

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่องการโคลนและการวิเคราะห์ลำดับ DNA ของยีน
สำหรับ arginine deiminase และบริเวณควบคุม
จากแบคทีเรียแลคติกที่แยกจากอาหารหมักในประเทศไทย

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปี 2546-2547

ผู้วิจัย

ดร. ประวดี อังประภาพรชัย

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

579.3
ป372ก
ร.3

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่องการโคลนและการวิเคราะห์ลำดับ DNA ของยีน
สำหรับ arginine deiminase และบริเวณควบคุม
จากแบคทีเรียแลคติกที่แยกจากอาหารหมักในประเทศไทย

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปี 2546-2547

ว ๑ เม.ย. 254๘

ผู้วิจัย

ดร. ประวดี อังประภาพรชัย

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

บทคัดย่อ

Arginine deiminase (ADI) pathway ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสลายอาร์จินีน สามารถพบได้ในแบคทีเรียหลายชนิด รวมทั้งแบคทีเรียแลคติก โดยผลผลิตหนึ่งที่ได้จากการสลายอาร์จินีนผ่าน ADI pathway คือแอมโมเนีย ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของ tetramethylpyrazine (TMP) ซึ่งเป็นสารที่มีความสำคัญทางอุตสาหกรรมอาหารและทางการแพทย์

ผู้วิจัยได้แยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกจำนวน 29 isolates จากอาหารหมักชนิดต่างๆ ที่ผลิตหรือจำหน่ายในประเทศไทย ทำการสกัดโครโมโซมจากเชื้อดังกล่าวเพื่อใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ชิ้นส่วนของยีนสำหรับ arginine deiminase ด้วยวิธี PCR โดยใช้ degenerate primers และสามารถสังเคราะห์ขึ้น DNA ที่ต้องการได้จากคริมเปียร์ว (ไฟร์โมสต์) No. 8 จากนั้นทำการสังเคราะห์ DNA สำหรับยีนอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับ ADI pathway ด้วยการทำ PCR โดยใช้ specific primers จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้พบว่าประกอบด้วย 3 open reading frames คือ *arcA*, *arcB* และ *arcD* (บางส่วน) ตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของ ArcA และ ArcB พบว่ามีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของ arginine deiminase และ ornithine transcarbamylase จาก *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 99.5% และ 100% ตามลำดับ และพบว่าลำดับกรดอะมิโนของ ArcD เหมือนกับ arginine/ornithine antiporter (ArcD1) ของ *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 99.8% นอกจากนี้ยังพบโปรโมเตอร์ที่บริเวณ upstream ของ *arcA* และทำการยืนยันสมบัติการเป็นโปรโมเตอร์โดยการโคลนบริเวณดังกล่าวเข้าไปใน pBlue-TOPO ซึ่งเป็น promoter-probe vector และดูการแสดงออกของยีน *lacZ* นอกจากนี้ได้จำแนกเชื้อที่แยกได้

ในระดับ subspecies โดยอาศัย Restriction fragment length polymorphism ของชิ้นส่วนของยีน *gadB* โดยการทำให้ PCR แล้ววิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าว ปรากฏว่าไม่พบบริเวณตัดจำเพาะของ *Ase I* ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อที่แยกได้น่าจะเป็น *L. lactis* subsp. *cremoris*



Abstract

Arginine deiminase (ADI) pathway, involved in arginine degradation, can be found in several bacteria, including lactic acid bacteria. One of the products from arginine degradation via the ADI pathway is ammonia which is the precursor of tetramethylpyrazine (TMP), an important substance in food industry and medicine.

Twenty-nine isolates of lactic acid bacteria from fermented foods produced or sold in Thailand were isolated and selected. Chromosomal DNA samples were extracted from the bacteria, and used as templates for PCR amplification of an arginine deiminase fragment using degenerate primers. The desired PCR fragment was amplified from sour cream (Foremost) No. 8. DNA fragments containing the other genes of the ADI pathway were then amplified by PCR with specific primers, and sequenced. Analysis of the combined DNA sequence revealed 3 open reading frames: *arcA*, *arcB* and *arcD* (partial), respectively. Analysis of the translated amino acid sequences of *arcA* and *arcB* (designated ArcA and ArcB, respectively) showed 99.5 % and 100 % identity to arginine deiminase and ornithine transcarbamylase of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363, respectively. The translated amino acid sequence of *arcD* (ArcD) showed 99.8 % identity to arginine/ornithine antiporter (ArcD1) of *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403. In addition, a promoter region was found upstream from *arcA*. The promoter activity was confirmed by cloning the

DNA region into pBlue-TOPO, a promoter-probe vector, and showing the expression of *lacZ* gene. The bacterial isolate was also identified to subspecies level, based on the Restriction fragment length polymorphism of the PCR-amplified *gadB* gene fragment. Following DNA sequence analysis of the gene fragment, *Ase* I restriction site was not observed, which suggested that the isolate is a member of *L. lactis* subsp. *cremoris*.



บทนำ

แบคทีเรียแลคติกเป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญทางอุตสาหกรรมการผลิตอาหาร โดยเฉพาะในประเทศไทย อาหารที่หมักโดยแบคทีเรียแลคติกมีการบริโภคอย่างแพร่หลาย และยังมีศักยภาพในการพัฒนาสู่การส่งออกจำหน่ายในต่างประเทศ การศึกษาเมแทบอลิซึม รวมทั้งหน้าที่และการทำงานของยีนและเอนไซม์ของแบคทีเรียแลคติกจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง ทั้งนี้เพื่อเป็นการเพิ่มพูนองค์ความรู้ และยังสามารถนำไปสู่การพัฒนาเพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ของแบคทีเรียและผลิตภัณฑ์อาหารอีกด้วย

ถึงแม้ว่าผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จากการหมักสารคาร์โบไฮเดรตโดยแบคทีเรียแลคติกจะเป็นกรดแลคติก แต่ผลผลิตรอง (by-products) บางชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารที่ให้กลิ่น (flavouring compounds) ก็มีความสำคัญต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ ดังนั้นจึงมีความสนใจศึกษาการทำงานของยีนและเอนไซม์ใน pathways ที่เกี่ยวข้อง รวมทั้งมีความพยายามที่จะพัฒนาศายพันธุ์ของแบคทีเรียให้สร้างสารดังกล่าวได้มากขึ้น โดยที่ pathway หนึ่งที่มีการศึกษาอย่างกว้างขวางคือ diacetyl-acetoin pathway ของ *Lactococcus lactis*

Diacetyl (2,3-butanedione) จัดเป็นสารสำคัญอย่างหนึ่งที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลคติก สารนี้จะพบได้ในผลิตภัณฑ์อาหารชนิดต่างๆ โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์นมหมัก เช่น unripened cheeses, cultured buttermilk, cultured sour cream และ ripened cream butter (Seitz *et al.*, 1963) นอกจากนี้ diacetyl ยังมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์และรา ซึ่งรวมทั้งเชื้อก่อโรคที่แพร่ทางอาหารด้วย (Jay, 1982a; Jay, 1982b; Bowles and Juneja, 1998) และเพื่อเพิ่มการผลิต diacetyl ได้มีการศึกษาเมแทบอลิซึมของเอนไซม์และยีนที่เกี่ยวข้อง

ข้อในแบคทีเรียแลคติก ตลอดจนมีความพยายามในการชักนำให้เกิดการกลาย (mutation) ของยีนดังกล่าว

Kaneko *et al.* (1990) ใช้การฉายแสง UV เพื่อทำให้เกิดมิวเตชัน แล้วคัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิต diacetyl ที่สูงสุด ต่อมาภายหลังได้มีการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมอย่างแพร่หลายเพื่อเพิ่มการผลิต diacetyl ได้แก่ การสร้างแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ที่มีการยับยั้ง (inactivation) การทำงานของยีนสำหรับ lactate dehydrogenase ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการสร้างผลผลิตหลักคือกรดแลคติก ทำให้มีการสร้างผลผลิตรองต่างๆเพิ่มขึ้น (Gasson *et al.*, 1996) และการสร้างสายพันธุ์ที่มีการยับยั้งยีนสำหรับ pyruvate-formate lyase (Arnau *et al.*, 1997) นอกจากนี้ยังมีการดัดแปลงยีนที่เกี่ยวข้องกับ diacetyl-acetoin pathway ของแบคทีเรียแลคติกโดยตรง เช่นการสร้างสายพันธุ์ที่ปราศจากยีนสำหรับ α -acetolactate decarboxylase โดยวิธี gene deletion (Gasson *et al.*, 1996; Swindell *et al.*, 1996) การเพิ่มการแสดงออกของยีนสำหรับ α -acetolactate synthase (Platteeuw *et al.*, 1995; Benson *et al.*, 1996) และการสร้างสายพันธุ์ที่เป็น double-mutation โดยการยับยั้ง ยีนสำหรับ pyruvate-formate lyase ในสายพันธุ์ที่ปราศจากยีน α -acetolactate decarboxylase (Aungpraphapornchai, 1996) เป็นต้น

สารที่ให้กลิ่นที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งที่เกิดโดยแบคทีเรียแลคติกคือ tetramethylpyrazine (TMP) ซึ่งเป็นสารที่ให้กลิ่นถั่วหมัก (fermented soybeans odour) (Maga and Sizer, 1973) โดยสารดังกล่าวได้รับการยอมรับว่าไม่เป็นอันตราย (Generally Recognised As Safe หรือ GRAS) โดย Food Additives Committee of the Flavor and Extract Manufacturers' Association (FEMA) (Hall and Oser, 1970) นอกจากนี้ TMP ยังมีความสำคัญทางการแพทย์โดยพบว่ามีสมบัติในการ

ขยายหลอดเลือด (vasodilation) และยับยั้งการเกาะตัวของเกล็ดเลือด (antiplatelet aggregation) โดยในประเทศจีนมีการใช้ TMP ในการรักษาอาการปวดเนื่องจากโรคหัวใจ (angina pectoris) หลอดเลือดหัวใจผิดปกติ (cardiovascular disorders) และ cerebral ischemic syndromes (Feng *et al.*, 1996; Pang *et al.*, 1996) TMP เกิดจากการรวมตัวระหว่าง 2 โมเลกุลของ acetoin และ 2 โมเลกุลของแอมโมเนีย โดยเป็นปฏิกิริยาที่ไม่มีเอนไซม์มาเกี่ยวข้อง โดยที่ acetoin เป็นผลิตภัณฑ์จาก diacetyl-acetoin pathway และแอมโมเนียได้จากการสลายอาร์จินีนโดยผ่าน arginine deiminase (ADI) pathway

มีรายงานของยีนที่เกี่ยวข้องกับ ADI pathway จากแบคทีเรียชนิดต่างๆ ซึ่งยีนเหล่านี้มีการจัดเรียงตัวเป็น operon โดยพบว่าใน *Pseudomonas aeruginosa* มีการเรียงตัวของยีนสำหรับทั้ง 3 เอนไซม์ของ ADI pathway (arginine deiminase, ornithine transcarbamylase และ carbamate kinase ซึ่งแทนด้วย *arcA*, *arcB* และ *arcC* ตามลำดับ) คือ *arcABC* (Baur *et al.*, 1989) นอกจากนี้ยังพบการเรียงตัวของยีนในลักษณะนี้ ใน *Rhizobium etli* อีกด้วย (D'Hooghe *et al.*, 1997) ในขณะที่ยีนของ *Clostridium perfringens* มีการจัดเรียงตัวที่ต่างออกไปคือ *arcABDC* โดยที่ *arcD* เป็นยีนสำหรับ arginine/ornithine antiporter ซึ่งเป็นเมมเบรนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการลำเลียงอาร์จินีนและ ornithine (Ohtani *et al.*, 1997) และยังพบการเรียงตัวของยีนลักษณะนี้ใน *Bacillus licheniformis* ด้วย (Maghnouj *et al.*, 1998) ส่วนใน *Halobacterium salinarum* พบการเรียงตัวของยีนในรูปแบบ *arcRACB* โดย *arcR* เป็นยีนสำหรับโปรตีนควบคุม (regulatory protein) (Ruepp and Soppa, 1996)

ในแบคทีเรียแลคติก มีรายงานของยีนสำหรับ ADI pathway จาก *Lactobacillus sakei* โดยพบการเรียงตัวคือ *arcABCTD* โดยเชื่อว่า *arcT* เป็นยีนสำหรับเอนไซม์ transaminase (Zuniga et al., 1998) และต่อมาได้มีการค้นพบยีน *arcR* เพิ่มเติม ซึ่งอยู่บริเวณ downstream ของ *arcD* ทำให้การจัดเรียงตัวของยีนสำหรับ ADI pathway ของ *L. sakei* ที่ทราบในปัจจุบันคือ *arcABCTDR* (Zuniga et al., 2002) สำหรับ *Lactobacillus hilgardii* X₁B มีรายงานของยีนสำหรับ ADI pathway ว่ามีการจัดเรียงตัวในรูปแบบ *arcABC* (Arena et al., 2002) ส่วน *Lactococcus lactis* พบการเรียงตัวของยีนดังกล่าวในรูปแบบ *arcABDC₁C₂* นอกจากนี้ยังมีการค้นพบบริเวณควบคุม ซึ่งมีทั้งบริเวณที่น่าจะทำหน้าที่เป็น promoter ของ ADI operon และยังพบบริเวณที่น่าจะเป็น operator 2 แห่งคือ Catabolite repression element (Cre) sequence และ Arg box โดยเชื่อว่าทั้ง 2 บริเวณน่าจะเกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีนแบบ catabolite repression และการควบคุมโดยอาร์จินีนตามลำดับ (Aungpraphapornchai, 2000) และต่อมาได้มีการค้นพบยีนที่เกี่ยวข้องเพิ่มเติม ดังนั้นยีนที่เกี่ยวข้องกับ ADI pathway ของ *L. lactis* จึงมีการเรียงตัวคือ *arcABD₁C₁C₂TD₂C₃* (Zuniga et al., 2002) สำหรับใน *Streptococcus* มีรายงานของยีนที่เกี่ยวข้องกับ ADI pathway จาก *S. gordonii* DL1 โดยพบว่า operon มีขนาด 7.6 kb และมีการจัดเรียงตัวของยีนคือ *arcABCDTR* โดยที่ *arcT* เป็นยีนสำหรับ dipeptidase (Dong et al., 2002) ซึ่งแตกต่างจาก *arcT* ของ *L. sakei* และนอกจากนี้ยังมีรายงานของยีนสำหรับ ADI pathway จาก *Streptococcus rattus* FA-1 ซึ่งมีการเรียงตัวในรูปแบบ *arcABCDT-adiR* โดยคาดว่า *adiR* เป็นยีนสำหรับโปรตีนควบคุม (Griswold et al., 2004) ส่วนใน *Enterococcus faecalis* (เดิมคือ *Streptococcus faecalis*) พบการเรียงตัวของยีนเป็นแบบ *arcABCRD* (Barcelona-Andres et al., 2002) นอกจากนี้ยังมีรายงานของยีนสำหรับ ADI pathway

จาก *Oenococcus oeni* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแลคติกที่มีความสำคัญต่อการผลิตไวน์ โดยพบการเรียงตัวของยีนเป็นแบบ *arcABC* (Tanon *et al.*, 2001)

แบคทีเรียแลคติกเป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการเป็นผู้ผลิต TMP โดย Lee *et al.* (1996) ได้แสดงให้เห็นว่า *Lactococcus lactis* สามารถผลิต TMP ได้ทั้งในสภาพที่เป็นเซลล์อิสระหรืออิมโมบิไลซ์เซลล์ นอกจากนี้ยังได้มีความพยายามในการเพิ่มผลผลิต TMP โดยแบคทีเรียดังกล่าว โดยการปรับปรุงสภาวะการเจริญให้เหมาะสมเพื่อเพิ่มผลผลิตของ acetoin และแอมโมเนีย ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของ TMP (Kim and Lee, 1991a; Kim and Lee, 1991b)

จะเห็นได้ว่า ADI pathway เป็น pathway หนึ่งที่มีความสำคัญต่อการสังเคราะห์ TMP โดยแบคทีเรียแลคติก การศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับ pathway จะช่วยเพิ่มพูนองค์ความรู้และยังสามารถนำไปสู่การพัฒนาสายพันธุ์ของแบคทีเรียโดยวิธีทางพันธุวิศวกรรมเพื่อเพิ่มการผลิต TMP ซึ่งเป็นสารที่มีความสำคัญทางอุตสาหกรรมอาหารและทางการแพทย์ นอกจากนี้การศึกษางานของบริเวณควบคุม ทั้งส่วนของ promoter และ operators อาจนำไปสู่การพัฒนา inducible expression vector สำหรับแบคทีเรียแลคติก เพื่อใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนอื่นๆต่อไปในอนาคต หรือใช้ในการสร้างสายพันธุ์แบคทีเรียแลคติกที่มีการแสดงออกของยีนสูง (over-expression strains) ได้

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อหาลำดับ DNA ของยีนที่เกี่ยวข้องกับ ADI pathway จากแบคทีเรียแลคติก ที่แยกจากอาหารหมักในประเทศไทย
2. เพื่อหาลำดับ DNA ของบริเวณควบคุมของยีนสำหรับ arginine deiminase เอนไซม์ และทดสอบการทำงานของบริเวณควบคุม



อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การแยกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมัก

อาหารหมักชนิดต่างๆจะถูกทำให้เจือจางในน้ำกลั่นมาเชื้อ จากนั้นตัวอย่างอาหารบางส่วนจะถูกนำมา ลากบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่เติม calcium carbonate 1% (w/v) โดยใช้หัวเข็มเย็บผ้า แล้วบ่มที่ 30°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง โคโลนีเดี่ยวที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีวงใส (clear zone) อยู่รอบโคโลนีจะถูกคัดเลือกแบบสุ่ม เพื่อนำมาตรวจสอบรูปร่าง การติดสีแกรม และการสร้างเอนไซม์ catalase โดยเชื้อที่มีลักษณะเป็นรูปท่อน ทรงกลม หรือรูปรี ติดสีแกรมบวก และเป็น catalase negative จะถูกคัดเลือกไว้ เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. การทดสอบความสามารถในการผลิต acetoin (Voges-Proskauer test) และการใช้อาร์จินีนเป็นแหล่งพลังงานของแบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จะถูกทดสอบความสามารถในการผลิต acetoin โดยเลี้ยงเชื้อใน Methyl Red-Voges Proskauer medium ที่ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อเจริณมา 1 ml แล้วเติม α -naphthol solution (5% α -naphthol ใน absolute ethanol) 0.6 ml และสารละลาย KOH (40% KOH, 0.3% creatine) 0.2 ml และผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที ถ้ามี acetoin อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อก็จะเกิดปฏิกิริยาให้สีแดง

สำหรับการทดสอบการใช้อาร์จินีนของแบคทีเรียแลคติก จะเลี้ยงเชื้อใน modified MRS medium (ซึ่งดัดแปลงจาก MRS medium โดยใส่ 0.3% (w/v) arginine hydrochloride แทน triammonium citrate) ที่ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยการวัดความขุ่นที่ OD_{600 nm} เทียบกับ modified MRS medium ที่ไม่มีการเติมเชื้อ ถ้าแบคทีเรียสามารถเจริญในอาหารดังกล่าวได้แสดงว่าสามารถใช้อาร์จินีนเป็นแหล่งพลังงานได้

3. การสกัดโครโมโซมของแบคทีเรียแลคติก

ในการสกัดโครโมโซมของแบคทีเรียแลคติกจะใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Lewington *et al.* (1987) โดยมีการเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกใน MRS broth 10 ml เป็นเวลา 1 คืน แล้วแยกเซลล์ออกโดยการปั่นด้วยเครื่อง microcentrifuge จากนั้นจะเติมสารละลายซึ่งประกอบด้วย 0.25 M sucrose และ 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) ปริมาตร 240 μ l แล้วเติม lysozyme (10 mg/ml) ปริมาตร 50 μ l บ่มที่ 37°C 10 นาที แล้วเติม 20% SDS 160 μ l และสารละลาย 5 M NaCl ที่เย็นจัด 80 μ l จากนั้นบ่มในน้ำแข็ง 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะแยกส่วนที่เป็นของเหลวออกโดยการปั่นในเครื่อง microcentrifuge แล้วนำมาสกัดโปรตีนออกด้วย phenol/chloroform (1:1) 2 ครั้งและด้วย chloroform 1 ครั้ง หลังจากนั้นจะนำมามาตกตะกอน DNA ด้วย 3 M sodium acetate ปริมาตร 0.1x และ absolute ethanol ปริมาตร 2x แล้วนำตะกอน DNA ที่ได้มาละลายใน DNase-free water ที่ปราศจากเชื้อ

4. Polymerase Chain Reaction (PCR)

การทำ PCR จะใช้ chromosomal DNA เป็นต้นแบบ และใช้ primers 2 ชนิดที่ออกแบบขึ้น โดยใน 50 μ l reaction ประกอบด้วย DNA template ประมาณ 250 ng, 5 μ l PCR buffer ที่ผสม $MgCl_2$ (10x), dNTP แต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 2 mM, primer แต่ละชนิดปริมาณ 50 pmol, และ *Taq* DNA polymerase ปริมาณ 0.4 unit โดยเตรียมใน DNase-free water ที่ปราศจากเชื้อ

ในการทำ PCR 1 รอบจะมีขั้นตอนดังนี้คือ denaturation ที่ 92°C เป็นเวลา 2 นาที primer annealing ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม เป็นเวลา 2 นาที และ primer extension ที่ 72°C เป็นเวลา 2 นาที โดยทำทั้งหมด 30 รอบ หลังจากนั้น PCR product จะถูกวิเคราะห์โดยการทำ agarose gel electrophoresis

สำหรับในการทำ Colony PCR นั้น จะใช้ colony ของ *E. coli* ในปริมาณที่เหมาะสมเป็น DNA template แทน chromosomal DNA

5. Primers

Primers ที่ใช้ในการทำ PCR ทำการสังเคราะห์โดย BioService Unit

6. Agarose gel electrophoresis

เตรียม 1% agarose gel (w/v) โดยหลอม electrophoresis grade agarose ใน TBE buffer (0.5x) แล้วเทใน gel apparatus รอจน gel แข็งตัว แล้วใส่ลงใน chamber จากนั้นเท TBE buffer (0.5x) ให้ท่วม นำ DNA ที่ผสมกับ gel-loading buffer ใส่ในช่องภายใน gel แล้วให้กระแสไฟฟ้าที่ประมาณ 100 volts ในระยะเวลาที่เหมาะสม จากนั้นนำ gel ไปย้อมในสารละลาย ethidium bromide (0.1 $\mu\text{g/ml}$) นาน 15 นาที หลังจากนั้นนำ gel ไปดูภายใต้แสง UV โดย DNA จะปรากฏให้เห็นเป็นแถบสีส้ม

7. การโคลนชิ้น DNA เข้าไปในพลาสมิดและการทำ transformation

ชิ้น DNA ที่ได้จากการสังเคราะห์โดยวิธี PCR จะถูกโคลนเข้าในพลาสมิด pCR2.1-TOPO (Invitrogen) หรือ pBlue-TOPO (Invitrogen) และ ligation mix ที่ได้จะถูกนำไปใช้ทำ transformation กับ competent *E. coli* TOP10 ตามวิธีที่ระบุโดยผู้ผลิต

8. การสกัดพลาสมิด

การสกัดพลาสมิดจาก *E. coli* ทำโดยใช้ Wizard Plus SV Minipreps kit (Promega) ตามวิธีที่ระบุโดยผู้ผลิต

9. การหาลำดับ DNA (DNA sequencing)

การหาลำดับ DNA จัดทำโดย BioService Unit

10. การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับ DNA

การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับ DNA ทำโดยใช้โปรแกรมจาก European Bioinformatics Institute

(www.ebi.ac.uk)



ผลการทดลอง

1. การแยกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมัก

นำอาหารหมักชนิดต่างๆที่ผลิตหรือจำหน่ายในประเทศไทยจำนวน 14 ตัวอย่างมาทำการแยกแบคทีเรียแลคติก โดยสุ่มคัดเลือกโคโลนีเดียวที่เกิดขึ้นบน MRS medium ที่เติม calcium carbonate ซึ่งมีวงใส (clear zone) อยู่รอบโคโลนี เพื่อนำมาตรวจสอบรูปร่าง การติดสีแกรม และการสร้างเอนไซม์ catalase โดยคัดเลือกเฉพาะเชื้อที่มีลักษณะเป็นรูปท่อน (rod) ทรงกลม (coccus) หรือรูปรี (ovoid) ซึ่งติดสีแกรมบวก และเป็น catalase negative ได้จำนวนทั้งสิ้น 43 isolates ดังแสดงในตารางที่ 1

2. การทดสอบความสามารถในการผลิต acetoin และใช้อาร์จินีนเป็นแหล่งพลังงานของแบคทีเรียที่คัดเลือก

นำเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกไว้จำนวน 43 isolates มาทำการทดสอบความสามารถในการผลิต acetoin (Voges-Proskauer test) และความสามารถในการใช้อาร์จินีนเป็นแหล่งพลังงาน โดยดูจากความสามารถในการเจริญใน modified MRS medium ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ความสามารถของแบคทีเรียที่แยกจากอาหารหมักในการผลิต acetoin (Voges-Proskauer test) และความสามารถในการใช้อาร์จินีนเป็นแหล่งพลังงาน

ตัวอย่างอาหาร	isolate	รูปร่าง	Voges-Proskauer test ^b	การเจริญใน modified MRS medium ^c
ปลาสด	No. 1	rod	+	+
	No. 2	rod	-	-
	No. 3	rod	-	-
	No. 4	rod	-	+
นมเปรี้ยว (บีทาแกน)	No. 1	rod	+	+
	No. 2	rod	-	+
โยเกิร์ต (ดัชชี)	No. 1	rod	-	+
	No. 2	rod	-	-
Mature Cheddar cheese (Asda)	No. 1	rod	+	+
Red Leicester cheese (Asda)	No. 1	rod	+	+
Double Gloucester cheese (Asda)	No. 1	rod	-	+
นมเปรี้ยว (เมจิ)	- ^a	-		

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่างอาหาร	isolate	รูปร่าง	Voges-Proskauer test ^b	การเจริญใน modified MRS medium ^c
ครีมเปรี้ยว (โฟรไมสต์)	No. 1	rod	+	-
	No. 2	rod	+	-
	No. 3	ovoid	-	+
	No. 4	rod	+++	+++
	No. 5	ovoid	-	+
	No. 6	ovoid	+	+
	No. 7	ovoid	+	+
	No. 8	ovoid	+	+
Danish Camembert cheese (Rasmus)	No. 1	coccus	+	+
	No. 2	rod	+	+++
	No. 3	ovoid	-	+++
	No. 4	ovoid	+	+++
Danish Blue cheese (Rosenborg)	No. 1	rod	+	+
	No. 2	coccus	+	+
	No. 3	coccus	+	+

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่างอาหาร	isolate	รูปร่าง	Voges-Proskauer test ^b	การเจริญใน modified MRS medium ^c
Danish Blue cheese (Rosenborg)	No. 4	rod	+	+++
	No. 5	rod	+	+++
	No. 6	rod	+	+++
	No. 7	rod	+	+++
	No. 8	rod	+	+++
Fresh cream cheese (Caroline)	No. 1	rod	+++	+
	No. 2	coccus	+	-
	No. 3	rod	+	+
	No. 4	rod	+	+++
	No. 5	rod	+	+++
	No. 6	ovoid	-	+
Edam cheese (Mainland)	No. 1	ovoid	+	+
	No. 2	ovoid	+++	+
	No. 3	ovoid	+	+
	No. 4	ovoid	+	+++

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่างอาหาร	isolate	รูปร่าง	Voges-Proskauer test ^b	การเจริญใน modified MRS medium ^c
Edam cheese (Mainland)	No. 5	ovoid	+	+++
	No. 6	ovoid	+	+++
Light Philadelphia spreadable (Kraft)	- ^a	-		
Gouda cheese (Mainland)	- ^a	-		

หมายเหตุ a: ไม่สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกได้ในสภาวะที่ใช้ในการทดลอง

b: เชื้อที่มีการสร้าง acetoin จะแสดงด้วยเครื่องหมาย + และเชื้อที่มีการสร้าง acetoin ในปริมาณมากจะแสดงด้วยเครื่องหมาย +++

c: เชื้อที่เจริญได้ในอาหาร modified MRS medium จะแสดงด้วยเครื่องหมาย + และเชื้อที่เจริญได้ดีในอาหารดังกล่าว คือให้ค่า OD_{600 nm} สูงกว่า 0.5 จะแสดงด้วยเครื่องหมาย +++

3. การสกัด chromosomal DNA ของแบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้าง acetoin ได้และสามารถใช้อาร์จินีนเป็นแหล่งพลังงาน จำนวน 29 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1) ถูกนำมาสกัด chromosomal DNA เพื่อใช้เป็นต้นแบบสำหรับการทำ PCR ต่อไป

4. การออกแบบ degenerate primers สำหรับสังเคราะห์ชิ้นส่วนของยีน arginine deiminase

เนื่องจากแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารหมักเป็นแบคทีเรียแลคติก จึงทำการออกแบบ degenerate primers สำหรับสังเคราะห์ชิ้นส่วนของยีน arginine deiminase โดยการนำลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ arginine deiminase เฉพาะของแบคทีเรียแลคติกที่มีรายงานอยู่ใน European Molecular Biology Laboratory (EMBL) database มาเปรียบเทียบกัน เพื่อหาบริเวณของโปรตีนที่เหมือนหรือคล้ายกันระหว่างเอนไซม์ เพื่อใช้ในการออกแบบ degenerate primers (รูปที่ 1)

AJ250129	1	MNNGINVNSF IGKLK SVLLHRPGAEVENITPDTMKQLLFDDIPYLKIAQK	50
AJ001330	1	MTSPH VNSEIGKLK TVLLKRPGEVENITPDIMYRLLFDDIPYLPITQK	50
AJ250129	51	EHDFF QAQTLRDNG AETVYIENLATEVFKESSSETKEEFLSHLLHEAGYRPG	100
AJ001330	51	EHDQ FAQTLRDNG VEVLYLENLAAEAID-AGDVKEAFLDKMLNESHKSP	99
AJ250129	101	RTYDGLTEYLTSMP TKDMVEKVYAGVRKNE [^] LDIKRTALSDMAGSDAENY-	149
AJ001330	100	QVQAALKDY LISMATLDMVEKIMAGVRTNEIDIKSKALIDVSADD--DYP	147
AJ250129	150	FYLNPLPNAYFTRDPQ [^] ASMGVGMTINKMTFPARQPESLITEYVMANHPRF	199
AJ001330	148	FYMDPMPNLYFTRDPAASMGDGLTINKMTFEARQRESMFMEVIMQHHPRF	197
AJ250129	200	--KDTPIWRDRNHTTRIEGGDELILNKTTVAIGVSERTSSKTIQNLAKEL	247
AJ001330	198	ANQGAQVWRDRDHIDRMEGGDELILSDKVLAIGISQRTSAQSIEELAKVL	247
AJ250129	248	FANPLSTFDTVLAVEIPHNHAM MHLDTVFTM INHDQFTVFPGIMDGAGNI	297
AJ001330	248	FANH-SGFELILA IKIPHKHAM MHLDTVFTM IDYDKFTIHPGIQGAGGMV	296
AJ250129	298	NVFILRPGQDGEVEIEHLTDLKAALKKVLNLSELDIECGAGDPIAAPRE	347
AJ001330	297	DTYILEPGNND EIKITHQTDLKVLRLDALEVPELTLP CGGGDAVVAPRE	346
AJ250129	348	QWNDGSNTLAIAPGEIVTYDRNYVTVELL-----ISSELGRGRGG	387
AJ001330	347	QWNDGSNTLAIAPGVVVTYDRNYVSNENLRQYGIKVIEVPSSSELSRGRGG	396
AJ250129	388	ARCMSQPLWREDL 400	
AJ001330	397	PRCMSPLVRRKT 409	

