



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดขนาดเล็กจาก *Lactobacillus* sp. ที่มี
บทบาทในอาหารหมักของไทยและการศึกษายีนที่ต้านทานโลหะหนัก
Sequence Analysis of a Small Plasmid from *Lactobacillus* sp., a Starter
Culture Used in Thai Fermented Food and Isolation of Metal Resistance Gene

โดยนางสาวนงพงา คุณจักร

และ

นายวิเชียร ลีลาวัชรมาศ

เดือน ปี ที่เสร็จโครงการ : 3 พฤศจิกายน 2553

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดขนาดเล็กจาก *Lactobacillus* sp. ที่มีบทบาท
ในอาหารหมักของไทยและการศึกษายีนที่ต้านทานโลหะหนัก

คณะผู้วิจัย

สังกัด

1. นางสาวนงพงา คุณจักร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
2. นายวิเชียร ลีลาวัชรมาศ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ.และสกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ทางผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย ที่ได้ให้โอกาสและสนับสนุนเงินทุนวิจัยเป็นระยะเวลา 2 ปี ขอขอบคุณ รศ.ดร. วิเชียร ลีลาวัชรมาศ อาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ นักวิจัยที่ปรึกษาโครงการ Prof. Noel Dunn และ Dr. Liu C.-Q. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยนิวเซาท์เวลส์ ประเทศออสเตรเลีย ที่ได้ให้ความรู้และให้แนวทางในการทำงานวิจัย ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือวิเคราะห์ต่างๆ

รหัสโครงการ : MRG4780019

ชื่อโครงการ : การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดขนาดเล็กจาก *Lactobacillus* sp. ที่มีบทบาทในอาหารหมักของไทยและการศึกษายีนที่ต้านทานโลหะหนัก

ชื่อนักวิจัย : นางสาวนงพงา คุณจักร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

E-mail Address : naongpanga.khu@kmutt.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี

Abstract

The aim of this work was to isolate a small cryptic plasmid from *Lactobacillus* isolated from food samples to be used as a food grade cloning vector for *Lactobacilli* and related strains. Metal resistance determinants, such as nickel, copper and cadmium from lactic acid bacteria were also studied in order to use those resistance genes as food grade selection markers to replace antibiotic resistance markers. A total of 174 *Lactobacillus* strains were isolated from food samples. One isolate from Nham identified as *Lactobacillus plantarum* (designated *L. plantarum* KM1) was chosen as it contains small plasmid. A small 3-kilobase plasmid namely pKM1 was isolated from *L. plantarum* KM 1 for sequencing. Sequence analysis revealed two open reading frames (ORFs). The deduced amino acid sequence encoded by ORF1 and ORF2 showed high degrees of sequence homology to the Mob and Rep proteins, respectively, of a numbers of rolling circle plasmids from lactic acid bacteria such as pLC88, pRS4, pF8801, pWCFS101 and pRS4. Two conserved sequences of *dso* (double strand origin) and *sso* (single strand origin) characteristic of rolling circle plasmid were also identified upstream of ORF2. Therefore, pKM1 from *L. plantarum* KM1 could be classified as rolling circle type plasmid that can be used to construct a cloning vector for *Lactobacilli*. Screening of metal ion resistance lactic acid bacteria was carried out and the results showed that 61, 45 and 12 isolates could resistance to copper sulfate, nickel sulfate and cadmium chloride to up to 20, 200 and 1 mM, respectively. Plasmid curing using novobiocin and high temperature was failed to identify plasmid harboring metal resistance determinants. The genes responsible for cadmium resistance therefore were identified by PCR using primers specific to *cadA* gene. About 600 bp PCR products were obtained and subjected to direct sequencing analysis. A homology search revealed sequence similarity to *cadA* gene on plasmids pGdh 442, pNP40, pAH82, pAG6, pND302 and pLI100 from a number of lactic acid bacteria. Southern hybridization *cadA* specific probe was carried out to localize cadmium resistance determinants plasmids. Positive signals were detected from 3 isolates C53, V13 and NU1.

Keywords: *Lactobacillus plantarum*, cadmium resistance, rolling circle plasmid, Mob and RepA proteins, plasmid curing

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการแยกพลาสมิดขนาดเล็กจากเชื้อ *Lactobacillus* ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารเพื่อนำมาพัฒนาใช้เป็นเวกเตอร์ชนิดที่เป็น food grade ที่ใช้ในการโคลนยีนสำหรับเชื้อ *Lactobacillus* และเชื้อสายพันธุ์ใกล้เคียง นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาในที่ควบคุมการต้านทานโลหะหนักจากแบคทีเรียแลคติก เพื่อนำมาใช้เป็นยีน selection markers ทดแทนยีนต้านทานยาปฏิชีวนะ ได้ทำการแยกเชื้อ *Lactobacillus* จากตัวอย่างอาหารได้ 174 ไอโซเลต จากการศึกษาารูปแบบของพลาสมิด (plasmid profile) ได้เลือกเชื้อที่มีพลาสมิดขนาดเล็กซึ่งแยกได้จากนม และจัดจำแนกเชื้อได้เป็น *Lactobacillus plantarum* โดยให้ชื่อว่า *L. plantarum* KM1 ทำการแยกพลาสมิดขนาดประมาณ 3.0 กิโลเบส และให้ชื่อพลาสมิดว่า pKM1 จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์พบ open reading frame 2 ชนิด ซึ่งเมื่อศึกษาลำดับกรดอะมิโนจากลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า ORF1 และ ORF2 มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายโปรตีน mobilization (Mob) และ replication (RepA) ตามลำดับ โดยมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับโปรตีนที่พบบนพลาสมิดที่มีการจำลองตัวเองแบบ rolling circle จากแบคทีเรียแลคติกหลายชนิดเช่น พลาสมิด pLC88, pRS4, pF8801, pWCFS101 และ pRS4 นอกจากนี้ยังพบตำแหน่งที่เรียกว่า double strand origin (dso) และ single strand origin (sso) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของพลาสมิดที่มีการจำลองตัวเองแบบ rolling circle ดังนั้นพลาสมิด pKM1 จึงจัดเป็นพลาสมิดชนิด rolling circle และจากการที่พลาสมิด pKM1 มีตำแหน่งที่สามารถตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถใช้ในการตัดต่อยีนได้จึงสามารถนำมาพัฒนาสร้างเป็นเวกเตอร์สำหรับการโคลนยีนสำหรับ *Lactobacillus* ได้

จากการคัดเลือกเชื้อที่ต้านทานโลหะหนักพบเชื้อสามารถต้านทานนิกเกิล 20 mM คอปเปอร์ 200 mM และแคดเมียม 1 mM จำนวน 61, 45 และ 12 ไอโซเลต ตามลำดับ การทำ plasmid curing โดยใช้สาร novobiocin ร่วมกับการใช้อุณหภูมิสูงไม่สามารถแยกชั้นพลาสมิดที่มียีนควบคุมการต้านทานโลหะหนักได้ การศึกษายีนต้านทานแคดเมียมด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *cadA* ซึ่งควบคุมการต้านทานแคดเมียมพบว่าสามารถแยกชั้นดีเอ็นเอที่เป็นผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 600 คู่เบสจากการใช้พลาสมิดและโครโมโซมเป็นแม่แบบ และจากการศึกษาลำดับเบสบนผลผลิต PCR พบว่าคล้ายกับยีน *cadA* บนพลาสมิดหลายชนิดจากแบคทีเรียแลคติก ได้แก่พลาสมิด pGdh 442, pNP40, pAH82, pAG6, pND302 และ pLI100 การหาชั้นของพลาสมิดที่มียีนควบคุมการต้านทานแคดเมียมโดยวิธี Southern hybridization โดยใช้โพรบที่จำเพาะกับยีน *cadA* และ *cadC* พบพลาสมิดจากเชื้อ V13, C53 และ NU1 ที่มียีนต้านทานแคดเมียมคล้ายกับยีน *cadA*

คำสำคัญ: *Lactobacillus plantarum*, การต้านทานแคดเมียม, พลาสมิด rolling circle, โปรตีน Mob และ RepA, plasmid curing

สารบัญ

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	4
บทคัดย่อภาษาไทย.....	5
กิตติกรรมประกาศ	3
สารบัญ.....	6
สารบัญตาราง	7
สารบัญภาพ.....	8
บทที่ 1 บทนำ.....	9
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	11
บทที่ 2 การทบทวนเอกสาร	12
บทที่ 3 วิธีการทดลอง.....	14
3.1 การแยกและคัดเลือกเชื้อในกลุ่ม <i>Lactobacillus</i> sp. จากตัวอย่างอาหาร.....	14
3.2 การศึกษา plasmid profile ของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้.....	14
3.3 การจัดจำแนกแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกโดยใช้ API 50CHL kit และ 16S rDNA sequencing.....	14
3.4 ทดสอบความเสถียร (stability) ของพลาสมิดโดยการเลี้ยงในสภาวะที่ไม่เหมาะสม.....	15
3.5 การแยกพลาสมิดขนาดที่ต้องการออกจากพลาสมิดอื่นๆ.....	15
3.6 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดที่แยกได้.....	15
3.7 การทดสอบการต้านทานโลหะหนัก	15
3.8 การแยกยีนต้านทานแคดเมียมบางส่วนจากพลาสมิดโดยวิธี Polymerase Chain Reaction ...	16
3.9 Southern Hybridization	16
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์.....	17
4.1 การแยกแบคทีเรียแลคติกและการศึกษารูปแบบของพลาสมิดของเชื้อ	17
4.2 การจัดจำแนกเชื้อรหัส KM1 และ SV12	18
4.3 การศึกษาความคงตัวของพลาสมิดของเชื้อ <i>Lactobacillus plantarum</i> KM1.....	19
4.4 ลักษณะยีนที่อยู่บนพลาสมิด pKM1.....	20
4.5 การทดสอบการต้านทานคอปเปอร์ นิกเกิลและแคดเมียมของแบคทีเรียแลคติก	25
4.6 การตรวจสอบพลาสมิดของแบคทีเรียแลคติกที่ต้านทานโลหะหนัก	28
4.7 การศึกษาตำแหน่งของยีนที่ต้านทานนิกเกิลโดยวิธี plasmid curing.....	30
4.8 การศึกษาตำแหน่งของยีนต้านทานแคดเมียมโดยเทคนิค PCR.....	32
4.9 การทำ hybridization ของแบคทีเรียแลคติกที่สามารถต้านทานแคดเมียมได้.....	36
สรุปผลการทดลอง	38
เอกสารอ้างอิง	39

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1	แสดงรหัสเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกจากนมแพะและตัวอย่างอาหารที่ให้ผลผลิต PCR ของยีนที่ควบคุมการต้านทานแคดเมียม.....33
2	แสดงสายพันธุ์แบคทีเรียที่มียีน <i>cadA</i> คล้ายกับยีนในแบคทีเรียแลคติก รหัส C53 และ NU1 34

สารบัญญภาพ

รูปที่	หน้า
1	Plasmid profiles ของเชื้อ <i>Lactobacillus</i> sp. ที่แยกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก (A) และผักดอง (B) 17
2	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ 1,476 คู่เบสของยีน 16S rRNA จากเชื้อรหัส KM1 และมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับเชื้อ <i>Lactobacillus plantarum</i> 19
3	Plasmid profile ของ <i>Lactobacillus plantarum</i> KM1 20
4	แผนที่พลาสมิด pKM 1 ขนาดประมาณ 3300 คู่เบสจากเชื้อ <i>Lactobacillus plantarum</i> KM1 21
5	ลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 3,311 คู่เบส ของพลาสมิด pKM 1 22
6	แสดงการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน RepA ของพลาสมิด pKM1 กับโปรตีน RepA ของพลาสมิดชนิดอื่นๆ 5 ชนิด ที่พบในของแบคทีเรียแลคติก 24
7	แสดงการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Mop ของพลาสมิด pKM1 กับโปรตีน Mob ของพลาสมิดชนิดอื่นๆ ที่พบในแบคทีเรียแลคติก 25
8	Plasmid profile ของแบคทีเรียแลคติกที่ดำนทานคอปเปอร์ (A) แคดเมียม (B) และนิกเกิล (C) 28
9	ผลการสกัดพลาสมิดหลังจากการทำ plasmid curing ของเชื้อรหัส A55 และ G35 ที่ดำนทานนิกเกิลได้ P = parent strain 31
10	ผลการสกัดพลาสมิดหลังจากการทำ plasmid curing ของเชื้อรหัส X32 ที่ดำนทานคอปเปอร์และเกิดการสูญหายของพลาสมิดขนาด 2.5 และ 5.5 กิโลเบส 32
11	แสดงตัวอย่างผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 600 คู่เบส ที่ได้จากแบคทีเรียแลคติก 33
12	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิต PCR ของยีน <i>cadA</i> ขนาดประมาณ 600 คู่เบส จากแบคทีเรียแลคติกรหัส C53 และ NU1 34
13	แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน <i>cadA</i> จากแบคทีเรียแลคติก รหัส C53 และ NU1 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อที่มีพลาสมิดชนิดที่ดำนทาน แคดเมียมในฐานข้อมูล GenBank 35
14	(A) Plasmid profile ของแบคทีเรียแลคติกที่ดำนทานแคดเมียม (B) แสดงผลการทำ southern hybridization ของแบคทีเรียแลคติกที่ดำนทานแคดเมียมได้ 37

บทที่ 1

บทนำ

แบคทีเรียแลคติก (Lactic Acid Bacteria) จัดเป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในอาหารหมักหลายชนิด ทั้งที่เป็นอุตสาหกรรมขนาดใหญ่เช่น ผลิตภัณฑ์นมหมัก ได้แก่ โยเกิร์ต นมเปรี้ยว เนย และเนยแข็ง เป็นต้น ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเนื้อหมักเช่น แหนมและไส้กรอก ผลิตภัณฑ์จากผักและผลไม้ดอง เป็นต้น ประเทศไทยจัดเป็นประเทศที่มีผลิตภัณฑ์ที่ได้จากแบคทีเรียแลคติกจำนวนมาก ที่สำคัญคือผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากเนื้อ ผัก และผลไม้ โดยอาศัยแบคทีเรียแลคติกที่มีบทบาทในผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างกันไป ปัจจุบันผลิตภัณฑ์หลายชนิดได้ใช้แบคทีเรียแลคติกเป็นหัวเชื้อเติมลงไปเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ตามต้องการแทนการหมักโดยธรรมชาติ และยังได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้เป็นโปรไบโอติกที่ช่วยป้องกันการเกิดโรคของสัตว์บก และสัตว์น้ำ ทดแทนยาปฏิชีวนะ ทั้งยังช่วยทำให้สัตว์มีสุขภาพแข็งแรง ทำให้มีอัตราการเจริญเร็ว รวมทั้งใช้เป็นโปรไบโอติกในคน (Drisko et al., 2003)

จากความสำคัญของเชื้อในอุตสาหกรรม ได้มีการศึกษาเพื่อปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม งานวิจัยที่ศึกษาทางด้านพันธุกรรมของแบคทีเรียแลคติกที่ศึกษากันอย่างกว้างขวางคือเชื้อ *Lactococcus lactis* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมนมโดยเฉพาะเนยแข็ง บทบาทและหน้าที่ที่สำคัญของจุลินทรีย์เหล่านี้ในอาหารหมักได้แก่การสร้างกรดอินทรีย์จากการหมักน้ำตาล การย่อยสลายโปรตีน การสร้างสารให้กลิ่นรสและสารที่ให้เนื้อสัมผัส การสร้างสารต่างๆที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคอื่นๆเช่น ไดอะเซทิล (diacetyl), แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) การต้านทานต่อไวรัสของแบคทีเรีย การสร้างสารพวกเอกโซโพลิแซคคาไรด์ (exopolysaccharide) เป็นต้น (Konings et al., 2000) ลักษณะต่างๆเหล่านี้มีรายงานว่าถูกควบคุมบนยีนที่อยู่ทั้งบนโครโมโซมและบนพลาสมิด พลาสมิดจะมียีนที่ทำหน้าที่ควบคุมลักษณะที่สำคัญเนื่องจากพลาสมิดมีขนาดเล็กเมื่อเปรียบเทียบกับโครโมโซม การพบยีนที่ควบคุมอยู่บนพลาสมิดจึงมีข้อดีคือทำให้การหาตำแหน่ง การแยก การวิเคราะห์ และศึกษากลไกการควบคุมหรือการแสดงออกของยีนเหล่านั้นได้ง่าย นอกจากนี้ พลาสมิดยังสามารถแยกหรือถ่ายโอนไปให้เซลล์เจ้าบ้านอื่นๆได้โดยยังทำหน้าที่ได้ตามปกติ แบคทีเรียบางสายพันธุ์ไม่มีพลาสมิดแต่บางสายพันธุ์มีพลาสมิดที่มีจำนวนและขนาดที่แตกต่างกัน (plasmid profile) โดยจะมีความจำเพาะกับเซลล์เจ้าบ้าน และสามารถนำไปใช้ในการจัดจำแนกเชื้อได้ในระดับหนึ่ง (Sewaki et al., 2001) ดังนั้นการเก็บข้อมูลจำนวนและขนาดของพลาสมิดแต่ละสายพันธุ์จึงนับว่ามีประโยชน์ในการอ้างอิงชนิดของเชื้อได้ ในประเทศไทยได้มีการศึกษาชนิดและขนาดของพลาสมิดจากแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักบางชนิด อย่างไรก็ตามยังไม่มี การวิเคราะห์ลำดับเบสหรือยีนที่อยู่บนพลาสมิดเหล่านั้นเพื่อนำมาใช้ประโยชน์มากนัก เนื่องจากแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักบางสายพันธุ์มีพลาสมิดอยู่จำนวนมากและเป็นพลาสมิดที่ยังไม่รู้หน้าที่ซึ่งเรียกว่า cryptic plasmid การศึกษาทางด้านพันธุกรรมของพลาสมิดอาจค้นพบยีนใหม่ๆที่มีความสำคัญที่จะสามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้

นอกจากจะเป็นแหล่งของยีนที่ควบคุมลักษณะต่างๆแล้ว พลาสมิดยังถือเป็นเครื่องมือสำคัญที่ใช้ในการศึกษาคุณสมบัติและกลไกการควบคุมการแสดงออกของยีน รวมทั้งการปรับปรุงลักษณะทาง

พันธุกรรมของแบคทีเรียแลคติก โดยสามารถนำพลาสมิดมาพัฒนาเป็นเวกเตอร์ (vector) ทั้งแบบ cloning vector และ expression vector สำหรับแบคทีเรียแลคติกที่จำเพาะของแต่ละสายพันธุ์ เนื่องจากความหลากหลายทางพันธุกรรมของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ จึงยังมีความจำเป็นที่จะต้องพัฒนาเวกเตอร์ทั้งที่เป็น cloning และ expression vector สำหรับเชื้อที่จำเพาะ ปัจจุบันมีการศึกษาการสร้างเวกเตอร์ที่มีความปลอดภัย (food grade vector) (Konings et al., 2000) แต่การใช้งานยังอยู่ในวงจำกัดเนื่องจากมีข้อจำกัดที่พลาสมิดมีความจำเพาะกับเซลล์เจ้าบ้าน และที่สำคัญคือเชื้อที่ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์มักจะมีพลาสมิดอยู่แล้ว (indigenous plasmids) ซึ่งอาจมีจำนวนตั้งแต่ 1 ถึงหลายพลาสมิด พลาสมิดเหล่านี้สามารถอยู่ร่วมกันได้โดยไม่มีการสูญหายในสภาวะการเลี้ยงเชื้อปกติเนื่องจากกลไกการจำลองตัวที่เฉพาะกับเซลล์เจ้าบ้าน การนำพลาสมิดจากภายนอกใส่เข้าไปอาจเกิดการไม่ยอมรับและเกิดการสูญหายของพลาสมิดที่ใส่เข้าไปได้ ดังนั้นการสร้างเวกเตอร์สำหรับเชื้อที่ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์จึงควรนำพลาสมิดที่มีอยู่แล้วในเชื้อนั้นๆ มาเป็นต้นแบบเพื่อใช้ในการสร้างเวกเตอร์ที่ใช้ในการศึกษาหน้าที่ของยีนต่างๆ

ในการสร้างเวกเตอร์ที่มีความปลอดภัย นอกจากจะใช้พลาสมิดที่แยกได้จากแบคทีเรียแลคติกที่จัดว่าเป็นเชื้อที่ปลอดภัยแล้ว (GRAS, Generally Recognized As Safe) การใช้ selection marker ที่ปลอดภัยก็มีความจำเป็นเช่นกัน cloning vector และ expression vector ที่ใช้ในการสร้างสิ่งมีชีวิตดัดแปรพันธุกรรมในปัจจุบันอาศัยยีนที่ต้านทานยาปฏิชีวนะเช่น ยีนต้านทานเตตราไซคลิน แอมพิซิลิน และคลอแรมฟินิคอล เป็นต้น ซึ่งยีนเหล่านี้ไม่เป็นที่ยอมรับในการนำมาใช้กับอาหารเนื่องจากเสี่ยงต่อการถ่ายโอนยีนเหล่านี้ให้กับเชื้อประจำถิ่นในร่างกาย (normal flora) ซึ่งจะทำให้เกิดการดื้อยาของเชื้อเหล่านี้ได้ การใช้ selection marker อื่นๆ ที่แยกได้จากแบคทีเรียแลคติกจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะนำมาทดแทนยีนที่ต้านทานยาปฏิชีวนะได้ (Emond et al., 2001; Labrie et al., 2005)

