

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

1. จากผลการทดลองสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์มาตรฐานทั้ง 3 สายพันธุ์ รวมถึงเชื้อตัวอย่างทั้ง 58 strains ที่แยกได้จากอาหารหมักดองพื้นเมือง พบว่าวิธีการที่คัดแปลงมาจาก Dudley Ed (1995) และ Ausubel และคณะ (1987) นี้ให้ yield ของดีเอ็นเอประมาณ 3 μg จาก culture ปริมาณ 2 ml และสามารถให้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีคือ มีสิ่งเจือปน (impurity) น้อยและไม่เกิดการฉีกขาดเป็นท่อนสั้นๆ ซึ่งสังเกตเห็นได้ชัดเจนเมื่อ run gel electrophoresis ที่ความเข้มข้น agarose 0.8 % ภายใต้แรงดันไฟฟ้า 40 volts เป็นระยะทาง 3 cm ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่มีคุณภาพเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณโดยวิธี RAPD

2. ภาวะและปฏิกิริยาที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ *L. pentosus*, *L. plantarum* และ *P. pentosaceus* โดย PCR คือ

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 μ M arbitrary primer	1.0 μ l
- Taq DNA Polymerase (5 U/ μ l)	0.2 μ l
- distilled H ₂ O	4.8 μ l

3. สามารถสรรหา arbitrary primer ขนาด 10-mers ที่เหมาะสมที่จะใช้ในการจัดจำแนกสายพันธุ์เชื้อระหว่าง *L. pentosus*, *L. plantarum* และ *P. pentosaceus* ได้ 4 primers จากจำนวนทั้งสิ้น 100 primers คือ primer ที่มีลำดับเบส (5'-AGTCAGCCAC-3'), (5'-CAATCGTTCT-3'), (5'-GATGACCGCC-3') และ (5'-ACTTCGCCAC-3') ซึ่งทั้ง 4 primers นี้สามารถให้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะสำหรับเชื้อแต่ละชนิดได้

4. ผลจากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อทั้ง 58 strains โดยใช้ค่าความสัมพันธ์ Similarity Index สรุปว่าเชื้อถูกจัดแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มของ *L. plantarum* ประกอบด้วยเชื้อจำนวน 25 strains โดยมีค่า %S.I. กับ type strain อยู่ระหว่าง 92 ถึง 23 % กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มของ *L. pentosus* ประกอบด้วยเชื้อจำนวน 21 strains โดยมีค่า %S.I. กับ type strain อยู่ระหว่าง 85 ถึง 40 % กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มของ *P. pentosaceus* ประกอบด้วยเชื้อจำนวน 7 strains โดยมีค่า %S.I. กับ type strain อยู่ระหว่าง 94 ถึง 58 % และกลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยเชื้อ 4 strains คือ 1145, FN 12-1, P 322-1 และ P 46-1 ซึ่งไม่สามารถระบุสายพันธุ์ได้ ซึ่งผลที่ได้จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากวิธี RAPD นี้มีความสอดคล้องกับวิธีทางชีวเคมีเฉพาะในกลุ่มของ *P. pentosaceus* เท่านั้น ส่วนในกลุ่มของ *L. pentosus* และ *L. plantarum* นั้นพบว่ายังมีความแปรปรวนอยู่บ้าง