PRAWARUN AGRICULTURAL JOURNAL

https://li01.tci-thaijo.org/index.php/pajrmu/index

บทความวิจัย

การคัดแยกและจำแนกพลาสมิดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *Lactobacillus* spp. คัดแยกจากอาหารหมักท้องถิ่นภาคใต้

ศุภชัย นิติพันธ์[1*] และ ประมวล ทรายทอง[2]

[1]*ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีจุลินทรีย์เพื่อการเกษตร อาหาร และสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง 93210*

[2]*สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพมหานคร 10900*

ข้อมูลบทความ

Article history
รับ: 28 มิถุนายน 2565
แก้ไข: 16 สิงหาคม 2565
ตอบรับการตีพิมพ์: 20 สิงหาคม 2565
ตีพิมพ์ออนไลน์: 31 สิงหาคม 2565

คำสำคัญ
พลาสมิดดีเอ็นเอ
โปรตีนลูกผสม
วัคซีน
แบคทีเรียกรดแลคติก
อาหารหมัก

บทคัดย่อ

จีนัส *Lactobacillus* เป็นหนึ่งในแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบได้ในอาหารหมักหลากหลายชนิด ในปัจจุบันมีการนำแบคทีเรีย *Lactobacillus* มาใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับผลิตโปรตีนลูกผสม (recombinant protein) เพื่อเป็นเอนติเจนที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อโรคต่าง ๆ พลาสมิดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *Lactobacillus* มีความจำเพาะแตกต่างของแบคเรียแกรมลบ จึงมีการค้นหาและพัฒนาพลาสมิดดีเอ็นเอชนิดใหม่ขึ้นมาใช้ ส่วนใหญ่พลาสมิดดีเอ็นเอเหล่านั้นมีการจดสิทธิบัตรคุ้มครองอยู่ในหลาย ๆ ประเทศ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและศึกษาความหลากหลายของพลาสมิดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *Lactobacillus* spp. คัดแยกได้จากอาหารหมักของท้องถิ่นภาคใต้ เช่น ปลาส้ม ปลาดุกร้า ปลาแป้งแดง กุ้งส้ม และแหนมเห็ด เป็นต้น จากทั้งหมด 89 ไอโซเลต สามารถสกัดแยกพลาสมิดดีเอ็นเอได้ 20 ไอโซเลต พบพลาสมิดดีเอ็นเอทั้งหมดจำนวน 34 พลาสมิด จากแบคทีเรีย *L. plantarum*, *L. lactis*, *L. acidophilus* และ *L. casei* มีจำนวนตั้งแต่ 1 ถึง 3 พลาสมิดต่อไอโซเลต ซึ่งมีขนาดตั้งแต่ 2.5 ถึง 15 กิโลเบส (kb) จากการจำแนกด้วยวิธี restriction fragment length polymorphism (RFLP) แสดงให้เห็นว่าพลาสมิดดีเอ็นเอทั้งหมดมีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *Eco*RI *Hind*III และ *Bam*HI ทั้งหมด 8 รูปแบบ

บทนำ

พลาสมิดดีเอ็นเอเป็นสารพันธุกรรมที่อยู่นอกโครโมโซม สามารถจำลองตัวเองได้อย่างอิสระเพราะมีตำแหน่งเริ่มต้นของการจำลองตัวเอง (origin of replication) พลาสมิดดีเอ็นเออาจมีตำแหน่งยีนของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการจำลองตัวเอง (replication protein) เช่น *repA*, *repB* และ *repC* (Jie et al., 2017) ยีนของโปรตีนที่ทำหน้าที่ส่งผ่านพลาสมิดดีเอ็นเอไปยังเซลล์แบคทีเรียผู้รับด้วยกระบวนการ conjugation เช่น *Mob* (mobilization protein) (Asteri et al., 2010) บางชนิดอาจพบยีนดื้อยาปฏิชีวนะ (Feld et al., 2009) และยีนของการสร้าง bacteriocin (Van Reene et al., 2003) เป็นต้น พลาสมิดดีเอ็นเอมีความสำคัญกับการสร้างโปรตีนลูกผสม (recombinant protein) ทำหน้าที่เป็นตัวกลาง (vector) สำหรับถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์ผู้รับ ส่วนใหญ่นิยมใช้เซลล์ผู้รับเป็นแบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* สายพันธุ์ต่าง ๆ เช่น DH5, JM109 หรือ TOP10 เป็นต้น ปัจจุบันมีการมีการนำแบคทีเรียเกรดอาหาร (food grad bacteria) เช่น *Lactobacillus plantarum* (Suphatpahirapol et al., 2019) *L. curieae* (Zhu et al., 2020) *L. casei* (Zhang et al., 2019; Hua *et al*., 2021) และ *L. acidophilus* (Zang et al., 2020) ใช้เป็นเซลล์ผู้รับสำหรับผลิตโปรตีนลูกผสมแต่แบคทีเรีย *Lactobacillus* ต้องการพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีคุณสมบัติเฉพาะตัว มีรายงานการพบพลาสมิดดีเอ็นเอจาก *Lactobacillus* มากกว่า 22 สายพันธุ์ มีขนาดหลากหลายตั้งแต่ 1.81 – 242.96 kb จำนวนตั้งแต่ 1 – 10 พลาสมิดต่อสายพันธุ์ *L. plantarum* เป็นแบคทีเรียที่พบในอาหารหมัก เช่น ซาวเคราท์ (sauerkraut) กิมจิ (kimchi) และ ขนมปังซาวโดวจ์ (sourdough bread) (Siezen & Van Hylckama Vlieg, 2011) มีการรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดดีเอ็นเอจาก *L. plantarum* มากกว่า 56 ชนิด ในฐานข้อมูลสาธารณะและมีการวิเคราะห์ตำแหน่งของยีนต่าง ๆ บนพลาสมิดดีเอ็นเอ ส่วนใหญ่เป็นยีนของโปรตีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่ (putative protein) มีเพียงบางพลาสมิดดีเอ็นเอที่พบตำแหน่งของยีนเกี่ยวกับการดื้อยาปฏิชีวนะ (Feld et al., 2009) การสังเคราะห์ exopolysaccharide (Crowley et al., 2013) การนำ chloride และ potassium เข้าเซลล์ (Chen et al., 2012) ต้านทานต่อ bacteriophage (Eguchi et al., 2000)

*Corresponding author
E-mail address: nisupachai@tsu.ac.th (S. Nitipan)
Online print: 31 August 2022 Copyright © 2022. This is an open access article, production, and hosting by Faculty of Agricultural Technology, Rajabhat Maha Sarakham University. https://doi.org/10.14456/paj.2022.13

และยีนของการสร้าง bacteriocin (van Reene et al., 2003) พลาสมิดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *Lactobacillus* มีคุณสมบัติแตกต่างจากพลาสมิดดีเอ็นเอของ *E. coli* โดยเฉพาะตำแหน่งเริ่มต้นของการจำลองตัวเอง (ori: origin of replication) เป็นส่วนสำคัญของการจำลองตัวเอง พลาสมิดดีเอ็นเอขนาดเล็กมีการจำลองตัวเองแบบ rolling–circle replication (RCR) ในขณะที่พลาสมิดดีเอ็นเอขนาดใหญ่ เช่น pMD5057, pWCFS103 และ pST–III มีการจำลองแบบ theta replication (Pan et al., 2011; Cho et al., 2013) พลาสมิดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย *Lactobacillus* หลายชนิดถูกพัฒนาใช้สำหรับการผลิตโปรตีนลูกผสม เพื่อใช้เป็นแอนติเจนป้องกันโรค ตัวอย่างเช่น *L. plantarum* NC8 ผลิตโปรตีน goose parvovirus VP2 (Liu et al., 2017) *L. lactis* ผลิตโปรตีน type 3 capsular polysaccharide (Gilbert et al., 2000) *Lactobacillus* strains LA4356–pH และ DLD17–pH ผลิตโปรตีน HPAI virus protein hemagglutinin 1 (Wang et al., 2012) และ *L. plantarum* TLG02 (WCFS1 derivative, D–alanine auxotroph) ผลิตโปรตีนลูกผสม KU_Sej_LRR_2012 (Nitipan et al., 2013; Suphatpahirapol et al., 2019) เป็นต้น

อย่างไรก็ตามการสร้างโปรตีนลูกผสมด้วยพลาสมิดดีเอ็นเอและแบคทีเรีย *Lactobacillus* ที่กล่าวมาข้างต้นยังคงมีข้อจำกัด เนื่องจากพลาสมิดดีเอ็นเอเหล่านี้มีการปรับเปลี่ยนข้อมูลนิวคลีโอไทด์ให้เหมาะสมกับเซลล์เจ้าบ้านโดยนักวิจัยจากต่างประเทศ และมีการคุ้มครองสิทธิ์ไว้ในหลาย ๆ ประเทศ ทำให้การใช้พลาสมิดดีเอ็นเอเหล่านี้ต้องขออนุญาตและมีค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายของพลาสมิดดีเอ็นเอดั้งเดิมจากแบคทีเรีย *Lactobacillus* spp. ที่คัดแยกได้จากอาหารหมักหลายชนิด จัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยการทดสอบความสามารถในการย่อยแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน (API50 CHL kit) และยืนยันผลด้วยข้อมูลของยีน *16S rRNA* แล้วสกัดแยกพลาสมิดเพื่อศึกษาความหลากหลายด้วยเทคนิค restriction fragment length polymorphism (RFLP) ด้วยเอนไซม์ *Eco*RI *Hind*III และ *Bam*HI เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับนำไปใช้พัฒนาเป็นพลาสมิดดีเอ็นสร้างโปรตีนลูกผสมในแบคทีเรียเกรดอาหารต่อไปในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

การคัดแยกแบคทีเรีย Lactobacillus spp. จากอาหารหมัก

คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากอาหารหมัก ได้แก่ ปลาส้ม ปลาดุกร้า ปลาแป้งแดง กุ้งส้ม แหนมเห็ดนางฟ้า บูดู ไตปลา และปลาเค็ม โดยนำตัวอย่างปลาส้มตัวอย่างละ 25 g บดย่อยในสารละลาย 0.85% NaCl ปริมาตร 225 ml จากนั้นทำการเจือจางด้วยวิธี 10–fold serial dilution จนได้ความเข้มข้นเป็น 10^{-6} ดูดส่วนใสจากความเข้มข้นที่ 10^{-3} – 10^{-6} ปริมาตร 100 µl กวาดลงในอาหาร MRS (Man, Rogosa and Sharpe) agar ที่ผสม 0.2% bromocresol purple จากนั้นเลี้ยงในโถไร้อากาศ (anaerobic jar) บ่มที่อุณหภูมิ 35±2 ^{O}C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่แสดงลักษณะวงใสสีเหลือง นำไป re–streak บนอาหารแข็ง MRS อีกครั้ง ทดสอบคุณสมบัติทางเคมีเบื้องต้นของแบคทีเรียกรดแลคติก ได้แก่ ย้อมติดสีแกรม ทดสอบการสร้างเอนไซม์แคตาเลสตามวิธีมาตรฐาน AOAC (2005) และทดสอบการย่อยน้ำตาลด้วยชุดทดสอบ API 50CHL แล้วยืนยันผลด้วยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *16S rRNA*

การจำแนกแบคทีเรีย Lactobacillus spp. ด้วยชุดทดสอบ API50 CHL และวิธี 16S rRNA

ดำเนินการตามคำแนะนำของผู้ผลิต (Biomerieux, France) โดยมีวิธีดังนี้ เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว MRS ปั่นเก็บเซลล์แบคทีเรียที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วย 0.85% NaCl จำนวน 2 ครั้ง นำเซลล์แบคทีเรียมาเจือจางด้วย API 50 CHL medium ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2.0 McFarland แบ่งเซลล์แบคทีเรียใส่ลงใน strip ของชุดทดสอบ จำนวนทั้งหมด 50 ช่อง ปิดทับผิวหน้าของแต่ละช่องด้วย paraffin oil บ่มที่อุณหภูมิ 37±2 ^{O}C สังเกตการเปลี่ยนแปลงในชั่วโมงที่ 24 และ 48 โดยช่องที่มีการกิจกรรมจะเปลี่ยนสีจากน้ำเงิน–ม่วงเป็นสีเหลือง จากนั้นนำผลที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล apiweb (https://apiweb.biomerieux.com/servlet/Identify) เพื่อยืนยันชนิดของแบคทีเรีย

สกัด gDNA ของแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ PureLink genomic DNA mini kit (Invitrogen, USA) ดำเนินการตามคำแนะนำของผู้ผลิต เพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ด้วยไพรเมอร์ 27f (5'–AGAGTTTGATCMTGGCTCAG–3') และ 1525r (5'–AAGGAGGTGWTCCARCC–3') (Lane, 1991) เตรียมส่วนผสมปริมาตร 25 µl ประกอบด้วย 2X OnePCR™ Plus master mix (GeneDireX, USA) ปริมาตร 12.5 µl ไพรเมอร์แต่ละชนิดความเข้มข้น 25 mM ปริมาตร 0.3 µl และ gDNA ต้นแบบ 10 ng ปรับปริมาตรด้วย nuclease–free sterile water ให้ได้ 25 µl จากนั้นนำตัวอย่างไปดำเนินการต่อโดยใช้ thermal cycler โดยใช้อุณหภูมิดังต่อไปนี้ 95 ^{O}C 5 นาที แล้วต่อด้วย 35 รอบ ของ 95 ^{O}C 45 วินาที 55 ^{O}C 30 วินาที และ 72 ^{O}C 30 วินาที หลังจากครบ 35 รอบใช้อุณหภูมิ 72 ^{O}C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นวิเคราะห์ผลผลิตจากการทำ PCR ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis ให้ไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ 30 นาที ย้อมด้วย SyBr® gold (GeneDireX, USA) จากนั้นนำไปถ่ายภาพด้วยเครื่องถ่ายภาพ ChemiDoc™ MP system (BIO–RAD, USA) แล้วส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA จากนั้นนำรหัสพันธุกรรมที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ด้วยวิธี BLAST

การคัดแยกพลาสมิดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย Lactobacillus spp.

การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย *Lactobacillus* spp. ด้วยวิธีดัดแปลงจาก alkaline–detergent lysis (Klaenhammer, 1984) ตะกอนเซลล์แบคทีเรียเลี้ยงในอาหาร MRS ปริมาตร 2 ml ปั่นเหวี่ยงที่ 3000 x g ละลายตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย 25% sucrose ที่เติม 30 mg/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{O}C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมสารละลาย alkaline SDS (ประกอบด้วย 0.2 N NaOH และ 3% SDS) บ่มเป็นเวลา 7 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เติม 3 M sodium acetate (pH 4.8) ที่เย็นจัด แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 x g ที่ 4 ^{O}C นาน 15 นาที ย้ายส่วนใสใสในหลอดใหม่แล้วเติมฟีนอล คลอโรฟอร์มและไอโซโพรพานอล (phenol: chloroform: isopropanol (25:24:1)) ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 x g ที่ 4 ^{O}C นาน 10 นาที ย้ายส่วนใสลงในหลอดใหม่แล้วเติม 95% เอทานอล (เย็นจัด) ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 x g ที่ 4 ^{O}C นาน 10 นาที จากนั้นทำให้

บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัด QIAprep spin miniprep kit (QIAGEN, Germany) ย้ายส่วนใสลงในคอลัมน์ QIAprep spin column ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 x g ที่ 4 ^{O}C นาน 1 นาที เติม PE buffer ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 x g ที่ 4 ^{O}C นาน 1 นาที ทิ้งส่วนใส ย้ายคอลัมน์ใส่ในหลอดใหม่ เติม EB buffer 50 µl บ่มที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 x g ที่ 4 ^{O}C นาน 1 นาที เก็บส่วนใสที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอไว้สำหรับวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

จัดกลุ่มพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธี RFLP

แบ่งกลุ่มพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ตามขนาดด้วยวิธี 1.5% agarose gel electrophoresis และแยกความแตกต่างของพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธี RFLP ตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI, *Hind*III และ *Bam*HI (ThermoFisher Scientific, USA) มีองค์ประกอบดังนี้ 10X FastDigest® Green buffer ปริมาตร 2 µl FastDigest® enzyme ปริมาตร 1 µl และพลาสมิดดีเอ็นเอ 1 µg แล้วปรับปริมาตรด้วย nuclease–free sterile water ให้ได้ 20 µl บ่มที่อุณหภูมิ 37^{O}C นาน 90 นาที จากนั้นหยุดกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยการบ่มที่อุณภูมิ 60^{O}C เป็นเวลา 15 นาที แล้วตรวจสอบผลการตัดด้วย 2.0% agarose gel electrophoresis ย้อมด้วยสี SyBr gold (GeneDireX, USA)

ผลการวิจัย

การคัดแยกและจำแนกชนิดของแบคทีเรีย Lactobacillus spp.

แบคทีเรีย *Lactobacillus* spp. จำนวน 89 ไอโซเลต (Table 1) คัดแยกได้จากตัวอย่าง ปลาส้ม (45 ไอโซเลต) ปลาดุกร้า (12 ไอโซเลต) ปลาแป้งแดง (18 ไอโซเลต) กุ้งส้ม (4 ไอโซเลต) แหนมเห็ดนางฟ้า (3 ไอโซเลต) บูดู (2 ไอโซเลต) ปลาเค็ม (3 ไอโซเลต) และไตปลา (2 ไอโซเลต) ทั้งหมดเป็นแบคทีเรียรูปท่อนสั้น (short rod) ติดสีย้อมแกรมบวก และสร้างเอนไซม์คะตาเลส จากการจำแนกโดยใช้ข้อมูลของยีน *16S rRNA* เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล สามารถจำแนกได้ทั้งหมด 7 ชนิด ได้แก่ *L. plantarum* (39 ไอโซเลต) *L. lactis* (24 ไอโซเลต) *L. amylovorns* (12 ไอโซเลต) *L. casei* (7 ไอโซเลต) *L. acidophilus* (4 ไอโซเลต) *L. farciminis* (2 ไอโซเลต) และ *L. graminis* (1 ไอโซเลต) คิดเป็น 43.8, 26.9, 13.5, 7.9, 4.6, 2.2 และ 1.1% ตามลำดับ ผลการทดสอบการย่อยแหล่งคาร์บอนต่างชนิดด้วยชุดทดสอบ API50CHL เปรียบเทียบผลกับฐานข้อมูลใน APIweb™ พบว่าตัวแทนของแต่ละกลุ่มให้ผลการทดสอบสอดคล้องกับการจำแนกด้วยวิธี 16S rDNA

การคัดแยกและจำแนกชนิดของพลาสมิดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้

การคัดแยกพลาสมิดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *Lactobacillus* spp ด้วยวิธี alkaline–detergent lysis และทำบริสุทธิ์ด้วยชุดสกัด QIAprep miniprep plasmid purification kit (QIAGEN, Germany) พบพลาสมิดดีเอ็นเอจำนวนทั้งหมด 34 พลาสมิด (Table 2) จากแบคทีเรีย *L. plantarum* (12 ไอโซเลต) *L. lactis* (5 ไอโซเลต) *L. acidophillus* (2 ไอโซเลต) และ *L. casei* (1 ไอโซเลต) จำนวนพลาสมิด 19, 10, 4 และ 1 พลาสมิด ตามลำดับ (Table 2) จากการวิเคราะห์ขนาดของพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธี 2% agarose gel electrophoresis แบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ พลาสมิดขนาดเล็กมีขนาดประมาณ 2.5, 3.0 และ 3.5 kb และขนาดใหญ่ประมาณ 15 kb พลาสมิดดีเอ็นเอทั้งหมดจำนวน 34 พลาสมิดประกอบด้วยขนาด 2.5 kb จำนวน 19 พลาสมิด ขนาด 3.0 kb จำนวน 11 พลาสมิด ขนาด 3.5 kb จำนวน 2 พลาสมิด และขนาด 15 kb จำนวน 2 พลาสมิด (Figure 1 และ Table 3)

การจัดกลุ่มพลาสมิดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย Lactobacillus spp. ด้วยวิธี RFLP

การจัดกลุ่มพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธี RFLP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด คือ *Eco*RI, *Hind*III และ *Bam*HI พบความแตกต่างทั้งหมด 8 รูปแบบ ดังนี้ รูปแบบที่ 1 ตัดด้วยเอนไซม์ *Hind*III ได้ชิ้นส่วน DNA ขนาดประมาณ 0.8 และ 1.7 kb รูปแบบที่ 2 ตัดด้วยเอนไซม์ *Hind*III ได้ชิ้นส่วน DNA ขนาดประมาณ 0.5, 0.6 และ 1.9 kb รูปแบบที่ 3 ตัดด้วยเอนไซม์ *Hind*III ได้ชิ้นส่วน DNA ขนาดประมาณ 0.6, 1.0 และ 1.4 kb รูปแบบที่ 4 ตัดด้วยเอนไซม์ *Hind*III ได้ชิ้นส่วน DNA ขนาดประมาณ 0.8 และ 2.7 kb รูปแบบที่ 5 ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI ได้ชิ้นส่วน DNA ขนาดประมาณ 0.6 และ 1.9 kb รูปแบบที่ 6 ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI ได้ชิ้นส่วน DNA ขนาดประมาณ 0.5 และ 2.5 kb รูปแบบที่ 7 สามารถตัดด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด (ตัดคนละครั้ง) คือ *Eco*RI ได้ชิ้นส่วน DNA ขนาดประมาณ 0.2 และ 2.3 kb และ *Hind*III ได้ชิ้นส่วน DNA ขนาดประมาณ 0.7 และ 1.8 kb และรูปแบบที่ 8 สามารถตัดด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด (ตัดคนละครั้ง) คือ *Hind*III ได้ชิ้นส่วน DNA ขนาดประมาณ 1.1, 1.5, 2.5 และ 9.9 kb และเอนไซม์ *Bam*HI ได้ชิ้นส่วน DNA ขนาดประมาณ 1.8, 3.3 และ 9.9 kb รายละเอียดแสดงใน Figure 2 และ Table 4

Table 1 Isolation of *Lactobacillus* spp. from fermented food

Fermented food	Lp	Ll	Lam	Lc	Lac	Lf	Lg	Total
Pla–som	18	10	9	5	–	2	1	45
Pla–duk–ra	6	6	–	–	–	–	–	12
Pla–pang–dang	6	6	3	2	1	–	–	18
Kung–som	2	–	–	–	2	–	–	4
Nham–hed–nang–fa	3	–	–	–	–	–	–	3
Budu	1	–	–	–	1	–	–	2
Pla kem	1	2	–	–	–	–	–	3
Tai pla	2	–	–	–	–	–	–	2
Total	39	24	12	7	4	2	1	89

Lp: *L. plantarum*, Ll: *L. lactis*, Lam: *L. amylovorus*, Lc: *L. casei,* Lac: *L. acidophilus*, Lf: *L. farciminis*, Lg: *L. graminis*

Table 2 The number of *Lactobacillus* spp. isolates containing DNA plasmids

Name (*n:* total isolates)	Number of isolates			
	No plasmid	1 plasmid	2 plasmids	3 plasmids
L. plantarum (n=41)	27	5	4	2
L. lactis (n=24)	19	3	2	1
L. amylovorus (n=13)	12	–	–	–
L. acidophilus (n=7)	5	–	2	–
L. farciminis (n=3)	3	–	–	–
L. casei (n=2)	2	1	–	–
L. graminis (n=1)	1	–	–	–
Total	69	9	8	3

Table 3 The DNA plasmids isolated from *Lactobacillus* spp.

No.	Isolates Name	Plasmid name	Plasmid size (kb)	Sources	Organisms
1	Lp72/12	pLP2.5–1	2.5	Pla–som	*L. plantarum*
2	Lp/72/19	pLP2.5–2	2.5	Pla–som	*L. plantarum*
3	Lp120/13	pLP2.5–3	2.5	Pla–som	*L. plantarum*
4	Lp120/17	pLP2.5–7	2.5	Pla–som	*L. plantarum*
5	LpPD04	pLP2.5–4	2.5	Pla–pang–dang	*L. plantarum*
6	Ll48/5	pLL2.5–2	2.5	Pla–som	*L. lactis*
7	Ll72/9	pLL2.5–5	2.5	Pla–som	*L. lactis*
8	Ll72/13	pLL2.5–6	2.5	Pla–som	*L. lactis*
9	Lc48/2	pLC3.0–1	3.0	Pla–som	*L. casei*
10	Lp72/27	pLP2.5–11, pLP3.0–4	2.5, 3.0	Pla–som	*L. plantarum*
11	Lp96/14	pLP2.5–5, pLP3.0–2	2.5, 3.0	Pla–som	*L. plantarum*
12	Lp96/17	pLP2.5–6, pLP3.0–3	2.5, 3.0	Pla–som	*L. plantarum*
13	LlPD01	pLL2.5–4, pLL3.0–3	2.5, 3.0	Pla–pang–dang	*L. lactis*
14	LlPD06	pLL2.5–1, pLL3.0–1	2.5, 3.0	Pla–pang–dang	*L. acidophillus*
15	LacKS01	pLA2.5–1, pLA3.0–1	2.5, 3.0	Kung–som	*L. plantarum*
16	LpPD06	pLP2.5–9, pLP3.0–5	2.5, 3.5	Pla–pang–dang	*L. plantarum*
17	LacKS02	pLA2.5–2, pLA3.5–1	2.5, 3.5	Kung–som	*L. acidophillus*
18	LlPR03	pLL2.5–3, pLL3.0–2, pLL3.5–1	2.5, 3.0, 3.5	Pla–duk–ra	*L. lactis*
19	Lp72/29	pLP2.5–8, pLP3.0–1, pLP15–1	2.5, 3.0, 15	Pla–som	*L. plantarum*
20	Lp120/31	pLP2.5–10, pLP3.0–6, pLP15–2	2.5, 3.0, 15	Pla–som	*L. plantarum*

Table 4 The approximate fragments size of the extracted plasmids DNA from RFLP classification

Groups	Plasmid name	Plasmid size (bp)	Fragment DNA size (bp)		
			*Hind*III	*Eco*RI	*Bam*HI
1	pLP2.5–1	2500	800, 1700	–	–
	pLP2.5–2	2500	800, 1700	–	–
	pLP2.5–3	2500	800, 1700	–	–
	pLP2.5–7	2500	800, 1700	–	–
	pLP2.5–11	2500	800, 1700	–	–
	pLL2.5–2	2500	800, 1700	–	–
	pLL2.5–3	2500	800, 1700	–	–
	pLL2.5–5	2500	800, 1700	–	–
	pLL2.5–6	2500	800, 1700	–	–
	pLA2.5–1	2500	800, 1700	–	–
	pLA2.5–2	2500	800, 1700	–	–
2	pLP3.0–1	3000	500, 600, 1900	–	–
	pLP3.0–2	3000	500, 600, 1900	–	–
	pLP3.0–3	3000	500, 600, 1900	–	–
	pLP3.0–5	3000	500, 600, 1900	–	–
	pLL3.0–1	3000	500, 600, 1900	–	–
	pLL3.0–3	3000	500, 600, 1900	–	–
3	pLA3.0–1	3000	600, 1000, 1400	–	–
4	pLL3.5–1	3500	800, 2700	–	–
	pLA3.5–1	3500	800, 2700	–	–
5	pLP2.5–4	2500	–	600, 1900	–
	pLP2.5–5	2500	–	600, 1900	–
	pLP2.5–6	2500	–	600, 1900	–
	pLP2.5–9	2500	–	600, 1900	–
	pLL2.5–1	2500	–	600, 1900	–
	pLL2.5–4	2500	–	600, 1900	–
	pLP3.0–4	3000	–	600, 1900	–
	pLP3.0–6	3000	–	600, 1900	–
	pLL3.0–2	3000	–	600, 1900	–
6	pLC3.0–1	3000	–	–	500, 2500
7	pLP2.5–8	2500	700, 1800	200, 2300	–
	pLP2.5–10	2500	700, 1800	200, 2300	–
8	pLP15–1	15000	1100, 1500, 2500, 9900	–	1800, 3300, 9900
	pLP15–2	15000			

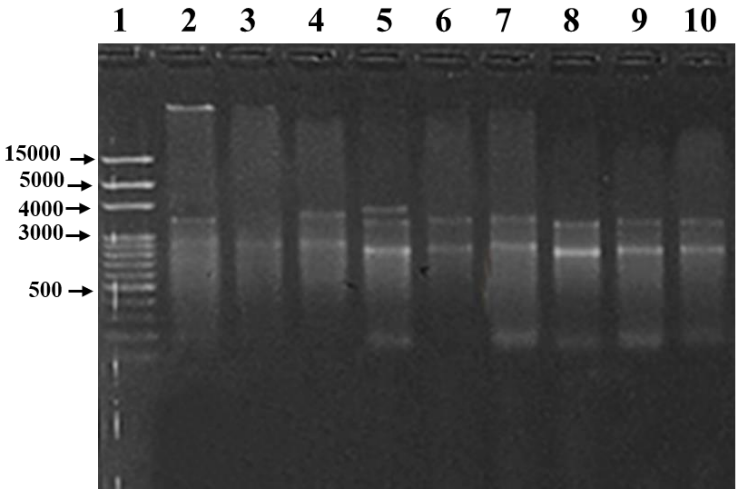

Figure 1 Plasmid profile of *Lactobacillus* spp.: lane 1 molecular mass marker 1 kb plus, lane 2 *L. plantarum* Lp72/29, lane 3 *L. plantarum* Lp72/12, lane 4 *L. plantarum* Lp96/14, lane 5 *L. lactis* LlPR03, lane 6 *L. lactis* LlPD01, lane 7 *L. lactis* LlPD06, lane 8 *L. plantarum* Lp72/27, lane 9 *L. plantarum* Lp96/17, lane 10 *L. acidophillus* LacKS01

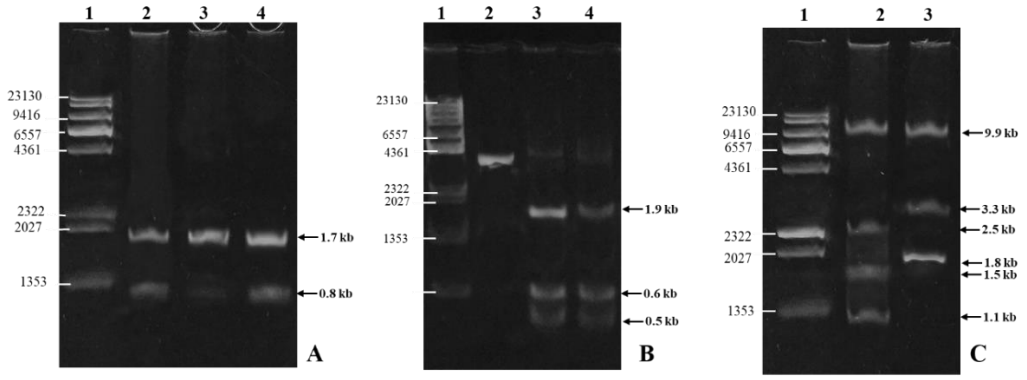

Figure 2 Restriction pattern of *Lactobacillus* plasmids, (A) lane 2 *Hind*III digested pLP2.5–1 plasmid, lane 3 *Hind*III digested pLL2.5–2, lane 3 *Hind*III digested pLA2.5–1, (B) lane 2 pLP3.0–2 (uncut), lane 3 *Hind*III digested pLP3.0–1, lane 4 *Hind*III digested pLL3.0–1, (C) lane 2 *Hind*III digested pLP15–1, lane 3 *Bam*HI digested pLP15–1, and lane 1 of all molecular mass marker Lamda DNA *Hind*III

วิจารณ์ผลการวิจัย

การศึกษานี้สามารถคัดแยกพลาสมิดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียจีนัส *Lactobacillus* ด้วยวิธี alkaline–detergent lysis ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานของการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย *Lactobacillus* (Lin et al., 2001; Jie et al., 2017) และดัดแปลงขั้นตอนการทำบริสุทธิ์พลาสมิดดีเอ็นเอด้วย QIAprep spin miniprep kit (Weber et al., 1998) พบพลาสมิดดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 34 พลาสมิด จากแบคทีเรีย *L. plantarum*, *L. lactis*, *L. acidophilus* และ *L. casei* มีขนาดตั้งแต่ 2.5 – 15 kb พลาสมิดดีเอ็นเอสูงสุดจำนวน 3 พลาสมิดต่อไอโซเลต จากแบคทีเรีย *L. plantarum* (Lp72/29 และ Lp120/31) และ *L. lactis* (LlPR03) แสดงถึงความหลากหลายต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานก่อนหน้า เช่น พลาสมิดดีเอ็นเอของ *L. plantarum* strain 16 มีจำนวนมากถึง 10 พลาสมิด (pLp16A – pLp16L) ขนาดตั้งแต่ 6.46 – 74.08 kb (Crowley et al., 2013) *L. plantarum* ไอโซเลต A15, F31, F32, F33, F34 และ F35 คัดแยกจากตัวอย่างแหนมของประเทศไทยมีพลาสมิดดีเอ็นเอจำนวน 6 – 8 พลาสมิดต่อไอโซเลต มีขนาดตั้งแต่ 1 – 19.3 kb (Auputinan et al., 2011) พลาสมิดดีเอ็นเอของ *L. reuteri* KCTC 3678 พบทั้งหมด 6 (Moon et al., 2008) และ *L. plantarum* WCFS1 พบ 3 พลาสมิด ได้แก่ pWCFS101, pWCFS102 และ pWCFS103 ขนาด 1.917, 2.365 และ 36.07 kb (Kranenburg et al., 2005) เป็นต้น แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากการศึกษานี้ส่วนใหญ่มีพลาสมิดเพียง 1 หรือ 2 พลาสมิดต่อไอโซเลต สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้า เช่น แบคทีเรีย *L. acidophilus* คัดแยกจากนมหมักของประเทศปากีสถานมีพลาสมิดดีเอ็นเอเพียง 2 พลาสมิด ขนาด 2.3 และ 23 kb แบคทีเรีย *L. casei* พบพลาสมิดดีเอ็นเอเพียง 1 พลาสมิดต่อไอโซเลต ขนาด 6.5 และ 20 kb ตามลำดับ (Soomro & Masud, 2007) *L. acidipiscis* ACA–DC 1533 พบพลาสมิด pLAC1 ขนาด 3.5 kb (Asterie et al., 2010) *L. plantarum* NC7 พบพลาสมิด p256 ขนาด 7.2 kb (Sorvig et al., 2005) และ *L. sakei* RV332 พบพลาสมิด pRV500 ขนาด 13 kb (Alpert et al., 2003) เป็นต้น ทั้งนี้ความแตกต่างของจำนวนพลาสมิดในแบคทีเรียอาจเป็นเพราะสภาพแวดล้อมที่อาศัยต่างกันจึงมียีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมต่างกัน เช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเมทาบอลิซึม (promoting growth trait) ยีนต้านทานความเครียดจากสิ่งแวดล้อม (environmental stress resistant genes) และยีนของการสร้างแบคเทอริโอซิน (bacteriocin production gene) ส่วนใหญ่ยีนเหล่านี้มีตำแหน่งอยู่บนพลาสมิดดีเอ็นเอ (Mills et al., 2006)

พลาสมิดดีเอ็นเอที่แยกได้มีความแตกต่างของตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด คือ *Eco*RI (GAATTC), *Hind*III (AAGCTT) และ *Bam*HI (GGATCC) เป็นเอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำแบบ 6 นิวคลีโอไทด์ (6 cutter) มีรายงานการใช้เอนไซม์ทั้งสามชนิดในการศึกษาความหลากหลายของพลาสมิดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *Vibrio anguillarum* (Pedersen et al., 1996) จากการวิเคราะห์พบความแตกต่างของการตัดทั้งหมด 8 รูปแบบ แบ่งเป็นมีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์เพียงชนิดเดียว คือ *Hind*III (4 รูปแบบ) *Eco*RI (1 รูปแบบ) และ *Bam*HI (1 รูปแบบ) และมีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ 2 ชนิด คือ *Hind*III กับ *Eco*RI (1 รูปแบบ) และ *Hind*III กับ *Bam*HI (1 รูปแบบ) แสดงให้เห็นว่าพลาสมิดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *Lactobacillus* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน สอดคล้องกับในปัจจุบันมีการรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดดีเอ็นเอไว้มากกว่า 50 ชนิด (Gao et al., 2011; Siezen et al., 2010; Panya et al., 2012)

สรุปผลการวิจัย

พลาสมิดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย *Lactobacillus* spp. คัดแยกได้จากอาหารหมักท้องถิ่นของภาคใต้ มีทั้งหมด 4 ขนาด คือ 2.5, 3.0, 3.5 และ 15 kb แบคทีเรีย *L. plantarum* และ *L. lactis* เป็นสายพันธุ์ที่พบพลาสมิดดีเอ็นเอมากที่สุด มีจำนวน 1 ถึง 3 พลาสมิดต่อไอโซเลต มีความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยเฉพาะตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI, *Hind*III และ *Bam*HI แตกต่างกันทั้งหมด 8 รูปแบบ อย่างไรก็ตามต้องมีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดดีเอ็นเอ วิเคราะห์ตำแหน่งของยีนบนพลาสมิดและประเมินความปลอดภัยของพลาสมิดดีเอ็นเอก่อน จึงจะระบุได้ว่าพลาสมิดเหล่านี้สามารถใช้สำหรับการผลิตโปรตีนลูกผสมในแบคทีเรียเกรดอาหารได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรมประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2564 และขอขอบคุณ สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยทักษิณ

References

Alpert, C. A., Crutz–Le Coq, A. M., Malleret, C., & Zagorec, M. (2003). Characterization of a theta–type plasmid from *Lactobacillus sakei*: a potential basis for low–copy–number vectors in Lactobacilli. *Applied Environmental Microbiology*, *69(9)*, 5574–5584.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (2005). *FDA bacteriological analytical manual*. 18th ed. Washington DC.

Asteri, I. A., Papadimitriou, K., Boutou, E., Anastasiou, R., Pot, B., Vorgias, C. E., & Tsakalidou, E. (2010). Characterization of pLAC1, a cryptic plasmid isolated from *Lactobacillus acidipiscis* and comparative analysis with its related plasmids. *International Journal of Food Microbiology*, *141*(3), 222–228.

Auputinan, P., Tragoolpua, Y., Pruksakorn, S., & Thongwei, N. (2011). Profile of plasmids in Lactobacilli isolated from fermented food. *Chiang Mai Journal of Science*, *38*(4), 648–652.

Chen, C., Ai, L. Z., Zhou, F., Ren, J., Sun, K., Zhang, H., Chen, W., & Guo, B. (2012). Complete nucleotide sequence of plasmid pST–III from *Lactobacillus plantarum* ST–III. *Plasmid*, *67*(3), 236–244.

Cho, G. S., Huch, M., Mathara, J. M., Van Belkum, M. J., & Franz, C. M. A. P. (2013). Characterization of pMRI 5.2, a rolling–circle–type plasmid from *Lactobacillus plantarum* BFE 5092 which harbours two different replication initiation genes. *Plasmid*, *69*(2), 160–171.

Crowley, S., Bottacini, F., Mahony, J., & Van Sinderen, D. (2013). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* strain 16, a broad–spectrum antifungal–producing lactic acid bacterium. *Genome Announcement*, *1*(4), e00533–13.

Eguchi, T., Doi, K., Nishiyama, K., Ohmomo, S., & Ogata, S. (2000). Characterization of a phage resistance plasmid, pLKS, of silage – making *Lactobacillus plantarum* NGRI0101. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, *64*(4), 751–756.

Feld, L., Bielak, E., Hammer, K., & Wilcks, A. (2009). Characterization of a small erythromycin resistance plasmid pLFE1 from the food–isolate *Lactobacillus plantarum* M345. *Plasmid*, *61*(3), 159–170.

Gao, Y., Lu, Y., Teng, K. L., Chen, M. L., Zheng, H. J., Zhu, Y. Q., & Zhong, J. (2011). Complete genome sequence of *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* CV56, a probiotic strain isolated from the vaginas of healthy women. *Journal of Bacteriology*, *193*(11), 2886–2887.

Gilbert, C., Robinson, K, Le Page, R. W., & Wells, J. M. (2000). Heterologous expression of an immunogenic pneumococcal type 3 capsular polysaccharide in *Lactococcus lactis*. *Infection and Immunity, 68*(6), 3251–3260.

Hua, X., Zhou, Y., Feng, Y., Duan, K., Ren, X., Sun, J., Gao, S., Wang, N., Li, J., Yang, J., Xia, D., Li, C., Guan, X., Chi, W., & Liu, M. (2021). Oral vaccine against IPNV based on antibiotic–free resistance recombinant *Lactobacillus casei* expressing CK6–VP2 fusion protein. *Aquaculture*, *535*, 736425. doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.736425

Jie, L., Zhang, H., Zhang, J., Jin, J., Lui, H., & Xie, Y. (2017). Characterization of four novel plasmids from *Lactobacillus plantarum* BM4. *Jundishapur Journal of Microbiology*, *10*(11), e12894. doi: 10.5812/jjm.12894

Klaenhammer, T. R. (1984). A general method for plasmid isolation in lactobacilli. *Current Microbiology*, *10,* 23–28. doi: 10.1007/BF01576043

Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (eds.), *Nucleic acids techniques in bacterial systematics* (pp. 115–175), New York: John Wiley & Sons.

Lin, C. F., Ho, J. L., & Chung, T. C. (2001). Characterization of the replication region of the *Lactobacillus reuteri* plasmid pTC82 potentially used in the construction of cloning vector. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, *65*(7), 1495–1503.

Liu, Y. Y., Yang, W. T., Shi, S. H., Li, Y. J., Zhao, L., Shi, C. W., Zhou, F. Y., Jiang, Y. L., Hu, J. T., Gu, W., Yang, G. L., & Wang, C. F. (2017). Immunogenicity of recombinant *Lactobacillus plantarum* NC8 expressing goose parvovirus VP2 gene in BALB/c mice. *Journal of Veterinary Science*, *18*(2), 159–167.

Mills, S., McAuliffe, O. E., Coffey, A., Fitzgerald, G. F., & Ross, R. P. (2006). Plasmids of lactococci–genetic accessories or genetic necessities? *FEMS Microbiology Reviews*, *30*(2), 243–273.

Moon, G. S., Lee, Y. D., & Kim, W. J. (2008). Screening of a novel lactobacilli replicon from plasmids of *Lactobacillus reuteri* KCTC 3678. *Food Science and Biotechnology*, *17*(2), 438–441.

Nitipan, S., Sritrakul, T., Kunjantarachot, A., & Prapong, S. (2013). Identification of epitopes in *Leptospira borgpetersenii* leucine–rich repeat proteins. *Infection, Genetics and Evolution, 14*, 46–57.

Pan, Q., Zhang, L., Li, J., Chen, T., Chen, W., Wang, G., & Yin, J. (2011). Characterization of pLP18, a novel cryptic plasmid of *Lactobacillus plantarum* PC518 isolated

from Chinese pickle. *Plasmid*, *65*(3), 204–209.

Panya, M., Lulitanond, V., Tangphatsornruang, S., Namwat, W., Wannasutta, R., Suebwongsa, N., & Mayo, B. (2012). Sequencing and analysis of three plasmids from *Lactobacillus casei* TISTR1341 and development of plasmid–derived *Escherichia coli–L. casei* shuttle vectors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *93*(1), 261–272.

Pedersen, K., Tiainen, T., & Larsen, J. L. (1996). Plasmid profiles, restriction fragment length polymorphisms and O–serotypes among *Vibrio anguillarum* isolates. *Epidemiology and Infection*, *117*(3), 471–478.

Siezen, R. J., Bayjanov, J., Renckens, B., Wels, M., Van Hijum, S. A. F. T., Molenaar, D., & Van Hylckama Vlieg, J. E. T. (2010). Complete genome sequence of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KF147, a plant– associated lactic acid bacterium. *Journal of Bacteriology*, *192*(10), 2649–2650.

Siezen, R. J., & Van Hylckama Vlieg, J. E. T. (2011). Genomic diversity and versatility of *Lactobacillus plantarum*, a natural metabolic engineer. *Microbial Cell Factories, 10*(Suppl 1), S3. doi: 10.1186/1475–2859–10–S1–S3

Soomro, A. H., & Masud, T. (2007). Protein pattern and plasmid profile of lactic acid bacteria isolated from Dahi, a traditional fermented milk product of Pakistan. *Food Technology and Biotechnology*, *45*(4), 447–453.

Sorvig, E., Mathiesen, G., Naterstad, K., Eijsink, V. G. H., & Axelsson, L. (2005). High–level, inducible gene expression in *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus plantarum* using versatile expression vectors. *Microbiology (Reading)*, *151*(Pt7), 2439–2449.

Suphatpahirapol, C., Nguyen, T. H., Tansiri, Y., Yingchutrakul, Y., Roytrakul, S., Nitipan, S., Wajjwalkul, W., Haltrich, D., Prapong, S., & Keawsompong, S. (2019). Expression of a leptospiral leucine–rich repeat protein using a food-grade vector in *Lactobacillus plantarum*, as a strategy for vaccine delivery. *3 Biotech*, *9*, 324. doi: 10.1007/s13205–019–1856–8

Van Reenen, C. A., Chikindas, M. L., Van Zyl, W. H., & Dicks, L. M. T. (2003). Characterization and heterologous expression of a class IIa bacteriocin, plantaricin 423 from *Lactobacillus plantarum* 423, in *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, *81*(1), 29–40.

Wang, Z., Yu, Q., Gao, J., & Yang, Q. (2012). Mucosal and systemic immune responses induced by recombinant *Lactobacillus* spp. expressing the hemagglutinin of the avian influenza virus H5N1. *Clinical and Vaccine Immunology*, *19*(2), 174–179.

Weber, S., Horn, R., & Friedt, W. (1998). Isolation of a low–copy plasmid from agrobacterium using QIAprep technology. QIAGEN News No. 5 1998, 7.

Zang, Y., Tian, Y., Li, Y., Xue, R., Hu, L., Zhang, D., Sun, S., Wang, G., Chen, J., Lan, Z., Lin, S., & Jiang, S. (2020). Recombinant *Lactobacillus acidophilus* expressing S1 and S2 domains of porcine epidemic diarrhea virus could improve the humoral and mucosal immune levels in mice and sows inoculated orally. *Veterinary microbiology*, *248*, 108827.

Zhang, Z., Man, C., Sun, L., Yang, X., Li, M., Zhang, W., & Jiang, Y. (2019). Short communication: Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* J26, a probiotic strain with immunomodulatory activity. *Journal of Dairy Science*, *102*(12), 10838–10844. doi: 10.1016/j.vetmic.2020.108827

Zhu, J., Sun, J., Tang, Y., Xie, J., & Wei, D. (2020). Expression, characterization and structural profile of a heterodimeric β–galactosidase from the novel strain *Lactobacillus curieae* M2011381. *Process Biochemistry*, *97*, 87–95.

Research article

Isolation and identification of DNA plasmids of *Lactobacillus* spp. isolated from traditional food in Southern Thailand

Supachai Nitipan[1*] and Pramuan Saithong[2]

[1]*Microbial Technology for Agriculture, Food and Environment Research Center, Thaksin University, Phatthalung campus, Phapayom, Phatthalung, 93210*
[2] *Department of Applied Microbiology, Institute of Food Research and Product Development, Kasetsart University, Bangkok, 10900*

ARTICLE INFO

Article history
Received: 28 June 2022
Revised: 16 August 2022
Accepted: 20 August 2022
Online published: 31 August 2022

Keyword
DNA Plasmid
recombinant protein
vaccine
lactic acid bacteria
fermented food

ABSTRACT

Lactobacillus is lactic acid bacteria (LAB), which have been found in various fermented foods. Recently, Lactobacillus was used as a host–cell bacteria to produce the recombinant protein. These proteins were antigens that could produce the immunity against several diseases. Additionally, antigen–producing Lactobacillus could use directly as edible vaccine via mixing with feed and drinking water, reducing the protein purification process. DNA plasmids of Lactobacillus were specific and different with plasmid of gram's negative bacteria. The novel DNA plasmids were found and developed. The most of those plasmid DNA are patented in many countries. The aims of this research were to isolate and classify the DNA plasmids of Lactobacillus isolated from traditional fermented foods sampling around Southern area of Thailand namely Pla–som, Pla–duk–ra, Pla–pang–dang, Kung–som and Nham–hed. The twenty of eighty–nine isolates were isolated DNA plasmid. A total thirty– four DNA plasmids were found in *L. plantarum*, *L. lactis*, *L. acidophilus* and *L. casei*. There were one to three DNA plasmids per isolate, with DNA plasmid sizes ranging between 2.5 to 15 kb. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) identification revealed that all DNA plasmids had eight distinct enzyme recognition sites for *Eco*RI, *Hind*III and *Bam*HI.

*Corresponding author
E–mail address: nisupachai@tsu.ac.th (S. Nitipan)

Online print: 31 August 2022 Copyright © 2022. This is an open access article, production, and hosting by Faculty of Agricultural Technology, Rajabhat Maha Sarakham University. https://doi.org/10.14456/paj.2022.13