การทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *Lactobacillus pentosus* และ *Lactobacillus plantarum* จากอาหารหมักดองพื้นเมืองโดยวิธี Random Amplified Polymorphic DNA

นายศุภกิจ สอนประจักษ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2539

ISBN 974-636-275-5

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17259149

GENOMIC DNA FINGERPRINTING OF *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum* FROM TRADITIONAL FERMENTED FOOD USING RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA

MR. Supakij Sornprajak

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Department of Food Technology
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 1996

ISBN 974-636-275-5

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *Lactobacillus pentosus* และ *Lactobacillus plantarum* จากอาหารหมักดองพื้นเมืองโดยวิธี Random Amplified Polymorphic DNA
โดย	นายศุภกิจ สอนประจักษ์
ภาควิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุวิมล กีรติพิบูล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร. รุจ วัลยะเสวี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ นพ. ศุภวัฒน์ ชุติวงศ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(อาจารย์ ดร. รมณี ลงวนดีกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุวิมล กีรติพิบูล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ดร. รุจ วัลยะเสวี)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์)

..... กรรมการ
(ดร. ฐิตาภา เชียวชจี)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

C627191 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY
KEY WORD: GENOMIC DNA / *Lactobacillus pentosus* / *Lactobacillus plantarum* / FINGERPRINTING / TRADITIONAL FERMENTED FOOD / RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA

SUPAKIJ SORNPRAJAK : GENOMIC DNA FINGERPRINTING OF *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum* FROM TRADITIONAL FERMENTED FOOD USING RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA. THESIS ADVISOR : ASSIS. PROF. SUWIMON KEERATIPIBUL, Ph. D.

108 pp. ISBN 974-636-275-5

58 strains of lactic acid bacteria isolated from traditional fermented foods eg. *nham*, *pla-som* and *phak-dong* are classified using arbitrary primer polymerase chain reaction. A method of extraction for the total genomic DNA was developed. The bacterial cells were treated with lysozyme (100 µg/ ml Tris-EDTA-Sodium chloride; TES) and mutanolysin (1 U/ µl TES) followed by proteinase K (1 mg/ ml TES). Cells were lysed by sodium dodecyl sulfate (20 % in TES). The cell wall and cell membrane were removed by CTAB/NaCl (10 % in water) and chloroform / isoamyl alcohol (24 : 1) extraction. The total yield of DNA of 3 µg were obtained from 2 ml culture grown to OD_{600} = 3.5. The chromosomal DNAs of the three type strains of *L. pentosus* DSM 20314, *L. plantarum* DSM 20174 and *P. pentosaceus* DSM 20336 were amplified using 100 different arbitrary primers (10 mers oligonucleotide). The four oligonucleotide primers of 5'-AGTCAGCCAC-3', 5'-CAATCGCCGT-3', 5'-GATGACCGCC-3' and 5'-ACTTCGCCAC-3' were found to differentiate between the species of *L. pentosus* and *L. plantarum*. The optimal amplification conditions were; denaturation at 94 °C for 1 minute, annealing at 35 °C for 1 minute and nucleotide extension at 72 °C for 2 minute. The 10 µl reaction composed of 10 mM Tris-HCl, 2 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 0.001% gelatin, 100 mM deoxynucleoside triphosphate, 0.2 µM arbitrary primer, 1.0 unit Taq DNA Polymerase and 3.0 ng of DNA template. The similarity indice of different strains of bacteria were calculated using :

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

where n_x and n_y are the number of bands in the lanes X and Y

n_{xy} is the number of bands common to the lanes X and Y

The similarity indice were used to construct a dendrogram. The 58 strains could be divided into 4 groups. The first group consisted of 21 different strains of *L. pentosus* which had the similarity indice between 85 to 40% to the type strain. The second group consisted of 25 different strains of *L. plantarum* which had the similarity indice between 92 to 23% to the type strain. The third group of bacteria consisted of 7 different strains which had the similarity indice between 94 to 58% to the type strain of *P. pentosaceus* DSM 20336. And the fourth group which were 4 different bacterial strains 1145, FN 12-1, P 322-1 and P 46-1 with the similarity indice of 7%, 7%, 10% and 13% to both type strains of *L. pentosus* DSM 20314 and *L. plantarum* DSM 20174 and 4% to the the type strain of *P. pentosaceus* DSM 20336. These strains were unidentified because of their low values of similarity indices to the type strains. These results obtained from DNA fingerprints were in good agreement with biochemical results.

ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร ลายมือชื่อนิสิต ศุภกิจ สอนประจักษ์

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา สุวิมล กีรติพิบูล

ปีการศึกษา 2539 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาตราจารย์ ดร. สุวิมล กีรติพิบูล ที่ได้กรุณารับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และได้ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ คำปรึกษา ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. รุจ วัลยะเสวี ที่ได้กรุณารับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ให้คำปรึกษาทางวิชาการ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ ที่ได้อนุเคราะห์สายพันธุ์แบคทีเรียแลคติก เอกสารอ้างอิงทางวิชาการ และกรุณารับเป็นกรรมการในการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. ฐิตาภา เขียวขจี ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. รมณี สงวนดีกุล ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ที่กรุณาอนุเคราะห์ทุนในการดำเนินงานวิจัย ตลอดจนสถานที่ปฏิบัติงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ประจำห้องปฏิบัติการลายพิมพ์ดีเอ็นเอ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ได้อนุเคราะห์สถานที่ปฏิบัติงานวิจัย ตลอดจนให้คำปรึกษาด้านวิชาการ

ขอขอบคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ที่ปฏิบัติงานอยู่ ณ. ห้องปฏิบัติการลายพิมพ์ดีเอ็นเอ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์เสมอมา

ท้ายที่สุดขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ คุณย่า และน้องๆ ที่ให้กำลังใจตลอดจนให้คำปรึกษา และให้ความช่วยเหลือทุกๆ สิ่งอย่างหาที่สุดมิได้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ
กิตติกรรมประกาศ..... ฉ
สารบัญ..... ช
สารบัญตาราง..... ซ
สารบัญรูป..... ฌ
บทที่
1 บทนำ..... 1
2 วารสารปริทัศน์..... 2
3 วัสดุอุปกรณ์ และขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย..... 26
4 ผลการทดลอง..... 36
5 วิจารณ์ผลการทดลอง..... 73
6 สรุปผลการทดลอง..... 95
รายการอ้างอิง..... 97
ภาคผนวก ก..... 98
ภาคผนวก ข..... 103
ประวัติผู้เขียน..... 108

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ลักษณะความแตกต่างระหว่าง *L. pentosus* และ *L. plenterum*.....	21
2	ลักษณะความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ของ Pediococci.....	22
3	รายชื่อและแหล่งที่มาของแบคทีเรียแลคติก 58 strains.....	27
4	แสดงการแปรปริมาณ Taq DNA Polymerase 5 ระดับ ที่ภาวะการใช้อุณหภูมิในการ annealing 3 ระดับ และจำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 2 ระดับ.....	33
5	ชนิดและรหัสของ arbitrary primers ที่นำมาใช้ในการทดสอบจำนวน 100 primers.....	34
6	แสดงการใช้แหล่ง carbon 10 ชนิด ของแบคทีเรียแลคติกรูปท่อน 51 strains.....	63
7	แสดงความสามารถในการใช้น้ำตาลและการเจริญเติบโตในภาวะต่างๆ ของ Pediococci.....	67
8	เปรียบเทียบผลการจัดจำแนกสปีชีส์แบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมักดองพื้นเมืองระหว่างวิธีทางชีวเคมีกับวิธี RAPD.....	68
9	ค่า %S.I. ของแบคทีเรียแลคติกทั้ง 58 strains ที่มีต่อ type strain ทั้ง 3 ชนิด เมื่อรวมตำแหน่ง marker ของ primer ทั้ง 4 primers.....	84

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	แสดงการใช้น้ำตาลของพวก Homofermentative lactic acid bacteria.....	4
2	แสดงการใช้น้ำตาลของพวก Heterofermentative lactic acid bacteria.....	5
3	ส่วนประกอบย่อยของดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ชนิดต่างๆ.....	8
4	โครงสร้างของดีเอ็นเอ แสดงทิศทางปลาย 5' และ 3'.....	8
5	โครงสร้างโมเลกุลของดีเอ็นเอ.....	9
6	กราฟแสดงการเสียสภาพของดีเอ็นเอ.....	10
7	การจำลองตัวของดีเอ็นเอ.....	13
8	การเพิ่มจำนวนของสายดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR.....	14
9	Chromosomal DNA ของแบคทีเรียแลคติกชนิดต่างๆ ที่ได้จากการทำ gel electrophoresis โดยใช้แรงดันไฟฟ้า 40 volts.....	36
10	ผลของปริมาณ Taq DNA Polymerase 5 ระดับ ที่มีต่อรูปแบบการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอของเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน 3 สายพันธุ์ โดยใช้อุณหภูมิในการ annealing ที่ 35 °C.....	38
11	ผลของปริมาณ Taq DNA Polymerase 5 ระดับ ที่มีต่อรูปแบบการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอของเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน 3 สายพันธุ์ โดยใช้อุณหภูมิในการ annealing ที่ 50 °C.....	38
12	ผลของปริมาณ $MgCl_2$ 4 ระดับ ที่มีผลต่อการทำงานของ Taq DNA Polymerase และรูปแบบการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอของเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน 3 สายพันธุ์.....	40
13	รูปแบบการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอของเชื้อมาตรฐาน 3 สายพันธุ์ที่เกิดจาก arbitrary primers รหัส OPA 01-OPA 18.....	42
14	รูปแบบการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอของเชื้อมาตรฐาน 3 สายพันธุ์ที่เกิดจาก arbitrary primers รหัส OPB 17-OPC 14.....	43
15	รูปแบบการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอของเชื้อมาตรฐาน 3 สายพันธุ์ที่เกิดจาก arbitrary primers รหัส OPC 15-OPD 12.....	43

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
16	รูปแบบการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอของเชื้อมาตรฐาน 3 สายพันธุ์ที่เกิดจาก arbitrary primers รหัส OPD 13-OPE 10.....	44
17	แสดงตำแหน่ง molecular marker ของเชื้อมาตรฐาน 3 สายพันธุ์ที่เกิดจาก arbitrary primer ที่เหมาะสมทั้ง 4 primers.....	45
18	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักดองพื้นเมืองที่เกิดจากการใช้ primer OPA 03.....	48-49
19	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักดองพื้นเมืองที่เกิดจากการใช้ primer OPA 11.....	50-51
20	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักดองพื้นเมืองที่เกิดจากการใช้ primer OPC 05.....	52-53
21	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักดองพื้นเมืองที่เกิดจากการใช้ primer OPC 20.....	54-55
22	densitogram ของ standard molecular weight marker (Lambda DNA/*Bam* HI/*Bgl* II).....	57
23	standard molecular weight curve ที่ได้จาก standard molecular weight marker (Lambda DNA/*Bam* HI/*Bgl* II).....	58
24	ตำแหน่งของ molecular marker ของแบคทีเรียแลคติกแต่ละ strain จากอาหารหมักดองพื้นเมือง.....	59
25	Dendrogram แสดงความสัมพันธุ์ระหว่างแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมักดองพื้นเมืองทั้ง 58 strains ที่เกิดจากการรวมตำแหน่ง molecular marker ของ primer OPA 03, OPA 11, OPC 05 และ OPC 20.....	61
26	ภาพถ่าย chromosomal DNA ของแบคทีเรียแลคติก strain ต่างๆ ที่ได้จากการใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอของ Dudley Ed. (1995).....	74

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

27 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักดอง พื้นเมืองที่เกิดจากการใช้ primer OPB 06..... 77-78

28 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักดอง พื้นเมืองที่เกิดจากการใช้ primer OPB 08..... 79-80

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย