

การโคลน และการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของยีนที่เกี่ยวข้องกับ arginine deiminase pathway  
จากแบคทีเรียแลคติกที่แยกจากผลิตภัณฑ์นมหมัก

ปริญญาานิพนธ์  
ของ  
นัทธ์หทัย สงบพันธ์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา  
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

พฤษภาคม 2548

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

๕๖๙.๖๕๕

๒๕๑๑๗

๖.๖

การโคลน และการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของยีนที่เกี่ยวข้องกับ arginine deiminase pathway  
จากแบคทีเรียแลคติกที่แยกจากผลิตภัณฑ์นมหมัก

๕๖ ก.ค. ๒๕๔๘

บทคัดย่อ  
ของ  
นัทธ์หทัย สงบพันธ์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

พฤษภาคม ๒๕๔๘

๒ ๒๖๐๐๖๒

นัทธ์หทัย สงบพันธ์ (2548) การโคลน และการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของยีนที่เกี่ยวข้องกับ *arginine deiminase pathway* จากแบคทีเรียแลคติกที่แยกจากผลิตภัณฑ์นมหมัก ปริญญา นิพนธ์ วท ม (ชีววิทยา) กรุงเทพฯ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ คณะ กรรมการควบคุม อาจารย์ ดร ประวัติ อังประภาพรชัย, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ขจีนาฏ โพธิเวช กุล, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร อนันต์ พุทธิยาสถาพร, อาจารย์ ดร อรอนงค์ พริ้งศุลกะ

Arginine deiminase (ADI) pathway ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสลายอาร์จินีน สามารถพบได้ใน แบคทีเรียหลายชนิด รวมทั้งแบคทีเรียแลคติก โดยผลผลิตหนึ่งที่ได้จากการสลายอาร์จินีนผ่าน ADI pathway คือแอมโมเนีย ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของ tetramethypyrazine (TMP) ซึ่งเป็นสารที่มีความสำคัญ ทางอุตสาหกรรมอาหารและทางการแพทย์

ผู้วิจัยได้แยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกจำนวน 25 isolates จากผลิตภัณฑ์นมหมักชนิด ต่างๆที่ผลิตหรือจำหน่ายในประเทศไทย และสกัดโครโมโซมจากเชื้อดังกล่าวเพื่อใช้เป็นต้นแบบในการ สังเคราะห์ชิ้นส่วนของยีนสำหรับ arginine deiminase ด้วยการทำให้ PCR โดยใช้ degenerate primers และสามารถสังเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการได้จากครีมาเปรี้ยว (ไฟรีโมสต์) No 8 จากนั้นทำการ สังเคราะห์ดีเอ็นเอสำหรับยีนอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับ ADI pathway ด้วยการทำให้ PCR โดยใช้ specific primers จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้พบว่าประกอบด้วย 3 open reading frames คือ *arcA*, *arcB* และ *arcD* ตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของ ArcA และ ArcB พบว่า มีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของ arginine deiminase และ ornithine transcarbamylase จาก *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* MG1363 96% และ 97 3% ตามลำดับ และพบว่าลำดับกรด อะมิโนของ ArcD เหมือนกับ arginine/ornithine antiporter (ArcD1) ของ *L lactis* subsp *lactis* MG1363 84 8% นอกจากนี้ยังพบโปรโมเตอร์ที่บริเวณ upstream ของ *arcA* และทำการยืนยันสมบัติ การเป็นโปรโมเตอร์โดยการโคลนบริเวณดังกล่าวเข้าไปใน pBlue ซึ่งเป็น promoter-probe vector และดูการแสดงออกของยีน *lacZ* นอกจากนี้ได้ทำการจำแนกเชื้อที่แยกได้ในระดับ subspecies โดย การทำให้ PCR เพื่อสังเคราะห์ชิ้นส่วนของยีน *gad* และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดังกล่าว ปรากฏว่าไม่พบบริเวณตัดจำเพาะของ *Asel* ซึ่งเมื่อพิจารณารวมกับความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน ของ ArcA, ArcB และ ArcD ทำให้สรุปได้ว่าเชื้อที่แยกได้น่าจะเป็น *L lactis* subsp *cremoris*

Cloning and DNA sequence analysis of arginine deiminase pathway genes from  
lactic acid bacteria isolated from fermented dairy products

AN ABSTRACT

BY

NUTHATHAI SANGOBPUN

Presented in partial fulfillment of the requirements for the

Master of Science Degree of Biology

At Srinakharinwirot University

May 2005

Nuthathai Sangobpun (2005) *Cloning and DNA sequence analysis of arginine deiminase*

*pathway genes from lactic acid bacteria isolated from fermented dairy products*

Master thesis M Sc (Biology) Bangkok Graduate School Srinakharinwirot

University Advisor Committee Dr Prawat Aungpraphapornchai, Assist Prof

Kajeenart Potivejku, Assist Prof Dr Anan Poopittayasataporn, Dr Onanong

Pringsulaka

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 tetramethypyrazine (TMP), an important substance in food industry and medicine.

Twenty-five isolates of lactic acid bacteria from fermented dairy products 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 desirable 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 DNA sequence revealed 3 open reading frames: *arcA*, *arcB* and *arcC* (partial), respectively. Analysis of amino acid sequences of ArcA and ArcB showed 96% and 97.3% identity to arginine deiminase and ornithine transcarbamylase of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363, respectively. Amino acid sequence of ArcD showed 84.8% identity to arginine/ornithine antiporter (ArcD1) of *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363. In addition, a promoter region was found upstream from *arcA*. The promoter activity was confirmed by cloning the DNA region into pBlue, a promoter-probe vector, and showing the expression of *lacZ* gene. The bacterial isolate was also identified to subspecies level by PCR amplification and DNA sequence analysis of *gad* gene fragment, in which *Asel* restriction site was not observed. Combining this with the % identities of ArcA, ArcB and ArcD, it can be concluded that the isolate was a member of *L. lactis* subsp. *cremoris*.

ปริญญาานิพนธ์  
เรื่อง

การโคลน และการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของยีนที่เกี่ยวข้องกับ arginine deiminase pathway  
จากแบคทีเรียแลคติกที่แยกจากผลิตภัณฑ์นมหมัก

ของ  
นางสาวนันทิพย์ สงบพันธ์

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา  
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เพ็ญสิริ จิระเดชากุล)

วันที่ ๒ เดือน พฤษภาคม พ.ศ. ๒๕๔๘

คณะกรรมการสอบปริญญาานิพนธ์

ประธาน

(อาจารย์ ดร. ประวิติ อังประภาพรชัย)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ขจีนาฏ โพธิเวชกุล)

กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนันต์ พุทธิพิทยาลภพร)

กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม

(อาจารย์ ดร. อรอนงค์ พริ้งศุลกะ)

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย

จาก

งบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปี 2546-2547

## ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์นี้สำเร็จได้ด้วยดีเป็นเพราะผู้วิจัยได้รับความกรุณาอย่างยิ่งจากอาจารย์ ดร. ประวัติ อังประภาพรชัย ประธานกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ขจีนาฏ โพธิเวชกุล และ คณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ ผู้ซึ่งเสียสละเวลาอันมีค่าเพื่อให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการจัดทำงานวิจัยทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี อีกทั้งทำให้ผู้วิจัยได้รับประสบการณ์ในการทำงานวิจัยที่จะช่วยเป็นพื้นฐานเพื่อพัฒนาความรู้ความสามารถในการทำงานวิจัยต่อไปในอนาคต ผู้วิจัยขอขอบพระคุณอย่างสูง

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้แก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา ซึ่งทำให้ผู้วิจัยสามารถนำความรู้มาประยุกต์ใช้ในการจัดทำงานวิจัยนี้และยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์เพื่อเป็นส่วนหนึ่งในการพัฒนาประเทศตามเจตนารมณ์ของการศึกษาตามหลักสูตรชีวิตวิทยาต่อไป รวมทั้งขอขอบคุณพี่ น้อง และเพื่อนๆทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและกำลังใจต่างๆมาโดยตลอด

ท้ายที่สุดผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และผู้ที่ให้การสนับสนุนทุกท่านสำหรับความช่วยเหลือ คำแนะนำ และเป็นกำลังใจที่สำคัญตลอดระยะเวลาที่ศึกษาและทำงานวิจัย

นัทธ์หทัย สงบพันธ์

## สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ	1
ภูมิหลัง	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย	3
ความสำคัญของการวิจัย	3
ขอบเขตของการวิจัย	3
สมมติฐานของการวิจัย	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
แบคทีเรียแลคติก	4
Tetramethylpyrazine (TMP)	13
การผลิต acetoin และ diacetyl โดยแบคทีเรียแลคติก	15
Arginine deiminase (ADI) Pathway	18
3 วิธีดำเนินการวิจัย	24
อุปกรณ์และสารเคมี	24
วิธีดำเนินการทดลอง	28
4 ผลการทดลอง	36
5 สรุป อภิปรายผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	61
บรรณานุกรม	63
ภาคผนวก	72
ประวัติย่อผู้วิจัย	75

## บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า	
1	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักโดยแบคทีเรียแลคติกในอุตสาหกรรมอาหาร	5
2	จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตอาหาร probiotics	7
3	genus ต่างๆของแบคทีเรียแลคติก	8
4	ความสามารถของแบคทีเรียที่แยกจากผลิตภัณฑ์นมหมักในการผลิต acetoin (Voges-Proskauer test) และความสามารถในการใช้อาร์จินีนเป็นแหล่งพลังงาน	37
5	ลำดับนิวคลีโอไทด์ใน EMBL database ที่มีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ด้วย primer rdi2 และ rdi30 ของแบคทีเรียที่แยกจากครีมเปรี้ยว (ไฟรีโมสต์) No 8 โดยใช้โปรแกรม Fasta 3	42
6	โปรตีนใน EMBL database ที่มีความคล้ายกับลำดับกรดอะมิโนที่สังเคราะห์ด้วยคู่ของ primer rdi-fwd และ rdi-rev ของแบคทีเรียที่แยกจากครีมเปรี้ยว (ไฟรีโมสต์) No 8 โดยใช้โปรแกรม Blast	53

## บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 การใช้กลูโคสผ่าน Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) pathway	11
2 การใช้กลูโคสผ่าน Phosphoketolase pathway (PKP)	12
3 ขั้นตอนการสังเคราะห์ Tetramethylpyrazine	14
4 การผลิตสาร acetoin ผ่านทาง diacetyl-acetoin pathway	17
5 ขั้นตอนการสลาย L- arginine ของเอนไซม์ใน ADI pathway	20
6 ลักษณะการจัดเรียงของยีนใน ADI pathway ที่พบในแบคทีเรียบางชนิด	24
7 โครงสร้างของ pCR <sup>®</sup> 2 1 vector และตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ต่างๆ	32
8 โครงสร้างของ pBlue-TOPO <sup>®</sup> vector และตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ต่างๆ	33
9 ซีนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ครั้งที่ 2 ด้วย degenerate primer rdi30 และ rdi2 ของแบคทีเรียที่แยกจากครีမ်เปรี้ยว (ไฟรีโมสต์) No 8	41
10 ซีนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ด้วย primer rdi-fwd และ rdi-rev ของแบคทีเรียที่แยกจากครีမ်เปรี้ยว (ไฟรีโมสต์) No 8	44
11 ซีนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ด้วย primer rdi-fwd2 และ rdi-rev2 ของแบคทีเรียที่แยกจากครีမ်เปรี้ยว(ไฟรีโมสต์) No 8	45
12 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำ PCR ด้วย primer rdi-fwd และ rdi-rev, rdi-fwd2 และ rdi-rev2	46
13 ซีนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ด้วย primer gad B21 (forward) และ GAD7 (reverse)	56
14 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำ PCR ด้วย primer gad B21 (forward) และ GAD7 (reverse)	57
15 โคลินี้ที่ได้จากการวิเคราะห์การทำงานของโปรโมเตอร์ โดยใช้ pBlue-TOPO <sup>®</sup> vector	59
16 โครงสร้างของ pBlue-TOPO <sup>®</sup> vector ซึ่งมีซีนดีเอ็นเอขนาด 500 bp ที่มี ส่วนของโปรโมเตอร์เชื่อมต่อกันด้วยทิศทางถูกต้อง	60

# บทที่ 1

## บทนำ

### ภูมิหลัง

แบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่ดำรงชีวิตอยู่ทั่วไปในธรรมชาติ และมีความหลากหลายทั้งทางด้านสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และพันธุศาสตร์ เป็นผลให้แบคทีเรียมีสมบัติแตกต่างกันในด้านต่างๆ เช่น สมบัติในการใช้ออกซิเจนเพื่อดำรงชีวิต สมบัติในการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิต่างๆ สมบัติในการผลิตสารบางชนิด หรือสมบัติในการเปลี่ยนแปลงสารชนิดหนึ่งให้กลายเป็นสารชนิดอื่นๆ ซึ่งทำให้สามารถจำแนกแบคทีเรียได้หลายกลุ่ม จากการที่แบคทีเรียเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับมนุษย์ในหลายด้าน จึงมีการนำแบคทีเรียมาใช้ประโยชน์ต่างๆมาเป็นเวลานาน เช่น การถนอมอาหาร การผลิตอาหารและเครื่องดื่ม และการผลิตยารักษาโรค โดยเฉพาะในด้านอาหารและเครื่องดื่มมีการนำแบคทีเรียหลายชนิดมาใช้ เพื่อให้แบคทีเรียเปลี่ยนแปลงสารที่มีอยู่ในอาหารไปเป็นสารประกอบที่ทำให้อาหารนั้นมีกลิ่นรส และเนื้อสัมผัสที่ดีขึ้น (สมบุญ ธินาศุภวัฒน์ 2543 ออนไลน์)

แบคทีเรียแลคติก (lactic acid bacteria) เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญทางอุตสาหกรรมการผลิตอาหาร โดยเฉพาะในประเทศไทยอาหารที่หมักโดยแบคทีเรียแลคติกมีการบริโภคอย่างแพร่หลาย มีแบคทีเรียแลคติกหลาย genus และหลาย species เกี่ยวข้องกับอาหารหมักพื้นเมืองหลายชนิด เช่น ปลาซำม ไข่กรอกเปรี้ยว ปลาร้า หอยดอง ซีอิ้ว น้ำปลา และแหนม (สมบุญ ธินาศุภวัฒน์ 2543 ออนไลน์) นอกจากนี้อาหารที่หมักโดยแบคทีเรียแลคติกยังมีศักยภาพในการพัฒนาสู่การส่งออกจำหน่ายในต่างประเทศ อุตสาหกรรมที่มีการใช้แบคทีเรียแลคติกอย่างเด่นชัด คือ อุตสาหกรรมนมและผลิตภัณฑ์จากนม เช่น การผลิตเนยแข็ง (cheese) เนย (butter) นมเปรี้ยว (sour milk) ครีมเปรี้ยว (sour cream) และโยเกิร์ต (yogurt) (Swindell et al 1996 2641-2643) โดยแบคทีเรียแลคติกจะมีบทบาทในการหมัก ทำให้คาร์โบไฮเดรตและน้ำตาลต่างๆที่มีอยู่ในนมถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดแลคติก (lactic acid) ซึ่งจะเป็นสารที่ทำให้นมมีรสเปรี้ยว นอกจากการหมักคาร์โบไฮเดรตได้เป็นกรดแลคติกแล้ว แบคทีเรียแลคติกยังสามารถผลิตสารที่เป็นผลผลิตรอง (by-product) บางชนิด (Arena, de Nadra, & Muñoz 2002 61-66) โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารที่ให้กลิ่นรส (flavour compound) เช่น diacetyl (2,3-butanedione) และ tetramethylpyrazine (TMP) (Maga, & Sizer 1973 39-115) ซึ่งมีความสำคัญต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์เช่นกัน

Diacetyl (2,3-butanedione) จัดว่าเป็นสารที่สำคัญอย่างหนึ่งที่เกิดโดยแบคทีเรียแลคติก สารนี้เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก diacetyl-acetoin pathway โดยพบได้ในผลิตภัณฑ์อาหารหมักชนิดต่างๆ โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์นมหมัก เช่น unripened cheeses, cultured buttermilk, cultured sour

cream และ ripened cream butter (Seitz et al 1963 186-189) นอกจากนี้ diacetyl ยังมี ความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และรา ซึ่ง รวมทั้งเชื้อก่อโรคที่แพร่ทางอาหารด้วย (Jay 1982a 525-532, Jay 1982b 1829-1831, Bowles, & Juneja 1998 101-112)

สารที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลคติกคือ tetramethylpyrazine (TMP) ซึ่งเป็น สารที่ให้กลิ่นถั่วหมัก (fermented soybeans odour) (Maga, & Sizer 1973 39-115) โดยสาร ดังกล่าวได้รับการยอมรับว่าไม่เป็นอันตรายต่อการบริโภค (Generally Recognised As Safe หรือ GRAS) โดย Food Additives Committee of the Flavor and Extract Manufacturers' Association (FEMA) (Hall, & Oser 1970 471-478) นอกจากนี้ TMP ยังมีความสำคัญทางการแพทย์โดยพบว่ามี คุณสมบัติในการขยายหลอดเลือด (vasodilation) และยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด (antiplatelet aggregation) ในประเทศจีนมีการใช้ TMP ที่สกัดจากพืชสมุนไพรในการรักษาอาการ ปวดเนื่องจากโรคหัวใจ (angina pectoris) หลอดเลือดหัวใจผิดปกติ (cardiovascular disorders) และ อาการภาวะสมองขาดเลือด (cerebral ischemic syndromes) (Feng, Liu, & Tong 1996 379-381) TMP เกิดจากการรวมตัวระหว่างแอมโมเนีย 2 โมเลกุล และ acetoin 2 โมเลกุล ในปฏิกิริยา ที่ไม่มีเอนไซม์มาเกี่ยวข้อง โดยที่ acetoin เป็นผลผลิตจาก diacetyl-acetoin pathway และ แอมโมเนียได้จากการสลายอาร์จินีนโดยผ่าน arginine deiminase (ADI) pathway

Arginine Deiminase Pathway พบได้ในสิ่งมีชีวิตพวก prokaryote ทั่วไป ประกอบด้วย เอนไซม์พื้นฐาน 3 ชนิด คือ arginine deiminase (ADI), ornithine transcarbamylase (OTC), และ carbamate kinase (CK) (Arena, de Nadra, & Muñoz 2002 61-66) ในการสลายอาร์จินีน 1 โมเลกุล จะได้ ornithine 1 โมเลกุล คาร์บอนไดออกไซด์ 1 โมเลกุล ATP 1 โมเลกุลและแอมโมเนีย 2 โมเลกุล (Tanon, Bourdineaud, & Lorvoud-Funel 2001 653-661) ซึ่งแอมโมเนียสามารถรวมตัว กับ acetoin ที่เป็นผลผลิตจาก diacetyl-acetoin pathway กลายเป็นสาร TMP

แบคทีเรียแลคติกเป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิต TMP โดย Lee และคนอื่นๆ(1996) ได้แสดงให้เห็นว่า *Lactococcus lactis* สามารถผลิต TMP ได้ทั้งในสภาพที่เป็นเซลล์อิสระหรืออิมโม บิไลซ์เซลล์ นอกจากนี้ยังมีความพยายามในการเพิ่มผลผลิต TMP ของแบคทีเรียดังกล่าว โดยการ ปรับปรุงสภาวะการเจริญให้เหมาะสมเพื่อเพิ่มผลผลิตของ acetoin และแอมโมเนีย ซึ่งเป็นสารตั้งต้น ของ TMP (Kim, & Lee 1991a 202-206, 1991b 281-284)

จะเห็นได้ว่า ADI pathway เป็น pathway หนึ่งที่มีความสำคัญต่อการสังเคราะห์ TMP ใน แบคทีเรียแลคติก การศึกษาเมแทบอลิซึมรวมทั้งหน้าที่และการทำงานของยีนและเอนไซม์ใน pathway ดังกล่าวจากแบคทีเรียแลคติกที่แยกจากอาหารหมักในประเทศไทยจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งใน

การเพิ่มพูนองค์ความรู้ และยังนำไปสู่การพัฒนาสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติกในประเทศไทยโดยวิธีทางพันธุวิศวกรรมเพื่อเพิ่มคุณภาพในการผลิตอาหาร รวมทั้งการผลิตสาร TMP ซึ่งเป็นสารที่มีความสำคัญทางอุตสาหกรรมอาหารและทางการแพทย์

### ความมุ่งหมายการวิจัย

เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกจากผลิตภัณฑ์นมหมักที่ผลิตหรือจำหน่ายในประเทศไทยที่สามารถผลิต acetoin และ แอมโมเนีย ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของสาร TMP และศึกษาเอ็นที่เกี่ยวข้อกับ ADI pathway ในแบคทีเรียแลคติก

### ความสำคัญของการวิจัย

- 1 เพื่อแยกแบคทีเรียแลคติกจากผลิตภัณฑ์นมหมักที่ผลิตหรือจำหน่ายในประเทศไทย ที่มีความสามารถในการผลิต acetoin และแอมโมเนีย
- 2 เพื่อศึกษาลำดับดีเอ็นเอของเอ็นที่เกี่ยวข้อกับ ADI pathway จากแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้ เพื่อใช้ในงานวิจัยที่เกี่ยวข้อกับแบคทีเรียแลคติกและสำหรับนำไปใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียแลคติกต่อไป

