รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การโคลนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนสำหรับแบคทีริโอซิน และ 16S rDNA จาก *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* FFL17-2

Cloning and DNA sequence analyses of a gene encoding bacteriocin and 16S rDNA from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* FFL17-2

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
เงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2553

หัวหน้าโครงการวิจัย

ดร. ประวัติ อังประภาพรชัย

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

บทคัดย่อ

Lactococcus lactis subsp. *lactis* FFL17-2 เป็นแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากปลาส้มฟัก จ. ลพบุรี ซึ่งมีรายงานว่าสามารถสร้างแบคทีริโอซินได้ ในงานวิจัยนี้ได้ทำการโคลนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA จากแบคทีเรียดังกล่าว และพบว่ามีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA จาก *L. lactis* ที่มีรายงานในฐานข้อมูล สูงสุด 100% ซึ่งเป็นการยืนยันว่าเชื้อดังกล่าวเป็นสมาชิกของ species *L. lactis* จริง และสอดคล้องกับผลการจัดจำแนกด้วยวิธีทางชีวเคมีที่มีรายงานไว้ก่อนหน้านี้ นอกจากนี้ได้ทำการโคลนชิ้นส่วนของยีน *lanB* ซึ่งเชื่อว่าเป็นยีนเกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แบคทีริโอซิน และจากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัส พบว่ามีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของ NisB จาก *L. lactis* สายพันธุ์ต่างๆ 99.2-100% และมีความพยายามในการโคลนยีนที่กำหนดรหัสแบคทีริโอซิน (*lanA*) พบว่ามีหลายตำแหน่งที่ยังไม่สามารถระบุนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้องได้ แต่จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัส (บางส่วน) มีความเป็นไปได้ว่ายีนดังกล่าวน่าจะเหมือนกับ *nisA* หรือ *nisZ* ของ *L. lactis*

คำสำคัญ: แบคทีเรียแลคติก, *Lactococcus lactis*, FFL17-2, แบคทีริโอซิน, 16S rDNA, NisB

Abstract

Lactococcus lactis subsp. *lactis* FFL17-2 is a bacteriocin-producing lactic acid bacterium, isolated from fermented minced-fish (Pla-Som-Fug), Lopburi Province. In this study, 16S rDNA of the bacteria was cloned, and analysis of the DNA sequence showed 100% identity to 16S rDNA of *L. lactis* from the database, thus confirming the previous identification by biochemical methods that the bacteria is truly a member of the species *L. lactis*. In addition, a fragment of a gene (*lanB*), putatively involved in bacteriocin biosynthesis, was cloned and analysed. Its deduced amino acid sequence showed high similarity with NisB of several *L. lactis* (99.2-100% identity). An attempt was made to identify the bacteriocin structural gene (*lanA*), without complete success. However, analyses of the partial DNA sequence and deduced amino acid sequence suggested that the gene was probably highly similar with *nisA* or *nisZ* of *L. lactis*

Keywords: lactic acid bacteria, *Lactococcus lactis*, FFL17-2, bacteriocin, 16S rDNA, NisB

ประกาศคุณูปการ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ รศ.สมใจ ศิริโภค ที่อนุเคราะห์เชื้อ *L. lactis* subsp. *lactis* FFL17-2 สำหรับใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ และขอขอบคุณ น.ส.ภัทร์ศยา จันทราวุฒิกร น.ส.สรารัตน์ ช่อไม้ทอง น.ส.สุกัญญา เอี่ยมสำอาง น.ส.สุทธิดา บุรผากา น.ส.เบญจรงค์ ทองใบ และนายวัลลภ ลี่เด็น ที่มีส่วนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วง

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2553

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	2
Abstract	3
ประกาศคุณูปการ	4
สารบัญ	5
บัญชีตาราง	6
บัญชีภาพประกอบ	6
บทที่ 1 บทนำ	7
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	8-9
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	10-12
3.1 จุลินทรีย์ และอาหารเลี้ยงเชื้อ	10
3.2 การทดสอบสมบัติบางประการของ *L. lactis* subsp. *lactis* FFL17-2	10
3.3 การสกัด chromosomal DNA	10
3.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)	11
3.5 การโคลนผลผลิต PCRและการทำ Transformation	11
3.6 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA และการวิเคราะห์ลำดับ DNA	12
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	13-24
4.1 การยืนยันความถูกต้องของ *L. lactis* subsp. *lactis* FFL17-2	13
4.2 การโคลนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA	13
4.3 การโคลนชิ้นส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตแบคทีริโอซิน	14
4.4 การออกแบบ primers เพื่อโคลนยีนสำหรับแบคทีริโอซิน	17
4.5 การโคลนยีนสำหรับแบคทีริโอซิน	17
บทที่ 5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	25-27
บรรณานุกรม	28-30
ประวัติย่อผู้วิจัย	31-33

บัญชีตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primers และสภาวะในการทำ PCR 11
ตารางที่ 2 ลำดับกรดอะมิโนจากฐานข้อมูลที่มีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของ *lanB* 16
ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์จาก EMBL Database ที่มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *lanA* 24

บัญชีภาพประกอบ

หน้า

รูปที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA จาก *L. lactis* subsp. *lactis* FFL17-2 ความยาว 1,572 bp 14
รูปที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนของยีน *lanB* และลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัส 16
รูปที่ 3 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนของยีน *lanB* จาก *L. lactis* subsp. *lactis* FFL17-2 และยีนสำหรับ *nis* operon จาก *L. lactis* 6F3, *L. lactis* subsp. *lactis* NIZO R5 และ *L. lactis* subsp. *lactis* M78 18-22
รูปที่ 4 แถบ DNA ขนาดประมาณ 1 kb ที่เกิดจากการทำ PCR ด้วย primers Nis-fwd + Nis-rev 23
รูปที่ 5 (a) chromatogram ที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (บางส่วน) ของผลผลิต PCR 23
(b) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณที่น่าจะเป็นยีนสำหรับแบคทีริโอซิน (*lanA*) ของ *L. lactis* subsp. *lactis* FFL17-2 และลำดับกรดอะมิโน ที่ได้จากการแปลรหัส 24
รูปที่ 6 การเปรียบเทียบระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *lanA* จาก *L. lactis* subsp. *lactis* FFL17-2 และ *nisA* จาก *L. lactis* subsp. *lactis* UQ2 24

บทที่ 1
บทนำ

แบคทีริโอซินเป็นสารโปรตีนที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ และพบในแบคทีเรียหลายชนิด แต่มีความสนใจในการศึกษาแบคทีริโอซินจากแบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria หรือ LAB) เป็นอันมาก เนื่องจากเป็นเชื้อที่เกี่ยวข้องกับการผลิตอาหารหมัก และส่วนใหญ่ได้รับการยอมรับว่ามีความปลอดภัยในการบริโภค ดังนั้นแบคทีริโอซินที่สร้างจากเชื้อดังกล่าวจึงน่าจะมีความปลอดภัยเช่นเดียวกัน

แบคทีริโอซินจาก LAB ชนิดหนึ่งที่มีการศึกษาอย่างละเอียดและมีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารอย่างแพร่หลายคือ nisin A โดยใช้ในการควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิดและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสีย แต่เนื่องจากข้อจำกัดบางประการของ nisin A และความเสี่ยงในการเกิดเชื้อที่ดื้อต่อ nisin A เมื่อมีการใช้เพียงชนิดเดียวอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานาน จึงมีความสนใจในการค้นหา LAB ที่สร้างแบคทีริโอซินชนิดใหม่ และประเมินศักยภาพของแบคทีริโอซินที่ค้นพบ ในการใช้กับอาหารเพื่อทดแทนหรือร่วมกับการใช้ nisin A

ก่อนหน้านี้ได้มีการแยก LAB ที่สร้างแบคทีริโอซินได้ คือไอโซเลท FFL17-2 จากปลาส้มฟัก จ. ลพบุรี และได้มีการศึกษาสมบัติของแบคทีริโอซินดังกล่าว นอกจากนี้ยังได้ทำการจัดจำแนกเบื้องต้น และพบว่าเชื้อดังกล่าวน่าจะเป็น *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (สมใจ และคณะ, 2550) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการโคลนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนสำหรับแบคทีริโอซิน จาก *L. lactis* subsp. *lactis* FFL17-2 และรวมทั้งการโคลน 16S rDNA เพื่อใช้ในการจัดจำแนกเชื้อ เปรียบเทียบกับวิธีทางชีวเคมีที่มีรายงานไว้ก่อนหน้านี้

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แบคทีริโอซินเป็นสารเปปไทด์หรือโปรตีนที่มีสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ ซึ่งสังเคราะห์ผ่านไรโบโซม โดยพบได้ในแบคทีเรียหลายชนิด (Galvez *et al.*, 2007) แต่หลายปีที่ผ่านมามีความสนใจในการศึกษาแบคทีริโอซินจาก LAB เป็นอันมาก ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียดังกล่าวมีความสำคัญในการผลิตอาหารหมักและมีการบริโภคมาเป็นเวลานานโดยไม่ทำให้เกิดอันตราย LAB จำนวนมากจึงได้รับการยอมรับว่ามีความปลอดภัยในการบริโภค (Generally recognized as safe หรือ GRAS) (Jack *et al.*, 1995) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าแบคทีริโอซินจาก LAB มีสมบัติอื่นๆที่ทำให้มีศักยภาพสำหรับใช้กับผลิตภัณฑ์อาหาร ได้แก่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ยูคาริโอต เสียสภาพไปเมื่อถูกย่อยด้วย protease ในทางเดินอาหาร ทนต่อ pH และความร้อนได้ดี และสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลากหลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสีย เป็นต้น (Galvez *et al.*, 2007)

อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าจะมีการค้นพบแบคทีริโอซินจาก LAB เป็นจำนวนมากในปัจจุบัน แต่แบคทีริโอซินซึ่งเป็นที่ยอมรับและมีการใช้อย่างแพร่หลายคือ nisin A จาก *L. lactis* โดย nisin A ได้รับการรับรองความปลอดภัยจาก World Health Organization และ Food and Agriculture Organization และมีการใช้ในหลายประเทศทั่วโลก (Delves-Broughton *et al.*, 1996) และยังมีรายงานการค้นพบ nisin Z (Mulders *et al.*, 1991) nisin Q (Zendo *et al.*, 2003) และ nisin F (de Kwaadsteniet *et al.*, 2008) ซึ่งเป็น variants ของ nisin ที่พบในธรรมชาติ และสร้างจาก *L. lactis* เช่นเดียวกัน โดยลำดับกรดอะมิโนของ nisin propeptides ทั้งสามชนิดมีความแตกต่างจากของ nisin A จำนวน 1 (H27N), 4 (A15V, M21L, H27N และ I30V) และ 2 ตำแหน่ง (H27N และ I30V) ตามลำดับ (Wirawan *et al.*, 2006; de Kwaadsteniet *et al.*, 2008) นอกจากนี้ยังมีรายงานถึง nisin U ซึ่งเป็นอีกหนึ่ง variant ของ nisin ที่สร้างจาก *Streptococcus uberis* อีกด้วย (Wirawan *et al.*, 2006) แต่อย่างไรก็ตามนอกจาก nisin A แล้ว variants ต่างๆของ nisin ยังไม่มีการรับรองให้ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร

แบคทีริโอซินเป็นกลุ่มของสารโปรตีนที่มีความหลากหลายทั้งทางด้านโครงสร้างและพันธุศาสตร์ โดยพบว่ายีนสำหรับแบคทีริโอซินนั้นอาจพบได้ทั้งบนพลาสมิดและบนโครโมโซม ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของแบคทีริโอซิน และยังพบว่ายีนสำหรับแบคทีริโอซินและยีนอื่นที่ทำหน้าที่ที่เกี่ยวข้อง มักมีการจัดเรียงตัวกันเป็นกลุ่ม (cluster) (Jack *et al.*, 1995) ในกรณีของยีนสำหรับการสร้าง nisin A ซึ่งเป็นกลุ่มของยีนที่มีผู้สนใจศึกษากันเป็นอันมาก พบว่ากลุ่มของยีนดังกล่าวอยู่บนโครโมโซมของ *L. lactis* และประกอบด้วยยีนจำนวน 11 ยีนซึ่งแบ่งเป็น 3 operons คือ *nisABTCIP*, *nisRK* และ *nisFEG* (Cheigh and Pyun, 2005) ซึ่งการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องดังกล่าวทำให้ทราบกลไกการสังเคราะห์ nisin A ได้อย่างละเอียด โดยที่ *nisA* เป็นยีนโครงสร้างสำหรับ nisin A ในขณะที่ยีนอื่นๆทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการ

ลำเลียง nisin A ออกนอกเซลล์ ภูมิคุ้มกันต่อ nisin A การดัดแปลงโมเลกุลของ nisin A ภายหลังจากการสังเคราะห์ และควบคุมการสังเคราะห์ nisin A เป็นต้น (Lubelski *et al.*, 2008) นอกจากนี้ความรู้เรื่องลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนสำหรับ nisin โดยเฉพาะอย่างยิ่ง nisin A และ nisin Z นำไปสู่การดัดแปลงโปรตีนทั้งสอง โดยการทำให้เกิดการกลายของยีนและศึกษาความเปลี่ยนแปลงของ activity ของ nisin ที่ได้ แต่อย่างไรก็ตามพบว่า nisin ที่ได้รับการดัดแปลงส่วนใหญ่ไม่ได้มี activity เพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเป็นเพราะ nisin ในรูปแบบที่พบในธรรมชาตินั้นเป็นรูปแบบที่เหมาะสม และถูกคัดเลือกตามธรรมชาติมาแล้ว (Lubelski *et al.*, 2008)

ถึงแม้ว่า nisin A จะเป็นแบคทีริโอซินที่ได้รับการยอมรับให้ใช้ในอาหารและมีการใช้อย่างแพร่หลาย แต่ nisin A ก็มีข้อจำกัดคือ มีความคงตัวต่ำที่ pH ในช่วงที่เป็นกลางและเบส และนอกจากนี้การใช้ nisin A อย่างต่อเนื่องเป็นเวลานาน อาจนำไปสู่การเกิดเชื้อสายพันธุ์ที่ดื้อต่อ nisin A ขึ้นมาได้ (Fujita *et al.*, 2007) จึงทำให้มีความสนใจในการค้นหาแบคทีริโอซินชนิดใหม่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีริโอซินจาก LAB เพื่อใช้แทนหรือร่วมกับ nisin A ในอนาคต เช่น Lacticin Q ที่สร้างจาก *L. lactis* ซึ่งมีความคงตัวสูงในสภาวะที่เป็นเบส และยังออกฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้รวดเร็วกว่า nisin A (Fujita *et al.*, 2007) และ lacticin 3147 จาก *L. lactis* ซึ่งมีการประเมินศักยภาพในการใช้ควบคุม nonstarter LAB ในการผลิตเนยแข็ง รวมทั้งเพื่อควบคุมเชื้อก่อโรค และยืดอายุผลิตภัณฑ์อาหาร (Guinane *et al.*, 2005) และรวมถึงการแยก LAB สายพันธุ์ใหม่จากธรรมชาติ ที่อาจผลิตแบคทีริโอซินชนิดใหม่ ที่มีความปลอดภัยและมีศักยภาพในการควบคุมจุลินทรีย์ไม่พึงประสงค์ในผลิตภัณฑ์อาหาร (Shin *et al.*, 2008; Rouse *et al.*, 2008)

ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้มีการแยก LAB ไอโซเลท FFL17-2 จากปลาส้มฟัก จ. ลพบุรี โดยพบว่าเชื้อดังกล่าวมีการสร้างแบคทีริโอซินซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้หลายชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus sakei*, *Lb. plantarum*, *Leuconostoc mesenteriodes*, *Pediococcus pentosaceus*, *Streptococcus salivarius*, *Bacillus cereus*, *B. circulans*, *B. coagulans* และ *Listeria monocytogenes* โดยแบคทีริโอซินดังกล่าวสามารถทนความร้อนที่ 100°C เป็นเวลา 10 นาทีโดยไม่ทำให้ activity ลดลง และมีความคงตัวที่ pH ในช่วง 4-7 (สมใจ และคณะ, 2550) และจากการจัดจำแนก FFL17-2 โดยใช้ชุดทดสอบ API 20 Strep (BioMerieux) พบว่าเป็น *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ที่ระดับความถูกต้อง 98% (สมใจ และคณะ, 2550)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นการต่อยอดจากงานวิจัยเดิม โดยทำการโคลนยีนสำหรับแบคทีริโอซินจาก *L. lactis* subsp. *lactis* FFL17-2 ดังกล่าว และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ได้ นอกจากนี้ยังมีการโคลนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA เพื่อใช้ในการจัดจำแนกเชื้อ เปรียบเทียบกับวิธีทางชีวเคมีที่มีรายงานไว้แล้ว

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 จุลินทรีย์ และอาหารเลี้ยงเชื้อ

L. lactis subsp. *lactis* FFL17-2 (สมใจ และคณะ, 2550) จะถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS medium (de Man *et al.*, 1960) ที่ 30°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ส่วน *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen, California, USA) ที่ใช้เป็นตัวรับ recombinant plasmid จะถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria Bertani (LB) medium (Sambrook *et al.*, 1989) ที่มีการเติม ampicillin ความเข้มข้น 100 μg/ml ที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2 การทดสอบสมบัติบางประการของ *L. lactis* subsp. *lactis* FFL17-2

ทำการยืนยันความถูกต้องของ *L. lactis* subsp. *lactis* FFL17-2 ที่เก็บรักษาไว้ โดยนำเชื้อดังกล่าวมาทดสอบสมบัติบางประการตามที่มีรายงานไว้ก่อนหน้านี้ ซึ่งได้แก่การศึกษารูปร่างของเซลล์ การติดสีแกรม รวมทั้งความสามารถในการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* TISTR118 และ *Lactobacillus sakei* 912 ด้วยวิธี Agar spot assay และ Agar well diffusion assay (สมใจ และคณะ, 2550)

3.3 การสกัด chromosomal DNA

ในการสกัด chromosomal DNA จาก *L. lactis* subsp. *lactis* FFL17-2 ทำโดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Lewington *et al.* (1987)

โดยทำการเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ปริมาตร 10 ml ให้มีอายุ 24 ชั่วโมง เก็บเซลล์โดยวิธี centrifugation แล้วนำเซลล์มาทำ suspension ในสารละลายที่ประกอบด้วย 0.25 M sucrose และ 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) ปริมาตร 240 μl แล้วเติมสารละลาย lysozyme ความเข้มข้น 10 mg/ml ปริมาตร 50 μl บ่มที่ 37°C 10 นาที เติม 20% SDS ปริมาตร 160 μl และ 5 M NaCl ที่เย็นจัด ปริมาตร 80 μl จากนั้นบ่มในน้ำแข็งหรือที่ 4°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงในเครื่อง microcentrifuge เป็นเวลา 5 นาที แล้วแยกส่วนที่เป็นของเหลวนำมาสกัดโปรตีนออกด้วย phenol/chloroform (1:1) ปริมาตร 1x 2 ครั้ง และสกัดด้วย chloroform ปริมาตร 1x 1 ครั้ง หลังจากนั้นทำการตกตะกอน DNA โดยการเติม 3 M sodium acetate ปริมาตร 0.1x และ absolute ethanol ปริมาตร 2x แล้วบ่มที่ -70°C เป็นเวลา 30 นาที ทำการแยก DNA โดยการปั่นเหวี่ยงในเครื่อง microcentrifuge เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำตะกอน DNA ที่ได้มาละลายใน UltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water (Invitrogen, California, USA) ที่ปราศจากเชื้อ

3.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)

ในการทำ PCR จะใช้เครื่อง Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) โดยที่ใน 50 µl PCR reaction ประกอบด้วยสารละลาย chromosomal DNA ที่ใช้เป็นต้นแบบประมาณ 250 ng, 1x PCR buffer ที่ผสม $MgCl_2$ ความเข้มข้น 2 mM, dNTP แต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 2 mM, primer แต่ละชนิด ปริมาณ 50 pmol (สังเคราะห์โดยบริษัท ไบโอดีไซน์ จำกัด จ.ปทุมธานี ประเทศไทย) และ *Taq* DNA polymerase ปริมาณ 0.4 unit โดยเตรียมใน UltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water (Invitrogen, California, USA) ที่ปราศจากเชื้อ หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis โดยที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primers และสภาวะในการทำ PCR ได้แสดงในตารางที่ 1

สำหรับ Colony PCR ทำโดยใช้โคโลนีของแบคทีเรียเป็นต้นแบบแทนการใช้สารละลาย DNA

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primers และสภาวะในการทำ PCR

Primers	Sequence (5' to 3')	PCR conditions	Reference
fD1 rD1 rP2	ccgaattcgtcgacaacagagtttgatcctggctcag cccgggatccaagcttaaggaggtgatccagcc cccgggatccaagcttacggctaccttgttacgactt	35 cycles of 95°C (2 min), 42°C (30 s) and 72°C (4 min); and 72°C (20 min) final extension	Weisburg *et al.*, 1991
M13 Forward (-20) M13 Reverse	gtaaaacgacggccag caggaaacagctatgac	30 cycles of 92°C (2 min), 48°C (2 min) and 72°C (2.5 min)	Invitrogen, California, USA
LanBFwd LanBRev LanCFwd LanCRev	tatgatcgagaa(a/g)(c/t)a(g/t)a(a/t)agatatgg ttatta(a/c/g/t)(a/g)ca(a/c/g/t)atg(a/c/g/t)a(c/t)(a/g/t)a(a/t)act taatttaggat(a/t)(a/c/g/t)(c/g)(c/t)(a/c/g/t)(a/c)a(c/t)gg acc(a/t)g(g/t)(a/c/g/t)(a/c/g/t)(a/c/g/t)(a/c/g/t)cc(a/g)t(a/g)(a/g)cacca	30 cycles of 92°C (1.5 min), 40°C (2.5 min) and 72°C (1.5 min)	Wirawan *et al.*, 2006
Nis-fwd Nis-rev	cattaacaaatctaaaacagtc ttcgtctccatagcaaagc	30 cycles of 92°C (2 min), 48°C (2 min) and 72°C (2 min)	This study

3.5 การโคลนผลผลิต PCR และการทำ Transformation

การโคลนผลผลิต PCR และ Transformation ทำโดยใช้ TA Cloning Kit (Invitrogen, California, USA) โดยนำ DNA ที่ได้จากการสังเคราะห์โดยวิธี PCR มาโคลนในพลาสมิด pCR2.1 และ

นำ ligation mix ที่ได้ไปใช้ทำ transformation กับ One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli* ตามวิธีที่ระบุโดยผู้ผลิต

3.6 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA และการวิเคราะห์ลำดับ DNA

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA จัดทำโดยสถาบันจีโนม จ.ปทุมธานี ประเทศไทย และการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับ DNA ทำโดยใช้โปรแกรมจาก European Bioinformatics Institute, Cambridge, UK (www.ebi.ac.uk/Tools/)

บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 การยืนยันความถูกต้องของ *L. lactis* subsp. *lactis* FFL17-2

เนื่องด้วยในตอนต้นของการวิจัย พบปัญหาการปนเปื้อนใน stock เชื้อ *L. lactis* subsp. *lactis* FFL17-2 ซึ่งเป็นแบคทีเรียหลักที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ จึงจำเป็นต้องทำการแยกเชื้อดังกล่าวให้บริสุทธิ์อีกครั้ง โดยนำเชื้อ *L. lactis* subsp. *lactis* FFL17-2 รุ่นต่างๆที่เก็บรักษาไว้ใน stock ที่อุณหภูมิ -20°C และ -70°C มาเลี้ยงให้เจริญในอาหาร MRS broth แล้วทำการทดสอบสมบัติบางประการเพื่อยืนยันความถูกต้องของเชื้อ ซึ่งได้แก่การศึกษารูปร่างของเซลล์ การติดสีแกรม รวมทั้งความสามารถในการยับยั้ง *S. aureus* TISTR118 และ *Lb. sakei* 912 ด้วยวิธี Agar spot assay และ Agar well diffusion assay

