รายงานผลงานวิจัย

เรื่อง

การศึกษาคุณสมบัติในระดับโมเลกุลของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Lactobacillus lactis* PS 21

Studies on molecular properties of a bacteriocin produced by *Lactobacillus lactis* PS 21

โดย

นายพงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ซึ่งได้รับเงินทุนสนับสนุนการวิจัยประจำปี 2546 จากสภาวิจัยแห่งชาติ

คำนำ

รายงานฉบับนี้เป็นรายงานผลงานวิจัยเรื่อง "การศึกษาคุณสมบัติในระดับโมเลกุลของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Lactobacillus lactis* PS 21 (Studies on molecular properties of a bacteriocin produced by *Lactobacillus lactis* PS 21)" ซึ่งได้รับเงินทุนสนับสนุนการวิจัยประจำปี 2544 จากสภาวิจัยแห่งชาติ งานวิจัยดังกล่าวนี้ได้ดำเนินการโดยมี นายพงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ เป็นหัวหน้าโครงการ และมี นางปาริชาติ พุ่มขจร เป็นผู้ร่วมโครงการ

ขอขอบคุณสภาวิจัยแห่งชาติ และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีที่สนับสนุนให้งานวิจัยดังกล่าวดำเนินไปได้ด้วยดีตลอดโครงการ

(นายพงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ)
หัวหน้าโครงการ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	1
บทนำ	2
การตรวจเอกสาร	4
วัสดุและวิธีการทดลอง	24
ผลการทดลอง	29
วิจารณ์ผลการทดลอง	33
สรุปผลการทดลอง	35
เอกสารอ้างอิง	36

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 ตัวอย่างของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่ไม่ใช่แลคติคแอสิดแบคทีเรีย 5

2 ตัวอย่างของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแลคติคแอสิดแบคทีเรีย 6

3 ตัวอย่างของแบคเทอริโอซินในกลุ่มต่าง ๆ ตามการจำแนกแบคเทอริโอซินโดย Jack และคณะ 11

4. ตัวอย่างของแบคเทอริโอซินที่ถูกจัดอยู่ใน group IIc bacteriocins ตามการจำแนก แบคเทอริโอซินของ Klaenhammer โดย Jack และคณะ 15

5 สารเคมีที่ช่วยทำให้แบคทีเรียสูญเสีย plasmid (curing agents) ที่นิยมใช้ และกลไก การทำงานของสารเคมีดังกล่าว 19

6 เปอร์เซนต์การเกาะของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. lactis* PS 21 บนผิวเซลล์ของ แบคทีเรียดังกล่าว (percentage of bacteriocin adsorbed) ที่ค่า pH ต่าง ๆ 29

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1 เปอร์เซนต์การเกาะของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. lactis* PS 21 บนผิวเซลล์ของแบคทีเรียดังกล่าว (percentage of bacteriocin adsorbed) ที่ค่า pH ต่าง ๆ 29

2 polyacrylamide gel ที่ได้จากการวิเคราะห์แบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. lactis* PS 21 31

3 แถบ DNA ที่ได้จากการสกัด plasmid จาก *L. lactis* SK 2.1 และ *L. lactis* PS 21 32

บทนำ

แบคเทอริโอซินเป็นสารประกอบประเภทโปรตีนที่สร้างโดยแบคทีเรีย และมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้อย่างจำเพาะ (Jack และคณะ 1995, Klaenhammer 1988, Tagg และคณะ 1976) แบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้มีหลายชนิด เช่น *Bacillus cereus* (Oscariz และ Pisaborro 2000) *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 จากการค้นพบว่าแบคเทอริโอซินหลายชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย (Daeschel 1989) และจุลินทรีย์ก่อโรค (Nielsen และคณะ 1990, Harris และคณะ 1989, Spelhaug และ Harlander 1989) ทำให้มีนักวิทยาศาสตร์จำนวนมากหันมาให้ความสนใจในการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาแบคเทอริโอซินดังกล่าวให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารและในทางการแพทย์

ปัญหาหนึ่งที่ทำให้เกิดข้อจำกัดในการนำแบคเทอริโอซินไปใช้ประโยชน์ ไม่ว่าจะเป็นการนำไปใช้ในการศึกษาต่อ หรือการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและในทางการแพทย์ คือ การขาดข้อมูลเกี่ยวกับคุณสมบัติในระดับโมเลกุล (molecular properties) ของแบคเทอริโอซิน เช่น น้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) ของแบคเทอริโอซิน ลำดับกรดอมิโน (amino acid sequence) ของแบคเทอริโอซิน ตำแหน่งของยีนสำหรับแบคเทอริโอซิน (bacteriocin gene) ลำดับเบส (nucleotide sequence) ของยีนสำหรับแบคเทอริโอซิน เป็นต้น นอกจากข้อมูลต่าง ๆ เหล่านี้จะช่วยทำให้สามารถนำแบคเทอริโอซินไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้นแล้ว ข้อมูลดังกล่าวยังอาจช่วยทำให้การนำแบคเทอริโอซินไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและในทางการแพทย์มีความปลอดภัยยิ่งขึ้น ตัวอย่างเช่น การทราบว่าแบคเทอริโอซินมีส่วนประกอบอะไร และมีโครงสร้างเป็นอย่างไร อาจทำให้ทราบว่าแบคเทอริโอซินมีความปลอดภัยมากน้อยเพียงใดต่อผู้บริโภค เป็นต้น

Lactobacillus lactis PS 21 เป็นแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่แยกได้ในห้องปฏิบัติการของภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี แลคติคแอสิดแบคทีเรียดังกล่าวสามารถสร้างแบคเทอริโอซินไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้หลายชนิด เช่น *Bacillus cereus* ATCC 11778 *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Streptococcus pneumoniae* P. 785 และ *Streptococcus pyogenes* DMS 3393

เป็นต้น ด้วยเหตุนี้แบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. lactis* PS 21 จึงเป็นแบคเทอริโอซินที่น่าสนใจในการนำไปพัฒนาเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและในทางการแพทย์ต่อไป

ในการศึกษานี้มุ่งเน้นที่การศึกษาคุณสมบัติในระดับโมเลกุลของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Lactobacillus lactis* PS 21 ซึ่งได้แก่ การหาน้ำหนักโมเลกุลของแบคเทอริโอซินดังกล่าว และการหาตำแหน่งของยีนสำหรับแบคเทอริโอซินดังกล่าว ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้จะเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่สำคัญที่จะนำไปสู่การศึกษาคุณสมบัติในระดับโมเลกุลของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. lactis* PS 21 ในขั้นต่อไป เช่น การหาลำดับกรดอมิโนของแบคเทอริโอซิน การหาลำดับเบสของยีนสำหรับแบคเทอริโอซิน และการศึกษาการควบคุมการแสดงออกของยีนสำหรับแบคเทอริโอซิน (regulation of bacteriocin gene expression) เป็นต้น

ตรวจเอกสาร

แบคเทอริโอซิน (bacteriocins)

แบคเทอริโอซินเป็นสารที่สร้างจากแบคทีเรียและมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นได้อย่างจำเพาะ (Jack และคณะ 1995, Klaenhammer 1988, Tagg และคณะ 1976) ถึงแม้ว่าแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียต่างชนิดกันมักมีคุณสมบัติทางเคมีและทางชีวภาพที่แตกต่างกัน เช่น มีมวลโมเลกุลที่แตกต่างกัน มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน และมีกลไกการทำลายจุลินทรีย์เป้าหมาย (target microorganism) ที่แตกต่างกัน เป็นต้น แต่สารที่จะถูกจัดว่าเป็นแบคเทอริโอซินต้องมีคุณสมบัติหลัก ๆ ที่เหมือนกันคือเป็นโปรตีนที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้อย่างจำเพาะ ซึ่งโดยปกติแล้วแบคเทอริโอซินมักจะไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่อยู่ในจีนัส (genus) หรือสปีชีส์ (species) ที่ใกล้เคียงกับจีนัส หรือสปีชีส์ของจุลินทรีย์ที่สร้างแบคเทอริโอซิน

ความสนใจในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับแบคเทอริโอซินเริ่มมีมากขึ้นเมื่อมีการพบว่าแบคเทอริโอซินบางชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุทำให้อาหารเน่าเสีย (Daeschel 1989) และแบคทีเรียก่อโรคซึ่งปะปนอยู่ในอาหาร (Nielsen และคณะ 1990, Harris และคณะ 1989, Spelhaug และ Harlander 1989) นอกจากนี้แล้วงานวิจัยที่แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการนำแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้ไปใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น (starter culture) ของการหมักในอุตสาหกรรมอาหารต่าง ๆ (Giraffa และคณะ 1994, Campanini และคณะ 1993, Roberts และ Zottola 1993, Maiser-Patin และคณะ 1992) ก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้นักวิทยาศาสตร์จำนวนมากหันมาให้ความสนใจในการศึกษาแบคเทอริโอซิน

ในปัจจุบันมีแบคเทอริโอซินที่ถูกค้นพบแล้วเป็นจำนวนมาก ซึ่งแบคเทอริโอซินเหล่านี้ถูกสร้างโดยแบคทีเรียที่ต่างชนิดกัน ตารางที่ 1 แสดงตัวอย่างของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่ไม่ใช่แลคติคแอสิดแบคทีเรีย และตารางที่ 2 แสดงตัวอย่างของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแลคติคแอสิดแบคทีเรีย

Producer organisms	Bacteriocins	References
Bacillus sp.		
B. polyfermenticus	Polyfermenticin SCD	Lee และคณะ 2001
B. thuringiensis EMG1.7	Thuricin 7	Cherif และคณะ 2001
B. cereus Bc7	Cerein 7	Oscariz และ Pisaborro 2000
B. coagulans I_1	Coagulin	Hyronimus และคณะ 1998
B. megaterium 216	Megacin A-216	von Tersch และ Carlton 1983
B. subtilis	Subtilin	Gross และ Kiltz 1973
Escherichia sp.		
E. coli	Colicins	Braun และคณะ 1994
Serratia sp.		
S. marcescens N28b	Bacteriocin 28b	Viejo และคณะ 1992
Shigella sp.		
S. boydii	Colocin U	Smajs และคณะ 1997
Staphylococcus sp.		
S.aureus	Aureocin A53	Netz และคณะ 2002
S.aureus	Aureocin A70	Netz และคณะ 2001
S.warneri ISK-1	Nukacin ISK-1	Sashihara และคณะ 2000
S.aureus AB201	Bac 201	Iqbal และคณะ 1999
S.aureus KSI1829	Bac 1829	Crupper และคณะ 1997
S. epidermidis	Pep5	Kellner และคณะ 1989
S. gallinarum	Gallidermin	Kellner และคณะ 1988
S. epidermidis	Epidermin	Allgaier และคณะ 1986
Xanthomonas sp.		
X. campestris pv. glycines 8ra	Glycinecin A	Heu และคณะ 2001

ตารางที่ 1 ตัวอย่างของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่ไม่ใช่แลคติคแอสิดแบคทีเรีย

Producer organisms	Bacteriocins	References
Bifidobacterium sp.		
B. bifidum NCFB1454	Bifidocin B	Yildrim และ Johnson 1998a
Brevibacterium sp.		
B. linens	Linecin A	Kato และคณะ 1991
Carnobacterium sp.		
C. divergens	Divercin VH1	Metivier และคณะ 2000
C. piscicola JG126	Piscicola 126	Jack และคณะ 1996
C. piscicola V1	Piscicocin V1a	Bhugaloo-Vial และคณะ 1996
C. piscicola V1	Piscicocin V1b	Bhugaloo-Vial และคณะ 1996
C. divergens LV13	Divergicin A	Worobo และคณะ 1995
C. piscicola UI49	Carnocin UI49	Stoffels และคณะ 1992
C. piscicola LV61	Piscicolin 61	Schillinger และ Holzapfel 1990
C. piscicola LV17A	Carnobacteriocin A	Ahn และ Stiles 1990
C. piscicola LV17B	Carnobacteriocin B	Ahn และ Stiles 1990
Enterococcus sp.		
E. faecalis K-4	Enterocin SE-K4	Eguchi และคณะ 2001
E. gallinarum	Enterocin 012	Jennes และคณะ 2000
E. faecium DPC1146	Enterocin A	O'Keeffe และคณะ 1999
E. faecalis EJ97	Enterocin EJ97	Galvez และคณะ 1998
E. facium L50	Enterocin L50A	Cintas และคณะ 1998
E. facium L50	Enterocin L50B	Cintas และคณะ 1998
E. faecium P13	Enterocin P	Cintas และคณะ 1997
E. faecium T136	Enterocin B	Casaus และคณะ 1997
E. faecalis INIA4	Enterocin 4	Joosten และคณะ 1996
E. faecium DPC1146	Enterocin 1146	Parente และ Hill 1992
E. faecalis subsp. *liquefaciens* S-48	Bc-48	Lopez-Lara และคณะ 1991
E. faecalis subsp. *liquefaciens* S-48	AS-48	Galvez และคณะ 1989
E. faecalis E-1	Streptocin E-1	Brock และคณะ 1963

ตารางที่ 2 ตัวอย่างของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแลคติคแอสิดแบคทีเรีย

Producer organisms	Bacteriocins	References
Lactobacillus sp.		
L. salivarius subsp. *salivarius* UCC118	ABP-118	Flynn และคณะ 2002
L. helveticus G51	Helveticin 51	Bonade และคณะ 2001
L. lactis KCA2386	Lactococcin K2386	Ko และ Anh 2000
L. plantarum BFE905	Plantaricin D	Franz และคณะ 1998
L. plantarum NCIM2084	Plantaricin LP84	Suma และคณะ 1998
L. brevis SB27	Brevicin 27	Benoit และคณะ 1997
L. salivarius subsp. *salicinius* T140	Salivacin 140	Arihara และคณะ 1996
L. brevis VB286	Brevicin 286	Coventry และคณะ 1996
L. plantarum KW30	Plantaricin KW30	Kelly และคณะ 1996
L. acidophilus JCM1229	Acidocin J1229	Tahara และ Kanatani 1996
L. acidophilus JCM1132	Acidocin J1132	Tahara และคณะ 1996
L. acidophilus M46	Acidocin B	Leer และคณะ 1995
L. plantarum C11	Plantaricin A	Diep และคณะ 1994
L. curvatus FS47	Curvaticin FS47	Garver และ Muriana 1994
L. sake Lb674	Sakacin 674	Holck และคณะ 1994
L. plantarum LPCO10	Plantaricin S	Jimnez-Daz และคณะ 1993
L. plantarum LPCO10	Plantaricin T	Jimnez-Daz และคณะ 1993
L. bavaricus MI401	Bavaricin A	Larsen และคณะ 1993
L. curvatus LTH1174	Curvacin A	Tichaczek และคณะ 1992
L. sake LTH673	Sakacin P	Tichaczek และคณะ 1992
L. lactis subsp. *cremoris* 9B4	Lactococcin A	van Belkum และคณะ 1992
L. lactis subsp. *cremoris* 9B4	Lactococcin B	van Belkum และคณะ 1992
L. sake L45	Lactocin S	Mortvedt และคณะ 1991
L. acidophilus 11088	Lactacin F	Muriana และ Klaenhammer 1991

ตารางที่ 2 ตัวอย่างของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแลคติคแอสิดแบคทีเรีย (ต่อ)

Producer organisms	Bacteriocins	References
Lactobacillus sp.		
L. acidophilus LAPT 1060	Acidophilucin A	Toba และคณะ 1991a
L. delbrueckii subsp. *lactis*	Lacticin	Toba และคณะ 1991b
L. casei	Caseicin 80	Rammelsberg และ Radler 1990
L. sake Lb706	Sakacin A	Schillinger และ Lucke 1989
L. plantarum NCDO 1193	Plantaricin B	West และ Warner 1988
L. helveticus 481	Helveticin J	Joerger และ Klaenhammer 1986
L. acidophilus N2	Lactacin B	Barefoot และ Klaenhammer 1984
		Barefoot และ Klaenhammer 1983
L. helveticus LP27	Lactocin 27	Upreti และ Hindsdill 1975
Lactococcus sp.		
L. lactis subsp. *lactis* DPC3147	Lacticin 3147	Ryan และคณะ 1998
L. lactis subsp. *cremoris* R	Lactococcin R	Yildirim และ Johnson 1998b
L. lactis subsp. *lactis* pv. diacetylactis UL720	Diacetin B	Ali และคณะ 1995
L. lactis subsp. *lactis* LMG2081	Lactococcin Gα	Nissen-Meyer และคณะ 1992
L. lactis subsp. *lactis* LMG2081	Lactococcin Gβ	Nissen-Meyer และคณะ 1992
L. lactis subsp. *lactis* bv. *Diacetylactis* WM4	Lactococcin A	Stoddard และคณะ 1992
L. lactis subsp. *lactis* bv. *Diacetylactis* WM4	Lactococcin B	Stoddard และคณะ 1992
L. lactis subsp. *lactis* CNRZ481	Lacticin 481	Piard และคณะ 1992
L. lactis subsp. *cremoris* 9B4	Lactococcin A	van Belkum และคณะ 1992
L. lactis subsp. *cremoris* 9B4	Lactococcin B	van Belkum และคณะ 1992
L. lactis subsp. *cremoris* LMG2130	Lactococcin A	Holo และคณะ 1991
L. lactis subsp. *cremoris* 9B4	Lactococcin M	van Belkum และคณะ 1991
L. lactis subsp. *cremoris* 9B4	Lactococcin N	van Belkum และคณะ 1991
L. lactis subsp. *cremoris* 346	Diplococcin 346	Davey 1981
L. lactis subsp. *lactis*	Nisin	Hurst 1981
L. lactis	Lactostrepcins	Kozak และคณะ 1978
		Kozak และคณะ 1977

ตารางที่ 2 ตัวอย่างของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแลคติคแอสิดแบคทีเรีย (ต่อ)

Producer organisms	Bacteriocins	References
Leuconostoc sp.		
L. mesenteroides subsp. *mesenteroides* FR52	Mesenterocin 52	Mathieu และคณะ 1993
L. mesenteroides Y105	Mesentericin Y105	Hechard และคณะ 1992
L. paramesenteroides	Leuconocin S	Lewus และคณะ 1992
L. mesenteroides UL5	Mesenteroicin 5	Daba และคณะ 1991
L. gelidium	Leuconocin A-UAL187	Hastings และคณะ 1991
Pediococcus sp.		
P. sp. KCA1303-10	Pediocin K1	Kim และคณะ 2000
P. pentosaceus Pep1	Pediocin P	Osmanagaoglu และคณะ 2000
P. acidilactici M	Pediocin AcM	Elegado และคณะ 1997
P. pentosaceus FBB61	Pediocin A	Piva และ Headon 1994
P. acidilactici H	Pediocin AcH	Bhunia และคณะ 1988
P. acidilactici PAC1.0	Pediocin PA-1	Pucci และคณะ 1988
Propionobacterium sp.		
P. thoenii	Propionicin PLG-1	Lyon และ Glatz 1993
Streptococcus sp.		
S. mutans	Mutacin 1140	Hillman และคณะ 1998
S. pyogenes FF22	SA-FF22	Jack และคณะ 1994
S. thermophillus Sfi13	Thermophilin 13	Marciset และ Mollet 1993
S. cremoris 346	Diplococcin	Davey 1981

ตารางที่ 2 ตัวอย่างของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแลคติคแอสิดแบคทีเรีย (ต่อ)

การจำแนกแบคเทอริโอซิน (Classification of bacteriocins)

ในการจำแนกแบคเทอริโอซิน นักวิทยาศาสตร์มักแยกพิจารณาแบคเทอริโอซินที่ถูกสร้างโดยแบคทีเรียแกรมบวก (gram positive bacteria) ออกจากแบคเทอริโอซินที่ถูกสร้างโดยแบคทีเรียแกรมลบ (gram negative bacteria) ดังนั้นในที่นี้จึงจะกล่าวถึงการจำแนกแบคเทอริโอซินออกเป็น 2 หัวข้อ คือ การจำแนกแบคเทอริโอซินที่ถูกสร้างโดยแบคทีเรียแกรมบวก และ การจำแนกแบคเทอริโอซินที่ถูกสร้างโดยแบคทีเรียแกรมลบ

การจำแนกแบคเทอริโอซินที่ถูกสร้างโดยแบคทีเรียแกรมบวก (Classification of bacteriocins produced by gram posistive bacteria)

การจำแนกแบคเทอริโอซินที่ถูกสร้างโดยแบคทีเรียแกรมบวกสามารถทำได้หลายวิธี ขึ้นอยู่กับเกณฑ์ที่ใช้ในการจำแนก เช่น สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซิน (bacteriocin-producing strains) มวลโมเลกุล (molecular mass) ของแบคเทอริโอซิน โครงสร้างทางเคมี (chemical structure) ของแบคเทอริโอซิน และกลไกการทำงาน (mode of action) ของแบคเทอริโอซิน เป็นต้น (Ennahar และคณะ 2000, Jack และคณะ 1995, Klaenhammer 1993, Kolter และ Moreno 1992, Tagg และคณะ 1976)

Jack และคณะ (1995) อาศัยการมี disulfide bond และ monosulfide bond เป็นเกณฑ์ในการจำแนกแบคเทอริโอซินที่ถูกสร้างโดยแบคทีเรียแกรมบวก จากเกณฑ์ดังกล่าวทำให้ Jack และคณะสามารถจำแนกแบคเทอริโอซินได้เป็น 4 กลุ่ม คือ

1. กลุ่มที่มีกรดอมิโนที่ถูกดัดแปลงหลังจากกระบวนการ translation (posttranslationally modified amino acid) ซึ่งได้แก่ dehydroalanine dehydrobutirine lanthionine และ β-methyl-lanthionine Jack และคณะ เรียกแบคเทอริโอซินกลุ่มนี้ว่า lantibiotics ตัวอย่างของแบคเทอริโอซินในกลุ่มนี้แสดงไว้ในตารางที่ 3

2. กลุ่มที่มี disulfide bond อย่างน้อย 1 พันธะ Jack และคณะ เรียกแบคเทอริโอซินกลุ่มนี้ว่า cystibiotics ตัวอย่างของแบคเทอริโอซินในกลุ่มนี้แสดงไว้ในตารางที่ 3

3. กลุ่มที่มี thiol group (-SH group) 1 กลุ่ม Jack และคณะ เรียกแบคเทอริโอซิน กลุ่มนี้ว่า thiolbiotics ตัวอย่างของแบคเทอริโอซินในกลุ่มนี้แสดงไว้ในตารางที่ 3

4. กลุ่มที่ไม่มีกรดอมิโน cysteine ตัวอย่างของแบคเทอริโอซินในกลุ่มนี้แสดงไว้ในตารางที่ 3

Bacteriocins	Molecular mass (kDa)	Numbers of amino acids	Producer organisms
Lantibiotics			
Actagardine	1.9	19	*Actinoplanes* spp.
Ancovenin	2.0	19	*Streptomyces* spp.
Cinnamycin	2.0	19	*Streptomyces cinnamoneus*
Duramycin	2.0	19	*Streptomyces cinnamoneus*
Epidermin	2.2	22	*Staphylococcus epidermidis*
Gallidermin	2.2	22	*Staphylococcus gallinarum*
Lanthiopeptin	2.0	19	*Streptoverticullium cinnamoneus*
Mersacidin	1.8	19	*Bacillus* sp.
Nisin	3.4	34	*Lactococcus lactis*
Pep5	3.5	34	*Staphylococcus epidermidis*
Subtilin	3.3	32	*Bacillus subtilis*
Cystibiotics			
Pediocin AcH	4.6	44	*Pediococcus acidilactici* H
Pediocin PA-1	4.6	44	*Pediococcus acidilactici* PAC1.0
Leucocin A-UAL187	3.9	37	*Leuconostoc gelidium*
Mesentericin Y105	3.8	37	*Leuconostoc mesenteroides* Y105
Sakacin A	4.3	41	*Lactobacillus sake* Lb706
Sakacin P	4.4	43	*Lactobacillus sake* LTH673
Lactacin F	5.6	57	*Lactobacillus acidophilus* 11088
Carnobacteriocin A	5.1	53	*Carnobacterium piscicola* LV17A
Cerein 7	4.9	56	*Bacillus cereus* Bc7

ตารางที่ 3 ตัวอย่างของแบคเทอริโอซินในกลุ่มต่าง ๆ ตามการจำแนกแบคเทอริโอซินโดย Jack และคณะ

Bacteriocins	Molecular mass (kDa)	Numbers of amino acids	Producer organisms
Thiolbiotics			
Lactococcin B	5.3	47	*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 9B4
			Lactococcus lactis subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* WM4
No cysteine			
Lactococcin A	5.8	54	*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 9B4
			Lactococcus lactis subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* WM4
			Lactococcus lactis subsp. *cremoris* LMG2130
Lactococcin M	4.3	48	*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 9B4
Lactococcin N	4.4	47	*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 9B4
Lactococcin Gα	4.3	39	*Lactococcus lactis* subsp.*lactis* LMG2081
Lactococcin Gβ	4.1	35	*Lactococcus lactis* subsp.*lactis* LMG2081

ตารางที่ 3 ตัวอย่างของแบคเทอริโอซินในกลุ่มต่าง ๆ ตามการจำแนกแบคเทอริโอซินโดย Jack และคณะ (ต่อ)

Klaenhammer (1993) อาศัยมวลโมเลกุล (molecular mass) การทนต่อความร้อน (thermostability) การไวต่อเอนไซม์ต่าง ๆ (enzyme sensitivity) การมีกรดอมิโนที่ถูกดัดแปลงหลังจากกระบวนการ translation และกลไกการทำงาน (mode of action) เป็นเกณฑ์ในการจำแนกแบคเทอริโอซินที่ถูกสร้างโดยแบคทีเรียแกรมบวก จากเกณฑ์ดังกล่าวทำให้ Klaenhammer สามารถจำแนกแบคเทอริโอซินได้เป็น 4 กลุ่ม คือ class I bacteriocins class II bacteriocins classIII bacteriocins และ class IV bacteriocins

