

**Thesis Title** Antibacterial and Spermicidal Activities, Protein Characteristics and Acute Dermal Irritation on Rabbit Skin of Bacteriocin Produced From *Lactobacillus*

**Author** Mr. Sarawuth Manonuek

**Degree** Master of Science (Microbiology)

**Thesis Advisory Committee**

Dr. Siriwoot Sookkhee Advisor

Asst. Prof. Dr. Chatchawann Apichartpiyakul Co - advisor

Asst. Prof. Choompone Sakonwasun, M.D. Co - advisor

**ABSTRACT**

The objectives of the present study were to discover and characterize the antimicrobial and spermicidal protein which produced by *Lactobacillus*. Among 1,065 *Lactobacillus* isolates, 69 isolates exhibited the antibacterial supernatants against the reference strains of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Neisseria gonorrhoeae* and clinical strains of *N. gonorrhoeae* and *Streptococcus agalactiae* but did not inhibit the reference strain of *Lactobacillus acidophilus*. Their crude proteins were selected to determine the antibacterial and spermicidal activities. According to the molecular weight 7, 14, 6 and 1 crude proteins of 1<sup>st</sup> (3 - 5), 2<sup>nd</sup> (5 - 10), 3<sup>rd</sup> (10 - 30) and 4<sup>th</sup> (> 30 kDa) fractions, they demonstrated

potent activities against 4 clinical strains of *N. gonorrhoeae*. Only 2, 6, 4 and 1 crude proteins possessed low MBC against *N. gonorrhoeae* CMU01 after tested by agar - dilution technique. They were the antibacterial crude proteins. Among 4 fractions of 69 antibacterial supernatants, 4, 8, 8 and 3 crude proteins of them demonstrated the faster sperm immobilization time and higher spermicidal activity than the activity of crude nisin, the positive control. These proteins could be called as the spermicidal proteins. Only B16F3, B84/7F1, B84/7F2 and B84/7F4 crude proteins possessed both antibacterial and spermicidal activities. They produced by *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus crispatus* for B16 and B84/7 according to the biochemical identification. B84/7F2 crude protein showed the fastest sperm immobilization time and highest spermicidal activity,  $34.90 \pm 9.15$  sec and  $83.67 \pm 1.33$  %, after determining among 24 and 6 volunteers, respectively. However, its sperm immobilization time was increased after mixed with the semen  $\geq 3$  ml. For the characterization of this protein, it was demonstrated that the antibacterial activity against *N. gonorrhoeae* ATCC 49226 and the spermicidal activity were inhibited at  $\text{pH} > 8$  or by protease enzymes. It was heat stable. Furthermore, its rapid inhibition time against *N. gonorrhoeae* ATCC 49226 was 15 min, respectively. Two protein bands at 7.08 and 8.81 kDa were detected on tricine SDS - PAGE gel after stained with silver. Partially purified protein of B84/7F2 was eluted by ion exchange column chromatography. This protein did not cause the acute dermal irritation. However, this protein and its mode of action should be additionally analyzed. These findings may be candidates for eventual apply as microbicidal and spermicidal agent.

## ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และฆ่าอสุจิ ลักษณะเฉพาะของ

โพรตีน และการระคายเคืองผิวหนังแบบเฉียบพลันบน

ผิวหนังกระต่ายของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อแลค

โตบาซิลลัส

## ผู้เขียน

นายศราวุฒิ มะโนนิก

## ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

## คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

อ.ดร. ศิริวุฒิ สุขจี

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

ผศ. ดร. ชัชวาลย์ อภิชาติปิยกุล

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ผศ. นพ. ชุมพล สกลวสันต์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

## บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหา และศึกษาคุณลักษณะของ โพรตีนผลิตโดยเชื้อแลคโตบาซิลลัส ที่แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และฤทธิ์ฆ่าอสุจิ ในจำนวนแลคโตบาซิลลัส 1,065 ไอโซเลท พบ 69 ไอโซเลท แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่อสายพันธุ์อ้างอิงของเชื้อ *Escherichia coli*,

*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* และ *Neisseria gonorrhoeae* และสายพันธุ์ก่อ

โรคของเชื้อ *N. gonorrhoeae* และ *Streptococcus agalactiae* แต่ไม่มีผลยับยั้งสายพันธุ์อ้างอิงของเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* สารสกัดโพรตีนของไอโซเลทดังกล่าวถูกคัดเลือกเพื่อศึกษาฤทธิ์

ต้านแบคทีเรีย และฆ่าอสุจิ สารสกัดโพรตีนจำนวน 7, 14, 6 และ 1 ชนิดของส่วนสกัดที่ 1 (3 - 5), 2

(5 - 10), 3 (10 - 30) และ 4 (> 30 กิโลดาลตัน) ตามลำดับ แสดงฤทธิ์ต่อเชื้อ *N. gonorrhoeae* สาย

พันธุ์ก่อโรค 4 สายพันธุ์ได้ดีพบสารสกัดโพรตีนเพียง 2, 6, 4 และ 1 ชนิดที่มีค่าความเข้มข้นที่น้อย

ที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อ *N. gonorrhoeae* CMU 01 ต่ำเมื่อทดสอบด้วยวิธีอะการ์ไดลูชัน เรียกโปรตีนเหล่านี้เป็นโปรตีนที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ในจำนวน 4 ส่วนสกัดของ 69 น้ำเพาะเลี้ยงที่แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียพบว่ามีการสกัดโปรตีนของส่วนสกัดอยู่ 4, 8, 8 และ 3 ชนิดที่แสดงเวลายับยั้งการเคลื่อนที่ของอสุจิได้เร็วกว่า และฤทธิ์ฆ่าอสุจิได้สูงกว่าฤทธิ์ของสารสกัดในจีนซึ่งเป็นตัวควบคุมผลบวก โปรตีนเหล่านี้เรียกได้ว่าเป็นโปรตีนที่มีฤทธิ์ต้านอสุจิ มีเพียงสารสกัดโปรตีน B16F3, B84/7F1, B84/7F2 และ B84/7F4 ที่แสดงทั้งฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และต้านอสุจิได้ดี สารสกัดเหล่านี้ผลิตได้จากเชื้อ *Lactobacillus rhamonosus* และ *Lactobacillus crispatus* ไอโซเลท B16 และ B84/7 ตามลำดับ ตามหลักการจำแนกทางชีวเคมี สารสกัดโปรตีน B84/7F2 แสดงเวลาในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของอสุจิได้เร็วที่สุด คือ  $34.90 \pm 9.15$  วินาที และยังแสดงฤทธิ์ฆ่าอสุจิสูงสุดร้อยละ  $83.67 \pm 1.33$  เมื่อศึกษาในอาสาสมัคร 24 ราย และ 6 ราย ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเวลาการยับยั้งการเคลื่อนที่ของอสุจิกลับเพิ่มขึ้นหลังผสมกับน้ำอสุจิมากกว่าหรือเท่ากับ 3 มิลลิลิตร เมื่อศึกษาคุณลักษณะของโปรตีนดังกล่าวพบว่าฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่อ *N. gonorrhoeae* ATCC 49226 และฤทธิ์ฆ่าอสุจิ ถูกยับยั้งได้ ณ ความเป็นกรด - ด่างสูงกว่า 8 หรือมีเอนไซม์ย่อยโปรตีน โปรตีนนี้ทนความร้อน นอกจากนี้เวลาเร็วที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *N. gonorrhoeae* ATCC 49226 คือ 15 นาที แถบโปรตีน 2 แถบ ขนาด 7.08 และ 8.81 กิโลดาลตันได้ถูกตรวจพบบนเจล tricine SDS - PAGE หลังข้อมลชีลเวอ์ โปรตีนกิ่งบริสุทธิ์ของ B84/7F2 ถูกชะออกได้ด้วยวิธีคอลัมน์ โครมาโตกราฟี ชนิดแลกเปลี่ยนประจุ โปรตีนนี้ไม่เป็นเหตุให้เกิดการระคายเคือง ฉีดยาบนผิวหนังกระต่าย อย่างไรก็ตามโปรตีน และกลไกการออกฤทธิ์ควรวิเคราะห์เพิ่มเติม การค้นพบครั้งนี้เป็นอีกแนวทางเพื่อประยุกต์ใช้เป็นสารฆ่าเชื้อและฆ่าอสุจิต่อไป