### ขอบเขตของการวิจัย

- 1 แยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากผลิตภัณฑ์นมหมักที่ผลิตหรือจำหน่ายในประเทศไทย
- 2 คัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการผลิต acetoin และแอมโมเนีย
- 3 การโคลนเอ็นที่เกี่ยวข้อกับ ADI pathway
- 4 การหาลำดับดีเอ็นเอและวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของเอ็นที่เกี่ยวข้อกับ ADI pathway
- 5 วิเคราะห์การทำงานของโปรโมเตอร์
- 6 จัดจำแนกเชื้อที่คัดเลือกไว้จนถึงระดับ species หรือ subspecies

### สมมติฐานการวิจัย

แบคทีเรียแลคติกที่แยกจากผลิตภัณฑ์นมหมักที่ผลิตหรือจำหน่ายในประเทศไทยอาจมีเอ็นที่เกี่ยวข้อกับ ADI pathway

## บทที่ 2

### เอกสารวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### แบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria)

แบคทีเรียแลคติกเป็นแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับชีวิตประจำวันของมนุษย์ โดยเฉพาะในด้านอาหาร ทำให้มีการนำแบคทีเรียกลุ่มนี้มาใช้ประโยชน์ต่างๆมาเป็นเวลานาน พบว่าในสมัยโบราณมีการใช้แบคทีเรียแลคติกในการหมักเนื้อสัตว์ นม ผักและผลไม้ต่างๆเพื่อถนอมอาหาร มีรายงานว่าการหมักนมให้กลายเป็นโยเกิร์ต เนยแข็ง และเนย มีการทำมาประมาณ 3,200 ปี ก่อนคริสตกาล และยังพบว่ามีการใช้แบคทีเรียแลคติก ในการทำ sourdough bread เมื่อ 5,000 ปีมาแล้ว และมีการกล่าวถึง sourdough ไว้ในคัมภีร์ไบเบิล (Wahren 1990 117-118)

Lister (1873) ได้แยกแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกได้เป็นครั้งแรกและตั้งชื่อว่า *Bacterium lactis* จนกระทั่งในปี ค.ศ 1890 Weigmann และ Storch ได้นำแบคทีเรียแลคติกมาใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตเนยแข็งและนมเปรี้ยว ซึ่งถือได้ว่าเป็นการเปิดทางสู่อุตสาหกรรมการผลิตอาหารหมัก (Stiles, & Holzapfel 1997 1-29) ในปัจจุบันแบคทีเรียแลคติกจัดเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญที่สุดต่ออุตสาหกรรมอาหาร โดยเฉพาะอุตสาหกรรมนมและผลิตภัณฑ์จากนม เช่น ในการผลิต เนยแข็ง เนย นมเปรี้ยว ครีมเปรี้ยว โยเกิร์ต และ buttermilk นอกจากนี้ยังมีการใช้แบคทีเรียแลคติกในการผลิต salami กะหล่ำปลีดอง (sauerkraut) sourdough bread ปลาซั้ม ไข่กรอกเปรี้ยว น้ำปลา และแฮม เป็นต้น (สมบุญ ธนาศุภวัฒน์ 2543 ออนไลน์, Dubernet, Desmasures, & Gueguen 2002 217-275, Swindell et al 1996 2641-2643 )

สำหรับในประเทศไทยมีอาหารท้องถิ่นหลายชนิดที่มีแบคทีเรียแลคติกเป็นส่วนสำคัญในการผลิต เช่น แฮม พบว่ามีแบคทีเรียแลคติก 2 กลุ่ม คือ *Pediococcus* และ *Lactobacillus* ที่มีบทบาทในการหมัก รวมทั้งปลาซั้มที่ผลิตโดยใช้แบคทีเรียแลคติกในการหมักเช่นกัน Tanon และคนอื่นๆ (2001) และ de Orduña และคนอื่นๆ (2000) รายงานว่าแบคทีเรียแลคติกบางชนิดที่มีอยู่ในไวน์ โดยเฉพาะในกลุ่ม lactobacilli, pediococci และ *Oenococcus oeni* มีบทบาทในการปรับปรุงรสชาติของไวน์ให้ดีขึ้นด้วยการเปลี่ยน L-malic acid ให้กลายเป็น L-lactic acid ซึ่งเป็นกระบวนการที่มักเกิดขึ้นหลังจากกระบวนการหมักด้วยยีสต์ ตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักโดยแบคทีเรียแลคติกในอุตสาหกรรมอาหารได้แสดงไว้ในตาราง 1

ตาราง 1 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักโดยแบคทีเรียแลคติกในอุตสาหกรรมอาหาร (Potter 1978 1-706)

---

(I) Lactic acid bacteria

(A) Vegetables and fruits

- (1) Cucumbers → dill pickles sour pickles salt stock
- (2) Olives → green olives, ripe olives
- (3) Cabbage → sauerkraut
- (4) Turnips → sauerruben
- (5) Lettuce → lettuce kraut
- (6) Mixed vegetables, turnips, radish, cabbage → Paw Tsay
- (7) Mixed vegetables in Chinese cabbage → Kimchi
- (8) Vegetables and milk → Tarhana
- (9) Vegetables and rice → Sajur asin
- (10) Dough and milk → Kishk
- (11) Coffee cherries → coffee beans
- (12) Vanilla beans → Vanilla
- (13) Taro → poi

(B) Meats → sausages such as salami Thüringer, summer pork roll Lebanon bologna cervelat

(C) Dairy products

- (1) Sour cream
- (2) Sour milk drinks — acidophilus, yoghurt, cultured buttermilk, bulgarian, skyr, gioddu, leban, dadhi, taette, mazun
- (3) Butter ----- sour cream butter, cultured butter ghee
- (4) Cheese ----- unopened → cottage pot, schmierkase, cream whey → mysost, primost, ricotta, schottengsied  
opened → Cheddar, American, Edam, Gouda, Cheshire provolone

(II) Lactic acid bacteria with other microorganisms

(A) Dairy products

(a) With other bacteria

- (1) Propionic acid bacteria ----- Emmenthaier Swiss, Samsso, Gruyere cheeses
- (2) Surface ripening bacteria ----- Limburger, brick, Trappist, Munster, Port de Salut

(b) With yeasts ----- kefir kumiss or kumys

(c) With molds ----- Roquefort Camembert, Brie, hand, Gorgonzola, Stilton, Blue

(B) Vegetable products

- (a) With yeasts ----- Nukamiso pickles
  - (b) With molds ----- tempeh, soya sauce
-

นอกจากนี้ในปัจจุบันมีการนำแบคทีเรียแลคติกมาใช้ในการผลิตอาหารเพื่อสุขภาพที่เรียกว่า probiotics โดยมีการเติมแบคทีเรียแลคติกบางชนิด โดยเฉพาะ lactobacilli ลงในอาหาร และไม่มีการฆ่าเชื้อเพื่อให้เชื้อเข้าสู่ร่างกาย และมีผลในการช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ เมื่อแบคทีเรียแลคติกสร้างกรดแลคติกในลำไส้ใหญ่จะทำให้ค่า pH ในลำไส้ใหญ่ลดลง จึงมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรคได้ ส่วนสารต่างๆที่แบคทีเรียเหล่านี้ผลิตขึ้นพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แกรมบวกและแกรมลบบางชนิด รวมทั้งยังสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายให้ต่อต้านเซลล์มะเร็งได้ดี (Gibson, & Roberfroid 1995 1401-1412, de Orduña et al 2000 31-35) ตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตอาหาร probiotics ได้แสดงไว้ในตาราง 2

โดยทั่วไปจะพบแบคทีเรียแลคติกได้ในพืช ผลไม้ ผลิตภัณฑ์จากธัญพืช เนื้อสัตว์ และนม รวมทั้งยังสามารถพบได้ในร่างกายของมนุษย์และสัตว์ เช่น ในระบบทางเดินอาหารและระบบทางเดินหายใจ เป็นต้น (Stiles, & Holzapfel 1997 1-29)

ในการจัดจำแนกอนุกรมวิธาน (taxonomy) ของแบคทีเรียแลคติกนั้น แต่เดิมจะทำการจัดจำแนกจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา เช่น ส่วนประกอบของผนังเซลล์ กรดไขมัน และ isoprenoid quinone เป็นต้น นอกจากนี้อาจพิจารณาสมบัติในการผลิตสารที่สำคัญต่างๆโดยเฉพาะกรดแลคติกสมบัติทางภูมิคุ้มกัน รวมทั้งความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆเป็นแหล่งพลังงาน ก่อนหน้านี้แบคทีเรียแลคติกหมายถึง กลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถหมักและตกตะกอนนมได้ ซึ่งรวมถึง coliform bacteria ที่มีความสามารถในการสร้างกรดแลคติก (Stiles, & Holzapfel 1997 1-29) อย่างไรก็ตามในปี 1901 Beijerinck ได้แยก *Lactobacillus* ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก ออกจาก coliform bacteria ต่อมา Orla-Jensen (1919) ได้กำหนดว่าแบคทีเรียแลคติกที่แท้จริงจะต้องมีลักษณะเป็นแกรมบวก, เคลื่อนที่ไม่ได้, ไม่สร้างสปอร์, มีรูปร่างเป็นท่อนหรือกลม มีความสามารถในการหมักคาร์โบไฮเดรตให้อยู่ในรูปกรดแลคติกเป็นส่วนใหญ่ โดยเสนอแบคทีเรียแลคติกไว้ 7 genus ซึ่งแสดงในตาราง 3 (Stiles, & Holzapfel 1997 1-29) จากการจัดจำแนกของ Orla-Jensen ทำให้ coliform bacteria ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ ถูกจัดออกไปจากแบคทีเรียแลคติก

ตาราง 2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตอาหาร probiotics (Conway 1996 10-14)

Genus	Species
<i>Lactobacillus</i>	<i>L acidophilus</i>
	<i>L plantarum</i>
	<i>L casei</i>
	<i>L casei</i> subsp <i>rhamnosus</i>
	<i>L delbreuckii</i> subsp <i>bulgaricus</i>
	<i>L fermentum</i>
	<i>L reuteri</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>L lactis</i> subsp <i>lactis</i>
	<i>L lactis</i> subsp <i>cremoris</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B bifidum</i>
	<i>B infantis</i>
	<i>B adolescentis</i>
	<i>B longum</i>
	<i>B breve</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>S salivarius</i> subsp <i>thermophilus</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>E faecalis</i>
	<i>E faecium</i>

ตาราง 3 genus ต่างๆของแบคทีเรียแลคติก (Stiles 1997 1-29)

Genus <sup>a</sup>	Shape	Catalase	Nitrite reduction	Fermentation	Current genera
<i>Betabacterium</i>	Rod	-	-	Hetero-	<i>Lactobacillus</i> <i>Weissella</i>
<i>Thermobacterium</i>	Rod	-	-	Homo-	<i>Lactobacillus</i>
<i>Streptobacterium</i>	Rod	-	-	Homo-	<i>Lactobacillus</i> <i>Carnobacterium</i>
<i>Streptococcus</i>	Coccus	-	-	Homo-	<i>Streptococcus</i> <i>Enterococcus</i> <i>Lactococcus</i> <i>Vagococcus</i>
<i>Betacoccus</i>	Coccus	-	-	Hetero-	<i>Leuconostoc</i> <i>Oenococcus</i> <i>Weissella</i>
<i>Microbacterium</i>	Rod	+	+	Homo-	<i>Brochothrix</i>
<i>Tetracoccus</i>	Coccus	+ <sup>b</sup>	+	Homo-	<i>Pediococcus</i> <i>Tetragenococcus</i>

<sup>a</sup> According to Orla - Jensen (1919)

<sup>b</sup> In general *Pediococci* are catalase negative but some strains produce a pseudocatalase that results in false positive reactions

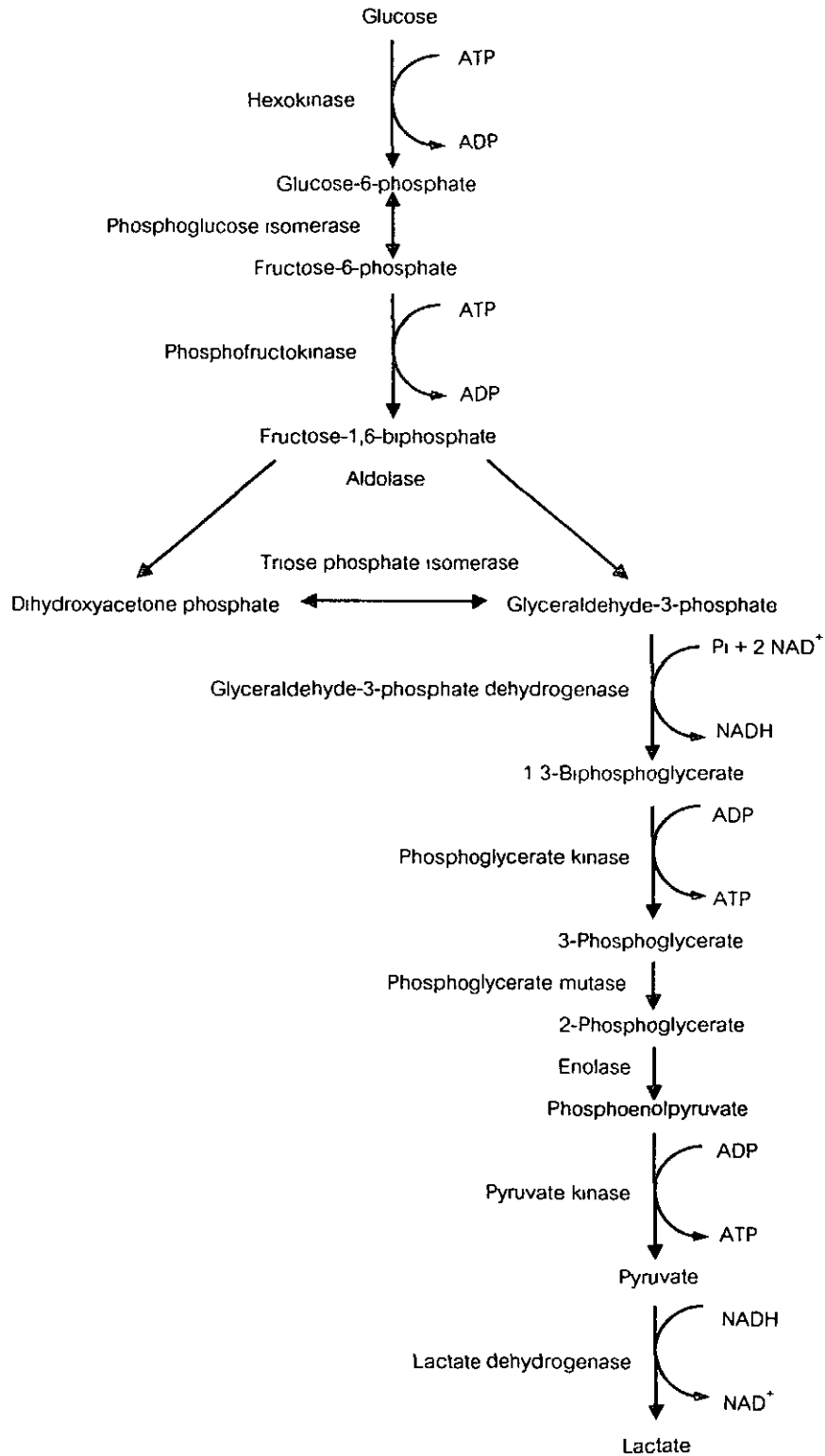
ในปี ค.ศ. 1986 มีการแก้ไขการจำแนกแบคทีเรียแลคติกใหม่ โดยใช้ข้อมูลทางเคมีและพันธุศาสตร์ ลักษณะทางโมเลกุลกลายเป็นสิ่งสำคัญในการจัดอนุกรมวิธาน เช่น ค่า mol% ของปริมาณ guanine รวมกับ cytosine (G+C) ที่มีอยู่ในดีเอ็นเอ การศึกษาการจับกันของดีเอ็นเอ (DNA hybridization) รวมทั้งโครงสร้างและลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rRNA ซึ่งในบางครั้งพบว่ามีความขัดแย้งกับการจัดอนุกรมวิธานจาก phenotypes ของแบคทีเรีย (Stiles, & Holzapfel 1997 1-29, Wood, & Holzapfel 1995 1-398)

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16s และ 23s rRNA ของแบคทีเรียพบว่าสามารถแบ่งแบคทีเรียได้ 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ *Clostridium* branch ที่มีปริมาณ G+C ต่ำกว่า 50 mol% (low DNA G+C content) และ *Actinomyces* branch ที่มีปริมาณ G+C สูงกว่า 50 mol% (high DNA G+C content) ในกลุ่ม *Clostridium* branch ประกอบด้วยแบคทีเรียแกรมบวกรวมทั้งแบคทีเรียแลคติก (Wood, & Holzapfel 1995 1-398) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอนุกรมวิธานของแบคทีเรียแลคติกมากมาย เช่น สมาชิกของ genus *Streptococcus* บางชนิดถูกจัดไปเป็น genus ใหม่ คือ *Enterococcus* และ *Lactococcus* ต่อมาพบว่ามีความแตกต่างกันของสมาชิกภายใน genus *Lactococcus* ทำให้มีการแยกสมาชิกบางชนิดของ genus นี้ออกไปเป็น genus ใหม่ คือ *Vagococcus* ส่วนจุลินทรีย์รูปร่างเป็นท่อนที่เคยถูกจัดอยู่ใน genus *Lactobacillus* บางชนิดได้ถูกแยกออกมาเป็น genus *Carnobacterium* (Aungpraphapornchai, & Griffin 1998 395-403) โดยพบว่าแบคทีเรียจากทั้งสอง genus นี้มีพื้นฐานวิวัฒนาการเหมือนกัน แต่ *Carnobacterium* จะมีสมบัติทางกายภาพและกิ่งทางวิวัฒนาการ (phylogenetics) เหมือนกับ genus *Enterococcus* (Wood, & Holzapfel 1995 1-398) ส่วน genus *Tetragenococcus* ถูกตั้งขึ้นมาใหม่โดยมีสมาชิกชนิดแรกคือ *Pediococcus halophilus* ที่ย้ายมาจาก genus *Pediococcus* (Aungpraphapornchai, & Griffin 1998 395-403) ในขณะที่ genus *Weissella* ได้ถูกตั้งขึ้นโดยเริ่มแรกมีสมาชิกจาก genus *Leuconostoc* คือ *Leuconostoc paramesenteroides* (Collins et al 1993 425-429) และได้มีการย้ายบางสายพันธุ์ของ *Lactobacillus xylosus* ไปเป็น *Lactococcus lactis* subsp *lactis* และ *Lactobacillus hordinae* ไปเป็น *Lactococcus lactis* subsp *hordinae* (Stiles, & Holzapfel 1997 1-29)

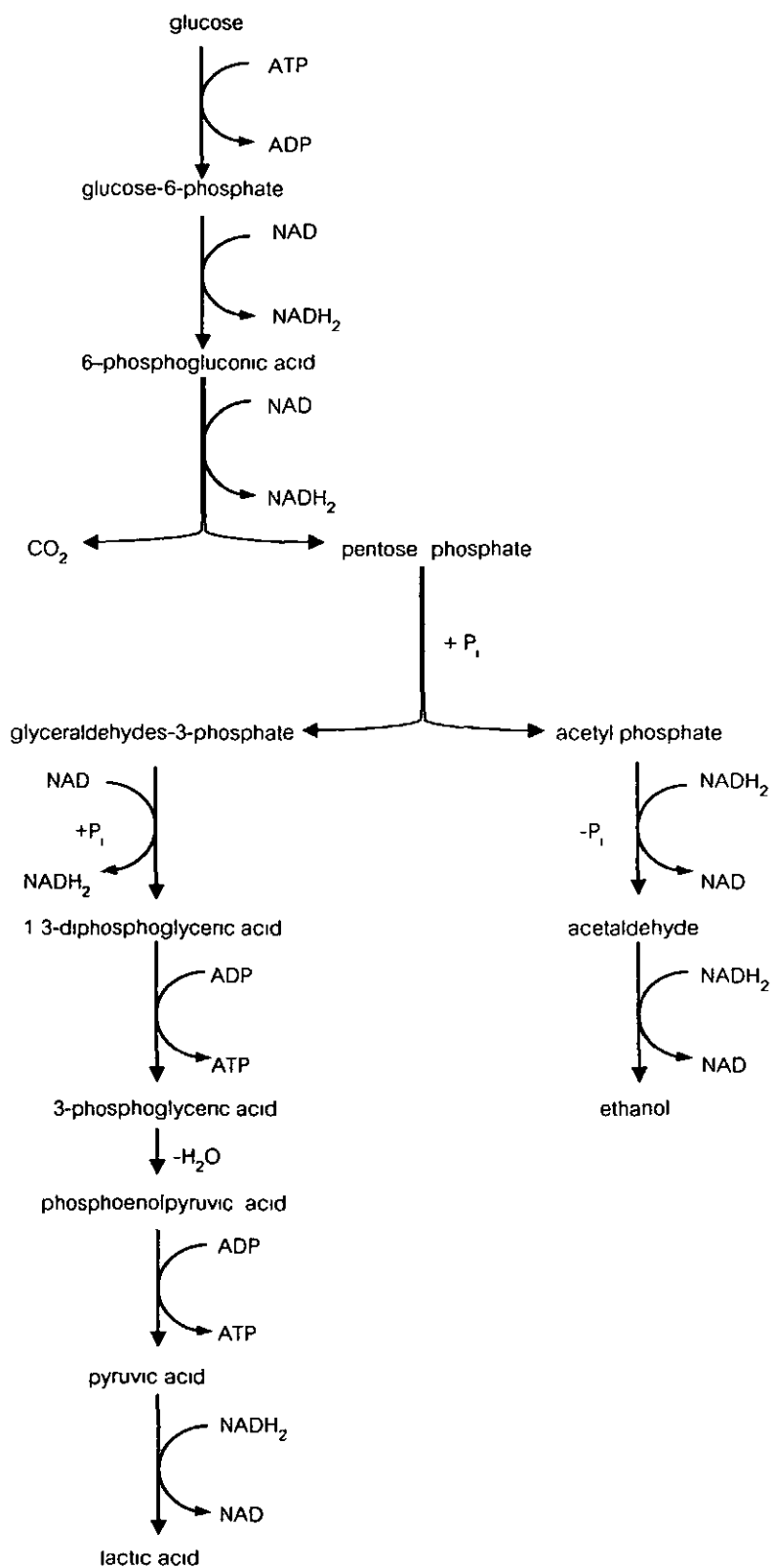
ในปัจจุบันแบคทีเรียแลคติกที่มีความสำคัญต่อการหมักอาหาร ได้แก่ *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* และ *Weissella* (Aungpraphapornchai, & Griffin 1998 395-403, Stiles, & Holzapfel 1997 1-29) โดยสมบัติของแบคทีเรียแลคติกเพิ่มเติมคือ ไม่มีการสร้างเอนไซม์ catalase, ไม่มี cytochrome โดยทั่วไปจะเจริญในภาวะที่ไม่มีออกซิเจนแต่

