

ชื่อวิทยานิพนธ์	สารสังเคราะห์ชีวภาพเปปไทด์ที่ได้จาก <i>Lactobacillus paracasei</i> HL32 ในการควบคุมโรคปริทันต์ที่เกิดจาก <i>Porphyromonas gingivalis</i>
ผู้เขียน	นางสาวกนกพร ปางสมบูรณ์
สาขาวิชา	เภสัชศาสตร์
ปีการศึกษา	2550

### บทคัดย่อ

ในการศึกษานี้ได้จำแนกผลทางชีวภาพและเคมีกายภาพของแบคทีเรียไอซอินที่แยกได้จากเชื้อ *Lactobacillus paracasei* HL32 แบคทีเรียไอซอินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มีฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคปริทันต์แกรมลบชนิดแท่ง *Porphyromonas gingivalis* โดยการทำลายเยื่อหุ้มผนังเซลล์แบคทีเรียชนิดดังกล่าวทำให้เกิดการรั่วของโปแตสเซียม ทำให้เชื้อแบคทีเรียตายภายในสองชั่วโมงที่ค่าความเข้มข้นที่ออกฤทธิ์ฆ่า 0.14 มิลลิโมลาร์ การศึกษาด้านเคมีกายภาพพบว่าแบคทีเรียไอซอินทนต่อความร้อนได้ดี สามารถออกฤทธิ์ได้ในค่าพีเอชที่แตกต่างกัน การเก็บรักษาไว้ในที่เย็นจะมีความเสถียรมากกว่าที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิร่างกายมนุษย์ แบคทีเรียไอซอินจะหมดฤทธิ์เมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีเอส ฤทธิ์สูญเสียไปบางส่วนเมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส แต่ไม่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ไลเปส การระบุชนิดของโปรตีนทำโดยตัดแบนด์ที่แยกได้จาก SDS-PAGE นำไปย่อยให้เป็นสายสั้นๆ ด้วยเอนไซม์ทริปซิน จากนั้นนำไปวิเคราะห์มวลโมเลกุลด้วยเทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry ตามด้วยการหาลำดับกรดอะมิโนจากมวลโมเลกุลดังกล่าว จากการสืบค้นพบว่าลำดับกรดอะมิโนของแบคทีเรียไอซอินไม่ตรงกับข้อมูลที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูลลำดับโปรตีน การศึกษาฤทธิ์ทางชีววิทยาของแบคทีเรียไอซอินที่สัมผัสน้ำลายหรือน้ำเหลืองเหลืองที่แยกได้จากอาสาสมัครปกติจำนวน 15 คน และอาสาสมัครที่เป็นโรคปริทันต์จำนวน 12 คน พบว่าอาร์จินีนและไลซีน มีความสำคัญในการออกฤทธิ์และสารคัดหลั่งดังกล่าวมีผลลดฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ โดยสรุป แบคทีเรียไอซอินที่แยกได้จากเชื้อ *L. paracasei* HL32 ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *P. gingivalis* โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดรู และเกิดการขับโปแตสเซียมที่ค่าความเข้มข้นที่ออกฤทธิ์ฆ่า และมีผลทำให้เกิดการแตกของเมมเบรนแดงที่ค่าความเข้มข้นสูงกว่าค่าความเข้มข้นที่ออกฤทธิ์ฆ่า ดังนั้นแบคทีเรียไอซอินอาจสามารถนำไปประยุกต์ใช้เฉพาะที่ในโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *P. gingivalis*

<b>Thesis title</b>	Biosynthetic peptide from <i>Lactobacillus paracasei</i> HL32 on <i>Porphyromonas gingivalis</i> control in periodontal diseases
<b>Author</b>	Miss Kanokporn Pangsomboon
<b>Major Program</b>	Pharmaceutical Sciences
<b>Academic year</b>	2007

### ABSTRACT

A biological and physicochemical characterisation of a bacteriocin isolated from *Lactobacillus paracasei* HL 32 were described. The bacteriocin was purified and a protein of approximately 56 kDa was found to exhibit inhibitory activity against the periodontal Gram-negative pathogen *Porphyromonas gingivalis*, by disrupting membrane structure leading to leakage of cellular K<sup>+</sup>. It caused cell death within 2 h at a minimum bactericidal concentration (MBC) of 0.14 mM. The bacteriocin was also found to exert haemolytic activity. Physicochemical studies revealed that the bacteriocin activity against *P. gingivalis* was heat-stable, possessed activity in a wide range of pH, although the stability was greater at 4 °C than 25 and 37 °C, and that it was completely destroyed by proteases, partially destroyed by amyloglucosidase but not by lipase. Bacteriocin characterization was performed by SDS-PAGE, followed by protein digestion with trypsin, MALDI-TOF mass spectrometry and subsequent database searches using peptide mass fingerprint. Nevertheless the purified band of bacteriocin which composed of 156 amino acid residues is still to be characterized as not enough information about bacteria is found existing protein sequence databases. The biological activity of the bacteriocin was determined in saliva and crevicular fluid collected from 12 periodontal patients and 15 healthy volunteers. The presence of cationic charge from Lys and Arg was essential to biological activity and reduction of activity was found to occur in biological fluid. In conclusion, the bacteriocin from *L. paracasei* HL32 had the ability to kill *P. gingivalis* by inducing pore formation and potassium efflux at the MBC, although the hemolytic activity was shown at higher concentration than the MBC, suggesting that it could be a promising topical chemotherapeutic agent for *P. gingivalis* infections.