รูปที่ 1 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ arginine deiminase ของแบคทีเรียแลคติกที่มีรายงานอยู่ใน EMBL database โดยใช้โปรแกรม Align (Needle) โดยที่ AJ250129 เป็นลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์จาก *Lactococcus lactis* MG1363 (Aungpraphapornchai, 2000) และ AJ001330 เป็นของเอนไซม์จาก *Lactobacillus sakei* (Zuniga et al., 1998) บริเวณที่ใช้ในการออกแบบ degenerate primers: rdi29 (forward), rdi30 (forward) และ rdi2 (reverse) คือบริเวณที่มีการขีดเส้นใต้ตามลำดับ

จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ arginine deiminase จากแบคทีเรียแลคติกที่มีรายงานใน EMBL database (รูปที่ 1) ได้ทำการออกแบบ degenerate primers จำนวน 3 แบบ ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังต่อไปนี้

rdi29 (forward):

5'-GT(AGCT)AA(CT)(AT)(GC)(AGCT)GA(AG)AT(ACT)GG(AGCT)AA(AG)(CT)T(AGCT)AA-3'

rdi30 (forward):

5'-TT(CT)GC(AGCT)CA(AG)AC(AGCT)(CT)T(AGCT)(AC)G(AGCT)GA(CT)AA(CT)GG-3'

rdi2 (reverse):

5'-CAT(AGCT)GT(AG)AA(AGCT)AC(AGCT)GT(AG)TC(AGCT)A(AG)(AG)TGCAT-3'

5. การสังเคราะห์ชิ้นส่วนของยีน arginine deiminase โดยวิธี PCR และการโคลนชิ้น DNA เข้าในพลาสมิด

มีการทำ PCR เพื่อสังเคราะห์ชิ้นส่วนของยีน arginine deiminase โดยใช้ chromosomal DNA ที่สกัดจากแบคทีเรียแลคติก 29 ตัวอย่างเป็นต้นแบบ โดยสำหรับแต่ละตัวอย่างจะทำ PCR 2 ชุด คือชุดที่ 1 จะใช้ degenerate primers rdi29 และ rdi2 และชุดที่ 2 จะใช้ degenerate primers rdi30 และ rdi2 โดยคาดหวัง DNA ผลผลิตของ PCR ขนาดประมาณ 810 และ 670 bp จากการทำ PCR ชุดที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

จากการทดลอง ในการใช้ degenerate primers ชุดที่ 1 ไม่พบการสังเคราะห์ชิ้น DNA ที่ต้องการจาก chromosomal DNA ทั้ง 29 ตัวอย่าง ในขณะที่การใช้ degenerate primers ชุดที่ 2 พบ

ว่าเกิดการสังเคราะห์ขึ้น DNA ขนาดใกล้เคียงกับขนาดที่คาดไว้ จาก chromosomal DNA 2 ตัวอย่าง คือ Red Leicester cheese (Asda) No. 1 และครีมเปรี้ยว (โฟรโมสต์) No. 8

หลังจากนั้นนำ DNA ที่สังเคราะห์ได้จากทั้งสองตัวอย่างไปโคลนเข้าในพลาสมิด pCR2.1-TOPO แล้วนำ ligation mix ไปใช้ในการทำ transformation กับ competent *E. coli* TOP10 ทำการคัดเลือกโคโลนีของ *E. coli* ที่ได้รับ recombinant plasmid โดยการทำ Colony PCR โดยใช้ primers M13(-20) (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') และ M13(rev) (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') แล้วทำการสกัด recombinant plasmid ที่มี DNA ที่สังเคราะห์ขึ้นจากแต่ละตัวอย่างเข้าแทรกอยู่ แล้วนำพลาสมิดไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น DNA ดังกล่าว

6. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น DNA ที่สังเคราะห์ได้

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วน (ความยาว 418 นิวคลีโอไทด์ โดยเริ่มจากนิวคลีโอไทด์ตัวแรกที่อยู่ถัดจาก primer rdi30) ของชิ้น DNA ที่สังเคราะห์จากเชื้อที่แยกจาก Red Leicester cheese (Asda) No. 1 โดยใช้โปรแกรม Fasta พบว่าไม่มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนสำหรับ arginine deiminase ใน EMBL database แต่กลับคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *lp1241* จาก *Lactobacillus plantarum* WCFS1 (accession number: AL935255) โดยมีความเหมือนกันถึง 99.282 % แต่ยังไม่มียางานถึงหน้าที่ของโปรตีนผลผลิตของยีนดังกล่าว

ในขณะที่การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วน (ความยาว 467 นิวคลีโอไทด์ โดยเริ่มจากนิวคลีโอไทด์ตัวแรกที่อยู่ถัดจาก primer rdi30) ของชิ้น DNA ที่สังเคราะห์จากเชื้อที่แยกจากครีม

เบรียว (โฟรมอสต์) No. 8 โดยใช้โปรแกรม Fasta พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวมีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนสำหรับ arginine deiminase จากสิ่งมีชีวิตต่างๆที่มีรายงานใน EMBL database ดังแสดงในตารางที่ 2

7. การออกแบบ primers สำหรับสังเคราะห์ DNA บริเวณที่เหลือของยีนสำหรับ arginine deiminase และบริเวณข้างเคียง

จากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน DNA ที่สังเคราะห์จากเชื้อที่แยกจากครีมเบรียว (โฟรมอสต์) No. 8 ซึ่งพบว่ามีลักษณะเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนสำหรับ arginine deiminase จาก *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 และ *L. lactis* subsp. *lactis* ML3 สูงถึง 99.786 และ 99.572 % ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ทำให้ทราบว่ายีน DNA ที่สังเคราะห์ได้น่าจะเป็นชิ้นส่วนของยีนสำหรับ arginine deiminase และเชื้อที่แยกได้น่าจะมีความใกล้เคียงกับ *L. lactis* เป็นอย่างมาก

ดังนั้นในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนสำหรับ arginine deiminase ที่สมบูรณ์ รวมทั้งยีนข้างเคียงที่เกี่ยวข้องกับ ADI pathway ของเชื้อที่แยกได้ จึงทำการออกแบบ specific primers จำนวน 3 คู่ คือ rdi-fwd และ rdi-rev; rdi-fwd2 และ rdi-rev2; และ rdi-fwd3 และ rdi-rev3 จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับ ADI pathway จาก *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 (accession number: AJ250129) เพื่อใช้ในการสังเคราะห์ชิ้นส่วน DNA ที่ประกอบไปด้วยยีนสำหรับ arginine deiminase และยีนข้างเคียงโดยวิธี PCR ซึ่ง primers ที่ออกแบบไว้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้

rdi-fwd (forward):

5'-CTTCTTGGGGTTGCTGC-3'

rdi-rev (reverse):

5'-AATACTGAGTTTACTTCTGC-3'

rdi-fwd2 (forward):

5'-GGAAAAATAATGACATCACC-3'

rdi-rev2 (reverse):

5'-TGTTTTCTTCTCTTGAATCCC-3'

rdi-fwd3 (forward):

5'-TGTTATCATGATTTGTTATGCC-3'

rdi-rev3 (reverse):

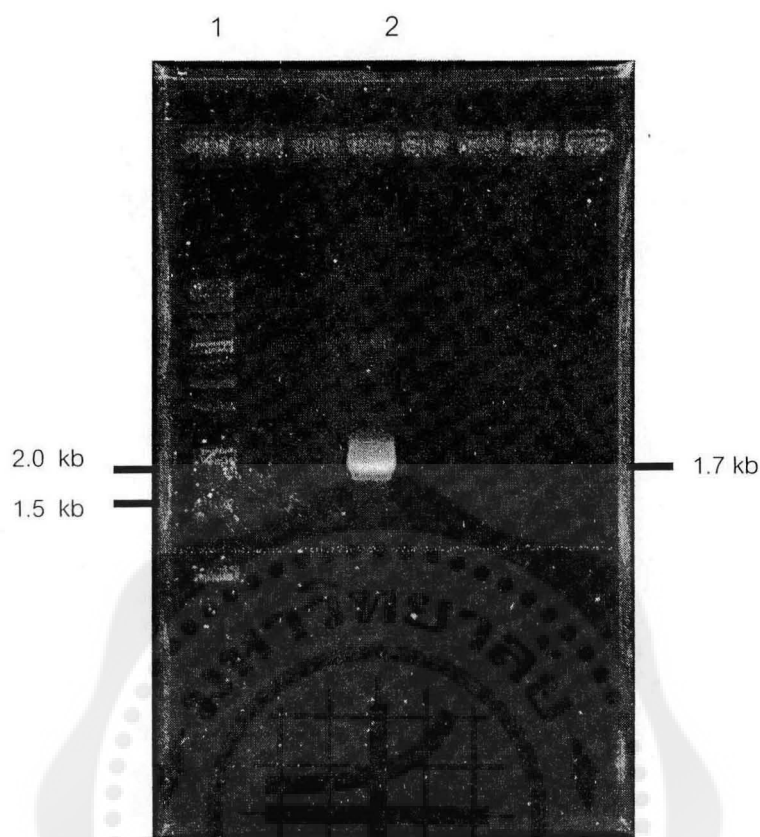
5'-ATGCTACATCAGAAATGTAGC-3'

จากนั้นทำ PCR โดยใช้ primers rdi-fwd และ rdi-rev; rdi-fwd2 และ rdi-rev2; และ rdi-fwd3 และ rdi-rev3 เพื่อสังเคราะห์ DNA ของยีนที่เกี่ยวข้องกับ ADI pathway โดยใช้ chromosomal DNA ที่สกัดจากเชื้อที่แยกจากครีมเปรี้ยว (โฟร์โมสต์) No. 8 เป็นต้นแบบ ซึ่งคาดว่าจะได้ DNA ผลผลิตขนาด 1.7 kb, 2.4 kb และ 2.4 kb ตามลำดับ พบว่าชิ้น DNA ที่สังเคราะห์ได้จากการทำ PCR ด้วยคู่ของ primer rdi-fwd และ rdi-rev; และ rdi-fwd2 และ rdi-rev2 มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดที่คาดไว้ ดังแสดงในรูปที่ 2 และ 3 ตามลำดับ ส่วนการทำ PCR ด้วย primer rdi-fwd3 และ rdi-rev3 นั้นปรากฏว่าไม่มีการสังเคราะห์ DNA จาก primers ดังกล่าว

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานใน EMBL database ที่มีความคล้ายคลึงกับลำดับ

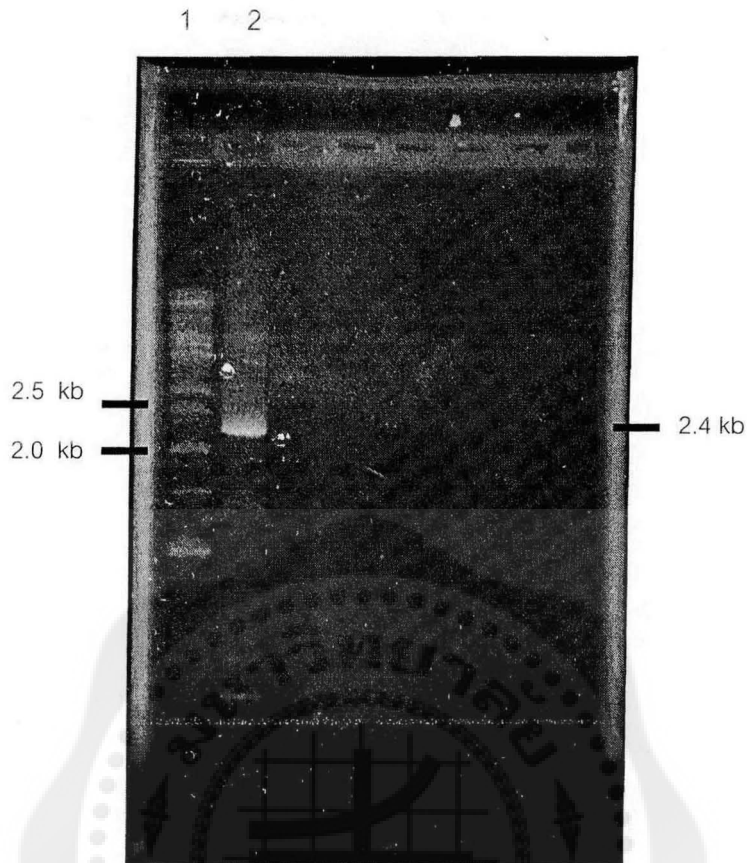
นิวคลีโอไทด์ของ DNA ที่สังเคราะห์จาก ครีมเปรี้ยว (โฟรโมสต์) No. 8

Gene/Organism	Accession No.	% identity
arginine deiminase gene/ <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363	AJ250129	99.786
arginine deiminase gene/ <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ML3	AF282249	99.572
arginine deiminase gene/ <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IL1403	AE006433	92.505
arginine deiminase gene/ <i>Oenococcus oeni</i> ATCC23279	AF124851	61.123
arginine deiminase gene/ <i>Lactobacillus sakei</i> BL13	AJ001330	58.774
arginine deiminase gene/ <i>Lactobacillus hilgardii</i> X1B	AJ421514	57.773



รูปที่ 2 DNA ผลผลิตที่ได้จากการทำ PCR ด้วย primers rdi-fwd และ rdi-rev โดยใช้ chromosomal DNA ของแบคทีเรียที่แยกจากครีมีเปรี้ยว (โฟร์โมสต์) No. 8 เป็นต้นแบบ

แถวที่ 1 คือ 1 kb DNA Marker (Amersham Biosciences), แถวที่ 2 คือ DNA ผลผลิตที่ได้จากการทำ PCR



รูปที่ 3 DNA ผลผลิตที่ได้จากการทำ PCR ด้วย primers rdi-fwd2 และ rdi-rev2 โดยใช้ chromosomal DNA ของแบคทีเรียที่แยกจากครีมีเปรี้ยว (โฟร์โมสต์) No. 8 เป็นต้นแบบ

แถวที่ 1 คือ 1 kb DNA Marker (Amersham Biosciences), แถวที่ 2 คือ DNA ผลผลิตที่ได้จากการทำ PCR

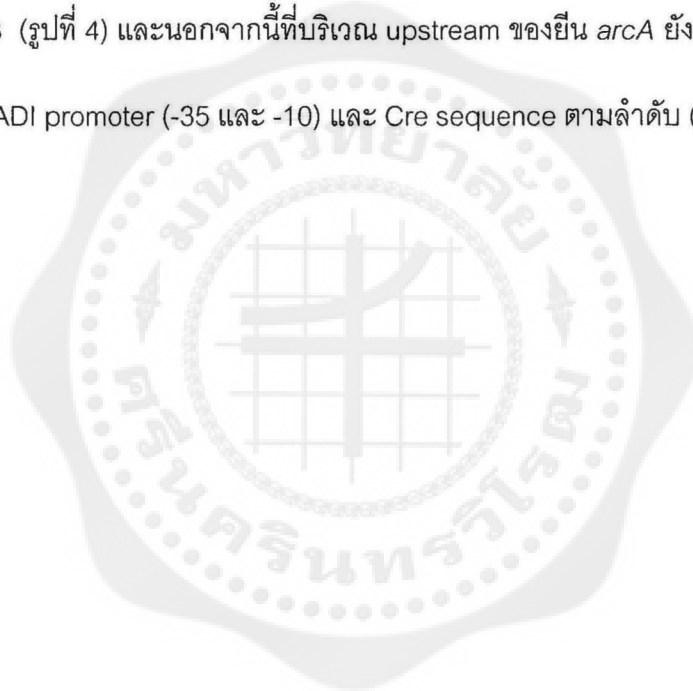
หลังจากนั้นนำ DNA ที่สังเคราะห์ได้จากการทำ PCR โดยใช้ primers ทั้งสองคู่โคลนเข้าไปในพลาสมิด pCR2.1-TOPO แล้วนำ ligation mixes ไปใช้ในการทำ transformation กับ competent *E. coli* TOP10 ทำการคัดเลือกโคโลนี *E. coli* ที่ได้รับ recombinant plasmids โดยการทำ Colony PCR โดยใช้ primers M13(-20) และ M13(rev) แล้วทำการสกัด recombinant plasmids ทั้งสองแบบ จากนั้นนำพลาสมิดไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น DNA ทั้งสองดังกล่าว หลังจากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองที่ได้ซึ่งมีบริเวณที่ซ้อนกัน (overlap) มาเชื่อมกันและแสดงไว้ในรูปที่ 4

