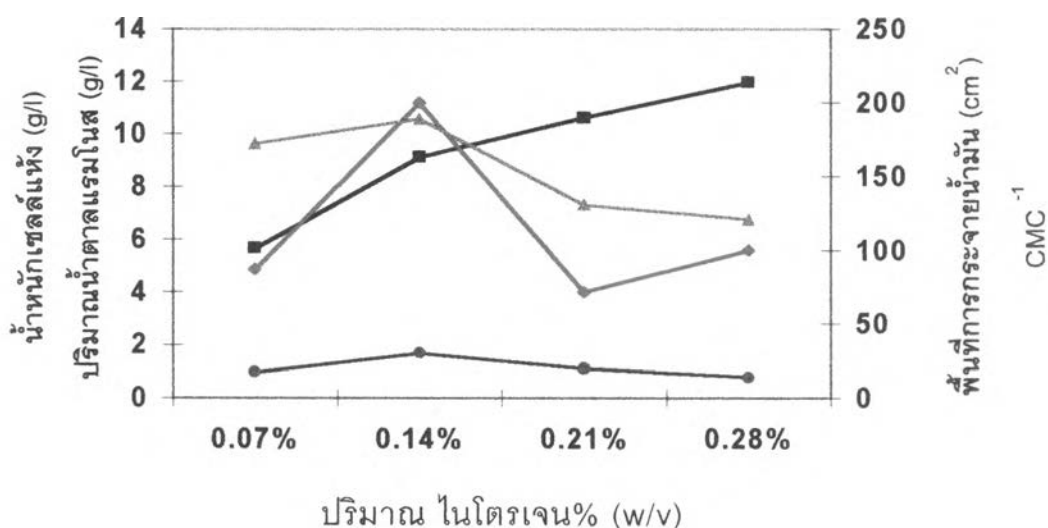


บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41

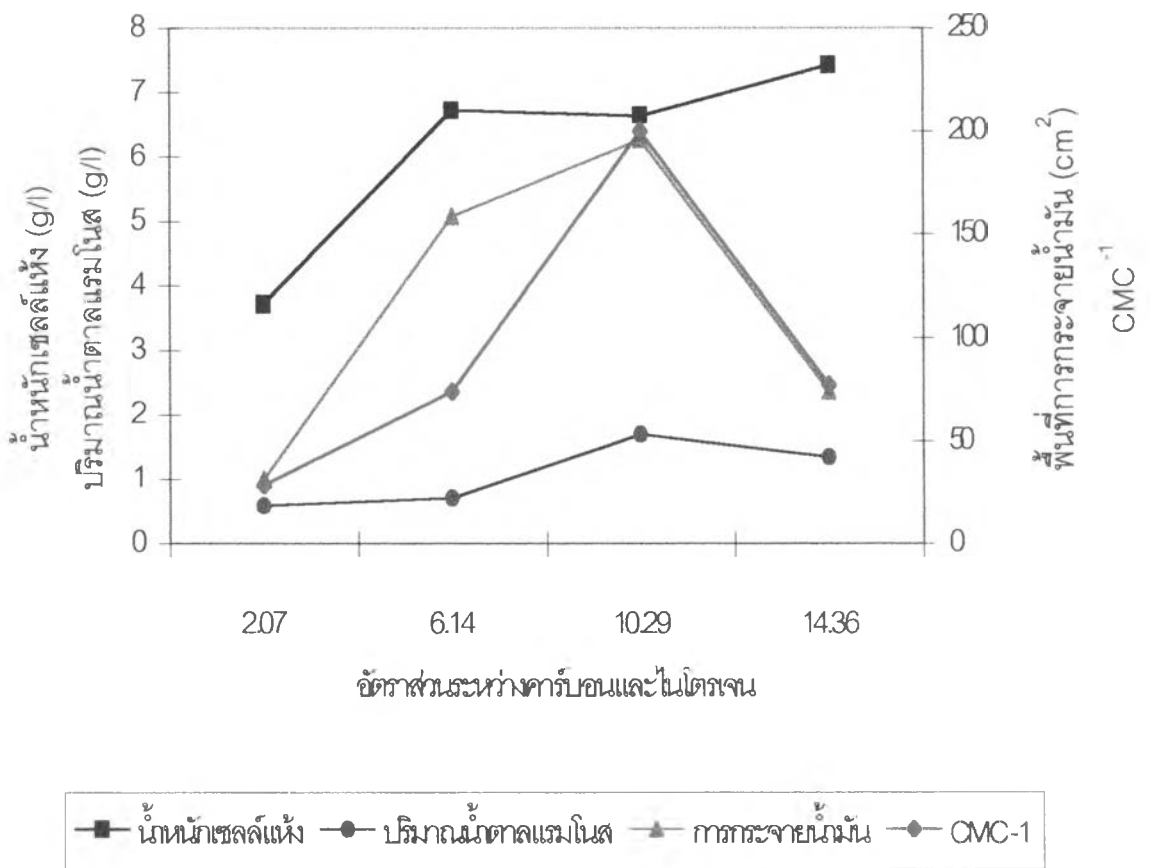
แบคทีเรียสายพันธุ์ A41 แยกได้จากน้ำในบริเวณดอนหอยหลอด จังหวัดสมุทรสงคราม เมื่อนำมาจำแนกตามวิธีของ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt และคณะ, 1994) พบว่าเป็น *Pseudomonas* sp. จึงเรียกว่า *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 และ เมื่อนำมาแปรชนิดของแหล่งไนโตรเจนพบว่า แอมโมเนียมไนเตรท เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 ใช้ได้ดีที่สุด ซึ่งข้อมูลข้างต้นมาจาก อารีย์ กังฉิน, 2542 วิทยานิพนธ์นี้จึงเริ่มจากการแปรปริมาณไนโตรเจนเพื่อที่จะหาอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ การแปรปริมาณไนโตรเจนจะแปรตั้งแต่ 0.07-0.28% (w/v) โดยจะแสดงผลดังรูป



- น้ำหนักเซลล์แห้ง
- ปริมาณน้ำตาลแรมโนส
- ◆ CMC -1
- ▲ การกระจายน้ำมัน

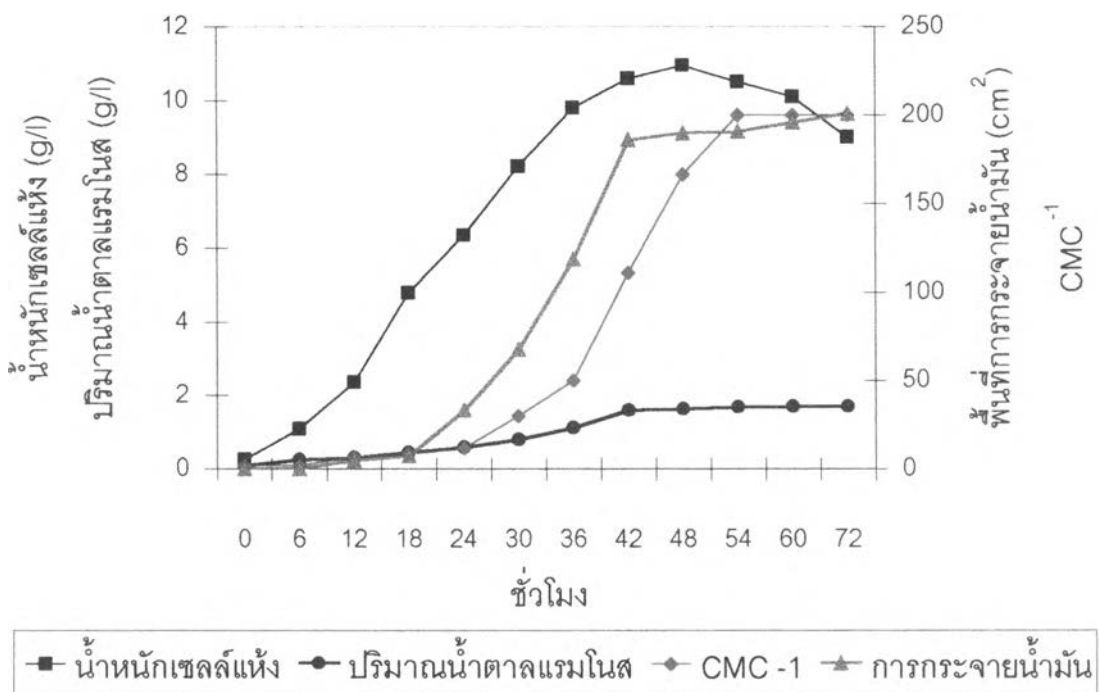
รูปที่ 4.1 ผลการแปรปริมาณไนโตรเจนของ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 ป่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 72 ชั่วโมง แล้วตรวจวัดน้ำหนักเซลล์แห้ง, ปริมาณน้ำตาลแรมโนส, การกระจายน้ำมัน และ CMC⁻¹ เพื่อเป็นปัจจัยในการเปรียบเทียบปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน

จากการแปรปริมาณไนโตรเจนพบว่าปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเท่ากับ 0.14 % (w/v) ซึ่งจะให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 9.12 กรัมต่อลิตร, ปริมาณน้ำตาลแรมโนสเท่ากับ 1.67 กรัมต่อลิตร, การกระจายน้ำมันเท่ากับ 188.69 cm^2 และ CMC^{-1} เท่ากับ 200 จากรูปที่ 1 จะเห็นได้ว่าค่า CMC^{-1} , ปริมาณน้ำตาลแรมโนส และการกระจายน้ำมันมากกว่าปริมาณไนโตรเจนค่าอื่นๆอย่างชัดเจน ดังนั้นจึงใช้ไนโตรเจนที่มีปริมาณเท่ากับ 0.14 % (w/v) ในการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนโดยแสดงผลดังรูป



รูปที่ 4.2 ผลของการแปรอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนของ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 72 ชั่วโมง แล้วตรวจวัดน้ำหนักเซลล์แห้ง, ปริมาณน้ำตาลแรมโนส, การกระจายน้ำมัน และ CMC^{-1} เพื่อเป็นปัจจัยในการเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน

จากผลของการแปรอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนพบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพพบว่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนเท่ากับ 10.29 จะให้ปริมาณน้ำตาลแรมโนสเท่ากับ 1.70 กรัมต่อลิตร, การกระจายน้ำมันเท่ากับ 196.06 cm^2 และ CMC^{-1} เท่ากับ 200 ซึ่งเป็นค่าที่มากที่สุดเมื่อเทียบกับอัตราส่วนอื่นๆ ดังนั้นกล่าวได้ว่าภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพคือที่อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนเท่ากับ 10.29 ซึ่งใช้ที่ภาวะดังกล่าวศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ณ เวลาต่างๆ ตามรูปที่ 4.3



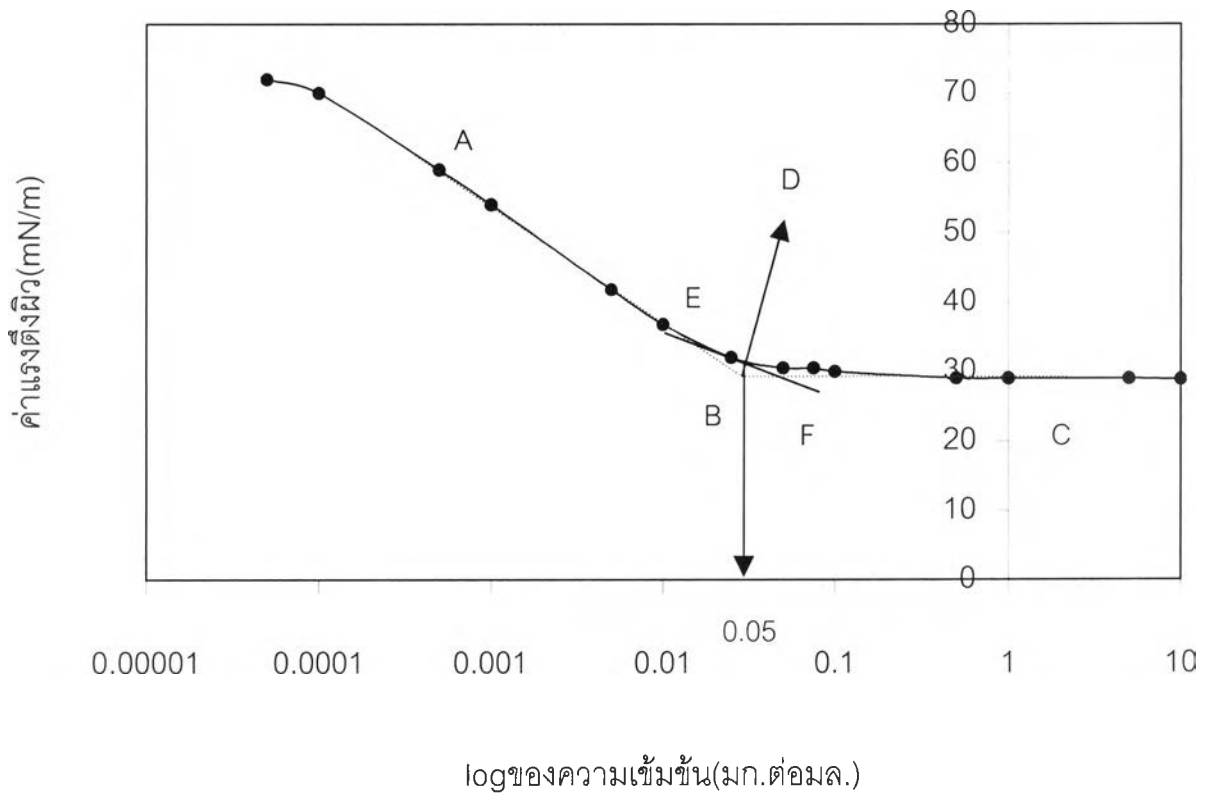
รูปที่ 4.3 ผลการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เวลาต่างๆ จากปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ปริมาณน้ำตาลแรมโนส, ค่าการกระจายน้ำมัน และ CMC^{-1}

จากรูปที่ 4.3 แสดงให้เห็นว่าปริมาณน้ำตาลแรมโนส และค่าการกระจายน้ำมันมีค่าคงที่ที่ 42 ชั่วโมง แต่ค่าการกระจายน้ำมันเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนสิ้นสุดการทดลอง อย่างไรก็ตามได้เลือกเวลาที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ 72 ชั่วโมงซึ่งมีค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 201.06 cm^2 , ปริมาณน้ำตาลแรมโนสเท่ากับ 1.7 กรัมต่อลิตร และ ค่า CMC^{-1} เท่ากับ 200 ทั้งนี้เนื่องจากน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ที่มีลักษณะใสเหมาะต่อการที่จะนำไปทำให้บริสุทธิ์ในขั้นต่อไป ในขณะที่น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ที่เวลา 42 ชั่วโมงมีลักษณะขุ่นและเป็นคอลลอยด์ทำให้ยากต่อการทำบริสุทธิ์ จากการ

ทดสอบหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพข้างต้นกล่าวได้ว่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ 10.29 โดยใช้ไขมันปาล์มซึ่งมีปริมาณคาร์บอนเท่ากับ 71.907 % (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน และมีแอมโมเนียมไนเตรทซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.14%(w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจนและใช้ระยะเวลาในการบ่มเท่ากับ 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง อัตราเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที

4.2 สมบัติทางชีวเคมีของสารลดแรงตึงผิวที่บริสุทธิ์บางส่วน

4.2.1 การหา Critical Micelle Concentration (CMC) จากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้รับการทำบริสุทธิ์บางส่วน

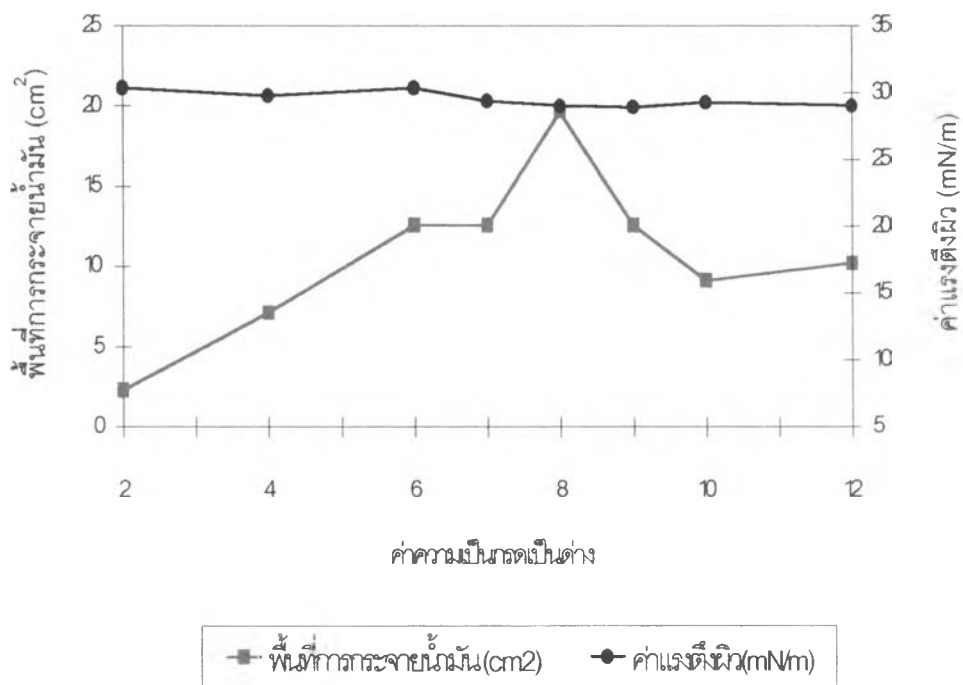


รูปที่ 4.4 แสดงการหาค่า CMC ซึ่งเขียนกราฟระหว่างค่าแรงตึงผิวและlogของความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วน

