การแยกแลคติกแอสิดแบคทีเรียจากอาหารหมักเพื่อนำมาพัฒนาเป็นตัวนำดีเอ็นเอ

Isolation of Lactic Acid Bacteria from Fermented Foods to be developed as DNA Delivery Vehicles

ศรีสรรค์ ปูพบุญ, นริศรา ปัดภัย, สุกฤตา ปุณยอุปพัทธ์, ปาริชาติ พุ่มขจร และ พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ*

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

*E-mail: rattanachaikunsopon@yahoo.com

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่เหมาะสมไปพัฒนาเป็นตัวนำดีเอ็นเอเข้าสู่ร่างกายมนุษย์ จากการแยกแลคติกแอสิดแบคทีเรีย (LAB) จากปลาส้มและผักดอง ได้ LAB จำนวน 42 ไอโซเลต ซึ่งมีเพียง 10 ไอโซเลตเท่านั้น (SF-02, SF-03, SF-09, SF-10, SF-12, SF-15, SF-17, SF-18, SF-20 และ SF-22) ที่สามารถยับยั้งได้ทั้ง *Escherichia coli* และ *Listeria monocytogenes* เมื่อนำ LAB ทั้ง 10 ไอโซเลตดังกล่าวไปศึกษาการทนกรด และเกลือน้ำดี พบว่า เฉพาะ LAB รหัส SF-09 เท่านั้นที่ทนกรดที่ pH เท่ากับ 2 และทนเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.30% ได้ การตรวจสอบสายพันธุ์ของ LAB รหัส SF-09 โดยวิธี 16S rDNA sequence analysis พบว่าลำดับเบสของ 16S rDNA ของ LAB ดังกล่าวคล้ายกับลำดับเบสของ 16S rDNA ของ *Enterococcus faecium* strain LMG 11423 ด้วยเปอร์เซ็นต์ความคล้ายเท่ากับ 99% ดังนั้นจึงเรียก LAB ดังกล่าวว่า *E. faecium* SF-09 การทดลองสกัดพลาสมิดจาก *E. faecium* SF-09 ทำให้ทราบว่าแบคทีเรียดังกล่าวไม่มีพลาสมิด เมื่อทดลองนำ vector DNA pFLP1 เข้าสู่เซลล์ของ *E. faecium* SF-09 โดยวิธี electroporation พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวสามารถรับเอา pFLP1 เข้าสู่เซลล์ได้ และพลาสมิดดังกล่าวยังสามารถคงอยู่ภายในเซลล์ของ *E. faecium* SF-09 ได้ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า *E. faecium* SF-09 มีศักยภาพที่จะนำไปปรับปรุงสายพันธุ์ให้เป็นตัวนำ DNA เข้าสู่ร่างกายของมนุษย์ต่อไป

คำสำคัญ: แลคติกแอสิดแบคทีเรีย ตัวนำดีเอ็นเอ อาหารหมัก

Abstract

This study aimed to find a suitable lactic acid bacterium for further development as a vehicle to deliver DNA into the human body. A total of 42 lactic acid bacteria (LAB) isolates were obtained from Pla Som (fermented fish) and fermented vegetables, 22 from the former and 20 from the latter. Of the isolated LAB, only 10 isolates (SF-02, SF-03, SF-09, SF-10, SF-12, SF-15, SF-17, SF-18, SF-20 และ SF-22) had antimicrobial ability against both *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. When these 10 LAB isolates with antimicrobial activity were tested for their tolerance to acid and bile salt, it was found that only LAB SF-09 was tolerant to acid at pH 2 and to bile salt at the concentration of 0.3%. The identification of LAB SF-09 by 16S rDNA sequence analysis revealed that its 16S rDNA sequence showed 99% homology to that of *Enterococcus faecium* strain LMG 11423. Therefore, LAB SF-09 was designated *E. faecium* SF-09. Plasmid isolation showed that *E. faecium* SF-09 contained no plasmid. The introduction of vector DNA pFLP1 into *E. faecium* SF-09 cells was successful by electroporation and the vector was found to be stable in the cells. This study showed that *E. faecium* SF-09 had potential for further genetic modification as a vehicle to deliver DNA into the human body