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้พบว่าประกอบด้วย 3 open reading frames ซึ่งน่าจะเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับ ADI pathway คือ *arcA*, *arcB* และ *arcD* (บางส่วน) ตามลำดับ (รูปที่ 4) อย่างไรก็ตามในกรณีของ *arcD* นั้นพบว่ามี cytosine เกินมา 1 ตัวที่นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 2990 และทำให้เกิด frameshift ขึ้นในการแปลรหัสของนิวคลีโอไทด์ไปเป็นกรดอะมิโนที่บริเวณดังกล่าว ในที่นี้จึงตัด cytosine ดังกล่าวออกจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในการแปลรหัสไปเป็นลำดับกรดอะมิโน เพื่อให้ได้ลำดับกรดอะมิโนของ ArcD ที่ต่อเนื่องกัน

หลังจากนั้นทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนทั้งสามกับลำดับกรดอะมิโนที่มีรายงานใน EMBL database โดยใช้โปรแกรม Fasta และจากผลที่ได้ สำหรับกรดอะมิโนของยีนแต่ละตัว (คือ ArcA, ArcB และ ArcD) จะนำลำดับกรดอะมิโนจาก database ที่ให้ค่าความเหมือนสูงสุด 5 อันดับแรกมาทำการเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนดังกล่าวเพื่อหาค่า % identity และ % similarity โดยใช้โปรแกรม Align (Needle) และพบว่าลำดับกรดอะมิโนของยีนทั้งสามมีความเหมือนับกรดอะมิโนของยีนสำหรับ arginine deiminase, ornithine transcarbamylase และ arginine/ornithine antiporter จากแบคทีเรียชนิดต่างๆตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3

นอกจากนี้ สำหรับลำดับกรดอะมิโนของยีนแต่ละตัว (ArcA, ArcB และ ArcD) ยังได้นำลำดับกรดอะมิโนจาก database ที่ให้ค่าความเหมือนสูงสุด 5 อันดับแรก (ตารางที่ 3) มาทำ multiple sequence alignments โดยใช้โปรแกรม ClustalW เพื่อทำการเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโน ซึ่งผลของการเปรียบเทียบดังกล่าวได้แสดงไว้ในรูปที่ 5-7 ตามลำดับ

และจากการนำลำดับกรดอะมิโนของยีนทั้งสามมาหา protein motifs โดยใช้โปรแกรม PPSearch พบว่ามี Aspartate and ornithine carbamoyltransferases signature ภายในลำดับกรดอะมิโนของ ArcB (รูปที่ 4) และนอกจากนี้ที่บริเวณ upstream ของยีน *arcA* ยังพบบริเวณควบคุม ซึ่งได้แก่ Arg box, ADI promoter (-35 และ -10) และ Cre sequence ตามลำดับ (รูปที่ 4)



Arg box

1: TCCTGAAAATATGTAAAAATTATACTTAATTATTTAATCTCTTATCAAAAAG

52: AATTTAATTCTTGCTGATGAGAGATTTTTTGTATTATTTTAAAAACATTT

103: TGTAATAAGTATTTTAATAAAAACTAAGAATCCCATGATAAGCAAAGG

154: AGTGCATAAACGTGAAATTGTCAGAATATAAA[^]AAAAACATGTATAAATGAAT

-35

205: AAACCTTTGTAAAGTGTAGCATTAGTGCTTCGACAAAAAAATATGCATAGATG

-10 Cre sequence ribosome
binding site

256: TATAATTTCTTTGTAAACGATTCTAATAATACTGAATCGAAATCAGAAAGG

arcA →

307: ATA[^]CTCCAAAATGAACAATGGAATTAATGTTAACTCAGAAATTGGGAAATT
M N N G I N V N S E I G K L

358: AAAATCAGTCCTTCTCCACCGCCAGGTGCAGAGGTAGAGAATATTACCCC
K S V L L H R P G A E V E N I T P

409: AGACACAATGAAACAGCTTTTATTTGATGATATTCCATATCTCAAAATTGC
D T M K Q L L F D D I P Y L K I A

460: TCAAAAAGAGCATGATTTCTTTGCTCAAACATTGCGTGACAATGGTGCTGA
Q K E H D F F A Q T L R D N G A E

511: AACTGTTTATATCGAAAATCTTGCAACAGAAGTTTTTGAAAAATCATCTGA
T V Y I E N L A T E V F E K S S E

562: AACAAAAGAAGAGTTTTTAAGCCATTTGTTGCATGAAGCAGGTTACCGTCC
T K E E F L S H L L H E A G Y R P

577: AGGACGTACTTATGATGGATTGACTGAATATTTAACTTCAATGCCAACAAA
G R T Y D G L T E Y L T S M P T K

628: AGATATGGTTGAAAAAGTCTATGCCGGTGTTTCGTAAAAATGAATTGGATAT
D M V E K V Y A G V R K N E L D I

679: CAAACGCACAGCACTTAGTGACATGGCAGGTTCTGATGCAGAAAATTATTT
K R T A L S D M A G S D A E N Y F

730: CTACCTCAACCCATTACCAAATGCTTACTTCACACGTGACCCACAAGCTTC
Y L N P L P N A Y F T R D P Q A S

781: AATGGGTGTCGGAATGACTATTAATAAAATGACTTTCCAGCACGTCAACC
M G V G M T I N K M T F P A R Q P

823: TGAAAGCTTGATTCCCGAATATGTGATGGCTAACCATCCACGTTTCAAAGA
E S L I P E Y V M A N H P R F K D

883: CACTCCAATCTGGCGTGATCGTAATCATACTACTCGTATTGAAGGTGGTGA
T P I W R D R N H T T R I E G G D

934: TGAATTAATTCTTAATAAGACAACCTGTAGCAATCGGGGTTTCAGAACGTAC
E L I L N K T T V A I G V S E R T

985: TTCATCTAAACAATTCAAATCTTGCTAAAGAATTATTTGCAAATCCACT
S S K T J Q N L A K E L F A N P L

1036: TTCAACATTTGATACAGTGCTTGCGGTTGAAATCCCTCATAACCATGCAAT
S T F D T V L A V E I P H N H A M

1087: GATGCACTTGGATACTGTATTTACAATGATTAACCATGATCAATTTACAGT
M H L D T V F T M I N H D Q F T V

1138: TTTCCCAGGAATTATGGATGGTGCAGGTAACATCAACGTCTTCATTCTTCG
F P G I M D G A G N I N V F I L R

1189: TCCTGGTCAAGATGGTGAAGTTGAAATTGAACATTTGACAGATCTTAAAGC
P G Q D G E V E I E H L T D L K A

1240: AGCCCTTAAGAAAGTCTTGAACCTTTCAGAACTTGACTTGATTGAATGTGG
A L K K V L N L S E L D L I E C G

1291: TTCAGGTGACCCAATTGCCGCTCCTCGTGAACAATGGAATGATGGTTCAAA
S G D P I A A P R E Q W N D G S N

1342: TACCTTGCTATTCTCCAGGAGAAATCGTTACTTATGACCGTAACTATGT
T L A I A P G E I V T Y D R N Y V

1393: AACTGTTGAACTTTTGAAAGAACATGGTATTAAAGTTCATGAAATTTCTTTC
T V E L L K E H G I K V H E I L S

1444: AAGTGAACCTTGGTCGTGGTGGTGGGAGCGCGTTGTATGTCACAACCACT
S E L G R G R G G A R C M S Q P L

1495: TTGGCGTGAAGATTTGTAATCTGAAGACTTTTACATAATGTTCTTGAATTT
W R E D L *

1546: AACTACTAAATTTAAAAACAAGTGAATTTATAAATTTAGTTTTATAAGTTC

1597: GTAAATTAAGATGAAAGTAGCTCATTAATGTAATTTAAAAAATTCATTA

ribosome
 binding site *arcB*
 →

1648: AATATTTAAAAATAGAAAAAGGAAAAAATAATGACATCACCCTTATTAC
M T S P L I T

1699: AAAAGCAGAAGTAACTCAGTATTCCAAGGTCGTAGCTTGCTTGCTGAAAA
K A E V N S V F Q G R S L L A E K

1750: AGATTTTACACCAGCTGAAATTAACCTTGTTGATTTTGGTCTTCATTT
D F T P A E I N Y L V D F G L H L

1801: GAAAGCATTGAAACAACAAAATATTCCTCATCACTATCTTGAAGGTAAAA
K A L K Q Q N I P H H Y L E G K N

1852: TATTGCCTTGTTATTTGCAAAACTTCAACTCGTACACGTGCCGCATTTAC
I A L L F A K T S T R T R A A F T

1903: AACTGCTGCCATTGACCTTGGTGCTCATCCTGAATATCTTGGTGCAAATGA
 T A A I D L G A H P E Y L G A N D
 1954: TATCCAACTCGGAATCAAAGAATCAACAGAAGATACAGCACGTGTTCTTGG
 I Q L G I K E S T E D T A R V L G
 2005: TTCAATGTTTGATGCTATTGAACGTCGTGGATTTTCTCAAAAAGAAGTTGA
 S M F D A I E R R G F S Q K E V E
 2056: AGATTTGGCAAAATACTCTGGTGTTCCAGTTTGGAAATGGTTTGACAGATGA
 D L A K Y S G V P V W N G L T D D
 2107: TTGGCATCCAACACAAATGATTGCTGACTTTATGACGGTAAAAGAAAACCTT
 W H P T Q M I A D F M T V K E N F
 2158: TGGTTACCTTAAAGGGTTGACATTAGTTTACGTTGGTGATGGTCGTAACAA
 G Y L K G L T L V Y V G D G R N N
 2209: CATGGCAAATTCATCTCATCGTAACTGGTTCTATGCTTGGTGTAATGTTCA
 M A N S L I V T G S M L G V N V H
 2260: TATCGTTGCTCCAGATTCATTCCTTCTAAAGAAGTTATGGATATTGC
 I V A P D S L H P S K E V M D I A
 2311: CAATAAATTTGCTGAAAAATCAGGTGCTAAACCTCTTGCAACTTCTAATAT
 N K F A E K S G A K P L A T S N I
 2362: TGAAGAAGGTGTTAAAGGTGCTAACATTATTTATTCAGACGTTTGGGTATC
 E E G V K G A N I I Y S D V W V S
 2413: TATGGGAGAATCTAACTGGGAAGAACGTGTTAAACTTTTGACACCATACCG
 M G E S N W E E R V K L L T P Y R
 2464: CATCACAATGGATATGTTGAAAATGACAGGAAATGCTGACAACGGTAAACT
 I T M D M L K M T G N A D N G K L
 2515: TATCTTTATGCACTGCTTACCAGCCTTCCATGCACTGAAACTGAATATGG
 I F M H C L P A F H D T E T E Y G
 2566: TAAAGAAATCAAAGAAAAATATGGTTTGACAGAAATGGAAGTTACTGACGA
 K E I K E K Y G L T E M E V T D E
 2617: AGTTTTCCGTTCTAAATATGCTCGTCAATTTGAAGAAGCAGAAAATCGTAT
 V F R S K Y A R Q F E E A E N R M
 2668: GCACTCAATCAAAGCAATTATGGCTGCAACTTTGGGTAATTTATTTATCCC
 H S I K A I M A A T L G N L F I P
 2719: AGCAGTTCCTGAAGATTTTAAATAATTAAAATAGATAATTTGTCAGTTTAC
 A V P E D F K *
 2770: TGACAGAGCTGTCAGTAACTGATAGATTTTGATTTAAGTCGTTGAAAGCA
 ribosome
 binding site
 2821: GTCTAAGATAGTTTTTAGACTGTTTTGACGGTTAAAATCATTGAAAGGATT

arcD

2872: GATATGGACGCAGAAAATAAAAAAGGAATTGGCCTTGCTGCTTTAGTTGCG
M D A E N K K G I G L A A L V A

2923: ATTATTGTTTCTGGAGCGATTGGTGGTGGGGTATTCAACCTCTCTAACGAT
I I V S G A I G G G V F N L S N D

2974: TTAGCAACAAATGCATCCACCTGGTGGTGTGTCATTTTCATGGATCGTTAT
L A T N A S P G G V V I S W I V I

3025: TGGTTTTGGTATATTAATGTTGGTTTTATCACTGAATCATTTGGTGGTAAA
G F G I L M L V L S L N H L V V N

3076: CAAACCTGAACTTTCAGGTGTGTCAGATTATGCACGTGCTGGTTTTGGTAA
K P E L S G V S D Y A R A G F G N

3127: TATGGTTGGTTTTATCTCAGGATGGGGTTATTGGTTATCTGCTTGGGCAGG
M V G F I S G W G Y W L S A W A G

3178: TAATATTGCCTTTTGCTGTTTTGATGATGACTGCCGTTGACTATTTCTTCCC
N I A F A V L M M T A V D Y F F P

3229: CGGCGTTTTTCAAGCTAAGAATGGCTCATTGACCATTCTGTCAGTAATTGT
G V F Q A K N G S L T I L S V I V

3280: TGTTTCAATTGTTTCGTGGGGATTGACTTTACTTGTTATGCGAGGTGTTGA
V S I V S W G L T L L V M R G V E

3331: AGGGGCTGCTGCCATTAATGCAATTGTCCTTGTTGCAAAATTGATTCCCTT
G A A A I N A I V L V A K L I P L

3382: GTTGTCTTTGTTATTGCTGGAATAGTTACTTTCAAAGCTGGAGTCTTTAG
F V F V I A G I V T F K A G V F S

3433: TGCTCACTTTTGGCAAAATTCGTTGCGAATACAAATGCTGATGGCGTAAT
A H F W Q N F V A N T N A D G V I

3484: TAAGAGTTTAACTTGGTCTAATATGACTGGCGGAGATTTATTCAGTCAAGT
K S L T W S N M T G G D L F S Q V

3535: CAAAGGTTCACTCATGGTTATGATTTGGGTCTTCGTCGGAATCGAAGGGGC
K G S L M V M I W V F V G I E G A

3586: TGCTATGATGGGTGACCGTGCCAAACGTAAATCAGATGCTGGTAAAGCTTC
A M M G D R A K R K S D A G K A S

3637: AATTCTCGGTTTGATTGCCTTGTTAGTGATTTATATCTTGCTCTCACTATT
I L G L I A L L V I Y I L L S L L

3688: GCCATTTGGTTTTATGAGCCAACAAGAACTAGCTAATACTGGTCAACCAGG
P F G F M S Q Q E L A N T G Q P G

3739: TTTGGTTCATATTTTGAACGCTATGGTTGGCGGTTGGGGTGGTTCATAAT
L V H I L N A M V G G W G G S L M

3790: GGCCATTGGTCTTGTGATTTCACCTTCTTGGAGCTTGGTTGTCATGGACAAT
 A I G L V I S L L G A W L S W T M

3841: GCTTCCCGTTGAAGCAACACAACAATTATCAGAACAAAAATTACTTCCTAG
 L P V E A T Q Q L S E Q K L L P S

3892: TTGGTTTGGTAACTTAATGACAAAGGTGCACCTAAAAATTCACCTTTTGCT
 W F G K L N D K G A P K N S L L L

3943: GACACAATTGATTGTTCAAATTTTCTTGATTGTCACCTATTTTGTAGCTGA
 T Q L I V Q I F L I V T Y F V A D

3994: TGCTTACAATGTCTTTGTTTACCTTTGTACCGCTGTTATCATGATTGTGA
 A Y N V F V Y L C T A V I M I C Y

4045: TGCCTTAGTTGGTTTATATCTCTTTAAATTA
 A L V G L Y L F K L

รูปที่ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการเชื่อมระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตของ PCR 2 ชิ้น ที่เกิดจาก primers 2 คู่คือ rdi-fwd และ rdi-rev; และ rdi-fwd2 และ rdi-rev2 (ไม่ได้แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primers rdi-fwd และ rdi-rev2 ที่ปลายทั้งสองข้าง ตามลำดับ) และลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ open reading frames ที่พบ

