



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)

ปริญญา

พันธุศาสตร์

สาขา

พันธุศาสตร์

ภาควิชา

เรื่อง การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีนแบคเทอรีโอซินจากเชื้อ
Lactobacillus salivarius

Structure and Function Relationships of Bacteriocin of *Lactobacillus salivarius*

นามผู้วิจัย นางสาวปัทมสร แสงธนู

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์อัญญาณี คุณเบอร่า, ประ.ด.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เกียรติทิพย์ ชูวงศ์โกมล, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์สมศักดิ์ อภิสิทธิ์วานิช, Dr.Agr.Sci.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญาณี ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีนแบคเทอรีโอซินจาก
เชื้อ *Lactobacillus salivarius*

Structure and Function Relationships of Bacteriocin of *Lactobacillus salivarius*

โดย

นางสาวปภัศรา แสงธนู

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)

พ.ศ. 2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปัทมสรา แสงธนู 2555: การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้าง และหน้าที่ของ
โปรตีนแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus salivarius* ปรินญาวิทยาศาสตร์
มหบัณฑิต (พันธุศาสตร์) สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพันธุศาสตร์ อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์อัญญณี ภูเบอร่า, ปร.ค. 90 หน้า

แบคทีเรียโอซินเป็นโปรตีนที่ด้านจุลินทรีย์มีขนาดเล็ก ซึ่งสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่เป็น
สาเหตุการเน่าเสียของอาหาร วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้าง
และหน้าที่ โดยแบคทีเรียโอซิน Salvicin K (sal K) และ antimicrobial-like bacteriocin β (alb β) จากเชื้อ
Lactobacillus salivarius K4 ที่แยกมาจากลำไส้ไก่ถูกโคลนเข้าไปใน *E. coli* โดยใช้โปรตีน intein ขนาด
50 กิโลดาลตัน เป็น fusion tag โปรตีนถูกผสมที่ได้คือ inactive sal K, active sal K, inactive alb β และ
active alb β มีขนาดประมาณ 55 กิโลดาลตัน ถูกชักนำให้มีการแสดงออกด้วย IPTG พบว่าโปรตีน
ที่ได้อยู่ในรูป inclusion body ละลายโปรตีนที่ได้ใน 50 mM Tris-HCl pH 8.8 และนำไปทดสอบกิจกรรม
การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ โดยเทคนิค spot-on-lawn เพื่อตรวจสอบกิจกรรมการต้านเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย
พบว่า active alb β สามารถยับยั้งเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917^T ได้ หลังจากนั้นนำเปปไทด์
สังเคราะห์ active sal K และ active alb β ไปทดสอบความเข้มข้นของเปปไทด์ในระดับต่ำสุดที่
สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียเป้าหมาย (MIC) พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *Enterococcus*
faecalis JCM 5803^T, *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917^T และ *Streptococcus* sp. TISTR 1030
ตรวจสอบการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงของหนู พบว่า LC₅₀ ของเปปไทด์ active sal K และ
active alb β คือ 371.83 และ 366.23 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม
ต่อมิลลิกรัม และสามารถทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกตัว 87.36 เปอร์เซ็นต์ และ 85.38 เปอร์เซ็นต์
ตามลำดับ จากนั้นศึกษาโครงสร้างของเปปไทด์ด้วยเครื่อง spectropolarimeter พบว่าเปปไทด์
มีโครงสร้าง α -helix และ β -sheet ในสถานะที่มีลักษณะเหมือนเยื่อหุ้มเซลล์ การศึกษานี้แสดงว่า
โครงสร้าง α -helix และ β -sheet ของแบคทีเรียโอซิน sal K และ alb β อาจทำให้เกิดรูรั่วของเซลล์
เป้าหมาย จึงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ *Lb. salivarius* K4 สามารถใช้เป็น probiotic
เพื่ออุตสาหกรรมอาหารในอนาคตได้

Papassara Sangtanoo 2012: Structure and Function Relationships of Bacteriocin of *Lactobacillus salivarius*. Master of Science (Genetics), Major Field: Genetics, Department of Genetics. Thesis Advisor: Mrs. Anchane Kubera, Ph.D. 90 pages.

Bacteriocins are antimicrobial peptides that can inhibit bacteria which are the cause of food spoilage. The aims of the present study are to understand the mechanism of these peptides and to improve the bacteriocin production. Two isoforms of bacteriocin, salvicin K (sal K) and antimicrobial-like bacteriocin β (alb β) from *Lactobacillus salivarius* K4 were cloned into *Escherichia coli* using intein as a fusion tag. The recombinant proteins were expressed under IPTG induction as inclusion bodies. These inclusion bodies were solubilized in 50 mM Tris-HCl pH 8.8. The solubilized proteins were tested by spot-on-lawn technique to check antimicrobial activity against sensitive indicator strains. The recombinant active alb β fused with intein could inhibit *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917^T. The active sal K and alb β peptides were synthesized and checked their minimal inhibitory concentrations (MICs). The results showed antimicrobial activities of these peptides against several gram-positive bacteria, *Enterococcus faecalis* JCM 5803^T, *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917^T and *Streptococcus* sp. TISTR 1030. These two peptides also performed hemolysis against rat red blood cells. The LC₅₀ of sal K and alb β were found at 371.83 μ g/ml and 366.23 μ g/ml, respectively. The hemolysis activity of active sal K and active alb β were 87.36% and 85.38%, respectively. No synergism of sal K and alb β was observed. Both sal K and alb β showed unordered structure when they were in buffer pH 3-9 but they exhibited alpha helix and beta sheet structure when they were in membrane-mimicking environment. These results implied that alpha helix and beta sheet conformation may play an important role for their antimicrobial activity.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ดร. อัญชนิ คูเบอร่า อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และ ผศ. ดร. เกียรติวิ หวงส์โกมล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ให้คำปรึกษาในการเรียน การค้นคว้าวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์

กราบขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาพันธุศาสตร์ และภาควิชาชีวเคมีทุกท่าน ที่ได้อบรม สั่งสอน เอื้อเฟื้อสถานที่ และมอบความรู้อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

ขอขอบพระคุณมูลนิธิศาสตราจารย์ ดร.แถบ นีละนิธิ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย ที่มอบทุนสนับสนุนในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณสถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดลสาธาฯ ที่ให้ความ อนุเคราะห์ในการใช้เครื่อง Circular dichroism spectroscopy ในการศึกษาโครงสร้างโปรตีนทุติยภูมิ

ขอขอบพระคุณคุณพ่อ และคุณแม่ที่ได้อบรมสั่งสอน และให้กำลังใจตลอดมา และความ ห่วงใยจากพี่น้องในครอบครัว

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณ นางสาวชนิดา เป้นจันทร์ สำหรับคำปรึกษา และคำแนะนำในการทำ วิทยานิพนธ์เป็นอย่างดี ขอขอบคุณสมาชิกในห้องปฏิบัติการ 4507 ภาควิชาพันธุศาสตร์ ซึ่งคอยให้ คำปรึกษาในระหว่างการทำวิทยานิพนธ์ ตลอดจนคอยช่วยเหลือในทุกๆ เรื่องจนงานสำเร็จลุล่วง

ปภัสตรา แสงธนู

สิงหาคม 2555

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	29
อุปกรณ์	29
วิธีการ	31
ผลและวิจารณ์	41
ผล	41
วิจารณ์	71
สรุปและข้อเสนอแนะ	76
สรุป	76
ข้อเสนอแนะ	78
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	79
ภาคผนวก	84
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	90

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียโอซินและสารปฏิชีวนะ	14
2	เชื้อเป้าหมายที่ใช้ทดสอบ 14 สายพันธุ์	36
3	ผลกิจกรรมการยับยั้งเชื้อทดสอบโดยวิธี MIC ของเปปไทด์สังเคราะห์ active sal K และ active alb β ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	54
4	ผลการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ และค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (means $\pm$ SEM) การแตกตัวของเม็ดเลือดแดงใน active sal K และ active alb β	56
5	การคำนวณเปอร์เซ็นต์โครงสร้างทุติยภูมิจากค่า CD spectra ด้วยโปรแกรม SELCON Version 3	64

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การเกิดรู (pore) ของลิปิดไบเลเยอร์ ในแบบจำลอง barrel-stave	7
2	การเกิดรู (pore) และ micelles ในแบบจำลอง carpet	8
3	การเกิดรู (pore) ในแบบจำลอง toroidal pore	9
4	กระบวนการผลิตแบคทีเรียโอซินเกิดจากการทำงานร่วมกันของ HK, RR และ IP ส่งสัญญาณเหนี่ยวนำให้เกิดการลอรหัสของยีน โดย IP จะถูกส่งออกนอกเซลล์พร้อมกับแบคทีเรียโอซินด้วย ABC transporter และ accessory protein จากนั้น IP ที่ผลิตจะเกิดการสะสม และจับกับ HK บนเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดฟอสโฟลิเดชัน และเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ RR ซึ่งจะทำหน้าที่กระตุ้นการทำงานของยีนที่ผลิตแบคทีเรียโอซินต่อไป	18
5	การทำลายเซลล์เป้าหมายของแบคทีเรียโอซิน เกิดจากการที่แบคทีเรียโอซินแต่ละโมเลกุลมารวมกันทำให้เกิดเป็นรูหรือช่องว่างที่เยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมาย ซึ่งจะมีลักษณะคล้ายชิ้นไม้ที่มาประกอบกันเป็นผนังด้านข้างของถังไม้ รูดังกล่าวจะทำให้เกิดการเสียสมดุลไอออน สูญเสีย กรดอะมิโน และสารประกอบอินทรีย์ในหมู่ฟอสเฟต ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในการสร้างพลังงานของเซลล์	21
6	แสดงโครงสร้างโมเลกุลของ colicins ภายใน โมเลกุลจะจัดเรียงตัวเป็น 3 กลุ่ม แต่ละกลุ่มจะมีกิจกรรม และหน้าที่ต่างกันออกไป	22
7	กลุ่มยีนควบคุมการสังเคราะห์ class II แบคทีเรียโอซินใน <i>Lb. salivarius</i> UCC118 ประกอบด้วย 18 ORF	24
8	ลักษณะการหมุนของแสงโพลาไรซ์ที่ผ่านเข้าไปในสารตัวอย่างทำให้มีการหมุนของมุม	27
9	แสดงโครงสร้างทุติยภูมิของ alpha helix และ beta sheet (standard)	28
10	ตำแหน่งตัดจำเพาะที่ใช้สำหรับโคลนแบคทีเรียโอซินยีน <i>inactive sal K</i> , <i>active sal K</i> , <i>inactive alb β</i> และ <i>active alb β</i> ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>NdeI</i> และ <i>XhoI</i> เข้าสู่ดีเอ็นเอพาหะ pTYB1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>NdeI</i> และ <i>XhoI</i>	32
11	Intein fusion protein ทั้งสองแบบ คือ N-terminal fusion protein และ C-terminal fusion protein และการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์เมื่อใช้ intein fusion system	34

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
12	35
การทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อด้วยสารทดสอบ bacteriocins fused intein (inactive sal K, active sal K, inactive alb β และ active alb β) positive control (<i>Lb. salivarius</i> K4), negative control (50 mM Tris-HCl pH 8.8) โปรตีนในรูป Inclusion body (โปรตีนที่ละลาย 50 mM Tris-HCl pH 8.8) และโปรตีนในรูป supernatant หลัง sonication	
13	41
PCR amplification ของยีนแบคทีเรียโอซินสายแอลฟาและสายเบต้าแบบ inactive และ active form (M = DNA ladder marker, IA = inactive sal K, AA = active sal K, IB = inactive alb β และ AB = active alb β)	
14	42
ลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนของแบคทีเรียโอซิน <i>inactive sal K</i> , <i>active sal K</i> , <i>inactive alb β</i> และ <i>active alb β</i> จาก <i>Lb. salivarius</i> K4 โดยแบคทีเรียโอซินที่เป็น inactive form จะประกอบด้วย leader peptide เมื่อมีการตัด leader peptide ออกไป โดยใช้ตำแหน่งกรดอะมิโน GG เป็นตำแหน่งจดจำทำให้เปปไทด์แบคทีเรียโอซินกลายเป็น active sal K และ active alb β	
15	43
การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในเวกเตอร์ pTYB1 ซึ่งมีขนาด 55 กิโลดาลตัน (I คือ Inclusion body และ S คือ Supernatant)	
16	44
การละลายของรีคอมบิแนนท์โปรตีน bacteriocins fused intein (inactive sal K, active sal K, inactive alb β) และ active alb β ที่ละลายใน 50 mM Tris-HCl pH 8.8	
17	45
การแยกและทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยด้วยตัวจับที่จำเพาะของโปรตีน bacteriocins fused intein (inactive sal K)	
18	46
การแยกและทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยด้วยตัวจับที่จำเพาะของโปรตีน bacteriocins fused intein (active sal K)	
19	47
การแยกและทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยด้วยตัวจับที่จำเพาะของโปรตีน bacteriocins fused intein (inactive sal β)	
20	48
การแยกและทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยด้วยตัวจับที่จำเพาะของโปรตีน bacteriocins fused intein (active sal β)	

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
21 การแยกและทำโปรตีน bacteriocins fused intein (inactive sal K และ active sal K) ให้บริสุทธิ์ด้วยการตัดด้วย 50 mM DTT ของ ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง	49
22 การแยกและทำโปรตีน bacteriocins fused intein (inactive alb β และ active alb β) ให้บริสุทธิ์ด้วยการตัดด้วย 50 mM DTT ของ ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง	50
23 แสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของ active alb β fused intein ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 14917 ^T	51
24 แสดงการยับยั้งเชื้อทดสอบ 9 เชื้อ ในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่าเปปไทด์ sal K สามารถยับยั้งเชื้อ <i>Enterococcus faecalis</i> JCM 5803 ^T , <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 14917 ^T และ <i>Streptococcus</i> sp. TISTR 1030	52
25 แสดงการยับยั้งเชื้อทดสอบในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่าเปปไทด์ alb β สามารถยับยั้งเชื้อ <i>Enterococcus faecalis</i> JCM 5803 ^T , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> JCM 6124 ^T , <i>Lactobacillus sakei</i> TISTR 890, <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 14917 ^T และ <i>Streptococcus</i> sp. TISTR 1030	53
26 แสดงการยับยั้งเชื้อทดสอบในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก พบว่าเปปไทด์ sal K ไม่สามารถยับยั้งเชื้อเป้าหมายได้ แต่ alb β สามารถยับยั้งเชื้อ <i>Brochotrix campestris</i> NBRC 11547 ^T	53
27 การแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงของ sal K พบว่าเปปไทด์ที่ความเข้มข้น 500 $\mu\text{g/ml}$ มีการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดง 87.36 เปอร์เซ็นต์	55
28 การแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงของ alb β พบว่าเปปไทด์ที่ความเข้มข้น 500 $\mu\text{g/ml}$ มีการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดง 85.38 เปอร์เซ็นต์	55
29 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ และค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (means $\pm$ SEM) การแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงในเปปไทด์ sal K และ alb β	57
30 กราฟแสดงโครงสร้างสองทุติยภูมิของ active sal K ที่ละลายใน CH_3COONa (C) pH3-6 และ Tris-HCl (T) pH7-9 พบว่าไม่มีโครงสร้าง α -helix และ β -sheet	59
31 กราฟแสดงโครงสร้างทุติยภูมิของ alb β ที่ละลายใน CH_3COONa (C) pH3-6 และ Tris-HCl (T) pH7-9 พบว่าไม่มีโครงสร้าง α -helix และ β -sheet	59

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
32	กราฟแสดงโครงสร้างทุติยภูมิของ active sal K ที่ละลายใน SDS (S) กับ CH_3COONa (C) pH3-6 และ Tris-HCl (T) pH7-9 พบว่ามีโครงสร้าง α -helix ที่ pH7 และ pH9 ส่วน β -sheet ที่ pH8	60
33	กราฟแสดงโครงสร้างทุติยภูมิของ active alb β ที่ละลายใน SDS (S) กับ CH_3COONa (C) pH3-6 และ Tris-HCl (T) pH7-9 พบว่ามีโครงสร้าง α -helix ที่ pH3, pH4, pH5, pH6, pH7, pH8 และ pH9	60
34	กราฟแสดงโครงสร้างทุติยภูมิของ active sal K ที่ละลายใน liposome (L) กับ CH_3COONa (C) pH3-6 และ Tris-HCl (T) pH7-9 พบว่ามีโครงสร้าง α -helix ที่ pH4, pH6 และ pH8	61
35	กราฟแสดงโครงสร้างทุติยภูมิของ active alb β ที่ละลายใน liposome (L) กับ CH_3COONa (C) pH3-6 และ Tris-HCl (T) pH7-9 พบว่ามีโครงสร้าง β -sheet ที่ pH3, pH4 และ pH8	61
36	กราฟแสดงโครงสร้างทุติยภูมิของ active sal K ที่ละลายใน DPC (D) กับ CH_3COONa (C) pH3-6 และ Tris-HCl (T) pH7-9 พบว่ามีโครงสร้าง β -sheet ที่ pH5 และ pH9	62
37	กราฟแสดงโครงสร้างทุติยภูมิของ active alb β ที่ละลายใน DPC (D) กับ CH_3COONa (C) pH3-9 พบว่ามีโครงสร้าง β -sheet ที่ pH5, pH6, pH7, pH8 และ pH9	62

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีนแบคเทรีโอซินจาก เชื้อ *Lactobacillus salivarius*

Structure and Function Relationships of Bacteriocin of *Lactobacillus salivarius*

คำนำ

การใช้ยาปฏิชีวนะเป็นที่นิยมอย่างมากในการควบคุม และฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆที่เป็นอันตราย ทั้งทางด้านแพทย์ เพื่อรักษาโรคต่างๆที่เกิดขึ้นในมนุษย์ ด้านการปศุสัตว์ เพื่อยับยั้งโรคติดเชื้อมนุษย์ รวมไปถึงการเติมสารเคมีด้านจุลินทรีย์ในอาหาร และผลิตผลทางการเกษตร เช่น ผลิตภัณฑ์จากนม เนื้อสัตว์ เพื่อเป็นการยืดอายุของอาหารให้อยู่ในสภาพที่ดีได้ยาวนานขึ้น แต่ปัญหาใหญ่ที่พบในปัจจุบันคือ การดื้อยาของเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆต่อยาปฏิชีวนะ และสารเคมีด้านจุลินทรีย์ โดยมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น ทำให้การรักษาโรค การเก็บรักษาอาหาร และการถนอมอาหารไม่มีประสิทธิภาพ ส่งผลให้เกิดการสูญเสียประชากร รวมไปถึงการสูญเสียมูลค่าทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก ในปัจจุบันผู้บริโภคได้คำนึงถึงอันตรายที่เกิดจากการใช้สารเคมีในการถนอมอาหาร จึงได้มีการนำสารที่ได้จากธรรมชาติ (biopreservation) มาใช้ประโยชน์ในการถนอมอาหารมากขึ้น เพื่อป้องกันอันตรายที่อาจจะเกิดกับผู้บริโภค และลดปริมาณสารตกค้างในอาหาร ซึ่งแบคทีเรียกรดแลกติก เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ และมีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย ปัจจุบันได้มีการนำแบคทีเรียกรดแลกติกมาใช้ในการถนอมอาหาร และทำลายจุลินทรีย์ก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร โดยแบคทีเรียกรดแลกติกมีคุณสมบัติในการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียหลายชนิด เช่น กรดอินทรีย์ ไดอะซีทิล และแบคเทรีโอซิน โดยเฉพาะแบคเทรีโอซินพบว่ามีคุณสมบัติในการยับยั้งและทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค และจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเกิดการเน่าเสีย แต่ไม่ตกค้างในร่างกายผู้บริโภค โดยแบคเทรีโอซินจัดอยู่ในกลุ่มโปรตีนสายสั้นที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial peptide) ซึ่งโปรตีนในกลุ่มนี้สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากการศึกษาของ (Pilasombut, 2006) ได้ทำการคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลกติกจากลำไส้ไก่ที่สามารถสร้างโปรตีนสายสั้นแบคเทรีโอซินได้ และพบว่า *Lactobacillus salivarius* K4 และ K7 สามารถสร้างโปรตีนแบคเทรีโอซิน โดยแบคเทรีโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Lb. salivarius* K4 มี 2 ชนิด คือ Salivaricin B และ Salvicin K (abp118 α) โดยมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM1157, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM6124, *Enterococcus faecalis* JCM5803, *Bacillus coagulans* JCM2257, *Listeria innocua* ATCC33090

และ *Brochotrix campestris* NBRC11547 ส่วนแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Lb. salivarius* K7 สามารถสร้างแบคทีเรียโอซิน abp118 β และสามารถยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM1157, *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM6124 และ *B. coagulans* JCM2257

อย่างไรก็ตามการสกัดแบคทีเรียโอซินจากธรรมชาติในปัจจุบันต้องใช้เวลาทำให้บริสุทธิ์หลายขั้นตอน และแบคทีเรียโอซินที่ได้มีปริมาณน้อยมาก ดังนั้นจึงมีการพัฒนาทางด้านการผลิตแบคทีเรียโอซินในสิ่งมีชีวิตอื่น เช่น *Escherichia coli* (*E.coli*) ซึ่งจะช่วยให้เพิ่มปริมาณการผลิตแบคทีเรียโอซินได้ในปริมาณสูงขึ้นและเร็วขึ้น

จากการค้นคว้าข้อมูล พบว่ากลไกการทำงานของโปรตีนชนิดนี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่าเป็นอย่างใด ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จึงต้องการศึกษาโครงสร้าง และกลไกการทำงานของโปรตีนแบคทีเรียโอซินที่ได้จากเชื้อ *Lb. salivarius* เพื่อที่จะสามารถนำไปใช้ประโยชน์และประยุกต์ใช้ในการควบคุมจุลินทรีย์ที่เป็นอันตรายต่อทั้งคน และสัตว์ รวมไปถึงการปรับปรุงโปรตีนชนิดนี้ เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการฆ่าจุลินทรีย์ได้ดียิ่งขึ้น

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาการแสดงออกของโปรตีนแบคทีเรียโอซินในระบบที่เหมาะสม และการทำโปรตีนแบคทีเรียโอซินให้บริสุทธิ์
2. ศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ ของโปรตีนแบคทีเรียโอซิน
3. ศึกษาและเปรียบเทียบโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนแบคทีเรียโอซินโดยใช้ Circular dichroism spectroscopy และทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนแบคทีเรียโอซิน

การตรวจเอกสาร

เปปไทด์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Antimicrobial peptides, AMPs)

เปปไทด์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ เป็นโปรตีนขนาดเล็ก มีขนาดโมเลกุลน้อยกว่า 10 กิโลดาลตัน มีบทบาทในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้อย่างกว้าง (broad spectrum) เช่น แบคทีเรีย รา และไวรัส เป็นต้น เป็นเปปไทด์ที่สังเคราะห์โดยเอนไซม์และไรโบโซม (Beutler, 2004; Hancock and Sahl, 2006) โดยปกติธรรมชาติที่เป็นรหัสของเปปไทด์ต้านเชื้อจุลินทรีย์จำแนกได้หลายชนิด เปปไทด์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่พร้อมทำงานโดยปกติประกอบด้วยกรดอะมิโน 12-100 กรดอะมิโน มีประจุสุทธิเป็นบวก มีโครงสร้างแบบ amphiphatic หรือเปปไทด์ที่มีทั้งส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำในโมเลกุลเดียวกัน ซึ่งจะช่วยให้เกิดปฏิกิริยากับส่วนที่ไม่ชอบน้ำที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (Yeaman and Yount, 2007; Linde *et al.*, 2008; Sang and Blecha, 2008) สิ่งมีชีวิตที่สามารถสร้างเปปไทด์ต้านจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรียกรดแลคติก เชื้อรา พืช แมลง สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และมนุษย์ เป็นต้น

เปปไทด์ต้านเชื้อจุลินทรีย์สามารถแบ่งออกเป็นหลายกลุ่มตามลักษณะของโครงสร้าง และสมบัติของประจุในเส้นเปปไทด์ ซึ่งแบ่งกลุ่มได้ดังนี้

กลุ่มที่ 1 พวกที่มีประจุลบส่วนใหญ่มีขนาดเล็ก พบเปปไทด์กลุ่มนี้ในเยื่อเมือก เซลล์หลอดลม

กลุ่มที่ 2 เป็นเปปไทด์ที่มีประจุบวก ส่วนใหญ่ประกอบด้วยกรดอะมิโนไม่เกิน 40 กรดอะมิโน มักจะไม่มีกรดอะมิโนซิสเทอีน มักมีโครงสร้างหรือรูปร่างที่ไม่แน่นอนในสารละลาย แต่ถ้าละลายในสารละลายบางชนิด เช่น trifluoroethanol, SDS micelles, phospholipid และ liposome โครงสร้างของโมเลกุลมักเป็นแอลฟา-เฮลิคัล เช่น LL37 ซึ่งจากการศึกษาของนักวิทยาศาสตร์พบว่าการเกิดเป็นโครงสร้างแบบแอลฟา-เฮลิคัลจะทำให้มีคุณสมบัติเป็น antimicrobial peptide ได้ดียิ่งขึ้น

กลุ่มที่ 3 มีสมาชิกในกลุ่มประมาณ 44 เปปไทด์ มีประจุเป็นบวก และมักมีกรดอะมิโนที่จำเพาะเป็นองค์ประกอบจำนวนมาก

กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มเปปไทด์ที่มีทั้งประจุบวกและประจุลบ และมีกรดอะมิโนซิสเทอีนในโมเลกุล มีจำนวนประมาณ 380 เปปไทด์ และมีการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ มักเป็นโครงสร้างแบบแผ่นบีต้า

กลุ่มที่ 5 นอกจากนี้ปัจจุบันพบว่าเปปไทด์สายสั้นๆ จากโปรตีนบางชนิดก็มีสมบัติในการทำลายแบคทีเรียได้จากการศึกษาในกลุ่มนี้ หน้าที่ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่พบว่าเปปไทด์สายสั้นๆ ของไลโซไซม์ ฮีโมโกลบินของคน แอลฟา-แลคโตลูมิน หรือแลคโตเฟอริน จากแลคโตเฟอรินก็สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียได้เช่นกัน จากการศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีน หรือเปปไทด์สายสั้นๆเหล่านี้ ทำให้เข้าใจบทบาทและหน้าที่ของโปรตีนนี้ว่าการมีขนาด ลำดับกรดอะมิโน การมีประจุ หรือการเปลี่ยนโครงสร้างของเปปไทด์มีผลต่อการทำลายหรือยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

คุณสมบัติของ antimicrobial peptides

1. ขนาด (Size) มีขนาดตั้งแต่ 6 ลำดับกรดอะมิโนในเปปไทด์ที่มีประจุลบ จนมากกว่า 59 กรดอะมิโน
2. ลำดับกรดอะมิโนในโครงสร้าง (Sequence) มักพบเปปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนไลซีนและอาร์จินีน และพบกรดอะมิโนที่มีสมบัติเป็นไฮโดรโฟบิก เช่น อะลานีน ฟีนิลอะลานีน หรือทริปโตฟาน ไทโรซีน หรือบางเปปไทด์จะมีกรดอะมิโนที่มีลำดับที่ซ้ำๆ โดยทั่วไปจะมีอัตราส่วนของกรดอะมิโนที่เป็นไฮโดรโฟบิกต่อกรดอะมิโนที่มีประจุเป็น 1:1 หรือ 2:2
3. ประจุ (Charge) มีทั้งเปปไทด์ที่แสดงประจุบวกและประจุลบ โดยเปปไทด์ที่แสดงประจุลบจะประกอบด้วยกรดอะมิโนแอสปาดิก และกรดอะมิโนกลูตามิก ส่วนเปปไทด์ที่แสดงประจุบวกจะประกอบด้วยกรดอะมิโนไลซีนและอาร์จินีน เปปไทด์ที่เป็นคอมเพล็กซ์กับสังกะสีจะเป็นเปปไทด์ที่มีประสิทธิภาพในการทำลายแบคทีเรียได้ดีกว่าเปปไทด์ที่ไม่มีประจุ
4. โครงสร้างของเปปไทด์ (Conformation and structure) เปปไทด์ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจะมีโครงสร้างระดับทุติยภูมิหลายแบบ เช่น แอลฟาเฮลิกซ์ relaxed coils และบีต้าชีท ขนานสวนทางกัน จะพบโครงสร้างที่มีสองคุณสมบัติในเฮลิกซ์ (Amphipathic α helical peptides) ทำให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าเปปไทด์ที่ไม่มีโครงสร้างทุติยภูมิ

