บทที่ 2

การทบทวนเอกสาร

แบคทีเรียแลคติกจัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส มีรูปร่างแบบกลม และแบบแท่ง มีบทบาทสำคัญในอาหารหมักหลายชนิด ประเทศไทยจัดเป็นประเทศที่มีผลิตภัณฑ์ที่ได้จากแบคทีเรียแลคติกจำนวนมาก ที่สำคัญคือผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากเนื้อ ผัก และผลไม้ แบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในอาหารหมักเหล่านี้เช่น *Lactobacillus plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. fermentum*, *L b. 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 ไส้กรอก เปรี้ยว ปลาร้า ปลาเจ่า ปลาส้ม และในกลุ่มผักดองเช่น กระหล่ำปลีดอง ผักกาดดอง หน่อไม้ดอง เป็นต้น โดยจะทำงานร่วมกับแบคทีเรียแลคติกกลุ่มอื่นๆขึ้นกับชนิดของผลิตภัณฑ์ (วิวัฒน์, 2534) นอกจากนี้ยังถูกนำมาใช้เป็นเชื้อเป็นเชื้อโปรไบโอติก ทั้งในคนและสัตว์ (Dunne et al., 2001)

นอกจากแบคทีเรียแลคติกจะมีสารพันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะที่สำคัญต่างๆอยู่บนโครโมโซมแล้ว ยังมี ดีเอนเอ ที่อยู่นอกโครโมโซมที่เรียกว่าพลาสมิด โดยในแต่ละสายพันธุ์จะมีพลาสมิดได้ตั้งแต่ 1 – 16 พลาสมิดและมีขนาดได้ตั้งแต่ 1 – 120 กิโลเบส (Xanthopoulos et al., 2000; วิเชียร, 2537) ขึ้นกับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย พลาสมิดที่พบส่วนใหญ่เป็นพลาสมิดที่ไม่ทราบคุณสมบัติที่เรียกว่าcryptic plasmid ส่วนพลาสมิดที่ทราบคุณสมบัติจะทำหน้าที่ควบคุมลักษณะสำคัญที่มีบทบาทในการหมัก เช่น การผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน (Kok, 1990) การใช้ซิเตรต (Vaughan et al., 1995) การใช้น้ำตาลซูโครสและแลคโตส (Axelson, 1993) การผลิตแบคเทอริโอซิน (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 ดังนั้นในการศึกษาจำเป็นต้องสร้างเวคเตอร์ที่เหมาะกับสายพันธุ์ที่ใช้ ซึ่งสามารถทำได้โดยการใช้พลาสมิดที่เชื้อนั้นๆมีอยู่แล้ว (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 และเมื่อทดลองนำมาพัฒนาเป็นเวคเตอร์ที่ใช้ในการโคลนยีนในเชื้อ *Leu. mesenteroides* subsp. *dextranicum* DSM20484 พบว่าเวคเตอร์ที่ใช้ไม่เสถียรและเกิดการสูญหายของพลาสมิดหลังจากเลี้ยงไป 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 และได้ทดลองนำมาพัฒนาเป็นเวคเตอร์ที่ปลอดภัยในการโคลนยีนที่สร้างแบคเทอริโอซินในเชื้อ *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 และทดลองนำมาพัฒนาเป็นเวคเตอร์ชนิด 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 อย่างไรก็ตามเมื่อนำมาพัฒนาเป็นเวคเตอร์แล้วจำนวนชุดของพลาสมิดจะมีน้อยลง (low copy number)

ในการพัฒนาการสร้างเวคเตอร์ที่ปลอดภัย 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 โดยใช้ ยีน *lacF* ที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ที่ใช้น้ำตาลแลคโตสสำหรับเชื้อ *Lactococcus lactis* แต่มีข้อจำกัดที่ต้องใช้กับเชื้อกลายพันธุ์ชนิดที่ไม่มียีน *lacF* อยู่บนโครโมโซม (de Vos and Simon, 1994) นอกจากนี้ยังมีเวคเตอร์ 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)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 22 มิ.ย. 2555
เลขทะเบียน 246164
เลขเรียกหนังสือ