จุดตัด B ได้จากเส้นสัมผัส AB และ BC แล้วลากจากจุด B ตั้งฉากกับเส้น EF สุดท้ายได้จุด D เมื่อลากเส้นตรงจากจุด D ตั้งฉากกับแกน X ก็จะได้ค่า CMC เท่ากับ 50 มก.ต่อลิตร และค่า γ_{CMC} (ค่าแรงตึงผิว ณ การเกิดไมเซลล์) เท่ากับ 30 mN/m

4.2.2 การหาค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสม

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ทำบริสุทธิ์บางส่วนมา 10 มก.ต่อ มล. ใน 50 มิลลิโมลาร์ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรดเป็นด่างตั้งแต่ 2-12 แล้ววัดการกระจายน้ำมันและค่าแรงตึงผิวตามข้อ 3.2.3 และ 3.2.2



รูปที่ 4.5 แสดงค่าการกระจายน้ำมันและค่าแรงตึงผิวเมื่อความเป็นกรดเป็นด่างตั้งแต่ 2-12

จากรูป 4.5 แสดงให้เห็นว่าค่าแรงตึงผิวมีค่าไม่เปลี่ยนแปลงมากนักคืออยู่ในช่วง 29-30.4 mN/m เมื่อมีค่าความเป็นกรดเป็นด่างตั้งแต่ 2-12 อาจกล่าวได้ว่าที่ค่าความเป็นกรดสูงและที่ค่าความเป็นด่างมากไม่มีผลต่อค่าแรงตึงผิวต่างจากการกระจายน้ำมันพบว่าพื้นที่การกระจายน้ำมันสูงสุดเท่ากับ 19.63 cm² ที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 8 กล่าวได้ว่าที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่างระหว่าง 2 - 4 และ

9 - 12 มีพื้นที่การกระจายน้ำมันน้อย ช่วงค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสมของการกระจายน้ำมัน ประมาณ 7 - 9

4.2.3 ความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อความเป็นกรดเป็นด่าง

ทำการทดสอบหาความเสถียรต่อความเป็นกรดเป็นด่างโดยนำสารลดแรงตึงผิวที่บริสุทธิ์บางส่วนมาปรับให้ได้ความเข้มข้น 10 มก.ต่อมล. ใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดเป็นด่างตั้งแต่ 2-12 โดยทำซ้ำ 3 ชุดการทดลอง หาความเสถียรโดยการตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเก็บตัวอย่างมาทดสอบทุกๆ 10 วันในสามเดือนแรกจากนั้นค่อยเก็บตัวอย่างทุก 1 เดือนเป็นเวลานาน 6 เดือน การวัดการกระจายน้ำมันและค่าแรงตึงผิวจะวัดที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 8 ด้วยการนำมาเจือจางด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 8 จากตารางที่ 4.1 ความเป็นกรดเป็นด่างไม่มีผลต่อค่าแรงตึงผิวเห็นได้ค่าแรงตึงผิวโดยมีค่าอยู่ระหว่าง 29-30 mN/m ตลอดระยะเวลา 6 เดือนในทุกๆค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ส่วนการกระจายน้ำมันจากตารางที่ 4.2 ที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่างระหว่าง 2-6 มีพื้นที่การกระจายน้ำมัน 5.9-7.1 cm² ตั้งแต่แรกจนตลอดระยะเวลาทำการทดลอง ซึ่งเมื่อปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างกลับเป็น 8 แล้วน่าจะมีค่าประมาณ 11-12 cm² (ความเข้มข้นที่ทำการวัดค่าการกระจายน้ำมันประมาณ 0.1 มก.ต่อมล.) อาจกล่าวได้ว่าที่ความเป็นกรดเป็นด่างที่ 2-6 ความเสถียรของการกระจายน้ำมันลดลงเกือบ 50 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 8-12 พื้นที่การกระจายน้ำมันอยู่ระหว่าง 10-12.5 cm² ตลอดระยะเวลา 6 เดือนดังนั้นค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 8-12 มีความเสถียรมากกว่าที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 2-6

ตารางที่ 4.1 แสดงความเสถียรของค่าแรงดึงผิวที่มีต่อค่าความเป็นกรดเป็นด่างในระยะเวลาต่างๆ

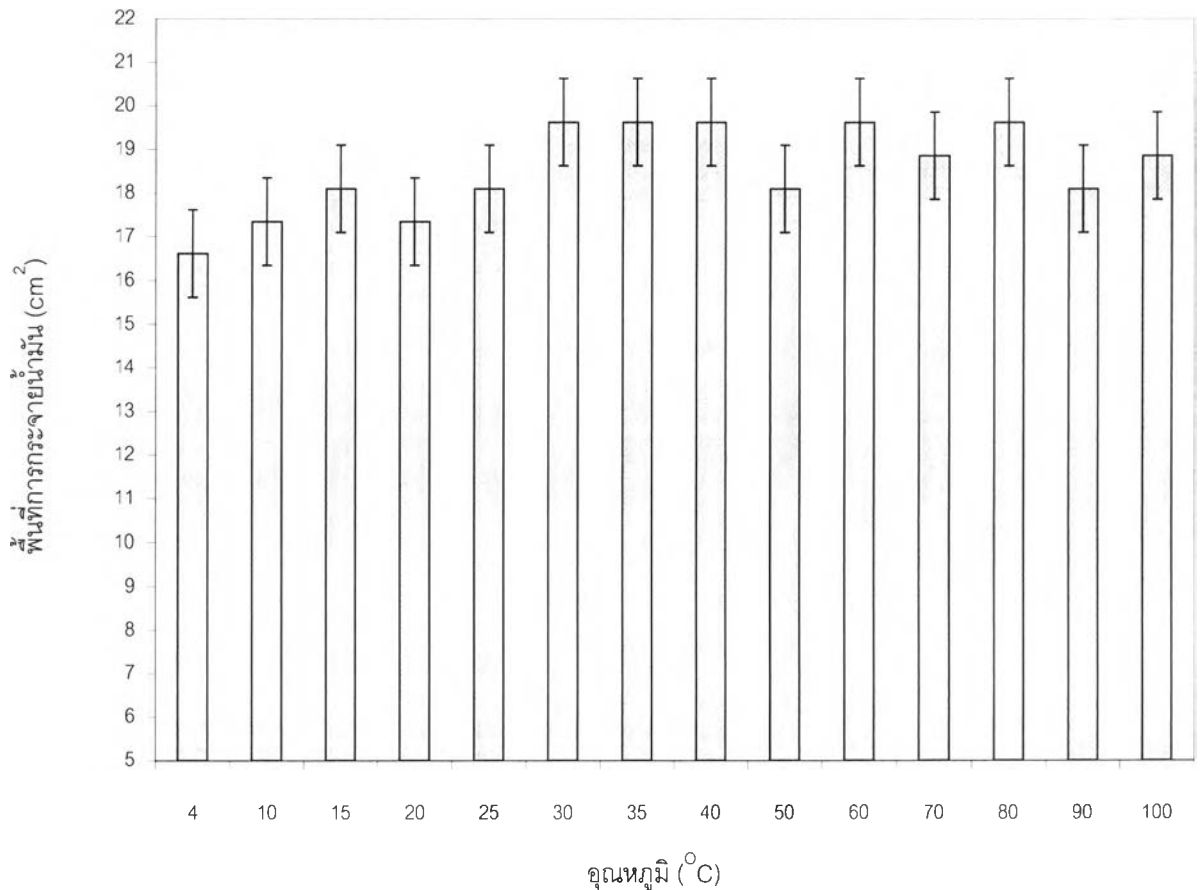
ระยะเวลา	ค่าแรงดึงผิว (mN/m)					
	ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง					
	2	4	6	8	10	12
10 วัน	29.5	28.9	29.0	29.0	29.0	29.0
20 วัน	30.0	29.0	29.8	29.5	29.9	29.0
30 วัน	29.5	30.0	29.0	29.0	30.0	29.0
40 วัน	30.0	29.0	29.0	29.5	29.0	30.0
50 วัน	29.7	29.0	29.0	29.0	29.0	29.0
60 วัน	29.5	29.7	29.5	29.5	29.5	29.0
70 วัน	29.0	29.0	29.0	29.0	29.0	29.5
80 วัน	29.1	28.9	29.5	29.0	29.5	29.5
90 วัน	29.0	29.0	29.0	29.0	29.0	29.0
4 เดือน	29.0	29.0	29.5	29.0	29.5	29.0
5 เดือน	29.5	29.0	29.5	29.5	29.0	29.0
6 เดือน	29.0	29.5	29.5	29.0	29.5	29.0

ตารางที่ 4.2 แสดงความเสถียรของการกระจายน้ำมันที่มีต่อค่าความเป็นกรดเป็นด่างในระยะเวลาต่างๆ

ระยะเวลา	ค่าการกระจายน้ำมัน (cm ²)					
	ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง					
	2	4	6	8	10	12
10 วัน	6.6	5.94	6.3	12.6	11.1	10.2
20 วัน	7.1	7.1	6.4	12.6	10.2	10.1
30 วัน	6.6	7.1	6.0	11.1	10.1	10.2
40 วัน	7.1	6.6	6.6	11.1	11.1	10.5
50 วัน	6.6	7.1	7.1	10.2	11.0	11.1
60 วัน	7.1	6.6	7.1	11.1	11.2	10.5
70 วัน	6.6	7.1	6.1	12.6	10.3	10.8
80 วัน	6.6	7.1	7.1	11.1	11.2	10.1
90 วัน	6.8	7.0	7.0	12.0	11.5	11.0
4 เดือน	6.8	7.0	7.0	12.5	11.5	10.6
5 เดือน	7.0	6.8	6.8	11.8	11.2	11.0
6 เดือน	7.0	7.0	7.0	12.5	11.5	10.5

4.2.4 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนมา 10 มก.ต่อ มล. ใน 50 มิลลิโมลาร์ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 8 นำไว้ที่อุณหภูมิต่างๆดังรูป 4.6 ที่ซึ่งไว้นสารละลายสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมินั้นๆ(ประมาณ 5-10 นาที) แล้ววัดการกระจายน้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ความเข้มข้น 0.1 มก.ต่อ มล.ตามข้อ 3.2.3 ทั้งนี้



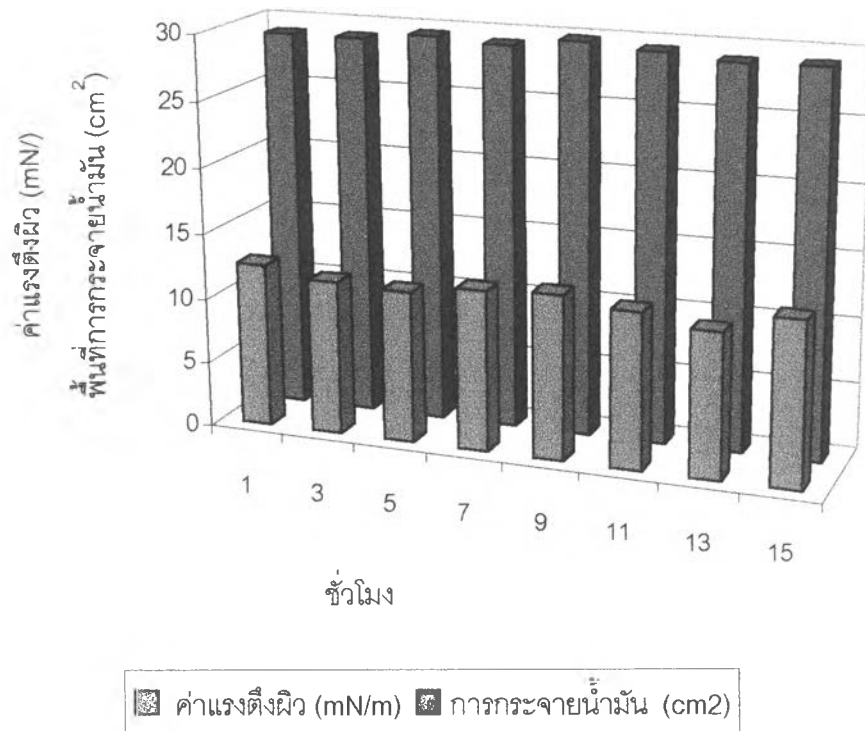
รูปที่ 4.6 แสดงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนโดยวัดการทำงานจากค่ากระจายน้ำมัน

เหตุผลที่วัดเฉพาะการกระจายน้ำมันเพราะไม่สามารถควบคุมอุณหภูมิขณะวัดแรงตึงผิวได้และเมื่ออุณหภูมิเปลี่ยนของวงทองคำขาวที่ใช้วัดค่าแรงตึงผิวในเครื่องวัดค่าแรงตึงผิว (tensiometer) เกิดการขยายและหดตัวต่างกันทำให้เส้นรอบวงเปลี่ยนไปอาจทำให้ค่าแรงตึงผิวผิดพลาดได้ จากรูปที่ 4.6 เมื่อวัดการกระจายน้ำมันที่อุณหภูมิตั้งแต่ 4-100 °C และพื้นที่การกระจายน้ำมันอยู่ระหว่าง 16.62-19.63 cm²

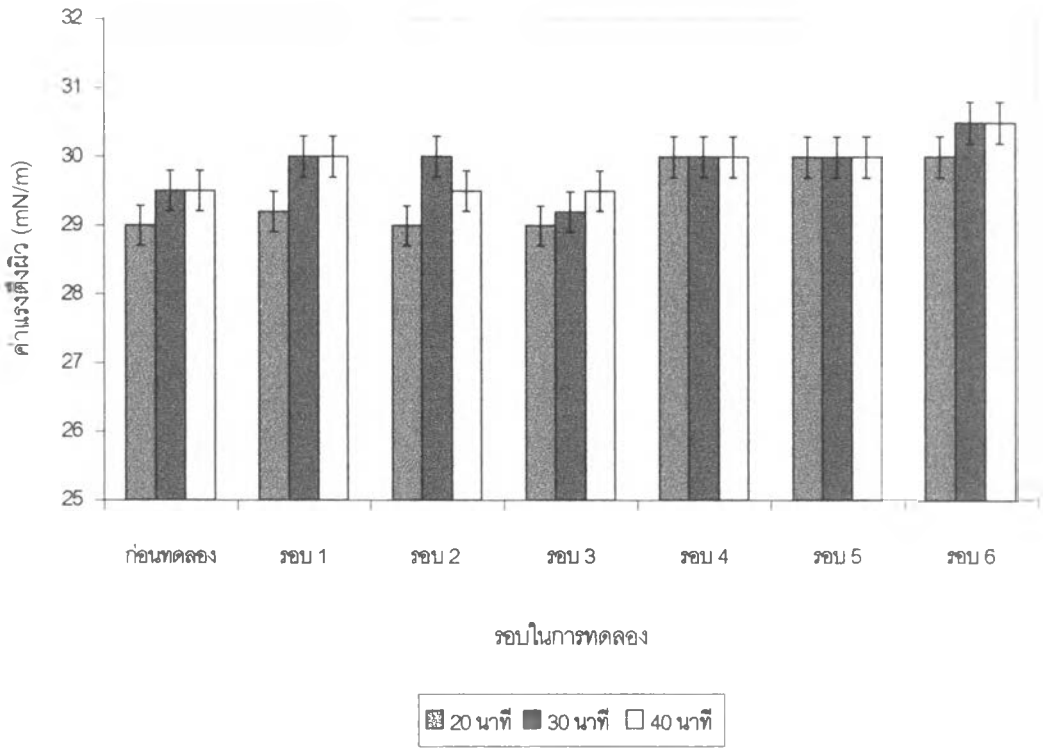
แถบแสดงความผิดพลาดเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์กล่าวได้ว่าการกระจายน้ำมันที่อุณหภูมิต่างๆตามรูปข้างต้นมีค่าแตกต่างกันไม่เกิน 5 เปอร์เซ็นต์ดังนั้นอุณหภูมิจึงไม่มีผลต่อการกระจายน้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วน

4.2.5 ความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่ออุณหภูมิ

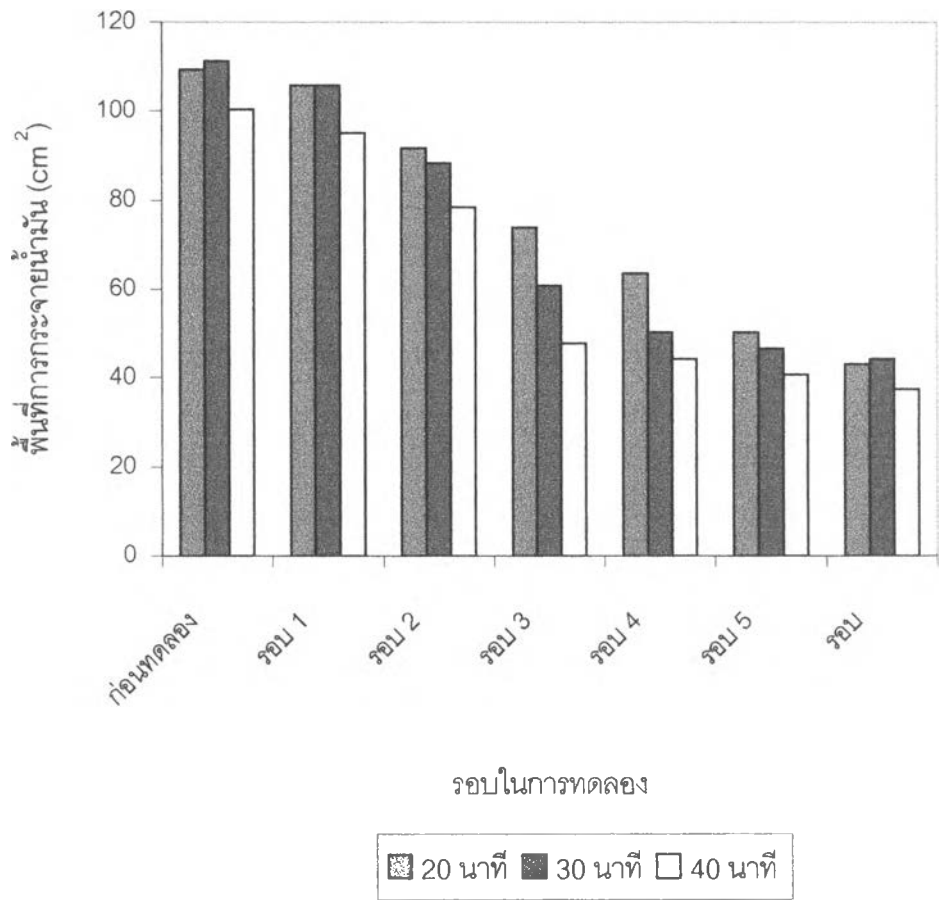
นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนมา 10 มก.ต่อ มล. ใน 50 มิลลิโมลาร์ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ ซึ่งแบ่งการทดลองเป็น 2 ตอนได้แก่ ความเสถียรที่อุณหภูมิเท่ากับ 100°C และ ความเสถียรที่ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว(ภาวะที่ใช้ฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ) โดยวัดการกระจายน้ำมันตามข้อ 3.2.3 และ ค่าแรงตึงผิวตามข้อ 3.2.2 โดยก่อนที่จะวัดให้ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20-30 นาที