นอกจากนี้โครงสร้างที่เป็นบีตาชีทที่ขนานในทิศทางตรงข้ามก็เป็น โมเลกุลที่มีการทำลายเชื้อแบคทีเรียได้ดี

5. ความเป็นไฮโดรโฟบิก (Hydrophobicity) ความสามารถนี้จะเกี่ยวข้องกับการละลายได้ดีกับเมมเบรนที่เป็น lipid bilayer

6. ความเป็นสมบัติสองหน้า (Amphipathicity) เป็นโมเลกุลที่เป็นที่มีสมบัติเป็นสองหน้า คือด้านหนึ่งของโมเลกุลมีความเป็นไฮโดรโฟบิกส่วนด้านหนึ่งของโมเลกุลมีสมบัติเป็นประจุ

กลไกการทำงานของ antimicrobial peptides

เปปไทด์ที่ทำลายเชื้อแบคทีเรียได้ จะมีความหลากหลายทั้งในด้านโครงสร้าง และการทำหน้าที่ในการเข้าทำลายเชื้อแบคทีเรีย โดยทั่วไปพบว่ากลไกการทำลายหรือยับยั้งจะขึ้นอยู่กับรูปร่าง และประจุที่มีอยู่ในโครงสร้างของเปปไทด์นั้น มีหลายเทคนิคที่ใช้ในการศึกษากลไกการทำงานของเปปไทด์ และแต่ละเทคนิคก็จะทำให้ทราบรายละเอียดในแต่ละจุดซึ่งต้องมีการใช้หลายเทคนิคร่วมกัน จึงจะทำให้ทราบกลไกที่แน่ชัดได้

Antimicrobial peptide ทำหน้าที่ฆ่าเซลล์แบคทีเรีย

พบว่าเปปไทด์จะมีการฆ่าเซลล์แบคทีเรียได้แตกต่างกัน และมีการใช้เวลาที่แตกต่างกันด้วย ขึ้นอยู่กับชนิดของเปปไทด์ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่ามีขั้นตอนที่แตกต่างกันดังนี้

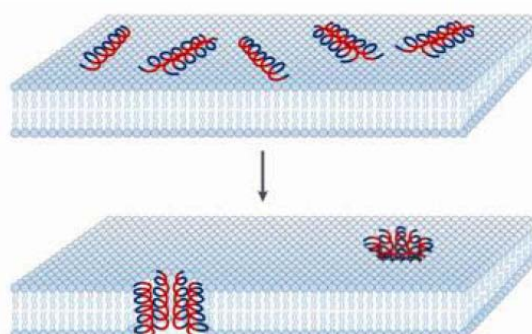
1. Attraction การเข้าจับของเปปไทด์กับผิวเซลล์แบคทีเรีย ขั้นตอนนี้น่าจะเกิดจากแรง electrostatic ระหว่างประจุของเปปไทด์กับผิวเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งพบว่าเปปไทด์ที่เป็นประจุบวกจะเข้าจับกับผิวด้านนอกของแบคทีเรียที่มีประจุลบ (LPS ของ Gram-negative) และกรดเทโคอิกที่อยู่บนผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก จากการศึกษาพบว่าเปปไทด์อาจมีกลไกการเกิดอิเล็กโตรสแตติกระหว่างประจุของเปปไทด์กับไฮโดรลาลิสมิกเมมเบรนได้

2. ขั้น Attachment เป็นขั้นตอนที่สำคัญที่จะทำให้เปปไทด์ผ่านเข้าไปหาเมมเบรน เป็นขั้นตอนที่เปปไทด์จะผ่านไลโปโพลีแซคคาไรด์ (LPS) ก่อนถึงเมมเบรนชั้นนอก ในกรณีแบคทีเรียแกรมลบ ส่วนแบคทีเรียแกรมบวกเปปไทด์จะต้องผ่านโพลีแซคคาไรด์ กรดเทโคอิก และไลโปโพลี

แซกคาไรด์ก่อนที่จะเข้าถึงไซโทพลาสซึมเมมเบรน ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่สำคัญแต่มีรายงานการศึกษาน้อยมาก ซึ่งพบว่าเมื่อเปปไทด์ผ่านเข้าสู่เมมเบรน เปปไทด์จะทำปฏิกิริยากับลิพิดไบเลเยอร์ที่สูง โครงสร้างระดับทุติยภูมิของเปปไทด์จะถูกดูดซับและฝังลงไป head group ของไขมันในสภาพที่ไม่ทำงานแต่ก็ทำให้เมมเบรนถูกดึงยืดออก และเมื่อความเข้มข้นของเปปไทด์เพิ่มขึ้น จะทำให้เมมเบรนบางลง ซึ่งมีความจำเพาะกับเปปไทด์ และความเข้มข้นของเปปไทด์ด้วย

3. ขั้นตอนการสอดเปปไทด์เข้าในเมมเบรนแล้วทำให้เกิดเมมเบรน permeability พบว่าถ้าความเข้มข้นของเปปไทด์และไขมันน้อย เปปไทด์จะจับแบบขนานกับชั้นไขมันไบเลเยอร์ และถ้ามีความเข้มข้นของเปปไทด์สูงขึ้น เปปไทด์จะสอดเข้าไปในเมมเบรน และเกิดเป็นรูขึ้น แล้วทำให้เมมเบรนเกิด permeability ซึ่งจะมีหลายแบบจำลองของการเกิดขั้นตอนนี้คือ

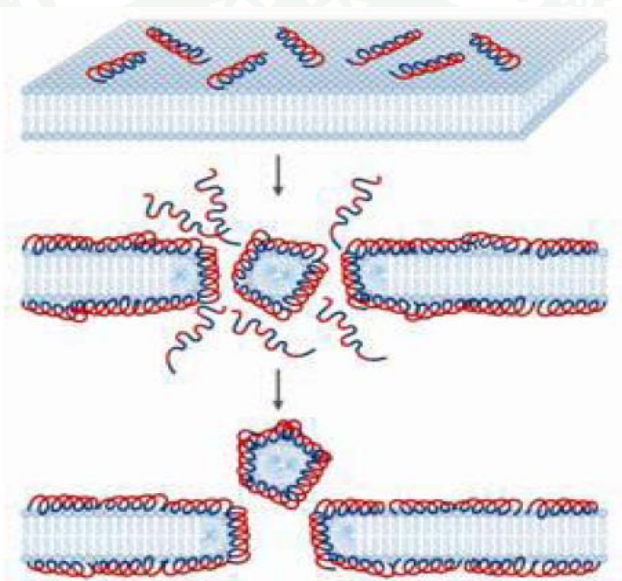
3.1 แบบจำลอง barrel-stave ซึ่งมีคของเปปไทด์ที่เป็นเฮลิคซ์จะอยู่ในเมมเบรนโดยมีลักษณะมีรูตรงกลางคล้ายลำกล้องปืนและมีคของเฮลิคซ์เปปไทด์ล้อมรอบรูเป็นวงกลม และมีเปปไทด์เฮลิคซ์เป็นตัวแท่งที่เมมเบรนและทำให้เกิดเปปไทด์ทะลุเข้าไป การสร้างรูจำลองแบบนี้จะมีลักษณะที่พิเศษ โดยการกระตุ้นของ Alamethicin ซึ่งจากการศึกษาหลายเทคนิคพบว่า Alamethicin จะเกิดเป็นแอลฟา-เฮลิคซ์แล้วสอดเข้าเมมเบรน โดยส่วนที่เป็นไฮโดรโฟบิกของเปปไทด์จะทำปฏิกิริยากับลิพิดในชั้นไขมันไบเลเยอร์ และส่วนที่เป็นไฮโดรฟิลิกของเปปไทด์จะทำปฏิกิริยากันเองทำให้เกิดรูขึ้นมา Alamethicin ที่ทำให้เกิดรูได้ จะประกอบด้วย 3-11 แท่งของแอลฟา-เฮลิคซ์ มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณด้านใน 1.8 nm และด้านนอก 4 nm นอกจากนี้ยังพบว่าถ้าส่วนประกอบของเมมเบรนเปลี่ยนไปจะกระตุ้นให้เกิดการรวมตัวของเปปไทด์ที่ได้จำนวนที่เปลี่ยนไป ดังแสดงภาพที่ 1



ภาพที่ 1 การเกิดรู (pore) ของลิพิดไบเลเยอร์ ในแบบจำลอง barrel-stave

ที่มา: Brogden K.A. (2005)

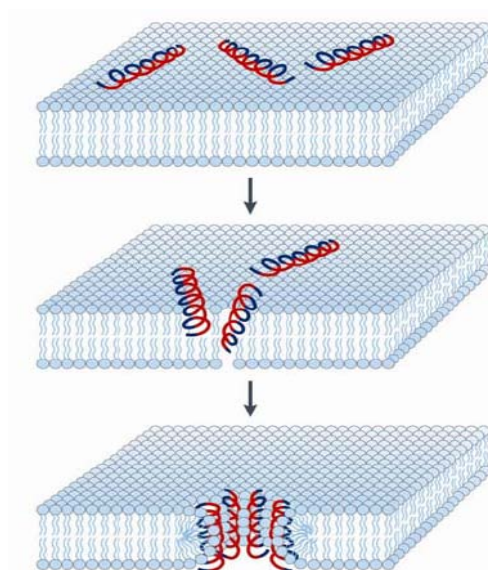
3.2 แบบจำลองแบบ carpet คือจะมีการสะสมของเปปไทด์ที่ผิวของชั้นไขมันไบเลเยอร์ ยกตัวอย่างเช่น ovipirin เปปไทด์นี้จะจับแบบขนานไปกับผิวของเมมเบรน โดยเปปไทด์จะทำปฏิกิริยาอิเล็กทรอนิกส์กับประจุลบของหมู่ฟอสเฟตหลายตำแหน่งเหมือนการปูพรม ความเข้มข้นของเปปไทด์ที่สูงจะทำให้เกิดการขัดขวางไบเลเยอร์เหมือนกับการทำงานของดีเทอร์เจนต์ (detergent) และทำให้เกิดไมเซลล์ขึ้น และในจุดที่ความเข้มข้นของเปปไทด์ที่สูงเปปไทด์จะสร้างรูชั่วคราวขึ้นในเมมเบรน ทำให้เปปไทด์เข้าสู่เมมเบรนได้มากขึ้น ซึ่งสุดท้ายจะทำให้เมมเบรนหลุดออกจากกันเกิดเป็น micelles ดังแสดงภาพที่ 2



ภาพที่ 2 การเกิดรู (pore) และ micelles ในแบบจำลอง carpet

ที่มา: Brogden K.A. (2005)

3.3 แบบจำลอง toroidal pore ตัวอย่างของ เปปไทด์คือ margainings, protegrins และ melittin ซึ่งเฮลิคซ์เปปไทด์นี้จะสอดเข้าไปในเมมเบรนแล้วกระตุ้นให้ lipid monolayer โค้งงอจนทำให้เกิดรู ซึ่งทำให้แกนกลางของน้ำถูกขนาบข้างโดยเปปไทด์ที่ถูกสอด และที่หัวของไขมัน โดยส่วนที่ขบของเปปไทด์จะทำปฏิกิริยากับ polar head group ของไขมัน ข้อแตกต่างของแบบจำลอง barrel stave model กับ toroidal pore คือ เปปไทด์ของ toroidal pore จะมีปฏิสัมพันธ์กับ lipid head group ถึงแม้จะสอดเข้าไปในชั้นไขมันไบเลเยอร์แล้วก็ตาม การสร้างรูของ margainings จะมีขนาดใหญ่กว่าที่พบใน Alamethicin โดยพบว่าจะมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3-8.4 nm และประกอบด้วย 4-7 มอนอเมอร์ของ margainings ดังแสดงภาพที่ 3



ภาพที่ 3 การเกิดรู (pore) ในแบบจำลอง toroidal pore

ที่มา: Brogden K.A. (2005)

จะเห็นว่ากลไกการฆ่าเชื้อแบคทีเรียอาจจะเกี่ยวข้องสัมพันธ์กับการสร้าง ion channel หรือการสร้างรูที่เมมเบรน (transmembrane pore) หรือการเกิดการเสียหายกับเมมเบรน แต่ก็ไม่ได้หมายความว่ากลไกต่างๆ เหล่านี้จะเกี่ยวข้องสัมพันธ์ในทุกเปปไทด์ อาจจะมีการจำลองอื่นๆ ที่ทำให้เกิดการเสียหายของเซลล์ ซึ่งเป็นไปได้ว่าเปปไทด์อาจจะไปทำให้เกิดการเสียหายกับเซลล์ของแบคทีเรียในส่วนอื่นได้ นอกจากนี้ยังอาจทำให้เซลล์ไม่เกิดการแบ่งตัวยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ ยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน จะเห็นได้ว่าการศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีน หรือเปปไทด์จะสามารถเข้าใจกลไกการทำงาน และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอนาคตได้

แบคทีเรียกรดแลคติก

การศึกษานุกรมวิธานของแบคทีเรียกรดแลคติก โดยอาศัยลักษณะทางกายภาพ สมบัติทางชีวเคมี ลักษณะพื้นฐาน องค์ประกอบของผนังเซลล์ กรดไขมันภายในเซลล์ ควินิน รวมทั้งการศึกษาระดับโมเลกุล การเข้าสู่กันของ DNA และลำดับเบสบน rRNA ทำให้พบลักษณะที่แตกต่างกันของแบคทีเรียแต่ละสกุล ปัจจุบันสามารถจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกออกได้เป็น 12 สกุล (นงลักษณ์และปรีชา, 2544)

แบคทีเรียกรดแลคติกจัดอยู่ในตระกูล Lactobacillaceae เจริญได้ในสภาวะที่มีอากาศเพียงเล็กน้อย (microaerophile) หรือไม่มีอากาศ (strictly anaerobe) เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่ได้พลังงานจากการหมักน้ำตาลโดยไม่ใช้ออกซิเจน จึงมีความต้องการสารอาหารที่ค่อนข้างซับซ้อน แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียกลุ่มใหญ่ที่มีความหลากหลายของลักษณะฟีโนไทป์ ชีวเคมี และสรีระวิทยา เนื่องจากมีความแตกต่างของโมลเปอร์เซ็นต์ G+C ภายในสกุลสูง ลักษณะของเซลล์มีรูปร่างท่อนหรือทรงรี (coccobacilli) ทนต่อกรดและต้องการสารอาหารหลายชนิด บางสายพันธุ์สามารถผลิตอะเลสเทียซึม (pseudo-catalase) ได้มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกสำหรับมนุษย์และสัตว์ (ภักดี, 2548) นอกจากนี้ยังเป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างกลม (cocci) หรือท่อน (rods) ไม่สร้างสปอร์ ไม่มีไซโตโครม (cytochrome) และมีค่า G+C content น้อยกว่า 55 โมลเปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วยจีสต่างๆ ได้แก่ *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Oenococcus* และ *Weissella* แบคทีเรียแลคติกจะเปลี่ยนอาหารที่มีน้ำตาลให้เป็นกรดแลคติกประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ และผลิตภัณฑ์อื่น เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะเซทิล และกรดอินทรีย์ แบคทีเรียแลคติกได้รับการยอมรับว่าเป็นแบคทีเรียที่ปลอดภัย (generally recognized as safe bacteria; GRAS status) และมักใช้ในการหมักอาหารและถนอมอาหาร ซึ่งอาจหมักโดยธรรมชาติโดยใช้แบคทีเรียแลคติกที่มีอยู่ในวัตถุดิบหรืออาจเติมแบคทีเรียแลคติกในรูปเชื้อตั้งต้น (start culture) เติมนลงในอาหารภายใต้สภาวะควบคุม

Lactobacillus

เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มใหญ่ที่สุด มีความหลากหลายของลักษณะฟีโนไทป์ ชีวเคมี และสรีระวิทยา เนื่องจากมีความแตกต่างของ mol%GC ภายในสกุลสูงระหว่าง 32-53 เปอร์เซ็นต์ เซลล์มีรูปร่างท่อนหรือทรงรี (coccobacillus) ทนต่อกรด และต้องการสารอาหารหลายชนิด ประกอบด้วย 55 สปีชีส์ บางสายพันธุ์สามารถผลิตอะเลสเทียซึม พบบริเวณลำไส้เล็กของสัตว์มีกระดูกสันหลังและพืช ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกสำหรับมนุษย์และสัตว์

Ulrike et. al. (2002) พบว่า *Lactobacillus* K7 แยกได้จากอุจจาระของทารกอายุ 1 สัปดาห์ มีความสามารถในการสร้าง bacteriocin-like activity ต่อแบคทีเรียกรดแลคติกสปีชีส์อื่นๆ หลายชนิดรวมทั้ง *Clostridium* sp. และพบว่ามีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก เช่น ทนต่อค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำ และสามารถผลิตแบคเทอรีโอซินได้สูงสุดในระยะ log phase ของการเจริญ

ชัยวัฒน์ (2547) รายงานว่า *Lb. salivarius* เป็นแบคทีเรียรูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ ดิจีสแกรมบวก และเปลี่ยนเป็นแกรมลบเมื่อมีอายุมากขึ้น ไม่สร้างกะตะเลส มีลักษณะเด่นคือ ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตเพียงเล็กน้อย (microaerophile) อุณหภูมิที่เหมาะสม 30-40 องศาเซลเซียส มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.5 ที่เหมาะสมต่อการเจริญ และพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ โดยเฉพาะในสัตว์ พบว่าเป็น microflora ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์

สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติก นอกจากจะมีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดกลิ่นเฉพาะตัวในอาหารหมักแล้ว ยังสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญ และทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเกิดการเน่าเสีย และจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ซึ่งปะปนมากับอาหาร ซึ่งสารที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างออกมาส่วนใหญ่เป็นกรดแลคติก และกรดอะซิติก นอกจากนี้ยังมีสารชนิดอื่นๆที่เกิดขึ้นในปริมาณน้อย แต่มีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่างๆ เช่นกัน ได้แก่ กรดฟอร์มิก, กรดไขมันอิสระ, แอมโมเนีย, เอทานอล, ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์, ไดอะซิติก, อะซิโตน, อะซิโตนไฮไดรด์ และเบนโซเอต เอนไซม์ที่มีผลทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก และแบคทีเรียโอซิน รวมทั้งสารยับยั้งที่ยังไม่สามารถจัดจำแนกได้อีกหลายชนิด นอกจากนี้การที่มีแบคทีเรียกรดแลคติกเจริญอยู่ร่วมกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ จะเป็นการควบคุมแบคทีเรียเหล่านั้นโดยทางอ้อมคือ จะทำให้เกิดการแข่งขันกันในการใช้สารอาหาร และการใช้พื้นที่สำหรับการเติบโต

ปัจจุบันแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก ได้รับความสนใจและมีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง โดยสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการถนอมอาหารด้วยวิธีการทางชีวภาพ ซึ่งเป็นวิธีการที่เลียนแบบมาจากการรักษาสมดุลของจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ ในธรรมชาติ จึงไม่มีสารพิษตกค้างเหมือนการใช้สารเคมี

การนำแบคทีเรียโอซินไปใช้ในการปรับปรุงความปลอดภัยในอาหาร

แบคทีเรียโอซินสามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงความปลอดภัยในอาหาร เพื่อลดการปนเปื้อนเนื่องจากอาหารเป็นพิษ โดยทั่วไปการควบคุมการผลิตอาหารในโรงงานอุตสาหกรรมควรมีระบบที่ป้องกันหรือลดจำนวนการปนเปื้อนของแบคทีเรีย ทั้งนี้รวมถึงการมีระบบสุขาภิบาล สุขอนามัย และการจัดการที่ดี (good manufacturing practices) ซึ่งครอบคลุมถึงกระบวนการตั้งแต่การคัดเลือกวัตถุดิบ บริเวณโรงงานผลิต ควบคุมผลิตภัณฑ์อาหาร รวมทั้งอนามัยส่วนบุคคล

นอกจากนี้การควบคุมความปลอดภัยของอาหารโดยอาศัยหลักการพื้นฐานของ Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) นั้น จะวัดจากการที่โรงงานสามารถจำแนก ประเมิน และควบคุมระบบอันตรายที่ส่งผลถึงความปลอดภัยในอาหาร (NACMCF, 1998)

แบคทีเรียโอซินได้เข้ามามีบทบาทอย่างน้อย 3 ทางในการควบคุมความปลอดภัยในอาหาร คือ การใช้แบคทีเรียโอซินที่บริสุทธิ์หรือบริสุทธิ์บางส่วนในการเติมเป็นส่วนประกอบหนึ่งในอาหาร การใช้สายพันธุ์ของเชื้อที่สร้างแบคทีเรียโอซินผสมกับองค์ประกอบที่ใช้เตรียมอาหาร หรือการใช้สายพันธุ์ที่สร้างแบคทีเรียโอซินแทนสายพันธุ์เดิมที่ใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในอาหารหมัก (Deegan *et. al.*, 2006)

ประโยชน์ของแบคทีเรียโอซินนั้นเป็นที่รู้จักกันมากกว่า 1,000 ปี ความรู้เกี่ยวกับแบคทีเรียโอซินชนิดอื่นที่มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับโอซินสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอาหารชนิดอื่นรวมทั้งนำมาใช้ในการยับยั้งเชื้ออื่น การใช้แบคทีเรียโอซินนั้นเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค เนื่องจากจะช่วยลดการใช้สารเคมี โดยอาจใช้แบคทีเรียโอซินร่วมกับสารที่ให้นอนมอาหารทางธรรมชาติอื่น

ปัญหาที่พบในการใช้แบคทีเรียโอซินในการใช้เป็นสารกันเสียในอาหาร คือ พบการพัฒนาการดื้อต่อแบคทีเรียโอซิน ซึ่งการแก้ไขปัญหานี้ทำได้โดยการใช้เชื้อตั้งต้นที่สร้างแบคทีเรียโอซินหลายสายพันธุ์ (Rogers *et. al.*, 1928)

ปัจจุบันได้มีการประยุกต์ใช้อณูพันธุ์ของแบคทีเรียโอซินที่มีการปรับปรุงทางพันธุวิศวกรรมมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยเทคนิคดังกล่าวสามารถเพิ่มความเสถียร และเพิ่มการสร้างแบคทีเรียโอซินให้มากขึ้น รวมทั้งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำลายเชื้อแบคทีเรียแกรมลบในอาหาร ซึ่งกระบวนการผลิตล้วนมีผลต่อแอกติวิตี และความเสถียรของแบคทีเรียโอซิน (Yuan *et. al.*, 2004)

แบคทีเรียโอซิน (Bacteriocin)

จากการศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียโอซิน พบว่าแบคทีเรียทั้งแกรมบวก และแกรมลบ สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้ ตัวอย่างของแบคทีเรียแกรมลบที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้ คือ *E. coli* ซึ่งสามารถผลิตสารในกลุ่มโปรตีนออกมายับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้ และเรียกสารดังกล่าวว่า

colicins ต่อมา มีการค้นพบสารที่มีลักษณะคล้าย colicin ซึ่งสร้างโดยแบคทีเรียแกรมบวก จึงเรียกลักษณะนี้ว่าแบคทีเรียโอซิน (bacteriocin) โดยในระยะแรกพบว่าแบคทีเรียโอซินเป็นโมเลกุลของโปรตีน ซึ่งสร้างจากแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ มีคุณสมบัติในการทำลายเฉพาะแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ในสปีชีส์เดียวกันเท่านั้น (Tagg *et. al.*, 1976) อ้างโดย พงษ์เทพ (2546) ให้คำจำกัดความของแบคทีเรียโอซินว่าเป็นสารประกอบโปรตีนที่มีลักษณะดังนี้

1. มีการออกฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียชนิดเดียวกัน หรือที่ใกล้เคียงกับแบคทีเรียที่สร้างแบคทีเรียโอซินออกมา
2. การออกฤทธิ์ทำให้แบคทีเรียที่ต้องการยับยั้งเกิดการตาย (bactericidal mode of action)
3. มีตำแหน่งที่จำเพาะในการยึดจับกับเซลล์เป้าหมาย
4. ยีนที่ควบคุมการสร้าง และการต้านทานของเซลล์ต่อแบคทีเรียโอซินที่สร้างขึ้นอยู่บนพลาสมิด (plasmid)
5. เซลล์ที่สร้างจะถูกทำลายขณะที่มีการปลดปล่อยแบคทีเรียโอซินออกนอกเซลล์

นอกจากนี้ยังพบว่าการสร้างแบคทีเรียโอซินภายในเซลล์ของแบคทีเรียเหมือนกับการสร้างโปรตีนทั่วไปที่ผลิตจากไรโบโซม ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนการถอดรหัส (transcription) และการแปลรหัส (translation) จากยีนที่ควบคุมการสร้างแบคทีเรียโอซิน โดยยีนที่ควบคุมการสร้างแบคทีเรียโอซินบางชนิดอยู่บนโครโมโซม เช่น nisin, lactocin, helveticin J, lactacin B และ F หรืออยู่บนพลาสมิด

ดังนั้นคำนิยามของแบคทีเรียโอซิน ซึ่งเป็นที่นิยมนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน คือ สารประกอบโปรตีนที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่มีความไวต่อสารดังกล่าว และไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ผลิต ในการศึกษาวิจัยทางด้านสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยทั่วไปอาจจะมี ความสับสนหรือไม่แน่ใจระหว่างแบคทีเรียโอซิน และสารปฏิชีวนะ ซึ่ง (Cleveland *et. al.*, 2001) ได้สรุปความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียโอซิน และสารปฏิชีวนะไว้ ดังแสดงตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียโอซินและสารปฏิชีวนะ

ลักษณะและคุณสมบัติ	แบคทีเรียโอซิน	สารปฏิชีวนะ
การนำไปใช้งาน	ทางอาหาร	ทางการแพทย์
กระบวนการสังเคราะห์	ผลิตจากไรโบโซม	ผลิตโดยผ่านกระบวนการที่เป็น secondary metabolite
ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมายที่มีความหลากหลาย	น้อย	มาก
การสร้างระบบภูมิคุ้มกันตนเองของเซลล์ผู้ผลิต	มี	ไม่มี
กลไกในการต่อต้านของเซลล์เป้าหมาย	โดยปรับสภาพองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์	โดยการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม
ลักษณะของปฏิกริยาบนเซลล์เป้าหมาย	ทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์	ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์หรือโครงสร้างภายในเซลล์
ความเป็นพิษหรือผลข้างเคียง	ยังไม่มีรายงาน	มี

ที่มา: คัดแปลงมาจาก Cleveland *et al.* (2001)

ความแตกต่างของแบคทีเรียโอซินกับสารปฏิชีวนะในการออกฤทธิ์ยับยั้ง คือ แบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแกรมบวกจะออกฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะกับแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแกรมลบจะออกฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะกับแบคทีเรียแกรมลบ ในขณะที่สารปฏิชีวนะคือ สารที่ผลิตจากสิ่งมีชีวิตทั้ง prokaryotes และ eukaryotes ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งสิ่งมีชีวิตทั้ง prokaryotes และ eukaryotes โดยที่ระดับความเข้มข้นต่ำ และจะไม่ยับยั้งตัวเอง และการใช้สารปฏิชีวนะสามารถใช้ได้การรักษาโรคเท่านั้น

แบคทีเรียโอซินบางชนิดที่มีฤทธิ์กว้าง เช่น ไนซิน จะมีประสิทธิภาพในการใช้มากกว่า โดยพบว่า ไนซินมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกได้หลายชนิด รวมถึงกลุ่มที่ก่อโรคด้วย (Tagg *et al.*, 1976) ซึ่งมักจะก่อโรคในอาหารกระป๋องและผลิตภัณฑ์นม โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ที่นำมาแปรรูปเป็นเนย ซึ่งความร้อนที่ใช้ในการฆ่าเชื้อจะแพร่ผ่านได้ลำบาก ในขณะที่แบคทีเรียโอซิน

ที่มีฤทธิ์แคบก็สามารถยับยั้งเชื้อเฉพาะกลุ่ม โดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในอาหาร เช่น *Listeria monocytogenes* โดยไม่ก่อให้เกิดอันตรายกับเชื้อประจำถิ่นชนิดอื่น

แบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกนั้นมีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการนำมาใช้เป็นสารกันเสียในอาหาร กล่าวคือ

1. เป็นที่ยอมรับว่าเป็นสารที่ปลอดภัย
2. ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ยูคาริโอต
3. สามารถถูกยับยั้งได้ด้วยน้ำย่อยประเภทโปรติเอส จึงมีผลน้อยมากกับแบคทีเรียที่อยู่ในระบบทางเดินอาหาร
4. มักจะทนต่อ pH และความร้อน
5. บางชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งกว้าง สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค และแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าในอาหาร เช่น *Listeria monocytogenes* และ *Clostridium botulinum*
6. มักถูกควบคุมการสร้างโดยพลาสมิด จึงง่ายต่อการทำ genetic manipulation
7. ช่วยให้ผลิตภัณฑ์อาหารมีคุณภาพดีขึ้น เช่น เพิ่มความปลอดภัย และรสชาติดีขึ้น
8. มีแอกติวิตีจำเพาะ (specific activity) (O'Sullivan, 2002)

การจัดจำแนกแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียโอซินแตกต่างจากสารปฏิชีวนะจำพวกเปปไทด์อื่น คือสร้างมาจากไรโบโซม (ribosomally synthesized) และจัดเป็นเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) รวมทั้งยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างจะพบเป็นคลัสเตอร์ (cluster) ในโอเปอรอน ในปัจจุบันมีการจัดจำแนกแบคทีเรียโอซินออกเป็น 4 class ซึ่งส่วนใหญ่แบคทีเรียโอซินที่พบมักจัดอยู่ใน class I และ class II

กลุ่ม 1 (class I) มีโครงสร้างเป็นเปปไทด์ ที่ทนความร้อน และมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (น้อยกว่า 5 กิโลดาลตัน) ซึ่งหลังจากผ่านกระบวนการแปลรหัสแล้ว จะเข้าร่วมตัวกับกรดอะมิโน แลนไทโอนิน (lanthionine; Lan) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีไทโออีเทอร์ (thioether) อยู่ในโมเลกุล และเมทิลแลนไทโอนิน (methyllanthionine; MeLan) ในบางครั้งจึงเรียก class I นี้ว่า แลนติไบโอติก (lantibiotics) มักแบ่งออกเป็น 2 type หรือ 2 subclass โดยอาศัยความคล้ายคลึงกันทางโครงสร้างเป็นหลักคือ type A หรือ subclass Ia ซึ่งเป็นสารที่มีโครงสร้างเป็นเปปไทด์ที่มีประจุเป็นบวก มีสายยาวไม่คงรูป และออกฤทธิ์โดยทำให้เกิดรูที่เชื่อมหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียบางสปีชีส์ ตัวอย่างของกลุ่มนี้คือ ไนซิน อีกกลุ่มหนึ่งคือ type B หรือ subclass Ib มีโครงสร้างเป็นเปปไทด์ที่เป็นก้อน (globular) ซึ่งคงรูป และมีประจุลบหรือไม่มีประจุ มีฤทธิ์ในการรบกวนการทำงานของเอนไซม์ที่จำเป็นต่อเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียบางชนิด ตัวอย่างของกลุ่มนี้คือ เมอร์ซาซิดิน (mersacidin) ซึ่งออกฤทธิ์รบกวนการสร้างผนังเซลล์โดยการเข้าเชื่อมต่อกับสารตั้งต้นในการสร้าง peptidoglycan ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถสร้างผนังเซลล์ได้ อย่างไรก็ตามได้มีการจำแนก subclass ของแลนติไบโอติกเพิ่มขึ้นโดยอาศัยกลไกการออกฤทธิ์ ซึ่งมักจะเกิดความสับสนเนื่องจากสารบางชนิดสามารถออกฤทธิ์ได้หลายแบบ เช่น สามารถทำให้เกิดรู และยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ ในบางครั้งจึงแบ่งแลนติไบโอติก ออกเป็น 11 subclass โดยอาศัยความคล้ายคลึงกันของโครงสร้างทางเปปไทด์ ซึ่งแต่ละกลุ่มมีชื่อดังนี้ คือ ไนซิน (nisin) อีพิดิเคมิน (epidermin) สเตรปติน (streptin) เปป 5 (pep 5) แลคติซิน 481 (lactacin 481) เมอร์ซาซิดิน (mersacidin) แอลทีเอ็นเอ 2 (LmA 2) ไซโตไลซิน (cytolysin) แลคโตซิน S (lactocin S) ซินนามัยซิน (cinnamycin) และ ซับแลนซิน (sublancin)

กลุ่ม 2 (class II) มีโครงสร้างเป็นเปปไทด์ที่ทนความร้อน และมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (น้อยกว่า 10 กิโลดาลตัน) แต่ไม่มีอนุพันธ์ของกรดอะมิโนแลนไทโอนิน ปัจจุบันที่พบมากมี 2 subclass คือ subclass IIa มีชื่อว่า pediocin-like (หรือเรียกว่า *Listeria*-active) และ subclass IIb หรือ แบคเทอริโอซิน ที่มี 2 องค์ประกอบ (two-component bacteriocins) ใน class IIa ตัวที่มีการศึกษามากที่สุดคือ เพดดิโอซิน AcH/PA-1 สารที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้มีความคล้ายคลึงกันทางลำดับของกรดอะมิโน 40-60 เปอร์เซ็นต์ โดยบริเวณ N-terminal ของโครงสร้าง จะมีลำดับของกรดอะมิโนเป็น YGNGVXCXXXXCXV หรือเรียกว่า pediocin box ต่อกับกรดอะมิโนซิสเทอีน 2 ตัว ด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulphide bridge) subclass IIa ปัจจุบันได้รับความสนใจมาก เนื่องจากฤทธิ์ในการยับยั้งไม่กว้างเหมือนไนซิน โดยจะยับยั้งเฉพาะเชื้อ *Listeria* เท่านั้น จึงไม่ยับยั้งเชื้อตั้งต้นที่ใช้ในหมักอาหาร แต่อย่างไรก็ตามข้อจำกัดก็คือไม่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคชนิดนี้ได้อย่างสมบูรณ์ในอาหาร subclass IIb หมายถึงแบคเทอริโอซินที่มีโครงสร้างประกอบด้วยองค์ประกอบ 2 ส่วน ประกอบด้วยเปปไทด์ 2 ชนิด

ที่ทำงานเสริมฤทธิ์กัน ถ้าเหลือตัวใดตัวหนึ่งมักจะไม่มีแอกติวิตีหรือมีแอกติวิตีเหลือเล็กน้อยเท่านั้น ตัวอย่างของกลุ่มนี้ คือ แลคตาซินเอฟ (lactacin F) และแลคโตคอกซินจี (lactococcin G) นอกจากนี้ยังมี subclass IIc (*sec*-dependent bacteriocins) ตัวอย่างเช่น อะซิโดซิน B (acidocin B) ไดเวอจีซิน A (divergicin A) แบคทีริโอซิน 31 และเอนเทอโรซิน P (enterocin P) และ subclass IId ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างจาก subclass อื่น ตัวอย่างเช่น แลคโตคอกซิน A และ B ไดอะเซติน B (diacetin B) อะซิโดซิน 8912 (acidocin 8912) เป็นต้น

กลุ่ม 3 (class III) ประกอบด้วยแบคทีริโอซินขนาดใหญ่ ไม่ทนความร้อน จึงแตกต่างจาก class I และ II ตัวอย่างของกลุ่มนี้ คือ เฮลเวติซิน J (helveticin J) และเอนเทอโรไลซิน A (enterolysin A)

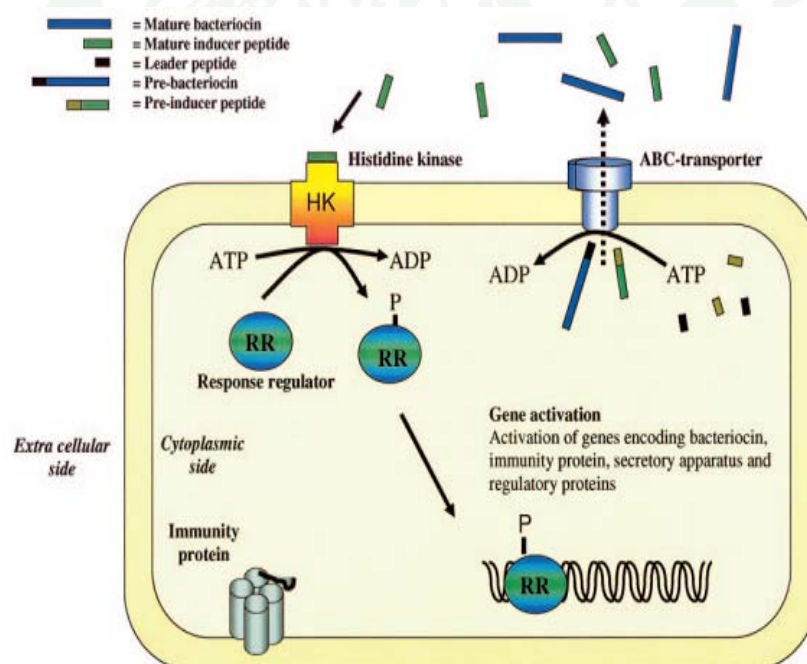
กลุ่ม 4 (class IV) Klaenhammer (1993) ได้เสนอให้มีการแบ่งกลุ่มแบคทีริโอซินเพิ่มขึ้นอีก 1 class คือ class IV ซึ่งแบคทีริโอซินในกลุ่มนี้จะมีหมู่กลูซิดิก (glucidic) และลิปิดในโครงสร้าง ด้วยนอกเหนือจากส่วนที่เป็นโปรตีน ตัวอย่างของแบคทีริโอซินกลุ่มนี้ เช่น ลิวโคซิน S (leucocin S) และแลคโตซิน 27 ซึ่งจะมีส่วนของไกลโคโปรตีนในโครงสร้าง หรือมีเซ็นเทอริซิน 52 (mesenterocin 52) ซึ่งจะพบส่วนของลิพิดโปรตีนในโครงสร้าง เป็นต้น

กระบวนการผลิตแบคทีริโอซินในระดับเซลล์

กระบวนการผลิตแบคทีริโอซิน จะถูกควบคุมโดยยีนที่อยู่บนพลาสมิด ซึ่งยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์แบคทีริโอซินนี้มีทั้งยีนโครงสร้าง (structural gene) และยีนภูมิคุ้มกัน (immunity gene) โดยส่วนใหญ่จะอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม (cluster) และยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิต และการขนส่ง แบคทีริโอซินออกนอกเซลล์ประกอบด้วย

1. ยีนสำหรับผลิตเปปไทด์ที่ยังไม่พร้อมทำงาน (prepeptide)
2. ยีนสำหรับโปรตีนภูมิคุ้มกัน (immunity protein)
3. ยีนสำหรับขนส่งโปรตีน ATP binding cassette (ABC) transport protein
4. ยีนสำหรับโปรตีนที่ช่วยในการจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane-bound accessory protein)

กระบวนการผลิตแบคทีริโอซินเกิดจากการทำงานร่วมกันของ Histidine kinase (HK), Response regulator (RR) และ inducer peptide (IP) ซึ่งทำหน้าที่เหมือนตัวส่งสัญญาณเหนี่ยวนำให้เกิดการถอดรหัส (transcription) ของยีน โดย IP จะถูกส่งออกนอกเซลล์พร้อมกับแบคทีริโอซินด้วย ABC transporter และ accessory protein จากนั้น IP ที่ผลิตขึ้นจะเกิดการสะสม และจับกับ HK บนเยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาฟอสโฟรีเลชัน และเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ RR และ RR จะทำหน้าที่กระตุ้นการทำงานของยีนที่ผลิตแบคทีริโอซินต่อไป ดังแสดงภาพที่ 4 แบคทีริโอซินถูกสังเคราะห์บนไรโบโซมในรูปเปปไทด์ที่ยังไม่พร้อมทำงาน และจะถูกแยกส่วน N-terminal leader ออกโดยผ่านการตัดแปลงหลังกระบวนการแปลรหัส (post-translational modification) ซึ่งทำให้เปปไทด์อยู่ในสภาพพร้อมทำงาน ส่วน N-terminal leader ของแบคทีริโอซินอาจมีลักษณะเป็น double glycine peptide หรือ signal peptide (Worobo *et. al.*, 1995)



ภาพที่ 4 กระบวนการผลิตแบคทีริโอซินเกิดจากการทำงานร่วมกันของ HK, RR และ IP

ส่งสัญญาณเหนี่ยวนำให้เกิดการถอดรหัสของยีน โดย IP จะถูกส่งออกนอกเซลล์พร้อมกับแบคทีริโอซินด้วย ABC transporter และ accessory protein จากนั้น IP ที่ผลิตจะเกิดการสะสม และจับกับ HK บนเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดฟอสโฟรีเลชัน และเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ RR ซึ่งจะทำหน้าที่กระตุ้นการทำงานของยีนที่ผลิตแบคทีริโอซินต่อไป

ที่มา: Drider *et. al.* (2006)

แบคทีเรียโอซินจะถูกสร้างขึ้นในไรโบโซม (ribosome) ต่อจากนั้นก็รวมตัวกับ immunity protein เกิดเป็นโมเลกุลของสารประกอบเชิงซ้อน ซึ่งจะผ่านเยื่อชั้นใน และสะสมอยู่ในบริเวณ periplasmic space ของไซโตพลาสซึม และแผ่ขยายไปถึงบริเวณผิวหน้าของแบคทีเรียที่บริเวณผิวหน้าของแบคทีเรียนี้ สารประกอบเชิงซ้อนจะจับกับ polysaccharides หรือ O-antigen ของ outer membrane และทำให้เกิดแบคทีเรียโอซินขับออกสู่ภายนอกเซลล์

การทำงานของแบคทีเรียโอซิน

แบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรียต่างชนิดกันจะมีคุณสมบัติต่างกัน ความสามารถในการยับยั้งหรือการทำลายจะแตกต่างกันด้วย สำหรับกลไกการออกฤทธิ์ของแบคทีเรียโอซินชนิดต่างๆ แบ่งได้ดังนี้

1. ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ ซึ่งเป็นส่วนที่อยู่นอกสุดของเซลล์ มีความแข็งแรงทำหน้าที่ป้องกันสิ่งที่อยู่ในเซลล์ สำหรับแบคทีเรียผนังเซลล์เป็นส่วนสำคัญที่ใช้ในการจำแนกแบคทีเรียเป็นแกรมบวก แกรมลบ

โครงสร้างพื้นฐานของแบคทีเรียทั้ง 2 พวกที่ต่างกัน คือ peptidoglycan (เรียกว่า glycopeptides หรือ mucopeptide หรือ murien) พวกแกรมบวกมีส่วนนี้หนามาก ในแกรมลบจะบางกว่า และแกรมลบจะมีส่วนของ lipopolysaccharide หุ้มอีกชั้นหนึ่ง peptidoglycan ของแบคทีเรียทั้งหลายจะมีโครงสร้างหลักเป็น polysaccharide ซึ่งสลับกันระหว่าง N-acetylglucosamine (GlcNAC) และ N-acetylmuramate (MurNAC) แต่มี side chain แตกต่างกันไป (วิลาวณิช, 2553)

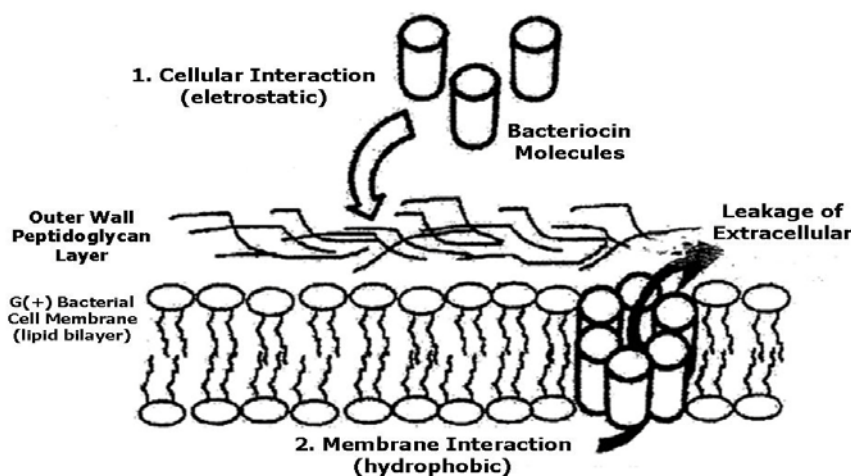
แบคทีเรียโอซินจะไปยับยั้งการสร้าง peptidoglycan ซึ่งส่งผลให้หยุดการสร้างผนังเซลล์ เนื่องจากผนังเซลล์มีความสำคัญมากหากถูกทำลายหรือสร้างไม่สมบูรณ์แบคทีเรียจะตายได้ แบคทีเรียโอซินพวกนี้จึงจัดเป็น bacteriocidal

2. รบกวนหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งเป็นส่วนที่ถัดจากผนังเซลล์เข้ามา หน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ทั่วไป คือ osmotic barrier ที่ช่วยป้องกันไม่ให้สารต่างๆ เข้าหรือออกจากเซลล์มากเกินไป อีกหน้าที่หนึ่งเกี่ยวข้องกับระบบขนส่ง เพื่อนำสารเข้า-ออกเซลล์โดยมีผลต่อ Proton motive force ของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ความสมดุลของ K^+ ของเซลล์เปลี่ยนแปลงไป โดยมีการผ่านเข้าไปในเซลล์มากขึ้น และเกิดการสะสมทำให้แรงดันในเซลล์ไม่สมดุลเซลล์จะแตก และตายในที่สุด

กลไกการทำลายเซลล์แบคทีเรียเป้าหมายของแบคทีเรียโอซิน

การทำลายเซลล์เป้าหมายของแบคทีเรียโอซิน เกิดจากการที่แบคทีเรียโอซินแต่ละโมเลกุลมารวมกันทำให้เกิดเป็นรูหรือช่องว่างที่เชื่อมหุ้มเซลล์เป้าหมาย ซึ่งจะมีลักษณะคล้ายชิ้นไม้ที่มาประกอบกันเป็นผนังด้านข้างของถังไม้ (barrel stave) ดังแสดงภาพที่ 5 โดยรูดังกล่าวจะทำให้เกิดการเสียสมดุลของไอออน สูญเสียกรดอะมิโน และสารประกอบอนินทรีย์ในหมู่ฟอสเฟต ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในการสร้างพลังงานของเซลล์ (Muriana, 1996 and Ennaher *et. al.*, 2000) ขั้นตอนและกลไกในการทำลายเซลล์เป้าหมายจะแตกต่างกันไปตามชนิดของแบคทีเรียโอซิน เช่น colicins ที่สร้างจาก *E.coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ จะเป็นโปรตีนขนาดใหญ่ประมาณ 40-70 กิโลดาลตัน และขั้นตอนการควบคุมการสร้าง colicins จะอยู่บนพลาสมิด โดย *E.coli* จะสร้าง colicins แล้วปลดปล่อยออกสู่ภายนอกเซลล์ในช่วงการเจริญระยะ exponential เมื่อศึกษาโครงสร้างแบบ 3 มิติ ซึ่งแต่ละกลุ่มจะมีกิจกรรม และหน้าที่ต่างกันออกไปในแต่ละขั้นตอนของการทำลายแบคทีเรียเป้าหมาย กลไกการทำลายเซลล์เป้าหมายจะแบ่งเป็น 3 ขั้นตอนคือ

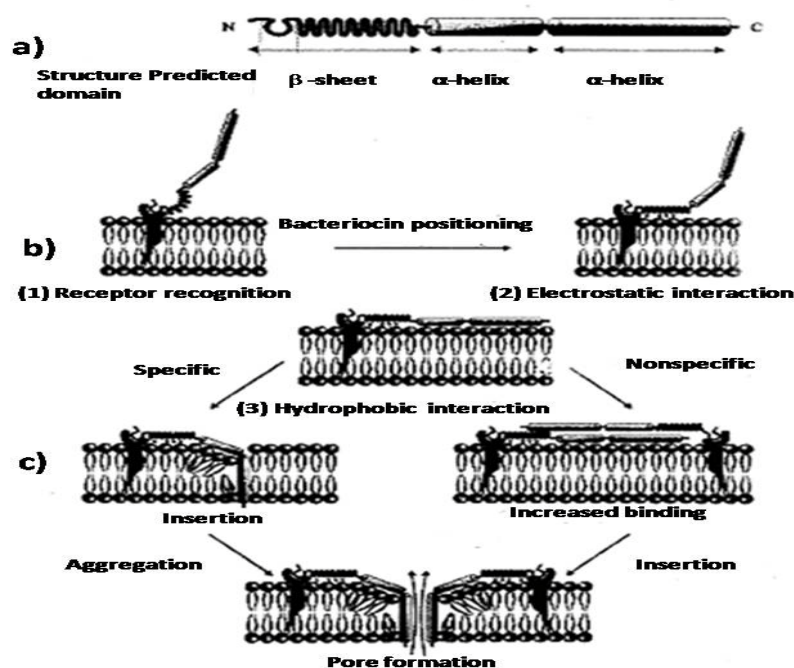
1. บริเวณตรงกลางของโมเลกุล colicins จะทำหน้าที่ในการจับกับตำแหน่งที่จำเพาะบนผิวเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมาย
2. บริเวณปลายด้าน N (N-terminal) จะทำหน้าที่เคลื่อนย้ายโมเลกุลของ colicins ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมาย
3. บริเวณปลายด้าน C (C-terminal) จะทำหน้าที่ในการทำลายเซลล์เป้าหมาย (McCormick *et. al.*, 1999) สาเหตุที่ทำให้เซลล์เป้าหมายของ colicins ตาย เกิดจากเยื่อหุ้มเซลล์เกิดการรั่ว และทำให้เกิดการสูญเสียแรงในการขับเคลื่อนโปรตอนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ และทำให้เซลล์เป้าหมายเกิดการเสียรูปทรง (Schaller *et. al.*, 1981)



ภาพที่ 5 การทำลายเซลล์เป้าหมายของแบคทีเรียโอซิน เกิดจากการที่แบคทีเรียโอซินแต่ละโมเลกุลมารวมกันทำให้เกิดเป็นรูหรือช่องว่างที่เชื่อมเซลล์เป้าหมาย ซึ่งจะมีลักษณะคล้ายชั้นไม้ที่มาประกอบกันเป็นผนังด้านข้างของถังไม้ รูดังกล่าวจะทำให้เกิดการเสียสมดุลไอออน สูญเสีย กรดอะมิโน และสารประกอบอินทรีย์ในหมู่ฟอสเฟต ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในการสร้างพลังงานของเซลล์

ที่มา: Muriana (1996)

นอกจากนี้ในแบคทีเรียโอซินกลุ่ม non lantibiotic ที่มีขนาดเล็ก และทนความร้อน พบว่าในขั้นตอนแรกปลายด้าน N ของโมเลกุลแบคทีเรียโอซิน ซึ่งมีประจุบวกจะเข้าจับส่วนหัวของฟอสโฟลิปิด ที่เชื่อมเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมาย ที่มีประจุลบโดยแรงทางไฟฟ้าสถิต (electrostatic binding) หลังจากนั้นปลายด้าน C ในโมเลกุลของแบคทีเรียโอซิน ซึ่งมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) จะทำปฏิกิริยากับหมู่เอซิล (acyl group) ของไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดเป็นรูที่เชื่อมเซลล์ เกิดการสูญเสียความสมดุลของไอออน และสารประกอบฟอสเฟตในเซลล์ ดังแสดงภาพที่ 6 (Ennaher *et. al.*, 2000)



ภาพที่ 6 a) แสดงโครงสร้างโมเลกุลของ colicins ภายในโมเลกุลจะจัดเรียงตัวเป็น 3 กลุ่มแต่ละกลุ่มจะมีกิจกรรม และหน้าที่ต่างกันออกไป

b) (1) บริเวณตรงกลางโมเลกุลของ colicins ทำหน้าที่ในการจับกับตำแหน่งที่จำเพาะของตัวเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมาย (2) บริเวณปลายด้าน N-terminal จะทำหน้าที่เคลื่อนย้ายโมเลกุลของ colicins ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมาย (3) บริเวณปลายด้าน C-terminal จะทำหน้าที่ในการทำลายเป้าหมาย

c) สาเหตุที่ทำให้เซลล์เป้าหมายของ colicins ตาย เกิดจากเยื่อหุ้มเซลล์เกิดการรั่ว ทำให้เกิดการสูญเสียแรงในการขับเคลื่อนโปรตอนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ และทำให้เซลล์เป้าหมายเกิดการเสียรูปทรง

ที่มา: McCormick *et. al.* (1999)

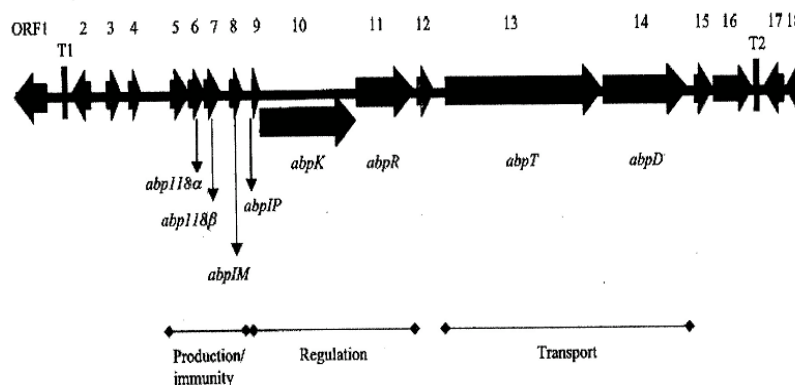
กลไกการออกฤทธิ์

แบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติก มีกลไกในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้แตกต่างกัน โดยทั่วไปมักออกฤทธิ์ต่อเยื่อหุ้มเซลล์ โนซินเป็นสารที่มีแอกติวิตีต่อเชื้อในกลุ่มแกรมบวกเป็น

ส่วนใหญ่โดยการยับยั้งการออกของสปอร์ของ *Bacillus* spp. และ *Clostridium* spp. ในทางกลับกัน แลคโตคอกซิน A (lactococcin A) มีฤทธิ์ค่อนข้างแคบ สามารถยับยั้งเฉพาะกลุ่มแลคโตคอกคัส แบคทีเรียโอซินจะเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมายโดยอาศัยแรง electrostatic และแบคทีเรียโอซินส่วนใหญ่จะเหนี่ยวนำให้เกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์เป้าหมายโดยกลไกการออกฤทธิ์ของแบคทีเรียโอซินที่มีการศึกษามากที่สุดคือ ไนซิน ซึ่งไนซินจะทำให้เกิดรู และขัดขวางกระบวนการ proton motive force รวมทั้งรบกวนสมดุลของ pH เป็นผลให้เกิดการรั่วไหลของไอออน และการสลายตัวของ ATP ทำให้เซลล์เกิดการตายที่สุด นอกจากนี้ยังมีแลนติไบโอติกอื่นที่ทำให้เกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์ ได้แก่ แลคคิซิน ซับทิลิน และอีพิเดอมิน อย่างไรก็ตามไนซินยังรบกวนการสร้างผนังเซลล์ด้วย (Deegan *et. al.*, 2006) ซึ่งกลไกการทำงานของไนซินทั้งสองนี้สามารถออกฤทธิ์ได้ที่มีความเข้มข้นในระดับนาโนโมลาร์ (nM) เท่านั้น แบคทีเรียโอซิน class II จะออกฤทธิ์โดยการสร้างรูบนเยื่อหุ้มเซลล์เช่นกัน เป็นผลให้เกิดการแยกตัวของเยื่อหุ้มเซลล์ เกิดการรั่วไหลของกรดอะมิโนและไอออน รวมทั้ง ATP ภายในเซลล์ (Breukink *et. al.*, 1999)

การสังเคราะห์แบคทีเรียโอซินใน class II

แบคทีเรียโอซินโดยส่วนใหญ่จะมีการสังเคราะห์ในรูปของสายเปปไทด์ที่ยังไม่พร้อมทำงาน ประกอบด้วย N-terminal peptide โดยเฉพาะใน class II พบว่ามี double glycine เป็น leader peptide มีหน้าที่ในการป้องกันเซลล์จากการถูกทำลายด้วยแบคทีเรียโอซิน และเป็นบริเวณจดจำสำหรับระบบการขนส่งสายเปปไทด์ออกนอกเซลล์ ยีนที่ทำหน้าที่การสังเคราะห์แบคทีเรียโอซินส่วนใหญ่จะอยู่รวมกันเป็นกลุ่มยีน (cluster) ดังแสดงภาพที่ 7 ประกอบด้วยยีนโครงสร้าง (structural gene) ซึ่งเป็นรหัสสำหรับการสังเคราะห์เปปไทด์ที่ยังไม่พร้อมทำงาน ยีนภูมิคุ้มกัน (immunity gene) ทำหน้าที่ป้องกันเซลล์จากแบคทีเรียโอซิน ยีนสำหรับโปรตีนขนส่ง ATP binding cassette (ABC) transport protein ทำหน้าที่ขนส่งแบคทีเรียโอซินออกนอกเซลล์ และยีนที่ช่วยในการจับกันระหว่างแบคทีเรียโอซินกับเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane-bound accessory protein) (Nes *et al.*, 1996)



