รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การแยกและศึกษาคุณสมบัติของไลติกเฟจที่ทำลาย *Lactococcus lactis* RP359 ซึ่งเป็นหัวเชื้อในการหมักเค็มบักนัด

Isolation and characterization of lytic phage against *Lactococcus lactis* RP359, kem-buk-nud starter culture

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1. ผศ.ดร.ปาริชาติ พุ่มขจร	ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
2. รศ.ดร.พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ	ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงบประมาณแผ่นดิน
ประจำปีงบประมาณ 2554-2555

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย มอบ.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทสรุปผู้บริหาร

โครงการวิจัยเรื่อง "การแยกและศึกษาคุณสมบัติของไลติกเฟจที่ทำลาย *Lactococcus lactis* RP359 ซึ่งเป็นหัวเชื้อในการหมักเค็มบักนัด" (Isolation and characterization of lytic phage against *Lactococcus lactis* RP359, kem-buk-nud starter culture) เป็นโครงการวิจัยที่ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ โดยใช้เงินงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ 2554 และ 2555 (รหัสข้อเสนอโครงการวิจัย 2554A11702010 และ 2555A11702010) วงเงินที่ได้รับจัดสรรในปีงบประมาณ 2554 เท่ากับ 337,700.- บาท (สามแสนสามหมื่นเจ็ดพันเจ็ดร้อยบาท) และวงเงินที่ได้รับจัดสรรในปีงบประมาณ 2555 เท่ากับ 345,400.- บาท (สามแสนสี่หมื่นห้าพันสี่ร้อยบาท) ภายใต้การบริหารโครงการโดยมีหัวหน้าโครงการคือ นางปาริชาติ พุ่มขจร และผู้ร่วมโครงการคือ นายพงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ ระยะเวลาการดำเนินงานวิจัยเริ่มตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2553 ถึงวันที่ 31 กันยายน 2555

โครงการวิจัยดังกล่าวมีวัตถุประสงค์สำคัญ 2 ประการคือ (1) เพื่อตรวจหาแบคเทอริโอเฟจที่สามารถทำลาย *Lactococcus lactis* RP359 และ (2) เพื่อศึกษาคุณสมบัติสำคัญบางประการของแบคเทอริโอเฟจที่แยกได้นั้น โดยคุณสมบัติที่ทำการศึกษามีดังนี้ ศึกษาความสามารถของแบคเทอริโอเฟจในการทำลายแลคติกแอสิดแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ศึกษาผลของสารละลาย $CaCl_2$ ต่อการเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจในโฮสต์เซลล์ ศึกษาการยึดเกาะของแบคเทอริโอเฟจบนผิวเซลล์ของโฮสต์ ศึกษาการทนความร้อนของแบคเทอริโอเฟจ ศึกษารูปร่างของแบคเทอริโอเฟจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน ศึกษาโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของแบคเทอริโอเฟจโดยวิธี SDS-PAGE และศึกษาสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจ

การดำเนินงานของโครงการวิจัยนี้ ได้บรรลุวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ทั้ง 2 ประการ โดยได้ตั้งชื่อแบคเทอริโอเฟจที่แยกได้นี้ว่า "แบคเทอริโอเฟจ ϕRP359" และได้ทำการศึกษาคุณสมบัติสำคัญของแบคเทอริโอเฟจดังกล่าวในด้านต่าง ๆ ตามขอบเขตของแผนงานที่เสนอไว้ ผลที่ได้จากงานวิจัยในครั้งนี้ได้รวบรวมเขียนเป็นต้นฉบับภาษาอังกฤษและส่งไปตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ และได้รับการตอบรับให้ตีพิมพ์ในวารสาร African Journal of Microbiology Research ในชื่อเรื่อง "Isolation and characterization of lytic phage against *Lactococcus lactis* RP359, kem-buk-nud starter culture" ในปี 2012 ฉบับที่ 6(37) หน้า 6678-6684

บทคัดย่อ

การทำลายหัวเชื้อโดยแบคเทอริโอเฟจ เป็นปัญหาที่สำคัญประการหนึ่งในกระบวนการหมัก เนื่องจากอาจส่งผลให้กระบวนการหมักล้มเหลวได้ ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์คือ ต้องการแยกแบคเทอริโอเฟจที่มีความสามารถในการบุกรุกทำลายหัวเชื้อ *Lactococcus lactis* RP359 ในการหมักเค็มบักนัดซึ่งเป็นอาหารหมักพื้นบ้านชนิดหนึ่งของคนไทย พร้อมทั้งศึกษาคุณสมบัติสำคัญบางประการของแบคเทอริโอเฟจดังกล่าวนั้น ผลการศึกษาพบว่าสามารถแยกแบคเทอริโอเฟจที่สามารถบุกรุกทำลาย *L. lactis* RP359 ได้หนึ่งชนิดจากอาหารหมักเค็มบักนัด และเรียกแบคเทอริโอเฟจที่แยกได้นี้ว่า แบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 เมื่อทำการศึกษาคุณสมบัติของแบคเทอริโอเฟจดังกล่าวพบว่า แบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 จัดเป็นไลติกเฟจ เนื่องจากสามารถทำให้เกิดพลาคที่มีลักษณะใส และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของพลาคโดยเฉลี่ยเท่ากับ 1 ถึง 1.5 มิลลิเมตร ความสามารถในการทำลายแบคทีเรียของแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 มีความจำเพาะสูงมากต่อ *L. lactis* RP359 จากการศึกษารูปร่างและสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 พบว่า เป็นแบคเทอริโอเฟจที่มีหางแบบยืดหดได้ และมีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอสายคู่ ดังนั้นจึงจัดเป็นแบคเทอริโอเฟจในแฟมิลี *Myoviridae* การศึกษาโปรตีนโครงสร้างของแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 โดยวิธี SDS-PAGE พบว่ามีโครงสร้างหลักประกอบด้วยโปรตีน 5 ชนิด ซึ่งมีขนาดเท่ากับ 80, 57, 40, 25 และ 15 กิโลดาลตัล แบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 มีความสามารถในการยึดเกาะบนผิวเซลล์ของโฮสต์ได้สูงถึง 85 เปอร์เซ็นต์ภายในเวลา 20 นาที และสามารถทนความร้อนได้ค่อนข้างดีคือ สามารถทนความร้อนได้ในช่วงอุณหภูมิ 60-90 องศาเซลเซียส แม้ว่าจำนวนแบคเทอริโอเฟจที่รอดชีวิตจะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นก็ตาม นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณแคลเซียมไอออนมีผลต่อการเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 โดยปริมาณแคลเซียมไอออนที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจมีค่าเท่ากับ 20 มิลลิโมลาร์ จากผลการศึกษาในครั้งนี้อาจกล่าวได้ว่าแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 เป็นแบคเทอริโอเฟจชนิดแรกที่มีรายงานว่าตรวจพบในอาหารหมักเค็มบักนัดของไทย ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากการศึกษาคุณสมบัติของแบคเทอริโอเฟจดังกล่าวจึงน่าจะเป็นประโยชน์และสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นแนวทางในการพัฒนากระบวนการหมักเค็มบักนัดแบบเติมหัวเชื้อได้ในอนาคต

Abstract

Starter culture-infecting bacteriophages have become a major problem of food fermentation because of their ability to ruin fermentation. This study aims to isolate and characterize a phage having ability to infect *Lactococcus lactis* RP359, a starter culture of kem-buk-nud, a traditional Thai fermented food. A lytic phage ϕRP359 was isolated from a kem-buk-nud sample and produced clear plaques of 1 to 1.5 mm in diameter. It was highly specific to *L. latis* RP359. Since phage ϕRP359 was a tailed phage with a contractile tail and its genome was double stranded DNA, the phage was classified as a member of the family *Myoviridae.* Structural protein profile of the phage studied by SDS-PAGE consisted of 5 bands with molecular masses of 80, 57, 40, 25, and 15 kDa. The highest phage adsorption rate of 85% was observed at 20 min of infection. Although the phage was tolerant to high temperature, the temperature dependent reduction of phage titer was observed over the temperature ranging from 60 to 90°C. The influence of Ca^{2+} ion on phage propagation was also observed with the optimal concentration of Ca^{2+} ion of 20 mM. Phage ϕRP359 is the first starter culture-infecting phage isolated from kem-buk-nud. Knowledge of its characteristics and infection mechanism might help to improve the starter culture dependent fermentation of kem-buk-nud.

สารบัญเรื่อง

หน้า

บทสรุปผู้บริหาร	i
บทคัดย่อไทย	ii
บทคัดย่ออังกฤษ	iii
สารบัญเรื่อง	iv
สารบัญตาราง	v
สารบัญรูป	vi
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	3
บทที่ 3 วัสดุและวิธีการทดลอง	11
บทที่ 4 ผลการทดลอง	17
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	26
เอกสารอ้างอิง	31
ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ กิจกรรมที่ดำเนินการมา และผลที่ได้รับตลอดโครงการ	34
รายงานการเงิน	36
ภาคผนวก (บทความที่ตีพิมพ์เผยแพร่)	37

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1	ตัวอย่างอาหารหมักและแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่เป็นหัวเชื้อ	4
ตารางที่ 2	ตัวอย่างแบคเทอริโอเฟจที่ทำลายแลคติกแอสิดแบคทีเรีย	7
ตารางที่ 3	ชนิดและจำนวนอาหารหมักและการตรวจพบแบคเทอริโอเฟจ	17
ตารางที่ 4	การทดสอบความสามารถของแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 ในการทำลายแลคติกแอสิดแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ๆ	19

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 ตัวอย่างรูปร่างและส่วนประกอบสำคัญของแบคเทอริโอเฟจ 8

รูปที่ 2 การเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจ 8

รูปที่ 3 แบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารหมักเค็มบักนัด 18

รูปที่ 4 ผลของแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) ต่อการเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 20

รูปที่ 5 การยึดเกาะของแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 บนผิวเซลล์ *Lactococcus lactis* RP359 21

รูปที่ 6 การทนความร้อนของแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 ที่อุณหภูมิ 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส 22

รูปที่ 7 ภาพถ่ายของแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 เมื่อย้อมแบบ negative staining และศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) 23

รูปที่ 8 โปรตีนโครงสร้างของแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 เมื่อแยกโดยวิธี SDS-PAGE 24

รูปที่ 9 สารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 เมื่อตัดด้วย restriction endonuclease 25

บทที่ 1
บทนำ

ไนซิน (nisin) เป็นแบคเทอริโอซินชนิดหนึ่ง สร้างจาก *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* มีฤทธิ์ยับยั้งหรือทำลายเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ เช่น จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียของอาหาร (food-spoilage microorganisms) และจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร (food pathogen) แม้ว่าแลคติกแอสิดแบคทีเรีย (lactic acid bacteria; LAB) ชนิดอื่นก็สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้ และแบคเทอริโอซินแต่ละชนิดก็มีคุณสมบัติทางชีวเคมี และความสามารถในการยับยั้งหรือทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้แตกต่างกัน แต่ปัจจุบันมีเพียงไนซินเท่านั้นที่ได้รับการยอมรับจากทั้งยุโรป และอเมริกาว่าสามารถนำไปใช้เป็นสารถนอมอาหาร (food preservative) และถือว่าปลอดภัยในการบริโภค (generally recognized as safe; GRAS) ไนซินสามารถทำลายเชื้อก่อโรคที่สำคัญได้หลายชนิด เช่น *Listeria monocytogenes, Clostridium botulinum* และ *Bacillus cereus* เป็นต้น ไนซินนอกจากจะช่วยลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารแล้ว ยังช่วยยืดอายุของอาหาร (shelf-life) ทำให้สามารถเก็บไว้ได้นานขึ้นด้วย ด้วยเหตุนี้ *Lactococcus lactis* RP359 ซึ่งแยกได้จากอาหารหมักพื้นบ้านของทางภาคอีสานคือเค็มบักนัด และเป็นสายพันธุ์ที่สามารถสร้างไนซินได้ จึงมีศักยภาพที่จะนำไปใช้เป็นหัวเชื้อ (starter culture) ในการหมัก เพื่อทำให้ได้อาหารหมักที่มีคุณภาพดี ปลอดภัยและเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคมากยิ่งขึ้น

การหมักอาหารสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 แบบ คือ (1) spontaneous fermentation คือการหมักที่เกิดขึ้นเองโดยธรรมชาติ การหมักแบบนี้นับว่าเป็นวิธีการหมักแบบดั้งเดิมและยังคงใช้อยู่จนกระทั่งทุกวันนี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการหมักที่ทำในครัวเรือนหรือระดับชุมชน ปัญหาของการหมักแบบ spontaneous fermentation คือความไม่แน่นอนของผลผลิต เช่น อาจเกิดความล้มเหลวของการหมัก ความไม่คงที่หรือไม่สม่ำเสมอของรสชาติ (taste) กลิ่น (smell) และเนื้อสัมผัส (texture) ของอาหาร และต้องอาศัยประสบการณ์และความชำนาญในการหมัก อีกทั้งยังไม่สามารถเพิ่มคุณค่าของผลผลิตได้ตามต้องการ ซึ่งเหล่านี้ล้วนมีผลต่อความนิยมของผู้บริโภคด้วย โดยเฉพาะกลุ่มผู้บริโภคที่ไม่คุ้นเคยกับอาหารหมักมักเกรงว่าจะไม่ถูกสุขลักษณะ (2) starter fermentation คือการหมักที่มีการเติมจุลินทรีย์บางชนิดลงไปเป็นเชื้อเริ่มต้นของการหมัก และเรียกเชื้อที่เติมลงไปนั้นว่า หัวเชื้อ (starter culture) ซึ่งไปทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการหมักและผลผลิตให้มีคุณสมบัติเป็นไปตามที่ต้องการ คุณสมบัติหรือลักษณะของจุลินทรีย์ที่เป็นหัวเชื้อที่ดี ได้แก่ ช่วยลดระยะเวลาการหมักให้สั้นลง สามารถผลิตสารที่ให้กลิ่นหรือรสชาติที่ดี สามารถผลิตวิตามินบางชนิด หรือสามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้ เป็นต้น การหมักแบบนี้เป็นที่นิยมมากในการผลิตระดับอุตสาหกรรมหรือเพื่อการส่งออกโดยเฉพาะในประเทศที่พัฒนาแล้ว เพราะสามารถแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นจากการหมักแบบ spontaneous fermentation ได้ จึงช่วยลดการสูญเสียที่อาจเกิดจากความล้มเหลวของการหมัก ช่วยเพิ่มมูลค่าให้ผลผลิต และเพิ่มความปลอดภัยในการบริโภค อีกทั้งยังสามารถควบคุมผลผลิตแต่ละครั้งให้มีคุณภาพหรือมาตรฐานใกล้เคียงกันด้วย ดังนั้นการหมักแบบ starter

fermentation จึงนับว่ามีบทบาทสำคัญที่จะช่วยพัฒนาอุตสาหกรรมการหมักเพื่อให้ได้อาหารหมักที่มีคุณภาพดียิ่งขึ้น

ปัญหาหนึ่งที่พบในกระบวนการหมักแบบ starter fermentation คือ แบคทีเรียที่เป็นหัวเชื้อมักถูกทำลายโดยไวรัสหรือแบคเทอริโอเฟจ (bacteriophage) ทำให้เกิดการตายของหัวเชื้อหรือมีจำนวนลดลงมากจนไม่สามารถควบคุมกระบวนการหมักให้ดำเนินต่อไปได้ หรือแม้ว่าการหมักจะสามารถดำเนินไปได้แต่ก็ให้ผลผลิตที่ขาดคุณสมบัติตามต้องการเพราะหัวเชื้อได้ถูกทำลายไปหมดแล้ว ปัญหาดังกล่าวนี้พบได้ในอาหารหมักหลายชนิด ได้แก่ การหมักแตงกวาดอง (fermented cucumber) โดยใช้ *Lactobacillus plantarum* เป็นหัวเชื้อ การหมักชีส (Swiss cheeses) โดยใช้ *Lactobacillus helveticus* เป็นหัวเชื้อ การหมักกระหล่ำปลีดอง (sauerkraut) โดยมีแลคติกแอสิดแบคทีเรียหลายชนิดร่วมกันเป็นหัวเชื้อ และการหมักยาคูลท์ (Yakult) โดยใช้ *Lactobacillus casei* strain Shirota เป็นหัวเชื้อ เป็นต้น

แนวทางหนึ่งที่จะช่วยป้องกันมิให้หัวเชื้อถูกทำลายโดยแบคเทอริโอเฟจคือ การคัดเลือก (selection) หรือการใช้วิธีทางพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) ในการปรับปรุงพันธุ์แบคทีเรียหัวเชื้อให้ได้สายพันธุ์ที่ต้านทานต่อแบคเทอริโอเฟจ (bacteriophage resistance strain) ซึ่งจะช่วยทำให้หัวเชื้อดังกล่าวไม่ถูกทำลายโดยแบคเทอริโอเฟจหลังจากที่เติมลงไปในถังหมักแล้ว อย่างไรก็ตามการปรับปรุงพันธุ์ของหัวเชื้อให้มีคุณสมบัติทนทานต่อแบคเทอริโอเฟจจะต้องมีข้อมูลมากพอเกี่ยวกับแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อหัวเชื้อชนิดนั้น แต่เท่าที่ทราบในขณะนี้แทบจะไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับแบคเทอริโอเฟจในอาหารหมักของไทยเลย ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับนิเวศวิทยาของแบคเทอริโอเฟจ (bacteriophage ecology) เช่น แหล่งที่อยู่ (habitat) วงจรชีวิต (life-cycle) และวิธีการเพิ่มจำนวน (replication) เป็นต้น ตลอดจนการศึกษาความสามารถในการทำลายแลคติกแอสิดแบคทีเรียชนิดอื่น (host range) รูปร่าง (morphology) และโครงสร้างหรือส่วนประกอบของแบคเทอริโอเฟจ และชนิดของสารพันธุกรรม (genome) ของแบคเทอริโอเฟจ เหล่านี้ล้วนมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการวิเคราะห์หาแนวทางในการป้องกันมิให้แบคเทอริโอเฟจบุกรุก (infect) ทำลายหัวเชื้อ ในการศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นที่จะตรวจหาและศึกษาคุณสมบัติของแบคเทอริโอเฟจจากอาหารหมักพื้นบ้านของไทยซึ่งสามารถทำลาย *L. lactis* RP359 ข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการนำไปพัฒนาหัวเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว ให้มีความต้านทานต่อแบคเทอริโอเฟจ อีกทั้งยังน่าจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้กับหัวเชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรียชนิดอื่นที่มีปัญหาในลักษณะเดียวกันนี้ได้อีกด้วย

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรม

แลคติกแอสิดแบคทีเรีย (lactic acid bacteria; LAB) เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ใน family *Lactobacillaceae* ติดสีแกรมบวก (gram-positive) ไม่สร้างสปอร์ (non-spore forming) ไม่สร้างเอ็นไซม์คะตะเลส (catalase) เจริญได้ดีในที่ที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย (microaerophile) สามารถหมัก (ferment) น้ำตาลแล้วให้ผลผลิตหลักคือ กรดแลคติก (lactic acid) มีรูปร่างทั้งแบบกลม (*Aerococcus,* Alloiococcus, *Carnobacterium, Enterococcus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus, Tetragenococcus, Vagococcus*) และแบบแท่ง (*Lactobacillus, Carnobacterium, Bifidobacterium*) (De Vuyst and Vandamme, 1993)

แลคติกแอสิดแบคทีเรียสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม โดยอาศัยผลผลิตสุดท้ายที่เกิดขึ้นหลังกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคส คือ (1) homofermentative lactic acid bacteria หมายถึงแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก (lactic acid) เป็นผลผลิตหลัก (ประมาณ 85-90%) และ (2) heterofermentative lactic acid bacteria หมายถึงแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่นอกจากผลิตกรดแลคติก (ประมาณ 50%) แล้วยังผลิตสารอื่น ๆ ด้วย เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ (carbon dioxide) และเอธานอล (ethanol) เป็นต้น (De Vuyst and Vandamme, 1993; Axelsson, 1998)

ในอดีตการผลิตอาหารหมักมักเกิดขึ้นจากการสังเกตและความบังเอิญ โดยอาศัยแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่มีอยู่ตามธรรมชาติในอาหารเป็นตัวการทำให้เกิดกระบวนการหมัก และเป็นเพียงอุตสาหกรรมในครัวเรือน กระบวนการหมักอาหารแบบนี้จึงเรียกว่า spontaneous fermentation หรือ natural fermentation ซึ่งเป็นกระบวนการหมักอาหารที่ผู้ผลิตไม่สามารถควบคุมคุณภาพของอาหารหมักได้ ต่อมาความรู้และเทคโนโลยีทางด้านการหมักได้พัฒนาไปทำให้อาหารหมักและอาหารแปรรูปกลายเป็นอุตสาหกรรมขนาดใหญ่และมีหลากหลายชนิด จนบางครั้งผู้บริโภคแทบจะไม่รู้ตัวว่าอาหารที่บริโภคอยู่นั้นเป็นผลิตผลที่ได้จากกระบวนการหมัก อุตสาหกรรมการผลิตอาหารหมักในปัจจุบันมีการใช้แลคติกแอสิดแบคทีเรียเป็นเชื้อเริ่มต้นหรือหัวเชื้อ (starter culture) ในการหมักอาหารหลายชนิด (ตารางที่ 1) และเรียกการหมักแบบนี้ว่า starter fermentation สารต่าง ๆ ที่สร้างโดยแลคติกแอสิดแบคทีเรีย ได้แก่ กรดอินทรีย์ (organic acids) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) และไดอะซิติล (diacetyl) เป็นต้น ล้วนมีส่วนช่วยในการปรุงแต่งกลิ่น (smell) สี (color) เนื้อสัมผัส (texure) และรสชาติ (taste) ของอาหารให้ดียิ่งขึ้น อีกทั้งยังช่วยยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย (food-spoilage microorganisms) และจุลินทรีย์ก่อโรค (food pathogen) หลายชนิด (Caplice and Fitzgerald, 1999)

ตารางที่ 1 ตัวอย่างอาหารหมักและแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่เป็นหัวเชื้อ

อาหารหมัก	แลคติกแอสิดแบคทีเรียที่เป็นหัวเชื้อ
ผักดอง	
- Sauerkraut	*Leuc. mesenteroides, Lb. plantarum, P. acidilactici*
	Leuc. mesenteroides, P. cerevisiae, Lb. brevis,
- Pickles	*Lb. plantarum*
	Leuc. mesenteroides, Lb. pentosus, Lb. plantarum
- Fermented olives	*P. acidilactici, P. pentosaceus, Lb. plantarum,*
- Fermented vegetables	*Lb. fermentum*
เนื้อสัตว์หมัก	
- Fermented sausage (Europe)	*Lb. sakei, Lb. curvatus*
- Fermented sausage (USA)	*P. acidilactici, P. pentosaceus*
เครื่องดื่มหมัก	
- Wine (malolactic fermentation)	*O. oeni*
- Rice wine	*Lb. sakei*
นมและผลิตภัณฑ์จากนม	
- Hard cheeses without eyes	*L. lactis* subsp. *lactis, L. lactis* subsp. *cremoris*
- Cheeses with small eyes	*L. lactis* subsp. *lactis, L. lactis* subsp. *lactis var. diacetylactis,*
	L. lactis subsp. *cremoris,*
	Leuc. menesteroides subsp. *cremoris*
- Swiss-and Italian-type cheeses	*Lb. delbrueckii* subsp. *lactis, Lb. helveticus,*
	Lb. casei, Lb. delbrueckii subsp. *bulgaricus,*
	S. thermophilus
- Butter and buttermilk	*L. lactis* subsp. *lactis, L. lactis* subsp. *lactis var. diacetylactis,*
	L. lactis subsp. *cremoris,*
	Leuc. menesteroides subsp. *cremaris*
- Yoghurt	*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus, S. thermophilus*
- Fermented, probiotic milk	*Lb. casei, Lb. ocidophilus, Lb. rhamnosus,*
	Lb. johnsonii, B. lactis, B. bifidum, B. breve
- Kefir	*Lb. kefir, Lb. kefiranofacies, Lb. brevis*
แป้งหมัก	
- Sourdough	*Lb. sanfransiscensis, Lb. farciminis,*
	Lb. fermentum, Lb. brevis, Lb. plantarum,
	Lb. amylovorus, Lb. reuteri, Lb. pontis
ปลาหมัก	*Lb. alimentarius, C. piscicola*
ซอสถั่วเหลือง	*T. halophilus*

B.=Bifidobacterium, C.=Carnobacterium, L.=Lactococcus, Lb.=Lactobacillus, Leuc.=Leuconostoc,
O.=Oenococcus, P.=Pediacoccus, S.=Streptococcus, T.=Tetragenococcus, W.=Weissella

(Leroy and De Vuyst, 2004)

แบคเทอริโอซินเป็นสารจำพวกโปรตีนหรือมีโปรตีนเป็นส่วนประกอบ สร้างจากแบคทีเรียและมีฤทธิ์ยับยั้งหรือทำลายเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นได้ (Klaenhammer, 1998) โดยปกติแบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินจะมีภูมิต้านทานต่อฤทธิ์ของแบคเทอริโอซินที่ตนเองสร้าง การสร้างแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียนั้นเชื่อว่าเพื่อต่อสู้หรือแก่งแย่งในการดำรงชีวิตกับแบคทีเรียชนิดอื่นที่อาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมเดียวกัน โดยแบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินมีโอกาสที่จะมีชีวิตรอดมากกว่าแบคทีเรียที่ไม่ได้สร้างแบคเทอริโอซิน แบคเทอริโอซินที่จัดเป็นต้นแบบ (prototype) ที่ใช้ในการศึกษาคือ โคลิซิน (colicin) ซึ่งสร้างจาก *Escherichia coli* ต่อมาพบว่ามีแบคทีเรียอีกหลายชนิดในวงศ์ *Enterobacteriaceae* สามารถสร้างโคลิซินได้เช่นกัน อีกทั้งแบคทีเรียอื่นนอกเหนือจากวงศ์ *Enterobacteriaceae* ก็สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้ (Jack et. al., 1995) แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียต่างชนิดกันจะมีคุณสมบัติทางเคมีและชีวภาพแตกต่างกัน ปัจจุบันมีแบคเทอริโอซินเพียงชนิดเดียวคือ ไนซิน (nisin) ซึ่งสร้างจาก *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Buchman et. al., 1988) ถูกนำไปใช้เป็นสารชีวภาพถนอมอาหาร และเป็นที่ยอมรับของทั้ง Food and Drug Administration (FDA) และ World Health Organization (WHO) ว่าปลอดภัยต่อผู้บริโภค

ไนซินเป็นแบคเทอริโอซินที่จัดอยู่ในกลุ่มแลนไทไบโอติก (lantibiotics) หรือแบคเทอริโอซิน class I ประกอบด้วยกรดอะมิโน 34 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 3,500 ดาลตัน สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้หลายชนิด เช่น *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris, Micrococcus, Staphylococcus aureus, Mycobacterium, Corynebacterium, Listeria monocytogenes, Clostridium, Bacillus* และ *Lactobacillus* เป็นต้น และยังสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบได้ด้วยหากใช้ร่วมกับสารที่มีฤทธิ์ทำลาย outer membrane ของแบคทีเรีย (Steven et. al., 1992) ไนซินสามารถทนความร้อน 100 องศาเซลเซียสได้นานอย่างน้อย 10 นาที ถูกทำลายฤทธิ์โดยไคโมทริปซิน (chymotrypsin) แต่ไม่ถูกทำลายฤทธิ์โดยโปรเนส (pronase) และทริปซิน (trypsin) อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างไนซินคือ milk and buffered complex media ไนซินจะถูกสร้างออกมาในช่วง exponential phase ของการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย กระบวนการสร้างไนซินเมื่อผ่านขั้นตอน translation แล้วไนซินจะอยู่ในรูปโปรไนซิน (pronisin) ก่อน และก่อนส่งออกไปนอกเซลล์โปรไนซินจะถูกเอ็นไซม์ตัดเอาบางส่วนออกไปทำให้กลายเป็นไนซิน ไนซินมีฤทธิ์ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมาย ยีนที่ควบคุมการสร้างอาจอยู่ในพลาสมิดหรือโครโมโซมก็ได้ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อที่สร้าง (Buchman et. al., 1988) ไนซินมี 3 ชนิด (nisin variants) คือ ไนซิน เอ (nisin A), ไนซิน แซด (nisin Z) และ ไนซิน คิว (nisin Q) ซึ่งแต่ละชนิดมีลำดับของกรดอะมิโนแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

Lactococcus lactis RP359 เป็นแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่แยกได้จากเค็มบักนัด (โดยห้องปฏิบัติการของภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี) โดยพบว่าเป็นเชื้อที่สามารถสร้างไนซินได้ (Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn, 2008) และเมื่อทำการศึกษาแล้วพบว่ามีฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียก่อโรคได้หลายชนิด เช่น *Listeria monocytogenes, Clostridium perfringens, Staphylococcus aureus* และ *Bacillus cereus* เป็นต้น ดังนั้นจึงน่าจะ

สามารถนำไปพัฒนาเป็นหัวเชื้อในการหมักและนำกลับไปใช้ในอาหารหมักได้ เพื่อทำให้อาหารหมักมีคุณภาพ และมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคมากยิ่งขึ้น

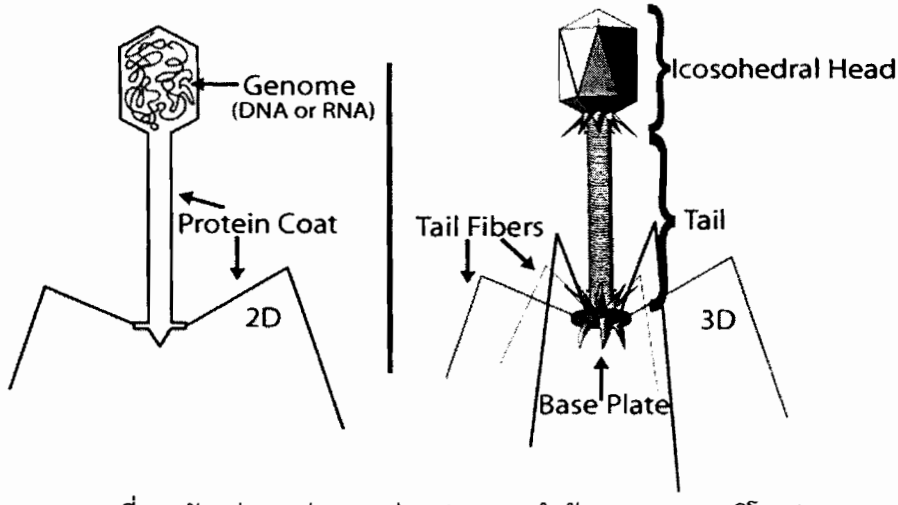
ปัญหาหนึ่งที่มักพบเมื่อมีการนำแลคติกแอสิดแบคทีเรียมาใช้เป็นหัวเชื้อของการหมักคือ การที่แลคติกแอสิดแบคทีเรียถูกทำลายโดยไวรัสหรือแบคเทอริโอเฟจ (bacteriophage) (Lu et. al., 2003; Deutsch et. al., 2002; Coffey et. al., 1998) ปัญหาดังกล่าวนำไปสู่การล้มเหลวของกระบวนการหมัก ซึ่งทำให้อาหารหมักที่ได้มีคุณภาพไม่ตรงตามที่ผู้ผลิตต้องการ การทำลายแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่เป็นหัวเชื้อของการหมักโดยแบคเทอริโอเฟจถูกค้นพบครั้งแรกโดย Whitehead และ Cox (1935) ซึ่งทำการศึกษากับ *Lactococcus lactis* หลังจากนั้นได้มีการค้นพบแบคเทอริโอเฟจที่ทำลายแลคติกแอสิดแบคทีเรียอีกหลายชนิด (ตารางที่ 2) ปัญหาดังกล่าวข้างต้นได้นำไปสู่ความพยายามในการหาวิธีป้องกันไม่ให้แลคติกแอสิดแบคทีเรียหัวเชื้อถูกทำลายโดยแบคเทอริโอเฟจ ซึ่งการหาวิธีป้องกันแลคติกแอสิดแบคทีเรียจากการทำลายของแบคเทอริโอเฟจชนิดใด ๆ ก็ตาม นักวิทยาศาสตร์จำเป็นต้องมีข้อมูลเกี่ยวกับแบคเทอริโอเฟจชนิดนั้น ๆ ให้มากที่สุด ดังนั้นในระยะแรกของการศึกษาเพื่อหาวิธีการในการป้องกันไม่ให้แลคติกแอสิดแบคทีเรียถูกทำลายโดยแบคเทอริโอเฟจ จึงต้องมุ่งเน้นในการศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของแบคเทอริโอเฟจ เช่น วงจรชีวิต (life cycle) ปัจจัยที่มีผลต่อการยึดเกาะกับเซลล์แบคทีเรียเป้าหมาย ปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจภายในเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านหรือโฮสต์ (host cell) ปฏิสัมพันธ์ระหว่างแบคเทอริโอเฟจกับแลคติกแอสิดแบคทีเรียซึ่งเป็นโฮสต์ (bacteriophage-host interaction) กลไกการทำลายแลคติกแอสิดแบคทีเรีย รูปร่างและโครงสร้างของแบคเทอริโอเฟจ (bacteiophage morphology) ตลอดจนชนิดของสารพันธุกรรม (genome) และลำดับเบสภายในสารพันธุกรรมนั้น เป็นต้น เมื่อได้ข้อมูลต่าง ๆ เหล่านี้แล้ว นักวิทยาศาสตร์จึงจะสามารถนำมาวิเคราะห์เพื่อหาวิธีการป้องกันการทำลายแลคติกแอสิดแบคทีเรียโดยแบคเทอริโอเฟจที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพต่อไป

แบคเทอริโอเฟจเป็นไวรัสของแบคทีเรีย มีโครงสร้างหรือส่วนประกอบสำคัญคือ สารพันธุกรรมหรือนิวคลิอิกแอสิด (nucleic acid) และโปรตีนห่อหุ้มสารพันธุกรรมเรียกว่า แคปซิด (capsid) ซึ่งอาจมีรูปร่างเป็นรูปหลายเหลี่ยม เช่น icosahedral เป็นต้น สารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจอาจเป็น DNA หรือ RNA ก็ได้ สารพันธุกรรมที่ถูกหุ้มด้วยแคปซิดนี้บางทีอาจเรียกว่า ส่วนหัว (head) แบคเทอริโอเฟจบางชนิดอาจมีส่วนประกอบเพิ่มเติมคือ มีส่วนซึ่งมีลักษณะเป็นท่อยาวต่อจากส่วนหัว เรียกว่า ส่วนหาง (tail) และบริเวณส่วนหางนี้อาจพบโครงสร้างอื่น ๆ ได้ด้วย เช่น base plate, tail fiber เป็นต้น (รูปที่ 1) การมีหรือไม่มีส่วนหาง และการยืด-หดได้ของส่วนหางนี้ยังสามารถใช้ในการจำแนกชนิดของแบคเทอริโอเฟจได้ด้วย (Ackermann, 2003)

