

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การหาค่าประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1

ธนัสถา เชียงอุทัย (2549) ได้ทำการทดลองโดยใช้แหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียวคือ น้ำมันถั่วเหลือง ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 ซึ่งให้ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 0.26 กรัมต่อลิตร งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาน้ำตาลหรือแหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำที่เหมาะสมที่สุดเมื่อใช้ร่วมกับน้ำมันถั่วเหลือง เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพและปริมาณในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1

โดยเมื่อทำการแปรผันชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลชนิดต่างๆ ในอัตราส่วน 1:1 กับน้ำมันถั่วเหลือง พบว่าที่ความเข้มข้นกลูโคส 8 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับน้ำมันถั่วเหลือง 8 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสมที่สุดในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยจะให้ค่าแรงตึงผิว 34 mN/m Δ ค่าแรงตึงผิว μ (ผลต่างของค่าแรงตึงผิว ณ เวลาเริ่มต้นและเมื่อสิ้นสุดการทดลอง) เท่ากับ 20 mN/m และมีค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 12.98 ตารางเซนติเมตร ดังแสดงผลในตารางที่ 4.1 ซึ่งมากกว่าการใช้เพียงกลูโคสชนิดเดียวเป็นแหล่งคาร์บอน (ตารางที่ 4.2)

จากนั้นเมื่อได้ชนิดของน้ำตาลที่เหมาะสมที่สุดแล้ว ก็ทดลองหาอัตราส่วนน้ำมันถั่วเหลืองต่อกลูโคสภายในปริมาณแหล่งคาร์บอนทั้งสองชนิดรวมกันเป็น 16 เปอร์เซ็นต์พบว่าที่อัตราส่วนน้ำมันถั่วเหลืองต่อกลูโคส 2:1 เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยให้ค่าแรงตึงผิว 35 mN/m และค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 17.34 ตารางเซนติเมตร ดังแสดงผลในตารางที่ 4.3 ซึ่งมีค่าแรงตึงผิวต่ำที่สุด และมีค่าการกระจายน้ำมันมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับที่อัตราส่วนน้ำมันถั่วเหลืองต่อกลูโคสอื่นๆ ดังแสดงในรูปที่ 4.1 และ 4.2

ตารางที่ 4.1 ผลการศึกษาการแปรผันแหล่งคาร์บอนน้ำมันถั่วเหลืองร่วมกับน้ำตาลชนิดและความเข้มข้นต่างๆ ที่อัตราส่วน 1:1 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

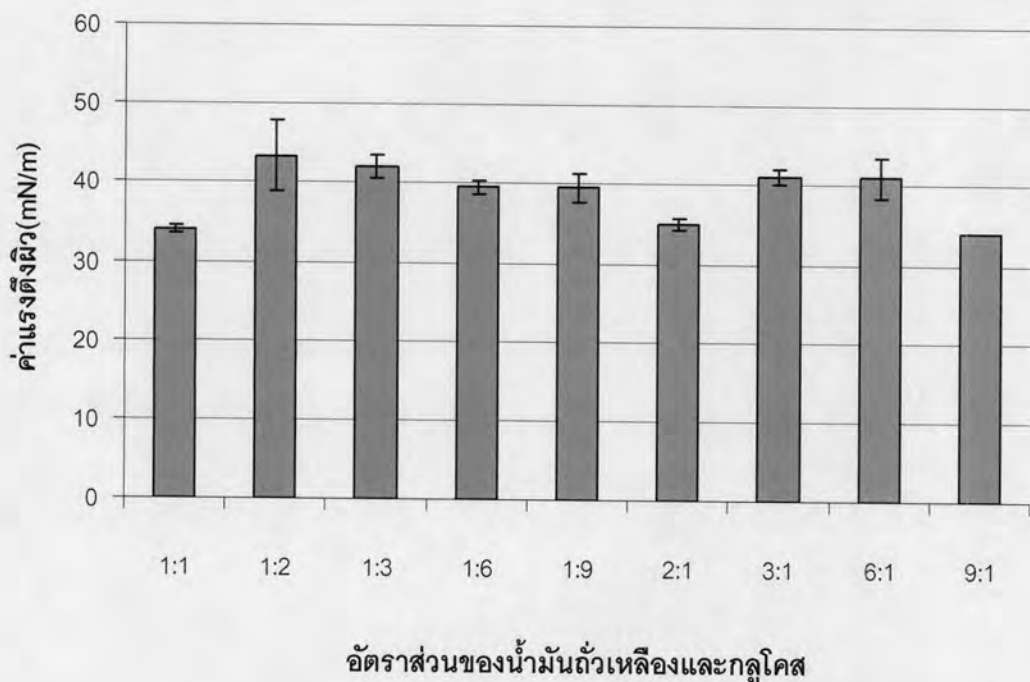
แหล่งคาร์บอน	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	Δ ค่าแรงตึงผิว ^{b-t} (mN/m)	ค่าการกระจายตัวของน้ำมัน (cm ²)	ค่า pH
แหล่งคาร์บอนไม่ละลายน้ำ : แหล่งคาร์บอนละลายน้ำ; 2%:2%					
กลูโคส	18.99 ± 0.06	39 ± 1.15	14	0.59 ± 0.12	8.08 ± 0.05
กาแลคโตส	15.20 ± 0.08	47 ± 2.18	11	0.35 ± 0.06	7.52 ± 0.04
ซูโครส	18.82 ± 0.03	38 ± 1.73	19	1.40 ± 0.29	7.93 ± 0.07
แหล่งคาร์บอนไม่ละลายน้ำ : แหล่งคาร์บอนละลายน้ำ; 4%:4%					
กลูโคส	16.03 ± 0.03	40 ± 1.89	18	0.59 ± 0.12	8.39 ± 0.05
กาแลคโตส	8.60 ± 0.02	44 ± 1.04	12	0.42 ± 0.12	5.57 ± 0.18
ซูโครส	19.74 ± 0.01	35 ± 1.61	21	4.27 ± 0.76	7.52 ± 0.70
แหล่งคาร์บอนไม่ละลายน้ำ : แหล่งคาร์บอนละลายน้ำ; 6%:6%					
กลูโคส	27.56 ± 0.13	36 ± 3.21	14	15.90 ± 0.35	8.34 ± 0.10
กาแลคโตส	24.59 ± 0.05	47 ± 0.58	6.5	1.54 ± 0.20	5.34 ± 0.04
ซูโครส	7.71 ± 0.12	42 ± 1.61	0.5	2.01 ± 0.17	4.66 ± 0.76
แหล่งคาร์บอนไม่ละลายน้ำ : แหล่งคาร์บอนละลายน้ำ; 8%:8%					
กลูโคส	29.47 ± 0.17	34 ± 0.50	20	12.98 ± 0.06	8.07 ± 0.17
กาแลคโตส	25.76 ± 0.06	43 ± 2.02	5	1.69 ± 0.25	5.50 ± 0.09
ซูโครส	6.33 ± 0.04	53 ± 1.00	1	0.89 ± 0.06	5.78 ± 0.01
แหล่งคาร์บอนไม่ละลายน้ำ : แหล่งคาร์บอนละลายน้ำ; 10%:10%					
กลูโคส	16.00 ± 0.02	35 ± 4.16	16	1.01 ± 0.40	5.78 ± 1.15
กาแลคโตส	25.40 ± 0.16	41 ± 1.61	13	0.68 ± 0.06	5.71 ± 0.04
ซูโครส	7.12 ± 0.11	53 ± 0.29	0	0.03 ± 0.00	4.21 ± 0.10

ตารางที่ 4.2 ผลการศึกษาการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

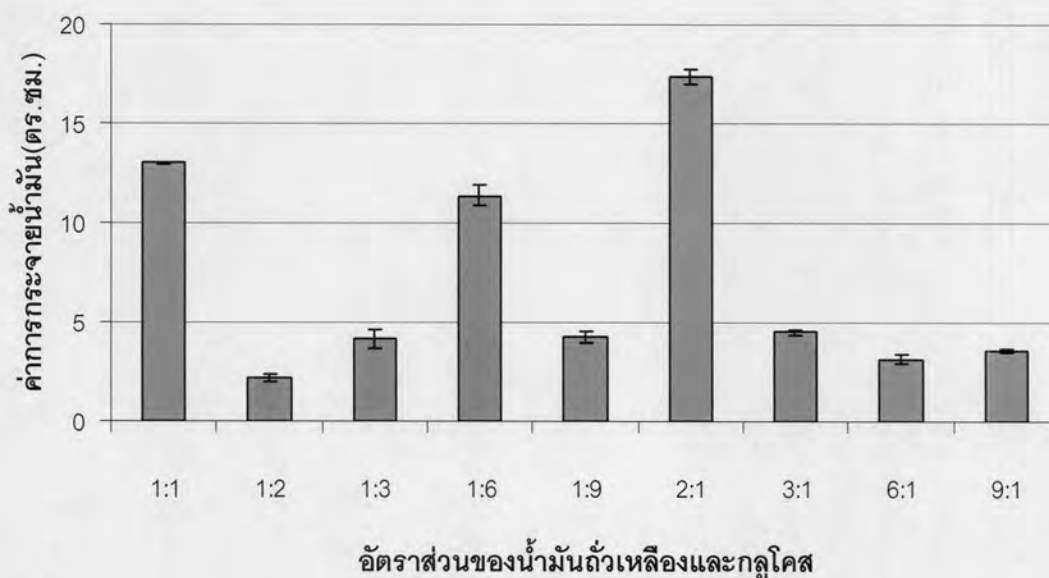
แหล่งคาร์บอน	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	Δ ค่าแรงตึงผิว ^{b-t} (mN/m)	ค่าการกระจายตัวของน้ำมัน (cm ²)	ค่า pH
กลูโคส 4%	12.60 ± 0.05	47 ± 3.61	10.5	0.79 ± 0.00	8.64 ± 0.20
กลูโคส 8%	15.65 ± 0.04	45.5 ± 4.77	17.5	2.54 ± 0.17	6.43 ± 0.69

ตารางที่ 4.3 ผลการศึกษาการแปรผันอัตราส่วนแหล่งคาร์บอนน้ำมันถั่วเหลืองร่วมกับน้ำตาลกลูโคสที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

อัตราส่วน น้ำมันถั่ว เหลืองต่อ กลูโคส	น้ำหนักเซลล์ แห้ง (g/l)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	Δ ค่าแรงตึงผิว ^{b-t} (mN/m)	ค่าการกระจาย ตัวของน้ำมัน (cm ²)	ค่า pH
1:1	29.47 ± 0.17	34 ± 0.50	20	12.98 ± 0.06	8.07 ± 0.17
1:2	22.33 ± 0.46	43 ± 4.51	5	2.18 ± 0.15	6.06 ± 0.80
1:3	20.15 ± 0.24	42 ± 1.50	10	4.15 ± 0.49	6.20 ± 0.71
1:6	14.87 ± 0.07	40 ± 0.87	12	11.34 ± 0.53	7.05 ± 0.24
1:9	15.28 ± 0.13	40 ± 1.80	7	4.27 ± 0.29	6.83 ± 0.40
2:1	33.67 ± 0.08	35 ± 0.71	20	17.34 ± 0.35	7.96 ± 0.16
3:1	28.95 ± 0.15	41 ± 1.04	12	4.52 ± 0.14	7.96 ± 0.16
6:1	27.56 ± 0.05	41 ± 2.52	14	3.14 ± 0.26	7.49 ± 0.10
9:1	27.15 ± 0.08	34 ± 0.00	22	3.57 ± 0.12	6.03 ± 0.04



รูปที่ 4.1 แสดงค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก *Pichia anomala* PY1 ที่ใช้น้ำมันถั่วเหลืองร่วมกับน้ำตาลกลูโคสในอัตราส่วนต่างๆ กันเป็นแหล่งคาร์บอนที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

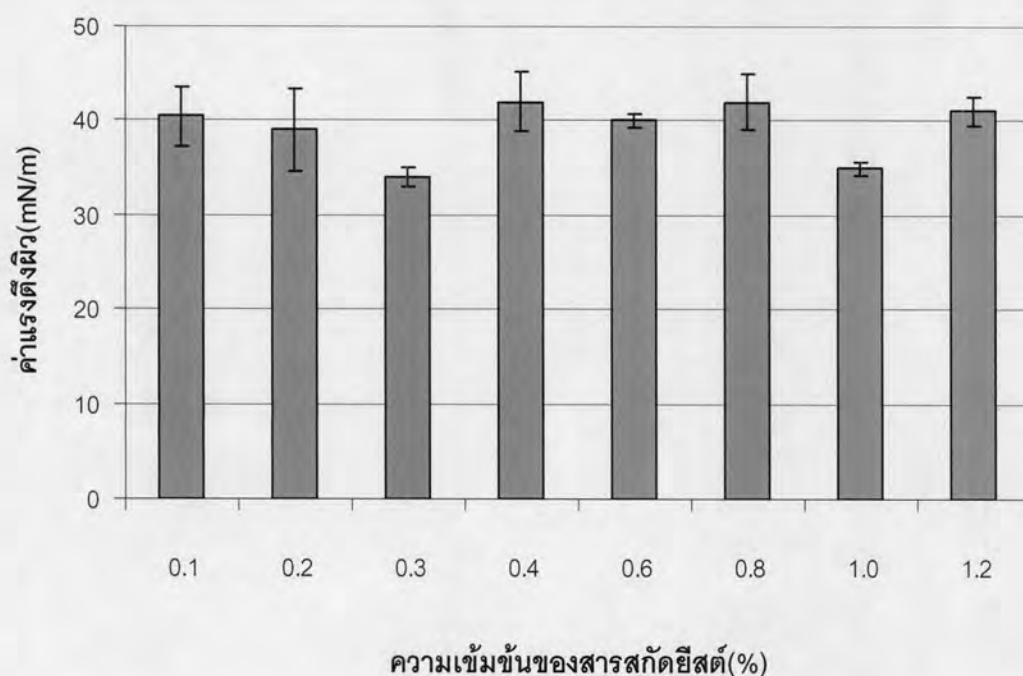


รูปที่ 4.2 แสดงการกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก *Pichia anomala* PY1 ที่ใช้น้ำมันถั่วเหลืองร่วมกับน้ำตาลกลูโคสในอัตราส่วนต่างๆ กันเป็นแหล่งคาร์บอนที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

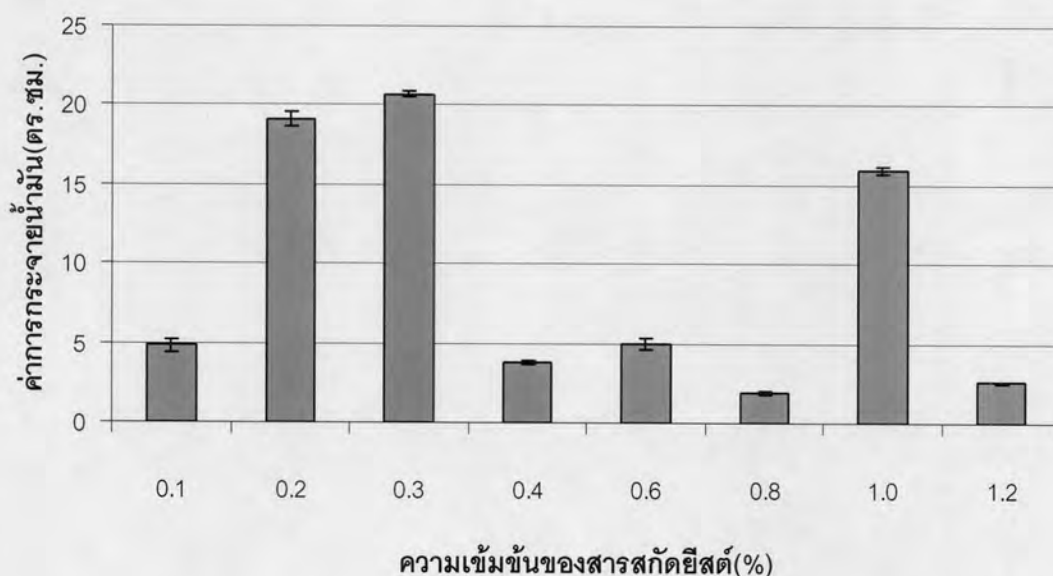
เมื่อได้แหล่งคาร์บอนทั้งชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมแล้ว นำมาหาความเข้มข้นของสารสกัดยีสต์และอายุหัวเชื้อที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่าที่ความเข้มข้นสารสกัดยีสต์ 0.3 เปอร์เซ็นต์เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยให้ผลค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 34 mN/m และค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 20.69 ตารางเซนติเมตร ดังแสดงในตารางที่ 4.4 ซึ่งมีค่าแรงตึงผิวต่ำที่สุด และมีค่าการกระจายน้ำมันมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองที่ความเข้มข้นของสารสกัดยีสต์อื่นๆ ดังแสดงในรูปที่ 4.3 และ 4.4 และอายุหัวเชื้อที่เหมาะสมที่สุดคือ 18 ชั่วโมง โดยให้ผลค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 33 mN/m และค่าการกระจายน้ำมันสูงสุดเท่ากับ 66.44 ตารางเซนติเมตร ดังแสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.4 ผลการศึกษาการแปรผันความเข้มข้นของสารสกัดยีสต์ในอาหารที่ใช้ไขมันถั่วเหลืองร่วมกับน้ำตาลกลูโคสในอัตราส่วน 2:1 เป็นแหล่งคาร์บอนที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

ความเข้มข้นสารสกัดยีสต์ (%)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	Δ ค่าแรงตึงผิว _{b-t} (mN/m)	ค่าการกระจายตัวของน้ำมัน (cm ²)	ค่า pH
0.1	19.98 ± 0.06	40 ± 3.06	9	4.87 ± 0.40	8.39 ± 0.12
0.2	24.07 ± 0.09	39 ± 4.37	14	19.11 ± 0.50	8.46 ± 0.06
0.3	27.73 ± 0.16	34 ± 1.0	17	20.69 ± 0.21	8.20 ± 0.20
0.4	27.96 ± 0.10	42 ± 3.06	9	3.80 ± 0.10	8.09 ± 0.13
0.6	30.84 ± 0.15	40 ± 0.71	13	4.91 ± 0.35	8.10 ± 0.06
0.8	28.98 ± 0.06	42 ± 2.93	10	1.85 ± 0.12	8.00 ± 0.05
1.0	29.88 ± 0.19	35 ± 0.71	18	15.90 ± 0.21	7.84 ± 0.04
1.2	28.04 ± 0.20	41 ± 1.53	9	2.54 ± 0.10	7.89 ± 0.07



รูปที่ 4.3 แสดงค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก *Pichia anomala* PY1 ที่แปรผันความเข้มข้นของสารสกัดยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ไขมันถั่วเหลืองร่วมกับน้ำตาลกลูโคสในอัตราส่วน 2:1 เป็นแหล่งคาร์บอนที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



รูปที่ 4.4 แสดงค่าการกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก *Pichia anomala* PY1 ที่แปรผันความเข้มข้นของสารสกัดยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ไขมันถั่วเหลืองร่วมกับน้ำตาลกลูโคสในอัตราส่วน 2:1 เป็นแหล่งคาร์บอนที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

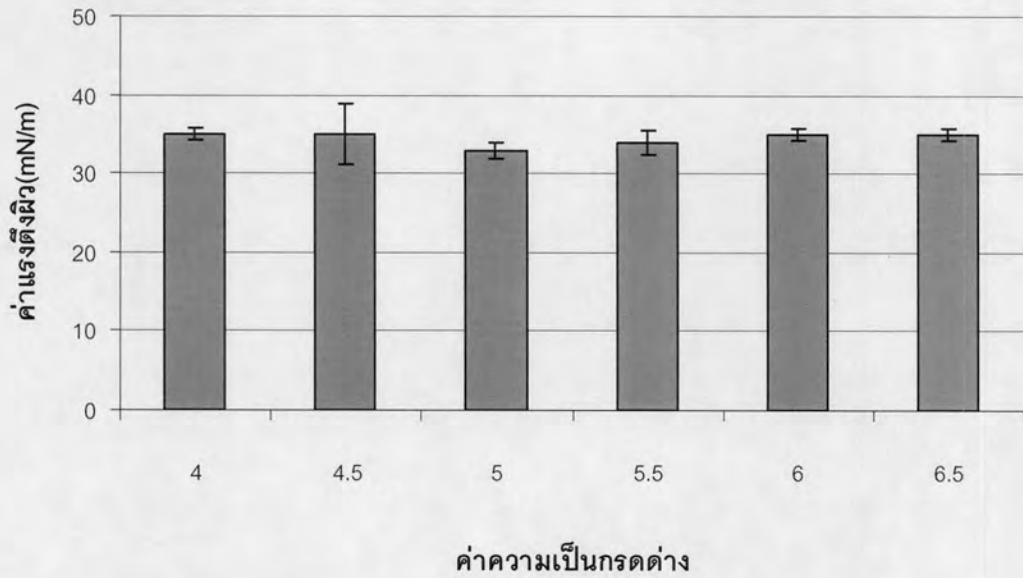
ตารางที่ 4.5 ผลการศึกษาการแปรผันอายุหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอาหารที่ใช้ไขมันถั่วเหลืองร่วมกับน้ำตาลกลูโคสในอัตราส่วน 2:1 เป็นแหล่งคาร์บอนที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

อายุหัวเชื้อ (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	Δ ค่าแรงตึงผิว _{b-t} (mN/m)	ค่าการกระจายตัวของน้ำมัน (cm ²)	ค่า pH
8	25.23 ± 0.16	34 ± 0.17	21	24.62 ± 0.10	8.17 ± 0.17
12	27.41 ± 0.08	35 ± 1.44	20	50.24 ± 0.57	8.28 ± 0.21
16	29.42 ± 0.07	33 ± 0.76	22	55.39 ± 0.42	8.01 ± 0.17
18	28.26 ± 0.02	33 ± 2.02	22	66.44 ± 0.50	8.21 ± 0.07
20	28.10 ± 0.11	34 ± 1.15	21	50.24 ± 1.06	8.21 ± 0.04
24	25.89 ± 0.12	36 ± 1.80	19	31.49 ± 1.02	8.31 ± 0.12

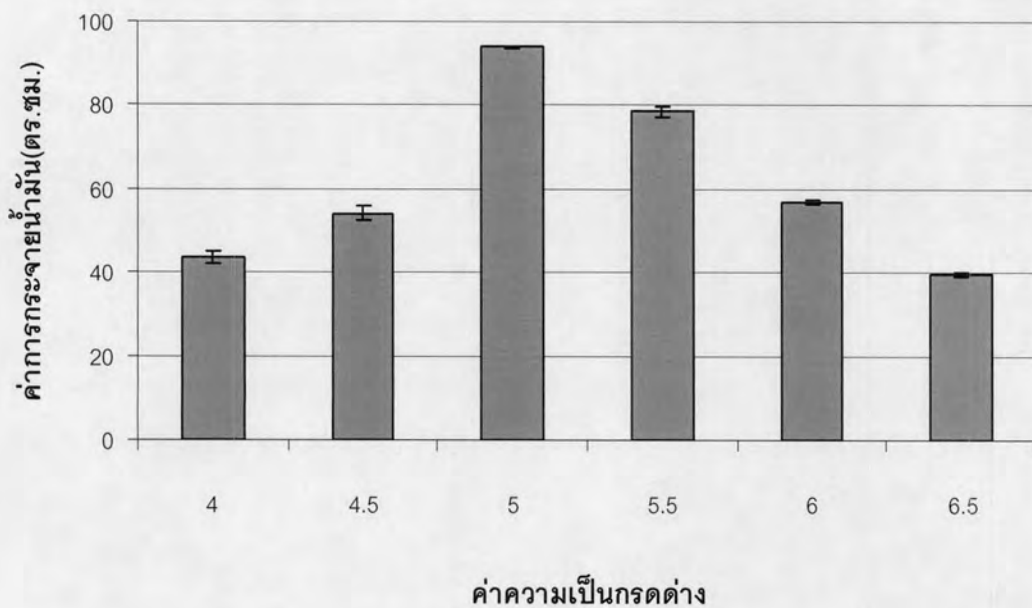
จากนั้นได้ทำการศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยน้ำมันถั่วเหลืองร่วมกับน้ำตาลกลูโคสในอัตราส่วน 2:1 เป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าที่ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยให้ผลค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 33 mN/m และค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 78.50 ตารางเซนติเมตร ดังแสดงในตารางที่ 4.6 ซึ่งมีค่าแรงตึงผิวต่ำที่สุด และมีค่าการกระจายน้ำมันมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองที่ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นอื่นๆ ดังแสดงในรูปที่ 4.5 และ 4.6

ตารางที่ 4.6 ผลการศึกษาค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ไขมันถั่วเหลืองร่วมกับน้ำตาลกลูโคสในอัตราส่วน 2:1 เป็นแหล่งคาร์บอนที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ค่า pH เริ่มต้น	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	Δ ค่าแรงตึงผิว _{b-t} (mN/m)	ค่าการกระจายตัวของน้ำมัน (cm ²)	ค่า pH
4.0	27.41 ± 0.10	35 ± 0.87	22	43.76 ± 1.44	8.29 ± 0.08
4.5	30.09 ± 0.11	35 ± 3.79	25	54.08 ± 1.77	8.20 ± 0.08
5.0	30.79 ± 0.11	33 ± 1.04	29	78.50 ± 0.15	8.29 ± 0.15
5.5	27.97 ± 0.14	34 ± 1.53	28	56.72 ± 1.32	8.34 ± 0.16
6.0	30.33 ± 0.09	35 ± 0.76	28	26.41 ± 0.49	8.29 ± 0.15
6.5	30.76 ± 0.11	35 ± 0.76	23	18.85 ± 0.64	8.05 ± 0.18

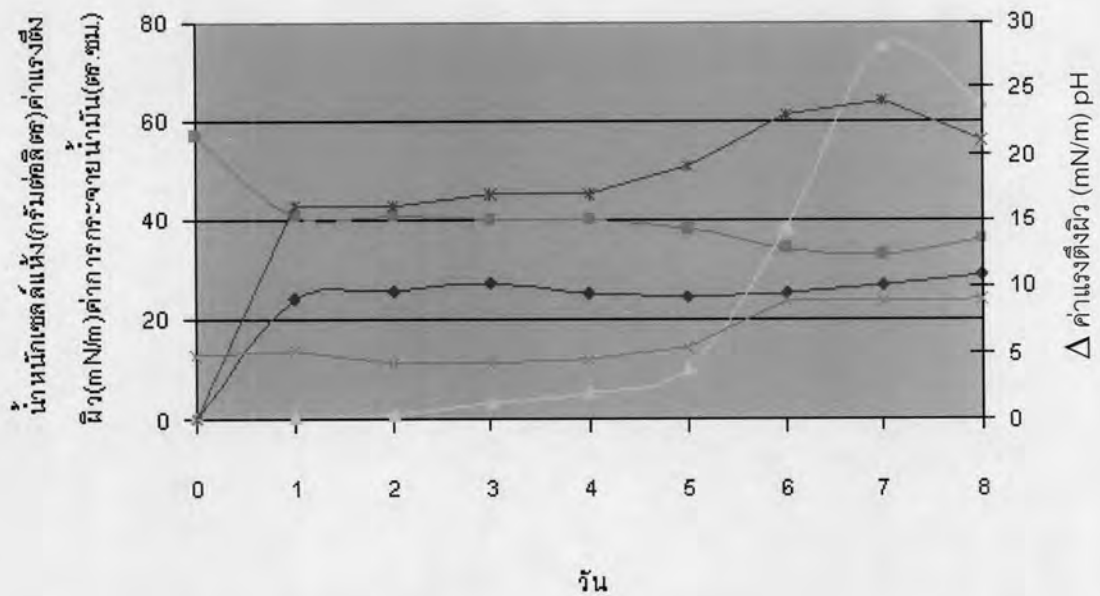


รูปที่ 4.5 แสดงค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 ทำการแปรผันค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำมันถั่วเหลืองร่วมกับน้ำตาลกลูโคสในอัตราส่วน 2:1 เป็นแหล่งคาร์บอน เท่ากับ 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 และ 6.5



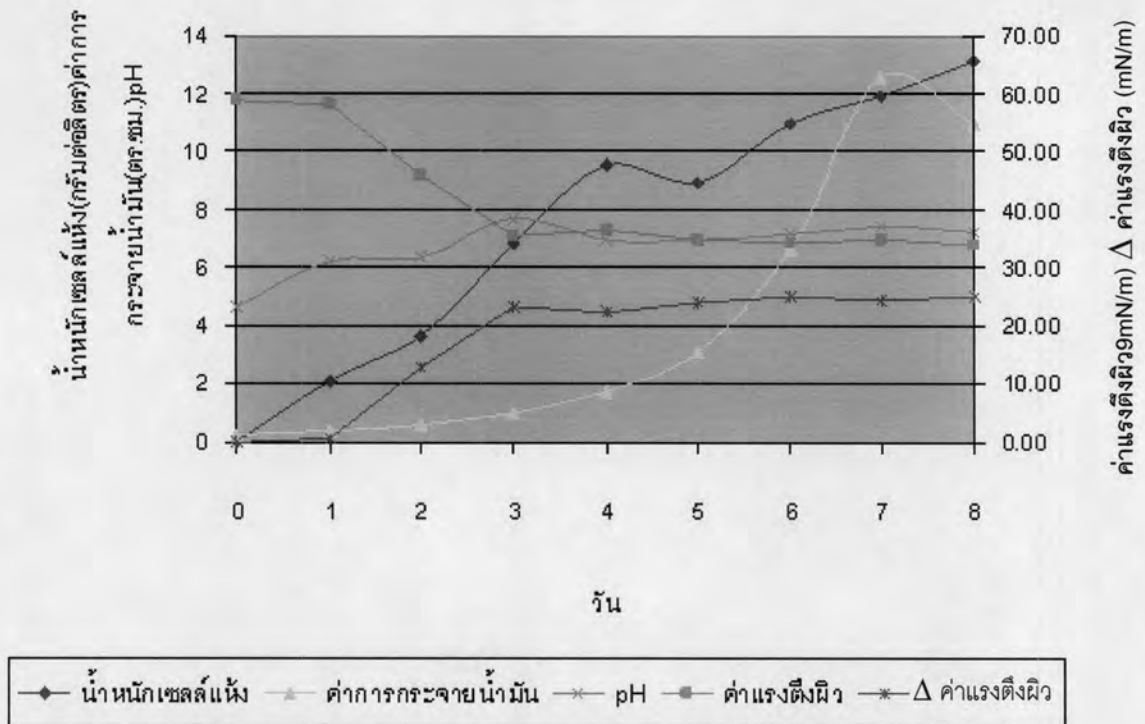
รูปที่ 4.6 แสดงค่าการกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 ทำการแปรผันค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำมันถั่วเหลืองร่วมกับน้ำตาลกลูโคสในอัตราส่วน 2:1 เป็นแหล่งคาร์บอน เท่ากับ 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 และ 6.5

เมื่อทำการทดลองโดยใช้หัวเชื้อยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YM อายุ 18 ชั่วโมงในอาหารเหลวปรับปรุงสูตรที่ประกอบด้วยน้ำมันถั่วเหลืองและน้ำตาลกลูโคส อัตราส่วน 2:1 ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที และติดตามการเจริญของยีสต์โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดต่าง และประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยการวัดค่าแรงตึงผิวและค่าการกระจายน้ำมัน ทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 14 วัน ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มีประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อวันที่ 7 คือ มีค่าแรงตึงผิวต่ำสุดเท่ากับ 33 mN/m และค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 75.39 ตารางเซนติเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4.7 และตั้งแต่วันที่ 8 -14 เซลล์มีการเจริญลดลง ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของเซลล์ค่อนข้างคงที่ ค่าการกระจายน้ำมันมีค่าลดลงตามลำดับ และค่าความเป็นกรดต่างอยู่ในช่วง 8-9 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับ การเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำมันถั่วเหลืองเพียงชนิดเดียวพบว่า การเจริญของเชื้อและประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ดีกว่า ดังแสดงในรูปที่ 4.8



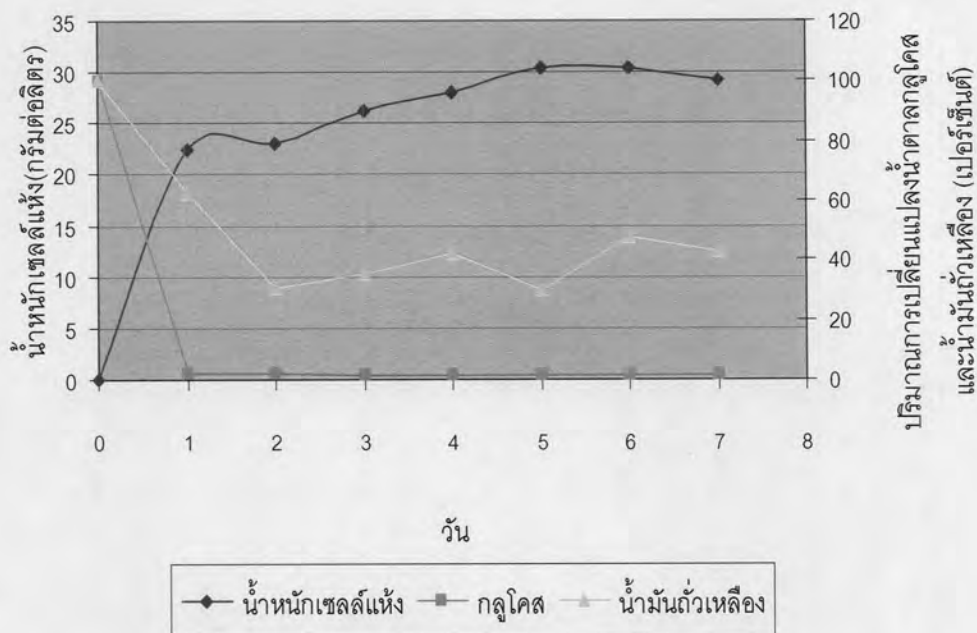
◆ น้ำหนักเซลล์แห้ง ■ ค่าแรงตึงผิว ▲ ค่าการกระจายน้ำมัน × pH * Δ ค่าแรงตึงผิว

รูปที่ 4.7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อยีสต์ *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยน้ำมันถั่วเหลืองและน้ำตาลกลูโคส ในอัตราส่วน 2:1 เป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 4.8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อยีสต์ *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว

เมื่อติดตามการเจริญและการใช้แหล่งคาร์บอนทั้งน้ำมันถั่วเหลืองและน้ำตาลกลูโคสของยีสต์พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ยีสต์ใช้น้ำตาลกลูโคสไปเกือบหมดคือ เหลือเพียง 1-2 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น และน้ำหนักเซลล์แห้งก็เพิ่มขึ้นตามลำดับจนคงที่ ส่วนน้ำมันถั่วเหลืองลดลงต่ำสุดเมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง คือ ลดลงเหลือประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองเริ่มต้นและเริ่มคงที่ไปจนถึงสิ้นสุดการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 4.9



รูปที่ 4.9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อยีสต์ *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 และการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองและน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย น้ำมันถั่วเหลืองและน้ำตาลกลูโคสในอัตราส่วน 2:1 เป็นแหล่งคาร์บอน

4.2 การผลิตและสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากยีสต์ *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในอาหารเหลวปรับปรุงสูตรที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.02 เปอร์เซ็นต์ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดยีสต์ 0.3 เปอร์เซ็นต์ NaNO_3 0.4 เปอร์เซ็นต์ น้ำมันถั่วเหลือง 10.67 เปอร์เซ็นต์ และกลูโคส 5.33 เปอร์เซ็นต์ (อัตราส่วน 2:1) ควบคุมค่าความเป็นกรดต่าง เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในระดับขวดเขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน หลังจากการสกัดด้วยสารละลายอินทรีย์จะให้ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเท่ากับ 0.95 กรัมต่อลิตร สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มีค่าแรงตึงผิวต่ำสุด 33 mN/m และค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 75.39 ตารางเซนติเมตร

4.3 ลักษณะสมบัติทางชีวเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

การศึกษาผลของค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานและความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ พบว่าที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8-9 เหมาะสมที่สุดต่อการทำงานของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งให้ค่าแรงตึงผิวในวันแรกเท่ากับ 34-35.5 mN/m (Δ ค่าแรงตึงผิว b_1 เท่ากับ 18.5-19 mN/m) และค่าแรงตึงผิวมีความเสถียรอยู่ในช่วง 33-36.5 mN/m เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน ดังแสดงในตารางที่ 4.7

ส่วนค่าการกระจายน้ำมันมีค่าเท่ากับ 7.07 ตารางเซนติเมตร ในวันแรกที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8 เช่นกัน และคงความเสถียรของการกระจายน้ำมันจนเวลา 30 วัน เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ขณะที่ที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 9 มีค่าการกระจายน้ำมันเพียง 5.31 ตารางเซนติเมตร ดังนั้นที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8 จึงจัดว่าเหมาะสมที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.7 ผลของค่าความเป็นกรดต่างต่างๆ ต่อค่าแรงตึงผิวและความเสถียรของค่าแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY 1

วัน	ค่าแรงตึงผิว (mN/m) ที่ค่าความเป็นกรดต่างต่างๆ										
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
C*	43	44	43	43	43	43	53	54	54	51.5	56
1	35	34	35.5	36	34	34	34	35.5	39	39.5	41
10	35	34	36	35	35	33	33	36.5	40	39.5	40
20	34	35	35	35.5	34	33	33.5	35	38	40	41
30	36	34	40	34	33.5	35	33	35	38	41	39

(C* ตัวควบคุม หมายถึง 50 มิลลิโมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 2-6 และ 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 7-12)

ตารางที่ 4.8 ผลของค่าความเป็นกรดต่างๆ ต่อค่าการกระจายน้ำมันและความเสถียรของค่าการกระจายน้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY 1

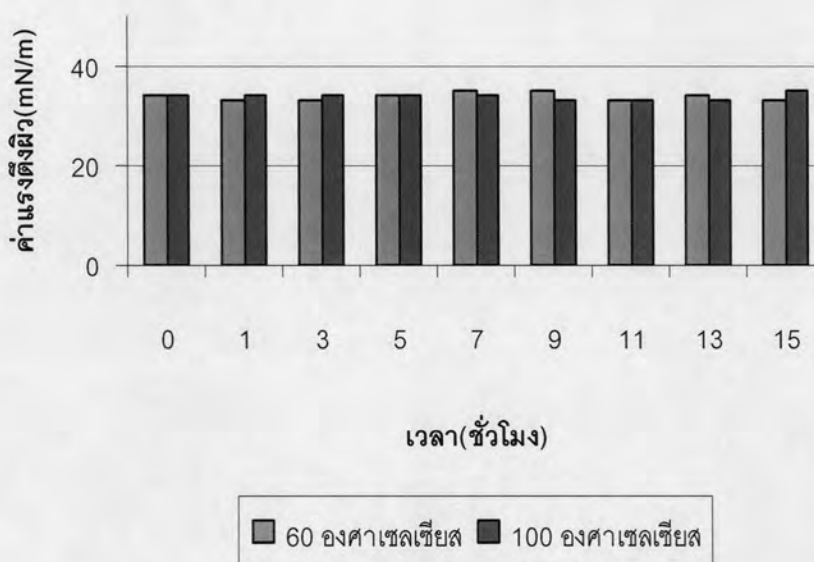
วัน	ค่าการกระจายน้ำมัน (ตารางเซนติเมตร) ที่ค่าความเป็นกรดต่างๆ										
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
C*	0.50	0.28	0.28	0.28	0.28	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.28
1	4.52	7.07	7.07	5.31	5.31	6.15	7.07	5.31	3.80	2.01	2.01
10	3.80	7.07	5.31	7.07	5.31	5.31	7.07	3.14	3.14	2.01	2.01
20	3.14	6.15	7.07	5.31	6.15	6.15	7.07	3.80	3.14	2.54	2.01
30	4.52	7.07	7.07	5.31	5.31	8.04	9.07	2.54	2.54	2.01	1.54

(C* ตัวควบคุม หมายถึง 50 มิลลิโมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ ที่ความเป็นกรดต่าง 2-6 และ 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ที่ความเป็นกรดต่าง 7-12)

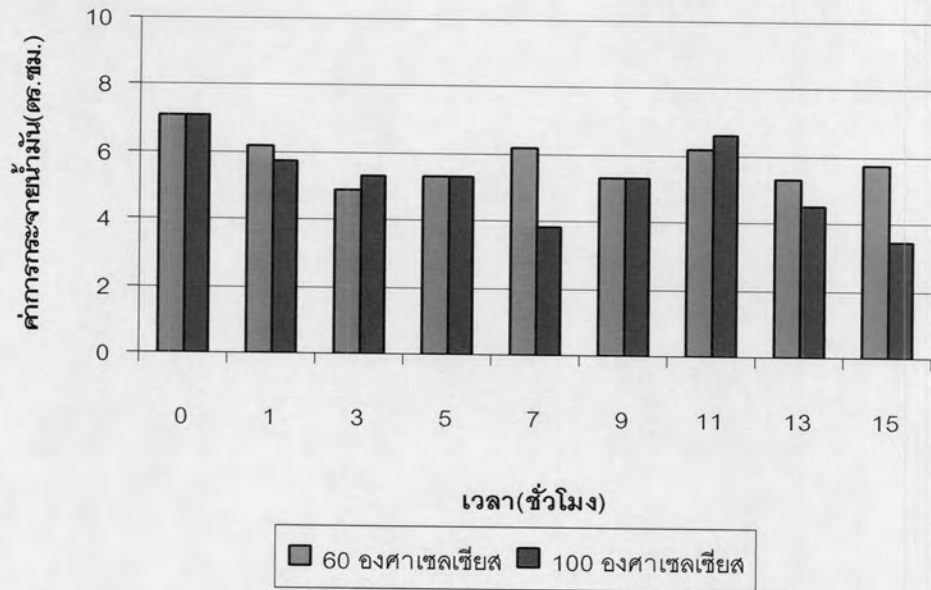
ศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิต่อความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ที่ 60 และ 100 องศาเซลเซียส โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้เมื่อเริ่มต้นทำการละลายด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ที่ความเป็นกรดเท่ากับ 8 มีค่าการกระจายน้ำมัน 7.07 ตารางเซนติเมตร และมีค่าแรงตึงผิว 34 mN/m หลังจากทำการป้อนที่อุณหภูมิ 60 และ 100 องศาเซลเซียส นำออกมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วทำการวัดค่าการกระจายน้ำมันและค่าแรงตึงผิว พบว่าทั้งที่อุณหภูมิ 60 และ 100 องศาเซลเซียส สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้สามารถทำงานได้ดีและคงความเสถียรได้จนเวลาผ่านไป 15 ชั่วโมง โดยมีค่าการกระจายน้ำมัน 3-6 ตารางเซนติเมตร และมีค่าแรงตึงผิว 33-35 mN/m ดังแสดงในตารางที่ 4.9 และยังทำการทดลองที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส รอบละ 15 นาที เป็นเวลา 5 รอบ พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้สามารถทำงานและคงความเสถียรได้ดี โดยมีค่าการกระจายน้ำมัน 5-7 ตารางเซนติเมตร และมีค่าแรงตึงผิว 33-36 mN/m ดังแสดงในรูปที่ 4.12

ตารางที่ 4.9 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของค่าการกระจายน้ำมันและค่าแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY 1 ที่อุณหภูมิ 60 และ 100 องศาเซลเซียส

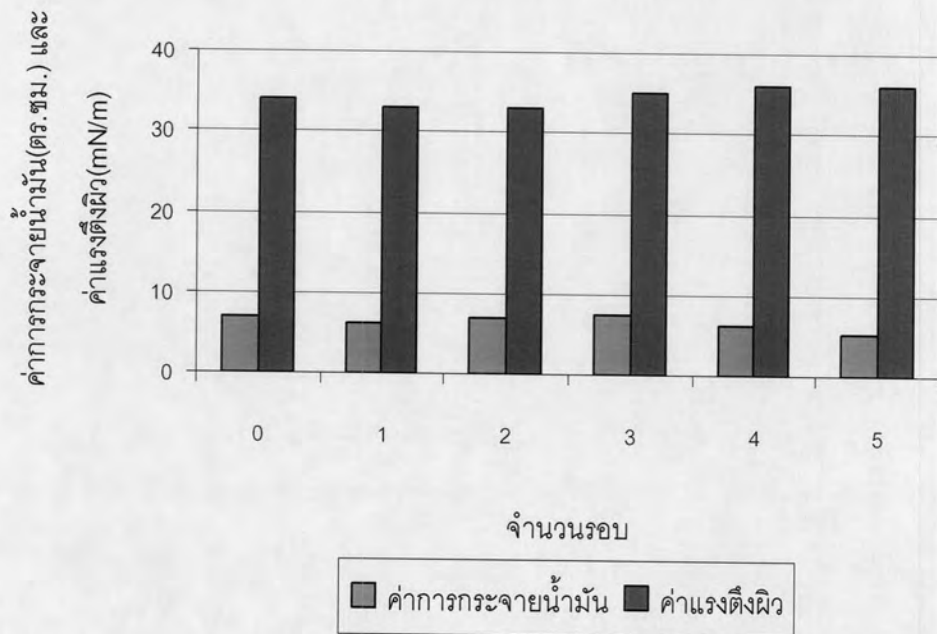
เวลา (ชั่วโมง)	60 องศาเซลเซียส		100 องศาเซลเซียส	
	ค่าการกระจาย น้ำมัน(ตร.ซม.)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	ค่าการกระจาย น้ำมัน(ตร.ซม.)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)
0	7.07	34	7.07	34
1	6.15	33	5.72	33
3	4.91	33	5.31	34
5	5.31	34	5.31	34
7	6.15	35	3.8	34
9	5.31	35	5.31	33
11	6.15	33	6.6	33
13	5.31	34	4.52	33
15	5.72	33	3.46	35



รูปที่ 4.10 กราฟแสดงค่าแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY 1 ที่อุณหภูมิ 60 และ 100 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.11 กราฟแสดงค่าการกระจายน้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY 1 ที่อุณหภูมิ 60 และ 100 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.12 กราฟแสดงจำนวนรอบทดสอบค่าการกระจายน้ำมันและค่าแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY 1 และผ่านการบ่มที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

นอกจากนี้ยังทำการศึกษาค่าความเข้มข้นของไซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการทำงานและความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้เมื่อเริ่มต้นทำการละลายด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ที่ความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8 ที่ยังไม่เติมไซเดียมคลอไรด์มีค่าการกระจายน้ำมัน 9.07 ตารางเซนติเมตร และมีค่าแรงตึงผิว 34 mN/m พบว่าที่ค่าความเข้มข้นของไซเดียมคลอไรด์ 0.5-5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ค่าแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้เริ่มต้นเท่ากับ 32-34 mN/m และยังคงความเสถียรของการทำงานไปจนถึง 30 วัน เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยมีการเปลี่ยนแปลงค่าแรงตึงผิวไม่เกิน 37 mN/m ดังแสดงในตารางที่ 4.10 ส่วนค่าการกระจายน้ำมันเริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 9-14 ตารางเซนติเมตร และเมื่อเวลาผ่านไป 30 วัน พบว่าค่าการกระจายน้ำมันค่าลดลงเพียงเล็กน้อย ดังแสดงในตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.10 ผลของค่าความเข้มข้นของไซเดียมคลอไรด์ต่อค่าแรงตึงผิวและความเสถียรของค่าแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY 1

วัน	ค่าแรงตึงผิว (mN/m) ที่ความเข้มข้นไซเดียมคลอไรด์ต่างๆ(เปอร์เซ็นต์)									
	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5
C*	50	49	50.5	50	47	48.5	48	49.5	49	48.5
1	34.5	33	33	32	33	33	34	34	34	34
10	33	33	33	32	32	32.5	33	33	33.5	33.5
20	34	36	33.5	32	32	32	32	33	32	32
30	36	36.5	37	33	35	33	32	32	32	34

(C* ตัวควบคุม หมายถึง 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8 เติมไซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ)

ตารางที่ 4.11 ผลของค่าความเข้มข้นของไซเดียมคลอไรด์ต่อค่าการกระจายน้ำมันและความเสถียรของค่าการกระจายน้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY 1

วัน	ค่าการกระจายน้ำมัน (ตร.ซม.) ที่ความเข้มข้นไซเดียมคลอไรด์ต่างๆ (เปอร์เซ็นต์)									
	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5
C*	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12
1	12.56	11.34	13.85	11.34	12.56	11.34	9.07	12.56	12.56	12.56
10	12.56	9.07	11.34	11.34	11.34	12.56	12.56	10.17	11.34	11.34
20	12.56	8.04	11.34	8.04	12.56	11.34	12.56	12.56	10.17	7.07
30	11.34	8.04	9.07	7.07	7.07	10.17	10.17	9.07	12.56	8.04

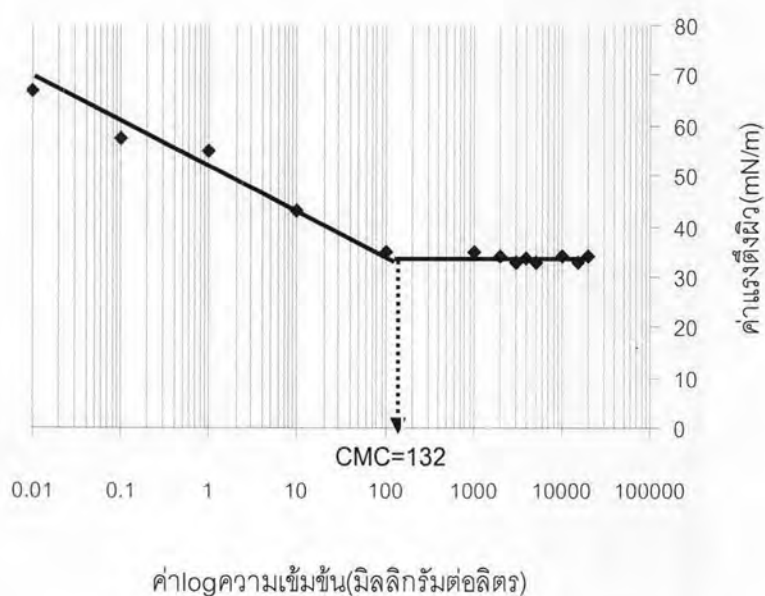
(C* ตัวควบคุม หมายถึง 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8 เดิม ไซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ)

วัดค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน (Emulsion Index) เปรียบเทียบกับน้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ เช่น น้ำมันปาล์ม น้ำมันสลัด น้ำมันดอกคำฝอย น้ำมันงา เฮกซาเดคเคน ไซโคลเฮกเซน น้ำมันพาราฟิน (paraffin oil) เป็นต้น ตามวิธีของ Shepherd และคณะ (1995) พบว่าความสามารถในการการก่ออิมัลชัน (Emulsification activity) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ มีค่าใกล้เคียงกันคือ มีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร ประมาณ 0.443-0.566 และค่าความเสถียรในการก่ออิมัลชัน (Emulsification stability) หรือค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันต่อน้ำมันชนิดต่างๆ เช่น น้ำมันคาโนลา น้ำมันงา น้ำมันสลัด น้ำมันรำข้าว น้ำมันดอกคำฝอย และน้ำมันถั่วเหลือง ที่ 24 ชั่วโมง มีค่ามากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำมันคาโนลาและน้ำมันดอกคำฝอยมีค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันลดลงน้อยที่สุดใน 3 วันแรก คือ 10 เปอร์เซ็นต์ น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันรำข้าว น้ำมันสลัดและน้ำมันงา ลดลง 15-25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากนั้นลดลงประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ใน 5 วัน และลดลง 60-70 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 7 วัน ในน้ำมันทุกชนิด ส่วนความสามารถในการก่ออิมัลชันต่อสารประกอบไฮโดรคาร์บอนมีค่าใกล้เคียงกันคือ มีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร ประมาณ 0.487-0.584 ยกเว้น เฮกเทนที่มีค่า 0.728 แต่ไม่เสถียรในการก่ออิมัลชัน มีเพียง ไอโซโพรพิล ไมริสเตท เฮกซาเดคเคนและเอทิล โอเลเอท ที่มีค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันที่ 24 ชั่วโมงมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ และลดลงเรื่อยๆ จนต่ำกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ ในสารประกอบไฮโดรคาร์บอนทุกชนิดภายในเวลา 7 วัน ดังแสดงในตารางที่ 4.12

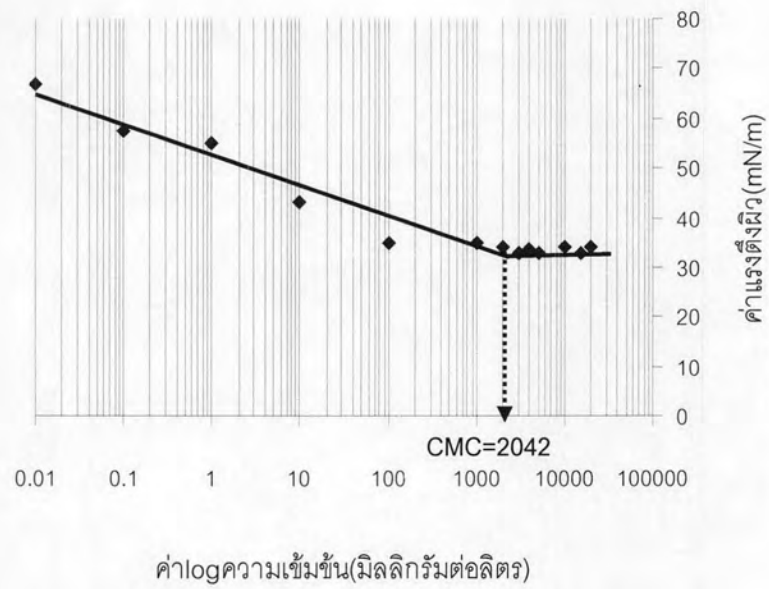
ตารางที่ 4.12 แสดงค่าการก่ออิมัลชัน (Emulsification activity) และความเสถียรของการก่ออิมัลชัน (Emulsification stability) หรือค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน (Emulsion Index) ที่เวลาต่างๆ ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้น้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ

น้ำมันและ สารประกอบ ไฮโดรคาร์บอน	ค่าการก่อ อิมัลชัน (OD units)	ค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน			
		E ₂₄ (1 วัน)	E ₇₂ (3 วัน)	E ₁₂₀ (5 วัน)	E ₁₆₈ (7 วัน)
น้ำมันโจโจ้บา	0.462	75.32	62.77	36.80	25.54
น้ำมันคาโนลา	0.505	93.07	83.17	40.79	32.08
น้ำมันงา	0.443	91.87	66.59	46.95	31.38
น้ำมันสลัด	0.566	91.87	68.55	38.34	24.91
น้ำมันรำข้าว	0.488	92.62	70.08	38.93	25.82
น้ำมันมะกอก	0.464	82.33	58.84	35.99	23.92
น้ำมันปาล์ม	0.487	62.83	61.40	40.86	23.00
น้ำมันดอกคำฝอย	0.462	92.21	83.33	31.17	26.19
น้ำมันถั่วเหลือง	0.482	93.98	78.22	35.68	23.86
น้ำมันเมล็ดฝ้าย	0.565	77.52	56.64	32.21	24.07
น้ำมันพาราฟิน	0.584	85.62	74.83	47.09	32.88
เฮปเทน	0.728	71.84	48.35	34.89	30.63
ไอโซโพรพิล ไมริสเตท	0.563	93.78	71.94	49.20	31.62
โดดีเคน	0.505	86.34	77.82	43.76	37.03
ดีคานอล	0.487	77.82	74.95	34.50	25.67
เฮกซาเดคเคน	0.538	93.68	84.94	41.64	33.09
เอทิล ไอลเอท	0.582	95.36	71.13	36.43	27.32

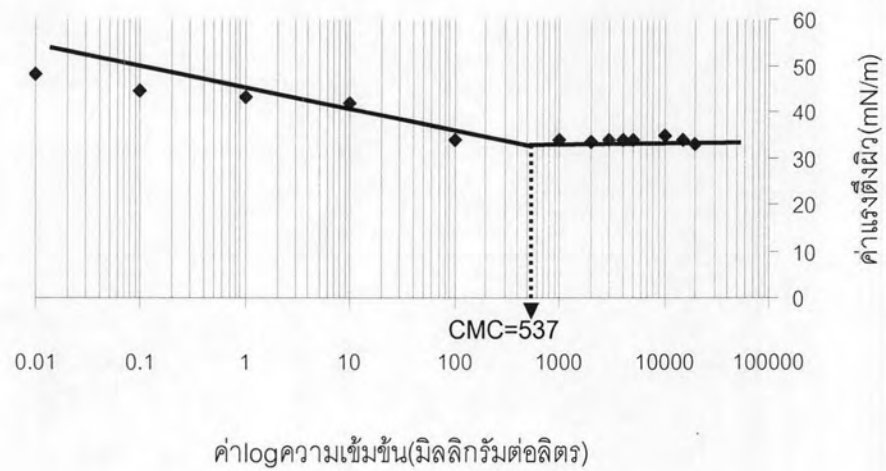
การหาค่าจุดวิกฤติของความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ (Critical micelle concentration; CMC) จากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ โดยละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริส ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8 เตรียมให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ กัน ตั้งแต่ 0.01-20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าแรงตึงผิว และคำนวณหาค่า CMC พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY 1 มีค่า CMC เท่ากับ 132 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าแรงตึงผิว ณ การเกิดไมเซลล์ (γ_{CMC}) เท่ากับ 35 mN/m เปรียบเทียบกับ สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ เคมเทค 307 ไทรทอน เอ็กซ์ 100 และโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต มีค่า CMC เท่ากับ 2,042 537 และ 2,630 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีค่าแรงตึงผิว ณ การเกิดไมเซลล์ (γ_{CMC}) เท่ากับ 33 34 และ 41 mN/m ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.13-4.16 นอกจากนี้ยังมี ค่าใกล้เคียงกับไซโฟโรลิพิดจาก *Candida bombicola* (Otto และคณะ, 1999) และแรมโนลิพิด จาก *Pseudomonas aeruginosa* (Pornsunthorntawee และคณะ, 2008) ด้วย ดังแสดงใน ตารางที่ 4.13



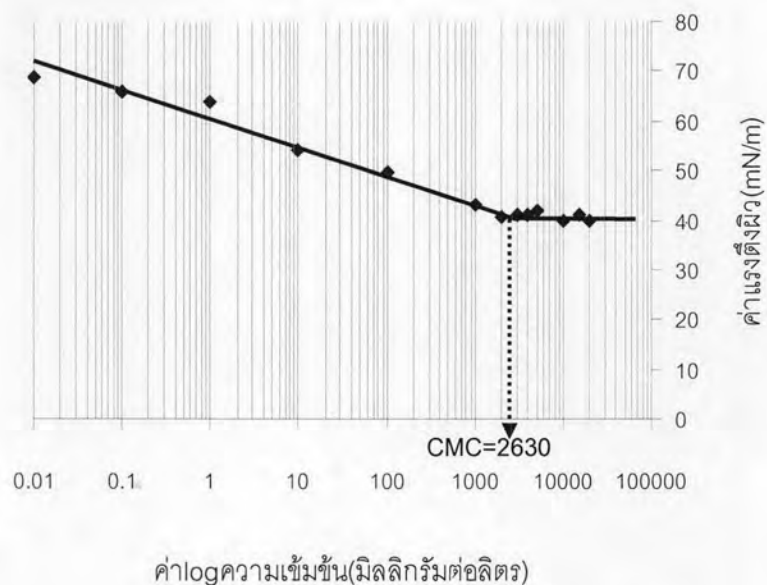
รูปที่ 4.13 แสดงการหาค่า CMC ซึ่งเขียนกราฟระหว่างค่าแรงตึงผิวและ log ของความเข้มข้นของ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1



รูปที่ 4.14 แสดงการหาค่า CMC ซึ่งเขียนกราฟระหว่างค่าแรงตึงผิวและ log ของความเข้มข้นของ สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ เคมเทค 307



รูปที่ 4.15 แสดงการหาค่า CMC ซึ่งเขียนกราฟระหว่างค่าแรงตึงผิวและ log ของความเข้มข้นของ สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ ไทรทอน เอกซ์ 100



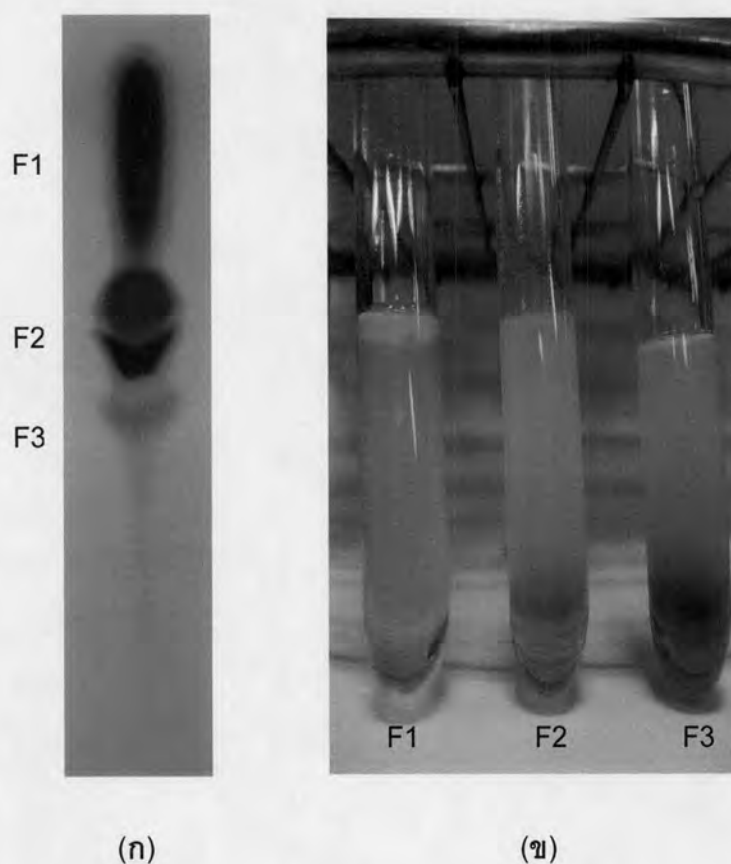
รูปที่ 4.16 แสดงการหาค่า CMC ซึ่งเขียนกราฟระหว่างค่าแรงตึงผิวและ log ของความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ไฮโดรเจนไดออกไซด์ซัลเฟต

ตารางที่ 4.13 แสดงค่าจุดวิกฤติของความเข้มข้นของสารเกิดไมเซลล์ (Critical micelle concentration ; CMC) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดต่างๆ

จุลินทรีย์	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	CMC (มิลลิกรัมต่อลิตร)	อ้างอิง
<i>Pichia anomala</i> PY1	ไกลโคลิพิด	132	งานวิจัยนี้
<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214	ไซโฟโรลิพิด	130	Otto และคณะ, 1999
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SP4	แรมโนลิพิด	200	Pornsunthorntawe และคณะ, 2008
<i>Bacillus subtilis</i> LB5a	เซอร์แฟคติน	33	Nitschke และ Pastor, 2006
<i>Pseudozyma aphidis</i> DSM 70725	แมนโนซิลเออร์ไททอลลิพิด	10	Rau และคณะ, 2005

4.4 การทำบริสุทธิ์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธีโครมาโตกราฟี

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จากข้อ 4.2 มาแยกและทดสอบบนแผ่น TLC silica gel 60 มีเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยคลอโรฟอร์มต่อเมทานอลต่อน้ำเท่ากับ 65: 25: 4 แล้วทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารด้วยไอระเหยของไอโอดีน พบว่าสามารถแยกสารออกได้เป็น 3 ลำดับส่วน เรียกว่า F1 ถึง F3 โดยมีค่าคงที่ของอัตราส่วนการเคลื่อนที่ (R_f) เป็น 0.88, 0.72 และ 0.62 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.17(ก) เมื่อนำแต่ละลำดับส่วนมาตรวจสอบประสิทธิภาพด้วยการวัดค่าการกระจายน้ำมัน พบว่า F2 มีค่าการกระจายน้ำมันสูงที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 4.14 เมื่อตรวจสอบหาปริมาณน้ำตาลด้วยมอร์ส รีเอเจนท์พบว่า F2 และ F3 ให้ผลบวก ดังแสดงในรูปที่ 4.17(ข) จึงสันนิษฐานได้ว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 ผลิตได้มีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบหรือเป็นสารประเภทไกลโคลิพิด



รูปที่ 4.17 ผลการวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ด้วยวิธี analytical TLC แล้วทำการตรวจสอบผลด้วย (ก)ไอโอดีน และ (ข) มอร์ส รีเอเจนท์

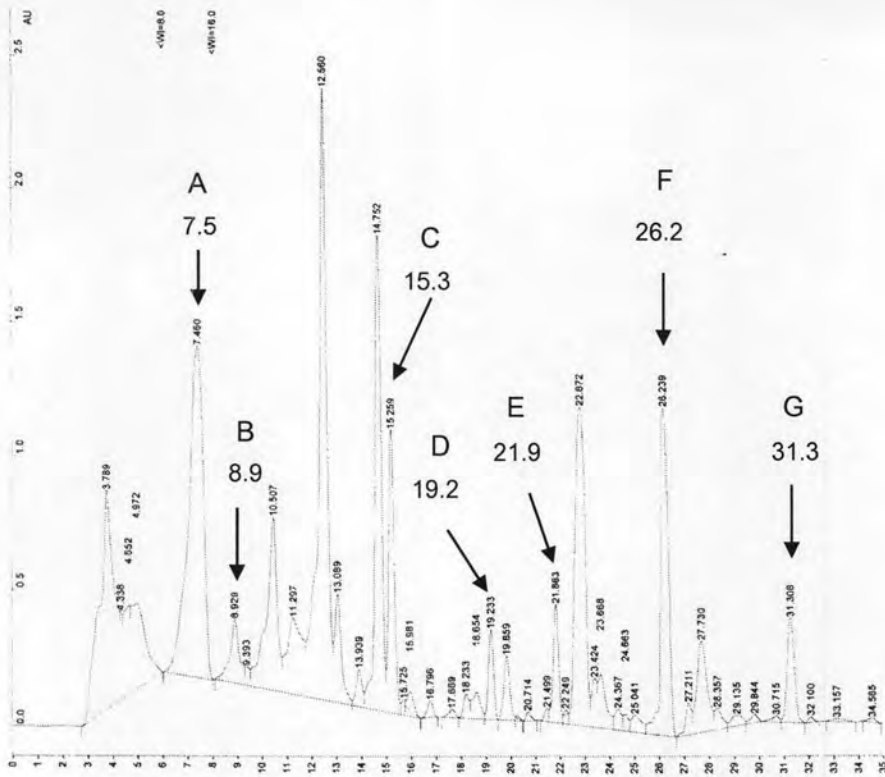
ตารางที่ 4.14 อัตราการเคลื่อนที่ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากการเลี้ยงเชื้อโดยมีน้ำมันถั่วเหลืองและน้ำตาลกลูโคส อัตราส่วน 2:1 เป็นแหล่งคาร์บอนบนแผ่น TLC และค่าการกระจายน้ำมันแต่ละลำดับส่วน

แถบที่	อัตราการเคลื่อนที่ (R_f)	ค่าการกระจายน้ำมัน (cm^2)
F1	0.88	4.91
F2	0.72	134.71
F3	0.62	83.28

จากนั้นนำตัวอย่างสารตำแหน่ง F2 (R_f เท่ากับ 0.72) ที่เตรียมจาก preparative TLC มาวิเคราะห์สารและทำให้บริสุทธิ์ด้วย HPLC ดังแสดงในรูปที่ 4.17 ด้วยภาวะตามข้อ 3.4.3 และทำการเก็บลำดับส่วนตัวอย่างจากทุกพีคที่ปรากฏและนำมาทำให้แห้งแล้วเติม 50 มิลลิโมลาร์ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดต่าง เท่ากับ 8 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร นำตัวอย่างที่ได้ไปวัดค่าการกระจายน้ำมัน ดังแสดงในตารางที่ 4.15

ตารางที่ 4.15 สรุปค่าการกระจายน้ำมันของตัวอย่างตำแหน่ง F2 เมื่อผ่านการวิเคราะห์และทำให้บริสุทธิ์ด้วย HPLC

ตำแหน่งพีคจากสารตำแหน่ง F2	Retention time (RT) (min)	ค่าการกระจายน้ำมัน (cm^2)
1	7.5	3.79
2	8.9	9.07
3	10.5	12.56
4	12.6	12.56
5	14.8	4.52
6	15.3	63.59
7	19.2	103.82
8	21.9	94.99
9	22.9	34.19
10	26.2	102.02
11	27.7	0.79
12	31.3	81.67



รูปที่ 4.18 โครมาโตแกรมของ HPLC จากตัวอย่างตำแหน่ง F2

ค่า RT ของพีคที่มีค่าการกระจายตัวของน้ำมันมาก ได้แก่ 7.5, 8.9, 15.3, 19.2, 21.9, 26.2 และ 31.4 นาที ซึ่งมีค่าการกระจายตัวของน้ำมันเท่ากับ 3.80, 9.07, 63.59, 103.82, 94.99, 102.02 และ 81.67 ตารางเซนติเมตร ตามลำดับ

จากตารางที่ 4.13 ได้เลือก 2 ตัวอย่างที่มี RT ใกล้เคียงกับโครมาโตแกรมของ HPLC จากสารไซโทโรลิพิคที่ใช้เป็นสารเปรียบเทียบ (ภาคผนวก ง) คือ

- ตำแหน่งพีคที่ 1 เรียกว่า ตัวอย่างสาร A คือ ตำแหน่งที่ RT 7.5 นาที มีค่าการกระจายน้ำมัน 3.79 ตารางเซนติเมตร
- ตำแหน่งพีคที่ 2 เรียกว่า ตัวอย่างสาร B คือ ตำแหน่งที่ RT 8.9 นาที มีค่าการกระจายน้ำมัน 9.07 ตารางเซนติเมตร

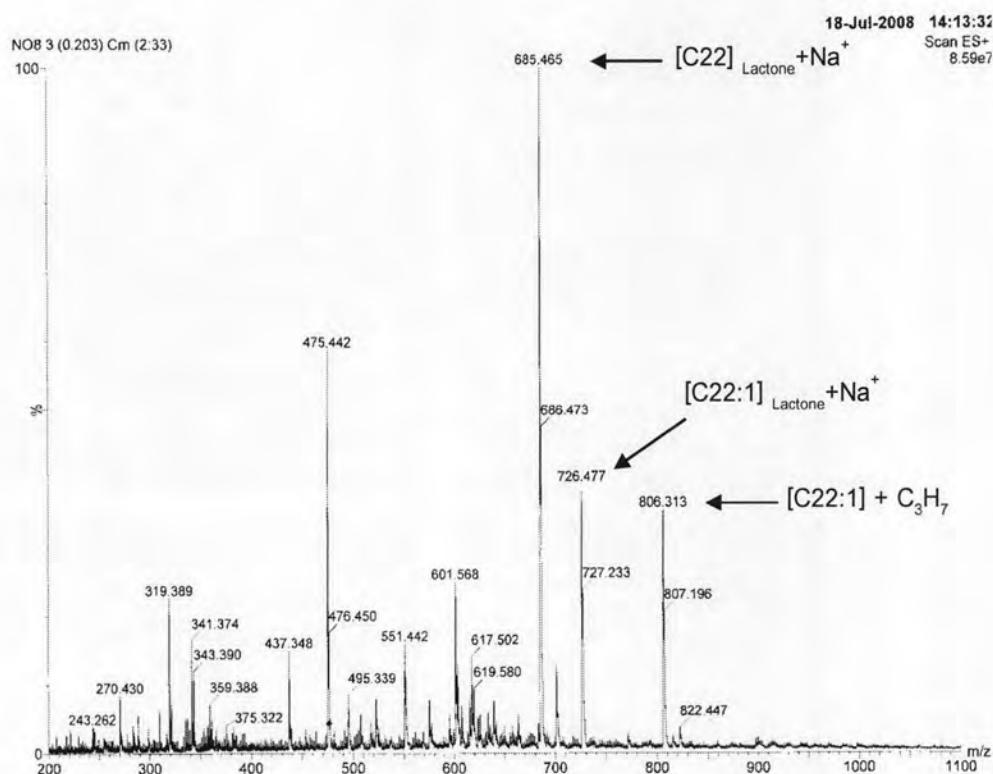
และตำแหน่งพีคที่มีค่าการกระจายน้ำมันสูงสุด จากโครมาโตแกรมของ HPLC อีก 5 ตัวอย่าง ดังนี้

