



คุณสมบัติของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *Streptococcus* SK 5.1

ปวีณา เกษมสินธุ์¹ ปาริชาติ พุ่มขจร² พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ²

บทคัดย่อ

Streptococcus SK 5.1 เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากกระหล่ำดอง (sauerkraut) และสามารถยับยั้งการเจริญของ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 ได้ จากการศึกษาคุณสมบัติบางประการของแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากเชื้อดังกล่าว พบว่าแบคทีเรียโอซินที่ถูกสร้างออกมาจากเซลล์จะจับอยู่ที่ผิวเซลล์เมื่อ pH ของน้ำเลี้ยงเซลล์เท่ากับ 6.5 และแบคทีเรียโอซินจะถูกปล่อยออกมาจากผิวเซลล์เมื่อ pH เท่ากับ 2 กลไกการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโอซินต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบเป็นแบบ bactericidal เนื่องจากเชื้อที่สร้างแบคทีเรียโอซินไม่มีพลาสมิด ดังนั้นตำแหน่งของยีนที่ควบคุมการสร้างแบคทีเรียโอซินจึงน่าจะอยู่ในโครโมโซม ซึ่งจะต้องมีการทดลองต่อไปโดยการตรวจหายีนดังกล่าวในโครโมโซม

คำรหัส: *Streptococcus* • แบคทีเรียโอซิน

บทนำ

แบคทีเรียโอซิน (bacteriocin) เป็นโปรตีนที่สร้างจากแบคทีเรียและมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอื่นได้ โดยแบคทีเรียที่ถูกยับยั้งการเจริญได้มักเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน หรือเป็นแบคทีเรียชนิดที่ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ที่สร้างแบคทีเรียโอซินนั้น (closely-related species)¹ แบคทีเรียโอซินบางชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค (pathogenic bacteria) หรือแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการเน่าเสียของอาหาร (food-spoilage bacteria) ได้ ดังนั้นจึงมีผู้ที่สนใจศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียโอซินกันอย่างกว้างขวางเพื่อหวังว่าจะนำแบคทีเรียโอซินไปใช้เป็นสารถนอมอาหาร (food preservative)²

แบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินได้มีหลายชนิดทั้งแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก³ แลคติกแอซิดแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่พบบ่อยที่สุดว่าสามารถสร้างแบคทีเรียโอซินได้ เช่น *Lactococcus lactis*

subsp. *lactis* สร้างโนซิน (nisin)⁴ *Pediococcus acidilactici* strain H สร้างเพดดิโอซิน AcH (pediocin AcH)⁵ และ *Leuconostoc mesenteroides* UL5 สร้างมีเซนเทอโรยซิน 5 (mesenteroicin 5)⁶ เป็นต้น แบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียต่างชนิดกันอาจมีคุณสมบัติแตกต่างกันไป ทั้งในแง่ของคุณสมบัติทางชีวเคมี (biochemical properties) กลไกการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบ (indicator organism) และยีนที่ควบคุมการสร้างแบคทีเรียโอซิน ดังนั้นการศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียโอซินจึงนับว่ามีความสำคัญอย่างยิ่งก่อนที่จะนำแบคทีเรียโอซินหรือเชื้อที่สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินได้ไปใช้ประโยชน์จริง

ในการศึกษารั้ครั้งนี้จะศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียโอซินที่สร้างจาก *Streptococcus* SK 5.1 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากกระหล่ำดอง (sauerkraut) และสามารถยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes*

¹ นักศึกษาสาขาสถาปัตยกรรมชั้นปีที่ 4 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

² ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

Partial characterization of bacteriocin produced by *Streptococcus* SK 5.1

Pawena Kasemsin¹, Parichat Phumkhachorn², Pongsak Rattanaichakunsopon³

Abstract

Streptococcus SK 5.1 was a bacterial strain isolated from sauerkraut and had antimicrobial activity against *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473. Some characteristics of the bacteriocin produced by *Streptococcus* SK 5.1 were studied. The bacteriocin was adsorbed to cell surface of the producer strain at the pH 6.5 and released from its cell surface at the pH 2. The action of bacteriocin of *Streptococcus* SK 5.1 was shown to be bacteriocidal against the sensitive strain. Since the producer strain contained no plasmid, it is likely that the bacteriocin gene was located in chromosome. The further study on bacteriocin gene localization is needed.

