บทที่ 5

สรุปและอภิปรายการทดลอง

ในการคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากตัวอย่าง ดิน น้ำทิ้ง ผลไม้ และอาหารหมักดอง จำนวน 109 ตัวอย่างที่ได้ทำการเก็บตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ ทำการคัดแยกบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YM ได้เชื้อยีสต์บริสุทธิ์ 43 สายพันธุ์ เมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YM ที่ปกคลุมด้วยน้ำมันดิบ พบเชื้อยีสต์จำนวน 27 สายพันธุ์ ที่มีบริเวณใสรอบ ๆ โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าในจำนวนนี้มีเพียง 3 สายพันธุ์ ที่ให้ประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพดี โดยพิจารณาจากค่าแรงตึงผิวและค่าการกระจายตัวของน้ำมัน โดยเชื้อยีสต์สายพันธุ์ PY1 และ PY2 ที่แยกได้จากอาหารพื้นบ้าน (ข้าวหมาก) ที่ อำเภอพนัสนิคม จังหวัดชลบุรี สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวที่มีประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวใกล้เคียงกัน คือ 28 และ 29 mN/m ตามลำดับ แต่เมื่อพิจารณาค่าการกระจายตัวของน้ำมัน พบว่ายีสต์สายพันธุ์ PY1 ให้ค่าการกระจายตัวของน้ำมันสูงกว่า ซึ่งมีค่าเท่ากับ 56.77 cm^2 ดังนั้นจึงนำยีสต์สายพันธุ์ PY1 ไปจำแนกสกุลและศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เมื่อจำแนกสกุลของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ PY1 อ้างอิงตาม The yeast a taxonomic study (Lodder และคณะ, 1952) พบว่ายีสต์สายพันธุ์ PY1 มีลักษณะโคโลนีกลม ขอบเรียบ สีขาวครีม ผิวด้าน กลางโคโลนีมีผิวย่นเล็กน้อย การย้อมสีติดแกรมบวก รูปร่างเชื้อยีสต์เป็นทรงกลมรี ขนาดกว้าง 2.0 - 4.8 ไมครอน ยาว 2.6 - 5.2 ไมครอน มีการสร้างสปอร์ที่มีรูปทรงคล้ายหมวก และยังให้ผลบวกกับการทดสอบการสร้างเอนไซม์ไลเปส จากการศึกษาทางด้านชีวเคมีของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ PY1 อ้างอิงตาม The chemistry and biology of yeasts (Cook, 1958) โดยพิจารณาจากความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนชนิดต่างๆ ความสามารถในการหมักน้ำตาล การย่อยสลายยูเรีย และการทดสอบ Diazonium Blue B (DBB) (ตารางที่ 4.4) สามารถจำแนกเชื้อยีสต์สายพันธุ์ PY1 ได้เป็น *Pichia anomala*

การบ่งชี้ชนิดของยีสต์สายพันธุ์ PY1 ในระดับสปีชีส์โดยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ประมวลรหัสของตำแหน่ง internal transcribed spacer ผลการวิเคราะห์ได้สารละลายดีเอ็นเอที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ประมาณ 600 bp พบว่าเชื้อยีสต์สายพันธุ์ PY1 มีความคล้ายคลึง 98% กับ *Pichia anomala* MTCC 462 จึงอาจสรุปได้ว่ายีสต์สายพันธุ์ PY1 เป็นจุลินทรีย์ *Pichia anomala* ซึ่งนับว่าเป็นการค้นพบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากยีสต์ในสกุล *Pichia* เป็น

ครั้งแรก เนื่องจากไม่เคยมีรายงานมาก่อน โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากยีสต์นั้น ส่วนใหญ่ผลิตได้จากยีสต์กลุ่ม *Candida* sp. (Kitamoto และคณะ, 2002)

การศึกษาการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอาหารกำหนดสูตร ของเชื้อยีสต์ *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 พบว่าเชื้อยีสต์สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพควบคู่ไปกับการเจริญของเชื้อ

ในการศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม สำหรับการเลี้ยงเชื้อยีสต์ *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 เพื่อศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่า น้ำมันถั่วเหลือง เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุด สำหรับงานวิจัยนี้ที่เลือกใช้น้ำมันถั่วเหลือง เนื่องจากเป็นน้ำมันพืชชนิดหนึ่งที่ได้จากการแปรรูปผลิตผลทางการเกษตรในประเทศไทย และมีราคาถูก โดยเมื่อแปรผันความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลือง พบว่าที่ความเข้มข้น 4% (w/v) มีความเหมาะสมที่สุดต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 พบว่า $NaNO_3$ ที่ความเข้มข้น 0.4% (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ทำให้การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพดีที่สุด เพราะ $NaNO_3$ มีผลต่อค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะส่งผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อไป การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงยีสต์ที่คัดแยกได้เพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จากผลการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเนื่องจากมีค่าแรงตึงผิวใกล้เคียงกัน (29 และ 30 mN/m ตามลำดับ) แต่เมื่อพิจารณาค่าการกระจายตัวของน้ำมัน พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีค่าการกระจายตัวของน้ำมันสูงสุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 43.03 cm^2 จึงเลือกอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการควบคุมการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ นอกจากนี้ได้ศึกษาผลของค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่าที่ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมเท่ากับ 5.5 โดยให้ค่าการกระจายน้ำมันสูงสุด 63.64 cm^2 และมีค่าแรงตึงผิวต่ำสุด 28 mN/m ในการทดลองพบว่าค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะอยู่ในช่วงประมาณ 5.5 - 7.4 ซึ่งถือว่าเป็นช่วงค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยยีสต์ *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1

การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากยีสต์ *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในอาหารเหลวปรับปรุงสูตรที่ประกอบด้วย 0.02% KH_2PO_4, 0.02% $MgSO_4.7H_2O$, 0.1% สารสกัดยีสต์, 0.4% $NaNO_3$ และ 4% น้ำมันถั่วเหลือง ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.5 โดยมีภาวะการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในระดับขวดเขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน ซึ่ง *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 ให้ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 0.26 กรัมต่อลิตร โดยสารลด

แรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มีค่าแรงตึงผิวต่ำสุด 28 mN/m และค่าการกระจายน้ำมัน เท่ากับ 95.07 cm^2

ลักษณะสมบัติทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวที่บริสุทธิ์บางส่วนที่ผลิตจาก *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 มีค่า CMC เท่ากับ 180 mg/l และค่าแรงตึงผิว ณ การเกิดไมเซลล์ (γCMC) เท่ากับ 29.5 mN/m ซึ่งมีค่าต่ำกว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ที่นำมาเปรียบเทียบ (ไทรทอน เอกซ์ 100 และเคมเทค 307) เมื่อเปรียบเทียบค่าการกระจายน้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 กับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มีความสามารถในการกระจายน้ำมันได้ดีกว่าเคมเทค 307 แต่มีความสามารถด้อยกว่าไทรทอน เอกซ์ 100 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มีประสิทธิภาพพอที่จะนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้เท่าเทียมกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์บางชนิด นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 ยังมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดอื่น เช่น แรมโนลิพิด (RL-4) ที่มีค่า CMC เท่ากับ 200 mg/l และ γCMC เท่ากับ 30 mN/m (Kitamoto และคณะ, 2002)

การเตรียมสารให้บริสุทธิ์และการวิเคราะห์ชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธี analytical TLC ด้วยไอระเหยของไอโอดีนและมอริส รีเอเจนท์ พบว่าสามารถแยกสารออกได้เป็น 6 ลำดับส่วน เมื่อตรวจสอบด้วยไอโอดีน โดยมีค่าคงที่ของอัตราส่วนการเคลื่อนที่ (R_f) เป็น 0.94, 0.86, 0.8, 0.73, 0.62 และ 0.52 (F1-F6) ตามลำดับ และเมื่อตรวจสอบด้วยมอริส รีเอเจนต์ พบว่าเกิดผลบวกมีจุดสีเขียวที่มีอัตราการเคลื่อนที่ (R_f) 0.92, 0.86, 0.73 และ 0.52 (S1-S4) ตามลำดับ จึงอาจสันนิษฐานได้ว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 มีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบหรืออาจเป็นสารประเภทไกลโคลิพิด จากนั้นทำการเตรียมสารตำแหน่ง F2 (R_f 0.86) จำนวนมากโดยใช้ preparative TLC และนำมาวิเคราะห์สารและทำให้บริสุทธิ์ด้วย HPLC จากโครมาโตแกรมในรูปที่ 4.14 พบว่าลำดับส่วนตัวอย่างที่เก็บได้จาก Retention time ที่ 9.777, 17.773 และ 25.768 นาที ให้ค่าการกระจายตัวของน้ำมันมาก จึงนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี LC- MS ต่อไป จากผลการวิเคราะห์สารด้วยวิธี LC-MS บอกถึงน้ำหนักมวลโมเลกุลของสารและสามารถวิเคราะห์โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ ในการทดลองพบว่ามวลโมเลกุลของสารส่วนใหญ่มีค่าเท่ากับ 658, 674 และ 691 ซึ่งเทียบเคียงได้กับสารโซโฟโรลิพิดที่มีกรดไขมันเป็นองค์ประกอบ มีโครงสร้างเป็น $[C20]_{Lactone}$+Na, C20+Na และ C20+Na (oxidized form) ตามลำดับ ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทไกลโคลิพิด แต่ไม่สามารถระบุโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้อย่างชัดเจน ซึ่งอาจทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี NMR (Nuclear Magnetic Resonance) และวิธีทางเคมีอื่นๆ ต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาด้านพันธุศาสตร์ของ *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 โดยการพัฒนาทางพันธุวิศวกรรม เพื่อนำไปใช้เพิ่มผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้

2. ควรมีการศึกษาถึงแหล่งอาหารที่เหมาะสม เพื่อเพิ่มผลผลิตและการศึกษาลักษณะสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ให้มากกว่านี้ เช่น ค่าอิมัลชัน อิเด็กซ์ ความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในภาวะต่าง ๆ เป็นต้น เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำสารลดแรงตึงผิวไปประยุกต์ในงานต่างๆ