จากนั้นคัดเลือกเชื้อที่มีสมบัติตรงกับที่มีรายงานไว้ก่อนหน้านี้ ซึ่งก็คือเซลล์รูปไข่ ติดสีแกรมบวก และสามารถยับยั้ง *S. aureus* TISTR118 และ *Lb. sakei* 912 ได้ (สมใจ และคณะ, 2550) นำมาสกัด chromosomal DNA เพื่อใช้ในการศึกษาลำดับต่อไป

4.2 การโคลนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA

ทำการสังเคราะห์ชิ้นส่วนของยีนสำหรับ 16S rRNA (หรือ 16S rDNA) จาก *L. lactis* subsp. *lactis* FFL17-2โดยนำ chromosomal DNA ที่สกัดได้มาใช้เป็นต้นแบบในการทำ PCR โดยใช้ primers 2 ชุดคือ fD1 + rD1 และ fD1 + rP2 และพบว่าเกิดผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 1.5 kb ซึ่งตรงกับขนาดที่คาดหวัง จากทั้งสองปฏิกิริยาดังกล่าว

ทำการโคลนผลผลิต PCR ทั้งสองในพลาสมิด pCR2.1 แล้วนำ ligation mix ที่ได้ไปใช้ในการทำ transformation กับ One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli* จากนั้นทำการคัดเลือกโคลนของ *E. coli* TOP10 ที่มี recombinant plasmid โดยวิธี Blue/White screening และ Colony PCR ด้วย primers M13 Forward (-20) และ M13 Reverse ซึ่งโคลนที่มี recombinant plasmid จะให้ผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 1.7 kb

สุ่มคัดเลือกโคลนที่ให้ผลผลิต PCR ตามที่ต้องการ เพื่อทำการสกัดและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ recombinant DNA (จัดทำโดยสถาบันจีโนม จ.ปทุมธานี ประเทศไทย) โดยพบว่าชิ้นส่วน DNA ที่สังเคราะห์ขึ้นโดยวิธี PCR ดังกล่าวข้างต้นมีขนาด 1,572 bp (รูปที่ 1)

```
   1 CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTA
  61 ATACATGCAAGTTGAGCGCTGAAGGTTGGTACTTGTACCGACTGGATGAGCAGCGAACGG
 121 GTGAGTAACGCGTGGGGAATCTGCCTTTGAGCGGGGGACAACATTTGGAAACGAATGCTA
 181 ATACCGCATAAAAACTTTAAACACAAGTTTTAAGTTTGAAAGATGCAATTGCATCACTCA
 241 AAGATGATCCCGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGATGATA
 301 CATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTA
 361 CGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCG
 421 TGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGGTAGAGAAGAACGTTGGTGAGAG
 481 TGGAAAGCTCATCAAGTGACGGTAACTACCCAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCA
 541 GCCGCGGTAATACGTAGGTCCCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCA
 601 GGTGGTTTATTAAGTCTGGTGTAAAAGGCAGTGGCTCAACCATTGTATGCATTGGAAACT
 661 GGTAGACTTGAGTGCAGGAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA
 721 TATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGCCTGTAACTGACACTGAGGCTC
 781 GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGT
 841 GCTAGATGTAGGGAGCTATAAGTTCTCTGTATCGCAGCTAACGCAATAAGCACTCCGCCT
 901 GGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTG
 961 GAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTCGTG
1021 CTATTCCTAGAGATAGGAAGTTCCTTCGGGACACGGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCG
1081 TCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATTGTTAG
1141 TTGCCATCATTAAGTTGGGCACTCTAACGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGG
1201 GGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATG
1261 GTACAACGAGTCGCGAGACAGTGATGTTTAGCTAATCTCTTAAAACCATTCTCAGTTCGG
1321 ATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACG
1381 CCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGGGAGTTGGGA
1441 GTACCCGAAGTAGGTTGCCTAACCGCAAGGAGGGCGCTTCCTAAGGTAAGACCGATGACT
1501 GGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTAAGC
1561 TTGGATCCCGGG
```

รูปที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA จาก *L. lactis* subsp. *lactis* FFL17-2 ความยาว 1,572 bp บริเวณที่เป็นตัวเข้มและขีดเส้นใต้คือตำแหน่งของ primers fD1 และ rD1 ตามลำดับ

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 1,502 bp โดยไม่รวมบริเวณที่เกิดจาก primers fD1 และ rD1 (รูปที่ 1) ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NCBI Blast พบว่ามีความเหมือนสูงสุด 100% กับ 16S rDNA จาก *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 (1502/1502), *L. lactis* subsp. *lactis* CV56 (1502/1502) และ *L. lactis* subsp. *lactis* KF147 (1502/1502) ที่มีรายงานอยู่ใน EMBL Database (Accession Numbers: X64887/AE005176, CP002365 และ CP001834 ตามลำดับ) ซึ่งจากการที่ 16S rDNA ของ *L. lactis* subsp. *lactis* FFL17-2 มีความเหมือนกับ 16S rDNA จาก *L. lactis* สายพันธุ์ต่างๆเกินกว่า 99% เป็นการยืนยันว่าแบคทีเรียดังกล่าวเป็นสมาชิกของ species *Lactococcus lactis* อีกทางหนึ่ง

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA จาก *L. lactis* subsp. *lactis* FFL17-2 ความยาว 1,502 bp ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ ถูกบันทึกไว้ใน EMBL Database โดยมี Accession number คือ HE805077

4.3 การโคลนชิ้นส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตแบคทีริโอซิน

เมื่อพิจารณาจากสมบัติการทนความร้อนของแบคทีริโอซินจาก *L. lactis* subsp. *lactis* FFL17-2 และความสามารถในการยับยั้งเชื้อที่หลายหลาย (broad spectrum) จึงมีความเป็นไปได้ที่แบคทีริโอซินดังกล่าวจะอยู่ในกลุ่ม Lantibiotics ดังนั้นในการโคลนยีนสำหรับแบคทีริโอซินดังกล่าวจึงเริ่มจากการใช้

degenerate primers ที่ออกแบบมาเพื่อสังเคราะห์ชิ้นส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการผลิตแบคทีริโอซินคือ *lanB* และ *lanC* ซึ่งน่าจะอยู่ใกล้เคียงกับยีนโครงสร้างสำหรับแบคทีริโอซิน (*lanA*) (Wirawan *et al.*, 2006)

ทำการสังเคราะห์ชิ้นส่วนของยีนทั้งสองดังกล่าว โดยนำ chromosomal DNA ของ *L. lactis* subsp. *lactis* FFL17-2 มาใช้เป็นต้นแบบในการทำ PCR และใช้ primers 2 ชุดคือ LanBFwd + LanBRev และ LanCFwd + LanCRev พบว่าในชุดแรก (LanBFwd + LanBRev) มีผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 450 bp เกิดขึ้น ส่วนชุดที่สอง (LanCFwd + LanCRev) ไม่เกิด DNA ผลผลิตจากการทำ PCR

จากนั้นนำผลผลิต PCR ขนาด 450 bp ดังกล่าวมาโคลนในพลาสมิด pCR2.1 และทำ transformation กับ One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli* แล้วทำการคัดเลือกโคลนของ *E. coli* TOP10 ที่มี recombinant plasmid โดยวิธี Blue/White screening และ Colony PCR ด้วย primers M13 Forward (-20) และ M13 Reverse สุ่มคัดเลือกโคลนที่ให้ผลผลิต Colony PCR ขนาดประมาณ 650 bp เพื่อทำการสกัดและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ recombinant DNA (จัดทำโดยสถาบันจีโนม จ. ปทุมธานี ประเทศไทย) โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน DNA ดังกล่าวได้แสดงไว้ในรูปที่ 2

เมื่อใช้โปรแกรม Transeq แปลรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวเป็นลำดับกรดอะมิโน (รูปที่ 2) แล้วทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม FASTA ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 2 โดยพบว่าลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของชิ้นส่วนของยีน *lanB* มีความเหมือนกับ NisB จาก *L. lactis* สูงถึง 99.2-100% ซึ่งมีรายงานว่า NisB ทำหน้าที่ในกระบวนการ maturation ของ nisin (Sen *et al.*, 1999) และถูกกำหนดรหัสโดยยีน *nisB* ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ *nis* operon: *nisABTCIP* (Cheigh and Pyun, 2005)

ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้สูงที่ยีนสำหรับแบคทีริโอซินของ *L. lactis* subsp. *lactis* FFL17-2 (*lanA*) จะมีความคล้ายคลึงกับยีน *nisA* ซึ่งกำหนดรหัส nisin prepeptide (Cheigh and Pyun, 2005) และน่าจะตั้งอยู่บริเวณ upstream ของชิ้นส่วนของยีน *lanB* ที่โคลนได้

```
   1 TATGATCGAGAAGCAGATAGATATGGTGGATTTGATACTTTAGAGTTATCCGAAGCAATA
                               G  F  D  T  L  E  L  S  E  A  I

  61 TTTTGTGCCGATTCTAAAATTATTCCAAATTTGCTTACATTGATAAAAGATACTAATAAT
     F  C  A  D  S  K  I  I  P  N  L  L  T  L  I  K  D  T  N  N

 121 GATTGGAAAGTCGATGATGTATCAATCTTGGTGAATTATTTATATCTGAAATGCTTCTTT
     D  W  K  V  D  D  V  S  I  L  V  N  Y  L  Y  L  K  C  F  F

 181 CAGAATGATAACAAAAAGATTCTTAATTTTTTGAATTTAGTTAGTCCTAAAAAGGTTAAA
     Q  N  D  N  K  K  I  L  N  F  L  N  L  V  S  P  K  K  V  K

 241 GAAAATGTCAATGAAAAGATTGAACATTATCTTAAGCTTCTGAAAGTTAATAATCTAGGT
     E  N  V  N  E  K  I  E  H  Y  L  K  L  L  K  V  N  N  L  G

 301 GACCAAATTTTTTATGACAAGAATTTTAAAGAATTAAAGCATGCCATAAAAAATTTATTT
     D  Q  I  F  Y  D  K  N  F  K  E  L  K  H  A  I  K  N  L  F

 361 TTAAAAATGATAGCTCAAGATTTTGAACTTCAGAAAGTTTATTCAATTATTGACAGTATA
     L  K  M  I  A  Q  D  F  E  L  Q  K  V  Y  S  I  I  D

 421 GTCCATTTGCATAATAA
```

รูปที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนของยีน *lanB* ความยาว 437 bp และลำดับกรดอะมิโนความยาว 129 กรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัส โดยบริเวณที่เป็นตัวเข้มและขีดเส้นใต้แสดงตำแหน่งของ primers LanBFwd และ LanBRev ตามลำดับ

ตารางที่ 2 ลำดับกรดอะมิโนจากฐานข้อมูลที่มีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนความยาว 129 กรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของ *lanB*

Organism	**Protein**	**% identity**	**% similarity**	**amino acid overlap**	**Accession No.**
L. lactis subsp. *lactis* IO-1	NisB	100	100	129	H5SXJ4
L. lactis subsp. *lactis*	NisB	99.2	100	129	D9IXB6
L. lactis	NisB	99.2	100	129	Q48673
L. lactis	NisB	99.2	99.2	129	C4PKI4
L. lactis subsp. *lactis*	NisB	99.2	99.2	129	P20103
L. lactis subsp. *lactis* CV56	NisB	99.2	99.2	129	F2HKA5
L. lactis	Lantibiotic dehydratase (NiqB)	66.7	89.9	129	B5MET7
Streptococcus salivarius	Putative lantibiotic dehydratase (SlvB)	37.4	67.2	131	H2D759

