

บทคัดย่อ

Bacteriocin คือโปรตีนหรือเปปไทด์ขนาดเล็กที่ผลิตโดยแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ จัดเป็นสาร bioactive compound ที่มีฤทธิ์ในการทำลายแบคทีเรียในกลุ่มที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกัน ซึ่ง bacteriocin ที่ผลิตจากแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีน้ำหนักโมเลกุล คุณสมบัติด้านชีวเคมี การออกฤทธิ์ และกลไกในการยับยั้งที่ต่างกัน งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการทำให้บริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติบางประการจากเชื้อ *Bacillus* spp. โดยทำการเพาะเลี้ยง *Bacillus* spp. 2 ไอโซเลต ได้แก่ BA 145 และ BA 213 ในอาหารเหลว LB และเมื่อนำส่วนใสที่ไม่มีเซลล์ (cell-free supernatant) มาทดสอบกับแบคทีเรียก่อโรค คือ *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus aureus* 1-2261 ด้วยวิธี agar well diffusion พบว่า BA 145 และ BA 213 มีสามารถยับยั้งเชื้อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทดสอบ ซึ่งกิจกรรมการยับยั้งไม่แตกต่างกันที่เวลา 24, 36 และ 48 ชั่วโมง จากการนำส่วนใสของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงที่ 24 ชั่วโมง ตกตะกอนโปรตีนด้วย 40 % ammonium sulphate (40% ASB) นำไปปั่นเหวี่ยง 18000 rpm 15 นาที แล้วละลายโปรตีนด้วยน้ำกลั่น ปลอดเชื้อ dialysis และนำไปทดสอบด้วยปัจจัยต่างๆ พบว่า โปรตีนจาก BA 145 มีกิจกรรมในการยับยั้ง *B. cereus* เมื่อทดสอบด้วยอุณหภูมิ 60, 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และ pH 4, 10 บ่มที่ 37 °C เวลา 20 นาที และ 1 mg/ml trypsin, pepsin บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เวลา 2 ชั่วโมง ในขณะที่โปรตีนที่ทดสอบด้วย 60, 100 องศาเซลเซียส, pH 4, pH 10 ไม่เกิด inhibition zone กับเชื้อ *S. aureus* และสำหรับ BA 213 มีความเสถียรต่อทุกปัจจัยที่กล่าวมา โดยยังคงพบว่ามีกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบในระดับหนึ่ง จากการแยกโปรตีนตามความแตกต่างของขนาดโมเลกุลด้วยกระแสไฟฟ้าด้วยวิธี SDS-PAGE พบแถบโปรตีนของ BA 145 และ BA 213 มีขนาดโมเลกุล ประมาณ 14 kDa และ 12 kDa ตามลำดับ และมี inhibition zone ที่แถบโปรตีนขนาด 12-14 kDa เมื่อทดสอบกับ *B. cereus* และ *S. aureus* สำหรับตัวอย่างโปรตีนจาก BA 213 นั้น เมื่อนำไปทดสอบด้วยวิธี Native-PAGE และเทราดด้วยแบคทีเรียทดสอบ (overlay method) จะพบ inhibition zone เมื่อทดสอบด้วยเชื้อ *B. cereus* ที่ช่วงโมเลกุลประมาณ 25-70 kDa สำหรับ BA 145 อยู่ในช่วงประมาณ 25-40 kDa แสดงว่าสารแบคทีเรียโอซิน ที่ผลิตจาก BA 145 และ BA 213 มีขนาดโมเลกุลค่อนข้างเล็ก และมีคุณสมบัติทนทานต่อความร้อน pH และ สาร SDS detergent ที่แตกต่างกัน

คำสำคัญ: Bacteriocin, *Bacillus* spp., Bioactive compound, SDS-PAGE

Abstract

Bacteriocins are small proteins or peptides with an antibacterial activity against bacteria closely related to the producer. Bacteriocins are different in molecular mass, biochemical, antagonistic spectrum. The objective of this study was to purify and characterize the properties of bacteriocin produced by *Bacillus* spp., BA 145 and BA 213. After incubation for 24 hrs, the antibacterial activities of cell-free supernatants were tested with *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus aureus* 1-2261 using agar well diffusion method. Ammonium sulphate (AS) was added to the cell-free supernatants while stirring to reach 40 % saturation. Each resulting suspension was subjected to centrifugation at 18,000 rpm for 15 min. The supernatant was discarded and the pellet was dissolved in 1 ml of sterile water and put into the dialysis tubing. The 40% AS bacteriocin (ASB) of BA 145 was treated as follows; heating at 60 and 100 °C for 15 min, adjusting to pH 4 and pH 10 (37 °C, 20 min) and incubating for 2 hrs in the presence of 1 mg/ml trypsin and pepsin. All the above treatments showed activity against *B. cereus*. However, when treated by 60, 100 °C and pH 4, 10, it showed no activity against *S. aureus*. Interestingly, the 40% ASB of BA 213 was quite stable in all treatments and remained some antibacterial activity against both *B. cereus* and *S. aureus*. According to SDS-PAGE, 40% ASB of BA 145 and BA 213 showed the molecular weight at about 12 kDa and 14 kDa, respectively and after tested by overlay method with *B. cereus* and *S. aureus* cultures the inhibition zones were detected at 12-14 kDa. When the 40% ASB of BA 145 and BA 213 were run on the native-PAGE and overlaid with the antibacterial activity was observed at molecular weights between 25-40 kDa and 25-70 kDa, respectively. These results suggest that BA 145 and BA 213 produced the bacteriocins differed in stability properties against heat, some proteolytic enzymes and SDS detergent.

Key words: Bacteriocin, *Bacillus* spp., SDS-PAGE, Native-PAGE