การแยกและการศึกษาลักษณะของเฟจของแบคทีเรียกรดแลคติค ที่ได้จากแหนมในประเทศไทย

ปริญญานิพนธ์

ของ

ณัฐพร ภัทรสินไพบูลย์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

พฤษภาคม 2552

การแยกและการศึกษาลักษณะของเฟจของแบคทีเรียกรดแลคติค ที่ได้จากแหนมในประเทศไทย

ปริญญานิพนธ์

ของ

ณัฐพร ภัทรสินไพบูลย์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
พฤษภาคม 2552

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การแยกและการศึกษาลักษณะของเฟจของแบคทีเรียกรดแลคติค ที่ได้จากแหนมในประเทศไทย

บทคัดย่อ

ของ

ณัฐพร ภัทรสินไพบูลย์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
พฤษภาคม 2552

ณัฐพร ภัทรสินไพบูลย์. (2552). *การแยกและการศึกษาลักษณะของเฟจของแบคทีเรียกรดแลคติคที่ได้จากแหนมในประเทศไทย*. ปริญญานิพนธ์ วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: อาจารย์ ดร.อรอนงค์ พริ้งศุลกะ, อาจารย์ ดร.ณัฏฐิกา สุวรรณาศรัย

จากการแยกแบคทีเรียกรดแลคติคและแลบเฟจจากตัวอย่างแหนมในประเทศไทยทั้งหมด 36 ตัวอย่าง สามารถแยกแบคทีเรียกรดแลคติคได้ทั้งหมด 41 ไอโซเลท เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติคทั้งหมดมาแยกแลบเฟจพบว่าสามารถแยกแลบเฟจได้ 2 ตัว คือ **Φ**22b และ **Φ**22s เมื่อทำการจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติค N22 ที่ใช้เป็นโฮสท์ในการแยกเฟจดังกล่าว โดยการเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของโฮสท์ N22 กับฐานข้อมูล GenBank พบว่าโฮสท์ N22 มีความคล้ายคลึงกับ *Weissella cibaria* ร้อยละ 99 สำหรับลักษณะทั่วไปของเฟจทั้งสองตัว พบว่าให้พลาคใสจึงจัดเป็นไลติคเฟจ และเมื่อศึกษารูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าจัดอยู่ใน Family Podoviridae โดย เฟจ **Φ**22b และ **Φ**22s มีหัวหกเหลี่ยมขนาด 92 x 50 นาโนเมตร และ 91 x 36 นาโนเมตร ตามลำดับ ส่วนหางยาว 25 และ 27 นาโนเมตร ตามลำดับ เมื่อนำมาศึกษาโฮสท์-เรนจ์ พบว่าเฟจทั้งสองตัวไม่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อ *Weissella* สปีชีส์อื่นหรือแบคทีเรียกรดแลคติคจีนัสอื่นได้ และจากการศึกษากราฟการเจริญของเฟจ พบว่าเฟจ **Φ**22b และ **Φ**22s มี latent period เท่ากับ 52 และ 110 นาที ตามลำดับ มี burst size เท่ากับ 152 และ 55 phage particles/infected cell ตามลำดับ เฟจทั้งสองตัวสามารถเข้าเกาะติดที่เซลล์ของโฮสท์ได้ร้อยละ 99 ในเวลา 10 นาที หลังจากทำให้เกิดการติดเชื้อ และพบว่าการเติมแคลเซียมไอออน (10-30 มิลลิโมลาร์) ลงในอาหารเหลว MRS ไม่ช่วยส่งเสริมการเข้าเกาะติดเซลล์โฮสท์ในวงชีวิตแรก นอกจากนี้เฟจทั้งสองตัวสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อกับโฮสท์ในช่วงค่าความเป็นกรดด่าง 5-8 และค่า *D* values ของเฟจทั้งสองตัว สามารถคำนวณได้เท่ากับ 60 วินาที ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และเมื่อสกัดดีเอ็นเอของเฟจทั้งสองตัวแล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ พบว่าเฟจทั้งสองตัวมีรูปแบบของดีเอ็นเอหลังจากตัดด้วยเอนไซม์ต่างกัน จึงยืนยันได้ว่าเป็นแลบเฟจต่างชนิดกัน นอกจากนี้เฟจยังส่งผลทำให้การหมักแหนม ช้าลง ซึ่งจากการศึกษาทั้งหมดพบว่าเป็นรายงานครั้งแรกที่ค้นพบแลบเฟจของ *Weissella cibaria* นอกจากนี้การค้นพบเฟจดังกล่าวยังเป็นข้อมูลสำคัญในการพัฒนากระบวนการควบคุมการหมักแหนมต่อไป

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF LACTIC ACID BACTERIOPHAGES ISOLATED FROM NHAM (THAI FERMENTED PORK) IN THAILAND

AN ABSTRACT

BY

NATTAPORN PATTARASINPAIBOON

Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the

Master of Science Degree in Biotechnology

at Srinakharinwirot University

May 2009

Nattaporn Pattarasinpaiboon. (2009). *Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteriophages Isolated from Nham (Thai Fermented Pork) in Thailand*. Master Thesis. M.S. (Biotechnology). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Dr. Onanong Pringsulaka, Dr. Nuttika Suwannasai

Lactic acid bacteria and LAB phages from Nham (Thai Fermented Pork) in Thailand were isolated. From a total of 36 samples, 41 isolates of lactic acid bacteria were obtained and employed as hosts for isolation of phages. It was found that two phages designated Φ22b and Φ22s were isolated. The lactic acid bacterial isolate named N22 that was sensitive to phage infection was identified by 16S rDNA sequence analysis. The result from the analysis revealed that this isolate possessed 99% similarity to *Weissella cibaria* in the GenBank database. Both Φ22b and Φ22s produce clear plaques indicating that they were virulent phages. Electron micrographs demonstrated that the heads of Φ22b and Φ22s phages were hexagonal (92 x 50 nm and 91 x 36 nm, respectively) and these phages had short tail (25 nm and 27 nm, respectively). On the basis of the morphology, the phages belong to the family Podoviridae. Host-range determination revealed that these phages were not capable of infecting all of the isolates of lactic acid bacteria and reference *Weissella* strains used. One-step growth experiment showed that the latent periods were estimated at 55 and 110 min and burst sizes were estimated at 152 and 55 phage particles/infected cell for Φ22b and Φ22s phages, respectively. Ninety-nine percent of phage particles adsorbed to the host cells 10 min after infection. Supplementation of calcium ion (10-30 mM $CaCl_2$) in MRS medium did not affect the first cycle of phage adsorption. Furthermore, the phages were infective over a wide range of pH (pH 5-8) and the *D* values of phages were calculated as 60 s at 70 °C. In addition, DNAs isolated from the two phages were characterized by restriction analyses. Results showed that the restriction fragment patterns generated from the Φ22b and Φ22s phages were different. Phage infection of LAB has caused a delay in fermentation of Nham. This is the first report on the isolation of *Weissella cibaria* phages. The discovery of these phages provides valuable information that must be considered for the improvement of procedures in assurance for Nham fermentation.

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การแยกและการศึกษาลักษณะของเฟจของแบคทีเรียกรดแลคติคที่ได้จากแหนมในประเทศไทย

ของ

ณัฐพร ภัทรสินไพบูลย์

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.สมชาย สันติวัฒนกุล)

วันที่ ..... เดือน ..... พ.ศ. 2552

คณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์

.....ประธาน

(อาจารย์ ดร.อรอนงค์ พริ้งศุลกะ)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร.ณัฏฐิกา สุวรรณาศรัย)

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

.....ประธาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัจฉริยา รังษิรุจิ)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร.อรอนงค์ พริ้งศุลกะ)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร.ณัฏฐิกา สุวรรณาศรัย)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร.ศิรพรรณ สุคนธสิงห์)

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุน
จาก
เงินรายได้มหาวิทยาลัยประจำปี พ.ศ. 2551

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์นี้สำเร็จได้ด้วยดีเป็นเพราะผู้วิจัยได้รับความกรุณาอย่างยิ่งจากอาจารย์ ดร. อรอนงค์ พริ้งศุลกะ ประธานกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ และอาจารย์ ดร.ณัฏฐิกา สุวรรณาศรัย คณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ ผู้ซึ่งเสียสละเวลาอันมีค่าเพื่อให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการจัดทำงานวิจัย ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี รวมทั้งผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัจฉริยา รังษิรุจิ อาจารย์ ดร.ศิรพรรณ สุคนธสิงห์ ที่ร่วมเป็นกรรมการในการสอบ และรองศาสตราจารย์ ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อที่ใช้ในการทดสอบ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ผู้วิจัยขอกราบขอบคุณอาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้แก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา และขอขอบคุณ คุณสุธีวรรณ บินชัย และคุณสิทธิพร ปานเม่น ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยครั้งนี้

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้มหาวิทยาลัยประจำปี พ.ศ. 2551 ผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ ที่นี้ ท้ายที่สุดขอน้อมรำลึกถึงคุณบิดามารดาและขอบคุณพี่ๆ น้องๆ ที่ให้กำลังใจ ให้การสนับสนุนในด้านการศึกษาแก่ผู้วิจัยด้วยดีตลอดมา และขอขอบคุณผู้มีพระคุณท่านอื่นๆ ที่มิได้กล่าวนามในที่นี้ที่ให้ความช่วยเหลือในทุกๆ ด้าน จนปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จเรียบร้อยด้วยดี

ณัฐพร ภัทรสินไพบูลย์

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	**บทนำ**.....	1
	ภูมิหลัง.....	1
	ความมุ่งหมายของการศึกษาวิจัย.....	2
	ความสำคัญของการศึกษาวิจัย.....	2
	ขอบเขตของการศึกษาวิจัย.....	3
2	**เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**.....	4
	แหนม.....	4
	แบคทีเรียกรดแลคติค.....	6
	แบคเทอริโอเฟจ.....	12
	แลคติคแอซิดแบคเทอริโอเฟจ.....	27
3	**วิธีดำเนินการวิจัย**.....	29
	อุปกรณ์และสารเคมี.....	29
	วิธีดำเนินการทดลอง.....	31
	การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติค.....	31
	การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติค.....	31
	การแยกแลบเฟจโดยใช้แบคทีเรียกรดแลคติคที่แยกได้เป็นโฮสท์.....	35
	การตรวจสอบแลบเฟจโดยใช้เทคนิคการทำอาหารวุ้นสองชั้น.....	35
	การหาปริมาณแลบเฟจ.....	36
	การเพิ่มจำนวนแลบเฟจ.....	37
	การหาอัตราส่วนของแลบเฟจต่อโฮสต์ที่เหมาะสมต่อการติดเชื้อ.....	37
	การศึกษาสมบัติของแลบเฟจในการติดเชื้อกับแบคทีเรียกรดแลคติค สายพันธุ์อื่นและจีนัสอื่น.....	38
	การศึกษากราฟการเจริญของแลบเฟจ.....	38

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
3	(ต่อ)	
	การศึกษารูปร่างของแลบเฟจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน	39
	การศึกษาผลของไดวาเลนต์แคทไอออนที่มีผลต่อการเข้าเกาะติดโฮสต์ของแลบเฟจ	39
	การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการอยู่รอดของแลบเฟจ	40
	การศึกษาผลของความเป็นกรดด่างต่อความสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อของแลบเฟจ	40
	การศึกษาผลของแลบเฟจต่อการหมักแหนม	40
	การศึกษาดีเอ็นเอของแลบเฟจ	41
4	**ผลการศึกษา**	43
5	**สรุป อภิปรายผลการทดลองและข้อเสนอแนะ**	71
บรรณานุกรม		76
ภาคผนวก		86
ประวัติย่อผู้วิจัย		95

บัญชีตาราง

ตาราง		หน้า
1	การจัดอนุกรมวิธานของไวรัสโดยอาศัยสมบัติต่างๆ.....	15
2	Primers ที่ใช้ในการหาลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA.....	34
3	การคัดแยกแบคทีเรียที่ให้โคโลนีที่มีวงใสบนอาหารแข็ง MRS.....	45
4	ลักษณะของพลาคและจำนวนพลาคหลังจากทำการเพิ่มจำนวนแลบเฟจ.....	47
5	ลักษณะบางประการของแบคทีเรียกรดแลคติคไอโซเลท N22.....	48
6	การจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติคไอโซเลท N22 ด้วยชุดจำแนกแบคทีเรียชนิดสำเร็จรูป API 50 CHL.....	50
7	แสดงผลการทดลองอัตราส่วนของแลบเฟจต่อโฮสท์ที่เหมาะสมต่อการติดเชื้อ.....	57
8	สรุประยะการเจริญต่างๆ และ burst size ของเฟจ Φ22b และ Φ22s.....	57
9	ผลการศึกษารูปร่างของเฟจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องผ่าน.....	59
10	ความสามารถในการเกิดพลาคที่ความเป็นกรดด่างต่างๆ.....	63

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ **หน้า**

1 การผลิตกรดแลคติคโดย กระบวนการหมักแบบ Homofermentation และ Heterofermentation…… 7

2 การจัดจำแนกเฟจโดยอาศัยรูปร่างและชนิดของกรดนิวคลีอิก…… 14

3 การจัดจำแนก Family ของเฟจตามวิธีของคณะกรรมการสากลว่าด้วยการจัดอนุกรมวิธานของไวรัส…… 17

4 รูปร่างพื้นฐานของอนุภาคเฟจ..... 19

5 One step growth experiment..... 21

5 วงชีวิตแบบไลติคของเฟจ…… 22

7 วงชีวิตแบบไลโสเจนิคของเฟจ..... 23

8 ลักษณะของพลาคที่เจริญบนลอนของแบคทีเรีย…….. 24

9 ตำแหน่งการจับของ primers บริเวณ 16S rDNA…….. 34

10 การทำอาหารวุ้นสองชั้น..... 36

11 การเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติคไอโซเลท N22 บนอาหาร MRS ที่เติม $CaCO_3$ ร้อยละ 0.5..... 43

12 ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียกรดแลคติคที่แยกได้จากแหนม..... 44

13 ผลการจัดจำแนกเชื้อ N22 ด้วยชุดจำแนกแบคทีเรียชนิดสำเร็จรูป API 50 CHL… 49

14 ผลการจัดจำแนกเชื้อ N22 ด้วยชุดจำแนกแบคทีเรียชนิดสำเร็จรูป API 50 CHL ที่ผ่านการประมวลผลจากโปรแกรมแล้ว..... 52

15 ผลการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA จากดีเอ็นเอของแบคทีเรียกรดแลคติคไอโซเลท N22 โดยการทำ Polymerase Chain Reaction…..... 53

16 ลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ในแบคทีเรียกรดแลคติคไอโซเลท N22 และตำแหน่งการจับของ primers..... 54

17 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ในแบคทีเรียกรดแลคติคไอโซเลท N22 กับลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ในฐานข้อมูลของ GenBank 56

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ **หน้า**

18 กราฟการเจริญของเฟจ Φ22b..... 58

19 กราฟการเจริญของเฟจ Φ22s..... 58

20 การเข้าเกาะติดของเฟจ Φ22b ในอาหารที่มี $CaCl_2$..... 60

21 การเข้าเกาะติดของเฟจ Φ22s ในอาหารที่มี $CaCl_2$..... 60

22 ผลของอุณหภูมิต่อการอยู่รอดของเฟจของเฟจ Φ22b..... 61

23 ผลของอุณหภูมิต่อการอยู่รอดของเฟจของเฟจ..... 62

24 กราฟความเป็นกรดด่างของแหนมที่เปลี่ยนไปตลอดเวลาของการหมักแหนม..... 64

25 กราฟปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดตลอดระยะเวลาของการหมักแหนม..... 65

26 กราฟปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติคทั้งหมดตลอดระยะเวลาของการหมักแหนม..... 66

27 กราฟเฟจ Φ22b และ Φ22sตลอดระยะเวลาของการหมักแหนม..... 67

28 ดีเอ็นเอของเฟจ Φ22b และ Φ22s หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI..... 68

29 ดีเอ็นเอของเฟจ Φ22b และ Φ22s หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII และ *Apa*LI..... 69

30 ดีเอ็นเอของเฟจ Φ22b และ Φ22s หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*II, *Nde*I และ *Pst*I..... 70

บทที่ 1
บทนำ

ภูมิหลัง

แหนมเป็นอาหารหมักพื้นเมืองของประชาชนทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งมีการบริโภคอย่างแพร่หลายทั่วทุกภาค มีรสเปรี้ยว แหนมที่นิยมบริโภคกันส่วนใหญ่จะผลิตจากเนื้อหมู ซึ่งมีหลายประเภท เช่น แหนมหูหมู แหนมหมูผสมหนังหมู แหนมซี่โครงหมู เป็นต้น นำหมูมาผสมกับข้าวสุกบด กระเทียมบด และเครื่องปรุงต่างๆ จากนั้นบ่มไว้ประมาณ 3-4 วัน เพื่อให้เกิดการหมักอันเนื่องมาจากกิจกรรมของแบคทีเรียกรดแลคติค (Adam; & Moss. 1995: 232-248) จนผลิตภัณฑ์มีรสเปรี้ยว การผลิตแหนมในปัจจุบันมักผลิตในลักษณะอุตสาหกรรมในครัวเรือนทำให้มีปัญหาในการควบคุมคุณภาพ แหนมที่ผลิตได้มีอายุการเก็บรักษาสั้น มีการเน่าเสียสูง รวมทั้งมีการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโทษ ทั้งนี้สาเหตุหลักเกิดจากการผลิตที่ยังไม่มีการควบคุมสุขลักษณะ รวมทั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักแต่ละครั้งไม่คงที่ ผู้ผลิตมักอาศัยจุลินทรีย์ตามธรรมชาติในการหมัก แต่อย่างไรก็ตามยังมีรายงานการวิจัยไม่มากนักเกี่ยวกับสาเหตุอื่นๆ ที่ทำให้การหมักแหนมให้ผลที่ไม่ดี

แบคเทอริโอเฟจ (bacteriophage) หรือ เฟจ (phage) เป็น bacterial virus หมายถึงกลุ่มของไวรัสที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในแบคทีเรีย ค้นพบครั้งแรกโดย Twort ในปี ค.ศ. 1915 และ d' Herelle ในปี ค.ศ. 1917 โดย d' Herelle ได้ให้ความหมายของแบคเทอริโอเฟจว่า ตัวกินแบคทีเรีย (Adams. 1959: 450-456) เฟจจัดเป็นออบลิเกตพาราไซต์ (obligate parasite) ของแบคทีเรีย ทำให้การเพิ่มจำนวนของอนุภาคเฟจเกิดขึ้นเฉพาะเมื่ออยู่ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย โดยเฟจจะเข้าไปเกาะติดกับผนังเซลล์และปล่อยสารพันธุกรรมเข้าไปในเซลล์ของแบคทีเรีย หลังจากนั้นก็เข้าสู่วงชีวิตของเฟจ เพื่อเพิ่มจำนวนอนุภาคเฟจต่อไป (Mckane; & Kandel. 1996: 306)

แลคติคแอซิดแบคเทอริโอเฟจ หรือแลคติคเฟจ (lactic phage) หรือแลบเฟจ (LAB phage) คือเฟจที่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อกับแบคทีเรียกรดแลคติค (lactic acid bacteria) ซึ่งเป็นเชื้อที่มีความสำคัญอย่างมาก เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้จัดเป็นแบคทีเรียที่ได้รับการยอมรับว่าปลอดภัย (Generally Recognized As Safe: GRAS) และได้ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารหมักหลายประเภท เช่น ผลิตภัณฑ์นม ผักและผลไม้ ปลา และเนื้อสัตว์ (วิเชียร. 2539: 29-31; Geoffrey. 1987: 9-13) จากการทดลองพบว่า แบคทีเรียกรดแลคติคช่วยในการสร้างกรดของผลิตภัณฑ์ ทำให้ผลิตภัณฑ์มีรสเปรี้ยว ส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ และจุลินทรีย์ก่อโรค นอกจากนั้นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียกรดแลคติคยังมีคุณสมบัติเป็นสารกันบูดชีวภาพ (biopreservative) (Kelly; Asmunson; & Huang. 1996) ซึ่งในการผลิตอาหารหมักให้ได้ผลดี

นั้นขึ้นอยู่กับหลายๆ ปัจจัยทั้งทางด้านกายภาพ เคมี และชีวภาพ รวมถึงหัวเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ในการหมัก (starter) และแบคเทอริโอเฟจ โดยพบว่าถ้าหัวเชื้อเริ่มต้นมีการปนเปื้อนด้วยแลบเฟจจะทำให้เชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นมีจำนวนน้อยและไม่สามารถทำให้การหมักเกิดกรดได้ตามต้องการ ส่งผลเสียต่อผลิตภัณฑ์ เช่น ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักอาหารไม่ดี การหมักใช้เวลานาน (Lu; et al. 2003a: 225-235) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการแยกแบคทีเรียกรดแลคติค และแยกแลบเฟจซึ่งปนเปื้อนในแหนม จากนั้นทำการศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ของแลบเฟจ เพื่อสามารถนำไปใช้ในการพัฒนาการควบคุมการผลิตอาหารหมักให้ได้ผลดี และทราบแนวทางการป้องกันการปนเปื้อนจากแลบเฟจในเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ในการผลิตอาหารหมัก

ความมุ่งหมายของการศึกษาวิจัย

1. เพื่อแยกแบคทีเรียกรดแลคติค และแลบเฟจจากแหนมพื้นเมืองของประเทศไทย
2. เพื่อศึกษารูปร่างของแลบเฟจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน
3. เพื่อศึกษาลักษณะของแลบเฟจที่แยกได้ โดยดูจากคุณสมบัติต่างๆ ได้แก่ คุณสมบัติในการติดเชื้อกับแบคทีเรียกรดแลคติคสปีชีส์อื่น และจีนัสอื่น ความสามารถในการเข้าเกาะติดโฮสท์ของแลบเฟจ ผลของแคลเซียมต่อการเข้าเกาะติดโฮสท์ การศึกษากราฟการเจริญของแลบเฟจ ผลของอุณหภูมิต่อการอยู่รอดของแลบเฟจ ผลของความเป็นกรดด่างต่อความสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อของแลบเฟจ และรูปแบบของดีเอ็นเอของแลบเฟจ
4. เพื่อศึกษาผลของแลบเฟจต่อการหมักแหนม

ความสำคัญของการศึกษาวิจัย

การศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติต่างๆ ของแลบเฟจจะเป็นองค์ความรู้ที่สามารถนำไปใช้ในการพัฒนาการควบคุมการผลิตแหนมต่อไปในอนาคต รวมทั้งทราบแนวทางการป้องกันการปนเปื้อนจากแลบเฟจในเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ในการผลิตอาหารหมัก

ขอบเขตการศึกษาวิจัย

1. แยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคจากตัวอย่างแหนม
2. จัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติค
3. แยกแลบเฟจโดยใช้เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคที่แยกได้เป็นโฮสท์
4. ศึกษารูปร่างของแลบเฟจที่แยกได้โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน
5. ศึกษาคุณสมบัติในการติดเชื้อกับแบคทีเรียกรดแลคติคสปีชีส์อื่น และจีนัสอื่นของแลบเฟจ โดยทดสอบการติดเชื้อกับแบคทีเรียกรดแลคติคสายพันธุ์มาตรฐาน และสายพันธุ์ที่แยกได้
6. ศึกษาคุณสมบัติของแลบเฟจที่แยกมาได้ ได้แก่ ความสามารถในการเข้าเกาะติดโฮสท์ของแลบเฟจ ผลของแคลเซียมต่อการเข้าเกาะติดโฮสท์ การศึกษากราฟการเจริญของแลบเฟจ ผลของอุณหภูมิต่อการอยู่รอดของแลบเฟจ ผลของความเป็นกรดด่างต่อความสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อของแลบเฟจ และรูปแบบของดีเอ็นเอของแลบเฟจ
7. ศึกษาผลของแลบเฟจต่อการหมักแหนม

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. แหนม

แหนม (Nham) หรือ Thai fermented pork เป็นผลิตภัณฑ์เนื้อหมักพื้นบ้านของไทย มีรสเปรี้ยว จัดเป็นอาหารประเภท semi-dry sausage นอกจากนี้ยังถือว่าแหนมเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโปรตีนสูงและมีปริมาณไขมันต่ำ การผลิตแหนมสามารถทำได้โดยใช้วิธีการที่ไม่ซับซ้อนและไม่ต้องผ่านความร้อน โดยมีสัดส่วนและองค์ประกอบของวัตถุดิบที่แตกต่างกันไปตามแต่ละท้องถิ่น ซึ่งส่วนใหญ่ผลิตจากเนื้อหมูบดละเอียด หนังหมู ข้าวสุกบด กระเทียมบด และมรการเติมเครื่องปรุงต่างๆ ได้แก่ โซเดียมไนไตรท์ (sodium nitrite) น้ำตาล เกลือ พริกไทย หรือบางสูตรอาจมีการเติมสมุนไพรบางชนิด วิธีการหมักแหนมทำได้โดยนำส่วนผสมทั้งหมดมาคลุกเคล้าให้เข้ากัน และบรรจุลงในถุงพลาสติกหรือห่อด้วยใบตอง จากนั้นบ่มไว้ประมาณ 3-4 วัน เพื่อให้เกิดการหมักจนผลิตภัณฑ์มีรสเปรี้ยว ซึ่งเกิดจากกิจกรรมของแบคทีเรียกรดแลคติค (Adam; & Moss. 1995: 232-248) โดยแหนมที่ทำเสร็จใหม่ๆ จะมีความเป็นกรดอยู่ระหว่าง 6.2-6.5 ความชื้นร้อยละ 70-80 แหนมที่หมักจนบริโภคได้จะมีความเป็นกรดอยู่ระหว่าง 4.5-5.3 และความชื้นจะลดลงเหลือร้อยละ 65-70 สำหรับคุณค่าทางอาหารพบว่าในแหนมจะมีโปรตีนประมาณร้อยละ 20-25 ไขมันประมาณร้อยละ 5-8 รวมถึงมีวิตามินบีและแร่ธาตุเล็กน้อย (Twiddy; & Reilly. 1987: 197-203)

จากกระบวนการผลิตแหนมที่ทำโดยปล่อยให้เกิดการหมักด้วยเชื้อในธรรมชาติที่ต้องการออกซิเจนเพียงเล็กน้อยเพื่อการเจริญ ดังนั้นการบรรจุจึงต้องเน้นความสะอาดและต้องไล่อากาศออกให้หมด เพื่อให้จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดกรดแลคติคซึ่งมีรสเปรี้ยวเจริญเติบโตได้เพียงอย่างเดียว ส่วนจุลินทรีย์อื่นที่ต้องการออกซิเจนจะไม่เจริญเติบโตและจุลินทรีย์ชนิดที่ไม่ชอบความเป็นกรดจะตายเพราะกรดที่สร้างออกมาจากจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติค (ประเวทย์ และ ฆรณี. 2536)

การหมักแหนมทำได้สองวิธี คือ การหมักแหนมตามธรรมชาติ (natural fermentation) เป็นการหมักโดยภาวะต่างๆ ในการหมักจะขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม และแบคทีเรียกรดแลคติคที่อยู่ตามธรรมชาติ จากการแยกแบคทีเรียกรดแลคติคจากตัวอย่างแหนมที่หมักตามธรรมชาติพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติคที่ทราบสายพันธุ์ในแหนมมีหลายสายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus bavaricus, Lb. curvatus, Lb. farciminis , Lb. plantarum, Lb. sake, Pediococcus damnosus, P. acidilactici, P. pentosaceus* และ *Leuconostoc* sp. (ปิ่นมณี. 2546) อย่างไรก็ตามการหมักตามธรรมชาติกิจกรรมการหมักมักไม่คงที่ ทำให้ไม่สามารถควบคุมคุณภาพของแหนมที่ผลิตได้ เทคโนโลยีการผลิตแหนมในประเทศไทยส่วนใหญ่ยังนิยมการหมักโดยอาศัยเชื้อตามธรรมชาติและใช้ดินประสิวเข้า

ช่วยเพื่อให้แหนมน่ารับประทาน จากการสำรวจผู้ผลิตจำนวน 80 ราย ในภาคเหนือตอนบนและภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบว่า ทุกรายใช้วิธีการหมักตามธรรมชาติ โดยใช้ดินประสิวหรือแป้งช่วยในการหมัก นอกจากนี้ยังพบว่ามีผู้ผลิตในภาคเหนือตอนบนเพียงรายเดียวเท่านั้นที่ใช้เทคนิคการผลิตโดยใช้หัวเชื้อบริสุทธิ์ แต่ไม่พบผู้ผลิตที่ใช้เทคนิคการฉายรังสีแต่อย่างใด (อารี; และคนอื่นๆ. 2545)

การหมักแหนมอีกวิธีหนึ่งคือ การหมักด้วยหัวเชื้อ ซึ่งมีการเติมหัวเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียกรดแลคติคลงในส่วนผสมที่ใช้ในการผลิต (Jay. 1996: 110-113) โดยหัวเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคที่นิยมใช้ ได้แก่ *Lactobacillus plantarum*, *L. curvatus*, *Pediococcus pentosaceus* และ *P. acidilactici* ซึ่งหัวเชื้อเหล่านี้เป็นแบคทีเรียกรดแลคติคที่คัดเลือกได้จากการหมักตามธรรมชาติ (Hammes; & Knauf. 1994: 155-168) ประโยชน์ของแบคทีเรียกรดแลคติคพบว่าช่วยในการสร้างกรดทำให้ผลิตภัณฑ์มีรสเปรี้ยว และส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ (อรนุช. 2530) เช่น เชื้อก่อโรค หรือเชื้อที่ทำให้อาหารเกิดการเน่าเสีย นอกจากนี้ยังผลิตสารบางชนิดที่มีคุณสมบัติเป็นสารกันบูดชีวภาพ (Kelly; Asmunson; & Huang. 1996: 657-662) จากการศึกษาพบว่ากรดแลคติคที่เกิดขึ้นในผลิตภัณฑ์การหมักนั้นนอกจากจะช่วยยืดอายุการเก็บรักษา ทำให้คุณภาพของอาหารดีขึ้นแล้ว ยังช่วยรักษาคุณภาพเนื้อสัมผัสของอาหารหมักอีกด้วย (Twiddy; & Reilly. 1987: 197-203)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์แหนมที่มีการรายงาน ได้แก่ ผลของโซเดียมไนเตรทและไนไตรท์ต่อคุณภาพแหนม (สุธยา; ไพโรจน์; และนินนาท. 2537: 296-312; Rotsachakul; & Chaiseri. 2002) การตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาของแหนม โดยทำการเปรียบเทียบกับเกณฑ์มาตรฐานของผลิตภัณฑ์แหนมที่กำหนดขึ้นโดยสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม หรือกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (อิสยา. 2545: 1-10; นงคราญ; และ นิตยา. 2535: 22-39; Osiriphun; Pongpoolponsak; & Tuitemwong. 2004: 58-65) และการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตแหนมเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์แหนมสำหรับการจำหน่าย เป็นต้น (ไพโรจน์; ลักขณา; และอำพิน. 2536: 51-60)

