Agricultural Sci. J. 39 : 3 (Suppl.) : 469-472 (2008) ว. วิทย. กษ. 39 : 3 (พิเศษ) : 469-472 (2551)

การผลิตกล้าเชื้อโยเกิร์ตที่ทนต่อแบคทีรีโอฟาจ

Production of Yoghurt Starters Resistant to Bacteriophage

รัตติกาล คำมามุง[1] เรณู ปิ่นทอง[1] สุมาลี พฤกษากร[2] กุลชัย นาคบุปผา[1] พนิดา รัตนปิติกรณ์[1,3] และ อภิรักษ์ เพียรมงคล[1]

Rattikan Kommamung,[1] Renu Pinthong,[1] Sumalee Pruksakorn,[2] Kulchai Nakbubpa,[1] Panida Rattanapitigorn[1] and Aphirak Phianmongkhol[1,3]

Abstract

This study aimed to isolate bacteriophage (phage) - resistant lactic acid bacteria (LAB) to be used for yoghurt production. The experiments carried out by isolation of LAB from raw milk samples from 6 co-operative milk collection centers in Chiang Mai province, followed by induction of phages from isolated LAB obtained by added and non-added mitomycin C methods. The isolated phages were determined for bacterial-phage lysis reaction by performing spot test on the double layer-soft agar technique. It was found that isolates FSCMU 44-01, FSCMU 44-131 และ FSCMU 44-132 were the most phage resistant LAB whereas phage ϕFSCMU 40-061 and phageϕFSCMU 40-062 were the most active phages able to lyse most isolated LAB.

Keywords: lactic acid bacteria, bacteriophage, spot test

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ต้องการแยกเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกที่ทนต่อแบคทีรีโอฟาจ (ฟาจ) สำหรับใช้ในการผลิตโยเกิร์ต โดยทำการแยกเชื้อจากตัวอย่างนมดิบของโรงนมห้วยแก้วและสหกรณ์โคนมในเชียงใหม่ ทั้งหมด 6 แห่ง คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกที่มีคุณสมบัติการเจริญและสร้างกรดได้ดีในนม ที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส ได้จำนวน 20 สายพันธุ์ นำมาทำการทดสอบการปลดปล่อยฟาจ ด้วยการกระตุ้นด้วยการเติมและไม่เติม Mitomycin C แล้วทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกที่ทนต่อแบคทีรีโอฟาจ โดยวิธี spot test บน double layer- soft agar plate technique จากฟาจจำนวน 56 isolates พบว่าเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกที่ทนต่อฟาจมากที่สุด เช่น FSCMU 44-01, FSCMU 44-131 และ FSCMU 44-132 ส่วนผลของฟาจที่มีความสามารถสลายเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกได้มากที่สุด เช่น ฟาจ ϕFSCMU 40-061 และ ฟาจ ϕFSCMU 40-062

คำสำคัญ: แบคทีเรียผลิตกรดแลกติก แบคทีรีโอฟาจ spot test

คำนำ

การถนอมรักษาอาหารโดยใช้วิธีการหมักสามารถยืดอายุการเก็บอาหารได้ ซึ่งในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารขนาดใหญ่จะใช้ระบบการคัดเลือกกล้าเชื้อบริสุทธิ์ เพื่อให้เกิดความมั่นใจในคุณภาพของผลิตภัณฑ์สุดท้าย โดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก (Lactic acid bacteria, LAB) เชื้อจุลินทรีย์กลุ่มนี้สามารถผลิตกรดอินทรีย์หลายชนิด ไดอะซิติล ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และสารปฏิชีวนะ ได้ถูกนำมาใช้แพร่หลายในอุตสาหกรรมนม เชื้อ *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus bulgaricus* สายพันธุ์ต่าง ๆ มีความจำเป็นต่ออุตสาหกรรมการผลิตโยเกิร์ต

