รายงานผลงานวิจัย

เรื่อง

การแยกและการศึกษาคุณสมบัติของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Leuconostoc mesenteroides* UBU1

Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* UBU1

โดย

นาง ปาริชาติ พุ่มขจร

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ซึ่งได้รับเงินทุนสนับสนุนการวิจัยประจำปี 2547 จากสภาวิจัยแห่งชาติ

คำนำ

รายงานฉบับนี้เป็นรายงานผลงานวิจัยเรื่อง "การแยกและการศึกษาคุณสมบัติของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Leuconostoc mesenteroides* UBU1 (Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* UBU1)" ซึ่งได้รับเงินทุนสนับสนุนการวิจัยประจำปี 2547 จากสภาวิจัยแห่งชาติ งานวิจัยดังกล่าวนี้ได้ดำเนินการโดยมี นางปาริชาติ พุ่มขจร เป็นหัวหน้าโครงการ และมี นายพงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ เป็นผู้ร่วมโครงการ

ขอขอบคุณสภาวิจัยแห่งชาติ และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีที่สนับสนุนให้งานวิจัยดังกล่าวดำเนินไปได้ด้วยดีตลอดโครงการ

(นางปาริชาติ พุ่มขจร)
หัวหน้าโครงการ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	1
บทนำ	2
การตรวจเอกสาร	4
วัสดุและวิธีการทดลอง	14
ผลการทดลอง	19
วิจารณ์ผลการทดลอง	27
สรุปผลการทดลอง	30
เอกสารอ้างอิง	31

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	ผลของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. mesenteroides* UBU1 ต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และต่อค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ของ *L. mesenteroides* TISTR 473	19
2	การเจริญเติบโต และการสร้างแบคเทอริโอซินของ *L. mesenteroides* UBU1 ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส	21
3	การเจริญเติบโต และการสร้างแบคเทอริโอซินของ *L. mesenteroides* UBU1 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส	22
4	การเจริญเติบโต และการสร้างแบคเทอริโอซินของ *L. mesenteroides* UBU1 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	23
5	การเจริญเติบโต และการสร้างแบคเทอริโอซินของ *L. mesenteroides* UBU1 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส	24
6	ผลของค่า pH ต่อความสามารถของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. mesenteroides* UBU1 ในการยับยั้งการเจริญของ องค์ *L. mesenteroides* TISTR 473	25
7	polyacrylamide gel ที่ได้จากการศึกษาแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. mesenteroides* UBU1	26

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติบางประการของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Leuconostoc mesenteroides* UBU1 ซึ่งจากการศึกษาพบว่าแบคเทอริโอซินดังกล่าวสามารถทำให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable cells) ของ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 ลดลงจากประมาณ 5.2 X 10^8 cfu/ml เป็นประมาณ 2.4 X 10^4 cfu/ml และสามารถทำให้ค่าการดูดกลืนแสง (optical density) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรของสารละลาย phosphate buffer ที่มีเซลล์ของ *L. mesenteroides* TISTR 473 แขวนลอยอยู่ลดลงจาก 0.65 เป็น 0.25 จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญ และการสร้างแบคเทอริโอซินของ *L. mesenteroides* UBU1 พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวเจริญที่อุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียสได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 20 และ 25 องศาเซลเซียส ส่วนการสร้างแบคเทอริโอซิน แบคทีเรียดังกล่าวสามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยค่า bacteriocin activity สูงสุดที่วัดได้มีค่าเท่ากับ 1,680 AU/ml ซึ่งวัดได้เมื่อ *L. mesenteroides* UBU1 อยู่ในช่วงต้นของระยะ stationary phase ของการเจริญเติบโต แบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. mesenteroides* UBU1 สามารถยับยั้งการเจริญของ *L. mesenteroides* TISTR 473 ได้ดีที่สุดเมื่อแบคเทอริโอซินดังกล่าวอยู่ในสภาวะที่มี pH ในช่วง 4 ถึง 7 จากการทดลองแยกแบคเทอริโอซินให้บริสุทธิ์ตามวิธีการของ Yang และคณะ และนำแบคเทอริโอซินที่ได้ไปวิเคราะห์โดยวิธี SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) พบว่าแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. mesenteroides* UBU1 เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 35 kDa

บทนำ

แบคเทอริโอซินเป็นสารที่สร้างได้จากแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Staphylococcus aureus* (Netz และคณะ 2002, Netz และคณะ 2001) *Bacillus cereus* (Oscariz และ Pisaborro 2000, Hyronimus และคณะ. 1998) *Shigella boydii* (Smajs และคณะ 1997) *Escherichia coli* (Braun และคณะ 1994) *Serratia marcescens* (Viejo และคณะ 1992) *Bacillus subtilis* (Gross และ Kiltz 1973) และแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มแลคติคแอสิดแบคทีเรีย (lactic acid bacteria) เป็นต้น สารดังกล่าวเป็นสารประกอบประเภทโปรตีน และมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้อย่างจำเพาะ (Jack และคณะ 1995, Klaenhammer 1988, Tagg และคณะ 1976) จากการค้นพบว่าแบคเทอริโอซินหลายชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และ/หรือจุลินทรีย์ก่อโรคได้ (Nielsen และคณะ 1990, Harris และคณะ 1989, Spelhaug และ Harlander 1989) ทำให้มีนักวิทยาศาสตร์จำนวนมากหันมาให้ความสนใจในการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาแบคเทอริโอซินดังกล่าวให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารและ/หรือในทางการแพทย์ได้

ในการนำแบคเทอริโอซินไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารและ/หรือในทางการแพทย์ ผู้ที่จะนำแบคเทอริโอซินไปใช้จะต้องมีข้อมูลต่าง ๆ เกี่ยวกับคุณสมบัติของแบคเทอริโอซินที่จะนำไปใช้มากเพียงพอที่จะสามารถกำหนดแนวทางการใช้แบคเทอริโอซินให้เป็นไปอย่างเหมาะสม และมีประสิทธิภาพ ตัวอย่างของข้อมูลเกี่ยวกับคุณสมบัติของแบคเทอริโอซินที่มีประโยชน์ต่อการนำไปใช้พิจารณากำหนดแนวทางการใช้แบคเทอริโอซิน เช่น ความสามารถในการทนต่อความร้อนของแบคเทอริโอซิน กลไกการทำงานของแบคเทอริโอซิน สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เป้าหมาย (target microorganism) สภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างแบคเทอริโอซิน รวมทั้งข้อมูลเกี่ยวกับคุณสมบัติในระดับโมเลกุล (molecular properties) ของแบคเทอริโอซิน เช่น น้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) ของแบคเทอริโอซิน ลำดับกรดอะมิโน (amino acid sequence) ของแบคเทอริโอซิน ตำแหน่งของยีนสำหรับแบคเทอริโอซิน (bacteriocin gene) ลำดับเบส (nucleotide sequence) ของยีนสำหรับแบคเทอริโอซิน เป็นต้น แต่เนื่องจากแบคเทอริโอซินแต่ละชนิดมีคุณสมบัติหลายประการที่แตกต่างกัน ดังนั้นการนำแบคเทอริโอซินชนิดใดชนิดหนึ่งไปใช้งาน จึงจำเป็นต้องทำการศึกษาคุณสมบัติของแบคเทอริโอซินนั้น ๆ โดยเฉพาะ

Leuconostoc mesenteroides UBU1 เป็นแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่แยกได้ในห้องปฏิบัติการของภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี แลคติคแอสิดแบคทีเรียดังกล่าวสามารถสร้างแบคเทอริโอซินไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้หลายชนิด เช่น *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 และ *Bacillus cereus* ATCC 11778 เป็นต้น ด้วยเหตุนี้แบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. mesenteroides* UBU1 จึงเป็นแบคเทอริโอซินที่น่าที่จะนำไปพัฒนาเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและ/หรือในทางการแพทย์ต่อไป อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังมีความต้องการข้อมูลเกี่ยวกับคุณสมบัติของแบคเทอริโอซินดังกล่าวเพิ่มเติม เพื่อใช้ประกอบการพิจารณากำหนดแนวทางการใช้แบคเทอริโอซินดังกล่าวให้เป็นไปอย่างเหมาะสม และมีประสิทธิภาพ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงต้องการที่จะศึกษาคุณสมบัติของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. mesenteroides* UBU1 ซึ่งได้แก่ การศึกษากลไกการทำงานของแบคเทอริโอซิน การศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาในการบ่มเชื้อต่อการสร้างแบคเทอริโอซิน การศึกษาผลของค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (ค่า pH) ต่อความสามารถของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ รวมทั้งการหาน้ำหนักโมเลกุลของแบคเทอริโอซิน ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้จะมีประโยชน์ต่อการพิจารณานำแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. mesenteroides* UBU1 ไปใช้งานอย่างเหมาะสม และมีประสิทธิภาพ

การตรวจเอกสาร

แบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ

แบคเทอริโอซินเป็นสารต่อต้านจุลินทรีย์ ซึ่งสร้างได้จากแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Bacillus cereus* (Oscariz และ Pisaborro 2000, Hyronimus และคณะ. 1998) *Bacillus subtilis* (Gross และ Kiltz 1973) *Escherichia coli* (Braun และคณะ 1994) *Serratia marcescens* (Viejo และคณะ 1992) *Shigella boydii* (Smajs และคณะ 1997) *Staphylococcus aureus* (Netz และคณะ 2002, Netz และคณะ 2001) และแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มแลคติคแอสิดแบคทีเรีย (lactic acid bacteria) เป็นต้น ตัวอย่างของแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้ เช่น *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* UCC118 สร้าง ABP-188 (Flynn และคณะ. 2002) *Enterococcus faecalis* K-4 สร้าง enterocin SE-K4 (Eguchi และคณะ. 2001) *Pediococcus pentosaceus* Pep1 สร้าง pediocin P (Osmanagaoglu และคณะ. 2000) *Leuconostoc* sp. J2 สร้าง leuconocin J (Choi และคณะ. 1999) *Lactococcus lactis* BFE 1500 สร้าง nisin Z (Olasupo และคณะ. 1999) *Lactobacillus plantarum* BFE 905 สร้าง plantaricin D (Franz และคณะ. 1998) Bifidobacterium *bifidum* NCFB 1454 สร้าง bifidocin B (Yildirim and Johnson 1998a) *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* R สร้าง lactococcin R (Yildirim and Johnson 1998b) *Pediococcus damnosus* NCFB 1832 สร้าง pediocin PD-1 (Green และคณะ. 1997) *Lactobacillus brevis* VB 286 สร้าง brevicin 286 (Coventry และคณะ. 1996) *Lactobacillus plantarum* KW 30 สร้าง plantaricin KW 30 (Kelly และคณะ. 1996) *Lactobacillus acidophilus* JCM 1229 สร้าง acidocin J 1229 (Tahara and Kanatani 1996) *Lactobacillus gasseri* LA 39 สร้าง gassericin A (Itoh และคณะ. 1995) *Lactobacillus plantarum* SA 6 สร้าง plantaricin SA 6 (Reknifn และคณะ. 1995) *Propionibacterium thoenii* สร้าง propionicin PLG-1 (Lyon and Glatz 1993) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481 สร้าง lacticin 481 (Piard และคณะ. 1992) *Carnobacterium piscicola* สร้าง carnocin U 149 (Stoffels และคณะ. 1992) *Pediococcus acidilactici* H สร้าง pediocin AcH (Bhunia และคณะ. 1991) *Leuconostoc mesenteroides* UL5 สร้าง mesenteroicin 5 (Daba และคณะ. 1991) *Leuconostoc gelidum* สร้าง leuconocin A-UAL 187 (Hastings และคณะ. 1991) *Lactobacillus sake* L45 สร้าง lactocin S (Mortvedt และคณะ. 1991) *Lactobacillus sake* 706 สร้าง sakacin A (Schillinger and Lucke 1989) *Lactobacillus plantarum* สร้าง plantaricin SIK-83 (Andersson และคณะ. 1988) และ *Lactobacillus helveticus*