ตำแหน่งของบริเวณที่น่าจะเป็นยีนสำหรับ ADI pathway คือ *arcA*: 317-1513, *arcB*: 1679-2743 และ *arcD* (บางส่วน): 2875-4075 (ในการแปลรหัสของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *arcD* ไปเป็นลำดับกรดอะมิโน (ArcD) มีการตัดนิวคลีโอไทด์ที่ 2990 ซึ่งทำให้เกิด frameshift ออกเพื่อให้ได้ลำดับกรดอะมิโนที่ต่อเนื่องกัน)

พร้อมกันนี้ได้แสดงบริเวณที่น่าจะเป็น ribosome binding sites สำหรับยีนทั้งสาม และบริเวณควบคุมซึ่งอยู่บริเวณ upstream ของยีน *arcA* ซึ่งได้แก่ Arg box, ADI promoter (-35 และ -10) และ Cre sequence ตามลำดับ

นอกจากนี้ภายในลำดับกรดอะมิโนของ ArcB ยังพบ protein motif คือ Aspartate and ornithine carbamoyltransferases signature (FAKTSTRT)

ตารางที่ 3 ลำดับกรดอะมิโนของผลผลิตของยีนที่มีรายงานใน EMBL database ที่มีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสจาก 3 open reading frames ที่พบในผลผลิตของ PCR คือ ArcA, ArcB และ ArcD ตามลำดับ

Gene product	Gene product/Organism from the EMBL database	Accession No.	% identity	% similarity
ArcA	arginine deiminase/ <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363	AJ250129	99.5	99.8
	arginine deiminase/ <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ML3	AF282249	99.3	99.5
	arginine deiminase/ <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IL1403	AE006433, AE005176	98.5	99.3
	arginine deiminase/ <i>Lactobacillus hilgardii</i> X1B	AJ421514	59.0	73.2
	arginine deiminase/ <i>Lactobacillus sakei</i> BL13	AJ001330	59.6	74.8
ArcB	ornithine transcarbamylase/ <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363	AJ250129	100.0	100.0
	ornithine transcarbamylase/ <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ML3	AF282249	99.2	100.0
	ornithine transcarbamylase/ <i>Lactobacillus hilgardii</i> X1B	AJ421514	72.9	86.2

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Gene product	Gene product/Organism from the EMBL database	Accession No.	% identity	% similarity
ArcB	ornithine transcarbamoylase/ <i>Lactobacillus sakei</i> BL13	AJ001330	72.4	83.7
	ornithine transcarbamylase/ <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	AJ312276	73.2	83.9
ArcD	arginine/ornithine antiporter (ArcD1)/ <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IL1403	AE006433, AE005176	99.8	100.0
	arginine/ornithine antiporter/ <i>Lactococcus</i> <i>lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363	AJ250129	99.5	99.8
	arginine/ornithine antiporter (ArcD1)/ <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ML3	AF282249	97.5	97.8
	arginine/ornithine antiporter (ArcD2)/ <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ML3	AF282249	72.0	83.2
	arginine/ornithine antiporter (ArcD2)/ <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IL1403	AE006432, AE005176	71.0	83.5


```

ArcA      -----MNNGINVNSEIGKLSVLLHRPGAEEVENITPDTMKQLLFDDIPYLKIAQKEHDF 55
ArcA1     -----MNNGINVNSEIGKLSVLLHRPGAEEVENITPDTMKQLLFDDIPYLKIAQKEHDF 55
ArcA2     -----MTNNGINVNSEIGKLSVLLHRPGAEEVENITPDTMKQLLFDDIPYLKIAQKEHDF 55
ArcA3     -----MNNGINVNSEIGKLSVLLHRPGAEEVENITPDTMKQLLFDDIPYLKIAQKEHDF 55
ArcA4     MEVTQMTSPIHNYS*IGKLKTVLLKRPGREIENFTPDMMPRLLFDDIPYLPKIAQKEHDYF 60
ArcA5     -----MTSPIHVNSEIGKLTLLKRPGEVENITPDIMYRLLFDDIPYLPKIQKEHQF 55
           *..*:*****:***:****:***:***:***** *****
           *..*:*****:***:****:***:***:***** *****

ArcA      AQTLRDNGAETVYIENLATEVEFEKSS-ETKEEFLSHLLHEAGYRPGRTYDGLTEYLTSM 114
ArcA1     AQTLRDNGAETVYIENLATEVEFEKSS-ETKEEFLSHLLHEAGYRPGRTYDGLTEYLTSM 114
ArcA2     AQTLRDNGAETVYIENLATEVEFEKSS-ETKEEFLSHLLHEAGYRPGRTYDGLTEYLTSM 114
ArcA3     AQTLRDNGAETVYIENLATEVEFEKSS-ETKEEFLSHLLHEAGYRPGRTYDGLTEYLTSM 114
ArcA4     ADTLRDNGVEVLYLEKLSAEALDAGGEEVRNHFLEQMLTSGYAAGSIHDALKEYLGSMN 120
ArcA5     AQTLRDNGVEVLYLENLAAEAIDAG--DVKEAFLDKMLNESHIKSPQVQAALKDYLSMA 113
           *:*****.*..*:***:***:***:***:***:***** *****
           *:*****.*..*:***:***:***:***:***:***** *****

ArcA      TKDMVEKVYAGVRKNELDIKRTALSDMAGSDAENYFYLNLPLNAYFTRDPQASMGVGMTI 174
ArcA1     TKDMVEKVYAGVRKNELDIKRTALSDMAGSDAENYFYLNLPLNAYFTRDPQASMGVGMTI 174
ArcA2     TKDMVEKVYAGVRKNELDIKRTALSDMAGSDAENYFYLNLPLNAYFTRDPQASMGVGMTI 174
ArcA3     TKDMVEKIYAGVRKNELDIKRTALSDMAGSDAENYFYLNLPLNAYFTRDPQASMGVGMTI 174
ArcA4     NQDMVVKIMEGVRKNELDFVPKDLVSCA-ENQDYEFYMDPMPNLYFTRDPSACIGDGLSI 179
ArcA5     TLDMVEKIMAGVRTNEIDIKSALKDVS-ADDDYPFYMDPMPNLYFTRDPAASMGDLTI 172
           .****:***:***:***:***:***:***** *****
           .****:***:***:***:***:***:***** *****

ArcA      NKMTFPARQPESLIPEYVMANHPRFKDT--PIWRDRNHTTRIEGGDELILNKTVAIGVS 232
ArcA1     NKMTFPARQPESLIPEYVMANHPRFKDT--PIWRDRNHTTRIEGGDELILNKTVAIGVS 232
ArcA2     NKMTFPARQPESLIPEYVMANHPRFKDT--PIWRDRNHTTRIEGGDELILNKTVAIGVS 232
ArcA3     NKMTFPARQPESLIPEYVMANHPRFKDT--PIWRDRNHTTRIEGGDELILNKTVAIGVS 232
ArcA4     NHMTFVARQRESLFNETIIKYHPRFANKGIHVWRDRNHTTRIEGGDELVLNNHVMAIGVS 239
ArcA5     NKMTFEARQRESMFLVIMQHHPRFANQGAQVWRDRDHIDRMEGGDELILSDKVLAIIGS 232
           *:*** ***:***:***:***:***:***:***** *****
           *:*** ***:***:***:***:***:***:***** *****

ArcA      ERTSSKTIQNLAKELFANPLSTFDTVLAVEIPHNHAMHLDTVFTMINHDQFTVFPGIMD 292
ArcA1     ERTSSKTIQNLAKELFANPLSTFDTVLAVEIPHNHAMHLDTVFTMINHDQFTVFPGIMD 292
ArcA2     ERTSSKTIQNLAKELFANPLSTFDTVLAVEIPHNHAMHLDTVFTMINHDQFTVFPGIMD 292
ArcA3     ERTSSKTIQNLAKELFANPLSTFDTVLAVEIPHNHAMHLDTVFTMINHDQFTVFPGIMD 292
ArcA4     QRTSADAIQDIAKNLFKDGQ--YDTVIAIKIPHNHAMHLDTVFTMINYDQFTVHPGILG 297
ArcA5     QRTSAQSIEELAKVLFANHSG-FEKILAIKIPHKHAMHLDTVFTMIDYDKFTIHPGIQG 291
           :***:..*:***:***:***:***:***:***** *****
           :***:..*:***:***:***:***:***:***** *****

ArcA      GAGNINVFILRPGQDG-EVEIEHLTDLKAALKKVLNLSSELDLIECGSDPIAAPREQWND 351
ArcA1     GAGNINVFILRPGQDG-EVEIEHLTDLKAALKKVLNLSSELDLIECGSDPIAAPREQWND 351
ArcA2     GAGNINVFILRPGQDG-EVEIEHLTDLKAALKKVLNLSSELDLIECGSDPIAAPREQWND 351
ArcA3     GAGNINVFILRPGKDD-EVEIEHLTDLKAALKKVLNLSSELDLIECGSDPIAAPREQWND 351
ArcA4     KGGQIDTWTITPGKNEGELNLQHDLDLKKVLTALNLDLDTIPTGNGDPIIAGREQWND 357
ArcA5     AGGMVDTYILEPGNND-EIKITHQTDLEKVLRLDALEVPELTLPICGGGDVAVAPREQWND 350
           .*::: :***:***:***:***:***:***** *****
           .*::: :***:***:***:***:***:***** *****

ArcA      GSNTLAIAPGEIVTYDRNYVTVELLKEHGKIVHEILSSELGRGRGGARCMQSPLWREDL- 410
ArcA1     GSNTLAIAPGEIVTYDRNYVTVELLKEHGKIVHEILSSELGRGRGGARCMQSPLWREDL- 410
ArcA2     GSNTLAIAPGEIVTYDRNYVTVELLKEHGKIVHEILSSELGRGRGGARCMQSPLWREDL- 410
ArcA3     GSNTLAIAPGEIVTYDRNYVTVELLKEHGKIVHEILSSELGRGRGGARCMQSPLWREDL- 410
ArcA4     GSNTLAIAPGVVVTYRNYVSNELLRKHGLKVLEVISSELSRGRGGPRCMSCPIVREDLKK 418
ArcA5     GSNTLAIAPGVVVTYDRNYVSNENLRQYGLKVIIEVPSSELSRGRGGPRCMSPVLRRTK- 409
           ***** :***:***:***:***:***:***** *****
           ***** :***:***:***:***:***:***** *****

```

รูปที่ 5 ผลการทำ multiple sequence alignment ระหว่างลำดับกรดอะมิโนของ ArcA และ

ลำดับกรดอะมิโนที่คล้ายคลึงกันจาก EMBL database โดยที่ ArcA1-5 หมายถึงลำดับกรดอะมิโนของ

สำหรับเอนไซม์ arginine deiminase จาก accession numbers: AJ250129, AF282249,

AE006433, AJ421514 และ AJ001330 ตามลำดับ

```

ArcB      MTSPLITKAEVNSVFQGRSLLAEKDFTPAEINYLVDFGLHLKALKQQNIPHHYLEGKNIA 60
ArcB1     MTSPLITKAEVNSVFQGRSLLAEKDFTPAEINYLVDFGLHLKALKQQNIPHHYLEGKNIA 60
ArcB2     MTSPLITKAEVNSVFQGRSLLAEKDFTPAEINYLVDFGLHLKALKQQNIPHHYLEGKNIA 60
ArcB3     -----MTKDFRQNVFQGRSVLAEKDFSAAELEYLIDFGLHLKALKGAGIPHHYLEGKNIA 55
ArcB4     -----MTNSVFQGRSLLAEKDFTKSELEYLIDFSLHLKDLKKKGIPHHYLEGKNIA 51
ArcB5     -----MNSVFQGRSLLAEKDFSRAELEYLVDFS IHLKELKKKGIPHHYLEGKNIA 50
           :.*****:*****: :*::*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:

ArcB      LLFAKTSTRTRAAFTTAAIDLGAPHEYLGANDIQLGIKESTEDTARVLGSMFDAIERRGF 120
ArcB1     LLFAKTSTRTRAAFTTAAIDLGAPHEYLGANDIQLGIKESTEDTARVLGSMFDAIERRGF 120
ArcB2     LLFAKTSTRTRAAFTTAAIDLGAPHEYLGANDIQLGIKESTEDTARVLGSMFDAIERRGF 120
ArcB3     LLFEKSSTRTRSAFTTASIDLGAPHEYLQNDIQLGKKESTSDTAKVLGSMFDGIEFRGF 115
ArcB4     LLFEKNSTRTRAAFTTAAIDLGAPHEYLGNNDIQLGKKESVEDTAKVLGSMFDGIEFRGF 111
ArcB5     LLFEKTSTRTRSAFTTAAIDLGAPHEYLGANDIQLGKKESVEDTAIVLGSMFDGIEFRGF 110
           *** *:*****:*****:*****:*** ***** ***,** *****:*** *:

ArcB      SQKEVEDLAKYSGVPVWNGLTDDWHPTQMIADFMTVKENFGYLGKLTLYVVGDRNNMAN 180
ArcB1     SQKEVEDLAKYSGVPVWNGLTDDWHPTQMIADFMTVKENFGYLGKLTLYVVGDRNNMAN 180
ArcB2     SQKEVEDLAKYSGVPVWNGLTDDWHPTQMIADFMTVKENFGHLKGLTLYVVGDRNNMAN 180
ArcB3     KQSDAEILARDSGVPVWNGLTDEWHPTQMLADFMTVKENFGKLQGLTLYVVGDRNNVAN 175
ArcB4     AK-VVEDLAKYSCVPVWNGLTDEWHPTQMIADFMTVKENFGKLKGVTLTYVVGDRNNMAN 170
ArcB5     SQEVVEDLAKYSGVPVWNGLTQWHPTQMIADFMTVKENFGRLEGITLYVVGDRNNMAN 170
           :  * *:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:

ArcB      SLIVTGSM LGVNVHIVAPDSLHPSKEVMDIANKFAEKSGAKPLATS NIEEGVKGANIIYS 240
ArcB1     SLIVTGSM LGVNVHIVAPDSLHPSKEVMDIANKFAEKSGAKPLATS NIEEGVKGANIIYS 240
ArcB2     SLIVTGSM LGVNVHIVAPDSLHPTKEVMDIANKFAEKSGAKPLATS NIEEGVKGANIIYS 240
ArcB3     SLLVTGAILGVNIHIVAPKALFPTEETQNIAGKFAEKSGAKLVITDDLDEGLKGSNNVYT 235
ArcB4     SLLVTGSM LGVNIHIVAPDSLQPTQEVRLAEGYAKETGSKNMITSDVDAGVKGSVDLYT 230
ArcB5     SLLVTGAILGVNVRICAPKELFPSDEVVNYAKEFAKESGAELMITDDVAKGVKGANVLYT 230
           **,:**,:**,:*: * *: * *: * *: * *: * *: * *: * *: * *: * *:

ArcB      DVVWSMGESN-WEERVKLLTPYRITMDMLKMTGNADNGKLI FMHCLPAFHDTEYGKEI 299
ArcB1     DVVWSMGESN-WEERVKLLTPYRITMDMLKMTGNADNGKLI FMHCLPAFHDTEYGKEI 299
ArcB2     DVVWSMGESN-WEERVKLLTPYRITMDMLKMTGNADNGQLI FMHCLPAFHDTEYGKEI 299
ArcB3     DVVWSMGESN-WEERVKELTPYQVNMEAMKKTGTPDD-QLI FMHCLPAFHNTDTQYGKEI 293
ArcB4     DVVWSMGEE DKFEERVNLLKPYQINMDMVKKTG NEN---MIIMHCLPAFHDIETEGYKKI 287
ArcB5     DVVWSMGEE DKFEERVNLLKPYQINMAMLEKTENMDG-DLIVLHCLPAFHDTKTQYGEMV 289
           *****: :*****: * *:*: * : * : * :*:*****: :*:*: :

ArcB      KEKYGLTEMEVTDEVFRSKYARQFEEAENRMHSIKAIMAATLGNLFIPAVPEDFK 354
ArcB1     KEKYGLTEMEVTDEVFRSKYARQFEEAENRMHSIKAIMAATLGNLFIPAVPEDFK 354
ArcB2     KEKYGLTEMEVTDEVFRSKYARQFEEAENRMHSIKAIMAATLGNLFIPAVPEDFK 354
ArcB3     KEKYGITEMEVTDEVFTSKYARQFEEAENRMHSIKAMMAATLGNLFIPRV----- 343
ArcB4     DEQFGIQEMEITDEAFRSKYARQFEEAENRMHSIKAIMAATLGNLFIPQA----- 337
ArcB5     AEKFGITEMEITDEVFRSKYGRQFEEAENRMHSIKAIMAATLGNLFIPRV----- 339
           *:*: **:**:* * * *.*****:*****:*****:*****:

```

รูปที่ 6 ผลการทำ multiple sequence alignment ระหว่างลำดับกรดอะมิโนของ ArcB และลำดับกรดอะมิโนที่คล้ายคลึงกันจาก EMBL database โดยที่ ArcB1-5 หมายถึงลำดับกรดอะมิโนของสำหรับเอนไซม์ ornithine transcarbamylase จาก accession numbers: AJ250129, AF282249, AJ421514, AJ001330 และ AJ312276 ตามลำดับ

```

ArcD      MDAENKKGIGLAALVAIIIVSGAIGGGVFNLSNDLATNASPGGVVISWIVIGFGLMLVLS 60
ArcD1     MDAENKKGIGLAALVAIIIVSGAIGGGVFNLSNDLATNASPGGVVISWIVIGFGLMLVLS 60
ArcD2     MDAENKKGIGLAALVAIIIVSGAIGGGVFNLSNDLATNASPGGVVISWIVIGFGLMLVLS 60
ArcD3     MDAENKKGIGLAALVAIIIVSGAIGGGVL-ASRLATNASPGGVVISWIVIGFGLMLVLS 59
ArcD4     MENKKTGKISLFALLAIIISGAIGGGVFNLANDLARGSTPGGVVISWLFIFGGLMLVLS 60
ArcD5     MENKKTGKISLFALLAIIISGAIGGGVFNLANDLANGSTPGGVVISWLFIFGGLMLVLS 60
          *: :.***. * **:***:*****: : ** .:****:***:*****:*****

ArcD      LNHLVVNKPESGVSDYARAGFGNMVGFISGWGYWLSAWAGNIAFAVLMMTAVDYFFPGV 120
ArcD1     LNHLVVNKPESGVSDYARAGFGNMVGFISGWGYWLSAWAGNIAFAVLMMTAVDYFFPGV 120
ArcD2     LNHLVVNKPESGVSDYARAGFGNMVGFISGWGYWLSAWAGNIAFAVLMMTAVDYFFPGV 120
ArcD3     LNHLVVNKPESGVSDYARAGFGNMVGFISGWGYWLSAWAGNIAFAVLMMTAVDYFFPGA 119
ArcD4     FNRLITIKPDLGVSDYARAGFGDFVGLSGWGYWISAWTGTIGFAVLMMTSADYFFPSK 120
ArcD5     FNRLITIRPKLSGVSDYAREGFGDFIGFLSGWGYWISAWTGTIGFAVLMMTSADYFFPSK 120
          :*.*: .*.***** **::*:***:***:*.*.*****:*****.

ArcD      FQAKNGSLTILSVIIVSVISWGLTLLVMRGVEGAAAINAIVLVAKLIPLFVFVIAGIVTF 180
ArcD1     FQAKNGSLTILSVIIVSVISWGLTLLVMRGVEGAAAINAIVLVAKLIPLFVFVIAGIVTF 180
ArcD2     FQAKNGSLTILSVIIVSVISWGLTLLVMRGVEGAAAINAIVLVAKLIPLFVFVIAGIVTF 180
ArcD3     FQAKNGSLTILSVIIVSVISWGLTLLVMRGVEGAAAINAIVLVAKLIPLFVFVIAGIVTF 179
ArcD4     FQAKNGSLTILSVIIVSVISWGLTLLVMRGVEGAAAINAIVLVAKLIPLFVFVIAGIVTF 180
ArcD5     FANSNGSLTVLSVIIIVSVISWGLTLLVMRGVEGAAAINAIVLVAKLIPLFVFVIAGIVTF 180
          * .*****:***:***:*** * :* ***** * :*:***:***:***:***:

ArcD      KAGVFSAHFWQNFVANTNADGVIKSLTWSNMTGGDLFSQVKGSLMVMIVFVVGIEGAAMM 240
ArcD1     KAGVFSAHFWQNFVANTNADGVIKSLTWSNMTGGDLFSQVKGSLMVMIVFVVGIEGAAMM 240
ArcD2     KAGVFSAHFWQNFVANTNADGVIKSLTWSNMTGGDLFSQVKGSLMVMIVFVVGIEGAAMM 240
ArcD3     KAGVFSAHFWQNFVANTNADGVIKSLTWSNMTGGDLFSQVKGSLMVMIVFVVGIEGAAMM 239
ArcD4     KANVFTQHFQWTFSTNFAADGSVKDFVWHATTVSLGSSQIKGSLMVMIVFVVGIEGATMM 240
ArcD5     KADVFTQHFQWTFSTNLAADGSVKSLVWHAMTAGGLDQIKGSLMVMIVFVVGIEGAAMM 240
          *.*: .***:*.:* *** :*:. * ..* .*:*****:*****:***

ArcD      GDRAKRSDAGKASILGLIALLVIIYLLSLPFGFMSQQELANTGQPLVHILNAMVGGW 300
ArcD1     GDRAKRSDAGKASILGLIALLVIIYLLSLPFGFMSQQELANTGQPLVHILNAMVGGW 300
ArcD2     GDRAKRSDAGKASIFGLIALLVIIYLLSLPFGFMSQQELANTGQPLVHILNAMVGGW 300
ArcD3     GDRAKRSDAGKASIFGLIALLVIIYLLSLPFGFMSQQELANTGQPLVHILNAMVGGW 299
ArcD4     GNRAKKSDTAKTTVIGLAVLLVVIYVLLSLPYGYMDQASLANVKAPGLVYILNEMVGGW 300
ArcD5     GNRAKKSDTAKATIIGLAVLLVVIYVLLSLPYGYMDQASLANVKAPGLVYILNEMVGGW 300
          *:***:***:*.*:*** .*****:*****:*.*. * .***. *****: * *****

ArcD      GGSLSMAIGLVISLLGAWLSWTMLPVEATQQLSEQKLLPSWFGKLNKDGAPKNSLLLTQLI 360
ArcD1     GGSLSMAIGLVISLLGAWLSWTMLPVEATQQLSEQKLLPSWFGKLNKDGAPKNSLLLTQLI 360
ArcD2     GGSLSMAIGLVISLLGAWLSWTMLPVEATQQLSEQKLLPSWFGKLNKDGAPKNSLLLTQLI 360
ArcD3     GGSLSMAIGLVISLLGAWLSWTMLPVEATQQLSEQKLLPSWFGKLNKDGAPKNSLLLTQLI 359
ArcD4     GGSLSMAVGLMISLLGAWLSWTMLPVEATQQLAEQKLLPSWFGKLNKDHAPSNSLLITQLM 360
ArcD5     GGSLSMAIGLVISLLGAWLSWTMLPVEATQQLAEQKLLPSWFGKLNKDHAPSNSLLITQLM 360
          *****:*.*****:*****:*.*****:*****. **.*.***:***:

ArcD      VQIFLIIVTYFVADAYNVFVYLCTAVIMICYALVGLYLFKL----- 400
ArcD1     VQIFLIIVTYFVADAYNVFVYLCTAVIMICYALVGLYLFKLGIQEKKTSNIIIGFIAAAAFQ 420
ArcD2     VQIFLIIVTYFVADAYNVFVYLCTAVIMICYALVGLYLFKLGIQEKKTSNIIIGFIAAAAFQ 420
ArcD3     VQIFLIIVTYFVADAYNVFVYLCTAVIMICYALVGLYLFKLGIQEKKTSNIIIGFIAAAAFQ 419
ArcD4     IQIFIIITYFVANAYNVFIYMATAVIMICYALVGAYLFKLGLEASVKNILIGFFTFAFQ 420
ArcD5     IQIFIIITYFVANAYNVFIYMATAVIMICYALVGAYLLKIGIKEGSIKNILIGFFTFAFQ 420
          :***:*.*****:*****:*.*****:***** **:*

ArcD      -----
ArcD1     ILALYYSWQFVWLSLILYAVGFILYALGKKEYGTMSTAELIATFVLTVLGILAVFGVY 480
ArcD2     ILALYYSWQFVWLSLILYAVGFILYALGKKEYGTMSTTEVIATFILTVLGILAVFGVY 480
ArcD3     ILALYYSWQFVWLSLILYAVGFILYALGKKEYGTMSTVHN----- 459
ArcD4     ALALYLSWQFVWLSLILYAVGFILYALGKKEYGTMSTVHN----- 480
ArcD5     ALALYLSWQFVWLSLILYAVGFILYALGKKEYGTMSTVHN----- 480

ArcD      -----
ArcD1     GNWLARCTWN----- 490
ArcD2     GNWLGLQDALGIDGNTLLVAVVPLIVVTFIVYFVVRSDINKKGIKN 526
ArcD3     -----
ArcD4     CGAKAGTAFDLRGLLGF----- 497
ArcD5     CGAKSGTALDLRGLLGY----- 497

```

รูปที่ 7 ผลการทำ multiple sequence alignment ระหว่างลำดับกรดอะมิโนของ ArcD (บางส่วน) และลำดับกรดอะมิโนที่คล้ายคลึงกันจาก EMBL database โดยที่ ArcD1-5 หมายถึงลำดับกรดอะมิโนของสำหรับ arginine/ornithine antiporter จาก accession numbers: AE006433, AJ250129, AF282249 (ArcD1), AF282249 (ArcD2) และ AE006432 ตามลำดับ

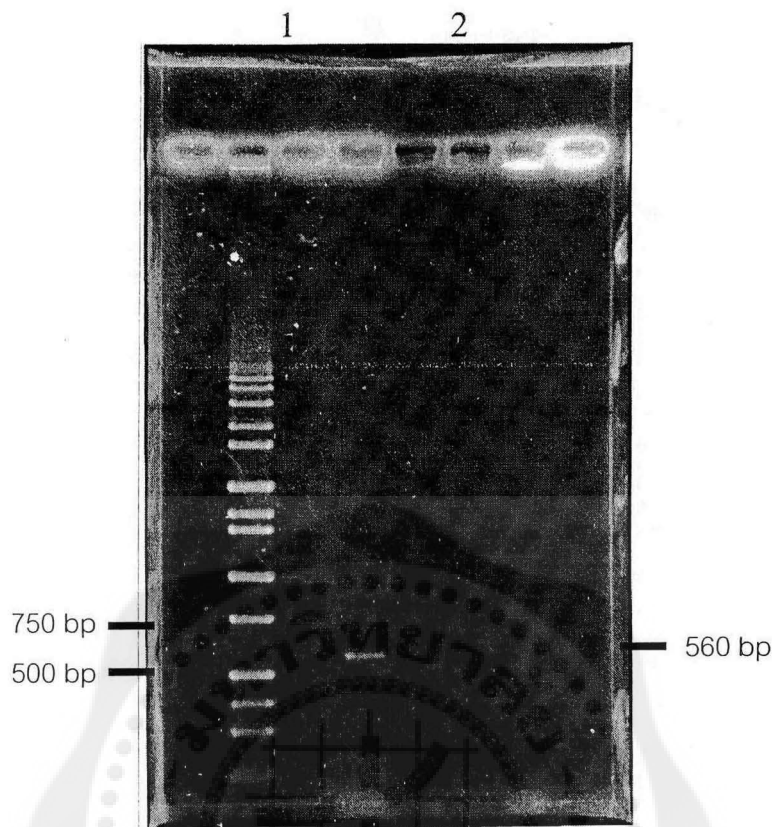
จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนทั้งสาม (ArcA, ArcB และ ArcD) กับลำดับกรดอะมิโนที่มีรายงานอยู่ใน EMBL database (ตารางที่ 3) พบว่าลำดับกรดอะมิโนที่ได้นั้นมีความคล้ายคลึงสูงมากกับลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ *L. lactis* โดยที่ลำดับกรดอะมิโนของ ArcA มีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของ arginine deiminase จาก *L. lactis* สายพันธุ์ต่างๆ โดยมีค่า % identity สูงกว่า 98 % ในขณะที่ลำดับกรดอะมิโนของ ArcB มีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของ ornithine transcarbamylase จาก *L. lactis* กว่า 99 % และลำดับกรดอะมิโนของ ArcD มีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของ arginine/ornithine antiporter (ArcD1) จาก *L. lactis* โดยมีค่า % identity สูงกว่า 97 % และมีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของ arginine/ornithine antiporter (ArcD2) จาก *L. lactis* กว่า 71 % จากข้อมูลข้างต้นจึงคาดว่าเชื้อที่แยกได้น่าจะเป็นสมาชิกของ *L. lactis*

8. การจำแนกเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้ในระดับ subspecies

ในการจำแนกเชื้อ *L. lactis* ในระดับ subspecies ได้ใช้วิธีของ Nomura *et al.* (2002) ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่าง *L. lactis* subsp. *lactis* และ *L. lactis* subsp. *cremoris* โดย

อาศัย Restriction fragment length polymorphism โดยการนำ chromosomal DNA ของเชื้อที่แยกได้มาใช้เป็นต้นแบบสำหรับการทำ PCR โดยใช้ primers gadB21 และ GAD7 เพื่อสังเคราะห์ชิ้นส่วนของยีน *gadB* ซึ่งเป็นยีนสำหรับเอนไซม์ glutamate decarboxylase (GAD) โดยนำ DNA ผลผลิตที่ได้ซึ่งมีขนาดประมาณ 560 bp (รูปที่ 8) โคลนเข้าไปใน pCR2.1-TOPO จากนั้นนำพลาสมิดที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น DNA ขนาด 560 bp ดังกล่าว

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA ผลผลิตของ PCR (รูปที่ 9) ไม่พบบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Ase I* และรวมทั้งจากขนาดของชิ้น DNA ที่สังเคราะห์ได้ซึ่งมีขนาดประมาณ 560 bp สนับสนุนว่าเชื้อที่แยกได้จากครีมเปรี้ยว (โฟร์โมสต์) No. 8 นี้ น่าจะเป็นสมาชิกของ *L. lactis* subsp. *cremoris*



