บทความวิจัย

การแยกและการศึกษาลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติกและเฟจของแบคทีเรียกรดแลคติกจากนมเปรี้ยว

อรอนงค์ พริ้งศุลกะ* สิรินธร สุนทรธรรมาสน์ เกตุวดี อินเสียน ณัฏฐิกา สุวรรณาศรัย สุขุมาภรณ์ สุขขุม สิริรักษ์ ศรวณียารักษ์ และ อัจฉริยา รังษิรุจิ

บทคัดย่อ

การติดเชื้อโดยแบคทีริโอเฟจหรือเฟจเป็นสาเหตุที่ทำให้สูญเสียอย่างมากทางเศรษฐกิจในอุตสาหกรรมการผลิตนม โดยโรงงานส่วนใหญ่ได้ประสบปัญหาการปนเปื้อนของเฟจอย่างรุนแรงซึ่งส่งผลให้การหมักล้มเหลว โรงงานบางแห่งในประเทศไทยได้มีการส่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวให้บริษัทต่างประเทศเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนเฟจ แต่ข้อมูลเกี่ยวกับเฟจที่พบในโรงงานของไทยนั้นยังไม่มีเพียงพอ จากความสำคัญดังกล่าวในงานวิจัยนี้จึงเน้นถึงการแยกและศึกษาลักษณะของเฟจที่ติดเชื้อในแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวที่มาจากการหมักล้มเหลวในโรงงานของไทย จากการศึกษาพบว่า สามารถแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ 1 ไอโซเลท เมื่อจัดจำแนกโฮสต์โดยการเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของโฮสต์กับฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Lactobacillus plantarum* ถึง 100% และเมื่อแยกเฟจจากเทคนิคการทำอาหารวุ้น 2 ชั้น พบพลาคขนาดเล็กและมีลักษณะใส และให้ชื่อเฟจนี้ว่า T 25 จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเฟจ T 25 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านพบว่าเฟจ T 25 มีส่วนหัวเป็นรูปหกเหลี่ยม โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของส่วนหัวเท่ากับ 60 นาโนเมตร และมีส่วนหางที่ยืดหดไม่ได้ขนาด 225 นาโนเมตร ดังนั้นจึงจัดจำแนกเฟจนี้อยู่ในแฟมิลี Siphoviridae จากการศึกษา one-step growth kinetic พบว่า เฟจ T 25 มี latent period เท่ากับ 20 นาที เมื่อนำมาศึกษาสมบัติของเฟจในการติดเชื้อกับแบคทีเรียกรดแลคติกสปีชีส์อื่นและจีนัสอื่นพบว่า เฟจ T 25 ไม่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อข้ามไปยังแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์อื่นและจีนัสอื่นที่นำมาทดสอบได้ ซึ่งการศึกษาด้านชีวโมเลกุลยังพบว่าเฟจมีขนาดดีเอ็นเอโดยประมาณเท่ากับ 44 kb นอกจากนี้ยังพบว่าไดวาเลนท์แคทไอออน ($CaCl_2$) ที่ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ มีผลต่อการเข้าเกาะติดโฮสต์ของเฟจ เฟจ T 25 สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงถึง 72 องศาเซลเซียสได้ และยังสามารถทนต่อ pH ในช่วง 4.0-10.0 ดังนั้น จากคุณสมบัติทั้งหมดของเฟจที่ได้มาจากการศึกษาครั้งนี้จึงสรุปได้ว่า เฟจ T 25 ไม่สามารถถูกทำลายด้วยอุณหภูมิพาสเจอร์ไรซ์และการปรับ pH ได้ ดังนั้น จึงควรมีการพัฒนาวิธีอื่นๆ เพื่อลดการปนเปื้อนและควบคุมเฟจต่อไป

คำสำคัญ: เฟจ แบคทีเรียกรดแลคติก *Lactobacillus plantarum* นมเปรี้ยว

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

*ผู้นิพนธ์ประสานงาน, e-mail: onanong@swu.ac.th

Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria and Lactic Acid Bacteria Phages from Fermented Milk

Onanong Pringsulaka*, Sirinthorn Sunthornthummas, Katewadee Insian, Nuttika Suwannasai, Sukhumaporn Sukkhum, Siriruk Sarawaneeyaruk and Achariya Rangsiruji

ABSTRACT

Infections by bacteriophages or phages can lead to great economic losses in the dairy industries. Most of the dairy plants have encountered severe phage contamination, which resulting in fermentation failure. Some Thai factories have sent the samples of their fermented milk products to oversea companies for detecting phage contamination. However, the characteristics of phages found in Thai factories are not well elucidated. Hence, this study aimed to isolate and characterize the phages of lactic acid bacteria (LAB) from the milk products acquired from fail fermentation in Thai factories. The results showed that only 1 isolate of LAB was obtained. This LAB was identified by 16S rDNA sequence analysis and BLAST searching within the GenBank database which revealing that it possessed 100% similarity to *Lactobacillus plantarum.* When using double agar layer techniques for phage isolation, the small and clear plaques were produced by the phage which was named as T 25. Electron micrographs showed that T 25 phage was found to have hexagonal head (60 nm in diameter) and long noncontractile tail (225 nm in length), indicating that it belonged to Siphoviridae family. From the study of one-step growth kinetics, the results showed that T 25 phage had the latent period of 20 min. The host-range determination found that this T 25 phage was incapable of cross-infection to other genus or species of tested LAB. The molecular characterization of T 25 showed that it had molecular weight of approximately 44 kb. Furthermore, the addition of divalent cations ($CaCl_2$) at 30 mM was found to affect phage adsorption to their hosts. Also, this phage was shown to be capable of surviving at temperature as high as 72°C and pH ranging from 4.0 to 10.0. In conclusion, from the characteristics of T 25 phage, the results suggested that pasteurization temperature and pH adjustment were incapable of destroying this phage. Therefore, other methods for effective decontamination and controlling this phage should be further determined.

Keywords: phage, lactic acid bacteria, *Lactobacillus plantarum,* fermented milk

Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University
*Corresponding author, e-mail: onanong@swu.ac.th

บทนำ

แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกไม่สร้างสปอร์ ทนกรด มีรูปร่างท่อนหรือกลม สามารถสร้างกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในการหมักคาร์โบไฮเดรต แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถพบได้ในการหมักอาหาร รวมทั้งบริเวณ mucosal surface ของมนุษย์และสัตว์ ปัจจุบันแบคทีเรียกรดแลคติกประกอบด้วยแบคทีเรียประมาณ 20 จีนัส เช่น *Aerococcus, Carnobacterium, Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Oenococcus, Pediococcus, Streptococcus, Tetragenococcus, Vagococcus* และ *Weissella* เป็นต้น แบคทีเรียกรดแลคติกถูกยอมรับว่าเป็นแบคทีเรียปลอดภัย (Generally regarded as safe; GRAS) และมักใช้ในการหมักอาหารและถนอมอาหาร ซึ่งอาจหมักตามธรรมชาติโดยใช้แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีอยู่ในวัตถุดิบหรืออาจเติมแบคทีเรียกรดแลคติกในรูปหัวเชื้อเติมลงในอาหารภายใต้ภาวะควบคุม [1]

แบคทีเรียกรดแลคติกถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหารโดยเฉพาะในผลิตภัณฑ์นม เนื้อ ผัก และขนมปัง [2] โดยการใช้แบคทีเรียกรดแลคติกก่อให้เกิดผลดี คือ สามารถยืดอายุการเก็บอาหาร โดยเฉพาะอาหารที่มีน้ำตาลเป็นส่วนผสมในวัตถุดิบ ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกจะเปลี่ยนน้ำตาลให้กลายเป็นกรดแลคติก ทำให้อาหารมี pH ลดลง และไม่เหมาะกับการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียหรือจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในอาหาร [3, 4] นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติกบางสายพันธุ์จะสร้างสารประเภทเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกอื่น [5-7] อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพในการหมักโดยการใช้แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นหัวเชื้อตามธรรมชาตินั้นมักถูกยับยั้งโดยสารต่างๆ เช่น สารปฏิชีวนะที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบ หรือสารฆ่าเชื้อที่ใช้ในการชำระล้างอุปกรณ์ในการผลิต แต่ส่วนใหญ่มักเกิดจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้เป็นหัวเชื้อเกิดการติดเชื้อด้วยเฟจ [8, 9] ตัวอย่างของหัวเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีการปนเปื้อนด้วยเฟจ เช่น การพบเฟจที่มีความจำเพาะต่อ *Lactococcus lactis* ในการหมักผลิตภัณฑ์นม เป็นต้น [10]

เฟจสามารถแบ่งตามวงชีวิตออกได้เป็น 2 ประเภท คือ virulent phage และ temperate phage โดยเฟจประเภทแรกจะมีการเพิ่มจำนวนโดยอาศัย lytic cycle ซึ่งจะทำให้มีการสร้างอนุภาคเฟจออกมาเป็นจำนวนมาก และทำให้เซลล์แบคทีเรียเกิดการแตกสลาย ส่วนเฟจประเภทที่ 2 จะมีการแทรกดีเอ็นเอเข้าไปในโครโมโซมของแบคทีเรีย และจะเพิ่มจำนวนไปพร้อมกับแบคทีเรีย โดยวงชีวิตแบบนี้จะเรียกว่า lysogenic cycle อย่างไรก็ตาม temperate phage อาจเข้าสู่ lytic cycle ได้เมื่อมีการกระตุ้นหรือเหนี่ยวนำจากสารเคมีหรือสภาพแวดล้อมบางอย่าง หรือจากการแตกหักของดีเอ็นเอ [11]

ความสำคัญของเฟจที่ทำให้เกิดการแตกสลายของหัวเชื้อในผลิตภัณฑ์นมได้ศึกษาครั้งแรกโดย Whitehead และ Cox ในปี ค.ศ. 1935 [12] หลังจากนั้นได้มีความพยายามในการควบคุมการปนเปื้อนของเฟจและการพัฒนาวิธีการในการกำจัดเฟจในบริเวณโรงงานที่ผลิต โดยการติดเชื้อเฟจในแบคทีเรียกรดแลคติกถือว่าเป็นปัญหาที่สำคัญที่สุดปัญหาหนึ่งในการผลิตผลิตภัณฑ์นมในระดับอุตสาหกรรม การติดเชื้อด้วยเฟจมักเกิดจากวัสดุอุปกรณ์ในการผลิตที่ไม่ได้ฆ่าเชื้อ รวมทั้งการใช้หัวเชื้อเดิมซ้ำในการหมักนมทำให้มีการเพิ่มจำนวนของเฟจอย่างต่อเนื่อง [13, 14] โดยการติดเชื้อด้วยเฟจจะทำให้เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกมีการสร้างกรดแลคติกได้ช้าและน้อยลง ลดคุณภาพของผลิตภัณฑ์ เช่น รสชาติและเนื้อสัมผัส และทำให้กระบวนการหมักล้มเหลว ซึ่งส่งผลต่อการสูญเสียทางด้านเศรษฐกิจที่สำคัญของอุตสาหกรรมนมหมัก [15, 16]

เฟจสามารถพบได้โดยทั่วไปในบริเวณโรงงานผลิตนมหมัก โดยเฉพาะในนมดิบซึ่งยังไม่ได้ผ่านกระบวนการปลอดเชื้อ ซึ่งเฟจสามารถเพิ่มจำนวนในแบคทีเรียที่พบในนมดิบได้ [17] นอกจากนี้ยังพบเฟจประเภท temperate phage ซึ่งเมื่อเกิดการกระตุ้นหรือเหนี่ยวนำอาจทำให้ temperate phage เข้าสู่ lytic cycle ทำให้เกิดการแตกสลายในหัวเชื้อได้ รวมทั้งอาจพบในบริเวณส่วนของการผลิตซึ่งจะพบในปริมาณมากน้อยต่างกัน โดยจะพบในปริมาณน้อยบริเวณห้องปลอดเชื้อ และพบในปริมาณมากในละอองอากาศ เวย์ (whey) และติดมากับคนงานในโรงงาน [18] นอกจากนี้ Klaenhammer (1984) [19] ยังสรุปว่าเฟจสามารถปนเปื้อนได้ในบริเวณที่ทำชีสทุกแหล่งทั่วโลก แม้จะมีการควบคุมทางสุขอนามัยเป็นอย่างดีหรือมีการเปลี่ยนหัวเชื้อ หรือแม้กระทั่งการใช้เชื้อที่ต้านทานการติดเชื้อด้วยเฟจก็ตาม อย่างไรก็ตาม หากเกิดเฟจในบริเวณใดบริเวณหนึ่งจะทำให้เกิดการแพร่กระจายไปทั่วโรงงานได้ และพบว่าการกำจัดเฟจนั้นยากมาก เนื่องจากเฟจมีการเพิ่มจำนวนได้เร็ว ในวงชีวิตแต่ละครั้งจะทำให้เกิดเฟจออกมาเป็นจำนวนมาก และเฟจจะทนต่อการพาสเจอร์ไรซ์ [20, 21] โดยเฟจที่มีการศึกษากันมาก ได้แก่ เฟจของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus, Lactococcus* และ *Streptococcus* [22]

การศึกษาเฟจที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในหัวเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกของผลิตภัณฑ์นมหมักในประเทศไทยยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน นอกจากนี้จากการสัมภาษณ์ผู้ประกอบการโรงงานผลิตนมเปรี้ยว พบว่าโรงงานส่วนใหญ่ได้พบการปนเปื้อนของเฟจและส่งผลให้การผลิตนมเปรี้ยวล้มเหลว บางโรงงานได้มีการส่งตัวอย่างนมเปรี้ยวให้ต่างประเทศทำการแยกเฟจในผลิตภัณฑ์และในบริเวณโรงงาน โดยพบว่าสามารถแยกเฟจได้เป็นจำนวนมาก แต่ยังไม่ทราบถึงข้อมูลเกี่ยวกับเฟจด้านอื่นๆ จากความสำคัญดังกล่าวในงานวิจัยนี้จึงเน้นถึงการแยกและศึกษาลักษณะของเฟจที่แยกจากนมเปรี้ยวที่มีการหมักล้มเหลวจากโรงงานผลิตนมเปรี้ยวของประเทศ โดยทำการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้เป็นหัวเชื้อ และทำการแยกเฟจจากตัวอย่างนมชนิดเดียวกัน รวมถึงศึกษาลักษณะของเฟจ ตลอดจนศึกษาปัจจัยทางด้าน pH และอุณหภูมิที่มีผลต่อเฟจและผลของไดวาเลนท์แคทไอออนที่มีผลต่อการเข้าเกาะติดโฮสต์ของเฟจ โดยคาดว่าข้อมูลที่ได้จะทำให้ทราบถึงการปนเปื้อนของเฟจในนมเปรี้ยว และสามารถต่อยอดในการพัฒนาวิธีการในการรักษาหัวเชื้อ รวมทั้งการควบคุมการผลิตให้ปราศจากการปนเปื้อนจากเฟจในผลิตภัณฑ์ต่อไป

วิธีการทดลอง

การคัดแยกเชื้อและการจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติก

แยกหัวเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างนมเปรี้ยวที่ล้มเหลวจากการหมัก โดยนำมา streak ลงบนอาหาร MRS agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใน anaerobic jar เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือกโคโลนีนำไปย้อมสีแกรมเพื่อดูลักษณะรูปร่าง ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยใช้ชุด API 50 CHL และหาลำดับเบสในส่วน 16S rDNA ซึ่งทำได้โดยสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก แล้วเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในบริเวณดังกล่าวโดยใช้วิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) ด้วย universal primer 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) และ 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT) จากนั้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และเทียบเคียงข้อมูลพันธุกรรมที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank เพื่อการระบุสปีชีส์

การแยกเฟจโดยใช้หัวเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้เป็นโฮสต์

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหาร MRS broth เป็นเวลาประมาณ 6-7 ชั่วโมง จากนั้นใส่ตัวอย่างนมเปรี้ยวที่ล้มเหลวจากการหมักปริมาณ 25 มิลลิลิตรลงไป บ่มต่อไปอีกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7000x*g* เป็นเวลา 10 นาที เก็บน้ำใสนำมากรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร และนำมาวิเคราะห์ขั้นต่อไปว่ามีเฟจอยู่หรือไม่ โดยใช้เทคนิคการทำอาหารวุ้นสองชั้นโดยใช้อาหาร MRS agar [24, 25]

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเฟจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

นำตัวอย่างเฟจที่แยกได้ข้างต้นมาเติม PEG 8000 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) จากนั้นนำไปตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 15000x*g* เป็นเวลา 30 นาที นำตะกอนเฟจมาย้อมด้วย uranyl acetate 1 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปส่องดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน [26, 27]

การศึกษาสมบัติของเฟจในการติดเชื้อกับแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์และจีนัสอื่น

นำเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ทดสอบ ได้แก่ *Weissella cibaria* N22, *Lactobacillus (Lb.) plantarum* ATCC 8014, *Lb. sakei* JCM 1157, *Lactococcus (Lc.) lactis* JCM 7638, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* TUA 1344L, *Leconostoc (Leu.) mesenteroides* JCM 6124, *Pediococcus (P.) pentosaceus* JCM 5885, *P. pentosaceus* JCM 5890, *Streptococcus salivarius* JCM 57007 ความเข้มข้น 10^8 CFU/ml ปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาเติมลงในอาหาร MRS broth ที่มีวุ้นร้อยละ 0.5 ที่หลอมเหลวแล้วผสมให้เข้ากันแล้วเททับลงบนอาหาร MRS agar ที่แข็งตัว จากนั้นหยดเฟจที่แยกได้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลความสามารถของเฟจในการติดเชื้อกับแบคทีเรียกรดแลคติกสปีชีส์อื่นหรือจีนัสอื่นที่นำมาทดสอบด้วยการเกิดพลาคบริเวณที่หยดเฟจลงไป [24, 25]

การสกัดและการตัดดีเอ็นเอของเฟจด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำส่วนใสซึ่งมีเฟจจากการทดลองข้างต้นมาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการของ Sambrook และคณะ (1989) [28] แล้วนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ โดยเติมบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมกับเอนไซม์แต่ละชนิดตามที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด ตรวจสอบแถบของดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟเรซิส โดยการตรวจสอบด้วยวิธีนี้ต้องเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานของแลมดาเฟจที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII ทุกครั้ง

การศึกษากราฟการเจริญของเฟจ (One-step growth experiment)

นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ถูกติดเชื้อด้วยเฟจเป็นเวลา 10 นาที มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 21,952x*g* เป็นเวลา 30 วินาที นำส่วนตะกอนมาทำการแขวนลอยในอาหาร MRS broth เก็บตัวอย่างเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,025x*g* เป็นเวลา 10 นาที จาก

นั้นนำส่วนใสไปกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร และนำไปหาปริมาณเฟจโดยใช้เทคนิคการทำอาหารวุ้นสองชั้น นำปริมาณเฟจที่คำนวณได้ไปสร้างกราฟการเจริญของเฟจ โดยกำหนดให้ระยะเวลาตั้งแต่เฟจเริ่มเกาะติดจนถึงเวลาก่อนที่เฟจทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกครั้งแรกเป็น latent period และเวลาที่เฟจทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกครั้งแรกเป็นต้นไปเป็นการเริ่ม rise period [22]

การศึกษาผลของไดวาเลนท์แคทไอออนที่มีผลต่อการเข้าเกาะติดโฮสต์ของเฟจ

ทำได้โดยนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่เจริญใน MRS broth (ที่มี $CaCl_2$ 0, 10 และ 30 มิลลิโมลาร์) ที่มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 1×10^8 CFU/ml มาทำการติดเชื้อด้วยเฟจปริมาณ 10^6 PFU/ml บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10, 15, 20 และ 25 นาที เก็บตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร นำไปกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร และนำไปหาปริมาณเฟจที่เหลือโดยใช้เทคนิคการทำอาหารวุ้นสองชั้น และใช้ปริมาณเฟจเริ่มต้นในอาหาร MRS broth ที่ไม่มีเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นตัวควบคุม โดยเปอร์เซ็นต์การเข้าเกาะติดของเฟจ (% adsorption) คำนวณได้จาก [(ปริมาณเฟจเริ่มต้นในอาหารที่เป็นตัวควบคุม-ปริมาณเฟจที่เหลือ)/ปริมาณเฟจเริ่มต้นในอาหารที่เป็นตัวควบคุม] × 100% [22]