ภาพที่ 7 กลุ่มยีนควบคุมการสังเคราะห์ class II แบคทีเรียโอซินใน *Lb. salivarius* UCC118 ประกอบด้วย 18 ORF

ที่มา: Flynn *et. al.* (2002)

แบคทีเรียโอซินที่สร้างโดย *Lb. salivarius*

ในปัจจุบันมีการศึกษา การควบคุม และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตแบคทีเรียโอซินในระดับเซลล์ของแบคทีเรียหลายๆชนิด แต่ละชนิดที่มีการศึกษากันมากที่สุดคือ ในซัน ที่ผลิตโดย *Lb. lactis* spp. *Lactis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียโอซินเพียงชนิดเดียวที่หน่วยงาน FDA ของประเทศสหรัฐอเมริกาอนุญาตให้ใช้กับอาหารได้ สำหรับแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจาก *Lb. salivarius* ได้เริ่มมีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย โดย Flynn *et. al.* (2002) ได้ทำการศึกษายีนของแบคทีเรียโอซินในกลุ่มของ *Lb. salivarius* UCC 118 ซึ่งแยกได้จากลำไส้เล็กส่วนที่ต่อจากกระเพาะอาหารของมนุษย์ พบว่า *Lb. salivarius* UCC 118 สร้างแบคทีเรียโอซินที่ประกอบด้วยสายเปปไทด์ 2 สาย คือ abp118 α และ abp118 β กระบวนการผลิตแบคทีเรียโอซิน ประกอบด้วยกลุ่มยีนที่ทำงานร่วมกัน ดังแสดงภาพที่ 8 ได้แก่ abp118 α, abp118 β, abpIM, abpIP และ K เป็นต้น โดยแต่ละยีนจะมีคุณสมบัติที่คล้ายกับยีนในสิ่งมีชีวิตอื่น พบว่าโครงสร้างในสายโพลีเปปไทด์ของแบคทีเรียโอซินสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ส่วน ซึ่งแต่ละส่วนจะมีหน้าที่แตกต่างกันดังนี้

1. binding peptide ทำหน้าที่ช่วยให้โมเลกุลของแบคทีเรียโอซินจับบนผิวเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมาย

2. active peptide มีหน้าที่ทำลายแบคทีเรียโดย active peptide จะยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน และการสังเคราะห์โมเลกุลขนาดใหญ่ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย
3. immunity protein ทำหน้าที่จับกับ active peptide อย่างจำเพาะ ซึ่งจะป้องกันไม่ให้เกิดการทำลายแบคทีเรียที่มี immunity protein ลักษณะเหมือนกัน
4. translocation peptide ช่วยให้มีการเคลื่อนย้ายโมเลกุลของแบคทีเรียไอออนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมาย

Pilasombut (2006) ได้ทำการศึกษาแบคทีเรียไอออนที่ผลิตจากเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ที่แยกได้จากลำไส้ไก่ จากการศึกษาสามารถแยกแบคทีเรียไอออนได้ 2 ชนิด คือ FK12 และ FK15 โดยแบคทีเรียไอออน FK12 มีลักษณะใกล้เคียงกับแบคทีเรียไอออน presalivarin B (sal B)(accession No. CAB 63019, 96% homology และ bacteriocin-like prepeptide (accession No.AAM 61775, 94% homology) แบคทีเรียไอออน FK12 มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 4438.84 ดาลตันส่วน FK15 หรือ Salvicin K (sal K) ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับ bactericin abp 118 α ที่ได้จากเชื้อ *Lb. salivarius* subsp. *salivarius* UCC118 (64% identity) มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 4346.10 ดาลตัน จากการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ พบว่าแบคทีเรียไอออน Sal K สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบที่เป็นแกรมบวกได้หลายชนิด ได้แก่ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM1157^T, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^T, *Enterococcus faecalis* JCM 5803^T, *Bacillus coagulans* JCM 2257^T, *Listeria innocua* ATCC 33090^T and *Brochotrix campestris* NBRC 11547^T แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Staphylococcus aureus*, *E.coli* JM109 และแบคทีเรียแกรมลบอื่นๆ

Pilasombut (2006) ได้ทำการศึกษาแบคทีเรียไอออนที่ผลิตจากเชื้อ *Lb. salivarius* K7 ซึ่งแยกได้จากลำไส้ไก่ จากการศึกษาสามารถแยกแบคทีเรียไอออนชนิด FK22 หรือ antimicrobial like bacteriocin β (alb β) ซึ่งมีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 4331.70 ดาลตัน และมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดโมเลกุลของ bactericin abp 118 β ที่ได้แยกได้จาก *Lb. salivarius* subsp. *salivarius* UCC118 และมิลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับ bactericin abp 118 β 98% แบคทีเรียไอออน alb β สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้บางชนิด เช่น *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^T และ *Bacillus coagulans* JCM 2257^T แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้

การผลิตแบคทีเรียโอซินโดยใช้ระบบการแสดงออกในแบคทีเรีย *E. coli*

การผลิตโปรตีนโดยใช้ *E. coli* เป็นเซลล์เจ้าบ้านยังคงได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก เนื่องจากสามารถผลิตโปรตีนได้ในปริมาณมาก เพิ่มปริมาณได้ง่าย อีกทั้งใช้ระยะเวลาในการผลิตโปรตีนสั้น มีขั้นตอนน้อยในการทำให้บริสุทธิ์ แต่การผลิตโปรตีนที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่น ตัวอย่างเช่น แบคทีเรียโอซิน หรือเปปไทด์ต้านจุลชีพชนิดอื่นนั้นยาก เนื่องจากสายเปปไทด์ที่มีประจุบวก และเป็นพิษต่อเซลล์ถูกทำลายได้ง่ายโดยโปรตีนบางชนิด หรืออาจการตกตะกอนของโปรตีน เนื่องจากการม้วนพับ (folding) ที่ไม่ถูกต้องจึงได้มีการแก้ปัญหาโดยใช้โปรตีนตัวเชื่อม (fusion protein) ซึ่งโปรตีนตัวเชื่อมจะส่งเสริมให้โปรตีนที่ต้องการมีการม้วนพับที่ถูกต้อง และไม่ถูกทำลายโดยโปรตีนบางชนิด อีกทั้งยังช่วยลดขั้นตอนในการทำให้บริสุทธิ์ โปรตีนตัวเชื่อมมีหลายชนิด ได้แก่ glutathione-S-transferase (GST), intein และ maltose binding protein (MBP) เป็นต้น

โปรตีน (Protein)

โปรตีนเป็นสายโพลิเปปไทด์ เกิดจากกรดอะมิโนแต่ละหน่วยเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์ สายโพลิเปปไทด์ขนาดสั้นจะเป็นโพลีเมอร์ที่มีลักษณะเป็นเส้นตรง แต่ถ้าหากมีความยาวมากๆ หมู่แน่นข้างของกรดอะมิโนแต่ละหน่วยที่ตำแหน่งต่างๆ ที่จำเพาะพอดีกันจะสร้างพันธะต่างๆ ต่อกัน เช่น พันธะไฮโดรเจน และอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic interaction) เป็นต้น ทำให้สายโพลิเปปไทด์เกิดการขดม้วน พับ (folding) เป็นโครงสร้าง 3 มิติขึ้น ทั้งนี้สามารถจัดแบ่งโครงสร้างของโปรตีนที่เกิดขึ้นจากการม้วนพับด้วยพันธะต่างๆ นี้เป็น 4 ระดับ ดังนี้

1. โครงสร้างระดับปฐมภูมิ (Primary structure) เป็นการเรียงตัวเชื่อมต่อกันของกรดอะมิโนด้วยพันธะเปปไทด์ในโปรตีนแต่ละชนิดจะมีลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนที่จำเพาะโดยกรดอะมิโนตัวแรกที่ปลายอะมิโนหรือปลายเอ็น (N-terminus) ด้านซ้ายมือต่อด้วยกรดอะมิโนตัวที่ 2, 3 ถัดไปเรื่อยๆ จนถึงกรดอะมิโนตัวสุดท้ายที่ปลายคาร์บอกซีหรือปลายซี (C-terminus)

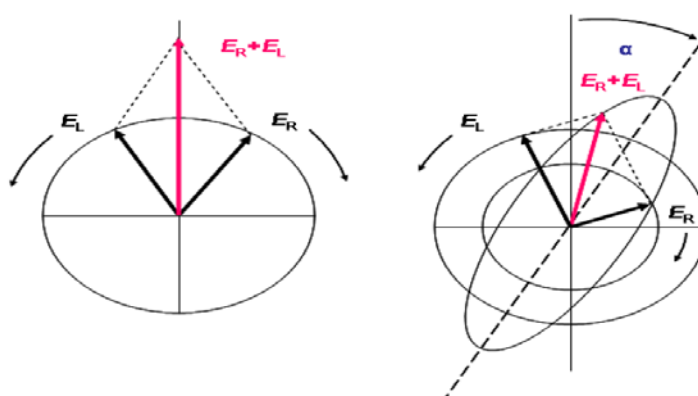
2. โครงสร้างทุติยภูมิ (Secondary Structure) เกิดจากการม้วน การขด หรือการทับกันของโครงสร้างปฐมภูมิของสายโปรตีน จากการศึกษาพบว่าโปรตีนในธรรมชาติส่วนใหญ่มีการม้วนพับเกิดเป็นโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นแบบเกลียวที่เรียกว่า เกลียวแอลฟา (α -helix) และขดทับกันเป็นแผ่นที่เรียกว่า แผ่นชีทเบต้า (β -pleated Sheet)

3. โครงสร้างตติยภูมิ (Tertiary Structure) เป็นโครงสร้างที่สายโพลีเปปไทด์ขดหรือม้วนตัวกันทำให้ได้โครงรูปที่คงตัว ได้แก่ โปรตีนก้อนกลม (Globular Protein) ที่สายเปปไทด์จะพันกันไปมา และอัดแน่นกันจนโมเลกุลมีรูปร่างเป็นก้อนกลม

4. โครงสร้างจตุรภูมิ (Quaternary Structure) โครงสร้างจตุรภูมิเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยหน่วยย่อย (Subunit) ของสายโพลีเปปไทด์หลายๆหน่วยมาอยู่รวมกัน โดยอาศัยแรงยึดเหนี่ยวอย่างอ่อน เช่น ฮีโมโกลบิน

เทคนิคการศึกษาโครงสร้างทุติยภูมิ โดย Circular dichroism (CD)

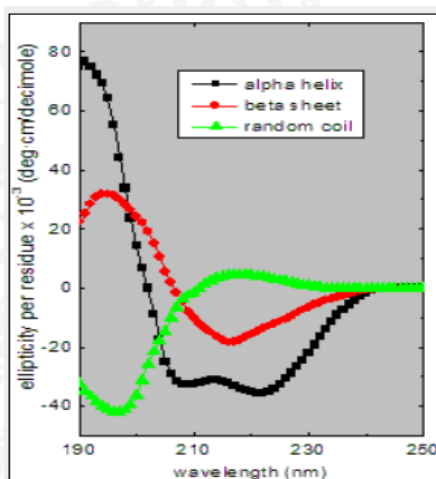
เป็นเทคนิคที่วัดโครงสร้างระดับทุติยภูมิ การเรียงตัว และการผ่าน (penetrate) ของเปปไทด์เข้าไปในชั้นไขมันของลิพิดไบเลเยอร์ (lipid bilayer) จากการใช้เทคนิคนี้ (Selsted *et al.*, 1992) กล่าวว่า indolicidin จะมีโครงสร้างที่ผิดปกติถ้าอยู่ในสารละลายที่เป็นสารอินทรีย์ แต่จะมีโครงสร้างที่เรียงตัวได้ดีแต่ไม่ใช่แอลฟา-เฮลิกซ์ ใน SDS micelle และ lipid bilayer เทคนิคนี้ทำให้อาจรายละเอียดปฏิสัมพันธ์ของเปปไทด์กับเมมเบรนของแบคทีเรีย และพบว่าสภาพแวดล้อมที่ผิวเมมเบรนแบคทีเรียจะกระตุ้นให้เปปไทด์มีการเปลี่ยนโครงสร้างที่ทำให้เกิดการจับ และสอดเปปไทด์เข้าไปในเมมเบรนได้ดีขึ้น แสงโพลาไรซ์ที่เป็นวงกลมจะเคลื่อนตัวผ่านสารที่ทำให้การหักเหแสงนี้ได้ด้วยความเร็วที่แตกต่างขึ้นอยู่กับการ reflect ทางฝั่งขวา และซ้ายของสารนั้น ดังแสดงภาพที่ 8



ภาพที่ 8 ลักษณะการหมุนของแสงโพลาไรซ์ที่ผ่านเข้าไปในสารตัวอย่างทำให้มีการหมุนของมุม

ที่มา: Rupp (2010)

โดยโปรตีนจะมีการดูดกลืนแสงในช่วง far-UV หรือ near UV เกี่ยวข้องการเปลี่ยนแปลงของอิเล็กตรอน เทคนิคนี้ใช้ศึกษาโครงสร้างระดับทุติยภูมิได้ดีเฉพาะแอลฟา-เฮลิคซ์ หรือเบต้า-ชีท จะมีการให้สัญญาณ CD ที่สามารถบอกปริมาณ (content) ของโครงสร้างทุติยภูมิ การตรวจสอบโครงสร้างของ alpha helix จะตรวจสอบที่ความยาวคลื่น 208 และ 222 นาโนเมตร และโครงสร้างของ beta sheet จะตรวจสอบที่ความยาวคลื่น 210 และ 220 นาโนเมตร ดังแสดงในภาพที่ 9



ภาพที่ 9 แสดงโครงสร้างทุติยภูมิของ alpha helix และ beta sheet (standard)

ที่มา: Alliance Protein Laboratories Inc (2011)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์

1. เครื่อง UV-Visible spectrophotometer
2. เครื่อง Nano drop UV/Visible spectrophotometer
3. หม้อนึ่งความดันไอ
4. เครื่องปั่นเหวี่ยง(centrifuge)
5. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (shaker)
6. ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator)
7. ตู้อบไอร้อน
8. ตู้ปลอดเชื้อ
9. ตู้เย็น 4°C
10. ตู้เย็นแช่แข็ง -20 °C และ -80 °C
11. อ่างควบคุมอุณหภูมิ
12. เครื่องคอมพิวเตอร์
13. เครื่องชั่งสาร 2 ตำแหน่ง
14. เครื่องชั่งสาร 4 ตำแหน่ง
15. เครื่องโปรตีนอิเล็กโตรโฟรีซิสแนวดิ่ง
16. ไมโครปีเปต
17. pH มิเตอร์
18. เครื่อง Spectropolarimeter จากมหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา
19. water bath
20. ชุดอิเล็กโตรโฟรีซิส
21. เครื่อง sonicator

2. สารเคมี

1. *Lactobacillus salivarius* K4 (ดร. คมแข พิลาสสมบัติ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง)

2. *E. coli* BL21 (DE3) (promega, USA)
3. pGEM-T[®] easy vector (promega, USA)
4. pTYB1 (New England Biolab, UK)
5. ชุดสำเร็จสำหรับสกัดพลาสมิด (Fermentus, USA)
6. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Luria-Bertani broth (LB broth)
7. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) (Conda pronadisa, Spain)
8. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Tryptic soy broth (TSB) (Himedia Laboratories Pvt. Ltd, India)
9. Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (Vivantis Inc., USA)
10. Chitin beads (New England Biolab, UK)
11. 1,4-Dithiothreitol (DTT) (GE Healthcare Bio-science AB, Sweden)
12. 40% w/v Acrylamide monomer solution
13. Ammonium persulfate (APS)
14. Sodium dodecyl sulfate (SDS)
15. TEMED (tetramethylenediamine)
16. β -mercaptoethanol (Merck, Germany)
17. Sodium acetate (CH_3COONa)
18. Trifluoroethanol (TFE)
19. Dodecylphosphocholine (DPC) micelle (Avantilipids, USA)

วิธีการ

1. การโคลนยีนแบคทีเรียโอซิน

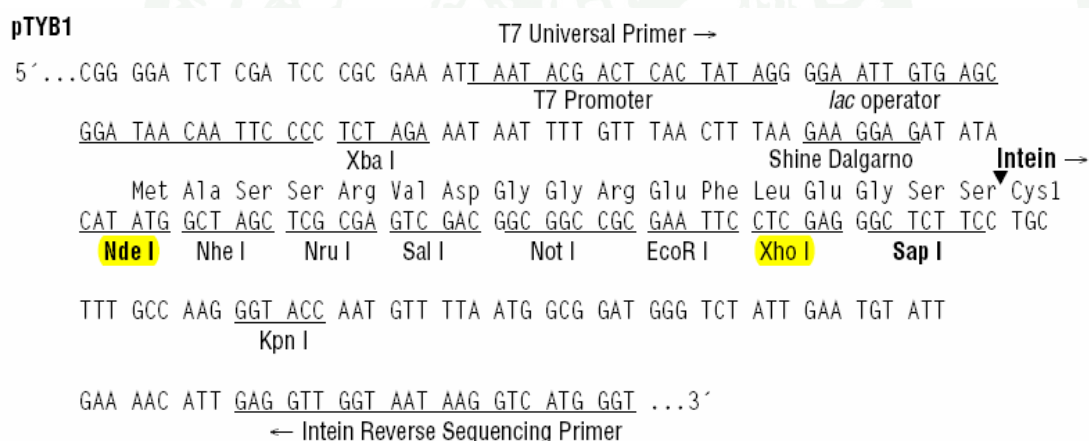
Lactobacillus salivarius K4 เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากลำไส้ไก่ และสามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซินยับยั้งแบคทีเรียได้หลายชนิด จากคุณสมบัติดังกล่าวจึงได้ทำการศึกษาความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ *Lb. salivarius* K4 เจริญได้ดีในอาหารเหลว MRS (De Man-Rogosa and Sharpe, Merck, Germany) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Pilasombut, 2006) เก็บเชื้อในกลีเซอรอลความเข้มข้นที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบคุณสมบัติในการสร้างสารยับยั้ง ดังแสดงในตารางที่ 2

แบคทีเรียโอซินเป็นโปรตีนที่แบคทีเรียสร้างขึ้น และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่มีสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันได้ แบคทีเรียโอซิน salvicin K (sal K) และ antimicrobial like bacteriocin β (alb β) เป็นแบคทีเรียโอซินที่ได้จากเชื้อ *Lb. salivarius* K4 ในลำไส้ของไก่ โดยพบว่า sal K และ alb β มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียโอซินที่ได้จากเชื้อ *Lb. salivarius* subsp. *salivarius* UCC118, Abp118 α และ Abp118 β ซึ่งแยกมาจากลำไส้มนุษย์

ซึ่งในการวิจัยนี้ได้โปรตีนแบคทีเรียโอซินที่โคลนแล้ว จาก ดร.อัญชลี กุเบอร่า ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ซึ่งโปรตีนที่ได้จากการโคลนมานั้น คือ inactive sal K, active sal K, inactive alb β และ active alb β โดยทั้ง 4 ชนิด จะเชื่อมกับโปรตีน intein ทำการออกแบบไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ยีนแบคทีเรียโอซิน inactive sal K และ active alb β จากจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของ *Lb. salivarius* K4 นำยีนที่ได้มาเชื่อมกับ pGEMT vector หลังจากนั้นจึงทำการ subclone ยีนเข้าสู่พลาสมิด pTYB1 โดยการทำให้ชิอาร์ 35 รอบ โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมในการทำพีซีอาร์ดังนี้

ขั้น pre-denaturation	94°C	1 นาที
ขั้น denature	94°C	30 วินาที
ขั้น annealing	48°C	30 วินาที
ขั้น extension	72°C	30 วินาที
ขั้น last-extension	72°C	5 นาที

เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของ inactive sal K, active sal K, inactive alb β และ active alb β ตัดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอนไซม์ *NdeI* (Fermentas, USA) ร่วมกับเอนไซม์ *XhoI* (Fermentas, USA) ดังแสดงในภาพที่ 10 จากนั้นเชื่อมต่อดีเอ็นเอของยีนแบคทีเรียโอซินเข้ากับพลาสมิด pTYB1 ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase แล้วถ่ายดีเอ็นเอสายผสมที่ตรวจสอบแล้ว โดยเลือกโคโลนีของเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยว ซึ่งลักษณะของพลาสมิด pTYB1 จะมี intein เป็น fusion protein ส่วนของ intein อยู่ทางด้าน 3' ของตำแหน่ง MCS จากนั้นย้ายรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่คอมพิเทนท์เซลล์ชนิด *E.coli* สายพันธุ์ BL 21 (DE3) เพื่อนำไปศึกษาการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนต่อไป และเนื่องจากยีนแบคทีเรียโอซินภายในเซลล์จะอยู่ในรูปแบบที่ไม่พร้อมทำงาน (inactive form) เพราะมียีนที่เป็นรหัสของส่วนที่เป็น leader peptide ในกระบวนการขนส่งแบคทีเรียโอซินออกนอกเซลล์จะมีการตัดเปปไทด์ แบคทีเรียโอซินที่ตำแหน่งกรดอะมิโน GG เพื่อกำจัด leader peptide ออก ทำให้แบคทีเรียโอซินอยู่ในรูปที่พร้อมทำงาน (active form) โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโน ของ sal K และ alb β ในรูป inactive และ active



ภาพที่ 10 ตำแหน่งตัดจำเพาะที่ใช้สำหรับโคลนแบคทีเรียโอซินยีน *inactive sal K*, *active sal K*, *Inactive alb β* และ *active alb β* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *XhoI* เข้าสู่ดีเอ็นเอพาหะ pTYB1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *XhoI*

2. การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน

นำโคโลนีที่มียีนแบคทีเรียโอซินอยู่ย้ายเข้าสู่คอมพิเทนท์เซลล์ชนิด *E.coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) โดยใช้วิธี heat shock transformation และเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนไปเลี้ยงในอาหาร LB broth ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นนำเซลล์ที่เลี้ยงไว้ข้ามคืน 1-2 เพลอร์เซนต์มาใส่

ลงใน LB broth ใหม่ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่มีแอมพิซิลินเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จนกระทั่งค่าดูดกลืนแสงที่ความเข้มแสง 600 นาโนเมตร ประมาณ 0.4-0.6 ทำการชักนำให้มีการแสดงออกของโปรตีนด้วยการเติม IPTG ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ต่ออีก 4 ชั่วโมง จากนั้นจึงทำการเก็บเซลล์ บั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง และนำตะกอนเซลล์มาทำให้เซลล์แตกโดยใส่ lysozyme 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี sonication และบั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บตะกอนเซลล์และละลายด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 มิลลิลิตร ตรวจสอบขนาดของโปรตีนที่ได้ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยใช้ 12% acrylamide

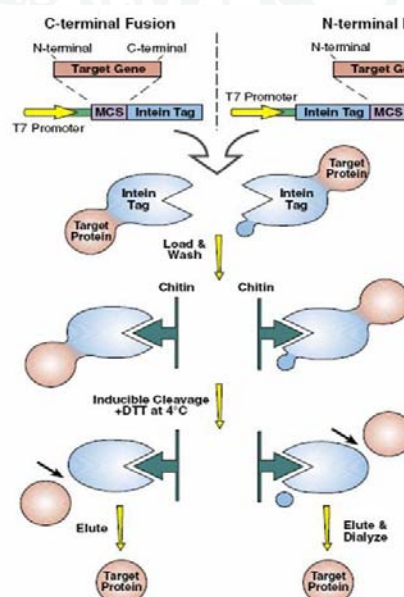
3. การละลายโปรตีน

นำตะกอนที่ได้หลังจาก sonication บั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วละลายตะกอนโดยใช้ 50 mM Tris-HCl pH 8.8 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ไปบั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บสารละลายส่วนใส ตรวจสอบขนาดของโปรตีนที่ได้ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยใช้ 12% acrylamide

4. การทำโปรตีน bacteriocins fused intein ให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบจำเพาะ (Affinity chromatography)

เนื่องจากรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้เชื่อมต่อกับโปรตีน intein ซึ่ง intein fusion system เป็นการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์โดยการให้การตัดด้วยตัวเอง (self-cleavage) ด้วย splicing element ที่เรียกว่า intein เพื่อแยกโปรตีนเป้าหมายออกจาก affinity tag โดยใช้ DTT, β -mercaptoethanol หรือ อะมิโนซิสเทอีน ที่จะเข้าไปแทนที่ ทำให้ได้โปรตีนที่ยังคงคุณสมบัติ และสามารถทำงานได้ โปรตีน intein มีส่วนของ chitin binding domain (CBD) อยู่ chitin สามารถแยก intein fusion protein ให้บริสุทธิ์ใน single column two step ซึ่งโปรตีนจะจับกับ intein-CBD ด้วยพันธะไดรเอสเทอร์ สามารถตัดเอาโปรตีนเป้าหมายออกมาจากรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้ในตำแหน่งของ specific self-cleavage ดังนั้น จึงนำโปรตีนที่ละลายใน 50 mM Tris-HCl pH 8.8 มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ chitin bead ดังแสดงในภาพที่ 11 โดยการเตรียมคอลัมน์ คือ คูด chitin bead 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในคอลัมน์ เพื่อล้าง ethanol ที่อยู่ใน chitin bead ออกด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 5 มิลลิลิตร จากนั้นล้างด้วย column

buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.8, 500mM NaCl, 1mM EDTA) อีก 10 มิลลิลิตร นำส่วนของโปรตีนที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงแล้วผ่าน chitin bead ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที เพื่อให้แบคทีเรียโอซินเปปไทด์ที่เชื่อมกับ intein จับอยู่กับ chitin bead แล้วค่อยปล่อยโปรตีนอื่นออกจากคอลัมน์ (flow through) จากนั้นล้างด้วย column buffer 10 มิลลิลิตร เพื่อชะเอาโปรตีนอื่นที่ไม่ได้เกาะกับ chitin bead ออกจากคอลัมน์ (wash) ทำการตัดแบคทีเรียโอซินเปปไทด์ออกจาก intein โดยใช้ cleavage buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.8, 500mM NaCl, 1mM EDTA, 1,4-Dithiothreitol) 3 มิลลิลิตร ที่มี DTT ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ และบ่มไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ล้างด้วย column buffer อีก 3 มิลลิลิตร เพื่อปล่อยแบคทีเรียโอซินเปปไทด์ออกมา (elute) ตรวจสอบขนาดของโปรตีนที่ได้ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยใช้ 12% acrylamide



ภาพที่ 11 Intein fusion protein ทั้งสองแบบ คือ N-terminal fusion protein และ C-terminal fusion protein และการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์เมื่อใช้ intein fusion system

ที่มา: Anonymous (2006)

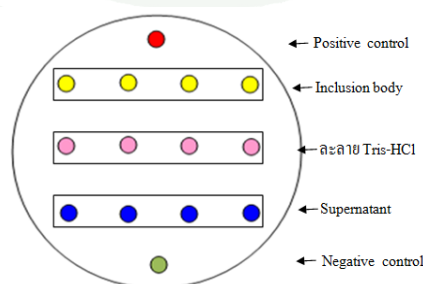
5. การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โปรตีน bacteriocins fused intein โดยการตัดด้วย 1,4-Dithiothreitol (DTT)

นำโปรตีนที่ละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl pH 8.8 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติม cleavage buffer ด้วย 50 มิลลิโมลาร์ DTT ลงในคอลัมน์ และบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง และทำการตรวจสอบขนาดของโปรตีนที่ได้ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยใช้ 12% acrylamide เพื่อตรวจสอบการตัดแบคทีริโอซินออกจาก intein

6. การตรวจสอบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อทดสอบกับโปรตีน bacteriocins fused intein โดยวิธี Spot on lawn

ทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี spot on lawn ดัดแปลงจาก Ennahar *et al.*, 1999 โดยมีเชื้อเป้าหมาย 14 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 2 ทำการเพาะเชื้อในอาหารเหลวสูตร De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) และอาหารเหลวสูตร TSB ปริมาณ 2 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีวุ้น 2% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งตัว ถ่ายเชื้อทดสอบที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MRS และ TSB ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีวุ้น 1.5% ซึ่งหลอมตัวและมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากันแล้วเทหับลงในจานเพาะเชื้อเป้าหมายที่เตรียมไว้ ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อให้อาหารแข็งตัว จากนั้นหยดโปรตีน bacteriocins fused intein (inactive sal K, active sal K, inactive alb β และ active alb β) โดยสภาวะสารละลายที่แตกต่างกัน คือ โปรตีนในรูป inclusion body, โปรตีนละลายใน 50 mM Tris-HCl pH 8.8 และโปรตีนหลังจาก sonication ลงไปบนผิวอาหาร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร รอจนสารละลายซึมผ่านวุ้นนำไปบ่มในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบแต่ละชนิด เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง และอ่านผลโดยวัดขนาดของวงใสที่เกิดขึ้น (clear zone) โดยวัดจากขอบโซนข้างหนึ่งไปยังขอบโซนอีกข้างหนึ่ง ดังแสดงในภาพที่ 12



ภาพที่ 12 การทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อด้วยสารทดสอบ bacteriocins fused intein

(inactive sal K, active sal K, inactive alb β และ active alb β) positive control

(*Lb. salivarius* K4), negative control (50 mM Tris-HCl pH 8.8)

โปรตีนในรูป Inclusion body (โปรตีนที่ละลาย 50 mM Tris-HCl pH 8.8)

และโปรตีนในรูป supernatant หลัง sonication

ตารางที่ 2 เชื้อเป้าหมายที่ใช้ทดสอบ 14 สายพันธุ์

Indicator strains	Media	Code
Lactic acid bacteria		
<i>Enterococcus faecalis</i> JCM 5803 ^T	MRS	M1
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> JCM 6124 ^T	MRS	M2
<i>Lactobacillus sakei</i> TISTR 890	MRS	M3
<i>Lactococcus cremoris</i> TISTR 1344	MRS	M4
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 14917 ^T	MRS	M5
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> JCM 1157 ^T	MRS	M6
<i>Enterococcus faecalis</i> TISTR 888	MRS	M7
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> TISTR 942	MRS	M8
<i>Streptococcus</i> sp. TISTR 1030	MRS	M9
Other gram positive bacteria		
<i>Brochotrix campestris</i> NBRC 11547 ^T	TSB	T1
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090 ^T	TSB	T2
<i>Pseudomonas fluorescens</i> TISTR 358	TSB	T3
<i>Staphylococcus aureus</i> TISTR 118	TSB	T4
<i>Bacillus coagulans</i> TISTR 1447	TSB	T5

ATCC = American Type Culture Collection, Rockville. Md

JCM = Japanese culture of Microorganisms, Wako, Japan

NRBC = National Institute of Technology and Evaluation (NITE) Biological Resource Center

TISTR = Thailand Institute of Scientific and Technological Research

TSB = Tryptic soy broth (Merck, Germany)

MRS = De Man Rogosa and Sharpe (Merck, Germany)

7. การตรวจสอบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อทดสอบโดยวิธี MIC (Minimal inhibitory concentration) ด้วยวิธี Broth microdilution assay

การตรวจสอบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อทดสอบโดยวิธี MIC คือ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ

7.1 การเตรียมแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบต้องอยู่ในระยะที่เซลล์ทุกๆเซลล์พร้อมที่จะเจริญเติบโตหรือแบ่งเซลล์ได้ ควรเป็นแบคทีเรียที่มีอายุไม่มากนัก โดยทั่วไปใช้แบคทีเรียที่มีอายุประมาณ 16-18 ชั่วโมง จากนั้นดูดเชื้อจาก stock 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหารเหลว MRS และ TSB ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าเพื่อให้เชื้อกระจายตัวออกจากกัน แล้วนำหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS และ TSB แล้วนำไปวัดความขุ่นให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร แล้วเจือจางเซลล์ให้ได้เซลล์เริ่มต้นที่ 10^7 CFU/ml

7.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ในการทดสอบนี้จะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Man, Rogosa and Sharpe (MRS) และ Trypticase soy broth (TSB)

7.3 เตรียมเปปไทด์สังเคราะห์ (aapptec, USA) ที่ใช้ในการทดสอบ คือ active sal K และ active alb β โดยเตรียมความเข้มข้นเริ่มต้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางเปปไทด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ แบบ twofold serial dilution (15.625, 31.25, 62.5, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

7.4 เติมนสารละลายแบคทีเรีย 10^7 CFU/ml ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงใน 96-well microtiter cell-culture plates เติมนสารละลายเปปไทด์ 10 ไมโครลิตร (เจือจางให้มีความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 500, 250, 125, 62.5, 31.25 และ 15.625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ลงใน 96-well microtiter cell-culture plates (ชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นมาเชื้อเป็น positive control และ SDS เป็น negative control)

7.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

7.6 การอ่านผลการหา Minimal inhibitory concentration (MIC) เมื่อป่มเชื้อจนครบ 16-18 ชั่วโมงแล้ว โดยรายงานผลเป็นค่า a-b ซึ่ง a คือ ค่าความเข้มข้นสูงสุดที่แบคทีเรียเจริญ และ b คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย อ่านปริมาณของสารทดสอบของหลอดนี้เป็นค่า MIC

8. ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง (Hemolysis activity)

เตรียมเลือดหนูสำหรับใช้ในการทดสอบ 2% v/v Rat red blood cell (RRBCs) จะต้องทำการล้างเลือดก่อน ล้าง RRBCs ด้วย phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเฉพาะเซลล์เม็ดเลือดแดงออกมา 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง จากนั้นเติม 1X PBS ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในหลอด 15 มิลลิลิตร ต่อจากนั้นปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และดูดเลือดที่ตกตะกอนอยู่ด้านล่างมา 200 ไมโครลิตร แล้วเติม 1X PBS 9.8 มิลลิลิตร ดูดใส่ใน 96-well microtiter cell-culture plates ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นใส่เปปไทด์สังเคราะห์ active sal K และ active alb β ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (twofold serial dilution) คือ 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นมาเชื่อเป็น positive control และ Triton X-100 เป็น negative control) ทำทั้งหมด 3 ชุดการทดลอง และแต่ละชุดทำ 3 ซ้ำ จากนั้นหา % Hemolysis โดยวัด UV-Vis ที่ 540 นาโนเมตร คำนวณค่า Standard deviation (SD) และ Standard error of mean (SEM)

9. ศึกษาโครงสร้างทุติยภูมิ โดยใช้ Circular dichroism (CD) spectropolarimeter

เป็นการวิเคราะห์โครงสร้างระดับทุติยภูมิของเปปไทด์สังเคราะห์ โดยตรวจวัดการดูดกลืนแสงของโมเลกุลที่ไม่สมมาตร ซึ่งจะให้ข้อมูลของการดูดกลืนแสงที่ไม่เท่ากันของฝั่งซ้ายและฝั่งขวาของ circular polarized light เป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้วัดการดูดกลืนแสงของโปรตีน ซึ่งค่าที่ได้คือค่า CD spectra (โมเลกุลของสารนั้นจะไม่สมมาตร)

9.1 ละลายเปปไทด์สังเคราะห์ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 20 mM CH_3COONa ที่ pH3, pH4, pH5, และ pH6 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

9.2 ละลายเปปไทด์สังเคราะห์ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 20 mM Tris-HCl ที่ pH7, pH8 และ pH9 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

9.3 ละลายเปปไทด์สังเคราะห์ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 20 mM CH_3COONa ที่ pH3, pH4, pH5 และ pH6 กับ 10% SDS ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

9.4 ละลายเปปไทด์สังเคราะห์ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 20 mM Tris-HCl ที่ pH7, pH8 และ pH9 ใน 10% SDS ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

9.5 ละลายเปปไทด์สังเคราะห์ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 20 mM CH_3COONa ที่ pH3, pH4, pH5 และ pH6 กับ liposome ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

9.6 ละลายเปปไทด์สังเคราะห์ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 20 mM Tris-HCl ที่ pH7, pH8 และ pH9 กับ liposome ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

9.7 ละลายเปปไทด์สังเคราะห์ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 2 mM dodecylphosphocholine (DPC) micelle (Avantipid, USA) กับ 20 mM CH_3COONa ที่ pH3, pH4, pH5 และ pH6 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

9.8 ละลายเปปไทด์สังเคราะห์ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 2 mM dodecylphosphocholine (DPC) micelle (Avantipid, USA) และ 20 mM Tris-HCl ที่ pH7, pH8 และ pH9 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

9.9 วัดค่า molar ellipticities ของเปปไทด์ในข้อ 9.1-9.8 ด้วยเครื่อง CD spectropolarimeter (สแกนที่ความยาวคลื่น 190-260 นาโนเมตร) ความเร็วในการสแกน 50 นาโนเมตรต่อนาที ทำ 3 ครั้ง

9.10 โปรตีนจะมีการดูดกลืนแสงในช่วง far-UV หรือ near UV เกี่ยวข้องการเปลี่ยนแปลงของอิเล็กตรอน เทคนิคนี้ใช้ศึกษาโครงสร้างระดับทุติยภูมิได้ดีเฉพาะแอลฟา-เฮลิกซ์ หรือเบต้า-ชีท จะมีการให้สัญญาณ CD ที่สามารถบอกปริมาณ (content) ของโครงสร้างทุติยภูมิ การตรวจสอบโครงสร้างของ α -helix จะตรวจสอบที่ความยาวคลื่น 208 และ 222 นาโนเมตร และโครงสร้างของ β -sheet จะตรวจสอบที่ความยาวคลื่น 210 และ 220 นาโนเมตร

10. คำนวณหาเปอร์เซ็นต์โครงสร้างทุติยภูมิของเปปไทด์สังเคราะห์ active sal K และ active alb β ที่ละลายในสารละลายต่างๆ โดยใช้โปรแกรม SELCON Version 3 (Sreerama *et al*, 1999)

นำค่า CD spectra ที่ได้จากการศึกษาโครงสร้างทุติยภูมิของเปปไทด์สังเคราะห์ active sal K และ active alb β ในสถานะที่คล้ายเซลล์เมมเบรน โดยใช้ SDS micelle, Liposome และ DPC micelles มาทำการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์โครงสร้างทุติยภูมิ ของ α -helix, β -sheet (strand), Turn และ Unordered โดยสร้าง input file จากโปรแกรม CDDATA จากนั้นจึงคำนวณหา α -helix, β -sheet, Turn และ Unordered ด้วยโปรแกรม SELCON Version 3

11. การทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน (Protein prediction)

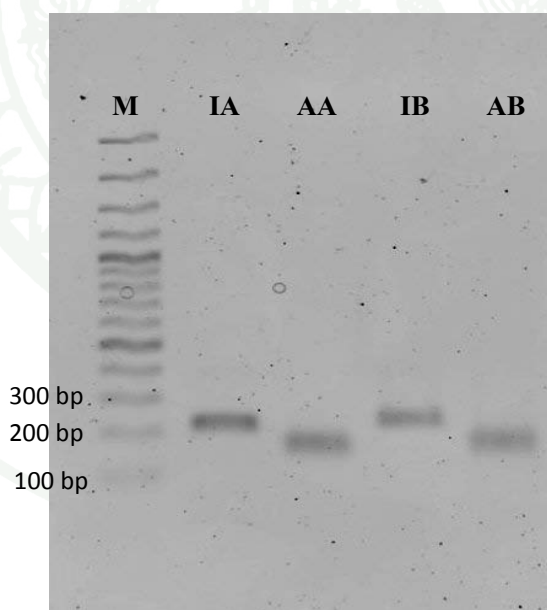
ทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของแบคทีเรียโอซิน active sal K และ active alb β โดยใช้เว็บไซต์ www.predictprotein.org เพื่อศึกษาคุณสมบัติของ amino acid side chain การทำนายโครงสร้างของแบคทีเรียโอซิน รวมถึงร้อยละของโครงสร้าง α -helix, β -sheet และ random coil ทำนายตำแหน่งที่เกิด disulfide bonds และ transmembrane

ผลและวิจารณ์

ผล

1. การโคลนยีนแบคทีเรียโอซิน

ซึ่งในการวิจัยนี้ได้โปรตีนแบคทีเรียโอซินที่โคลนแล้ว จาก ดร.อัญชนิ อุเบอร่า ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ซึ่งโปรตีนที่ได้จากการโคลนมาแล้วนั้น ได้แก่ inactive sal K, active sal K, inactive alb β และ active alb β ทำ PCR เพื่อเพิ่มชิ้นยีนแบคทีเรียโอซินสายแอลฟาและเบต้า เพื่อโคลนเข้าสู่พลาสมิดเวกเตอร์ pTYB1 โดยขนาดของชิ้นยีนแบคทีเรียโอซินสายแอลฟาและสายเบต้าแบบ inactive และ active form มีขนาดประมาณ 200 bp และ 144 bp ตามลำดับ ขนาดของดีเอ็นเอของยีนแบคทีเรียโอซิน ดังแสดงในภาพที่ 13 ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนของแบคทีเรียโอซิน ดังแสดงในภาพที่ 14



ภาพที่ 13 PCR amplification ของยีนแบคทีเรียโอซินสายแอลฟาและสายเบต้าแบบ inactive

และ active form (M = DNA ladder marker, IA = inactive sal K, AA = active sal K,

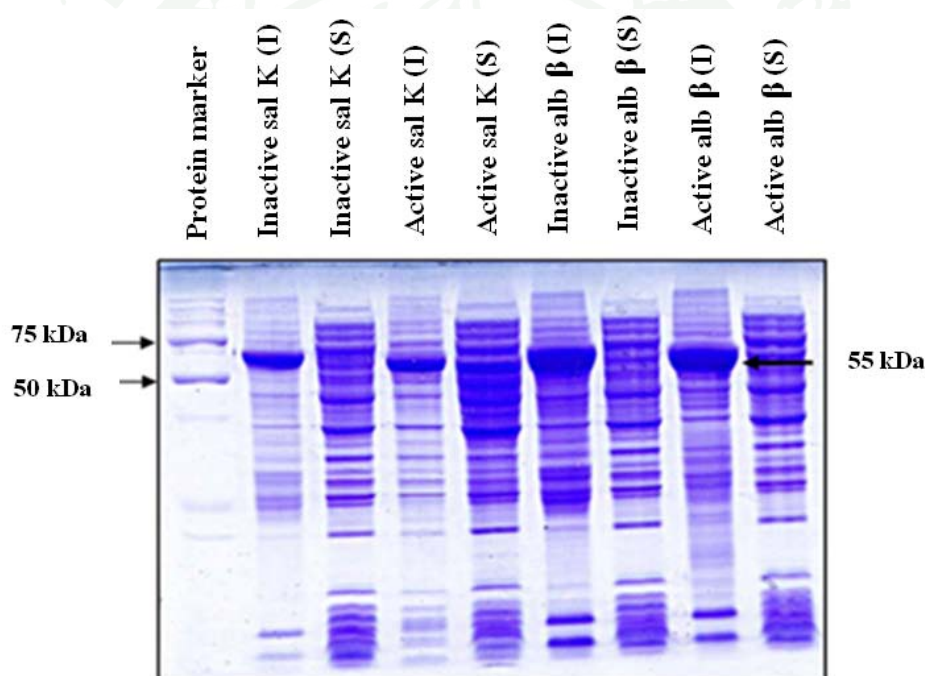
IB = inactive alb β และ AB = active alb β)



ภาพที่ 14 ลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนของเบคทีริโอซิน *inactive sal K*, *active sal K*, *inactive alb β* และ *active alb β* จาก *Lb. salivarius* K4 โดยเบคทีริโอซินที่เป็น inactive form จะประกอบด้วย leader peptide เมื่อมีการตัด leader peptide ออกไป โดยใช้ตำแหน่งกรดอะมิโน GG (บริเวณลูกศรชี้) เป็นตำแหน่งจดจำทำให้เปปไทด์เบคทีริโอซินกลายเป็น active sal K และ active alb β ดังแสดงในกล่องสีเทา

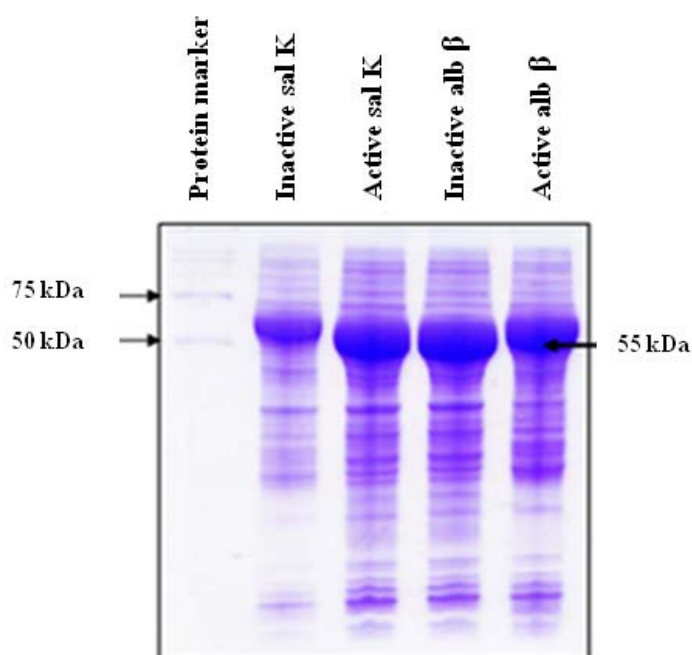
2. การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน

เมื่อนำโคโลนีที่ตรวจสอบแล้วว่ามียีน *inactive sal K*, *active sal K*, *inactive alb β* และ *active alb β* (ดร. อัญชนิ คุเบอรา ภาควิชาพันธุศาสตร์) ย้ายเข้าสู่คอมพิเทนท์เซลล์ชนิด *E. coli* BL21 (DE3) โดยใช้วิธี heat shock และเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนไปเลี้ยงในอาหาร LB broth ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ IPTG เป็นตัวชักนำให้มีการแสดงออก หลังจากตรวจสอบ 12% SDS-PAGE พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน *inactive sal K*, *active sal K*, *inactive alb β* และ *active alb β* อยู่ในรูปของ inclusion body และมีขนาด 55 กิโลดาลตัน ดังแสดงในภาพที่ 15



ภาพที่ 15 การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในเวกเตอร์ pTYB1 ซึ่งมีขนาด 55 กิโลดาลตัน (I คือ Inclusion body และ S คือ Supernatant)

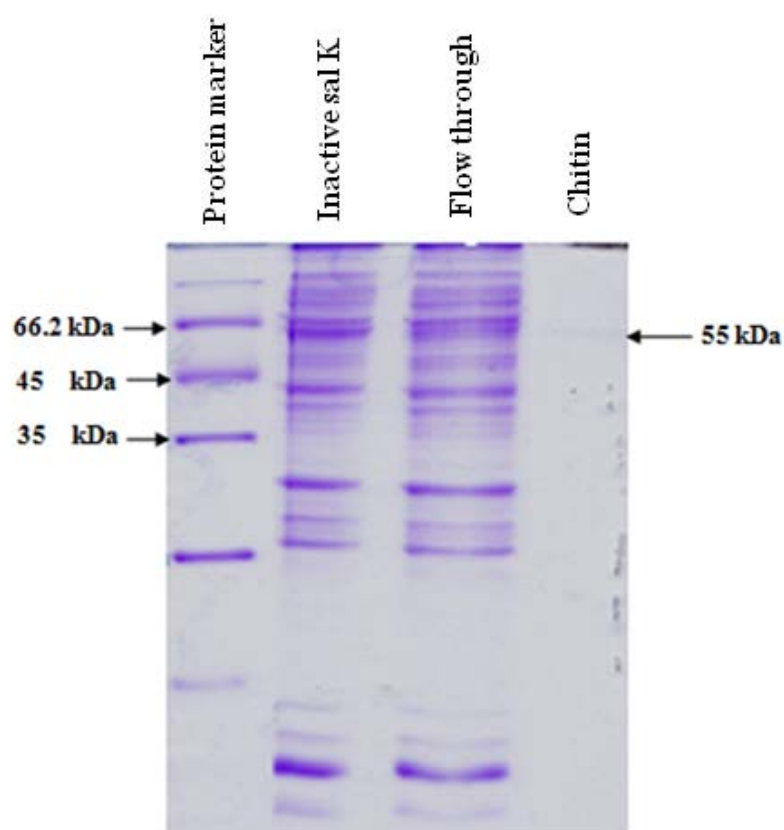
จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้มาละลายด้วย Tris-HCl pH 8.8 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำไปตรวจสอบ 12% SDS-PAGE จะได้รีคอมบิแนนท์โปรตีนในปริมาณมากขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 16



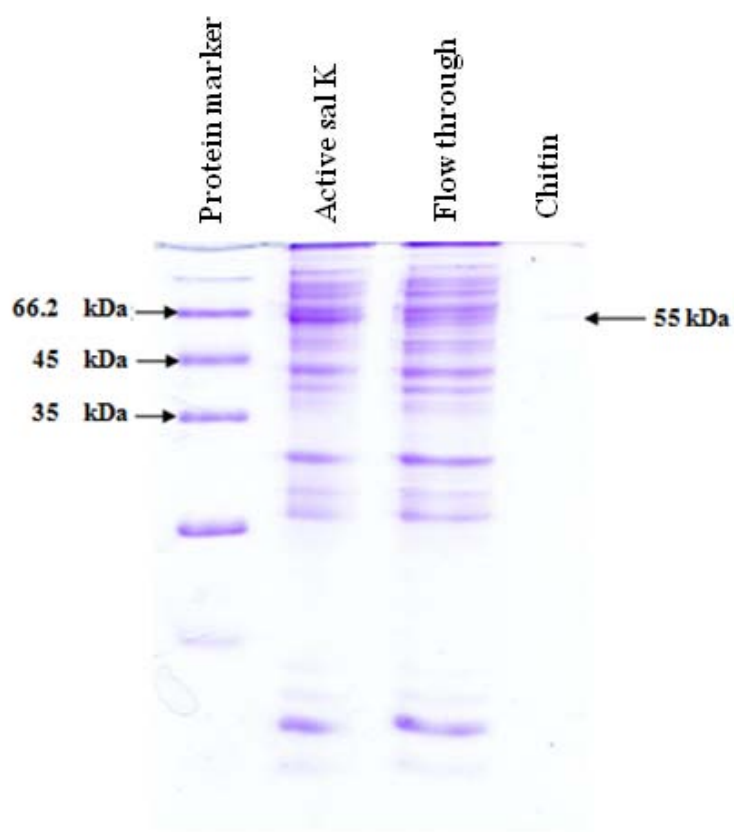
ภาพที่ 16 การละลายของรีคอมบิแนนท์โปรตีน bacteriocins fused intein (inactive sal K, active sal K, inactive alb β และ active alb β) ที่ละลายใน 50 mM Tris-HCl pH 8.8

3. การแยกและทำโปรตีน bacteriocins fused intein ให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบจำเพาะ (Affinity chromatography)

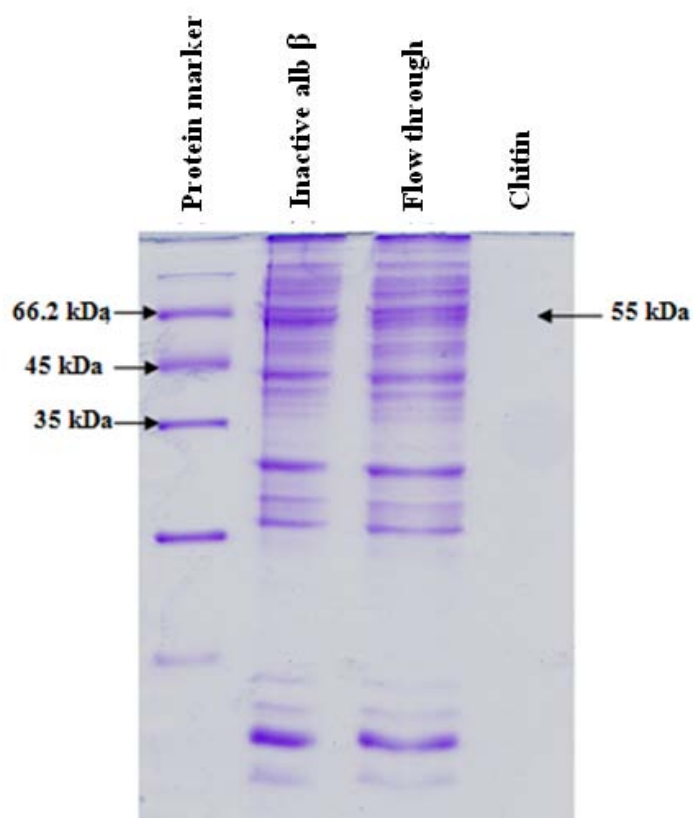
โดยรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ใช้คือ bacteriocins fused intein (inactive sal K, active sal K, inactive alb β และ active alb β) ที่มีขนาด 55 กิโลดาลตัน และเมื่อทำโปรตีนให้บริสุทธิ์จะได้โปรตีนขนาด 5.5 กิโลดาลตัน โดยใช้ DTT เป็นตัวตัดแบคเทอริโอซินออกจาก intein ผลการทดลองพบว่าไม่สามารถแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ได้ และรีคอมบิแนนท์โปรตีนยังคงเกาะอยู่กับ chitin bead และ 50 mM DTT ไม่สามารถตัดรีคอมบิแนนท์โปรตีนให้หลุดออกจาก intein ได้ ดังแสดงในภาพที่ 17-20



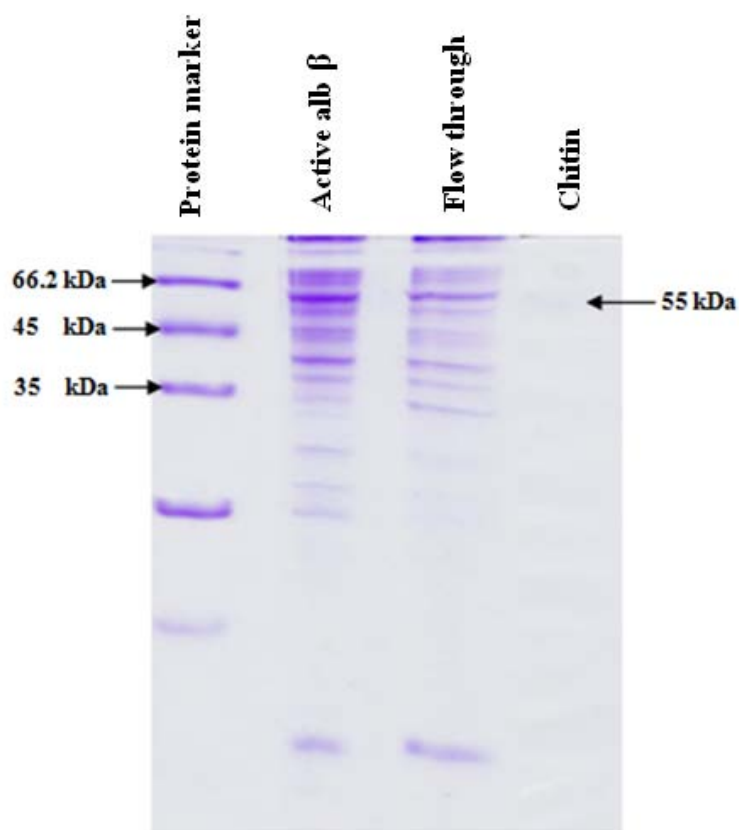
ภาพที่ 17 การแยกและทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยตัวจับที่จำเพาะของโปรตีน bacteriocins fused intein (inactive sal K)



ภาพที่ 18 การแยกและทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยตัวจับที่จำเพาะของโปรตีน bacteriocins fused intein (active sal K)

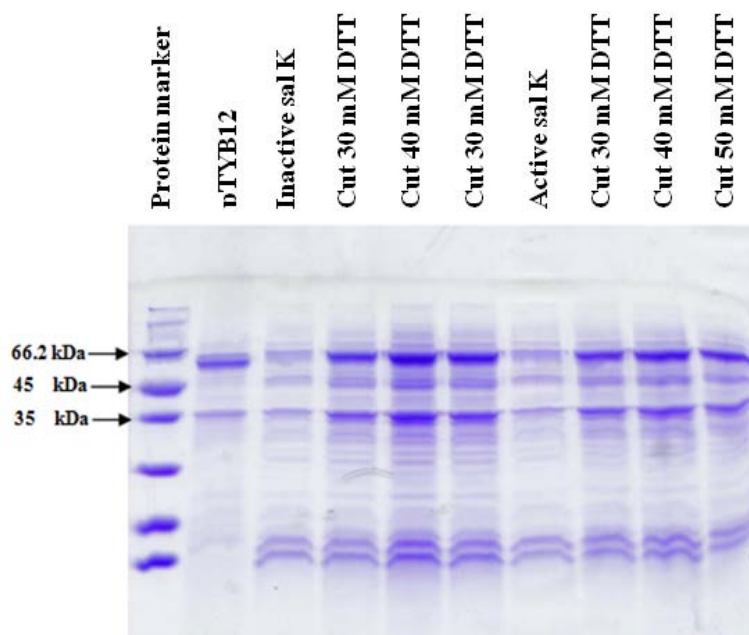


ภาพที่ 19 การแยกและทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยตัวจับที่จำเพาะของโปรตีน bacteriocins fused intein (inactive alb β)

