พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

ศุภกิจ สอนประจักษ์ : การทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *Lactobacillus pentosus* และ *Lactobacillus plantarum* จากอาหารหมักดองพื้นเมืองโดยวิธี Random Amplified Polymorphic DNA (GENOMIC DNA FINGERPRINTING OF *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum* FROM TRADITIONAL FERMENTED FOOD USING RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA)
อ. ที่ปรึกษา : ผศ. ดร. สุวิมล กีรติพิบูล , 108 หน้า . ISBN 974-636-275-5

ในการศึกษานี้ได้ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียแลคติกโดยการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อจำนวนทั้งสิ้น 58 strains ซึ่งแยกได้จากอาหารหมักดองพื้นเมืองชนิดต่างๆ เช่น แหนม ปลาส้ม ผักดอง เป็นต้น เริ่มจากการสกัดดีเอ็นเอทั้งหมด (total genomic DNA) ของเชื้อ โดยผนังเซลชั้นนอกจะถูกย่อยด้วยเอ็นไซม์ lysozyme (100 µg/ml Tris-EDTA-Sodium chloride; TES) และ mutanolysin (1 U/µl TES) ก่อนที่จะย่อยเยื่อหุ้มเซลด้วย proteinase K (1 mg/ml TES) และ sodium dodecyl sulfate (20 % in TES) จากนั้นจึงตกตะกอนแยกเศษผนังเซลโดยใช้ CTAB/NaCl (10 % in water) และ chloroform / isoamyl alcohol (24 : 1) จากผลการทดลองพบว่าได้ปริมาณดีเอ็นเอโดยเฉลี่ยประมาณ 3 µg จากการใช้เซลเชื้อ 2 ml จนได้ค่า OD_{600} = 3.5 จากนั้นจึงนำดีเอ็นเอที่ได้มาทดสอบปฏิกิริยาและภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มโดยวิธี Random Amplified Polymorphic DNA โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน 3 สายพันธุ์ในการทดสอบเพื่อแยกความแตกต่างคือ type strain ของ *L. pentosus* DSM 20314, type strain ของ *L. plantarum* DSM 20174 และ type strain ของ *P. pentosaceus* DSM 20336 โดยทดสอบ oligonucleotide primer ที่มีความยาว 10 mers จำนวนทั้งสิ้น 100 primers พบว่า primer ที่มีลำดับเบส 5'-AGTCAGCCAC-3', 5'-CAATCGCCGT-3', 5'-GATGACCGCC-3' และ 5'-ACTTCGCCAC-3' สามารถที่จะใช้บอกความแตกต่างระหว่างเชื้อ *L. pentosus* และ *L. plantarum* ได้และพบว่าภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอคือการใช้อุณหภูมิในการทำ denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 1 นาที, annealing ที่ 35 °C เป็นเวลา 1 นาที และ extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 2 นาที โดยปฏิกิริยารวม 10 µl ประกอบด้วย Tris-HCl ความเข้มข้น 10 mM, $MgCl_2$ ความเข้มข้น 2 mM, KCl ความเข้มข้น 50 mM, gelatin ความเข้มข้น 0.001%, deoxynucleoside triphosphate ความเข้มข้น 100 mM, primer ความเข้มข้น 0.2 µM, เอ็นไซม์ Taq DNA Polymerase 1.0 unit และดีเอ็นเอ 3.0 ng จากนั้นจึงนำ primer ทั้ง 4 มาใช้ในการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อทั้ง 58 strains และวิเคราะห์ความแตกต่างของเชื้อแต่ละ strain โดยค่าความสัมพันธ์ Similarity Index ดังนี้คือ

$$\text{Similarity Index} = 2n_{xy} / (n_x + n_y)$$

เมื่อ n_x และ n_y คือจำนวน band ใน lane X และ Y ตามลำดับ

n_{xy} คือจำนวน band รวมของ lane X และ lane Y ที่มีตำแหน่งตรงกัน

จากผลการวิเคราะห์ค่า Similarity Index ที่แสดงในรูปของ dendrogram สามารถจำแนกเชื้อทั้งหมดออกเป็น 4 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยเชื้อจำนวน 21 strains ที่มีค่า Similarity Index กับ type strain *L. pentosus* DSM 20314 อยู่ระหว่าง 85 % ถึง 40 % กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยเชื้อจำนวน 25 strains ที่มีค่า Similarity Index กับ type strain *L. plantarum* DSM 20174 อยู่ระหว่าง 92 % ถึง 23 % กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยเชื้อจำนวน 7 strains ที่มีค่า Similarity Index กับ type strain *P. pentosaceus* DSM 20336 อยู่ระหว่าง 94 % ถึง 58 % และมีค่าความสัมพันธ์เพียง 4 % กับ 2 กลุ่มแรก ส่วนกลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยเชื้อ 4 strains คือ 1145, FN 12-1, P 322-1 และ P 46-1 ไม่สามารถระบุสายพันธุ์ได้โดยมีค่า Similarity Index กับ type strain ของ *L. pentosus* DSM 20314 และ type strain ของ *L. plantarum* DSM 20174 ที่ 7%, 7%, 10% และ 13% ตามลำดับ และ 4% กับ type strain ของ *P. pentosaceus* DSM 20336 โดยผลการทดลองที่ได้นี้พบว่ามีความสอดคล้องกับผลการจัดจำแนกสายพันธุ์เชื้อโดยวิธีทางชีวเคมี

ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร ลายมือชื่อนิสิต ศุภกิจ สอนประจักษ์

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา สุวิมล กีรติพิบูล

ปีการศึกษา 2539 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....