บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

1. การใช้น้ำมะพร้าวและน้ำนึ่งปลาทูน่าเป็นแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตแบคเทอริโอซินจากเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN11 เชื้อสามารถเจริญได้ในอาหารทุกสูตร แต่จะเจริญได้ดีที่สุดในอาหารสำเร็จ MRS โดยให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* เป็น 20 AU/ml. ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 16 ถึง 24 ซึ่งเป็นช่วง late log phase ถึงระยะ early stationary phase ในขณะที่สูตรอาหารดัดแปลงที่มีการใช้ปริมาณน้ำมะพร้าวเพิ่มขึ้นเป็น 1 : 1 (Coco1) 1 : 2 (Coco2) 1 : 3 (Coco3) และ 1 : 4 (Coco4) มีกิจกรรมการยับยั้งเป็น 10 AU/ml. โดยที่เชื้อเริ่มผลิตแบคเทอริโอซินตั้งแต่ชั่วโมงที่ 16 ตลอดจนสิ้นสุดการทดลองที่ 48 ชั่วโมง และในสูตรอาหาร Tuna 2 และ Tuna 3 ที่มีการใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าเพิ่มขึ้น 2 และ 3 เท่า จะให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 10 AU/ml. โดยจะตรวจพบกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินตั้งแต่ช่วงแรกของการเจริญ และไม่พบกิจกรรมการยับยั้งหลังจากชั่วโมงที่ 16 และไม่พบกิจกรรมการยับยั้งใดๆ ในสูตรอาหาร Medium I และ Tuna 4

2. จากการทดลองพบว่าปัจจัยที่สำคัญในการผลิตแบคเทอริโอซินจากเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN11 คือ ปริมาณองค์ประกอบต่างๆ ของสารในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น ปริมาณน้ำตาล ปริมาณโปรตีน และปริมาณแร่ธาตุที่มีอยู่ในวัตถุดิบ โดยแบคเทอริโอซินผลิตได้ดีในสูตรอาหารสำเร็จ MRS ที่มีสัดส่วนปริมาณไนโตรเจนร้อยละ 25 และมีปริมาณคาร์บอนร้อยละ 20 โดยเมื่อปรับปริมาณสัดส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีปริมาณไนโตรเจนเพิ่มขึ้นในสูตรอาหารดัดแปลง Tuna 2 (ปริมาณไนโตรเจนร้อยละ 27.24), Tuna 3 (ปริมาณไนโตรเจนร้อยละ 34.05) และ Tuna 4 (ปริมาณไนโตรเจนร้อยละ 36.32) และเมื่อลดปริมาณไนโตรเจนลงในสูตรอาหารดัดแปลง Coco 2 (ปริมาณไนโตรเจนร้อยละ 15.12), Coco 3 (ปริมาณไนโตรเจนร้อยละ 11.35) และ Coco 4 (ปริมาณไนโตรเจนร้อยละ 9.08) จะทำให้กิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินที่ได้ลด

ลง ทั้งนี้เนื่องมาจากปริมาณสารอาหารที่มากเกินพอ เข้าไปมีผลในการยับยั้งการเจริญและการสร้างแบคเทอริโอซิน

3. สำหรับสูตรอาหารดัดแปลง Coco 1 ที่มีการปรับสัดส่วนน้ำนึ่งปลาทูน่าต่อน้ำมะพร้าวเป็น 1 ต่อ 1 มีปริมาณไนโตรเจนในสูตรอาหารร้อยละ 22.70 และมีปริมาณคาร์บอนในสูตรอาหารร้อยละ 18.50 ให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของแบคเทอริโอซินเท่ากับ 20 AU/ml ในชั่วโมงที่ 20 ซึ่งใกล้เคียงกับสูตรอาหารสำเร็จ MRS เนื่องจากปริมาณสัดส่วนของคาร์บอนและไนโตรเจนในสูตรอาหารใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงสามารถนำน้ำนึ่งปลาทูน่าและน้ำมะพร้าว ซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรมาใช้ในการพัฒนาสูตรอาหารเพื่อการผลิตแบคเทอริโอซินจากเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN 11 ได้

4. การทำบริสุทธิ์แบคเทอริโอซินจากเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN11 สามารถทำได้โดยใช้ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ 4 ขั้นตอน คือ การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต gel-filtration chromatography cation-exchange chromatography และ reverse phase high performance liquid chromatography โดยแบคเทอริโอซินที่ได้มีกิจกรรมการยับยั้งเป็น 100 AU/ml และมีค่ากิจกรรมการยับยั้งจำเพาะเพิ่มขึ้นเป็น 300 เท่า แต่ผลิตผลส่วนใหญ่จะสูญเสียไปในขั้นตอนของการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตทำให้เมื่อสิ้นสุดขั้นตอนการทำบริสุทธิ์มีปริมาณผลิตผลที่ได้เหลือเพียงร้อยละ 0.25

