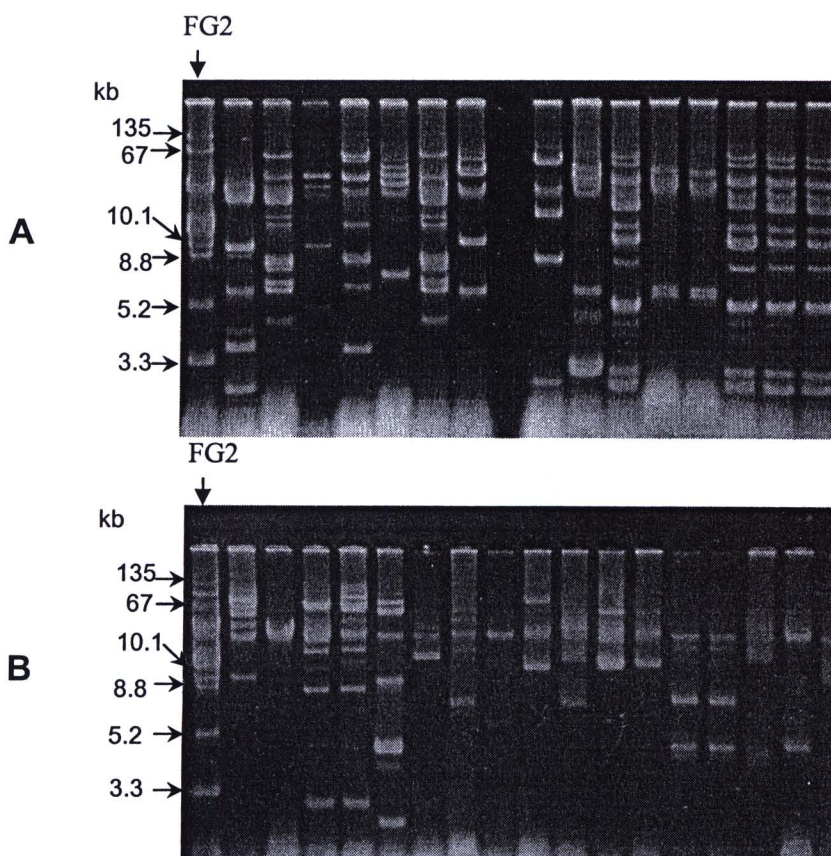


บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การแยกแบคทีเรียแลคติกและการศึกษารูปแบบของพลาสมิดของเชื้อ

จากการแยกแบคทีเรียแลคติกจากตัวอย่างอาหาร สามารถแยกเชื้อในกลุ่ม *Lactobacillus* ได้ทั้งหมด 174 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียรูปแท่ง ดิจีสแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์และเอนไซม์อะมิลเลส จากการศึกษารูปแบบพลาสมิดพบว่าแบคทีเรียแลคติกส่วนมากจะมีพลาสมิดเป็นองค์ประกอบ โดยเชื้อที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ประเภทเนื้อหมักจะมีพลาสมิดเป็นองค์ประกอบ 4 – 12 พลาสมิด มีขนาดตั้งแต่ 2 – 60 กิโลเบส (รูปที่ 1A) ในทางกลับกันเชื้อที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ประเภทผักดองจะมีจำนวนพลาสมิดน้อยกว่าคือ 1 – 6 พลาสมิด (รูปที่ 1B) ซึ่งเหตุผลน่าจะมาจากผลิตภัณฑ์ประเภทเนื้อหมักจะมีสารอาหารมากกว่าในพวกผัก เช่นเดียวกับการแยกแบคทีเรียแลคติกจากหย้าหมักพบว่าจะมีจำนวนพลาสมิดน้อยมากและมีขนาดใหญ่ 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 ซึ่งพลาสมิดเหล่านี้น่าจะเป็นแหล่งของยีนที่มีหน้าที่สำคัญในทางเทคโนโลยีชีวภาพ 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 ดังนั้นการศึกษาคูณสมบัติของพลาสมิดเหล่านี้จึงน่าจะสามารถนำยีนที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึมของเชื้อในกลุ่ม Lactobacilli มาใช้ประโยชน์ในการพัฒนาหรือปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อ นอกจากนี้พลาสมิดขนาดเล็กยังสามารถนำมาดัดแปลงและใช้เป็นเวกเตอร์ที่มีความปลอดภัยที่สามารถนำมาใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อ *Lactobacillus* sp. เนื่องจากเป็นเวกเตอร์ที่ได้มาจากเชื้อที่พบอยู่ในอาหาร (food grade vector)

ในการสร้างเวกเตอร์เพื่อใช้กับเชื้อ *Lactobacillus* ได้ทำการคัดเลือกเชื้อที่มีพลาสมิดขนาดเล็ก 2 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อรหัส KM1 แยกได้จากแหนมและ SV12 แยกได้จากหญ้าหมัก ซึ่งมีพลาสมิดขนาดเล็กประมาณ 3 กิโลเบส เป็นองค์ประกอบ พลาสมิดขนาดเล็กเหมาะที่จะนำมาใช้ในการสร้างเวกเตอร์ เนื่องจากสามารถสอดแทรกยีนอื่นๆ เข้าไปได้ 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

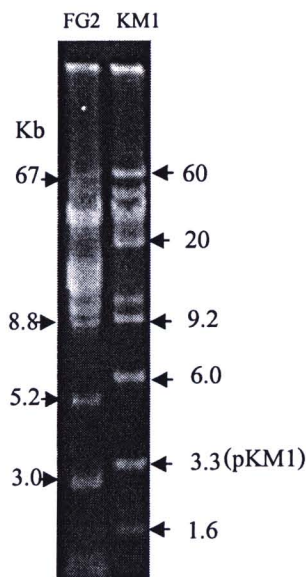
NCBI พบว่าเชื้อรหัส KM1 เหมือนเชื้อ *L. plantarum* 100% (Acc. No. FJ455520) ซึ่งเป็นการยืนยันผลจากการจัดจำแนกด้วยชุด API 50 CHL

```
1  TGCGCGTGCT ATCTGCAGTC GACGAACTCT GGTATTGATT GGTGCTTGCA
51  TCATGATTTA CATTTGAGTG AGTGGCGAAC TGGTGAGTAA CACGTGGGAA
101 ACCTGCCCCAG AAGCGGGGGA TAACACCTGG AAACAGATGC TAATACCGCA
151 TAACAACCTTG GACCGCATGG TCCGAGTTTG AAAGATGGCT TCGGCTATCA
201 CTTTTGGATG GTCCCGCGGC GTATTAGCTA GATGGTGGGG TAACGGCTCA
251 CCATGGCAAT GATACGTAGC CGACCTGAGA GGGTAATCGG CCACATTGGG
301 ACTGAGACAC GGCCCAAACCT CCTACGGGAG GCAGCAGTAG GGAATCTTCC
351 ACAATGGACG AAAGTCTGAT GGAGCAACGC CGCGTGAGTG AAGAAGGGTT
401 TCGGCTCGTA AAACCTCTGTT GTTAAAGAAG AACATATCTG AGAGTAACTG
451 TTCAGGTATT GACGGTATTT AACCAGAAAAG CCACGGCTAA CTACGTGCCA
501 GCAGCCGCGG TAATACGTAG GTGGCAAGCG TTGTCCGGAT TTATTGGGCG
551 TAAAGCGAGC GCAGGCGGTT TTTTAAGTCT GATGTGAAAG CCTTCGGCTC
601 AACCAGAGAA GTGCATCGGA AACTGGGAAA CTTGAGTGCA GAAGAGGACA
651 GTGGAACTCC ATGTGTAGCG GTGAAATGCG TAGATATATG GAAGAACACC
701 AGTGGCGAAG GCGGCTGTCT GGTCTGTAAC TGACGCTGAG GCTCGAAAGT
751 ATGGGTAGCA AACAGGATTA GATACCTGG TAGTCCATAC CGTAAACGAT
801 GAATGCTAAG TGTGGAGGG TTTCCGCCCT TCAGTGCTGC AGCTAACGCA
851 TTAAGCATTG CGCCTGGGGA GTACGGCCGC AAGGCTGAAA CTCAAAGGAA
901 TTGACGGGGG CCCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCTA
951 CGCGAAGAAC CTTACCAGGT CTTGACATAC TATGCAAATC TAAGAGATTA
1001 GACGTTCCTT TCGGGGACAT GGATACAGGT GGTGCATGGT TGTCGTCAGC
1051 TCGTGTCGTG AGATGTTGGG TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AACCCCTTATT
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 TCGCTACAT 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

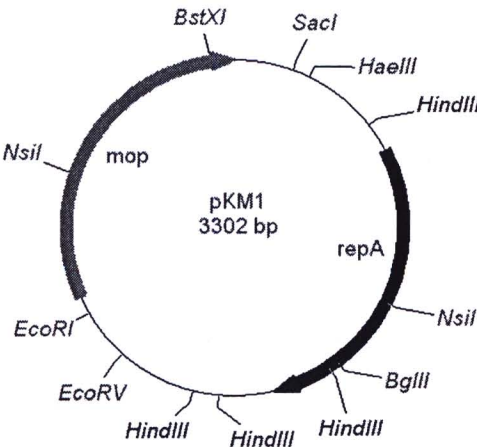
ในการพัฒนาเวกเตอร์ที่มาจากเชื้อ *L. plantarum* KM1 เวกเตอร์ที่ใช้ควรมีความคงตัว โดยไม่เกิดการสูญเสียไปในขณะเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นจึงได้ทดสอบความคงตัวโดยการเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีสาร novobiocin ซึ่งเป็นสารที่ใช้เหนี่ยวนำให้เกิดการสูญเสียของพลาสมิด (Ruiz-Barba et al., 1991) *L. plantarum* KM1 มีพลาสมิดเป็นองค์ประกอบ 8 ขนาดประมาณ 1.6, 3.3, 6.0, 9.2, 10.5, 20, 40 และ 60 กิโลเบส (รูปที่ 3) หลังจากทำ plasmid curing พบว่าเชือรอดชีวิตน้อยลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสาร 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



รูปที่ 4 แผนที่พลาสมิด pKM 1 ขนาดประมาณ 3300 คู่เบสจากเชื้อ *Lactobacillus plantarum* KM1

SSO

```

1  cccccgtca gtcacggtaa atcgaattaa agggacttac tgcttttagca
51  gttagtcctt ttttgaggct ttaaggagtt gattgactaa ccaaaccag
101 acactgaatt ggctgaaagc caaagtctcc taaactttgc tttcctgctt
151 cacggcgagt gcggggtgag tttgagcggg agctcccgtt catttatgct
201 gtcaagctgg tacagcttgg actgggttcg gggcgctcag gcccgagggc

                                dso      putative nic site
251 ttagaaactg gtcgattttg accagtttct tcttatcttg atactattag
301 aaacaacgga cttttccaaa tgtatagcaa aacgttgaca tgattggctt
351 taggcgtatt atgggtggtat aaaatgaata taaaaaaaac ccacgtgagc
401 ttcgaaagtt tgccgacctc gaacgcgtga gttaatcttg taaaaatcgt
451 atttggattt actagacata gtttaaagct tgaacccttt gccgtcaagc
501 cttctgactg atttaagtaa agcaagtaca taacagatta actcttctca

ORF1 (repA gene)
551 cgtggttggc gaggggagtt tttattttgg ctaatgaaaa agttttggtt 577 (start repA)
601 gatcgggtcaa agtcagggaa agttcgtccg tggcgggagc gtaagttaga
651 gaatttgcag tatggtgact atttgcaaatt attgaattat aagaaagctc
701 atcgggttaa agaattgtgg gaagttttgc gctttgtgga agatgaacaa
751 ggtcataaga aactagcgca gacttggttt tgctattccc gtttatgccc
801 gttatgcaat tggcggcgtg caatgaagca gtctaatacag ttaactcaaa
851 ttttagaaga agcgggttaa caacgaaaaa ctggtcgggtt cttatttcta
901 acgctgaccg ttgagaatac aactggtaag caattaaaga gtgagctacg
951 acaaatgggg cgagctgttc gtgatttaat gcgttataaa aagccagcta
1001 agaatttgtt aggtatgtg cgttcgactg aagtaaccgt taatcatgaa
1051 tcggatcagc cgatgtatca ccatcatatg catgttttat tatttgtgaa
1101 gagtctttat tttaaaggat ctgataacta tatttcacag tcagaatgga
1151 ctggttattg gcaacgggca atgaaattga cttatgttcc gatttgtgaat
1201 gttgaagcgg ttaaaccgaa tctgaaacgc cagagaaatt ctttactggc
1251 tagtgcccaa gaaacggcta aatatcaggt gaaatctaaa gatattttga
1301 ctaataatca agaacaagat ctacaagtaa ttgatgattt ggagcaagct
1351 ttggctgggt cccggcaaat tagctatggg ggcttactga aagaaattcg
1401 caagcagttg caactagaag atgttgaaaa tggtgacttg attaatacgg
1451 atagtgatga tctaaagact gatcaagtgg tacgtgaaat tgttgctaag
1501 tgggactatc agcgtaaaaa ttactttatt tgaatgagtg ctatattata 1531 (stop repA)
1551 tataaagaca ggaaaccatt tgtctagcga ggggattttt ttatgattta
1601 tgctgataag ataagctttt aatacggata gtgatgatct aaagactgat
1651 ccaagtggta cgtgaaattg ttgctaagtg ggactatcta gcgtaaaaat
1701 tactttattt gaatgagtgc tatattatat ataaagacag gaaaccattt
1751 gtctagcgag gggatttttt tatgatttat gctgataaga taagctttta
1801 tcgtggggac gaaaagcgtt tggaaactat tgttcggatt catattttt
1851 cgactagtgg tgaaggattt tctggctggg attataaaga ggatattaat
1901 gagtggcttc atgagaacag ctataagatt gtggtttata ttgatccata
1951 tcctgaattg attccctgtt gatggtgatc atgttaagta tgtcccgttc
2001 tagtaaggac gatactgaag aagataactt gcttaagcta gatattctatt
2051 atgaaaaaca ataaggaata caaaaaataa tttttgataa tcattgggag
2101 ctaaagcgat 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* ระบุไว้โดยการขีดเส้นใต้และระบุตำแหน่งไว้ด้านล่าง

-10promoter *orit*

2151 gagcccaaac tttacaaggt aaagtatatatt gggctataacc ttgcatggag 2169-2192 (*orit*)
 2201 gtttgccgaa ttctgtgcta tgctctaacc aaatttagct gtttggaat

ORF2 (*mob* gene)

2251 ggagtgggtga aatgagttat ttagtggcta atatgcagaa attaaaagct 2262 (start *mob*)
 2301 gataatttag ttggcttggg taatcatgat caacgccgaa cgcaacatca
 2351 caaaaataact gatattgacg ttgaccgttc tggcttaaatt tatgatttag
 2401 ttgctggtcg gactaaccat ttcaaacgg atattgcggc ttatattaac
 2451 gagcataaaa ccagtcaacg agcggtcaga aaagatgccg ttttagtcaa
 2501 tgaatggatt atttcgagcg atagcacttt ctttgccgat ttgacggcgg
 2551 ctgatactcg caaatatattt gaaacggcga ggaattatattt tgctgaaaaa
 2601 tttggtgaag aaaatattcg ttatgcaatt gttcatcttg atgagagtac
 2651 gccacatatg catatgggaa ttgtgccctt tgatgatgaa cataagttgt
 2701 ctgctaaagcg agtatttaac cgcacggcctt tgcgagatat tcaagatcaa
 2751 ttaccgactt atttgcaaca gcatgggtttt aatattcaac gtgggggttca
 2801 agaatcggaa cgtaaaagtt taacggtgcc agaataataa gctatgcggg
 2851 aagatttgaa aaaggcgacg cttcaaaaac aagaaataca agctgaactt
 2901 gaagatgcca gaaaacgcct tgctgaactt aaacctcgtg 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 acgttacaaag gaattgttcg gagcgttgac
 3201 cggttcttac agcgcaaatt aggtgttggc ttaccaaagtg agtggctaga
 3251 gcgagctgga ctaaaagaac cgactaaaaa agccctcag aggggggttg
 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* มีหน้าที่เป็นจุดเริ่มต้นในการจำลองตัวเองของ 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 นั้นเอง

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

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	MADRKVLVDRSQSGKVRPWRHKLENLQYGDYQLMLHYKKSHRVKECGEVLRFVEDKNGH	60
pF8801	MADRKVLVDRSQSGKVRPWRHKLENLQYGDYQLMLHYKKSHRVKECGEVLRFVEDKNGH	60
P141	MANEKVLVDRSQSGKVRPWRERKLENLQYGDYQLILHYKKAHRVKECGEVLRFVEDKNGH	60
RS4	MTDRKVLVDQSQSGKVRPWRERKLENLQYSDYQLILHYKKAHRVKECGEVLRFVEDKNGH	60
pKM1	VANEKVLVDRSQSGKVRPWRERKLENLQYGDYQLILNYKKAHRVKECGEVLRFVEDEQGH	60
pLab1000	-MSKKILKDVSRNRKERPWRERKLENLQYAEYLRILNFKKANRVKECGEVLRFVADDEGR	59
	..*:* * * :. * *****:*****.:*:*:*:*:*:***** * .:.*	
WCFS1	KKLAQTWFCHSRLCPLCNWRRSMQSNQLTQILTEAVKQRKTGRFLFLTTLTKNTTGDLL	120
pF8801	KKLAQTWFCHSRLCPLCNWRRSMQSNQLTQILTEAVKQRKTGRFLFLTTLTKNTTGDLL	120
P141	KKLAQTWFCHSRLCPLCNWRRAMQSNQLTQILTEAVKQRKTGRFLFLTTLTVENTTGDQL	120
RS4	KKLAQTWFCHSRLCPLCNWRRAMQSNQLTQILAEAVKQRKTGRFLFLTTLTVENTSGNQL	120
pKM1	KKLAQTWFCHSRLCPLCNWRRAMQSNQLTQILEEAVKQRKTGRFLFLTTLTVENTTGKQL	120
pLab1000	LRLYQTWFCKSRLCPLCNWRRSMQSNQLMQVLDEAHKQRKTGRFLFLTTLTAENASGENL	119
	:* *****:*****:* * ***** *: * * *****:*****.:*:*.*	
WCFS1	KSELRQMGRAIAKIFQYKKVAKNLLGYVRSTEVTINHEADQPMYHHHMHVLLFMKSSYFT	180
pF8801	KSELRQMGRAIAKIFQYKKVAKNLLGYVRSTEVTINHEADQPMYHHHMHVLLFMKSSYFT	180
P141	KSELRQMGRAIAKIFQYTKVAKNLLGYVRSTEVTVNHEAGQPMYHHHMHVLLFVKKNHYFK	180
RS4	KSELRQMGRAIRDLMRYKKPAKNLLGYVRSTEVTVNHEVDQPMYHHHMHVLLFMKSSYFT	180
pKM1	KSELRQMGRAVRDLMRYKKPAKNLLGYVRSTEVTVNHESDQPMYHHHMHVLLFVKSLYFK	180
pLab1000	KQEVKMGRAISKLFQYKKPAKNLLGYVRSTEITINKNG--TYHQHMHVLLFVKPTYFK	176
	.:*:*:*:*: .:.*.* *****:*****:*:*:*: **:******:* **.	
WCFS1	GTDNYSISQAEWTGYWQRAMKLDYVPVNVVEAVKPNVKRQKNSLLASAQETAKYQVKSUDI	240
pF8801	GTDNYSISQAEWTGYWQRAMKLAYVPVNVVEAVKPNVKRQKNSLLASAQETAKYQVKSUDI	240
P141	GTDNYSISQVEWTGFWQRAMKLTYPVMVNVVEAVKPNMNRHKNSLLASAQETAKYQVKSUDI	240
RS4	GTDNYSISQAEWTGYWQRAMKLTYPVNVVEAVKPNVNRHKNSLLASAQETAKYQVKSUDI	240
pKM1	GSDNYSISQSEWTGYWQRAMKLTYPVI NVVEAVKPNLKRQNSLLASAQETAKYQVKSUDI	240
pLab1000	DSANYINQAEWSKLWQRAMKLDYQPI NVVEAVRSNKAKGKNSLIASAQETAKYQVKSUDI	236
	.: ***.* **:* ***** * *:*****:* * : :***:*****:*****	
WCFS1	LTNNQEQLQVIDDLEQALAGSRQISYGGLLKEIRKQLQLEDVENGDLINTSDDDQKVDQ	300
pF8801	LTNNQEQLQVIDDLEQALAGSRQISYGGLLKEIRKQLQLEDVENGDLINTSDDDQKVDQ	300
P141	LTNNQEQLQVIDDLERALAGSRQISYGGLLKEIRKQLQLEDVENGDLINTSDDDQKVDQ	300
RS4	LTNNQEQLQVIDDLEQALAGSRQISYGGLLKEIRKQLQLEDVENGDLINTSDDDQKVDQ	300
pKM1	LTNNQEQLQVIDDLEQALAGSRQISYGGLLKEIRKQLQLEDVENGDLINTSDDLKTDDQ	300
pLab1000	LTNDQERDLQVVEDLEQGLAGSRQISYGGLFKEIRKQLQLEDVD-AHLINVDDDKVKIDE	295
	: *:***:***:*****:*****:*****: ..****.*.*. : *	
WCFS1	VVREIVAKWDYQRKNYFVW	319
pF8801	AVCEIVAKWDYQRKNYFI-	318
P141	VVREIVAKWDYQRKNYFV-	318
RS4	VVREIVAKWDYQRKNYFV-	318
pKM1	VVREIVAKWDYQRKNYFI-	318
pLab1000	VVREVAKWDYNKQNYFIW	314
	. * *:*****:***:	

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

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

pM4	MSYLVANMQKLKADNLVGLGNHDQRRRTQHHKNTDIDVDRSGLNYDLVAGRTNHFKTIDIAA	60
pLB925A08	MSYLVANMQKLKADNLVGLGNHDQRRRTQHHKNTDIEVDRSGLNYDLVAGRTNHFKTIDIAA	60
pKM1	MSYLVANMQKLKADNLVGLGNHDQRRRTQHHKNTDIDVDRSGLNYDLVAGRTNHFKTIDIAA	60
p141	MSYLVANMQKLKADNLVGLGNHDQRRRTQNHKNTDIDVDRSALNYDLVAGRTNHFKTIDIAA	60
pRS4	MSYLVANMQKLKADNLVGLGNHDQRRRTQNHKNTDIDVDRSALNYDLVAGRTNHFKTIDIAA	60
*****;*****;***.*****;		
pM4	YINEHKTSQRAVRKDAVLVNEWIISSDSNFFANLTAADTRKYFETAKAYFAEKFGREENIR	120
pLB925A08	YINEHKTSQRAVRKDAVLVDEWIISSDSNFFANLTAADTRKYFETAKAYFAEKFGREENVR	120
pKM1	YINEHKTSQRAVRKDAVLVNEWIISSDSTFFADLTAADTRKYFETARNYFAEKFGREENIR	120
p141	YINEHKTSQRAVRKDAVLVNEWIISSDRHFFADLTAVDTRKYFETAKAYFAEKFGREENIR	120
pRS4	YINEHKTSQRAVRKDAVLVNEWIISSDRHFFADLTAVDTRKYFETAKAYFAEKFGREENIR	120
*****;***** **;***.*****; *****;*		
pM4	YAIVHLDESTPHMHMGIVPFDDEYKLSAKRVFNRAALQNVQDQLPTYLQQHGFNIQRGVQ	180
pLB925A08	YAIVHLDESTPHMHMGIVPFDDEYKLSAKRVFNRAALQNVQDQLPTYLQQHGFNIQRGVQ	180
pKM1	YAIVHLDESTPHMHMGIVPFDDEHKLSAKRVFNRTALRDIQDQLPTYLQQHGFNIQRGVQ	180
p141	YAIVHLDESTPHMHMGIVPFDDEYKLSAKRVFNRTSLRDIQDQLPTYLQQHGFNVQRGVQ	180
pRS4	YAIVHLDESTPHMHMGIVPFDDEYKLSAKRVFNRTSLRDIQDQLPTYLQQHGFNVQRGVQ	180
*****;*****;*:;:*****;*****		
pM4	ESERKSLTVPEYKAMREDLKKATLQKQEIQAEELEDARKRLAELKPR--DQQEIESKPTFL	238
pLB925A08	ESERKSLTVPEYKAMREDLKKATLQKQEIQAEELEDARKRLAELKPR--DQQEIESKPTFL	238
pKM1	ESERKSLTVPEYKAMREDLKKATLQKQEIQAEELEDARKRLAELKPR--DQQEIESKPTFL	238
p141	ESERKSLTVPEYKAMRESIKQSQQKLAAVENETKQRQAKLKTYQATKFDVNSVKTKESRF	240
pRS4	ESERKSLTVPEYKAMRESIKQSQQKLAAVENETKQRQAKLKTYQATKFDVNSVKTKESRF	240
*****;*:; : : * : : : * :. * :.:* : :		
pM4	SKDKVVVRKSDLHDLESRAAVSDIYNQQQNRKLKLDNQSLNYQLLEVKNYELSKKNEKL	298
pLB925A08	SKDKVVVRKSDLHDLESRAAVSDIYNQQQNRKLKLDNQSLNYQLLEVKNYELSKKNEKL	298
pKM1	SKDKVVVRKSDLHDLESRAAVSDIYNQQQNRKLKLDNQSLNYQLLEVKNYELSKKNEKL	298
p141	HKRYVLVDRFDFDELKQGASLTDTYFTETLSQKSDMDIQKDRLIKAESKAMELDIENRRL	300
pRS4	HKRYVLVDRFDFDELKQGASLTDTYFTETLSQKSDMDIQKDRLIKAESKAMELDIENRRL	300
* *: * : *: :*: * : : * : : :*: :.: *: :* :		
pM4	QKLVDTLQGIIVRSVDRFLQKRLGVGLPSEWLERAGLKEPSKNAPQRPQERSEGHDELGD	358
pLB925A08	QKLVDTLQGIIVRSVDRFLQKRLGVGLPSEWLERAGLKEPSKNAPQRPQERSEGHDELGD	358
pKM1	QKLVDTLQGIIVRSVDRFLQKRLGVGLPNEWLERAGLKEPTKKAPQ-----GLRNR---	349
p141	QKLVGTLQGIIVRSVDHFLQKRLGVGLPGEWLERAGLKEPSKKAPQRPQERSEGHDELGD	360
pRS4	QKLVGTLQGIIVRSVDHFLQKRLGVGLPGEWLERAGLKEPSKKAPQRPQERSEGHDELGD	360
****.*****;*****.*****;*:***** * :.:		
pM4	PSL	361
pLB925A08	PSL	361
pKM1	---	
p141	PSF	363
pRS4	PSF	363

รูปที่ 7แสดงการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Mop ของพลาสมีด pKM1 กับโปรตีน Mobของพลาสมีดชนิดอื่นๆ ที่พบในแบคทีเรียแลคติก

* หมายถึงพลาสมีดทั้ง 5 ชนิดมีลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกัน

4.5 การทดสอบการต้านทานคอปเปอร์ นิกเกิลและแคดเมียมของแบคทีเรียแลคติก

จากการนำแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้ทั้ง 174สร้างกรด มาทดสอบความสามารถในการต้านทาน โลหะหนัก พบเชื่อที่สามารถต้านทานแคดเมียมที่ความเข้มข้น 1 mM ได้ 12 ไอโซเลต โดยมี 1 ไอโซเลต ที่ต้านทานแคดเมียมได้สูงถึง 5 mM ส่วนเชื่อต้านทานคอปเปอร์ที่ความเข้มข้น 20 mM พบ 61 ไอโซเลต โดยมีเชื่อเพียง 5 ไอโซเลต ที่ต้านทานคอปเปอร์ที่ความเข้มข้นสูงถึง 35 mM และมีเชื่อ 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 เมื่อเปรียบเทียบกับความสามารถในการต้านทานนิกเกิลของเชื้อที่แยกได้ในการศึกษาทดลองนี้ พบว่ามีเชื้อ 2 ไอโซเลต สามารถต้านทานนิกเกิลที่ความเข้มข้น 680 mM

ยีนควบคุมการต้านทานนิกเกิลถูกค้นพบและศึกษากันมากในเชื้อ *Ralstonia eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*) ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก พบในดินที่มีการปนเปื้อนด้วยนิกเกิล โดยเชื้อมีกลุ่มของยีนที่ควบคุมการต้านทานนิกเกิลระดับกลาง (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)



จากการคัดเลือกเชื้อดักจับแคดเมียมพบว่า เชื้อที่แยกได้จากอาหารหมักส่วนมากไม่สามารถดักจับแคดเมียม และสามารถดักจับได้ที่มีความเข้มข้นของแคดเมียมต่ำเพียง 1-5 mM ส่วนเชื้อที่แยกได้จากนมแพะ 33 ไอโซเลต พบว่าสามารถดักจับแคดเมียมความเข้มข้น 0.8 mM ได้ 27 ไอโซเลต จากการศึกษาของ O' Sullivan et al., (2001) ได้ทดสอบการดักจับแคดเมียมในเชื้อ *Lactococcus lactis* MG1614 โดยเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของแคดเมียมคลอไรด์สูงสุดเท่ากับ 0.3 mM ในปี 1996 Liu et al. ทำการศึกษาพลาสมิด pND302 ของเชื้อ *L. lactis* ที่สามารถดักจับแคดเมียมได้ โดยความเข้มข้นของแคดเมียมคลอไรด์ที่ใช้ในการเลี้ยง *L. lactis* เท่ากับ 1.0 mM อย่างไรก็ตามจากรายงานของ Mathurasa (1997) พบว่าแบคทีเรียแลคติก 4 สายพันธุ์ จาก 51 ไอโซเลตที่แยกจากกะหล่ำปลีจีนและหัวหอม สามารถดักจับแคดเมียมที่มีความเข้มข้นสูงถึง 50 mM ได้แก่ *Pediococcus pentosaceus*, *P. dextrinicus*, *Lactobacillus sake* และ *L. plantarum* ในการทดลองของ วีรชาติ ศรีอักษรินทร์ และคณะ (2544) ได้ทำการศึกษาความสามารถในการดักจับแคดเมียมของแบคทีเรียแลคติกที่แยกจากอาหารหมัก พบเชื้อดักจับแคดเมียมได้สูงสุดที่มีความเข้มข้น 1 mM ได้แก่เชื้อ *Lactobacillus* sp. แยกได้จากดอกเฟื่องฟ้า

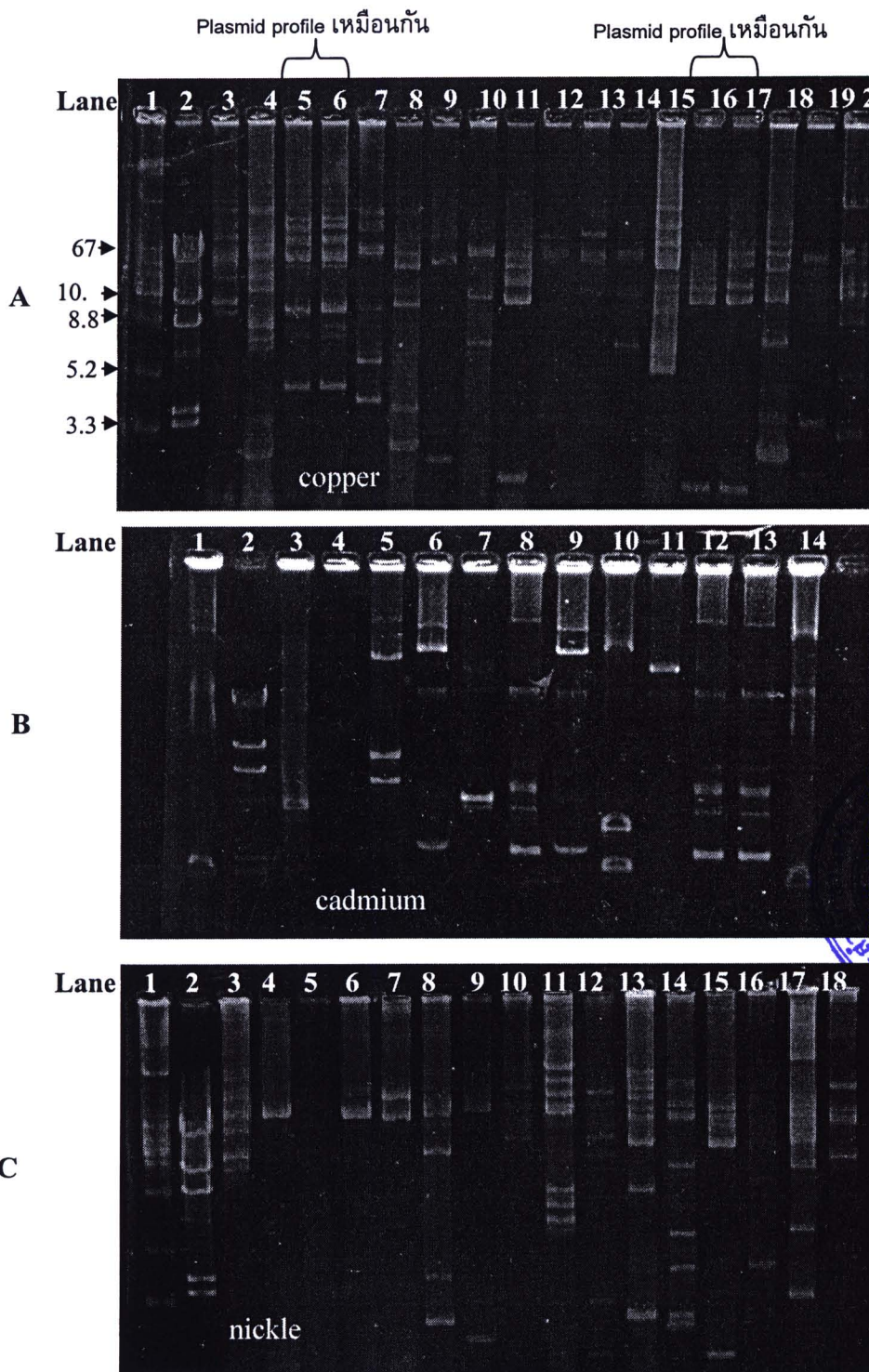
จากการศึกษายีนที่ควบคุมการดักจับแคดเมียม พบพลาสมิด pND302 ที่แยกได้จาก *L. lactis* subsp. *lactis* M71 มียีน *cadA* และ *cadC* ควบคุมสร้างโปรตีน CadA และ CadC (Liu et al., 1996) นอกจากนี้ใน *L. lactis* แล้วยีนดักจับแคดเมียมยังถูกพบในเชื้อ *Streptococcus thermophilus* 4134 โดยพบมี 2 ยีน คล้ายกับในเชื้อ *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}* เพียงอย่างเดียวก็เพียงพอที่จะทำให้เชื้อดักจับแคดเมียมได้ ส่วนยีน *CadC_{st}* ควบคุมการสร้างโปรตีนควบคุม (regulatory protein) ที่ทำหน้าที่จับกับดีเอ็นเอ (DNA binding protein) บริเวณโพรโมเตอร์ในสภาวะที่ไม่มีแคดเมียม และจะสูญเสียการจับกับโพรโมเตอร์ในสภาวะที่มีแคดเมียม (Schirawski et al., 2002)

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

จากการทดลองจะเห็นว่าแบคทีเรียแลคติกที่ดักจับโลหะหนักสามารถพบได้ทั่วไปในอาหารซึ่งยีนที่ควบคุมการดักจับโลหะหนักเหล่านี้ จัดได้ว่าเป็นยีนที่พบในแบคทีเรียแลคติกที่มีบทบาทในอาหารหมักและมนุษย์ได้บริโภคมาเป็นเวลานาน ดังนั้นยีนที่ควบคุมการดักจับโลหะหนักเหล่านี้จึงจัดเป็นยีนที่มีความปลอดภัยในการบริโภค (food grade) และสามารถนำยีนดักจับโลหะหนักที่อาจพบบนพลาสมิดหรือบนโครโมโซม มาใช้เป็นยีนติดตามที่ปลอดภัย (food grade selection marker) ทดแทนยีนดักจับยาปฏิชีวนะ 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 เมื่อเปรียบเทียบกับพลาสมิดของเชื้อ *L. lactis* subsp. *lactis* FG2 ที่ทราบขนาด จากรูปจะเห็นว่าถึงแม้แบคทีเรียแลคติกเหล่านี้จะสามารถต้านทานโลหะหนักเหมือนกัน แต่มีจำนวนและขนาดของพลาสมิดที่แตกต่างกัน (plasmid profile) โดยไม่พบพลาสมิดที่มีขนาดเท่ากันที่น่าจะมียีนที่ต้านทานโลหะหนักเหมือนกัน (common plasmid) เป็นองค์ประกอบ ทำให้ไม่สามารถระบุได้ว่า พลาสมิดใดที่น่าจะมียีนควบคุมการต้านทานโลหะหนักได้ หรือยีนต้านทานอาจอยู่บนโครโมโซม จากรูปจะเห็นว่าเชื้อบางสายพันธุ์ที่มีรูปแบบของพลาสมิดเหมือนกัน (รูปที่ 8 (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 จากการทดสอบโดยการทำ conjugation พบว่ายีนต้านทานคอปเปอร์ของเชื้อ *L. lactis* subsp. *lactis* MCL64 อยู่บนพลาสมิดขนาด 30 กิโลเบส จริง นอกจากนี้ยังมีรายงานพบยีนต้านทานต้านทานคอปเปอร์บน พลาสมิด pND306 ขนาด 54 กิโลเบส จากเชื้อ *L. lactis* subsp. *lactis* 1252D จากการทำ 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 นอกจากแบคทีเรียแลคติก 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* 57.1 โดยจะมียีนที่แตกต่างกับกลุ่มแรกคือยีน *cadDX* (Chen et al., 2008) และ ส่วนยีนต้านทานแคดเมียมบนโครโมโซมของ *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

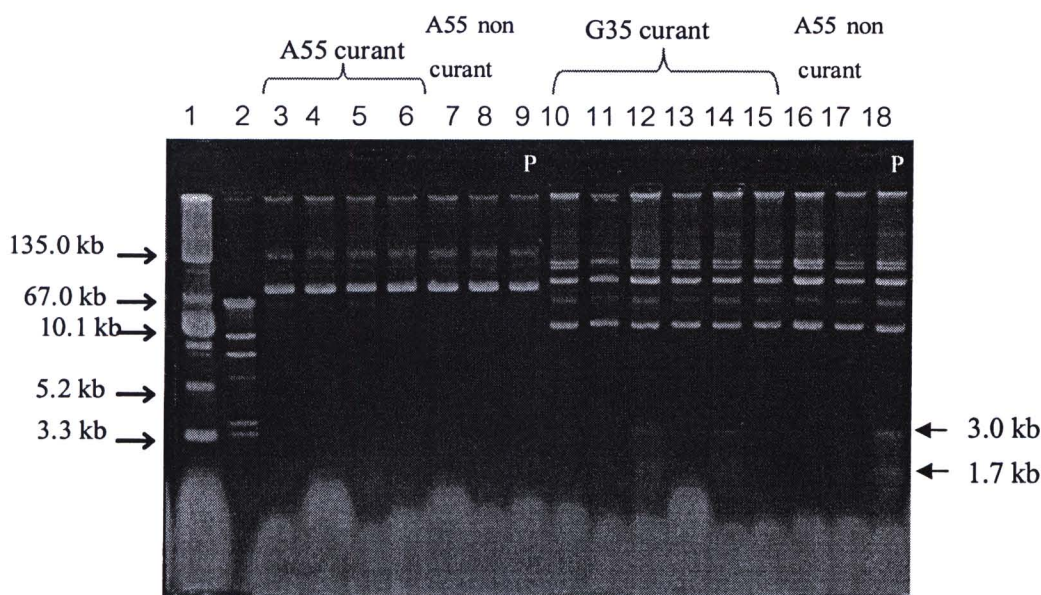
จากการนำเชื้อที่ต้านทานนิกเกิล 2 สายพันธุ์คือ เชื้อรหัส G35 และ A55 มาศึกษาพลาสมิดที่ควบคุมการต้านทานนิกเกิลด้วยวิธี plasmid curing โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิสูงในอาหารที่มีสาร novobiocin หลังจากการทำ plasmid curing นำเชื้อที่รอดชีวิตมาเลี้ยงในอาหารที่มีนิกเกิลความเข้มข้น 220 mM เพื่อทดสอบการต้านทานโลหะหนัก 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

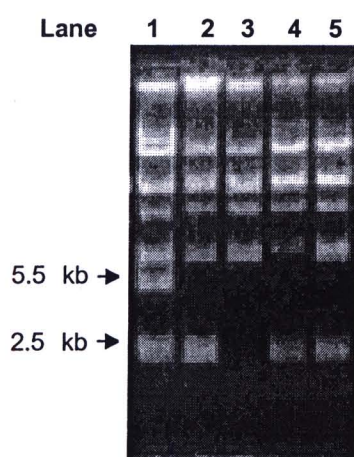
profile เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (รูปที่ 9 แถวที่ 9) พบว่า เชื้อรหัส A55 ซึ่งมีจำนวนพลาสมิด 2 ชิ้น ขนาด 43.3 และ 30.2 กิโลเบส ไม่สามารถถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการสูญเสียของพลาสมิดได้ ทั้งในกลุ่มที่ต้านทานและไม่ต้านทานนิกเกิล จึงไม่สามารถสรุปได้ว่ายีนต้านทานนิกเกิลอยู่บนพลาสมิดหรือโครโมโซม ส่วนเชื้อรหัส G35 ซึ่งมีจำนวนพลาสมิด 7 ชิ้น 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

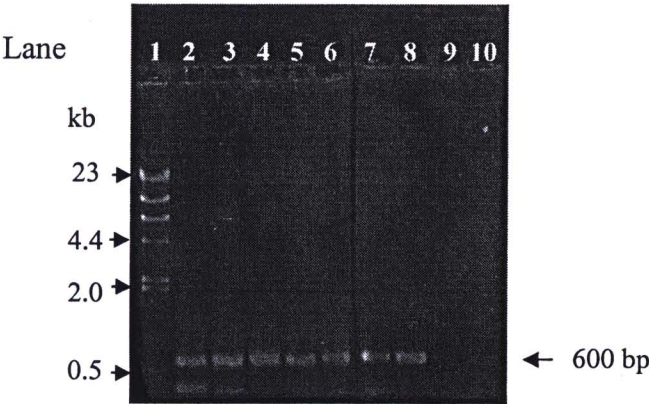
จากทดลองการทำ plasmid curing กับเชื้อที่ต้านทานคอปเปอร์รัส X32 ซึ่งมีพลาสมิด 7 แถบ ขนาด 99, 78, 22, 8.5, 7.5, 5.5 และ 2.5 กิโลเบส โดยใช้อุณหภูมิสูงร่วมกับการใช้สาร novobiocin โดยทำ curing ซ้ำ พบการสูญเสียพลาสมิดเกือบทุกขนาด ดังแสดงตัวอย่างในรูปที่ 10 จะเกิดการสูญเสียพลาสมิดขนาด 2.5 และ 5.5 กิโลเบส แต่ไม่พบการสูญเสียความสามารถในการต้านทานคอปเปอร์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



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

4.8 การศึกษาดำแหน่งของยีนต้านทานแคดเมียมโดยเทคนิค 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 แบคทีเรียแลคติกที่ดำนทานแคดเมียม

ตารางที่ 1 แสดงรหัสชื่อแบคทีเรียแลคติกที่แยกจากนมแพะและตัวอย่างอาหาร
ที่ให้ผลผลิต PCR ของยีนที่ควบคุมการดำนทานแคดเมียม

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 A A A C T A T A C G C C A T T C A T A A T T A T T A T G G C C C T T T G A T A G T G G T T G T T C
51 C T C C G C T A T T C T T T G G T G G T G A C T G G A A T A A A T G G C T T T A C C A A G G G T T A
101 T C C A T T T T A G T T G T C G G A T G T C C T T G T T C A T T A G T G A T C T C A A C A C C T G T
151 T T C A A T T G T T T C G G C T A T T G G T A A T G C A G C A A A A A T G G T G T T T A G T A A
201 A A G G C G G A G T C T A T C T G G A A G A A A T G G T C A T T T G A G A G C A A T G C T T T C
251 G A T A A G A C T G G A A C C T T A A C A A A G G A A A G C C T G T C G T A A C G G A T T T C A T
301 T G C A A C C A G T T C T G A A A C T G A T A T A A A T T A T C T A T C G A T T A T T C A T C G T
351 T G G A A T C T C T T T C T C A A C A C C C A T T A G C T T C T G C T A T T T T A A C G A A G C G
401 G A T A A A A C T A A T G T G G A T T A C A A G T C A A T A C A A T C G A G G A T T T C C A A T C
451 T A T C A C A G G T A A A G G A C T T A C A G G T A T A C A T C A A A A C A T A C G T T A C T A T A
501 T T G G A A G C C C T A A A C T G T T T T C T G C A T C A G T A A T C G A A G A A A C A G C G G T C
551 A A A G T A C A A T A C A G A C A A T T C A A G A A C A A G G G A A A A C C G

NU1_CadA-R

1 G A G C T C G T T A C C G C T G T T T C T T C G A T T A C T G A T G C A G A A A C A G T T T A G G
51 G C T T C C A A T A T A G T A A C G T A T G T T T T G A T G T A T A C C T G T A A G T C C T T T A C
101 C T G T G A T A G A T T G G A A A T C C T C G A T T T G T A T T G A C T T G T A A T C C A C A T T A
151 G T T T T A T C C G C T T C G T T T A A A T A G C A G A A G C T A A T G G G T G T T G A G A A A G
201 A G A T T C C A A C G A T G A A A T A A T C G A T A G A T A A T T T A T A T C A G T T C A G A A C
251 T G G T T G C A A T G A A A T C C G T T A C G A C A G G C T T T C C T T T T G T T A A G G T T C C A
301 G T C T T A T C G A A A G C A A T T G C T C T C A A A T G A C C A A T T T C T T C C A G A T A G A C
351 T C C G C C T T T T A C T A A A A C A C C A T T T T T G C T G C A T T A C C A A T A G C C G A A A
401 C A A T T G A A A C A G G T G T T G A G A T C A C T A A T G A A C A A G G A C A T C C G A C A A C T
451 A A A A T G G A T A A C C C T T G G T A A A G C C A T T T A T T C C A G T C A C C A C C A A G A A
501 T A G C G G A G G A A C A A C C A C T A T C A A A A G G G C A T A A T A A T T A T G A A T G G C G
551 T A T A G T A T T T T G C A A A T T T A T C T A C A A A G G C T T G T G C A G A

รูปที่ 12 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิต PCR ของยีน *cadA* ขนาดประมาณ 600 คู่เบสจาก
แบคทีเรียแลคติกกรหัส C53 และNU1

ตารางที่ 2 แสดงสายพันธุ์แบคทีเรียที่มียีน *cadA* คล้ายกับยีนในแบคทีเรียแลคติกกรหัส 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 Frangeul,2001

pGdh442	CCATTCATAATTATTATGGCCCTTTTGATAGTGGTTGTTCCCTCCGCTATTCCTTTGGTGGT	60
ICESde3396	CCATTCATAATTATTATGGCCCTTTTGATAGTGGTTGTTCCCTCCGCTATTCCTTTGGTGGT	60
C53	CCATTCATAATTATTATGGCCCTTTTGATAGTGGTTGTTCCCTCCGCTATTCCTTTGGTGGT	60
pAH82	CCATTCATAATTATTATGGCCCTTTTGATAGTGGTTGTTCCCTCCGCTATTCCTTTGGTGGT	60
NU1	CCATTCATAATTATTATGGCCCTTTTGATAGTGGTTGTTCCCTCCGCTATTCCTTTGGTGGT	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	GTTTTAGTAAAAGGCGGAGTCTATCTGGAAGAAATTGGTCATTGAGAGCAATTGCTTTC	240
ICESde3396	GTTTTAGTAAAAGGCGGAGTCTATCTGGAAGAAATTGGTCATTGAGAGCAATTGCTTTC	240
C53	GTTTTAGTAAAAGGCGGAGTCTATCTGGAAGAAATTGGTCATTGAGAGCAATTGCTTTC	240
pAH82	GTTTTAGTAAAAGGCGGAGTCTATCTGGAAGAAATTGGTCATTGAGAGCAATTGCTTTC	240
NU1	GTTTTAGTAAAAGGCGGAGTCTATCTGGAAGAAATTGGTCATTGAGAGCAATTGCTTTC	240

pGdh442	GATAAGACTGGAACCTTAACAAAAGGAAAGCCTGTCGTAACGGATTTTCATTGCAACCAGT	300
ICESde3396	GATAAGACTGGAACCTTAACAAAAGGAAAGCCTGTCGTAACGGATTTTCATTGCAACCAGT	300
C53	GATAAGACTGGAACCTTAACAAAAGGAAAGCCTGTCGTAACGGATTTTCATTGCAACCAGT	300
pAH82	GATAAGACTGGAACCTTAACAAAAGGAAAGCCTGTCGTAACGGATTTTCATTGCAACCAGT	300
NU1	GATAAGACTGGAACCTTAACAAAAGGAAAGCCTGTCGTAACGGATTTTCATTGCAACCAGT	300

pGdh442	TCTGAACTGATATAAATTATCTATCGATTATTTTCATCGTTGGAATCTCTTTCTCAACAC	360
ICESde3396	TCTGAACTGATATAAATTATCTATCGATTATTTTCATCGTTGGAATCTCTTTCTCAACAC	360
C53	TCTGAACTGATATAAATTATCTATCGATTATTTTCATCGTTGGAATCTCTTTCTCAACAC	360
pAH82	TCTGAACTGATATAAATTATCTATCGATTATTTTCATCGTTGGAATCTCTTTCTCAACAC	360
NU1	TCTGAACTGATATAAATTATCTATCGATTATTTTCATCGTTGGAATCTCTTTCTCAACAC	360

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

pGdh442	CAAATCGAGGATTTCCAATCTATCACAGGTAAAGGACTTACAGGTATACATCAAAACATA	480
ICESde3396	CAAATCGAGGATTTCCAATCTATCACAGGTAAAGGACTTACAGGTATACATCAAAACATA	480
C53	CAAATCGAGGATTTCCAATCTATCACAGGTAAAGGACTTACAGGTATACATCAAAACATA	480
pAH82	CAAATCGAGGATTTCCAATCTATCACAGGTAAAGGACTTACAGGTATACATCAAAACATA	480
NU1	CAAATCGAGGATTTCCAATCTATCACAGGTAAAGGACTTACAGGTATACATCAAAACATA	480

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

รูปที่ 13 แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *cadA* จากแบคทีเรียแลคติกโรทัส C53 และ NU1 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อที่มีพลาสมิดที่ต้านทานแคดเมียมในฐานข้อมูล GenBank * หมายถึงพลาสมิดทั้ง 5 ชนิดมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน



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/โอเปอเรเตอร์ในสถานะที่มีแคดเมียม เกิดการแสดงออกของยีน *cadA* ทำให้เชื้อสามารถต้านทานแคดเมียมได้ อย่างไรก็ตามกลไกในการต้านทานแคดเมียมพบว่าโปรตีน *cadA* เพียงชนิดเดียวก็พอเพียงในการทำงาน (Schirawski et al., 2002)

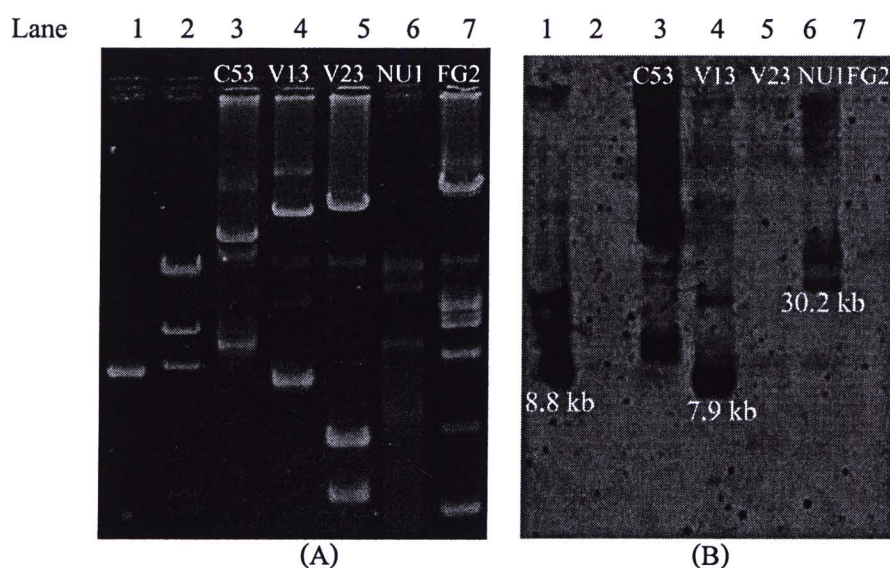
4.9 การทำ hybridization ของแบคทีเรียแลคติกที่สามารถต้านทานแคดเมียมได้

จากผลการทำ PCR เพื่อหาตำแหน่งของยีนควบคุมการต้านทานแคดเมียมพบว่าเชื้อรหัส 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 หรือถ้าอยู่บนพลาสมิดก็อาจมียีนที่แตกต่างกันกับยีน *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
แถวที่ 1: 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 พบว่าเชื้อสูญเสียพลาสมิดได้บางส่วนเท่านั้น และไม่สามารถแยกพลาสมิดที่ต้านทานโลหะหนักโดยวิธีนี้ได้ จึงได้ศึกษายีนต้านทานโลหะหนักโดยเทคนิค PCR โดยเลือกศึกษายีนต้านทานแคดเมียม พบเชื้อมียีนคล้ายยีน *cadA* โดยบางสายพันธุ์พบยีนบนโครโมโซมและบางสายพันธุ์พบบนพลาสมิด โดยให้ผลผลิต PCR ขนาด 600 คู่เบส จากการทำ homology search กับยีนบนฐานข้อมูลของ genBank พบว่าเชื้อรหัส NU1 และ C53 มีลำดับเบสคล้ายกันและคล้ายกับยีน *cadA* จากแบคทีเรียแลคติกบางสายพันธุ์ การศึกษาชนิดของพลาสมิดที่มียีนต้านทานแคดเมียมโดยการทำ southern hybridization โดยใช้ยีน *cadA* และ *cadC* จากพลาสมิด pND302 พบแถบพลาสมิดที่ให้ผลบวก แสดงว่ามียีนคล้าย *cadA* หรือ *cadC* อยู่บนพลาสมิดที่แยกได้จากตัวอย่างอาหาร ซึ่งสามารถแยกพลาสมิดมาศึกษา เพื่อนำยีนที่ควบคุมการต้านทานแคดเมียมมาใช้เป็นยีนคัดเลือก (selection marker gene) ชนิด food grade ต่อไป โดยการโคลนยีนลงไปในพลาสมิด pKM1 ที่ศึกษาไว้ในส่วนแรก