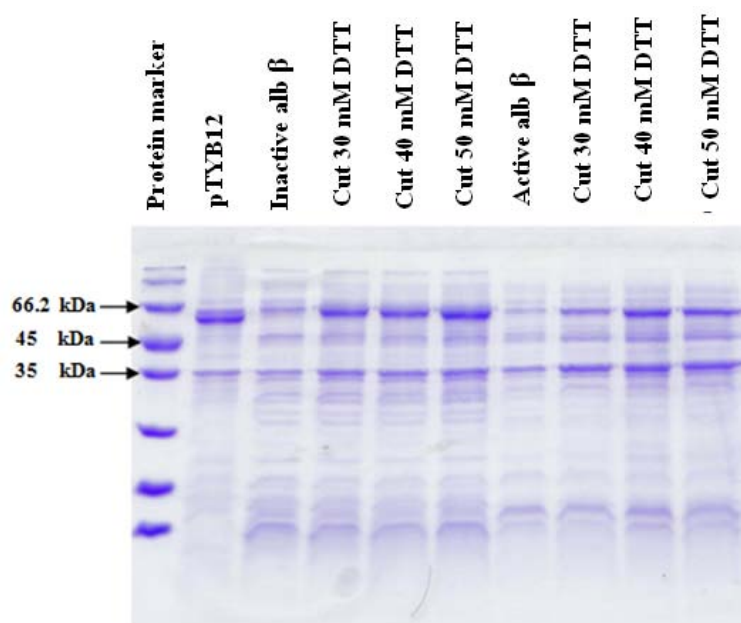


ภาพที่ 20 การแยกและทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยตัวจับที่จำเพาะของโปรตีน bacteriocins fused intein (active alb β)

หลังจากที่ใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบจำเพาะแล้ว พบว่าไม่สามารถใช้ 50 mM DTT ตัดโปรตีนขนาด 5.5 กิโลดาลตัน ออกมาได้ จึงทดสอบอีกวิธีโดยใช้ 50 mM DTT ตัดรีคอมบิแนนท์โปรตีน แล้วตรวจสอบ 12% SDS-PAGE เพื่อตรวจสอบการแยก และทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ ดังแสดงในภาพที่ 21 และ 22



ภาพที่ 21 การแยกและทำให้โปรตีน bacteriocins fused intein (inactive sal K และ active sal K) ให้บริสุทธิ์ด้วยการตัดด้วย 50 mM DTT ของ ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง



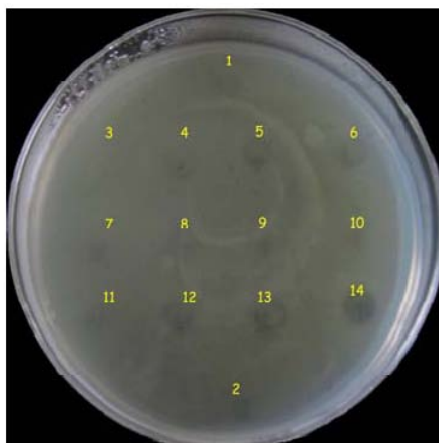
ภาพที่ 22 การแยกและทำโปรตีน bacteriocins fused intein (inactive alb β และ active alb β)

ให้บริสุทธิ์ด้วยการตัดด้วย 50 mM DTT ของ ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

การตัดด้วย DTT ของ inactive sal K, active sal K, inactive alb β และ active alb β พบว่าแถบโปรตีนลดลงจาก 55 กิโลดาลตัน เป็น 49.5 กิโลดาลตัน ของ intein โดยความเข้มข้น 40 mM DTT และ 50 mM DTT

4. การตรวจสอบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อทดสอบกับโปรตีน bacteriocins fused intein โดยวิธี Spot on lawn

ทดสอบกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินโดยดัดแปลงจากวิธีของ Hoover and Harlender (1993) โดยมีเชื้อเป้าหมาย 14 เชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 2 ดังนี้ *Enterococcus faecalis* JCM 5803^T, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^T, *Lactobacillus sakei* TISTR 890, *Lactococcus cremoris* TISTR 1344, *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917^T, *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T, *Enterococcus faecalis* TISTR 888, *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 942, *Streptococcus* sp. TISTR 1030, *Brochotrix campestris* NBRC 11547^T, *Listeria innocua* ATCC 33090^T, *Pseudomonas fluorescens* TISTR 358, *Staphylococcus aureus* TISTR 118 และ *Bacillus coagulans* TISTR 1447 โดยสภาวะสารละลายที่แตกต่างกัน คือ โปรตีนในรูป inclusion body, โปรตีนละลายใน 50 mM Tris-HCl pH 8.8 และ โปรตีนหลังจาก sonication



ภาพที่ 23 แสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของ active alb β fused intein ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917^T

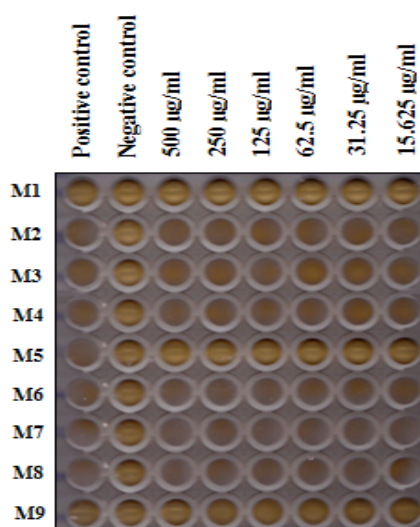
- 1 คือ positive control จาก crude cell ของ *Lb. salivarius* K4,
- 2 คือ negative control (50 mM Tris-Cl pH8.8),
- 3-6 คือ inclusion bodies (inactive sal K, active sal K, inactive alb β และ active alb β)
- 7-10 คือ inclusion bodies ละลายใน 50 mM Tris-Cl pH 8.8
- 11-14 คือ supernatant หลังจาก sonication (inactive sal K, active salK, inactive alb β และ active alb β)

จากการตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ 14 สายพันธุ์ ด้วยวิธี spot on lawn โดยใช้โปรตีน bacteriocins fused intein พบว่า active alb β สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917^T ได้ ดังแสดงในภาพที่ 23

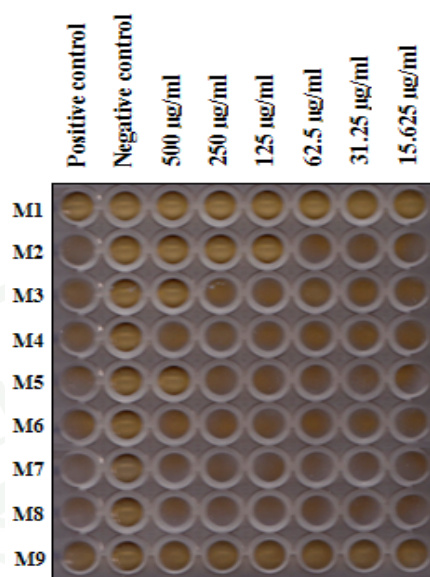
5. การตรวจสอบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อทดสอบกับเปปไทด์สังเคราะห์โดยวิธี MIC (Minimal inhibitory concentration)

การตรวจสอบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 2 กับเปปไทด์สังเคราะห์ active sal K และ active alb β (aapptec, USA) โดยวิธี MIC เมื่อป่มเชื้อจนครบ 16-18 ชั่วโมงแล้วพบว่าเปปไทด์ที่ใช้ในการทดสอบ active sal K และ active alb β มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อเป้าหมายได้แตกต่างกัน

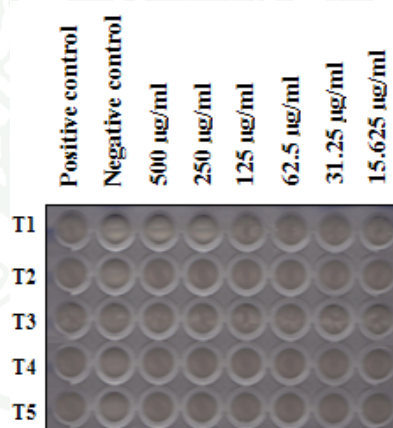
ผลจากการทดสอบ พบว่าเปปไทด์ active sal K สามารถยับยั้งเชื้อ *Enterococcus faecalis* JCM 5803^T, *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917^T และ *Streptococcus* sp. TISTR 1030 และเปปไทด์ active alb β สามารถยับยั้งเชื้อ *Enterococcus faecalis* JCM 5803^T, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^T, *Lactobacillus sakei* TISTR 890, *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917^T และ *Streptococcus* sp. TISTR 1030 และ *Brochotrix campestris* NBRC 11547^T ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 24-26 และตารางที่ 3 ตามลำดับ



ภาพที่ 24 แสดงการยับยั้งเชื้อทดสอบ 9 เชื้อ ในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่าเปปไทด์ active sal K สามารถยับยั้งเชื้อ *Enterococcus faecalis* JCM 5803^T, *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917^T และ *Streptococcus* sp. TISTR 1030



ภาพที่ 25 แสดงการยับยั้งเชื้อทดสอบในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่าเปปไทด์ active alb β สามารถยับยั้งเชื้อ *Enterococcus faecalis* JCM 5803^T, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^T, *Lactobacillus sakei* TISTR 890, *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917^T และ *Streptococcus* sp. TISTR 1030



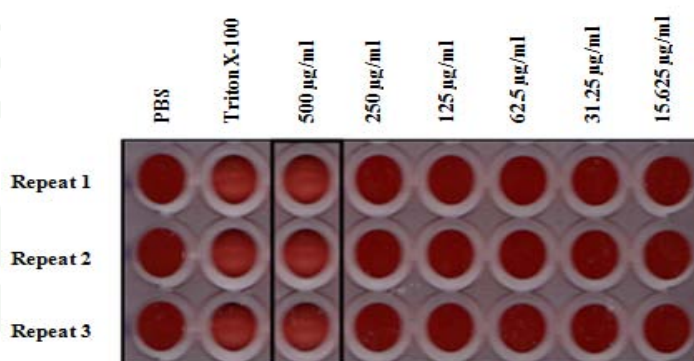
ภาพที่ 26 แสดงการยับยั้งเชื้อทดสอบในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก พบว่าเปปไทด์ active sal K ไม่สามารถยับยั้งเชื้อเป้าหมายได้ แต่ active alb β สามารถยับยั้งเชื้อ *Brochothrix campestris* NBRC 11547^T

ตารางที่ 3 ผลกิจกรรมการยับยั้งเชื้อทดสอบโดยวิธี MIC ของเปปไทด์สังเคราะห์ active sal K และ active alb β ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

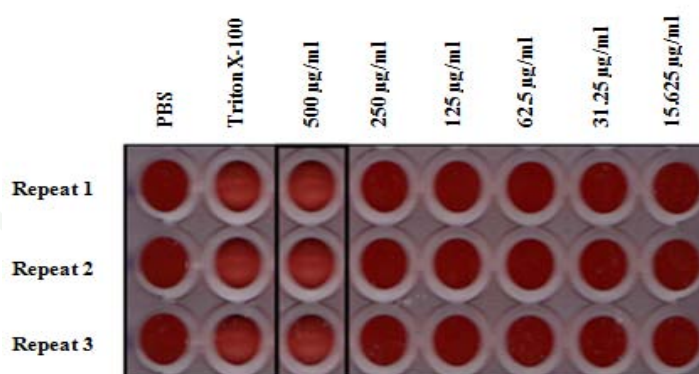
เปปไทด์	MIC ($\mu\text{g/ml}$)													
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	T1	T2	T3	T4	T5
Active sal K	15.6-31.25	>500	>500	>500	15.6-31.25	>500	>500	>500	15.6-31.25	>500	>500	>500	>500	>500
Active alb β	62.5-125	62.5-125	250-500	>500	250-500	>500	>500	>500	15.6-31.25	125-250	>500	>500	>500	>500

6. การตรวจสอบการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดง (Hemolysis activity)

เมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษของเปปไทด์สังเคราะห์ active sal K และ active alb β ต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงของหนู (Hemolytic activity assay) พบว่าไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง เนื่องจากเปปไทด์ active sal K และ active alb β สามารถทำลายเชื้อทดสอบได้ที่มีความเข้มข้นของเปปไทด์ต่ำสุด (MIC) 15.625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



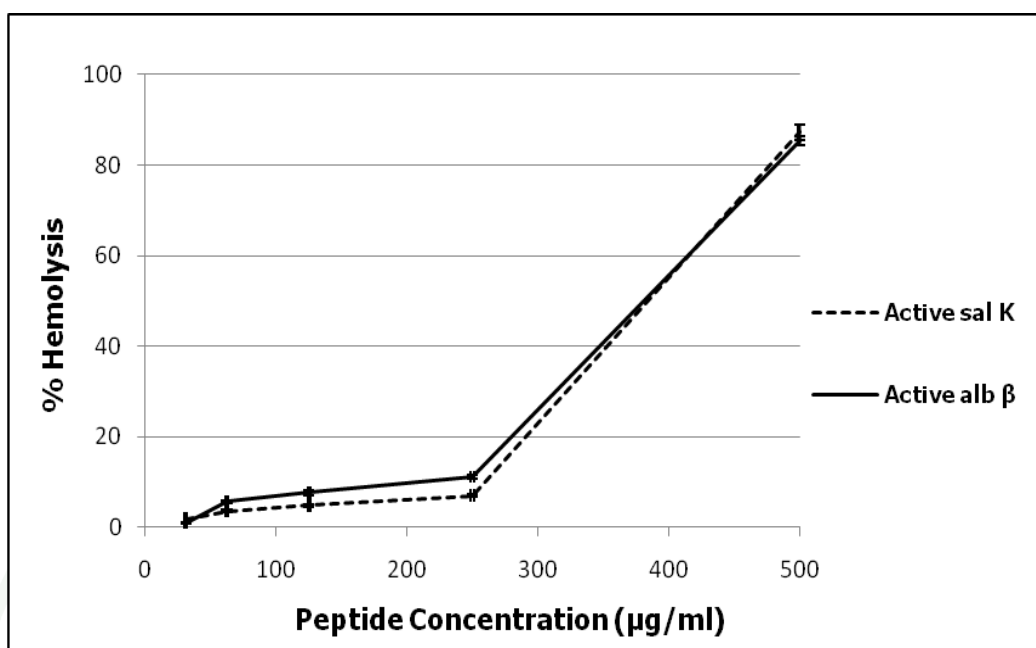
ภาพที่ 27 การแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงของ active sal K พบว่าเปปไทด์ที่ความเข้มข้น 500 $\mu\text{g/ml}$ มีการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดง 87.36 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 28 การแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงของ active alb β พบว่าเปปไทด์ที่ความเข้มข้น 500 $\mu\text{g/ml}$ มีการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดง 85.38 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4 ผลการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ และค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (means $\pm$ SEM) การแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงใน active sal K และ active alb β

เปปไทด์	ซ้ำที่	เปอร์เซ็นต์การแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดง				
		31.25 $\mu\text{g/ml}$	62.5 $\mu\text{g/ml}$	125 $\mu\text{g/ml}$	250 $\mu\text{g/ml}$	500 $\mu\text{g/ml}$
Active sal K	1	1.80	3.60	4.50	6.31	85.59
	2	1.89	2.83	3.77	6.60	89.62
	3	2.02	4.04	6.06	8.08	86.87
	$\bar{X} \pm \text{SEM}$	1.90 $\pm$ 0.05	3.49 $\pm$ 0.29	4.78 $\pm$ 0.55	6.99 $\pm$ 0.45	87.36 $\pm$ 0.97
Active alb β	1	0.90	6.31	7.2072	10.81	83.78
	2	0.90	5.41	7.2072	10.81	82.88
	3	1.05	5.26	8.4211	11.58	89.47
	$\bar{X} \pm \text{SEM}$	0.95 $\pm$ 0.04	5.66 $\pm$ 0.27	7.61 $\pm$ 0.33	11.07 $\pm$ 0.21	85.38 $\pm$ 1.68



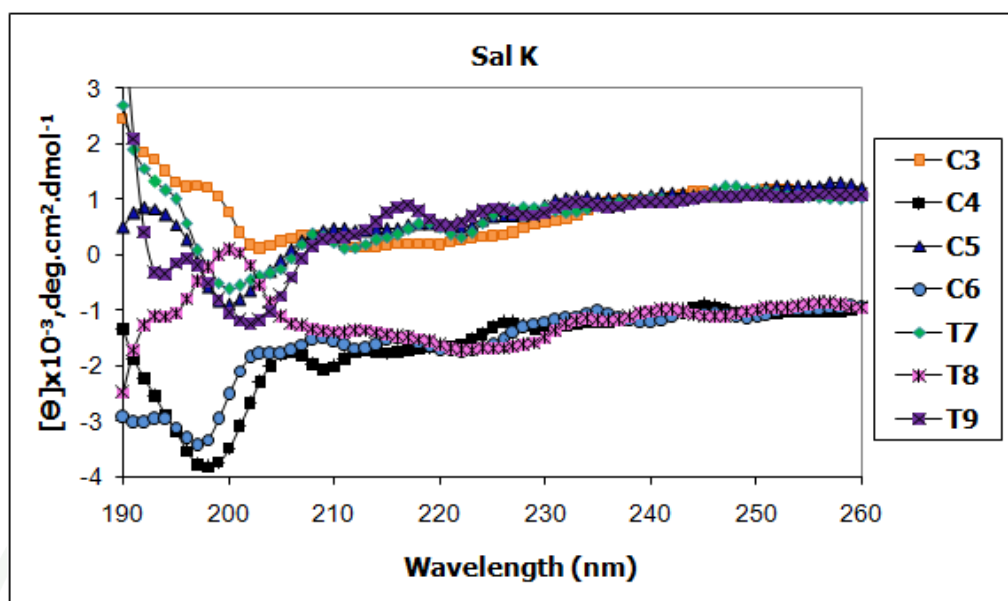
ภาพที่ 29 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ และค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (means $\pm$ SEM) การแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงในเปปไทด์สังเคราะห์ active sal K และ active alb β

จากการตรวจสอบการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงของหนู ดังแสดงภาพที่ 27 และ 28 พบว่าค่า LC_{50} (ค่าการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ 50 เปอร์เซ็นต์) ของเปปไทด์สังเคราะห์ active sal K และ active alb β คือ 371.83 และ 366.23 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้เปปไทด์ active sal K สามารถทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกตัวได้สูงสุดคิดเป็น 87.36 เปอร์เซ็นต์ และเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ไม่แตกตัวคิดเป็น 12.64 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเปปไทด์ active alb β สามารถแตกตัวได้สูงสุดคิดเป็น 85.38 เปอร์เซ็นต์ และเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ไม่แตกตัวคิดเป็น 14.62 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4

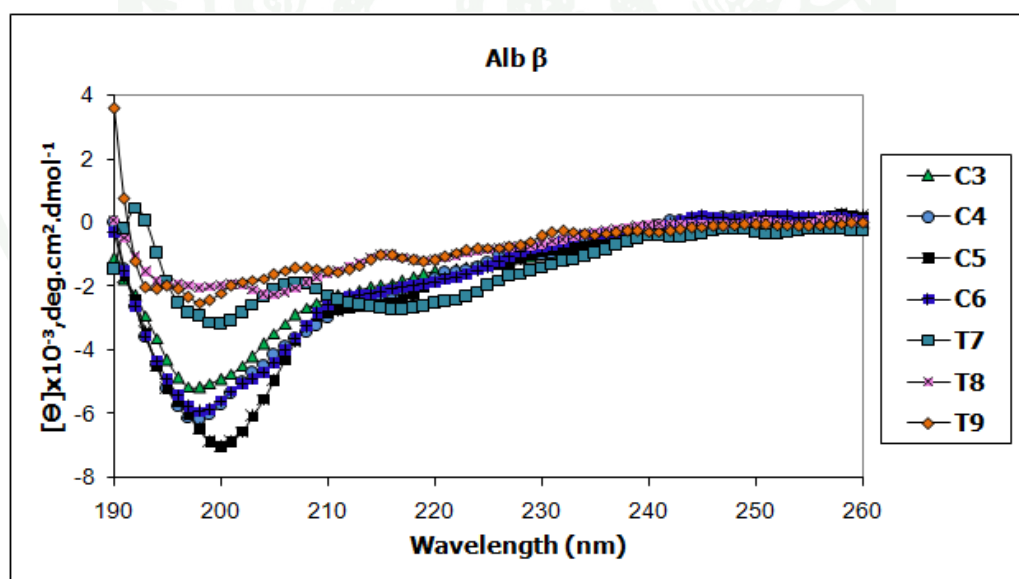
7. ศึกษาโครงสร้างทุติยภูมิ โดยใช้ Circular dichroism (CD) spectropolarimeter

จากการศึกษาคุณลักษณะทางด้านโครงสร้างของแบคทีเรียโอซินในสภาวะที่คล้ายเซลล์เมมเบรน โดยใช้ SDS micelle, Liposome และ DPC micelles ซึ่งพบว่าโครงสร้างทุติยภูมิเป็น α -helix และ β -sheet ซึ่งการที่มีเปปไทด์สังเคราะห์มีโครงสร้างทุติยภูมิที่แตกต่างกัน เนื่องจากสภาวะที่คล้ายเซลล์เมมเบรน

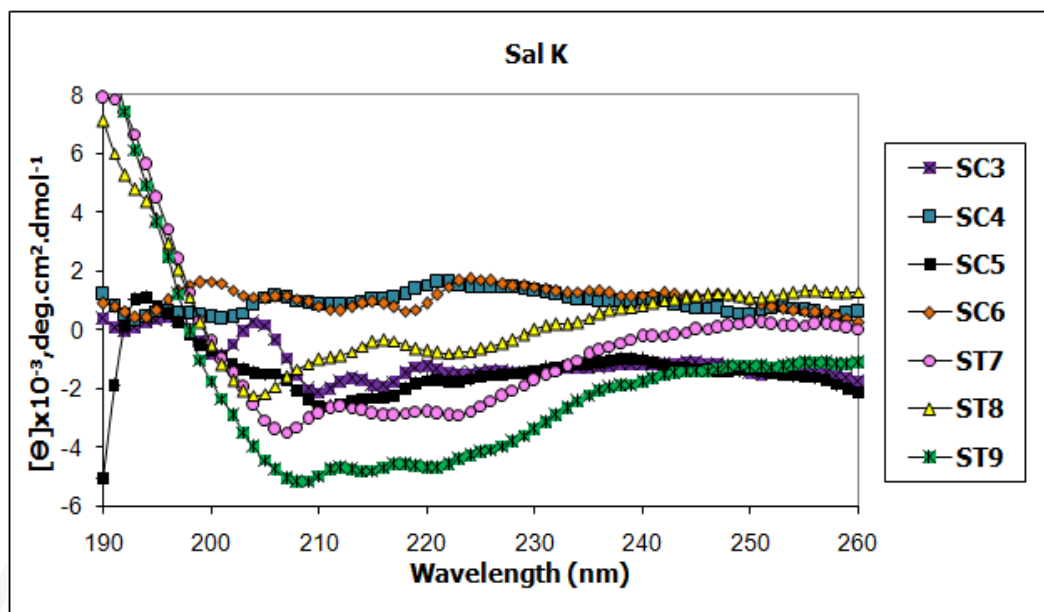
เมื่อเปปไทด์สังเคราะห์ active sal K และ active alb β ละลายอยู่ในบัฟเฟอร์ pH 3-9 ผลที่ได้พบว่าไม่มีโครงสร้างทุติยภูมิเกิดขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 30 และ 31 เมื่อละลายเปปไทด์สังเคราะห์ใน 10% SDS กับบัฟเฟอร์ pH 3-9 พบว่า active sal K มีโครงสร้างแบบ α -helix ที่ pH 7 และ pH 9 และมีโครงสร้าง β -sheet ที่ pH 8 ส่วน active alb β มีโครงสร้างแบบ α -helix ที่ pH 3, pH 4, pH 5, pH 6, pH 7, pH 8 และ pH 9 ดังแสดงในภาพที่ 32 และ 33 เมื่อละลายเปปไทด์สังเคราะห์ใน liposome กับบัฟเฟอร์ pH 3-9 พบว่า active sal K มีโครงสร้างแบบ α -helix ที่ pH 4, pH 6 และ pH 8 ส่วน active alb β มีโครงสร้างแบบ β -sheet ที่ pH 3, pH 4 และ pH 8 ดังแสดงในภาพที่ 34 และ 35 และเมื่อละลายเปปไทด์สังเคราะห์ใน DPC กับบัฟเฟอร์ pH 3-9 พบว่า active sal K มีโครงสร้างแบบ α -helix ที่ pH 5 และ pH 9 ส่วน active alb β มีโครงสร้างแบบ β -sheet ที่ pH 5, pH 6, pH 7, pH 8 และ pH 9 ดังแสดงในภาพที่ 36 และ 37 ตามลำดับ



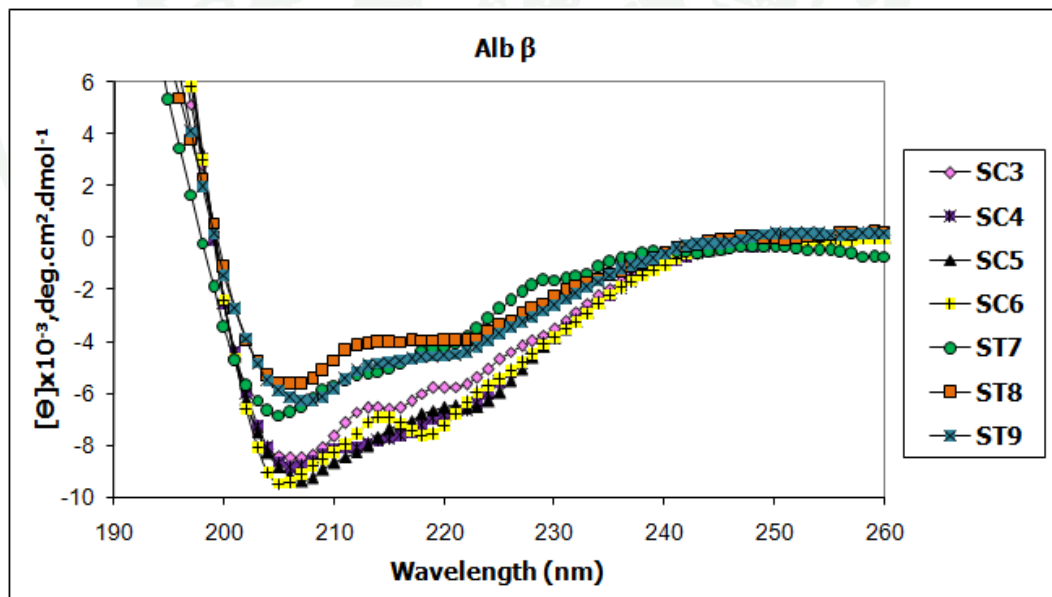
ภาพที่ 30 กราฟแสดงโครงสร้างทุติยภูมิของ active sal K ที่ละลายใน CH_3COONa (C) pH3-6 และ Tris-HCl (T) pH7-9 พบว่าไม่มีโครงสร้าง α -helix และ β -sheet



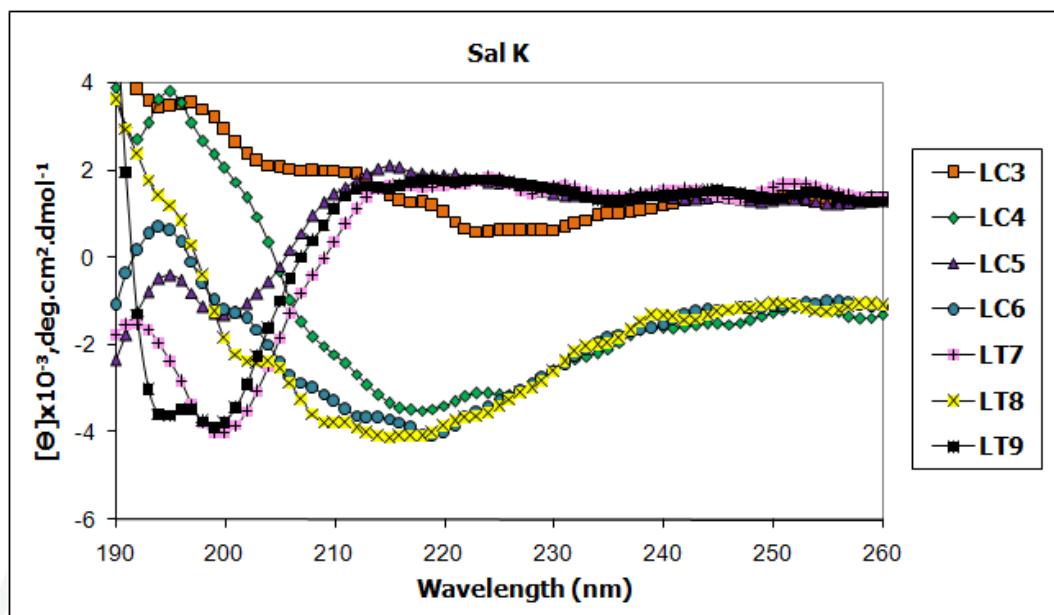
ภาพที่ 31 กราฟแสดงโครงสร้างทุติยภูมิของ active alb β ที่ละลายใน CH_3COONa (C) pH3-6 และ Tris-HCl (T) pH7-9 พบว่าไม่มีโครงสร้าง α -helix และ β -sheet



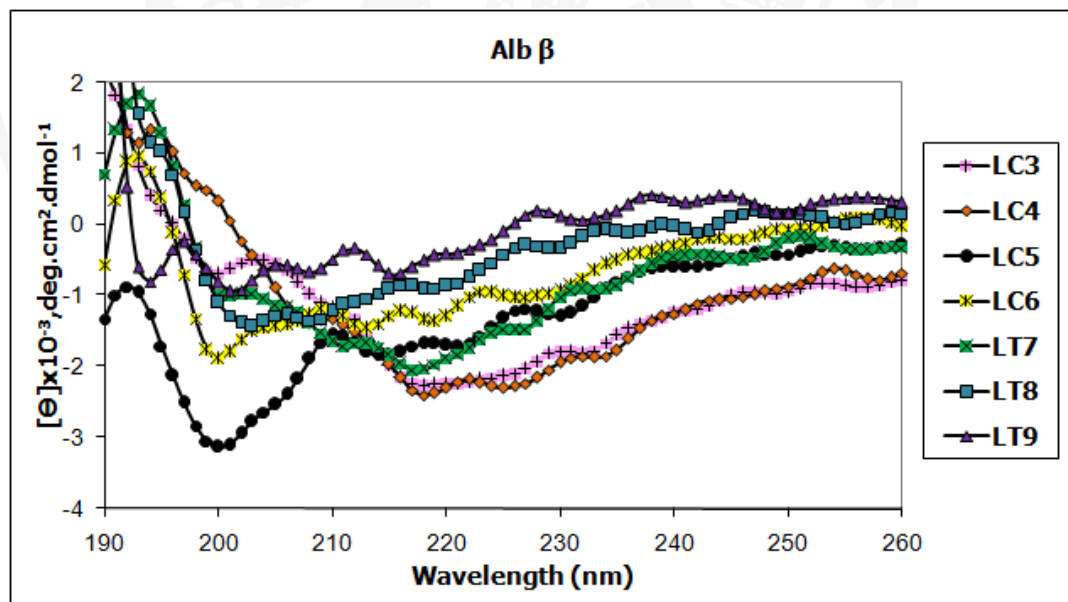
ภาพที่ 32 กราฟแสดงโครงสร้างทุติยภูมิของ active sal K ที่ละลายใน SDS (S) กับ CH_3COONa (C) pH3-6 และ Tris-HCl (T) pH7-9 พบว่ามีโครงสร้าง α -helix ที่ pH7 และ pH9 ส่วน β -sheet ที่ pH8



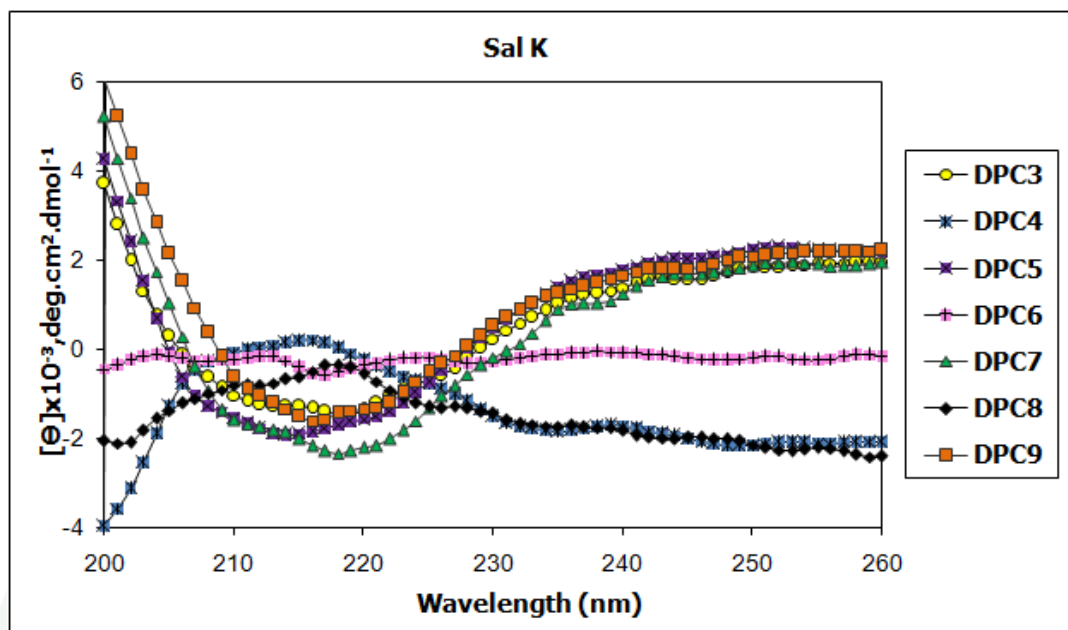
ภาพที่ 33 กราฟแสดงโครงสร้างทุติยภูมิของ active alb β ที่ละลายใน SDS (S) กับ CH_3COONa (C) pH3-6 และ Tris-HCl (T) pH7-9 พบว่ามีโครงสร้าง α -helix ที่ pH3, pH4, pH5, pH6, pH7, pH8 และ pH9



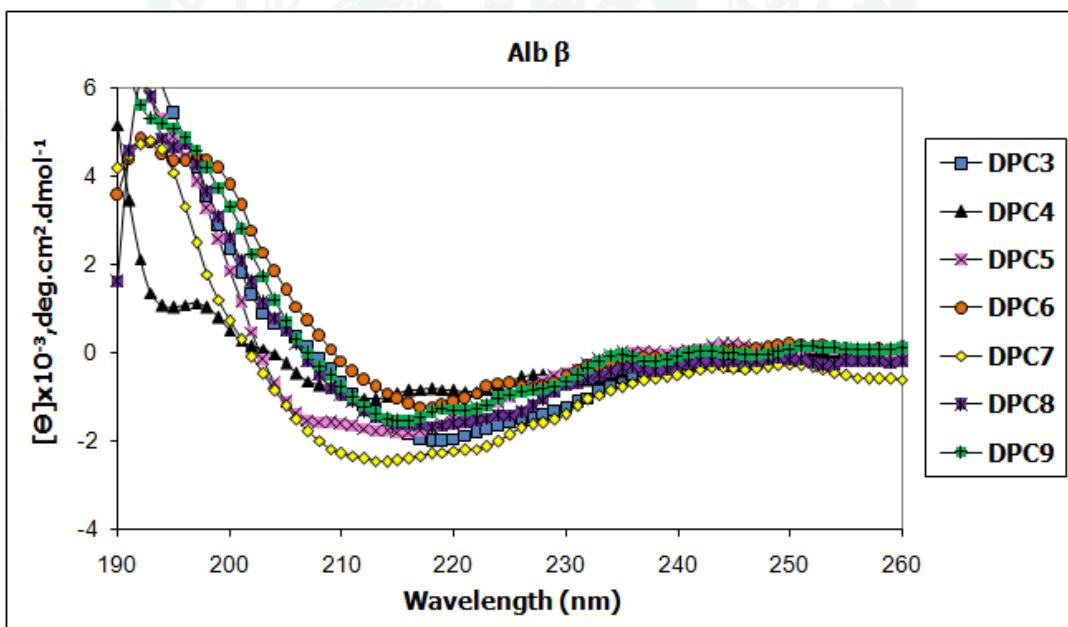
ภาพที่ 34 กราฟแสดงโครงสร้างทุติยภูมิของ active sal K ที่ละลายใน liposome (L) กับ CH_3COONa (C) pH3-6 และ Tris-HCl (T) pH7-9 พบว่ามีโครงสร้าง α -helix ที่ pH4, pH6 และ pH8



ภาพที่ 35 กราฟแสดงโครงสร้างทุติยภูมิของ active alb β ที่ละลายใน liposome (L) กับ CH_3COONa (C) pH3-6 และ Tris-HCl (T) pH7-9 พบว่ามีโครงสร้าง β -sheet ที่ pH3, pH4 และ pH8



ภาพที่ 36 กราฟแสดงโครงสร้างทุติยภูมิของ active sal K ที่ละลายใน DPC (D) กับ CH_3COONa (C) pH3-6 และ Tris-HCl (T) pH7-9 พบว่ามีโครงสร้าง β -sheet ที่ pH5 และ pH9



ภาพที่ 37 กราฟแสดงโครงสร้างทุติยภูมิของ active alb β ที่ละลายใน DPC (D) กับ CH_3COONa (C) pH3-9 พบว่ามีโครงสร้าง β -sheet ที่ pH5, pH6, pH7, pH8 และ pH9

8. คำนวณหาเปอร์เซ็นต์โครงสร้างทุติยภูมิของเปปไทด์สังเคราะห์ active sal K และ active alb β ที่ละลายในสารละลายต่างๆ โดยใช้โปรแกรม SELCON Version 3 (Sreerama *et al*, 1999)

จากการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์โครงสร้างทุติยภูมิ ซึ่งประกอบด้วย α -helix, β -sheet, turn และ unordered โดยใช้โปรแกรม SELCON Version 3 ซึ่งเป็นโปรแกรมที่ใช้คำนวณจากค่า CD spectra ของโปรตีน เพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน

จากการคำนวณโครงสร้างทุติยภูมิของเปปไทด์สังเคราะห์ active sal K ที่ละลายใน 10% SDS (S) กับบัฟเฟอร์ CH_3COONa (C) pH 3-9 พบว่าที่ pH 7, pH 8 และ pH 9 สามารถเกิดโครงสร้างในรูปแบบของ α -helix นอกจากนี้ยังพบว่าที่ pH 8 สามารถเกิดโครงสร้างในรูปแบบของ β -sheet ส่วนเปปไทด์สังเคราะห์ active alb β ที่ละลายใน 10% SDS (S) กับบัฟเฟอร์ CH_3COONa (C) pH 3-9 พบว่าสามารถเกิดโครงสร้างในรูปแบบของ α -helix ที่ pH 3, pH 4, pH5, pH6, pH7, pH8 และ pH 9 เปปไทด์สังเคราะห์ active sal K ที่ละลายใน Liposone (L) กับบัฟเฟอร์ CH_3COONa (C) pH 3-9 พบว่าพบว่าจะสามารถเกิดโครงสร้างในรูปแบบของ α -helix ที่ pH4, pH6 และ pH8 ส่วนเปปไทด์สังเคราะห์ active alb β ที่ละลายใน Liposone (L) กับบัฟเฟอร์ CH_3COONa (C) pH 3-9 พบว่ามีโครงสร้าง β -sheet ที่ pH3, pH4 และ pH8 เปปไทด์สังเคราะห์ active sal K ที่ละลายใน DPC (D) กับบัฟเฟอร์ CH_3COONa (C) pH 3-9 พบว่ามีโครงสร้าง β -sheet ที่ pH5 และ pH9 ส่วนเปปไทด์สังเคราะห์ active alb β ที่ละลายใน DPC (D) กับบัฟเฟอร์ CH_3COONa (C) pH 3-9 พบว่ามีโครงสร้าง β -sheet ที่ pH5, pH6, pH7, pH8 และ pH9 ตามลำดับ ซึ่งจะพบว่าเมื่อเปปไทด์อยู่ในสารละลายที่มีสภาวะคล้ายเมมเบรนสามารถเกิดโครงสร้างได้ในรูปแบบของ α -helix และ β -sheet โดยสามารถคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของโครงสร้างทุติยภูมิได้ ดังแสดงในตารางที่ 5 โดยสามารถหาเปอร์เซ็นต์ของ α -helix, β -sheet, Turn และ Unordered ได้จากโปรแกรม SELCON Version3ดังนี้

Structures: Helix1, Helix2, Strand1, Strand2, Turns and Unordered

Total Helix contet = Helix1 + Helix2

Total Sheet contet = Strand1 + Strand2

Trn = Turn

Unrd = Unordered

ตารางที่ 5 การคำนวณเปอร์เซ็นต์โครงสร้างทุติยภูมิจากค่า CD spectra ด้วยโปรแกรม SELCON Version 3

เปปไทด์ สังเคราะห์	ละลายใน สารละลาย บัฟเฟอร์ต่างๆ	เปอร์เซ็นต์โครงสร้างทุติยภูมิ				เกิดโครงสร้าง ทุติยภูมิในรูปแบบ
		α -helix	β -sheet	Turn	Unordered	
Active sal K	SC pH 7	31.4	18.6	20.8	29.5	α -helix
	SC pH 8	5.9	44	15.9	32.2	β -sheet
	SC pH 9	35.6	16.4	25.3	23.3	α -helix
	LC pH 4	46	24.9	18	11.5	α -helix
	LC pH 6	46.1	22.4	20.4	11.5	α -helix
	LC pH 8	44	24.7	18.3	13.5	α -helix
	DPC pH 5	2	42.9	21.7	32.5	β -sheet
	DPC pH 9	17.6	46.9	2.4	31.1	β -sheet
Active alb β	SC pH 3	58.4	24.1	12.4	21.4	α -helix
	SC pH 4	63.5	3.6	9.2	27	α -helix
	SC pH 5	66.9	3	14.6	18.5	α -helix
	SC pH 6	60.8	3.2	13.5	23.9	α -helix
	SC pH 7	38.3	18.3	20.7	23.9	α -helix
	SC pH 8	43	14.8	18.1	24.4	α -helix
	SC pH 9	44.6	15.1	15	26	α -helix
	LC pH 3	6.9	35.3	23	34.8	β -sheet
	LC pH 4	18.2	42.3	22.2	19.7	β -sheet
	LC pH 8	3.7	47.1	16	21.5	β -sheet
	DPC pH 5	6.4	50.3	18	24.3	β -sheet
	DPC pH 6	1.5	36.3	26.6	36.5	β -sheet
	DPC pH 7	20.1	29.1	22.1	28.7	β -sheet
	DPC pH 8	11.2	31	26.2	30.3	β -sheet
	DPC pH 9	0.08	34.7	24.8	32.2	β -sheet

9. การทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน (Protein prediction)

จากการทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน active sal K และ active alb β ในโปรแกรม predict protein (www.predictprotein.org) ซึ่งเป็นการศึกษาคุณสมบัติของ amino acid side chain จะดูการทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน รวมถึงร้อยละของโครงสร้าง helix, strand และ loop ทำนายตำแหน่งที่เกิด disulfide bonds และ โครงสร้างที่อยู่ใน micelle อาจเป็น transmembrane

Input

แบคทีเรียโอซิน active sal K

>query

KRYPNCTGKF LGGLAKGAAL GAISGGVPG AVIGGNIGMV AGAISCL

แบคทีเรียโอซิน active alb β

>query

KNGYGGSGIR WVHCGAGIVS GALMGSIGGN AWGAVAGGIS GGIKSCR

การทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน active sal K

PROFsec summary

Protein can be classified as **mixed** given the following classes:

all-alpha': %H > 45% AND %E < 5%

all-beta': %H < 5% AND %E > 45%

alpha-beta': %H > 30% AND %E > 20%

mixed': all others

Predicted secondary structure composition

sec str type	H	E	L
% in protein	25.53	19.15	55.32

การทำนายองค์ประกอบของโครงสร้างทุติยภูมิของเปปไทด์ active sal K มีโครงสร้างของ helix 25.53 เปอร์เซ็นต์ strand 19.15 เปอร์เซ็นต์ และ loop 55.32 เปอร์เซ็นต์

Predicted solvent accessibility composition (core/surface ratio) for your protein:

e: residues exposed with more than 16% of their surface

b: all other residues.

accessib type	b	e
% in protein	36.17	63.83

Prediction (brief) (Show Landscape View)

```

.....1.....2.....3.....4.....
AA      KRYPNCTGKFLGGLAKGAALGAISGGGVPGAVIGGNIGMVAGAISCL
OBS_sec
PROF_sec      HHHHHHHHHHHH      EEE      EEEEE
Rel_sec      97755452036667643430110157743205614300010000128
SUB_sec      LLLLL.L...HHHHH.....LLL....EE.....L

O_3_acc      bbbbbbbbbbbbbbbbbbbbbbbbbbbbbbbbbbbbbbbbbbb
P_3_acc      ee ee e eb ee eeeee ebeeee ebbbbe e bbbbbbbe e
Rel_acc      92202201301320241221210043111242100210123030214
SUB_acc      e.....e.....e.....b.....e

```

จากการทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของ active sal K พบว่ามีโครงสร้างของ helix ที่ amino acid ลำดับที่ 9-20 คือ KFLGGLAKGAAL และมีโครงสร้างของ strand ที่ amino acid ลำดับที่ 32-34 คือ VIG และ ลำดับที่ 40-45 คือ VAG AIS ตามลำดับ

Transmembrane

PHD results (brief) (Show Landscape View)

```

.....1.....2.....3.....4.....5
AA      KRYPNCTGKFLGGLAKGAALGAISGGGVPGAVIGGNIGMVAGAISCL
PHD_hm      MMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMM
Rel_hm      *****
PiMohtm      iiiiTiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTooooo

```

PHD results (normal) (Show Landscape View)

```

.....1.....2.....3.....4.....5
AA      KRYPNCTGKFLGGLAKGAALGAISGGGVPGAVIGGNIGMVAGAISCL
PHD_hm      MMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMM
Rel_hm      9999999999986556403456677777788888888888776531
SUB_hm      NNNNNNNNNNN.....MMMMMMMMMMMMMMMMMMMM.....

PHDrhtm      MMMMMMMMMMMMMMMMMM
PiMohtm      iiiiTiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTooooo

```

Coiled Coils

>query

```

seq      K R Y P N C T G K F L G G L A K G A A L G A I S G G G V P G A V I G G N I G M V A G A I S C L
frame-14 a b a b c d e f g a a b c d e f g a b c d e f g g e f g g a b c a b c d e f g a b c d e f g g
frame-21 a b a b c d e f g a b c d e f g a b c d e f g c d e f g b c d e f g f g a b c d e f g f g g g
frame-28 a b c d e f g a b c d e f g a a b c d e f g a b c d e f g a b c d e f g a b c d e f g e f g g
prob-14  -----
prob-21  -----
prob-28  -----
// End

```

การทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของ active alb β

PROFsec summary

Protein can be classified as **mixed** given the following classes:

all-alpha': %H > 45% AND %E < 5%

all-beta': %H < 5% AND %E > 45%

alpha-beta': %H > 30% AND %E > 20%

mixed': all others

Predicted secondary structure composition

sec str type	H	E	L
% in protein	17.02	34.04	48.94

การทำนายองค์ประกอบของโครงสร้างทุติยภูมิของเปปไทด์ active alb β มีโครงสร้างของ helix 17.02 เปอร์เซ็นต์ strand 34.04 เปอร์เซ็นต์ และ loop 48.94 เปอร์เซ็นต์

Predicted solvent accessibility composition (core/surface ratio) for your protein:

e: residues exposed with more than 16% of their surface

b: all other residues.

accessib type	b	e
% in protein	42.55	57.45

ผลการทำนายตำแหน่งที่เกิด disulfide bonds ของเปปไทด์ active sal K

	+	-----	+
	10.....20.....30.....40.....		
AA	K R Y P N C T G K F L G G L A K G A A L G A I S G G G V P G A V I G G N I G M V A G A I S C L		
DB_state	1		1
DB_conf	4		4

DB_bond bond(6, 46)

Conn_conf 1

พบว่าตำแหน่งของพันธะไดซัลไฟด์ของโปรตีน active sal K เกิดจาก cysteine ที่ตำแหน่ง 6 และ 46

ผลการทำนายตำแหน่งที่เกิด disulfide bonds ของ เปปไทด์ active alb β

	+	-----	+
	10.....20.....30.....40.....		
AA	K N G Y G G S G I R W V H C G A G I V S G A L M G S I G G N A W G A V A G G I S G G I K S C R		
DB_state	1		1
DB_conf	5		5

DB_bond bond(14, 46)

Conn_conf 1

พบว่าตำแหน่งของพันธะไดซัลไฟด์ของโปรตีน active alb β เกิดจาก cysteine ที่ตำแหน่ง 14 และ 46

พันธะไดซัลไฟด์ เกิดจากการจับตัวกันของ cysteine 2 residues โดยทั่วไปจะทนต่อสภาวะต่างๆที่ใช้ในการทำลายสภาพธรรมชาติของโปรตีน

การ form ตัวของพันธะไดซัลไฟด์ระหว่าง cysteine มีบทบาทสำคัญในการม้วนตัว โครงสร้างหน้าที่ และวิวัฒนาการ รวมถึงมีความสำคัญกับการช่วยแก้ปัญหาการม้วนตัวของโปรตีน ถ้าในกรณีที่เมื่อ 2 cysteine มีการเชื่อมกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ระหว่าง 2 โปรตีน ส่งผลทำให้มีความซับซ้อนทางด้านโครงสร้าง และหน้าที่ สำหรับปัญหาของการทำนายการม้วนตัวของโปรตีน หรือการระบุตำแหน่งของการเกิดพันธะไดซัลไฟด์ มีผลทำให้การหาโครงสร้างที่เสถียรได้รวดเร็ว ขึ้น และมีการเสนอวิธีการคำนวณ เพื่อทำนายสภาวะการเกิดพันธะไดซัลไฟด์จากข้อมูลสายลำดับ โปรตีน โครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน และความสามารถในการเข้าถึงแบบสัมพัทธ์ของสารละลาย

ส่วน Transmembrane protein (TP) หน้าที่ส่วนใหญ่ คือ gateway เพื่อส่งผ่าน specific substance เพื่อรับเข้าไปในเซลล์หรือออกนอกเซลล์ ซึ่ง Transmembrane มี 2 ชนิด คือ

1. Alpha-helical มีอยู่ใน inner membrane ของแบคทีเรีย หรือ plasma membrane ของ Eukaryote

2. Beta-barrel โปรตีนเหล่านี้จะพบใน outer membrane ของแบคทีเรียแกรมลบเท่านั้น ในผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก และ outer membrane ของไมโทคอนเดรีย และคลอโรพลาสต์ ซึ่งจะมีผลกระทบมาจาก evolutionary origin และ similar folding mechanism

วิจารณ์

1. การโคลนยีนของแบคทีเรียโอซิน

การใช้ pTYB1 เป็น expression vector ซึ่งมี intein เชื่อมต่ออยู่บริเวณปลายหมู่คาร์บอกซิลของโปรตีน เมื่อทำการตรวจสอบโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนขนาดประมาณ 55 กิโลดาลตัน และมีการตกตะกอนของโปรตีนเกิดขึ้น เนื่องจากโปรตีนมีการม้วนพับที่ไม่ถูกต้อง จึงทำการคืนสภาพโปรตีน เพื่อให้โปรตีนสามารถอยู่ในสภาพที่ละลาย และนำไปทดสอบต่อไป

2. การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน

จากการศึกษาการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดยการชักนำการแสดงออกด้วย IPTG พบว่ามีการแสดงออกในปริมาณมาก และอยู่ในรูปของ inclusion body จึงต้องทำการละลายตะกอนโปรตีนออกมาให้อยู่ในรูปของ supernatant โดยใช้ 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl pH 8.8 ค่าความเป็นกรด-ด่างก็มีผลต่อการสังเคราะห์โปรตีน ซึ่ง Xu *et al.* (2000) รายงานว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารที่ใช้เลี้ยง *E. coli* ที่ pH 6-8 เป็นสภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของ *E. coli* จึงทำให้มีการสังเคราะห์โปรตีนในปริมาณที่มากที่สุด นอกจากนี้ยังกล่าวอีกว่า การสังเคราะห์โปรตีนให้มีปริมาณมากขึ้นขึ้นอยู่กับโปรตีนแต่ละชนิด และชนิดของ fusion protein ด้วย

จากรายงานของ Yang *et al.* (2007) ซึ่งศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม เพื่อให้มีการแสดงออกของยีน SOD และมีการผลิตโปรตีนในปริมาณมาก โดยทำการศึกษาอุณหภูมิที่ 30, 34, 37 และ 39 องศาเซลเซียส จากการศึกษาพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสังเคราะห์โปรตีนในปริมาณมากนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของ fusion protein โครงสร้าง ขนาดของโปรตีนแต่ละชนิด และอาจส่งผลต่อการม้วนพับ (folding) ของโปรตีน (Qu and Zheng, 2000)

และจากผลการศึกษาของ Kililian *et al.* (2000) ซึ่งรายงานว่า การใช้แลคโตสเป็นตัวกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์โปรตีนนั้น แลคโตสเป็นตัวกระตุ้นที่ไม่ทำให้เกิดความเสียหายไม่เป็นพิษกับเซลล์ และไม่ทำลายเซลล์ เมื่อเทียบกับ IPTG ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน นอกจากนี้โปรตีนที่ได้จากการกระตุ้นด้วยแลคโตสยังมีการแสดงออกที่ถูกต้องภายในสภาวะที่เหมาะสม Kim *et al.* (2007) รายงานว่า การใช้แลคโตสเป็นตัวกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์โปรตีน มี

ประสิทธิภาพเทียบเท่ากับ IPTG ซึ่งการใช้แลคโตสเป็นการลดต้นทุนในกระบวนการผลิตเหมาะสำหรับการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมขนาดใหญ่

3. การแยกและทำโปรตีน bacteriocins fused intein ให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบจำเพาะ (Affinity chromatography)

รีคอมบิแนนท์โปรตีน intein active sal K ที่ได้ยังติดอยู่กับ intein-CBD ทางด้านปลาย C (C-terminal) ของโปรตีน active sal K จึงทำการตัดเพื่อแยก intein-CBD กับ active sal K ด้วย self cleavage buffer ที่มี DTT ความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ 30, 40 และ 50 มิลลิโมลาร์ ซึ่งพบว่าไม่สามารถแยก intein active sal K ให้ออกจากกันได้ ในขณะที่ Chong *et al.* (1998) รายงานว่ากลไกในการตัด intein-CBD ให้แยกออกจากโปรตีนนั้น ลำดับของกรดอะมิโนตัวแรกจะต้องสอดคล้องกับค่าความเป็นกรด-ด่างของบัฟเฟอร์ อุณหภูมิที่ทำการบ่ม และระยะเวลาที่ทำการบ่มด้วย NEB (2006) รายงานว่ากรดอะมิโนตัวแรกที่เป็น Arg (R) สามารถที่จะตัดเพื่อแยกโปรตีนออกจาก intein-CBD ได้ 75 เปอร์เซ็นต์ ในสถานะของ *In vivo* แต่ในสถานะของ *In vitro* ที่อุณหภูมิ 4 และ 16 องศาเซลเซียส ไม่สามารถแยกโปรตีนออกจาก intein-CBD ได้

4. การตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ

จากการตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ พบว่า active alb β fused intein สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917^T ได้เพียงชนิดเดียว การที่มี intein อยู่ทีบริเวณปลายด้านคาร์บอกซิลอาจมีผลต่อฤทธิ์ของแบคทีริโอซินได้ โดยอาจจะไปรบกวนการทำงานของแบคทีริโอซินทำให้มีฤทธิ์น้อยลง ซึ่งหากมีการกำจัด intein ออกไปได้ อาจทำให้ active alb β มีฤทธิ์มากขึ้นได้ (กรรณิกา, 2552)

การผลิตโปรตีนที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่น เช่น แบคทีริโอซิน หรือเปปไทด์ต้านจุลินทรีย์ชนิดอื่นเป็นเรื่องยาก เพราะสายเปปไทด์มีประจุเป็นบวก และเป็นพิษต่อเซลล์ถูกทำลายได้ง่ายโดยโปรตีนบางชนิด หรืออาจเกิดการตกตะกอนของโปรตีน เนื่องจากมีการม้วนพับ (folding) ที่ไม่ถูกต้อง จึงแก้ปัญหาโดยใช้โปรตีนตัวเชื่อม (fusion protein) ซึ่งจะส่งเสริมให้โปรตีนที่ต้องการม้วนพับถูกต้อง และไม่ถูกทำลายโดยโปรตีนบางชนิด และยังช่วยลดขั้นตอนในการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ด้วย

