

การโคลน และการแสดงออกของยีน *salvicin K4* ที่ผลิตโดย

Lactobacillus salivarius K4 ใน *Escherichia coli*

CLONING AND EXPRESSION OF *salvicin K4* GENE FROM
Lactobacillus salivarius K4 IN *Escherichia coli*



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางอาหารเกษตร

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2552

KMITL-2009-AG-M-101-026

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การโคลน และการแสดงออกของยีน *salvicin K4* ที่ผลิตโดย

Lactobacillus salivarius K4 ใน *Escherichia coli*

CLOWING AND EXPRESSION OF *salvicin K4* GENE FROM

Lactobacillus salivarius K4 IN *Escherichia coli*



T105158

ปิยฉัตร มีสวัสดิ์

PIYACHAT MEESAWAT

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....105158
วัน,เดือน,ปี...16 พ.ย. 2552

| |
|---------|
| .b..... |
| .i..... |

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกหรือเผยแพร่ข้อมูลของงานวิจัยนี้ไปยังบุคคลภายนอกเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พ.ศ. 2552
KMITL-2009-AG-M-101-026

**CLONING AND EXPRESSION OF *salvicin K4* GENE FROM
Lactobacillus salivarius K4 IN *Escherichia coli***



PIYACHAT MEESAWAT

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY
FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY**

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
2009

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

KMITL-2009-AG-M-101-026



COPYRIGHT 2009

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษานี้เท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่น
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|---------------------------------|---|
| หัวข้อวิทยานิพนธ์ | การโคลน และการแสดงออกของยีน <i>salvicin K4</i> ที่ผลิต |
| นักศึกษา | โดย <i>Lactobacillus salivarius K4</i> ใน <i>Escherichia coli</i> |
| รหัสประจำตัว | นางสาวปิยฉัตร มีสวัสดิ์ |
| ปริญญา | 49068907 |
| สาขาวิชา | วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต |
| พ. ศ. | วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต |
| อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ | เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร |
| อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม | 2552 |
| | ดร.คมเช ข พิลาสมบัติ |
| | ผศ.ดร.เกียรติทวี ชูวงศ์โกมล |

บทคัดย่อ

Lactobacillus salivarius K4 สร้างสารแบคทีเรียโอซิน *salvicin K4* ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อโคลนยีน *active salvicin K4* ให้มีการแสดงออกใน *Escherichia coli* และหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนแบคทีเรียโอซิน ทำการสร้างพลาสมิดขึ้นมาใหม่ โดยนำยีน *active salvicin K4* โคลนเข้าสู่ pTYB1 expression vector ที่มี intein-CBD เป็น fusion protein เพื่อให้มีการแสดงออกของแบคทีเรียโอซินยีน *active salvicin K4* จากนั้นทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียโอซิน โดยศึกษาความเข้มข้นของ IPTG 2 ระดับ คือ 0.5 และ 1 มิลลิโมลาร์ เทียบกับความเข้มข้นของแลคโตส 3 ระดับ คือ 6, 15 และ 30 มิลลิโมลาร์ ที่ใช้เป็นตัวกระตุ้น ในสภาวะของอุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส ผลการศึกษาพบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียโอซิน คือ การกระตุ้นด้วยแลคโตส ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วย chitin affinity column ที่จำเพาะกับ intein-CBD ผลจากการศึกษาพบว่า สามารถผลิตโปรตีนบริสุทธิ์ที่มีปริมาณ 44.8 มิลลิกรัมต่ออาหารที่ใช้เลี้ยง 1 ลิตร และจากนั้นนำโปรตีน intein *active salvicin K4* บริสุทธิ์ ไปทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ผลจากการศึกษาพบว่าโปรตีน intein *active salvicin K4* มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* TISTR 942 และ *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^T

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|--------------------------|--|
| Thesis Title | Cloning and expression of <i>salvicin K4</i> gene from <i>Lactobacillus salivarius K4</i> in <i>Escherichia coli</i> |
| student | Miss. Piyachat Meesawat |
| Student ID. | 49068907 |
| Degree | Master of Science |
| Program | Agricultural Biotechnology |
| Year | 2009 |
| Thesis Advisor | Dr. Komkhae Pilasombut |
| Thesis Co-Advisor | Aiss. Prof. Kiattawee Choowongkomon |

ABSTRACT

Lactobacillus salivarius K4 produced salvicin K4 bacteriocin that could inhibit several gram positive bacteria. The objectives of this study was to construct a pTYB1-*salvicin K4* plasmid (intein active salvicin K4) and to optimize conditions for a high yield expression of protein in *Escherichia coli* including concentrations of IPTG (0.5 and 1 mM), concentrations of lactose (6, 15 and 30 mM) and temperatures (25 and 37 °C). High yield of intein active salvicin K4 protein could be obtained by using 30 mM lactose as an inducer at 37 °C. Then protein purification was performed by using an chitin affinity column to obtain the high purified intein active salvicin K4 (44.8 mg/l). The purified protein possessed the activities against several gram positive bacteria, *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* TISTR 942 and *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^T

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้อย่างดีโดยได้รับความกรุณาจาก ดร. คมแข พิลาสมบัติ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผศ.ดร.เกียรติทวี ชูวงศ์โกมล จากภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์บางเขน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ ให้กำลังใจ ให้โอกาสได้เรียนรู้ และให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำวิทยานิพนธ์มา โดยตลอด ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งในความอนุเคราะห์จากท่านอาจารย์ทั้งสอง และขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่ง จากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ จากสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุกๆ ท่าน ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาให้กับข้าพเจ้า

ขอขอบคุณ น.ส.กรรณิกา ทองขาว น.ส.อนุสรณ์ วิเศษสิงห์ นายกัญจน์ ศิลป์ประสิทธิ์ น.ส. ศิริเกษ ฤทธิกิจ น.ส.สุภาภรณ์ สีทะหา รวมทั้งนักวิจัย และผู้ช่วยนักวิจัยทุกท่าน ห้องปฏิบัติการ Protein Engineering ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์บางเขน ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในเรื่องข้อมูล คำปรึกษา คอยให้กำลังใจ แนะนำการใช้อุปกรณ์เครื่องมือต่างๆ และวิธีการเตรียมสารเคมีที่ถูกต้อง ตลอดจนคำแนะนำต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จได้เป็นอย่างดี

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ในสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร และสาขาอื่นๆ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุกคนที่ให้คำแนะนำต่างๆ และคอยให้กำลังใจเสมอมา

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา พี่ๆ น้องๆ และเพื่อนๆ ทุกคน ที่เป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนในทุกเรื่องๆ ทำให้ข้าพเจ้าสามารถทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมาจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอบแต่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งหากมีการนำไปใช้

ปิยฉัตร มีสวัสดิ์

สารบัญ

| | หน้า |
|--|------|
| บทคัดย่อภาษาไทย..... | I |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... | II |
| กิตติกรรมประกาศ..... | III |
| สารบัญ..... | IV |
| สารบัญตาราง..... | VII |
| สารบัญภาพ..... | VIII |
| บทที่ 1 บทนำ..... | 1 |
| 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... | 1 |
| 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย..... | 3 |
| 1.3 สถานที่ดำเนินงาน..... | 3 |
| 1.4 สมมุติฐานของการศึกษา..... | 3 |
| 1.5 ขอบเขตงานวิจัย..... | 3 |
| 1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... | 4 |
| บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... | 5 |
| 2.1 แบคทีเรียกรดแลกติก..... | 5 |
| 2.2 อนุกรมวิธานของแบคทีเรียกรดแลกติก..... | 5 |
| 2.3 สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลกติก..... | 9 |
| 2.4 การใช้ประโยชน์แบคทีเรียโอซินในอุตสาหกรรมอาหาร..... | 23 |
| 2.5 แบคทีเรียโอซินที่สร้างโดย <i>Lb. salivarius</i> | 26 |
| 2.6 เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) | 33 |
| 2.7 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน | 34 |
| 2.8 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยระบบ intein fusion protein (IMPACT-CN System). | 35 |
| 2.9 Chitin Binding Domain (CBD)..... | 36 |
| บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย..... | 39 |
| 3.1 อุปกรณ์และสารเคมี..... | 39 |
| 3.2 สรุปขั้นตอนการทดลอง..... | 42 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่หรือใช้ในการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

| | หน้า |
|--|------|
| 3.3 วิธีการทดลอง..... | 43 |
| 3.3.1 ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรีย | 43 |
| 3.3.2 การสกัด DNA จาก <i>Lb. salivarius</i> K4 | 43 |
| 3.3.3 การออกแบบไพรเมอร์ สำหรับสังเคราะห์ยีน <i>salvicin K4</i> | 44 |
| 3.3.4 การเพิ่มปริมาณยีน <i>salvicin K4</i> ด้วยวิธี PCR | 45 |
| 3.3.5 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด โดยใช้ pGEM-T easy vector..... | 46 |
| 3.3.6 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนของยีน <i>active salvicin K4</i> | 46 |
| 3.3.6.1 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอ เพื่อการผลิตรีคอมบิแนนท์ของยีน <i>active salvicin K4</i> | 46 |
| 3.3.6.2 การเตรียมพลาสมิด pTYB1 Expression vector..... | 47 |
| 3.3.6.3 การเตรียม linear DNA ของพลาสมิด pTYB1 Expression vector..... | 48 |
| 3.3.6.4 การเชื่อมดีเอ็นเอยีน <i>active salvicin K4</i> เข้ากับ linear DNA ของ พลาสมิด pTYB1 Expression vector..... | 49 |
| 3.3.6.5 การย้ายดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน <i>E. coli</i> DH5α.... | 49 |
| 3.3.6.6 การคัดเลือกหาเซลล์ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม..... | 49 |
| 3.3.7 การผลิต และชักนำให้มีการสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีน..... | 50 |
| 3.3.7.1 การชักนำให้มีการสังเคราะห์โปรตีน..... | 50 |
| 3.3.7.2 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการชักนำให้มีการสังเคราะห์โปรตีน | 51 |
| 3.3.7.3 ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้มี การสังเคราะห์โปรตีนปริมาณมาก..... | 52 |
| 3.3.7.4 สภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้มีการสังเคราะห์โปรตีน ปริมาณมาก..... | 52 |
| 3.3.8 การทำโปรตีน intein <i>active salvicin K4</i> ให้บริสุทธิ์..... | 53 |
| 3.3.9 คุณสมบัติของ โปรตีนแบคทีเรีย โอซินบริสุทธิ์ต่อความสามารถใน การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทดสอบ | 54 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

| | หน้า |
|---|------|
| บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ | 56 |
| 4.1 จีโนมิกดีเอ็นเอของ <i>Lb. salivarius</i> K4 | 56 |
| 4.2 การเพิ่มปริมาณยีน <i>salvicin</i> K4 ด้วยวิธี PCR | 57 |
| 4.3 ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>inactive salvicin</i> K4 ที่ต่อกับ pGEM-T easy | 59 |
| 4.4 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนของยีน <i>active salvicin</i> K4 | 62 |
| 4.5 การผลิตและชักนำให้มีการสังเคราะห์โปรตีน | 64 |
| 4.6 การทำโปรตีน intein active <i>salvicin</i> K4 ให้บริสุทธิ์ | 70 |
| 4.7 คุณสมบัติของ โปรตีนแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์ต่อความสามารถใน การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทดสอบ | 76 |
| บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง..... | 85 |
| บรรณานุกรม..... | 87 |
| ภาคผนวก..... | 94 |
| ภาคผนวก ก | 95 |
| ภาคผนวก ข | 100 |
| ประวัติผู้เขียน..... | 102 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

| ตารางที่ | หน้า |
|--|------|
| 1 ความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียโอซินและสารปฏิชีวนะ..... | 13 |
| 2 แบคทีเรียโอซินกลุ่ม I : Lantibiotic | 14 |
| 3 แบคทีเรียกรดแลกติกที่ผลิตแบคทีเรียโอซินกลุ่ม IIa | 15 |
| 4 แบคทีเรียกรดแลกติกที่ผลิตแบคทีเรียโอซินกลุ่ม IIb..... | 16 |
| 5 แบคทีเรียกรดแลกติกที่ผลิตแบคทีเรียโอซินกลุ่ม IIc..... | 17 |
| 6 แบคทีเรียกรดแลกติกที่ผลิตแบคทีเรียโอซินกลุ่ม III | 17 |
| 7 แบคทีเรียกรดแลกติกที่ผลิตแบคทีเรียโอซินกลุ่ม IV..... | 18 |
| 8 แบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลกติกที่แยกได้จากอาหารชนิดต่างๆ..... | 22 |
| 9 แบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเสื่อมเสีย ซึ่งถูกยับยั้งโดยแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลกติกชนิดต่างๆ | 23 |
| 10 ผลการทดลองประยุกต์ใช้แบคทีเรียโอซินในการถนอมอาหารชนิดต่างๆ..... | 25 |
| 11 คุณสมบัติของยีนที่พบ ใน <i>Lb. salivarius</i> UCC 118 | 28 |
| 12 ไพร์เมอร์ที่ใช้สำหรับการสังเคราะห์ยีน <i>salvicin K4</i> | 45 |
| 13 ส่วนประกอบของสารละลายสำหรับกระบวนการทำ PCR | 46 |
| 14 เชื้อแบคทีเรียทดสอบ..... | 55 |
| 15 การเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนของ <i>salvicin K4</i> ที่ผลิตโดย <i>Lb. salivarius</i> K4 กับ inactive <i>salvicin K4</i> ที่เชื่อมอยู่กับ pGEM-T | 60 |
| 16 ปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ได้จากการเปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารที่ เหมาะสมในการชักนำให้มีการสังเคราะห์โปรตีน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส..... | 67 |
| 17 ปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ได้จากการเปรียบเทียบความเข้มข้นของ IPTG และแลคโตส ในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน..... | 69 |
| 18 ประสิทธิภาพของ intein active <i>salvicin K4</i> ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของ เชื้อแบคทีเรียทดสอบ..... | 77 |
| 19 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทดสอบ..... | 82 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ห้ามเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ

สารบัญญภาพ

| ภาพที่ | | หน้า |
|--------|--|------|
| 1 | กระบวนการสังเคราะห์แบคเทอรีโอซิน class II | 19 |
| 2 | การรวมกันของโมเลกุลแบคเทอรีโอซิน ทำให้เกิดเป็นรูหรือช่องว่างที่เชื่อมหุ้มเซลล์ เรียกว่า Barrel-stave | 22 |
| 3 | โครงสร้างของแบคเทอรีโอซิน Class II และการเข้าจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมาย | 21 |
| 4 | การเรียงตัวของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์แบคเทอรีโอซินบนโครโมโซมของ <i>Lb. salivarius</i> UCC 118..... | 27 |
| 5 | เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับระบบฐานข้อมูลของ GenBank | 30 |
| 6 | ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของแบคเทอรีโอซินที่ผลิตโดย <i>Lb. salivarius</i> K4..... | 31 |
| 7 | เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน ที่ได้จากการเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์ เป็นลำดับกรดอะมิโน กับระบบฐานข้อมูลของ GenBank | 32 |
| 8 | โครงสร้างของ pTYB expression vector | 37 |
| 9 | การแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ (Protein Purification)..... | 38 |
| 10 | ลักษณะของยีนแบคเทอรีโอซินก่อนที่จะมีการแสดงออก..... | 44 |
| 11 | ขนาดของจีโนมมิกซีเอ็นเอของ <i>Lb. salivarius</i> K4 เทียบกับ <i>λ</i> Hind III | 56 |
| 12 | ขนาดของยีน <i>salvicin K4</i> ในรูป active form และ inactive form | 57 |
| 13 | แผนภาพแสดงการออกแบบไพรเมอร์จากกลุ่มยีนของ <i>Lb. salivarius</i> UCC 118..... | 58 |
| 14 | เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>inactive salvicin K4</i> ที่เชื่อมอยู่กับ pGEM-T กับยีน <i>salvicin K4</i> ที่ผลิตโดย <i>Lb. salivarius</i> K4..... | 59 |
| 15 | เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ <i>salvicin K4</i> ที่ผลิตโดย <i>Lb. salivarius</i> K4 กับลำดับกรดอะมิโน <i>inactive salvicin K4</i> ที่เชื่อมอยู่กับ pGEM-T..... | 60 |
| 16 | เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ <i>inactive salvicin K4</i> กับลำดับกรดอะมิโน <i>abp118β</i> ที่ผลิตโดย <i>Lb. salivarius</i> UCC 118..... | 60 |
| 17 | เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ <i>salvicin K (sal K)</i> ที่ผลิตโดย <i>Lb. salivarius</i> K4 กับ <i>abp118α</i> ที่ผลิตโดย <i>Lb. salivarius</i> UCC 118..... | 61 |

สารบัญญภาพ

| ภาพที่ | หน้า |
|--------|--|
| 18 | เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ <i>salvicin K4</i> ที่ผลิตโดย <i>Lb. salivarius K4</i> กับ <i>abp118β</i> ที่ผลิตโดย <i>Lb. salivarius UCC 118</i> 61 |
| 19 | เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ <i>salvicin K4</i> ที่ผลิตโดย <i>Lb. salivarius K4</i> กับ <i>abp118β</i> ที่ผลิตโดย <i>Lb. salivarius UCC 118</i> 61 |
| 20 | ตรวจสอบโคโลนีที่มีสี <i>active salvicin K4</i> สอดแทรกอยู่ด้วยวิธี PCR..... 62 |
| 21 | เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ <i>active salvicin K4</i> ที่ถูกแทรกเข้าสู่พลาสมิด <i>pTYB1</i> กับ <i>inactive salvicin K4</i> ที่เชื่อมอยู่กับ <i>pGEM-T</i> 63 |
| 22 | แผนภาพพลาสมิด <i>pTYB1-salvicin K4</i> แสดงตำแหน่งของยีน <i>active salvicin K4</i> ที่ติดอยู่กับ <i>intein-CBD</i> 63 |
| 23 | ผลการเหนี่ยวนำโปรตีน <i>intein active salvicin K4</i> เทียบกับ โปรตีน <i>intein-CBD</i> ของพลาสมิด <i>pTYB1</i> ด้วย IPTG..... 64 |
| 24 | ระยะเวลาที่เหมาะสมในการกระตุ้นให้เกิดการผลิตโปรตีน <i>intein active salvicin K4</i> 66 |
| 25 | เปรียบเทียบความเป็นกรด-ด่างของอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้มีการสังเคราะห์โปรตีน <i>intein active salvicin K4</i> ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 68 |
| 26 | ความบริสุทธิ์ของโปรตีน <i>intein active salvicin K4</i> ที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วย <i>chitin affinity column</i> 72 |
| 27 | ตรวจสอบขนาดและความบริสุทธิ์ของโปรตีน <i>intein active salvicin K4</i> 73 |
| 28 | การตัดโปรตีน <i>intein active salvicin K4</i> ด้วย <i>self cleavage buffer</i> ที่มีความเข้มข้นของ <i>DTT</i> แตกต่างกัน 74 |
| 29 | โปรตีน <i>intein active salvicin K4</i> ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> TISTR 942 และ <i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> JCM 6124 ^T เทียบกับ <i>intein-CBD</i> 79 |
| 30 | โปรตีน <i>intein active salvicin K4</i> ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Lb. sakei</i> subsp. <i>sakei</i> JCM 1157 ^T เทียบกับ <i>intein-CBD</i> 80 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันประเทศไทยกำลังพัฒนาจากภาคการเกษตรเข้าสู่ภาคอุตสาหกรรม รวมทั้งการแปรรูปผลิตภัณฑ์ และการส่งออกสินค้าที่ได้จากการเกษตรกรรม ในขณะเดียวกันประเทศไทยกำลังประสบกับปัญหาโรคไข้หวัดนก ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญในการส่งออก เนื่องจากปัจจุบันได้มีการห้ามนำเข้าเนื้อสดจากประเทศไทย แต่อยู่ในรูปของผลิตภัณฑ์แปรรูปเนื้อสัตว์เพื่อการส่งออกมากขึ้น แม้จะพยายามควบคุมความปลอดภัยด้วยระบบ Good Manufacturing Practice (GMP) และ Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) ในขบวนการผลิต แต่ก็ยังพบจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนได้ในขั้นตอนการผลิต จากปัญหาดังกล่าวจึงส่งผลกระทบต่อผู้บริโภค ซึ่งถ้าได้รับเชื้อที่ก่อโรคเข้าไปอาจทำให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพผู้บริโภค ทำให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการแปรรูป และการส่งออกเนื้อสัตว์อย่างมาก ดังนั้น การลดปริมาณการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในเนื้อสัตว์จึงเป็นอีกปัญหาหนึ่งที่ต้องได้รับการแก้ไข

แบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria) เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ได้นำมาใช้เพื่อการควบคุมเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารต่างๆ รวมทั้งเนื้อสัตว์ โดยแบคทีเรียกรดแลคติกพบได้ทั่วไปตามธรรมชาติ และมีบทบาทสำคัญในอาหารหมักชนิดต่างๆ เช่น นมเปรี้ยว โยเกิร์ต ซีอิ๊ว แหนม ไข่กรอก สัตว์น้ำที่แปรรูปโดยผ่านกระบวนการหมัก และดอง นอกจากนี้ยังพบว่า เป็นเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ และมนุษย์ เช่น *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. salivarius* เป็นต้น โดยแบคทีเรียดังกล่าวช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค และแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียที่ปนเปื้อนมาในผลิตภัณฑ์ด้วยสารเมแทบอไลต์ (metabolite) ที่สร้างขึ้น เช่น กรดอินทรีย์ (organic acids) คาร์บอนไดออกไซด์ (carbondioxide) ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) ไดอะซีทิล (diacetyl) และแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) ปัจจุบันแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก ได้รับความสนใจและมีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง โดยสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการถนอมอาหารด้วยวิธีการทางชีวภาพ (biopreservation) ซึ่งเป็นวิธีการที่เลียนแบบมาจากการรักษาสมดุลของจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ ในธรรมชาติ จึงไม่มีสารพิษตกค้างเหมือนการใช้สารเคมี (Schillinger *et al.* 1996; Rodriguez *et al.* 2003) ดังนั้น Food and Drug Administration (FDA) จึงกำหนดให้การถนอมอาหารโดยใช้แบคทีเรียกรดแลคติก และแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นวิธีที่มีความปลอดภัย (Generally Recognized As Safe, GRAS) นอกจากนี้ยังมีการนำแบคเทอริโอซินไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารประเภทต่างๆ อีก เช่น นม ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ สัตว์น้ำ อาหารกระป๋อง และ

เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับอาหาร

Lb. salivarius เป็นแบคทีเรียกรดแลกติกที่พบได้ทั่วไปในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ จัดเป็นเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นที่ช่วยในการรักษาสมดุลของจุลินทรีย์ต่างๆ ที่อาศัยอยู่ในทางเดินอาหารของสัตว์ และยังพบว่า *Lb. salivarius* สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินที่จำเป็นต่อระบบทางเดินอาหาร เพราะช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ก่อโรคได้ นอกจากนี้สารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *Lb. salivarius* ยังจัดเป็นสารชีวภาพที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการถนอมอาหารแทนการใช้สารเคมีได้อีกด้วย (Robredo and Torres, 2000)

จากการศึกษาเบื้องต้นของ Pilasombut *et al.* (2006a และ b) ได้ทำการคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลกติกจากลำไส้ไก่ที่สามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซินได้ และพบว่า *Lb. salivarius* K4 และ K7 สามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซิน โดยสารแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Lb. salivarius* K4 มี 2 ชนิด คือ salivarin B (*sal B*) และ salvicin K (*sal K*) นอกจากนี้ยังพบยีน *salvicin K4* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกับ *abp118β* ที่ผลิตโดย *Lb. salivarius* UCC 118 ซึ่งพบว่า ส่วนใส (supernatant) ของอาหารที่ใช้เลี้ยง *Lb. salivarius* K4 สามารถยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^T, *Enterococcus faecalis* JCM 5803^T, *Bacillus coagulans* JCM 2257^T, *Listeria innocua* ATCC 33090^T และ *Brochotrix campestris* NBRC 11547^T ส่วนแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *Lb. salivarius* K7 สร้างแบคทีเรียโอซิน *abp118β* และสามารถยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T, *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^T และ *B. coagulans* JCM 2257^T แต่เนื่องจากแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์ที่ผลิตได้มีปริมาณน้อยใช้เวลานาน และมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง จึงนำแนวคิดทางด้านพันธุวิศวกรรมมาใช้ในการผลิตสารแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์ให้ได้ปริมาณที่สูง และเป็นสารที่มีความคงตัว โดยการโคลนยีนที่ผลิตแบคทีเรียโอซินลงในพลาสมิด และชักนำให้มีการแสดงออกของยีนแบคทีเรียโอซินในเซลล์ผู้รับ เพื่อนำสารแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์ที่ได้มาใช้ในการศึกษาต่อไป เช่น ทดสอบโปรตีนแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรค และเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในเนื้อสัตว์ การผลิตแบคทีเรียโอซินให้มีปริมาณมากนับว่ามีประโยชน์ในการนำมาใช้ในงานอุตสาหกรรม โดยเฉพาะอุตสาหกรรมเนื้อสัตว์ และอุตสาหกรรมแปรรูปผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ซึ่งการนำแบคทีเรียโอซินมาใช้ประโยชน์ในการลดปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในอาหารจะทำให้ผู้บริโภคมีความปลอดภัยในการบริโภคอาหารมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อผลิตแบคทีเรียโอซินให้มีการแสดงออกใน *Escherichia coli* ด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม
2. เพื่อผลิตแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์ให้ได้ปริมาณที่มากขึ้น
3. เพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย

1.3 สถานที่ดำเนินงาน

1. ห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์เนื้อสัตว์ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
2. ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.4 สมมุติฐานของการศึกษา

แบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก ได้รับความสนใจและมีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง โดยสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการถนอมอาหารด้วยวิธีการทางชีวภาพ (biopreservation) ซึ่งเป็นวิธีการที่เลียนแบบมาจากการรักษาสมดุลของจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ ในธรรมชาติ จึงไม่มีสารพิษตกค้างเหมือนการใช้สารเคมี สารแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์ที่ผลิตได้มีปริมาณน้อย ใช้เวลานาน และมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง ดังนั้น จึงนำแนวคิดทางด้านพันธุวิศวกรรมมาใช้ในการผลิตสารแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์ให้ได้ปริมาณมาก โดยการโคลนยีนที่ผลิตแบคทีเรียโอซินลงในพลาสมิดที่มีความเหมาะสม ชักนำให้มีการแสดงออกของยีนในเซลล์ผู้รับ และนำแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์ที่ผลิตได้มาใช้ในการทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ ต่อไป

1.5 ขอบเขตการวิจัย

ทำการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อ *Lb. salivaruis* K4 แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *salvicin* K4 จากนั้นทำการเชื่อมต่อยีนกับ pTYB1 expression vector แล้วนำพลาสมิดที่มียีนแบคทีเรียโอซินมาชักนำให้มีการแสดงออกในสภาวะที่เหมาะสม เพื่อผลิตแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์ให้ได้ปริมาณมาก และนำแบคทีเรียโอซิน บริสุทธิ์มา

ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ ต่อไป

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถโคลนยีนแบคทีเรียโอซิน *salvicin K4* และสามารถผลิตสารแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์ได้ในปริมาณมาก
2. ทราบถึงคุณสมบัติของแบคทีเรียโอซินต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แบคทีเรียกรดแลกติก

การศึกษาอนุกรมวิธานของแบคทีเรียกรดแลกติก โดยอาศัยลักษณะทางกายภาพ สมบัติทางชีวเคมี ลักษณะพื้นฐาน องค์ประกอบของผนังเซลล์ กรดไขมันภายในเซลล์ ไอโซพรีนอยด์ (isoprenoid) ควิโนน (quinone) รวมทั้งการศึกษาระดับโมเลกุล เช่น mol % G+C ของดีเอ็นเอ การเข้าคู่กันของ DNA และลำดับเบสบน rRNA ทำให้พบลักษณะที่แตกต่างกันของแบคทีเรียแต่ละสกุล ปัจจุบันสามารถจำแนกแบคทีเรียกรดแลกติกออกได้เป็น 12 สกุล ได้แก่ *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Aerococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Carnobacterium*, *Weissella* และ *Lactobacillus* (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2544)

แบคทีเรียกรดแลกติกจัดอยู่ในตระกูล Lactobacillaceae เจริญได้ในสภาพที่มีอากาศเพียงเล็กน้อย (microaerophile) หรือไม่มีอากาศ (strictly anaerobe) เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่ได้พลังงานจากการหมักน้ำตาลโดยไม่ใช้ออกซิเจน จึงมีความต้องการสารอาหารที่ค่อนข้างซับซ้อนและสมบูรณ์ และ กักคิ สุขพันธ์ (2548) รายงานว่า แบคทีเรียกรดแลกติกเป็นแบคทีเรียกลุ่มใหญ่ที่มีความหลากหลายของลักษณะฟีโนไทป์ ชีวเคมี และสรีระวิทยา เนื่องจากมีความแตกต่างของ mol % G+C ภายในสกุลสูง ลักษณะของเซลล์มีรูปร่างท่อนหรือทรงรี (cocci) ทนต่อกรดและต้องการสารอาหารหลายชนิด บางสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์เทียม (pseudo-catalase) ได้ มีคุณสมบัติเป็น โปรไบโอติกสำหรับมนุษย์ และสัตว์

2.2 อนุกรมวิธานของแบคทีเรียกรดแลกติก

แบคทีเรียกรดแลกติก (lactic acid bacteria) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีลักษณะสำคัญคือ ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ หมักคาร์โบไฮเดรตเป็นกรดแลกติก และแอลกอฮอล์ รูปร่างเป็นแท่ง (rod) และกลม (cocci) แบคทีเรียกรดแลกติกจัดอยู่ใน family Lactobacillaceae ซึ่งมีอยู่ 2 กลุ่มใหญ่คือ กลุ่ม homofermentative และกลุ่ม heterofermentative โดยกลุ่มแรกสามารถสร้างกรดแลกติกจากน้ำตาลกลูโคส หรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 ตัว อื่นๆ ได้กรดแลกติกประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ ที่เหลือจะเปลี่ยนไปเป็นกรดอะซิติกจากน้ำตาลกลูโคส หรือน้ำตาลที่มีคาร์บอนไดออกไซด์อีกเล็กน้อย ส่วนแบคทีเรียกลุ่มหลังสามารถผลิตกรดแลกติกจากน้ำตาลกลูโคส หรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 ตัว ได้กรดแลกติกประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ได้กรดอะซิติกรวมทั้งเอทานอล 20-25 เปอร์เซ็นต์ และคาร์บอนไดออกไซด์ 20-25 เปอร์เซ็นต์

การศึกษาอนุกรมวิธานของแบคทีเรียกรดแลกติกโดยอาศัยลักษณะทางกายภาพ สมบัติทางชีวเคมี ลักษณะสัณฐาน องค์ประกอบของผนังเซลล์ กรดไขมันภายในเซลล์ ไอโซพรีนอยด์ (isoprenoid) ควิโนน (quinone) รวมทั้งการศึกษาในระดับโมเลกุล เช่น mol % G+C ของดีเอ็นเอ การเข้าคู่กันของดีเอ็นเอ และลำดับเบสบน rRNA ทำให้พบลักษณะที่แตกต่างกันของแบคทีเรียแต่ละสกุล ปัจจุบันสามารถจำแนกแบคทีเรียกรดแลกติกออกได้เป็น 12 สกุล (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2544) ได้แก่

2.2.1 *Streptococcus*

เป็นแบคทีเรียรูปร่างกลมหรือรูปไข่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8-1.2 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นคู่หรือโซ่ ต้องการสารอาหารหลายชนิด เจริญที่อุณหภูมิ 20-40 องศาเซลเซียส ประกอบด้วย 39 สปีชีส์ ประกอบด้วยสปีชีส์ที่ทำให้เกิดโรคและสปีชีส์ที่มีการใช้เป็นกล้าเชื้อในอุตสาหกรรมนมหมัก (Hardie and Whiley. 1995)

2.2.2 *Lactococcus*

เดิมอยู่ในสกุล *Streptococcus* มีรูปร่างเป็นรูปไข่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นเชลล์เดี่ยว คู่ หรือต่อกันเป็นสายโซ่ ไม่เคลื่อนที่ เจริญที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส มี mol % G+C 34-43 ประกอบด้วย 5 สปีชีส์ คือ *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *Lc. lactis* subsp. *hordinae*, *Lc. garvieae*, *Lc. plantarum*, *Lc. reffinolactis* และ *Lc. piscium* (Teuber. 1995)

Seuk-Hyun and Cheol (2000) ได้คัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ KCA238-6 จาก white kimchi สามารถผลิตสารแบคเทอริโอซิน ยับยั้งแบคทีเรียกรดแลกติกชนิดอื่น และแบคทีเรียก่อโรคได้ หลังจากจำแนกเชื้อพบว่า เป็น *Lc. lactis* ให้ชื่อว่า *Lc. lactis* KCA 2386 ซึ่งพบว่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมคือ 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลกติกส่วนใหญ่จะมีผลการยับยั้งต่อเชื้อทดสอบสายพันธุ์ใกล้เคียงกับแบคทีเรียกรดแลกติก ในขณะที่แบคเทอริโอซินบางชนิด เช่น nisin และ pediocin จะมีผลในการยับยั้งทั้งสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับแบคทีเรียกรดแลกติก และสายพันธุ์อื่นที่ไม่มีความใกล้เคียงกัน

2.2.3 *Vagococcus*

เป็นแบคทีเรียที่แยกมาจาก *Streptococcus* เดิม เนื่องจากสามารถเคลื่อนที่ได้ ประกอบไปด้วย 2 สปีชีส์ คือ *V. fluvialis* และ *V. salmoninarum* ซึ่งแยกได้จากปลาแซลมอนที่เป็นโรค (Stiles and Holzapfel. 1997)

2.2.4 *Enterococcus*

เปลี่ยนชื่อมาจาก *Streptococcus* มีรูปร่างกลม จัดเรียงตัวเป็นเชลล์เดี่ยวหรือสายโซ่สั้นๆ สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส ระดับความเป็นกรด-ด่าง 9.6 โซเดียมคลอไรด์ 6.5 เปอร์เซ็นต์ และน้ำดี 40 เปอร์เซ็นต์ มีลำดับเบสบน 16S rRNA ใกล้เคียงกับ *Carnobacterium* และ *Vagobacterium* มากกว่า *Streptococcus* และ *Lactococcus* มี mol % G+C 37-40

Ohmomo *et al.* (1998) กล่าวว่า *Enterococci* เป็นแบคทีเรียโดยธรรมชาติจะพบอยู่ในอาหารหมักพื้นเมืองหลายอย่างในเมดิเตอร์เรเนียน และแอฟริกา ยังพบอีกว่าเชื่อนี้จะพบในสิ่งขับถ่าย ซึ่งจะมีปัญหาสำหรับการควบคุมความปลอดภัยของอาหาร แบคทีเรียกรดแลคติกหลายชนิดจะสร้าง แบคทีเรียโอซิน ซึ่งสามารถเป็นตัวช่วยในการถนอมอาหารตามธรรมชาติ เพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุให้อาหารเน่าเสีย และจุลินทรีย์ที่ก่อโรค แบคทีเรียโอซินจาก *Enterococci* จะมีประโยชน์ในการถนอมอาหารหมักพื้นเมือง ในการศึกษาเพื่อแยกเชื้อที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินจาก 50 สายพันธุ์ พบว่า *E. faecium* 30 สายพันธุ์และ *E. faecalis* 4 สายพันธุ์ สามารถสร้างสารยับยั้งในอาหารเหลวได้ และพบว่าเวลาที่เหมาะสมในการสร้างแบคทีเรียโอซินจะแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ แบคทีเรียโอซินบางชนิดจะตรวจสอบได้ในระยะ log phase ของการเจริญ ขณะที่บางชนิดจะตรวจพบได้ในระยะ stationary phase ของการเจริญเท่านั้น

2.2.5 *Pediococcus*

มีรูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.36 –1.43 ไมครอน มีการแบ่งตัวในลักษณะ 2 ทิศทางบนระนาบเดียวกัน ทำให้เกิดการเรียงตัวเป็นคู่หรือสี่เซลล์ติดกัน มี mol % G+C 34-44 ประกอบด้วย 6 สปีชีส์ ได้แก่ *Pediococcus acidilactici*, *P. damonosus*, *P. dextrinicus*, *P. inopinatus*, *P. parvulus* และ *P. pentosaceus* (Simpson and Taguchi. 1995)

2.2.6 *Tetragenococcus*

เปลี่ยนมาจาก *P. halophilus* เดิม มีรูปร่างกลม การแบ่งตัวเหมือนกับ *Pediococcus* และมีลำดับเบสบน 16S rRNA แตกต่างจาก *Pediococci* ต้องการ โซเดียมคลอไรด์ในการเจริญถึง 18 เปอร์เซ็นต์ (Simpson and Taguchi. 1995)

2.2.7 *Aerococcus*

มีรูปร่างกลม การแบ่งตัวเหมือนกับ *Pediococcus* มีปริมาณ mol % G+C ต่ำ ประกอบด้วย 2 สปีชีส์คือ *Aerococcus viridans* และ *A. urinae* ซึ่งเปลี่ยนมาจาก *P. homari* และ

P. urinae ตามลำดับ (Stiles and Holzapfel. 1997)

2.2.8 *Leuconostoc*

มีรูปร่างกลม จัดเรียงตัวเป็นคู่หรือเดี่ยว หมักน้ำตาลกลูโคสแบบ heterofermentative ได้ผลิตภัณฑ์คือ กรดแลกติก ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และสารหอมระเหย เช่น กรดอะซิติก เมธานอล ประกอบด้วย 8 สปีชีส์ ได้แก่ *Leuc. mesenteroides*, *Leuc. lactis*, *Leuc. gelidum*, *Leuc. carnosum*, *Leuc. pseudomesenteroides*, *Leuc. citreum*, *Leuc. argentinum* และ *Leuc. fallax* (Dellaglio et al. 1995)

2.2.9 *Oenococcus*

มีรูปร่างกลม เปลี่ยนมาจาก *L. oeos* เดิม เนื่องจากมีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างจาก *Leuconostoc* ทนต่อแอลกอฮอล์ และกรดได้ดีกว่า รวมทั้งข้อมูลพันธุกรรมจากดีเอ็นเอ : ดีเอ็นเอไฮบริโดเซชัน และลำดับเบสของ 16s rRNA ต่างจากสปีชีส์อื่นในสกุล *Leuconostoc* อย่างเห็นได้ชัด (Dellaglio et al. 1995)

2.2.10 *Lactobacillus*

เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มใหญ่ที่สุด มีความหลากหลายของลักษณะฟีโนไทป์ชีวเคมี และสรีระวิทยา เนื่องจากมีความแตกต่างของ mol % G+C ภายในสกุลสูงระหว่าง 32-53 เปอร์เซ็นต์ เซลล์มีรูปร่างท่อนหรือทรงรี (coccobacilli) ทนต่อกรด และต้องการสารอาหารหลายชนิด ประกอบด้วย 55 สปีชีส์ บางสายพันธุ์สามารถผลิตคะตะเลสเทียม (pseudo-catalase) พบบริเวณลำไส้เล็กของสัตว์มีกระดูกสันหลังและพืช ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น โปรไบโอติกสำหรับมนุษย์และสัตว์

Ulrike et al. (2002) พบว่า *Lactobacillus* K7 ที่แยกได้จากอุจจาระของทารกอายุ 1 สัปดาห์ มีความสามารถในการสร้าง bacteriocin-like activity ต่อแบคทีเรียกรดแลคติกสปีชีส์อื่นๆ หลายชนิดรวมทั้ง *Clostridium* sp. และพบว่ามีความสัมพันธ์เป็น โปรไบโอติก เช่น ทนต่อค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำ ทนต่อกรดน้ำดี และสามารถผลิตแบคทีริโอซินได้สูงสุดในระยะ log phase ของการเจริญ

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

2.2.11 *Carnobacterium*

เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างแท่งคล้าย *Lactobacilli* แต่ต่างกันว่าไม่สามารถเจริญบนอาหารอะซีเตต เจริญที่ระดับความเป็นกรดค่า 8.5-9.0 จัดเรียงตัวเป็นเชลล์เดี่ยวหรือคู่ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-0.7 ไมครอน และยาว 1.0-3.0 ไมครอน ประกอบด้วย 6 สปีชีส์ ได้แก่ *Carnobacterium duvergens*, *C. piscicola*, *C. gallinarum*, *C. mobile*, *C. funditum* และ *C. alterfunditum* (Schillinger and Holzapel. 1996)

2.2.12 *Weissella*

เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกสกุลเดียวที่มีทั้งสปีชีส์ที่มีรูปร่างกลม และแท่ง ประกอบด้วย 7 สปีชีส์ ซึ่งเคิมอยู่ในสกุล *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* คือ *Weissella paramesenteroides* (*Leuc. paramesenteroides*), *W. confusus* (*Lb. confusus*), *W. halotolerans* (*Lb. Halotolerans*), *W. kandleri* (*Lb. Kandleri*), *W. minor* (*Lb. Minor*), *W. viridescens* (*Lb. Viridescens*) และสปีชีส์ใหม่ที่แยกจากไส้กรอกเปรี้ยว คือ *W. hellenica* (Stiles and Holzapel. 1997)

2.3 สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติก นอกจากจะมีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดกลิ่นเฉพาะตัวในอาหารหมักแล้ว ยังสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญ และทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเกิดการเน่าเสีย และจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ซึ่งปะปนมากับอาหาร เช่น *B. cereus*, *C. botulinum*, *C. perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *L. monocytogenes* เป็นต้น ซึ่งสารที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างออกมาส่วนใหญ่เป็นกรดแลคติก และกรดอะซิติก นอกจากนี้ยังมีสารชนิดอื่นๆ ที่เกิดขึ้นในปริมาณน้อย แต่มีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่างๆ เช่นกัน ได้แก่ กรดฟอร์มิก (formic acid), กรดไขมันอิสระ (free fatty acid), แอมโมเนีย (ammonia), เอทานอล (ethanol), ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide), ไดอะซีทิล (diacetyl), อะซีโตอิน (acetoin), อะซีทัลดีไฮด์ (acetaldehyde), เบนโซเอต (benzoate), เอนไซม์ที่มีผลทำให้เชลล์แบคทีเรียแตก (bacteriolytic enzyme) และแบคทีริโอซิน (bacteriocin) รวมทั้งสารยับยั้งที่ยังไม่สามารถจัดจำแนกได้อีกหลายชนิด (Franz *et al.* 1998) นอกจากนี้การที่มีแบคทีเรียกรดแลคติกเจริญอยู่ร่วมกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ จะเป็นการควบคุมแบคทีเรียเหล่านั้นโดยทางอ้อมคือ จะทำให้เกิดการแข่งขันกันในการใช้สารอาหาร และการใช้พื้นที่สำหรับการเติบโต (Hechard and Sahl. 2002)

สารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ ซึ่งสร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีการศึกษากันมาก จากรายงานของ ภัคดี สุขพันธ์ (2548) ได้แก่

2.3.1 กรดอินทรีย์ (Organic acid)

กรดอินทรีย์ที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลกติก ได้แก่ กรดแลกติก และกรดอะซิติก สำหรับกรดอะซิติกสามารถยับยั้งได้ดีกว่ากรดแลกติก และมีช่วงการยับยั้งที่กว้าง สามารถยับยั้งได้ทั้งยีสต์ รา และแบคทีเรีย การใช้กรดทั้งสองชนิดนี้ร่วมกันสามารถลดอัตราการเจริญของ *Salmonella Typhimurium* ได้มากกว่าการใช้กรดชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงอย่างเดียว จึงกล่าวได้ว่ากรดทั้งสองมี synergistic activity เมื่อกรดอินทรีย์เข้าไปภายในเซลล์แล้วกรดจะแตกตัวปล่อยโปรตอนเข้าไปใน cytoplasm ทำให้เกิดภาวะที่เป็นกรดจึงทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้

กรดแลกติกจะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์แตก และเอนไซม์ถูกปลดปล่อยออกมาออกเซลล์ หรืออาจจะแทรกผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียได้โดยตรง และเข้าไปอยู่ในส่วนของ cytoplasm ดังนั้น จึงเกิดการปลดปล่อยโปรตอนออกมาออกเซลล์เพื่อรักษาสมดุล จากผลนี้จะทำให้เกิดการทำลายแรงขับเคลื่อนของโปรตอน (proton motive force) ทำลายกระบวนการ uncouple oxidative phosphorylation และการเคลื่อนย้ายสารอาหารต่างๆ ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

Carina *et al.* (2001) ได้ทำการศึกษา *Lb. salivarius* ที่แยกได้จากกระเพาะพัก และถ้าใส่ไก่ พบว่า สามารถสร้างกรดอินทรีย์มายับยั้งการเจริญของ *E. coli* และ *Salmonella Enteritidis* ได้

2.3.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นสารที่ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึมในระหว่างการเจริญของแบคทีเรียทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ สามารถพบได้ในแบคทีเรียกรดแลกติก เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลกติกไม่ผลิตเอนไซม์คะตะเลส ซึ่งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีผลต่อแบคทีเรียที่ไม่สามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลส เพราะไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นของการเกิด superoxide radicals (O_2^-) และ hydroxyl radicals (OH^\cdot) ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สะสมเป็นจำนวนมาก ก็จะมีฤทธิ์ในการทำลายเซลล์ของแบคทีเรียอื่นๆ

Lindgren and Dobrogosz (1990) รายงานว่า ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.12 มิลลิโมลต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *Lactococci* ได้ร้อยละ 50 และความเข้มข้นมากกว่า 1.5 มิลลิโมลต่อลิตร จะทำให้เซลล์ตาย ในสภาวะที่มีออกซิเจน แบคทีเรียกรดแลกติกจะสามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งเป็นตัวออกซิไดซ์ที่รุนแรง และมีผลต่อเซลล์แบคทีเรีย โดยหมู่ sulfhydryl ภายในโมเลกุลโปรตีนของเซลล์และในชั้นไขมันที่เมมเบรนสามารถถูกออกซิไดซ์ได้ ทำให้โครงสร้างของกรดนิวคลีอิก และโปรตีนในเซลล์เปลี่ยนไปจนไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ

2.3.3 คาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂)

ส่วนมากคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) จะเกิดจากกระบวนการหมักน้ำตาลเฮกโซส ให้เป็นกรดแลกติกแบบ heterofermentative fermentation นอกจากนี้วิธีเมแทบอลิซึมอื่นๆ ก็ สามารถสร้างคาร์บอนไดออกไซด์ได้ในระหว่างกระบวนการหมัก

King and Nagel (1975) กล่าวว่า คาร์บอนไดออกไซด์จะไปยับยั้งระบบเอนไซม์ ของกระบวนการคีคาร์บอกซิลเลชัน (Decarboxylation) และมีการสะสมของ CO₂ ในชั้นไขมัน เป็นเหตุให้คุณสมบัติในการซึมผ่านของสารเสียไป CO₂ ที่ความเข้มข้นสูงๆ สามารถป้องกันการเจริญ ของจุลินทรีย์บางชนิดได้

2.3.4 ไดอะซีทิล (Diacetyl)

ไดอะซีทิลชนิด 2,3-butanedione เป็นผลผลิตสุดท้ายที่ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียกรดแลกติก ซึ่งสังเคราะห์ขึ้นจากไพรูเวตที่เป็นสารตัวกลาง (intermediate)

Caplice and Fitzgerald (1999) รายงานว่า แบคทีเรียกรดแลกติกทั้ง *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* และ *Streptococcus* สามารถสังเคราะห์ไดอะซีทิลได้ ซึ่งเป็นสารที่ให้กลิ่นเฉพาะในผลิตภัณฑ์นมหมัก และมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ด้วย โดยจะมีการสร้างสารไดอะซีทิลขึ้นในระหว่างการใช้น้ำตาลเฮกโซส (hexose) และบางครั้ง อาจเกิดขึ้นจากการใช้ซิเตรต (citrate) โดยซิเตรตจะถูกเปลี่ยนผ่านไพรูเวตไปเป็นสารไดอะซีทิล และอาจอยู่ในรูปคีโตนคือ อะซีโตอิน (acetoin)

Krier *et al.* (1998) กล่าวว่าไดอะซีทิล (diacetyl) และแบคเทอริโอซิน เป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ประเภทโปรตีน หรือ โปรตีนเชิงซ้อน (protein complex) ซึ่งสามารถยับยั้งแบคทีเรีย ที่เป็นแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร (food-borne pathogen) เช่น *L. monocytogenes*, *C. perfringens*, *B. cereus* และ *St. aureus* เพราะฉะนั้นจึงถือได้ว่าแบคเทอริโอซินเป็นสารถนอมอาหาร ตามธรรมชาติ

2.3.5 สารต่อต้านจุลชีพที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ

สารต่อต้านจุลชีพที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำมีคุณสมบัติวงกว้างที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่ำ เสถียรต่อความร้อน มีฤทธิ์ในการทำงานกว้าง และละลายได้ในอะซิโตน จำแนกชนิดสารได้ 2 ชนิด คือ reuterin ซึ่งสร้างโดย *Lb. reuteri* เป็นแบคทีเรียประจำอยู่ในทางเดินอาหารของคนและ สัตว์ reuterin สามารถยับยั้งแบคทีเรีย รา โปรโตซัว และไวรัสได้ โดยจะไปทำปฏิกิริยาต่อต้านกับ หมู่ sulfhydryl ของเอนไซม์ไรโบนิวคลีโอไทด์รีดักเทส (Ribonucleotide reductase) ใน กระบวนการสังเคราะห์ DNA

Axelsson L. (1998) กล่าวว่า รูทีริน (reuterin) เป็นสารซึ่งไม่ใช่โปรตีน มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ละลายน้ำได้ดีที่ พีเอชเป็นกลาง เซลล์จุลินทรีย์จะสังเคราะห์สารนี้เมื่อเจริญอยู่ในสภาวะที่ไม่มีอากาศในสารผสมของกลูโคสและกลีเซอรอลหรือกลีเซอรอลดีไฮด์ ส่วนใหญ่จะถูกสร้างในช่วง stationary phase ของการเจริญ เมื่อเกิดปฏิกิริยา dehydration ของกลีเซอรอลจะมีการสร้างสาร 3-hydroxypropanol (reuterin) และต่อมาจะถูกรีดิวซ์ไปเป็น 1,3-propaediol โดยเอนไซม์ NADH+H⁺ dehydrogenase ซึ่งการเจริญในช่วง log phase จะไม่มีการสร้างสารรูทีรินขึ้น จนกว่าจะมีการรีดิวซ์ขึ้นมา โดยสารที่มี reducing power จากกระบวนการเมแทบอลิซึมของกลูโคส แต่เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะ stationary phase จะเริ่มมีการสะสมของสารรูทีริน และเมื่อสัมผัสกับเซลล์เป้าหมาย จะกระตุ้นให้มีการสร้างสารรูทีรินเพิ่มขึ้น

2.3.6 แบคทีริโอซิน (bacteriocin)

จากการศึกษาเกี่ยวกับแบคทีริโอซิน พบว่า แบคทีเรียทั้งแกรมบวก และแกรมลบ สามารถผลิตแบคทีริโอซินได้ ตัวอย่างของแบคทีเรียแกรมลบที่สามารถผลิตแบคทีริโอซินได้ คือ *E. coli* ซึ่งสามารถผลิตสารในกลุ่มโปรตีนออกมายับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้ และเรียกดังกล่าวว่าเป็น colicins ต่อมา มีการค้นพบสารที่มีลักษณะคล้าย colicin ซึ่งสร้างโดยแบคทีเรียแกรมบวก จึงเรียกดังกล่าวว่าเป็นแบคทีริโอซิน (bacteriocin) โดยในระยะแรกพบว่าแบคทีริโอซินเป็นโมเลกุลของโปรตีน ซึ่งสร้างจากแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ มีคุณสมบัติในการทำลายเฉพาะแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ในสปีชีส์ (species) เดียวกันเท่านั้น Tagg *et al.* (1976) อ้างโดย พงษ์เทพ วิไลพันธ์ (2546) ให้คำจำกัดความของแบคทีริโอซินว่าเป็นสารประกอบโปรตีนที่มีลักษณะดังนี้ (1) มีการออกฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียชนิดเดียวกัน หรือที่ใกล้เคียงกับแบคทีเรียที่สร้างแบคทีริโอซินออกมา (2) การออกฤทธิ์ทำให้แบคทีเรียที่ต้องการยับยั้งเกิดการตาย (bactericidal mode of action) (3) มีตำแหน่งที่จำเพาะในการยึดจับกับเซลล์เป้าหมาย (4) ยีนที่ควบคุมการสร้างและการต้านทานของเซลล์ต่อแบคทีริโอซินที่สร้างขึ้นอยู่บนพลาสมิด (plasmid) (5) เซลล์ที่สร้างจะถูกทำลายขณะที่มีการปลดปล่อยแบคทีริโอซินออกนอกเซลล์

นอกจากนี้ยังพบอีกว่า การสร้างแบคทีริโอซินภายในเซลล์ของแบคทีเรีย เหมือนกับการสร้างโปรตีนทั่วไปที่ผลิตจากไรโบโซม ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนการลอกแบบ (transcription) และการแปลรหัส (translation) จากยีนที่ควบคุมการสร้างแบคทีริโอซิน โดยยีนที่ควบคุมการสร้างแบคทีริโอซินบางชนิดอยู่บนโครโมโซม เช่น nisin, lactocin, helveticin J, lactacin B และ F หรืออยู่บนพลาสมิด เช่น diplococcin, lactacin 481, lactococcins, pediocins, sakacin A และ lactocin B (de Vuyst and Vandamme. 1994; Joerger and Klaenhammer. 1986; Lyon and Glatz. 1993) ดังนั้นคำนิยามของแบคทีริโอซินซึ่งเป็นที่นิยมนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายใน

ปัจจุบัน คือ สารประกอบโปรตีนที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่มีความไวต่อสารดังกล่าว และไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ผลิต (de Vuyst and Vandamme. 1994)

ในการศึกษาวิจัยทางด้านสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยทั่วไปอาจจะมีความสับสนหรือไม่แน่ใจระหว่างแบคทีเรียโอซิน และสารปฏิชีวนะ ซึ่ง Cleveland *et al.* (2001) ได้สรุปความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียโอซินและสารปฏิชีวนะไว้ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียโอซินและสารปฏิชีวนะ

| ลักษณะและคุณสมบัติ | แบคทีเรียโอซิน | สารปฏิชีวนะ |
|--|--|--|
| การนำไปใช้งาน | ทางอาหาร | ทางการแพทย์ |
| กระบวนการสังเคราะห์ | ผลิตจากไรโบโซม | ผลิตโดยผ่านกระบวนการที่ เป็น secondary metabolite |
| ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมายที่มีความหลากหลาย | น้อย | มาก |
| การสร้างระบบภูมิคุ้มกันตนเองของเซลล์ผู้ผลิต | มี | ไม่มี |
| กลไกในการต่อต้านของเซลล์เป้าหมาย | โดยปรับสภาพองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ | โดยการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม |
| ลักษณะของปฏิกริยาบนเซลล์เป้าหมาย | ยังไม่มีรายงาน | ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์หรือโครม |
| ความเป็นพิษหรือผลข้างเคียง | | สร้างภายในเซลล์ |
| | | มี |

ที่มา : Cleveland *et al.* (2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.6.1 การจัดแบ่งประเภทของแบคทีเรียโอซิน

Klaenhammer (1993) ได้แบ่งประเภทของแบคทีเรียโอซิน โดยพิจารณาจากชนิดของกรดอะมิโน มวลโมเลกุล (MW) โครงสร้างพื้นฐานและพันธะต่างๆ ภายในโมเลกุล รวมถึง คุณสมบัติด้านอื่นๆ เช่น คุณสมบัติในการทนความร้อน ทำให้สามารถจัดแบ่งแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกออกได้เป็น 4 กลุ่ม คือ

กลุ่ม I : Lantibiotic เป็นแบคทีเรียโอซินที่มีสายเพปไทด์ขนาดเล็กประกอบด้วยจำนวนกรดอะมิโน 19-38 โมเลกุล มวลโมเลกุลน้อยกว่า 5 กิโลดาลตัน แบคทีเรียโอซินกลุ่มนี้มีคุณสมบัติในการทนต่อความร้อน ซึ่งกระบวนการสร้างสายเพปไทด์ภายในเซลล์ต้องผ่านกระบวนการที่เรียกว่า post-translation modification โดยจะมีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนบางตัวก่อนที่จะส่งออกภายนอกเซลล์ จึงทำให้ในสายเพปไทด์มีกรดอะมิโนที่แตกต่างจากกรดอะมิโนที่พบโดยทั่วไป เช่น didehydroalanine และ didehydrobutyrine ซึ่งเกิดจากกระบวนการ dehydration ของ serine และ threonine นอกจากนี้ภายในสายเพปไทด์แต่ละสายยังมีโครงสร้างลักษณะเป็นวงแหวนย่อยๆ ที่เกิดจากการสร้าง thioether bridge ระหว่าง sulphhydryl group ของกรดอะมิโนซิสเทอีนกับกรดอะมิโน didehydroalanine ที่มีชื่อเรียกว่า lanthionine หรือ กรดอะมิโนซิสเทอีนกับกรดอะมิโน didehydrobutyrine ที่มีชื่อเรียกว่า β -methyl lanthionine ตัวอย่างแบคทีเรียโอซินดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แบคทีเรียโอซินกลุ่ม I : Lantibiotic

| แบคทีเรียโอซิน | สายพันธุ์แบคทีเรียที่สร้าง |
|---------------------|---|
| Nisin A | <i>Lc. lactis</i> NIZOR5, 6F3, NCFB894, ATCC11454 |
| Nisin Z | <i>Lc. lactis</i> N8, NIZO22186 |
| Lactocin S | <i>Lb. sake</i> 145 |
| Lactococcin | <i>Lb. lactis</i> ADRI85L030 |
| Lacticin 481 | <i>Lc. lactis</i> CNRZ481, ADRIA85LO30 |
| Cytolysin | <i>E. faecalis</i> DS16 |
| Salvaricin A | <i>Streptococcus salvarius</i> 20P3 |
| Streptococcin A-FF2 | <i>S. pyrogens</i> FF22 |
| Carnocin U149 | <i>Carnobacterium piscicola</i> |

ที่มา : McAuliffe *et al.* (2001)

กลุ่ม II : Non Lantibiotic เป็นแบคทีเรียโอซินที่มีขนาดเล็ก โดยประกอบด้วยกรดอะมิโน 20-60 โมเลกุล เป็นแบคทีเรียโอซินชนิดที่ทนความร้อนได้ดี และสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเป้าหมายได้น้อยชนิด (narrow spectrum) เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียโอซินในกลุ่ม lantibiotic โดยจะสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณของเบส G+C ต่ำ เช่น *Listeria* และ *Clostridium* ได้ดี ซึ่งสามารถแบ่งแบคทีเรียโอซินกลุ่มนี้ออกได้เป็น 3 กลุ่มย่อย ได้แก่

IIa. กลุ่มแบคทีเรียโอซินที่สามารถทำลาย *Listeria* sp. ได้ดี ซึ่งในบางครั้งถูกเรียกว่ากลุ่ม pediocin-like bacteriocins โดยพบว่าในขั้นตอนแรกแบคทีเรียโอซินกลุ่มนี้จะถูกสร้างขึ้นในลักษณะที่เป็นสายเพปไทด์ตั้งต้น (precursor peptide) ที่ยังไม่สามารถทำลายเซลล์เป้าหมายได้ แต่หลังจากนั้นจะถูกเปลี่ยนแปลง โดยการตัดสายเพปไทด์ในตำแหน่งที่มีกรดอะมิโนไกลซีน 2 โมเลกุลติดกัน ได้เป็นสายเพปไทด์ที่สมบูรณ์ และมีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์เป้าหมาย นอกจากนี้ที่ปลาย N ในสายเพปไทด์ของแบคทีเรียโอซินแต่ละชนิดในกลุ่มนี้จะมีลำดับของกรดอะมิโนที่เป็นลักษณะจำเพาะเหมือนกัน (conserved N-terminal sequence) ได้แก่ Try-Gly-Asn-Gly-Val และมีการสร้างพันธะไคซัลไฟด์ระหว่างกรดอะมิโนซิสเทอีน 2 โมเลกุลที่อยู่ก่อนมาทางปลาย N ของสายเพปไทด์ ซึ่งตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้ เช่น pediocin AcH ที่สร้างจาก *P. acidilactici* H, sakacin A ที่สร้างจาก *Lb. sake* Lb 706, mundticin ที่สร้างจาก *E. mundtii* AT06 และ piscicocin V1a ที่สร้างจาก *Carnobacterium piscicola* V1 (Ennahar *et al.* 2000) ตัวอย่างแบคทีเรียโอซินดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตแบคทีเรียโอซินกลุ่ม IIa

| แบคทีเรียโอซิน | สายพันธุ์แบคทีเรียที่สร้าง |
|-------------------|---------------------------------------|
| Mesentericin Y105 | <i>Leuc. mesenteroides</i> Y105 |
| Mundticin | <i>E. mundtii</i> AT06 |
| Piscicocin 126 | <i>Carnobacterium piscicola</i> JG126 |
| Bavaricin A | <i>Lb. sake</i> MI401 |
| Sakacin P | <i>Lb. sake</i> LTH 673 |
| Pediocin AcH | <i>P. acidilactici</i> H |
| Bavaricin MN | <i>Lb. sake</i> MN |
| Divercin V41 | <i>C. divergen</i> V41 |
| Enterocin A | <i>E. faecium</i> CTC 492/T136 |

ที่มา : Ennahar *et al.* (2000)

IIb. กลุ่มแบคทีเรียโอซินที่ประกอบด้วยสายเพปไทด์ 2 สายที่แตกต่างกัน (two-peptide bacteriocin) สายเพปไทด์อาจแสดงกิจกรรมในการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมายเพียงเส้นใดเส้นหนึ่ง หรือทั้งสองเส้น แต่ในการยับยั้งเซลล์เป้าหมายจะมีประสิทธิภาพสูงสุดต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของสายเพปไทด์ทั้งสองเส้น เช่น brochocin A และ B ที่สร้างจาก *Br. campestris* ATCC 43754, enterocin 1071 A และ B ที่สร้างจาก *E. faecalis* BFE 1071, lactococcins G α และ β ที่สร้างจาก *Lc. lactis* LMG 2081, abp118 α และ β ที่สร้างจาก *Lb. salivarius* UCC 118 (Flynn *et al.* 2000) และ plantaricin E และ F ที่สร้างจาก *Lb. plantarum* C-11 (Garneau *et al.* 2002) ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตแบคทีเรียโอซินกลุ่ม IIb

| แบคทีเรียโอซิน | สายพันธุ์แบคทีเรียที่สร้าง |
|--|---------------------------------------|
| ABP118 (Abp 118 α and β) | <i>Lb. salivarius</i> UCC118 |
| Enterocin 1071A and 1071B | <i>E. faecalis</i> BFE1071 |
| Enterocin L50A and L50B | <i>E. faecium</i> L50 |
| Lactococcin G α and β | <i>Lc. Lactis</i> LMG2081 |
| Lactococcin M and N | <i>Lc. Lactis subsp. cremoris</i> 9B4 |
| Plantaricin E and F | <i>Lb. plantarum</i> C-11 |
| Plantaricin J and K | <i>Lb. plantarum</i> C-11 |
| Plantaricin S α and β | <i>Lb. plantarum</i> PLCO10 |
| Thermophilin 13 A and B | <i>S. thermophilus</i> SFi13 |
| Lacticin 3147 A1 and A2 | <i>Lc. Lactis</i> DPC3147 |

ที่มา : Garneau *et al.* (2002)

IIc. แบคทีเรียโอซินขนาดเล็กที่ไม่ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม IIa และ IIb ดังแสดงในตารางที่ 5 เป็นการทำงานระหว่างเพปไทด์ 2 สายขึ้นไป หรือเป็นวง (cyclic peptides) เช่น Enterocin AS-48 และ Gassericin A แบคทีเรียโอซินในกลุ่ม IIc สามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกเป็นแบคทีเรียโอซินที่มีกรดอะมิโน Cysteine หนึ่ง (thiolbiotics) หรือสองตัว (Cystibiotics) เป็นองค์ประกอบ ส่วนกลุ่มที่สองไม่มีกรดอะมิโน Cysteine เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ lactococcin A และ acidocin B (Oscáriz and Pisabarro. 2001)

ตารางที่ 5 แบคทีเรียกรดแลกติกที่ผลิตแบคทีเรียโอซินกลุ่ม IIc

| แบคทีเรียโอซิน | สายพันธุ์แบคทีเรียที่สร้าง |
|----------------|--|
| Cerein 7/8 | <i>B. cereus</i> Bc7 |
| Enterocin B | <i>E. faecium</i> T136 <i>E. faecium</i> CECT 492 |
| Lactococcin A | <i>Lc. lactis</i> LMG 2130 |
| Lactococcin B | <i>Lc. cremoris</i> <i>Lc. lactis</i> WM4 |
| Divergicin A | <i>Carnobacterium divergens</i> LV13 |
| Acidocin B | <i>Lb. acidophilus</i> M46 |

ที่มา : Oscáriz and Pisabarro (2001)

กลุ่ม III : Non Lantibiotic เป็นแบคทีเรียโอซินที่มีขนาดของโมเลกุลใหญ่กว่า 30 กิโลดาลตัน และเป็นชนิดที่มีคุณสมบัติไม่ทนต่อความร้อน เช่น helveticins J, acidophilucins A, lactacins A, lactacins B ซึ่งส่วนใหญ่จะผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ *Lactobacillus* (Ouweland, 1998; Oscáriz and Pisabarro, 2001) ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แบคทีเรียกรดแลกติกที่ผลิตแบคทีเรียโอซินกลุ่ม III

| แบคทีเรียโอซิน | สายพันธุ์แบคทีเรียที่สร้าง |
|-------------------|----------------------------|
| Acidophilucin A | <i>Lb. acidophilus</i> |
| Caseicin 80 | <i>Lb. casei</i> B80 |
| Helviticin J | <i>Lb. heviticus</i> |
| Helviticin V-1829 | <i>Lb. heviticus</i> |
| Lacticin A | <i>Lb. delbrueckii</i> |
| Lacticin B | <i>Lb. delbrueckii</i> |

ที่มา : Ouweland (1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้นำไปใช้ประโยชน์อื่นใดโดยไม่ได้รับอนุญาตจากสำนักหอสมุดกลาง
กลุ่ม IV : เป็นกลุ่มที่รวมตัวเป็นสารประกอบเชิงซ้อนขนาดใหญ่กับสารอื่นๆ เช่น ไซมัน หรือคาร์โบไฮเดรต (Ouweland, 1998) ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แบคทีเรียกรดแลกติกที่ผลิตแบคทีเรียโอซินกลุ่ม IV

| แบคทีเรียโอซิน | สายพันธุ์แบคทีเรียที่สร้าง |
|----------------|--------------------------------|
| Lactocin 27 | <i>Lb. helveticus</i> |
| Leuconocin S | <i>Leuc. paramesenteroides</i> |
| Pediocin SJ-1 | <i>P. acidilactici</i> |

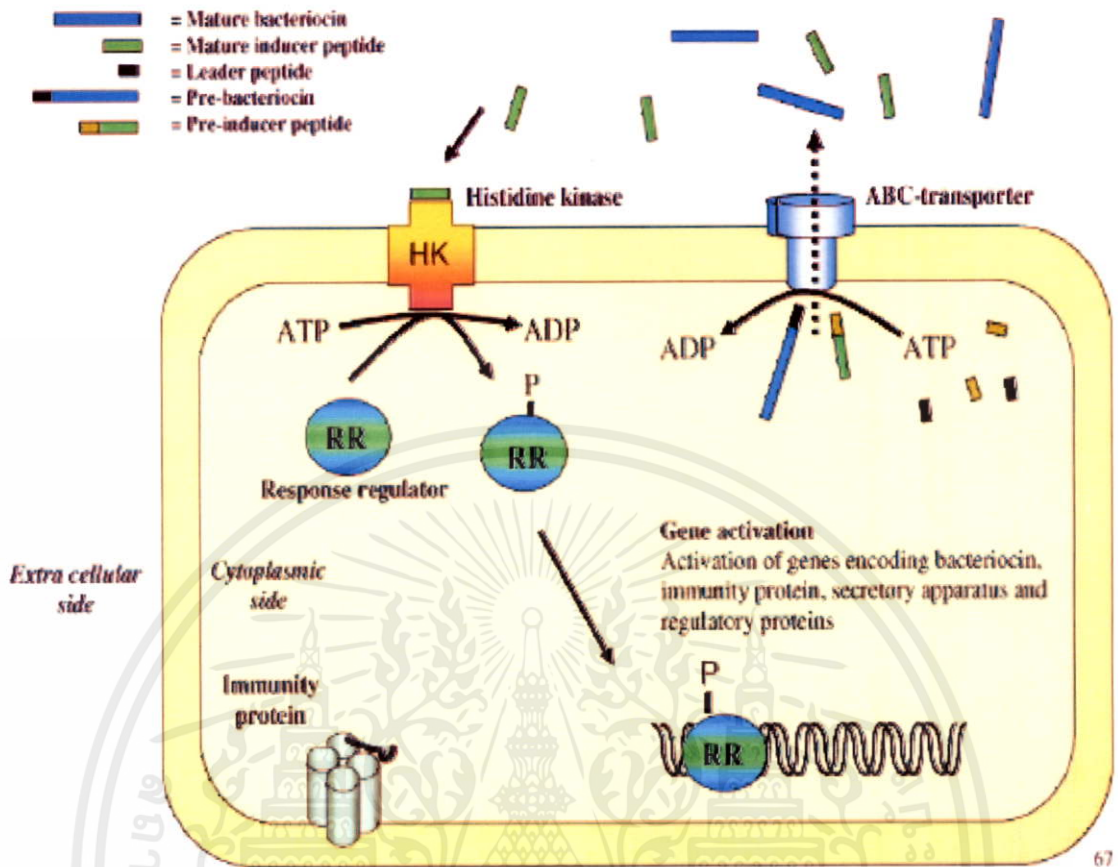
ที่มา : Ouwehand (1998)

