บทที่ 5

การอภิปรายผล

Bacillus sp. S11 ที่ใช้เป็นโพรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำสร้างสารต้านจุลชีพได้ สารดังกล่าวสามารถต้านแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบซึ่งได้แก่ *B. cereus*, *B. megaterium*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* (วรรนิภา เพี้ยนภักตร์, 2539) คุณสมบัติดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานที่มีมาก่อนหลายฉบับ กล่าวคือ กลุ่มที่สร้างสารปฏิชีวนะ เช่น *B. circulans* (Murray และคณะ, 1949), *B. polymyxa* (Francis และ Rippon, 1949), *B. pumilus* (Abraham และคณะ, 1956) และ *B. cereus* (Johnson และคณะ, 1949) กลุ่มที่สร้างสารคล้ายแบคเทอริโอซิน เช่น *B. stearothermophilus* (Shafia, 1966) และกลุ่มที่สร้างแบคเทอริโอซิน เช่น *B. megaterium* (Iványovics และ Alföldi, 1954; von Tersch และ Carlton 1983; Stahl, 1989.), *B. subtilis* (Jansen และ Hirschmann, 1944: Babasaki และคณะ,1985), *B. thermoleovorans* (Novotny และ Perry, 1992) และ *B. cereus* (Naclerio และคณะ, 1993)

โดยทั่วไป การสร้างสารต้านจุลชีพของแบคทีเรียเกิดขึ้นได้ตลอดช่วงของการเจริญ (growth cycle) ดังในการศึกษาของ Schlegel และ Slade (1974) พบว่าการสร้าง streptocin STH$_1$ จะเกิดได้ดีในช่วง exponential ของการเจริญแล้วลดลงในช่วง stationary phase ผลการศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับการสร้างสารต้านจุลชีพจาก *Bacillus* sp. S11ที่เริ่มปรากฏในระยะ log phase และมากที่สุดในระยะสุดท้ายของ log phase จากนั้นค่อยๆ ลดลง การที่แอคติวิตีของสารต้านจุลชีพลดลงในช่วงท้ายของ stationary phase อาจเกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุ เช่น การที่เซลล์สร้างสารขัดขวางสารต้านจุลชีพ (Jetten,Vogels และ De Windt, 1972) สารต้านจุลชีพถูกทำลายไปด้วยโปรตีเอสที่จุลินทรีย์นั้นผลิตขึ้นเอง (Foulds และ Shemin, 1969; Ellison และ Kautter, 1970; Tagg และคณะ, 1973)

อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างสารต้านจุลชีพในการวิจัยครั้งนี้คือ สารสกัดจากยีสต์ 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร), ไดโพแทสเซียม ฟอสเฟต 0.25 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) พีเอช 7.0 โดยไม่เติมกลูโคสและโซเดียมคลอไรด์ ใช้ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้นที่ 2% (ปริมาตร/ปริมาตร) ให้อากาศด้วยการเขย่า 200 รอบ/นาที และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นที่สังเกตว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้จะมีองค์ประกอบของไนโตรเจนสูง ปรากฏการณ์นี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Rogers (1972) ที่ใช้ สารสกัดจากยีสต์ 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) เติมลงใน Trypticase medium เพื่อส่งเสริมการสร้างแบคเทอริโอซิน

และเช่นเดียวกับผลงานของ Clarke และคณะ (1975) ที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย casein hydrolysate 5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) เพื่อการสร้าง butyricin 7423

จากการศึกษาในอดีต การเติมน้ำตาลบางชนิดส่งผลต่อการสร้างสารต้านจุลชีพได้ทั้งด้านเพิ่มและลดการสร้างสาร ดังตัวอย่างเช่น การเติมแมนนิทอล (mannitol) 0.5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเบรน ฮาร์ท อินฟิวชั่น (Brain Heart Infusion Broth) สามารถเพิ่มการสร้าง staphylococcus 414 (Hale และ Hinsdill, 1973) การเติมกลูโคสจะเพิ่มการผลิต streptococcin A-F22 แต่ลดการผลิต streptococcin B-74628 (Tagg, Dajani และ Wannamaker, 1975) ผลจากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 ขัดแย้งกับการศึกษาข้างต้น กล่าวคือการเติมหรือไม่เติมกลูโคสไม่ส่งผลต่อการเพิ่มหรือลดการสร้างสารต้านจุลชีพแต่อย่างใด ดังนั้นในการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 เพื่อให้ผลิตสารต้านจุลชีพจึงทำได้โดยไม่มีการเติมกลูโคสเพิ่ม

โดยทั่วไป อุณหภูมิที่เหมาะสมแก่การเจริญของจุลินทรีย์จะเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์ชนิดนั้นในการสร้างสารต้านจุลชีพ ถ้าอุณหภูมิต่างจากนี้จะทำให้ไม่เกิดการสร้างต้านจุลชีพหรือทำให้สารต้านจุลชีพสูญเสียสมบัติไป เช่น การสร้าง staphylococcin โดย *Staphylococcus aureus* (Dajani และ Taube, 1974; Jetten และ Vogels, 1973) แต่ในการศึกษานี้ *Bacillus* sp. S11 สร้างสารต้านจุลชีพได้ในช่วงอุณหภูมิที่เซลล์สามารถเจริญได้ดี (25-37 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิที่เซลล์เจริญได้น้อย (40 องศาเซลเซียส) และยังพบว่าสารต้านจุลชีพที่สร้างขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ให้ขอบเขตการยับยั้งเชื้อทดสอบได้สูง ทั้งนี้อาจเนื่องจาก สารต้านจุลชีพนี้ถูกปล่อยออกมานอกเซลล์ได้มากเมื่ออุณหภูมิภายนอกเซลล์สูงขึ้น และสารนี้ทนต่อความร้อนที่ 40 องศาเซลเซียสได้ จึงทำให้ตรวจพบแอคติวิตีของสารต้านจุลชีพขณะที่เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิดังกล่าว

ผลของพีเอชต่อการสร้างสารต้านจุลชีพพบว่า *Bacillus* sp. S11 จะสร้างสารต้านจุลชีพได้เมื่อมีปริมาณเซลล์พอสมควร ดังนั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีช่วงพีเอช 5.0-9.0 ซึ่งเป็นพีเอชที่เชื้อนี้เจริญได้ เซลล์จึงสร้างสารต้านจุลชีพและออกสู่นอกเซลล์ได้ ในกรณีที่พีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้การเจริญไม่ดี ได้แก่ พีเอช 5.0 จะทำให้การสร้างสารต้านจุลชีพออกมาในปริมาณน้อย และ *Bacillus* sp. S11 ไม่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่พีเอช 4.0 ทำให้ตรวจไม่พบสารต้านจุลชีพ ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Goebel และคณะ (1955) ซึ่งเกี่ยวกับการสร้าง colicin K ที่มีพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยสำคัญในการสร้าง และการปรับพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 6.5 เพื่อเพิ่มการผลิต streptococcin A-F22 (Tagg, Read และ McGiven, 1973)

จากการศึกษาผลของความร้อนต่อสารต้านจุลชีพในน้ำหมักของ *Bacillus* sp. S11 พบว่าสารนี้ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ระยะเวลาหนึ่ง ดังผลที่ได้หลังจากการเก็บสารนี้ไว้ที่อุณหภูมิ 70 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นแอคติวิตีของสารนี้จึงลดลง และสารต้านจุลชีพนี้สามารถให้แอคติวิตีได้ในช่วงพีเอชที่กว้างกล่าวคือที่พีเอช 3 – 10 การค้นพบสารต้านจุลชีพจากแบคทีเรียสกุลบาซิลลัสที่ทนอุณหภูมิสูงและการทำงานในช่วงพีเอชกว้าง (ตั้งแต่ 3 –10) นี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Novotny และ Perry (1992) ที่พบว่า thermoleovorin – S2 และ thermoleovorin – N9 ที่แยกได้จาก *B.thermoleovorans* S-II และ *B.thermoleovorans* NR-9 ตามลำดับ สามารถทนร้อนได้ที่อุณหภูมิ 70 และ 80 องศาเซลเซียส และเสถียรที่พีเอชกว้างในช่วง 3 –10 ส่วนผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อสารต้านจุลชีพพบว่า ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ไม่มีผลต่อแอคติวิตีของสารต้านจุลชีพที่ได้จาก *Bacillus* sp. S11 จึงมีความเป็นไปได้ในการนำสารนี้มาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารต่างๆ ที่ต้องการสารยับยั้งเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารในคนที่มีสาเหตุจาก *B. cereus* ตัวอย่างเช่น ก้อนซุปปรุงรส เครื่องปรุงรสต่างๆ ที่มีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์เพิ่มรสชาติหลังปรุงแต่งอาหาร

ในการศึกษาผลของเอนไซม์บางชนิดต่อแอคติวิตีของสารต้านจุลชีพที่ได้จาก *Bacillus* sp. S11 พบว่าเมื่อบำบัดด้วย protease สามารถลดแอคติวิตีของสารต้านจุลชีพนี้ได้ ทำให้สรุปได้ว่าสารดังกล่าวมีองค์ประกอบเป็นโปรตีน ทอปรกับในการย้อมแผ่นเจลอะคริลาไมด์ที่ได้จาก SDS-PAGE ด้วย Coomassie Brilliant Blue G-250 ตรวจพบว่าสารนี้มีมวลโมเลกุล 3.5 kDa ซึ่งเป็นขนาดเล็กจึงสามารถจัดสารต้านจุลชีพนี้ในกลุ่ม polypeptide ดังรายงานของ Klaenhammer (1993) ในขณะที่ผลการบำบัดสารดังกล่าวด้วย α-amylase และ lipase พบว่าเอนไซม์ทั้งสองชนิดไม่สามารถลดแอคติวิตีของสารนี้ได้ แต่จากการทดสอบโดยการย้อมเจลอะคริลาไมด์หลังการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE ด้วย Sudan Black B พบว่าสารดังกล่าวให้แถบสีเป็นผลบวกทำให้สรุปผลได้ว่าสารนี้มีองค์ประกอบของไขมัน แต่เมื่อนำสารดังกล่าวมาบำบัดด้วย lipase แอคติวิตีของสารลดลงเพียงเล็กน้อย อาจเป็นไปได้ว่า lipid ที่เป็นองค์ประกอบของสารดังกล่าวไม่มีหน้าที่หลักเกี่ยวกับการเกิดแอคติวิตีของสารต้านจุลชีพชนิดนี้

เมื่อศึกษาผลของตัวทำละลายต่อแอคติวิตีของสารต้านจุลชีพจาก *Bacillus* sp. S11 พบว่าสารนี้ทนต่อตัวทำละลายชนิดต่างๆ ได้ต่างกัน ตัวทำละลายที่ไม่สามารถลดแอคติวิตีของสารต้านจุลชีพได้แก่ อะซีโตน อะซีโตไนไทรล์ เอธานอล เมธานอล และตัวทำละลายที่ลดแอคติวิตีในชั้นของน้ำหมักลงได้ ได้แก่ คลอโรฟอร์ม ไดเอธิลอีเธอร์ และโทลูอีน ดังนั้นกล่าวได้ว่า สารต้านจุลชีพนี้มีความเป็นขั้ว (polarity) สูง ดังจะเห็นได้จากการมีแอคติวิตีในชั้นน้ำ (aqueous phase) เมื่อเติมคลอโรฟอร์ม ไดเอธิลอีเธอร์ และโทลูอีน การที่สารนี้มีความเป็นขั้วสูง จึงทำให้ละลายได้ดีในน้ำ ส่งผลดีหากนำสารนี้

ไปผสมในอาหารสัตว์ เพราะจะทำให้เกิดการกระจายตัวได้ดีในเม็ดอาหาร เนื่องจากในกระบวนการผลิตอาหารสัตว์จะมีการผสมน้ำเข้าไปในขั้นตอนการผสมและอัดเม็ด และทำให้ยึดเกาะกับเม็ดอาหารได้ดีเพราะองค์ประกอบในอาหารสัตว์ส่วนใหญ่จะเป็นสารมีขั้ว เช่น โปรตีน (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536) จากการที่สารต้านจุลชีพนี้สามารถทนต่อตัวทำละลายที่ใช้อย่างแพร่หลายในทางอุตสาหกรรม ได้แก่ อะซีโตน อะซีโตไนไทรล์ เอธานอลและเมธานอล สารเหล่านี้มีจุดเดือดต่ำ ทำให้ระเหยหมดไปได้ดี จึงมีความเป็นไปได้ในการนำตัวทำละลายดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ในกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ขั้นอุตสาหกรรม เช่น การสกัดด้วยตัวทำละลายดังกล่าว

ผลการนำสารต้านจุลชีพที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. S11 มาทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อทดสอบสองชนิดคือ *B. cereus* ATCC 11778 และ *V. harveyi* 639 พบว่าสารต้านจุลชีพนี้ทำให้เชื้อทดสอบ *B. cereus* ATCC 11778 ที่ความเข้มข้น 10^{6} CFU/ml ลดจำนวนลงหลังชั่วโมงที่ 3 ของการเติมสารต้านจุลชีพที่ความเข้มข้นสุดท้าย 4.10 และ 2.05 AU/ml และสามารถฆ่าเชื้อทดสอบนี้ได้ภายในเวลา 5 ชั่วโมงที่ความเข้มข้นสุดท้ายของสารต้านจุลชีพประมาณ 4.10 AU/ml เมื่อทดสอบกับ *V. harveyi* 639 ที่ความเข้มข้น 10^{6} CFU/ml ด้วยสารต้านจุลชีพที่ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 0, 240.8 และ 102.4 AU/ml พบว่าไม่สามารถฆ่าเชื้อ *V. harveyi* 639 ให้หมดไปได้ภายในเวลา 5 ชั่วโมง เมื่อใช้สารต้านจุลชีพนี้ที่ความเข้มข้นสุดท้ายน้อยกว่า 204.8 AU/ml ดังนั้นสารต้านจุลชีพจะแสดงการยับยั้งเชื้อได้มากหรือน้อยแตกต่างกันไปตามชนิดของเชื้อทดสอบดังผลจากการศึกษานี้แสดงการยับยั้งต่อ *B. cereus* ATCC 11778 ได้ดีกว่าการยับยั้ง *V. harveyi* 639 ผลการศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาของ Naclerio และคณะ (1993) ที่ได้ทำการศึกษาสารต้านจุลชีพจาก *B. cereus* และพบว่าสารต้านจุลชีพที่ผลิตขึ้นสามารถฆ่าแบคทีเรียทดสอบชนิดใกล้เคียงกับแบคทีเรียผู้ผลิตสารต้านจุลชีพได้ดี กล่าวคือ สารต้านจุลชีพผลิตจาก *B. cereus* สายพันธุ์หนึ่งฆ่า *B. cereus* ต่างสายพันธุ์ได้ดีกว่าแบคทีเรียชนิดอื่นๆ

สาเหตุที่แบคทีเรียซึ่งผลิตสารคล้ายแบคเทอริโอซินฆ่าแบคทีเรียชนิดใกล้เคียงกันได้ดีนั้นเกี่ยวข้องกับกลไกการทำงานของสารคล้ายแบคเทอริโอซิน กล่าวคือ สารคล้ายแบคเทอริโอซินจะจับกับบริเวณที่เหมาะสมบนเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อทดสอบ ก่อนจะทำให้เซลล์เสียความสามารถในการผ่านเข้าออกของสาร และตายในเวลาต่อมา เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกมีบริเวณที่เป็นพอลิเมอร์ของกรดไขมัน ได้แก่ teichoic acid และ lipoteichoic acid ซึ่งเหมาะสมแก่การจับกับสารคล้ายแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแกรมบวก (Bhunia และคณะ, 1991; Bierbaum และ Sahl, 1991) จากการศึกษาของผู้วิจัยหลายท่าน (Bhunia และคณะ, 1991; Bierbaum และ Sahl, 1993; Bruno และ Montville, 1993; Chikindas และคณะ, 1993; Christensen และ Hutkins, 1992;

Klaenhammer, 1993) พบว่า ความจำเพาะในการจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อทดสอบเป็นกลไกการทำงานที่สำคัญของแบคเทอริโอซินและสารคล้ายแบคเทอริโอซินที่มีขนาดโมเลกุลเล็กซึ่งผลิตโดยแบคทีเรียแกรมบวก ดังนั้น อาจกล่าวได้ว่าสารต้านจุลชีพจาก *Bacillus* sp. S11 ซึ่งมีขนาดโมเลกุลเล็ก มีกลไกการทำงานเกี่ยวข้องกับการจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อทดสอบอย่างจำเพาะ เนื่องจากมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อทดสอบชนิดใกล้เคียงกับเชื้อที่ผลิตสารต้านจุลชีพได้ดี สอดคล้องกับการศึกษาอื่นข้างต้น

จากขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของสารต้านจุลชีพจาก *Bacillus* sp. S11 เริ่มต้นด้วยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วงต่างๆ คือ 0 – 30 %, 30 – 50 % และ 50 – 80 % ผลที่ได้คือ ทุกช่วงของการตกตะกอนสามารถให้แอคติวิตีของสารต้านจุลชีพ แต่จะพบมากที่สุดในช่วง 0 – 30 % ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารนี้มีคุณสมบัติเป็นโปรตีนที่มี hydrophobic patches เป็นบริเวณมาก จึงตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตได้เร็ว (Harris และ Angal, 1989) หลักฐานอีกประการหนึ่งที่แสดงว่า สารต้านจุลชีพนี้มีส่วนไม่ชอบน้ำเป็นปริมาณมากคือ การใช้สารละลายฟอร์มัลดีไฮด์ 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) เพื่อตรึงสารนี้ไว้บนแผ่นเจลอะคริลาไมด์ที่ได้ในการทำ SDS-PAGE แทนการใช้สารละลายอะซีโต-เมธานอล (aceto-methanol) ในการตรึงเปปไทด์ทั่วๆ ไป ที่ไม่สามารถตรึงสารต้านจุลชีพนี้ได้ เนื่องจากเปปไทด์โมเลกุลเล็กที่มีส่วนไม่ชอบน้ำจะแพร่ผ่านออกจากแผ่นเจลอะคริลาไมด์ในระหว่างขั้นตอนการย้อมได้ จึงทำให้มองไม่เห็นแถบโปรตีนหลังการย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue G-250 กรณีเช่นนี้พบได้ในสารต้านจุลชีพหลายชนิดได้แก่ leucocin A-UAL 187 (Hastings และคณะ, 1991) Mesentericin Y105 Lacticin 481 และ lactacin B (Piard และคณะ, 1992; Barefoot และ Klaenhammer, 1984) ซึ่งไม่สามารถย้อมสารเหล่านี้บนแผ่นเจลอะคริลาไมด์ได้ด้วย Coomassie dye หรือ Silver staining จากการศึกษาพบว่าสาเหตุเนื่องจากการตรึงเปปไทด์ด้วยสารที่ไม่เหมาะสม ต่อมาเมื่อเปลี่ยนมาใช้สารตรึงที่แรงขึ้น เช่น ฟอร์มัลดีไฮด์ ทำให้ตรึงสารเหล่านี้ไว้และย้อมได้ด้วย Coomassie dye

เมื่อเริ่มจากขั้นตอนทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยการตกตะกอนในช่วง 0-30 % sat แล้วจึงผ่านขั้นตอนต่อมาคือ Gel Permeation Chromatography โดยใช้ Sephadex G-50 เป็นสารตัวกลางที่มีช่วงการแยกขนาดโมเลกุล (fractionation range) ที่ 1500 – 30000 ผลที่ได้คือโปรตีนในบริเวณยอดที่ 3 เท่านั้นที่ให้แอคติวิตี แสดงให้เห็นว่าโมเลกุลนี้มีขนาดเล็ก และเมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE ย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue G-250 ผลที่ได้มีความสอดคล้องกันคือ มวลโมเลกุลขนาดประมาณ 3.5 kDa ขั้นตอนสุดท้ายในการทำบริสุทธิ์บางส่วนคือการผ่าน Ion Exchange Chromatography โดยใช้ DEAE-Sephadex A-25 เป็นสารตัวกลางหลังจากชะด้วย 0.05 M Tris-

HCl; pH 7.0 ตรวจไม่พบแอคติวิตีในยอดที่ 1 แต่ตรวจพบแอคติวิตีในยอดที่ 2 ซึ่งเกิดขึ้นหลังจากการชะด้วย gradient 0 – 1.0 M NaCl ดังนั้นสารนี้จะมีประจุเป็นลบในบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 จึงเกาะกับสารตัวกลาง DEAE-Sephadex A-25 และเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์หลังจากการชะด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เกรเดียนท์ดังกล่าว เนื่องจากโปรตีนสามารถมีประจุสุทธิได้ทั้งบวกและลบ โดยจะเกิดประจุสุทธิเป็นลบเมื่ออยู่ในสารละลายที่มีพีเอชสูงกว่า pI และมีประจุสุทธิเป็นบวกเมื่ออยู่ในสารละลายที่มีพีเอชต่ำกว่าค่า pI (Roe, 1989) ดังนั้นกล่าวได้ว่า สารนี้น่าจะมีค่า pI ต่ำกว่า 7.0 เพราะแสดงประจุสุทธิเป็นลบเมื่ออยู่ในบัฟเฟอร์ที่มีพีเอช 7.0

การทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของสารต้านจุลชีพจาก *Bacillus* sp. S11 ทำให้สารนี้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 44, 75 และ 112 เท่า ในขั้นตอนการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต, Gel Permeation Chromatography และ Ion Exchange Chromatography ตามลำดับ % Recovery ลดลงเป็น 64, 9.6 และ 8 ตามลำดับ การลดลงของ % Recovery อาจมีสาเหตุได้หลายประการ เช่น การเสียสภาพของสารขณะทำให้บริสุทธิ์บางส่วน การสูญหายในขั้นตอนของคอลัมน์โครมาโตกราฟี และความผิดพลาดของผู้ทดลอง

เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE พบว่าสารต้านจุลชีพที่ได้จาก *Bacillus* sp. S11 นี้มีส่วนประกอบที่เป็น polypeptides และ lipid ดังแสดงให้เห็นจากการติดสี Coomassie Blue G-250 และ Sudan Black B ดังแสดงในรูปที่ 29 และ 31 และไม่ใช่องค์ประกอบแบบ glycoprotein เพราะแถบของสารนี้ให้ผลลบ (ไม่ให้แถบสีส้มแดง) เมื่อย้อมด้วย thymol และกรดซัลฟุริค (รูปที่ 30) ผลการทดสอบนี้สอดคล้องกับการศึกษาที่มีมาก่อนเกี่ยวกับบาซิลลัสส่วนใหญ่จะผลิตสารต้านจุลชีพมีองค์ประกอบเป็นเปปไทด์หรือโปรตีนดังแสดงในตารางที่ 3 นอกจากนี้ยังสามารถพบสารต้านจุลชีพจากบาซิลลัสที่เป็น lipoprotein เช่น surfactin ผลิตโดย *B. subtilis* OKB 105 (Vater, 1989) และ iturin ผลิตโดย *B. subtilis* (Korzygski, Kowszyk-Gindifer และ Kurytowicz, 1978) สารไลโปโปรตีนดังกล่าวมีขนาดใหญ่ เช่น surfactin มีมวลโมเลกุล 880 kDa แต่สารต้านจุลชีพจาก *Bacillus* sp. S11 เป็นสารซึ่งมี lipid เป็นองค์ประกอบ มีขนาดเล็ก มวลโมเลกุลประมาณ 3.5 kDa

จากการตรวจสอบติดตามและทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของสารต้านจุลชีพจาก *Bacillus* sp. S11 ในการศึกษาของผู้วิจัยครั้งนี้พบว่า สารที่สร้างขึ้นสามารถมีมวลโมเลกุลขนาดเล็กประมาณ 3.5 kDa และค่า pI ต่ำกว่า 7.0 ผลดังกล่าว มีความใกล้เคียงกับรายงานจากการศึกษาของ Zheng และ Slavik (1999) ที่แสดงให้เห็นว่า *B. subtilis* ที่แยกได้จาก Chinese fermented soybean seasoning สร้างแบคเทอริโอซินที่มีขนาด 3.4 kDa pI ประมาณ 4.7 และยังสอดคล้องกับการศึกษาเปรียบเทียบผลการวิจัยเกี่ยวกับการสร้างสารต้านจุลชีพของ *Bacillus* หลายชนิด (Zuber, Nakano และ Marahiel, 1993) อาจกล่าวได้ว่าสารต้านจุลชีพจาก *Bacillus* sp. S11 เป็นสารคล้ายแบคเทอริโอซินในลักษณะต่างๆ ได้แก่ มีองค์ประกอบหลักในโมเลกุลเป็นโปรตีน ต้านจุลชีพได้ดีกับเชื้อทดสอบชนิดใกล้เคียงกัน ยับยั้งเชื้อทดสอบโดยการฆ่าให้ตาย สารนี้ถูกสร้างขึ้นในระยะท้ายของการเจริญ ถ้าจะจัดให้สารต้านจุลชีพจาก *Bacillus* sp. S11 เป็นแบคเทอริโอซิน ต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับด้านต่างๆ ได้แก่ โครงสร้างของโมเลกุลเพื่อยืนยันว่าเป็นสารประเภทโปรตีน กลไกการยับยั้งเชื้อทดสอบ การสังเคราะห์ของสารนี้จากสารพันธุกรรมบนพลาสมิด (Jack, Tagg และ Ray, 1995)