แบคทีรีโอฟาจ (Bacteriophage) ที่ติดเข้าไปกับกล้าเชื้อบริสุทธิ์ก่อให้เกิดปัญหาในอุตสาหกรรมนมตั้งแต่ ค.ศ. 1930 จากนั้นได้มีการศึกษาเพื่อแยกฟาจของเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกหลายชนิด ปัญหานี้ยังพบอยู่ในปัจจุบันและพบอยู่ทั่วโลก ทำให้เชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกซึ่งมีความสามารถในการผลิตกรดแลคติก ถูกใช้เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ ความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้จะเปลี่ยนแปลงเมื่อมีฟาจติดเข้าไปในเซลล์ของเชื้อนั้น การปนเปื้อนโดยฟาจชนิดรุนแรงอาจทำให้กล้าเชื้อนั้นถูกย่อยทำลายไปและทำให้การหมักเกิดขึ้นช้าหรือทำให้ผลิตภัณฑ์เสียได้(Moineau,1999)

[1] ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

[1] Department of Food Science and Technology, Faculty of Agro-Industry, Chiang Mai University

[2] ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

[2] Department of microbiology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University

[3] ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

[3] Postharvest Technology Innovation Center, Chiang Mai University

อุปกรณ์และวิธีการ

1.การเพาะเลี้ยงแยกเชื้อแบคทีเรียจากน้ำนมดิบ

นำตัวอย่างน้ำนมดิบของโรงนมห้วยแก้ว ซึ่งมาจากแหล่งผลิตทั้งหมด 6 แห่ง คือ จากผู้ผลิตรายย่อย(เชียงใหม่) รหัส 7010, ผู้ผลิตรายย่อย(เชียงใหม่) รหัส 7021, ผู้ผลิตรายย่อย(เชียงใหม่) รหัส 7009, สหกรณ์โคนมแม่ลาว, สหกรณ์โคนมแม่โจ้ และ สหกรณ์โคนมสันป่าตอง - แม่วาง นำตัวอย่างน้ำนมดิบแต่ละแห่งมาทำการ pour plate ด้วย MRS broth ที่ระดับการเจือจาง 10^{-1} ถึง10^{-8} แล้ว ทำการตรวจนับจำนวนโคโลนี และบันทึกคุณลักษณะของโคโลนีที่พบ

2. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกจากน้ำนมดิบ

ทำการถ่ายเชื้อแบคทีเรียลงเลี้ยงในหลอดทดลองบรรจุ Litmus milk คัดเลือกเอาเฉพาะหลอดที่ Litmus milk เกิดการแข็งตัว (curd) มาทำการ streak plate ลงใน MRS agar 2 ครั้งเพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวที่บริสุทธิ์ นำเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกที่แยกได้จากน้ำนมดิบและเก็บรักษาไว้ใน MRS broth ที่มี 15 % glycerol หรือใน glass beads ที่อุณหภูมิ -20°C และตรวจสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ catalase นำเชื้อซึ่งให้ผลลบต่อการทดสอบการสร้างเอนไซม์ catalase มาทำการศึกษาคุณสมบัติความสามารถเจริญใน Litmus milk, ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิ 10, 37, 44, และ 55°C, ความสามารถทนเกลือ NaCl ที่ระดับความเข้มข้น 2, 4, และ 6.5%, การทดสอบ Voges-Proskauer การทดสอบการใช้น้ำตาล glucose lactose และ mannitol ในสภาวะที่มีและไม่มีก๊าซออกซิเจน การทดสอบความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิ 55°C นาน 15 นาที และการตรวจสอบรูปร่างลักษณะของเชื้อแบคทีเรียจากการย้อมแกรม

3. การคัดแยกแบคทีรีโอฟาจจากเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก และการทำให้แบคทีรีโอฟาจมีความบริสุทธิ์

การคัดแยกและนับจำนวนแบคทีรีโอฟาจของเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก โดยวิธี double layer - soft agar technique โดยเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกที่แยกได้จากนมดิบนี้ที่ไว้ใน MRS broth ที่ อุณหภูมิ 40°C และ 44°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำไปเติม mitomycin C ให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ mitomycin C เท่ากับ 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่วนตัวอย่างควบคุมไม่เติมสารนี้ บ่มเชื้อใน MRS broth ต่อไปจนครบ 16 ชั่วโมงที่อุณหภูมิเดิม นำมาทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็วรอบ 5,000 rpm เป็นระยะเวลา 10 นาที จากนั้นดูดส่วนสารละลายใส (supernatant) มาทำการกรองด้วย syringe filter ที่มีขนาดรูกรอง 0.2 ไมครอน ส่วนที่กรองได้นี้เรียกว่า phage lysate ซึ่งมีแบคทีรีโอฟาจที่แยกได้จากแบคทีเรียที่เป็นโฮสต์(host) นำไปเตรียม double layer -soft agar technique ต่อไป โดยปิเปต phage lysate นี้ จำนวน 10 หรือ 100 ไมโครลิตร ผสมกับแบคทีเรียที่เป็นโฮสต์ซึ่งเลี้ยงไว้ใน MRS broth 1 คืน จำนวน 100 ไมโครลิตร เติมลงในหลอดบรรจุsoft MRS agar(มีวุ้น 0.5 %) จำนวน 12 มิลลิลิตรที่ผ่านการหลอมเหลวแล้ว และเติม $CaCl_2$ เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ผสมให้เข้ากัน เพื่อใช้เป็น top agar โดยเทลงบนผิวหน้าของ MRS-C agar ((bottom layer) เตรียมโดยเท MRS agar ผสม $CaCl_2$ เข้มข้นสุดท้าย 10 มิลลิโมลาร์ ในจานเลี้ยงเชื้อ ประมาณจานละ 10 มิลลิลิตร แล้วรอให้ MRS-C agar ในจานเลี้ยงเชื้อแข็งตัว) บ่มจานเลี้ยงเชื้อที่ อุณหภูมิ 40°C และ 44°C 18-24 ชั่วโมง นับจำนวนplaque รายงานเป็น pfu/ml และบันทึกลักษณะของplaque(บริเวณใสขนาด 0.5- 2 มิลลิเมตร) และ halo (บริเวณวงแหวนใสที่มีความขุ่นภายในและภายนอก)บนจานเลี้ยงเชื้อ ทำให้ ฟาจบริสุทธิ์ โดยตัด plaque ใส่ใน MRS broth 5 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่ 4°C 1 คืน แล้วเติมแบคทีเรียที่เป็นโฮสต์ซึ่งเลี้ยงไว้ใน MRS broth 1 คืน จำนวน 200 ไมโครลิตรลงไป บ่มที่ อุณหภูมิ 40°C และ 44°C 18-24 ชั่วโมง จนเกิด lysis ในสารละลายเชื้อ นำไปเตรียม phage lysate และทำตามขั้นตอน double layer -soft agar technique ต่อไปอีก 2 ครั้ง จนได้plaque ที่มีลักษณะเหมือนกันในจานเลี้ยงเชื้อ จะได้ แบคทีรีโอฟาจบริสุทธิ์

การเก็บรักษาแบคทีรีโอฟาจบริสุทธิ์ ดูด chloroform เข้มข้น 95% ที่เก็บรักษาไว้ในห้องเย็นที่อุณหภูมิ 4°C มาเติมหลอดละ 600 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองที่มี phage lysate จำนวน 6 มิลลิลิตร แล้วนำ เก็บรักษาไว้ในห้องเย็นที่อุณหภูมิ 4°C (Champagne and Gardner 1995)

4. การทดสอบการทนของแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกต่อแบคคทีริโอฟาจโดยวิธี spot test ให้ปิเปต phage lysate ที่เตรียมจากแบคทีรีโอฟาจบริสุทธิ์ที่แยกได้ จำนวน 100 ไมโครลิตร นำไปหยดลงบน top agar ในจานเลี้ยงเชื้อที่เตรียมตามวิธี double layer soft agar technique ข้างบนนี้ แต่ใน top agar นี้ เติมเฉพาะแบคทีเรียที่ต้องการนำมาทดสอบความต้านทานต่อฟาจเท่านั้นโดยไม่ได้ผสม phage lysate บ่มที่ อุณหภูมิ 40°C และ 44°C 18-24 ชั่วโมง สังเกตุว่าเกิด plague หรือ halo หรือ ไม่มี ควรทดสอบซ้ำเช่นนี้ 3 ครั้ง ถ้าปรากฏ plague หรือ halo แสดงว่าแบคทีเรียไม่มีความต้านทานต่อฟาจ แต่ถ้าไม่ปรากฏ plague หรือ halo แสดงว่าแบคทีเรียนั้นมีความต้านทานต่อฟาจ

ผล

1.การเพาะเลี้ยงแยกเชื้อแบคทีเรียจากน้ำนมดิบ

จำนวน colony ที่ตรวจนับได้ของตัวอย่างน้ำนมดิบจากโรงนมห้วยแก้วจากตัวอย่าง นมดิบสหกรณ์โคนมแม่ลาว (มล.) มีจำนวนเชื้อแบคทีเรียมากที่สุดคือเท่ากับ $2.5x10^9$ cfu/ml ตัวอย่างน้ำนมดิบที่มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียน้อยที่สุดคือตัวอย่างน้ำนมดิบจากผู้ผลิตรายย่อย(เชียงใหม่)รหัส 7010 มีจำนวนเชื้อแบคทีเรียเท่ากับ $1.1x10^5$ cfu/ml

2.การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกจากน้ำนมดิบ

ตัวอย่างน้ำนมดิบของโรงนมห้วยแก้วแต่ละแห่งได้ จำนวนเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกจำนวน 20 สายพันธุ์ ดังนี้ ตัวอย่างน้ำนมดิบจากผู้ผลิตรายย่อย(เชียงใหม่) รหัส 7021 จำนวน 4 สายพันธุ์ ตัวอย่างน้ำนมดิบจากผู้ผลิตรายย่อย (เชียงใหม่) รหัส 7009 จำนวน 1 สายพันธุ์ ตัวอย่างน้ำนมดิบจากสหกรณ์โคนมแม่โจ้ จำนวน 7 สายพันธุ์และตัวอย่างน้ำนมดิบจากสหกรณ์โคนมสันป่าตอง-แม่วาง จำนวน 8 สายพันธุ์

3. การคัดแยกแบคทีรีโอฟาจจากเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก และการทำให้แบคทีรีโอฟาจมีความบริสุทธิ์

เมื่อทำการคัดแยกแบคทีรีโอฟาจจากเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก และการทำให้แบคทีรีโอฟาจมีความบริสุทธิ์ จะได้ฟาจที่ได้จากตัวอย่างเชื้อแลคติกที่แยกได้จากน้ำนมดิบจากผู้ผลิตรายย่อย(เชียงใหม่) รหัส 7021 จำนวน 8 ลักษณะ, ฟาจที่ได้จากตัวอย่างเชื้อแลคติกที่แยกได้จากน้ำนมดิบจากผู้ผลิตรายย่อย(เชียงใหม่) รหัส 7009 จำนวน 2 ลักษณะ, ฟาจที่ได้จากตัวอย่างเชื้อแลคติกที่แยกได้จากน้ำนมดิบจากสหกรณ์โคนมแม่โจ้ จำนวน 1 ลักษณะ และฟาจที่ได้จากตัวอย่างเชื้อแลคติกที่แยกได้จากน้ำนมดิบจากสหกรณ์โคนมสันป่าตอง-แม่วาง จำนวน 6 ลักษณะ มีจำนวนเชื้อแบคทีรีโอฟาจประมาณเท่ากับ $1x10^4$ - $1x10^6$ pfu/ml ของ phage lysate

4. การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียผลิตกรดแลคติกที่ทนต่อแบคทีรีโอฟาจ

พบว่าเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกที่ทนต่อฟาจมาก ประกอบด้วย FSCMU 44-01, FSCMU 44-131, FSCMU 44-05, FSCMU 44-13, FSCMU 44-07, FSCMU 44-051, FSCMU 44-012, FSCMU 44-141, FSCMU 44-132, FSCMU 44-034 และFSCMU 44-19 ส่วนเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกที่ทนต่อฟาจน้อยประกอบด้วย FSCMU 44-036, FSCMU 44-032, FSCMU 44-035, FSCMU 44-09, FSCMU 44-03และ FSCMU 44-14 ส่วนผลของฟาจที่มีความสามารถสลายเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกได้มากประกอบด้วย ฟาจ ϕFSCMU 40-061, ฟาจ ϕFSCMU 40-062 และ ϕFSCMU 44-091 เป็นต้น ดังแสดงในภาพที่ 1 และฟาจที่มีความสามารถสลายเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกได้น้อย ประกอบด้วย ϕFSCMU 44-052, ϕFSCMU 40-002, ϕFSCMU 44-132 เป็นต้น

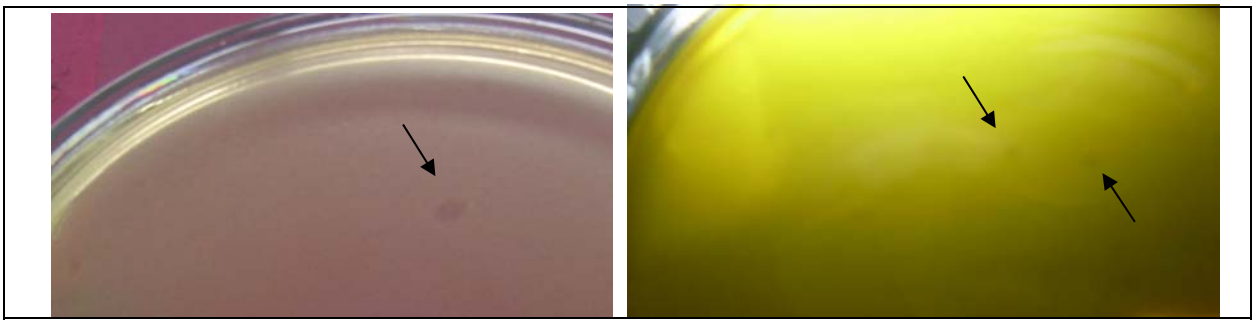

Figure 1 Bacteriophage (arrow) on MRS double layer –soft agar plates with isolated lactic acid bacteria as a host strain.

วิจารณ์ผล

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าเมื่อนำตัวอย่างน้ำนมดิบจากโรงนมห้วยแก้ว มาทำการตรวจนับเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างน้ำนมดิบสหกรณ์โคนมแม่ลาว (มล.) มีจำนวนเชื้อแบคทีเรียมากที่สุดคือเท่ากับ $2.5x10^9$ cfu/ml แต่ยังไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกทั้งหมด ซึ่งเมื่อนำมาทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีเพื่อคัดแยกเชื้อที่ผลิตกรดแลคติกจะเห็นได้ว่าตัวอย่างน้ำนมดิบจากสหกรณ์โคนมสันป่าตอง-แม่วาง ได้จำนวนแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกมากที่สุดคือ จำนวน 8 สายพันธุ์ และเมื่อทำการคัดแยกแบคทีรีโอฟาจจากเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก และเมื่อทำให้แบคทีรีโอฟาจมีความบริสุทธิ์ จะได้ฟาจมากที่สุดจากตัวอย่างเชื้อแลคติกที่แยกได้จากน้ำนมดิบจากผู้ผลิตรายย่อย(เชียงใหม่) รหัส 7021 ซึ่งจะมีจำนวน 8 ลักษณะ

เมื่อนำฟาจที่คัดแยกได้มาทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติไลโซเจน พบว่าเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกที่ทนต่อฟาจมาก จะพบว่าในตำแหน่งที่หยด phage lysate พบลักษณะตรงกลางขุ่นมีขอบใสล้อมรอบ และไม่พบการเปลี่ยนแปลงคือ มีความขุ่นเนื่องจากเชื้อเจริญดี และ ฟาจที่มีความสามารถสลายเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกได้ดี จะพบว่า พบ plaque ขนาดเล็กอยู่ในตำแหน่งที่หยด phage lysate และ อาจเกิด clear zone ขนาดใหญ่ตรงตำแหน่งที่หยด phage lysate

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณโครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิตสกว. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่สนับสนุนงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

Ackermann,H.W. (2001). Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. Arch Virol ; 146: 843-857

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

Champagne, C. P. and Gardner, N.(1995). The Spot Test Method for the In-plant Enumeration of Bacteriophages with Paired Cultures of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus salivarius* subsp.*thermophilus* International Dairy Journal 5:417-425.

Moineau, S. (1999). “Application of Phage Resistance in Lactic Acid Bacteria” Antonie Van Leeuwenhoek,.76, (1): 377-382.

Ross, R. P., Morgan, S.and Hill, C. (2002). Preservation and fermentation:past,present and future. International Journal of Food Microbiology 79:.3-16.