การศึกษาผลของ pH ต่อการอยู่รอดของเฟจ

นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 1×10^8 CFU/ml มาบ่มในอาหาร MRS broth ที่ pH ต่างๆ ตั้งแต่ 2.0-10.0 รวมทั้งนำมาทำการติดเชื้อด้วยเฟจในอาหาร MRS broth ที่ pH ตั้งแต่ 2.0-10.0 เช่นเดียวกัน [29] บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเก็บตัวอย่างของโฮสต์และเฟจมา 1 มิลลิลิตร นำไปหาปริมาณโฮสต์โดยนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นบนอาหาร MRS agar และนับจำนวนเฟจโดยใช้เทคนิคการทำอาหารวุ้นสองชั้น

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการอยู่รอดของเฟจ

นำเฟจมาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่น โดยให้มีปริมาณเฟจสุดท้ายเป็น 10^6 PFU/ml บ่มที่อุณหภูมิ 4, 30, 37, 45, 55, 63 และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเก็บตัวอย่างของเฟจที่อุณหภูมิต่างๆ นำไปหาปริมาณเฟจโดยใช้เทคนิคการทำอาหารวุ้นสองชั้น [22]

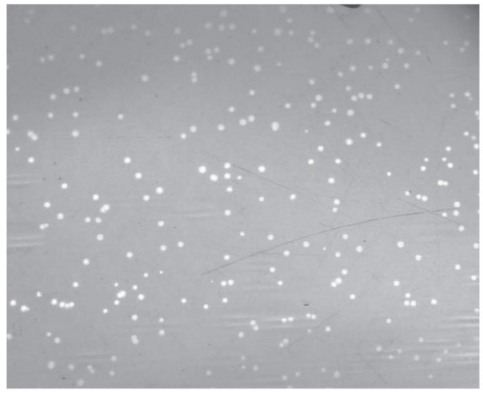
ผลการทดลอง

การคัดแยกเชื้อและการจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติก

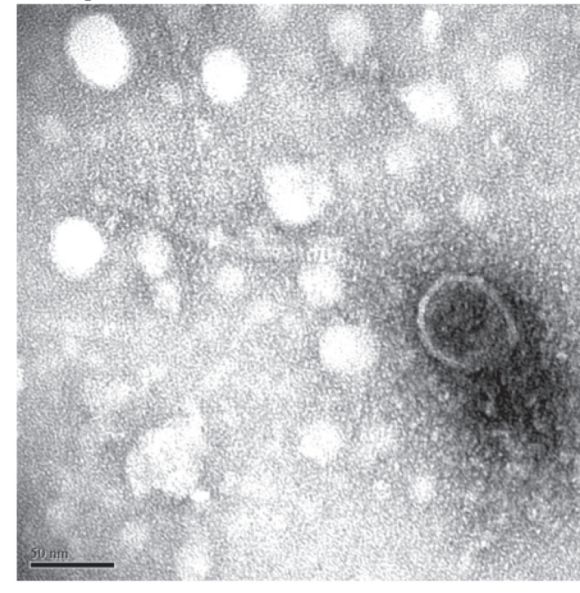
จากการคัดแยกเชื้อและจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้จากโรงงานผลิตนมเปรี้ยวพบว่าเป็นรูปร่างท่อน ติดสีแกรมบวก และเมื่อจัดจำแนกโดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยใช้ชุด API 50 CHL และการหาลำดับเบสในส่วน 16S rDNA พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Lactobacillus plantarum* 100%

การศึกษารูปร่างของเฟจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

จากการแยกเฟจโดยใช้หัวเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้เป็นโฮสต์พบว่า สามารถแยกเฟจได้โดยมีขนาดของพลาคประมาณ 2 มิลลิเมตร และให้ชื่อว่า เฟจ T 25 (รูปที่ 1ก) เมื่อทำพลาคให้บริสุทธิ์และนำเฟจมาส่องดูรูปร่าง โดยย้อมด้วย uranyl acetate 1 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านพบว่าขนาดของเฟจ T 25 มีขนาดส่วนหัว 60 นาโนเมตร ขนาดส่วนหางมีความยาว 225 นาโนเมตร (รูปที่ 1ข) จากลักษณะดังกล่าวสามารถจัดจำแนกเฟจนี้อยู่ในแฟมิลี Siphoviridae



ก.



ข.

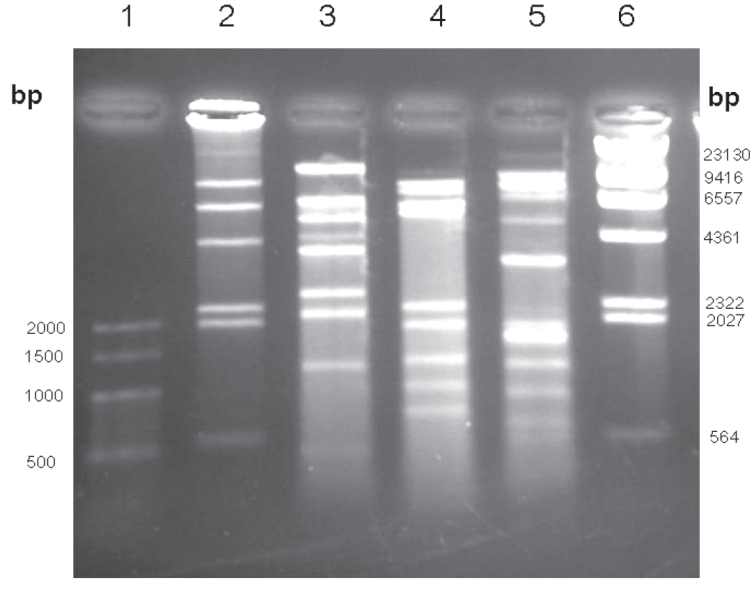
รูปที่ 1 รูปร่างของพลาคและเฟจ T 25
ก. รูปร่างพลาคของเฟจ T 25
ข. รูปร่างของเฟจ T 25 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องผ่าน

การศึกษาสมบัติของเฟจในการติดเชื้อกับแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์และจีนัสอื่น

การศึกษาสมบัติของเฟจ T25 ในการติดเชื้อกับแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์และจีนัสอื่น ได้แก่ *W. cibaria* N22, *Lb. plantarum* ATCC 8014, *Lb. sakei* JCM 1157, *Lc. lactis* JCM 7638, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* TUA 1344L, *Leu. mesenteroides* JCM 6124, *P. pentosaceus* JCM 5885, *P. pentosaceus* JCM 5890, *Streptococcus salivarius* JCM 57007 พบว่าเฟจ T 25 ไม่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อกับแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์และจีนัสอื่นที่นำมาทดสอบได้

การตัดดีเอ็นเอของเฟจด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

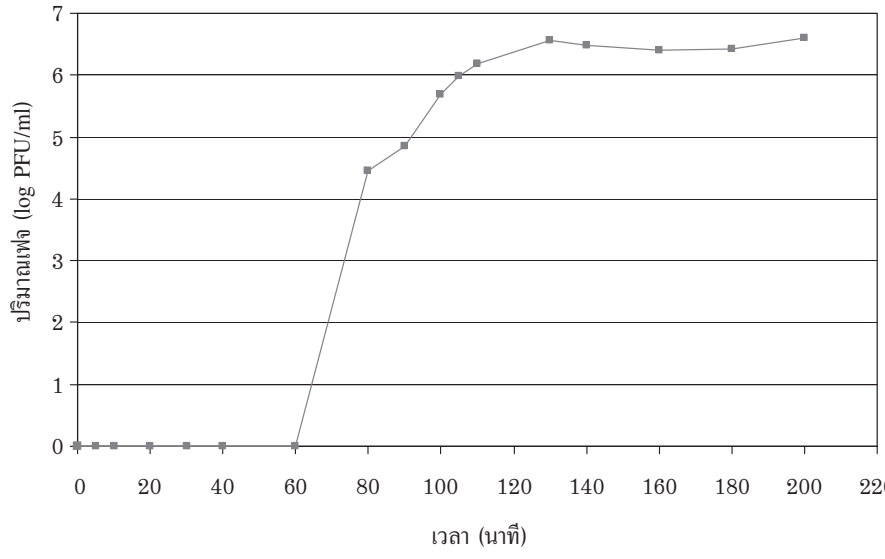
เมื่อนำเฟจ T 25 มาทำการสกัดดีเอ็นเอแล้วนำดีเอ็นเอที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 6 ชนิด คือ *Eco*RI, *Hind*III, *Pvu*I, *Sal*I, *Sac*I และ *Bam*HI พบว่าดีเอ็นเอของเฟจ T 25 ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI, *Hind*III และ *Pvu*I แต่ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Sal*I, *Sac*I และ *Bam*HI (ตัวอย่างการตัดแสดงดังรูปที่ 2) ซึ่งจากการตัดดังกล่าวสามารถประมาณขนาดของดีเอ็นเอของเฟจ T 25 ได้ประมาณ 44 kb



รูปที่ 2 ดีเอ็นเอของเฟจ T 25 หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ, DNA ladder (แถว 1); lambda DNA/*Hind*III marker (แถว 2); *Eco*RI (แถว 3); *Hind*III (แถว 4); *Pvu*I (แถว 5); *Sac*I (แถว 5); lambda DNA/*Hind*III marker (แถว 6)

การศึกษากราฟการเจริญของเฟจ (One-step growth experiment)

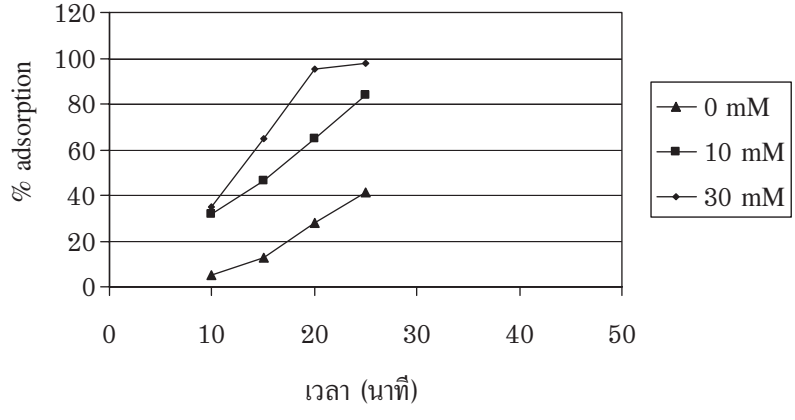
จากการศึกษากราฟการเจริญของเฟจ (รูปที่ 3) พบว่าเฟจ T 25 มีระยะ latent period 60 นาที และ rise period เท่ากับ 130 นาที และ burst size เท่ากับ 80 phages per cell



รูปที่ 3 กราฟการเจริญของเฟจ T 25

การศึกษาผลของไดวาเลนท์แคทไอออนที่มีผลต่อการเข้าเกาะติดโฮสต์ของเฟจ

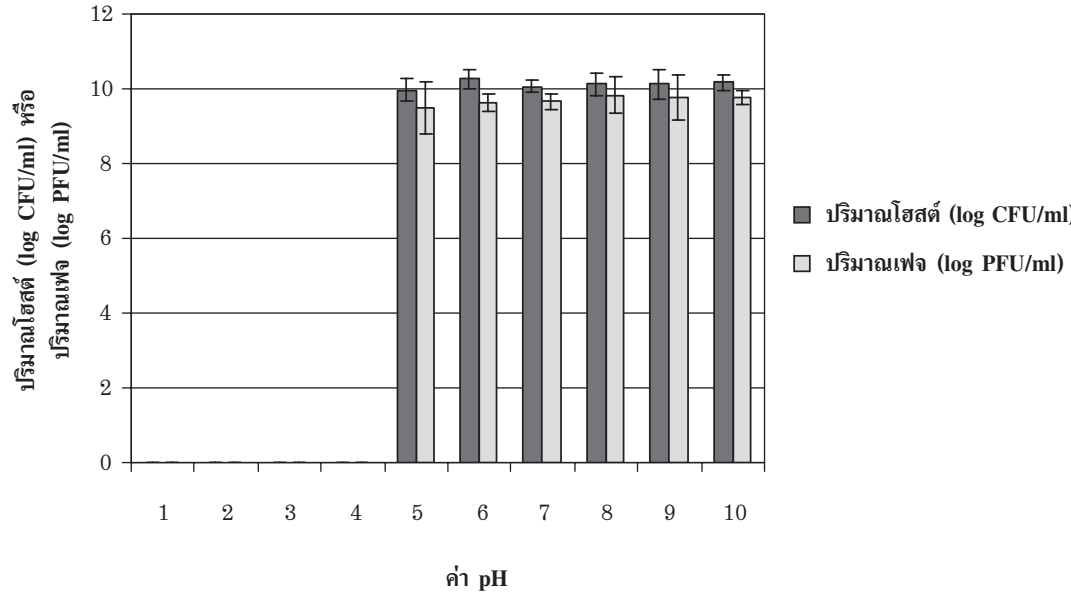
เมื่อแปรผันปริมาณของแคลเซียมไอออน ($CaCl_2$ 0, 10 และ 30 มิลลิโมลาร์) ที่มีผลต่อการเข้าเกาะติดโฮสต์ของเฟจเป็นเวลา 10, 15, 20 และ 25 นาที พบว่า ที่ความเข้มข้นของแคลเซียมไอออน 30 มิลลิโมลาร์ จะมีผลต่อการเข้าเกาะติดโฮสต์ของเฟจมากที่สุด โดยเฟจ T 25 จะมีการเกาะติดเกือบ 100% ที่เวลา 25 นาที และที่ความเข้มข้นของแคลเซียมไอออน 0 มิลลิโมลาร์ จะทำให้เกิดการเกาะติดของเฟจน้อยที่สุด (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 ผลของปริมาณแคลเซียมไอออนต่อการเข้าเกาะติดโฮสต์ของเฟจ (▲ $CaCl_2$ 0 มิลลิโมลาร์; ■ $CaCl_2$ 10 มิลลิโมลาร์; ♦ $CaCl_2$ 30 มิลลิโมลาร์)

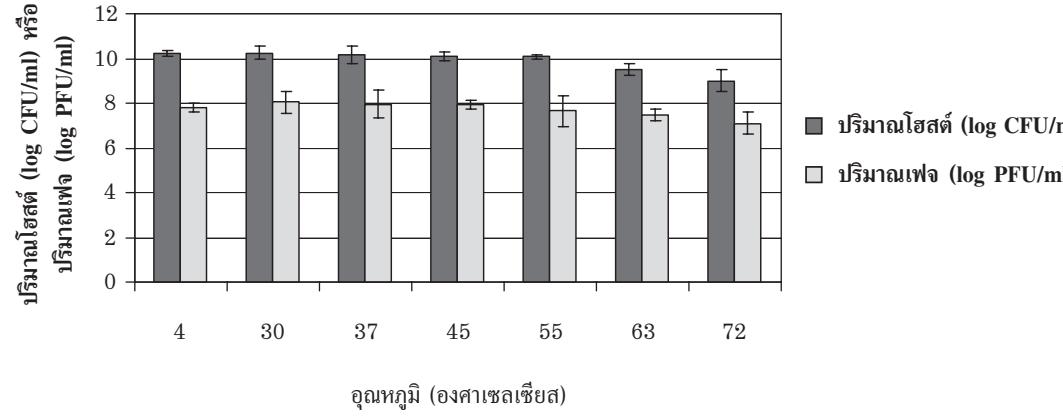
การศึกษาผลของ pH ต่อการอยู่รอดของเฟจ

เมื่อนับปริมาณของโฮสต์และเฟจที่รอดชีวิตหลังจากบ่มที่ pH ต่างๆ ตั้งแต่ 2.0-10.0 พบว่าทั้งโฮสต์และเฟจจะไม่สามารถอยู่รอดได้ที่ pH 2.0-4.0 ในขณะเดียวกันทั้งโฮสต์และเฟจสามารถอยู่รอดได้ที่ pH ในช่วง 5.0-11.0



การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการอยู่รอดของเฟจ

เมื่อนำโฮสต์และเฟจมาศึกษาการรอดชีวิตที่อุณหภูมิต่างๆ (4, 30, 37, 45, 55, 63 และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่าทั้งเฟจและโฮสต์สามารถรอดชีวิตได้ทุกอุณหภูมิที่ทำการศึกษา แม้กระทั่งอุณหภูมิที่ใช้ในการพาสเจอร์ไรซ์ (63 และ 72 องศาเซลเซียส) ดังนั้นจึงไม่สามารถทำลายเฟจในนมด้วยวิธีการพาสเจอร์ไรซ์ได้



สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในการผลิตผลิตภัณฑ์นมหมักในระดับอุตสาหกรรมมักใช้ถังหมักขนาดใหญ่และใช้แบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกในการหมัก ปัญหาที่มักพบ คือ การปนเปื้อนจากเฟจ ซึ่งจะส่งผลให้การหมักล้มเหลวหรือเกิดได้ช้า [9, 10, 30] โดยเฟจประเภท virulent ถือว่าเป็นตัวการหลักถึงร้อยละ 10 ที่ทำให้เกิดการสูญเสียมูลค่าทางเศรษฐกิจในอุตสาหกรรมนม [31] การใช้หัวเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในการเติมลงในนมจะส่งผลให้เกิดรสชาติและกลิ่นเฉพาะตัวในการผลิตผลิตภัณฑ์นม ซึ่งหัวเชื้อเหล่านี้จะเจริญและเพิ่มจำนวนในระหว่างกระบวนการหมัก ซึ่งสภาวะดังกล่าวนี่เองจะเป็นแหล่งที่ทำให้เฟจเกิดการติดเชื้อในแบคทีเรียที่ไวต่อเฟจชนิดนั้นๆ การแตกของเซลล์แบคทีเรียโดยเฟจจะทำให้ลดจำนวนหัวเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกลง ส่งผลให้การหมักเกิดช้าและมีผลต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์สุดท้าย หรืออาจทำให้การหมักล้มเหลวอย่างสิ้นเชิง [15, 16]

จากการแยกโฮสต์และเฟจจากผลิตภัณฑ์นมหมักตัวอย่างที่พบลักษณะผิดปกติเมื่อนำมาจัดจำแนกโฮสต์แล้วพบว่าเป็น *Lactobacillus plantarum* และเมื่อแยกเฟจจากเทคนิคการทำอาหารวุ้น 2 ชั้น พบลักษณะของพลาคขนาดเล็กและมีลักษณะใส ซึ่งแสดงว่าเฟจที่ได้เป็น lytic หรือ virulent phage โดยเมื่อแบคทีเรียเกิดการติดเชื้อแล้วจะเกิดการแตกสลาย ทำให้ส่งผลต่อการหมักนม โดยพบว่าค่า pH ของนมที่แยกเฟจได้มีค่าเท่ากับ 6.0 (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ซึ่งแสดงถึงการหมักที่ล้มเหลว เพราะนมเปรี้ยวโดยทั่วไปจะมีค่า pH อยู่ในช่วง 5.0 หรือต่ำกว่า เฟจ T 25 มี latent period เท่ากับ 20 นาที ซึ่งสั้นกว่าเฟจ B2 ซึ่งมีระยะ latent period เท่ากับ 75 นาที และสั้นกว่าเฟจ ΦJL-1 ซึ่งมีระยะ latent period เท่ากับ 35 นาที นอกจากนี้เฟจ T 25 จะไม่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อในแบคทีเรียในจีนัสอื่น ซึ่งคล้ายคลึงกับผลการวิจัยของ Lu และคณะ (2003) ซึ่งพบว่าเฟจ ΦJL-1 จะทำให้เกิดการแตกเฉพาะใน *Lb. plantarum* BI7 และสายพันธุ์กลาย MU45 ของเชื้อเท่านั้น [22] ซึ่งความจำเพาะในการติดเชื้อนี้พบได้ทั่วไปในเฟจของ *Lb. plantarum* เช่น ในเฟจ B2 และ fri [33, 34]

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเฟจ T 25 พบว่าขนาดของเฟจ T 25 มีขนาดส่วนหัว 60 นาโนเมตร ขนาดส่วนหางมีความยาว 225 นาโนเมตร ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่ากับเฟจส่วนใหญ่ของ *Lactobacillus* (เส้นผ่านศูนย์กลางของส่วนหัวประมาณ 50 นาโนเมตร และส่วนหางยาวประมาณ 170-180 นาโนเมตร) [35]

ในกระบวนการเข้าเกาะติดของเฟจ (adsorption) นอกจากจะต้องอาศัยความจำเพาะของรีเซพเตอร์ที่ผิวเซลล์แบคทีเรียแล้วยังขึ้นกับแคทไอออนที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย โดยทั่วไปเฟจจะต้องการไดวาเลนท์แคทไอออน เช่น แคลเซียมไอออน หรือแมกนีเซียมไอออน ที่ความเข้มข้นสูงกว่าที่เซลล์โฮสต์ต้องการในบางระยะของการติดเชื้อ ซึ่งความเข้มข้นที่โฮสต์ต้องการจะมีอยู่แล้วในอาหารเลี้ยงเชื้อ [36] จากการศึกษาผลของไดวาเลนท์แคทไอออนที่มีผลต่อการเข้าเกาะติดโฮสต์ของเฟจพบว่า ปริมาณของแคลเซียมไอออนในอาหาร MRS ที่ 30 มิลลิโมลาร์ ทำให้การเข้าเกาะติดของเฟจมากกว่าที่ 0 และที่ 10 มิลลิโมลาร์ ซึ่งผลดังกล่าวจะแตกต่างจากงานวิจัยของ Lu และคณะ (2003) [22] และ Jantang และคณะ [37] ซึ่งพบว่า แคลเซียมไอออนไม่มีผลต่อการเข้าเกาะติดของเฟจ

เฟจ T 25 มีจีโนมเป็นดีเอ็นเอสายคู่เช่นเดียวกับเฟจที่มีหาง (tailed phage) ตัวอื่น มีขนาดดีเอ็นเอโดยประมาณเท่ากับ 44 kb ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับเฟจ *Lb. plantarum* คือ ΦLP2 (47 kb) [39]

แต่มากกว่าเฟจ ΦJL-1 (36.7 kb) [22] และเล็กกว่าจีโนมของเฟจ SC921 (66.5 kb) [40], B2 (73 kb) [32], ΦLP1 (80 kbp) และ fri (133 kbp) [39] และเมื่อเทียบกับเฟจของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์อื่นพบว่าเฟจ T 25 มีขนาดดีเอ็นเอที่มากกว่าเฟจ PWH2 ของ *Lb. bulgaricus* (35 kb) [41] เฟจ ch2 (35 kb) [42] และเฟจ J-1 ของ *Lb. casei* (37 kb) [43] ซึ่งเมื่อดูจากรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะพบว่า ไม่เหมือนกับเฟจชนิดอื่นที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้

เฟจ T 25 สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงถึง 72 องศาเซลเซียสได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเฟจสามารถทนต่ออุณหภูมิที่ใช้ในการพาสเจอร์ไรซ์ ดังนั้นการควบคุมเฟจชนิดนี้โดยกระบวนการดังกล่าวจึงไม่สามารถทำได้ รวมทั้งเฟจสามารถทนต่อ pH ได้ใกล้เคียงกับโฮสต์ ดังนั้น การสร้างกรดแลคติกจากแบคทีเรียชนิดนี้จึงไม่ส่งผลในการลดจำนวนของเฟจในผลิตภัณฑ์ ซึ่งจากข้อมูลดังกล่าวผู้วิจัยจึงจะทำการศึกษาต่อถึงการควบคุมเฟจด้วยวิธีอื่น หรือการคัดเลือกสายพันธุ์กลายของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ทนต่อเฟจ (phage resistant mutant) ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปี 2556 ผู้วิจัยขอขอบพระคุณอย่างสูงมา ณ ที่นี้ และคณะผู้วิจัยขอขอบคุณ อาจารย์ ดร.ปวีณา รัตนเสนา ที่ช่วยตรวจทานงานวิจัยนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. Axelsson, L. 2004. Lactic Acid Bacteria: Classification, and Physiology. In: Lactic Acid Bacteria: Microbiology, and Functional Aspects. Salminen, S., Wright, A, and Ouwehand, A., Editors. New York. Marcel Dekker. p. 1-66.
2. Marrug, J. D. 1991. Bacteriocins, Their Role in Developing Natural Products. *Food Biotechnology* 5: 305-312.
3. de Roissart, H., and Luquet, F. M., Editors. 1994. Bacteéries Lactiques. France. Lorica, Uriage.
4. Salminen, S., and von Wright, S. A., Editors. 1998. Lactic Acid Bacteria. Microbiology and Functional Aspects. New York. Marcel Dekker.
5. Nes, I. F., Diep, D. B., Havarstein, L. S., and Brurberg, M. B. 1996. Biosynthesis of Bacteriocins in Lactic Acid Bacteria. *Antonie van Leeuwenhoe*k 70: 113-128.
6. Moll, G. N., Konings, W. N., and Driessen, A. J. M., 1999. Bacteriocins: Mechanism of Membrane Insertion, and Pore Formation. *Antonie van Leeuwenhoek* 76: 185-198.
7. Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., and Chikindas, M. L. 2001. Bacteriocins: Safe, Natural Antimicrobials for Food Preservation. *International Journal of Food Microbiology* 71: 1-20.

