197711

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

197711

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.