

ชื่อเรื่องการค้นคว้าแบบอิสระ

การแยกและการคัดเลือกกล้าเชื้อ โยเกิร์ต
ที่ทนต่อแบคทีรีโอฟาจ

ผู้เขียน

นางสาวรัตติกาล คำมามุง

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
(วิทยาศาสตรและเทคโนโลยีการอาหาร)

อาจารย์ที่ปรึกษาการค้นคว้าแบบอิสระ

ดร.พนิดา รัตนปิติกรรณ์

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะแยกเชื้อแบคทีเรียผลิตภัณฑ์กรดแลคติกที่ทนต่อแบคทีรีโอฟาจจากน้ำนมโค เพื่อนำไปผลิตเป็นกล้าเชื้อใช้ในอุตสาหกรรมนมจากแหล่งน้ำนมดิบของกลุ่มเกษตรกรผู้ผลิตนมดิบรายย่อยเชียงใหม่และเชียงราย 3 แห่ง มีจุลินทรีย์ทั้งหมดในช่วง $1.1 \times 10^5 - 2.5 \times 10^9$ cfu/ml ซึ่งสามารถแยกแบคทีเรียผลิตภัณฑ์กรดแลคติกจากน้ำนมดิบได้ 20 ไอโซเลท และแยกแบคทีรีโอฟาจโดยวิธี Double Layer Agar Technique ที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียสได้ 17 ไอโซเลท ทดสอบความต้านทานของแบคทีเรียต่อฟาจโดยวิธี Spot Test 56 ไอโซเลท วินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียผลิตภัณฑ์กรดแลคติกโดยวิธี gene sequencing และชุดทดสอบ API ได้ทั้งหมด 19 สายพันธุ์ ดังนี้ นมดิบของสมาชิกโรงงานนม อสค. ห้วยแก้ว เชียงใหม่ 3 ราย ได้แก่ รหัส 7010 พบ *Enterococcus faecium* ทั้งหมด 1 สายพันธุ์ รหัส 7021 พบ *E. faecium* ทั้งหมด 2 สายพันธุ์ และ *E. faecalis* 2 สายพันธุ์ รหัส 7009 พบ *E. faecium* 1 สายพันธุ์ สหกรณ์โคนมแม่ใจ พบ *E. durans* 4 สายพันธุ์ *E. faecalis* 1 สายพันธุ์ และ *Leuconostoc* spp. 1 สายพันธุ์ สหกรณ์โคนมสันป่าตอง-แม่วาง จังหวัดเชียงใหม่ พบ *E. faecium* 6 สายพันธุ์ และ *Leuconostoc* spp. 1 สายพันธุ์ คัดเลือกแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ที่แยกได้จากนมดิบคือ *Leuconostoc* spp. FSCMU 44-10 (IMJ) ที่แยกได้จากน้ำนมดิบจากสหกรณ์โคนมแม่ใจและ *Leuconostoc* spp. FSCMU 44-19 (hสด) ที่แยกได้จากสหกรณ์โคนมสันป่าตอง-แม่วาง มาเลี้ยงในนมขาดมันเนยร้อยละ 10 ในสภาวะมีฟาจ โดยฟาจที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ ϕ FSCMU40-061 ที่คัดแยกได้จาก *E. faecium* FSCMU40-061 ซึ่งเป็นฟาจที่มีขนาดดีเอ็นเอมากกว่า 3000 คู่ สามารถย่อยสลายแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกได้หลายสายพันธุ์ทั้งกรรมบวรूपร่างกายและแห้ง จึงใช้เป็นฟาจมาตรฐานในการทดสอบ พบว่า FSCMU 44-10 (IMJ)

