SWU Sci. J. Vol. 23 No. 1 (2007)

บทความวิจัย

การแยกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมักที่มีศักยภาพในการผลิต tetramethylpyrazine

ประวัติ อังประภาพรชัย* นัทธ์หทัย สงบพันธ์ และ ภัทราวุธ โสภา

บทคัดย่อ

คณะผู้วิจัยทำการแยกแบคทีเรียแลคติกจำนวน 43 ไอโซเลท จากอาหารหมัก 14 ชนิด แล้วนำเชื้อที่ได้มาทดสอบศักยภาพในการเป็นผู้ผลิต tetramethylpyrazine (TMP) โดยทดสอบการสร้าง acetoin และความสามารถในการใช้อาร์จินีนเป็นแหล่งพลังงาน ซึ่งจากการทดสอบพบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 29 ไอโซเลทที่มีสมบัติทั้งสองประการดังกล่าว โดยเฉพาะอย่างยิ่งไอโซเลท SC4 ซึ่งสามารถผลิต acetoin ได้ในปริมาณสูงและเจริญได้ดีในอาหารที่ใช้ทดสอบการใช้อาร์จินีน จึงน่าจะเป็นเชื้อที่มีศักยภาพสูงในการเป็นผู้ผลิต TMP

มีความพยายามในการสังเคราะห์ชิ้นส่วนของยีนสำหรับเอนไซม์ arginine deiminase โดยวิธี PCR โดยใช้ degenerate primers ที่ออกแบบจากลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ arginine deiminase จาก *Lactococcus lactis* และ *Lactobacillus sakei* และใช้โครโมโซมจากแบคทีเรีย 29 ไอโซเลทเป็นต้นแบบ พบว่าสามารถสังเคราะห์ชิ้น DNA ที่ต้องการได้จากไอโซเลท SC8 โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น DNA ดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนสำหรับ arginine deiminase จาก *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ต่างๆสูงกว่า 92 %

คำสำคัญ: แบคทีเรียแลคติก อาร์จินีน tetramethylpyrazine, acetoin, arginine deiminase

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

*ผู้นิพนธ์ประสานงาน, email: prawat@swu.ac.th

Isolation of Lactic Acid Bacteria from Fermented Foods Which Have Potential for Tetramethylpyrazine Production

Prawat Aungpraphapornchai*, Nuthathai Sangobpun and Pattarawut Sopha

ABSTRACT

Forty-three isolates of lactic acid bacteria from 14 fermented food samples were isolated and selected. These isolates were assessed on their potential for tetramethylpyrazine (TMP) production by testing for acetoin production and utilization of arginine. As a result, 29 isolates were found to possess both of these properties. Isolate SC4, in particular, could produce a high amount of acetoin, and showed high growth in the arginine-containing medium, indicating its high potential as a TMP producer.

In an attempt to amplify arginine deiminase gene fragments, Polymerase Chain Reactions with degenerate primers - designed from amino acid sequences of arginine deiminase enzymes from *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus sakei*, were carried out, using chromosomal DNA samples extracted from the 29 isolates as templates. A desired product was generated from isolate SC8, and its nucleotide sequence showed over 92 % similarities to arginine deiminase genes from a number of *Lactococcus lactis* strains.

Keywords: Lactic acid bacteria, tetramethylpyrazine, acetoin, arginine, arginine deiminase

Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University
*Corresponding author, email: prawat@swu.ac.th

บทนำ

แบคทีเรียแลคติกเป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งต่ออุตสาหกรรมการผลิตอาหาร ในประเทศไทยอาหารที่หมักโดยแบคทีเรียแลคติกมีการบริโภคอย่างแพร่หลายและยังมีศักยภาพในการพัฒนาสู่การส่งออกจำหน่ายในต่างประเทศ ถึงแม้ว่าผลผลิตหลักที่เกิดขึ้นจากการหมักสารคาร์โบไฮเดรตโดยแบคทีเรียแลคติกคือกรดแลคติก แต่ผลผลิตรอง (by-products) บางชนิดโดยเฉพาะอย่างยิ่งสารที่ให้กลิ่น (flavouring compounds) จัดว่ามีความสำคัญต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหาร โดยสารที่สำคัญได้แก่ diacetyl (2,3-butanedione) และ tetramethylpyrazine (TMP)

Diacetyl เป็นสารที่ให้กลิ่นเนย (buttery flavour) ซึ่งพบได้ในผลิตภัณฑ์อาหารชนิดต่างๆ โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์นมหมักเช่น unripened cheeses, cultured buttermilk, cultured sour cream และ ripened cream butter [1] นอกจากนี้สารดังกล่าวยังมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์และรา ซึ่งรวมทั้งเชื้อก่อโรคที่แพร่ทางอาหาร [2-4] diacetyl เป็นผลผลิตจาก diacetyl-acetion pathway โดยเกิดจากปฏิกิริยา oxidative decarboxylation ของ α-acetolactate อย่างไรก็ตามสารสำคัญอีกชนิดหนึ่งที่เป็นผลผลิตของ pathway นี้คือ acetoin ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยา reduction ของ diacetyl หรือ enzymatic decarboxylation ของ α-acetolactate โดย acetoin สามารถใช้เป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์สารที่ให้กลิ่นที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งคือ TMP

