รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารแบคเทอริโอซิน และการประยุกต์ใช้ในการถนอมอาหาร

Bioactive activity of bacteriocin and its application as safe and natural food biopreservative

โดย

ผศ.ดร. วิไลลักษณ์ ศิริพรอดุลศิลป์

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย ประเภททุนอุดหนุนทั่วไป

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ประจำปีงบประมาณ 2554

บทคัดย่อ

Bacteriocin คือโปรตีนหรือเปปไทด์ขนาดเล็กที่ผลิตโดยแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ จัดเป็นสาร bioactive compound ที่มักมีฤทธิ์ในการทำลายแบคทีเรียในกลุ่มที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกัน 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 แล้วละลายโปรตีนด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ dialysis และนำไปทดสอบด้วยปัจจัยต่างๆ พบว่า โปรตีนจาก BA 145 มีกิจกรรมในการยับยั้ง *B. cereus* เมื่อทดสอบด้วยอุณหภูมิ 60, 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และ pH 4, 10 บ่มที่ 37 ^{o}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 จากการแยกโปรตีนตามความแตกต่างของขนาดมวลโมเลกุลด้วยกระแสไฟฟ้าด้วยวิธี 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* ที่ช่วงมวลโมเลกุลประมาณ 25-70 kDa สำหรับ BA 145 อยู่ในช่วงประมาณ 25-40 kDa แสดงว่าสารแบคเทอริโอซิน 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 ^{o}C for 15 min, adjusting to pH 4 and pH 10 (37 ^{o}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 ^{o}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

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยเรื่อง “ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารแบคเทอริโอซินและการประยุกต์ใช้ในการถนอมอาหาร” เสร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความอนุเคราะห์เงินทุนวิจัยจากสำนักงานโครงการพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาสยามบรมราชกุมารีฯ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอขอบคุณ นางสาวนลิษา คชมิตร นักศึกษาภาควิชาจุลชีววิทยา สำหรับการทดลองที่ดำเนินการทั้งหมด ณ ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

วิไลลักษณ์ ศิริพรอดุลศิลป์
14 พฤศจิกายน 2555

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ ก
Abstract ข
กิตติกรรมประกาศ ค
สารบัญ ง
สารบัญตาราง ฉ
สารบัญภาพ ช
บทที่ 1 บทนำ 1
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 แบคทีเรีย *Bacillus* spp. 3
2.2 แบคเทอริโอซิน (Bacteriocin) 3
2.3 คุณสมบัติที่จัดว่าเป็นแบคเทอริโอซิน 4
2.4 การจัดจำแนกแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติก 6
2.5 แบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างแบคเทอริโอซิน 8
2.6 การประยุกต์ใช้สารแบคเทอริโอซินในการถนอมอาหาร 11
2.7 การประยุกต์ใช้สารแบคเทอริโอซินในบรรจุภัณฑ์อาหาร 11
2.8 การประยุกต์ใช้แบคทีเรียที่ผลิตสารแบคเทอริโอซินเป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ (probiotics) 11
บทที่ 3 อุปกรณ์ สารเคมี และอาหารเลี้ยงเชื้อ 14
บทที่ 4 วิธีการดำเนินการวิจัย 16
4.1 ศึกษาสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติบางประการของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* spp. 16
4.2 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมกับการเจริญ และการผลิตสารแบคเทอริโอซินของ *Bacillus* spp. ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์แกรมบวกและแกรมลบ 16
4.3 การทำให้ bacteriocin ที่ได้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น 17
4.4 ทดสอบผลของอุณหภูมิ, pH และเอนไซม์ที่มีต่อ bacteriocin 17
4.5 SDS-PAGE 17
4.6 Native-PAGE 17
บทที่ 5 ผลการวิจัย 19
5.1 ผลการบ่งชี้เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย 19
5.2 ผลการศึกษาคุณสมบัติของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ 20
5.3 เวลาที่เหมาะสมเพื่อคัดเลือก *Bacillus* spp. ที่มีความสามารถในการผลิตสารแบคเทอริโอซิน 23
5.4 การทำให้ แบคเทอริโอซิน ที่ได้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น 23
5.5 ผลของอุณหภูมิ, pH และเอนไซม์ที่มีต่อ แบคเทอริโอซิน 24
5.6. SDS-PAGE 28
5.7 Native-PAGE 28

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 6 สรุป และวิจารณ์ผลการวิจัย 30
เอกสารอ้างอิง 32
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ 35
ภาคผนวก ข สารเคมี 36
ภาคผนวก ค Protein marker 38

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการทำงานของสารแบคเทอริโอซินในการถนอมอาหาร 14
ตารางที่ 2 ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *B. cereus*, *E. coli*, *S. aureus* และ *S. aureus* 1-2261 ของสารแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Bacillus* spp. BA 145 และ BA 213 23
ตารางที่ 3 ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *B. cereus*, *E. coli*, *S. aureus* และ *S. aureus* 1-2261 ของ BA 145 และ BA 213 ที่ตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือที่มีความเข้มข้น 30%, 40%, 50% ammonium sulphate เมื่อเทียบกับส่วนใสที่ไม่ได้ตกตะกอน (control) 24
ตารางที่ 4 ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* และ *S. aureus* ของ BA 145 เมื่อทดสอบด้วยปัจจัยต่างๆ เทียบกับส่วนใสที่ตกตะกอนโปรตีนด้วย 40% ammonium sulphate ที่ไม่ได้ทดสอบด้วยปัจจัยดังกล่าว (control) 27
ตารางที่ 5 ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* และ *S. aureus* ของ BA 213 เมื่อทดสอบด้วยปัจจัยต่างๆ เทียบกับส่วนใสที่ตกตะกอนโปรตีนด้วย 40% ammonium sulphate ที่ไม่ได้ทดสอบด้วยปัจจัยดังกล่าว (control) 27

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1 (ก) ลักษณะการติดสีแกรมของ BA 213 (ข) ผลการทดสอบทางชีวเคมี API 50 CHB ของ BA 213 (ค) ผลการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ของ *Bacillus* spp. 19

รูปที่ 2 ลักษณะการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (cassava starch) และแป้งข้าวเจ้า (rice starch) ของ *Bacillus* spp. BA 145 และ BA 213 20

รูปที่ 3 ฤทธิ์ของสารแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Bacillus* spp. BA 145 และ BA 213 ที่มีต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *B. cereus E. coli S. aureus* และ *S. aureus* 1-2261 หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง 21

รูปที่ 4 ฤทธิ์ของสารแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Bacillus* spp. BA 145 และ BA 213 ที่มีต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *B. cereus E. coli S. aureus* และ *S. aureus* 1-2261 หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง 22

รูปที่ 5 ลักษณะ inhibition zone ของ BA 145 และ BA 213 ในการยับยั้ง *B. cereus* เมื่อทดสอบด้วยปัจจัยต่างๆ เทียบกับส่วนใสที่ตกตะกอนโปรตีนด้วย 40% ammonium sulphate ที่ไม่ได้ทดสอบด้วยปัจจัยดังกล่าว (control) 25

รูปที่ 6 ลักษณะ inhibition zone ของ BA 145 และ BA 213 ในการยับยั้ง *S. aureus* เมื่อทดสอบด้วยปัจจัยต่างๆ เทียบกับส่วนใสที่ตกตะกอนโปรตีนด้วย 40% ammonium sulphate ที่ไม่ได้ทดสอบด้วยปัจจัยดังกล่าว (control) 26

รูปที่ 7 การวิเคราะห์ขนาดของโปรตีนที่ตกตะกอนโปรตีนด้วย 40% ammonium sulphate ด้วยวิธี SDS-PAGE M: Protein Marker #SM 0671 28

รูปที่ 8 การวิเคราะห์ขนาดโปรตีนที่ตกตะกอนโปรตีนด้วย 40% ammonium sulphate ด้วยวิธี Native-PAGE 1: 40% AS bacteriocin ของ BA 213, 2: 40% AS bacteriocin ของ BA 145 และ M: Protein Marker #SM 0671 และ inhibition zone ที่เกิดจากการ overlay ด้วย *B. cereus* และ *S. aureus* 29

รูปที่ 9 การวิเคราะห์ขนาดของโปรตีนที่ตกตะกอนโปรตีนด้วย 40% ammonium sulphate ด้วยวิธี Native-PAGE 1: 40% AS bacteriocin ของ BA 213, 2: 40% AS bacteriocin ของ BA 145, M: Protein Marker #SM 0671 และ inhibition zone ที่เกิดจากการ overlay ด้วย *B. cereus* และ *S. aureus* 29