริมาณเป็น 4 ระดับคือ 10, 20, 30 และ 40 nmol/reaction โดยผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 12 จากรูปแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าระดับของ Mg^{++} อิสระที่เป็น co-factor กับเอ็นไซม์ Taq DNA Polymerase นั้นมีผลต่อรูปแบบการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอที่ได้โดย type strain of *L. pentosus* DSM 20314 นั้นพบว่าที่ระดับปริมาณ Taq DNA Polymerase 0.6 และ 0.8 unit การใช้ $MgCl_2$ ที่ 10 nmole สามารถให้รูปแบบการเคลื่อนที่ของชิ้นดีเอ็นเอชัดเจนที่สุด ส่วนที่ระดับปริมาณเอ็นไซม์ 1.0 unit พบว่าปริมาณ $MgCl_2$ ที่ 20 nmole ก็สามารถให้รูปแบบการเคลื่อนที่ที่ชัดเจนเช่นเดียวกับที่ระดับ 10 nmole โดยปรากฏเป็น distinct band จำนวน 3 band (ซึ่งเกิดจากการที่ primer ไปสุ่มเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ณ. ตำแหน่งที่แตกต่างกัน) และจะสังเกตเห็นว่าการใช้ปริมาณเอ็นไซม์ที่ระดับ 1.0 unit สามารถให้รูปแบบการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอที่ชัดเจนกว่า 0.6 และ 0.8 unit ที่ระดับ $MgCl_2$ ที่เท่ากัน ส่วน type strain of *L. plantarum* DSM 20174 พบว่ามีความแตกต่างกันของรูปแบบการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างการใช้ปริมาณ Taq DNA Polymerase ที่ 0.6, 0.8 และ 1.0 unit เมื่อเปรียบเทียบที่รูปแบบการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ปริมาณ $MgCl_2$ ทั้ง 4 ระดับ ที่แต่ละปริมาณเอ็นไซม์ก็พบว่าได้รูปแบบที่ใกล้เคียงกันแต่มีแนวโน้มให้เห็นว่าการใช้ปริมาณเอ็นไซม์ที่ระดับ 1.0 unit ที่ระดับ $MgCl_2$ 20 และ 30 nmole ให้ผลที่ชัดเจนกว่าการใช้เอ็นไซม์ที่ระดับ 0.6 และ 0.8 unit เล็กน้อย โดยพบว่าที่ระดับเอ็นไซม์นี้การใช้ $MgCl_2$ ที่ 10 nmole ค่อนข้างได้รูปแบบการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอที่จางกว่าที่ระดับ 20, 30 และ 40 nmole โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ระดับเอ็นไซม์ 1.0 unit นั้นเกิดลักษณะ smear ขึ้น ซึ่งเกิดจากการเคลื่อนที่ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอสั้นๆ ที่ได้จากการถูกเพิ่มขนาดและปริมาณอย่างไม่สมบูรณ์ เนื่องจากปริมาณ Mg^{2+} ไม่เพียงพอกับปริมาณเอ็นไซม์ Taq DNA Polymerase และส่วน type strain of *P. pentosaceus* DSM 20336 นั้นพบว่า การใช้ปริมาณ $MgCl_2$ ทั้ง 4 ระดับคือ 10, 20, 30 และ 40 nmole ให้ distinct band เพียง 1 band โดยพบว่าที่ระดับ $MgCl_2$ 20 และ 30 nmole สามารถให้ distinct band ที่คมชัดกว่าที่ 40 nmole ส่วนที่ระดับ 10 nmole พบว่า distinct band ไม่คมชัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ระดับเอ็นไซม์ 1.0 unit จะสังเกตเห็นลักษณะ smear เช่นเดียวกับที่พบใน type strain of *L. plantarum* DSM 20174 จากผลการทดลองนี้จึงสรุปว่าการใช้ปริมาณ $MgCl_2$ ที่ระดับ 20 และ 30 nmole ที่ระดับการใช้เอ็นไซม์ 1.0 unit สามารถให้รูปแบบ

การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอที่ชัดเจนที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับ type strain of *L. pentosus* DSM 20314 นั้นจะเห็นผลได้ชัดเจนที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ type strain อีก 2 ชนิด

แต่อย่างไรก็ตามจากผลการวิจัยของ McPherson และคณะ(1991) พบว่าการใช้ปริมาณ $MgCl_2$ ในปฏิกิริยามากเกินไปจะไปมีผลในการผลักดันปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยเอ็นไซม์ Taq DNA Polymerase เร็วเกินไปทำให้เอ็นไซม์ลดความแม่นยำลงซึ่งจะเห็นได้ชัดเจนในกรณีของการเพิ่มปริมาณยีนที่ทราบลำดับเบสที่แน่นอน เมื่อนำชิ้นของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มาหาลำดับเบสจะพบว่ามีเบสบางตำแหน่งที่เกิดความผิดพลาดไม่มีลักษณะเป็นเบสคู่สม (complementary) กับเบสบนสายดีเอ็นเอต้นแบบ ดังนั้นจากผลการทดลองในที่นี้สรุปได้ว่าภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดย PCR คือการใช้ปริมาณ $MgCl_2$ ที่ระดับ 20 nmol โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ 1.0 unit มีความเหมาะสมมากที่สุด



รูปที่ 12 ผลของปริมาณ $MgCl_2$ 4 ระดับ ที่มีผลต่อการทำงานของ Taq DNA Polymerase และรูปแบบการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอของเชื้อมาตรฐาน 3 สายพันธุ์

จากผลการทดลองศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยา PCR สรุปได้ว่า ภาวะที่เหมาะสมคือ

heating up to	90 °C	1 min	
denaturation at	94 °C	1 min	
annealing at	35 °C	1 min	45 cycles amplification
extension at	72 °C	2 min	
complete nascent products at	72 °C	5 min	
hold at	28 °C		

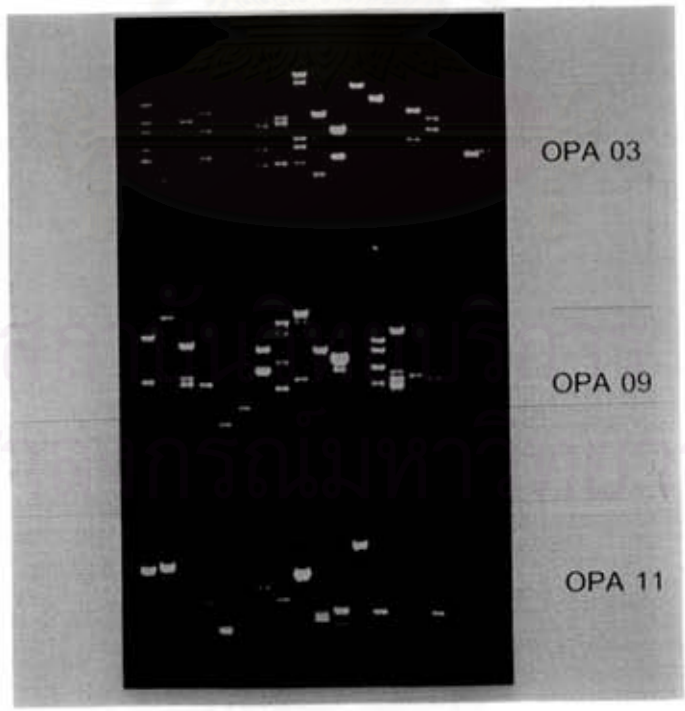
โดยปฏิกิริยา 10 µl ประกอบด้วย

- DNA template (1.5 ng/µl) 2.0 µl
- 10 X PCR buffer 1.0 µl
  (100 mM Tris-Cl; pH 8.3,
  500 mM KCl, 20 mM $MgCl_2$, 0.01% gelatin)
- 1 mM deoxynucleoside triphosphate (dNTPs) 1.0 µl
  (1 mM dATP, 1mM dCTP,
  1 mM dGTP and 1 mM dTTP)
- 2 µM arbitrary primer 1.0 µl
- Taq DNA Polymerase (5 U/µl) 0.2 µl
- distilled H_2O 4.8 µl

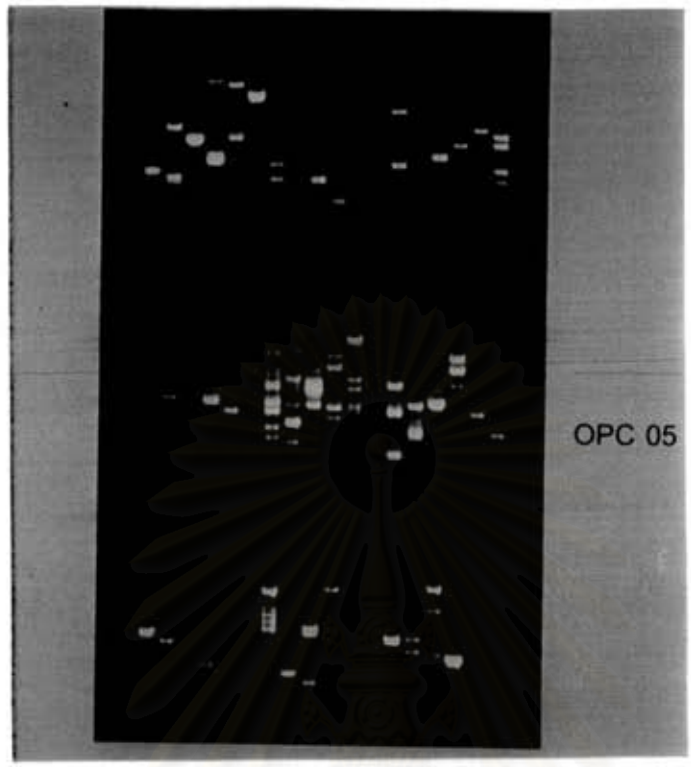
3. <u>การศึกษาหา arbitrary primer ที่เหมาะสมในการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติก</u>

จากผลการศึกษาหาภาวะและปฏิกิริยาที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดย PCR ในข้อ 2 พบว่า primer ที่ใช้ตามคำแนะนำของ Tailliez และคณะ (5'GTCCACACGG- 3') นั้นไม่สามารถให้รูปแบบการเคลื่อนที่ของชิ้นดีเอ็นเอ (polymorphism) ของ type strain of *P. pentosaceus* DSM 20336 ได้ โดยได้ distinct band เพียง 1 band ทำให้ไม่สามารถระบุถึงระดับความเหมือนหรือระดับความแตกต่างภายในสายพันธุ์ *P. pentosaceus* ได้ ดังนั้นจึงต้องนำภาวะของ PCR ดังกล่าวมาใช้ในการสรรหา arbitrary primer ที่เหมาะสมที่จะให้ polymorphism ของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ที่แตกต่างกันได้โดยทำการทดสอบ arbitrary primer ของบริษัท Operon Co;.Ltd. (U.S.A.) ซึ่งเป็น primer ที่มี

