

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5280133

ชื่อโครงการ : การตรวจและศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียโอเฟจที่ทำลาย *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* TFF221 ซึ่งสามารถสร้างในจีนและมีศักยภาพเป็นหัวเชื้อในอาหารหมักของไทย

ชื่อนักวิจัย : ผศ.ดร.ปาริชาติ พุ่มขจร ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

E-mail Address : scpariph@ubu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี (16 มีนาคม 2552-15 มีนาคม 2554)

แบคทีเรียโอเฟจ ϕ TFF221 แยกได้จากกุ้งจ่อมและสามารถทำลาย *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* TFF221 ซึ่งสร้างในจีนได้ เมื่อนำแบคทีเรียโอเฟจไปเลี้ยงกับแบคทีเรียที่เป็นโฮสต์ จะทำให้เกิด plaque ที่มีลักษณะกลม-ใสแสดงว่าเป็นไลติกเฟจ เมื่อศึกษาสารพันธุกรรมของแบคทีเรียโอเฟจโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ พบว่าเป็น double-stranded DNA มีขนาดประมาณ 65 กิโลเบส จากการศึกษารูปร่างของแบคทีเรียโอเฟจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าส่วนหัวมีรูปร่างหลายเหลี่ยม มีหางยึด-หดได้ ที่บริเวณปลายหางมี baseplate และน่าจะจัดอยู่ใน *Myoviridae* family เมื่อศึกษาโปรตีนโครงสร้างหลักของแบคทีเรียโอเฟจโดยวิธี SDS-PAGE พบว่าประกอบด้วยโปรตีน 5 ชนิดซึ่งมีมวลโมเลกุลประมาณ 45.3, 39.8, 26.8, 16.5 และ 8.9 กิโลดาลตัน จากกราฟการเจริญของแบคทีเรียโอเฟจพบว่ามี latent period เท่ากับ 30 นาที burst period เท่ากับ 120 นาที และ burst size เท่ากับ 60 pfu/เซลล์ที่ติดเชื้อ แบคทีเรียโอเฟจมีความจำเพาะอย่างมากต่อแบคทีเรียที่เป็นโฮสต์ เนื่องจากไม่สามารถทำลายแลคติกแอซิดแบคทีเรียชนิดอื่นที่นำมาทดสอบ แบคทีเรียโอเฟจทนต่อค่า pH ในช่วงกว้างตั้งแต่ 4-10 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลายาวนานอย่างน้อย 3 นาที และทนต่อสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่ความเข้มข้น 1-5% ได้ดีกว่าที่ความเข้มข้น 10% จากการติดตาม *L. lactis* subsp. *lactis* TFF221-GFP⁺ ที่ใช้เป็นหัวเชื้อและแบคทีเรียโอเฟจ ϕ TFF221 ในอาหารหมักพบว่า จำนวนของ *L. lactis* subsp. *lactis* TFF221-GFP⁺ ที่เติมลงไปในการทดลองลดลงอย่างมากเมื่อมีแบคทีเรียโอเฟจอยู่ในอาหาร ข้อมูลที่ได้จากการตรวจพบและศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียโอเฟจในครั้งนี้ น่าจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนาวิธีการหมักอาหารแบบใช้หัวเชื้อ

คำหลัก : แบคทีเรียโอเฟจ, *Lactococcus lactis*, หัวเชื้อ

Abstract

Project Code : MRG5280133

Project Title : Detection and characterization of a bacteriophage against nisin producing-*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* TFF221, a potential starter culture in Thai fermented foods

Investigator : Asst. Prof. Parichat Phumkhachorn, Department of Biological Science, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University

E-mail Address : scpariph@ubu.ac.th

Project Period : 2 years (16 March 2009-15 March 2011)

A lytic bacteriophage ϕ TFF221, specific for nisin-producing *L. lactis* subsp. *lactis* TFF221, was first isolated from kung-jom, a Thai traditional fermented shrimp paste. The plaques were clear and round-shaped on the lawn of bacteria, indicating its lytic activity. Restriction analysis indicated that genome of phage ϕ TFF221 was double-stranded DNA with an approximate size of 65 kb. Transmission electron microscopy revealed that it had an icosahedral head with a contractile tail and a baseplate, and might be tentatively classified as a member of the *Myoviridae* family. Structural protein profile of phage ϕ TFF221 by SDS-PAGE showed five bands with molecular masses estimated at 45.3, 39.8, 26.8, 16.5, and 8.9 kDa. One-step growth experiment of its lytic activity appeared latent and burst periods of 30 and 120 min, respectively, with a burst size of about 60 pfu/infected cell. The phage was highly specific to its host. None of the tested LAB strains was sensitive to phage ϕ TFF221. Phage was stable over a wide pH range of 4-10 at 30°C for 1 h, and survived after heating at 70°C for at least 3 min. Phage had more survivals in 1-5% of NaCl than in 10% of NaCl. Kinetic monitoring of *L. lactis* subsp. *lactis* TFF221-GFP⁺ starter, which was containing pN014-GFP and had a fluorescent ability, and phage ϕ TFF221 in food model demonstrated the considerable decrease in the number of the starter in the presence of phage. Knowledge of these basic properties of this phage might be important for the development of using starter fermentation.

Keywords: Bacteriophage, *Lactococcus lactis*, starter culture