ตารางที่ 2 ตัวอย่างแบคเทอริโอเฟจที่ทำลายแลคติกแอสิดแบคทีเรีย

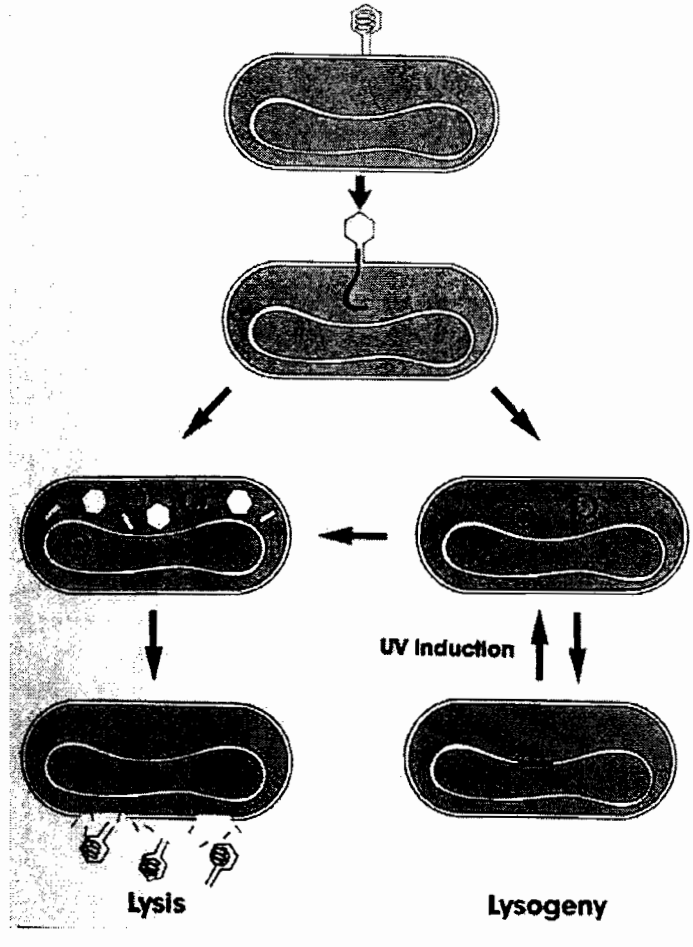
แบคเทอริโอเฟจ	แลคติกแอสิดแบคทีเรีย
bIL67 (lytic)	*L. lactis*
c2 (lytic)	*L. lactis*
sk1 (lytic)	*L. lactis*
ϕbIL70 (lytic)	*L. lactis*
r1t (temperate)	*L. lactis*
Tuc2009 (temperate)	*L. lactis*
Tp-901-1 (temperate)	*L. lactis*
ϕLL-H (lytic)	*Lb. delbrueckii* spp. *lactis*
ϕgle (temperate)	*Lactobacillus*
ϕ01205 (temperate)	*S. thermophilus*
ϕ7201 (temperate)	*S. thermophilus*
ϕDT1 (temperate)	*S. thermophilus*
BK5-T (temperate)	*L. lactis*
ϕvML3 (lytic)	*L. lactis*
F4-1 (lytic)	*L. lactis*
ϕ7-9 (lytic)	*L. lactis*
ϕ50 (lytic)	*L. lactis*
ϕLC3 (temperate)	*L. lactis*
ϕUS3 (lytic)	*L. lactis*
ϕ197 (lytic)	*L. lactis*
bIL66 (lytic)	*L. lactis*
bIL41 (lytic)	*L. lactis*
ϕ31 (lytic)	*L. lactis*
ϕadh (temperate)	*Lb. gasseri*
mv4 (temperate)	*Lb. delbrueckii* spp .*lactis*
ϕSfi21 (temperate)	*S. thermophilus*

(Forde and Fitzgerald, 1999)



รูปที่ 1 ตัวอย่างรูปร่างและส่วนประกอบสำคัญของแบคเทอริโอเฟจ

(ที่มา : http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Tevenphage.svg)



รูปที่ 2 การเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจ

(ที่มา : http://www.mun.ac/biochem/course/4103/figures/ptashne/Chapter1/F)

ในปี ค.ศ. 1967 Bradley ได้จำแนกแบคเทอริโอเฟจออกเป็นกลุ่มตามลักษณะรูปร่างและสารพันธุกรรมได้เป็น 6 กลุ่ม (group) คือ A, B, C, D, E และ F โดยแบคเทอริโอเฟจกลุ่ม A, B และ C มีสารพันธุกรรมเป็น double stranded DNA, แบคเทอริโอเฟจกลุ่ม D และ F มีสารพันธุกรรมเป็น single stranded DNA และแบคเทอริโอเฟจกลุ่ม E มีสารพันธุกรรมเป็น single stranded RNA แบคเทอริโอเฟจที่ยับยั้งหรือทำลายแลคติกแอสิดแบคทีเรียส่วนใหญ่จะอยู่ในกลุ่ม A, B และ C และแบคเทอริโอเฟจสำหรับ *Lactococcus* ส่วนใหญ่มักจะอยู่ในกลุ่ม B (Bradley, 1967)

โดยทั่วไปการบุกรุก (infect) ของแบคเทอริโอเฟจเข้าสู่โฮสต์เซลล์มักจะมีความจำเพาะสูงมาก (highly specific) หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคือแบคเทอริโอเฟจชนิดใดชนิดหนึ่งก็มักจะทำลายแบคทีเรียเพียงชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น ความจำเพาะระหว่างแบคเทอริโอเฟจกับแบคทีเรียที่เป็นโฮสต์เซลล์นั้น เกิดขึ้นโดยอาศัยการจับกันระหว่างตำแหน่งที่อยู่บนอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจ เรียกว่า attachment site กับตำแหน่งที่อยู่บนผิวเซลล์ของแบคทีเรียซึ่งเรียกว่า receptor site จากนั้นสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจก็จะถูกนำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียและเริ่มต้นสู่กระบวนการเพิ่มจำนวน (replication) ของแบคเทอริโอเฟจต่อไป

การเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจภายในเซลล์ของแบคทีเรียสามารถออกได้เป็น 2 ลักษณะคือ แบบ lysis (lytic cycle) และแบบ lysogeny (lysogenic cycle) (รูปที่ 2) การเพิ่มจำนวนแบบ lysis เมื่อสารพันธุกรรมถูกนำเข้ามาภายในเซลล์แล้ว กลไกต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการดำรงชีวิตของแบคทีเรียโดยปกติจะหยุดชะงักลง เนื่องจากแบคเทอริโอเฟจจะเข้าไปควบคุมและใช้กลไกต่าง ๆ เหล่านั้นเพื่อการเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจเท่านั้น โดยเริ่มจากสร้างโปรตีนหรือเอ็นไซม์สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการจำลองสารพันธุกรรม แล้วจึงสร้างโปรตีนหรือส่วนประกอบของแคปซิดและโครงสร้างอื่น ๆ จากนั้นส่วนประกอบต่าง ๆ ที่ถูกสร้างขึ้นมาเป็นจำนวนมากนี้จึงมารวมกัน (assembly) กลายเป็นแบคเทอริโอเฟจสมบูรณ์จำนวนมากเกิดขึ้นภายในเซลล์ แบคเทอริโอเฟจที่เกิดขึ้นใหม่นี้เรียกว่า progeny bacteriophage โดยระยะเวลาที่ใช้ตั้งแต่แบคเทอริโอเฟจบุกรุกเข้าสู่เซลล์และเกิด progeny bacteriophage อาจใช้เวลาเพียงเล็กน้อย เช่น 1-2 ชั่วโมงเท่านั้น ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคเทอริโอเฟจ และในที่สุดแบคเทอริโอเฟจก็จะสร้างสารบางอย่างออกมาทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรีย จนผนังเซลล์เกิดการแตกสลาย (lysis) และปล่อย progeny bacteriophage จำนวนมากเหล่านั้นออกมานอกเซลล์ จากนั้น progeny bacteriophage ซึ่งมีคุณสมบัติเช่นเดียวกับแบคเทอริโอเฟจเริ่มแรกที่เข้าสู่เซลล์ ก็พร้อมที่จะเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเซลล์ใหม่ที่อยู่ข้างเคียงต่อไป (Medigan et. al., 1997) การบุกรุกหรือทำลายเซลล์แบคทีเรียของแบคเทอริโอเฟจแบบ lysis นี้ ในที่สุดจะทำให้แบคทีเรียหมดไปจากบริเวณที่มีแบคเทอริโอเฟจชนิดนั้นอยู่ ส่วนการเพิ่มจำนวนแบบ lysogeny แบคเทอริโอเฟจที่สามารถเพิ่มจำนวนแบบนี้ได้เรียกว่า temperate phage เมื่อสารพันธุกรรมถูกนำเข้ามาภายในเซลล์แล้ว แบคเทอริโอเฟจจะนำสารพันธุกรรมนั้นเข้าไปแทรกอยู่ในโครโมโซมของแบคทีเรีย สารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจที่แทรกอยู่ในโครโมโซมนี้เรียกว่า prophage และเมื่อแบคทีเรียแบ่งตัวเพิ่มจำนวน สารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจก็จะมีการจำลองตัวเองไปพร้อมกัน และยังคงแทรกอยู่ในโครโมโซมเช่นเดิม โดยไม่ทำให้เกิด progeny bacteriophage ดังนั้นการเพิ่มจำนวนของ

แบคเทอริโอเฟจแบบ lysogeny จึงไม่ทำให้เกิดการแตกสลายหรือการตายของแบคทีเรีย (Vegge et. al., 2005) แต่อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของแบคทีเรียได้ ในบางสภาวะ prophage อาจหลุดออกจากโครโมโซมของแบคทีเรียและสามารถกลับเข้าสู่การเพิ่มจำนวนแบบ lysis ได้ เรียกปรากฏการณ์เช่นนี้ว่า induction โดยสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิด induction ได้แก่ การกระตุ้นด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet) หรือสารเคมีบางชนิด เป็นต้น

บทที่ 3
วัสดุและวิธีการทดลอง

1. จุลินทรีย์และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

ในการศึกษานี้จะใช้ *Lactococcus lactis* RP359 เป็นโฮสต์เซลล์ (host cell) เพื่อตรวจหาแบคเทอริโอเฟจในอาหารหมักชนิดต่าง ๆ นอกจากนี้แบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวยังใช้ในการเพิ่มจำนวนและศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของแบคเทอริโอเฟจที่ตรวจพบด้วย การศึกษาความสามารถของแบคเทอริโอเฟจในการทำลายแลคติกแอสิดแบคทีเรียชนิดอื่นใช้แลคติกแอสิดแบคทีเรียทดสอบดังแสดงในตารางที่ 4

แลคติกแอสิดแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษานี้เพาะเลี้ยงโดยใช้อาหารเหลว (MRS broth) หรืออาหารแข็ง (MRS agar) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลาประมาณ 18-24 ชั่วโมง การเก็บรักษาแลคติกแอสิดแบคทีเรีย ทำโดยนำแบคทีเรียที่เจริญในอาหาร MRS broth เติม glycerol ลงไปให้ได้สัดส่วนของ glycerol เท่ากับ 15% (v/v) นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการนำแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่เก็บรักษาไว้นี้มาใช้ จะนำไปเลี้ยงในอาหาร MRS broth ก่อน แล้วจึงนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

2. การเตรียมตัวอย่างอาหารหมัก

อาหารหมักที่นำมาใช้ในการแยกแบคเทอริโอเฟจแบ่งออกเป็น 2 ลักษณะคือ (1) อาหารที่มีลักษณะแห้งหรือมีน้ำเป็นส่วนประกอบน้อย (เช่น แหนม หม่ำ ไส้กรอกเปรี้ยว เค็มบักนัด เป็นต้น) และ (2) อาหารที่มีลักษณะเป็นน้ำหรือมีส่วนประกอบที่เป็นของเหลวมาก (เช่น ผักดองชนิดต่าง ๆ เป็นต้น) ในกรณีที่อาหารมีลักษณะแห้งหรือมีน้ำเป็นส่วนประกอบน้อย นำอาหารมาชั่งให้ได้น้ำหนักประมาณ 5 กรัม ผสมกับ PBS buffer ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) ไว้สำหรับทำการเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจ (bacteriophage enrichment) ในกรณีที่อาหารมีลักษณะเป็นน้ำหรือส่วนประกอบที่เป็นของเหลวมาก นำเอาส่วนที่เป็นน้ำหรือของเหลวมาใช้โดยตรง โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสไว้สำหรับทำการเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจในตัวอย่างอาหารในขั้นตอนต่อไป

3. การเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจในตัวอย่างอาหาร

การเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจในตัวอย่างอาหาร ใช้วิธี bacteriophage enrichment ซึ่งทำได้โดย นำส่วนใส (supernatant) ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงไปกรองผ่านแผ่นกรอง (membrane filter) ที่มีขนาดของรูพรุน (pore size) เท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร ของเหลวที่ผ่านการกรองจะเรียกว่า “ตัวอย่างที่กรองแล้ว” (filtrated sample) นำตัวอย่างที่กรองแล้วนี้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาผสมกับอาหาร MRS broth ที่เตรียมให้มีความเข้มข้นเป็นสองเท่า (double strength MRS broth) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเติม *L. lactis* RP359 ที่บ่มข้ามคืน (overnight culture) ลงไปปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 30 องศา

เซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงไปกรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดของรูพรุนเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร ของเหลวที่ผ่านการกรองนี้เรียกว่า "สารละลายสำหรับตรวจสอบแบคเทอริโอเฟจ" ซึ่งจะนำไปทดสอบว่ามีแบคเทอริโอเฟจที่สามารถทำลาย *L. lactis* RP359 อยู่หรือไม่โดยวิธี spot test

4. การตรวจหาแบคเทอริโอเฟจ

การตรวจหาแบคเทอริโอเฟจ (bacteriophage detection) ใช้วิธี spot test ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้ นำ *L. lactis* RP359 ที่เลี้ยงในอาหาร MRS broth และเจริญอยู่ในระยะ log phase ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมลงในหลอดอาหาร MRS soft agar ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นของ agar เท่ากับ 0.4% และก่อนใช้ให้นำไปหลอมเพื่อให้วุ้นละลายและมีอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส) ผสมแบคทีเรียและ soft agar ให้เข้ากันด้วย vortex mixer แล้วเททับให้ทั่วผิวหน้าอาหาร MRS agar รอให้ MRS soft agar ที่เททับลงไปนั้นแข็งตัว (ใช้เวลาประมาณ 5-10 นาที) จากนั้นหยดสารละลายสำหรับตรวจสอบแบคเทอริโอเฟจ ลงไปปริมาตร 10 ไมโครลิตร โดยหยดลงตรงกลางของจานเพาะเลี้ยงเชื้อ นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 18-24 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตว่ามีส่วนใสของการยับยั้ง (clear zone) เกิดขึ้นตรงตำแหน่งที่มีการหยดสารละลายสำหรับตรวจสอบแบคเทอริโอเฟจหรือไม่ ถ้ามีส่วนใสของการยับยั้งเกิดขึ้นที่ตำแหน่งดังกล่าวแสดงว่าในสารละลายดังกล่าวมีแบคเทอริโอเฟจที่สามารถทำลาย *L. lactis* RP359 อยู่

5. การแยกแบคเทอริโอเฟจ

ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop) ซึ่งฆ่าเชื้อแล้วขูดหรือลอกตรงบริเวณที่เกิด clear zone (เอาเฉพาะเนื้อวุ้นที่อยู่ชั้นบนซึ่งก็คือชั้นของ soft agar) ใส่ลงในหลอดทดลองซึ่งมี *L. lactis* RP359 เจริญอยู่ในระยะ log phase ในอาหาร MRS broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer เพื่อให้เนื้อวุ้นแตกกระจายในอาหาร MRS broth ดังกล่าว จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ประมาณ 18-24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงไปกรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดของรูพรุนเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร ของเหลวที่ผ่านการกรองนี้เรียกว่า "สารละลายแบคเทอริโอเฟจ" (bacteriophage suspension) นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

นำสารละลายแบคเทอริโอเฟจที่ได้มาทำ plaque assay โดยใช้วิธี double-layer agar method เพื่อให้ได้ plaque เดี่ยว ดังนี้ นำสารละลายแบคเทอริโอเฟจมาทำการเจือจางแบบ ten-fold serial dilution ในอาหาร MRS broth จากนั้นนำตัวอย่างที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงไปในอาหาร MRS soft agar ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติม *L. lactis* RP359 ที่เจริญอยู่ในระยะ log phase ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเททับลงบนอาหาร MRS agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 18-24 ชั่วโมง จากนั้นเลือก plaque ที่อยู่เดี่ยว ๆ มาหนึ่งอัน โดยใช้

loop เขี่ยเนื้อวุ้นตรงตำแหน่งที่เกิด plaque มาจุ่มลงในอาหาร MRS broth ที่มี *L. lactis* RP359 เจริญอยู่ในระยะ log phase ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เนื้อวุ้นแตกกระจายในอาหารโดยใช้ vortex mixer แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงไปกรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดของรูพรุนเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร ของเหลวที่ผ่านการกรองนี้เรียกว่า "สารละลายแบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์" (purified bacteriophage suspension) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปศึกษาในการทดลองอื่น ๆ ต่อไป

6. การหาความเข้มข้นของแบคเทอริโอเฟจ

ในการหาความเข้มข้นของแบคเทอริโอเฟจหรือนับปริมาณของแบคเทอริโอเฟจ (bacteriophage titer) จะรายงานเป็นค่า plaque-forming unit/ml (pfu/ml) โดยใช้วิธี double-layer agar method ซึ่งมีวิธีการคือ นำตัวอย่างที่ต้องการหาความเข้มข้นของแบคเทอริโอเฟจมาทำการเจือจางแบบ ten-fold serial dilution ในอาหาร MRS broth จากนั้นนำตัวอย่างที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงไปในอาหาร MRS soft agar ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติม *L. lactis* RP359 ที่เจริญอยู่ในระยะ log phase ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเททับลงบนอาหาร MRS agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 18-24 ชั่วโมง จากนั้นทำการนับจำนวน plaque ที่ปรากฏบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (เลือกนับจากจานเพาะเลี้ยงที่มี plaque อยู่ในช่วง 30-300 อัน) นำจำนวน plaque ที่นับได้ไปคำนวณค่าความเข้มข้นของแบคเทอริโอเฟจโดยใช้สูตรการคำนวณดังนี้