481 สร้าง helveticin J (Joerger and Klaenhammer 1986) เป็นต้น แบคเทอริโอซินโดยทั่วไปจะมีลักษณะที่เหมือนกัน คือ เป็นโปรตีนที่มีความสามารถในการต่อต้านจุลินทรีย์ได้อย่างจำเพาะ (Jack และคณะ 1995, Klaenhammer 1988, Tagg และคณะ 1976) โดยแบคเทอริโอซินจะต่อต้านจุลินทรีย์ที่มีบริเวณรับที่จำเพาะ (specific receptor) ต่อแบคเทอริโอซินเท่านั้น อย่างไรก็ตาม แบคเทอริโอซินต่างชนิดกันมักจะมีคุณสมบัติหลายอย่างที่แตกต่างกัน เช่น มีน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกัน มีความสามารถในการต่อต้านจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน ทนทานต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่แตกต่างกัน และมีกลไกการทำงานที่แตกต่างกัน เป็นต้น

ในการนำแบคเทอริโอซินชนิดใดชนิดหนึ่งไปใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมอาหาร และ/หรือในทางการแพทย์ มักจะต้องทำการศึกษาคุณสมบัติของแบคเทอริโอซินชนิดนั้นก่อน เพื่อที่จะได้นำข้อมูลดังกล่าวไปใช้พิจารณากำหนดแนวทางการใช้แบคเทอริโอซินนั้นให้เป็นไปอย่างเหมาะสม และมีประสิทธิภาพต่อไป คุณสมบัติของแบคเทอริโอซินที่มักจะศึกษาก่อนที่จะนำแบคเทอริโอซินไปใช้งาน เช่น กลไกการทำงานของแบคเทอริโอซิน สภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างแบคเทอริโอซิน สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เป้าหมาย รวมทั้งคุณสมบัติในระดับโมเลกุลของแบคเทอริโอซิน เช่น น้ำหนักโมเลกุลของแบคเทอริโอซิน ลำดับกรดอะมิโนของแบคเทอริโอซิน ตำแหน่งของยีนสำหรับแบคเทอริโอซิน และลำดับเบสของยีนสำหรับแบคเทอริโอซิน เป็นต้น

กลไกการทำงานของแบคเทอริโอซิน

จากการศึกษากลไกการทำงานของแบคเทอริโอซินที่ผ่านมา พบว่าแบคเทอริโอซินต่างชนิดกันอาจมีกลไกการทำงานที่แตกต่างกัน แบคเทอริโอซินบางชนิดมีกลไกการทำงานแบบ bactericidal mode of action without cell lysis คือ จะไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เป้าหมาย โดยไม่ไปทำให้เซลล์ของจุลินทรีย์เป้าหมายแตกสลาย ในขณะที่แบคเทอริโอซินบางชนิดมีกลไกการทำงานแบบ bacteriolytic mode of action คือ จะไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เป้าหมาย โดยไปทำให้เซลล์ของจุลินทรีย์เป้าหมายแตกสลาย ตัวอย่างของ แบคเทอริโอซินที่มีกลไกการทำงานแบบ bactericidal mode of action without cell lysis เช่น pediocin PD-1 (Green และคณะ. 1997) plantaricin KW 30 (Kelly และคณะ. 1996) acidocin J 1299 (Tahara and Kanatani 1996) และ gassericin A (Itoh และคณะ. 1995) เป็นต้น ส่วนตัวอย่างของแบคเทอริโอซินที่มีกลไกการทำงานแบบ bacteriolytic mode of action เช่น coagulin (Hyronimus และคณะ. 1998) lactococcin R

(Yildirim and Johnson 1998b) pediocin AcH (Bhunia และคณะ. 1991) และ plantaricin SIK-83 (Anderson และคณะ. 1988) เป็นต้น

อุณหภูมิและระยะเวลาการบ่มเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างแบคเทอริโอซิน

อุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มเชื้อเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการสร้างแบคเทอริโอซิน โดยแบคเทอริโอซินต่างชนิดกันจะถูกสร้างได้มากที่สุดที่อุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ในการบ่มเชื้อที่แตกต่างกัน เช่น brevicin 286 ถูกสร้างได้มากที่สุดที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เมื่อบ่ม *Lactobacillus brevis* VB 286 เป็นเวลา 30 ชั่วโมง (Coventry และคณะ. 1996) plantaricin KW 30 ถูกสร้างได้มากที่สุดที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เมื่อบ่ม *Lactobacillus plantarum* KW 30 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (Kelly และคณะ. 1996) และ acidocin J 1229 ถูกสร้างได้มากที่สุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อบ่ม *Lactobacillus acidophilus* JCM 1229 เป็นเวลา 22 ชั่วโมง (Tahara and Kanatani 1996) เป็นต้น

ค่า pH ของสารละลายแบคเทอริโอซินกับความสามารถของแบคเทอริโอซินในการต่อต้านจุลินทรีย์

ค่า pH ของสารละลายแบคเทอริโอซินเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญอย่างมากต่อความสามารถของแบคเทอริโอซินในการต่อต้านจุลินทรีย์ แบคเทอริโอซินต่างชนิดกันมีความสามารถในการต่อต้านจุลินทรีย์ได้ดีที่สุดเมื่ออยู่ในสารละลายที่มีค่า pH ต่างกัน เช่น แบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFR 2028 มีความสามารถในการต่อต้านจุลินทรีย์ได้ดีที่สุดเมื่ออยู่ในสารละลายที่มีค่า pH ในช่วง 4 ถึง 4.5 (Balasubramanyam and Varadaraj 1998) plantaricin D มีความสามารถในการต่อต้านจุลินทรีย์ได้ดีที่สุดเมื่ออยู่ในสารละลายที่มีค่า pH ในช่วง 2 ถึง 8 (Franz และคณะ 1998) แบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Lactobacillus curvatus* IFPL 105 มีความสามารถในการต่อต้านจุลินทรีย์ได้ดีที่สุดเมื่ออยู่ในสารละลายที่มีค่า pH ในช่วง 4 ถึง 6 (Casla และคณะ 1996) และ plantaricin KW 30 มีความสามารถในการต่อต้านจุลินทรีย์ได้ดีที่สุดเมื่ออยู่ในสารละลายที่มีค่า pH ในช่วง 2 ถึง 10 (Kelly และคณะ 1996) เป็นต้น

ความร้อนกับความสามารถของแบคเทอริโอซินในการต่อต้านจุลินทรีย์

แบคเทอริโอซินส่วนใหญ่มักทนต่อความร้อนได้ดี ทั้งนี้เนื่องจากแบคเทอริโอซินมักเป็นโปรตีนที่มีขนาดเล็ก และมีโครงสร้างไม่ซับซ้อน ตัวอย่างของแบคเทอริโอซินที่ทนต่อความร้อนได้ดี เช่น pediocin PA1 ซึ่งสร้างจาก *Pediococcus acidilactici* PAC1.0 (Henderson และคณะ 1992)

lactacin 481 ซึ่งสร้างจาก *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ481 (Piard และคณะ 1992) carnocin U149 ซึ่งสร้างจาก *Carnobacterium piscicola* (Stoffels และคณะ 1992) curvacin A ซึ่งสร้างจาก *Lactobacillus curvatus* LTH1174 (Tichaczek และคณะ 1992) mesenteroicin 5 ซึ่งสร้างจาก *Leuconostoc mesenteroides* UL5 (Daba และคณะ 1991) lactococcin S ซึ่งสร้างจาก *Lactobacillus sake* L45 (Mortvedt และคณะ 1991) lactacin F ซึ่งสร้างจาก *Lactobacillus acidophilus* 11088 (Muriana Klaenhammer 1991) plantaricin A ซึ่งสร้างจาก *Lactobacillus plantarum* C11 (Daeschel และคณะ 1990) sakacin A ซึ่งสร้างจาก *Lactobacillus sake* 706 (Schillinger และ Lucke 1989) pediocin AcH ซึ่งสร้างจาก *Pediococcus acidilactici* H (Bhunia และคณะ 1988) และ lactococcin I ซึ่งสร้างจาก *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AC1 (Geis และคณะ 1983) เป็นต้น อย่างไรก็ตามแบคเทอริโอซินบางชนิดไม่สามารถทนความร้อนได้ ซึ่งแบคเทอริโอซินเหล่านี้ส่วนใหญ่มักมีขนาดใหญ่ และมีโครงสร้างที่ซับซ้อน ตัวอย่างของแบคเทอริโอซินที่ไม่ทนต่อความร้อน เช่น helveticin 51 ซึ่งสร้างจาก *Lactobacillus helveticus* G51 (Bonade และคณะ 2001) helveticin J ซึ่งสร้างจาก *Lactobacillus helveticus* 481 (Joerger และ Klaehammer 1986) และ lactacin B ซึ่งสร้างจาก *Lactobacillus acidophilus* (Barefoot และ Klaehammer 1984, Barefoot และ Klaehammer 1983) เป็นต้น

น้ำหนักโมเลกุลของแบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซินโดยทั่วไปมักมีน้ำหนักโมเลกุลไม่เกิน 10 kDa ตัวอย่างเช่น pediocin K1 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 4.2 kDa (Kim และคณะ 2000) lactococcin K2386 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 8.1 kDa (Ko และ Anh 2000) bifidocin B ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3.3 kDa (Yildirim และ Johnson 1998a) piscicolin 126 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 4.5 kDa (Jack และคณะ 1996) acidocin J1229 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 6.3 kDa (Tahara และ Kanatani 1996) acidocin J1132 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 6.3 kDa (Tahara และคณะ 1996) propionicin PLG-1 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10 kDa (Lyon และ Glatz 1993) enterocin 1146 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3 kDa (Parente และ Hill 1992) lactococcin A ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 5.8 kDa (Holo และคณะ 1991) และ pedioin AcH ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 2.7 kDa (Bhunia และคณะ 1988) เป็นต้น อย่างไรก็ตามยังมีแบคเทอริโอซินที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่มากกว่า 10 kDa ซึ่งโดยส่วนใหญ่มักถูกสร้างโดยแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่อยู่ใน genus *Lactobacillus* ตัวอย่างเช่น helveticin 51 ซึ่งถูกสร้างโดย *Lactobacillus helveticus* G51 (Bonade และคณะ 2001)

helveticin J ซึ่งถูกสร้างโดย *Lactobacillus helveticus* 481 (Joerger และ Klaehammer 1986) และ lactacin B ซึ่งถูกสร้างโดย *Lactobacillus acidophilus* (Barefoot และ Klaehammer 1984, Barefoot และ Klaehammer 1983) เป็นต้น

การแยกแบคทอริโอซินให้บริสุทธิ์

การแยกแบคเทอริโอซินให้บริสุทธิ์สามารถทำได้หลายวิธี แต่วิธีที่นิยมใช้กันในปัจจุบันมีขั้นตอนดังนี้ เลี้ยงแบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม จากนั้นนำ culture ของแบคทีเรียดังกล่าวไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) เพื่อให้เซลล์ของแบคทีเรียตกตะกอน และเก็บส่วนใส (supernatant) ซึ่งมีแบคเทอริโอซินละลายอยู่ไปผ่าน ขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนด้วย ammonium sulfate (ตะกอนโปรตีนที่ได้จะประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิดผสมกันอยู่) นำตะกอนโปรตีนที่ได้ไปละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ (buffer) ที่เหมาะสม จากนั้นนำสารละลายโปรตีนดังกล่าวไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธี dialysis (ขั้นตอนนี้เป็นการกำจัดเกลือต่าง ๆ และโปรตีนที่มีขนาดเล็ก ๆ ออกจากสารละลายโปรตีน) หลังจากนั้นจึงทำการแยกโปรตีนต่าง ๆ ที่ผสมกันอยู่ในสารละลายโปรตีนออกจากกัน โดยวิธี column chromatography ก่อนที่จะนำโปรตีนแต่ละชนิดที่แยกได้ไปทดสอบว่าโปรตีนใดเป็นแบคเทอริโอซิน วิธีการในการแยกแบคเทอริโอซินให้บริสุทธิ์ที่กล่าวมาข้างต้นได้ถูกนำไปใช้กับแบคเทอริโอซินหลายชนิด เช่น acidocin J 1299 (Tahara and Kanatani 1996) propionicin PLG-1 (Lyon and Glatz 1993) lacticin 481 (Piard และคณะ 1992) leuconocin A-UAL 187 (Hastings และคณะ 1991) lactocin S (Mortvedt และคณะ. 1991) pediocin AcH (Bhunia และคณะ 1988) และ helveticin J (Joerger and Klaenhammer 1986) เป็นต้น