- ตำแหน่งพีคที่ 6 เรียกว่า ตัวอย่างสาร C คือ ตำแหน่งที่ RT 15.3 นาที มีค่าการกระจายน้ำมัน 63.59 ตารางเซนติเมตร

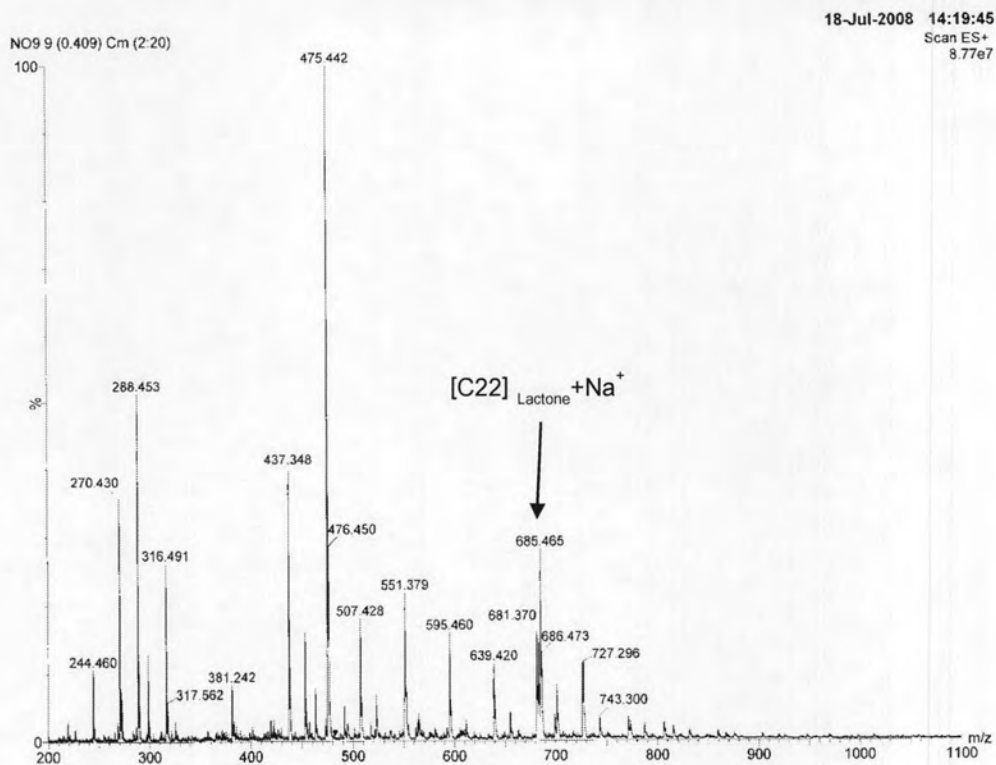
- ตำแหน่งพีคที่ 7 เรียกว่า ตัวอย่างสาร D คือ ตำแหน่งที่ RT 19.2 นาที มีค่าการกระจายน้ำมัน 103.82 ตารางเซนติเมตร
- ตำแหน่งพีคที่ 8 เรียกว่า ตัวอย่างสาร E คือ ตำแหน่งที่ RT 21.9 นาที มีค่าการกระจายน้ำมัน 94.99 ตารางเซนติเมตร
- ตำแหน่งพีคที่ 10 เรียกว่า ตัวอย่างสาร F คือ ตำแหน่งที่ RT 26.2 นาที มีค่าการกระจายน้ำมัน 102.02 ตารางเซนติเมตร
- ตำแหน่งพีคที่ 12 เรียกว่า ตัวอย่างสาร G คือ ตำแหน่งที่ RT 31.3 นาที มีค่าการกระจายน้ำมัน 81.67 ตารางเซนติเมตร

4.5 วิเคราะห์โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

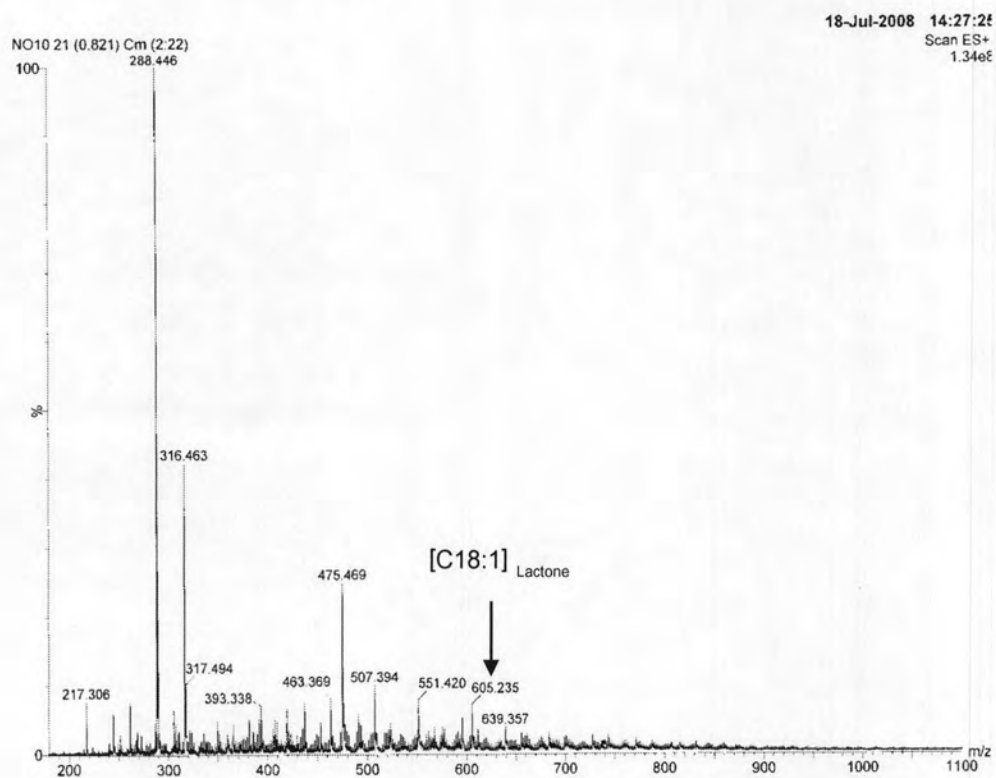
นำตัวอย่างสาร A ถึง G มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย HPLC และนำไปทำการวิเคราะห์หาน้ำหนักมวลโมเลกุลด้วยวิธี Liquid Chromatography - Mass Spectrometry (LC-MS) ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



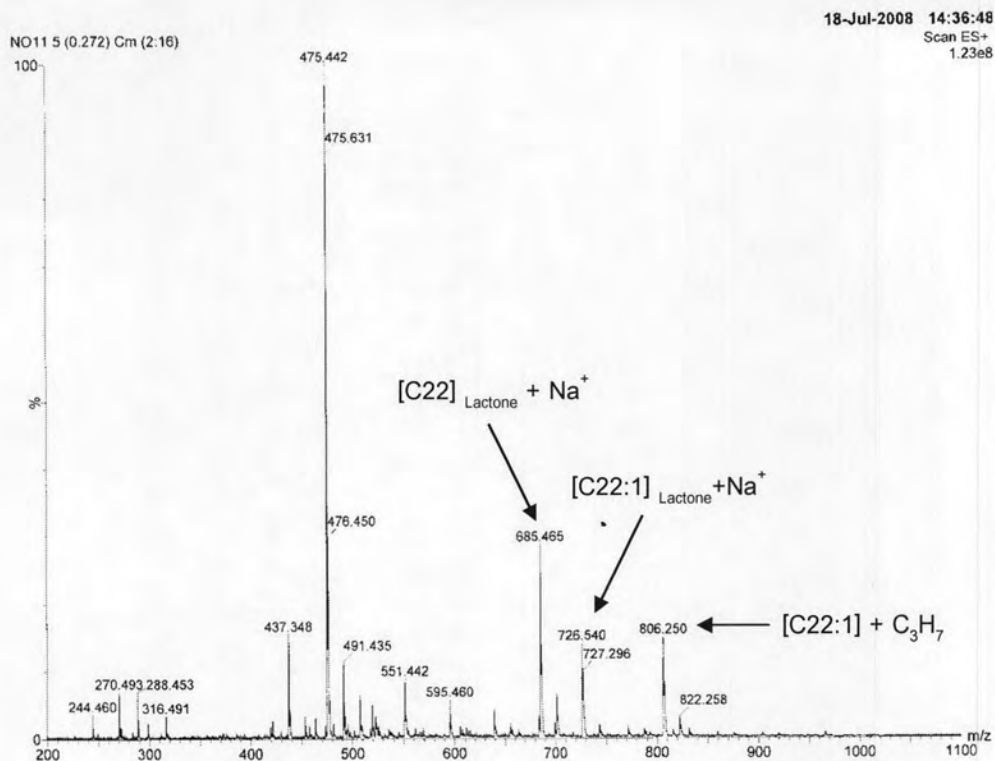
รูปที่ 4.19 โครมาโตแกรมของ LC-MS ของตัวอย่างสาร A



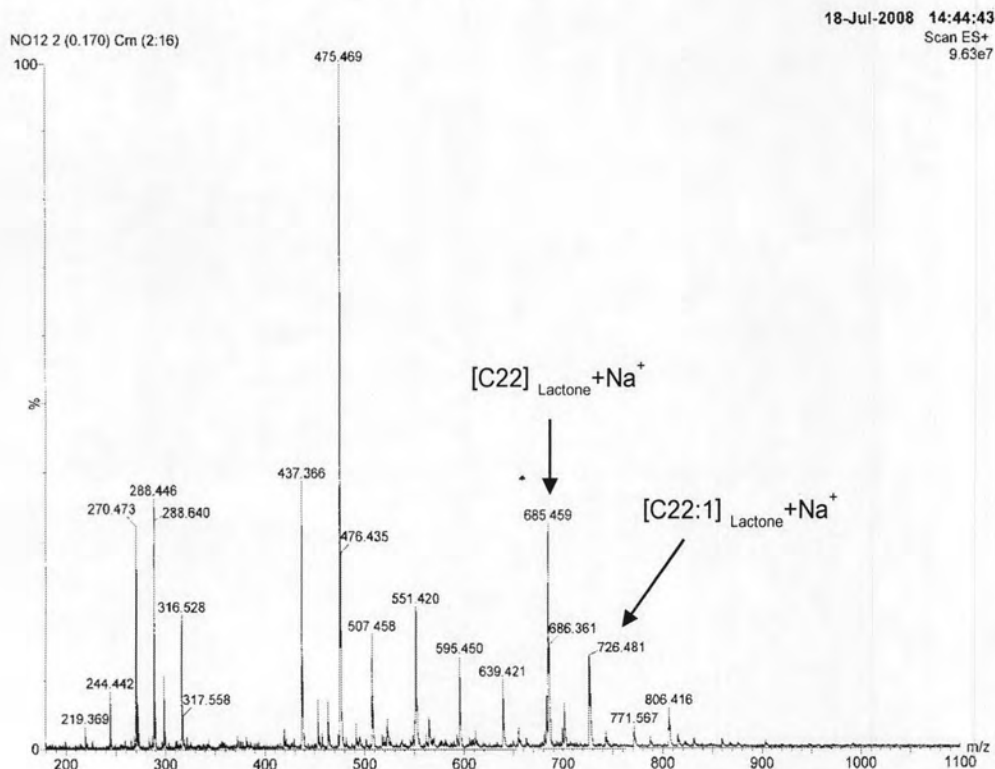
รูปที่ 4.20 โครมาโตแกรมของ LC-MS ของตัวอย่างสาร B



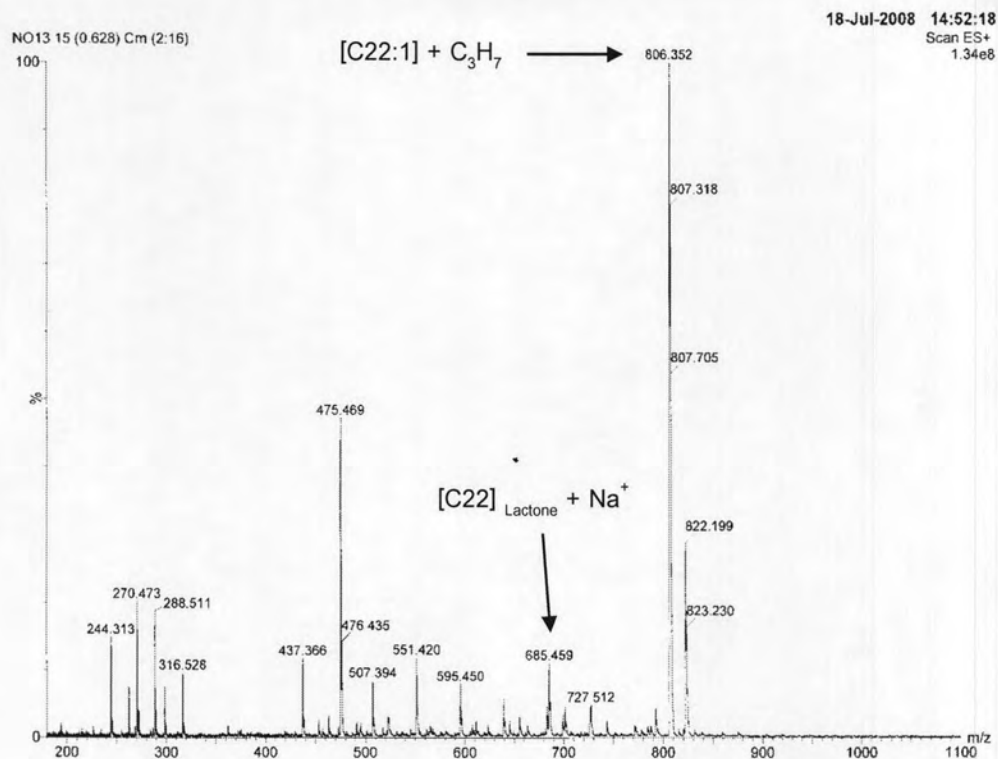
รูปที่ 4.21 โครมาโตแกรมของ LC-MS ของตัวอย่างสาร C



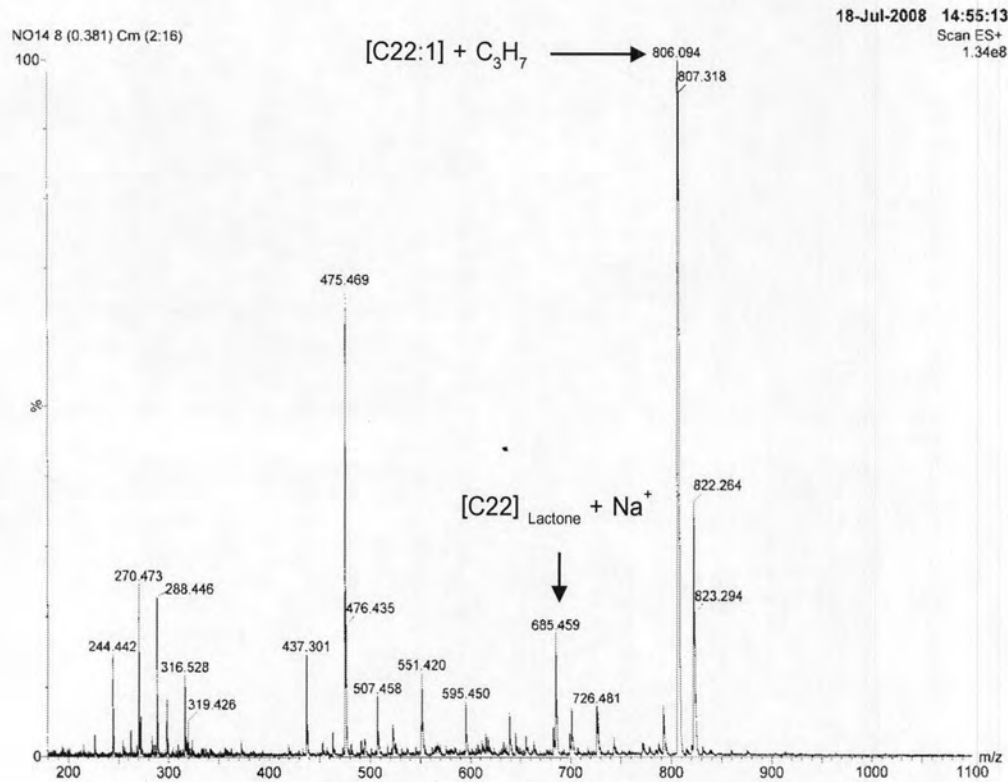
รูปที่ 4.22 โครมาโตแกรมของ LC-MS ของตัวอย่างสาร D



รูปที่ 4.23 โครมาโตแกรมของ LC-MS ของตัวอย่างสาร E



รูปที่ 4.24 โคโรมาโตแกรมของ LC-MS ของตัวอย่างสาร F



รูปที่ 4.25 โคโรมาโตแกรมของ LC-MS ของตัวอย่างสาร G

จากผลการวิเคราะห์สารด้วย LC-MS ข้างต้นบ่งบอกถึงน้ำหนักโมเลกุลของสารและสามารถวิเคราะห์โครงสร้างของสารที่ผลิตได้ ดังแสดงผลการวิเคราะห์ในตารางที่ 4.16

ตารางที่ 4.16 แสดงผลการวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ด้วย LC- MS

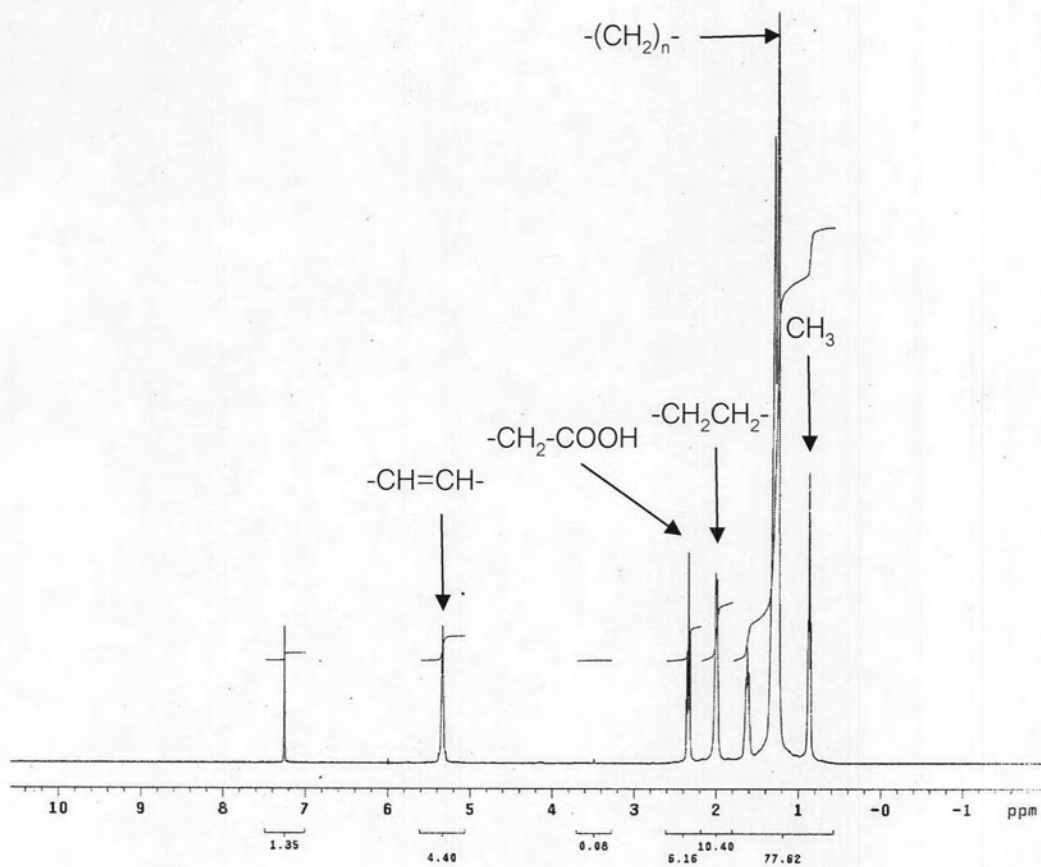
ตัวอย่างสาร	ค่า RT (นาที) จาก HPLC	ค่าที่วัดได้	มวลโมเลกุล	โครงสร้างสารไซโฟไลพิด
ตัวอย่างสาร A	7.460	685.465	662	$[C22]_{Lactone} + Na^+$ (R1=R2=H)
		726.477	702	$[C22:1]_{Lactone} + Na^+$ (R1=H, R2=COCH ₃ หรือ R1= COCH ₃ , R2=H)
		806.313	762	$[C22:1] + C_3H_7$ (R1=R2=COCH ₃)
ตัวอย่างสาร B	8.929	685.465	662	$[C22]_{Lactone} + Na^+$ (R1=R2=H)
ตัวอย่างสาร C	15.259	605.235	604	$[C18:1]_{Lactone}$ (R1=R2=H)
ตัวอย่างสาร D	19.233	685.465	662	$[C22]_{Lactone} + Na^+$ (R1=R2=H)
		726.540	702	$[C22:1]_{Lactone} + Na^+$ (R1=H, R2=COCH ₃ หรือ R1= COCH ₃ , R2=H)
		806.250	762	$[C22:1] + C_3H_7$ (R1=R2=COCH ₃)
ตัวอย่างสาร E	21.863	685.465	662	$[C22]_{Lactone} + Na^+$ (R1=R2=H)
		726.481	702	$[C22:1]_{Lactone} + Na^+$ (R1=H, R2=COCH ₃ หรือ R1= COCH ₃ , R2=H)

ตารางที่ 4.16 แสดงผลการวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ด้วย LC- MS (ต่อ)

ตัวอย่างสาร	ค่า RT (นาที) จาก HPLC	ค่าที่วัดได้	มวลโมเลกุล	โครงสร้างสารไซโฟลิพิด
ตัวอย่างสาร F	26.239	685.459	662	[C22] _{Lactone} +Na ⁺ (R1=R2=H)
		806.352	762	[C22:1] + C ₃ H ₇ (R1=R2=COCH ₃)
ตัวอย่างสาร G	31.308	685.459	662	[C22] _{Lactone} +Na ⁺ (R1=R2=H)
		806.094	762	[C22:1] + C ₃ H ₇ (R1=R2=COCH ₃)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากยีสต์ *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 พบว่ามีมวลโมเลกุลเท่ากับ 662 702 และ 762 ซึ่งเทียบเคียงได้กับสารไซโฟลิพิดที่มีโครงสร้างที่มีกรดไขมันเป็นองค์ประกอบของ C22 และ C22:1 ทั้งในรูป Acidic และ Lactonic form ที่มี R1 และ R2 เป็นทั้ง H COCH₃ และปลายสายของไฮโดรคาร์บอนที่มี C₃H₇

จากนั้นนำตัวอย่างสาร G ที่มีปริมาณมากพอไปวิเคราะห์ด้วยวิธี ¹H-NMR ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พบว่ามี ¹H-NMR spectrum ที่มีฟีกปรากฏในช่วง chemical shift ที่ 0.9 ppm เป็นหมู่เมทิล (-CH₃) ที่ 1.2 และ 2.0 ppm จะเป็นสายยาวไฮโดรคาร์บอน (-CH₂)_n ที่ 2.4 ppm เป็น -CH₂-COOH และพบพันธะคู่ -CH=CH- ที่ chemical shift ที่ 5.4 ppm ดังแสดงในรูปที่ 3.26



รูปที่ 4.26 1H -NMR spectrum ของตัวอย่าง G