บทที่ 1

บทนำ

แบคทีเรียแลคติก (Lactic Acid Bacteria) จัดเป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในอาหารหมักหลายชนิด ทั้งที่เป็นอุตสาหกรรมขนาดใหญ่เช่น ผลิตภัณฑ์นมหมัก ได้แก่ โยเกิร์ต นมเปรี้ยว เนย และเนยแข็งเป็นต้น ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเนื้อหมักเช่น แหนมและไส้กรอก ผลิตภัณฑ์จากผักและผลไม้ดองเป็นต้น 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 การสร้างสารพวกเอกโซโพลีแซคคาไรด์ (exopolysaccharide) เป็นต้น (Konings et al., 2000) ลักษณะต่างๆเหล่านี้มีรายงานว่าถูกควบคุมบนยีนที่อยู่ทั้งบนโครโมโซมและบนพลาสมิด พลาสมิดจะมียีนที่ทำหน้าที่ควบคุมลักษณะที่สำคัญ เนื่องจากพลาสมิดมีขนาดเล็กเมื่อเปรียบเทียบกับโครโมโซม การพบยีนที่ควบคุมอยู่บนพลาสมิดจึงมีข้อดีคือทำให้การหาตำแหน่ง การแยก การวิเคราะห์ และศึกษากลไกการควบคุมหรือการแสดงออกของยีนเหล่านั้นได้ง่าย นอกจากนี้ พลาสมิดยังสามารถแยกหรือถ่ายโอนไปให้เซลล์เจ้าบ้านอื่นๆได้โดยยังทำหน้าที่ได้ตามปกติ แบคทีเรียบางสายพันธุ์ไม่มีพลาสมิดแต่บางสายพันธุ์มีพลาสมิดที่มีจำนวนและขนาดที่ แตกต่างกัน (plasmid profile) โดยจะมีความจำเพาะกับเซลล์เจ้าบ้าน และสามารถนำไปใช้ในการจัดจำแนกเชื้อได้ในระดับหนึ่ง (Sewaki et al., 2001) ดังนั้นการเก็บข้อมูลจำนวนและขนาดของพลาสมิดแต่ละสายพันธุ์จึงนับว่ามีประโยชน์ในการอ้างอิงชนิดของเชื้อได้ ในประเทศไทยได้มีการศึกษาชนิดและขนาดของพลาสมิดจากแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักบางชนิด อย่างไรก็ตามยังไม่มีการวิเคราะห์ลำดับเบสหรือยีนที่อยู่บนพลาสมิดเหล่านั้นเพื่อนำมาใช้ประโยชน์มากนัก เนื่องจากแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักบางสายพันธุ์มีพลาสมิดอยู่จำนวนมากและเป็นพลาสมิดที่ยังไม่รู้หน้าที่ซึ่งเรียกว่า cryptic plasmid การศึกษาทางด้านพันธุกรรมของพลาสมิดอาจค้นพบยีนใหม่ๆที่มีความสำคัญที่จะสามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้

นอกจากจะเป็นแหล่งของยีนที่ควบคุมลักษณะต่างๆแล้ว พลาสมิดยังถือเป็นเครื่องมือสำคัญที่ใช้ในการศึกษาคุณสมบัติและกลไกการควบคุมการแสดงออกของยีน รวมทั้งการปรับปรุงลักษณะทาง

พันธุกรรมของแบคทีเรียแลคติก โดยสามารถนำพลาสมิดมาพัฒนาเป็นเวคเตอร์ (vector) ทั้งแบบ cloning vector และ expression vector สำหรับแบคทีเรียแลคติกที่จำเพาะของแต่ละสายพันธุ์ เนื่องจากความหลากหลายทางพันธุกรรมของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ จึงยังมีความจำเป็นที่จะต้องพัฒนาเวคเตอร์ทั้งที่เป็น cloning และ expression vector สำหรับเชื้อที่จำเพาะ ปัจจุบันมีการศึกษาการสร้างเวคเตอร์ที่มีความปลอดภัย (food grade vector) (Konings et al., 2000) แต่การใช้งานยังอยู่ในวงจำกัดเนื่องจากมีข้อจำกัดที่พลาสมิดมีความจำเพาะกับเซลล์เจ้าบ้าน และที่สำคัญคือเชื้อที่ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์มักจะมีพลาสมิดอยู่แล้ว (indigenous plasmids) ซึ่งอาจมีจำนวนตั้งแต่ 1 ถึงหลายพลาสมิด พลาสมิดเหล่านี้สามารถอยู่ร่วมกันได้โดยไม่มีการสูญหายในสภาวะการเลี้ยงเชื้อปกติเนื่องจากกลไกการจำลองตัวที่เฉพาะกับเซลล์เจ้าบ้าน การนำพลาสมิดจากภายนอกใส่เข้าไปอาจเกิดการไม่ยอมรับและเกิดการสูญหายของพลาสมิดที่ใส่เข้าไปได้ ดังนั้นการสร้างเวคเตอร์สำหรับเชื้อที่ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์จึงควรนำพลาสมิดที่มีอยู่แล้วในเชื้อนั้นๆมาเป็นต้นแบบเพื่อใช้ในการสร้างเวคเตอร์ที่ใช้ในการศึกษาหน้าที่ของยีนต่างๆ

ในการสร้างเวคเตอร์ที่มีความปลอดภัย 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 อื่นๆที่แยกได้จากแบคทีเรียแลคติกจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะนำมาทดแทนยีนที่ต้านทานยาปฏิชีวนะได้ (Emond et al., 2001; Labrie et al., 2005)

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

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษา plasmid profile ของเชื้อ *Lactobacillus* sp. ที่มีบทบาทสำคัญในอาหารหมักของไทยเช่นแหนมและผักดอง เพื่อเป็นการเก็บข้อมูลทางพันธุกรรมของเชื้อ
2. ศึกษาการแยกพลาสมิดและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดที่มีความคงตัวสูงและทำการวิเคราะห์โครงสร้างหรือยีนที่เป็นองค์ประกอบของพลาสมิด เพื่อสร้างแผนที่ของ พลาสมิด รวมทั้งการศึกษากลไกการจำลองตัว เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาพลาสมิดอื่นๆ ต่อไป
3. เพื่อที่จะนำพลาสมิดนี้มาใช้เป็นต้นแบบในการสร้างเวคเตอร์ (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