Keywords: Lactic acid bacteria; DNA delivery vehicle; Fermented foods

บทนำ

ในปัจจุบันมีการป้องกัน และรักษาโรคโดยการนำ DNA เข้าสู่ร่างกายมนุษย์ ตัวอย่างเช่น การนำ DNA ที่ทำหน้าที่เป็นวัคซีน (vaccine) เข้าสู่ร่างกายมนุษย์ เพื่อให้ร่างกายสามารถสร้างภูมิต้านทานโรคได้ หรือการนำ DNA เข้าสู่ร่างกายมนุษย์ เพื่อทดแทน DNA ที่ผิดปกติ เป็นต้น ถึงแม้ว่าการนำ DNA เข้าสู่ร่างกายมนุษย์สามารถทำได้หลายวิธี แต่วิธีที่จัดว่าง่าย สะดวก และเสียค่าใช้จ่ายน้อย คือ การนำ DNA เข้าสู่ร่างกายมนุษย์โดยการกิน ด้วยเหตุนี้ในปัจจุบันจึงมีความสนใจที่จะนำแบคทีเรียที่ปลอดภัย และไม่ก่อโรคมาใช้เป็นตัวนำ DNA (DNA delivery vehicle) เข้าสู่ร่างกายมนุษย์ แบคทีเรียที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากที่จะนำมาใช้เป็นตัวนำ DNA เข้าสู่ร่างกายมนุษย์ คือ แลคติกแอสิดแบคทีเรียที่พบในอาหาร หรือ food-grade lactic acid bacteria เนื่องจากแบคทีเรียประเภทนี้ถูกจัดให้เป็นแบคทีเรียที่มีความปลอดภัย และมีการรับเข้าสู่ร่างกายมนุษย์อยู่เป็นประจำอยู่แล้ว ข้อดีของการนำแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่พบในอาหารมาใช้เป็นตัวนำ DNA เข้าสู่ร่างกายมนุษย์ นอกจากมีความปลอดภัยแล้ว แลคติกแอสิดแบคทีเรียส่วนใหญ่ยังมีความสามารถในการทนต่อสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหาร และทนต่อสารต่าง ๆ ในทางเดินอาหาร เช่น เอนไซม์ต่าง ๆ และน้ำดี เป็นต้น ที่ผ่านมา มีงานวิจัยจำนวนมาก ที่ศึกษาเกี่ยวกับการนำแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่พบในอาหารมาใช้เป็นตัวนำ DNA เข้าสู่ร่างกายของมนุษย์ เช่น *Lactococcus lactis* [1], [2], *Lactobacillus casei* [3], *Lactobacillus acidophilus* [4] และ *Streptococcus gordonii* [5]

ในการพัฒนาแลคติกแอสิดแบคทีเรียให้มีความสามารถในการนำ DNA เข้าสู่ร่างกายมนุษย์ มีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมี vector DNA ที่ได้รับการยอมรับว่าปลอดภัย และสามารถนำเข้าสู่ร่างกายของมนุษย์ได้ โดย vector DNA เหล่านี้ต้องประกอบด้วย DNA ที่ได้มาจากแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารเท่านั้น ดังนั้นจึงมักเรียก vector DNA เหล่านี้ว่า food-grade vector DNA นอกจากนี้ลักษณะที่สำคัญของ food-grade vector DNA คือต้องไม่มียีนที่ทำให้แบคทีเรียดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (antibiotic resistance gene) เป็นส่วนประกอบ ในปัจจุบันมี food-grade vector DNA หลายชนิดที่ถูกสร้างขึ้นเพื่อใช้กับแบคทีเรียต่าง ๆ เช่น pLEB590 ซึ่งถูกสร้างขึ้นเพื่อใช้สำหรับ *Lactococcus lactis* [6] pND919 ซึ่งถูกสร้างขึ้นเพื่อใช้สำหรับ *Streptococcus thermophilus* [7] pFMN30 ซึ่งถูกสร้างขึ้นเพื่อใช้สำหรับ *Lactococcus lactis* [8] pLEB690 ซึ่งถูกสร้างขึ้นเพื่อใช้สำหรับ *Lactococcus lactis* [9] และ pFLP1 ซึ่งถูกสร้างขึ้นเพื่อใช้สำหรับ *Lactbacillus plantarum* [10]

ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกแลคติกแอสิดแบคทีเรียจากอาหารที่มีคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการนำไปพัฒนาเป็นตัวนำ DNA เข้าสู่ร่างกายมนุษย์ต่อไป ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวได้แก่ การทนต่อสภาวะความเป็นกรด การทนต่อน้ำดี และการมี vector DNA ภายในเซลล์ เพื่อใช้ในการรับเอายีนของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นเข้าสู่เซลล์ได้ แลคติกแอสิดแบคทีเรียที่ได้จากการศึกษานี้มีประโยชน์ต่อการนำไปศึกษาและพัฒนาต่อเพื่อให้เหมาะสมต่อการนำไปใช้เป็นตัวนำ DNA เข้าร่างกายมนุษย์ต่อไป

วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. อาหาร และเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบที่ใช้ในงานวิจัย

อาหารหมักที่ใช้ในการแยกและคัดเลือกแลคติกแอสิดแบคทีเรีย ได้แก่ ผักเสี้ยนดอง และปลาส้มจากตลาดวารินเจริญศรี อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี

เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบที่ใช้ในการศึกษานี้ได้แก่ *Escherichia coli* O157:H7 และ *Listeria monocytogenes* ATCC 19115

2. การแยกและคัดเลือกเชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรียจากอาหารหมัก

การแยกและคัดเลือกแลคติกแอสิดแบคทีเรียจากตัวอย่างอาหารหมัก ทำโดยชั่งตัวอย่างอาหารหมัก 25 กรัม ใส่ใน 0.85% (w/v) NaCl ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Stomacher ทำ serial dilution ให้ได้ระดับความเจือจางที่ 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} และ 10^{-6} จากนั้นปิเปตเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลวของตัวอย่างอาหารที่ความเจือจาง 10^{-4}, 10^{-5} และ 10^{-6} เติมลงบนผิวหน้าของอาหาร MRS agar ที่เติม 1% (w/v) $CaCO_3$ โดยใช้เทคนิค spread plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำโคโลนีที่สร้างโซนใสรอบโคโลนีไป streak plate จนได้โคโลนีเดี่ยวๆ เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ ทำการศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์ โดยการย้อมสีแกรม จากนั้นเก็บรักษาแลคติกแอสิดแบคทีเรียในอาหาร MRS broth ที่เติม 30% (v/v) glycerol ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

3. การทดสอบความสามารถของแลคติกแอสิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

การทดสอบความสามารถของแลคติกแอสิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ ประกอบด้วยขั้นตอนการเตรียมส่วนใสปราศจากเซลล์ (cell free supernatant) ของแลคติกแอสิดแบคทีเรีย และขั้นตอนการทดสอบกิจกรรมการยับยั้ง

ขั้นตอนการเตรียมส่วนใส ปราศจากเซลล์ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียทำโดยเลี้ยงแลคติกแอสิดแบคทีเรียในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่เจริญไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเซลล์ออก จากนั้นเก็บส่วนใสไว้ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบต่อไป

ขั้นตอนการทดสอบกิจกรรมการยับยั้ง ใช้วิธี swab-paper disc ซึ่งทำโดยนำเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ *E. coli* O157:H7 และ *L. monocytogenes* ATCC 19115 ที่เลี้ยงไว้ในอาหาร nutrient broth (NB) และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาป้าย (swab) บนจานอาหาร nutrient agar (NA) นำแผ่น paper disc ปลอดเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร วางลงบนผิวหน้าอาหาร จากนั้นหยด cell free supernatant ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบนแผ่น paper disc จากนั้นนำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกต inhibition zone ที่เกิดขึ้นรอบๆ แผ่น paper disc ในการทดลองนี้ใช้อาหาร MRS broth ที่ปลอดเชื้อเป็น negative control และใช้ยาปฏิชีวนะมาตรฐาน Penicillin (10 ไมโครกรัม) และ Tetracycline (30 ไมโครกรัม) disc เป็น positive control

4. การทดสอบความสามารถของแลคติกแอสิดแบคทีเรียในการทนกรด

การทดสอบความสามารถของแลคติกแอสิดแบคทีเรียในการทนกรดและเบส ทำโดยถ่ายเชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่ปรับ pH ให้มีค่าต่างๆ คือ 2, 3, 4 และ 7 โดยใช้ 5 M HCl หรือ 5 M NaOH วิเคราะห์ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 0 ชั่วโมง และหลังจากบ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส โดยวิธี plate count แสดงผลเป็นค่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดซึ่งสามารถคำนวณโดย

เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด = {[ปริมาณเชื้อรอดชีวิตที่ 3 ชั่วโมง (Log CFU/ml)] / [ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 0 ชั่วโมง (Log CFU/ml)]} x 100

5. การทดสอบความสามารถของแลคติกแอสิดแบคทีเรียในการทนเกลือน้ำดี

การทดสอบความสามารถของแลคติกแอสิดแบคทีเรียในการทนเกลือน้ำดี ทำโดยถ่ายเชื้อแลคติกแอสิด แบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่เติม Ox-bile power ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.15% และ

0.3% (w/v) วิเคราะห์ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 0 ชั่วโมง และหลังจากบ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส โดยวิธีการ plate count แสดงผลเป็นค่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด (ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น)

6. การตรวจวินิจฉัยชนิดของแลคติกแอสิดแบคทีเรียโดยวิธี 16S rDNA sequence analysis

การตรวจวินิจฉัยชนิดของแลคติกแอสิดแบคทีเรียโดยวิธี 16S rDNA sequence analysis ทำโดยสกัด genomic DNA ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป (Real Biotech Corporation, Taiwan) นำ genomic DNA ที่ได้มาใช้เป็นแม่แบบ (template) เพื่อทำ PCR (polymerase chain reaction) โดยใช้ primer 2 ชนิด ได้แก่ FD1 ซึ่งมีลำดับเบสเป็น 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' และ RP2 ซึ่งมีลำดับเบสเป็น 5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3' สภาวะที่ใช้ในการทำ PCR คือ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที 1 รอบ, 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที, 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที 1 รอบ นำ PCR product ที่ได้ไปตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเครื่อง automated DNA sequencer แล้วนำลำดับเบสที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสของ 16S rDNA ในฐานข้อมูล GENBANK โดยใช้โปรแกรม BLASTN (Basic Local Alignment Search Tools) เพื่อหาค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงหรือความเหมือน (% identity) ระหว่างลำดับเบสของ 16S rDNA ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียกับลำดับเบสของ 16S rDNA ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียในฐานข้อมูล GENBANK

7. การสกัดพลาสมิดจากแลคติกแอสิดแบคทีเรีย

การสกัดพลาสมิดจากแลคติกแอสิดแบคทีเรียทำโดยนำแลคติดแอสิดแบคทีเรียมาเลี้ยงใน MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป (NucleoSpin® Plasmid QuickPure, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Germany) จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้ไปวิเคราะห์โดยวิธี agarose gel electrophoresis

8. การนำ vector DNA เข้าสู่เซลล์ของแลคติกแอสิดแบคทีเรีย

การนำ vector DNA เข้าสู่เซลล์ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียโดยวิธี electroporation ประกอบด้วยขั้นตอนการเตรียม electrocompetent cell และขั้นตอนการนำ vector DNA เข้าสู่ electrocompetent cell

ขั้นตอนการเตรียม electrocompetent cell ทำโดยเลี้ยงแลคติกแอสิดแบคทีเรีย ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่เติม 0.5 M sorbitol ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นทำการถ่ายเชื้อ โดยนำเชื้อที่เลี้ยงไว้ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ไปใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ growth medium (MRS broth, 0.5 M sorbitol, 3% glycerol, 40 mM DL-threonine) ปริมาตร 800 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนเชื้อเข้าสู่ระยะ mid log phase แล้วเก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างเซลล์ดังกล่าวสองครั้งด้วยสารละลาย washing solution (0.5 M sorbitol, 10% glycerol) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร และแขวนลอย (suspen) เซลล์แบคทีเรียในสารละลาย electroporation buffer (0.5 M sorbitol, 1 mM K_2HPO_4, 1 mM MgCl, pH 7.0) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอด microcentrifuge tube หลอดละ 80 ไมโครลิตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้

ขั้นตอนการนำ vector DNA เข้าสู่ electrocompetent cell ทำได้โดยนำ electrocompetent cell ที่เตรียมไว้ปริมาตร 80 ไมโครลิตร และ vector DNA ซึ่งในการศึกษานี้ใช้ pFLP1 [10] ประมาณ 1 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด electroporation cuvette ที่มีขนาดของ electrode gap เท่ากับ 1 มิลลิเมตร ความกว้าง 2 มิลลิเมตร electricalfield 12.5 kv/cm จากนั้นนำหลอด electroporation cuvette ดังกล่าวไปใส่ในเครื่อง Hybaid celljet Pro (Hybaid Ltd., UK) ซึ่งตั้งค่า

สำหรับการทำ electroporation ดังนี้ ค่าความต้านทานเท่ากับ 200 Ω ค่าความจุไฟฟ้า (capacitance) เท่ากับ 25 μF ค่า Voltage เท่ากับ 2,500 V และเวลาเท่ากับ 5 ms หลังจากนั้นนำหลอด electroporation cuvette ออกจากเครื่อง Hybaid celljet Pro และเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ recovery medium (MRS broth, 0.5 M sorbital, 20 mM MgCl, 2 mM $CaCl_2$) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอด electroporation cuvette ดังกล่าว แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเลี้ยงบนอาหาร MRS agar ที่มี $CdCl_2$ ความเข้มข้นเท่ากับ 0.3 mM บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สังเกตโคโลนีที่ปรากฏบนผิวหน้าอาหาร ซึ่งโคโลนีดังกล่าวจะเป็นเซลล์ที่ได้รับ vector DNA เรียกแบคทีเรียที่ได้ในขั้นตอนนี้ว่า “transformant”

การตรวจสอบว่าโคโลนีของแบคทีเรียที่สามารถเจริญบนอาหาร selective medium ดังกล่าวมี pFLP1 หรือไม่ทำโดยการเลือกโคโลนีของ *E. Faecium* SF-09 transformant แบบสุ่มจำนวน 3 โคโลนีมาสกัดพลาสมิด ตามวิธีการที่กล่าวมาข้างต้น และนำพลาสมิดที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) 2 ชนิด คือ *Kpn*I และ *Bam*HI ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถตัด pFLP1 ให้ได้เป็น DNA 2 ชิ้น ที่มีขนาด 5.2 kb และ 2.9 kb

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. การแยกแลคติกแอสิดแบคทีเรียจากอาหารหมัก และการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

การทดลองนี้สามารถคัดเลือกแลคติกแอสิดแบคทีเรียได้ทั้งหมด 42 ไอโซเลต โดยแบ่งเป็นแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่แยกได้จากปลาส้มจำนวน 22 ไอโซเลต และแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่แยกได้จากผักเสี้ยนดองจำนวน 20 ไอโซเลต จากนั้นนำแบคทีเรียที่ได้ทั้งหมดไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ 2 ชนิด ซึ่งได้แก่ *E. coli* O157:H7 และ *L. monocytogenes* ATCC 19115 โดยวิธีการ swab-paper disc ซึ่งพบว่ามีแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 2 ชนิด จำนวน 10 ไอโซเลต (SF02, SF03, SF09, SF10, SF12, SF15, SF17, SF18, SF20 และ SF22)

2. การทดสอบความสามารถของแลคติกแอสิดแบคทีเรียในการทนกรด

เมื่อนำแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 2 ชนิดมาทดสอบความสามารถในการทนกรดที่ระดับ pH 2, 3, 4 และ 7 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่ามีเฉพาะแลคติกแอสิดแบคทีเรียรหัส SF-09 เท่านั้นที่สามารถทนกรดได้ทั้งที่ pH 2, 3 และ 4 และหากสังเกตอัตราการรอดชีวิต (% survival rate) ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียรหัส SF-09 ที่ pH 2, 3 และ 4 จะพบว่ามีค่ามากกว่า 100% ซึ่งหมายความว่าแลค ติกแอสิดแบคทีเรียรหัส SF-09 ไม่เพียงแต่ทนกรดได้ที่ pH 2, 3 และ 4 เท่านั้น แต่ยังสามารถเจริญได้ที่ pH ดังกล่าวด้วย (ตารางที่ 1)

3. การทดสอบความสามารถของแลคติกแอสิดแบคทีเรียในการทนเกลือน้ำดี

เมื่อนำแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 2 ชนิดมาทดสอบความสามารถในการทนเกลือน้ำดีที่ระดับความเข้มข้นของเกลือน้ำดี เท่ากับ 0.15% และ 0.3% เป็นเวลา 3 ชั่วโมงพบว่า มีแลคติกแอสิดแบคทีเรียจำนวน 10 ไอโซเลตที่สามารถทนและเจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือน้ำดีทั้งสองความเข้มข้น (สังเกตจากการที่มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 100%) ซึ่งได้แก่ แลคติกแอสิดแบคทีเรียรหัส SF-02, SF-03, SF-09, SF-10, SF-12, SF-18, SF-20 และ SF-22 (ตารางที่ 2)

จากผลการทดลองที่ผ่านมาเห็นได้ว่ามีเพียงแลคติกแอสิดแบคทีเรียรหัส SF-09 เท่านั้นที่มีความสามารถในการยับยั้งได้ทั้ง *E. coli* O157:H7 และ *L. monocytogenes* มีความสามารถในการทนกรดที่ pH 2, 3 และ 4 และมีความสามารถในการทนเกลือน้ำดีที่ความระดับความ เข้มข้นของเกลือน้ำดี

เท่ากับ 0.15% และ 0.3% ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้เฉพาะแลคติกแอสิดแบคทีเรียรหัส SF-09

4. การตรวจวินิจฉัยชนิดของแลคติกแอสิดแบคทีเรียโดยวิธี 16S rDNA sequence analysis

เมื่อนำแลคติกแอสิดแบคทีเรียรหัส SF-09 มาสกัดเอา genomic DNA เพื่อใช้เป็น template DNA ในการทำ PCR โดยใช้ universal primer 2 ชนิด คือ fd1 และ 1492r ซึ่งเป็น primer ที่จำเพาะต่อ 16S rDNA พบว่า PCR product ที่ได้มีขนาดประมาณ 1,500 bp เมื่อนำ PCR product ไปตรวจหาลำดับเบส พบว่ามีลำดับเบสจำนวน 1,512 bp และเมื่อนำลำดับเบสดังกล่าวไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสของ 16S rDNA ที่อยู่ในฐานข้อมูล GENBANK พบว่าลำดับเบสของ PCR product ที่ได้มีความคล้ายคลึงกับลำดับเบสของ 16S rDNA ของ *Enterococcus faecium* strain LMG 11423 (accession NR NR_042054.1) ด้วยเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง (% homology) เท่ากับ 99% ผลจากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าแลคติกแอสิดแบคทีเรีย รหัส SF-09 มีความเป็นไปได้ที่จะเป็นแบคทีเรีย *Enterococcus faecium* ดังนั้นจึงให้ชื่อแบคทีเรียดังกล่าวว่า *Enterococcus faecium* SF-09

ตารางที่ 1 อัตราการรอดชีวิตของแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่ระดับ pH ต่างๆ

LAB isolate	(% survival rate)			
	pH 2.0	pH 3.0	pH 4.0	pH 7.0
SF-02	0	100.00	100.17	100.65
SF-03	0	100.25	100.95	103.45
SF-09	108.80	108.85	109.47	110.82
SF-10	0	102.23	103.41	105.02
SF-12	0	95.99	101.41	101.50
SF-15	0	95.44	97.62	98.80
SF-17	0	97.44	105.00	105.31
SF-18	0	74.65	95.35	101.68
SF-20	0	88.51	91.28	100.00
SF-22	0	92.88	100.00	104.07

ตารางที่ 2 อัตราการรอดชีวิตของแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้นของเกลือน้ำดีเท่ากับ 0.15% และ 0.3%

LAB isolate	(% survival rate)	
	0.15% bile salt	0.3% bile salt
SF-02	105.50	105.95
SF-03	103.06	102.09
SF-09	105.73	105.47
SF-10	103.56	104.26
SF-12	104.96	101.24
SF-15	83.79	73.75
SF-17	96.87	96.43
SF-18	103.00	102.11
SF-20	99.03	97.56
SF-22	107.39	103.53

5. การตรวจสอบการมีพลาสมิดของแลคติกแอสิดแบคทีเรียรหัส SF-09

เมื่อนำแลคติกแอสิดแบคทีเรียรหัส SF-09 มาทำการสกัดพลาสมิด แล้วนำไปศึกษาด้วยวิธี agarose gel lectrophoresis พบว่าแลคติกแอสิดแบคทีเรียดังกล่าวไม่มีพลาสมิด

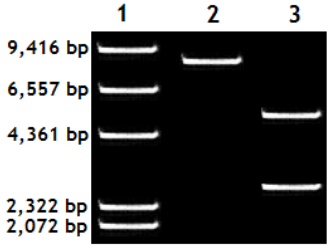
การจะนำ vector DNA เข้าสู่เซลล์แบคทีเรียมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องตรวจสอบดูว่าแบคทีเรียที่จะนำมาเป็นตัวรับ vector DNA มีพลาสมิดอยู่ภายในเซลล์หรือไม่ หากเซลล์แบคทีเรียมีพลาสมิดอยู่จะทำให้มีข้อจำกัดในการเลือกใช้ vector DNA กล่าวคือ vector DNA ที่จะนำมาใช้ได้ต้องเข้ากันได้กับพลาสมิดที่เซลล์แบคทีเรียมีอยู่ หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งก็คือ vector DNA ที่ใส่เข้าไปกับ พลาสมิดที่มีอยู่เดิมจะต้องสามารถอยู่ด้วยกันได้ภายในเซลล์แบคทีเรีย แต่หากเซลล์แบคทีเรียไม่มีพลาสมิดอยู่ จะทำให้ข้อจำกัดในการเลือกใช้ vector DNA น้อยลง เนื่องจากไม่ต้องกังวลถึงการเข้ากันได้ระหว่าง vector DNA ที่ใส่เข้าไปกับพลาสมิดที่มีอยู่เดิม ตัวอย่างการทดลองที่แสดงให้เห็นว่าพลาสมิดที่แบคทีเรียมีอยู่เดิมสามารถขัดขวางการรับDNA ชนิดอื่นเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียได้ ได้แก่ การทดลองของ Tomita และคณะ [11] โดย Tomita และคณะได้นำ *Enterococcus faecium*

BM4105RF สองสายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ที่มีพลาสมิด pMG1 และสายพันธุ์ที่ไม่มีพลาสมิด pMG1 มาเป็นตัวรับพลาสมิด pHTα pHTβ และ pHTγ พบว่า *E. faecium* BM4105RF สายพันธุ์ที่ไม่มีพลาสมิด pMG1 สามารถรับพลาสมิดทั้งสามชนิดได้ดีกว่า *E. faecium* BM4105RF สายพันธุ์ที่มีพลาสมิด pMG1 ในการศึกษานี้ พบว่า *E. faecium* SF-09 ไม่มีพลาสมิด ซึ่งทำให้การเลือกใช้ vector DNA สำหรับนำเข้าสู่แบคทีเรียดังกล่าวมีข้อจำกัดน้อยลง

6. การนำ pFLP1 เข้าสู่เซลล์ของแลคติกแอสิดแบคทีเรีย

หลังจากที่ทำการทดลองนำ pFLP1 เข้าสู่เซลล์ของ *E. faecium* SF-09 โดยวิธี electroporation แล้วนำเซลล์ที่ได้ไปเลี้ยงบนอาหาร selective medium (MRS-Cd agar) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีโคโลนีของแบคทีเรียที่สามารถเจริญบนอาหาร selective medium ดังกล่าวได้ ด้วยเหตุที่แบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS-Cd agar เป็น *E. faecium* SF-09 ที่ได้มาจากการทำ electrotransformation ดังนั้นจึงเรียก *E. faecium* SF-09 transformant

จากการสกัดพลาสมิดพบว่า *E. faecium* SF-09 transformant ทั้ง 3 โคโลนีมีพลาสมิดที่มีขนาดประมาณ 8.1 kb (ซึ่งเป็นขนาดของ pFLP1) (รูปที่ 1) และเมื่อทำการตรวจสอบว่าพลาสมิดที่สกัดได้เป็น pFLP1 หรือไม่ โดยการตัดพลาสมิดที่สกัดได้ด้วย *Kpn*I และ *Bam*HI พบว่า พลาสมิด ดังกล่าวสามารถถูกตัดได้เป็น 2 ชิ้น มีขนาดเท่ากับ 5.2 kb และ 2.9 kb ซึ่งเป็นผลการทดลองที่ยืนยันว่าพลาสมิดที่สกัดได้เป็น pFLP1



รูปที่ 1 การศึกษาพลาสมิดที่สกัดได้จาก *E. faecium* SF-09 transformant โดยวิธี agarose gel electrophoresis (แสดงผลของ *E. faecium* SF-09 transformant เพียง 1ตัว); Lane 1 = DNA marker (lambda DNA cut with *Hin*dIII); Lane 2 = พลาสมิดที่สกัดได้จาก *E. faecium* SF-09 transformant; Lane 3 = DNA ที่ได้จากการตัด พลาสมิดที่สกัดได้จาก *E. faecium* SF-09 transformant ด้วย *Kpn*I และ *Bam*HI

ถึงแม้ว่า pFLP1 เป็น food grade vector DNA ที่สร้างจากพลาสมิดของ *Lactobacillus* แต่ในการศึกษานี้ ทางผู้วิจัยได้ทดลองใช้ vector DNA ดังกล่าวกับ *E. faecium* SF-09 ด้วยเหตุผล ดังนี้

1. มีรายงานความสำเร็จในการนำ vector DNA ที่สร้างจากพลาสมิดของ *Lactobacillus* เข้าสู่เซลล์ของ *Enterococcus* ซึ่งได้แก่ การนำ vector DNA pLAB1301 ซึ่งสร้างจากพลาสมิดของ *Lactobacillus hilgardii* เข้าสู่เซลล์ของ *Enterococcus faecalis* [12], [13] การนำ vector DNA pGT633 ซึ่งสร้างจากพลาสมิดของ *Lactobacillus reuteri* เข้าสู่เซลล์ของ *E. faecalis* [13], [14] และการนำ vector DNA pLFM2 ซึ่งสร้างจากพลาสมิดของ *Lactobacillus fermentus* เข้าสู่เซลล์ของ *E. faecalis* และ *E. faecium* [15]

2. มีการทดลองที่แสดงให้เห็นว่ายีน *repA* ใน pRV566 (ซึ่งก็คือยีน *repA* ใน pFLP1) สามารถทำให้พลาสมิดเพิ่มจำนวนได้ไม่เฉพาะใน *Lactobacillus* เท่านั้น แต่ยังสามารถทำให้พลาสมิดเพิ่มจำนวนได้ใน *Enterococcus* ด้วย [16]

3. pFLP014 เป็น food-grade vector DNA ที่สร้างขึ้นโดยทีมวิจัยที่ทำการศึกษานี้ [10] ดังนั้นจึงไม่มีปัญหาเรื่องการขออนุญาตใช้ เรื่องลิขสิทธิ์ และเรื่องเงื่อนไขต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการขอใช้

7. การเปรียบเทียบคุณสมบัติของ *E. faecium* SF-09 กับ *E. faecium* SF-09 transformant

จากการนำ *E. faecium* SF-09 transformant มาศึกษาการเจริญเติบโต ความสามารถในการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 และ *L. monocytogenes* ความสามารถในการทนกรดที่ pH 2, 3 และ 4 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และความสามารถในการทนเกลือน้ำดีที่ความระดับความ เข้มข้นของเกลือน้ำดี เท่ากับ 0.15% และ 0.3% เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างกับผลที่ได้ของ *E. faecium* SF-09 ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าการนำ pFLP1 เข้าสู่เซลล์ของ *E. faecium* SF-09 ไม่มีผลต่อคุณสมบัติดังกล่าวของแบคทีเรีย

สรุปและเสนอแนะ

จากการศึกษานี้ทำให้สรุปได้ว่า pFLP1 สามารถนำมาใช้เป็น vector DNA ในการปรับปรุงพันธุกรรมของ *E. faecium* SF-09 เพื่อให้สามารถทำหน้าที่เป็นตัวนำ DNA เข้าสู่ร่างกายมนุษย์ได้ แต่อย่างไรก็ตามการจะนำ *E. faecium* SF-09 ที่มี pFLP1 ไปใช้งานจริงยังอาจต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมอีกมาก เพื่อให้การใช้งานมีประสิทธิภาพสูงสุด

อย่างไรก็ตามในอนาคตข้างหน้า หากมีการสร้าง vector DNA จากพลาสมิดของ *Enterococcus* ขึ้นมาเพื่อใช้กับ *E. faecium* SF-09 ก็น่าจะทำให้การนำ vector DNA เข้าสู่เซลล์ของ *E. faecium* SF-09 และการเพิ่มจำนวนของ vector DNA ภายในเซลล์ของ *E. faecium* SF-09 มีประสิทธิภาพมากขึ้น จากการสืบค้นข้อมูล ถึงแม้ไม่พบว่าเคยมีการสร้าง food grade vector DNA สำหรับ *Enterococcus* มาก่อน แต่ก็มีรายงานการสร้าง vector DNA จากพลาสมิดของ *Enterococcus* [17] ซึ่งรายงานดังกล่าวชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้ของการพบพลาสมิดใน *Enterococcus* และการนำพลาสมิดดังกล่าวมาใช้ในการสร้าง vector DNA สำหรับใช้กับ *Enterococcus* ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

[1] Mannam, P., Jones, K. F. and Geller, B. L. 2004. “Mucosal vaccine made from live, recombinant *Lactococcus lactis* protects mice against pharyngeal infection with *Streptococcus pyogenes*”. **Infection and Immunity**. 72 (6): 3444-3450.

[2] Gu, Q., Song, D. and Zhu, M. 2009. “Oral vaccination of mice against *Helicobacter pylori* with recombinant *Lactococcus lactis* expressing urease subunit B”. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. 56 (3): 197-203.

[3] Wei, C. H., Liu, J. K., Hou, X. L., Yu, L. Y., Lee, J. S. and Kim, C. J. 2010. “Immunogenicity and protective efficacy of orally or intranasally administered recombinant *Lactobacillus casei* expressing ETEC K99”. **Vaccine**. 28 (24): 4113-4118.

[4] Mohamadzadeh, M., Duong, T., Sandwick, S. J., Hoover, T. and Klaenhammer, T. R. 2009. “Dendritic cell targeting of *Bacillus anthracis* protective antigen expressed by *Lactobacillus acidophilus* protects mice from lethal challenge.” **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 106 (11): 4331-4336.

[5] Lee, S. F., March, R. J., Halperin, S. A., Faulkner, G. and Gao, L. 1999. “Surface Expression of a Protective Recombinant Pertussis Toxin S1 Subunit Fragment in *Streptococcus gordonii*”. **Infection and Immunity**. 67(3): 1511-1516.

[6] Takala, T. M. and Saris, P. E. J. 2002. “A food-grade cloning vector for lactic acid bacteria based on the nisin immunity gene nisI.” **Applied Microbiology and Biotechnology**. 59 (4-5): 467-471.

[7] Wong, W. Y., Su, P., Allison, G. E., Liu, C. Q. and Dunn, N. W. 2003. “A potential food-grade cloning vector for Streptococcus thermophilus that uses cadmium resistance as the selectable marker.” **Applied and Environmental Microbiology**. 69 (10): 5767-5771.

[8] Jeong, D. W., Lee, J. H., Kim, K. H. and Lee, H. J. 2006. “A food-grade expression/secretion vector for *Lactococcus lactis* that uses an α-galactosidase gene as a selection marker.” **Food Microbiology**. 23 (5): 468-475.

[9] Li, R., Takala, T. M., Qiao, M., Xu, H. and Saris, P. E. 2011. “Nisin-selectable food-grade secretion vector for *Lactococcus lactis*.” **Biotechnology Letters**. 33 (4):797-803.

[10] Rattanachaikunsopon, P. and Phumkhachorn, P. 2012. “Construction of food-grade cloning vector for *Lactobacillus plantarum* and its utilization in food model.” **Journal of General and Applied Microbiology**. 58 (4): 317-324.

[11] Tomita, H., Tanimoto, K., Hayakawa, S., Morinaga, K., Ezaki, K., Oshima, H., and Ike, Y. 2003. “Highly Conjugative pMG1-Like Plasmids Carrying Tn1546-Like Transposons That Encode Vancomycin Resistance in *Enterococcus faecium*.” **Journal of Bacteriology**. 185 (23): 7024-7028.

[12] Josson, K., Soetaert, P., Michiels, F., Joos, H. and Mahillon, J. 1990. “*Lactobacillus hilgardii* plasmid pLAB1000 consists of two functional cassettes commonly found in other gram-positive organisms.” **Journal of Bacteriology**. 172 (6): 3089-3099.

[13] Shareck, J., Choi, Y., Lee, B. and Miguez, C. B. 2004. “Cloning vectors based on cryptic plasmids isolated from lactic acid bacteria: their characteristics and potential applications in biotechnology.” **Critical Reviews in Biotechnology**. 24 (4): 155-208.

[14] Tannock, G. W., Luchansky, J. B., Miller, L., Connel, H., Thode-Andersen, S., Mercer, A. A. and Klaenhammer, T. R. 1994. “Molecular characterization of a plasmid-borne (pGT633) erythromycin resistance determinant (ermGT) from *Lactobacillus reuteri* 100–63.” **Plasmid**. 31 (1): 60-71.

[15] Aleshin, V. V., Semenova, E. V., Doroshenko, V. G., Jomantas, Y. V., Tarakanov, B. V., and Livshits, V. A. 1999. “The broad host range plasmid pLF1311 from *Lactobacillus fermentum* VKM1311.” **FEMS Microbiology Lettres**. 178 (1): 47-53.

[16] Crutz-Le Coq, A. M. and Zagorec, M. 2008. “Vectors for Lactobacilli and other Gram-positive bacteria based on the minimal replicon of pRV500 from *Lactobacillus sakei*.” **Plasmid**. 60 (3):212-220.

[17] Wyckoff, H. A., Barnes, M., Gillies, K. O. and Sandine, W. E. 1996. “Characterization and sequence analysis of a stable cryptic plasmid from *Enterococcus faecium* 226 and development of a stable cloning vector.” **Applied and Environmental Microbiology**. 62 (4): 1481-1486.