ความเข้มข้นของแบคเทอริโอเฟจ (pfu/ml) = จำนวน plaque × 10 × ระดับความเจือจาง

7. การศึกษาความสามารถของแบคเทอริโอเฟจในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น

ความสามารถของแบคเทอริโอเฟจในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น (bacteriophage host range) ทดสอบโดยวิธี spot test ดังนี้ นำแลคติกแอสิดแบคทีเรียทดสอบชนิดต่าง ๆ (ตารางที่ 4) ซึ่งเจริญอยู่ในระยะ log phase ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับอาหาร MRS soft agar ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วเททับลงบนผิวหน้าอาหาร MRS agar รอจนผิวหน้าอาหารแข็งตัว หยดสารละลายแบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^6 pfu/ml ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าอาหาร MRS soft agar ดังกล่าว โดยหยดลงบริเวณกลางจานเพาะเลี้ยง นำจานเพาะเลี้ยงไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 18-24 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตว่ามีส่วนใสของการยับยั้ง (clear zone) เกิดขึ้นตรงตำแหน่งที่มีการหยดสารละลายแบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์หรือไม่ ถ้ามีส่วนใสของการยับยั้งเกิดขึ้นที่ตำแหน่งดังกล่าว แสดงว่าแบคเทอริโอเฟจดังกล่าวสามารถทำลายแบคทีเรียทดสอบชนิดนั้นได้

8. การศึกษาผลของสารละลาย $CaCl_2$ ต่อการเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจ

การศึกษาผลของสารละลาย $CaCl_2$ ต่อความสามารถของแบคเทอริโอเฟจในการทำลาย *L. lactis* RP359 สามารถทำได้โดยการนำ *L. lactis* RP359 ที่เจริญอยู่ในระยะ log phase ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จำนวน 7 หลอด มาเติมสารละลาย $CaCl_2$ ที่มีความเข้มข้น 1 โมลาร์ (M) โดยให้ความเข้มข้นสุดท้าย (final concentration) ในแต่ละหลอดเท่ากับ 0, 1, 10, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิโมลาร์ (mM) จากนั้นเติมสารละลายแบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์โดยให้มีปริมาณแบคเทอริโอเฟจความเข้มข้นสุดท้ายในแต่ละหลอดเท่ากับ 10^4 pfu/ml นำหลอดทดลองทั้ง 7 ไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสไปกรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดของรูพรุนเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร นำของเหลวที่ได้จากการกรองไปตรวจหาความเข้มข้นของแบคเทอริโอเฟจ (pfu/ml)

9. การศึกษาการยึดเกาะของแบคเทอริโอเฟจบนผิวเซลล์ของโฮสต์

การศึกษาการยึดเกาะของแบคเทอริโอเฟจบนผิวเซลล์ของโฮสต์ ซึ่งในที่นี้คือ *L. lactis* RP359 ทำโดยนำ *L. lactis* RP359 ที่เจริญอยู่ในระยะ log phase ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายแบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์ ให้มีค่า MOI (multiplicity of infection) เท่ากับ 0.01 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่าง (ครั้งละ 10 มิลลิลิตร) ที่เวลา 0, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที นำตัวอย่างที่เก็บได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสไปกรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดของรูพรุนเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร นำของเหลวที่ได้จากการกรองไปตรวจหาความเข้มข้นของแบคเทอริโอเฟจ ซึ่งความเข้มข้นของแบคเทอริโอเฟจที่ได้จะเป็นความเข้มข้นของแบคเทอริโอเฟจที่ไม่ได้เกาะที่ผิวเซลล์ของ *L. lactis* RP359 เรียกว่า residual titer

การทดลองนี้จะต้องทำการทดลองชุดควบคุม (control) ควบคู่ไปด้วย โดยในการทดลองชุดควบคุมจะทำทุกขั้นตอนเช่นเดียวกับที่กล่าวมา แต่ใช้ MRS broth แทน *L. lactis* RP359 ความเข้มข้นของแบคเทอริโอเฟจที่ได้จากการทดลองชุดควบคุมเรียกว่า control titer

การคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะของแบคเทอริโอเฟจบนผิวเซลล์ของโฮสต์ (% adsorption of the bacteriophage) สามารถทำได้โดยใช้สูตรดังต่อไปนี้

$$[(\text{control titer} - \text{residual titer}) / \text{control titer}] \times 100$$

10. การศึกษาการทนความร้อนของแบคเทอริโอเฟจ

การศึกษาการทนความร้อนของแบคเทอริโอเฟจทำโดยนำน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (sterile distilled water) ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด microcentrifuge tube แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่าง ๆ ดังนี้ 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้น้ำกลั่นปลอดเชื้อมีอุณหภูมิตามที่ตั้งไว้ จากนั้นนำสารละลายแบคเทอริโอเฟจ (bacteriophage suspension) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมลงไปในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่มีอุณหภูมิตามที่ตั้งไว้แล้ว โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของแบคเทอริโอเฟจ

สำนักวิทยบริการ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ในแต่ละหลอดนั้นเท่ากับ 10^8 pfu/ml หลังจากที่เติมสารละลายแบคเทอริโอเฟจแล้วให้เริ่มจับเวลาทันที และเก็บตัวอย่างทุก ๆ 30 วินาที เป็นเวลา 3 นาที ตัวอย่างที่เก็บมานั้นจะถูกทำให้เย็นลงทันทีหลังการเก็บ โดยจุ่มลงในน้ำแข็ง นำแต่ละตัวอย่างไปหาค่าความเข้มข้นของแบคเทอริโอเฟจ (pfu/ml)

11. การทำแบคเทอริโอเฟจให้บริสุทธิ์ (Bacteriophage purification)

การทำแบคเทอริโอเฟจให้บริสุทธิ์ มีวิธีการดังนี้ เลี้ยง *L. lactis* RP359 ในอาหาร MRS broth ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เมื่อเชื้อเจริญอยู่ในระยะ log phase เติมสารละลายแบคเทอริโอเฟจ (bacteriophage suspension) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย $CaCl_2$ ที่มีความเข้มข้น 1 M ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) มากรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดของรูพรุนเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 23,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ละลายตะกอน (pellet) ใน bacteriophage buffer (20 mM Tris-HCl (pH7.5), 50 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ใส่ลงในสารละลาย CsCl ที่มีความหนาแน่นแตกต่างกัน (CsCl gradient ที่มีความหนาแน่น 1.35, 1.53 และ 1.65 กรัม/มิลลิลิตร) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 35,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ใช้ syringe ดูดสารละลายแบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์ (purified bacteriophage suspension) ออกมาจากสารละลาย CsCl แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธี dialysis ใน bacteriophage buffer

12. การศึกษารูปร่างของแบคเทอริโอเฟจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

การศึกษารูปร่าง (morphology) ของแบคเทอริโอเฟจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน สามารถทำได้โดยนำสารละลายแบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์ (purified bacteriophage suspension) 1 หยด (ประมาณ 10 ไมโครลิตร) หยดลงบน grid ที่ฉาบด้วยคาร์บอน (carbon-coated grid) ทิ้งไว้ 3 นาที แล้วย้อมแบบ negative ด้วย 2% (w/v) uranyl acetate (pH 4.0) ทิ้งไว้ 10 วินาที จากนั้นนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope; TEM) การจำแนกชนิดของแบคเทอริโอเฟจอาศัยเกณฑ์ (criteria) ที่กำหนดโดย International Committee of Taxonomy of Viruses

13. การศึกษาโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของแบคเทอริโอเฟจโดยวิธี SDS-PAGE

การศึกษาโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) สามารถทำได้โดยนำสารละลายแบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์ (purified bacteriophage suspension) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับ 2× sample buffer (125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 20% glycerol, 4% SDS, 2% β-mercaptoethanol, 0.04% bromophenol blue) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปหยอดลงในช่อง (well) บน

แผ่น polyacrylamide gel โดยหยอดสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล (standard protein marker) ลงในช่องข้าง ๆ ด้วย จากนั้นปล่อยกระแสไฟฟ้าคงที่ (ประมาณ 50 มิลลิแอมแปร์, mA) ผ่านแผ่น polyacrylamide gel เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 1 ชั่วโมง นำแผ่น polyacrylamide gel ไปย้อมด้วย coomassie brilliant blue ล้างสีย้อมส่วนเกินออกด้วย destaining solution (45% (v/v) methanol, 10% (v/v) glacial acetic acid) จะเห็นแถบ (band) โปรตีนเป็นสีน้ำเงิน น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของแบคเทอริโอเฟจ สามารถคาดคะเนได้จากการเปรียบเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน

14. การสกัดและศึกษาสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจ

นำสารละลายแบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์มาสกัดสารพันธุกรรม โดยใช้ชุดสกัดสารพันธุกรรม PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit (Invitrogen) จากนั้นนำสารพันธุกรรมที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ RNase และ restriction endonucleases ชนิดต่าง ๆ ตามสภาวะที่บริษัทผู้ผลิตเอนไซม์กำหนด (Promega) หลังจากสารพันธุกรรมถูกตัดด้วยเอนไซม์ดังกล่าวแล้ว นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วนำชิ้นส่วนสารพันธุกรรมไปศึกษาโดยวิธี agarose gel electrophoresis

วิธี agarose gel electrophoresis ที่ใช้ในการศึกษาชิ้นส่วนสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจ มีวิธีการดังนี้ เตรียม agarose gel (ความเข้มข้นของ agarose เท่ากับ 1 %) นำชิ้นส่วนสารพันธุกรรมที่ได้หลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ผสมกับ DNA loading sample แล้วใส่ลงในช่อง (well) บนแผ่น agarose gel เติม DNA มาตรฐานที่ทราบขนาด (DNA marker: λ DNA /*Hin*d III) ลงในช่องข้าง ๆ เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบกับขนาดของชิ้นส่วนสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจ บัฟเฟอร์ที่ใช้คือ Tris-acetate-EDTA buffer กระแสไฟฟ้าที่ปล่อยผ่าน agarose gel มีค่าความต่างศักย์คงที่เท่ากับ 100 โวลต์ (V) และใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำ agarose gel ไปย้อมด้วย GelStar (Lonza Bioscience) และดูด้วย Dark Reader transilluminator (Clare Chemical Research)

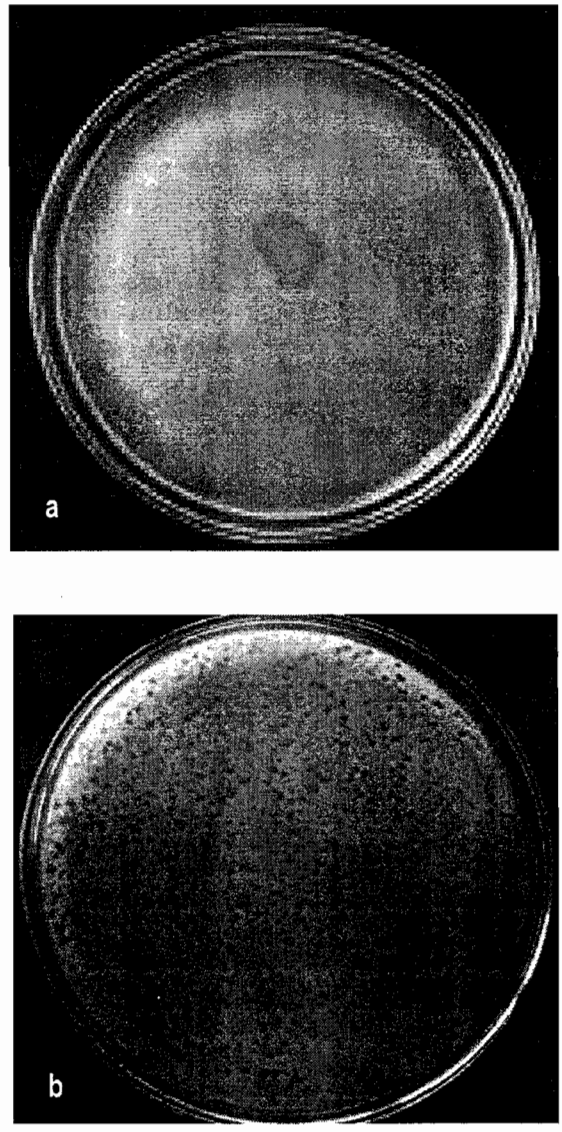
บทที่ 4
ผลการทดลอง

1. การตรวจหาแบคเทอริโอเฟจจากอาหารหมักชนิดต่าง ๆ ซึ่งสามารถทำลาย *Lactococcus lactis* RP359

จากการสุ่มเลือกตัวอย่างอาหารหมักชนิดต่าง ๆ รวมทั้งสิ้น 30 ตัวอย่าง (ตารางที่ 3) มาทำการตรวจหาแบคเทอริโอเฟจที่สามารถทำลาย *L. lactis* RP359 โดยวิธี enrichment method จากนั้นนำไปทดสอบความสามารถในการทำลาย *L. lactis* RP359 โดยวิธี spot test พบว่าสามารถแยกแบคเทอริโอเฟจที่สามารถทำลาย *L. lactis* RP359 ได้ จำนวน 1 isolate จากอาหารหมัก 1 ชนิดคือ เค็มบักนัด (ตารางที่ 3) ลักษณะของ clear zone ที่พบคือ ใสและเป็นวงกว้างตรงตำแหน่งที่หยดสารละลายสำหรับตรวจสอบแบคเทอริโอเฟจลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี *L. lactis* RP359 เจริญอยู่ (รูปที่ 3a) เมื่อนำสารละลายดังกล่าวซึ่งผ่านการทดสอบโดยวิธี spot test แล้วและเกิด clear zone นั้น มาทำการแยกแบคเทอริโอเฟจให้บริสุทธิ์โดยวิธี double-layer agar method พบว่า plaque ของแบคเทอริโอเฟจที่แยกได้มีลักษณะเป็นวงใสขนาดเล็ก มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 1-1.5 มิลลิเมตร (รูปที่ 3b) จากนั้นได้ทำการเก็บ plaque เดี่ยว ๆ นั้นเพื่อไปเพิ่มจำนวนแบคเทอริโอเฟจ (phage propagation) และหาความเข้มข้นของแบคเทอริโอเฟจในหน่วย plaque forming unit (pfu)/ml) ตั้งชื่อแบคเทอริโอเฟจที่แยกได้นี้ว่า ϕRP359 และนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

ตารางที่ 3 ชนิดและจำนวนอาหารหมักและการตรวจพบแบคเทอริโอเฟจ

อาหารหมัก	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนแบคเทอริโอเฟจที่แยกได้
ผักดอง	4	-
แหนม	5	-
ไส้กรอกอีสาน	4	-
หม่ำ	4	-
กุ้งจ่อม	4	-
ปลาส้ม	5	-
เค็มบักนัด	4	1



รูปที่ 3 แบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารหมักเค็มบักนัด (a) วิธี spot test (b) วิธี double-layer agar method

2. การศึกษาความสามารถของแบคเทอริโอเฟจในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น

เมื่อนำแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 ไปทดสอบความสามารถในการทำลายแลคติกแอสิดแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นโดยวิธี spot test แลคติกแอสิดแบคทีเรียที่นำมาทดสอบแสดงไว้ในตารางที่ 4 ผลการทดลองพบว่าแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 สามารถทำลายได้เฉพาะ *L. lactis* RP359 เท่านั้นและไม่สามารถทำลายแลคติกแอสิดแบคทีเรียทดสอบชนิดอื่น ๆ ได้เลย (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 การทดสอบความสามารถของแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 ในการทำลายแลคติกแอสิดแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ๆ

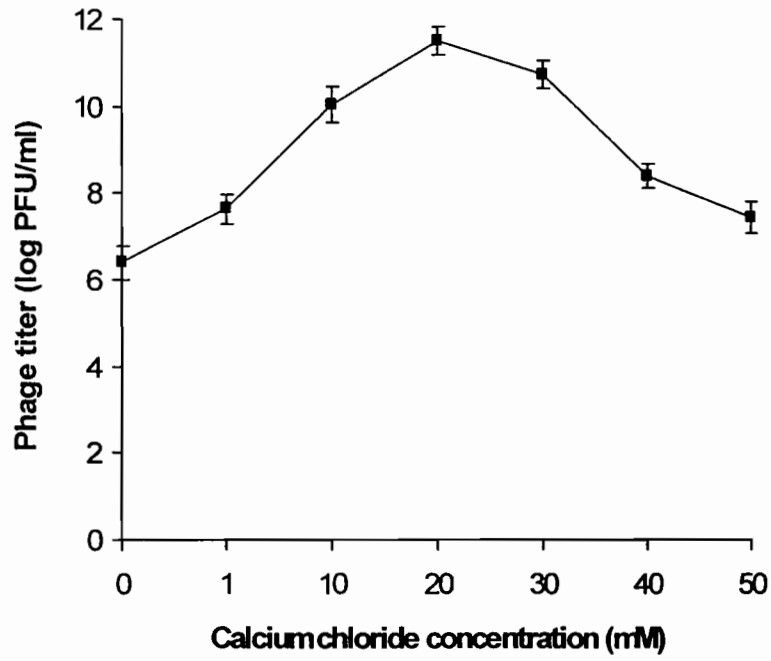
แลคติกแอสิดแบคทีเรียที่ทดสอบ[a]	ผลการทดสอบ[b] (spot test)
Lactococcus lactis RP359	+
Lactococcus lactis ATCC 11454	-
Lactococcus lactis subsp. *lactis* TFF221	-
Lactococcus lactis subsp. *lactis* ATCC11007	-
Lactobacillus brevis ATCC 14869	-
Lactobacillus brevis UBUB001	-
Lactobacillus curvatus ATCC 25601	-
Lactobacillus delbrueckii subsp. *lactis* ATCC 12315	-
Lactobacillus pentosus ATCC 8041	-
Lactobacillus plantarum ATCC 8014	-
Leuconostoc fallax ATCC 700006	-
Leuconostoc mesenteroides TISTR 473	-
Pediococcus pentosaceus ATCC 25745	-
Pediococcus pentosaceus TISTR374	-
Enterococcus faecalis ATCC29212	-
Enterococcus faecalis TISTR927	-

[a]ATCC, American Type Culture Collection; TISTR, Thailand Institute of Scientific and Technology Research; TFF and UBU, Culture Collection of Biological Science Department, Faculty od Science, Ubon Ratchathani University.