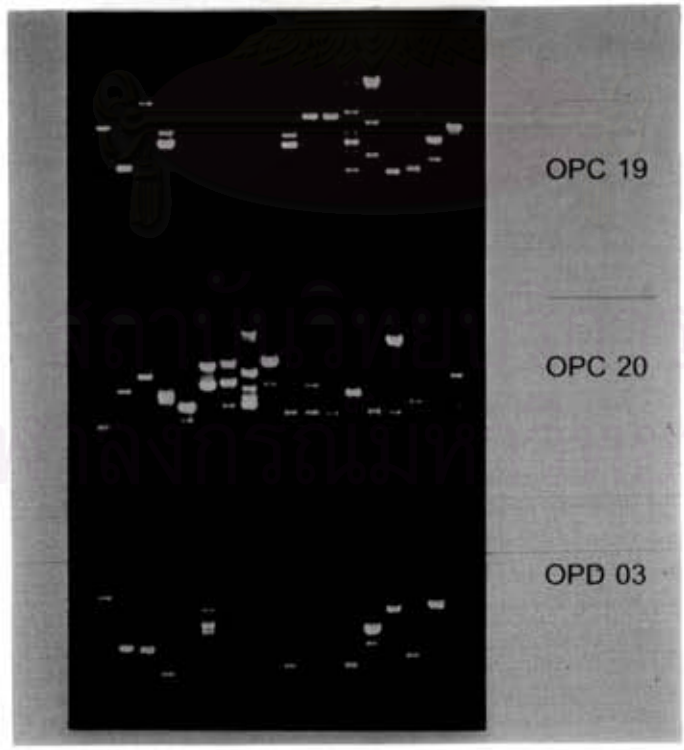
ความยาว 10 base จำนวนทั้งสิ้น 100 primers โดยผลการทดสอบ primer เหล่านี้กับ type strain ทั้ง 3 ชนิด แสดงดังรูปที่ 13-16 จากรูปพบว่า primer OPA 03 (5'-AGTCAGCCAC-3'), OPA 09 (5'-GGGTAACGCC-3'), OPA 11 (5'-CAATCGCCGT-3'), OPC 05 (5'-GATGACCGCC-3'), OPC 19 (5'-GTTGCCAGCC-3'), OPC 20 (5'-ACTTCGCCAC-3'), OPD 03 (5'-TCGCCGTCA-3'), OPE 03 (5'-CCAGATGCAC-3') และ OPE 04 (5'-GTGACATGCC-3') สามารถที่จะให้รูปแบบการเคลื่อนที่ของชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ที่แตกต่างกันของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ จากนั้นนำ primer ทั้ง 9 มาทดสอบซ้ำที่ภาวะและปฏิกิริยาเดิมพบว่าได้ primer จำนวน 4 primers ที่สามารถให้รูปแบบการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ในขณะเดียวกัน primer ทั้ง 4 สามารถทำให้เกิดตำแหน่งของ molecular marker ที่แตกต่างกันในระหว่าง primer ด้วยซึ่งนอกจากจะสามารถระบุความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ได้แล้วยังสามารถที่จะบอกได้ถึงระดับความแตกต่างภายในสปีชีส์เดียวกันด้วย ดังแสดงในรูปที่ 17



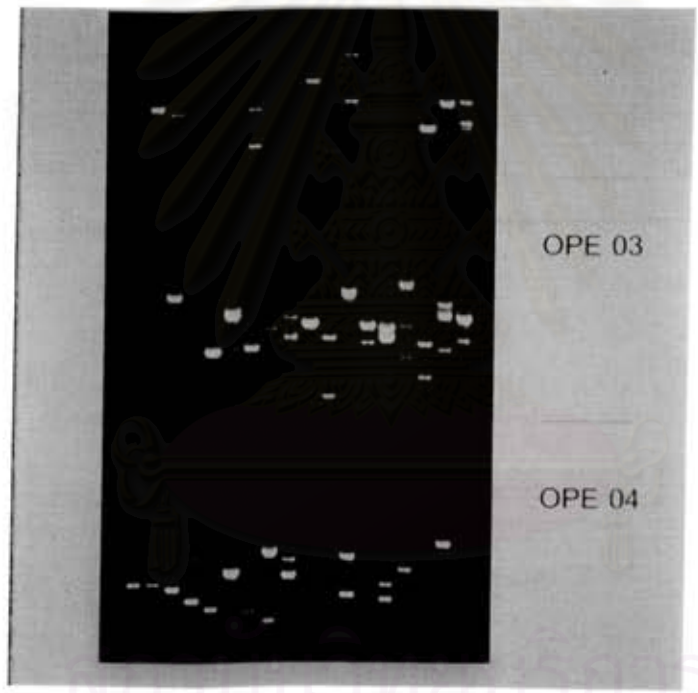
รูปที่ 13 รูปแบบการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอของเชื้อมาตรฐาน 3 สายพันธุ์ ที่เกิดจาก arbitrary primers รหัส OPA 01- OPA 18



รูปที่ 14 รูปแบบการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอของเชื้อมาตรฐาน 3 สายพันธุ์ ที่เกิดจาก arbitrary primers รหัส OPB 17-OPC 14

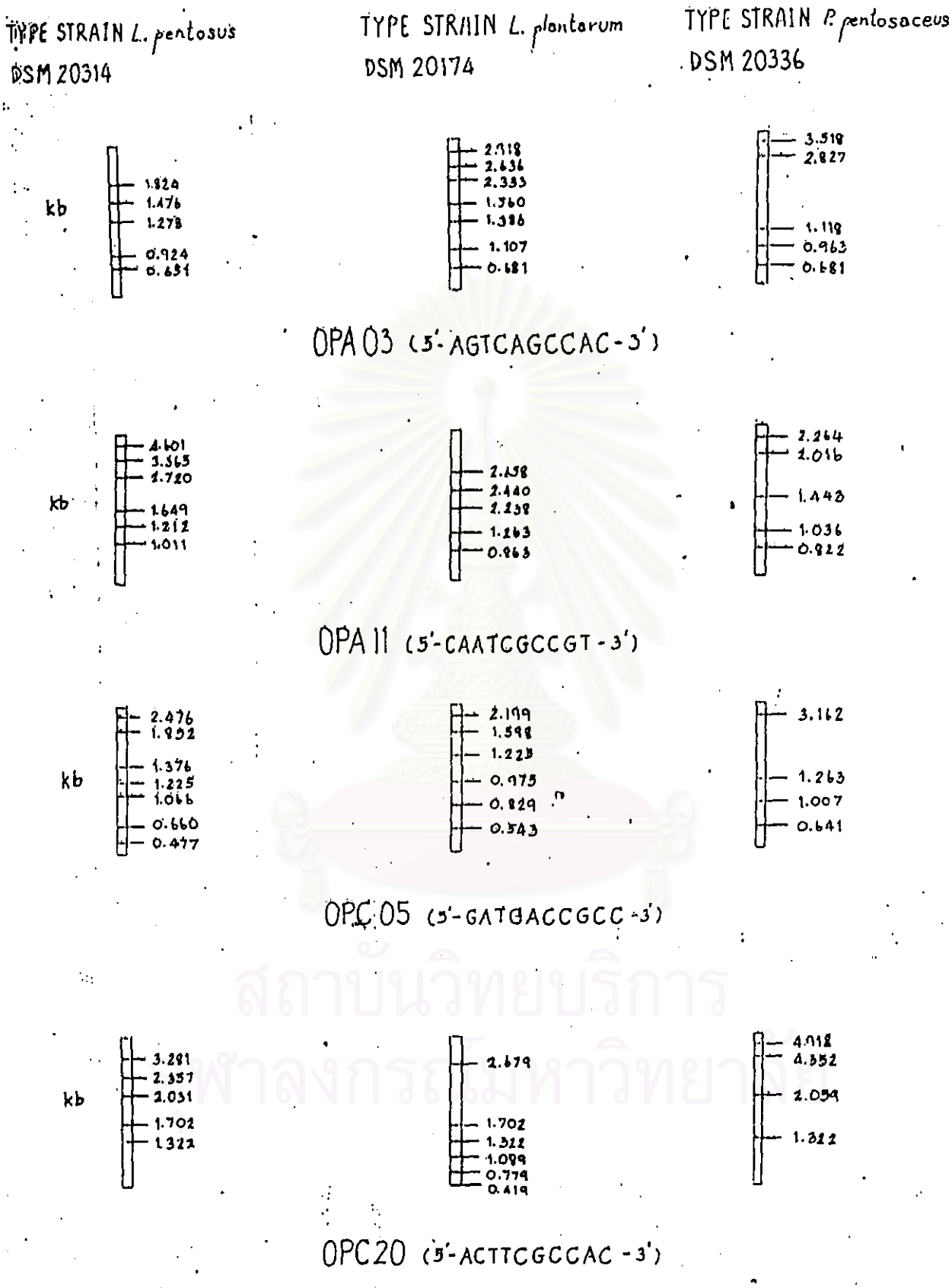


รูปที่ 15 รูปแบบการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอของเชื้อมาตรฐาน 3 สายพันธุ์ ที่เกิดจาก arbitrary primers รหัส OPC 15-OPD 12



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 16 รูปแบบการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอของเชื้อมาตรฐาน 3 สายพันธุ์ ที่เกิดจาก arbitrary primers รหัส OPD 13-OPE 10



รูปที่ 17 แสดงตำแหน่ง molecular marker ของเชื้อมาตรฐาน 3 สายพันธุ์ ที่เกิดจาก arbitrary primer ที่เหมาะสมทั้ง 4 primers

จากรูปที่ 17 แสดงให้เห็นถึงตำแหน่งของ molecular marker ที่ได้จากการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอของ type strain ทั้ง 3 สายพันธุ์ที่เกิดจาก primer OPA 03, OPA 11, OPC 05 และ OPC 20 ตามลำดับ สำหรับ OPA 03 ให้ตำแหน่งของ marker ของ *L. pentosus* 5 ตำแหน่งที่แตกต่างกันคือ 1.82, 1.47, 1.27, 0.92 และ 0.65 kb ตามลำดับ ของ *L. plantarum* 7 ตำแหน่งคือ 2.91, 2.63, 2.33, 1.56, 1.38, 1.10 และ 0.68 kb ตามลำดับ และของ *P. pentosaceus* 5 ตำแหน่งคือ 3.51, 2.82, 1.11, 0.96 และ 0.68 kb ตามลำดับ primer OPA 11 ให้ตำแหน่ง marker ของ *L. pentosus* 6 ตำแหน่งคือ 4.60, 3.36, 2.72, 1.64, 1.21 และ 1.01 kb ตามลำดับ ของ *L. plantarum* 5 ตำแหน่งคือ 2.65, 2.44, 2.23, 1.26 และ 0.86 kb ตามลำดับ ของ *P. pentosaceus* 5 ตำแหน่งคือ 2.26, 2.01, 1.44, 1.03 และ 0.82 kb ตามลำดับ primer OPC 05 ให้ตำแหน่ง marker ของ *L. pentosus* 7 ตำแหน่งคือ 2.47, 1.85, 1.37, 1.22, 1.06, 0.66 และ 0.47 kb ตามลำดับ ของ *L. plantarum* 6 ตำแหน่งคือ 2.19, 1.59, 1.22, 0.97, 0.82 และ 0.54 kb ตามลำดับ ของ *P. pentosaceus* 4 ตำแหน่งคือ 3.16, 1.26, 1.00 และ 0.64 kb ตามลำดับ และ primer OPC 20 ให้ตำแหน่ง marker ของ *L. pentosus* 5 ตำแหน่งคือ 3.28, 2.35, 2.03, 1.70 และ 1.32 kb ตามลำดับ ของ *L. plantarum* 6 ตำแหน่งคือ 2.67, 1.70, 1.32, 1.08, 0.77 และ 0.41 kb ตามลำดับ และของ *P. pentosaceus* 4 ตำแหน่งคือ 4.91, 4.35, 2.05 และ 1.32 kb ตามลำดับ

จากตำแหน่งต่างๆ ของ marker ที่เกิดขึ้น เมื่อพิจารณาภายในเชื้อสายพันธุ์เดียวกันจะพบว่า primer ทั้ง 4 ให้ค่าของตำแหน่ง marker ที่ต่างกัน เนื่องจาก primer ทั้ง 4 มีลำดับเบสที่ต่างกันจึงทำให้ตำแหน่งที่เป็นเบสคู่สมที่ primer สามารถเข้าไปจับกับสายดีเอ็นเอของเชื้อแตกต่างกันไปด้วย ดังนั้นเมื่อดีเอ็นเอถูกเพิ่มปริมาณโดยปฏิกิริยา PCR จึงทำให้ได้ดีเอ็นเอสายใหม่ที่มีขนาดและปริมาณต่างกัน ในขณะเดียวกันเมื่อพิจารณาระหว่างสปีชีส์ของเชื้อพบว่า primer แต่ละ primer ให้ค่าตำแหน่งของ marker ที่แตกต่างกันด้วย เนื่องจากเหตุผลดังกล่าวคือเชื้อต่างสายพันธุ์กันมีลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอแตกต่างกัน เป็นผลทำให้ primer ไปจับกับตำแหน่งที่เป็นเบสคู่สมได้ในตำแหน่งที่แตกต่างกัน จึงทำให้ได้ดีเอ็นเอสายใหม่ที่มีขนาดและปริมาณต่างกัน

4. <u>การจัดทำลายพิมพ์ ดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติกทั้ง 58 strains ที่แยกได้จากอาหารหมักดองพื้นเมือง</u>

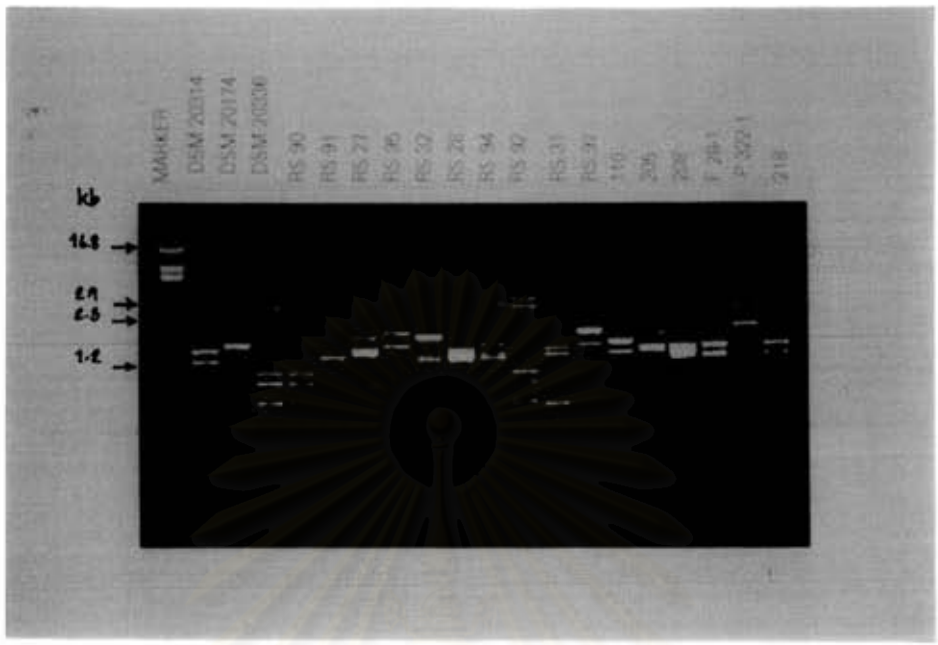
จากภาวะและปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดย PCR ในข้อ 2 และ arbitrary primer ทั้ง 4 primers ที่เหมาะสมในข้อ 3 คือ OPA 03 (5'-AGTCAGCCAC-3'), OPA 11 (5'-CAATCGCCGT-3'), OPC 05 (5'-GATGACCGCC-3') และ OPC 20 (5'-ACTTCGCCAC-3') ถูกนำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อทั้ง 58 strains โดยรูปแบบการเคลื่อนที่ของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ gel electrophoresis (1.0 % agarose, 40 volts, migration 5.0 cm and staining in ethidium bromide

(0.5 ug/ml) for 1 hr.) จะปรากฏให้เห็นเป็นแถบดีเอ็นเอขนาดโมเลกุลต่างๆตามทิศทางการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า ซึ่งเรียกรูปแบบนี้ว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอดังรูปที่ 18 ถึง 21

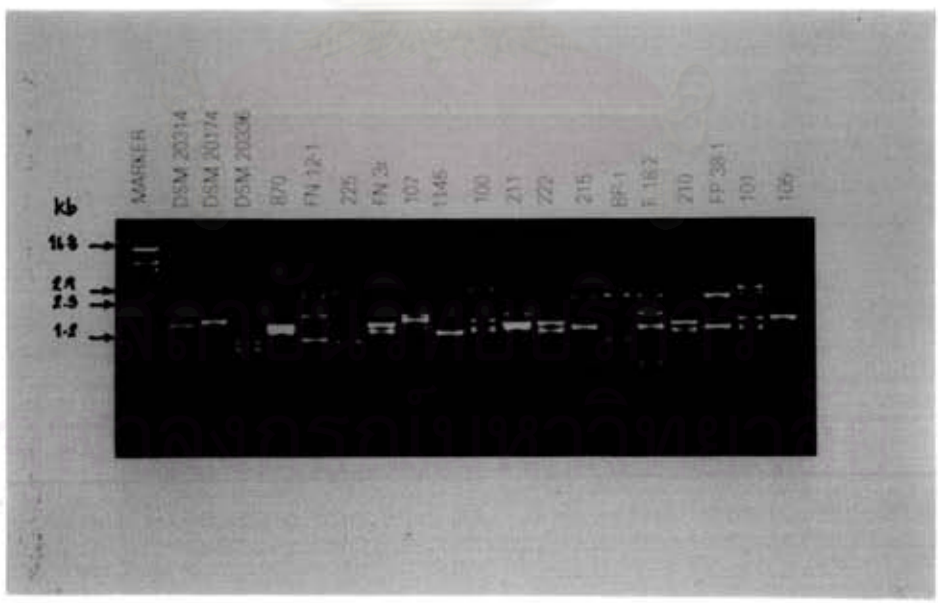
จากรูปที่ 18 พบว่า primer OPA 03 สามารถจัดจำแนกตัวอย่างแบคทีเรียทั้ง 58 strains ออกเป็น 3 กลุ่ม โดยอาศัยตำแหน่งของ marker ที่เกิดขึ้นโดยเทียบกับตำแหน่งของ marker ของ type strain ทั้ง 3 สายพันธุ์ ซึ่ง strain ที่เป็นสายพันธุ์เดียวกันจะได้ตำแหน่งของ marker ตรงกันและมีค่า M.W. เท่ากัน และเมื่อพิจารณาตำแหน่งของ marker พบว่า เชื้อที่อยู่ในกลุ่มของ *L. pentosus* มีจำนวน 12 strains คือ 222, 210, 236, F 28-1, 218, 211, 205, 215, F 18-2, RS 27, FN 3r, 208, 200, 203, RS 98, F 10-2, RS 31, FN 12-1, FP 38-1, 870, RS 28 และ A 24 แต่มีบาง strain ที่ตำแหน่งของ marker ที่ปรากฏนั้นมีลักษณะเป็น band ติดกัน 2 band คือ RS 28, 208, 870 และ A 27-2 แต่ระดับของตำแหน่ง marker ตรงกับ *L. pentosus* จึงจัดให้เป็นเชื้อในกลุ่ม *L. pentosus* ส่วนกลุ่มของ *L. plantarum* มีจำนวน 22 strains คือ 100, 862, 105, FP 48-1, 450, 111, RS 55, RS 56, RS 74, RS 93, F 33-1, 107, 110, FP 15-1, 112, RS 43, RS 44, 108, 106, P 322-1, P 46-1 และ RS 46 ในกลุ่มนี้มี 1 strain คือ FP 15-1 ที่ตำแหน่งของ marker ที่ปรากฏนั้นมีลักษณะเป็น band ติดกัน 2 band อยู่กึ่งกลางระหว่าง *L. pentosus* และ *L. plantarum* โดยมีตำแหน่งของ M.W. 1.60 และ 1.35 kb ตรงกับ type strain of *L. plantarum* และ 1 ตำแหน่งคือ M.W. 1.45 kb ตรงกับ type strain of *L. pentosus* จึงมีความเหมือนกับ *L. plantarum* มากกว่า และกลุ่มของ *P. pentosaceus* มี 7 strain คือ 225, RS 90, RS 92, N78, F 20, BP-1 และ RS 96 ซึ่งมีตำแหน่งของ marker เกือบทั้งหมดตรงกับ type strain of *P. pentosaceus* DSM 20336 และมีเชื้อจำนวน 7 strains คือ RS 32, RS 94, RS 95, RS 97, RS 91, 1145 และ 402 ซึ่งมีตำแหน่งของ marker ส่วนใหญ่ไม่ตรงกับ type strain ทั้ง 3 สายพันธุ์

รูปที่ 19 คือลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติกทั้ง 58 strains ที่ได้จากการใช้ primer OPA 11 เมื่อพิจารณาจากตำแหน่งของ marker พบว่าเชื้อที่จัดอยู่ในกลุ่มของ *L. pentosus* มีจำนวน 21 strains คือ 222, 210, 236, 218, FP 38-1, 101, 870, RS 28, 215, F 18-2, 211, F 28-1, RS 43, 205, FN 3r, 208, 203, RS 27, RS 31, F 10-2 และ RS 98 ส่วนกลุ่มของ *L. plantarum* มีจำนวน 19 strain คือ 450, 111, RS 44, RS 46, RS 55, RS 56, RS 74, RS 93, 107, 862, FP 15-1, 100, 110, RS 94, F 33-1, 106, 108, 105 และ 112 และกลุ่มของ *P. pentosaceus* มีจำนวน 7 strains คือ RS 90, 225, BP-1, N 78, RS 96, F 20 และ RS 92 และมีเชื้อจำนวน 11 strains คือ 1145, RS 32, RS 91, RS 95, P 46-1, P 322-1, RS 97, 402, A 24, FN 3s, RS 27, RS 31, F 10-2, RS 98 และ FN 12-1 ซึ่งมีตำแหน่งของ marker ส่วนใหญ่ไม่ตรงกับ type strain ทั้ง 3 สายพันธุ์

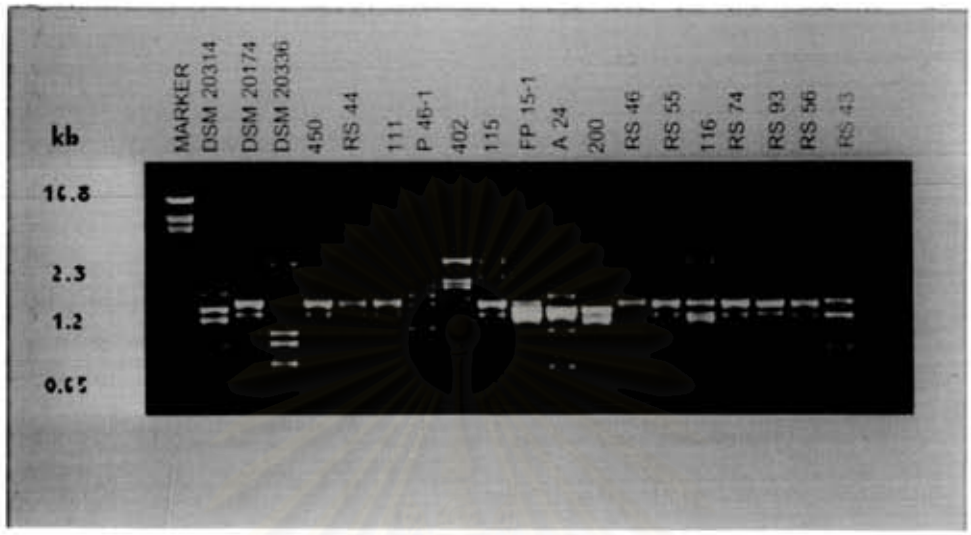
รูปที่ 20 คือลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติกทั้ง 58 strains ที่ได้จากการใช้ primer OPC 05 เมื่อพิจารณาจากตำแหน่งของ marker พบว่า เชื้อที่จัดอยู่ในกลุ่ม *L. pentosus* มีจำนวน 23 strains



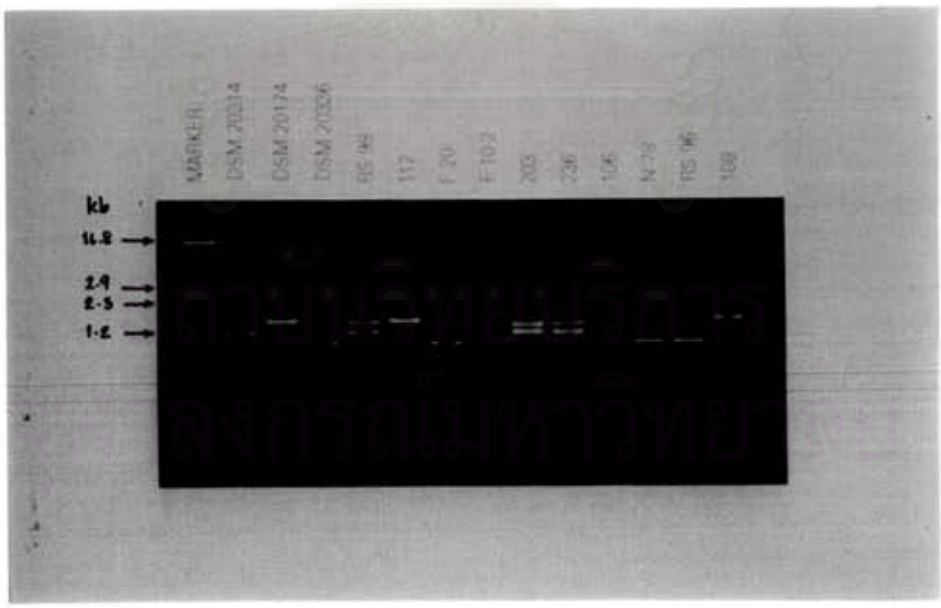
รูปที่ 18 ก ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักดองพื้นเมืองที่เกิดจากการใช้ primer OPA 03



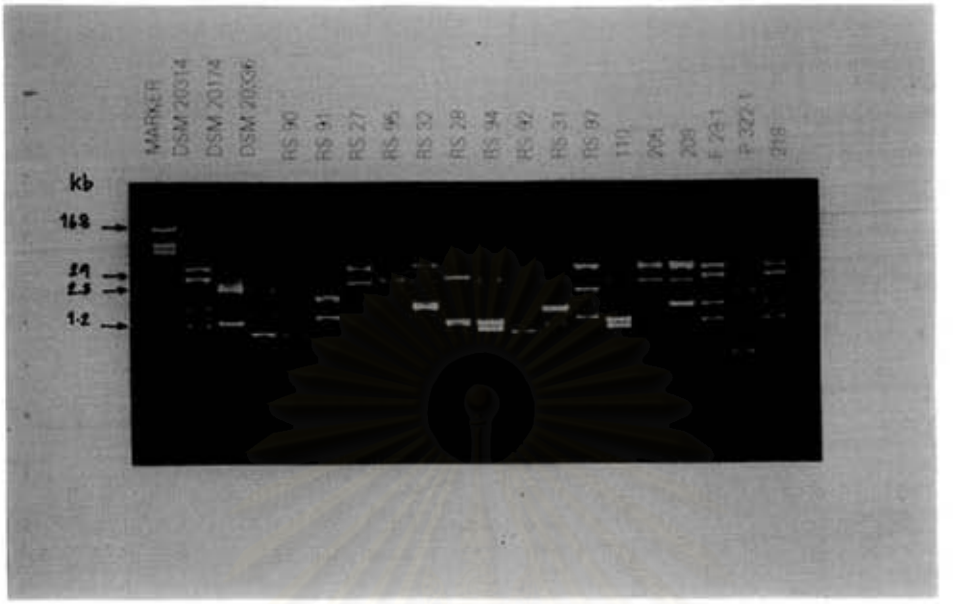
รูปที่ 18 ข ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักดองพื้นเมืองที่เกิดจากการใช้ primer OPA 03



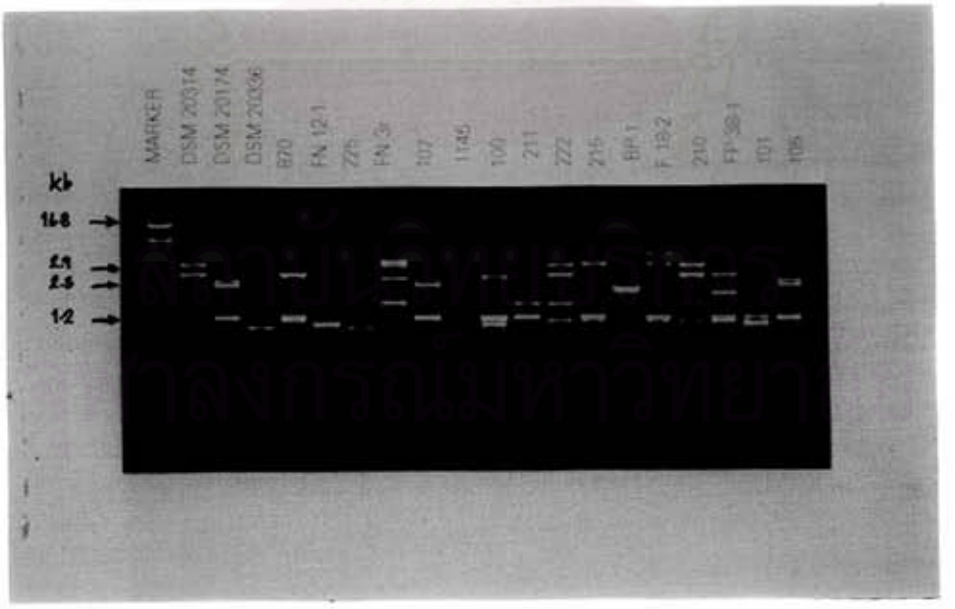
<u>รูปที่ 18 ค</u> ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักดองพื้นเมืองที่เกิดจากการใช้ primer OPA 03



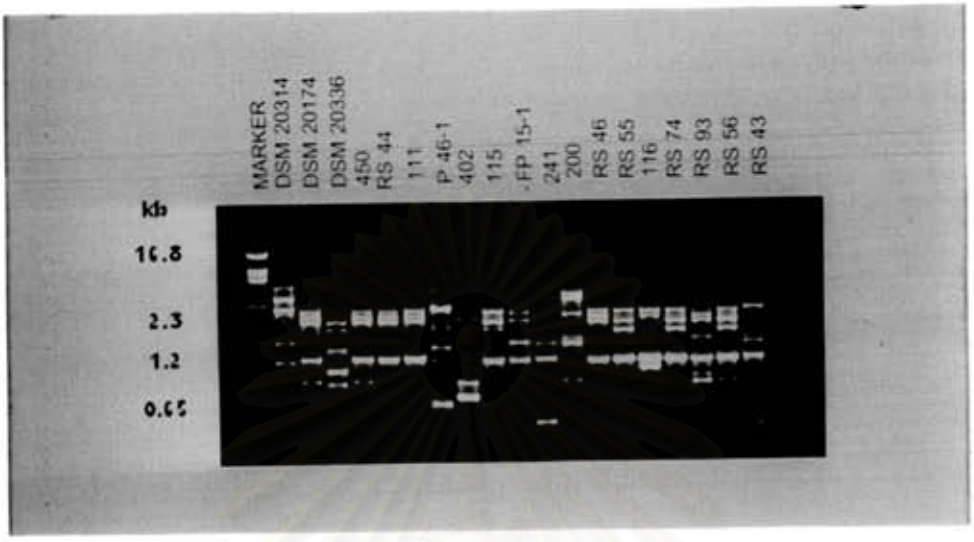
<u>รูปที่ 18 ง</u> ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักดองพื้นเมืองที่เกิดจากการใช้ primer OPA 03



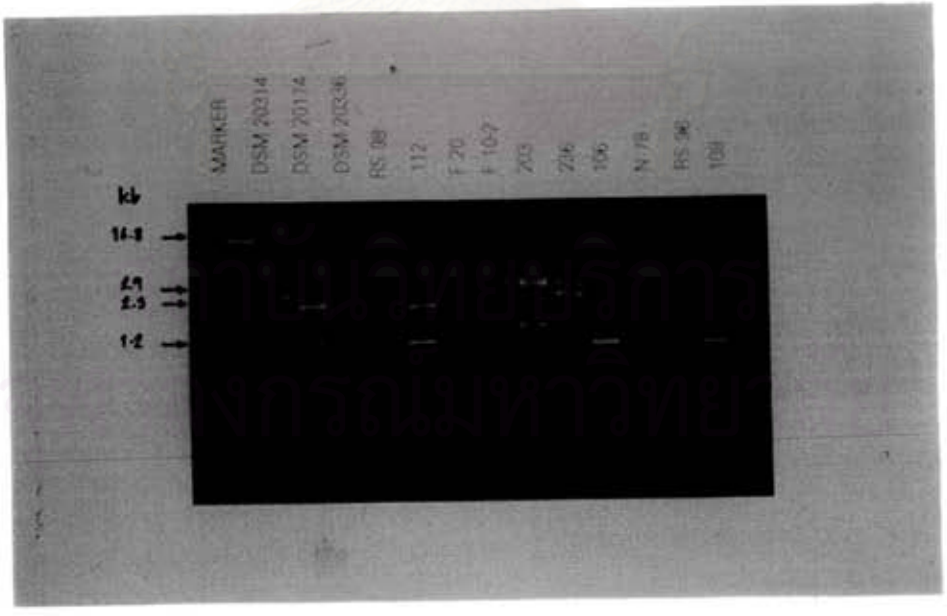
รูปที่ 19 ก ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักดองพื้นเมืองที่เกิดจากการใช้ primer OPA 11



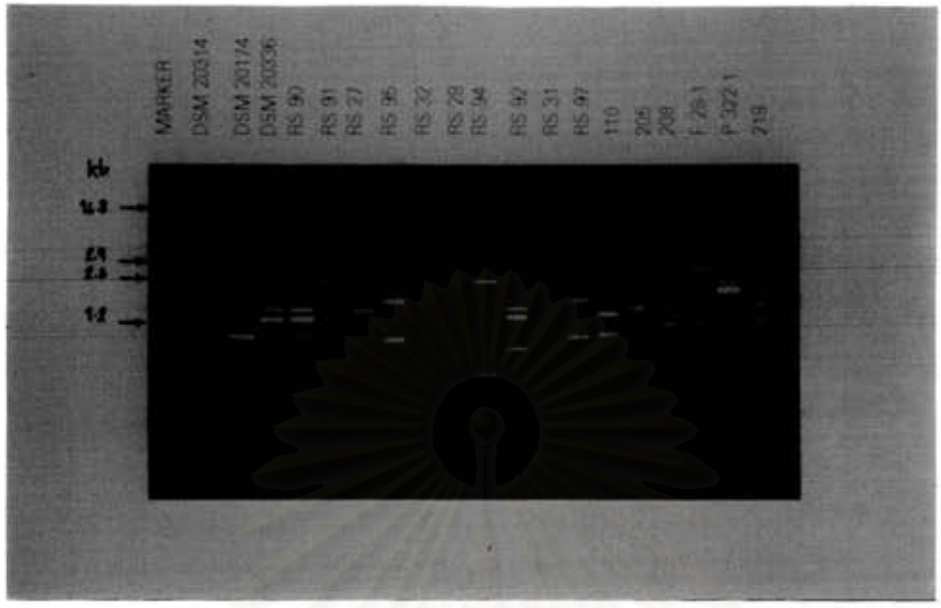
รูปที่ 19 ข ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักดองพื้นเมืองที่เกิดจากการใช้ primer OPA 11



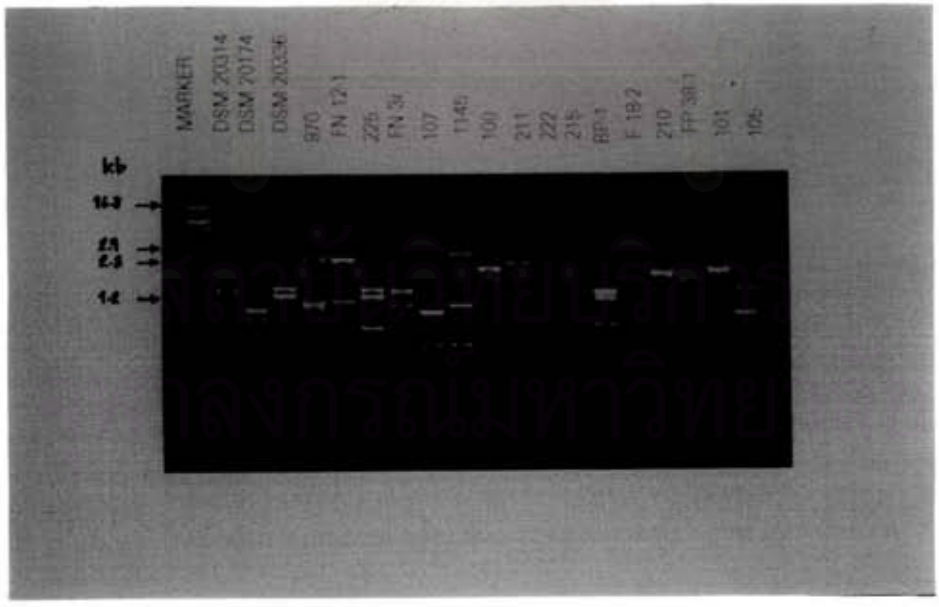
รูปที่ 19 ค ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักดองพื้นเมืองที่เกิดจากการใช้ primer OPA 11



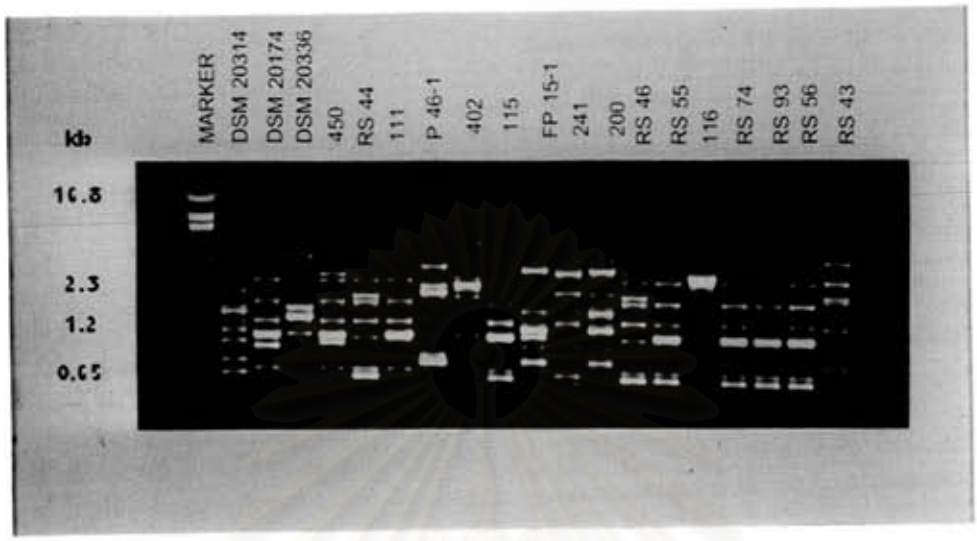
รูปที่ 19 ง ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักดองพื้นเมืองที่เกิดจากการใช้ primer OPA 11



รูปที่ 20 ก ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักดองพื้นเมืองที่เกิดจากการใช้ primer OPC 05

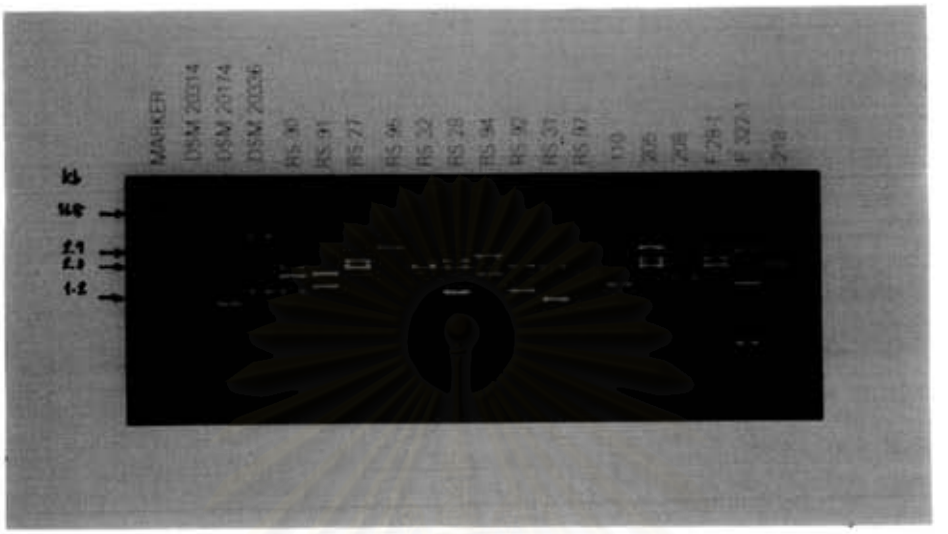


รูปที่ 20 ข ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักดองพื้นเมืองที่เกิดจากการใช้ primer OPC 05

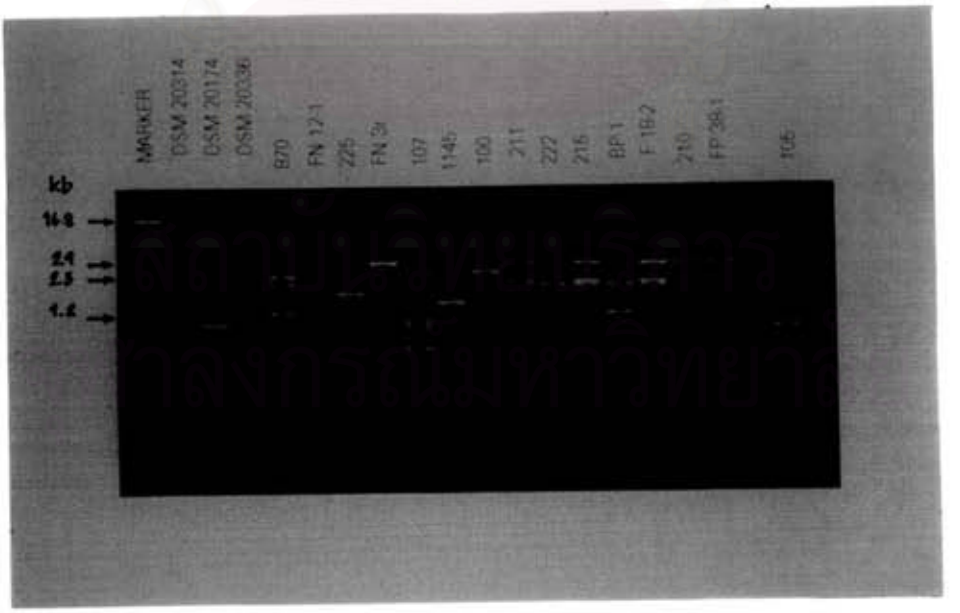


<u>รูปที่ 20 ค</u> ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักดองพื้นเมืองที่เกิดจากการใช้ primer OPC 05

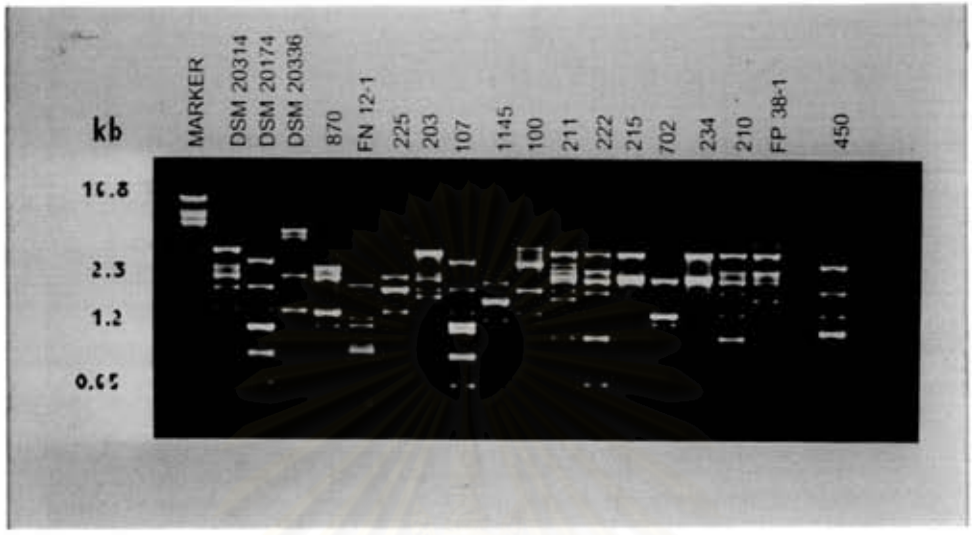
<u>รูปที่ 20 ง</u> ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักดองพื้นเมืองที่เกิดจากการใช้ primer OPC 05



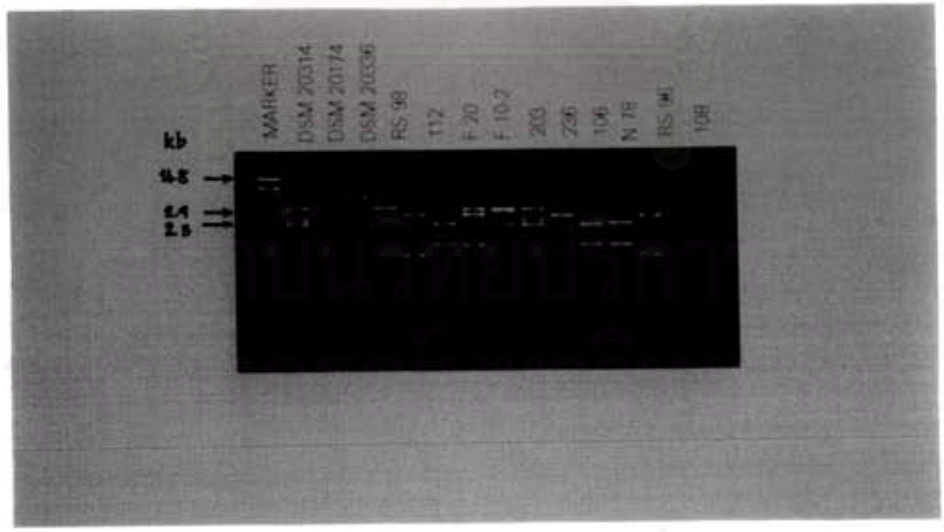
รูปที่ 21 ก ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักดองพื้นเมืองที่เกิดจากการใช้ primer OPC 20



รูปที่ 21 ข ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักดองพื้นเมืองที่เกิดจากการใช้ primer OPC 20



รูปที่ 21 ค ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักดองพื้นเมืองที่เกิดจากการใช้ primer OPC 20



รูปที่ 21 ง ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักดองพื้นเมืองที่เกิดจากการใช้ primer OPC 20

คือ 236, 200, F 28-1, 205, 1145, 870, RS 28, FN 3r, 208, 218, RS 27, RS32, 203, P 46-1, A 27-2, RS 31, A 24, 222, 215, F 18-2, 210, F 10-2 และ FP 38-1 ส่วนกลุ่มของ *L. plantarum* มี 26 strains คือ 106, 107, FP 15-1, 108, RS 94, 105, 862, RS 44, RS 46, RS 55, RS 56, RS 74, RS 93, 450, 112, RS 91, RS 43, 110, 111, RS 97, RS 95, RS 98, F 33-1, 100, 101 และ P 322-1 และกลุ่มของ *P. pentosaceus* มีจำนวน 7 strains คือ RS 90, 225, RS 92, BP-1, F 20, N 78 และ RS 96 และมีเชื้อจำนวน 2 strains คือ FN 12-1 และ 402 ซึ่งมีตำแหน่งของ marker ส่วนใหญ่ไม่ตรงกับ type strain ทั้ง 3 สายพันธุ์

รูปที่ 21 คือลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติกทั้ง 58 strains ที่ได้จากการใช้ primer OPC 20 เมื่อพิจารณาจากตำแหน่งของ marker พบว่า เชื้อที่จัดอยู่ในกลุ่มของ *L. pentosus* มีจำนวน 24 strains คือ F 28-1, F 10-2, 236, 222, 210, A 24, 211, FP 38-1, 870, RS 28, RS 31, RS 32, 215, F 18-2, 208, 203, RS 95, RS 98, 205, RS 27, 218, FN 3r, 200 และ RS 43 ส่วนกลุ่มของ *L. plantarum* มีจำนวน 19 strains คือ 862, RS 55, RS 56, RS 74, RS 93, 107, 105, FP 15-1, 112, 106, 108, 111, 110, 100, F 33-1, 101, 450, RS 94 และ RS 97 และกลุ่มของ *P. pentosaceus* มี 7 strains คือ F20, N 78, RS 96, 225, RS 90, BP-1 และ RS 92 และมีเชื้อจำนวน 8 strains คือ 1145, RS 91, FN 12-1, P 322-1, P 46-1, RS 44, RS 46 และ 402 ซึ่งมีตำแหน่งของ marker ส่วนใหญ่ไม่ตรงกับ type strain ทั้ง 3สายพันธุ์

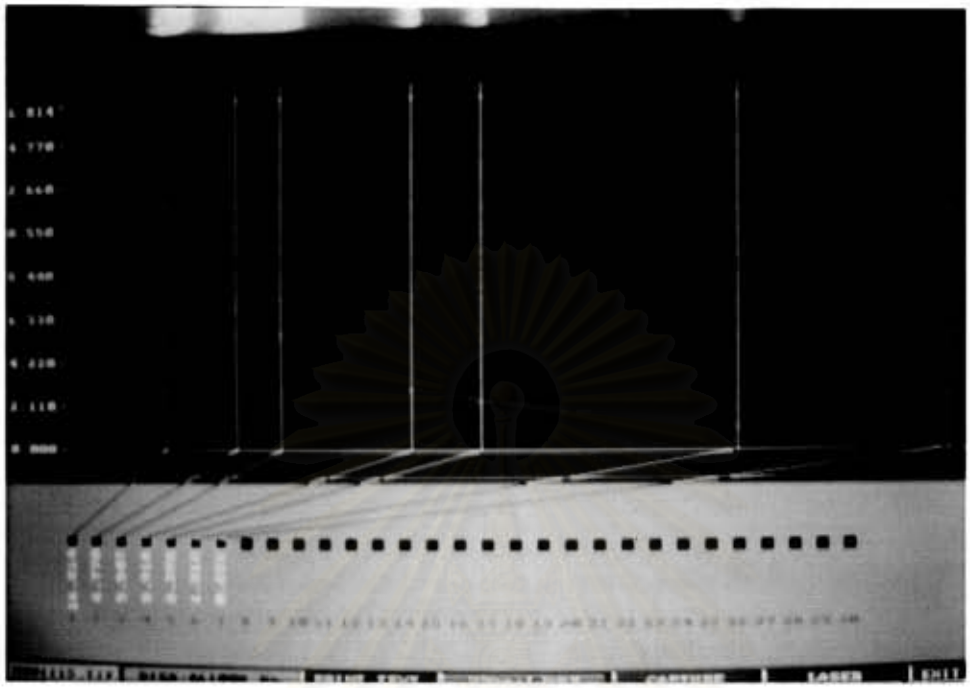
ผลจากการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดย primer ทั้ง 4 พบว่ามีเชื้อจำนวน 18 strains คือ 200, A 24, RS 98, FN 12-1, 101, RS 43, RS 32, P 46-1, RS 95, 1145, RS 44, P322-1, RS 46, RS 94, RS 91, RS 97, RS 95 และ 402 ที่ primer ทั้ง 4 จัดจำแนกได้ไม่เหมือนกันโดย strain 200 นั้น primer OPA 03, OPC 05 และ OPC 20 ให้ตำแหน่งของ marker ตรงกับ type strain *L. pentosus* ส่วน primer OPA 11 นั้น ให้ตำแหน่งของ marker ตรงกับ *L. pentosus* จำนวน 2 ตำแหน่งคือ 3.36 และ 1.71 kb และให้ตำแหน่ง marker ที่ตรงกับ type strain *L. plantarum* 2 ตำแหน่งคือ 2.46 และ 0.87 kb ทำให้ primer นี้ไม่สามารถจัดกลุ่มให้กับ A 35 ได้อย่างชัดเจน ส่วน strain A 24 นั้น primer OPA 03, OPA 11 และ OPC 20 ให้ตำแหน่งของ marker ตรงกับ type strain *L. plantarum* ส่วน primer OPC 05 นั้น ให้ตำแหน่งของ marker ที่ตรงกับ type strain *L. pentosus* จำนวน 2 ตำแหน่งคือ 1.85 และ 0.47 kb และตำแหน่ง marker ที่ตรงกับ type strain *L. plantarum* 1 ตำแหน่งคือ 1.22 kb ซึ่งตำแหน่งนี้เป็นตำแหน่งร่วมของทั้ง *L. pentosus* และ *L. plantarum* ทำให้ primer OPC 05 ไม่สามารถจัดกลุ่มให้กับ A 24 ได้อย่างชัดเจน จากเหตุผลเดียวกัน strains RS 98, 101, RS 43, RS 32, RS 95, RS 44, RS 46, RS 94, RS 91, RS 97 และ RS 95 นั้น primer แต่ละ primer ไม่สามารถจัด

กลุ่มได้อย่างชัดเจนส่วน strains FN 12-1, P 46-1, 1145, P 322-1 และ 402 นั้น พบว่าตำแหน่งของ marker ส่วนใหญ่ไม่ตรงกับ type strain ทั้ง 3 สายพันธุ์

5. การวิเคราะห์และสรุปผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากวิธี (RAPD)

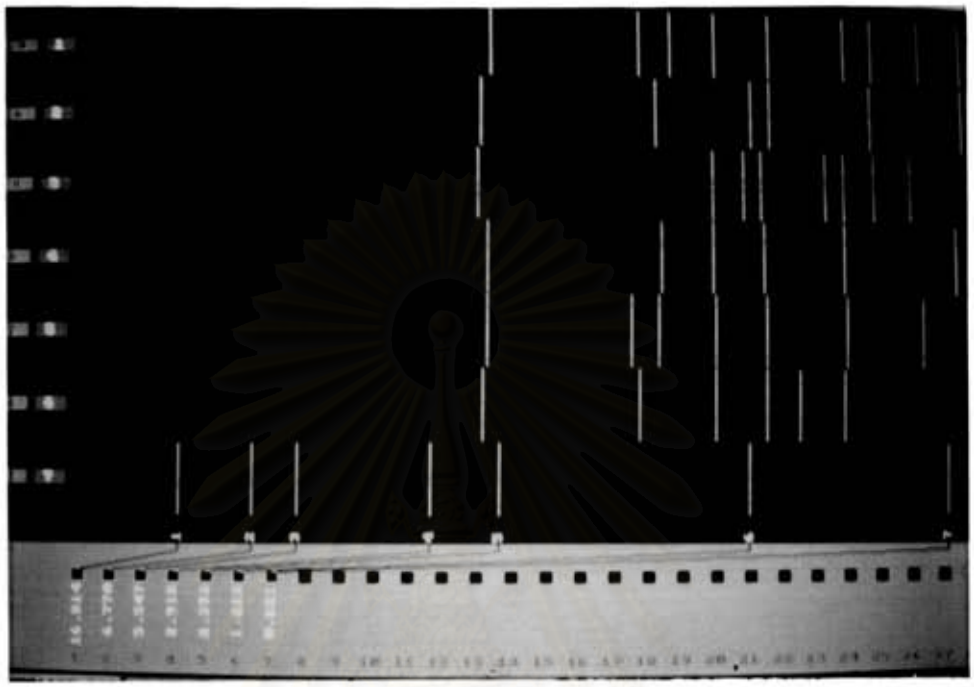
การวิเคราะห์ผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้ software "Bio-gene" นั้นในขั้นแรกโปรแกรมจะวิเคราะห์ที่ standard marker lane (Lambda DNA ตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ B*am* HI และ B*gl* II) โดยจะวัดความเข้มของตำแหน่ง band ของดีเอ็นเอทั้ง 7 band เทียบกับระยะทางที่ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ไปแล้วสร้างเป็น densitogram ออกมา (ดังรูปที่ 22) จากนั้นจึงทำการคำนวณพื้นที่ใต้ peak ซึ่งได้ผลออกมาเป็นค่าของขนาดของโมเลกุลของดีเอ็นเอ ณ. ตำแหน่งนั้น โดยในที่นี้ standard marker ที่ใช้จะให้ ค่าของ molecular marker 7 ตำแหน่งคือ 16.8, 6.5, 5.0, 2.9, 2.3, 1.2 และ 0.65 kb ตามลำดับ

รูปที่ 22 densitogram ของ standard molecular weight marker (Lambda DNA/*Bam* HI/*Bgl* II) แกน X แสดงระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบ (band) ดีเอ็นเอ แกน Y แสดงค่าความเข้มของแต่ละแถบ (band) ของดีเอ็นเอ



รูปที่ 23 standard molecular weight curve ที่ได้จาก standard molecular weight marker (Lambda DNA/*Bam* HI/*Bgl* II)
แกน X แสดงระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบ (band) ดีเอ็นเอ แกน Y แสดงค่าขนาดของดีเอ็นเอ (หน่วยเป็น kb)

จากนั้นโปรแกรมจะสร้าง standard molecular weight curve ของ standard marker ที่ใช้เป็นมาตรฐานในการเปรียบเทียบเพื่อให้ได้ค่าของตำแหน่ง molecular marker ของ lane อื่นๆ (ดังรูปที่ 23) จากนั้นจึงไปวิเคราะห์ตำแหน่งของ band ที่เป็น marker ใน lane อื่นๆ แล้วนำมาเปรียบเทียบกับ standard molecular weight curve ที่สร้างขึ้นเพื่อให้ได้ค่าของ molecular marker ของแต่ละ lane ออกมา ดังรูปที่ 24



รูปที่ 24 ตำแหน่งของ molecular marker ของแบคทีเรียแลคติกแต่ละ strain จากอาหารหมักดองพื้นเมือง
แกน X แสดงระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบ (band) ดีเอ็นเอ แกน Y แสดงรายชื่อเชื้อแต่ละ strains

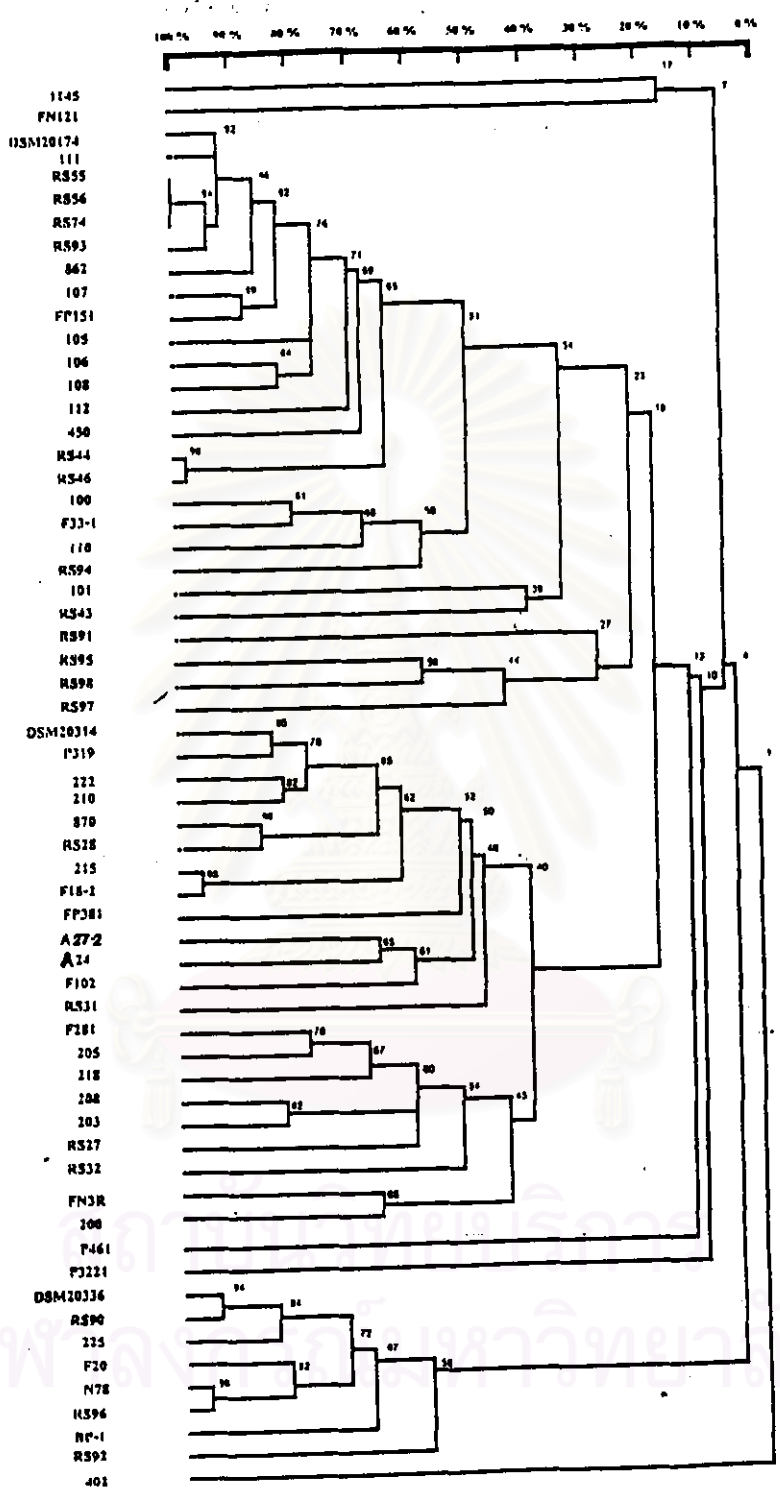
จากนั้นจึงนำค่าของ marker ที่ได้ในแต่ละ lane (marker ของเชื้อแต่ละ strain) มาหาความสัมพันธ์โดยค่า Similarity Index (S.I. = $2n_{xy}/n_x+n_y$) จากค่า S.I. ที่คำนวณได้จะคิดออกมาเป็น %S.I. แล้วแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อแต่ละ strain ออกมาในรูปแบบที่เรียกว่า dendrogram ดังแสดงในรูปที่ 25 จาก dendrogram สรุปได้ว่าแบคทีเรียแลคติกจำนวนทั้งสิ้น 58 strains ถูกแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 มีค่า S.I. อยู่ระหว่าง 23 ถึง 92 % กับ type strain of *L. plantarum* DSM 20174 ซึ่งในกลุ่มนี้มีเชื้อ 15 strains คือ 111, RS 55, RS 56, RS 74, RS 93, 862, 107, FP 15-1, 105, 106, 108, 112, 450, RS44 และ RS 46 มีค่า S.I. กับ type strain มากกว่า 65 % 4 strains คือ 100, F 33-1, 110 และ RS 94 มีค่า S.I. กับ type strain 51 % 2 strains คือ 101 และ RS 43 มีค่า S.I. กับ type strain 34 % และ 4 strains คือ RS 91, RS 95, RS 98 และ RS 97 มีค่า S.I. กับ type strain 23 % นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ RS 55, RS 56 และ RS 74 เป็นเชื้อชนิดเดียวกันโดยมีค่า S.I. 100 % หมายถึงตำแหน่งของ molecular marker ที่เกิดขึ้นของเชื้อทั้ง 3 ชนิดนี้มีค่าตรงกันทุกตำแหน่ง ส่วน strain อื่นๆมีค่า S.I.

อยู่ระหว่าง 23 ถึง 39 % กับ type strain ดูเหมือนว่าจะมีความสัมพันธุ์ในกลุ่มน้อยคือเชื้อ 101 และ RS 43 โดยมีความสัมพันธ์กันเพียง 39 % เท่านั้น ส่วนเชื้อ RS 91, RS 95, RS 98 และ RS 97 มีความสัมพันธ์กันเพียง 27 % สำหรับ RS 95, RS 98 และ RS 97 มีความสัมพันธ์กันเพียง 44 % โดยที่ RS 95 กับ RS 98 มีความสัมพันธ์กัน 58 %

กลุ่มที่ 2 มีค่า S.I. กับ type strain of *L. pentosus* DSM 20314 อยู่ระหว่าง 40 ถึง 85 % โดยกลุ่มนี้สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มย่อยโดยมี 11 strains คือ 236, 222, 210, 870, RS 28, 215, F 18-2, FP 38-1, 211, A 24 และ F 10-2 มีค่า S.I. กับ type strain อยู่ระหว่าง 50 ถึง 85 % 1 strain คือ RS 31 มีค่า S.I. กับ type strain 48 % และ 9 strains คือ F 28-1, 205, 218, 208, 203, RS 27, RS 32, FN 3r และ 200 มีค่า S.I. กับ type strain 40 % ในกลุ่มที่ 2 นี้พบว่าแต่ละกลุ่มย่อยมีความใกล้เคียงกันภายในกลุ่มมากกว่ากลุ่มแรก ยกเว้นเพียงเชื้อ 2 strains คือ FN 3r และ 200 35 ซึ่งมีความสัมพันธ์กับ strain อื่นเพียง 45 %

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยเชื้อ 7 strains คือ RS 90, 225, F 20, N 78, RS 96, BP-1 และ RS 92 มีค่า S.I. กับ type strain of *P. pentosaceus* DSM 20336 อยู่ระหว่าง 58 ถึง 94 % โดยกลุ่มนี้พบว่ามีความสัมพันธ์ภายในกลุ่มสูงมากคืออยู่ระหว่าง 58 ถึง 96 % นอกจากนี้ยังพบว่าค่าS.I. ของกลุ่มนี้มีความสัมพันธ์เพียง 4 % กับ 2 กลุ่มแรกคือ *L. plantarum* กับ *L. pentosus* ซึ่งชี้ให้เห็นว่า arbitrary primer ที่ใช้ทั้ง 4 primers คือ OPA 03 (5'-AGTCAGCCAC-3'), OPA 11 (5'-CAATCGCCGT-3'), OPC 05 (5'-GATGACCGCC-3') และ OPC 20 (5'-ACTTCGCCAC-3') สามารถแยกความแตกต่างระหว่างจีนัส Lactobacilli กับ Pediococci ได้

กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยเชื้อ 4 strains คือ 1145, FN 12-1, P 322-1 และ P 46-1 ซึ่งไม่สามารถระบุจีนัสและสปีชีส์ได้ โดยมีค่า S.I. กับ type strain of *L. plantarum* DSM 20174 และ type strain of *L. pentosus* DSM 20314 ที่ 7 %, 7 %, 10 % และ 13 % ตามลำดับ และ 4 % กับ type strain of *P. pentosaceus* DSM 20336 สำหรับ *L. sake* 402 ซึ่งใช้เป็น negative control มีความสัมพันธ์เพียง 1 % กับ type strain ทั้ง 3 ชนิด



รูปที่ 25 Dendrogram แสดงความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมักดองพื้นเมืองทั้ง 58 strains ที่เกิดจากการรวมตำแหน่ง molecular marker ของ primer OPA 03, OPA 11, OPC 05 และ OPC 20

6. <u>เปรียบเทียบผลการจัดจำแนกสายพันธุ์เชื้อทั้ง 58 strains ที่ได้จากวิธี RAPD กับวิธีทางชีวเคมี (biochemical tests)</u>

ตารางที่ 6 แสดงผลการทดสอบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน 10 ชนิด ระหว่างแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นท่อน โดยคุณสมบัติสำคัญของ *L. pentosus* และ *L. plantarum* ซึ่งผนังเซลมี meso-diaminopimelic acid เป็นองค์ประกอบคือ สามารถใช้น้ำตาล ribose ได้ จากผลการทดลองพบว่าเชื้อทุก strains สามารถใช้น้ำตาล ribose ได้ ยกเว้นเพียง strain 200 ซึ่งถ้าเปรียบเทียบกับผลการทดลองที่ได้จากวิธี RAPD ก็พบว่าจัดอยู่ในกลุ่ม *L. pentosus* แต่มีค่า %S.I. กับ type strain ที่ระดับต่ำเพียง 40% ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าไม่ใช่สปีชีส์ *L. pentosus* เมื่อพิจารณาถึงความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดอื่นๆ เพื่อจัดจำแนกระหว่าง *L. pentosus* และ *L. plantarum* (ตามหลักการของ Hammers และคณะ 1991) พบว่ามีคุณสมบัติ 2 ประการที่แตกต่างกันคือ *L. pentosus* สามารถใช้ glycerol และน้ำตาล xylose ได้ แต่ *L. plantarum* ไม่มีคุณสมบัติดังกล่าวนี้ ส่วนน้ำตาลที่เหลืออีก 7 ชนิดพบว่าทั้ง 2 สปีชีส์มีคุณสมบัติที่ใกล้เคียงกันมากคือ strain เกือบทั้งหมดมีความสามารถในการใช้น้ำตาลดังกล่าว จากหลักการนี้เมื่อพิจารณาผลการทดลองในตารางที่ 6 จะพบว่าในกลุ่มของ *L. pentosus* ประกอบด้วยเชื้อจำนวน 19 strains คือ 110, 203, 205, 208, 211, 215, 218, F 28-1, 222, F 18-2, 236, P 46-1, 870, FP 38-1, A 24, F 10-2, FN 3r, RS 27 และ RS 28 โดยกลุ่มนี้มีเชื้อจำนวน 8 strains ที่มีคุณสมบัติตรงตามลักษณะของสปีชีส์ทุกประการคือ 215, F 28-1, 222, 236, 870, FP 38-1, A 24, และ RS 27 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองกับวิธี RAPD พบว่ามีค่า %S.I. ที่ระดับ 62, 40, 78, 85, 65, 52, 50 และ 40% ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าสวนใหญ่มีค่าสูงตั้งแต่ระดับ 50% ขึ้นไป ยกเว้นเพียง F 28-1 และ RS 27 เท่านั้นที่มีค่า %S.I. เพียง 40% กับ type strain