จะสามารถทนต่อออกซิเจนได้ จากการที่แบคทีเรียแลคติกสามารถใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งพลังงานแล้วเปลี่ยนไปเป็นกรดแลคติกนั้น ทำให้สามารถแบ่งแบคทีเรียแลคติกออกเป็นกลุ่มย่อยได้อีก 2 กลุ่ม ตามลักษณะการใช้คาร์โบไฮเดรต คือ กลุ่ม homofermentative ซึ่งเป็นกลุ่มที่ใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งพลังงานแล้วได้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นแลคเตท ตัวอย่างแบคทีเรียแลคติกที่จัดอยู่ในกลุ่ม homofermentative คือ lactococci, lactobacilli บางชนิด และ *Streptococcus thermophilus* ในกรณีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคสแบคทีเรียเหล่านี้จะใช้กลูโคสผ่านทาง Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) pathway (แสดงในภาพประกอบ 1) และสามารถผลิตแลคเตท 2 โมเลกุล จากกลูโคสที่ใช้ไป 1 โมเลกุล (Aungpraphapornchai, & Griffin 1998 395-403) และกลุ่ม heterofermentative ซึ่งเป็นกลุ่มที่ใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งพลังงานแล้วได้ผลิตภัณฑ์เป็น lactate รวมทั้งผลิตภัณฑ์อื่นๆ ได้แก่ เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน แบคทีเรียแลคติกที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ซึ่งได้แก่ leuconostocs จะใช้กลูโคสผ่านทาง Phosphoketolase pathway (PKP) (แสดงในภาพประกอบ 2) ยกเว้นบางชนิด เช่น ในกลุ่ม bifidobacteria จะใช้กลูโคสผ่านทาง Bifidus pathway (Wood, & Holzapfel 1995 1-398)

นอกจากจะสามารถเปลี่ยนไพรูเวทไปเป็น lactate และสารอื่นๆดังที่กล่าวมาแล้วแบคทีเรียแลคติกยังมี pathway ที่สามารถเปลี่ยนไพรูเวทไปเป็นสารที่ให้กลิ่นรสที่ดีในอาหาร เช่น diacetyl (2,3-butanedione) และ acetoin (Aungpraphapornchai, & Griffin 1998 395-403) ซึ่งสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิต TMP ได้ นอกจากนี้แบคทีเรียแลคติกยังสามารถใช้แหล่งพลังงานอื่นๆทดแทนในกรณีที่ไม่มีคาร์โบไฮเดรตได้ เช่น สามารถใช้อาร์จินีนผ่านทาง arginine deiminase (ADI) pathway ได้



ภาพประกอบ 1 การใช้กลูโคสผ่าน Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) Pathway (Wood, & Holzapel 1995 1-398)

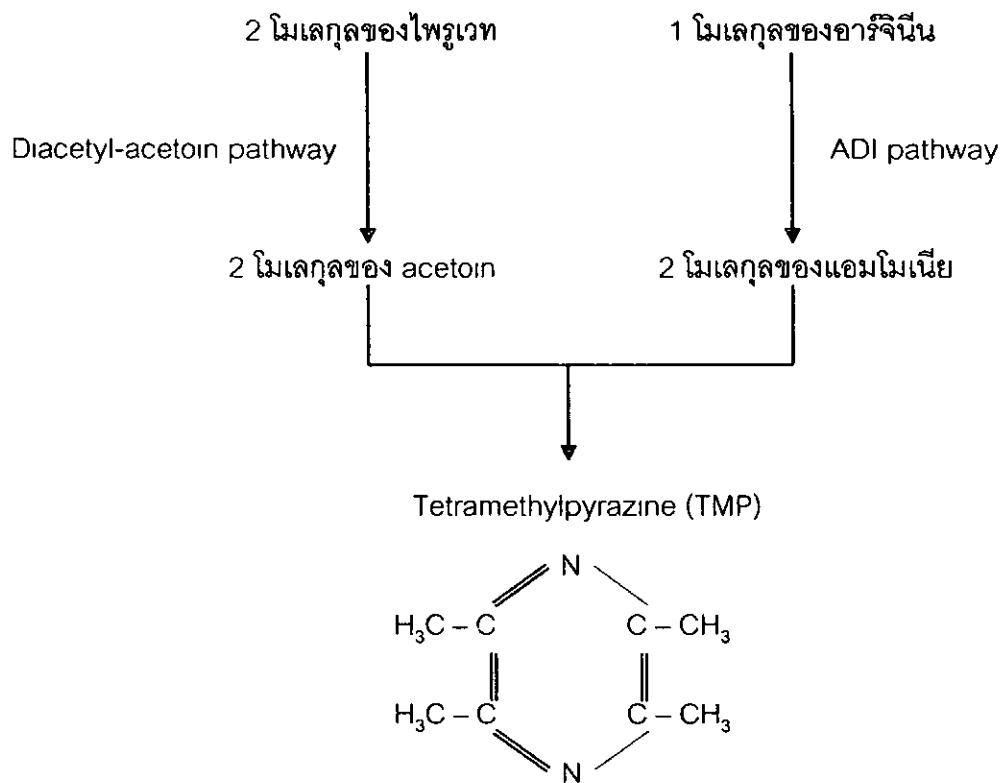


ภาพประกอบ 2 การใช้กลูโคสผ่านทาง Phosphoketolase pathway (PKP) (Wood, & Holzappel 1995 1-398)

## Tetramethylpyrazine (TMP)

Tetramethylpyrazine หรือ TMP เป็นสารที่ระเหยได้ง่าย (volatile compound) ที่ให้กลิ่นถั่วหมัก (fermented soybeans odour) จึงมีการใช้ TMP เป็นสารปรุงแต่งในอาหาร นอกจากนี้ยังมีสรรพคุณทางการแพทย์ โดยพบว่ามีคุณสมบัติในการขยายหลอดเลือด (vasodilation) และยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด (antiplatelet aggregation) ซึ่ง TMP พบได้ในอาหารชนิดต่างๆรวมทั้งอาหารหมักจากแบคทีเรีย โดย TMP ได้รับการยอมรับว่าไม่เป็นอันตรายต่อการบริโภค (generally recognised as safe หรือ GRAS) โดย Food Additives Committee of the Flavor and Extract Manufacture's Association (FEMA) (Hall, & Oser 1970 471-478) ในประเทศจีนมีการใช้ TMP ที่สกัดจากพืชสมุนไพร *Ligusticum wallichii* Franch (Lee, Liu, & Yang 2002 601-608) ในการรักษาอาการเจ็บหน้าอกเนื่องจากโรคหัวใจ (angina pectoris) หลอดเลือดหัวใจผิดปกติ (cardiovascular disorders) และอาการภาวะสมองขาดเลือด (cerebral ischemic syndrome) (Feng, Liu, & Tang 1996 379-381, Pang, Shan, & Chiu 1996 431-435) นอกจากนี้ยังพบว่า TMP ทำหน้าที่เป็น calcium antagonist ที่ช่วยควบคุมการส่งผ่านแคลเซียมจากภายนอกเซลล์มาทาง calcium channels และยับยั้งการหลั่งแคลเซียมภายในเซลล์ที่สะสมอยู่บริเวณหลอดเลือดของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ (Lee, Liu, & Yang 2002 601-608, Pang, Shan, & Chiu 1996 431-435)

TMP เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา condensation ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ไม่มีเอนไซม์มาเกี่ยวข้อง โดยเป็นการรวมตัวกันระหว่าง 2 โมเลกุล ของ acetoin ที่เป็นผลผลิตจากการเปลี่ยนแปลงไพรูเวทผ่าน diacetyl-acetoin pathway โดยที่ไพรูเวทเป็นผลผลิตของการสลายน้ำตาลผ่าน EMP pathway (Aymes, Monnet, & Corrieu 1999 87-92, Swindell et al 1996 2641-2643) รวมกับ 2 โมเลกุล ของแอมโมเนีย ที่เป็นผลผลิตจากการสลายอาร์จินีน โดยแบคทีเรียผ่านทาง arginine deiminase (ADI) pathway ดังแสดงในภาพประกอบ 3 ซึ่งทั้งสอง pathway นี้ จะพบได้ในแบคทีเรียหลายชนิดรวมทั้งแบคทีเรียแลคติก



ภาพประกอบ 3 ขั้นตอนการสังเคราะห์ Tetramethylpyrazine (Demain, Jackson, & Trenner 1967 323-326)

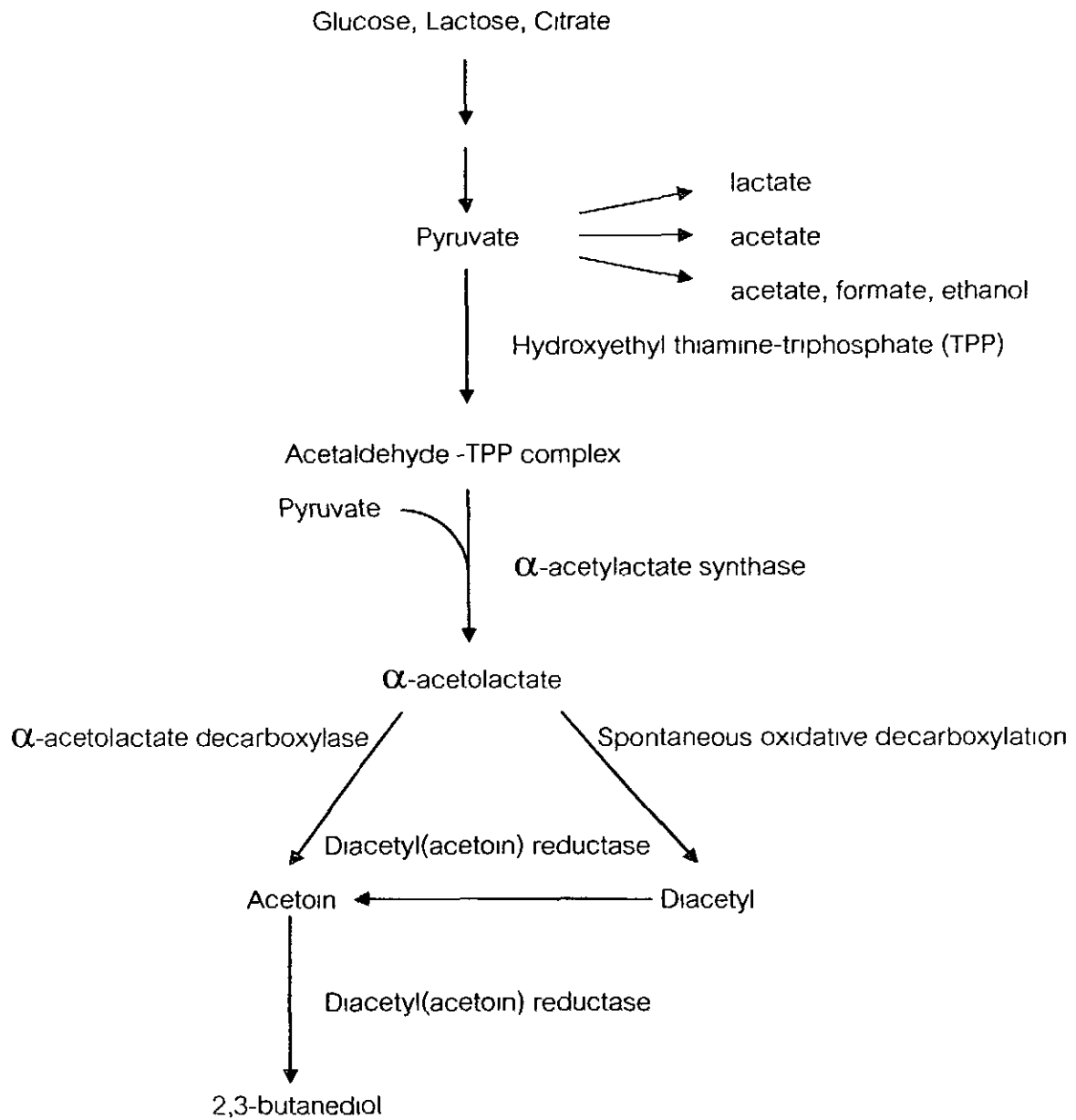
## การผลิต acetoin และ diacetyl โดยแบคทีเรียแลคติก

Diacetyl (2,3-butanedione) เป็นสารประกอบในกลุ่มคีโตนที่ระเหยง่าย มีคุณสมบัติในการให้กลิ่นของเนย (buttery flavour) จึงเป็นสารสำคัญในผลิตภัณฑ์จากนมหมักหลายชนิด เช่น unripened cheese, cultured butter milk, cultured sour cream และ ripened cream butter (Seitz et al 1963 186-189) รวมทั้งในผลิตภัณฑ์อาหารที่ไม่ใช่ผลิตภัณฑ์จากนม เช่น butterscotch, น้ำผึ้ง, กาแฟ, maple syrup, ขนมปัง, summer sausage และ oleomargarine ต่างมี diacetyl เป็นส่วนประกอบด้วยเช่นกัน (Collins 1972 1022-1028) นอกจากนี้ diacetyl ยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์และรา ซึ่งรวมทั้งเชื้อก่อโรคที่แพร่ทางอาหารด้วย (Jay 1982a 525-532, 1982b 1829-1831, Bowles, & Juneja 1998 101-112) diacetyl เป็นสารที่จุลินทรีย์ไม่ได้ใช้ในการเจริญเติบโต (secondary metabolite) เมื่อถูกผลิตขึ้นบางส่วนจะถูกขับออกนอกเซลล์แต่บางส่วนจะถูกเปลี่ยนไปเป็น acetoin ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของ TMP ที่เป็นสารให้กลิ่นรสแก่อาหารอีกชนิดหนึ่ง

acetoin และ diacetyl เป็นสารที่แบคทีเรียแลคติกสามารถผลิตได้จากการสลายโมเลกุลน้ำตาล เช่น กลูโคส และแลคโตส ที่มีอยู่ในอาหารผ่านทาง Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) pathway ได้เป็นสารตัวกลาง คือ ไพรูเวท ซึ่งจะเข้าสู่ diacetyl-acetoin pathway (แสดงในภาพประกอบ 4) โดยไพรูเวทจะทำปฏิกิริยากับ hydroxyethyl-thiamine-triphosphate (TPP) กลายเป็น active acetaldehyde (acetaldehyde-TPP complex) ซึ่งจะรวมตัวกับไพรูเวทอีก 1 โมเลกุล ไปเป็น  $\alpha$ -acetolactate โดยการทำงานของเอนไซม์  $\alpha$ -acetylactate synthase (Collins 1972 1022-1028) จากนั้น  $\alpha$ -acetolactate จะเกิดปฏิกิริยา decarboxylation โดย  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase ไปเป็น acetoin (Blomqvist et al 1993 1392-1404) และนอกจากนี้  $\alpha$ -acetolactate สามารถเปลี่ยนไปเป็น diacetyl ได้เองโดยการเกิด oxidative decarboxylation (Aymes, Monnet, & Corneu 1999 87-92, Swindell et al 1996 2641-2643) diacetyl สามารถเปลี่ยนไปเป็น acetoin จากการเกิด reduction โดยเอนไซม์ diacetyl (acetoin) reductase (หรือ 2,3-butanediol dehydrogenase) และเอนไซม์ชนิดนี้ยังสามารถ reduce acetoin ให้เปลี่ยนไปเป็น 2,3-butanediol ได้ (Aymes, Monnet, & Corneu 1999 87-92, Swindell et al 1996 2641-2643)

นอกจากนี้แบคทีเรียแลคติกยังสามารถสร้าง acetoin และ diacetyl จากการสลายซิเตรท ซึ่งซิเตรทจะถูกนำเข้าสู่เซลล์โดยเอนไซม์ citrate permease เมื่อเข้าสู่เซลล์แล้วซิเตรทจะถูกเอนไซม์ citrate lyase เปลี่ยนเป็น acetate และ oxaloacetate จากนั้น oxaloacetate จะเกิดปฏิกิริยา

decarboxylation กลายเป็นไพรูเวท โดยการทำงานของเอนไซม์ oxaloacetate decarboxylase ซึ่งไพรูเวทที่เกิดขึ้นจะเข้าสู่ diacetyl-acetoin pathway ต่อไป (Aungpraphapornchai, & Griffin 1998 395-403)



ภาพประกอบ 4 การผลิตสาร acetoin ผ่านทาง diacetyl-acetoin pathway (Aymes, Monnet, & Corneu 1999 87-92)

## Arginine Deiminase (ADI) Pathway

Arginine deiminase pathway (ก่อนหน้านั้นเรียกว่า arginine dihydrolase pathway) เป็นหนึ่งใน pathway ของการสลายอาร์จินีนในสภาวะที่ไม่ใช้ออกซิเจนที่พบได้มากที่สุด โดยจะพบได้ใน prokaryotes หลายชนิด เช่น ในแบคทีเรียแลคติกบางชนิด, แบคทีเรียใน *Pseudomonas* spp, *Aeromonas* spp, clostridia, *Mycoplasma* spp, *Spiroplasma* spp, *Spirochaete* spp, cyanobacteria และ halobacteria (Cunin et al 1986 314-352) และเนื่องจาก ADI pathway มีบทบาทสำคัญในสิ่งมีชีวิตที่ไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญหรือในสิ่งมีชีวิตที่เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน ทำให้ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับยีนที่เกี่ยวข้องหรือการทำงานของ pathway นี้ ใน eukaryote ขึ้นสูงมากนัก และมักเป็นเพียงรายงานเกี่ยวกับ ADI pathway เฉพาะใน mitochondria เท่านั้น (Zuñiga, Perez, & Gonzalez-Candeles 2002 429-444) อย่างไรก็ตามมีการพบ pathway นี้ใน eukaryotes ที่ไม่ใช้ออกซิเจนในการดำรงชีวิต เช่น *Giardia intestinalis* (Knodler et al 1995 2063-2070)

