

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

จากการแยกแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ทนอุณหภูมิสูง (thermotolerant) ในตัวอย่างอาหารหมักดองจากพืช สัตว์ ผลไม้ดอง และผลิตภัณฑ์นม พบว่าขั้นตอนการแยกตัวอย่างอาหารหมักดองส่วนใหญ่จะเป็นการหมักด้วยกรดที่ใช้ผสมเป็นน้ำดองซึ่งประกอบด้วย น้ำส้มสายชู (CH_3COOH) ปรงรสด้วยน้ำตาล เกลือ และเครื่องเทศ เพื่อให้มีรสเปรี้ยว เค็ม หวาน มีกลิ่นหอมและสีที่น่ารับประทาน ใช้เวลาในการหมักไม่นาน (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2543) เมื่อนำมาแยกแลคติกแอซิดแบคทีเรียมักจะไม่ค่อยพบเชื้อหรือพบปริมาณเล็กน้อย และต้องใช้เวลาในการบ่มนานเกิน 48 ชั่วโมงเมื่อเทียบกับอาหารหมักดองตามธรรมชาติซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นอาหารหมักดองตามตลาดนอกเมือง จะแยกเชื้อได้ง่าย บางตัวอย่างเช่น ใบเมี่ยง ผักกาดดอง หน่อไม้ดอง สามารถแยกเชื้อได้ 2 ถึง 3 ชนิด เชื้อเจริญเติบโตได้เร็วประมาณ 24 ชั่วโมง ซึ่งจะมีข้อสังเกตได้ว่าตัวอย่างอาหารชนิดใดที่หมักด้วยกรดโดยเมื่อเทตัวอย่างอาหารลงใน MRS broth ที่มี bromocresol green เป็นอินดิเคเตอร์สีของอาหารจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลืองทันที ส่วนอาหารที่เป็นอาหารหมักดองตามธรรมชาติสีของอาหารจะไม่เปลี่ยนหรือสีจะจางลงเล็กน้อย และในขั้นตอนการแยกแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่เป็น thermotolerant ถ้าแยกที่อุณหภูมิห้อง ($15-25^\circ\text{C}$) และเชื้อสามารถเจริญได้ แต่เมื่อนำไปทดสอบการเจริญที่ 45°C เชื้อส่วนใหญ่เกือบ 98 เปอร์เซ็นต์จะไม่สามารถเจริญได้ แต่ถ้าแยกที่อุณหภูมิ 45°C ก่อนแล้วจึงนำไปทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิห้อง ($15-25^\circ\text{C}$) เชื้อสามารถเจริญได้ทั้งอุณหภูมิสูงและอุณหภูมิต่ำ ดังนั้นในขั้นตอนการแยกควรทำการแยกเชื้อที่ 45°C ก่อน แล้วจึงนำไปทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิห้อง

ในขั้นตอนการเก็บรักษาเชื้อควรหลีกเลี่ยงการต่อเชื้อ (subculture) บ่อย ๆ เนื่องจากการทดลองพบว่าเชื้อที่มีการต่อเชื้อเกิน 3 ครั้ง จะสูญเสียความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ ดังนั้นในการเก็บรักษาเชื้อถ้าต้องการเก็บเชื้อไว้นาน ๆ โดยที่มีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของเชื้อน้อยที่สุดควรเก็บไว้ใน 20% glycerol triptose broth (ศิริพรรณ, 2533) โดยแบ่งเก็บเป็น vial เล็ก ๆ หลาย ๆ vial สามารถเก็บไว้ที่ช่องแช่แข็งของตู้เย็นธรรมดาหรือจะเก็บไว้ที่ -20°C ก็ได้ เวลาใช้ควรนำมาทำให้เชื้อแข็งแรงก่อน โดยเลี้ยงเชื้อใน MRS broth ก่อนแล้วจึงนำไปเลี้ยงบน MRS agar การเก็บใน 20% glycerol triptose broth จะสามารถเก็บเชื้อได้นานเป็นปี หรือจะเก็บไว้ใน Litmus milk

ก็ได้ซึ่งจะสามารถเก็บเชื้อได้นาน 3-6 เดือนโดยไม่ต้องต่อเชื้อ แต่มีข้อเสียคือจะปนเปื้อนด้วยเชื้อราได้ง่ายเนื่องจากการเก็บโดยวิธีนี้จะเก็บไว้ในตู้เย็นธรรมดาจึงทำให้เชื้อราเจริญได้ง่าย ถ้าต้องการความสะดวกรวดเร็วในการใช้งานสามารถเก็บในอาหารแข็ง MRS ที่เติม 2% CaCO_3 ได้ แต่มีข้อเสียคือ เชื้อตายได้ง่าย ถ้าไม่มีการต่อเชื้อภายใน 2-3 อาทิตย์ และเกิดการปนเปื้อนเชื้อราได้ง่าย วิธีนี้จึงเหมาะสำหรับเก็บเชื้อไว้ทดสอบภายในหนึ่งอาทิตย์

จากการนำแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ 4 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* และ *Aspergillus flavus* รวมทั้งเชื้อทดสอบของอัญรา (2541) ได้แก่ *Salmonella enteritidis*, *Vibrio parahaemolyticus* และ *Bacillus cereus* โดยวิธีแพร่จากแผ่นกระดาษกลม (Paper disc diffusion method) โดยใช้ส่วนของน้ำเลี้ยงที่มีตัวเซลล์และไม่มีการปรับ pH พบว่าจากจำนวนเชื้อ thermotolerant lactic acid bacteria ทั้งหมด 117 ไอโซเลท ให้ผลในการยับยั้งต่อ *E. coli*, *S. aureus*, *S. enteritidis*, *V. parahaemolyticus* และ *B. cereus* 5, 19, 3, 4 และ 18 ไอโซเลท ตามลำดับ โดยเชื้อที่ถูกยับยั้งส่วนใหญ่จะเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งผลการทดลองได้ใกล้เคียงกับการศึกษาของอัญรา (2541) ส่วน *Sacch. cerevisiae* มี 6 ไอโซเลท ที่ให้ผลการยับยั้งได้บางส่วน (Intermediate inhibition) และ *A. flavus* มี 3 ไอโซเลท ที่ให้ผลยับยั้งได้เฉพาะตอนที่เป็นเส้นใย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างทางโครงสร้างของผนังเซลล์ระหว่างแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ ยีสต์และรา เพราะเซลล์ของจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีกลไกการป้องกันตัวเองจากสิ่งแปลกปลอมที่จะผ่านเข้า-ออกเซลล์ต่างกัน เช่น เซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบมีชั้นที่เป็น lipopolysaccharide ที่ขัดขวางการเข้าทำลายเซลล์โดยสารต่าง ๆ และยังมี receptors สำหรับแบคทีเรียฟาจ (bacteriophage) และแบคทีเรียโอซิน (Quinn, 2536) การที่แบคทีเรียแกรมลบมี receptors สำหรับแบคทีเรียโอซินอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้แบคทีเรียโอซินไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบหรือยับยั้งได้น้อย นอกจากนี้ lipopolysaccharide ในผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบมีคุณสมบัติเป็นเอนโดทอกซิน (endotoxin) ซึ่งสามารถขัดขวางสารที่มีโมเลกุลใหญ่ ๆ เช่น แอนติบอดีและ lytic enzyme ไม่ให้ผ่านเข้าเซลล์ จึงมีส่วนช่วยในการป้องกันเซลล์ ต่างจากแบคทีเรียแกรมบวกที่มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นเปปติโดไกลแคนและโพลีแซคคาไรด์ที่เป็นน้ำตาลซึ่งสลายตัวได้ง่ายจึงทำให้สารต่าง ๆ ผ่านเข้าออกจากเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกได้ง่าย ส่วนโครงสร้างผนังเซลล์ของเชื้อราส่วนใหญ่ประกอบด้วยไคติน (chitin) โครงสร้างผนังเซลล์ของยีสต์ส่วนใหญ่ประกอบด้วยกลูแคน (glucan) และแมนแนน (mannan) (Berry, 1982) ซึ่งอาจมีความทนทานต่อการถูกทำลายด้วยกรด ดังเช่นการทดลองนี้ จะต้องใช้กรดแลคติกที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 50% ขึ้นไปจึงจะสามารถยับยั้งเชื้อราและยีสต์ได้ นอกจากนี้ส่วนประกอบของผนังเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงตามอายุและอิทธิพล

ของสิ่งแวดล้อม เช่น ส่วนประกอบของอาหาร ความเป็นกรดค่า อุณหภูมิ อาจมีผลต่อการยับยั้งเชื้อราและยีสต์ได้ ดังจะเห็นจากการทดลองที่เชื้อแลกติกแอซิคแบคทีเรียยับยั้งเชื้อราได้เฉพาะตอนที่เป็นเส้นใย ส่วนยีสต์จะยับยั้งได้ไม่หมด (intermedia inhibition) ซึ่งอาจจะเป็นการยับยั้งการเจริญเติบโตโดยที่เซลล์ไม่ถูกทำลาย และการยับยั้งจะไม่เกิดขึ้นทุกครั้งที่ทดลองอาจเนื่องมาจากปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการยับยั้ง

จากการศึกษาขั้นตอนการยับยั้งส่วนใหญ่ น่าจะเกิดจากกรดแลกติกที่เชื้อแลกติกแอซิคแบคทีเรียสร้างขึ้น การที่กรดแต่ละชนิดมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ขึ้นอยู่กับความสามารถในการแตกตัวของกรดแล้วให้ H^+ กรดที่มีความสามารถแตกตัวได้ดี เช่น กรดกำมะถัน กรดเกลือ จะมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้น้อยกว่ากรดที่อยู่ในรูปที่ไม่แตกตัว เช่น กรดอะซิติก กรดแลกติก เนื่องจากความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ต้องอาศัยทั้งปริมาณไฮโดรเจนไอออนและความเป็นพิษของกรดที่อยู่ในรูปไม่แตกตัว เซลล์ส่วนใหญ่จะไม่ยอมให้กรดที่แตกตัวผ่านเข้าออกเซลล์ แต่จะยอมให้กรดที่ไม่แตกตัวผ่านเข้าออกเซลล์ได้ กรดที่ไม่แตกตัว เช่น กรดแลกติกเมื่อผ่านเข้าไปในเซลล์ จะเกิดการแตกตัวภายในเซลล์ โดยไม่สามารถกลับออกมาออกเซลล์ได้ เมื่อมีการสะสมมาก ๆ pH ของเซลล์จะเปลี่ยนไปจนกระทั่งเซลล์ไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ จึงทำให้กรดแลกติกหรือกรดที่เชื้อแลกติกแอซิคแบคทีเรียผลิตขึ้นมีคุณสมบัติที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่นได้ (ลูกจันทร์, 2535) ดังนั้นเพื่อเป็นการทดสอบว่าการยับยั้งไม่ได้เกิดขึ้นเนื่องจากกรดหรือตัวเชื้อ แต่อาจเป็นผลเนื่องมาจากการยับยั้งด้วยสาร metabolite ที่เชื้อสร้างขึ้นได้แก่ bacteriocin หรือสารที่เป็น low molecular metabolite เช่น reuterin diacetyl และสารประเภทเปปไทด์ (Gilliland and Speck, 1975; Daeschel, 1989) จึงได้ทดลองต่อโดยการนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปปั่นที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที $4^{\circ}C$ 15 นาที ปรับ pH ด้วย 2N NaOH ให้มี pH 6.5-7.0 นำ supernatant กรองด้วย cellulose acetate ขนาด $0.2 \mu m$ จะได้น้ำเลี้ยงที่ผ่านการปรับ pH และไม่มีตัวเซลล์ (cell-free culture filtrate) นำไปทดสอบผลการยับยั้งโดยวิธีแพร่จากแผ่นกระดาษกลม (paper disc diffusion method) พบว่า มีเพียง 2 ไอโซเลท คือ CT16 และ CT62 ที่ยังคงให้ผลการยับยั้ง โดย CT16 ให้ผลการยับยั้งต่อ *E. coli*, *S. aureus* และ *B. cereus* ส่วน CT62 ให้ผลยับยั้งต่อ *S. aureus* และ *B. cereus* จากการทดลองในขั้นตอนนี้ทำให้ทราบว่า การยับยั้งไม่ได้เกิดจากกรดที่เชื้อสร้างขึ้นหรือเกิดจากตัวเชื้อเอง เนื่องจากได้ปรับ pH ให้เป็นกลาง และได้กรองเอาตัวเชื้อออกแล้ว จึงคาดว่า การยับยั้งน่าจะเกิดจากสาร metabolite อื่น ๆ จึงได้ศึกษาคุณสมบัติของสารยับยั้ง ได้แก่ การศึกษาถึงอิทธิพลของกรดที่ได้จากการหมักน้ำตาล และอิทธิพลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยการลดปริมาณน้ำตาลกลูโคสจาก 2% ให้เหลือเพียง 0.2% และบ่มเชื้อใน anaerobe incubator จากการลดปริมาณน้ำตาลทำให้ pH ของ culture media เพิ่มขึ้น ซึ่งแต่เดิมจากการใช้

กลูโคส 2% pH จะอยู่ในช่วง 4.2-4.5 เมื่อลดเปอร์เซ็นต์น้ำตาลจะอยู่ในช่วง 6.1-6.5 แต่ยังคงให้ผลในการยับยั้งเชื้ออยู่ การยับยั้งที่เกิดขึ้นจึงไม่ได้เกิดจากกรดอินทรีย์ที่ได้จากการหมักน้ำตาลหรือเกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จึงได้ศึกษาถึงคุณสมบัติการทนความร้อนของสารยับยั้ง โดยการนำไปต้มที่เวลา 5, 10, 15 และ 20 นาที พบว่าทั้ง 2 ไอโซเลท ยังคงให้ผลการยับยั้งต่อ *S. aureus* และ *B. cereus* เมื่อต้มนาน 5 และ 10 นาที ซึ่งผลการทดลองใกล้เคียงกับเชื้อของอัจฉรา (2541) ที่คาดว่าสารยับยั้งน่าจะเป็นโปรตีนที่ทนความร้อนได้นาน 10 นาที จากสมมติฐานดังกล่าว ถ้าสารยับยั้งเป็นโปรตีนจึงน่าจะถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์โปรติเอส การศึกษาคุณสมบัติในข้อนี้ได้เติมเอนไซม์โปรติเอสโดยใช้ทริปซิน (trypsin) ใน cell-free culture filtrate พบว่าทั้ง 2 ไอโซเลทไม่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้คือ *S. aureus* และ *B. cereus* ซึ่งคาดว่าสารยับยั้งนี้เป็นโปรตีนที่ถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์โปรติเอส จากรายงานของ Swetiwathana *et al.*, 1999) การแยกแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สร้างแบคทีริโอซินในนมได้โดยการเติมเอนไซม์โปรติเอสโดยใช้ trypsin เติมลงไปในการอาหาร MRS แล้วนำไปทดสอบการยับยั้งกับเชื้อทดสอบ ถ้าไม่เกิดการยับยั้งแสดงว่าเชื้อสร้างแบคทีริโอซิน ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นโปรตีนชนิดหนึ่ง Holzapfel และ Mortvedt (Holzapfel *et al.*, 1995, Mortvedt *et al.*, 1991) พบว่าแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกันโดยการยับยั้งไม่ได้เกิดขึ้นเนื่องจากกรดหรือสารประกอบอื่น ๆ ที่เชื้อสร้างขึ้น คาดว่าสารนี้น่าจะเป็นแบคทีริโอซิน เพื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติดังกล่าวจึงนำ cell-free culture filtrate ของไอโซเลท CT16 และ CT62 ไปทดสอบผลการยับยั้งกับแลคติกแอซิดแบคทีเรียด้วยกันคือ *Lactobacillus lactis*, *Streptococcus lactis* และ *Pediococcus* sp. พบว่าทั้ง 2 ไอโซเลทสามารถยับยั้งเชื้อ *Pediococcus* sp. ได้ ภายหลังจำแนกเชื้อไอโซเลท CT16 และ CT62 ได้เป็น *Pediococcus* sp. การทดลองนี้จึงเป็นคุณสมบัติข้อหนึ่งของสารยับยั้งที่คาดว่าน่าจะเป็นแบคทีริโอซิน

จากการศึกษาคุณสมบัติบางประการของสารยับยั้งที่สร้างขึ้นโดยไอโซเลท CT16 และ CT62 ได้แก่ การลดอิทธิพลของกรดและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ การทนความร้อน การถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์โปรติเอส และการยับยั้งแบคทีเรียสายพันธุ์ใกล้เคียงกัน จากคุณสมบัติเหล่านี้ คาดว่าสารยับยั้งน่าจะเป็นโปรตีนที่เป็นแบคทีริโอซิน จึงศึกษาถึงการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์บางส่วนโดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยผงถ่าน (activated charcoal) จากการทดลองพบว่า ไอโซเลท CT62 เมื่อตกตะกอนโปรตีนด้วยผงถ่านความเข้มข้น 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ใช้เวลาในการตกตะกอน 3 ชั่วโมง ตะกอนของผงถ่านสามารถยับยั้ง *B. cereus* ได้ ส่วน CT16 ไม่สามารถยับยั้งเชื้อใดได้ การตกตะกอนโปรตีนด้วยผงถ่านมีข้อเสียคือเมื่อใช้ผงถ่านที่ความเข้มข้นสูง ๆ ผงถ่านไม่สามารถละลายได้หมดทำให้ไม่สะดวกต่อการนำมาใช้ตกตะกอนโปรตีน และถ้าจะทำให้โปรตีนที่

ตกตะกอนได้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นจะต้องมีขั้นตอนในการสกัดเอาโปรตีนออกมาจากผงถ่าน ซึ่งเป็นวิธีการที่ยุ่งยากจึงไม่นิยมนำมาใช้ในการตกตะกอนโปรตีน วิธีที่นิยมใช้ในการตกตะกอนโปรตีนอีกวิธีหนึ่งคือ การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว จากการทดลองในครั้งนี้ พบว่าการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวตั้งแต่ 40-80% ของไอโซเลท CT62 ให้ผลการยับยั้งต่อ *S. aureus* โดยให้วงใสกว้างที่สุดที่ความเข้มข้น 70% ความเข้มข้นนี้ใกล้เคียงกับงานของอัจฉรา (อัจฉรา, 2541) ที่ตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 60% ใน *Pediococcus* sp. A7 และ Lee (Lee et al., 1999) ที่ตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 75% ใน *Lactococcus lactis* sub sp. *lactis* H-559

ทำการตกตะกอนโปรตีนไอโซเลท CT62 อีกครั้งด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 70% ตะกอนที่ได้แบ่งเป็น 3 ส่วนคือ ตะกอนส่วนที่นำไปต้ม 10 นาที ส่วนที่เติมเอนไซม์โปรติเอส และส่วนที่เป็นตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต นำไปทดสอบผลการยับยั้งกับเชื้อทดสอบพบว่า ส่วนที่คัมมานาน 10 นาทีและส่วนที่ไม่คัมสามารถยับยั้ง *S. aureus* และ *Pediococcus* sp. A7 ได้ดี และยับยั้ง *B. cereus* ได้เล็กน้อย (weakly inhibition) ส่วนที่เติมเอนไซม์โปรติเอสไม่สามารถยับยั้งเชื้อใดได้ ซึ่งจากการทดลองดังกล่าวสารยับยั้งน่าจะเป็นสารประเภท โปรตีนที่ทนความร้อน 100°C ได้นาน 10 นาทีและถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์โปรติเอส ดังนั้นเพื่อให้โปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตบริสุทธิ์มากขึ้นจึงนำตะกอนของไอโซเลท CT62 ส่วนที่เหลือไปทำไคอะไลซิสเพื่อแยกเอาตะกอนของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหลือออก และทำให้โปรตีนที่ได้บริสุทธิ์มากขึ้น จากการทำไคอะไลซิสโดยใช้ถุงไคอะไลซิสที่มีขนาดรูพรุน 10,000-12,000 หลังจากทำการไคอะไลซิสเสร็จแล้วและนำสารละลายในถุงไปปั่นเพื่อเอาตะกอนทดสอบผลยับยั้งกับเชื้อทดสอบ พบว่าตะกอนที่ได้มีปริมาณน้อยมากและไม่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ ซึ่งก็น่าจะเป็นไปได้ว่าสารยับยั้งมีขนาดเล็กกว่ารูพรุนของถุงไคอะไลซิส และสามารถผ่านออกมาจากรูพรุนของถุงไคอะไลซิสออกมาในบัฟเฟอร์ที่ใช้ทำการไคอะไลซิส

จึงทำการทดลองซ้ำโดยทำการไคอะไลซิสในบัฟเฟอร์ปริมาณน้อย ๆ และในแต่ละครั้งที่เปลี่ยนบัฟเฟอร์จะเก็บบัฟเฟอร์ไว้ นำบัฟเฟอร์ที่เก็บไว้ไปทำการระเหยแห้ง (concentrate) โดยใช้อ่างน้ำร้อน เมื่อทำการระเหยแห้งหมดจะเหลือคราบสีขาวติดอยู่ที่ภาชนะ ใช้ KPB buffer ในปริมาณที่น้อยที่สุดละลายตะกอน ส่วนสารละลายในถุงไคอะไลซิสนำไปปั่นเอาตะกอน นำทั้งสองส่วนไปทดสอบผลการยับยั้งกับ *S. aureus* และ *B. cereus* ผลการทดสอบตะกอนทั้งสองส่วนไม่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ ซึ่งเป็นไปได้ว่าโปรตีนที่เป็นสารยับยั้งมีมวลโมเลกุลขนาดเล็กกว่ารูพรุนของถุงไคอะไลซิสและออกมาละลายอยู่ในบัฟเฟอร์ และได้สูญเสียสภาพการยับยั้งในขณะที่นำไประเหยแห้งในอ่างน้ำร้อน เนื่องจากอุณหภูมิที่ใช้ในการระเหยแห้งจะใช้อุณหภูมิ 98°C และ