5. การใช้ Amberlite XAD-4 เป็นตัวดูดซับร่วมกับเทคนิคโครมาโทกราฟีสามารถลดการสูญเสียและลดขั้นตอนในการทำบริสุทธิ์ได้ โดยมีขั้นตอนดังนี้ คือ ดูดซับด้วย Amberlite XAD-4 สกัดโดยใช้ Methanol และแยกด้วย RP-FPLC จากการทดลองทำให้ได้แบคเทอริโอซินบริสุทธิ์ที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งเป็น 320 AU/ml มีค่ากิจกรรมการยับยั้งเพิ่มขึ้น 60 เท่า และมีปริมาณผลิตผลร้อยละ 2 เมื่อสิ้นสุดขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ โดยมีปริมาตรแบคเทอริโอซินเริ่มต้นเท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร

6. การปรับปรุงเทคนิคในการทำบริสุทธิ์แบคเทอริโอซินเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและปริมาณผลิตผลของแบคเทอริโอซิน สามารถให้ผลิตผลเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 32 มีค่า

กิจกรรมการยับยั้งเพิ่มขึ้น 60 เท่า และให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งเป็น 320 AU/ml โดยเมื่อนำไปทดสอบความบริสุทธิ์โดยวิธี SDS-PAGE ได้เป็นแบนเดี่ยวชัดเจน

7. แบคเทอริโอซินบริสุทธิ์ที่ผลิตโดยเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN11 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3,975 ดาลตัน จากการวิเคราะห์โดยใช้วิธี SDS-PAGE และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 3,454 ดาลตัน เมื่อวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารโดยใช้เทคนิค EMS

8.ในการศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ของแบคเทอริโอซิน บริสุทธิ์ พบว่าการเตรียมแบคเทอริโอซินที่ความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (256 AU/ml) และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (320 AU/ml) สามารถลดปริมาณเชื้อ *S. aureus* ลงได้ 115
log CFU/ml และเมื่อทดสอบกิจกรรมการยับยั้งกับเชื้อ *E. coli* และ *Strep. lactis* พบว่าสามารถลดปริมาณเชื้อทั้งสองชนิดลงได้ 1 log CFU/ml และไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *L. monocytogenes* ได้

9. ในการทดสอบความคงตัวของแบคเทอริโอซิน (1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)ต่ออุณหภูมิโดยใช้เชื้อ *S. aureus* *E. coli* *Strep. lactis* และ *L. monocytogenes* เป็นแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ในการทดสอบกิจกรรมการยับยั้ง จากการทดลองพบว่าแบคเทอริโอซินสามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ได้ โดยยังคงมีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* *E. coli* และ *Strep. lactis* เท่ากับ 320 AU/ml 20 AU/ml และ 160 AU/ml ตามลำดับ และทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 และ 60 นาที และที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ได้โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* *E. coli* และ *Strep. lactis* ลดลงเป็น 160 AU/ml 20 AU/ml และ 80 AU/ml ตามลำดับ โดยแบคเทอริโอซินที่ทดสอบไม่มีผลใดๆ ต่อการเจริญของเชื้อ *L. monocytogenes*

10. จากการทดสอบความคงตัวของแบคเทอริโอซินต่อพีเอช โดยทำการปรับสภาวะให้มีพีเอชเป็น 1 ถึง 14 พบว่าแบคเทอริโอซินสามารถทนพีเอชได้ในช่วงกว้าง โดยแบคเทอริโอซินยังคงมีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* *E. coli* และ *Strep. lactis* ที่พีเอช 2 ถึง 8 และเมื่อทดสอบความคงตัวของแบคเทอริโอซินต่อเอนไซม์ย่อย

โปรตีน พบว่าแบคเทอริโอซินถูกทำลายได้โดยเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน Trypsin α-Chrymotrypsin และ Proteinase K

11. จากการศึกษาสมบัติบางประการของแบคเทอริโอซินบริสุทธิ์ ทำให้ทราบว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตได้โดยเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN11 เป็นโปรตีนทนร้อนและทนพีเอชได้ในช่วงกว้าง แต่สามารถถูกทำลายได้โดยเอนไซม์ย่อยโปรตีน จากความสามารถเหล่านี้ถือเป็นข้อดีของแบคเทอริโอซิน เพราะสามารถนำแบคเทอริโอซินที่ได้ไปใช้เป็นสารป้องกันการเสื่อมเสียในอุตสาหกรรมที่ใช้ความร้อนและใช้สภาวะที่เป็นกรดในการแปรรูปได้