[b]+, เกิด clear zone; -, ไม่เกิด clear zone

3. การศึกษาผลของสารละลาย $CaCl_2$ ต่อการเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจในโฮสต์เซลล์

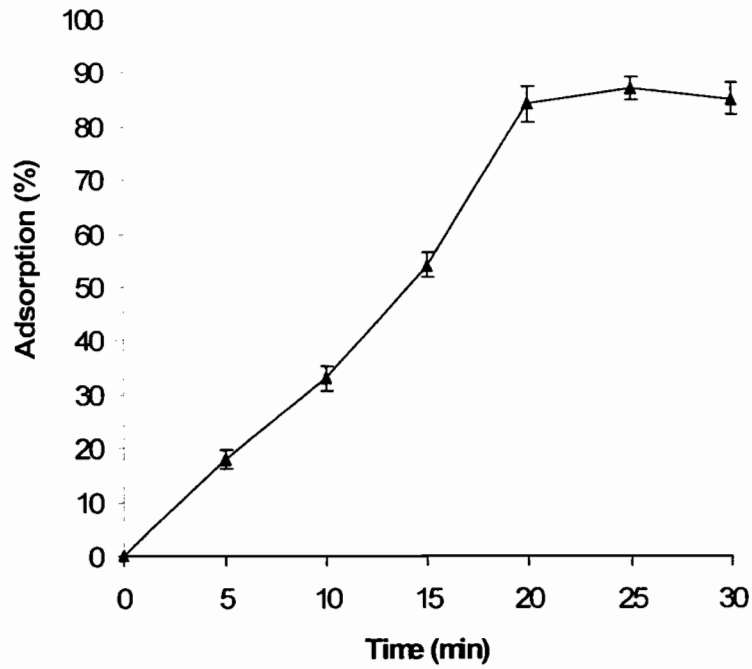
เมื่อทดสอบผลของสารละลาย $CaCl_2$ ต่อการเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจในโฮสต์เซลล์ (*L. lactis* RP359) ที่เจริญอยู่ในระยะ log phase โดยใช้สารละลาย $CaCl_2$ ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย (final concentration) เท่ากับ 0, 1, 10, 20, 30, 40 และ 50 mM และแบคเทอริโอเฟจเริ่มต้นเท่ากับ 10^4 pfu/ml เมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง แล้วเก็บตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้นของ $CaCl_2$ ที่ใช้ มาทำการตรวจนับจำนวนแบคเทอริโอเฟจที่ถูกสร้างและปล่อยออกมานอกโฮสต์เซลล์โดยวิธี double-layer agar method พบว่าเมื่อเติม $CaCl_2$ ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 20 mM มีผลทำให้แบคเทอริโอเฟจถูกสร้างออกมาได้มากที่สุด เมื่อเทียบกับการไม่เติมสารละลาย $CaCl_2$ (0 mM) และความเข้มข้นอื่น ๆ ของสารละลาย $CaCl_2$ ที่ทดสอบ (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 ผลของแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) ต่อการเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359

4. การศึกษาการยึดเกาะของแบคเทอริโอเฟจบนผิวเซลล์ของโฮสต์

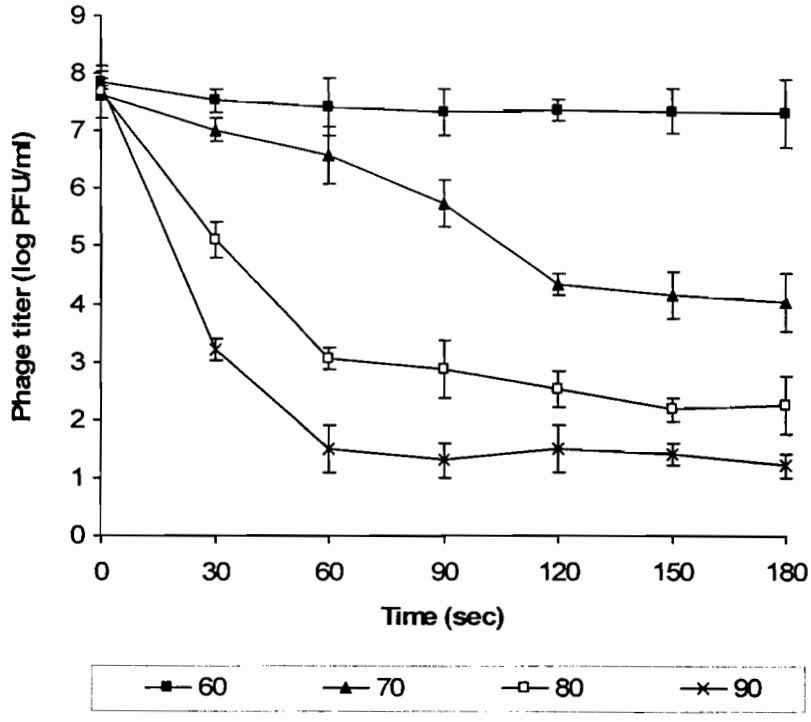
เมื่อทำการศึกษาความสามารถในการยึดเกาะบนผิวเซลล์ของโฮสต์ของแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุด ชุดแรกเป็นชุดทดสอบ (มีทั้งโฮสต์เซลล์และแบคเทอริโอเฟจอยู่ด้วยกันในอาหาร MRS broth) และอีกชุดหนึ่งเป็นชุดควบคุม (มีเฉพาะแบคเทอริโอเฟจเท่านั้นที่อยู่ในอาหาร MRS broth) หลังจากบ่มและเก็บตัวอย่างเป็นช่วง ๆ ตั้งแต่เวลา 0-30 นาที แล้วนำแต่ละตัวอย่างไปทำการนับจำนวนแบคเทอริโอเฟจโดยวิธี double-layer agar method ปริมาณแบคเทอริโอเฟจที่นับได้ในชุดทดสอบเรียกว่า residual titer และปริมาณแบคเทอริโอเฟจที่นับได้ในชุดควบคุมเรียกว่า control titer เมื่อนำ residual titer และ control titer ที่เวลาต่าง ๆ ของแต่ละชุดการทดสอบไปคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะ (% adsorption of the bacteriophage) ตามสมการที่กล่าวมาข้างต้น พบว่าแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 สามารถยึดเกาะที่ผิวเซลล์ของโฮสต์ได้สูงถึง 85% ภายในเวลา 20 นาที (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 การยึดเกาะของแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 บนผิวเซลล์ *Lactococcus lactis* RP359

5. การศึกษาการทนความร้อนของแบคเทอริโอเฟจ

การทดสอบการทนความร้อนของแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 ที่อุณหภูมิ 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส โดยหลังจากให้ความร้อนแล้ว จะเริ่มจับเวลาและเก็บตัวอย่างทุก ๆ 30 วินาที เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นจึงนำแต่ละตัวอย่างที่เก็บมานั้น ไปทำการนับจำนวนแบคเทอริโอเฟจที่รอดชีวิตโดยวิธี double-layer agar method ผลการทดลองพบว่าแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสได้ดี เมื่ออุณภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 70 องศาเซลเซียส แบคเทอริโอเฟจจะลดจำนวนลงมากถึง 3 log PFU/ml โดยประมาณ ภายในเวลา 120 วินาที ที่อุณหภูมิ 80 และ 90 องศาเซลเซียส แบคเทอริโอเฟจลดจำนวนลงอย่างรวดเร็วภายในเวลาเพียง 60 วินาที ทั้งนี้ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส จำนวนของแบคเทอริโอเฟจลดลงเร็วกว่าที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส โดยแบคเทอริโอเฟจลดจำนวนลงถึง 6 log PFU/ml ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส และแบคเทอริโอเฟจลดจำนวนลงถึง 5 log PFU/ml ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 การทนความร้อนของแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 ที่อุณหภูมิ 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส

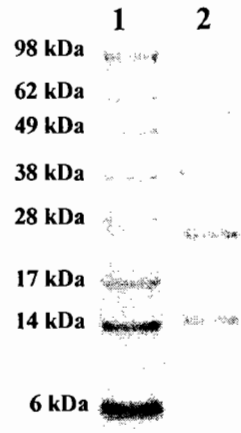
6. การศึกษารูปร่างของแบคเทอริโอเฟจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

หลังจากที่นำแบคเทอริโอเฟจไปทำให้บริสุทธิ์ และนำสารละลายแบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์ (purified bacteriophage suspension) ที่เตรียมได้ไปศึกษารูปร่างของแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 โดยนำไปย้อมแบบ negative staining ด้วย 2% (w/v) uranyl acetate และดูรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) พบว่าแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 มีหัวแบบ icosahedral head มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 70 นาโนเมตร และมีหางแบบ contractile tail ยาวประมาณ 100 นาโนเมตร (รูปที่ 7) และจากรูปร่างของแบคเทอริโอเฟจภายใต้กล้อง แบคเทอริโอเฟจชนิดนี้น่าจะจัดอยู่ใน order *Caudovirales* และอยู่ใน family *Myoviridae* เมื่ออาศัยเกณฑ์ในการจำแนกไวรัสตาม International Committee of Taxonomy of Viruses (ICTV)

รูปที่ 7 ภาพถ่ายของแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 เมื่อย้อมแบบ negative staining และศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

7. การศึกษาโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของแบคเทอริโอเฟจโดยวิธี SDS-PAGE

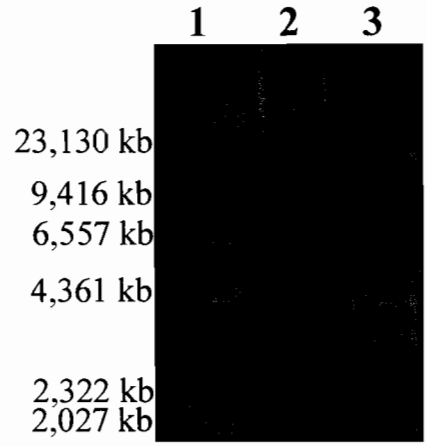
นำสารละลายแบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์ (purified bacteriophage suspension) ของแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 ไปศึกษาโปรตีนโครงสร้าง (structural proteins) ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของแบคเทอริโอเฟจ พบว่าแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 ประกอบด้วยโปรตีนโครงสร้างหลัก (major proteins) จำนวน 5 ชนิดปรากฏให้เห็นบนแผ่น polyacrylamide gel โดยมีขนาดเท่ากับ 80, 57, 40, 25 และ 15 กิโลดาลตัน (kDa) (รูปที่ 8)



รูปที่ 8 โปรตีนโครงสร้างของแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 เมื่อแยกโดยวิธี SDS-PAGE: Lane 1; SeeBlue® Plus2 molecular mass markers, Lane 2; phage ϕRP359

8. การศึกษาสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจ

จากการสกัดสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 และนำไปตัดด้วยเอนไซม์ RNase และ restsriction endonucleases ชนิดต่าง ๆ แล้วนำไปตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนสารพันธุกรรมหลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์โดยวิธี agarose gel electrophoresis พบว่าสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ RNase และ restsriction endonucleases บางชนิด (ไม่ได้แสดงผล) แต่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Pst*I (รูปที่ 9) จากผลการทดลองนี้แสดงว่าสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 เป็น double-stranded DNA



รูปที่ 9 สารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 เมื่อตัดด้วย restriction endonuclease: Lane 1; Lambda DNA cleaved with *Hind*III, Lane 2; uncut genome ของแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359, Lane 3; genome ของแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 ตัดด้วย *Pst*I

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

แลคติกแอสิดแบคทีเรีย (lactic acid bacteria; LAB) เป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมอาหารหมัก โดยมีส่วนสำคัญในการปรุงแต่งรสชาติ กลิ่น ตลอดจนเนื้อสัมผัสของอาหาร นอกจากนี้ยังมีบทบาทสำคัญในการแปรรูปและถนอมอาหารให้สามารถเก็บไว้ได้เป็นเวลานาน แม้ว่าอุตสาหกรรมการหมักอาหารไทยพื้นบ้านตั้งแต่อดีตมาจนถึงปัจจุบันได้มีการพัฒนามาอย่างต่อเนื่อง แต่ส่วนใหญ่ก็ยังคงนิยมการหมักแบบธรรมชาติ (natural fermentation) คืออาศัยแบคทีเรียที่มีอยู่ในวัตถุดิบที่ใช้ในการหมักหรือเกิดขึ้นเองในขณะหมัก แต่ข้อเสียคือไม่สามารถควบคุมการหมักได้ และต้องอาศัยภูมิปัญญาหรือความรู้พื้นบ้านในการหมักเป็นสำคัญ ส่งผลให้อาหารหมักไม่ได้มาตรฐานในการหมักแต่ละครั้ง และยังมีโอกาสที่จะสูญเสียผลผลิตหรือผลิตภัณฑ์การหมักในครั้งนั้น ๆ ได้หากไม่มีการควบคุมการหมักอย่างดีพอ นอกจากนี้การที่อาหารหมักพื้นบ้านไม่ค่อยได้รับความนิยมในการบริโภค หรือบริโภคกันอยู่เฉพาะในวงที่จำกัด เนื่องจากเกรงว่าจะไม่ปลอดภัยต่อผู้ที่ไม่คุ้นเคยในการบริโภค เช่น อาจมีการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคบางชนิด เป็นต้น

การนำแลคติกแอสิดแบคทีเรีย (LAB starter culture) มาใช้เป็นหัวเชื้อ (starter culture) ในการหมักจึงได้รับความสนใจมากขึ้นโดยเฉพาะในอุตสาหกรรมการหมักขนาดใหญ่ ข้อดีของการใช้หัวเชื้อในการหมักคือ สามารถควบคุมคุณภาพของอาหารหมักที่ผลิตในแต่ละครั้งให้เหมือนกันหรือใกล้เคียงกันได้ และยังสามารถเพิ่มเติมคุณสมบัติบางอย่างลงไปในผลิตภัณฑ์เพื่อเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์ได้ด้วย โดยการเลือกใช้หัวเชื้อที่มีคุณสมบัติตามต้องการเติมลงไปในกระบวนการหมัก เช่น ใช้แลคติกแอสิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) เพื่อไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคหรือแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย ใช้แลคติกแอสิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารให้ความหวานเพิ่มมากขึ้นกว่าปกติ (enhanced sweetness) หรือให้กลิ่นหอม (aroma generation) และใช้แลคติกแอสิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตน้ำตาลที่มีแคลอรีต่ำ (low-calorie sugar) เป็นต้น

จากการศึกษาก่อนหน้านี้โดยกลุ่มของผู้วิจัยเอง สามารถแยกแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินที่ชื่อว่าไนซิน (nisin) ได้ โดยแบคทีเรียดังกล่าวนี้คือ *Lactococcus lactis* RP359 (Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn, 2008) ดังนั้นจึงมีความประสงค์ที่จะพัฒนาเชื้อดังกล่าวมาใช้เป็นหัวเชื้อในการหมัก เพื่อพัฒนาอุตสาหกรรมการหมักอาหารพื้นบ้านของไทยให้มีมาตรฐานและมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคมากยิ่งขึ้น แต่ปัญหาหนึ่งที่พบเมื่อนำแลคติกแอสิดแบคทีเรียชนิดนี้ไปใช้ในกระบวนการหมักคือ แลคติกแอสิดแบคทีเรียหัวเชื้อถูกทำลายโดยแบคเทอริโอเฟจ (bacteriophage infection) มีผลทำให้กระบวนการหมักไม่เป็นไปตามที่คาดหวัง และส่งผลให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่มีคุณสมบัติตรงตามที่ต้องการ ดังนั้นจึงนำมาสู่การทำงานวิจัยในครั้งนี้เพื่อจะได้หาแนวทางในการแก้ไขปัญหาต่อไป

การวิจัยครั้งนี้เริ่มต้นจากการตรวจหาแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะหรือสามารถทำลายหัวเชื้อ *L. lactis* RP359 จากอาหารหมักพื้นบ้านในภาคอีสาน 30 ตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วยอาหารหมักชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ผักดอง แหนม ไส้กรอกอีสาน หม่ำ กุ้งจ่อม ปลาส้ม และเค็มบักนัด และสามารถตรวจพบแบคเทอริโอเฟจที่สามารถทำลาย *L. lactis* RP359 ได้ 1 ชนิด โดยตั้งชื่อว่าแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 จากลักษณะ clear zone โดยวิธี spot test และลักษณะ plaque โดยวิธี plaque assay ของแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 ที่ปรากฏบน lawn ของแบคทีเรียที่เป็นโฮสต์ คือ เห็นเป็นวงใสอย่างชัดเจน แสดงว่าแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 ที่แยกได้นี้น่าจะเป็นไลติกเฟจ (lytic phage หรือ virulent phage) โดยสามารถเข้าไปอาศัยและเพิ่มจำนวนภายในโฮสต์เซลล์ และทำให้โฮสต์เซลล์แตกสลายในที่สุด (Matsuzaki et. al., 2005) lytic phage ที่สามารถทำลายแลคติกแอสิดแบคทีเรียและตรวจพบในอาหารหมักที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้ ได้แก่ แบคเทอริโอเฟจ ϕJL-1 ซึ่งแยกได้จาก cucumber fermentation และสามารถทำลาย *Lactobacillus plantarum* (Lu et. al., 2003) แบคเทอริโอเฟจ ϕR01, ϕR03, ϕR05, ϕR09, ϕR12 และ ϕR19 ซึ่งแยกได้จาก sauerkraut fermentation และสามารถทำลาย *Leuconostoc fallax* (Barrangou et. al., 2002) และแบคเทอริโอเฟจ asccϕ28 ซึ่งแยกได้จาก cheese & whey และสามารถทำลาย *Lactococcus lactis* (Kotsonis et. al., 2008) เป็นต้น