8. Desmazeaud, M. J. 1994. Le lait milieu de culture. In: de Roissart, H., and Luquet, F.M., Editors. Bacteries Lactiques. France. Lorica. p. 25-36.
9. Josephsen, J., and Neve, H. 1998. Bacteriophages, and Lactic Acid Bacteria. In: Lactic Acid Bacteria. Microbiology and Functional Aspects. Salminen, S., and von Wright, S. A., Editors. New York. Marcel Dekker. p. 385- 436.
10. Brüssow, H. 2001. Phages of Dairy Bacteria. *Annual Review of Microbiology* 55: 283-303.
11. Guttman, B., Raya , R., and Kutter, E. 2005. Basic Phage Biology. In: Bacteriophages. Biology, and Applications. Kutter E., and Sulakvelidze, A., Editors. Boca Raton, FL. CRC Press. p. 29-66
12. Whitehead, U. R., and Cox, G. A. 1935. Observations on Some Factors in the Milk of Individual Cows which Modify the Growth of Lactic Streptococci. *Biochemical Journal* 27: 951-959.
13. Coveney, H. M., Fitzgerald, G. F., and Daly, C., 1994. A Study of the Microbiological Status of Irish Farmhouse Cheeses with Emphasis on Selected Pathogenic, and Spoilage Microorganisms. Journal of Applied Bacteriology 77: 621-630.
14. Neve, H., Berger, A., and Heller, K. J. 1995. A Method for Detecting and Enumerating Airborne Virulent Bacteriophage of Dairy Starter Cultures. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* 47: 193-207.
15. Lawrence, R. C. 1978. Action of Bacteriophage on Lactic Acid Bacteria: Consequences, and Protection. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* 13: 129-136.
16. Coffey, A., and Ross, R. P. 2002. Bacteriophage-Resistance Systems in Dairy Starter Strains: Molecular Analysis to Application. *Antonie van Leeuwenhoek* 82: 303-321.
17. Heap, H. A., Limsowtin, G. K. Y., and Lawrence, R. C. 1978. Contribution of *Streptococcus* lactis Strains in Raw Milk to Phage Infection in Commercial Cheese Factories. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* 13(1): 16-22.
18. McIntyre, K., Heap, H. A., Davey, G. P., and Limsowtin, G. K. Y. 1991. The Distribution of *Lactococcal Bacteriophage* in the Environment of Cheese Manufacturing Plant. *International Dairy Journal* 1: 183-197.
19. Klaenhammer, T. R. 1984. Interactions of Bacteriophages with Lactic Streptococci. *Advances in Applied Microbiology* 30: 1-29.
20. Daly, C., Fitzgerald, G. F., and Davis, R. 1996. Biotechnology of Lactic Acid Bacteria with Special Reference to Bacteriophage Resistance. *Antonie van Leeuwenhoek* 70: 99-110
21. Madera, C., Monjardin, C., and Suarez, J. E. 2004. Milk Contamination, and Resistance to Processing Conditions Determined the Fate of *Lactococcus lactis* Bacteriophages in Dairies. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 7365-7371.

22. Lu, Z., Breidt, Jr. F., Fleming, H. P., Altermann, E., and Klaenhammer, T. R. 2003. Isolation, and Characterization of a *Lactobacillus plantarum* Bacteriophage, ∅JL-1, from a Cucumber Fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 84(2): 225-235.
23. Reiter, B., and Kirikova, M. 1976. The Isolation of Lysogenic Strains from a Multiple Strains Starter Culture. *Journal of the Society of Dairy Technology* 29: 221-225.
24. Baross, J. A., Liston, J., and Morita, R. Y. 1978. Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* Bacteriophages and Other *Vibrio* Bacteriophages in Marine Samples. *Applied and Environmental Microbiology* 36: 492-499.
25. Koga, T., Toyoshima, S., and Kawata, T. 1982. Morphological Varieties, and Host-Ranges of *Vibrio parahaemolyticus* Bacteriophages Isolated from Seawater. *Applied and Environmental Microbiology* 44: 466-470.
26. Depaola, A., Motes, M. L., Chan, A. M., and Suttle, C. A. 1998. Phage Infecting *Vibrio vulnificus* Are Abundant, and Diverse in Oysters Collected from the Gulf of Mexico. *Applied and Environmental Microbiology* 84: 346-351.
27. Ghosh, A. M., Ansari, M. Q., and Datta, G. C. 1989. Isolation and Morphological Characterization of El Tor Cholera Phages. *Journal of General Virology* 70: 2241-2243.
28. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning. 2nd Edition. USA. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
29. Capra, M. L., Quiberoni, A., and Reinheimer, J. A. 2004. Thermal and Chemical Resistance of *Lactobacillus casei,* and *Lactobacillus paracasei* Bacteriophages. *Letters in Applied Microbiology* 38(6): 499-504.
30. Garneau, J., and Moineau, S. 2011. Bacteriophages of Lactic Acid Bacteria, and their Impact on Milk Fermentations. Microbial Cell Factories. 10(Suppl. 1): S20.
31. Moineau, S., and Lévesque, C. 2005. In: Bacteriophages Biology, and Applications. Kutter, E., and Sulakvelidze, A., Editors. Florida. CRC Press, Boca Raton. p. 285-296.
32. Nes, I. F., Brendehaug, J., and von Husby, K. O. 1988. Characterization of the Bacteriophage B2 of *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. *Biochimie* 70: 423-427.
33. Trevors, K. E., Holley, R. A., and Kempton, A. G. 1983. Isolation and Characterization of a *Lactobacillus plantarum* Bacteriophage isolated from a Meat Starter Culture. *Journal of Applied Bacteriology* 54: 281-288.
34. Douglas, L. J., and Wolin, M. J. 1971. Cell wall Polymers and Phage Lysis of *Lactobacillus plantarum. Biochemistry* 10: 1551-1555.
35. Jarvis, A. W. 1989. Bacteriophage of Lactic Acid Bacteria. *Journal of Dairy Science* 72: 3406- 3428.

36. Watanabe, K., Takesue, S. 1972. The Requirement for Calcium in Infection with *Lactobacillus phage. Journal of General Virology* 17: 19-30.
37. Jantang, P., Pringsulaka, O., Suwannasai, N., Suksawat, P., and Rangsiruji, A. 2011. Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria Phages from Fermented Fish Products in Thailand. *Srinakharinwirot Science Journal* 27(1): 87-105. (in Thai)
38. Luria, S. E., Darnell, Jr., J. E., Baltimore, D., and Campbell, A. 1978. Phage-Bacterium Interaction: General Features. General Virology. 3rd Edition. New York. Wiley. p. 135-156.
39. Caso, J. L., de los Reyes-Gavilaán, C. G., Herrero, M., Montilla, A., Rodriguez, A., and Suarez, J. E. 1995. Isolation and Characterization of Temperate, and Virulent Bacteriophage of *Lactobacillus plantarum. Journal of Dairy Science* 78: 741-750.
40. Yoon, S.-S., Kim, J. W., Breidt, F., and Fleming, H. P. 2001. Characterization of a Lytic *Lactobacillus plantarum* Bacteriophage and Molecular Cloning of a Lysin Gene in *Escherichia coli. International Journal of Food Microbiology* 65: 63-74.
41. Leuschner, R. G. K., Arendt, E. K., and Hammes, W. P. 1993. Characterization of Virulent *Lactobacillus sake* Phage PWH2. *Applied Microbiology and Biotechnology* 39: 617- 621.
42. Chow, J. J., Batt, C A., and Sinskey, A. J. 1988. Characterization of *Lactobacillus bulgaricus* Bacteriophage ch2. *Applied and Environmental Microbiology* 54: 1138-1142.
43. Khosaka, T. 1977. Physicochemical Properties of Virulent *Lactobacillus* Phage Containing DNA with Cohesive Ends. *Journal of General Virology* 37: 209-214.

ได้รับบทความวันที่ 9 สิงหาคม 2556
ยอมรับตีพิมพ์วันที่ 25 กันยายน 2556