ชื่อวิทยานิพนธ์ การพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและทำบริสุทธิ์แบคเทอริโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* SN 11

ผู้เขียน นางสาวลัญจกร จันทร์อุดม

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2548

บทคัดย่อ

ในการศึกษาการใช้น้ำมะพร้าวและน้ำนึ่งปลาทูน่าเป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตแบคเทอริโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* SN11 พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ในอาหารทุกสูตร แต่เจริญได้ดีที่สุดในอาหารสำเร็จ MRS โดยให้กิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* เป็น 20 AU/ml ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 16 ถึง 24 ซึ่งเป็นช่วง late log phase ถึงระยะ early stationary phase ในขณะที่สูตรอาหารดัดแปลง Coco 1 (สัดส่วนน้ำมะพร้าว : น้ำนึ่งปลาเป็น 1 : 1) ให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งเป็น 20 AU/ml ในชั่วโมงที่ 20 และสูตรอาหารดัดแปลง Coco 2 (1 : 2), Coco 3 (1 : 3) และ Coco 4 (1 : 4) มีกิจกรรมการยับยั้งเป็น 10 AU/ml ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 16 ตลอดจนสิ้นสุดการทดลอง และพบกิจกรรมการยับยั้งเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อยในสูตรอาหาร Tuna 2 (สัดส่วนน้ำนึ่งปลาทูน่า : น้ำมะพร้าว เป็น 2 : 1) และ Tuna 3 (3 : 1) และไม่พบกิจกรรมการยับยั้งใดๆ ในสูตรอาหาร Medium I (สัดส่วนน้ำนึ่งปลาทูน่า : น้ำกลั่นเป็น 1 : 1 และมีการเติมน้ำตาลซูโครสร้อยละ 1) และ Tuna 4 (4 : 1)

ในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์แบคเทอริโอซินสามารถทำได้โดยใช้ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ 4 ขั้นตอน คือ การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต gel-filtration chromatography, cation-exchange chromatography และ reverse phase-high performance liquid chromatography โดยแบคเทอริโอซินที่ได้มีกิจกรรมการยับยั้งเป็น 100 AU/ml และมีค่ากิจกรรมการยับยั้งจำเพาะเพิ่มขึ้นเป็น 300 เท่า แต่เมื่อสิ้นสุดขั้นตอนการทำบริสุทธิ์แล้วปริมาณผลิตผลที่ได้เหลือเพียงร้อยละ 0.25 จึงมีการนำเอา Amberlite XAD-4 มาใช้เป็นตัวดูดซับแบคเทอริโอซินในน้ำหมักเพื่อลดการสูญเสีย

และลดขั้นตอนในการทำบริสุทธิ์ จากการทดลองทำให้ได้แบคเทอริโอซินบริสุทธิ์ที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งเป็น 320 AU/ml มีค่ากิจกรรมการยับยั้งเพิ่มขึ้น 60 เท่า และเมื่อสิ้นสุดขั้นตอนการทำบริสุทธิ์มีปริมาณผลิตผลเกิดขึ้นร้อยละ 8 ซึ่งยังเป็นปริมาณที่ต่ำ จึงปรับปรุงวิธีการทำบริสุทธิ์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและปริมาณผลิตผลโดยใช้ Amberlite XAD-4 เป็นตัวดูดซับ gel chromatography และ RP-FPLC จากการทำบริสุทธิ์พบว่าแบคเทอริโอซินมีกิจกรรมการยับยั้งเป็น 640 AU/ml มีค่ากิจกรรมการยับยั้งเพิ่มขึ้น 60 เท่า และเมื่อมีปริมาณผลิตผลเพิ่มขึ้นร้อยละ 32 โดยแบคเทอริโอซินที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3,975 ดาลตัน จากการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี Sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 3,454 ดาลตัน จากการวิเคราะห์โดยวิธี Electrospray mass spectrometry (EMS)

จากการศึกษาคุณสมบัติบางประการของแบคเทอริโอซินบริสุทธิ์จากเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN11 พบว่าการเตรียมแบคเทอริโอซินที่ความเข้มข้น 0.8 mg/ml และ 1.0 mg/ml สามารถลดปริมาณเชื้อ *S. aureus* ลงได้ 2 log CFU/ml และสามารถลดปริมาณเชื้อ *Escherichia coli* และ *Streptococcus lactis* ลงได้ 1 log CFU/ml และไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ได้ แบคเทอริโอซินถูกทำลายได้โดยเอนไซม์ Trypsin, α-Chrymotrypsin และ Proteinase K และเมื่อทดสอบความคงตัวของแบคเทอริโอซินต่ออุณหภูมิพบว่าแบคเทอริโอซินทนความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ได้โดยยังคงมีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *S. aureus, E. coli* และ *Strep. lactis* และยังสามารถทนพีเอชได้ในช่วงกว้าง (pH 2 – 8)

Thesis Tittle	Development of Medium for Cultivation and Purification of Bacteriocin from *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* SN 11
Author	Miss Lunchakorn Junudom
Major Program	Biotechnology
Academic Year	2005

Abstract

The coconut water and tuna condensate were used to produce bacteriocin from *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* SN 11 by comparing with commercial medium, MRS. Bacteriocin activity was determined by using *Straphylococcus aureus* as indicator. When *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN 11 was grown in MRS medium the highest bacteriocin was observed at 18-24 hour with inhibitory activity of 20 AU/ml. While growing in modified media Coco1 (tuna condensate : coconut water = 1 : 1) the organism had inhibitory activity of bacteriocin as 20 AU/ml at 20 hour. In modified media Coco2 (1 : 2), Coco3 (1 : 3), and Coco4 (1 : 4) had inhibitory activity of bacteriocin as 10 AU/ml at 16 hour. The bacteriocin activity was also found when *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN 11 grown in Tuna2 (tuna condensate : coconut water = 2 : 1) and Tuna3 (3 : 1) but no activity was observed in Medium I (tuna condensate : distilled water = 1 : 1 and 1% sucrose) and Tuna4 (4 : 1).

The bacteriocin from the supernatant of *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN 11 cultured in MRS medium was purified in four stages : ammonium sulfate precipitation, gel-filtration chromatography, cation-exchange chromatography and reverse phase high performance liquid chromatography technique. The purification resulted in approximately 300-folds increase in the specific activity. However, the yield of the purified bacteriocin was only 0.25 % of the original. Therefore, amberlite XAD-4 was applied to the supernatant to reduce the working time and protect the yield. It was

found that the purified bacteriocin had inhibitory activity as 320 AU/ml, and had higher specific activity as 60-folds and 8 % yield. However, the low yield of purified bacteriocin was occurred then improving of techniques were used. Amberlite XAD-4 gel-filtration chromatography and RP-FPLC were applied to purify method. The purified bacteriocin had inhibitory activity as 640 AU/ml 60-folds in specific activity and 32 % yield. In addition, the molecular weight of this bacteriocin was 3,975 and 3,454 Da. detected with sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and electrospray mass spectrometry (EMS), respectively.

Purified bacteriocin of *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN 11 at concentration 0.8 mg/ml and 1.0 mg/ml could reduce population of *S. aureus* *Escherichia coli* and *Streptococcus lactis* for 2 and 1 log CFU/ml, respectively but did not show inhibitiory effect on *Listeria monocytogenes.* In addition, the bacteriocin was destroyed by trypsin, α - chrymotrypsin and proteinase K. This bacteriocin was stable to heat at 121 ^{o}C for 15 min and at pH 2-8.