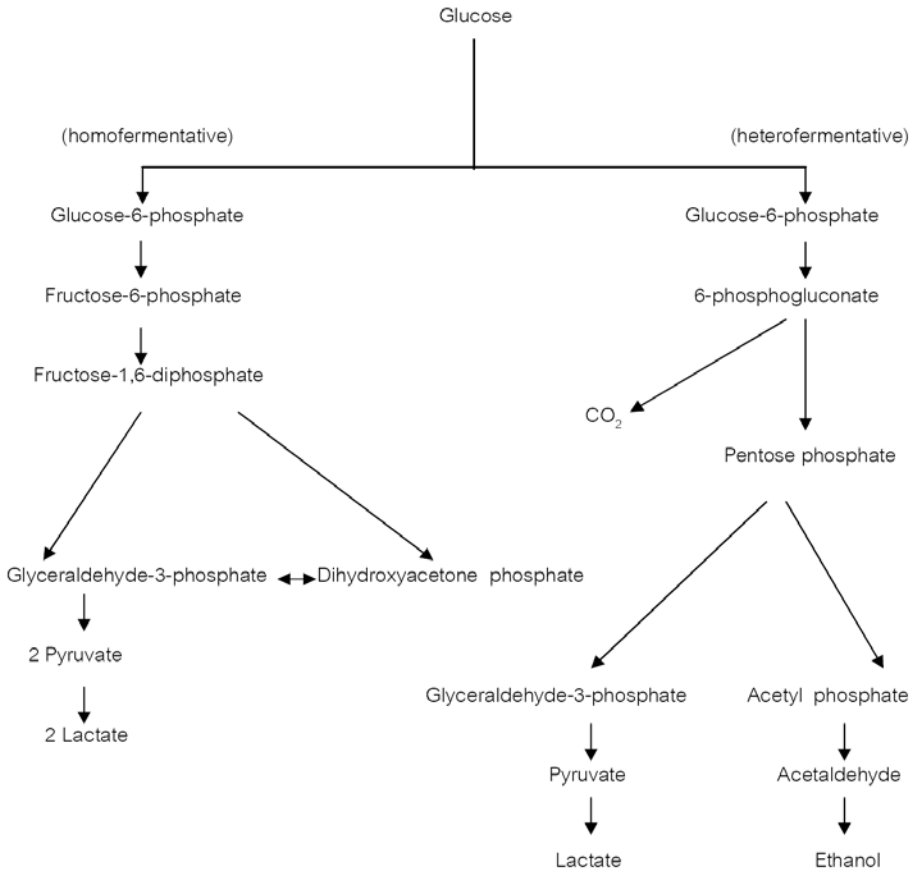
2. แบคทีเรียกรดแลคติค

2.1 คุณลักษณะและคุณสมบัติทั่วไป

แบคทีเรียกรดแลคติค เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (gram positive bacteria) ไม่สร้างสปอร์ มีรูปร่างทรงกลม ท่อนสั้น หรือเป็นท่อนยาว ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ส่วนใหญ่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเพียงเล็กน้อย (microaerophile) ไม่มีไซโทโครม (cytochrome) มีปริมาณของเบส G+C น้อยกว่า 50 โมลเปอร์เซ็นต์ (mol%) ไม่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase enzyme) แต่อาจพบการสร้างเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติคล้ายเอนไซม์คะตะเลสได้ (pseudocatalase enzyme) ในสภาวะการเจริญที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลต่ำ สามารถทนต่อสภาวะที่มีค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ต่ำกว่า 5 หรือที่อุณหภูมิสูงกว่า 37-40 องศาเซลเซียส รวมทั้งต้องการสารประกอบไนโตรเจนเพื่อใช้เป็นแหล่งของกรดอะมิโนและวิตามินสำหรับการเจริญและการสร้างกรดอินทรีย์ (Pot; et al. 1994: 513-517; Ringo; & Gatesoupe. 1998: 177-203) โดยแบคทีเรียกรดแลคติคต้องการพลังงานสำหรับการเจริญจากกระบวนการหมัก (fermentation) คาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ เช่น น้ำตาลกลูโคส ซึ่งกระบวนการหมักสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 รูปแบบ (ภาพประกอบ 1) (Litchfield. 1996: 45-95; Holzapfel; & Wood. 1995: 1-6) คือ

1. Homofermentation เป็นกระบวนการหมักกลูโคสแล้วได้ผลผลิตส่วนใหญ่เป็นกรดแลคติคโดยวิถีไกลโคไลซิส (Glycolysis pathway; Embden-Meyerhof-Parnas pathway) ทั้งนี้เชื้อจะเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นกรดไพรูวิก (pyruvic acid) แล้วจึงเปลี่ยนแปลงต่อไปเป็นกรดแลคติคโดยเอนไซม์แลคเตทดีไฮโดรจีเนส (lactate dehydrogenase) (Schlegel. 1993; Holzapfel; & Wood. 1995: 1-6) โดยแบคทีเรียกรดแลคติคที่เกิดกระบวนการหมักประเภทนี้ ได้แก่ *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus casei, Lactobacillus delbrueckii, Lactobacillus plantarum* และ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* เป็นต้น

2. Heterofermentation เป็นกระบวนการหมักที่จะเกิดกรดแลคติคเพียงบางส่วน และได้ผลิตภัณฑ์อื่นด้วย ได้แก่ เอทิลแอลกอฮอล์ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ หรือกรดแอซิติค (acetic acid) เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่มีเอนไซม์ที่จำเป็นสำหรับวิถีไกลโคไลซิส ซึ่งกลไกการเกิดกรดแลคติคและสารอื่นๆ นั้นจะเป็นไปตามวิถีเพนโตสฟอสเฟต (pentose phosphate pathway) (Schlegel. 1993; Holzapfel; & Wood. 1995: 1-6) โดยแบคทีเรียกรดแลคติคที่เกิดกระบวนการหมักประเภทนี้ ได้แก่ *Lactobacillus brevis, Lactobacillus bifermentans, Lactobacillus fermentum, Leuconostoc lactis* และ *Leuconostoc mesenteroides*



ภาพประกอบ 1 การผลิตกรดแลคติคโดยกระบวนการหมักแบบ Homofermentation และ Heterofermentation

ที่มา: Forsyth. (2000). *The Microbiology of Safe Food*. p.124.

2.2 การจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติค

การจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติค ในระยะแรก Orla-Jensen (1919) ได้จัดหมวดหมู่แบคทีเรียกรดแลคติค โดยอาศัยคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยา รูปแบบของกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคส ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ และโครงสร้าง (configuration) ของกรดแลคติคที่สร้างขึ้น ซึ่งสามารถแบ่งแบคทีเรียกรดแลคติคออกเป็น 4 จีนัส ได้แก่ *Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus* และ *Streptococcus* ต่อมาได้มีการนำเอาความรู้ทางด้านสรีรวิทยา ชีวเคมี และพันธุศาสตร์มาช่วยในการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติค เช่น องค์ประกอบของผนังเซลล์ (Kandler; & Weiss. 1986: 1209-1234) ชนิดและปริมาณของกรดไขมันภายในเซลล์ (Schleifer.

1987: 201-203) ชนิดของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์โดยเทคนิค SDS-PAGE (Pot; et al. 1993: 513-517) ความเหมือนกันของดีเอ็นเอ (DNA homology) (Johnson. 1984: 8-11) การศึกษาความแตกต่างของพลาสมิดที่อยู่ภายในเซลล์ (plasmid profile) (Josephson; & Nielsen. 1988: 219-223) ลำดับเบสของยีน ribosomal RNA (Saiki; et al. 1988: 487-494) ซึ่งจากคุณสมบัติดังกล่าวจึงทำให้สามารถแบ่งแบคทีเรียกรดแลคติคจาก 4 จีนัสข้างต้นออกเป็นจีนัสใหม่ๆ เพิ่มขึ้น เช่น จีนัส *Streptococcus* ถูกแบ่งออกเป็น 4 จีนัส คือ *Enterococcus, Lactococcus, Streptococcus* และ *Vagococcus* ส่วน *Pediococcus halophilus* ถูกแยกออกมาอยู่ในจีนัสใหม่คือ *Tetragenococcus halophilus* นอกจากนี้ยังมีการแยกจีนัส *Carnobacterium* ซึ่งเป็นแบคทีเรียกรดแลคติคที่มีรูปร่างท่อนออกมาจากจีนัส *Lactobacillus* เป็นต้น (Stiles; & Holzapfel. 1997: 1-29) ต่อมาในปี ค.ศ. 1998 Axelsson ได้จัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติค โดยอาศัยความแตกต่างของลักษณะทางฟีโนไทป์ (phenotype) และลักษณะอื่นๆ ทำให้แบ่งแบคทีเรียกรดแลคติคออกเป็น 12 จีนัสคือ *Aerococcus (A.), Carnobacterium (C.), Enterococcus (E.), Lactobacillus (Lb.), Lactococcus (Lc.), Leuconostoc (Ln.), Oenococcus (O.), Pediococcus (P.), Streptococcus (S.), Tetragenococcus (T.), Vagococcus (V.)* และ *Weissella (W.)* โดยในจำนวนนี้พบว่า 11 จีนัส (ยกเว้น *Aerococcus*) เป็นแบคทีเรียกรดแลคติค ซึ่งถูกระบุว่ามีความสำคัญและเกี่ยวข้องกับอาหาร (Stiles; & Holzapfel. 1997: 1-29) ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติคแต่ละจีนัสมีลักษณะดังนี้

2.2.1 *Aerococcus*

เป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่อยู่ใน Family Streptococcaceae เซลล์มีรูปร่างทรงกลม ไม่มีการเคลื่อนที่ มีการแบ่งตัวแบบ 2 ระนาบ โดยทั่วไปจึงพบเซลล์อยู่เป็นคู่หรือ 4 เซลล์ สามารถเจริญได้ดีในสภาพที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย เป็นพวก Homofermentative มีบางสายพันธุ์มีการสร้างเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติคล้ายเอนไซม์คะตะเลส แบคทีเรียที่พบในจีนัสนี้มี 2 สปีชีส์ คือ *A. urinae* และ *A. viridans* ซึ่งเปลี่ยนชื่อมาจาก *Pediococcus urinae-equi* และ *P. homari* ตามลำดับ (Singleton; & Sainsbury. 1988: 485-486; Stiles; & Holzapfel. 1997: 1-29)

2.2.2 *Carnobacterium*

เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นท่อนคล้าย *Lactobacillus* sp. ซึ่งก่อนหน้านี้เคยจำแนกไว้ใน *Lactobacillus* sp. เป็นกลุ่ม Heterofermentative ส่วนใหญ่เจริญได้ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีบางสายพันธุ์ที่สร้างก๊าซจากการใช้น้ำตาลกลูโคส ไม่สามารถเจริญบนอาหารที่มีแอซิเตท (acetate) และไม่สร้างกรดโอลิอิค (oleic acid) มีปริมาณของ G+C ประมาณ 33.0-37.2 โมลเปอร์เซ็นต์ พบได้ตามเนื้อสัตว์ที่บรรจุในสภาพสุญญากาศ ปลา และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ปีก (Jay. 1996: 110-113; Schleifer; & Ludwing. 1995: 7 -19)

2.2.3 *Enterococcus*

เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีเซลล์รูปร่างคล้ายไข่ พบการจัดเรียงตัวของเซลล์เป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรืออาจพบเป็นโซ่สายสั้นๆ สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส เจริญได้ในสภาพที่มีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 6.5 และน้ำดี (bile) ร้อยละ 40 เจริญได้ที่ความเป็นกรดด่าง 9.6 มีปริมาณของ G+C ประมาณ 37-45 โมลเปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียจีนัสนี้ประกอบด้วย 20 สปีชีส์ (Devriese; & Pot. 1995: 327-367; Jay. 1996: 110-113; Schleifer; & Ludwing. 1995: 7-19)

2.2.4 *Lactobacillus*

เป็นกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติคกลุ่มใหญ่ที่สุด มีความหลากหลายของลักษณะทางฟีโนไทป์ ลักษณะทางชีวเคมี และลักษณะทางสรีรวิทยา อันเนื่องมาจากมีความแตกต่างของปริมาณของ G+C ภายในจีนัสค่อนข้างสูง โดยอยู่ระหว่าง 32-53 โมลเปอร์เซ็นต์ (Axelsson. 1998: 1-72) เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนหรือเป็นรูปทรงรี มีการจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวๆ หรือเป็นโซ่ บางสายพันธุ์มีการสร้างเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติคล้ายเอนไซม์คะตะเลส สามารถใช้เป็นโพรไบโอติกได้เป็นอย่างดี พบได้ทั่วไปในมนุษย์และสัตว์ นมและผลิตภัณฑ์นม อาหารหมักชนิดต่างๆ และเครื่องดื่ม พบในพืชเพียงเล็กน้อย เช่น หญ้าหมักและผักดอง โดยทั่วไปไม่เป็นพิษ (Harrigan. 1998: 346-348)

2.2.5 *Lactococcus*

เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่พบได้ในผลิตภัณฑ์นมหลายชนิด มีเซลล์เป็นรูปไข่ ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1 ไมครอน มีการจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือต่อกันเป็นโซ่ยาว เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีปริมาณของ G+C ประมาณ 34-43 โมลเปอร์เซ็นต์ (Schleifer; & Ludwing. 1995: 7-19)

2.2.6 *Leuconostoc*

เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่พบได้ในผลิตภัณฑ์นมหลายชนิด เครื่องดื่มที่ได้จากการหมักและผักดองหลายชนิด ลักษณะของเซลล์มีรูปร่างทรงกลม มีการจัดเรียงตัวเป็นคู่หรือเป็นโซ่ จัดเป็นพวก Heterofermentative อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 20-30 องศาเซลเซียส มักพบอยู่ร่วมกับ *Lactobacillus* sp. มีปริมาณของ G+C ประมาณ 38-44 โมลเปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วย 15 สปีชีส์ คือ *L. carnosum*, *L. citreum*, *L. durionis*, *L. fallax*, *L. ficulneum*, *L. fructosum*, *L. garlicum*, *L. gasicomitatum*, *L. gelidum*, *L. inhae*, *L. kimchii*, *L. lactis*, *L. mesenteroides*, *L. pseudoficulneum* และ *L. pseudomesenteroides* (Dessaet; & Steenson. 1995: 665-698; Jay. 1996: 110-113; Schleifer; & Ludwing. 1995: 7-19)

2.2.7 *Oenococcus*

เป็นกลุ่มแบคทีเรียรูปร่างทรงกลม ซึ่งถูกเปลี่ยนชื่อมาจาก *Leuconostoc oenus* เดิม เนื่องจากมีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างจาก *Leuconostoc* และทนต่อกรดได้ดีกว่า (Dick; Dellaglio; & Collin. 1995: 395-397)

2.2.8 *Pediococcus*

เป็นแบคทีเรียรูปร่างทรงกลม มีการแบ่งตัวแบบ 2 ทิศทางบนระนาบเดียวกัน พบการจัดเรียงตัวอยู่เป็นคู่หรืออยู่เป็น 4 เซลล์ติดกัน เป็นพวก Homofermentative ต้องการสารอาหารที่มีความซับซ้อน มักพบร่วมกับพืชที่นำมาหมัก เช่น ผักดองเค็ม นอกจากนั้นยังพบว่ามีการปนเปื้อนในเครื่องดื่มที่หมักด้วยยีสต์ มีปริมาณของ G+C ประมาณ 34-44 โมลเปอร์เซ็นต์ (Harrigan. 1998: 346-348; Jay. 1996: 110-113)

2.2.9 *Streptococcus*

เป็นกลุ่มแบคทีเรียรูปร่างทรงกลมหรือรูปไข่ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8-1.2 ไมครอน มีการจัดเรียงตัวเป็นคู่หรือเป็นโซ่ยาว ต้องการสารอาหารหลายชนิดในการเจริญ สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 20-40 องศาเซลเซียส เป็นได้ทั้ง Homofermentative และ Heterofermentative พบได้ในอาหารเป็นส่วนใหญ่นิยมใช้เป็นหัวเชื้อในอุตสาหกรรมนมหมัก ประกอบด้วย 39 สปีชีส์ (Hardie; & Whiley. 1995: 55-124)

2.2.10 *Tetragenococcus*

จีนัส *Tetragenococcus* ถูกเปลี่ยนชื่อมาจาก *P. halophillus* เดิม ลักษณะส่วนใหญ่จึงเหมือนกับ *Pediococcus* มีรูปร่างทรงกลม ต้องการโซเดียมคลอไรด์ในการเจริญ และสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์สูงถึงร้อยละ 18 และมีลำดับเบสของยีน 16S rRNA ต่างจาก *Pediococcus* (Simpson; & Taguchi. 1995: 125-164)

2.2.11 *Vagococcus*

เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่แยกออกมาจากจีนัส *Streptococcus* เนื่องจากสามารถเคลื่อนที่ได้ ประกอบด้วย 5 สปีชีส์ คือ *V. fluvialis, V. carniphilus, V. fessus, V. lutrae* และ *V. salmoninarum* (Ali Al-Ahmad; et al. 2008: 235-238)

2.2.12 *Weissella*

เป็นกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติคจีนัสเดียวที่มีทั้งรูปร่างทรงกลม และรูปท่อน ประกอบด้วย 12 สปีชีส์ ซึ่งเดิมจำแนกอยู่ในสกุล *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* คือ *Weissella paramenteroides* (*Leuconostoc paramesenteroides*), *W. confusus* (*Lb. confusus*), *W. halotolerans* (*Lb. halotolerans*), *W. kandleri* (*Lb. kandleri*), *W. minor* (*Lb. minor*),

นอกจากนี้ยังมีสปีชีส์ที่แยกได้ใหม่คือ *W. hellenica* (Stiles; & Holzapfel. 1997: 1-29), *W. thailandensis* (Tanasupawat; et al. 2000: 1479–1485), *W. cibaria* (Björkroth; et al. 2002: 141-148), *W. kimchii* (Choi; et al. 2002: 507–511), *W. soli* (Magnusson; et al. 2002: 831-834) และ *W. koreensis* (Lee; et al., 2002: 1257–1261)

2.3 แหล่งที่พบ

ตามปกติสามารถพบแบคทีเรียกรดแลคติคได้ในอาหารประเภทต่างๆ เช่น เนื้อสัตว์ ผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ นมและผลิตภัณฑ์อาหารที่ผ่านกระบวนการหมัก นอกจากนี้ยังพบในระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินอาหาร สิ่งขับถ่ายของมนุษย์และสัตว์ รวมถึงในน้ำเสียจากแหล่งต่างๆ อีกด้วย (Pot; et al. 1994: 513-517; Sarkar; & Banerjee. 1996: 231-233; Stiles; & Holzapfel. 1997: 1-29)

2.4 ความสำคัญ

แบคทีเรียกรดแลคติคเป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญทั้งทางด้านเศรษฐกิจ รวมถึงสุขภาพอนามัยของมนุษย์และสัตว์ เช่น ความสามารถในการย่อยสลายน้ำตาลแลคโตส การสร้างเอนไซม์ที่สามารถย่อยโปรตีน และการสร้างแบคเทอริโอซิน (McKay; Dajani; & Wannamaker. 1983: 259-274) รวมทั้งช่วยปรับปรุงคุณภาพด้านโภชนาการของอาหาร กระตุ้นกระบวนการสร้างวิตามิน ป้องกันและยับยั้งการติดเชื้อในลำไส้และช่องทางเดินปัสสาวะ ลดระดับคอเลสเทอรอล (cholesterol) ในกระแสเลือด ลดความเป็นพิษจากสารก่อมะเร็ง กระตุ้นภูมิคุ้มกันให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเนื้องอก (Gilliland. 1990: 175-185) นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติคยังมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการหมักในหลายด้าน คือ

1. เป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อให้เกิดโรค ไม่สร้างสารพิษหรือผลผลิตที่เป็นพิษ
2. มีคุณสมบัติที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเพียงเล็กน้อยและสามารถทนต่อสภาวะที่มีออกซิเจนได้ดี จึงไม่ต้องการกระบวนผลิตที่ซับซ้อน
3. มีการเจริญที่รวดเร็วจึงใช้ระยะเวลาในกระบวนการผลิตสั้น
4. เป็นแบคทีเรียที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารมาเป็นระยะเวลานาน จึงมีขั้นตอนและวิธีการสำหรับการเลี้ยงเชื้อในระดับขยายส่วนการผลิตอยู่แล้ว
5. สามารถใช้สารตั้งต้นในการผลิตที่มีราคาถูก
6. การเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติคจะมีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย และแบคทีเรียอื่นๆ ที่ปนเปื้อนอยู่ในกระบวนการผลิต

7. แบคทีเรียกรดแลคติคบางชนิดสามารถสร้างและหลั่งโปรตีนออกมาภายนอกเซลล์ได้ (De Vuyst; & Vandamme. 1992: 571-578)

แบคทีเรียกรดแลคติคถูกนำมาใช้ในอาหารหมักหลากหลายประเภท อุตสาหกรรมอาหารหมักที่มักใช้แบคทีเรียกรดแลคติคเป็นหัวเชื้อ ได้แก่ อุตสาหกรรมการผลิตชีส ซึ่งนิยมใช้เชื้อ *Lactococcus lactis* อุตสาหกรรมการผลิตโยเกิร์ต ซึ่งมักใช้เชื้อ *Streptococcus thermophilus* ร่วมกับ *Lactobacillus delbrueckii* เป็นต้น นอกจากนี้ lactobacilli หลายสปีชีส์ยังถูกใช้เป็นโปรไบโอติก (probiotic) อย่างไรก็ตามปัญหาหลักที่สำคัญในการหมักอาหาร ได้แก่ การปนเปื้อนจากแบคเทอริโอเฟจ ซึ่งทำให้เกิดการแตกสลายของเซลล์แบคทีเรียที่ใช้เป็นหัวเชื้อ ทำให้การเปลี่ยนน้ำตาลที่มีอยู่ในอาหารไปเป็นกรดแลคติคเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ การหมักเกิดช้าลง หรืออาจทำให้ไม่ได้ผลิตภัณฑ์ตามต้องการ (Lu; et al., 2005: 45-54)

3. แบคเทอริโอเฟจ

3.1 ประวัติการค้นพบแบคเทอริโอเฟจ

แบคเทอริโอเฟจ เป็นไวรัสที่ทำให้เกิดการติดเชื้อกับแบคทีเรีย ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Twort นักวิทยาศาสตร์ชาวอังกฤษ ในปี ค.ศ. 1915 ซึ่งพบว่าลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Staphylococcus* ที่ทำการเพาะเลี้ยงและมีการติดเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงไป และแพร่ไปยังโคโลนีอื่น โดยตัวที่ทำให้เกิดการติดเชื้อนี้สามารถผ่านเครื่องกรองได้ จึงได้มีการตั้งสมมติฐานไว้อย่างหลากหลาย และอธิบายลักษณะที่เกิดขึ้นนี้ว่าเป็นสิ่งที่สามารถผ่านเครื่องกรองได้คล้ายไวรัสที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์ (animal viruses) และพืช (plant viruses) อย่างไรก็ตามรายงานดังกล่าวถูกมองข้ามจากนักวิทยาศาสตร์ และไม่มีการศึกษาค้นคว้าต่อ จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1917 d' Herelle นักวิทยาศาสตร์ชาวแคนาดา ซึ่งทำงานอยู่ใน Pasteur Institute ได้ทดลองกับเชื้อ *Shigella dysenteriae* ที่เป็นสาเหตุโรคบิด และพบว่าได้เกิดเหตุการณ์คล้ายกับ Twort โดยเขาได้แยกเชื้อ *S. dysenteriae* จากอุจจาระ และนำอุจจาระไปกรอง นำส่วนของเหลวที่ได้ผสมกับอาหารที่มีเชื้อ *S. dysenteriae* ช่วงกำลังเจริญ บ่มไว้ข้ามคืน พบว่าอาหารเหลวมีลักษณะใสไม่มีการเจริญของเชื้อ จึงสรุปว่าสิ่งที่ผ่านเครื่องกรองได้ คือ ไวรัสของแบคทีเรีย และให้ความหมายของแบคเทอริโอเฟจว่า ตัวกินแบคทีเรีย (Adams. 1958: 1-3)

3.2 สมบัติทั่วไปของแบคเทอริโอเฟจ

แบคเทอริโอเฟจมีสมบัติทั่วไป (Voyles. 2002: 83) ดังนี้ คือ

3.2.1 สามารถดำรงชีวิตแบบอิสระได้ แต่การเพิ่มจำนวนอนุภาคเฟจเกิดขึ้นได้เฉพาะเมื่ออยู่ภายในเซลล์ของแบคทีเรียที่ติดเชื้อเฟจหรือภายในโฮสท์เท่านั้น โดยอาศัยเมแทบอลิสึมของโฮสท์ในการผลิตเฟจรุ่นใหม่ออกมา

3.2.2 ไม่จัดเป็นเซลล์เพราะไม่มีเยื่อหุ้มเซลล์ หรือโครงสร้างอื่นๆ ของเซลล์

3.2.3 องค์ประกอบหลักของเฟจมีเพียงกรดนิวคลีอิกซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอ (DNA) หรืออาร์เอ็นเอ (RNA) ชนิดใดชนิดหนึ่ง และส่วนของแคพซิด (capsid) ซึ่งเป็นโปรตีนห่อหุ้ม (protein coat) เพื่อป้องกันกรดนิวคลีอิกที่อยู่ภายใน

3.2.4 กรดนิวคลีอิกที่บรรจุอยู่ภายในส่วนใหญ่เป็นแบบดีเอ็นเอสายคู่ (double-stranded DNA) อาจพบชนิดอื่นๆ เช่น ดีเอ็นเอสายเดี่ยว (single-stranded DNA) อาร์เอ็นเอสายคู่ (double-stranded RNA) หรือ อาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (single-stranded RNA)

3.2.5 ขนาดของกรดนิวคลีอิกแตกต่างกันตามชนิดของเฟจ

3.3 การจัดจำแนกเฟจ

การจัดจำแนกเฟจอาศัยลักษณะรูปร่างของเฟจจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และชนิดของกรดนิวคลีอิก โดยแบ่งออกเป็น 6 กลุ่มตามวิธีของ Bradley ซึ่งเป็นพื้นฐานของการจัดหมวดหมู่ของเฟจในปัจจุบัน (Bradley. 1967: 230-234) ดังนี้ คือ

3.3.1 กลุ่ม A ส่วนหัวมีลักษณะรูปร่างเป็นรูปหกเหลี่ยม (hexagonal) มีส่วนหาง (tail) ที่มีชีทที่ยืดหดได้ห่อหุ้ม (contractile sheath) และเป็นแท่งตรง ส่วนใหญ่พบระยางค์ (appendage) ซึ่งเป็นโครงสร้างส่วนปลาย เช่น ใยหาง (tail fiber) มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายคู่ อาจมีการแบ่งเป็นกลุ่มย่อยต่อไปอีกตามลักษณะรูปร่าง

3.3.2 กลุ่ม B ส่วนหัวมีลักษณะเป็นรูปหกเหลี่ยม มีส่วนหางที่ไม่มีชีทห่อหุ้มจึงไม่สามารถหดตัวได้ แต่มีความยาวมากกว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของส่วนหัวมาก อาจมีหรือไม่มีระยางค์ซึ่งเป็นโครงสร้างส่วนปลายอนุภาคก็ได้ มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายคู่

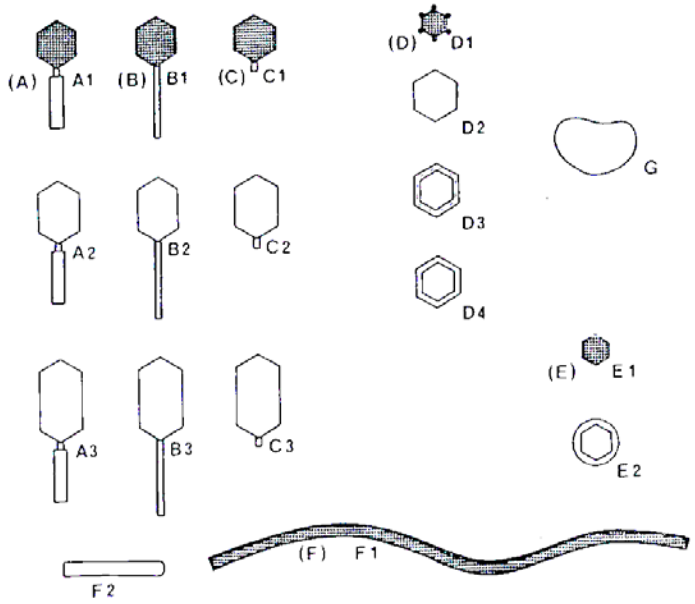
3.3.3 กลุ่ม C ส่วนหัวมีลักษณะเป็นรูปหกเหลี่ยม มีส่วนหางที่มีความยาวสั้นกว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของส่วนหัวมากและไม่มีชีทห่อหุ้ม จึงไม่สามารถหดตัวได้ อาจมีหรือไม่มีระยางค์ มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายคู่

3.3.4 กลุ่ม D ส่วนหัวมีลักษณะเป็นรูปหกเหลี่ยมซึ่งมีปุ่ม (knob) หรือแคพโซเมอร์ขนาดใหญ่อยู่บนมุมของแคพซิด ไม่มีส่วนหาง มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว

3.3.5 กลุ่ม E ส่วนหัวมีลักษณะเป็นรูปหกเหลี่ยมที่ประกอบด้วยแคพโซเมอร์ขนาดเล็ก มีกรดนิวคลีอิกเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว

3.3.6 กลุ่ม F ลักษณะรูปร่างไม่เหมือนกลุ่มอื่นๆ เพราะเป็นสายยาวที่มีความยืดหยุ่น มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว

นอกจากนี้พบเฟจกลุ่ม G ซึ่งมีรูปร่างไม่แน่นอน มี envelope ที่มีไขมันเป็นส่วนประกอบ (Ackermann; et al. 1999: 135-201) แต่ไม่พบส่วนของแคพซิด มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายคู่ เช่น เฟจ MV-L2 โดยทั่วไปเฟจที่พบมีรูปร่างอยู่ในกลุ่ม A, B และ C ดังแสดงในภาพประกอบ 2



ภาพประกอบ 2 การจัดจำแนกเฟจโดยอาศัยรูปร่างและชนิดกรดนิวคลีอิก

ที่มา: Goyal; Gerbra; & Bitton. (1987). *Phage Ecology*. p. 53.

ในการจัดหมวดหมู่ (classification) ของไวรัสมีการอธิบายน้อยกว่าในแบคทีเรีย เพราะขาดความรู้เบื้องต้น เช่น แหล่งกำเนิด วิวัฒนาการ โดยทั่วไปแบ่งไวรัสแบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ 3 กลุ่ม คือ ไวรัสสัตว์ ไวรัสพืช และไวรัสแบคทีเรีย ซึ่งใช้ความแตกต่างของโฮสท์ในการแบ่งกลุ่ม อย่างไรก็ตามไม่สามารถจัดหมวดหมู่และตั้งชื่อ (nomenclature) ให้เป็นระบบเดียวกันได้ จนกระทั่งคณะกรรมการสากลว่าด้วยการจัดอนุกรมวิธานของไวรัส (International Committee on Taxonomy of Viruses: ICTV) ได้พัฒนารูปแบบการจัดหมวดหมู่ และแบ่งไวรัสเป็น 50 Families สำหรับชื่อ Family ให้ลงท้าย

ด้วยคำว่า -viridae เช่น Family Poxviridae ชื่อ Subfamily ให้ลงท้ายด้วยคำว่า -virinae เช่น Subfamily Chorodopoxvirinae และชื่อ Genus ให้ลงท้ายด้วยคำว่า *-virus* เช่น Genus *Orthopoxvirus* (Harley; & Klein. 1993: 363) การจัดอนุกรมวิธานของไวรัสโดยอาศัยสมบัติต่างๆ ดังแสดงในตาราง 1

ตาราง 1 การจัดอนุกรมวิธานของไวรัสโดยอาศัยสมบัติต่างๆ

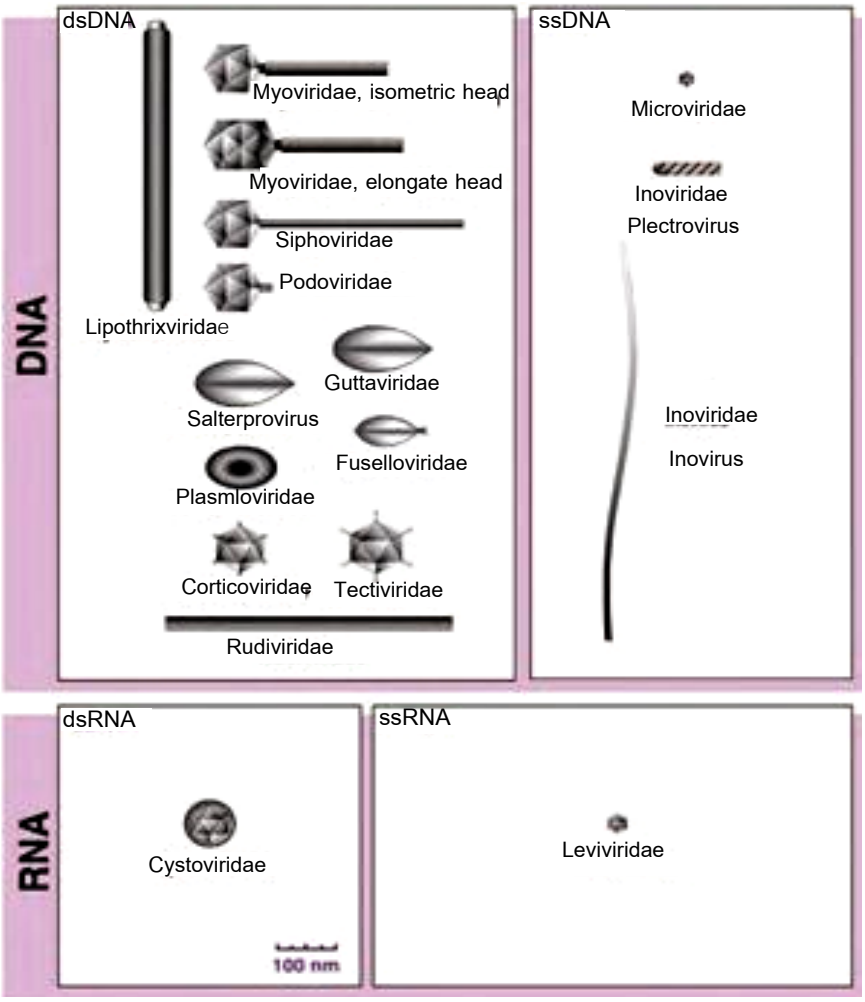
สมบัติต่างๆ ของไวรัสที่นำมาจัดทำอนุกรมวิธาน
1. รูปร่างและขนาด ความสมมาตรของแคพซิด การมี spike การมีหรือไม่มี envelope
2. สมบัติทางฟิสิกส์และเคมีฟิสิกส์ของไวรัส
2.1 น้ำหนักโมเลกุล buoyant density และ sedimentation coefficient
2.2 ความทนต่อกรด ความร้อน ไอออนที่มีประจุบวก สารละลาย ผงซักฟอก และรังสี
2.3 ลักษณะของจีโนม เช่น
ชนิดของจีโนม เป็นอาร์เอ็นเอหรือดีเอ็นเอ เป็นสายเดี่ยวหรือสายคู่ เป็นเส้นตรงหรือเป็นวงกลม ในกรณีที่เป็นท่อนมีจำนวนและความยาวเท่าใด
ความยาวของจีโนม
ลำดับนิวคลีโอไทด์
G-C content
2.4 สมบัติของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบ เช่น
จำนวน ขนาด และหน้าที่ของโปรตีนโครงสร้าง (structural protein)
จำนวน ขนาด และหน้าที่ของโปรตีนที่ไม่ใช่โปรตีนโครงสร้าง (non-structural protein)
การมีโปรตีนที่มีหน้าที่พิเศษต่างๆ เช่น transcriptase, reverse transcriptase และ hemagglutinin
ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน
2.5 สมบัติของไขมัน ได้แก่ ปริมาณ ชนิด และอื่นๆ
2.6 สมบัติของคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ ปริมาณ ชนิด และอื่นๆ
2.7 การเรียงตัวของยีนในจีโนม (genome organization) และการเพิ่มจำนวน ได้แก่
การจัดลำดับยีน
วิธีการเพิ่มจำนวน
จำนวนและตำแหน่งของ open reading frame

ตาราง 1 (ต่อ)

สมบัติต่างๆ ของไวรัสที่นำมาจัดทำอนุกรมวิธาน
การถอดรหัส (transcription) และการแปลรหัส (translation)
ตำแหน่งภายในเซลล์ที่โปรตีนของไวรัสสะสมอยู่
ตำแหน่งภายในเซลล์ที่ไวรัสประกอบเป็นอนุภาค
ตำแหน่งและวิธีการที่ไวรัสเกิดเป็นอนุภาคสมบูรณ์ และออกจากเซลล์
2.8 สมบัติของแอนติเจน ได้แก่ สมบัติทาง serology
2.9 สมบัติทางชีววิทยา ได้แก่
โฮสท์-เรนจ์ ในธรรมชาติ
วิธีการติดต่อในธรรมชาติ การมีพาหะ การก่อโรค
สภาพภูมิศาสตร์ในแหล่งที่พบไวรัส
ความชอบต่อเนื้อเยื่อ (tissue tropism) และพยาธิวิทยา

ที่มา: Van Regenmortel; Fauquel; & Bishop. (2000). *Virus Taxonomy.* p. 98.

สำหรับการจัดจำแนก Family ของเฟจ เน้นสมบัติ 3 ประการ คือ ชนิดของกรดนิวคลีอิก (nucleic acid type) จำนวนสายของกรดนิวคลีอิก (nucleic acid strandedness) และการมีหรือไม่มี envelope โดยได้จัดจำแนกและตั้งชื่อ Family เฟจที่มีอยู่มากกว่า 2,000 ชนิด ตามที่มีการค้นพบในเวลานั้น (Lim. 1998: 390) ดังแสดงในภาพประกอบ 3



ภาพประกอบ 3 การจัดจำแนก Family ของเฟจตามวิธีของคณะกรรมการสากลว่าด้วยการจัดอนุกรมวิธานของไวรัส

ที่มา: Van Regenmortel; Fauquel; & Bishop. (2000). *Virus Taxonomy*. p. 53.

จากการศึกษาเกี่ยวกับเฟจที่ผ่านมาพบว่า เฟจที่ถูกศึกษาส่วนใหญ่เป็นเฟจที่มีหัวลักษณะรูปร่างเป็นรูปหกเหลี่ยม (hexagonal) มีหาง (tail) ถึงร้อยละ 96 ซึ่งจัดอยู่ใน Family Siphoviridae, Myoviridae หรือ Podoviridae โดยมีเฟจที่ถูกจัดอยู่ใน Family Siphoviridae ถึงร้อยละ 61.7 รองลงมาคือ Family Myoviridae ร้อยละ 24.5 และ Family Podoviridae ร้อยละ 13.9 (Ackermann. 1999: 135-201)

3.4 โครงสร้างของเฟจ

โครงสร้างของอนุภาคเฟจประกอบด้วยส่วนสำคัญ 2 ส่วนคือ โปรตีนห่อหุ้มหรือแคพซิด เป็นโครงสร้างภายนอก และกรดนิวคลีอิกซึ่งอยู่ภายในแคพซิด

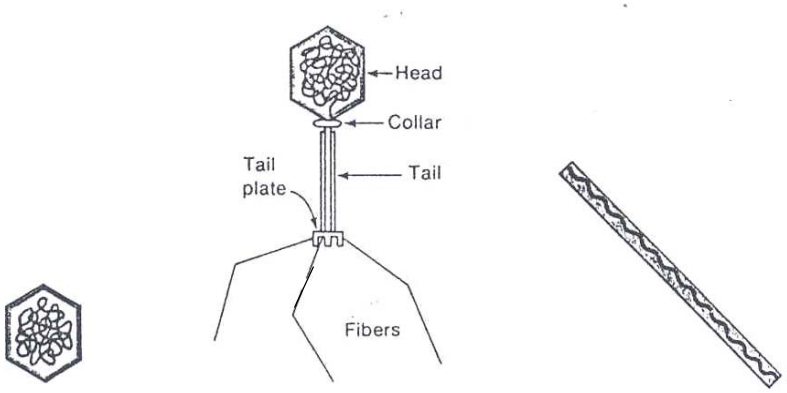
3.4.1 แคพซิด

แคพซิด เป็นโปรตีนโครงสร้างของอนุภาคเฟจ ทำหน้าที่ห่อหุ้มกรดนิวคลีอิกไว้ภายในช่วยป้องกันกรดนิวคลีอิกจากการถูกทำลายด้วยรังสี อุณหภูมิ สารเคมี แคพซิดประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อย เรียกว่า แคพโซเมอร์ (capsomer) เมื่อแคพโซเมอร์มาต่อกันทำให้เกิดโครงสร้างแบบต่างๆ ดังนี้ (Mckane; & Kandel. 1996: 306-309; Maloy; Cronan; & Freifelder. 1994: 82)

3.4.1.1 โครงสร้างรูปทรงหลายเหลี่ยม (polyhedral structure) เช่น รูปทรงแบบไอโคซาฮีดรัล (icosahedral) โดยโครงสร้างบริเวณส่วนหัว มีมุมยอดทั้งหมด 12 มุม แต่ละมุมประกอบด้วยแคพโซเมอร์ 5 หน่วย มารวมกันเรียกว่า เพนตอน (penton) นอกจากนี้มีหน้าสามเหลี่ยมด้านเท่า 20 หน้า เกิดจากแคพโซเมอร์ 6 หน่วย เรียก เฮกซอน (hexon) มาเรียงตัวรอบเพนตอน ดังแสดงในภาพประกอบ 4 (A)

3.4.1.2 โครงสร้างซับซ้อน (complex structure) จะมีส่วนหางที่เกิดจากการเรียงตัวของแคพโซเมอร์ต่อจากส่วนหัวลงมา ในลักษณะที่เรียงตัวแบบขดเป็นเกลียวและส่วนหางอาจประกอบด้วยชีทห่อหุ้มแกนกลาง (core) แผ่นฐาน (base plate) และใยหาง ดังแสดงในภาพประกอบ 4 (B)

3.4.1.3 โครงสร้างแบบสายยาว (filamentous structure) เกิดจากแคพโซเมอร์มาเรียงต่อกันในลักษณะแบบขดเป็นเกลียว มีกรดนิวคลีอิกเป็นแกนกลาง ดังแสดงในภาพประกอบ 4 (C)



(A) Icosahedral tailless (B) Icosahedral tailed (C) Filamentous

ภาพประกอบ 4 รูปร่างพื้นฐานของอนุภาคเฟจ (A) โครงสร้างรูปทรงหลายเหลี่ยม (B) โครงสร้างซับซ้อน (C) โครงสร้างแบบสายยาว

ที่มา: Maloy; Cronan; & Freifelder. (1994). *Microbial Genetics*. p. 82.

3.4.2 กรดนิวคลีอิก

กรดนิวคลีอิกที่พบเป็นองค์ประกอบของอนุภาคเฟจ อาจเป็นดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอแบบใดแบบหนึ่งเท่านั้น ซึ่งอนุภาคของเฟจส่วนมากมีกรดนิวคลีอิกชนิดดีเอ็นเอสายคู่ นอกจากนี้อาจพบดีเอ็นเอสายเดี่ยว อาร์เอ็นเอสายคู่ และอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว โดยกรดนิวคลีอิกจะอัดตัวแน่นอยู่ภายในแคพซิด (Maloy; Cronan; & Freifelder. 1994: 82)

3.5 วงชีวิตของเฟจ

วงชีวิตของเฟจ แบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ

3.5.1 วงชีวิตแบบไลติค (lytic cycle)

เฟจที่เพิ่มจำนวนโดยใช้วงชีวิตนี้ เรียกว่า ไวรูเรนต์เฟจ หรือไลติคเฟจ โดยเฟจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิสึมของแบคทีเรียที่เกิดการติดเชื้อ ทำให้เซลล์ของแบคทีเรียแตกสลายและตาย เพื่อปล่อยเฟจรุ่นใหม่ออกมา (Boyd. 1995: 403; Maloy; Cronan; & Freifelder. 1994: 84-85)

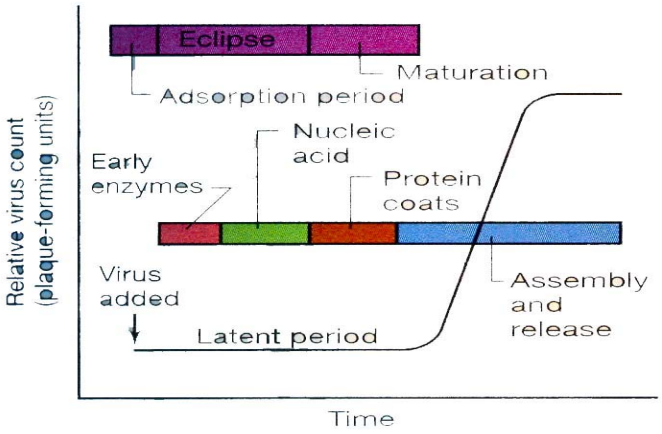
ตัวอย่าง เช่น วงชีวิตของเฟจ T7 ของ *E. coli* ประกอบด้วยขั้นตอน ดังนี้

3.5.1.1 การเกาะติด (adsorption) เฟจจะอาศัยความจำเพาะระหว่างตำแหน่งเกาะติด (attachment site) ของเฟจ กับตำแหน่งรีเซพเตอร์ (receptor site) บนเซลล์ของแบคทีเรีย ซึ่งอาจเป็นลิโพโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) แคปซูล (capsule) พิไล (pili) แฟลกเจลลา (flagella) โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) เป็นต้น ตำแหน่งเกาะติดของเฟจและตำแหน่งรีเซพเตอร์บนเซลล์ของแบคทีเรียมีความจำเพาะต่อกันสูงมาก ถ้าแบคทีเรียเกิดการกลายพันธุ์ในบริเวณตำแหน่งรีเซพเตอร์ จะทำให้แบคทีเรียชนิดนั้นเกิดการต้านทานต่อการติดเชื้อเฟจเดิมที่เคยทำให้เกิดการติดเชื้อได้

3.5.1.2 การส่งกรดนิวคลีอิกของเฟจเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย (penetration) ขั้นตอนนี้เฟจจะปล่อยกรดนิวคลีอิกผ่านผนังเซลล์จนเข้าสู่ไซโตพลาสสึมของแบคทีเรีย ส่วนของแคพซิดและองค์ประกอบอื่นยังคงอยู่ภายนอกเซลล์ของแบคทีเรีย

3.5.1.3 การสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกและโครงสร้างของเฟจ (biosynthesis) เมื่อกรดนิวคลีอิกของเฟจเข้าไปภายในเซลล์ของแบคทีเรีย จะหยุดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอของแบคทีเรีย และเริ่มมีการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกและโปรตีนของเฟจ เริ่มตั้งแต่ขั้นตอนการจำลองดีเอ็นเอของเฟจ หลังจากนั้นดีเอ็นเอของเฟจจะถูกถอดรหัสเป็น mRNA ของเฟจ และ mRNA ของเฟจจะถูกแปลรหัสเป็นโปรตีนของเฟจ โดย mRNA ที่สร้างขึ้นในช่วงแรก (early mRNA) จะถูกแปลรหัสเป็นเอนไซม์และโปรตีน ที่จำเป็นสำหรับทำให้เกิดการติดเชื้อในแบคทีเรีย ส่วน mRNA ที่สร้างขึ้นช่วงหลัง (Late mRNA) จะถูกแปลรหัสเป็นโปรตีนโครงสร้างของเฟจ เช่น แคพซิด หาง เป็นต้น หรือแปลรหัสเป็นโปรตีนสำหรับใช้ในขั้นตอนการแตกสลายของเซลล์แบคทีเรีย เพื่อปลดปล่อยอนุภาคเฟจรุ่นใหม่ออกมา

การศึกษาเฟจที่อยู่ในระยะนี้ทำได้โดยวิธีที่เรียกว่า One step growth experiment ซึ่งวิธีนี้จะทำให้สามารถศึกษาการเจริญของเฟจอย่างต่อเนื่อง ทำให้ทราบถึงระยะพัก (latent period) (ระยะเวลาตั้งแต่เฟจเริ่มเกาะติดจนถึงเวลาที่เฟจทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกครั้งแรก) ระยะเพิ่มจำนวน (rise period) (เวลาที่เฟจทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกครั้งแรกเป็นต้นไป) ของเฟจ (Adams. 1959; Ellis; Delbruck. 1939) นอกจากนี้ยังสามารถหา burst size (จำนวนอนุภาคของเฟจหลังจากเพิ่มจำนวนต่อโฮสท์ 1 เซลล์) ได้จากอัตราส่วนของจำนวนเฟจที่ถูกปล่อยออกมาจากเซลล์แบคทีเรียในช่วงสุดท้ายของ latent period ต่อจำนวนเฟจที่ถูกปล่อยออกมาจากเซลล์แบคทีเรียครั้งแรก (Adams. 1959) ดังแสดงในภาพประกอบ 5

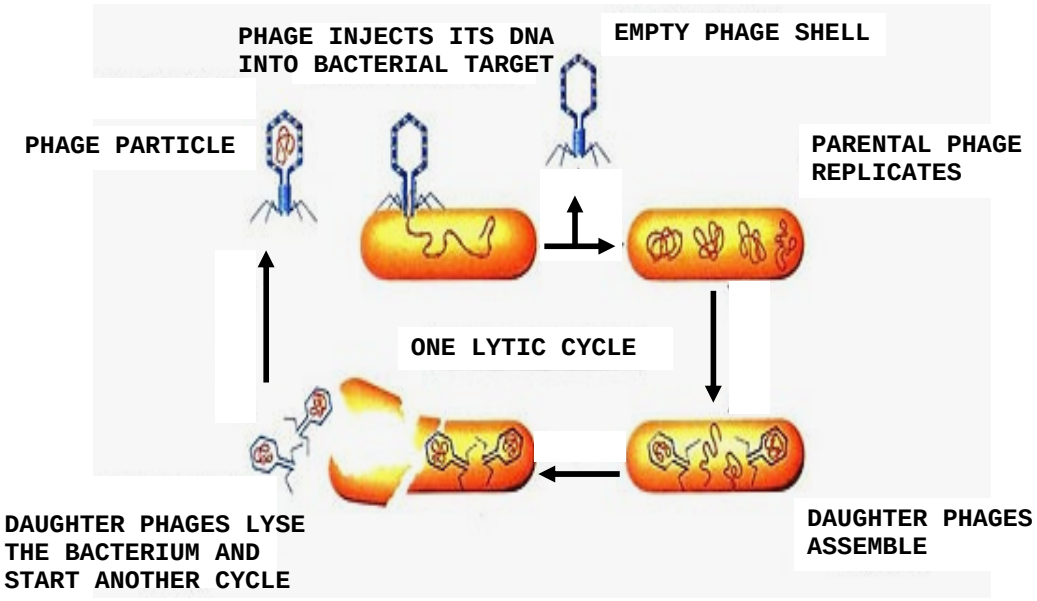


ภาพประกอบ 5 One step growth experiment

ที่มา: Madigan; Martinko; & Parker. (2003). *Brock Biology of Microorganism.* p. 241.

3.5.1.4 การประกอบตัวของเฟจ (assembly) ขั้นตอนนี้โปรตีนที่เป็นโครงสร้างของอนุภาคเฟจ เกิดการประกอบตัวเข้าด้วยกัน โดยส่วนของกรดนิวคลีอิกจะถูกบรรจุเข้าไปในแคพซิดที่สร้างขึ้น จากนั้นส่วนของแคพซิดจะเชื่อมต่อกับซีทห่อหุ้มและส่วนหาง แล้วประกอบกันเป็นอนุภาคเฟจที่สมบูรณ์

3.5.1.5 การแตกสลายของแบคทีเรีย (lysis) ขั้นตอนนี้อนุภาคเฟจรุ่นใหม่จะถูกปลดปล่อยออกมาหลังจากที่เซลล์ของแบคทีเรียเกิดการแตกสลายและตาย เซลล์ของแบคทีเรียที่แตกสลายนี้ เกิดจากการย่อยด้วยเอนไซม์ ได้แก่ ไลโซไซม์ (lysozyme) และ โฮลิน (holin) ซึ่งหลั่งโดยเฟจเพื่อย่อยผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียตามลำดับ วงชีวิตแบบไลติคเฟจ ดังแสดงในภาพประกอบ 6



ภาพประกอบ 6 วงชีวิตแบบไลติคของเฟจ

ที่มา: Leiman; et al. (2004). *Cell*. p. 29.

3.5.2 วงชีวิตแบบไลโสเจนิค (lysogenic cycle)

เฟจที่มีวงชีวิตทั้งแบบไลโสเจนิคและแบบไลติค เรียกว่า เทมเพอเรตเฟจ (temperate phage) (Alcamo. 1996: 338; Mckane; & Kandel. 1996: 317) ตัวอย่าง เช่น แลมดาเฟจ (lambda phage) ที่มีความจำเพาะกับ *E. coli* วงชีวิตแบบไลโสเจนิคประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

3.5.2.1 การเกาะติด เกิดเหมือนกับวงชีวิตแบบไลติค

3.5.2.2 การส่งกรดนิวคลีอิกของเฟจเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย โดยเฟจจะส่งกรดนิวคลีอิกของเฟจ ที่มีลักษณะเป็นสายตรงผ่านผนังเซลล์เข้าสู่ไซโตพลาสสึมของแบคทีเรีย จากนั้นกรดนิวคลีอิกที่เป็นสายตรงจะเปลี่ยนเป็นรูปวงแหวนแบบปิด ซึ่งขั้นตอนที่ 1 และ 2 ของวงชีวิตแบบไลโสเจนิคยังคงเหมือนกับวงชีวิตแบบไลติค

3.5.2.3 การสอดแทรกดีเอ็นเอของเฟจในโครโมโซมของโฮสท์ (integration) โดยอาศัยเอนไซม์อินทีเกรส (integrase enzyme) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการแทรกตัวของกรดนิวคลิอิกของเฟจ เข้าไปในโครโมโซมของแบคทีเรีย เรียกเฟจระยะนี้ว่า โปรเฟจ (prophage) และเรียกแบคทีเรียที่มีโปรเฟจแทรกอยู่ว่า ไลโสเจน (lysogen) ขั้นตอนนี้จะเริ่มจากการจำลองดีเอ็นเอถอดรหัส และแปลรหัส จนได้โปรตีนควบคุม (repressor protein) ซึ่งทำหน้าที่ขัดขวางการทำงานของ

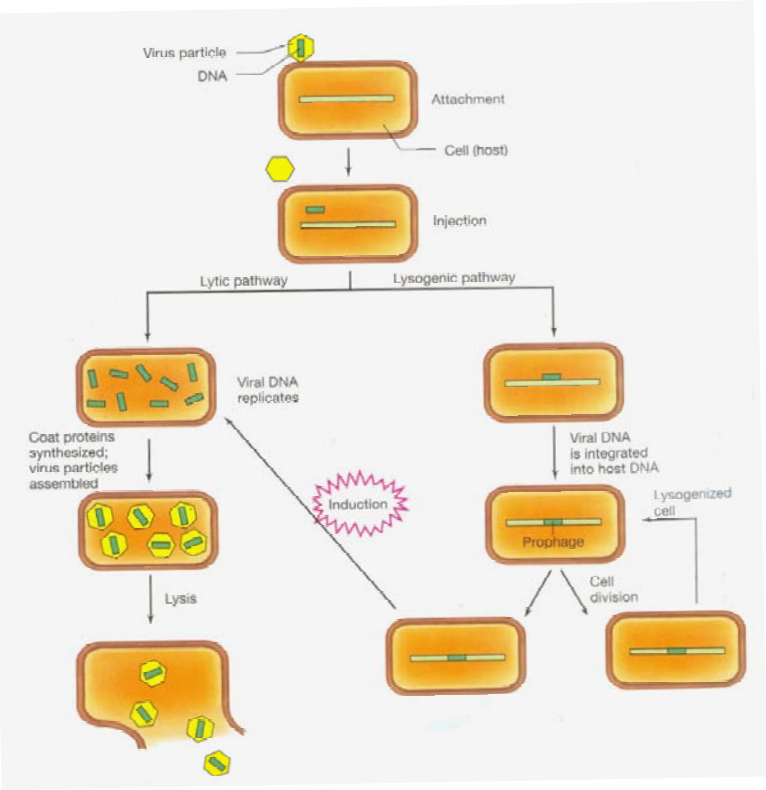
อาร์เอ็นเอโพลีเมอเรส (RNA polymerase) จึงไม่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอและโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบต่างๆ ของเฟจได้ เมื่อเฟจเข้าไปแทรกตัวกับโครโมโซมของแบคทีเรียแล้ว เฟจจะมีการเพิ่มจำนวนไปพร้อมกับการเพิ่มจำนวนของโครโมโซมแบคทีเรีย

3.5.2.4 การชักนำสู่วงชีวิตแบบไลติค (induction) การชักนำเข้าสู่วงชีวิตแบบไลติคอาจเกิดจากหลายสาเหตุ ดังนี้

- ดีเอ็นเอของแบคทีเรียได้รับความเสียหาย โปรเฟจจึงหลุดออกจากโครโมโซมของแบคทีเรียเข้าสู่วงชีวิตแบบไลติค

- ปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น แสงอุลตราไวโอเลต (Voyles. 2002: 96) หรือสารเคมี เช่น มิโตมัยซิน ซี (mitomycin C) (Lim. 1998: 411)

เมื่อแบคทีเรียตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมภายนอกเหล่านี้ทำให้โปรตีนควบคุมถูกทำลาย เฟจจะเข้าสู่วงชีวิตแบบไลติค ดังแสดงในภาพประกอบ 7



ภาพประกอบ 7 วงชีวิตแบบไลโสเจนิคของเฟจ

ที่มา: Madigan; Martinko; & Parker (2003). *Brock Biology of Microorganism.* p. 250.

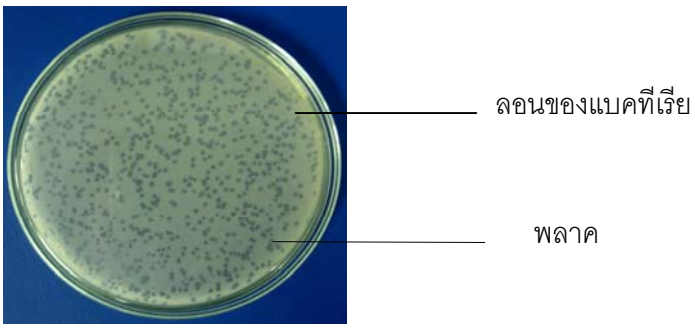
3.6 การตรวจสอบการติดเชื้อในโฮสท์

การตรวจสอบการติดเชื้อในโฮสท์ใช้เทคนิคที่เรียกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสองชั้น (double agar layer method) โดยนำเฟจและแบคทีเรียที่เป็นโฮสท์ที่มีความจำเพาะกัน มาผสมกันในอาหารวุ้นเหลว แล้วเทบลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นวุ้นแข็งในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ บ่มในอุณหภูมิที่เหมาะสม เป็นเวลา 16–24 ชั่วโมง จะพบว่าโฮสท์หรือแบคทีเรียที่ไม่ติดเชื้อสามารถเจริญปกคลุมผิวหน้าอาหารชั้นบนสุด เรียกว่า ลอน (lawn) แต่ถ้าพบว่ามีบริเวณที่มีลักษณะใสขึ้นบนลอนของแบคทีเรีย เรียกลักษณะนี้ว่า พลาค (plaque) (Cappuccino; & Sherman. 2001: 231) ซึ่งเกิดจากแบคทีเรียเกิดการติดเชื้อเฟจและแตกสลาย เกิดการปลดปล่อยอนุภาคเฟจรุ่นใหม่ออกมา อนุภาคเฟจที่ปลดปล่อยออกมาสามารถเข้าทำลายเซลล์ของแบคทีเรียบริเวณข้างเคียง จนเกิดเป็นวงใสสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งในบริเวณนี้ไม่มีการเจริญของแบคทีเรีย ดังแสดงในภาพประกอบ 8

ลักษณะของพลาค มี 2 แบบ คือ

1. พลาคใส (clear plaque) พลาคที่ปรากฏจะมีลักษณะใส เนื่องจากเฟจเพิ่มจำนวนด้วยวงชีวิตแบบไลติค เฟจจะทำให้เซลล์ของแบคทีเรียแตกสลายและตายจึงเห็นเป็นวงใส เฟจที่ทำให้เกิดพลาคในลักษณะนี้ คือ ไวรูเรนท์เฟจหรือไลติคเฟจ

2. พลาคขุ่น (turbid plaque) พลาคที่ปรากฏจะมีลักษณะขุ่น เฟจที่ทำให้เกิดพลาคมีลักษณะขุ่น คือ เทมเพอเรตเฟจ โดยเริ่มแรกเฟจจะมีการเพิ่มจำนวนอนุภาคด้วยวงชีวิตแบบไลติค จนถึงระยะหนึ่งเฟจบางส่วนจะเพิ่มจำนวนด้วยวงชีวิตแบบไลโสเจนิค ซึ่งแบคทีเรียที่เกิดการติดเชื้อโดยเฟจชนิดนี้จะไม่เกิดการแตกสลายของเซลล์ จึงพบแบคทีเรียเจริญอยู่ในพลาค ทำให้เห็นพลาคมีลักษณะขุ่น



ภาพประกอบ 8 ลักษณะของพลาคที่เจริญบนลอนของแบคทีเรีย

ที่มา: พรทิพย์ สุขสวัสดิ์. (2549). *การศึกษาสมบัติของวิบริโอเฟจที่แยกจากตัวอย่างน้ำทะเลและอาหารทะเลดิบในประเทศไทย*. หน้า. 17.

3.7 การศึกษาความสามารถในการติดเชื้อกับแบคทีเรียกรดแลคติคสปีชีส์อื่น และจีนัสอื่นของเฟจ

เฟจบางชนิดมีความจำเพาะสูง สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อกับแบคทีเรียสปีชีส์เดียว หรือเพียง 2-3 สปีชีส์ เรียกว่า เฟจมีโฮสท์-เรนจ์แคบ บางชนิดอาจทำให้เกิดการติดเชื้อกับแบคทีเรียหลายสปีชีส์ เรียกว่า เฟจมีโฮสท์-เรนจ์กว้าง ดังนั้นการศึกษาโฮสท์-เรนจ์ คือ การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเฟจที่ทำให้เกิดการติดเชื้อกับแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น นอกเหนือจากแบคทีเรียที่ใช้แยกเฟจชนิดนั้น ปัจจุบันนำมาทดสอบความจำเพาะกับแบคทีเรียต่างสปีชีส์หรือจีนัส (Matsuzaki; et al. 1992: 93-97) ต่อมาได้มีการเรียกเฟจที่จำเพาะต่อแบคทีเรียสปีชีส์เดียวว่า monovalent phage และเรียกเฟจที่มีความจำเพาะกับแบคทีเรียมากกว่า 1 สปีชีส์ว่า polyvalent phage (Kalmanson; & Bronfenbrenner. 1942: 13)

ตัวอย่างรายงานการศึกษาโฮสท์-เรนจ์ หรือการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเฟจ ที่ทำให้เกิดการติดเชื้อกับแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นนอกเหนือจากแบคทีเรียที่ใช้แยกเฟจชนิดนั้น เช่น เฟจบางตัวทำให้เกิดการติดเชื้อทั้งใน *Lc. lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* และ *Lc. lactis* biovariant *diacetylactis* แต่ในขณะที่เชื้อหลายสายพันธุ์จะสามารถต้านทานต่อเฟจที่จำเพาะกับสายพันธุ์นั้นได้ (Mullan. 2002)

3.8 การศึกษารูปร่างของเฟจ

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเป็นเครื่องมือสำหรับนำมาศึกษารูปร่าง และวัดขนาดเฟจ โดยมักจะใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope, TEM) และย้อมตัวอย่างเฟจด้วยวิธีเนกาทีฟสเตนนิ่ง (negative staining) โดยใช้ยูเรนิลอะซีเตด (uranyl acetate) หรือ กรดฟอสโฟทังสเตนิค (phosphotunstanic acid) ทำให้เห็นรูปร่างเฟจมีสีอ่อนบนพื้นผิว (background) ที่ทึบแสง สำหรับการวัดขนาดอนุภาคเฟจจะวัดจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน อย่างไรก็ตามบางครั้งอาจเกิดความผิดพลาด อันเนื่องมาจากตัวอย่างเฟจแห้งมาก ทำให้ขนาดที่วัดได้เล็กกว่าความเป็นจริง หรืออาจมีขนาดใหญ่ขึ้นจากเงาของโลหะที่พอกตัวหนาเกินไป (Zachary. 1976: 415–422; Kay; & Bradley. 1960: 553-563)

3.9 ปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อเฟจ

3.9.1 ความต้องการอิเลคโทรไลท์ (electrolyte requirements)

เฟจต้องการไดวาเลนท์แคทไอออน เช่น แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) หรือแมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) ในช่วงใดช่วงหนึ่งของการติดเชื้อ (Watanabe; & Takesue. 1972: 19–30) ซึ่งความต้องการไดวาเลนท์ไอออนสำหรับการเพิ่มจำนวนของเฟจนั้นถูกศึกษามาเป็นระยะเวลานาน พบว่าไดวาเลนท์ไอออนเป็นปัจจัยที่สำคัญในการเข้าเกาะติดโฮสท์ของเฟจ เพราะไดวาเลนท์แคทไอออน เช่น แคลเซียมไอออนจะมีส่วนช่วยให้เฟจสามารถเข้าเกาะติดกับผนังเซลล์ของโฮสท์ซึ่งมีประจุเป็นลบได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้แคลเซียมไอออนยังมีความจำเป็นต่อการเพิ่มจำนวนของเฟจส่วนใหญ่ด้วย โดยระดับของแคลเซียมไอออนที่เฟจต้องการเพื่อให้สามารถเพิ่มจำนวนเฟจให้ได้มากที่สุดมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเฟจ และชนิดของโฮสท์ แต่โดยทั่วไปจะมีการเติมแคลเซียมไอออนลงไปในอาหารที่ใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับเฟจประมาณ 5-10 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมักจะมีการเติมแคลเซียมไอออนลงไปในรูปของแคลเซียมคลอไรด์ (calcium chloride) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าการเติมแมกนีเซียมซัลเฟต (magnesium sulphate) ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถช่วยเพิ่มขนาดของพลาคให้ใหญ่ขึ้นได้ (Mullan. 2002)

3.9.2 อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีผลอย่างมากต่อการอยู่รอดของเฟจ โดยทั่วไปเฟจส่วนใหญ่จะถูกทำลายที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที อย่างไรก็ตามเฟจบางตัวสามารถทนที่อุณหภูมิดังกล่าวได้ 5 นาทีในหางนม (skim milk; pH 6.0) บางชนิดทนต่อในการทำแห้งที่อุณหภูมิ 90-95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเฟจบางตัวยังสามารถอยู่รอดได้แม้ว่าจะผ่านการทำพาสเจอร์ไรซ์แบบใช้อุณหภูมิสูงแต่ใช้เวลาสั้น (High Temperature-Short Time; HTST pasteurization; อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที) ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีความจำเป็นในการใช้ความร้อนสูงเพื่อทำลายเฟจ โดยส่วนใหญ่จะใช้อุณหภูมิประมาณ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อให้แน่ใจว่าเฟจจะถูกทำลายหมดไปในกระบวนการผลิตนม (Mullan. 2002) แต่ในอุตสาหกรรมการหมักหลายชนิด พบว่าวัตถุดิบที่ใช้ในการหมักไม่สามารถที่จะผ่านความร้อนสูงเป็นระยะเวลานานได้ เพราะจะส่งผลต่อเนื้อสัมผัส และกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์นั้นได้ ดังนั้นในการศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อเฟจในปัจจุบันจะเน้นศึกษาถึงอุณหภูมิและระยะเวลาที่ทำให้เฟจเหลือน้อยที่สุดพอที่จะทำให้การหมักได้ผลดีและไม่ส่งผลต่อเนื้อสัมผัส และกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์ ซึ่งการศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อเฟจนั้นจะช่วยที่ให้ทราบถึงวิธีที่จะควบคุมเฟจต่อไปในอนาคต

3.9.3 ความเป็นกรดด่าง (pH)

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเฟจจะถูกทำลายในภาวะที่มีความเป็นกรดด่างต่ำ โดยเมื่อมีการเติมกรดแลคติคร้อยละ 2.5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงไปในนมเป็นเวลา 5 นาที เฟจจะถูกทำลายหมด อย่างไรก็ตามการเติมกรดแลคติคลงไปในนมน้อยกว่าร้อยละ 1 จะมีผลต่อเฟจน้อยมาก แม้ว่าจะบ่มไว้นานถึง 24 ชั่วโมงก็ตาม ซึ่งจากการทดลองต่อมาพบว่าเฟจจะถูกทำลายอย่างรวดเร็วเมื่ออยู่ในภาวะที่มีความเป็นกรดด่างน้อยกว่าหรือเท่ากับ 2.5 และมากกว่าหรือเท่ากับ 11.8 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แต่ในภาวะที่มีความเป็นกรดด่างอยู่ระหว่าง 2.5-11.8 จะเห็นผลได้ช้า ส่วนที่ความเป็นกรดด่าง 4.0–7.0 จะต้องใช้เวลามากกว่า 5 วัน เฟจถึงจะถูกทำลายได้ อย่างไรก็ตามการศึกษาในปัจจุบันพบว่า เฟจจะถูกยับยั้งอย่างรวดเร็วที่ความเป็นกรดด่างต่ำกว่า 5 โดยเฉพาะเมื่ออยู่ในภาวะที่มีความเป็นกรดด่างต่ำกว่า 4.5 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Mullan. 2002)

4. แลคติดแอซิดแบคเทอริโอเฟจ (lactic acid bacteriophages)

แลคติดแอซิดแบคเทอริโอเฟจ หรือแลบเฟจ ถูกแยกได้ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1930 โดยพบการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก หลังจากนั้นมาก็ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับแลบเฟจกันอย่างแพร่หลาย โดยทำการแยกแลบเฟจจากอาหารหมักหลายๆ แหล่ง เช่น จากเชื้อเริ่มต้นในการหมักเนื้อ (Trevors; et al. 1983: 281–288) หางนมจากการผลิตชีส (Caso; et al. 1995: 741–750) กิมจิ (Yoon; et al. 2001: 63–74) และน้ำแตงกวาดอง (Lu; et al. 2003a: 225-235) เพื่อศึกษาเกี่ยวกับลักษณะและคุณสมบัติของแลบเฟจเพิ่มมากขึ้น แลบเฟจที่มีการศึกษากันมาก ได้แก่ เฟจของเชื้อในกลุ่ม *Lactobacillus, Lactococcus* และ *Streptococcus* ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า แลบเฟจยังคงเป็นปัญหาสำคัญในการผลิตอาหารหมักทุกประเภท (Lu; et al. 2005: 45-54)

แบคทีเรียกรดแลคติคสามารถแยกได้จากอาหารที่ผ่านกระบวนการหมัก ระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินอาหาร สิ่งขับถ่ายของมนุษย์และสัตว์ รวมถึงในน้ำเสียจากแหล่งต่างๆ ดังนั้นจึงสามารถแยกแลบเฟจได้จากแหล่งเดียวกัน การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อแลบเฟจที่แยกจากตัวอย่างต่างๆ ได้แก่ รีเซฟเตอร์จำเพาะที่อยู่บนผิวเซลล์ของโฮสท์ และการมีแคทไอออนอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ (Topley; & Wison. 1990) เนื่องจากเฟจต้องการไดวาเลนท์แคทไอออน เช่น แคลเซียมไอออน หรือแมกนีเซียมไอออน ในช่วงใดช่วงหนึ่งของการติดเชื้อ (Watanabe; & Takesue. 1972: 19–30) ซึ่งการจะเข้าเกาะติดโฮสท์ของเฟจได้หรือไม่นั้น ขึ้นอยู่กับการมีหรือไม่มีไดวาเลนท์แคทไอออนด้วย (Topley; & Wilson, 1990) แต่การศึกษาต่อมาพบว่าไดวาเลนท์แคทไอออนไม่มีผลต่อการเข้าเกาะติดโฮสท์ของเฟจในช่วง 30 นาทีแรก (Lu; et al. 2003a: 225-235)

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อเฟจของแบคทีเรียกรดแลคติคที่ผ่านมาพบว่า แลบเฟจส่วนใหญ่สามารถอยู่รอดได้แม้จะผ่านการทำพาสเจอร์ไรซ์แบบใช้อุณหภูมิสูงแต่ใช้เวลาสั้น (HTST) (Mullan, 2002) ในการศึกษาต่อมาพบว่าเฟจ ΦJL-1 ที่แยกมาจากน้ำแตงกว่าดองถูกยับยั้งการทำงานได้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที และถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิมากกว่า 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที (Lu; et al. 2003a: 225-235)

นอกจากนี้จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าแลบเฟจสามารถปนเปื้อนได้ในบริเวณที่ทำชีสทุกแหล่งของโลก แม้ว่าจะมีการควบคุมทางสุขอนามัยอย่างดี หรือมีการเปลี่ยนหัวเชื้อ หรือใช้เชื้อที่ต้านทานต่อการติดเชื้อด้วยเฟจก็ตาม (Klaenhammer, 1984: 1-29) และแลบเฟจยังคงเป็นปัญหาสำคัญในการผลิตอาหารหมักทุกประเภท (Lu; et al. 2005: 45-54) การปนเปื้อนด้วยแลบเฟจในอาหารหมักนับเป็นปัญหาหลักในระดับอุตสาหกรรม การสุขาภิบาลที่ดีในบริเวณที่ใช้ในการหมักจะช่วยลดการปนเปื้อนของเฟจในการหมักได้ ทั้งนี้รวมถึงการแยกห้องเก็บหัวเชื้อในการหมักจากห้องที่ใช้ในการผลิต การใช้ความร้อนในการฆ่าเชื้ออุปกรณ์ การใช้อาหารที่ยับยั้งเฟจ (Phage Inhibitory Medium; PIM) ในการถ่ายหัวเชื้อ เป็นต้น (Mullan, 1986: 39-42)

จากความสำคัญดังกล่าว ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับแลบเฟจที่แยกจากแหนมในประเทศจะเป็นข้อมูลสำคัญในการศึกษาการแพร่กระจายของแลบเฟจในแหนมที่ใช้แบคทีเรียกรดแลคติคเป็นหัวเชื้อ รวมถึงปริมาณและคุณสมบัติต่างๆ ของเฟจที่ปนเปื้อนในการหมักแหนม ซึ่งจะช่วยพัฒนาวิธีการในการลดการปนเปื้อนของแลบเฟจ การควบคุมสุขาภิบาลในบริเวณการผลิต การป้องกันและควบคุมการแพร่กระจายของเฟจ การปรับปรุงกระบวนการในการหมักให้มีประสิทธิภาพปราศจากการปนเปื้อนด้วยเฟจ รวมทั้งการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ทนต่อการติดเชื้อด้วยเฟจในอนาคต

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator) (SHEL-LAB)

หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) (Astell)

ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow) (Science Tech)

ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot–air sterilizing oven) (Fisher Scientific)

เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) (Du Pont)

กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน (Jeol รุ่น JEM-1010)

เครื่องอิเล็คโตรโฟเรซิส (Electrophoresis apparatus) (Bio-Rad)

เครื่อง Polymerase Chain Reaction (PCR; Mini Cycler ^{TM} PTC-150) (MJ Research)

ชุดจำแนกแบคทีเรียสำเร็จรูป API 50 CHL (BioMerieux)

QIA quick gel extraction Kit (Qiagen)

ชุดถ่ายภาพเจล (Viber Lourmat)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

MRS agar (Hi-media)

MRS broth (Hi-media)

nutrient agar (Hi-media)

polyethylene glycol 8000 (Sigma)

sodium dodecyl sulfate (Sigma)

chloroform (Merck)

absolute ethanol (Merck)

phenol (USB)

ethidium bromide (BIO-RAD)

loading dye (Fermentas)

lysozyme (Fermentas)

2-Log DNA Ladder (New England Biolabs)

Lambda DNA marker/*Hin*dIII (Fermentas)

isopropanol (Merck)

เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Apa*LI, *Eco*RI (Promega), *Bgl*II, *Pst*I, *Hin*dIII, *Nde*I (Fermentas)

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติค

ใช้ Loop เผาไฟจนแดง รอจนเย็นแล้วนำ loop แตะบริเวณต่างๆ ของแหนม นำมา streak ลงบนอาหาร MRS agar ที่ผสม $CaCO_3$ ร้อยละ 0.5 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใน candle jar เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติค

2.1 การคัดเลือกเบื้องต้น

2.1.1 รูปร่าง

คัดเลือกโคโลนีสีขาวที่เป็นโคโลนีเดี่ยว ขนาด 1-3 มิลลิเมตร ที่มีบริเวณใสรอบโคโลนีบนอาหาร MRS agar ที่ผสม $CaCO_3$ ร้อยละ 0.5 นำไปย้อมสีแกรมเพื่อดูลักษณะรูปร่าง เก็บเชื้อที่ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ลงในอาหาร MRS agar

2.1.2 การทดสอบเอนไซม์คะตะเลส

ใช้ loop เขี่ยเชื้อจากข้อ 2.1.1 ที่เจริญบน MRS agar มาแตะลงบนสไลด์ที่มี 1 หยดของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ร้อยละ 3 เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคจะให้ผลลบ

ถ้าเชื้อทดสอบให้ผลบวกในข้อ 2.1.1 และให้ผลลบในข้อ 2.1.2 คาดว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติค ให้เก็บเชื้อไว้ใน MRS agar เพื่อนำเชื้อที่ได้ไปทดสอบทางชีวเคมีอื่นๆ เพื่อจำแนกสปีชีส์ต่อไป โดย subculture ทุก 2 สัปดาห์ และเก็บ stock culture ใน MRS broth ที่เติมกลีเซอรอล ร้อยละ 20 ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.2 การจำแนกจีนัสโดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมี

2.2.1 ตรวจสอบความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส

ปิเปตเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียกรดแลคติค ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหาร MRS broth นำไปบ่มใน candle jar ที่อุณหภูมิต่างกันคือ ที่ 10 องศาเซลเซียส 30 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน บันทึกผลจากการสังเกตว่าเชื้อเจริญได้หรือไม่

2.2.2 ตรวจสอบความสามารถในการเจริญที่สภาวะค่าความเป็นกรดด่าง 4.4 และ 9.6

ปิเปตเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียกรดแลคติค ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหาร MRS broth ที่ปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเป็น 4.4, 5.7 และ 9.6 นำไปบ่มใน candle jar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน บันทึกผลจากการสังเกตว่าเชื้อเจริญได้หรือไม่

2.2.3 ตรวจสอบความสามารถในการเจริญที่สภาวะมี NaCl เข้มข้นร้อยละ 6.5 และ 18

ปิเปตเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียกรดแลคติค ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหาร MRS broth ที่ไม่มี NaCl และมี NaCl ร้อยละ 6.5 และ 18 นำไปบ่มใน candle jar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน บันทึกผลจากการสังเกตว่าเชื้อเจริญได้หรือไม่

2.2.4 ตรวจสอบการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากการหมักน้ำตาลกลูโคส

ปิเปตเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียกรดแลคติค ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหาร MRS broth ที่มีหลอดดักก๊าซ 1 หลอด บ่มใน candle jar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน บันทึกผลจากการเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ

2.3 การจำแนกสปีชีส์โดยใช้ชุดจำแนกแบคทีเรียสำเร็จรูป API 50 CHL

นำแบคทีเรียกรดแลคติคที่ผ่านการจัดจำแนกในระดับจีนัส มาจัดจำแนกในระดับสปีชีส์โดยใช้ชุดจำแนกแบคทีเรียสำเร็จรูป API 50 CHL (BioMerieux, France) (ภาคผนวก ค ข้อ 1)

2.4 การจำแนกสปีชีส์โดยอาศัยลำดับเบสในบริเวณ 16S rDNA

2.4.1 การสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียกรดแลคติค ที่มีจำนวนเซลล์ 5 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ไปปั่นที่ความเร็ว 4,025xg เป็นเวลา 3 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ แล้วล้างเซลล์ด้วย TE buffer (pH 8) (ภาคผนวก ข ข้อ 2) จากนั้นทำเซลล์แขวนลอยใน TE buffer (pH 8) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ lysozyme 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม sodium dodecyl sulfate ร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) (ภาคผนวก ข ข้อ 1) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลายฟีนอล: คลอโรฟอร์ม (อัตราส่วน 1: 1) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,244xg เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วทำซ้ำอีกครั้งหนึ่ง จากนั้นแยกส่วนใสด้านบนมาทำการตกตะกอนดีเอ็นเอโดยดูดส่วนใสด้านบนที่ได้มาเติมโซเดียมอะซิเตท 3 โมลาร์ (ภาคผนวก ข ข้อ 4) ในอัตราส่วนปริมาตร 1 ต่อ 10 และเอธานอลร้อยละ 95 (ที่แช่เย็น) ในอัตราส่วนปริมาตร 2 ต่อ 1 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำมาปั่นเหวี่ยงความเร็ว 13,244xg เป็นเวลา 10 นาที ล้างดีเอ็นเออีกครั้งด้วยเอธานอลร้อยละ 70 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงความเร็ว 13,244xg เป็นเวลา 1 นาที ดูดเอธานอลทิ้ง จากนั้นนำไประเหยเอธานอลออก แขวนลอยดีเอ็นเอด้วยน้ำ nuclease-free ปริมาตร 30-50 ไมโครลิตร แล้วนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาวิเคราะห์ด้วยวิธีอิเล็กโทร-โฟเรซิส (electrophoresis) โดยชั่งอะกาโรส 0.5 กรัม ผสมกับ 1X TBE 50 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข ข้อ 3) นำมาหลอมให้เจลละลาย แล้วเทเจลลงใน gel apparatus เมื่อเจลแข็งตัวนำมาใส่ใน chamber จากนั้นเท 1X TBE ให้ท่วมเจล นำดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่สกัดได้ผสมกับ loading dye แล้วนำมาใส่ลง

ในช่องภายในเจล ให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำเจลมาย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide (0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 10 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยการแช่น้ำเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นตรวจดูเจลภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต ดีเอ็นเอจะปรากฏให้เห็นเป็นแถบสีส้ม โดยการตรวจสอบด้วยวิธีนี้ต้องเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (2-Log DNA Ladder, New England Biolabs)

2.4.2 การเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรีย

นำ DNA ที่สกัดได้มาเป็น template ในการทำ Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียโดยใช้ primers ที่มีลำดับเบสดังนี้ (Erko; & Michael. 1991)

forward primer (8-27f): 5’ AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG 3’

reverse primer (1525r): 5’ TACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT 3’

โดยส่วนผสมของ PCR reaction (QIAGEN) ปริมาตรรวมทั้งหมด 50 ไมโครลิตร มีดังนี้ 10X *Taq* buffer 5 ไมโครลิตร, dNTP mix 1 มิลลิโมลาร์, forward primer 15 พิโคโมล, reverse primer 15 พิโคโมล, ดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อแบคทีเรีย 40 นาโนกรัม, *Taq* DNA polymerase 0.2 ไมโครลิตร, $MgCl_2$ 2 มิลลิโมลาร์ และ 5X Q solution 10 ไมโครลิตร

นำหลอด micro centrifuge ขนาด 0.2 มิลลิลิตร ชนิด thin wall ที่ผสมสารต่าง ๆ เรียบร้อยแล้วใส่ในเครื่อง MiniCycler™ โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาสำหรับเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. preheating อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที
2. denaturing อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
3. annealing อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
4. extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
5. ทำซ้ำขั้นที่ 2-4 เป็นจำนวน 30 รอบ
6. final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
7. คงอุณหภูมิไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปทำการวิเคราะห์ต่อไป

แล้วนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR นี้มาวิเคราะห์ขนาดด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟ-เรซิส เช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 2.4.1

2.4.3 การทำให้ชิ้นดีเอ็นเอบริสุทธิ์

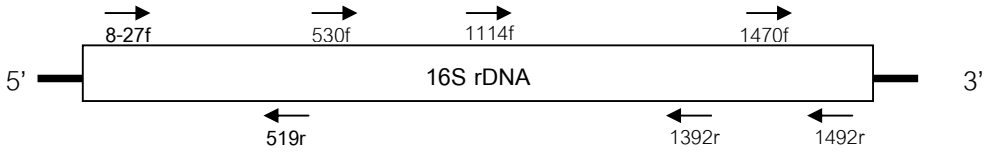
ใช้ QIA quick Gel Extraction kit (QIAGEN) (ภาคผนวก ง)

2.4.4 การเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA กับลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ในฐานข้อมูล

นำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ส่งไปหาลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA โดยใช้ primers ดังตาราง 2 จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้มาตรวจสอบความถูกต้องด้วยตาเปล่าโดยใช้โปรแกรม Chromas version 2.0.1 (Technelysium Pty Limited. Australia) และจัดเรียงต่อสายดีเอ็นเอที่ได้ด้วยโปรแกรม Bioedit version 7.0.9 (Tom Hall, North Carolina State University) แล้วนำลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอไปเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ในฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information :GenBank โดยใช้โปรแกรม Blastn (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) และทำการส่งลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ไปเก็บในฐานข้อมูล European Molecular Biology Laboratory – European Bioinformatics Institute: EMBL- EBI (http://www.ebi.ac.uk)

ตาราง 2 Primers ที่ใช้ในการหาลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA

ชื่อ primer	**ลำดับเบส (5'→3')**	**อ้างอิง**
8-27f	AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG	(Erko;& Michael. 1991)
519r	G(A/T)ATTACCGCGGC(G/T)GCTG	(Erko;& Michael. 1991)
530f	GTGCCAGC(A/C)GCCGCGG	(Erko;& Michael. 1991)
1114f	GCAACGAGCGCAACCC	(Erko;& Michael. 1991)
1392r	ACGGGCGGTGTGT(A/G)C	(Erko;& Michael. 1991)
1492r	TACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT	(Erko;& Michael. 1991)
1450f	GTTTGTAACACCCAAAGCCGG	ได้จากการออกแบบ (ภาคผนวก จ)



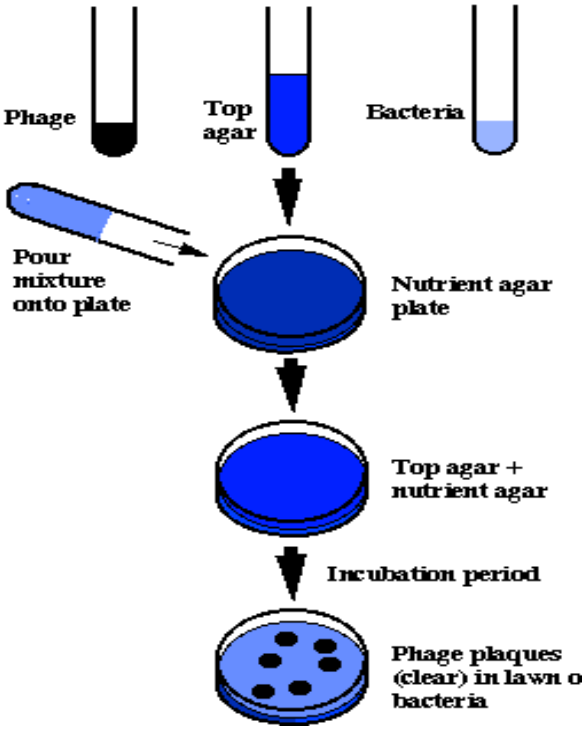
ภาพประกอบ 9 ตำแหน่งการจับของ primers บริเวณ 16S rDNA

3. การแยกแลบเฟจโดยใช้แบคทีเรียกรดแลคติคที่แยกได้เป็นโฮสท์

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคในอาหาร MRS broth บ่มใน candle jar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมเป็นเซลล์แขวนลอยที่มีค่า OD_{600} เท่ากับ 0.6 ดูดมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดทดลองรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ประมาณ 6-7 ชั่วโมง จากนั้นใส่แหนมปริมาณ 25 กรัม ลงไปบ่มต่อไปอีกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปตกตะกอน เพื่อแยกตัวอย่างอาหารและเซลล์ที่ไม่ต้องการออก โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,025xg เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกส่วนน้ำใสมากรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร และนำมาวิเคราะห์ขั้นต่อไปว่ามีแลบเฟจอยู่หรือไม่ (Baross; Liston; & Morita. 1978a: 493; Koga; Toyoshima; & Kawata. 1982: 466)

4. การตรวจสอบแลบเฟจโดยใช้เทคนิคการทำอาหารวุ้นสองชั้น

นำน้ำใสที่ได้จากข้อ 3 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และแบคทีเรียกรดแลคติค ปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาเติมลงในอาหาร MRS broth ที่มีวุ้นร้อยละ 0.5 ที่หลอมเหลวแล้ว บรรจุอยู่ในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันแล้วเททับลงบนอาหาร MRS agar ที่แข็งตัว บ่มใน candle jar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบวงใสหรือพลาคที่เกิดขึ้น ดังแสดงในภาพประกอบ 10 (Baross; Liston; & Morita. 1978b: 501)



ภาพประกอบ 10 การตรวจสอบแลบเฟจโดยเทคนิคการทำอาหารวุ้นสองชั้น

ที่มา: Nester; Robert; & Nester. (1995). *Microbiology*. p. 293.

5. การหาปริมาณของแลบเฟจ

การหาปริมาณของแลบเฟจทำได้โดยเจือจางแลบเฟจในตัวอย่างแบบ serial dilution ให้มีค่าลดลงระดับละสิบเท่า นำสารแขวนลอยของแลบเฟจในแต่ละระดับความเจือจาง และแบคทีเรียกรดแลคติคที่ใช้เป็นโฮสท์มาหาปริมาณแลบเฟจ โดยการทำอาหารวุ้นสองชั้นตามวิธีทดลองในข้อ 4 นับจำนวนพลาคที่เกิดขึ้นแล้วนำไปคำนวณกับอัตราการเจือจาง เพื่อหาค่าความสามารถในการเกิดพลาค (Plaque Forming Unit /ml; PFU/ml) โดยคำนวณได้จากสูตร (Depaola; et al. 1998: 347)

$$\text{ค่าความสามารถในการเกิดพลาค (PFU/ml)} = \frac{\text{จำนวนพลาค}}{\text{ปริมาณเฟจที่ใช้ X ค่าความเจือจาง}}$$

6. การเพิ่มจำนวนของแลบเฟจ

เตรียมแลบเฟจโดยเทคนิคการทำอาหารวุ้นสองชั้น ตามวิธีการทดลองในข้อ 4 หลังจากบ่มไว้เป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง จนมีพลาคเกิดขึ้น ให้เททับหน้าอาหารด้วย MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ประมาณ 2-5 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องเพื่อชะแลบเฟจออกจากผิวหน้าอาหาร จากนั้นแยกตัวอย่างอาหารและเซลล์ที่ไม่ต้องการออก โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,025xg เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนน้ำใสมากรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร เก็บส่วนน้ำใสที่กรองได้ไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Adams, 1958: 447)

7. การหาอัตราส่วนของแลบเฟจต่อโฮสท์ที่เหมาะสมต่อการติดเชื้อ (Multiplicity of Infection; MOI)

นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคที่เจริญใน MRS broth เป็นเวลาไม่เกิน 24 ชั่วโมง มาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่า OD_{600} เท่ากับ 0.8 หรือมีปริมาณเซลล์เท่ากับ 1×10^8 CFU/ml นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคมาทำให้ติดเชื้อด้วยแลบ-เฟจ ให้มีอัตราส่วนของปริมาณเฟจต่อปริมาณโฮสท์ เท่ากับ 0.01, 0.1 และ 1 PFU/CFU บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมงครึ่ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,025xg เป็นเวลา 3 นาที แยกส่วนน้ำใสและตะกอนไปทำการวิเคราะห์ดังนี้ คือ

7.1 ส่วนน้ำใส นำไปกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร และนำไปหาปริมาณเฟจโดยใช้เทคนิคการทำอาหารวุ้นสองชั้น ตามวิธีการทดลองในข้อ 4 นับจำนวนพลาคแล้วนำไปคำนวณค่าความสามารถในการเกิดพลาค

7.2 ส่วนตะกอน นำไปหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่ยังมีชีวิตอยู่ โดยนำเชื้อไปทำเซลล์แขวนลอยในอาหาร MRS broth และทำการเจือจางเชื้อแบบ serial dilution จากนั้นนำเชื้อไปทำการ spread ลงบนอาหาร MRS agar นำไปบ่มไว้ใน candle jar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนเชื้อที่เหลืออยู่ นำไปคำนวณเป็นค่า CFU/ml

ในการทดลองนี้จะใช้เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคที่อยู่ใน MRS broth โดยไม่มีเฟจ และเฟจใน MRS broth ที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติค เป็นตัวควบคุม จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาอัตราส่วนของเฟจต่อโฮสท์ที่เหมาะสมต่อการติดเชื้อจากสูตร

$$\text{อัตราส่วนของเฟจต่อโฮสท์ที่เหมาะสมต่อการติดเชื้อ (PFU/CFU)} = \frac{\text{จำนวนของเฟจ (PFU/ml)}}{\text{จำนวนของโฮสท์ (CFU/ml)}}$$

ค่าอัตราส่วนของปริมาณเฟจต่อปริมาณโฮสท์ที่เหมาะสมต่อการติดเชื้อ ที่ได้ควรมีค่าอยู่ระหว่าง 0.01-1 PFU/CFU เพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีเซลล์แบคทีเรียใดที่มีการติดเชื้อด้วยเฟจมากกว่า 1 ตัว (Birge, 2000: 254)

8. การศึกษาสมบัติของแลบเฟจในการติดเชื้อกับแบคทีเรียกรดแลคติคสายพันธุ์อื่น และจีนัสอื่น

นำเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียกรดแลคติคสปีชีส์อื่น และแบคทีเรียกรดแลคติคจีนัสอื่นที่จะทดสอบ ได้แก่ *W. confusa* NRIC 0207, *W. hellenica* NRIC 0203, *W. paramesenteroides* NRIC 1542 และ *W. thailandensis* FS61-1 (ได้รับความอนุเคราะห์เชื้อทั้ง 4 สปีชีส์จากรองศาสตราจารย์ ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาเติมลงในอาหาร MRS broth ที่มีวุ้นร้อยละ 0.5 ที่หลอมเหลวแล้ว ผสมให้เข้ากันแล้วเททับลงบนอาหาร MRS agar ที่แข็งตัว จากนั้นหยดแลบเฟจที่แยกได้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลความสามารถของแลบเฟจในการติดเชื้อกับแบคทีเรียกรดแลคติคสายพันธุ์อื่นหรือจีนัสอื่นที่นำมาทดสอบ จากการเกิดพลาคบริเวณที่หยดแลบ-เฟจลงไป (Baross; Liston; & Morita. 1978b: 502; Koga; Toyoshima; & Kawata. 1982: 466–470)

9. การศึกษากราฟการเจริญของแลบเฟจ (One-step growth experiment)

นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคที่ถูกติดเชื้อด้วยแลบเฟจเป็นเวลา 10 นาที มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 21,952xg เป็นเวลา 30 วินาที นำส่วนตะกอนมาทำการแขวนลอยในอาหาร MRS broth เก็บตัวอย่างทุก 5-10 นาที เป็นเวลามากกว่า 2 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,025xg เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนใสไปกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร และนำไปหาปริมาณเฟจโดยใช้เทคนิคการทำอาหารวุ้นสองชั้นตามวิธีการทดลองในข้อ 4 นำปริมาณเฟจที่คำนวณได้ไปสร้างกราฟการเจริญของเฟจ โดยกำหนดให้ระยะเวลาตั้งแต่เฟจเริ่มเกาะติดจนถึงเวลาที่เฟจทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกครั้งแรก เป็น latent period และเวลาที่เฟจทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกครั้งแรกเป็นต้นไป เป็นการเริ่ม rise period (Adams, 1959; Ellis; & Delbruck, 1939) และคำนวณ burst size ซึ่งหาได้จากอัตราส่วนของจำนวนเฟจที่ถูกปล่อยออกมาจากเซลล์แบคทีเรียในช่วงสุดท้ายของ latent period ต่อจำนวนเฟจที่ถูกปล่อยออกมาจากเซลล์แบคทีเรียครั้งแรกตามวิธีของ Adams (1959) (Lu; et al. 2003a: 225-235)

10. การศึกษารูปร่างของแลบเฟจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

เตรียมแลบเฟจในอาหารเหลว โดยนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดทดลองรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 6-7 ชั่วโมง ใส่แลบเฟจที่แยกได้ลงไป 100 ไมโครลิตร บ่มต่อไปอีกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปตกตะกอนเพื่อแยกเซลล์ที่ไม่ต้องการออกโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,025xg เป็นเวลา 10 นาที แยกเอาส่วนน้ำใสซึ่งมีแลบเฟจมาเติมเกลือให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 โมลาร์ แช่น้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที และเติมพอลิเอธิลีนไกลคอล 8000 (polyethylene glycol 8000) ร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 21,952xg เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกส่วนน้ำใสทิ้ง และนำแลบเฟจที่ตกตะกอนได้มาส่องดูรูปร่าง โดยนำกริด (grid) วางทับบนตะกอน เป็นเวลา 5 นาที ยกกริดซึ่งจะมีตัวอย่างแลบเฟจ นำมาย้อมด้วย uranyl acetate ร้อยละ 1 นำไปส่องศึกษารูปร่างของแลบเฟจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Depaola; et al. 1998: 347; Ghosh; Ansari; & Datta. 1989: 2241; Sambrook; Fritsch; & Maniatis. 1989: 4.22)

11. การศึกษาผลของไดวาเลนท์แคทไอออนที่มีผลต่อการเข้าเกาะติดโฮสท์ของแลบเฟจ

ทำได้โดยนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคที่เจริญใน MRS broth (ที่มี $CaCl_2$ 0, 10, 20 และ 30 มิลลิโมลาร์) ที่มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 1 x 10^8 CFU/ml มาทำการติดเชื้อด้วยแลบเฟจให้มีค่าอัตราส่วนของปริมาณเฟจต่อปริมาณโฮสท์ที่เหมาะสมต่อการติดเชื้อ เท่ากับ 0.01 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30 และ 45 นาที เก็บตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร นำไปกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร และนำไปหาปริมาณเฟจที่เหลือโดยใช้เทคนิคการทำอาหารวุ้นสองชั้น ตามวิธีการทดลองในข้อ 4 และใช้เฟจในอาหาร MRS broth ที่ไม่มีเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติคเป็นตัวควบคุม (ปริมาณเฟจเริ่มต้น) โดยคำนวณร้อยละของการเข้าเกาะติดโฮสท์ของเฟจจากสูตร (Lu; et al. 2003a: 225-235)

$$\text{ร้อยละของการเข้าเกาะติดของเฟจ} = \frac{(\text{ปริมาณเฟจเริ่มต้น} - \text{ปริมาณเฟจที่เหลือ})}{\text{ปริมาณเฟจเริ่มต้น}} \times 100$$

12. การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการอยู่รอดของแลบเฟจ

นำเฟจมาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่น โดยให้มีปริมาณเฟจสุดท้ายเป็น 10^6 PFU/ml บ่มที่อุณหภูมิ 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บตัวอย่างของเฟจที่ช่วงเวลาต่างๆ มา 1 มิลลิลิตร นำไปหาปริมาณเฟจโดยใช้เทคนิคการทำอาหารวุ้นสองชั้น ตามวิธีการทดลองในข้อ 4 (Lu; et al. 2003a: 225-235)

13. การศึกษาผลของความเป็นกรดด่างต่อความสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อของเฟจ

เจือจางแลบเฟจในแบบ serial dilution ให้มีค่าลดลงระดับละสิบเท่า นำสารแขวนลอยของแลบเฟจในแต่ละระดับความเจือจาง และแบคทีเรียกรดแลคติคที่ใช้เป็นโฮสท์มาหาปริมาณแลบเฟจโดยการทำอาหารวุ้นสองชั้นตามวิธีทดลองในข้อ 4 โดยจะต้องปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหาร MRS broth ที่มีวุ้นร้อยละ 0.5 และ MRS agar ให้มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.4-9.6 บ่มใน candle jar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนพลาคที่เกิดขึ้นแล้วนำไปคำนวณกับอัตราการเจือจาง เพื่อหาค่าความสามารถในการเกิดพลาคตามวิธีการทดลองในข้อ 5

14. การศึกษาผลของแลบเฟจต่อการหมักแหนม

ทำการหมักแหนมโดยใช้เนื้อหมู 600 กรัม ผสมรวมกับกระเทียมสับ 25 กรัม ข้าวสุก 45 กรัม พริกไทย 0.3 กรัม และเกลือ 13 กรัม เมื่อผสมจนเข้ากันดีแล้ว แบ่งออกเป็น 4 ส่วน นำส่วนที่ 1-3 ไปฆ่าเชื้อด้วยแสงอุลตราไวโอเลต นาน 30 นาที และออกแบบการทดลองดังนี้

ส่วนที่ 1 เติมเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคที่แยกได้เพียงอย่างเดียว

ส่วนที่ 2 เติมเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคที่แยกได้ และแลบเฟจ

ส่วนที่ 3 เติมแลบเฟจเพียงอย่างเดียว

ส่วนที่ 4 ปล่อยให้เกิดการหมักโดยธรรมชาติ

นำส่วนผสมทั้ง 4 ส่วน บรรจุถุงพลาสติก ไล่อากาศออกให้หมด มัดด้วยยางให้แน่น บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ จากนั้นนำผลิตภัณฑ์แหนมที่ได้ไปทำการทดลองดังนี้

14.1 การหาค่าความเป็นกรดด่าง

ชั่งตัวอย่างแหนม 5 กรัมใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เขย่าจนเนื้อแหนมกระจายตัวผสมกับน้ำกลั่น ทำการวัดค่าความเป็นกรดด่างด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง

14.2 การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

ชั่งตัวอย่างแหนม 1 กรัมทำการวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด โดยวิธี aerobic plate count method ในอาหาร nutrient agar และทำการวิเคราะห์หาจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติคด้วยอาหาร MRS agar ผสม $CaCO_3$ ร้อยละ 0.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใน candle jar เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นแล้วนำมาคำนวณปริมาณของเซลล์ในรูป CFU/ml

14.3 การตรวจหาแลบเฟจ

ชั่งตัวอย่างแหนม 1 กรัม ใส่ลงใน MRS broth เขย่าให้แหนมแตกตัว จากนั้นนำตัวอย่างไปตกตะกอน เพื่อแยกตัวอย่างอาหารและเซลล์ที่ไม่ต้องการออก โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,025xg เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกส่วนน้ำใสนำมากรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วหาปริมาณเฟจ โดยใช้เทคนิคตามวิธีการทดลองในข้อ 4 นับจำนวนพลาคที่เกิดขึ้นแล้วนำมาคำนวณค่าความสามารถในการเกิดพลาค ตามวิธีการทดลองในข้อ 5

15. การศึกษาดีเอ็นเอของแลบเฟจ

15.1 นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคที่เจริญใน MRS broth เป็นเวลาไม่เกิน 24 ชั่วโมง มาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่า OD_{600} เท่ากับ 0.5 นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคมาทำให้ติดเชื้อด้วยแลบเฟจ ให้มีอัตราส่วนของปริมาณเฟจต่อปริมาณโฮสท์มากกว่า 1 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเก็บตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร ทุกๆ 10 นาที นำตัวอย่างไปตกตะกอน โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,025xg เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนตะกอนไปแช่ในเอทานอล ร้อยละ 95 ที่มีอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำตะกอนมาทำให้ละลายในน้ำแข็ง แล้วแขวนลอยตะกอนด้วย lysis solution (ภาคผนวก ข ข้อ 5) ที่แช่เย็น 400 ไมโครลิตร และเติม lysozyme (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที นำมาเติม sodium dodecyl sulfate ร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) (ภาคผนวก ข ข้อ 1) 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้น ทำการสกัดโปรตีนที่ไม่ต้องการออกโดยเติมฟีนอล 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 21,952xg เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศา-เซลเซียส แยกส่วนใสด้านบนมาเติมคลอโรฟอร์ม แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 21,952xg เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นแยกส่วนใสด้านบนมาทำการตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติมโซเดียมอะซิเตท 3 โมลาร์ ในอัตราส่วนปริมาตร 1 ต่อ 10 (ภาคผนวก ข ข้อ 4) และเอธานอล ที่แช่เย็นร้อยละ 95 ในอัตราส่วนปริมาตร 1 ต่อ 2 แล้วนำไปแช่ที่ตู้ -70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำมาปั่นเหวี่ยงความเร็ว 21,952xg เป็นเวลา 10 นาที ล้างดีเอ็นเออีกครั้งด้วยเอธานอล ร้อยละ 70

ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ดูดเอธานอลทิ้ง จากนั้นนำไประเหยเอธานอลออกใน vacuum chamber ละลายดีเอ็นเอของแลบเฟจด้วยน้ำ nuclease-free ปริมาตร 30-50 ไมโครลิตร (Colin; Joanna; & Todd. 1991: 283-288) แล้วนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาวิเคราะห์ด้วยวิธี อิเล็กโทรโฟเรซิส ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.4.1 (Sambrook; Fritsch; & Maniatis. 1989: 4.22) โดยการตรวจสอบด้วยวิธีนี้ต้องเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda DNA/*Hin*dIII (Fermentas) และ 2-Log DNA Ladder (New England Biolabs)

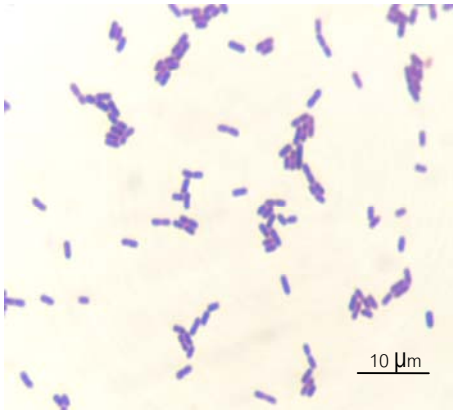
15.2 เมื่อตรวจสอบดีเอ็นเอที่แยกได้ว่าบริสุทธิ์ ให้นำดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ ได้แก่ *Apa*LI, *Eco*RI, *Hin*dIII, *Pst*I, *Bgl*II และ *Nde*I โดยเติมบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมกับเอนไซม์แต่ละชนิดตามที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด จากนั้นบ่มเป็นเวลา 1-3 ชั่วโมง ตรวจสอบแถบของดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟเรซิส เช่นเดียวกับข้อ 2.4.1 โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda DNA/*Hin*dIII (Fermentas) และ 2-Log DNA Ladder (New England Biolabs)

บทที่ 4
ผลการศึกษา

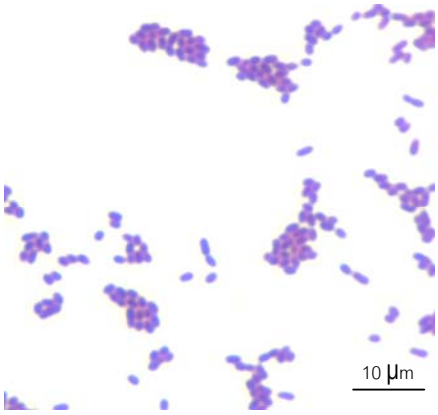
1. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติค

จากการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติคจากตัวอย่างแหนมจำนวน 36 ตัวอย่าง โดยเลือกโคโลนีเดี่ยวที่มีบริเวณใสรอบโคโลนี (ตัวอย่างดังภาพประกอบ 11) บนอาหาร MRS ที่เติม $CaCO_3$ ร้อยละ 0.5 นำมาย้อมสีแกรม (ตัวอย่างดังภาพประกอบ 12) แล้วตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ และทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส คัดเลือกเชื้อที่ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ และไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ได้ 41 ไอโซเลท โดยมีรูปท่อน 26 ไอโซเลท รูปไข่ 11 ไอโซเลท และทรงกลม 4 ไอโซเลท ดังแสดงในตาราง 3

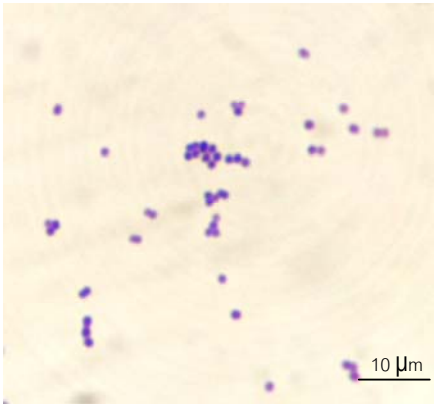
ภาพประกอบ 11 การเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติค ไอโซเลท N22 บนอาหาร MRS ที่เติม $CaCO_3$ ร้อยละ 0.5



ก. เซลล์รูปท่อน



ข. เซลล์รูปไข่



ค. เซลล์รูปทรงกลม

ภาพประกอบ 12 ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียกรดแลคติคที่แยกได้จากแหนม ก. ไอโซเลท N22 (ขนาด 1.4 x 0.9 ไมโครเมตร) ข. ไอโซเลท N2 (ขนาด 1.1 x 0.9 ไมโครเมตร) ค. ไอโซเลท N19 (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 ไมโครเมตร)

ตาราง 3 การคัดแยกแบคทีเรียที่ให้โคโลนีที่มีวงใสบนอาหารแข็ง MRS

ไอโซเลทที่แยกได้	รูปร่าง	สถานที่เก็บ	วัน /เดือน/ปี ที่เก็บตัวอย่าง
N1	รูปท่อน	ตลาดปลาเหมือด จ. เชียงใหม่	10 / 9 / 50
N2	รูปไข่	ตลาดปลาเหมือด จ. เชียงใหม่	10 / 9 / 50
N3	รูปท่อน	ตลาดเจดีย์หลวง จ. เชียงใหม่	11 / 9 / 50
N4	รูปท่อน	ตลาดเจดีย์หลวง จ. เชียงใหม่	11 / 9 / 50
N5	รูปท่อน	ตลาดเจดีย์หลวง จ. เชียงใหม่	11 / 9 / 50
N6	รูปท่อน	ตลาดเจดีย์หลวง จ. เชียงใหม่	11 / 9 / 50
N7	รูปไข่	ตลาดเจดีย์หลวง จ. เชียงใหม่	11 / 9 / 50
N8	รูปท่อน	ตลาดเจดีย์หลวง จ. เชียงใหม่	11 / 9 / 50
N9	รูปไข่	ตลาดเจดีย์หลวง จ. เชียงใหม่	11 / 9 / 50
N10	รูปท่อน	ตลาดเจดีย์หลวง จ. เชียงใหม่	11 / 9 / 50
N11	รูปท่อน	ตลาดเจดีย์หลวง จ. เชียงใหม่	11 / 9 / 50
N12	รูปท่อน	ตลาดเจดีย์หลวง จ. เชียงใหม่	11 / 9 / 50
N13	รูปไข่	ตลาดบางขุนนนท์ กรุงเทพมหานคร	23 / 9 / 50
N14	รูปท่อน	หน้าห้างสรรพสินค้าแม็คโคร สาขาจรัญสนิทวงศ์ กรุงเทพมหานคร	6 / 11 / 50
N15	รูปท่อน	ห้างสรรพสินค้าแม็คโคร สาขาจรัญสนิทวงศ์ กรุงเทพมหานคร	6 / 11 / 50
N16	รูปไข่	หน้าห้างสรรพสินค้าเซ็นทรัล พลาซ่า สาขาปิ่นเกล้า กรุงเทพมหานคร	22 / 11 / 50
N17	รูปท่อน	ตลาดหน้ามหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่	21 / 12 / 50
N18	รูปทรงกลม	ตลาดหน้ามหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ. เชียงใหม่	21 / 12 / 50
N19	รูปทรงกลม	ตลาดหน้ามหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ. เชียงใหม่	21 / 12 / 50
N20	รูปไข่	ตลาดหน้ามหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ. เชียงใหม่	21 / 12 / 50
N21	รูปท่อน	ตลาดหน้ามหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ. เชียงใหม่	21 / 12 / 50
N22	รูปท่อน	ตลาดหน้ามหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ. เชียงใหม่	21 / 12 / 50

ตาราง 3 (ต่อ)

ไอโซเลทที่แยกได้	รูปร่าง	สถานที่เก็บ	วัน /เดือน/ปี ที่เก็บตัวอย่าง
N23	รูปท่อน	ตลาดหน้ามหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ. เชียงใหม่	21 / 12 / 50
N24	รูปไข่	ตลาดบางขุนศรี กรุงเทพมหานคร	9 / 3 / 51
N25	รูปทรงกลม	ตลาดบางขุนนนท์ กรุงเทพมหานคร	16 / 3 / 51
N26	รูปท่อน	ตลาดบางขุนนนท์ กรุงเทพมหานคร	23 / 3 / 51
N27	รูปท่อน	ตลาดบางขุนนนท์ กรุงเทพมหานคร	23 / 3 / 51
N28	รูปไข่	หน้าห้างสรรพสินค้า เทสโก้ โลตัส สาขาปิ่นเกล้า กรุงเทพมหานคร	28 / 3 / 51
N29	รูปทรงกลม	หน้าร้าน seven eleven สาขาชัยพฤกษ์ กรุงเทพมหานคร	30 / 3 / 51
N30	รูปท่อน	หน้า ร้าน seven eleven สาขาชัยพฤกษ์ กรุงเทพมหานคร	30 / 3 / 51
N31	รูปท่อน	หน้า ร้าน seven eleven สาขาชัยพฤกษ์ กรุงเทพมหานคร	30 / 3 / 51
N32	รูปท่อน	หน้า ร้าน seven eleven สาขาชัยพฤกษ์ กรุงเทพมหานคร	30 / 3 / 51
N33	รูปท่อน	หน้าห้างสรรพสินค้าเทสโก้ โลตัส สาขาปิ่นเกล้า กรุงเทพมหานคร	17 / 5 / 51
N34	รูปไข่	ตลาดบางขุนศรี กรุงเทพมหานคร	20 / 5 / 51
N35	รูปท่อน	ตลาดบางขุนศรี กรุงเทพมหานคร	20 / 5 / 51
N36	รูปท่อน	ตลาดบางขุนศรี กรุงเทพมหานคร	20 / 5 / 51
N37	รูปไข่	ตลาดบางขุนนนท์ กรุงเทพมหานคร	25 / 5 / 51
N38	รูปท่อน	ตลาดบางขุนนนท์ กรุงเทพมหานคร	25 / 5 / 51
N39	รูปท่อน	ตลาดบางขุนนนท์ กรุงเทพมหานคร	25 / 5 / 51
N40	รูปไข่	ตลาดบางขุนนนท์ กรุงเทพมหานคร	30 / 6 / 51
N41	รูปท่อน	หน้าห้างสรรพสินค้าแม็คโคร สาขาจรัญสนิทวงศ์ กรุงเทพมหานคร	30 / 6 / 51

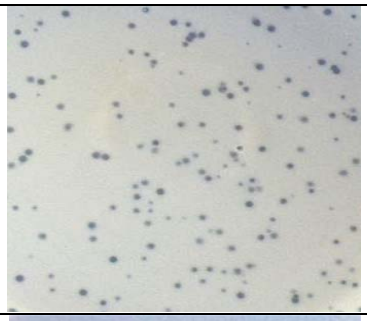
2. การคัดแยกแลบเฟจโดยใช้เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคที่แยกได้เป็นโฮสท์

นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคทั้ง 41 ไอโซเลท ที่แยกได้มาเป็นโฮสท์สำหรับแยกแลบเฟจจากตัวอย่างแหนม โดยวิธีการส่งเสริมการเจริญตามวิธีการทดลองในข้อ 3 จากนั้นเก็บตัวอย่างน้ำใสที่คาดว่ามีแลบเฟจ จำนวน 41 ตัวอย่าง ไปวิเคราะห์ในขั้นต่อไป

3. การตรวจสอบแลบเฟจและหาปริมาณแลบเฟจ

นำตัวอย่างน้ำใสที่ได้มาตรวจสอบว่ามีแลบเฟจหรือไม่ โดยใช้เทคนิคการทำอาหารวุ้นสองชั้นตามวิธีการทดลองในข้อ 4 แล้วตรวจสอบปริมาณพลาคที่เกิดขึ้น จากนั้นนำมาแยกเป็นพลาคเดี่ยว (single plaque isolation) พบว่าสามารถแยกแลบเฟจได้ 2 ตัว คือเฟจ Φ22b และ Φ22s โดยใช้แบคทีเรียกรดแลคติค N22 เป็นโฮสท์ ซึ่งลักษณะพลาคของแลบเฟจทั้งสองตัวมีขนาดแตกต่างกัน จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนแลบเฟจตามวิธีการทดลองในข้อ 6 โดยลักษณะของพลาค และจำนวนพลาคหลังจากทำการเพิ่มจำนวนแลบเฟจแสดงดังตาราง 4 ซึ่งจากลักษณะพลาคใสที่ได้แสดงว่าเฟจทั้งสองตัวเป็นไลติคเฟจ

ตาราง 4 ลักษณะของพลาคและจำนวนพลาคหลังจากทำการเพิ่มจำนวนแลบเฟจ

เฟจ	จำนวนพลาค (PFU/ml)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของพลาค (มิลลิเมตร)	ลักษณะของพลาค	รูปร่างของพลาค
Φ22b	4.5×10^9	1-1.2	ใส	
Φ22s	4.0×10^9	0.5 -0.7	ใส	

4. การจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียแลคติดที่แยกเฟจได้

4.1 การจัดจำแนกในระดับจีนัส

เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติคไอโซเลท N22 ซึ่งเป็นโฮสท์ที่แยกเฟจได้ มาทดสอบการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคส และการเจริญในสภาวะต่างๆ พบว่าได้ผลดังแสดงในตาราง 5 คือ สามารถสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคส เจริญที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส เจริญได้ในที่มีเกลือ 6.5 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่เจริญในอาหารที่มีเกลือ 18 เปอร์เซ็นต์ ไม่เจริญในอาหารที่มีความเป็นกรดด่าง pH 4.4 แต่เจริญได้ในอาหารที่มีความเป็นกรดด่าง 9.6 (Axelsson. 1998: 1-23)

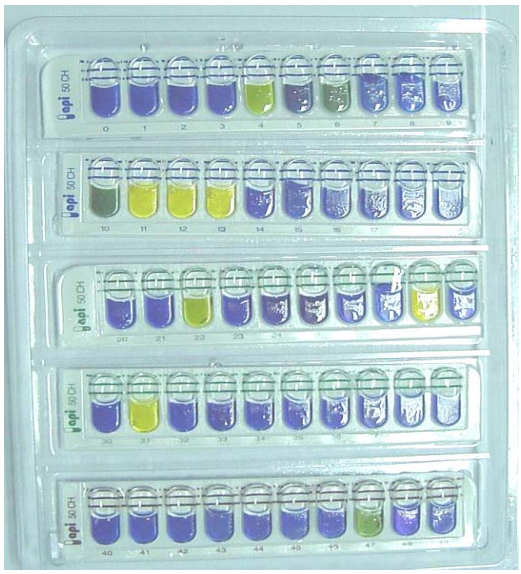
ตาราง 5 ลักษณะบางประการของแบคทีเรียกรดแลคติคไอโซเลท N22

ลักษณะที่ใช้ทดสอบ	ผลการทดสอบ
รูปร่าง	rod
Catalase test	-
Gram stain	Gram positive
Gas from glucose	+
Growth at 10°C	+
Growth at 45°C	+
Growth in 4% NaCl	+
Growth in 6.5% NaCl	+
Growth in 18% NaCl	-
Growth at pH 4.4	-
Growth at pH 7.0	+
Growth at pH 8.5	+
Growth at pH 9.6	+

หมายเหตุ: + = ให้ผลบวก, - = ให้ผลลบ

4.2 การจัดจำแนกในระดับสปีชีส์โดยใช้ชุดจำแนกแบคทีเรียสำเร็จรูป API 50 CHL

เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติคไอโซเลท N22 มาจัดจำแนกในระดับสปีชีส์โดยใช้ชุดจำแนกแบคทีเรียชนิดสำเร็จรูป API 50 CHL (BioMerieux, France) พบว่าได้ผลดังแสดงในภาพประกอบ 13 และตาราง 6 เมื่อนำผลที่ได้ไปผ่านการประมวลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้สำหรับชุดจัดจำแนก API 50 CHL พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติคไอโซเลท N22 ถูกจัดจำแนกเป็น *Weissella viridescens* ที่ระดับความเหมือน (% identity) 91.8 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพประกอบ 14



ภาพประกอบ 13 ผลการจัดจำแนกเชื้อ N22 ด้วยชุดจำแนกแบคทีเรียชนิดสำเร็จรูป API 50 CHL (BioMerieux, France)

ตาราง 6 การจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติคไอโซเลท N22 ด้วยชุดจำแนกแบคทีเรียชนิดสำเร็จรูป API 50 CHL (หมายเหตุ: + = ผลบวก, - = ผลลบ, ? = ผลไม่ชัดเจน)

ลักษณะที่ใช้ทดสอบ	ผลการทดสอบ		
	ไอโซเลท N22	*W. viridescens* ATCC 33313	*W. cibaria* LMG 17699
Glycerol	-	-	-
Erythritol	-	-	-
D-arabinose	-	-	-
L- arabinose	?	?	+
D-ribose	-	-	-
D-xylose	?	?	+
L-xylose	-	-	-
D-adonitol	-	-	-
Methyl-β-D-xylopyranoside	-	-	-
D-galactose	?	?	-
D-glucose	+	+	+
D-fructose	+	+	+
D-mannose	+	+	+
L-sorbose	-	-	-
L-rhamnose	-	-	-
Dulcitol	-	-	-
Inositol	-	-	-
D-manitol	-	-	-
D-sorbitol	-	-	-
Methyl-α-D-mannopyranoside	-	-	-
Methyl-α-D-glucopyranoside	-	-	-
N-acetylglucosamine	+	+	+
Amygdalin	-	-	+
Arbutin	-	-	+

ตาราง 6 (ต่อ)

ลักษณะที่ใช้ทดสอบ	ผลการทดสอบ		
	ไอโซเลท N22	*W. viridescens* ATCC 33313	*W. cibaria* LMG 17699
Esculin ferric citrate	-	-	+
Salicin	-	-	+
D-cellobiose	-	-	+
D-maltose	+	+	+
D-lactose (bovine origin)	-	-	-
D-melibiose	-	-	-
D-saccharose (sucrose)	+	+	+
D-trehalose	-	+	-
Inulin	-	-	-
D-melezitose	-	-	-
D-raffinose	-	-	-
Amidon (starch)	-	-	-
Glycogen	-	-	-
Xylitol	-	-	-
Gentiobiose	-	?	+
D-turanose	-	-	-
D-lyxose	-	-	-
D-tagatose	-	-	-
D-fucose	-	-	-
L-fucose	-	-	-
D-arabitol	-	-	-
L-arabitol	-	-	-
Potassium gluconate	+	+	-
Potassium 2-ketogluconate	-	-	-
Potassium 5-ketogluconate	-	-	-

LOW DISCRIMINATION	
Strip	API 50 CHL V5.1
Profile	- - - - ? - ? - - - ? + + + - - - - - - - - + - - - - - + - - + - - - - - - - - - - - - - - - + - -
Note	

Significant taxa	% ID	T	Tests against					
Weissella viridescens	91.8	0.55	TRE	93%	GNT	25%		
Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii	7.7	0.55	GNT	2%				

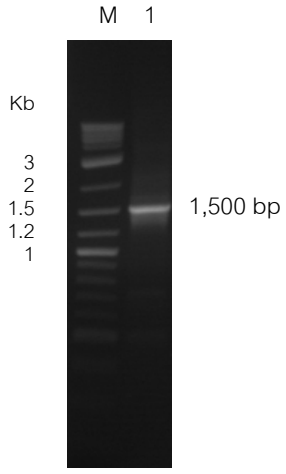
Next taxon	% ID	T	Tests against					
Leuconostoc lactis	0.3	0.4	LAC	99%	GNT	5%		

Complementary test(s)	GLUCOSEg	15°C	45°C	
Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii	-	-	+	
Weissella viridescens	+	+	-	

ภาพประกอบ 14 ผลการจัดจำแนกเชื้อ N22 ด้วยชุดจำแนกแบคทีเรียชนิดสำเร็จรูป API 50 CHL (BioMerieux, France) ที่ผ่านการประมวลผลจากโปรแกรมแล้ว

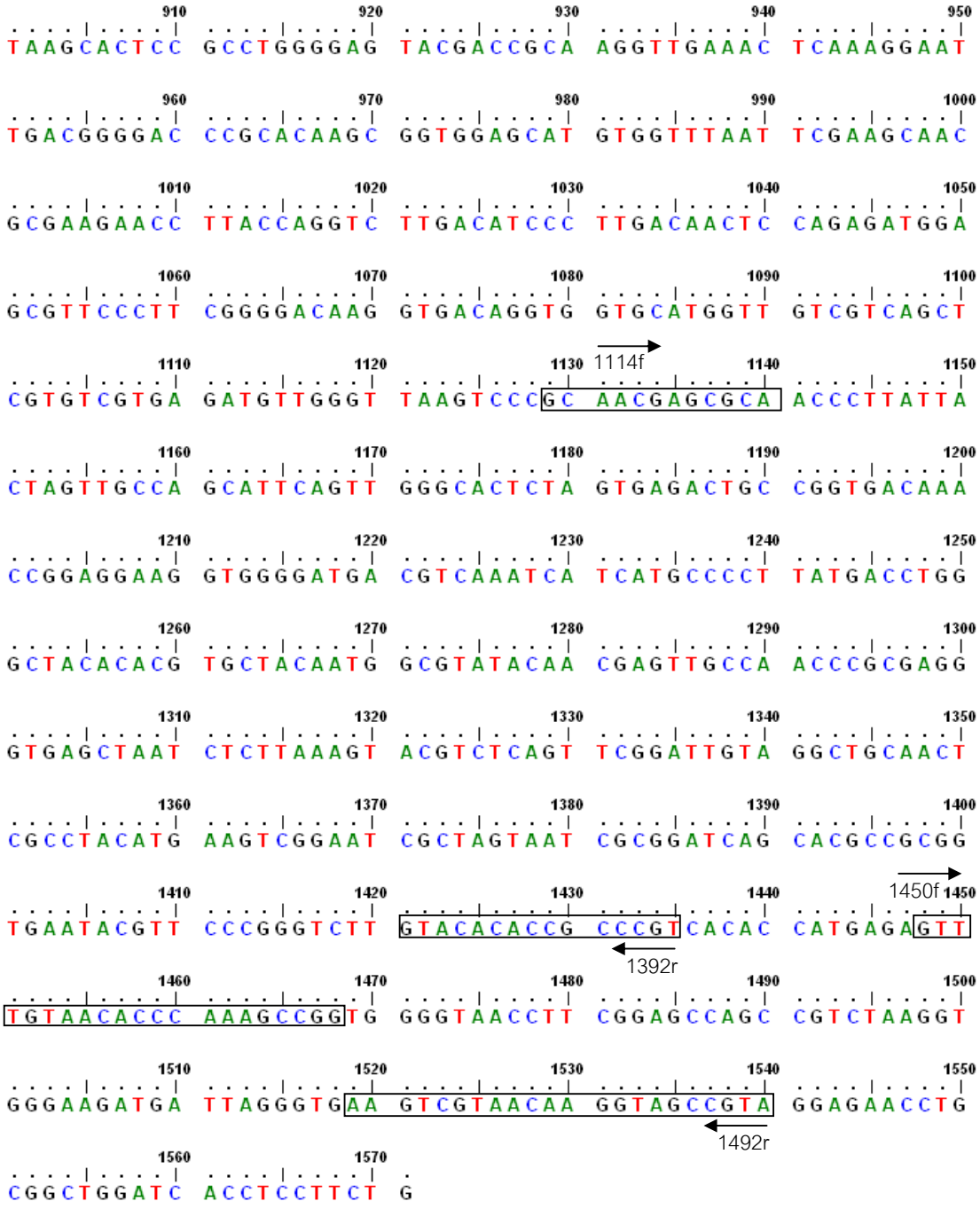
4.2 การจัดจำแนกในระดับสปีชีส์ โดยอาศัยลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA

เมื่อทำการสกัดดีเอ็นเอของโฮสท์ N22 แล้วนำไปเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA โดยการทำ Polymerase Chain Reaction พบว่าชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส (base pair; bp) (ภาพประกอบ 15) เมื่อนำมาจำแนกสปีชีส์โดยเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA แสดงดังภาพประกอบ 16 ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าโฮสท์ N22 มีความคล้ายคลึงกับ *Weissella cibaria* (GenBank accession number AB362617) ร้อยละ 99 แสดงดังภาพประกอบ 17 และจากการส่งลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ (1,571 คู่เบส) ไปเก็บในฐานข้อมูล EMBL ได้รับ accession number คือ FN330974 (ภาคผนวก ฉ)



ภาพประกอบ 15 ผลการเพิ่มจำนวนบริเวณ 16S rDNA จากดีเอ็นเอของแบคทีเรียกรดแลคติค ไอโซเลท N22 โดยการทำ Polymerase Chain Reaction (แถว M คือ 2-Log DNA Ladder, แถวที่ 1 คือ ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR)

8-27f
530f
519r



ภาพประกอบ 16 ลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ในแบคทีเรียกรดแลคติคไอโซเลท N22 และตำแหน่งการจับของ primers (ลูกศรแสดงทิศทางของ primers)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AB362617.1	Weissella cibaria gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NRIC	2874	2874	99%	0.0	99%
DQ294961.1	Weissella cibaria strain Uqa49-1 16S rRNA gene, complete sequenc	2861	2861	99%	0.0	99%
AB362614.1	Weissella cibaria gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NRIC	2844	2844	98%	0.0	99%
DQ321751.1	Weissella confusa strain Inje LM S-338 16S ribosomal RNA gene, pa	2835	2835	99%	0.0	99%
DQ294963.1	Weissella cibaria strain Uqa63-2 16S rRNA gene, complete sequenc	2815	2815	98%	0.0	99%
AJ422031.1	Weissella cibaria 16S rRNA gene, strain ACA-DC 3411t2	2806	2806	97%	0.0	99%
FJ611786.1	Weissella sp. PSMS4-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2804	2804	97%	0.0	99%
AM491820.1	Weissella cibaria partial 16S rRNA gene, isolate R-32690	2804	2804	97%	0.0	99%
DQ294965.1	Weissella cibaria strain Uqa41 16S rRNA gene, complete sequence	2804	2804	98%	0.0	99%
DQ294962.1	Weissella cibaria strain Uqa57 16S rRNA gene, complete sequence	2804	2804	98%	0.0	99%
FJ377714.1	Weissella cibaria strain RSD09 16S ribosomal RNA gene, partial seq	2802	2802	97%	0.0	99%
AJ295989.1	Weissella cibaria partial 16S rRNA gene, strain LMG 17699T	2800	2800	97%	0.0	99%
EU157913.1	Weissella sp. MMZ50B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2780	2780	98%	0.0	99%
AM420124.1	Uncultured Weissella sp. partial 16S rRNA gene, clone 401F04(oral)	2771	2771	97%	0.0	99%
DQ860024.1	Uncultured bacterium clone F1H 16S ribosomal RNA gene, partial se	2763	2763	98%	0.0	99%
AF312874.1	Weissella kimchii 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2763	2763	96%	0.0	99%
AF477495.1	Weissella confusa strain PL9001 16S ribosomal RNA gene, complete	2760	2760	96%	0.0	99%
AF515221.1	Weissella kimchii strain RO5 16S ribosomal RNA gene, complete se	2750	2750	97%	0.0	99%
AF252318.1	Uncultured bacterium pPD5 16S ribosomal RNA gene, partial sequer	2748	2748	95%	0.0	99%
DQ294967.1	Weissella sp. Uqa65-2 16S rRNA gene, complete sequence	2748	2748	99%	0.0	98%
AM157435.1	Weissella cibaria 16S rRNA gene, clone 9C4	2748	2748	97%	0.0	98%

ภาพประกอบ 17 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ในแบคทีเรียกรดแลคติคไอโซเลท N22 กับลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม Blastn

5. การหาอัตราส่วนของแลบเฟจต่อโฮสท์ที่เหมาะสมต่อการติดเชื้อ และการศึกษาสมบัติของแลบเฟจในการติดเชื้อกับแบคทีเรียกรดแลคติคสายพันธุ์อื่น และจีนัสอื่น

เฟจทั้งสองตัวมีอัตราส่วนของแลบเฟจต่อโฮสท์ที่เหมาะสมต่อการติดเชื้อ เท่ากับ 0.01 PFU/CFU แสดงดังตาราง 7 โดยพบว่าได้ปริมาณเฟจสูงสุดเท่ากับ 3.5×10^9 และ 1.9×10^9 PFU ต่อมิลลิลิตร สำหรับเฟจ **Φ**22b และ **Φ**22s ตามลำดับ แลบเฟจทั้งสองตัวไม่สามารถติดเชื้อกับแบคทีเรียกรดแลคติคสปีชีส์อื่น ได้แก่ *W. confusa* NRIC 0207, *W. hellenica* NRIC 0203, *W. paramesenteroides* NRIC 1542 และ *W. thailandensis* FS61-1 และแบคทีเรียกรดแลคติคจีนัสอื่น ได้แก่ แบคทีเรียกรดแลคติคทั้งหมดที่แยกได้จากตัวอย่างแหนม จำนวน 40 ไอโซเลท และ *Lactobacillus sakei* ATCC 15521

ตาราง 7 ผลการทดลองอัตราส่วนของแลบเฟจต่อโฮสท์ที่เหมาะสมต่อการติดเชื้อ

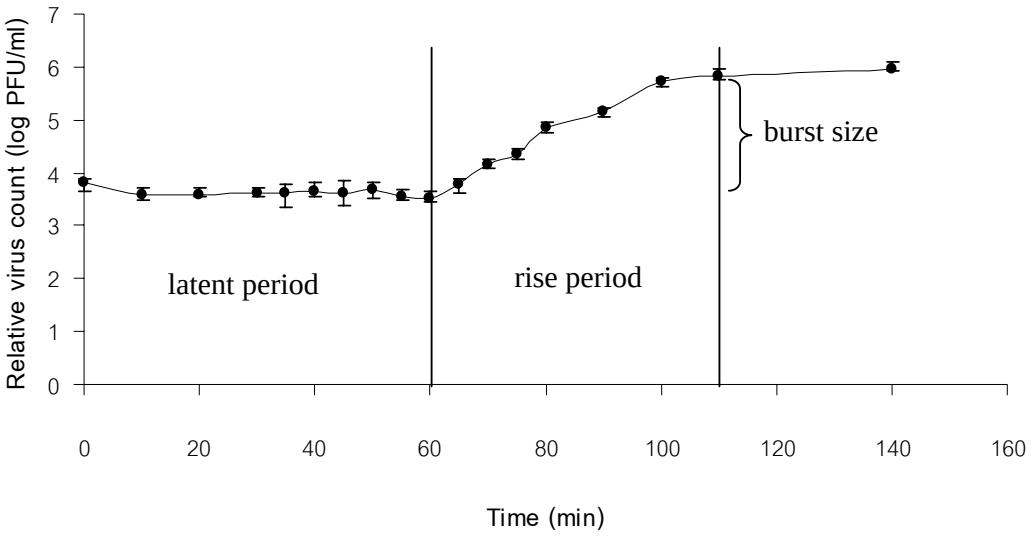
อัตราส่วนของแลบเฟจต่อโฮสท์ PFU/CFU	Φ22b		Φ22s	
	จำนวนพลาค (PFU/ml)	จำนวนโฮสท์ (CFU/ml)	จำนวนพลาค (PFU/ml)	จำนวนโฮสท์ (CFU/ml)
1	1.2×10^{7}	0	8×10^{6}	0
0.1	4.7×10^{8}	51	5.1×10^{8}	114
0.01	3.5×10^{9}	8×10^{2}	1.9×10^{9}	4.2×10^{3}

6. การศึกษากราฟการเจริญของแลบเฟจ

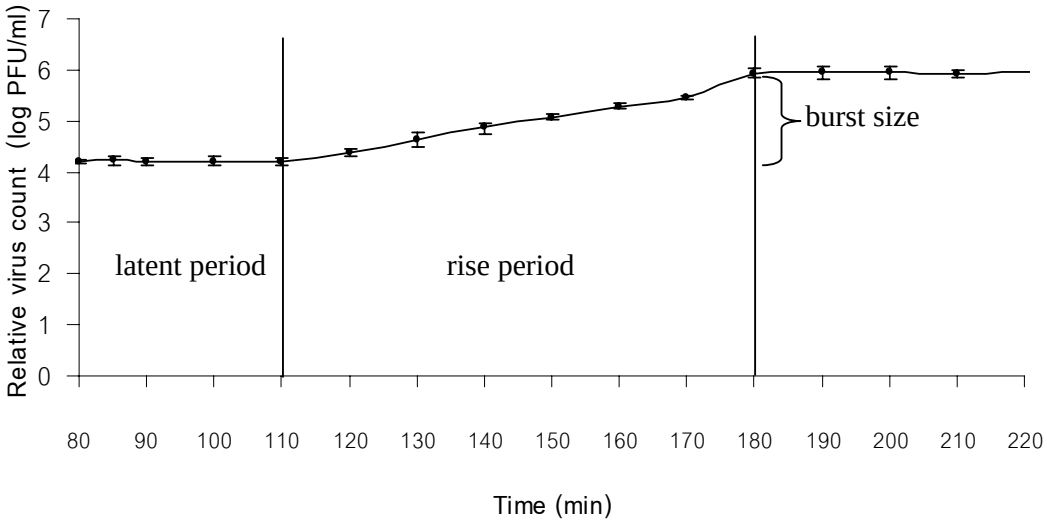
จากการศึกษากราฟการเจริญของเฟจ Φ22b และ Φ22s (ภาพประกอบ 18 และ 19) สามารถสรุป latent period, rise period และคำนวณ burst size ได้ดังตาราง 8

ตาราง 8 สรุประยะการเจริญต่างๆ และ burst size ของเฟจ Φ22b และ Φ22s

เฟจ	latent period (นาที)	rise period (นาที)	burst size (phages particles/infected cell)
Φ22b	60	50	152
Φ22s	110	70	55



ภาพประกอบ 18 กราฟการเจริญของเฟจ Φ22b

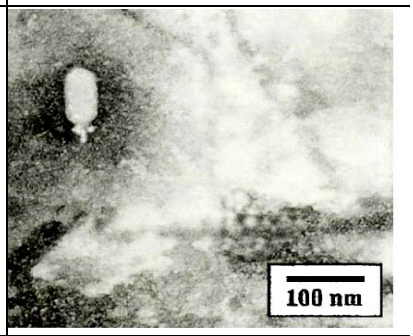
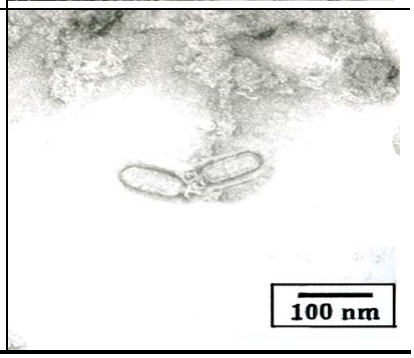


ภาพประกอบ 19 กราฟการเจริญของเฟจ Φ22s

7. การศึกษารูปร่างของแลบเฟจ

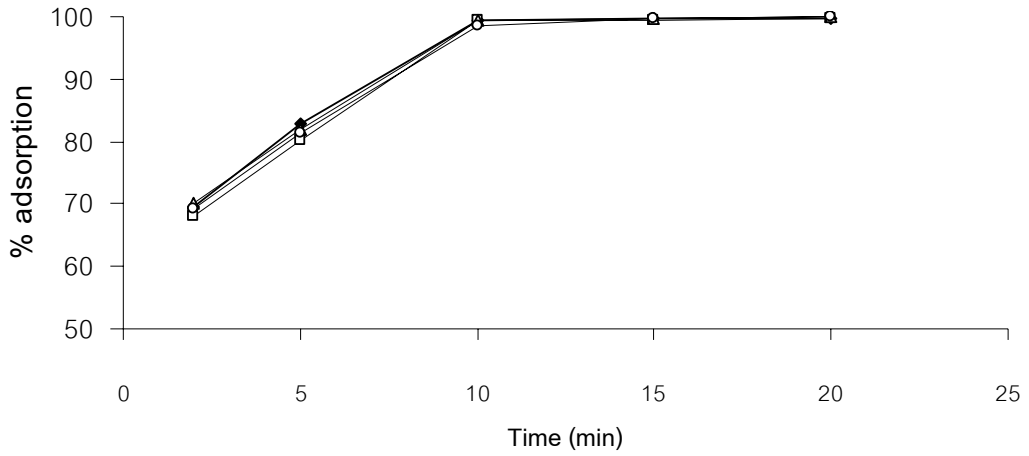
เมื่อนำเฟจทั้งสองตัวไปศึกษารูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องผ่าน ซึ่งผลการศึกษาแสดงดังตาราง 9 พบว่าเฟจทั้งสองตัวจัดอยู่ในกลุ่ม C ตามวิธีของ Bradley และอยู่ใน Family Podoviridae ตามวิธีของคณะกรรมการสากลว่าด้วยการจัดอนุกรมวิธานของไวรัส

ตาราง 9 ผลการศึกษารูปร่างของเฟจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องผ่าน

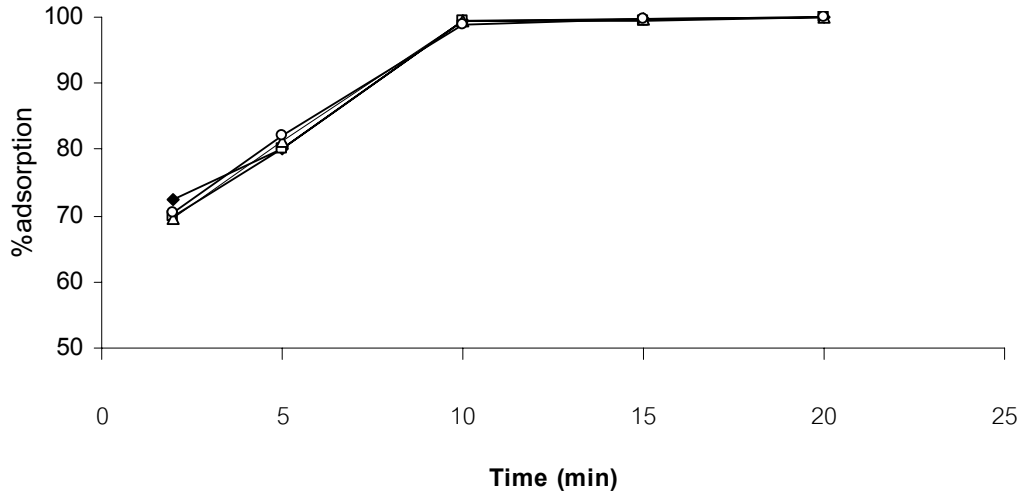
เฟจ	ขนาดส่วนหัว (นาโนเมตร^2)	ความยาวส่วนหาง (นาโนเมตร)	รูปร่างของเฟจ
Φ22b	92 x 50	25	
Φ22s	91 x 36	27	

8. การศึกษาผลของไดวาเลนท์แคทไอออนที่มีผลต่อการเข้าเกาะติดโฮสท์ของแลบเฟจ

จากการศึกษาการเข้าเกาะติดโฮสท์ของเฟจทั้งสองตัวพบว่า เฟจ Φ22b สามารถเข้าเกาะติดที่ผิวเซลล์ของโฮสท์ ได้ร้อยละ 69, 81 และ 99 ในระยะเวลา 2, 5 และ 10 นาที ตามลำดับ (ภาพประกอบ 20) ส่วนเฟจ Φ22s สามารถเข้าเกาะติดที่ผิวเซลล์ของโฮสท์ ได้ร้อยละ 70, 81 และ 99 ในระยะเวลา 2, 5 และ 10 นาที ตามลำดับ (ภาพประกอบ 21) นอกจากนี้การเข้าเกาะติดโฮสท์ของแลบเฟจในอาหารเหลว MRS ที่ไม่มีการเติม $CaCl_2$ ให้ผลไม่ต่างกับในอาหารเหลวที่มีการเติม $CaCl_2$ 10, 20 และ 30 มิลลิโมลาร์



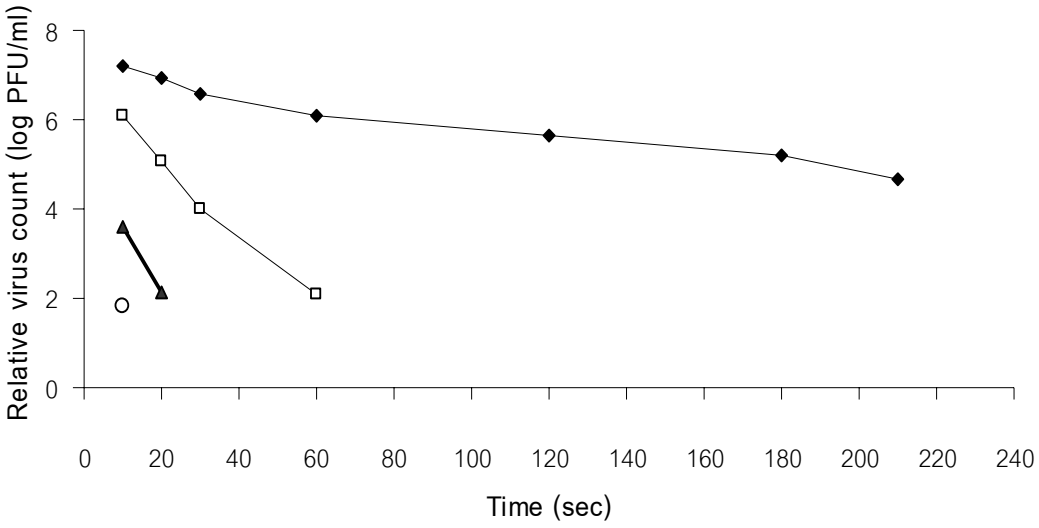
ภาพประกอบ 20 การเข้าเกาะติดของเฟจ Φ22b ในอาหารที่มี $CaCl_2$ 0 มิลลิโมลาร์ (◆), 10 มิลลิ-โมลาร์ (□), 20 มิลลิโมลาร์ (△) และ 30 มิลลิโมลาร์ (o)



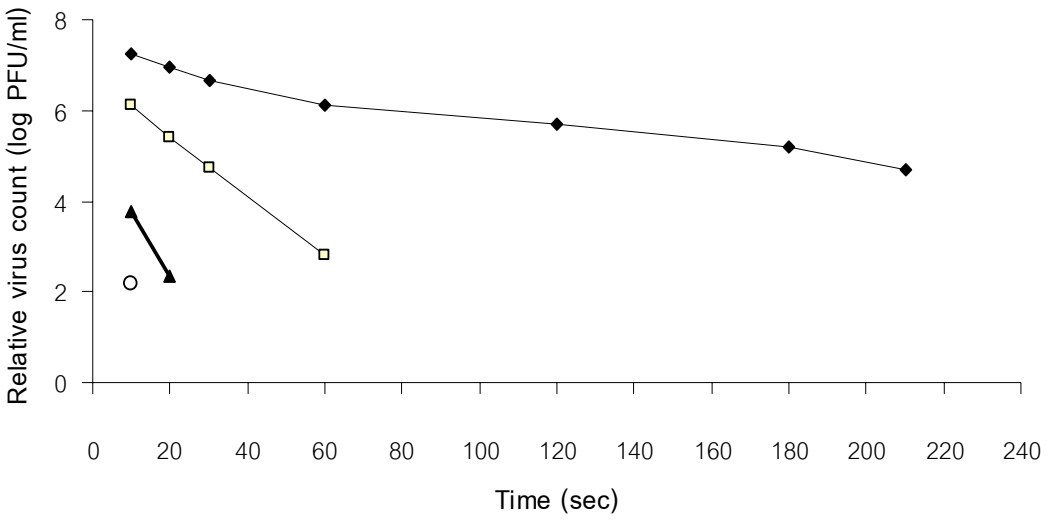
ภาพประกอบ 21 การเข้าเกาะติดของเฟจ Φ22s ในอาหารที่มี $CaCl_2$ 0 มิลลิโมลาร์ (◆),10 มิลลิ-โมลาร์ (□), 20 มิลลิโมลาร์ (△) และ 30 มิลลิโมลาร์ (o)

9. การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการอยู่รอดของแลบเฟจ

เมื่อนำแลบเฟจทั้งสองตัวที่มีค่าความสามารถในการเกิดพลาคเท่ากับ 10^6 PFU/ml บ่มที่อุณหภูมิ 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส พบว่าค่า *D* values (ระยะเวลาที่ทำให้ปริมาณเฟจลดลง 1 log PFU/ml ณ อุณหภูมินั้น) ของ **Φ**22b สามารถคำนวณได้เท่ากับ 60 วินาที ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และ 10 วินาที ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ส่วนค่า *D* values ของ **Φ**22s สามารถคำนวณได้เท่ากับ 60 วินาที ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และ 15 วินาที ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส และปริมาณเฟจทั้งสองตัวจะลดลงจนไม่สามารถตรวจสอบได้ ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ระยะเวลามากกว่า 60 วินาที หรือที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลามากกว่า 20 วินาที หรือที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ระยะเวลามากกว่า 10 วินาที ดังแสดงในภาพประกอบ 22 และ 23



ภาพประกอบ 22 ผลของอุณหภูมิต่อการอยู่รอดของเฟจของเฟจ **Φ**22b ที่อุณหภูมิ 70 (◆), 80 (□), 90 (▲) และ 100 (o) องศาเซลเซียส



ภาพประกอบ 23 ผลของอุณหภูมิต่อการอยู่รอดของเฟจของเฟจ Φ22s ที่อุณหภูมิ 70 (◆), 80 (□), 90 (▲) และ 100 (o) องศาเซลเซียส

10. การศึกษาผลของความเป็นกรดด่างต่อความสามารถในการติดเชื้อของเฟจ

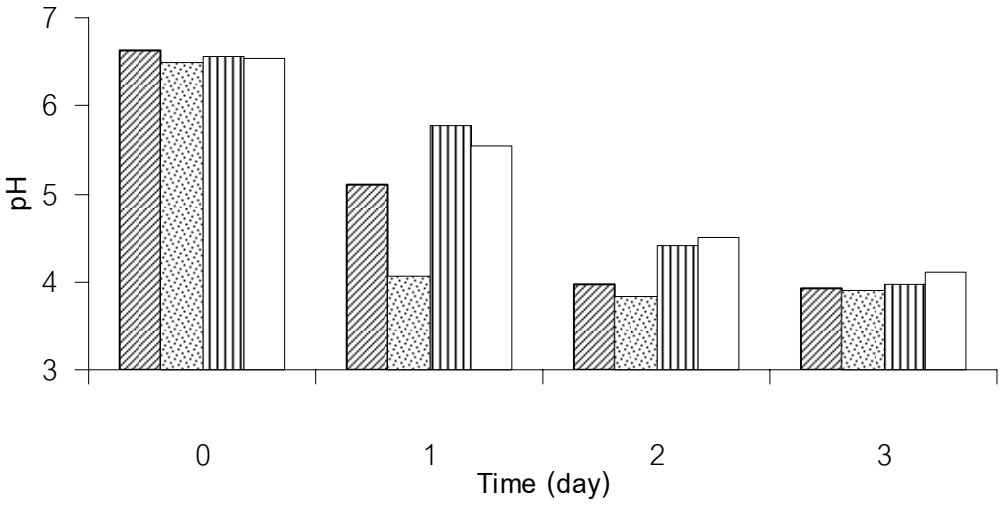
เมื่อทำการปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหาร MRS broth ที่มีวุ้นร้อยละ 0.5 และ MRS agar ให้มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.4-9.6 ในการเตรียมการทำอาหารวุ้น 2 ชั้นเพื่อทดสอบปริมาณพลาคที่เกิดขึ้น พบว่าเฟจ Φ22b และ Φ22s สามารถทำเกิดการติดเชื้อในโฮสท์ได้ดีที่สุดในอาหารที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 โดยมีค่าความสามารถที่ทำให้เกิดพลาคเท่ากับ 3.1 x 10^9 PFU/ml และ 1.4 x 10^9 PFU/ml ตามลำดับ และไม่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อในโฮสท์ที่ค่าความเป็นกรดด่างน้อยกว่าหรือเท่ากับ 4.4 และมากกว่าหรือเท่ากับ 9.6 ดังแสดงในตาราง 10

ตาราง 10 ความสามารถในการเกิดพลาค ที่ความเป็นกรดด่างต่างๆ

ค่าความเป็นกรดด่าง	ค่าความสามารถในการเกิดพลาคของเฟจ Φ22b (PFU/ml)	ค่าความสามารถในการเกิดพลาคของเฟจ Φ22s (PFU/ml)
4.4	0	0
5	4.4×10^6	7.4×10^6
6	1.1×10^8	1.1×10^8
7	3.1×10^9	1.4×10^9
8	8.4×10^8	4×10^8
9.6	0	0

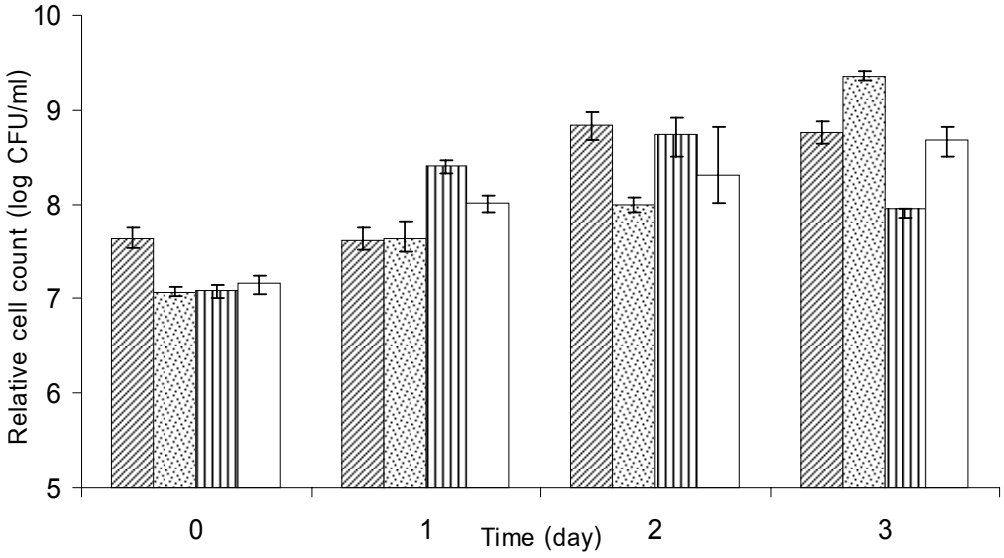
11. การศึกษาผลของแลบเฟจต่อการหมักแหนม

เมื่อทำการหมักแหนมในสภาวะที่ต่างกันตามวิธีการทดลองข้อ 15 แล้วนำไปหาค่าความเป็นกรดด่างของแหนมที่เปลี่ยนแปลงตลอดเวลาของการหมักแหนม (ภาพประกอบ 24) พบว่าการหมักแหนมโดยมีการเติมเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติดเพียงอย่างเดียวลงไป จะทำให้ความเป็นกรดด่างของแหนมลดลงมาอยู่ในค่าปกติของแหนม (ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5-5.3) ได้ภายใน 24 ชั่วโมง แต่การเติมเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคที่มีการเติมเฟจของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคลงไปในการหมักแหนมด้วยจะทำให้ค่าความเป็นกรดด่างของแหนมลดลงช้ากว่าปกติ กล่าวคือต้องใช้เวลาหมักนานกว่า 24 ชั่วโมง ซึ่งไม่มีความแตกต่างกับการเติมเฟจเพียงอย่างเดียวหรือการปล่อยให้เกิดการหมักโดยธรรมชาติ

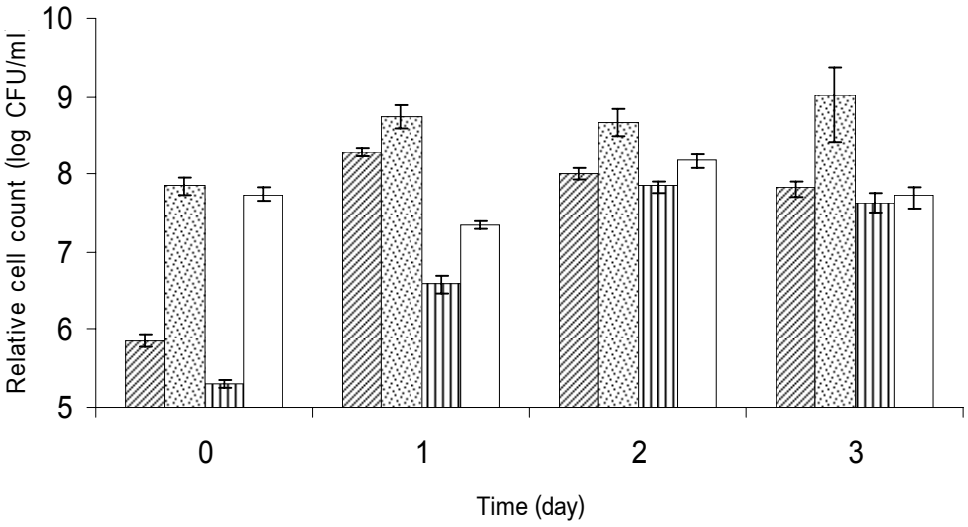


ภาพประกอบ 24 กราฟความเป็นกรดด่างของแหนมที่เปลี่ยนไปตลอดเวลาของการหมักแหนม [การหมักโดยธรรมชาติ (▨), เติมเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคไอโซเลท N22 เพียงอย่างเดียว (▩), เติมแลบเฟจเพียงอย่างเดียว (▥), เติมเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคไอโซเลท N22 และแลบเฟจ (□)]

การตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและปริมาณของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคในแหนมพบว่าปริมาณจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการหมักที่เพิ่มขึ้น ดังแสดงในภาพประกอบ 25 และ 26 แต่ในการหมักแหนมที่มีการเติมเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคที่เติมเฟจของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคลงไปในการหมักแหนมด้วยนั้น จะทำให้ปริมาณของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคลดลงในวันแรกของการหมักแต่จะค่อยๆ เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการหมักที่นานขึ้น

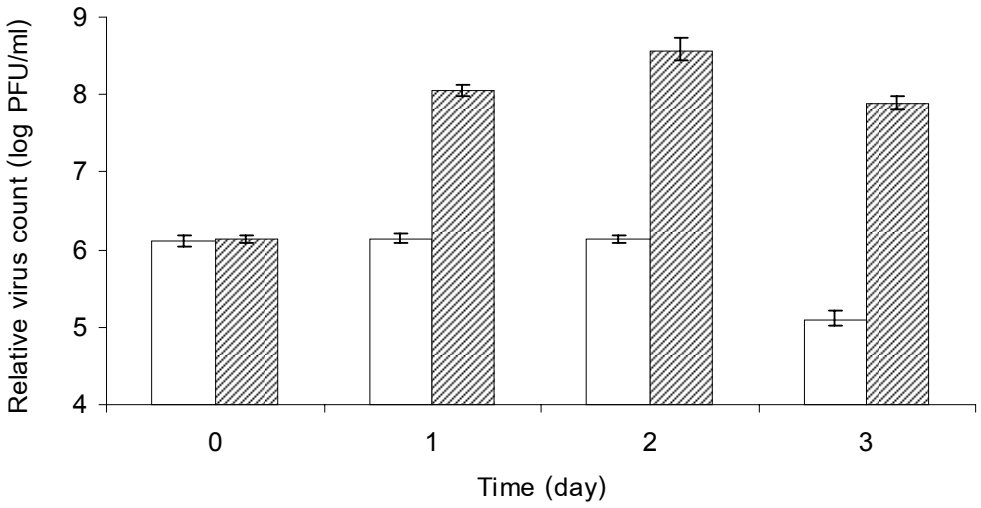


ภาพประกอบ 25 กราฟปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดตลอดระยะเวลาของการหมักแหนม [การหมักโดยธรรมชาติ (▨), เติมเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคไอโซเลท N 2 2 เพียงอย่างเดียว (⬚), เติมแลบเฟจเพียงอย่างเดียว (▥), เติมเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคไอโซเลท N22 และแลบเฟจ (□)]



ภาพประกอบ 26 กราฟปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติคทั้งหมดตลอดระยะเวลาของการหมักแหนม [การหมักโดยธรรมชาติ (▨), เติมเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคไอโซเลท N22 เพียงอย่างเดียว (▩), เติมแลบเฟจเพียงอย่างเดียว (▥), เติมเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคไอโซเลท N22 และแลบเฟจ (□)]

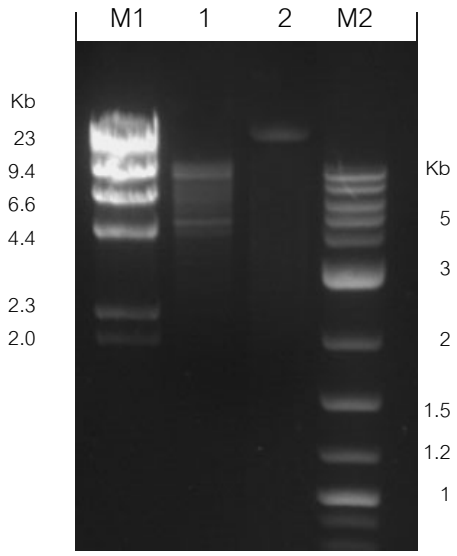
การตรวจหาปริมาณของเฟจที่อยู่ในแหนม (ภาพประกอบ 27) พบว่าในแหนมที่มีการเติมเฟจลงไปเพียงอย่างเดียว เฟจจะสามารถอยู่รอดได้แต่จะไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ และปริมาณของเฟจจะลดลงหลังการหมักผ่านไปมากกว่า 72 ชั่วโมง ส่วนการเติมเฟจพร้อมกับโฮสท์ในการหมักแหนม พบว่าเฟจจะสามารถเพิ่มจำนวนได้ แต่จะเริ่มมีปริมาณลดลงหลังการหมักผ่านไปมากกว่า 72 ชั่วโมง



ภาพประกอบ 27 กราฟเฟจ **Φ**22b และ **Φ**22s ตลอดระยะเวลาของการหมักแหนม [เติมแลบเฟจเพียงอย่างเดียว (□), เติมเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคไอโซเลท N22 และแลบเฟจ (▨)]

12. การศึกษาดีเอ็นเอของแลบเฟจ

ได้สกัดดีเอ็นเอของแลบเฟจทั้ง 2 ตัว คือ **Φ**22b และ **Φ**22s ตามวิธีการทดลองในข้อ 15 จากนั้นนำดีเอ็นเอของแลบเฟจมาตรวจสอบความบริสุทธิ์ เมื่อพบว่าดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์ จึงนำดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 6 ชนิด พบว่าดีเอ็นเอของเฟจ **Φ**22s ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 6 ชนิดคือ *Hin*dIII, *Eco*RI, *Apa*LI, *Bgl*II, *Nde*I และ *Pst*I ส่วนดีเอ็นเอของเฟจ **Φ**22b ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI, *Hin*dIII และ *Apa*LI แต่ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bgl*II, *Nde*I และ *Pst*I แสดงดังภาพประกอบ 28, 29 และ 30



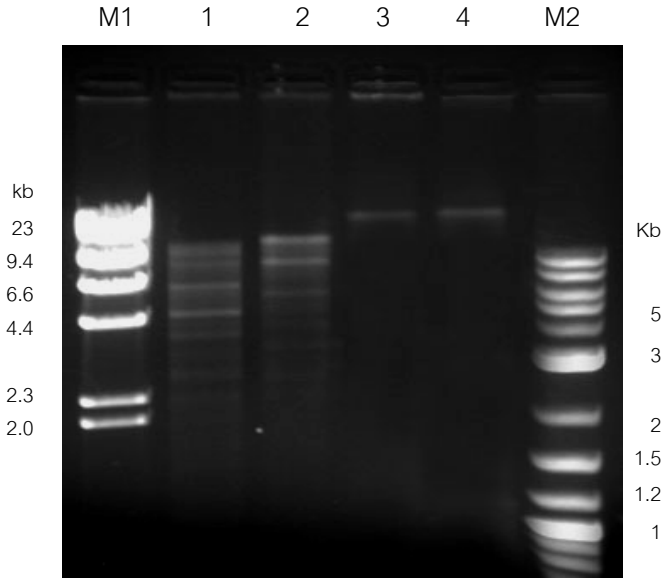
ภาพประกอบ 28 ดีเอ็นเอของเฟจ **Φ**22b และ **Φ**22s หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

แถว M1 Lambda DNA marker/ *Hin*dIII

แถว 1 ดีเอ็นเอของเฟจ**Φ**22b

แถว 2 ดีเอ็นเอของเฟจ**Φ**22s

แถว M2 2-Log DNA Ladder



ภาพประกอบ 29 ดีเอ็นเอของเฟจ Φ22b และ Φ22s หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII และ *Apa*LI

แถว M1 Lambda DNA marker/ *Hin*dIII

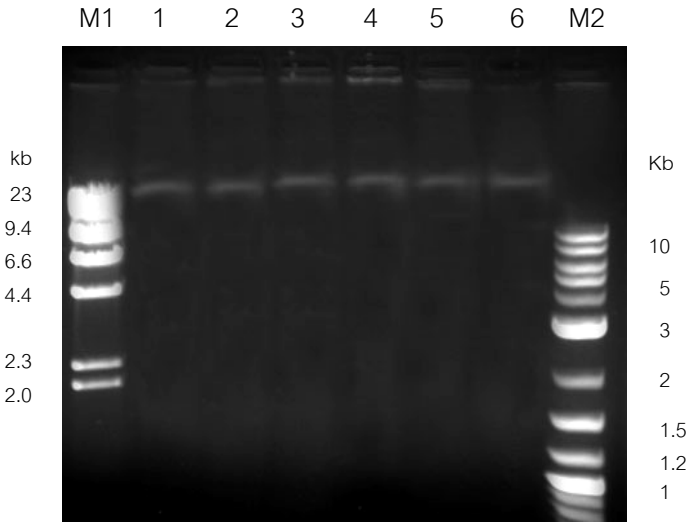
แถว 1 ดีเอ็นเอของเฟจΦ22b ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII

แถว 2 ดีเอ็นเอของเฟจΦ22b ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Apa*LI

แถว 3 ดีเอ็นเอของเฟจΦ22s ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII

แถว 4 ดีเอ็นเอของเฟจ Φ22s ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Apa*LI

แถว M2 2-Log DNA Ladder



ภาพประกอบ 30 ดีเอ็นเอของเฟจ **Φ**22b และ **Φ**22s หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*II, *Nde*I และ *Pst*I

แถว M1 Lambda DNA marker/ *Hin*dIII

แถว 1 ดีเอ็นเอของเฟจ**Φ**22b ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*II

แถว 2 ดีเอ็นเอของเฟจ**Φ**22b ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I

แถว 3 ดีเอ็นเอของเฟจ**Φ**22b ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I

แถว 4 ดีเอ็นเอของเฟจ**Φ**22s ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*II

แถว 5 ดีเอ็นเอของเฟจ**Φ**22s ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I

แถว 6 ดีเอ็นเอของเฟจ**Φ**22s ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I

แถว M2 2-Log DNA Ladder

บทที่ 5
สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

จากการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติคจากตัวอย่างแหนม จำนวนทั้งหมด 36 ตัวอย่าง พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียกรดแลคติคได้ทั้งหมด 41 ไอโซเลท ซึ่งจากกระบวนการผลิตแหนมที่ทำการบรรจุโดยไล่อากาศออก แล้วปล่อยให้เกิดการหมักด้วยเชื้อในธรรมชาติที่ต้องการออกซิเจนเพียงเล็กน้อยเพื่อการเจริญ นั้นพบว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่เจริญมักจะเป็นแบคทีเรียกรดแลคติคซึ่งทำให้ผลิตภัณฑ์มีรสเปรี้ยว ส่วนจุลินทรีย์อื่นที่ต้องการออกซิเจนจะไม่เจริญเติบโตและจุลินทรีย์ชนิดที่ไม่ชอบความเป็นกรดจะตายเพราะกรดที่สร้างออกมาจากจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติค (ประเวทย์ และ ฆรณี. 2536) การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติคที่ทราบสายพันธุ์ในแหนมที่หมักตามธรรมชาติ (natural fermentation) มีหลายสายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus bavaricus, Lb. curvatus, Lb. farciminis , Lb. plantarum, Lb. sake, Pediococcus damnosus, P. acidilactici, P. pentosaceus* และ *Leuconostoc* sp. (ปิ่นมณี. 2546) อย่างไรก็ตามการหมักตามธรรมชาติ กิจกรรมการหมักมักไม่คงที่ ทำให้ไม่สามารถควบคุมคุณภาพของแหนมที่ผลิตได้ เทคโนโลยีการผลิตแหนมในประเทศไทยส่วนใหญ่ยังนิยมการหมักโดยอาศัยเชื้อตามธรรมชาติ จากการสำรวจผู้ผลิตจำนวน 80 ราย ในภาคเหนือตอนบน และภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบว่าทุกรายใช้วิธีการหมักตามธรรมชาติ โดยใช้ดินประสิวหรือแป้งช่วยในการหมัก นอกจากนี้ยังพบว่ามีผู้ผลิตในภาคเหนือตอนบนเพียงรายเดียวเท่านั้นที่ใช้เทคนิคการผลิตโดยใช้หัวเชื้อบริสุทธิ์ แต่ไม่พบผู้ผลิตที่ใช้เทคนิคการฉายรังสีแต่อย่างใด (อารี; และคนอื่นๆ. 2545)

เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติคที่แยกได้ทั้ง 41 ไอโซเลท มาใช้เป็นโฮสท์สำหรับการแยกแลบ-เฟจ พบว่าสามารถแยกแลบเฟจได้ 2 ตัว คือ เฟจ Φ22b และ Φ22s ซึ่งโฮสท์ของเฟจทั้งสองตัวนี้ คือ เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติค N22 ที่แยกได้จากแหนมที่เก็บตัวอย่างมาจากตลาดหน้ามหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ เมื่อนำเชื้อ N22 มาจัดจำแนกโดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมีอื่นโดยใช้ชุดจำแนกแบคทีเรียสำเร็จรูป API 50 CHL (BioMerieux, France) พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Weissella* sp. ร้อยละ 91.8 และเมื่อนำมาจำแนกสปีชีส์โดยอาศัยลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA พบว่าโฮสท์ N22 มีความคล้ายคลึงกับ *Weissella cibaria* ร้อยละ 99 ซึ่งเชื้อ *W. cibaria* มีการแยกและศึกษาครั้งแรกในปี ค.ศ. 2002 โดยครั้งนั้นได้ทำการแยกเชื้อจากวัตถุดิบที่จะทำอาหารหมักในประเทศมาเลเซีย (Björkroth.; et al. 2002: 141-148) และจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าสามารถแยกเชื้อ *W. cibaria* ได้จากแหล่งต่างๆ เช่น แป้งหมัก (sourdoughs) (De Vuyst.; et al. 2002: 6059-6069) ไส้กรอกเลือด

(Morcilla de Burgos) (Santos; et al. 2005: 285-296**)** และ ปลาส้ม (Paludan-M**ü**ller; et al. 2002: 61-70) เป็นต้น และงานวิจัยนี้เป็นครั้งแรกที่แยกเชื้อ *W. cibaria* ได้จากแหนม

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพลาคและของแลบเฟจทั้งสองตัวพบว่า เฟจ **Φ**22b และ **Φ**22s ทำให้เกิดพลาคใสขนาด 1.2 และ 0.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ แสดงว่าเฟจทั้งสองเป็นไลติคเฟจ เมื่อศึกษารูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าเฟจทั้ง 2 ตัวจัดอยู่ใน Family Podoviridae โดยเฟจ **Φ**22b มีส่วนหัวเป็นรูปหกเหลี่ยม ขนาด 92 x 50 นาโนเมตร และส่วนหางสั้นความยาว 25 นาโนเมตร ส่วน **Φ**22s มีส่วนหัวเป็นรูปหกเหลี่ยมขนาด 91 x 36 นาโนเมตร และส่วนหางสั้นความยาว 27 นาโนเมตร ซึ่งเฟจทั้งสองมีขนาดของส่วนหัวที่เล็กกว่าเฟจ KSY1 (Chopin; et al. 2007: 1-9) ซึ่งมีขนาดส่วนหัวเท่ากับ 223 x 45 นาโนเมตร และมีขนาดใหญ่กว่าเฟจ P369 (Deveau; et al. 2006: 4338–4346) และเฟจ ascc**Φ**28 (Kotsonis; et al. 2008: 3453–3460) ซึ่งมีขนาดส่วนหัวเท่ากับ 57 x 40 นาโนเมตร และ 59 x 42 ตามลำดับ นอกจากนี้เฟจทั้งสองยังมีส่วนหางที่สั้นกว่าเฟจ KSY1 (32 นาโนเมตร) แต่ยาวกว่าเฟจ P369 (19 นาโนเมตร) และเฟจ ascc**Φ**28 (21 นาโนเมตร) เฟจทั้งสองมีลักษณะรูปร่างแตกต่างจากแลบเฟจของ *Weissella* sp. และแลบเฟจส่วนใหญ่ของแบคทีเรียกรดแลคติคที่เคยมีรายงานโดยส่วนใหญ่จะถูกจัดอยู่ใน Family Siphoviridae จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าแลบเฟจที่จัดอยู่ใน Family Podoviridae นั้นมีน้อยกว่าร้อยละ 1 และส่วนใหญ่จะเป็น lactococcal phages (Ackermann. 2001: 843-857) ซึ่งงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่พบเฟจของ *Weissella* sp. ที่จัดอยู่ใน Family Podoviridae

เมื่อนำเฟจ **Φ**22b และ **Φ**22s มาศึกษาสมบัติของแลบเฟจในการติดเชื้อกับแบคทีเรียกรดแลคติคสายพันธุ์อื่นและจีนัสอื่น พบว่าเฟจทั้งสองตัวไม่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อ *Weissella* สปีชีส์อื่น หรือแบคทีเรียกรดแลคติคจีนัสอื่นได้ ซึ่งคล้ายกับเฟจของเชื้อ *Weissella* สปีชีส์อื่นซึ่งมักจะเป็นเฟจที่มีความสามารถในการติดเชื้อกับแบคทีเรียกรดแลคติคสายพันธุ์อื่น และจีนัสอื่นน้อย (Lu.; et al. 2003b: 3192–3202)

จากการศึกษากราฟการเจริญ พบว่าเฟจ **Φ**22b มี latent period เท่ากับ 60 นาที ซึ่งเร็วกว่าเฟจ phage B2 (Nes; Brendehaug; & Von Husby. 1988: 423–427) ที่มี latent period เท่ากับ 75 นาที แต่นานกว่าเฟจ **Φ**JL-1 (Lu; et al. 2003a: 225-235) และเฟจ ascc**Φ**28 (Kotsonis; et al. 2008: 3453–3460) ที่มี latent period เท่ากับ 35 และ 40 นาที ตามลำดับ ส่วนเฟจ **Φ**22s มี latent period เท่ากับ 110 นาที ซึ่งนานกว่าเฟจ ascc**Φ**28 (Kotsonis; et al. 2008: 3453–3460) และเฟจ **Φ**JL-1 (Lu; et al. 2003a: 225-235) ที่มี latent period เท่ากับ 44 และ 35 นาที ตามลำดับ

เฟจ **Φ**22b มี burst size เท่ากับ 152 phage particles/infected cell ซึ่งมากกว่าเฟจ **Φ**JL-1 (Lu; et al. 2003a: 225-235) และเฟจ ascc**Φ**28 (Kotsonis.; et al. 2008: 3453–3460) ที่มี burst

size เท่ากับ 22 และ 121 phage particles/infected cell ตามลำดับ ส่วนเฟจ **Φ**22s มี burst size เท่ากับ 55 phage particles/infected cell ซึ่งมากกว่าเฟจ **Φ**JL-1 (Lu; et al. 2003a: 225-235) ที่มี burst size เท่ากับ 22 phage particles/infected cell แต่น้อยกว่าเฟจ ascc**Φ**28 (Kotsonis; et al. 2008: 3453–3460) ที่มี burst size เท่ากับ 121 phage particles/infected cell

การเข้าเกาะติดโฮสท์ของเฟจมีปัจจัยที่สำคัญคือ ความจำเพาะระหว่างตำแหน่งเกาะติดของเฟจกับตำแหน่งรีเซพเตอร์บนเซลล์ของแบคทีเรีย นอกจากนี้แล้วยังขึ้นอยู่กับการมีแคทไอออนอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ ซึ่งการที่เฟจจะสามารถเข้าเกาะติดโฮสท์ของเฟจได้หรือไม่นั้น ขึ้นอยู่กับการมีหรือไม่มีไดวาเลนท์แคทไอออนด้วย (Topley; & Wison. 1990: 973) เนื่องจากเฟจต้องการไดวาเลนท์แคทไอออน เช่น แคลเซียมไอออน หรือแมกนีเซียมไอออน ในช่วงใดช่วงหนึ่งของการติดเชื้อ (Watanabe; & Takesue. 1972: 19–30) นอกจากนี้ยังเคยมีรายงานว่าเฟจส่วนใหญ่ไม่สามารถเข้าเกาะที่โฮสท์ได้ในน้ำกลั่นหรือในสภาวะที่มีปริมาณแคทไอออนน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.01 มิลลิโมลาร์ (Luria; et al. 1978: 135–156) จากการศึกษาผลของไดวาเลนท์แคทไอออนที่มีผลต่อการเข้าเกาะติดโฮสท์ของแลบเฟจ พบว่าเฟจ **Φ**22b และ **Φ**22s สามารถเข้าเกาะติดที่ผิวเซลล์ของโฮสท์ ได้ร้อยละ 99 ในระยะเวลา 10 นาที หลังจากทำให้เกิดการติดเชื้อ ซึ่งเร็วกว่า เฟจ **Φ** LP1-A (Caso; et al. 1995: 741–750) และ **Φ**JL-1 (Lu; et al. 2003a: 225-235) ที่สามารถเข้าเกาะติดที่ผิวเซลล์ของโฮสท์ ได้ร้อยละ 92 และ 75 ตามลำดับ ภายในเวลา 10 นาที หลังจากทำให้เกิดการติดเชื้อ ส่วนการเติมแคลเซียมคลอไรด์ (10-30 มิลลิโมลาร์) ลงในอาหารเหลว MRS ไม่มีผลต่ออัตราการเข้าเกาะติดที่ผิวเซลล์ของโฮสท์ของเฟจทั้งสองในช่วง 30 นาทีแรก ซึ่งผลที่ได้ตรงกับการทดลองก่อนหน้านี้ ที่พบว่าไดวาเลนท์แคทไอออนไม่มีผลต่อการเข้าเกาะติดโฮสท์ของเฟจในช่วง 30 นาทีแรก เนื่องจากในการเข้าเกาะติดที่ผิวเซลล์ของโฮสท์ของเฟจในรอบแรกนั้น ในอาหารเหลว MRS มีแคทไอออนชนิดอื่น เช่น โซเดียมไอออน (Na^{+}) และแมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) ที่เพียงพอต่อความต้องการที่จะช่วยให้เฟจสามารถเข้าเกาะติดที่ผิวเซลล์ของโฮสท์ได้ (Lu; et al. 2003a: 225-235) แต่แคทไอออนในอาหารเหลว MRS ไม่มีปริมาณมากพอสำหรับการเข้าเกาะติดที่ผิวเซลล์ของโฮสท์ในรอบต่อๆ ไป ดังนั้นปริมาณแคลเซียมไอออนที่มากเกินพอ จะทำให้การเข้าเกาะติดที่ผิวเซลล์ของโฮสท์ของเฟจในรอบต่อไปของวงชีวิตของเฟจเร็วขึ้น แต่จะไม่มีผลต่อปริมาณของเฟจ เพราะปริมาณของเฟจที่อยู่ในอาหารที่ไม่มีการเติมไดวา-เลนท์แคทไอออนจะเพิ่มจำนวนจนมีปริมาณเท่ากับเฟจในอาหารที่มีไดวาเลนท์แคทไอออนในชั่วโมงที่ 4 หลังการติดเชื้อ (Watanabe; & Takesue. 1972: 19-30)

เฟจ **Φ**22b และ **Φ**22s สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อกับโฮสท์ในช่วงค่าความเป็นกรดด่างกว้างคือ ตั้งแต่ 5-8 และค่า *D* values ของเฟจทั้งสองตัวสามารถคำนวณได้เท่ากับ 60 วินาที ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส แต่ค่า *D* values ของเฟจ **Φ**22b และ **Φ**22s มีค่าเท่ากับ 10 และ 15

วินาที ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ปริมาณเฟจทั้งสองจะลดลงจนไม่สามารถตรวจสอบได้ ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ระยะเวลามากกว่า 60 วินาที หรือที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลามากกว่า 20 วินาที หรือที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ระยะเวลาน้อยกว่า 10 วินาที ซึ่งเฟจทั้งสองตัวมีความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิสูงได้น้อยกว่าเฟจ **Φ**JL-1 (Lu; et al. 2003a: 225-235) ที่มีค่า *D* values เท่ากับ 2.7 นาที ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และ 0.2 นาที ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส

เมื่อนำเฟจทั้งสองตัวมาทำการสกัดดีเอ็นเอแล้วนำดีเอ็นเอที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 6 ชนิดคือ *Hin*dIII, *Eco*RI, *Apa*LI, *Bgl*II, *Nde*I และ *Pst*I เพื่อตรวจสอบยืนยันว่าเป็นแลบเฟจชนิดเดียวกันหรือไม่ พบว่า ดีเอ็นเอของเฟจ **Φ**22s ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 6 ชนิด แสดงว่าดีเอ็นเอของเฟจ **Φ**22s ไม่มีบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 6 ชนิด ส่วนดีเอ็นเอของเฟจ **Φ**22b ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Apa*LI, *Eco*RI และ *Hin*dIII แสดงว่าดีเอ็นเอของเฟจ **Φ**22b มีบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Apa*LI, *Eco*RI และ *Hin*dIII แม้ดีเอ็นเอของเฟจ **Φ**22b ถูกตัดด้วยเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้ แต่แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏยังแยกได้ไม่ชัดเจน จึงควรเลือกใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดอื่นที่เหมาะสมต่อไป จากรูปแบบดีเอ็นเอของแลบเฟจแต่ละตัวหลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแตกต่างกัน จึงยืนยันได้ว่าเป็นแลบเฟจต่างชนิดกัน

จากการศึกษาผลของแลบเฟจต่อการหมักแหนมพบว่า การมีเฟจที่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อกับแบคทีเรียที่ใช้เป็นหัวเชื้อในการหมักแหนมจะทำให้การหมักแหนมใช้เวลานานกว่าการหมักแหนมที่มีหัวเชื้อเริ่มต้นที่ไม่มีเฟจปนเปื้อน เนื่องจากเฟจจะไปทำให้เชื้อแบคทีเรียเกิดการติดเชื้อเพื่อเพิ่มจำนวนของเฟจ ทำให้ปริมาณเชื้อลดลงจึงสามารถผลิตกรดออกมาได้น้อย ส่งผลให้ค่าความเป็นกรดด่างของแหนมลดลงได้ช้า ในขณะที่เฟจยังสามารถอยู่รอดได้ในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรดด่างต่ำกว่า 5 เป็นเวลา 2 วัน แต่จะไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ นอกจากนี้ในแหนมที่มีการเติมเฟจเพียงอย่างเดียวแต่ความเป็นกรดด่างของแหนมก็ยังลดลง เนื่องจากการนำแหนมไปฆ่าเชื้อด้วยแสงอุลตราไวโอเลตนั้นสามารถฆ่าเชื้อได้แต่ที่ผิวของแหนม ทำให้เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคที่อยู่ภายในแหนมยังอยู่รอดได้และสร้างกรดออกมา ทำให้ความเป็นกรดด่างของแหนมลดลง จากผลการทดลองนี้ทำให้สามารถยืนยันรายงานก่อนหน้านี้ที่ระบุว่าว่า แลบเฟจยังคงเป็นปัญหาสำคัญในการผลิตอาหารหมักทุกประเภท (Lu; et al. 2005: 45-54) และการปนเปื้อนด้วยแลบเฟจในอาหารหมักนับเป็นปัญหาหลักในระดับอุตสาหกรรม

จากการศึกษาทั้งหมดพบว่าเป็นรายงานครั้งแรกที่ค้นพบแลบเฟจของ *Weissella cibaria* และเฟจที่ได้มีมีลักษณะรูปร่างแตกต่างจากแลบเฟจของ *Weissella* sp. และแลบเฟจส่วนใหญ่ของแบคทีเรียกรดแลคติคที่เคยมีรายงาน นอกจากนี้จากผลการศึกษาผลของอุณหภูมิและความเป็นกรด

ด่างของเฟจ Φ22b และ Φ22s ยังสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการป้องกันการปนเปื้อนจากแลบเฟจในเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ในการผลิตอาหารหมัก นอกจากนี้การสุขาภิบาลที่ดีในบริเวณที่ใช้ในการหมักจะช่วยลดการปนเปื้อนของเฟจในการหมักได้ ทั้งนี้รวมถึงการแยกห้องเก็บหัวเชื้อในการหมักจากห้องที่ใช้ในการผลิต การใช้ความร้อนในการฆ่าเชื้ออุปกรณ์ การใช้อาหารที่ยับยั้งเฟจ (Phage Inhibitory Medium; PIM) ในการถ่ายหัวเชื้อ เป็นต้น (Mullan, 1986: 39-42)

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

นงคราญ เรืองประพันธ์; และ นิตยา พันธ์บัว. (2535). การสำรวจคุณภาพทางจุลชีววิทยาของแหนมและหมูยอที่ผลิตในจังหวัดภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย. *อาหาร* 22: 32-39.

ปิ่นมณี ขวัญเมือง. (2546). *การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างแหนมของประเทศไทยเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ*. ปริญญานิพนธ์ วท.ด. (วิทยาศาสตร์การอาหาร) กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ถ่ายเอกสาร.

ประเวทย์ ตุ้ยเต็มวงศ์; และ ฆรณี ตุ้ยเต็มวงศ์. (2536). *Rapid Method และ Automation สำหรับจุลชีววิทยาทางอาหาร*. กรุงเทพฯ: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

พรทิพย์ สุขสวัสดิ์. (2549). *การศึกษาสมบัติของวิบริโอเฟจที่แยกจากตัวอย่างน้ำทะเล และอาหารทะเลดิบในประเทศไทย.* ปริญญานิพนธ์ กศ.ม. (ชีววิทยา) กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.

ไพโรจน์ วิริยจารี; ลักขณา รุจนะไกรกานต์; และ อำพิน กันธิยะ. (2536). การพัฒนาผลิตภัณฑ์แหนมโดยใช้เทคโนโลยีเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสม 1. แหล่งคาร์โบไฮเดรตที่เหมาะสมต่อการผลิตแหนม. *วารสารเกษตร* 9: 51-60.

วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. (2539). อาหารจากแลคติคแอสิดแบคทีเรียนานาชาติ (ตอนที่ 3). *วารสารจาร์พา* 3 (3): 29-31.

สุธยา บุญถนอม; ไพโรจน์ วิริยจารี; และ นินนาท ชินประหัษฐ์. (2537). ผลของโซเดียมไนเตรทและโซเดียมไนไตรท์ต่อคุณภาพแหนมที่ผลิตโดย Glucono-delta-lactone ร่วมกับเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสม. *วารสารเกษตร* 10: 296-312.

อรนุช อุดรภิชาติ. (2530). *การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติคที่สามารถยับยั้งการเจริญของซัลโมเนลลา และการผลิตกล้าเชื้อผงในการหมักแหนม.* ปริญญานิพนธ์ วท.ม. (วิทยาศาสตร์การอาหาร) กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ถ่ายเอกสาร.

อารี วิบูลย์พงศ์; และคนอื่นๆ (2545). *รายงานการวิจัยการศึกษาสถานภาพการผลิตแหนม: ภาคเหนือตอนบนและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ*. สืบค้นเมื่อ 7 เมษายน 2551, จาก http://www.mcc.cmu.ac.th/agbus/data/research%20paper/Project%20Nham.pdf.

อิสยา จันทร์วิทยานุชิต. (2545). คุณภาพทางจุลชีววิทยาของแหนมในเขตกรุงเทพมหานคร. *วารสาร มฉก.วิชาการ* 5: 1-10.

Ackermann, H.W. (1999). Tailed Bacteriophage: the Order Caudovirales. *Advances in Virus Research* 51: 135–201.

Ackermann, H.W. (2001). Frequency of Morphilogical Phage Descriptions in the Year 2000. *Archaeology of Virology* 146: 843-857.

Adams, M.H. (1959). *Bacteriophages.* New York: Interscience Publishers.

Adam, M.R.; & Moss, M.O. (1995). *Food Microbiology*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry.

Alcamo, E. (1996). *Fundamentals of Microbiology*. 5 th Ed. The United States of America: Benjamin / Cummings.

Ali Al-Ahmad.; et al. (2008). Characterization of the First Oral *Vagococcus* Isolated from a Root-Filled Tooth with Periradicular Lesions. *Current Microbiology* 57: 235-238.

Axelsson, L. (1998). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology, In Salminen, S.; & Wright, A.V., (Eds.). *Lactic Acid Bacteria*. pp. 1-72. New York: Marcel Dakker, Inc.

Baross, J.A.; Liston, J.; & Morita, R.Y. (1978a). Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* Bacteriophages and Other *Vibrio* Bacteriophages in Marine Samples. *Applied and Environmental Microbiology* 36: 492-499.

Baross, J.A.; Liston, J.; & Morita, R.Y. (1978b). Ecological Relationship Between *Vibrio parahaemolyticus* and Agar-Digesting Vibrios As Evidenced by Bacteriophage Susceptibility Patterns. *Applied and Environmental Microbiology* 36: 500-505.

Boyd, R.F. (1995). *Basic Medical Microbiology*. 5 th Ed. The United States of America: Little and Brown.

Birge, E.A., (2000). *Bacterial and Bacteriophage Genetics*. 4th Ed. New York: Springer.

Bradley, D.E. (1967). Ultrastructure of Bacteriophages and Bacteriocins. *Bacteriological Reviews* 31: 230-314.

Björkroth, K.J.; et al. (2002). Taxonomic Study of *Weissella confusa* and Description of *Weissella cibaria* sp. Nov., Detected in Food and Clinical Samples. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 141-148.

Cappuccino, J.G.; & Sherman, N. (2001). *Microbiology: A Laboratory Manual*. San Francisco: Benjamin Cummings.

Caso, J.L.; et al. (1995). Isolation and Characterization of Temperate and Virulent Bacteriophage of *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Dairy Science* 78: 741–750.

Choi, H.-J.; et al. (2002). *Weissella kimchii* sp. Nov., a Novel Lactic Acid Bacterium from Kimchi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 507–511.

Chopin, A.; et al. (2007). KSY1, a Lactococcal Phage with a T7-like Transcription. *Journal of Virology* 365: 1-9.

Colin, H.; Joanna, M.I.; & Todd, R.K. (1991). Rapid Method to Characterize Lactococcal Bacteriophage Genomes. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 283-288.

Depaola, A.; et al (1998). Phage Infecting *Vibrio vulnificus* Are Abundant and Diverse in Oysters Collected from the Gulf of Mexico. *Applied and Environmental Microbiology* 84: 346-351.

Dessaet, S.R.; & Steenson, L.R. (1995). Biotechnology of Dairy *Leuconostoc,* In Hui, Y.H.; & Khaehatouriam, G.G. (Eds.). *Biotechnology*. The United States of America: VCH. Publishers, Inc.

Deveau, H.; et al. (2006). Biodiversity and Classification of Lactococcal Phages. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 4338–4346.

Devriese, L.A.; & Pot, B. (1995). The Genus of *Enterococcus,* In Wood, B.J.B.; & Holzapfel, W.H. (Eds.). *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. 2nd Ed. Glasgow: Blackie Academic & Professional.

De Vuyst, L. (1994). Antimicrobial Potential of Lactic Acid Bacteria, In De Vuyst, L.; & Vandamme, E.J. (Eds.). *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetic and Application.* London: Blackie-Academic & Professional.

De Vuyst, L.; & Vandamme, E.J. (1992). Influence of the Carbon Source on Nisin Production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* in Batch Fermentations. *Journal of General Microbiology* 138: 571-578.

De Vuyst, L.; et al. (2002). The Biodiversity of Lactic Acid Bacteria in Greek Traditional Wheat Sourdoughs is Reflected in Both Composition and Metabolite Formation. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 6059–6069.

Dick, L.M.; Dellaglio, T.E.; & Collins, M.D. (1995). Proposal to Reclassify *Leuconostoc* As *Oenococcus oeni* (corring). *International Journal of Systematic Bacteriology* 45: 395-397.

Ellis, E.L.; & Delbruck, M. (1939). The Growth of Bacteriophage. *Journal of General Physiology* 22: 365–384.

Erko, S.; & Michael, G. (1991). *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. The United States of America: John Wiley & Sons.

Forsyth, S.J. (2000). *The Microbiology of Safe Food*. Oxford: Blackwell Science Ltd.

Foschino, R.; Perrone, F.; & Galli, A. (1995). Characterization of Two Virulent *Lactobacillus fermentu*m Bacteriophage Isolated from Sour Dough. *Journal of Applied Bacteriology* 79: 677–683.

Geoffrey, C.P. (1987). *Fermentation Foods of the World: A Dictionary and Guide*. London: Butterworth.

Ghosh, A.M.; Ansari, M.Q.; & Datta, G.C. (1989). Isolation and Morphological Characterization of El Tor Cholera Phages. *Journal of General Virology* 70: 2241-2243.

Gilliland, S.E. (1990). Health and Nutritional Benefits from Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiology Review* 87: 175-185.

Goyal, S.M.; Gerbra, C.P.; & Bitton, G. (1987). *Phage Ecology*. The United States of America: A Wiley-Interscience.

Hammes, W.P.; & Knauf, H.J. (1994). Starter in the Processing of Meat Products. *Meat Sciences* 36: 155-168.

Hardie, J.M.; & Whiley, R.A. (1995). The Genus of *Streptococcus*, In Wood, B.J.B. ; & Holzapfel, W.H. (Eds.). *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. 2nd Ed. Glasgow: Blackie Academic & Professional.

Harley, O.P.; & Klein, D.A. (1993). *Microbiology*. 2nd Ed. Oxford: Wm.C.Brown.

Harrigan, W.F. (1998). *Laboratory Method in Food Microbiology*. 3 rd Ed. New York: Academic Press.

Holzapfel, W.H.; & Wood, B.J.B. (1995). Lactic Acid Bacteria in Contemporary Perspective, In Wood, B.J.B. ; & Holzapfel, W.H. (Eds.). *The Genera of Lactic Acid Bacteria.* London: Blackie Academic & Professional.

Jay, M.T. (1996). *Modern Food Microbiology*. New York: International Thomson Publishing.

Johnson, J.L. (1984). Bacterial Classification III. Nucleic Acids in Bacterial Classification, In Krieg, N.R.; & Holt, J.G. (Eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1.* Baltimore: Williams & Wilkins.

Josephsen, J.; & Nielsen, E.W. (1988) Plasmid Profiles and Bacteriophage Sensitivity of Bacteria of a Cheddar Starter Used for Five Years without Rotation. *Milchwissenschaft* 43: 219–223.

Kalmanson, G.; & Bronfenbrenner, J. (1942). Evidence of Serological Heterogeneity of Polyvalent "Pure Line" Bacteriophage. *Journal of Immunology* 45: 13.

Kandler, O.; & Weiss, N. (1986). Genus *Lactobacillus beijerinck* 1901, In Sneath, P.H.A. ; & Mair, N.S.; & Sharpe, M.E.; & Holt, J.G. (Eds.). *Bergey 's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2.* Baltimore: Williams and Wilkins.

Kay, D.; & Bradley, D.E. (1960). The Fine Structure of Bacteriophages. *Journal of General Microbiology* 23: 553-563.

Kelly, W.J.; Asmunson, R.V.; & Huang, C.M. (1996). Characterization of Plantaricin KW30, a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Bacteriol*ogy 81: 657-662.

Klaenhammer, T.R. (1984). Interactions of Bacteriophages with Lactic Streptococci. *Applied Microbiology* 30: 1-29.

Koga, T.; Toyoshima, S.; & Kawata, T. (1982). Morphological Varieties and Host Ranges of *Vibrio parahaemolyticus* Bacteriophages Isolated from Seawater. *Applied and Environmental Microbiology* 44: 466-470.

Kotsonis, S.E.; et al. (2008). Characterization and Genomic Analysis of Phage asccΦ28, a Phage of the Family *Podoviridae* Infecting *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 74 : 3453–3460.

Lee, J.-S.; et al. (2002). *Weissella koreensis* sp. Nov., Isolated from Kimchi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 1257–1261.

Leiman, P.G.; et al. (2004). *Cell* 118(4): 419-429.

Lim, D. (1998). *Microbiology*. 2 nd Ed. The United States of America: McGraw- Hill.

Litchfield, J.H. (1996). Microbiological Production of Lactic Acid Bacteria. *Advance and Applied Microbiology* 42: 45-95.

Lu, Z.; et al. (2003a). Isolation and Characterization of a *Lactobacillus plantarum* Bacteriophage, ΦJL-1, from a Cucumber Fermentation. *Journal of Food Microbiology* 84: 225-235.

----------. (2003b). Bacteriophage Ecology in Commercial Sauerkraut Fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 3192–3202.

Lu, Z.; et al. (2005). Sequence Analysis of the *Lactobacillus plantarum* Bacteriophage, ΦJL-1. *Gene Section Functional Genomics* 348: 45-54.

Luria, S.E.; et al. (1978). *General Virology*. 3rd Ed. New York: Wiley.

Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; & Parker, J. (2003). *Brock Biology of Microorganism.* The United States of America: Pearson Education.

Magnusson, J.; et al. (2002). *Weissella soli* sp. Nov., a Lactic Acid Bacterium Isolated from Soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 831–834.

Maloy, S.R.; Cronan, J.F.; & Freifelder, D.J. (1994). *Microbial Genetics*. 2 nd Ed. Boston: Jones and Bartlett.

Matsuzaki, S.; et al. (1992). A Broad-Host-Range Vibriophage, KVP 40, Isolated from Seawater. *Microbiology and Immunology* 36: 93-97.

Mckane, L.; & Kandel, J. (1996). *Microbiology*. The United States of America: McGraw-Hill.

McKay, L.L.; Dajani, A.S.; & Wannamaker, L.W. (1983). Functional Properties of Plasmids in Lactic Streptococci. *Antonie van Leeuwenhoek* 49: 259-274.

Mullan, W.M.A. (1986). Bacteriophage Induced Starter Problems. *Dairy Industries International* 51: 39-42.

Mullan, W.M.A. (2002). Bacteriophage Enumeration. *Dairy Science and Food Technology*. Retrieved April, 9, 2008. from http://www.dairyscience.info/phage/enumeration.asp.

Nes, I.F.; Brendehaug, J.; & Von Husby, K.O. (1988). Characterization of the Bacteriophage B2 of *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. *Biochimie* 70: 423–427.

Nester, E.W.; Roberts, C.B.; & Nester, M.T. (1995). *Microbiology: A Human Perspective*. United States of America: Wn. C. Brown.

Orla-Jensen, S. (1919). *The Lactic Acid Bacteria.* Copenhagen: Host and Son.

Osiriphun, S.; Pongpoolponsak, A.; & Tuitemwong, K. (2004). Quantitative Risk Assessment of *Salmonella* spp. in Fermented Pork Sausage (Nham). *Kasetsart Journal* 38: 58-65.

Paludan-Müller, C.; et al. (2002). Fermentation and Microflora of *Plaa-Som*, a Thai Fermented Fish Product Prepared with Different Salt Concentrations. *International Journal of Food Microbiology*. 73: 61–70.

Pot, B.; et al. (1993). Identification and Classification of *Lactobacillus acidophilus*, *L. johnsonii* Strain by SDS-PAGE and rRNA-Targeted Oligonucleotides Probe Hybridization. *Journal of General Microbiology* 139: 513-517.

Pot, B.; et al. (1994). Taxonomy of Lactic Acid Bacteria, In Vuyst, L. De; & Vandamme, E.J. (Eds.). *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications*. London: Blackie Academic & Professional.

Ringo, E.; & Gatesoupe, F.J. (1998). Lactic Acid Bacteria in Fish: a Review. *Aquaculture* 160: 177-203.

Rosachakul, P.; & Chaiseri, S. (2002). Effects of Sodium Nitrite Content on Formation of Volatile Compounds in Nham (Thai Fermented Sausage). *Annual Meeting and Food Expo*. California: Anaheim.

Saiki, R.K.; et al. (1988). Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with Thermostable DNA Polymerase. *Science* 239: 487-494.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning*. 2nd Ed. The United States of America: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Santos, E. M.; et al. (2005). Characterization and Identification of lactic Acid Bacteria in ''morcilla de Burgos''. *International Journal of Food Microbiology* 97: 285-296.

Sarkar, P.K.; & Banerjee, S. (1996). Antibacterial Activity of Lactic Acid Bacterial Isolates Obtained from Natural Habitats. *Journal of Food Science Technology* 33: 231-233.

Schlegel, H.G. (1993). *General Microbiology*. Cambridge: Cambridge University Press.

Schleifer, K.H. (1987). Recent Changes in the Taxonomy of Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 46: 201-203.

Schleifer, K.H.; & Ludwing, W. (1995). Phylogenetic Relationship of Lactic Acid Bacteria, In Wood, B.J.B.; & Holzapfel, W.H. (Eds.). *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. 2nd Ed. Glasgow: Blackie Academic & Professional.

Simpson, W.J.; & Taguchi, H. (1995). The Genus *Pediococus* with Notes on the Genera *Tetragenococcus* and *Aerococcus,* In Wood, B.J.B.; & Holzapfel, W.H. (Eds.). *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. 2nd Ed. Glasgow: Blackie Academic & Professional.

Singleton, P.; & Sainsbury, D. (1988). *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*. 2nd Ed. Singapore: John Wiley & Sons.

Stiles, M.E.; & Holzapfel, W.H. (1997). Lactic Acid Bacteria of Foods and Their Current Taxonomy. *International Journal of Food Microbiology* 36: 1-29.

Tanasupawat, S.; et al. (2000). *Lactobacillus acidipiscis* sp. Nov. and *Weissella thailandensis* sp. Nov., Isolated From Fermented Fish in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 1479–1485.

Trevors, K.E.; Holley, R.A.; & 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.

Topley, W.W.C.; & Wilson, G.S. (1990). *Principles of Bacteriology, Virology and Immunity*. London: B.C. Decker Publishing.

Twiddy, P.J.A.; & Reilly, L. (1987). *Lactobacillus in Health and Disease*. Kyoto: Yakult Honsha Co.

Van Regenmortel, M.H.V.; Fauquel, C.M.; & Bishop, D.H. (2000). Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Virus. *Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Academic Press.

Voyles, B.A. (2002). *The Biology of Viruses*. 2nd Ed. New York: McGraw–Hill.

Watanabe, K.; & Takesue, S. (1972). The Requirement for Calcium in Infection with *Lactobacillus* Phage. *Journal of General Virology* 17: 19–30.

Yoon, S.; et al. (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.

Zachary, A. (1976). Physiology and Ecology of Bacteriophages of the Marine Bacterium *Beneckea natriegens*: Salinity. *Applied and Environmental Microbiology* 31: 415-422.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth

peptone	10	กรัม
beef extract	10	กรัม
yeast extract	5	กรัม
glucose	20	กรัม
dipotassium hydrogen phosphate	2	กรัม
tween 80	1	กรัม
diammonium hydrogen citrate	2	กรัม
sodium acetate	5	กรัม
magnesium sulfate	0.1	กรัม
manganese sulfate	0.05	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ในกรณีที่ต้องการเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ให้เติมวุ้นผงลงไป 15 กรัม แต่ถ้าเตรียมเป็น MRS soft agar ให้เติมวุ้นผงลงไป 0.7 กรัม

2. Nutrient agar (NA)

peptone	5	กรัม
beef extract	3	กรัม
agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ในกรณีที่ต้องการเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ

ภาคผนวก ข

สารเคมี

1. 10% sodium dodecyl sulfate (SDS)

sodium dodecyl sulfate	100	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. TE- buffer

Tris-HCl	0.1	โมลาร์
EDTA	1	มิลลิโมลาร์

ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ 8.0 และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. 10X TBE buffer

Tris- HCl (pH 8)	108	กรัม
boric acid	55	กรัม
EDTA	9	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่อจะใช้ให้ทำการเจือจางเป็น 1X ด้วยน้ำกลั่น

4. 3 M sodium acetate

sodium acetate	408.3	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรดด่าง ให้ได้ 5.2 โดย Glacial acetic acid เข้มข้นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. lysis solution

sucrose	67	กรัม
Trise	50	มิลลิโมลาร์
EDTA	1	มิลลิโมลาร์

ปรับค่าความเป็นกรดด่าง ให้ได้ 8.0 และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สภาวะที่ใช้ในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

*Eco*RI (Promega)

DNA	10	ไมโครลิตร
Enzyme	0.5	ไมโครลิตร
Buffer H	2	ไมโครลิตร
Distilled water	7.3	ไมโครลิตร
BSA	0.2	ไมโครลิตร
รวม	20	ไมโครลิตร

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

*Nde*I (Fermentas)

DNA	8	ไมโครลิตร
Enzyme	0.5	ไมโครลิตร
Buffer D	3.5	ไมโครลิตร
รวม	12	ไมโครลิตร

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

*Hin*dIII (Fermentas)

DNA	10	ไมโครลิตร
Enzyme	1	ไมโครลิตร
Buffer R	1	ไมโครลิตร
Distilled water	3	ไมโครลิตร
รวม	15	ไมโครลิตร

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

*Bgl*II (Fermentas)

DNA	8	ไมโครลิตร
Enzyme	1	ไมโครลิตร
Buffer O	1	ไมโครลิตร
รวม	10	ไมโครลิตร

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

*Pst*I (Fermentas)

DNA	8	ไมโครลิตร
Enzyme	1	ไมโครลิตร
Buffer O	1	ไมโครลิตร
รวม	10	ไมโครลิตร

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

*Apa*LI (Promega)

DNA	10	ไมโครลิตร
Enzyme	3	ไมโครลิตร
10x Buffer	3	ไมโครลิตร
BSA	2	ไมโครลิตร
Distilled water	2	ไมโครลิตร
รวม	10	ไมโครลิตร

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ค

การจำแนกสปีชีส์โดยใช้ชุดจำแนกแบคทีเรียสำเร็จรูป API 50 CHL (BioMerieux, France)

มีวิธีการดังนี้

1. การเตรียม inoculum

นำเชื้อที่เจริญอยู่ในอาหารเหลว MRS มาปั่นเหวี่ยงความเร็ว 4,025xg เป็นเวลา 5 นาที เพื่อเก็บเซลล์ของแบคทีเรีย แล้วนำเชื้อที่ได้มาแขวนลอยใน API 50 CHL medium ให้มีความเข้มข้นประมาณ McFarland No.2 โดยเชื้อแขวนลอยที่เตรียมได้จะต้องนำไปใช้ทันที

2. การเติมเชื้อแขวนลอยลงใน strip

แถบ strip จะมีหลุมทั้งหมด 50 ช่อง เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดฟองอากาศให้วางกล่องบ่มเชื้อที่มี strip ในลักษณะเอียงตั้งขึ้น และวางปลายปิเปตตรงด้านข้างของหลุม หยดเชื้อแขวนลอยลงไปในแต่ละช่องประมาณ 100 ไมโครลิตร

หยด liquid paraffin ลงไปในช่องทุกช่องให้เต็ม จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับการอ่านผลครั้งแรก และ 48 ชั่วโมงสำหรับการอ่านผลครั้งที่ 2 การอ่านผลจะอ่านโดยใช้ตารางอ่านผลและแปลผลด้วยโปรแกรมAPIWEP (http://apiwep.biomerieux.com) โดยใส่เครื่องหมายเป็น + (ให้ผลบวก), - (ให้ผลลบ) และ ? (สำหรับผลไม่ชัดเจน)

ภาคผนวก ง

การทำให้ PCR product บริสุทธิ์ (PCR product purification) โดยใช้ QIA quick gel extraction kit

นำ PCR product มาทำอิเล็กโทรโฟเรซิส ในอะกาโรสเจล ร้อยละ 1.5-2.0 ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำเจลมาดูผลขนาดของ PCR product ภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต ตัดเจลตรงที่ดีเอ็นเอมีขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส ใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ชั่งน้ำหนักของเจลที่ได้ เติม QG buffer ให้มีปริมาตรเป็น 3 เท่าของน้ำหนักเจล แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติมโซเดียมอะซิเตท 3 โมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เติมไอโซ-โพรพานอล (isopropanol) ปริมาตร 1 เท่าของน้ำหนักเจล ผสมให้เข้ากัน แล้วดูดส่วนผสม (ประมาณ 750 ไมโครลิตร) มาใส่ใน QIA quick column ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงความเร็ว 11,356xg เป็นเวลา 2 นาที ทิ้งส่วนใสที่อยู่ข้างล่างของ column แล้วดูดส่วนผสมที่เหลือมาใส่ใน column แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงความเร็ว 11,356xg เป็นเวลา 2 นาที ทิ้งส่วนใสที่อยู่ข้างล่างของ column แล้วเติม QG buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงความเร็ว 11,356xg เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใสที่อยู่ข้างล่างของ column เติม PE buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 2-5 นาที แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงความเร็ว 11.356xg เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใสที่อยู่ข้างล่างของ column นำ column มาวางบน หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร อันใหม่ แล้วใส่น้ำ nuclease-free ปริมาตร 35 ไมโครลิตร ลงตรงกลางของ column ตั้งทิ้งไว้ 1-2 นาที แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงความเร็ว 11,356xg เป็นเวลา 1-2 นาที แล้วนำดีเอ็นเอที่ได้นี้มาวิเคราะห์ขนาดของ PCR product ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟเรซิส ในอะกาโรสเจล ร้อยละ 1 ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำเจลมาดูผลขนาดของ PCR product ภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต

ภาคผนวก จ

การออกแบบ primers

นำลำดับเบสที่ต้องการจะใช้เป็นต้นแบบในการออกแบบ primers มาทำการวิเคราะห์ด้วยสายตา (manual selection) จากนั้นทำการออกแบบ primers ให้ลำดับเบสของ primers สามารถจับกับดีเอ็นเอต้นแบบในตำแหน่งที่ต้องการได้ โดยมีหลักการ คือ1. primers ที่ออกแบบควรมีความยาวประมาณ 20-25 นิวคลีโอไทด์ 2. มีปริมาณเบส G+C ประมาณร้อยละ 55-65 3. primers ไม่เกิดการจับกันเอง 4. primers ไม่มี hair pin loop 5. ปลายของ primers ทั้ง 2 ข้างควรจะเป็นเบส G หรือ C 6. มีอุณหภูมิที่ primers สามารถจับกับดีเอ็นเอต้นแบบได้ (T_m) อยู่ในช่วง 55-65 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ฉ

ลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของเชื้อไอโซเลท N22 ที่ส่งไปเก็บในฐานข้อมูล EMBL

```
ID   FN330974; SV 1; linear; genomic DNA; STD; PRO; 1571 BP.
ST * private 25-DEC-2009
AC   FN330974;
DT   09-APR-2009 (Rel. 100, Created)
DT   09-APR-2009 (Rel. 100, Last updated, Version 0)
DE   Weissella cibaria partial 16S rRNA gene, isolate N22
OS   Weissella cibaria
OC   Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Weissella.
RN   [1]
RP   1-1571
RA   Pringsulaka O.;
RL   Submitted (09-APR-2009) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.
RL   Pringsulaka O., Biology, Srinakharinwirot University, 114 Sukhumvit 23,
RL   Bangkok, THAILAND.
RN   [2]
RA   Patarasinpaiboon N., Pringsulaka O., Suwannasai N., Rangsiruji A.;
RT   "Isolation of LAB phage from Nham (Thai fermented pork) in Thailand";
RL   Unpublished.
FH   Key           Location/Qualifiers
FT   source        1..1571
FT                 /organism="Weissella cibaria"
FT                 /isolate="N22"
FT                 /mol_type="genomic DNA"
FT                 /country="Thailand:Chaingmai"
FT                 /isolation_source="Thai fermented pork (Nham)"
FT                 /collected_by="Pattarasinpaiboon, N."
FT                 /collection_date="21-Dec-2005"
FT                 /identified_by="Pattarasinpaiboon, N. and Pringsulaka,O."
FT                 /db_xref="taxon:137591"
FT   rRNA          <1..>1571
FT                 /gene="16S rRNA"
FT                 /product="16S ribosomal RNA"
SQ   Sequence 1571 BP; 419 A; 342 C; 458 G; 352 T; 0 other;

  tagagtttga tcatggctca ggatgaacgc tggcggcgtg cctaatacat gcaagtcgaa       60
  cgctttgtgg ttcaactgat ttgaagagct tgctcagata tgacgatgga cattgcaaag      120
  agtggcgaac gggtgagtaa cacgtgggaa acctacctct tagcagggga taacatttgg      180
  aaacagatgc taataccgta taacaatagc aaccgcatgg ttgctactta aaagatggtt      240
  ctgctatcac taagagatgg tcccgcggtg cattagttag ttggtgaggt aatggctcac      300
  caagacgatg atgcatagcc gagttgagag actgatcggc cacaatggga ctgagacacg      360
  gcccatactc ctacgggagg cagcagtagg gaatcttcca caatgggcga aagcctgatg      420
  gagcaacgcc gcgtgtgtga tgaagggttt cggctcgtaa aacactgttg taagagaaga      480
  atgacattga gagtaactgt tcaatgtgtg acggtatctt accagaaagg aacggctaaa      540
  tacgtgccag cagccgcggt aatacgtatg ttccaagcgt tatccggatt tattgggcgt      600
  aaagcgagcg cagacggtta tttaagtctg aagtgaaagc cctcagctca actgaggaat      660
  tgctttggaa actggatgac ttgagtgcag tagaggaaag tggaactcca tgtgtagcgg      720
  tgaaatgcgt agatatatgg aagaacacca gtggcgaagg cggctttctg gactgtaact      780
  gacgttgagg ctcgaaagtg tgggtagcaa acaggattag ataccctggt agtccacacc      840
  gtaaacgatg agtgctaggt gtttgagggt ttccgcccct aagtgccgca gctaacgcat      900
  taagcactcc gcctggggag tacgaccgca aggttgaaac tcaaaggaat tgacggggac      960
  ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat tcgaagcaac gcgaagaacc ttaccaggtc     1020
  ttgacatccc ttgacaactc cagagatgga gcgttccctt cggggacaag gtgacaggtg     1080
  gtgcatggtt gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt taagtcccgc aacgagcgca     1140
  acccttatta ctagttgcca gcattcagtt gggcactcta gtgagactgc cggtgacaaa     1200
  ccggaggaag gtggggatga cgtcaaatca tcatgcccct tatgacctgg gctacacacg     1260
  tgctacaatg gcgtatacaa cgagttgcca acccgcgagg gtgagctaat ctcttaaagt     1320
  acgtctcagt tcggattgta ggctgcaact cgcctacatg aagtcggaat cgctagtaat     1380
  cgcggatcag cacgccgcgg tgaatacgtt cccgggtctt gtacacaccg cccgtcacac     1440
  catgagagtt tgtaacaccc aaagccggtg gggtaacctt cggagccagc cgtctaaggt     1500
  gggaagatga ttagggtgaa gtcgtaacaa ggtagccgta ggagaacctg cggctggatc     1560
  acctccttct g                                                         1571
```

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ - ชื่อสกุล	นางสาวณัฐพร ภัทรสินไพบูลย์
วันเดือนปีเกิด	22 มีนาคม 2526
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 5/1 หมู่ 2 แขวงตลิ่งชัน เขตตลิ่งชัน จังหวัดกรุงเทพมหานคร 10170
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2544	ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนวัดน้อยใน (ปัจจุบันได้รับพระราชทานนามเป็น โรงเรียนทีปังกรวิทยาพัฒน์ (วัดน้อยใน) ในพระราชูปถัมภ์ฯ)
พ.ศ. 2549	วท.บ. (จุลชีววิทยา) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
พ.ศ. 2552	วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ผลงานทางวิชาการ

พรทิพย์ สุขสวัสดิ์; อรอนงค์ พริ้งศุลกะ; จริยา สินเดิมสุข; ณัฐพร ภัทรสินไพบูลย์; ณัฐพงษ์ ใจคง; และ ชลธิศ เทพยศ. (2549). การศึกษาสมบัติของวิบริโอเฟจที่แยกจากตัวอย่างน้ำทะเลและอาหารทะเลดิบในประเทศไทย. *วารสารวิทยาศาสตร์ มศว* 22(2): 34-47.

อรอนงค์ พริ้งศุลกะ; และ ณัฐพร ภัทรสินไพบูลย์. การแยกแบคทีเรียกรดแลคติค และเฟจของแบคทีเรียกรดแลคติคจากตัวอย่างแหนม. การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 34. 31 ตุลาคม – 2 พฤศจิกายน 2551, ณ ศูนย์ประชุมแห่งชาติสิริกิติ์ กรุงเทพมหานคร: 75.

ณัฐพร ภัทรสินไพบูลย์; อรอนงค์ พริ้งศุลกะ; อัจฉริยา รังษิรุจิ และ ณัฏฐิกา สุวรรณาศรัย. (2552). การแยกแลบเฟจจากตัวอย่างแหนมในประเทศไทย. *วารสารวิทยาศาสตร์ มศว* 25(1): (กำลังตีพิมพ์)