

1. ชื่อโครงการวิจัย

การผลิตสารชีวสังเคราะห์จาก *Lactobacillus paracasei* HL32 เพื่อควบคุมเชื้อก่อโรคปริทันต์
(The production of biosynthetic substances from *Lactobacillus paracasei* HL32 for bacterial control in periodontal diseases)

2. หน่วยงานหลักที่รับผิดชอบงานวิจัย

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา 90112

3. คณะผู้วิจัย บทบาทของนักวิจัยแต่ละคนในการทำวิจัย และสัดส่วนที่ทำการวิจัย (%)

รศ.ดร. ชีระพล ศรีชนะ (สัดส่วนที่ทำการวิจัยคิดเป็น 70%)

การแยกและการทำให้สารที่ได้จากชีวสังเคราะห์บริสุทธิ์
วิเคราะห์โครงสร้างของเปปไทด์และการพิสูจน์เอกลักษณ์
การตัดสายโปรตีนเพื่อวิเคราะห์การออกฤทธิ์
การวิเคราะห์เชิงปริมาณ

ดร. เสน่ห์ แก้วพรัตน์ (สัดส่วนที่ทำการวิจัยคิดเป็น 30%)

การเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสาร bacteriocin

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

4. ประเภทของการวิจัย

การวิจัยพื้นฐาน

5. สาขาวิชาการและกลุ่มวิชาที่ทำการวิจัย

วิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช

6. คำสำคัญ (keywords) ของโครงการวิจัย

เปปไทด์ *lactobacillus*, periodontal diseases

7. ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรคปริทันต์ (periodontal diseases) นับเป็นปัญหาหลักด้านสุขภาพช่องปากและยิ่งทวีความสำคัญมากขึ้นเมื่อพบว่าเป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญในการก่อโรคหลอดเลือดและหัวใจ (Southard and Godowski, 1998) ซึ่งมีสาเหตุหลักมาจากการติดเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคปริทันต์ เชื้อแบคทีเรียและเยื่อหุ้มเซลล์ด้านนอกสามารถแทรกผ่านเยื่อบุผิวบริเวณร่องเหงือกไปยังหลอดเลือดดำ (Dorn et al., 2000) ทำให้เกิด atheroma อันเป็นจุดเริ่มต้นของการเกิดโรคหลอดเลือดและหัวใจ (Sharma et al., 2000; Kang and Kuramitsu, 2002; Qi et al., 2003) โรคปริทันต์มีอาการเริ่มจากการอักเสบของเหงือกและลูกกลมทำให้เกิดการสูญเสียหรือการทำลายอวัยวะปริทันต์ (Kinane, 2001) ได้แก่ เอ็นยึดปริทันต์ (periodontal ligament) เหงือก (gingiva) เคลือบรากฟัน (cementum) และกระดูกเบ้าฟัน (alveolar bone) อันเป็นที่รู้จักในนามของโรคปริทันต์อักเสบ เอ็นยึดปริทันต์เป็นเนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่ยึดระหว่างเคลือบรากฟันและกระดูกเบ้าฟัน เมื่อมีการสูญเสียหรือทำลายเอ็นยึดปริทันต์จะเกิดร่องลึกปริทันต์ขึ้น โดยส่วนใหญ่โรค ปริทันต์อักเสบจะพบตั้งแต่อายุ 30 ปีเป็นต้นไป พบการระบาดได้ทั่วโลก (Southard and Godowski, 1998; Bhatti et al., 2001) จัดเป็นสาเหตุอันดับสองต่อการสูญเสียฟันในประชากรทั่วไปและอันดับหนึ่งในประชากรอายุ 50 ปีขึ้นไป โดยจำนวนฟันที่ถูกถอนจากโรคปริทันต์อักเสบจะเพิ่มขึ้นตามอายุ (Hull et al., 1997) การเข้ารับการรักษาซ้ำทำให้โรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังทวี

ความรุนแรงขึ้น โดยเฉพาะในประเทศไทยพบรายงานถึง 28.7% (Jainkittivong and Premisirinirund, 2001) ในขณะที่การบำบัดรักษาโรคปริทันต์อักเสบแบบรุนแรงจำเป็นต้องใช้ยาต้านจุลชีพพร้อมกับการขูดหินปูนและเกลารากฟัน โดยยาที่นิยมใช้ในการรักษาได้แก่ เมโทรนิดาโซล และเตตราซัยคลิน (Southard and Godowski, 1998) อย่างไรก็ตามในปัจจุบันนี้การดื้อยาในกลุ่มเตตราซัยคลินมีรายงานเพิ่มมากขึ้นตามลำดับและการใช้ยาเตตราซัยคลินที่มีการออกฤทธิ์กว้างเป็นเวลานานทำให้เกิดการติดเชื้อจากเชื้อรากลุ่มแคนดิดา (Edward, 2001) การใช้เมโทรนิดาโซลสำหรับรักษาโรคปริทันต์กลับทำให้เชื้อก่อฟันผุ *Streptococcus mutans* เจริญเติบโต (Loesche et al., 1991) ขณะที่มีการพัฒนาต้านจุลชีพเพิ่มขึ้นเพื่อต่อต้านการดื้อยา ทำให้ค่าใช้จ่ายที่ใช้ในการรักษาเพิ่มสูงขึ้น ดังนั้นเพื่อเป็นการลดงบประมาณที่ต้องใช้จ่ายเพื่อการรักษาโรคปริทันต์อักเสบแบบเรื้อรังและการใส่ฟันทดแทน การค้นคว้าหาสารใหม่ที่ออกฤทธิ์เป็นสารต้านจุลชีพและพัฒนาผลิตภัณฑ์ขึ้นเองในประเทศ จึงเป็นสิ่งที่ทำนายและเกิดประโยชน์ในวงกว้าง สารกลุ่มหนึ่งที่สนใจมากคือ สารต้านจุลชีพเปปไทด์ ที่สร้างขึ้นจากแบคทีเรียซึ่งเรียกว่า แบคเทอริโอซิน แบคทีเรียในร่างกายมนุษย์สร้าง และหลั่งแบคเทอริโอซินออกนอกเซลล์เพื่อต้านการเจริญเติบโตของจุลชีพที่อาศัยอยู่ร่วมกัน (Huttunen, 1987; Kaewnopparat, 1999) โครงสร้างเปปไทด์จากกรดอะมิโนชนิด D ทำให้ต้านการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ด้วยเอนไซม์ เนื่องจากแบคทีเรียดังกล่าวได้ถูกคัดเลือกตามธรรมชาติทำให้แบคเทอริโอซินไม่ก่อให้เกิดการแพ้และการดื้อของจุลชีพ (Boman, 1991; Ryadnov et al., 2002; Zasloff, 2002) อย่างไรก็ตามในการพัฒนาแบคเทอริโอซินเป็นยาต้านจุลชีพในการรักษาโรคปริทันต์ สารนั้นควรจะจำเพาะจงต่อการฆ่าเชื้อที่ก่อโรคปริทันต์ ปลอดภัยต่อเชื้อประจำถิ่น สามารถออกฤทธิ์ได้ในร่องลึกปริทันต์ และนักวิจัยต้องเข้าใจในกลไกการทำลายเชื้อและการออกแบบโมเลกุลให้มีความเป็นพิษต่อเม็ดเลือดแดงหรือเซลล์ที่เกี่ยวข้องในร่างกายต่ำ

8. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1) สร้างนวัตกรรมในการค้นพบสารต้านจุลชีพกลุ่มเปปไทด์ ที่ออกฤทธิ์เฉพาะเจาะจงเชื้อก่อโรคปริทันต์
- 2) เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังชนิดรุนแรง
- 3) สามารถทราบถึงกลไกการฆ่าเชื้อของสารเปปไทด์หรือโปรตีน

9. ขอบเขตของโครงการวิจัย

- 1) เลือกแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์มาทดสอบสี่ชนิด คือ *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277 และ ATCC 53798) *Prevotella Intermedia* (ATCC 25611) และ *Bacteroides forsythus* (ATCC 43037)
- 2) ทดสอบกับเชื้อประจำถิ่นในช่องปาก 2 ชนิด คือ *Streptococcus salivarius* (ATCC 25975) และ *Streptococcus sanguis* (ATCC 10556)
- 3) ทำการตัด glycogen ออกจาก glycoprotein bacteriocin ซึ่งผลิตจากเชื้อ *Lactobacillus paracasei* ก่อนนำมาวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนในสายเปปไทด์
- 4) ศึกษาการทำลายผนังเซลล์โดยใช้เทคนิคทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนและการนำไฟฟ้า
- 5) ทดสอบความเป็นพิษของสารเปปไทด์โดยใช้เม็ดเลือดแดง และเซลล์เนื้อเยื่อเอ็นไนด์ปริทันต์และเนื้อเยื่อเหงือก

10. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

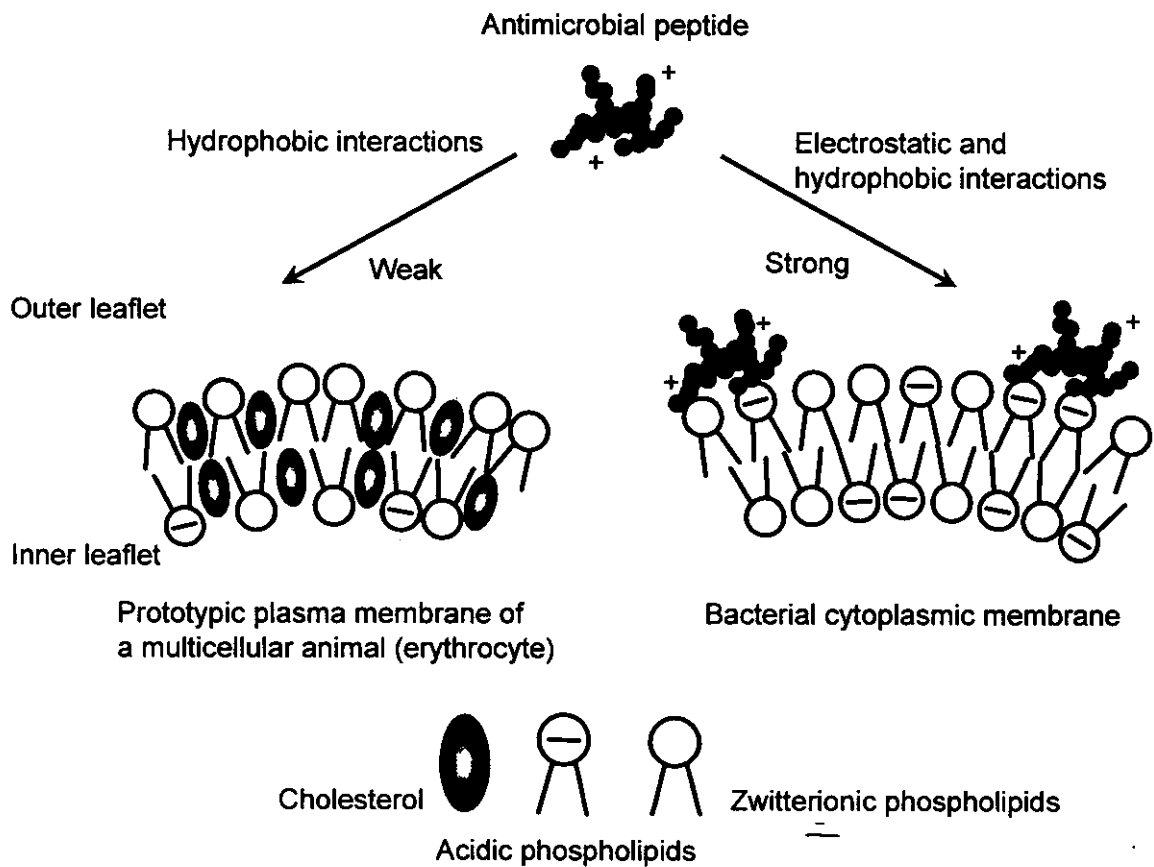
- 1) ได้สารต้านจุลชีพเปปไทด์ชนิดใหม่
- 2) ทราบกลไกในการออกฤทธิ์ และองค์ประกอบสำคัญที่ทำให้เปปไทด์มีฤทธิ์เพื่อใช้ในการออกแบบยา
- 3) สร้างแนวทางการผลิตยาโดยอาศัยชีวสังเคราะห์จากแบคทีเรีย

11. การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

การค้นพบสารต้านจุลชีพในรอบ 20 ปี ที่ผ่านมามีทำให้ทราบถึงการปกป้องร่างกายที่เกิดโดยธรรมชาติ เพื่อให้สิ่งมีชีวิตอยู่ร่วมกับจุลชีพได้ สัตว์หลายชนิดอยู่ร่วมกับจุลชีพได้โดยอาศัยสารต้านจุลชีพเปปไทด์ เพื่อป้องกันตนเองโดยไม่ต้องอาศัยเม็ดเลือดขาวหรือแอนติบอดี ยาด้านจุลชีพเปปไทด์เป็นเครื่องมือที่มีโดยธรรมชาติทั้งในอาณาจักรพืชและสัตว์รวมถึงแบคทีเรียและเชื้อรา เปปไทด์ต้านจุลชีพเกิดจากวิวัฒนาการที่ซับซ้อนของสิ่งมีชีวิต การจัดประเภทของเปปไทด์ที่สร้างจากสิ่งมีชีวิตแบ่งตามความสามารถของโมเลกุลในการจัดเรียงตัวหรือปรับรูปร่างให้กลุ่มที่ไม่ชอบน้ำและกลุ่มที่ชอบน้ำแทรกเข้าสู่เซลล์เพื่อทำลายเชื้อจุลชีพ (Zaslouf, 2002)

มีรายงานการทดลองทางคลินิกของ magainin analogue ซึ่งเป็นเปปไทด์เพื่อทดสอบการติดของเชื้อแบคทีเรีย พบว่าแบคทีเรียที่ไม่ชอบออกซิเจนกรัมลบจะไวต่อการถูกทำลายผนังเซลล์ด้านนอก เนื่องจากผนังภายนอกเป็น lipopolysaccharide ซึ่งอยู่ร่วมกับ magnesium และ calcium ion และเชื่อมต่อกับประจุลบของน้ำตาล การเติมเปปไทด์ประจุบวกลงไปจะทำให้เกิดการทดแทนไอออนทำให้เสริมการเคลื่อนที่ของสารจากภายนอกเข้าสู่เซลล์ (Bechinger et al., 1993) การไม่ติดของสารเปปไทด์เนื่องจากเป้าหมายที่ทำให้เกิดความเสียหายอยู่ที่เมมเบรนของแบคทีเรีย ดังนั้นเมมเบรนจะปรับให้ทนทานได้ต้องมีการปรับองค์ประกอบหรือการจัดเรียงตัวใหม่ของไขมัน ซึ่งเป็นไปได้ยาก การทำลายสารต้านจุลชีพเปปไทด์ก็ทำได้ยาก เนื่องจากสายเปปไทด์ประกอบด้วยกรดอะมิโนหลายชนิดที่ออกฤทธิ์ได้

การออกฤทธิ์ของเปปไทด์จะจำเพาะเจาะจงต่อเมมเบรนของแบคทีเรีย ซึ่งมีประจุลบจากกลุ่มฟอสเฟตของไขมัน ขณะที่ผนังเมมเบรนของสัตว์และพืชจะไม่มีประจุ (Matsuzaki, 1999) ดังนั้นในการอธิบายฤทธิ์ของสารต้านจุลชีพเปปไทด์มีดังนี้ เปปไทด์จะเข้าไปแทนที่ไขมันและรบกวนโครงสร้างของเมมเบรน (รูปที่ 1) บางกรณีการเข้าไปของเปปไทด์จะไปรวมกับคอเลสเตอรอลในเซลล์เป้าหมายทำให้ลดฤทธิ์ของสารได้ เปปไทด์โดยมากจะทำงานที่ความเข้มข้นต่ำและมีสภาวะที่เหมาะสม เช่น ค่า ionic strength กลไกในการฆ่าเชื้อมีหลายสมมุติฐาน เช่น การเกิด fatal depolarization ของเซลล์เมมเบรนแบคทีเรียทำให้เกิดรูบนผนังเซลล์ ทำให้สารที่อยู่ภายในเซลล์รั่วไหลออกมา การกระตุ้นจะเริ่มจากการเหนี่ยวนำให้ hydrolase ทำลายผนังเซลล์พร้อมกับรบกวนการกระจายของไขมันใน lipid bilayer การทำลาย intracellular target หลังการเกิด internalization ของเปปไทด์ (Krakol et al., 2001)



รูปที่ 1 ผลของสารต้านจุลชีพเปปไทด์ต่อผนังเมมเบรนของเม็ดเลือดแดงและผนังเมมเบรนของแบคทีเรีย

Amphipathic α -helix เป็นโครงสร้างพื้นฐานที่จำเป็นของเปปไทด์ที่มีฤทธิ์หลายชนิด ส่วนหลักของเกลียวจะจับบนผนังเมมเบรนที่เป็น recognition site อันตรกริยาของเปปไทด์กับเมมเบรนมากหรือน้อยขึ้นกับพื้นผิวสัมผัสและประจุ สารต้านจุลชีพเปปไทด์จะมีส่วนมีขั้วและไม่มีขั้วใกล้เคียงกันและให้ประจุบวกขณะเป็นกลาง (Saberwal and Nagaraj, 1994) การศึกษาวิจัยบางรายงานพบว่าลำดับของกรดอะมิโนไม่ใช่ปัจจัยสำคัญที่เป็นตัวบ่งบอกฤทธิ์ทางชีวภาพ หลายกรณีที่กรดอะมิโนในธรรมชาติถูกแทนที่แล้วสามารถเพิ่มฤทธิ์ต้านจุลชีพ (Malog and Kari, 1995) แต่ขณะเดียวกันความเป็นพิษต่อเซลล์ก็มักเพิ่มขึ้นด้วย

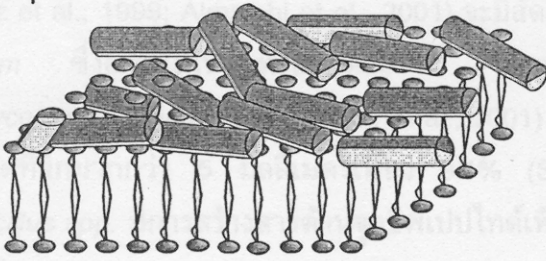
กลไกการออกฤทธิ์ของยาด้านจุลชีพเปปไทด์ (Shai and Oren, 2001) แบ่งออกได้ 2 แบบ (รูปที่ 2) คือ

1. Barrel stave model โดยเกิด transmembrane channel และ pore formation
2. Carpet model เกิด membrane permeation และต่อด้วย disruption

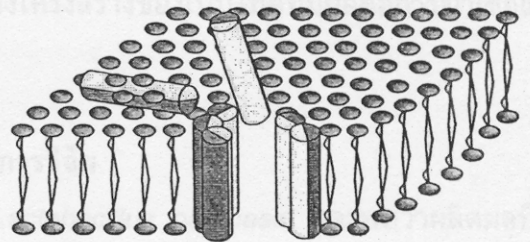
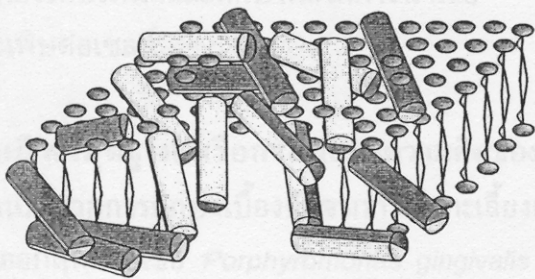
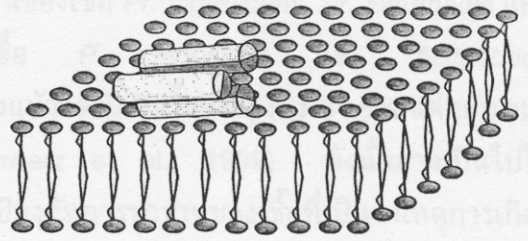
โมเลกุลหลายชนิดได้ถูกพัฒนาเป็นยารักษาโรค ซึ่งผ่านการทดลองระดับห้องปฏิบัติการและทางคลินิกมาแล้วและสรุปว่าโอกาสการดื้อยาเปปไทด์มีน้อยเมื่อเทียบกับยาปฏิชีวนะกลุ่มอื่น ปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะกระตุ้นความสนใจในการพัฒนาสารกลุ่มเปปไทด์เป็นยา ปัจจุบันบริษัทยาได้พัฒนาเป็นยาใช้ภายนอก เช่น magainin analogue เนื่องจากการใช้ภายนอกค่อนข้างปลอดภัย อีกเหตุผลมาจากการไม่มีข้อมูล long term

toxicity ของยาที่ให้ทางระบบเลือด นอกจากนี้ยังมีข้อด้อยเรื่องการทำเปปไทด์ทำให้เกิดพิษได้ง่าย (Darveau et al., 1991) จึงไม่เป็นที่ยอมรับเรื่องความปลอดภัย

“Carpet”



“barrel-stave”



รูปที่ 2 โมเดลแสดงการเกิด membrane permeation ด้านซ้ายแบบ “carpet” เปปไทด์จะปกคลุมโดยหันด้านไม่มีขั้วเกาะกับเมมเบรน เมื่อมีปริมาณสูงพอทำให้เกิด membrane disintegration (ซ้ายล่าง) ด้านขวาแบบ “barrel-stave” เปปไทด์เกิดการแทรกเข้าไปในเมมเบรนส่วนไขมันเกิดเป็นรูหรือช่อง

ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้าง และการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลชีพเปปไทด์มีผู้ทำการศึกษารวบรวมไว้ อย่างเป็นระบบ (Powers and Hancock, 2003) พบว่าการแทนที่ตำแหน่ง L-amino acid ด้วย D-amino acid พบว่าจะเพิ่มฤทธิ์การเป็นสารต้านจุลชีพและทนต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ เนื่องจากสารต้านจุลชีพ มักเป็นพิษต่อเม็ดเลือดแดง ในการทดลองใหม่ ๆ ได้พยายามค้นหาสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพจากเปปไทด์ชนิด diastereomeric peptide ซึ่งคาดว่าจะไม่มีผลต่อการแตกของเซลล์ภายในร่างกาย

เชื้อกลุ่มหนึ่งที่สามารถสร้างสารต้านจุลชีพเปปไทด์ได้ คือ แลคโตบาซิลลัส (*Lactobacillus*) แบคทีเรียกลุ่มนี้ มีคุณสมบัติสามารถเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดแลคติกในกระบวนการหมัก มีการนำแลคโตบาซิลลัสไปใช้ประโยชน์ ด้านอาหารและสุขภาพ เช่น สารกันเสียตามธรรมชาติในไส้กรอกอีสานและอาหารหมัก (Charernjitrakul and Sukboon, 1998; Charernjitrakul, 2000) สารต้านจุลชีพ อาหารเสริมเพื่อสุขภาพ (Huttunen et al., 1987) พาหนะสำหรับการให้วัคซีนทางปาก (Reveneau et al., 2002) จึงนับว่าเป็นเชื้อที่มีความปลอดภัยสูง ไม่ก่ออันตรายต่อผู้ใช้ *Lactobacillus paracasei* HL32 เป็นสมาชิกของแลคโตบาซิลลัสที่แยกได้จากอุจจาระ ของอาสาสมัครสุขภาพดี สามารถผลิตสารต่างๆ ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา (Kaewnopparat,

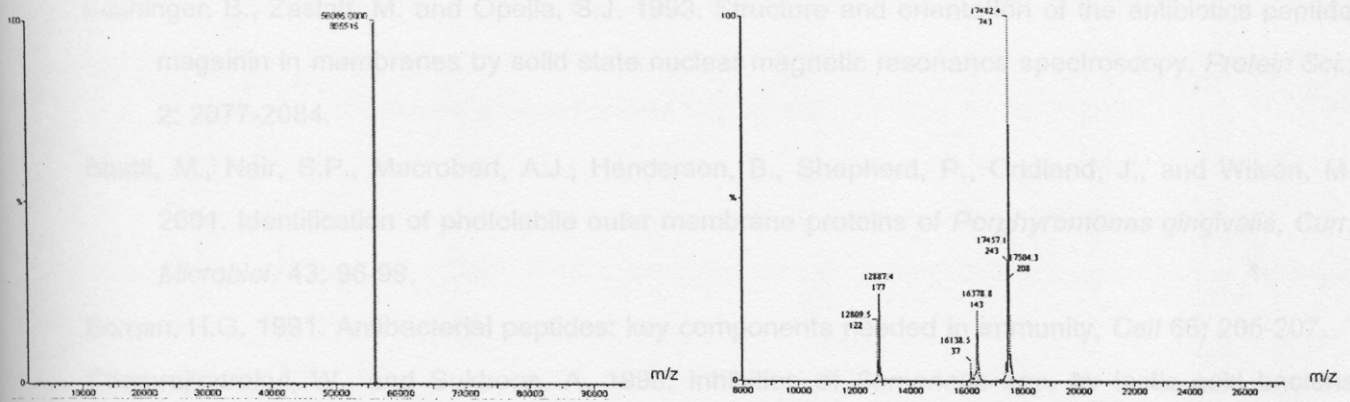
1999) ได้แก่ กรดแลกติก กรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 12 kDa อย่างไรก็ตามยังมีข้อมูลน้อยมากเกี่ยวกับสารต้านจุลชีพที่ *L. paracasei* HL 32 สร้างขึ้น ขณะที่ข้อมูลจากงานวิจัยในผู้ป่วยที่มีจำนวน *Lactobacillus spp.* บริเวณควาบบจุลินทรีย์เหนือเหงือกเพิ่มขึ้น (Schwarz et al., 1999; Almstahl et al., 2001) จะมีสัดส่วนของเชื้อ *Pr. nigrescens*, *Pr. intermedia* และ *F. nucleatum* ซึ่งอาศัยในร่องเหงือกลดลง ไม่พบเชื้อ *P. gingivalis* และ *Actinobacillus actinomycetemcomitans* เลย (Almstahl et al., 2001) ถึงแม้ว่าจะมีหินน้ำลายสูงถึง 84.8% แต่กลับพบร่องลึกปริทันต์ที่ลึกมากกว่า 5 มิลลิเมตรเพียง 9.1% (Schwarz et al., 1999) ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า *Lactobacillus spp.* มีการสร้างสารต้านจุลชีพเปปไทด์เพื่อป้องกันการรุกรานของเชื้อที่เป็นสาเหตุการเกิดโรคปริทันต์อักเสบ

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยจะงศึกษาผลของสารชีวสังเคราะห์ที่ได้จาก *L. paracasei* HL 32 ในการต้านเชื้อก่อโรคปริทันต์และศึกษากลไกการฆ่าเชื้อ รวมถึงโครงสร้างของเปปไทด์ที่มีผลต่อการฆ่าเชื้อและความเป็นพิษต่อเซลล์

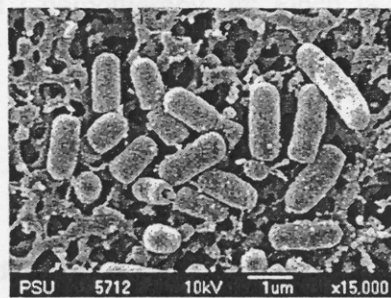
12. ทฤษฎี สมมุติฐาน หรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

สมมุติฐานมาจากการศึกษาเบื้องต้นจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus paracasei* และพบว่าผลิตผลที่ได้สามารถออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) ได้ เมื่อทำให้ผลิตผลบริสุทธิ์มากขึ้นพบว่าสามารถระบุได้ว่าสารดังกล่าวที่ออกฤทธิ์มีน้ำหนักโมเลกุล 56 kDa (รูปที่ 3 ด้านซ้าย) และเป็นโปรตีนเมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ต่อพบว่ามีส่วนของโมเลกุลเป็นน้ำตาลเมื่อย่อยน้ำตาลออกจากสายโมเลกุลพบว่ามีส่วนเปปไทด์ประกอบด้วยกรดอะมิโนดังนี้ กรดแอสพาทิก (2.7%, 13 ตัว) ซีรีน(1.55%, 10 ตัว) กรดกลูตามิก (4.54%, 20 ตัว) ไกลซีน (5.43%, 53 ตัว) ฮิสติดีน (1.0%, 4 ตัว) อาร์จินีน (2.37%, 9 ตัว) ตรีโอนิน (1.3%, 7 ตัว) อะลานีน (2.19%, 17ตัว) โพรลีน (4.08%, 24 ตัว) ไทโรซีน (0.19%, 1 ตัว) วาลีน (1.46%, 8 ตัว) ไลซีน (2.09%, 9 ตัว) ไอโซลูซีน (1.26%, 6 ตัว) ลูซีน (1.29%, 6 ตัว) ฟีนิลอะลานีน (0.55%, 2 ตัว) และ เมทไทโอนีน (0.36%, 2 ตัว) จากการวิเคราะห์จะเห็นได้ว่ามีกรดอะมิโนหลายตัวที่ส่งเสริมการออกฤทธิ์ฆ่าจุลชีพและคุณสมบัติ amphipathic ที่พอเหมาะ ดังนั้นจึงทำการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน 15 ตัวแรกจาก N-terminal ผลปรากฏดังนี้ อะลานีน-กลูตามิก-กลูตามิก-ตรีโอนิน-ลูซีน-เมทไทโอนีน-ตรีโอนิน-กลูตามิก-ไทโรซีน-ตรีโอนิน-อะลานีน-อาร์จินีน-ไลซีน-อาร์จินีน-กลูตามิก ทำให้มีแนวคิดที่จะทำการศึกษากลไกการฆ่าเชื้อซึ่งได้ผลเบื้องต้นและสังเกตการเกิดเป็นรูรั่วที่ผนังของเซลล์แบคทีเรีย (รูปที่ 4) แต่การนำสารใดไปใช้ประโยชน์และสามารถจดสิทธิบัตรได้ต้องมีข้อมูลประโยชน์และโทษอย่างแท้จริง จึงได้กำหนดการขออนุญาตงบประมาณเพื่อทดสอบเชื้อก่อโรคปริทันต์อีก 3 ชนิด ได้แก่ *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* สายพันธุ์อื่น และ *Bacteroides forsythus* เพื่อให้ครอบคลุมเชื้อที่อยู่รวมกันภายในร่องเหงือก รวมทั้งสารดังกล่าวต้องไม่ทำลายเชื้อประจำถิ่นตัวอย่าง เช่น *Streptococcus sanquis* *Streptococcus salivarius* และไม่เป็นพิษต่อเม็ดเลือดแดงรวมทั้งเนื้อเยื่อในบริเวณร่องเหงือก การวางแผนการศึกษาจะครอบคลุมมากขึ้นและลงรายละเอียดในเรื่องกลไกการฆ่าเชื้อ รวมไปถึงการย่อยให้เปปไทด์สั้นลงแล้วยังมีฤทธิ์หรือไม่ หรือตอบคำถามเรื่องความคงตัวของเปปไทด์ และการย่อยไกลโคเจนแล้วทำให้เกิดการสูญเสียฤทธิ์

หรือไม่ ข้อสรุปจากงานวิจัยหากทำการค้นคว้าจากฐานข้อมูล GenBank และ Protein data base แล้วพบว่า เป็นสารใหม่ก็จะสามารถนำมาจดสิทธิบัตรได้



รูปที่ 3 มวลโมเลกุลของสารชีวสังเคราะห์เปปไทด์จาก *L. paracasei* HL 32 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย gel permeation chromatography ตรวจสอบด้วยเครื่อง electrospray ionization-mass spectrometry ก่อน (ด้านซ้าย) และหลัง (ด้านขวา) การย่อยน้ำตาล



รูปที่ 4 จุลทรรศน์แบบส่องกราดแสดงภาพรูปร่างบริเวณผนังเซลล์ *P. gingivalis* ภายหลังจากสัมผัสสารชีวสังเคราะห์เปปไทด์บริสุทธิ์จาก *L. paracasei* HL32 (ลูกศรแสดงตัวอย่างรูปร่างที่เกิดขึ้น)

13. เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

- Almstahl, A., Wikstrom, M., and Kroneld, U. 2001. Microflora in oral ecosystems in Sjögren's syndrome, *J. Rheumatol.* 28: 1007-1013.
- Bechinger, B., Zasloff, M. and Opella, S.J. 1993. Structure and orientation of the antibiotics peptide magainin in membranes by solid state nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Protein Sci.*, 2: 2077-2084.
- Bhatti, M., Nair, S.P., MacRobert, A.J., Henderson, B., Shepherd, P., Cridland, J., and Wilson, M. 2001. Identification of photolabile outer membrane proteins of *Porphyromonas gingivalis*, *Curr. Microbiol.* 43: 96-99.
- Boman, H.G. 1991. Antibacterial peptides: key components needed in immunity, *Cell* 65: 205-207.
- Charernjiratrakul, W., and Sukboon, A. 1998. Inhibition of *Samonella spp.* by lactic acid bacteria isolated from traditional fermented Thai sausage, *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 20: 429-436.
- Charernjiratrakul, W. 2000. Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from southern Thailand traditional fermented foods, *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 22: 177-189.
- Darveau, R.P. et al. β -lactam antibiotics potentiate magainin 2 antimicrobial activity in vitro and in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 1153-1159.
- Dorn, B.R., Burks, J.N., Seifert, K.N., and Progulske-Fox, A. 2000. Invasion of endothelial and epithelial cells by strains of *Porphyromonas gingivalis*, *FEMS Microbiol. Lett.* 187: 139-144.
- Edward, DI. Antibiotic and Chemotherapy. In: Finch G, Greenwood D, Norrby SR, Whiteley RJ, editors. *Anti-infective agent and their use in therapy*. Churchill Livingstone: Cornwall; 2001. p. 335-336.
- Hull, P.S., Worthington, H.V., Clerehugh, V., Tsirba, R., Davies, R.M., and Clarkson, J.E. 1997. The reason for tooth extractions in adults and their validation, *J. Dent.* 25: 233-237.
- Huttunen, E., Noro, K., and Yang, Z. 1987. Purification and identification of antimicrobial substances produced by two *Lactobacillus casei* strains, *Int. Dairy J.* 5: 503-513.
- Jainkittivong, A., and Premsiririrund, T. 2001. Chief complaints of patients seeking treatment for periodontitis, *J. Dent. Assoc. Thai.* 51: 77-84.
- Javadpour, M.M., Juban, M.M., Lo, W.-C. J., Bishop, S.M., Alberty, J.B., Cowell, S.M., Becker, C.L., and McLaughlin, M.L. 1996. De Novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity, *J. Med. Chem.* 39: 3107-31113.
- Kaewnopparat, S. 1999. Human Lactobacilli as antidiarrheal and anticholesterol bio-agents: in vitro and in vivo studies. PhD thesis, submitted at Faculty of Graduate Studies, Mahidol University, Thailand.

- Kang, I.C., and Kuramitsu, H.K. 2002. Induction of monocyte chemoattractant protein-1 by *Porphyromonas gingivalis* in human endothelial cells, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 34: 311-317.
- Kinane, D.F. 2001. Causation and pathogenesis of periodontal disease, *Periodontol.* 2000 25: 8-20.
- Kragol, G. et al. 2001. The antibacterial peptide pyrrolicorin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. *Biochemistry* 40: 3016-3026.
- Loesche, W.J., Schmidt, E., Smith, B.A., Morrison, E.C., Caffesse, R. and Hujoel, P.P. 1991. Effects of metronidazole on periodontal treatment needs. *J. Periodontol.* 62: 247-257.
- Malog, W.L. and Kari, U.P. 1995. Structure activity studies on magainin and host defense peptides. *Biopolymer* 37: 105-122.
- Matsuzaki, K. 1999. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainin and tachyplesins as archetypes. *Biochem. Biophys. Acta* 1462: 1-10.
- Powers, J.P.S. and Hancock, R.E.W. 2003. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides* 24: 1681-1691.
- Qi, M., Miyakawa, H., and Kuramitsu, H.K. 2003. *Porphyromonas gingivalis* induces murine macrophage foam cell formation, *Microb. Pathogen.* 35: 259-267.
- Reveneau, N., Geoffroy, M.-C., Loch, C., Chagnaud, P., and Mercenier, A. 2002. Comparison of the immune response induced by local immunizations with recombinant *Lactobacillus plantarum* producing tetanus toxin fragment C in different cellular locations, *Vaccine* 20: 1769-1777.
- Ryadnov, M.G., Degtyareva, O.V., Kashparov, I.V., and Mitin, Y.U. 2002. A new synthetic all-D-peptide with high bacteria and low mammalian cytotoxicity. *Peptides* 23: 1869-1871.
- Saberwal, G., and Nagaraj, R. 1994. Cell lytic and antibacterial peptides that act by perturbing the barrier function of membranes: facts of their conformational features, structure-function correlations and membrane perturbing abilities. *Biochem. Biophys. Acta* 1197: 109-131.
- Schwarz, E., Chiu, G.K.C., and Leung, W.K. 1999. Oral health status of southern Chinese following head and neck irradiation therapy for nasopharyngeal carcinoma, *J. Dent.* 27: 21-28.
- Shai, Y. and Oren, Z. 2001. From carpet mechanism to de novo designed diastereomeric cell selective antimicrobial peptides. *Peptides* 22: 1629-1641.
- Sharma, A., Novak, E.K., Sojar, H.T., Swank, R.T., Kuramitsu, H.K., and Genco, R.J. 2000. *Porphyromonas gingivalis* platelet aggregation activity: outer membrane vesicles are potent activators of murine platelets, *Oral Microbiol. Immunol.* 15: 393-396.
- Southard, G.L., and Godowski, K.C. 1998. Subgingival controlled release of antimicrobial agents in the treatment of periodontal disease, *Int. J. Antimicrob. Ag.* 9: 239-253.

Szlinder-Richert, J. et al. 2000. Comparative studies on cell stimulatory, permeabilizing and toxic effects induced in sensitive and multidrug resistant fungal strains by amphotericin B and N-methyl-N-D-fructosyl amphotericin B methyl ester, *Acta Biochemica Polonica*. 47:133-140.

Zasloff, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms, *Nature* 415: 389-395.

14. วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

14.1 การเตรียมและเพาะเลี้ยงเชื้อ *L. paracasei* HL32

เชื้อแบคทีเรีย *L. Paracasei* HL32 ถูกเก็บรักษาไว้ในสภาพผงแห้ง การเตรียมเชื้อใช้เชื้อเริ่มต้น 10% โดยปริมาตร นำไปบ่มเชื้อในอาหาร Brain heart infusion media (BHI) เสริมด้วย 1%กลูโคส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปบ่มต่ออาหารเหลวชนิดเดียวกันที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในภาวะไร้ออกซิเจนเป็นเวลา 72 ชั่วโมงจากนั้นนำอาหารเหลวที่ผ่านการบ่มเชื้อไปปั่นแยกที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อจัดเซลล์แบคทีเรียแล้วนำส่วนใสไปทำให้แห้งโดยเทคนิค lyophilization ก่อนนำไปทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียขั้นต่อไป

14.2 การทดสอบผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

เปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียของยาเดตราซัยคลิน เมโทรนิดาโซล และสารชีวสังเคราะห์จาก *L. paracasei* HL 32 แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ ตัวแทนแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์ 4 ชนิด สายพันธุ์ *P. gingivalis* W 50 และ ATCC 33277 *Prevotella Intermedia* (ATCC 25611) และ *Bacteroides forsythus* (ATCC 43037) ตัวแทนแบคทีเรียประจำถิ่นในช่องปาก 2 ชนิด *Streptococcus salivarius* (25975) และ *Streptococcus sanguis* (ATCC 10556) ตัวแทนแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* ATCC 25923 และ ATCC 29213 ตัวแทนแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* ATCC 25922

14.3 การทดสอบการฆ่าแบคทีเรีย

ปิเปต cell suspension จากแต่ละหลุมของชุดควบคุมและชุดทดสอบที่มีค่าร้อยละการยับยั้งจากสูตรตั้งแต่ 90% หลุมละ 10 ไมโครลิตร นำไปหยดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ อ่านผลโคโลนีที่พบบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยที่ความเข้มข้นของสารชีวสังเคราะห์บริสุทธิ์ที่น้อยที่สุดที่ไม่พบโคโลนี รายงานผลเป็นค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย

14.4 ศึกษา killing kinetics

นำเชื้อก่อโรคปริทันต์ใส่ในจานอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร ให้ได้ปริมาณเชื้อเท่ากับ 5×10^5 โคโลนี/มิลลิลิตรใน sBHI จากนั้นใส่สารชีวสังเคราะห์บริสุทธิ์ความเข้มข้นเท่ากับ 0.25MBC, 0.5MBC, MBC หลุมละ 100 ไมโครลิตร ความเข้มข้นละ 8 หลุม จากนั้นนำไปบ่มเพาะเชื้อ เป็นเวลา 0, 2, 5, 9, 24, 48, 72 ชั่วโมง คูดสารละลายจากแต่ละหลุมหลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปเจือจางและเพาะเชื้อบน sBA จากนั้นบ่มเพาะเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนี นำไปพลอตกราฟหาความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและ CFU/ml ทำซ้ำ 3 ครั้ง

14.5 ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคปริทันต์โดยเทคนิค scanning electron microscopy

ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของผนังเซลล์แบคทีเรีย นำ suspension cell 1 มิลลิลิตร ที่ได้จากการศึกษาการฆ่าแบคทีเรีย มากรองผ่านเซลล์โลสเมมเบรน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมครอน โดยใช้

2.5% glutaraldehyde ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์โซลีนเป็นตัวจับยึด จากนั้นนำไปเคลือบทองแล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

14.6 ตรวจสอบโมเลกุลของสารชีวสังเคราะห์ที่ส่งผลต่อการออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อ

ศึกษาฤทธิ์ฆ่าเชื้อของ bacteriocin ขณะที่ยังอยู่ในรูป glycoprotein และขณะที่ย่อย glycogen ออกไปแล้ว และเมื่อทำการย่อยให้ได้สายเปปไทด์ที่สั้นลงฤทธิ์ของสารเปปไทด์เป็นอย่างไร

14.7 ตรวจสอบการรั่วของ lipid bilayer จำลองโดยวัดค่าการนำไฟฟ้า

เตรียมเมมเบรนโดยให้มี lipid bilayer เคลือบบนผนังสองด้านและใช้คั่นระหว่าง 2 compartment ทดลองเติมสารชีวสังเคราะห์ลงไปเพื่อศึกษาการรั่วที่เกิดบน lipid bilayer ส่งผลให้ศักย์ไฟฟ้าและการนำไฟฟ้าเปลี่ยนแปลง (Bessin et al., 2004)

14.8 ตรวจสอบ K^+ efflux

นำ suspension cell ของเชื้อที่ปรับความขุ่นจนได้ปริมาณ 10^8 โคโลนีมิลลิลิตร ด้วย 0.9% น้ำเกลือปราศจากเชื้อ ไปใส่สารชีวสังเคราะห์ปริมาณเท่ากับค่า MBC โดยมียาเพนนิซิลลินเป็น positive control และ normal saline solution เป็น negative control นำไปวัดปริมาณโปแตสเซียมที่ถูกปลดปล่อยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับปริมาณโปแตสเซียมทั้งหมดภายในเซลล์ (Szlinger-Richert et al., 2000)

14.9 การทำให้บริสุทธิ์การตรวจสอบเอกลักษณ์และการวิเคราะห์สารชีวสังเคราะห์จาก *L. paracasei*

ขั้นตอนแรก dialysis เพื่อแยกกรด และสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กออกจากส่วนใส วิธีการคือนำส่วนใสที่ได้จากการปั่นบรจุใน dialysis tube ที่มี molecular weight cut offs ที่ 6-8000 Da แล้วปิดด้วย plastic clip นำไปวางไว้ใน two-way double jacket tank ต่อกับอ่างน้ำวนควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ภายในอ่างก็จะบรรจุ dialysis medium ที่แตกต่างกันดังนี้ น้ำกลั่น pH 7 น้ำกลั่น pH 4 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 หรือ อะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 4 คนทิ้งไว้ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที โดยเปลี่ยนน้ำหรือบัฟเฟอร์ทุก 3 ชั่วโมง และทิ้งไว้ข้ามคืน ทำการเปลี่ยนเป็นเวลา 3 วัน ทำ 3 ซ้ำ หรือจนกว่า pH ของน้ำกลั่นที่ใช้ dialysis ไม่เปลี่ยนแปลง ส่วน dialysis medium ที่ใช้บัฟเฟอร์จะใช้เวลาในการ dialysis เท่ากับเวลาที่ใช้ในน้ำกลั่น จากนั้นเปรียบเทียบผลเพื่อคัดเลือกภาวะที่เหมาะสมในการทำ dialysis

ขั้นตอนที่สอง gel permeation chromatography นำสารละลายที่แยกได้จากขั้นตอนแรก มาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ Sephadex® G-100 ใช้สารละลายผสมระหว่างเมทานอล:น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 10:100 ปริมาตร/ปริมาตร เป็นตัวชะ อัตราการไหลของตัวชะ 2.5 มิลลิลิตร/นาที เก็บแยกตัวอย่างครั้งละ 5 มิลลิลิตร จนครบ 500 มิลลิลิตร

14.10 การตรวจสอบเอกลักษณ์และการวิเคราะห์

ตรวจหาค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดด้วยเครื่อง UV spectrophotometer พิสูจน์เอกลักษณ์โดยการทดสอบ ninhydrin (McGinn, 1996) ตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยใช้ thin layer chromatography และ gel electrophoresis วิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี mass spectrometry วิเคราะห์ปริมาณและลำดับกรดอะมิโน ศึกษาโครงสร้างโมเลกุลโดยการทำ x-ray crystallography เพื่ออธิบายกลไกการฆ่าเชื้อ

4.11 การทดสอบความคงตัว

การทดสอบความคงตัวของสารชีวสังเคราะห์ที่ pH และอุณหภูมิต่างๆ รวมทั้งในสภาวะที่อยู่ในน้ำลายและน้ำเหลืองเหงือก

14.12 การทดสอบความเป็นพิษของเซลล์

การวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์เอ็นยัดปริทันต์ เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเนื้อเยื่อเหงือก และเซลล์เยื่อบุผิว

14.13 การวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเม็ดเลือดแดง

ตัวอย่างเลือดนำมาจากคลังเลือดที่ได้จากอาสาสมัครที่ไม่ระบุนาม นำตัวอย่างเลือดที่ใส่สารป้องกันเลือดแข็งตัว และนับจำนวนเม็ดเลือดโดยใช้ hemocytometer แล้วคำนวณหาค่าปริมาณเม็ดเลือดแดงรวมเป็นจำนวนเซลล์/มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นแยกเพื่อกำจัด buffy coat ล้างเม็ดเลือดแดงที่ได้หลังจากการปั่นเป็นจำนวน 3 ครั้งใน 0.85% น้ำเกลือ และเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ศึกษาผลของแบคทีเรียโอซินต่อการแตกของเม็ดเลือดแดงที่ระยะเวลา 30 นาที, 6, 12, 24, 48, 72 ชั่วโมง (ปรับปรุงจาก Javadpour et al., 1996)

14.14 การวิเคราะห์หาปริมาณสารชีวสังเคราะห์

การศึกษาโดยใช้เครื่อง HPLC มี detector ชนิด UV และ คอลัมน์ชนิด reversed-phase C_{18} ทำการวิเคราะห์เปปไทด์สังเคราะห์ หรืออาจใช้เทคนิค capillary electrophoresis หรือ TLC with densitometry

=

Bacteriocin produced by *Lactobacillus paracasei* HL32: its mode of action, hemolytic, biological activity and stability

Pangsomboon K¹, Bansal S², Martin GP², Suntainalert P³, Kaewnopparat S¹, Srichana T¹

¹ Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, Thailand

² Department of Pharmacy, King's College London, Waterloo Campus, London, United Kingdom

³ Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, Thailand

Background: *Porphyromonas gingivalis* is one of the most important oral pathogens associated with periodontal disease. An isolated bacteriocin from *Lactobacillus paracasei* HL32 has been shown to have activity against the pathogen.

Objectives: This study reports upon its mode of action, hemolytic and biological activity and stability.

Methods: Antimicrobial activity and mode of action were evaluated. The activity of the bacteriocin was determined in saliva and crevicular fluid collected from 12 periodontal patients and 15 healthy volunteers. The effects of storage, heat, biological fluids and enzymatic treatment on the activity of the bacteriocin were determined.

Results: The bacteriocin was found to inhibit *P. gingivalis* selectively at the minimum bactericidal concentration (MBC) of 0.14 mM. The bacteriocin caused pore formation in the cytoplasmic membranes and potassium efflux was shown. Bacteriocin concentrations of 2-4 times of MBC were proved to induce hemolysis. The bacteriocin was heat-stable and possessed activity in a wide range of pH. Reduction of activity was found to occur in biological fluids.

Conclusions: A bacteriocin produced from *L. paracasei* HL32 had specifically bactericidal activity against *P. gingivalis* by inducing pore formation and potassium efflux, although the hemolytic activity was shown at higher concentration.

Introduction

Lactobacillus is ubiquitous bacteria in nature and has a long history of safe use in food and healthcare (1, 2). In humans, lactobacilli are found in the mouth, lower intestine and vagina (2). Over the past decades, there has been an increase in using lactobacillus as a live microorganism ingestion for promoting or supporting a balance of indigenous microflora as a probiotic as well as providing a potential source of antimicrobial agents, such as bacteriocins, for the prevention of certain infectious diseases (2, 3). However, the mechanisms of such protective effects are not entirely understood (2, 4-6).

The activity of bacteriocins was, in the early work, found to be selective, with activity being found against Gram-positive organisms and closely related species to that of the producer (1, 7-9). Later work presented evidence that showed their inhibitory activity towards both Gram positive and Gram negative bacteria but also confirmed that their antimicrobial activity remained selective for closely related species (1, 10).

Most work has focused mostly on the purification, amino acid sequencing and description of genetic determinants of bacteriocin, with fewer studies concerned with the mechanism of action. Mechanisms that have been proposed to account for the activity of bacteriocins include the possible formation of a barrel/stave poration complex, the destabilization of the bacterial membrane as a consequence of transient pore formation, and the depletion of the proton-motive force, which can be a primary or secondary event (4-6). The composite amino acid residues of the bacteriocin confer a cationic amphiphilic structure, and such a characteristic is likely to contribute to the mechanisms of action (11).

Lactobacillus plantarum, *L. rhamnosus*, *L. salivarius*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. acidophilus*, *L. oris*, *L. paracasei*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. delbrueckii*, *L. jensenii*, *L. gasseri* and *L. agilis* are the most common species found within the human oral cavity. The presence of such oral lactobacilli is correlated with good oral health, since most of these species have the

ability to inhibit the growth of both periodontal and caries-related pathogens *in vitro*. The prominent species i.e., *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* and *L. salivarius*, have been shown to reduce the growth of periodontal pathogens (12, 13). However, in the earlier studies, the antimicrobial effects from organic acids were not eliminated.

Bacteriocins have been identified as being antimicrobial products from bacterial fermentation which have a protein or peptide component that is crucial for their bactericidal activities (1, 4, 6). Some have composite structure of protein, lipid, and/or carbohydrate moieties (4), and it is generally accepted that bacteriocins act by targeting bacterial cytoplasmic membranes. As the prevalence of antibiotic-resistant strains of periodontal pathogens has increased, there is a greater requirement to develop a selective means of killing microorganisms (14-16). The secretion of bacteriocins has been proposed to occur as part of a feasible survival strategy for organisms in the oral microbial population (17, 18), and the use of a bacteriocin from *Prevotella nigrescens* has been demonstrated to provide an effective means of killing oral pathogens, including *P. gingivalis* (3, 19).

Recently, we have shown that the bacteriocin produced by *L. paracasei* HL32 has a narrow spectrum of activity against *P. gingivalis* ATCC 33277 and can cause cell death within 2 h, probably as a consequence of pore formation (20). The principal aim of the present study was to determine whether the bacteriocin isolated from *L. paracasei* HL32 exhibited antimicrobial activity against *P. gingivalis* WP 50 and other selected oral microorganisms. Secondary aims were to seek to identify the mode of action of the isolated bacteriocin and to determine its cytotoxicity as well as its stability to storage, pH change and temperature and to oral biological fluids.

Materials and methods

Bacteriocin production

Bacterial fermentations were carried out in a 5 L fermentor equipped with instrumentation for measurement and control of temperature at 37°C over a period of 72 h (MBR BioReactor AG, Switzerland). The fermentor containing heat-sterilized brain heart infusion broth (BHI) was inoculated with 10% v/v of *L. paracasei* HL32. Agitation was performed at a speed of 100 rpm to maintain the fermentation broth in a homogeneous state. No aeration was performed, and the dissolved oxygen was depleted during the fermentation from its initial level to that present at the end of exponential growth phase.

Isolation, purification and identification of bacteriocin

The scheme employed to isolate the bacteriocin from the original broth culture is summarized in Fig.1. Purification was performed by using column chromatography. Superdex-G 200 (Pharmacia, Piscataway, NJ, USA) was packed into a column (2 x 45 cm), using 0.05 mM phosphate buffer (pH 7.3) as an eluant. The isolated crude sample was dissolved in the eluting buffer at an initial concentration of 200 mg/ml and applied to the gel permeation column, using an ÄKTA Prime system (Amersham Pharmacia Biotech, UK) at room temperature. An elution flow rate of 1 ml/min was employed, 4 ml fractions were collected sequentially, and the protein content in each fraction was measured by UV absorption at 280 nm.

The bacteriocin was found to be eluted in fractions 15-25 (Fig. 2). These fractions were pooled and the resultant solutions were dialyzed against distilled water overnight, followed by lyophilization to generate a “partially purified” sample. In due course, a portion of the sample was dissolved (100 mg/ml) in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8). The sample was applied to an anion exchange column (2 x 5 cm) (HiTrap Q HP, Amersham, Pharmacia Biotech) and the sample eluted, using initially 20 mM Tris-HCl buffer at a flow rate of 1.5 ml/min. Elution was

carried out using a linear gradient of NaCl up to 0.5 M (from 100% 20 mM Tris-HCl buffer pH 8 at 0 min to 100% 0.5 M NaCl at 180 min) using the ÄKTA Prime system. The fractions which contained inhibitory activity were eluted within the void volume. Some contaminants were absorbed to the anion exchange column, and these were eluted in fractions 10-78. The void volume from the column was collected and desalted using Sephadex G-25 (2x5 cm) (HiTrap Q HP, Amersham, Pharmacia Biotech) and the final active solid obtained by lyophilization. Protein content (in mg per ml) was estimated by the Lowry method (21), using human albumin as a standard.

Gel electrophoresis

The purity of each of the isolated samples, was determined using gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Mini-PROTEIN 3 cell, Bio-Rad) on 4-15% gradient Tris-HCl, gels which employed a specified voltage (70 V) and current (222 mA) for 30 min and 1x running buffer (10 x Tris/Glycine/SDS buffer, Bio-Rad). After electrophoresis, the gels were stained with GelCode[®] protein stain solution (Pierce, USA) for 1 h with gentle agitation. Prestained SDS-PAGE Standards, which spanned a broad range of MW (7.4-192 kDa, Bio-Rad), were used as molecular weight markers.

Antimicrobial activity and mode of action

The bacteria used for the antimicrobial activity testing were grown under the conditions specified in Table 1. The cylinder plate method and microtiter assay were applied to detect the inhibitory and bactericidal activities, as described previously (22, 23).

The effect of bacteriocin on the ultrastructural morphology of *P. gingivalis* was assessed using transmission electron microscopy (TEM). *P. gingivalis* ATCC 33277 and *P. gingivalis* WP 50 grown in supplemented BHI broth were treated with the minimum inhibitory concentration (MIC) of bacteriocin for 2 h. The bacteria were isolated by centrifuging the cultured cells at

10000 g for 5 min. Samples of harvested sedimented cells were prepared for TEM by fixing with 2.5% (v/v) glutaraldehyde, post fixing with 1% (v/v) osmium tetroxide for 1 h and then dehydrating with ethyl alcohol. The sections were embedded in epoxy resin and cut, and then mounted on 300 mesh copper grid, stained with uranyl acetate and lead citrate, and then examined using analytical transmission electron microscope (TEM) (JEOL JEM-2010 at 200 kV, Japan).

Potassium leakage

P. gingivalis was grown in supplemented BHI broth in the presence of bacteriocin at the MIC. At periodic time interval of 3, 4, and 6 h, the broth was removed and centrifuged at 3000 RPM for 15 min. The potassium concentration within the supernatant was determined by atomic absorption spectroscopy (Perkin-Elmer HGA 800, Norwalk, CT), using the method described previously (24). Standard potassium chloride solutions (10, 20, 30, 40, 50, and 100 mg/l potassium) were prepared to check the linearity of the analytical method. Freshly prepared standard solutions were used for every experiment.

Subjects

The study groups were composed of 12 chronic periodontitis patients, age 53 ± 8.7 (mean \pm SD) and 18 periodontally healthy subjects, age 43 ± 9.8 (mean \pm SD). Both groups had no systemic diseases, were not receiving antibiotic medication, and had no periodontal therapy within 6 months prior to the start of this study. The diagnosis of chronic periodontitis patients required the appearance of gingival inflammation, periodontal breakdown with a pocket depth 5 mm, and radiographic evidence of bone loss. Healthy individuals were so designated if there was no evidence of a periodontal pocket or attachment loss, and a gingival index score was 0 or 1. Informed consent was obtained from all subjects, in accordance with the study design approved

by the Ethics Review Committee on Human Research of the Faculty of Dentistry, Prince of Songkla University.

Collecting saliva and crevicular fluid

Paraffin-stimulated whole saliva was collected from the volunteers, using the method described previously (25), and was stored at -20°C until further investigation. Crevicular fluid samples were collected from different pocket sites in each chronic periodontitis patient and from two sites in each healthy subject by paper strip insertion. Prior to sampling, the area was isolated with cotton rolls, and the supragingival region of the tooth surface was cleaned and dried with the sterile cotton pellets. After leaving the paper strips at each site for 1 min, each strip was transferred to an Eppendorf vial containing 1 ml of autoclave distilled water. The vials were stored at -20°C until further investigation.

Stability of bacteriocin in biological fluids

Saliva and crevicular fluid were sterilized by filtration through 0.22 µm cellulose acetate membrane filter (Sartorius, Germany). The purified bacteriocin was dissolved in either fluid at the level of the MIC. The % inhibition of *P. gingivalis* ATCC 33277 was determined using the microtiter assay for the antimicrobial activity, as described previously (20).

Red blood cell toxicity

Red blood cell toxicity was determined by assessing the hemolytic activity using published method with some modifications (24). In brief serial dilutions of the bacteriocin contained in 100 µl phosphate buffer saline (PBS, 0.01 M) at pH 7.4 were incubated with 50 µl of 1/25 packed volume of human red blood cells distributed in microtiter plate wells. The plates were incubated with rocking (Rocker platform, Bellco Biotechnology, USA) at 37°C. Concentrations that induced either partial or complete lysis were determined visually after

incubation for up to 24 h. The percentage hemolysis was calculated using equation 1. Solutions of melittin in PBS (concentrations: 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 2.5 and 5 μ M) were used as a positive control.

$$\% \text{hemolysis} = \frac{(A_{\text{exper}} - A_{\text{control}})}{(A_{\text{total}} - A_{\text{control}})} \times 100 \quad \text{Equation 1}$$

where A_{exper} is the absorbance values of supernatants from treated red blood cells

A_{control} is the absorbance values of supernatant from non-treated red blood cells

A_{total} is the absorbance of the red cells treated with 0.1% Triton X-100, corresponding to 100% lysis

Mammalian cell toxicity

The toxicity of peptides to induce cell death of either human fibroblasts or human periodontal cell ligament (PDL) (gifted from Kamolmattayakul, S. and Wattanaarunwong, N., Prince of Songkla University) was determined by 2-fold serial dilution assay; 50 μ L of a stock peptide solution was diluted with an equal volume of Minimum Essential Medium (MEM), and 1:2 serial dilutions in MEM are prepared. Each dilution was applied to a 1-day old monolayer of the cells (approximately 1×10^4 cells/well) maintained in a 96-well plate with fresh MEM (50 μ L/well). Peptide-treated and control (no peptide) cells were incubated at, 37°C for 30 min. The supernatant was removed and the cells were gently treated with 0.2% trypan blue stain and viewed under an inverted light microscope. Inclusion of trypan blue dye within a cell is an indication of cell death. A sublethal dose was defined as a highest dilution in which only 1-10 adherent cells were not stained. No cytotoxicity means that cell population survival is unchanged from controls (22).

Bacteriocin stability

Thermal stability

The purified bacteriocin redissolved in sterilized water, was heated at fixed temperatures of 25 (control), 50, 80, and 100 °C. Samples were removed after 5, 10, 15, 20, 25 and 30 min. The purified bacteriocin was also autoclaved at either 100 °C for 60 min, 110 °C for 30 min, or 121 °C for 15 min, 12 and 10 min. After heating treatment, the samples were cooled to room temperature and tested for the antibacterial activity using the microtiter assay (22).

pH stability

To determine the effect of pH on the bacteriocin activity, the purified product (0.14 mM) was redissolved in either 5 mM phosphate-citrate buffer (pH 2.6-7.4) or 5 mM Tris-HCl pH (8.0-9.0) and incubated at room temperature for 1 h. Bacteriocin dissolved in water (pH 6.8±0.2) served as a reference. The antibacterial activity was subsequently determined using the cylinder plate method (23).

Stability to enzymes

A 500 µl of bacteriocin in water (0.28 mM) was incubated with 500 µl α-chymotrypsin (500 µg/ml in 0.01 M phosphate buffer, pH 7.8), trypsin (500 µg/ml in 0.01 M phosphate buffer, pH 7.6), lipase (1 mg/ml in 0.01 M phosphate buffer, pH 7.2) or amyloglucosidase (30 mg/ml in 0.05 M citrate buffer, pH 4.5) at room temperature for 2 h for all enzymes, except lipase, which was incubated at 37 °C for 2 h. Following incubation, the mixture was heated at 100°C for 10 min to denature the enzymes, and then was filter sterilized. The antibacterial activity was determined using the cylinder plate method, as described previously (23).

Storage stability

Accurately purified bacteriocin samples (32 mg) were stored in sealed amber bottle as a solid and incubated under desiccation at 4 °C, room temperature (25 °C) or at 37°C. A series of samples were prepared at time zero and stored at the separate temperatures with individual

bottled samples being withdrawn periodically up to 3 months. The antibacterial activity was determined using the microtiter assay (22).

Statistical method

Bacteriocin activity before and after treatments was analyzed using the Mann-Whitney U test. The differences in the antibacterial activity, after dissolving the bacteriocin in the biological fluids collected from either the healthy or periodontitis groups, were tested using the Wilcoxon signed Rank test for paired comparisons. *P-values* < 0.05 were considered statistically significant and Prism statistic software (Release 3.0) was used for this analysis.

Results

Purification and identification

SDS-PAGE electrophoresis of the crude bacteriocin sample showed two major bands with a MW between the range of 112-116 kDa and minor protein bands corresponding to smaller molecular weight (Fig. 3). Further purification involving elution of the crude sample through a Superdex column produced a partially purified product where the two major bands were still detected, but other species which produced minor bands corresponding to a MW of 16-45 kDa had disappeared. The final purified product obtained after passing through an anion exchange column, the flow through fraction exhibited a single band by electrophoresis, corresponding to 56 kDa and the protein retained antimicrobial activity.

Antimicrobial activity and mode of action

The activity spectrum of purified bacteriocin against oral bacterial species is shown in Table 2. Both strains of *P. gingivalis* were susceptible to the antimicrobial action of bacteriocin (MIC: 0.14 mM), whereas the other oral pathogens and normal flora were not sensitive to the

bacteriocin, except that *P. intermedia* showed some resistance to the bacteriocin. The antibacterial profile of the bacteriocin showed some selectivity against only *P. gingivalis*, but not *P. intermedia*. Whereas, metronidazole has an activity against *P. gingivalis*, *P. intermedia* and *T. forsythensis* (Table 2).

Transmission electron micrographs of *P. gingivalis* exposed to the bacteriocin showed areas where the outer and inner membranes appeared to be disrupted, as indicated by the thick arrows in Figs 4c and 4d, without apparent loss of the underlying cell morphology, whereas cell membranes of the control group remained intact. The presence of membrane associated vesicles, with their distinctive trilaminar appearance, was apparent in the control images, as shown by the thin arrow heads in Figs 4a and 4b, but they were absent in the cells treated with bacteriocin. The cytoplasm in both groups is homogenous in appearance, with no evidence of clumping or filamenting of the cytoplasmic constituents, and no phage particles were observed.

The analytical method employed to determine potassium concentration by atomic absorption produced a linear response (10-100 mg/L, $r^2 = 0.990$). There was an increase in potassium concentration within the supernatant when cultures of *P. gingivalis* were incubated with bacteriocin at the level of the MIC (solid line). There was no difference in potassium levels between the absence of bacteriocin and at initial (Fig. 5).

Hemolysis assay

Bacteriocin was found to be non-hemolytic at the MIC under the conditions employed in this study (Table 3). When erythrocytes were treated at two times of MIC, bacteriocin showed 16% relative hemolysis, compared with the positive controls of 0.1% (v/v) Triton X-100 within 1 h or melittin 0.625 μ M, where 100% hemolysis occurred following 24 h incubation.

Mammalian cell assay

No effect on the morphology and viability of fibroblast cells and periodontal ligament cells were observed for bacteriocin treatment up to 0.14 mM for 12 h. No significant decrease in viable cells was observed after 48 h for PDL cells and 24 h for fibroblast cells (data not shown). Significant decrease in %viable cells at higher concentration was also observed. The toxic level of mellitin is obviously much lower than bacteriocin.

Biological activity

The antimicrobial activity of bacteriocin on *P. gingivalis* ATCC 33277 was decreased by 17% when the saliva that derived from healthy volunteers was presence and by 12% when it was derived from periodontal patients, compared to controls. However this difference was not significant. The % inhibition determined in the presence of gingival crevicular fluids obtained from healthy volunteers and periodontal patients, decreased by $\pm 1\%$ and 9%, respectively, from the control. Again there was no significant difference in the reductions; however, there was a statistically significant difference between the inhibition in the presence of saliva and gingival crevicular fluid obtained from the healthy volunteers ($P < 0.01$) (Table 4).

pH, thermal, and storage stability and sensitivity to the enzymes

The bacteriocin remained soluble and active over a wide range of pH 2.6-9.0. A reduction in its bactericidal activity was observed following heat treatment, but even autoclaving the bacteriocin in solution at 121 °C for 15 min activity decreased by only 4-8%. There was no statistically significant difference between the % inhibition obtained after heat sterilization at 100 °C for 60 min and that obtained following filter sterilization ($P=0.841$) (Table 4). There was also no significant reduction in activity upon storage of bacteriocin at 4 °C for 6 months (data not shown). In contrast, at 25 °C (room temperature) and at 37 °C, the bacteriocin activity was found to be lost after 11 weeks. The antibacterial activity of the bacteriocin was destroyed by

incubation with trypsin and chymotrypsin. Although, there was no reduction in activity by incubation with lipase, there was a slight reduction in activity as a consequence of incubation with amyloglucosidase (Table 2).

Discussion

Non-fully characterized antibacterial agents obtained from *L. paracasei* HL32, isolated from a healthy volunteer, have been shown to have antimicrobial activity towards spoilage pathogens (27). The same species have been found at the gingival crevice in healthy volunteers, and also isolated after periodontal therapy (12). A crude product isolated from the supernatant, obtained from bacterial cultures of *L. paracasei* HL32, has been found to inhibit a range of selected microorganisms, but a narrower spectrum of the activity was demonstrated after the elimination of organic acids (3, 20). Partial characterization of the bacteriocin has shown that it was composed of 26.3% hydrophobic amino acids in the total residues of 171 amino acids (20).

Lactic acid, a major by-product of lactobacilli fermentation, was removed by dialysis (7, 9), and the purification procedures employed in this study led to the isolation of a purified bacteriocin. The latter's molecular weight was determined by SDS-PAGE. The crude product migrated as a protein with a MW of 112-116 kDa; however, further purification generated a single band corresponding to a MW of around 56 kDa. The latter MW was the same as that reported in a previous study, which employed electrospray ionisation mass spectrometry (ESI-MS) (20). About a half reduction in Mw may be due to the fact that the dimer peptide might be broken down to monomer. When the peptide was treated in such conditions as the purification step or ESI-MS, the dimer may be cleaved, since this has been reported to occur previously (28, 29).

The selection of the indicator strains (Gram-positive bacteria: *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus salivarius*) was based on their importance in the oral ecosystem as members of the dominant indigenous normal flora. Other periodontal pathogens were included in the study to

evaluate the specificity of the antagonistic substance(s). Even when metronidazole, the drug of choice in periodontal treatment, is employed, *Streptococcus mutans* and microaerophilic bacteria have been reported to increase in number after drug treatment (30). The results of this study revealed that the *L. paracasei* HL32 produced an antibacterial compound which, when purified, inhibited *P. gingivalis* strains only. Interestingly, the bacteriocin was inactive after incubation with trypsin and chymotrypsin, but after treatment with either enzyme it showed activity against *S. salivarius*. The trypsin activity cleaves amide and ester bonds of substrate specificity based upon positively charged arginine (Arg) and Lysine (Lys) side chains (31), whereas the chymotrypsin cleaves the peptide bond at tryptophan (Trp), phenylalanine (Phe), tyrosine (Tyr) and leucine (Leu) (31). The bacteriocin contained 9 residues of Arg, 9 residues of Lys, 2 residues of Phe, 1 residue of Tyr and 6 residues of Leu (20). Hence, cationic and hydrophobic residues (Lys, Arg and Leu) of bacteriocin may play important role in the antimicrobial activity, which is in accordance with the previous observations (4-6, 11). In addition, the activity was reduced by the action of amyloglucosidase, indicating that the bacteriocin is likely to contain carbohydrates. Nevertheless, deglycosylated bacteriocin still retained bactericidal activity (87% inhibition) against both strains of *P. gingivalis*.

Potassium is the major intracellular cation in bacteria. K^+ acts as a cytoplasmic-signalling molecule, activating or inducing enzymes and transport systems that allow the cell to adapt to the elevated osmolarity (32). The perforation of the cell membrane and the absence vesicle as viewed by TEM observation, together with the fact that cells of *P. gingivalis* incubated with the bacteriocin showed efflux of potassium, suggests that the bacteriocin targets the bacterial membrane and lipopolysaccharide and, therefore, potassium leakage might be expected to occur as a secondary event (4). The absence of vesicles as determined by TEM also confirmed that bacteriocin showed the bactericidal activity against *P. gingivalis*.

The erythrocyte plasma membrane is a natural membrane in the body which contains anionic surface charge and a lipid monolayer. In this study the toxicity of bacteriocin was

compared with melittin, a venom peptide derived from the bee. The bacteriocin was shown to induce hemolysis, but at concentrations much higher than the MIC. In cell cytotoxicity assay for the bacteriocin, we found that the periodontal cells and fibroblast cells began to decrease after 12 h even in presence of minimum bactericidal concentration of bacteriocin. The cytotoxicity was concentration- and time-dependent. More specifically, at low peptide concentrations (0.35, 0.7, and 0.14 mM), cell survival was independent on time. However, different sensitivity between the periodontal cells and fibroblast cells to bacteriocin was observed at 72 h when the concentration of the peptide was above 0.14 μ M.

Bacteriocin activity may be reduced by the action of enzymes or may be influenced by pH, temperature, and biological fluid. A previous study showed that pH values from 2.6 to 5.6 inhibited the growth of *P. gingivalis* without any treatment (3, 33). However, if the concentration of buffer was reduced from 50 to 5 mM, the different pH values were found not to affect the growth of *P. gingivalis*. Over wide range of pH, using the lower buffer concentration, there was no change in the determination of the antimicrobial activity. Therefore, it is practical to use bacteriocin as a topical application in the subgingival pocket because bacteriocin is more active in acidic pH while *P. gingivalis* strains grow at neutral pH and the pH tends to rise to alkaline conditions during growth (33). In respect to its temperature sensitivity, cell free supernatant samples were tested (8-10) but differed from this study in which the purified bacteriocin was tested. The sensitivity of the purified bacteriocin was not altered by heat treatment after 30 min at the fixed temperatures from 50 to 100 °C. The bacteriocin appeared to be heat-stable, since it was able to withstand the effects of a high temperature over 100°C for 1 h, with the residual activity remaining. Such heat stability is unusual, but is probably a result of protein glycosylation which generally provides resistance against degradation by heat treatment. This heat stability would be advantageous for possible commercial development of the bacteriocin, since sterilization by autoclaving could be contemplated instead of the more

expensive filtration process. The bacteriocin resistance to autoclaving indicates that the antibacterial inhibitory effects are not a consequence of bacteriophage contaminant.

In summary, the isolated bacteriocin from *L. paracasei* HL32 was shown to have selective antimicrobial activity against two strains of *P. gingivalis*. However, its MIC is quite high which may not be advantageous in new drug development. A bacteriocin that allows selective killing of a specific pathogen, without disturbing normal indigenous oral microflora, and has no toxicity at therapeutic level would be a good candidate for periodontal treatment. However, bacteriocin would not appear to be suitable for systemic administration, since it does exhibit toxicity to human erythrocytes.

Acknowledgements

The authors would like to thank the National Research Council Thailand for financial support and Prince of Songkla University for facilities.

References

1. Klaenhammer TR. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 1993; **12**: 39-85.
2. Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis in't VJH. Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol* 1998; **41**: 85-101.
3. Kaewsrichan J, Douglas CW, Nissen-Meyer J, Fimland G, Teanpaisan R. Characterization of a bacteriocin produced by *Prevotella nigrescens* ATCC 25261. *Lett Appl Microbiol* 2004; **39**: 451-458.
4. Montville TJ, Winkowski K, Ludescher RD. Models and mechanisms for bacteriocin action and application. *Int Dairy J* 1995; **5**: 797-814.
5. Hancock RE. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect Dis* 2001; **1**: 156-164.
6. Duche D. The pore-forming domain of colicin A fused to a signal peptide: a tool for studying pore-formation and inhibition. *Biochimie* 2002; **84**: 455-464.

7. Schillinger U, Lucke FK. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl Environ Microbiol* 1989; **55**:1901-1906.
8. Sobrino OJ, Rodriguez JM, Moreira WL, Fernandez MF, Sanz B, Hernandez PE. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from dry fermented sausages. *Int J Food Microbiol* 1991; **13**: 1-10.
9. Daeschel MA, McKenney MC, McDonald LC. Bacteriocidal activity of *Lactobacillus plantarum* C-11. *Food Microbiol* 1990; **7**: 91-98.
10. Suma K, Misra MC, Varadaraj MC. Plantaricin LP84, a broad spectrum heat-stable bacteriocin of *Lactobacillus plantarum* NCIM 2084 produced in a simple glucose broth medium. *Int J Food Microbiol* 1998; **40**: 17-25.
11. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 2002; **415**: 389-395.
12. Koll-Klais P, Mandar R, Leibur E, Marcotte H, Hammarstrom L, Mikelsaar M. Oral lactobacilli in chronic periodontitis and periodontal health: species composition and antimicrobial activity. *Oral Microbiol Immunol* 2005; **20**: 354-361.
13. Sookkhee S, Chulasiri M, Prachyabrued W. Lactic acid bacteria from healthy oral cavity of Thai volunteers: inhibition of oral pathogens. *J Appl Microbiol* 2001; **90**: 172-179.
14. Walker CB. The acquisition of antibiotic resistance in the periodontal microflora. *Periodontol 2000* 1996; **10**: 79-88.
15. Sanai Y, Persson GR, Starr JR *et al*. Presence and antibiotic resistance of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Prevotella nigrescens* in children. *J Clin Periodontol* 2002; **29**: 929-934.
16. Chan Y, Chan CH. Antibiotic resistance of pathogenic bacteria from odontogenic infections in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 2003; **36**: 105-110.
17. Fujimura S, Nakamura T. Sanguicin, A bacteriocin of oral *Streptococcus sanguis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1979; **16**: 262-265.
18. Nakamura T, Fujimura S, Obata N, Yamazaki N. Bacteriocin-like substance (melaninocin) from oral *Bacteroides melaninogenicus*. *Infect Immun* 1981; **31**: 28-32.
19. Teanpaisan R, Baxter AM, Douglas CW. Production and sensitivity of bacteriocin-like activity among *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Pr.*

nigrescens strains isolated from periodontal sites. *J Med Microbiol* 1998; 47: 585-589.

20. Pangsomboon K, Kaewnopparat S, Pitakpompreecha T, Srichana T. Antibacterial activity of a bacteriocin from *Lactobacillus paracasei* HL32 against *Porphyromonas gingivalis*. *Arch Oral Biol* 2006; 51: 784-793.
21. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
22. Javadpour MM, Juban MM, Lo WC *et al.* De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. *J Med Chem* 1996; 39: 3107-3113.
23. Koo H, Gomes BP, Rosalen PL, Ambrosano GM, Park YK, Cury JA. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. *Arch Oral Biol* 2000; 45: 141-148.
24. Srichana, T., Suedee, R., Muanpanarai, D., and Tanmanee, N. The study of in vitro-in vivo correlation: pharmacokinetics and pharmacodynamics of albuterol dry powder inhalers. *J Pharm Sci* 2005; 94: 220-230.
25. Johansson I, Lenander-Lumikari M, Saellstrom AK. Saliva composition in Indian children with chronic protein-energy malnutrition. *J Dent Res* 1994; 73: 11-19.
26. Kondejewski LH, Farmer SW, Wishart DS, Kay CM, Hancock RE, Hodges RS. Modulation of structure and antibacterial and hemolytic activity by ring size in cyclic gramicidin S analogs. *J Biol Chem* 1996; 271: 25261-25268.
27. Kaewnopparat S. Human lactobacilli as antidiarrheal and anticholesterol bio-agents: *in vitro* and *in vivo* studies. Faculty of Graduate Studies, Bangkok: Mahidol University, 1999. 235 pp. PhD Thesis.
28. Mortvedt CI, Nissen-Meyer J, Sletten K, Nes, I F. Purification and amino acid sequence of lactocin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* L45. *Appl Environ Microbiol* 1991; 57: 1829-1834.26.
29. Onda, T., Yanagida, F., Tsuji, M., Shinohara, T., and Yokotsuka, K. Production and purification of a bacteriocin peptide produced by *Lactococcus* sp. strain GM005, isolated from Miso-paste. *Int J Food Microbiol* 2003; 87: 153-159.
30. Epstein W. The roles and regulation of potassium in bacteria. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2003; 75: 293-320.

31. Creighton TE. *Proteins: structures and molecular properties*, 2nd edn. New York: WH Freeman, 1993.
32. Loesche WJ, Schmidt E, Smith BA, Morrison EC, Caffesse R, Hujoel PP. Effects of metronidazole on periodontal treatment needs. *J Periodontol* 1991; **62**: 247-57.
33. Takahashi N, Saito K, Schachtele CF, Yamada T. Acid tolerance and acid-neutralizing activity of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Fusobacterium nucleatum*. *Oral Microbiol Immunol* 1997; **12**: 323-328.

Table 1. Bacterial strains and growth conditions

Organism	ATCC number	Media		Conditions	
		Broth	Agar	Temperature	Atmosphere
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277 TM	sBHI (BHI with YE 5 mg/ml, vitamin K ₁ 5 µg/ml and hemin 5 µg/ml)	TSA with YE 1 mg/ml,	37°C	Anaerobic gas mixture, 80%N ₂ -10%CO ₂ -10%H ₂
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	53978 TM		vitamin K ₁ 5 µg/ml, hemin 5 µg/ml and		
<i>Prevotella intermedia</i>	25611 TM		5% blood		
<i>Tannerella forsythensis</i>	43037 TM				
<i>Streptococcus sanguinis</i>	10556 TM	BHI	TSA with 5% blood		5% CO ₂
<i>Streptococcus salivarius</i>	25975 TM	BHI	BHI agar		Aerobic

supplemented BHI; BHI: brain heart infusion broth; TSA: tryptic soy agar; YE: yeast extract

||

Table 2. Antimicrobial activity spectrum of bacteriocin produced by *L. paracasei* HL32, compared with metronidazole as a reference

Bacterial strains	Mean (SD) zone of inhibition (mm)					
	metronidazole	Bacteriocin treated with enzyme				
		Without	enzyme			
			Trypsin	Chymo trypsin	Lipase	Amyloglu cosidase
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	48	25.5 (0.3)	(-)	(-)	24.8(0.2)	17.2 (0.3)
<i>P. gingivalis</i> WP 50	16.6 (0.2)	19.8 (0.4)	(-)	(-)	19.2 (0.3)	17.3 (0.2)
<i>P. intermedia</i> ATCC 25611	53.6 (1.1)	R	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>T. forsythensis</i> ATCC 43037	70	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>S. salivarius</i> ATCC 25975	(-)	(-)	14.1(0.2)	17.1 (0.2)	(-)	(-)
<i>S. sanguinis</i> ATCC 10556	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

-, no inhibition zone; R, resistant (inhibition zone \leq 8.0 mm).

Table 3. Hemolytic potential of bacteriocin on human erythrocytes following a 24 h exposure time.

compound	% hemolysis (\pm SD)
Bacteriocin 0.14 mM	0 (0.0)
0.28 mM	16 (0.3)
0.56 mM	100 (0.0)
Melittin 0.625 μ M	100 (0.0)

Table 4. The effect of heat, pH, and biological fluids on the activity of bacteriocin

Treatment	% inhibition (\pm SD)	<i>P</i> -value
Bacteriocin 0.14 mM	83.40 (0.45)	
pH:		
2.2-6.8 (acidic condition)	83.19 (3.64)	
7.4 (physiological pH)	84.13 (0.78)	
8.5-9.0 (basic condition)	83.31 (3.73)	
Heat:		
100 °C for 60 min	83.57 (2.18)	0.841
110 °C for 30 min	80.10 (0.43)	= 0.007
121 °C for 10 min	79.89 (1.96)	0.007
121 °C for 12 min	75.78 (4.72)	0.015
121 °C for 15 min	75.15 (3.56)	0.015
Biological fluid		
A, Saliva (healthy volunteers)	66.86 (7.11)	A and C, 0.0005
B, Saliva (periodontitis patients)	71.71 (9.85)	B and A, 0.1484
C, GCF (healthy volunteers)	72.46 (5.85)	C and D, 0.4609
D, GCF (periodontitis patients)	74.75 (6.38)	D and B, 0.3828

Porphyromonas gingivalis ATCC 33277 was used as an indicator organism.

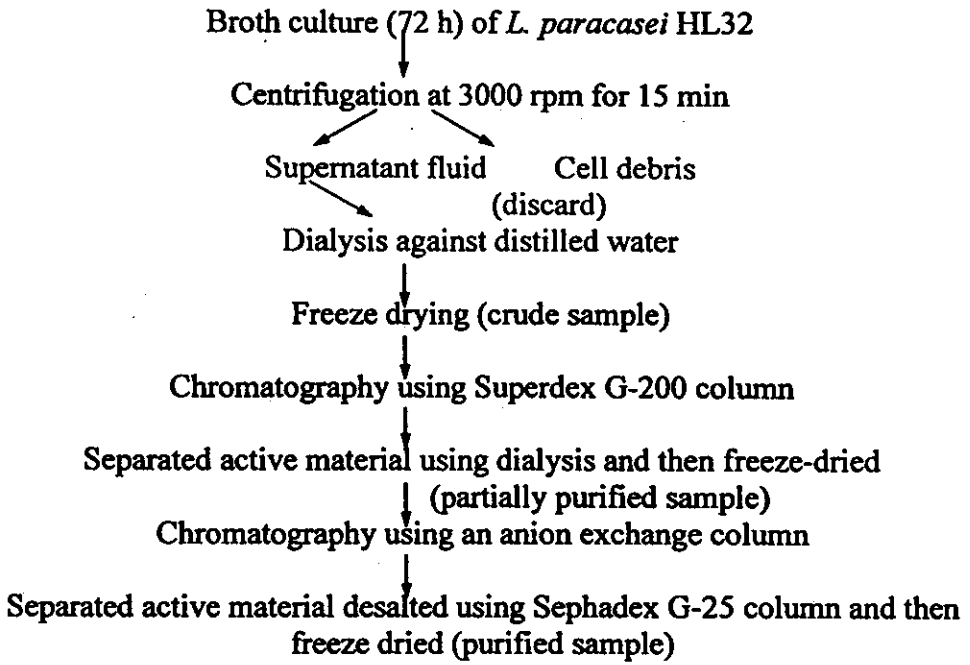


Fig. 1. Purification of bacteriocin produced by *Lactobacillus paracasei* HL32

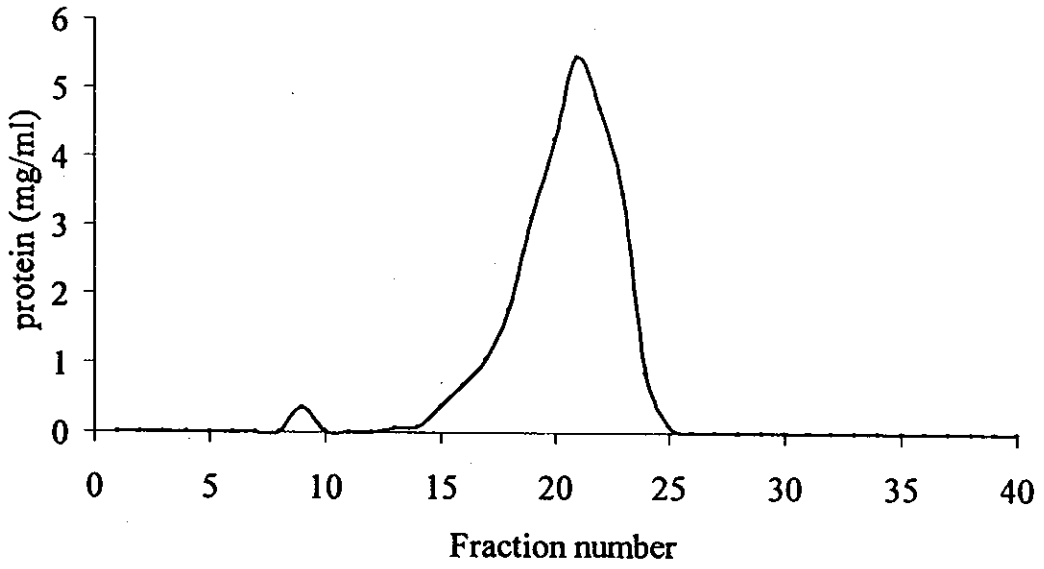


Fig. 2. Elution of crude bacteriocin through Superdex G-200 column.
Fractions 15-25 were pooled for further purification.

—

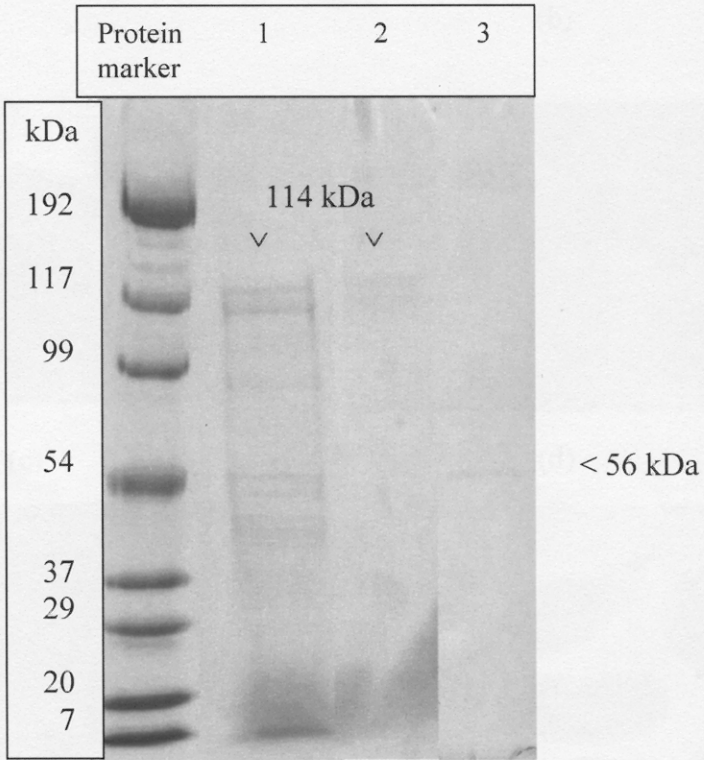


Fig. 3. SDS-PAGE of bacteriocin produced by *L. paracasei* HL32 on 4-15% Tris-HCl gel; crude sample (Lane1), partially purified sample (Lane 2) and purified sample (Lane 3).

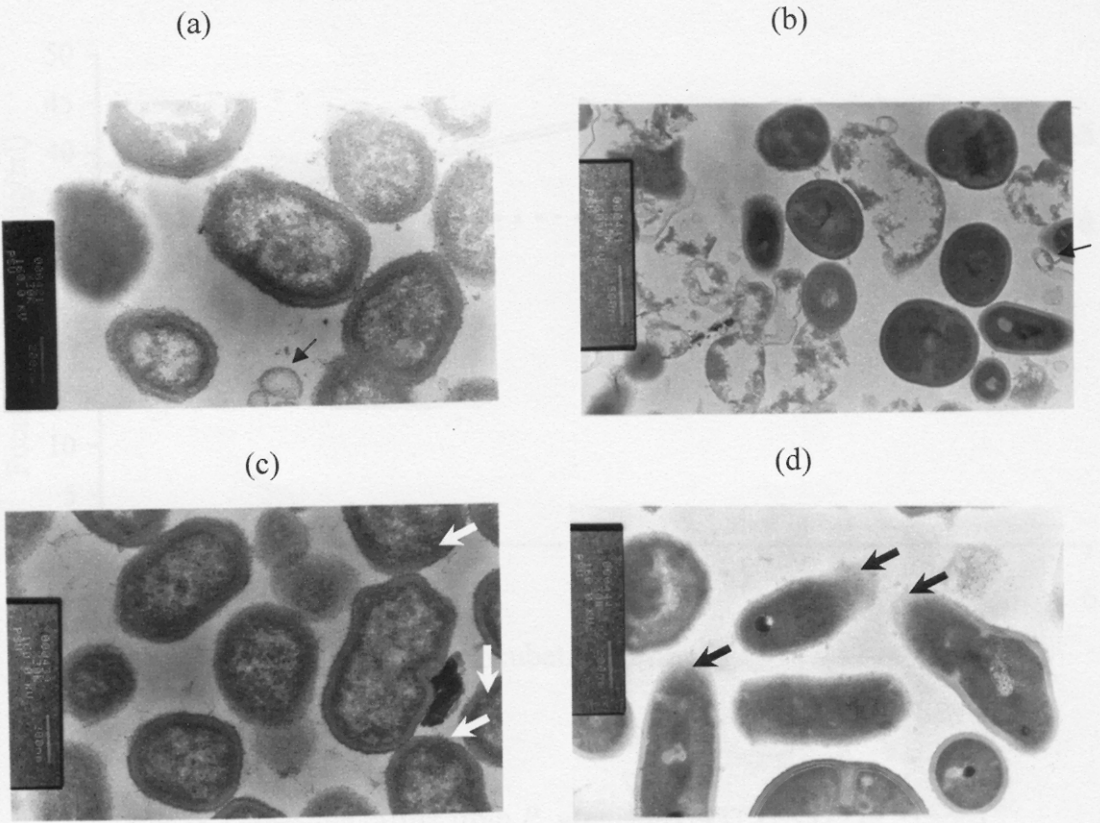


Fig. 4. Transmission electron micrographs (TEM) of *P. gingivalis* (a) ATCC 33277 control (b) WP 50 control (c) ATCC 33277 incubated with 0.14 mM bacteriocin (2 h) and (d) WP 50 incubated with 0.14 mM bacteriocin (2 h). Bar = 200 nm in all figures.

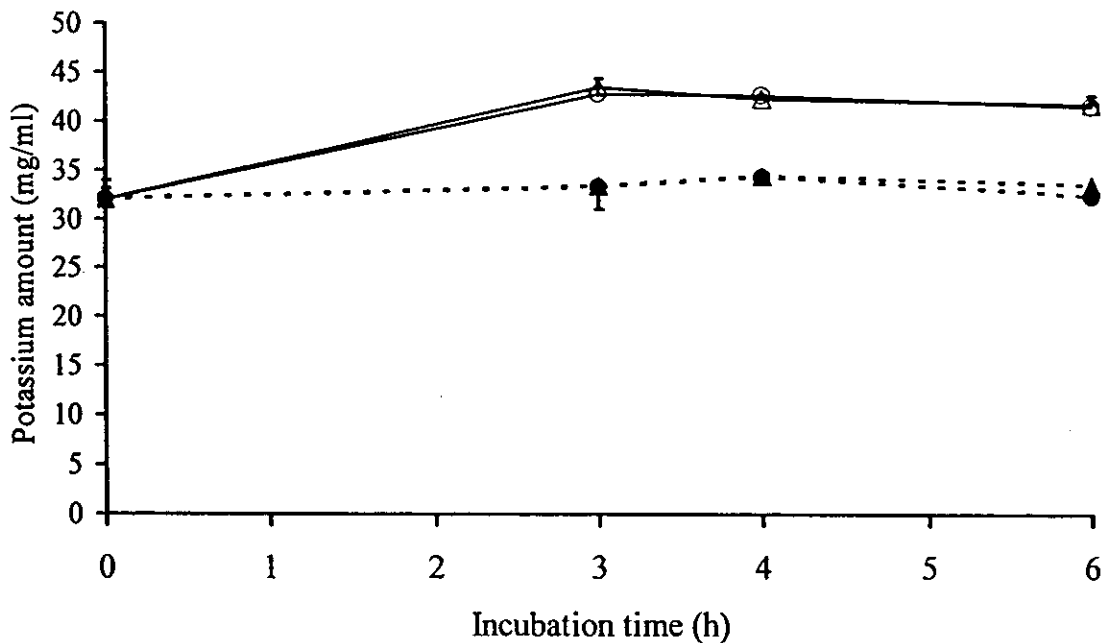


Fig. 5. Potassium efflux from *P. gingivalis* ATCC 33277 (Δ) and WP 50 (\circ) incubated with 0.14 mM bacteriocin and *P. gingivalis* ATCC 33277 (\blacktriangle) and WP50 (\bullet) without the bacteriocin.