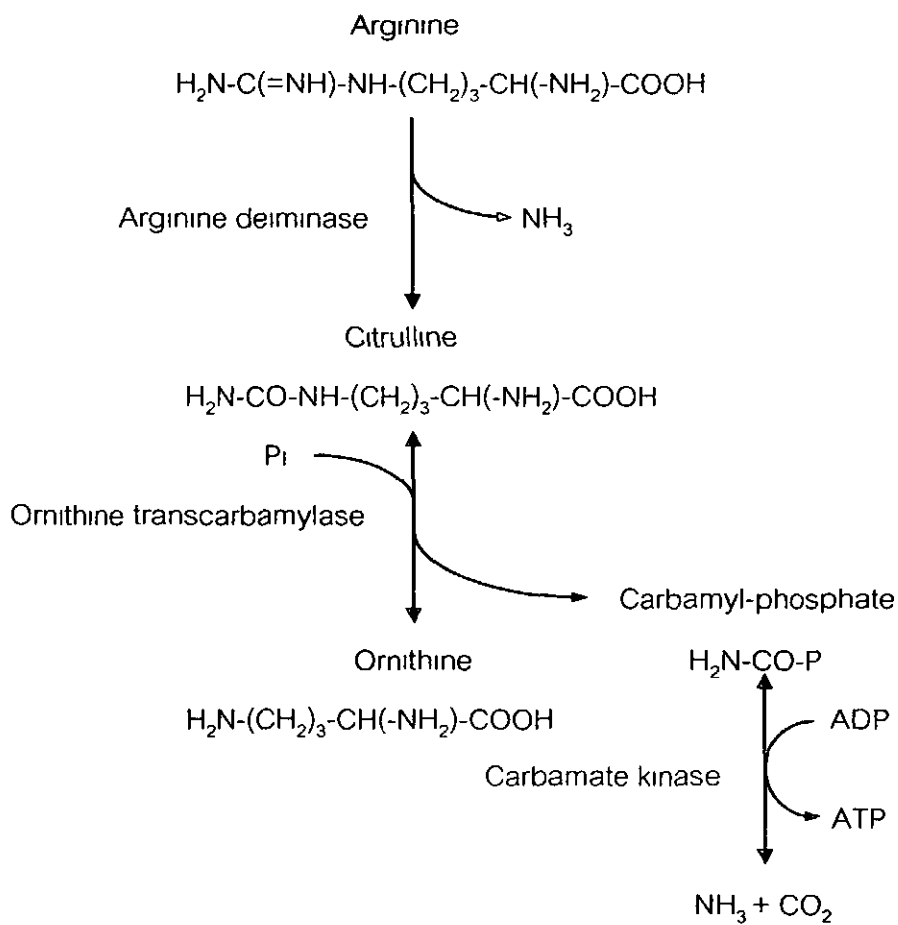
สำหรับในแบคทีเรีย ADI pathway มีความสำคัญในการเป็นแหล่งสร้างไนโตรเจนให้แบคทีเรีย และทำให้แบคทีเรียสามารถใช้อาร์จินีนเป็นแหล่งคาร์บอนในสภาวะที่ไม่ใช้ออกซิเจนแทนการใช้แหล่งคาร์บอนอื่นที่อาจมีปริมาณจำกัด เช่น กลูโคส และ แลคโตส ในกรณีของ *Streptococcus faecalis*, *Mycoplasma* spp, *Pseudomonas aeruginosa*, halobacteria และ *Spirochaete* spp พบว่ามีการใช้อาร์จินีนเป็นแหล่งพลังงานเพียงแหล่งเดียว ซึ่งส่วนใหญ่แล้วสายพันธุ์เหล่านี้จะใช้อาร์จินีนผ่านทาง ADI pathway แล้วจึงขับ ornithine ออกมาในปริมาณมาก (Cunin et al 1986 314-352) Broman และคนอื่นๆ (1978) ได้ทำการสังเกตการเจริญของ *Bacillus licheniformis* บน minimal medium ที่มีการเติมเฉพาะกลูโคสร่วมกับแอมโมเนีย, กลูโคสร่วมกับอาร์จินีน หรือ ไพรูเวทร่วมกับอาร์จินีน แต่จะไม่มีมีการเติมไพรูเวทลงไปร่วมกับแอมโมเนีย พบว่าอาร์จินีนสามารถถูกสลายทาง ADI pathway เพื่อสร้างพลังงานในขณะขาดแคลนแหล่งพลังงานที่ดีกว่า แต่เมื่อมีแหล่งพลังงานอื่น เช่น น้ำตาลกลูโคส แลคโตส รวมทั้งน้ำตาลกาแลคโตส เซลล์จะสลายน้ำตาลเหล่านี้ก่อนที่จะเปลี่ยนไปใช้อาร์จินีน โดยอาร์จินีนถูกเปลี่ยนเป็นแอมโมเนีย ซึ่งจะป้อนการทำงานของ ADI pathway

ความสำคัญอีกประการหนึ่งของ ADI pathway คือ ทำให้แบคทีเรียสามารถทนกรดและเจริญในสภาวะที่มี pH ต่ำได้ เพราะ pathway นี้ทำให้แบคทีเรียสามารถควบคุมการสร้างแอมโมเนียเพื่อให้มีค่า pH ที่เหมาะสม คือ มีความเป็นกรดน้อยที่สุดที่เซลล์สามารถเจริญได้ รวมทั้งแอมโมเนียที่ถูกสร้างขึ้นภายในเซลล์ สามารถเกิดการรวมตัวกับโปรตอนแล้วกลายเป็นแอมโมเนียม ( $\text{NH}_4^+$ ) ได้ ซึ่งปฏิกิริยา

นี้จะทำให้ค่า pH ของไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ภายในเซลล์เพิ่มขึ้น เป็นการป้องกันการทำลายของกรดต่อโครงสร้างที่บอบบางภายในไซโตพลาสซึม (Curran, Lieou, & Marquis 1995 4494-4496)

นอกจากนี้ ADI pathway ยังสามารถผลิตแอมโมเนียซึ่งเป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์ tetramethylpyrazine (TMP) โดยแบคทีเรียแลคติก รวมทั้งจากรายงานของ Schieberle (1996) ที่พบว่า ornithine ซึ่งเป็นสารที่เกิดขึ้นจากการสลายอาร์จินีนโดย ADI pathway นั้น สามารถเป็นสารตั้งต้นของ 2-acetyl-L-pyrroline ซึ่งเป็นสารที่ให้กลิ่นรสคล้ายกับการย่างอาหารหรือคล้ายกับกลิ่นข้าวโพดคั่ว

ADI pathway ดังแสดงในภาพประกอบ 5 ประกอบด้วยเอนไซม์พื้นฐาน 3 ชนิด คือ arginine deiminase (ADI, EC 3.5.3.6), ornithine transcarbamylase (หรือ transcarbamylase) (OTC, EC 2.1.3.3) และ carbamate kinase (CK, EC 2.7.2.2) ซึ่งขั้นตอนในการสลายอาร์จินีนเริ่มจากเอนไซม์ arginine deiminase (ADI) สลาย L-arginine ได้เป็น L-citrulline และแอมโมเนีย ต่อมา L-citrulline จะถูกเปลี่ยนแปลงโดยเอนไซม์ ornithine transcarbamylase (OTC) ไปเป็น L-ornithine และ carbamyl phosphate จากนั้น carbamyl phosphate จะถูกเอนไซม์ carbamate kinase (CK) เปลี่ยนไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และแอมโมเนียอย่างละ 1 โมเลกุล โดยในขั้นตอนการสลาย citrulline และ carbamyl phosphate จะเป็นปฏิกิริยาที่ผันกลับได้ ในระหว่างการสลายอาร์จินีนจะมี ATP เกิดขึ้นโดยการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) ออกจาก carbamyl phosphate ให้แก่ ADP ได้เป็น ATP 1 โมเลกุล ต่อการสลายอาร์จินีน 1 โมเลกุล อย่างไรก็ตามพบว่าในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆจะมีความหลากหลายของปริมาณเอนไซม์แต่ละชนิดใน ADI pathway สูง (Arena, de Nadra, & Muñoz 2002 61-66, Crow, & Thomas 1982 1024-1032)

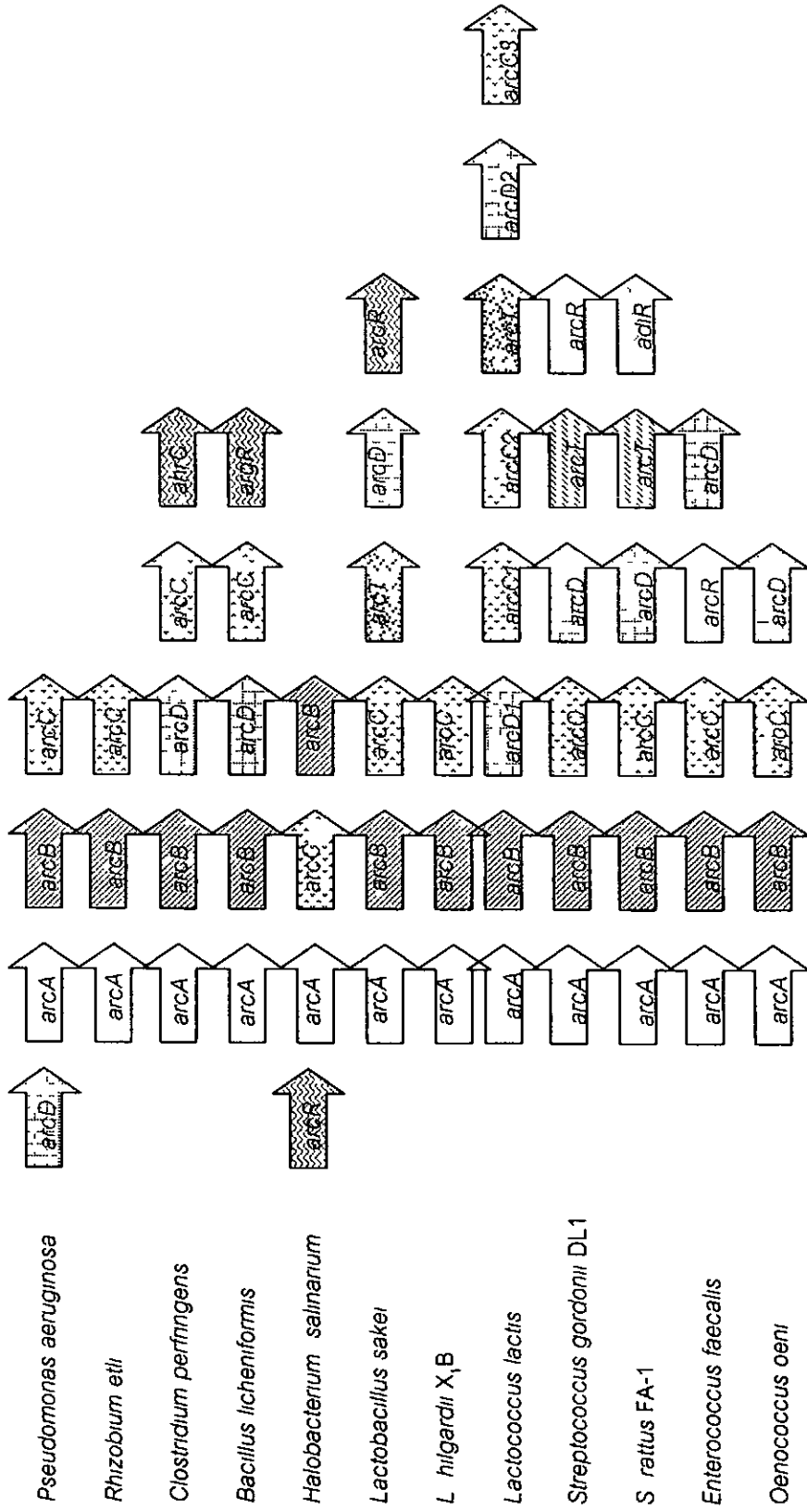


ภาพประกอบ 5 ขั้นตอนการสลาย L-arginine ของเอนไซม์ใน ADI pathway (Cunin et al 1986 314-352)

มีการศึกษาอื่นที่เกี่ยวข้องกับ ADI pathway จากแบคทีเรียชนิดต่างๆ พบว่ายีนเหล่านี้มีการจัดเรียงตัวเป็น operon โดยใน *Pseudomonas aeruginosa* มีการจัดเรียงตัวของยีนสำหรับเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดของ ADI pathway (arginine deiminase, ornithine transcarbamylase และ carbamate kinase ซึ่งแทนด้วย *arcA*, *arcB* และ *arcC* ตามลำดับ) ในรูปแบบ *arcABC* (Baur et al 1989 53-60) ต่อมามีการค้นพบยีน *arcD* ซึ่งเป็นยีนสำหรับเมมเบรนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการลำเลียงอาร์จินินและ ornithine มีตำแหน่งของยีนอยู่บริเวณ upstream ของยีน *arcA* (Winteler et al 1996 3391-3398) ส่วน *Rhizobium etli* มีการจัดเรียงตัวของยีนสำหรับเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด คล้ายกับ *P. aeruginosa* คือ *arcABC* แต่ไม่พบยีน *arcD* (D'Hooghe et al 1997 7403-7409) ใน *Clostridium perfringens* มีการจัดเรียงตัวของยีนที่ต่างออกไปคือ *arcABDC* และ *ahrC* ซึ่งคาดว่าเป็นยีนสำหรับสร้าง repressor ของ operon นี้ (Ohtani et al 1997 155-159) การจัดเรียงตัวของยีนในลักษณะนี้ยังพบได้ใน *Bacillus licheniformis* คือ *arcABDC* และ *argR* ซึ่งเป็นยีนสำหรับสร้าง repressor เช่นเดียวกับ *ahrC* ของ *C. perfringens* (Maghnouj et al 1998 6468-6475) นอกจากนี้ยังพบยีนสำหรับ ADI pathway ใน *Halobacterium salinarum* ซึ่งเป็น archaea bacteria มีรูปแบบการเรียงตัวของยีนเป็น *arcRACB* โดย *arcR* เป็นยีนสำหรับโปรตีนควบคุม (regulatory protein) (Ruepp, & Soppa 1996 4942-4947)

ส่วนในแบคทีเรียแลคติก มีรายงานของยีนสำหรับ ADI pathway จาก *Lactobacillus sakei* (ก่อนหน้านี้นี้คือ *Lactobacillus sake*) ซึ่ง Zuñiga และคนอื่นๆ (1998) พบการเรียงตัวของยีนแบบ *arcABCTD* โดยเชื่อว่า *arcT* เป็นยีนสำหรับเอนไซม์ transaminase เมื่อเร็วๆ นี้มีการพบยีนสำหรับ ADI pathway จาก *L. sakei* เพิ่มเติม คือ *arcR* โดยมีตำแหน่งของยีนอยู่ถัดจาก *arcD* ทำให้การจัดเรียงตัวของยีนจาก *L. sakei* ที่ทราบในปัจจุบันคือ *arcABCTDR* (Zuñiga, Miralles, & Perez-Martinez 2002 6051-6058) มีรายงานของยีนสำหรับ ADI pathway จาก *Lactobacillus hilgardii* X<sub>B</sub> ซึ่งพบว่ามีการเรียงตัวของยีน คือ *arcABC* โดยยังไม่พบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่น่าจะเป็น *arcD* (Arena et al 2002 61-66) ใน *Lactococcus lactis* นั้น Aungpraphapornchai (2000) พบการเรียงตัวของยีนสำหรับ ADI pathway คือ *arcABD<sub>1</sub>C<sub>1</sub>C<sub>2</sub>* ต่อมาได้พบการเรียงตัวของยีนดังกล่าวเพิ่มเติมโดยอยู่ในรูปแบบ *arcABD<sub>1</sub>C<sub>1</sub>C<sub>2</sub>TD<sub>2</sub>C<sub>3</sub>* (Zuñiga, Perez, & Gonzalez-Candeles 2002 429-444) ส่วนใน *Streptococcus* มีรายงานเกี่ยวกับยีนสำหรับ ADI pathway จาก *Streptococcus gordonii* DL1 โดยพบว่าทั้ง operon มีขนาด 7.6 Kb มีการจัดเรียงตัวของยีนคือ *arcABCDTR* ซึ่ง *arcT* เป็นยีนสำหรับเอนไซม์ dipeptidase (Dong et al 2002 5549-5553) ต่างจากใน *L. sakei* ที่เชื่อว่า *arcT* เป็นยีนสำหรับเอนไซม์ transaminase และเมื่อเร็วๆ นี้ Grswold และคนอื่นๆ (2004) พบยีนสำหรับ pathway ดังกล่าวจาก *Streptococcus rattus* FA-1 โดยรายงานว่าการเรียงตัวของยีนใน

รูปแบบ *arcABCdT-adiR* ซึ่งคล้ายกับการจัดเรียงตัวของยีนจาก *S. gordonii* DL1 โดย *adiR* คาดว่าเป็นยีนสำหรับโปรตีนควบคุม แต่ไม่มีการกล่าวถึง *arcT* ว่าเป็นยีนสำหรับโปรตีนชนิดใด ส่วนใน *Enterococcus faecalis* (เดิมถูกจัดอยู่ใน genus *Streptococcus* คือ *S. faecalis*) พบการเรียงตัวของยีนในรูปแบบ *arcABCdR* (Barcelona-Andres, Marina, & Rubio 2002 6289-6300) นอกจากนี้ยังมีรายงานของยีนสำหรับ ADI pathway จาก *Oenococcus oeni* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญต่อการผลิตไวน์ โดยในครั้งแรกพบการเรียงตัวของยีนแบบ *arcABC* (Tanon, Bourdineaud, & Lonvaud-Funel 2001 653-661) ต่อมา Divol และคนอื่นๆ (2003) ได้รายงานเกี่ยวกับการพบยีน *arcD* ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการลำเลียงอาร์จินีนเข้าสู่เซลล์ ทำให้ในปัจจุบัน *O. oeni* มีรูปแบบการจัดเรียงตัวของยีน คือ *arcABCD* ลักษณะการจัดเรียงตัวของยีนใน ADI pathway ในแบคทีเรียชนิดต่างๆได้แสดงในภาพประกอบ 6



ภาพประกอบ 6 ลักษณะการจัดเรียงของยีนใน ADI pathway ที่พบในแบคทีเรียบางชนิด (Arena et al 2002 61-66, Aungpraphapornchai 2000, Barcelona-Andres, Marina, & Rubio 2002 6289-6300, Baur et al 1989 53-60, D'Hooghe et al 1997 7403-7409, Divol et al 2003, Dong et al 2002 5549-5553, Griswold et al 2004 1321-1327, Maghnouj et al 1998 6468-6475, Ruepp, & Soppa 1996 4942-4947, Tanon, Bourdineaud, & Lonvaud-Funel 2001 653-661, Winteler et al 1996 3391-3398, Zuñiga et al 1998 4154-4159, Zuñiga, Perez, & Gonzalez-Candeles 2002 429-444, Zuñiga, Miralles, & Pérez-Martinez 2002 6051-6058)

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### อุปกรณ์และสารเคมี

- 1 ผลิตภัณฑ์นมหมักที่นำมาแยกเชื้อ
  - 1 1 ครีมเปรี้ยว (บริษัท โพรโมสต์)
  - 1 2 Danish Camembert cheese (บริษัท Rasmus)
  - 1 3 Danish Blue cheese (บริษัท Rosenborg)
  - 1 4 Fresh cream cheese (บริษัท Caroline)
  - 1 5 Edam cheese (บริษัท Mainland)
  - 1 6 Light Philadelphia spreadable (บริษัท Kraft)
  - 1 7 Gouda cheese (บริษัท Mainland)
  
- 2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง
  - 2 1 เครื่องชั่งสาร (บริษัท AND)
  - 2 2 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) (บริษัท Du pont)
  - 2 3 microcentrifuge (บริษัท Du pont)
  - 2 4 vortex (บริษัท FINE PCR)
  - 2 5 ultraviolet transilluminator (บริษัท Spectroline)
  - 2 6 เครื่องเขย่าสาร (shaker) (บริษัท IKA Labor Technik)
  - 2 7 master cycler (บริษัท eppendorf)
  - 2 8 microwave (บริษัท imarflex)
  - 2 9 electrophoresis apparatus (บริษัท Bio-Rad)
  - 2 10 กล้องจุลทรรศน์ (บริษัท Olympus)
  - 2 11 กล้องและอุปกรณ์ถ่ายภาพ (บริษัท Polaroid)
  - 2 12 water bath (บริษัท Heto)
  - 2 13 ตู้เพาะเลี้ยงเชื้อ (incubator) (บริษัท SHEL-LAB)
  - 2 14 ตู้แช่แข็ง -70°C (บริษัท Jouan)
  - 2 15 ตู้แช่แข็ง -20°C (บริษัท Sunyo)

- 2 16 ตู้เย็น 4°C (บริษัท Sunyo)
- 2 17 เตาไฟฟ้า (hot plate) (บริษัท Ego)
- 2 18 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง (บริษัท Sunyo)
- 2 19 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (บริษัท Perkin Elmer instruments)

### 3 เคมีภัณฑ์

- 3 1 0.25 M sucrose ผสมกับ 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)
- 3 2 lysozyme ความเข้มข้น 10 mg/ml (บริษัท USB)
- 3 3 20% SDS
- 3 4 5 M NaCl
- 3 5 สารละลาย phenol/chloroform (อัตราส่วน 1:1)
- 3 6 chloroform (บริษัท Merck)
- 3 7 3 M sodium acetate
- 3 8 absolute ethanol (บริษัท Merck)
- 3 9 น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ
- 3 10 5%  $\alpha$ -naphthol solution ใน absolute ethanol
- 3 11 40% KOH ที่ผสมกับ 0.3% creatine
- 3 12 Taq DNA Polymerase (บริษัท Promega)
- 3 13 10x Taq buffer (บริษัท Promega)
- 3 14 50 mM MgCl<sub>2</sub> (บริษัท Promega)
- 3 15 dNTP (บริษัท Promega)
- 3 16 TOPO<sup>®</sup> Reporter kits (บริษัท Invitrogen)
- 3 17 (10 x) ligation buffer (บริษัท Invitrogen)
- 3 18 electrophoresis grade agarose (บริษัท USB)
- 3 19 TBE buffer (ดูภาคผนวก)
- 3 20 ethidium bromide (บริษัท Promega)
- 3 21 marker (บริษัท Amersham Biosciences, Minnesota Molecular)
- 3 22 loading dye (บริษัท Fluka) (ดูภาคผนวก)
- 3 23 TOPO TA Cloning kit<sup>®</sup> (บริษัท Invitrogen)
- 3 24 T4 DNA ligase (บริษัท Invitrogen)

- 3 25 เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* (บริษัท Promega)
- 3 26 ยาปฏิชีวนะ ampicillin (บริษัท Sigma)
- 3 27 X-gal (บริษัท AMRESCO)
- 3 28 Wizard Plus SV Minipreps kit (บริษัท Promega)
- 3 29 น้ำยาสำหรับย้อมเซลล์แบบ gram stain