เมื่อนำแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 ไปศึกษาความสามารถในการทำลายแลคติกแอสิดแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ พบว่าแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 ไม่สามารถทำลายแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่นำมาทดสอบได้เลย แสดงว่ามีความสามารถในการทำลายแบคทีเรียได้อย่างจำเพาะ คือสามารถทำลายได้เฉพาะแบคทีเรียที่เป็นโฮสต์เซลล์ (*L. lactis* RP359) เท่านั้น หรืออาจกล่าวได้ว่าแบคเทอริโอเฟจที่แยกได้นี้จัดเป็น narrow-host-range bacteriophage อย่างไรก็ตามความสามารถในการทำลายแบคทีเรียอย่างจำเพาะเจาะจงนั้นนับเป็นคุณสมบัติที่พบได้ในแบคเทอริโอเฟจส่วนใหญ่ (Lu et. al., 2003; Sandeep, 2006) แม้ว่าแบคเทอริโอเฟจบางชนิดสามารถทำลายแบคทีเรียที่อยู่ใน genus และ species เดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์ (strain) ได้ก็ตาม (Barrangou et. al., 2002) นอกจากนี้ก็เคยมีรายงานด้วยว่า แบคเทอริโอเฟจบางชนิดสามารถทำลายแบคทีเรียได้มากกว่าหนึ่งชนิดและต่าง genus ได้ หรือจัดเป็น broad-host-range bacteriophage (Jensen et. al., 1998; Capra et. al., 2006)

การศึกษาผลของสารละลาย $CaCl_2$ ต่อการเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 พบว่าเมื่อใช้ $CaCl_2$ ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 20 mM มีผลทำให้แบคเทอริโอเฟจถูกสร้างและปล่อยออกมานอกโฮสต์เซลล์ได้มากที่สุด แสดงว่า $CaCl_2$ มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจชนิดนี้ เหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากการยึดเกาะ (adsorption) ของแบคเทอริโอเฟจบนผิวเซลล์ของโฮสต์ ซึ่งนับเป็นจุดเริ่มต้นของของกระบวนการเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจ (infection cycle) นั้น นอกจากจะต้องอาศัยความจำเพาะระหว่าง specific receptor บนผิวเซลล์ของโฮสต์กับ attachment site บนโครงสร้างภายนอกของแบคเทอริโอเฟจแล้ว (Topley and Wilson, 1990) บางครั้งยังจำเป็นต้องอาศัย divalent cations (เช่น calcium ions หรือ magnesium ions) ที่มีอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่แบคทีเรียและแบคเทอริ

โอเฟจอาศัยอยู่ร่วมกันด้วย เคยมีรายงานว่าบางครั้งแบคเทอริโอเฟจต้องการ divalent cations ในปริมาณที่มากกว่าที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ใช้เป็นโฮสต์เซลล์ (Watanabe and Takesue, 1972) ในการทดลองนี้พบว่าแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 มีความต้องการ $CaCl_2$ เพื่อการเพิ่มจำนวนคล้ายคลึงกับแบคเทอริโอเฟจ ϕJL-1 (Lu et. al., 2003) และแบคเทอริโอเฟจ MLC-A (Capra et. al., 2006) นอกจากนี้ยังเป็นไปได้ด้วยว่าความต้องการ divalent cations ในการเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจนั้น อาจไม่เกี่ยวข้องกับขั้นตอน adsorption แต่ไปเกี่ยวข้องกับขั้นตอนอื่น ๆ ของการเพิ่มจำนวนในโฮสต์เซลล์ เช่น การบุกรุกเข้าสู่โฮสต์เซลล์ (penetration) หรือการเพิ่มจำนวนภายในโฮสต์เซลล์ (replication) (Paranchy, 1966; Watanabe and Takesue, 1972) เป็นต้น อีกทั้งยังเคยมีรายงานด้วยว่า calcium ions มีผลต่อการเกิด plaque (Quiberoni et. al., 2004)

การทดสอบความสามารถในการยึดเกาะของแบคเทอริโอเฟจบนผิวเซลล์ของโฮสต์ในครั้งนี้ มิได้เติมสารละลาย $CaCl_2$ ลงไปในขั้นตอนของการทดสอบ เพราะต้องการศึกษาการยึดเกาะของแบคเทอริโอเฟจบนผิวเซลล์ของโฮสต์ในสภาวะที่แบคทีเรียเจริญอยู่ในอาหาร MRS broth ปกติ ผลการทดลองพบว่าแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 สามารถยึดเกาะบนผิวเซลล์ของโฮสต์ได้ตั้งแต่ 5 นาทีแรกที่ทดสอบ และสามารถยึดเกาะบนผิวเซลล์ของโฮสต์ได้ประมาณ 50% เมื่อเวลาผ่านไปเพียง 15 นาที และสามารถยึดเกาะบนผิวเซลล์ของโฮสต์ได้ 85% ภายในเวลา 20 นาที ทั้งนี้เปอร์เซ็นต์การยึดเกาะบนผิวเซลล์ของโฮสต์ระหว่างแบคเทอริโอเฟจและโฮสต์แต่ละคู่อาจแตกต่างกันไป เช่น การศึกษาความสามารถในการยึดเกาะของแบคเทอริโอเฟจ ϕJL-1 บนผิวเซลล์ของโฮสต์คือ *Lactobacillus plantarum* ในอาหาร MRS broth ที่ไม่เติม $CaCl_2$ พบว่าแบคเทอริโอเฟจสามารถยึดเกาะบนผิวเซลล์ได้ 75% ภายในเวลา 10 นาที และยึดเกาะบนผิวเซลล์ได้สูงถึง 90% และ 96% ภายในเวลา 20 นาที และ 30 นาที ตามลำดับ อีกทั้งยังพบว่าเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการยึดเกาะบนผิวเซลล์ของโฮสต์ของแบคเทอริโอเฟจ ϕJL-1 ในอาหาร MRS broth ที่เติม $CaCl_2$ ก็ให้ผลไม่แตกต่างกัน (Lu et. al., 2003) แต่จากการศึกษาความสามารถในการยึดเกาะของแบคเทอริโอเฟจ MLC-A บนผิวเซลล์ของโฮสต์คือ *Lactobacillus paracasei* ในอาหาร MRS broth ที่ไม่เติม $CaCl_2$ พบว่าแบคเทอริโอเฟจสามารถยึดเกาะบนผิวเซลล์เพียง 37% เมื่อเวลาผ่านไป 45 นาที แต่เมื่อเปรียบเทียบกับความสามารถในการยึดเกาะบนผิวเซลล์ของโฮสต์ของแบคเทอริโอเฟจ MLC-A ในอาหาร MRS broth ที่เติม $CaCl_2$ กลับพบว่าสามารถยึดเกาะบนผิวเซลล์ได้สูงถึง 95% ภายในเวลา 15 นาที (Capra et. al., 2006)

แบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 สามารถทนความร้อนได้ดีเมื่ออยู่ในอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เนื่องจากจำนวนแบคเทอริโอเฟจแทบไม่ลดลงเลยเมื่อเวลาผ่านไป 3 นาที แต่เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส จำนวนแบคเทอริโอเฟจที่รอดชีวิตจะลดลงอย่างเห็นได้ชัดภายในเวลาเพียงแค่ 3 นาที อีกทั้งจำนวนแบคเทอริโอเฟจที่ลดลงแปรผันตรงกับอุณภูมิที่สูงขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่ออุณหภูมิสูงถึง 90 องศาเซลเซียส และเวลาผ่านไป 3 นาที ก็ยังคงมีแบคเทอริโอเฟจรอดชีวิตเหลืออยู่ จากผลการทดลองยังชี้ให้เห็นว่าแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 น่าจะสามารถทนความร้อนที่ใช้ในกระบวนการพาสเจอไรส์

(pasteurization) แบบ high-temperature, short time (HTST) ซึ่งใช้อุณหภูมิเท่ากับ 71.7 องศาเซลเซียส (หรือ 161 องศาฟาเรนไฮต์) นาน 15-20 วินาทีได้ ซึ่งสอดคล้องกันรายงานก่อนหน้านี้ที่กล่าวว่าแบคเทอริโอเฟจที่มีโฮสต์เป็นแบคทีเรียใน genus *Lactococcus* หรือเรียกว่า lactococcal phage ส่วนใหญ่สามารถทนการพาสเจอไรส์แบบ HTST ได้ และโดยทั่วไป lactococcal phage จะถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เมื่อใช้เวลานานอย่างน้อย 15 นาที ทั้งนี้ความสามารถในการทนความร้อนของแบคเทอริโอเฟจแต่ละชนิดอาจแตกต่างกันไป เช่น แบคเทอริโอเฟจ MLC-A สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 63 และ 72 องศาเซลเซียสได้นานอย่างน้อย 45 นาที (Capra et al., 2006) แบคเทอริโอเฟจ ϕJL-1 สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส (Lu et. al., 2003) และแบคเทอริโอเฟจ ϕYS40 สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสได้ดีเมื่ออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม เช่น HB8 broth (Sakaki and Oshima, 1975) เป็นต้น การทราบข้อมูลเกี่ยวกับความสามารถในการทนความร้อนของแบคเทอริโอเฟจ น่าจะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการหาแนวทาง หรือวิธีการควบคุมการปนเปื้อนของแบคเทอริโอเฟจในกระบวนการหมัก

จากผลการศึกษาโปรตีนโครงสร้างของแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 โดยวิธี SDS-PAGE พบว่าแบคเทอริโอเฟจมีโปรตีนโครงสร้างหลัก (major proteins) ที่มีขนาดเท่ากับ 80, 57, 40, 25 และ 15 กิโลดาลตัน (kDa) โปรตีนโครงสร้างหลักของแบคเทอริโอเฟจแต่ละชนิดอาจแตกต่างกันและเป็นเอกลักษณ์หรือลักษณะเฉพาะของแบคเทอริโอเฟจนั้น ๆ Braun และคณะ (1989) เคยทำการศึกษาโปรตีนโครงสร้างหลักของแบคเทอริโอเฟจ 10 ชนิด (6 ชนิดเป็น lytic phage และอีก 4 ชนิดเป็น temperate phage) ที่จำเพาะต่อ *Lactococcus lactis* โดยวิธี SDS-PAGE พบว่า รูปแบบของโปรตีนโครงสร้างหลักของแบคเทอริโอเฟจทั้ง 10 ชนิดไม่เหมือนกันเลย โดยทั่วไปแบคเทอริโอเฟจที่มีโครงสร้างไม่ซับซ้อนมักมีโปรตีนโครงสร้างหลักเพียงไม่กี่ชนิด ในขณะที่แบคเทอริโอเฟจที่มีโครงสร้างซับซ้อนมักจะมีโปรตีนโครงสร้างหลักเป็นจำนวนมากหรือหลากหลายกว่า โปรตีนโครงสร้างหลักของแบคเทอริโอเฟจส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่พบอยู่ที่แคปซิด (capsid) และที่ส่วนหาง (tail) แคปซิดเป็นโครงสร้างที่ทำหน้าที่ห่อหุ้มและปกป้องสารพันธุกรรมไว้ภายในและยังเป็นส่วนหัว (head) ของแบคเทอริโอเฟจบางชนิดด้วย สำหรับแบคเทอริโอเฟจที่มีหาง (เช่น genus *Myoviridae* และ *Siphoviridae* เป็นต้น) ส่วนหางนอกจากจะเป็นท่อกลวงที่เป็นทางให้สารพันธุกรรมเคลื่อนที่ผ่านจากหัวของแบคเทอริโอเฟจไปยังโฮสต์เซลล์แล้ว แบคเทอริโอเฟจบางชนิดยังอาจมีโปรตีนโครงสร้างอื่น ๆ เพิ่มเติม เช่น tail fibers และ base plate เป็นต้น นอกจากนี้แบคเทอริโอเฟจที่มีหางบางชนิด ตรงบริเวณรอบ ๆ ท่อกลวงของส่วนหาง อาจมีโครงสร้างที่เรียกว่า contractile sheath หุ้มไว้อีกด้วย ซึ่ง contractile sheath นี้นอกจากจะมีส่วนช่วยให้หางของ แบคเทอริโอเฟจสามารถยืดหดได้แล้ว ยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับขั้นตอนการฉีด (injection) สารพันธุกรรมเข้าสู่เซลล์ของโฮสต์อีกด้วย tail fibers และ base plate ของแบคเทอริโอเฟจบางชนิดยังเป็นโครงสร้างที่ใช้ในการยึดเกาะกับ receptor บนผิวเซลล์ของโฮสต์ แต่สำหรับแบคเทอริโอเฟจที่ไม่มี tail fibers และ base plate ก็จะใช้โครงสร้างอื่นบนอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจในการยึดเกาะกับเซลล์ของโฮสต์

การศึกษารูปร่างและชนิดของสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจ เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการจำแนกชนิดของแบคเทอริโอเฟจ ในการศึกษานี้ได้ทำการตรวจสอบรูปร่างของแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 โดยการทำแบคเทอริโอเฟจให้บริสุทธิ์และมีความเข้มข้นมากพอก่อนที่จะนำไปย้อมด้วยวิธี negative staining และศึกษารูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 มีรูปร่างแบบ complex structure ประกอบด้วยส่วนหัวและหาง ส่วนหัวมีลักษณะเป็น icosahedral และหางเป็นแบบยืดหดได้ (contractile tail) จากลักษณะรูปร่างดังกล่าวแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 จึงจัดอยู่ใน *Myoviridae* family ตามเกณฑ์ของ International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) (Ackermann, 2003) และเมื่อศึกษาชนิดของสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 โดยการสกัดสารพันธุกรรมแล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ พบว่าสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ RNase และ restsriction endonucleases บางชนิดที่นำมาทดสอบ แต่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Pst*I จากผลการทดลองนี้แสดงว่าสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 เป็น double-stranded DNA ซึ่งสอดรับกับผลการศึกษารูปร่างของแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เนื่องจากแบคเทอริโอเฟจใน *Myoviridae* family ทุกตัวที่เคยมีรายงานมีสารพันธุกรรมเป็น double-stranded DNA (Ackermann, 2003) และจากการค้นคว้ารายงานก่อนหน้านี้เกี่ยวกับ lactococcal phage พบว่า มากกว่า 95% ของ lactococcal phage เป็นแบคเทอริโอเฟจแบบมีหาง ซึ่งมีอยู่ด้วยกัน 3 family คือ *Myoviridae* (เป็น แบคเทอริโอเฟจที่มีหางยาว และหางยืดหดได้) *Siphoviridae* (เป็นแบคเทอริโอเฟจที่มีหางยาว และหางยืดหดไม่ได้) และ *Podoviridae* (เป็นแบคเทอริโอเฟจที่มีหางสั้น) โดย family ที่พบมากที่สุดคือ *Siphoviridae* รองลงมาคือ *Podoviridae* และ *Myoviridae* ตามลำดับ (Deveau et al., 2006)

เอกสารอ้างอิง

Ackermann, H.W. 2003. Bacteriophage observations and evolution. Res Microbiol 154: 245-251.

Axelsson, L. 1998. Lactic acid bacteria : Classification and physiology. In: Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects. S. Salminen and A. von Wright (Eds.), 2nd ed, pp. 1-72. Marcel Dekker Inc., New York.

Barrangou, R., Yoon, S.S., Breidt Jr.F., Fleming H.P. and Klaenhammer, T.R. 2002. Characterization of six *Leuconostoc fallax* bacteriophages isolated from an industrial sauerkraut fermentation. Appl Environ Microbiol 68: 5452-5458.

Bradley, D. E. 1967. Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. Bacteriol Rev 31: 230-314.

Braun, V., Hertwig, S., Neve, H., Geis, A. and Teuber, M. 1989. Taxonomic differentiation of bacteriophages of *Lactococcus lactis* by electron microscopy, DNA-DNA hybridization, and protein profiles. J Gen Microbiol 135: 2551-2560.

Buchman, G.W., Banerjee, S. and Hansen, J.N. 1988. Structure, expression and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. J Biol Chem 263: 16260-16266.

Caplice, E. and Fitzgerald, G.F. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. Int J Food Microbiol 50: 131-149.

Capra, M.L., Quiberoni A.L., Ackermann, H.W., Moineau, S. and Reinheimer, J.A. 2006. Characterization of new virulent phage (MLC-A) of *Lactobacillus paracasei*. J Dairy Sci 89: 2414-2423.

Coffey, A., Coakley, M., McGarry, A., Fitzgerald, G.F. and Ross, R.P. 1998. Increasing phage resistance of cheese starters: a case study using *Lactococcus lactis* DPC4268. Lett Appl Microbiol 26: 51-55.

Deutsch, S-M., Ferain, T., Delcour, J. and Lortal, S. 2002. Lysis of lysogenic strains of *Lactobacillus helveticus* in Swiss cheeses and first evidence of concomitant *Streptococcus thermophilus* lysis. Int Dairy J 12: 591-600.

Deveau, H., Labrie, S.J., Chopin, M-C. and Moineau, S. 2006. Biodiversity and classification of Lactococcal phages. Appl Environ Microbiol 72: 4338-4346.

De Vuyst, L. and Vandamme, E.J. 1993. Lactic acid bacteria and bacteriocin: their practical importance. In: Bacteriocin of Lactic Acid Bacteria. L. De Vuyst and E.J. Vandamme (Eds.) pp. 1-12. Blackie Academic & Professional, California.

Forde, A. and Fitzgerald, F.G. 1999. Bacteriophage defence systems in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek 76: 89-113.

Jack, R.W., Tagg, J.R. and Ray, B. 1995. Bacteriocins of gram positive bacteria. Microbiol Rev 59: 171-200.

Jensen, E.C., Schrader, H.S., Rieland, B., Thomas, T.L., Lee, K.W., Nickerson, K.W. and Kokjohn, T.A. 1998. Prevalence of broad-host-range lytic bacteriophages of *Sphaerotilus natans, Escherichia coli,* and *Pseudomonas aeruginosa*. Appl Environ Microbiol 64: 575-580.

Klaenhammer, T.R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochimie 70: 337-349.

Kotsonis, S.E., Powell, I.B., Pillidge, C.J., Limsowtin, G.K.Y., Hillier, A.J. and Davidson, B.E. 2008. Characterization and genomic analysis of phage asccϕ28, a phage of the family *Podoviridae* infecting *Lactococcus lactis*. Appl Environ Microbiol 74: 3453-3460.

Leroy, F. and De Vuyst, L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Trends Food Sci & Technol 15: 67-78.

Lu, Z., Breidt, Jr. F., Fleming, H.P., Altermann, E. and Klaenhammer, T.R. 2003. Isolation and characterization of a *Lactobacillus plantarum* bacteriophage, ϕJL-1, from a cucumber fermentation. Int J Food Microbiol 84: 225-235.

Matsuzaki, S., Rashel, M., Uchiyama, J., Sakurai, S., Ujihara, T., Kuroda, M., Ikeuchi, M., Tani, T., Fujieda, M., Wakiguchi, H. and Imai, S. 2005. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious disease. J Infect Chemother. 11: 211-219.

Medigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J. 1997. Brock Biology of Microorganisms. Upper Saddle River, N.J.: Prentice Hall.

Paranchy, W. 1966. Stages in phage R17 infection: The role of divalent cations. J Viol 28: 90-99.

Quiberoni, A., Guglielmotti, D., Binetti, A. and Reinheimer, J. 2004. Characterization of three *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* phages and the physicochemical analysis of phage adsorption. J Appl Microbiol 96: 340-351.

Rattanachaikunsopon, P. and Phumkhachorn, P. 2008. Characterization of nisin produced by *Lactococcus lactis* RP359 isolated from Kem-Buk-Nud, a traditional Thai fermented food. Int J Microbiol 5(1): 1-9.

Sandeep, K. 2006. Bacteriophage precision drug against bacterial infections. Curr Sci 90: 631-633.

Sakaki, Y. and Oshima, T. 1975. Isolation and characterization of a bacteriophage infectious to an extreme thermophile, *Thermus thermophilus* HB8. J Virol 15: 1449-1453.

Stevens, K.A., Sheldon, B.W., Klapes, N.A. and Klaenhammer, T.R. 1992. Effect of treatment conditions on nisin inactivation of gram-negative bacteria. J Food Prot 55: 856-862.

Topley, W.W.C. and Wilson, G.S. 1990. In: Collier, L.H., Timbury, M.C. (Eds.), Principles of Bacteriophage, Virology and Immunity, vol. 4. B.C. Decker, London, UK, pp. 52-53.

Vegge, C.S., Brondsted, L., Neve, H., Mc Grath, S., van Sinderen, D. and Vogensen, F.K. 2005. Structural characterization and assembly of the distal tail structure of the temperate lactococcal bacteriophage TP901-1. J Bacteiol 187: 4187-4197.

Watanabe, K. and Takesue, S. 1972. The requirement for calcium in infection with *Lactobacillus* phage. J Gen Viro 17: 19-30.

Whitehead, H.R. and Cox, C.A. 1935. The occurrence of bacteriophages in starter cultures of lactic streptococci. New Zealand J Sci Tech 16: 319-320.

ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ กิจกรรมที่ดำเนินการมา และผลที่ได้รับตลอดโครงการ

วัตถุประสงค์	ผลที่ได้รับตลอดโครงการ
1. เพื่อตรวจหาแบคเทอริโอเฟจที่สามารถทำลาย *Lactococcus lactis* RP359	1. สามารถคัดแยกแบคเทอริโอเฟจที่สามารถทำลาย *Lactococcus lactis* RP359 จากอาหารหมัก และเรียกแบคเทอริโอเฟจที่คัดแยกได้นี้ว่า "แบคเทอริโอเฟจ ϕRP359"
2. เพื่อศึกษาคุณสมบัติสำคัญบางประการของแบคเทอริโอเฟจที่สามารถทำลาย *Lactococcus lactis* RP359	2. นำแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 มาศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ดังนี้คือ ความสามารถในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ผลของสารละลาย $CaCl_2$ ต่อการเพิ่มจำนวน การยึดเกาะของแบคเทอริโอเฟจ การทนความร้อน รูปร่าง โปรตีนที่เป็นส่วนประกอบ และสารพันธุกรรม

กิจกรรมที่วางแผนไว้	กิจกรรมที่ดำเนินการมา
ปีงบประมาณ 2554	
1. ตรวจหาแบคเทอริโอเฟจจากอาหารหมักซึ่งสามารถทำลาย *L. lactis* RP359	1. ตรวจหาแบคเทอริโอเฟจจากอาหารหมักซึ่งสามารถทำลาย *L. lactis* RP359
2. ศึกษาความสามารถของแบคเทอริโอเฟจในการทำลายแลคติกแอสิดแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น	2. ศึกษาความสามารถของแบคเทอริโอเฟจในการทำลายแลคติกแอสิดแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น
3. ศึกษาผลของสารละลาย $CaCl_2$ ต่อการเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจในโฮสต์เซลล์	3. ศึกษาผลของสารละลาย $CaCl_2$ ต่อการเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจในโฮสต์เซลล์
4. ศึกษาการยึดเกาะของแบคเทอริโอเฟจบนผิวเซลล์ของโฮสต์	4. ศึกษาการยึดเกาะของแบคเทอริโอเฟจบนผิวเซลล์ของโฮสต์
ปีงบประมาณ 2555	
5. ศึกษาการทนความร้อนของแบคเทอริโอเฟจ	5. ศึกษาการทนความร้อนของแบคเทอริโอเฟจ
6. ศึกษารูปร่างของแบคเทอริโอเฟจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน	6. ศึกษารูปร่างของแบคเทอริโอเฟจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน
7. ศึกษาโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของแบคเทอริโอเฟจโดยวิธี SDS-PAGE	7. ศึกษาโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของแบคเทอริโอเฟจโดยวิธี SDS-PAGE
8. ศึกษาสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจ	8. ศึกษาสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจ
9. รวบรวมข้อมูล วิเคราะห์ผล เขียนรายงาน และส่งผลงานไปตีพิมพ์	9. รวบรวมข้อมูล วิเคราะห์ผล เขียนรายงาน และส่งผลงานไปตีพิมพ์

รายงานการเงิน

ปีงบประมาณ 2554	ปีงบประมาณ 2555
งบที่ได้รับจัดสรร	งบที่ได้รับจัดสรร
337,700.- บาท	345,400.- บาท
(สามแสนสามหมื่นเจ็ดพันเจ็ดร้อยบาท)	(สามแสนสี่หมื่นห้าพันสี่ร้อยบาท)

หมายเหตุ

รายละเอียดเกี่ยวกับหลักฐานการเบิกจ่ายเงิน สามารถตรวจสอบได้ที่ สำนักงานเลขานุการ งานการเงินและบัญชี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ภาคผนวก

ผลงานที่ได้จากโครงการวิจัยนี้ ได้นำไปตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติชื่อ African Journal of Microbiology Research ในชื่อเรื่อง “Isolation and characterization of lytic phage against *Lactococcus lactis* RP359, kem-buk-nud starter culture” ปีที่พิมพ์ 2012 ฉบับที่ 6(37) หน้า 6678-6684. (รายละเอียดดังเอกสารที่แนบมา)

African Journal of Microbiology Research Vol. 6(37), pp. 6678-6684, 27 September, 2012
Available online at http://www.academicjournals.org/AJMR
DOI: 10.5897/AJMR12.1145
ISSN 1996-0808 ©2012 Academic Journals

Full Length Research Paper

Isolation and characterization of lytic phage against *Lactococcus lactis* RP359, kem-buk-nud starter culture

Parichat Phumkhachorn and Pongsak Rattanachaikunsopon*

Department of Biological Science, Ubon Ratchathani University, Warin Chamrap, Ubon Ratchathani 34190, Thailand.

Accepted 5 September, 2012

Starter culture-infecting bacteriophages have become a major problem of food fermentation because of their ability to ruin fermentation. This study aims to isolate and characterize a phage having ability to infect *Lactococcus lactis* RP359, a starter culture of kem-buk-nud, a traditional Thai fermented food. A lytic phage ϕRP359 was isolated from a kem-buk-nud sample and produced clear plaques of 1 to 1.5 mm in diameter. It was highly specific to *L. lactis* RP359. Since phage ϕRP359 was a tailed phage with a contractile tail and its genome was double stranded DNA, the phage was classified as a member of the family *Myoviridae*. Structural protein profile of the phage studied by SDS-PAGE consisted of 5 bands with molecular masses of 80, 57, 40, 25, and 15 kDa. The highest phage adsorption rate of 85% was observed at 20 min of infection. Although the phage was tolerant to high temperature, the temperature dependent reduction of phage titer was observed over the temperature ranging from 60 to 90°C. The influence of Ca^{2+} ion on phage propagation was also observed with the optimal concentration of Ca^{2+} ion of 20 mM. Phage ϕRP359 is the first starter culture-infecting phage isolated from kem-buk-nud. Knowledge of its characteristics and infection mechanism might help to improve the starter culture dependent fermentation of kem-buk-nud.

Key words: Bacteriophage, food fermentation, kem-buk-nud, *Lactococcus lactis*, *Myoviridae*.

INTRODUCTION

Among the various food fermentation processes, lactic acid fermentation is one of the oldest and most widespread. In Thailand, lactic fermentation technology has been indigenously developed for an extensive range of raw materials yielding an extensive range of products. Kem-buk-nud is one kind of Thai fermented foods which is consumed in almost all communities in northeastern Thailand. It is traditionally made from pieces of fresh fish mixed throughly with salt, minced pineapple and then packed in a bottle. It is generally fermented for at least 6 months. Since fermentation of kem-buk-nud is still carried out by indigenous bacteria, its quality and safety vary from batch to batch. In order to abate the trouble, the use of nisin-producing *Lactococcus lactis* RP359 starter culture in fermentation of kem-buk-nud is considered as a better way to get higher quality and safety of the product (Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn, 2008).

*Corresponding author. E-mail: rattanachaikunsopon@yahoo.com. Tel/Fax: +6645-288380.

Unfortunately, phage (or bacteriophage) infection of the starter culture remains an important problem in the fermentation process. Although good manufacturing practices have considerably reduced the incidence of complete starter culture failure, phages are still an ever-present threat causing slow fermentations with ensuing schedule disruptions and low-grade product. Therefore, the problematic phage causing starter culture failure needs to be investigated.

Phages occur everywhere in the biosphere. The number of phage species in nature has been evaluated at several 100,000 or even millions (Rohwer, 2003). The immense majority of viral sequences are not found in database and only a few can be related to known phages such as T4 and T7 (Breitbart and Rohwer, 2005). Moreover, most phages are from Europe and America, while almost nothing of phages in the environments of other vast regions has been known. Knowledge of the phage world is evidently incomplete and still seems to be comprehended quite a little (Ackermann, 2003).

According to its life cycle, phages can have two different replication cycles. If the phage DNA is integrated

into the host, the phage can then stay within the bacteria causing no harm. This pathway is called the lysogenic cycle. On the other hand, the phage can also cause lysis and death of the host after it reproduces inside the host and subsequently escapes with numerous progeny through the lytic cycle.

Lytic phages are the most significant cause of fermentation failures worldwide. Due to their harmful effects on fermentation as well as their biodiversity within ecological niche, numerous lactococcal phages have been isolated and characterized, with the overall aim of improving phage control strategies (Deveau et al., 2006). They have been grouped in 12 species (Jarvis et al., 1991), later reduced to 10 (Josephsen and Neve, 1998), out of which 936, P335 and c2 are the most frequently isolated from dairy fermentations. According to the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), phages are members of the Caudovirales order which contains three major families, namely, the *Myoviridae* (with long, contractile tail), the *Siphoviridae* (with long, noncontractile tail), and the *Podoviridae* (with short tail). Lactococcal phages are mainly members of the *Siphoviridae* family, with a few members from the *Podoviridae* (Maniloff and Ackermann, 1988) and *Myoviridae* families (Deveau et al., 2006).

The present study focused on the isolation and characterization of a lytic phage of *L. lactis* RP359. The basic properties of this phage were examined including host range, morphology, structural proteins and type of genome, adsorption on its host, effect of calcium ions on phage propagation, and thermal stability. The results should be used as basic information to find out successful strategies for controlling the phage in the fermentation process.

MATERIALS AND METHODS

Bacteria, phage, culture conditions and phage titration

L. lactis RP359 strain was used as a host bacterium for phage isolation and propagation. The strain was grown in deMan Rogosa Sharpe (MRS) medium at 30°C. To test the host range of the phage, 20 strains of LAB were used (Table 1). All the LAB used in this study was grown in MRS medium at 30°C. The bacterial cultures were stored as stock cultures in MRS broth supplemented with 20% (vol/vol) glycerol at -70°C.

The phage was purified by single plaque isolation (Lu et al., 2003). A single plaque was picked from the lawn of the bacterial host, and propagated in 10 ml of an early log phase *L. lactis* RP359 culture (10^8 CFU/ml) in MRS broth, supplemented with 10 mM $CaCl_2$ (MRS-Ca). After incubating at 30°C for 24 h, phage lysate was centrifuged at 4500 × *g* for 10 min. The supernatant was filtered through 0.45 μm membrane filter (Sartorius, Goettingen, Germany). Phage stock was stored at 4°C, and an aliquot was frozen at -70°C.

Phage titer was enumerated as plaque forming unit (PFU/ml) by using the double-layer agar plaque method. Briefly, 100 μl of diluted phage solution, 100 μl of the 24 h-bacterial culture, and 5 ml of MRS-Ca soft agar (0.4% agar) were mixed in a glass tube and poured onto a MRS agar containing Petri dish. Plates were incubated for 24 h after which, plaque forming unit were counted.

Phage isolation

Phage was isolated from kem-buk-nud samples which were randomly purchased at local markets in Ubon Ratchathani province, Thailand. To prepare the samples for phage isolation, 5 g of samples were mildly blended in 50 ml of phosphate buffered saline (PBS) with stomacher apparatus and the homogenates were centrifuged at 4500 × *g* for 10 min and the supernatants were collected for phage isolation.

Phage was isolated from the samples by using enrichment protocol (Lu et al., 2003). The obtained supernatant of the samples was added to an equal volume of double strength MRS-Ca broth and incubated with an early log phase of host culture. After incubation at 30°C for 24 h, the medium was centrifuged at 4500 × *g* for 10 min. The obtained supernatant was passed through 0.45 μm membrane filter for ascertainable bacterial sterilization and then the filtrate was tested for the presence of phage.

Phage detection and host range determination

Phage detection was performed by using a spot test method (Lu et al., 2003). The test was used for the presence of phage by observing lytic activity of phages. Soft agar in 5 ml MRS-Ca broth was seeded with 0.1 ml of early log phase host culture, mixed thoroughly, and poured onto an MRS agar plate. After solidification, 10 μl of phage filtrate was spotted onto the top agar layer. After drying, the plate was incubated at 30°C for 24 h. A clear zone in the plate, resulting from the lysis of host cells, indicated the presence of phage. Spot test was also used for phage host range study with LAB listed in Table 1.

Influence of calcium ions on phage propagation

Calcium effect on phage propagation was determined in seven 15 ml test tubes. Ten milliliters of early log phase host culture in MRS broth was transferred into each of the seven tubes containing 0, 1, 10, 20, 30, 40 or 50 mM supplemented $CaCl_2$. After the final volume was adjusted with sterile distilled water, each tube was infected with the phage at an MOI of 0.01. After incubation at 30°C for 24 h, the phages were enumerated in all tubes by the double-layer agar plaque method.

Phage adsorption

Phage adsorption rates on the host cells were carried out by the method of Quiberoni et al. (2004) with some modifications. Exponentiallly growing (OD_{600nm} = 0.5) host strain cultures in MRS broth were centrifuged and resuspended at a concentration of about 10^8 CFU/ml in MRS-Ca broth. The phage was added at a MOI of 0.01, and a phage-host mixture was incubated at 30°C. Aliquots of the mixture were taken at 0, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 min after infection and centrifuged at 4500 × *g* for 10 min to sediment the phage-adsorbed cells. Then the titers of unadsorbed phages in the supernatant (residual titer) were determined by the double-layer agar plaque method. MRS-Ca broth containing only phage was used as a control. Percent adsorption of the phage was calculated as [(control titer–residual titer)/control titer] × 100% (Lu et al., 2003).

Thermal tolerance of phage

Thermal tolerance of phage was examined at temperature ranging

Table 1. Host range specificity study of phage ϕRP359.

Bacterial strains[a]	Spot test[b]
Lactococcus lactis RP359	+
Lactococcus lactis subsp. lactis ATCC11454	–
Lactococcus lactis subsp. *lactis* ATCC11007	–
Lactococcus lactis subsp. *lactis* TFF221	–
Lactococcus lactis UBUB 143	–
Lactococcus lactis UBUB 157	–
Lactobacullus acidophilus ATCC4356	–
Lactobacillus brevis ATCC14869	–
Lactobacillus brevis UBUB001	–
Lactobacillus casei ATCC334	–
Lactobacillus curvatus ATCC25601	–
Lactobacillus delbrueckii subsp. *lactis* ATCC12315	–
Lactobacillus pentosus ATCC8041	–
Lactobacillus plantarum ATCC8014	–
Leuconostoc cremoris ATCC19254	–
Leuconostoc fallax ATCC700006	–
Leuconostoc mesenteroides TISTR473	–
Pediococcus pentosaceus ATCC25745	–
Pediococcus pentosaceus TISTR374	–
Enterococcus faecalis ATCC29212	–
Enterococcus faecalis TISTR927	–

[a]American Type Culture Collection (ATCC); Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR); TFF and UBUB, Culture Collection of Biological Science Department, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University. [b]+, clear zone; – no clear zone.

from 60 to 90°C. A 1.5-ml microcentrifuge tube containing 900 µl of MRS-broth was preheated to a desirable temperature. One hundred microliters of phage solution was added into the tube to obtain a final concentration of about 10^8 PFU/ml. After heating at intervals of 30 s for 3 min, the tube was placed on an ice bath and a sample was taken. The samples were assayed to enumerate surviving phage in PFU/ml.

Study of phage morphology by transmission electron microscopy

Phage preparation for direct visualization by transmission electron microscopy was carried out as described by Watanabe et al. (1970) with some modifications. Briefly outlined, 500 ml of MRS-Ca medium was inoculated with *L. lactis* RP359, and grown to an optical density at 600 nm of 0.5. The bacterial host was then infected with 5 ml of a phage suspension (10^5 PFU/ml) and incubated for 24 h at 30°C. After centrifugation at 4500 × *g* for 20 min, the supernatant was collected, and was centrifuged at 4°C with a 70.1Ti rotor at 28500 × *g* for 1 h in a Beckman L-80 ultracentrifuge (Beckman, CA, USA). The resulting pellets were resuspended in 5 ml of phage buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 10 mM $MgSO_4$). A purified phage was recovered after centrifugation (4500 × *g* for 20 min) and the supernatant was passed through a 0.45 µm membrane filter. The purified phage was stored at 4°C for transmission electron microscopy.

A drop of the purified phage suspension was applied to a carbon-coated grid for 5 min, then removed with a pipette and immediately replaced with a solution of 2% (wt/vol) uranyl acetate. After 1 min, the excess liquid was removed with a filter paper. The grid was allowed to air dry for 10 min and examined in a transmission electron microscopy (JEOL, JEM-1230, Japan).

Analysis of phage proteins

Purified phage suspension was precipitated with 4 volumes of ice-cold acetone. After centrifugation (10000 × *g*, 10 min, 4°C), the pellet was air-dried and resuspended in PBS buffer. Phage structural proteins were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) according to Laemmli (1970). Briefly, the sample was mixed with 2x sample loading buffer (0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 20% glycerol, 4% SDS, 5% β-mercaptoethanol, 0.01% bromophenol blue) and then heated in a boiling water bath for 3 min, followed by separating the proteins in the gel (12%). Protein bands were visualized by staining the gel with Coomassie brilliant blue.

Restriction digestion of phage genome

Phage genome was isolated according to the protocol provided with a commercial kit (PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Purified phage genome was digested with *Pst*I restriction endonuclease under the condition prescribed by the manufacturer (Promega, Madison, WI, USA). After digestion, the sample was heated for 10 min at 70°C to avoid possible cohesive end ligation. Electrophoresis of digested genome was carried out

Figure 1. Electron micrograph of phage ϕRP359 negatively stained with 2% uranyl acetate (bar = 50 nm).

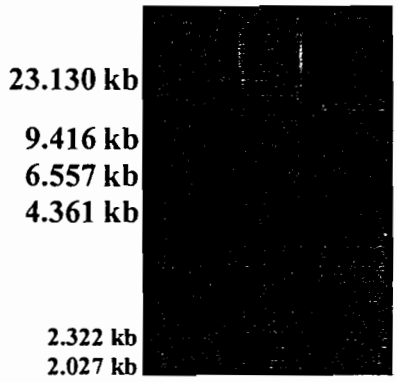


Figure 2. Restriction digestion of phage ϕRP359 genome. Lane 1, Lambda DNA cleaved with *Hind*III; Lane 2, phage ϕRP359 genome; Lane 3, phage ϕRP359 genome cleaved with *Pst*I.

on 1% agarose gel in 1x TAE (0.04 mM Tris-acetate, 0.001 M EDTA) and band patterns were visualized by a Dark Reader transilluminator (Clare Chemical Research) after staining with GelStar (Lonza Bioscience, Rockland, ME, USA).

RESULTS

Among 30 kem-buk-nud samples, one phage against *L. lactis* RP359 was isolated and named ϕRP359. The phage was found to produce a prominent clear spot by the spot test and cause numerously small clear plaques on the bacterial lawn by the double-layer agar plaque method denoting the lytic nature of the phage. An average diameter of plaque sizes is about 1 to 1.5 mm.

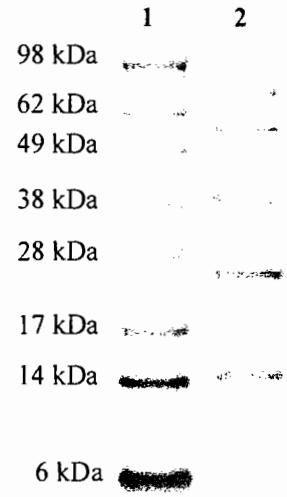


Figure 3. SDS-PAGE analysis of phage ϕRP359 structural proteins. Lane 1, SeeBlue®Plus2 molecular mass markers; Lane 2, phage ϕRP359.

The purified phage was kept for further studies. The susceptibility to phage ϕRP359 was also investigated with twenty other bacterial strains by the spot test. None of the tested bacteria was susceptible to this phage (Table 1). Moreover, the phage could not even lyse other *L. lactis* strains used in this study. The results indicated that phage ϕRP359 had a narrow host range.

A transmission electron micrograph showed that the phage ϕRP359 particle had an icosahedral head of 70 nm with a contractile tail of 100 nm (Figure 1). This implied that the phage belongs to the order *Caudovirales* and the family *Myoviridae* in the ICTV classification. Genomic DNA of the phage was extracted and digested with *Pst*I restriction endonuclease, and subsequently subjected to electrophoresis analysis. As shown in Figure 2, the phage genome could be digested by the tested enzyme. The restriction analysis positively confirmed that the phage ϕRP359 was a double stranded DNA virus. To further characterize, purified phage particles were subjected to SDS-PAGE and proteomic patterns were obtained after Coomassie staining and destaining (Figure 3). Five protein bands were observed on the gel, with the molecular weights of 80, 57, 40, 25, and 15 kDa.

The adsorption rate of phage ϕRP359 in the MRS broth with 10 mM $CaCl_2$ supplementation are shown in Figure 4. The adsorption rate continuously increased from the beginning of the experiment and reached the maximum rate of about 85% at 20 min. After that, the adsorption

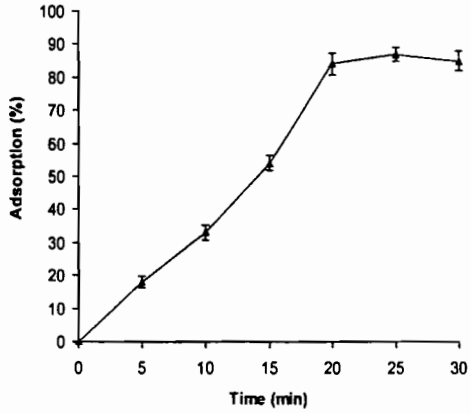


Figure 4. Adsorption kinetic of phage ϕRP359 on *Lactococcus lactis* RP359 in MRS-Ca medium at 30°C. Values are the mean of 3 determinations.

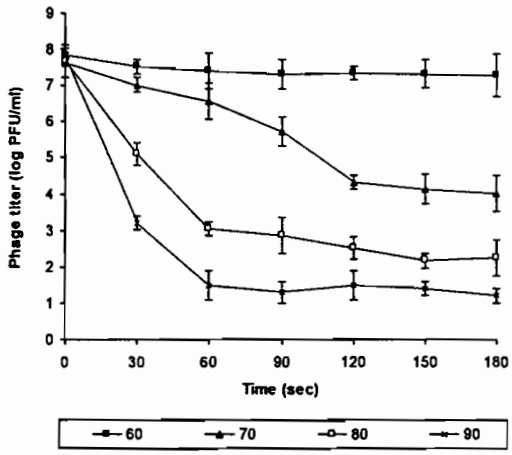


Figure 5. Thermal toterance of phage ϕRP359 in MRS broth. Samples were taken at different time intervals to titer the surviving particles in PFU/ml. Values are the mean of 3 determinations.

rate was somewhat stable throughout the experiment. Thermal tolerance of phage ϕRP359 was determined by testing its survival under different temperatures for 180 s. The reduction of phage was temperature dependent (Figure 5). No significant change of phage titer was observed when the phage was treated at 60°C. The phage titer decreased from about 8 log PFU/ml to about 4, 3, and 2 log PFU/ml after heat treatment at 70, 80, and 90°C, respectively. However, there was no completely elimination of the phage in all temperature treatments.

The influence of divalent cations on phage propagation was investigated by incubation (30°C for 24 h) of infected *L. lactis* RP359 culture in MRS broth without and with 1, 10, 20, 30, 40, and 50 mM $CaCl_2$. The results showed that divalent Ca^{2+} ion was necessary for lysis of the phage-infected cells in the MRS broth and the optimal concentration of $CaCl_2$ in the medium was 20 mM (Figure 6). An addition of $CaCl_2$ over than 20 mM in the medium decreased the phage titers.

DISCUSSION

Food fermentation is one of the food preservation methods. It not only extends food shelf-life but also creates unique property of food such as texture, aroma and taste. Lactic acid bacteria are a major group of microorganisms responsible for food fermentation process. Most of food manufacturers have currently produced fermented food by using LAB starter cultures because quality and safety of final food products can be controlled. Like many food fermentations using starter cultures, the production of kem-buk-nud, a traditional Thai fermented food, by using *L. lactis* RP359 as a starter culture can fail due to the infection of the starter culture by phage. Knowledge of properties of phages infecting starter cultures may be helpful for fermented food manufacturers to find suitable ways to prevent such infection. We, therefore, isolated and characterized a phage capable of infecting *L. lactis* RP359.

Phages are generally isolated from environments that are habitats for the respective host bacteria (Nakai and Park, 2002). Since *L. lactis* RP359 used as a main host in phage screening isolated from kem-buk-nud (Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn, 2008), kem-buk-nud would be an ideal source for isolation of *L. lactis* RP359 phages. Several previous works also found phages in the same kinds of foods where their hosts were isolated. For examples, *Lactobacillus plantarum* ϕJL-1 and its phage was isolated from fermented cucumber (Lu et al., 2003) and *L. lactis* subsp. *Lactis* TFF221 and its phage was isolated from kung jom, a traditional Thai fermented shrimp paste (Phumkhachorn and Rattanachaikunsopon, 2011). Although this work is not the first report presenting the isolation of phage specific to bacteria used as starter cultures in Thai fermented food, it is the first report showing the presence of phage specific to *L. lactis* RP359 in kem-buk-nud.

The genome of ϕRP359 was found to be double stranded DNA because it was digested with restriction endonuclease. As a tailed phage with double stranded DNA, ϕRP359 fell into the order Caudovirales that contains three families of tailed viruses that infect Bacteria and Archaea (van Regenmortel et al., 2000). Possession of an icosahedral head and a contractile tail would tentatively place it in the family *Myoviridae*.

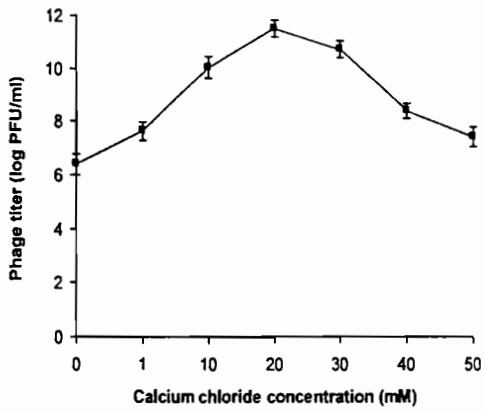


Figure 6. The effect of calcium ions on phage ϕRP359 propagation at 30°C in MRS broth. Values are the mean of 3 determinations.

Although lactococcal phages are mainly members of the *Siphoviridae* family with a few members in the *Podoviridae* family (Deveau et al., 2006), it does not mean that no lactococcal phage has been classified into the *Myoviridae* family. At least, two lactococcal myophages, phage RZh and c10III, have been evident (Deveau et al., 2006). Therefore, it is not an unusual case for our study to isolate a myophage infecting *L. lactis*.

Lactococcal phages are known to have variation in number of proteins (Deveau et al., 2006). In this study, SDS-PAGE analysis showed that ϕRP359 possessed 5 proteins with molecular masses ranging from 15 to 80 kDa. However, their amino acid sequences and functions have not been revealed. Variation in genome size, nucleic acid sequence and number of genes has been found in lactococcal phages as well (Deveau et al., 2006). Further studies are required to find out the size and sequence of ϕRP359 genome and to identify the open reading frames corresponding to the observed proteins. This information may be useful to unveil the relationship between ϕRP359 and other lactococcal phages.

The phage ϕRP359 had a narrow host range. It infected only *L. lactis* RP359 but not the rest of the bacteria used in this study. Similar results were also obtained from other phages infecting starter cultures. Phumkhachorn and Rattanachaikunsopon (2011) showed that ϕTFF221 isolated from Thai fermented shrimp paste was specifically virulent to its own host, *L. lactis* subsp. *lactis* TFF221. The phage ϕJL-1 was reported to be lytic only to *L. plantarum* B17, a starter culture of fermented cucumber (Lu et al., 2003).

Bacterial infection by some phages depends on the presence of certain cations in the media. These phages usually require higher concentrations of divalent cations, such as calcium or magnesium, at some stage of their infection cycle than the concentration required for the growth of host cells (Watanabe and Takesue, 1972). In this study, the optimal concentration of $CaCl_2$ for the propagation of ϕRP359 was 20 mM. Effect of $CaCl_2$ on phage propagation can be different depending on type of phage. Some phages required $CaCl_2$ for their adsorption onto their host cell surface while other phages required $CaCl_2$ for other step of phage propagation such as penetration of their genome into their host cells (Lu et al., 2003; Watanabe and Takesue, 1972). For ϕRP359, it is still unknown what step of propagation is really affected by $CaCl_2$.

Knowledge on the sensitivity of ϕRP359 to heat may provide some information helpful for the prevention of the infection of *L. lactis* RP359 starter culture by the phage. Our result showed that the phage was highly tolerant to heat. It could not be completely eliminated with heat treatment at 90°C. This indicated that standard pasteurization may not be the appropriate approach for inactivating the phage. Furthermore, the isolation of ϕRP359 from the final product of kem-buk-nud fermentation suggested that the phage had to be tolerant to the acidic environment throughout the food fermentation. However, there was a report presenting that the phage ϕTFF221 infecting the starter culture of Thai fermented shrimp paste was sensitive to high concentration of NaCl (Phumkhachorn and Rattanachaikunsopon 2011). Therefore, fermentation with an appropriate amount of NaCl may help to reduce the chance of fermentation failure due to phage infection of starter cultures. Several more factors have to be taken into consideration to come up with an appropriate approach for preventing phage infection of starter cultures during fermentation such as the protection of phage by food matrix.

In conclusion, ϕRP359 is the first reported *L. lactis* phage isolated from kem-buk-nud. The study of phage-host interaction in food environment could lead to a further understanding of this phage in the fermentation process. Due to its potential to cause fermentation failure, the strategy for prevention of ϕRP359 infections is needed and has been one of the main research subjects undertaken in our laboratory.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by research grants (2554A11702010, 2555A11702010) from the National Research Project Management.

REFERENCES

Ackermann HW (2003). Bacteriophage observations and evolution. Res. Microbiol. 154:245-251.

Breitbart M, Rohwer F (2005). Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? Trends Microbiol. 13:278-284.

Deveau H, Labrie SJ, Chopin MC, Moineau S (2006). Biodiversity and classification of Lactococcal phages. Appl. Environ. Microbiol. 72:4338-4346.

Jarvis AW, Fitzgerald GF, Mata M, Mercenier A, Neve H, Powell IB, Ronda C, Saxelin M, Teuber M (1991). Species and type phages of lactococcal bacteriophages. Intervirol. 32:2-9.

Josephesn J, Neve H (1998). Bacteriophages and lactic acid bacteria. In: Salminen S, von Wright SA (EDs.), Lactic Acid Bacteria. Microbiol. Functional Aspects. Marcel Dekker, New York. pp. 385-436.

Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

Lu Z, Breidt JrF, Flaming HP, Altermann E, Klaenhammer TR (2003). Isolation and characterization of a *Lactobacillus plantarum* bacteriophage, ϕJL-1, from a cucumber fermentation. Int. J. Food Microbiol. 84:225-235.

Maniloff J, Ackermann H-W (1998). Taxonomy of bacterial viruses: establishment of tailed virus genera and the other *Caudovirales*. Arch. Virol. 143: 2015-2063.

Nakai T, Park SC (2002) Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture. Res. Microbiol. 153:13-18.

Phumkhachorn P, Rattanachaikunsopon P (2011). Bacteriophage specific to nisin producing-*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* TFF221, a starter culture in Thai fermented food. Afr. J. Microbiol. Res. 5:1203-1210.

Quiberoni A, Guglielmotti D, Binetti A, Reinheimer J (2004). Characterization of three *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* phages and the physicochemical analysis of phage adsorption. J. Appl. Microbiol. 96:340-351.

Rattanachaikunsopon P, Phumkhachorn P (2008). Characterization of nisin produced by *Lactococcus lactis* RP359 isolated from kem-buk-nud, a traditional Thai fermented food. Int. J. Microbiol. 5(1):1-9.

Rohwer F (2003). Global phage diversity. Cell 131:141.

van Regenmortel MHV, Fauguet CM, Bishop DHL, Carsteus EB, EstesMK, Lemon SM, Maniloff JM, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wicher RB (2000). Virus taxonomy. Academic Press, San Diego, CA.

Watanabe K, Takesue S, Jin-Nai K, Yoshikawa T (1970). Bacteriophage active against the lactic acid beverage-producing bacterium *Lactobacillus casei*. Appl. Microbiol. 20:409-415.

Watanabe K, Takesue S (1972.) The requirement for calcium in infection with Lactobacillus phage. J. Gen. Virol. 17:19-30.

สำนักวิทยบริการ
มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช