การคัดกรองแบคทีเรียที่สร้างไนซินและการยืนยันยีนที่ประมวลรหัสไนซิน

นางสาวไปรมา แก้วสามศรี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SCREENING OF NISIN PRODUCING BACTERIA AND CONFIRMATION OF GENE ENCODING THEREOF

Miss Prima Kaewsarmsri

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology
Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดกรองแบคทีเรียที่สร้างไนซินและการยืนยันยีนที่ประมวลรหัสไนซิน
โดย	นางสาวไปรมา แก้วสามศรี
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชุลี ยมภักดี)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ไปรมา แก้วสามศรี: การคัดกรองแบคทีเรียที่สร้างไนซินและการยืนยันยีนที่ประมวลรหัสไนซิน (SCREENING OF NISIN PRODUCING BACTERIA AND CONFIRMATION OF GENE ENCODING THEREOF) อ. ที่ปรึกษา: ผศ.ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา; 95 หน้า.

ได้ทำการแยกแบคทีเรียที่สร้างไนซินจากตัวอย่างน้ำนมดิบและแหนมจำนวน 23 ตัวอย่าง คัดแยกแบคทีเรียแลคติกทั้งหมดได้ 115 ไอโซเลต นำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ *Lactobacillus plantarum* TISTR 850, *Pediococcus pentosaceus* TISTR 374 และ *Propionibacterium freundenreichii* TISTR 446 ด้วยวิธีแพร่ซึมในวุ้น พบว่าส่วนน้ำใสของแบคทีเรียแลคติกจำนวน 4 ไอโซเลต ให้ผลการยับยั้งเชื้อทดสอบทั้ง 3 ชนิด จากนั้นยืนยันการสร้างไนซินด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับบริเวณยีนไนซินตั้งต้น พบว่าแบคทีเรีย 2 ไอโซเลตคือ MF2 และ MF3 ให้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่จำเพาะขนาดประมาณ 300 คู่เบส เลือกแบคทีเรีย MF2 มาวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบกรอบอ่านรหัสเปิดของยีนไนซินตั้งต้นมีขนาด 171 คู่เบส ที่ประมวลรหัสสร้างโปรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโน 57 หมู่ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 59 กิโลดัลตัน จากข้อมูลการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปเปรียบเทียบความคล้ายในฐานข้อมูล GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีความเหมือนกับยีนไนซินเอ และยีนไนซินแซดของแบคทีเรีย *L. lactis* subsp. *lactis* เท่ากับ 99% และ 98% ตามลำดับ ลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับไนซินเอตั้งต้น และ ไนซินแซดตั้งต้น เท่ากับ 100% และ 98% ตามลำดับ และผลการแปลรหัสกรดอะมิโนพบว่ากรดอะมิโนตำแหน่งที่ 27 เป็นฮิสติดีน ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าแบคทีเรีย MF2 ผลิตแบคเทอริโอซินชนิดไนซินเอ การจำแนกสกุลทางอนุกรมวิธานโดยอาศัยวิธีทางสัณฐานวิทยา และชีวเคมีร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 เอสไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอ สามารถจำแนกสายพันธุ์ MF2 เป็น *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* เมื่อแยกยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไนซินจาก *L. lactis* subsp. *lactis* MF2 ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วน 700 คู่เบส ที่มีความเหมือน 100% กับยีน *lciB* ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แลคโตคอคซินบีอิมมูนิตี

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2549 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4672337023 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: nisin A/ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*/ bacteriocin

PRIMA KAEWSARMSRI : SCREENING OF NISIN PRODUCING BACTERIA AND CONFIRMATION OF GENE ENCODING THEREOF. THESIS ADVISOR: ASST. PROF. SUPAT CHAREONPORNWATTANA.Ph.D., 95 pp.

A total of 115 lactic acid bacteria were isolated from 23 samples of raw milk and Thai fermented sausages (nham). The bacteria were tested by agar well diffusion method for inhibition activity. The results showed that supernatants of 4 lactic acid bacteria produced inhibition zone against 3 indicator bacteria, *Lactobacillus plantarum* TISTR 850, *Pediococcus pentosaceus* TISTR 374 and *Propionibacterium freundenreichii* TISTR 446. Confirmation of nisin producing strains were performed by Polymerase Chain Reaction (PCR) using nisin specific primers. Two bacterial isolates MF2 and MF3, showed a specific PCR product with expected size of 300 bp. PCR product from MF2 was selected for further analysis. Nucleotide sequence of PCR product revealed an open reading frame (ORF) of 171 bp and encoded a protein of 57 amino acids with expected molecular weight of 59 KDa. Nucleotide sequence identity of PCR product compared with *nisA* gene and *nisZ* gene from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* were 99% and 98%, respectively. The amino acid sequence identity compared with nisin A and nisin Z precursor were 100% and 98%, respectively. Amino acid analysis showed that PCR product encoded nisin A as indicated by histidine residue at position 27. Based on its morphological characteristics and biochemical analysis together with 16S rRNA sequence, MF2 was classified as *L. lactis* subsp. *lactis*. Gene involving in nisin biosynthesis was isolated from *L. lactis* subsp. *lactis* MF2. Nucleotide sequences of the cloned fragment from *L. lactis* subsp. *lactis* MF2 of 700 bp shows 100% homology to *lciB* gene that involving of lactococcin B immunity biosynthesis.

Department Microbiology Student's signature Prima

Field of study Industrial Microbiology Advisor's signature

Academic year 2006 Co-advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้ให้ความกรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ และข้อเสนอแนะต่าง ๆ ทุกขั้นตอน ตลอดจนตรวจแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

กราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุลี ยมภักดี ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการและกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และให้ความรู้ คำแนะนำต่าง ๆ แก่ผู้วิจัย ตลอดจนช่วยตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำต่าง ๆ แก่ผู้วิจัย และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่ช่วยเหลือและเอื้ออำนวยความสะดวกตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ทุกคนสำหรับคำแนะนำเกี่ยวกับงานวิจัย ขอบคุณสำหรับทุกความช่วยเหลือ และขอบคุณสำหรับทุกความห่วงใยและกำลังใจที่มีให้ตลอดมา

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวทุกคนที่ให้การสนับสนุนและความช่วยเหลือตลอดจนให้กำลังใจแก่ผู้วิจัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ซ

สารบัญภาพ ..... ฌ

บทที่

1. บทนำ 1
2. วารสารปริทัศน์ 4
3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย..... 31
4. ผลการทดลอง 49
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 65

รายการอ้างอิง 70

ภาคผนวก 75

ภาคผนวก ก 76

ภาคผนวก ข 80

ภาคผนวก ค..... 90

ภาคผนวก ง..... 92

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 95

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ตัวอย่างแบคเทอริโอซินในกลุ่มต่าง ๆ	5
2.2	แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบความไวต่อไนซิน.....	15
2.3	เปรียบเทียบค่าต่างๆ ระหว่างวิธีแพร่ซึมในวุ้นกับวิธีวัดความขุ่น.....	18
3.1	จีโนไทป์/ฟีโนไทป์ ของสายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยนี้.....	35
3.2	พลาสมิดที่ใช้ในงานวิจัย.....	36
3.3	โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	36
4.1	ผลการคัดเลือกแบคทีเรียจากแหล่งต่าง ๆ ที่ให้โซนสีเหลืองรอบโคโลนี.....	50
4.2	ผลการยับยั้งเชื้อทดสอบโดยแบคทีเรียที่แยกได้.....	51
4.3	ผลการทดสอบด้านต่าง ๆ เพื่อจำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ MF2.....	59
4.4	ผลการทดสอบที่ภาวะต่าง ๆ เพื่อจำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ MF2.....	60

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
2.1	โครงสร้างของไนซินเอ จาก *L. lactis* subsp. *lactis*.....	9
2.2	โครงสร้างของไนซินแซด จาก *L. lactis* subsp. *lactis*.....	10
2.3	โครงสร้างของไนซินคิว *L. lactis* subsp. *lactis* สายพันธุ์ 61-14.....	10
2.4	แบบจำลองการทำ ELISA.....	20
2.5	ลักษณะของ พอลิซิสทรอนิคเอ็มอาร์เอ็นเอ ที่มีกรอบอ่านรหัสเปิดรอบยีนไนซิน.....	22
2.6	ตำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์ไนซิน การควบคุม และระบบภูมิคุ้มกันตัวเองจากไนซิน	23
2.7	ตำแหน่งของโปรโมเตอร์บนยีนไนซิน.....	24
2.8	โครงสร้างและกระบวนการสังเคราะห์ไนซิน เอ	27
2.9	แบบจำลองกระบวนการกระตุ้นตัวเองด้วย signal transduction และการสังเคราะห์ไนซิน.....	29
4.1	ลักษณะโคโลนีที่มีสีเหลืองในการทดสอบการแยกแบคทีเรียที่ผลิตไนซิน.....	49
4.2	การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบทั้ง 3 ชนิด (ก) *Lactobacillus plantarum* TISTR 850 (ข) *Pediococcus pentosaceus* TISTR 374 (ค) *Propionibacterium freundenreichii* TISTR 446 จากการยับยั้งด้วยส่วนน้ำใสของแบคทีเรีย 4 ไอโซเลต ได้แก่ NHA2, MF3, MF2 และ B13.....	53
4.3	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสแสดงผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของแบคทีเรีย MF2 และ MF3.....	55
4.4	ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR ของแบคทีเรีย MF2 ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ NOKF และ NOKR	56
4.5	ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR ของแบคทีเรีย MF2 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* nisin A precursor gene	57
4.6	ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของกรดอะมิโนที่ได้จากชิ้นส่วน PCR ของแบคทีเรีย MF2 กับ nisin-A precursor.....	58

สารบัญภาพ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.7	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ 16 เอสไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอ ของแบคทีเรีย MF2.....	61
4.8	อะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของ *L. lactis* subsp. *lactis* สายพันธุ์ MF2 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่าง ๆ และสัญญาณจาก southern hybridization ด้วยดีเอ็นเอติดตาม NisA.....	62
4.9	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสแสดงผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้จากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pUCNisA.....	63
4.10	ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการใช้ยูนิเวอร์ซัลไพรเมอร์ M13 ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pUCNisA.....	64

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

การถนอมอาหารมีวัตถุประสงค์หลักคือ การยืดอายุการเก็บรักษาอาหาร และผลิตภัณฑ์ อีกทั้งเป็นการแปรรูปอาหารให้มีความหลากหลายมากขึ้น การถนอมอาหารมีหลายวิธีเช่น การถนอมอาหารโดยใช้ความร้อน, ความเย็น, การทำแห้ง หรือการใช้สารเคมีเป็นต้น ถึงแม้ว่าสารเคมีจะเข้ามามีบทบาทสำคัญในการถนอมอาหารแต่ก็พบว่าสารเคมีบางชนิดมีผลข้างเคียงต่อผู้บริโภค

สารปฏิชีวนะ (antibiotic) เป็นสารที่ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) ของสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะจุลินทรีย์โดยสร้างขึ้นมาเพื่อทำลายหรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น โดยใช้ปริมาณน้อย ๆ (Waksman, 1961) จากการค้นพบสารปฏิชีวนะได้สร้างประโยชน์มากมายในด้านการแพทย์ และการรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อได้อย่างจำเพาะ แต่ก็มีขีดจำกัดในการใช้สารปฏิชีวนะโดยเฉพาะในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากไม่อนุญาตให้เติมสารปฏิชีวนะลงในอาหาร ดังนั้นการค้นหาสารที่มีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อจำเพาะเหมือนสารปฏิชีวนะ และมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจ

แบคเทอริโอซิน (Bacteriocin) เป็นสารต้านจุลชีพชนิดเพปไทด์หรือโปรตีนที่ผลิตมาจากแบคทีเรีย แบคเทอริโอซินถูกจัดให้เป็นวัตถุกันเสียที่ได้จากธรรมชาติ (natural preservative) หรือวัตถุกันเสียทางชีวภาพ (biopreservative) เนื่องมาจากแบคเทอริโอซินมีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียในอาหาร และแบคเทอริโอซินส่วนใหญ่สร้างมาจากแบคทีเรียในกลุ่มแลคติกซึ่งมีความปลอดภัย แบคเทอริโอซินจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ในการถนอมอาหารแทนการใช้สารเคมี (De Vuyst และ Vandamme, 1994) โดยที่ไนซินเป็นแบคเทอริโอซินชนิดแรกที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร และต่อมาองค์การอนามัยโลก (WHO) และองค์การอาหารและยาของอเมริกา และยุโรป ให้การรับรองว่าไนซินมีความปลอดภัย และอนุญาตให้เติมไนซินในผลิตภัณฑ์เพื่อถนอมอาหาร ในปัจจุบันไนซินมีการใช้อย่างแพร่หลายมากกว่า 50 ประเทศทั่วโลก (Jay, 2000)

ไนซินเป็นสารต้านจุลชีพชนิดเพปไทด์ซึ่งมีส่วนประกอบของแลนไธโอนีน (lanthionine) ดังนั้นจึงจัดไนซินอยู่ในกลุ่มแลนติไบโอติก (lantibiotic) (กลุ่มของสารต้านจุลชีพที่มีหมู่แลนไธโอนีนเป็นองค์ประกอบ) โครงสร้างของไนซิน ประกอบด้วยกลุ่มกรดอะมิโนที่ไม่พบในธรรมชาติ (unusual amino acid) ได้แก่ ดีไฮโดรอะลานีน (Dha), ดีไฮโดรบิวทีรีน (Dhb), แลนไธโอนีน และ

บีตาเมทิลแลนไธโอนีน (β- methyllanthionine) (Hansen, 1993) ไนซินมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3.5 กิโลดัลตัน มีสมบัติไม่ชอบน้ำและมีประจุบวก มีความเสถียรที่ความร้อน 121°ซ เป็นเวลานานที่ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 2 แต่จะทนความร้อนได้ลดลงเมื่อค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 5-7 ไนซินสูญเสียสภาพโดยสารเคมีและโปรตีเอสบางชนิด ไนซินมีกลไกในการทำลายจุลินทรีย์โดยการทำให้เกิดรูบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมาย (Chen และ Hoover, 2003)

ไนซินสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้กว้างโดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวกทั้งที่สร้างและไม่สร้างสปอร์ตัวอย่าง เช่นแบคทีเรียในสกุลต่าง ๆ ได้แก่ *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus* และ *Listeria. monocytogenes* โดยเฉพาะ *L. monocytogenes* เป็นแบคทีเรียที่ก่อโรคในอาหารซึ่งพบทั่วไปในสิ่งแวดล้อมและควบคุมยาก สำหรับแบคทีเรียแกรมบวกที่สร้างสปอร์พบว่าไนซินมีฤทธิ์ป้องกันการสร้างสปอร์ใน Clostridia และ Bacilli เป็นต้น ไนซินสามารถแบ่งออกได้เป็นสองชนิดโดยอาศัยความแตกต่างของกรดอะมิโน ได้แก่ ไนซินเอ (nisin A) ซึ่งมีกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 27 เป็นฮิสติดีน (histidine) และไนซินแซด (nisin Z) ที่มีกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 27 เป็นแอสพาราจีน (asparagine) (Chen และ Hoover, 2003)

ไนซินเป็นสารที่สร้างขึ้นโดย *Lactococcus lactis* ส่วนใหญ่แยกได้จากน้ำนม หรือผลิตภัณฑ์ที่มาจากน้ำนม ทั้งนมวัว, น้ำนมแพะ และน้ำนมแกะ *L. lactis* นอกจากจะแยกได้จากน้ำนมยังสามารถแยกได้จากอาหารหมักต่าง ๆ เช่น ไส้กรอกหมัก และกิมจิ เป็นต้น (Rodriguez และคณะ, 1995; Park และคณะ, 2003)

การทดสอบหาแบคทีเรียที่สร้างไนซินอาศัยสมบัติความเป็นสารต้านจุลชีพที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียที่ไวต่อไนซิน วิธีแพร่ซึมในอาหารแข็งเป็นวิธีที่วิเคราะห์ง่ายและมีต้นทุนต่ำ ดังนั้นจึงเป็นวิธีที่นิยมใช้ (Parente และคณะ, 1995) และในปัจจุบันเทคโนโลยีทางด้านอณูชีววิทยาได้มีการพัฒนามากขึ้น ได้มีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สังเคราะห์ไนซินซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์สำหรับกระบวนการลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) เพื่อยืนยันการสร้างไนซิน

การศึกษาทางด้านยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไนซินนั้นได้มีการค้นพบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไนซินและพบลักษณะพอลิซิสทรอนิคเอ็มอาร์เอ็นเอ (polycistronic mRNA) ซึ่งจะต้องประกอบด้วยการทำงานของกลุ่มยีนจึงจะสามารถผลิตเป็นไนซินที่สมบูรณ์ได้ การแยก และการหา

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไนซินนำไปสู่ข้อมูลทางพันธุกรรมที่มีประโยชน์ต่อการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อให้สามารถผลิตไนซินในระดับสูง และสามารถนำไปใช้งานได้ในระดับอุตสาหกรรม

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อทำการคัดกรองแบคทีเรีย จากแหล่งต่างๆ ที่สามารถสร้างไนซินและทำการยืนยันยีนที่ประมวลรหัสไนซินโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในการทดสอบ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

การถนอมอาหาร

การถนอมอาหารเป็นการเก็บรักษาอาหารไม่ให้เน่าเสีย โดยเป็นการยับยั้ง ทำลาย และลดปริมาณจุลินทรีย์ในอาหาร การถนอมอาหารมีหลายวิธีเช่น การใช้ความร้อน ความเย็น การทำให้แห้ง การใช้สารเคมี และการใช้รังสี เป็นต้น แต่วิธีการเหล่านี้มักประสบปัญหา ได้แก่ พบแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ที่ทนความร้อนได้ เช่น *Bacillus cereus*, *Clostridium* sp. หรือพบแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ เช่น *Listeria monocytogenes* นอกจากนี้ยังพบว่าสารเคมีที่ใส่ไปในอาหารเพื่อถนอมอาหารบางชนิด เช่น ไนเตรต มีผลข้างเคียงทำให้เป็นมะเร็งได้ (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2541) หรือวิธีการถนอมอาหารต้องเสียต้นทุนสูง จากสาเหตุเหล่านี้ทำให้นักวิทยาศาสตร์พยายามศึกษาวิธีการถนอมอาหารแบบใหม่ ต่อมาได้มีการค้นพบสารต้านจุลชีพที่เป็นโปรตีนโดยสร้างมาจากแบคทีเรียแลคติกซึ่งใช้เป็นหัวเชื้อในการหมักอาหารทั่วไป ภายหลังให้ชื่อสารนี้ว่า แบคเทอริโอซิน การค้นพบสารแบคเทอริโอซิน ซึ่งเป็นสารต้านจุลชีพชนิดเพปไทด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียซึ่งมีสมบัติในการทำลายหรือยับยั้งแบคทีเรีย จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่นำมาใช้ในการถนอมอาหาร เนื่องจากมีความปลอดภัยและสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้กว้าง การใช้สารแบคเทอริโอซินในการถนอมอาหารจะเป็นการใช้ในรูปสารบริสุทธิ์ สารกึ่งบริสุทธิ์ หรือหัวเชื้อแบคทีเรียแลคติกในการหมักเพื่อให้ผลิตสารแบคเทอริโอซิน (Cintas และคณะ, 2001)

แบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) เป็นเพปไทด์หรือโปรตีนที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียที่ไวต่อสารนี้ แบคเทอริโอซินถูกค้นพบครั้งแรกในแบคทีเรียแกรมลบ คือ โคลิซิน (colicin) ที่ผลิตจาก *Escherichia coli* ซึ่ง โคลิซินนี้มีผลยับยั้งแบคทีเรียเฉพาะกลุ่มที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ที่สร้าง (Oscariz และ Pisabarro, 2001) แบคเทอริโอซินมีสมบัติคล้ายกับสารปฏิชีวนะแต่ก็มีความแตกต่างในสมบัติการยับยั้งแบคทีเรีย แบคเทอริโอซินจะมีขอบเขตการยับยั้งที่แคบและยับยั้งได้ในกลุ่มสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันเท่านั้น ดังนั้นแบคเทอริโอซินจึงนิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อป้องกันการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย ในขณะที่สารปฏิชีวนะส่วนใหญ่จะใช้เพื่อยับยั้งหรือรักษาโรคติดเชื้อ (Hoover และ Steenson, 1993)

สมบัติของแบคเทอริโอซินโดยทั่วไปมีฤทธิ์ในการฆ่าแบคทีเรียที่ไวต่อสารนั้น และถูกย่อยได้อย่างรวดเร็วด้วยโปรตีเอสในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ (Chen และ Hoover, 2003)

ปัจจุบันแบคเทอริโอซินเป็นที่รู้จักกันกว้างขวางในแง่ของการเป็นสารต้านจุลชีพ และสารถนอมอาหาร ในอุตสาหกรรมอาหารแบคเทอริโอซินส่วนใหญ่ผลิตมาจากแบคทีเรียแกรมบวกที่สร้างมาจากกลุ่มแบคทีเรียแลคติกซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีความปลอดภัยในอุตสาหกรรมอาหาร

การจำแนกประเภทของแบคเทอริโอซิน (Chen และ Hoover, 2003)

แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติก โดยทั่วไปจะมีสมบัติเป็นโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic molecule) และมีประจุบวก ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 20-60 หมู่ โดยตัวอย่างแบคเทอริโอซินในแต่ละกลุ่มแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างแบคเทอริโอซินในกลุ่มต่าง ๆ (Chen และ Hoover, 2003)

Bacteriocins	Producers
กลุ่ม 1 (แลนติไบโอติก)	
1.1	
nisin	*Lactococcus lactis*
lactocin S	*Lactobacillus sakei*
epidermin	*Staphylococcus epidermidis*
gallidermin	*Staphylococcus gallinarum*
lacticin 481	*L. lactis*
1.2	
mersacidin	*Bacillus subtilis*
cinnamycin	*Streptomyces cinnamoneus*
ancovenin	*Streptomyces* sp.
duramycin	*S. cinnamoneus*
actagardin	*Actinoplanes* sp.

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างแบคเทอริโอซินในกลุ่มต่าง ๆ (ต่อ)

กลุ่ม 2 (โมเลกุลขนาดเล็กทนความร้อน)	
2.1	
pediocin PA-1/AcH	*Pediococcus acidilactici*
sakacin A	*Lb. sakei*
sakacin P L. sake	*Lb. sakei*
leucocin A-UAL 187	*Leuconostoc gelidum*
mesentericinY105	*Leuconostoc mesenteroides*
enterocin A	*Enterococcus faecium*
divercin V41	*Carnobacterium divergens*
lactococcin MMFII	*L. lactis*
2.2	
lactococcin G	*L. lactis*
lactococcin M	*L. lactis*
lactacin F	*Lactobacillus johnsonii*
plantaricin A	*Lactobacillus plantarum*
plantaricin EF	*Lb. plantarum*
plantaricin JK	*Lb. plantarum*
2.3	
acidocin B	*Lactobacillus acidophilus*
carnobacteriocin	*Carnobacterium piscicola*
divergicin A	*C. divergens*
enterocin P	*E. faecium*
enterocin B	*E. faecium*
กลุ่ม 3 (โมเลกุลขนาดใหญ่ไม่ทนความร้อน)	
helveticin J	*Lactobacillus helveticus*
helveticin V-1829	*Lb. helveticus*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สามารถแบ่งชนิดของแบคเทอริโอซินตามน้ำหนักโมเลกุล และโครงสร้างทางกายภาพและทางเคมี ได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่

1. แลนติไบโอติก (Lantibiotics)

แบคเทอริโอซินกลุ่มนี้เป็นสายเพปไทด์สายสั้น ๆ ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 19-50 หมู่ มีสมบัติทนความร้อนและมีกรดอะมิโนที่ถูกดัดแปลงเป็นองค์ประกอบ เช่น แลนไธโอนีน (lanthionine) บีตาเมทิลแลนไธโอนีน (β-methyl-lanthionine) ดีไฮโดรบิวทิวรีน (dehydrobutyrine, Dhb) และ ดีไฮโดรอะลานีน (dehydroalanine, Dha) ดังนั้นแบคเทอริโอซินกลุ่มนี้จึงต้องมีกระบวนการดัดแปลงหลังการแปลรหัสเพื่อให้ได้กรดอะมิโนที่สามารถใช้งานได้ ปฏิกิริยาเคมีของการดัดแปลงนี้เกี่ยวข้องกับการกำจัดน้ำ (dehydration) ที่ปลายเซรีน (serine) และธรีโอนีน (threonine) ได้เป็น Dha และ Dhb ตามลำดับ หลังจากนั้นหมู่ซัลฟ์ไฮดริล (sulphydryl) ของปลายซิสเตอีน (cysteine) จะเกิดปฏิกิริยากับ Dha และ Dhb สร้างเป็นสะพานซัลไฟด์ของ แลนไธโอนีน (Ala-s-Ala) หรือวงแหวนเมทิลแลนไธโอนีน (Ala-s-Aba) ปฏิกิริยานี้เร่งโดยเอนไซม์อย่างน้อย 2 ชนิด ซึ่งยีนที่ถอดรหัสเอนไซม์เหล่านี้มักจะอยู่บริเวณใกล้กับยีนโครงสร้าง (structural gene) นอกจากนี้เมื่อมีการขนส่งแบคเทอริโอซินชนิดนี้ด้วยวิธี ABC transport system ออกจากเซลล์จะมีการกำจัดเพปไทด์สายนำด้วยโปรตีเอส

ภายในกลุ่มแลนติไบโอติกยังมีความแตกต่างทางโครงสร้างและกลไกในการยับยั้งทำให้แยกแลนติไบโอติกได้อีกเป็น 2 กลุ่ม คือ

1.1) แลนติไบโอติกที่มีโครงสร้างสายเพปไทด์เป็นเส้นตรง มีสมบัติไม่ชอบน้ำและมีประจุบวก มีกลไกในการยับยั้งโดยการทำให้เกิดรูบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมาย แลนติไบโอติกกลุ่มนี้ที่ค้นพบครั้งแรก คือ ไนซิน (nisin) ซึ่งปัจจุบันมีความสำคัญในแง่ของการเป็นสารถนอมในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากมีฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียกว้าง

1.2) แลนติไบโอติกที่มีโครงสร้างสายเพปไทด์เป็นรูปร่างกลม (globular) ไม่มีประจุหรือมีประจุลบ กลไกการยับยั้งเกี่ยวของกับการยับยั้งเอนไซม์ที่มีความจำเพาะ และมีฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียค่อนข้างกว้างทำให้เป็นที่สนใจและในอนาคตอาจเป็นสารต้านจุลชีพที่เป็นจุดเด่นของแบคทีเรียแลคติกที่สำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร

2. แบคเทอริโอซินที่มีโมเลกุลขนาดเล็กและทนต่อความร้อน

กลุ่มนี้เป็นสายเพปไทด์ที่ไม่มีการดัดแปลง มีมวลโมเลกุลต่ำกว่า 10 กิโลดัลตัน และทนความร้อนได้ 60-100°ซ มากกว่า 30 นาที แบคเทอริโอซินกลุ่มนี้สามารถแบ่งเป็น 3 กลุ่มย่อยคือ

2.1) แบคเทอริโอซินที่มีลักษณะคล้ายเพดิโอซิน (pediocin-like peptide)

2.2) แบคเทอริโอซินที่ประกอบด้วยเพปไทด์ที่แตกต่างกัน 2 ส่วน ซึ่งแบคเทอริโอซินกลุ่มนี้จะทำงานได้ก็ต่อเมื่อเพปไทด์ทั้ง 2 ส่วนนี้ทำงานร่วมกัน

2.3) sec dependent secreted bacteriocin

นอกจากนั้นยังพบแบคเทอริโอซินใหม่อีก 2 กลุ่มที่มีโมเลกุลขนาดเล็กและทนต่อความร้อน กลุ่มแรกเป็นแบคเทอริโอซินที่ประกอบด้วยซีสเตอีนหนึ่งหรือสองชิ้นส่วน คือ ไธออลไบโอติก (thiolbiotics) และซิสติไบโอติก (cystibiotics) ตามลำดับ แบคเทอริโอซินในกลุ่มนี้ได้แก่ แลคโตคอคซิน เอ (lactococcin A) และอีกกลุ่มคือแบคเทอริโอซินที่ไม่มีส่วนประกอบของซีสเตอีน ได้แก่ แลคโตคอคซิน บี (lactococcin B) (Oscariz และ Pisabarro, 2001)

3. แบคเทอริโอซินที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่แต่ไม่ทนต่อความร้อน

แบคเทอริโอซินกลุ่มนี้เป็นโปรตีนที่มีขนาดใหญ่มีมวลโมเลกุลมากกว่า 30 กิโลดัลตัน สูญเสียประสิทธิภาพการทำงานเมื่อถูกความร้อน 100^{O}ซ เป็นเวลา 30 นาที หรือมากกว่านั้น

นอกจากนี้ยังพบแบคเทอริโอซินที่แตกต่างจาก 3 กลุ่มที่กล่าวข้างต้นโดยเป็นแบคเทอริโอซินที่มีความซับซ้อน ตัวอย่างเช่น ต้องการคาร์โบไฮเดรตหรือลิพิดในการออกฤทธิ์ เช่น แลคโตซิน 27 อย่างไรก็ตามแบคเทอริโอซินในกลุ่มนี้ยังไม่มีการศึกษาอย่างละเอียดจึงยังไม่สามารถกำหนดนิยามของแบคเทอริโอซินในกลุ่มนี้ได้

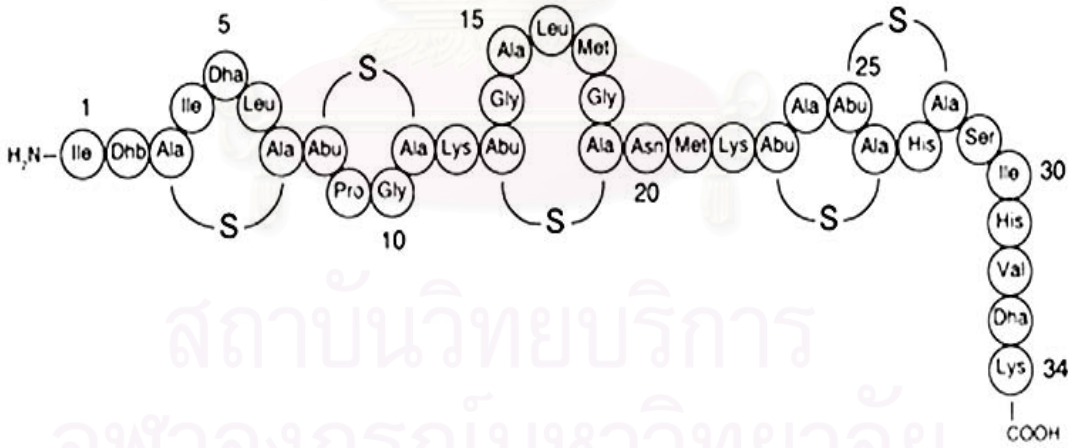
ไนซิน

ไนซินเป็นแบคเทอริโอซินชนิดหนึ่งซึ่งรู้จักมากกว่า 50 ปี ไนซินถูกค้นพบครั้งแรกโดย Rogers และคณะ ในปี 1928 โดยพบว่าแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactococcus* มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแลคติกชนิดอื่น ๆ หลังจากนั้นได้มีการศึกษาโดย Whitehead และคณะในปี 1933 พบว่านมที่เก็บไว้เพื่อเตรียมเป็นเนยแข็งจะเป็นกรดช้า ซึ่งสาเหตุที่เกิดการเป็นกรดช้าก็เนื่องมาจากหัวเชื้อที่เติมลงไปเพื่อใช้ในการเตรียมเนยแข็งสร้างสารบางอย่างที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สร้างกรด จากนั้นได้ทำการทดลองแยกสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจากนมและพบว่าสารนั้นมีสมบัติเป็นโปรตีน ต่อมาในปี 1943 Shattock และ Mattick ได้ศึกษาแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactococcus* ที่สร้างสารยับยั้งพบว่ามีลักษณะทางเซรุ่มวิทยาจัดอยู่ในกลุ่ม N ซึ่งมีสมบัติในการ

ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคหลายชนิด และให้เรียกสารต้านจุลชีพนี้ว่า ไนซิน ซึ่งมาจาก “ Group **N** **I**nhibitory **S**ubstance” ดังนั้นคำจำกัดความของไนซินก็คือ สารต้านจุลชีพที่ผลิตจากเชื้อในกลุ่ม *Lactococcus* ซึ่งมีลักษณะทางวิทยาเซรุ่มตามการจัดกลุ่มแบบ Lancefield ในกลุ่ม N (De Vuyst และ Vandamme, 1994)

ไนซินเป็นสารต้านจุลชีพชนิดเพปไทด์ที่สร้างขึ้นโดยแบคทีเรียในสายพันธุ์ *Lactococcus lactis* เนื่องจากไนซินมีส่วนประกอบของแลนไธโอนีน จึงจัดไนซินอยู่ในกลุ่มแลนติไบโอติก โครงสร้างของไนซิน ประกอบด้วยกลุ่มกรดอะมิโนที่ไม่พบในธรรมชาติ ได้แก่ Dha, Dhb, แลนไธโอนีน และบีตาเมทิลแลนไธโอนีน (Hoover และ Steenson, 1993)

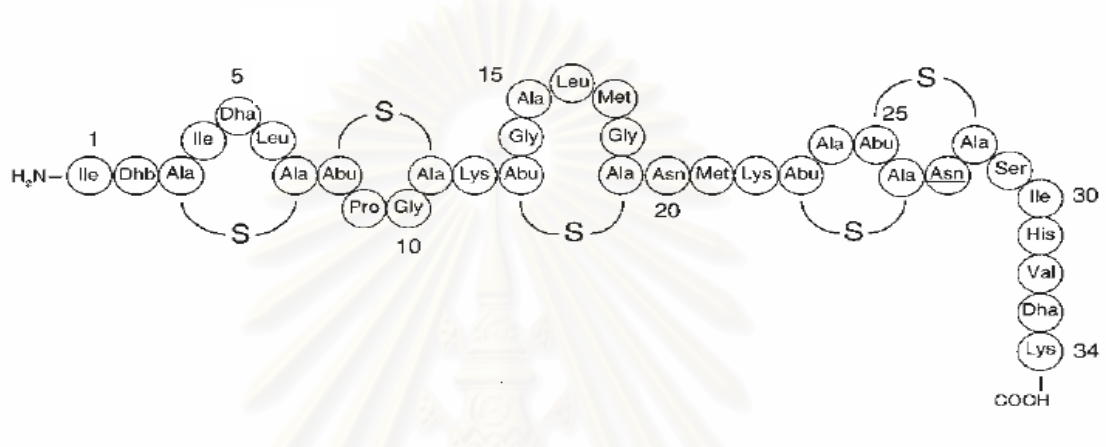
ไนซินสามารถแบ่งออกได้เป็นสองชนิดโดยอาศัยความแตกต่างของกรดอะมิโน ได้แก่ ไนซินเอ และ ไนซินแซด โดยไนซินเอ เป็นไนซินชนิดแรกที่ถูกค้นพบ ไนซินเอ แยกได้จาก *L. lactis* subsp *lactis* NCFB 497, *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 และ *L. lactis* subsp. *lactis* ไนซินเอ มีขนาดมวลโมเลกุลเท่ากับ 3,354.53 ดัลตัน (De Vuyst และ Vandamme, 1994) รูปที่ 2.1 แสดงโครงสร้างของไนซิน เอ



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของไนซินเอ จาก *L. lactis* subsp. *lactis* (De Vuyst และ Vandamme, 1994)

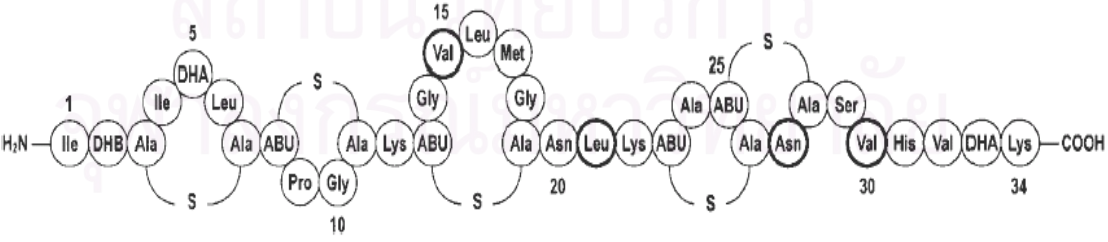
ต่อมาในปีค.ศ.1991 ได้มีการค้นพบไนซินที่มีความแตกต่างจากไนซินเอ โดยมีกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 27 เป็นแอสพาราจีน ซึ่งต่างจากไนซินเอ ที่เป็นฮิสติดีน และเรียกไนซินชนิดนี้ว่าไนซินแซด ซึ่งแยกได้จาก *L. lactis* subsp. *lactis* NIZO 22186, *L. lactis* subsp. *lactis* N8, *L. lactis* subsp. *lactis* SIK-83 และ *L. lactis* subsp. *lactis* สายพันธุ์อื่น ๆ ไนซินแซด มีขนาดมวลโมเลกุล

เท่ากับ 3,330.91 ดัลตัน ไนซินแซด มีสมบัติการละลายที่ค่าความเป็นกรด-เบสเป็นกลางได้ดีกว่าไนซินเอ ทั้งไนซินเอ และแซด มีฤทธิ์ในการทำลายแบคทีเรียแกรมบวกได้กว้างเหมือนกัน เช่น กลุ่มแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในอาหาร และแบคทีเรียที่ก่อโรคในมนุษย์ (De Vuyst และ Vandamme, 1994) รูปที่ 2.2 แสดงโครงสร้างของไนซินแซด



รูปที่ 2.2 โครงสร้างของไนซินแซด (De Vuyst และ Vandamme, 1994)

ในปี 2003 Zendo และคณะ ได้ค้นพบไนซินคิว ซึ่งเป็นไนซินชนิดใหม่ที่มีกรดอะมิโนแตกต่างจาก ไนซินเอ โดยในส่วนของเพปไทด์สายหลักมีกรดอะมิโนแตกต่างจากไนซินเอ 4 หมู่ และในส่วนของเพปไทด์สายนำ มีกรดอะมิโนแตกต่างจากไนซินเอ 2 หมู่ ไนซินคิว สังเคราะห์จาก *L. lactis* สายพันธุ์ 61-14 ซึ่งแยกจากแม่น้ำในประเทศญี่ปุ่น ขนาดมวลโมเลกุลของไนซินคิว เท่ากับ 3,327 ดัลตัน รูปที่ 2.3 แสดงโครงสร้างของไนซินคิว



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของไนซินคิว (Zendo และคณะ, 2003)

ฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียของไนซิน

ไนซินจะมีฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียที่ค่อนข้างกว้าง ไนซินสามารถยับยั้งแบคทีเรียโดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวกทั้งที่สร้าง และไม่สร้างสปอร์ ตัวอย่างเช่น แบคทีเรียในสกุลต่อไปนี้ *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus* และ *L. monocytogenes* โดยเฉพาะ *L. monocytogenes* เป็นแบคทีเรียที่ก่อโรคในอาหารซึ่งพบทั่วไปในสิ่งแวดล้อมและควบคุมยาก สำหรับแบคทีเรียแกรมบวกที่สร้างสปอร์พบว่าไนซินมีฤทธิ์ป้องกันการสร้างสปอร์ใน Clostridia และ Bacilli เป็นต้น (Chen และ Hoover, 2003) ส่วนแบคทีเรียแกรมลบ รา ยีสต์ และ ไวรัสไม่สามารถถูกยับยั้งด้วยไนซิน อย่างไรก็ตามได้มีการรายงานว่า ยีสต์ และรา ถูกยับยั้งแบบไม่จำเพาะเมื่อใช้ปริมาณไนซินที่มีความเข้มข้นสูง (De Vuyst และ Vandamme, 1994) ไนซินไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ แต่ในปัจจุบันได้มีการประยุกต์ใช้ไนซินร่วมกับสารคีเลต เช่น EDTA เพื่อช่วยในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย แกรมลบ (Mishra และ Lambert, 1996)

กลไกการยับยั้งแบคทีเรียของไนซิน

กลไกในการยับยั้งแบคทีเรียของไนซินจะเหมือนของสารเคมีพวกดีเทอร์เจนต์ คือ การทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ไนซินจะใช้ส่วนที่ชอบน้ำหรือประจุบวกที่บริเวณ N-terminal ทำปฏิกิริยากับส่วนที่เป็นประจุลบที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดช่องผ่านเข้า-ออกของสารบริเวณที่มีประจุลบ เช่น กรดไทโคอิก (teichoic acid) กรดไลโพไทโคอิก (lipoteichoic acid) และฟอสฟอลิพิด (phospholipids) เป็นผลให้เกิดรู และสูญเสียสภาพบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้สารที่มีมวลโมเลกุลต่ำ เช่น โปแทสเซียม ไฮโดรเจน กรดอะมิโน นิวคลีโอไทด์ รั่วออกมานอกเซลล์ และสูญเสียความต่างศักย์บนเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้ไม่สามารถสร้างพลังงานได้ ในที่สุดกระบวนการสังเคราะห์ชีวโมเลกุลต่างๆ ก็จะหยุด เป็นสาเหตุให้เซลล์ตาย สำหรับการยับยั้งการสร้างสปอร์นั้นไนซินจะไปเปลี่ยนแปลงหมู่ซัลฟ์ไฮดริลของโปรตีนที่อยู่ในส่วนประกอบของเยื่อหุ้มสปอร์ซึ่งจะอยู่ในระยะที่จะเกิดการงอกของสปอร์ทำให้ไม่สามารถเกิดเป็นสปอร์ที่สมบูรณ์ได้ (De Vuyst และ Vandamme, 1994)

ประโยชน์ของไนซิน และการประยุกต์ใช้

ไนซินเป็นสารต้านจุลชีพที่น่าสนใจเนื่องมาจากเป็นสารต้านจุลชีพชนิดแรกที่ใช้เป็นวัตถุกันเสียในอาหาร โดยใช้ครั้งแรกในปี ค.ศ.1950 ไนซินถูกเติมลงในเนยแข็งเพื่อป้องกันการเน่าเสียที่เกิดจาก *Clostridium butyricum* ในปี ค.ศ. 1968 องค์การอนามัยโลก (WHO) รับรองว่าไนซินมีความปลอดภัยและอนุญาตให้ใช้ไนซินเติมในอาหารเพื่อถนอมอาหารได้ ปัจจุบันได้มีการใช้ไนซินอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหารมากกว่า 50 ประเทศทั่วโลก ในหลายประเทศได้มีการประยุกต์ใช้ไนซินในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่มาจากนม และป้องกันการเกิดการเน่าเสียในอาหารกระป๋องจากแบคทีเรียที่ทนความร้อน นอกจากนั้นยังพบว่าในอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ และไวน์มีการใช้ไนซินเติมลงไปในการผลิตเพื่อลดการปนเปื้อนจากแบคทีเรียแลคติกที่ทำให้เกิดกรดในผลิตภัณฑ์เบียร์ และไวน์ (Jay, 2000)

แหล่งของไนซิน และจุลินทรีย์ที่ผลิตไนซิน

จุลินทรีย์ที่ผลิตไนซินสายพันธุ์แรกแยกได้จากผลิตภัณฑ์นม จากการทดลองระบุว่าแบคทีเรียที่พบคือ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* แบคทีเรียในสายพันธุ์ *Lactococcus lactis* ส่วนใหญ่แยกได้จากน้ำนม หรือผลิตภัณฑ์ที่มาจากน้ำนม ทั้งนมวัว น้ำนมแพะ และน้ำนมแกะ *L. lactis* นอกจากจะแยกได้จากน้ำนมยังสามารถแยกได้จากอาหารหมักต่าง ๆ เช่น ไส้กรอกหมักและกิมจิ เป็นต้น (Rodriguez และคณะ, 1995; Park และคณะ, 2003) นอกจากนี้ยังพบ *Lactococcus* ที่สร้างไนซินในเนยแข็ง อุจจาระของวัวรวมทั้งในลำคอมนุษย์อีกด้วย (De Vuyst และ Vandamme, 1994)

Rodriguez และคณะ (1995) แยกแบคทีเรียแลคติกจากไส้กรอกพื้นเมืองในประเทศสเปนเพื่อหาแบคทีเรียที่สามารถสร้างไนซิน พบว่าแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ BB24 และ 618 สามารถสร้างแบคเทอริโอซินซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิดและระบุว่าแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์เป็น *Lactococcus lactis* ตามสมบัติทางชีวเคมี และการหมักน้ำตาล ยืนยันด้วยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับแบคทีเรียที่สร้างไนซินเอ ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์สร้างสารแบคเทอริโอซินชนิด ไนซินเอ

Cai และคณะ (1997) แยกแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *L. monocytogenes* จากส่วนหน่อของพืชตระกูลถั่ว (bean sprouts) จากผลการแยกแบคทีเรียทั้งหมดพบว่าแบคทีเรีย HPB 1688 ให้ผลการยับยั้งเกิดบริเวณใสกว้างที่สุด และได้จำแนกชนิดของแบคทีเรีย HPB 1688 ซึ่งระบุว่า

เป็น *L. lactis* subsp. *lactis* การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีนไนซิน พบว่า *L. lactis* subsp. *lactis* ที่แยกได้สร้างไนซินแซด *L. lactis* subsp. *lactis* HPB 1688 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 3- 4.5°ซ นาน 20 วัน และมีฤทธิ์ยับยั้ง *L. monocytogenes* ที่อุณหภูมิ 5°ซ

Franz และคณะ (1997) แยก *L. lactis* subsp. *lactis* จากตัวอย่างผัก แบคเทอริโอซินที่แยกได้จาก *L. lactis* subsp. *lactis* มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแลคติก รวมทั้งแบคทีเรียก่อโรค เช่น *L. monocytogenes* และ *S. aureus* แบคเทอริโอซินที่แยกมีสมบัติทนความร้อนที่ 121°ซ นาน 15 นาที และพบว่าที่ค่าความเป็นกรด-เบส ต่ำกว่า 5 จะมีฤทธิ์ในการยับยั้งสูงที่สุด ผลการทดสอบปฏิกิริยาทางวิทยาภูมิคุ้มกัน โดยการทำ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ให้ผลกับแบคเทอริโอซินชนิดไนซิน การแยกแบคทีเรียที่สร้างไนซินจากผักมีประโยชน์ในการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเนื่องจากมีความปลอดภัย และสามารถนำมาใช้ควบคุมการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในอาหารหมักที่มีผักเป็นส่วนประกอบ

Garde และคณะ (2001) สนใจที่จะแยกแบคทีเรียในสกุล *Lactococcus* จากน้ำนมดิบที่จะใช้ในการเตรียมเนยแข็ง โดยต้องการแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างสารต้านจุลชีพได้ดี โดยทำการแยก *L. lactis* subsp. *lactis* โดยอาศัยสมบัติเกี่ยวกับรูปร่าง สมบัติด้านสรีรวิทยา และยืนยันด้วยการทำ PCR จากการทำ PCR โดยเลือกใช้ไพรเมอร์ที่ความจำเพาะต่อแบคเทอริโอซินหลายชนิด พบว่า *L. lactis* subsp. *lactis* ที่แยกได้มีส่วนประกอบของยีนที่สังเคราะห์ไนซิน และจากการหาลำดับยีนก็พบว่ามีลำดับยีนเหมือนกับไนซินแซด

Zendo และคณะ (2003) แยก *L .lactis* จากแม่น้ำในประเทศญี่ปุ่น ผลการศึกษาสารต้านจุลชีพที่อยู่ในส่วนน้ำใสของแบคทีเรียที่แยกได้ พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิด เช่น แบคทีเรียกลุ่มแลคติก *Bacillus* sp., *Listeria* sp. และ *Micrococcus* sp.เป็นต้น ซึ่งฤทธิ์ในการยับยั้งเหมือนกับแบคเทอริโอซินชนิดไนซิน จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนน้ำหนักมวลโมเลกุล และการทำ PCR ด้วย ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีนไนซิน สรุปว่าแบคเทอริโอซินที่แยกได้เป็นไนซินชนิดใหม่ที่มีกรดอะมิโนแตกต่างจากไนซินเอ และไนซินแซด

Beasly และ Saris (2004) เก็บตัวอย่างน้ำนมดิบจากมนุษย์โดยเก็บจากน้ำนมมารดาที่ให้นมบุตรหลังคลอด 80 วัน นำตัวอย่างน้ำนมที่แยกได้มาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ *M. luteus* ด้วยวิธี agar diffusion พบว่าแบคทีเรีย 20 ไอโซเลต เกิดบริเวณใสจากการยับยั้ง ทั้ง 20 ไอโซเลต นำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA แบคทีเรียจำนวน 7 สายพันธุ์ ระบุว่ามียีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไนซิน การพบแบคทีเรียที่สร้างไนซินในมนุษย์เกี่ยวข้องกับการ

ป้องกันมารดาและบุตรจากการติดเชื้อจากแบคทีเรียประจำถิ่นบริเวณผิวหนัง เช่น *S. aureus* เป็นต้น

การวิเคราะห์หาไนซินและการคัดกรองแบคทีเรียที่สร้างไนซิน

วิธีที่ใช้ทดสอบสามารถแบ่งได้เป็น 4 วิธีใหญ่ ๆ ได้แก่ วิธีทางชีวภาพ วิธีทางกายภาพ วิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกัน และวิธีวิเคราะห์ระดับโมเลกุล

1. วิธีทางชีวภาพ (bioassay)

เป็นวิธีที่ใช้ทดสอบแบคทีเรียที่สร้างไนซินโดยอาศัยสมบัติความเป็นสารต้านจุลชีพที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่น ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่ไวต่อไนซินแสดงในตารางที่ 2.2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.2 แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบความไวต่อไนซิน

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ	เอกสารอ้างอิง
Lactobacillus brevis *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* *Bacillus stearothermophillus* *Micrococcus luteus* *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* *Bacillus coagulans*	De Vuyst และ Vandamme (1994)
Lactococcus lactis subsp. *cremoris* CNRZ117	Parente และคณะ (1995)
Clostridium divergens LV 13	Rose และคณะ (1999)
Pediococcus acidilactici	Turcotte และคณะ (2004)
Lactobacillus plantarum TISTR 850 *Pediococcus pentosaceus* TISTR 374 *Propionibacterium freundenreichii* TISTR 446	Noonpakdee และคณะ (2003)
Lactobacillus sakei *Brochothrix thermosphacta*	Pongtharangkul และ Demirci (2004)

วิธีทางชีวภาพสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 วิธี คือ วิธีแพร่ซึมในอาหารแข็ง (agar diffusion assay) และวิธีวัดความขุ่น (turbidimetric assay, photometric assay)

1.1 วิธีแพร่ซึมในอาหารแข็ง (agar diffusion assay)

1.1.1 วิธี direct plate method

เป็นการทดสอบบนอาหารแข็งที่มีการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่จะใช้ทดสอบการสร้างไนซิน โดยผสมแบคทีเรียทดสอบ (แบคทีเรียที่ไวต่อไนซิน) กับอาหารเลี้ยงเชื้อที่หลอมเหลวและเทลงบนจานอาหาร (pour plate) จากนั้นนำไปบ่มที่สภาพไร้อากาศ ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จานอาหารที่มีการเจริญของแบคทีเรียนำมาเททับด้วยอาหาร

กึ่งแข็ง (มีส่วนประกอบของวุ้น 0.7%) ที่ผสมกับแบคทีเรียทดสอบ หลังจากการบ่ม โคโลนีที่เกิดบริเวณใสสันนิษฐานว่าสามารถสร้างไนซินซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ (Noonpakdee และคณะ, 2003)

1.1.2 วิธี agar well diffusion

ทำได้โดยนำแบคทีเรียทดสอบมาผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่หลอมเหลวแล้วเทลงบนจานอาหาร จากนั้นนำอาหารที่แข็งแล้วมาเจาะหลุม และหยอดด้วยส่วนน้ำใสของแบคทีเรียที่จะทดสอบการสร้างไนซิน แบคทีเรียที่สามารถสร้างไนซินได้จะไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบทำให้เกิดบริเวณใสรอบโคโลนี (Parente และคณะ, 1995)

1.1.3 วิธี agar spot method

วิธีทดสอบจะเหมือนกับวิธี agar well diffusion แต่ใช้การจุดแบคทีเรียลงบนอาหารแข็งแทนการหยอดใส่หลุม และเททับด้วยแบคทีเรียทดสอบ (Imphol และคณะ, 2003)

Ohmomo และคณะ (2003) ได้ประยุกต์วิธีทดสอบที่ผสมกันระหว่างวิธี direct plate method กับวิธี agar well diffusion โดยขั้นแรกนำแบคทีเรียมาจุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง บ่ม 1 คืน และเททับด้วยอาหารกึ่งเหลวที่มีแบคทีเรียทดสอบ หลังจากนั้นบ่มแบคทีเรียกับแบคทีเรียทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงเลือก โคโลนีที่เกิดโซนใสมาทดสอบขั้นที่สอง โดยนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวแล้วกรองเอาส่วนใสมาหยอดบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีแบคทีเรียทดสอบผสม จากนั้นนำไปบ่ม โคโลนีที่เกิดบริเวณใสแสดงว่าสามารถสร้างไนซิน

1.1.4 วิธี rapid plate method

เป็นวิธีที่ประยุกต์ให้มีความรวดเร็วในการวิเคราะห์มากขึ้นโดยนำแบคทีเรียที่จะทดสอบมาจุดบนแผ่นกรองไนโตรเซลลูโลสที่มีขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นนำแผ่นกรองไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อป้องกันไนซินที่สร้างจะถูกดูดซับบนผิวแก้วจึงผสมกรดไฮโดรคลอริก 0.02 โมลาร์ และ tween 80 0.1% ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วจึงแยกเอาแผ่นกระดาษกรองออก นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีรอยของแบคทีเรียไปบ่มที่ 4°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อช่วยในการแพร่ แล้วจึงนำมาเททับด้วยอาหารกึ่งแข็งที่มีแบคทีเรียทดสอบผสมอยู่ บ่มต่อที่ 37°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจหาแบคทีเรียที่สร้างไนซินจากการสร้างบริเวณใสรอบโคโลนีที่ทดสอบ (Chandraprati และ O' Sullivian, 1998)

การวิเคราะห์การสร้างไนซินด้วยวิธีแพร่ซึมในวุ้นสามารถประยุกต์ใช้หาปริมาณไนซินที่แบคทีเรียสร้างได้โดยทำการทดลองเปรียบเทียบโซนของการยับยั้งระหว่างแบคทีเรียที่จะทดสอบกับไนซินมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานระหว่างเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนการยับยั้ง (แกน Y) กับ ความเข้มข้นของไนซิน (แกน X)

กิจกรรมของไนซินจะแสดงในรูป arbitrary unit (AU) ซึ่งหมายถึงค่าความเจือจางที่สูงที่สุดที่ได้จากการทำเจือจาง 2 เท่าเป็นลำดับ (two fold serial dilution) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ไวต่อไนซินต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร หรืออาจแสดงในรูป international unit (IU) ซึ่งแสดงถึงค่ากิจกรรมของไนซินบริสุทธิ์ที่เตรียมด้วยวิธีมาตรฐานปริมาตร 1 ไมโครกรัม เทียบกับไนซินมาตรฐาน เช่น เทียบกับไนซินมาตรฐาน Nisaplin (Nisaplin 1 กรัม มีกิจกรรมที่แน่นอน 10^6 IU) (De Vuyst และ Vandamme 1994) การทดสอบการสร้างไนซินด้วยวิธีแพร่ซึมในวุ้นเป็นวิธีที่วิเคราะห์ง่าย และมีต้นทุนต่ำ ดังนั้นจึงเป็นวิธีที่นิยมใช้ แต่มีขีดจำกัดหลายอย่างโดยเฉพาะในการวิเคราะห์หาปริมาณไนซินนั้นขนาดของโซนเป็นสิ่งสำคัญ ถ้าขนาดโซนมีความคลาดเคลื่อนก็จะทำให้เกิดความผิดพลาดในการวิเคราะห์ปริมาณ (Pongtharangkul และ Demirci, 2004)

1.2 วิธีวัดความขุ่น (turbidimetric assay, photometric assay)

เป็นวิธีที่ใช้ในการหาปริมาณไนซิน โดยเปรียบเทียบความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแบคทีเรียตัวอย่างที่จะทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียที่ไวต่อไนซิน กับไนซินมาตรฐาน ซึ่งสามารถเตรียมในรูปหลอดทดลองหรือในปัจจุบันนิยมใช้ในรูป microtiter plate ซึ่งมีความสะดวกและสามารถเตรียมได้หลายตัวอย่าง ทำได้โดยการนำไนซินที่แยกได้จากแบคทีเรียมาทำให้บริสุทธิ์และนำมาเจือจางให้ได้หลายความเข้มข้นจากนั้นบ่มไนซินกับแบคทีเรียทดสอบที่ไวต่อไนซิน และหยุดการเจริญด้วยการเติมไธโอเมอร์ซาเลต (thiomersalate) จากนั้นนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปริมาณไนซินของสารตัวอย่างหาได้โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน วิธีนี้เป็นวิธีที่รวดเร็ว สามารถประยุกต์ใช้ในการหาปริมาณไนซินในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ได้ แต่สารที่จะใช้ทดสอบหรืออาหารเลี้ยงเชื้อต้องใสและไม่มีตะกอน (Flores และคณะ, 2003)

Turcotte และคณะ (2004) ได้พัฒนาวิธีวัดความขุ่นให้มีความแม่นยำ มีความไว และใช้เวลาน้อย โดยพบว่าเมื่อใช้แบคทีเรียทดสอบความไวเป็น *Pediococcus acidilactici* UL5 ปริมาณ 10^7 CFU จะช่วยลดเวลาในการบ่มแบคทีเรียลงเหลือ 3 ชั่วโมง และได้ทำการเปรียบเทียบค่าต่าง ๆ ของการวิเคราะห์ด้วยวิธีแพร่ซึมในวุ้นกับวิธีวัดความขุ่น ดังแสดงในตารางที่ 2.3 ซึ่งจะ

เห็นว่าวิธีวัดความขุ่นเป็นวิธีวิเคราะห์ที่รวดเร็วกว่า และมีความไวมากกว่า และไม่มีปัญหาเกี่ยวกับการแพร่ในวุ้น แต่วิธีนี้จะยุ่งยากกว่าเพราะต้องเตรียมไนซินให้บริสุทธิ์ก่อนที่จะวิเคราะห์

ตารางที่ 2.3 เปรียบเทียบค่าต่างๆ ระหว่างวิธีแพร่ซึมในวุ้นกับวิธีวัดความขุ่น (Turcotte และคณะ, 2004)

	วิธีแพร่ซึมในวุ้น	วิธีวัดความขุ่น
ความแม่นยำ (precision)	SDM<15%	SDM<7%
ความถูกต้อง (accuracy)	ความคลาดเคลื่อน<20%	ความคลาดเคลื่อน<10%
ปริมาตรที่วิเคราะห์ได้	0.3-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	0.08-60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
เวลาที่ใช้เตรียมสาร	เวลาเตรียมอาหารให้เย็น 30 นาที แช่เย็น 2-3 ชั่วโมง วิเคราะห์ 5-10 นาทีต่อจานอาหาร	ประมาณ 15 นาทีต่อจานอาหาร
เวลาบ่ม	24-48 ชั่วโมง	3-4 ชั่วโมง
เวลาที่ใช้อ่านค่า	5 นาทีต่อจานอาหาร	เป็นวินาที
อุปกรณ์ที่ใช้	3-4 ตัวอย่างต่อจานอาหาร	12 ตัวอย่างต่อจานอาหาร

SDM =standard derivation of mean

Reunanen และ Saris (2003) ได้ปรับปรุงแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบความไวต่อไนซินให้มีการตรวจสอบง่ายขึ้น มีความไว และมีความแม่นยำมากขึ้นโดยทำการสร้างพลาสมิดที่ประกอบด้วยยีน *nisR* และ *nisK* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมตัวเอง (autoregulation gene) และยีน *gfp* ซึ่งเป็นยีนที่สร้างโปรตีน green fluorescent จากนั้นนำพลาสมิดใส่เข้าไปใน *L. lactis* สายพันธุ์ MG1614 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไม่สร้างไนซิน ด้วยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน และเรียกสายพันธุ์ใหม่นี้ว่า *L. lactis* LAC240 ซึ่งใช้เป็นแบคทีเรียทดสอบที่ไวต่อไนซิน เมื่อบ่ม *L. lactis* LAC240 กับแบคทีเรียที่ต้องการจะทดสอบการสร้างไนซิน ถ้าแบคทีเรียนั้นสามารถสร้างไนซิน ไนซินที่สร้างจะไปกระตุ้นให้โปรตีน green fluorescent เปล่งแสงวัดแสงที่เปล่งออกด้วยเครื่องฟลูออโรมิเตอร์ โดยที่แปลผลออกมาเป็นค่าความสัมพันธ์ระหว่างแสงที่กระตุ้นวัดได้ที่ความยาวคลื่น 485 นาโนเมตร และแสงที่ปล่อยออกวัดได้ที่ความยาวคลื่น 538 นาโนเมตร ค่า relative fluorescence unit (RFU) จะแปรผันตามปริมาณไนซิน วิธีนี้สามารถวิเคราะห์ไนซินได้แม้มีเพียงปริมาณเล็กน้อย วิเคราะห์ไนซิน บริสุทธิ์ได้ตั้งแต่ 2.5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์ไนซินในนมที่มีความเข้มข้นเพียง 45

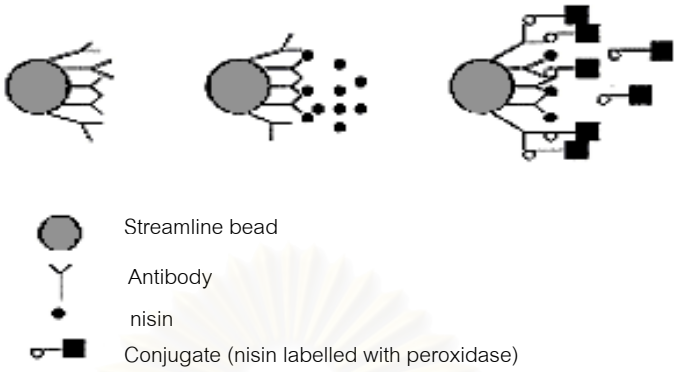
นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในผลิตภัณฑ์เนยแข็ง 0.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และวิเคราะห์ไนซินในน้ำสลัดได้ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. วิธีทางกายภาพ

เป็นวิธีตรวจหาไนซินโดยอาศัยโครงสร้างของไนซิน เช่น การวิเคราะห์โดยแก๊ส โครมาโทกราฟี (gas chromatography) ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครโมโทกราฟี (high performance liquid chromatography) นอกจากนั้นยังสามารถวิเคราะห์จากมวลโมเลกุลของ ไนซิน โดยวิธี Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) จากการทดลองของ Rose และคณะ (1999) ได้ใช้เทคนิค MALDI-TOF MS ในการหาไนซินจากสารละลายส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรีย โดยวิเคราะห์จากมวลโมเลกุลเทียบกับไนซินมาตรฐาน MALDI-TOF MS เป็นวิธีที่มีความรวดเร็วเมื่อเทียบกับวิธีทางชีวภาพที่ต้องบ่มเชื้อ และสามารถนำมาใช้วิเคราะห์หาไนซินในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ แต่ก็มีข้อด้อยคือ การเตรียมสารเคมีในการทดสอบมีความยุ่งยาก และเครื่องมือที่จะใช้วิเคราะห์มีราคาแพง และในการทำปริมาณวิเคราะห์จำเป็นจะต้องเตรียมไนซินให้มีความบริสุทธิ์สูง

3. วิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกัน

เป็นวิธีที่อาศัยปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี โดยไนซินเป็นแอนติเจน และสร้างแอนติบอดีจากการฉีดไนซินเข้าในสัตว์ทดลองเพื่อให้สร้างแอนติบอดีต่อไนซิน วิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เป็นวิธีที่สามารถนำมาประยุกต์เพื่อใช้วิเคราะห์หาปริมาณไนซินโดยอาศัยหลักการที่ไนซินจะจับกับแอนติบอดีต่อไนซิน โดยเตรียมให้แอนติบอดีจับกับเม็ดบีด จากนั้นเมื่อเติมสารที่จะวิเคราะห์ไนซินลงไปไนซินในสารตัวอย่างจะจับกับแอนติบอดีแล้วจึงทำการล้างออกและเติมคอนจูเกตไนซินซึ่งติดฉลากด้วยเอนไซม์ฮอร์สราดิชเพอร์ออกซิเดส คอนจูเกตไนซินจะไปแย่งจับกับแอนติบอดี และเมื่อเติมซับสเตรตเอนไซม์จะย่อยซับสเตรตซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ 540 นาโนเมตร โดยปริมาณไนซินจะแปรผกผันกับค่าการดูดกลืนแสง ถ้าในตัวอย่างมีไนซินมากคอนจูเกตไนซินจะเข้าไปแย่งจับกับแอนติบอดีได้น้อยทำให้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำ (Nandakumar และคณะ, 1999) แบบจำลองการทำ ELISA แสดงในรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 แบบจำลองการทำ ELISA (Nandakumar และคณะ, 1999)

4. วิธีวิเคราะห์ระดับโมเลกุล

ปัจจุบันเทคโนโลยีทางด้านอณูชีววิทยาได้มีการพัฒนามากขึ้น การค้นพบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ใช้ในการสังเคราะห์ไนซินมีประโยชน์ และสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์หาแบคทีเรียที่สามารถสร้างไนซินได้ โดยการหายีนไนซินเป็นการหาในระดับโมเลกุลของแบคทีเรีย ซึ่งสามารถใช้ยืนยันการสร้างไนซินของแบคทีเรียนั้นได้อย่างแม่นยำ เทคโนโลยี PCR ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการหายีนที่สร้างไนซินโดยการออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อยีนไนซิน เมื่อทำการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่จะทดสอบการสร้างไนซิน และนำเข้าสู่กระบวนการต่างของ PCR สายดีเอ็นเอที่มียีนไนซินซึ่งมีความจำเพาะกับไพรเมอร์จะถูกเพิ่มจำนวน ดังนั้นถ้าดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่จะทดสอบสามารถเพิ่มจำนวนได้เมื่อผ่านการทำ PCR ก็แสดงว่าแบคทีเรียนั้นมียีนไนซิน

ในการทำ PCR มีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของสายดีเอ็นเอ เช่น ภาวะในแต่ละขั้นตอนของ PCR เอนไซม์พอลิเมอเรสที่ใช้ และไพรเมอร์โดยที่ไพรเมอร์จะต้องมีความจำเพาะต่อยีนไนซินจึงจะสามารถระบุได้ว่าแบคทีเรียมียีนไนซินจริง จากความรู้ในด้านยีนของ ไนซินสามารถนำมาใช้ในการศึกษาเพื่อระบุ และยืนยันการผลิตไนซินของแบคทีเรียแลคติกแอซิดที่สนใจ โดยในการยืนยันระดับยีนนั้นจะให้ผลที่แม่นยำและน่าเชื่อถือ

Meghrous และคณะ (1999) ทำการสกัดแยกยีนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ประมวลรหัสไนซินแซด และเพิ่มจำนวนยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสนำมาติดฉลากด้วย digoxigenin เพื่อเตรียมเป็นดีเอ็นเอติดตาม จากการทดลองได้ทำการเปรียบเทียบความไวในการตรวจหาชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มียีนประมวลรหัส ไนซินระหว่างวิธีไฮบริไดเซชันกับปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสพบว่าการใช้ดีเอ็นเอติดตามสามารถตรวจพบชิ้นส่วน

ดีเอ็นในปริมาณเพียง 1.4 นาโนกรัม ในขณะที่ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสต้องใช้ปริมาณดีเอ็นเอ 11 นาโนกรัม ดังนั้นจึงสรุปว่าการทำไฮบริไดเซชันโดยใช้ดีเอ็นเอติดตามที่ติดฉลากด้วย digoxigenin เป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจสอบแบคทีเรียที่สร้างไนซินได้ และมีความไว

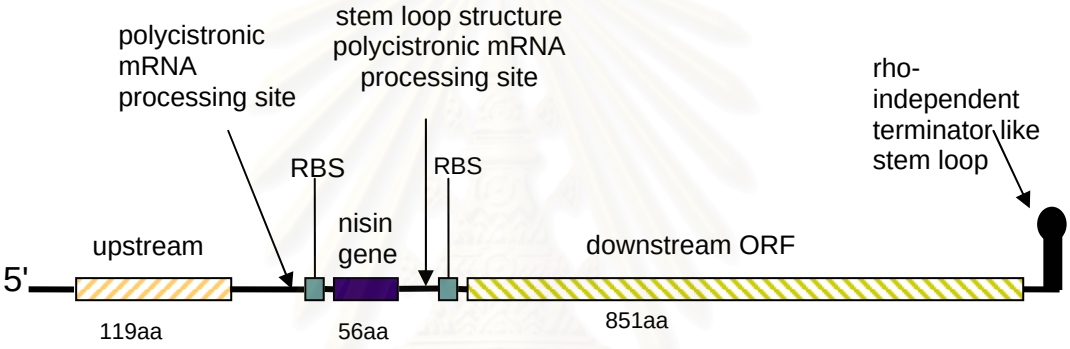
Noonpakdee และคณะ (2003) ได้ทำการศึกษาทดสอบแยกแบคทีเรียจากอาหารหมักดอง โดยจากการสุ่มตัวอย่างหาแบคทีเรียในแหนมซึ่งเป็นอาหารหมักพื้นบ้านของไทย พบว่ามีแบคทีเรีย *L. lactis* สายพันธุ์ WNC 20 ซึ่งสามารถผลิตสารที่มีสมบัติทางกายภาพเป็นแบคเทอริโอซินและมีฤทธิ์สามารถยับยั้งเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแลกติคที่ใกล้เคียง และเชื้อก่อโรคอื่นๆ เช่น *L. monocytogenes*, *C. perfringens*, *B. cereus* และ *S. aureus* จากการศึกษาได้ทำการสกัดดีเอ็นเอของ *L. lactis* WNC 20 และทำการเพิ่มจำนวนด้วย PCR โดยใช้ไพรเมอร์เป็นลำดับเบสที่จำเพาะกับยีนไนซินพบว่าสามารถเพิ่มจำนวนได้และเมื่อนำมาทำการวิเคราะห์ด้วย อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส พบว่าชิ้นส่วนมีขนาด 227 bp จากนั้นทำการหาลำดับเบสเทียบกับยีนไนซินให้ผลมีความคล้ายคลึงกับไนซินแซด คือมีกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 27 เป็นแอสพาราจีน จึงสามารถสรุปได้ว่า *L. lactis* WNC 20 ที่แยกได้จากแหนมสามารถผลิตแบคเทอริโอซินชนิดไนซินแซด

ชีวโมเลกุลของไนซิน

การศึกษาเกี่ยวกับยีนของไนซินเริ่มต้นด้วยการพบยีนไนซินตั้งต้น (nisin precursor gene) โดย Buchman และคณะ (1988) ได้ทำการโคลนและหาลำดับยีน *spa N* ที่ทำหน้าที่ประมวลรหัสเพปไทด์ตั้งต้น (peptide precursor) ของไนซิน จาก *Streptococcus lactis* 11454 (ปัจจุบันเป็น *Lactococcus lactis)* จากการวิเคราะห์หาลำดับเบส พบกรอบอ่านรหัสเปิด (ORF) ในส่วน 3′ ด้านหลัง inverted repeat ของยีนไนซิน ตำแหน่งบริเวณจับเกาะของไรโบโซม (RBS) หาจากตำแหน่งของโคดอนเริ่มต้น (start codon) ร่วมกับข้อมูลจากลำดับคอนเซนซัส (consensus sequence) ของ Shine-Dalgarno ใน *B. subtilis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สร้างแลนติไบโอติก ชนิดซับทิลิน (subtilin) ที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับไนซิน โดยจะเริ่มต้นการถอดรหัสที่ตำแหน่งโคดอนเริ่มต้น ATG ยีน *spa N* เมื่อนำมาวิเคราะห์พบว่าสังเคราะห์ กรดอะมิโนทั้งหมด 57 หมู่ ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่เป็นส่วนนำ (leader region) 23 หมู่ และเป็นส่วนโครงสร้าง (structural region) ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 34 หมู่ จากการศึกษาพบว่าส่วนโครงสร้างประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิด เซรีน ธรีโอนีน และ ซีสเตอีน โดยกรดอะมิโนทั้งสามนี้จะเข้าสู่กระบวนการดัดแปลงหลังการแปลรหัส (posttranslation modification) ซึ่งประกอบด้วย

กระบวนการดึงน้ำออกในกรดอะมิโนเซรีนกับธรีโอนีน และกระบวนการ cross linking ในซีสเตอีนเป็นแลนไธโอนีน ซึ่งสุดท้ายจะได้เป็นไนซินที่สมบูรณ์

จากการทดลองของ Steen และคณะ (1991) ได้ทำการหาลำดับเบสบริเวณกรอบอ่านรหัสเปิดสรุปได้ว่ายีนที่ใช้ในการสังเคราะห์ไนซินเป็น พอลิซิสทรอนิคเอ็มอาร์เอ็นเอ (polycistronic mRNA) เนื่องมาจากมีกรอบอ่านรหัสเปิดที่ยาวซึ่งเป็นไปได้ว่าสังเคราะห์มาจากอาร์เอ็นเอขนาดใหญ่และสังเคราะห์โปรตีนหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไนซิน ลักษณะของพอลิซิสทรอนิคเอ็มอาร์เอ็นเอ แสดงในรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5. ลักษณะของพอลิซิสทรอนิคเอ็มอาร์เอ็นเอ ที่มีกรอบอ่านรหัสเปิดรอบยีนไนซิน ทิศทางการถอดรหัสจากซ้ายไปขวา (Steen และคณะ, 1991)

ในการที่จะสร้างไนซินที่สมบูรณ์จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของยีนหลายยีนด้วยกัน ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบยีนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โดยยีนต่างๆ จะถูกถอดรหัสและเริ่มการแปลรหัสจนถึงเป็นไนซินที่สมบูรณ์ที่มีสมบัติเป็นสารต้านจุลชีพ

กลุ่มยีนไนซิน (Nisin gene cluster).

จากการศึกษาที่ผ่านมาสามารถสรุปได้ว่าในการสังเคราะห์ไนซินนั้นมียีนที่เกี่ยวข้องทั้งหมด 11 ยีน (Ra และคณะ, 1999) ดังนี้

- ยีน *nisA* ทำหน้าที่สังเคราะห์เพปไทด์ไนซินตั้งต้น (nisin precursor peptide) ที่มีกรดอะมิโนทั้งหมด 57 หมู่

- ยีน *nisB* และ *nisC* ทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการดัดแปลงหลังการแปลรหัสของไนซิน

- ยีน *nisT* ทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีนที่เกี่ยวข้องในการขนส่งไนซินผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ออกนอกเซลล์ ซึ่งพบว่ามีความคล้ายคลึงกับ ABC translocater

- ยีน *nisP* ทำหน้าที่สังเคราะห์เอนไซม์ subtilin like proteinase ซึ่งมีสมบัติตัดเพปไทด์สายนำในกระบวนการสร้างไนซินที่สมบูรณ์

- ยีน *nisI* ทำหน้าที่สังเคราะห์ลิโพโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของแบคทีเรียในการป้องกันตัวเองจากฤทธิ์ของไนซิน

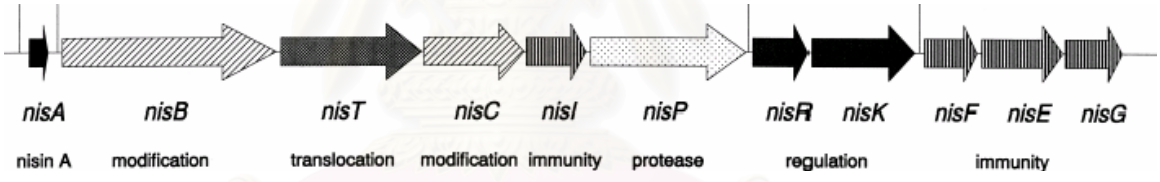
- ยีน *nisFEG* ทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีนที่ใช้ในการขนส่งไนซินออกนอกเซลล์ซึ่งจะทำงานร่วมกับโปรตีน NisI เพื่อป้องกันตัวเองจากฤทธิ์ของไนซิน

- ยีน *nisR* และ *nisK* ทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมตัวเอง

โปรตีน NisR เป็น regulator protein

โปรตีน NisK เป็น activate sensor kinase

ลำดับการเรียงตำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์ไนซินแสดงในรูปที่ 2.7

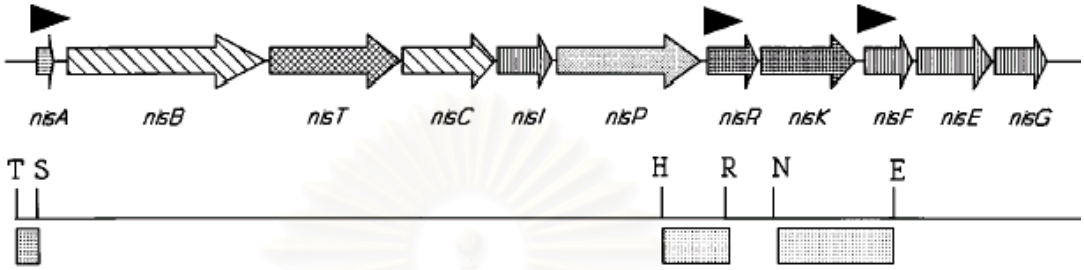


รูปที่ 2.6 ตำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์ไนซิน การควบคุม และระบบภูมิคุ้มกันตัวเองจากไนซิน (Ra และคณะ, 1999)

โปรโมเตอร์ (Promoter)

จากการศึกษาในด้านยีนไนซินช่วงแรกยังไม่มีการระบุตำแหน่งที่แน่ชัดของโปรโมเตอร์โดยทั่วไป โปรโมเตอร์ของแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactococcus* จะมีบริเวณอนุรักษ์ที่ตำแหน่ง –35 เป็น TTGACA และตำแหน่ง -10 เป็น TATAAT และจากการหาลำดับเบสของยีนไนซิน พบว่ามีส่วนที่มีลำดับเบสใกล้เคียง 3 ตำแหน่งคือ หน้ายีน *nisA*, *nisR* และ *nisF* ในปี 1996 de Ruyter และคณะ ได้ทำการศึกษาการทำงานของโปรโมเตอร์ทั้งสามตำแหน่งโดยใช้วิธี primer extension และ

ใช้ยีน *gusA* จาก *E. coli* เพื่อช่วยในการตรวจสอบตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีนไนซินแสดงในรูปที่ 2.7



รูปที่2.7 ตำแหน่งของโปรโมเตอร์แสดงด้วยสัญลักษณ์ ▶และส่วนที่เติม *gusA* ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดเฉพาะต่าง ๆ: T,*Tth*I; S,*Sst*I; H,*Hin*dIII; R,*Eco*RV; N,*Nde*I; E,*Eco*RI (De Ruyter และคณะ,1996)

ซึ่งพบว่าโปรโมเตอร์ทั้งสามให้ผลการแสดงออกของยีน *gusA* ดังนั้นจึงสามารถยืนยันการทำงานของโปรโมเตอร์ทั้งสามว่าสามารถทำงานได้จริง และจากการหาลำดับเบสของโปรโมเตอร์ทั้งสามชนิดพบว่าโปรโมเตอร์ *nisA* และ *nisF* มีลำดับเบสที่ตำแหน่ง -35 คล้ายคลึงกันและมีโคดอนเริ่มต้นเหมือนกันคือ ATG สำหรับโปรโมเตอร์ *nisR* มี TATAAT box ลำดับเบสที่ตำแหน่ง -35 ไม่ชัดเจน และมีโคดอนเริ่มต้นเป็น GTG โดยสรุปแล้วลำดับเบสของโปรโมเตอร์ *nisR* ไม่มีความคล้ายคลึงกับโปรโมเตอร์ *nisA* และ *nisF* นอกจากนั้นเมื่อศึกษาถึงสมบัติในด้านการกระตุ้นโปรโมเตอร์ของทั้ง *nisA* และ *nisF* ซึ่งจะถูกกระตุ้นด้วยการเติมไนซินเหมือนกัน และเมื่อเพิ่มปริมาณไนซินที่เติมลงไปจะมีผลต่อการเพิ่มการทำงานของยีน *nisA* และ *nisF* ซึ่งแตกต่างกับโปรโมเตอร์ *nisR* ที่การทำงานไม่ขึ้นกับการกระตุ้นจากไนซินที่เติมลงไป

Koponen และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษาถึงหน้าที่ที่สำคัญของโปรตีน NisB และ NisC ในกระบวนการดัดแปลงหลังการแปลรหัสของไนซิน โดยในกระบวนการดัดแปลงหลังการแปลรหัสประกอบด้วยสองส่วนที่สำคัญ คือ กระบวนการดึงน้ำออกในกรดอะมิโนเซรีน และธรีโอนีน และกระบวนการสร้างแลนไธโอนีน โดยในการทดลองทำการเติมกรดอะมิโนฮีสติดีนที่ส่วนปลายของยีนไนซิน ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้เพื่อช่วยในการทำไนซินให้บริสุทธิ์ ซึ่งในการต่อปลายด้วยฮิสติดีนนั้นไม่มีผลกระทบต่อการสังเคราะห์ไนซิน สายพันธุ์กลายที่ขาดยีน *nisB* และ *nisC* จะไม่สร้างโปรตีน NisB และ NisC ตามลำดับ ทำให้กระบวนการขนส่งไนซินออกนอกเซลล์ต่ำลงและสามารถตรวจสอบกระบวนการการดึงน้ำออกได้จากการวิเคราะห์ด้วยแมสสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

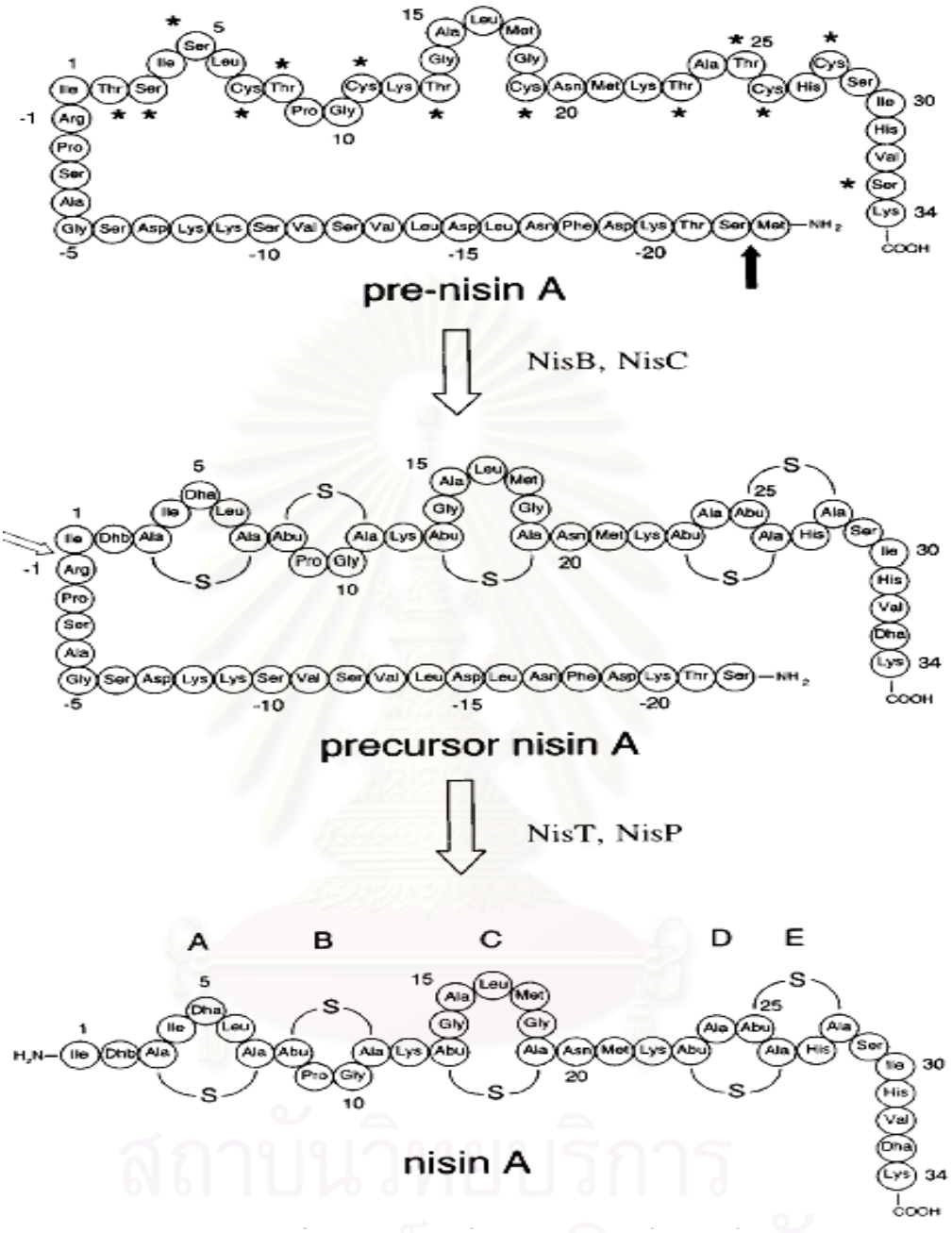
(MS) โดยในกระบวนการดึงน้ำออกนั้นมวลของไนซินตั้งต้นจะลดลงประมาณ 18 ดัลตัน จากการทดลองในสายพันธุ์ที่ขาด *nisB* แต่มี *nisC* จะให้ผลน้ำหนักมีค่าหนักมากกว่าในสายพันธุ์ที่ขาด *nisC* แต่มี *nisB* แสดงว่า *nisB* มีความสำคัญในกระบวนการดึงน้ำออกของเซรีน และธรีโอนีน ดังนั้นเมื่อขาด *nisB* ทำให้ไม่มีกระบวนการดึงน้ำออก จึงทำให้มีน้ำหนักเพิ่มขึ้น แต่วิธี MS ไม่สามารถวิเคราะห์ว่ามีการสร้างแลนไธโอนีนได้ จากข้อเท็จจริงที่ว่าถ้ามีการสังเคราะห์แลนไธโอนีนเมื่อส่วนเพปไทด์สายนำถูกตัดแล้วก็จะได้ไนซินที่สมบูรณ์ทำหน้าที่เป็นสารต้านจุลชีพได้ แต่เมื่อทำการทดลองหาการทำงานของไนซินในสายพันธุ์ที่ขาด *nisC* แต่มี *nisB* ไม่พบการทำงานของไนซินจึงคาดว่ายีน *nisC* จะสร้างโปรตีน Nis C ที่เกี่ยวข้องในการสร้างแลนไธโอนีนในกระบวนการสังเคราะห์ไนซิน

จากการที่ไนซินมีสมบัติเป็นสารต้านจุลชีพซึ่งมีฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียอื่น ๆ แต่ไม่มีผลต่อตัวเอง ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจสำหรับแบคทีเรียที่สร้างไนซินน่าจะต้องมีกลไกบางอย่างที่ควบคุมและป้องกันตัวเองจากฤทธิ์ของไนซินที่ตัวเองสร้าง จึงได้มีการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับระบบป้องกันตัวเอง โดยประกอบด้วยหลายยีนเป็นกลุ่มยีนอิมมูนิตี (immunity genes) จากการศึกษาของ Stein และคณะ (2002) ได้อธิบายถึงกลไกการทำลายแบคทีเรียของไนซินประกอบด้วย 4 ขั้นตอน คือเริ่มจากการจับของ ไนซินที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ขั้นที่สองไนซินจะแทรกเข้าไปในชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์ ขั้นที่สามเป็นกระบวนการที่ทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ และสุดท้ายรูที่เยื่อหุ้มเซลล์จะขยายออกใหญ่ขึ้นจนทำให้เซลล์สูญเสียสมดุลและตายในที่สุด กลุ่มยีนอิมมูนิตีซึ่งประกอบด้วยยีน *nisI*, *nisF*, *nisE* และ *nisG* จะป้องกันตัวเองจากกลไกเหล่านี้ จากการทดลองโคลนยีนทั้งสี่เข้าใน *B. subtilis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไวต่อไนซินควบคุมการแสดงออกของกลุ่มยีนอิมมูนิตีด้วยโปรโมเตอร์ชนิดเหนี่ยวนำ (inducible promoter) พบว่าในสายพันธุ์ที่โคลนยีนทั้งหมดสี่ชนิดมีระดับการทนทานต่อไนซินสูงสุดนอกจากนั้นกลุ่มยีนอิมมูนิตีจะมีความจำเพาะต่อไนซิน จากการทดลองบ่มไนซินกับโปรตีน NisI จะทำให้เกิดการจับกันระหว่างไนซินกับโปรตีน NisI เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน และปริมาณของไนซินอิสระจะลดลง แต่ไม่เกิดผลเช่นนี้เมื่อบ่มโปรตีน NisI กับซับทิลินซึ่งเป็นแลนติไบโอติกที่ใกล้เคียงกับไนซิน NisI เป็นลิโพโปรตีนมีขนาด 25.8 กิโลดัลตัน จะถูกส่งออกนอกเยื่อหุ้มเซลล์โดยจะทำหน้าที่ตัดสายไนซินบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อป้องกันไนซินเข้าสู่เซลล์ และไม่ให้ไนซินเพิ่มจำนวนมากขึ้น และโปรตีน NisFEG จะทำหน้าที่ส่งไนซินออกนอกเซลล์ซึ่งจะช่วยลดปริมาณของไนซินที่จะเข้าภายในเซลล์ การทำงานร่วมกันของยีน *nisIFEG* จะช่วยป้องกันตัวเองจากฤทธิ์ของไนซิน

กระบวนการสังเคราะห์ไนซิน

จากการศึกษาเรื่องหน้าที่ต่าง ๆ ของยีนที่เกี่ยวข้องในการสร้างไนซินที่สมบูรณ์ จึงทำให้สามารถทราบกลไกในการสังเคราะห์ไนซิน กระบวนการสังเคราะห์ไนซิน แสดงในรูปที่ 2.8 โดยเริ่มจากยีน *nisA* ถอดรหัสได้ออกมาเป็นสายอาร์เอ็นเอนำรหัส (mRNA) และแปลรหัสเป็นไนซินตั้งต้น จากนั้นไนซินตั้งต้นจะถูกดัดแปลงให้เป็นไนซินที่สมบูรณ์โดยมีโปรตีน NisB จะจับกับ NisC เป็นสารประกอบเชิงซ้อน และ NisC อย่างน้อยสองโมเลกุลจะจับกับ NisT ที่มีสมบัติเป็น ABC transporter อย่างน้อยสองโมเลกุลเช่นกันโดยเกิดขึ้นที่ส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ การดัดแปลงไนซินให้สมบูรณ์จะสิ้นสุดเมื่อโปรตีน NisT นำไนซินตั้งต้นออกนอกเซลล์ จากนั้นโปรตีน NisP จะทำหน้าที่ตัดส่วนเพปไทด์สายนำ และจะได้ไนซินที่สมบูรณ์ที่พร้อมจะทำงานออกมาภายนอกเซลล์ NisI และ NisFEG ทำหน้าที่ป้องกันเซลล์จากการทำลายของไนซิน (Siegers และคณะ, 1996)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.8 แสดงโครงสร้างและกระบวนการสังเคราะห์ไนซินเอ เครื่องหมาย * แสดงตำแหน่งที่ถูกดัดแปลง ลูกศรดำแสดงตำแหน่งเมธิโอนีน ลูกศรเล็กขาวแสดงตำแหน่งเพปไทด์สายนำที่ถูกตัดด้วยโปรตีน NisP (Kuipers และคณะ, 1995)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กลไกการควบคุมตัวเองของไนซิน (nisin autoregulation)

กระบวนการควบคุมตัวเองในการถอดรหัสของยีนไนซินควบคุมผ่านทาง signal transduction *L. lactis* จะถูกกระตุ้นให้สร้างไนซินเมื่อมีการเติมไนซิน ไนซินที่ถูกดัดแปลง (nisin mutant) หรือสารที่มีโครงสร้างคล้ายไนซิน (nisin analogs) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Kuipers et al., 1995)

จากการทดลองของ Kuipers และคณะ (1995) โดยทำการตัด 4 คู่เบส ในยีน *nisA* ออก พบว่าทำให้ไม่สามารถเกิดการแปลรหัสเป็นโปรตีน NisA ได้ แต่เมื่อมีการเติมไนซินเอ ภายนอกลงไปจะทำให้สามารถกลับมาเกิดกระบวนการแปลรหัสได้อีกครั้งและปริมาณไนซินเอ ที่เพิ่มมากขึ้นจะส่งผลให้มีการแปลรหัสเพิ่มขึ้นด้วย นอกจากไนซินเอ แล้วเพปไทด์อื่น ๆ เช่น ไนซิน แซด และไนซินที่ถูกดัดแปลงก็สามารถกระตุ้นการแปลรหัสของไนซินได้อีกด้วย เมื่อทำการยับยั้งยีน *nisK* ด้วยการแทรกด้วยยีนต้านทานอีริโธรมัยซิน และทำการกระตุ้นด้วยไนซินเอ เช่นเดิมพบว่าไม่มีการถอดรหัสของยีน *nisA* ซึ่งสรุปได้ว่ายีน *nisK* มีความสำคัญในกระบวนการ signal transduction โดยยีน *nisK* จะสังเคราะห์โปรตีน NisK ซึ่งทำหน้าที่ส่งสัญญาณเมื่อพบไนซินภายนอกเซลล์ ดังนั้นสารต้านจุลชีพชนิดเพปไทด์ในธรรมชาตินอกจากจะทำหน้าที่ยับยั้งหรือทำลายแบคทีเรียอื่นแล้ว ยังสามารถทำหน้าที่เป็นสัญญาณสำหรับกระตุ้นการทำงานให้กับยีนของตัวเองหรือยีนที่สร้างสารต้านจุลชีพชนิดอื่น ๆ ได้อีกด้วย

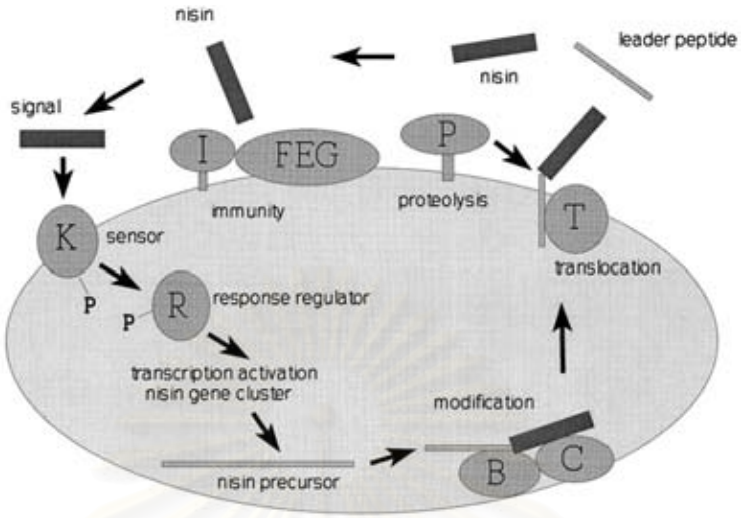
ในกระบวนการควบคุมตัวเองของยีนไนซินโดยกระบวนการ signal transduction มีประโยชน์ต่อตัวเชื้อคือ

1. ช่วยป้องกันการสูญเสียพลังงานโดยควบคุมการทำงานของยีนไนซินทั้งหมดให้สามารถทำงานได้สมบูรณ์ในภาวะที่มีบางยีนผิดปกติโดยการกระตุ้นด้วยไนซินภายนอก ซึ่งจะทำให้กระบวนการสังเคราะห์ไนซินกลับมาเป็นปกติ

2. ช่วยเพิ่มฤทธิ์ในการทำลายแบคทีเรียให้สูงขึ้นโดยกระตุ้นให้แบคทีเรียอื่นสร้างไนซินหรือสารต้านจุลชีพเพิ่มขึ้น

3. เพิ่มระดับภูมิคุ้มกันตัวเองให้ทนต่อไนซินที่สร้างจากแบคทีเรียอื่นสูงขึ้น

กระบวนการกระตุ้นตัวเองด้วย signal transduction จะเริ่มจากโปรตีน NisK ส่งสัญญาณเมื่อพบไนซินภายนอกและจะเติมหมู่ฟอสเฟตในส่วนฮิสติดีนให้กับตัวเอง จากนั้นหมู่ฟอสเฟตจะถูกส่งไปยังโปรตีน NisR ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นกระบวนการถอดรหัส (transcriptional activator) และเริ่มกระบวนการถอดรหัสตามปกติ (Kuipers et al., 1995) กลไกการกระตุ้นตัวเองด้วย signal transduction แสดงในรูป 2.9



รูปที่ 2.9 แสดงแบบจำลองกระบวนการการกระตุ้นตัวเองด้วย signal transduction และการสังเคราะห์ไนซิน (Kuipers และคณะ, 1995)

อย่างไรก็ตามการสร้างไนซินสามารถถูกยับยั้งภายใต้บางภาวะ Li และ Sullivan (2003) ได้ศึกษาและพบว่าการสร้างไนซินถูกยับยั้งภายใต้ภาวะดังต่อไปนี้คือ เมื่อ *L. lactis* เจริญสูงสุดที่ 40°ซ หรือภาวะที่มีการถ่ายทอดยีนไนซินไปสู่สายพันธุ์อื่น หรือภาวะที่มีการทำอิเล็กโทรพอเรชันใน *L. lactis* ที่สร้างไนซิน โดยทั้งภาวะทั้งสามนี้ทำให้ยีน *nisA* ไม่มีการแสดงออกซึ่งตรวจสอบโดยการทำ northern blot และ RT PCR แต่กลุ่มยีนอิมมูนิตียังมีการแสดงออก ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการที่ไนซินถูกยับยั้งน่าจะมาจากกระบวนการ signal transduction ถูกยับยั้ง

การถ่ายทอดยีนไนซินระหว่างสายพันธุ์ใน *Lactococcus lactis*

จากการศึกษาของ Buchman ในปี 1988 พบส่วน IS 904 insertion element ที่อยู่ข้างหน้าก่อนยีนประมวลรหัสไนซินตั้งต้น และจากการรายงานเกียวกับ *L. lactis* ที่พบว่าบางสายพันธุ์มียีนประมวลรหัสไนซินอยู่บนพลาสมิดที่มีขนาดใหญ่ จากข้อมูลเหล่านี้ สันนิษฐานว่าเป็นลักษณะสำคัญที่ทำให้เกิดการถ่ายทอดยีนไนซินไปสู่สายพันธุ์อื่น ๆ (Hensen, 1993)

Li และ Sullivan (2002) ได้ทำการคอนจูเกต Tn 5307 ซึ่งเป็นส่วนทรานสโพซอนของ *L. lactis* เข้าสู่ใน *Enterococcus* sp. เพื่อให้สามารถสร้างไนซินในสายพันธุ์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมการหมักอาหารได้ *Enterococcus* sp. ที่ถูกคอนจูเกตจะมียีน *nisA* และกลุ่มยีนไนซิน

อิมมูนิตี ซึ่งคาดว่าจะผลิตไนซินที่สมบูรณ์ได้ แต่จากผลการทดลองทำ slot blot northern hybridization โดยใช้ดีเอ็นเอติดตาม *nis*A พบว่าไม่มีการถอดรหัสของยีน *nisA* ส่งผลให้ไม่มีการสร้างไนซินแต่เมื่อทำการเติมไนซินภายนอกลงไปเพื่อเป็นตัวกระตุ้นพบว่าทำให้ยีน *nisA* สามารถถอดรหัสและสร้างไนซินได้ ดังนั้นในการตัดต่อยีนไนซินไปสู่สายพันธุ์อื่นสิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึงคือการกระตุ้นการทำงานของยีนด้วยไนซินภายนอก

Yukel และ Hensen (2007) ทำการสอดแทรกกลุ่มยีนไนซินเข้าในโครโมโซมของ *B. subtilis* สายพันธุ์168 โดยเวกเตอร์ที่ใช้ในการสอดแทรก คือ PLPV Cat Shuttle Vector จากการทดลองพบกระบวนการถอดรหัสของยีนไนซิน และพบฤทธิ์ในการยับยั้งจากส่วนใสของน้ำเลี้ยงแบคทีเรียที่แยกได้จาก *B. subtilis* ที่มีการสอดแทรกของยีนไนซิน แต่เมื่อทำการวิเคราะห์หามวลโมเลกุลไม่พบสารต้านจุลชีพที่มีขนาดเท่ากับไนซิน (3,363 ดัลตัน) จากรายงานสรุปได้ว่าเหตุผลที่ทำให้ไม่ได้ไนซินที่สมบูรณ์แต่ยังมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ นั้นเกิดจากกระบวนการตัดเพปไทด์ตั้งต้นที่โปรตีเอส ไม่สามารถทำงานได้

สำหรับงานวิจัยนี้ได้มุ่งเน้นที่จะคัดกรองแบคทีเรียที่สร้างไนซิน และยืนยันยีนที่ประมวลรหัสไนซิน โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในการทดสอบ จากความรู้เกี่ยวกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไนซินทำให้สามารถนำข้อมูลทางพันธุกรรมมาใช้เป็นฐานข้อมูลเบื้องต้นในการปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อผลิตไนซินได้เพิ่มขึ้นในระดับต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น MLS3020 ของบริษัท SANYO, Japan.
2. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น D06063 ของบริษัท Memmert, Germany.
3. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิพร้อมเครื่องเขย่า (waterbath shaker) ของบริษัท Memmert, Germany.
4. เครื่องชั่ง รุ่น PG2002-S และ AG285 ของบริษัท METTLER TOLEDO, Switzerland.
5. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries, USA.
6. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น D06061 ของบริษัท Memmert, Germany.
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น SORVALL® Biofuge pico ของบริษัท Kendro laboratory products, Germany.
8. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920 ของบริษัท Kubota, Japan.
    - หัวปั่นเหวี่ยง (rotor) ขนาดเล็ก รุ่น RA50J
    - หัวปั่นเหวี่ยง (rotor) ขนาดใหญ่ รุ่น RA228J
9. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น 6500 ของบริษัท Kubota, Japan.
    - หัวปั่นเหวี่ยง (rotor) ขนาดกลาง รุ่น AG-506R
    - หัวปั่นเหวี่ยง (rotor) ขนาดใหญ่ รุ่น AG-2506
10. ตู้เขี่ยเชื้อรุ่น Clean model. V4 ของบริษัท LAB Service, Thailand.
11. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Lamda 25 ของบริษัท Perkin Elmer, USA.
12. เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH meter) รุ่น 240 ของบริษัท Corning, USA.
13. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -70°ซ รุ่น ULT1786 ของบริษัท Forma Scientific, USA.

14. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20°ซ รุ่น MDF-U332 ของบริษัท Sanyo Electric, Japan.
15. ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส (agarose gel electrophoresis)
10. Mini gel electrophoresis system ของบริษัท Mupid-2 Advance, Japan.
11. Mini Sub-Cell GT agarose gel electrophoresis systems ของบริษัท Bio-Rad, USA.
16. ไมโครปิเปตต์ (micropipette) รุ่น P10 P20 P200 P1000 ของบริษัท Gilson, France.
17. เครื่องควบคุมอุณหภูมิและระเหยแห้งแบบให้ความร้อน (thermo-block) รุ่น Mylab™ Thermo-Block SLTDB-120 ของบริษัท SeouLin Bioscience, Korea.
18. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตต ขนาดความกว้างรู 0.45 ไมโครเมตร รุ่น DISMIC-25SC ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan.
19. กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 1 มิลลิลิตร และ 5 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro, Japan.
20. หลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง (cryotube) ของบริษัท Nalgene, USA.
21. กระดาษกรอง (filter paper) ของบริษัท Advantec, Japan.
22. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) รุ่น 2400 ของบริษัท Perkin Elmer, USA.
23. เครื่อง UV-light Transilluminator Model, USA.
24. อุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ
12. Gel Documentation และโปรแกรม Quantity One เวอร์ชั่น 4.4.1 ของบริษัท Bio-Rad, USA.

3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ

1. ทริปโตน (tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
2. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
3. พอลิเพปโตน (polypeptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
4. อะกาโรสเจล (agarose gel) ของบริษัท IUAI, Japan.
5. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Merck, Germany.
6. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany.

7. โซเดียมอะซีเตต (CH_3COONa) ของบริษัท APS Chemicals, Australia.
8. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตโดเดคะไฮเดรต ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) ของบริษัท Carlo ERBA, France.
9. ไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ของบริษัท J.T. Baker, USA.
10. แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) ของบริษัท J.T. Baker, USA.
11. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) ของบริษัท Carlo ERBA, France.
12. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮป
13. ทะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) ของบริษัท Merck, Germany.
14. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท BDH Chemical, AUS.
15. กรดอะซีติกเข้มข้น (glacial CH_3COOH) ของบริษัท Merck, Germany.
16. กลีเซอรอล (glycerol) ของบริษัท Carlo ERBA, France.
17. ฟีนอล (phenol) ของบริษัท Merck, Germany.
18. คลอโรฟอร์ม (chloroform, CH_3Cl) ของบริษัท Merck, Germany.
19. น้ำตาลซูโครส (sucrose) ของบริษัท Merck, Germany.
20. น้ำตาลกลูโคส (glucose) ของบริษัท Merck, Germany.
21. สีบรอมฟีนอลบลู (bromphenol blue) ของบริษัท Fluka, Germany.
22. สีบรอมครีซอลเพอร์เพิล (bromocresol purple) ของบริษัท Fluka, Germany.
23. ไลโซไซม์ (lysozyme) ของบริษัท Sigma, USA.
24. Trizma base (tris [hydroxymethyl] aminomethane, $C_4H_{11}NO_3$) ของบริษัท Sigma, USA.
25. EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid, $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2.2H_2O$) ของบริษัท Sigma, USA.
26. SDS (sodium dodecyl sulfate, $C_{12}H_{25}OSO_3$) ของบริษัท Nacalai tesque, Japan.
27. CTAB (cetyltrimethylammonium bromide, $(C_{16}H_{32}N(CH_3)_3)Br$) ของบริษัท TCK-EP, Japan.
28. 1 kb DNA ladder ของบริษัท Promega, USA.
29. 100 bp DNA ladder ของบริษัท Fermantas, USA.
30. Proteinase K ของบริษัท Promega, USA.
31. สารปฏิชีวนะ แอมพิซิลลิน (ampicillin) ของบริษัท Nacalai tesque, Japan.

32. เรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI, *Eco*RI, *Hin*dIII, *Pst*I, ของบริษัท Fermantas, USA.
33. KOD DNA polymerase ของบริษัท TOYOBO, Japan.
34. dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ของบริษัท TOYOBO, Japan.
35. ไลเกส (ligase) ของบริษัท Fermantas, USA.
36. แอลคาไลน์ฟอสฟาเทส (alkaline phosphatase) ของบริษัท Promega, USA.
37. Ribonuclease A (Rnase A) ของบริษัท Promega, USA.
38. X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) ของบริษัท Fermantas, USA.
39. IPTG (Isopropyl thio-β-D-galactoside) ของบริษัท Wako, Japan.
40. ชุดสกัดพลาสมิด QIAprep Spin Miniprep Kit ของบริษัท Qiagen, Germany.
41. ชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล DNA Extraction Kit ของบริษัท Fermentas, USA.
42. ชุดติดฉลากและติดตามตำแหน่งดีเอ็นเอ DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I ของบริษัท Roche, Germany.

<u>หมายเหตุ</u> สารเคมีที่ใช้ในการทดลองทุกชนิดเป็นชนิดเพื่อการวิเคราะห์ (analytical grade)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 แบคทีเรีย

แบคทีเรียและพลาสมิดที่ใช้ในงานวิจัยนี้ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 จีโนไทป์/ฟีโนไทป์ ของสายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยนี้

แบคทีเรีย	จีโนไทป์/ฟีโนไทป์	เอกสารอ้างอิง
Escherichia coli สายพันธุ์ DH5α	ϕ80d*lacZ*ΔM15, *end*A1, *rec*A1,*gyr*A96, *thi*-1,*hsd*R17, *rel*A1, *supE*44, *deo*R, Δ(*lacZ*YA-*arg*F) U169	Hanahan, 1983
Lactobacillus plantarum TISTR 850	แบคทีเรียทดสอบที่ไวต่อไนซิน	Noonpakdee, 2003
Pediococcus pentosaceus TISTR 374	แบคทีเรียทดสอบที่ไวต่อไนซิน	Noonpakdee, 2003
Propionibacterium freundenreichii TISTR 446	แบคทีเรียทดสอบที่ไวต่อไนซิน	Noonpakdee, 2003

3.4 พลาสมิดและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์

พลาสมิดและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3.2 และ 3.3 ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.2 พลาสมิด

พลาสมิด	จีโนไทป์/ฟีโนไทป์	เอกสารอ้างอิง
pGEM-3Zf(+)	Ap^r, αlab/MCS	บริษัท Promega, USA
pUC18	Ap^r, αlab/MCS	บริษัท Promega, USA

ตารางที่ 3.3 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (T_m)	เอกสารอ้างอิง
NOKF	5'-CGAGCATAATAAACGGC-3' (61°ซ)	De Vos และคณะ (1993)
NOKR	5'-GGATAGTATCCATGTCTGAAC-3' (66°ซ)	De Vos และคณะ (1993)
M13 Forward	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3' (52°ซ)	บริษัท Promega, USA
UFUL	5'-GCCTAACACATGCAAGTCGA-3' (52°ซ)	Nilsson และคณะ (2003)
URUL	5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGG-3' (58°ซ)	Nilsson และคณะ (2003)

3.5 การเลี้ยงและเก็บรักษาแบคทีเรีย

3.5.1 เลี้ยง *Escherichia coli* ทุกสายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB (ภาคผนวก ก1) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 16-18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°ซ กรณีที่ต้องเติมสารปฏิชีวนะ (ภาคผนวก ข2) ใช้แอมพิซิลลิน (Am) ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทำเป็นอาหารแข็งเติมวุ้น 1.5% บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 16-18 ชั่วโมง

3.5.2 ลี้ยงแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ทดสอบและสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS (ภาคผนวก ก4) เพาะเลี้ยงใน candle jar นาน 16-18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30°ซ

หมายเหตุ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 374 บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ

3.5.3 เก็บรักษาแบคทีเรียโดยเลี้ยง *E. coli* ทุกสายพันธุ์ และแบคทีเรียแลคติกทุกสายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวตามข้อ 3.5.1 - 3.5.2 นำมาผสมกับกลีเซอรอล (ภาคผนวก ข1) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของกลีเซอรอลเท่ากับ 20% (v/v) บรรจุลงในหลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง เก็บที่อุณหภูมิ -20^{o}ซ เป็นเวลา 6 เดือน หรือที่อุณหภูมิ –70^{o}ซ เป็นเวลา 1 ปี

3.6 แยกและคัดกรองแบคทีเรียที่สังเคราะห์ไนซิน

3.6.1 แยกเชื้อจากตัวอย่างแหนมและน้ำนมดิบ

นำตัวอย่างแหนมและน้ำนมดิบมาคัดแยกแบคทีเรียให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์โดยนำตัวอย่างมาทำการทดลองดังนี้