#### 4 วัสดุภัณฑ์

- 4 1 ไมโครปิเปต (บริษัท Gilson)
- 4 2 ทิป (บริษัท Axygen)
- 4 3 กล่องเก็บความเย็น (บริษัท DyNa Chill)
- 4 4 พาราฟิล์ม (บริษัท Whatman)
- 4 5 หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml และ 1 ml (บริษัท Axygen)
- 4 6 หลอดเซนตริฟิวจ์
- 4 7 cuvet ขนาด 1 ml
- 4 8 หลอดแก้วฝาเกลียว (บริษัท Pyrex)
- 4 9 ฟลasks ขนาด 250 ml (บริษัท Pyrex)
- 4 10 หลอด thin wall สำหรับทำ PCR ปริมาตร 200  $\mu$ l (บริษัท M $\beta$ P' Molecular Bioproduct)
- 4 11 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (บริษัท Sterilin)
- 4 12 แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อ (spreader)
- 4 13 สไลด์
- 4 14 กล่องใส่สไลด์
- 4 15 ห่วงเขี่ยเชื้อ
- 4 16 ถู่มือยาง (บริษัท Princess)
- 4 17 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 4 18 ขวดแก้วฝาเกลียว (บริษัท Schott Duran)
- 4 19 ไม้จิ้มฟัน

## 5 primer ที่ใช้ในการทดลอง

- 5 1 rdi29 5'-GT(AGCT)AA(CT)(AT)(GC)(AGCT)GA(AG)AT(ACT)GG(AGCT)AA  
(AG)(CT)T(AGCT)AA-3' (ภัทรารุณ 2544)
- 5 2 rdi30 5'-TT(CT)GC(AGCT)CA(AG)AC(AGCT)(CT)T(AGCT)(AC)G(AGCT)G  
A(CT)AA(CT)GG-3' (ภัทรารุณ 2544)
- 5 3 rdi2 5'-CAT(AGCT)GT(AG)AA(AGCT)AC(AGCT)GT(AG)TC(AGCT)A(AG)  
(AG)TGCAT-3' (ภัทรารุณ 2544)
- 5 4 rdi-fwd 5'-CTTCTTGGGGTTGCTGC-3'
- 5 5 rdi-rev 5'-AATACTGAGTTTACTTCTGC-3'
- 5 6 rdi-fwd2 5'-GGAAAAATAATGACATCACC-3'
- 5 7 rdi-rev2 5'-TGTTTTCTTCTCTTGAATCCC-3'
- 5 8 rdi-fwd3 5'-TGTTATCATGATTTGTTATGCC-3'
- 5 9 rdi-rev3 5'-ATGCTACATCAGAAATGTAGC-3'
- 5 10 rdi 1253-33 5'-GAAATCATGCTCTTTTTGAGC-3'
- 5 11 M13 (-20) 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'
- 5 12 M13 (rev) 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'
- 5 13 gadB21 5'-CGTTATGGATTTGATGGATATAAAGC-3' (Nomura et al 2002)
- 5 14 GAD7 5'-ACTCTTCTTAAGAACAAGTTTAACAGC-3' (Nomura et al 2002)

## 6 ชนิดของพลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง

- 6 1 pCR<sup>®</sup>2 1 TOPO vector (บริษัท Invitrogen)
- 6 2 pBlue-TOPO<sup>®</sup> vector (บริษัท Invitrogen)

## 7 อาหารเลี้ยงเชื้อ (ดูภาคผนวก)

- 7 1 MRS medium
- 7 2 modified MRS medium
- 7 3 Methyl Red-Voges Proskauer medium
- 7 4 Luria-Bertani (LB) medium

## วิธีดำเนินการทดลอง

### ดำเนินการโดยภาพรวม

แยกเชื้อจากผลิตภัณฑ์นมหมักแล้วนำมาศึกษารูปร่าง การติดสีแกรม และการสร้างเอนไซม์ catalase

ทดสอบความสามารถในการผลิต acetoin และการใช้อาร์จินีนเป็นแหล่งพลังงาน

สกัดโครโมโซมแบคทีเรียที่สามารถผลิต acetoin และใช้อาร์จินีนเป็นแหล่งพลังงานได้

สังเคราะห์ชิ้นส่วนของยีน *arcA* ด้วยการทำให้ PCR โดยใช้ degenerate primer rdi2, rdi29 และ rdi30 โคลนขึ้นดีเอ็นเอที่ได้เข้าสู่ pCR<sup>®</sup>2 1-TOPO vector พร้อมทั้งทำการ transformation จากนั้นนำโคลนนี้ไปทำ colony PCR แล้วเลือกเฉพาะโคลนที่ให้ band ขนาดที่ต้องการมาสกัดพลาสมิดออกจากเซลล์เพื่อนำมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์และวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม Fasta 3

เพิ่มจำนวนยีนสำหรับ arginine deiminase pathway ด้วยการทำให้ PCR โดยใช้ primer rdi-fwd และ rdi-rev, rdi-fwd2 และ rdi-rev2, rdi-fwd3 และ rdi-rev3 แล้วทำการโคลนขึ้นดีเอ็นเอจนถึงการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ตามขั้นตอนเดียวกับการสังเคราะห์ชิ้นส่วนของยีน จากนั้นวิเคราะห์ข้อมูลด้วย

โปรแกรม Blast

จัดจำแนก subspecies ของแบคทีเรียที่ได้ด้วยการทำให้ PCR โดยใช้ primer gadB21 และ GAD7 โคลนขึ้นดีเอ็นเอเข้าสู่ pCR<sup>®</sup>2 1-TOPO vector พร้อมทั้งทำการ transformation และนำโคลนนี้ไปทำ colony PCR จากนั้นนำมาสกัดพลาสมิดและวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์

วิเคราะห์การทำงานของโปรโมเตอร์โดยการทำ PCR ด้วย primer rdi-fwd และ rdi 1253-33 โคลนขึ้นดีเอ็นเอที่ได้เข้าสู่ pBlue-TOPO<sup>®</sup> vector แล้วทำการ transformation จากนั้นเลือกโคลนที่มีสีฟ้ามาสกัดพลาสมิดออกจากเซลล์และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อยืนยันว่าโคลนสีฟ้าที่คัดเลือกมานั้นมีพลาสมิดที่ต้องการ ก่อนการนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์

## 1 การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกจากผลิตภัณฑ์นมหมักที่สามารถผลิต acetoin และใช้ arginine เป็นแหล่งพลังงานได้

### 1.1 การแยกแบคทีเรียแลคติกจากผลิตภัณฑ์นมหมักชนิดต่างๆ

ผลิตภัณฑ์นมหมักที่ใช้ในการแยกเชื้อมี 7 ชนิด นำอาหารหมักชนิดต่างๆมาเจือจางในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นนำห้วงเชื้อเข้ามา cross-streak บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่เติม calcium carbonate 1% (w/v) แล้วนำเชื้อไปบ่มที่ 30°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง โคลินี้เดี่ยวที่มีวงใส (clear zone) อยู่รอบโคโลนีจะถูกคัดเลือกแบบสุ่มเพื่อนำไปตรวจสอบขั้นต่อไป นำโคโลนีเดี่ยวที่คัดเลือกไว้มาศึกษารูปร่าง การติดสีแกรม และการสร้างเอนไซม์ catalase

### 1.2 การทดสอบความสามารถในการผลิต acetoin และการใช้อาร์จินีนเป็นแหล่งพลังงานของแบคทีเรียแลคติก

#### 1.2.1 การทดสอบความสามารถในการผลิต acetoin

นำโคโลนีที่ได้คัดเลือกไว้แล้วมาเลี้ยงใน Methyl Red-Voges Proskauer medium ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเปิดอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อเจริญมา 1 ml ใส่ในหลอดทดสอบ เติม 5%  $\alpha$ -naphthol solution ใน absolute ethanol ปริมาตร 0.6 ml และสารละลาย 40% KOH ที่ผสมกับ 0.3% creatine ปริมาตร 0.2 ml ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมี acetoin จะเกิดปฏิกิริยากับ KOH ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีสีแดง

#### 1.2.2 การทดสอบการใช้อาร์จินีนเป็นแหล่งพลังงาน

เลี้ยงเชื้อใน modified MRS broth (ซึ่งได้ดัดแปลงมาจาก MRS broth โดยใส่ 0.3% (w/v) arginine hydrochloride แทน ammonium citrate) ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm เทียบกับ modified MRS medium ที่ไม่มีการเติมเชื้อ ถ้าแบคทีเรียสามารถเจริญได้แสดงว่าสามารถใช้อาร์จินีนเป็นแหล่งพลังงานได้

## 2 การเตรียมชิ้นส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับ arginine deiminase

### 2.1 การสกัดโครโมโซมของแบคทีเรียแลคติก

ในการสกัดโครโมโซมของแบคทีเรียแลคติกจะใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Lewington และคนอื่นๆ (1987) โดยมีขั้นตอนดังนี้

ทำการเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกในอาหารเหลว MRS 10 ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการปั่นที่ 5,000 rpm อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที นำออกมาเทส่วนใสทิ้ง แล้วเติมสารละลายที่ประกอบด้วย 0.25 M sucrose และ 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) ลงไป 240  $\mu$ l เติม lysozyme ที่มีความเข้มข้น 10 mg/ml ปริมาตร 50  $\mu$ l จากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37°C นาน 10 นาที นำมาเติม 20% SDS ที่มีอุณหภูมิ 37°C ลงไป 160  $\mu$ l ผสมให้เข้ากันประมาณ 5 วินาที แล้วเติม 5 M NaCl ที่เย็นจัดปริมาตร 80  $\mu$ l ทันที จากนั้นผสมให้เข้ากันอีกครั้ง บ่มในน้ำแข็งนานประมาณ 1 ชั่วโมง เมื่อครบ 1 ชั่วโมงแล้ว นำมาปั่นที่ 12,000 rpm อุณหภูมิ 10°C นาน 10 นาที เก็บส่วนใสไว้ แล้วนำมาสกัดโปรตีนออกด้วยสารละลาย phenol/chloroform (อัตราส่วน 1:1) 2 ครั้ง และด้วย chloroform อีก 1 ครั้ง โดยใช้ปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของส่วนใส ทำการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย sodium acetate ความเข้มข้น 3 M โดยใช้ปริมาตร 0.1 เท่าของส่วนใส และ absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่าของส่วนใส จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -70°C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอนเทของเหลวทิ้งเหลือเพียงตะกอนดีเอ็นเอ แล้วนำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้มาละลายในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ แล้วนำมาวัดปริมาณและความบริสุทธิ์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 nm

2.2 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอของยีน arginine deiminase และยีนสำหรับ arginine deiminase pathway โดยวิธี PCR

ผสมสารที่ใช้ในการทำ PCR ทั้งหมดลงในหลอด PCR ปริมาตร 200  $\mu$ l ซึ่งประกอบด้วย ดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติกที่สกัดไว้แล้ว (DNA template) 2  $\mu$ l (ประมาณ 250 ng), 10x Taq buffer 5  $\mu$ l, 50 mM MgCl<sub>2</sub> 2  $\mu$ l, dNTP ที่แต่ละชนิดมีความเข้มข้น 2 mM 4  $\mu$ l, primer forward และ reverse ชนิดละ 50 pmol และ Taq DNA polymerase (5 U/ $\mu$ l) 0.1  $\mu$ l จากนั้นเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีปริมาตรสุทธิ 50  $\mu$ l แล้วนำหลอด PCR ที่ผสมสารที่ใช้ในการทำ PCR ใส่ในเครื่อง master cycler ใช้เวลาในการทำ 30 รอบ โดยตั้งอุณหภูมิและเวลาในการทำแต่ละรอบดังนี้ คือ ทำการแยกสายคู่ของดีเอ็นเอ (degeneration) ที่อุณหภูมิ 92°C เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นลดอุณหภูมิลงที่ 48°C เพื่อให้ primer เข้าจับกับสายดีเอ็นเอ (annealing) เป็นเวลา 2 นาที และเพิ่มอุณหภูมิเป็น 72°C เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจาก primer (primer extension)

จากนั้นนำ PCR product ที่ได้จากการทำ PCR มาทำการวิเคราะห์ขนาดด้วยการทำ electrophoresis ใน 1% agarose gel (w/v) โดยชั่ง electrophoresis grade agarose 0.5 g ผสมกับ TBE buffer (ความเข้มข้น 0.5 เท่า) 50 ml นำมาหลอมให้เจลละลายเข้ากับ TBE buffer จากนั้นเทเจลลงใน gel apparatus รอให้เจลแข็งตัว แล้วจึงนำมาใส่ใน chamber จากนั้นเท TBE buffer (ความ

เข้มข้น 0.5 เท่า) ให้ท่วมเจล นำ PCR product ที่ผสมกับ gel-loading buffer ใส่ลงในช่องภายในเจล ให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ประมาณ 100 โวลต์ ในระยะเวลาที่เหมาะสม ย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide (0.1 µg/ml) นาน 15 นาที จากนั้นตรวจดูเจลภายใต้แสง UV ดีเอ็นเอ จะปรากฏให้เห็นเป็นแถบสีส้ม

## 2.3 การโคลนชิ้นดีเอ็นเอและการทำ transformation

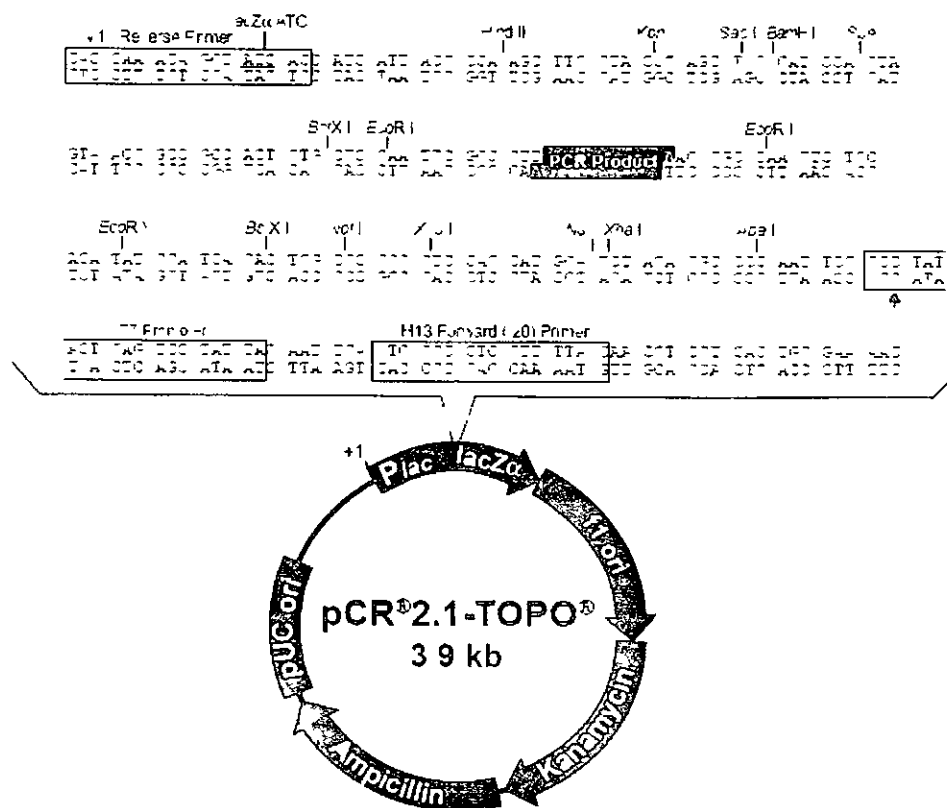
### 2.3.1 การเตรียม competent cell ของแบคทีเรีย สำหรับการทำ transformation (Cohen et al 1972)

เลี้ยงเชื้อ *E. coli* Top 10 ใน Luria-Bertani (LB) medium ที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อ 1 ml ใส่ใน LB broth ปริมาตร 100 ml ใหม่ที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 500 ml แล้วเขย่าที่ 37°C ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง จนวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 nm ได้ค่าประมาณ 0.3 เมื่อวัดค่าความขุ่นได้แล้ว นำมาปั่นแยกเซลล์ออกจากอาหารเหลวที่ 5,000 rpm นาน 5 นาที (หลอดเซนตริฟิวส์ที่ใช้ต้องปราศจากเชื้อและมีอุณหภูมิ 4°C) นำออกมาเทส่วนใสทิ้งแล้วละลายตะกอนด้วยแคลเซียมคลอไรด์ 50 mM ที่เย็นจัด 20 ml จากนั้นทิ้งไว้บนกล่องเก็บความเย็น 0°C (หรือน้ำแข็ง) 20 นาที แล้วนำมาปั่นที่ 5,000 rpm อุณหภูมิ 4°C นาน 5 นาที ละลายตะกอนอีกครั้งด้วยแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 50 mM ที่ผสมกลีเซอรอลให้มีความเข้มข้น 15% (v/v) ที่เย็นจัดลงไป ปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 5 ml ปิเปิดแยกใส่หลอด eppendorf หลอดละ 200 µl เก็บที่อุณหภูมิ -70°C จนกว่าจะนำมาใช้งาน

### 2.3.2 การนำ PCR product เชื่อมต่อกับพลาสมิด

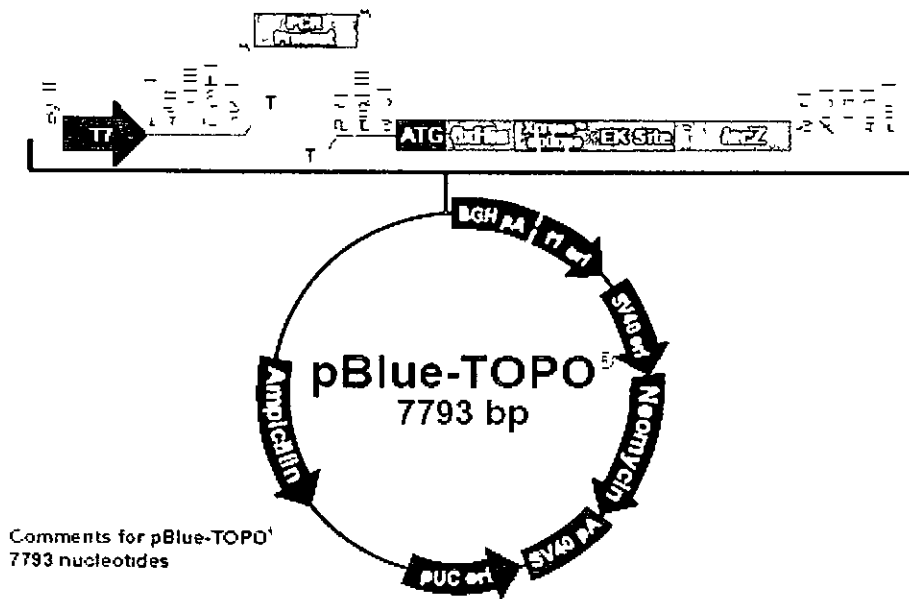
การนำ PCR product เชื่อมต่อกับ pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO vector (ภาพประกอบ 7) ได้ใช้ TA cloning kit (Invitrogen) โดยการผสมสารต่างๆ คือ PCR product จากหัวข้อ 2.2 ปริมาตร 2 µl, pCR<sup>®</sup>2.1 vector (ความเข้มข้น 25 ng/µl) 2 µl, ligation buffer (ความเข้มข้น 10 เท่า) 1 µl, T4 DNA ligase (4 U/µl) 1 µl และเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 µl ผสมสารต่างๆ ให้เข้ากัน จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 14°C เป็นเวลาอย่างน้อย 4 ชั่วโมง

ส่วนการนำ PCR product เชื่อมต่อกับ pBlue-TOPO<sup>®</sup> vector (ภาพประกอบ 8) จะใช้ TOPO<sup>®</sup> Reporter kits (Invitrogen) โดยการผสมสารต่างๆ คือ PCR product จากหัวข้อ 2.2 ปริมาตร 3 µl, salt solution 1 µl, น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 1 µl และ pBlue-TOPO<sup>®</sup> vector 1 µl ผสมสารต่างๆ ให้เข้ากัน จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 5 นาที



Comments for pCR<sup>2.1</sup>-TOPO<sup>®</sup>  
3931 nucleotides

ภาพประกอบ 7 โครงสร้างของ pCR<sup>2.1</sup> vector และตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ต่างๆ  
(Invitrogen)



ภาพประกอบ 8 โครงสร้างของ pBlue-TOPO<sup>®</sup> vector และตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ต่างๆ (Invitrogen)

### 2 3 3 การทำ transformation

นำสารผสม (ligation mix) ในข้อ 2 3 2 มา 2  $\mu$ l ผสมกับ competent cell

*E. coli* TOP 10 แล้วบ่มในกล่องเก็บความเย็น  $0^{\circ}\text{C}$  30 นาที จากนั้นทำการ heat shock ที่อุณหภูมิ  $42^{\circ}\text{C}$  นาน 30 วินาที แล้วเติม SOC medium ลงไป 250  $\mu$ l นำไปเขย่าในแนวนอนที่ความเร็วรอบประมาณ 200 rpm นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วแบ่งของเหลวในหลอดมาเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani agar ที่ผสม ampicillin และ X-gal (ความเข้มข้น 1  $\mu$ l/อาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ml) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  นานประมาณ 24 ชั่วโมง

### 2 3 4 การทำ colony PCR

นำโคโลนีที่มีสีขาวจากจานเพาะเชื้อ Luria - Bertani agar โดยใช้ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วแตะโคโลนีมาทำเป็นสารแขวนลอยในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 10 ml ในหลอด microcentrifuge ที่ปราศจากเชื้อ แล้วทำ PCR ตามวิธีที่ระบุในหัวข้อ 2 2 โดยใช้โคโลนีที่ผสมในน้ำกลั่นแทนดีเอ็นเอ และใช้ primer M13 (-20) และ M13 (rev)

จากนั้นทำการวิเคราะห์ขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ด้วยการทำ electrophoresis ใน 1% agarose gel (w/v)

## 2 4 การสกัดพลาสมิดที่ถูกโคลนด้วยชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการออกจาก *E. coli*

นำโคโลนีที่ต้องการมาเพาะเลี้ยงในอาหาร LB broth 10 ml ในตู้เพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  ประมาณ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเพื่อแยกเซลล์ออกที่ความเร็ว 5,000 rpm อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  นาน 2 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้งให้เหลือเฉพาะส่วนที่เป็นเซลล์ จากนั้นจะใช้ชุด Wizard Plus SV Minipreps kit (Promega) ในการสกัดพลาสมิดด้วยวิธีตามที่ระบุโดยผู้ผลิต

## 2 5 การตัดพลาสมิดที่ถูกโคลนด้วยชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ผสมสารที่ใช้ในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งประกอบด้วย พลาสมิดที่ถูกโคลนด้วยชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ 3  $\mu$ l, เอนไซม์ตัดจำเพาะ 1  $\mu$ l, 10x buffer 1  $\mu$ l และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 5  $\mu$ l จากนั้นผสมสารต่างๆให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  นาน 1 ชั่วโมง

### 3 การศึกษาลำดับดีเอ็นเอของยีนที่เกี่ยวข้องกับ ADI pathway

#### 3.1 การหาลำดับดีเอ็นเอ

การหาลำดับดีเอ็นเอจัดทำโดย BioService Unit

#### 3.2 การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับดีเอ็นเอ

การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับดีเอ็นเอ ทำโดยใช้โปรแกรม Fasta 3 และ Blast จาก European Bioinformatics Institute ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk))

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 1 การแยกแบคทีเรียแลคติกจากผลิตภัณฑ์นมหมัก

แยกแบคทีเรียแลคติกจากผลิตภัณฑ์นมหมักชนิดต่างๆ โดยสุ่มคัดเลือกโคโลนีเดียวที่เกิดขึ้นบน MRS medium ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ซึ่งมีวงใสอยู่รอบโคโลนี เพื่อนำมาตรวจสอบรูปร่าง การติดสีแกรม และการสร้างเอนไซม์ catalase โดยคัดเลือกเฉพาะเชื้อที่มีลักษณะเป็นรูปท่อน (rod) ทรงกลม (coccus) หรือรูปรี (ovoid) ซึ่งติดสีแกรมบวก และให้ผล catalase เป็นลบ โดยแยกเชื้อจากครีมเปรี้ยว(เฟิร์มอสต์) สามารถแยกเชื้อได้จำนวน 8 isolates Danish Camembert cheese (Rasmus) ไข่จำนวน 4 isolates Danish Blue cheese (Rosenborg) แยกเชื้อไข่จำนวน 8 isolates Fresh cream cheese (Caroline) แยกเชื้อไข่จำนวน 6 isolates Edam cheese (Mainland) แยกเชื้อไข่จำนวน 6 isolates ส่วน Light Philadelphia spreadable (Kraft) และ Gouda cheese (Mainland) พบว่าไม่สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกได้ในสภาวะที่ใช้ทดลอง

#### 2 การทดสอบความสามารถในการผลิต acetoin และการใช้อาร์จินีนเป็นแหล่งพลังงาน

นำเชื้อที่คัดเลือกไว้มาทำการทดสอบความสามารถในการผลิต acetoin และความสามารถในการใช้อาร์จินีนเป็นแหล่งพลังงาน โดยผลการทดลองได้แสดงในตาราง 4

#### 3 การสกัด chromosomal DNA ของแบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียที่สามารถสร้าง acetoin ได้และสามารถใช้อาร์จินีนเป็นแหล่งพลังงานจำนวน 25 ตัวอย่าง (ตาราง 4) นำมาสกัด chromosomal DNA เพื่อใช้เป็น template สำหรับการทำให้ PCR ต่อไป

ตาราง 4 ความสามารถของแบคทีเรียที่แยกจากผลิตภัณฑ์นมหมักในการผลิต acetoin (Voges-Proskauer test) และความสามารถในการใช้อาร์จินีนเป็นแหล่งพลังงาน

ตัวอย่างอาหาร	Isolate	รูปร่าง	Voges-Proskauer test <sup>b</sup>	การเจริญใน modified MRS medium <sup>c</sup>
ครีมเบรียว(โฟร์โมสต์)	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	+	+
	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	oviod	-	+

ตาราง 4 (ต่อ)

ตัวอย่างอาหาร	Isolate	รูปร่าง	Voges-Prokauer test <sup>b</sup>	การเจริญใน modified MRS medium <sup>c</sup>
Edam cheese (Mainland)	No 1	ovoid	+	+
	No 2	ovoid	+++	+
	No 3	ovoid	+	+
	No 4	ovoid	+	+++
	No 5	ovoid	+	+++
	No 6	ovoid	+	+++
Light Philadelphia spreadable (Kraft)	- <sup>a</sup>	-		
Gouda cheese (Mainland)	- <sup>a</sup>	-		

หมายเหตุ a ไม่สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกได้ในสภาวะที่ใช้ทดลอง

b เชื้อที่มีการสร้าง acetoin จะแสดงด้วยเครื่องหมาย + และเชื้อที่มีการสร้าง acetoin ในปริมาณมากจะแสดงด้วยเครื่องหมาย +++

c เชื้อที่เจริญได้ในอาหาร modified MRS medium จะแสดงด้วยเครื่องหมาย + และเชื้อที่เจริญได้ดีในอาหารดังกล่าว คือ ให้ค่า OD<sub>600 nm</sub> สูงกว่า 0.5 จะแสดงด้วยเครื่องหมาย +++

#### 4 การออกแบบ primer สำหรับเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนยีน arginine deiminase

degenerate primer สำหรับการสังเคราะห์ชิ้นส่วนของยีน arginine deiminase ได้ออกแบบไว้แล้วโดยภัทรารุช โสภา (2544) ได้แก่ rdi29 (forward), rdi30 (forward) และ rdi2 (reverse) โดยการนำลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ arginine deiminase เฉพาะของแบคทีเรียแลคติกที่มีรายงานอยู่ใน European Molecular Biology Laboratory (EMBL) database มาเปรียบเทียบกัน เพื่อหาบริเวณของโปรตีนที่เหมือนหรือคล้ายกันระหว่างเอนไซม์ arginine deiminase ของแบคทีเรียแลคติกแต่ละชนิด โดยใช้โปรแกรม Pairwise เพื่อใช้ในการออกแบบ degenerate primers โดยลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ arginine deiminase ที่นำมาใช้เปรียบเทียบเพื่อออกแบบ degenerate primers มี 2 ชนิด คือ AJ250129 ที่เป็นลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์จาก *Lactococcus lactis* MG1363 (Aungpraphapornchai 2000) และ AJ001330 เป็นลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์จาก *Lactobacillus sakei* (Zuniga et al 1998 4154-4159)

ในการทดลองนี้ได้ทำการออกแบบ primer จากลำดับนิวคลีโอไทด์ AJ250129 จาก *Lactococcus lactis* (Aungpraphapornchai 2000) ขึ้น 3 คู่ คือ rdi-fwd และ rdi-rev, rdi-fwd2 และ rdi-rev2, rdi-fwd3 และ rdi-rev3 เพื่อใช้ในการสังเคราะห์ชิ้นส่วนของยีนทั้งหมด โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้

rdi-fwd 5'-CTTCTTGGGGTTGCTGC-3'

rdi-rev 5'-AATACTGAGTTTACTTCTGC-3'

rdi-fwd2 5'-GGAAAAATAATGACATCACC-3'

rdi-rev2 5'-TGTTTTCTTCTTTGAATCCC-3'

rdi-fwd3 5'-TGTTATCATGATTTGTTATGCC-3'

rdi-rev3 5'-ATGCTACATCAGAAATGTAGC-3'

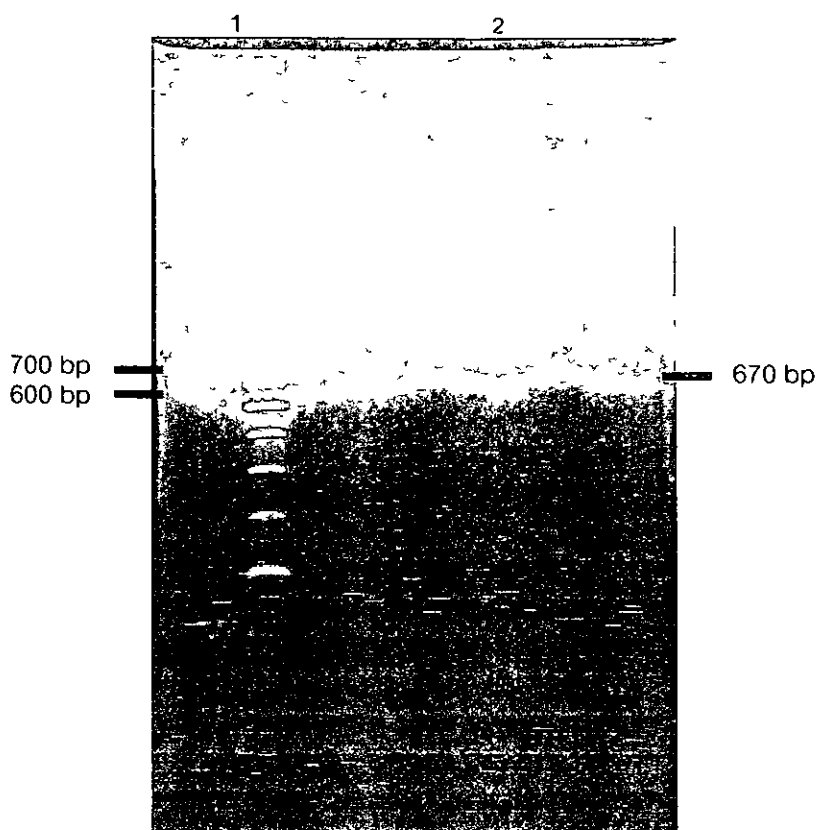
## 5 การสังเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอสำหรับยีน arginine deiminase โดยวิธี PCR และการโคลนชิ้นดีเอ็นเอเข้าสู่พลาสมิด

การทำ PCR เพื่อสังเคราะห์ชิ้นส่วนของยีน arginine deiminase โดยใช้ chromosomal DNA ที่สกัดจากแบคทีเรียแลคติก 25 ตัวอย่างเป็น template ซึ่งตัวอย่างทั้งหมดจะถูกนำมาทำ PCR 2 ชุด คือ ชุดที่ 1 จะใช้ degenerate primers rdi29 และ rdi2 และชุดที่ 2 จะใช้ degenerate primer rdi30 และ rdi2 โดยคาดหวังว่าจะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 810 และ 670 bp จากการทำ PCR ชุดที่ 1 และ ชุดที่ 2 ตามลำดับ

จากการทำ PCR ชุดที่ 1 โดยใช้ degenerate primer rdi29 และ rdi2 ไม่พบการสังเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการ จาก chromosomal DNA ทั้ง 25 ตัวอย่าง ในขณะที่การทำ PCR ชุดที่ 2 โดยใช้ degenerate primer rdi30 และ rdi2 พบว่ามีการสังเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 670 bp 1 ตัวอย่าง คือ จาก chromosomal DNA ของแบคทีเรียแลคติกจากคริมเบรียว (ไฟรีโมสท์) No 8 ซึ่งได้แสดงขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ในภาพประกอบ 9

หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้มาโคลนเข้าสู่พลาสมิด pCR2 1-TOPO แล้วนำไปใช้ในการทำ transformation กับ competent cell *E. coli* Top10 จากนั้นทำการคัดเลือก *E. coli* โคลนีสีขาวซึ่งได้รับพลาสมิดลูกผสม (recombinant plasmid) ที่มีดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ขึ้น แล้วนำมาทำ colony PCR โดยใช้ primer M13 (-20) และ M13 (rev) เพื่อเพิ่มจำนวนและวิเคราะห์ขนาดของพลาสมิดลูกผสมที่ได้รับดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ขึ้นจากโคลนีสีขาวนั้น ว่าเป็นขนาดที่ถูกต้องหรือไม่ จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดลูกผสมที่มีขนาดถูกต้องออกจากเซลล์ *E. coli* แล้วนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าว

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จาก primer rdi30 และ rdi2 (ความยาว 467 นิวคลีโอไทด์ โดยเริ่มจากนิวคลีโอไทด์ตัวแรกที่อยู่ถัดจาก primer rdi30 จนถึงนิวคลีโอไทด์ตัวสุดท้ายก่อนถึง primer rdi2) ของชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์จากเชื้อที่แยกจากคริมเบรียว (ไฟรีโมสท์) No 8 โดยใช้โปรแกรม Fasta3 พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวมีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนสำหรับเอนไซม์ arginine deiminase ใน EMBL database ดังแสดงในตาราง 5



ภาพประกอบ 9 ขึ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ชุดที่ 2 ด้วย degenerate primer rdi30 และ rdi2 ของแบคทีเรียที่แยกจากครีมีเปรี้ยว (ไฟโรโมสท์) No 8 แถวที่ 1 คือ 100 bp DNA Marker (Amersham Biosciences), แถวที่ 2 คือ ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ของแบคทีเรียที่แยกจากครีมีเปรี้ยว (ไฟโรโมสท์) No 8 (ขนาด 670 bp)

ตาราง 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ใน EMBL database ที่มีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ  
ที่สังเคราะห์ด้วย primer rdi2 และ rdi30 จากแบคทีเรียที่แยกจากครีมเปรี้ยว (เฟิร์มอสต์) No 8  
โดยใช้โปรแกรม Fasta3

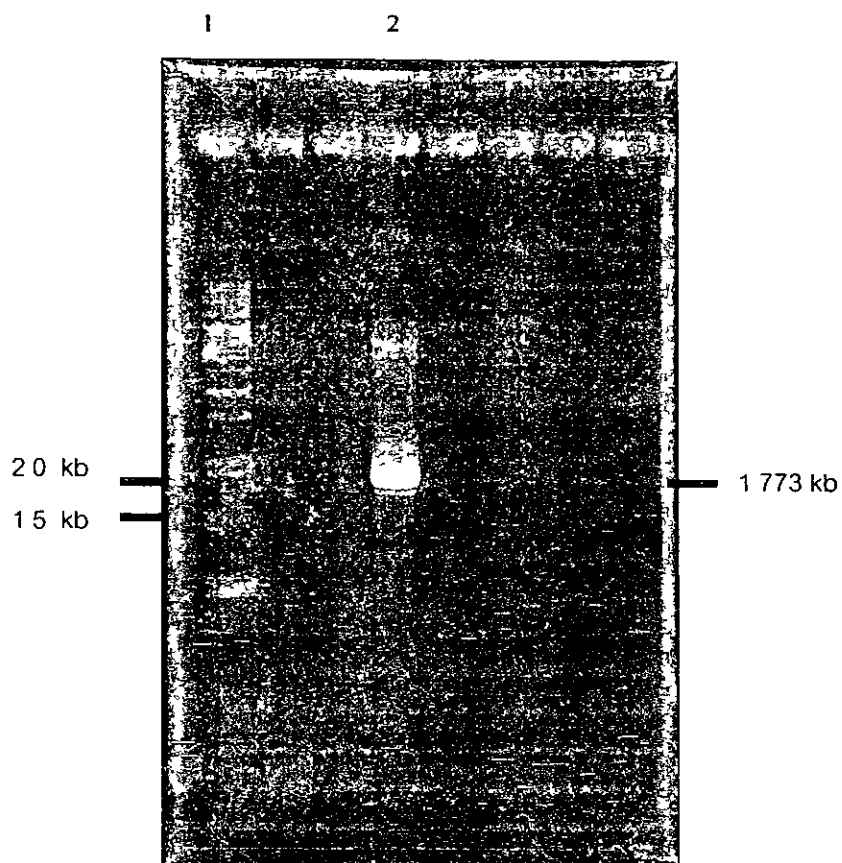
เอนไซม์/แบคทีเรีย	Accession No	%identity	ที่มา
arginine deiminase จาก <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>cremoris</i> MG 1363	AJ250129	99 786	Aungpraphaporn chai et al (2000)
arginine deiminase จาก <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>cremoris</i> ML3	AF282249	99 572	Chou, Weimer, & Xie (2000)
arginine deiminase จาก <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> IL1403	AE006433	92 505	Bolotin et al (2001)
arginine deiminase จาก <i>Oenococcus oeni</i> ATCC 23279	AF124851	61 123	Tonon, Bourdi neaud, & Lonvaud-Funel (2001)
arginine deiminase จาก <i>Lactobacillus sakei</i> BL13	AJ001330	58 774	Zuniga et al (1998)
arginine deiminase จาก <i>Lactobacillus</i> <i>hilgardii</i> X <sub>1</sub> B	AJ421514	57 773	Arena et al (2002)

## 6 การสังเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับ arginine deiminase pathway

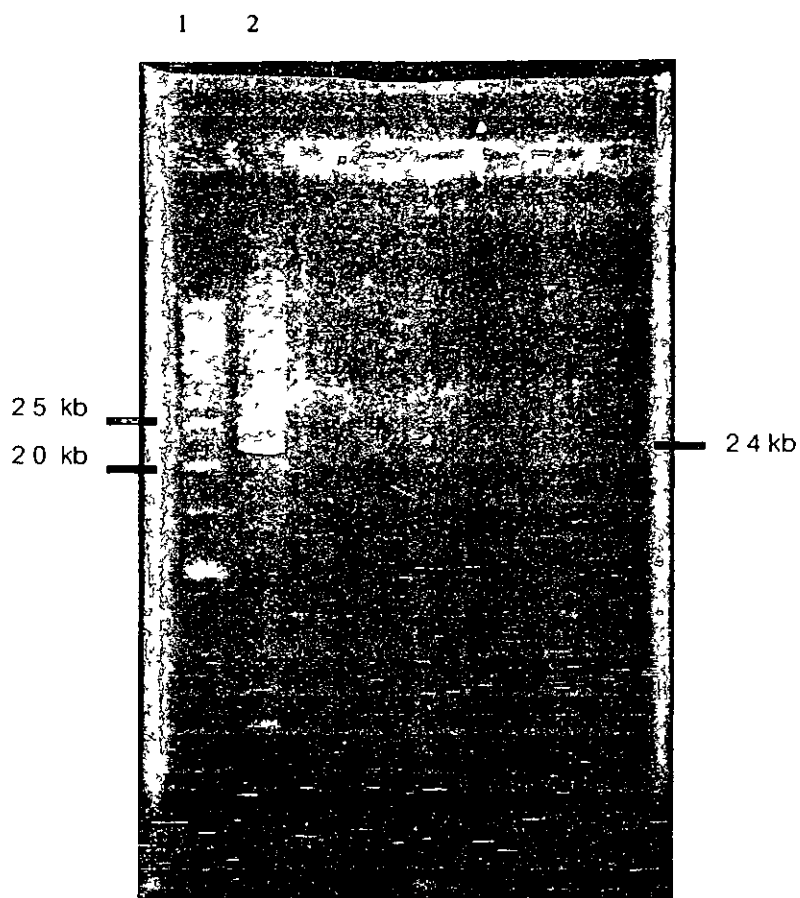
เนื่องจากชิ้นดีเอ็นเอขนาด 670 bp ที่สังเคราะห์ได้จากการทำ PCR โดยใช้ degenerate primers มีความใกล้เคียงกับยีนสำหรับเอนไซม์ arginine deiminase ของ *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* มากกว่า 99% ดังนั้นในการศึกษาอื่นต่างๆของ ADI pathway ของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้ จึงทำการออกแบบ specific primers จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *L. lactis* subsp *cremoris* MG1363 (AJ250129) จำนวน 3 คู่ คือ rdi-fwd และ rdi-rev, rdi-fwd2 และ rdi-rev2 , rdi-fwd3 และ rdi-rev3

ในการทำ PCR โดยใช้ primer rdi-fwd และ rdi-rev, rdi-fwd2 และ rdi-rev2 , rdi-fwd3 และ rdi-rev3 เพื่อสังเคราะห์ชิ้นส่วนของยีนทั้งหมด โดยใช้ chromosomal DNA ที่สกัดจากแบคทีเรียแลคติกซึ่งมาจากตัวอย่างครีมเปรี้ยว (โฟร์โมสต์) No 8 เป็น template ซึ่งคาดหวังว่าจะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1 773 kb, 2 4 kb และ 2 4 kb ตามลำดับ พบว่าชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ด้วยคู่ของ primer rdi-fwd และ rdi-rev, rdi-fwd2 และ rdi-rev2 มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดที่คาดหวัง โดยได้แสดงขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จาก primer rdi-fwd และ rdi-rev ในภาพประกอบ 10 และแสดงขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากคู่ของ primer rdi-fwd2 และ rdi-rev2 ในภาพประกอบ 11 ส่วนการทำ PCR ด้วย primer rdi-fwd3 และ rdi-rev3 นั้น ไม่พบแถบดีเอ็นเอบน gel แสดงว่าไม่มีการสังเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอจาก primer ดังกล่าว