จากที่กล่าวมาแล้วว่าพลาสมิดจากเชื้อ *Lactococcus lactis* ได้รับการศึกษากันอย่างกว้างขวางต่างจาก *Lactobacillus* sp. ที่ยังมีการศึกษากันไม่มาก ดังนั้นในการนำพลาสมิดจากเชื้อกลุ่มนี้ซึ่งมีบทบาทสำคัญในอาหารหมักของไทยมาใช้ประโยชน์ในการเป็นเครื่องมือในการปรับปรุงลักษณะทางพันธุกรรม จึงจำเป็นที่จะต้องศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และหน้าที่ของยีนบนพลาสมิดเหล่านี้ งานวิจัยนี้จึงจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทำการแยกและศึกษาพลาสมิดขนาดเล็กจาก *Lactobacillus plantarum* ที่แยกได้จากแหนม และศึกษาการแยกยีนต้านทานโลหะหนักจากกลุ่มแบคทีเรียแลคติก เพื่อนำมาพัฒนาเป็นเวกเตอร์ที่ปลอดภัยที่สามารถใช้กับเชื้อในอุตสาหกรรมอาหารได้ต่อไป

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษา plasmid profile ของเชื้อ *Lactobacillus* sp. ที่มีบทบาทสำคัญในอาหารหมักของไทยเช่นแหนมและผักดอง เพื่อเป็นการเก็บข้อมูลทางพันธุกรรมของเชื้อ
2. ศึกษาการแยกพลาสมิดและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดที่มีความคงตัวสูงและทำการวิเคราะห์โครงสร้างหรือยีนที่เป็นองค์ประกอบของพลาสมิด เพื่อสร้างแผนที่ของ พลาสมิด รวมทั้งการศึกษากลไกการจำลองตัว เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาพลาสมิดอื่นๆต่อไป
3. เพื่อที่จะนำพลาสมิดนี้มาใช้เป็นต้นแบบในการสร้างเวกเตอร์ (vector) ทั้งที่เป็น non-food grade และ food grade vector ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการศึกษาการควบคุมการแสดงออกของยีนในเชื้อที่ใช้เป็นผู้ผลิตได้
4. เพื่อทำการคัดเลือกพลาสมิดที่ต้านทานต่อโลหะหนักจาก *Lactobacillus* sp. และแยกยีนที่ต้านทานต่อโลหะหนักเพื่อนำมาใช้เป็น food grade selection marker ในการพัฒนาสร้าง food grade marker สำหรับ *Lactobacillus* sp. ต่อไป

บทที่ 2

การทบทวนเอกสาร

แบคทีเรียแลคติกจัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์อะตะเลส มีรูปร่างแบบกลม และแบบแท่ง มีบทบาทสำคัญในอาหารหมักหลายชนิด ประเทศไทยจัดเป็นประเทศที่มีผลิตภัณฑ์ที่ได้จากแบคทีเรียแลคติกจำนวนมาก ที่สำคัญคือผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากเนื้อ ผัก และผลไม้ แบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในอาหารหมักเหล่านี้เช่น *Lactobacillus plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. fermentum*, *Lb. petosus*, *Lb. sake*, *Lb. acidipiscis*, *Pediococcus* sp., *P. acidilactici*, *P. pentosaceus*, *Enterococcus* sp. *E. faecalis*, และ *Leuconostoc* sp. เป็นต้น ส่วนหัวเชื้อที่ใช้ในอุตสาหกรรมนมหมักเช่น *Lactococcus lactis*, *L. cremoris*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. acidophilus*, และ *Streptococcus thermophilus* แบคทีเรียแลคติกที่มีบทบาทเด่นในอาหารหมักของไทยได้แก่ *Lactobacillus* sp. โดยเฉพาะ *Lb. plantarum* โดยจะพบในอาหารหมักหลายชนิดเช่น แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว ปลาร้า ปลาเจ่า ปลาซ้ม และในกลุ่มผักดองเช่น กระหล่ำปลีดอง ผักกาดดอง หน่อไม้ดอง เป็นต้น โดยจะทำงานร่วมกับแบคทีเรียแลคติกกลุ่มอื่นๆ ขึ้นกับชนิดของผลิตภัณฑ์ (วิวัฒน์, 2534) นอกจากนี้ยังถูกนำมาใช้เป็นเชื้อเป็นเชื้อโปรไบโอติก ทั้งในคนและสัตว์ (Dunne et al., 2001)

นอกจากแบคทีเรียแลคติกจะมีสารพันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะที่สำคัญต่างๆ อยู่บนโครโมโซมแล้วยังมี ดีเอ็นเอ ที่อยู่นอกโครโมโซมที่เรียกว่าพลาสมิด โดยในแต่ละสายพันธุ์จะมีพลาสมิดได้ตั้งแต่ 1 – 16 พลาสมิดและมีขนาดได้ตั้งแต่ 1 – 120 กิโลเบส (Xanthopoulos et al., 2000; วิเชียร, 2537) ขึ้นกับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย พลาสมิดที่พบส่วนใหญ่เป็นพลาสมิดที่ไม่ทราบคุณสมบัติที่เรียกว่า cryptic plasmid ส่วนพลาสมิดที่ทราบคุณสมบัติจะทำหน้าที่ควบคุมลักษณะสำคัญที่มีบทบาทในการหมัก เช่น การผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน (Kok, 1990) การใช้ซิเตรต (Vaughan et al., 1995) การใช้น้ำตาลซูโครส และแลคโตส (Axelson, 1993) การผลิตแบคทีเรียโอซิน (Balla et al., 2000) การต้านทานต่อไวรัสของแบคทีเรีย (O'Sullivan et al., 2001) การต้านทานต่อไนซิน (Froseth and McKay, 1991) การต้านทานโลหะบางชนิดเช่น แคดเมียม (Liu et al., 1997) คอปเปอร์ (Leelawatcharamas et al., 1997) เป็นต้น โดยเชื้อที่มีการศึกษากันมากคือเชื้อในกลุ่ม *Lactococcus lactis*

การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีนที่ควบคุมลักษณะเหล่านี้ มีข้อจำกัดคือ ความหลากหลายของพลาสมิดซึ่งมีความแตกต่างกันแม้จะเป็นเชื้อที่อยู่ในสปีชีส์เดียวกัน (Tannock et al., 1990) และความจำเพาะของพลาสมิดต่อเซลล์เจ้าบ้าน หรือแม้แต่วิธีการถ่ายโอนพลาสมิดก็ยังทำได้ยาก ซึ่งในปัจจุบันใช้วิธี electroporation และ electro- transformation โดยทั่วไปจะยังได้ค่าความถี่ในการถ่ายโอน (transformation frequency) ต่ำ ซึ่งจะต้องมีการพัฒนาวิธีการสำหรับเชื้อแต่ละสายพันธุ์โดยเฉพาะ (Serror et al., 2002) จากการศึกษาของ Yamamoto and Takano (1996) ได้สร้าง cloning vector pCP53D จาก cryptic plasmid pCP53 ที่แยกจากเชื้อ *Lactobacillus helveticus* CP53 แล้วถ่ายโอนให้เชื้อ *Lb. helveticus* จำนวน 15 สายพันธุ์ พบว่ามีเพียง 2 สายพันธุ์ที่สามารถรับพลาสมิดนี้ได้ ดังนั้นในการศึกษาจำเป็นต้องสร้างเวกเตอร์ที่เหมาะสมกับสายพันธุ์ที่ใช้ ซึ่งสามารถทำได้โดยใช้พลาสมิดที่เชื่อนั้นๆ มีอยู่แล้ว (indigenous plasmid) ตัวอย่างการนำพลาสมิดจากแบคทีเรียแลคติกมาศึกษาลำดับเบส

เพื่อพัฒนาเป็น cloning vector เช่นพลาสมิด pKJ50 จาก *Bifidobacterium longum* KJ ซึ่งเป็นเชื้อที่ใช้เป็นโปรไบโอติกในอุตสาหกรรมนมหมัก (Park et al., 1999) Biet et al., (1999) ได้ทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cryptic plasmid pFR18 ขนาด 1.8 กิโลเบส แยกจาก *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 และจากการวิเคราะห์พบว่าพลาสมิดนี้มีกลไกการจำลองตัวแบบ rolling circle และเมื่อทดลองนำมาพัฒนาเป็นเวกเตอร์ที่ใช้ในการโคลนยีนในเชื้อ *Leu. mesenteroides* subsp. *dextranicum* DSM20484 พบว่าเวกเตอร์ที่ใช้ไม่เสถียรและเกิดการสูญหายของพลาสมิดหลังจากเลี้ยงไป 100 generations ต่อมาในปี คศ 2002 Biet, et al. ได้ทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cryptic plasmid pTXL1 ขนาด 2.6 กิโลเบส แยกจาก *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* Y110 พบว่าพลาสมิดนี้มีกลไกการจำลองตัวแบบ theta ซึ่งเป็นกลไกที่ทำให้พลาสมิดมีความเสถียรเมื่อเปรียบเทียบกับกลไกการจำลองตัวแบบ rolling circle และได้ทดลองนำมาพัฒนาเป็นเวกเตอร์ที่ปลอดภัยในการโคลนยีนที่สร้างแบคทีเรียโอซินในเชื้อ *Leu. mesenteroides* subsp. *dextranicum* DSM20484 และ *L. cremoris* สายพันธุ์อื่น Emond, et al., (2001) ได้ทำการหาลำดับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pCD4 ขนาด 6.09 กิโลเบส ที่มีการจำลองตัวแบบ theta จาก *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MJC15 และทดลองนำมาพัฒนาเป็นเวกเตอร์ชนิด food grade ในการโคลนยีนที่ต้านทานต่อไวรัสของแบคทีเรียและให้มีการแสดงออกในเชื้อ *L. lactis* MG1363 การศึกษาในเชื้อ *Lactobacillus* เช่นการทดลองของ Alpert et al., (2003) ได้ศึกษาลำดับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pRV500 ขนาด 13 กิโลเบส ที่มีการจำลองตัวแบบ theta จาก *Lactobacillus sakei* RV322 จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบยีนที่ควบคุมระบบ Restriction and Modification system อยู่บนพลาสมิดนี้ อย่างไรก็ตามเมื่อนำมาพัฒนาเป็นเวกเตอร์แล้วจำนวนชุดของพลาสมิดจะมีน้อยลง (low copy number)

ในการพัฒนาการสร้างเวกเตอร์ที่ปลอดภัย นอกจากจะใช้พลาสมิดจากเซลล์เจ้าบ้านมาเป็นต้นแบบแล้ว ยีนที่ใช้เป็น selection marker ที่ใช้ควรมีความปลอดภัย (food grade selection marker) และสามารถแสดงออกได้ในเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งสามารถทำได้โดยการคัดแยกจากแบคทีเรียที่ใช้เป็นผู้ผลิตหรือในกลุ่มแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ใกล้เคียงกัน ยีนที่มีการศึกษาเช่นการใช้ยีนในกลุ่มการต้านทานโลหะหนัก โดยใช้ยีนที่ต้านทานต่อแคดเมียมที่แยกจากเชื้อ *Lactococcus lactis* ในพลาสมิด pND302 (Liu et al., 1997) และพลาสมิด pNP40 (Trotter et al., 2001) และเมื่อนำมาทดลองนำไปใช้สร้าง shuttle vector กับพลาสมิดที่แยกจาก *Streptococcus thermophilus* พบว่ายีนต้านทานแคดเมียมสามารถแสดงออกได้ใน *S. thermophilus* เช่นกัน (Wong et al., 2003)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการใช้ยีนในเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียแลคติกเองเป็น selection marker เช่น การสร้างพลาสมิด pNZ1125 โดยใช้ยีน *lacF* ที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ที่ใช้น้ำตาลแลคโตสสำหรับเชื้อ *Lactococcus lactis* แต่มีข้อจำกัดที่ต้องใช้กับเชื้อกลายพันธุ์ชนิดที่ไม่มียีน *lacF* อยู่บนโครโมโซม (de Vos and Simon, 1994) นอกจากนี้ยังมีเวกเตอร์ pSW211 ที่ใช้ยีนที่ควบคุมการต้านทานต่อไนซินเป็น selection marker ยีนนี้แยกได้จากเชื้อ *L. lactis* เช่นกัน (von Wright and Raty, 1993) การใช้ยีนที่ควบคุมการหมัก melibiose มาใช้เป็น selection marker ใน *L. lactis* (Boucher et al., 2002)

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 การแยกและคัดเลือกเชื้อในกลุ่ม *Lactobacillus* sp. จากตัวอย่างอาหาร

นำตัวอย่างอาหารเช่นแหนมผักตองและนม มาเจือจางด้วย 0.85% NaCl แล้วนำมาแยกเชื้อโดยใช้อาหารแข็ง MRS (de Man, Rogosa and Sharpe) ที่เติม CaCO_3 0.5% บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง เลือกเฉพาะโคโลนีที่เกิดบริเวณใสรอบโคโลนีมาทำให้บริสุทธิ์ แล้วนำมาทดสอบเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกด้วยการทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการย้อมแกรมและทดสอบการสร้างเอนไซม์อะเลส คัดเลือกเชื้อ *Lactobacillus* sp. โดยเลือกเชื้อที่มีรูปร่างแท่ง ไม่สร้างสปอร์ ติดสีแกรมบวกและไม่สร้างเอนไซม์อะเลส

3.2 การศึกษา plasmid profile ของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้

ทำการสกัดพลาสมิดจากเชื้อ *Lactobacillus* sp. ที่แยกได้และจากเชื้อ *Lactococcus lactis* FG2 ซึ่งมีพลาสมิดที่ทราบขนาดเพื่อใช้เป็นพลาสมิดมาตรฐาน โดยวิธีของ Anderson and McKay, (1983) ทำการตรวจสอบพลาสมิดโดยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ agarose 0.8% ตามวิธีของ Sambrook and Russell, (2001) คัดเลือกเชื้อที่มีพลาสมิดขนาดเล็กประมาณ 3.0 กิโลเบส มาทำการจัดจำแนกและทดสอบความเสถียรของพลาสมิด

3.3 การจัดจำแนกแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกโดยใช้ API 50CHL kit และ 16S rDNA sequencing

การจัดจำแนกเชื้อโดยใช้คุณสมบัติการหมักน้ำตาลด้วย API 50 CHL kit (bioMerieux, France) และจัดจำแนกเชื้อระดับสปีชีส์โดยใช้ซอฟต์แวร์ APILAB Plus version 3.3.3 ของ bioMerieux ส่วนการจัดจำแนกเชื้อโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ทำการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอของ 16S rDNA ขนาดประมาณ 1.5 กิโลเบส โดยใช้ไพรเมอร์ 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') และ 1525r (5'-AAGGAGGTG(A/T)TCCA(A/G)CC-3') (Lane, 1991) จาก Bioservice Unit (BSU) ทำให้ผลผลิต PCR บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสำเร็จรูป QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, Hilden, Germany) และตรวจสอบดีเอ็นเอโดยวิธี agarose gel electrophoresis ใช้ผลผลิต PCR ที่ได้เป็นแม่แบบในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรเมอร์ 27f, 530f, 981f, 1325f, 1525r, 1100r, และ 530r วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยเครื่อง ABI310 Automate Sequencer (PE-Applied Biosystem) และทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรมและฐานข้อมูลบน internet ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) นำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI เพื่อจัดจำแนกชนิดของเชื้อ

3.4 ทดสอบความเสถียร (stability) ของพลาสมิดโดยการเลี้ยงในสภาวะที่ไม่เหมาะสม

โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MRS ที่เติม novobiocin ที่ความเข้มข้น 700 µg/ml ป่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง คัดเลือกหลอดที่มีการเจริญน้อยที่สุดมาทดสอบการสูญเสียพลาสมิดโดยวิธี agarose gel electrophoresis เปรียบเทียบกับเชื้อที่ไม่ผ่านการป่มด้วยสาร novobiocin

3.5 การแยกพลาสมิดขนาดที่ต้องการออกจากพลาสมิดอื่น ๆ

ทำการสกัดพลาสมิดโดยวิธีของ Anderson and McKay, (1983) แล้วนำมาแยกโดยวิธี agarose gel electrophoresis ทำการแยกพลาสมิดโดยตัดแถบวงที่มีพลาสมิดขนาดที่ต้องการ แล้วนำมาสกัดพลาสมิดออกจากวงโดยใช้ Gel Extraction Kit (QIAGEN) ตรวจสอบอีกครั้งโดยวิธี agarose gel electrophoresis

3.6 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดที่แยกได้

นำพลาสมิดที่แยกออกจาก agarose gel มาตัดด้วยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction endonuclease) ทั้งแบบเอนไซม์ชนิดเดี่ยวและสองชนิด เอนไซม์ที่ใช้ได้แก่ *HindIII* *BamHI* *XbaI* *HaeIII* *NsiI* *ClaI* *BstXI* *SacI* เป็นต้น แล้วทำการเชื่อมชิ้น DNA ที่ตัดได้ลงใน sequencing vector pGEM7Zf(+) โดยใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase ทำการ transformation ด้วยวิธี heat shock โดยใช้ competent cell ของเชื้อ *Escherichia coli* DH5α เป็นเซลล์เจ้าบ้าน ทำการคัดเลือกโคลนที่มีพลาสมิดลูกผสม (transformants) โดยวิธี blue/white colony selection โดยเทคนิคการโคลนนิ่งใช้ตามวิธีการของ Sambrook and Russell, (2001) แล้วใช้พลาสมิดลูกผสมที่ได้เป็นแม่แบบ (template) ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยทำการสกัดและทำให้ DNA บริสุทธิ์ด้วย DNA purification kit (QIAGEN) ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ Dye Deoxy terminator Taq sequencing kit บนเครื่อง PCR (model 2400 thermal cycler) และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยเครื่อง ABI310 Automate Sequencer (PE-Applied Biosystem) โดยใช้ Universal primer T7 และ Sp6 และใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับเบสบนพลาสมิดที่ทราบแล้ว (walking primer) และทำการวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้โปรแกรม online เช่น chromas Lite 2.01, CAP3 Sequence Assembly Program, WWW READSEQ Sequence Conversion, ClustalW2 (EMBL-MBI), ORF finder (NCBI) และ NebCutter V.2 (New England Bio Labs) เป็นต้น การทำ homology search ใช้ฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

3.7 การทดสอบการต้านทานโลหะหนัก

เชื้อมาจากที่เรียลแลคติกอายุ 18-24 ชั่วโมง ลงบนอาหารแข็ง MRS ที่มีส่วนผสมของโลหะหนักความเข้มข้นแตกต่างกัน โดยความเข้มข้นที่ใช้คือ คอปเปอร์ 10 - 40 mM นิกเกิล 200 - 700 mM และแคดเมียม 1-6 mM นำไปป่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยดูการเจริญของแบคทีเรียแลคติกบนอาหาร

3.8 การแยกยีนต้านทานแคดเมียมจากพลาสมิดโดยวิธี Polymerase Chain Reaction

ทำการสกัดพลาสมิดจาก แล้วนำมาใช้เป็นแม่แบบในการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอของยีนที่ควบคุมการต้านทานแคดเมียมโดยใช้ไพรเมอร์ cadA-R และ cadA-L ที่ออกแบบจากพลาสมิด pND302 (Liu et al., 1997) โดยใช้พลาสมิด pND302 เป็น positive control โดยในปฏิกิริยา PCR (25 µl) ประกอบด้วยพลาสมิดหรือโครโมโซมดีเอ็นเอ 100 ng ไพรเมอร์ชนิดละ 15 pmol, dNTP 0.2 mM, 1X PCR buffer, MgCl₂ 2.5 mM และ เอนไซม์ Taq DNA polymerase 1.5 Unit โดยมีสภาวะในการทำ PCR คือ pre denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 3 นาที; เริ่มรอบ PCR ขั้น denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 20 วินาที ; annealing ที่ 55 °C เป็นเวลา 30 วินาที และ elongation ที่ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที โดยทำซ้ำ 25 รอบ จากนั้นเป็นขั้นตอนสุดท้าย final elongation ที่ 72 °C เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบผลผลิต PCR โดยวิธี agarose gel electrophoresis และทำให้บริสุทธิ์ด้วย PCR purification kit ก่อนนำผลผลิต PCR ไปทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย BigDye Terminator Cycle Sequencing kit V3.1 (Applied Biosystem/Perkin-Elmer) เพื่อยืนยันว่าเป็นยีนต้านทานแคดเมียมจริง

3.9 Southern Hybridization

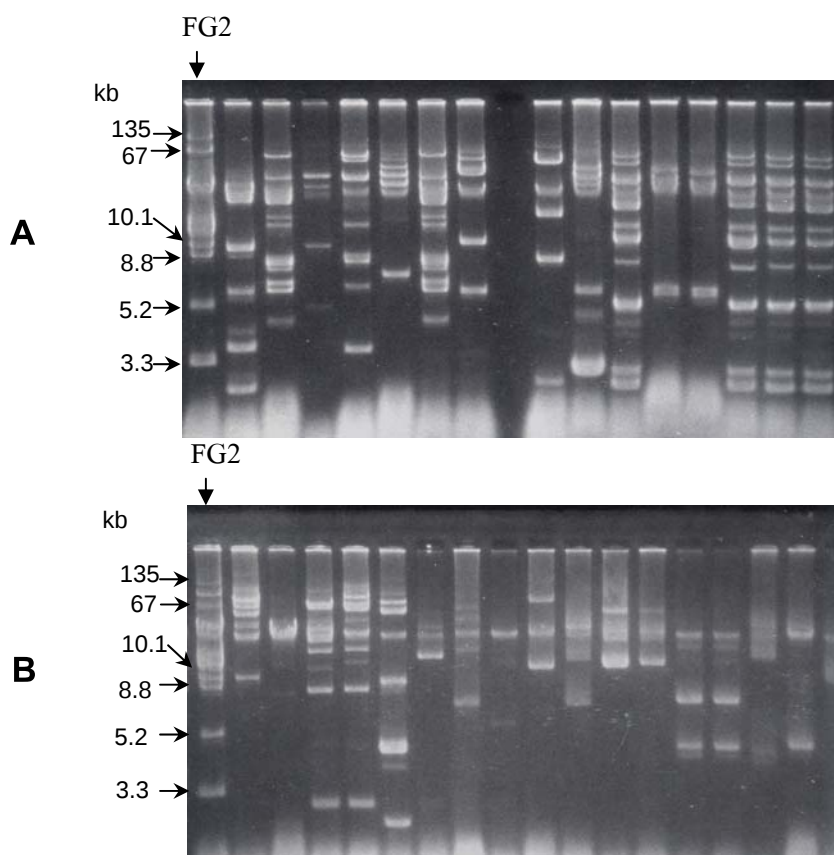
การทำ Southern hybridization ทำตามวิธีการของ Sambrook and Russell, (2001) ร่วมกับวิธีการที่แนะนำโดยชุด hybridization kit ECL Direct Labelling and Detection System (GEHealthcare) โดยทำการสกัด พลาสมิดและโครโมโซมจากแบคทีเรียแลคติก (Lewington et al., 1987) นำดีเอ็นเอมาแยกบน agarose gel electrophoresis ทำการย้ายดีเอ็นเอลงบนแผ่น nylon membrane โดยนำแผ่นเจลที่ได้แช่ในสารละลายกรด HCl ความเข้มข้น 0.25 N เป็นเวลา 15 นาที แล้วย้ายไปล้างในน้ำกลั่น หลังจากนั้นนำไปแช่ในสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 0.5 N เป็นเวลา 30 นาที นำไปล้างด้วยน้ำกลั่นก่อนจะนำไปแช่ในสารละลาย SSC ความเข้มข้น 10X เป็นเวลา 90 นาที ย้ายดีเอ็นเอจากเจลสู่ nylon membrane โดยวิธี vacuum blotter ทำการตรวจสอบว่าดีเอ็นเอถูกชะออกจากแผ่นเจลหมดหรือไม่โดยทำการย้อมแผ่นเจลด้วย ethidium bromide ทำให้แผ่น nylon membrane แห้งที่อุณหภูมิห้องแล้วทำให้ดีเอ็นเอติดอยู่กับ nylon membrane โดยใช้วิธีการ UV crosslinking หลังจากนั้นทำการติดฉลากชิ้นดีเอ็นเอที่ใช้เป็นโพรบซึ่งในที่นี้จะใช้ดีเอ็นเอที่มีส่วนของยีน cadA และ cadC ที่ตัดจากพลาสมิด pND 302

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การแยกแบคทีเรียแลคติกและการศึกษารูปแบบของพลาสมิดของเชื้อ

จากการแยกแบคทีเรียแลคติกจากตัวอย่างอาหาร สามารถแยกเชื้อในกลุ่ม *Lactobacillus* ได้ทั้งหมด 174 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียรูปแท่ง ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์และเอนไซม์อะไมเลส จากการศึกษารูปแบบพลาสมิดพบว่าแบคทีเรียแลคติกส่วนมากจะมีพลาสมิดเป็นองค์ประกอบ โดยเชื้อที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ประเภทเนื้อหมักจะมีพลาสมิดเป็นองค์ประกอบ 4 – 12 พลาสมิด มีขนาดตั้งแต่ 2 – 60 กิโลเบส (รูปที่ 1A) ในทางกลับกันเชื้อที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ประเภทผักดองจะมีจำนวนพลาสมิดน้อยกว่าคือ 1 – 6 พลาสมิด (รูปที่ 1B) ซึ่งเหตุผลน่าจะมาจากผลิตภัณฑ์ประเภทเนื้อหมักจะมีสารอาหารมากกว่าในพวกผัก เช่นเดียวกับการแยกแบคทีเรียแลคติกจากหญ้าหมักพบว่าจะมีจำนวนพลาสมิดน้อยมากและมีขนาดใหญ่ การสูญเสียพลาสมิดอาจเกิดขึ้นได้ในสภาวะไม่เหมาะสม (stress condition) เช่นที่อุณหภูมิสูง ในสภาวะที่สารอาหารน้อย ในการกำจัดพลาสมิดออกจากเซลล์แบคทีเรียสามารถทำได้โดยเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีสารเคมีบางชนิด เช่น โซเดียมไดออกไซด์ ethidium bromide และ novobiocin (Ruiz-Barba et al., 1991) อุณหภูมิสูงถูกนำมาใช้ในการเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียเกิดการสูญเสียพลาสมิด (plasmid curing) ได้อย่างมีประสิทธิภาพเช่นกัน (Trotter et al., 2002)



รูปที่ 1 Plasmid profiles ของเชื้อ *Lactobacillus* sp. ที่แยกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก (A) และผักดอง (B)

FG2: ขนาดพลาสมิดมาตรฐานจากเชื้อ *Lactococcus lactis* FG2

จากรายงานของ Ruiz-Barba et al., (1991) ได้ศึกษารูปแบบพลาสมิดของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* จำนวน 35 สายพันธุ์ที่แยกได้จาก green olive หมัก พบเชื้อทุกสายพันธุ์มีพลาสมิดเป็นองค์ประกอบ 5 -15 พลาสมิด โดยมีขนาด 2 – 68 กิโลเบส โดยเป็นพลาสมิดที่ยังไม่ทราบหน้าที่ (cryptic plasmid) Ricci et al., (2006) ศึกษาการกระจายและความหลากหลายของพลาสมิดที่แยกจากเชื้อ *Lactobacillus helveticus* จำนวน 22 สายพันธุ์ที่แยกจากอิตาเลียนชีสจากแหล่งต่างๆ พบเชื้อ 16 สายพันธุ์มีพลาสมิดจำนวนและขนาดที่แตกต่างกัน 13 รูปแบบ โดยพบเพียง 1 – 5 พลาสมิด ขนาด 2.3 – 31 กิโลเบส ส่วนสายพันธุ์ที่เหลือไม่มีพลาสมิดเป็นองค์ประกอบ จะเห็นว่าการวิเคราะห์ plasmid profile สามารถใช้แยกความแตกต่างของเชื้อได้ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารที่มาจากแหล่งต่างกัน มี plasmid profile เหมือนกัน แสดงถึงความคงตัวของพลาสมิดและการกระจายของเชื้อชนิดเดียวกันในสิ่งแวดล้อม

จากการศึกษาพลาสมิดของเชื้อ *Lactobacillus* ที่แยกได้จากอาหารหมักจะเห็นว่า เชื้อเหล่านี้ในธรรมชาติมีพลาสมิดจำนวนมากเป็นองค์ประกอบ ซึ่งพลาสมิดเหล่านี้จะเป็นแหล่งของยีนที่มีหน้าที่สำคัญในทางเทคโนโลยีชีวภาพ เช่นเดียวกับที่มีรายงานในเชื้อในกลุ่ม Lactococci เช่น ยีนที่ควบคุมการใช้น้ำตาลแลคโตส การผลิตโพลีแซคคาไรด์ (Pidoux et al., 1990) การผลิตเอนไซม์โปรติเอส (O'Keeffe et al., 1999) การสร้างสารแบคทีริโอซิน (Wada et al., 2009) การต้านทานยาปฏิชีวนะ และการต้านทานต่อแบคทีริโอฟาจ (Forde et al., 1999) เป็นต้น ในเชื้อ Lactobacilli ซึ่งปกติจะพบพลาสมิดเป็นจำนวนมาก แต่ยังมีการศึกษาคุณสมบัติของพลาสมิดน้อยกว่าในเชื้อ Lactococci ซึ่งเป็นเชื้อที่นิยมใช้เป็นหัวเชื้อในอุตสาหกรรมการผลิตชีส และพลาสมิดจาก Lactobacilli ส่วนใหญ่ยังเป็นพลาสมิดที่ไม่ทราบคุณสมบัติซึ่งเรียกว่า cryptic plasmid ดังนั้นการศึกษาคูสมบัติของพลาสมิดเหล่านี้จึงน่าจะสามารถนำยีนที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึมของเชื้อในกลุ่ม Lactobacilli มาใช้ประโยชน์ในการพัฒนาหรือปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อ นอกจากนี้พลาสมิดขนาดเล็กยังสามารถนำมาดัดแปลงและใช้เป็นเวกเตอร์ที่มีความปลอดภัยที่สามารถนำมาใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อ *Lactobacillus* sp. เนื่องจากเป็นเวกเตอร์ที่ได้มาจากเชื้อที่พบอยู่ในอาหาร (food grade vector)

ในการสร้างเวกเตอร์เพื่อใช้กับเชื้อ *Lactobacillus* ได้ทำการคัดเลือกเชื้อที่มีพลาสมิดขนาดเล็ก 2 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อรหัส KM1 แยกได้จากแหนมและ SV12 แยกได้จากหญ้าหมัก ซึ่งมีพลาสมิดขนาดเล็กประมาณ 3 กิโลเบส เป็นองค์ประกอบ พลาสมิดขนาดเล็กเหมาะที่จะนำมาใช้ในการสร้างเวกเตอร์เนื่องจากสามารถสอดแทรกยีนอื่นๆเข้าไปได้ และเนื่องจากมีขนาดเล็กจึงเกิดการแตกหักได้ง่าย

4.2 การจัดจำแนกเชื้อรหัส KM1 และ SV12

จากผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อรหัส KM1 และ SV12 โดยใช้ชุดทดสอบ API50 CHL ในการหมักคาร์โบไฮเดรต 49 ชนิด พบว่าทั้งสองสายพันธุ์ถูกจัดจำแนกเป็น *Lactobacillus plantarum* โดยมีร้อยละของความเหมือน เท่ากับ 99 และ 45.7 ตามลำดับ เนื่องจากเชื้อรหัส SV12 มีร้อยละของความเหมือนต่ำมาก จึงคัดเลือกเชื้อรหัส KM1 มาใช้ในการศึกษาต่อไป ในการจัดจำแนกเชื้อได้ทำการยืนยันผลการจัดจำแนกด้วยเทคนิค 16S rDNA sequence analysis โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ขนาดประมาณ 1.476 กิโลเบส (รูปที่ 2) จากการเปรียบเทียบกับ 16S rRNA ในข้อมูลของ

NCBI พบว่าเชื้อรหัส KM1 เหมือนเชื้อ *L. plantarum* 100% (Acc. No. FJ455520) ซึ่งเป็นการยืนยันผลจากการจัดจำแนกด้วยชุด API 50 CHL

```

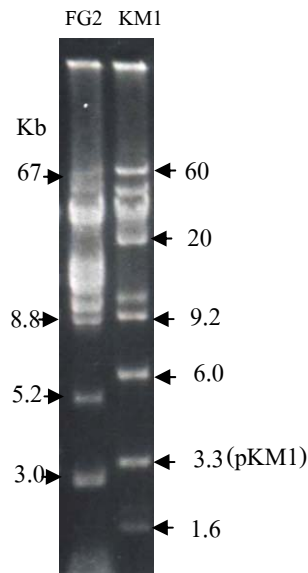
1  TCGCGTGCT ATCTGCAGTC GACGAACTCT GGTATTGATT GGTGCTTGCA
51  TCATGATTTA CATTTGAGTG AGTGGCGAAC TGGTGAGTAA CACGTGGGAA
101 ACCTGCCAG AAGCGGGGGA TAACACCTGG AAACAGATGC TAATACCGCA
151 TAACAACCTG GACCGCATGG TCCGAGTTTG AAAGATGGCT TCGGCTATCA
201 CTTTTGGATG GTCCCGCGGC GTATTAGCTA GATGGTGGGG TAACGGCTCA
251 CCATGGCAAT GATACGTAGC CGACCTGAGA GGGTAATCGG CCACATTGGG
301 ACTGAGACAC GGCCCAAACT CCTACGGGAG GCAGCAGTAG GGAATCTTCC
351 ACAATGGACG AAAGTCTGAT GGAGCAACGC CGCGTGAGTG AAGAAGGGTT
401 TCGGCTCGTA AAATCTGTGT GTTAAAGAAG AACATATCTG AGAGTAACTG
451 TTCAGGTATT GACGGTATTT AACCAGAAAG CCACGGCTAA CTACGTGCCA
501 GCAGCCGCGG TAATACGTAG GTGGCAAGCG TTGTCCGGAT TTATTGGGCG
551 TAAAGCGAGC GCAGGCGGTT TTTTAAGTCT GATGTGAAAG CCTTCGGCTC
601 AACCGAAGAA GTGCATCGGA AACTGGGAAA CTTGAGTGCA GAAGAGGACA
651 GTGGAACCTC ATGTGTAGCG GTGAAATGCG TAGATATATG GAAGAACCAC
701 AGTGGCGAAG GCGGCTGTCT GGTCTGTAAC TGACGCTGAG GCTCGAAAGT
751 ATGGGTAGCA AACAGGATTA GATACCTGG TAGTCCATAC CGTAAACGAT
801 GAATGCTAAG TGTGGAGGG TTTCCGCCCT TCAGTGCTGC AGCTAACGCA
851 TTAAGCATTC CGCTGGGGA GTACGGCCGC AAGGCTGAAA CTCAAAGGAA
901 TTGACGGGGG CCCGCACAAG CCGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCTA
951 CGCGAAGAAC CTTACCAAGT CTTGACATAC TATGCAAAATC TAAGAGATTA
1001 GACGTTCCCT TCGGGGACAT GGATACAGGT GGTGCATGGT TGTCGTACGC
1051 TCGTGTCTGT AGATGTTGGG TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AACCCCTTAT
1101 ATCAGTTGCC AGCATTAAGT TGGGCACTCT GGTGAGACTG CCGGTGACAA
1151 ACCGGAGGAA GGTGGGGATG ACGTCAAATC ATCATGCCCC TTATGACCTG
1201 GGCTACACAC GTGCTACAAT GGATGGTACA ACGAGTTGCG AACTCGCGAG
1251 AGTAAGCTAA TCTCTTAAAG CCATTCTCAG TTCGGATTGT AGGCTGCAAC
1301 TCGCCTACAT GAAGTCGGAA TCGCTAGTAA TCGCGGATCA GCATGCCGCG
1351 GTGAATACGT TCCCGGGCCT TGTACACACC GCCCGTCACA CCATGAGAGT
1401 TTGTAACACC CAAAGTCGGT GGGGTAACCT TTAGGAACC AGCCGCCTAA
1451 GGTGGGACAG ATGATTAGGG TGAAGT

```

รูปที่ 2 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ 1,476 กิโลเบสของยีน 16S rRNA จากเชื้อรหัส KM1 และมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับเชื้อ *Lactobacillus plantarum*

4.3 การศึกษาความคงตัวของพลาสมิดของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* KM1

ในการพัฒนาเวกเตอร์ที่มาจากเชื้อ *L. plantarum* KM1 เวกเตอร์ที่ใช้ควรมีความคงตัว โดยไม่เกิดการสูญหายไปในขณะที่เลี้ยงเชื้อ ดังนั้นจึงได้ทดสอบความคงตัวโดยการเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีสาร novobiocin ซึ่งเป็นสารที่ใช้เหนี่ยวนำให้เกิดการสูญหายของพลาสมิด (Ruiz-Barba et al., 1991) *L. plantarum* KM1 มีพลาสมิดเป็นองค์ประกอบ 8 ขนาดประมาณ 1.6, 3.3, 6.0, 9.2, 10.5, 20, 40 และ 60 กิโลเบส (รูปที่ 3) หลังจากทำ plasmid curing พบว่าเชื้อรอดชีวิตน้อยลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสาร novobiocin จนถึง 500 µg/ml และจากการนำเชื้อที่รอดชีวิตมาทดลองสกัดพลาสมิดเปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์เดิม ไม่พบการสูญเสียพลาสมิดทุกขนาด แสดงว่าพลาสมิดมีความคงตัวแม้จะอยู่ในสภาวะกดดัน ในการทดลองนี้จึงเลือกพลาสมิดขนาดประมาณ 3.3 กิโลเบส และให้ชื่อว่า พลาสมิด pKM1 มาศึกษาลำดับเบส และเพื่อนำมาใช้ในการสร้างเป็นเวกเตอร์สำหรับเชื้อ *L. plantarum* ต่อไป



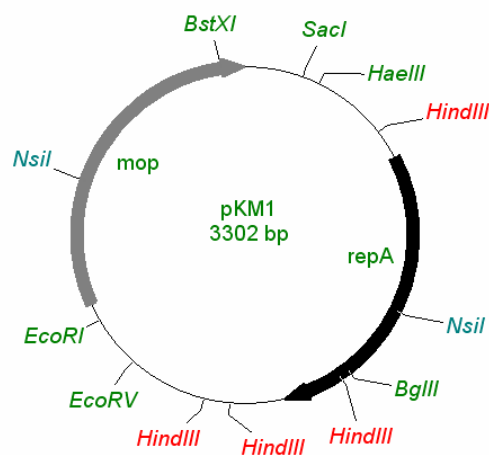
รูปที่ 3 Plasmid profile ของ *Lactobacillus plantarum* KM1

FG2 = *L. lactis* FG2 standard plasmid size

KM1= พลาสมิดจากเชื้อ *L. plantarum* KM1

4.4 ลักษณะยีนที่อยู่บนพลาสมิด pKM1

จากการแยกพลาสมิด pKM1 จากเชื้อ *L. plantarum* KM1 และวิเคราะห์ขนาดของพลาสมิดโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะหลายชนิด พบว่า pKM1 มีขนาดประมาณ 3.3 กิโลเบส โดยมีแผนที่ของพลาสมิดดังแสดงในรูปที่ 4 จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 3.3 กิโลเบส (รูปที่ 5) ยืนยันผลตำแหน่งที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเช่นเดียวกับที่แสดงในรูปที่ 4 จากรูปจะเห็นว่า pKM1 เป็นพลาสมิดที่มีขนาดเล็ก แต่มีตำแหน่งที่ถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวหลายชนิดของเอนไซม์ที่สามารถนำมาใช้ในการตัดต่อยีนได้ เช่น *BstXI* *EcoRV* *SacI* *EcoRI* และ *HaeIII* โดยที่พลาสมิดจะยังคงจำลองตัวเองได้ อย่างไรก็ตามในพลาสมิดไม่พบยีนที่จะใช้เป็นยีนคัดเลือก (selection marker gene) จึงต้องมีการนำไปพัฒนาต่อก่อนที่จะนำไปใช้เป็นเวกเตอร์ชนิด food grade ได้



ရုပ်

SSO

1 cccccgtca gtcacggtaa atcgaattaa agggacttac tgcttttagca
 51 gttagtcct ttttgaggct ttaaggagtt gattgactaa ccaaaccag
 101 aactgaatt ggctgaaagc caaagtttcc taaactttgc tttcctgcct
 151 cacggcgagt gcggggtgag tttgagcggg agctcccgcct catttatgcg
 201 gtcaagctgg tacagcttgg actgggttcg gggcgtcagc gcccgagggc
dso ↓ **putative nic site**
 251 ttagaaactg gtcgattttg accagtttct tcttatcttg atactattag
 301 aaacaacgga cttttccaaa tgtatagcaa aacgttgaca tgattggctt
 351 taggcgtatt atgggtggtat aaaatgaata taaaaaaaac ccacgtgagc
 401 ttcgaaagt tgcgcacctc gaacgcgtga gttaatcttg taaaaatcgt
 451 atttgattt actagacata gtttaaagct tgaacccttt gccgtcaagc
 501 ctcttgactg atttaagtaa agcaagtaca taacagatta actcttctca
ORF1 (repA gene)
 551 cgtggttggc gaggggagtt tttatttttg ctaatgaaaa agttttggtt 577 (start repA)
 601 gatcgggtcaa agtcagggaa agttcgtccg tggcgggagc gtaagttaga
 651 gaatttgag tatggtgact atttgcaaat attgaattat aagaaagctc
 701 atcgggttaa agaattgtgg gaagttttgc gctttgtgga agatgaacaa
 751 ggtcataaga aactagcgca gacttggttt tgtcattccc gtttatgccc
 801 gttatgcaat tggcggcgtg caatgaagca gtctaatacag ttaactcaaa
 851 ttttagaaga agcgggttaa caacgaaaaa ctggtcggtt cttatttcta
 901 acgctgaccg ttgagaatac aactggtaag caattaaaga gtgagctacg
 951 acaaatgggg cgagctgttc gtgatttaat gcgttataaa aagccagcta
 1001 agaatttgtt aggctatgtg cgttcgactg aagtaaccgt taatcatgaa
 1051 tcggatcagc cgatgtatca ccatcatatg catgttttat tatttgtgaa
 1101 gagtctttat tttaaaggat ctgataacta tatttcacag tcagaatgga
 1151 ctggttattg gcaacgggca atgaaattga cttatgttcc gattgtgaat
 1201 gttgaagcgg ttaaaccgaa tctgaaacgc cagagaaatt ctttactggc
 1251 tagtgcccaa gaaacggcta aatatcaggt gaaatctaaa gatattttga
 1301 ctaataatca agaacaagat ctacaagtaa ttgatgattt ggagcaagct
 1351 ttggctggtt cccggcaaat tagctatggg ggcttactga aagaaattcg
 1401 caagcagttg caactagaag atgttgaaaa tgggtgactg attaatacgg
 1451 atagtgatga tctaaagact gatcaagtgg tacgtgaaat tgttgctaag
 1501 tgggactatc agcgtaaaaa ttactttatt **tgaa**tgagtg ctatattata 1531 (stop repA)
 1551 tataaagaca ggaaaccatt tgtctagcga ggggattttt ttatgattta
 1601 tgctgataag ataagctttt aatacggata gtgatgatct aaagactgat
 1651 ccaagtggta cgtgaaattg ttgctaagtg ggactatcta gcgtaaaaat
 1701 tactttatctt gaatgagtgc tatattatat ataaagacag gaaaccattt
 1751 gtctagcgag gggatttttt tatgatttat gctgataaga taagctttta
 1801 tcgtggggac gaaaagcgtt tggaaactat tgttcggatt catttatttt
 1851 cgactagtgg tgaagggtatt tctggctggt attataaaga ggatattaat
 1901 gagtggcttc atgagaacag ctataagatt gtggttttata ttgatccata
 1951 tcctgaattg attccctggt gatggtgatc atgttaagta tgtcccgttc
 2001 tagtaaggac gatactgaag aagataactt gcttaagcta gatattctatt
 2051 atgaaaaaca ataaggaata caaaaaataa tttttgataa tcattgggag
 2101 ctaaacgcgt ctttgattat ttttttgcca acggcaaaaa ttgcctcgca

รูปที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 3,311 คู่เบส ของพลาสมิด pKM 1 ตำแหน่ง single strand origin (sso) และ double strand origin (dso) และ origin of transfer (*oriT*) เป็นบริเวณที่ขีดเส้นใต้ -10 promoter ของยีน *mob* เป็นบริเวณที่ขีดเส้นใต้ 2 เส้น ตำแหน่ง nick site (putative) ระบุด้วยลูกศร ตำแหน่ง start และ stop codon ของยีน *repA* และ *mop* ระบุไว้โดยการขีดเส้นใต้และระบุตำแหน่งไว้

-10 promoter ด้านหลัง *oriT*

2151 gagcccaaac tttaacaagg aaagtatatt gggctatacc ttgcatggag 2169-2192(*oriT*)
 2201 gtttgccgaa ttctgtgcta tgctctaacc aaatttagct gtttggaat

ORF2 (*mob* gene)

2251 ggagtggtga aatgagttat ttagtggtca atatgcagaa attaaaagct 2262(start *mob*)
 2301 gataatttag ttggcttggg taatcatgat caacgccgaa cgcaacatca
 2351 caaaaatact gatattgacg ttgaccgttc tggcttaaatt tatgatttag
 2401 ttgctgggtcg gactaaccat ttcaaaacgg atattgcggc ttatattaac
 2451 gagcataaaa ccagtcaacg agcggtcaga aaagatgccg ttttagtcaa
 2501 tgaatggatt atttcgagcg atagcacttt ctttgccgat ttgacggcgg
 2551 ctgatactcg caaatatatt gaaacggcga ggaattatatt tgctgaaaaa
 2601 tttggtgaag aaaatatctg ttatgcaatt gttcatcttg atgagagtac
 2651 gccacatatg catatgggaa ttgtgccctt tgatgatgaa cataagttgt
 2701 ctgctaagcg agtatattaat cgcacggctt tgcgagatat tcaagatcaa
 2751 ttaccgactt atttgcaaca gcatggtttt aatattcaac gtgggggttca
 2801 agaatcggaa cgtaaaagtt taacggtgcc agaataaaa gctatgcggg
 2851 aagatttgaa aaaggcgacg cttcaaaaac aagaaataca agctgaactt
 2901 gaagatgcca gaaaacgcct tgctgaactt aaacctctg atcagcagga
 2951 aattgagagc aaacctactt ttttaagcaa ggataaagtg gttgttagaa
 3001 aaagtgatct tcatgactta gaatctcgag cagctgtcag tgatatttat
 3051 aatcaacaac agaaccgttt aaaacttgat aatcaaagcc taaattatca
 3101 actgcttgaa gttaaagaca ataattatga ttttaagcaag aaaaatgaga
 3151 agctccaaaa attagtggat acgttacaag gaattgttcg gagcgttgac
 3201 cggttcttac agcgcaaatt aggtgttggc ttaccaaag agtggttaga
 3251 gcgagctgga ctaaaagaac cgactaaaaa agccctcag aggggggttc
 3301 gaaatcggta a 3311(Stop *mob*)

รูปที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 3311 คู่เบส ของพลาสมิด pKM 1 (ต่อ)

จากการวิเคราะห์รหัสพันธุกรรมของพลาสมิด pKM1 พบ open reading frame 2 ตำแหน่ง คือ ORF1 และ ORF2 ที่มีการถอดรหัส (transcription) ในทิศทางเดียวกัน เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูลของ GenBank พบว่า ORF1 ซึ่งมีขนาด 957 คู่เบส (577-1531) มีความคล้ายกับ ยีน *repA* ที่ควบคุมการสร้างโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการจำลองตัวของพลาสมิด (replication protein) ทางด้านหน้าของ ORF1 พบลำดับเบส 5' CAGTTTCTTCTTATCTTGATACTATTAGAAACAAC 3' ซึ่งคล้ายกับตำแหน่ง *dso* (double-strand origin) (Khan, 1997; Alegre et al., 2005) ที่พบบน พลาสมิดชนิด rolling ลำดับเบสของ *dso* ของพลาสมิด pKM1 มีลำดับเหมือนกับ *dso* ของพลาสมิด pM4 จากเชื้อ *L. plantarum* M4 (Yin et al., 2008) และพลาสมิด pRS4 จาก *P. pentosaceus* RS4 (Alegre et al., 2005) ซึ่งจัดเป็นพลาสมิดที่อยู่ในแฟมิลี pC194 *dso* มีหน้าที่เป็นจุดเริ่มต้นในการจำลองตัวเอง

ของ พลาสมิดแบบ rolling circle (rolling circle plasmid) สาย leading strand โดยพบตำแหน่งที่ถูกตัด (nick site) และตำแหน่งที่จับกับ replication protein บนบริเวณ *dso* นี้ด้วย นอกจากนี้ทางด้านหน้าของตำแหน่ง *dso* ของพลาสมิด pKM1 ยังพบลำดับเบสที่คล้ายกับตำแหน่ง *sso* (single-strand origin) ของพลาสมิด pWCFS01 (Acc. No.CR377164) และ pSAM23 (Acc. No.DQ116709) ตำแหน่ง *sso* มีหน้าที่ในการเริ่มการจำลองตัวเองของสาย lagging ของพลาสมิดหลังจากการจำลองตัวเองของ leading strand เนื่องจาก *sso* จะทำงานเมื่อพลาสมิดอยู่ในรูป single strand เท่านั้น ลำดับเบสของตำแหน่ง *sso* จะค่อนข้างแตกต่างกันแม้แต่ในพลาสมิดที่อยู่ในแฟมิลีเดียวกัน (Khan, 1997)

Open reading frame ที่ 1 ซึ่งมีขนาด 954 คู่เบส ถอดรหัสให้โปรตีนที่มี 318 กรดอะมิโน มีขนาดประมาณ 35.4 kDa โปรตีนมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับโปรตีน RepA (replication initiator protein) ที่พบในพลาสมิดที่มีการจำลองตัวเองแบบ rolling circle ของแบคทีเรียแลคติกหลายสายพันธุ์ (รูปที่ 6) โดยพลาสมิดที่มีความคล้ายมากที่สุด 4 ลำดับได้แก่ pRS4 (90% identity) จากเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* (Alegre et al., 2009), pWCSF101 (89%) จากเชื้อ *Lactobacillus plantarum* (van Kranenburg et al., 2005), pF8801 (88%) จากเชื้อ *P. damnosus* (Walling et al., 2005) และ pLAB1000 (71%) จากเชื้อ *L. hilgardii* (Josson et al., 1990) โปรตีน RepA มีหน้าที่ในการตัดดีเอ็นเอบริเวณ nick site บนตำแหน่ง *dso* (รูปที่ 5) โดยจะจับกับสาย leading strand ที่ตำแหน่ง *dso* (Rep binding sequence) ซึ่งจะมีความจำเพาะกับลำดับเบสบน *dso* จากการที่โปรตีน RepA ของพลาสมิด pKM1 มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายโปรตีน RepA ของพลาสมิดที่มีการจำลองตัวเองแบบ rolling circle และยังพบตำแหน่ง *dso* และ *sso* ด้วย ดังนั้นพลาสมิด pKM1 จึงน่าจะมีการแบ่งตัวแบบ rolling circle เช่นกันหรือจัดเป็นพลาสมิดแบบ rolling circle นั่นเอง

Open reading frame ที่ 2 (ORF2) ที่ลำดับเบสยังไม่สมบูรณ์ ที่รายงานมีขนาด 1047 คู่เบส สามารถถอดรหัสให้โปรตีนได้ 349 กรดอะมิโน ซึ่งลำดับเบสที่มีรายงานทั่วไปจะมีขนาด 1089 คู่เบส สามารถถอดรหัสให้โปรตีนได้ 363 กรดอะมิโน ลำดับโปรตีน Mob ของพลาสมิด pKM 1 จะมีความคล้ายกับโปรตีน mobilization ของพลาสมิดหลายชนิด ที่คล้ายมากที่สุด 2 ชนิดแรก 97% ได้แก่ พลาสมิด pM4 จาก *L. plantarum* M4 (Acc.No.YP_001621756) และ pLB925A08 จาก *L. brevis* 925A (YP_002790952) นอกจากนี้ยังคล้ายกับพลาสมิดหลายชนิดโดยมีความคล้ายอยู่ในช่วง 71-72% ได้แก่ พลาสมิด p141 จาก *L. plantarum* (BAH97325), pRS4 จาก *P. pentosaceus*, pCL88 จาก *L. casei* (U31333), pSAM23 จาก *L. casei* (DQ116709) และ pF8801 จาก *P. damnosus* รูปที่ 7 เป็นการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Mob จากพลาสมิดของแบคทีเรียแลคติกอื่นๆ โดยพลาสมิดเหล่านี้จัดเป็นพลาสมิดที่เรียกว่า mobilizable plasmid ซึ่งบนพลาสมิดจะมีลำดับเบสที่เรียกบริเวณนี้ว่า mobilization region หรือ ยีน *mob* ที่ประกอบไปด้วยยีนที่ถอดรหัสให้เอนไซม์ relaxases และบริเวณที่เรียกว่า origin of transfer (*oriT*) ซึ่งบนแต่ละพลาสมิดอาจพบยีน *mob* ได้ 1 ถึง 3 ยีน (Francia et al., 2004) ส่วนในพลาสมิด pKM1 จะพบยีน *mob* เพียง 1 ยีน นอกจากนี้ยังพบบริเวณที่คล้ายตำแหน่ง *oriT* ด้านหน้าของยีน *mob* ซ้อนอยู่กับตำแหน่งโปรโมเตอร์ -10 (-10 promoter) ของยีน *mob* ซึ่งบริเวณ *oriT* จะประกอบไปด้วยลำดับเบสซ้ำแบบ invert (inverted repeat, IR) และใกล้เคียงกันจะมีบริเวณที่มีเบส AT อยู่จำนวนมาก (AT rich region) จากโครงสร้างที่ประกอบไปด้วยยีน *mob* และมี

บริเวณ *oriT* ด้านหน้า *mob* ยีน พลาสมิด pKM1 จึงจัดเป็น mobilizable plasmid ซึ่งสามารถส่งถ่ายไปยังแบคทีเรียอื่นได้โดยอาศัยพลาสมิดชนิด conjugative หรือ conjugative element ที่อยู่บนโครโมโซม (Tanous et al., 2007) ดังนั้นพลาสมิด pKM1 จึงน่าจะช่วยในการส่งผ่านยีนที่ควบคุมคุณลักษณะที่ต้องการเข้าสู่แบคทีเรียที่เป็นหัวเชื้อที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมการหมักได้

จากการที่พลาสมิด pKM1 จากเชื้อ *L. plantarum* KM1 มียีน *repA* และยีน *mop* ที่สามารถถอดรหัสให้โปรตีนที่เหมือนกับโปรตีน RepA และโปรตีน Mob ของเชื้อ *P. pentosaceus*, *P. damnosus*, *L. casei* และ *L. hilgardii* จึงเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียแลคติกเหล่านี้มีการส่งถ่ายพลาสมิดระหว่างสายพันธุ์ที่มีจีโนมและสปีชีส์ต่างกัน (horizontal transfer)

```

WCFS1      MADRKVLVDRSQSGKVRPWEHKLLENLQYGDYQLMLHYKKSHRVKECGEVLRFVEDKNGH 60
pF8801     MADRKVLVDRSQSGKVRPWEHKLLENLQYGDYQLMLHYKKAHRVKECGEVLRFVEDKNGH 60
P141      MANEKVLVDRSQSGKVRPWRERKLLENLQYGDYQLILHYKKAHRVKECGEVLRFVEDKNGH 60
RS4       MTDKVLVDQSQSGKVRPWRERKLLENLQYSDYQLILHYKKAHRVKECGEVLRFVEDKNGH 60
pKM1      VANEKVLVDRSQSGKVRPWRERKLLENLQYGDYQLILNYKKAHRVKECGEVLRFVEDEQGH 60
pLab1000  -MSKKILKDVSRNRKERPWRERKLLENLQYAEYLRILNFKKANRVKECGEVLRFVADDEGR 59
          ..*:* * *..* *****:*****.:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

WCFS1      KKLAQTFWCHSRLCPLCNWRRSMKQSNQLTQILTEAVKQKRTGRFLFLTTLTVKNNTGDLL 120
pF8801     KKLAQTFWCHSRLCPLCNWRRSMKQSNQLTQILTEAVKQKRTGRFLFLTTLTVKNNTGDLL 120
P141      KKLAQTFWCHSRLCPLCNWRRAMKQSNQLTQILTEAVKQKRTGRFLFLTTLTVENTTGDQL 120
RS4       KKLAQTFWCHSRLCPLCNWRRAMKQSNQLTQILAEAVKQKRTGRFLFLTTLTVENTSGNQL 120
pKM1      KKLAQTFWCHSRLCPLCNWRRAMKQSNQLTQILEAVKQKRTGRFLFLTTLTVENTTGGKQL 120
pLab1000  LRLYQTFWCKSRLCPLCNWRRSMGQSNQLMQVLDEAHKQKRTGRFLFLTTLTAENASGENL 119
          :* *****:*****:* ***** *:* * * *****:*****.:*:*:*:*

WCFS1      KSELQMGRAIAKIFQYKKVAKNLLGYVRSTEVTINHEADQPMYHHHMHVLLFMKSSYFT 180
pF8801     KSELQMGRAIAKIFQYKKVAKNLLGYVRSTEVTINHEADQPMYHHHMHVLLFMKSSYFT 180
P141      KSELQMGRAIAKIFQYTKVAKNLLGYVRSTEVTINHEADQPMYHHHMHVLLFVKNHYFK 180
RS4       KSELQMGRAIRDLMRYKKPAKNLLGYVRSTEVTINHEVDQPMYHHHMHVLLFMKSSYFT 180
pKM1      KSELQMGRAVRDLRMRYKKPAKNLLGYVRSTEVTINHESDQPMYHHHMHVLLFVKSLEYFK 180
pLab1000  KQEVKMGRAISKLFQYKKPAKNLLGYVRSTEITINKNG---TYHQHMHVLLFVKPTYFK 176
          *:*:*:*:*:*:..*:* *****:*****:*:*:*: *****:* * *

WCFS1      GTDNYISQAEWTGYWQRAMKLDYVPVNVNVEAVKPNVKRQKNSLLASAQETAKYQVKSUDI 240
pF8801     GTDNYISQAEWTGYWQRAMKLDYVPVNVNVEAVKPNVKRQKNSLLASAQETAKYQVKSUDI 240
P141      GTDNYISQAEWTGYWQRAMKLDYVPVNVNVEAVKPNMNRHKNNSLLASAQETAKYQVKSUDI 240
RS4       GTDNYISQAEWTGYWQRAMKLDYVPVNVNVEAVKPNVNRHKNNSLLASAQETAKYQVKSUDI 240
pKM1      GSDNYISQSEWTGYWQRAMKLDYVPVNVNVEAVKPNLKRQRNSLLASAQETAKYQVKSUDI 240
pLab1000  DSANYINQAEWSKLWQRAMKLDYQPIVNVNVEAVRSNKAQKNSLIASAQETAKYQVKSUDI 236
          :.***.* **: ***** * *:*:*:*:*:*: * : :*:*:*:*:*:*:******

WCFS1      LTNNQEQLQVIDDLEQALAGSRQISYGGLLKEIRKQLQLEDVENGDLINTDSDQKVDQ 300
pF8801     LTNNQEQLQVIDDLEQALAGSRQISYGGLLKEIRKQLQLEDVENGDLINTDSDQKVDQ 300
P141      LTNNQEQLQVIDDLEQALAGSRQISYGGLLKEIRKQLQLEDVENGDLINTDSDQKVDQ 300
RS4       LTNNQEQLQVIDDLEQALAGSRQISYGGLLKEIRKQLQLEDVENGDLINTDSDQKVDQ 300
pKM1      LTNNQEQLQVIDDLEQALAGSRQISYGGLLKEIRKQLQLEDVENGDLINTDSDDLKTDQ 300
pLab1000  LTNDQERDLQVVEDLEQALAGSRQISYGGLLKEIRKQLQLEDVD-AHLINVDQKVIDE 295
          ***: *:*:*:*:*:*:*****:*****:*****:*****:..***.*.*. : *

WCFS1      VVREIVAKWDYQRKNYFVW 319
pF8801     AVCEIVAKWDYQRKNYFI- 318
P141      VVREIVAKWDYQRKNYFV- 318
RS4       VVREIVAKWDYQRKNYFV- 318
pKM1      VVREIVAKWDYQRKNYFI- 318
pLab1000  VVREIVAKWDYNKQNYFIW 314
          .* *:*:*:*:*:*:*****:

```

รูปที่ 6 แสดงการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน RepA ของพลาสมิด pKM1 กับโปรตีน RepA ของพลาสมิดชนิดอื่นๆ 5 ชนิด ที่พบในของแบคทีเรียแลคติก * = กรดอะมิโนชนิดเดียวกัน

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

```

pM4      MSYLVANMQKLKADNLVGLGNHDQRRQTQHHKNTDIDVDRSGLNYDLVAGRTNHFKTDIAA 60
pLB925A08 MSYLVANMQKLKADNLVGLGNHDQRRQTQHHKNTDIEVDRSGLNYDLVAGRTNHFKTDIAA 60
pKM1      MSYLVANMQKLKADNLVGLGNHDQRRQTQHHKNTDIDVDRSGLNYDLVAGRTNHFKTDIAA 60
p141      MSYLVANMQKLKADNLVGLGNHDQRRQTQHHKNTDIDVDRSGLNYDLVAGRTNHFKTDIAA 60
pRS4      MSYLVANMQKLKADNLVGLGNHDQRRQTQHHKNTDIDVDRSGLNYDLVAGRTNHFKTDIAA 60
          *****.*****.*****.*****.*****

pM4      YINEHKTSQRAVRKDAVLVNEWIISSDSNFFANLTAADTRKYFETAKAYFAEKFGREENIR 120
pLB925A08 YINEHKTSQRAVRKDAVLVDEWIISSDSNFFANLTAADTRKYFETAKAYFAEKFGREENVR 120
pKM1      YINEHKTSQRAVRKDAVLVNEWIISSDSTFFADLTAADTRKYFETARNYFAEKFGREENIR 120
p141      YINEHKTSQRAVRKDAVLVNEWIISSDRHFFADLTAVDTRKYFETAKAYFAEKFGREENIR 120
pRS4      YINEHKTSQRAVRKDAVLVNEWIISSDRHFFADLTAVDTRKYFETAKAYFAEKFGREENIR 120
          *****.*****.*****.*****.*****.*****

pM4      YAIVHLDSTPHMHMGIVPFDDEYKLSAKRVFNRAALQNVQDQLPTYLQQHGFINIQRGVQ 180
pLB925A08 YAIVHLDSTPHMHMGIVPFDDEYKLSAKRVFNRAALQNVQDQLPTYLQQHGFINIQRGVQ 180
pKM1      YAIVHLDSTPHMHMGIVPFDDEYKLSAKRVFNRTALRDIQDQLPTYLQQHGFINIQRGVQ 180
p141      YAIVHLDSTPHMHMGIVPFDDEYKLSAKRVFNRTSLRDIQDQLPTYLQQHGFINIQRGVQ 180
pRS4      YAIVHLDSTPHMHMGIVPFDDEYKLSAKRVFNRTSLRDIQDQLPTYLQQHGFINIQRGVQ 180
          *****.*****.*****.*****.*****

pM4      ESERKSLTVPEYKAMREDLKKATLQKQEIQALEDARKRLAELKPR--DQQEIESKPTFL 238
pLB925A08 ESERKSLTVPEYKAMREDLKKATLQKQEIQALEDARKRLAELKPR--DQQEIESKPTFL 238
pKM1      ESERKSLTVPEYKAMREDLKKATLQKQEIQALEDARKRLAELKPR--DQQEIESKPTFL 238
p141      ESERKSLTVPEYKAMRESIKQSQQKLAAVENETKQRQAKLKTYQATKFDVNSVKTESRF 240
pRS4      ESERKSLTVPEYKAMRESIKQSQQKLAAVENETKQRQAKLKTYQATKFDVNSVKTESRF 240
          *****.*****.*****.*****.*****

pM4      SKDKVVVRKSDLHDLESRAAVSDIYNQQNRLKLDNQSLNYQLLEVKNYELSKKNEKL 298
pLB925A08 SKDKVVVRKSDLHDLESRAAVSDIYNQQNRLKLDNQSLNYQLLEVKNYELSKKNEKL 298
pKM1      SKDKVVVRKSDLHDLESRAAVSDIYNQQNRLKLDNQSLNYQLLEVKNYELSKKNEKL 298
p141      HKRYVLVDRFDFDELKQGASLTDTYFTETLSQKSDMDIQKDRLIKAESKAMELDIENRRL 300
pRS4      HKRYVLVDRFDFDELKQGASLTDTYFTETLSQKSDMDIQKDRLIKAESKAMELDIENRRL 300
          *  *: *  : *: *: *: *  :  : *  :  : *: *: *:  *: *: *:

pM4      QKLVDTLQGIVRSVDRFLQKRLGVGLPSEWLERAGLKEPSKNAPQRPQERSEGGHDELDG 358
pLB925A08 QKLVDTLQGIVRSVDRFLQKRLGVGLPSEWLERAGLKEPSKNAPQRPQERSEGGHDELDG 358
pKM1      QKLVDTLQGIVRSVDRFLQKRLGVGLPNEWLERAGLKEPTKKAPQR-----GLRNR--- 349
p141      QKLVGTLQGIVRSVDHFLQKRLGVGLPGEWLERAGLKEPSKKAPQRPQERSEGGHDELDG 360
pRS4      QKLVGTLQGIVRSVDHFLQKRLGVGLPGEWLERAGLKEPSKKAPQRPQERSEGGHDELDG 360
          ****.*****.*****.*****.*****.*****

pM4      PSL 361
pLB925A08 PSL 361
pKM1      ---
p141      PSF 363
pRS4      PSF 363

```

รูปที่ 7 แสดงการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Mop ของพลาสมิด pKM1 กับโปรตีน Mob ของพลาสมิดชนิดอื่นๆ ที่พบในแบคทีเรียแลคติก

* หมายถึงพลาสมิดทั้ง 5 ชนิดมีลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกัน

4.5 การทดสอบการต้านทานคอปเปอร์ นิกเกิลและแคดเมียมของแบคทีเรียแลคติก

จากการนำแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้ทั้ง 174 สร้างกรด มาทดสอบความสามารถในการต้านทานโลหะหนัก พบเชื้อที่สามารถต้านทานแคดเมียมที่ความเข้มข้น 1 mM ได้ 12 ไอโซเลต โดยมี 1 ไอโซเลต ที่ต้านทานแคดเมียมได้สูงถึง 5 mM ส่วนเชื้อต้านทานคอปเปอร์ที่ความเข้มข้น 20 mM พบ 61 ไอโซเลต โดยมีเชื้อเพียง 5 ไอโซเลต ที่ต้านทานคอปเปอร์ที่ความเข้มข้นสูงถึง 35 mM และมีเชื้อ 45 ไอ

โซเลตที่ ด้านทานนิกเกิลที่ 200 mM โดยมีเชื้อ 2 ไอโซเลต ที่สามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นของนิกเกิลสูงสุดที่ 680 mM

ในการทดลองนี้พบว่าความเข้มข้นสูงสุดของคอปเปอร์ที่เชื้อสามารถต้านทานได้คือ 35 mM ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองของ (Mathurasa, 1997) พบแบคทีเรียแลคติก 5 ไอโซเลต จาก 51 ไอโซเลต สามารถต้านทานคอปเปอร์ที่ความเข้มข้น 100 mM ได้แก่ *Pediococcus pentosaceus*, *P. dextrinicus*, *Lactobacillus buchneri* และ *L. sake* โดยแบคทีเรียแลคติกแยกได้จากแตงกวาและกะหล่ำปลีจีน แต่จากการศึกษาของ Liu et al., 2002 พบว่าเชื้อ *Lactococcus lactis* สามารถต้านทานคอปเปอร์ซัลเฟตที่ระดับความเข้มข้นสูงสุดเพียง 4.5 mM โดยพบว่ามียีนควบคุมการต้านทานคอปเปอร์คือ *lcoA*, *lcoB* และ *lcoC* จะเห็นว่า เชื้อ *L. lactis* ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากนม จะมีความสามารถในการต้านทานคอปเปอร์ได้ต่ำกว่าเชื้อที่แยกได้จากอาหารหมักจำพวก ผัก และเนื้อ ซึ่งมักพบเชื้อในกลุ่มอื่นที่ไม่ใช่ *L. lactis* เช่น จากรายงานของ ปิ่นมณี ขวัญเมือง (2546) ซึ่งทำการแยกแบคทีเรียแลคติกจากแหนม 60 ตัวอย่าง สามารถแยกแบคทีเรียแลคติกได้จำนวน 118 ไอโซเลต โดยพบแบคทีเรียรูปร่างแท่งมากกว่ารูปร่างกลม โดยแบคทีเรียรูปร่างแท่งที่พบจำแนกได้เป็นเชื้อกลุ่ม *Lactobacillus* ขณะที่ Tanasupawat and Daengsubha, (1983) แยกได้แบคทีเรียรูปร่างกลมที่มีการจัดเรียงตัวแบบ tetrad และจัดจำแนกได้เป็นเชื้อกลุ่ม *Pediococcus* และ วิเชียร ลีลาวัชรมาศ (2534) รายงานการพบแบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์ปลาหมัก โดยเป็นแบคทีเรียรูปร่างแท่งซึ่งจัดจำแนกได้เป็นเชื้อ *Lactobacillus plantarum* และเชื้อรูปร่างกลมจัดจำแนกได้เป็นเชื้อ *Leuconostoc* sp., *Pediococcus acidilactici* และ *Streptococcus* sp. จะเห็นว่าไม่มีรายงานการพบเชื้อในกลุ่ม *Lactococcus lactis* ในผลิตภัณฑ์เหล่านี้

สำหรับการต้านทานนิกเกิลพบว่า เชื้อที่แยกได้สามารถต้านทานนิกเกิลได้ที่ความเข้มข้นสูงกว่าที่มีรายงาน เช่น Mathurasa, (1997) ทำการศึกษาความสามารถในการต้านทานนิกเกิลของแบคทีเรียแลคติก พบว่ามีจำนวน 10 ไอโซเลต จาก 51 ไอโซเลต แบ่งเป็น 5 สายพันธุ์ สามารถต้านทานนิกเกิลที่ความเข้มข้น 10 mM ได้แก่ *Lactobacillus sake*, *L. plantarum*, *L. buchneri*, *Pediococcus dextrinicus* และ *Leuconostoc mesenteroides* โดยแยกเชื้อได้จาก หัวหอม ผักขม มะม่วง แตงกวา และกะหล่ำปลีจีน การศึกษาเช่นเดียวกันของ วีรชาติ ศรีอักษรินทร์ และคณะ (2544) พบว่า *Lactobacillus* sp. ที่แยกได้จากแหนมสามารถต้านทานนิกเกิลได้สูงสุดถึง 300 mM เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการต้านทานนิกเกิลของเชื้อที่แยกได้ในการทดลองนี้ พบว่ามีเชื้อ 2 ไอโซเลต สามารถต้านทานนิกเกิลที่ความเข้มข้น 680 mM

ยีนควบคุมการต้านทานนิกเกิลถูกค้นพบและศึกษากันมากในเชื้อ *Ralstonia eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*) ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก พบในดินที่มีการปนเปื้อนด้วยนิกเกิล โดยเชื่อมีกลุ่มของยีนที่ควบคุมการต้านทานนิกเกิลระดับกลาง (10 mM) คือ โอเปอรอน *cnrYXHCBA* (Liesegang et al., 1993) นอกจากกลุ่มยีน *cnr* แล้วยังพบกลุ่มยีน *ncc* และ *nre* จากเชื้อ *R. eutropha*-like strains 31A (*Alcaligenes xylosoxidans* 31A) ที่ควบคุมการต้านทานนิกเกิลในระดับสูง (20-50 mM) และระดับต่ำ (3 mM) ตามลำดับ (Taghavi et al., 2001)

จากการคัดเลือกเชื้อต้านทานแคดเมียมพบว่า เชื้อที่แยกได้จากอาหารหมักส่วนมากไม่สามารถต้านทานแคดเมียม และสามารถต้านทานได้ที่มีความเข้มข้นของแคดเมียมต่ำเพียง 1-5 mM ส่วนเชื้อที่แยกได้จากนมแพะ 33 ไอโซเลต พบว่าสามารถต้านทานแคดเมียมความเข้มข้น 0.8 mM ได้ 27 ไอโซเลต จากการศึกษาของ O' Sullivan et al., (2001) ได้ทดสอบการต้านทานแคดเมียมในเชื้อ *Lactococcus lactis* MG1614 โดยเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของแคดเมียมคลอไรด์สูงสุดเท่ากับ 0.3 mM ในปี 1996 Liu et al. ทำการศึกษาพลาสมิด pND302 ของเชื้อ *L. lactis* ที่สามารถต้านทานแคดเมียมได้ โดยความเข้มข้นของแคดเมียมคลอไรด์ที่ใช้ในการเลี้ยง *L. lactis* เท่ากับ 1.0 mM อย่างไรก็ตามจากรายงานของ Mathurasa (1997) พบว่าแบคทีเรียแลคติก 4 สายพันธุ์ จาก 51 ไอโซเลตที่แยกจากกะหล่ำปลีจีนและหัวหอม สามารถต้านทานแคดเมียมที่มีความเข้มข้นสูงถึง 50 mM ได้แก่ *Pediococcus pentosaceus*, *P. dextrinicus*, *Lactobacillus sake* และ *L. plantarum* ในการทดลองของ วีรชาติ ศรีอักษรินทร์ และคณะ (2544) ได้ทำการศึกษาความสามารถในการต้านทานแคดเมียมของแบคทีเรียแลคติกที่แยกจากอาหารหมัก พบเชื้อต้านทานแคดเมียมได้สูงสุดที่มีความเข้มข้น 1 mM ได้แก่เชื้อ *Lactobacillus* sp. แยกได้จากดอกเฟื่องฟ้า

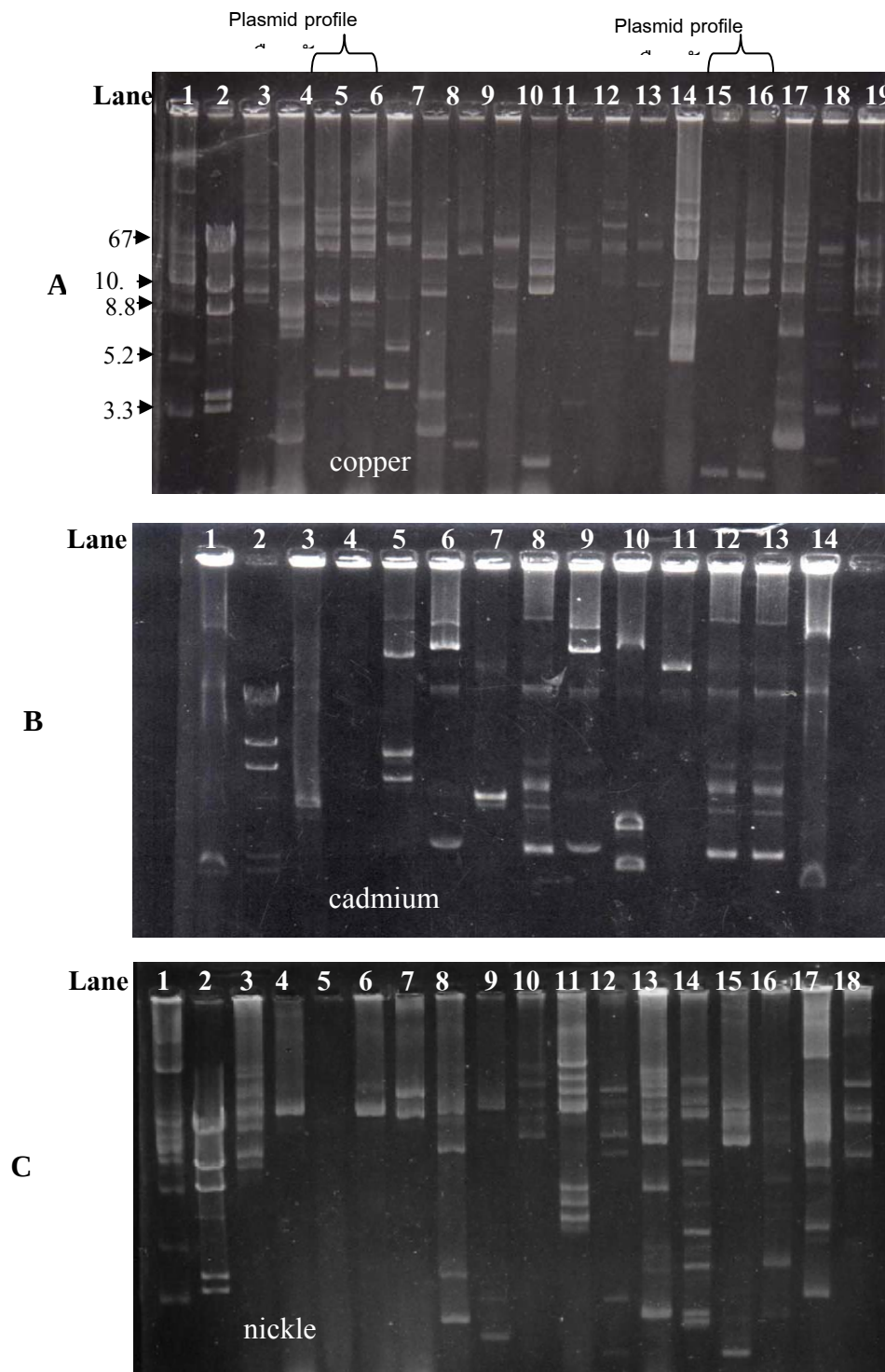
จากการศึกษายีนที่ควบคุมการต้านทานแคดเมียม พบพลาสมิด pND302 ที่แยกได้จาก *L. lactis* subsp. *lactis* M71 มียีน *cadA* และ *cadC* ควบคุมสร้างโปรตีน CadA และ CadC (Liu et al., 1996) นอกจากนี้ใน *L. lactis* แล้วยีนต้านทานแคดเมียมยังถูกพบในเชื้อ *Streptococcus thermophilus* 4134 โดยพบมี 2 ยีน คล้ายกับในเชื้อ *L. lactis* subsp. *lactis* M71 คือ *cadA_{St}* และ *CadC_{St}* ซึ่งอยู่บนโอเปอรอนเดียวกันและจะมีการถอดรหัสในสภาวะที่มีแคดเมียม ยีน *cadA_{St}* ควบคุมการสังเคราะห์โปรตีน CadA_{St} ซึ่งช่วยในการขนส่งแคดเมียมออกนอกเซลล์ (P-type cadmium efflux ATPases) ซึ่งการแสดงออกของยีน *CadA_{St}* เพียงอย่างเดียวก็เพียงพอที่จะทำให้เชื้อต้านทานแคดเมียมได้ ส่วนยีน *CadC_{St}* ควบคุมการสร้างโปรตีนควบคุม (regulatory protein) ที่ทำหน้าที่จับกับดีเอ็นเอ (DNA binding protein) บริเวณโปรโมเตอร์ในสภาวะที่ไม่มีแคดเมียม และจะสูญเสียการจับกับโปรโมเตอร์ในสภาวะที่มีแคดเมียม (Schirawski et al., 2002)

แบคทีเรียต้านทานโลหะหนักสามารถพบได้ทั่วไป เนื่องจากในธรรมชาติมีการปนเปื้อนของโลหะหนักจากการเกษตรและอุตสาหกรรมต่างๆ ตามสิ่งแวดล้อม เช่น ดิน ต้นพืช และแหล่งน้ำ ในสัตว์เลี้ยง ทำให้แบคทีเรียมีการปรับตัวให้เกิดความสามารถในการต้านทานโลหะหนักและมีการแพร่กระจายอยู่ทั่วไป (Morishima and Oka, 1980; Silver and Phung, 1996)

จากการทดลองจะเห็นว่าแบคทีเรียแลคติกที่ต้านทานโลหะหนักสามารถพบได้ทั่วไปในอาหารซึ่งยีนที่ควบคุมการต้านทานโลหะหนักเหล่านี้ จัดได้ว่าเป็นยีนที่พบในแบคทีเรียแลคติกที่มีบทบาทในอาหารหมักและมนุษย์ได้บริโภคมาเป็นเวลานาน ดังนั้นยีนที่ควบคุมการต้านทานโลหะหนักเหล่านี้จึงจัดเป็นยีนที่มีความปลอดภัยในการบริโภค (food grade) และสามารถนำยีนต้านทานโลหะหนักที่อาจพบบนพลาสมิดหรือบนโครโมโซม มาใช้เป็นยีนติดตามที่ปลอดภัย (food grade selection marker) ทดแทนยีนต้านทานยาปฏิชีวนะ ในการสร้างเวกเตอร์ที่ปลอดภัย (food grade vector) สำหรับใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียแลคติกได้

4.6 การตรวจสอบพลาสมิดของแบคทีเรียแลคติกที่ต้านทานโลหะหนัก

ทำการสกัดพลาสมิดจากแบคทีเรียแลคติก 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่มีความสามารถในการต้านทานคอปเปอร์ นิกเกิลและแคดเมียม โดยใช้พลาสมิดจากเชื้อ *Lactococcus lactis* FG2 เป็นพลาสมิดมาตรฐาน ซึ่งมีจำนวนพลาสมิดทั้งหมด 11 แถบ มีขนาดประมาณ 135.0, 67.0, 50.0, 27.0, 14.0, 12.9, 11.9, 10.1, 8.8, 5.2 และ 3 กิโลเบส ได้ผล plasmid profile ดังแสดงในรูปที่ 8



รูปที่ 8 Plasmid profiles ของแบคทีเรียแลคติกที่ต้านทานคอปเปอร์ (A) แคดเมียม (B) และนิกเกิล (C)

จากรูปที่ 8 พบว่าแบคทีเรียแลคติกส่วนใหญ่จะมีพลาสมิดเป็นองค์ประกอบ โดยมีจำนวนตั้งแต่ 1- 9 พลาสมิด ขนาดตั้งแต่ประมาณ 1 – มากกว่า 70 กิโลเบส เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดของพลาสมิดของเชื้อ *L. lactis* subsp. *lactis* FG2 ที่ทราบขนาด จากรูปจะเห็นว่าถึงแม้แบคทีเรียแลคติกเหล่านี้จะสามารถต้านทานโลหะหนักเหมือนกัน แต่มีจำนวนและขนาดของพลาสมิดที่แตกต่างกัน (plasmid profile) โดยไม่พบพลาสมิดที่มีขนาดเท่าๆกันที่น่าจะมียีนที่ต้านทานโลหะหนักเหมือนกัน (commom plasmid) เป็นองค์ประกอบ ทำให้ไม่สามารถระบุได้ว่า พลาสมิดใดที่น่าจะมียีนควบคุมการต้านทานโลหะหนักได้ หรือยีนต้านทานอาจอยู่บนโครโมโซม จากรูปจะเห็นว่าเชื้อบางสายพันธุ์ที่มีรูปแบบของพลาสมิดเหมือนกัน (รูปที่8 (A) Lane 5 และ 6, Lane 16 และ 17) ซึ่งน่าจะเป็นเชื้อสายพันธุ์เดียวกัน ดังนั้นการวิเคราะห์ plasmid profile ของเชื้อสามารถนำมาทดสอบเชื้อที่เป็นสายพันธุ์เดียวกันได้และยังสามารถคัดเลือกเชื้อที่เหมือนกันออกเพื่อเป็นการลดจำนวนเชื้อที่จะนำไปศึกษาต่อไป

ยีนที่ควบคุมความสามารถในการต้านทานโลหะหนักมีรายงานพบได้ทั้งบนพลาสมิดและโครโมโซม จากการทดลองไม่สามารถสรุปได้ว่า ยีนต้านทานแคดเมียม คอปเปอร์และนิกเกิลนั้น อยู่บนโครโมโซมหรือพลาสมิด ส่วนเชื้อที่ไม่พบพลาสมิดน่าจะมียีนที่ควบคุมการต้านทานโลหะหนักอยู่บนโครโมโซม ดังนั้นในการหาตำแหน่งของยีนที่ต้านทานโลหะหนักจึงสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การทำ plasmid curing การใช้เทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มียีนที่สามารถจับกับยีนต้านทานโลหะหนักได้ หรือการทำ southern hybridization โดยใช้โพรบที่มียีนที่ต้านทานโลหะหนัก

Akcelik (2001) ได้ศึกษาถึงคุณสมบัติในการย่อยสลายน้ำตาลแลคโตสและการต้านทานคอปเปอร์ของเชื้อ *L. lactis* subsp. *lactis* MCL64 จากการศึกษา plasmid profile พบมีพลาสมิดทั้งหมด 9 ขนาด คือ 45.8 , 30.0 , 28.8 , 22.5 , 16.7 , 12.3 , 8.4 , 4.1 และ 2.6 กิโลเบส จากการทำ plasmid curing โดยการใช้อุณหภูมิสูงพบว่าเชื้อที่สูญเสียความสามารถในการใช้น้ำตาลแลคโตสและการต้านทานคอปเปอร์ เมื่อนำมาตรวจสอบพลาสมิดพบมีการสูญหายไปของพลาสมิดขนาด 30 กิโลเบส จากการทดสอบโดยการทำให้ conjugation พบว่ายีนต้านทานคอปเปอร์ของเชื้อ *L. lactis* subsp. *lactis* MCL64 อยู่บนพลาสมิดขนาด 30 กิโลเบส จริง นอกจากนี้ยังมีรายงานพบยีนต้านทานต้านทานคอปเปอร์บน พลาสมิด pND306 ขนาด 54 กิโลเบส จากเชื้อ *L. lactis* subsp. *lactis* 1252D จากการทำให้ hybridization โดยใช้ยีนต้านทานคอปเปอร์จาก pND306 เป็นโพรบ พบว่าเชื้อ *L. lactis* สายพันธุ์อื่นๆ และเชื้อ *L. cremoris* มียีนต้านทานคอปเปอร์ที่คล้ายกันบนพลาสมิดขนาดใหญ่ (Liu et al., 1996) นอกจากนี้เชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแลคติก ยีนต้านทานคอปเปอร์ยังพบในเชื้ออื่นๆ เช่น *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค apical necrosis ในมะม่วง โดยพบยีนต้านทานคอปเปอร์บนพลาสมิดขนาด 62 กิโลเบส โดยมีกลุ่มของยีน *copABCD* (Cazorla et al., 2002)

สำหรับการต้านทานแคดเมียม Liu et al., (1996) พบพลาสมิด pND302 ขนาด 8.8 กิโลเบส ที่แยกได้จาก *L. lactis* subsp. *lactis* M71 มียีน *cadA* และ *cadC* ควบคุมการต้านทานแคดเมียม นอกจากนี้แบคทีเรียแลคติก ยีนต้านทานแคดเมียมยังพบอยู่บนพลาสมิดของเชื้อแกรมบวกอื่นๆ เช่น *Listeria monocytogenes* มียีนต้านทานแคดเมียมบนพลาสมิด pLM74 ขนาด 20.5 กิโลเบส (Lebrun et al., 1994) โดยมียีน *cadA* และ *cadC* คล้ายกับที่พบบนพลาสมิด pND302 และบนพลาสมิด pl258 ของเชื้อ *Staphylococcus aureus* (Nucifora et al., 1989) อย่างไรก็ตามยีนต้านทานแคดเมียมยัง

สามารถพบได้บนโครโมโซมของเชื้อ *Streptococcus salivarius* 57.I โดยจะมียีนที่แตกต่างกับกลุ่มแรกคือยีน *cadDX* (Chen et al., 2008) และ ส่วนยีนต้านทานแควดเมียมบนโครโมโซมของ *S. thermophilus* จะมียีน *cadAC* เช่นเดียวกับกลุ่มแรก (Schirawski et al., 2002)

ยีนที่ควบคุมการต้านทานนิกเกิลพบมีรายงานในเชื้อ *Ralstonia* sp. strain CH34 โดยพบอยู่บนพลาสมิด pMOL28 โดยยีนที่ควบคุมได้แก่กลุ่มยีน *cnr* โดยมี 2 กลุ่มคือ *cnrYXH* และ *cnrCBA* ควบคุมการต้านทานนิกเกิลขนาดกลาง (medium level) (Grass et al., 2000) ส่วนพลาสมิด pTOM9 จากเชื้อ *Alcaligenes xylosoxidans* 31A และพลาสมิด pGOE2 จากเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* KTO2 จะมีกลุ่มยีน *ncc* และ *nre* ที่ควบคุมการต้านทานนิกเกิลระดับสูงและระดับกลาง ตามลำดับ (Schmidt et al., 1991; Schmidt and Schlegel, 1994)

4.7 การศึกษาตำแหน่งของยีนที่ต้านทานนิกเกิลโดยวิธี plasmid curing

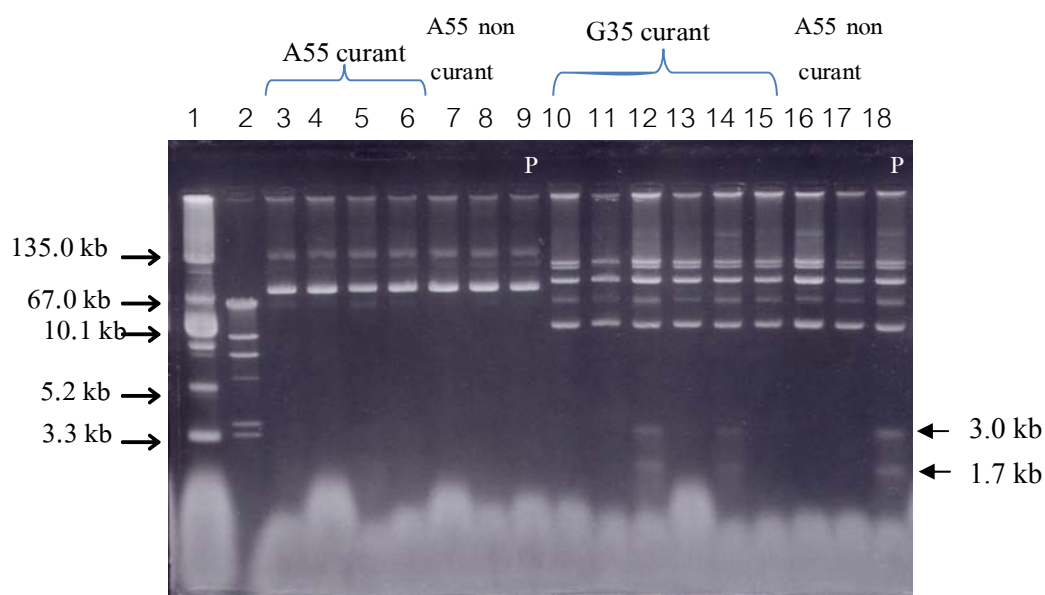
จากการนำเชื้อที่ต้านทานนิกเกิล 2 สายพันธุ์คือ เชื้อรหัส G35 และ A55 มาศึกษาพลาสมิดที่ควบคุมการต้านทานนิกเกิลด้วยวิธี plasmid curing โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิสูงในอาหารที่มีสาร novobiocin หลังจากการทำ plasmid curing นำเชื้อที่รอดชีวิตมาเลี้ยงในอาหารที่มีนิกเกิลความเข้มข้น 220 mM เพื่อทดสอบการต้านทานโลหะหนัก จากนั้นเลือก curant ซึ่งเป็นเชื้อที่ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีนิกเกิลรวมทั้งเลือกเชื้อที่ยังคงสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีนิกเกิล มาทำการสกัดพลาสมิดเพื่อศึกษาจำนวนและขนาดของพลาสมิดที่มีการสูญหายไป novobiocin เป็นสารที่มีรายงานว่าให้ผลที่ดีในการทำ plasmid curing เช่นการทดลองของ Ruiz-Barba et al., 1991 ทำ plasmid curing ของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* สายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ *L. plantarum* LPS5 , *L. plantarum* 128/1 , *L. plantarum* 2/112/1 และ *L. plantarum* LPCO10 มาทำ plasmid curing โดยใช้สาร novobiocin ethidium bromide และ sodium dodesyl sulfate และทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลาอย่างน้อย 72 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่า เปอร์เซ็นต์ curant ที่ได้จากการใช้สาร novobiocin มีค่าเกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเปอร์เซ็นต์ curant ที่ได้จากการใช้สาร ethidium bromide และ sodium dodesyl sulfate มีค่าเท่ากับ 5 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

จากการทดลองพบเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลต มีเปอร์เซ็นต์ของการอยู่รอดต่ำมากเพียง 0.02-0.04% ทั้งนี้เนื่องจากสาร novobiocin จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ gyrase ไม่ให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ และยังสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ topoisomerase IV ซึ่งเป็นสารตัวกลางที่มีความสำคัญต่อการจำลองตัวของดีเอ็นเอในแบคทีเรีย ทำให้ไม่สามารถเกิดจำลองดีเอ็นเอได้ (Zechiedrich et al., 1997) ความร้อนสูงที่ใช้ก็ยังเป็นตัวยับยั้งการเจริญของเชื้อ โดยความร้อนจะทำให้โปรตีนที่อยู่ในเซลล์เกิดการตกตะกอน ซึ่งจะมีผลต่อปฏิกิริยาทางเคมี เช่น การทำงานของเอนไซม์ เป็นต้น จึงมีผลทำให้เชื้อสามารถเจริญได้น้อยลง

จากการนำเชื้อที่รอดชีวิตมาทดสอบความสามารถในการต้านทานนิกเกิลพบว่า เชื้อส่วนมากยังสามารถต้านทานนิกเกิลได้ โดยมีเชื้อที่สูญเสียความสามารถในการต้านทานนิกเกิลเพียง 7-8% จากการศึกษาการทำ plasmid curing ของเชื้อรหัส A55 โดยเมื่อนำเชื้อที่เป็น curant ที่สูญเสียความสามารถในการต้านทานนิกเกิลจำนวน 4 ไอโซเลต (รูปที่ 9 แถวที่ 3, 4, 5 และ 6) และเชื้อที่ยังสามารถต้านทานนิกเกิลได้จำนวน 2 ไอโซเลต (รูปที่ 9 แถวที่ 7 และ 8) มาทำการศึกษา plasmid

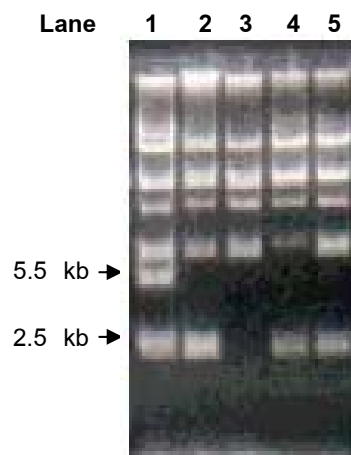
profile เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (รูปที่ 9 แถวที่ 9) พบว่า เชื้อรหัส A55 ซึ่งมีจำนวนพลาสมิด 2 ชั้น ขนาด 43.3 และ 30.2 กิโลเบส ไม่สามารถถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการสูญเสียของพลาสมิดได้ ทั้งในกลุ่มที่ต้านทานและไม่ต้านทานนิกเกิล จึงไม่สามารถสรุปได้ว่ายีนต้านทานนิกเกิลอยู่บนพลาสมิดหรือโครโมโซม ส่วนเชื้อรหัส G35 ซึ่งมีจำนวนพลาสมิด 7 ชั้น มีขนาดเท่ากับ 49.0 , 43.7.0 , 33.9 , 23.4 , 14.5 , 3.0 และ 1.7 กิโลเบส เมื่อนำเชื้อที่สูญเสียความสามารถในการต้านทานนิกเกิลจำนวน 6 ไอโซเลต (รูปที่ 9 แถวที่ 10 -15) และที่ไม่สูญเสียความสามารถในการต้านทานนิกเกิลจำนวน 2 ไอโซเลต (รูปที่ 9 แถวที่ 16 และ 17) มาทำการศึกษา plasmid profile เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (รูปที่ 9 แถวที่ 18) พบว่า เกิดการสูญเสียพลาสมิดขนาดเล็กขนาดประมาณ 1.7 และ 3.0 กิโลเบส ทั้งในเชื้อที่สูญเสียและไม่สูญเสียความสามารถในการต้านทานนิกเกิล ดังนั้นพลาสมิดดังกล่าวจึงไม่น่ามียีนที่ควบคุมการต้านทานโลหะหนัก แสดงให้เห็นว่ายีนที่ควบคุมการต้านทานนิกเกิลอาจจะอยู่บนพลาสมิดในชั้นที่ไม่เกิดการสูญเสียไปซึ่งก็คือ พลาสมิดขนาด 49.0 , 43.7.0 , 33.9 , 23.4 , 14.5 กิโลเบส หรือยีนที่ควบคุมการต้านทานนิกเกิลอาจอยู่บนโครโมโซม เนื่องจากเชื้อบางไอโซเลต (รูปที่ 9 แถวที่ 12 และ 14) ไม่เกิดการสูญเสียพลาสมิด แต่เกิดการสูญเสียความสามารถในการต้านทานนิกเกิลไป

การทดลองของ Ruiz-Barba et al. (1991) ได้ทำ plasmid curing ในเชื้อ *Lactobacillus plantarum* สายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ *L. plantarum* LPS5 , *L. plantarum* 128/1 , *L. plantarum* 2/112/1 และ *L. plantarum* LPCO10 พบว่า เปอร์เซ็นต์ curant ที่ได้มีค่าเกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยมีการสูญเสียจำนวนพลาสมิดที่สูงมาก และพลาสมิดที่มีขนาดใหญ่จะมีการสูญเสียน้อยกว่าพลาสมิดขนาดเล็ก ยกเว้นเชื้อ *L. plantarum* LPCO10 ที่มีการสูญเสียพลาสมิดขนาดใหญ่จำนวนมาก ซึ่งแตกต่างจากการทดลองนี้ที่เปอร์เซ็นต์การสูญเสียพลาสมิดต่ำมาก ดังนั้นจึงไม่สามารถใช้วิธีการทำ plasmid curing ในการหาชั้นของพลาสมิดที่ควบคุมการต้านทานนิกเกิลได้



รูปที่ 9 ผลการสกัดพลาสมิดหลังจากการทำ plasmid curing ของเชื้อรหัส A55 และ G35 ที่ต้านทานนิกเกิลได้ P= parent strains

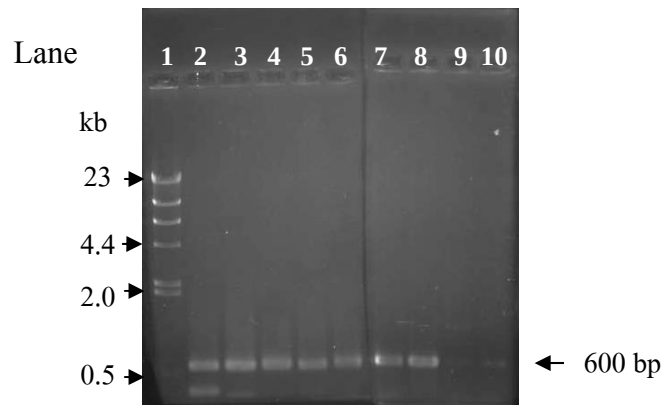
จากทดลองการทำ plasmid curing กับเชื้อที่ต้านทานคอปเปอร์รัส X32 ซึ่งมีพลาสมิด 7 แถบ ขนาด 99, 78, 22, 8.5, 7.5, 5.5 และ 2.5 กิโลเบส โดยใช้อุณหภูมิสูงร่วมกับการใช้สาร novobiocin โดยทำ curing ซ้ำ พบการสูญเสียพลาสมิดเกือบทุกขนาด ดังแสดงตัวอย่างในรูปที่ 10 จะเกิดการสูญเสียพลาสมิดขนาด 2.5 และ 5.5 กิโลเบส แต่ไม่พบการสูญเสียความสามารถในการต้านทานคอปเปอร์ แสดงว่ายีนต้านทานคอปเปอร์ไม่ได้อยู่บนพลาสมิดเหล่านี้ ดังนั้นจึงได้ใช้เทคนิค PCR และ southern hybridization ในการศึกษาตำแหน่งของยีนที่ควบคุมการต้านทานโลหะหนัก โดยจะเลือกใช้ยีนต้านทานแคดเมียมในการศึกษา เนื่องจากมีข้อมูลลำดับยีนที่สามารถนำมาออกแบบไพรเมอร์ในการทำ PCR และออกแบบโพรบในการทำ southern hybridization



รูปที่ 10 ผลการสกัดพลาสมิดหลังจากการทำ plasmid curing ของเชื้อรหัส X32 ที่ต้านทานคอปเปอร์ และเกิดการสูญเสียของพลาสมิดขนาด 2.5 และ 5.5 กิโลเบส

4.8 การศึกษาตำแหน่งของยีนต้านทานแคดเมียมโดยเทคนิค PCR

เนื่องจากการทำ plasmid curing ไม่สามารถแยกพลาสมิดที่มียีนต้านทานโลหะหนักได้ จึงได้ทดลองใช้เทคนิค PCR ในการหาลำดับของยีนต้านทานแคดเมียมทั้งที่อยู่บนพลาสมิดและโครโมโซม โดยการใช้พลาสมิดและโครโมโซมดีเอ็นเอของเชื้อ C53, V13, V23, และ NU1 เป็นแม่แบบ และนอกจากนี้ยังได้ใช้เชื้อต้านทานแคดเมียมที่แยกจากตัวอย่างนมแพะเพิ่มเติม 27 ตัวอย่าง จากการใช้ไพรเมอร์ cadA-L และ cadA-F ที่ออกแบบจากยีน *cadA* ของ พลาสมิด pND 302 พบว่าได้ผลผลิต PCR ที่มีขนาดใกล้เคียงกับที่คาดหวังคือขนาดประมาณ 600 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 11 โดยพบยีนทั้งที่อยู่บนพลาสมิดและโครโมโซม (ตารางที่ 1)



รูปที่ 11 แสดงตัวอย่างผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 600 คู่เบส ที่ได้จากแบคทีเรียแลคติก
1= Lamda *Hind* III marker, 2-10 แบคทีเรียแลคติกที่ต้านทานแคดเมียม

ตารางที่ 1 แสดงรหัสชื่อแบคทีเรียแลคติกที่แยกจากนมแพะและตัวอย่างอาหาร
ที่ให้ผลผลิต PCR ของยีนที่ควบคุมการต้านทานแคดเมียม

นมแพะ		อาหาร	
plasmid	chromosome	plasmid	chromosome
C071	B141	NU1	C53
C072	C023	V13	
C073	C093	V18	
C074	D072	V23	
C092	E072	V26	
C101	E101		
C102	E102		
D011	F062		
E013	G011		

จากการนำผลผลิต PCR ขนาด 600 คู่เบส จากเชื้อรหัส NU1 และ C53 มาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลดังแสดงในรูปที่ 12 และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับยีนในฐานข้อมูล NCBI โดยใช้โปรแกรม nucleotideBlast พบว่าผลผลิต PCR ของเชื้อทุกรหัสมีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายยีน *cadA* ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ cadmium efflux ATPase จากเชื้อแบคทีเรียแลคติก และเชื้อ *Listeria innocua* ดังแสดงในตารางที่ 2 โดยจะมีความคล้าย 99% รูปที่ 13 แสดงการเปรียบเทียบลำดับเบสของผลผลิต PCR ของยีน *cadA* จากเชื้อรหัส C53 และ NU1 กับยีน *cadA* บน ICESde3396, พลาสมิด pGdh 442 และพลาสมิด pAH82

C53_CadA-R

```

1  AAACTATACG CCATTCTATAA TTATTATGGC CCTTTTGATA GTGGTTGTTC
51 CTCCGCTATT CTTTGGTGGT GACTGGAATA AATGGCTTTA CCAAGGGTTA
101 TCCATTTTAG TTGTCGGATG TCCTTGTTCA TTAGTGATCT CAACACCTGT
151 TTCAATTGTT TCGGCTATTG GTAATGCAGC AAAAAATGGT GTTTTAGTAA
201 AAGGCGGAGT CTATCTGGAA GAAATTGGTC ATTTGAGAGC AATTGCTTTC
251 GATAAGACTG GAACCTTAAC AAAAGGAAAG CCTGTCGTAA CGGATTTTCAT
301 TGCAACCACT TCTGAACTG ATATAAATTA TCTATCGATT ATTTTCATCGT
351 TGGAACTCTT TTCTCAACAC CCATTAGCTT CTGCTATTTT AAACGAAGCG
401 GATAAACTA ATGTGGATTA CAAGTCAATA CAAATCGAGG ATTTCCAATC
451 TATCACAGGT AAAGGACTTA CAGGTATACA TCAAAACATA CGTTACTATA
501 TTGGAAGCCC TAAACTGTTT TCTGCATCAG TAATCGAAGA AACAGCGGTC
551 AAAGTACAAT ACAGACAATT TCAAGAACAA GGGAAAACCG

```

NU1_CadA-R

```

1  GAGCTCGTTA CCGCTGTTTC TTCGATTACT GATGCAGAAA ACAGTTTAGG
51 GCTTCCAATA TAGTAACGTA TGTTTTGATG TATACCTGTA AGTCCTTTAC
101 CTGTGATAGA TTGGAATCC TCGATTTGTA TTGACTTGTA ATCCACATTA
151 GTTTTATCCG CTTGTTTTAA AATAGCAGAA GCTAATGGGT GTTGAGAAAG
201 AGATTCCAAC GATGAAATAA TCGATAGATA ATTTATATCA GTTTCAGAAC
251 TGGTTGCAAT GAAATCCGTT ACGACAGGCT TTCTTTTGT TAAGGTTCCA
301 GTCTTATCGA AAGCAATTGC TCTCAAATGA CCAATTTCTT CCAGATAGAC
351 TCCGCCTTTT ACTAAAACAC CATTTTTTGC TGCATTACCA ATAGCCGAAA
401 CAATTGAAAC AGGTGTTGAG ATCACTAATG AACAAAGGACA TCCGACAAC
451 AAAATGGATA ACCCTTGTA AAGCCATTTA TTCCAGTCAC CACCAAAGAA
501 TAGCGGAGGA ACAACCACTA TCAAAAGGGC CATAATAATT ATGAATGGCG
551 TATAGTATTT TGCAAATTTA TCTACAAAGG CTTGTGCAGA

```

รูปที่ 12 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิต PCR ของยีน *cadA* ขนาดประมาณ 600 คู่เบสจาก
แบคทีเรียแลคติกกรด C53 และ NU1

ตารางที่ 2 แสดงสายพันธุ์แบคทีเรียที่มียีน *cadA* คล้ายกับยีนในแบคทีเรียแลคติกกรด C53 และ NU1

สายพันธุ์แบคทีเรีย	ตำแหน่งที่พบยีน	Accession no. / % similarity	เอกสารอ้างอิง
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> strain NS3396	Integrative Conjugative Element ICESde3396	EU142041/99 2117	Davies et al., 2009
<i>Lactococcus lactis</i> 2117	พลาสมิด pGdh 442	AY849557/99	Tanous et al., 2007
<i>Lactococcus lactis</i> M71	พลาสมิด pND302	U78967/99	Liu et al., 1997
<i>L. lactis</i>	พลาสมิด pNP40	AY530537/99	O'Driscoll et al., 2006
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	พลาสมิด pAH82	AF243383/99	O' Sullivan et al., 2001
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 712	พลาสมิด pAG6	AB198069/99	Kobayashi, 2005
<i>Streptococcus thermophilus</i>	โครโมโซม	AJ315964/99	Schirawski et al., 2002
<i>Listeria innocua</i> Clip11262	พลาสมิด pLI100	AL592102/99	Glaser and Frangoul, 2001

pGdh442	CCATTCATAATTATTATGGCCCTTTTGATAGTGGTTGTTCCCTCCGCTATTCTTTGGTGGT	60
ICESde3396	CCATTCATAATTATTATGGCCCTTTTGATAGTGGTTGTTCCCTCCGCTATTCTTTGGTGGT	60
C53	CCATTCATAATTATTATGGCCCTTTTGATAGTGGTTGTTCCCTCCGCTATTCTTTGGTGGT	60
pAH82	CCATTCATAATTATTATGGCCCTTTTGATAGTGGTTGTTCCCTCCGCTATTCTTTGGTGGT	60
NU1	CCATTCATAATTATTATGGCCCTTTTGATAGTGGTTGTTCCCTCCGCTATTCTTTGGTGGT	60

pGdh442	GACTGGAATAAATGGCTTTACCAAGGGTTATCCATTTTAGTTGTCGGATGTCCTTGTTCA	120
ICESde3396	GACTGGAATAAATGGCTTTACCAAGGGTTATCCATTTTAGTTGTCGGATGTCCTTGTTCA	120
C53	GACTGGAATAAATGGCTTTACCAAGGGTTATCCATTTTAGTTGTCGGATGTCCTTGTTCA	120
pAH82	GACTGGAATAAATGGCTTTACCAAGGGTTATCCATTTTAGTTGTCGGATGTCCTTGTTCA	120
NU1	GACTGGAATAAATGGCTTTACCAAGGGTTATCCATTTTAGTTGTCGGATGTCCTTGTTCA	120

pGdh442	TTAGTGATCTCAACACCTGTTTCAATTGTTTCGGCTATTGGTAATGCAGCAAAAAATGGT	180
ICESde3396	TTAGTGATCTCAACACCTGTTTCAATTGTTTCGGCTATTGGTAATGCAGCAAAAAATGGT	180
C53	TTAGTGATCTCAACACCTGTTTCAATTGTTTCGGCTATTGGTAATGCAGCAAAAAATGGT	180
pAH82	TTAGTGATCTCAACACCTGTTTCAATTGTTTCGGCTATTGGTAATGCAGCAAAAAATGGT	180
NU1	TTAGTGATCTCAACACCTGTTTCAATTGTTTCGGCTATTGGTAATGCAGCAAAAAATGGT	180

pGdh442	GTTTTAGTAAAAGGCGGAGTCTATCTGGAAGAAATTGGTCATTTGAGAGCAATTGCTTTC	240
ICESde3396	GTTTTAGTAAAAGGCGGAGTCTATCTGGAAGAAATTGGTCATTTGAGAGCAATTGCTTTC	240
C53	GTTTTAGTAAAAGGCGGAGTCTATCTGGAAGAAATTGGTCATTTGAGAGCAATTGCTTTC	240
pAH82	GTTTTAGTAAAAGGCGGAGTCTATCTGGAAGAAATTGGTCATTTGAGAGCAATTGCTTTC	240
NU1	GTTTTAGTAAAAGGCGGAGTCTATCTGGAAGAAATTGGTCATTTGAGAGCAATTGCTTTC	240

pGdh442	GATAAGACTGGAACCTTAACAAAAGGAAAGCCTGTCGTAACGGATTTTCATTGCAACCACT	300
ICESde3396	GATAAGACTGGAACCTTAACAAAAGGAAAGCCTGTCGTAACGGATTTTCATTGCAACCACT	300
C53	GATAAGACTGGAACCTTAACAAAAGGAAAGCCTGTCGTAACGGATTTTCATTGCAACCACT	300
pAH82	GATAAGACTGGAACCTTAACAAAAGGAAAGCCTGTCGTAACGGATTTTCATTGCAACCACT	300
NU1	GATAAGACTGGAACCTTAACAAAAGGAAAGCCTGTCGTAACGGATTTTCATTGCAACCACT	300

pGdh442	TCTGAAACTGATATAAATTATCTATCGATTATTTTCATCGTTGGAATCTCTTTCTCAACAC	360
ICESde3396	TCTGAAACTGATATAAATTATCTATCGATTATTTTCATCGTTGGAATCTCTTTCTCAACAC	360
C53	TCTGAAACTGATATAAATTATCTATCGATTATTTTCATCGTTGGAATCTCTTTCTCAACAC	360
pAH82	TCTGAAACTGATATAAATTATCTATCGATTATTTTCATCGTTGGAATCTCTTTCTCAACAC	360
NU1	TCTGAAACTGATATAAATTATCTATCGATTATTTTCATCGTTGGAATCTCTTTCTCAACAC	360

pGdh442	CCATTAGCTTCTGCTATTTTAAACGAAGCGGATAAACTAATGTGGATTACAAGTCAATA	420
ICESde3396	CCATTAGCTTCTGCTATTTTAAACGAAGCGGATAAACTAATGTGGATTACAAGTCAATA	420
C53	CCATTAGCTTCTGCTATTTTAAACGAAGCGGATAAACTAATGTGGATTACAAGTCAATA	420
pAH82	CCATTAGCTTCTGCTATTTTAAACGAAGCGGATAAACTAATGTGGATTACAAGTCAATA	420
NU1	CCATTAGCTTCTGCTATTTTAAACGAAGCGGATAAACTAATGTGGATTACAAGTCAATA	420

pGdh442	CAAATCGAGGATTTCCAATCTATCACAGGTAAGGACTTACAGGTATACATCAAAACATA	480
ICESde3396	CAAATCGAGGATTTCCAATCTATCACAGGTAAGGACTTACAGGTATACATCAAAACATA	480
C53	CAAATCGAGGATTTCCAATCTATCACAGGTAAGGACTTACAGGTATACATCAAAACATA	480
pAH82	CAAATCGAGGATTTCCAATCTATCACAGGTAAGGACTTACAGGTATACATCAAAACATA	480
NU1	CAAATCGAGGATTTCCAATCTATCACAGGTAAGGACTTACAGGTATACATCAAAACATA	480

pGdh442	CGTTACTATATTGGAAGCCCTAAACTGTTTTCTGCATCAGTAATCGAAGAAACAGCGGTC	540
ICESde3396	CGTTACTATATTGGAAGCCCTAAACTGTTTTCTGCATCAGTAATCGAAGAAACAGCGGTC	540
C53	CGTTACTATATTGGAAGCCCTAAACTGTTTTCTGCATCAGTAATCGAAGAAACAGCGGTC	540
pAH82	CGTTACTATATTGGAAGCCCTAAACTGTTTTCTGCATCAGTAATCGA-----	527
NU1	CGTTACTATATTGGAAGCCCTAAACTGTTTTCTGCATCAGTAATCGAAGAAACAGCGGTA	540

รูปที่ 13 แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *cadA* จาก
 แบคทีเรียแลคโตกรหัส C53 และ NU1 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อที่มีพลาสมิดที่ต้านทาน
 แคลเมียมในฐานข้อมูล GenBank * หมายถึงพลาสมิดทั้ง 5 ชนิดมีลำดับลำดับ นิวคลีโอ-ไทด์
 เหมือนกัน

ยีน *cadA* ที่พบในแบคทีเรียแลคติกในตารางที่ 2 จะมีขนาดเท่ากันคือ 2117 คู่เบส ถอดรหัสให้เอนไซม์ ATPase ชนิด P-type ทำหน้าที่ในการกำจัดแคดเมียมออกจากเซลล์ (cadmium efflux) จากการที่ยีน *cadA* มีความเหมือนกันสูง จึงเป็นไปได้ว่ายีน *cadA* ที่พบในเชื้อที่แยกได้จากการทดลองนี้น่าจะมีกลไกการทำงานในการต้านทานแคดเมียมคล้ายกับที่มีรายงานในเชื้ออื่น เช่นในเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *S. thermophilus* ที่พบว่ายีนต้านทานแคดเมียมจะประกอบด้วย operon ของยีน *cadA* และ *cadC* โดยโปรตีน CadC จากยีน *cadC* จะทำหน้าที่เป็นเป็นโปรตีนควบคุมในการแสดงออกของยีน *cadA* โดยจะจับกับโปรโมเตอร์/โอเปอเรเตอร์ของ *cad* operon แบบ negative regulation คือเมื่อจับแล้วจะทำให้ยีน *cadA* ไม่สามารถถอดรหัสได้ (transcriptional regulatory repressor) ซึ่งโปรตีน CadA จะมีหน้าที่ในการจับหรือกำจัดแคดเมียม โปรตีน CadC จะหลุดออกจากโปรโมเตอร์/โอเปอเรเตอร์ในสภาวะที่มีแคดเมียม เกิดการแสดงออกของยีน *cadA* ทำให้เชื้อสามารถต้านทานแคดเมียมได้ อย่างไรก็ตามกลไกในการต้านทานแคดเมียมพบว่าโปรตีน *cadA* เพียงชนิดเดียวก็พอเพียงในการทำงาน (Schirawski et al., 2002)

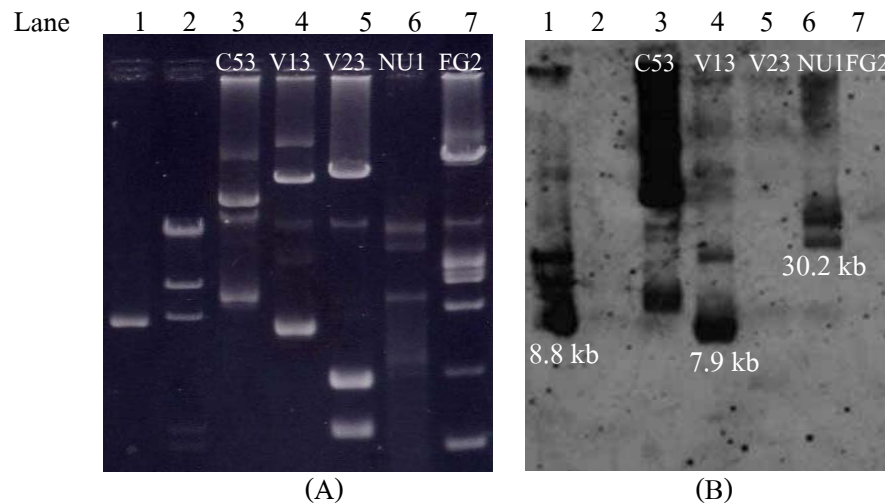
4.9 การทำ hybridization ของแบคทีเรียแลคติกที่สามารถต้านทานแคดเมียมได้

จากผลการทำ PCR เพื่อหาดำแหน่งของยีนควบคุมการต้านทานแคดเมียมพบว่าเชื้อรหัส NU1, V13, V18, V23 C53, และ 26 น่าจะมียีนคล้าย *cadA* อยู่บนพลาสมิดหรือโครโมโซม (ตารางที่ 2) เนื่องจากการทำ PCR ใช้พลาสมิดทั้งหมดที่สกัดได้ ซึ่งพบว่าแต่ละสายพันธุ์มีพลาสมิดมากกว่า 1 ชนิด ดังแสดงในรูปที่ 14 A ทำให้ไม่สามารถระบุขนาดของพลาสมิดที่มียีน *cadA* ได้ จึงใช้การทำ southern hybridization ในการหาชิ้นของพลาสมิดที่มียีน *cadA*

จากการทำ hybridization พบว่า เชื้อรหัส C53 ซึ่งมีพลาสมิด 4 ขนาด คือ 61.66 , 43.7 , 26.9 และ 16.6 กิโลเบส (รูปที่ 14 A แถวที่ 3) เกิดแถบดำบนแผ่นฟิล์มที่ตำแหน่งพลาสมิดขนาด 61.7 , 43.7 และ 16.6 กิโลเบส (รูปที่ 14 B แถวที่ 3) ส่วนเชื้อรหัส V13 ซึ่งมีขนาดพลาสมิดประมาณ 70.8 , 55.0 , 30.2 , 18.6 และ 7.9 กิโลเบส (รูปที่ 14 A แถวที่ 4) เกิดแถบดำบนแผ่นฟิล์มตำแหน่งพลาสมิดขนาด 7.9 กิโลเบส เพียงแถบเดียว (รูปที่ 14 B แถวที่ 4) และเชื้อรหัส NU1 เกิดแถบดำบนแผ่นฟิล์มที่พลาสมิดขนาด 30.2 กิโลเบส (รูปที่ 14 B แถวที่ 6) ส่วนเชื้อ V23 ไม่เกิดแถบดำบนแผ่นฟิล์ม (รูปที่ 14 B แถวที่ 5) แสดงว่าพลาสมิดที่ให้ผลบวกมียีนที่คล้ายกับยีน *cadA* ที่ใช้เป็นโพรบ ส่วนเชื้อที่ให้ผลลบแสดงว่ายีนที่ต้านทานแคดเมียมอาจอยู่บนโครโมโซม หรือถ้าอยู่บนพลาสมิดก็อาจมียีนที่แตกต่างกับยีน *cadA* ที่แยกได้จากเชื้อ *Lactococcus lactis* ส่วนเชื้อรหัส V23 ซึ่งตรวจพบผลผลิต PCR แต่ไม่พบแถบพลาสมิดที่ให้ผลบวกกับโพรบซึ่งต้องทำการตรวจสอบอีกครั้ง

จากการพบแถบพลาสมิดที่ให้ผลบวกมากกว่า 1 แถบ ในเชื้อชนิดเดียว อาจเป็นไปได้ว่าพลาสมิดที่เห็นหลายชิ้นอาจเป็นพลาสมิดเดียวกันแต่อาจมีรูปร่างไม่เหมือนกัน โดยพลาสมิดมีรูปร่างได้หลายแบบเช่น supercoil หรือ covalently closed circular DNA (CCC), open circular DNA (OC), linear, CCC dimer และ CCC trimer เป็นต้น ถึงแม้ว่าจะมีขนาดเท่ากัน แต่การที่พลาสมิดมีรูปร่างต่างกันทำให้การเคลื่อนที่บน agarose gel แตกต่างกัน โดยพลาสมิดรูปร่างแบบ supercoil จะเคลื่อนที่ได้เร็วที่สุดรองลงมาคือ linear, open circular DNA, CCC dimer และ CCC (Molloy et al., 2004)

Liu et al., (1995) ได้ศึกษา plasmid profile และตรวจสอบยีนที่ต้านทานแคดเมียมของเชื้อ *L. lactis* spp *lactis* M71 ซึ่งเชื้อมีพลาสมิดทั้งหมด 5 ขนาด อยู่ในช่วงตั้งแต่ 4.0 - 52.0 กิโลเบส จากการทำ transconjugation โดยใช้เชื้อ *L. lactis* subsp. *lactis* M71 เป็นตัวให้พลาสมิด และใช้เชื้อ *L. lactis* LMO230 เป็นตัวรับพลาสมิด พบว่าเชื้อ *L. lactis* LMO230 สามารถเจริญบนอาหาร M17G ที่มีแคดเมียมคลอไรด์ และพบ *L. lactis* LMO230 มีพลาสมิดขนาด 8.8 กิโลเบส แสดงให้เห็นว่าพลาสมิดขนาด 8.8 กิโลเบส มียีนที่ควบคุมการต้านทานแคดเมียมได้



รูปที่ 14 (A) Plasmid profile ของแบคทีเรียแลคติกที่ต้านทานแคดเมียม
(B) แสดงผลการทำ southern hybridization ของแบคทีเรียแลคติกที่ต้านทานแคดเมียมได้
แถวที่1: pND302, 2: Lamda *Hind* III, 3: C53, 4: V13, 5: V23, 6: NU1, 7: *Lactococcus lactis* FG2

สรุปผลการทดลอง

ทำการแยกแบคทีเรียแลคติกจากตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนื้อหมักและผักดอง สามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมด 176 ไอโซเลต และพบว่าเชื้อที่แยกส่วนมากจะมีพลาสมิดเป็นองค์ประกอบ โดยพบพลาสมิดขนาดเล็กตั้งแต่ประมาณ 2 -60 คู่เบส โดยมีจำนวนที่แตกต่างกันตั้งแต่ 1 - 12 พลาสมิด ในการพัฒนาเวกเตอร์ (vector) ชนิด food grade ได้ทำการคัดเลือกพลาสมิด pKM1 ซึ่งมีขนาดเล็ก จากเชื้อ *Lactobacillus plantarum* KM1 ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างแหนมมาศึกษา จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pKM1 พบว่ามีขนาดประมาณ 3.3 กิโลเบส โดยมีปริมาณเบส GC 39% จากการวิเคราะห์ลำดับเบสพบว่าพลาสมิด pKM1 ประกอบด้วย 2 open reading frame (ORF1 และ ORF2) ที่มีการแสดงออกในทิศทางเดียวกัน จากการทำ homology search พบว่า ORF1 ซึ่ง encode ให้โปรตีนที่มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับโปรตีน RepA (replication protein) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ควบคุมการจำลองตัวเองของพลาสมิดที่มีกลไกการจำลองตัวเองแบบ rolling circle ส่วน ORF2 ควบคุมการสร้างโปรตีนที่มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับโปรตีน Mob (mobilization protein) ทำหน้าที่ในการเคลื่อนย้ายพลาสมิดในขบวนการ conjugation (cojugative mobilization) พลาสมิด pKM1 เป็นพลาสมิดที่มีขนาดเล็ก แต่มีตำแหน่งที่ถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถนำมาใช้ในการตัดต่อยีนได้ อย่างไรก็ตามในพลาสมิดไม่พบยีนที่จะใช้เป็นยีนคัดเลือก (selection marker gene) จึงต้องมีการนำไปพัฒนาต่อก่อนที่จะนำไปใช้เป็นเวกเตอร์ชนิด food grade ได้ โดยการนำยีนต้านทานแคดเมียมซึ่งถือว่าเป็นยีนที่แยกจากแบคทีเรียแลคติกเช่นกันมาใช้เป็นยีนคัดเลือกโดยการตัดต่อลงไปในพลาสมิด pKM1

จากการทดสอบความสามารถในการต้านทานโลหะหนัก แคดเมียม (CdCl_2) คอปเปอร์ (CuSO_4) และนิกเกิล (NiSO_4) พบเชื้อที่สามารถต้านทานแคดเมียมได้น้อยเมื่อเปรียบเทียบกับที่ต้านทานคอปเปอร์และนิกเกิล ในการคัดเลือกเชื้อที่มียีนต้านทานโลหะหนักทั้ง 3 ชนิด บนพลาสมิด โดยการใช้เทคนิค plasmid curing ด้วยสาร novobiocin ร่วมกับการใช้อุณหภูมิสูง พบว่าเชื้อสูญเสียพลาสมิดได้บางขนาดเท่านั้น และไม่สามารถแยกพลาสมิดที่ต้านทานโลหะหนักโดยวิธีนี้ได้ จึงได้ศึกษายีนต้านทานโลหะหนักโดยเทคนิค PCR โดยเลือกศึกษายีนต้านทานแคดเมียม พบเชื้อมียีนคล้ายยีน *cadA* โดยบางสายพันธุ์พบยีนบนโครโมโซมและบางสายพันธุ์พบบนพลาสมิด โดยให้ผลผลิต PCR ขนาด 600 คู่เบส จากการทำ homology search กับยีนบนฐานข้อมูลของ genBank พบว่าเชื้อรหัส NU1 และ C53 มีลำดับเบสคล้ายกันและคล้ายกับยีน *cadA* จากแบคทีเรียแลคติกบางสายพันธุ์ การศึกษาชนิดของพลาสมิดที่มียีนต้านทานแคดเมียมโดยการทำให้ southern hybridization โดยใช้ยีน *cadA* และ *cadC* จากพลาสมิด pND302 พบแถบพลาสมิดที่ให้ผลบวก แสดงว่ามียีนคล้าย *cadA* หรือ *cadC* อยู่บนพลาสมิดที่แยกได้จากตัวอย่างอาหาร ซึ่งสามารถแยกพลาสมิดมาศึกษา เพื่อนำยีนที่ควบคุมการต้านทานแคดเมียมมาใช้เป็นยีนคัดเลือก (selection marker gene) ชนิด food grade ต่อไป โดยการโคลนชั้นยีนลงในพลาสมิด pKM1 ที่ศึกษาไว้ในส่วนแรก

เอกสารอ้างอิง

ปิ่นมณี ขวัญเมือง และวิเชียร สีลาวัชรมาศ . 2546 . การจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากตัวอย่างหมกของไทย . การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 41 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ . 3 - 7 กุมภาพันธ์ 2546 . มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ

วิเชียร สีลาวัชรมาศ 2534. อาหารจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียในประเทศไทย. โปรซีดดิ้งส์แลคติกแอซิดแบคทีเรียในอุตสาหกรรมอาหารไทย ครั้งที่ 1 28 – 29 ตุลาคม 2534. หน้า 8 – 20

วิเชียร สีลาวัชรมาศ 2537. พลาสมิดของแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากอาหารหมักดองของไทย. โปรซีดดิ้งส์แลคติกแอซิดแบคทีเรียในอุตสาหกรรมอาหารไทย ครั้งที่ 2. 27 – 29 ตุลาคม 2537. หน้า 24 – 43

วิวัฒน์ แดงสุภา, 2534. งานวิจัยและพัฒนาแบคทีเรียแลคติกในประเทศไทย. โปรซีดดิ้งส์แลคติกแอซิดแบคทีเรียในอุตสาหกรรมอาหารไทย ครั้งที่ 1. 28 – 29 ตุลาคม 2534. หน้า 81 – 87

วีรชาติ ศรีอักษรินทร์, ศักดิ์ธีรพี เกษมถาวรศิลป์ และ รัชต โชคชัยชาลิต, 2544, " การศึกษาความสามารถในการต้านทานโลหะหนักของแบคทีเรียแลคติก", วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, กรุงเทพฯ.

Akcelik, M., 2001, "Identification of a Lactose Utilization and Copper Resistance Plasmid in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MCL64", **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences** Vol. 25, pp. 783-787.

Alegre, M.T., Rodriguez, M.C. and Juan, M.M., 2009, "Characterization of pRS5: A Theta-Type Plasmid Found in a Strain of *Pediococcus pentosaceus* Isolated from Wine That Can Be Used to Generate Cloning Vectors for Lactic Acid Bacteria", **Plasmid**, Vol. 61, No. 2, pp. 130-134.

Alegre, M.T., Rodríguez, M.C. and Mesas, J.M., 2005, "Nucleotide Sequence, Structural Organization and Host Range of pRS4, a Small Cryptic *Pediococcus pentosaceus* Plasmid That Contains Two Cassettes Commonly Found in Other Lactic Acid Bacteria", **FEMS Microbiology Letters**, Vol. 250, No. 1, pp. 151-156.

Alpert, C.-A., Crutz-Le Coq, A.-M., Malleret, C. and Zagorec, M., 2003, "Characterization of a Theta-Type Plasmid from *Lactobacillus sakei*: A Potential Basis for Low-Copy-Number Vectors in Lactobacilli", **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 69, No. 9, pp. 5574-5584.

Anderson, D.G. and McKay, L.L., 1983, "Simple and Rapid Method for Isolating Large Plasmid DNA from Lactic Streptococci", **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 46, No. 3, pp. 549-552.

Axelsson, L.T., 1993, "**Lactic Acid Bacteria : Classification and Physiology**". In Lactic Acid Bacteria,, Marcel Dekker, New York,

Cazorla, F.M., Arrebola, E., Sesma, A., Pérez-García, A., Codina, J.C., Murillo, J. and de Vicente, A., 2002, "Copper Resistance in *Pseudomonas syringae* Strains Isolated from Mango is Encoded Mainly by Plasmids", **Bacteriology**, Vol. 92, No. 8, pp. 909-916.

Balla, E., Dicks, L.M.T., Du Toit, M., Van Der Merwe, M.J. and Holzapfel, W.H., 2000, "Characterization and Cloning of the Genes Encoding Enterocin 1071A and Enterocin 1071B, Two Antimicrobial Peptides Produced by *Enterococcus faecalis* BFE 1071", **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 66, No. 4, pp. 1298-1304.

Biet, F., Cenatiempo, Y. and Fremaux, C., 1999, Characterization of pFR18, a Small Cryptic Plasmid from *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* FR52, and Its Use as a Food Grade Vector", **FEMS Microbiology Letters**, Vol. 179, pp. 375-383.

Biet, F., Cenatiempo, Y. and Fremaux, C., 2002, "Identification of a Replicon from pTXL1, a Small Cryptic Plasmid from *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* Y110, and Development of a Food-Grade Vector", **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 68, No. 12, pp. 6451-6456.

Boucher, I., Parrot, M., Gaudreau, H., Champagne, C.P., Vadeboncoeur, C. and Moineau, S., 2002, "Novel Food-Grade Plasmid Vector Based on Melibiose Fermentation for the Genetic Engineering of *Lactococcus lactis*", **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 68, No. 12, pp. 6152-6161.

Chen, Y.-Y.M., Feng, C.W., Chiu, C.F. and Burne, R.A., 2008, "CadDX Operon of *Streptococcus salivarius* 57", **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 74, No. 5, pp. 1642-1645. .

Davies, M.R., Shera, J., Van Domselaar, G.H., Sriprakash, K.S. and McMillan, D.J., 2009, "A Novel Integrative Conjugative Element Mediates Genetic Transfer from Group G Streptococcus to Other {Beta}-Hemolytic Streptococci", **Journal Bacteriology**, Vol. 191, No. 7, pp. 2257-2265.

de Vos, W.M. and Simon, G.M.F., 1994, **Gene Cloning and Expression Systems in Lactococci**. P. 53-105. In Gasson M.J. and de Vos W.M. (eds), **Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria**., Vol. Chapman and Hall Blackie Academic and Professional, Glasgow.

Drisko, J.A., Giles, C.K. and Bischoff, B.J., 2003, "Probiotics in Health Maintenance and Disease Prevention", **Alternative Medicine Review**, Vol. 8, No. 2, pp. 143-155.

Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G.C., Shanahan, F. and Collins, J.K., 2001, "In Vitro Selection Criteria for Probiotic Bacteria of Human Origin: Correlation with in Vivo Findings", **American Journal of Clinical Nutrition**, Vol. 73, No. 2, pp. 386S-392.

Emond, E., Lavallee, R., Drolet, G., Moineau, S. and LaPointe, G., 2001, "Molecular Characterization of a Theta Replication Plasmid and Its Use for Development of a Two-Component Food-Grade Cloning System for *Lactococcus lactis*", **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 67, No. 4, pp. 1700-1709.

Forde, A., Daly, C. and Fitzgerald, G.F., 1999, "Identification of Four Phage Resistance Plasmids from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* HO2", **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 65, No. 4, pp. 1540-1547.

Francia, M.V., Varsaki, A., Garcillan-Barcia, M.P., Latorre, A., Drainas, C. and de la Cruz, F., 2004, "A Classification Scheme for Mobilization Regions of Bacterial Plasmids", **FEMS Microbiology Reviews**, Vol. 28, No. 1, pp. 79-100.

Froseth, B.R. and McKay, L.L., 1991, "Molecular Characterization of the Nisin Resistance Region of *Lactococcus Lactis* Subsp. *Lactis* biovar diacetylactis DRC3.", **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 57, pp. 804-811.

Gosalbes, M.J., Esteban, C.D., Galan, J.L. and Perez-Martinez, G., 2000, "Integrative Food-Grade Expression System Based on the Lactose Regulon of *Lactobacillus Casei*", **Applied and Environmental Microbiology** Vol. 66, pp. 4822-4828.

Grass, G., Grobe, C. and Nies, D.H., 2000, "Regulation of the *cnr* Cobalt and Nickel Resistance Determinant from *Ralstonia* sp. strain CH34", **Journal of Bacteriology**, Vol. 182, No. 5, pp. 1390-1398. .

- Josson, K., Soetaert, P., Michiels, F., Joos, H. and Mahillon, J., 1990, "*Lactobacillus hilgardii* Plasmid pLAB1000 Consists of Two Functional Cassettes Commonly Found in Other Gram-Positive Organisms.", **Journal Bacteriology**, Vol. 172, No. 6, pp. 3089-3099.
- Khan, S., 1997, "Rolling-Circle Replication of Bacterial Plasmids", **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Vol. 61, No. 4, pp. 442-455.
- Kok, J., 1990, "Genetics of the Proteolytic System of Lactic Acid Bacteria", **FEMS Microbiology Letters**, Vol. 87, No. 1-2, pp. 15-41.
- Konings, W.N., Kok, J., Kuipers, O.P. and Poolman, B., 2000, "Lactic Acid Bacteria: The Bugs of the New Millennium", **Current Opinion in Microbiology**, Vol. 3, No. 3, pp. 276-282.
- Labrie, S., Bart, C., Vadeboncoeur, C. and Moineau, S., 2005, "Use of an [Alpha]-Galactosidase Gene as a Food-Grade Selection Marker for *Streptococcus thermophilus*", **Journal of Dairy Science**, Vol. 88, No. 7, pp. 2341-2347.
- Lane, D.J., 1991, "16s/23s rRNA Sequencing", In: **Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., Ed. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. New York, Wiley**, Vol., pp. 115-175.
- Lebrun, M., Audurier, A. and Cossart, P., 1994, "Plasmid-Borne Cadmium Resistance Genes in *Listeria monocytogenes* are Similar to *cadA* and *cadC* of *Staphylococcus aureus* and are Induced by Cadmium", **Journal of Bacteriology**, Vol. 176, No. 10, pp. 3040-3048.
- Leelawatcharamas, V., Chia, L.G., Charoenchai, P., Kunajakr, N., Liu, C.-Q. and Dunn, N.W., 1997, "Plasmid-Encoded Copper Resistance in *Lactococcus lactis*", **Biotechnology Letters**, Vol. 19, No. 7, pp. 639-643.
- 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**, Vol. 5, No. 3, pp. 51-53.
- Liesegang, H., Lemke, K., Siddiqui, R.A. and Schlegel, H.G., 1993, "Characterization of the Inducible Nickel and Cobalt Resistance Determinant *cnr* from pMOL28 of *Alcaligenes eutrophus* CH34", **Journal of Bacteriology**, Vol. 175, No. 3, pp. 767-778.
- Liu, C.-Q., Charoechai, P., Khunajakr, N., Deng, Y.-M., Widodo and Dunn, N.W., 2002, "Genetic and Transcriptional Analysis of a Novel Plasmid-Encoded Copper Resistance Operon from *Lactococcus lactis*", **Gene**, Vol. 297, No. 1-2, pp. 241-247.

Liu, C.-Q., Khunajakr, N., Chia, L.G., Deng, Y.-M., Charoenchai, P. and Dunn, N.W., 1997, "Genetic Analysis of Regions Involved in Replication and Cadmium Resistance of the Plasmid pND 302 From *Lactococcus lactis*", **Plasmid**, Vol. 38, No. 2, pp. 79-90.

Liu, C.-Q., Leelawatcharamas, V., Harvey, M.L. and Dunn, N.W., 1996, "Cloning Vectors for Lactococci Based on a Plasmid Encoding Resistance to Cadmium", **Current Microbiology**, Vol. 33, No. 1, pp. 35-39.

Mathurasa, L., 1997, "Study of Resistance Plasmid in Lactic Acid Bacteria Isolated from Fermented Vegetables and Fruits", **Ph.D. Thesis, Bangkok : Kasetsart University**.

Molloy, M.J., Hall, V.S., Bailey, S.I., Griffin, K.J., Faulkner, J. and Uden, M., 2004, "Effective and Robust Plasmid Topology Analysis and the Subsequent Characterization of the Plasmid Isoforms Thereby Observe", **Nucleic Acids Research**, Vol. 32, No. 16, p. e129.

Morishima, H. and Oka, H.-I., 1980, "The Impact of Copper Pollution on Water Foxtail (*Alopecurus Aequalis* Sobol.) Populations and Winter Weed Communities in Rice Fields", **Agro-Ecosystems**, Vol. 6, No. 1, pp. 33-49.

Nucifora, G., Chu, L., Misra, T.K. and Silver, S., 1989, "Cadmium Resistance from *Staphylococcus aureus* Plasmid p1258 *cadA* Gene Results from a Cadmium-Efflux ATPase ", **Proceeding National. Academic. Science. USA**, Vol. 86, pp. 3544-3548.

O' Sullivan, D., Ross, R.P., Twomey, D.P., Fitzgerald, G.F., Hill, C. and Coffey, A., 2001, "Naturally Occurring Lactococcal Plasmid Pah90 Links Bacteriophage Resistance and Mobility Functions to a Food-Grade Selectable Marker", **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 67, No. 2, pp. 929-937.

O'Driscoll, J., Glynn, F., Fitzgerald, G.F. and Sinderen, D.v., 2006, "Sequence Analysis of the Lactococcal Plasmid pNP40: A Mobile Replicon for Coping with Environmental Hazards", **Journal of Bacteriology**, Vol. 188, No. 18, pp. 6629-6639.

O'Keeffe, T., Hill, C. and Ross, R.P., 1999, "Characterization and Heterologous Expression of the Genes Encoding Enterocin a Production, Immunity, and Regulation in *Enterococcus faecium* DPC1146", **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 65, No. 4, pp. 1506-1515.

Park, M.S., Shin, D.W., Lee, K.H. and Ji, G.E., 1999, "Sequence Analysis of Plasmid pKJ 50 from *Bifidobacterium longum*", **Microbiology**, Vol. 145, No. 3, pp. 585-592.

Pidoux, M., Marshall, V.M., Zaroni, P. and Brooker, B., 1990, "Lactobacilli Isolated from Sugary Kefir Grains Capable of Polysaccharide Production and Minicell Formation", **Journal of Applied Microbiology**, Vol. 69, No. 3, pp. 311-320.

Ricci, G., Borgo, F. and Fortina, M.G., 2006, "Plasmids from *Lactobacillus helveticus*: Distribution and Diversity among Natural Isolates", **Letters in Applied Microbiology**, Vol. 42, No. 3, pp. 254-258.

Ruiz-Barba, J.L., Piard, J.C. and Jimnez-Daz, R., 1991, "Plasmid Profiles and Curing of Plasmids in *Lactobacillus plantarum* Strains Isolated from Green Olive Fermentations", **Journal of Applied Microbiology**, Vol. 71, No. 5, pp. 417-421.

Sambrook, J. and Russell, D.W., 2001, **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Serror, P., Sasaki, T., Ehrlich, S.D. and Maguin, E., 2002, "Electrotransformation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis* with Various Plasmids", **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 68, No. 1, pp. 46-52.

Schirawski, J., Hagens, W., Fitzgerald, G.F. and van Sinderen, D., 2002, "Molecular Characterization of Cadmium Resistance in *Streptococcus thermophilus* Strain 4134: An Example of Lateral Gene Transfer", **Applied and Environmental Microbiology** Vol. 68, No. 11, pp. 5508-5516.

Schmidt, T. and Schlegel, H.G., 1994, "Combined Nickel-Cobalt-Cadmium Resistance Encoded by the *ncc* Locus of *Alcaligenes xylosoxidans* 31A", **Journal of Bacteriology**, Vol. 176, No. 22, pp. 7045-7054.

Schmidt, T., Stoppel, R.D. and Schlegel, H.G., 1991, "High-Level Nickel Resistance in *Alcaligenes xylosoxydans* 31A and *Alcaligenes eutrophus* KTO2", **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 57, No. 11, pp. 3301-3309.

Sewaki, T., Hirai, T., Sasaki, S. and Miyamoto, T., 2001, "Plasmid DNA Profiles in Strains of Lactococcus, Streptococcus, Enterococcus, Leuconostoc, Pediococcus and Lactobacillus", **Animal Science Journal**, Vol. 72, pp. 245-252.

Silver, S. and Phung, L.T., 1996, "Bacterial Heavy Metal Resistance : New Surprises", **Annual Review of Microbiology**, Vol. 50, No. 1, pp. 753-789.

Taghavi, S., Delanghe, H., Lodewyckx, C., Mergeay, M. and van der Lelie, D., 2001, "Nickel-Resistance-Based Minitransposons: New Tools for Genetic Manipulation of Environmental Bacteria", **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 67, No. 2, pp. 1015-1019.

Tanasupawat, S. and Daengsubha, W., 1983, "Pediococcus Species and Related Bacteria Found in Fermented Foods and Related Materials in Thailand", **Journal of General and Applied Microbiology**, Vol. 29, No. 6, pp. 487-506.

Tannock, G.W., Fuller, R. and Pedersen, K., 1990, "Lactobacillus Succession in the Piglet Digestive Tract Demonstrated by Plasmid Profiling ", **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 56, No., pp. 1310 - 1316.

Tanous, C., Chambellon, E. and Yvon, M., 2007, "Sequence Analysis of the Mobilizable Lactococcal Plasmid pGDH442 Encoding Glutamate Dehydrogenase Activity", **Microbiology**, Vol. 153, No. 5, pp. 1664-1675.

Trotter, M., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F. and Coffey, A., 2002, "*Lactococcus lactis* DPC5598, a Plasmid-Free Derivative of a Commercial Starter, Provides a Valuable Alternative Host for Culture Improvement Studies", **Journal of Applied Microbiology**, Vol. 93, No. 1, pp. 134-143.

van Kranenburg, R., Golic, N., Bongers, R., Leer, R.J., de Vos, W.M., Siezen, R.J. and Kleerebezem, M., 2005, "Functional Analysis of Three Plasmids from *Lactobacillus plantarum*", **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 71, No. 3, pp. 1223-1230.

Vaughan, E.E., David, S., Harrington, A., Daly, C., Fitzgerald, G.F. and de Vos, W.M., 1995, "Characterization of Plasmid-Encoded Citrate Permease (Citp) Genes from *Leuconostoc* Species Reveals High Sequence Conservation with the *Lactococcus lactis* Citp Gene", **Applied and Environmental Microbiology** Vol. 61, No. 8, pp. 3172-3176

von Wright, A. and Raty, K., 1993, "The Nucleotide Sequence for the Replication Region of pSV40, a Lactococcal Food Grade Cloning Vector", **Letters in Applied Microbiology**, Vol. 17, pp. 25-28.

Wada, T., Noda, M., Kashiwabara, F., Jeon, H.J., Shirakawa, A., Yabu, H., Matoba, Y., Kumagai, T. and Sugiyama, M., 2009, "Characterization of Four Plasmids Harboured in a

Lactobacillus brevis Strain Encoding a Novel Bacteriocin, Brevicin 925A, and Construction of a Shuttle Vector for Lactic Acid Bacteria and *Escherichia coli*", **Microbiology**, Vol. 155, No. 5, pp. 1726-1737.

Walling, E., Gindreau, E. and Lonvaud-Funel, A., 2005, "A Putative Glucan Synthase Gene dps Detected in Exopolysaccharide-Producing *Pediococcus damnosus* and *Oenococcus Oeni* Strains Isolated from Wine and Cider", **International Journal of Food Microbiology**, Vol. 98, No. 1, pp. 53-62.

Wong, W.Y., Su, P., Allison, G.E., Liu, C.-Q. and Dunn, N.W., 2003, "A Potential Food-Grade Cloning Vector for *Streptococcus thermophilus* That Uses Cadmium Resistance as the Selectable Marker, **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 69, No. 10, pp. 5767-5771.

Yin, S., Hao, Y., Zhai, Z., Li, R., Huang, Y., Tian, H. and Luo, Y., 2008, Characterization of a Cryptic Plasmid pM4 from *Lactobacillus plantarum* M4. **FEMS Microbiology Letters** Vol. 285, No.2, pp. 183-187.

Zechiedrich, E.L., Khodursky, A.B. and Cozzarelli, N.R., 1997, "Topoisomerase IV, Not Gyrase, Decatenates Products of Site-Specific Recombination in *Escherichia Coli* ", **Gene Development**, Vol. 11, No., pp. 2580-2592.

Xanthopoulos, V., Hatzikamari, M., Adamidis, T., Tsakalidou, E., Tzanetakis, N. and Litopoulou-Tzanetaki, E., 2000, "Heterogeneity of *Lactobacillus plantarum* Isolates from Feta Cheese Throughout Ripening", **Journal of Applied Microbiology**, Vol. 88, No. 6, pp. 1056-1064.

Yamamoto, N. and Takano, T., 1996, "Isolation and Characterization of a Plasmid from *Lactobacillus helveticus* CP53", **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Vol. 60, pp. 2069 - 2070.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกอ. และ สกว.

กำลังดำเนินการเพื่อนำเสนอผลงานวิจัย โดยจะแจ้งให้ทาง สกอ. และ สกว. ทราบอีกครั้ง