ต้องใช้เวลาไม่น้อยกว่า 3 ชั่วโมงจึงจะสามารถระเหยน้ำออกได้หมด ซึ่งจากการทดลองพบว่าโปรตีนที่เป็นสารยับยั้งนี้สามารถทนอุณหภูมิน้ำเดือดเมื่อนำไปต้มได้เพียง 10 นาที เมื่อโดนความร้อนนาน ๆ ในระหว่างระเหยแห้งจึงทำให้โปรตีนสูญเสียสภาพการยับยั้งได้ เมื่อทำการเปลี่ยนขนาดของถุงไคอะไลซิสที่มีรูพรุน 8,000-10,000 มาทำการไคอะไลซิสโดยวิธีเดิม และนำทั้งส่วนตะกอนที่ได้จากสารละลายในถุงไปปั่นและตะกอนของบัฟเฟอร์ไประเหยแห้งและนำไปทดสอบผลการยับยั้งกับเชื้อทดสอบ พบว่าในส่วนของตะกอนที่อยู่ในถุงไคอะไลซิสทั้งที่ต้มนาน 10 นาทีและส่วนที่ไม่ต้มให้ผลการยับยั้งต่อ *S. aureus* ได้ แต่วงใสจะแคบลงเมื่อเทียบกับวงใสที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ผลการทดลองดังตาราง 9 และรูป 14 ส่วนตะกอนที่ได้จากการระเหยแห้งบัฟเฟอร์ไม่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ จากผลการทดลองสารยับยั้งน่าจะเป็นโปรตีน ทั้งนี้เนื่องจากพวก polymer เช่น protein, polysaccharide หรือ nucleic acid เมื่อผ่านการไคอะไลซิสสารเหล่านี้จะอยู่ในถุงไคอะไลซิส (inner solution) เนื่องจากเป็นสารที่มีมวลโมเลกุลขนาดใหญ่ ส่วนสารพวกที่มีมวลโมเลกุลขนาดเล็กจะต้องนำบัฟเฟอร์ไปทำการระเหยแห้ง ซึ่งจากผลการระเหยแห้งบัฟเฟอร์ตะกอนไม่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ สารยับยั้งจึงไม่ใช่สารที่เป็นโมเลกุลขนาดเล็ก หรือเกิดจากการที่โปรตีนโดนความร้อนเป็นเวลานานกว่า 10 นาที จึงสูญเสียความสามารถในการยับยั้ง

จากการทดลองหลาย ๆ ครั้งในขั้นตอนของการไคอะไลซิสต่อการยับยั้งเชื้อทดสอบ ผลการทดลองไม่สามารถให้ผลการยับยั้งต่อเชื้อทดสอบได้ทุกครั้งที่มีการทดลองซ้ำ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการใช้ถุงไคอะไลซิสที่มีขนาดรูพรุนไม่เหมาะสมกับขนาดของโปรตีนที่เป็นสารยับยั้ง ดังจะเห็นได้จากการใช้ถุงไคอะไลซิสที่มีขนาดรูพรุน 10,000-12,000 ตะกอนที่ได้จากการไคอะไลซิสไม่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ เมื่อเปลี่ยนถุงไคอะไลซิสที่มีขนาดรูพรุน 8,000-10,000 ตะกอนสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้แต่ให้วงใสแคบ ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่ามีโมเลกุลของโปรตีนบางส่วนเล็ดลอดออกมาจากถุงไปอยู่ในบัฟเฟอร์ แต่เนื่องจากบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการไคอะไลซิสจะใช้ในปริมาณมาก ทำให้โปรตีนเจือจางลง

จากการนำตะกอนที่ผ่านการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และผ่านการไคอะไลซิสมาทำการวิเคราะห์และแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์มากขึ้น เพื่อที่จะหามวลโมเลกุลของสารยับยั้งโดยวิธี SDS-PAGE จากการทดลองนี้ไม่สามารถที่จะแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์และหามวลโมเลกุลของสารยับยั้งได้ เนื่องจากในขั้นตอนการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยวิธี SDS-PAGE ไม่สามารถเห็นแถบของโปรตีนปรากฏบนเจลในช่องของสารยับยั้ง เมื่อเทียบกับแถบโปรตีนของ BSA ที่ใช้เป็นตัวแทนเปรียบเทียบ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารยับยั้งที่เป็นโปรตีนมีปริมาณน้อยเกินไปหรือขั้นตอนการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ไม่เหมาะสม จึงไม่สามารถแยกโปรตีนออกมาได้ ซึ่งการที่จะทำให้สารยับยั้งที่เป็นโปรตีนหรือแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์นั้นเป็นวิธีการที่ยากและใช้เทคนิควิธีการสำหรับแยกและทำให้บริสุทธิ์มาประยุกต์ใช้ร่วมกันหลายวิธี (Hoover and Harlander, 1993) ดังแสดงในตาราง 11 และตาราง 12

ตาราง 11 Purification and Activity of Pediocin PA-1 (Hoover and Harlander, 1993)

Treatment	Specific activity (AU/ml)	%yield	Fold Purification
Crude extract	107	100	1.0
Gel filtration	166	50	1.5
Ion exchange	1,330	9.4	12.5
Dialysis	6,700	7.0	63.0
HPLC	50,000	0.6	470.0

ตาราง 12 Conditions for Production and Purification of Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria (Hoover and Harlander, 1993)

Organism	Bacteriocin	Medium ^a	Purification scheme ^a	Molecular weight (kDa)
<i>Lactobacillus</i>				
<i>L. helveticus</i> LP27	Lactocin 27	APT w/o Tween 80	GF, CHCl ₃ precipitation, SDS-PAGE	12.4
<i>L. plantarum</i> C-11	Plantaricin A	MRS	Concentrated by dialysis	ND
<i>L. plantarum</i> NCDO 1193	Plantacin B	MRS (0.5% gluc)	NP	ND
<i>L. reuteri</i> LA6	Reuterin 6	MRS	UF, dialysis	ND
<i>L. sake</i> Lb706	Sakacin A	MRS-0.2 (0.2% gluc)	Dialysis, vacuum concentrated	ND
<i>L. sake</i> L45	Lactocin S	MRS	AS, GF, IEX, HIC, HPLC	ND
<i>L. sake</i> 148	NN	MRS	NP	ND
<i>Lactobacillus</i> sp. 100-37	NN	MRS	AS, dialysis	ND
<i>Lactococcus</i>				
<i>L. cremoris</i> 346	Diplococcin	M17 broth; M17 agar	AS, CEX, dialysis, SDS-PAGE	5.3
<i>L. cremoris</i> LMG2130	Lactococcin A	M17 broth; M17 agar	AS, CEX, HIC, FPLC	5.8

ตาราง 12 (ต่อ)

Organism	Bacteriocin	Medium ^a	Purification scheme ^a	Molecular weight (kDa)
<i>L. diacetylactis</i> S50	Bacteriocin	M17G	NP	ND
<i>L. lactis</i> ADRIA-85LO30	S50			2.3
<i>L. lactis</i> ADRIA-85LO30	Lactococcin	CG broth; M17G agar	Dialysis, CEX, GF, SDS-PAGE	
<i>L. lactis</i> DRC 1	Dricin	SL1 broth	NP	ND
<i>L. lactis</i> CNRZ 481	Lacticin 481	Elliker (w/o gelatin, pH 5.5)	AS, GF, HPLC, SDS-PAGE	1.7
<i>L. lactis</i>	Nisin	Gommercial preparation	GF, ultracentrifugation	3.5
<i>Pediococcus</i> <i>P. acidilactici</i> H	Pediocin AcH	TGE	AS, GF, IEX, SDS-PAGE	2.7
<i>P. acidilactici</i> PAC1.0	Pediocin PA-1	MRS	AS, dialysis, GF, IEX	16.5
<i>P. acidilactici</i> PO2	NN	APT	NP	ND
<i>P. acidilactici</i> JD1-23	NN	MRS+2% YE (MRS-YE)	NP	ND
<i>P. pentosaceus</i> FBB61	Pediocin A	MRS	NP	ND

^aAbbreviations: MRS, APT, M17, and Elliker broths are commercially available media; TJM, tomato juice medium; TSA, tryptic soy agar; YE, yeast extract; M17G, M17-glucose; SM-2, CG, SL1, CAA, BM, TGE, and D-MRS broths are modified media; AS, ammonium sulfate precipitation ; AP, acid precipitation; GF, gel filtration; IEX, ion exchange; CEX, cation exchange; HPLC, high performance liquid chromatography; UF, ultrafiltration; FPLC, fast protein liquid chromatography; HIC, hydrophobic interaction chromatography; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

^bNN, Not named.

^cND, Not determined

^dNP, Not purified

จากทั้ง 2 ตารางแสดงให้เห็นว่า การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์นั้นไม่สามารถทำให้สำเร็จได้ โดยเลือกใช้วิธีการใดวิธีการหนึ่ง จึงจำเป็นต้องอาศัยหลักการต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องมาประยุกต์ใช้ร่วมกัน โดยคำนึงถึงสถานะที่ใช้ในการแยกและการเลือกวิธีการที่เหมาะสม อย่างไรก็ตามการศึกษาเรื่องสารยับยั้งหรือแบคทีเรียโอซินที่สร้างโดยแลคติกแอซิดแบคทีเรียสกุลต่าง ๆ บางครั้งก็ไม่จำเป็นที่จะต้องทำให้สารยับยั้งนั้นบริสุทธิ์ เพียงแต่ใช้วิธีการศึกษาถึงคุณสมบัติของสารยับยั้ง ดังเช่นตาราง 12 ได้แสดงให้เห็นถึงการศึกษาสารยับยั้งทั้งที่ทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีต่าง ๆ และบางชนิดก็ไม่จำเป็นต้องทำให้บริสุทธิ์ ก็สามารถสรุปได้ว่าสารนั้นเป็นแบคทีเรียโอซินดังเช่น Swetwathana (Swetwathana, 1999) ได้ศึกษาการสร้างแบคทีเรียโอซินโดย *Pediococcus* spp. 5 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากเหนม ศึกษาถึงคุณสมบัติของสารยับยั้งภายใต้สถานะที่มีการกำจัดผลของกรดอินทรีย์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เปรียบเทียบผลการยับยั้งเชื้อทดสอบกับแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สร้างแบคทีเรียโอซิน Sakacin A คือเชื้อ *L. sakei* CTH 2342 พบว่า *Pediococcus* spp. 3 สายพันธุ์สร้างสารประกอบที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก เมื่อนำไปทดสอบการถูกทำลายคุณสมบัติของโปรตีนโดยใช้เอนไซม์โปรติเอส (trypsin) พบว่าสารประกอบที่เชื้อสร้างขึ้นถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์โปรติเอสได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งสารประกอบนี้มีลักษณะเป็นแบคทีเรียโอซิน เป็นต้น

จากตัวอย่างการศึกษาของ Swatwathana *et al.*, 1999 มีลักษณะใกล้เคียงกับการศึกษาสารยับยั้งที่สร้างโดย *Pediococcus* spp. CT62 ที่ศึกษาอยู่ และมีผลการศึกษาลักษณะคล้ายกัน ดังนั้นสารยับยั้งนี้จึงน่าจะมีลักษณะเป็นแบคทีเรียโอซิน ถึงแม้จะไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์และหามวลโมเลกุลได้ก็ตาม ซึ่งคุณสมบัติต่าง ๆ ที่ศึกษาก็มีคุณสมบัติเช่นเดียวกับแบคทีเรียโอซินทั่วไป

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาและการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี การใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ของไอโซเลท CT16 และ CT62 โดยนำลักษณะต่าง ๆ ที่ได้จากการทดสอบเทียบกับ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology ฉบับพิมพ์ครั้งที่ 9 (1994) พบว่าทั้งสองไอโซเลทจัดอยู่ในจีนัส *Pediococcus* sp. CT16 และ *Pediococcus* sp. CT62 ซึ่งสามารถเจริญได้ทั้งอุณหภูมิห้อง (25-30°C) ที่อุณหภูมิ 37°C และที่อุณหภูมิ 45°C จึงกล่าวได้ว่าทั้งสองจีนัสจัดเป็น thermotolerant lactic acid bacteria

ในการทดสอบการยับยั้งของแต่ละขั้นตอนได้แก่ การใช้ cell-free culture filtrate ที่นำไปต้ม การตกตะกอนด้วยผงถ่าน การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต การทำให้โปรตีนบริสุทธิ์มากขึ้นโดยการทำให้ไอโซเลท การยับยั้งอาจไม่เกิดทุกครั้งที่ทำทดสอบ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการสูญเสียความสามารถในการยับยั้งที่คาดว่าจะโปรตีนที่ยังไม่เสถียรหรือสร้างในปริมาณน้อย ซึ่งอาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงสถานะต่าง ๆ ในการเลี้ยงเชื้อ เช่น การเปลี่ยนแปลงชนิดของอาหาร pH ของอาหาร อุณหภูมิ เวลา ปริมาณและอายุของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียและเชื้อทดสอบ ดังจะ

เห็นได้จากเชื้อทดสอบที่มีอายุการเจริญ 4-6 ชั่วโมง จะถูกยับยั้งด้วยแลคติกแอซิคแบคทีเรียได้ดีกว่าเชื้อที่เพาะเลี้ยง 18-24 ชั่วโมง การต่อเชื้อ (subculture) เชื้อแลคติกแอซิคแบคทีเรียและเชื้อทดสอบก็มีผล เช่น เชื้อแลคติกแอซิคแบคทีเรียที่มีการต่อเชื้อติดต่อกันเกิน 3 ครั้ง จะทำให้สูญเสียความสามารถในการยับยั้ง เป็นต้น De Vuyst (De Vuyst และ Vandamme, 1944) กล่าวว่า ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้ออาจไม่ใช่สภาวะที่เชื้อสามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้สูงสุด ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาสภาวะต่าง ๆ อย่างต่อเนื่อง ตลอดจนหาวิธีการทำให้สารยับยั้งนี้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น ซึ่งอาจจะต้องใช้เทคนิคและวิธีการสำหรับการแยกและทำให้บริสุทธิ์หลาย ๆ วิธีมาประยุกต์ใช้ร่วมกัน เช่น gel filtration, ion exchangers, cation exchange, HPLC, ultrafiltration เป็นต้น