Class I bacteriocins

Class I bacteriocins ประกอบด้วยแบคเทอริโอซินที่ถูกจัดเป็น lantibiotics (ตามการจำแนกแบคเทอริโอซินของ Jack และคณะ) และมีมวลโมเลกุลตั้งแต่ 1,959 Da (มวลโมเลกุลของ duramycin) ถึง 4,635 Da (มวลโมเลกุลของ carnocin UI 49) แบคเทอริโอซินในกลุ่มนี้สามารถจำแนกออกได้อีกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ group Ia bacteriocins และ group Ib bacteriocins โดยอาศัยโครงสร้าง (structure) ของแบคเทอริโอซิน และ ประจุ (charge) ของแบคเทอริโอซินเป็นเกณฑ์ในการจำแนก

group Ia bacteriocins

group Ia bacteriocins ประกอบด้วยแบคเทอริโอซินที่มีรูปร่างเป็นเกลียว (screw-shaped) และมีประจุสุทธิเป็นบวก (cationic) แบคเทอริโอซินในกลุ่มย่อยนี่มักทำให้เกิดรู (pore) ที่เยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ของเซลล์เป้าหมาย (target cell) จำนวนของกรดอมิโนที่ถูกดัดแปลงหลังจากกระบวนการ translation ของแบคเทอริโอซินในกลุ่มย่อยนี้แตกต่างกันไปตามแต่ชนิดของแบคเทอริโอซิน ตัวอย่างเช่น pep5 มีกรดอมิโนที่ถูกดัดแปลงหลังจากกระบวนการ translation จำนวน 3 ตัว (Reis และคณะ 1994) epidermin มีกรดอมิโนที่ถูกดัดแปลงหลังจากกระบวนการ translation จำนวน 4 ตัว (Allgaier และคณะ 1986) nisin (Hurst 1978) และ subtilin (Banerjee และ Hansen 1988) มีกรดอมิโนที่ถูกดัดแปลงหลังจากกระบวนการ translation จำนวน 5 ตัว เป็นต้น

group Ib bacteriocins

group Ib bacteriocins ประกอบด้วยแบคเทอริโอซินที่มีรูปร่างกลม (globular shape) และมีประจุสุทธิเป็นลบ (anionic) หรือเป็นกลาง (neutral) ตัวอย่างของแบคเทอริโอซินในกลุ่มย่อยนี้ เช่น mersacidin (Chatterjee และคณะ 1992) actagardin (Jung 1991) cinnamycin (Kaletta และคณะ 1991) และ mutacin A (Woodruff และคณะ 1998) เป็นต้น

Class II bacteriocins

Class II bacteriocins ประกอบด้วยแบคเทอริโอซินที่ทนร้อนได้ดี มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 10 kDa และไม่มีกรดอมิโนที่ถูกดัดแปลงหลังจากกระบวนการ translation แบคเทอริโอซินในกลุ่มนี้สามารถจำแนกออกได้อีกเป็น 3 กลุ่มย่อย คือ group IIa bacteriocins group IIb bacteriocins และ group IIc bacteriocins

group IIa bacteriocins

group IIa bacteriocins เป็นแบคเทอริโอซินที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Listeria* ได้ (antilisterial bacteriocins) แบคเทอริโอซินในกลุ่มย่อยนี้มี consensus sequence YGNGV ที่บริเวณ N-terminus และมักฆ่าเซลล์เป้าหมายโดยการไปทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมายให้เสียหาย ซึ่งส่งผลให้เซลล์เป้าหมายตายในที่สุด เนื่องจากเซลล์เป้าหมายไม่สามารถควบคุมการผ่านเข้าสู่เซลล์ และออกจากเซลล์ของสารและอิออน (ions) ต่าง ๆ ได้ ตัวอย่างของแบคเทอริโอซินในกลุ่มย่อยนี้ เช่น pediocin AcH pediocin PA1 mesentericin Y105 sakacin A และ sakacin P เป็นต้น

group IIb bacteriocins

group IIb bacteriocins เป็นแบคเทอริโอซินที่ทำให้เกิดรู (pore) ที่เยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมาย โดยการทำงานของแบคเทอริโอซินในกลุ่มย่อยนี้ต้องอาศัยแบคเทอริโอซิน 2 ชนิดทำงานร่วมกัน เช่น enterocin L50A ต้องทำงานร่วมกับ enterocin L50B ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์เป้าหมาย (Cintas และคณะ 1998) lactococcin Gα ต้องทำงานร่วมกับ lactococcin Gβ ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์เป้าหมาย (Nissen-Meyer และคณะ 1992) และ lactococcin M ต้องทำงานร่วมกับ lactococcin N ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์เป้าหมาย (van Belkum และคณะ 1991) เป็นต้น

group IIc bacteriocins

group IIc bacteriocins ประกอบด้วยแบคเทอริโอซินที่ไม่สามารถถูกจัดให้อยู่ใน group IIa bacteriocins และ group IIb bacteriocins ได้ แบคเทอริโอซินในกลุ่มย่อยนี้สามารถถูกจำแนกได้อีกเป็น 2 ประเภท คือ

- แบคเทอริโอซินที่มีกรดอมิโน cysteine 1 หรือ 2 ตัว ซึ่งได้แก่ แบคเทอริโอซินที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม thiolbiotics และ cystibiotics ตามการจำแนกแบคเทอริโอซินของ Jack และคณะ (1995)
- แบคเทอริโอซินที่ไม่มีกรดอมิโน cysteine เช่น lactococcin A และ acidocin B เป็นต้น

ตัวอย่างของแบคเทอริโอซินที่ถูกจัดอยู่ใน group IIc bacteriocins ได้แสดงไว้ใน ตารางที่ 4

Bacteriocins	Producer strains	Molecular mass (Da)	Number of amino acids	Number of Cysteine
Cerein 7	*Bacillus cereus* Bc7	4,893	56	2
Enterocin B	*Enterococcus faecium* T136	5,465	53	2
Carnobacteriocin A	*Carnobacterium piscicola* LV17A	5,053	53	2
Lactococcin A	*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 9B4 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* WM4 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LMG2130	5,778	54	0
Lactococcin B	*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 9B4 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* WM4	5,328	47	1
Divergicin A	*Carnobacterium divergens* LV13	4,224	46	2
Acidocin B	*Lactobacillus acidophilus* M46	5,754	59	0

ตารางที่ 4 ตัวอย่างของแบคเทอริโอซินที่ถูกจัดอยู่ใน group IIc bacteriocins ตามการจำแนกแบคเทอริโอซินของ Klaenhammer

Class III bacteriocins

Class III bacteriocins ประกอบด้วยแบคเทอริโอซินที่ไม่ทนความร้อน (heat labile) และมีขนาดใหญ่ ซึ่งโดยทั่วไปมักมีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 30 kDa ส่วนใหญ่ถูกสร้างโดยแบคทีเรียใน genus *Lactobacillus* ตัวอย่างของแบคเทอริโอซินในกลุ่มนี้ 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

Class IV bacteriocins

Class IV bacteriocins ประกอบด้วยแบคเทอริโอซินที่มีโครงสร้างเป็น glycoprotein หรือ lipoprotein ตัวอย่างของแบคเทอริโอซินที่มีโครงสร้างเป็น glycoprotein เช่น lactocin 27 (Upreti และ Hinsdill 1975) ตัวอย่างของแบคเทอริโอซินที่มีโครงสร้างเป็น lipoprotein เช่น lacstrepcins (Kozak และคณะ 1978, Kozak และคณะ 1977)

การจำแนกแบคเทอริโอซินที่ถูกสร้างโดยแบคทีเรียแกรมลบ

(Classification of bacteriocins produced by gram negative bacteria)

Kolter และ Moreno (1992) ได้จำแนกแบคเทอริโอซินที่ถูกสร้างโดยแบคทีเรียแกรมลบออกเป็น 2 กลุ่ม คือ colicins และ microcins

Colicins

แบคเทอริโอซินที่จะถูกจัดเป็นแบคเทอริโอซินในกลุ่ม Colicins ต้องเป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรียแกรมลบ และมีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 10 kDa แบคเทอริโอซินแต่ละชนิดในกลุ่มนี้มักมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ในจำนวนไม่มาก (narrow antibacterial spectrum) โดยการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยแบคเทอริโอซินในกลุ่มนี้แบคเทอริโอซินจำเป็นต้องไปจับกับ receptor ที่จำเพาะที่อยู่ที่ผิวของเซลล์เป้าหมาย (Alonso และคณะ 2000)

Microcins

แบคเทอริโอซินที่จะถูกจัดเป็นแบคเทอริโอซินในกลุ่ม Microcins ต้องเป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรียแกรมลบ และมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 10 kDa แบคเทอริโอซินในกลุ่มนี้มักถูกสร้างในช่วง stationary phase ของการเจริญ ตัวอย่างของแบคเทอริโอซินที่จัดเป็น microcins เช่น colicin V ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินที่ถูกสร้างโดย *Escherichia coli* V และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 6 kDa และ microcin C7 ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินที่ถือว่าเล็กที่สุดในปัจจุบัน โดยแบคเทอริโอซินดังกล่าวประกอบด้วยกรดอมิโนเพียงแค่ 7 ตัวเท่านั้น (Gonzalez-Pastor และคณะ 1994)

การสกัด plasmid DNA จากแลคติคแอสิดแบคทีเรีย

วิธีการที่ใช้ในการสกัด plasmid DNA จากแลคติคแอสิดแบคทีเรียมีหลายวิธี ซึ่งวิธีการต่าง ๆ เหล่านี้ได้ถูกพัฒนาและปรับปรุงโดยนักวิทยาศาสตร์หลายท่าน

Cords และคณะ (1974) ได้ทำการสกัด plasmid DNA จากแลคติคแอสิดแบคทีเรีย โดยใช้วิธี cesium chloride-ethidium bromide density gradient centrifugation วิธีการสกัด plasmid DNA ดังกล่าวมีข้อเสีย คือ เป็นวิธีการสกัด plasmid DNA ที่ต้องใช้ ethidium bromide ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) และให้ปริมาณของ plasmid DNA ที่ค่อนข้างต่ำ เนื่องจากขั้นตอนการย่อยสลายเซลล์ของแลคติคแอสิดแบคทีเรียของวิธีการดังกล่าวมีประสิทธิภาพค่อนข้างต่ำ Kleanhammer และคณะ (1978) ได้ทำการปรับปรุงวิธีการสกัด plasmid DNA ของ Cords และคณะ เพื่อให้การย่อยสลายเซลล์ของแลคติคแอสิดแบคทีเรียมีประสิทธิภาพมากขึ้น ซึ่งส่งผลให้สามารถสกัด plasmid DNA ได้ในปริมาณที่มากขึ้น

วิธีการที่ Gasson และ Davies (1980) ใช้ในการสกัด plasmid DNA จาก แลคติคแอสิดแบคทีเรียมีข้อจำกัด คือ มักจะไม่สามารถสกัด plasmid DNA ที่มีขนาดใหญ่กว่า 30 MDa ได้ Walsh และ McKay (1981) จึงได้พัฒนาวิธีการที่ใช้ในการสกัด plasmid DNA ที่มีขนาดใหญ่จากแลคติคแอสิดแบคทีเรีย โดยการปรับปรุงวิธีการสกัด plasmid DNA จากแลคติคแอสิดแบคทีเรียของ Hansen และ Olsen (1978) ซึ่งวิธีการที่ Walsh และ McKay พัฒนาขึ้นสามารถใช้สกัด plasmid DNA ที่มีขนาดตั้งแต่ 30 MDa ขึ้นไปจากแลคติคแอสิดแบคทีเรียได้

อย่างไรก็ตามปริมาณของ plasmid DNA ที่ได้จากการสกัด plasmid DNA โดยวิธีการต่าง ๆ ที่กล่าวมาข้างต้นยังไม่เป็นที่พอใจของนักวิทยาศาสตร์ ดังนั้น Anderson และ McKay (1983) จึงได้พัฒนาวิธีการในการสกัด plasmid DNA จากแลคติคแอสิดแบคทีเรียขึ้น โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้เป็นวิธีการสกัด plasmid DNA ที่ให้ปริมาณ plasmid DNA มาก และสามารถใช้ในการสกัด plasmid DNA ที่มีขนาดใหญ่ได้ วิธีการดังกล่าวเป็นวิธีการสกัด plasmid DNA จากแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่นิยมใช้กันในปัจจุบัน โดยอาจมีการดัดแปลงวิธีการดังกล่าวเล็กน้อยเพื่อให้เหมาะสมกับชนิดของแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่ใช้ และวัสดุอุปกรณ์ที่แต่ละห้องทดลองมี

วิธีการสกัด plasmid DNA จากแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่กล่าวมาข้างต้นต้องใช้แลคติคแอสิดแบคทีเรียที่อยู่ในระยะ log phase ของการเจริญเติบโต โดยไม่สามารถใช้แลคติคแอสิดแบคทีเรียที่ถูกเลี้ยงข้ามคืน (overnight culture) (แลคติคแอสิดแบคทีเรียที่ถูกเลี้ยงข้ามคืนมักอยู่ในระยะ stationary phase ของการเจริญเติบโต) ทั้งนี้เนื่องจากแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่ถูกเลี้ยงข้ามคืนมักมีการสะสมของโปรตีนต่าง ๆ ค่อนข้างมาก ซึ่งไปมีผลต่อการย่อยสลายเซลล์ของแลคติคแอสิดแบคทีเรีย จากการ

ที่วิธีการสกัด plasmid DNA จากแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่กล่าวมาข้างต้นต้องใช้แลคติคแอสิดแบคทีเรียที่อยู่ในระยะ log phase ของการเจริญเติบโต ทำให้วิธีการเหล่านั้นเป็นวิธีการสกัด plasmid DNA ที่กินเวลา เนื่องจากต้องมีการถ่ายเชื้อที่เลี้ยงข้ามคืนลงในอาหารใหม่ และรอเวลาให้แลคติคแอสิดแบคทีเรียเข้าสู่ระยะ log phase ของการเจริญเติบโต ดังนั้นจึงได้มีความพยายามในการพัฒนาวิธีการสกัด plasmid DNA จากแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่ถูกเลี้ยงข้ามคืน O'Sullivan และ Klaenhammer (1993) ได้พัฒนาวิธีการสกัด plasmid DNA จากแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่ถูกเลี้ยงข้ามคืน แต่วิธีการดังกล่าวต้องใช้ ethidium bromide ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง และมีขั้นตอนการตกตะกอน DNA (DNA precipitation) ถึง 2 ครั้ง ส่วน Duan และคณะ (1999) ได้พัฒนาวิธีการสกัด plasmid DNA จากแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่ถูกเลี้ยงข้ามคืน โดยวิธีการดังกล่าวใช้ acetone ช่วยในการย่อยสลายเซลล์ของแลคติคแอสิดแบคทีเรีย ทำให้เซลล์ของแลคติคแอสิดแบคทีเรียถูกย่อยสลายอย่างมีประสิทธิภาพ

<u>การทำให้เกิดการสูญเสีย plasmid ออกจากเซลล์แบคทีเรีย (Plasmid curing in bacteria)</u>

ในการตรวจสอบคุณสมบัติใดคุณสมบัติหนึ่งของแบคทีเรียที่มี plasmid (plasmid-containing bacteria) ว่าคุณสมบัตินั้นถูกกำหนดโดยยีนที่อยู่ใน plasmid หรือไม่ จำเป็นต้องมีการสร้างแบคทีเรียที่สูญเสีย plasmid (plasmid-cured bacteria) โดยปกติแล้ว โอกาสที่แบคทีเรียที่มี plasmid จะสูญเสีย plasmid ไปเองตามธรรมชาติมีน้อยมาก ดังนั้นการสร้างแบคทีเรียที่สูญเสีย plasmid จึงจำเป็นต้องอาศัยสารเคมีหรือวิธีการที่ช่วยให้แบคทีเรียที่มี plasmid สูญเสีย plasmid ไป ในปัจจุบันมีสารเคมี และวิธีการมากมายที่สามารถช่วยให้แบคทีเรียสูญเสีย plasmid โดยสารเคมีดังกล่าวแต่ละชนิด และวิธีการดังกล่าวแต่ละวิธีจะใช้ในการทำให้เกิดการสูญเสีย plasmid ได้กับแบคทีเรียบางชนิด ดังนั้นในการทำให้แบคทีเรียสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่งสูญเสีย plasmid จึงจำเป็นต้องทดลองใช้สารเคมีดังกล่าวหลาย ๆ ชนิด และวิธีการดังกล่าวหลาย ๆ วิธี เพื่อให้ได้สารเคมี หรือวิธีการที่เหมาะสมที่สุดในการทำให้แบคทีเรียสายพันธุ์นั้น ๆ สูญเสีย plasmid (Trevors 1986)

สารเคมีที่ช่วยทำให้แบคทีเรียสูญเสีย plasmid (curing agents)

สารเคมีที่ช่วยทำให้แบคทีเรียสูญเสีย plasmid (curing agents) มีมากมาย โดยสารเคมีดังกล่าวแต่ละชนิดมีกลไกในการทำให้แบคทีเรียสูญเสีย plasmid ที่แตกต่างกันออกไป ในที่นี้จะกล่าวถึงสารเคมีที่ช่วยทำให้แบคทีเรียสูญเสีย plasmid บางชนิดที่นิยมใช้กันในปัจจุบัน รวมทั้งกลไกการทำงานของสารเคมีดังกล่าว (ตารางที่ 5)

Curing agents	Mode of action
Intercalaing dyes: Acriflavin, acridine orange, ethidium bromide, quinacrine	Preferential inhibition of plasmid replication
Coumermycin, novobiocin	Inhibition of DNA gyrase-dependent supercoiling of plasmid
Rifampicin	Inhibition of RNA polymerase
Mitomycin C	Metabolic activation followed by nucleophilic attack on purine bases
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Bacteria that have plasmid-specific pili on cell surface are possibly more sensitive to SDS

ตารางที่ 5 สารเคมีที่ช่วยทำให้แบคทีเรียสูญเสีย plasmid (curing agents) ที่นิยมใช้ และกลไกการทำงานของสารเคมีดังกล่าว

Intercalating agents

สารเคมีที่สามารถช่วยทำให้เกิดการสูญเสีย plasmid ออกจากเซลล์แบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่ม intercalating agents ได้แก่ acriflavin, acridine orange, ethidium bromide และ quinacrine สารเคมีในกลุ่มนี้ช่วยทำให้เกิดการสูญ plasmid ออกจากเซลล์แบคทีเรีย โดยการยับยั้งไม่ให้มีการเพิ่มจำนวนของ plasmid ทำให้เมื่อเซลล์แบคทีเรียมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน เซลล์แบคทีเรียที่ได้จากการแบ่งตัวจึงไม่มี plasmid ความเข้มข้นของสารเคมีในกลุ่มนี้ที่ใช้ในการทำให้เกิดการสูญเสีย plasmid ออกจากเซลล์แบคทีเรีย ขึ้นอยู่กับชนิดของสารเคมี และ สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ใช้

สารเคมีในกลุ่มนี้ได้ถูกใช้ในการทำให้เกิดการสูญเสีย plasmid ออกจากเซลล์แบคทีเรียหลายชนิด เช่น acriflavin ได้ถูกใช้ในการทำให้เกิดการสูญเสีย plasmid ออกจากเซลล์ของ *Lactobacillus curvatus* IFPL105 (Casla และคณะ 1996) acridine orange ได้ถูกใช้ในการทำให้เกิดการสูญเสีย

plasmid ออกจากเซลล์ของ *Escherichia coli* (Wechsler และ Kline 1980, Hahn และ Ciak 1971, Hohn และ Korn 1969, Southhamer และคณะ 1963, Hirota 1960) ethidium bromide ได้ถูกใช้ในการทำให้เกิดการสูญเสีย plasmid ออกจากเซลล์ของ *Staphylococcus aureus* (Rubin และ Rosenblum 1971) และ quinacrine ได้ถูกใช้ในการทำให้เกิดการสูญเสีย plasmid ออกจากเซลล์ของ *Escherichia coli* (Hahn และ Caik 1971)

ถึงแม้ว่า acridine orange และ ethidium bromide สามารถใช้ในการทำให้แบคทีเรียสูญเสีย plasmid ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว แต่สารเคมีดังกล่าวไม่สามารถใช้ในการทำให้เกิดการสูญเสีย plasmid ได้กับแบคทีเรียทุกชนิด ตัวอย่างเช่น acridine orange และ ethidium bromide ไม่สามารถทำให้เกิดการสูญเสีย plasmid ที่มีขนาดใหญ่ (ใหญ่กว่า 250 MDa ขึ้นไป) จากเซลล์ของ *Rhizobium* และ *Agrobacterium* spp. นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า ethidium bromide ไม่สามารถทำให้เกิดการสูญเสีย plasmid จากเซลล์ของ *Bacillus cereus* (Izaki 1981)

coumermycin และ novobiocin

coumermycin และ novobiocin ทำให้เกิดการสูญเสีย plasmid ออกจากแบคทีเรีย โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ DNA gyrase ซึ่งเป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเพิ่มจำนวนของ plasmid (Gellert และคณะ 1976)

coumermycin ได้ถูกใช้ในการทำให้เกิดการสูญเสีย plasmid ออกจากเซลล์ของ *E. coli* (Danilevskaya และ Gragerov 1980) และ *S. aureus* (Novick 1969) ส่วน novobiocin ได้ถูกใช้ในการทำให้เกิดการสูญเสีย plasmid ออกจากเซลล์ของ *Bacillus coagulans* I_4 (Hyronimus และคณะ 1988) และเซลล์ของ *Lactobacillus plantarum* (Kelly และคณะ 1996)

rifampicin

rifampicin เป็นสารเคมีที่สามารถยับยั้งการทำงานของ RNA polymerase (Johnston และ Richmond 1970) Johnston และ Richmond (1970) ได้เสนอแนะถึงสาเหตุที่ rifampicin สามารถทำให้เกิดการสูญเสีย plasmid ออกจากเซลล์แบคทีเรีย ว่าเซลล์แบคทีเรียอาจมี RNA polymerase ที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของ plasmid (plasmid replication) และการแบ่งแยก plasmid ไปยังเซลล์ที่ได้จากการแบ่งตัวของแบคทีเรีย (segregation of plasmid to daughter cells)

rifampicin ได้ถูกใช้ในการทำให้เกิดการสูญเสีย plasmid ออกจากเซลล์ของ *S. aureus* (Johnston และ Richmond 1970) และ *Alcaligenes eutrophus* (Anderson และคณะ 1981)

mitomycin C

mitomycin C เป็นสารเคมีที่สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้นกับ hydroquinone ซึ่งเมื่อสารดังกล่าวได้รับการเปลี่ยนแปลงจะสามารถไปทำปฏิกิริยากับเบสที่อยู่ในกลุ่ม purine จากคุณสมบัติดังกล่าวทำให้ mitomycin C เป็นสารเคมีที่สามารถทำให้เกิดการสูญเสีย plasmid ออกจากเซลล์แบคทีเรีย

mitomycin C ได้ถูกใช้ในการทำให้เกิดการสูญเสีย plasmid ออกจากเซลล์ของ *Acinetobactor* (Keil และคณะ 1983) *Alcaligenes* (Behki และคณะ 1983, Anderson และคณะ 1981) และ *Pseudomonas* (Bestetti และ Galli 1984, Boronin และคณะ 1984, Haefeli และคณะ 1984, Khesin และ Karasyova 1984, Bopp และคณะ 1983, Serdar และคณะ 1982, Dunn และ Gunsalus 1973)

sodium dodecyl sulfate (SDS)

SDS มักใช้ในการทำให้เกิดการสูญเสีย plasmid ออกจากเซลล์แบคทีเรียที่มี pili ที่ผิวของเซลล์ เนื่องจากแบคทีเรียดังกล่าวไว (sensitive) ต่อ SDS มากกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น

SDS ได้ถูกใช้ในการทำให้เกิดการสูญเสีย plasmid ออกจากเซลล์ของ *A. eutrophus* (Anderson และคณะ 1981) *E. coli* (Mach และ Grimes 1982, Tomoeda และคณะ 1968) และ *S. aureus* (Sonstein และ Baldwin 1972)

วิธีการที่ช่วยทำให้แบคทีเรียสูญเสีย plasmid (curing procedures)

วิธีการที่ช่วยทำให้แบคทีเรียสูญเสีย plasmid (curing procedures) มีมากมายหลายวิธี แต่ในที่นี้จะกล่าวถึงวิธีการที่ช่วยทำให้แบคทีเรียสูญเสีย plasmid บางวิธีที่นิยมใช้กันในปัจจุบัน ซึ่งได้แก่ การเพิ่มอุณหภูมิของการเลี้ยงแบคทีเรีย (elevated growth temperature) และการจำกัดปริมาณของ thymine ในการเลี้ยงแบคทีเรีย (Thymine limitation)

การทำให้แบคทีเรียสูญเสีย plasmid โดยการเพิ่มอุณหภูมิของการเลี้ยงแบคทีเรีย

การเพิ่มอุณหภูมิของการเลี้ยงแบคทีเรียให้สูงขึ้นจากอุณหภูมิปกติที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียประมาณ 5 ถึง 7 องศาเซลเซียส จะช่วยทำให้เซลล์แบคทีเรียสูญเสีย plasmid ได้ดีขึ้น ตัวอย่างเช่น ถ้าต้องการทำให้แบคทีเรียสายพันธุ์หนึ่ง (ซึ่งโดยปกติเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส) สูญเสีย plasmid โดยวิธีการเพิ่มอุณหภูมิของการเลี้ยงแบคทีเรีย ให้นำแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวไปเลี้ยงที่อุณหภูมิประมาณ 42 ถึง 44 องศาเซลเซียส

การเพิ่มอุณหภูมิของการเลี้ยงแบคทีเรียได้ถูกใช้ในการทำให้เกิดการสูญเสีย plasmid ออกจากเซลล์ของ *A. eutrophus* (Anderson และคณะ 1981) *E. coli* (Timoney และ Linton 1982,

Stadler และ Adelberg 1972) *Lactobacillus plantarum* BFE 905 (Franz และคณะ 1998) *Rhizobium* sp. (Morrison และคณะ 1983) และ *S. aureus* (May และคณะ 1964)

การทำให้แบคทีเรียสูญเสีย plasmid โดยการจำกัดปริมาณของ thymine ในการเลี้ยงแบคทีเรีย

การจำกัดปริมาณของ thymine ในการเลี้ยงแบคทีเรียสามารถใช้ในการทำให้เกิดการสูญเสีย plasmid ออกจากเซลล์แบคทีเรียที่ต้องการ thymine ในการเจริญ (thymin-requiring auxotrophs) วิธีการดังกล่าวได้ถูกใช้ในการทำให้เกิดการสูญเสีย plasmid ออกจากเซลล์ของ *E. coli* (Pinney และ Smith 1971, Clowes และคณะ 1965)

การแยกแบคเทอริโอซินให้บริสุทธิ์ (purification of bacteriocin)

ขั้นตอนที่สำคัญขั้นตอนหนึ่งในการนำเอาแบคเทอริโอซินไปใช้ประโยชน์ คือ ขั้นตอนการแยกแบคเทอริโอซินให้บริสุทธิ์ (purification of bacteriocin) ซึ่งวิธีการที่นิยมใช้กันอยู่ในปัจจุบันในการแยกแบคเทอริโอซินให้บริสุทธิ์มีขั้นตอนดังนี้ เลี้ยงแบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม จากนั้นนำ culture ของแบคทีเรียดังกล่าวไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) เพื่อให้เซลล์ของแบคทีเรียตกตะกอน และเก็บส่วนใส (supernatant) ซึ่งมีแบคเทอริโอซินละลายอยู่ไปผ่านขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนด้วย ammonium sulfate (ตะกอนโปรตีนที่ได้จะประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิดผสมกันอยู่) นำตะกอนโปรตีนที่ได้ไปละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ (buffer) ที่เหมาะสม จากนั้นนำสารละลายโปรตีนดังกล่าวไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธี dialysis (ขั้นตอนนี้เป็นการกำจัดเกลือต่าง ๆ และโปรตีนที่มีขนาดเล็ก ๆ ออกจากสารละลายโปรตีน) หลังจากนั้นจึงทำการแยกโปรตีนต่าง ๆ ที่ผสมกันอยู่ในสารละลายโปรตีนออกจากกัน โดยวิธี column chromatography ก่อนที่จะนำโปรตีนแต่ละชนิดที่แยกได้ไปทดสอบว่าโปรตีนใดเป็นแบคเทอริโอซิน วิธีการในการแยกแบคเทอริโอซินให้บริสุทธิ์ที่กล่าวมาข้างต้นได้ถูกนำไปใช้กับแบคเทอริโอซินหลายชนิด เช่น แบคเทอริโอซินที่สร้างจาก *Pediococcus* spp. (Bhunia และคณะ 1990, Bhunia และคณะ 1988, Bhunia และคณะ 1987, Gonzalez และ Kunka 1987) แบคเทอริโอซินที่สร้างจาก *Lactobacillus* spp. (Tahara และ Katani 1996, Mortvedt และคณะ 1991, Muriana และ Klaenhammer 1991, Joerger และ Klaehammer 1986) แบคเทอริโอซินที่สร้างจาก *Lactococcus* spp. (Piard และคณะ 1992, Holo และคณะ 1991, Davey และ Richardson 1981, Hurst 1981) แบคเทอริโอซินที่สร้างจาก *Leuconostoc* spp. (Daba และคณะ 1991, Hastings และคณะ 1991) และ แบคเทอริโอซินที่สร้างจาก *Propionibacterium* spp. (Lyon และ Glatz 1993) เป็นต้น

อย่างไรก็ตามการแยกแบคเทอริโอซินให้บริสุทธิ์โดยวิธีการดังที่กล่าวมาข้างต้นต้องใช้เวลานาน และใช้วัสดุอุปกรณ์ที่มีราคาค่อนข้างแพง นอกจากนี้วิธีการดังกล่าวยังประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ หลายขั้นตอน ซึ่งในแต่ละขั้นตอนสามารถสูญเสียแบคเทอริโอซินไปได้ ดังนั้นวิธีการในการแยกแบคเทอริโอซินให้บริสุทธิ์ดังที่ได้กล่าวมาข้างต้นจึงเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพค่อนข้างต่ำ

ในปีค.ศ. 1991 Bhunia และคณะได้สังเกตพบว่าแบคเทอริโอซินสามารถเกาะที่ผิวของเซลล์แบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินได้ โดยการเกาะของแบคเทอริโอซินที่ผิวของเซลล์แบคทีเรียขึ้นอยู่กับค่า pH จากการศึกษาของ Bhunia และคณะ (1991) พบว่า pediocin AcH ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างจาก *Pediococcus acidilactici* H สามารถเกาะที่ผิวของเซลล์แบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินได้ดีที่สุดที่ pH 6 และที่ pH 6.5 แต่แบคเทอริโอซินดังกล่าวไม่สามารถเกาะที่ผิวของเซลล์แบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินที่ pH ตั้งแต่ 2 ลงไป จากผลการทดลองดังกล่าวของ Bhunia และคณะ (1991) ทำให้ Yang และคณะคิดค้นวิธีการในการแยกแบคเทอริโอซินให้บริสุทธิ์ที่มีประสิทธิภาพสูง และมีขั้นตอนที่ไม่ยุ่งยาก โดยวิธีการดังกล่าวได้ถูกเผยแพร่ในวารสาร Applied and Environmental Microbiology ฉบับที่ 58 ปีค.ศ. 1992 หน้า 3355 ถึง 3359 (Yang และคณะ 1992)

การแยกแบคเทอริโอซินให้บริสุทธิ์ตามวิธีการของ Yang และคณะ อาศัยหลักการที่ว่าแบคเทอริโอซินสามารถเกาะที่ผิวของเซลล์แบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินได้ดีที่สุด เมื่อเซลล์แบคทีเรียและแบคเทอริโอซินอยู่ในสารละลายที่มีค่า pH ที่จำเพาะค่าหนึ่ง และแบคเทอริโอซินจะไม่สามารถเกาะที่ผิวของเซลล์แบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินได้ เมื่อเซลล์แบคทีเรียและแบคเทอริโอซินอยู่ในสารละลายที่มีค่า pH ที่จำเพาะอีกค่าหนึ่ง ดังนั้นถ้าทำการเลี้ยงแบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม เพื่อให้แบคทีเรียดังกล่าวผลิตแบคเทอริโอซินออกมาแล้วทำการปรับค่า pH ของ culture ของแบคทีเรียดังกล่าวให้มีค่า pH เท่ากับค่า pH ที่ทำให้แบคเทอริโอซินสามารถเกาะที่ผิวของเซลล์แบคทีเรียได้ดีที่สุด แบคเทอริโอซินก็จะไปเกาะที่ผิวของเซลล์แบคทีเรีย และถ้านำเซลล์แบคทีเรียที่มีแบคเทอริโอซินเกาะอยู่ไปใส่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่มีค่า pH เท่ากับค่า pH ที่ทำให้แบคเทอริโอซินไม่สามารถไปเกาะที่ผิวของเซลล์แบคทีเรียได้ แบคเทอริโอซินที่เกาะอยู่ที่ผิวของเซลล์แบคทีเรียก็จะหลุดออกจากผิวของเซลล์แบคทีเรีย และละลายอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ ซึ่งถ้าทำการกำจัดเอาเกลือต่าง ๆ ออกจากสารละลายแบคเทอริโอซินดังกล่าว โดยวิธี dialysis ก็จะทำให้ได้สารละลายแบคเทอริโอซินที่บริสุทธิ์

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

วัสดุและวิธีการทดลอง

จุลินทรีย์และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

แบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้ (producer strain) ที่ใช้ในการศึกษานี้ คือ *Lactobacillus lactis* PS 21 ส่วนแบคทีเรียที่ใช้เป็นแบคทีเรียทดสอบ (indicator strain) คือ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473

ทั้ง *Lactobacillus lactis* PS 21 และ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 ถูกเลี้ยงใน 0.2 % glucose MRS agar หรือ 0.2 % glucose MRS broth ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 0.2 เปอร์เซ็นต์

การหาค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเกาะของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Lactobacillus lactis* PS 21 บนผิวของเซลล์แบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินดังกล่าว

ในการทดลองนี้ต้องใช้ส่วนใส (supernatant) ที่มีแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. lactis* PS 21 ละลายอยู่ และสารแขวนลอยของ *L. lactis* PS 21 ซึ่งสามารถเตรียมได้ดังนี้

การเตรียม supernatant ที่มีแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. lactis* PS 21 ละลายอยู่สามารถทำได้โดยเลี้ยง *L. lactis* PS 21 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 0.2% glucose MRS broth ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำ culture ของ *L. lactis* PS 21 ดังกล่าวไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) ที่ได้ และนำไปทำให้ปริมาตรลดลงจนเหลือปริมาตรประมาณ 1 มิลลิลิตร

การเตรียมสารแขวนลอยของ *L. lactis* PS 21 สามารถทำได้โดยเลี้ยง *L. lactis* PS 21 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 0.2% glucose MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำ culture ของ *L. lactis* PS 21 ดังกล่าวไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ได้ไปล้างด้วยสารละลาย 5 mM sodium phosphate (pH 6) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ก่อนที่จะนำตะกอนดังกล่าวไปแขวนลอยในสารละลาย 1M NaCl (pH 2) คนสารแขวนลอยที่ได้ด้วย magnetic stirrer ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำสารแขวนลอยดังกล่าวไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนที่ได้ไปแขวนลอยในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร

หลังจากที่ได้ส่วนใส (supernatant) ที่มีแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. lactis* PS 21 ละลายอยู่และสารแขวนลอยของ *L. lactis* PS 21 แล้ว จึงจะสามารถทำการหาค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเกาะของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. lactis* PS 21 บนผิวของเซลล์แบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินดังกล่าว ซึ่งทำได้โดยนำส่วนใส (supernatant) ที่มีแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. lactis* PS 21 ละลายอยู่ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และสารแขวนลอยของ *L. lactis* PS 21 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาเติมลงไปในหลอดทดลองที่มีสารละลาย 5 mM sodium phosphate ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร จากนั้นนำหลอดทดลองดังกล่าวไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ก่อนที่จะนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 17,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวัดความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ (ซึ่งก็คือ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473)

การวัดความสามารถของส่วนใสในการยับยั้งการเจริญของ *L. mesenteroides* TISTR 473 สามารถทำได้โดยนำส่วนใสไปเจือจางที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ ดังนี้คือ ที่ระดับความเจือจาง 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 และ 1:128 ตามลำดับ จากนั้นนำเอาส่วนใสที่มีระดับความเจือจางต่าง ๆ เหล่านี้ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *L. mesenteroides* TISTR 473 โดยใช้วิธี swab-paper disc ความสามารถของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบจะถูกแสดงในหน่วย AU (arbitrary unit)/ml

ค่าความสามารถของส่วนใสในการยับยั้งการเจริญของ *L. mesenteroides* TISTR 473 ในหน่วย AU/ml สามารถหาได้จากค่าส่วนกลับของระดับความเจือจางสูงสุดของส่วนใสที่ยังสามารถยับยั้งการเจริญของ *L. mesenteroides* TISTR 473 ได้ ตัวอย่างเช่น ถ้าใช้ส่วนใสปริมาตร 25 ไมโครลิตร ในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *L. mesenteroides* TISTR 473 และพบว่าระดับความเจือจางสูงสุดของส่วนใสที่ยังสามารถยับยั้งการเจริญของ *L. mesenteroides* TISTR 473 ได้ คือ 1:16 ดังนั้นค่าความสามารถของส่วนใสในการยับยั้งการเจริญของ *L. mesenteroides* TISTR 473 จะมีค่าเท่ากับ 16 AU/25 ไมโครลิตร หรือ 640 AU/ml

ในการทดลองนี้จะทำการทดลองทั้งหมด 10 ชุดการทดลอง โดยแต่ละชุดการทดลองจะแตกต่างกันที่ค่า pH ของสารละลาย 5 mM sodium phosphate ซึ่งจะมีค่าดังนี้ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 ในแต่ละชุดการทดลองจะมีชุดการทดลองควบคุม (control) 2 ชุด คือ control I และ control II โดยในชุดการทดลองควบคุม control I จะใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรแทนส่วนใส (supernatant) ที่มีแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. lactis* PS 21 ละลายอยู่ ส่วนในชุดการทดลองควบคุม control II จะใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรแทนสารแขวนลอยของ *L. lactis* PS 21

การหาค่าเปอร์เซนต์การเกาะของแบคเทอริโอซินบนผิวของเซลล์แบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซิน (percentage of bacteriocin adsorbed) สามารถคำนวณได้จากสูตรนี้

100 x [1 – {(AU/ml in supernatant – AU/ml in control I)/(AU/ml in control II)}]

การทดสอบความสามารถของสารละลายในการยับยั้งการเจริญของ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 โดยวิธี swab-paper disc method

การทดสอบความสามารถของสารละลายในการยับยั้งการเจริญของ *L. mesenteroides* TISTR 473 โดยวิธี swab-paper disc method สามารถทำได้โดยเลี้ยง *L. mesenteroides* TISTR 473 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 0.2% glucose MRS broth จากนั้นนำ culture ของแบคทีเรียดังกล่าวไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำมาป้าย (swab) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 0.2% glucose MRS agar ให้ทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นำแผ่น paper disc ที่ปลอดเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตรมาวางบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว แล้วหยดสารละลายที่ต้องการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *L. mesenteroides* TISTR 473 ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงบนแผ่น paper disc นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนที่จะสังเกตว่ามี inhibition zone เกิดขึ้นรอบ ๆ แผ่น paper disc หรือไม่ ถ้าเห็น inhibition zone เกิดขึ้นรอบ ๆ แผ่น paper disc ก็แสดงว่าสารละลายที่นำมาทดสอบมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *L. mesenteroides* TISTR 473 ได้

การแยกแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Lactobacillus lactis* PS 21 ให้บริสุทธิ์

ในการศึกษานี้จะใช้วิธีการของ Yang และคณะ ในการแยกแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. lactis* PS 21 ให้บริสุทธิ์ ซึ่งวิธีการดังกล่าวมีขั้นตอนดังนี้ เลี้ยง *L. lactis* PS 21 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 0.2% glucose MRS broth ปริมาตร 1 ลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำ culture ดังกล่าวไปปรับค่า pH ให้มีค่าเท่ากับค่า pH ที่ทำให้แบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. lactis* PS 21 เกาะที่ผิวของเซลล์แบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินดังกล่าวได้ดีที่สุด ก่อนที่จะนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากที่ให้ความร้อนกับ culture ของ *L. lactis* PS 21 แล้ว นำ culture ดังกล่าวไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเก็บส่วนที่เป็นตะกอนของเซลล์แบคทีเรียที่ได้ไปล้างด้วยสารละลาย 5 mM sodium phosphate (pH 6.5) ก่อนที่จะนำตะกอนดังกล่าวไปแขวนลอยในสารละลาย 100 mM NaCl ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยสารละลาย 100 mM NaCl ที่ใช้จะมีค่า pH เท่ากับค่า pH ที่ทำให้แบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. lactis* PS 21 ไม่สามารถยึดเกาะที่ผิวของเซลล์แบคทีเรียที่สร้าง

แบคเทอริโอซินดังกล่าวได้ 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 และนำแบคเทอริโอซินที่ได้มาละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 400 ไมโครลิตร ซึ่งจะทำให้ได้สารละลายแบคเทอริโอซินบริสุทธิ์ไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

<u>การหาน้ำหนักโมเลกุลของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. lactis* PS 21</u>

การหาน้ำหนักโมเลกุลของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. lactis* PS 21 สามารถทำได้โดยนำสารละลายแบคเทอริโอซินบริสุทธิ์มาวิเคราะห์ โดยวิธี sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ นำสารละลายแบคเทอริโอซินบริสุทธิ์ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร มาผสมกับ sample solvent (62.5 mM Tris-HCl [pH6.8], 10% glycerol, 2% SDS, 5% β-mercaptoethanol) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ก่อนที่จะนำไปหยอดลงในช่องบนแผ่น polyacrylamide gel โดยให้หยอดสารละลายของโปรตีนมาตราฐาน ที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลในช่องข้าง ๆ ด้วย ซึ่งในการทดลองนี้ได้ใช้ Step-View™ 20 kDa prestained protein size marker (elpisbio) เป็นโปรตีนมาตราฐาน หลังจากที่ทำการหยอดสารละลายโปรตีนลงในช่องบนแผ่น polyacrylamide gel เรียบร้อยแล้ว ทำการปล่อยให้โปรตีนวิ่งผ่านแผ่น polyacrylamide gel ในสภาวะที่มีค่ากระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 50 mA เป็นเวลาประมาณ 3-4 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่น polyacrylamide gel ไปย้อมด้วย coomassie brilliant blue ซึ่งจะทำให้เห็นแถบโปรตีนเป็นแถบสีน้ำเงิน น้ำหนักโมเลกุลของแบคเทอริโอซินสามารถถูกคาดคะเนได้จากการเปรียบเทียบระยะทางที่แถบโปรตีนแบคเทอริโอซินเคลื่อนที่ได้ในแผ่น polyacrylamide gel กับระยะทางที่แถบโปรตีนมาตราฐานเคลื่อนที่ได้ในแผ่น polyacrylamide

<u>การสกัด plasmid จาก *L. lactis* PS 21</u>

การสกัด plasmid จาก *L. lactis* PS 21 สามารถทำได้โดยนำ *L. lactis* PS 21 มาเลี้ยงใน 0.2% glucose MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการถ่ายเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหาร 0.2% glucose MRS broth ใหม่ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง เพื่อให้ *L. lactis* PS 21 อยู่ในระยะ log phase นำ *L. lactis* PS 21 ที่อยู่ในระยะ log phase ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรมาปั่น

เหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ แล้วนำไปตกตะกอนโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนที่ได้มาเติม solution I ปริมาตร 379 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมสารละลาย lysozyme (ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรใน solution II) ปริมาตร 96.5 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติม solution III ปริมาตร 48.2 ไมโครลิตร และสารละลาย SDS (ความเข้มข้น 20% wt/vol ใน solution IV) ปริมาตร 27.6 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 3 N NaOH ปริมาตร 27.6 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติม solution V ปริมาตร 49.6 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ อีกครั้งเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเติมสารละลาย VI ปริมาตร 71.7 ไมโครลิตร แล้วจึงเติม phenol ที่อิ่มตัวใน 3% NaCl ปริมาตร 700 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ ก่อนที่จะนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดส่วนใสชั้นบนใส่ microcentrifuge tube อันใหม่ เติม phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 :24 :1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ ก่อนที่จะนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสชั้นบนใส่ microcentrifuge tube อันใหม่ เติม isopropanol ปริมาตร 700 ไมโครลิตร แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที จากนั้นจึงนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอน DNA ที่ได้ไปล้างด้วย 70% alcohol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และทำการตกตะกอน DNA อีกครั้งหนึ่งโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอน DNA ที่ได้ไปทำให้แห้ง แล้วละลายตะกอน DNA ด้วย TE buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในการสกัด plasmid จากแลคติคแอสิดแบคทีเรีย

solution I : 6.7% sucrose, 50 mM Tris, 1 mM EDTA (pH 8.0)

solution II : 25 mM Tris (pH 8.0)

solution III : 0.25 M EDTA, 50 mM Tris (pH 8.0)

solution IV : 20 mM EDTA, 50 mM Tris (pH 8.0)

solution V : 2 M Tris-hydrochloride (pH 7.0)

solution VI : 5 M NaCl

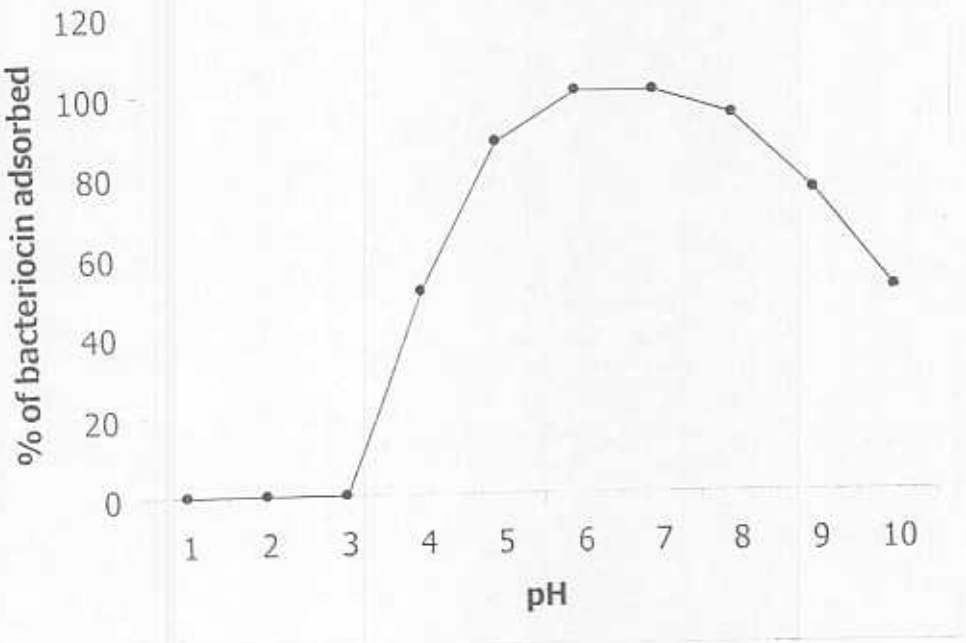
ผลการทดลอง

การหาค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเกาะของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Lactobacillus lactis* PS 21 บนผิวของเซลล์แบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินดังกล่าว

จากการศึกษาเพื่อหาค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเกาะของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Lactobacillus lactis* PS 21 บนผิวของเซลล์แบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินดังกล่าว พบว่า ที่ค่า pH ตั้งแต่ 1 ถึง 3 ค่าเปอร์เซนต์การเกาะของแบคเทอริโอซินบนผิวของเซลล์แบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซิน (percentage of bacteriocin adsorbed) มีค่าเท่ากับ 0% แต่เมื่อค่า pH สูงขึ้น ค่า percentage of bacteriocin adsorbed จะมีค่ามากขึ้นจนมีค่าสูงสุด (100%) ที่ pH 6 และ 7 หลังจากนั้น ค่า percentage of bacteriocin adsorbed จะมีค่าลดลงเรื่อย ๆ เมื่อค่า pH ขึ้นสูงขึ้น (รูปที่ 1 และตารางที่ 6)

PH	Percentage of bacteriocin adsorbed (%)
1	0
2	0
3	0
4	50
5	87.5
6	100
7	100
8	93.75
9	75
10	50

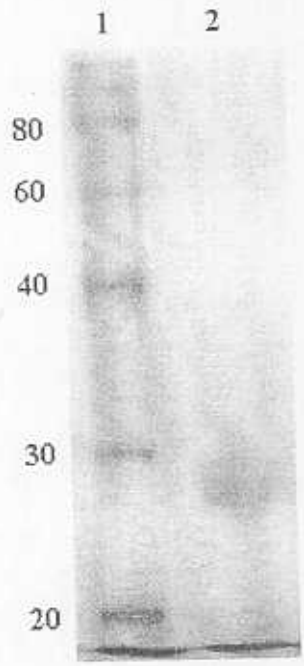
ตารางที่ 6 เปอร์เซนต์การเกาะของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. lactis* PS 21 บนผิวของเซลล์แบคทีเรียดังกล่าว (percentage of bacteriocin adsorbed) ที่ค่า pH ต่าง ๆ



รูปที่ 1 เปอร์เซนต์การเกาะของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. lactis* PS 21 บนผิวของเซลล์แบคทีเรียดังกล่าว (percentage of bacteriocin adsorbed) ที่ค่า pH ต่าง ๆ

การหาน้ำหนักโมเลกุลของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. lactis* PS 21

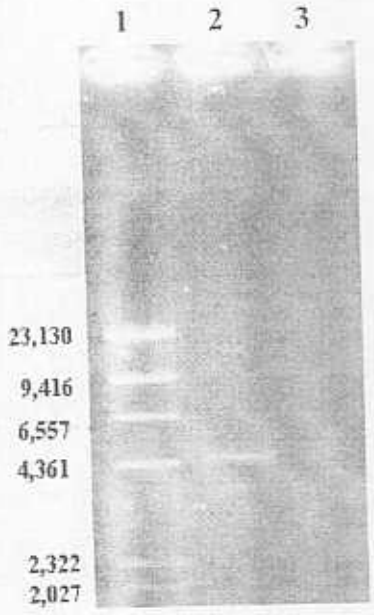
จากการแยกแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Lactobacillus lactis* PS21 ให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธีการของ Yang และคณะ (1992) และนำแบคเทอริโอซินดังกล่าวมาวิเคราะห์โดยวิธี sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) พบแถบโปรตีนหนึ่งแถบ ซึ่งมีขนาดประมาณ 28 kDa (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 polyacrylamide gel ที่ได้จากการวิเคราะห์แบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. lactis* PS 21
Lane 1 = โปรตีนมาตราฐาน (Step-View™ 20 kDa prestained protein size marker)
Lane 2 = แบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. lactis* PS 21
(น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนแสดงในหน่วย kDa)

การตรวจหาตำแหน่งของยีนสำหรับแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. lactis* PS 21

ในการตรวจหาตำแหน่งของยีนสำหรับแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. lactis* PS 21 ว่ายีนดังกล่าวเป็นยีนที่อยู่บน plasmid หรือเป็นยีนที่อยู่บน chromosome ของแลคติคแอสิดแบคทีเรีย เริ่มจากการศึกษาว่า *L. lactis* PS 21 มี plasmid หรือไม่ โดยการนำแลคติคแอสิดแบคทีเรียดังกล่าวไปผ่านขั้นตอนการสกัด plasmid ซึ่งจากการทดลองพบว่า *L. lactis* PS 21 ไม่มี plasmid (รูปที่ 3) ในการทดลองนี้ได้ทำการสกัด plasmid จาก *Lactobacillus lactis* SK 2.1 ซึ่งเป็นแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่มี plasmid ขนาดประมาณ 4.5 kb เพื่อยืนยันว่าวิธีการที่ใช้ในการสกัด plasmid ในการทดลองนี้สามารถใช้ในการสกัด plasmid จากแลคติคแอสิดแบคทีเรียได้



รูปที่ 3 แถบ DNA ที่ได้จากการสกัด plasmid จาก *L. lactis* SK 2.1 และ *L. lactis* PS 21

Lane 1 = Lambda DNA digested with Hind III

Lane 2 = แถบ DNA ที่ได้จากการสกัด plasmid จาก *L. lactis* SK 2.1

Lane 3 = แถบ DNA ที่ได้จากการสกัด plasmid จาก *L. lactis* PS 21

(น้ำหนักโมเลกุลของ DNA แสดงในหน่วย bp)

วิจารณ์ผลการทดลอง

ในการนำแบคเทอริโอซินไปใช้ประโยชน์ ไม่ว่าจะเป็นการนำไปใช้ในการศึกษาต่อ หรือการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร หรือการนำไปใช้ในทางการแพทย์ จำเป็นต้องมีข้อมูลเกี่ยวกับคุณสมบัติต่าง ๆ ของแบคเทอริโอซิน เพื่อให้การนำแบคเทอริโอซินไปใช้มีความปลอดภัย และเกิดประสิทธิภาพสูงสุด ในการศึกษานี้ได้ทำการทดลองเพื่อหาข้อมูลเกี่ยวกับคุณสมบัติในระดับโมเลกุล (molecular properties) ของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. lactis* PS 21 โดยข้อมูลที่สนใจคือ น้ำหนักโมเลกุลของแบคเทอริโอซินดังกล่าว และตำแหน่งของยีนสำหรับแบคเทอริโอซินดังกล่าว

ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. lactis* PS 21 ตามวิธีการของ Yang และคณะ (1992) จำเป็นต้องทราบค่า pH ที่ทำให้แบคเทอริโอซินดังกล่าวเกาะที่ผิวของเซลล์ *L. lactis* PS 21 ได้ดีที่สุด และค่า pH ที่ทำให้แบคเทอริโอซินดังกล่าวไม่สามารถเกาะที่ผิวของเซลล์ *L. lactis* PS 21 ได้ ซึ่งจากการทดลองเพื่อหาค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเกาะของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Lactobacillus lactis* PS 21 บนผิวของเซลล์แบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินดังกล่าว พบว่าแบคเทอริโอซินดังกล่าวสามารถเกาะที่ผิวของเซลล์ *Lactobacillus lactis* PS 21 ได้ดีที่สุดที่ pH 6 และ 7 แต่จะไม่สามารถเกาะที่ผิวของเซลล์ *Lactobacillus lactis* PS 21 ได้ที่ pH ตั้งแต่ 3 ลงไป การศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาที่ได้เคยทำกับแบคเทอริโอซินชนิดอื่น เช่น pediocin AcH nisin sakacin A และ leuconocin Lcm1 (Yang และคณะ 1992) จากการศึกษาดังกล่าวพบว่า pediocin AcH สามารถเกาะที่ผิวของเซลล์ *Pediococcus acidilactici* LB 42-923 (เซลล์ที่สร้าง pediocin AcH) ได้ดีที่สุดที่ pH 6 และ 6.5 แต่จะไม่สามารถเกาะที่ผิวของเซลล์ *P. acidilactici* LB 42-923 ได้ที่ pH ตั้งแต่ 1.5 ลงไป nisin สามารถเกาะที่ผิวของเซลล์ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 (เซลล์ที่สร้าง nisin) ได้ดีที่สุดที่ pH 6.5 แต่จะไม่สามารถเกาะที่ผิวของเซลล์ *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 ได้ที่ pH ตั้งแต่ 3 ลงไป sakacin สามารถเกาะที่ผิวของเซลล์ *Lactobacillus sake* Lb 706 (เซลล์ที่สร้าง sakacin A) ได้ดีที่สุดที่ pH ตั้งแต่ 5.5 ขึ้นไป แต่จะไม่สามารถเกาะที่ผิวของเซลล์ *L. sake* Lb 706 ได้ที่ pH ตั้งแต่ 2 ลงไป และ leuconocin Lcm1 สามารถเกาะที่ผิวของเซลล์ *Leuconostoc carnosum* Lm 1 (เซลล์ที่สร้าง leuconocin Lcm1) ได้ดีที่สุดที่ pH 5.5 แต่จะไม่สามารถเกาะที่ผิวของเซลล์ *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 ได้ที่ pH ตั้งแต่ 3 ลงไป และที่ pH ตั้งแต่ 8 ขึ้นไป

จากผลการทดลองที่ได้จากการหาค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเกาะของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Lactobacillus lactis* PS 21 บนผิวของเซลล์แบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินดังกล่าว ทำให้การ

แยกแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. lactis* PS21 ให้บริสุทธิ์ตามวิธีการของ Yang และคณะ (1992) ที่ใช้ในการศึกษานี้เลือกใช้ pH 7 เป็น pH ที่ทำให้แบคเทอริโอซินดังกล่าวเกาะที่ผิวของเซลล์ *L. lactis* PS21 และเลือกใช้ pH 2 เป็น pH ที่ทำให้แบคเทอริโอซินดังกล่าวหลุดออกจากผิวของเซลล์ *L. lactis* PS21

จากการทดลองหาน้ำหนักโมเลกุลของแบคเทอริโอซินที่สร้างจาก *L. lactis* PS 21 พบว่าแบคเทอริโอซินดังกล่าวเป็นโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ โดยมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 28 kDa ซึ่งแตกต่างไปจากแบคเทอริโอซินทั่วไปที่มักมีน้ำหนักโมเลกุลไม่เกิน 10 kDa แบคเทอริโอซินที่มีขนาดใหญ่ที่ถูกสร้างโดยแบคทีเรียที่อยู่ใน genus *Lactobacillus* 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

จากการนำ *L. lactis* PS 21 มาทำการสกัด plasmid พบว่า แลคติคแอสิดแบคทีเรียดังกล่าวไม่มี plasmid ดังนั้นยีนสำหรับแบคเทอริโอซิน (bacteriocin gene) น่าที่จะอยู่บน chromosome จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ายีนสำหรับแบคเทอริโอซินบางชนิดเป็นยีนที่อยู่บน plasmid ในขณะที่ยีนสำหรับแบคเทอริโอซินบางชนิดเป็นยีนที่อยู่บน chromosome ตัวอย่างของยีนสำหรับแบคเทอริโอซินที่อยู่บน plasmid เช่น ยีนสำหรับแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Lactobacillus curvatus* IFPL 105 (Casla และคณะ 1996) และ ยีนสำหรับ coagulin (Hyronimus และคณะ 1998) เป็นต้น ส่วนตัวอย่างของยีนสำหรับแบคเทอริโอซินที่อยู่บน chromosome เช่น ยีนสำหรับ helveticus 51 (Bonade และคณะ 2001) ยีนสำหรับ plantaricin KW 30 (Kelly และคณะ 1996) ยีนสำหรับ plantaricin D (Franz และคณะ 1998) และยีนสำหรับ helveticin J (Joerger และ Klaehammer 1986) เป็นต้น

สรุปผลการทดลอง

แบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. lactis* PS 21 เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 28 kDa มีความสามารถในการเกาะที่ผิวของเซลล์ *L. lactis* PS 21 ได้ดีที่สุดที่ pH 6 และ pH 7 แต่จะไม่สามารถเกาะที่ผิวของเซลล์ *L. lactis* PS 21 ได้ที่ pH ตั้งแต่ 3 ลงไป และยีนสำหรับแบคเทอริโอซินดังกล่าวเป็นยีนที่อยู่บนโครโมโซม

เอกสารอ้างอิง

Ahn C and Stiles ME (1990) Plasmid-associated bacteriocin production by a strain of *Carnobacterium piscicola* from meat. Appl Environ Microbiol 56, 2503-2510.

Ali D, Lacroix C, Thuault D, Bourgeois CM and Simard RE (1995) Characterizationof diacetin B, a bacteriocin from*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. diacetylactis UL720. Can J Microbiol 41, 832-841.

Allgaier H, Jung G, Werner RG, Schneider U and Zahner H (1986) Epidermin: sequencing of a heterodet tetracyclic 21-peptide amide antibiotic. Eur J Biochem 160, 9-22.

Alonso G, Vilchez G and Lemoine VR (2000) How bacteria protect themselves against channel-forming colicins. Int Microbiol 3, 81-88.

Anderson DG and McKay LL (1983) Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic Streptococci. Appl Environ Microbiol 46, 549-552.

Anderson K, Tait RC and King WR (1981) Plasmids required for utilization of molecular hydrogen by *Alcaligenes eutrophus*. Arch Microbiol 129, 384-390.

Arihara K, Ogihara S, Mukai T, Itoh M and Kondo Y (1996) Salivacin 140, a novel bacteriocin from *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius*T140 active against pathogenic bacteria. Lett Appl Microbiol 22, 420-424.

Banerjee S, Hansen JN (1988) Structure and expression of a gene encoding the producer of subtilin, a small protein antibiotic. J Biol Chem 263, 9508-9514.

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.

Behki RM, Selvaraj G and Iyer VN (1983) Hydrogenase and ribulose-1,5-biphosphate carboxylase activities of *Alcaligenes eutrophus* ATCC17706 associated with an indigenous plasmid. Can J Microbiol 29, 767-774.

Benoit V, Lebrihi A, Milliere JB and Lefebvre G (1997) Purification and partial amino acid sequence of brevicin 27, a bacteriocin produced by *Lactobacillus brevis* SB27. Curr Microbiol **34**, 173-179.

Bestetti G and Galli E (1984) Plasmid-coded degration of ethylbenzene and 1-phenylethanol in *Pseudomonas fluorescens*. FEMS Microbiol Lett **21**, 165-168.

Bhugaloo-Vial P, Dousset X, Metivier A, Sorokine O, Anglade P, Boyaval P and Marion D (1996) Purification and amino acid sequences of piscicocins V1a and V1b, two classIIa bacteriocins secreted by *Carnobacterium piscicola* V1 that display significantly different levels of specific inhibitory activity. Appl Environ Microbiol **62**, 4410-4416.

Bhunia AK, Johnson MC, Ray B and Belden EL (1990) Antigenic property of pediocin AcH produced by *Pediococcus acidilactici* H. J Appl Bacteriol **69**, 211-215.

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.

Bhunia AK, Johnson MC and Ray B (1987) Direct detection of an antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J Ind Microbiol **2**, 319-322.

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.

Bopp LH, Chakrabarty AM and Ehrlich HL (1983) Chromate resistance plasmid in *Pseudomonas fluorescens*. J Bacteriol **155**, 1105-1109.

Boronin AM, Naumova RP, Grishchenkov and Ilijinskaya ON (1984) Plasmids speciying ε-Caprolactam degradation in *Pseudomonas* strains. FEMS Microbiol Lett **22**, 167-170.

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

Brock TD, Peacher B and Pierson D (1963) Survey of the bacteriocins of enterococci. J Bacteriol **86**, 702-707.

Campanini M, Pedrazzoni I, Barbuti S and Baldini P (1993) Behaviour of *Listeria monocytogenes* during the maturation of naturally and artificially contaminated salami: effect of lactic acid bacteria starter cultures. Int J Food Microbiol **20**, 169-175.

Casaus P, Nilsen T, Cintas LM, Nes IF, Hernandez PE and Holo H (1997) Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. Microbiology **143**, 2287-2294.

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.

Chatterjee S, Chatterjee DK, Jani RH, Blumbach J, Ganguli BN, Klesel N, Limbert M and Seibert G (1992) Mersacidin, a new antibiotic from *Bacillus*. In vitro and in vivo antibacterial activity. J Antibiot (Tokyo) **45**, 839-845.

Cherif A, Ouzari H, Daffonchio D, Cherif H, Ben Slama K, Hassen A, Jaoua S and Boudabous A (2001) Thuricin 7: a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG1.7, a new strain isolated from soil. Lett Appl Microbiol **32**, 243-247.

Cintas LM, Casaus P, Havarstein LS, Hernandez PE and Des IF (1997) Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with broad antimicrobial spectrum. Appl Environ Microbiol **63**, 4321-4330.

Cintas LM, Casaus P, Holo H, Hernandez PE, Nes IF and Havarstein LS (1998) Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins J Bacteriol **180**, 1988-1994.

Clowes RC Moody EEM and Pritchard RH (1965) The elimination of extrachromosomal elements in thymineless strains of *Escherichia coli* K12. Genet Res Camb **6**, 147-152.

Cords BR, McKay LL and Guerry P (1974) Extrachromosomal elements in group N streptococci. J Bacteriol **117**, 1149-1152.

Coventry MJ, Wan J, Gordon JB, Mawson RF and Hickey MW (1996) Production of brevisin 286 by *Lactobacillus brevis* VB286 and partial characterization. J Appl Bacteriol **80**, 91-98.

Crupper SS, Gies AJ and Iandolo JJ (1997) Exploiting the unique biophysical properties of bacteriocins to purify Bac 1829 from *Staphylococcus aureus* KSI1829. Protein Expr Purif 9, 228-232.

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 (1989) Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservative. Food Technol 43, 164-467.

Danilevskaya ON and Gragerov AI (1980) Curing of *Escherichia coli* K12 plasmids by coumermycin. Mol Gen Genet 178, 233-235.

Davey GP (1981) Mode of action of diplococcin, a bacteriocin from *Streptococcus cremoris* 346. NZ J Dairy Sci Technol 16, 187-190.

Davey GP and Richardson BC (1981) Purification and some properties of diplococcin from *Streptococcus cremoris* 346. Appl Environ Microbiol 41, 84-89.

Diep DB, Havarstein LS, Nissen Meyer J and Nes IF (1994) The gene encoding plantaricin A, a bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* C11, is located on the same transcription unit as an agr-like regulatory system. Appl Environ Microbiol 60, 160-166.

Duan K, Dunn NW and Kim WS (1999) Rapid plasmid DNA isolation from *Lactococcus lactis* using overnight culture. Biotechnol Tech 13, 519-521.

Dunn NW and Gunsalus IC (1973) Transmissible plasmid coding early enzymes of napthalane oxidation in *Pseudomonas putida*. J Bacteriol 114, 974-979.

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.

Ennahar S, Sashihara T, Sonomoto K and Ishizaki A (2000) ClassIIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. FEMS Microbiol Rev 24, 85-106.

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. Let Appl Microbiol 26, 231-235.

Galvez A, Gimenez-Gallego G, Maqueda M and Valdivia E (1989) Purification and amino acid composition of peptide antibiotic AS-48 produced by *Streptococcus (Enterococcus) faecalis* subsp. *liquefaciens* S-48. Antimicrob Agents Chemother 33, 437-441.

Galvez A, Valdivia E, Abriouel H, Camafeita F, Mendez E, Martinez Bueno M and Maqueda M (1998) Isolation and characterization of enterocin EJ97, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* EJ97. Arch Microbiol 171, 59-65.

Gasson MJ and Davies FL (1980) High-frequency conjugation associated with *Streptococcus lactis* donor cell aggregation. J Bacteriol 143, 1260-1264.

Garver KI and Muriana PM (1994) Purification and partial amino acid of curvaticin FS47, a heat-stable bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* FS47. Appl Environ Microbiol 60, 2191-2195.

Gellert M, O'Dea MH, Itoh T and Tomizawa JI (1976) Novobiocin cnd coumermycin inhibit DNA supercoilingcatalyzed by DNA gyrase. Proc Natl Acad Sci USA 73, 4474-4478.

Giraffa G, Neviani E and Tarelli GT (1994) Antilisterial activity by enterococci in a model predicting the temperature evolution of Taleggio, an Italian soft cheese. J Dairy Sci 77, 1176-1182.

Gonzalez CF and Kunka BS (1987) Plasmid-associated bacteriocin production and sucrose fermentation in *Pediococcus acidilactici*. Appl Environ Microbiol 53, 2534-2538.

Gonzalez-Pastor JE, San Millan JL and Moreno F (1994) The smallest known gene. Nature 369, 281.

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.

Haefeli C, Franklin C and Hardy K (1984) Plasmid-determined silver resistance in *Pseudomonas stutzeri* isolated from a silver mine. J Bacteriol 158, 389-392.

Hahn FE and Ciak J (1971) Elimination of bacterial episomes by DNA-complexing compound. Ann N Y Acad Sci 182, 295-304.

Hansen JB and Olsen RH (1978) Isolation of large bacterial plasmids and characterization of the P2 incompatibility group plasmids pMG1 and pMG5. J Bacteriol 135, 227-238.

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.

Hirota Y (1960) Th effect of acridine dyes on mating type factors in*Escherichia coli*. Proc Nati Acad Sci USA 46, 57-64.

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.

Heu S, Oh J, Kang Y, Ryu S, Cho SK, Cho V and Cho M (2001) gly gene cloning and expression and purification of glycinecin A, a bacteriocin produced by *Xanthomonas campestris* pv. glycines 8ra. Appl Environ Microbiol 67, 4105-4110.

Hillman JD, Novak J, Sagura E, Gutierrez JA, Brooks TA, Crowley PJ, Hess M, Azizi A, Leung Cvitkovitch D and Bleiweis AS (1998) Genetic and biochemical analysis of mutacin 1140, a lantibiotic from *Streptococcus mutans*. Infect Immun 66, 2743-2749.

Hohn B and Korn D (1969) Cosegregation of a sex factor with the *Escherichia coli* chromosome during curing by acridine orange. J Mol Biol 45, 385-395.

Holck A, Axelsson L, Huhne K and Krockel L (1994) Purification and cloning of sakacin 674, abacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb674. FEMS Microbiol Lett **115**, 143-150.

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.

Hurst A (1981) Nisin. Adv Appl Microbiol **27**,85-123.

Hurst A (1978) Nisin: its preservative effect and function in the growth cycle of the producer organism. Soc Appl Bacteriol Symp Ser **7**, 297-314.

Hyronimus B, Le Marrec C and Urdaci MC (1998) Coagulin, a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans* I_4. J Appl Microbiol **85**, 42-50.

Iqbal A, Ahmed S, Ali SA and Rasool SA (1999) Isolation and partial characterization of Bac201: a plasmid-associated bacteriocin-like inhibitory substance from *Staphylococcus aureus* AB201. J Basic Microbiol **39**, 325-336.

Izaki K (1981) Enzymatic reduction of mercurous and mercuric ions in *Bacillus cereus*. Can J Microbiol **27**, 192-197.

Jack RW, Carne A, Metzger J, Stevanovic S, Sahl HG, Jung G and Tagg J (1994) Elucidation of the structure of SA-FF22, a lanthionine-containing antibacterial peptide produced by *Streptococcus pyogenes* strain FF22. Eur J Biochem **220**, 455-462.

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.

Jennes W, Dicks LM and Verwoerd DJ (2000) Enterocin 012, a bacteriocin produced by *Enterococcus gallinarum* isolated from the intestinal tract of ostrich. J Appl Microbiol **88**, 349-357.

Jimnez-Daz R, Ros-Sanchez RM, Desmazeaud M, Ruiz-Barba JL and Piard JC (1993) Plantaricin S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation. Appl Environ Microbiol **59**, 1416-1424.

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.

Johnston JH and Richmond MH (1970) The increased rate of loss of penicillinase plasmids from*Staphylococcus aureus* in the presence of rifampicin. J Gen Microbiol **60**, 137-139.

Joosten HM, Nunez M, Devreese B, Van BJ and Marugg JD. (1996) Purification and characterization of enterocin 4, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* INIA4. Appl Environ Microbiol **62**, 4220-4223.

Jung G (1991) Lantibiotics: ribosomally synthesized biologically active polypeptides containing sulfide bridges and a, b didehydroamino acids. Angew Chem Ed Engl **30**, 1051-1068.

Kaletta C, Entian KD and Jung G (1991) Prepeptide sequence of cinnamycin (Ro 09-0198): the first structural gene of a duramycin-type lantibiotic. Eur J Biochem **199**, 411-415.

Kato F, Eguchi Y, Nakano M, Oshima T and Murata A (1991) Purification and characterization of linecin A, a bacteriocin of *Brevibacterium linens*. Appl Environ Microbiol **45**, 1808-1815.

Keil H, Tittman U and Lingens F (1983) Degradation of aromatic carboxylic acids by *Acinetobacter*. System Appl Microbiol **4**, 313-325.

Kellner R, Jung EJ, Hornor T, Zahner H, Schnell N, Entian KD and Gotz F (1988) Gallidermin: a new lanthionine-containing polypeptide antibiotic. Eur J Biochem **177**, 53-59.

Kellner R, Jung G, Josten M, Kaletta C, Enrian KD and Sahl HG (1989) Pep5, a new lantibiotic: structure elucidation and amino acid sequence of the peptide. Angew Chem Int Ed Engl **28**, 616-619.

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.

Khesin RB and Karasyova EV (1984) Mercury-resistant plasmids in bacteria from a mercury and antimony deposit area. Mol Gen Genet **197**, 280-285.

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.

Klaenhammer TR, McKay LL and Baldwin KA (1978) Improved lysis of group N streptococci for isolation and rapid characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. Appl Environ Microbiol **35**, 592-600.

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

Kolter R and Moreno F (1992) Genetics of ribosomally synthesized peptide antibiotics. Annu Rev Microbiol **46**, 141-163.

Kozak W, Bardowski J and Dobrzanski WT (1978) Lactostrepcins-acid bacteriocins produced by lactic streptococci. J Dairy Res **45**, 247-257.

Kozak W, Bardowski J and Dobrzanski WT (1977) Lactostrepcin-a bacteriocin produced by *Streptococcus lactis*. Bull Acad Pol Sci (Biol) **25**, 217-221.

Larsen AG, Vogensen FK, Josephsen J (1993) Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs: purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* MI401. J Appl Bacteriol **75**, 113-122.

Lee KH, Jun KD, Kim WS and Paik HD (2001) Partial characterization of polyfermenticin SCD, a newly identified bacteriocin of *Bacillus polyfermenticus*. Lett Appl Microbiol **32**, 146-151.

Leer RJ, van der Vossen JM, van Giezen M, van Noort JM and Pouwels PH (1995) Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Microbiology 141, 1629-1635.

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.

Lopez-Lara I, Galvez A, Martinez-Bueno M, Maqueda M and Valdivia E (1991) Purification, characterization, and biological effects of a second bacteriocin from *Enterococcus faecalis* ssp. *liquefaciens* S-48 and its mutant strain B-48-28. Can J Microbiol 37, 769-774.

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.

Mach PA and Grimes DJ (1982) R-plasmid transfer in a wastewater treatment plant. Appl Environ Microbiol 44, 1395-1403.

Maiser-Patin S, Deschamps N, Tatini SR and Richard J (1992) Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Camembert cheese made with a nisin-producing starter. Lait 72, 249-263.

Marciset O and Mollet B (1993) Characterization of thermophilin 13, a bacteriocin of *Streptococcus thermophilus* Sfi13. FEMS Microbiol Rev 12, 129-625.

Mathieu F, Suwandhi 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.

May JW, Houghton RH and Perret CJ (1964) The effect of growth at elevated temperatures on some heritable properties of *Staphylococcus aureus*. J Gen Microbiol 37, 157-169.

Metivier A, Boyaval P, Duffes F, Dousset X, Compoint JP and Marion D (2000) Triton X-114 phase partitioning for isolation of a pediocin-like bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. Lett Appl Microbiol 30, 42-46.

Morrison NA, Hau CY, Trinick MJ, Shine J and Rolfe BG (1983) Heat curing of a *sym* plasmid in a fast-growing *Rhizobium* sp. that is able to nodulate legumes and the nonlegume *Parasponia* sp. J Bacteriol **153**, 527-531.

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, de Freire and Bastos Mdo C (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.

Nissen-Meyer J, Holo H, Havarstein LS, Sletten K and Nes IF (1992) A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. J Bacteriol **174**, 5686-5692.

Novick RP (1969) Extrachromosomal inheritance in bacteria. Bacteriol Rev **33**, 210-235.

O'keeffe T, Hill C and Ross RP (1999) Characterization and heterologous expression of the genes encoding enterocin a production, immunity, and regulation in *Enterococcus faecium* DPC1146. Appl Environ Microbiol **65**, 1506-1515.

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.

O'Sullivan DJ and Klaenhammer TR (1993) Rapid mini-prep isolation of high-quality plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* spp. Appl Environ Microbiol **59**, 2730-2733.

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.

Pinney RJ and Smith JT (1971) R-facter elimination by thymine starvation. Genet Res Camb **18**, 173-177.

Piva A and Headon DR (1994) Pediocin A, a bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* FBB61. Microbiology **140**, 697-702.

Pucci MI, Vedamuthu ER, Kunka BS and Vandenberg PA (1988) Inhibition of *Listeria monocytogenes* by using bacteriocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC1.0. Appl Environ Microbiol **54**, 2349-2335.

Rammelsberg M and Radler F (1990) Antibacterial polypeptides of *Lactobacillus* species. J Appl Bacteriol **69**, 177-184.

Reis M, Eschbach-Bludau M, Iglesias-Wind MI, Kupke T and Sahl HG (1994) Producer immunity towards the lantibiotic Pep5: identification of the immunity gene pepI and localization and functional analysis of its gene product. Appl Environ Microbiol **60**, 2876-2883.

Roberts RF and Zottola EA (1993) Shelf-life of pasteurized process cheese spreads made from cheddar cheese manufactured with a nisin-producing starter culture. J Dairy Sci **76**, 1829-1836.

Rubin SJ and Rosenblum ED (1971) Effects of ethidium bromide on growth and on loss of the penicillinase plasmid of *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol **108**, 1200-1204.

Ryan MP, Meaney WJ, Ross RP and Hill C (1998) Evaluation of lacticin 3147 and a teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. Appl Environ Microbiol 64, 2287-2290.

Sashihara T, Kimura H, Higuchi T, Adachi A, Matsusaki H, Sonomoto K and Ishizaki A (2000) A novel lantibiotic, nukacin ISK-1, of *Staphylococcus warneri* ISK-1: cloning of the structural gene and identification of the structure. Biosci Biotechnol Biochem 64, 2420-2428.

Schillinger U and Holzapfel WH (1990) Antibacterial activity of carnobacteria. Food Microbiol 7, 305-310.

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

Serdar CM, Gibson DT, Munnecke DM and Lancaster JH (1982) Plasmid involvement in parathion hydrolysis by *Pseudomonas diminuta* Appl Environ Microbiol 44, 246-249.

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

Sonstein SA and Baldwin JN (1972) Loss od the penicillinase plasmid after treatment of *Staphylococcus aureus* with sodium dodecyl sulfate. J Bacteriol 109, 262-265.

Southhamer AH, De Haan PG and Bulten EJ (1963) Kinetics od F-curing by acridine orange in relation to the number of F-Particles in *Escherichia coli* Genet Res Camb 4, 305-317.

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.

Stadler J and Adelberg EA (1972) Temperature dependence of sex-factor maintenance in *Escherichia coli* K-12. J Bacteriol 109, 447-449.

Stoddard GW, Petzel JP, van Belkum MJ Kok J and McKay LL (1992) Molecular analyses of the lactococcin A gene cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* WM4. Appl Environ Microbiol 58, 1952-1961.

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.

Suma K, Misra MC and Varadaraj MC (1998) Plantaricin LP84, a broad spectrum heat-stable bacteriocin of *Lactobacillus plantarum* NCIM 2084 produced in a simple glucose broth medium. Int J Food Microbiol 40, 17-25.

Tagg JR, Dajani AS and Wannamaker LW (1976) Bacteriocins 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.

Timoney JF and Linton AH (1982) Experimental ecological studies on H2 plasmids in the intestine and faeces of calf. J Appl Bacteriol 52, 417-424.

Toba T, Yoshioka E and Itoh T (1991a) Acidophilucin A, a new heat-labile bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* LAPT 1060. Lett Appl Microbiol 12, 106-108.

Toba T, Yoshioka E and Itoh T (1991b) Lacticin, a bacteriocin produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. Lett Appl Microbiol 12, 43-45.

Tomoeda M, Inuzuka M, Kubo N and Nakamura S (1968) Effective elimination of drug resistance and sex factors in *Escherichia coli* by sodium dodecyl sulfate. J Bacteriol 95, 1078-1089.

Trevors JT (1986) Plasmid curing in bacteria. FEMS Microbiol Rev 32, 149-157.

Upreti GC and Hinsdill RD (1975) Production and mode of action of lactocin 27: bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. Antimicrob Agents Chemother 7, 139-145.

van Belkum MJ, Hayema BJ, Jeeninga RE, Kok J and Venema G (1991) Organization and nucleotide sequences of two lactococcal bacteriocin operons. Appl Environ Microbiol 57, 492-498.

van Belkum MJ, Kok J and Venema G (1992) Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of *lcnB*, a third bacteriocin determinant from the lactococcal bacteriocin plasmid p9B4-6. Appl Environ Microbiol 58, 572-577.

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.

von Tersch MA and Carlton BC (1983) Bacteriocin from *Bacillus megaterium* ATCC 19213: comparative studies with megacin A-216. J Bacteriol 155, 866-871.

Walsh PM and McKay LL (1981) Recombinant plasmid associated cell aggregation and high-frequency conjugation of *Streptococcus lactis* ML3. J Bacteriol 146, 937-944.

Wechsler J and Kline BC (1980) Mutation and identification of the F-plasmid locus determining resistance to acridine orange curing. Plasmid 4, 276-280.

West C and Warner PJ (1988) Plantaricin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* NCDO 1193. FEMS Microbiol Lett 49, 163-165.

Woodruff WA, Novak J and Caufield PW (1998) Sequence analysis of mutA and mutM gene involved in the biosynthesis of the lantibiotic mutacin II in *Streptococcus mutans*. Gene 206, 37-43.

Worobo RW, van Belkun MJ, Sailer M, Roy KL, Vederas JC, Stiles ME (1995) A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. J Bacteriol 177, 3143-3149.

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

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.

1. acidocin J1229

6301 Da

Lactobacillus acidophilus JCM 1229

Tahara T and Kanatani K (1996)