เมื่อทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำ PCR ด้วยคู่ของ primer rdi-fwd2 และ rdi-rev2 จากครีมเปรี้ยว (โฟร์โมสต์) No 8 พบบริเวณที่เป็นโปรโมเตอร์ คือ -35 region (TCGACA) และ -10 region (TATAAT) รวมทั้งบริเวณ ribosome binding site และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน ยังพบบริเวณที่คาดว่าจะเป็ยีนอยู่ 3 บริเวณ (ภาพประกอบ 12) จึงนำลำดับกรดอะมิโนจากบริเวณที่คาดว่าน่าจะเป็นยีนมาเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนในฐานข้อมูล ด้วยโปรแกรม Blast พบว่ามีความคล้ายกับลำดับกรดอะมิโนของยีนสำหรับเอนไซม์ arginine deiminase (*arcA*), เอนไซม์ ornithine transcarbamylase (*arcB*) และบางส่วนของยีนสำหรับ arginine/ornithine antiporter (*arcD1*) จากแบคทีเรียแลคติกชนิดต่างๆดังตาราง 6 นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากแบคทีเรียในฐานข้อมูลยังพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนสำหรับ arginine/ornithine antiporter มี cytosine เพิ่มขึ้น 1 ตัว



ภาพประกอบ 10 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ด้วย primer rdi-fwd และ rdi-rev ของแบคทีเรียที่แยกจากครีมีเปรี้ยว (ไฟโรโมสค์) No 8 แถวที่ 1 คือ 1 kb DNA Marker (Amersham Biosciences), แถวที่ 2 คือ ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ของแบคทีเรียที่แยกจากครีมีเปรี้ยว (ไฟโรโมสค์) No 8 (ขนาด 1 773 kb)



ภาพประกอบ 11 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ด้วย primer rdi-fwd2 และ rdi-rev2 ของแบคทีเรียที่แยกจากครีมเปรี้ยว (ไฟรีโมสต์) No 8 แถวที่ 1 คือ 1 kb DNA Marker (Amersham Biosciences), แถวที่ 2 คือ ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ด้วย primer rdi-fwd2 และ rdi-rev2 ของแบคทีเรียที่แยกจากครีมเปรี้ยว (ไฟรีโมสต์) No 8 (ขนาด 2.4 kb)

1 TCCTGAAAATATGTAAAAATATACTTAATTATTTAATCTCTTATCAAAAAG

52 AATTTAATTCTTGCTGATGAGAGATTTTTTTGTTTATTTTTTAAAACATTT

103 TGAAAAATAAGTATTTTAATAAAAAACTAAGAATCCCATGATAAGCAAAGG

154 AGTGCATAAACGTGAAATTGTCAGAATATAAAAAAACATGTATAAATGAAT

205 AAACCTTTGTAAAGTGTAGCATTAGTGCTCGACAAAAAAATATGCATAGATG

- 35

256 TATAATTTCCTTGTAACGATTCTAATAACTGAATCGAAATCAGAAAGG

- 10 ribosome  
binding site

*arca*  
→

307 ATACTCCAAAATGAACAATGGAATTAATGTTAACTCAGAAATTGGGAAATT  
M N N G I N V N S E I G K L

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

409 AGACACAATGAAACAGCTTTTATTTGATGATATTCATATCTCAAATTC  
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 AGGACGTACTIONTATGATGGATTGACTGAATATTTAACTTCAATGCCAACAAA  
G R T Y D G L T E Y L T S M P T K

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

## ภาพประกอบ 12 (ต่อ)

- 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 TGAATTAATTCTTAATAAGACAACGTAGCAATCGGGGTTTCAGAACGTAC  
E L I L N K T T V A I G V S E R T
- 985: TTCATCTAAAACAATTCAAATCTTGCTAAAGAATTATTTGCAAATCCACT  
S S K T I 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: TTTCCAGGAATTATGGATGGTGCAGGTAACATCAACGTCTTCATTCTTCG  
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

## ภาพประกอบ 12 (ต่อ)

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

1393 AACTGTTGAACTTTTGAAAGAACATGGTATTAAGTTCATGAAATTCCTTC  
T V E L L K E H G I K V H E I L S

1444 AAGTGAACCTGGTCGTGGTCGTGGTGGAGCGCGTTGTATGTCACAACCACT  
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 GTAAAATTAAGATGAAAGTAGCTCATTAATGTAATTTAAAAAATTCATTA

1648 AATATTTAAAAATAGAAAAAGGAAAAAATAATGACATCACCACCTTATTAC  
ribosome binding site
*arcB*  
↔
→  
M T S P L I T

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

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

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

1852· TATTGCCTTGTTATTTGCAAAAACCTTCAACTCGTACACGTGCCGCATTAC  
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 TATCCAACCTCGGAATCAAAGAATCAACAGAAGATACAGCACGTGTTCTTGG  
I Q L G I K E S T E D T A R V L G

## ภาพประกอบ 12 (ต่อ)

- 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. CATGGCAAATTCACCTCATCGTAACTGGTTCTATGCTTGGTGTAATGTTCA  
M A N S L I V T G S M L G V N V H
- 2260 TATCGTTGCTCCAGATTCACCTCATCCTTCTAAAGAAGTTATGGATATTGC  
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 TATGGGAGAATCTAACTGGGAAGAACGTGTTAAACTTTTGACACCATAACCG  
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 TATCTTTATGCACTGCTTACCAGCCTTCCATGACACTGAAACTGAATATGG  
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

## ภาพประกอบ 12 (ต่อ)

- 2668 GCACTCAATCAAAGCAATTATGGCTGCAACTTTGGGTAATTTATTTATCCC  
H S I K A I M A A T L G N L F I P
- 2719 AGCAGTTCCTGAAGATTTTAAATAATTAATAATAGATAATTTGTCAGTTTAC  
A V P E D F K \*
- 2770 TGACAGAGCTGTCAGTAACTGATAGATTTTGATTTAAGTCGTTGAAAGCA
- 2821· GTCTAAGATAGTTTTTACTGTTTTGACGGTTAAAATCATTGAAAGGATT  
ribosome  
binding site
- arcD*  
→  
2872: GATATGGACGCAGAAAATAAAAAAGGAATTGGCCTTGCTGCTTTAGTTGCG  
M D A E N K K G I G L A A L V A
- 2923 ATTATTGTTTTCTGGAGCGATTGGTGGTGGGGTATTCAACCTCTCTAACGAT  
I I V S G A I G G G V F N L S N D
- 2974 TTAGCAACAAATGCATCCACCTGGTGGTGTTCATTTTCATGGATCGTTAT  
L A T N A S P G G V V I S W I V I
3025. TGGTTTTGGTATATTAATGTTGGTTTTATCACTGAATCATTGGTGGTAAA  
G F G I L M L V L S L N H L V V N
- 3076 CAAACCTGAACCTTCAGGTGTGTCAGATTATGCACGTGCTGGTTTTGGTAA  
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 TAATATTGCCTTTGCTGTTTTGATGATGACTGCCGTTGACTATTTCTTCCC  
N I A F A V L M M T A V D Y F F P
3229. CGGCGTTTTTCAAGCTAAGAATGGCTCATTGACCATTCTGTGAGTAATTGT  
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

## ภาพประกอบ 12 (ต่อ)

- 3331 AGGGGCTGCTGCCATTAATGCAATTGTCCTTGTTGCAAAATTGATTCCCTT  
G A A A I N A I V L V A K L I P L
- 3382 GTTTGTCTTTGTTATTGCTGGAATAGTTACTTTCAAAGCTGGAGTCTTTAG  
F V F V I A G I V T F K A G V F S
- 3433 TGCTCACTTTTGGCAAAATTTGTTGCGAATACAAATGCTGATGGCGTAAT  
A H F W Q N F V A N T N A D G V I
- 3484 TAAGAGTTTAACTTGGTCTAATATGACTGGCGGAGATTTATTCACTCAAGT  
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 TGCTATGATGGGTGACCGTGCCAAACGTAATCAGATGCTGGTAAAGCTTC  
A M M G D R A K R K S D A G K A S
- 3637 AATTCTCGTTTTGATTGCCTTGTTAGTGATTTATATCTTGCTCTCACTATT  
I L G L I A L L V I Y I L L S L L
- 3688 GCCATTTGTTTTATGAGCCAACAAGAACTAGCTAATACTGGTCAACCAGG  
P F G F M S Q Q E L A N T G Q P G
3739. TTTGGTTCATATTTGAACGCTATGGTTGGCGGTTGGGGTGGTTCACTAAT  
L V H I L N A M V G G W G G S L M
- 3790 GGCCATTGGTCTTGTGATTTCACTTCTTGGAGCTTGGTTGTCATGGACAAT  
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 TTGGTTTGGTAACTTAATGACAAAGGTGCACCTAAAAATTCACTTTTGCT  
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

ภาพประกอบ 12 (ต่อ)

3994 TGCTTACAATGTCCTTTGTTTACCTTTGTACCGCTGTTATCATGATTTGTTA  
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

ภาพประกอบ 12 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำ PCR ด้วย primer rdi-fwd และ rdi-rev, rdi-fwd2 และ rdi-rev2 จากครีมเบียร์ว (เฟร์โมสต์) No 8

ตาราง 6 โปรตีนใน EMBL database ที่มีความคล้ายกับลำดับกรดอะมิโนที่สังเคราะห์ด้วยคู่ของ primer rdi-fwd และ rdi-rev, rdi-fwd2 และ rdi-rev2 จากแบคทีเรียที่แยกจากครีมเปรี้ยว (ไฟร์โมสค์) No 8 โดยใช้โปรแกรม Blast

เอนไซม์	แบคทีเรีย	Accession No	%identity	ที่มา
arginine deiminase	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>cremoris</i> MG1363	AJ250129	96.0	Aungpraphapornchai et al (2000)
	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> ML3	AF282249	95.8	Chou, Weimer, & Xie (2000)
	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> IL1403	AE006433	95.1	Bolotin et al (2001)
	<i>Lactobacillus hilgardii</i> X <sub>1</sub> B	AJ421514	57.6	Arena et al (2002)
	<i>Lactobacillus sakei</i> BL13	AJ001330	57.5	Zuniga et al (1998)
ornithine transcarbamylase	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>cremoris</i> MG1363	AJ250129	97.3	Aungpraphapornchai et al (2000)
	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> ML3	AF282249 AE006433	96.4	Chou, Weimer, & Xie (2000)
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	AJ312276 AE016947	71.2	Paulsen et al (2003)
	<i>Lactobacillus hilgardii</i> X <sub>1</sub> B	AJ421514	70.9	Arena et al (2002)
	<i>Lactobacillus sakei</i>	AJ001330	70.4	Zuniga et al (1998)

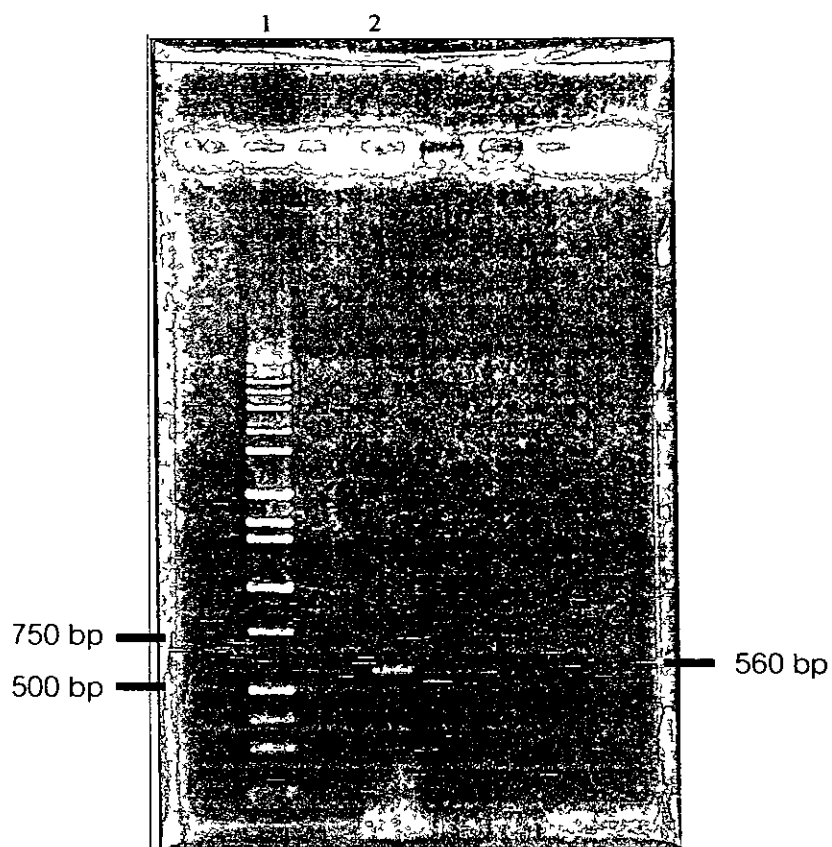
ตาราง 6 (ต่อ)

เอนไซม์	แบคทีเรีย	Accession No	%identity	ที่มา
arginine/ornithine antiporter	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> ML3 ( <i>arcD1</i> )	AF282249	84.8	Chou, Weimer, & Xie (2000)
	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> IL1403 ( <i>arcD1</i> )	AE006433	81.4	Bolotin et al (2001)
	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>cremoris</i> MG1363	AJ250129	75.7	Aungpraphapornchai et al (2000)
	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> ML3 ( <i>arcD2</i> )	AF282249	57.9	Chou, Weimer, & Xie (2000)
	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> IL1403 ( <i>arcD2</i> )	AE006432	57.1	Bolotin et al (2001)

## 7 การจำแนก subspecies ของ *Lactococcus lactis*

จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ใน EMBL database ที่มีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอจากครีมเปรี้ยว (โฟร์โมสต์) No 8 ที่ได้จาก primer rdi30 และ rdi2 ทำให้พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ใน 3 อันดับแรก คล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับเอนไซม์ arginine deiminase จาก *Lactococcus lactis* โดยมีความคล้ายสูงถึง 99.786%, 99.572% และ 92.505% ตามลำดับ จึงคาดว่าเชื้อที่แยกได้น่าจะเป็น *Lactococcus lactis*

ในการจัดจำแนก subspecies ของ *Lactococcus lactis* ได้ใช้วิธีของ Nomura และคนอื่นๆ (2002) ด้วยการทำ PCR โดยใช้ primer gadB21 และ GAD7 เมื่อวิเคราะห์ผลจากการทำ PCR ด้วยวิธี electrophoresis ใน 1% agarose gel (w/v) พบว่าชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มีขนาด 560 bp (แสดงในภาพประกอบ 13) และเมื่อทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์จากชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ ก็พบว่าชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าว ไม่มีบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ AseI (ATTAAT) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Nomura และคนอื่นๆ (2002) ที่รายงานว่า *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* จะไม่มีบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ AseI ยกเว้น *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 เท่านั้น ที่พบว่ามีบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ AseI (แสดงในภาพประกอบ 14) จากผลการทดลองแสดงว่าเชื้อที่แยกได้น่าจะเป็น *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*



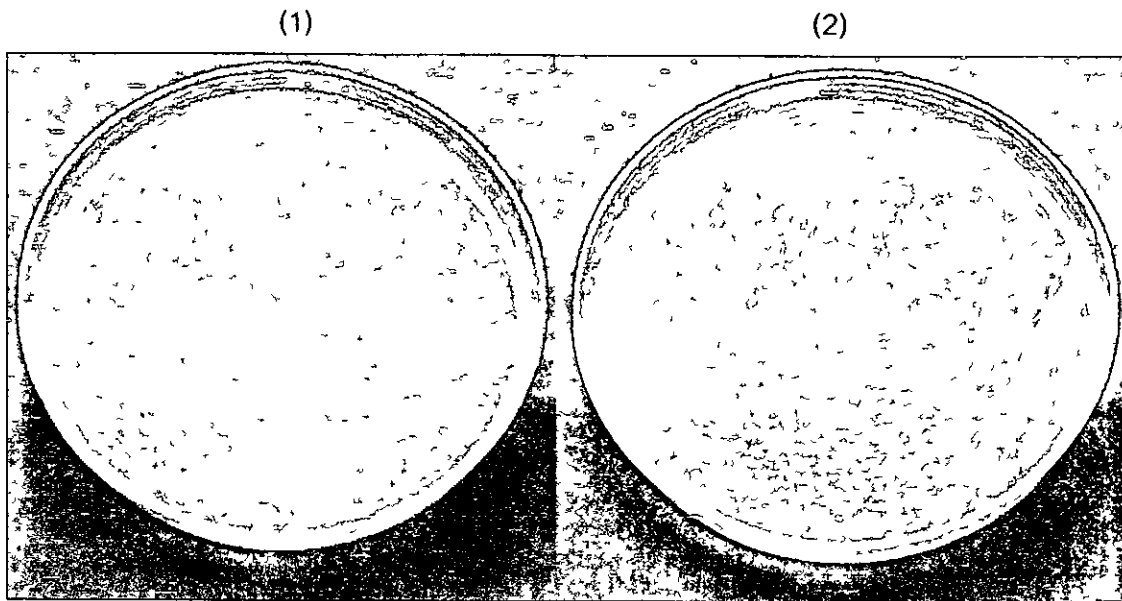
ภาพประกอบ 13 ชั้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ด้วย primer gad B21 (forward) และ GAD7 (reverse) ของแบคทีเรียที่แยกจากครีมเปรี้ยว (ไฟโรโมสต์) No 8 แถวที่ 1 คือ Hi-Lo Marker (Minnesota Molecular), แถวที่ 2 คือ ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ของ แบคทีเรียที่แยกจากครีมเปรี้ยว (ไฟโรโมสต์) No 8 (ขนาด 560 bp)

1. TATTCATGAGAGAACGCATAAAAGTAGCCATGTATTTAGCAGAAGAAATTGA  
 52 AAAAAACAGGAATGTTTGAGATTATGAACGATTGGTCACAATTGCCAATTGT  
 103 CTGCTACAAATTAAGAAAATTCAAATCTTGGTTGGAATCTTTATGATTT  
 154 GGCAGATCGTTTATTTAATGAAGGGATGGCAAGTGCCTGCTTATCCACTTC  
 205 CTAAAAATTTGGAAAATGAAATCATTCAACGTTTAGTAATTCGAGCAGATT  
 256 TCGGGATGAATATGGCATTAACTATGTTCAAGATATAACAAGAAGCAATTG  
 307: ATGCACTAAACAAGGCTCATATTCTATTTTCATCAGGAACCTGAAAATAAAA  
 358 CATATGGCTTTACTCACTAAAAATAAAAGCGATATATCTTAGATATATCGC  
 409. TTTTATTTTATTTTAAGCTATTTACTAATTAGCTTATCGCCTATTCTTTTC  
 460. ATAGTATTTATCCAAAATTTCCATTTTAAAGGAGTAATTTTAGATAGAGG  
 511 G

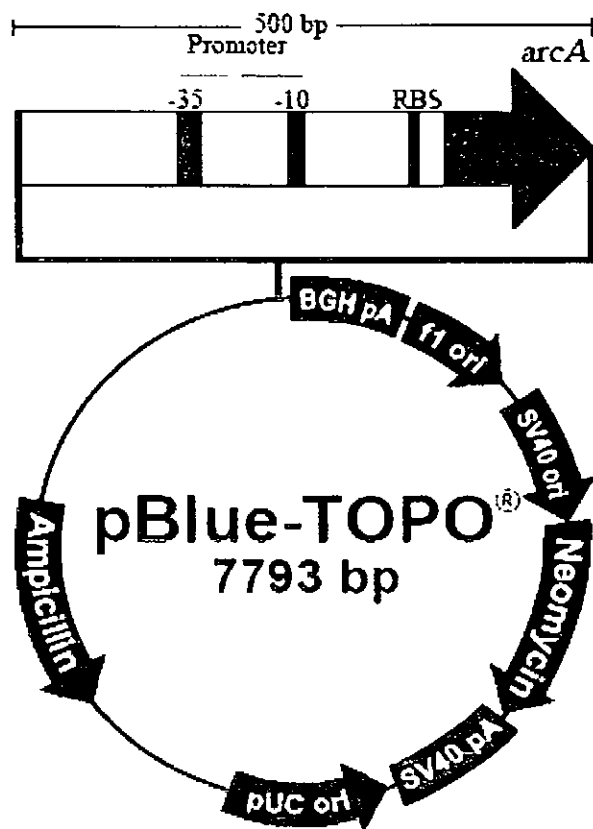
ภาพประกอบ 14 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำ PCR ด้วย primer gad B21 (forward) และ GAD7 (reverse) ของแบคทีเรียที่แยกจากครีมเบรียว (ไฟรีโมสต์) No 8 บริเวณที่ขีดเส้นใต้ คือ บริเวณที่แตกต่างจากตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ AseI (ATTAAT) โดยมี thymine เพิ่มขึ้น 1 ตัว

## 6 การวิเคราะห์การทำงานของโปรโมเตอร์

การวิเคราะห์การทำงานของโปรโมเตอร์ จะทำ PCR โดยใช้ primer rdi-fwd และ primer rdi1253-33 ที่ออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่แยกจากครีมีเปรี้ยว (ไฟรีโมสท์) No 8 ซึ่งจะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 500 bp ครอบคลุมบริเวณโปรโมเตอร์ จากนั้นนำชิ้นดีเอ็นเอนี้มาเชื่อมต่อกับ pBlue-TOPO<sup>®</sup> vector (Invitrogen) ซึ่งเป็นเวกเตอร์ที่ไม่มีโปรโมเตอร์ โดยโคโลนีที่ได้รับเวกเตอร์แต่ไม่มีชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวเชื่อมต่อยู่หรือมีทิศทางในการเชื่อมต่อไม่ถูกต้องจะมีสีขาว ในขณะที่โคโลนีซึ่งได้รับเวกเตอร์ที่มีชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวเชื่อมต่อยู่ด้วยทิศทางถูกต้องจะมีสีฟ้า (ภาพประกอบ 15) และเมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า มีตำแหน่งของบริเวณต่างๆดังในภาพประกอบ 16



ภาพประกอบ 15 โคโลนีที่ได้จากการวิเคราะห์การทำงานของโปรโมเตอร์ โดยใช้ pBlue-TOPO® vector (1) โคโลนีสีฟ้าที่ได้รับเวกเตอร์ซึ่งมีชิ้นดีเอ็นเอที่มีบริเวณโปรโมเตอร์เชื่อมต่ออยู่ด้วยทิศทางถูกต้อง (2) โคโลนีสีขาวที่ได้รับเวกเตอร์แต่ไม่มีชิ้นดีเอ็นเอที่มีบริเวณโปรโมเตอร์เชื่อมต่ออยู่หรือมีทิศทางในการเชื่อมต่อไม่ถูกต้อง



ภาพประกอบ 16 โครงสร้างของ pBlue-TOPO<sup>®</sup> vector ซึ่งมีขนาดเป็นขนาด 500 bp ที่มี ส่วนของโปรโมเตอร์เชื่อมต่อกับทิศทางถูกต้อง

## บทที่ 5

### สรุป อภิปรายผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

เมื่อทำการทดสอบคุณสมบัติต่างๆกับแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์นมหมักทั้ง 7 ชนิด พบว่ามีแบคทีเรียแลคติกที่มีสมบัติตามที่ต้องการ คือ สามารถสร้าง acetoin และใช้อาร์จินีนเป็นแหล่งพลังงานได้ จำนวน 25 isolate จึงคาดว่าน่าจะพบ arginine deiminase pathway ได้ในแบคทีเรียแลคติกเหล่านี้

จากการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติกทั้ง 25 isolate แล้วนำมาทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนยีนสำหรับเอนไซม์ arginine deiminase (*arcA*) ด้วย primer *rdi2*, *rdi29* ไม่พบว่ามีแถบดีเอ็นเอใดๆเกิดขึ้นบน gel เลย ส่วนการทำ PCR ด้วย primer *rdi2* และ *rdi30* พบว่ามีแถบดีเอ็นเอที่ถูกต้องคือ ขนาด 670 bp จากแบคทีเรียที่แยกจากครีมเปรี้ยว (โฟร์โมสต์) No 8 เพียง 1 ตัวอย่างเท่านั้น ซึ่งอาจเกิดจากการที่ degenerate primer ถูกออกแบบมาจากลำดับกรดอะมิโนของแบคทีเรียแลคติกต่างชนิดกันซึ่งอาจมีลำดับกรดอะมิโนแตกต่างจากแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้ และมีรหัสหลายแบบที่สามารถถูกถอดรหัสได้เป็นกรดอะมิโนชนิดเดียวกัน ทำให้มีความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์สูง primer จึงมีความจำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้ต่ำ แต่ในปัจจุบันมีการค้นพบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียแลคติกชนิดต่างๆเพิ่มขึ้น จึงน่าจะสามารถออกแบบ primer ชนิดใหม่ที่มีความจำเพาะมากขึ้นกว่าเดิมได้

ผลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำ PCR ด้วย primer *rdi2* และ *rdi29* พบว่าคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์ arginine deiminase จาก *Lactococcus lactis* subsp *cremonis* MG1363 ถึง 99.786% แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์จากเชื้อที่แยกได้มีความคล้ายกับแบคทีเรียแลคติกดังกล่าวอย่างมาก ทำให้สามารถนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จาก *Lactococcus lactis* subsp *cremonis* MG1363 มาออกแบบ primer ได้แก่ *rdi-fwd* และ *rdi-rev*, *rdi-fwd2* และ *rdi-rev2*, *rdi-fwd3* และ *rdi-rev3* เพื่อสังเคราะห์ชิ้นส่วนของยีนใน ADI operon จากดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติกที่แยกจากครีมเปรี้ยว (โฟร์โมสต์) No 8 โดยพบว่าการทำ PCR ด้วย primer *rdi-fwd* และ *rdi-rev*, *rdi-fwd2* และ *rdi-rev2* มีแถบดีเอ็นเอขนาดที่ถูกต้อง คือ 1.773 kb และ 2.4 kb ตามลำดับ ในขณะที่ primer *rdi-fwd3* และ *rdi-rev3* ไม่พบว่ามีแถบดีเอ็นเอบน gel อาจเนื่องมาจาก primer *rdi-rev3* นั้นถูกออกแบบมาจากนิวคลีโอไทด์บริเวณที่อยู่ถัดไปจากยีนสุดท้ายใน ADI operon ของ AJ250129 ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ระหว่างแบคทีเรียชนิดต่างๆสูง ทำให้ primer มีความจำเพาะต่ำ จึงไม่สามารถจับกับบริเวณที่ต้องการบนสายนิวคลีโอไทด์ต้นแบบและทำ

การสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ต้องการได้ ซึ่งเหตุผลที่ต้องออกแบบ primer rdi-rev3 จากบริเวณนี้เพราะต้องการให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มียีนครบทั้ง operon

เมื่อนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วย primer rdi-fwd และ rdi-rev, rdi-fwd2 และ rdi-rev2 มาหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบการจัดเรียงตัวของยีนใน arginine deiminase pathway ดังนี้ ยีนสำหรับเอนไซม์ arginine deiminase (*arcA*) และ ornithine transcarbamylase (*arcB*) ที่สมบูรณ์ รวมทั้งบางส่วนของยีนสำหรับ arginine/ornithine antiporter (*arcD1*) โดยส่วนของยีน *arcD1* เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากแบคทีเรียแลคติกในฐานข้อมูล พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์เพิ่มขึ้น 1 ตัว ซึ่งอาจเกิดจากความผิดพลาดจากขั้นตอนการทำ PCR หรืออาจมีการเกิด point mutation ของแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์นี้ อีกทั้งยังพบบริเวณ ribosome binding site และโปรโมเตอร์ ที่ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของ arginine deiminase pathway ซึ่งพบการทำงานได้จากการเชื่อมต่อดีเอ็นเอบริเวณโปรโมเตอร์เข้าสู่พลาสมิดที่ไม่มีโปรโมเตอร์ แล้วโคลนเข้าสู่เซลล์ *E. coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ โดยจากการทดลองของ van de Guchte และคนอื่นๆ (1992) พบว่าโปรโมเตอร์ของ lactococci ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกแต่สามารถแสดงออกในเซลล์ของ *E. coli* ได้ เนื่องจากมีบริเวณ consensus sequences ที่คล้ายกันมาก

จากการวิเคราะห์บริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ AseI และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำ PCR ด้วย primer rdi2 และ rdi30 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ใน EMBL database โดยใช้โปรแกรม Fasta3 พบว่าเชื้อที่แยกได้มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ *Lactococcus lactis* subsp. *cremonis* MG1363 ถึง 99.786% รวมทั้งการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนลำดับซึ่งถอดรหัสมาจากนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำ PCR ด้วยคู่ของ primer rdi-fwd และ rdi-rev, rdi-fwd2 และ rdi-rev2 กับลำดับกรดอะมิโนในฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม Blast ผลจากการศึกษาส่วนใหญ่พบว่าแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์นมหมักมีความคล้ายกับ *Lactococcus lactis* subsp. *cremonis* โดยเฉพาะสายพันธุ์ MG1363 แต่พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้มีความแตกต่างจาก *Lactococcus lactis* subsp. *cremonis* MG1363 เนื่องจากไม่พบตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ AseI พบเพียงบริเวณที่คล้ายกันแต่มี thymine เพิ่มขึ้น 1 ตัว ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ *Lactococcus lactis* subsp. *cremonis* หลายสายพันธุ์ ยกเว้นสายพันธุ์ MG1363 เท่านั้นที่พบตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ AseI (Nomura et al. 2002: 2209-2213) ทำให้คาดว่าแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้น่าจะเป็น *Lactococcus lactis* subsp. *cremonis* สายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับ MG1363

**บรรณานุกรม**

## บรรณานุกรม

- ภัทรารุจ โสภา (2544) การโคลน arginine deiminase gene จาก *Lactobacillus* sp ด้วย degenerate primers ปัญหาพิเศษ (จุลชีววิทยา) กรุงเทพฯ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ถ่ายเอกสาร
- สมบูรณ์ ธนาศุกวัฒน์ (2543, พฤศจิกายน-ธันวาคม) การค้นพบแบคทีเรียชนิดใหม่ของโลก จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ออนไลน์) แหล่งที่มา [http://www.chula.ac.th/research/activity/journal/rj43\\_118.htm](http://www.chula.ac.th/research/activity/journal/rj43_118.htm) วันที่สืบค้น 25 กันยายน 2547
- Angelis, M D , Mariotti, L , Rossi, J , Servili, M , Fox, P F , Rollan, G and Gobbetti, M (2002) Arginine catabolism by sourdough lactic acid bacteria purification and characterization of the arginine deiminase pathway enzymes from *Lactobacillus Sanfranciscensis* CB1 *Applied and Environmental Microbiology* 68 6193-6201
- Arena, M E and Saquir, F M (1999) Arginine dihydrolase pathway in *Lactobacillus plantarum* from orange *International Journal of Food Microbiology* 47 203-209
- Arena, M E , de Nadra, M and Muñoz, R (2002) The arginine deiminase pathway in the wine lactic acid bacterium *Lactobacillus hilgardii* X<sub>1</sub>B structural and functional study of the *arcABC* genes *Gene* 301 61-66
- Aungpraphapornchai, P (1996) Genetics manipulation of the gene encoding diacetyl reductase and pyruvate-formate lyase in *Lactococcus lactis* M Sc Dissertation, the University of East Anglia, UK
- Aungpraphapornchai, P and Griffin, H G (1998) Bioengineering of pyruvate metabolism in lactic acid bacteria *Recently Research Development In Biotechnology and Bioengineering* 1 395-403
- 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
- Aymes, F , Monnet, C and Corrieu, G (1999) Effect of  $\alpha$ -acetolactase decarboxylase inactivate on  $\alpha$ -acetolactate and diacetyl production by *Lactococcus lactis* subsp *lactis* biovar *diacetylactis* *Journal of Bioscience and Bioengineering* 87(1) 87-92

- 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 gene of *Pseudomonase aeruginosa* *European Journal of Biochemistry* 179 53-60
- Benson, K H , Godon, J -J , Renault, P , Griffin, H G and Gasson, M J (1996) Effect of *ilvBN*-encoded  $\alpha$ -acetolactate synthase expression on diacetyl production in *Lactococcus lactis* *Applied Microbiology and Biotechnology* 45 107-111
- Blomqvist, K , Blomqvist, K , Nikkola, M , Lehtovaara, P , Suihko, M L , Airaksinen, U , Straby, KB , Knowles, JK and Penttila, M E (1993) Characterization of the genes of the 2,3-butanediol operons from *Klebsiella terrigena* and *Enterobacter aerogenes* *Journal of Bacteriology* 175(5) 1392-1404
- 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
- Broman, K , Lauwers, N , Stalon, V and Wiame, J M (1978) Oxygen and nitrate in utilization by *Bacillus licheniformis* of the arginase and other factors affecting their synthesis *Journal of Bacteriology* 134 920-927
- Cohen, S N , Chang, A C Y and Hsu, L (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA *Proceedings of the National Academy of sciences of the United States of America* 69(8) 2110-2114
- Collins, E B (1972) Biosynthesis of flavor compounds by microorganisms *Journal of Dairy science* 55(7) 1022-1028
- Collins, M D , Facklam, R R , Rodrigues, U M and Ruoff, K L (1993) Phylogenetic analysis of some Aerococcus-like organism from clinical sources description of *Helcococcus kunzii* gen nov , sp nov *International Journal of Systematics Bacteriology* 43 425-429
- Conway, P L (1996) Selection criteria for probiotic microorganisms *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 5(1) 10-14

- Crow, V L and Thomas, T D (1982) Arginine metabolism in lactic Streptococci *Journal of Bacteriology* 150(3) 1024-1032
- Cunin, R , Glansdorff, N , Pierard, A and Stalon, V (1986) Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria *Microbiological Reviews* 50(3) 314-352
- Curran, T , Lieou, J and Marquis, R (1995) Arginine deiminase system and acid adaptation of oral Streptococci *Applied Environmental Microbiology* 61 4494-4496
- D' Hooghe, I , Wauven, C V , Michiels, J , Tricot, C , de Wilde, P , Vanderleyden, L 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(26) 7403-7409
- Demain, A L , Jackson, M , and Trenner, N R (1967) Thiamine-dependent accumulation of tetramethylpyrazine accompanying a mutation in the isoleucine-valine pathway *Journal of Bacteriology* 94(2) 323-326
- Divol, B , Tanon, T , Morchon S , Gindreau, E and Lonvaud-funel, A (2003) Molecular characterization of *Oenococcus oeni* genes encoding proteins involved in arginine transport *Journal of Applied Microbiology* 94(4)
- 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
- Dubernet, S , Desmasures, N and Gueguen, M (2002) A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level *FEMS Microbiology Letters* 214 217-275
- Edwards, U , Rogall, T , Blocker, H , Emde, M and Bottger, E C (1989) Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes Characterization of a gene coding for 16s ribosomal RNA *Nucleic Acids Research* 17(19) 7843-7853
- Ennahar, S , Cai, Y and Fujita, Y (2003) Phylogenetics diversity of lactic acid bacteria associated with paddy rice silage as determined by 16s ribosomal DNA analysis *Applied and Environmental Microbiology* 69(1) 44-451
- Feng, J , Liu, R and Tang, S (1996) Pretreatment with tetramethylpyrazine increase the release of PGI<sub>2</sub> and decrease TXA<sub>2</sub> 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
- Gibson, G R and Roberfroid, M B (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota introducing the concept of probiotics *Journal of Nutrition* 125(6) 1401-1412
- 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
- van de Guchte, M , Kok, J and Venema, G (1992) Gene expression in *Lactococcus lactis* *FEMS Microbiology Reviews* 88 73-92
- Hall, R L and Oser, B L (1970) Recent progress in the consideration of flavoring ingredients under the food additives amendment 4 GRAS substance *Food Technology* 95 471-478
- Heikkila, M P and Saris, P E J (2003) Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk *Journal of Applied Microbiology* 96 471-478
- 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 microorganism *Journal of Food science* 47 1829-1831
- Kaneko, T , Watanabe, Y and Suzuki, H (1990) Enhancement of diacetyl production by diacetyl-resistance mutant of citratepositive *Lactococcus lactis* sp *Lactis* 3022 and by aerobic conditions of growth *Journal of Dairy Science* 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

- Knodler, L A , Schofield, P J , Edwards, M R (1995) L-arginine transport and metabolism in *Giardia intestinalis* support its position as a transition between prokaryotic and eukaryotic kingdoms *Microbiology* 141 2063-2070
- 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
- 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
- Lee, L-M , Liu, C-F and Yang, P-P (2002) Effect of tetramethylpyrazine on lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic mice - active component of *Ligusticum wallich* french chuanxiang *American Journal of Chinese Medicine* 30(4) 601-608
- Maga, J A and Sizer, C E (1973) Pyrazine in foods *CRC Critical Reviews in Food Technology* 4 39-115
- Maghouj, A , Cebal, 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
- 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
- Ochman, H , Gerber, A S and Hartl, D L (1988) Genetics application of an Inverse polymerase chain reaction *Genetics* 120 621-623
- de Orduña, R M , Patchett, M L , Liu, S-Q and Pilone, G J (2000) Ethyl carbamate precursor citrulline formation from arginine degradation by malolactic wine lactic acid bacteria *FEMS Microbiology Letters* 183 31-35

- de Orduña, R M , Patchett, M L , Liu, S-Q and Pilone, G J (2001) Growth and arginine metabolism of the wine lactic acid bacteria *Lactococcus buchneri* and *Oenococcus oeni* at different pH values and arginine concentration *Applied and Environmental Microbiology* 67(4) 1657-1662
- Otani, K , Bando, M , Swe, T , Banu, S , Oe, M , Hayashi, S 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  $\alpha$ -acetolactate synthase in strain deficient in lactate dehydrogenase as a function of culture condition *Applied and Environmental Microbiology* 178 4942-4927
- Potter, N N (1978) *Food science* 3<sup>rd</sup> ed AVI Publishing, Com , Inc Westport, Connecticut 1-706
- Pu, Z Y , Dobos, M , Limsowtin, G K Y and Powell, I B (2002) Integrated polymerase chain reaction-based procedures for the detection and identification of species and subspecies of the gram-positive bacterial genus *Lactococcus* *Journal of Applied Microbiology* 93 353-361
- Rizzi, G P (1988) Formation of pyrazines from acyloin precursors under mild conditions *Journal of Agricultural of Food Chemistry* 36 349-352
- 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
- Schieberle, P (1996) Intense aroma compounds-useful tools to monitor the influence of processing and storage on bread aroma *Advance in Food Science* 18 237-244
- Seitz, E W , Sandine, W E , Elliker, P R and Day, E A (1963) Distribution of diacetyl reductase among bacteria *Journal of Dairy Science* 46 186-189
- Sherman, J M (1937) The streptococci *Bacteriological Reviews* 1 3-97

- Stiles, M E and Holzapel, W H (1997) Review article lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy *International Journal of Food Microbiology* 36 1-29
- Swindell, S R , Benson, K H , Griffin, H G , Renault, P , Ehrlich, S D and Gasson, M J (1996) Genetics manipulation of the pathway for diacetyl metabolism in *Lactococcus lactis* *Applied and Environmental Microbiology* 62(7) 2641-2643
- Tamime, A Y and Robinson, R K (1985) *Yoghurt Science and Technology* Pergamon Press, Oxford
- 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
- Ui, S , Hosaka, T , Mizutani, K , Ohtsuki, T and Mimura, A (2002) Acetylacetoin synthase as a marker enzyme for detecting the 2,3-butanediol cycle *Journal of Bioscience and Bioengineering* 93(2) 248-251
- Wahren, M (1990) *Brot and getreide in der Urgeschichte* In Die ersten Bauern, Vol 1 Schweizerisches Landesmuseum, Zurich, 117-118
- Winteler, H V , Schneidinger, B , Jaeger, K-E and Haas, D (1996) Anaerobically controlled expression system derived from the *arcDABC* operon of *Pseudomonas aeruginosa* application to lipase production *Applied and Environmental Microbiology* 62(9) 3391-3398
- Wood, B J B and Holzapel, W H (1995) *The genera of lactic acid bacteria*, vol 2 5<sup>th</sup> edition Black Academic and Professional, Glasgow 1-398
- Yarlett, N , Martinez, M P , Moharrami, M A and Tachezy, J (1996) The contribution of the arginine dihydrolase pathway to energy metabolism by *Trichomonas vaginalis* *Molecular and Biochemical Parasitology* 78 117-125
- Zuñiga, 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
- Zuñiga, M , Perez, G and Gonzalez-Candeles, F (2002) Evolution of arginine deiminase (ADI) pathway genes *Molecular Phylogenetics and Evolution* 25 429-444

Zuñiga, M , Miralls, M, C and Perez-Matinez, G (2002) The product 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

ภาคผนวก

## ภาคผนวก

1	MRS medium		
	Beef extract	1	g
	Yeast extract	0.5	g
	Peptone	1	g
	Dipotassium hydrogenphosphate	0.2	g
	Sodium acetate	0.5	g
	Magnesium sulphate heptahydrate	0.02	g
	Manganese sulphate monohydrate	0.005	g
	Tween 80	0.1	ml
	Diammonium citrate	0.2	g
	Agar	1.5	g
	calcium carbonate	1	g
	เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร	100	ml
2	modified MRS broth		
	Beef extract	1	g
	Yeast extract	0.5	g
	Peptone	1	g
	Dipotassium hydrogenphosphate	0.2	g
	Sodium acetate	0.5	g
	Magnesium sulphate heptahydrate	0.02	g
	Manganese sulphate monohydrate	0.005	g
	Tween 80	0.1	ml
	Arginine hydrochloride	3	g
	เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร	100	ml

## 3 Luna - Bertani (LB) medium

Trytone	1	g
Yeast extracts	0.5	g
NaCl	1	g
1M NaOH	0.5	ml
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร	100	ml
ปรับ pH 7.0		

## 4 10x TBE buffer

Tris Base	10.778	g
Boric acid	5.5028	g
Na <sub>2</sub> EDTA	0.7444	g
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร	100	ml

## 5 loading dye

Bromophenol blue	40	g
Ficoll	0.3	g
น้ำกลั่น	5	ml

ประวัติย่อผู้วิจัย

## ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นางสาวนันทน์หทัย สงบพันธ์
วันเดือนปีเกิด	8 ธันวาคม 2523
สถานที่เกิด	บางกอกน้อย กรุงเทพฯ
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	5/1110 ถ ประชาชื่น ตำบลบางตลาด อำเภอปากเกร็ด นนทบุรี 11120
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ประวัติการศึกษา	
พ ศ 2540	ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย จากศูนย์การศึกษา ศึกษานอกโรงเรียนกรุงเทพมหานคร
พ ศ 2545	วท บ (เทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร) สถาบัน เทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ
พ ศ 2548	วท ม (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิ โรฒ