TMP เป็นสารที่ให้กลิ่นถั่ว (nutty flavour) หรือกลิ่นถั่วเหลืองหมัก (fermented soybeans odour หรือ “natto”) [5-7] ที่พบได้ในผลิตภัณฑ์อาหารหลากหลายชนิด โดยสารดังกล่าวได้รับการยอมรับว่าปลอดภัยในการบริโภค (Generally Recognised As Safe หรือ GRAS) [8] และนอกจากนี้ TMP ยังมีความสำคัญทางการแพทย์โดยพบว่ามีสมบัติในการขยายหลอดเลือดและยับยั้งการเกาะตัวของเกล็ดเลือด ในประเทศจีนมีการใช้ TMP ที่สกัดจากพืชสมุนไพร *Ligusticum wallichii* Franch ในการรักษาอาการปวดเนื่องจากโรคหัวใจ หลอดเลือดหัวใจผิดปกติและภาวะสมองขาดเลือด [9, 10] TMP เกิดจากการรวมตัว (condensation) ระหว่าง acetoin และแอมโมเนียอย่างละ 2 โมเลกุลโดยเป็นปฏิกิริยาที่ไม่มีเอนไซม์มาเกี่ยวข้อง โดยที่ acetoin เป็นผลผลิตจาก diacetyl-acetoin pathway และแอมโมเนียได้จากการสลายอาร์จินีนโดยผ่าน arginine deiminase (ADI) pathway

แม้ว่าสารพวก pyrazines จะพบได้ในผลิตภัณฑ์จากพืช เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์นม [7] แต่มีรายงานว่าแบคทีเรียบางชนิดสามารถผลิต TMP ได้ ซึ่งได้แก่ *Bacillus subtilis* [11], *Bacillus natto* [12], *Bacillus cereus* [13] และ *Corynebacterium glutamicum* สายพันธุ์ที่เกิดการกลายของยีนที่เกี่ยวข้องกับ isoleucine-valine pathway [6] อย่างไรก็ตามมีผู้เสนอว่าแบคทีเรียแลคติกน่าจะมีศักยภาพในการเป็นผู้ผลิต TMP โดย Lee และคณะ [14] ได้แสดงให้เห็นว่า *Lactococcus lactis* สามารถผลิต TMP ได้ทั้งในสภาพที่เป็นเซลล์อิสระหรืออิมโมบิไลซ์เซลล์ นอกจากนี้ยังได้มีความพยายามในการเพิ่มผลผลิต TMP โดยแบคทีเรียดังกล่าว โดยการปรับปรุงสภาวะการเจริญให้เหมาะสมเพื่อเพิ่มผลผลิตของ acetoin [15] และแอมโมเนีย [16] ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของ TMP

บทความวิจัยนี้รายงานการแยกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมักและทดสอบศักยภาพในการเป็นผู้ผลิต TMP และรวมทั้งการสังเคราะห์ชิ้นส่วนของยีนสำหรับ arginine deiminase และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เบื้องต้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการศึกษายีนดังกล่าวในระดับโมเลกุลต่อไป และอาจนำไปสู่การประยุกต์เพื่อนำแบคทีเรียที่แยกได้มาใช้ในการผลิต TMP

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

แบคทีเรีย พลาสมิดและอาหารเลี้ยงเชื้อ

แบคทีเรียแลคติกที่ใช้ในการศึกษาแยกได้จากอาหารหมักชนิดต่าง ๆ โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS medium [17] ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แบคทีเรียที่ใช้เป็นโฮสต์สำหรับพลาสมิดคือ *E. coli* สายพันธุ์ TOP10 (Invitrogen, California, USA) โดยเลี้ยงในอาหารเหลว Luria Bertani (LB) medium [18] ที่มีการเติม ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และพลาสมิดที่ใช้ในการโคลนผลผลิตของ PCR คือ pCR2.1-TOPO (Invitrogen, California, USA)

การแยกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมัก

ทำการเจือจางตัวอย่างอาหารหมักในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ จากนั้นนำมาลาก (cross-streak) บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่เติม 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) calcium carbonate บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง สุ่มเลือกโคโลนีเดี่ยวที่มีวงใส (clear zone) อยู่รอบเพื่อนำมาตรวจสอบรูปร่าง การติดสีแกรม และการสร้างเอนไซม์ catalase โดยคัดเลือกเชื้อเป็นรูปท่อน ทรงกลม หรือรูปรี ติดสีแกรมบวก และไม่สร้างเอนไซม์ catalase เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียแลคติกในการผลิต acetoin และการใช้อาร์จินีนเป็นแหล่งพลังงาน

การทดสอบความสามารถในการผลิต acetoin ของแบคทีเรียแลคติกทำโดยนำเชื้อที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ Methyl Red-Voges Proskauer broth มา 1 มิลลิลิตร เติม α-naphthol solution (5 เปอร์เซ็นต์ α-naphthol ใน absolute ethanol) 0.6 มิลลิลิตร และสารละลาย KOH (40% KOH, 0.3% creatine) 0.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่ม 15 นาที ถ้ามี acetoin ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะเกิดปฏิกิริยาให้สีแดง

การทดสอบการใช้อาร์จินีนทำโดยเลี้ยงเชื้อใน modified MRS medium (ดัดแปลงจาก MRS medium โดยใส่ 0.3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) arginine hydrochloride แทน triammonium citrate) ที่ 30 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการวัดความขุ่นที่ OD_{600} เทียบกับ modified MRS medium ที่ไม่มีการเติมเชื้อ ถ้ามีการเจริญเกิดขึ้นแสดงว่าแบคทีเรียสามารถใช้อาร์จินีนเป็นแหล่งพลังงานได้

การสกัดโครโมโซมของแบคทีเรียแลคติก

ในการสกัดโครโมโซมของแบคทีเรียแลคติกจะใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Lewington และคณะ [19] โดยนำแบคทีเรียที่เจริญในอาหารเหลว MRS broth 10 มิลลิลิตร มาเก็บเซลล์โดยวิธี centrifugation จากนั้นเติมสารละลาย 0.25 M sucrose และ 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 240 ไมโครลิตร แล้วเติม lysozyme (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 10 นาที แล้วเติม 20 เปอร์เซ็นต์ SDS 160 ไมโครลิตร และ 5 M NaCl ที่เย็นจัด 80 ไมโครลิตร บ่มในน้ำแข็ง 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นแยกส่วนที่เป็นของเหลวออกโดยวิธี centrifugation แล้วนำมาสกัดโปรตีนออกด้วย phenol/chloroform (1: 1) 2 ครั้งและด้วย chloroform 1 ครั้ง ทำการตกตะกอน DNA ด้วย 3 M sodium acetate ปริมาตร 0.1x และ absolute ethanol ปริมาตร 2x แล้วนำตะกอน DNA ที่ได้มาละลายใน DNase-free water ที่ปราศจากเชื้อ

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Degenerate primers ที่ใช้ในการทำ PCR ได้แก่ rdi29 (Forward): 5'-GT(AGCT)AA(CT)(AT)(GC)(AGCT)GA(AG)AT(ACT)GG(AGCT)AA(AG)(CT)T(AGCT)AA-3', rdi30 (Forward): 5'-TT(CT)GC(AGCT)CA(AG)AC(AGCT)(CT)T(AGCT)(AC)G(AGCT)GA(CT)AA(CT)GG-3' และ rdi2 (Reverse): 5'-CAT(AGCT)GT(AG)AA(AGCT)AC(AGCT)GT(AG) TC(AGCT)A(AG)(AG)TGCAT-3' ซึ่งสังเคราะห์โดย BioService Unit, Bangkok, Thailand

ในปฏิกิริยา PCR (50 ไมโครลิตร) ประกอบด้วย DNA ต้นแบบประมาณ 250 นาโนกรัม, 1x PCR buffer ที่ผสม $MgCl_2$, dNTP แต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 2 mM, primer แต่ละชนิดปริมาณ 50 pmol, และ Taq DNA polymerase 0.4 unit โดยเตรียมใน DNase-free water ที่ปราศจากเชื้อ แต่ละรอบของ PCR ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้คือ denaturation ที่ 92 องศาเซลเซียส 2 นาที Primer annealing ที่ 40 องศาเซลเซียส 2 นาทีและ primer extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที และมีการทำทั้งหมด 30 รอบ

การสร้าง Recombinant DNA และการทำ transformation

การโคลนชิ้น DNA เข้าไปในพลาสมิดและการทำ transformation ทำโดยใช้ TOPO TA cloning kit (Invitrogen, California, USA) ตามวิธีที่ระบุโดยผู้ผลิต โดยชิ้น DNA ที่สังเคราะห์ด้วยวิธี PCR จะถูกโคลนเข้าในพลาสมิด pCR2.1-TOPO และ recombinant DNA ที่ได้จะถูกนำเข้าสู่ One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli* (*E. coli* TOP10) โดยการทำ Transformation

การสกัดพลาสมิด

การสกัดพลาสมิดจาก *E. coli* ทำโดยใช้ Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Wisconsin, USA) ตามวิธีที่ระบุโดยผู้ผลิต

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ recombinant DNA จัดทำโดย BioService Unit, Bangkok, Thailand

การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทำโดยใช้โปรแกรมจาก European Bioinformatics Institute, Cambridge, UK (http://www.ebi.ac.uk/services/)

ผลการทดลอง

การแยกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมัก

นำอาหารหมักจำนวน 14 ตัวอย่างมาทำการแยกแบคทีเรียแลคติก โดยสุ่มเลือกโคโลนีเดี่ยวที่เกิดขึ้นบน MRS medium ที่เติม calcium carbonate ซึ่งมีวงใส (clear zone) อยู่รอบโคโลนีเพื่อนำมาตรวจสอบรูปร่าง การติดสีแกรม และการสร้างเอนไซม์ catalase โดยคัดเลือกเฉพาะเชื้อที่มีลักษณะเป็นรูปท่อน (rod-shaped) ทรงกลม (coccoid) หรือรูปรี (ovoid) ซึ่งติดสีแกรมบวกและไม่สร้างเอนไซม์ catalase ได้จำนวนทั้งสิ้น 43 ไอโซเลท ดังแสดงในตารางที่ 1

การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียแลคติกในการผลิต acetoin และการใช้อาร์จินีนเป็นแหล่งพลังงาน

นำแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกไว้จำนวน 43 ไอโซเลทมาทดสอบความสามารถในการผลิต acetoin (Voges-Proskauer test) และการเจริญใน modified MRS medium ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 1 โดยมีแบคทีเรียแลคติกจำนวน 29 ไอโซเลทที่สามารถสร้าง acetoin และสามารถใช้อาร์จินีนเป็นแหล่งพลังงานได้

การออกแบบ degenerate primers สำหรับสังเคราะห์ชิ้นส่วนของยีนสำหรับ arginine deiminase

ทำการออกแบบ degenerate primers สำหรับสังเคราะห์ชิ้นส่วนของยีน arginine deiminase จากแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้ โดยนำลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ arginine deiminase จากแบคทีเรียแลคติก 2 ชนิดที่มีรายงานใน European Molecular Biology Laboratory (EMBL) database คือ *Lactococcus lactis* MG1363 (EMBL accession number AJ250129) [20] และ *Lactobacillus sakei* (EMBL accession number AJ001330) [21] มาเปรียบเทียบกันโดยใช้โปรแกรม Align (Needle) เพื่อหาบริเวณของโปรตีนที่เหมือนหรือคล้ายกันระหว่างเอนไซม์ทั้งสองเพื่อใช้ในการออกแบบ degenerate primers: rdi29 (Forward), rdi30 (forward) และ rdi2 (reverse) (รูปที่ 1)

การสังเคราะห์ชิ้นส่วนของยีน arginine deiminase

นำแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้าง acetoin และสามารถใช้อาร์จินีนเป็นแหล่งพลังงานได้จำนวน 29 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1) มาสกัดโครโมโซม จากนั้นทำการสังเคราะห์ชิ้นส่วนของยีน arginine deiminase ด้วยวิธี PCR โดยใช้โครโมโซมที่สกัดได้ 29 ตัวอย่างเป็นต้นแบบ สำหรับแต่ละตัวอย่างจะทำ PCR 2 ชุดคือชุดที่ 1 ใช้ degenerate primers rdi29 และ rdi2 และชุดที่ 2 ใช้ degenerate primers rdi30 และ rdi2 โดยผลผลิตที่คาดว่าน่าจะเกิดขึ้นจากการทำ PCR ชุดที่ 1 และ 2 มีขนาดประมาณ 810 และ 670 bp ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์ผลผลิตของการทำ PCR ทั้งสองชุดโดยการทำ agarose gel electrophoresis พบว่าในชุดที่ 1 ไม่มีการสังเคราะห์ชิ้น DNA ที่ต้องการจากโครโมโซมของแบคทีเรียแลคติกทั้ง 29 ตัวอย่าง ในขณะที่ชุดที่ 2 เกิดการสังเคราะห์ชิ้น DNA ขนาดใกล้เคียงกับขนาดที่คาดไว้จากโครโมโซม 2 ตัวอย่างคือจากไอโซเลท LC1 และ SC8

การสร้าง recombinant DNA และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำชิ้น DNA ที่สังเคราะห์ได้จากตัวอย่างทั้งสองมาโคลนเข้าไปในพลาสมิด pCR2.1-TOPO แล้วนำ recombinant DNA ที่ได้เข้าสู่เซลล์ *E. coli* TOP10 โดยการทำ transformation จากนั้นทำการสกัด recombinant plasmid ซึ่งมีชิ้น DNA ที่สังเคราะห์ขึ้นจากแต่ละตัวอย่างเข้าแทรกอยู่ แล้วนำพลาสมิดที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น DNA ดังกล่าว

ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น DNA ทั้งสอง (บางส่วน) โดยใช้โปรแกรม Fasta ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของ LC1 และ SC8 ที่นำไปวิเคราะห์ (โดยทั้งสองเริ่มจากนิวคลีโอไทด์ตัวแรกที่อยู่ถัดจาก primer rdi30) มีความยาว 418 และ 467 นิวคลีโอไทด์ตามลำดับ ผลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองพบว่าชิ้น DNA ที่สังเคราะห์จาก LC1 ไม่มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนสำหรับ arginine deiminase ใน EMBL database แต่กลับคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน lp1241 จาก *Lactobacillus plantarum* WCFS1 (EMBL accession number AL935255) โดยมีความเหมือนกันถึง 99.282 เปอร์เซ็นต์ แต่ยังไม่มีรายงานถึงหน้าที่ของโปรตีนผลผลิตของยีนดังกล่าว ในขณะที่ชิ้น DNA ที่สังเคราะห์จาก SC8 มีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนสำหรับ arginine deiminase จากสิ่งมีชีวิตต่าง ๆที่มีรายงานใน EMBL database ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 ความสามารถของแบคทีเรียที่แยกจากอาหารหมักในการผลิต acetoin (Voges-Proskauer test) และการใช้อาร์จินีนเป็นแหล่งพลังงาน

ตัวอย่างอาหาร	ไอโซเลท	รูปร่าง	Voges-Proskauer test[b]	การเจริญใน modified MRS medium[c]
ปลาส้ม	FF1	rod-shaped	+	+
	FF2	rod-shaped	-	-
	FF3	rod-shaped	-	-
	FF4	rod-shaped	-	+
นมเปรี้ยว (ยี่ห้อ B)	SM1	rod-shaped	+	+
	SM2	rod-shaped	-	+
โยเกิร์ต (ยี่ห้อ D)	YG1	rod-shaped	-	+
	YG2	rod-shaped	-	-
ครีมเปรี้ยว (ยี่ห้อ F)	SC1	rod-shaped	+	-
	SC2	rod-shaped	+	-
	SC3	ovoid	-	+
	SC4	rod-shaped	+++	+++
	SC5	ovoid	-	+
	SC6	ovoid	+	+
	SC7	ovoid	+	+
	SC8	ovoid	+	+
Mature Cheddar Cheese (ยี่ห้อ A)	ChC1	rod-shaped	+	+
Red Leicester Cheese (ยี่ห้อ A)	LC1	rod-shaped	+	+

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่างอาหาร	ไอโซเลท	รูปร่าง	Voges-Proskauer test[b]	การเจริญใน modified MRS medium[c]
Double Gloucester Cheese (ยี่ห้อ A)	GC1	rod-shaped	-	+
Danish Camembert Cheese (ยี่ห้อ RA)	CaC1	coccoid	+	+
	CaC2	rod-shaped	+	+++
	CaC3	ovoid	-	+++
	CaC4	ovoid	+	+++
Danish Blue Cheese (ยี่ห้อ RO)	BC1	rod-shaped	+	+
	BC2	coccoid	+	+
	BC3	coccoid	+	+
	BC4	rod-shaped	+	+++
	BC5	rod-shaped	+	+++
	BC6	rod-shaped	+	+++
	BC7	rod-shaped	+	+++
	BC8	rod-shaped	+	+++
Fresh cream Cheese (ยี่ห้อ C)	CrC1	rod-shaped	+++	+
	CrC2	coccoid	+	-
	CrC3	rod-shaped	+	+
	CrC4	rod-shaped	+	+++
	CrC5	rod-shaped	+	+++
	CrC6	ovoid	-	+

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่างอาหาร	ไอโซเลท	รูปร่าง	Voges-Proskauer test[b]	การเจริญใน modified MRS medium[c]
Edam Cheese (ยี่ห้อ MA)	EC1	ovoid	+	+
	EC2	ovoid	+++	+
	EC3	ovoid	+	+
	EC4	ovoid	+	+++
	EC5	ovoid	+	+++
	EC6	ovoid	+	+++
นมเปรี้ยว (ยี่ห้อ ME)	-[a]	-		
Light Philadelphia spreadable (ยี่ห้อ K)	-[a]	-		
Gouda cheese (ยี่ห้อ MA)	-[a]	-		

หมายเหตุ: [a] ไม่สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกได้ในสภาวะที่ใช้ในการทดลอง

[b] เชื้อที่มีการสร้าง acetoin (เกิดสีแดง) แสดงด้วยเครื่องหมาย + และเชื้อที่มีการสร้าง acetoin ในปริมาณมาก (เกิดสีแดงเข้ม) แสดงด้วยเครื่องหมาย +++

[c] เชื้อที่เจริญได้ในอาหาร modified MRS medium แสดงด้วยเครื่องหมาย + และเชื้อที่เจริญได้ดีในอาหารดังกล่าวคือให้ค่า $OD_{600\ nm}$ สูงกว่า 0.5 แสดงด้วยเครื่องหมาย +++

```
AJ250129          1 MNNGINVNSEIGKLKSVLLHRPGAEVENITPDTMKQLLFDDIPYLKIAQK     50
                    |.:.|:|||||||||:|||.|||.||||||||.|.:|||||||||...||
AJ001330          1 MTSPIHVNSEIGKLKTVLLKRPGKEVENITPDIMYRLLFDDIPYLPTIQK     50
                            rdi29

AJ250129         51 EHDFFAQTLRDNGAETVYIENLATEVFEKSSETKEEFLSHLLHEAGYRPG    100
                    |||.|||||||||.|.:|:||||.|..: :.:.||.||..:|:|:..:..
AJ001330         51 EHDQFAQTLRDNGVEVLYLENLAAEAID-AGDVKEAFLDKMLNESHIKSP     99
                          rdi30

AJ250129        101 RTYDGLTEYLTSMPTKDMVEKVYAGVRKNELDIKRTALSDMAGSDAENY-    149
                    :....|.:||.||.|.|||||:.||||.||:|||..||.|::..|  :|
AJ001330        100 QVQAALKDYLISMATLDMVEKIMAGVRTNEIDIKSKALIDVSADD--DYP    147


AJ250129        150 FYLNPLPNAYFTRDPQASMGVGMTINKMTFPARQPESLITEYVMANHPRF    199
                    ||::|:||.||||||.||||.|:|||||||.|||.||:..|.:|.:||||
AJ001330        148 FYMDPMPNLYFTRDPAASMGDGLTINKMTFEARQRESMFMEVIMQHHPRF    197


AJ250129        200 --KDTPIWRDRNHTTRIEGGDELILNKTTVAIGVSERTSSKTIQNLAKEL    247
                      :...:||||:|..|:||||||||:...:|||:|:|||:::|:.|||.|
AJ001330        198 ANQGAQVWRDRDHIDRMEGGDELILSDKVLAIGISQRTSAQSIEELAKVL    247


AJ250129        248 FANPLSTFDTVLAVEIPHNHAMMHLDTVFTMINHDQFTVFPGIMDGAGNI    297
                    |||. |.|:.:||::|||.|||||||||||||::|:||:.|||....|.:
AJ001330        248 FANH-SGFEKILAIKIPHKHAMMHLDTVFTMIDYDKFTIHPGIQGAGGMV    296
                                        rdi2

AJ250129        298 NVFILRPGQDGEVEIEHLTDLKAALKKVLNLSELDLIECGAGDPIAAPRE    347
                    :.:||.||.:.:|::|.|.|||:..|:..|.:.||.||.||.||.:.||||
AJ001330        297 DTYILEPGNNDEIKITHQTDLEKVLRDALEVPELTLIPCGGGDAVVAPRE    346


AJ250129        348 QWNDGSNTLAIAPGEIVTYDRNYVTVELL----------ISSELGRGRGG    387
                    |||||||||||||.:||||||||:.|.|          .||||.|||||
AJ001330        347 QWNDGSNTLAIAPGVVVTYDRNYVSNENLRQYGIKVIEVPSSELSRGRGG    396


AJ250129        388 ARCMSQPLWREDL    400
                    .||||.||.|...
AJ001330        397 PRCMSMPLVRRKT    409
```

รูปที่ 1 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ arginine deiminase จากแบคทีเรียแลคติก 2 ชนิดโดยใช้ โปรแกรม Align (Needle) โดยที่ AJ250129 เป็นลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์จาก *Lactococcus lactis* MG1363 [20] และ AJ001330 เป็นของเอนไซม์จาก *Lactobacillus sakei* [21] บริเวณที่ใช้ในการออกแบบ degenerate primers: rdi29 (forward), rdi30 (forward) และ rdi2 (reverse) คือบริเวณที่มีการขีดเส้นใต้ตามลำดับ

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ใน EMBL database ที่มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA (ความยาว 467 bp) ที่สังเคราะห์จาก SC8

Gene/Organism	EMBL accession No.	DNA size (bp)	% identity
Arginine deiminase gene/*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363	AJ250129	467	99.786
Arginine deiminase gene/*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ML3	AF282249	467	99.572
Arginine deiminase gene/*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403	AE006433	467	92.505
Arginine deiminase gene/*Oenococcus oeni* ATCC23279	AF124851	481	61.123
Arginine deiminase gene/*Lactobacillus sakei* BL13	AJ001330	473	58.774
Arginine deiminase gene/*Lactobacillus hilgardii* X1B	AJ421514	476	57.773

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

คณะผู้วิจัยได้แยกแบคทีเรียแลคติกจำนวน 43 ไอโซเลทจากอาหารหมัก 14 ชนิด โดยเชื้อที่คัดเลือกไว้มีสมบัติดังนี้คือเกิดวงใสอยู่รอบโคโลนีเมื่อเจริญบน MRS medium ที่เติม calcium carbonate มีรูปร่างท่อน ทรงกลม หรือรูปรี ติดสีแกรมบวกและไม่สร้างเอนไซม์ catalase แล้วนำเชื้อที่แยกได้มาทำการทดสอบศักยภาพในการเป็นผู้ผลิต TMP ซึ่งเป็นสารให้กลิ่นที่สำคัญในผลิตภัณฑ์อาหารและมีความสำคัญทางการแพทย์ โดยทดสอบการสร้าง acetoin และความสามารถในการใช้อาร์จินีนเป็นแหล่งพลังงาน โดยที่ TMP เกิดจากปฏิกิริยาการรวมตัวของ acetoin และแอมโมเนียซึ่งเป็นผลผลิตจากการสลายอาร์จินีนของแบคทีเรียผ่าน arginine deiminase (ADI) pathway จากการทดสอบพบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 29 ไอโซเลทที่มีสมบัติทั้งสองประการดังกล่าว (ตารางที่ 1) โดยในจำนวนนี้มีบางไอโซเลทที่สร้าง acetoin ในปริมาณสูงซึ่งได้แก่ SC4, CrC1 และ EC2 และพบว่ามีหลายไอโซเลทที่สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่ใช้ทดสอบการใช้อาร์จินีนซึ่งได้แก่ SC4, CaC2, CaC3, CaC4, BC4, BC5, BC6, BC7, BC8, CrC4, CrC5, EC4, EC5 และ EC6 จะเห็นว่าแบคทีเรียแลคติกทั้ง 29 ไอโซเลทมีศักยภาพในการเป็นผู้ผลิต TMP โดยเฉพาะอย่างยิ่ง SC4 ซึ่งสามารถผลิต Acetoin ได้ในปริมาณมากและน่าจะมีการผลิตแอมโมเนียในปริมาณมากเช่นกัน อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้เป็นการคัดเลือกเชื้อที่มีศักยภาพในการเป็นผู้ผลิต TMP เบื้องต้น ส่วนการเปรียบเทียบการผลิต TMP ของเชื้อดังกล่าวในเชิงปริมาณอาจจะต้องมีการเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่ส่งเสริมการผลิต acetoin

[15] และแอมโมเนีย [16] และวัดปริมาณ TMP ที่เกิดขึ้นโดยใช้วิธีที่เหมาะสม [14] ต่อไป

จากการทำ PCR เพื่อสังเคราะห์ชิ้นส่วนของยีน arginine deiminase โดยใช้โครโมโซมที่สกัดจากแบคทีเรียแลคติก 29 ไอโซเลทเป็นต้นแบบและใช้ degenerate primers 2 ชุดซึ่งออกแบบมาจากลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ arginine deiminase ของ *Lactococcus lactis* และ *Lactobacillus sakei* ที่มีรายงานอยู่ใน EMBL database พบว่าผลของการทำ PCR ชุดที่ 1 (ใช้ degenerate primers rdi29 และ rdi2) ไม่เกิดการสังเคราะห์ชิ้น DNA ที่ต้องการจากโครโมโซมของแบคทีเรียแลคติกทั้ง 29 ตัวอย่าง ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าบริเวณของลำดับกรดอะมิโนที่ใช้ในการออกแบบ degenerate primer rdi29 อาจไม่ใช่บริเวณ conserved region ของเอนไซม์ arginine deiminase ของแบคทีเรียแลคติก หรืออุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอน annealing temperature อาจสูงเกินไปทำให้ degenerate primer ดังกล่าวจับกับ DNA ต้นแบบได้ไม่ดีพอ

ในการทำ PCR ชุดที่ 2 (ใช้ degenerate primers rdi30 และ rdi2) พบการสังเคราะห์ชิ้น DNA ที่มีขนาดที่ต้องการจากโครโมโซม 2 ตัวอย่างคือจากไอโซเลท LC1 และ SC8 และจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของผลผลิตของ PCR ที่สังเคราะห์จาก LC1 โดยใช้โปรแกรม Fasta พบว่ามีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน lp1241 จาก *Lactobacillus plantarum* ถึง 99.282 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งหน้าที่ของโปรตีนผลผลิตของยีนดังกล่าวยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่ไม่พบความเหมือนระว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น DNA ดังกล่าวและของยีนสำหรับ arginine deiminase ใดๆ ใน EMBL database จึงน่าเชื่อได้ว่าชิ้น DNA ที่สังเคราะห์ได้นี้ไม่ใช่ชิ้นส่วนของยีน arginine deiminase ในขณะที่ผลของการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของผลผลิตของ PCR ที่สังเคราะห์จาก SC8 แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนสำหรับ arginine deiminase จากแบคทีเรียแลคติกชนิดต่างๆใน EMBL database (ตารางที่ 2) จึงมีความเป็นไปได้สูงที่ชิ้น DNA ที่สังเคราะห์ขึ้นเป็นชิ้นส่วนของยีน arginine deiminase และจากการที่ชิ้น DNA ที่สังเคราะห์ได้มีความเหมือนกับยีนสำหรับ arginine deiminase จาก *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 สูงที่สุด (99.786 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ได้มีผู้รายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดังกล่าว (arcA) และรวมทั้งยีนอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับ ADI pathway มาแล้ว [20] และนอกจากนี้ยังมีการรายงานถึงบริเวณที่น่าจะเป็นบริเวณควบคุมการแสดงออกของยีนที่บริเวณ upstream ของยีน arcA ซึ่งประกอบด้วยโปรโมเตอร์ Arg box และ catabolite repression element (Cre) sequence ของแบคทีเรียแกรมบวก [20] จึงมีความน่าสนใจที่จะศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนสำหรับ arginine deiminase ที่สมบูรณ์ของ SC8 ซึ่งอาจนำไปสู่การปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีการแสดงออกของยีนดังกล่าวในปริมาณที่สูงขึ้นเพื่อเพิ่มการผลิตแอมโมเนียซึ่งเป็นสารตั้งต้นของ TMP และรวมทั้งการศึกษาบริเวณควบคุมของยีนดังกล่าวซึ่งอาจนำไปสู่การพัฒนา inducible expression vector ที่ควบคุมการแสดงออกได้โดยใช้อาร์จินีน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนตามโครงการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปี 2546-2547

เอกสารอ้างอิง

1. Seitz, E. W., Sandine, W. E., Elliker, P. R. and Day, E. A. 1963. Distribution of Diacetyl Reductase Among Bacteria. *Journal of Dairy Science* 46: 186-189.
2. Jay, J. M. 1982a. Antimicrobial Properties of Diacetyl. *Applied and Environmental Microbiology* 44(3): 525-532.
3. Jay, J. M. 1982b. Effect of Diacetyl on Foodborne Microorganisms. *Journal of Food Science* 47: 1829-1831.
4. Bowles, B. L. and Juneja, V. K. 1998. Inhibition of Foodborne Bacterial Pathogens by Naturally Occuring Food Additives. *Journal of Food Safety* 18: 101-112.
5. Wasserman, B. P., Montville, T. J. and Korwek, E. L. 1988. Food Biotechnology. *Food Technology* 42(1): 133-146.
6. Demain, A. L., Jackson, M. and Trenner, N. R. 1967. Thiamine-Dependent Accumulation of Tetramethylpyrazine Accompanying a Mutation in the Isoleucine-Valine Pathway. *Journal of Bacteriology* 94(2): 323-326.
7. Maga, J. A. and Sizer, C. E. 1973. Pyrazines in Foods. *CRC Critical Reviews in Food Technology* 4: 39-115.
8. Hall, R. L. and Oser, B. L. 1970. Recent Progress in the Consideration of Flavoring Ingredients under the Food Additives Amendment. 4. GRAS Substances. *Food Technology* 24: 533-542.
9. Feng, J., Liu, R., Wu, G. and Tang, S. 1996. Pretreatment with Tetramethylpyrazine Increases the Release of PGI_2 and Decreases TXA_2 Release in Isolated Rat Heart. *Planta Medica* 62: 379-381.
10. Pang, P. K. T., Shan, J. J. and Chiu, K. W. 1996. Tetramethylpyrazine, a Calcium Antagonist. *Planta Medica* 62: 431-435.
11. Kosuge, T. and Kamiya, H. 1962. Discovery of a Pyrazine in a Natural Product: Tetramethylpyrazine from Cultures of a Strain of *Bacillus subtilis. Nature* 193: 776.
12. Kosuge, T., Adachi, T. and Kamiya, H. 1962. Isolation of Tetramethylpyrazine from Culture of *Bacillus natto*, and Biosynthetic Pathways of Tetramethylpyrazine. *Nature* 195: 1103.
13. Ogai, D. K., Zunnundzhanov, A., Uraunbaeva, D. Iu., Musaev, Sh. M. and Shcherbakov, V. K. 1982. *Bacillus cereus* Strain 147: Producer of Tetramethylpyrazine. *Prikladnaia Biohimiia I Mikrobiologiia* 18(5): 648-651.

14. Lee, J.-E., Woo, G.-J. and Lee, H. J. 1996. Tetramethylpyrazine Production by Immobilized Culture of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetilactis FC1. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 6(2): 137-141.

15. Kim, K. H. and Lee, H. J. 1991a. Optimum Conditions for the Formation of Acetoin as a Precursor of Tetramethylpyrazine During the Citrate Fermentation by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetilactis FC1. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 1(3): 202-206.

16. Kim, K. H. and Lee, H. J. 1991b. Optimum Conditions for the Formation of Ammonia as a Precursor of Tetramethylpyrazine by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar diacetilactis FC1. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 1(4): 281-284.

17. 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.

18. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Vol. 1. 2nd Edition. USA. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

19. 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.

20. Aungpraphapornchai, P. 2000. Genetic Manipulation of Genes and Enzymes Involved in Flavour Generation by *Lactococcus lactis*. Ph.D. Thesis. The University of East Anglia, UK.

21. Zuniga, M., Champomier-Verges, M., Zagorec, M. and Perez-Martinez, G. 1998. Structural and Functional Analysis of the Gene Cluster Encoding the Enzymes of the Arginine Deiminase Pathway of *Lactobacillus sake*. *Journal of Bacteriology* 180(16): 4154-4159.

ได้รับบทความวันที่ 15 พฤศจิกายน 2549
ยอมรับตีพิมพ์วันที่ 4 พฤษภาคม 2550