ส่วนกลุ่มของ *L. plantarum* พบว่าประกอบด้วยเชื้อจำนวน 22 strains คือ 100, 101, 105, 106, 107, 108, 111, 112, 402, 450, 1145, FN 12-1, 862, FP 15-1, F 33-1, RS 55, RS 56, RS 74, RS 93, RS 44, RS 46 และ RS 94 โดยในกลุ่มนี้พบว่าเชื้อส่วนใหญ่มีคุณสมบัติตรงตามลักษณะของสปีชีส์ ส่วน strain ที่มีคุณสมบัติไม่ตรงตามสปีชีส์คือ 100, 402, 1145, F 33-1 และ RS 94 โดย strain 100 นั้นไม่สามารถใช้น้ำตาล melezitose, raffinose และ melibiose ได้ ส่วน strains F 33-1 และ RS 94 นั้นไม่สามารถใช้น้ำตาล melezitose และ arabinose ได้ ซึ่งตามลักษณะของสปีชีส์นี้ควรมีความสามารถดังกล่าว และเมื่อเปรียบเทียบค่า %S.I. กับ type strain ที่ได้จากวิธี RAPD พบว่า strains 100, F 33-1 และ RS 94 นั้นมีค่า %S.I. ที่ระดับ 51, 60 และ 51% ตามลำดับจัดว่าอยู่ในระดับค่อนข้างสูงคือมากกว่า 50% ขึ้นไป สำหรับ strain 1145 ซึ่งไม่สามารถใช้น้ำตาล melezitose และ raffinose ได้ นั้นพบว่าวิธี RAPD ไม่สามารถระบุสายพันธุ์ได้โดยมีค่า %S.I. กับ type strain ทั้ง 3 ชนิดเพียง 7% เช่นเดียวกับ *L. sake* 402 แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาเชื้อในกลุ่มนี้จะพบว่า strain FN 12-1 ซึ่งวิธี

ตารางที่ 6 แสดงการใช้แหล่ง carbon 10 ชนิด ของแบคทีเรียแลคติกรูปท่อน 51 strains

STRAIN	carbon utilization									
	glycerol	xylose	L-rhamnose	melezitose	raffinose	arabinose	melibiose	fructose	maltose	ribose
100	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
101	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+
105	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
106	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
107	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
108	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
110	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
111	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
112	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
200	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
203	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
205	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
208	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+
210	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
211	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+

STRAIN	carbon utilization									
	glycerol	xylose	L-rhamnose	melezitose	raffinose	arabinose	melibiose	fructose	maltose	ribose
215	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
218	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
F 28-1	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
222	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
P 322-1	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
F 18-2	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
236	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
402	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
450	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
1145	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
FN 12-1	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
P 46-1	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
862	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
FP 15-1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
F 33-1	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+
870	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

STRAIN	carbon utilization									
	glycerol	xylose	L-rhamnose	melezitose	raffinose	arabinose	melibiose	fructose	maltose	ribose
FP 38-1	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
A 24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F 10-2	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
FN 3r	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
RS 55	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
RS 56	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
RS 74	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
RS 93	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
RS 44	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
RS 46	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
RS 94	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+
RS 43	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
RS 91	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+
RS 95	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
RS 97	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

STRAIN	carbon utilization									
	glycerol	xylose	L-rhamnose	melezitose	raffinose	arabinose	melibiose	fructose	maltose	ribose
RS 98	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+
RS 27	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
RS 28	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
RS 31	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
RS 32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L. pentosus DSM 20314	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
L. plantarum DSM 20174	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
P. pentosaceus DSM 20336	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

+ หมายถึง สามารถใช้แหล่ง carbon ชนิดนั้นๆ ได้

- หมายถึง ไม่สามารถใช้แหล่ง carbon ชนิดนั้นๆ ได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 แสดงความสามารถในการใช้น้ำตาลและการเจริญเติบโตในภาวะต่างๆ ของ Pediococci

STRAIN	ribose	maltose	melezitose	growth at 50 °C	growth at 40 °C	growth with 6.5% NaCl	growth at pH 4.2
F 20	+	+	-	-	+	+	+
N 78	+	+	-	-	+	+	+
BP-1	+	+	-	-	+	+	+
RS 92	+	+	-	-	+	+	+
RS 90	+	+	-	-	+	+	+
225	+	+	-	-	+	+	+
RS 96	+	+	-	-	+	+	+
P. acidilactici DSM 20284	+	-	-	+	+	+	+
P. pentosaceus DSM 20336	+	+	-	-	+	+	+

+ หมายถึง สามารถใช้น้ำตาลและเจริญเติบโตในภาวะนั้นๆ ได้

- หมายถึง ไม่สามารถใช้น้ำตาลและเจริญเติบโตในภาวะนั้นๆ ได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบผลการจัดจำแนกสปีชีส์แบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมักดองพื้นเมืองระหว่างวิธีทางชีวเคมีกับวิธี RAPD

STRAIN	Biochemical tests			RAPD		
	L. pentosus	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*
100		✓			51	
101		✓			34	
105		✓			76	
106		✓			76	
107		✓			82	
108		✓			76	
110	✓				51	
111		✓			92	
112		✓			71	
200	+	+		40	18	
203	✓			40		
205	✓			40		
208	✓			40		

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

STRAIN	Biochemical tests			RAPD		
	L. pentosus	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*
210	+	+		78	18	
211	✓			50		
215	✓			62		
218	✓			40		
F 28-1	✓			40		
222	✓			78		
225			✓			84
P 322-1	+	+		10	10	4
F 18-2	✓			62		
236	✓			85		
402		✓		1	1	1
450		✓			69	
1145		✓		7	7	4
FN 12-1		✓		7	7	4
P 46-1	✓			13	13	4
862		✓			92	
RS 96			✓			72

STRAIN	Biochemical tests			RAPD		
	L. pentosus	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*
FP 15-1		✓			82	
F 33-1		✓			51	
870	✓			65		
FP 38-1	✓			52		
F 10-2	✓			50		
A 24	✓			50		
FN 3r	✓			40		
F 20			✓			72
N 78			✓			72
BP-1			✓			67
RS 55		✓			92	
RS 56		✓			92	
RS 74		✓			92	
RS 93		✓			92	
RS 44		✓			65	
RS 46		✓			65	
RS 94		✓			51	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

STRAIN	Biochemical tests			RAPD		
	L. pentosus	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*
RS 43	+	+		18	34	
RS 91	+	+		18	23	
RS 95	+	+		18	23	
RS 97	+	+		18	23	
RS 98	+	+		18	23	
RS 27	✓			40		
RS 28	✓			65		
RS 31	+	+		48	18	
RS 32	+	+		40	18	
RS 90			✓			94
RS 92			✓			58

✓ หมายถึง วิธีชีวเคมีระบุได้แน่นอนว่าเป็นสปีชีส์นั้นๆ

\+ หมายถึง วิธีชีวเคมีไม่สามารถระบุได้แน่นอนว่าเป็น *L. pentosus* หรือ *L. plantarum*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

RAPD ให้ผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ไม่ตรงกับ type strain และมีค่า %S.I. ที่ระดับเพียง 1% กับ type strain ทั้ง 3 สายพันธุ์เท่านั้น แต่วิธีทางชีวเคมีจัดให้รวมอยู่ในกลุ่ม *L. plantarum* ด้วย โดยมีคุณสมบัติตรงตามลักษณะของสปีชีส์ทุกประการ

ส่วนเชื้อที่เหลือ 10 strains คือ 200, 210, P 322-1, RS 43, RS 91, RS 95, RS 97, RS 98, RS 31 และ RS 32 นั้นพบว่าวิธีชีวเคมีไม่สามารถระบุได้ชัดเจนว่าเป็นสายพันธุ์ใดเนื่องจากคุณสมบัติการใช้ glycerol และ xylose ไม่เป็นไปตามลักษณะของสปีชีส์กล่าวคือ บาง strain สามารถใช้ glycerol ได้แต่ไม่สามารถใช้ xylose ได้ และบาง strain ไม่สามารถใช้ glycerol ได้แต่สามารถใช้ xylose ได้ และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้จากวิธี RAPD พบว่า strains 200, 210, RS 31 และ RS 32 มีค่า %S.I. กับ type strain of *L. pentosus* DSM 20314 อยู่ที่ระดับ 40, 78, 48 และ 40% ตามลำดับ ซึ่งเป็นระดับที่ต่ำยกเว้นเพียง strain 210 เท่านั้น ส่วน RS 43, RS 91, RS 95, RS 97 และ RS 98 มีค่า %S.I. กับ type strain of *L.plantarum* DSM 20174 ที่ระดับ 34, 23, 23, 23 และ 23% ตามลำดับ ซึ่งเป็นระดับที่ต่ำเช่นกัน

ส่วน strain ที่มีรูปร่างกลมและเป็นกลุ่มๆ ละ 4 เซล (tetrad) นั้นพบว่ามีจำนวน 7 strains คือ F 20, N 78, BP-1, RS 92, RS 90, 225 และ RS 96 (แสดงในตารางที่ 7) ซึ่งวิธี RAPD ให้ผลการทดลองที่ชัดเจนว่าเป็น *P. pentosaceus* โดยมีค่า %S.I. กับ type strain อยู่ในระดับสูงคือ ตั้งแต่ 58% ถึง 94% และผลการทดสอบทางชีวเคมี (แสดงในตารางที่ 8) พบว่าให้ผลที่สอดคล้องกันทั้งหมดคือจากการทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาล maltose และการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 50 $^{\circ}$C ระบุว่าไม่ใช่สายพันธุ์ *P. acidilactici* และเมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาล melezitose พบว่าทุก strain สามารถใช้ได้แสดงว่าไม่ใช่ *P. halophilus* จากนั้นจึงนำมาตรวจสอบการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 40 $^{\circ}$C และการเจริญเติบโตในภาวะที่มีเกลือความเข้มข้น 6.5% พบว่าเชื้อทั้ง 7 strains ให้ผลเป็นบวกทั้ง 2 คุณสมบัติ แสดงว่าอาจเป็น *P. pentosaceus* หรือ *P. urinaeequi* จึงต้องนำมาทดสอบการเจริญเติบโตที่ pH 4.2 พบว่าเชื้อทั้งหมดสามารถเจริญเติบโตได้ จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเป็นเชื้อสายพันธุ์ *P. pentosaceus*