สามารถผลิตกรดแลกติกได้ร้อยละ 0.31 และมีฟาจ 5.3 log pfu/ml และ h สด FSCMU 44-19 สามารถผลิตกรดแลกติกได้ร้อยละ 0.27 และมีฟาจ 6.2 log pfu/ml ในขณะที่เชื้อ *Streptococcus thermophilus* TISTR894 และ *Lactobacillus bulgaricus* TISTR895 ซึ่งใช้เป็นเชื้อมาตรฐานในการเปรียบเทียบความสามารถในการทนต่อฟาจ พบว่า *S. thermophilus* TISTR894 ผลิตกรดแลกติกได้ร้อยละ 0.33 มีฟาจ 7.7 log pfu/ml และ *Lb. bulgaricus* TISTR895 สามารถผลิตกรดแลกติกได้ร้อยละ 0.37 และมีฟาจ 5.6 log pfu/ml สรุปว่า *Leuconostoc* spp. FSCMU 44-10 (IMJ) ที่แยกได้จากการทดลองนี้มีความสามารถในการทนต่อฟาจมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก แกรมบวก รูปร่างกลม อีก 2 สายพันธุ์ที่ได้ในการทดลองนี้

The logo of Chiang Mai University is a circular emblem. It features a central illustration of an elephant standing and facing left. Above the elephant's head is a traditional Thai umbrella (parasol). The emblem is surrounded by a circular border containing the university's name in Thai script at the top and 'CHIANG MAI UNIVERSITY 1964' in English at the bottom. There are decorative floral motifs on either side of the elephant.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Independent Study Title Isolation and Screening of Bacteriophage
Resistant Yoghurt Starters

Author Miss Rattikan Kommamung

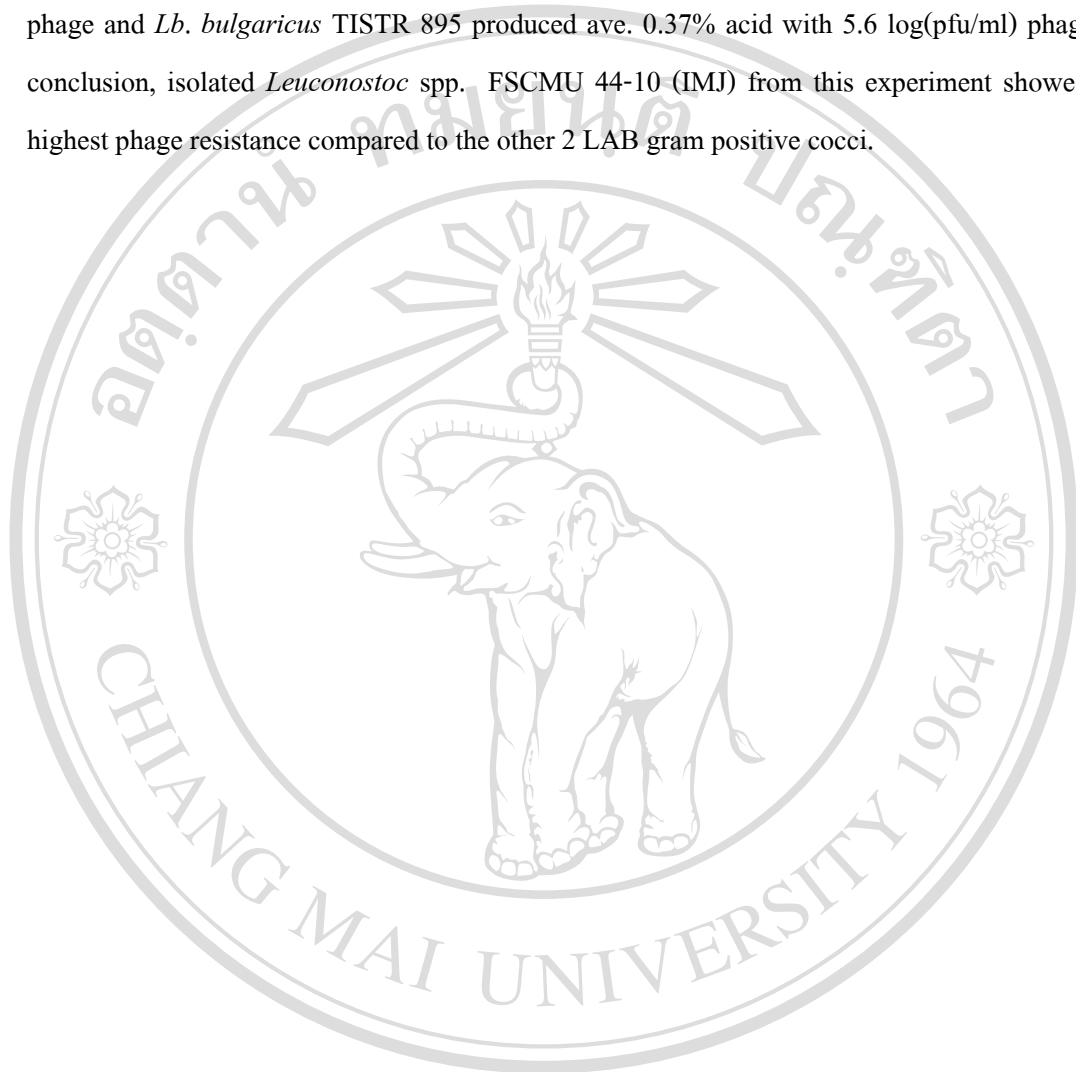
Degree Master of Science
(Food Science and Technology)

Independent Study Advisor Dr. Panida Rattanapitigorn

ABSTRACT

This project aimed to isolate LAB resistant to bacteriophage from raw milk to be used to produce fermented milk products. There were 3 raw milk sources from farms in Chiang Mai and Chiang Rai province contained 1.1×10^5 - 2.5×10^9 cfu/mL total counts which 20 isolates of LAB and 17 plagues (bacteriophage, phage) were isolated by Double Layer Agar Technique at 44°C. Bacteria were tested against 56 isolated phages for bacterial resistance by Spot Test. There were 19 LAB strains identified from raw milk by gene sequencing technique and API test kits from 3 raw milk sources. One strain of *Enterococcus faecium* from Hauy Kaew Dairy Factory member no. 7010, whereas 2 strains of *E. faecium* and 2 strains of *E. faecalis* were found from member no. 7021 and *E. faecium* from member no. 7009. There were 4 strains of *E. durans*, one strain of *E. faecalis* and one strain of *Leuconostoc* spp. isolated from Mae Jo, while 6 and 1 strains of *E. faecium* and *Leuconostoc* spp. respectively were identified from Sanpatong-Maewang Co-operatives in Chiang Mai. Selected 2 strain of LAB, *Leuconostoc* spp. FSCMU 44-10 (IMJ) isolated from Mae Jo Co-operatives and *Leuconostoc* spp. FSCMU 44-19 (หสศ) from Sanpatong-Maewang was cultured in 10% skim milk with 8 log(pfu/ml) phage. Phage ϕ FSCMU40-061, isolated from *E. faecium* FSCMU40-061 was used as reference phage. It contained more than 3000 base pairs DNA and was able to lyse both Gram positive cocci and rod LAB. FSCMU 44-10 (IMJ) was able to produce ave. 0.31% acid with 5.3 log(pfu/ml) phage and FSCMU 44-19 (หสศ) was able to produce ave. 0.27% acid with 6.2 log(pfu/ml) phage.

Streptococcus thermophilus TISTR894 and *Lactobacillus bulgaricus* TISTR 895 were used as reference culture. *S. thermophilus* TISTR894 was able to produce ave. 0.33% acid with 7.7 log(pfu/ml) phage and *Lb. bulgaricus* TISTR 895 produced ave. 0.37% acid with 5.6 log(pfu/ml) phage. In conclusion, isolated *Leuconostoc* spp. FSCMU 44-10 (IMJ) from this experiment showed the highest phage resistance compared to the other 2 LAB gram positive cocci.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อักษรย่อและสัญลักษณ์

มม.	=	มิลลิเมตร
พ.ศ.	=	พุทธศักราช
cfu	=	colony forming unit
g	=	กรัม
ml	=	มิลลิลิตร
No.	=	Number
ppm	=	Part Per Million
rpm	=	Revolutions per minute
mg	=	มิลลิกรัม
mmolar	=	มิลลิโมลาร์
M	=	โมลาร์
MC	=	Mitomycin C
pH	=	power of hydrogen ion
%	=	เปอร์เซ็นต์
°C	=	องศาเซลเซียส
pfu	=	plaque forming unit
v/v	=	ปริมาตรต่อปริมาตร
PCR	=	Polymerase Chain Reaction
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
TISTR	=	Thailand Institute of Scientific and Technological Research

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved