บทที่ 4

การอภิปรายและสรุปผลการทดลอง

จากการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างอาหารหมักดอง ผัก และผลไม้ โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน เพื่อคัดเลือกจุลชีพที่มีสมบัติในการฆ่าจุลชีพอื่นๆ สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ 3 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการฆ่าจุลินทรีย์กลุ่มยีสต์ ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของ *Bacillus* sp. ทั้งสามสายพันธุ์ให้ผลดีในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ทดสอบ และเมื่อทำการทดสอบความสามารถในการฆ่าจุลินทรีย์อื่น พบว่า จุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้สามารถฆ่าจุลินทรีย์ในกลุ่มอื่น ๆได้อย่างกว้างขวางทั้งแบคทีเรีย รา และ ยีสต์ โดยสามารถฆ่าจุลินทรีย์ในกลุ่มยีสต์และราได้ทุกสายพันธุ์ทดสอบ แต่ฆ่าแบคทีเรียได้บางสายพันธุ์เท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Katz และคณะ,1977 ซึ่งพบว่า สารปฏิชีวนะกลุ่มเปปไทด์ที่สร้างจากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ส่วนใหญ่จะมีความสามารถในการฆ่าจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก แต่บางสายพันธุ์จะสามารถสร้างสารที่สามารถฆ่าจุลินทรีย์ในกลุ่มรา และยีสต์ได้ จากการทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบในการทดลองนี้ใช้การศึกษา 3 วิธี ได้แก่ (1) การขีดไขว้บนอาหารแข็งที่มีเชื้อทดสอบเจริญอยู่ และสังเกตบริเวณใสที่เกิดขึ้นจากการยับยั้งการเจริญ (2) การดูดซึมของสารผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อ (Agar diffusion) และเปรียบเทียบบริเวณยับยั้งรอบหลุมทดสอบ (3) การทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบโดยวิธี tube test และติดตามผลการฆ่ายีสต์ทดสอบ โดยการวัดค่าความขุ่นของเซลล์แขวนลอยของจุลชีพทดสอบที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร เมื่อเปรียบเทียบ พบว่า การทดสอบโดยวิธีการขีดไขว้เป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็ว เหมาะสำหรับดูผลโดยประมาณการแต่ผลการทดลองที่ได้จะไม่แม่นยำนัก ในขณะที่วิธีที่ 2 นั้นให้ผลดีกว่าในเชิงปริมาณ (Semi-quantitative) แต่มีข้อเสียเนื่องจากความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบโดยวิธีนี้ขึ้นกับอัตราการแพร่ของสารผ่านวุ้นเพาะเชื้อ ซึ่งในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละครั้งอัตราการแพร่ของสารจะไม่คงที่ เนื่องจากความไม่เที่ยงตรงในการเทวุ้น ปริมาณความชื้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ ตลอดจนความไม่แม่นยำในการ

วัดความกว้างของบริเวณยับยั้ง วิธีสุดท้ายเป็นวิธีที่ใกล้กับวิธีเชิงปริมาณ (Quantitative) ที่สุด การวัดผลทำโดยใช้เครื่องมือที่มีการแสดงค่าเป็นตัวเลข จึงเป็นวิธีที่มีความเที่ยงตรง แม่นยำ และเชื่อถือได้มากที่สุด

จากผลการทดสอบความสามารถในการฆ่าจุลินทรีย์กลุ่มต่าง ๆ ข้างต้นพบว่า แบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้มีความสามารถสูงในการฆ่าจุลินทรีย์อื่น ๆ ทั้ง แบคทีเรีย รา และยีสต์ แต่สำหรับการทดลองในครั้งนี้ได้เลือกใช้ยีสต์เป็นเชื้อทดสอบ ทั้งนี้มีวัตถุประสงค์อันเนื่องมาจากว่า ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสูงต่อการหมักต่าง ๆ ทางอุตสาหกรรม ในการศึกษาเบื้องต้นได้เลือกใช้ *Torulopsis glabrata* เป็นเชื้อทดสอบ เนื่องจากเป็นยีสต์ทดสอบมาตรฐาน (Standard strain) ที่นิยมใช้ในงานวิจัยทั่วไป (Young และ Yagin, 1978) ต่อมาได้ใช้ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นเชื้อทดสอบควบคู่ไปด้วย เนื่องจากเล็งเห็นว่า *Saccharomyces cerevisiae* เป็นยีสต์ที่มีบทบาทมากในอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมการผลิตไวน์, เบียร์, แอลกอฮอล์ เป็นต้น ดังนั้นในกรณีหลังหาก *Saccharomyces cerevisiae* มีความไวต่อทอกซินนี้ อาจสามารถประยุกต์ใช้ทอกซินนี้มาใช้ประโยชน์ในการหยุดกระบวนการได้ จากการติดตามเปรียบเทียบระยะเวลาในการเจริญของยีสต์ทดสอบทั้ง 2 สายพันธุ์ ดังแสดงในรูปที่ 3.2 และเปรียบเทียบคุณสมบัติในการเป็นยีสต์ทดสอบบนอาหารแข็งที่ทำการทดสอบโดยการดูดซึมทอกซินในวุ้นเพาะเชื้อ พบว่า ยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์จะให้ผลการทดลองที่ใกล้เคียงกัน แต่ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นเชื้อทดสอบต่อการออกฤทธิ์ของทอกซินเพียงสายพันธุ์เดียว เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่มีบทบาทสูงมากในอุตสาหกรรมการหมักปัจจุบัน ดังได้กล่าวไว้ข้างต้น

ในการคัดเลือกจุลชีพที่มีสมบัติดีที่สุดในการผลิตทอกซินจาก *Bacillus* sp.ทั้ง 3 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ โดยการติดตามการเจริญและทดสอบความเสถียรของทอกซินที่ผลิตได้ ดังแสดงในรูป 3.4, 3.5 และ 3.6 พบว่า สายพันธุ์ F2.2 เป็นสายพันธุ์ที่ให้ผลดีในสภาวะการทดสอบ ดังนั้นจึงเลือกสายพันธุ์นี้สำหรับการผลิตทอกซิน โดยมีเหตุผลว่า F2.2 มีอัตราการเจริญที่รวดเร็วกว่าสายพันธุ์ 5/12 และ 3/38 และผลิตทอกซินรวมทั้งปลดปล่อยออกมาได้เร็วกว่า ทั้งนี้พบว่าเมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่าง ๆ ไปทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจะสังเกตเห็นบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นรอบหลุมทดสอบก่อนสายพันธุ์อื่น ในแง่ของความเสถียรของทอกซิน

พบว่าเมื่อนำทอกซินของสายพันธุ์ F2.2 และ 5/12 ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ตลอดจนการทำให้แห้งภายใต้อุณหภูมิต่ำ (รูปที่ 3.7) พบว่า ทอกซินที่สร้างจากแบคทีเรียสายพันธุ์ F2.2 มีความเสถียรต่อสภาวะที่ทดสอบดีกว่าสายพันธุ์ 5/12 ทั้งนี้โดยพิจารณาจากเปอร์เซนต์การฆ่าสัมพัทธ์ของการเก็บที่สภาวะต่างๆ เมื่อเทียบกับความสามารถในการฆ่าเชื้อเมื่อทดสอบทันที จะเห็นว่าทอกซินที่ผลิตจากเชื้อ F2.2 เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำและการทำให้แห้งภายใต้อุณหภูมิต่ำเปอร์เซนต์การฆ่าจะไม่ลดลงมากนัก แต่การเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน เปอร์เซนต์การฆ่าสัมพัทธ์จะลดลงมากกว่า 50% นั่นคือทอกซินจะสูญเสียแอคติวิตีและความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบไป สำหรับทอกซินที่ผลิตจากเชื้อ 5/12 ความเสถียรต่อสภาวะในการทดสอบต่าง ๆ จะต่ำกว่า F2.2 เปอร์เซนต์การฆ่าสัมพัทธ์จะลดลงมากกว่า 50% ในทุกสภาวะของการเก็บ ยกเว้นการทำให้แห้งภายใต้อุณหภูมิต่ำ เปอร์เซนต์การฆ่าสัมพัทธ์จะลดลงเพียง 19.71% เท่านั้น สำหรับการทดลองนี้ไม่นำสายพันธุ์ 3/38 มาทำการศึกษาร่วมด้วย เนื่องจากได้นำไปแยกใช้ในอีกการวิจัยหนึ่ง ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้นจะสรุปได้ว่า สายพันธุ์ที่มีศักยภาพสูงในการฆ่าเชื้อทดสอบได้แก่สายพันธุ์ F2.2 ดังนั้นจึงคัดเลือกสายพันธุ์ F2.2 ไว้ใช้ในการสร้างทอกซินเพื่อการศึกษาในลำดับต่อไป