ตัวอย่างแหนม: เก็บตัวอย่างแหนมจากตลาดสดแหล่งต่าง ๆ ในกรุงเทพมหานคร และปริมณฑล จากนั้นนำตัวอย่างแหนม 25 กรัม ใส่ใน stomacher bag แล้วเทสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ลงไป 225 มิลลิลิตร ตีป่น 1 นาที (ค่าการเจือจางเท่ากับ 10^{-1}) ทำการเจือจางจนได้ค่าการเจือจางเท่ากับ 10^{-5} นำตัวอย่างที่ค่าการเจือจาง 10^{-2}-10^{-5} มาแยกเชื้อโดยวิธีเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่มีบรอมครีซอลเพอร์เพิล 0.004 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นอินดิเคเตอร์ นำไปบ่มภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตัวอย่างน้ำนมดิบ: เก็บตัวอย่างน้ำนมดิบจากฟาร์มโคนมในจังหวัดต่าง ๆ ได้แก่ นครราชสีมา, ปทุมธานี, ราชบุรี และสมุทรสาคร จากนั้นใช้ปิเปตต์ดูดน้ำนมตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ที่มีน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 90 มิลลิลิตร (ค่าการเจือจางเท่ากับ 10^{-1}) ทำการเจือจางจนได้ค่าการเจือจางเท่ากับ 10^{-5} ต่อจากนั้นจึงทำตามขั้นตอนเช่นเดียวกับตัวอย่างแหนม คัดเลือกโคโลนีสีเหลืองนำมาขีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS จนได้โคโลนีเดี่ยว

3.6.2 คัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ

นำแบคทีเรียที่ได้จากข้อ 3.6.1 มาทดสอบการสังเคราะห์ไนซินโดยใช้แบคทีเรียทดสอบโดยนำมาจุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS นำไปบ่มใน candle jar ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเททับด้วยเชื้อทดสอบที่เตรียมโดยนำเชื้อทดสอบแต่ละชนิดมาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปรับความขุ่นของเชื้อให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความ

ยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.5 จากนั้นนำเชื้อทดสอบ 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับอาหาร MRS กึ่งเหลวที่มีความเข้มข้นของวุ้น 0.7 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) 20 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^6 CFU/มิลลิลิตร หลังจากนั้นบ่มเชื้อทดสอบเป็นเวลา 16 – 18 ชั่วโมง แล้วจึงเลือกโคโลนีที่เกิดวงใสมาทดสอบขั้นที่สองโดยแยกมาเลี้ยงในอาหารเหลว บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 12°ซ เป็นเวลา 15 นาที ส่วนใสที่ได้นำมาปรับค่าความเป็นกรด-เบสให้ได้ 5.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 โมลาร์ กรองสารละลายผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร เก็บสารละลายที่ 4°ซ (Ohmomo และคณะ, 2003)

3.6.3 เตรียมเชื้อทดสอบ

นำเชื้อทดสอบแต่ละชนิดมาเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปรับความขุ่นของเชื้อให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.5 จากนั้นนำเชื้อทดสอบ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วเททับด้วยอาหารกึ่งเหลวรอจนอาหารแข็ง ใช้คอร์กบอเรอร์เจาะลงบนวุ้นจำนวน 4 หลุมต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยให้แต่ละหลุมห่างกันพอสมควร หยดส่วนใสที่ได้จากข้อ 3.6.2 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมนำไปบ่มที่ 37°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สารละลายที่ให้บริเวณใสรอบหลุมคาดว่าสามารถสร้างไนซิน เก็บตัวอย่างแบคทีเรียเพื่อนำไปทดสอบขั้นต่อไป

3.7 ยืนยันการสร้างไนซิน

3.7.1 เตรียมดีเอ็นเอต้นแบบโดยใช้จีโนมิกดีเอ็นเอ

ทำการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียจากข้อ 3.6.3 ดัดแปลงตามวิธีของ วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด (2536) โดยเขี่ยเชื้อโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในหลอดเซนทริฟิวจ์ของบริษัท Nalgene, USA นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ที่ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข15) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีไลโซไซม์ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 37°ซ นาน 1 ชั่วโมง เติม SDS 10% (ภาคผนวก ข5) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5% กลิ้งหลอดเบา ๆ เพื่อผสมสารละลายให้เข้ากัน

เซลล์จะแตกโดยสังเกตได้จากความใสของผสมในหลอด แล้วจึงเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 5 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมา เติมสารละลาย CTAB/NaCl (ภาคผนวก ข12) ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65°ซ เป็นเวลา 10 นาที สกัดโปรตีนออกโดยเติมสารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข18) ปริมาณเท่าตัว ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดไปมาหลาย ๆ ครั้ง และปั่นในหลอดเซนทริฟิวจ์ที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อแยกชั้นแอลเควียสและฟีนอลดูดส่วนใสชั้นบนที่มีดีเอ็นเอละลายอยู่มาสกัดซ้ำด้วยฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ จนกว่าจะไม่เห็นตะกอนขาวระหว่างชั้นฟีนอล (ชั้นล่าง) กับชั้นบัฟเฟอร์ (ชั้นบน) จากนั้นเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ในปริมาณเท่าตัวผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือตะกอนและชั้นคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ใหม่ แล้วเติมสารละลายโซเดียมอะซีเตต 3 โมลาร์ ปริมาตร 0.1 เท่าของสารละลาย และตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยการเติมเอทานอล 95% 2 เท่าโดยปริมาตร เก็บที่ -20°ซ นาน 30 นาที ปั่นเก็บดีเอ็นเอที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70% ทำให้แห้งและละลายด้วยบัฟเฟอร์ TE 50 ไมโครลิตร และเติม RNase A เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข24) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอ บ่มที่ 37°ซ นาน 30 นาที เก็บรักษาดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 4°ซ

3.7.2 วิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

นำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร คำนวณค่า A_{260} ต่อ A_{280} ค่าที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วง 1.8-2.0

คำนวณหาค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากสมการ

ดีเอ็นเอสายคู่ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = A_{260} x 50 x dilution factor

เมื่อกำหนดให้ ดีเอ็นเอ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรเท่ากับ 1.0 (Ausubel และคณะ, 1999)

3.7.3 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้จีโนมิกดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากข้อ 3.7.1 เป็นต้นแบบในปฏิกิริยาโดยใช้ไพรเมอร์ NOKF และ NOKR ที่อนุพันธ์มาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ไนซิน โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยาแสดงดังต่อไปนี้

ส่วนประกอบ	**ความเข้มข้น**	**ปริมาตร (ไมโครลิตร)**	**ความเข้มข้นสุดท้าย**
$MgCl_2$	25mM	2	1μM
KOD DNA polymerase buffer	10X	5	1X
ไพรเมอร์ NOKF และ NOKR	20μM	10	0.2 μM (ของแต่ละชนิด)
dNTP	2mM (ของแต่ละตัว)	5	200 μM (ของแต่ละตัว)
KOD DNA polymerase	2.5 units/μl	1	2.5 U
ดีเอ็นเอแม่แบบ		1	100-1,000 ng
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ		16	
ปริมาตรสุทธิ		50 μl	

และดำเนินภาวะการทำปฏิกิริยาดังต่อไปนี้

hot start	ที่อุณหภูมิ	98°ซ	1 นาที	
denaturation	ที่อุณหภูมิ	98°ซ	15 วินาที	25 รอบ
annealing	ที่อุณหภูมิ	60°ซ	2 วินาที	
extension	ที่อุณหภูมิ	74°ซ	30 วินาที	
final extension	ที่อุณหภูมิ	74°ซ	5 นาที	

ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) (Perkin Elmer, USA) ตามภาวะการทำปฏิกิริยาที่กำหนดไว้ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยทำอะกาโรสเจลอีเล็กโทรโฟเรซิสโดยใช้ 2% อะกาโรสเจล จากนั้นย้อมอะกา

โรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 5-10 นาที ล้างเอธิเดียมโบรไมด์ที่เกินออกในน้ำกลั่นปลอดประจุ เป็นเวลา 15-20 นาที แล้วตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร

3.8 การจำแนกสกุลของแบคทีเรียที่สามารถผลิตไนซินทางอนุกรมวิธานและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 เอสไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอ

นำแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตไนซินที่ได้จากข้อ 3.7 มาศึกษาลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics) การทดสอบลักษณะทางสรีรวิทยาและทางชีวเคมี (Physiological and biochemical characteristics) อ้างอิงตาม Bergey 's Manual of Systemic Bacteriology และการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 เอสไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอ

3.8.1 การศึกษาลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยา

- ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง (Cultural characteristic) ศึกษาลักษณะและสีของโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง MRS เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- ศึกษาการย้อมสีแกรมดูการติดสี รูปร่าง ขนาด และการจัดเรียงตัวของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.8.2 การทดสอบลักษณะทางสรีรวิทยาและสมบัติทางชีวเคมี

- ความสามารถในการเคลื่อนที่
- ความสามารถในการสร้างเอนไซม์แคทาเลส
- ความสามารถในการหมักคาร์โบไฮเดรตบางชนิดโดยใช้น้ำตาลทดสอบ 4 ชนิด ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส, แมนนิทอล, แรฟฟิโนส และแลคโทส
- ความสามารถในการใช้กรดอะมิโนอาร์จินีน

3.8.3 การทดสอบการเจริญในภาวะต่าง ๆ

- การเจริญในอุณหภูมิต่าง ๆ ได้แก่ ที่ 40°ซ และ 45°ซ
- การเจริญในอาหารที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 4% และ 6.5%

3.8.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 เอสไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอ

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 เอสไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอ ทำได้โดยนำสารละลายดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่สามารถผลิตไนซินส่งไปวิเคราะห์ที่โครงการการให้บริการหา

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ สังกัดภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยใช้ไพรเมอร์สำหรับส่วนต้นของยีน 16 เอสไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอ คือ UFUL และ URUL นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank ด้วยโปรแกรม BlastN

3.9 **ติดฉลากชิ้นดีเอ็นเอติดตามด้วย** Digoxigenin (DIG)

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสตามข้อ 3.7.3 มาติดฉลากด้วยชุดติดฉลากและติดตามตำแหน่งดีเอ็นเอ DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche, Germany) (ภาคผนวก ข11) ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิตดังนี้ ดูดสารละลายดีเอ็นเอ 16 ไมโครลิตร (ประมาณ 1 ไมโครกรัม) ใส่หลอดไมโครฟิวจ์ นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที เพื่อแยกสายดีเอ็นเอแล้วแช่ในน้ำแข็งทันที เติมสารละลาย DIG High Prime 4 ไมโครลิตร ผสมเบา ๆ ให้เข้ากัน บ่มในอ่างน้ำอุณหภูมิ 37°ซ นาน 20 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในน้ำอุ่น 65°ซ นาน 10 นาที เก็บรักษาดีเอ็นเอติดตามไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ

3.10 Southern hybridization

3.10.1 Southern transfer

ตัดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย MF2 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ที่เหมาะสม แล้วนำไปทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส (อะกาโรสเจล 1%) ตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation และโปรแกรม Quantity One version 4.4.1 และถ่ายรูปเก็บไว้ แล้วทำการย้ายดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลไปยังไนลอนเมมเบรนใช้ระบบบัฟเฟอร์ alkaline transfer buffer (Sambrook และ Russell, 2001) มีขั้นตอนดังนี้

เตรียมเจลก่อนการเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอโดยแช่เจลในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.2 นอร์แมล นาน 10 นาที ล้างเจลหลาย ๆ ครั้งด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ จากนั้นเติม alkaline transfer buffer (ภาคผนวก ข6) พอท่วมเจล เขย่าที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที เทบัฟเฟอร์เก่าทิ้ง แล้วเติม alkaline transfer buffer ใหม่ ๆ เข้าไปแล้วเขย่าต่ออีก 20 นาที หลังจากนั้นเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอไปยังไนลอนเมมเบรน (Pall Bio Support, USA) โดยใช้ alkaline transfer buffer เป็นสารละลายตัวกลางในการเคลื่อนย้ายและใช้กระดาษดูดซับความหนา 5 เซนติเมตร เป็นวัสดุดูด

ซับปล่อยทิ้งไว้นานข้ามคืน ล้างไนลอนเมมเบรนด้วย neutralization buffer II (ภาคผนวก ข7) โดยการเขย่านาน 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เพื่อล้างเอาเศษอะกาโรสเจลที่ติดบนไนลอนเมมเบรนออกและปรับภาวะความเป็นกรด-เบส ให้เหมาะสม จากนั้นนำไปซับให้แห้ง และทำการตรึงดีเอ็นเอให้ติดบนไนลอนเมมเบรนด้วยการนำไนลอนเมมเบรนด้านที่มีดีเอ็นเอไปส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลตประมาณ 3 นาที นำไนลอนเมมเบรนไปใช้ในขั้นตอนไฮบริไดเซชันได้ทันทีหรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นาน 6 เดือน

3.10.2 พรีไฮบริไดเซชันและไฮบริไดเซชัน

นำเมมเบรนไปพรีไฮบริไดเซชันด้วยสารละลาย DIG Easy Hyb (ภาคผนวก ข11) 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 42°ซ นาน 30 นาที เทสารละลายทิ้งแล้วนำเมมเบรนไปไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามที่ผ่านการต้มซึ่งละลายอยู่ในสารละลาย DIG Easy Hyb ที่อุณหภูมิ 42°ซ นานข้ามคืน

หลังขั้นตอนไฮบริไดเซชันนำไนลอนเมมเบรนที่ได้มาล้างดีเอ็นเอติดตามส่วนเกินออกด้วยสารละลาย 2XSSC/0.1%SDS (ภาคผนวก ข16) 30-50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง พร้อมกับการเขย่าเบา ๆ นาน 15 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นล้างอีก 2 ครั้งด้วย 0.5XSSC/0.1%SDS (ภาคผนวก ข11) ที่อุณหภูมิ 68°ซ นาน 15 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง

ตรวจหาตำแหน่งดีเอ็นเอเป้าหมายที่ไฮบริไดซ์ได้กับดีเอ็นเอติดตาม โดยใช้ชุดติดฉลากและติดตามดีเอ็นเอ DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิตดังนี้ (ทุกขั้นตอนทำที่อุณหภูมิห้อง) เริ่มจากนำไนลอนเมมเบรนที่ล้างดีเอ็นเอติดตามส่วนเกินออกแล้ว มาล้างด้วย maleic acid buffer (ภาคผนวก ข16) ในกล่องพลาสติกโดยใช้ปริมาตรท่วมไนลอนเมมเบรน เขย่าเบาๆ นาน 5 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง จากนั้นเติม blocking solution (ภาคผนวก ข16) 100 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ นาน 30 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง แล้วเติมสารละลายแอนติบอดี (Anti-DIG-AP conjugate) ที่เตรียมโดยการเจือจาง Anti-DIG-AP conjugate (ภาคผนวก ข16) 3 ไมโครลิตรใน blocking solution 15 มิลลิลิตร (เตรียมก่อนใช้ในหลอดพลาสติกฝาเกลียว) (เจือจาง 1:5,000) เขย่าเบาๆ นาน 30 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง แล้วล้าง Anti-DIG-AP conjugate ส่วนเกินออกด้วย maleic acid buffer 100 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ นาน 15 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง เติม detection buffer (ภาคผนวก ข16) 20 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ นาน 5 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง จากนั้นเตรียมซับสเตรต NBT/BCIP (ภาคผนวก ข16) โดยเจือจางสารละลายในหลอดที่ 5 200 ไมโครลิตร ใน detection buffer 10 มิลลิลิตร (เตรียมก่อนใช้ใน

หลอดฝาเกลียวที่หุ้มให้มืด) ย้ายไนลอนเมมเบรนมาใส่ในถุงพลาสติกแล้วติดผนึกด้านข้างเช่นเดียวกับขั้น ไฮบริไดซ์ จากนั้นเทซับสเตรตที่เตรียมไว้ลงในถุง ไล่ฟองอากาศออกแล้วผนึกปิดถุง นำไปบ่มในที่มืด (ห้ามเขย่า) ตั้งทิ้งไว้จนกว่าจะเกิดแถบสีชัดเจน (ประมาณ 1-16 ชั่วโมง) เมื่อเสร็จสิ้นการบ่มกับซับสเตรตแล้วนำเมมเบรนออกจากถุงพลาสติกมาล้างในน้ำกลั่นปลอดประจุปลอดเชื้อ นาน 10 นาที ซับและตากให้แห้งแล้วจึงเก็บในที่มืด

3.11 สร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดและวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

3.11.1 เตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอ

สกัดพลาสมิดด้วยวิธี Alkaline lysis

เลี้ยง *E. coli* สายพันธุ์ ที่มีพลาสมิดที่ต้องการในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มีแอมพิซิลลิน 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ นานข้ามคืน แล้วนำมาสกัดพลาสมิดด้วยวิธี Alkaline lysis (Sambrook และ Russell, 2001) ดังขั้นตอนต่อไปนี้ ถ่ายเชื้อ 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์นาน 2 นาที ที่ 10,000 รอบต่อนาที เทส่วนน้ำใสทิ้งให้หมด นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาเติมสารละลาย I (ภาคผนวก ข20) 100 ไมโครลิตร กระจายตะกอนเซลล์โดยการใช้ไมโครปิเปตต์ดูดขึ้นลง จากนั้นเติมสารละลาย II (ภาคผนวก ข20) ที่เตรียมใหม่ ๆ 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมาเบาๆ 2-3 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นเติมสารละลาย III (ภาคผนวก ข20) ที่เย็น 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมาเบาๆ 2-3 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็ง 3-5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ถ่ายเฉพาะส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือตะกอนมาประมาณ 400 ไมโครลิตร แล้วเติม เอทานอล 95% ปริมาตร 2 เท่าของส่วนน้ำใส กลับหลอดไปมาเบา ๆ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ ประมาณ 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทส่วนของเอทานอล 95% ทิ้ง ปั่นล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอทานอล 70% ที่เย็นจัด ประมาณ 500 ไมโครลิตร ทำซ้ำ 2 ครั้ง โดยการปั่นล้างเก็บตะกอน นาน 5 นาที ค่อย ๆ เทส่วนน้ำใสทิ้ง สุดท้ายนำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไประเหยให้แห้งสนิทแล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ TE 50 ไมโครลิตร และใส่ Rnase A เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลิลิตร 2 ไมโครลิตร เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอออก เก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ

สกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) (ภาคผนวก ข3)

สกัดพลาสมิดตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต โดยเลี้ยง *E. coli* สายพันธุ์ที่มีพลาสมิดที่ต้องการและปั่นเก็บเซลล์ แขวนลอยเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ P1 250 ไมโครลิตร จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ P2 250 ไมโครลิตร ผสมโดยการกลับหลอดจนกระทั่งของผสมเริ่มหนืดและใสขึ้นภายในระยะเวลาไม่เกิน 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย N3 350 ไมโครลิตร ผสมโดยกลับหลอดไปมาจนเกิดเป็นตะกอนขาว นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ตะกอนตกที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แยกส่วนน้ำใสลงใน QIAprep spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PB 500 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PE 750 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ก่อนทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดส่วนน้ำใสที่เหลือติดคอลัมน์ ย้ายคอลัมน์มายังหลอดไมโครฟิวจ์ใหม่ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อหรือบัฟเฟอร์ EB 50-100 ไมโครลิตร นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จะได้สารละลายพลาสมิดอยู่ในส่วนน้ำใส เก็บพลาสมิดที่อุณหภูมิ -20°ซ

3.11.2 วิเคราะห์ปริมาณพลาสมิดที่สกัดได้

วิเคราะห์ปริมาณพลาสมิดตามวิธีในข้อ 3.7.2

3.11.3 ตัดดีเอ็นเอด้วยเรสทริกชันเอนไซม์

ตัดจีโนมิกดีเอ็นเอและพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ โดยใช้บัฟเฟอร์และอุณหภูมิที่เหมาะสมกับเรสทริกชันเอนไซม์ตามที่ระบุไว้โดยบริษัทผู้ผลิต

3.11.4 ทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

ทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสเพื่อวิเคราะห์ลักษณะและขนาดของพลาสมิดที่ถูกตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์โดยมีวิธีการดังนี้คือ ผสมพลาสมิดปริมาณที่เหมาะสมกับสีติดตาม (Promega, USA) หยอดสารละลายลงไปในช่องและใช้ 1kb DNA ladder (Promega, USA) เป็น

ดีเอ็นเอมาตรฐาน ซึ่งเจลประกอบไปด้วย อะกาโรสเจล 1% ในบัฟเฟอร์ 1X TAE (ภาคผนวก ข16) จากนั้นทำอิเล็กโทรโฟเรซิสด้วยชุดทำอิเล็กโทรโฟเรซิส mini Sub-Cell GT หรือชุดทำอิเล็กโทรโฟเรซิส Mupid-2 ใช้ความต่างศักย์ 50-100 โวลต์ ทิ้งไว้จนกระทั่งสีน้ำเงินของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ลงมาจนสุดขอบอะกาโรสเจลอีกด้าน ย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข22) นาน 5-10 นาที ล้างเอธิเดียมโบรไมด์ส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุ ตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation และโปรแกรม Quantity One version 4.4.1 ของบริษัท Bio-Rad, USA.

3.11.5 การแยกชิ้นดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจล

ทำอะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟเรซิสเพื่อแยกชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ตามขนาด ตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วย UV-light Transilluminator ตัดเจลให้ครอบคลุมแถบดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยใบมีดและนำชิ้นเจลที่ตัดได้ใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ แยกชิ้นดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล DNA Extraction Kit (Fermantas, USA.) (ภาคผนวก ข4) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิตดังนี้ เติม binding solution 3 เท่าของปริมาตรชิ้นอะกาโรสเจล บ่มที่อุณหภูมิ 55°ซ นาน 5 นาที หรือจนกระทั่งอะกาโรสเจลละลายหมด เติมสารแขวนลอยที่เข้ากันของซิลิกา 5-10 ไมโครลิตร ผสมให้สารละลายดีเอ็นเอเข้ากันกับซิลิกา แล้วทำการบ่มนาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 55°ซ ระหว่างบ่มให้กลับหลอดเบา ๆ ทุก 1-2 นาที เพื่อป้องกันซิลิกาตกตะกอน นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 วินาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วยสารละลาย wash buffer 500 ไมโครลิตร ทำซ้ำ 3 ครั้ง แต่ละครั้งที่ล้างให้กระจายตะกอนออกให้หมดแล้วปั่นตกตะกอนที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 วินาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ระเหยแห้งตะกอนแล้วชะดีเอ็นเอออกจากตะกอนซิลิกาด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ 20 ไมโครลิตร โดยกระจายตะกอนออกให้เข้ากันดีในน้ำ นำไบ่มที่อุณหภูมิ 55°ซ นาน 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที ถ่ายส่วนน้ำใสที่มีชิ้นดีเอ็นเอละลายอยู่ไปยังหลอดไมโครฟิวจ์ใหม่ เก็บรักษาชิ้นดีเอ็นเอไว้ที่ -20°ซ

3.11.6 เชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับเวกเตอร์

เชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอและพลาสมิดเวกเตอร์ที่ถูกตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ที่เหมาะสมโดยใช้ T4DNA ligase (Fermentas, USA) อัตราส่วนโมลาร์ของชิ้นดีเอ็นเอกับเวกเตอร์ที่ใช้ในการเชื่อมต่อโดยทั่วไปคือ 5:1 หรือ 3:1 ปรับปริมาตรสุดท้ายของสารผสมปฏิกิริยาที่ใช้ในการทดลองนี้ให้เป็น 10 ไมโครลิตรด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ นำของผสมชิ้นดีเอ็นเอและพลาสมิดเวกเตอร์ไปให้ความร้อนที่ 65°ซ นาน 10 นาที ปล่อยให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้องแล้วเติม 10X ไลเกชันบัฟเฟอร์ และ T4 DNA ligase บ่มของผสมปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 16°ซ นานข้ามคืนก่อนที่จะนำไป ทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

3.12 การทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *E. coli*

3.12.1 การเตรียมคอมพีเทนต์เซลล์

เตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ (Sambrook และ Russell, 2001) โดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของ *E. coli* DH5α ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 2YT (ภาคผนวก ก3) 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37°ซ นานข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ จากนั้นถ่ายหัวเชื้อ 700 ไมโครลิตร ไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 2YT 720 มิลลิลิตร ที่บรรจุใน armed flask นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37°ซ จนกระทั่ง OD_{600} เท่ากับ 0.3-0.5 ระหว่างช่วงที่รอการเจริญของเชื้อให้ทำการเตรียมสารละลาย $MgSO_4/CaCl_2$ (เตรียมก่อนใช้และสารละลายทุกชนิดที่ใช้เตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ต้องแช่ในอ่างน้ำแข็ง) ดังนี้ ผสมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อที่เย็น 40 มิลลิลิตร เข้ากับสารละลาย $CaCl_2$ 1 โมลาร์ที่ปลอดเชื้อและเย็น 3.5 มิลลิลิตร ในหลอดพลาสติกฝาเกลียว ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็งให้ได้อุณหภูมิ 4°ซ จากนั้นเติมสารละลาย $MgSO_4$ 1 โมลาร์ ที่ปลอดเชื้อและเย็น 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อที่เย็นเพื่อปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร แช่ในอ่างน้ำแข็งก่อนใช้

เมื่อได้ค่า OD_{600} ตามที่ต้องการแล้วให้ถ่ายเชื้อลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ปลอดเชื้อ 35 มิลลิลิตร ที่เย็น จำนวน 2 หลอด จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 4°ซ ความเร็วในการปั่นเหวี่ยง 4000 รอบต่อนาที นาน 6 นาที (ตั้งแต่ขั้นตอนนี้ต้องทำที่อุณหภูมิ 4°ซ ตลอด) เทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง เติมสารละลาย $MgSO_4/CaCl_2$ ที่

เย็น 10.5 มิลลิลิตร ลงในตะกอนเซลล์แต่ละหลอด กระจายตะกอนให้เข้ากับสารละลาย $MgSO_4/CaCl_2$ (ห้ามใช้เครื่องปั่นผสม) แช่หลอดเซนตริฟิวจ์ที่มีตะกอนเซลล์และสารละลาย $MgSO_4/CaCl_2$ ในอ่างน้ำแข็ง นาน 30-45 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°ซ ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง จากนั้นเติมสารละลาย $MgSO_4/CaCl_2$ ที่เย็น 3.5 มิลลิลิตร ลงในตะกอนเซลล์แต่ละหลอดอีกครั้ง กระจายตะกอนให้เข้ากับสารละลาย $MgSO_4/CaCl_2$ แช่ในอ่างน้ำแข็งนาน 45 นาที ขึ้นไป แล้วเติมกลีเซอรอลปลอดเชื้อ 875 ไมโครลิตร ลงไปในแต่ละหลอดและผสมให้เข้ากันเบาๆ สุดท้ายทำการแบ่งใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ปลอดเชื้อที่เย็นประมาณหลอดละ 100 ไมโครลิตร แล้วเก็บคอมพีเทนต์เซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ -70°ซ

3.12.2 ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *E.coli*

ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *E.coli* (Sambrook และ Russell, 2001) โดยทุกขั้นตอนทำที่อุณหภูมิ 4°ซ ยกเว้นช่วงทำ heat shock ดังนี้ นำคอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* DH5α ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70°ซ มาแช่ในอ่างน้ำแข็งให้ละลายช้า ๆ เมื่อเซลล์ละลายแล้วให้ใส่รีคอมบิแนนท์พลาสมิดลงในคอมพีเทนต์เซลล์ *E . coli* DH5α 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำแข็งอย่างน้อย 30 นาที จากนั้นทำการ heat shock ที่อุณหภูมิ 42°ซ นาน 90 วินาที เมื่อครบเวลาให้แช่ลงในอ่างน้ำแข็งทันทีนาน 2 นาที แล้วจึงเติมอาหารเหลว 2YT 1 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดเชื้อ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ อย่างน้อย 1 ชั่วโมง จากนั้นเกลี่ยเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มีแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งผ่านการเกลี่ยด้วย 50 ไมโครลิตร ของ X-gal (5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-β -D-galactoside) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข26) และ 7 ไมโครลิตรของ IPTG (Isopropyl thio-β-D-galactoside) 0.1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข27) (ทำการเตรียมเกลี่ยสารดังกล่าวก่อนใช้ทุกครั้ง) บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ นานข้ามคืน

3.13 การสังเคราะห์ไพรเมอร์และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

สังเคราะห์ไพรเมอร์และหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยหน่วยบริการชีวภาพของสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)

