วิจารณ์ผลการทดลอง
(Discussion)

แม้ว่าการทำอาหารหมักในประเทศไทยส่วนใหญ่ยังไม่ค่อยนิยมใช้หัวเชื้อเป็นเชื้อเริ่มต้นของการหมักแต่เป็นการหมักโดยจุลินทรีย์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติ แต่หากต้องการพัฒนาอุตสาหกรรมอาหารหมักของไทยให้มีคุณภาพด้านมาตรฐานและความปลอดภัย ก็จำเป็นต้องมีการพัฒนาการหมักให้ได้มาตรฐานมากยิ่งขึ้น แนวทางหนึ่งในการพัฒนาอุตสาหกรรมการหมักคือการหาหัวเชื้อที่มีคุณภาพดีเพื่อนำไปใช้ในกระบวนการหมัก ปัจจุบันมีความพยายามในการพัฒนาหรือค้นหาแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการพัฒนาไปเป็นหัวเชื้อ แต่ทั้งนี้หัวเชื้อที่เหมาะสมก็ขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารหมักด้วย *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* TFF221 ที่สร้างไนซินเป็นแบคทีเรียที่น่าจะพัฒนาไปใช้เป็นหัวเชื้อของการหมัก เนื่องจากไนซินมีคุณสมบัติสำคัญคือสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคหลายชนิด แต่ปัญหาการทำลายหัวเชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรียดังกล่าวโดยแบคเทอริโอเฟจก็สามารถนำไปสู่ความล้มเหลวของกระบวนการหมัก หรือทำให้การหมักนั้นไม่ได้ผลผลิตตามที่ต้องการ แม้ว่าปัญหาดังกล่าวเป็นปัญหาที่พบได้ทั่วโลก แต่ข้อมูลเกี่ยวกับแบคเทอริโอเฟจในการทำลายหัวเชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรียของไทยยังไม่เคยมีรายงานไว้เลย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาเพื่อค้นหาแบคเทอริโอเฟจที่สามารถทำลาย *L. lactis* subsp. *lactis* TFF221 และศึกษาคุณสมบัติของแบคเทอริโอเฟจดังกล่าว ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลในการหาวิธีป้องกันหรือพัฒนาหัวเชื้อต่อไป

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการตรวจหาแบคเทอริโอเฟจที่สามารถทำลาย *L. lactis* subsp. *lactis* TFF221 โดยแยกแบคเทอริโอเฟจจากอาหารหมักหลายชนิดรวมจำนวน 30 ตัวอย่าง และสามารถตรวจพบแบคเทอริโอเฟจที่สามารถทำลาย *L. lactis* subsp. *lactis* TFF221 จากอาหารหมัก 1 ชนิดคือกุ้งจ่อม จึงให้ชื่อแบคเทอริโอแฟจที่ตรวจพบนี้ว่า ϕTFF221 เมื่อนำแบคเทอริโอเฟจ ϕTFF221 ไปศึกษาความสามารถในการทำลายแลคติกแอสิดแบคทีเรียชนิดอื่นอีกจำนวน 17 ชนิด ผลปรากฏว่าแบคเทอริโอเฟจดังกล่าวไม่สามารถทำลายแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่นำมาทดสอบเลย แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะ (specific) ระหว่างแบคเทอริโอเฟจ ϕTFF221 และ *L. lactis* subsp. *lactis* TFF221 และหลังจากการแยกแบคเทอริโอเฟจให้บริสุทธิ์โดยวิธี double layer plaque assay พบว่า plaque ที่ปรากฏมีลักษณะใส (clear plaque) แสดงว่าแบคเทอริโอเฟจชนิดนี้น่าจะเป็น lytic phage ดังนั้นหากในสิ่งแวดล้อมที่ *L. lactis* subsp. *lactis* TFF221 อาศัยอยู่มีการปนเปื้อนของแบคเทอริโอเฟจชนิดนี้ ก็น่าจะมีผลทำให้เกิดการตายของแบคทีเรียดังกล่าวเป็นจำนวนมาก

จากการศึกษาที่ผ่านมาเกี่ยวกับการค้นพบแบคเทอริโอเฟจที่สามารถทำลายแลคติกแอสิดแบคทีเรีย พบว่ามีทั้งแบคเทอริโอเฟจที่มีความจำเพาะสูงต่อโฮสต์เซลล์ (host specific) และแบคเทอริโอเฟจที่สามารถทำลายโฮสต์เซลล์ได้มากกว่าหนึ่งชนิด (broad host range) ตัวอย่างแบคเทอริโอเฟจที่สามารถทำลายโฮสต์เซลล์ได้เพียงชนิดเดียวหรือเพียงสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่ง

เท่านั้น ได้แก่ แบคเทอริโอเฟจ ϕPY5 ซึ่งแยกได้จากหญ้าหมักอาหารสัตว์ (silage) สามารถทำลาย *Lactobacillus casei* (Doi et al., 2003) แบคเทอริโอเฟจ Y4 ซึ่งแยกได้จาก sauerkraut สามารถทำลาย *Leuconostoc mesenteroides* LA112 (Yoon et al., 2002) แบคเทอริโอเฟจ Y20 ซึ่งแยกได้จาก sauerkraut สามารถทำลาย *Lactobacillus* sp. LA296 (Yoon et al., 2002) และแบคเทอริโอเฟจ PL-1 ซึ่งแยกได้จาก yakult สามารถทำลาย *Lactobacillus casei* Shirota strain (Watanabe et al., 1970) เป็นต้น สำหรับตัวอย่างแบคเทอริโอเฟจที่สามารถทำลายโฮสต์เซลล์ได้มากกว่าหนึ่งชนิดหรือหลายสายพันธุ์ ได้แก่ แบคเทอริโอเฟจ ϕPY1, ϕPY2, ϕPY3, ϕPY4, ϕPY6, ϕPY7, ϕPY8, ϕPY9 และ ϕPY10 ซึ่งแยกได้จากหญ้าหมักอาหารสัตว์ (silage) (Doi et al., 2003) แบคเทอริโอเฟจ ϕJL-1 ซึ่งแยกได้จากแตงกว่าดอง (Lu et al., 2003) แบคเทอริโอเฟจ ϕ1, ϕ2, ϕ3, ϕ4, ϕ5, ϕ6, ϕ7, ϕ8, ϕ9, ϕ10 และ ϕ11 ซึ่งแยกได้จาก yogurt (Quiberoni et al., 2003b) แบคเทอริโอเฟจ SC921 ซึ่งแยกได้จากกิมจิ (kimchi) (Yoon et al., 2001) และแบคเทอริโอเฟจ jw30, jw31 และ jw32 ซึ่งแยกได้จาก cheddar cheese (Josephsen et al., 1999) เป็นต้น

การบุกรุกทำลายโฮสต์เซลล์ของแบคเทอริโอเฟจโดยทั่วไป ขั้นตอนสำคัญและเป็นจุดเริ่มต้นของการเข้าไปเพิ่มจำนวนในโฮสต์เซลล์คือ phage adsorption ในการศึกษานี้จึงได้ทำการทดลองตรวจหาเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะของแบคเทอริโอเฟจ ϕTFF221 บนผิวของเซลล์ *L. lactis* subsp. *lactis* TFF221 และพบว่ามีค่าสูงถึง 97.8% เมื่อเวลาผ่านไปเพียง 15 นาที จากผลการศึกษานี้เป็นไปได้ว่าเมื่อแบคเทอริโอเฟจได้พบเจอกับโฮสต์ที่จำเพาะ หรืออยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีโฮสต์เซลล์อาศัยอยู่ แบคเทอริโอเฟจจะนำโครงสร้างที่เรียกว่า attachment site ซึ่งมักอยู่บริเวณภายนอกของแบคเทอริโอเฟจมายึดเกาะกับ receptor site ที่มักเป็นโครงสร้างภายนอกของแบคทีเรียเช่นกัน ซึ่งอาจอยู่ที่ pili, fimbriae หรือ cell wall ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย ระยะเวลาที่ใช้ในขั้นตอน phage adsorption นี้อาจแตกต่างกันไปและเป็นลักษณะเฉพาะตัวของแบคเทอริโอเฟจและโฮสต์เซลล์แต่ละคู่ เช่น แบคเทอริโอเฟจ ϕJL-1 มีเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะบนผิวของโฮสต์เซลล์ *Lactobacillus plantarum* MU45 สูงถึง 96% ภายในเวลา 30 นาที (Lu et al., 2003) แบคเทอริโอเฟจ ϕLP1-A มีเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะบนผิวของโฮสต์เซลล์ *Lactobacillus plantarum* ATCC8014 สูงถึง 92% ภายในเวลา 45 นาที (Caso et al., 1995) และแบคเทอริโอเฟจ MLC-A มีเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะบนผิวของโฮสต์เซลล์ *Lactobacillus paracasei* ประมาณ 95% ภายในเวลา 45 นาที (Capra et al., 2006a) เป็นต้น

ปัจจัยสำคัญประการหนึ่งที่มีผลต่อขั้นตอน phage adsorption คือประจุ (ion) ที่ปรากฏอยู่ภายนอกระหว่างโครงสร้างของแบคเทอริโอเฟจและแบคทีเรียและในสิ่งแวดล้อมที่สิ่งมีชีวิตทั้งสองอาศัยอยู่ร่วมกัน โดยธรรมชาติมักพบว่าโครงสร้างภายนอกของทั้งแบคเทอริโอเฟจและแบคทีเรียมักมีประจุโดยรวมเป็นลบ ซึ่งอาจทำให้เกิดการผลักกันของประจุลบดังกล่าว และเป็นอุปสรรคต่อขั้นตอน phage adsorption เคยมีรายงานว่าแบคเทอริโอเฟจอาจต้องการ divalent cations เช่น Ca^{2+} หรือ Mg^{2+} ในการเพิ่มจำนวน ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้ทดลองเติมสารละลายจำพวก divalent cations คือ $CaCl_2$ ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจ

โดยใช้ความเข้มข้นของ $CaCl_2$ ตั้งแต่ 0-50 mM ผลปรากฏว่าเมื่อความเข้มข้นของ $CaCl_2$ เท่ากับ 10 mM ทำให้แบคเทอริโอเฟจสามารถเพิ่มจำนวนได้มากที่สุด แสดงว่าการเติมสารละลาย $CaCl_2$ ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ น่าจะมีผลต่อการเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจ ϕTFF221 ในเซลล์ *L. lactis* subsp. *lactis* TFF221 ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Watanabe และ Takesue (1972) ที่รายงานว่า Ca^{2+} มีความจำเป็นต่อการ penetration เข้าสู่เซลล์ *Lactobacillus casei* ผลการทดลองของ Bowes และ Dowell (1974) ที่รายงานว่า divalent cations มีผลต่อขั้นตอน adsorption ของแบคเทอริโอเฟจ ST-1 กับ *Escherichia coli* W3110 และผลการทดลองของ Lu และคณะ (2003) ที่รายงานว่า Ca^{2+} น่าจะมีส่วนช่วยกระตุ้นให้แบคเทอริโอเฟจเพิ่มจำนวนใน *Lactobacillus plantarum* ได้อย่างรวดเร็ว อีกทั้งน่าจะมีส่วนช่วยทำให้เกิดการแตกสลาย (lysis) ของโฮสต์เซลล์ด้วย อย่างไรก็ตามเคยมีรายงานว่า divalent cations ไม่จำเป็นต่อการเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจในโฮสต์เซลล์เสมอไป เนื่องจากมีแบคเทอริโอเฟจหลายชนิดที่ไม่ต้องการ $CaCl_2$ หรือ $MgCl_2$ ในการเพิ่มจำนวน เช่น แบคเทอริโอเฟจ PL-1 และ J-1 (Capra et al., 2006b) เป็นต้น นอกจากนี้ในการศึกษานี้ยังพบว่าความเข้มข้นของ $CaCl_2$ ที่มากขึ้น (20-50 mM) ไม่ได้ช่วยทำให้แบคเทอริโอเฟจเพิ่มจำนวนมากขึ้นตามไปด้วย แสดงว่าผลของ divalent cations ต่อการเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจ ϕTFF221 ไม่ได้เป็นแบบ dose-dependent อย่างไรก็ตามการเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจในโฮสต์เซลล์เป็นกระบวนการที่ต่อเนื่องและประกอบด้วยหลายขั้นตอน เช่น phage adsorption, penetration, biosynthesis of progeny phage และ release เพื่อปลดปล่อย progeny phage ออกสู่นอกเซลล์โดยทำให้เกิดการแตกสลายของโฮสต์เซลล์ เป็นต้น จากผลการศึกษาในครั้งนี้ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าสารละลาย $CaCl_2$ ไปมีผลต่อขั้นตอนใดบ้างของการเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจ ดังนั้นประเด็นความสำคัญหรือบทบาทของสารละลาย $CaCl_2$ ต่อการเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจชนิดนี้จึงควรต้องทำการศึกษาในรายละเอียดต่อไป

แบคเทอริโอเฟจ ϕTFF221 ถือว่ามีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมได้ค่อนข้างดี คือสามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียสได้นานอย่างน้อย 3 นาที และอาจเป็นไปได้ว่าแบคเทอริโอเฟจชนิดนี้จะสามารถทนต่อการฆ่าหรือทำลายโดยวิธี pasteurization นอกจากนี้แบคเทอริโอเฟจ ϕTFF221 ยังสามารถมีชีวิตรอดได้แม้ในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วงกว้างตั้งแต่ pH 4-10 อีกด้วย ความสามารถในการทนทานต่อสภาวะแวดล้อมของแบคเทอริโอเฟจแต่ละชนิดอาจแตกต่างกันไป ยกตัวอย่างเช่น แบคเทอริโอเฟจ MLC-A สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 63 และ 72 องศาเซลเซียสได้นานอย่างน้อย 45 นาที และสามารถทนความเป็นกรด-ด่างในช่วง pH เท่ากับ 3-10 ได้ (Capra et al., 2006a) แบคเทอริโอเฟจ ϕJL-1 สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส (Lu et al., 2003) แบคเทอริโอเฟจ ϕYS40 สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสได้ดีเมื่ออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเช่น HB8 broth (Sakaki and Oshima, 1975) เป็นต้น การทราบความทนทานของแบคเทอริโอเฟจต่อสภาวะแวดล้อม น่าจะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการหาแนวทาง

หรือวิธีการป้องกันการปนเปื้อนของแบคเทอริโอเฟจในกระบวนการหมัก ในการศึกษานี้ยังได้ศึกษาเกี่ยวกับความทนทานของแบคเทอริโอเฟจ ϕTFF221 ในสารละลายเกลือ NaCl ที่มีความเข้มข้นต่ำ (low-salt; 1-5%) เปรียบเทียบกับความทนทานของแบคเทอริโอเฟจในสารละลายเกลือ NaCl ที่มีความเข้มข้นสูง (high-salt; 10%) โดยติดตามการรอดชีวิตของแบคเทอริเฟจเป็นเวลานานถึง 7 วัน พบว่าแบคเทอริโอเฟจชนิดนี้สามารถทนต่อสารละลายเกลือ NaCl ที่มีความเข้มข้นต่ำได้ดีกว่าสารละลายเกลือ NaCl ที่มีความเข้มข้นสูง ดังนั้นน่าจะเป็นไปได้ว่าหากนำ *L. lactis* subsp. *lactis* TFF221 ไปใช้เป็นหัวเชื้อในอาหารหมักที่มีความเข้มข้นของสารละลายเกลือ NaCl สูงกว่า 5% น่าจะช่วยลดโอกาสในการที่หัวเชื้อดังกล่าวจะถูกทำลายโดยแบคเทอริโอเฟจ ϕTFF221 ที่อาจปนเปื้อนอยู่ในกระบวนการหมัก

การศึกษารูปร่างและชนิดของสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการจำแนกชนิดของแบคเทอริโอเฟจ ในการศึกษานี้ได้ทำการตรวจสอบรูปร่างของแบคเทอริโอเฟจ ϕTFF221 โดยการดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน ซึ่งทำให้มองเห็นได้อย่างชัดเจนว่าแบคเทอริโอเฟจดังกล่าวมีรูปร่างแบบ complex structure โดยแบ่งเป็นส่วนหัวและหาง ส่วนหัวมีลักษณะเป็น icosahedral head และมีหางชนิดที่ยืด-หดได้ เรียกว่า contractile tail ดังนั้นแบคเทอริโอเฟจ ϕTFF221 จึงน่าจะถูกจัดไว้ใน *Myoviridae* family เมื่อพิจารณาตามเกณฑ์ของ International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) พบว่าแบคเทอริโอเฟจที่มีโฮสต์เซลล์เป็น *L. lactis* ส่วนใหญ่ (มากกว่า 95%) เป็นพวกที่มีหาง ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 3 family คือ *Myoviridae* คือพวกที่มีหางและหางยืด-หดได้ *Siphoviridae* คือพวกที่มีหางแต่หางยืด-หดไม่ได้ และ *Podoviridae* คือพวกที่มีหางสั้น และเท่าที่เคยมีรายงานไว้ก่อนหน้านี้พบว่า lactococcal phage ส่วนใหญ่จะพบอยู่ใน *Siphoviridae* family มีบ้างบางส่วนที่พบว่าอยู่ใน *Podoviridae* family ส่วน *Myoviridae* family นั้นพบได้ค่อนข้างน้อย อย่างไรก็ตามการจัดจำแนกแบคเทอริโอเฟจโดยอาศัยการศึกษารูปร่างเพียงอย่างเดียว ก็เป็นเพียงการจัดจำแนกในเบื้องต้นเท่านั้น แนวโน้มในอนาคตเมื่อมีการค้นพบแบคเทอริโอเฟจชนิดใหม่ ๆ เป็นจำนวนมาก การจำแนกแบคเทอริโอเฟจโดยอาศัยรูปร่างเพียงอย่างเดียวคงไม่เพียงพอ และเพื่อให้การจัดจำแนกแบคเทอริโอเฟจมีความน่าเชื่อถือและเป็นระบบมากขึ้น การศึกษาแบคเทอริโอเฟจในระดับโมเลกุล (molecular level) เช่น การศึกษาลำดับของสารพันธุกรรม (genome sequence) ของแบคเทอริโอเฟจ และการนำลำดับสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจแต่ละชนิดมาเปรียบเทียบกันเพื่อหาความสัมพันธ์หรือความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างแบคเทอริโอเฟจก็น่าจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง

จากผลการศึกษาโปรตีนโครงสร้างของแบคเทอริโอเฟจ ϕTFF221 โดยวิธี SDS-PAGE พบว่าประกอบด้วยโปรตีนโครงสร้างหลักที่มีขนาดตั้งแต่ 8.9-45.3 กิโลดาลตัน (kDa) โปรตีนโครงสร้างที่เป็นส่วนประกอบของแบคเทอริโอเฟจแต่ละชนิดอาจเป็นเอกลักษณ์หรือลักษณะเฉพาะตัวของแบคเทอริโอเฟจก็ได้ และน่าจะสามารถนำมาใช้ในการจัดกลุ่มหรือช่วยในการจำแนกชนิดของแบคเทอริโอเฟจได้ด้วย Braun และคณะ (1989) เคยทำการศึกษาโปรตีนโครงสร้างของ

แบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อ *L. lactis* จำนวน 10 ชนิด (โดยมี 6 ชนิดเป็น lytic phage และ 4 ชนิดเป็น temperate phage) โดยวิธี SDS-PAGE พบว่ารูปแบบของโปรตีน (protein profile) ที่พบในแบคเทอริโอเฟจทั้ง 10 ชนิดนั้นไม่เหมือนกันเลย แต่ความน่าสนใจของผลการทดลองนี้คือเขาพบว่าแบคเทอริโอเฟจส่วนใหญ่มีแถบโปรตีนที่มีขนาดเท่ากับ 30 kDa ปรากฏให้เห็น ผลการทดลองของ Braun และคณะ (1989) สอดคล้องกับผลการทดลองของ Kotsonis และคณะ (2008) คือพบว่าแบคเทอริโอเฟจ asccϕ28 ซึ่งจำเพาะต่อ *L. lactis* ก็มีโปรตีนที่มีขนาดเท่ากับ 30 kDa ปรากฏให้เห็นเมื่อศึกษาด้วยวิธี SDS-PAGE เช่นกัน และในการศึกษาโปรตีนโครงสร้างของแบคเทอริโอเฟจ ϕTFF221 ครั้งนี้ก็พบโปรตีนที่มีขนาดใกล้เคียงกับ 30 kDa เช่นกัน (คือโปรตีนที่มีขนาดเท่ากับ 26.8 kDa) ดังนั้นประเด็นที่น่าจะทำการศึกษาต่อไปคือการศึกษา N-terminal sequencing ของโปรตีนขนาด 30 kDa เพื่อจะได้นำไปสู่ DNA sequence ที่ควบคุมการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าว ตลอดจนช่วยให้ทราบ open reading frame (ORF) ของโปรตีนดังกล่าวใน DNA sequence นั้นอีกด้วย

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแบคเทอริโอเฟจและโฮสต์เซลล์ (relationship between bacteriophage and host cell) ในกระบวนการหมักนับว่ามีความน่าสนใจอย่างยิ่ง เพื่อจะได้ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงของจำนวนแบคเทอริโอเฟจและจำนวนแบคทีเรียในกระบวนการหมักที่เกิดขึ้นจริง แต่ในการติดตามแบคทีเรียชนิดใดชนิดหนึ่งในอาหารซึ่งประกอบด้วยแบคทีเรียอื่น ๆ อีกหลายชนิด ซึ่งจัดเป็น complex environment นั้นเป็นเรื่องที่ทำได้ค่อนข้างยาก ดังนั้นในการศึกษานี้จึงนำยีน *gfp* มาใช้ในการติดตามเซลล์แบคทีเรียที่สนใจซึ่งในที่นี้คือ *L. lactis* subsp. *lactis* TFF221 จากรายงานที่ผ่านมาการนำยีน *gfp* มาใช้ในการติดตามเซลล์แบคทีเรียสามารถใช้ได้ผลดีในแบคทีเรียหลายชนิดรวมทั้งแลคติกแอสิดแบคทีเรียด้วย (Fernandez de Palencia et al., 2000; Gory et al., 2001; Phumkhachorn et al., 2007) การนำยีน *gfp* ใส่เข้าไปในเซลล์แบคทีเรียทำโดยนำพลาสมิด pN014-GFP ซึ่งมียีน *gfp* ใส่เข้าไปในเซลล์ *L. lactis* subsp. *lactis* TFF221 จากนั้นทำการคัดเลือก transformant โดยเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มียา erythromycin และตรวจสอบคุณสมบัติของ transformant ที่ต้องการว่ามีคุณสมบัติดังนี้ (1) แบคทีเรียมีการรับพลาสมิดไว้ภายในเซลล์จริง โดยการสกัดพลาสมิดจากเซลล์แบคทีเรียมาตรวจสอบขนาด (2) โคโลนีของแบคทีเรียสามารถเรืองแสงได้เมื่อสัมผัสกับแสง UV และ (3) แบคทีเรียยังมีความไวต่อแบคเทอริโอเฟจ ϕTFF221 แบคทีเรียหรือ transformant ที่มีคุณสมบัติทั้งสามประการตามที่กล่าวมานี้ให้ชื่อว่า *L. lactis* subsp. *lactis* TFF221-GFP^{+} และนำไปใช้เป็นหัวเชื้อในกระบวนการหมัก สำหรับกระบวนการหมักที่ใช้เป็น food model เพื่อการติดตามหัวเชื้อและแบคเทอริโอเฟจในการทดลองนี้คือ กุ้งจ่อม เนื่องจากเป็นอาหารที่แยกแบคเทอริโอเฟจ ϕTFF221 ได้ โดยแบ่งออกเป็น 2 ชุดการหมัก คือ ชุดทดลองซึ่งเติมทั้งหัวเชื้อและแบคเทอริโอเฟจลงไป และชุดควบคุมซึ่งเติมเฉพาะหัวเชื้อแต่ไม่เติมแบคเทอริโอเฟจ เพื่อเปรียบเทียบจำนวนหัวเชื้อและจำนวนแบคเทอริโอเฟจในการทดลองทั้งสองชุด โดยการเก็บตัวอย่างมาตรวจทุกวัน เป็นเวลา 5 วัน ผลปรากฏว่าสามารถติดตามแบคทีเรียหัวเชื้อได้อย่างง่ายดาย เพียงแค่นำจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีโคโลนีของ

แบคทีเรียเจริญอยู่นั้นไปดูภายใต้แสง UV และนับจำนวนแบคทีเรีย และจากผลการติดตามหัวเชื้อและแบคเทอริโอเฟจในกุ้งจ่อมทั้งสองชุดการทดลอง พบว่าในชุดการทดลองแบคเทอริโอเฟจสามารถทำลายหัวเชื้อให้ลดลงอย่างมาก และในขณะเดียวกันจำนวนแบคเทอริโอเฟจก็เพิ่มขึ้นในทางตรงกันข้ามในชุดควบคุมจำนวนหัวเชื้อกลับเพิ่มมากขึ้น แต่ไม่สามารถตรวจนับจำนวนแบคเทอริโอเฟจได้เลยตลอดช่วงเวลาการหมัก ดังนั้นการทดลองนี้จึงชี้ให้เห็นอย่างชัดเจนว่า การปนเปื้อนของแบคเทอริโอเฟจในกระบวนการหมัก น่าจะมีผลทำให้หัวเชื้อถูกทำลาย จนอาจส่งผลให้หัวเชื้อที่เติมลงไปนั้นไม่มีบทบาทในกระบวนการหมัก