รูปที่ 4.7 ความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านความร้อน 100°C นาน 15 ชั่วโมง วิเคราะห์จากค่าแรงตึงผิวและการกระจายน้ำมัน

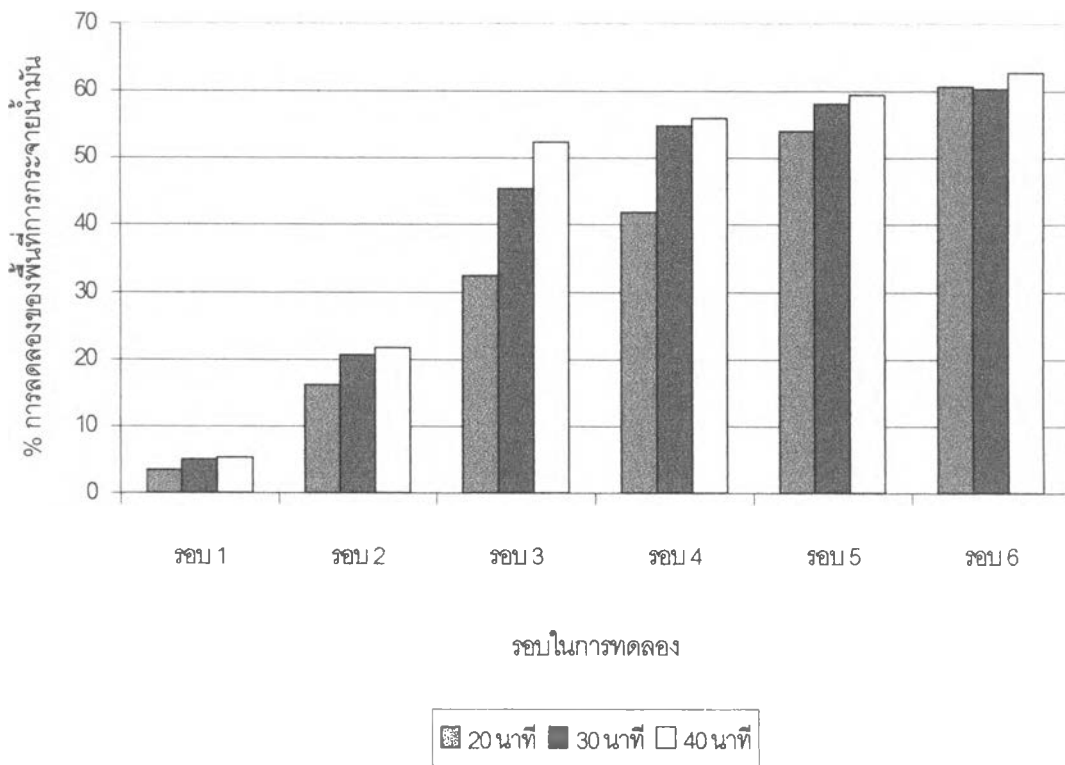


รูปที่ 4.8 ความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวซึ่งภาพที่ผ่านความร้อน 121°C เป็นเวลา 20, 30 และ 40 นาที 1 – 6 รอบ วิเคราะห์ค่าแรงตึงผิว



รูปที่ 4.9 แสดงความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านความร้อน 121°C เป็นเวลา 20, 30 และ 40 นาที 1 – 6 รอบ วิเคราะห์การกระจายน้ำมัน

จากรูปที่ 4.7 จะเห็นได้ว่าทั้งค่าแรงตึงผิวจะอยู่ระหว่าง 29-30 mN/m และการกระจายน้ำมันอยู่ระหว่าง 11.0-12.6 cm² โดยตลอด 15 ชั่วโมงแถบไม่มีการเปลี่ยนจากกล่าวได้ว่าที่อุณหภูมิ 100 °C นาน 15 ชั่วโมงไม่มีผลต่อค่าแรงตึงผิวและการกระจายน้ำมัน ในรูปที่ 4.8 ตลอดทำการทดลองทั้ง 6 รอบค่าแรงตึงผิวจะอยู่ระหว่าง 29-30.5 mN/m และแถบแสดงความผิดพลาดไม่มากไปกว่า 1 เปอร์เซ็นต์และรูปที่ 4.9 พื้นที่การกระจายน้ำมันจะลดตามจำนวนรอบในการทดลองจึงได้คำนวณเปอร์เซ็นต์การลดลงตามรูปที่ 4.10



รูปที่ 4.10 แสดงเปอร์เซ็นต์การลดลงของพื้นที่การกระจายน้ำมันทั้ง 6 รอบใน 20, 30 และ 40 นาที

$$\text{เปอร์เซ็นต์การลดลงของพื้นที่การกระจายน้ำมัน} = \frac{B-A}{B} \times 100$$

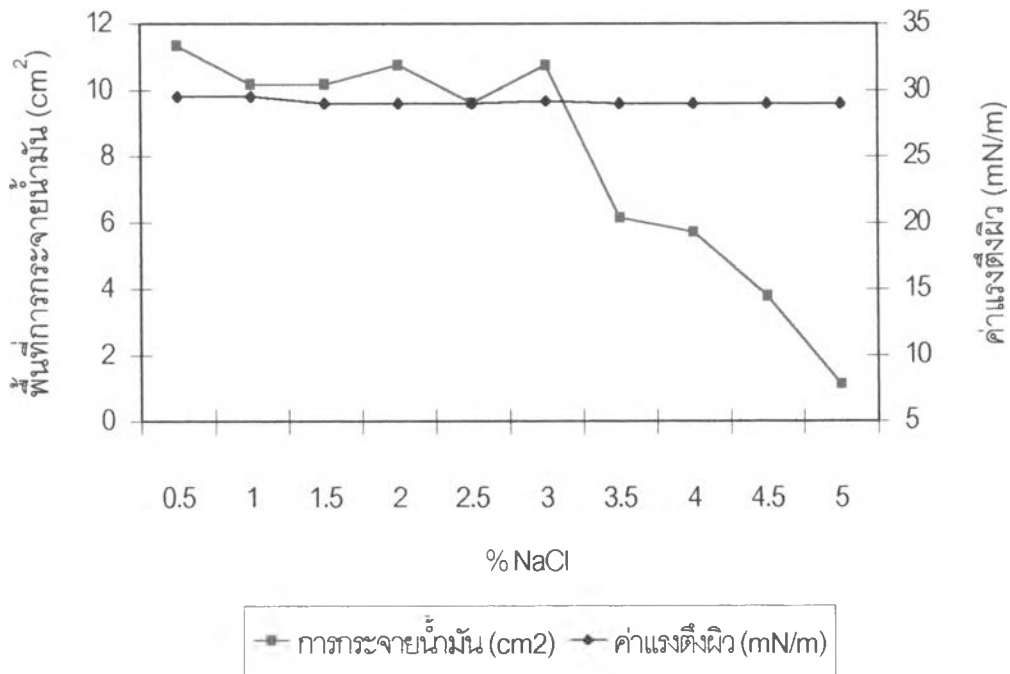
A คือ พื้นที่การกระจายน้ำมันในครั้งที่ทำการทดลอง

B คือ พื้นที่การกระจายน้ำมันก่อนการทดลอง

จากรูปที่ 4.10 พบว่าการกระจายน้ำมันในการทดลองครั้งที่ 1 ลดลงน้อยมากในทุกระยะเวลาที่ 121°C คือลดไม่ถึง 10 % จะมีเปอร์เซ็นต์การลดลงมากกว่า 50 % เมื่อทดลองครั้งที่ 3 ระยะเวลา 40 นาที ระยะเวลา 30 นาที ที่การทดลองครั้งที่ 4 และระยะเวลา 20 นาที ที่การทดลองครั้งที่ 5

4.2.6 ความเข้มข้นของ NaCl ต่อการทำงานของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนมา 10 มก.ต่อ มล. ใน 50 มิลลิโมลาร์ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 8 โดยแปรความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ตั้งแต่ 0.5-5.0% (w/v)



รูปที่ 4.11 แสดงเปอร์เซ็นต์ของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการกระจายน้ำมันและค่าแรงตึงผิว

จากรูปที่ 4.11 พบว่าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ 0.5 – 5.0% ไม่มีผลต่อค่าแรงตึงผิวซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 29-29.5 mN/m แต่มีผลต่อการกระจายน้ำมันโดยค่าของพื้นที่การกระจายน้ำมันจะเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยซึ่งอยู่ระหว่าง 11.3-10.8 cm² ในช่วงความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 0.5-3.0 % เมื่อความเข้มข้นตั้งแต่ 3.5% เป็นต้นไปพื้นที่การกระจายน้ำมันจะลดลงอย่างต่อเนื่องจนที่ความเข้มข้นเท่ากับ 5.0% พื้นที่การกระจายน้ำมันเท่ากับ 1.13 cm²

4.2.7 ความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อความเข้มข้นของ NaCl

ในการหาความเสถียรต่อปริมาณของโซเดียมคลอไรด์นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนมาปรับให้เป็น 10 มก.ต่อ มล. ใน 50 มิลลิโมลาร์ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 8 โดยแปรความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ตั้งแต่ 0.5-5.0% (w/v) แล้วเจือจาง 100 เท่าด้วย 50 มิลลิโมลาร์ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 8 ซึ่งสุดท้ายจะมีความเข้มข้นเหลือ 0.005-0.5% ตามตารางที่ 4.3 ค่าแรงตึงผิวอยู่ระหว่าง 29.0-29.5 mN/m ตลอด 6 เดือนในทุกๆความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์หมายถึงความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ไม่มีผลต่อค่าแรงตึงผิว แต่การกระจายน้ำมันในตารางที่ 4.4 ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ตั้งแต่ 0.5-3.0 เปอร์เซ็นต์พื้นที่การกระจายน้ำมันอยู่ที่ 12-10 cm² ตลอดระยะเวลาทำการทดลอง



ตารางที่ 4.3 ความเสถียรของค่าแรงตึงผิวต่อค่าความเข้มข้นต่างๆ ของโซเดียมคลอไรด์

ระยะ เวลา	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)									
	ความเข้มข้นของ NaCl (%w/v)									
	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0
10 วัน	29.5	29.0	29.3	29.4	29.1	29.4	29.3	29.0	29.5	29.0
20 วัน	29.0	29.5	29.4	29.1	29.3	29.0	29.1	29.0	29.0	29.5
30 วัน	29.0	29.0	29.4	29.3	29.4	29.1	29.4	29.3	29.3	29.4
40 วัน	29.5	29.1	29.3	29.1	29.3	29.1	29.4	29.0	29.4	29.1
50 วัน	28.8	29.0	29.4	29.1	29.3	29.0	29.3	29.3	29.1	29.3
60 วัน	29.1	29.3	29.2	29.1	29.1	29.4	29.1	29.3	29.4	29.0
70 วัน	29.3	29	29.2	29.3	29.4	29.4	29.0	29.1	29.3	29.1
80 วัน	29.5	29.6	29.4	29.5	29.3	29.4	29.7	29.1	29.0	29.0
90 วัน	29.7	29.6	29.4	29.1	29.8	29.3	29.4	29.5	29.0	29.1
4 เดือน	29.5	29.1	29.3	29.1	29.3	29.1	29.4	29.0	29.0	29.4
5 เดือน	29.8	29.0	29.4	29.1	29.3	29.0	29.3	29.3	29.3	29.1
6 เดือน	29.1	29.3	29.2	29.1	29.1	29.4	29.1	29.3	29.3	29.0

ตารางที่ 4.4 ความเสถียรของการกระจายน้ำมันต่อค่าความเข้มข้นต่างๆ ของโซเดียมคลอไรด์

ระยะ เวลา	ค่าการกระจายน้ำมัน (cm ²)									
	ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (%w/v)									
	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0
10 วัน	12.5	11.3	10.8	10.8	10.8	10.8	6.2	5.7	4.9	1.1
20 วัน	12.6	11.4	10.8	10.8	10.8	10.8	6.2	5.7	4.9	1.1
30 วัน	12.6	11.3	10.8	10.8	10.8	10.6	6.1	5.7	4.9	1.2
40 วัน	12.3	11.3	10.8	10.8	10.7	10.8	6.0	5.8	4.9	1.1
50 วัน	12.4	11.3	10.7	10.7	10.6	10.8	6.1	5.7	4.9	1.2
60 วัน	12.4	11.4	10.6	10.6	10.6	10.8	6.0	5.5	4.9	1.2
70 วัน	12.4	11.4	10.7	10.7	10.7	10.6	6.1	5.6	4.8	1.2
80 วัน	12.4	11.3	10.7	10.6	10.7	10.6	6.1	5.6	4.9	1.2
90 วัน	12.4	11.4	11.0	10.6	10.7	10.6	6.0	5.7	4.9	1.2
4 เดือน	12.4	11.3	10.7	10.7	10.7	10.8	6.1	5.8	4.9	1.1
5 เดือน	12.4	11.3	10.7	10.7	10.7	10.8	6.1	5.7	4.9	1.2
6 เดือน	12.4	11.4	10.6	10.7	10.7	10.8	6.1	5.7	4.5	1.2

4.2. ค่าอิมัลชัน อินเด็กซ์

การหาค่าอิมัลชัน อินเด็กซ์นั้นจะวิเคราะห์กับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทั้งในรูปแบบน้ำเลี้ยงปราศจากเซลล์จากข้อ 3.6.1 และในรูปแบบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนจากข้อ 3.6.2 ที่ความเข้มข้น 10 มก.ต่อ มล. โดยวัดค่าอิมัลชัน อินเด็กซ์ตามข้อ 3.7.8 ทั้งนี้หากใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนที่ความเข้มข้นต่ำมาก (ต่ำกว่า 10 มก.ต่อ มล.) อิมัลชันที่เกิดขึ้นจะไม่เสถียรคือ ไม่สามารถวัดได้หลังจากระยะเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.5 แสดงค่าอิมัลชัน อินเด็กซ์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนต่อตัวทำละลาย อินทรีย์ชนิดต่างๆ

ประเภทของตัวทำละลายอินทรีย์	ค่าความเป็นขี้	ค่าอิมัลชัน อินเด็กซ์ (%)					
		24 ชั่วโมง		7 วัน		30 วัน	
		น้ำเลี้ยงเชื้อ	สารบริสุทธิ์บางส่วน	น้ำเลี้ยงเชื้อ	สารบริสุทธิ์บางส่วน	น้ำเลี้ยงเชื้อ	สารบริสุทธิ์บางส่วน
ไซโคลเฮกเซน	0.0	75.56	67.12	70.00	61.52	0.00	36.59
เฮกเซน	0.0	61.64	63.89	60.05	63.21	0.00	61.11
โทลูอีน	0.4	44.76	70.83	40.00	68.85	0.00	60.38
ไซลีน	2.3	45.21	71.13	41.25	70.00	0.00	68.57
เบนซีน	2.4	44.37	70.14	0.00	69.82	0.00	55.74
ไดคลอโรมีเทน	3.0	62.50	67.13	62.00	67.03	62.00	65.67
คลอโรฟอร์ม	3.4	79.73	68.49	75.58	68.0	0.00	62.50
เอทิลอะซิเตด	4.3	84.62	65.15	80.00	60.87	2.89	0.00
เอทิลเมทิลคีโตน	4.5	55.24	0.00	52.00	0.00	0.00	0.00

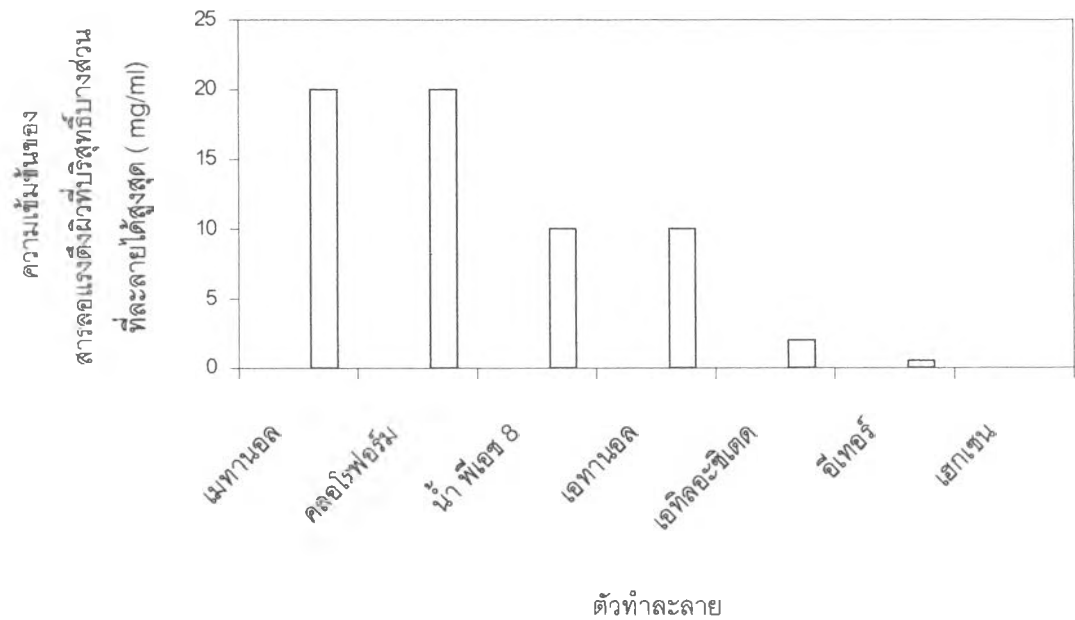
ตารางที่ 4.6 แสดงค่าอิมัลชัน อินเด็กซ์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนต่อน้ำมันชนิดต่างๆ

ชนิดของน้ำมัน	ค่าอิมัลชัน อินเด็กซ์ (%)					
	24 ชั่วโมง		7 วัน		30 วัน	
	น้ำ เลี้ยงเชื้อ	สาร บริสุทธิ์ บางส่วน	น้ำ เลี้ยงเชื้อ	สาร บริสุทธิ์ บางส่วน	น้ำ เลี้ยงเชื้อ	สาร บริสุทธิ์ บางส่วน
น้ำมันก๊าด	18.24	70.14	11.10	67.11	4.05	11.59
น้ำมันพาราฟิน	69.23	56.67	65.87	56.12	8.00	54.79
น้ำมันปาล์ม	83.33	60.81	80.88	57.26	36.76	41.10
น้ำมันถั่วเหลือง	74.64	68.92	71.58	62.88	14.45	37.84
น้ำมันมะกอก	66.12	58.87	59.56	58.23	13.06	42.86

จากตารางที่ 4.5 ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ให้อิมัลชัน อินเด็กซ์มากที่สุดใน 24 ชั่วโมงแรกในน้ำเลี้ยงเชื้อคือเอทิลอะซิเตด และในสารบริสุทธิ์บางส่วนคือ ไชลีน เหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากองค์ประกอบในน้ำเลี้ยงเชื้อมีพวกโปรตีนปะปนมามากและในขณะที่ปริมาณแรมโนลิปิดต่อปริมาตรน้อยกว่าในสารบริสุทธิ์บางส่วน จึงอาจเป็นเหตุให้ความเสถียรของอิมัลชันจากน้ำเลี้ยงเชื้อน้อยกว่าจากสารลดแรงตึงผิวเนื่องจากที่ 30 วัน อิมัลชัน อินเด็กซ์จากน้ำเลี้ยงเชื้อมีค่าเป็นศูนย์ในตัวทำละลายอินทรีย์เกือบทั้งหมดยกเว้น ไดคลอโรมีเทน และ เอทิลอะซิเตด และอิมัลชัน อินเด็กซ์จากสารบริสุทธิ์บางส่วนยังคงอยู่ แต่ที่ 90 วัน ค่าอิมัลชัน อินเด็กซ์มีค่าเป็นศูนย์ในทั้งอิมัลชันฟรายเออร์จากน้ำเลี้ยงเชื้อและสารบริสุทธิ์บางส่วนในตัวทำละลายอินทรีย์ทุกชนิด แต่เมื่อสารอินทรีย์เป็นพวกน้ำมันสามารถเกิดอิมัลชันกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนมีค่าอิมัลชัน อินเด็กซ์มากในน้ำมันส่วนใหญ่ และค่าอิมัลชัน อินเด็กซ์ลดลงไม่เกิน 50 เปอร์เซ็นต์เมื่อเวลาผ่านไป 30 วัน ในน้ำมันพาราฟิน น้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลืองและน้ำมันมะกอก แต่เมื่อเวลาผ่านไป 90 วันไม่สามารถตรวจวัดค่าอิมัลชัน อินเด็กซ์ในน้ำมันทุกชนิดเช่นกัน

4.2.9 สมบัติการละลายของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วน

ทำการทดลองโดยใช้ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนโดยแปรความเข้มข้น 0.5 - 40 มก.ต่อมล. ทดสอบการละลายใน เมทานอล, เอทานอล, เฮกเซน, คลอโรฟอร์ม, อีเทอร์, เอทิลอะซิเตด และ 50 มิลลิโมลาร์ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 8

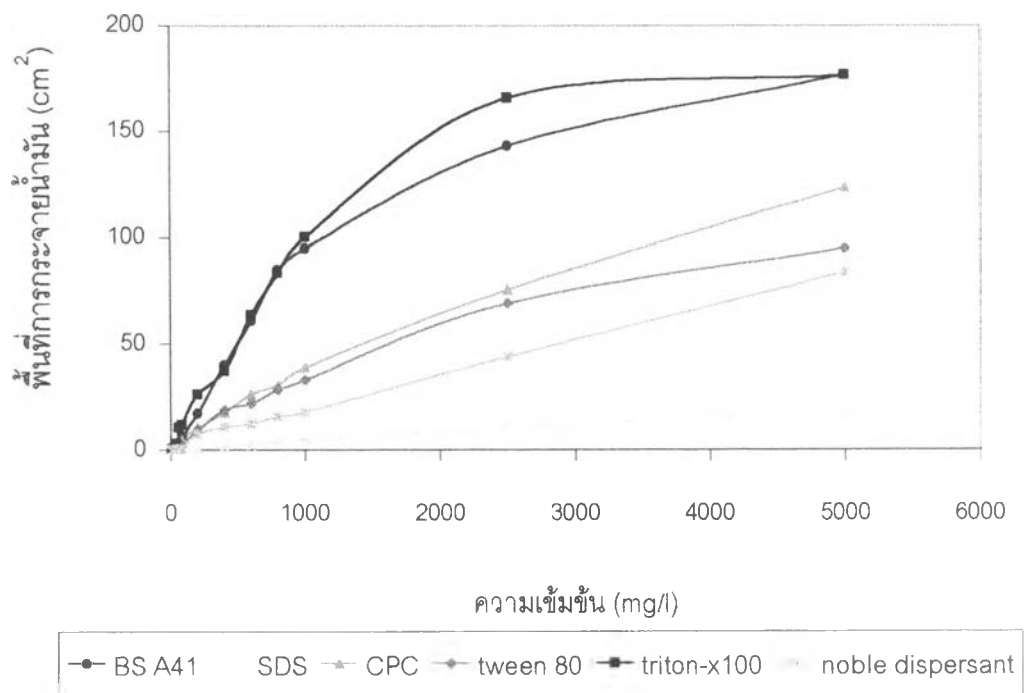


รูปที่ 4.12 แสดงการละลายของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41. ในตัวทำละลายชนิดต่างๆ

พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก *Pseudomonas* sp. A41. ละลายได้ดีที่สุดใน เมทา-นอล และ คลอโรฟอร์ม คือละลายได้สูงสุด 20 มก. ต่อ มล. รองลงไปคือ เอทานอล และ น้ำที่ความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 8 คือละลายได้สูงสุด 10 มก. ต่อ มล. ในขณะที่ไม่ละลายในเฮกเซน

4.2.10 การกระจายน้ำมันระหว่างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนเปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์

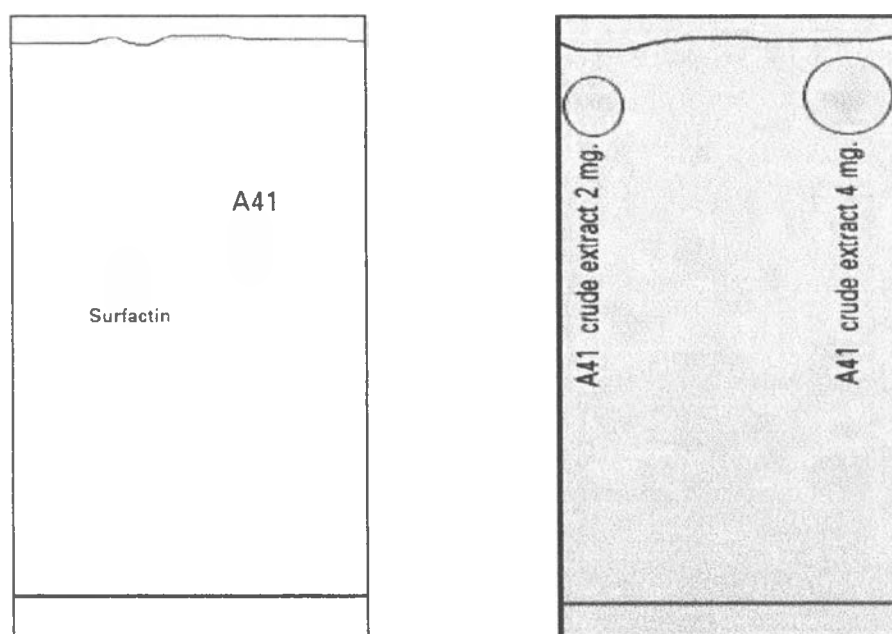
การเปรียบเทียบการกระจายน้ำมันระหว่างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ โดยเตรียมให้มีความเข้มข้น 10 มก.ต่อ มล. เท่ากันทุกชนิดแล้วเจือจางให้มีความเข้มข้น 10 – 20,000 มก.ต่อ ลิตร และวัดค่าการกระจายน้ำมันตามข้อ 3.2.3 สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ที่ใช้ทดสอบได้แก่ โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต, ไทรทอน เอ็กซ์-100, ทวิน 80, ซีทิลไพรดีเนียม คลอไรด์ และสารกระจายน้ำมันที่ใช้ในกองทัพเรือ (noble dispersant) ซึ่งทดสอบในภาวะที่ความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 8 พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 มีความสามารถในการกระจายน้ำมันมากกว่าโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS), ไทรทอน เอ็กซ์-100 (Triton X-100), ทวิน 80 (Tween 80) และโนเบิล ดิสเพอร์ซัน (noble dispersant) โดยที่ซีทิลไพรดีเนียม คลอไรด์ (CPC) มีความสามารถในการกระจายน้ำมันสูงกว่าเล็กน้อย (รูปที่ 4.13)



รูปที่ 4.13 เปรียบเทียบความสามารถในการกระจายน้ำมันระหว่างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (BS A41) และสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ซึ่งได้แก่ โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS), ไทรทอน เอ็กซ์-100 (Triton X-100), ทวิน 80 (Tween 80), โนเบิล ดิสเพอร์ซัน (noble dispersant) และซีทิลไพรดีเนียม คลอไรด์ (CPC)

4.2.11 การหาส่วนประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธี analytical TLC

ในการหาสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนี้จะใช้มอร์ส รีเอเจนต์สำหรับตรวจสอบแรมโนลิปิด ในขณะที่กรดอะมิโนจะทดสอบด้วยนินไฮดริน โดยนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์จากข้อ 3.6.2 มาทดสอบ สามารถตรวจพบแรมโนลิปิดที่ R_f 0.90 และกรดอะมิโนที่ R_f 0.62 ตามรูปที่ 4.14



ก. ตรวจสอบด้วยนินไฮดริน

ข. ตรวจสอบด้วยมอร์ส รีเอเจนต์

รูปที่ 4.14 ตรวจสอบบน TLC เพื่อหาแรมโนลิปิดด้วยมอร์ส รีเอเจนต์และกรดอะมิโนด้วยนินไฮดรินซึ่งมี silica gel 60 เป็นเฟสคงที่ และมีเฟสเคลื่อนที่เป็นคลอโรฟอร์ม ต่อ เมทานอล ต่อ น้ำ (65 : 25 : 4)

4.2.12 การเปรียบเทียบปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ระหว่างน้ำมันปาล์มและน้ำตาลกลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน

เมื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยมีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนตามภาวะเหมาะสมข้อ 4.1 จากน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาตร 10 ลิตรพบว่าสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบริสุทธิ์บางส่วนตามข้อ 3.6.2 ได้เท่ากับ 133.5 กรัม หรือ 13.35 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบหาปริมาณแรมโนลิปิดโดยเทียบกับน้ำตาลแรมโนสได้ 1.8 กรัมของน้ำตาลแรมโน สต่อลิตรของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ มีปริมาณคาร์บอนในอาหารเหลวกำหนดสูตรเมื่อใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนเท่ากับ 14.38 กรัมต่อลิตร ดังนั้นการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยมีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน มี production yield ($Y_{p,s}$) เท่ากับ 0.125 กรัม

ต่อกรัม(กรัมของน้ำตาลแรมโนสต่อกรัมของคาร์บอน) เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตสารลดแรงตึงผิวซึ่งใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนโดยใช้ภาวะตามอารีย์ กังฉิน, 2542 พบว่าสามารถผลิต 0.9 กรัมของน้ำตาลแรมโนสต่อลิตรน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ มีปริมาณคาร์บอนในอาหารเหลวกำหนดสูตรเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเท่ากับ 8 กรัมต่อลิตรมีproduction yield (Y_{PS}) เท่ากับ 0.113 กรัมต่อกรัม

ตารางที่ 4.7 เปรียบเทียบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเมื่อใช้แหล่งเป็นน้ำมันปาล์มและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

ชนิดแหล่งคาร์บอน	ปริมาณแหล่งคาร์บอน (g/l)	ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วน (g/l)	ปริมาณแรมโนลิปิด (g of rhamnolipid/l)	Production yield (Y_{PS}) (g/g)	ค่าการกระจายน้ำมันในbroth (cm ²)		
					ระยะเวลาบ่ม(ชม.)		
					24	48	72
2% (w/v) กลูโคส	8.00	6.97	0.9	0.113	36	97	113
2% (v/v) น้ำมันปาล์ม	14.38	13.35	1.8	0.125	48	186	196

4.3 การทำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโตกราฟี

4.3.1 ทำให้บริสุทธิ์โดย preparative TLC

สารลดแรงตึงผิวบริสุทธิ์บางส่วนนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย preparative TLC โดยใช้สารปริมาณ 25 มก.ต่อแผ่น เมื่อทำตามวิธีการทดลองข้อ 3.8.1 แล้วเมื่อนำไปอังด้วยไอไอโอดีนอ้อมตัวพบว่าเกิดแถบสีน้ำตาลบนแผ่น TLC 6 แถบและมีการเคลื่อนที่ดังตารางที่ 8 ค่าการกระจายน้ำมันและอัตราการเคลื่อนที่เป็นค่าเฉลี่ยจากการทำแผ่นTLC 5 แผ่น พบว่าแถบที่มีอัตราการเคลื่อนที่ไกลที่สุด ให้ค่าการกระจายน้ำมันมากซึ่งแถบที่มีค่าการกระจายน้ำมันมากได้แก่แถบที่ 3, 5 และ6

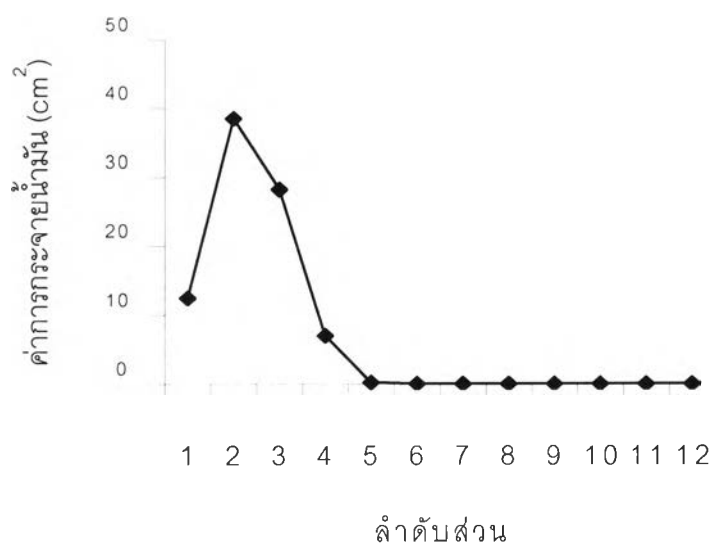
ตารางที่ 4.8 แสดงอัตราการเคลื่อนที่ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนและผลการกระจายน้ำมัน

แถบที่	อัตราการเคลื่อนที่ R_f	ค่าการกระจายน้ำมัน (ตารางเซนติเมตร)
1	0.33	38.48
2	0.61	56.7
3	0.68	102.0
4	0.75	93.7
5	0.83	128.0
6	0.95	121.0

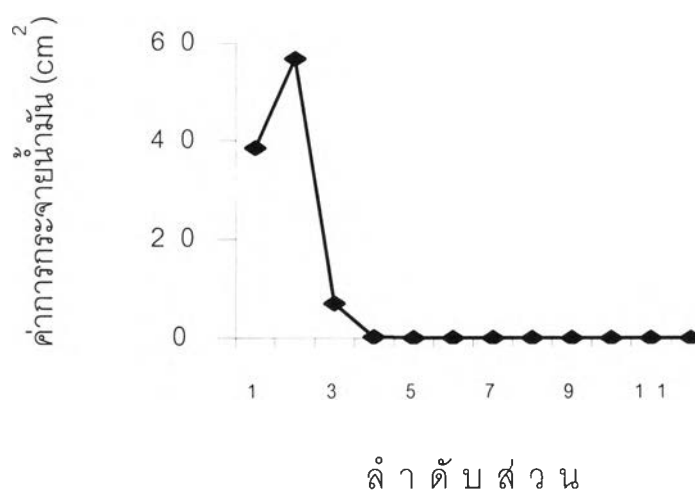
4.3.2 ทำให้บริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ silica gel 60

เมื่อสกัดแต่ละแถบด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมตามข้อ 3.8.1 แล้วนำมาระเหยแห้งและละลายกลับคลอโรฟอร์มปริมาตร 1 มล. โดยแต่ละแถบนำมาชะด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมตามข้อ 3.8.2 โดยเก็บ fraction ละ 16 มล.ทิ้งไว้ให้ปริมาตรลดลงเหลือประมาณ 5 มล.แล้วจึงวัดค่าการกระจายน้ำมัน เมื่อนำค่าการกระจายน้ำมันของลำดับส่วนต่างๆ มาเขียนกราฟดังรูป 4.15

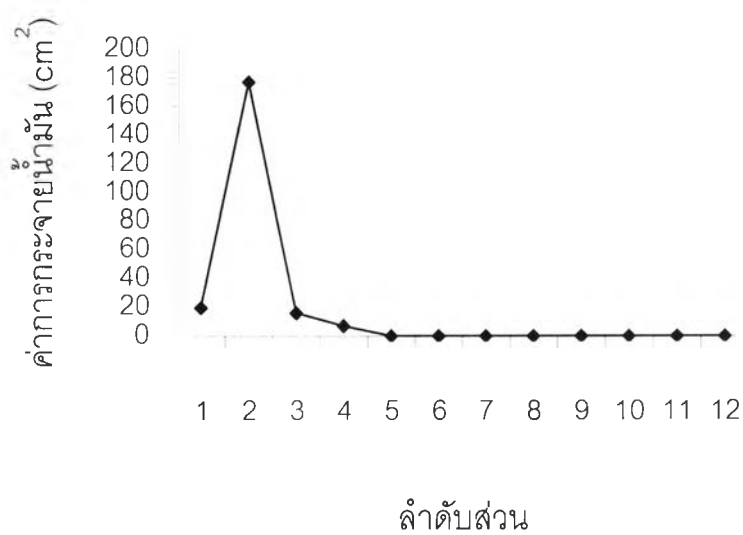
รูปที่ 4.15 การกระจายน้ำมันของลำดับส่วนต่างๆ ที่ออกจากคอลัมน์ silica gel 60



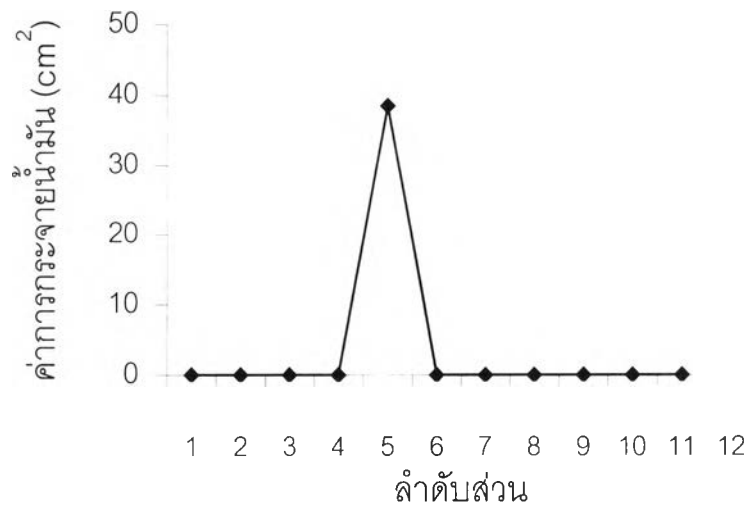
ก. กราฟแสดงค่าการกระจายน้ำมันของลำดับส่วนต่างๆ ของแถบที่ 1 จาก TLC รวมลำดับส่วนที่ 1-4 เรียกว่า F1



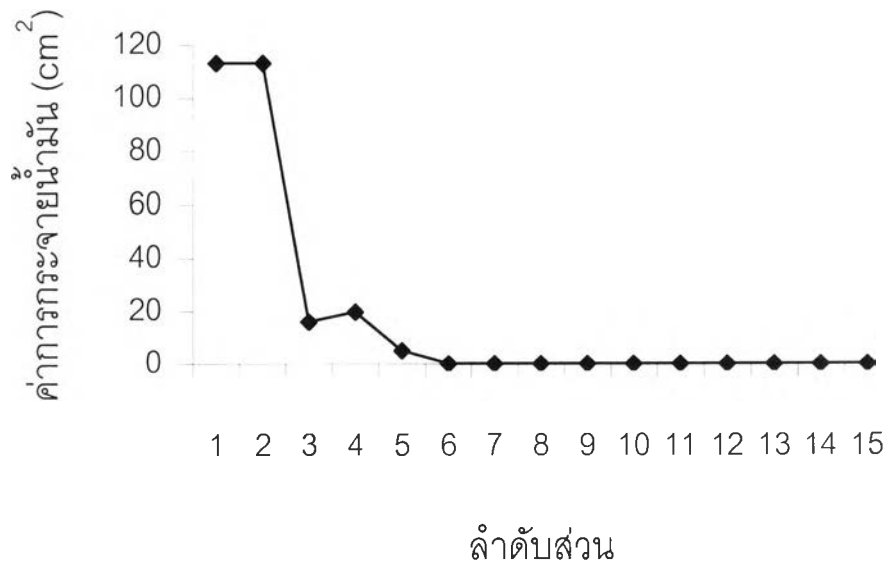
ข. กราฟแสดงค่าการกระจายน้ำมันของลำดับส่วนต่างๆ ของแถบที่ 2 จาก TLC รวมลำดับส่วนที่ 1-3 เรียกว่า F2



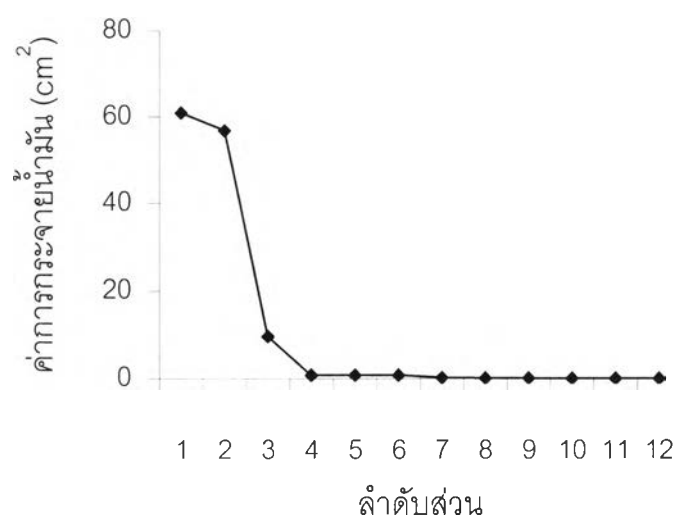
ค. กราฟแสดงค่าการกระจายน้ำมันของลำดับส่วนต่างๆ ของแถบที่ 3 จาก TLC รวมลำดับส่วนที่ 1-3 เรียกว่า F3



ง. กราฟแสดงค่าการกระจายน้ำมันของลำดับส่วนต่างๆ ของแถบที่ 4 จาก TLC 4 รวมลำดับส่วนที่ 4-6 เรียกว่า F4

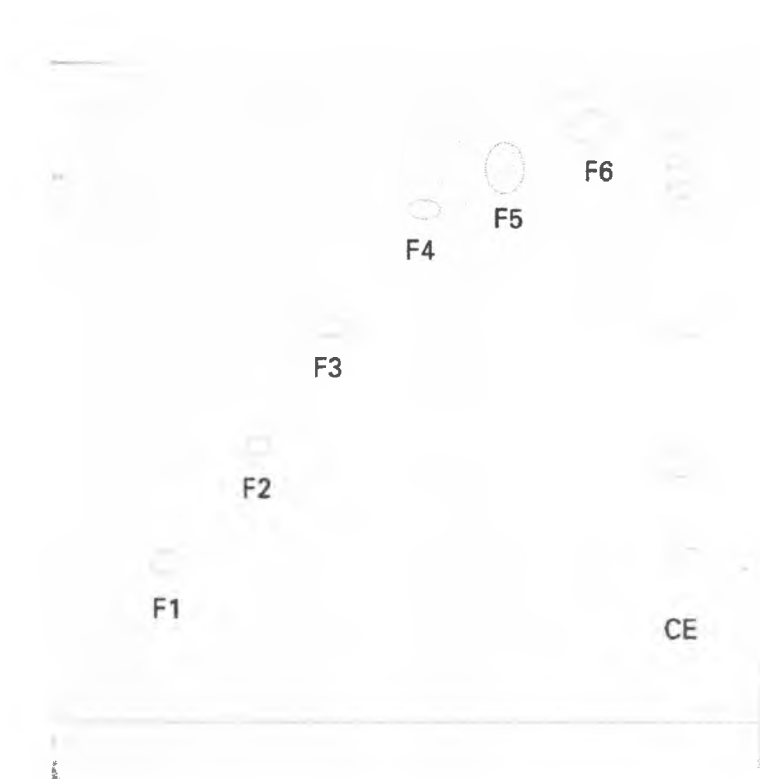


จ. กราฟแสดงค่าการกระจายน้ำมันของลำดับส่วนต่างๆ ของแถบที่ 5 จาก TLC รวมลำดับส่วนที่ 1-3 เรียกว่า F5



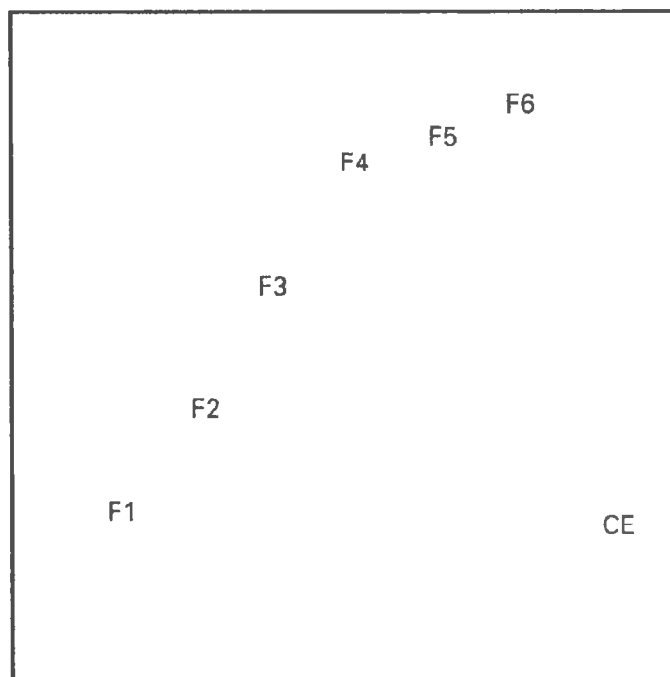
- จ. กราฟแสดงค่าการกระจายน้ำมันของลำดับส่วนต่างๆ ของแถบที่ 6 จาก TLC รวมลำดับส่วนที่ 1-3
เรียกว่า F6

นำตัวอย่างจากการแยกด้วย silica gel column ตามข้อ 3.8.2 ได้แก่ F1 – F6 และ สารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนจากข้อ 3.6.2 มา spot บน analytic TLC เพื่อตรวจความบริสุทธิ์หลังจากรวม fraction ต่างๆ ที่ผ่าน silica gel column ตามรูปที่ 4.16 หลังจากบันทึกผล analytic TLC ที่ยังด้วยไอโอไดดีน แล้วทิ้งไว้เพื่อให้ไอโอไดดีนระเหยออกให้หมดจากนั้นจึงพ่นด้วยมอลิส รีเอเจนต์ เพื่อตรวจหาแรมโนลิปิด ตามรูปที่ 4.17



รูปที่ 4.16 แสดงผลการทดสอบด้วย analytic TLC ตามข้อ 3.8.1 ซึ่งใช้ไอโอไดดีนตรวจสอบ

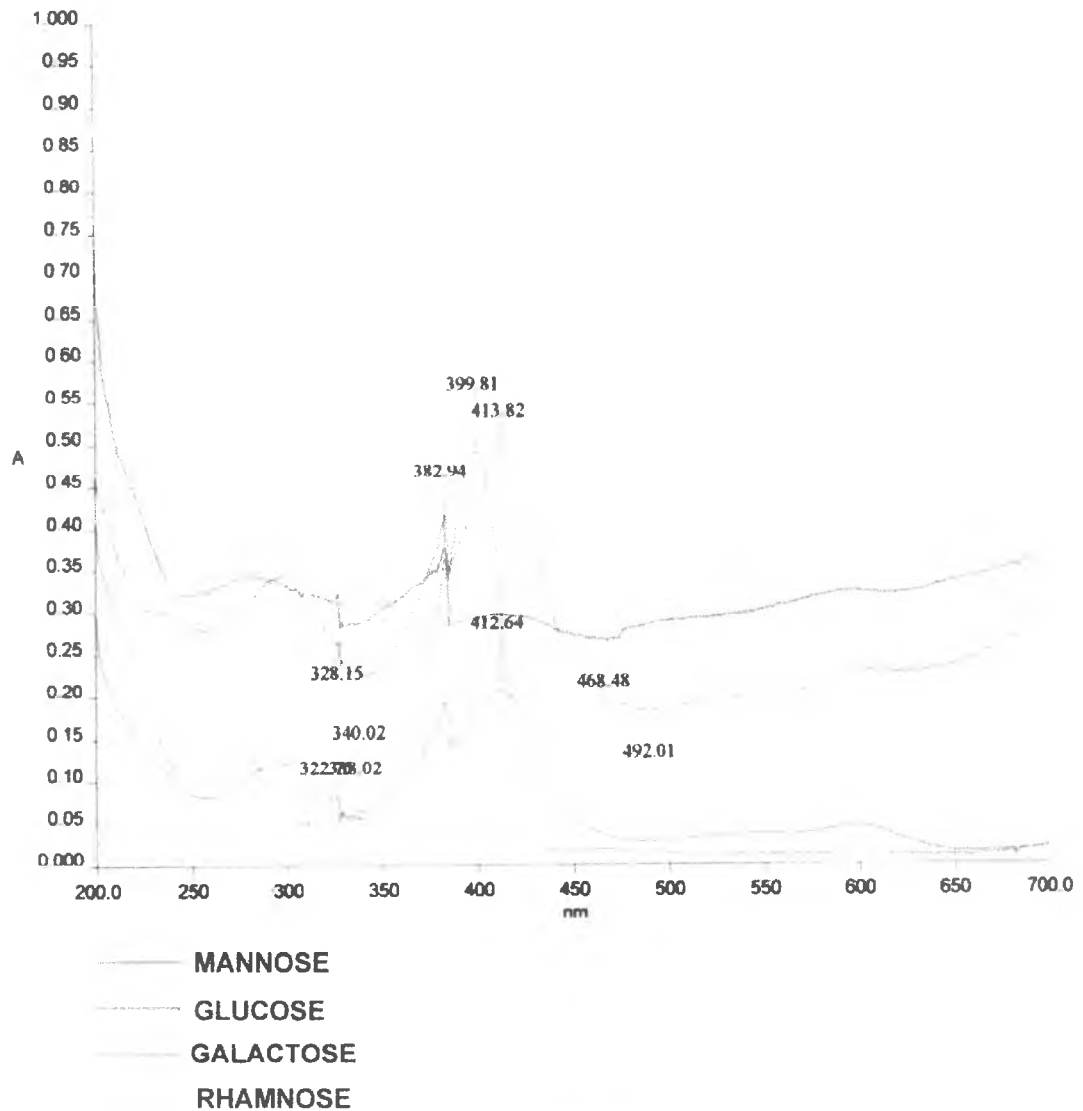
- F1 หมายถึง ลำดับส่วนที่ 1-4 จากแถบตัวอย่างที่ 1 หลังจากผ่าน silica gel column
- F2 หมายถึง ลำดับส่วนที่ 1-3 จากแถบตัวอย่างที่ 2 หลังจากผ่าน silica gel column
- F3 หมายถึง ลำดับส่วนที่ 1-3 จากแถบตัวอย่างที่ 3 หลังจากผ่าน silica gel column
- F4 หมายถึง ลำดับส่วนที่ 4-6 จากแถบตัวอย่างที่ 4 หลังจากผ่าน silica gel column
- F5 หมายถึง ลำดับส่วนที่ 1-3 จากแถบตัวอย่างที่ 5 หลังจากผ่าน silica gel column
- F6 หมายถึง ลำดับส่วนที่ 1-3 จากแถบตัวอย่างที่ 6 หลังจากผ่าน silica gel column
- CE หมายถึง สารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนจากข้อ 3.6.2



รูปที่ 4.17 แสดงผลการทดสอบด้วย analytical TLC ตามข้อ 3.8.1 ซึ่งตรวจสอบผลด้วยมอลิส รีเอเจนต์ ซึ่งเมื่อทิ้งไว้ในตู้ความชื้นประมาณ 3-4 ชั่วโมงสีเขียวจะกลายเป็นสีม่วงเข้ม
หมายเหตุ: คำย่อเหมือนในรูปที่ 4.16

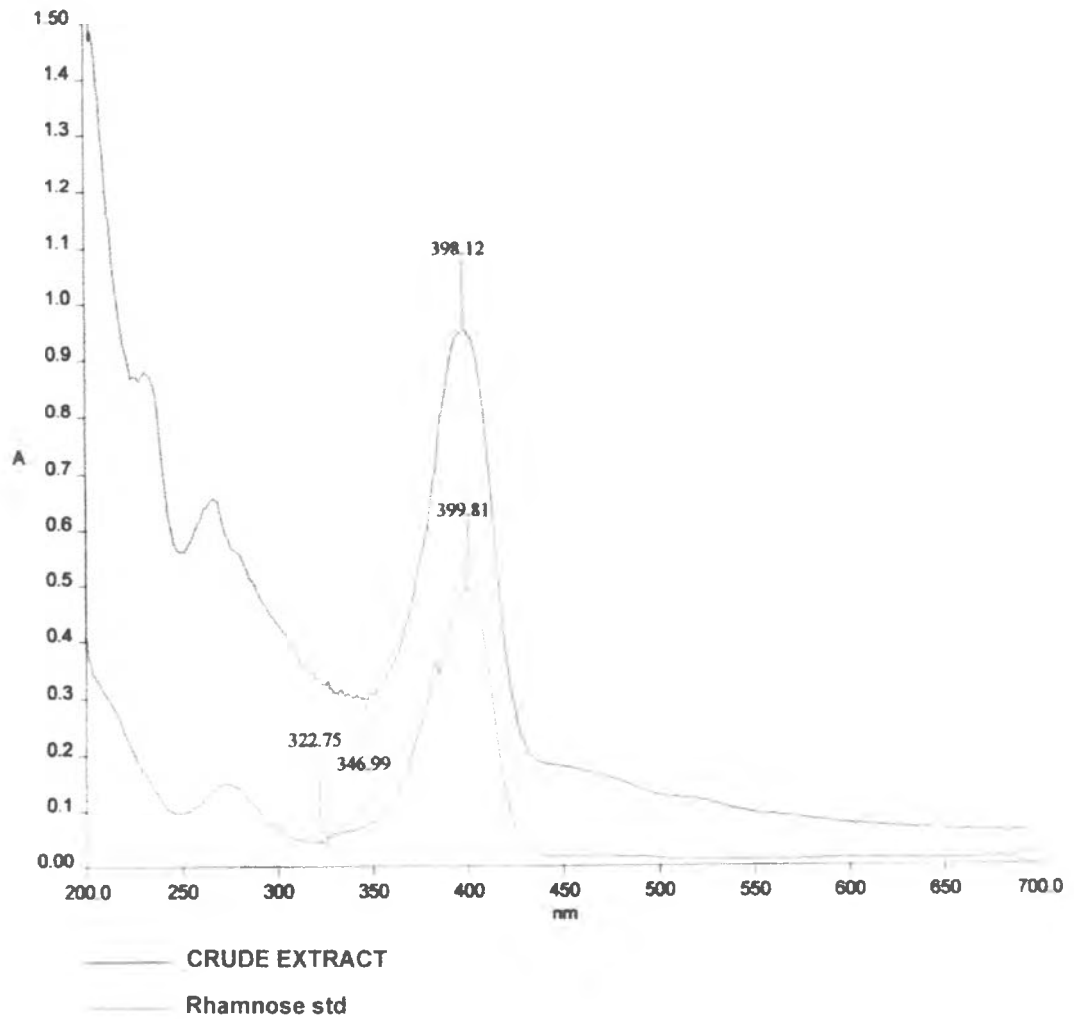
4.3.3 การตรวจวิเคราะห์น้ำตาลแรมโนสด้วยวิธีสแกนยูวี-วิสิเบิลสเปกตรัม

เนื่องจากไม่สามารถบ่งได้อย่างแน่ชัดว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 เป็นแรมโนลิปิด จึงได้ทำการวิเคราะห์หาน้ำตาลแรมโนสซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งของแรมโนลิปิด โดยได้ทำการเปรียบสแกนหายูวี-วิสิเบิลสเปกตรัมของน้ำตาลที่ผลิตใน *Pseudomonas* sp. ซึ่งได้แก่น้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส แมนโนส และแรมโนส ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 5 $\mu\text{l/ml}$



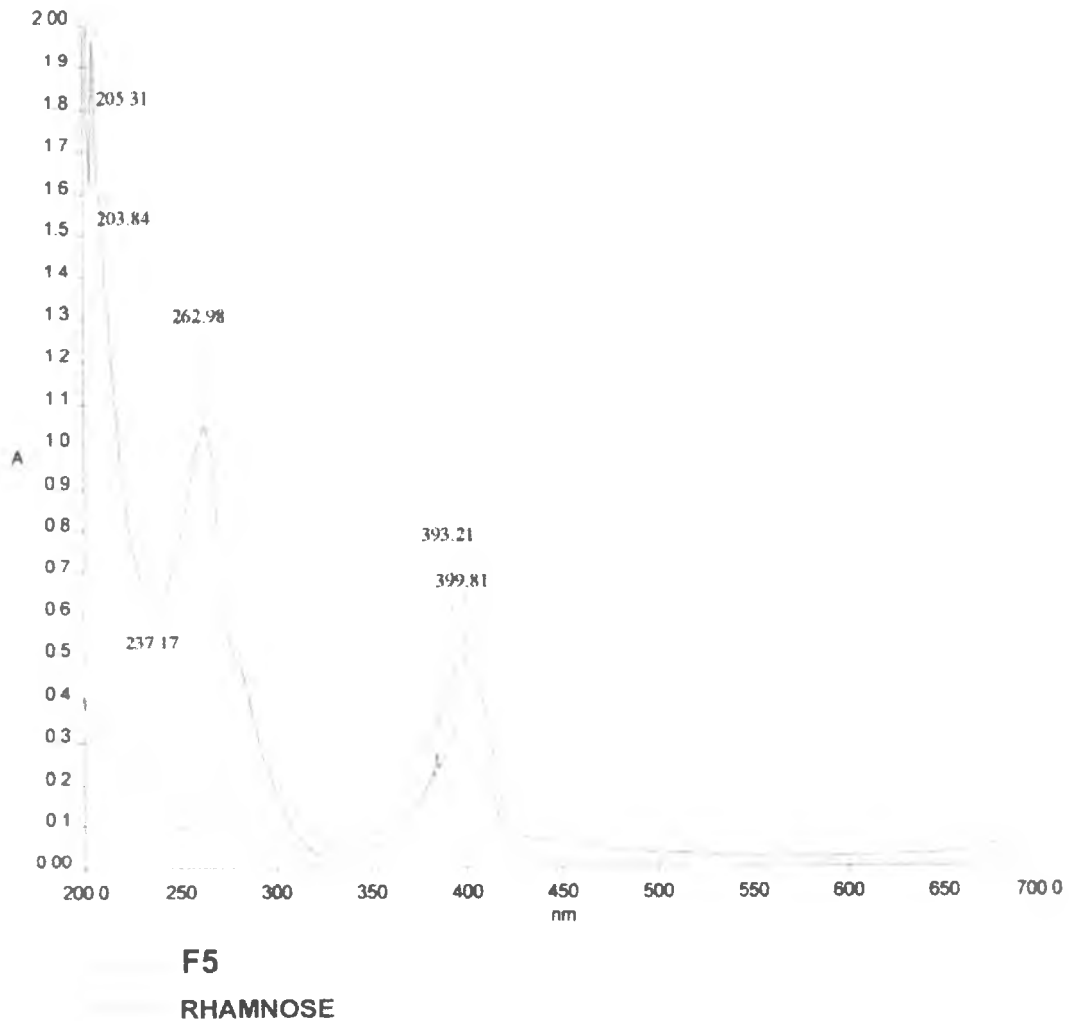
รูปที่ 4.18 แสดงยูวี-วิสิเบิลสเปกตรัมของน้ำตาลบริสุทธิ์ชนิดต่างๆ ที่ผลิตได้ใน *Pseudomonas* sp.

จากรูปด้านบนจะเห็นได้ว่าหลังจากทำการทดลองหาน้ำตาลแรมโนสตามข้อ 3.4 น้ำตาลแต่ละชนิดให้สเปกตรัมและค่าการดูดกลืนแสงที่มากที่สุดแตกต่างกัน น้ำตาลแมนโนสดูดกลืนแสงมากที่สุดที่ 399.81 nm น้ำตาลกลูโคสดูดกลืนแสงมากที่สุดที่ 413.82 nm น้ำตาลกาแลคโตสดูดกลืนแสงมากที่สุดที่ 382.94 nm น้ำตาลรhamnoseดูดกลืนแสงมากที่สุดที่ 412.64 nm



รูปที่ 4.19 แสดงยูวี-วิสิเบิลสเปกตรัมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนจากข้อ 3.6.2

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนดูดกลืนแสงมากที่สุดที่ 398.12 nm และน้ำตาลแรมโนสดูดกลืนแสงมากที่สุดที่ 399.81 nm

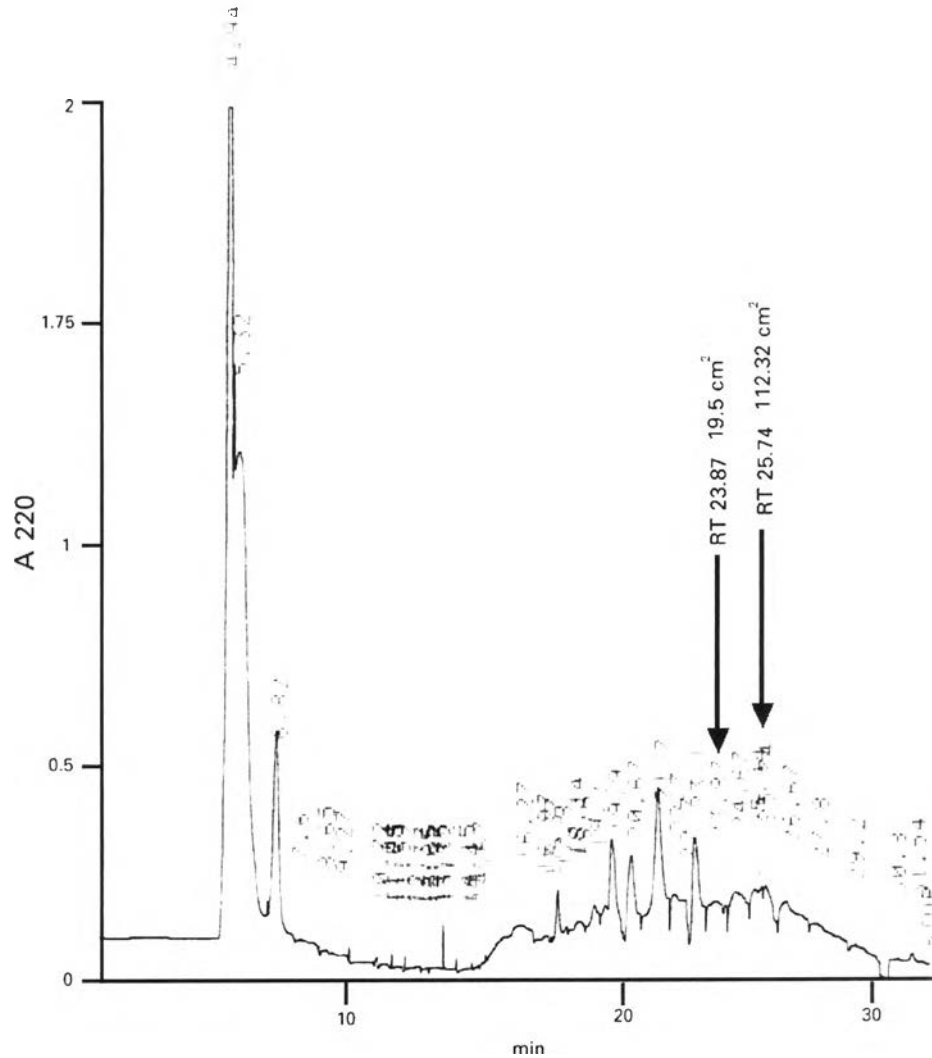


รูปที่ 4.20 แสดงยูวี-วิสิเบิลสเปกตรัมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนที่ผ่านการแยกด้วย silica gel column (F5) ตามข้อ 3.8.2

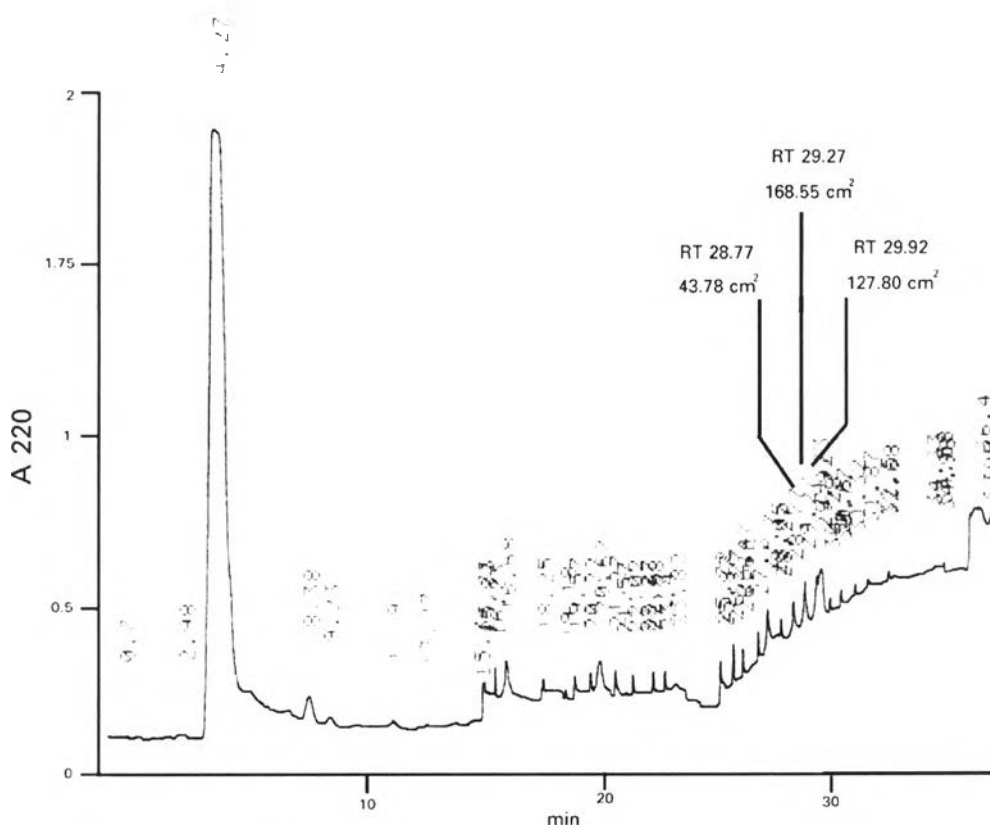
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนดูดกลืนแสงมากที่สุดที่ 393.12 nm และน้ำตาลแรมโนสดูดกลืนแสงมากที่สุดที่ 399.81 nm จะเห็นได้ว่ายูวี-วิสิเบิลสเปกตรัมของน้ำตาลแรมโนสและ F5 มีลักษณะคล้ายกันทั้งยังมีค่าดูดกลืนแสงมากที่สุดใกล้เคียงกัน โดยมีผลเหมือนกันทั้งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนจากข้อ 3.6.2 และ F5 ซึ่งอาจกล่าว *Pseudomonas sp.* สายพันธุ์ A41 สามารถผลิตน้ำตาลแรมโนสอันเป็นองค์ประกอบหลักของแรมโนลิปิด ที่ผลิตได้ใน *Pseudomonas sp.*

4.3.4 ทำให้บริสุทธิ์วิธี HPLC

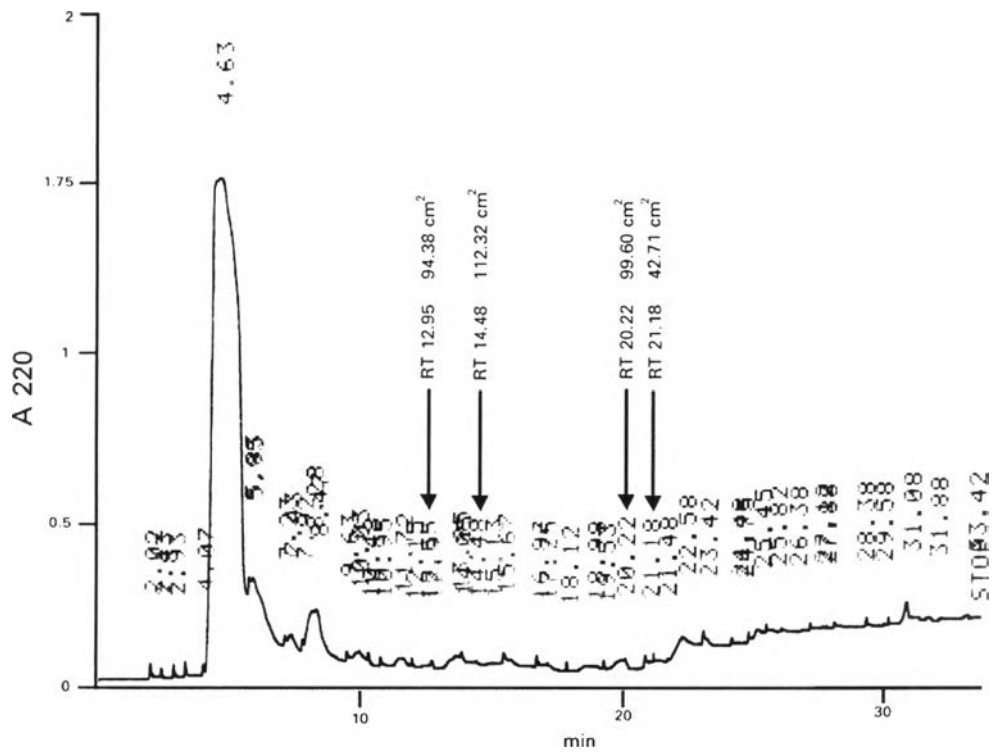
นำตัวอย่าง F1-F6 ที่ผ่านคอลัมน์ silica gel 60 column มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย HPLC ด้วยภาวะตามข้อ 3.8.3 เก็บทุก peak ที่ปรากฏมาวัดค่าการกระจายน้ำมันตามข้อ 3.2.3 โดยทำให้แห้งแล้วเติม 1 โมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ มีค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 8 ปริมาณ 1 μ l



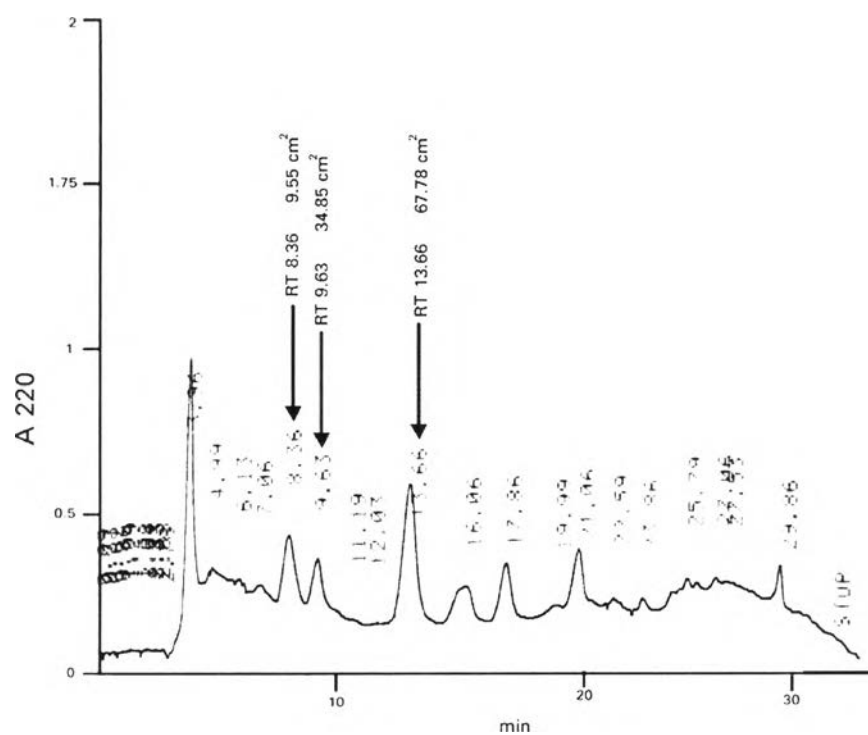
รูปที่ 4.21 โคโรมาโตแกรม HPLC จากตัวอย่าง F1 RT ของพีกที่มีค่าการกระจายน้ำมันมากได้แก่พีกที่ 23.87 นาที มีค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 19.5 ตร.ซม. และพีกที่ 25.74 นาที มีค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 112.32 ตร.ซม.



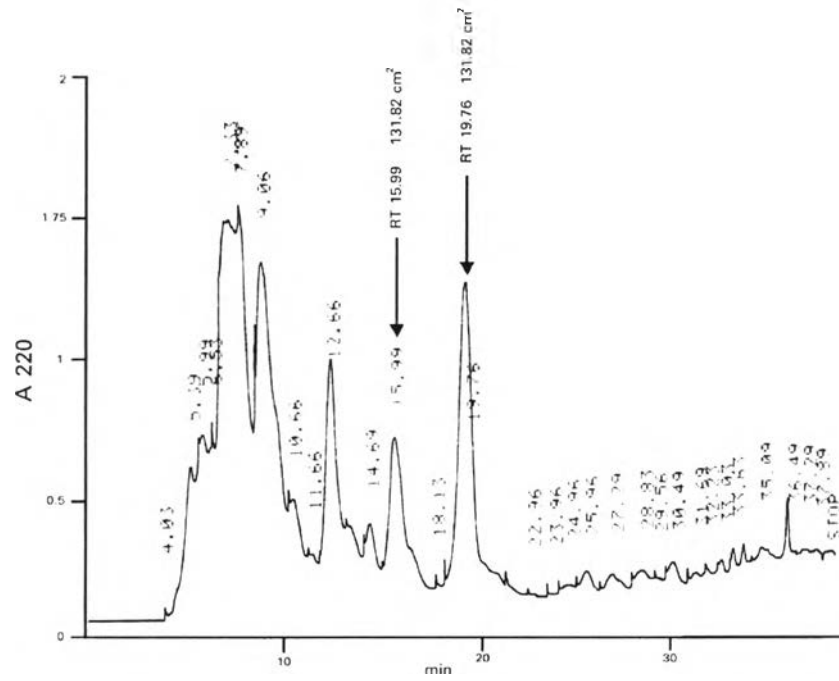
รูปที่ 4.22 โครมาโตแกรม HPLC จากตัวอย่าง F2 RT ของพีคที่มีค่าการกระจายน้ำมันมากได้แก่พีคที่ 28.77 นาที มีค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 43.87 ตร.ซม. พีคที่ 29.27 นาที มีค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 168.55 ตร.ซม. และ 29.92 มีค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 127.80 ตร.ซม.



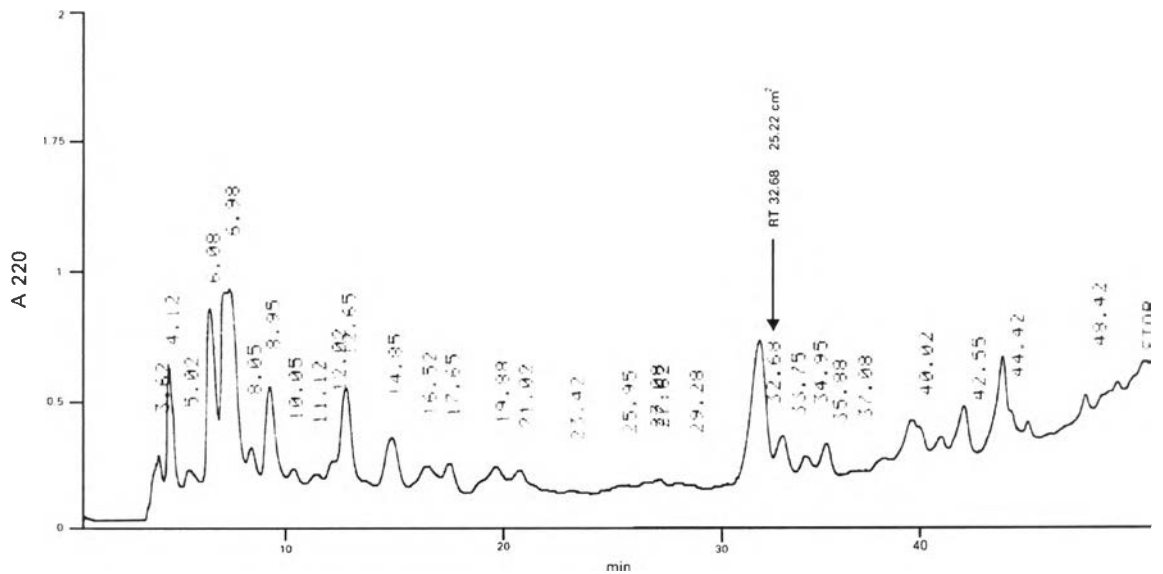
รูปที่ 4.23 โครมาโตแกรม HPLC จากตัวอย่าง F3 RT ของพีคที่มีค่าการกระจายน้ำมันมากได้แก่ พีคที่ 12.95 นาที มีค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 94.38 ตร.ซม. พีคที่ 14.48 นาที มีค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 112.32 ตร.ซม. พีคที่ 20.22 นาที มีค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 99.60 ตร.ซม. และพีคที่ 21.18 นาที มีค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 42.71 ตร.ซม.



รูปที่ 4.24 โครมาโตแกรม HPLC จากตัวอย่าง F4 RT ของพีคที่มีค่าการกระจายน้ำมันมากได้แก่ พีคที่ 8.36 นาที มีค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 9.55 ตร.ซม. พีคที่ 9.63 นาที มีค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 34.85 ตร.ซม. และพีคที่ 13.66 นาที มีค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 67.78 ตร.ซม.

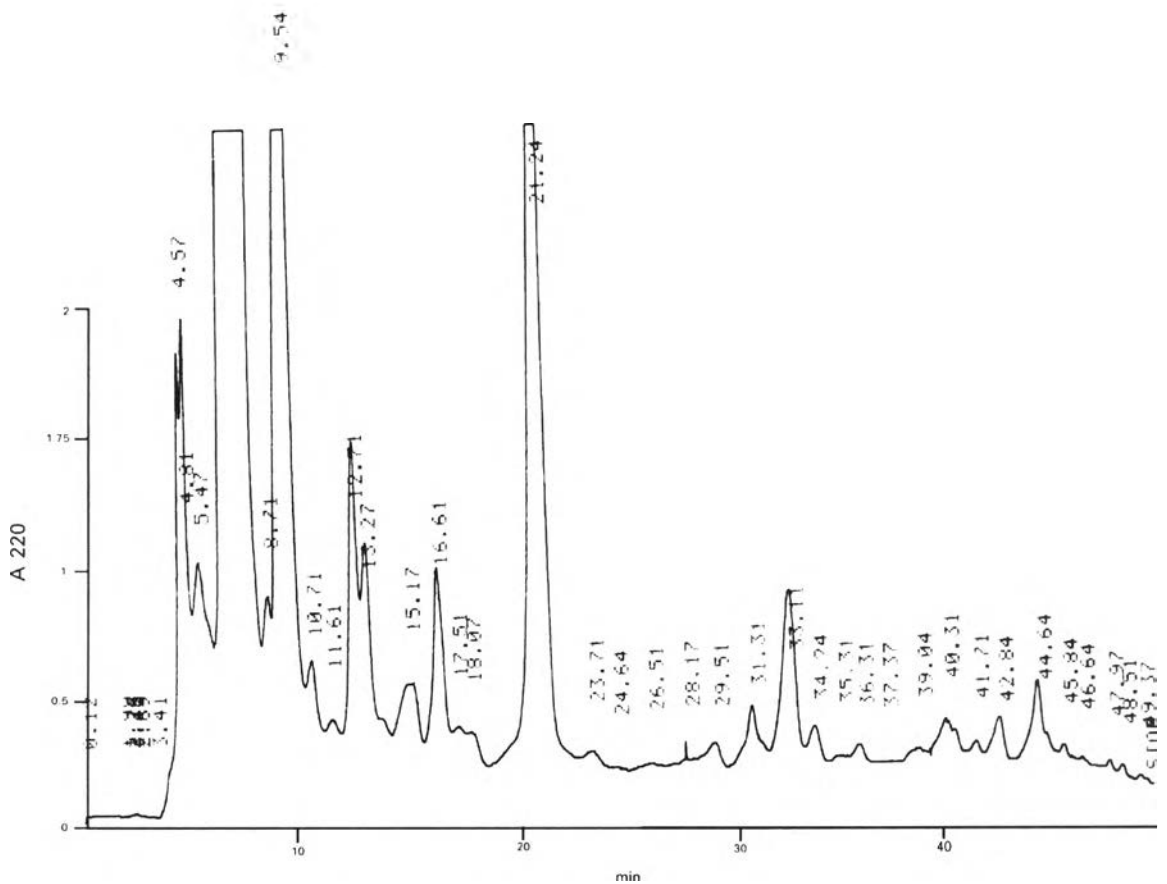


รูปที่ 4.25 โครมาโตแกรม HPLC จากตัวอย่าง F5 RT ของพีคที่มีค่าการกระจายน้ำมันมากได้แก่ พีคที่ 15.99 นาที มีค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 131.82 ตร.ซม. และพีคที่ 19.76 นาที มีค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 131.82 ตร.ซม.



รูปที่ 4.26 โครมาโตแกรม HPLC จากตัวอย่าง F6 ของพืชมีค่าการกระจายน้ำมันมากได้แก่พีคที่ 32.68 นาที มีค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 25.22 ตร.ซม.

เพื่อทดสอบว่าตัวอย่าง F5 และ F6 มีสารตัวอย่างเหมือนกันหรือไม่ และจากรูปข้างบนไม่พบ peak หลักของ F5 คือ RT ของพีคที่ 15.99 นาที และ 19.76 นาที จึงนำตัวอย่างจาก F5 และ F6 ผสมอย่างละ 1 ต่อ 1 แล้วใช้สภาวะเดียวกับตัวอย่าง F5 ตามข้อ 3.8.3 เช่นกัน



รูปที่ 4.27 โครมาโตแกรมHPLC จากตัวอย่าง F5 และ F6 ผสมกัน ซึ่งฉีดในสภาวะเช่นเดียวกับตัวอย่าง F5

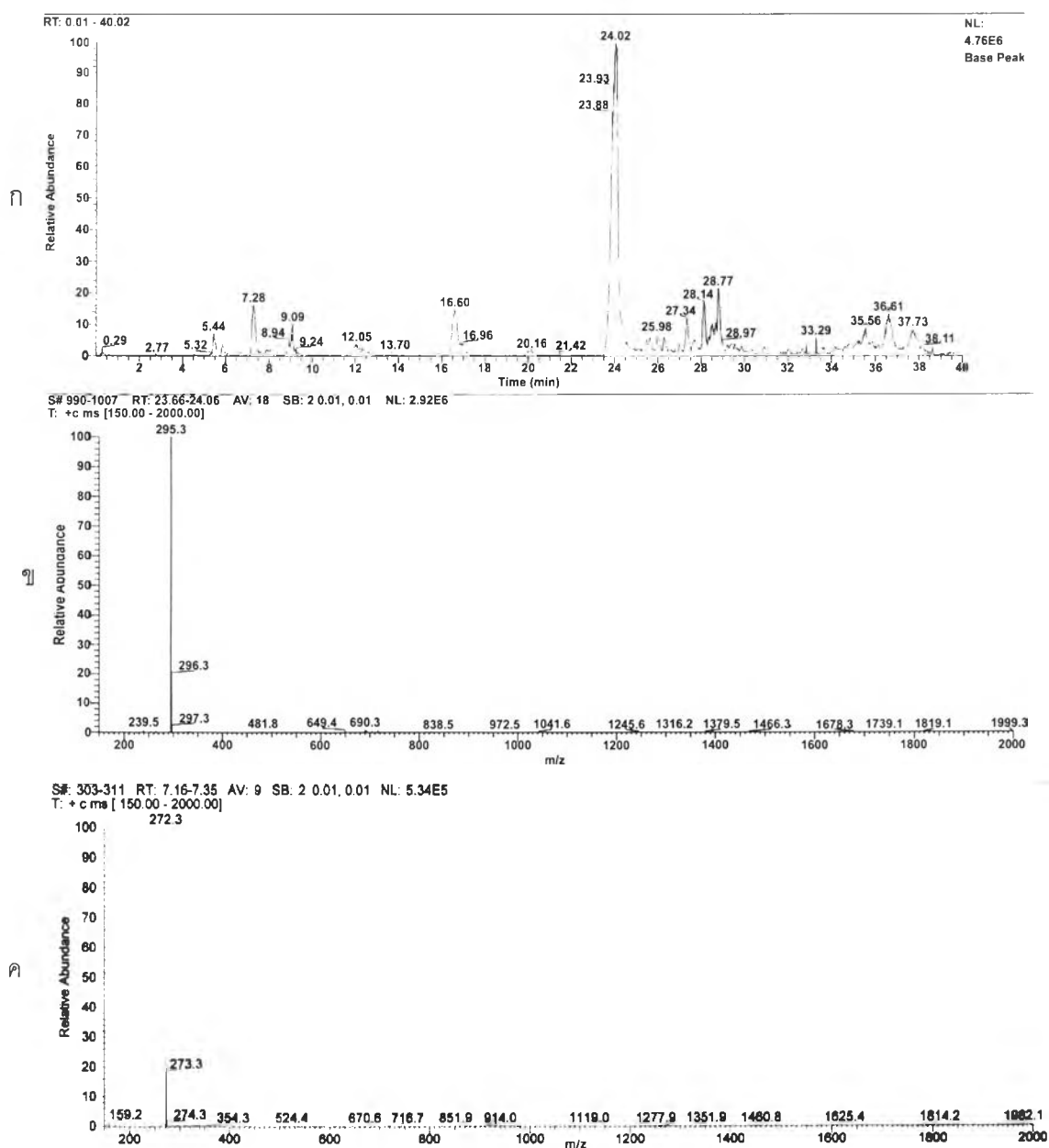
เมื่อนำตัวอย่างจากทั้งF5 และ F6 มาผสมแล้วฉีดพร้อมกันซึ่งทำให้ตัวอย่างจาก F5 RT เลื่อนจากพีคที่ 15.99 นาที เป็น16.61 นาที และ จากพีคที่ 19.76 นาที เป็น 21.24 นาที และตัวอย่าง F6 RT เลื่อนจากพีคที่ 32.68 นาที เป็น 33.11 นาที อย่างไรก็ตามจะมีส่วนที่ปนกันจนแยกไม่ออกว่ามาจากตัวอย่างใด ในช่วง 4-13 นาทีแต่ในการทดสอบนี้ละไว้ไม่สนใจเนื่องจากช่วงดังกล่าวไม่พบการกระจายน้ำมัน

4.4 วิเคราะห์โครงสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เลือก peak ที่ได้จากการด้วย HPLC ที่มีค่าการกระจายน้ำมันสูง และมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 220 nm สูง peak ที่เลือกมาวิเคราะห์โครงสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพคือ

- peak จาก F4 ที่มี RT 13.66 นาที มีค่าการกระจายน้ำมัน 67.78 ตร.ซม. เรียกเป็นตัวอย่าง A
- peak จาก F5 ที่มี RT 15.99 นาที มีค่าการกระจายน้ำมัน 131.82 ตร.ซม. เรียกเป็นตัวอย่าง B

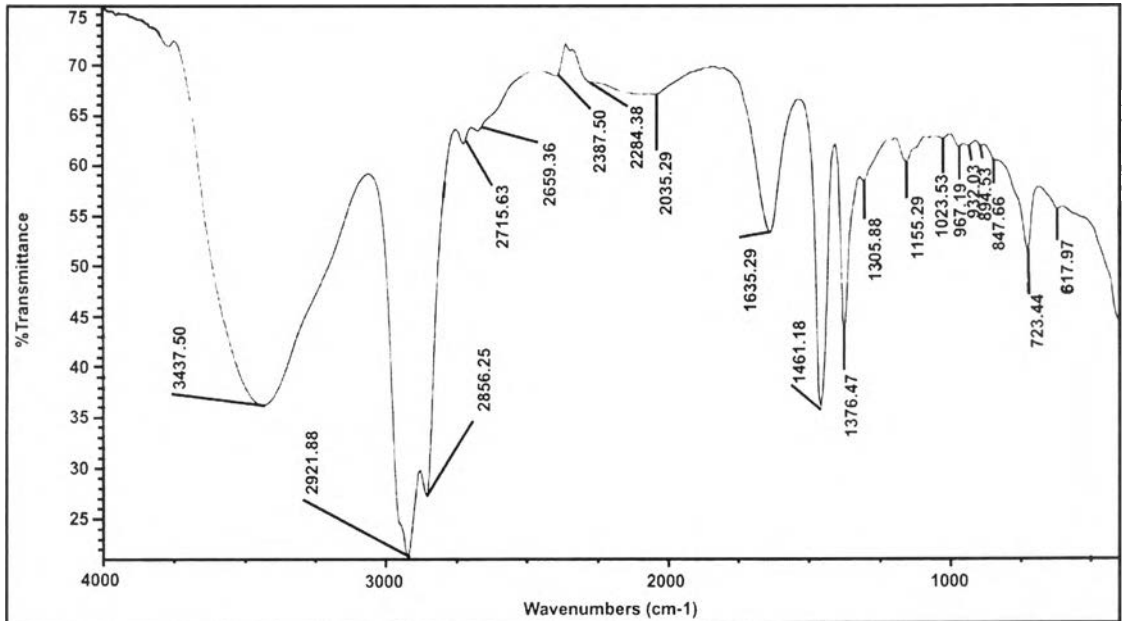
- peak จาก F5 ที่มี RT 19.76 นาที มีค่าการกระจายน้ำมัน 131.82 ตร.ซม. เรียกเป็นตัวอย่าง C นำตัวอย่าง F4 และ F5 มาแยกด้วย HPLC ซ้ำตัวอย่างละ 6 ครั้งโดยเก็บแต่ละ peak ที่ต้องการเพื่อนำไปวิเคราะห์ LC-MS และ IR ตัวอย่าง A,B และ C ที่นำไปวิเคราะห์ LC-MS และ IR มีปริมาณตัวอย่างละประมาณ 1 – 2 มก. (เมื่อทำให้แห้งแล้ว)



รูปที่ 4.28 แสดงผลโครมาโตแกรมของ LC-MS และ Mass spectrum ของตัวอย่าง A

ก. โดยมี peak หลักที่ RT 24.02 นาที มีค่า $[M+H]^+$ เท่ากับ 295.3

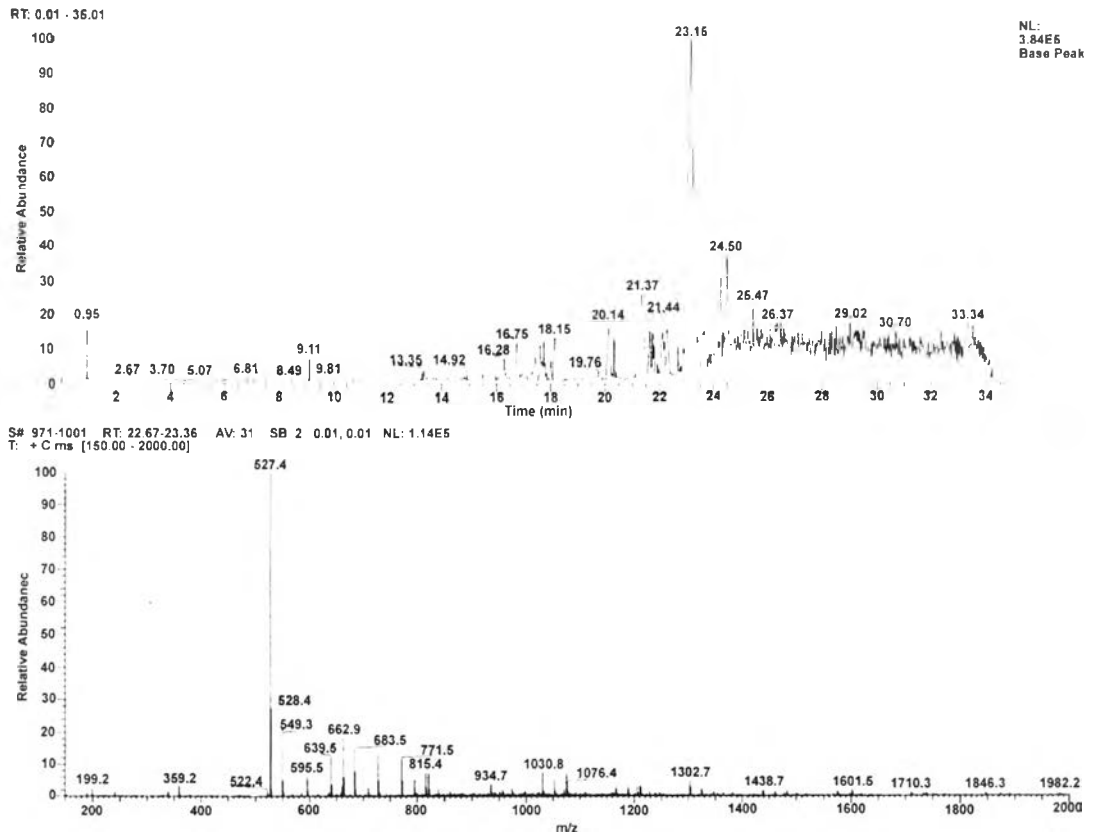
ข. peak RT ที่ 7.28 $[M+H]^+$ เท่ากับ 272.3



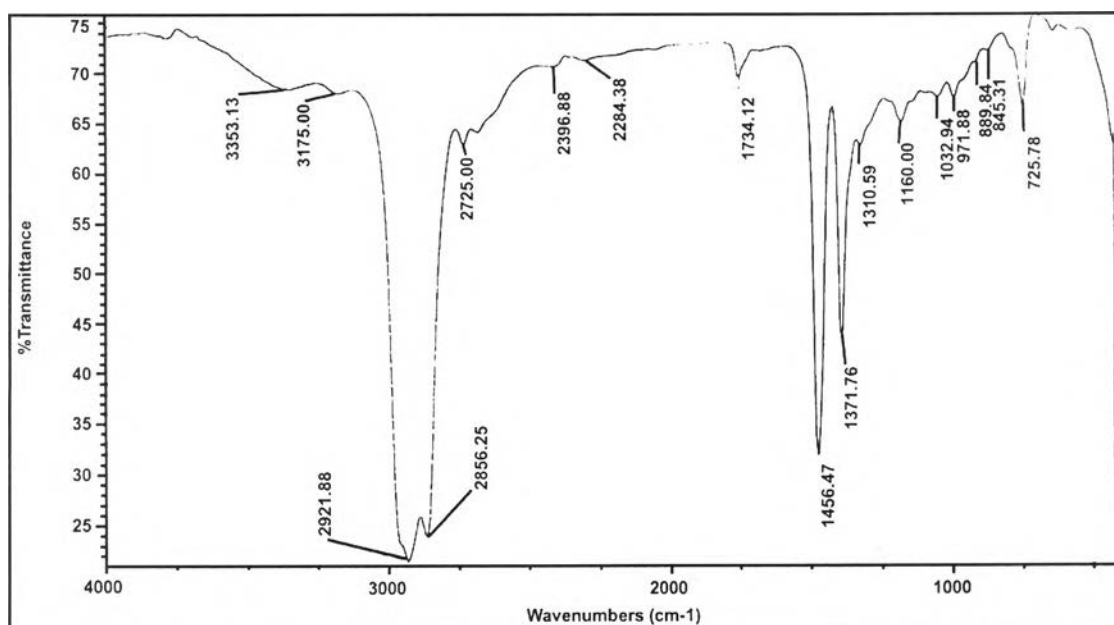
รูปที่ 4.29 แสดงผล IR spectrum ของตัวอย่าง A ที่ผ่านการแยกจาก HPLC

ตารางที่ 4.9 แสดงหมู่ฟังก์ชัน ที่ได้จาก IR spectrum ของตัวอย่าง A โดยรายงานตาม แม้น อมริททิ์ และ อมร เพชรสม, 2534

WAVENUMBER (cm ⁻¹)	Functional group
1376.47	CH ₃ bending
1461.18	CH ₂ , CH ₃ bending
1635.29	-COO-
2856.25, 2921.88	CH- (-CH ₂ -, -CH ₃) stretching
3437.50	OH



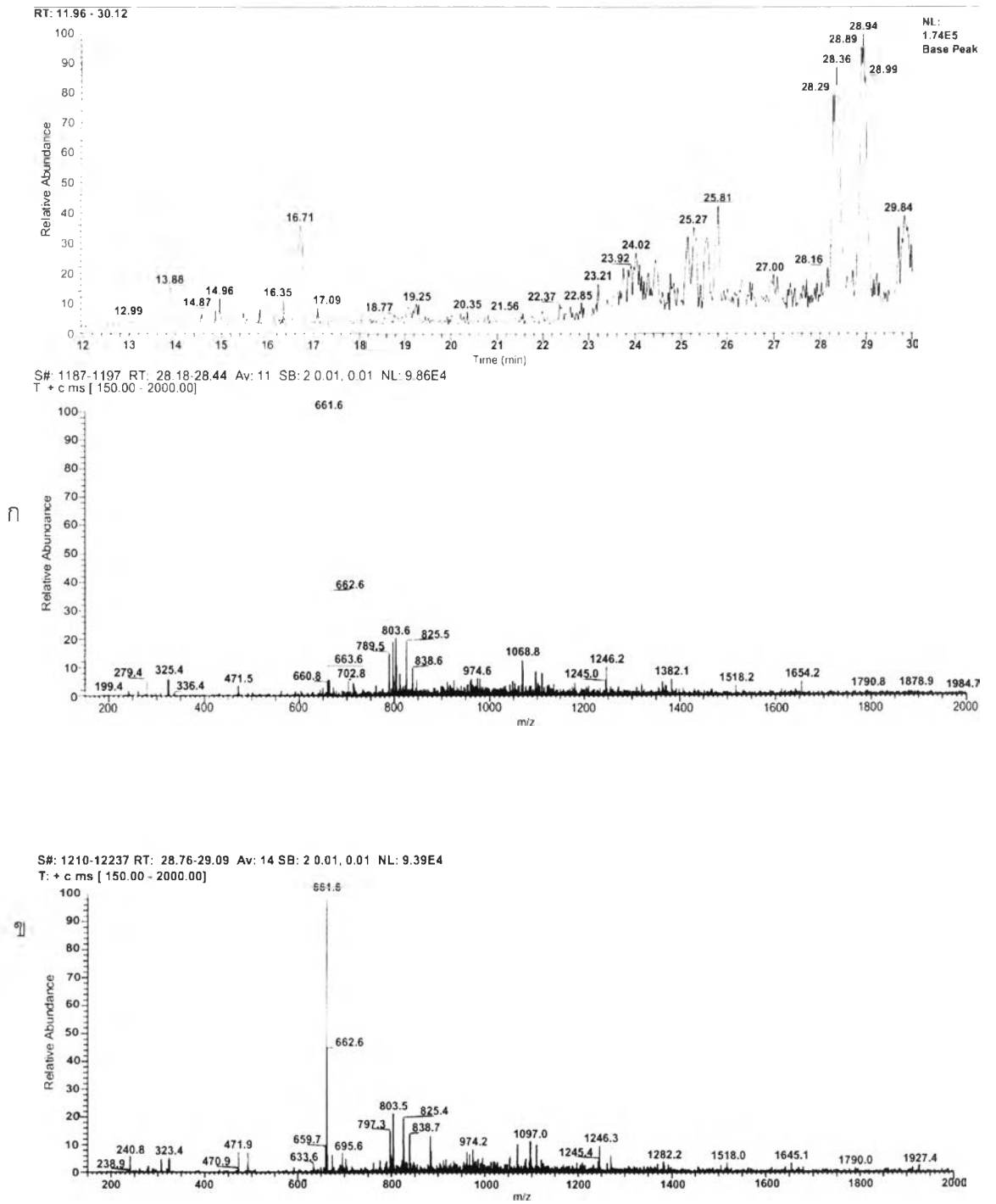
รูปที่ 4.30 แสดงผลโครมาโตแกรมของ LC-MS และ Mass spectrum ของตัวอย่าง B โดยมี peak หลักที่ RT 23.15 นาที มีค่า $[M+H]^+$ เท่ากับ 527.4



รูปที่ 4.31 แสดงผล IR spectrum ของตัวอย่าง B ที่ผ่านการแยกจาก HPLC

ตารางที่ 4.10 แสดงหมู่ฟังก์ชัน ที่ได้จาก IR spectrum ของตัวอย่าง B โดยรายงานตาม แม้น อมรสิทธิ์ และ อมรเพชรสม, 2534

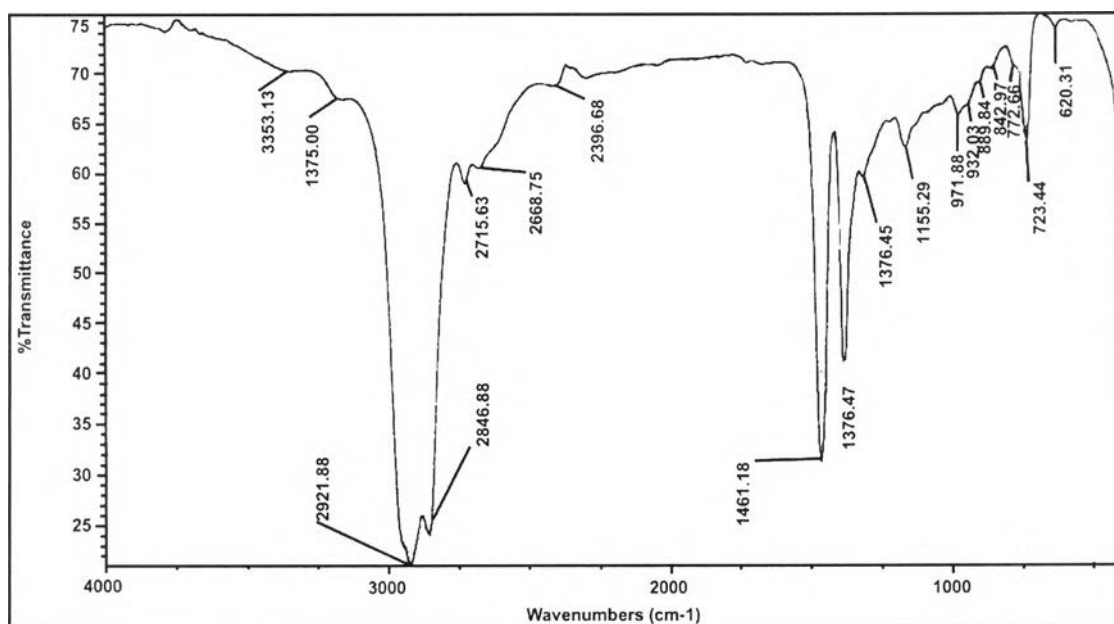
WAVENUMBER (cm ⁻¹)	Functional group
1160.00	-C-O-C-
1376.47	CH ₃ bending
1456.47	CH ₂ , CH ₃ bending
1635.29	-COO-
2856.25, 2921.88	C-H(-CH ₂ -, -CH ₃)
3353.13 - 2700	OH



รูปที่ 4.32 แสดงผลโครมาโตแกรมของ LC-MS และ Mass spectrum ของตัวอย่าง C โดยมี peak หลักที่ RT 28.36 และ 28.94 นาที มีค่า $[M+H]^+$ เท่ากับ 661.6 ทั้งสอง peak

ก. แสดง Mass spectrum ของ RT 28.36 นาที

ข. แสดง Mass spectrum ของ RT 28.94 นาที



รูปที่ 4.33 แสดงผล IR spectrum ของตัวอย่าง C ที่ผ่านการแยกจาก HPLC

ตารางที่ 4.11 แสดงหมู่ฟังก์ชัน ที่ได้จาก IR spectrum ของตัวอย่าง C โดยรายงานตาม แม้น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม, 2534

WAVENUMBER (cm ⁻¹)	Functional group
1155.29	-C-O-C-
1376.47	CH ₃ bending
1461.18	CH ₂ , CH ₃ bending
2846.88, 2921.88	C-H (-CH ₂ -, -CH ₃)

จากผลของการวิเคราะห์สารด้วย LC-MS และ IR ข้างต้นสามารถวิเคราะห์โครงสร้างของสารได้ โดยเปรียบเทียบจากโครงสร้างของแรมโนลิปิดที่ผลิตได้จาก *Pseudomonas aeruginosa* ที่เคยมีในรายงาน (Edwards และ Hayashi, 1965; Hisatsuka และคณะ, 1971; Rendell และคณะ, 1990; Deziel และคณะ, 1999; 2000; Mata-Sandoval และคณะ, 1999)

ตารางที่ 4.12 แสดงโครงสร้างของตัวอย่าง A, B และ C

ตัวอย่าง	RT จาก HPLC (min)	ค่าการกระจายน้ำมัน (cm ²)	[M+H] ⁺	โครงสร้าง
A	13.66	67.78	273	Hydroxyhexadecanoic acid
			295	Sodiumhydroxyhexadecanoic acid
B	15.99	131.82	527	RhaC ₁₀ C ₁₀ Na ⁺
C	19.76	131.82	661	Unidentified