อย่างไรก็ตามการแยกแบคเทอริโอซินให้บริสุทธิ์โดยวิธีการดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ต้องใช้เวลานาน และใช้วัสดุอุปกรณ์ที่มีราคาค่อนข้างแพง นอกจากนี้วิธีการดังกล่าวยังประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ หลายขั้นตอน ซึ่งในแต่ละขั้นตอนก็จะมีการสูญเสียแบคเทอริโอซินไป ดังนั้นวิธีการในการแยกแบคเทอริโอซินให้บริสุทธิ์ดังที่ได้กล่าวมาข้างต้นจึงเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพค่อนข้างต่ำ

ในปีค.ศ. 1992 Yang และคณะได้เสนอวิธีการในการแยกแบคเทอริโอซินให้บริสุทธิ์ที่มีประสิทธิภาพค่อนข้างสูง และมีขั้นตอนที่ไม่ยุ่งยาก ซึ่งวิธีการดังกล่าวได้ถูกตีพิมพ์ในวารสาร Applied and Environmental Microbiology ฉบับที่ 58 ปีค.ศ. 1992 หน้า 3355-3359 (Yang และคณะ 1992)

การแยกแบคเทอริโอซินให้บริสุทธิ์ตามวิธีการของ Yang และคณะอาศัยหลักการที่ว่าแบคเทอริโอซินสามารถเกาะที่ผิวของเซลล์แบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินได้ดีที่สุด เมื่อเซลล์แบคทีเรียและแบคเทอริโอซินอยู่ในสารละลายที่มีค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (ค่า pH) ที่จำเพาะค่าหนึ่ง และแบคเทอริ

โอซินจะไม่สามารถเกาะที่ผิวของเซลล์แบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินได้ เมื่อเซลล์แบคทีเรียและแบคเทอริโอซินอยู่ในสารละลายที่มีค่า pH ที่จำเพาะอีกค่าหนึ่ง ดังนั้นถ้าทำการเลี้ยงแบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเพื่อให้แบคทีเรียดังกล่าวผลิตแบคเทอริโอซินออกมา แล้วทำการปรับค่า pH ของ culture ของแบคทีเรียดังกล่าวให้มีค่า pH เท่ากับค่า pH ที่ทำให้แบคเทอริโอซินสามารถเกาะที่ผิวของเซลล์แบคทีเรียได้ดีที่สุด แบคเทอริโอซินก็จะไปเกาะที่ผิวของเซลล์แบคทีเรีย และถ้านำเซลล์แบคทีเรียที่มีแบคเทอริโอซินเกาะอยู่ไปใส่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่มีค่า pH เท่ากับค่า pH ที่ทำให้แบคเทอริโอซินไม่สามารถไปเกาะที่ผิวของเซลล์แบคทีเรียได้ แบคเทอริโอซินที่เกาะอยู่ที่ผิวของเซลล์แบคทีเรียก็จะหลุดออกจากผิวของเซลล์แบคทีเรีย และละลายอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ ซึ่งถ้าทำการกำจัดเอาเกลือต่าง ๆ ออกจากสารละลายแบคเทอริโอซินดังกล่าวโดยวิธี dialysis ก็จะทำให้ได้สารละลายแบคเทอริโอซินที่บริสุทธิ์

การแยกแบคเทอริโอซินให้บริสุทธิ์ตามวิธีการของ Yang และคณะได้ถูกนำไปใช้กับแบคเทอริโอซินหลายชนิดเช่น lactococcin R (Yildirim and Johnson 1998b) และ pediocin AcM (Elegado และคณะ 1997) เป็นต้น

แบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Leuconostoc*

Leuconostoc เป็นแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่ม heterofermentative lactic acid bacteria ซึ่งสามารถพบได้ในอาหารหลายชนิด เช่น ผัก ผลไม้ เนื้อสัตว์ ผลิตภัณฑ์นมเนย รวมทั้งไวน์ ในอดีตแบคทีเรียที่อยู่ใน genus *Leuconostoc* ถูกแบ่งออกเป็น 4 สายพันธุ์ คือ *L. mesenteroides* (subsp. *mesenteroides*, subsp. *dextranicum* และ subsp. *cremoris*) *L. paramesenteroides* *L. lactis* และ *L. oenos* แต่ในปี 1989 Shaw และ Harding ได้ค้นพบแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่อยู่ใน genus *Leuconostoc* อีก 2 สายพันธุ์ คือ *L. carnosum* และ *L. gelidum* โดยแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์นี้แยกได้จากเนื้อสัตว์แช่เย็น (chill-stored meats)

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ที่อยู่ใน genus *Leuconostoc* สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้ ตัวอย่างเช่น *Leuconostoc* MF215B สามารถสร้าง leucocin H_α และ leucocin H_β ได้ (Blom และคณะ 1999) *L. mesenteroides* Y105 สามารถสร้าง mesentericin Y105 และ mesentericin B105 ได้ (Hechard และคณะ 1999, Hechard และคณะ 1992) *L. mesenteroides* TA33a สามารถสร้าง leucocin A-TA33a leucocin B-TA33a และ leucocin C-TA33a ได้ (Papathanasopoulos และคณะ 1998) *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 สามารถสร้าง mesenterocin 52A และ mesenterocin 52B ได้ (Revol-Junelles และคณะ

1996, Mathieu และคณะ 1993) *L. paramesenteroides* สามารถสร้าง leuconocin S ได้ (Lewus และคณะ 1992) *L. carnosum* LA44A สามารถสร้าง carnocin ได้ (van Laack และคณะ 1992) *L. mesenteroides* UL5 สามารถสร้าง mesenteroicin 5 ได้ (Daba และคณะ 1991) และ *L. gelidum* สามารถสร้าง leuconocin A-UAL187 ได้ (Hastings และคณะ 1991)

Carnocin

Carnocin เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Leuconostoc carnosum* LA44A ซึ่งแยกได้จากไส้กรอกชนิดหนึ่ง (Vienna-type sausage) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 2.5 ถึง 6.0 kDa สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส ได้นาน 15 นาที แต่ถูกทำลายได้โดยเอนไซม์ chymotrypsin trypsin และ amylase แบคเทอริโอซินชนิดนี้สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้หลายชนิด เช่น *Listeria* spp. *Lactobacilli* *Carnobacteria* *Enterococci* *Pediococci* และ *Leuconostoc* เป็นต้น *Leuconostoc carnosum* LA44A จะสร้าง carnocin ออกมาได้มากที่สุดเมื่อแบคทีเรียดังกล่าวอยู่ในช่วงปลายของระยะ logarithmic phase ของการเจริญเติบโต (van Laack 1992)

Leucocin A-UAL187

Leucocin A-UAL187 เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Leuconostoc gelidum* ซึ่งแยกได้จากเนื้อสัตว์ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 2.5 ถึง 3.0 kDa สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส ได้นาน 30 นาที แต่ถูกทำลายได้โดยเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่าง ๆ เช่น protease chymotrypsin trypsin papain และ pepsin แบคเทอริโอซินชนิดนี้สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้หลายชนิด เช่น *Listeria monocytogenes* *Enterococcus faecalis* *Leuconostoc* *Lactobacilli* และ *Pediococci* เป็นต้น *Leuconostoc gelidum* จะสร้าง leucocin A-UAL187 ออกมาได้มากที่สุดเมื่อแบคทีเรียดังกล่าวอยู่ในช่วงต้นของระยะ logarithmic phase ของการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ pH เท่ากับ 6.0 ยีนสำหรับแบคเทอริโอซินชนิดนี้เป็นยีนที่อยู่ใน plasmid (Hastings และคณะ 1991)

Leucocin A-TA33a

Leucocin A-TA33a เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Leuconostoc mesenteroides* TA33a ประกอบด้วยกรดอะมิโน 37 ตัว และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3.9 kDa แบคเทอริโอซินชนิดนี้มีกรดอะมิโน และน้ำหนักโมเลกุลเหมือนกับ leucocin A-UAL187 (Papathanasopoulos และคณะ 1998)

Leucocin B-TA33a

Leucocin B-TA33a เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Leuconostoc mesenteroides* TA33a ประกอบด้วยกรดอะมิโน 31 ตัว และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3.5 kDa แบคเทอริโอซินชนิดนี้มีกรด

อะมิโน และน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับ mesenterocin 52B (62% homology) (Papathanasopoulos และคณะ 1998)

Leucocin C-TA33a

Leucocin C-TA33a เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Leuconostoc mesenteroides* TA33a ประกอบด้วยกรดอะมิโน 36 ตัว และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 4.6 kDa แบคเทอริโอซินชนิดนี้มีกรดอะมิโน และน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับแบคเทอริโอซินที่อยู่ใน class II ตามการจัดจำแนกแบคเทอริโอซินของ Klaenhammer (1993) ตัวอย่างเช่น มีกรดอะมิโน และน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับ leucocin A-AUL187 (80% homology) มีกรดอะมิโน และน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับ mesentericin Y105 (78% homology) มีกรดอะมิโน และน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับpediocin PA-1 (61% homology) (Papathanasopoulos และคณะ 1998) เป็นต้น

Leucocin H

Leuconostoc MF215B เป็นแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้สองชนิด คือ leucocin H_α และ leucocin H_β เมื่อแบคเทริโอซินสองชนิดนี้ทำงานร่วมกันจะสามารถยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* *Bacillus cereus* และ *Clostridium perfringens* ได้ดี นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Lactobacillus* spp. *Carnobacterium* spp. *Lactococcus* spp. *Pediococcus* spp. *Enterococcus* spp. และ *Staphylococcus aureus* ได้ด้วย *Leuconostoc* MF215B จะสร้าง leucocin H ออกมาได้มากที่สุดเมื่อแบคทีเรียดังกล่าวอยู่ในช่วงปลายของระยะ logarithmic phase ของการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และ pH เท่ากับ 6.0 ทั้ง leucocin H_α และ leucocin H_β ซึ่งสามารถถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์ pepsin และ trypsin จะประกอบด้วยกรดอะมิโน (amino acid) ประมาณ 40 ตัว ซึ่งมีลำดับของกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน (Blom และคณะ 1999)

Leuconocin S

Leuconocin S เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Leuconostoc paramesenteroides* ซึ่งแยกได้จากเนื้อแกะขายปลีก (retail lamb) สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ได้นาน 30 นาที แต่ถูกทำลายได้โดยเอนไซม์ chymotrypsin trypsin protease proteinase k และ amylase เนื่องจาก leuconocin S สามารถถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์ amylase ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าแบคเทอริโอซินชนิดนี้น่าที่จะเป็นสารประกอบประเภท glycoprotein และสามารถถูกจัดอยู่ใน class IV bacteriocin ตามการจัดจำแนกแบคเทอริโอซินของ Klaenhammer (1993) การยับยั้งการเจริญของ

แบคทีเรียชนิดอื่นโดย leuconocin S มักจะเป็นการยับยั้งการเจริญแบบ bacteriostatic (Lewus และคณะ 1992)

Mesenteroicin 5

Mesenteroicin 5 เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Leuconostoc mesenteroides* UL5 ซึ่งแยกได้จากเนยแข็งชนิดหนึ่ง (Swiss-type cheese) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 4.5 kDa สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ได้นาน 30 นาที แต่ถูกทำลายได้โดยเอนไซม์ protease แบคเทอริโอซินชนิดนี้สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้หลายชนิด เช่น *Listeria monocytogenes* *Streptococcus faecalis* *Brevibacterium linens* และ *Pediococcus pentosaceus* เป็นต้น *L. mesenteroides* UL5 จะสร้าง mesenteroicin 5 ออกมาได้มากที่สุดเมื่อแบคทีเรียดังกล่าวอยู่ในช่วงต้นของระยะ stationary phase ของการเจริญเติบโต (Daba และคณะ 1991)

Mesenterocin 52A

Mesenterocin 52A เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้หลายชนิด รวมทั้ง *Listeria* spp. แบคเทอริโอซินชนิดนี้ซึ่งถูกจัดอยู่ใน class IIa bacteriocin ตามการจัดจำแนกแบคเทอริโอซินของ Klaenhammer (1993) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 37 ตัว และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3.8 kDa สิ่งที่น่าสนใจมากเกี่ยวกับ mesenterocin 52A คือ แบคเทอริโอซินชนิดนี้มีกรดอะมิโน และน้ำหนักโมเลกุลเหมือนกับ mesentericin Y105 ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Leuconostoc mesenteroides* Y105 (Revol-Junelles และคณะ 1996, Mathieu และคณะ 1993)

Mesenterocin 52B

Mesenterocin 52B เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 สามารถยับยั้งการเจริญได้เฉพาะ *Leuconostoc* บางสายพันธุ์เท่านั้น แบคเทอริโอซินชนิดนี้ซึ่งถูกจัดอยู่ใน class II bacteriocin ตามการจัดจำแนกแบคเทอริโอซินของ Klaenhammer (1993) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 32 ตัว และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3.5 kDa สิ่งที่น่าสนใจมากเกี่ยวกับ mesenterocin 52B คือ แบคเทอริโอซินชนิดนี้มีกรดอะมิโน และน้ำหนักโมเลกุลเหมือนกับ mesentericin B105 ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Leuconostoc mesenteroides* Y105 (Revol-Junelles และคณะ 1996, Mathieu และคณะ 1993)

Mesentericin B105

Mesentericin B105 เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Leuconostoc mesenteroides* Y105 สามารถยับยั้งการเจริญได้เฉพาะ *Leuconostoc* บางสายพันธุ์เท่านั้น แบคเทอริโอซินชนิดนี้ซึ่งถูกจัดอยู่ใน class II bacteriocin ตามการจัดจำแนกแบคเทอริโอซินของ Klaenhammer (1993) นอกจาก mesentericin B105 จะมีกรดอะมิโน และน้ำหนักโมเลกุลเหมือนกับ mesenterocin 52B แล้วยังมีกรดอะมิโน และน้ำหนักโมเลกุลที่ใกล้เคียงกับ leucocin B-TA33a (ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52) (Hechard และคณะ 1999, Hechard และคณะ 1992)

Mesentericin Y105

Mesentericin Y105 เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Leuconostoc mesenteroides* Y105 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้หลายชนิด รวมทั้ง *Listeria* spp. แบคเทอริโอซินชนิดนี้ซึ่งถูกจัดอยู่ใน class IIa bacteriocin ตามการจัดจำแนกแบคเทอริโอซินของ Klaenhammer (1993) นอกจาก mesentericin Y105 จะมีกรดอะมิโน และน้ำหนักโมเลกุลเหมือนกับ mesenterocin 52A แล้วยังมีกรดอะมิโน และน้ำหนักโมเลกุลที่ใกล้เคียงกับ leucocin A-TA33a (ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52) และ leucocin A-UAL 187 (ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Leuconostoc gelidum*) (Hechard และคณะ 1999, Hechard และคณะ 1992)

วัสดุและวิธีการทดลอง

จุลินทรีย์และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

แบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้ (producer strain) ที่ใช้ในการศึกษานี้ คือ *Leuconostoc mesenteroides* UBU1 ส่วนแบคทีเรียที่ใช้เป็นแบคทีเรียทดสอบ (indicator strain) คือ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473

ทั้ง *L. mesenteroides* UBU1 และ *L. mesenteroides* TISTR 473 ถูกเลี้ยงใน 0.2 % glucose MRS agar หรือ 0.2 % glucose MRS broth ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 0.2 เปอร์เซ็นต์

การศึกษากลไกการทำงานของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. mesenteroides* UBU1 ในการยับยั้งการเจริญของ *L. mesenteroides* TISTR 473

การศึกษากลไกการทำงานของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. mesenteroides* UBU1 ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบทำโดยเลี้ยงแบคทีเรียทดสอบ (ซึ่งในการศึกษานี้คือ *L. mesenteroides* TISTR 473) ใน 0.2 % glucose MRS broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเอา culture ของแบคทีเรียดังกล่าวไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียทดสอบ นำตะกอนเซลล์ดังกล่าวไปทำการแขวนลอยในสารละลาย phosphate buffer ซึ่งมีความเข้มข้นเท่ากับ 50 มิลลิโมลต่อลิตร (mmol/l) และ pH เท่ากับ 6.5 โดยใช้สารละลาย phosphate buffer ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเติม culture supernatant ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง culture ของ *L. mesenteroides* UBU1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไปในสารละลาย phosphate buffer ที่มีเซลล์ของแบคทีเรียทดสอบแขวนลอยอยู่ และทำการเก็บตัวอย่างแบคทีเรียทดสอบที่เวลา 30, 60, 90 และ 120 นาทีหลังจากที่มีการเติม culture supernatant ตัวอย่างแบคทีเรียทดสอบที่เก็บมาได้ถูกนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และนำไปนับจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียทดสอบที่ยังมีชีวิตอยู่ (viable counts) ในการทดลองนี้มีชุดการทดลองควบคุม (control) ด้วย โดยในชุดการทดลองควบคุมได้เติม 0.2% glucose MRS broth ลงไปในสารละลาย phosphate buffer ที่มีแบคทีเรียทดสอบแขวนลอยอยู่ แทนการใช้ culture supernatant ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง culture ของ *L. mesenteroides* UBU1

การแปรผลที่ได้จากการทดลองนี้ให้นำค่า viable counts และค่า OD ที่ได้จากแต่ละชุดการทดลองมาเปรียบเทียบกัน ถ้าค่า viable counts และค่า OD ที่ได้จากชุดการทดลองที่มีการเติม culture supernatant ของ *L. mesenteroides* UBU1 มีค่าต่ำกว่าค่า viable counts และ ค่า OD ที่ได้จากชุดการทดลองควบคุม แสดงว่าแบคทอริโอซินที่ละลายอยู่ใน culture supernatant ดังกล่าวน่าจะไปทำลายเซลล์ของแบคทีเรียทดสอบโดยการทำให้เซลล์ดังกล่าวแตกสลายไป แต่ถ้าค่า viable counts ที่ได้จากชุดการทดลองที่มีการเติม culture supernatant ของ *L. mesenteroides* UBU1 มีค่าต่ำกว่าค่า viable counts ที่ได้จากชุดการทดลองควบคุม ส่วนค่า OD ที่ได้จากชุดการทดลองทั้งสองชุดมีค่าเท่ากันหรือใกล้เคียงกันมาก แสดงว่าแบคทอริโอซินที่ละลายอยู่ใน culture supernatant ดังกล่าว น่าจะไปทำลายเซลล์ของแบคทีเรียทดสอบโดยไม่ไปทำให้เซลล์ดังกล่าวแตกสลายไป

การศึกษาผลของอุณหภูมิและระยะเวลาการบ่มเชื้อต่อการสร้างแบคเทอริโอซินโดย *L. mesenteroides* UBU1

การศึกษาผลของอุณหภูมิ และระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มเชื้อต่อการสร้างแบคเทอริโอซินโดย *L. mesenteroides* UBU1 ทำโดยเลี้ยง *L. mesenteroides* UBU1 ใน 0.2% glucose MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ จากนั้นทำการถ่ายเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียดังกล่าวที่เลี้ยงไว้ข้ามคืนปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ (flask) ที่มี 0.2% glucose MRS broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จำนวน 4 ขวด นำ culture ของ *L. mesenteroides* UBU1 ที่อยู่ในขวดรูปชมพู่แต่ละขวดไปบ่มแยกกันที่อุณหภูมิ 20, 25, 37 และ 45 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างแบคทีเรียปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากขวดรูปชมพู่ดังกล่าวทั้งสี่ขวดทุก ๆ หนึ่งชั่วโมงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากที่มีการถ่ายเชื้อ นำตัวอย่างแบคทีเรียที่เก็บมาได้ปริมาตร 2 มิลลิลิตรไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ส่วนตัวอย่างแบคทีเรียที่เหลืออีก 1 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ปริมาณของแบคเทอริโอซิน แต่เนื่องจากการวัดปริมาณของแบคเทอริโอซินโดยตรงทำได้ยาก ดังนั้นในการศึกษานี้จึงใช้การวัดความสามารถของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ (bacteriocin activity) แทนการวัดปริมาณของแบคเทอริโอซินโดยตรง การวัดความสามารถของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. mesenteroides* UBU1 ในการยับยั้งการเจริญของ *L. mesenteroides* TISTR 473 ทำโดยนำตัวอย่างแบคทีเรียที่เก็บมาได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดเอาเฉพาะส่วนใส (culture supernatant) ซึ่งมีแบคเทอริโอซินละลายอยู่ไปเจือจางที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ ดังนี้คือ ที่ระดับความเจือจาง 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 และ 1:128 ตามลำดับ

จากนั้นนำเอา culture supernatant ที่มีระดับความเจือจางต่าง ๆ เหล่านี้ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *L. mesenteroides* TISTR 473 โดยใช้วิธี swab-paper disc ความสามารถของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. mesenteroides* UBU1 ในการยับยั้งการเจริญของ *L. mesenteroides* TISTR 473 ถูกแสดงในหน่วย AU (arbitrary unit)/ml

ค่าความสามารถของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ ในหน่วย AU/ml สามารถหาได้จากค่าส่วนกลับของระดับความเจือจางสูงสุดของ culture supernatant ที่ยังสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ ตัวอย่างเช่น ถ้าใช้ culture supernatant ที่เตรียมได้จาก culture ของแลคติคแอสิดแบคทีเรีย ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ และพบว่าระดับความเจือจางสูงสุดของ culture supernatant ที่ยังสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ คือ 1:16 ดังนั้นค่าความสามารถของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ (bacteriocin activity) จะมีค่าเท่ากับ 16 AU/25 ไมโครลิตร หรือ 640 AU/ml

<u>การศึกษาผลของค่า pH ต่อความสามารถของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. mesenteroides* UBU1 ในการยับยั้งการเจริญของ *L. mesenteroides* TISTR 473</u>

การศึกษาผลของค่า pH ของสารละลายแบคเทอริโอซินต่อความสามารถของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. mesenteroides* UBU1 ในการยับยั้งการเจริญของ *L. mesenteroides* TISTR 473 ทำโดยนำส่วนใส (culture supernatant) ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง culture ของ *L. mesenteroides* UBU1 ไปปรับค่า pH โดยใช้สารละลาย HCl หรือ NaOH เพื่อให้ culture supernatant ดังกล่าวมีค่า pH เท่ากับ 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 จากนั้นจึงนำส่วนใสดังกล่าวแต่ละอันไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *L. mesenteroides* TISTR 473 โดยวิธี swab-paper disc

การทดสอบความสามารถของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. mesenteroides* UBU1 ในการยับยั้งการเจริญของ *L. mesenteroides* TISTR 473 โดยวิธี swab-paper disc

การทดสอบความสามารถของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. mesenteroides* UBU1 ในการยับยั้งการเจริญของ *L. mesenteroides* TISTR 473 ทำโดยเลี้ยง *L. mesenteroides* UBU1 ใน 0.2% glucose MRS broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ (anaerobic condition) จากนั้นนำ culture ของแลคติคแอสิดแบคทีเรียดังกล่าวไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อเก็บเอาส่วนใส (culture

supernatant) ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงซึ่งมีแบคเทอริโอซินละลายอยู่ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *L. mesenteroides* TISTR 473 โดยวิธี swab-paper disc ซึ่งทำโดยเลี้ยง *L. mesenteroides* TISTR 473 ใน 0.2% glucose MRS broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาป้าย (swab) ลงบน 0.2% glucose MRS agar ให้ทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นำแผ่น paper disc ที่ปลอดเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตรมาวางบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งดังกล่าว แล้วหยด culture supernatant ของ *L. mesenteroides* UBU1 ที่เตรียมไว้แล้ว ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงบนแผ่น paper disc นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนสังเกตว่ามี inhibition zone เกิดขึ้นรอบ ๆ แผ่น paper disc หรือไม่ ถ้าเห็น inhibition zone เกิดขึ้นรอบ ๆ แผ่น paper disc แสดงว่าแบคเทอริโอซินที่นำมาทดสอบมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *L. mesenteroides* TISTR 473

การแยกแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. mesenteroides* UBU1 ให้บริสุทธิ์