เมื่อศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของจุลินทรีย์กับการสร้างทอกซินของเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 พบว่า รูปแบบการเจริญจะมีลักษณะที่เรียกว่า Diphasic growth (รูปที่ 3.8) โดยทอกซินจะถูกสร้างขึ้นและปลดปล่อยออกสู่อาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเข้าสู่ระยะหลังของการเจริญแบบลอการิธึมของจุลินทรีย์ (Late logarithmic phase และจะเริ่มสร้างออกมามากขึ้นเมื่อจุลินทรีย์มีการเจริญเข้าสู่ระยะพักที่ 1 (First stationary phase) และสูงสุดเมื่อเซลล์มีการเจริญเข้าสู่ระยะพักที่ 2 (Secondary stationary phase) ที่ระยะเวลาของการเลี้ยงเท่ากับ 72 ชั่วโมง ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของนักวิทยาศาสตร์อื่นๆ เช่น Bulock, 1961; Woodruff, 1966 และ Weinberg, 1970;1971 ซึ่งรายงานไว้ว่า สารปฏิชีวนะกลุ่มเปปไทด์เป็นเมตาบอไลท์ทุติยภูมิ ซึ่งจะมีการสังเคราะห์และผลิตออกมาเมื่อจุลินทรีย์หยุดการเจริญและเพิ่มจำนวน ซึ่งสารปฏิชีวนะที่มีการผลิตออกมาในลักษณะเดียวกันนี้ ได้แก่ เพนนิซิลิน ,กรามิซิดิน-เอส ,เซฟาโรสปอริน-ซี ,ไทโรซิดิน ,แอคติโนมัยซิน , มัยโคบาซิลลิน ,

อิดิอีน ,โพลีมิกซิน และ ไตรโอสติน (Javis และ Johnson, 1947 ; Winnick และคณะ, 1961; Demain, 1963; Mach และคณะ, 1963; Katz และคณะ,1965; Banerjee และคณะ, 1967; Kurylo-Borowska, 1967; Panlus, 1967 ; Yoshida และ Katagiri, 1969)

เมื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วงการเจริญ พบว่าจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนัก คือจะมีค่าอยู่ในช่วง 5.5-7.5 ซึ่งเป็นผลจากการควบคุมของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีการเติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้ในระหว่างการเจริญของจุลินทรีย์ค่าความเป็นกรด-ด่างมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก (Roscoe และ Abraham, 1966) สำหรับโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อในระยะแรกของการเจริญจะมีค่าค่อนข้างคงที่ แต่เมื่อจุลินทรีย์เริ่มมีการปลดปล่อยทอกซินออกสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณโปรตีนจะเริ่มสูงขึ้นและสูงสุดเมื่อการเจริญเริ่มเข้าสู่ระยะพักซึ่งเป็นระยะที่ทอกซินถูกสร้างออกมามากที่สุด ทำให้พอจะสันนิษฐานได้ในขั้นต้นว่าทอกซินที่สร้างจากเชื้อ *Bacillus* sp. จัดเป็นสารประเภทโปรตีน เมื่อปลดปล่อยออกสู่อาหารเลี้ยงเชื้อทำให้ปริมาณโปรตีนที่ตรวจวัดได้มีค่าสูงขึ้น สำหรับการที่พบว่าในระยะต่อไปปริมาณโปรตีนที่ตรวจวัดได้กลับมีค่าลดลงนั้น อาจอธิบายได้ว่าในระยะหลังนี้ยังคงมีการสร้างและปลดปล่อยทอกซินออกสู่อาหารเลี้ยงเชื้อมากขึ้น โดยเซลล์จะหยุดการสังเคราะห์โปรตีนอื่น และหันมาสังเคราะห์ทอกซินมากขึ้นเพื่อนำไปใช้ในระหว่างกระบวนการสร้างสปอร์ (Hodgson,1970) หรือนำไปสร้างเป็นองค์ประกอบในโครงสร้างของสปอร์ (Bernlohr และ Novelli,1963)

ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตทอกซินในขวดเขย่า พบว่าระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ 3 วันให้ผลผลิตสูงสุด (รูปที่ 3.9) ซึ่งเป็นระยะที่จุลินทรีย์สิ้นสุดการเจริญและเข้าสู่ระยะพัก จึงมีการปลดปล่อยทอกซินออกสู่อาหารเลี้ยงเชื้อมาก สำหรับการเลี้ยงเชื้อที่ระยะเวลามากกว่า 3 วัน พบว่า ความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบจะต่ำลง สังเกตจากค่าความขุ่นของเซลล์แขวนลอยจะสูงขึ้น สำหรับผลของความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความสำคัญต่อการผลิตสารปฏิชีวนะของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 นั้นพบว่า ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 5.0-7.0 เป็นช่วงที่มีความเหมาะสมที่สุดในการผลิตทอกซิน ดังแสดงในรูป 3.10 จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตทอกซินจากเชื้อ *Bacillus* sp.

สายพันธุ์ F2.2 คือ 30°ซ. ดังแสดงในรูปที่ 3.11 จะเห็นได้ว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเพื่อสร้างสารปฏิชีวนะแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกันออกไปขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ เช่น อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเบซิเทรซินโดย *Bacillus licheniformis* คือ 35-37°ซ. (Anker และคณะ, 1948) การผลิตแบคเทอริโอซิน(Bacteriocin)โดย *Pediococcus acidilactici* อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30°ซ. (Bhunia และคณะ, 1988) ในขณะที่การผลิตเพนนิซิลินโดย *Penicillium chrysogenum* เป็น 20°ซ. (Soltero และ Johnson, 1953) เป็นต้น

ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในขวดเขย่า ได้ใช้สูตรอาหารชนิดวายอีพีดี (YEPD) ในการผลิตทอกซินจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 และพบว่า น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้ผลผลิตของทอกซินสูงสุดเมื่อเทียบกับซูโครสและแป้ง ดังแสดงในรูปที่ 3.12 โดยไม่เกิดการยับยั้งที่เรียกว่า "คาตาบอไลท์รีเพรสชั่น" (Catabolite repression) ของการผลิตสารปฏิชีวนะและเมตาบอไลท์ทุติยภูมิ ดังรายงานอื่นๆ เช่น ดารารัตน์ รอดพยาธิ์, 2525; วนิดา เรืองศรี,2532; Drew, 1977; Egorov และคณะ, 1986 ในขณะที่สอดคล้องกับการศึกษาของ Snoke (1961) และ Haavik (1974 a, b) ซึ่งพบว่าน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดต่อการผลิตเบซิเทรซินจาก *B. licheniformis* และสารปฏิชีวนะอื่น ๆ เช่น มัยโคบาซิลลิน, โพลีมัยซิน และแอคติโนมัยซิน สำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตทอกซินในอาหารเหลวที่มีซูโครสและแป้งเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่า ปริมาณทอกซินที่ถูกผลิตออกมาน้อยมากเมื่อเทียบกับกลูโคส ซึ่งอาจเนื่องมาจากซูโครสและแป้งมีโครงสร้างโมเลกุลที่ซับซ้อนกว่า จุลินทรีย์ไม่สามารถนำไปใช้ได้ทันทีต้องผ่านขบวนการย่อยสลายให้อยู่ในรูปที่จุลินทรีย์สามารถใช้ได้ก่อน การนำไปใช้โดยเซลล์จึงเป็นไปอย่างช้า ๆ ซึ่งอาจไม่เพียงพอต่อความต้องการในระหว่างการเจริญของจุลินทรีย์และการผลิตสารปฏิชีวนะ

สารไนโตรเจนเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาโดยเลือกใช้แหล่งสารไนโตรเจนอินทรีย์ เนื่องจากหาง่าย ราคาถูก และให้ผลผลิตสูงกว่าแหล่งสารอนินทรีย์ ทั้งนี้เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้อย่างช้า ๆ จึงไม่เกิดการยับยั้งที่เรียกว่า"แอมโมเนียมรีเพรสชั่น" (Drew, 1977; Aharonuwitz, 1980)

ในการศึกษานี้ได้ทำการเปรียบเทียบระหว่างทริปโตน ผงสกัดมอล์ท และเปปโตน พบว่าเปปโตนให้ผลผลิตสูงสุด ดังแสดงในรูปที่ 3.13 ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเปปโตนนอกจากจะเป็นแหล่งไนโตรเจนที่สำคัญแล้วยังสามารถพยุงความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ซึ่งมีความสำคัญต่อการผลิตสารปฏิชีวนะมาก (Haavik, 1974a)

สำหรับการศึกษาแหล่งเกลือแร่และวิตามินที่เหมาะสม (รูปที่ 3.14) พบว่า สารที่เลือกนำมาทดสอบทั้ง 3 ชนิด นอกจากจะเป็นแหล่งเกลือแร่และวิตามินแล้ว ยังทำหน้าที่เป็นแหล่งไนโตรเจนอีกด้วย การเติมสารสกัดจากยีสต์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่า ปริมาณการผลิตทอกซินจากเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 จะมีค่าสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับการเติมคาซามิโนแอซิดและคอร์นสตีฟลิเคอร์ เนื่องจากสารทั้งสองเมื่อเติมลงไปจะมีผลลดค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ต่ำลง ในขณะที่คอร์นสตีฟลิเคอร์นอกจากจะประกอบด้วยกรดอะมิโนแล้ว ยังมีกรดแลคติกและฟินิลอะลานีน ซึ่งสามารถแตกตัวได้เป็นกรดฟีนิลอะซิติก (วนิดา เรืองศรี, 2532) จึงทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความเป็นกรดสูงมาก ไม่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างสารปฏิชีวนะ

จากการทำการทดลองเพื่อศึกษาระยะที่เหมาะสมในการออกฤทธิ์ของทอกซินต่อยีสต์ทดสอบ เมื่อทำการบ่มทอกซินกับ *Saccharomyces cerevisiae* ในหลอดทดสอบเป็นเวลาต่าง ๆ กัน พบว่าที่เวลาของการบ่ม 14 ชั่วโมงจะเป็นเวลาสั้นที่สุดที่ทอกซินสามารถออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อทดสอบ (รูปที่ 3.15) Holland (1962) ได้ทำการศึกษาพบว่า สภาวะในการทดสอบเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญในการออกฤทธิ์ฆ่าจุลินทรีย์ทดสอบ สารปฏิชีวนะเมกาซิน (Megacin) จากเชื้อ *Bacillus megaterium* จะให้ผลดีในการฆ่าจุลชีพทดสอบเมื่ออุณหภูมิในการทดสอบเหมาะสมและเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของระบบเอนไซม์ นอกจากนี้ Ben-Gurion และ Hertman (1958) ยังรายงานถึงการเพิ่มขึ้นของแอคติวิตีของสารปฏิชีวนะเพสทิซิน (Pesticin) จากเชื้อ *Pasteurella pestis* เมื่อทำการทดสอบที่อุณหภูมิ 37°ซ. สำหรับการทดลองนี้ค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วง 5.0-7.0 และอุณหภูมิของการบ่ม 25°ซ. เป็นสภาวะที่ทอกซินออกฤทธิ์ฆ่าจุลินทรีย์ทดสอบได้ดีที่สุด ดังแสดงในรูป 3.16 และ 3.17 และจาก

การศึกษาเพื่อหาระยะเวลาในการเจริญของ *Saccharomyces cerevisiae* ที่เหมาะสมต่อการออกฤทธิ์ของทอกซิน พบว่า ระยะเวลาในการเจริญเท่ากับ 15 ชั่วโมงจะมีความเหมาะสมที่สุด (รูปที่ 3.10) ซึ่งตรงกับระยะกึ่งกลางของการเจริญแบบลอกาลิธึม (Mid-logarithmic phase) ของยีสต์ สอดคล้องกับการทดลองของ Wood (1966) ที่ได้รายงานไว้ว่า *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ทดสอบจะเหมาะสมต่อการฆ่าของทอกซินซึ่งสร้างจากคิลเลอร์ยีสต์ในระหว่างที่เซลล์กำลังมีการเจริญ แต่จะหยุดชะงักลงเมื่อการเจริญเข้าสู่ระยะพัก (Stationary phase) ซึ่งสาเหตุของความเหมาะสมของเซลล์ยีสต์ในระยะนี้ต่อการออกฤทธิ์ของทอกซินยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด (Wood และ Bevan, 1968) จากการที่เซลล์ยีสต์ในระยะกึ่งกลางของการเจริญแบบลอกาลิธึมให้ผลดีที่สุดในการเป็นเชื้อทดสอบ ทำให้เกิดผลดีในแง่การปรับปรุงนำทอกซินไปใช้ประโยชน์ เนื่องจากเป็นที่ทราบกันดีแล้วว่า ผลผลิตที่ได้จากกระบวนการหมักโดยเซลล์ยีสต์มักเกิดขึ้นควบคู่ไปกับการเจริญ เมื่อเซลล์ให้ผลผลิตในปริมาณที่ต้องการแล้ว สามารถหยุดปฏิกิริยาการหมักได้โดยการเติมทอกซิน ซึ่งปริมาณการใช้จะไม่สูงนัก เนื่องจากเซลล์ในระยะนี้มีความไวต่อการออกฤทธิ์ของทอกซินดังได้กล่าวไปแล้ว

เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นในช่วงที่สามารถถูกดูดกลืนได้โดยกรดอะมิโนชนิดอะโรมาติก อันได้แก่ ไทโรซิน (Tyrosine), ทริปโตแฟน (Tryptophan) และฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine) และที่ 260 นาโนเมตร พบว่า อัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงทั้งสองมีค่าเท่ากับ 1.54 ซึ่งใกล้เคียงกับ 2.0 แสดงว่าทอกซินที่ผลิตได้มีคุณสมบัติในการเป็นโปรตีนที่มีการปนเปื้อนจากกรดนิวคลีอิกบ้างเล็กน้อย เมื่อนำทอกซินมาทำการเจือจางพบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรที่อ่านได้จะลดลงตามลำดับส่วนของการเจือจาง (รูปที่ 3.20) เพื่อเป็นการยืนยันสมมุติฐานนี้จึงได้ทำการทดลองโดยการเติมเอนไซม์โปรติเอสลงในทอกซิน แล้วทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบบนอาหารแข็ง พบว่า ทอกซินที่ผ่านการย่อยสลายด้วยโปรติเอสยังคงมีความสามารถในการฆ่ายีสต์ทดสอบ แต่บริเวณใสที่เกิดขึ้นบนอาหารวุ้นจะมีความกว้างลดลงเล็กน้อย (รูปที่ 3.2) เมื่อเปรียบเทียบกับทอกซินปกติ แสดงว่า ทอกซินที่สร้างขึ้นจากเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 จะ

สามารถถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนได้เพียงบางส่วน โดยบริเวณที่ถูกย่อยสลายอาจไม่ใช่บริเวณจำเพาะจึงทำให้ความสามารถของทอกซินสูญเสียไปบ้าง หรืออาจเนื่องมาจากในโมเลกุลของทอกซินประกอบไปด้วยองค์ประกอบอื่นด้วยนอกจากส่วนที่เป็นโปรตีน เมื่อทดลองเติมสารทวีน 80 ซึ่งเป็นดีเทอร์เจนต์ลงในหลอดทดสอบ พบว่า ความสามารถในการฆ่ายีสต์ทดสอบจะลดลง ดังแสดงในรูป 3.22 จึงเสนอแนะว่าโครงสร้างของทอกซินน่าจะมีส่วนประกอบของไขมัน (Lipid) ซึ่งจะเสียสภาพไปโดยทวีน 80 จึงตั้งสมมุติฐานได้ว่า ทอกซินจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ F2.2 มีคุณสมบัติเป็นไลโพโปรตีน (Lipoprotein) ตัวอย่างของสารปฏิชีวนะที่มีคุณสมบัติเป็นไลโพโปรตีน ได้แก่ อิทูริน (Iturin), บาซิโลมัยซิน (Bacillomycin), มัยโคซับทิลิน (Mycosubtilin) และเซอแฟคติน (Surfactin) เป็นต้น (Sandrin และคณะ, 1990)

จากการศึกษาความเสถียรของทอกซินในบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ พบว่า ทอกซินจะมีความเสถียรต่อค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วงกว้างคือ 5.0-9.0 (รูปที่ 3.23) และสูญเสียแอคติวิตีที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2.0-4.0 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hamilton-Miller (1973) ซึ่งกล่าวว่า การที่สารปฏิชีวนะมีเสถียรภาพต่ำในบัฟเฟอร์ที่มีสภาพเป็นกรดอาจจะเป็นเพราะว่าโมเลกุลของสารปฏิชีวนะมีการเปลี่ยนแปลงไปเนื่องจากการกระทำของไฮโดรเจนอิออน (H^+) ทำให้กลุ่มเคมี (Chemical group) บางกลุ่มบนโมเลกุลของสารเปลี่ยนไปจากเดิม ซึ่งกลุ่มเคมีของสารที่เปลี่ยนไปนั้นอาจเป็นส่วนสำคัญของสารที่แสดงปฏิกิริยา(Active site) จึงทำให้ประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะลดลง

ในแง่ความทนทานต่ออุณหภูมิระดับต่าง ๆ ของทอกซิน พบว่า ที่อุณหภูมิ -70°ซ.,-20°ซ. และ 0°ซ. ทอกซินทนอยู่ได้นานถึง 9 อาทิตย์ จากนั้นความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบจะลดลงเรื่อย ๆ (รูปที่ 3.24 และ 3.25) ที่อุณหภูมิ 4°ซ. ทอกซินจะทนอยู่ได้นานประมาณ 2 อาทิตย์ (รูปที่ 3.26) และที่อุณหภูมิห้อง 45°ซ. และ 60°ซ. ทอกซินจะสูญเสียความเสถียรไปหลังจากทำการบ่มเป็นเวลาเพียง 1 วัน เท่านั้น (รูปที่ 3.27) ดังนั้นในขั้นตอนของการทำทอกซินกึ่งบริสุทธิ์จึงได้เลือกทำในที่อุณหภูมิต่ำเพื่อรักษาความเสถียรของทอกซิน

เมื่อทำการตรวจสอบชนิดของจุลินทรีย์ที่เลือกใช้ในการผลิตทอกซินพบว่า เชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีระวิทยา และผลการทดสอบทางชีวเคมีที่เหมือนกับ *Bacillus licheniformis* ตามเกณฑ์การจัดจำแนกแบคทีเรียตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Sneath และคณะ, 1986) ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 มีลักษณะที่เหมือนกับ *Bacillus licheniformis*

ในการสกัดแยกทอกซินจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 ทำโดยการตกตะกอนด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ค่าความเป็นกรด-ด่างในสารละลายเท่ากับ 2.5 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการสกัดแยกสารปฏิชีวนะกลุ่มเปปไทด์จาก *Bacillus polymyxa* โดยการตกตะกอนด้วยกรดไฮโดรคลอริก (Kurusu และ OHba, 1987) และการทำโพลีมิกซินให้บริสุทธิ์ โดยการตกตะกอนด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นจนค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงเป็น 2.0 (Shoji และคณะ, 1977) จากการทดลองที่ผ่านมาพอจะทราบแล้วว่าทอกซินที่สร้างขึ้นจากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 มีคุณสมบัติเป็นไลโพโปรตีน จึงทำการสกัดแยกทอกซินออกมาโดยใช้บิวทานอลซึ่งเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่โพลาร์ (Non polar) นำสารละลายทอกซินซึ่งอยู่ในชั้นบิวทานอลมาทำโครมาโตรกราฟีบนคอลัมน์ซิลิกาเจล ซึ่งจัดเป็นโครมาโตรกราฟีแบบดูดซับ (Adsorption chromatography) แล้วชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ต่าง ๆ ได้แก่ บิวทานอล อะซิโตน เอธานอล อะซิโตไนไทร์ และเมธานอล ที่มีค่าความสามารถในการละลายน้ำเพิ่มขึ้นตามลำดับ (Hydrophobic ---> Hydrophilic) พบว่า โปรตีนที่ดูดซับอยู่บนคอลัมน์จะถูกชะออกมากับตัวชะในลำดับส่วนต่าง ๆ กัน ดังแสดงในรูปที่ 3.31 โดยโปรตีนในยอดที่ออกมากับการชะคอลัมน์ด้วยเมธานอลเท่านั้นที่จะแสดงความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบ

นำส่วนทอกซินซึ่งถูกชะออกจากคอลัมน์ซิลิกาเจลด้วยเมธานอล ที่ให้ผลในการฆ่าเชื้อทดสอบมาผ่านลงคอลัมน์ซีเอ็ม-เซฟาเด็กซ์ ซี-50 พบว่า ทอกซินจะไม่ถูกยึดเกาะกับตัวกลาง แต่จะถูกชะออกจากคอลัมน์พร้อมกับโปรตีนอื่นๆ แต่เมื่อนำมาผ่านลงคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 และทำการชะคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0-1000 มิลลิโมลาร์ ใน 0.05 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 ให้ผลดังรูป 3.35 พบว่าโปรตีนที่มีแอคติวิตีในการฆ่าจุลชีพ

ทดสอบมีเพียงยอดเดียว และจะออกมาที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 100-300 มิลลิโมลาร์ แสดงว่าทอกซินในส่วนที่ให้ผลในการฆ่าเชื้อทดสอบมีประจุเป็นลบที่ไม่สูงมาก เนื่องจากสามารถถูกชะออกมาที่ช่วงของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ไม่สูงมาก (100-300 มิลลิโมลาร์) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสารปฏิชีวนะเบซิเทรซินที่สร้างจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* จะพบว่าสารปฏิชีวนะที่มีความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบจะถูกชะออกมาในช่วงของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ใกล้เคียงกัน คือ ในช่วง 200-300 มิลลิโมลาร์ เมื่อผ่านคอลัมน์ดีอีเออี-เซลลูโลส (Simlot และคณะ,1973)

เมื่อรวมสารละลายในช่วงที่ให้ความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบเข้าด้วยกัน แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดยอาศัยหลักการแยกตามขนาดโมเลกุลในคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-75 และชะล้างคอลัมน์ด้วย 0.05 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 พบว่าเมื่อทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรนั้นมีโปรตีนออกมาจำนวนหลายยอด แต่โปรตีนในยอดที่ให้ผลในการฆ่าเชื้อทดสอบจะออกมาหลังจากปริมาตรช่องว่างในคอลัมน์ (Void volume) ในลำดับส่วนที่ 52-65 ดังแสดงในรูปที่ 3.37 จากคุณสมบัติของเซฟาเด็กซ์ จี-75 จะสามารถแยกสารได้ดีในช่วงน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3,000-70,000 ดาลตัน (Pharmacia Fine chemicals, 1983) ถ้าสารที่นำมาแยกมีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 70,000 ดาลตัน ก็จะไหลออกมาจากคอลัมน์พร้อมกับปริมาตรช่องว่างในคอลัมน์ การศึกษาครั้งนี้พบว่า ทอกซินจะออกมาในลำดับส่วนหลัง ๆ ซึ่งห่างจากปริมาตรในช่องว่างของคอลัมน์มาก ดังนั้นจึงพอจะคาดได้ว่า ทอกซินที่นำมาศึกษาครั้งนี้มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วงต่ำกว่า 5,000 ดาลตัน เพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลองนี้ได้ทำการหาน้ำหนักโมเลกุลและวิเคราะห์หน่วยย่อยของทอกซินในลำดับสุดท้ายจากขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธีอิเลคโตรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลิอะคริลาไมด์เจล พบว่า ได้แถบโปรตีนที่ติดสีอย่างเด่นชัดเพียง 1 แถบ แสดงว่า ทอกซินจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 มีองค์ประกอบเป็นสายเปปไทด์เดี่ยว และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 2,000 ดาลตัน เมื่อเทียบกับโปรตีนมาตรฐานซึ่งสอดคล้องกับคุณสมบัติของสารปฏิชีวนะกลุ่มเปปไทด์ ซึ่งจะมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วงต่ำ คือ 270-4,500 ดาลตัน (Katz และ Demain,1977)

สำหรับการตรวจสอบความสามารถในการฆ่ายีสต์ทดสอบ ของทอกซินที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 ในระหว่างขั้นตอนของการทำทอกซินกึ่งบริสุทธิ์ ได้ทำการนำของเหลวในทุกขั้นตอนมาหยอดลงในหลุมทดสอบและสังเกตบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นจากการดูดซึมทอกซินในวุ้นเพาะเชื้อ ที่มี *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นเชื้อทดสอบเจริญอยู่ ผลการทดลองดังแสดงในรูป 3.28, 3.29 และ 3.30 พบว่า เฉพาะหลุมที่ทำการหยอดด้วยของเหลวในลำดับส่วนที่เลือกนำไปศึกษาต่อเท่านั้นที่ให้ประสิทธิภาพในการฆ่า โดยจะแสดงบริเวณใสเกิดขึ้นบนจานเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันได้ว่า หลังจากผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการต่าง ๆ แล้ว ทอกซินยังคงความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบอยู่ และเพื่อเป็นการยืนยันถึงความบริสุทธิ์ที่เพิ่มขึ้นของทอกซินในขั้นตอนสุดท้ายที่ได้จากคอลัมน์โครมาโตรกราฟี จึงทดลองโดยนำทอกซินก่อนและหลังผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC แล้วเปรียบเทียบโครมาโตรแกรมที่ได้ ผลการทดลองพบว่าจำนวนพีคที่ปรากฏในโครมาโตรแกรมของทอกซินที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์มีจำนวนลดลงอย่างมาก จึงพอสรุปได้ว่า ทอกซินที่ได้มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ ยังไม่สามารถทำทอกซินให้บริสุทธิ์มากพอที่จะนำไปศึกษารายละเอียดทางโครงสร้างโมเลกุล และการวิเคราะห์ทางเคมีอื่นๆ เช่น นิวเคลียร์แมกเนติกเรซอแนนท์ (NMR), อินฟราเรดสเปคตรัม (IR), แมสสเปคตรัม (Mass spectrum) จึงยังไม่สามารถสรุปได้ว่า ทอกซินที่สังเคราะห์จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 นี้เป็นสารชนิดใด