รูปที่ 8 DNA ผลผลิตที่ได้จากการทำ PCR ด้วย primers gadB21 และ GAD7 โดยใช้ chromosomal DNA ของแบคทีเรียที่แยกจากครีมเปรี้ยว (โฟร์โมสต์) No. 8 เป็นต้นแบบ

แถวที่ 1 คือ Hi-Lo Marker (Minnesota Molecular), แถวที่ 2 คือ DNA ผลผลิตที่ได้จากการทำ PCR

1: TATTCATGAGAGAACGCATAAAGTAGCCATGTATTTAGCAGAAGAAATTGA

52: AAAAACAGGAATGTTTGAGATTATGAACGATTGGTCACAATTGCCAATTGT

103: CTGCTACAAATTAAGAAAATTCAAATCTTGGTTGGAATCTTTATGATTT

154: GGCAGATCGTTTATTTAATGAAGGGATGGCAAGTGCCTGCTTATCCACTTC

205: CTAAAAATTTGGAAAATGAAATCATTCAACGTTTAGTAATTCGAGCAGATT

256: TCGGGATGAATATGGCATTTAACATGTTCAAGATATACAAGAAGCAATTG

307: ATGCACTAAACAAGGCTCATATTCTATTTTCATCAGGAACCTGAAAAATAAAA

358: CATATGGCTTTACTCACTAAAAATAAAAGCGATATATCTTAGATATATCGC

409: TTTTATTTTATTTTAAGCTATTTACTAATTAGCTTATCGCCTATTCTTTTC

460: ATAGTATTTATCCAAAATTTCCATTTTTAAAGGAGTAATTTTAGATAGAGG

511: G

รูปที่ 9 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA ผลผลิตจากการทำ PCR ด้วย primer gad B21 และ GAD7 โดยใช้ chromosomal DNA ของแบคทีเรียที่แยกจากครีมเปรี้ยว (โฟร์โมสต์) No. 8 เป็นต้นแบบ (แสดงเฉพาะบริเวณที่อยู่ระหว่าง primers ทั้งสอง)

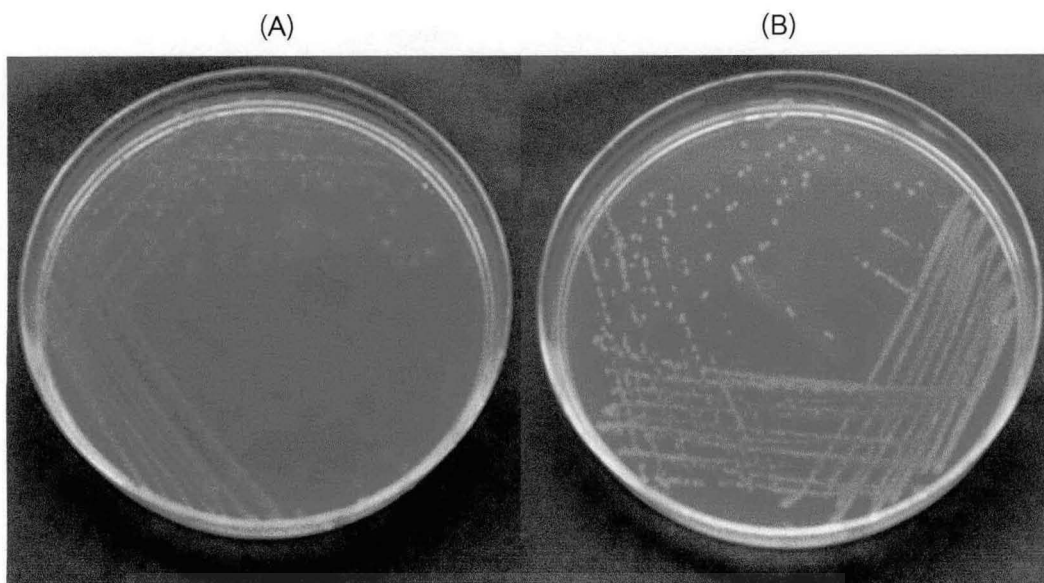
บริเวณที่ขีดเส้นใต้คือบริเวณที่สามารถใช้บอกความแตกต่างระหว่าง *L. lactis* 2 subspecies กล่าวคือในกรณีของ *L. lactis* subsp. *lactis* ที่บริเวณดังกล่าวจะพบบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ Ase I (ATTAAT) ในขณะที่ *L. lactis* subsp. *cremoris* จะไม่พบ

9. การทดสอบสมบัติของ ADI promoter

จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับ ADI pathway (รูปที่ 4) พบว่าที่บริเวณ upstream ของ *arcA* มีบริเวณที่น่าจะเป็นบริเวณควบคุมการแสดงออกของยีน ซึ่งประกอบด้วย Arg box, ADI promoter (-35 และ -10) และ Cre sequence ตามลำดับ

ในการทดสอบบริเวณที่เชื่อน่าจะเป็น ADI promoter ว่าสามารถทำหน้าที่เป็นโปรโมเตอร์ได้หรือไม่ ใช้วิธีการทำ PCR โดยใช้ primers rdi-fwd และ rdi1253-33 ซึ่งจะให้ DNA ผลผลิตขนาดประมาณ 500 bp ซึ่งครอบคลุมบริเวณควบคุมดังกล่าว และรวมทั้งยีน *arcA* บางส่วนอีกด้วย จากนั้นนำ DNA ที่สังเคราะห์ได้มาโคลนใน pBlue-TOPO โดยที่ cloning site จะอยู่บริเวณ upstream ของยีน *lacZ* ที่ปราศจาก promoter ซึ่งถ้าชิ้น DNA ที่โคลนเข้าไบนั้นมีสมบัติเป็น promoter ก็จะทำให้เกิดการแสดงออกของยีน *lacZ* ทำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ β -galactosidase ซึ่งสามารถสลาย X-gal ให้เป็นสารสีน้ำเงินได้

จากนั้นนำ recombinant DNA ที่ได้มาทำ transformation กับ competent *E. coli* Top10 แล้วเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เติม X-gal หลังจากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนีสีน้ำเงินและสีขาวมาสกัดพลาสมิด แล้วทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ cloning sites ของพลาสมิดทั้งสอง พบว่าพลาสมิดที่ได้จากโคโลนีสีน้ำเงินคือ pBlue-TOPO ที่มีชิ้น DNA ขนาด 500 bp เข้าแทรกในทิศทางที่ถูกต้อง ในขณะที่พลาสมิดที่ได้จากโคโลนีสีขาวคือ pBlue-TOPO ที่ไม่ได้รับชิ้น DNA ซึ่งลักษณะของโคโลนีทั้งสองได้แสดงไว้ในรูปที่ 10



รูปที่ 10 ลักษณะของโคโลนีของ *E. coli* TOP10 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติม X-gal โดยที่ (A) มีพลาสมิด pBlue-TOPO ที่มีชิ้น DNA ขนาด 500 bp เข้าแทรกในทิศทางที่ถูกต้อง และ (B) มี pBlue-TOPO ที่ไม่ได้รับชิ้น DNA ดังกล่าว

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ได้ทำการแยกแบคทีเรียจากอาหารหมักที่ผลิตหรือจำหน่ายในประเทศไทยจำนวนทั้งสิ้น 14 ชนิด โดยเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีวงใส (clear zone) อยู่รอบโคโลนีเมื่อเจริญบน MRS medium ที่เติม calcium carbonate จากนั้นนำเชื้อที่ได้มาตรวจสอบรูปร่าง การติดสีแกรม และ catalase activity แล้วคัดเลือกเฉพาะเชื้อที่มีรูปร่างท่อน ทรงกลม หรือรูปรี ที่ติดสีแกรมบวก และเป็น catalase negative ได้ทั้งสิ้น 43 isolates นำเชื้อที่คัดเลือกไว้มาทดสอบความสามารถในการสร้าง acetoin และความสามารถในการใช้อาร์จินีนเป็นแหล่งพลังงาน พบว่ามีเชื้อจำนวน 29 isolates ที่มีสมบัติทั้งสองประการดังกล่าว ซึ่งเชื้อเหล่านี้จะถูกนำไปทดสอบต่อไป

ทำการสกัด chromosomal DNA จากเชื้อทั้ง 29 isolates แล้วนำไปใช้เป็นต้นแบบในการทำ PCR เพื่อสังเคราะห์ชิ้นส่วนของยีน arginine deiminase โดยใช้ degenerate primers 2 ชุด ซึ่งออกแบบมาจากลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ arginine deiminase ของแบคทีเรียแลคติก *Lactococcus lactis* และ *Lactobacillus sakei* ที่มีรายงานอยู่ใน EMBL database

ในการทำ PCR โดยใช้ primers ชุดที่ 1 (rdi29 และ rdi2) ไม่พบการสังเคราะห์ DNA ที่ต้องการจาก chromosomal DNA ทั้ง 29 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นไปได้ว่าบริเวณของลำดับกรดอะมิโนที่ใช้ในการออกแบบ degenerate primer rdi29 อาจไม่ใช่บริเวณ conserved region ของเอนไซม์ arginine deiminase ของแบคทีเรียแลคติก อย่างไรก็ตามได้มีรายงานการใช้ primer rdi2 ร่วมกับ degenerate primer อีกตัวหนึ่ง (rdi1) ในการสังเคราะห์ชิ้นส่วนของยีน arginine deiminase จาก *Lactococcus lactis* (Aungpraphapornchai, 2000)

จากการใช้ primers ชุดที่ 2 (rdi30 และ rdi2) ในการทำ PCR พบว่ามีการสังเคราะห์ DNA ที่มีขนาดที่ต้องการ (ประมาณ 670 bp) จาก DNA 2 ตัวอย่างคือจาก Red Leicester cheese (Asda) No. 1 และครีมเปรี้ยว (โฟรโมสต์) No. 8 และจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ DNA ผลผลิตของ PCR ที่สังเคราะห์จากเชื้อที่แยกจาก Red Leicester cheese (Asda) No. 1 พบว่าเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *lp1241* จาก *Lactobacillus plantarum* ถึง 99.282% ซึ่งหน้าที่ของโปรตีนผลผลิตของยีนดังกล่าวยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่ไม่พบความเหมือนระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน DNA ดังกล่าวและของยีนสำหรับ arginine deiminase ใดๆใน EMBL database จึงน่าจะเชื่อได้ว่ายีน DNA ที่สังเคราะห์ได้นี้ไม่ใช่ยีนส่วนของยีน arginine deiminase แต่อย่างไรก็ตามการที่ยีน DNA ที่สังเคราะห์ขึ้นนี้มีความเหมือนกับ DNA ของ *Lactobacillus plantarum* สูงมาก จึงมีความเป็นไปได้สูงที่ว่าเชื้อที่แยกจาก Red Leicester cheese (Asda) No. 1 น่าจะเป็น *Lactobacillus plantarum* ในขณะที่การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ DNA ผลผลิตของ PCR ที่สังเคราะห์จากเชื้อที่แยกจากครีมเปรี้ยว (โฟรโมสต์) No. 8 พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนสำหรับ arginine deiminase จากแบคทีเรียแลคติกต่างๆใน EMBL database จึงมีความน่าจะเป็นสูงที่ยีน DNA ที่สังเคราะห์ขึ้นเป็นยีนส่วนของยีน arginine deiminase และนอกจากนี้การที่ยีน DNA ที่สังเคราะห์ขึ้นมีความเหมือนกับ DNA ของ *Lactococcus lactis* สูงกว่า 92% จึงน่าจะเชื่อได้ว่าเชื้อที่แยกได้จากครีมเปรี้ยว (โฟรโมสต์) No. 8 น่าจะเป็น *Lactococcus lactis*

เนื่องจาก DNA ของเชื้อที่แยกได้จากครีมเปรี้ยว (โฟรโมสต์) No. 8 มีความคล้ายคลึงสูงกับ DNA จาก *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 ซึ่งมีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน

ต่างๆ สำหรับ arginine deiminase pathway อยู่แล้วใน EMBL database ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนสำหรับ arginine deiminase และยีนอื่นๆที่เกี่ยวข้องจากเชื้อที่แยกได้นี้ จึงทำโดยการออกแบบ specific primers จำนวน 3 คู่คือ rdi-fwd และ rdi-rev; rdi-fwd2 และ rdi-rev2; และ rdi-fwd3 และ rdi-rev3 จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับ arginine deiminase pathway ของ *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 เพื่อใช้ในการทำ PCR เพื่อสังเคราะห์บริเวณของ DNA ที่เกี่ยวข้องกับ ADI pathway จากเชื้อที่แยกได้โดยตรง และจากการทำ PCR พบว่าเกิดการสังเคราะห์ DNA ที่ต้องการขึ้นจากการใช้ primers 2 คู่แรก ในขณะที่ primers คู่ที่สามไม่เกิดผลผลิตของ PCR ที่ต้องการ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า primers rdi-fwd3 และ/หรือ rdi-rev3 อาจไม่จำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อที่แยกได้ และจากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตของ PCR ทั้งสองซึ่งมีบริเวณที่ซ้อนกันมาเชื่อมกัน ทำให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 4075 bp (ไม่รวมบริเวณของ primers rdi-fwd และ rdi-rev2 ที่ปลายทั้งสองข้างตามลำดับ)

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้พบว่าประกอบด้วย 3 open reading frames ซึ่งน่าจะเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับ ADI pathway คือ *arcA*, *arcB* และ *arcD* (บางส่วน) ตามลำดับ และเมื่อทำการแปลรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสามไปเป็นลำดับกรดอะมิโน (ArcA, ArcB และ ArcD) แล้วทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่ได้กับลำดับกรดอะมิโนที่มีรายงานอยู่ใน EMBL database พบว่าลำดับกรดอะมิโนของ ArcA มีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของ arginine deiminase จาก *L. lactis* สายพันธุ์ต่างๆสูงกว่า 98% ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *arcA* น่าจะเป็นยีนสำหรับ arginine deiminase ในขณะที่ลำดับกรดอะมิโนของ ArcB มีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของ ornithine transcarbamylase จาก *L. lactis* กว่า 99% และนอกจากนี้การค้นพบ protein motif คือ Aspartate

and ornithine carbamoyltransferases signature ภายในลำดับกรดอะมิโนของ ArcB ยังเป็นข้อสนับสนุนว่า *arcB* น่าจะเป็นยีนสำหรับ ornithine transcarbamylase ในการแปลรหัสของ *arcD* ไปเป็นลำดับกรดอะมิโนนั้นพบว่ามินิกลิโอไทด์ที่เกินมา 1 ตัวที่นิกลิโอไทด์ที่ 2990 ซึ่งทำให้เกิด frameshift ขึ้น ดังนั้นในการแปลรหัสของ *arcD* จึงตัดนิกลิโอไทด์ดังกล่าวออกเพื่อให้ได้ลำดับกรดอะมิโนที่ต่อเนื่องกัน อย่างไรก็ตามนิกลิโอไทด์ที่เกินมาดังกล่าวอาจเกิดจากความผิดพลาดของการทำ PCR ทั้งนี้เนื่องจากมีรายงานว่าในการทำ PCR โดยทั่วไปจะพบนิกลิโอไทด์ที่ไม่ถูกต้องในผลผลิต DNA ที่เกิดขึ้นประมาณ 0.25% (Saiki *et al.*, 1988) หรือนิกลิโอไทด์ดังกล่าวอาจเกิดจาก mutation ของสายพันธุ์ ซึ่งสามารถพิสูจน์ได้โดยการทำ PCR อีก 2 ชุดโดยสังเคราะห์ DNA ที่ครอบคลุมบริเวณที่สงสัย แล้วเปรียบเทียบลำดับนิกลิโอไทด์ทั้งสาม โดยที่ตำแหน่งใดๆ นิกลิโอไทด์ที่เหมือนตั้งแต่ 2 ตัวขึ้นไปจะถือว่านิกลิโอไทด์นั้นถูกต้อง (Aungpraphapornchai, 2000) จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของ ArcD พบว่ามีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของ arginine/ornithine antiporter (ArcD1) จาก *L. lactis* สูงกว่า 97 % และมีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของ arginine/ornithine antiporter (ArcD2) จาก *Lactococcus lactis* กว่า 71 % ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *arcD* น่าจะเป็นยีนสำหรับ arginine/ornithine antiporter นอกจากนี้จากการที่ลำดับกรดอะมิโนทั้งสามของเชื้อที่แยกมีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของ *L. lactis* สูงมาก (97-100 %) จึงคาดว่าเชื้อที่แยกได้น่าจะเป็นสมาชิกของ *Lactococcus lactis*

ในการจำแนกเชื้อ *L. lactis* ในระดับ subspecies ทำโดยอาศัย Restriction fragment length polymorphism ของชิ้นส่วนของยีน *gadB* ซึ่งเป็นยีนสำหรับ glutamate decarboxylase (GAD) ซึ่งสามารถใช้บอกความแตกต่างระหว่าง *L. lactis* subsp. *lactis* และ *L. lactis* subsp.

cremoris ได้ (Nomura *et al.*, 2002) จากการทำ PCR เพื่อสังเคราะห์ชิ้นส่วนของยีนดังกล่าวและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตของ PCR พบว่า DNA ที่สังเคราะห์ได้มีขนาดประมาณ 560 bp และไม่พบบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Ase I* ภายในชิ้น DNA ดังกล่าวซึ่งสอดคล้องกับสมบัติของ *L. lactis* subsp. *cremoris* ในขณะที่ *L. lactis* subsp. *lactis* จะได้ DNA ผลผลิตของ PCR ขนาดประมาณ 600 bp ซึ่งมีบริเวณตัดจำเพาะของ *Ase I* อยู่ภายใน (Nomura *et al.*, 2002) ทำให้สรุปได้ว่าเชื้อที่แยกจากครีมเบียร์ว (โฟร์โมสต์) No. 8 นี้ น่าจะเป็น *L. lactis* subsp. *cremoris*

อย่างไรก็ตามสมบัติประการหนึ่งที่ใช้ในการจำแนกความแตกต่างระหว่าง *L. lactis* ทั้งสอง subspecies ข้างต้นในอดีต คือความสามารถในการผลิตแอมโมเนียจากอาร์จินีน (หรือการสลายอาร์จินีนโดยผ่าน ADI pathway) กล่าวคือ *L. lactis* subsp. *lactis* สามารถผลิตแอมโมเนียจากอาร์จินีนได้ ในขณะที่ *L. lactis* subsp. *cremoris* ไม่สามารถผลิตได้หรือผลิตได้ในปริมาณเล็กน้อย (Niven *et al.*, 1942) ในกรณีของ *L. lactis* MG1363 (ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนของ arginine deiminase และ ornithine transcarbamylase เหมือนกับ ArcA และ ArcB ของเชื้อที่แยกได้สูงถึง 99.5 และ 100.0 % ตามลำดับ) ซึ่งสามารถสลายอาร์จินีนได้ เดิมเคยถูกจัดอยู่ใน subspecies *lactis* แต่ภายหลังจากการศึกษา DNA homology พบว่าเชื้อสายพันธุ์นี้มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *L. lactis* subsp. *cremoris* มากกว่า จึงถูกย้ายมาอยู่ใน subspecies *cremoris* (Godon *et al.*, 1992) และจากการศึกษาชิ้นส่วนของยีน *gadB* ของ *L. lactis* MG1363 พบว่าเชื่อดังกล่าวให้ผลผลิต DNA ขนาด 560 bp แต่ยังไม่พบบริเวณตัดจำเพาะของ *Ase I* ด้วย (Nomura *et al.*, 2002) ในขณะที่ *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 (ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนของ arginine/ornithine antiporter (ArcD1) เหมือนกับ ArcD ของเชื้อที่แยกได้สูงถึง 99.8 %) พบว่าให้ชิ้นส่วนของยีน *gadB* ขนาด 600 bp ซึ่งมีบริเวณตัดจำเพาะของ *Ase I* แต่เชื้อสาย

พันธุ์ดังกล่าวไม่สามารถสร้างแอมโมเนียจากอาร์จินีนได้ (Nomura *et al.*, 2002) ในขณะที่เชื้อที่แยกได้จากงานวิจัยนี้สอดคล้องกับการเป็นสมาชิกของ *L. lactis* subsp. *cremoris* แต่ก็ยังเป็นเชื้อที่สามารถสลายอาร์จินีนได้ และยังแตกต่างไปจาก *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ upstream ของ *arcA* พบบริเวณที่น่าจะทำหน้าที่เป็นโปรโมเตอร์ของยีนใน ADI pathway จึงทำการทดสอบโดยการโคลน DNA บริเวณดังกล่าวไปใน pBlue-TOPO ซึ่งเป็น promoter-probe vector และปรากฏว่าชิ้น DNA ที่โคลนเข้าไปที่บริเวณ cloning site ซึ่งอยู่บริเวณ upstream ของยีน *lacZ* ที่ปราศจากโปรโมเตอร์ สามารถทำให้เกิดการแสดงออกของยีน *lacZ* ได้ จึงสรุปว่าบริเวณดังกล่าวมีคุณสมบัติเป็นโปรโมเตอร์

นอกจากนี้ที่บริเวณควบคุมยังพบบริเวณที่คล้ายกับ Arg box ของ *E. coli* ซึ่งเชื่อว่าเป็นบริเวณที่จับของ arginine repressor (ArgR) ในสถานะที่มีอาร์จินีนและยับยั้งการแสดงออกของยีนที่ถูกควบคุม (Maas, 1994) อย่างไรก็ตามในกรณีของ *Bacillus subtilis* พบว่าในสถานะที่มีอาร์จินีน arginine repressor (AhrC) จะทำหน้าที่ยับยั้งการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อาร์จินีน และกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสลายอาร์จินีน (Maas, 1994) ซึ่งสมบัติดังกล่าวยังพบใน arginine repressor (ArgR) ของ *Bacillus licheniformis* เช่นเดียวกัน (Maghnouj *et al.*, 1998) และมีรายงานถึง Arg box ที่บริเวณ upstream ของ *arc* promoter ของ *B. licheniformis* โดยมีการแสดงให้เห็นว่า ArgR จะเข้าจับที่บริเวณดังกล่าวในสถานะที่มีอาร์จินีน (Maghnouj *et al.*, 1998) นอกจากนี้ยังมีการค้นพบ Arg box ที่บริเวณ upstream ของยีนสำหรับ ADI pathway จาก *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 อีกด้วย (Aungpraphapornchai, 2000) จึงอาจเป็นไปได้ว่า

บริเวณ Arg box ดังกล่าวอาจมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนของ ADI pathway ในสภาวะที่มีอาร์จินีน

ที่บริเวณควบคุมยังพบบริเวณที่คล้ายกับ Catabolite repression element (Cre) sequence ของแบคทีเรียแกรมบวก (Weickert and Chambliss, 1990; Zuniga *et al.*, 1998) ซึ่งเชื่อว่าจะเป็นที่จับของ repressor ในสภาวะที่มีกลูโคส แล้วยับยั้งการแสดงออกของยีนที่ถูกควบคุม (Weickert and Chambliss, 1990) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาใน *L. lactis* ที่พบว่าสามารถชักนำให้ activities ของ เอนไซม์ arginine deiminase และ ornithine transcarbamylase เพิ่มขึ้นได้ในสภาวะที่มีอาร์จินีนและ มีกลูโคสปริมาณที่จำกัด (Crow and Thomas, 1982)



เอกสารอ้างอิง

Arena, M. E., de Nadra, M. and Munoz, R. (2002). The arginine deiminase pathway in the wine lactic acid bacterium *Lactobacillus hilgardii* X₁B: structural and functional study of the *arcABC* genes. *Gene* 301, 61-66.

Arnau, J., Jorgensen, F., Madsen, S. M., Vrang, A. and Israelsen, H. (1997). Cloning, expression, and characterization of the *Lactococcus lactis* *pfl* gene, encoding pyruvate formate-lyase. *Journal of Bacteriology* 179(18), 5884-5891.

Aungpraphapornchai, P. (1996). Genetic manipulation of the genes encoding diacetyl reductase and pyruvate-formate lyase in *Lactococcus lactis*. M.Sc. dissertation, the University of East Anglia, UK.

Aungpraphapornchai, P. (2000). Genetic manipulation of genes and enzymes involved in flavour generation by *Lactococcus lactis*. Ph.D. Thesis, the University of East Anglia, UK.

Barcelona-Andres, B., Marina, A. and Rubio, V. (2002). Gene structure, organization, expression, and potential regulatory mechanism of arginine catabolism in *Enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology* 184(22), 6289-6300.

Baur, H., Luethi, E., Stalon, V., Mercenier, A. and Hass, D. (1989). Sequence analysis and expression of the arginine-deiminase and carbamate-kinase genes of *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur. J. Biochem.* 179, 53-60.

Benson, K. H., Godon, J.-J., Renault, P., Griffin, H. G. and Gasson, M. J. (1996). Effect of *ilvBN*-encoded α -acetolactate synthase expression on diacetyl production in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45,107-111.

Bowles, B. L. and Juneja, V. K. (1998). Inhibition of foodborne bacterial pathogens by naturally occurring food additives. *Journal of Food Safety* 18, 101-112.

Crow, V. L. and Thomas, T. D. (1982). Arginine metabolism in lactic streptococci. *Journal of Bacteriology* 150(3), 1024-1032.

D'Hooghe, I., Wauven, C. V., Michiels, J., Tricot, C., de Wilde, P., Vanderleyden, J. and Stalon, V. (1997). The arginine deiminase pathway in *Rhizobium etli*: DNA sequence analysis and functional study of the *arcABC* genes. *Journal of Bacteriology* 179(23), 7403-7409.

Dong, Y., Chen, Y.-Y. M., Snyder, J. A. and Burne, R. A. (2002). Isolation and molecular analysis of the gene cluster for the arginine deiminase system from *Streptococcus gordonii* DL1. *Applied and Environmental Microbiology* 68(11), 5549-5553.

Feng, J., Liu, R., Wu, G. and Tang, S. (1996). Pretreatment with tetramethylpyrazine increases the release of PGI₂ and decreases TXA₂ release in isolated rat heart. *Planta Medica* 62, 379-381.

Gasson, M. J., Benson, K., Swindell, S. and Griffin, H. G. (1996). Metabolic engineering of the *Lactococcus lactis* diacetyl pathway. *Lait* 76, 33-40.

Godon, J.-J., Delorme, C., Ehrlich, S. D. and Renault, P. (1992). Divergence of genomic sequences between *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Applied and Environmental Microbiology* 58(12), 4045-4047.

Griswold, A., Chen, Y. Y., Snyder, J. A. and Burne, R. A. (2004). Characterization of the arginine deiminase operon of *Streptococcus rattus* FA-1. *Applied and Environmental Microbiology* 70(3), 1321-1327.

Hall, R. L. and Oser, B. L. (1970). Recent progress in the consideration of flavoring ingredients under the Food Additives Amendment. 4. GRAS substances. *Food Technology* 24, 533-542.

Jay, J. M. (1982a). Antimicrobial properties of diacetyl. *Applied and Environmental Microbiology* 44(3), 525-532.

Jay, J. M. (1982b). Effect of diacetyl on foodborne microorganisms. *J. of Food Sci.* 47, 1829-1831.

Kaneko, T., Watanabe, Y. and Suzuki, H. (1990). Enhancement of diacetyl production by a diacetyl-resistant mutant of citrate-positive *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 3022 and by aerobic conditions of growth. *J. Dairy Sci.* 73, 291-298.

Kim, K. H. and Lee, H. J. (1991a). Optimum conditions for the formation of acetoin as a precursor of tetramethylpyrazine during the citrate fermentation by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis FC1. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 1(3), 202-206.

Kim, K. H. and Lee, H. J. (1991b). Optimum conditions for the formation of ammonia as a precursor of tetramethylpyrazine by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar diacetylactis FC1. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 1(4), 281-284.

Lee, J.-E., Woo, G.-J. and Lee, H. J. (1996). Tetramethylpyrazine production by immobilized culture of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis FC1. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 6(2), 137-141.

Lewington, J., Greenaway, S. D. and Spillane, B. J. (1987). Rapid small scale preparation of bacterial genomic DNA, suitable for cloning and hybridization analysis. *Letters in Applied Microbiology* 5, 51-53.

Maas, W. K. (1994). The arginine repressor of *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews* 58(4), 631-640.

Maga, J. A. and Sizer, C. E. (1973). Pyrazines in foods. *CRC Critical Reviews in Food Technology* 4, 39-115.

Maghnouj, A., Cabral, T. F. D., Stalon, V. and Wauven, C. V. (1998). The *arcABDC* gene cluster, encoding the arginine deiminase pathway of *Bacillus licheniformis*, and its activation by the arginine repressor ArgR. *Journal of Bacteriology* 180(24), 6468-6475.

Niven, Jr., C. F., Smiley, K. L. and Sherman, J. M. (1942). The hydrolysis of arginine by streptococci. *Journal of Bacteriology* 43, 651-660.

Nomura, M., Kobayashi, M. and Okamoto, T. (2002). Rapid PCR-based method which can determine both phenotype and genotype of *Lactococcus lactis* subspecies. *Applied and Environmental Microbiology* 68(5), 2209-2213.

Ohtani, K., Bando, M., Swe, T., Banu, S., Oe, M., Hayashi, H. and Shimizu, T. (1997). Collagenase gene (*colA*) is located in the 3'-flanking region of the perfringolysin O (*pfoA*) locus in *Clostridium perfringens*. *FEMS Microbiology Letters* 146, 155-159.

Pang, P. K. T., Shan, J. J. and Chiu, K. W. (1996). Tetramethylpyrazine, a calcium antagonist. *Planta Medica* 62, 431-435.

Platteeuw, C., Hugenholtz, J., Starrenburg, M., van Alen-Boerrigter, I. and de Vos, W. M. (1995). Metabolic engineering of *Lactococcus lactis*: influence of the overproduction of α -acetolactate synthase in strains deficient in lactate dehydrogenase as a function of culture conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 61(11), 3967-3971.

Ruepp, A. and Soppa, J. (1996). Fermentative arginine degradation in *Halobacterium salinarum* (formerly *Halobacterium halobium*): genes, gene products, and transcripts of the *arcRACB* gene cluster. *Journal of Bacteriology* 178, 4942-4947.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.

Seitz, E. W., Sandine, W. E., Elliker, P. R. and Day, E. A. (1963). Distribution of diacetyl reductase among bacteria. *J. Dairy Sci.* 46, 186-189.

Swindell, S. R., Benson, K. H., Griffin, H. G., Renault, P., Ehrlich, S. D. and Gasson, M. J. (1996). Genetic manipulation of the pathway for diacetyl metabolism in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 62(7), 2641-2643.

Tanon, T., Bourdineaud, J.-P. and Lonvoud-Funel, A. (2001). The *arcABC* cluster encoding the arginine deiminase pathway of *Oenococcus oeni*, and arginine induction of a CRP-like gene. *Research in Microbiology* 152, 653-661.

Weickert, M. J. and Chambliss, G. H. (1990). Site-directed mutagenesis of a catabolite repression operator sequence in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6238-6242.

Zuniga, M., Champomier-Verges, M., Zagorec, M. and Perez-Martinez, G. (1998). Structural and functional analysis of the gene cluster encoding the enzymes of the arginine deiminase pathway of *Lactobacillus sake*. *Journal of Bacteriology* 180(16), 4154-4159.

Zuniga, M., Miralls, M. C. and Perez-Martinez, G. (2002). The production of *arcR*, the sixth gene of the *arc* operon of *Lactobacillus sakei*, is essential for expression of the arginine deiminase pathway. *Applied and Environmental Microbiology* 68(12), 6051-6058.