2.3.6.2 กระบวนการผลิตแบคทีเรียโอซินในระดับเซลล์

กระบวนการผลิตแบคทีเรียโอซิน จะถูกควบคุมโดยยีนที่อยู่บนพลาสมิด ซึ่งยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์แบคทีเรียโอซินนี้มีทั้งยีนโครงสร้าง (structural gene) และยีนภูมิคุ้มกัน (immunity gene) โดยส่วนใหญ่จะอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม (cluster) และยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิต และการขนส่งแบคทีเรียโอซินออกนอกเซลล์ประกอบด้วย (1) ยีนสำหรับผลิตเปปไทด์ที่ยังไม่พร้อมทำงาน (prepeptide) (2) ยีนสำหรับโปรตีนภูมิคุ้มกัน (immunity protein) (3) ยีนสำหรับขนส่งโปรตีน ATP binding cassette (ABC) transport protein และ (4) ยีนสำหรับโปรตีนที่ช่วยในการจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane-bound accessory protein) (Vincent *et al.* 2002; Ennahar *et al.* 2000)

กระบวนการผลิตแบคทีเรียโอซินเกิดจากการทำงานร่วมกันของ Histidine kinase (HK), Response regulator (RR) และ Inducer peptide (IP) ซึ่งทำหน้าที่เสมือนตัวส่งสัญญาณเหนี่ยวนำให้เกิดการถอดรหัส (transcription) ของยีน โดย IP จะถูกส่งออกนอกเซลล์พร้อมกับแบคทีเรียโอซินด้วย ABC transporter และ accessory protein จากนั้น IP ที่ผลิตขึ้นจะเกิดการสะสมและจับกับ HK บนเยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาฟอสโฟริเลชัน และเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ RR และ RR จะทำหน้าที่กระตุ้นการทำงานของยีนที่ผลิตแบคทีเรียโอซินต่อไป ดังแสดงในภาพที่ 1 แบคทีเรียโอซินถูกสังเคราะห์บนไรโบโซมในรูปเปปไทด์ที่ยังไม่พร้อมทำงาน และจะถูกแยกส่วน N-terminal leader ออกโดยผ่านการตัดแปลงหลังกระบวนการแปลรหัส (post-translational modification) ซึ่งทำให้เปปไทด์อยู่ในสภาพพร้อมทำงาน ส่วน N-terminal leader ของแบคทีเรียโอซินอาจมีลักษณะเป็น double glycine leader peptide หรือ signal peptide (Worobo *et al.* 1995)

แบคทีเรียโอซินจะถูกสร้างขึ้นในไรโบโซม (ribosome) ต่อจากนั้นก็จะรวมตัวกับ immunity protein เกิดเป็นโมเลกุลของสารประกอบเชิงซ้อน ซึ่งจะผ่านเยื่อเยื่อชั้นในและสะสมอยู่ในบริเวณ periplasmic space ของไซโตพลาสซึม และแผ่ขยายไปถึงบริเวณผิวหน้าของแบคทีเรียที่บริเวณผิวหน้าของแบคทีเรียนี้ สารประกอบเชิงซ้อนจะจับกับ polysaccharides หรือ O-antigen ของ outer membrane และทำให้เกิดแบคทีเรียโอซิน ขับออกสู่ภายนอกเซลล์ (Vincent *et al.* 2002)

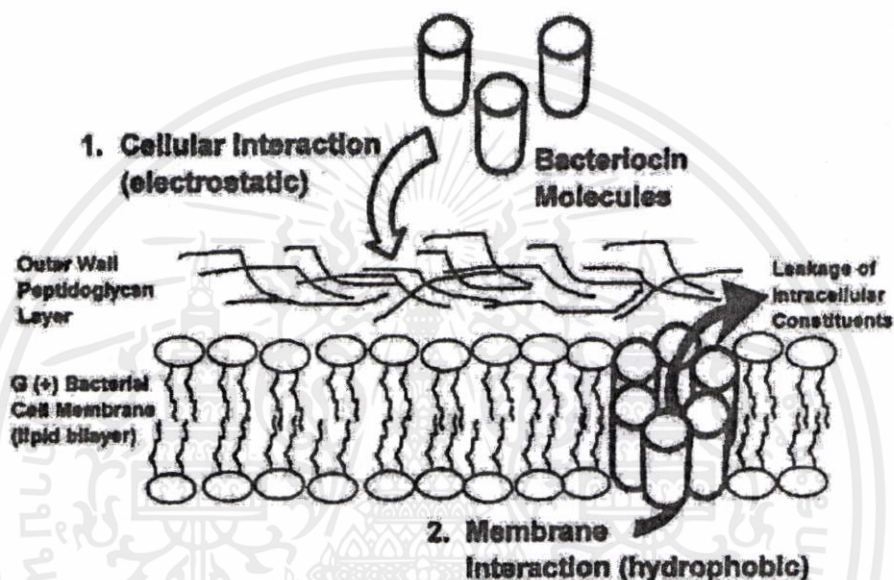


ภาพที่ 1 กระบวนการสังเคราะห์แบคทีเรียโอซิน class II (Drider *et al.* 2006)

2.3.6.3 กลไกในการทำลายเซลล์แบคทีเรียเป้าหมายของแบคทีเรียโอซิน

การทำลายเซลล์เป้าหมายของแบคทีเรียโอซิน เกิดจากการที่แบคทีเรียโอซินแต่ละโมเลกุลมารวมกันทำให้เกิดเป็นรูหรือช่องว่างที่เชื่อมหุ้มเซลล์เป้าหมาย ซึ่งจะมีลักษณะคล้ายซี่ไม้ที่มาประกอบกันเป็นผนังด้านข้างของถังไม้ (barrel stave) (ดังแสดงในภาพที่ 2) โดยรูดังกล่าวจะทำให้เกิดการเสียสมดุลของไอออน สูญเสียกรดอะมิโน และสารประกอบอินทรีย์ในกลุ่มฟอสเฟต ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในการสร้างพลังงานของเซลล์ (Muriana. 1996; Vincent *et al.* 2002; Ennahar *et al.* 1999) ขั้นตอนและกลไกในการทำลายเซลล์เป้าหมายจะแตกต่างกันไปตามชนิดของแบคทีเรียโอซิน เช่น colicins ที่สร้างจาก *E. coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ จะเป็นโปรตีนขนาดใหญ่ประมาณ 40-70 กิโลดาลตัน และขั้นที่ควบคุมการสร้าง colicins จะอยู่บนพลาสมิด โดย *E. coli* จะสร้าง colicins แล้วปลดปล่อยออกสู่ภายนอกเซลล์ในช่วงการเจริญระยะ exponential เมื่อศึกษาโครงสร้างแบบ 3 มิติของ colicins พบว่าโครงสร้างของโปรตีนภายในโมเลกุลจะจัดเรียงตัวเป็น 3 กลุ่ม ซึ่งแต่ละกลุ่มจะมีกิจกรรม และหน้าที่ต่างกันออกไปในแต่ละขั้นตอนของการทำลายแบคทีเรียเป้าหมาย กลไกการทำลายเซลล์เป้าหมายจะแบ่งเป็น 3 ขั้นตอนคือ

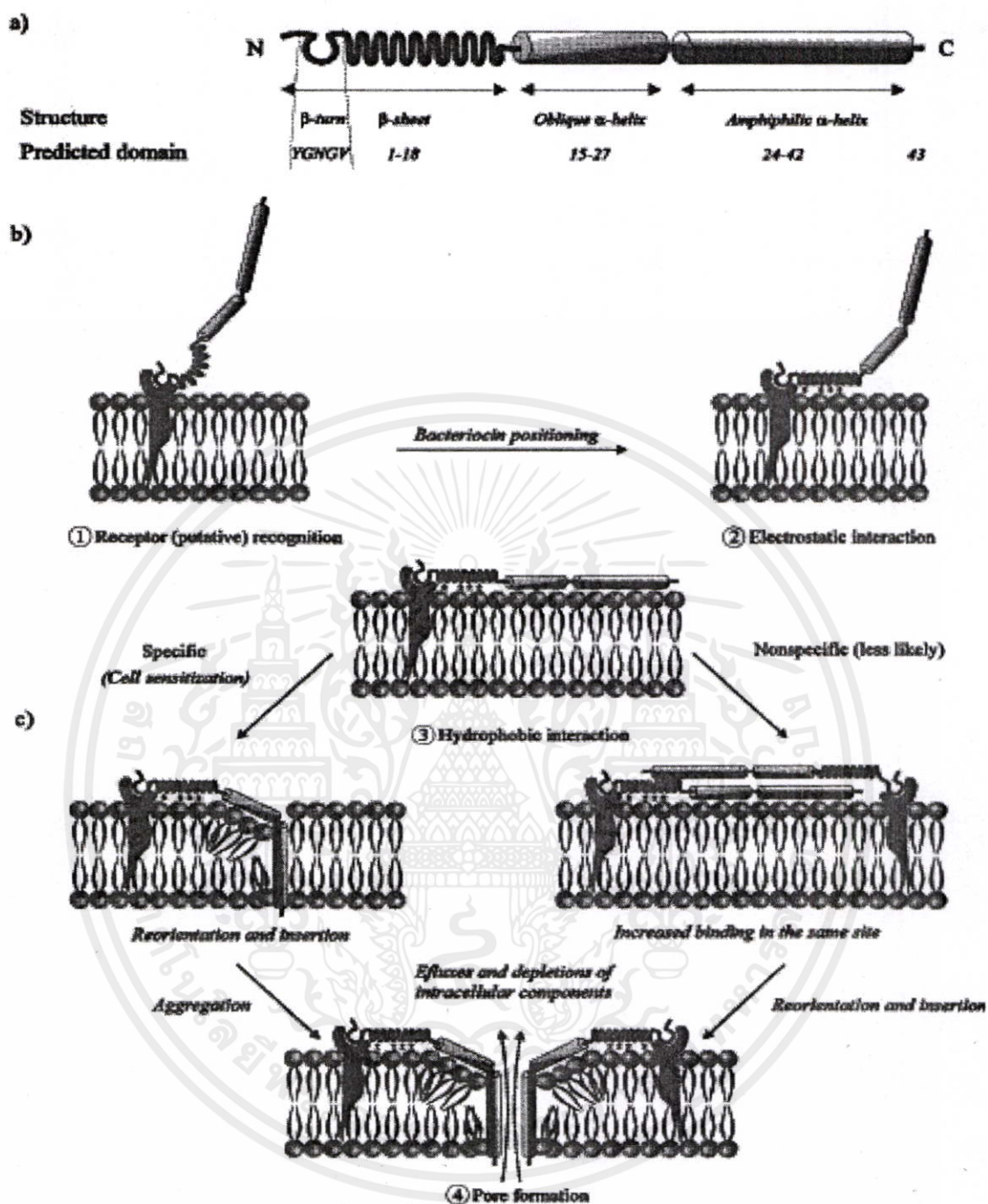
(1) บริเวณตรงกลางโมเลกุลของ colicins จะทำหน้าที่ในการจับกับตำแหน่งที่จำเพาะบนผิวเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมาย (2) บริเวณปลายด้าน N (N-terminal) จะทำหน้าที่เคลื่อนย้ายโมเลกุลของ colicins ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมาย (3) บริเวณปลายด้าน C (C-terminal) จะทำหน้าที่ในการทำลายเซลล์เป้าหมาย (McCormick *et al.* 1999) สาเหตุที่ทำให้เซลล์เป้าหมายของ colicins ตายเกิดจากเยื่อหุ้มเซลล์เกิดการรั่ว และทำให้เกิดการสูญเสียแรงในการขับเคลื่อนโปรตอนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ และทำให้เซลล์เป้าหมายเกิดการเสียชีวิต (Schaller *et al.* 1981)



ภาพที่ 2 การรวมกันของโมเลกุลแบคทีริโอซิน ทำให้เกิดเป็นรูหรือช่องว่างที่เยื่อหุ้มเซลล์ เรียกว่า Barrel stave (Muriana. 1996)

นอกจากนี้ในแบคทีริโอซินกลุ่ม non lantibiotic ที่มีขนาดเล็ก และทนความร้อน พบว่า ในขั้นตอนแรกปลายด้าน N ของโมเลกุลแบคทีริโอซิน ซึ่งมีประจุบวกจะเข้าจับส่วนหัวของฟอสโฟลิปิดที่เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมาย ที่มีประจุลบโดยแรงทางไฟฟ้าสถิตย์ (electrostatic binding) หลังจากนั้นปลายด้าน C ในโมเลกุลแบคทีริโอซิน ซึ่งมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) จะทำปฏิกิริยากับหมู่เอซิล (acyl group) ของไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดเป็นรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ เกิดการสูญเสียความสมดุลของไอออนและสารประกอบฟอสเฟตภายในเซลล์ ดังแสดงภาพที่ 3 (Ennahar *et al.* 2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3 โครงสร้างของแบคทีริโอซิน Class II และการเข้าจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ เป้าหมาย

(Ennahar *et al.* 2000)

(a) โครงสร้างของแบคทีริโอซิน

(b) การเข้าจับกันของแบคทีริโอซินกับผิวของเซลล์เป้าหมาย

(c) การแทรกตัวของแบคทีริโอซิน ทำให้เกิดช่องว่าง และเกิดการผ่านเข้าออกของน้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาและวิจัยเท่านั้น ไม่ควรนำข้อมูลไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น หากมีข้อสงสัยหรือต้องการข้อมูลเพิ่มเติม กรุณาติดต่อฝ่ายวิชาการ

แบคทีเรียโอซินนอกจากจะมีผลในการฆ่าทำลายเซลล์เป้าหมาย (bactericidal) แล้ว ยังอาจมีผลในการหยุดการเจริญของเซลล์ (bacteriostatic) ได้ด้วย เช่นที่พบใน leuconocin S แบคทีเรียโอซินจะมีผลต่อเซลล์ในลักษณะใดนั้น มักขึ้นอยู่กับความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของแบคทีเรียโอซิน สภาพแวดล้อม ชนิดและปริมาณของเซลล์เป้าหมาย (de Vuyst and Vandamme. 1994) ซึ่งตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากอาหารชนิดต่างๆ แสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากอาหารชนิดต่าง ๆ

| แบคทีเรียโอซิน | สายพันธุ์แบคทีเรียที่สร้าง | ผลิตภัณฑ์ที่พบ |
|-------------------|--------------------------------------|----------------------------------|
| Carnocin LV17 | <i>Carnobacterium piscicola</i> LV17 | เนื้อวัวที่บรรจุในถุงสุญญากาศ |
| Carnocin UI49 | <i>C. piscicola</i> UI49 | ปลา |
| Carnocin CP5 | <i>C. piscicola</i> CP5 | เนยเหลว |
| Piscicolin 61 | <i>C. piscicola</i> LV61 | เนื้อวัว |
| Enterocin 226 NWC | <i>E. faecalis</i> 226 | เนยที่ทำจากหางนมของกระบือ |
| Enterocin 6E | <i>E. faecium</i> 6E | เนย |
| Enterocin 01 | <i>E. faecium</i> NA 01 | น้ำนมเปรี้ยวของประเทศไนจีเรีย |
| Enterocin RZS C5 | <i>E. faecium</i> RZS C5 | เนยและอาหารสัตว์ที่ได้จากการหมัก |
| Enterocin CRL 35 | <i>E. faecium</i> CRL35 | เนย |
| Acidocin A | <i>Lb. acidophilus</i> TK9201 | น้ำนมวัวหมัก |
| Bavaricin MN | <i>Lb. bavaricus</i> MN | เนื้อวัว |
| Curvaticin FS47 | <i>Lb. curvatus</i> FS47 | เนื้อวัวบด |
| Curvaticin 13 | <i>Lb. curvatus</i> SB13 | ไส้กรอกแบบกึ่งแห้ง |
| Plantaricin C19 | <i>Lb. plantarum</i> C19 | แตงกวาดอง |
| Plantaricin F | <i>Lb. plantarum</i> BF001 | ปลาแล่ |
| Sakacin P | <i>Lb. sake</i> LTH673 | เนื้อวัว |
| Curvacin A | <i>Lb. curvatus</i> LTH1174 | ผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ |
| Nisin | <i>Lc. lactis</i> BB24 & G18 | ไส้กรอกหมักแบบแห้ง |
| Carnosin 44A | <i>Leuc. carnosum</i> LA44A | ไส้กรอกแบบเวียนนา |
| Carnosin 54 | <i>Leuc. carnosum</i> LA54A | เนื้อวัวที่บรรจุในถุงสุญญากาศ |
| Mesenterocin 52 | <i>Leuc. mesenterodies</i> FR 52 | น้ำนมวัวดิบ |

ที่มา : รวบรวมและคัดแปลงจาก Muriana (1996)

2.4 การใช้ประโยชน์แบคทีเรียโอซินในอุตสาหกรรมอาหาร

ในปัจจุบันการถนอมอาหารโดยการใช้แบคทีเรียกรดแลคติกจัดเป็นวิธีการที่ปลอดภัย (GRAS : generally recognized as safe) เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกจะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่อยู่ในผลิตภัณฑ์โดยการไปแย่งใช้สารอาหาร รวมทั้งสร้างสารยับยั้งการเจริญเติบโตบางชนิดออกมา (Schillinger *et al.* 1996) ซึ่งในกลุ่มของสารยับยั้งนี้พบว่าแบคทีเรียโอซิน โดยเฉพาะไนซินเป็นสารที่ได้รับการยอมรับในด้านความปลอดภัยโดย FDA (Eckner. 1992) และ FAO/WHO (Schillinger *et al.* 1996) และพบว่าไนซินมีการผลิตขายในทางการค้า รวมทั้งมีการใช้ในประเทศต่างๆ กว่า 50 ประเทศ (Gould. 1996; Hurst and Hoover. 1993) ตามปกติแบคทีเรียโอซินจะมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกที่ก่อให้เกิดโรค และแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย เช่น *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *C. botulinum* (McMullen and Stiles. 1996; Schillinger *et al.* 1996) *C. tyrobutyricum*, *B. stearothermophilus*, *C. thermosaccharolyticum* (Gould. 1996), *B. licheniformis* (Beasley and Saris. 2002) และแบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิด (Davidson and Hoover. 1993) ส่วนการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Salmonella* พบว่าได้ผลไม่ชัดเจน ยกเว้นในกรณีที่ใช้ร่วมกับสารจับอนุมูลของโลหะ (chelating agent) ที่ยอมให้ใช้ในอาหาร ได้แก่ EDTA, EGTA ซึ่งสารดังกล่าวจะไปรบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียเป้าหมาย ทำให้เซลล์มีความไวต่อแบคทีเรียโอซินมากขึ้น (Cutter and Siragusa. 1995) โดยแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค และแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียที่ถูกยับยั้งโดยแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดต่างๆ ได้รวบรวมไว้ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเสื่อมเสีย ซึ่งถูกยับยั้งโดยแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดต่าง ๆ

| แบคทีเรียกรดแลคติก | แหล่งที่พบ | แบคทีเรียที่ถูกยับยั้ง |
|--------------------------------------|--------------------|---|
| <i>Carnobacterium piscicola</i> CP 5 | เนยเหลว | <i>Carnobacterium</i> , <i>Listeria</i> , <i>Enterococcus</i> |
| <i>C. piscicola</i> JG 126 | แฮมที่เสื่อมคุณภาพ | <i>L. monocytogenes</i> |
| <i>E. mundtii</i> | ผัก | <i>L. monocytogenes</i> , <i>C. botulinum</i> |
| <i>E. faecalis</i> 226 | หางนม | <i>L. monocytogenes</i> |
| <i>E. faecalis</i> EFS 2 | เนย | <i>L. innocua</i> |
| <i>Lb. delbrueckii</i> | เนยเหลือทิ้ง | <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>S. aureus</i> , |
| <i>Lb. plantarum</i> BFE 905 | สลัด | <i>L. monocytogenes</i> |

ตารางที่ 9 (ต่อ)

| แบคทีเรียกรดแลกติก | แหล่งที่พบ | แบคทีเรียที่อุกยั้ง |
|--|---------------------|--|
| <i>Lb. plantarum</i> WHE 92 | เนย | <i>L. monocytogenes</i> |
| <i>Lb. plantarum</i> UG1 | ไส้กรอกอบแห้ง | <i>L. monocytogenes</i> , <i>B. cereus</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>C. sporogenes</i> |
| <i>Lb. plantarum</i> SA 6 | ไส้กรอกหมัก | <i>Lactobacillus</i> |
| <i>Lb. bavaricus</i> | แป้งขนมปัง | <i>L. monocytogenes</i> |
| <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> R | พืชหัว | <i>Clostridium</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Listeria</i> |
| <i>Lc. lactis</i> subsp. | กระท่อมปลีคอง | <i>L. monocytogenes</i> |
| <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> | ถั่วอก | <i>L. monocytogenes</i> Scott A |
| <i>Lc. lactis</i> DPC 3147 | เมล็ดธัญพืช | <i>Clostridium</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Listeria</i> , <i>Leuconostoc</i> |
| <i>Leuc. mesenteroides</i> Y 105 | นมแพะ | <i>L. monocytogenes</i> |
| <i>Leuc. carnosum</i> Ta 11A | เนื้อวัว | <i>L. monocytogenes</i> |
| <i>Streptococcus</i> sp. | ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก | <i>Clostridium</i> sp., <i>L. monocytogene</i> |

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

ส่วนการนำแบคทีเรียโอซินไปใช้งานนั้น ทำได้ใน 3 ลักษณะคือ (1) เติมแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินลงไปเป็นเชื้อตั้งต้น หรือเชื้อที่มีส่วนร่วมในกระบวนการหมัก (2) เติมแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์ หรือกึ่งบริสุทธิ์ลงไปเป็นสารถนอมอาหาร (3) เติมผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการหมักของแบคทีเรียกรดแลกติกที่สร้างแบคทีเรียโอซินลงไปเป็นส่วนประกอบในกระบวนการผลิตอาหาร (Schillinger *et al.* 1996) ซึ่ง Davidson and Hoover (1993) ได้รวบรวมความเข้มข้นของไนซินที่ใช้สำหรับยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่างๆ เช่น *Bacillus* ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะถูกยับยั้งที่ความเข้มข้น 0.04-2.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร *C. sporogenes* ที่อยู่ในเนื้อหมูจะถูกยับยั้งที่ความเข้มข้น 5-75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร *L. monocytogenes* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดจะถูกยับยั้งที่ความเข้มข้น 1-7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปริมาณของไนซินที่ใช้จะขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณเชื้อตั้งต้น และค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น นอกจากนี้ Cleveland *et al.* (2001) ได้รวบรวมการทดลองที่ใช้ประโยชน์แบคทีเรียโอซินเป็นสารถนอมอาหาร ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ผลการทดลองประยุกต์ใช้แบคทีเรียโอซินในการถนอมอาหารชนิดต่างๆ

| แบคทีเรียโอซิน | ลักษณะการประยุกต์ใช้งาน | ผลที่ได้ |
|----------------|---|--|
| Nisin A | ใช้เติมลงในขั้นตอนการผสมเนื้อสัตว์ | ลดจำนวนแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ |
| Pediocin AcH | ใช้พ่นลงบนผิวหน้าของเนยแข็งในช่วงเริ่มต้นการบ่ม | ยับยั้งการเจริญของ <i>Listeria monocytogenes</i> |
| Linocin M-18 | ใช้ <i>Brevibacterium lines</i> ซึ่งผลิต linocin M-18 เป็นเชื้อตั้งต้นในการผลิตเนย | ลดจำนวนของ <i>L. ivanovii</i> และ <i>L. monocytogenes</i> ลง 100 เท่า |
| Nisin A | ใช้เติมลงไปในการบ่มเนย | ยับยั้งการเจริญของ <i>L. monocytogenes</i> ได้นาน 8 สัปดาห์ |
| Piscicolin 126 | ใช้เติมลงในแฮมบด | ให้ผลการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมายได้ดีกว่าการใช้ในจีน |
| Leucocin A | ใช้ <i>Leuc. gelidum</i> UAL 187 ซึ่งผลิต leucocin A ผสมลงในเนื้อที่เก็บรักษาไว้ในสภาวะสุญญากาศ | ยับยั้งการเจริญของ <i>Lb. sake</i> ได้นาน 8 สัปดาห์ |
| Lactocin 705 | ใช้ในผลิตภัณฑ์เนือบด | ยับยั้งการเจริญของ <i>L. monocytogenes</i> |
| Pediocin AcH | ใช้ <i>P. acidilactici</i> ซึ่งผลิต pediocin AcH เป็นเชื้อตั้งต้นในการผลิตไส้กรอกไก่แบบเปรี้ยว | ยับยั้งการเจริญของ <i>L. monocytogenes</i> ได้ |
| Pediocin | ถ่ายทอดยีสที่ควบคุมการสร้าง pediocin ไปสู่ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | ช่วยในการถนอมอาหารอบและไวน์ |
| Pediocin AcH | เติมลงในไก่สด | ควบคุมการเจริญของ <i>L. monocytogenes</i> ได้นาน 28 วัน ที่อุณหภูมิ 5 °ซ |
| Enterocin | เติมลงในแฮม เนื้อไก่ เนื้อหมู และไส้กรอก | ควบคุมการเจริญของ <i>L. monocytogenes</i> |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ เว้นแต่จะขออนุญาตจากเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

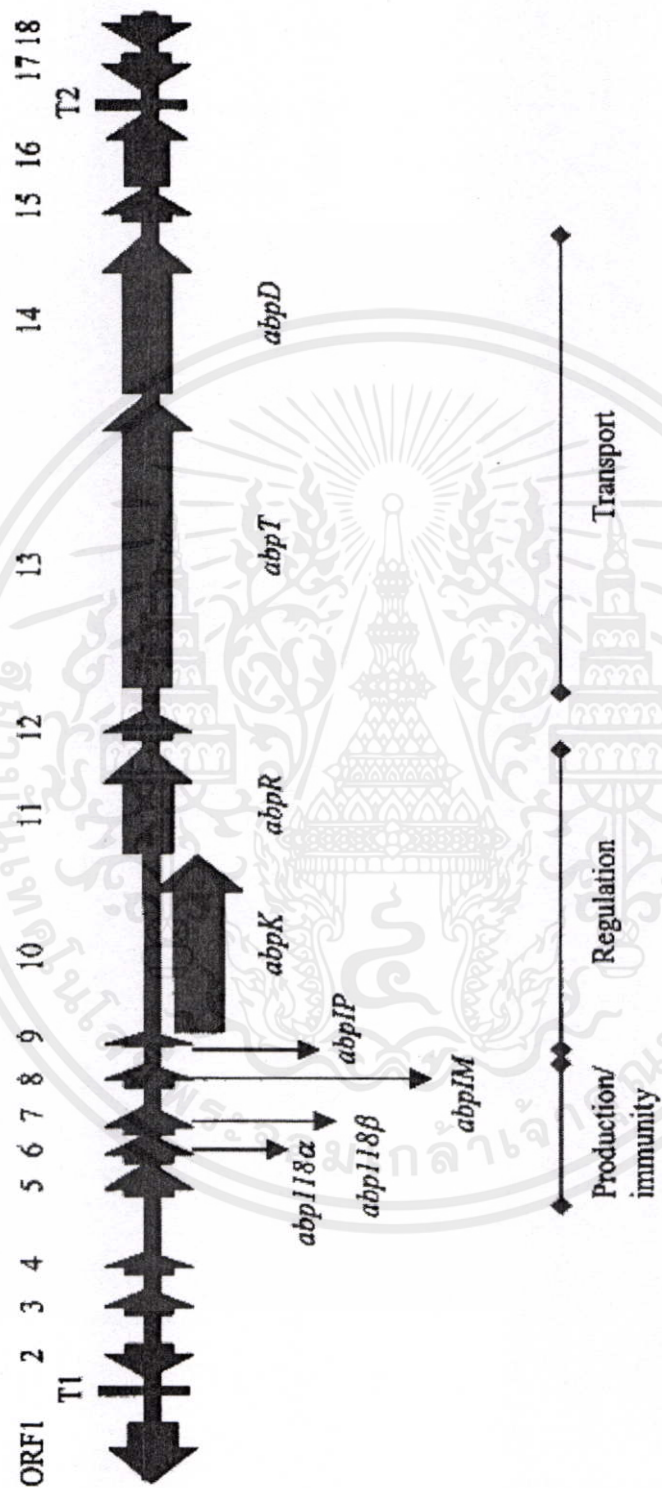
ที่มา : Cleveland et al. (2001)

2.5 แบคทีเรียโอซินที่สร้างโดย *Lb. salivarius*

ในปัจจุบันมีการศึกษา การควบคุม และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตแบคทีเรียโอซินในระดับเซลล์ของแบคทีเรียหลายๆ ชนิด แต่ชนิดที่มีการศึกษากันมากที่สุดคือ โอซิน ที่ผลิตโดย *Lc. lactis* ssp. *lactis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียโอซินเพียงชนิดเดียวที่หน่วยงาน FDA ของประเทศสหรัฐอเมริกาอนุญาตให้ใช้กับอาหารได้ สำหรับแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจาก *Lb. salivarius* ได้เริ่มมีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย โดย Flynn *et al.* (2002) ได้ทำการศึกษายีนของแบคทีเรียโอซินในกลุ่มของ *Lb. salivarius* UCC 118 ซึ่งแยกได้จากลำไส้เล็กส่วนที่ต่อจากกระเพาะอาหารของมนุษย์ พบว่า *Lb. salivarius* UCC 118 สร้างแบคทีเรียโอซินที่ประกอบด้วยสายเพปไทด์ 2 สาย คือ abp118 α และ abp118 β กระบวนการผลิตแบคทีเรียโอซิน ประกอบด้วยกลุ่มยีนที่ทำงานร่วมกัน (ภาพที่ 4) ได้แก่ abp118 α , abp118 β , abpIM, abpIP และ abpK เป็นต้น โดยแต่ละยีนจะมีคุณสมบัติที่คล้ายกับยีนในสิ่งมีชีวิตอื่น (ตารางที่ 11) Hamon (1988) อ้างโดย พงษ์เทพ วิไลพันธ์ (2546) พบว่า โครงสร้างในสายโพลีเพปไทด์ของแบคทีเรียโอซินสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ส่วน ซึ่งแต่ละส่วนจะมีหน้าที่แตกต่างกันดังนี้

1. binding peptide ทำหน้าที่ช่วยให้โมเลกุลของแบคทีเรียโอซินจับบนผิวเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมาย
2. active peptide มีหน้าที่ทำลายแบคทีเรียโดย active peptide จะยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน และการสังเคราะห์โมเลกุลขนาดใหญ่ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย
3. immunity protein ทำหน้าที่จับกับ active peptide อย่างจำเพาะ ซึ่งจะป้องกันไม่ให้เกิดการทำลายแบคทีเรียที่มี immunity protein ลักษณะเหมือนกัน
4. translocation peptide ช่วยให้มีการเคลื่อนย้ายโมเลกุลของแบคทีเรียโอซินผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4 การเรียงตัวของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์แบคทีเรียโอซิเบน โคร โม โชมของ *Lb. salivarius* UCC 118 (Flynn *et al.* 2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 11 คุณสมบัติของยีนที่พบใน *Lb. salivarius* UCC 118

| ORF (gene) | Size (aa) | Predict Proteins | Reference |
|-------------------------|-----------|--|---------------------------------|
| ORF1 | 150 | Accessory transport protein, brochocin-C system | McCormick <i>et al.</i> (1998) |
| ORF2 | 87 | No homologues | |
| ORF3 | 57 | Presalivarin B of <i>Lactobacillus salivarius</i> M7 | CAB63109. |
| ORF4 | 50 | No homologues | |
| ORF5 | 85 | No homologues | |
| ORF6(<i>abp118α</i>) | 64 | BlpI, auto-induced peptide of <i>Streptococcus pneumonia</i> | de Saizieu <i>et al.</i> (2000) |
| ORF7 (<i>abp118β</i>) | 68 | Plantaricin 1.25b of <i>Lactobacillus plantarum</i> | Ehrmann <i>et al.</i> (2000) |
| ORF8 (<i>abpIM</i>) | 55 | No homologues | |
| ORF9 (<i>abpIP</i>) | 38 | Competence pheromone of <i>Streptococcus gordonii</i> | Havarstein <i>et al.</i> (1996) |
| ORF10 (<i>abpK</i>) | 429 | Histidine kinase, carnobacteriocin A system | Franz <i>et al.</i> (2000) |
| ORF11 (<i>abpR</i>) | 264 | Response regulator, carnobacteriocin A system | Franz <i>et al.</i> (2000) |
| ORF12 | 79 | No homologues | |
| ORF13 (<i>abpT</i>) | 719 | ABC transporter, plantaricin A system | Diep <i>et al.</i> (1994) |
| ORF14 (<i>abpD</i>) | 384 | Accessory transport protein, sakacin A system | Axelsson & Holck (1995) |
| ORF15 | 76 | No homologues | |

ที่มา : คัดแปลจาก Flynn *et al.* (2002)

จากตารางที่ 11 เป็นที่น่าสังเกตว่า ในกลุ่มยีนแบคทีริโอซิน ORF3 คือ presalivaricin B (MNNFIQVVK KELAHIIIGGR NSYDYIDSGQ FGYDIGCTIA NTIFFKLRHS NQNICS) ที่ผลิตโดย *Lb. salivarius* UCC 118 จะมีลำดับของกรดอะมิโนเหมือนกับแบคทีริโอซิน salivaricin B ที่รายงานโดย Çataloluk (2001) ซึ่งทำการแยกเชื้อ *Lb. salivarius* M7 ใน dental plaque ของสัตว์ฟันแทะ แต่อย่างไรก็ตาม ORF3 (presalivaricin B) ที่พบใน *Lb. salivarius* UCC 118 ไม่มีผลต่อการยับยั้ง หรือทำลายจุลินทรีย์ก่อโรค แต่ salivaricin B ที่ได้จาก *Lb. salivarius* M7 มีผลในการยับยั้งและทำลายจุลินทรีย์ก่อโรค

Pilasombut (2006) ทำการคัดเลือก *Lb. salivarius* K4 จากลำไส้ไก่ ซึ่ง *Lb. salivarius* K4 จัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารแบคทีริโอซิน และสารแบคทีริโอซินมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T, *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^T, *E. faecalis* JCM 5803^T, *B. coagulans* JCM 2257^T, *L. innocua* ATCC 33090^T และ *Br. campestris* NBRC 11547^T เมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี hydrophobic interaction, ion-exchange, HPLC และวิเคราะห์กรดอะมิโน พบว่าสามารถแยกแบคทีริโอซิน salivaricin B (FK 12) และ salvicin K (FK 15) และเมื่อตรวจสอบลำดับกรดอะมิโนพบว่าแบคทีริโอซิน salivaricin B มีลำดับของกรดอะมิโนคล้ายกับแบคทีริโอซิน bacteriocin-like prepeptide (ORF3) ที่ผลิตโดย *Lb. salivarius* UCC 118 ถึง 91 เปอร์เซ็นต์ และมีลำดับของกรดอะมิโนคล้ายกับแบคทีริโอซิน presalivaricin B ที่ผลิตโดย *Lb. salivarius* M7 ถึง 94 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่แบคทีริโอซิน salvicin K (FK 15) มีลำดับของกรดอะมิโนคล้ายกับแบคทีริโอซิน abp118α ที่ผลิตโดย *Lb. salivarius* UCC 118 ถึง 64 เปอร์เซ็นต์ (ดังแสดงในภาพที่ 5) และจากรายงานของ Flynn *et al.* (2002) พบว่า แบคทีริโอซินที่ผลิตโดย *Lb. salivarius* UCC 118 จัดอยู่ในกลุ่มของ two-peptide bacteriocin คือมีแบคทีริโอซิน abp118α และ abp118β ดังนั้น Pilasombut (2006) จึงได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และผลการทดลองพบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ salivaricin B (FK 12) คล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ bacteriocin-like prepeptide และ presalivaricin B อยู่ 94 และ 96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ salvicin K (FK 15) คล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ abp118α ซึ่งแบคทีริโอซิน abp118α จัดเป็น two-peptide bacteriocin ดังนั้น จึงมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีลักษณะคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ abp118β และให้ชื่อว่า salvicin K4 (ดังแสดงในภาพที่ 6)

Pilasombut *et al.* (2006a) ได้ทำการศึกษาเพิ่มเติม โดยทำการคัดแยก *Lb. salivarius* K7 จากลำไส้ไก่ และพบว่า *Lb. salivarius* K7 สามารถผลิตสารแบคทีริโอซินที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T, *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^T และ *B. coagulans* JCM 2257^T และทำการจำแนกชนิดของแบคทีริโอซิน โดยการแยกสาร

แบคทีเรียโอซินให้บริสุทธิ์ และวิเคราะห์กรดอะมิโน ด้วยวิธี Edman degradation ซึ่งพบว่าแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจาก *Lb. salivarius* K7 (FK22 ดังภาพที่ 7) มีลำดับกรดอะมิโน KNGYGGSGNR QVTEGAGIVG จึงได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เป็นลำดับกรดอะมิโนอีกครั้ง ผลการทดลองพบว่า ลำดับกรดอะมิโนของแบคทีเรียโอซินที่ได้จาก *Lb. salivarius* K7 (FK22 : deduced peptides ดังภาพที่ 7) มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของ abp118 β ที่ผลิตโดย *Lb. salivarius* UCC 118 นอกจากนี้ยังพบว่ามีลำดับของกรดอะมิโนอีก 10 ตัว (KRGPNVCVGN F) อย่างไรก็ตาม Pilsombut *et al.* (2006a) ได้ทำการศึกษาลำดับของกรดอะมิโน 10 ตัว ดังกล่าว (ดังภาพที่ 7) พบว่าลำดับของกรดอะมิโน 10 ตัว มีลำดับที่เหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของแบคทีเรียโอซิน abp118 α ที่สร้างจาก *Lb. salivarius* UCC 118 แต่ลำดับของกรดอะมิโนที่ได้ สั้นกว่า abp118 α ส่งผลให้การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์แตกต่างจากแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *Lb. salivarius* UCC 118 ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* และ *Pseudomonas fluorescens* ในขณะที่แบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *Lb. salivarius* K7 สามารถยับยั้งได้เฉพาะเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกเท่านั้น

a) FK12

| | |
|--------------------------|--|
| FK12 | MNNNFYQVDKKELAHIIGG RNSYDYIDSG QFGYDIGCTI ANTKFFKRLR HSNQDICS |
| PresalivacinB | MNNNFIQVDKKELAHIIGG RNSYDYIDSG QFGYDIGCTI ANTKFFKRLR HSNQNICS |
| Bacteriocin-like peptide | MNNNFIQVDK KE LAHIIGG RNSYDYIDSG QFGYDIGCTI ANTIFFKRLR HSNQNIC |

b) FK15

| | |
|-----------------|--|
| FK15 | MNKEFTVLTEMELVKVDGG KRYPNCTIGKFLGGLAKGAALGAISSGGVPGAVIGGNIGMVAGAISCL |
| Abp118 α | MMKEFTVLTECELAKVDGG KRGPNVCVGNFLGGLFAGAAAGVPLGPAGIVGGANLGMVGGALTCL |
| Abp118 β | MKNLDKRFTIMTEDNLSVNGG KNGYGGSGNRWVHCAGIVGGALIGAIGPWSAVAGGISGGFTSCR |

ภาพที่ 5 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับระบบฐานข้อมูลของ GenBank (Pilsombut. 2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

K4 forward primer

1 **AGAGCAGATGAAGTGAATAATTA**TAAAGTGTAATTATAGCTATAATAAATTTTTAAAATT 61

FK12

61 ATGAGGTGTTGAAGTTATGAATAATAATTTTGTACAAGTTGATAAGAAAGAATTGGCACA 121

M N N N F V Q V D K K E L A H

121TATAATTGGTGGAAAGAAATTCTTATGATTATATAGATAGCGGACAGTTTGGTTACGATAT 181

I I G G R N S Y D Y I D S G Q F G Y D I

181 AGGATGTACAATTGCTAATACTAAATTTTTCAAAAAGATTAAGACATTCAAATCAGGATAT 241

G C T I A N T K F F K R L R H S N Q D I

241 TTGTAGCTAAACTGTTTAGTAATCTTAACATAACCAATTAAGCACAAAATAATGCGTCTT 301

C S *

301 ACGTTAAAATAGTGTGTTGAAGCTGAAATGATAATACAACAAAAGGGTAAGGTATGTTTAA 361

361 TAGGTGTTTTAGAAAGGATGTGTTTTATATGCTAAAAAAGTTATGGAATATTATTTGGTT 421

421 AGATGGCGGATTTCTTAAAGGAAATAAGAGATATGTAATCATTCCAATTATCTTTGCAGT 481

481 AGTTCCTCCTCTATCAATGTGGCTATCCGACAACGAAGGAATGTCTTATTTAGAGTATAT 541

541 CCAAGAGCCTAAATGGATAATGTTTGCTGTTTTTTGTTTGGTAAGTGGCAGTACACTACT 601

601 TTATCTATTGGATACTGCAATAAAAGTAAATAAACATATGAAAGGATGATTATCATGAAT 661

FK15 M N

661 AAAGAATTTACAGTATTAACAGAAATGGAATTAGTTAAGGTAGACGGTGGGAAACGTTAT 721

K E F T V L T E M E L V K V D G G K R Y

721 CCTAATTGTACAGGAAAATTTTAGGTGGATTAGCAAAAGGAGCAGCATTAGGTGCTATT 781

P N C T G K F L G G L A K G A A L G A I

781 TCTGGTGGCGGAGTTCCTGGAGCAGTTATAGGTGGAAATATCGGTATGGTGGCCGGAGCA 841

S G G G V P G A V I G G N I G M V A G A

841 ATTTCTTGTATTATAGGAGTGATTAATATGAAAAATTTAGATAAGAGATACACAATTATGC 901

I S C L * M K N L D K R Y T I M

901 CAGAAGAAAATCTATCCATAATTGTTGGTGGTAAAAATGGCTATGGTGGAGTGGAAATTC 961

P E E N L S I I V G G K N G Y G G S G I

961 GTTGGGTTCACTGTGGAGCAGGTATTGTAAGTGGAGCTTTGATGGGATCTATTGGTGGAA 1021

R W V H C G A G I V S G A L M G S I G G

1021 ACGCATGGGGAGCCGTAGCAGGTGGCATTCTGGTGGTATAAAAAGTTGTGTTAAGATG 1081

N A W G A V A G G I S G G I K S C R *

1081 AGCCTAATGAATTAGAAAATAAGAAATAAATCTATTTTTCT**CTTACACTTGACACTACTTGA**1141

K4 reverse primer

ภาพที่ 6 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของเบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *Lb. salivarius* K4
เบคทีเรียโอซิน salivarin B (ลำดับที่ 77-249), salvicin K (ลำดับที่ 654-851) และ
salvicin K4 (ลำดับที่ 866-1072) (Pilasombut. 2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

a) FK22

FK22: (Edman degradation)

KNGYGGSG NRQVTEGAGI VG

FK22: (deduced peptides) : MKNLDKRFTI MTEDNLASVN GGKNGYGGSG NRWVHCAGI VGGALIGAIG GPWSAVAGGI SGGFTSCR

abp118β:

MKNLDKRFTI MTEDNLASVN GGKNGYGGSG NRWVHCAGI VGGALIGAIG GPWSAVAGGI SGGFTSCRb) 277 bp bacteriocin (*Lb. salivarius* K7)

277 bp bacteriocin: (Edman degradation)

KRGPNVGNF

277 bp bacteriocin: (deduced peptides): MMKETVLTECELAQVDGG KRGPNVGNF

abp118α:

MMKETVLTECELAQVDGG KRGPNVGNF LGGLFAGAAA GVPLGPAGIV GGANLGMVGG ALTCL

ภาพที่ 7 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน ที่ได้จากการเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นลำดับกรดอะมิโน กับระบบฐานข้อมูลของ GenBank (Pilasombut *et al.* 2006a)

Busarcevic *et al.* (2008) ทำการผลิตแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์ bacteriocin LS1 ที่ผลิตโดย *Lb. salivarius* BGHO1 ซึ่งพบอยู่ในช่องปากของมนุษย์ โดยวิธีการตกตะกอนด้วย ammonium sulfate, reverse-phase chromatography และ high-performance liquid chromatography แบคทีเรียโอซินที่ได้มีขนาด 5 กิโลดาลตัน ซึ่งมีคุณสมบัติที่ทนต่อความร้อน และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *St. mutans*, *St. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *Micrococcus flavus* และ *Salmonella* Enteritidis

Barrett *et al.* (2007) ทำการศึกษา *Lb. salivarius* DPC6005 ที่แยกได้จากลำไส้หนู และพบว่าสามารถผลิตแบคทีเรียโอซิน salivarin P ซึ่งมีลักษณะที่คล้ายกับแบคทีเรียโอซิน ABP-118 ที่ผลิตโดย *Lb. salivarius* strain ยีนที่พบมีลักษณะของโมเลกุลโปรตีนที่คล้ายกับ ABP-118 (Sln1-ABP118α และ Sln2-ABP118β) สรุปได้ว่าเป็น two-component bacteriocin และยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. innocua*

Stern *et al.* (2006) ทำการแยกเชื้อ *Lb. salivarius* NRRT B-30514 และทำการแยกแบคทีเรียโอซิน OR-7 ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ ion-exchange และ hydrophobic-interaction chromatography จากการหาลำดับกรดอะมิโนของ OR-7 (KTYYGTVNGVH CTKNSLWGKV RLKNMKYDQN TTYMGRLQDI LLGWATGAFG KTFH) ทำให้สามารถจัดกลุ่มได้ว่า OR-7 อยู่ในกลุ่ม class IIa bacteriocin ซึ่งคล้ายกับ Acidocin A ที่ผลิตจาก *Lb. acidophilus* แต่ OR-7 มีผลต่อแบคทีเรียแกรมลบ และจัดว่าเป็น antibacterial อีกชนิดหนึ่ง จากนั้นได้ทำการศึกษาต่อ โดยการนำโปรตีนที่ได้ไปผสมกับอาหารไก่ และจัดกลุ่มการทดลอง เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้ง *Campylobacter*

jejuni ในระบบย่อยอาหาร จากผลการทดลอง พบว่า แบคทีเรียโอซินที่ได้จาก *Lb. salivarius* NRRT B-30514 มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *C. jejuni* ในระบบย่อยอาหารได้

Ocana *et al.* (1999) ทำการศึกษาแบคทีเรียโอซินที่ได้จาก *Lb. salivarius* subsp. *salivarius* CRL 1328 ที่แยกได้จาก vaginal พบว่ามีผลต่อการยับยั้ง *E. faecalis*, *E. faecium* และ *Neisseria gonorrhoeae* ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค และจากผลการทดลองยังพบว่า โปรตีนที่ได้มีคุณสมบัติในการทนความร้อน และยับยั้งการทำงานของแบคทีเรียอื่นๆ ได้ คุณสมบัติดังกล่าวนี้ สามารถนำ *Lb. salivarius* subsp. *salivarius* CRL 1328 มาประยุกต์ใช้เป็นโปรไบโอติกได้

Arihara *et al.* (1996) ทำการศึกษาแบคทีเรียโอซินที่ได้จาก *Lb. salivarius* subsp. *salicinius* T 140 ที่แยกได้จาก surface of Japanese pampas grass leaves ซึ่งสามารถผลิตแบคทีเรียโอซิน Salivacin 140 ที่สามารถยับยั้ง *S. aureus*, *St. mutans*, *Actinomyces viscosus*, *Propionibacterium acnes* and *Yersinia enterocolitica* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในช่องปากและผิวหนัง นอกจากนี้ยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการถนอมอาหาร ประยุกต์ใช้เพื่อป้องกันสุขภาพภายในช่องปาก และใช้ในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดผิวหรือเครื่องสำอางได้

2.6 เทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

เทคนิค PCR เป็นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเป้าหมายเฉพาะส่วนอย่างเจาะจงภายในหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยการเลียนแบบการสังเคราะห์ที่เกิดขึ้นในร่างกาย (*in vivo*) ส่วนประกอบของปฏิกิริยาจะประกอบไปด้วย สายดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ใช้เป็นแม่พิมพ์ (single stranded DNA template) ไพร์เมอร์ที่เป็น oligonucleotide sequence มีลำดับเป็นคู่สมกับสายแม่พิมพ์ deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) และ polymerase enzyme ดีเอ็นเอสายใหม่ที่สังเคราะห์ขึ้นจะเป็นคู่สมกับสายแม่พิมพ์ จากความสามารถของเอนไซม์ในสภาพที่เหมาะสม โดยปกติ buffer ของ PCR จะประกอบด้วย Mg^{2+} , monovalent cations และ co-solvent บางชนิด ช่วยให้เอนไซม์คงตัว (Rolfs *et al.* 1992)

2.6.1 เทคนิค PCR ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน

Denaturation เพื่อแยกสายคู่ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ให้เป็นสายเดี่ยว อุณหภูมิจะอยู่ในช่วง 92-96 องศาเซลเซียส

Annealing เป็นขั้นตอนการให้ไพร์เมอร์เข้าไปจับกับเส้นแม่พิมพ์ตรงตำแหน่งที่เป็น complementary กัน อุณหภูมิจะอยู่ในช่วง 50-72 องศาเซลเซียส

Extension เป็นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่โดยการเติม dNTPs ที่ตำแหน่ง OH ของด้านปลาย 3' ของเส้นดีเอ็นเอสายใหม่ ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส

จำนวนสายดีเอ็นเอที่ได้จะเป็นไปตามสูตร $(2^n)X$
 n คือ จำนวนรอบที่ใช้ในการสังเคราะห์
 X คือ จำนวนสายของแม่พิมพ์ที่ใช้เริ่มต้น

2.6.2 การที่ปฏิกิริยา PCR มีความจำเพาะ (specificity) และความไวสูง (sensitivity)

2.6.2.1 เป็นคุณสมบัติของ oligodeoxynucleotide ที่สามารถจับกับกรดนิวคลีอิกที่มี complementary อย่างจำเพาะเจาะจง 100% ถ้ามีอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมกับการเข้าจับ การเข้าจับจะเกิดได้เร็วมาก โดยใช้เวลาประมาณ 1/100 วินาที

2.6.2.2 เป็น compound action โดยไพรเมอร์ทั้ง 2 เส้น เข้าจับกับดีเอ็นเอ 2 เส้น แล้วทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของผลผลิตโดยที่ Taq DNA Polymerase สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยอัตราเร็ว 100-140 nucleotides ต่อ 1 วินาที

2.6.2.3 คุณสมบัติของปฏิกิริยาลูกโซ่ดีเอ็นเอเส้นใหม่จะทำหน้าที่เป็นดีเอ็นเอเป้าหมายในรอบต่อไปของ PCR จึงทำให้มีการเพิ่มผลผลิตเป็นทวีคูณ

2.7 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน

การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดยทั่วไปจะเริ่มโดยการโคลนยีนที่แปลรหัสเป็นโปรตีนที่ต้องการลงในเวกเตอร์ (vector) ที่มี promoter ควบคุมการสังเคราะห์โปรตีน และเหนี่ยวนำให้พลาสมิดเข้าไปในเซลล์เจ้าบ้าน การเจริญของเซลล์เจ้าบ้านจะเป็นการชักนำให้มีการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน ที่สามารถตรวจสอบโปรตีนเป้าหมายด้วยการทำ SDS-PAGE ซึ่งในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนต้องคำนึงถึงสายพันธุ์ของเซลล์เจ้าบ้าน ชนิด คุณสมบัติของเวกเตอร์ และสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งเซลล์เจ้าบ้านที่ใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน มีอยู่หลายชนิดตามวัตถุประสงค์และการใช้งาน แต่ที่นิยมใช้กันมากคือ *E. coli* system เป็นเซลล์ที่สามารถผลิตโปรตีนได้จำนวนมาก การเลี้ยงและการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนทำได้สะดวกและรวดเร็ว แต่ข้อเสียของ *E. coli* system คือ โปรตีนที่ผลิตได้มักจะไม่หลังออกนอกเซลล์ และไม่มีขบวนการ post-translation modification ต่างๆ เซลล์เจ้าบ้านที่ใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน (Robertson *et al.* 1997) ได้แก่

2.7.1 เซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Mammalian cell)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า สามารถผลิตโปรตีนได้สูง และมีขบวนการ post-translational modification เช่น glycosylation, phosphorylation และ mRNA processing

2.7.2 Baculovirus vectors

เป็นระบบที่ผลิตโปรตีนภายในเซลล์แมลง ซึ่งมีขบวนการ post-translational modification และโปรตีนที่สร้างขึ้นบางครั้งจะถูกปล่อยออกมาในน้ำเลี้ยงเซลล์ทำให้ง่ายในการแยกโปรตีน

2.7.3 ยีสต์ (Yeast)

การผลิต recombinant protein ในยีสต์มีข้อดีคือ มีลักษณะใกล้เคียงกับ eukaryotic cell มีกระบวนการ glycosylation และการตัดแปลงโปรตีนหลังการสังเคราะห์ คล้ายกับสิ่งมีชีวิตชั้นสูง

2.8 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยระบบ intein fusion protein (IMPACT-CN System)

IMPACT-CN System เป็น expression vectors (pTYB vectors) ซึ่งมี tag ที่เชื่อมต่อเข้ากับโปรตีนทางด้าน C-terminus (pTYB1 และ pTYB2; C-terminal fusion) หรือ ด้าน N-terminus (pTYB11 และ pTYB12; N-terminal fusion) และเป็นระบบที่รวมกันระหว่างการผลิต (expression) และการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ (purification) ด้วยตัวจับที่มีความจำเพาะ (affinity chromatography) ซึ่ง pTYB expression vector เป็นระบบที่มีประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำให้มีการผลิตโปรตีนร่วมกับ intein-CBD ที่มีขนาด 55 กิโลดาลตัน และสามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ด้วยการใช้ chitin affinity chromatography และสามารถตัดเอาโปรตีนเป้าหมายออกมาจากรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้ในตำแหน่งของ specific self-cleavage

pTYB1 และ pTYB11 vectors ประกอบด้วยส่วนสำคัญในการผลิตโปรตีน และการเตรียมโปรตีนให้บริสุทธิ์ได้ดังนี้ (แสดงในภาพที่ 8)

1. การแสดงออกใน pTYB1 vectors ถูกควบคุมโดย T7 promotor ร่วมกับ *lac* operator
2. ส่วนของ Chitin Binding Domain (CBD)
3. ตำแหน่ง multiple cloning site (MCS)
4. ส่วนของ intein อยู่ทางด้าน 3' ของตำแหน่ง MCS (pTYB1) และด้าน 5' ของตำแหน่ง MCS (pTYB11)

5. M13 Origin of replication

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้เรียนเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

6. (Ap^R) เป็นส่วนที่มีผลในการต้านยาปฏิชีวนะ ampicillin

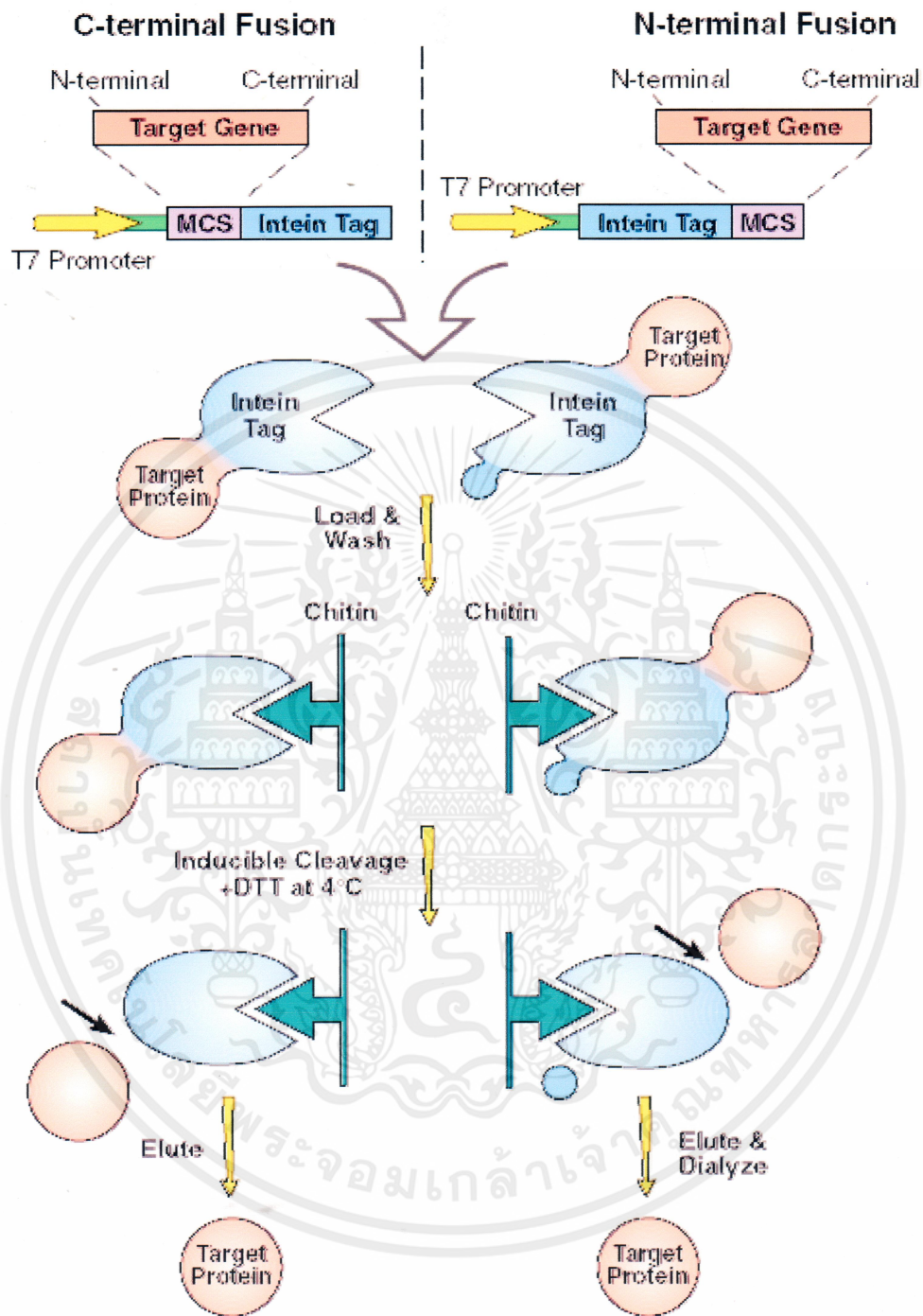
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9 Chitin Binding Domain (CBD)

Chitin สามารถแยก intein fusion protein ให้บริสุทธิ์ใน single column two step ซึ่งโปรตีนจะจับกับ intein-CBD ด้วยพันธะไตรเอสเทอร์ โดยโปรตีนจะถูกชะออกมาหลังจากที่มีการ self cleavage ด้วย DTT, β -mercaptoethanol และ cysteine ที่จะเข้าไปแทนที่ ทำให้ได้โปรตีนที่ยังคงคุณสมบัติ และสามารถทำงานได้ และ intein fusion protein ถูกชะออกจาก chitin bead ด้วยเกลือ 0.3M NaOH (NEB. 2006) ดังแสดงในภาพที่ 9



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 9 การแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ (Protein Purification) (NEB, 2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์ และสารเคมี

อุปกรณ์

1. เครื่อง UV-Visible spectrophotometer (Cary 50 Conc Varian, North America)
2. เครื่อง Nano drop UV/Visible spectrophotometer
3. เครื่อง PCR Thermal cycler (TC-28/4 Lio-Labinter, USA)
4. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) (Z383K Hermle Labortechnik GmbH, Germany และ 16M spectrafuge, USA)
5. เครื่อง UV Transilluminator
6. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (shaker) (VS-8480SFN Meditop, England)
7. ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator)
8. ตู้ปลอดเชื้อ
9. ตู้เย็น 4°C
10. ตู้เย็นแช่แข็ง -20 °C และ -80 °C
11. pH มิเตอร์ (Seven Easy pH meter Mettler Toledo, USA)
12. เครื่อง vortex mixer (VX100 Labnet, USA)
13. เครื่องชั่ง (TB-214 Denver Becthai, Thailand)
14. Autopipet (Gilson, Germany)
15. Heat Box (D1100 Labnet, USA)
16. ชุดอิเล็กโตรโฟรีซิส ประกอบด้วย
 - เครื่องเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแนวนอน (Gel electrophoresis)
 - เครื่องเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแนวตั้ง (SDS-PAGE electrophoresis) (AE 6530 ATTO, Japan)
17. เครื่อง sonicator
18. เครื่องทำแห้งสารละลาย (freeze-dryer)

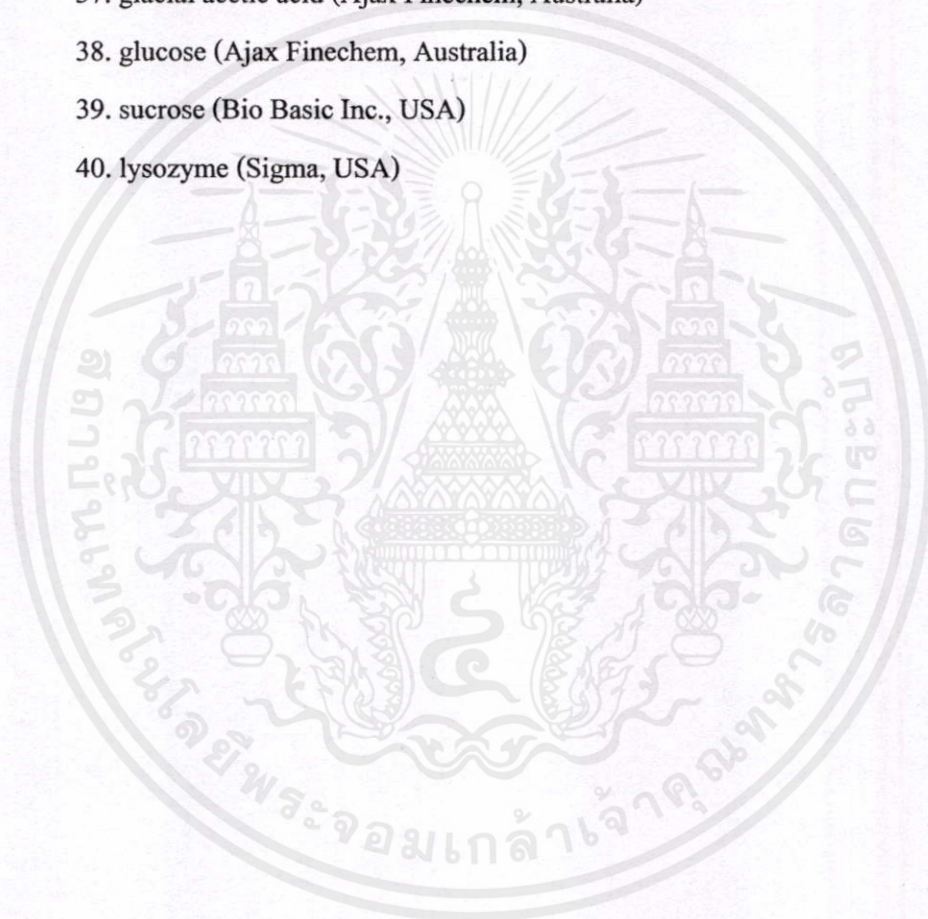
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ 19. ชุดทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟี (Bio-Rad, USA) ให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารเคมี

1. pGEM-T[®] easy vector (Promega, USA)
2. pTYB1 (New England Biolab, UK)
3. เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Nde* I และ *Xho* I (Fermentus, USA)
4. เอนไซม์ T4 DNA ligase และ *Taq* polymerase (Fermentus, USA)
5. ชุด gel extraction kit (Qiagen, USA)
6. ชุดสำเร็จสำหรับสกัดพลาสมิด (Fermentus, USA)
7. ดีเอ็นเอไพรมเมอร์ (Fermentus, USA)
8. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Luria-Bertani broth (LB broth)
9. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) (Merck, Germany)
10. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Tryptic Soy Broth Yeast Extract (TSBYE) (Merck, Germany)
11. แกลกโตส (Ajax Finechem, Australia)
12. Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (Fermentus, USA)
13. chitin beads (New England Biolab, UK)
14. 1, 4-Dithiothreitol (DTT) (Fermentus, USA)
15. phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (Serva, USA)
16. EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt) (Univar, Australia)
17. Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Research Organic Inc., USA)
18. sodium dodecyl sulfate (SDS) (Bio Basic Inc., USA)
19. β -mercaptoethanol (Merck, Germany)
20. bradford Reagent (Bio Rad, USA)
21. acrylamide (Bio Basic Inc., USA)
22. *N,N'*-methylenebisacrylamide (BIS) (Bio Basic Inc., USA)
23. SDS (sodium dodecyl sulfate) (Bio Basic Inc., USA)
24. TEMED (tetramethylethylenediamine) (Bio Basic Inc., USA)
25. ammoniumpersulfate (Ajax Finechem, Australia)
26. coomassie blue R250 (Research organics, USA)
27. methanol (Ajax Finechem, Australia)
28. bromophenol blue (Ajax Finechem, Australia)
29. ethanol (Merck, Germany)

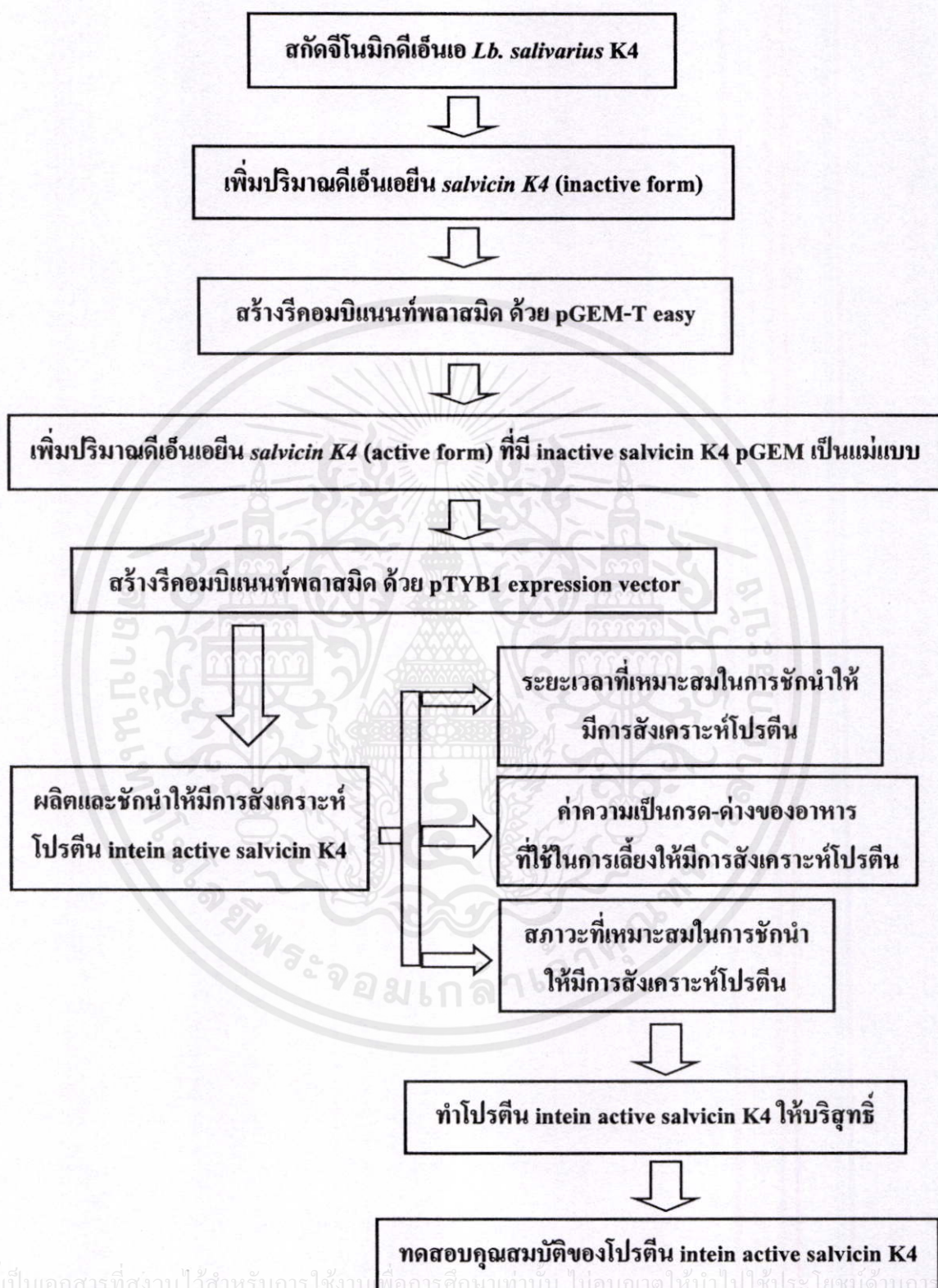
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น

30. BSA (bovine serum albumin) (Fluka Biochemika, USA)
31. NaCl (J.T.Baker, Malaysia)
32. NaOH (Merck, Germany)
33. TritonX-100 (USB Corporation, USA)
34. glycerol (Ajax Finechem, Australia)
35. boric acid (Fisher Scientific, UK)
36. potassium acetate (Ajax Finechem, Australia)
37. glacial acetic acid (Ajax Finechem, Australia)
38. glucose (Ajax Finechem, Australia)
39. sucrose (Bio Basic Inc., USA)
40. lysozyme (Sigma, USA)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 สรุปขั้นตอนการทดลอง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้า ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่น
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรีย

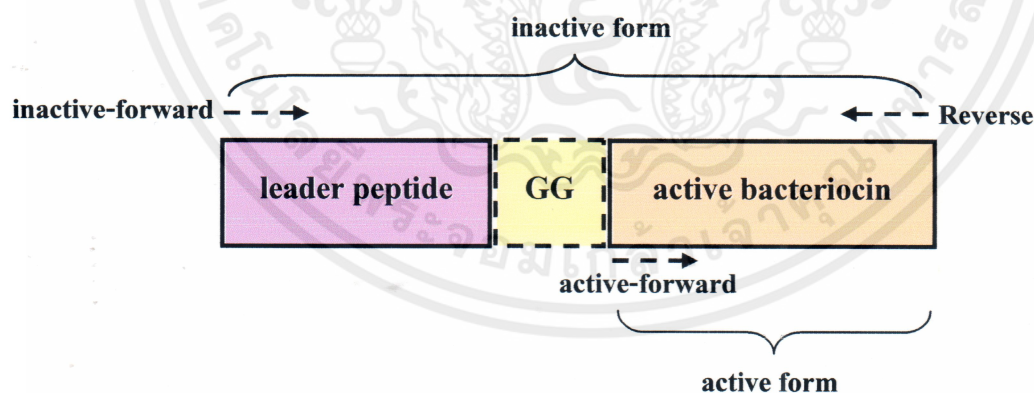
Lb. salivarius K4 เลี้ยงในอาหารสูตร MRS ในสภาพไม่มีอากาศ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส *E. coli* DH5 α และ *E. coli* BL21 (DE3) (Promega, USA) เลี้ยงในอาหารสูตร LB ในสภาพต้องการอากาศ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3.3.2 การสกัด DNA จาก *Lb. salivarius* K4 (คัดแปลงจาก Carolissen-Mackay *et al.* 1997)

นำ *Lb. salivarius* K4 1 โคโลนีมาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS 3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อจำนวน 2 เพลอร์เซ็นต์ ลงในอาหาร MRS หลอดใหม่ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิเดิมเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในหลอดไมโครเซนติฟิวส์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทำการเก็บซ้ำประมาณ 2-3 รอบ โดยสังเกตปริมาณตะกอนเซลล์ที่ได้ เติมสารละลาย A (TE buffer, 6.7% sucrose) 500 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติมเอนไซม์ lysozyme ความเข้มข้น 70 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แล้วเติม SDS ความเข้มข้น 20 เพลอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมเอนไซม์ RNase ปริมาตร 4 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลายฟีนอลปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเพื่อแยกส่วนใสด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ทำการดูดส่วนใสลงในหลอดไมโครเซนติฟิวส์หลอดใหม่ จากนั้นเติม phenol : chloroform (1 : 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเพื่อแยกส่วนใสด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และดูดส่วนใสลงในหลอดไมโครเซนติฟิวส์หลอดใหม่ แล้วเติม chloroform : isoamylalcohol (24 : 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนแยกส่วนใสด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และดูดส่วนใสใส่หลอดไมโครเซนติฟิวส์หลอดใหม่ แล้วเติม isopropylalcohol ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ประมาณ 16 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนดีเอ็นเอ ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และทำการล้างตะกอนดีเอ็นเอ 2 ครั้ง ด้วยเอทานอล ความเข้มข้น 70 เพลอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร พลิกหลอดกลับไปมา แล้วดูดสารละลายเอทานอลทิ้ง จากนั้นทำให้แห้งโดยการตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำ ตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอ ด้วยวิธี electrophoresis บน agarose gel ที่มีความเข้มข้น 1 เพลอร์เซ็นต์ โดยใช้กระแสไฟ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ย้อมเจลในสารละลาย ethidium bromide เป็นเวลา 2 นาที ล้างด้วยน้ำเปล่า นาน 10 นาที ทำการตรวจดูแถบดีเอ็นเอ และขนาดของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV Transilluminator

3.3.3 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ยีน *salvicin K4*

การออกแบบไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ยีน *salvicin K4* จากจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Lb. salivarius K4* สามารถทำได้โดยการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแบคทีริโอซิน *salvicin K4* มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ของยีนแบคทีริโอซินที่ผลิตโดย *Lb. salivarius* UCC 118 โดยใช้โปรแกรม ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>) เปรียบเทียบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *salvicin K4* จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *salvicin K4* ที่ได้จากจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Lb. salivarius K4* เข้าสู่โปรแกรม primer3 (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) โดยแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในรูป inactive form และ active form เนื่องจากแบคทีริโอซินก่อนที่จะมีการแสดงออก โปรตีนจะอยู่ในลักษณะของแบคทีริโอซินที่ไม่พร้อมจะทำงาน (inactive form) คือมี leader peptide ที่มีจุดตัดตรงตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เป็น GG และภายหลังจากการตัดกรดอะมิโนตำแหน่ง GG นี้แล้ว โปรตีน แบคทีริโอซินจะอยู่ในรูปที่พร้อมทำงาน (active form) แสดงในภาพที่ 10 ดังนั้นในการออกแบบไพรเมอร์จึงได้มีการออกแบบให้ได้ชิ้นยีนที่อยู่ทั้งในรูปของ inactive form และ active form โดยออกแบบไพรเมอร์บริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ที่กำหนดแบคทีริโอซินในรูป inactive form เพื่อสร้างแบคทีริโอซินในรูป inactive form และออกแบบไพรเมอร์หลังตำแหน่งกรดอะมิโน GG ของ leader peptide เพื่อสร้างแบคทีริโอซินในรูป active form (ดังแสดงในตารางที่ 12)



ภาพที่ 10 ลักษณะของยีนแบคทีริโอซินก่อนที่จะมีการแสดงออก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 12 ไพร์เมอร์ที่ใช้สำหรับการสังเคราะห์ยีน *salvicin K4*

| Primer | Sequence (5'→3') |
|-------------------------------|--|
| 1. K4_BETA_F (inactive form) | 5'-GCCATATGAAAAATGGTTATGGTGGTAGTG-3' |
| 2. K4_AC_BETA_F (active form) | 5'-TACATATGAAAAATTTAGATAAGAGATACACA-3' |
| 3. K4_BETA_R | 5'-TTCTCGAGTTAACGACAACCTTTTAT-3' |

- หมายเหตุ 1. K4_BETA_F (inactive form) หมายถึง forward primer ที่ใช้ในรูป inactive form
 2. K4_AC_BETA_F (active form) หมายถึง forward primer ที่ใช้ในรูป active form
 3. K4_BETA_R หมายถึง reverse primer

3.3.4 การเพิ่มปริมาณยีน *salvicin K4* ด้วยวิธี PCR

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนแบคทีเรีย *salvicin K4* ที่อยู่ในรูป inactive form และ active form ด้วยวิธี PCR โดยใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *Lb. salivarius K4* เป็นแม่แบบ และใช้ไพร์เมอร์ K4_BETA_F กับ K4_BETA_R สำหรับยีนที่อยู่ในรูป inactive form ซึ่งมีขนาดของยีนประมาณ 210 คู่เบส และใช้ไพร์เมอร์ K4_AC_BETA_F กับ K4_BETA_R สำหรับยีนที่อยู่ในรูป active form ขนาดของยีนประมาณ 144 คู่เบส ซึ่งส่วนประกอบของสารละลายแสดงในตารางที่ 13 โดยมีสภาวะอุณหภูมิ และระยะเวลาที่เหมาะสม ดังนี้

ขั้นแรกที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที

ขั้นที่สอง Denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

Annealing ที่ 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที

Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

ขั้นสุดท้ายตามด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

จากนั้นทำการตรวจสอบขนาดของยีน Alb β ด้วยวิธี Electrophoresis บน agarose gel ที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้กระแสไฟ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ย้อมเจลในสารละลาย ethidium bromide นาน 2 นาที ล้างด้วยน้ำเปล่า นาน 10 นาที ตรวจสอบแถบ และขนาดของยีนด้วยเครื่อง UV Transilluminator

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะพิมพ์ใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 13 ส่วนประกอบของสารละลายสำหรับกระบวนการทำ PCR

| สาร | ความเข้มข้นสุดท้าย | ปริมาตร (ไมโครลิตร) | |
|-------------------------------------|--------------------|---------------------|-----|
| 10 X buffer i-Tag/MgCl ₂ | 1X | 2 | 10 |
| 25 mM dNTPs | 250 μ m | 2 | 10 |
| 5 pmole/ μ l Primer F | 10 pmole | 2 | 10 |
| 5 pmole/ μ l Primer R | 10 pmole | 2 | 10 |
| 10 pg- 1 μ g DNA Template | 1 ng -1 μ g | 1 | 5 |
| i-Taq DNA polymerase | 1 Unit | 0.2 | 1 |
| น้ำ | 1X | 10.8 | 54 |
| รวม | | 20 | 100 |

3.3.5 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยใช้ pGEM-T easy vector

นำดีเอ็นเอ *salvicin K4* ในรูป inactive ที่ทำการเพิ่มปริมาณและทำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ให้บริสุทธิ์ โดย gel extraction kit (Qiagen, USA) มาเชื่อมต่อกับ pGEM-T โดยใช้ pGEM-T easy vector kit (Promega, USA) ซึ่งประกอบด้วย 2x rapid ligation buffer, 50 ng pGEM-T easy vector, PCR product, 3U T4 DNA ligase ทำการผสมให้เข้ากัน บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ทำการย้ายส่วนผสมเข้าสู่เซลล์ของ *E. coli* DH5 α ด้วยวิธี heat shock transformation (Sambrook and Russell. 2001) แล้วทำการคัดเลือกรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอบนอาหารแข็งสูตร Luria-Bertani agar (LB agar) ที่มีแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม Isopropyl- β -D thiogalactoside (IPTG) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ และ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-Gal) ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง โดยคัดเลือกโคโลนีสีขาวบนอาหารแข็งสูตร LB ทำการตรวจสอบพลาสมิดที่มีดีเอ็นเอสายผสมที่ได้ด้วยวิธี PCR และตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

3.3.6 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนของยีน *active salvicin K4*

3.3.6.1 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอ เพื่อการผลิตรีคอมบิแนนท์ของยีน *active salvicin K4*

นำดีเอ็นเอยีน *active salvicin K4* ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR ซึ่งมี *inactive salvicin K4 pGEM* เป็นแม่แบบ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตัดด้วยเอนไซม์ *Nde* I (Fermentas, USA) ความเข้มข้น 10 ยูนิต ร่วมกับเอนไซม์ *Xho* I (Fermentas, USA) ความเข้มข้น 10 ยูนิต ชนิดละ 1 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 18 ไมโครลิตร เติมน้ำ 10x buffer O (50 mM

Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0.1 mg/ml BSA) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง นำส่วนผสมดังกล่าวมาตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย โซเดียมอะซิเตด ความเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 1/10 เท่าของปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอ เดิม เอธานอลบริสุทธิ์ 2 เท่าของปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอ นำไปเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงให้ดีเอ็นเอตกตะกอน และดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง ล้างตะกอนด้วย เอธานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ พลิกหลอดไปมา ดูดสารละลายเอธานอลทิ้ง จากนั้นทำ ตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธี electrophoresis บน agarose gel ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้กระแสไฟ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ย้อมเจลในสารละลาย ethidium bromide นาน 2 นาที ล้างด้วยน้ำเปล่า นาน 10 นาที ตรวจสอบแถบ และขนาดของยีนด้วย เครื่อง UV Transilluminator

3.3.6.2 การเตรียมพลาสมิด pTYB1 Expression vector

พลาสมิดที่ใช้ในการศึกษาคือ pTYB1 expression vector (NEB, 2006) ซึ่งเป็น พลาสมิดที่มี intein-CBD ที่เชื่อมเข้ากับยีนที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์ มีวิธีการคือ ทำการเพิ่มจำนวน พลาสมิด pTYB1 ให้ได้ปริมาณมากโดยการย้ายเข้าสู่เซลล์ของ *E. coli* DH5 α ด้วยวิธี heat shock transformation (Sambrook and Russell, 2001) โดยเติมพลาสมิด pTYB1 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลง ใน competent cells (*E. coli* DH5 α) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำหลอดไมโครเซนติฟิวส์แช่ลงใน น้ำแข็งทันที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำหลอดไมโครเซนติฟิวส์มาแช่ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที แล้วนำหลอดไมโครเซนติฟิวส์มาแช่น้ำแข็งทันที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติม อาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครเซนติฟิวส์หลอดเดิม แล้วนำมา บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบ ต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนใสทิ้งแล้วนำตะกอนเซลล์มาเลี้ยงบนอาหารแข็งที่เติมแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อ *E. coli* DH5 α ที่มีพลาสมิด pTYB1 ในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่ เติมแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อดังกล่าวมาทำการสกัดแยกพลาสมิด pTYB1 จากเซลล์ด้วยวิธี alkaline lysis method (Sambrook and Russell, 2001) โดยถ่ายเชื้อลงในหลอดไมโครเซนติฟิวส์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที รวบรวมตะกอนเซลล์ที่ได้ จากนั้นเติมสารละลาย I (solution I; 50mM glucose, 25mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA pH 8.0) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ละลายตะกอนด้วยเครื่อง vortex แล้ว

เติมสารละลาย II (solution II; 0.2N NaOH, 1% SDS) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดไปมา แล้วเติมสารละลาย III (solution III; 5M potassium acetate, 0.2M glacial acetic acid) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอน ด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ ปริมาตร 400 ไมโครลิตร แล้วเติมส่วนผสมของ phenol : chloroform ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำหลอดไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และทำการดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ แล้วเติมโซเดียมอะซิเตด ความเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 1/10 เท่าของปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอ แล้วเติมเอธานอลบริสุทธิ์ 2 เท่าของปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ พลิกหลอดไปมา นำไปแช่เย็นที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนพลาสติกด้วยเอธานอล ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นดูดส่วนใสทิ้ง ทำตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อที่เติม RNaseA ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ ด้วยวิธี electrophoresis บน agarose gel ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้กระแสไฟ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ย้อมเจลในสารละลาย ethidium bromide นาน 2 นาที ล้างด้วยน้ำเปล่า นาน 10 นาที ตรวจสอบแถบ และขนาดของยีนด้วยเครื่อง UV Transilluminator

3.3.6.3 การเตรียม linear DNA ของพลาสมิด pTYB1 expression vector

การเตรียม linear DNA ของพลาสมิด pTYB1 expression vector โดยการใช้อเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I ร่วมกับเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I ในการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอ ซึ่งปฏิกิริยาประกอบด้วยพลาสมิด pTYB1 ที่ได้จากข้อ 3.3.6.2 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 24 ไมโครลิตร แล้วเติม 10x buffer O (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0.1 mg/ml BSA) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเอนไซม์ *Nde* I และเอนไซม์ *Xho* I ชนิดละ 3 ไมโครลิตร โดยเติมเอนไซม์ทั้งสองชนิดพร้อมๆ กัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง เพื่อให้ดีเอ็นเอถูกตัดได้สมบูรณ์ จากนั้นนำส่วนผสมดังกล่าวมาตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยโซเดียมอะซิเตด ความเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 1/10 เท่าของปริมาตรสารละลาย เติมเอธานอลบริสุทธิ์ 2 เท่าของปริมาตรสารละลาย นำไปแช่เย็นที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงตกตะกอน ด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง แล้วนำตะกอนมาล้างด้วย เอธานอล ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ดูดส่วนใสทิ้ง ทำตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง จากนั้นละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธี electrophoresis บน agarose gel ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

3.3.6.4 การเชื่อมดีเอ็นเอ *active salvicin K4* เข้ากับ linear DNA ของพลาสมิด pTYB1 expression vector

ทำการเชื่อมต่อดีเอ็นเอ *active salvicin K4* เข้ากับ linear DNA ของพลาสมิด pTYB1 expression vector ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase เพื่อสร้างดีเอ็นเอสายผสม ซึ่งปฏิกิริยาประกอบด้วย ดีเอ็นเอ *active salvicin K4* ที่ได้จากข้อ 3.3.6.1 ปริมาตร 6 ไมโครลิตร เติมสารละลาย ligation buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วเติม linear DNA ของพลาสมิด pTYB1 expression vector ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.3.6.3 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเอนไซม์ T4 DNA ligase ความเข้มข้น 3 units ปริมาตร 1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง (Sambrook and Russell, 2001)

3.3.6.5 การย้ายดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* DH5 α

ย้ายดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านด้วยวิธี heat shock transformation (Sambrook and Russell, 2001) โดยนำส่วนผสม ligation ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ที่ได้จากข้อ 3.3.6.4 มาเติมลงใน competent cells (*E. coli* DH5 α) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำหลอดไมโคร เซนติฟิวส์ แช่ลงในน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำหลอดไมโครเซนติฟิวส์มาแช่ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที แล้วนำหลอดไมโครเซนติฟิวส์มาแช่น้ำแข็งทันที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติมอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครเซนติฟิวส์หลอดเดิม แล้วนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนใสทิ้งแล้วนำตะกอนเซลล์มาเลี้ยงบนอาหารแข็งที่เติมแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

3.3.6.6 การคัดเลือกเซลล์ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม

คัดเลือกเซลล์ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม โดยการเลือกโคโลนีของเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยวบนอาหารแข็งสูตร LB ด้วยวิธีการสุ่ม นำโคโลนีเดี่ยวที่เลือกมาเลี้ยงในอาหาร LB Broth ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่เติมแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB มาปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ นำตะกอนเซลล์มาสกัดพลาสมิดด้วยวิธี alkaline lysis method โดยเติมสารละลาย I (solution I) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ละลายตะกอนด้วยเครื่อง vortex แล้วเติมสารละลาย II (solution II) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดกลับไปมา แล้วเติมสารละลาย III (solution III) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสม

ให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดเก็บ ส่วนใสให้หลอดไมโครเซนติฟิวส์ใหม่ ปริมาตร 400 ไมโครลิตร แล้วเติมส่วนผสมของ phenol : chloroform ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดไปมา นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดเก็บส่วนใสด้านบนให้หลอดใหม่ แล้วเติม โซเดียมอะซิเตด ความเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 1/10 เท่าของปริมาตรสารละลาย จากนั้นเติม เอทานอลบริสุทธิ์ 2 เท่าของปริมาตรสารละลายที่ได้ พลิกหลอดไปมา นำไปแช่เย็นที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูด ส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนพลาสติกด้วยเอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ นำมาปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง ดูดส่วนใสทิ้ง ทำตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อที่เติม RNaseA ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบพลาสติกที่มีดีเอ็นเอสายผสมที่ได้ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ K4_AC_BETA_F กับ K4_BETA_R (active form) แล้วนำมาตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ด้วย electrophoresis บน agarose gel ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

3.3.7 การผลิต และการชักนำให้มีการสังเคราะห์โปรตีน

3.3.7.1 การชักนำให้มีการสังเคราะห์โปรตีน

ทำการย้ายดีเอ็นเอสายผสมหรือดีเอ็นเอของพลาสมิด pTYB1 เข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* BL 21 (DE3) ด้วยวิธี heat shock transformation (Sambrook and Russell, 2001) โดยนำดีเอ็นเอสายผสมและดีเอ็นเอของพลาสมิด pTYB1 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เติมลงใน competent cells (*E. coli* BL21) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร โดยแยกคนละหลอด นำหลอดไมโครเซนติฟิวส์แช่ลงในน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำหลอดไมโครเซนติฟิวส์มาแช่ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที แล้วนำหลอดไมโครเซนติฟิวส์มาแช่ในน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติมอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครเซนติฟิวส์หลอดเดิม แล้วนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนใสทิ้งแล้วนำตะกอนเซลล์มาเลี้ยงบนอาหารแข็งที่เติมแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่เติมแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ไม่ต่ำกว่า 10 ชั่วโมง เข้าด้วยความเร็ว 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นทำการถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ เติมลงในอาหารเหลวสูตร LB หลอดใหม่ ในอัตราส่วนของอาหาร 1 มิลลิลิตรต่อเชื้อแบคทีเรีย

1 ไมโครลิตร และเติมแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ให้มีค่าประมาณ 0.4-0.6 ทำการเก็บเซลล์ก่อน โดยดูดเก็บเซลล์ที่เลี้ยงไว้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวส์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นดูดส่วนใสทิ้ง และเก็บตะกอนไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เซลล์ที่เหลือชักนำให้มีการสังเคราะห์โปรตีนด้วย IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) ที่มีความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ นำมาเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทำการเก็บเซลล์ โดยดูดเก็บเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวส์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นดูดส่วนใสทิ้ง เก็บตะกอนเซลล์ นำมาเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ 6X loading dye (0.5M tris pH 6.8, 30% glycerol, 0.1% SDS และ 1.2 mg bromophenol blue) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปตรวจสอบขนาดของโปรตีนด้วยเทคนิค sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) เทียบขนาดกับโปรตีนมาตรฐาน

3.3.7.2 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการชักนำให้มีการสังเคราะห์โปรตีน

นำโคโลนีเดี่ยวของดีเอ็นเอสายผสมที่ได้จากการย้ายเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* BL21 (DE3) มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่เติมแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นทำการถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ เติมนลงในอาหารเหลวสูตร LB หลอดใหม่ 5 หลอด ในอัตราส่วนของอาหาร 1 มิลลิลิตรต่อเชื้อแบคทีเรีย 1 ไมโครลิตร และเติมแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ให้มีค่าประมาณ 0.4-0.6 ชักนำให้มีการสังเคราะห์โปรตีนด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ทำทั้งหมด 4 หลอด และทำการเก็บเซลล์ชั่วโมงละ 1 หลอด โดยทำการเก็บในชั่วโมงที่ 1, 2, 4 และ 6 (T_1 , T_2 , T_4 และ T_6 ตามลำดับ) โดยดูดอาหารปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดไมโครเซนติฟิวส์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง และเก็บตะกอนไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และ 1 หลอด ที่ไม่ถูกชักนำ ให้เป็น T_0 โดยทำการเก็บเซลล์พร้อมกับหลอดสุดท้ายในชั่วโมงที่ 6 จากนั้นนำตะกอนที่เก็บไว้ในช่วงเวลา T_0 , T_1 , T_2 , T_4 และ T_6 ชั่วโมง นำมาเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ 6X loading dye ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปตรวจสอบขนาดของโปรตีนด้วยเทคนิค sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) เทียบขนาดกับ โปรตีนมาตรฐาน

3.3.7.3 ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้มีการสังเคราะห์โปรตีนปริมาณมาก

นำโคโลนีเดี่ยวของ *E. coli* BL21 (DE3) มาเลี้ยงในอาหาร LB Broth ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่เติมแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นทำการถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ เติมนลงในอาหารเหลวสูตร LB หลอดใหม่ทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างในระดับที่แตกต่างกัน โดยเริ่มตั้งแต่ 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 และ 8.5 ที่เติมแอมพิซิลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ให้มีค่าประมาณ 0.4-0.6 ทำการชักนำให้มีการสังเคราะห์โปรตีนด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทำการเก็บเซลล์ โดยคูดอาหารปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดไมโครเซนติฟิวส์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที คูดส่วนใสทิ้ง นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาละลายด้วยสารละลาย lysis buffer (20mM Tris-HCl pH 8.0, 500mM NaCl, 1mM EDTA, 0.1% TritonX-100) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง sonicator นำสารละลายเซลล์มาหมุนเหวี่ยงแยกตะกอนกับส่วนใส ด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แบ่งส่วนใสที่ได้ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำมาเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ 6X loading dye ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปตรวจสอบขนาดของโปรตีนด้วย SDS-PAGE และนำสารละลายเซลล์ส่วนใสที่เหลือมาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนทั้งหมดด้วยวิธีของ Bradford (1976) โดยการนำสารละลายเซลล์ที่เป็นส่วนใส 3 ไมโครลิตร ผสมเข้ากับสารละลาย Bradford เจือจาง (1:4) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร โดยใช้ BSA เป็นมาตรฐาน

3.3.7.4 สภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้มีการสังเคราะห์โปรตีนปริมาณมาก

นำโคโลนีเดี่ยวของ *E. coli* BL21 (DE3) มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่เติมแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นทำการถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ เติมนลงในอาหารเหลวสูตร LB หลอดใหม่ ในอัตราส่วนของอาหาร 1 มิลลิลิตรต่อเชื้อแบคทีเรีย 1 ไมโครลิตร โดยเติมแอมพิซิลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเขย่าที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ให้มีค่าประมาณ 0.4-0.6 ทำการชักนำให้มีการ

สังเคราะห์โปรตีนด้วย IPTG ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ 0.5 และ 1 มิลลิโมลาร์ เทียบกับการชักนำให้มีการสังเคราะห์โปรตีนด้วยแลคโตส (lactose) ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ 6, 15 และ 30 มิลลิโมลาร์ (2, 5 และ 10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) จากนั้นนำแต่ละความเข้มข้นมาเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกันคือ 25 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทำการเก็บเซลล์ โดยคูดอาหารปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด ไมโครเซนตริฟิวส์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที คูดส่วนใสทิ้ง นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาละลายด้วยสารละลาย lysis buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง sonicator แล้วนำสารละลายเซลล์มาปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนกับส่วนใส ด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนทั้งหมดด้วยวิธีของ Bradford (1976)

3.3.8 การทำโปรตีน intein active salvicin K4 ให้บริสุทธิ์

นำโคลนเดี่ยวของดีเอ็นเอสายผสมที่ได้จากการย้ายเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* BL21 (DE3) มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่เติมแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นทำการถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ เติมนลงในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 1 ลิตร โดยเติมแอมพิซิลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ให้มีค่าประมาณ 0.4-0.6 แล้วทำการชักนำให้มีการสังเคราะห์โปรตีนด้วยสภาวะที่เหมาะสม เพื่อให้มีการสังเคราะห์โปรตีนในปริมาณมาก จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที คูดส่วนใสทิ้ง และเก็บตะกอนเซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำตะกอนเซลล์มาละลายด้วยสารละลาย lysis buffer ปริมาตร 15 มิลลิลิตรต่อเซลล์ 1 ลิตร และเติม phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 60 ไมโครลิตร จากนั้นทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง sonicator นำสารละลายเซลล์ที่ได้ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แยกตะกอนและส่วนใส นำส่วนใสที่ได้ไปเติมลงในคอลัมน์ที่มีความจำเพาะ (chitin affinity column) กับ intein-CBD จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ที่ใช้ล้าง (column buffer : 20mM Tris-HCl pH 8.0, 500mM NaCl, 1mM EDTA) เพื่อชะเอาส่วนที่ไม่จับกับ intein-CBD ออกมาก่อน จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ Stripping buffer (0.3M NaOH) เพื่อชะเอาโปรตีนบริสุทธิ์ออกมา และตรวจสอบขนาดของโปรตีนด้วย SDS-PAGE และนำโปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้ทำ dialysis ด้วยน้ำกลั่น เพื่อเอาโซเดียมไฮดรอกไซด์ออกจากนั้นนำสารละลายโปรตีนมาลดปริมาตรให้กลายเป็นผงด้วยเครื่อง freeze-dryer

เอกสารนี้
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.9 คุณสมบัติของโปรตีนแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์ต่อความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทดสอบ

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโต และสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต แสดงในตารางที่ 14 ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์เนื้อสัตว์ ภาควิชาเทคโนโลยีผลิตภัณฑ์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ใช้วิธี spot on lawn ในการทดสอบ (Hoover and Harlender. 1993) โดยทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ที่ต้องการตรวจสอบในสภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโต จากนั้นเตรียมอาหารกึ่งแข็งสำหรับเททับบนจานเลี้ยงเชื้อดังนี้คือ ชั้นล่างของจานเลี้ยงเชื้อ (plate) ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีวุ้น 1.5% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และชั้นบนประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีวุ้น 1% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ซึ่งจะมีเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการตรวจสอบเททับลงบนจานเลี้ยงเชื้อในอัตราส่วน 10 ไมโครลิตรต่อมิลลิตรของอาหาร รอให้น้ำอาหารแห้งประมาณ 10 นาที จากนั้นนำโปรตีนแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์ที่ต้องการทดสอบหยดลงอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ 10 ไมโครลิตร รอจนโปรตีนที่หยดแห้ง แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิที่เหมาะสมกับชนิดของเชื้อที่ใช้ตรวจสอบ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบบริเวณที่มีการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ ซึ่งมีลักษณะเป็นวงใส (clear zone) กำหนดค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซิน ด้วยเทคนิค critical dilution assay โดยเจือจางโปรตีนทดสอบลงครั้งละ 2 เท่า และค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินเป็นยูนิต (Arbitrary Unit; AU) ต่อมิลลิตร จากลำดับความเจือจางสูงสุดที่สังเกตเห็นบริเวณยับยั้งได้ชัดเจน (ภักดี สุขพันธ์. 2548)

$$\text{ยูนิต (AU) ต่อมิลลิตร} = \frac{\text{ระดับความเจือจางสูงสุดที่เกิดการยับยั้งชัดเจน} \times 1,000}{\text{ปริมาตรของสารละลายที่หยดบนผิวหน้าอาหาร}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 14 เชื้อแบคทีเรียทดสอบ

| Indicator strains | Media | Temperature (°C) | Condition |
|--|--------|------------------|-----------|
| Lactic acid bacteria | | | |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> 8014 | MRS | 30 | Anaerobic |
| <i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> JCM 1157 ^T | MRS | 30 | Anaerobic |
| <i>Lactobacillus sakei</i> TISTR 890 | MRS | 37 | Anaerobic |
| <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> 1344 | MRS | 30 | Anaerobic |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> TISTR 942 | MRS | 30 | Anaerobic |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> JCM 6124 ^T | MRS | 30 | Anaerobic |
| <i>Enterococcus faecalis</i> JCM 5803 ^T | MRS | 37 | Anaerobic |
| <i>Enterococcus faecalis</i> TISTR 888 | MRS | 37 | Anaerobic |
| <i>Streptococcus</i> sp. | MRS | 30 | Anaerobic |
| Other gram positive bacteria | | | |
| <i>Bacillus coagulans</i> TISTR 1147 | TSB-YE | 37 | Aerobic |
| <i>Bacillus coagulans</i> JCM 2257 ^T | TSB-YE | 37 | Aerobic |
| <i>Brochotrix campestris</i> NBRC 11547 ^T | TSB-YE | 26 | Aerobic |
| <i>Listeria innocua</i> ATCC 33090 ^T | TSB-YE | 37 | Aerobic |
| <i>Staphylococcus aureus</i> TISTR 118 | TSB-YE | 37 | Aerobic |
| Gram negative bacteria | | | |
| <i>Escherichia coli</i> BL21 | LB | 37 | Aerobic |
| <i>Pseudomonas fluorescense</i> TISTR 358 | TSB-YE | 26 | Aerobic |
| <i>Pseudomonas fluorescense</i> JCM 5693 ^T | TSB-YE | 26 | Aerobic |

ATCC = American Type Culture Collection, Rockville, Md

JCM = Japanese culture of Microorganisms, Wako, Japan

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

TISTR = Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Bangkok, Thailand

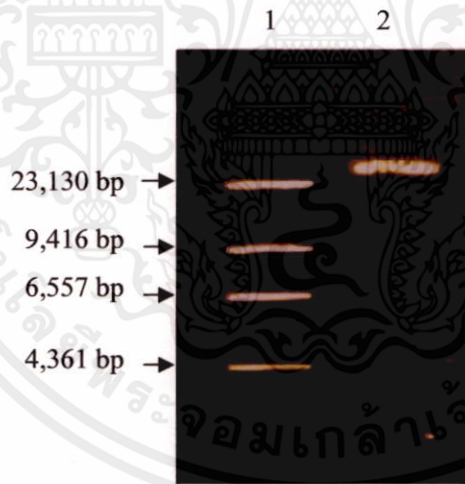
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับใช้ในกิจการศึกษาค้นคว้า มิใช่เพื่อเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง และวิจารณ์

4.1 จีโนมิกดีเอ็นเอของ *Lb. salivarius* K4

ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Lb. salivarius* K4 พบว่า มีขนาดประมาณ 24 กิโลเบส เมื่อเทียบกับ $\lambda/Hind$ III ดังแสดงในภาพที่ 11 ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับ Pilsombut (2006) รายงานว่าจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Lb. salivarius* K4 มีขนาดประมาณ 24 กิโลเบส ในขณะที่ Flynn *et al.* (2002) รายงานว่า มีขนาดของจีโนมิกดีเอ็นเอประมาณ 10.7 กิโลเบส ส่วนการศึกษาของ Çataloluk (2001) พบว่า ไม่มีรายงานขนาดของจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Lb. salivarius* M7 นอกจากนี้ Desmond *et al.* (2005) ได้รายงานถึงขนาดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์อื่น เช่น *Lb. paracasei* NFBC 338 ที่แยกได้จากกระเพาะอาหารของมนุษย์มีจีโนมิกดีเอ็นเอขนาด 780 กิโลเบส และ Lu *et al.* (2005) รายงานว่าขนาดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Lb. plantarum* มีขนาดประมาณ 36 กิโลเบส



ภาพที่ 11 ขนาดของจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Lb. salivarius* K4 เทียบกับ $\lambda/Hind$ III

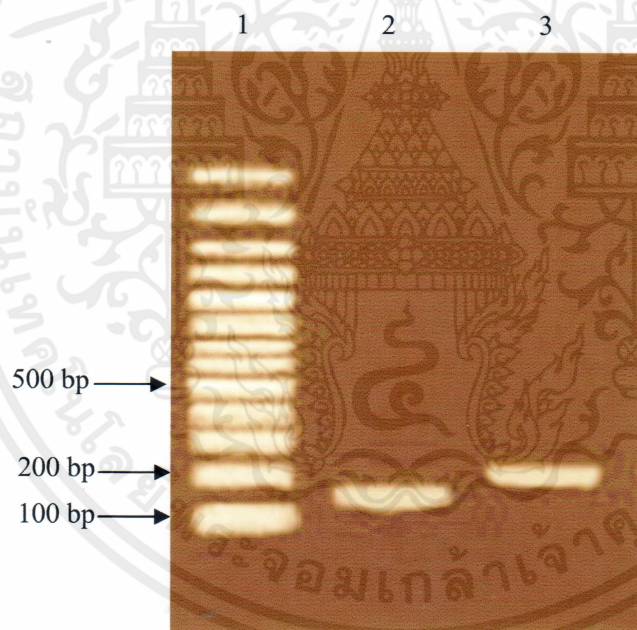
ช่องที่ 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน

ช่องที่ 2 คือ จีโนมิกดีเอ็นเอของ *Lb. salivarius* K4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การเพิ่มปริมาณยีน *salvicin K4* ด้วยวิธี PCR

โดยทั่วไปแล้วยีนของแบคทีเรียโอซินจะอยู่ในรูปที่ยังไม่พร้อมจะทำงาน (inactive form) คือมี leader peptide ที่มีจุดตัดตรงตำแหน่ง GG และเมื่อทำการตัด leader peptide บริเวณ GG แล้ว จะทำให้ได้แบคทีเรียโอซินที่อยู่ในรูปพร้อมทำงาน (active form) การศึกษาในครั้งนี้ทำการ ออกแบบไพรเมอร์ 2 รูปแบบ และทำการเพิ่มปริมาณยีนทั้งในรูป active form และ inactive form ซึ่งในรูป active form ใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน คือ ไพรเมอร์ K4_AC_BETA_F กับ K4_BETA_R โดยไพรเมอร์คู่นี้จะเริ่มเพิ่มปริมาณยีนหลังตำแหน่ง GG ผลการทดลองพบว่ายีน *active salvicin K4* มีขนาด 144 คู่เบส และไพรเมอร์สำหรับยีนในรูป inactive form คือ K4_BETA_F กับ K4_BETA_R ไพรเมอร์คู่นี้จะทำการเพิ่มปริมาณยีนโดยเริ่มตั้งแต่ต้นยีนรวมทั้ง leader peptide ด้วย ผลการทดลองพบว่า ได้ยีน *inactive salvicin K4* ที่มีขนาด 210 คู่เบส ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 12



ภาพที่ 12 ขนาดของยีน *salvicin K4* ในรูป active form และ inactive form

ช่องที่ 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน

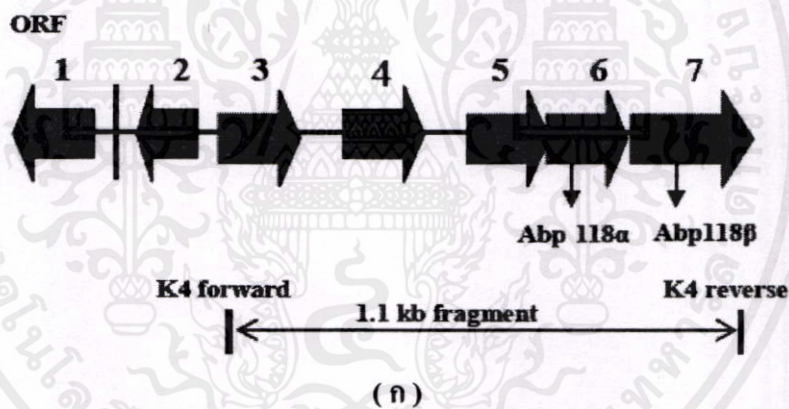
ช่องที่ 2 คือ ยีน *active salvicin K4* ขนาด 144 คู่เบส

ช่องที่ 3 คือ ยีน *inactive salvicin K4* ขนาด 210 คู่เบส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรายงานของ Pilasombut (2006) ซึ่งทำการออกแบบไพรเมอร์จากกลุ่มยีนของ *Lb. salivarius* UCC 118 โดยเริ่มตั้งแต่ ORF 3 (presalivaricin B) ครอบคลุมถึง ORF 7 (abp118 β) ดังแสดงในภาพที่ 13 พบว่า *Lb. salivarius* K4 มียีนแบคทีริโอซิน salivaricin B (*sal B*) และ salvicin K (*sal K*) นอกจากนี้ยังพบยีน *salvicin K4* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกับ abp118 β โดยพบว่าอยู่ในรูปที่แสดงออกทั้ง 3 ยีน และ Cataloluk (2001) รายงานว่า พบยีนแบคทีริโอซิน salivaricin B (*sal B*) ที่สร้างโดย *Lb. salivarius* M7 และอยู่ในรูปที่แสดงออก โดยมีขนาดของยีน 114 คู่เบส ในขณะที่ Flynn *et al.* (2002) รายงานว่า *Lb. salivarius* UCC 118 พบแบคทีริโอซิน presalivaricin B ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับ salivaricin B และมีขนาด 171 คู่เบส แต่อยู่ในรูปที่ไม่แสดงออก นอกจากนี้ยังพบ abp118 α และ abp118 β ซึ่งอยู่ในรูปที่แสดงออก โดยมีขนาด 192 คู่เบส และ 204 คู่เบส ตามลำดับ และมีรายงานเพิ่มเติมว่า abp118 α และ abp118 β จัดอยู่ในกลุ่ม two-peptide bacteriocin ซึ่งแบคทีริโอซินในกลุ่มนี้จะแสดงออกได้ดีที่สุด เมื่อมีการทำงานร่วมกันของเพปไทด์ทั้ง 2 สาย



| Primer set | Nucleotide sequence |
|------------|-----------------------------|
| K4 forward | 5'AGAGCAGATGAAGTGAATAATTA3' |
| K4 reverse | 5'CTTACACTTGACACTACTTGA3' |

(ข)

ภาพที่ 13 แผนภาพแสดงการออกแบบไพรเมอร์จากกลุ่มยีนของ *Lb. salivarius* UCC 118

เอกสารนี้เป็นเอกสาร (Pilasombut, 2006) ใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น (ก) แผนภาพแสดงการออกแบบไพรเมอร์โดยครอบคลุมตั้งแต่ ORF 3-ORF 7

(ข) แผนภาพแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์

4.3 ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *inactive salvicin K4* ที่ต่อกับ pGEM-T easy

จากการเพิ่มปริมาณยีนด้วยวิธี PCR พบว่า มีขนาดของยีน *inactive salvicin K4* ที่ต้องการ ซึ่งมีขนาด 210 คู่เบส จากนั้นทำการตรวจสอบความถูกต้องของยีนดังกล่าว โดยการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ การศึกษาครั้งนี้นำยีน *salvicin K4* ในรูป inactive form ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีนด้วยวิธี PCR มาต่อเชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pGEM-T easy ที่เป็น cloning kit จากนั้นเลือกโคโลนีที่มียีน *inactive salvicin K4* โดยเลือกโคโลนีที่มีลักษณะสีขาว เพื่อส่งตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้อง ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *inactive salvicin K4* มีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ 3 ตำแหน่ง ส่งผลให้มีความเหมือนกับยีน *salvicin K4* ที่ผลิตโดย *Lb. salivarius* K4 เพียง 98 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพที่ 14 เมื่อเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เป็นลำดับกรดอะมิโน พบว่า ผลจากการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโน 3 ตำแหน่ง และมีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของ *salvicin K4* ที่ผลิตโดย *Lb. salivarius* K4 คิดเป็น 95 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพที่ 15 ชนิดของกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลง ดังแสดงในตารางที่ 15 เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของ *inactive salvicin K4* เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของ *abp118β* ที่ผลิตโดย *Lb. salivarius* UCC 118 พบว่า มีความเหมือนอยู่ 69 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพที่ 16

| | | |
|-----------------------------|--|-----|
| <i>Inactive salvicin K4</i> | ATGAACCATTAGATAAGAGATACACAATTATGCCAGAAGAAAATCTATCCATAATTGTT | 60 |
| <i>salvicin K4</i> | ATGAAAAATTAGATAAGAGATACACAATTATGCCAGAAGAAAATCTATCCATAATTGTT | 60 |
| | ***** | |
| <i>Inactive salvicin K4</i> | GGTGGTAAAAATGGCTATGGTGGGAAGTGGAAATTCGTTGGGTTCACTGTGGAGCAGGTATT | 120 |
| <i>salvicin K4</i> | GGTGGTAAAAATGGCTATGGTGGGA-GTGGAAATTCGTTGGGTTCACTGTGGAGCAGGTATT | 119 |
| | ***** | |
| <i>Inactive salvicin K4</i> | ATAAGTGGAGCTTTGATGGGATCTATTGGTGGAAACGCATGGGGAGCCGTAGCAGGTGGC | 180 |
| <i>salvicin K4</i> | GTAAGTGGAGCTTTGATGGGATCTATTGGTGGAAACGCATGGGGAGCCGTAGCAGGTGGC | 179 |
| | ***** | |
| <i>Inactive salvicin K4</i> | ATTTCTGGTGGTATAAAAAGTTGTCGTTAA | 210 |
| <i>salvicin K4</i> | ATTTCTGGTGGTATAAAAAGTTGTCGTTAA | 209 |
| | ***** | |

ภาพที่ 14 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *inactive salvicin K4* ที่เชื่อมอยู่กับ pGEM-T กับ

ยีน *salvicin K4* ที่ผลิตโดย *Lb. salivarius* K4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

salvicin K MNKEFTVLTEMELVKVDGGKRYPNCTGKFLGGLAKGAALGAISGGVPGAVIGG-NIGMV 59
 abp118 α MMKEFTVLTECELAKVDGGKRGPNVCVGNFLGGLFAGAAAGVPLG---PAGIVGGANLGMV 57
 * ***** ** .***** *** .*:***** *** * . * * ..:*** *:***

salvicin K AGAISCL 66
 abp118 α GGALTCL 64
 .**.:**

ภาพที่ 17 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ salvicin K (*sal K*) ที่ผลิตโดย *Lb. salivarius* K4 กับ
 abp118 α ที่ผลิตโดย *Lb. salivarius* UCC 118 (Pilasombut. 2006)

salvicin K4 ATGAACCATTAGATAAGAGATACACAATTATGCCAGAAGAAAATCTATCCATAATTGTT 60
 abp118 β ATGAAAAATCTAGATAAAAGATTACACAATTATGACTGAAGATAACTTAGCATCAGTAAAT 60
 ***** ** ***** **** ***** * ***** ** * * * * *

salvicin K4 GGTGGTAAAAATGGCTATGGTGGAAAGTGAATTCGTTGGGTTCACTGTGGAGCAGGTATT 120
 abp118 β GGTGGTAAAAATG-----AGTGGAAATCGCTGGGTTCACTGTGGAGCTGGCATC 109
 ***** ***** **** ***** ***** ** **

salvicin K4 ATAAGTGGAGCTTTGATGGGATCTATTGGTGGAAACGCATGGGGAGCCGTAGCAGGTGGC 180
 abp118 β GTAGGTGGAGCTTTAATTGGAGCTATCGGTGGAC---CCTGGTCAGCCGTAGCGGGTGA 166
 ** ***** ** *

salvicin K4 ATTTCTGGTGGTATAAAAAGTTGTCGTTAA 210
 abp118 β ATTTCTGGTGGTTTTACAAGTTGCCGTTAA 196
 ***** * * ***** *****

ภาพที่ 18 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน salvicin K4 ที่ผลิตโดย *Lb. salivarius* K4 กับยีน
 abp118 β ที่ผลิตโดย *Lb. salivarius* UCC 118 (Pilasombut. 2006)

salvicin K4 MKNLDKRYTIMPEENLSIIVGGKNGYGGSGIRWVHCAGIVSGALMGS-IGGNWAGVAVAG 59
 abp118 β MKNLDKRFTIMTEDNLSVNGGKNGYGGSGNRWVHCAGIVGGALIGA-IGG-PWSAVAG 58
 *****:***.*:**: ***** ***** .***:*** .* *****

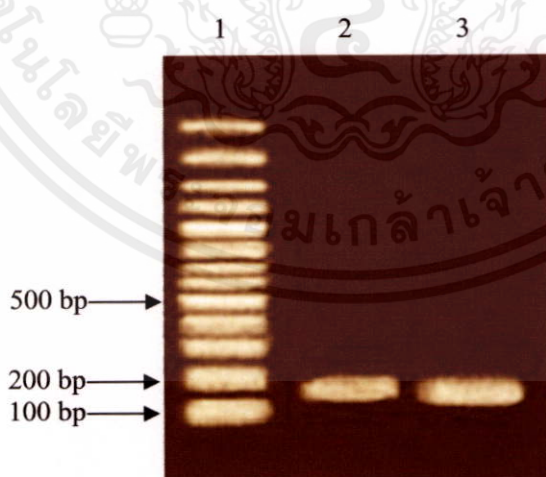
salvicin K4 GISGGIKSCR 69
 abp118 β GISGGFTSCR 68
 *****:***

ภาพที่ 19 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ salvicin K4 ที่ผลิตโดย *Lb. salivarius* K4 กับ
 abp118 β ที่ผลิตโดย *Lb. salivarius* UCC 118 (Pilasombut. 2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนของยีน *active salvicin K4*

การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดยการตัดพลาสมิด pTYB1 ที่มี intein-CBD เป็นองค์ประกอบด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzymes) *Nde I* และ *Xho I* ในขณะเดียวกันทำการตัดยีน *active salvicin K4* ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *salvicin K4* และมี *inactive salvicin K4 pGEM-T* เป็นแม่แบบ นำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน ผลการตัดทำให้ปลายสายของดีเอ็นเอยีน *active salvicin K4* และพลาสมิด pTYB1 มีลักษณะเป็นปลายเหนียว (sticky end) จากนั้นนำชิ้นส่วนของยีน *active salvicin K4* มาเชื่อมกับพลาสมิด pTYB1 ด้วยเอนไซม์ T4 ligase แล้วนำพลาสมิดที่เชื่อมต่อกัน transform เข้าสู่ *E. coli* DH5 α และทำการตรวจสอบหาโคโลนีที่มียีน *active salvicin K4* ที่สอดแทรกอยู่ด้วยวิธี PCR แล้วตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis พบว่า มียีน *active salvicin K4* ขนาดประมาณ 144 คู่เบส สอดแทรกอยู่ โดยดูจากขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเทียบกับขนาดผลผลิตพีซีอาร์ของยีน *active salvicin K4* ที่มี *inactive salvicin K4 pGEM-T* เป็นแม่แบบ (Positive control) และเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ดังแสดงในภาพที่ 20 และทำการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *active salvicin K4* พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *active salvicin K4* ที่ถูกแทรกเข้าสู่พลาสมิด pTYB1 มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *inactive salvicin K4* ที่เชื่อมอยู่กับ pGEM-T ดังแสดงในภาพที่ 21 ซึ่งแผนภาพพลาสมิด pTYB1-*salvicin K4* แสดงตำแหน่งของยีน *active salvicin K4* ที่ติดอยู่กับ intein-CBD แสดงในภาพที่ 22



ภาพที่ 20 ตรวจสอบโคโลนีที่มียีน *active salvicin K4* สอดแทรกอยู่ด้วยวิธี PCR

ช่องที่ 1 คือ DNA marker

ช่องที่ 2 คือ *active salvicin K4*

ช่องที่ 3 คือ Positive control

```

active salvicin K4      AAAAACTAGATAAAAAGATTCACAATTATGACTGAAGATAACTTAGCATCAGTAAATGGT 60
inactive salvicin K4  AAAAACTAGATAAAAAGATTCACAATTATGACTGAAGATAACTTAGCATCAGTAAATGGT 60
*****

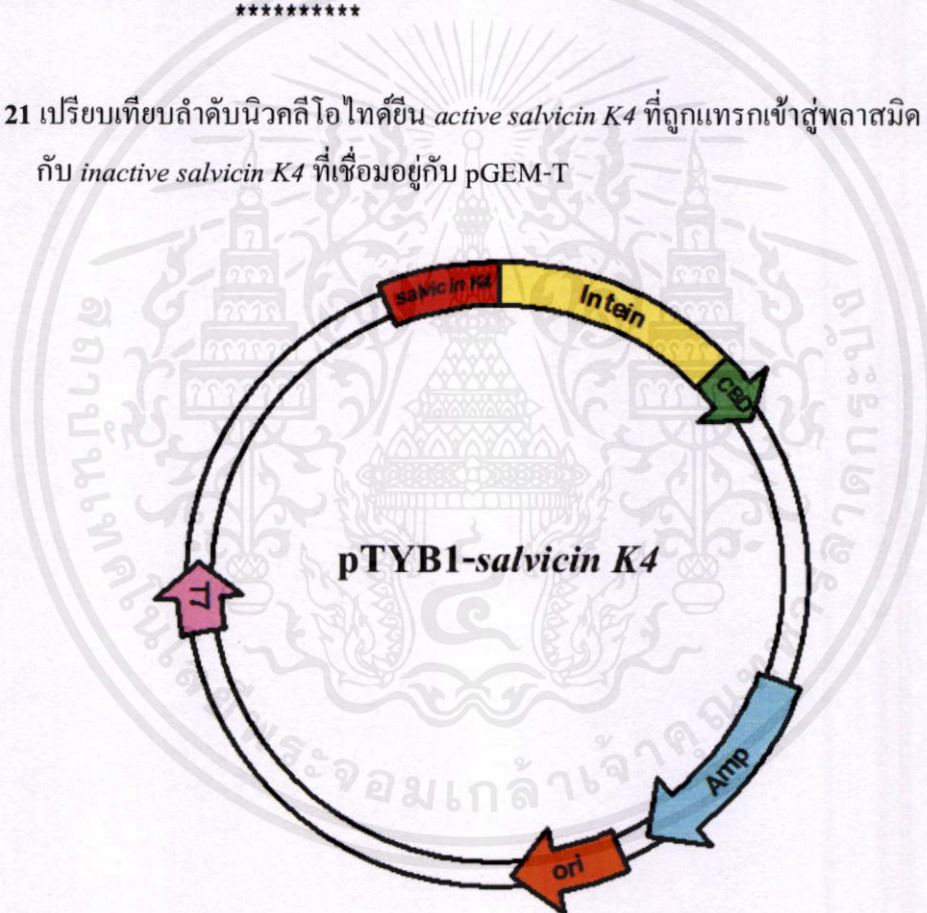
active salvicin K4      GGTA AAAATGAGTGGAAATCGCTGGGTTCACTGTGGAGCTGGCATCGTAGGTGGAGCTTT 120
inactive salvicin K4  GGTA AAAATGAGTGGAAATCGCTGGGTTCACTGTGGAGCTGGCATCGTAGGTGGAGCTTT 120
*****

active salvicin K4      AATTGGAGCTATCGGTGGACCCTGGTCAGCCGTAGCGGGTGAATTTCTGGTGGTTTTAC 180
inactive salvicin K4  AATTGGAGCTATCGGTGGACCCTGGTCAGCCGTAGCGGGTGAATTTCTGGTGGTTTTAC 180
*****

active salvicin K4      AAGTTGCCGTTAA 193
inactive salvicin K4  AAGTTGCCGT--- 190
*****

```

ภาพที่ 21 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *active salvicin K4* ที่ถูกแทรกเข้าสู่พลาสมิด pTYB1 กับ *inactive salvicin K4* ที่เชื่อมอยู่กับ pGEM-T



ภาพที่ 22 แผนภาพพลาสมิด pTYB1-salvicin K4 แสดงตำแหน่งของยีน *active salvicin K4* ที่ติดอยู่กับ intein-CBD ด้านปลาย N (N-terminal) ของ intein-CBD

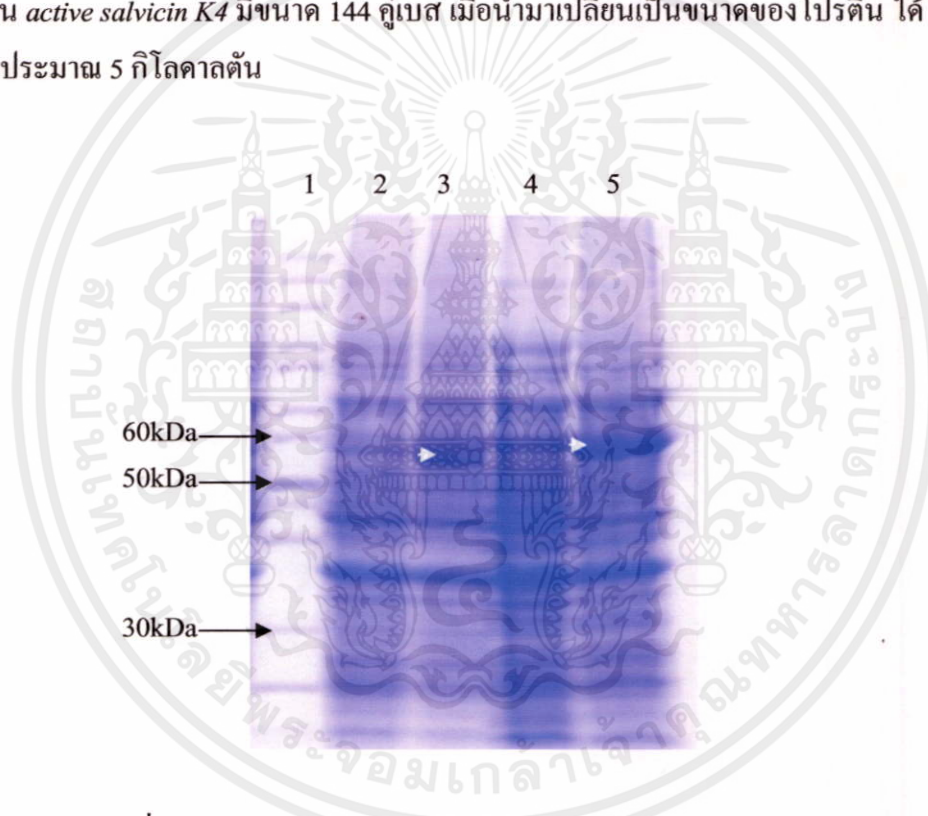
salvicin K4 : bacteriocin gene, Intein : fusion protein, CBD : Chitin Binding Domain,

Amp : Ampicilin resistant, ori : Origin of replication, T7 : Promoter

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะในรูปแบบใดก็ตาม หากพบเห็นผิดเพี้ยนเนื้อหา และต้องขังของสงวนลิขสิทธิ์ไว้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 การผลิตและชักนำให้มีการสังเคราะห์โปรตีน

เมื่อได้รับคอมบีแนนท์โปรตีน intein active salvicin K4 แล้ว ทำการย้ายรีคอมบีแนนท์โปรตีนเข้าสู่ *E. coli* BL21 (DE3) และทำการกระตุ้น (induce intein active salvicin K4) ให้มีการสังเคราะห์โปรตีนด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เทียบกับโปรตีน intein-CBD ของพลาสมิด pTYB1 ที่ถูกกระตุ้น (induce intein-CBD) และไม่ถูกกระตุ้น (noninduce intein-CBD) ผลการทดลองพบว่า รีคอมบีแนนท์โปรตีน intein active salvicin K4 มีการผลิตโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 60 กิโลดาลตัน ในขณะที่ intein-CBD ของพลาสมิด pTYB1 มีขนาด 55 กิโลดาลตัน ดังแสดงในภาพที่ 23 ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองก่อนหน้านี้ ที่พบว่ายีน *active salvicin K4* มีขนาด 144 คู่เบส เมื่อนำมาเปลี่ยนเป็นขนาดของโปรตีน ได้โปรตีนที่มีขนาดประมาณ 5 กิโลดาลตัน



ภาพที่ 23 ผลการเหนี่ยวนำโปรตีน intein active salvicin K4 เทียบกับ โปรตีน intein-CBD ของพลาสมิด pTYB1 ด้วย IPTG

ช่องที่ 1 คือ โปรตีนมาตรฐาน

ช่องที่ 2 คือ noninduce intein-CBD

ช่องที่ 3 คือ induce intein-CBD มีขนาด 55 กิโลดาลตัน

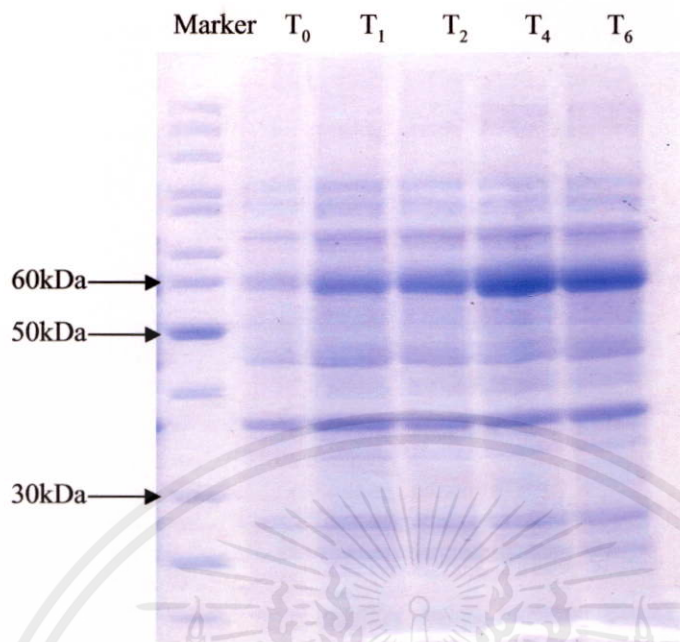
ช่องที่ 4 คือ noninduce intein active salvicin K4

ช่องที่ 5 คือ induce intein active salvicin K4 มีขนาด 60 กิโลดาลตัน

เอกสารนี้เป็นเอกสาร
ไม่อนุญาติให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น

เมื่อทำการตรวจสอบขนาดรีคอมบิแนนท์โปรตีน intein active salvicin K4 แล้ว จำเป็นต้องหาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์โปรตีน โดยเริ่มจากการสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีน intein active salvicin K4 เข้าสู่ *E. coli* BL21 (DE3) เพื่อทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีน ซึ่งรีคอมบิแนนท์โปรตีน intein active salvicin K4 จะถูกกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์โปรตีนด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และระยะเวลาหลังการกระตุ้นที่ทำการศึกษาคือ 1, 2, 4 และ 6 ชั่วโมง (T_1 , T_2 , T_4 และ T_6 ตามลำดับ) ภายหลังการกระตุ้นด้วย IPTG พบว่าในชั่วโมงที่ 4 (T_4) เป็นระยะเวลาที่มีการสังเคราะห์โปรตีนได้ปริมาณมากที่สุด และปริมาณโปรตีนคงที่ไปจนถึงชั่วโมงที่ 6 (T_6) ของการกระตุ้น เมื่อเทียบกับตัวควบคุมที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย IPTG (T_0) ดังแสดงในภาพที่ 24 ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณ โปรตีน intein active salvicin K4 ที่ได้จากการวิเคราะห์โปรตีน ที่ขนาด 60 กิโลดาลตัน คือ ในชั่วโมงที่ 1, 2, 4 และ 6 มีปริมาณความเข้มข้น 0.110, 0.111, 0.124 และ 0.121 ไมโครกรัม ตามลำดับ และเมื่อเทียบกับตัวควบคุมที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย IPTG มีความเข้มข้น 0.109 ไมโครกรัม พบว่าปริมาณโปรตีนในชั่วโมงที่ 4 คิดเป็น 1.138 เท่าของโปรตีนที่ไม่ถูกกระตุ้น ในขณะที่ปริมาณโปรตีนในชั่วโมงที่ 6 คิดเป็น 1.110 เท่าของโปรตีนที่ไม่ถูกกระตุ้น ดังนั้นระยะเวลา 4 ชั่วโมง หลังการกระตุ้น เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมในการสังเคราะห์โปรตีนให้มีปริมาณมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 24 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการกระตุ้นให้เกิดการผลิตโปรตีน intein active salvicin K4

Marker โปรตีนมาตรฐาน

| | |
|----------------|---|
| T ₀ | ตัวควบคุมที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย IPTG มีความเข้มข้น 0.109 ไมโครกรัม |
| T ₁ | ระยะเวลาหลังการกระตุ้นด้วย IPTG 1 ชั่วโมง มีความเข้มข้น 0.110 ไมโครกรัม |
| T ₂ | ระยะเวลาหลังการกระตุ้นด้วย IPTG 2 ชั่วโมง มีความเข้มข้น 0.111 ไมโครกรัม |
| T ₄ | ระยะเวลาหลังการกระตุ้นด้วย IPTG 4 ชั่วโมง มีความเข้มข้น 0.124 ไมโครกรัม |
| T ₆ | ระยะเวลาหลังการกระตุ้นด้วย IPTG 6 ชั่วโมง มีความเข้มข้น 0.121 ไมโครกรัม |

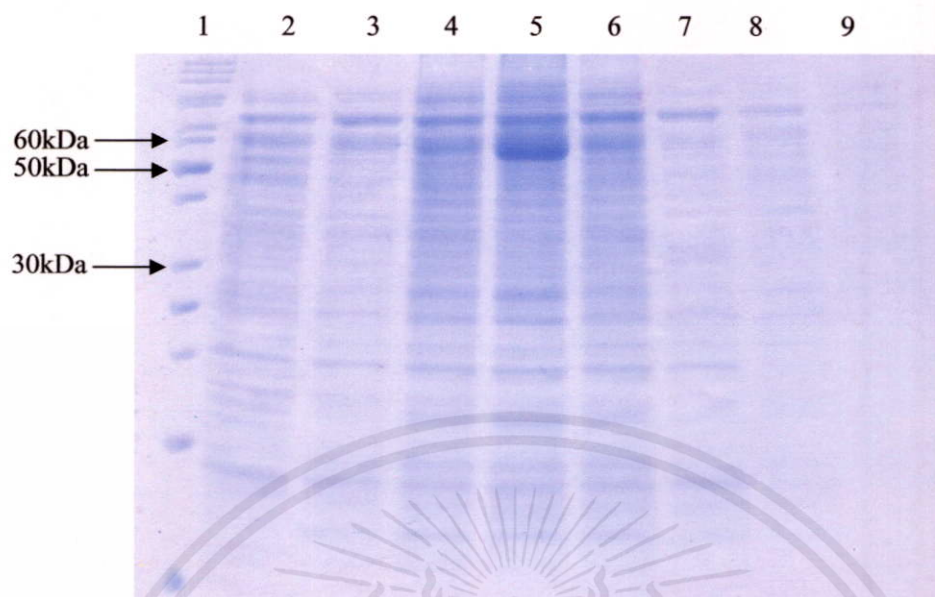
การศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้มีการสังเคราะห์โปรตีนให้มีปริมาณมากที่สุด โดยศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 และ 8.5 และทำการกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์โปรตีนด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นทำการหาปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ผลิตได้ ด้วยวิธี Bradford ผลการทดลองพบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการสังเคราะห์โปรตีนทั้งหมด (total protein) คือ 6.5 สามารถสังเคราะห์โปรตีนทั้งหมดได้ปริมาณ 0.68 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6, 7, 7.5, 8 และ 8.5 สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ปริมาณ 0.51, 0.52, 0.22, 0.11 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 16 จากนั้นทำการยืนยันผลการผลิตโปรตีน ด้วยวิธี SDS-PAGE ดังแสดงในภาพที่ 25 และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้ ขนาด 60 กิโลดาลตัน พบว่า ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6, 6.5, 6.8, 7, 7.5, 8 และ 8.5 มีปริมาณความเข้มข้น 0.105, 0.112, 0.104, 0.106, 0.101, 0.101 และ 0.098 ไมโครกรัม ตามลำดับ และมีค่าความ

เป็นกรด-ด่าง 6.8 ของอาหารปกติ ซึ่งไม่ถูกกระตุ้นด้วย IPTG เป็นตัวควบคุม และมีปริมาณความเข้มข้น 0.103 ไมโครกรัม โดยสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมด กล่าวคือ ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.5 มีปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนที่ขนาด 60 กิโลดาลตัน เป็น 0.112 ไมโครกรัม ซึ่งเป็นปริมาณที่มากที่สุด เมื่อเทียบกับปริมาณโปรตีนที่ขนาด 60 กิโลดาลตัน ของค่าความเป็นกรด-ด่าง 6, 7, 7.5, 8 และ 8.5 ดังนั้น ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารที่ใช้เลี้ยง *E. coli* ที่ 6.5 เป็นสถานะที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโต จึงทำให้มีการสังเคราะห์โปรตีนในปริมาณที่มากที่สุด ซึ่ง Xu *et al.* (2000) รายงานว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารที่ใช้เลี้ยง *E. coli* ที่ 6-8 เป็นสถานะที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของ *E. coli* จึงทำให้มีการสังเคราะห์โปรตีนในปริมาณที่มากที่สุด นอกจากนี้ยังกล่าวอีกว่า การสังเคราะห์โปรตีนให้มีปริมาณมาก ขึ้นอยู่กับ โปรตีนแต่ละชนิด และชนิดของ fusion protein ด้วย และผลการทดลองของ Ma *et al.* (2006) ซึ่งทำการทดลองเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ GST-rHLT-B ให้มีการแสดงออกใน *E. coli* โดยเลี้ยง *E. coli* ที่มีรีคอมบิแนนท์ GST-rHLT-B ในอาหารที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างแตกต่างกัน และพบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 8 เป็นสถานะที่เหมาะสม ทำให้มีการสังเคราะห์โปรตีนในปริมาณมาก โดยอธิบายว่า อาหารที่ใช้เลี้ยงมีค่าความเป็นด่าง ทำให้มีการย่อยสลายน้ำตาลจากแลคโตสและเกิดเป็นกรด เพื่อปรับสมดุลของอาหารให้มีสถานะเป็นกลาง และเหมาะสมกับการเจริญเติบโตของ *E. coli*

ตารางที่ 16 ปริมาณ โปรตีนทั้งหมดที่ได้จากการเปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้มีการสังเคราะห์โปรตีน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

| pH | 6.0 | 6.5 | 7.0 | 7.5 | 8.0 | 8.5 |
|-------------------------------|------|------|------|------|------|------|
| ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (มก./มล.) | 0.51 | 0.68 | 0.52 | 0.22 | 0.11 | 0.05 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 25 เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้มีการสังเคราะห์

โปรตีน intein active salvicin K4 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ช่องที่ 1 คือ โปรตีนมาตรฐาน

ช่องที่ 2 คือ noninduce pH 6.8 อาหารปกติ (control) มีปริมาณความเข้มข้น 0.103

ไมโครกรัม

ช่องที่ 3 คือ induce pH 6.8 อาหารปกติ มีปริมาณความเข้มข้น 0.104 ไมโครกรัม

ช่องที่ 4 คือ induce pH 6 มีปริมาณความเข้มข้น 0.105 ไมโครกรัม

ช่องที่ 5 คือ induce pH 6.5 มีปริมาณความเข้มข้น 0.112 ไมโครกรัม

ช่องที่ 6 คือ induce pH 7 มีปริมาณความเข้มข้น 0.106 ไมโครกรัม

ช่องที่ 7 คือ induce pH 7.5 มีปริมาณความเข้มข้น 0.101 ไมโครกรัม

ช่องที่ 8 คือ induce pH 8 มีปริมาณความเข้มข้น 0.101 ไมโครกรัม

ช่องที่ 9 คือ induce pH 8.5 มีปริมาณความเข้มข้น 0.098 ไมโครกรัม

ในการศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์โปรตีนให้มีปริมาณมากนั้น ได้ทำการเปรียบเทียบความเข้มข้นของ IPTG 2 ระดับ คือ 0.5 และ 1 มิลลิโมลาร์ เทียบกับความเข้มข้นของ แลคโตส 3 ระดับ คือ 6, 15 และ 30 มิลลิโมลาร์ (2, 5 และ 10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) โดยศึกษาอุณหภูมิที่แตกต่างกัน 2 ระดับ คือ 25 และ 37 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่า IPTG ความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีการสังเคราะห์โปรตีนปริมาณ 0.11 และ 0.07 ตามลำดับ ในขณะที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มี

การสังเคราะห์โปรตีนปริมาณ 0.09 และ 0.144 ตามลำดับ และเมื่อเทียบกับแลคโตส ความเข้มข้น 6, 15 และ 30 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีการสังเคราะห์โปรตีนปริมาณ 0.41, 0.45 และ 0.43 ตามลำดับ ในขณะที่การใช้แลคโตสความเข้มข้น 6, 15 และ 30 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีการสังเคราะห์โปรตีนปริมาณ 0.46, 0.50 และ 0.59 ตามลำดับ ซึ่งสถานะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์โปรตีนให้มีปริมาณมากที่สุดคือ แลคโตสความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ (10 กรัมต่อลิตร) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ดังแสดงในตารางที่ 17 ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Ma *et al.* (2006) ที่ใช้แลคโตสความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร เหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์โปรตีนได้ในปริมาณมากที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และจากผลการศึกษาของ Kilibian *et al.* (2000) รายงานว่า การใช้แลคโตสเป็นตัวกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์โปรตีนนั้น แลคโตสเป็นตัวกระตุ้นที่ไม่ทำให้เกิดความเสียหาย ไม่เป็นพิษกับเซลล์ และไม่ทำลายเซลล์ เมื่อเทียบกับ IPTG ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน นอกจากนี้โปรตีนที่ได้จากการกระตุ้นด้วยแลคโตสยังมีการแสดงออกที่ถูกต้องภายในสถานะที่เหมาะสม Kim *et al.* (2007) รายงานว่า การใช้แลคโตสเป็นตัวกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์โปรตีน มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับ IPTG ซึ่งการใช้แลคโตสเป็นการลดต้นทุนในกระบวนการผลิต เหมาะสำหรับการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมขนาดใหญ่

และจากรายงานของ Yang *et al.* (2007) ทำการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อให้มีการแสดงออกของยีน SOD และมีการผลิตโปรตีนในปริมาณมากที่สุด โดยทำการศึกษาอุณหภูมิที่ 30, 34, 37 และ 39 องศาเซลเซียส จากการศึกษา พบว่า อุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่มีการผลิตโปรตีนในปริมาณมากที่สุด ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสังเคราะห์โปรตีนในปริมาณมากที่สุดขึ้นอยู่กับชนิดของ fusion protein โครงสร้าง ขนาดของโปรตีนแต่ละชนิด และอาจส่งผลต่อการม้วนพับ (folding) ของโปรตีน (Qu and Zheng, 2000)

ตารางที่ 17 ปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ได้จากการเปรียบเทียบความเข้มข้นของ IPTG และแลคโตส ในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน

| ความเข้มข้นของตัวกระตุ้น | ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) | |
|--------------------------|---|------|
| | 25°C | 37°C |
| แลคโตส (มิลลิโมลาร์) | 6 | 0.41 |
| | 15 | 0.45 |
| | 30 | 0.43 |
| IPTG (มิลลิโมลาร์) | 0.5 | 0.11 |
| | 1 | 0.07 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่ควรนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ที่ลิขสิทธิ์ของเอกสารนี้ได้รับการเปลี่ยนแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงชื่อของเอกสารทุกครั้งที่มีกรนำไปใช้

4.6 การทำโปรตีน intein active salvicin K4 ให้บริสุทธิ์

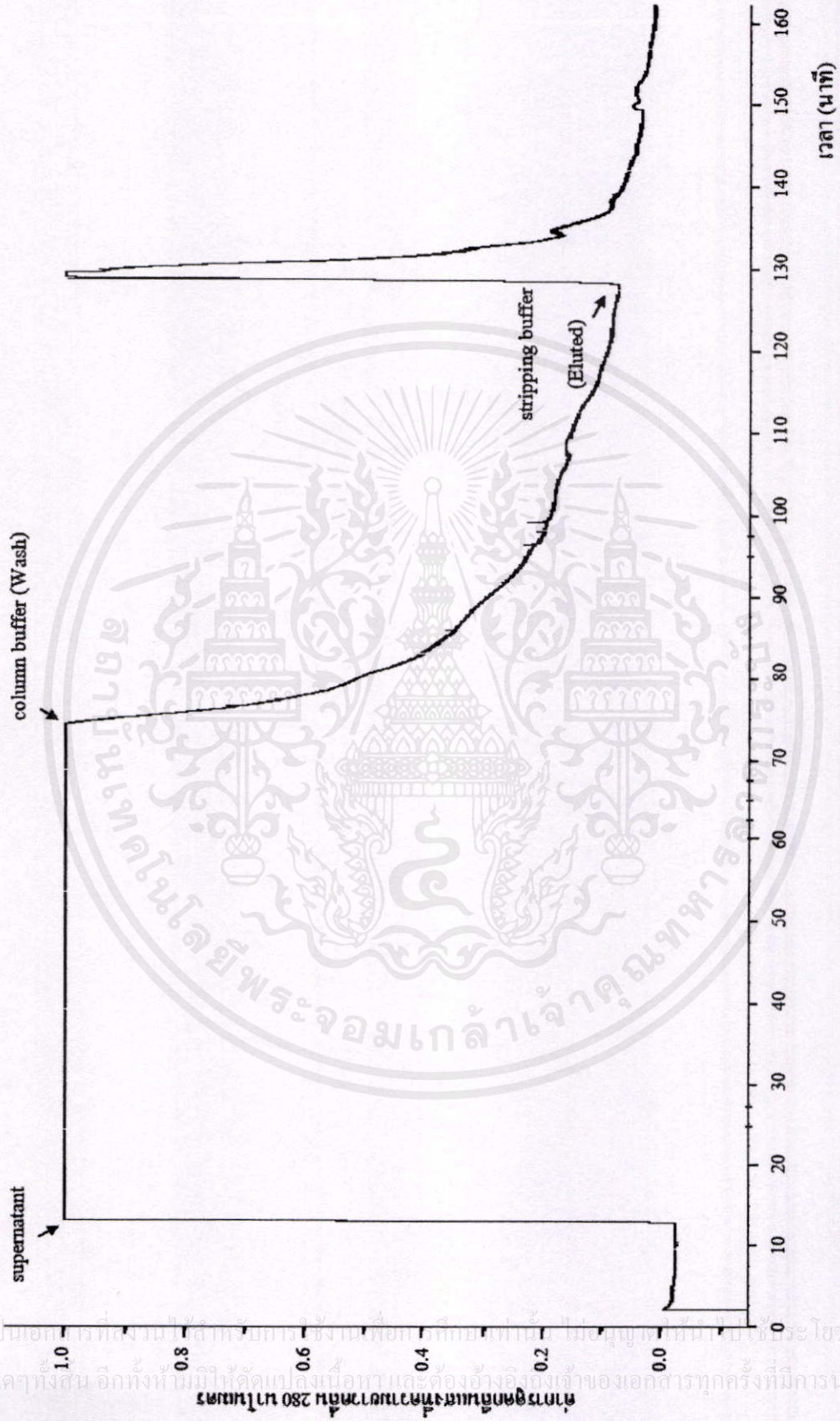
เมื่อทราบสถานะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์โปรตีนทั้งหมดแล้ว จึงทำโปรตีน intein active salvicin K4 ให้บริสุทธิ์ โดยการนำโปรตีน intein active salvicin K4 มาแยกด้วย chitin affinity column โดยการทำให้ผนังเซลล์ของ *E. coli* BL21 (DE3) แยก แล้วนำป็นแยกตะกอน (pellet) กับส่วนใส (supernatant) นำส่วนใสที่ได้เติมลงในคอลัมน์ ทำการล้างเพื่อแยกส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์ออก จากนั้นชะเอาโปรตีน intein active salvicin K4 บริสุทธิ์ออก ด้วย stripping buffer ดังภาพที่ 26 เมื่อได้โปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ทำการตรวจสอบความถูกต้องของโปรตีนดังกล่าว โดยการตรวจสอบขนาดของโปรตีน และตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE ผลการตรวจสอบพบว่า รีคอมบิแนนท์โปรตีน intein active salvicin K4 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มีขนาดประมาณ 60 กิโลดาลตัน และมีโปรตีนขนาดประมาณ 55 กิโลดาลตัน ทั้งนี้เนื่องจากเกิดกลไกการ self cleavage เมื่อนำโปรตีนมาผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ด้วย chitin affinity column ซึ่ง chitin มีความจำเพาะกับ intein-CBD จึงทำให้เห็น โปรตีน เป็น 2 ขนาด แต่เมื่อเปรียบเทียบความบริสุทธิ์ พบว่าโปรตีนที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์กระบวนการทำให้บริสุทธิ์ มีความบริสุทธิ์มาก เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งชี้ให้เห็นว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน intein active salvicin K4 ที่ผ่าน chitin affinity column มีความจำเพาะกับ chitin จึงทำให้แยกโปรตีนที่เชื่อมติดกับ intein ได้ ดังแสดงในภาพที่ 27 และเมื่อนำโปรตีน intein active salvicin K4 บริสุทธิ์ที่ได้ไปลดปริมาตรให้กลายเป็นผงด้วยวิธีการ freeze-dry แล้วชั่งน้ำหนัก พบว่าโปรตีน intein active salvicin K4 บริสุทธิ์ที่ได้มีน้ำหนัก 44.8 มิลลิกรัมต่อเซลล์แขวนลอยในอาหาร 1 ลิตร แต่เนื่องจากรีคอมบิแนนท์โปรตีน intein active salvicin K4 ที่ได้ยังคงติดอยู่กับ intein-CBD ทางด้านปลาย C (C-terminal) ของโปรตีน active salvicin K4 จึงทำการตัดเพื่อแยก intein-CBD กับ active salvicin K4 ด้วย self cleavage buffer ที่มี DTT ความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ 10, 30, 50, 100, 325 และ 625 มิลลิโมลาร์ แล้วบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่า self cleavage buffer ที่มี DTT ความเข้มข้นต่างๆ ไม่สามารถแยก intein active salvicin K4 ให้ออกจากกันได้ ดังแสดงในภาพที่ 28 จากคู่มือของ NEB (2006) รายงานว่า การตัดเพื่อแยก intein-CBD ให้ออกจากโปรตีนนั้น ลำดับของกรดอะมิโนตัวแรกจะต้องสอดคล้องกับค่าความเป็นกรด-ด่างของบัฟเฟอร์ ทั้งนี้ยังขึ้นอยู่กับ การเชื่อมโปรตีนให้ติดอยู่กับ intein-CBD ทางด้านปลาย C (C-terminal) หรือ N (N-terminal) จากการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการเชื่อมโปรตีนเข้ากับ intein-CBD ทางด้านปลาย C (C-terminal) ของโปรตีน และพบว่า ลำดับกรดอะมิโนตัวแรกที่ติดอยู่กับ intein-CBD คือ Arg (R) จึงไม่สามารถที่จะตัดเพื่อแยก intein-CBD ให้ออกจาก intein active salvicin K4 ได้ ซึ่งสอดคล้องกับ NEB (2006) รายงานว่ากรดอะมิโนตัวแรกที่เป็น Arg (R) สามารถที่จะตัดเพื่อแยกโปรตีนออกจาก intein-CBD ได้ 75 เปอร์เซ็นต์ ใน

สภาวะของ *In vivo* แต่ในสภาวะของ *In vitro* ที่อุณหภูมิ 4 และ 16 องศาเซลเซียส ไม่สามารถแยกโปรตีนออกจาก intein-CBD ได้

ในขณะที่ Chong *et al.* (1998) รายงานว่า กลไกในการตัด intein-CBD ให้แยกออกจากโปรตีนนั้น ลำดับของกรดอะมิโนตัวแรกจะต้องสอดคล้องกับค่าความเป็นกรด-ด่างของบัพเฟอร์ อุณหภูมิที่ทำการบ่ม และระยะเวลาที่ทำการบ่มด้วย นอกจากนี้ยังรายงานเพิ่มเติมว่าในการตัดโปรตีนที่ติดอยู่กับ intein-CBD ทางด้านปลาย N (N-terminal) ถ้าลำดับกรดอะมิโน Arg (R) ต้องใช้บัพเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 8 บ่มที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 ชั่วโมง จะทำให้เกิดการตัดแยกโปรตีนออกจาก intein-CBD 70-95 เปอร์เซ็นต์

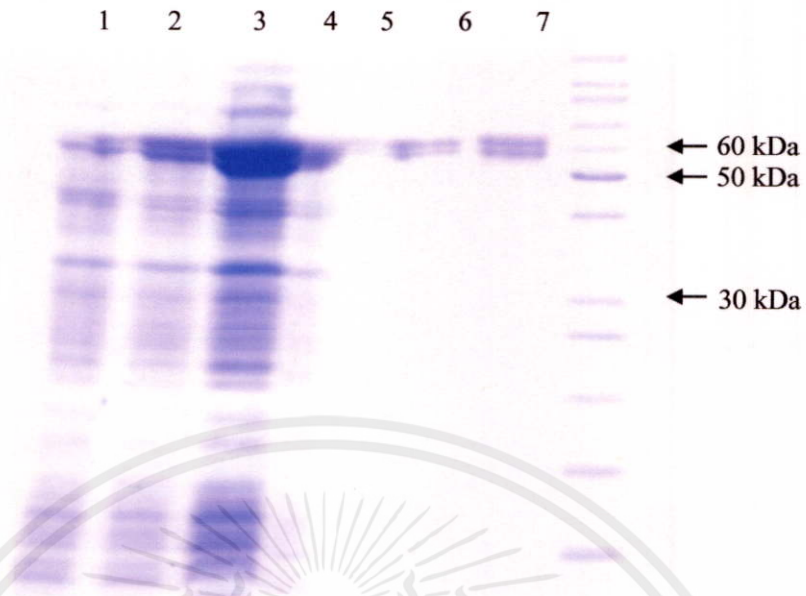


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 26 ความบริสุทธิ์ของ โปรตีน intein active salvicin K4 ที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วย chitin affinity column

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับกรใช้ภายในห้องปฏิบัติการเท่านั้น ไม่ควรเผยแพร่ไปยังบุคคลอื่นโดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆก็ตาม อีกทั้งยังมีให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำ



ภาพที่ 27 ตรวจสอบขนาดและความบริสุทธิ์ของ โปรตีน intein active salvicin K4

ช่องที่ 1 คือ noninduce

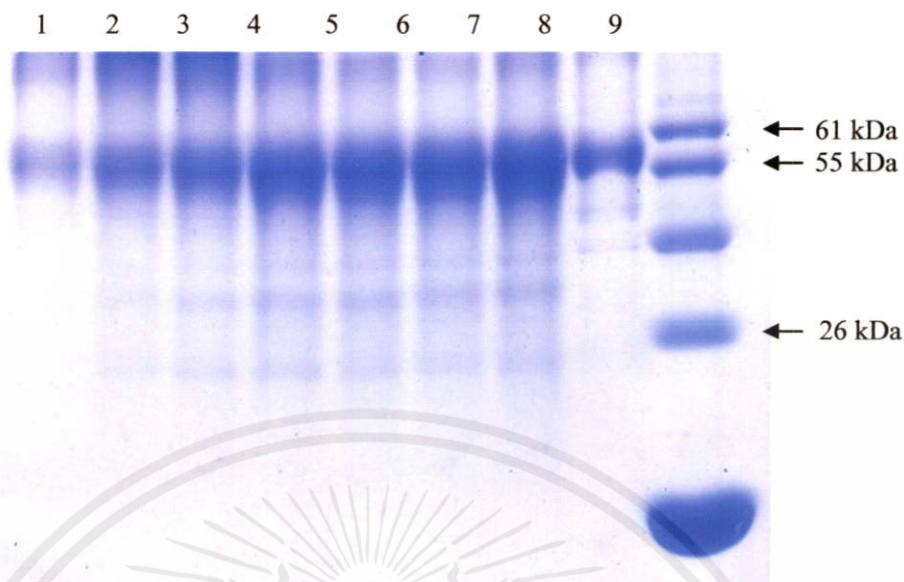
ช่องที่ 2 คือ induce

ช่องที่ 3 คือ สารละลายเซลล์ส่วนใส (supernatant)

ช่องที่ 4-6 คือ โปรตีนบริสุทธิ์

ช่องที่ 7 คือ โปรตีนมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 28 การตัดโปรตีน intein active salvicin K4 ด้วย self cleavage buffer ที่มีความเข้มข้นของ DTT ต่างกัน

ช่องที่ 1 คือ Uncut DTT

ช่องที่ 2 คือ 10mM DTT

ช่องที่ 3 คือ 30mM DTT

ช่องที่ 4 คือ 50mM DTT

ช่องที่ 5 คือ 100mM DTT

ช่องที่ 6 คือ 325mM DTT

ช่องที่ 7 คือ 625mM DTT

ช่องที่ 8 คือ intein-CBD

ช่องที่ 9 คือ โปรตีนมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทำโปรตีน intein active salvicin K4 ให้บริสุทธิ์ พบว่า โปรตีน intein active salvicin K4 มีน้ำหนักรวม 44.8 มิลลิกรัมต่ออาหารแขวนลอย 1 ลิตร แยกเป็นแบคทีเรียโอซิน active salvicin K4 บริสุทธิ์ ได้ 3.73 มิลลิกรัม (0.746 ไมโครโมลาร์) ในขณะที่ Pilasombut (2006) รายงานว่าจากการเลี้ยง *Lb. salivarius* K4 ปริมาตร 1 ลิตร สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์ ด้วยวิธี hydrophobic interaction, ion-exchange และ HPLC ได้ ปริมาณ 0.015 มิลลิกรัม (0.003 ไมโครโมลาร์) จากการศึกษาพบว่า การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน และการกระตุ้นให้มีการแสดงออกของยีนแบคทีเรียโอซินใน *E. coli* BL21 ให้ผลผลิตที่มากกว่าการผลิตแบคทีเรียโอซินด้วยวิธีเดิม

และจากการศึกษาของ Pilasombut (2006) ที่ได้ทำการออกแบบไพรเมอร์จากกลุ่มยีนของ *Lb. salivarius* UCC 118 ตั้งแต่ ORF 3 (presalivaricin B) ครอบคลุมถึง ORF 7 (abp118 β) ซึ่งภายในกลุ่มยีนนี้ประกอบด้วยยีน presalivaricin B, abp118 α และ abp118 β และจากการตรวจสอบยีนของ *Lb. salivarius* K4 พบว่ามียีนแบคทีเรียโอซิน salivaricin B (*sal B*) และ salvicin K (*sal K*) โดยยีน *sal B* มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับ presalivaricin B ส่วน *sal K* มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับ abp118 α ที่ผลิตจาก *Lb. salivarius* UCC 118 โดยมีความเหมือน 64 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบยีน *salvicin K4* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกับ abp118 β ที่ผลิตโดย *Lb. salivarius* UCC 118 โดยมีความเหมือนอยู่ 81 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำส่วนใส (supernatant) ที่ผลิตโดย *Lb. salivarius* K4 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี HPLC พบว่า สามารถแยกแบคทีเรียโอซิน salivaricin B และ salvicin K ได้ แต่ไม่สามารถแยกแบคทีเรียโอซิน salvicin K4 ได้ อาจเนื่องจากขนาดของยีน *sal K* ที่มีลักษณะคล้ายกับ abp118 α และอยู่ติดกับยีน *salvicin K4* ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกัน ทำให้การแยกแบคทีเรียโอซินให้บริสุทธิ์ทำได้ยาก หรืออาจเนื่องมาจากปริมาณโปรตีนแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยยีน *sal K* มีปริมาณมาก ทำให้การผลิตโปรตีน แบคทีเรียโอซิน salvicin K4 มีปริมาณน้อยมาก จึงเป็นสาเหตุให้การแยกแบคทีเรียโอซินให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี HPLC ไม่สามารถทำได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.7 คุณสมบัติของโปรตีนแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์ต่อความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทดสอบ

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดสอบคุณสมบัติของโปรตีนแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ 17 สายพันธุ์ (ตารางที่ 18) โดยทำการทดสอบโปรตีนบริสุทธิ์ 2 ชนิด คือ โปรตีน intein active salvicin K4 ที่ความเข้มข้น 2.5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ intein-CBD ความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองพบว่าโปรตีน intein active salvicin K4 ที่ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* TISTR 942 และ *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^T 200 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร, *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* TISTR 942 และ *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^T 800 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 18 ในขณะที่ intein-CBD ความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบได้เลย ดังแสดงในภาพที่ 29-30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 18 ประสิทธิภาพของ intein active salvicin K4 ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทดสอบ

| เชื้อแบคทีเรียทดสอบ | ค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซิน (ยูนิต/มล.) | |
|--|--|-----|
| | ความเข้มข้นของ intein active salvicin K4 (มก./มล.) | |
| | 2.5 | 10 |
| Lactic acid bacteria | | |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> 8014 | - | - |
| <i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> JCM 1157 ^T | - | 100 |
| <i>Lactobacillus sakei</i> TISTR 890 | - | - |
| <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> 1344 | - | - |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> TISTR 942 | 200 | 800 |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> JCM 6124 ^T | 200 | 800 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> JCM 5803 ^T | - | - |
| <i>Enterococcus faecalis</i> TISTR 888 | - | - |
| <i>Streptococcus</i> sp. | - | - |
| Other gram positive bacteria | | |
| <i>Bacillus coagulans</i> TISTR 1147 | - | - |
| <i>Bacillus coagulans</i> JCM 2257 ^T | - | - |
| <i>Brochothrix campestris</i> NBRC 11547 ^T | - | - |
| <i>Listeria innocua</i> ATCC 33090 ^T | - | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> TISTR 118 | - | - |
| Gram negative bacteria | | |
| <i>Escherichia coli</i> BL21 | - | - |
| <i>Pseudomonas fluorescense</i> TISTR 358 | - | - |
| <i>Pseudomonas fluorescense</i> JCM 5693 ^T | - | - |

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับที่ไม่อนุญาตให้ทำไปใช้ไปโดยไม่ขออนุญาต

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
หมายเหตุ

- คือ ไม่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย

ATCC = American Type Culture Collection, Rockville, Md

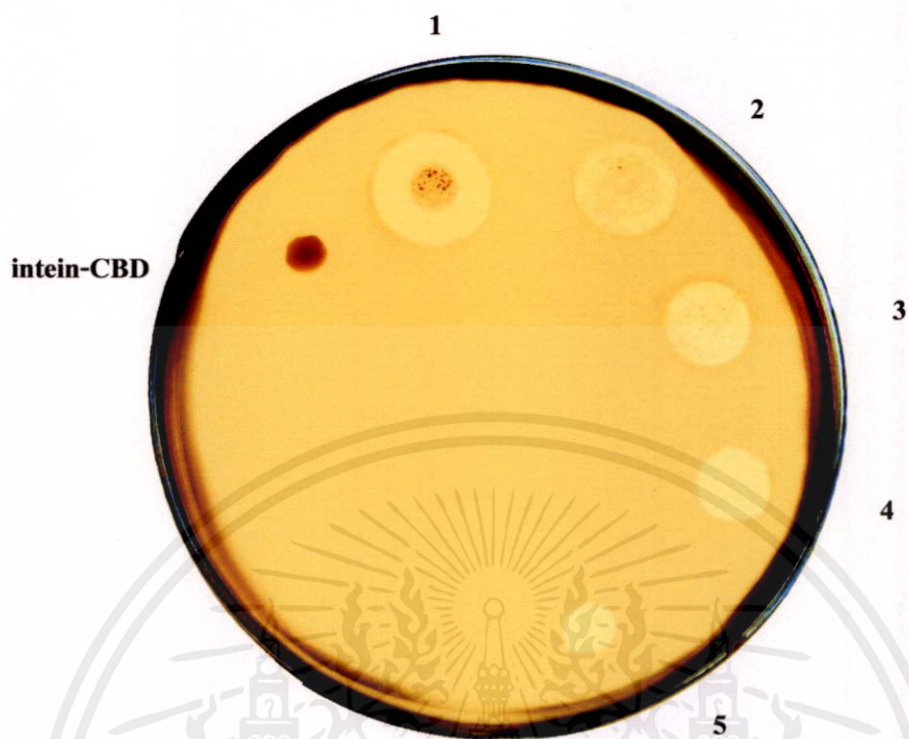
JCM = Japanese culture of Microorganisms, Wako, Japan

NBRC = National Institute of Technology and Evaluation (NITE) Biological Resource center

TISTR = Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Bangkok, Thailand



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 29 โปรีตีน intein active salvicin K4 ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* TISTR 942 และ *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^T เทียบกับ intein-CBD

intein-CDB ความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

1 คือ intein active salvicin K4 ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

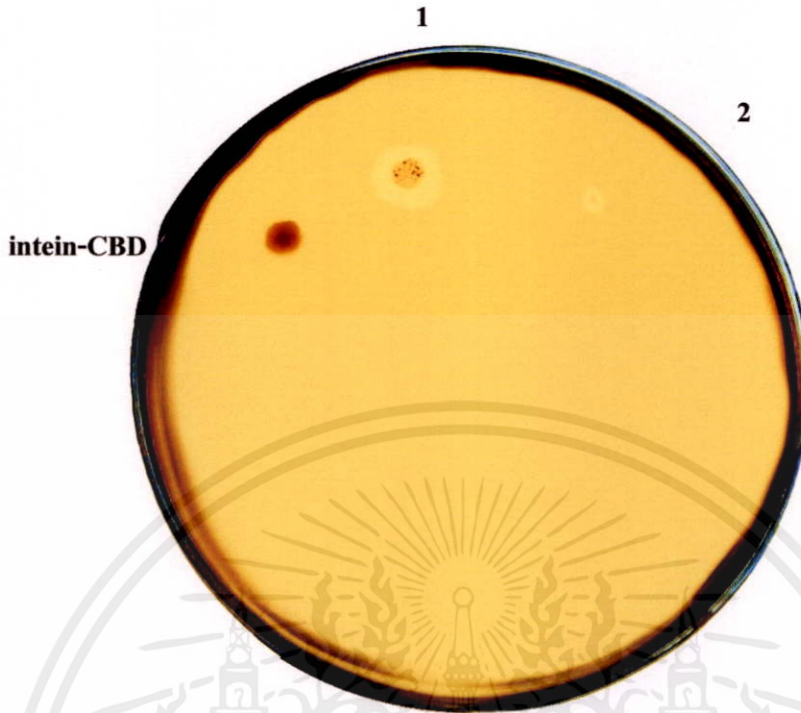
2 คือ intein active salvicin K4 ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (1:2)

3 คือ intein active salvicin K4 ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (1:4)

4 คือ intein active salvicin K4 ความเข้มข้น 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (1:8)

5 คือ intein active salvicin K4 ความเข้มข้น 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (1:16)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 30 โปรตีน intein active salvicin K4 ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T เทียบกับ intein-CBD

intein-CDB ความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

1 คือ intein active salvicin K4 ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2 คือ intein active salvicin K4 ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (1:2)

จากผลการทดลองของ Pilasombut (2006) ที่นำส่วนใสของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *Lb. salivarius* K4 ซึ่งประกอบด้วยแบคทีเรียโอซิน salivaricin B, salvicin K และ salvicin K4 มาทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย พบว่า มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้หลายชนิด ได้แก่ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T 3,200 AUต่อมิลลิลิตร, *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^T 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร, *E. faecalis* JCM 5803^T 200 AUต่อมิลลิลิตร, *B. coagulans* JCM 2257^T 1600 ยูนิตต่อมิลลิลิตร, *L. innocua* ATCC 33090^T และ *Br. campestris* NBRC 11547^T 200 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำส่วนใสมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี hydrophobic interaction, ion-exchange และ HPLC ตามลำดับ ซึ่งสามารถแยกแบคทีเรียโอซิน salivaricin B และ salvicin K ออกจากกันได้ แต่ไม่สามารถแยกแบคทีเรียโอซิน salvicin K4 ออกมาได้ จึงทำการศึกษาต่อโดยนำแบคทีเรียโอซิน salvicin K ความเข้มข้น 0.015 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกกลุ่มเดิม พบว่า สามารถยับยั้งการ

เจริญของเชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T 3,200 ยูนิตต่อมิลลิลิตร, *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^T 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร, *E. faecalis* JCM 5803^T 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร, *B. coagulans* JCM 2257^T, *L. innocua* ATCC 33090^T และ *Br. campestris* NBRC 11547^T 200 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 19 จากรายงานของ Flynn *et al.* (2002) พบว่า แบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *Lb. salivarius* UCC 118 จัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียโอซิน IIb คือมียีน *abp118α* และ *abp118β* ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* และแบคทีเรียแกรมลบบางชนิด เช่น *Pseudomonas fluorescens* ในขณะที่ Çataloluk and Gürakan (2003) พบว่า แบคทีเรียโอซิน salivarin B ที่ผลิตโดย *Lb. salivarius* M7 สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มใกล้เคียง เช่น *Lb. fermentum*, *Lb. plantarum* และ *Lb. acidophilus* และยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกอื่นๆ เช่น *L. monocytogenes* L2, *St. faecalis*, *S. epidermis* และ *S. aureus*

Pilasombut *et al.* (2006a) ได้ทำการคัดแยก *Lb. salivarius* K7 จากลำไส้ไก่ และพบว่า *Lb. salivarius* K7 สามารถผลิตสารแบคทีเรียโอซินที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T 1600 ยูนิตต่อมิลลิลิตร, *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^T 200 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ *B. coagulans* JCM 2257^T 400 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และทำการจำแนกชนิดของแบคทีเรียโอซิน โดยการแยกสารแบคทีเรียโอซินให้บริสุทธิ์ และวิเคราะห์กรดอะมิโน ด้วยวิธี Edman degradation ซึ่งพบว่าแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจาก *Lb. salivarius* K7 มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของ *abp118β* ที่ผลิตโดย *Lb. salivarius* UCC 118 และยังพบว่ามีลำดับของกรดอะมิโนอีก 10 ตัว ที่มีลำดับเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของแบคทีเรียโอซิน *abp118α* ที่สร้างจาก *Lb. salivarius* UCC 118

ตารางที่ 19 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทดสอบ

| Indicator strains | supernatant cell of <i>Lb. salivarius</i> K4 | salicin K (0.015 mg/ml) | supernatant cell of <i>Lb. salivarius</i> K7 | Intein active salicin K4 (10 mg/ml) |
|--|---|----------------------------|---|--|
| Lactic acid bacteria | | | | |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> 8014 | - | - | - | - |
| <i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> JCM 1157T | 3200 | 3200 | 1600 | 100 |
| <i>Lactobacillus sakei</i> TISTR 890 | - | - | - | - |
| <i>Lactococcus lactis</i> sp. <i>cremoris</i> 1344 | - | - | - | - |
| <i>Leiconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>Mesenteroides</i> TISTR 942 | - | - | - | 800 |
| <i>Leiconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>Mesenteroides</i> JCM 6124T | 100 | - | 200 | 800 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> JCM 5803T | 200 | 100 | - | - |
| <i>Enterococcus faecalis</i> TISTR 888 | - | - | - | - |
| <i>Streptococcus</i> sp. | - | - | - | - |
| Other gram positive bacteria | | | | |
| <i>Bacillus coagulans</i> TISTR 1147 | - | - | - | - |
| <i>Bacillus coagulans</i> JCM 2257T | 1600 | 200 | 400 | - |
| <i>Brochoitrix campestris</i> NBRC 11547 T | 800 | 200 | - | - |
| <i>Listeria innocua</i> ATCC 33090T | 800 | 200 | - | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> TISTR 118 | - | - | - | - |
| Gram negative bacteria | | | | |
| <i>Escherichia coli</i> BL21 | - | - | - | - |
| <i>Pseudomonas fluorescense</i> TISTR 358 | - | - | - | - |
| <i>Pseudomonas fluorescense</i> JCM 5693T | - | - | - | - |

ในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน intein active salvicin K4 ซึ่งมีประสิทธิภาพในยับยั้งการเจริญเติบโตได้เฉพาะเชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T, *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* TISTR 942 และ *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^T ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโน หรืออาจเนื่องมาจากโปรตีน intein active salvicin K4 ยังเชื่อมอยู่กับ intein-CBD ทางด้านปลาย C (C-terminal) ทำให้มีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของแบคทีเรียโอซินได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Chen *et al.* (2008) ที่ทำการเปรียบเทียบเพปไทด์ ABP-CM4 และ ABP-CMt ที่เชื่อมอยู่กับ intein-CBD เพื่อให้มีการแสดงออกใน *E. coli* พบว่า intein-CBD ที่มีขนาดใหญ่จะไปขัดขวางการทำงานของเพปไทด์ทั้งสองชนิด ทำให้ไม่สามารถทำลายสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์ ส่งผลให้มีการแสดงออกของเพปไทด์ทั้งสองชนิดโดยที่ *E. coli* ไม่ถูกทำลาย

และจากผลการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน พบว่า intein active salvicin K4 มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่เรียกทดสอบได้น้อยชนิด (narrow spectrum) ซึ่งยับยั้งเฉพาะเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกเท่านั้น และไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบได้ เนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบมีองค์ประกอบของผนังเซลล์ที่ซับซ้อนกว่าแบคทีเรียแกรมบวก โดยมีสารประกอบพอลิโพโปรตีน และลิโปโพลีแซ็กคาไรด์ ทำให้โมเลกุลของแบคทีเรียโอซินไม่สามารถแทรกผ่านผนังเซลล์ของแบคทีเรียและไม่ทำให้เกิดรูที่เชื่อมหุ้มเซลล์ส่วนในกรณีของแบคทีเรียกรดแลคติก และแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิด ที่ไม่ถูกทำลายด้วยแบคทีเรียโอซินนั้น Schved *et al.* 1994 กล่าวว่า แบคทีเรียแกรมบวกดังกล่าวมีตัวรับที่เชื่อมหุ้มเซลล์ไม่เหมาะสม รวมทั้งมีปริมาณของกรดไขมัน และฟอสโฟลิพิดในชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์ที่แตกต่างจากแบคทีเรียแกรมบวกที่ถูกทำลาย นอกจากนี้ Ennabar *et al.* (2000) กล่าวว่า องค์ประกอบของผนังเซลล์บางส่วนขัดขวางการทำงานของแบคทีเรียโอซิน และยังคงกล่าวอีกว่า เซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก จะถูกทำลายด้วยแบคทีเรียโอซิน เมื่อเซลล์อยู่ในลักษณะที่ไม่มีผนังเซลล์

นอกจากนี้ผลในการฆ่าทำลายเซลล์แบคทีเรียเป้าหมาย มักขึ้นอยู่กับความบริสุทธิ์ ความเข้มข้นของแบคทีเรียโอซิน สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม และปริมาณของเซลล์แบคทีเรีย (de Vuyst and Vandamme. 1994) รวมทั้งกลุ่มของแบคทีเรียโอซินด้วย เช่น แบคทีเรียโอซินกลุ่ม IIb เป็นกลุ่มแบคทีเรียโอซินที่ต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของแบคทีเรียโอซิน 2 ชนิด ถึงจะมีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมายได้ดีที่สุด ในขณะที่แบคทีเรียโอซิน intein active salvicin K4 ที่ได้จากการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนของเชื้อ *Lb. salivarius* K4 มีเพียงยีนเดียว ประสิทธิภาพของแบคทีเรียโอซิน intein active salvicin K4 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย จึงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้น้อยชนิด

แต่อย่างไรก็ตามแบคทีเรียที่ถูกยับยั้งด้วย intein active salvicin K4 เป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเกิดการเน่าเสียของเนื้อสัตว์แช่แข็ง ซึ่งสามารถนำ intein active salvicin K4 มาใช้ประโยชน์ในการถนอมอาหาร และอุตสาหกรรมเนื้อสัตว์ได้ โดยไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค และไม่ก่อให้เกิดสารพิษตกค้าง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การเพิ่มปริมาณยีนด้วยวิธี PCR โดยใช้จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้เป็นต้นแบบ เป็นวิธีการตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพ และมีความไวในการตรวจสอบสูง ซึ่งประสิทธิภาพของการตรวจสอบขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของไพรเมอร์ที่เลือกใช้ และสภาวะในการทำปฏิกิริยา พบว่าในการตรวจสอบยีน *salvicin K4* ของเชื้อ *Lb. salivarius K4* ด้วยไพรเมอร์ K4_BETA_F กับ K4_BETA_R (inactive form) และ K4_BETA_F กับ K4_AC_BETA_R (active form) มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ขนาด 210 คู่เบส และ 144 คู่เบส ตามลำดับ เพื่อยืนยันความถูกต้องว่ายีน *salvicin K4* ที่อยู่ในรูป inactive form ที่ทำการเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR ไม่ได้เกิดความผิดพลาด ซึ่งผลที่ได้จากการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *inactive salvicin K4* มีความเหมือนกับยีน *salvicin K4* ที่ผลิตโดย *Lb. salivarius K4* อยู่ 98 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปลี่ยนเป็นลำดับกรดอะมิโน พบว่ายีน *inactive salvicin K4* มีลำดับกรดอะมิโนที่ ถูกเปลี่ยนไป 3 ตำแหน่ง

การสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดยการเชื่อมต่อยีน *active salvicin K4* เข้ากับ pTYB1 expression vector และนำโคโลนีที่ได้ทำการตรวจสอบด้วยวิธี PCR พบว่า โคโลนีที่คัดเลือกมีขนาดของยีนที่ถูกแทรกเท่ากับขนาดของยีน *active salvicin K4* คือ 144 คู่เบส

นำรีคอมบิแนนท์โปรตีน intein active *salvicin K4* ที่ได้ ไปกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์โปรตีน ในเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* BL21 (DE3) ซึ่งนำมาเลี้ยงเพื่อเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์โปรตีน ในปริมาณมาก โดยใช้แลคโตสที่มีความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ เป็นตัวกระตุ้น และเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการตรวจสอบขนาดของโปรตีน intein active *salvicin K4* ด้วย SDS PAGE พบว่า โปรตีน intein active *salvicin K4* มีขนาด 60 กิโลดาลตัน จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์โปรตีน intein active *salvicin K4* ที่ถูกกระตุ้น ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ที่มีความจำเพาะ ซึ่งมีปริมาณโปรตีน intein active *salvicin K4* บริสุทธิ์ 44.8 มิลลิกรัมต่อการเลี้ยงด้วยอาหาร 1 ลิตร และประกอบด้วยแบคทีเรียโอซิน *active salvicin K4* บริสุทธิ์ 3.73 มิลลิกรัม ผลผลิตที่ได้มีปริมาณที่มากกว่าการผลิตแบคทีเรียโอซินด้วยวิธีเดิม 200 เท่า

นำโปรตีน intein active *salvicin K4* บริสุทธิ์ ไปทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค และแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียในอาหาร พบว่า โปรตีน intein active *salvicin K4* บริสุทธิ์ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM

1157^T, *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* TISTR 942 และ *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^T ด้วยความเข้มข้นที่แตกต่างกัน

จากผลการศึกษาพบว่า การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน intein active salvicin K4 และ กระตุ้นให้มีการแสดงออกของยีนแบคทีเรียโอซินใน *E. coli* BL21 (DE3) ให้ผลผลิตที่มากกว่าการผลิตแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์ด้วยวิธีเดิม แต่โปรตีน intein active salvicin K4 มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่เรียวทดสอบได้น้อยชนิด (narrow spectrum) เมื่อเทียบกับการผลิตแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *Lb. salivarius* K4 โดยตรง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

- ชัยวัฒน์ กิตติภูถ. 2547. เอกสารประกอบการสอนวิชาจุลชีววิทยาทั่วไป เรื่อง เชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ตามปกติในร่างกายคน. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2544. จุลชีววิทยาทั่วไป. ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์. 710 น.
- พงษ์เทพ วิไลพันธ์. 2546. “แบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในปลาไร้.” วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ
- ภักดี สุขพันธ์. 2548. “การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกผลิตแบคทีเรียโอซิน และเจริญได้ดีในสารโพลิโกแซคคาไรด์.” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ
- Arihara, K., Ogihara, S., Mukai, T., Ltoh, M. and Kondo, Y. 1996. “Salivacin 140, a novel bacteriocin from *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius* TI 40 active against atrogenic bacteria.” *Lett. Appl. Microbiol.* 22 : 420-424.
- Axelsson, L. 1998. Lactic acid bacteria: Classification and physiology, pp. 1-23. In S. Salminen and A.V. Wright, eds. *Lactic Acid Bacteria*. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Barrett, E., Hayes, M., O'Connor, P., Gardiner, G., Fitzgerald, G.F., Stanton, C., Ross, R.P. and Hill, C. 2007. “Salivaricin P, One of a Family of Two-Component Antilisterial Bacteriocins Produced by Intestinal Isolates of *Lactobacillus salivarius*.” *Appl. Environ Microbiol.* 73 (11) : 3719–3723.
- Bradford, M.M. 1976. “A rapid and sensitive for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”. *Anal. Biochem.* 72 : 248-254.
- Busarcevic, M., Kojic, M., Dalgalarondo, M., Chobert, J.M., Haertlé, T. and Topisirovic, L. 2008. “Purification of bacteriocin LS1 produced by human oral isolate *Lactobacillus salivarius* BGHO1.” *Oral. Microbiol. Immuno.* 23 (5) : 254-258
- Caplice, E. and Fitzgerald, G.F. 1999. “Food fermentations : role of microorganisms in food production and preservation.” *Int. J. Food Microbiol.* 50 : 131-149.
- Carina, M., Oliver, G. and Apella, M.C. 2001. “Effect of different complex carbon sources on growth and bacteriocin syntersis of *Enterococcus faecium*.” *Int. J. Food Microbiol.* 63 : 345-351.
- Carolissen-Mackay, V., Arendse, G. and Hastings, W. 1997. “Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers.” *Int. J. Food Microbiol.* 34 : 1-16.

- Çataloluk, O. 2001. "Molecular characterization of the gene encoding for the Salivaricin B activity and its flanking sequences." **Turk. J. Biol.** 25 : 379-386.
- Çataloluk, O. and Gürakan, C.G. 2003. "Characterization of salivaricin B, A protein expressed by *Lactobacillus salivarius* M7". **Turk. J. Biol.** 27: 131-136.
- Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F. and Chikindas, M.L. 2001. "Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation". **Int. J. Food Microbiol.** 71: 1-20.
- Chen, Y. Q., Zhang, S. Q., Li, B. C., Qiu, W., Jiao, B., Zhang, J. and Diao, Z. Y. 2008. "Expression of a cytotoxic cationic antibacterial peptide in *Escherichia coli* using two fusion partners." **Elsevier Protein Express. Pure.** 52 : 303–311.
- Chong, S., Montello, G.E., Zhang, A., Cantor, E.J., Liao, W., Xu, M.Q. and Benner, J. 1998. "Utilizing the C-terminal cleavage activity of a protein splicing element to purify recombinant proteins in a single chromatographic step." **Nucleic Acids Res.** 26 (22) : 5109-5115.
- Cutter, C.N. and Siragusa, G.R. 1995. "Population reductions of gram-negative pathogens following treatments with nisin and chelators under various conditions". **J. Food Prot.** 58 : 977-983.
- Davidson, P.M. and Hoover, D.G. 1993. Antimicrobial components from lactic acid bacteria, pp. 127-160. *In* S. Salminen and A. von Wright, eds. **Lactic Acid Bacteria**. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Dellaglio, F., Dicks, L.M.T. and Torriani, S. 1995. The genus of *Leuconostoc* pp. 235-278. *In* Wood, B.J.B. and Holzapfel, W.H. (eds.). **The Genera of Lactic Acid Bacteria**. Chapman and Hall, Glasgow.
- Desmond, C., Ross, R.P., Fitzgerald, G. and Stanton, C. 2005. "Sequence analysis of the plasmid genome of the probiotic strain *Lactobacillus paracasei* NFBC338 which includes the plasmids pCD01 and pCD02." **Elsevier Plasmid.** 54 : 160–175.
- de Vuyst, L. and Vandamme, E.J. 1994. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria, pp. 91-142. *In* de Vuyst, L. and Vandamme, E.J. eds. **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria : Microbiology, Genetic and Application**. Blackie-Academic & Professional, London.
- Drider, D., Fimland, G., Chard, Y. H., McMullen, L. M. and Pre'vost, H. 2006. "The Continuing Story of Class IIa Bacteriocins". **Microbiol. Molec. Bio. Reviews.** pp. 564–582.
- Eckner, K.F. 1992. "Bacteriocins and food application". **Dairy Food Environ.** 12 : 204-209.

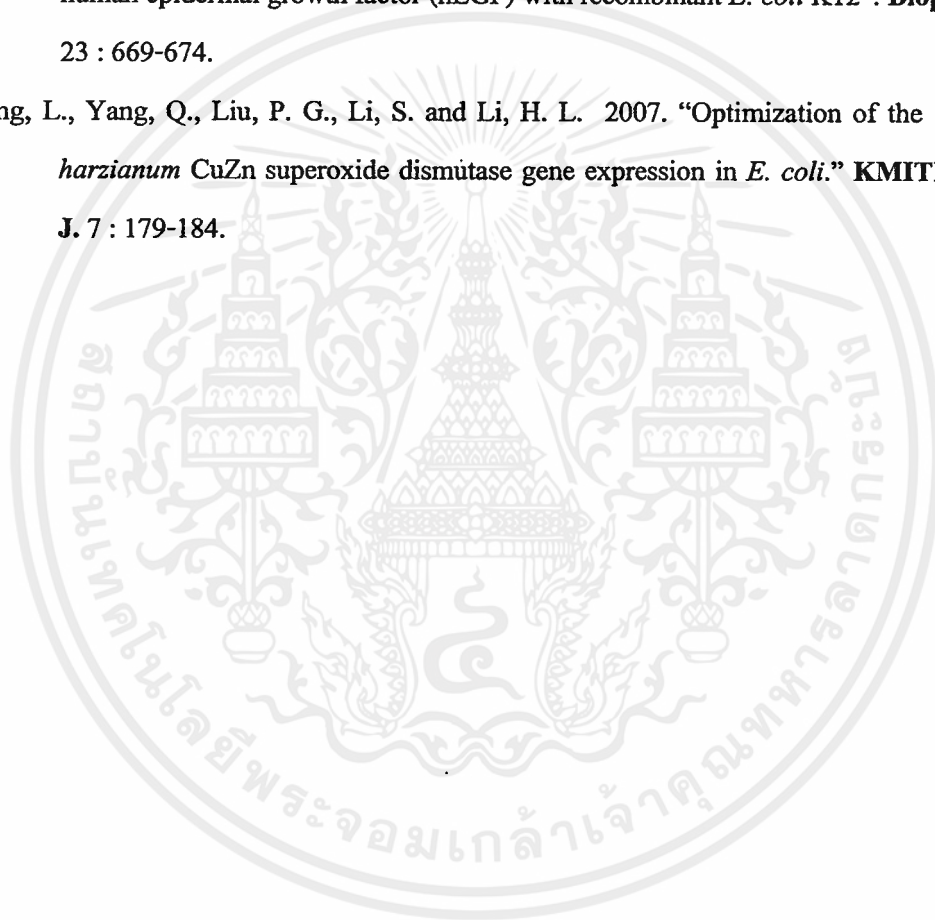
- Ennahar, S., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. 1999. "Class IIa bacteriocins from food preservation." **J. Biosci. Bioeng.** 87 (6) : 705-716.
- Ennahar, S., Sashihara, T. Sonomoto, K. and Ishizaki, A. 2000. "Class IIa bacteriocins : biosynthesis, structure and activity." **FEMS Microbiol. Rev.** 24 : 85-106.
- Flynn, S., Sinderen, D.V., Thornton, G. M., Holo, H., Nes, I.F. and Collins, J.K. 2002. "Characterization of the genetic locus responsible for the production of ABP-118, a novel bacteriocin produced by the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* UCC118." **Microbiol.** 148 : 973-984.
- Franz, C.M.A.P., Du Toit, M., Olasupo, N.A., Schillinger, U. and Holzapfel, W.H. 1998. "Plantaricin D, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* BFE 905 from ready-to-eat salad." **Lett. Appl. Microbiol.** 26 : 231-235.
- Garneau, S., Martin, N.I. and Vederas, J.C. 2002. "Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria." **Biochimie.** 84 : 577-592.
- Gould, G.W. 1996. "Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications". **J. Food Prot.** 59: 82-86.
- Hardie, J.M. and Whiley, R.A. 1995. The genus of *Streptococcus*, pp. 75-124. In Wood, B.J.B. and Holzapfel, W.H. (eds.). **The Genera of Lactic Acid Bacteria**. Chapman and Hall, Glasgow.
- Hechard, Y. and Sahl, H. 2002. "Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria." **Biochimie.** 84 : 545-557.
- Hoover, D.G. and Harlander, S.K. 1993. Screening methods for detecting bacteriocin activity, pp. 23-40. In Hoover, D.G. and Steenson, L.R. (eds.). **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria**. Academic Press Inc., London.
- Hurst, A. and Hoover, D.G. 1993. Nisin, pp. 369-394. In A.L. Branen and P.M. Davidson, eds. **Antimicrobial in Foods**. Marcel Dekker, New York.
- Joerger, M.C. and Klaenhammer, T.R. 1986. "Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481". **J. Bacteriol.** 167: 439-446.
- Kilikian, B.V., Sua'rez, I.D., Liria, C.W. and Gombert, A.K. 2000. "Process strategies to improve heterologous protein production in *Escherichia coli* under lactose or IPTG induction." **Proc. Biochem.** 35 : 1019-1025.

- Kim, M., Elvin, C., Brownlee, A. and Lyons, R. 2007. "High yield expression of recombinant pro-resilin: Lactose-induced fermentation in *E. coli* and facile purification". **Elsevier Protein Express. Pure.** 52 : 230-236.
- King, A.D.J. and Nagel, C.W. 1975. "Influent of carbon dioxide upon the metabolism of *Pseudomonas aeruginosa*." **J. Food Sci.** 40 : 362-366.
- Klaenhammer, T.R. 1993. "Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria." **FEMS Microbiol. Rev.** 12 : 39-85.
- Krier, F., Revol-Junelles, A.M. and Germain, P. 1998. "Influence of temperature and pH on production of two bacteriocins by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 during batch fermentation." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 50 : 359-363.
- Lindgren, S.E. and Dobrogosz, W.J. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentation, pp. 135-164. *In* Salminen, S. and Von Wright, A. (eds). **Lactic Acid Bacteria.** Marcel Dekker, inc., New York.
- Lu, Z., Altermannb, E., Breidtb, F., Predkid, P., Fleming, H.P. and Klaenhammer, T.R. 2005. "Sequence analysis of the *Lactobacillus plantarum* bacteriophage Φ JL-1." **Elsevier Gene.** 348 : 45-54.
- Lyon, W.J. and Glatz, B.A. 1993. "Isolation and purification of propionicin PLG-I, a bacteriocin produced by a strain of *Propionibacterium thoenii*". **Appl. Environ. Microbiol.** 59 : 83-88.
- Ma, X., Zheng, W., Wang, T., Wei, D. and Ma, Y. 2006. "Optimization and high-level expression of a functional GST-tagged rHLT-B in *Escherichia coli* and GM1 binding ability of purified rHLT-B." **J. Microbiol.** 44 (3) : 293-300.
- McAuliffe, O., Ross, R.P. and Hill, C. 2001. "Lantibiotics : structure, biosynthesis and mode of action". **FEMS Microbiol. Rev.** 25 : 285-308.
- McCormick, J.K., Klaenhammer, T.R. and Stiles, M.E. 1999. "Colicin V can be produced by lactic acid bacteria." **Lett. Appl. Microbiol.** 29 : 37-41.
- McMullen, L.M. and Stiles, M.E. 1996. "Potential for use of bacteriocin-producing lactic acid bacteria in the preservation of meats". **J. Food Prot.** 59 : 64-71.
- Muriana, P.M. 1996. "Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in food". **J. Food Prot.** 59 : 54-63.

- NEB. 2006. IMPACTTM-CN protein purification system now featuring fusion to C or N-terminus of the target protein version 2.1. **Available Source:** <http://www.neb.com/nebecomm/manualFiles/manualE6900.pdf>. March 20, 2009.
- Ocana, V.S., Holgado, A.A.P.D.R. and Nader-Macias, M.E. 1999. "Characterization of a bacteriocin-like substance produced by a vaginal *Lactobacillus salivarius* Strain." **Appl. Environ. Microbiol.** 65 (12) : 5631-5635.
- Ohmomo, S., Miho, K., Mizuo, Y., Puangpen, Y., Paipan, B. and Praphaisri, S. 1998. **Screening of Thermophilic Lactic Acid Bacteria Producing Bacteriocins in the Tropics.** Department of Animal Nutrition, NIAI. Abstract.
- Oscáriz, J.C. and Pisabarro, A.G. 2001. "Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by gram-positive bacteria". **Int. Microbiol.** 4 : 13-19.
- Ouwehand, A.C. 1998. Antimicrobial components from lactic acid bacteria, pp. 139-159. *In* Salminen, S. and Wright, A. V. (eds.). **Lactic Acid Bacteria : Microbiology and Functional Aspects.** Marcel Dekker, Inc., New York.
- Pilasombut, K. 2006. "Purification and characterization of bacteriocins produced by *Lactobacillus salivarius* K4 and K7 isolated from chicken intestine." Ph.D. Thesis, Kasetsart University, Bangkok. Thailand.
- Pilasombut, K., Sakpuaram, T., Wajjwalku, W., Nitisinprasert, S., Swetwiwathana, A., Zendo, T., Fujita, K., Nakayama, J. and Sonomoto, K. 2006a. "Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by *Lactobacillus salivarius* K7 isolated from chicken intestine." **J. Sci. Technol.** 28 (Suppl. 1) : 121-132.
- Pilasombut, K., Wajjwalku, W., Nitisinprasert, S., Swetwiwathana, A., Zendo, T., Fujita, K., Nakayama, J., Sonomoto, K. and Sakpuaram, T. 2006b. "Screening and characterization of bacteriocin producing lactic acid bacteria isolated from chicken intestine." **Kasetsart J. (Nat. Sci.)** 39 : 612-621.
- Qu, Z. and Zheng, Y. S. 2000. "Cloning, expression and purification of N-terminal of submit PB2 of influenza virus RNA polymerase." **Clin. Microb. Immuno.** 2 (1) : 21.
- Robertson, D., Shore, S. and Miller, D.M. 1997. **Manipulation and expression of recombinant DNA: A Laboratory Manual.** Academic Press, Newyork.
- Robredo, B. and Torres, C. 2000. "Bacteriocin production by *Lactobacillus salivarius* of animal origin." **J. Clin. microbiol.** 38 : 3908-3909.

- Rodriguez, J.M., Martinez, M.I., Horn, N. and Dodd, H.M. 2003. "Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria." **Int. J. Food Microbiol.** 81 : 101-116.
- Rolfs, A., Schuller, I., Finckh, U. and Weber P. I. 1992. **PCR : Clinical Diagnostics and Reserch.** Springer Verlag Berlin Heidelberg, Germany.
- Sambrook, J. and Russell, D. 2001. **Molecular Colining a Laboratory Manual.** 3rd. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Schaller, K., Dreher, R. and Braun, V. 1981. "Structural and functional properties of colicin M." **J. Bacteriol.** 146 : 54-63
- Schillinger, U., Geisen, R. and Holzapfel, W.H. 1996. "Potential of antagonistic microorganisms for the biological preservation of foods." **Trends Food Sci. Technol.** 7 : 158-164.
- Schved, F., Lalazar, A., Lindner, P. and Juven, B.J. 1994. "Interaction of the bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* SJ-1 with the cell envelope of *Lactobacillus* spp." **Lett. Appl. Microbiol.** 19 : 281-283.
- Seuk-Hyun, K. and Cheol, A. 2000. "Bacteriocin production by *Lactococcus lactis* KCA2386 isolated from White Kimchi." **Food sci. Biotechnol.** 9 : 263-269.
- Simpson, W. J. and Taguchi, H. 1995. The genus *Pediococcus*, with notes on the genera *Tetragenococcus* and *Aerococcus*, pp. 125-172. *In*.B. J. B. Wood and W. H. Holzapfel, eds. **The Genera of Lactic Acid Bacteria.** Chapman and Hall, Glasgow.
- Stern, N.J., Svetoch, E.A., Eruslanov, B.V., Perelygin, V.V., Mitsevich, E.V., Mitsevich, I.P., Pokhilenko, V.D., Levchuk, V.P., Svetoch, O.E. and Seal, B.S. 2006. "Isolation of a *Lactobacillus salivarius* strain and purification of its bacteriocin, which is inhibitory to *Campylobacter jejuni* in the chicken gastrointestinal system." **Antimicrob. Agents Chemother.** 50 (9) : 3111-3116.
- Stiles, M.E. and Holzapfel, H.W. 1997. "Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy." **Int. J. Food Microbiol.** 36 : 1-29.
- Teuber, M. 1995. The genus *Lactococcus*, pp. 173-174. *In* Wood, B.J.B and Holzapfel, W.H. (eds.). **The Genera of Lactic Acid Bacteria.** Chapman and Hall, Glasgow.
- Ulrike, L., Hannu, K. and Johanna, B. 2002. "Identification of lactic acid bacteria from spoiled, vacuum-packaged gravad rainbow trout using ribotyping." **Int. J. Food microbiol.** 72 : 147-153.

- Vincent, G.H.E., Lars, A., Dzung, B.D., Leiv, S.H., Helge, H. and Ingolf, F.N. 2002. "Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; An example of biological warfare and communication." **Antonie van Leeuwenhoek**. 81 : 639-654.
- Worobo, R.W., Van Belkum, M.J., Sailer, M., Roy, K.L., Vederas, J.C. and Stiles, M.E. 1995. "A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*." **J. Bacteriol.** 177 : 3143-3149.
- Xu, Z.N., Gang, L., Cen, P.L. and Wong, K.R. 2000. "Factors influencing secretive production of human epidermal growth factor (hEGF) with recombinant *E. coli* K12". **Bioprocess Eng.** 23 : 669-674.
- Yang, L., Yang, Q., Liu, P. G., Li, S. and Li, H. L. 2007. "Optimization of the *Trichoderma harzianum* CuZn superoxide dismutase gene expression in *E. coli*." **KMITL Sci. Tech. J.** 7 : 179-184.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

MRS / 1000 ml

MRS 52.5 g

TSBYE / 1000 ml

TSB 30 g

yeast extract 0.5 g

อาหาร LB broth / 1000 ml

Tryptone 10 g

yeast extract 5 g

NaCl 5 g

2. สารเคมีสำหรับสกัดดีเอ็นเอ

- TE buffer (10mM Tris, 1mM EDTA) pH 8.0

- 0.67% sucrose

- lysozyme (70 mg/ml)

- 20% SDS

- Phenol : Chloroform (1:1)

- Chloroform : Isoamylalcohol (24 :1)

- Isopopanol

- 70% Ethanol

3. สารเคมีสำหรับสกัดพลาสมิด

Alkaline lysis Solution I (Resuspension buffer) /100 ml

50 mM Glucose 2.5 ml

25 mM Tris-Hcl, pH 8 5 ml

10 mM EDTA 2 ml

Alkaline lysis Solution II (Lysis buffer) / 100 ml

0.2 N 2 ml

1% (w/v SDS) 5 ml

Alkaline lysis Solution III / 100 ml

5M Potassium acetate 50 ml

0.2 M Glacial acetic acid 11.5 ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น ยกเว้นกรณีมีเหตุผลเบ็ดเสร็จและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. สารเคมีสำหรับตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอ

| | |
|----------------------------------|---------|
| 10X TBE stock solution | 1000 ml |
| Tris base | 108 g |
| Boric acid | 55 g |
| EDTA | 5.84 g |
| DNA Loading dye | |
| 0.25% bromophenol blue | |
| 30% glycerol ละลายใน TE (pH 8.0) | |

5. สารเคมีสำหรับตรวจสอบขนาดโปรตีน

Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

30 % Acrylamide (30.8 % T, 2.6% C)/ 100 ml

30% Acrylamide acrylamide 30 g

N,N'-methylenebisacrylamide (BIS) 0.8 g

10% Amonium persulfate / 1 ml

Amonium persulfate 100 mg

Separating sol 1.5 M tris pH 8.8 / 200 ml

Tris base 36.3 g

stacking sol 0.5 M tris pH 6.8 / 100 ml

Tris base 6 g

| Reagent | 12% Separating Gel (ml) | 5% Stacking Gel (ml) |
|------------------------|-------------------------|----------------------|
| 30 % Bis-Acrylamide | 2.0 | 0.33 |
| Separating solution | 1.3 | - |
| Stacking solution | - | 0.25 |
| 10% Amonium persulfate | 0.05 | 0.02 |
| 10% SDS | 0.05 | 0.02 |
| TEMED | 0.002 | 0.002 |
| Water | 1.6 | 1.4 |
| total | 5.0 | 2.0 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆก็ตาม หากมีให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6x Protein loading dye

| | |
|------------------|--------|
| 0.5M tris pH 6.8 | 7ml |
| Glycerol | 3ml |
| SDS | 1g |
| bromophenol blue | 1.2 mg |

5x running buffer / 1000 ml

| | |
|-------------------|--------|
| 0.125 M Tris base | 15.1 g |
| 0.96 M Glycine | 72.0 g |
| 0.5%w/v SDS | 5 g |

5x Staining solution / 500ml

| | |
|-----------------------------|--------|
| 0.5%w/v coomassie blue R250 | 2.5 g |
| 40% methanol | 200 ml |
| 10% Acetic acid | 50 ml |

Destain / 1000 ml

| | |
|---------------------------|--------|
| 40 % Methanol, or ethanol | 400 ml |
| 10 % Acetic acid | 100 ml |

6. สารเคมีสำหรับการแยกโปรตีน (Purification Protein)**Lysis buffer / 50 ml**

| | |
|----------------------|--------|
| 20mM Tris-HCl pH 7.5 | 1ml |
| 500mM NaCl | 8.33ml |
| 1mM EDTA | 0.1ml |
| 0.1% TritonX | 0.05ml |

Column buffer / 500 ml

| | |
|----------------------|---------|
| 20mM Tris-HCl pH 7.5 | 10ml |
| 500mM NaCl | 83.33ml |
| 1mM EDTA | 1ml |

Stripping buffer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์การใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Clave buffer / 10 ml

| | |
|----------------------|--------|
| 20mM Tris-HCl pH 7.5 | 0.2ml |
| 500mM NaCl | 1.17ml |
| 1mM EDTA | 0.02ml |
| 50mM DTT | 0.077g |

7. Bradford Reagent**Bradford buffer**

| | |
|----------------|--------|
| 95% ethanol | 15 ml |
| 88% phosphoric | 30 ml |
| Serva Blue G | 30 ml |
| Water | 450 ml |



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

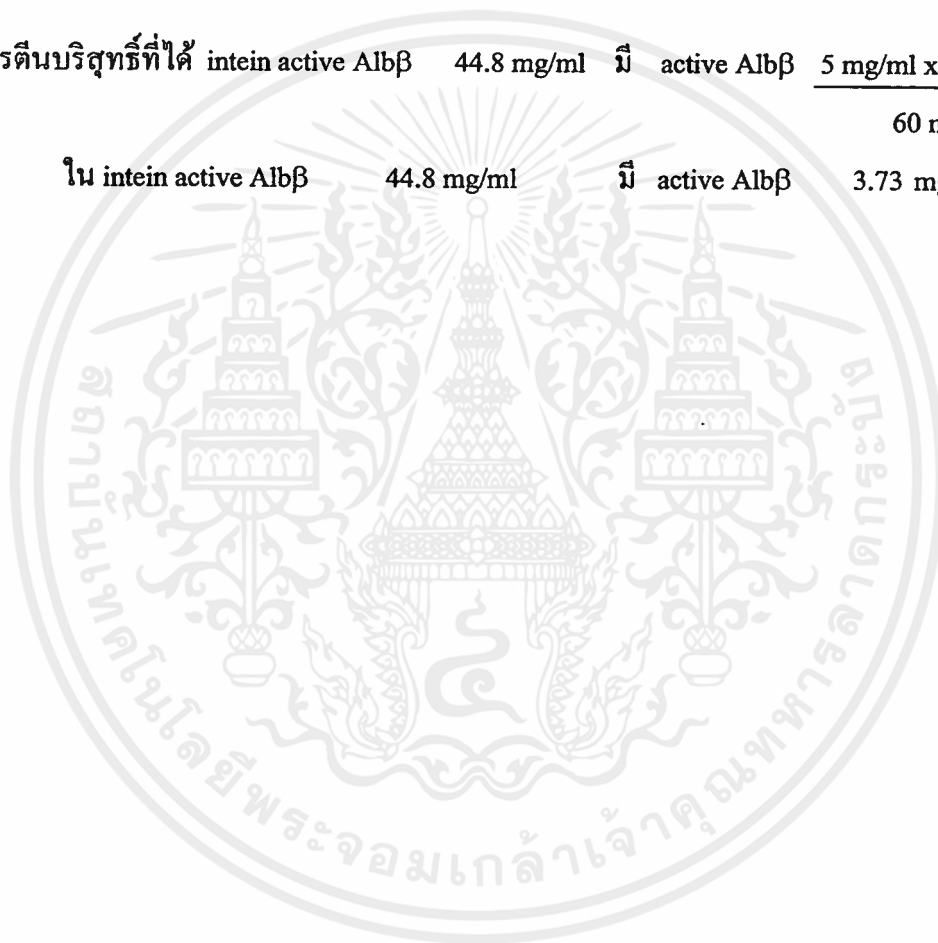
วิธีการคำนวณหาหน่วยสุทธิต่อหน่วยของแอสปาร์ทาม

| | |
|--|--|
| intein active Alb β มีน้ำหนักโมเลกุล 60 กิโลดาลตัน | เท่ากับ 60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (mg/ml) |
| intein-CBD มีน้ำหนักโมเลกุล 55 กิโลดาลตัน | เท่ากับ 55 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (mg/ml) |
| active Alb β มีน้ำหนักโมเลกุล 5 กิโลดาลตัน | เท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (mg/ml) |

intein active Alb β 60 mg/ml มี active Alb β 5 mg/ml

โปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้ intein active Alb β 44.8 mg/ml มี active Alb β $\frac{5 \text{ mg/ml} \times 44.8 \text{ mg/ml}}{60 \text{ mg/ml}}$

ใน intein active Alb β 44.8 mg/ml มี active Alb β 3.73 mg/ml



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

| | |
|------------------|--|
| ชื่อ-นามสกุล | นางสาวปิยฉัตร มีสวัสดิ์ |
| วัน เดือน ปีเกิด | 24 ตุลาคม พ.ศ. 2526 ที่จังหวัดยโสธร |
| ที่อยู่ | 524/1 หมู่ 1 ต.สามแยก อ.เลิงนกทา จ.ยโสธร 35120 |
| ประวัติการศึกษา | 2548 หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์และ เทคโนโลยีการเกษตร คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี 2552 หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอม เกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง |
| ความชำนาญพิเศษ | Molecular techniques : Cloning, Extract plasmid and PCR Protein : Expression and Purification Microbial : Gram positive bacterial and pathogen in meat |
| ประสบการณ์ | พ.ศ. 2543 การฝึกงานด้านการเลี้ยงโคนม จากสหกรณ์โคนมไทย เดนมาร์ก หัวสัตว์ใหญ่ จ.ประจวบคีรีขันธ์ พ.ศ. 2544 การฝึกงานด้านสารออกฤทธิ์ทางทะเล สถาบันวิทยาศาสตร์ ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา |
| ผลงานทางวิชาการ | Piyachat Meesawat, Kannika Thongkhao, Kiattawee Choowongkomon and komkhae Pilasombut. Cloning and Over expression of Bacteriocin Produced by <i>Lactobacillus</i> <i>salivarius</i> K4 in <i>Escherichia coli</i> . 1 st KMITL Graduate Research. Conference. August 28, 2008 at King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok Thailand Kannika Thongkhao, Piyachat Meesawat, Kiattawee Choowongkomon, Sunee Nitisinprasert and komkhae Pilasombut. Cloning, Expression and Purification of ABP118 β Like Bacteriocin in <i>Escherichia coli</i> . Poster presentation. 3 rd Symposium of Protein Society |

of Thailand. August 28-29, 2008 at Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok Thailand.

Kannika Thongkhao, Piyachat Meesawat, Komkhae Pilasombut, Sunee Nitisinprasert and Kiattawee Chuwongkomon. Optimization of Expression Vector to Produce Abp118 α like Bacteriocin and Abp118 β like Bacteriocin in *Escherichia coli*. 34th Congress on Science and Technology Thailand (STT 34). October 31 - November 2, 2008. Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok Thailand

ทุนวิจัยที่ได้รับ

ทุนสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้