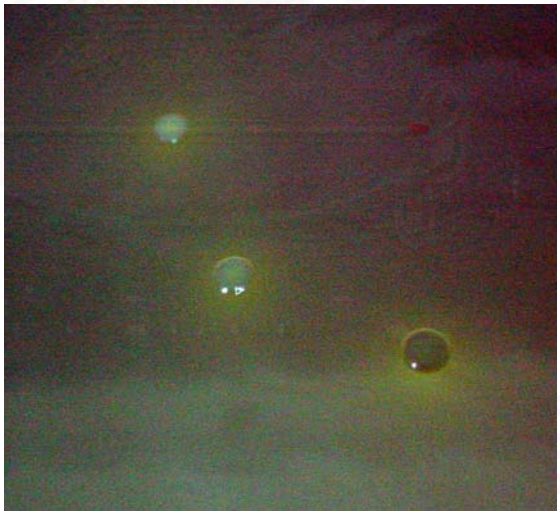
วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BioEdit, BlastN, BlastP, BlastX และ CLUSTALX

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างแหนมและน้ำนมดิบ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตไนซินโดยคัดเลือกแบคทีเรียจากตัวอย่างแหนมและน้ำนมดิบที่เก็บจากฟาร์มโคนมในจังหวัดต่าง ๆ ได้แก่ นครราชสีมา ปทุมธานี ราชบุรี และสมุทรสาคร ซึ่งจากตัวอย่างแหนมและน้ำนมดิบทั้งหมด 23 ตัวอย่าง นำมาทำการแยกแบคทีเรียแลกติกเบื้องต้นโดยการเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่มีสีบรอมครีซอลเพอร์เพิล 0.004 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นอินดิเคเตอร์ สังเกตุโคโลนีที่มีสีเหลืองและทำการเก็บโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่อุณหภูมิ 4^{o}ซ จากผลการทดลองสามารถแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 115 ไอโซเลต ดังแสดงผลการคัดเลือกแบคทีเรียจากตัวอย่างต่าง ๆ ในรูปที่ 4.1 และตารางที่ 4.1



รูปที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีที่มีสีเหลืองรอบ ๆ ในการทดสอบการแยกแบคทีเรียที่ผลิตไนซินโดยการเกลี่ยตัวอย่างบนอาหาร MRS ที่มีสีบรอมครีซอลเพอร์เพิล 0.004% และบ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 30^{o}ซ

ตารางที่ 4.1 ผลการคัดเลือกแบคทีเรียจากแหล่งต่าง ๆ ที่ให้โซนสีเหลืองรอบโคโลนี

ตัวอย่าง	สถานที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนแบคทีเรียที่มีสีเหลืองรอบโคโลนี
แหนม	กรุงเทพมหานคร	2	9
	สมุทรสาคร	4	35
น้ำนมดิบ	นครราชสีมา	4	10
	ปทุมธานี	2	8
	ราชบุรี	7	41
	สมุทรสาคร	4	12
รวม		23	115

4.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบโดยมี *Lactobacillus plantarum* TISTR 850, *Pediococcus pentosaceus* TISTR 374 และ *Propionibacterium freundenreichii* TISTR 446 เป็นแบคทีเรียทดสอบที่ไวต่อไนซิน ทำการทดสอบด้วยวิธีแพร่ซึมในอาหารแข็ง (agar diffusion assay) โดยนำแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมด 115 ไอโซเลตมาทำการทดสอบ โดยแบ่งการทดสอบเป็นสองขั้นตอน ในขั้นแรกนำแบคทีเรียที่แยกได้มาจุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS และนำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ จากผลการทดสอบพบว่าแบคทีเรียจำนวน 26 ไอโซเลต สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทั้ง 3 ชนิด โดยเกิดบริเวณใสรอบโคโลนีที่จุดบนอาหารแข็ง ได้ผลดังแสดงใน ตารางที่ 4.2 นำแบคทีเรียทั้ง 26 ไอโซเลต มาทดสอบขั้นที่สองโดยใช้ส่วนใสของแบคทีเรียมาทำการทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion ผลการวัดค่าความเป็นกรด-เบส ของส่วนน้ำใสที่แยกได้พบว่าอยู่ในช่วง 4-5 จากนั้นจึงนำส่วนน้ำใสมาปรับให้ได้ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 5.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 โมลาร์ พบว่าส่วนใสของแบคทีเรียทั้งหมด 4 ไอโซเลต ได้แก่ MF2, MF3, B13 และ NHA2 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทั้ง 3 ชนิดโดยเกิดบริเวณใสรอบหลุมที่หยอดด้วยส่วนน้ำใสของแบคทีเรียผลการยับยั้งดังแสดงในรูปที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ผลการยับยั้งเชื้อทดสอบโดยแบคทีเรียที่แยกได้

ตัวอย่าง (ไอโซเลต)	ความกว้างของบริเวณใสรอบหลุม (มม.)					
	ทดสอบขั้นที่ 1 (spot test)			ทดสอบขั้นที่ 2 (agar well diffusion)		
	Lb. plantarum	*P. pentosaceus*	*Pro. freundenreichii*	*Lb. plantarum*	*P. pentosaceus*	*Pro. freundenreichii*
B13	+ + +	+ +	+	+ +	+ +	+
B14	+	+	+	-	-	-
B34	+	+	+	-	-	-
CA3	+ +	+ +	+ +	+ +	+	-
CA6	+ +	+ +	+ +	+ +	+	-
FA1	+ +	+ +	+ +	+	-	+
FA2	+ + +	+ + +	+ + +	+	-	+
FA3	+ + +	+ + +	+ + +	+	+	-
FA4	+ +	+ + +	+ + +	+	+	-
FA6	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	-	+
FA7	+ +	+	+ +	+	-	-
MF2	+ +	+	+ + +	+ +	+ +	+ + +
MF3	+ + +	+ +	+ + +	+ +	+ +	+ + +
MG4	+ +	+	+ +	+ +	+	-
MI2	+ + +	+	+ + +	-	-	-
MK3	+ +	+	+ +	+	-	+
MK4	+ +	+	+ +	+	-	++
NHA1	+	+	+	-	-	-
NHA2	+ +	+ +	+++	+	+ +	+

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.2 ผลการยับยั้งเชื้อทดสอบโดยแบคทีเรียที่แยกได้ (ต่อ)

ตัวอย่าง (ไอโซเลต)	ความกว้างของบริเวณใสรอบหลุม (มม.)					
	ทดสอบขั้นที่ 1 (spot test)			ทดสอบขั้นที่ 2 (agar well diffusion)		
	Lb. plantarum	*P. pentosaceus*	*Pro. freundenreichii*	*LB. plantarum*	*P. pentosaceus*	*Pro. freundenreichii*
NHB2	+ +	+	+ + +	+ +	-	+ + +
NHC1	+ +	+ +	+ +	+	-	+
NHC3	+ +	+	+ +	+ +	-	+
NHC4	+ +	+	+ +	-	+	+
NHC5	+ +	+ +	+ +	-	-	+
NHC6	+ +	+ +	+	+ +	+	-
NHC7	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	-

+++ แสดงความกว้างของบริเวณใสขนาด 16-22 มม.

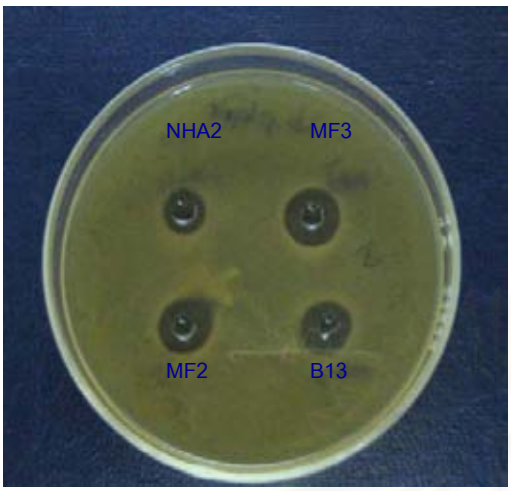
++ แสดงความกว้างของบริเวณใสขนาด 11-15 มม.

+ แสดงความกว้างของบริเวณใสขนาด 6-10 มม.

- ไม่เกิดบริเวณใส

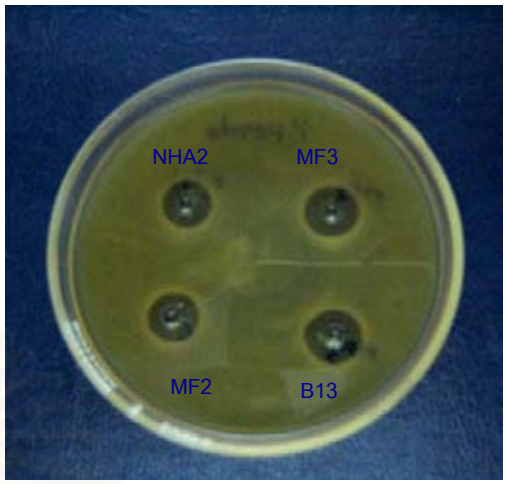
เส้นผ่าศูนย์กลางหลุมเท่ากับ 6 มิลลิเมตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



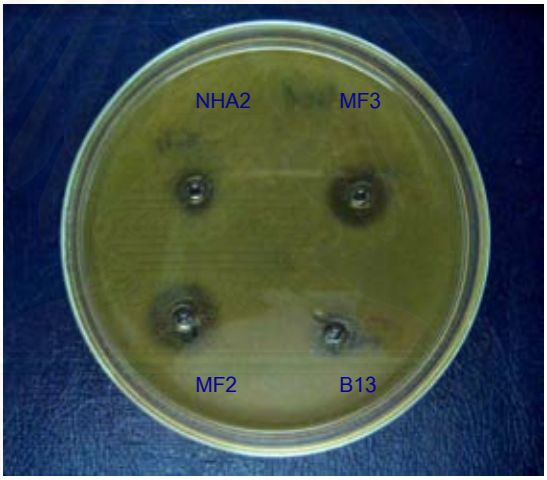
Lb. plantarum

(ก)



P. pentosaceus

(ข)



Pro. freundenreichii

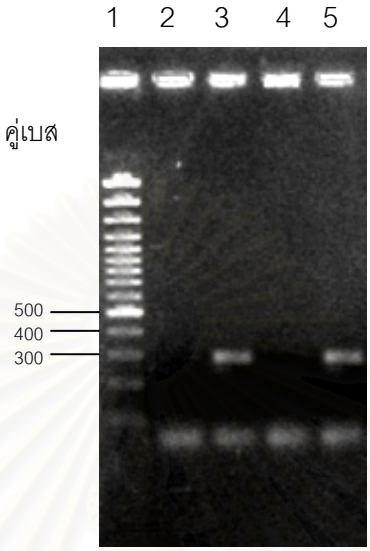
(ค)

รูปที่ 4.2 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบทั้ง 3 ชนิด (ก) *Lactobacillus plantarum* TISTR 850 (ข) *Pediococcus pentosaceus* TISTR 374 (ค) *Propionibacterium freundenreichii* TISTR 446 โดยความกว้างของบริเวณใสเกิดจากการยับยั้งด้วยส่วนน้ำใสของแบคทีเรีย 4 ไอโซเลต ได้แก่ NHA2, MF3, MF2 และ B13

4.3 ยืนยันการสร้างไนซินโดยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

จากการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบทำให้ได้กลุ่มแบคทีเรียที่คาดว่าจะสร้างไนซิน จากนั้นจึงทำการยืนยันการสร้างไนซินโดยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสได้ใช้ไพรเมอร์ คือ NOKF และ NOKR ที่ออกแบบจากลำดับไพรเมอร์ของ de vos และคณะ (1993) ที่จำเพาะกับยีนที่ประมวลรหัสการสร้างไนซินตั้งต้น ขนาดของผลิตภัณฑ์ประมาณ 300 คู่เบส ทดลองโดยใช้ภาวะและสารผสมปฏิกิริยาดังที่กล่าวไว้ในข้อ 3.7.3 หลังจากดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้โดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส พบว่าแบคทีเรีย 2 ไอโซเลต คือ MF2 และ MF3 ให้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 300 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 4.3 จากนั้นจึงเลือกเฉพาะแบคทีเรีย MF2 นำมาหาลำดับ นิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ NOKF จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบกรอบอ่านรหัสเปิด (ORF) ของยีนไนซินตั้งต้น 171 คู่เบส คือลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งที่ 80-251 แปลรหัสเป็นกรดอะมิโน 57 หมู่ โดยมีน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณ 59 กิโลดัลตัน ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR แสดงในรูปที่ 4.4 นำลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปเปรียบเทียบความคล้ายในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BlastN และ BlastP ตามลำดับ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีความเหมือนกับยีนไนซินเอ และยีนไนซินแซดของแบคทีเรีย *L. lactis* subsp. *lactis* เท่ากับ 99%และ 98% ตามลำดับ ลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับ ไนซินเอตั้งต้น และ ไนซินแซดตั้งต้น เท่ากับ 100% และ 98% ตามลำดับ ผลการเปรียบเทียบแสดงในรูปที่ 4.5-4.6 จากผลการแปลรหัสเป็นกรด อะมิโนของชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อผ่านกระบวนการตัดเพปไทด์สายนำพบว่ากรดอะมิโนตำแหน่งที่ 27 เป็น ฮิสติดีน ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าแบคทีเรีย MF2 ผลิตแบคเทอริโอซินชนิด ไนซินเอ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.3 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสแสดงผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของแบคทีเรีย MF2, MF3, B13 และ NHA2

ช่องที่ 1 100 bp DNA ladder

ช่องที่ 2 ผลิตภัณฑ์ PCR ของแบคทีเรีย B13

ช่องที่ 3 ผลิตภัณฑ์ PCR ของแบคทีเรีย MF2

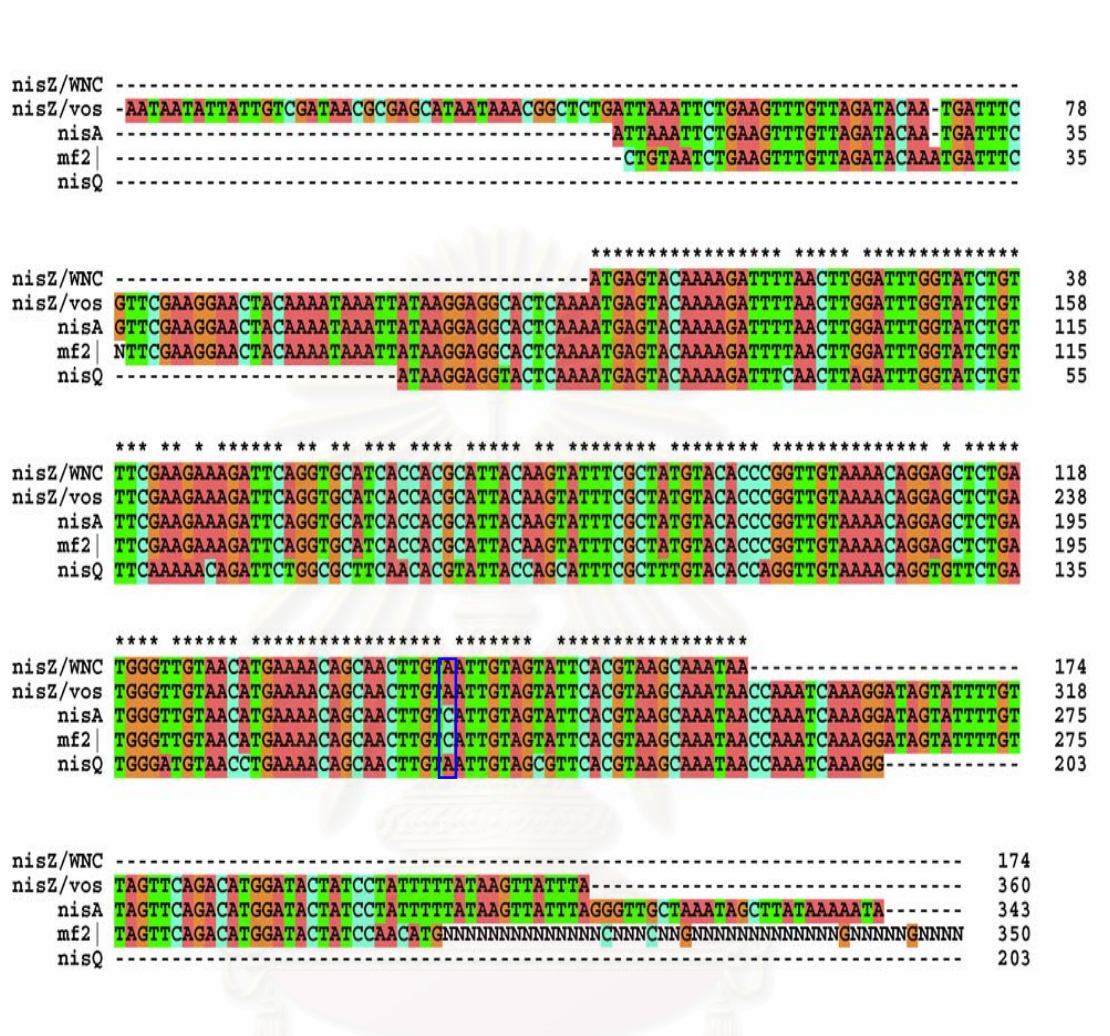
ช่องที่ 4 ผลิตภัณฑ์ PCR ของแบคทีเรีย NHA2

ช่องที่ 5 ผลิตภัณฑ์ PCR ของแบคทีเรีย MF3

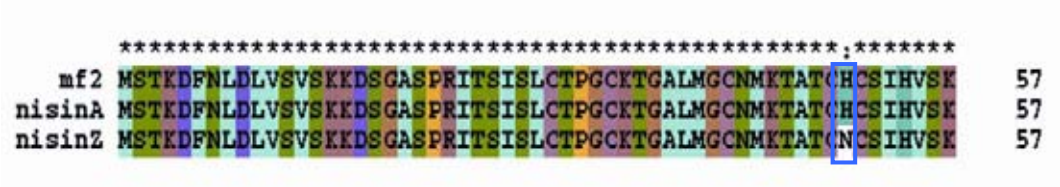
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.4 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR ของแบคทีเรีย MF2 ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ NOKF และ NOKR ในการดำเนินปฏิกิริยา ตัวอักษร M แสดงกรดอะมิโนเมไธโอนีน ซึ่งเป็นตำแหน่งโคดอนเริ่มต้น (start codon) เครื่องหมาย * แสดงรหัสสิ้นสุดการถอดรหัส (stop codon) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ขีดเส้นใต้แสดงบริเวณกรอบอ่านรหัสเปิดของไนซินตั้งต้น ลูกศรสีดำแสดงตำแหน่งที่คาดว่าถูกตัดเพปไทด์สายนำด้วยโปรตีเอส ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนที่แสดงด้วยตัวอักษรหนาคือส่วนที่เป็นไนซินที่สมบูรณ์ ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนที่ระบุว่าเป็นกรดฮิสติดีนแสดงไว้ในกรอบสี่เหลี่ยม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.5 แสดงผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไนซินแซด จาก *L. lactis* subsp. *lactis* WNC (Noonpakdee และคณะ, 2003) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไนซินแซดจาก *L. lactis* strain NIZO 22186 (de vos และคณะ, 1993) ยีนไนซินเอตั้งต้น จาก *L. lactis* subsp. *lactis* (Dodd และคณะ, 1990) ชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR ของแบคทีเรีย MF2 และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไนซินคิวจาก *Lactococcus lactis* 61-14 (Zendo และคณะ, 2003) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันแสดงเครื่องหมาย * ด้านบน ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ คือตำแหน่งกรดอะมิโนฮิสติดีนที่ระบุว่าเป็นไนซินเอ



รูปที่ 4.6 แสดงผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR ของแบคทีเรีย MF2 กับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนไนซินเอตั้งต้น จาก *L. lactis* subsp. *lactis* (Dodd และคณะ, 1990) และลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนไนซินแซดตั้งต้น จาก *L. lactis* subsp. *lactis* (Mulders และคณะ, 1991) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันแสดงเครื่องหมาย * ด้านบน ลำดับกรดอะมิโนใน คือตำแหน่งกรดอะมิโนฮิสติดีนที่ระบุว่าเป็น ไนซินเอ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4 การจำแนกสกุลแบคทีเรียทีคัดเลือกได้ทางอนุกรมวิธาน และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 เอสไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอ

การจำแนกสกุลของแบคทีเรียสายพันธุ์ MF2 อ้างอิงตาม Bergey 's Manual of Systemic Bacteriology ผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ผลการทดสอบด้านต่าง ๆ เพื่อจำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ MF2

ลักษณะ/การทดสอบ	ผลการทดสอบ
ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	
ลักษณะโคโลนีบนอาหาร	โคโลนีสีขาว เล็ก ขอบเรียบ ผิวเรียบ
การย้อมติดสีแกรม	แกรมบวก รูปร่างกลม ขนาดเล็ก เรียงตัวเป็นคู่
ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี	
การเคลื่อนที่	-
การทดสอบแคทาเลส	-
การหมักน้ำตาล	
กลูโคส	+
แมนนิทอล	+
แรฟฟิโนส	-
แลคโทส	+
การใช้กรดอะมิโนอาร์จินีน	+

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.4 ผลการทดสอบที่ภาวะต่าง ๆ เพื่อจำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ MF2

ลักษณะ/การทดสอบ	ผลการทดสอบ
การเจริญในภาวะต่าง ๆ	
อุณหภูมิ 40^{O}ซ	+
อุณหภูมิ 45^{O}ซ	-
ความเข้นข้น NaCl 4%	+
ความเข้นข้น NaCl 6.5%	-

+ positive หมายถึงเจริญได้หรือเกิดปฏิกิริยากับการทดสอบ

- negative หมายถึงไม่เจริญหรือไม่เกิดปฏิกิริยากับการทดสอบ

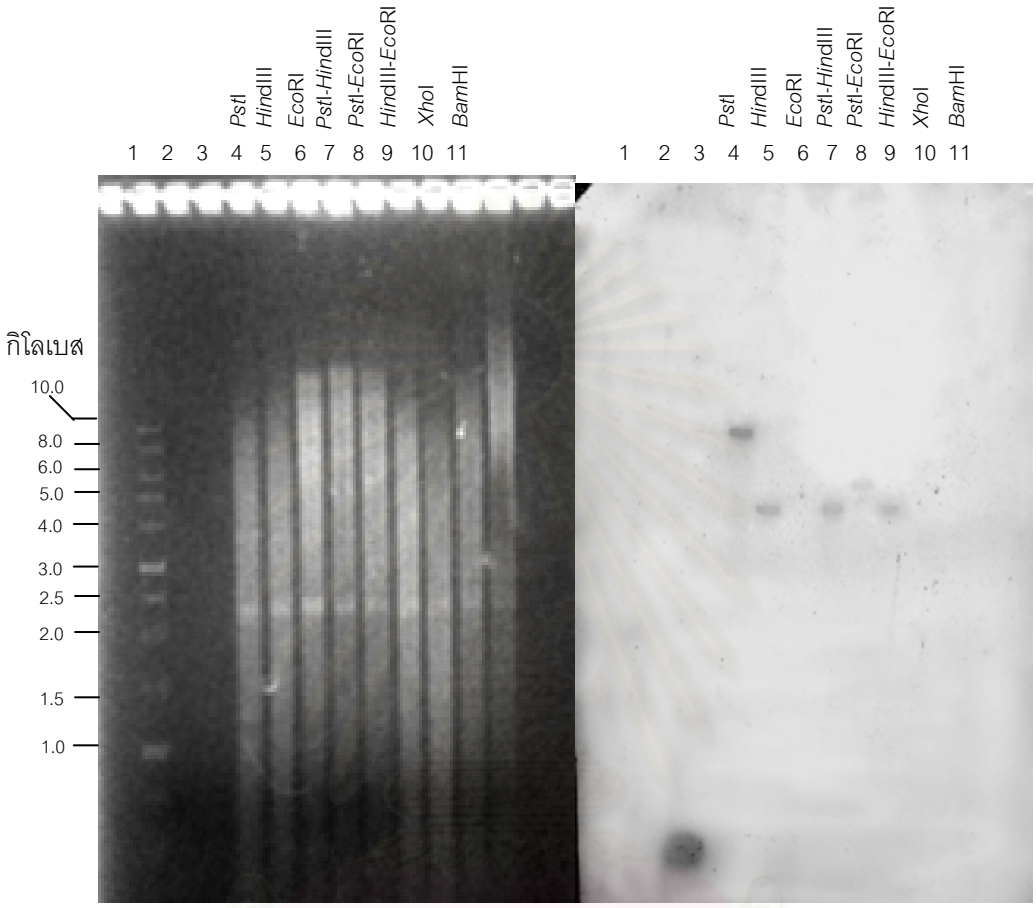
จากผลการทดสอบอ้างอิงตาม Bergey's Manual of Systemic Bacteriology โดยพิจารณาจากความสามารถในการหมักน้ำตาล การใช้กรดอะมิโนอาร์จินีน และการเติบโตในภาวะต่าง ๆ สามารถจำแนกแบคทีเรีย MF2 ได้เป็น *L. lactis* subsp. *lactis* และยืนยันด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 เอสไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอ ของแบคทีเรีย MF2 โดยใช้ไพรเมอร์สำหรับส่วนต้นของยีน 16 เอสไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอ คือ UFUL และ URUL ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนประมาณ 800 คู่เบส แสดงในรูปที่ 4.7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 เอสไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอ ของแบคทีเรีย MF2 นำไปเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ต่าง ๆ ใน ฐานข้อมูล GenBank วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BlastN พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ 16 เอสไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอ ของแบคทีเรีย MF2 มีความ เหมือน 99% กับลำดับนิวคลีโอไทด์16 เอสไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอ ของ *L. lactis* subsp. *lactis* สายพันธุ์ SC43K ผลแสดงในภาคผนวก ง ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าแบคทีเรีย MF2 เป็น *L. lactis* subsp. *lactis* และให้ชื่อว่า *L. lactis* subsp. *lactis* สายพันธุ์ MF2

```
1    GTCCACTGGATGATTTCNNNAACGGGNGAAAAANGCGTGGGGNTTCCCCTTTGAGCGGN  60
61   GACAACATTTGGAAACGAATGCTAATACCGCATAAAAACTTTANNCACAAGTTTTAAGTT  120
121  TGAAAGATGCAATTGCATCACTCAAAGATGATCCCGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTGAGG  180
181  TAAAGGCTCACCAAGGCGATGATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGG  240
241  ACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACG  300
301  AAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTT  360
361  GGTAGAGAAGAACGTTGGTGAGAGTGGAAAGCTCATCAAGTGACGGTAACTACCCAGAAA  420
421  GGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCGAGCGTTGTCCGGA  480
481  TTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGTGGTTTATTAAGTCTGGTGTAAAAGGCAGTGGCT  540
541  CAACCATTGTATGCATTGGAAACTGGTAGACTTGAGTGCAGGAGAGGAGAGTGGAATTCC  600
601  ATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCGGTGGCGAANGCGGCTCTCT  660
661  GGCCTGTACTGACACTGAGGCTCGAAGCGTGGGNAGCAACAGGATTAAATACCCTGGTAA  720
721  A
```

รูปที่ 4.7 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ 16 เอสไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอ ของแบคทีเรีย MF2

4.5 **การติดตามยีนไนซินด้วยเทคนิค** Southern hybridization

ตัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *L. lactis* subsp. *lactis* สายพันธุ์ MF2 อย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ 5 ชนิด ได้แก่ *Hin*dIII, *Pst*I, *Eco*RI, *Xho*I และ *Bam*HI และนำไปทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสแล้วจึงทำ southern hybridization ตามวิธีการในข้อ 3.12 โดยใช้ NisA-probe เป็นดีเอ็นเอติดตามซึ่ง NisA-probe สร้างมาจากผลิตภัณฑ์ PCR ของ *L. lactis* subsp. *lactis* สายพันธุ์ MF2 ที่ใช้ไพรเมอร์ NOKF และ NOKR ผลการติดตามดังแสดงในรูป 4.8 จากรูปพบว่าเรสทริกชันเอนไซม์ *Pst*I, *Hin*dIII, *Hin*dIII-*Eco*RI, *Hin*dIII-*Pst*I และ*Pst*I-*Eco*RI เกิดสัญญาณบวกกับดีเอ็นเอติดตาม NisA-probe ที่ตำแหน่งประมาณ 9, 4.5, 4.5, 4.5 และ 5.5 ซึ่งในที่นี้สัญญาณจากการตัดด้วย *Hin*dIII มีขนาดประมาณ 4.5 กิโลเบส ซึ่งเหมาะสมในการโคลนยีนไนซินซึ่งจะกล่าวในลำดับต่อไป



รูปที่ 4.8 ก) อะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของ *L. lactis* subsp. *lactis* สายพันธุ์ MF2 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่าง ๆ ข) สัญญาณจาก Southern hybridization ด้วยดีเอ็นเอติดตาม NisA

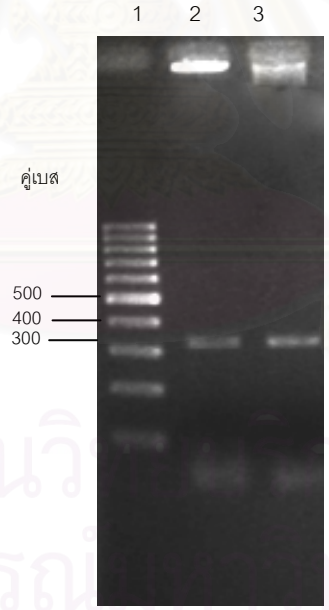
ช่องที่ 1 1 kb DNA ladder

ช่องที่ 2 ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *L. lactis* subsp. *lactis* สายพันธุ์ MF2 (ตัวควบคุมผลบวก)

ช่องที่ 4-11 ดีเอ็นเอของ *L. lactis* subsp. *lactis* สายพันธุ์ MF2 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่าง ๆ ได้แก่ *Pst*I, *Hin*dIII, *Eco*RI, *Pst*I/*Hin*dIII, *Pst*I/*Eco*RI, *Hin*dIII/*Eco*RI, *Xho*I และ *Bam*HI ตามลำดับ

4.6 **โคลนยีนไนซินจากชิ้นดีเอ็นเอที่ให้ผลบวกโดย** Southern hybridization

ตัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *L. lactis* subsp. *lactis* สายพันธุ์ MF2 อย่างสมบูรณ์ด้วย *Hin*dIII ทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสเพื่อแยกชิ้นดีเอ็นเอออกจากกันตามขนาด และคัดแยกเฉพาะชิ้นดีเอ็นเอในบริเวณที่เกิดสัญญาณจากการไฮบริไดซ์มาโคลนเข้าตำแหน่ง *Hin*dIII ของพลาสมิดพาหะ pUC18 ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* DH5α คัดเลือกโคลนที่ได้ด้วยวิธี Blue-White selection คัดเลือกเฉพาะโคลนที่มีสีขาวซึ่งเป็นโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกเชื่อมกับพลาสมิดเวกเตอร์และต้านต่อสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน คัดเลือกโคลนดังกล่าวมาทดสอบโดยสุ่มผสมโคลนทั้งหมด 10 โคลน ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB 1 หลอด สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากแต่ละหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำพลาสมิดเหล่านั้นมาดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ NOKF และ NOKR เพื่อคัดเลือกโคลนที่มียีนไนซินจากผลที่ได้พบว่าโคลน pPM 6.4 เกิดแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 300 คู่เบส ตามต้องการ ตั้งชื่อรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้เป็น pUCNisA ดังแสดงในรูป 4.9



รูปที่ 4.9 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสแสดงผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้จากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pUCNisA

ช่องที่ 1 100 bp DNA ladder

ช่องที่ 2 ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *L. lactis* subsp. *lactis* สายพันธุ์ MF2 (ตัวควบคุมผลบวก)

ช่องที่ 3 ผลิตภัณฑ์ PCR ของ pUCNisA

4.7 ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนไนซินจาก *L. lactis* subsp. *lactis* สายพันธุ์ MF2

เมื่อนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pUCNisA ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ยูนิเวอร์ซัลไพรเมอร์ M13 ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมด 700 คู่เบส ผลแสดงในรูปที่ 4.10 จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนที่ได้มาเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนต่าง ๆ ใน GenBank วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BlastN พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความเหมือน 100% กับยีนประมวลรหัส *lciB* ซึ่งทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีนแลคโตคอคซินบี อิมมูนิตี ผลการเปรียบเทียบแสดงในภาคผนวก ง ซึ่งแลคโตคอคซินบี เป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *L. lactis* subsp. *lactis*

```
1     GGTTAAGATACTAGAACAGGAAAAACAATATGTAAACAGACAATTGACACAGCAAGTTAT
61    ACATTTGGTGTAATGGCAGAAGGATGGGGAAAAACATTCCACTAATAAAAAAGAACTGAG
121   GTTTAGAGTTAATGAAAAAAAAAGTTGATACAGAAAAACAAATTACTTCTTGGGCATCTG
181   ACTTAGCTTCCAAAAATGAAACAAAGGTTCAAGAAAAATTAATACTGTCTTCTTATATTC
241   AGGACATCGAAAACCATGTTTACTTTCCAAAAGCAATGATTTCTTTAGAAAAAAAATTAC
301   GAGACCAAAATAATATTTGCGCTTTATCAAAAGAAGTCAATCAGTTTTATTTTAAAGTTG
361   TTGAAGTAAATCAAAGAAAATCCTGGATGGTAGGTTTGATAGTTTAATTATCTCAGAATT
421   ATTGATTCTATTTTTTTAAGAAGCTCCTTTGTAAAGGAGCTTCTTTTATCTTGATTTAAA
481   AACAATGAGAATGAAAATGTTTGGAGAAAAGAAAGATTAATTGACTGAAATGTAAAAACT
541   TTTTTTGGACAATATTTATGATTTAATATTAAATCCCGAAATTATAGAAGAGGAGTTTTA
601   GTATCCGCTAAACAGATTTAGAGAAGACAGGATTTTTACCCNGAGTAAAAATCCACTTAT
661   GCTTACTTTAGAGGTATGCATAATAGACCATTGACAATNCNATTCCAAATTTTTGTTATT
```

รูปที่ 4.10 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการใช้ยูนิเวอร์ซัลไพรเมอร์ M13 ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pUCNisA

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ไนซินเป็นแบคเทอริโอซินที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้กว้าง โดยไนซินมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกทั้งที่สร้างและไม่สร้างสปอร์ โดยเฉพาะ *L. monocytogenes* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคในอาหารที่ควบคุมยากและสามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม (Chen และ Hoover, 2003) จากคุณสมบัติของไนซินที่กล่าวมาเบื้องต้นทำให้องค์การอนามัยโลกอนุญาตและให้การรับรองความปลอดภัยในการใช้ไนซินเป็นสารถนอมอาหาร (Jay, 2000) โดยปัจจุบันได้มีการใช้ไนซินในอุตสาหกรรมอาหารอย่างแพร่หลาย งานวิจัยนี้จะทำการคัดกรองแบคทีเรียที่สร้างไนซินที่แยกได้จากตัวอย่างแหนมและน้ำนมดิบแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย และศึกษาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไนซินเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ในระดับพันธุวิศวกรรม

การคัดกรองแบคทีเรียที่สร้างไนซินโดยทำการแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างแหนม และน้ำนมดิบ Rodriguez และคณะ ในปี 2000 ได้ทำการหาความหลากหลายของแบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซินที่แยกได้จากน้ำนมดิบ พบว่าไนซินเป็นแบคเทอริโอซินที่พบได้มากที่สุดในตัวอย่างน้ำนมดิบ ดังนั้นจึงทำการเลือกเก็บตัวอย่างส่วนใหญ่เป็นน้ำนมดิบ โดยในขั้นต้นจะทำการคัดกรองแบคทีเรียในกลุ่มแลคติก เพราะเนื่องจากในปัจจุบันค้นพบแบคทีเรียเพียงสกุลเดียวที่ผลิตไนซิน คือ *L. Lactis* subsp. *lactis* (De Vuyst และ Vandamme, 1994) ซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่มแลคติก ในการจำแนกแบคทีเรียแลคติกเลือกใช้อาหารที่มีความจำเพาะได้แก่ อาหาร MRS ที่มีบรอมครีซอลเพอร์เพิลเป็นอินดิเคเตอร์ (pH 5.2-6.8) โดยเลือกโคโลนีที่มีโซนเหลืองรอบ ๆ เนื่องจากแบคทีเรียแลคติกสามารถสร้างกรดอินทรีย์ เช่น กรดแลคติก (Ingram, 1956) จึงมีผลทำให้บริเวณรอบโคโลนีมีความเป็นกรดโดยสีอินดิเคเตอร์จะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง จากการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 23 ตัวอย่าง สามารถแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 115 ไอโซเลต โดยอาศัยความแตกต่างของลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็งซึ่งใน 115 ไอโซเลต มีความเป็นไปได้ที่อาจมีบางไอโซเลตเป็นชนิดเดียวกัน จากนั้นทำการเก็บทั้ง 115 ไอโซเลตและนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อแยกให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์เพื่อนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ

การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียที่แยกได้ในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบโดยวิธีแพร่ซึมในวุ้นเป็นวิธีที่นิยมเนื่องจากวิเคราะห์ง่าย, สะดวก, แม่นยำ และมีต้นทุนต่ำ (Pongtharangkul และ Demirci, 2004) แบ่งการทดสอบเป็นสองขั้นตอนโดยขั้นแรกทดสอบโดย

การจุดแบคทีเรีย ไอโซเลตที่แยกได้และนำมาทดสอบการยับยั้งกับแบคทีเรียทดสอบ สำหรับผลการยับยั้งพบว่า 26 ไอโซเลต เกิดบริเวณใสรอบโคโลนี จากนั้นจึงนำทั้ง 26 ไอโซเลต มาทดสอบขั้นที่สองโดยนำไปเลี้ยงในอาหารเหลวและใช้ส่วนน้ำใสของแบคทีเรียมาทำการทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion ก่อนการทดสอบนำส่วนน้ำใสที่ได้มาวัดค่าความเป็นกรด- เบส พบว่าอยู่ในช่วง 4-5 ดังนั้นจึงนำส่วนน้ำใสมาปรับให้ได้ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 5.5 เพื่อยืนยันว่าการเกิดบริเวณใสนั้นไม่ได้มาจากกรดที่แบคทีเรียแลคติกสร้างแต่มาจากผลของสารต่อต้านจุลชีพที่แบคทีเรียชนิดนั้นสร้างขึ้น ซึ่งจากแบคทีเรีย 26 ไอโซเลต เมื่อนำส่วนน้ำใสมาทดสอบขั้นที่ 2 กับเชื้อทดสอบทั้ง 3 ชนิด พบว่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใส มีค่าลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสที่ได้จากการทดสอบขั้นที่ 1 ซึ่งสาเหตุที่บริเวณใสมีขนาดลดลงเนื่องมาจากในการทดสอบขั้นที่ 2 ด้วยวิธี agar well diffusion มีการปรับค่ากรด-เบส ให้เท่ากับ 5.5 ดังนั้นฤทธิ์ในการยับยั้งจึงมาจากสารต้านจุลชีพที่แบคทีเรียสร้างเพียงอย่างเดียว เปรียบเทียบกับวิธี spot test ที่ฤทธิ์ในการยับยั้งมาจากสารต้านจุลชีพร่วมกับกรดที่แบคทีเรียสร้างซึ่งเป็นสมบัติของแบคทีเรียแลคติกจึงทำให้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทดสอบเพิ่มมากขึ้น ผลจากการทดสอบขั้นที่ 2 สามารถคัดเลือกแบคทีเรียได้ 4 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบทั้ง 3 ชนิด ซึ่งได้แก่ MF2, MF3, NHA3 และ B13 โดยที่ MF2 และ MF3 แยกได้จากตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บจากฟาร์มโคนมจังหวัดราชบุรี และ NHAB และ B13 แยกได้จากตัวอย่างแหนม

แบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลต ที่ได้จากการทดลองขั้นที่สองนำมาทดสอบยืนยันการสร้างไนซินด้วยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้จีโนมิกดีเอ็นเอเป็นแม่แบบและใช้ไพรเมอร์ NOKF และ NOKR ที่มีความจำเพาะกับบริเวณยีนไนซินตั้งต้น และใช้เอนไซม์ KOD พอลิเมอเรส ดำเนินปฏิกิริยาพบว่าแบคทีเรีย 2 ไอโซเลต คือแบคทีเรีย MF2 และ MF3 เกิดผลิตภัณฑ์ PCR ที่จำเพาะขนาดประมาณ 300 คู่เบส (De Vos และคณะ, 1993) จากนั้นเลือกเฉพาะ MF2 นำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR เนื่องจากเป็นไอโซเลตที่เจริญเร็วแม้จะถ่ายเชื้อไปหลายครั้งก็ตาม โดยในการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ใช้ไพรเมอร์ NOKF จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบกรอบอ่านรหัสเปิด (ORF) โดยมีตำแหน่งที่ถอดรหัสเป็นยีนไนซินตั้งต้น เริ่มต้นที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งที่ 80-251 คิดเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 171 คู่เบส ซึ่งแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน 57 หมู่ มีน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณ 59 กิโลดัลตัน ผลการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR ของแบคทีเรีย MF2 พบว่ามีความเหมือนกับยีนไนซินเอ และยีนไนซินแซดของแบคทีเรีย *L. lactis* subsp. *lactis* เท่ากับ 99%และ 98% ตามลำดับ ลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับไนซินเอตั้งต้น เท่ากับ

100% และมีความเหมือนกับไนซินแซดตั้งต้น เท่ากับ 98% และจากข้อมูลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีกรดอะมิโนที่ตำแหน่งที่ 27 เป็นฮิสติดีน จึงสามารถระบุได้ว่าไนซินที่แบคทีเรีย MF2 ผลิตได้นั้นเป็นไนซิน เอ ซึ่งไนซินที่พบในธรรมชาติส่วนใหญ่จะเป็นไนซินแซด (De Vos และคณะ, 1993) จากนั้นจึงนำแบคทีเรีย MF2 มาทำการทดสอบจำแนกสกุลทางอนุกรมวิธานโดยอาศัยสมบัติทางสัณฐานวิทยา, วิธีทางชีวเคมีร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 เอสไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอ

จากผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา, สรีรวิทยา และชีวเคมีเบื้องต้นตามหลักของ Bergey 's Manual of Systemic Bacteriology ร่วมกับ การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16 เอสไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอ ของแบคทีเรีย MF2 สามารถจัดจำแนกแบคทีเรีย MF2 เป็นแบคทีเรียในสกุล *L. lactis* subsp. *lactis* ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Devust และ Vandamm ปี1994 ที่กล่าวว่า *L. lactis* subsp. *lactis* เป็นแบคทีเรียเพียงชนิดเดียวที่สามารถผลิตไนซิน การทดสอบทางชีวเคมีเป็นวิธีที่สามารถจำแนก *Lactococcus* ได้ถึงระดับสปีชีส์ย่อย *L. lactis* subsp. *lactis* และ *L. lactis* subsp. *cremoris* เป็น 2 สปีชีส์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมนมและมีความใกล้เคียงกันมากแต่ก็มีข้อแตกต่างโดยที่ *L. lactis* subsp. *lactis* สามารถเจริญได้ที่ 40°ซ และที่ความเข้มข้น NaCl 4% รวมทั้งสามารถย่อยกรดอะมิโนอาร์จินีน ซึ่งแตกต่างจาก *L. lactis* subsp. *cremoris* ที่ไม่มีสมบัติเหล่านี้ (Axelsson, 1998)

L. lactis subsp. *lactis* สายพันธุ์ MF2 นำมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไนซิน การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดังกล่าวเริ่มจากการสร้างดีเอ็นเอติดตามจากผลิตภัณฑ์ PCR ของ *L. lactis* subsp. *lactis* สายพันธุ์ MF2 จากนั้นนำไปติดตามยีนไนซินในจีโนมิกดีเอ็นเอของ *L. lactis* subsp. *lactis* สายพันธุ์ MF2 โดยใช้เทคนิค southern hybridization พบว่าชิ้นดีเอ็นเอ *Pst*I, *Hin*dIII, *Hin*dIII-*Eco*RIII, *Hin*dIII-*Pst*I และ*Pst*I-*Eco*RI เกิดสัญญาณบวกกับดีเอ็นเอติดตาม NisA-probe ที่ตำแหน่งประมาณ 9, 4.5, 4.5, 4.5 และ 5.5 กิโลเบส ตามลำดับ ซึ่งขนาด 4.5 กิโลเบส เป็นขนาดที่มีความเหมาะสมในการโคลนและเลือกโคลนชิ้นดีเอ็นเอ *Hin*dIII ดังนั้นจึงทำการเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอ *Hin*dIII กับพลาสมิดพาหะ pUC18 จากการคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ของ *E. coli* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้คู่ไพรเมอร์ NOKF และ NOKR พบโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอ *Hin*dIII เกิดผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 300 คู่เบสตามต้องการ และให้ชื่อรีคอมบิแนนท์พลาสมิดว่า pUCNisA เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอ NisA โดยใช้ยูนิเวอร์ซัลไพรเมอร์ M13 ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาดประมาณ 700 คู่เบส จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ต่าง ๆ ใน

GenBank วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BlastN พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความเหมือน 100% กับยีน *lciB* ของ *L. lactis* subsp. *lactis* ซึ่งทำหน้าที่ประมวลรหัสโปรตีน แลคโตคอคซินบี อิมมูนิตี การพบยีนบางส่วนของแลคโตคอคซินบี อิมมูนิตี มีความเป็นไปได้ที่จะมีการสร้างแบคเทอริโอซิน 2 ชนิด คือ ไนซินเอ และ แลคโตคอคซินบี ดังนั้นจึงควรทำการทดสอบเพื่อยืนยันความสามารถของ *L. lactis* subsp. *lactis* สายพันธุ์ MF2 ในการสร้างแบคเทอริโอซินทั้ง 2 ชนิด โดยวิธีที่เหมาะสมคือการทดสอบด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเนื่องจากการทดสอบด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเป็นวิธีที่มีความแม่นยำและรวดเร็ว โดยออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีนไนซินเอและแลคโตคอคซินบี ในการยืนยันการสร้างแบคเทอริโอซิน ทั้ง 2 ชนิด

แลคโตคอคซินบี เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. lactis* subsp. *lactis* และ *L. lactis* subsp. *cremoris* จัดเป็นแบคเทอริโอซินในกลุ่มของแบคเทอริโอซินที่มีขนาดเล็กและทนความร้อน โดยถูกจัดจำแนกให้เป็นแบคเทอริโอซินที่แตกต่างกับแบคเทอริโอซินชนิดอื่น ๆ คือไม่มีส่วนประกอบของซิสเตอีน (Cintas และคณะ, 2001) อย่างไรก็ตามเมื่อนำยีน *lciB* ที่พบใน *L. lactis* subsp. *lactis* สายพันธุ์ MF2 ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBanK พบว่าเหมือนกันกับ ยีน *lciB* ที่อยู่บนพลาสมิดใน *L. lactis* subsp. *lactis* สายพันธุ์ BGMN1-5 ซึ่งแยกได้จากกระบวนการผลิตชีส (Kojic และคณะ, 2006) จากการศึกษาของ van Belkum และคณะ ในปี 1992 รายงานว่า *L. lactis* subsp. *cremoris* สายพันธุ์ 9B4 มีส่วนของพลาสมิด p9B4 ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนระบุว่าเป็นยีน *lcnB* และ *lciB* ซึ่งทำหน้าที่สังเคราะห์แลคโตคอคซินบี พลาสมิด p9B4 พบว่ามีขนาด 60 กิโลเบส และมีสมบัติเป็นคอนจูเกทิฟพลาสมิด จากการทดลองพบการสร้าง แลคโตคอคซินที่แตกต่างกัน 3 ชนิด ในสายพันธุ์ 9B4 ได้แก่ แลคโตคอคซินเอ บี และ เอ็ม

Carnobacterium pissicola LV17A สามารถสร้างแบคเทอริโอซิน คาร์โนแบคเทอริโอซิน ได้ 3 ชนิดคือ คาร์โนแบคเทอริโอซินเอ บี และ ซี และยังพบว่ายีนคาร์โนแบคเทอริโอซิน เอ อิมมูนิตี มีความเหมือนกับยีน เอ็นเทอโรซินบี อิมมูนิตี แสดงให้เห็นว่าเกิดกระบวนการป้องกันข้ามชนิดของแบคเทอริโอซินในคาร์โนแบคเทอริโอซินเอ อิมมูนิตี กับ เอ็นเทอโรซินบี อิมมูนิตี (Franz และคณะ,2000) นอกจากนั้นยังพบการสร้างแบคเทอริโอซินมากกว่าหนึ่งชนิดใน *E. coli* ที่แยกได้จากอุจจาระมนุษย์ซึ่งสามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้มากกว่า 1 ชนิด โดยแบคเทอริโอซินที่ *E. coli* สร้างได้แก่ ไมโครซิน และโคลิซิน ชนิดต่าง ๆ ในการสร้างแบคเทอริโอซินมากกว่าหนึ่งชนิดนั้นจะช่วยเพิ่มฤทธิ์ในการยับยั้ง และทำให้แบคทีเรียนั้นสามารถเจริญได้ในภาวะที่แตกต่างกัน (Gordon และ O'Brien, 2006)

จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจที่จะทำการศึกษาต่อไปถึงความสามารถของแบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซินที่แตกต่างกันได้มากกว่าหนึ่งชนิดใน *L. lactis* subsp. *lactis* สายพันธุ์ MF2 ซึ่งจะทำให้แบคทีเรียชนิดนั้นมีข้อดีและมีประโยชน์สูงในการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2539. จุลชีววิทยาทั่วไป. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพมหานคร.

วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด. 2541. การแยกโครโมโซมจากแบคทีเรีย. หนังสือคู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ. เล่มที่1. หน้า11.15-11.17. สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย.

ภาษาอังกฤษ

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. 1999. Current Protocols in Molecular Biology. 4th ed. New York : John Wiley & Sons.

Ayad, E. H. E., Verheul, A., Wouters, J. T.M., and Smit, G. 2002. Antimicrobial-producing wild lactococci isolated from artisanal and non-dairy origins. Inter. Dairy. J. 12: 145-150.

Axelsson, L. 1998. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen, S. & von Wright, A. (eds). Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects 2nd Edition. New York: Marcel Dekker Inc., 1-72.

Beasley, S. S., and Saris, P. E. J. 2004. Nisin-producing *Lactococcus lactis* strains isolated from human milk. Appl. Environ. Microbiol. 70: 5051-5053.

Buchman, G. W., Banerjee, S., and Hansen, J. N. 1988. Structure, expression and evolution of a gene encoding the precursor nisin, a small peptide antibiotic. J. Biol. Chem. 263: 1620-1626.

Cai, Y., Ng, L. K., and Farber, J. M. 1997. Isolation and characterization of nisin producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from bean-sprouts. J. Appl. Microbiol. 83: 499–507.

Chandapati, S., and O'Sullivan, D. J. 1998. Procedure for quantifiable assessment of nutritional parameters influencing nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. J. Biotechnol. 63: 229-233.

Chen, H., and Hoover, D. G. 2003. Bacteriocins and their food applications. Comprehensive Rev. Food. Sci. Food. safe. 2: 82-100.

Cintas, L. M., Casaus, M. P., Herranz, C., Nes, I. F., and Hernandez, P. E. 2001. Review: bacteriocins of lactic acid bacteria. Food Sci. Tech. Int. 7: 281–305.

Coppola, R., Succi, M., Sorrentino, A., Iorizzo, M., and Grazia, L. 2003. Survey of lactic acid bacteria during the ripening of Caciocavallo cheese produced in Molise. Lait. 80: 211-222.

De Vos, W. M., Mulders, J. W. M., Siezen, R. J., Hugenholtz, J. and Kuipers, O. P. 1993. Properties of nisin Z and distribution of its gene , *nis Z*, in *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol. 59:213-218.

De Vuyst, L., and Vandamme, E. J. 1994. Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: properties, biosynthesis, fermentation and applications. In De Vuyst, L., and Vandamme, E. J. (eds.), Bacteriocins of lactic acid bacteria , pp. 152-199. United Kingdom: Chapman & Hall, The Alden Press.

Dodd, H. M., Horn, N., and Gasson, M.J. 1990. Analysis of the genetic determinant for production of the peptide antibiotic nisin. J. Gen. Microbiol. 136:555-566.

Franz, C. M. A. P., Du Toit, M., von Holy, A., Schillinger, U., and Holzapfel, W. H. 1997. Production of nisin-like bacteriocins by *Lactococcus lactis* strains isolated from vegetables. J. Basic Microbiol. 37: 187-196.

Franz, C. M., van Belkum, M. J., Worobo, R. W., Vederas, J. C., and Stiles, M. E. 2000. Characterization of the genetic locus responsible for production and immunity of carnobacteriocin A: the immunity gene confers cross- protection to enterocin B. Microbiology. 146: 621-631.

Flores, S. H., Braga,A. L. D. M., and Alegre, R. M. 2003. A modified method for the turbidimetric assay of nisin. Brazilian archeives of biology and technology. 46: 479-481.

Garde, S., Rodriguez, E., Gaya, P., Medina. M., and Nunez. M. 2001. PCR detection of the structural genes of nisin Z and lacticin 481 in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* INIA 415, a strain isolated from raw milk Manchego cheese. Biotechnol. Lett. 23: 85-90.

Gordon, D. M., and O'Brien, C. L. 2006. Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin production in *Escherichia coli*. Microbiology. 152: 3239-3244.

Giovannoni, S. J. 1991. The polymerase chain reaction. In Stackebrandt, E., and Goodfellow, M. (eds.), Sequencing and hybridization techniques in bacterial systematics. pp. 177–203. New York: John Wiley & Sons, Inc.

Hensen, J. N. 1993. The molecular biology of nisin and its structural analogues . In Hoover, D. G., and Steenson, L. R. (eds.), Bacteriocins of lactic acid bacteria. pp. 93-119: Academic Press.

Holt, J. G., Kreig, N. R., Sneath, P. H. A., and Williams, S. T. 1994. Bergeys Manual of Determinative Bacteriology .9th ed. pp. 527-558. Baltimore: Williams and Wilkins.Hoover, D. and Steenson, L. 1993. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Academic Press, New York: NY.

Imphol, U., Suriyawong, P., Pongpan, A., and Wiwat, C. 2003. Characterization of bacteriocin *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* C7 isolated from fermented food. Thai. J. Biotechnol. 4: 9-15.

Ingram, M., Otoway, F. J. H., and Coppock, J. B. M. 1956. The preservative action of acid substances in food. Chemistry and Industry. 42: 1154-1165.

Jay, J. M. 2000. Modern Food Microbiology. 6th ed. Aspen Publications.

Klaenhammer, T. R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 12:39–85.

Koponen, O., Tolonen, M., Qiao, M.Q., Wahlstrom, G., Helin, J., and Saris, P.E.J. 2002. NisB is required for the dehydration and NisC for the lanthionine formation in the post-translational modification of nisin. Microbiology. 148: 3561-3568.

Kuipers, O. P., Beerthuyzen, M. M., De Ruyter, P. C. M., Luesink, E. J., and De Vos, W. M. 1995. Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. J. Biol. Chem. 270, 27299-27304.

Li, H., and O'Sullivan, J. D. 2002. Heterologous expression of the *Lactococcus lactis* bacteriocin, nisin, in a dairy *Enterococcus* strain. Appl. Environ. Microbiol. 68: 3392-3400.

Mishra, C., and Lambart, J. 1996. Production of anti-microbial substance by probiotics. Asia Pacific J Clin Nutr. 5: 20-24.

Meghrous, J., Fliss, I. Bouksaim, M., and Lacroix, C. 1999. Digoxigenin-labeled probe for rapid identification of nisinogenic *Lactococcus lactis* strains. FEMS Microbiology Letters.171: 43-48.

Mulders, J. W., Boerrigter, I. J., Rollema, H. S., Siezen, R. J., and de Vos, W. M. 1991. Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant Eur. J. Biochem. 201(3): 581-584.

Nandakumar, R., Nandakumar, M. P., and Mattiasson, B. 1999. Quantification of nisin in flow-injection immunoassay systems. Biosensors & Bioeletronics. 15: 241-247.

Nilsson, B. W., Paranjype, R. N., DePaola, A., and Strom, S. M. 2003. Sequence polymorphism of the 16S rRNA gene of *Vibrio vulnificus* is a possible indicator of strain virulence. J. Clin. Microbiol. 41:442-446.

Noonpakdee, W., Santivarangkna, C., Jumriangrit. P., Sonomoto, K., and Panyim, S. 2003. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from *nham*, a traditional Thai fermented sausage. J. Food. Microbiol. 81: 137-145.

Ohmomo, S., Nitisinprasert, S., and Hiranpradit, S. 2003. How to screen favorable lactic acid bacteria strains, from the case of bacteriocin producing strain and silage fermentation starter strain. The World of Indigenous Fermented Foods for Technology Development and Food Safety, Aug. 1-6, 2003. Kasetsart University, Bangkok.

Oscariz, J. C., and Pisabarro, A. G. 2001. Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by gram-positive bacteria. Int. Microbiol. 4:13–19.

Parente, E., Brienza, C., Moles, M., and Ricciardi, A. 1995. A comparision of methods for the measurement of bacteriocin activity. J. Microbial. Method. 22: 95-108.

Park, S. H., Itoh, K., Kikuchi, E., Niwa, H., and Fujisawa, T. 2003. Identification and characteristics of nisin Z producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from Kimchi. Current Microbiology. 46 , pp. 385–388.

Pongtharangkul. T., and Demirci. A. 2004. Evaluation of agar diffusion bioassay for nisin quantification. Appl. Microbiol. Biotechnol., 65: 268-72.

Ra, R., Beerthuyzen. M. M., de Vos, W. M., Saris, P.E.J., and Kuipers, O. P. 1999. Effect of gene disruptions in the nisin gene cluster of *Lactococcus lactis* on nisin production and producer immunity. Microbiology. 145: 1227-1233.

Rauch, P. J. G., Kuipers, O.P., Siezen, R.J., and De Vos, W. M. 1994. Genetics and protein engineering of nisin. In de Vuyst, L. and Vandamme, E. J. (Eds.) Bacteriocins of lactic acid bacteria. Chapman & Hall, The Alden Press, Oxford, United Kingdom, pp. 223-243.

Reunanen, J., and Saris, P. E. J. 2003. Microplate bioassay for nisin in foods, based on nisin-induced green fluorescent protein fluorescence. Appl. Env. Microbiol. 69: 4214-4218

Rodriguez, J. M., Cintas, L. M., Casaus, P., Horn, N., Dodd, H. M., Hernandez, P. E., and Gasson, M. J. 1995. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* strains from dry fermented sausages. J. Appl. Bacteriol. 78: 109-115.

Rodriguez, J. M., and Dodd, H. M. 1996. Genetic determinants for the biosynthesis of nisin, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis*. Microbiologia. 12(1): 61-74.

Rodriguez, E., Gonzahlez, B., Gaya, P., Nunez, M., and Medina, M. 2000. Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. Inter. Dairy. J. 10: 7-15.

Rose, N. L., Sporns, P., and McMullen, L. M. 1999. Detection of bacteriocins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Appl. Environ. Microbiol., 65: 2238-2242.

Sambrook, J., and Russell, D. W. 2001. Molecular Cloning:a Laboratory Manual. 3rd. New york: Cold Spring Habor Laboratory Press.

Siegers, K., Heinzmann S., and Entian K-D. 1996. Biosynthesis of lantibiotic nisin posttranslational modifications of its prepeptide occurs at a multimeric membrane-associated lanthionine synthetase complex. J. Biol. Chem. 271 : 12294-12301.

Steen, M. T., Chung, Y. J., and Hansen, J. N. 1991. Characterization of the nisin gene as part of a polycistronic operon in the chromosome of *Lactococcus lactis* ATCC 11454. Appl. Environ. Microbiol . 57: 1181-1188.

Stein,T., Heinzmann, S., Solovieva, I. And Entian, K-D. 2003. Function of *Lactococcus lactis* nisin immunity genes *nisI* and *nisFEG* after coordinated expression in the surrogate host *Bacillus subtilis.* J. Biol. Chem. 278, 89-94.

Turcotte, C., Lacroix, C., Khead, E., Grignon, L., and Fliss, I. 2004. A rapid turbidometric microplate bioassay for accurate quantification of lactic acid bacteria bacteriocins. Int. J. Food. Microbiol. 90: 283-293.

van Belkum, M. J., Kok, J., and Venema, G. 1992. Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of *lcnB*, a third bacteriocin determinant from the lactococcal bacteriocin plasmid p9B4-6. Appl.Environ.Microbiol. 58: 572-577.

Waksman, S. 1961. The role of antibiotics in nature. Perspectives in Biology and Medicine. 4(3): 271-272.

Zendo, T., Fukao, M., Ueda, K., Higuchi, T., Nakayama, J., and Sonomoto, K. 2003. Identification of the lantibiotic nisin Q, a new natural nisin variant produced by *Lactococcus lactis* 61-14 isolated from a river in Japan. Biosci. Biotechnol. Biochem. 67: 1616-1619.

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. **อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria-Bertani (LB broth)** (Sambrook และ Russell, 2001)

ทริปโตน	10.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-เบสเป็น 7.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

2. **อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria-Bertani (LB agar)** (Sambrook และ Russell, 2001)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ละลายวุ้น 15 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

3. **อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 2YT (2YT broth) (Sambrook และ Russell, 2001)**

ทริปโตน	16.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์	10.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-เบสด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 20 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. **อาหารเลี้ยงเชื้อ** MRS

โปรติเอสเปปโตน	10.0	กรัม
เนื้อวัวสกัด	10.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์	5.0	กรัม
กลูโคส	22.0	กรัม
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	2.0	กรัม
ไดแอมโมเนียมซิเตรท	1.8	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.2	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต	0.089	กรัม
ทวีน 80	1.0	มล.

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบสให้เท่ากับ 6.2 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที

5. Carbohydrate fermentation medium (BBL™ Phenol Red Broth Base)

ทริปโตน	10.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0	กรัม
ฟีนอลเรด (Phenol Red)	18.0	มก.

เติมคาร์โบไฮเดรตที่ต้องการทดสอบลงไป 1 เปอร์เซ็นต์ ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบสให้เท่ากับ 7.4 ± 0.2 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 115 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 115°ซ เป็นเวลา 15 นาที

6. MRS medium for arginine hydrolysis (Coppola **และคณะ**, 2003)

โปรติเอสเปปโตน	10.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์	5.0	กรัม
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	2.0	กรัม
โซเดียมซิเตรท	2.0	กรัม

แอล-อาร์จินีน (L-arginine)	3.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.2	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต	0.089	กรัม
tween 80	1.0	มล.

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบสให้เท่ากับ 6.2 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. กลีเซอรอล

นำกลีเซอรอลมานึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121^{O}ซ เป็นเวลา 20 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนึ่งฆ่าเชื้อซ้ำอีกรอบหนึ่ง

2. สารปฏิชีวนะ

ละลายแอมพิซิลลิน 100 มิลลิกรัมในน้ำ 1 มิลลิลิตร ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตตขนาดรูกว้าง 0.45 ไมโครเมตร เก็บรักษาไว้ในหลอดไมโครฟิวจ์ที่อุณหภูมิ -20^{O}ซ เมื่อนำมาใช้แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4^{O}ซ ได้นาน 1 เดือน

3. ชุดสกัดพลาสมิด QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany)

ประกอบด้วย

- Buffer P1
- Buffer P2
- Buffer N3
- Buffer PB
- Buffer PE
- Buffer EB
- Rnase A
- Collection tube
- QIAprep Spin colum

ก่อนใช้ชุดสกัดพลาสมิดครั้งแรกให้เติม RNase A ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงใน Buffer P1 และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4^{O}ซ และเติมเอธานอลปริมาตร 24 มล. ลงใน Buffer PE

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. **ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจล** DNA Extraction Kit

ประกอบด้วย

Silica powder suspension

Binding solution

Concentrated washing buffer

TBE conversion buffer

ทำตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต

5. **สารละลาย** 10% SDS

ชั่ง sodium dodecyl sulfate 10 กรัม ค่อยๆละลายในน้ำปลอดประจุที่อุณหภูมิ 60^{O}ซ ปริมาตร 80 มล. เมื่อละลายหมดเติมน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 100 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121^{O}ซ ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที (หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อครั้งแรกแล้วจะไม่สามารถนำไปนึ่งฆ่าเชื้อซ้ำได้อีกเนื่องจากสารละลาย SDS จะเสียสภาพ)

6. Denaturation buffer

โซเดียมไฮดรอกไซด์	0.5 โมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	1.5 โมลาร์

ละลายโซเดียมคลอไรด์ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. จนหมดแล้วจึงละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เติมน้ำน้ำปลอดประจุจนครบปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121^{O}ซ เป็นเวลา 20 นาที

7. Neutralization buffer

Trismabase	0.5 โมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	3.0 โมลาร์

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-เบสเป็น 7.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น เติมน้ำปลอดประจุจนครบปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121^{O}ซ เป็นเวลา 20 นาที

8. **สารละลาย** 20XSSC

โซเดียมคลอไรด์	3.0 โมลาร์
โซเดียมอะซีเตต (CH_3COONa)	0.3 โมลาร์

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-เบสเป็น 7.0 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121^{O}ซ เป็นเวลา 20 นาที

9. **สารละลาย** 2XSSC/0.1%SDS

ละลาย 20XSSC ปริมาตร 10 มล. ในน้ำปลอดประจุ 89 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121^{O}ซ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 10%SDS ปริมาตร 1 มล. ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดลอง

10. **สารละลาย** 0.5XSSC/0.1%SDS

ละลาย 20XSSC ปริมาตร 2.5 มล. ในน้ำปลอดประจุ 96.5 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121^{O}ซ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 10%SDS ปริมาตร 1 มล. ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดลอง

11. **ชุดติดฉลากและติดตามตำแหน่งดีเอ็นเอ** DIG High Prime DNA labeling and detection starter kit I (Roche, Germany)

ประกอบด้วย

หลอดหมายเลข 1. DIG-High Prime, 5X conc.

หลอดหมายเลข 2. DIG-labeled control DNA 5 μg/ml

หลอดหมายเลข 3. DNA dilution buffer

หลอดหมายเลข 4. Anti-Digoxygenin-AP Conjugate 750 U/ml

หลอดหมายเลข 5. NBT/BCIP, 50X conc.

ขวดหมายเลข 6. Blocking solution, 10X conc.

ขวดหมายเลข 7. DIG Easy Hyb Granules (add 64 ml sterile double distilled water, dissolve at 37^{O}C)

และสารละลายที่ต้องเตรียมเพิ่มในการทดลองเป็นดังนี้

Maleic acid buffer

กรดมาเลอิก	0.1 โมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	0.15 โมลาร์

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-เบสด้วยเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็น 7.5 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121^{O}ซ เป็นเวลา 20 นาที

Blocking solution

ละลาย 10X blocking solution ใน Maleic acid buffer ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วด้วยอัตราส่วน 1 ต่อ 9 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดลอง

Detection buffer

Trismabase	0.1	โมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	0.1	โมลาร์

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-เบสด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 9.5 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121^{O}ซ เป็นเวลา 20 นาที

12. สารละลาย CTAB/NaCl (10%CTAB ใน 0.7 M NaCl)

CTAB	10.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	0.7	โมลาร์

ละลาย CTAB ในน้ำปลอดประจุที่อุณหภูมิ 60^{O}ซ ปริมาตร 80 มล.จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เมื่อละลายหมดแล้วเติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 100 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121^{O}ซ เป็นเวลา 20 นาท

13. สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-เบส 8.0

EDTA ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$)	186.1	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์	20	กรัม

ละลาย EDTA ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. เติมเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์ คนให้เข้ากันรอให้เย็นลงแล้วปรับค่าความเป็นกรด-เบสด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 8.0 ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มล. ด้วยน้ำปลอดประจุ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121^{O}ซ ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

14. สารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ความเป็นกรด-เบสเป็น 8.0

Trismabase ($C_4H_{11}NO_3$)	121.1	กรัม
กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น	42	มล.

ละลาย Trismabase ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น คนให้เข้ากันรอให้เย็นลงแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-เบสด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 8.0 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 20 นาที

15. บัฟเฟอร์ TE ความเป็นกรด-เบสเป็น 8.0

Tris-HCl	10.0	มิลลิโมลาร์
EDTA	1.0	มิลลิโมลาร์

ผสมสารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ที่มีค่าความเป็นกรด-เบส 8.0 ปริมาตร 10 มล. เข้ากับสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ที่มีค่าความเป็นกรด-เบสเป็น 8.0 ปริมาตร 2 มล. ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มล. ด้วยน้ำปลอดประจุ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

16. บัฟเฟอร์ 50X Tris-acetate (TAE)

Trismabase	242.0	กรัม
กรดอะซีติกเข้มข้น	57.1	มล.
สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0	100.0	มล.

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มล.ด้วยน้ำปลอดประจุ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

17. สารละลายฟีนอล (phenol)

นำฟีนอลในรูปเกล็ดของแข็งมาหลอมเหลวในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 68 °ซ เติมผงไฮดรอกซีควิโนลีน ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1% แล้วเติม Tris-HCl เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-เบสเป็น 8.0 ใช้ magnetic stirrer ค่อยๆคนเป็นเวลา 15 นาที ดูดน้ำใสส่วนบนทิ้ง เติม Tris-HCl เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ความเป็นกรด-เบสเป็น 8.0 ลงไปอีกครั้ง ค่อยๆคนเป็นเวลาประมาณ 15 นาที แล้วดูดน้ำใส่ส่วนบนทิ้ง ทำเช่นนี้ต่อไปเรื่อยๆจนกระทั่งได้สารละลายที่ความเป็นกรด-เบสมากกว่า

7.8 (วัดด้วย pH paper) สุดท้ายเติม Tris-HCl เข้มข้น 0.1 โมลาร์ความเป็นกรด-เบสเป็น 8.0 ที่ผสม β-mercaptoethanol ปริมาตร 0.1 เท่าของสารละลายที่ได้ เก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ ในขวดสีชาที่ปิดแน่น

18. สารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

ผสมสารละลายฟีนอลอิ่มตัวด้วย Tris-HCl เข้ากับคลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอลในอัตราส่วน ฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ เป็น 25:24:1 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4°ซ

19. สารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

ผสมคลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์เข้าด้วยกันในอัตราส่วน 24:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ

20. สารละลายสำหรับสกัดพลาสมิด

สารละลาย I

กลูโคส	50	มิลลิโมลาร์
สารละลาย Tris-HCl ความเป็นกรด-เบสเป็น 8.0	25	มิลลิโมลาร์
สารละลาย EDTAความเป็นกรด-เบสเป็น 8.0	10	มิลลิโมลาร์

ผสมส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกันแล้วเติมน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื่อที่เชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

สารละลาย II

ผสมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 นอร์มัล ปริมาตร 0.2 มล. เข้ากับน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 8.8 มล. แล้วเติมสารละลาย SDS 10% ปริมาตร 1.0 มล. เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

สารละลาย III

ผสมสารละลายโพแทสเซียมอะซีเตท 5.0 โมลาร์ ปริมาตร 50 มล. กับกรดอะซีติกเข้มข้น ปริมาตร 11.50 มล.นึ่งฆ่าเชื่อที่เชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

21. Loading dye สำหรับดีเอ็นเอ

Bromphenolblue	0.025 %
ซูโครส	40 %

ละลายส่วนผสมในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°ซ

22. สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE

ละลายผงเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บในภาชนะที่ปิดสนิทในที่มืด

23. สารละลายโซเดียมอะซีเตท เข้มข้น 3 โมลาร์ ความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 5.2

ละลายโซเดียมอะซีเตท น้ำหนัก 204 กรัม ในน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตรประมาณ 400 มล. นำไปปรับค่าความเป็นกรด-เบสให้เป็น 5.2 ด้วยกรดอะซีติกปริมาตรประมาณ 57 มล. ปรับปริมาตรให้เป็น 500 มล. ด้วยน้ำปลอดประจุ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

24. สารละลาย RNase A เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายผง RNase A น้ำหนัก 10 มก. ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ครบปริมาตร 1 มล. เก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ

25. สารละลาย X-gal ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายผง X-gal น้ำหนัก 500 มก. ในสารละลาย dimethylformamide ให้ครบปริมาตร 10 มล. เก็บที่อุณหภูมิ -20^{O}ซ ในหลอดปิดสนิทและมืด

26. สารละลาย IPTG ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

ละลายผง IPTG น้ำหนัก 0.2 กรัม ในน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 10 มล. กรองผ่านหัวกรองฆ่าเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิ -20^{O}ซ

27. สารละลาย 3 % ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (3% Hydrogen peroxide solution)

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 35 %	8.6	กรัม
น้ำกลั่น	100	มล.

28. Nessler's reagent

โซเดียมไฮดรอกไซด์	72.0	กรัม
เมอร์คิวริคไอโอไดด์	25.0	กรัม
โพแทสเซียมไอโอไดด์	20.0	กรัม

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในน้ำกลั่น 350 มิลลิลิตร จากนั้นเตรียมสารละลายไอโอไดด์โดยละลายเมอร์คิวริคไอโอไดด์ และโพแทสเซียมไอโอไดด์ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เทสารละลายไอโอไดด์ลงในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรเท่ากับ 500 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้สักครู่ใช้สารละลายส่วนใสด้านบนในการทดสอบ

29. ชุดย้อมสีแกรม

29.1 สารละลายคริสตัลไวโอเล็ต (Crystal Violet Solution)

คริสตัลไวโอเล็ต	4.0	กรัม
น้ำกลั่น	400	มล.

29.2 สารละลายแกรมไอโอดีน (Gram' s Iodine Solution)

ไอโอดีนคริสตัล	10.0	กรัม
โปแตสเซียมไอโอดีน (KI)	0.5	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	50	มล.

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในน้ำช้า ๆ แล้วจึงเติมไอโอดีนคริสตัลลงไปและเติมโปแตสเซียมไอโอไดด์เป็นลำดับสุดท้าย

29.3 สารละลายแอลกอฮอล์ 95% (95% Alcohol)

แอลกอฮอล์บริสุทธิ์	9.5	มล.

เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเท่ากับ 100 มล.

29.4 สารละลายสีซาฟรานิน (Safranin Staining Solution)

ซาฟรานิน	4.0	กรัม
น้ำกลั่น	200.0	มล.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

การจำแนกเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์มาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง MRS Agar บ่มที่ 30°ซ 24 ชั่วโมง นำมาทดสอบสมบัติทางชีวเคมี ดังนี้

1. การตรวจสอบการติดสีแกรม

เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ลงแผ่นสไลด์ นำไปผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง ย้อมสีด้วยสารละลายคริสตัลไวโอเล็ต เป็นเวลา 1 นาที เอียงสไลด์ เทสีทิ้งพร้อมทั้งหยดสารละลายไอโอดีนนาน 1 นาที เทสารละลายไอโอดีนทิ้ง พร้อมทั้งหยดแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ล้างสีออกนาน 10-20 วินาที ล้างแผ่นสไลด์ด้วยน้ำกลั่นแล้วจึงย้อมสีด้วยสารละลาย safranin O เป็นเวลา 1 นาที ล้างสีด้วยน้ำกลั่นอีกครั้งซับแผ่นสไลด์ให้แห้ง นำไปตรวจดูลักษณะเซลล์ การจัดเรียงตัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

2. การทดสอบการสร้างเอนไซม์แคทาเลส

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่เลี้ยงไว้ 18-24 ชั่วโมง มาเขี่ยลงบนกระดาษกรองที่หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3 เปอร์เซ็นต์ 2-3 หยด ถ้าพบโคโลนีที่เกิดฟองอากาศ แสดงว่าแบคทีเรียนั้นให้ผลบวก โดยใช้ *Bacillus subtillis* ที่ได้รับจากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นเชื้อควบคุมผลบวก ส่วนโคโลนีที่ไม่เปลี่ยนแปลงจะให้ผลลบ

3. การทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ

ถ่ายเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหาร Carbohydrate fermentation (ภาคผนวก ก.หมายเลข 5) ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนที่ใช้ทดสอบคือ น้ำตาลกลูโคส, แมนนิทอล, ราฟฟิโนส และ แลคโตส ในปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยใช้ฟีนอลเรด เป็นอินดิเคเตอร์ บ่มเชื้อที่ 30°ซ ตรวจผลทุกวัน โดยดูการเจริญของเชื้อซึ่งจะเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์จากสีแดงเป็นสีเหลือง

4. การทดสอบความสามารถในการย่อยกรดอะมิโนอาร์จินีน

ถ่ายเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหารเหลวที่ใช้ทดสอบการย่อยอาร์จินีน (ภาคผนวก ก. หมายเลข 6) บ่มเชื้อที่ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลการเกิดแอมโมเนียในหลอดโดยใช้ Nessler's reagent เชื้อ *L. Lactis* subsp. *lactis* จะให้ผลการทดสอบเป็นบวก คือสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองส้ม โดยเปรียบเทียบกับหลอดควบคุมผลลบที่ไม่มีการเติมกรดอะมิโน

5. การทดสอบการเจริญในอุณหภูมิต่าง ๆ

ถ่ายเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหารแข็ง MRS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40°ซ และ 45°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลการเจริญของเชื้อที่สามารถเจริญได้ตามรอยขีดบนอาหารแข็ง

6. การทดสอบความสามารถในการทนสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

เตรียมอาหารแข็ง MRS ที่มีบรอมเครซิลเพอร์เพิล เป็นอินดิเคเตอร์ให้มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 4.5%และ 6.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลการเจริญของเชื้อสังเกตการเปลี่ยนสีของอาหาร MRS จากสีม่วงเป็นสีเหลือง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

การเปรียบเทียบความเหมือนโดยโปรแกรม Blast N version 2.27

1. ผลจากการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 เอสไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอ ของแบคทีเรีย MF2

gb|AY626141.1| *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strain SCC43K 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=1510

Score = 910 bits (459), Expect = 0.0

Identities = 462/463 (99%), Gaps = 0/463 (0%) Strand=Plus/Minus

```
MF2:      20  CTTGATGAGCTTTCCACTCTCACCAACGTCCTTCTCTACCAACAGAGTTTTACGATCCGA  79
              |||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||
SCC43K:   465 CTTGATGAGCTTTCCACTCTCACCAACGTTCTTCTCTACCAACAGAGTTTTACGATCCGA  406

MF2:      80  AAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCC  139
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
SCC43K:   405 AAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCC  346

MF2:      140 CTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCACCC  199
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
SCC43K:   345 CTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCACCC  286

MF2:      200 TCTCAGGTCGGCTATGTATCATCGCCTTGGTGAGCCTTTACCTCACCAACTAGCTAATAC  259
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
SCC43K:   285 TCTCAGGTCGGCTATGTATCATCGCCTTGGTGAGCCTTTACCTCACCAACTAGCTAATAC  226

MF2:      260 AACGCGGGATCATCTTTGAGTGATGCAATTGCATCTTTCAAACTTAAAACTTGTGTTTAA  319
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
SCC43K:   225 AACGCGGGATCATCTTTGAGTGATGCAATTGCATCTTTCAAACTTAAAACTTGTGTTTAA  166

MF2:      320 AGTTTTTATGCGGTATTAGCATTCGTTTCCAAATGTTGTCCCCCGCTCAAAGGCAGATTC  379
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
SCC43K:   165 AGTTTTTATGCGGTATTAGCATTCGTTTCCAAATGTTGTCCCCCGCTCAAAGGCAGATTC  106

MF2:      380 CCCACGCGTTACTCACCCGTTCGCTGCTCATCCAGTTGGTACAAGTACCAACCTTCAGCG  439
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
SCC43K:   105 CCCACGCGTTACTCACCCGTTCGCTGCTCATCCAGTTGGTACAAGTACCAACCTTCAGCG  46

MF2:      440 CTCAACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCTGA  482
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
SCC43K:   45  CTCAACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCTGA  3
```

2. ผลจากการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของบางส่วนที่ได้จากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pUCNisA

gb|AY422080.1| *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* plasmid BGMN1-5 LcnB (*lcnB*) and LciB (*lciB*) genes, complete cds Length=709

Score = 799 bits (403), Expect = 0.0

Identities = 475/475 (100%), Gaps = 0/475 (0%) Strand=Plus/Plus

```
pUCNisA  5    AAGATACTAGAACAGGAAAAACAATATGTAAACAGACAATTGACACAGCAAGTTATACAT  64
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
lciB    235   AAGATACTAGAACAGGAAAAACAATATGTAAACAGACAATTGACACAGCAAGTTATACAT  294

pUCNisA  65   TTGGTGTAATGGCAGAAGGATGGGGAAAAACATTCCACTAATAAAAAAGAACTGAGGTTT  124
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
lciB    295   TTGGTGTAATGGCAGAAGGATGGGGAAAAACATTCCACTAATAAAAAAGAACTGAGGTTT  354

pUCNisA 125   AGAGTTAATGaaaaaaaaaGTTGATACAGAAAAACAAATTACTTCTTGGGCATCTGACTT  184
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
lciB    355   AGAGTTAATGAAAAAAAAAGTTGATACAGAAAAACAAATTACTTCTTGGGCATCTGACTT   414

pUCNisA 185   AGCTTCCAAAAATGAAACAAAGGTTCAAGAAAAATTAATACTGTCTTCTTATATTCAGGA  244
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
lciB    415   AGCTTCCAAAAATGAAACAAAGGTTCAAGAAAAATTAATACTGTCTTCTTATATTCAGGA  474

pUCNisA 245   CATCGAAAACCATGTTTACTTTCCAAAAGCAATGATTTCTTTAGaaaaaaaaTTACGAGA  304
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
lciB    475   CATCGAAAACCATGTTTACTTTCCAAAAGCAATGATTTCTTTAGAAAAAAAAATTACGAGA  534

pUCNisA 305   CCAAAATAATATTTGCGCTTTATCAAAAGAAGTCAATCAGTTTTATTTTAAAGTTGTTGA  364
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct   535   CCAAAATAATATTTGCGCTTTATCAAAAGAAGTCAATCAGTTTTATTTTAAAGTTGTTGA  594

pUCNisA 365   AGTAAATCAAAGAAAATCCTGGATGGTAGGTTTGATAGTTTAATTATCTCAGAATTATTG  424
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
lciB    595   AGTAAATCAAAGAAAATCCTGGATGGTAGGTTTGATAGTTTAATTATCTCAGAATTATTG  654

pUCNisA 425   ATTCTAttttttAAGAAGCTCCTTTGTAAAGGAGCTTCTTTTATCTTGATTTAA  479
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
lciB    655   ATTCTATTTTTTTAAGAAGCTCCTTTGTAAAGGAGCTTCTTTTATCTTGATTTAA  709
```

การเปรียบเทียบความเหมือนโดยโปรแกรม Blast X version 2.2.7

1. ผลจากการเปรียบเทียบความเหมือนของกรดอะมิโนบางส่วนที่ได้จารีคอมบิแนนท์พลาสมิด pUCNisA

sp|P35517|LCIB_LACLC Lactococcin B immunity protein

gb|AAB22373.1| lactococcin B immunity [Lactococcus lactis]

gb|AAQ97215.1| LciB [*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*] Length=91

Score = 182 bits (461), Expect = 2e-44

Identities = 91/91 (100%), Positives = 91/91 (100%), Gaps = 0/91 (0%)

Frame = +3

```
Query  132  MKKKVDTEKQITSWASDLASKNETKVQEKLILSSYIQDIENHVYFPKAMISLEKKLRDQN 311
            MKKKVDTEKQITSWASDLASKNETKVQEKLILSSYIQDIENHVYFPKAMISLEKKLRDQN
Sbjct  1    MKKKVDTEKQITSWASDLASKNETKVQEKLILSSYIQDIENHVYFPKAMISLEKKLRDQN  60


Query  312  NICALSKEVNQFYFKVVEVNQRKSWMVGLIV  404
            NICALSKEVNQFYFKVVEVNQRKSWMVGLIV
Sbjct  61   NICALSKEVNQFYFKVVEVNQRKSWMVGLIV  91
```

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวไปรมา แก้วสามศรี เกิดเมื่อวันที่ 31 ธันวาคม พ.ศ. 2524 ที่จังหวัดสมุทรสาคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ในปีการศึกษา 2545 และเข้ารับการศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2546

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย