

Thesis Title	Characterization and Partial Purification of Bacteriocin Produced by <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	
Author	Ms. Thidarat Suksangpleng	
Degree	Master of Science (Microbiology)	
Thesis Advisory Committee	Dr. Siriwoot Sookkhee	Chairman
	Asst. Prof. Dr. Sumalee Pruksakorn	Member
	Dr. Sarawut Nukoolkarn	Member

ABSTRACT

Lactobacillus could be found as the resident flora in gastrointestinal, genital tracts and oral cavity. It usually produces the antimicrobial proteinaceous substances or bacteriocins which may be applied for improving the human health. The aims of the present study were to characterize and purify the bacteriocin produced by the potent antimicrobial producing strain of lactobacilli towards *Porphyromonas gingivalis* W50, the major periodontal pathogen. Three isolates namely B85/4, B282 and B63/8 were demonstrated the strongest antimicrobial activity. The biochemical identification revealed that they were *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*. They were susceptible to clindamycin and erythromycin after testing by E-test. For the study of their growth curves, their generation times were 21.5, 18.2, 23.6 min, respectively. The residual antimicrobial activity of cell-free supernatants affected by pH, temperature and proteolytic enzymes treatments were determined. The activities of these cell-free supernatants were shown to be potent in acidic condition, resistant to 80°C and sensitive to protease enzymes. It may be hypothesized that the acidic proteins or bacteriocin-like substances containing in cell-free supernatant were involved in the activity. The crude bacteriocins could be harvested by using with 40% ammonium sulphate. The charges of crude bacteriocins were observed in both anionic and cationic zones in 2D-PAGE gels, especially the major clusters of anionic proteins

which detected at pI range between 5 and 6. The molecular weights of these crude bacteriocins were more than 30 kDa. The anionic proteins were partially purified by using an anion exchange column chromatography. The strongest antimicrobial activity against *P. gingivalis* W50 and highest bacteriocin unit were presented by the anionic fraction of B85/4. This potent fraction gave 306.73% of activity recovered. The *in vitro* killing time of the potent fraction of B85/4 against *P. gingivalis* was 6 hrs. Based on the SDS-PAGE result, the molecular weights of the detected proteins were 38 and 87 kDa. This observation suggests that the above bacteriocin could be classified as the class III bacteriocins with the anionic manner. This bacteriocin should be further purified and identified in the proteomic level.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การวิเคราะห์คุณลักษณะและการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของ สารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อแลคโตบาซิลลัส พาราเคซีไอ สายพันธุ์ พาราเคซีไอ	
ผู้เขียน	นางสาวธิดารัตน์ สุกแสงเปล่ง	
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ดร. ศิริวิมล สุขชี ผศ. ดร. สุมาลี พุกขาร ดร. สราวุธ นุกูลการ	ประธานกรรมการ กรรมการ กรรมการ

บทคัดย่อ

แลคโตบาซิลลัสพบเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในทางเดินอาหาร ช่องคลอดและช่องปาก ผลิตโปรตีนที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพหรือแบคทีเรียโอซิน ซึ่งอาจนำมาประยุกต์เพื่อเพิ่มสุขภาพของมนุษย์ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์คุณสมบัติ และแยกแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพก่อโรคปริทันต์ คือ *Porphyromonas gingivalis* W50 ผลการศึกษาพบว่าแลคโตบาซิลลัส 3 ไอโซเลท ได้แก่ B85/4 B282 และ B63/8 มีฤทธิ์ต้านจุลชีพที่ดีที่สุด จากการจำแนกสปีชีส์ด้วยวิธีทางชีวเคมี พบว่าทั้ง 3 ไอโซเลท จัดเป็น *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* มีความไวต่อคลินดามัยซินและอิริโทรมัยซินเมื่อทดสอบด้วยวิธี E-test จากการวิเคราะห์กราฟการเจริญพบเวลาที่ใช้ในการแบ่งตัวของเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลทเท่ากับ 21.5 นาที 18.2 นาที และ 23.6 นาที ตามลำดับ ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของเชื้อในน้ำเลี้ยงปราศจากเซลล์เมื่อได้รับผลของความเป็นกรดต่าง อุณหภูมิ และเอนไซม์ย่อยโปรตีน พบว่าฤทธิ์ต้านจุลชีพแสดงได้ดีในสภาวะเป็นกรด คงตัวที่ความร้อน 80 องศาเซลเซียส และไวต่อเอนไซม์โปรตีเอส ซึ่งอาจสันนิษฐานได้ว่าเกิดจากโปรตีนชนิดกรดหรือสารคล้ายแบคทีเรียโอซินในน้ำเลี้ยงปราศจากเซลล์ แบคทีเรียโอซินสกัดหยาบสามารถสกัดได้โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 40 ประจุของแบคทีเรียโอซินสกัดหยาบพบได้ทั้งในบริเวณที่แสดงประจุลบและประจุบวกในเจล 2D-PAGE โดยเฉพาะพบโปรตีนประจุลบกลุ่มใหญ่ระหว่างค่า pI 5 และ 6 มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 30

กิโลดัลตัน โปรตีนประจุลบเหล่านี้ถูกทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยวิธีโครมาโตกราฟีชนิดแลกเปลี่ยนประจุลบ ฤทธิ์ต้านจุลชีพต่อ *P. gingivalis* W50 และแบคทีเรียไอซินิกยูนิคที่สูงสุดพบในโปรตีนส่วนแยกประจุลบจากเชื้อ B85/4 และมีร้อยละของฤทธิ์ต้านจุลชีพที่กลับคืนมาเท่ากับ 306.73 และเวลาที่โปรตีนส่วนแยกนี้สามารถฆ่า *P. gingivalis* ได้ในหลอดทดลองเท่ากับ 6 ชั่วโมง จากผลการวิเคราะห์เจล SDS-PAGE พบว่าโปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 38 และ 87 กิโลดัลตัน การตรวจพบนี้สามารถจำแนกแบคทีเรียไอซินิกในส่วนแยกเป็นแบคทีเรียไอซินิกคลาสที่ 3 ชนิดแสดงประจุลบ แบคทีเรียไอซินิกนี้ควรจะมีการแยกให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์ชนิดโปรตีนต่อไปในระดับโปรตีโอมิก

The logo of Chiang Mai University is a circular emblem. In the center is a stylized elephant facing left, with a decorative tusk-like element on its trunk. Above the elephant is a traditional Thai umbrella (parasol). The entire emblem is surrounded by a circular border containing the text 'CHIANG MAI UNIVERSITY 1964' in English and Thai script. There are also decorative floral motifs on the sides.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved