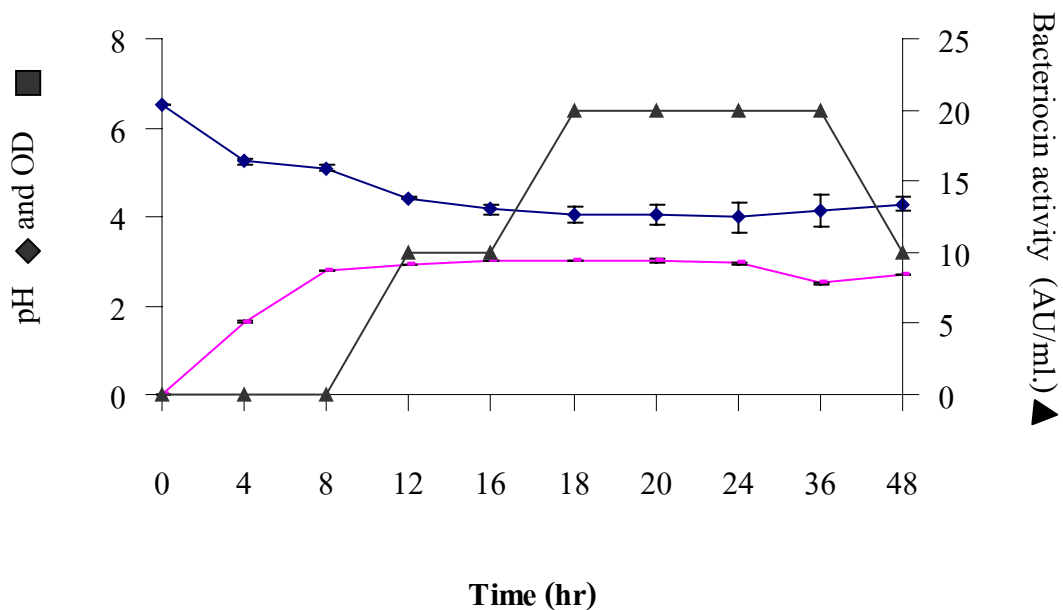


บทที่ 3

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเจริญของเชื้อ *L. casei ssp. rhamnosus* SN 11 ในอาหาร MRS

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อ *L. casei ssp. rhamnosus* SN 11 ในอาหาร MRS โดยติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร พร้อมกับการติดตามการเปลี่ยนแปลงของค่า pH และกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซินในอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้ผลดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 กราฟแสดงการเจริญของเชื้อ *L. casei ssp. rhamnosus* SN 11 ในอาหาร MRS

Figure 3 Growth of *L. casei ssp. rhamnosus* SN 11 in MRS

◆ pH ■ OD 660 nm. ▲ Bacteriocin activity (AU/ml)

การผลิตแบคทีริโอซินจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียโดยส่วนใหญ่จะมีความสัมพันธ์กับการเจริญของเชื้อ โดยการผลิตแบคทีริโอซินจะสูงสุดในระยะ late log

phase ไปจนถึงระยะ early stationary phase จากการทดลองเลี้ยงเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN 11 ในอาหารสำเร็จ MRS พบว่าเชื้อจะเจริญอย่างรวดเร็วใน 8 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นการเจริญจะเริ่มช้าลงและเข้าสู่ระยะคงที่ โดยวัดการเจริญสูงสุดของเชื้อได้ในชั่วโมง 18 โดยมีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* (วัดโดยวิธี agar well diffusion) เท่ากับ 20 AU/ml. และมีค่าพีเอชลดลงเป็น 4.3 ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของพีเอชจะผูกพันกับการเจริญของเชื้อ

และเมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 36 ของการเจริญ พบว่าการเจริญของเชื้อและกิจกรรมการยับยั้งลดลงเป็น 10 AU/ml และมีค่าพีเอชลดลงเป็น 4.10 จากการทดลองของภัทรพล จันทราภรณ์ (2543) ในการศึกษาการเจริญของเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN 11 ในอาหาร MRS พบว่าการเจริญของเชื้อจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 12 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นการเจริญจะเริ่มช้าลง โดยมีการเจริญสูงสุดอยู่ที่ 24 ชั่วโมง และมีการผลิตแบคทีเรียโอซินเกิดขึ้นสูงสุดในชั่วโมงที่ 16 โดยมีกิจกรรมการยับยั้งเป็น 30 AU/ml โดยกิจกรรมการยับยั้งที่เกิดขึ้นจะลดลงหลังจากเวลาผ่านไป 36 ชั่วโมงเช่นกัน

การลดลงของกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินหลังเซลล์เจริญเข้าสู่ระยะคงที่แล้วเกิดเนื่องมาจากการย่อยสลายแบคทีเรียโอซินโดยเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน (Proteolytic degradation) Avonts และคณะ (2004) กล่าวว่าในระหว่างที่เชื้อเกิดการไลซิส (lysis) จะปลดปล่อยเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนที่ไม่มีความจำเพาะออกมา ทำให้มีกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนเพิ่มขึ้น โดยเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนเหล่านี้จะเข้าไปย่อยสลายแบคทีเรียโอซิน ทำให้ปริมาณแบคทีเรียโอซินลดลงในช่วงปลายของการหมัก เช่นเดียวกับการทดลองของ Robert และคณะ (1996) พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเนสจะเพิ่มขึ้นพร้อมกับการลดลงของปริมาณ leuconosin ซึ่งผลิตจากเชื้อ *Leuconostoc paramesenteroides* ปัญหาการลดลงของปริมาณแบคทีเรียโอซินนอกจากการถูกทำลายโดยเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนแล้ว การลดลงของแบคทีเรียโอซินอาจเกิดจากการดูดซับของแบคทีเรียโอซินกับตัวเซลล์ทั้งที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต โดยรวมถึงการดูดซับอยู่กับโปรตีนที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้ออีกด้วย (Parente et al., 1994)

สำหรับการเปลี่ยนแปลงของพีเอชที่เกิดขึ้นในระหว่างการเจริญของเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN 11 เกิดเนื่องจากเชื้อเป็นแบคทีเรียแลคติกกลุ่ม homofermentative ซึ่งสามารถหมักน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลที่มีคาร์บอนหกตัวแล้วให้กรดแลคติกประมาณร้อยละ 85 - 95 ซึ่งกรดที่ผลิตขึ้นมีผลทำให้ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง จากการทดลองของ Ruiz-Barba และคณะ (1994) พบว่าการลดลงของค่าพีเอชในระหว่างการหมักจะมีผลต่อปริมาณแบคทีเรียโอซินที่ได้ คือ เมื่อพีเอชลดลงถึงจุดๆ หนึ่งที่ทำให้ค่าความแรงของประจุ (ionic strength) ที่เหมาะสม จะทำให้ผนังเซลล์ของจุลินทรีย์สามารถจับแบคทีเรียโอซินออกสู่นอกเซลล์ได้ดีขึ้น

2. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำนิ่งปลาทูน่าและน้ำมะพร้าว

ในการเจริญเติบโตและการผลิตแบคทีเรียโอซินจากแลคติกแอซิดแบคทีเรีย องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสำคัญเป็นอย่างมาก โดยแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนเป็นตัวสำคัญที่ใช้ควบคุมการเจริญและการผลิตแบคทีเรียโอซิน

น้ำมะพร้าวและน้ำนิ่งปลาทูน่าเป็นวัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมและจากการเกษตร ที่ยังมีโปรตีนและน้ำตาลในปริมาณสูง อีกทั้งยังมีแร่ธาตุต่างๆ เช่น แมงกานีส แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส และเหล็ก (ตารางที่ 1 และ 2) ที่จำเป็นต่อการเจริญของแบคทีเรียแลคติก ซึ่งเมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำนิ่งปลาทูน่าและน้ำมะพร้าว ที่นำมาใช้แทนแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว ได้องค์ประกอบเบื้องต้นดังแสดงในตารางที่ 7

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบเบื้องต้นในน้ำมะพร้าวพบว่ามีความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดร้อยละ 1.7 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ร้อยละ 0.5 และมีปริมาณไนโตรเจนเพียง ร้อยละ 0.1 จากการทดลองของ อวย เกตุสิงห์ (2497) และ Child (1974) พบว่าในน้ำมะพร้าวอ่อนจะมีน้ำตาลเฉลี่ยร้อยละ 5.77 เมื่อเจริญเต็มที่จะมีน้ำตาลเฉลี่ยลดลงเป็นร้อยละ 4.58 และเมื่อเป็นมะพร้าวห้าวจะมีน้ำตาลเฉลี่ยลดลงเป็นร้อยละ 1.6 น้ำตาลที่พบส่วนใหญ่จะเป็นน้ำตาลกลูโคส และ ฟรุคโทสในปริมาณที่เท่าๆ กัน โดยมีปริมาณไขมันและโปรตีนประมาณร้อยละ 0.1

ตารางที่ 7 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบเบื้องต้นของน้ำมะพร้าวและน้ำนึ่งปลาทูน่า

Table 7 Chemical composition of coconut water and tuna condensate

| Composition | Coconut water | | Tuna condensate | |
|--------------------|---|--|------------------------------------|-----------------------------------|
| | Before separated protein and macro molecule | After separated protein and macro molecule | Before separated protein and lipid | After separated protein and lipid |
| pH | 6.2 | 6.5 | 5.50 | 6.52 |
| Nitrogen (%) | 5.12 | 4.54 | 0.11 | 0.10 |
| Salt (%) | 0.23 | 0.19 | NA | NA |
| Reducing sugar (%) | NA | NA | 0.56 | 0.53 |
| Total sugar (%) | NA | NA | 1.71 | 1.69 |

NA = Not Available

และจากการวิเคราะห์หึ่งค์ประกอบเบื้องต้นในน้ำนิ่งปลาพบว่าปริมาณไนโตรเจนอยู่ร้อยละ 5.1 และหลังจากการเตรียมวัตถุดิบโดยการแยกโปรตีนและไขมัน ออกพบว่าปริมาณไนโตรเจนลดลงเหลือร้อยละ 4.5 ในขณะที่ปริมาณเกลือในน้ำนิ่งปลา พบว่ามีประมาณร้อยละ 0.2 จากการวิเคราะห์หึ่งค์ประกอบดังกล่าวพบว่าสอดคล้องกับการทดลองของ กัทพล จันทราภรณ์ (2543) ซึ่ง พบว่ามีปริมาณไนโตรเจนในน้ำนิ่งปลา พบว่าร้อยละ 7.0 และเมื่อแยกโปรตีนและไขมันออกพบว่ามีปริมาณไนโตรเจนเหลืออีกร้อยละ 4.0 (ตารางที่ 1) ซึ่งใกล้เคียงกับอาหาร MRS ที่มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ร้อยละ 4.8

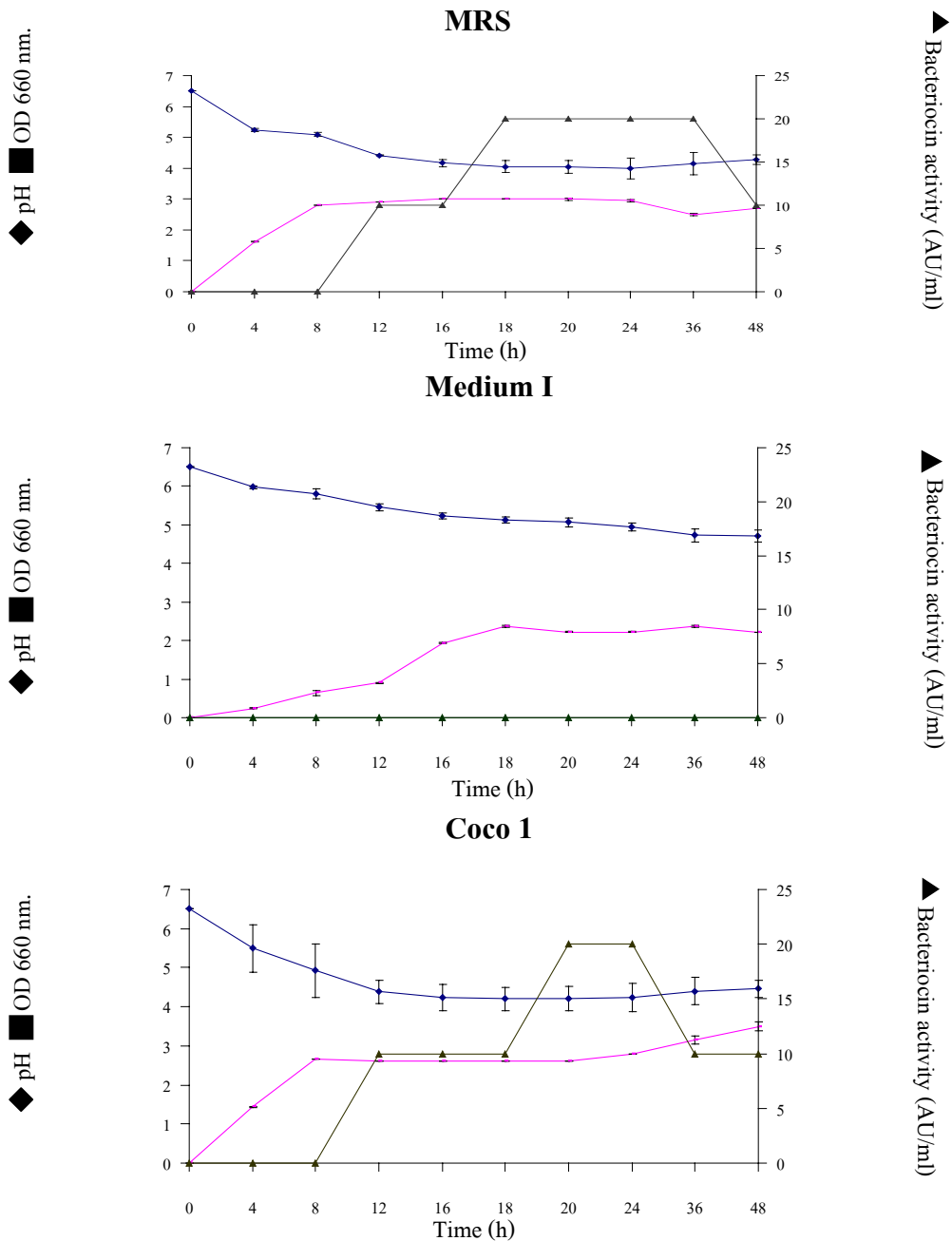
จากการทดลองเมื่อทราบองค์ประกอบของน้ำมะพร้าวและน้ำนิ่งปลาพบว่าแล้วจึงนำมาปรับสัดส่วนเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อตัดแปลงสูตรต่างๆ โดยแปลงสัดส่วนจากสูตรอาหาร MRS (ปริมาณไนโตรเจนร้อยละ 2.5 และปริมาณคาร์บอน ร้อยละ 2.0) และสูตรอาหารตัดแปลง Medium I ซึ่งมีการใช้น้ำตาล ซูโครส 10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและใช้น้ำนิ่งปลาเจือจางร้อยละ 50 เป็นแหล่งไนโตรเจน (ปริมาณไนโตรเจนร้อยละ 2.27 และปริมาณคาร์บอนร้อยละ 1.84)

จากการทดลองของกัทพล จันทราภรณ์ (2543) พบว่าในการตัดแปลงสูตรอาหาร MRS มาเป็นอาหารตัดแปลง Medium I สามารถใช้น้ำตาล ซูโครส ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1-2 เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ โดยไม่พบความแตกต่างใดๆ เกิดขึ้นในช่วงความเข้มข้นของน้ำตาลระดับนี้ ดังนั้นในการปรับสัดส่วนอาหารตัดแปลงจึงปรับสัดส่วนให้มีปริมาณน้ำนิ่งปลาต่อ น้ำมะพร้าวที่เพิ่มขึ้นเป็น 1 : 1 (Coco1) 1 : 2 (Coco2) 1 : 3 (Coco3) และ 1 : 4 (Coco4) โดยมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเพิ่มขึ้นเป็น 0.81, 1.41, 2.01 และ 2.59 ตามลำดับ และปรับสัดส่วนให้มีน้ำมะพร้าวต่อน้ำนิ่งปลาที่เพิ่มขึ้นเป็น 1 : 2 (Tuna2) 1 : 3 (Tuna3) และ 1 : 4 (Tuna4) โดยมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนลดลงเป็น 0.55, 0.42 และ 0.37 ตามลำดับ

3. การเจริญของเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN 11 การผลิตแบคทีเรียโอซินและการเปลี่ยนแปลงของพีเอชในอาหารที่ดัดแปลงที่ใช้ น้ำมะพร้าวและน้ำนึ่งปลาทูน่าเป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในการศึกษาและติดตามการเจริญของเชื้อ การผลิตแบคทีเรียโอซิน และการเปลี่ยนแปลงพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตรอาหาร Medium I และอาหารทั้ง 7 สูตร คือ Coco1 Coco2 Coco3 Coco4 Tuna2 Tuna3 และ Tuna4 เปรียบเทียบกับการเจริญและการผลิตแบคทีเรียโอซินในอาหารสำเร็จ MRS เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ดังภาพที่ 4) จากการทดลองเมื่อพิจารณาการเจริญเติบโตของเชื้อในอาหารสูตรต่างๆ ซึ่งวัดจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร จะพบว่าเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN11 เจริญได้ดีที่สุดในอาหารสำเร็จ MRS ในขณะที่การเจริญของเชื้อในอาหารดัดแปลงสูตรต่างๆ ที่ใช้น้ำมะพร้าวและน้ำนึ่งปลาเป็นองค์ประกอบนั้นมีการเจริญแตกต่างกัน โดยเชื้อสามารถเจริญได้ในอาหารทุกๆ สูตรและเจริญได้ดีในสูตรอาหารที่มีปริมาณน้ำมะพร้าว (Coco1 Coco2 และ Coco3) และน้ำนึ่งปลาสูงขึ้น (Tuna2 และ Tuna4) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มปริมาณน้ำมะพร้าวในสูตรอาหาร Coco4 และเพิ่มปริมาณน้ำนึ่งปลาทูน่าในสูตรอาหาร Tuna4 เป็น 4 เท่า จะทำให้การเจริญของเชื้อลดลง โดยรูปแบบการเจริญของเชื้อในอาหารทุกสูตรยังเป็นไปในรูปแบบเดียวกัน คือ เจริญอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 8 หลังจากนั้นการเจริญจะเริ่มช้าลงและเข้าสู่ระยะคงที่

การผลิตแบคทีเรียโอซินในอาหารแต่ละสูตรจะแตกต่างกัน ขึ้นกับองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อพิจารณาสัดส่วนของน้ำนึ่งปลาทูน่าและน้ำมะพร้าวในสูตรอาหารดัดแปลงจากอาหาร Medium I ทั้ง 7 สูตร พบว่าในสูตรอาหาร Coco1 Coco2 Coco3 และ Coco4 มีปริมาณคาร์บอนเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 1.85, 2.13, 2.27 และ 2.36 ตามลำดับ โดยมีการใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าทดแทนปริมาณไนโตรเจนในสูตรอาหาร โดยจะมีปริมาณไนโตรเจนลดลงเป็นร้อยละ 2.27, 1.51, 1.13 และ 0.91 ตามลำดับ ทำให้สัดส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเพิ่มขึ้นเป็น 0.81, 1.41, 2.01 และ 2.59 ตามลำดับ ในขณะที่สูตรอาหาร Tuna2 Tuna3 และ Tuna4 จะเพิ่มปริมาณน้ำนึ่งปลาทูน่าให้สูงขึ้นทำให้มีปริมาณไนโตรเจนเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 2.72, 3.41 และ 3.63 ตามลำดับ โดยมีปริมาณคาร์บอน

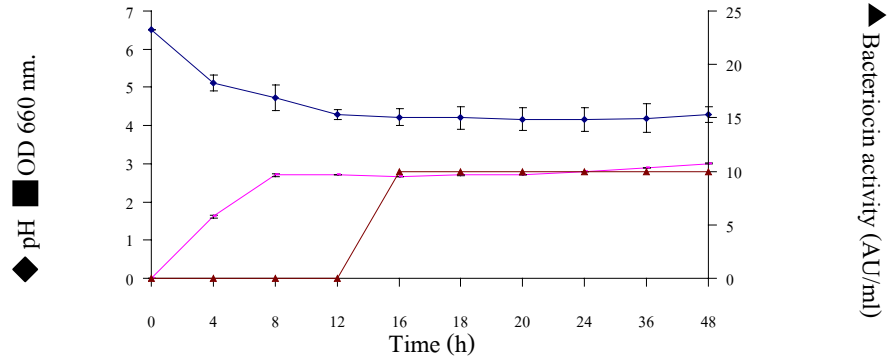


ภาพที่ 4 การเจริญของเชื้อ การเปลี่ยนแปลงพีเอช และกิจกรรมการยับยั้งของเชื้อ *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* SN11 ในอาหารสูตรต่างๆ

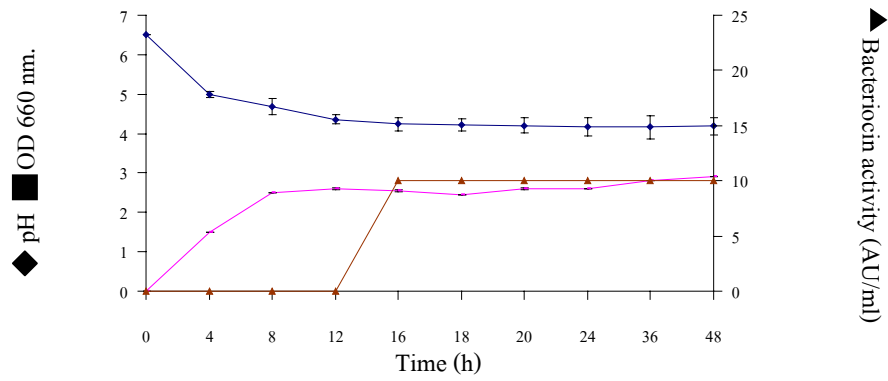
Figure 4 Growth pH changes and bacteriocin activity of *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* SN11

◆ pH ■ OD 600 nm. ▲ Bacteriocin activity (AU/ml.)

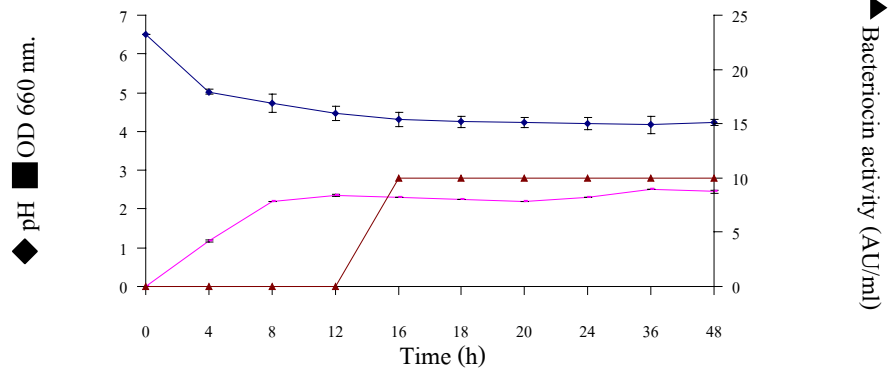
Coco 2



Coco 3



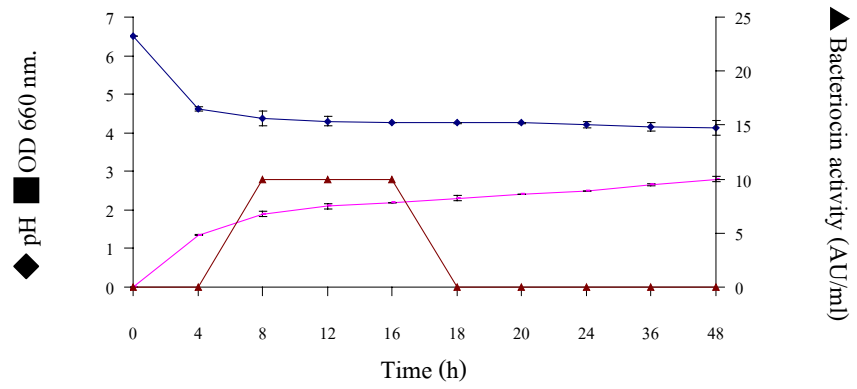
Coco 4



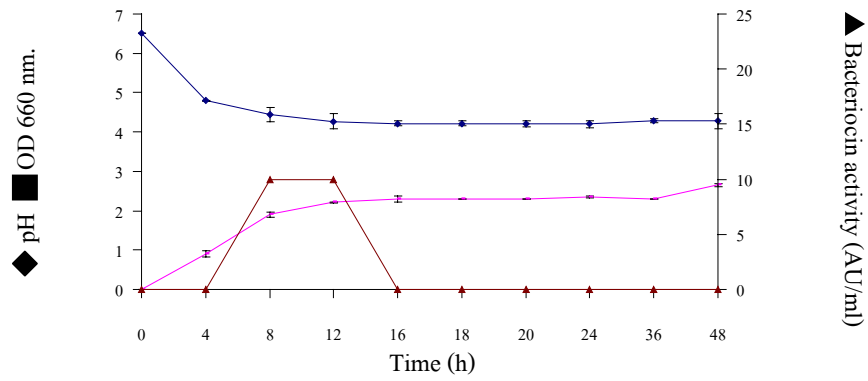
ภาพที่ 4 (ต่อ)

Figure 4 (Continue)

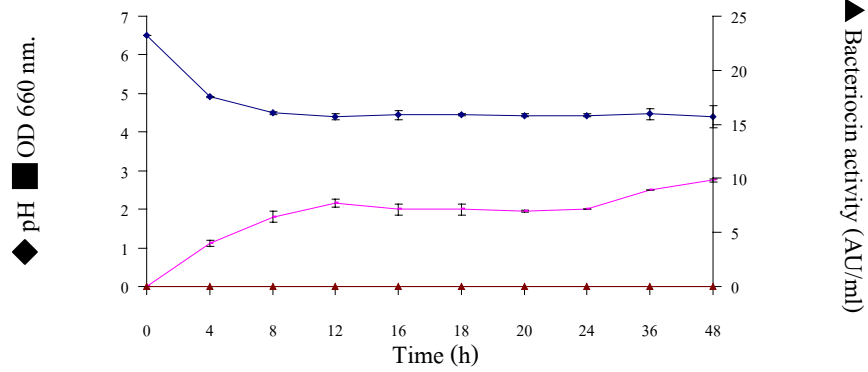
Tuna 2



Tuna 3



Tuna 4



ภาพที่ 4 (ต่อ)

Figure 4 (Continue)

ลดลงเป็นร้อยละ 1.51, 1.42 และ 1.34 ตามลำดับ โดยมีสัดส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนลดลงเป็น 0.55, 0.42 และ 0.37 ตามลำดับ

จากความแตกต่างขององค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลทำให้การผลิตแบคทีเรียโอซินในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละสูตรมีความแตกต่างกันไป โดยในสูตรอาหาร Coco1 เกิดขึ้นในช่วงเวลาที่ 12 มีกิจกรรมการยับยั้งสูงสุดเท่ากับ 20 AU/ml ในช่วงเวลาที่ 20 และกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินจะลดลงเป็น 10 AU/ml เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ซึ่งกิจกรรมการยับยั้งที่เกิดขึ้นในสูตรอาหาร Coco1 ใกล้เคียงกับกิจกรรมการยับยั้งในสูตรอาหารสำเร็จ MRS เพียงแต่ระยะเวลาในการคงตัวของแบคทีเรียโอซินในสูตรอาหาร Coco1 จะน้อยกว่าในสูตรอาหาร MRS (กิจกรรมการยับยั้งลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 36 ชั่วโมง) ดังนั้นการลดลงของปริมาณแบคทีเรียโอซินในสูตรอาหาร Coco1 จึงอาจเกิดจากการย่อยสลายโดยเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน และเกิดจากการดูดซับของแบคทีเรียโอซินกับตัวเซลล์ และโปรตีนที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกันกับสูตรอาหาร MRS

สำหรับในสูตรอาหาร Coco2 Coco3 และ Coco4 เชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* (SN11) จะผลิตแบคทีเรียโอซินเมื่อเข้าสู่ช่วงเวลาที่ 16 โดยมีกิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 10 AU/ml และยังคงมีกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินเกิดขึ้นจนถึงสิ้นสุดกระบวนการหมัก การผลิตแบคทีเรียโอซินในสูตรอาหารดัดแปลงทั้ง 3 สูตรนี้ จะเกิดช้าและมีกิจกรรมการยับยั้งต่ำกว่าในสูตรอาหาร MRS เนื่องจากในสูตรอาหารมีการใช้น้ำมะพร้าวแทนน้ำกลั่นในปริมาณมาก ทำให้ปริมาณโปรตีนในน้ำนิ่งปลาถูกเจือจางลง และทำให้เกิดความไม่สมดุลของอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (Vazques J.A. et. al., 2004) นอกจากนี้ในน้ำมะพร้าวยังมีปริมาณแร่ธาตุ เช่น เหล็ก แคลเซียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม และโปแตสเซียม (มีปริมาณสูงถึง 290 มิลลิกรัม) (ตารางที่ 2) เป็นองค์ประกอบ ซึ่งแร่ธาตุเหล่านี้ อาจเข้าไปมีผลในการยับยั้งหรือขัดขวางการทำงานของเชื้อ ทำให้การผลิตแบคทีเรียโอซินของเชื้อเกิดได้น้อยลง อีกทั้งน้ำมะพร้าวที่นำมาใช้ในการทดลองเป็นน้ำมะพร้าวแก่ ซึ่งจะมีปริมาณกรดซิตริกสูง (Campos et. al., 1996) ซึ่งจะเข้า

ไปมีผลต่อการเกิดออกโตไลซิสของเชื้อ โดยการเกิดออกโตไลซิสของเชื้อจะทำให้แบคทีเรียไอซันซึ่งเป็นสารประกอบโปรตีนเกิดการเสียสภาพ (Kang และคณะ, 1998)

นอกจากนี้ในการทดลองเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหาร Tuna2 Tuna3 และ Tuna4 ยังให้ผลการผลิตแบคทีเรียไอซันแตกต่างจากสูตรอาหารข้างต้น เนื่องจากในสูตรอาหารเหล่านี้มีการใช้น้ำนิ่งปลาทუნ่าเป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณ 2 3 และ 4 เท่า โดยมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 2.72, 3.45 และ 3.63 ตามลำดับ จากการทดลองพบว่าการผลิตแบคทีเรียไอซันในสูตรอาหาร Tuna2 และ Tuna3 จะเกิดขึ้นตั้งแต่ช่วงแรกของการเจริญของเชื้อ โดยสามารถตรวจพบกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียไอซันตั้งแต่ชั่วโมงที่ 8 โดยในสูตรอาหาร Tuna2 จะมีกิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 10 AU/ml จนถึงชั่วโมงที่ 16 ในขณะที่การผลิตแบคทีเรียไอซันในสูตรอาหาร Tuna3 สิ้นสุดที่ชั่วโมงที่ 12 และไม่มีการผลิตแบคทีเรียไอซันเกิดขึ้นในสูตรอาหาร Tuna4 และ MediumI การลดลงของแบคทีเรียไอซันอาจเป็นผลมาจากปริมาณโปรตีนเหลืออยู่ เนื่องจากปริมาณโปรตีนที่เหลือหลังจากการเจริญของเชื้อเข้าสู่ระยะ stationary อาจเป็นพิษต่อเซลล์ และเร่งการเกิดออกโตไลซิสของเชื้อ ซึ่งจะมีผลต่อความคงตัวของแบคทีเรียไอซัน (Jung, *et. al.*, 1992) สอดคล้องกับการทดลองของ Chii-Cherng และคณะ (1993) ที่ศึกษาผลของปริมาณยีสต์สกัดร้อยละ 0.5 1 2 3 และ 4 ในอาหารน้ำเวย์ พบว่าที่ปริมาณยีสต์สกัดร้อยละ 2 จะให้การผลิตแบคทีเรียไอซันสูงสุด แต่เมื่อเพิ่มปริมาณยีสต์สกัดปริมาณการผลิตแบคทีเรียไอซันจะลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากเพิ่มถึงจุดสูงสุด นอกจากนี้ปริมาณโปรตีนแล้ว ปริมาณน้ำตาลในสูตรอาหารก็มีผลต่อการผลิตแบคทีเรียไอซันเช่นเดียวกันจากการทดลองของ Ogunbanwo และคณะ (2003) พบว่าการใช้น้ำตาล กลูโคสในปริมาณมากไม่ได้ช่วยให้การผลิตแบคทีเรียไอซันเพิ่มขึ้นแต่กลับทำให้กิจกรรมของแบคทีเรียไอซันลดลงหรือไม่พบกิจกรรมของแบคทีเรียไอซันเลย สอดคล้องกับการทดลองของ Parente และคณะ (1999) พบว่าเมื่อใช้กลูโคสที่ความเข้มข้นสูงๆ (30 กรัมต่อลิตร) จะทำให้การผลิตแบคทีเรียไอซันลดลงเช่นกัน ดังนั้นในการผลิตแบคทีเรียไอซันควรควบคุมปริมาณสารอาหารให้สมดุล เพราะปริมาณสารอาหารที่มากเกินไปและเหลืออยู่จะไปยับยั้งการเจริญของเชื้อทำให้การเจริญของเชื้อลดลงและทำให้ผลิตแบคทีเรียไอ

ซึ่งได้น้อยจนถึงไม่ผลิตแบคทีเรียโอสินออกมาเลย (Dave R.I. *et. al.*, 1997 and Vazques J.A. *et. al.*, 2004)

นอกจากปริมาณน้ำตาลที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในอาหารสูตรต่างๆ ก็อาจมีผลต่อการผลิตแบคทีเรียโอสิน จากการทดลองของ Dave และคณะ (1997) พบว่าการใช้อาหารสำเร็จ MRS ที่มีการเปลี่ยนชนิดของน้ำตาล (กลูโคส ฟรุคโทส แมนโนส แล็กโทส ซูโครส มอลโทส ราฟฟิโนส และเซลโลไบโอส) เชื้อ *L. acidophilus* (LA-1) สามารถเจริญได้ในอาหารทุกสูตร แต่จะเจริญช้าในอาหารที่ใช้ น้ำตาลแมนโนส และราฟฟิโนส แต่จากการทดลองถึงแม้ว่าในอาหารสำเร็จ MRS จะใช้น้ำตาลเดกโทรสเป็นองค์ประกอบ ในขณะที่สูตรอาหารที่เหลือใช้น้ำตาล ซูโครส และน้ำตาลจากน้ำมะพร้าวและน้ำนิ่งปลาเป็นองค์ประกอบ ไม่มีผลต่อการผลิตแบคทีเรียโอสินจากเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN11 เพราะน้ำตาลจากน้ำมะพร้าวโดยส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลฟรุคโทส และกลูโคส ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเช่นเดียวกับน้ำตาลเดกโทรส ดังนั้นผลของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในอาหารจึงน่าจะมาจากการเพิ่มหรือลดลงของปริมาณน้ำตาลมากกว่าจะเป็นผลมาจากชนิดของน้ำตาลที่ใช้

ในส่วนของ การเปลี่ยนแปลงของพีเอชในอาหารแต่ละสูตร เมื่อพิจารณาที่ชั่วโมงที่ 24 ซึ่งเป็นช่วง late stationary phase พบว่าในอาหาร MRS Medium I Coco1 Coco2 Coco3 Coco4 Tuna2 Tuna3 และ Tuna4 มีค่าพีเอชเป็น 3.98 4.94 4.23 4.15 4.17 4.20 4.20 4.20 และ 4.40 ตามลำดับ จากการทดลองของภัทรพล จันทราภรณ์ (2543) พบว่าเมื่อควบคุมพีเอชในการผลิตแบคทีเรียโอสินจากเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN 11 ให้มีค่าพีเอชสุดท้ายเท่ากับ 4.5 จะให้ปริมาณการผลิตแบคทีเรียโอสินสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 16 และยังให้กิจกรรมการยับยั้งเพิ่มขึ้นเป็น 60 AU/ml แสดงให้เห็นว่าการควบคุมพีเอชในระหว่างการหมักให้เหมาะสมต่อการผลิต แบคทีเรียโอสินของเชื้อแต่ละชนิด เป็น ปัจจัยหนึ่ง ที่จำเป็นต่อการผลิตแบคทีเรียโอสิน เพราะในการผลิตแบคทีเรียโอสินจากเชื้อแต่ละชนิดจะมีค่าพีเอชที่เหมาะสมของมันต่อการเปลี่ยนรูปของแบคทีเรียโอสินจากรูป inactive เป็น active ในขั้นตอนการ protranslation และจากการทดลองของ Tom และคณะ 1998 พบว่ากิจกรรมสูงสุดของ plantaricin ที่ผลิตจาก

เชื้อ *L. plantarum* 423 จะเกิดขึ้นเมื่อพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงเป็น 4 ซึ่งการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินเกิดขึ้นจากการปลดปล่อยเปปไทด์ที่ยึดเกาะอยู่กับผนังเซลล์ของเชื้อซึ่งเหมือนกับการทดลองของ Hurst และ Dring (1968) ที่พบว่าในซันจะถูกลดระดับอยู่กับผนังเซลล์ของเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* เมื่อพีเอชเท่ากับ 6.8 และกิจกรรมของในซันจะเพิ่มขึ้นร้อยละ 80 เมื่อปรับ พีเอชให้ต่ำกว่า 6 ในขณะที่การผลิต pediocin AcH จะถูกลดระดับอยู่กับผนังเซลล์ที่พีเอช 6.0-5.5 และจะมีการปลดปล่อยอย่างสมบูรณ์ที่พีเอชเป็น 1.5 (Yang *et.al.*, 1992)

4. การทำบริสุทธิ์แบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* SN11

จากการศึกษาการทำบริสุทธิ์แบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN11 โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง (ช่วง late log phase) พบว่ามีค่ากิจกรรมการยับยั้งเป็น 20 AU/ml. ปรับพีเอชของสารละลายเป็น 3 เพื่อลดและป้องกันการดูดซับของแบคทีเรียโอซินกับผนังเซลล์ (Blom *et.al.*, 1991) จากนั้นนำเอาสารละลายที่ได้ไปเหวี่ยงแยกเซลล์ออกที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสที่ได้หลังจากการกำจัดตัวเซลล์ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส จากการทดลองพบว่ากิจกรรมการยับยั้งยังคงเท่ากับส่วนใสหลังแยกเซลล์ออก (20 AU/ml.) จากนั้นทำการแยกโปรตีนโมเลกุลใหญ่ออกจากน้ำหมัก โดยนำสารละลายที่ได้มากรองผ่าน Ultrafiltration ซึ่งมีขนาดแผ่นกรอง 100 กิโลดาลตัน พบว่าช่วยให้สีของน้ำหมักจางลงและไม่พบกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินในส่วนที่ไม่ผ่านแผ่นกรอง แต่ในส่วนที่ผ่านแผ่นกรองกิจกรรมการยับยั้งยังคงเดิม แสดงว่าแบคทีเรียโอซินที่ได้มีขนาดโมเลกุลต่ำกว่า 100 กิโลดาลตัน

4.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

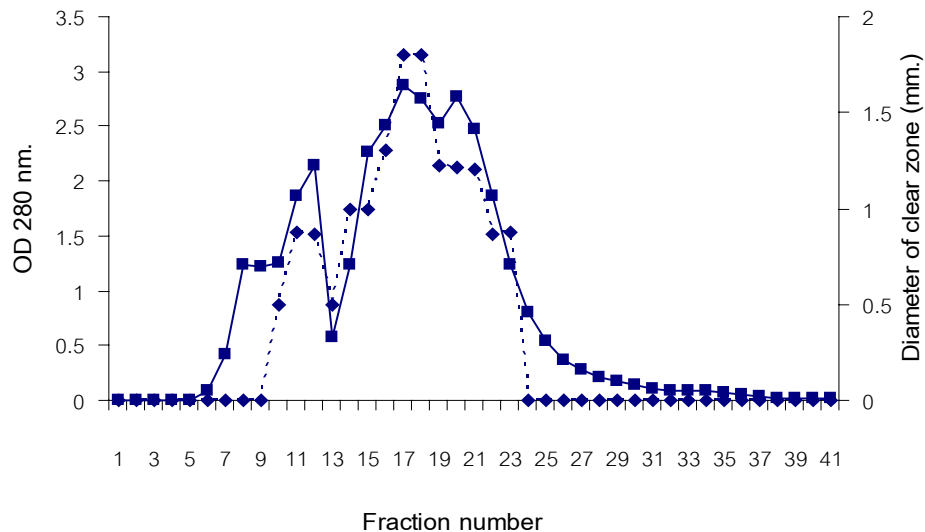
ทำการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 2 ระดับ คือที่ระดับเกลืออิ่มตัวร้อยละ 40 และร้อยละ 80 โดยทำการกวนผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนผสมที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมา

เหวี่ยงแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากการทดลองพบกิจกรรมการยับยั้งหลังจากตกตะกอนที่ระดับเกลืออิมตัวร้อยละ 40 ในส่วนตะกอนเท่ากับ 10 AU/ml. และในส่วนใสมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเป็น 20 AU/ml. โดยมีปริมาณโปรตีนเป็น 9.52 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 11.52 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการตกตะกอนต่อที่ระดับเกลืออิมตัวร้อยละ 80 โดยกวนผสมให้เข้ากันที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จะพบตะกอนเกิดขึ้น 2 ส่วน คือ ลอยอยู่บนผิวและตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด การเกิดตะกอนแบบนี้มักพบมากในการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตในการทำบริสุทธิ์แบคทีเรียโอสินจากแลคติกแอซิดแบคทีเรีย เช่น Lactacin F จากเชื้อ *L. acidophilus* 11088 (Muriana *et.al.*, 1991b) Brevicin 27 จากเชื้อ *L. brevis* SB27 (Benoit *et.al.*, 1997) และในการทำบริสุทธิ์ Lactocin S จากเชื้อ *L. sake* L45 (Mortvedt *et.al.*, 1991) ทำการเก็บรวบรวมตะกอนทั้งสองส่วนเข้าด้วยกัน ละลายตะกอนโดยใช้สารละลาย 0.2 โมลาร์ อะซิเตดบัฟเฟอร์ พีเอช 3 จากผลการทดลองไม่พบกิจกรรมการยับยั้งในส่วนใสแต่พบกิจกรรมการยับยั้งในส่วนตะกอนเท่ากับ 80 AU/ml. และมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 19.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

หลังจากการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นร้อยละ 80 แล้วนำมากำจัดเกลือโดยการใช้วิธีไดอะไลซิส นำสารละลายแบคทีเรียโอสินที่ได้บรรจุในถุงไดอะไลซิสซึ่งมีขนาดโมเลกุลผ่าน 3,500 ดาลตัน แช่ในสารละลาย 0.2 โมลาร์ อะซิเตดบัฟเฟอร์ พีเอช 3 ที่ค้างคืนไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยทำการเปลี่ยนบัฟเฟอร์ 2 ครั้ง ทำการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของสารละลายภายในถุงไดอะไลซิส พบว่ามีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 80 AU/ml. และมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 17.52 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้สาร CMC หรือ Carboxymethylcellulose เป็นตัวดูดซับโดยทำการดูดซับน้ำออกให้ปริมาตรของสารละลายลดลง 4 เท่า จากการทดลองพบว่ากิจกรรมการยับยั้งเพิ่มขึ้นเป็น 160 AU/ml. และมีค่ากิจกรรมการยับยั้งจำเพาะเพิ่มขึ้น 7 เท่า (แสดงในตารางที่ 8)

4.2 Gel-filtration Chromatography

ทำการปรับสภาพสมดุของคอลัมน์ (Sephadex G-50 ขนาด 1.5 X 20 cm.) โดยใช้สารละลาย 0.2 โมลาร์ อะซิเตดบัฟเฟอร์ พีเอช 3 เติมสารละลายแบคทีริโอซินทั้งหมดลงในคอลัมน์ ครั้งละ 5 มิลลิลิตร ชะด้วยสารละลาย 0.2 โมลาร์ อะซิเตดบัฟเฟอร์ พีเอช 3 ที่อัตราเร็ว 1 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บแยกส่วนที่ได้ครั้งละ 3 มิลลิลิตร จากการทดลองให้ผลดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 กิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของแต่ละส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์

Figure 5 Elution profile obtained from passing bacteriocin through gel filtration chromatography

---- OD 280 nm. — Diameter of clear zone

จากภาพที่ 5 ทำการเก็บรวบรวมส่วนที่มีกิจกรรมการยับยั้ง (Fraction no. 9 - 22) แล้วนำไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการระเหยภายใต้สูญญากาศ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พบว่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 800 AU/ml. และมีค่ากิจกรรมการยับยั้ง

จำเพาะเพิ่มขึ้นเป็น 40 เท่า โดยมีปริมาณผลิตผลเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 35 ทั้งนี้เนื่องมาจากเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิวเดชั่นเป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารตามขนาดโมเลกุล ดังนั้นสารที่มีขนาดโมเลกุลแตกต่างไปจากสารที่เราต้องการจึงถูกกำจัดออกไป นอกจากนี้การทำโครมาโทกราฟีโดยวิธีนี้ยังใช้ในการกำจัดเกลือออกจากสารตัวอย่างทำให้ความบริสุทธิ์ของสารที่ต้องการเพิ่มขึ้นและช่วยเพิ่มปริมาณผลิตผล

4.3 Cation-exchange Chromatography

นำสารที่แยกได้จากข้อ 4.2 ทั้งหมดมาเติมลงในคอลัมน์ Hitrap CM FF ขนาด 1 X 5 มิลลิลิตร ที่ผ่านการปรับสภาพสมดุลของคอลัมน์โดยสารละลายอะซิเตดบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 3 โดยเติมตัวอย่างครั้งละ 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นใช้บัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันที่มีความเข้มข้นของ Sodium chloride (NaCl) เพิ่มขึ้นตั้งแต่ 0.05 โมลาร์ 0.1 โมลาร์ 0.15 โมลาร์ และ 0.2 โมลาร์ ตามลำดับ เก็บแต่ละส่วนที่แยกได้ส่วนละ 1 มิลลิลิตร ที่อัตราเร็ว 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ไดอะไลซิสแยกเกลือออกและนำแต่ละส่วนไปทดสอบกิจกรรมการยับยั้ง พบว่ามีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 400 AU/ml. และให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งจำเพาะเพิ่มขึ้นเป็น 100 เท่า แต่ปริมาณผลิตผลที่ได้ลดลงเหลือเพียงร้อยละ 8 จากการทดลองของ Benoit และคณะ (1997) หลังจากการทำบริสุทธิ์ Brevicin 27 จากเชื้อ *L. brevis* SB27 โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ พบว่าปริมาณผลิตผลลดลงเหลือเพียงร้อยละ 0.34 ทั้งนี้เนื่องมาจากการสูญเสียแบคทีเรียไอซินในระหว่างขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ ซึ่งอาจเกิดเนื่องมาจากการดูดซับระหว่างสารที่ต้องการกับตัวเจล แต่ถึงอย่างไรก็ตามในขั้นตอนการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจะเก็บรวบรวมเฉพาะส่วนที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งสูง ทำให้บางส่วนที่มีกิจกรรมการยับยั้งเพียงเล็กน้อยสูญเสียไปเช่นกัน

ตารางที่ 8 ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์โดยใช้การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตร่วมกับเทคนิคโครมาโทกราฟี และกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN11

Table 8 Purification of bacteriocin from *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN11 by ammoniumsulfate (AS) precipitation and chromatography technique

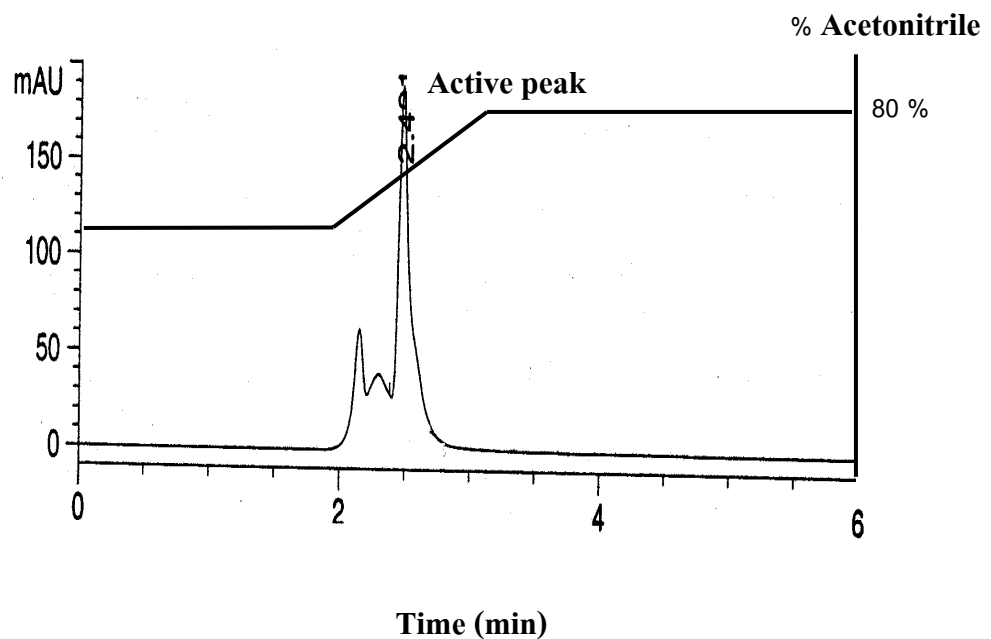
| Purification steps | Volume (ml.) | Bacteriocin activity (AU/ml.) | Total activity (AU) | Protein (mg/ml.) | Specific activity (AU/mg) | Increasing in specific activity | Yield (%) |
|------------------------------------|-----------------|-------------------------------------|------------------------|---------------------|---------------------------------|---------------------------------------|--------------|
| - Cell-free supernatant | 4,000 | 20 | 80,000 | 18.02 | 1.11 | 1 | 100 |
| - Ultrafiltration 100 Kda. | 3,000 | 20 | 60,000 | 18.52 | 1.08 | 0.97 | 75 |
| - Crude from AS precipitate 40-80% | 160 | 80 | 12,800 | 19.02 | 4.21 | 3.79 | 16 |
| - Dialysis | 160 | 80 | 12,800 | 17.52 | 4.57 | 4.12 | 16 |
| - After concentrated by CMC | 40 | 160 | 6,400 | 22.07 | 7.26 | 6.55 | 8 |
| - Gel-filtration Chromatography | 35 | 800 | 28,000 | 18.77 | 42.62 | 38.39 | 35 |
| - Cation-exchange Chromatography | 16 | 400 | 6,400 | 3.42 | 116.96 | 105.36 | 8 |
| - RP-HPLC | 2 | 100 | 200 | 0.27 | 370.37 | 333.67 | 0.25 |

4.4 Reverse-phase High Performance Liquid Chromatography

(RP- HPLC)

RP-HPLC เป็นขั้นตอนสุดท้ายในการทำบริสุทธิ์แบคทีริโอซินจากเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN11 จากการทำบริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ RP-18 (Lichrosorb RP18) โดยมีบัฟเฟอร์ A (สารละลาย TFA ร้อยละ 0.1 ใน สารละลาย Acetonitrile ร้อยละ 99.8) และบัฟเฟอร์ B (สารละลาย TFA ร้อยละ 0.1 ในน้ำกลั่น) เป็นตัวชะ โดยปรับให้มีอัตราการไหลเท่ากับ 0.9 มิลลิลิตรต่อนาที

จากการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของแบคทีริโอซิน พบว่าพีคที่ออกมา ณ นาทีที่ 2.49 เป็นพีคของแบคทีริโอซิน และสารแบคทีริโอซินที่ต้องการ จะออกมาพร้อมกับสารละลาย Acetonitrile ร้อยละ 70 (ภาพที่ 6)

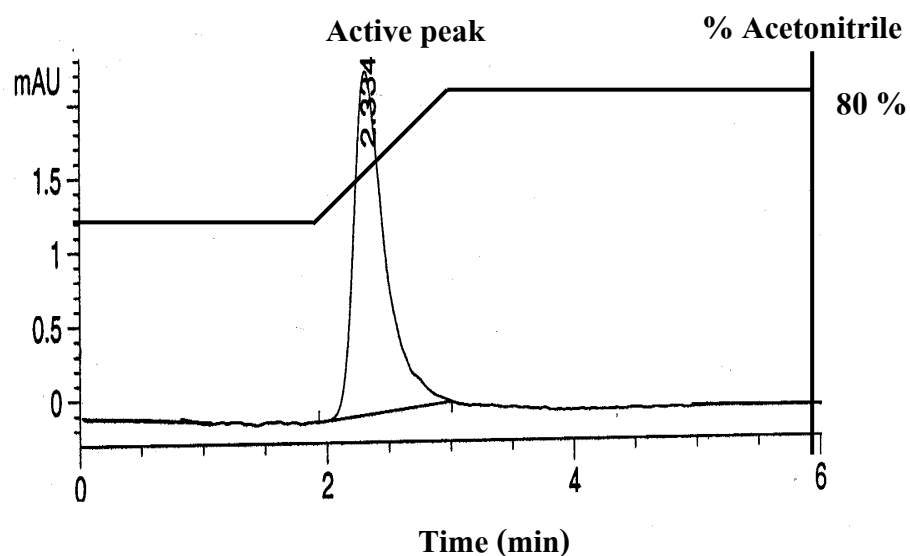


ภาพที่ 6 โครมาโทแกรมของแบคทีริโอซินที่ได้จากการทำ RP-HPLC โดยใช้คอลัมน์ RP-18 (Lichrosorb RP18)

Figure 6 RP-18 HPLC (Lichrosorb RP18) Chromatogram of bacteriocin

จากลักษณะของพีคดังกล่าวทำให้เราทราบถึงคุณสมบัติการเป็น Hydrophobic ของสารซึ่งพบว่าแบคทีเรียโอสตินหลายชนิดที่ผลิตจากแลคติกแอซิดแบคทีเรีย เช่น Lactocin S จากเชื้อ *L. sake* L45 (Mortvedt *et.al.*, 1991) และ Bozacin 14 จากเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B14 (Ivanova *et.al.*, 2000) แสดงคุณสมบัติการเป็น Hydrophobic สูง

จากพีคของแบคทีเรียโอสตินที่ได้จากการทำบริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ RP-18 (Lichrosorb RP18) พบว่าลักษณะของพีคที่ได้ยังไม่แยกออกจากกัน จึงทำการเก็บแยกแต่ละส่วนและนำไปผ่านคอลัมน์ RP-18 (Lichrosorb RP18) อีกครั้ง โดยใช้บัฟเฟอร์ A และ B ซึ่งมีปริมาตรของบัฟเฟอร์และอัตราการไหลของตัวชะเท่ากับทำการทดลองในครั้งแรก จากการทดลองพบว่าพีคที่ได้มีลักษณะเป็นพีคเดี่ยว (ภาพที่ 7) เมื่อเก็บส่วนที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนและทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอสติน พบว่ามีค่ากิจกรรมการยับยั้งจำเพาะเพิ่มขึ้นจากเดิมเป็น 300 เท่า (ตารางที่ 8)



ภาพที่ 7 ลักษณะพีคที่ได้จากการทำรีโครมาโทกราฟีโดยใช้คอลัมน์ RP-18 (Lichrosorb RP18)

Figure 7 Rechromatogram peak from RP-18 HPLC (Lichrosorb RP18)

5. การทำบริสุทธิ์แบคทีเรียโอสตินจากเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN11 โดยใช้ Amberlite XAD-4 ร่วมกับเทคนิคโครมาโทกราฟี

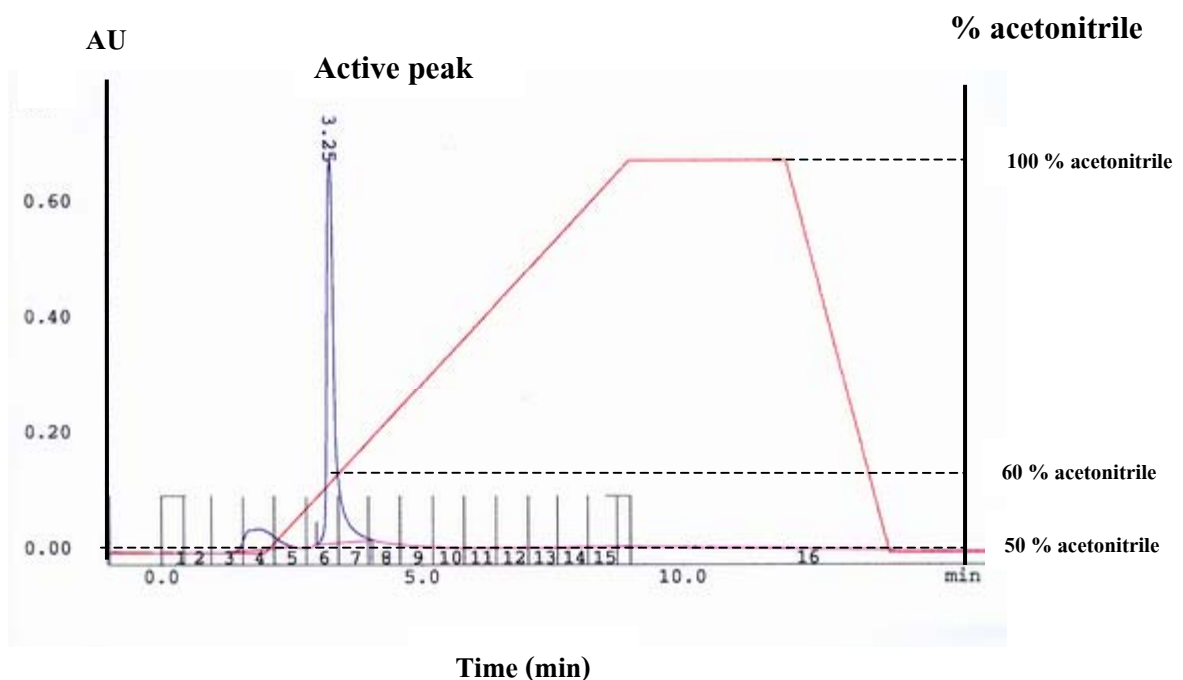
จากการศึกษาการทำบริสุทธิ์แบคทีเรียโอสตินจากเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN11 โดยวิธีการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตในข้อที่ 4 พบว่าปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้ส่วนใหญ่สูญเสียไปในช่วงของการตกตะกอน โดยพบว่าหลังจากผ่านขั้นตอนอัลตราฟิวเดชั่นขนาด 100 กิโลดาลตัน จะมีปริมาณผลิตภัณฑ์ร้อยละ 75 และเมื่อตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับเกลืออิ่มตัว ร้อยละ 40-80 พบว่าปริมาณผลิตภัณฑ์ลดลงเหลือเพียงร้อยละ 16 และเมื่อสิ้นสุดขั้นตอนการทำบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีพบว่าแบคทีเรียโอสตินที่ได้มีลักษณะความเป็น hydrophobicity สูง

การนำ Amberlite XAD-4 ซึ่งมีโครงสร้างเป็นอะโรมาติกโพลีเมอร์ ไม่ละลายน้ำ มีพื้นที่ในการดูดซับสูง และสามารถดูดซับพวก hydrophobic โมเลกุลจากสารละลายที่มีขี้ มาใช้สำหรับดูดซับแบคทีเรียโอสตินในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะช่วยลดการสูญเสีย เพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์และลดขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ได้

จากการทำบริสุทธิ์โดยการเติม Amberlite XAD-4 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อและกวนเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วกรองเอา Amberlite XAD-4 ที่ดูดซับโปรตีนมาบรรจุในคอลัมน์ ล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วชะตัวสารละลายผสมระหว่าง methanol : น้ำกลั่น พบว่าการชะด้วยสารละลายผสมในอัตราส่วน 1 : 1 ไม่สามารถชะแบคทีเรียโอสติน ออกจากตัวดูดซับได้ แต่หลังจากการชะด้วย methanol : 0.1 HCl ในอัตราส่วน 9 : 1 พบว่าสามารถชะเอาแบคทีเรียโอสติน ออกจาก Amberlite ได้ดี โดยให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์เป็น 80 AU/ml. โดยมีกิจกรรมการยับยั้งจำเพาะเป็น 3.35 และมีปริมาณผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 120 (ตารางที่ 9) จากการทดลองของ Tolonen และคณะ (2003) ในการทดสอบประสิทธิภาพการดูดซับในชั้นของสารดูดซับหลายชนิด ได้แก่ Streamline DEAE Streamline SP Streamline phenyl Amberlite XAD-4 และ Kieselguhr พบว่าปริมาณในชั้นที่เหลืออยู่ในบัฟเฟอร์ที่ใช้ Amberlite XAD-4 เป็นตัวดูดซับมีน้อยกว่า 100 IU/ml. ในขณะที่สารดูดซับตัว

อื่นๆ มีปริมาณในชั้นเหลืออยู่สูงถึง 900-1,000 IU/ml. (ปริมาณในชั้นเริ่มต้นเท่ากับ 1,000 IU/ml.) จากการทดลองแสดงว่า Amberlite XAD-4 มีความสามารถในการดูดซับในชั้นได้ดีกว่าสารดูดซับตัวอื่นๆ

แบคทีเรียไอซอินที่ถูกชะออกจาก Amberlite XAD-4 แล้วจะถูกนำมาทำบริสุทธิ์ต่อโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบผันกลับ หลังจากการปรับสภาพสมดุลของคอลัมน์ (Resource RPC) ด้วยสารละลาย Acetonitrile ร้อยละ 50 พบว่าแบคทีเรียไอซอินถูกชะออกมาพร้อมกับสารละลาย Acetonitrile ร้อยละ 60 ในเวลาที่ 3.25 (ภาพที่ 8) และให้กิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์เป็น 320 AU/ml. โดยมีกิจกรรมการยับยั้งทั้งหมดเท่ากับ 1,600 AU และมีกิจกรรมการยับยั้งเพิ่มขึ้นประมาณ 60 เท่า โดยมีปริมาณผลิตภัณฑ์เท่ากับร้อยละ 8 ดังแสดงในตารางที่ 9



ภาพที่ 8 โครมาโทแกรมที่ได้จากการทำบริสุทธิ์แบคทีเรียไอซอินโดยใช้คอลัมน์ชนิด Resource RPC

Figure 8 Chromatogram obtained from Resource RPC- FPLC

ตารางที่ 9 ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์โดยใช้ Amberlite XAD-4 เป็นตัวดูดซับ และกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN11

Table 9 Purification of bacteriocin from *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN11 by Amberlite XAD-4

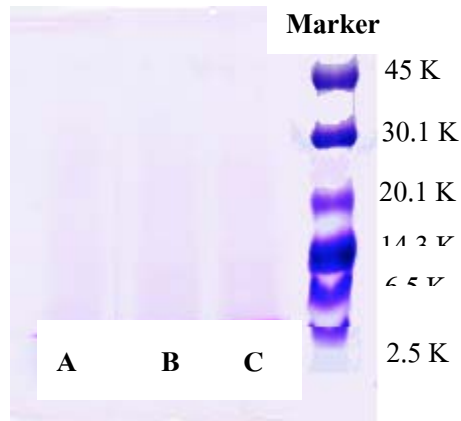
| Purification steps | Volume (ml.) | Activity (AU/ml.) | Total activity (AU) | Protein (mg/ml.) | Specific activity (AU/mg) | Increasing in specific activity | Yield (%) |
|---|-----------------|----------------------|------------------------|---------------------|---------------------------------|------------------------------------|--------------|
| - Cell-free supernatant | 1,000 | 20 | 20,000 | 18.52 | 1.11 | 1 | 100 |
| - Washed amberlite with distill water | 3,000 | 0 | 0 | 3.77 | 0 | 0 | 0 |
| - Eluted amberlite with methanol : water (1:1) | 500 | 0 | 0 | 16.02 | 0 | 0 | 0 |
| - Eluted amberlite with methanol : 0.1 HCl (9:1) | 300 | 80 | 24,000 | 21.52 | 3.72 | 3.35 | 120 |
| - Evaporation | 30 | 320 | 9,600 | 29.02 | 11.03 | 9.94 | 48 |
| - Reverse phases FPLC (Resource RPC) | 5 | 320 | 1,600 | 4.92 | 65.04 | 58.59 | 8 |

6. การปรับปรุงเทคนิคที่ใช้ในการทำบริสุทธิ์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและปริมาณผลิตผลของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN 11

จากการทดลองศึกษาหาวิธีการทำบริสุทธิ์แบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN 11 โดยใช้เทคนิคต่างๆ ร่วมกัน ได้แก่ การตกตะกอนโปรตีนโดยใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตร่วมกับเทคนิคโครมาโทกราฟี พบว่าวิธีการดังกล่าวทำให้เกิดการสูญเสียแบคทีเรียโอซินในปริมาณสูง และต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณมาก จึงจะได้แบคทีเรียโอซินออกมาซึ่งมีผลต่อต้นทุนการผลิต

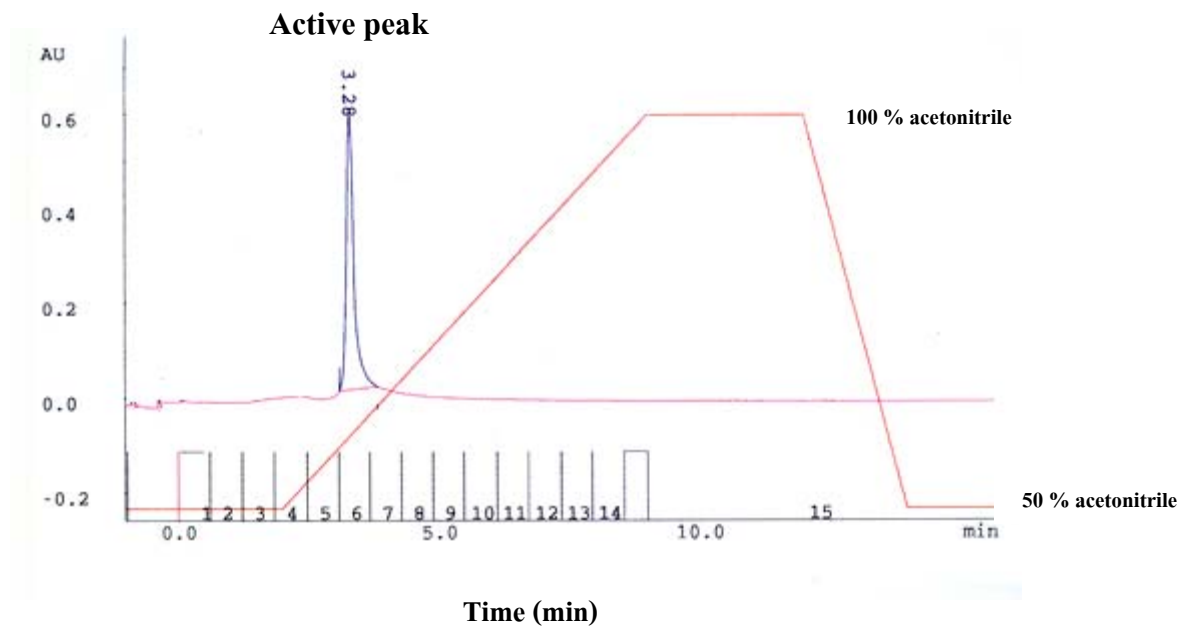
สำหรับการใช้ Amberlite XAD-4 ในการดูดซับแบคทีเรียโอซินออกจากน้ำหมัก หลังจากการแยกเซลล์และให้ความร้อน พบว่าช่วยเพิ่มความเข้มข้นของแบคทีเรียโอซินได้ โดยไม่ต้องใช้น้ำหมักปริมาณมาก และยังช่วยลดขั้นตอนในการทำบริสุทธิ์ได้อีกด้วย แต่อย่างไรก็ตามปริมาณแบคทีเรียโอซินที่ได้สุดท้ายยังต่ำ จึงทำการปรับปรุงวิธีการทำบริสุทธิ์เพื่อเพิ่มปริมาณแบคทีเรียโอซิน จากการปรับปรุงเทคนิคที่ใช้ในการทำบริสุทธิ์ โดยการใช้ Amberlite XAD-4 เจลฟิวเตชั่นโครมาโทกราฟีและโครมาโทกราฟีแบบผันกลับร่วมกัน พบว่าหลังการใช้ Amberlite XAD-4 ในการดูดซับและระเหยเมธานอลออก ยังคงมีปริมาณผลิตผลเหลืออยู่ร้อยละ 80 หลังจากนั้นเมื่อนำไปผ่านคอลัมน์เจลฟิวเตชั่น พบว่าแบคทีเรียโอซินมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องมาจากเทคนิคดังกล่าวสามารถกำจัดโปรตีนที่ไม่ต้องการออกไปได้ ทำให้กิจกรรมการยับยั้งทั้งหมดเพิ่มขึ้นเป็น 25,600 AU และมีกิจกรรมการยับยั้งจำเพาะเพิ่มขึ้นเป็น 20 เท่า ทำให้มีปริมาณผลิตผลเพิ่มขึ้นร้อยละ 128 (ตารางที่ 10)

เมื่อนำมาทำบริสุทธิ์ต่อโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบผันกลับโดยใช้ Acetonitrile และน้ำเป็นตัวชะ พบว่าแบคทีเรียโอซินถูกชะออกมาพร้อมกับสารละลาย Acetonitrile ร้อยละ 70 ในเวลาที่ 3.28 (ดังภาพที่ 10) โดยแบคทีเรียโอซินที่ได้มีกิจกรรมการยับยั้งจำเพาะทั้งหมดเป็น 1,600 AU และมีกิจกรรมการยับยั้งจำเพาะเพิ่มขึ้น 60 เท่า โดยยังมีปริมาณผลิตผลสูงถึงร้อยละ 32 (ตารางที่ 10) และเมื่อนำ active peak ที่ได้ไปทดสอบความบริสุทธิ์โดยใช้วิธี SDS-PAGE พบว่าให้ลักษณะเป็นแบนเดี่ยว ดังภาพที่ 9



ภาพที่ 9 ลักษณะแบนของ active fraction ของแบคทีเรียโอซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์

Figure 9 Bands of bacteriocin active fraction from purify technique improving
Lane A, B and C are a bacteriocin from purify technique improving



ภาพที่ 10 โครมาโทแกรมที่ได้จากการทำบริสุทธิ์แบคทีเรียโอซินโดยการปรับปรุงเทคนิคการทำบริสุทธิ์

Figure 10 Chromatogram obtained from the improve technique for purify

ตารางที่ 10 การปรับปรุงเทคนิคที่ใช้ในการทำบริสุทธิ์แบคทีริโอซินจากเชื้อ *L. casei* ssp. *ramnosus* SN11 และกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของแบคทีริโอซินที่ได้

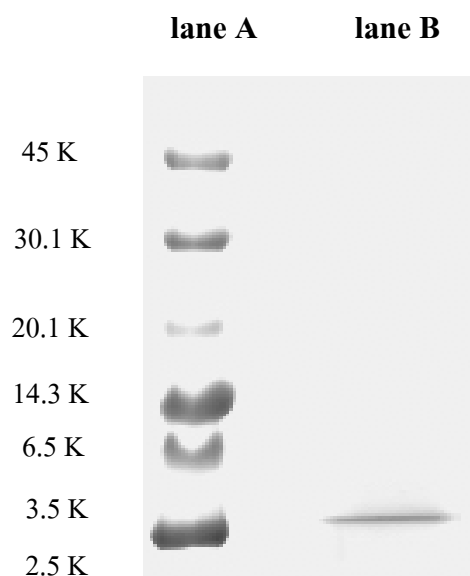
Table 10 Improve of purify technique of bacteriocin and bacteriocin activity from *L. casei* ssp. *ramnosus* SN11

| Purification steps | Volume (ml.) | Activity (AU/ml.) | Total activity (AU) | Protein (mg/ml.) | Specific activity (AU/mg) | Increasing in specific activity | Yield (%) |
|---|-------------------------|------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|--|--|----------------------|
| - Cell-free supernatant | 1,000 | 20 | 20,000 | 19.12 | 1.05 | 1 | 100 |
| - Bacteriocin adsorpted by Amberlite XAD-4 | 50 | 320 | 16,000 | 32.02 | 9.99 | 9.51 | 80 |
| - Gel-filtration Chromatography | 40 | 640 | 25,600 | 28.42 | 22.52 | 21.45 | 128 |
| - Reverse phases FPLC (Resource RPC) | 10 | 640 | 6,400 | 10.27 | 62.62 | 59.64 | 32 |

7. การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของแบคทีริโอซินจากเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* (SN11)

7.1 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของแบคทีริโอซินโดยวิธี SDS-PAGE

จากการทดลองวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของแบคทีริโอซินจากเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN11 โดยใช้เทคนิค SDS-PAGE ซึ่งทำการเตรียมเจล 2 ชนิด คือ Stacking gel ร้อยละ 4 และ Separating gel ร้อยละ 17 โดยมีโปรตีนมาตรฐานขนาด 2.5-45 กิโลดาลตัน เป็นโปรตีนเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลของแบคทีริโอซิน จากการทดลองให้ผลดังภาพที่ 11



ภาพที่ 11 น้ำหนักโมเลกุลของแบคทีริโอซินจากเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN11

Figure 11 Molecular weight of bacteriocin from *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN11

Lane A = standard protein

Lane B = Bacteriocin sample from Resource RPC column

จากการทดลองเมื่อเปรียบเทียบแถบโปรตีนของแบคทีริโอซินที่ได้จากเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* (SN11) กับแถบน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน (ภาคผนวก ข) พบว่าแบคทีริโอซินที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3,975 ดาลตัน

7.2 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของแบคทีริโอซินโดยวิธี EMS

จากการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยใช้เทคนิค Direct mass (Electrospray Positive Ionisation : ESI⁺) โดยใช้เครื่อง Liquid chromatography-Mass spectrometer พบว่าแบคทีริโอซินมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 3,454 ดาลตัน (แสดงในภาพที่ 12)

ภาพที่ 12 โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของแบคทีริโอซินโดยวิธี EMS

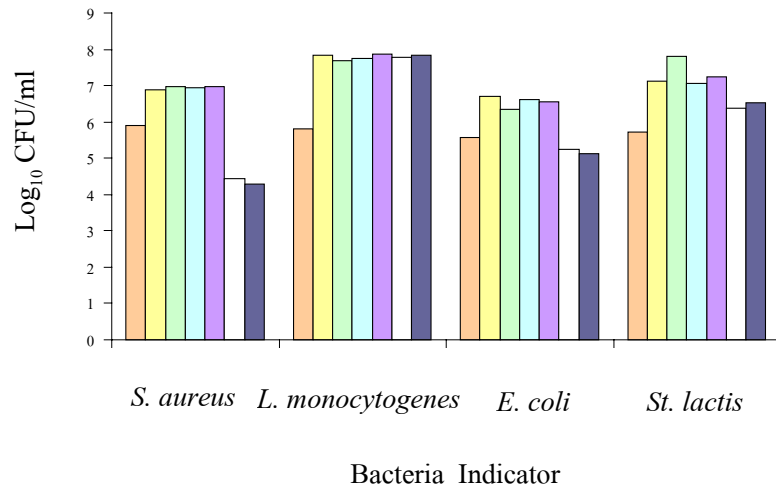
Figure 12 Molecular weight of bacteriocin from electrospray direct mass spectrometry

7. การศึกษาคุณสมบัติบางประการของแบคทีเรียโอสินบริสุทธิ์ที่ผลิตได้จากเชื้อ

L. casei ssp. *rhamnosus* SN11

7.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของแบคทีเรียโอสินบริสุทธิ์

จากการศึกษาหาประสิทธิภาพการยับยั้งของแบคทีเรียโอสิน เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำไป pour plate นับจำนวนโคโลนี พบว่าในการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของแบคทีเรียโอสินที่ความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (256 AU/ml) และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (320 AU/ml) สามารถลดปริมาณเชื้อลงได้ 2 log CFU/ml ในขณะที่เมื่อทดสอบกิจกรรมการยับยั้งกับเชื้อ *E. coli* และ *Strep. lactis* แบคทีเรียโอสินจากเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* (SN11) สามารถลดปริมาณแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ทั้ง 2 ชนิดได้ 1 log CFU/ml และไม่พบการเปลี่ยนแปลงใดๆ กับ การทดสอบกิจกรรมการยับยั้งกับเชื้อ *L. monocytogenes* (ดังภาพที่ 13) จากการทดลองของ นิตินทร ขำทวิ (2544) พบว่าแบคทีเรียโอสินจากเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* (SN11) ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่า *E. coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ และมีลักษณะคล้ายกับแบคทีเรียโอสินหลายชนิด เช่น แบคทีเรียโอสินที่ผลิตโดยเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* LF221 (Bogovic-Matijasic และ Rogelj, 1998) แบคทีเรียโอสินที่ผลิตโดยเชื้อ *Pediococcus damnosus* NCRB1832 (Green *et.al.*, 1997) และแบคทีเรียโอสินที่ผลิตโดยเชื้อ *Lactobacillus plantarum* KW30 (Kelly *et.al.*, 1996) เป็นต้น



ภาพที่ 15 ผลการทดสอบหาประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* (SN11)

Inhibition of bacteriocin to 4 bacteria indicator

- | | |
|--|---|
| Bacteria indicator (log CFU/ml) | Bacteria indicator after 12 hour |
| Bacteriocin conc. 0.2 mg/ml | Bacteriocin conc. 0.4 mg/ml |
| Bacteriocin conc. 0.6 mg/ml | Bacteriocin conc. 0.8 mg/ml |
| Bacteriocin conc. 1.0 mg/ml | |

4.1 ผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีน อุณหภูมิ และพีเอชต่อความคงตัวของแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* (SN11)

ทำการเตรียมแบคทีเรียโอซินเริ่มต้นให้มีค่าความเข้มข้นเริ่มต้นเป็น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (320 AU/ml) สำหรับการทดสอบผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีน อุณหภูมิ และพีเอชต่อความคงตัวของแบคทีเรียโอซิน

จากการศึกษาผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อความคงตัวของแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ โดยการนำแบคทีเรียโอซินไปผสมกับเอนไซม์ชนิดต่างๆ ซึ่งได้แก่ Trypsin α -Chymotrypsin และ Proteinase K ก่อนนำแบคทีเรียโอซินไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ พบว่าแบคทีเรียโอซินจะสูญเสียกิจกรรมโดยเอนไซม์ Trypsin α -Chymotrypsin และ Proteinase K โดยยังคงมีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* *E. coli* และ *Strep. lactis* เป็น 320 AU/ml 20 AU/ml และ 80 AU/ml และไม่มีผลใดๆ ต่อการเจริญของเชื้อ *L. monocytogenes* (ดังแสดงในตารางที่ 11) ซึ่งแสดงว่าสารที่ได้จากการทำบริสุทธิ์เป็นแบคทีเรียโอซิน ซึ่งสามารถถูกย่อยสลายได้โดยโปรติเอส

และจากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ทั้ง 4 ชนิด โดยการนำแบคทีเรียโอซิน 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (320 AU/ml.) ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้ คือ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 และ 60 นาที และที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ พบว่าแบคทีเรียโอซินสามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ได้โดยยังคงมีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* เป็น 320 AU/ml ในขณะที่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 100 องศาเซลเซียส และ 121 องศาเซลเซียส กิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินจะลดลงเป็น 160 AU/ml. นอกจากนี้เมื่อนำแบคทีเรียโอซินไปทดสอบกับเชื้อ *E. coli* และ *Strep. lactis* พบว่าแบคทีเรียโอซินยังคงมีกิจกรรมการยับยั้งเป็น 20 AU/ml และ 160 AU/ml ตามลำดับ โดยแบคทีเรียโอซินไม่มีผลใดๆ ต่อการเจริญของเชื้อ *L. monocytogenes* (ดังแสดงในตารางที่ 11)

จากการศึกษาผลของพีเอชต่อความคงตัวของแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *L. casei* ssp. *rhannosus* SN11 โดยการปรับสภาวะของแบคทีเรียโอซินให้มีพีเอชตั้งแต่ 1 ถึง 14 แล้วปรับพีเอชให้เป็นกลางก่อนนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ พบว่าแบคทีเรียโอซินยังคงมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ *S. aureus* *E. coli* และ *Strep. lactis*

ได้ หลังจากที่ถูกปรับสภาวะให้มีพีเอชตั้งแต่ 2 ถึง 8 แต่ความสามารถของแบคทีเรียโอสินจะสูญหายไปหลังจากที่ปรับพีเอชให้สูงขึ้นเป็น 9 ถึง 14 (ดังแสดงในตารางที่ 11)

การที่แบคทีเรียโอสินจากเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN11 สามารถถูกทำลายได้โดยเอนไซม์ย่อยโปรตีนและสามารถทนต่อความร้อนได้ แสดงว่าแบคทีเรียโอสินดังกล่าวเป็นโปรตีนที่ทนความร้อน และมีความแข็งแรงของพันธะสูง ซึ่งขึ้นอยู่กับพันธะของโมเลกุลของกรดอะมิโน และปริมาณไกลซีนที่มีอยู่ในโมเลกุล (Lee et. al., 1999) นอกจากนี้แบคทีเรียโอสินที่ผลิตจากเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN11 ยังมีคุณสมบัติในการคงสภาพได้ดีในช่วงพีเอชที่ค่อนข้างกว้าง ซึ่งสอดคล้องกับแบคทีเรียโอสินที่ผลิตจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ เช่น แบคทีเรียโอสินจากเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* 30 SC (Oh et. al., 2000) และ Bozacin 14 จากเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B 14 (Ivanova et. al., 2000) จะคงตัวที่ พีเอชตั้งแต่ 3 ถึง 10

ความคงตัวของแบคทีเรียโอสินต่อเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนจะต้องต่ำ ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ถึงการเป็นแบคทีเรียโอสิน ที่สามารถถูกย่อยสลายด้วยโปรติเอส ในขณะที่อุณหภูมิ และพีเอช เป็นคุณสมบัติที่ดีของแบคทีเรียโอสิน เพราะสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรมอาหารที่ใช้ความร้อนและสภาวะที่เป็นกรดต่ำในการแปรรูปได้

ตารางที่ 11 ผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีน อุณหภูมิ และพีเอชต่อความคงตัวของแบคทีริโอซิน จากเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN 11

Table 11 Effect of temperature pH and proteolytic enzyme for bacteriocin activity

| Charecterization | Residue activity (AU/ml) | | | |
|-------------------------|--------------------------|-------------------------|----------------|----------------------|
| | <i>S. aureus</i> | <i>L. monocytogenes</i> | <i>E. coli</i> | <i>Strep. lactis</i> |
| Enzyme | | | | |
| Control | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Trypsin | 40 | 0 | 0 | 0 |
| α -Chrymotrypsin | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Proteinase K | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Temperature | | | | |
| Untreat | 320 | 0 | 20 | 160 |
| 60 °C 30 min | 320 | 0 | 20 | 160 |
| 100 °C 30 min | 160 | 0 | 20 | 80 |
| 100 °C 60 min | 160 | 0 | 0 | 80 |
| 121 °C 30 min | 160 | 0 | 0 | 80 |
| pH | | | | |
| pH 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| pH 2-5 | 320 | 0 | 20 | 160 |
| pH 6-8 | 40 | 0 | 20 | 40 |
| pH 9-14 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Control = Treated with individual enzyme