

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ	MRG4780015
ชื่อโครงการ	การผลิตสารต้านจุลชีพจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหาร
ชื่อนักวิจัย	ผศ.ดร.ปิยะนุช เนียมทรัพย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ รศ.ดร.อภิญา อ้วนนิก ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
Email address	piyanuch@mju.ac.th
ระยะเวลาโครงการ	กรกฎาคม 2547-ธันวาคม 2549

การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์ ที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้ โดยวิธี direct plating จำนวน 26,765 โคโลนี พบว่า มีโคโลนีที่เกิดวงใสต่อเชื้อทดสอบ จำนวน 66 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ของแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งต่อเชื้อทดสอบ โดยวิธี well diffusion assay พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท CF50, CF51 และ CF52 มีฤทธิ์การยับยั้งต่อแบคทีเรียกรดแลคติกที่อยู่ในกลุ่มใกล้เคียง และแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดในอาหารได้ แบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที สามารถทนพีเอชได้ในช่วง 3.0-10.0 และกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินถูกทำลายได้โดยเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน เช่น proteinase k และ protease จากการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งต่อทดสอบ และการทนความร้อนของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท CF52 ให้ผลการทดสอบดีที่สุด เมื่อนำไปจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CH และหาลำดับเบสของ DNA ในส่วนของยีน 16S rRNA พบว่า เป็นแบคทีเรีย *Lactobacillus salivarius* CF52 จากการทดสอบหาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 พบว่า แบคทีเรียชนิดนี้สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุดเท่ากับ 5,120 AU/ml ในอาหาร MRS สูตรดัดแปลง ซึ่งประกอบด้วย maltose เข้มข้น 2.5 % (w/v), peptone เข้มข้น 0.5 % (w/v), beef extract เข้มข้น 1.0 % (w/v), K_2HPO_4 เข้มข้น 0.1-0.2 % (w/v), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ เข้มข้น 1.0 % (w/v), CH_3COONa เข้มข้น 0.5 % (w/v), $(NH_4)_2C_6H_6O_7$ เข้มข้น 0.2 % (w/v), $MnSO_4 \cdot H_2O$ เข้มข้น 0.004 % (w/v) และ Tween 80 เข้มข้น 0.1 % (w/v) พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจนและทำให้แบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์บางส่วนโดยตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และ gel filtration ทำให้ แบคทีเรียโอซินมีกิจกรรมการยับยั้งจำเพาะสูงขึ้น 207 เท่า และมีน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนประมาณ 3.5 kDa โดยวิธี 16.5 % Tris-Tricine-SDS-PAGE

คำสำคัญ: แบคทีเรียกรดแลคติก แบคทีเรียโอซิน ระบบทางเดินอาหาร

Abstract

Project code	MRG4780015
Project title	Production of bacteriocin by lactic acid bacteria in the intestinal tract
Investigator	Assistant Professor Dr.Piyanuch Niamsup Program in Biotechnology, Faculty of Science, Maejo University Associate Professor Dr.Apinya Assavanig Department of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University
Email address	piyanuch@mju.ac.th
Project period	July 2004-December 2006

The isolation of 26,765 colonies of lactic acid bacteria (LAB) from human and animal gastrointestinal tracts to test for their bacteriocidin production through direct plating, resulted to only 66 isolates which were able to produce bacteriocin. Later when these isolates were tested for the antimicrobial spectrum of bacteriocin against indicator strains using the well diffusion assay, it was found that CF50, CF51 and CF52 isolates were able to inhibit not only closely related LAB but also some food-borne pathogens. Bacteriocin produced by these three strains was found to be heat resistant at 121°C for 20 minutes and pH range of 3.0-10.0 but bacteriocin was also found to be inactivated by enzymes, proteinase k and protease. Based on the study of the antimicrobial spectrum of the bacteriocin and heat resistance of these isolates, results indicated that bacterial isolate CF52 gave the best findings and later, when tested for classification of bacterial strain by API 50 CH and of DNA base sequencing in terms of 16S rRNA, this isolate was identified as *Lactobacillus salivarius* CF52. Further study on media composition and suitable culture conditions for bacteriocin production, results showed that this *Lb. salivarius* CF52 displayed optimum bacterial inhibition activity (5,120 AU/ml) when cultured with modified MRS medium containing maltose (2.5%), peptone (0.5%), beef extract (1.0%) K₂HPO₄ (0.1-0.2%), MgSO₄7H₂O (1.0%), Na-acetate (0.5%), (NH₄)₂C₆H₆O₇ (0.2%), MnSO₄H₂O (0.004%) and Tween 80 (0.1%), with an initial pH of 6.5 and incubated anaerobically at 37°C for 16 hours. In addition, when bacteriocin was partially purified using ammonium sulfate precipitation and gel filtration, results indicated a 270-fold increase of its specific activity and a molecular weight of about 3.5 kDa.

Keywords: lactic acid bacteria, bacteriocin, gastrointestinal tract