Keywords: *Streptococcus* • bacteriocin

และ *Leuconostoc mesenteroides* โดยจะศึกษาในแง่ของกลไกในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อแบคทีเรียทดสอบและตำแหน่งของยีนที่ควบคุมการสร้างแบคทีเรียโอซิน

วัสดุและวิธีการ

1. แบคทีเรียและอาหารเลี้ยงเชื้อ

แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองมี 3 ชนิด คือ *Streptococcus* SK 5.1 ที่แยกได้จากกระทู้ดอง และเป็นสายพันธุ์ที่สร้างแบคทีเรียโอซิน (producer strain) *Lactococcus* SK 2.1 เป็นแบคทีเรียที่สร้างแบคทีเรียโอซินและทราบแล้วว่ามียีนขนาด 4.5 kb ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุม (control) ในการสกัดพลาสมิด (plasmid isolation) และ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 เป็นแบคทีเรียทดสอบ (indicator strain) ซึ่งสามารถถูกยับยั้งการเจริญได้โดย *Streptococcus* SK 5.1

แบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดเจริญได้ในอาหาร 0.2% glucose MRS (deMan, Rogosa and Sharpe) broth

หรือ agar เมื่อหมักเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส การเก็บรักษาแบคทีเรียทำได้โดยเติมกลีเซอรอล (glycerol) ลงไปในอาหาร 0.2% glucose MRS broth ที่มีเชื้อเจริญอยู่โดยให้มีปริมาณของกลีเซอรอลเป็น 20% (V/V) และเก็บเชื้อที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. การศึกษาการดูดซับของแบคทีเรียโอซินบนผิวเซลล์

โดยปกติแบคทีเรียโอซินที่สร้างโดยแลคติกแอซิดแบคทีเรียจะสามารถถูกดูดซับอยู่ที่ผิวของเซลล์ที่สร้างได้ในสภาวะที่มีค่า pH ค่าหนึ่ง ซึ่งโดยทั่วไปมักจะเป็นค่า pH ในช่วง 6-7 และจะถูกปล่อยจากผิวเซลล์ดังกล่าวได้ที่ค่า pH อีกค่าหนึ่ง ซึ่งโดยทั่วไปมักจะเป็นค่า pH ในช่วง 1-3 การศึกษาการดูดซับของแบคทีเรียโอซินบนผิวเซลล์ของ *Streptococcus* SK 5.1 ใช้วิธีของ Yang⁷ โดยนำ *Streptococcus* SK 5.1 ที่เลี้ยงในอาหาร 0.2% glucose MRS broth ปริมาตร 300 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาปรับ pH ให้ได้เป็น 6.5 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เพื่อเก็บตะกอนเซลล์พร้อมทั้งเก็บส่วนใสปราศจากเซลล์

¹ The 4th year student in Microbiology, Faculty of Science, Ubonratchathani University

² Department of Biological Science, Faculty of Science, Ubonratchathani University

(culture supernatant) ไว้ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (inhibition activity) ด้วย จากนั้นล้างตะกอนเซลล์ที่ได้ด้วย sodium phosphate buffer pH 6.5 ละลายตะกอนเซลล์ใน 100 mM NaCl pH 2.0 โดยคนตะกอนเซลล์ตลอดเวลาเป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อให้แบคทีเรียหลุดออกจากผิวเซลล์ หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เพื่อเก็บส่วนใสปราศจากเซลล์ (supernatant) นำส่วนใสปราศจากเซลล์ไปปรับ pH เป็น 6.5 แล้วนำไปทดสอบ inhibition activity

3. การทดสอบ inhibition activity

การทดสอบ inhibition activity ทำโดยนำส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ (culture supernatant หรือ supernatant ที่ได้หลังจากการละลายตะกอนเซลล์ที่ pH 2.0) มาเจือจางที่ระดับความเจือจางต่างๆ ดังนี้ คือ ระดับความเจือจาง 1:2 1:4 1:8 1:16 1:32 1:64 และ 1:128 ตามลำดับ จากนั้นนำเอาส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ที่มีระดับความเจือจางต่างๆ เหล่านี้ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *L. mesenteroides* TISTR 473 โดยใช้วิธี swab-paper disc ซึ่งทำโดยเลี้ยงแบคทีเรียทดสอบใน 0.2% glucose MRS broth จากนั้นนำ culture ของแบคทีเรียดังกล่าวไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาป้าย (swab) ลงบนผิวหน้าของอาหาร 0.2% glucose MRS agar นำแผ่น paper disc ที่ปลอดเชื้อ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร มาวางบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งดังกล่าว แล้วหยด culture supernatant หรือ supernatant ที่ได้หลังจากการละลายตะกอนเซลล์ที่ pH 2.0 ของ *Streptococcus* SK 5.1 ที่เจือจางไว้แล้ว ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงบนแผ่น paper disc นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตว่ามี inhibition zone เกิดขึ้นรอบๆ แผ่น paper disc หรือไม่ ถ้าเห็น inhibition

zone เกิดขึ้นรอบๆ แผ่น paper disc ก็แสดงว่าแบคทีเรียโอสินที่นำมาทดสอบมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบที่ใช้ในการทดลอง

ในการศึกษาได้รายงานค่า inhibition activity ในหน่วย AU (arbitrary unit)/ml โดยค่า inhibition activity ในหน่วย AU/ml สามารถหาได้จากค่าส่วนกลับของระดับความเจือจางสูงสุดของส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ที่ยังสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ด้วยอย่างเช่น ถ้าใช้ส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ที่เตรียมได้จาก culture ของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ในการทดสอบ inhibition activity และพบวาระดับความเจือจางสูงสุดของส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ที่ยังสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ คือ 1:16 ดังนั้นค่า inhibition activity จะมีค่าเท่ากับ 16 AU/25 ไมโครลิตร หรือ 640 AU/ml

4. การศึกษากลไกการยับยั้งการเจริญต่อแบคทีเรียดูด

เลี้ยง *L. mesenteroides* TISTR 473 ในอาหาร 0.2% glucose MRS broth ปริมาตร 30 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมน้ำส่วนใสปราศจากเซลล์ (culture supernatant) ของ *Streptococcus* SK 5.1 ปริมาตร 3 มิลลิลิตรลงไป เริ่มเก็บตัวอย่างที่เวลา 0 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างครั้งละ 3 มิลลิลิตร ที่เวลา 30, 60, 90 และ 120 นาที นำตัวอย่างที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และนำไปตรวจนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell count) โดยวิธี spread plate ลงบนผิวหน้าอาหาร 0.2% glucose MRS agar ในการศึกษาได้ทำการทดลองชุดควบคุม (control) ควบคู่ไปด้วย โดยในชุดควบคุมจะเติม 0.2% glucose MRS broth ปริมาตร 3 มิลลิลิตร แทนการเติมน้ำส่วนใสปราศจากเซลล์ของเชื้อ *Streptococcus* SK 5.1

5. การตรวจหาพลาสมิดจากเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย
 การสกัดพลาสมิดจากเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ใช้วิธีของ Anderson and McKay⁹ ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ นำแลคติกแอซิดแบคทีเรียมาเลี้ยงใน 0.2% glucose MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการถ่ายเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหาร 0.2% glucose MRS broth ใหม่ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง เพื่อให้ culture ของแลคติกแอซิดแบคทีเรียอยู่ในระยะ log phase (ประมาณ 10^6 cfu/ml) นำ culture ของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่อยู่ในระยะ log phase ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ แล้วนำไปตกตะกอนโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำตะกอนที่ได้มาเติม solution I (6.7% sucrose, 50 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) ปริมาตร 379 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมนสารละลาย lysozyme ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรใน solution II (25 mM Tris, pH 8.0) ปริมาตร 96.5 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติม solution III (0.25 M EDTA, 50 mM Tris, pH 8.0) ปริมาตร 48.2 ไมโครลิตร และสารละลาย sodium dodecyl sulphate (SDS) ความเข้มข้น 20% wt/vol ใน solution IV (20 mM EDTA, 50 mM Tris, pH 8.0) ปริมาตร 27.6 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมนสารละลาย 3 N NaOH ปริมาตร 27.6 ไมโครลิตร ผสมกลับปอกกลับเบาๆ เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติม solution V (2 M Tris-hydrochloride, pH 7.0) ปริมาตร 49.6 ไมโครลิตร ผสมกลับปอกกลับเบาๆ อีกครั้งเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเติม Solution VI (5 M NaCl) ปริมาตร 71.7 ไมโครลิตร แล้วจึงเติม phenol ที่อิ่มตัวใน 3% NaCl ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมกลับปอกกลับเบาๆ ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว

12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดส่วนใสชั้นบนใส Eppendorf tube อันใหม่ เติม phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมกลับปอกกลับเบาๆ ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสชั้นบนใส Eppendorf tube อันใหม่ เติม isopropanol ปริมาตร 700 ไมโครลิตร แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที จากนั้นจึงนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอน DNA ที่ได้ไปล้างด้วย 70% alcohol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และตกตะกอน DNA อีกครั้งหนึ่ง โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอน DNA ที่ได้ไปทำให้แห้งแล้วละลายตะกอน DNA ด้วย TE buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำสารละลาย DNA ที่ได้ไปตรวจหาพลาสมิดโดยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นของ agarose gel เท่ากับ 1% ในสารละลาย 1XTAE ใช้ความต่างศักย์ที่ 100 volt เป็นเวลา 45 นาที

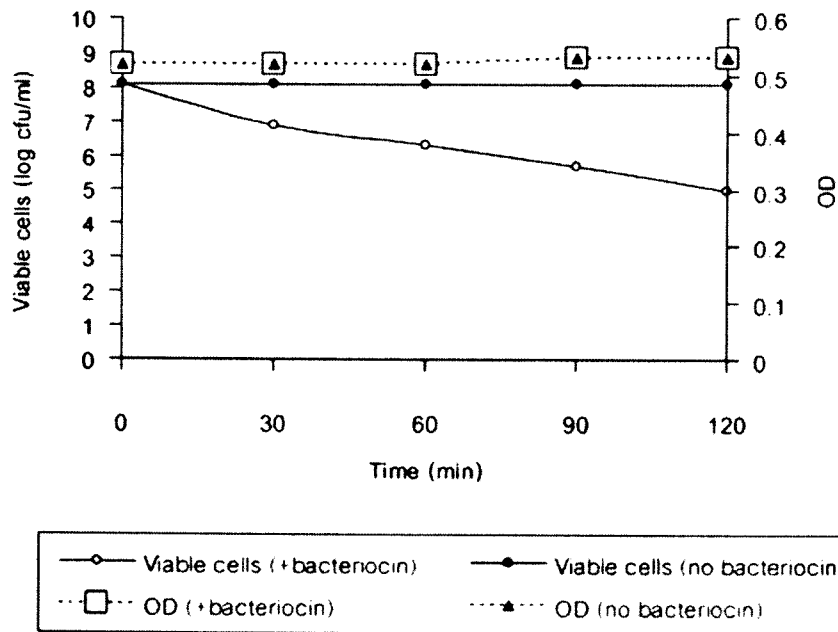
ผลการศึกษา

จากการศึกษาการดูดซับ (adsorption) ของแบคทีเรียโอซินบนผิวเซลล์ของ *Streptococcus* SK 5.1 ซึ่งเป็นเชื้อที่สร้างแบคทีเรียโอซิน โดยเลี้ยงเซลล์และปรับ pH ของน้ำเลี้ยงเซลล์ให้เท่ากับ 6.5 แล้วนำเฉพาะส่วนใสปราศจากเซลล์ไปหาค่า inhibition activity พบว่ามีค่าเท่ากับ 1,600 AU/ml แต่หลังจากล้างตะกอนเซลล์และละลายตะกอนเซลล์ในสารละลายที่มี pH เท่ากับ 2 แล้วจึงนำส่วนใสปราศจากเซลล์มาทดสอบ inhibition activity อีกครั้ง ปรากฏว่ามี inhibition activity เพิ่มขึ้นเป็น 12,800 AU/ml

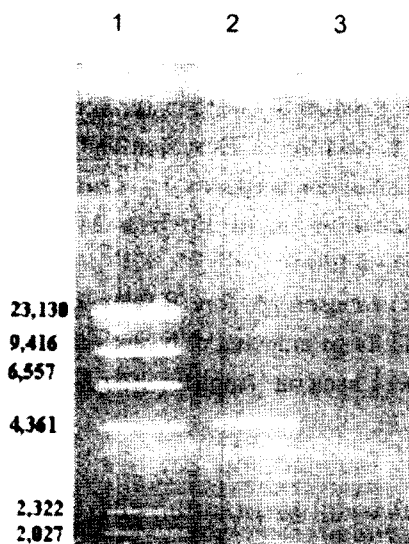
ในการศึกษากลไกการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ *L. mesenteroides* TISTR 473 โดยแบคทีเรียโอซินที่สร้างจาก *Streptococcus* SK 5.1 พบว่าหลังจากที่เติมแบคทีเรียโอซินลงใน culture ของเชื้อ

L. mesenteroides TISTR 473 แล้ววัดค่า OD ของ เชื้อที่เวลาต่างๆ พบว่า OD ที่ได้มีค่าเกือบจะคงที่ แต่ เมื่อนับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตกลับพบว่า มีจำนวนลดลง อย่างมากเมื่อเทียบกับการทดลองชุดควบคุม (รูปที่ 1)

ผลจากการสกัดพลาสมิดของเชื้อ *Streptococcus* SK 5.1 เปรียบเทียบกับเชื้อ *Lactococcus* SK 2.1 ซึ่งทราบแล้วมีพลาสมิดขนาดเท่ากับ 4.5 kb ปรากฏว่า ไม่พบว่าเชื้อ *Streptococcus* SK 5.1 มีพลาสมิด (รูปที่ 2)



รูปที่ 1 ผลของสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สร้างโดย *Streptococcus* SK 5.1 ต่อ *L. mesenteroides* TISTR 473



รูปที่ 2 แล่น DNA ที่ได้จากการสกัดพลาสมิดจาก *Lactococcus* SK 2.1 และ *Streptococcus* SK 5.1

Lane 1 = Lambda DNA digested with Hind III

Lane 2 = แล่น DNA ที่ได้จากการสกัดพลาสมิดจาก *Lactococcus* SK 2.1

Lane 3 = แล่น DNA ที่ได้จากการสกัดพลาสมิดจาก *Streptococcus* SK 5.1 (น้ำหนักโมเลกุลของ DNA แสดงในหน่วย bp)

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

ในการศึกษานี้ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติทางประการของแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Streptococcus* SK 5.1 ซึ่งแยกได้จากกระหล่ำตอง จากการศึกษาการดูดซับของแบคทีเรียโอซินบนผิวเซลล์ที่สร้างแบคทีเรียโอซิน (producer cell) โดยเปรียบเทียบ inhibition activity ของ culture supernatant เริ่มต้นซึ่งปรับให้มี pH เท่ากับ 6.5 กับ supernatant ที่ได้หลังจากปรับให้เซลล์ที่สร้างแบคทีเรียโอซินแขวนลอยอยู่ในสารละลายที่มี pH เท่ากับ 2 เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง พบว่า inhibition activity สูงขึ้นประมาณ 8 เท่า คือจาก 1,600 AU/ml เป็น 12,800 AU/ml แสดงว่าที่ pH เท่ากับ 2 แบคทีเรียโอซินน่าจะถูกล่อยออกมาจากผิวเซลล์ได้มากกว่าที่ pH เกือบจะเป็นกลาง (pH 6.5) การดูดซับของแบคทีเรียโอซินบนผิวเซลล์ที่สร้างแบคทีเรียโอซินเมื่อ pH เท่ากับ 6.5 และหลุดออกจากผิวเซลล์เมื่อ pH เท่ากับ 2 สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการแยกแบคทีเรียโอซินออกจากน้ำเลี้ยงเซลล์ เพื่อนำไปเตรียมเป็นแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์ต่อไปได้⁷

กลไกการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ *L. mesenteroides* TISTR 473 โดย แบคทีเรียโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Streptococcus* SK 5.1 เป็นแบบ bactericidal โดยไม่ทำให้เซลล์ของจุลินทรีย์ทดสอบแตกสลาย เพราะค่าการดูดกลืนแสง (OD) เกือบจะคงที่ แต่เมื่อนับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (viable cell count) กลับลดลงอย่างมาก กลไกการยับยั้งการเจริญลักษณะนี้ คล้ายคลึงกับแกสเซอร์ซิน A (gassericin A) ซึ่งเป็นแบคทีเรียโอซินที่สร้างโดย *Lactobacillus gasseri* LA 39¹⁰ และแบซิลโลซิน 490 (bacillocin 490) ซึ่งเป็นแบคทีเรียโอซินที่สร้างโดยเชื้อ *Bacillus licheniformis*¹¹

จากรายงานการศึกษาเกี่ยวกับตำแหน่งของยีนสำหรับแบคทีเรียโอซินหลายชนิด พบว่ายีนสำหรับแบคทีเรียโอซินบางชนิดเป็นยีนที่อยู่บนโครโมโซม^{12, 13} แต่ยีนสำหรับแบคทีเรียโอซินบางชนิดเป็นยีนที่อยู่บนพลาสมิด¹⁴ ใน

การศึกษานี้จึงได้ตรวจหาพลาสมิดจากเชื้อ *Streptococcus* SK 5.1 โดยทำการสกัดพลาสมิดจากเซลล์ของ *Streptococcus* SK 5.1 และนำไปวิเคราะห์โดยวิธี agarose gel electrophoresis ผลปรากฏว่าตรวจไม่พบพลาสมิดจากเชื้อดังกล่าว ดังนั้นจึงอาจจะสรุปได้ว่ายีนสำหรับแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Streptococcus* SK 5.1 น่าจะอยู่บนโครโมโซม ซึ่งจะต้องมีการทดลองต่อไปโดยการตรวจหายีนดังกล่าวในโครโมโซม

เอกสารอ้างอิง

1. Jack RW, Tagg JR, Ray B. Bacteriocin of gram positive bacteria. Microbiol Rev 1995; 59: 171-200.
2. Klaenhammer TR. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochimie 1988; 70: 337-49.
3. Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW. Bacteriocins of gram-positive bacteria. Bacteriol Rev 1976; 40: 722-56.
4. Buchman GW, Banerjee S, Hansen JN. Structure, expression and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. J Biol Chem 1988; 263: 16260-6.
5. Bhunia AK, Johnson MC, Ray B. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pedococcus acidilactici*. J Appl Bacteriol 1988; 65: 261-8.
6. Daba H, Pandian S, Gosselin JF, Simard RE, Huang J, Lacroix C. Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. Appl Environ Microbiol 1991; 57: 3450-5.
7. Yang R, Johnson M, Ray B. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. Appl Environ Microbiol 1992; 58: 3355-9.
8. พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ และปาริชาติ พุ่มขจร. วิธีการอย่างง่ายในการทดสอบการสร้างแบคทีเรียโอซิน. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 2541. 26: 281-8.

9. Anderson DG, Mc Kay LL. Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic Streptococci. *Appl Environ Microbiol* 1983; 45: 549-52.
10. Itoh T, Fujimoto Y, Kawai Y, Toba T, Saito T. Inhibition of food-borne pathogenic bacteria by bacteriocins from *Lactobacillus gasseri*. *Lett Appl Microbiol* 1995; 21: 137-41.
11. Martirani L, Varcamonti M, Naclerio G, De Felice M. Purification and partial characterization of bacillocin 490, a novel bacteriocin produced by a thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. *Microbial Cell Factories* 2002; 1: 1-5.
12. Franz CMAP, Du Toit M, Olasupo NA, Schillinger U, Holzapfel WH. Plantaricin D, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* BFE 905 from ready-to-eat salad. *Lett Appl Microbiol* 1998; 26: 231-5.
13. Kelly WJ, Asmundson RV, Huang CM. Characterization of plantaricin KW 30, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *J Appl Bacteriol* 1996; 81: 657-62.
14. Hyronimus B, Le Marrec C, Urdaci MC. Coagulin, a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans* I₄. *J. Appl. Microbiol* 1998; 85: 42-50.