PEDIOCIN SCREENING KIT FOR BIOTECHNOLOGICAL APPLICATION AND EDUCATION

DUONGDEARN SUWANJINDA

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIRMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(SCIENCE AND TECHNOLOGY EDUCATION)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2008

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

ชุดตรวจสอบ pediocin สำหรับการประยุกต์ใช้ทางเทคโนโลยีชีวภาพและการศึกษา
(PEDIOCIN SCREENING KIT FOR BIOTECHNOLOGICAL APPLICATION AND EDUCATION)

ดวงเดือน สุวรรณจินดา 4637312 SCED/D
ปร.ด. (วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีศึกษา)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด, Dr.Eng., ภิญโญ พานิชพันธ์, Ph.D., ชื่นจิตต์ บุญเฉิด, Ph.D., เปรมวดี วงษ์แสงจันทร์, Ph.D.

บทคัดย่อ

ได้คัดเลือกเชื้อ lactic acid bacteria (LAB) จากตัวอย่างแหนมและทดสอบความสามารถในการสร้าง “bacteriocin” และการมียีนนี้โดยดูผลการมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่มีพันธุกรรมใกล้เคียงกันและตรวจหายีนด้วยเทคนิค PCR ตามลำดับ ได้จำแนกชนิดของเชื้อ LAB ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อตัวทดสอบได้แก่ *Vibrio harveyi* และ *Lactobacillus plantarum* โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ 16S rRNA ยีน ได้เลือก *Pediococcus pentosaceus* P7 ซึ่งเป็นเชื้อที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อตัวทดสอบได้แก่ *V. harveyi* และ *Lb. plantarum* ได้ดีที่สุดเพื่อตรวจสอบการปรากฏของยีน pediocin (*pedA*) ด้วยวิธี PCR จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (*pedA*) พบว่ามีความคล้ายคลึง 100% กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *pedA* ยีน ที่พบในแบคทีเรีย LAB ชนิดอื่นๆ

ได้นำ *Ped. pentosaceus* P7 และเชื้ออีกสองสายพันธุ์ bacteriocin คือ *Enterococcus faecium* F103 and *Lactococcus lactis* F141 ซึ่งมียีนในการสร้าง pediocin, enterocin, และ nisin ตามลำดับมาใช้ในการออกแบบปฏิบัติการสำหรับนักศึกษาชั้นปีที่สาม ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยมหิดล เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของรายวิชา “Microbial Physiology and Genetics” ภาคปฏิบัติการซึ่งประกอบด้วยแบบปฏิบัติการห้าคาบเพื่อแยกและคัดเลือก LAB ที่สร้าง bacteriocin จากอาหารหมักของไทยโดยวิธีการทางจุลชีววิทยาเป็นลำดับแรก และตามด้วยการสกัด DNA อย่างง่ายและรวดเร็ว ได้ใช้วิธี multiplex PCR และใช้ไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบอย่างจำเพาะสามคู่เพื่อตรวจสอบการปรากฏของ ยีน bacteriocin ในเชื้อ LAB ที่แยกมา หากได้ผลการเพิ่มขยายยีนด้วยวิธี PCR ขนาด 332, 412, และ 608 คู่เบส จะบ่งชี้การปรากฏของยีน pediocin, enterocin, และ nisin ตามลำดับ ซึ่งการไม่ปรากฏของท่อนยีนขนาดดังกล่าวแสดงว่าไม่มี ยีน bacteriocin การทดลองนี้ให้ประสบการณ์แก่นักศึกษาในการใช้วิธีการทางจุลชีววิทยาและวิธี multiplex PCR และแสดงให้นักศึกษาเห็นว่าอณูชีววิทยาสามารถเกี่ยวข้องกับชีวิตกระจำวันของนักศึกษา นอกจากนี้แบบปฏิบัติการนี้สามารถนำไปปรับใช้เพื่อการศึกษาเชื้อ LABs ในอาหารหมักจากประเทศอื่นๆได้ง่ายด้วย

นอกจากการออกแบบการทดลองสำหรับนักศึกษาแล้ว การศึกษาในครั้งนี้ได้มีการพัฒนาและประยุกต์ใช้วิธี multiplex-overlapping PCR (mPCR) เพื่อการตรวจหา pediocin ยีน และการจำแนก species ระหว่าง *Ped. acidilactici* and *Ped. pentosaceus* ในครั้งเดียวกัน วิธีการ mPCR นี้เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และเป็นวิธีที่เชื่อถือได้สำหรับการจำแนก species ของเชื้อ *Pediococcus* ทั้งสองชนิด และสามารถตรวจหายีน pediocin ในปฏิกริยา PCR เดียว

188 หน้า

Copyright by Mahidol University

PEDIOCIN SCREENING KIT FOR BIOTECHNOLOGICAL APPLICATION AND EDUCATION

DUONGDEARN SUWANJINDA 4637312 SCED/D

Ph.D. (SCIENCE AND TECHNOLOGY EDUCATION)

THESIS ADVISORS: WATANALAI PANBANGRED, Dr.Eng., BHINYO PANIJPAN, Ph.D., CHUENCHIT BOONCHIRD, Ph.D., PRAMVADEE WONGSAENGCHANTRA, Ph.D.

ABSTRACT

Several lactic acid bacteria (LAB) were isolated from Nham samples. They were tested for bacteriocin activity and the presence of the corresponding gene by inhibiting growth of closely related bacteria and polymerase chain reaction (PCR), respectively. LAB-producing clear halo zones were identified by 16S rRNA gene sequencing. *Pediococcus pentosaceus* P7, which showed the highest inhibitory effect against the indicator strains (*Vibrio harveyi* and *Lactobacillus plantarum*), was selected and the presence of its pediocin A gene (*pedA*) was confirmed by PCR. The nucleotide sequence of the *pedA* gene is 100% homologous to the corresponding pediocin structural genes of other LABs.

Ped. pentosaceus P7, and other two bacteriocin-producing strains isolated from Nham samples, *Enterococcus faecium* F103 and *Lactococcus lactis* F141 harboring pediocin, enterocin and nisin genes, respectively, were selected and used for a practical laboratory designed for the third-year undergraduate students of Biotechnology, Mahidol University, as part of a Microbial Physiology and Genetics course. This five-session laboratory module aimed to screen foods for LAB and to test isolated LAB for the presence of bacteriocins. Traditional Thai fermented foods were first screened for bacteriocin-producing LAB using microbiological methods. This was followed by a simple and rapid DNA extraction and by a multiplex polymerase chain reaction (PCR) using three pairs of specific primers to test for the presence or absence of various bacteriocin genes in the isolated LAB. PCR amplicons of 332, 412, and 608 bp indicated the presence of pediocin, enterocin, and nisin genes, respectively, whereas no amplicon band indicates the absence of these bacteriocins. The laboratory provided the students with experience in the use of microbiological and multiplex PCR methods and showed how the molecular biology techniques can be related to their daily lives. The module could easily be adapted to the study of LABs in fermented foods from other countries.

Besides the laboratory designed for the students, in this study, the development of multiplex-overlapping PCR (mPCR) method for simultaneous detection of pediocin gene and species differentiation between *Ped. acidilactici* and *Ped. pentosaceus* was also conducted. This mPCR proved to be a simple, rapid method of determination and reliable method for differentiation of both pediococcal species as well as the detection of pediocin gene in a single PCR reaction.

KEY WORDS: PEDIOCIN / BACTERIOCIN / *PEDIOCOCCUS PENTOSACEUS* / *PED. ACIDILACTICI* / LAB / UNDERGRADUATE LABORATORY PRACTICE / BIOTECHNOLOGY / MPCR

188 pp.

Copyright by Mahidol University