ในการศึกษานี้ใช้วิธีการของ Yang และคณะ ในการแยกแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. mesenteroides* UBU1 ให้บริสุทธิ์ ซึ่งวิธีการดังกล่าวมีขั้นตอนดังนี้ เลี้ยง *L. mesenteroides* UBU1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 0.2% glucose MRS broth ปริมาตร 1 ลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำ culture ดังกล่าวไปปรับค่า pH ให้มีค่าเท่ากับ 7 (ซึ่งเป็นค่า pH ที่ทำให้แบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. mesenteroides* UBU1 เกาะที่ผิวของเซลล์แบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินดังกล่าวได้ดีที่สุด) ก่อนนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 ชั่วโมง หลังจากที่ให้ความร้อนกับ culture ของ *L. mesenteroides* UBU1 แล้ว นำ culture ดังกล่าวไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเก็บส่วนที่เป็นตะกอนของเซลล์แบคทีเรียที่ได้ไปล้างด้วยสารละลาย 5 mM sodium phosphate (pH 6.5) ก่อนนำตะกอนดังกล่าวไปแขวนลอยในสารละลาย 100 mM NaCl ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยสารละลาย 100 mM NaCl ที่ใช้มีค่า pH เท่ากับ 2 (ซึ่งเป็นค่า pH ที่ทำให้แบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. mesenteroides* UBU1 ไม่สามารถยึดเกาะที่ผิวของเซลล์แบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินดังกล่าวได้) หลังจากนั้นนำสารแขวนลอยที่ได้ไปคนโดยใช้ magnetic stirrer ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 29,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เพื่อให้ได้ส่วนใสที่มีแบคเทอริโอซินละลายอยู่ จากนั้นทำการกำจัดเกลือต่าง ๆ ออกจากส่วนใสที่ได้ โดยวิธี dialysis โดยใช้ dialysis tubing ที่มี molecular weight cut off ที่ 1,000 daltons แล้วจึงนำส่วนใสดังกล่าวไปทำให้แห้ง และ

นำแบคเทอริโอซินที่ได้มาละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ซึ่งทำให้ได้สารละลายแบคเทอริโอซินบริสุทธิ์ไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

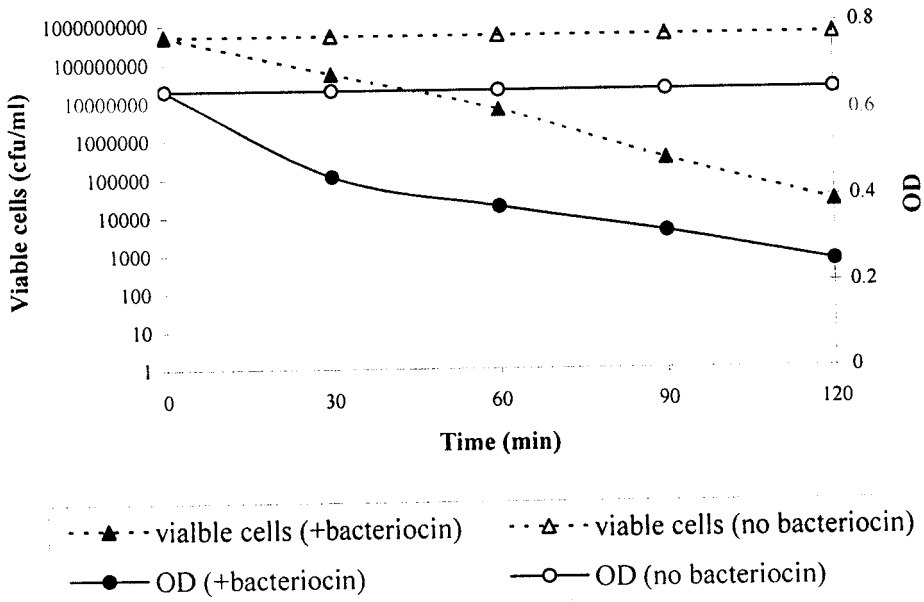
การหาน้ำหนักโมเลกุลของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L.* mesenteroides UBU1

การหาน้ำหนักโมเลกุลของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. mesenteroides* UBU1 ทำโดยนำสารละลายแบคเทอริโอซินบริสุทธิ์มาวิเคราะห์ โดยวิธี sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ นำสารละลายแบคเทอริโอซินบริสุทธิ์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาผสมกับ sample solvent (62.5 mM Tris-HCl [pH6.8], 10% glycerol, 2% SDS, 5% β-mercaptoethanol) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไปหยอดลงในช่องบนแผ่น polyacrylamide gel โดยให้หยอดสารละลายของโปรตีนมาตราฐาน (protein marker) ที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลในช่องข้าง ๆ ด้วย หลังจากที่ทำการหยอดสารละลายโปรตีนลงในช่องบนแผ่น polyacrylamide gel เรียบร้อยแล้ว ทำการปล่อยให้โปรตีนวิ่งผ่านแผ่น polyacrylamide gel ในสภาวะที่มีค่ากระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 40 mA เป็นเวลาประมาณ 3-4 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่น polyacrylamide gel ไปย้อมด้วย coomassie brilliant blue ซึ่งทำให้เห็นแถบโปรตีนเป็นแถบสีน้ำเงิน น้ำหนักโมเลกุลของแบคเทอริโอซินสามารถถูกคาดคะเนได้จากการเปรียบเทียบระยะทางที่แถบโปรตีนแบคเทอริโอซินเคลื่อนที่ได้ในแผ่น polyacrylamide gel กับระยะทางที่แถบโปรตีนมาตราฐานเคลื่อนที่ได้ในแผ่น polyacrylamide gel

ผลการทดลอง

การศึกษากลไกการทำงานของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. mesenteroides* UBU1 ในการยับยั้งการเจริญของ *L. mesenteroides* TISTR 473

จากการศึกษาผลของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. mesenteroides* UBU1 ต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable cells) ของ *L. mesenteroides* TISTR 473 และต่อค่าการดูดกลืนแสง (optical density) ของเซลล์ของ *L. mesenteroides* TISTR 473 ที่แขวนลอยในสารละลาย phosphate buffer พบว่าแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. mesenteroides* UBU1 ทำให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable cells) ของ *L. mesenteroides* TISTR 473 ลดลงจากประมาณ 5.2×10^8 cfu/ml เป็นประมาณ 2.4×10^4 cfu/ml (รูปที่ 1) และทำให้ค่าการดูดกลืนแสง (optical density) ของเซลล์ของ *L. mesenteroides* TISTR 473 ที่แขวนลอยในสารละลาย phosphate buffer ลดลงจาก 0.65 เป็น 0.25 ในขณะที่ในชุดทดลองควบคุม (control) จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *L. mesenteroides* TISTR 473 และ ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ของ *L. mesenteroides* TISTR 473 ที่แขวนลอยในสารละลาย phosphate buffer ไม่มีการเปลี่ยนแปลง (รูปที่ 1)



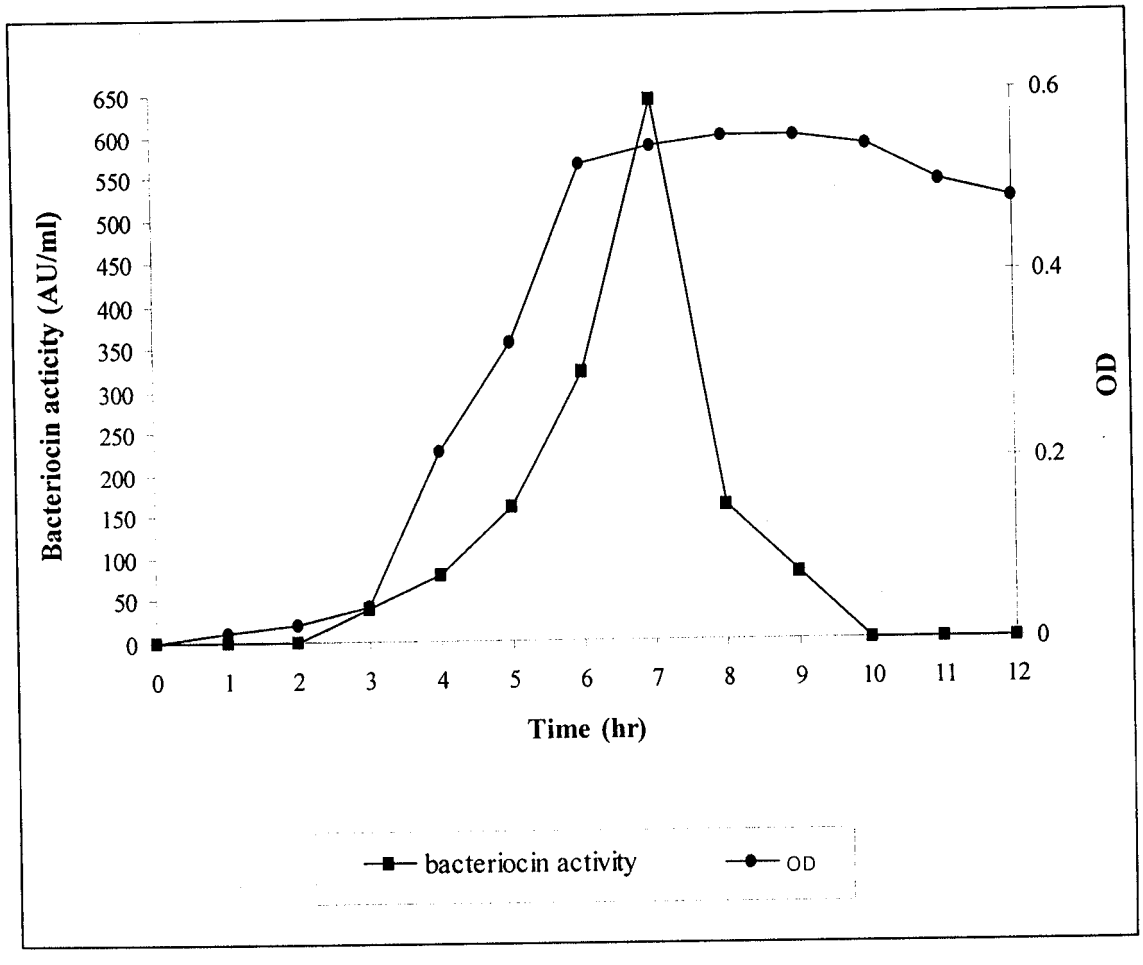
รูปที่ 1 ผลของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. mesenteroides* UBU1 ต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และต่อค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ของ *L. mesenteroides* TISTR 473

การศึกษาผลของอุณหภูมิและระยะเวลาการบ่มเชื้อต่อการสร้างแบคเทอริโอซินโดย *L. mesenteroides* UBU1

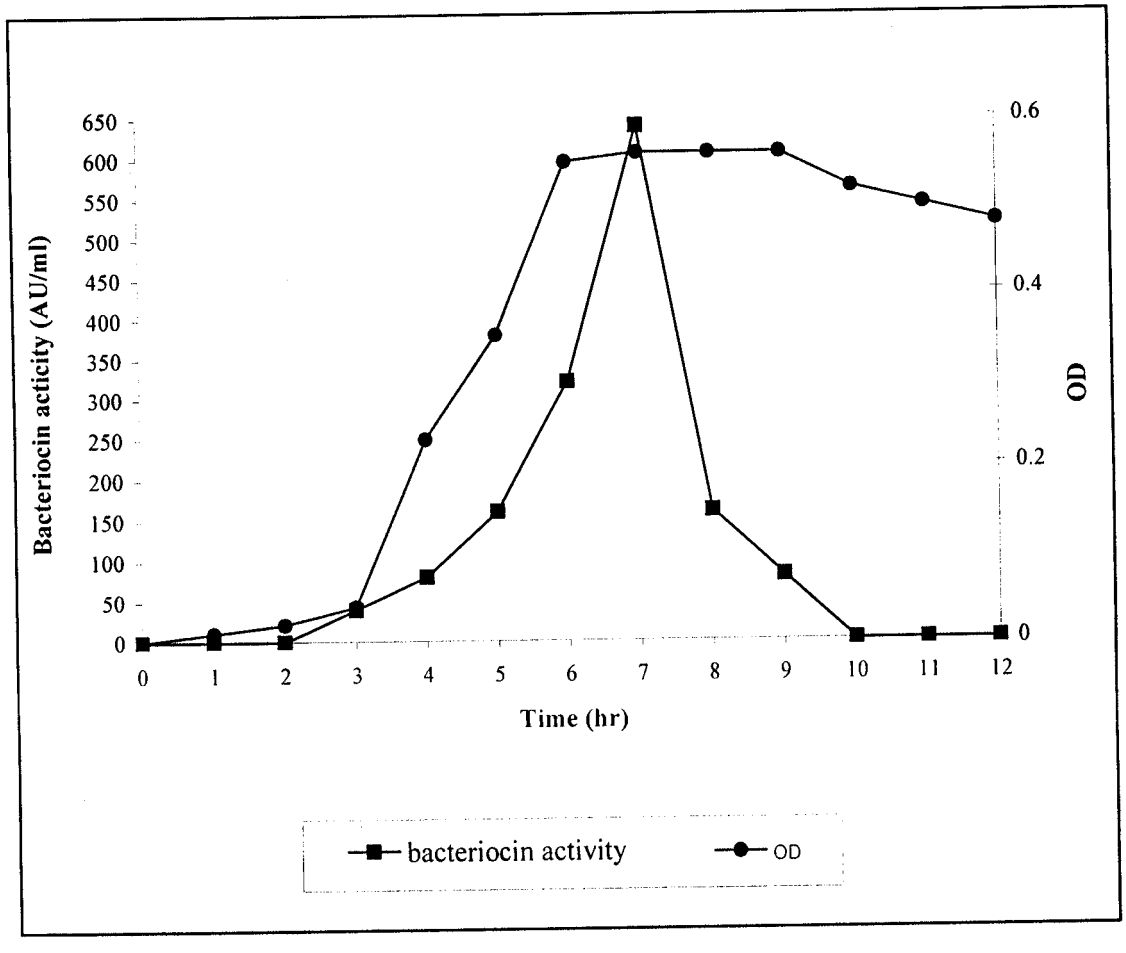
จากการศึกษาผลของอุณหภูมิ และระยะเวลาในการบ่มเชื้อต่อการสร้างแบคเทอริโอซินโดย *L. mesenteroides* UBU1 พบว่า เมื่อเลี้ยง *L. mesenteroides* UBU1 ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และ 25 องศาเซลเซียส แบคเทอริโอซินจะถูกสร้างเมื่อแบคทีเรียดังกล่าวเริ่มเข้าสู่ระยะ exponential phase ของการเจริญเติบโต ซึ่งใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมงหลังจากที่มีการถ่ายเชื้อ หลังจากนั้นแบคเทอริโอซินจะถูกสร้างเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนมีปริมาณสูงสุด เมื่อ *L. mesenteroides* UBU1 อยู่ในช่วงต้นของ stationary phase ของการเจริญเติบโต ซึ่งใช้เวลาประมาณ 7 ชั่วโมงหลังจากที่มีการถ่ายเชื้อ โดยค่า bacteriocin activity สูงสุดที่วัดได้มีค่าเท่ากับ 640 AU/ml (รูปที่ 2 และ รูปที่ 3) ในขณะที่เมื่อเลี้ยง *L. mesenteroides* UBU1 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส แบคเทอริโอซินจะถูกสร้างเมื่อแบคทีเรียดังกล่าวเริ่มเข้าสู่ระยะ exponential phase ของการเจริญเติบโต ซึ่งใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมงหลังจากที่มีการถ่ายเชื้อ หลังจากนั้นแบคเทอริโอซินจะถูกสร้างเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนมีปริมาณสูงสุด เมื่อ *L. mesenteroides* UBU1 อยู่ในช่วงต้นของ stationary phase ของการเจริญเติบโต ซึ่งใช้เวลาประมาณ 6 ชั่วโมงหลังจากที่มีการถ่ายเชื้อ โดยค่า bacteriocin activity สูงสุดที่วัดได้มีค่าเท่ากับ 1280 AU/ml เมื่อเลี้ยง *L. mesenteroides* UBU1 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (รูปที่ 4) และ 640 AU/ml เมื่อเลี้ยง *L. mesenteroides* UBU1 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (รูปที่ 5)

การศึกษาผลของค่า pH ต่อความสามารถของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. mesenteroides* UBU1 **ในการยับยั้งการเจริญของ** *L. mesenteroides* TISTR 473

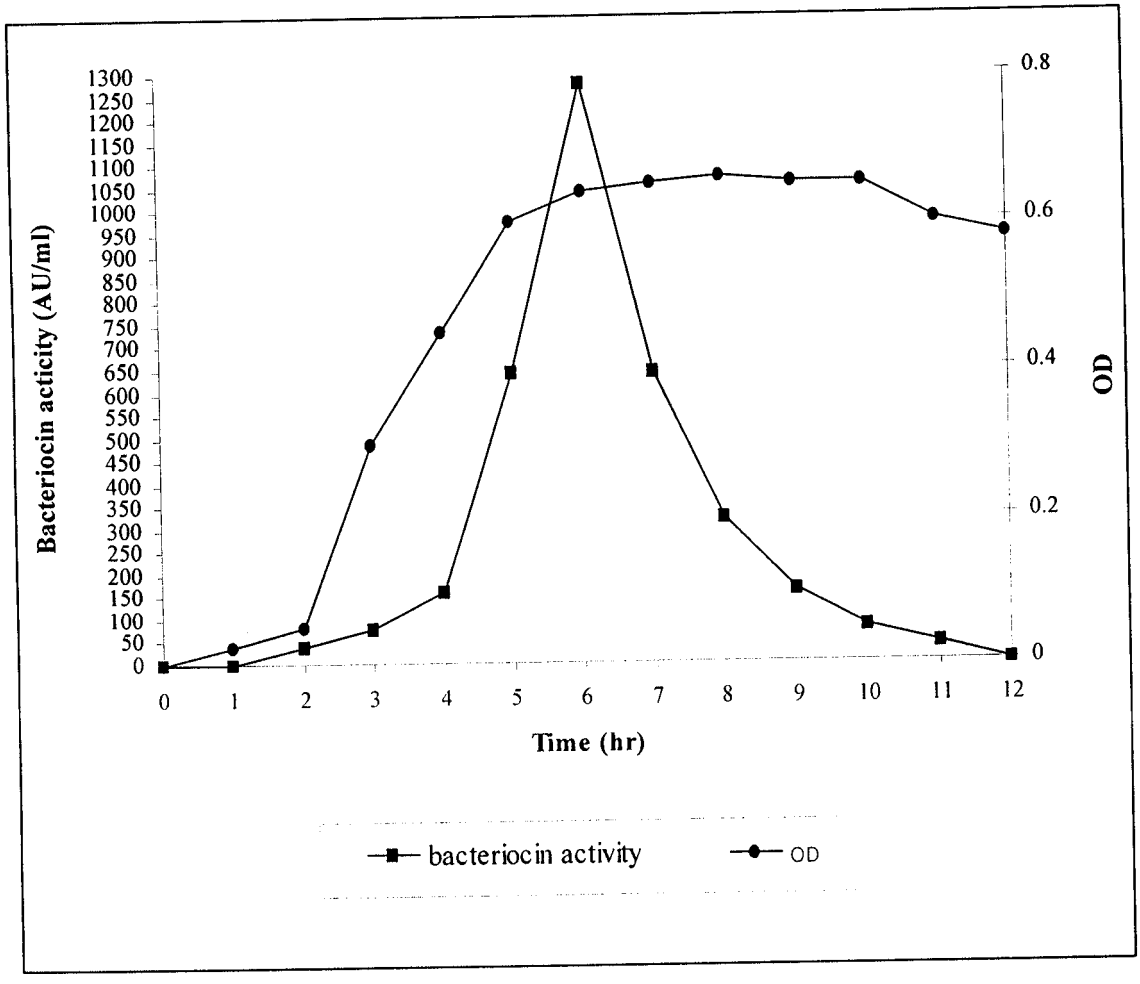
จากการศึกษาผลของค่า pH ต่อความสามารถของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. mesenteroides* UBU1 ในการยับยั้งการเจริญของ *L. mesenteroides* TISTR 473 พบว่า ค่า pH ที่ทำให้แบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. mesenteroides* UBU1 สามารถยับยั้งการเจริญของ *L. mesenteroides* TISTR 473 ได้ดีที่สุด คือ ค่า pH ในช่วง 4 ถึง 7 (รูปที่ 6) ในขณะที่ ที่ค่า pH เท่ากับ 1, 9 และ 10 แบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. mesenteroides* UBU1 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *L. mesenteroides* TISTR 473 (รูปที่ 6)



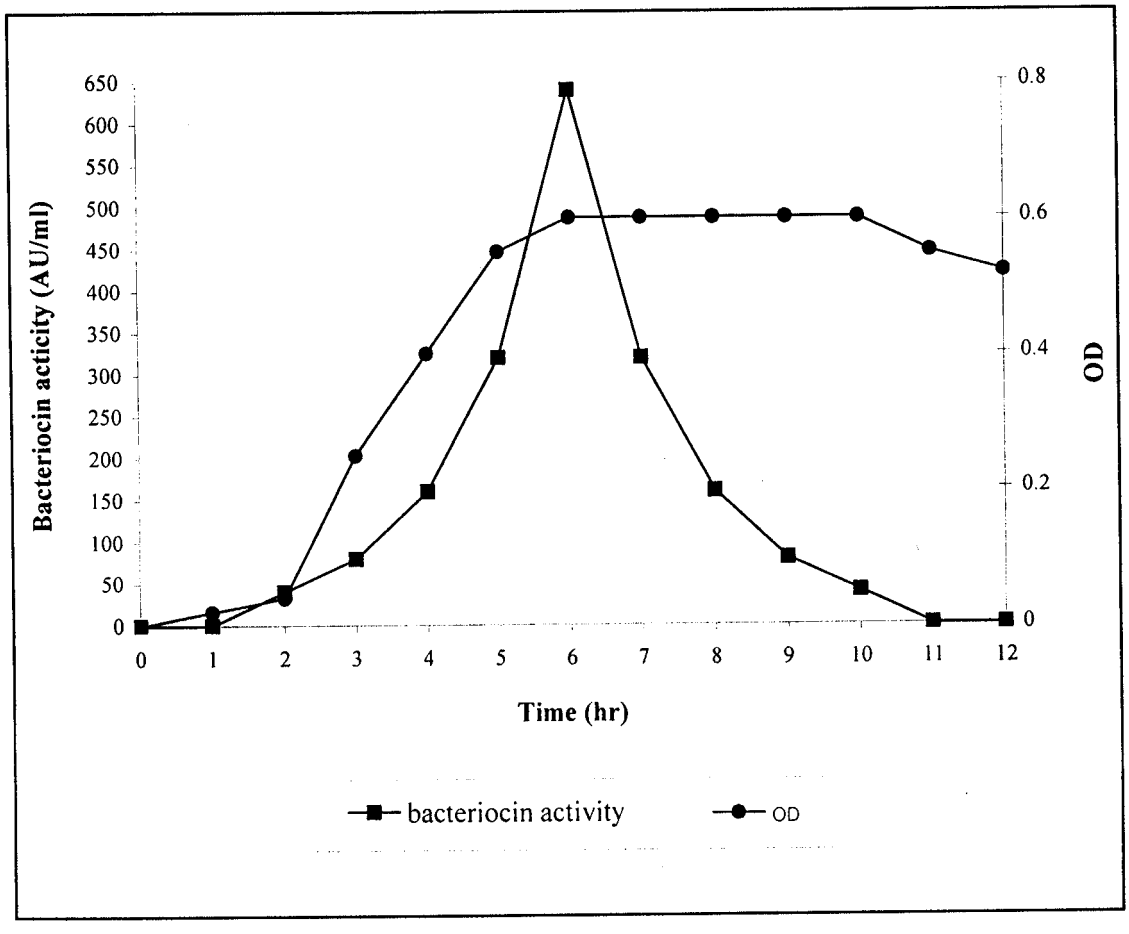
รูปที่ 2 การเจริญเติบโต และการสร้างแบคเทอริโอซินของ *L. mesenteroides* UBU1 ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส



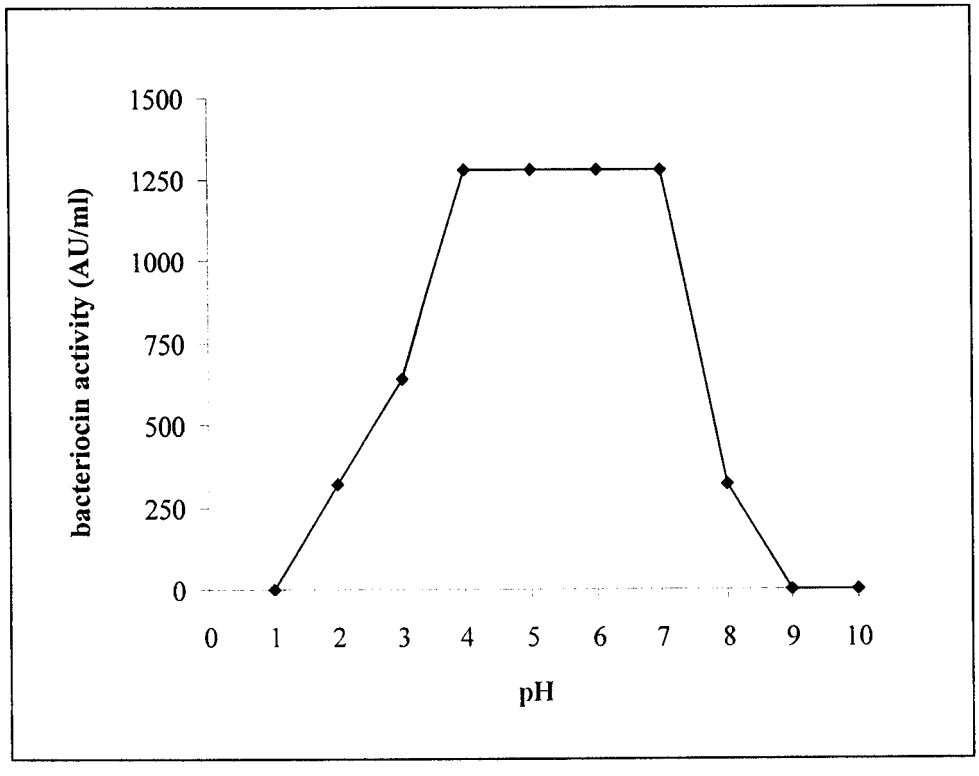
รูปที่ 3 การเจริญเติบโต และการสร้างแบคเทอริโอซินของ *L. mesenteroides* UBU1 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4 การเจริญเติบโต และการสร้างแบคเทอริโอซินของ *L. mesenteroides* UBU1 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส



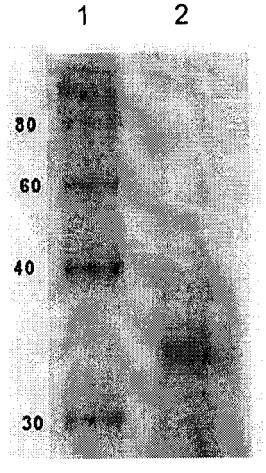
รูปที่ 5 การเจริญเติบโต และการสร้างแบคเทอริโอซินของ *L. mesenteroides* UBU1 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส



รูปที่ 6 ผลของค่า pH ต่อความสามารถของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. mesenteroides* UBU1 ในการยับยั้งการเจริญของ *L. mesenteroides* TISTR 473

การหาน้ำหนักโมเลกุลของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. mesenteroides* UBU1

จากการแยกแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. mesenteroides* UBU1ให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธีการของ Yang และคณะ (1992) และนำแบคเทอริโอซินดังกล่าวมาวิเคราะห์โดยวิธี sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) พบแถบโปรตีนหนึ่งแถบ ซึ่งมีขนาดประมาณ 35 kDa (รูปที่ 7)



รูปที่ 7 polyacrylamide gel ที่ได้จากการศึกษาแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. mesenteroides* UBU1

Lane 1 = โปรตีนมาตราฐาน (Step-View™ 20 kDa prestained protein size marker)

Lane 2 = แบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. mesenteroides* UBU1

(น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนแสดงในหน่วย kDa)

วิจารณ์ผลการทดลอง

Leuconostoc mesenteroides UBU1 ซึ่งเป็นแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่แยกได้ในห้องปฏิบัติการของภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี แบคทีเรียดังกล่าวมีความสามารถในการสร้างแบคเทอริโอซินไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้หลายสายพันธุ์ เช่น *L. mesenteroides* TISTR 473 และ *B. cereus* ATCC 11778 เป็นต้น จากรายงานที่ผ่านมาเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้ พบว่ามีจุลินทรีย์ใน genus *Leuconostoc* หลายสายพันธุ์ที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้ เช่น *Leuconostoc* MF215B ซึ่งสามารถสร้าง leucocin H_α และ leucocin H_β ได้ (Blom และคณะ 1999) *L. mesenteroides* Y105 ซึ่งสามารถสร้าง mesentericin Y105 และ mesentericin B105 ได้ (Hechard และคณะ 1999, Hechard และคณะ 1992) *L. mesenteroides* TA33a ซึ่งสามารถสร้าง leucocin A-TA33a leucocin B-TA33a และ leucocin C-TA33a ได้ (Papathanasopoulos และคณะ 1998) *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 ซึ่งสามารถสร้าง mesenterocin 52A และ mesenterocin 52B ได้ (Revol-Junelles และคณะ 1996, Mathieu และคณะ 1993) *L. paramesenteroides* ซึ่งสามารถสร้าง leuconocin S ได้ (Lewus และคณะ 1992) *L. carnosum* LA44A ซึ่งสามารถสร้าง carnocin ได้ (van Laack และคณะ 1992) *L. mesenteroides* UL5 ซึ่งสามารถสร้าง mesenteroicin 5 ได้ (Daba และคณะ 1991) และ *L. gelidum* ซึ่งสามารถสร้าง leuconocin A-UAL187 ได้ (Hastings และคณะ 1991) เป็นต้น

ถึงแม้ว่าแบคเทอริโอซินส่วนใหญ่จะมีคุณสมบัติร่วมที่เหมือนกัน คือ เป็นโปรตีนที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกับจุลินทรีย์ที่สร้างแบคเทอริโอซิน แต่แบคเทอริโอซินแต่ละชนิดก็จะมีคุณสมบัติบางอย่างที่เฉพาะตัว ซึ่งมีผลต่อการตัดสินใจนำแบคเทอริโอซินแต่ละชนิดไปใช้ประโยชน์ ดังนั้นการที่จะนำแบคเทอริโอซินชนิดใดชนิดหนึ่งไปใช้ประโยชน์อย่างมีประสิทธิภาพจึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาถึงคุณสมบัติต่าง ๆ ของแบคเทอริโอซินนั้น ๆ ก่อน เพื่อให้ได้ข้อมูลมาประกอบการกำหนดแนวทางการนำแบคเทอริโอซินไปใช้ประโยชน์ต่อไป การนำแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. mesenteroides* UBU1 ไปใช้ประโยชน์ ก็เช่นเดียวกัน จำเป็นที่จะต้องศึกษาคุณสมบัติของแบคเทอริโอซินดังกล่าวก่อน ซึ่งคุณสมบัติที่มักจะต้องศึกษา เช่น กลไกการทำงานของแบคเทอริโอซิน ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญ และการสร้างแบคเทอริโอซินของจุลินทรีย์ ผลของ pH ต่อความสามารถของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เป้าหมาย (target microorganism) และน้ำหนักโมเลกุลของแบคเทอริโอซิน เป็นต้น

จากการศึกษากลไกการทำงานของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. mesenteroides* UBU1 พบว่า แบคเทอริโอซินดังกล่าวมีผลทำให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable cells) ของ *L. mesenteroides* TISTR 473 ลดลง และทำให้ค่าการดูดกลืนแสง (optical density) ของเซลล์ของ *L. mesenteroides* TISTR 473 ที่แขวนลอยในสารละลาย phosphate buffer ลดลงด้วย (รูปที่ 1) จากผลการทดลองดังกล่าวทำให้สามารถสรุปได้ว่าแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. mesenteroides* UBU1 มีกลไกการทำงานในลักษณะที่ไปฆ่าเซลล์ของ *L. mesenteroides* TISTR 473 โดยทำให้เซลล์ที่ถูกฆ่าแตกสลาย (bacteriolytic mode of action) จากรายงานที่ผ่านมาพบว่ามีแบคเทอริโอซินหลายชนิดที่มีกลไกการทำงานคล้ายกับแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. mesenteroides* UBU1 ตัวอย่างเช่น plantaricin SIK-83 (Anderson และคณะ 1988) coagulin (Hyronimus และคณะ 1998) lactococcin R (Yildirim cและ Johnson 1998b) และ pediocin AcH (Bhunia และคณะ 1991) เป็นต้น

เมื่อทำการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของ *L. mesenteroides* UBU1 ที่เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ พบว่าแลคติคแอสิดแบคทีเรียดังกล่าวสามารถเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส ได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และ 25 องศาเซลเซียส (รูปที่ 2, 3, 4 และ 5) แต่จากการเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างแบคเทอริโอซินของ *L. mesenteroides* UBU1 ที่เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ พบว่าแลคติคแอสิดแบคทีเรียดังกล่าวสามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยค่า bacteriocin activity สูงสุดที่วัดได้เมื่อเลี้ยง *L. mesenteroides* UBU1 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 1280 AU/ml (รูปที่ 4) ในขณะที่ค่า bacteriocin activity สูงสุดที่วัดได้เมื่อเลี้ยง *L. mesenteroides* UBU1 ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส 25 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 640 AU/ml (รูปที่ 2, 3 และ 5) การสร้างแบคเทอริโอซินโดย *L. mesenteroides* UBU1 มีลักษณะคล้ายกับการสร้างแบคเทอริโอซินโดยแลคติคแอสิดแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ กล่าวคือ แบคเทอริโอซินจะเริ่มถูกสร้างเมื่อแบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินเริ่มเข้าสู่ระยะ exponential phase ของการเจริญเติบโต หลังจากนั้นแบคเทอริโอซินจะถูกสร้างเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนมีปริมาณสูงสุดเมื่อแบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินอยู่ในช่วงต้นของระยะ stationary phase ของการเจริญเติบโต ตัวอย่างของแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่มีการสร้างแบคเทอริโอซินในลักษณะดังกล่าว เช่น *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* (Rattanachaikunsopon และ Phumkhachorn, 2000) และ *Lactobacillus curvatus* IFPL105 (Casla และคณะ 1996) เป็นต้น

จากการศึกษาผลของค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ต่อความสามารถของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. mesenteroides* UBU1 ในการยับยั้งการเจริญของ *L. mesenteroides* TISTR 473 พบว่าแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. mesenteroides* UBU1 สามารถยับยั้งการเจริญของ *L. mesenteroides*

TISTR 473 ได้ในช่วง pH ที่ค่อนข้างกว้าง คือในช่วง pH ตั้งแต่ 2 ถึง 8 โดยแบคเทอริโอซินดังกล่าวจะทำงานได้ดีที่สุดที่ในช่วง pH ตั้งแต่ 4 ถึง 7 (รูปที่ 6) จากรายงานที่ผ่านมาพบว่ามีแบคเทอริโอซินหลายชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เป้าหมายได้ในช่วง pH ที่ค่อนข้างกว้าง ตัวอย่างเช่น plantaricin D ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เป้าหมายได้ในช่วง pH ตั้งแต่ 2 ถึง 8 (Franz และคณะ 1998) และ plantaricin KW 30 ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เป้าหมายได้ในช่วง pH ตั้งแต่ 2 ถึง 10 (Kelly และคณะ 1996) เป็นต้น

จากการทดลองเพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. mesenteroides* UBU1 พบว่า แบคเทอริโอซินดังกล่าวเป็นโปรตีนที่มีขนาดค่อนข้างใหญ่ โดยมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 35 kDa ซึ่งแตกต่างจากแบคเทอริโอซินโดยทั่วไปที่มักจะมีน้ำหนักโมเลกุลไม่เกิน 10 kDa จากผลการทดลองดังกล่าวอาจทำให้สามารถจัดจำแนกแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. mesenteroides* UBU1 ไว้ในกลุ่ม Class III bacteriocin ตามการจัดจำแนกแบคเทอริโอซินของ Klaenhammer (1993) เช่นเดียวกับแบคเทอริโอซินอีกหลายชนิด เช่น helveticin 51 ซึ่งถูกสร้างโดย *Lactobacillus helveticus* G51 (Bonade และคณะ 2001) helveticin J ซึ่งถูกสร้างโดย *Lactobacillus helveticus* 481 (Joerger และ Klaehammer 1986) และ lactacin B ซึ่งถูกสร้างโดย *Lactobacillus acidophilus* (Barefoot และ Klaehammer 1984, Barefoot และ Klaehammer 1983) เป็นต้น

สรุปผลการทดลอง

แบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Leuconostoc mesenteroides* UBU1 เป็นแบคเทอริโอซินที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 35 kDa และถูกสร้างได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยแบคเทอริโอซินจะมีปริมาณสูงสุดเมื่อ *L. mesenteroides* UBU1 อยู่ในช่วงต้นของระยะ stationary phase ของการเจริญเติบโต แบคเทอริโอซินดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญของ *L. mesenteroides* TISTR 473 ได้ดีในช่วง pH ตั้งแต่ 4 ถึง 7 โดยการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เป้าหมายมีลักษณะเป็นแบบ bacteriolytic mode of action

เอกสารอ้างอิง

Andersson RE, Daeschel MA and Hassan HM (1988) Antibacterial activity of plantaricin SIK-83, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. Biochimie 70, 381-390.

Balasubramanyam BV and Varadaraj MC (1998) Cultural conditions for the production of bacteriocin by a native isolate of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CFR 2028 in milk medium. J Appl Microbiol 84, 97-102.

Barefoot SF and Klaenhammer TR (1984) Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. Antimicrob Agents Chemother 26, 328-334.

Barefoot SF and Klaenhammer TR (1983) Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Appl Environ Microbiol 45, 1808-1815.

Bhunia AK, Johnson MC, Ray B and Kalchayanand N (1991) Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains. J Appl Bacteriol 70, 25-33.

Bhunia AK, Johnson MC and Ray B (1988) Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* H. J Appl Bacteriol 65, 261-268.

Blom H, Katla T, Holck A, Sletten K, Axelsson L and Holo H (1999) Characterization, production and purification of leucocin H, a two-peptide bacteriocin from *Leuconostoc* MF215B. Curr Microbiol 39, 43-48.

Bonade A, Murelli F, Vescovo M and Scolari G (2001) Partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus*. Lett Appl Microbiol 33, 153-158.

Braun V, Pilsl H and Grob P (1994) Colicins: structures, modes of action, transfer through membranes and evolution. Arch Microbiol 161, 199-206.

Casla D, Requena T and Gomez R (1996) Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from goat's milk and artisanal cheeses: characteristics of a bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* IFPL105. J Appl Bacteriol 81, 35-41.

Choi HJ, Lee HS, Her S, Oh DH and Yoon SS (1999) Partial characterization and cloning of leuconocin J, a bacteriocin produced by *Leuconostoc* sp. J2 isolated from the Korean fermented vegetable, Kimchi. J Appl Microbiol 86, 175-181.

Coventry MJ, Wan J, Gordon JB, Mawson RF and Hickey MW (1996) Production of brevicin 286 by *Lactobacillus brevis* VB 286 and partial characteriztion. J Appl Bacteriol 80, 91-98.

Daba H, Pandian S Gosselin JF Simard RE, Huang J and Lacroix C (1991) Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. Appl Environ Microbiol 57, 3450-3455.

Daeschel MA, Mckenney MC and Mcdonald LC (1990) Bacteriocidal acticity of *Lactobacillus plantarum* C-11. Food Microbiol 7, 91-98.

Eguchi T , Kaminaka K, Shima J, Kawamoto S, Mori K, Choi SH, Doi K, Ohmomo S and Ogata S (2001) Isolation and characterization of enterocin SE-K4 produced by thermophilic enterococci, *Enterococcus faecium* K-4. Biosci Biotechnol Biochem 65, 247-253.

Elegado FB, Kim WJ and Kwon DY (1997) Rapid purification, partial characterization, and antibacterial spectrum of the bacteriocin, pediocin AcM, from *Pediococcus acidilactici* M. Int J Food Microbiol 37, 1-11.

Flynn S, van Sinderen D, Thornton GM, Holo H, Nes IF and Collins JK (2002) Characterization of the genetic locus responsible for the production of ABP-118, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* UCC118. Microbiology 148, 973-984.

Franz CMAP, Du Toit M, Olasupo NA, Schillinger U and Holzapfel WH (1998) Plantaricin D, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* BFE 905 from read-to-eat salad. Lett Appl Microbiol 26, 231-235.

Geis A, Singh J and Teuber M (1983) Potential of lactic streptococci to produce bacteriocin. Appl Environ Microbiol 45, 205-211.

Green G, Dicks LMT, Bruggeman G, Vandamme EJ and Chikindas ML (1997) Pediocin PD-1, a bactericidal antimicrobial peptide from *Pediococcus damnosus* NCFB 1832. J Appl Microbiol 83, 127-132.

Gross E and Kiltz H (1973) The number and nature of α,β-unsaturated amino acids in subtilin. Biochem Biophys Res Commun 50, 559-565.

Harris LJ, Daeschel HA, Stiles MG and Klaenhammer TR (1989) Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. J Food Prot 52, 3784 - 3787.

Hastings JW, Sailer M, Johnson K, Roy KL, Vederas JC and Stiles ME (1991) Characterization of leuconocin A-UAL 187 and cloning of bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidium*. J Bacteriol 173, 7491-7500.

Henderson JT, Chopko AL and van Wassenaar PD (1992) Purification and primarystructure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1.0. Arch Biochem Biophys 295, 5-12.

Hechard Y, Derijard B, Letellier F and Cenatiempo Y (1992) Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-*Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. J Gen Microbiol 138, 2725-2731.

Hechard Y, Berjeaud JM and Cenatiempo Y (1996) Characterization of the *mes*B gene and expression of bacteriocins by *Leuconostoc mesenteroides* Y105. Curr Microbiol 39, 265-269.

Holo H, Nilssen O and Nes IF (1991) Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. J Bacteriol 173, 3879-3887.

Hyronimus B, Le Marrec C and Urdaci MC (1998) Coagulin, a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans* I4. J Appl Microbiol 85, 42-50.

Itoh T, Fujimoto Y, Kawai Y, Toba T and Saito T (1995) Inhibition of food-borne pathogenic bacteria by bacteriocins from *Lactobacillus gasseri*. Lett Appl Microbiol 21, 137-141.

Jack RW, Tagg JR and Ray B (1995) Bacteriocins of gram positive bacteria. Microbiol Rev 59, 171 -200.

Jack RW, Wan J, Gordon J, Harmark K, Davidson BE, Hillier AJ, Wettenhall REH and Hickey MW (1996) Characterization of the chemical and antimicrobial propeties of piscicolin 126, a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* JG126. Appl Environ Microbiol 62, 2897-2903.

Joerger MC and Klaenhammer TR (1986) Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. J Bacteriol 167, 439-446.

Kelly WJ, Asmundson RV and Huang CM (1996) Characterization of plantaricin KW 30, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. J Appl Bacteriol 81, 657-662.

Kim Ch, Ji GE and Ahn C (2000) Purification and molecular characteristic of a bacteriocin from *Pediococcus* sp. KCA1303-10 isolated from fermented flatfish. Food Sci Biotechnol 9, 270-276.

Klaenhammer TR (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol Rev 12, 39-85.

Klaenhammer TR (1988) Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochemic 70, 337-349.

Ko SH and Anh C (2000) Bacteriocin production by *Lactobacillus lactis* KCA2386 isolated from white kimchi. Food Sci Biotechnol 9, 263-269.

Lewus CB, Sun S and Montville TJ (1992) Production of an amylase-sensitive bacteriocin by an atypical *Leuconostoc paramesenteroides* strain. Appl Environ Microbiol 58, 143-149.

Lyon WJ and Glatz BA (1993) Isolation and purification of propionicin PLG-1, a bacteriocin produced by a strain of *Propionibacterium thoenii*. Appl Environ Microbiol 59, 83-88.

Mathieu F, Suwandhl LS, Rekhif N, Millier JB and Lefebvre G (1993) Mesenterocin 52, a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* ssp. mesenteroides FR52. J Appl Bacteriol 74, 372-379.

Mortvedt CI, Nissen-Meyer J, Stetten K and Nes IF (1991) Purification and amino acid sequence of lactocin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* L45. Appl Environ Microbiol 57, 1829-1834.

Muriana PM and Klaenhammer TR (1991) Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. Appl Environ Microbiol 57, 114-121.

Netz DJ, Pohl R, Beck-Sickinger AG, Selmer T, Pierik AJ, Bastos Mdo C and Sahl HG (2002) Biochemical characterisation and genetic analysis of aureocin A53, a new, atypical bacteriocin from *Staphylococcus aureus*. J Mol Biol 319, 745-756.

Netz DJ, Sahl HG, Marcolino R, dos Santos Nascimento J, de Oliveira SS, Soares MB, do Carmo de Freire Bastos M and Marcolino R (2001) Molecular characterisation of aureocin A70, a multi-peptide bacteriocin isolated from *Staphylococcus aureus*. J Mol Biol 311, 939-949.

Nielsen KW, Dickson JS and Crouse JD (1990) Use of bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat. Appl Environ Microbiol 58, 2142-2145.

Olasupo NA, Schillinger U, Narbad A, Dodd H and Holzapfel WH (1999) Occurrence of nisin Z production in *Lactococcus lactis* BFE 1500 isolated from wara, a traditional Nigerian cheese product. Int J Food Microbiol 53, 141-145.

Oscariz JC and Pisaborro AG (2000) Characterization and mechanism of action of cerein 7, a new bacteriocin produced by *Bacillus cereus* Bc7. J Appl Microbiol 89, 1-10.

Osmanagaoglu O, Beyatli Y, Gunduz U and Sacilik SC (2000) Analysis of the genetic determinant for production of the pediocin P of *Pediococcus pentosaceus* Pep1. J Basic Microbiol 40, 233-241.

Papathanasopoulos MA, Dykes GA, Revol-Junelles AM, Delfour A, von Holy A and Hastings JW (1998) Sequence and structural relationships of leucocins A-, B-, C-Ta33a from *Leuconostoc mesenteroides* TA33a. Microbiol 144, 1343-1348.

Parente E and Hill C (1992) Characterzation of enterocin 1146, a bacteriocin from *Enterococcus faecium* inhibitory to *Listeria monocytogenes*. J Food Prot 55, 497-502.

Piard JC, Muriana PM, Desmazeaud MJ and Klaenhammer TR (1992) Purification and partial characterization of lacticin 481, a lanthionine-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481. Appl Environ Microbiol 58, 279-284.

Rattanachaikunsopon P and Phumkhachorn P (2000) A bacteriroduced by *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* isolated from Thai fermented foods. ScienceAsia 26, 195-200.

Reknifn, Atrin A and Lefebure G (1995) Activity of plantaricin SA6, a bacteriocin produced by *Lactobacillus Plantarum* SA6 isolated from fermented sausage. J Appl Bacteriol 78, 349-358.

Revol-Junelles AM, Mathis R, Krier F, Fleury Y, Delfour A and Lefebvre G (1996) *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 synthesizes two distinct bacteriocins. Lett Appl Microbiol 23, 120-124.

Schillinger U and Lucke FK (1989) Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Appl Environ Microbiol 55, 1901-1906.

Shaw BG and Harding CD (1989) *Leuconostoc gelidum* sp. nov. and *Leuconostoc carnosum* sp. nov. from chill-stored meats. Int J Syst Bacteriol 39, 217-223.

Smajs D, Pilsl H and Braun V (1997) Colicin U, a novel colicin produced by *Shigella boydii*. J Bacteriol 179, 4919-4928.

Spelhaug SR and Harlander SA (1989) Inhibition of Food - borne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*. J Food Prot 52, 856-862.

Stoffels G, Nes IF and Gudmundsdottir A (1992) Isolation and properties of a bacteriocin-producing *Carnobacterium piscicola* isolated from fish. J Appl Bacteriol 73, 309-316.

Tagg JR, Dajani AS and Wannamarker LW (1976) Bacteriocin of gram positive bacteria. Bacteriol Rev 40, 722-756.

Tahara T and Kanatani K (1996) Isolation, partial characteization and mode of action of acidocin J 1229, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* JCM 1229. J Appl Bacteriol 81, 669-677.

Tahara T, Oshimura M, Umezawa C and Kanatani K (1996) Isolation, partial characterization and mode of action of acidocin J1132, a two-component bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* JCM1132. Appl Environ Microbiol 62, 892-897.

Tichaczek PS, Nissen-Meyer J, Nes IF, Vogel RF and Hammes WP (1992) Characterization of the bacteriocins curvacin A and sakacin P produced by *Lactobacillus curvatus* LTH1174 and *L. sake* LTH673. Syst Appl Microbiol 15, 460-468.

Van Laack RLJM, Schillinger U and Holzapfel WH (1992) Characterization and partial purification of a bacteriocin produced by *Leuconostoc carnosum* LA44A. Int J Food Microbiol 16, 183-195.

Viejo MB, Gargallo D, Ferrer S, Enfedaque J and Regue M (1992) Cloning and DNA sequencing analysis of a bacteriocin gene of *Serratia marcescens*. J Gen Microbiol 138, 1737-1743.

Yildirim Z and Johnson MG (1998a) Characterization and antimicrobial spectrum of bifidocin B, a bacteriocin produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. J Food Prot 61, 47-51.

Yildirim Z and Johnson MG (1998b) Detection and characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* R isolated from radish. Let Appl Microbiol 26, 297-304.

Yang R, Johnson MC and Ray B (1992) Novel method to extract large amounts of bacteriocins [illegible] ctic acid bacteria. Appl Environ Microbiol 58, 3355-3359.