แบคทีเรียโอซินนอกจากจะมีผลในการฆ่าทำลายเซลล์เป้าหมายแล้ว ยังอาจมีผลในการหยุดการเจริญของเซลล์ได้ด้วย เช่นที่พบใน leuconocin S แบคทีเรียโอซินจะมีผลต่อเซลล์ในลักษณะใดนั้น มักขึ้นอยู่กับความบริสุทธิ์ และความเข้มข้นของแบคทีเรียโอซิน สภาพแวดล้อม ชนิด และปริมาณของเซลล์เป้าหมาย (de Vuyst and Vandamme, 1994)

เปปไทด์ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจะมีโครงสร้างระดับทุติยภูมิหลายแบบ เช่น α -helix, relaxed coil และ β -sheet ทำให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าที่ไม่มีโครงสร้างทุติยภูมิ นอกจากนี้โครงสร้างที่เป็น β -sheet ก็เป็นโมเลกุลที่มีการทำลายเชื้อแบคทีเรียได้ดี

เปปไทด์ที่ทำลายเชื้อแบคทีเรียได้จะมีความหลากหลายทั้งในด้านโครงสร้าง และการทำหน้าที่ในการเข้าทำลายเชื้อแบคทีเรีย โดยทั่วไปพบว่ากลไกการทำลายหรือยับยั้งจะขึ้นอยู่กับรูปร่าง และประจุที่มีอยู่ในโครงสร้างของเปปไทด์นั้น

5. ศึกษาโครงสร้างทุติยภูมิ โดย Circular dichroism (CD)

จากการศึกษาโครงสร้างสองมิติของ active sal K และ active alb β พบว่ามีโครงสร้างเป็น α -helix และ β -sheet ซึ่งการศึกษาโครงสร้างทุติยภูมิโดย circular dichroism ทำให้เข้าใจปฏิสัมพันธ์ของเปปไทด์กับเมมเบรนของแบคทีเรีย ซึ่งเมื่อเปปไทด์จับกับ lipid membrane อาจจะมีการเรียงตัว และมีการผ่านของเปปไทด์เข้าไปในชั้นของ lipid bilayer และสภาพแวดล้อมที่ผิวเมมเบรน แบคทีเรียจะกระตุ้นให้เปปไทด์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างที่ทำให้เกิดการจับ และสอดเปปไทด์เข้าไปในเมมเบรนได้ดีขึ้น ซึ่งการที่ sal K และ alb β สามารถเกิดโครงสร้างทุติยภูมิเป็น α -helix และ β -sheet ได้ในสภาวะที่คล้ายเซลล์เมมเบรน ทำให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าเปปไทด์ที่ไม่มีโครงสร้างทุติยภูมิ Brogden K.A. (2005)

จากการวิเคราะห์โครงสร้างทุติยภูมิโดย Circular dichroism spectroscopy และนำค่า CD spectra มาคำนวณในโปรแกรม SELCON Version 3 พบว่าเปปไทด์สามารถเกิดโครงสร้างทุติยภูมิได้ทั้ง α -helix และ β -sheet เนื่องจากสภาวะที่คล้ายเซลล์เมมเบรนที่ใช้แตกต่างกัน เช่น SDS micelle, liposome และ DPC micelle เป็นต้น และทั้ง active sal K และ active alb β สามารถเกิดโครงสร้างได้ในรูปแบบแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์, ผนังเซลล์ของเซลล์เป้าหมาย และชนิดของแบคทีเรียเป้าหมาย เป็นต้น

SDS เป็น detergent จัดเป็นสารหรือโมเลกุลที่มีทั้งส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) และส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) จึงสามารถละลายได้น้ำ หรือสารที่มีขั้ว ซึ่งเมื่อ SDS ละลายในน้ำ สมบัติของสารละลายจะมีการเปลี่ยนแปลง คือ แรงดึงดูดของน้ำจะมีค่าลดลง และสามารถละลายได้ในสารที่ไม่มีขั้ว ซึ่ง ณ จุดที่ความเข้มข้นของสารละลายที่ทำให้คุณสมบัติมีการเปลี่ยนแปลง เรียกว่า critical micelle concentration (CMC) จะสามารถเกิดโครงสร้างรูปแบบต่างๆ ซึ่งเปปไทด์จะชักนำให้สามารถเกิดโครงสร้างในรูปแบบต่างๆ โดยเปปไทด์จะเป็น amphiphilic ส่วน liposome เป็น lipid bilayer ที่ล้อมรอบสารละลายน้ำอยู่ นอกจากนี้ DPC micelle จะกระตุ้น eukaryotic cell membrane ส่วน SDS mimics จะมีประจุเป็นลบ พบในเมมเบรนของแบคทีเรีย เนื่องจาก anionic exterior และ hydrophobic interior

กลไกการทำงานของ antimicrobial peptides โดยเปปไทด์จะเข้าจับกับผิวเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งขั้นตอนนี้น่าจะเกิดจากแรง electrostatic ระหว่างประจุของเปปไทด์กับผิวเซลล์แบคทีเรีย จากนั้นเปปไทด์จะผ่านเข้าไปหาเมมเบรน เป็นขั้นตอนที่เปปไทด์จะผ่านไลโปโพลีแซคคาไรด์ (LPS) ก่อนถึงเมมเบรนชั้นนอก เมื่อเปปไทด์ผ่านเข้าสู่เมมเบรน เปปไทด์จะทำปฏิกิริยากับ lipid bilayer โครงสร้างระดับทุติยภูมิของเปปไทด์ (แอลฟา-เฮลิกซ์) จะถูกดูดซับและฝังลงใน head group ของไขมันในสภาพที่ไม่ทำงาน แต่จะทำให้เมมเบรนถูกดึงแยกออก และต่อมาเปปไทด์จะสอดเข้าไปในเมมเบรน ซึ่งถ้าความเข้มข้นของเปปไทด์สูงขึ้น เปปไทด์จะสอดเข้าไปในเมมเบรน และเกิดเป็นรูขึ้น กลไกการฆ่าแบคทีเรียอาจจะเกี่ยวข้องสัมพันธ์กับการสร้าง ion channel หรือการสร้างรูที่เมมเบรน (transmembrane pore) หรืออาจเกิดความเสียหายกับเมมเบรน แต่ไม่ได้หมายความว่ากลไกต่างๆ เหล่านี้จะเกี่ยวข้องสัมพันธ์ในทุกเปปไทด์ อาจจะมีแบบจำลองอื่นๆ ที่ทำให้เกิดการเสียหายของเซลล์ ซึ่งเป็นไปได้ว่าอาจจะเกิดการเสียหายกับเซลล์ของแบคทีเรียในส่วนอื่นได้ Brogden K.A. (2005)

จากการรายงานของ Brogden KA. (2005) รายงานว่า ถ้าความเข้มข้นของเปปไทด์สูงจะทำให้เกิดการขัดขวางไบเลเยอร์เหมือนกับการทำงานของดีเทอร์เจนต์ (detergent) และทำให้เกิดไมเซลล์ (micelle) ขึ้น และในจุดที่ความเข้มข้นของเปปไทด์สูง เปปไทด์จะสร้างรูชั่วคราวขึ้นในเมมเบรน ทำให้เปปไทด์เข้าสู่เมมเบรนได้มากขึ้น ซึ่งสุดท้ายจะทำให้เมมเบรนหลุดออกจากกันเกิดเป็นไมเซลล์

จากการศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีนหรือเปปไทด์สายสั้นๆ ทำให้เข้าใจบทบาทและหน้าที่ของโปรตีนนี้ว่ามีขนาด ลำดับกรดอะมิโน การมีประจุ หรือการเปลี่ยนโครงสร้างของเปปไทด์มีผลต่อการทำลายหรือยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

จะเห็นได้ว่าการศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีน หรือเปปไทด์จะสามารถเข้าใจกลไกการทำงาน และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอนาคตได้



สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. จากการแสดงออกของโปรตีน intein fused bacteriocins พบว่า inactive sal K, active sal K, inactive alb β และ active alb β มีขนาดประมาณ 55 กิโลดาลตัน และโปรตีนอยู่ในรูปของ inclusion body
2. จากการแยกและทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบจำเพาะ (Affinity chromatography) โดยใช้ chitin bead เพื่อเป็นตัวจับกับโปรตีน พบว่า DTT ไม่สามารถตัด inactive sal K, active sal K, inactive alb β และ active alb β ออกจาก intein ได้
3. หลังจากไม่สามารถแยกและทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบจำเพาะแล้ว จึงเปลี่ยนมาใช้วิธีใหม่ โดยการตัดโปรตีน intein fused bacteriocins ด้วย DTT ไม่ต้องผ่านคอลัมน์ พบว่าขนาดของแถบโปรตีนที่ได้จากการตรวจสอบด้วย SDS-PAGE มีขนาดลดลง เมื่อเทียบกับ pTYB12 ซึ่งก็แสดงว่าเมื่อใช้ DTT ตัดโปรตีน intein fused bacteriocins โดยตรง จะสามารถตัด inactive sal K, active sal K, inactive alb β และ active alb β ออกจาก intein ได้
4. จากการตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ 14 สายพันธุ์ ด้วยวิธี spot on lawn โดยใช้โปรตีน intein fused bacteriocins พบว่า active alb β สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917^T ได้
5. จากการตรวจสอบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อทดสอบกับเปปไทด์ active sal K และ active alb β (aapptec, USA) โดยวิธี MIC เปปไทด์ active sal K สามารถยับยั้งเชื้อ *Enterococcus faecalis* JCM 5803^T, *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917^T และ *Streptococcus* sp. TISTR 1030 และเปปไทด์ active alb β สามารถยับยั้งเชื้อ *Enterococcus faecalis* JCM 5803^T, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^T, *Lactobacillus sakei* TISTR 890, *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917^T, *Streptococcus* sp. TISTR 1030 และ *Brochotrix campestris* NBRC 11547^T ตามลำดับ
6. จากการตรวจสอบการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงของหนู พบว่าค่า LC₅₀ (ค่าการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ 50 เปอร์เซ็นต์) ของเปปไทด์สังเคราะห์ active sal K และ active alb β

คือ 371.83 และ 366.23 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ที่ระดับความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้เปปไทด์ active sal K สามารถทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกตัวได้สูงสุดคิดเป็น 87.36 เปอร์เซ็นต์ และเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ไม่แตกตัวคิดเป็น 12.64 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเปปไทด์ active alb β สามารถแตกตัวได้สูงสุดคิดเป็น 85.38 เปอร์เซ็นต์ และเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ไม่แตกตัวคิดเป็น 14.62 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

7. จากการศึกษาโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนโดย Circular dichroism (CD) พบว่า active sal K และเปปไทด์ active alb β เป็นเปปไทด์ที่มีประจุบวก มักมีโครงสร้างหรือรูปแบบที่ไม่แน่นอนในสารละลายบัฟเฟอร์ แต่เมื่ออยู่ในสารละลาย SDS micelles, liposome, trifluoroethanol (TFE) ซึ่งมีสภาพคล้ายเมมเบรน สามารถเกิดโครงสร้างทุติยภูมิได้ทั้ง α -helix และ β -sheet จากนั้นนำค่า CD spectra มาคำนวณด้วยโปรแกรม SELCON Version 3 พบว่าทำให้ทราบสัดส่วนของ α -helix, β -sheet, Turn และ Unordered และทำนายโปรตีนจากโปรแกรม predict protein ของ amino acid ทั้งสายแอลฟาและเบต้า ซึ่งพบว่าผลที่ได้สอดคล้องกับผลของการวิเคราะห์ด้วย circular dichroism spectroscopy และจากการที่โปรตีนสามารถเกิดโครงสร้างทุติยภูมิได้ ทำให้มีคุณสมบัติเป็น antimicrobial peptide ได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้การศึกษาโครงสร้างระดับทุติยภูมิของเปปไทด์ ทำให้เข้าใจรายละเอียดปฏิสัมพันธ์ของเปปไทด์กับเมมเบรนของแบคทีเรียได้ดีขึ้น

8. จากการทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนในโปรแกรม predict protein พบว่า active sal K มีโครงสร้างของ helix 25.53 เปอร์เซ็นต์ strand 19.15 เปอร์เซ็นต์ และ loop 55.32 เปอร์เซ็นต์ ส่วน active alb β มีโครงสร้างของ helix 17.02 เปอร์เซ็นต์ strand 34.04 เปอร์เซ็นต์ และ loop 48.94 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ตำแหน่งของพันธะ disulfide bonds ของโปรตีน active sal K เกิดจาก cysteine ที่ตำแหน่ง 6 และ 46 ส่วนโปรตีน active alb β เกิดจาก cysteine ที่ตำแหน่ง 14 และ 46 และโครงสร้างที่อยู่ใน micelle อาจเป็น transmembrane

ข้อเสนอแนะ

1. เนื่องจากเปปไทด์ inactive sal K, active sal K, inactive alb β และ active alb β มีขนาด 5.5 กิโลดาลตัน ซึ่งเล็กมาก ทำให้ไม่สามารถตัดเปปไทด์ออกจาก intein ได้ เพื่อเป็นการแก้ไขปัญหาดังกล่าว จึงควรหาวิธีที่เหมาะสมในการแยก และทำให้โปรตีนบริสุทธิ์
2. การตรวจสอบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อทดสอบกับเปปไทด์ อาจจะต้องใช้ความเข้มข้นของเปปไทด์มากกว่านี้ รวมทั้งปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ในการทดสอบ
3. จากการศึกษาโครงสร้าง และกลไกการทำงานของโปรตีนแบคทีเรียโอซินที่ได้จากเชื้อ *Lb. salivarius* สามารถนำไปใช้ประโยชน์ และประยุกต์ ใช้ในการควบคุมจุลินทรีย์ที่เป็นอันตรายต่อทั้งคน และสัตว์ รวมไปถึงการปรับปรุงโปรตีนชนิดนี้ เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการฆ่าจุลินทรีย์ได้ดียิ่งขึ้นในอนาคต
4. เชื้อ *Lb. salivarius* K4 สามารถใช้เป็น probiotic เพื่ออุตสาหกรรมอาหารในอนาคตได้
5. การนำแบคทีเรียโอซินไปใช้งานนั้น ทำได้ 3 ลักษณะ คือ (1) เติบโตแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินลงไปเป็นเชื้อดัดแปลง หรือเชื้อที่มีส่วนร่วมในกระบวนการหมัก (2) เติบโตแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์ หรือกึ่งบริสุทธิ์ลงไปเป็นสารเติมอาหาร (3) เติบโตผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการหมักของแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างแบคทีเรียโอซินลงไปเป็นส่วนประกอบในกระบวนการผลิตอาหาร (Schillinger *et al.* 1996) ซึ่ง Davidson and Hoover (1993) ได้รวบรวมความเข้มข้นของโนซินที่ใช้สำหรับยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่างๆ

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กรรณิกา ทองขาว. 2552. การโคลนและการแสดงออกของยีน *Salvicin K* และ *antimicrobial like bacteriocin β* ของเชื้อ *Lactobacillus salivarius K4*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ชัยวัฒน์ กิตติกุล. 2547. เอกสารประกอบการสอนวิชาจุลชีววิทยาทั่วไป เรื่องเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ตามปกติในร่างกายคน. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2544. จุลชีววิทยาทั่วไป. ครั้งที่ 3. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์, กรุงเทพฯ.
- ปิยฉัตร มีสวัสดิ์. 2552. การโคลนและการแสดงออกของยีน *salvicin K4* ที่ผลิตโดย *Lactobacillus salivarius K4* ใน *Escherichia coli*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- พงษ์เทพ วิไลพันธ์. 2546. แบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในปลาข้าว. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ภักดี สุขพันธ์. 2548. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกผลิตแบคทีเรียโอซินและเจริญได้ดีในสารโพลิโกลแซคคาไรด์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2533. ชีววิทยาของแบคทีเรีย. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

Alliance Protein Laboratories Inc. 2011. **Circular dichroism**. Available Source: http://ap-lab.com/circular_dichroism.htm, May 5, 2012.

Anonymous. 2006. **IMPACT™-CN Protein purification System Now Featuring Fusion to C or N- Terminus of the Target Protein Version 2.1**. Available Source: <http://www.neb.com/nebecomm/manualFiles/manualE6900.pdf>, September 6, 2011.

- Beutler, B. 2004. Innate immunity: an overview. **Molec. Immunol.** 40: 845–859.
- Breukink, E., I. Weidemann, C. van Kraaij, O. P. Kuipers, H. G. Sahl and B. de Kruijff. 1999. Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. **Sci.** 286: 2361-2364.
- Brogden K.A. 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria. **Nat Reviews Microbiol.** 3: 238-250.
- Cleveland, J, T.J. Montville, I.F. Nes and M.L. Chikindas. 2001. Bacteriocins: Safe. Natural antimicrobials for food preservation. **Int. J. Food microbiol.** 71: 1-20.
- Chong, S., Montello, G.E., Zhang, A., Cantor, E.J., Liao, W., Xu, M.Q. and J. Benner. 1998. Utilizing the C-terminal cleavage activity of a protein splicing element to purify recombinant proteins in a single chromatographic step. **Nucleic Acids Res.** 26 (22): 5109-5115.
- Davidson, P.M. and D.G. Hoover 1993. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. **Lactic Acid Bacteria.** 127-160.
- De Vuyst, L. and E.J. Vandamme. 1994. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. **Bacteriocin of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetic and Application.** 91-142.
- Deegan, L. H., P. D. Cotter , C. Hill, and P. Ross. 2006. Bacteriocins: Biological Tools for Bio-Preservation and Shelf-Life Extension. **Int. Dairy J.** 16: 1058-1071.
- Drider, G. F, Y. Hechard, L.M. McMullen and H. Prevost. 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. **Microbiol. Molec. Biol. Rev.** 70: 564-582.
- Ennahar, S., T. Sashihara, K. Sonomoto and A. Ishizaki. 2000. Class II bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. **FEMS Microbiol. Rev.** 24: 85-106.

- Flynn, S., D.V. Sinderen, , G.M. Thornton, , H. Helo, , I.F. Nes, and J.K. Collons. 2002. Characterization of the genetic locus responsible for the production of ABP118, a novel bacteriocin produced by the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* UCC118. **Microbiol.** 148: 973-984.
- Hancock, R. E. and H. G. Sahl. 2006. Antimicrobial and host-defense peptides as new antiinfective therapeutic strategies. **Nat. Biotechnol.** 24: 1551–1557.
- Kilikian, B.V., Sua'rez, I.D., Liria, C.W. and A.K. Gombert. 2000. Process strategies to improve heterologous protein production in *Escherichia coli* under lactose or IPTG induction. **Process Biochem.** 35: 1019-1025.
- Kim, M., Elvin, C., Brownlee, A. and R. Lyons. 2007. High yield expression of recombinant pro-resilin: Lactose-induce fermentation in *E.coli* and facile purification. **Protein Expression Purification.** 52: 230-236.
- Linde, A., C. R. Ross, E. G. Davis, L. Dib, F. Blecha and T. Melgarejo. 2008. Innate immunity and host defense peptides in veterinary medicine. **J. Vet. Int. Med.** 22: 247–265.
- McCormick J.k., T.R. Klaenhammer and M.E. Stiles. 1999. Colicin can be produced by lactic acid bacteria. **Appl. Microbiol.** 29: 37-41.
- Muriana, P.M. 1996. Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in food. **J. Food Prot.** 59: 54-63.
- NACMCF. 1998. Hazard analysis and critical control point principles and application guidelines. National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. **J. Food Prot.** 61(9): 1246-1259.
- NEB. 2006. **IMPACTTM-CN protein purification system now featuring fusion to C or N-terminus of the target protein version 2.1.** Available Source: <http://www.neb.com/nebecomm/manualE6900.pdf>, September 5, 2011.

- Nes, I.F., D.B. Diep, L.S. Havarstein, M.B. Brurberg, V. Eijsink and H. Holo. 1996. Biosynthesis of Lactic acid bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek** 70: 113-128.
- O'Sullivan, L., R.P. Ross, and C. Hill. 2002. Potential of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria for Improvements in Food Safety and Quality. **Biochimie**. 84(5-6): 593-604.
- Pilasombut, K. 2006. **Purification and amino acid sequence of a bacteriocins produced by *Lactobacillus salivarius* K7 isolated from chicken intestine**. Ph.D. Thesis, Kasetsart University.
- Pilasombut, K., T. Sakpuaram, W. Wajjwalku, S. Nitisinprsert, A. Swetwiwathana, T. Zendo, K. Fujita, J. Nakayama and K. Sonomoto. 2006. Purification and amino acid sequence of a bacteriocins produced by *Lactobacillus salivarius* K7 isolated from chicken intestine. **J. Sci. Technol.** 28:121-132.
- Qu, Z. and Y.S. Zheng. 2000. Cloning, expression and purification of N-terminal of submit PB2 of influenza virus RNA polymerase. **Clin. Microb. Immunol.** 2(1): 21.
- Rogers, L. A. and E. D. Whittier. 1928. Limiting Factors in Lactic Fermentation. **J. Bacteriol.** 16: 211-229.
- Rupp, B. 2010. **Circular Dichroism Spectroscopy**. Available Source: <http://www.ruppweb.org/cd/cdtutorial.htm>, May 5, 2012.
- Sang, Y. and F. Blecha. 2009. Porcine host defense peptides: expanding repertoire and functions. **Dev. Comp. Immunol.** 33:334-343.
- Schillinger, U., Geisen, R. and W.H. Holzapfel. 1996. Potential of antagonistic microorganisms for the biological preservation of foods. **Trends Food Sci. Technol.** 7: 158-164.

- Selsted ME, Novotny MJ, Morris WL, Tang Y-Q, Smith W, Cullor JS (1992) Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. **J Biol Chem.** 267: 4292–4295.
- Sreerama N, Venyaminov, S.Yu. and R.W. Woody. 1999. Estimation of the number of α -helical and β -strand segments in proteins using CD spectroscopy. **Protein Sci.** 8: 370-380.
- Tagg, J. R., A. S. Dajani and L. W. Wannamaker. 1976. Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. **Microbiol. Reviews.** 40: 722-756.
- Ulrike, L., K. Hannu and B. Johanna. 2002. Identification of lactic acid bacteria from spoiled, vacuum-packaged gravad rainbow trout using ribotyping. **Int. J. of Food microbiol.** 72: 147-153.
- Worobo, R.W., M.J. Van Belkum, M. Sailer, K.L. Roy, J.C. Vederas and M.E. Stiles. 1995. A signal peptide secretion dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. **J. Bacteriol.** 177: 3143-3149.
- Xu, Z.N., Gang, L., Cen, P.L. and K.R. Wong. 2000. Factors influencing secretive production of human epidermal growth factor (hEGF) with recombinant *E.coli* K12. **Bioprocess Eng.** 23: 669-674.
- Yang, L., Yang, Q., Liu, P.G., Li., S. and H.L. Li. 2007. Optimization of the *Trichoderma harzianum* CuZn superoxide dismutase gene expression in *E.Coli*. **KMITL. Sci. Tech. J.** 7: 179-184.
- Yeaman, M. R. and N. Y. Yount. 2007. Unifying themes in host defence effector polypeptides. **Nat. Rev. Microbiol.** 5: 727–740.
- Yuan, J., Z. Z. Zhang, X. Z. Chen, W. Yang and L. D. Huan. 2004. Site Directed Mutagenesis of the Hinge Region of Nisin Z and Properties of Nisin Z Mutants. **Appl Microbiol. Biotechnol.** 64: 806-815.



1. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

อาหารสูตร MRS / 1000 ml

MRS	52.5 g
-----	--------

อาหารสูตร MRS agar / 1000 ml

MRS	52.5 g
-----	--------

Agar (1.5%, 2%)	15/20 g
-----------------	---------

อาหารสูตร TSB / 1000 ml

TSB	30 g
-----	------

อาหารสูตร TSB / 1000 ml

TSB	30 g
-----	------

Agar (1.5%, 2%)	15/20 g
-----------------	---------

อาหารสูตร LB broth / 1000 ml

Yeast extract	5 g
---------------	-----

Peptone	10 g
---------	------

NaCl	10 g
------	------

อาหารสูตร LA agar / 1000 ml

Yeast extract	5 g
---------------	-----

Peptone	10 g
---------	------

NaCl	10 g
------	------

Agar (1.5%)	15 g
-------------	------

2. สารเคมีสำหรับตรวจสอบขนาดโปรตีนด้วยวิธี Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

Acrylamide solution

40% w/v Acrylamide monomer solution

5% w/w bis-acrylamide

10% Ammonium persulfate /10 ml

Ammonium persulfate (APS) 1 g

Separating solution 1.5 M Tris pH 8.8 / 100 ml

Tris base 18.165 g

ปรับ pH ด้วย HCl ให้ได้ 8.8

Stacking solution 1.0 M Tris pH 6.8 / 100 ml

Tris base 12.11 g

ปรับ pH ด้วย HCl ให้ได้ 6.8

10% SDS / 100 ml

SDS 10 g

10x Running buffer / 1000 ml

Tris base 30 g

Glycine 144 g

SDS 10 g

Staining solution / 500 ml

Coomassie blue R250 2.5 g

40% methanol 200 ml

10% Acetic acid 50 ml

Staining solution / 1000 ml

40% methanol	400 ml
10% Acetic acid	100 ml

12% Separating gel / 7 ml

H ₂ O	3.01 ml
40% acrylamide	2.1 ml
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	1.75 ml
10% SDS	70 μ l
10% APS	70 μ l
TEMED	28 μ l

5% Stacking gel / 5ml

H ₂ O	3.65 ml
40% acrylamide	0.625 ml
1.0 M Tris-HCl pH 6.8	0.625 ml
10% SDS	50 μ l
10% APS	50 μ l
TEMED	5 μ l

4x Protein loading dye / 10 ml

1M Tris-HCl pH 6.8	2.4 ml
SDS	0.8 g
100% glycerol	4 ml
0.5 M EDTA	80 μ l
H ₂ O	2.8 ml
0.01% Bromophenol blue	
100 mM DTT	

3. สารเคมีสำหรับการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์

Column buffer / 500 ml

20 mM Tris-Cl pH 8.8	6.67 ml
500 mM NaCl	125 ml
1 mM EDTA	1 ml

Stripping buffer

0.3 M NaOH

DTT (Dithiothreitol) / 1 ml

2M DTT	0.31 g
--------	--------

Cleavage buffer / 3 ml

Column buffer	2.925 ml
DTT (Dithiothreitol)	0.075 ml

4. บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทำ Hemolysis

2% v/v Rat red blood cell (RRBCs)	10 ml
-----------------------------------	-------

1X phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.44 g
KH ₂ PO ₄	0.24 g

Triton X-100

0.1% Triton X-100	1 ml
-------------------	------

5. สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาโครงสร้างสองมิติ (CD)

Sodium dodecyl sulphate (SDS)

ซั้ง 10% SDS 0.2 g

20 mM Sodium acetate (CH_3COONa) pH 3-6 20 ml

20 mM Tris-HCl pH 7-9 20 ml

Trifluoroethanol (TFE) (10%-50%) อย่างละ 1 ml

2 mM Dodecylphosphocholine (DPC) micelle 1 ml

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ นางสาวปภัศรา แสงธนู
 เกิดวันที่ 26 เมษายน 2527
 สถานที่เกิด กรุงเทพมหานคร
 ประวัติการศึกษา วท.บ. (วิทยาศาสตร์ชีวภาพ) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
 ตำแหน่งปัจจุบัน -
 สถานที่ทำงานปัจจุบัน -
 ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ

Papassara Sangtanoo, Kiattawee Choowongkamon and Anchane Kubera. Cloning expression and purification of abp118 α -abp118 β like bacteriocin determining activity of bacteriocin in *Lactobacillus salivarius*. Poster presentation. 6th Symposium of Protein Society of Thailand. August 30 – September 2, 2011 at Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok Thailand.

Papassara Sangtanoo, Kiattawee Choowongkamon, Wunrada Surat, Sunee Nitisinprasert and Anchane kubera. Cloning, expression and purification of bacteriocins from *Lactobacillus salivarius*. 37th Congress on Science and Technology Thailand (STT 37). October 10-12, 2011. Centara Grand and Bangkok Conventiom Centre Central World, Bangkok, Thailand.

Papassara Sangtanoo, Kiattawee Choowongkamon, Wunrada Surat, Sunee Nitisinprasert and Anchane kubera. Structure and function relationship of bacteriocins of *Lactobacillus salivarius*. Proceeding. 7th Symposium of Protein Society of Thailand. August 29 – 31, 2011 at Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok Thailand.

ทุนการศึกษาที่ได้รับ ได้รับทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์จากมูลนิธิศาสตราจารย์ดร.แถบ นีละนิธิ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ. 2553