4.4 การออกแบบ primers เพื่อโคลนยีนสำหรับแบคทีริโอซิน

ในการโคลนยีนสำหรับแบคทีริโอซินของ *L. lactis* subsp. *lactis* FFL17-2 ทำโดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *nis* operon จาก *L. lactis* ที่มีรายงานใน EMBL Database ซึ่งได้แก่ *L. lactis* 6F3, *L. lactis* subsp. *lactis* NIZO R5 และ *L. lactis* subsp. *lactis* M78 (Accession numbers: X68307, L16226 และ HM219853 ตามลำดับ) มาทำการเปรียบเทียบโดยใช้โปรแกรม ClustalW (รูปที่ 3) จากนั้นเลือกบริเวณของนิวคลีโอไทด์ที่ตรงกันในทั้งสามสายพันธุ์ และครอบคลุมยีน *nisA* และส่วน 5' ของยีน *nisB* มาใช้ในการออกแบบ primers Nis-fwd และ Nis-rev (รูปที่ 3) ซึ่งผลผลิต PCR ที่ได้จะมีขนาดประมาณ 1 kb

4.5 การโคลนยีนสำหรับแบคทีริโอซิน (*lanA*)

นำ chromosomal DNA จาก *L. lactis* subsp. *lactis* FFL17-2 มาใช้เป็นต้นแบบในการทำ PCR ด้วย primers Nis-fwd + Nis-rev และพบว่าเกิดผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 1 kb ซึ่งตรงกับขนาดที่คาดหวัง (รูปที่ 4)

มีความพยายามในการโคลนชิ้นส่วน DNA ขนาด 1 kb ดังกล่าวในพลาสมิด pCR2.1 ก่อนที่จะนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ แต่ไม่ประสบความสำเร็จ จึงนำผลผลิต PCR นั้นไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (บางส่วน) โดยตรง ซึ่งได้ผลดังแสดงในรูปที่ 5

จะเห็นได้ว่าจากผลของการหาลำดับนิวคลีโอไทด์จากผลผลิต PCR โดยตรงในกรณีนี้ มีหลายตำแหน่งที่ไม่สามารถระบุนิวคลีโอไทด์ได้ (รูปที่ 5a และ 5b) แต่เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าว (*lanA*) ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม NCBI Blast พบว่ามีความเหมือนกับยีน *nisA* และ *nisZ* ของ *L. lactis* สายพันธุ์ต่างๆ 85.0% ดังแสดงในตารางที่ 3 และรูปที่ 6

```
FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          TAGTCTTATAACTATACTGACAATAGAAACATTAACAAATCTAAAACAGTCTTAATTCTA 1020
L16226          ------------------------GAAACATTAACAAATCTAAAACAGTCTTAATTCTA 35
HM219853        TAGTCTTATAACTATACTGACAATAGAAACATTAACAAATCTAAAACAGTCTTAATTCTA 689
                                           Nis-fwd

FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          TCTTGAGAAAGTATTGGTAATAATATTATTGTCGATAACGCGAGCATAATAAACGGCTCT 1080
L16226          TCTTGAGAAAGTATTGGTAATAATATTATTGTCGATAACGCGAGCATAATAAACGGCTCT 95
HM219853        TCTTGAGAAAGTATTGGTAATAATATTATTGTCGATAACGCGAGCATAATAAACGGCTCT 749


FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          GATTAAATTCTGAAGTTTGTTAGATACAATGATTTCGTTCGAAGGAACTACAAAATAAAT 1140
L16226          GATTAAATTCTGAAGTTTGTTAGATACAATGATTTCGTTCGAAGGAACTACAAAATAAAT 155
HM219853        GATTAAATTCTGAAGTTTGTTAGATACAATGATTTCGTTCGAAGGAACTACAAAATAAAT 809

                            nisA ->
FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          TATAAGGAGGCACTCAAAATGAGTACAAAAGATTTTAACTTGGATTTGGTATCTGTTTCG 1200
L16226          TATAAGGAGGCACTCAAAATGAGTACAAAAGATTTTAACTTGGATTTGGTATCTGTTTCG 215
HM219853        TATAAGGAGGCACTCAAAATGAGTACAAAAGATTTTAACTTGGATTTGGTATCTGTTTCG 869


FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          AAGAAAGATTCAGGTGCATCACCACGCATTACAAGTATTTCGCTATGTACACCCGGTTGT 1260
L16226          AAGAAAGATTCAGGTGCATCACCACGCATTACAAGTATTTCGCTATGTACACCCGGTTGT 275
HM219853        AAGAAAGATTCAGGTGCATCACCACGCATTACAAGTATTTCGCTATGTACACCCGGTTGT 929


FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          AAAACAGGAGCTCTGATGGGTTGTAACATGAAAACAGCAACTTGTCATTGTAGTATTCAC 1320
L16226          AAAACAGGAGCTCTGATGGGTTGTAACATGAAAACAGCAACTTGTCATTGTAGTATTCAC 335
HM219853        AAAACAGGAGCTCTGATGGGTTGTAACATGAAAACAGCAACTTGTCATTGTAGTATTCAC 989

                     nisA *
FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          GTAAGTAAATAACCAAATCAAAGGATAGTATTTT-TTAGTTCAGATATGGATACTATCCT 1379
L16226          GTAAGCAAATAACCAAATCAAAGGATAGTATTTTGTTAGTTCAGACATGGATACTATCCT 395
HM219853        GTAAGCAAATAACCAAATCAAAGGATAGTATTTTGTTAGTTCAGACATGGATACTATCCT 1049

                                                                   nisB ->
FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          ATTTTTATAAGTTATTTAGGGTTGCTAAATAGCTTATAAAAATAAAGAGAGGAAAAAACA 1439
L16226          ATTTTTATAAGTTATTTAGGGTTGCTAAATAGCTTATAAAAATAAAGAGAGGAAAAAACA 455
HM219853        ATTTTTATAAGTTATTTAGGGTTGCTAAATAGCTTATAAAAATAAAGAGAGGAAAAAACA 1109


FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          TGATAAAAAGTTCATTTAAAGCTCAACCGTTTTTAGTAAGAAATACAATTTTATGTCCAA 1499
L16226          TGATAAAAAGTTCATTTAAAGCTCAACCGTTTTTAGTAAGAAATACAATTTTATCTCCAA 515
HM219853        TGATAAAAAGTTCATTTAAAGCTCAACCGTTTTTAGTAAGAAATACAATTTTATCTCCAA 1169


FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          ACGATAAACGGAGTTTTACTGAATATACTCAAGTCATTGAGACTGTAAGTAAAAATAAAG 1559
L16226          ACGATAAACGGAGTTTTACTGAATATACTCAAGTCATTGAGACTGTAAGTAAAAATAAAG 575
HM219853        ACGATAAACGGAGTTTTACTGAATATACTCAAGTCATTGAGACTGTAAGTAAAAATAAAG 1229


FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          TTTTTTTGGAACAGTTACTACTAGCTAATCCTAAACTCTATGATGTTATGCAGAAATATA 1619
L16226          TTTTTTTGGAACAGTTACTACTAGCTAATCCTAAACTCTATGATGTTATGCAGAAATATA 635
HM219853        TTTTTTTGGAACAGTTACTACTAGCTAATCCTAAACTCTATGATGTTATGCAGAAATATA 1289


FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          ATGCTGGTCTGTTAAAGAAGAAAAGGGTTAAAAAATTATTTGAATCTATTTACAAGTATT 1679
L16226          ATGCTGGTCTGTTAAAGAAGAAAAGGGTTAAAAAATTATTTGAATCTATTTACAAGTATT 695
HM219853        ATGCTGGTCTGTTAAAGAAGAAAAGGGTTAAAAAATTATTTGAATCTATTTACAAGTATT 1349


FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          ATAAGAGAAGTTATTTACGATCAACTCCATTTGGATTATTTAGTGAAACTTCAATTGGTG 1739
L16226          ATAAGAGAAGTTATTTACGATCAACTCCATTTGGATTATTTAGTGAAACTTCAATTGGTG 755
HM219853        ATAAGAGAAGTTATTTACGATCAACTCCATTTGGATTATTTAGTGAAACTTCAATTGGTG 1409
```

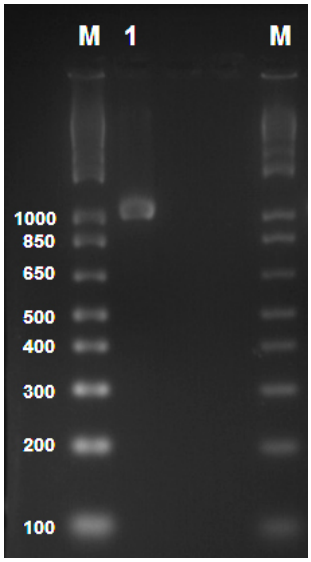
```
FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          TTTTTTCGAAAAGTTCACAGTACAAGTTAATGGGAAAGACTACAAAGGGTATAAGATTGG 1799
L16226          TTTTTTCGAAAAGTTCACAGTACAAGTTAATGGGAAAGACTACAAAGGGTATAAGATTGG 815
HM219853        TTTTTTCGAAAAGTTCACAGTACAAGTTAATGGGAAAGACTACAAAGGGTATAAGATTGG 1469

FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          ATACTCAGTGGTTGATTCGCCTAGTTCATAAAATGGAAGTAGATTTCTCAAAAAAGTTAT 1859
L16226          ATACTCAGTGGTTGATTCGCCTAGTTCATAAAATGGAAGTAGATTTCTCAAAAAAGTTAT 875
HM219853        ATACTCAGTGGTTGATTCGCCTAGTTCATAAAATGGAAGTAGATTTCTCAAAAAAGTTAT 1529

FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          CATTTACTAGAAATAATGCAAATTATAAGTTTGGAGATCGAGTTTTTCAAGTTTATACCA 1919
L16226          CATTTACTAGAAATAATGCAAATTATAAGTTTGGAGATCGAGTTTTTCAAGTTTATACCA 935
HM219853        CATTTACTAGAAATAATGCAAATTATAAGTTTGGAGATCGAGTTTTTCAAGTTTATACCA 1589

FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          TAAATAGTAGTGAGCTTGAAGAAGTAAATATTAAATATACGAATGTTTATCAAATTATTT 1979
L16226          TAAATAGTAGTGAGCTTGAAGAAGTAAATATTAAATATACGAATGTTTATCAAATTATTT 995
HM219853        TAAATAGTAGTGAGCTTGAAGAAGTAAATATTAAATATACGAATGTTTATCAAATTATTT 1649

FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          CTGAATTTTGTGAGAATGACTATCAAAAATATGAAGATATTTGTGAAACTGTAACGCTTT 2039
L16226          CTGAATTTTGTGAGAATGACTATCAAAAATATGAAGATATTTGTGAAACTGTAACGCTTT 1055
HM219853        CTGAATTTTGTGAGAATGACTATCAAAAATATGAAGATATTTGTGAAACTGTAACGCTTT 1709

FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          GCTATGGAGACGAATATAGAGAACTATCGGAACAATATCTTGGCAGTCTGATAGTTAATC 2099
L16226          GCTATGGAGACGAATATAGAGAACTATCGGAACAATATCTTGGCAGTCTGATAGTTAATC 1115
HM219853        GCTATGGAGACGAATATAGAGAACTATCGGAACAATATCTTGGCAGTCTGATAGTTAATC 1769
                Nis-rev

FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          ATTATTTGATCTCTAATTTACAAAAAGATTTGTTGTCAGATTTTTCTTGGAACACTTTTT 2159
L16226          ATTATTTGATCTCTAATTTACAAAAAGATTTGTTGTCAGATTTTTCTTGGAACACTTTTT 1175
HM219853        ATTATTTGATCTCTAATTTACAAAAAGATTTGTTGTCAGATTTTTCTTGGAACACTTTTT 1829

FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          TGACTAAAGTTGAAGCAATAGATGAAGATAAAAAATATATAATTCCTCTGAAAAAAGTTC 2219
L16226          TGACTAAAGTTGAAGCAATAGATGAAGATAAAAAATATATAATTCCTCTGAAAAAAGTTC 1235
HM219853        TGACTAAAGTTGAAGCAATAGATGAAGATAAAAAATATATAATTCCTCTGAAAAAAGTTC 1889

FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          AAAAGTTTATTCAAGAATACTCAGAAATAGAAATTGGTGAAGGTATTGAGAAACTGAAAG 2279
L16226          AAAAGTTTATTCAAGAATACTCAGAAATAGAAATTGGTGAAGGTATTGAGAAACTGAAAG 1295
HM219853        AAAAGTTTATTCAAGAATACTCAGAAATAGAAATTGGTGAAGGTATTGAGAAACTGAAAG 1949

FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          AAATATATCAGGAAATGTCACAAATTCTTGAGAATGATAATTATATTCAAATTGATTTAA 2339
L16226          AAATATATCAGGAAATGTCACAAATTCTTGAGAATGATAATTATATTCAAATTGATTTAA 1355
HM219853        AAATATATCAGGAAATGTCACAAATTCTTGAGAATGATAATTATATTCAAATTGATTTAA 2009

FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          TTAGTGATAGTGAAATAAATTTTGATGTTAAACAAAAGCAACAATTAGAACATTTAGCTG 2399
L16226          TTAGTGATAGTGAAATAAATTTTGATGTTAAACAAAAGCAACAATTAGAACATTTAGCTG 1415
HM219853        TTAGTGATAGTGAAATAAATTTTGATGTTAAACAAAAGCAACAATTAGAACATTTAGCTG 2069

FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          AGTTTTTAGGAAATACGACAAAATCTGTAAGAAGAACATATTTGGATGACTATAAGGATA 2459
L16226          AGTTTTTAGGAAATACGACAAAATCTGTAAGAAGAACATATTTGGATGACTATAAGGATA 1475
HM219853        AGTTTTTAGGAAATACGACAAAATCTGTAAGAAGAACATATTTGGATGACTATAAGGATA 2129

FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          AATTTATCGAAAAATATGGTGTAGATCAAGAAGTACAAATAACAGAATTATTTGATTCTA 2519
L16226          AATTTATCGAAAAATATGGTGTAGATCAAGAAGTACAAATAACAGAATTATTTGATTCTA 1535
HM219853        AATTTATCGAAAAATATGGTGTAGATCAAGAAGTACAAATAACAGAATTATTTGATTCTA 2189
```

```
FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          CATTTGGCATAGGAGCTCCATATAATTATAATCATCCTCGAAATGACTTTTATGAGTCCG 2579
L16226          CATTTGGCATAGGAGCTCCATATAATTATAATCATCCTCGAAATGACTTTTATGAGTCCG 1595
HM219853        CATTTGGCATAGGAGCTCCATATAATTATAATCATCCTCGAAATGACTTTTATGAGTCCG 2249

FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          AACCGAGTACTCTATACTATTCAGAAGAGGAGAGAGAAAAGTACCTCAGCATGTATGTAG 2639
L16226          AACCGAGTACTCTATACTATTCAGAAGAGGAGAGAGAAAAGTACCTCAGCATGTATGTAG 1655
HM219853        AACCGAGTACTCTATACTATTCAGAAGAGGAGAGAGAAAAGTACCTCAGCATGTATGTAG 2309

FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          AAGCCGTTAAAAATCATAATGTAATTAATCTTGACGACTTAGAGTCTCATTATCAAAAAA 2699
L16226          AAGCCGTTAAAAATCATAATGTAATTAATCTTGACGACTTAGAGTCTCATTATCAAAAAA 1715
HM219853        AAGCCGTTAAAAATCATAATGTAATTAATCTTGACGACTTAGAGTCTCATTATCAAAAAA 2369

FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          TGGACTTAGAAAAGAAAAGTGAACTTCAAGGGTTAGAATTATTTTTGAATTTGGCAAAGG 2759
L16226          TGGACTTAGAAAAGAAAAGTGAACTTCAAGGGTTAGAATTATTTTTGAATTTGGCAAAGG 1775
HM219853        TGGACTTAGAAAAGAAAAGTGAACTTCAAGGGTTAGAATTATTTTTGAATTTGGCAAAGG 2429

FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          AGTATGAAAAAGATATTTTTATTTTAGGGGATATCGTTGGAAATAATAATTTGGGAGGGG 2819
L16226          AGTATGAAAAAGATATTTTTATTTTAGGGGATATCGTTGGAAATAATAATTTGGGAGGGG 1835
HM219853        AGTATGAAAAAGATATTTTTATTTTAGGGGATATCGTTGGAAATAATAATTTGGGAGGGG 2489

FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          CATCAGGTAGATTTTCTGCACTCTCTCCGGAGTTAACAAGTTATCATAGAACGATAGTAG 2879
L16226          CATCAGGTAGATTTTCTGCACTCTCTCCGGAGTTAACAAGTTATCATAGAACGATAGTAG 1895
HM219853        CATCAGGTAGATTTTCTGCACTCTCTCCGGAGTTAACAAGTTATCATAGAACGATAGTAG 2549

FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          ATTCTGTCGAAAGAGAAAATGAGAATAAAGAAATTACATCGTGTGAAATAGTATTTCTTC 2939
L16226          ATTCTGTCGAAAGAGAAAATGAGAATAAAGAAATTACATCGTGTGAAATAGTATTTCTTC 1955
HM219853        ATTCTGTCGAAAGAGAAAATGAGAATAAAGAAATTACATCGTGTGAAATAGTATTTCTTC 2609

FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          CAGAAAATATCAGACATGCTAACGTTATGCATACATCAATTATGAGGAGGAAAGTACTTC 2999
L16226          CAGAAAATATCAGACATGCTAACGTTATGCATACATCAATTATGAGGAGGAAAGTACTTC 2015
HM219853        CAGAAAATATCAGACATGCTAACGTTATGCATACATCAATTATGAGGAGGAAAGTACTTC 2669

FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          CATTTTTTACAAGTACAAGTCACAATGAAGTTCTGTTAACTAATATCTATATTGGAATAG 3059
L16226          CATTTTTTACAAGTACAAGTCACAATGAAGTTCTGTTAACTAATATCTATATTGGAATAG 2075
HM219853        CATTTTTTACAAGTACAAGTCACAATGAAGTTCTGTTAACTAATATCTATATTGGAATAG 2729

FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          ACGAAAAAGAAAAATTTTATGCACGAGACATTTCAACTCAAGAGGTATTGAAATTCTACA 3119
L16226          ACGAAAAAGAAAAATTTTATGCACGAGACATTTCAACTCAAGAGGTATTGAAATTCTACA 2135
HM219853        ACGAAAAAGAAAAATTTTATGCACGAGACATTTCAACTCAAGAGGTATTGAAATTCTACA 2789

FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          TTACAAGCATGTACAATAAAACGTTATTCAGTAATGAGCTAAGATTTCTTTACGAAATTT 3179
L16226          TTACAAGCATGTACAATAAAACGTTATTCAGTAATGAGCTAAGATTTCTTTACGAAATTT 2195
HM219853        TTACAAGCATGTACAATAAAACGTTATTCAGTAATGAGCTAAGATTTCTTTACGAAATTT 2849

FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          CATTAGATGACAAGTTTGGTAATTTACCTTGGGAACTTATTTACAGAGACTTTGATTATA 3239
L16226          CATTAGATGACAAGTTTGGTAATTTACCTTGGGAACTTATTTACAGAGACTTTGATTATA 2255
HM219853        CATTAGATGACAAGTTTGGTAATTTACCTTGGGAACTTATTTACAGAGACTTTGATTATA 2909

FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          TTCCACGTTTAGTATTTGACGAAATAGTAATATCTCCTGCTAAATGGAAAATTTGGGGAA 3299
L16226          TTCCACGTTTAGTATTTGACGAAATAGTAATATCTCCTGCTAAATGGAAAATTTGGGGAA 2315
HM219853        TTCCACGTTTAGTATTTGACGAAATAGTAATATCTCCTGCTAAATGGAAAATTTGGGGAA 2969
```

```
FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          GGGATGTAAATAGTAAGATGACAATAAGAGAACTTATTCAAAGCAAAGAAATTCCCAAAG 3359
L16226          GGGATGTAAATAGTAAGATGACAATAAGAGAACTTATTCAAAGCAAAGAAATTCCCAAAG 2375
HM219853        GGGATGTAAATAGTAAGATGACAATAAGAGAACTTATTCAAAGCAAAGAAATTCCCAAAG 3029

FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          AGTTTTATATTGTCAATGGAGATAATAAAGTTTATTTATCACAGAAAAACCCATTGGATA 3419
L16226          AGTTTTATATTGTCAATGGAGATAATAAAGTTTATTTATCACAGGAAAACCCATTGGATA 2435
HM219853        AGTTTTATATTGTCAATGGAGATAATAAAGTTTATTTATCACAGGAAAACCCATTGGATA 3089

FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          TGGAAATTTTAGAGTCGGCGATAAAGAAGAGCTCAAAAAGAAAAGATTTTATAGAGCTAC 3479
L16226          TGGAAATTTTAGAGTCGGCGATAAAGAAGAGCTCAAAAAGAAAAGATTTTATAGAGCTAC 2495
HM219853        TGGAAATTTTAGAGTCGGCGATAAAGAAGAGCTCAAAAAGAAAAGATTTTATAGAGCTAC 3149

FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          AAGAATATTTTGAAGATGAAAATATCATAAATAAAGGAGAAAAGGGGAGAGTTGCCGATG 3539
L16226          AAGAATATTTTGAAGATGAAAATATCATAAATAAAGGAGAAAAGGGGAGAGTTGCCGATG 2555
HM219853        AAGAATATTTTGAAGATGAAAATATCATAAATAAAGGAGAAAAGGGGAGAGTTGCCGATG 3209

FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          TTGTAGTGCCTTTTATTAGAACGAGAGCATTAGGTAATGAAGGGAGAGCATTTATAAGAG 3599
L16226          TTGTAGTGCCTTTTATTAGAACGAGAGCATTAGGTAATGAAGGGAGAGCATTTATAAGAG 2615
HM219853        TTGTAGTGCCTTTTATTAGAACGAGAGCATTAGGTAATGAAGGGAGAGCATTTATAAGAG 3269

FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          AGAAAAGAGTTTCGGTTGAACGGCGTGAAAAATTGCCCTTTAACGAGTGGCTTTATCTAA 3659
L16226          AGAAAAGAGTTTCGGTTGAACGGCGTGAAAAATTGCCCTTTAACGAGTGGCTTTATCTAA 2675
HM219853        AGAAAAGAGTTTCGGTTGAACGGCGTGAAAAATTGCCCTTTAACGAGTGGCTTTATCTAA 3329

FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          AGTTGTACATTTCTATAAATCGTCAAAATGAATTTTTACTGTCGTATCTTCCAGATATTC 3719
L16226          AGTTGTACATTTCTATAAATCGTCAAAATGAATTTTTACTGTCGTATCTTCCAGATATTC 2735
HM219853        AGTTGTACATTTCTATAAATCGTCAAAATGAATTTTTACTGTCGTATCTTCCAGATATTC 3389

FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          AGAAAATAGTAGCAAACCTGGGTGGAAATCTATTCTTCCTAAGATATACTGATCCTAAAC 3779
L16226          AGAAAATAGTAGCAAACCTGGGTGGAAATCTATTCTTCCTAAGATATACTGATCCTAAAC 2795
HM219853        AGAAAATAGTAGCAAACCTGGGTGGAAATCTATTCTTCCTAAGATATACTGATCCTAAAC 3449

FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          CACATATTAGATTGCGTATAAAATGTTCAGATTTATTTTTAGCTTACGGATCTATTCTTG 3839
L16226          CACATATTAGATTGCGTATAAAATGTTCAGATTTATTTTTAGCTTACGGATCTATTCTTG 2855
HM219853        CACATATTAGATTGCGTATAAAATGTTCAGATTTATTTTTAGCTTACGGATCTATTCTTG 3509

FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          AAATCTTAAAAAGGAGTCGGAAAAATAGGATAATGTCAACTTTTGATATTTCTATTTATG 3899
L16226          AAATCTTAAAAAGGAGTCGGAAAAATAGGATAATGTCAACTTTTGATATTTCTATTTATG 2915
HM219853        AAATCTTAAAAAGGAGTCGGAAAAATAGGATAATGTCAACTTTTGATATTTCTATTTATG 3569

FFL17-2         ----------------------TGGATTTGATACTTTAGAGTTATCCGAAGCAATATTTT 38
X68307          ATCAAGAAGTAGAAAGATATGGTGGATTTGATACTTTAGAGTTATCCGAAGCAATATTTT 3959
L16226          ATCAAGAAGTAGAAAGATATGGTGGATTTGATACTTTAGAGTTATCCGAAGCAATATTTT 2975
HM219853        ATCAAGAAGTAGAAAGATATGGTGGATTTGATACTTTAGAGTTATCCGAAGCAATATTTT 3629
                                  ************************************

FFL17-2         GTGCCGATTCTAAAATTATTCCAAATTTGCTTACATTGATAAAAGATACTAATAATGATT 98
X68307          GTGCCGATTCTAAAATTATTCCAAATTTGCTTACATTGATAAAAGATACTAATAATGATT 4019
L16226          GTGCCGATTCTAAAATTATTCCAAATTTGCTTACATTGATAAAAGATACTAATAATGATT 3035
HM219853        GTGCCGATTCTAAAATTATTCCAAATTTGCTTACATTGATAAAAGATACTAATAATGATT 3689
                ************************************************************

FFL17-2         GGAAAGTCGATGATGTATCAATCTTGGTGAATTATTTATATCTGAAATGCTTCTTTCAGA 158
X68307          GGAAAGTCGATGATGTATCAATCTTGGTGAATTATTTATATCTGAAATGCTTCTTTCAGA 4079
L16226          GGAAAGTCGATGATGTATCAATCTTGGTGAATTATTTATATCTGAAATGCTTCTTTCAGA 3095
HM219853        GGAAAGTCGATGATGTATCAATCTTGGTGAATTATTTATATCTGAAATGCTTCTTTGAGA 3749
                ************************************************** ***
```

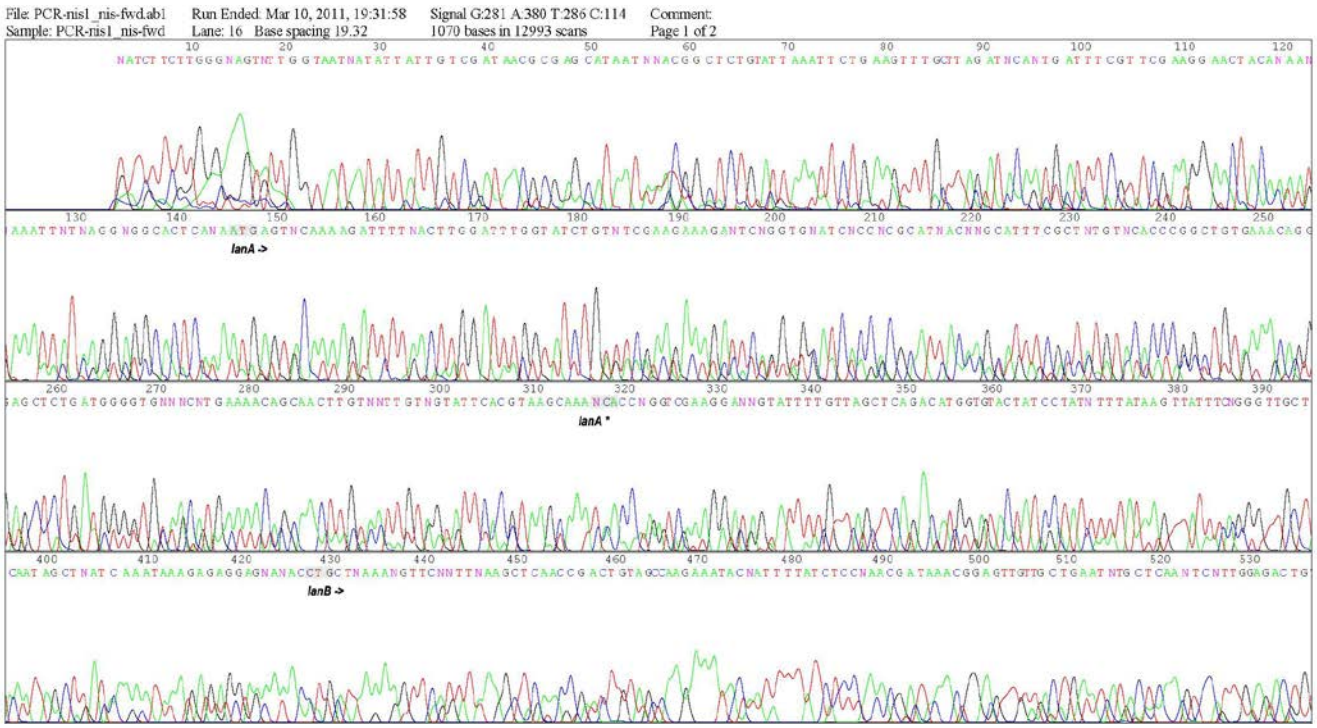
```
FFL17-2         ATGATAACAAAAAGATTCTTAATTTTTTGAATTTAGTTAGTCCTAAAAAGGTTAAAGAAA 218
X68307          ATGATAACAAAAAGATTCTTAATTTTTTGAATTTAGTTAGTACTAAAAAGGTTAAAGAAA 4139
L16226          ATGATAACAAAAAGATTCTTAATTTTTTGAATTTAGTTAGTCCTAAAAAGGTTAAAGAAA 3155
HM219853        ATGATAACAAAAAGATTCTTAATTTTTTGAATTTAGTTAGTCCTAAAAAGGTTAAAGAAA 3809
                ************************************* ******************

FFL17-2         ATGTCAATGAAAAGATTGAACATTATCTTAAGCTTCTGAAAGTTAATAATCTAGGTGACC 278
X68307          ATGTCAATGAAAAGATTGAACATTATCTTAAGCTTCTGAAAGTTAATAATCTAGGTGACC 4199
L16226          ATGTCAATGAAAAGATTGAACATTATCTTAAGCTTCTGAAAGTTAATAATCTAGGTGACC 3215
HM219853        ATGTCAATGAAAAGATTGAACATTATCTTAAGCTTCTGAAAGTTAATAATCTAGGTGACC 3869
                ************************************************************

FFL17-2         AAATTTTTTATGACAAGAATTTTAAAGAATTAAAGCATGCCATAAAAAATTTATTTTTAA 338
X68307          AAATTTTTTATGACAAGAATTTTAAAGAATTAAAGCATGCCATAAAAAATTTATTTTTAA 4259
L16226          AAATTTTTTATGACAAGAATTTTAAAGAATTAAAGCATGCCATAAAAAATTTATTTTTAA 3275
HM219853        AAATTTTTTATGACAAGAATTTTAAAGAATTAAAGCATGCCATAAAAAATTTATTTTTAA 3929
                ************************************************************

FFL17-2         AAATGATAGCTCAAGATTTTGAACTTCAGAAAGTTTATTCAATTATTGAC---------- 388
X68307          AAATGATAGCTCAAGATTTTGAACTTCAGAAAGTTTATTCAATTATTGACAGTATCATTC 4319
L16226          AAATGATAGCTCAAGATTTTGAACTTCAGAAAGTTTATTCAATTATTGACAGTATCATTC 3335
HM219853        AAATGATAGCTCAAGATTTTGAACTTCAGAAAGTTTATTCAATTATTGACAGTATCATTC 3989
                ********************************************

FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          ATGTCCATAATAACCGACTAATTGGTATTGAACGAGATAAAGAGAAATTAATTTATTACA 4379
L16226          ATGTCCATAATAACCGACTAATTGGTATTGAACGAGATAAAGAGAAATTAATTTATTACA 3395
HM219853        ATGTCCATAATAACCGACTAATTGGTATTGAACGAGATAAAGAGAAATTAATTTATTACA 4049


                                                nisB *          nisT ->
FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          CACTTCAAAGGTTGTTTGTTTCGGAAGAATACATGAAATGAGGACTAATAGATGGATGAA 4439
L16226          CACTTCAAAGGTTGTTTGTTTCGGAAGAATACATGAAATGAGGACTAATAGATGGATGAA 3455
HM219853        CACTTCAAAGGTTGTTTGTTTCGGAAGAATACATGAAATGAGGACTAATAGATGGATGAA 4109

FFL17-2         ------------------------------------------------------------
X68307          GTGAAAGAATTCACATCAAAACAATTTTTTTATACTTTACTTACTCTTCCAAGCACCTTG 4499
L16226          GTGAAAGAATTCACATCAAAACAATTTTTTAATACTTTACTTACTCTTCCAAGCACCTTG 3515
HM219853        GTGAAAGAATTCACATCAAAACAATTTTTTAATACTTTACTTACTCTTCCAAGCACCTTG 4169
```

รูปที่ 3 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนของยีน *lanB* (โดยไม่รวมบริเวณที่มาจาก primers) จาก *L. lactis* subsp. *lactis* FFL17-2 และยีนสำหรับ *nis* operon (บางส่วน) จาก *L. lactis* 6F3, *L. lactis* subsp. *lactis* NIZO R5 และ *L. lactis* subsp. *lactis* M78 (Accession numbers: X68307, L16226 และ HM219853 ตามลำดับ) โดยบริเวณที่ขีดเส้นใต้แสดงตำแหน่งที่ใช้ในการออกแบบ primers Nis-fwd และ Nis-rev ตามลำดับ ส่วนบริเวณที่ขีดเส้นใต้คู่และเป็นตัวเข้มแสดงตำแหน่งของ start codon (ATG) และ stop codon (*) ของยีน



รูปที่ 4 แถบ DNA ขนาดประมาณ 1 kb ที่เกิดจากการทำ PCR ด้วย primers Nis-fwd + Nis-rev (lane 1); lane M คือ 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, California, USA)

(a)



รูปที่ 5 (a) chromatogram ที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (บางส่วน) ของผลผลิต PCR และแสดงตำแหน่งที่น่าจะเป็น start codon (ATG) และ stop codon (*) ของ *lanA* และ start codon ของ *lanB* ตามลำดับ

(b)

```
  1 ATGAGTNCAAAAGATTTTNACTTGGATTTGGTATCTGTNTCGAAGAAAGANTCNGGTGNA
    M  S  X  K  D  F  X  L  D  L  V  S  V  S  K  K  X  S  G  X

 61 TCNCCNCGCATNACNNGCATTTCGCTNTGTNCACCCGGCTGTGAAACAGGAGCTCTGATG
    S  P  R  X  T  X  I  S  L  C  X  P  G  C  E  T  G  A  L  M

121 GGGTGNNNCNTGAAAACAGCAACTTGTNNTTGTNGTATTCACGTAAGCAAANCA
    G  X  X  X  K  T  A  T  C  X  C  X  I  H  V  S  K  X
```

รูปที่ 5 (b) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณที่น่าจะเป็นยีนสำหรับแบคทีริโอซิน (*lanA*) ของ *L. lactis* subsp. *lactis* FFL17-2 และลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัส บริเวณที่ขีดเส้นใต้แสดงลำดับกรดอะมิโนที่น่าจะเป็นส่วนของ propeptide

ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์จาก EMBL Database ที่มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *lanA*

Organism	**Gene**	**% identity**	**Accession No.**
L. lactis subsp. *lactis* UQ2	*nisA*	85.0	AAZ23019
L. lactis subsp. *lactis* IO-1	*nisA*	85.0	AP012281
L. lactis	*nisZ*	85.0	Z18947
L. lactis subsp. *lactis* N8	*nisZ*	85.0	Y13384
L. lactis NIZO 22186	*nisZ*	85.0	X61144

```
FFL17-2:     1  atgagtncaaaagattttnacttggatttggtatctgtntcgaagaaagantcnggtgna 60
                ||||||  ||||||||||| |||||||||||||||||||| |||||||||| || |||| |
AAZ23019:    1  atgagtacaaaagattttaacttggatttggtatctgtttcgaagaaagattcaggtgca 60

FFL17-2:    61  tcnccncgcatnacnngcatttcgctntgtncacccggctgtgaaacaggagctctgatg 120
                || || ||||| ||  | |||||||| ||| ||||||| ||| ||||||||||||||||
AAZ23019:   61  tcaccacgcattacaagtatttcgctatgtacacccggttgtaaaacaggagctctgatg 120

FFL17-2:   121 gggtgnnncntgaaaacagcaacttgtnnttgtngtattcacgtaagcaaa 171
                  || ||   | ||||||||||||||||  |||| ||||||||||||||||
AAZ23019:  121 ggttgtaacatgaaaacagcaacttgtcattgtagtattcacgtaagcaaa 171
```

รูปที่ 6 การเปรียบเทียบระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *lanA* จาก *L. lactis* subsp. *lactis* FFL17-2 และ *nisA* จาก *L. lactis* subsp. *lactis* UQ2 (Accession number: AAZ23019)

บทที่ 5
สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

LAB ไอโซเลท FFL17-2 เป็นเชื้อที่แยกได้จากปลาส้มฟัก จ. ลพบุรี โดยเชื้อชนิดนี้สามารถสร้างแบคทีริโอซินที่มีสมบัติยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียหลายชนิด ซึ่งได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus sakei*, *Lb. plantarum*, *Leuconostoc mesenteriodes*, *Pediococcus pentosaceus*, *Streptococcus salivarius*, *Bacillus cereus*, *B. circulans*, *B. coagulans* และ *Listeria monocytogenes* (สมใจ และคณะ, 2550)

ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้มีการจัดจำแนกแบคทีเรียไอโซเลทดังกล่าวด้วยวิธีทางชีวเคมี โดยใช้ชุดทดสอบ API 20 Strep (BioMerieux) และพบว่าเป็น *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ที่ระดับความถูกต้อง 98% (สมใจ และคณะ, 2550) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทำการโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA จาก *L. lactis* subsp. *lactis* FFL17-2 เพื่อใช้ในการจัดจำแนกเชื้อ และเปรียบเทียบกับวิธีทางชีวเคมีที่มีรายงานไว้แล้ว

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA จาก *L. lactis* subsp. *lactis* FFL17-2 ความยาว 1,502 bp ด้วยโปรแกรม NCBI Blast พบว่ามีความเหมือน 100% กับ 16S rDNA จาก *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403, *L. lactis* subsp. *lactis* CV56 และ *L. lactis* subsp. *lactis* KF147 ที่มีรายงานอยู่ใน EMBL Database ซึ่งการจำแนกแบคทีเรียโดยใช้ 16S rDNA นั้นมีหลักเกณฑ์ทั่วไปคือใช้ค่าความเหมือนที่ 97-99% ในการจัดจำแนกระดับ genus และสูงกว่า 99% ในระดับ species (Drancourt *et al.*, 2000) จึงสรุปได้ว่าผลจากการวิเคราะห์ 16S rDNA สอดคล้องกับผลที่ได้จากการใช้ API 20 Strep (BioMerieux) และเป็นการยืนยันว่าไอโซเลท FFL17-2 เป็นสมาชิกของ species *L. lactis* จริง

อย่างไรก็ตาม สำหรับการยืนยันไอโซเลท FFL17-2 ในระดับ subspecies โดยวิธีทางชีวโมเลกุลนั้น อาจทำได้โดยใช้วิธี PCR-RFLP ที่เสนอโดย Nomura *et al.* (2002) ซึ่งสามารถระบุ *L. lactis* subsp. *lactis* และ *L. lactis* subsp. *cremoris* โดยอาศัยความแตกต่างระหว่างชิ้นส่วนของยีนสำหรับ glutamate decarboxylase (*gadB*) กล่าวคือ *L. lactis* subsp. *cremoris* จะให้ชิ้นส่วน DNA ขนาด ~560 bp ในขณะที่ *L. lactis* subsp. *lactis* จะมีขนาด ~600 bp และถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ *Ase*I

อีกวิธีหนึ่งที่คล้ายกันถูกเสนอโดย Pu *et al.* (2002) เพื่อใช้บอกความแตกต่างระหว่าง subspecies ของ *L. lactis* โดยการสังเคราะห์ชิ้นส่วนของ 16S rDNA ด้วย primers 1RL + LacreR ซึ่งจำเพาะต่อ species ดังกล่าว จากนั้นนำผลผลิต PCR มาตัดด้วย *Hae*II และ *Mbo*II ซึ่งแต่ละเอนไซม์จะตัดได้เฉพาะผลผลิตจาก *L. lactis* subsp. *lactis* และ *L. lactis* subsp. *cremoris* เท่านั้น ตามลำดับ นอกจากนี้ Pu *et al.* (2002) ยังได้ออกแบบ primers 2 ชุดจากบริเวณของ 16S rDNA คือ CreF +

LancreR และ LacF + LancreR ซึ่งแต่ละชุดมีความจำเพาะต่อ *L. lactis* subsp. *cremoris* และ *L. lactis* subsp. *lactis* ตามลำดับ

แบคทีริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแกรมบวกสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ Class I หรือ Lantibiotics ซึ่งเป็นโปรตีนขนาดเล็กที่ทนความร้อนและมีการดัดแปลงภายหลังการจากแปลรหัส (post-translational modification) ทำให้มีกรดอะมิโน lanthionine เป็นองค์ประกอบ ส่วนแบคทีริโอซินใน Class II ประกอบด้วยโปรตีนขนาดเล็กที่ทนความร้อน แต่ไม่มีการดัดแปลงหลังจากการสังเคราะห์ และ Class III เป็นกลุ่มของแบคทีริโอซินที่ไม่ทนความร้อน (O'Sullivan *et al.*, 2002) อย่างไรก็ดีมีรายงานว่าแบคทีริโอซินที่ผลิตจาก *Lactococcus* นั้นพบเฉพาะ Class I และ Class II เท่านั้น (Guinane *et al.*, 2005)

ถึงแม้ว่าจะยังไม่ทราบโครงสร้างและองค์ประกอบของแบคทีริโอซินที่ผลิตจาก *L. lactis* subsp. *lactis* FFL17-2 แต่จากคุณสมบัติที่สามารถทนความร้อนที่ 100°C เป็นเวลา 10 นาทีโดยไม่ทำให้ activity ลดลง มีความคงตัวที่ pH ในช่วง 4-7 และโดยเฉพาะอย่างยิ่งสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้หลากหลาย (สมใจ และคณะ, 2550) จึงมีความเป็นไปได้ว่าแบคทีริโอซินดังกล่าวน่าจะจัดอยู่ใน Class I เนื่องจากแบคทีริโอซินใน Class II นั้นส่วนใหญ่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียได้ค่อนข้างจำกัด โดยยับยั้งได้เฉพาะกลุ่มที่มี G + C content ต่ำ ซึ่งได้แก่ *Listeria* sp., *Clostridium* sp. และ LAB เท่านั้น (Guinane *et al.*, 2005)

โดยทั่วไปยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตแบคทีริโอซินกลุ่ม Lantibiotics มักประกอบด้วยยีนโครงสร้างของแบคทีริโอซิน (*lanA*) และยีนอื่นๆ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการดัดแปลง prepeptide (*lanB* และ *lanC*/*lanM*) การตัดสายโปรตีน (*lanP*) การลำเลียงออกนอกเซลล์ (*lanT*) การปกป้องเซลล์ผู้ผลิต (*lanI* และ *lanEFG*) และการควบคุมการสังเคราะห์แบคทีริโอซิน (*lanR*, *lanK* และ *lanQ*) (Wirawan *et al.*, 2006)

เมื่อทำการสังเคราะห์ชิ้นส่วนของ *lanB* จาก *L. lactis* subsp. *lactis* FFL17-2 โดยใช้ degenerate primers ที่ออกแบบมาจากลำดับกรดอะมิโนซึ่งแปลรหัสจาก *lanB* homologues ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แบคทีริโอซิน 6 ชนิด คือ streptin, pep5, nisin, epidermin, epicidin และ subtilin (Wirawan *et al.*, 2006) แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปแปลรหัสและทำการเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนในฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม FASTA พบว่ามีความเหมือนกับ NisB จาก *L. lactis* สูงถึง 99.2-100% โดยมีรายงานว่า NisB เป็นเอนไซม์ dehydratase ซึ่งทำหน้าที่ในการเกิด dehydration ของ serines และ threonines ได้เป็น dehydroalanine และ dehydrobutyrine ในสายโปรตีน nisin prepeptide (NisA) โดยทำงานร่วมกับ NisC ซึ่งเป็นเอนไซม์ cyclase ที่ทำหน้าที่สร้าง (β-methyl) lanthionine rings ระหว่าง cysteines และ dehydroamino acids (Cheigh and Pyun, 2005; Lubelski *et al.*, 2009)

เนื่องจาก NisB ของ *L. lactis* นั้นถูกกำหนดรหัสโดยยีน *nisB* ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ *nis* operon: *nisABTCIP* (Cheigh and Pyun, 2005) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้สูงที่ยีนสำหรับแบคทีริโอซินของ *L.*

lactis subsp. *lactis* FFL17-2 (*lanA*) จะมีความคล้ายคลึงกับยีน *nisA* ซึ่งกำหนดรหัส nisin prepeptide และน่าจะตั้งอยู่บริเวณ upstream ของชิ้นส่วนของยีน *lanB* ที่โคลนได้ ด้วยเหตุนี้จึงได้นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *nis* operon จาก *L. lactis* ที่มีรายงานใน EMBL Database ซึ่งได้แก่ *L. lactis* 6F3, *L. lactis* subsp. *lactis* NIZO R5 และ *L. lactis* subsp. *lactis* M78 มาทำการเปรียบเทียบโดยใช้โปรแกรม ClustalW แล้วเลือกบริเวณของนิวคลีโอไทด์ที่ตรงกันในทั้งสามสายพันธุ์ และครอบคลุมยีน *nisA* และส่วน 5' ของยีน *nisB* มาใช้ในการออกแบบ primers Nis-fwd และ Nis-rev

แต่เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้ไม่ประสบความสำเร็จในการโคลนชิ้นส่วน DNA ที่สังเคราะห์จาก primers Nis-fwd + Nis-rev ในพลาสมิด pCR2.1 จึงได้นำผลผลิต PCR ดังกล่าวไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (บางส่วน) โดยตรง และพบว่ามีหลายตำแหน่งที่ไม่สามารถระบุนิวคลีโอไทด์ได้แน่ชัด ซึ่งอาจเกิดจากการที่ผลผลิต PCR นั้นประกอบด้วย DNA มากกว่า 1 รูปแบบปะปนกัน แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าว (*lanA*) ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม NCBI Blast ยังพบว่ามีความเหมือน 85.0% กับยีน *nisA* และ *nisZ* ของ *L. lactis* สายพันธุ์ต่างๆ

ในปัจจุบันมีรายงานถึง variants ต่างๆของ nisin ที่พบตามธรรมชาติ ซึ่งได้แก่ nisin A (Buchman *et al.*, 1988), nisin Z (Mulders *et al.*, 1991), nisin Q (Zendo *et al.*, 2003) และ nisin F (de Kwaadsteniet *et al.*, 2008) ซึ่งผลิตจาก *L. lactis* และ nisin U จาก *Streptococcus uberis* (Wirawan *et al.*, 2006) ซึ่งมีความแตกต่างกันในระดับกรดอะมิโนของ prepeptides/propeptides ที่ตำแหน่งต่างๆ เมื่อพิจารณาลำดับกรดอะมิโนของ propeptide ที่ได้จากการแปลรหัสของ *lanA* จาก *L. lactis* subsp. *lactis* FFL17-2 จำนวน 4 ตำแหน่ง ซึ่งเป็นจุดที่พบความแตกต่างระหว่างกรดอะมิโนของ nisin A, Z, Q และ F จาก *L. lactis* คือตำแหน่งที่ 15, 21, 27 และ 30 โดยพบว่าตำแหน่งที่อ่านได้คือ A15 และ I30 ตรงกับของทั้ง nisin A และ nisin Z จึงมีความเป็นไปได้ว่าแบคทีริโอซินที่สร้างจาก *L. lactis* subsp. *lactis* FFL17-2 อาจมีลำดับกรดอะมิโนของ propeptide ที่เหมือนกับ nisin A หรือ nisin Z

จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่า *L. lactis* subsp. *lactis* FFL17-2 เป็นสมาชิกของ species *L. lactis* จริง โดยอาศัยการวิเคราะห์ 16S rDNA และเป็นการยืนยันผลการจัดจำแนกโดยวิธีทางชีวเคมีที่มีรายงานไว้ก่อนหน้านี้ และได้ทำการโคลนยีนที่เชื่อว่าน่าจะเป็นยีนสำหรับแบคทีริโอซิน (*lanA*) ของแบคทีเรียดังกล่าว โดยพบว่ามีความเหมือนกับ *nisA* และ *nisZ* ซึ่งกำหนดรหัส nisin prepeptides จาก *L. lactis* เป็นอันมาก แต่อย่างไรก็ตาม ผลจากการวิเคราะห์ดังกล่าวได้มาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิต PCR ที่ยังมีความไม่ชัดเจนในหลายๆตำแหน่ง การที่จะระบุได้อย่างแน่ชัด ควรทำการโคลนผลผลิต PCR ดังกล่าวใน cloning vector เสียก่อน แล้วจึงนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์และทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลต่อไป

บรรณานุกรม

สมใจ ศิริโภค ประวัติ อังประภาพรชัย ขจีนาฏ โพธิเวชกุล และอรอนงค์ พริ้งศุลกะ. 2550. การคัดเลือกและการจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียแลคติกที่สร้างแบคทีริโอซินได้จากอาหารหมัก และการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีริโอซินที่ผลิตได้. *วารสารวิทยาศาสตร์ มศว* 23(2), 92-114.

Buchman, G. W., Banerjee, S. and Hansen, J. N., 1988. Structure, expression, and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. *Journal of Biological Chemistry* 263, 16260-16266.

Cheigh, C.-I. and Pyun, Y.-R., 2005. Nisin biosynthesis and its properties. *Biotechnology Letters* 27, 1641-1648.

de Kwaadsteniet, M., ten Doeschate, K. and Dicks, L. M. T., 2008. Characterization of the structural gene encoding nisin F, a new lantibiotic produced by a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolate from freshwater catfish (*Clarias gariepinus*). *Applied and Environmental Microbiology* 74(2), 547-549.

de Man, J. D., Rogosa, M. and Sharpe, M. E., 1960. A medium for the cultivation of Lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology* 23, 130-135.

Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R. J. and Hugenholtz, J., 1996. Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie van Leeuwenhoek* 69, 193-202.

Drancourt, M., Bollet, C., Carlioz, A., Martelin, R., Gayral, J.-P. and Raoult, D., 2000. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 38(10), 3623-3630.

Fujita, K., Ichimasa, S., Zendo, T., Koga, S., Yoneyama, F., Nakayama, J. and Sonomoto, K., 2007. Structural analysis and characterization of Lacticin Q, a novel bacteriocin belonging to a new family of unmodified bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 73(9), 2871-2877.

Galvez, A., Abriouel, H., Lopez, R. L. and Omar, N. B., 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology* 120, 51-70.

Guinane, C. M., Cotter, P. D., Hill, C. and Ross, R. P., 2005. Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. *Journal of Applied Microbiology* 98, 1316-1325.

Jack, R. W., Tagg, J. R. and Ray, B., 1995. Bacteriocins of Gram-postitive bacteria. *Microbiological Review*s 59(2), 171-200.

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

Lubelski, J., Rink, R., Khusainov, R., Moll, G. N. and Kuipers, O. P., 2008. Biosynthesis, immunity, regulation, mode of action and engineering of the model lantibiotic nisin. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65, 455-476.

Lubelski, J., Khusainov, R. and Kuipers, O. P., 2009. Directionality and coordination of dehydration and ring formation during biosynthesis of the lantibiotic nisin. *Journal of Biological Chemistry* 284(38), 25962-25972.

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. *European Journal of Biochemistry* 201, 581-584.

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

O'Sullivan, L., Ross, R. P. and Hill, C., 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie* 84, 593-604.

Pu, Z. Y., Dobos, M., Limsowtin, G. K. Y. and Powell, I. B., 2002. Integrated polymerase chain reaction-based procedures for the detection and identification of species and subspecies of the Gram-positive bacterial genus *Lactococcus*. *Journal of Applied Microbiology* 93, 353-361.

Rouse, S., Canchya, C. and van Sinderen, D., 2008. *Lactobacillus hordei* sp. nov., a bacteriocinogenic strain isolated from malted barley. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 58, 2013-2017.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning: a laboratory manual, vol. 1, 2nd ed. Cold Spring Habor Laboratory Press, USA.

Sen, A. K., Narbad, A., Horn, N., Dodd, H. M., Parr, A. J., Colquhoun, I. and Gasson, M. J., 1999. Post-translational modification of nisin, The involvement of NisB in the dehydration process. *European Journal of Biochemistry* 261, 524-532.

Shin, M. S., Han, S. K., Ryu, J. S., Kim, K. S. and Lee, W. K., 2008. Isolation and partial characterization of a bacteriocin produced by *Pediococcus pentasaceus* K23-2 isolated from Kimchi. *Journal of Applied Microbiology* 105(2), 331-339.

Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. and Lane, D. J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173(2), 697-703.

Wirawan, R. E., Klesse, N. A., Jack, R. W. and Tagg, J. R., 2006. Molecular and genetic characterization of a novel nisin variant produced by *Streptococcus uberis*. *Applied and Environmental Microbiology* 72(2), 1148-1156.

Zendo, T., Fukao, M., Ueda, K., Higuchi, T., Nakayama, J. And Sonomoto, K., 2003. Identification of the lactibiotic nisin Q, a new natural nisin variant produced by *Lactococcus lactis* 61-14 isolated from a river in Japan. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 67, 1616-1619.

ประวัติย่อผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

ดร. ประวัติ อังประภาพรชัย (Dr. Prawat AUNGPRAPHAPORNCHAI)

หน่วยงาน

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

โทรศัพท์: 02-664-6170-89 ต่อ 8521; Email: prawat@swu.ac.th

ประวัติการศึกษา

วท.บ. ชีววิทยา (เกียรตินิยมอันดับสอง) (2537)	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
M.Sc. Biological Sciences (1996)	University of East Anglia, UK
Ph.D. (2000)	University of East Anglia, UK

งานวิจัยที่ดำเนินการแล้วเสร็จ

1. โครงการการพัฒนากระบวนการแปรรูปเห็ดฟาง เรื่อง การวิจัยและพัฒนาการผลิตเห็ดฟางหมัก ตำบลอาษา อำเภอบ้านนา จังหวัดนครนายก ภายใต้โครงการเสริมสร้างความเข้มแข็งของชุมชนและเศรษฐกิจฐานรากของทบวงมหาวิทยาลัย (**หัวหน้าโครงการวิจัย** โครงการนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน จากทบวงมหาวิทยาลัย ประจำปี 2545)

2. โครงการการพัฒนากระบวนการแปรรูปเห็ดฟาง เรื่อง การวิจัยและพัฒนาการผลิตซอสเห็ดฟางปรุงรส ตำบลอาษา อำเภอบ้านนา จังหวัดนครนายก ภายใต้โครงการเสริมสร้างความเข้มแข็งของชุมชนและเศรษฐกิจฐานรากของทบวงมหาวิทยาลัย (ผู้ร่วมโครงการวิจัย โครงการนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน จากทบวงมหาวิทยาลัย ประจำปี 2545)

3. โครงการการพัฒนากระบวนการแปรรูปเห็ดฟาง เรื่อง การวิจัยและพัฒนาการผลิตเห็ดฟางอบแห้ง ตำบลอาษา อำเภอบ้านนา จังหวัดนครนายก ภายใต้โครงการเสริมสร้างความเข้มแข็งของชุมชนและเศรษฐกิจฐานรากของทบวงมหาวิทยาลัย (ผู้ร่วมโครงการวิจัย โครงการนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน จากทบวงมหาวิทยาลัย ประจำปี 2545)

4. การพัฒนาเพื่อยกระดับมาตรฐานคุณภาพด้านความปลอดภัยของผลผลิตแปรรูปทางการเกษตร ภายใต้ชื่อชุดโครงการ การจัดกระบวนการทางการเกษตรแบบยั่งยืน โครงการวิจัยและถ่ายทอดเทคโนโลยีการเกษตรสู่ชุมชนภาคกลาง (ผู้ร่วมโครงการวิจัย โครงการนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน จากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ประจำปี 2546)

5. การโคลน และการวิเคราะห์ลำดับ DNA ของยีนสำหรับ arginine deiminase และบริเวณควบคุม จากแบคทีเรียแลคติกที่แยกจากอาหารหมักในประเทศไทย (**หัวหน้าโครงการวิจัย** โครงการนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปี 2546-2547)

6. การคัดเลือกและการจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียแลคติกที่สร้างแบคทีริโอซินได้จากอาหารหมัก และการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีริโอซินที่ผลิตได้ (ผู้ร่วมโครงการวิจัย โครงการนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปี 2548-2549)

7. การแยกและการจัดจำแนกแบคทีเรียจากแหล่งน้ำธรรมชาติที่สามารถยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย *Microcystis aeruginosa* (**หัวหน้าโครงการวิจัย** โครงการนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปี 2549)

ผลงานทางวิชาการ

1. Gasson, M. J., Shearman, C. A., Griffin, H. G., Rawsthorne, H., Gostick, D. and **Aungpraphapornchai, P.**. Investigating the response of *Lactococcus lactis* to changes in environmental oxygen. EDC Biotech, Portugal, 31 May – 3 June 1997.

2. Shearman, C. A., Mulholland, F., **Aungpraphapornchai, P.**, Griffin, H. G. and Gasson, M. J.. Construction and analysis of *L. lactis* mutations in pyruvate metabolism. 2nd Conference of EC Biotech STARLAB project, Toulouse, France, 22-24 April 1998.

3. **Aungpraphapornchai, P.** and Griffin, H. G. (1998). Bioengineering of pyruvate metabolism in lactic acid bacteria. *Recent Res. Devel. in Biotech. & Bioeng.* 1, 395-403.

4. **Aungpraphapornchai, P.**, Griffin, H. G., and Gasson, M. J. (1999). Cloning, DNA sequence analysis, and deletion of a gene encoding diacetyl-acetoin reductase from *Lactococcus lactis*. *DNA sequence* 10(3), 163-172.

5. **ประวัติ อังประภาพรชัย** 2545 Single-primered Polymerase Chain Reaction วารสารวิทยาศาสตร์ มศว ปีที่ 18 ฉบับที่ 2 หน้า 73-79

6. สุมาลี เหลืองสกุล ขจีนาฏ โพธิเวชกุล **ประวัติ อังประภาพรชัย** เกษแก้ว กลิ่นจวง และชลีรัตน์ คุณวรเวทย์ การพัฒนากระบวนการแปรรูปเห็ดฟาง โครงการสัมมนาวิชาการและการเผยแพร่ผลงานวิจัยในโครงการเสริมสร้างความเข้มแข็งของชุมชนและเศรษฐกิจฐานราก 26 สิงหาคม - 5 กันยายน 2546

7. สุมาลี เหลืองสกุล ขจีนาฏ โพธิเวชกุล **ประวัติ อังประภาพรชัย** เกษแก้ว กลิ่นจวง และชลีรัตน์ คุณวรเวทย์ 2546 การพัฒนากระบวนการแปรรูปเห็ดฟาง ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สื่อการเรียนรู้ด้วยตนเองในรูปแบบวิดีทัศน์ ความยาว 16 นาที

8. **ประวัติ อังประภาพรชัย** นัทธ์หทัย สงบพันธ์ และภัทราวุธ โสภา 2550 การแยกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมักที่มีศักยภาพในการผลิต tetramethylpyrazine วารสารวิทยาศาสตร์ มศว ปีที่ 23 ฉบับที่ 1 หน้า 94-108

9. สมใจ ศิริโภค **ประวัติ อังประภาพรชัย** ขจีนาฏ โพธิเวชกุล และอรอนงค์ พริ้งศุลกะ 2550 การคัดเลือกและการจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียแลคติกที่สร้างแบคทีริโอซินได้จากอาหารหมัก และการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีริโอซินที่ผลิตได้ วารสารวิทยาศาสตร์ มศว ปีที่ 23 ฉบับที่ 2 หน้า 92-114

10. **Aungpraphapornchai, P.** and Sangobpun, N. (2008). Cloning and DNA sequence analysis of the putative arginine deiminase gene from a commercial strain of lactic acid bacteria. *SWU Sci. J.* 24(1), 165-181.