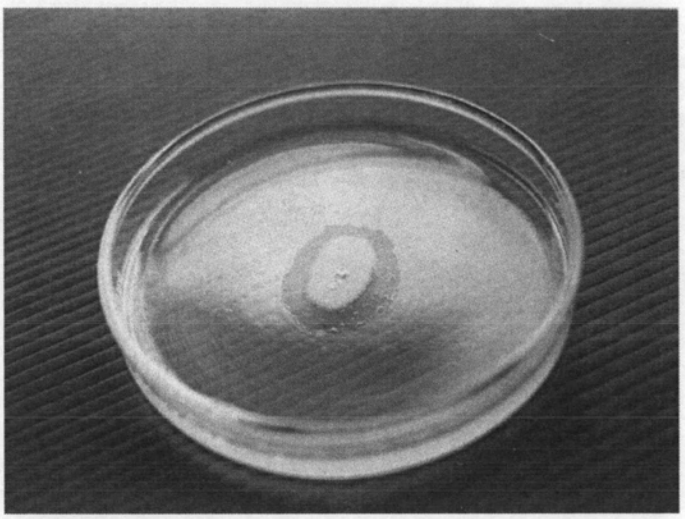
บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การคัดเลือกยีสต์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะคัดเลือกยีสต์ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยคัดเลือกยีสต์จากตัวอย่างดิน น้ำทิ้ง ผลไม้ และอาหารหมักดอง จำนวน 109 ตัวอย่างที่ได้ทำการเก็บตัวอย่างจากแหล่งต่าง ๆ ทำการคัดแยกบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YM ได้เชื้อยีสต์บริสุทธิ์ 43 สายพันธุ์ เมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YM ที่ปกคลุมด้วยน้ำมันดิบ พบเชื้อยีสต์จำนวน 27 สายพันธุ์ ที่มีบริเวณใสรอบ ๆ โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงผลการคัดเลือกเชื้อยีสต์จากตัวอย่างต่างๆ ในตารางที่ 4.1 และในรูปที่ 4.1 บริเวณใสรอบโคโลนีแสดงถึงความสามารถเบื้องต้นในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Morikawa และคณะ, 1993)



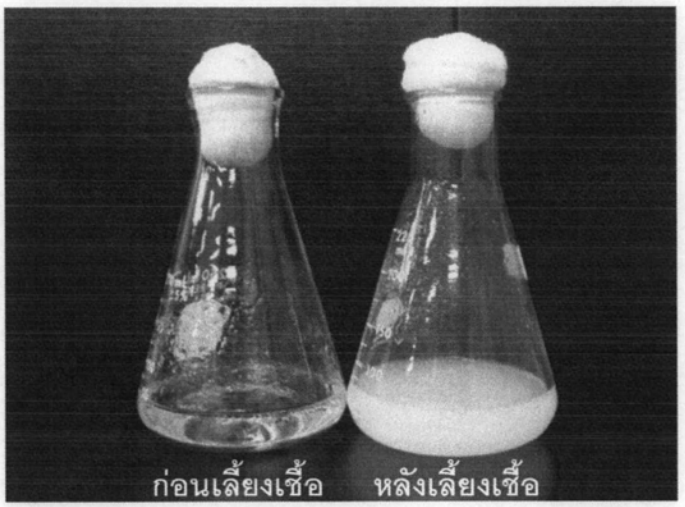
รูปที่ 4.1 ลักษณะการกระจายตัวของน้ำมันดิบในการทดสอบเบื้องต้นของเชื้อยีสต์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ โดยเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารแข็ง YM ที่ปกคลุมด้วยน้ำมันดิบ และบ่มเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.1 ผลสรุปการคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่มีความสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้

ตัวอย่าง	สถานที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนเชื้อยีสต์ที่แยกได้ (สายพันธุ์)	จำนวนเชื้อที่มีบริเวณใสรอบๆ โคโลนี (สายพันธุ์)
ดินและน้ำทิ้ง	จ. กรุงเทพมหานคร	11	1	-
	จ. ชลบุรี	8	1	-
	จ. เพชรบุรี	5	1	-
	จ. สิงห์บุรี	9	1	-
ผลไม้	จ. กรุงเทพมหานคร	7	3	1
	จ. จันทบุรี	4	2	-
	จ. นครปฐม	3	1	-
อาหารหมักดอง น้ำพริกแกง ข้าวหมาก	จ. กรุงเทพมหานคร	11	5	4
	จ. ขอนแก่น	8	4	2
	จ. ชลบุรี	22	13	11
	จ. นครปฐม	17	8	7
	จ. นนทบุรี	4	3	2
รวม		109	43	27

4.2 การคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระดับขวดเขย่า

นำเชื้อยีสต์ที่ให้บริเวณใสรอบๆ โคโลนี ที่ได้จากการทดสอบเบื้องต้นทั้ง 27 สายพันธุ์ มาเลี้ยงตามวิธีในข้อ 3.2 จากนั้น นำน้ำส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อไปวัดค่าแรงตึงผิวและค่าการกระจายตัวของน้ำมัน (ดังแสดงในตารางที่ 4.2) พบว่าในจำนวนนี้มีเพียง 3 สายพันธุ์ ที่ให้ประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพดี



รูปที่ 4.2 เปรียบเทียบลักษณะอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนและหลังการเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 4.2 ค่าแรงตึงผิว และค่าการกระจายตัวของน้ำมันของส่วนน้ำใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกได้

สายพันธุ์	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	ค่าการกระจายตัวของน้ำมัน (cm^2)
PY81	32	28.29
PY1	28	56.77
PY2	29	39.83

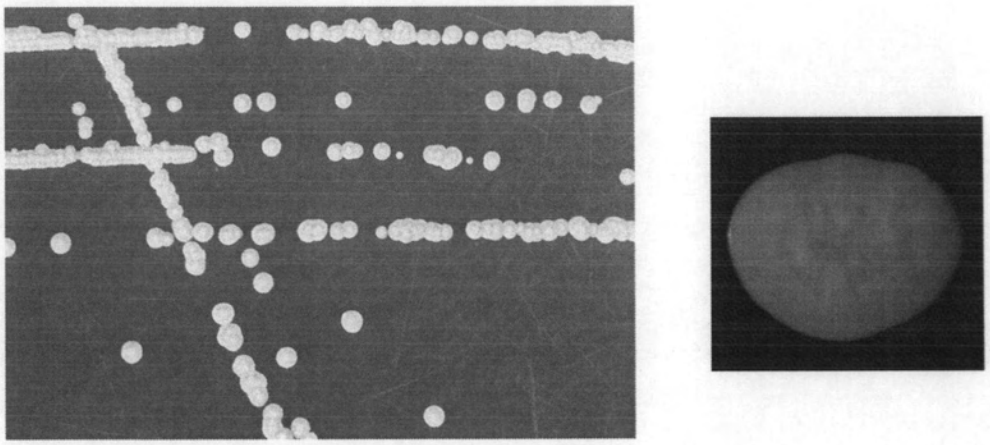
จากตารางที่ 4.2 ยีสต์สายพันธุ์ PY1 และ PY2 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวที่มีประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวใกล้เคียงกัน แต่เมื่อพิจารณาค่าการกระจายตัวของน้ำมัน พบว่ายีสต์สายพันธุ์ PY1 ให้ค่าการกระจายตัวของน้ำมันสูงกว่า ซึ่งมีค่าเท่ากับ 56.77 cm^2 และมีค่าแรงตึงผิว 28 mN/m ดังนั้นจึงนำยีสต์สายพันธุ์ PY1 ไปจำแนกสกุลและศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อไป

4.3 การจำแนกสกุลจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ทางอนุกรมวิธาน

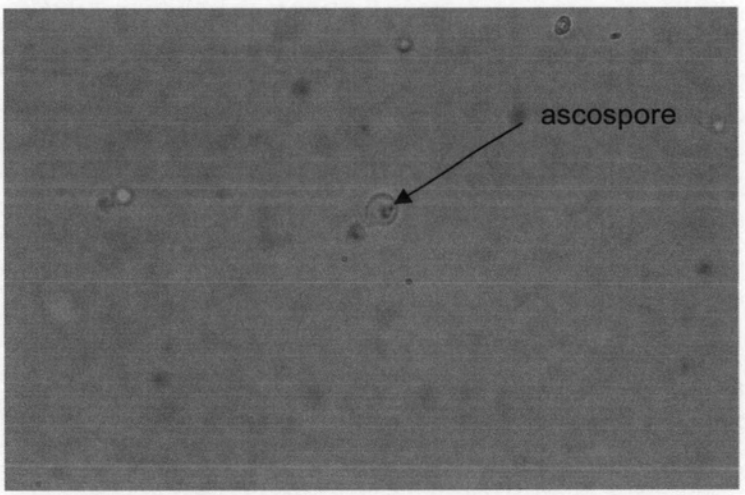
จากการจำแนกสกุลของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ PY1 อ้างอิงตาม The yeast a taxonomic study (Lodder และคณะ, 1952) พบว่ายีสต์สายพันธุ์ PY1 มีลักษณะโคโลนีกลม สีขาวครีม ขอบ

เรียบ ผิวด้าน กลางโคโลนีมีผิวย่นเล็กน้อย การย้อมสีติดแกรมบวก รูปร่างเซื้อยีสต์เป็นทรงกลมรี ขนาดกว้าง 2.0 - 4.8 ไมครอน ยาว 2.6 - 5.2 ไมครอน มีการสร้างสปอร์เป็นรูปทรงคล้ายหมวก

ผลการทดสอบทางชีวเคมีที่อ้างอิงใน The chemistry and biology of yeasts (Cook, 1958) แสดงไว้ในตารางที่ 4.3



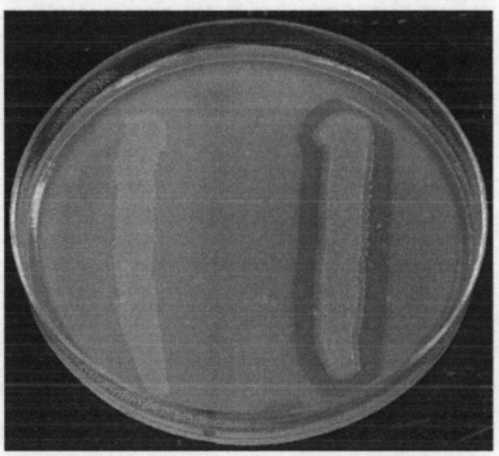
รูปที่ 4.3 ลักษณะโคโลนีของยีสต์สายพันธุ์ PY1



รูปที่ 4.4 รูปร่างเซลล์ของยีสต์สายพันธุ์ PY1 ซึ่งแสดง ascospore อยู่ภายในที่มีรูปร่างคล้ายหมวก (hat- shape) ขนาดขยาย 1,000 เท่า

ตารางที่ 4.3 ผลการศึกษาเพื่อจำแนกเชื้อยีสต์สายพันธุ์ PY1 ทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา

การศึกษา	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา
ลักษณะโคโลนี	สีขาวครีม ขอบเรียบ ผิวด้าน ผิวย่นเล็กน้อย
การย้อมติดสีแกรม	แกรมบวก
รูปร่างและขนาดของเซลล์	ลักษณะกลมรี กว้าง 2.0 - 4.8 ไมครอน ยาว 2.6 - 5.2 ไมครอน
การสร้างสปอร์	สร้างสปอร์ รูปร่างคล้ายหมวก
การเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ 20 °ซ 25 °ซ 30 °ซ 40 °ซ 45 °ซ	 ++ +++ +++ + -
การทดสอบไลเปส	+



เชื้อที่ไม่สร้างไลเปส เชื้อยีสต์สายพันธุ์ PY1

รูปที่ 4.5 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ไลเปสของยีสต์ที่คัดเลือกได้บนอาหารแข็งไตรบูไทริน บริเวณส่วนใสรอบโคโลนีแสดงถึงความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไลเปส

ตารางที่ 4.4 ผลการทดสอบทางด้านชีวเคมีเพื่อการจำแนกเชื้อยีสต์สายพันธุ์ PY1

การทดสอบ	เชื้อยีสต์สายพันธุ์ PY1	*Pichia anomala*
Assimilation of carbon compound		
- glucose	+	+
- galactose	+	+
- L- sorbose	+	+
- sucrose	+	+
- maltose	+	+
- thehalose	+	+
- lactose	-	-
- soluble starch	+	+
- D- xylose	+	+
- D- ribose	-	-
- D- mannitol	+	+
- glycerol	+	+
- ethanol	+	+
- inositol	-	-
- succinic acid	-	-
- citric acid	-	-
- D- glucuronic acid	+	+
- D- galacturonic	+	+
Assimilation of nitrogen compound		
- nitrate	+	+
- nitrite	-	-
- L- lysine	+	+
- ammonium	+	+

หมายเหตุ + สามารถใช้ได้ (Positive) - ไม่สามารถใช้ได้ (Negative)

ตารางที่ 4.4 ผลการทดสอบทางด้านชีวเคมีเพื่อการจำแนกเชื้อยีสต์สายพันธุ์ PY1 (ต่อ)

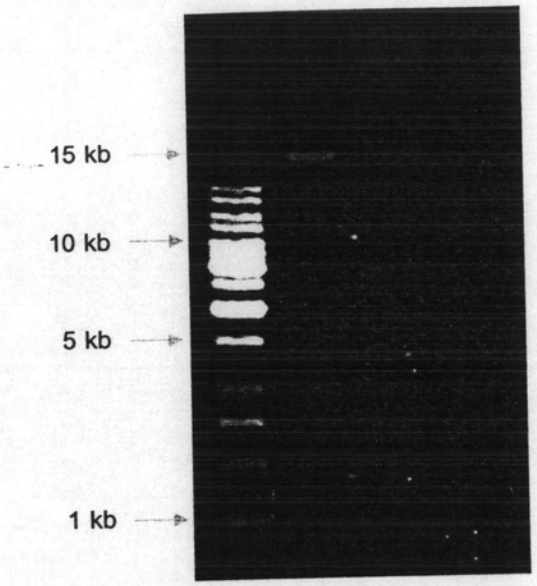
การทดสอบ	เชื้อยีสต์สายพันธุ์ PY1	*Pichia anomala*
Fermentation of sugars		
- Glucose	+	+
- Sucrose	+	+
- Galactose	+	+
- Lactose	-	-
Hydrolysis of urea	-	-
Diazonium Blue B (DBB) test	-	-

หมายเหตุ + หมายถึง เจริญได้ หรือ เกิดปฏิกิริยากับการทดสอบ (Positive)

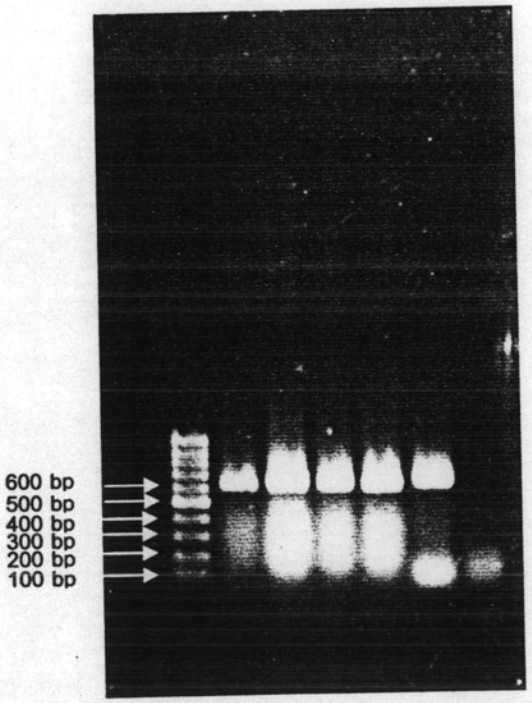
- หมายถึง ไม่เจริญ หรือ ไม่เกิดปฏิกิริยากับการทดสอบ (Negative)

จากการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ PY1 อ้างอิงตาม The chemistry and biology of yeasts (Cook, 1958) โดยพิจารณาจากความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนชนิดต่างๆ ความสามารถในการหมักน้ำตาล การย่อยสลายยูเรีย และการทดสอบ Diazonium Blue B (DBB) สามารถจำแนกเชื้อยีสต์สายพันธุ์ PY1 ได้เป็น *Pichia anomala*

การบ่งชี้ชนิดของยีสต์ในระดับสปีชีส์โดยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ประมวลรหัสของตำแหน่ง internal transcribed spacer (ITS) ณ ตำแหน่ง ITS1 ถึง ITS4 ของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ PY1 โดยการสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 15 กิโลเบส แล้วทำการเพิ่มปริมาณด้วยวิธีเทคนิคพีซีอาร์ ผลการวิเคราะห์ได้สารละลายดีเอ็นเอที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ประมาณ 600 bp จึงนำมาวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (จากผลวิเคราะห์บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้) ด้วยโปรแกรม DNASIS นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ 602 bp ในรูปที่ 4.7 เปรียบเทียบกับ Gen Bank ด้วยโปรแกรม Blast N ของ NCBI (http://www.ncbi.nlm. nih.gov/) ดังแสดงในรูปที่ 4.7 ผลการวิเคราะห์พบว่าเชื้อยีสต์สายพันธุ์ PY1 มีความคล้ายคลึง 98% กับ *Pichia anomala* MTCC 462 จึงอาจสรุปได้ว่ายีสต์สายพันธุ์ PY1 เป็นจุลินทรีย์ *Pichia anomala* ดังนั้นจึงขอเรียกยีสต์สายพันธุ์ PY1 ว่า *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1



รูปที่ 4.6 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของชิ้นส่วนโครมาโซมของยีสต์สายพันธุ์ PY1



รูปที่ 4.7 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจากบริเวณ ITS1 ถึง ITS4 ของ rDNA

>gi|29569628|gb|AY231607. *Pichia anomala* MTCC 462

Length = 602

Score = 936 bits (472), Expect = 0.0

Identities = 560/569 (98%), Gaps = 6/569 (1%)

Strand=Plus/Plus

```
14   GTATTCTATTGCCAGCGCTTAATTGCGC--CGATAAACCTTACACACATTGCTCTAGnnn  71
     ||||||||||||||||||||||||||||  |||||||||||||||||||||| |||||||
23   GTATTCTATTGCCAGCGCTTAATTGCGCGGCGATAAACCTTACACACATTG-TCTAGTTT  81

72   nnnnGAACTTTGCTTTGGGTGCATCAGCCTAGCTGCGTGCCCAAAGGTCTAAACACAnnn  131
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
82   TTTTGAACTTTGCTTTGGGTGCATCAGCCTAGCTGCGTGCCCAAAGGTCTAAACACATTT  141

132  nnnnAATGTTAAAACCTTTAACCAATAGTCATGAAAATTTTTAACCAAAATTAAAATCTT  191
     |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||
142  TTTTAATGTTAAAACCTTTAACCAATAGTCATGAAAATTTTTAACAAAAATTAAAATCTT  201

192  CAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG  251
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
202  CAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG  261

252  ATACGTATTGTGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCACC  311
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
262  ATACGTATTGTGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCACC  321

312  CTCTGGTATTCCAGAGGGTATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCTCAAACCTTCGGGTT  371
     |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||
322  CTCTGGTATTCCAGAGGGTATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCTCAAACCTTCGGGTT  381

372  TGGTATTGAGTGATACTCTGTCAAGGGTTAACTTGAAATATTGACTTACCAAGAGTGTAC  431
     |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||
382  TGGTATTGAGTGATACTCTGTCAAGGGTTAACTTGAAATATTGACTTAGCAAGAGTGTAC  441

432  TAATAAGCAG-CTTTCTGAAATAATGTATTAGGTTCTTCCAACTCGCTATATCAGCTAGG  490
     |||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||
442  TAATAAGCAGTCTTTCTGAAATAATGTATTAGGTTCTTCCAACTCGTTATATCAGCTAGG  501

491  CAGGTTTAGAAGTATTTTAGGCTCGGCTT-ACAACAATAAACTAAAAGTTTGACCTCAAA  549
     |||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||
502  CAGGTTTAGAAGTATTTTAGGCTCGGCTTAACAACAATAAACTAAAAGTTTGACCTCAAA  561

550  TCAGG-AGGACTACCCGCTGAACTTAAGC  577
     ||||| |||||||||||||||||||||||
562  TCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGC  590
```

รูปที่ 4.8 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ PY1 เปรียบเทียบกับข้อมูลและเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Pichia anomala* MTCC 462 ที่มีอยู่ใน Gen Bank ด้วยโปรแกรม Blast N

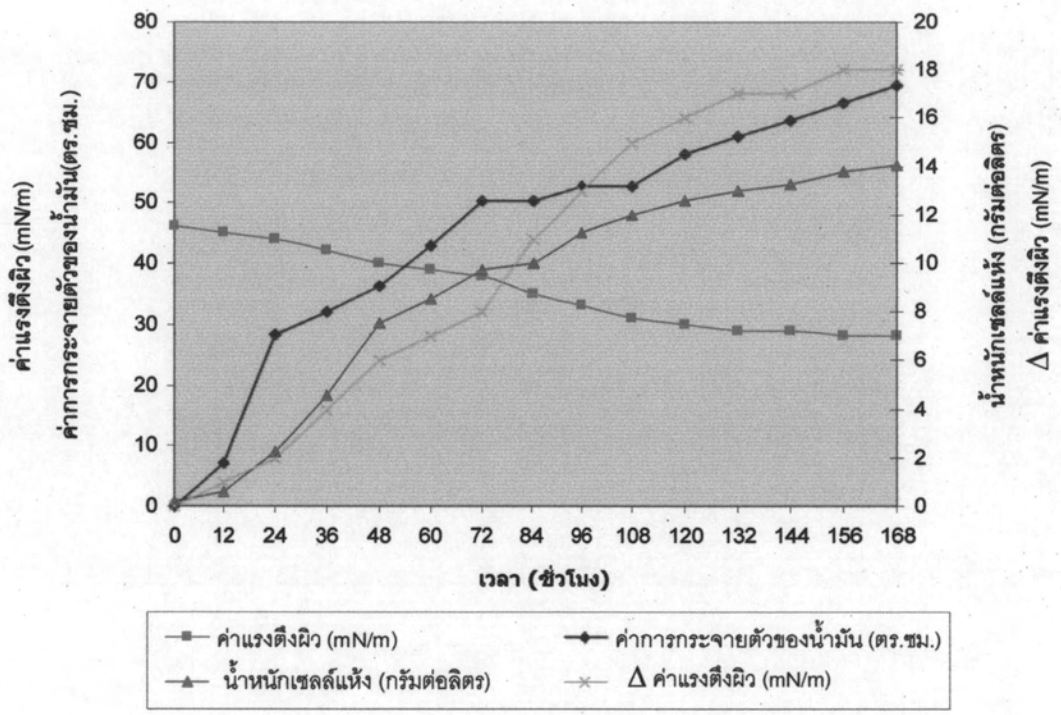
4.4 การศึกษาการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอาหารเหลวกำหนดสูตร

จากการศึกษาการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอาหารเหลวกำหนดสูตร (Hua และคณะ, 2003) (ภาคผนวก ก) เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °ซ ภาวะขวดเขย่าด้วยอัตราเร็ว รอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง นำน้ำเลี้ยงเชื้อมาวัดการเจริญโดยหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และนำส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อไปวัดประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ค่าของน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าการกระจายน้ำมัน ค่าแรงตึงผิว ของ *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l)	พื้นที่การกระจายน้ำมัน (cm^2)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	Δค่าแรงตึงผิว $_{b-t}$ (mN/m)
0	0.22	0	46	0
12	0.61	7.07	45	1
24	2.26	28.29	44	2
36	4.57	32.18	42	4
48	7.56	36.33	40	6
60	8.55	43.03	39	7
72	9.72	50.29	38	8
84	9.98	50.29	35	11
96	11.28	52.83	33	13
108	11.96	52.83	31	15
120	12.55	58.11	30	16
132	12.99	60.85	29	17
144	13.23	63.64	29	17
156	13.76	66.50	28	18
168	14.03	69.43	28	18

หมายเหตุ : Δ ค่าแรงตึงผิว $_{b-t}$ คือ ค่าแรงตึงผิวที่เวลาที่ 0 ชั่วโมง – ค่าแรงตึงผิว ณ เวลาใดๆ



รูปที่ 4.9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อยีสต์ *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

4.5 การศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

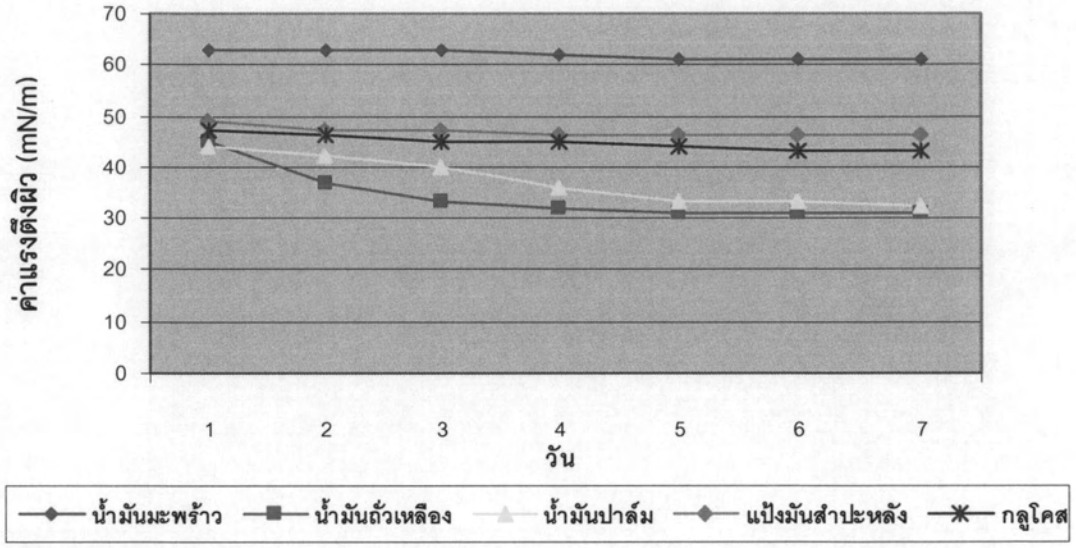
การแปรผันแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ผลการทดลองพบว่า น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากมีค่าการกระจายตัวของน้ำมันสูงสุด 34.23 cm^2 และค่าแรงตึงผิวต่ำสุด เท่ากับ 33 mN/m ดังแสดงในตารางที่ 4.6 ส่วนการแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน พบว่าที่ความเข้มข้น 4% ของน้ำมันถั่วเหลือง เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งจะให้ค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 38.50 cm^2 และค่าแรงตึงผิว 31 mN/m แสดงผลในตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.6 ผลการแปรผันแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

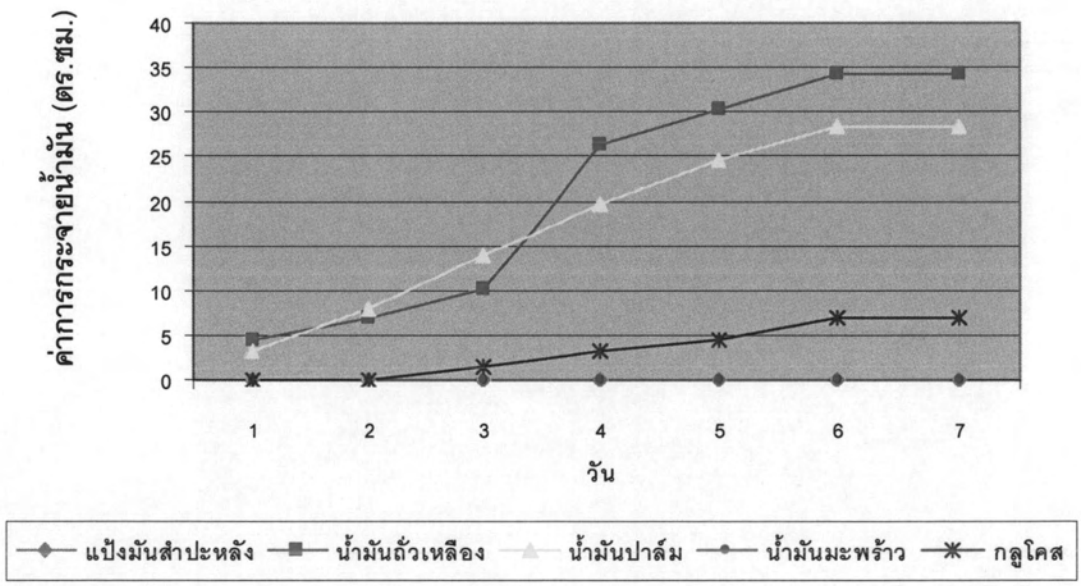
แหล่งคาร์บอน (8% w/v)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	Δค่าแรงตึงผิว $_{b-t}$ (mN/m)	ค่าการกระจายตัวของน้ำมัน (cm^2)	ค่า pH
กลูโคส	15.21	43	4	7.07	6.68
แป้งมันสำปะหลัง	10.78	61	5	< 1	6.56
น้ำมันถั่วเหลือง	14.94	33	19	34.23	7.51
น้ำมันปาล์ม	13.48	32.5	10.5	28.29	7.68
น้ำมันมะพร้าว	9.55	46	3	< 1	7.02

ตารางที่ 4.7 ผลการแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

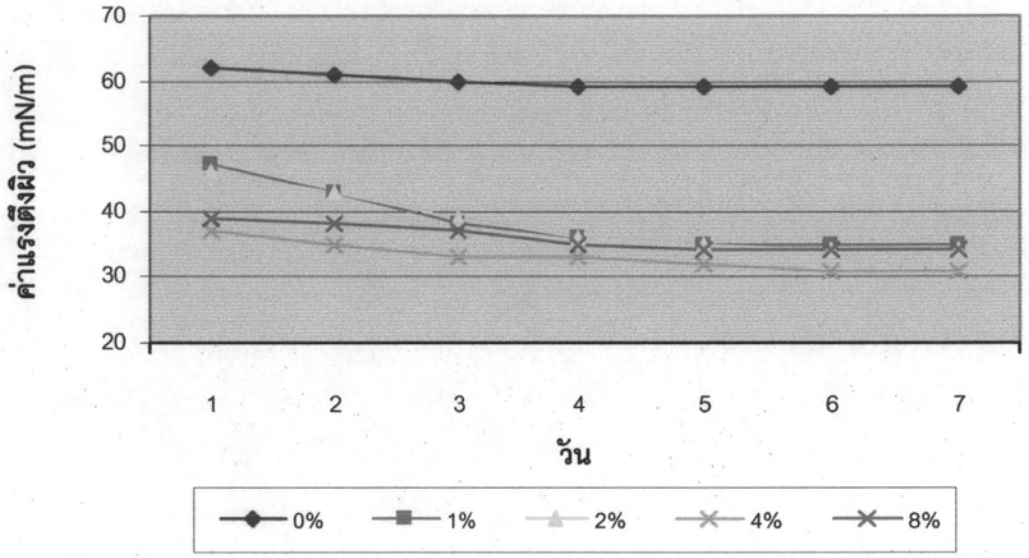
ความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลือง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	Δค่าแรงตึงผิว $_{b-t}$ (mN/m)	ค่าการกระจายตัวของน้ำมัน (cm^2)	ค่า pH
0 %	0.57	59	6	11.35	7.35
1 %	8.31	35	18	19.64	6.83
2 %	7.01	34	18	28.29	6.88
4 %	11.52	31	21	38.50	6.81
8 %	10.01	34	18	30.20	6.71



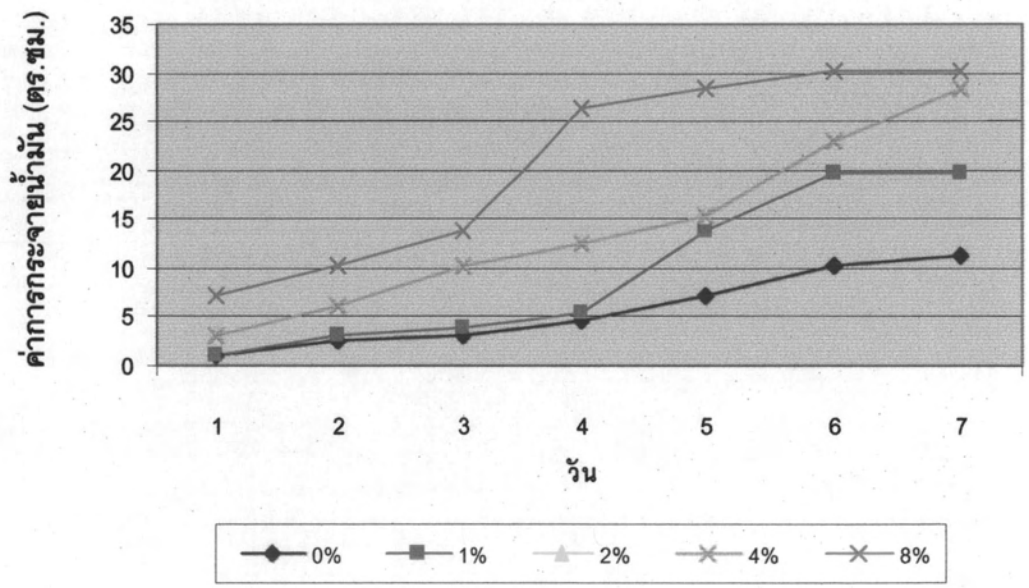
รูปที่ 4.10 แสดงค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 ที่ใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ



รูปที่ 4.11 แสดงค่าการกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ



รูปที่ 4.12 แสดงค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 เมื่อใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน ที่แปรผันความเข้มข้นต่างๆ



รูปที่ 4.13 แสดงค่าการกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 เมื่อใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน ที่แปรผันความเข้มข้นต่างๆ

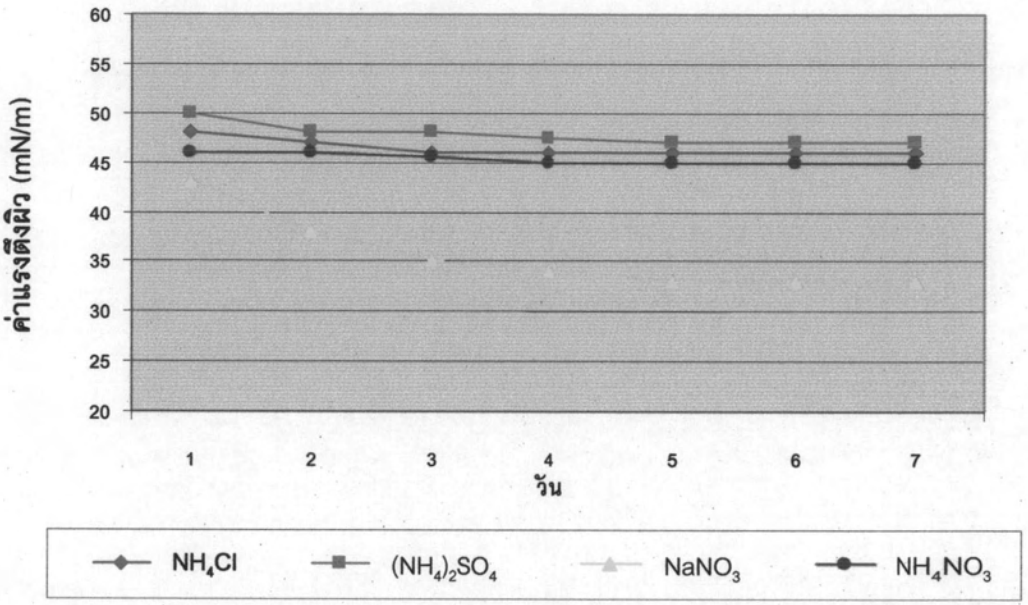
เมื่อทำการแปรผันแหล่งไนโตรเจน พบว่า $NaNo_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 ให้ผลค่าการกระจายตัวของน้ำมันสูงสุดเท่ากับ 28.29 cm^2 และค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 33 mN/m ดังแสดงในตารางที่ 4.8 และการแปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน จากผลการทดลอง พบว่าที่ความเข้มข้น 0.4% $NaNo_3$ จะให้ค่าการกระจายน้ำมัน 45.48 cm^2 และค่าแรงตึงผิว 29 mN/m ดังแสดงในตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.8 ผลการแปรผันแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

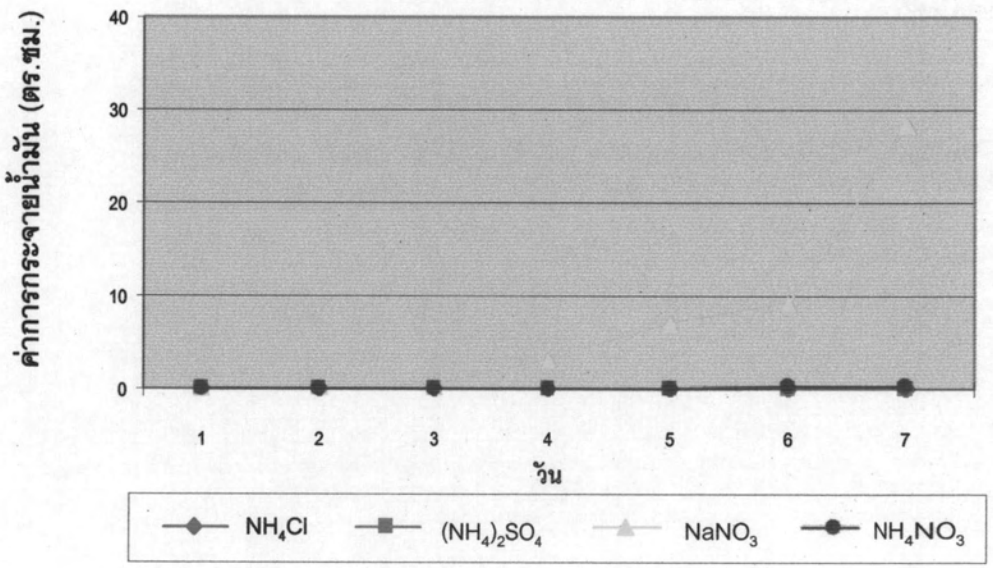
แหล่งไนโตรเจน (0.2% w/v)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	Δค่าแรงตึงผิว $_{b-t}$ (mN/m)	ค่าการกระจายตัวของน้ำมัน (cm^2)	ค่า pH
NH_4NO_3	3.71	45	1	< 1	7.15
$(NH_4)_2SO_4$	2.62	47	5	< 1	7.33
NH_4Cl	3.37	46	5	< 1	7.79
$NaNO_3$	10.08	33	20	28.29	7.20

ตารางที่ 4.9 ผลการแปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

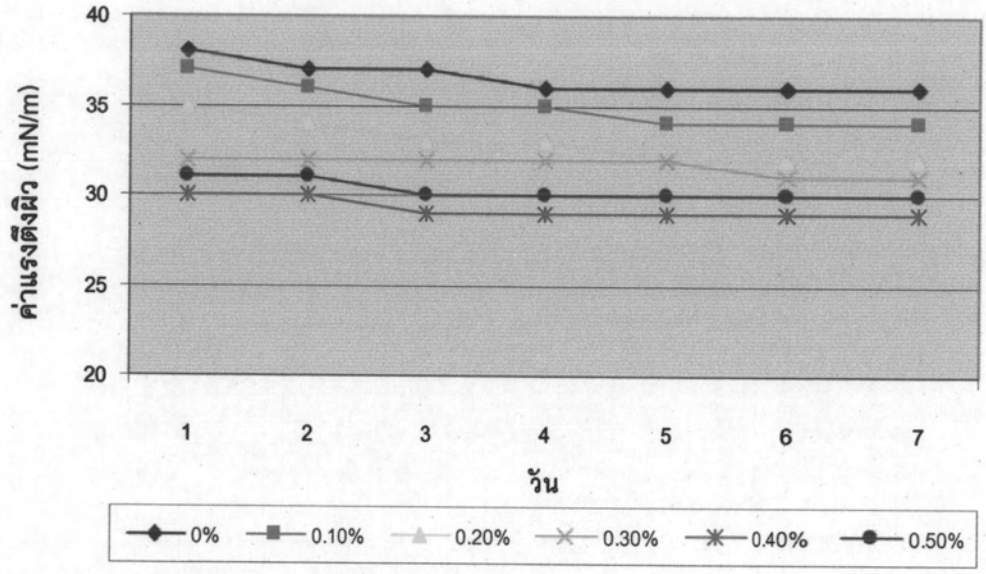
ความเข้มข้นของ $NaNO_3$	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	Δค่าแรงตึงผิว $_{b-t}$ (mN/m)	ค่าการกระจายตัวของน้ำมัน (cm^2)	ค่า pH
0 %	9.09	36	19	7.07	6.16
0.1 %	15.08	34	19	19.63	7.13
0.2 %	16.01	32	21	19.63	7.26
0.3 %	12.97	31	21	36.33	7.31
0.4 %	14.15	29	22	45.48	7.41
0.5 %	11.94	30	21	34.22	7.76



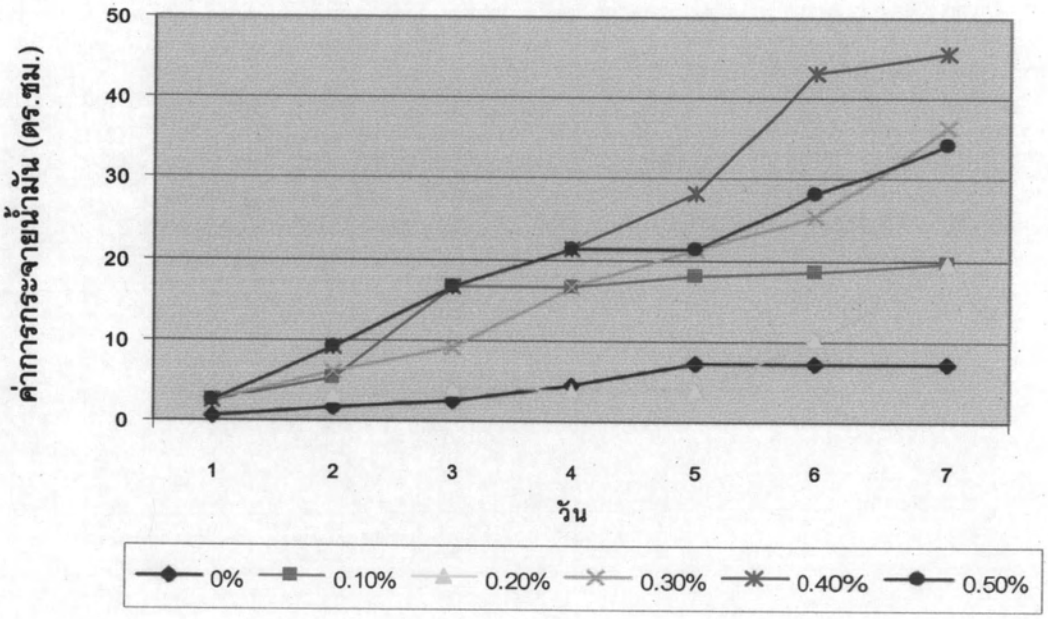
รูปที่ 4.14 แสดงค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 ที่ใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ



รูปที่ 4.15 แสดงค่าการกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1ที่ใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ



รูปที่ 4.16 แสดงค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 ที่ใช้ $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยทำการแปรผันความเข้มข้นต่างๆ



รูปที่ 4.17 แสดงค่าการกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 ที่ใช้ $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยทำการแปรผันความเข้มข้นต่างๆ

4.6 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงยีสต์ที่คัดแยกได้เพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

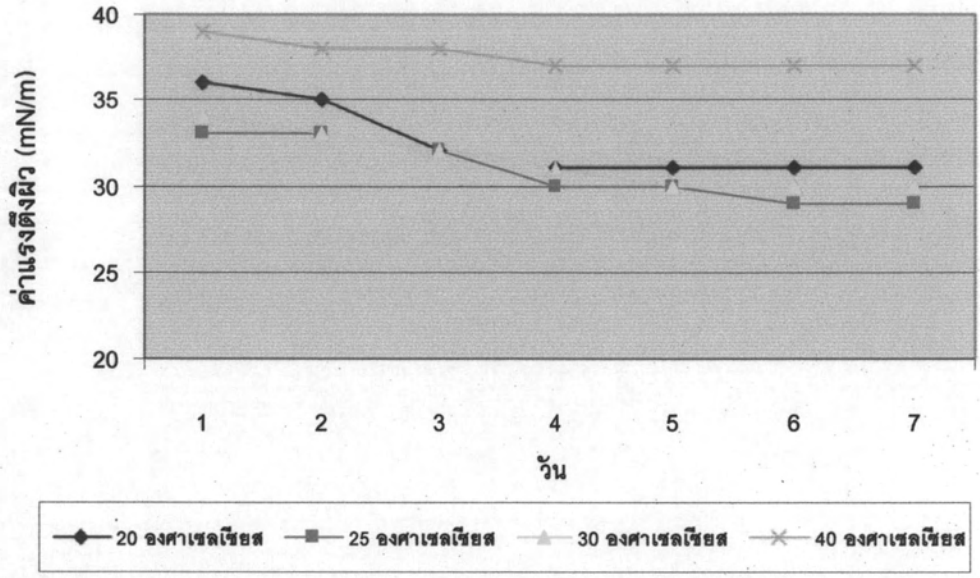
จากผลการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเนื่องจากมีค่าแรงตึงผิวใกล้เคียงกัน (29 และ 30 mN/m ตามลำดับ) แต่เมื่อพิจารณาค่าการกระจายตัวของน้ำมัน พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีค่าการกระจายตัวของน้ำมันสูงสุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 43.03 cm^2 ดังแสดงในตารางที่ 4.10 การศึกษาค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพพบว่าที่ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น เท่ากับ 5.5 ให้ผลการกระจายน้ำมันสูงสุด 63.64 cm^2 มีค่าแรงตึงผิว 28 mN/m ดังแสดงในตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.10 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

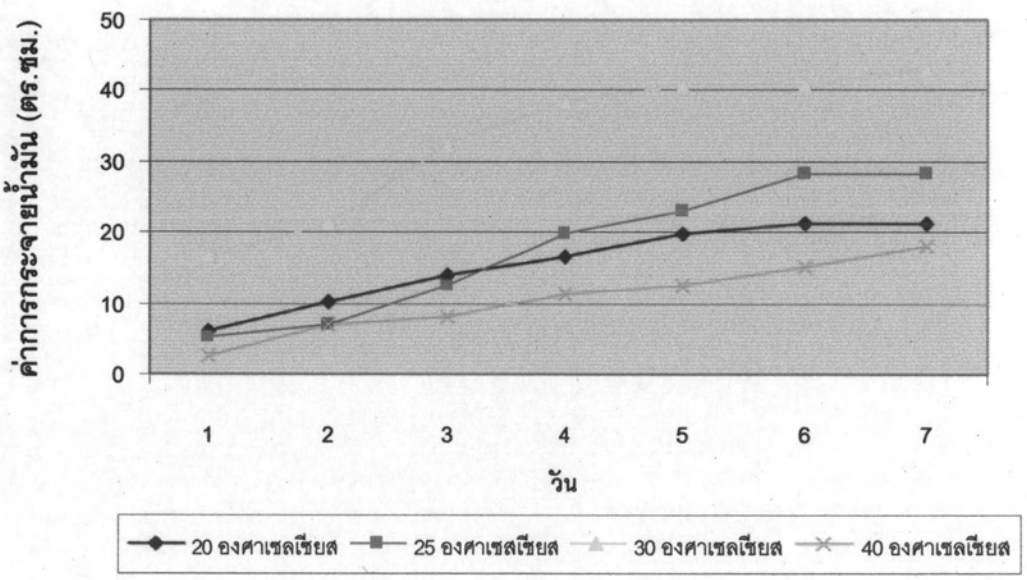
อุณหภูมิที่ศึกษา	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	Δค่าแรงตึงผิว $_{b-t}$ (mN/m)	ค่าการกระจายตัวของน้ำมัน (cm^2)	ค่า pH
20 °ซ	10.76	31	20	21.24	7.18
25 °ซ	11.04	29	22	28.29	7.23
30 °ซ	10.18	30	21	43.03	7.39
40 °ซ	6.03	37	14	18.10	6.89

ตารางที่ 4.11 ผลการศึกษาค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

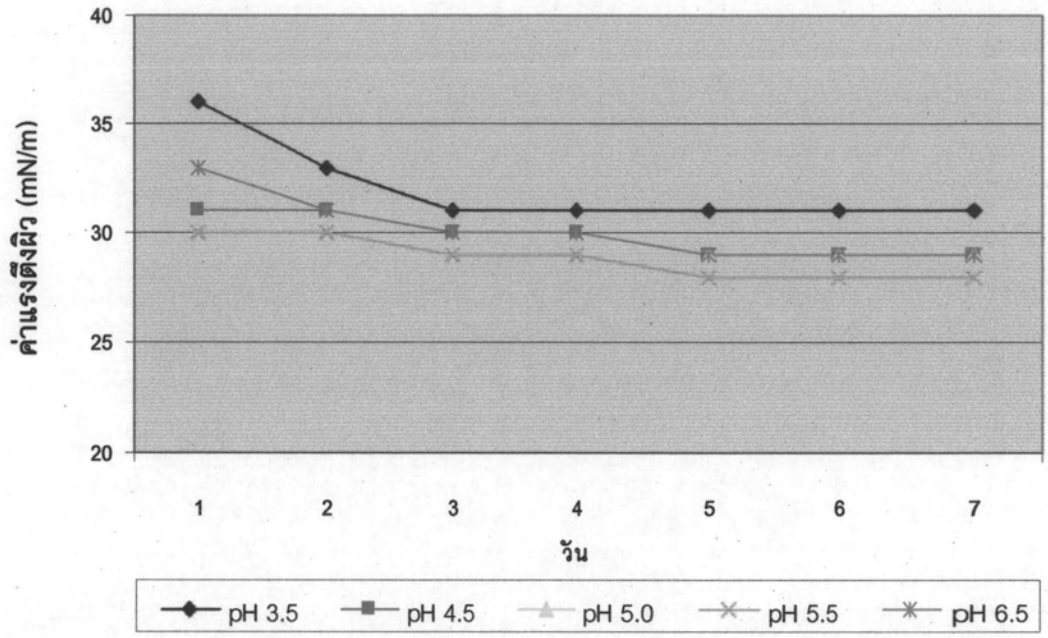
ค่า pH เริ่มต้นที่ศึกษา	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	Δค่าแรงตึงผิว $_{b-t}$ (mN/m)	ค่าการกระจายตัวของน้ำมัน (cm^2)	ค่า pH
3.5	13.45	31	19	30.20	6.87
4.5	10.02	29	21	32.18	7.11
5.0	11.34	29	21	55.44	7.37
5.5	10.39	28	22	63.64	7.44
6.5	12.83	29	20	52.83	8.04



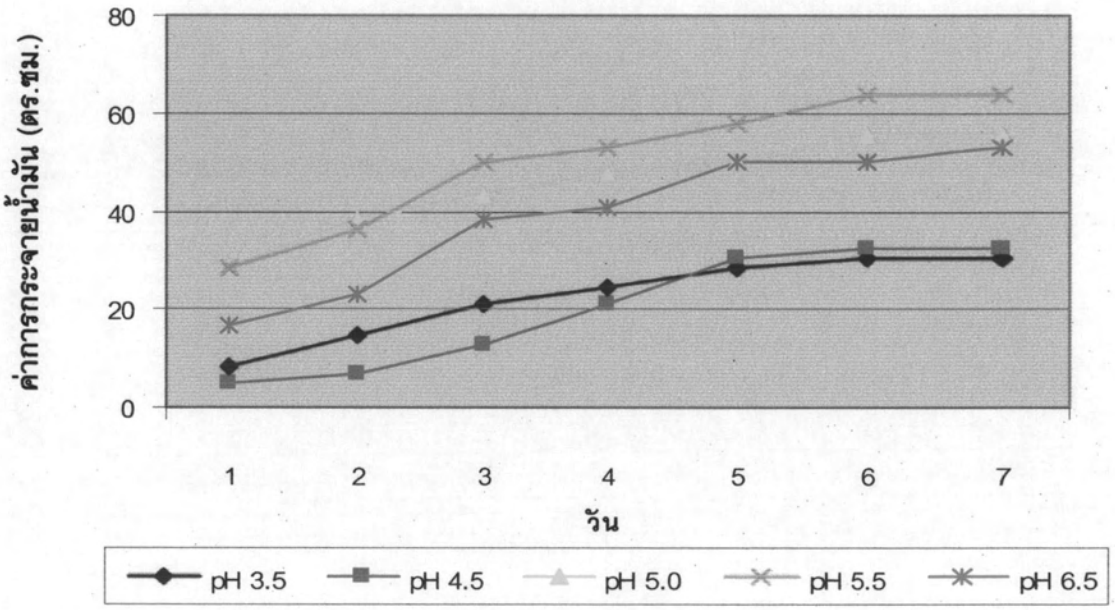
รูปที่ 4.18 แสดงค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 ทำการแปรผันอุณหภูมิการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 20, 25, 30 และ 40 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.19 แสดงค่าการกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 ทำการแปรผันอุณหภูมิการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 20, 25, 30 และ 40 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.20 แสดงค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 ทำการแปรผันค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 3.5, 4.5, 5.0, 5.5 และ 6.5



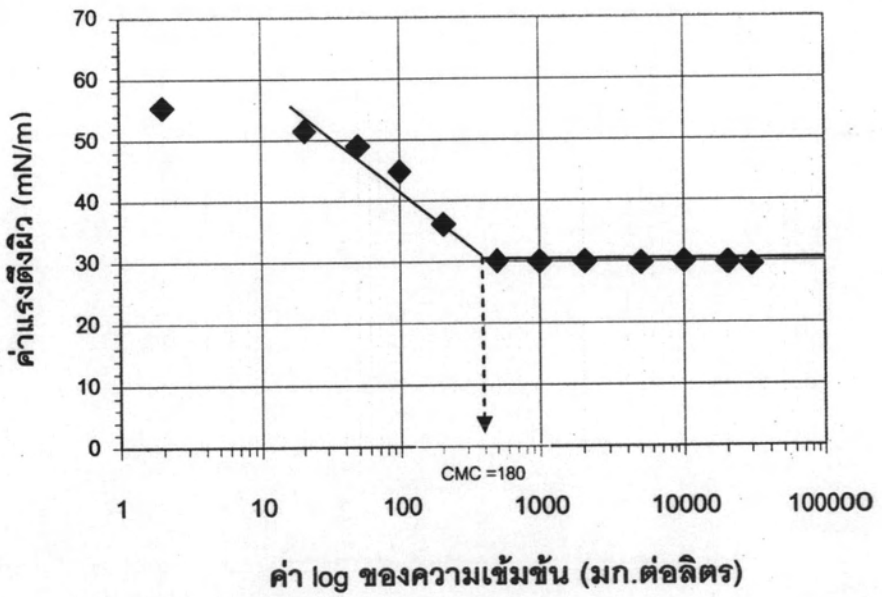
รูปที่ 4.21 แสดงค่าการกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 ทำการแปรผันค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 3.5, 4.5, 5.0, 5.5 และ 6.5

4.7 การผลิตและการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากยีสต์ *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่ประกอบด้วย 0.02% KH_2PO_4, 0.02% $MgSO_4.7H_2O$, 0.1% สารสกัดยีสต์ 0.4% $NaNO_3$ และ 4% น้ำมันถั่วเหลือง ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$ ซ ในระดับขวดเขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน หลังจากการสกัดด้วยสารละลายอินทรีย์จะให้ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เท่ากับ 0.26 กรัมต่อลิตร สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มีค่าแรงตึงผิวต่ำสุด 28 mN/m และค่าการกระจายน้ำมัน เท่ากับ 95.07 cm^2

4.8 การศึกษาสมบัติทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

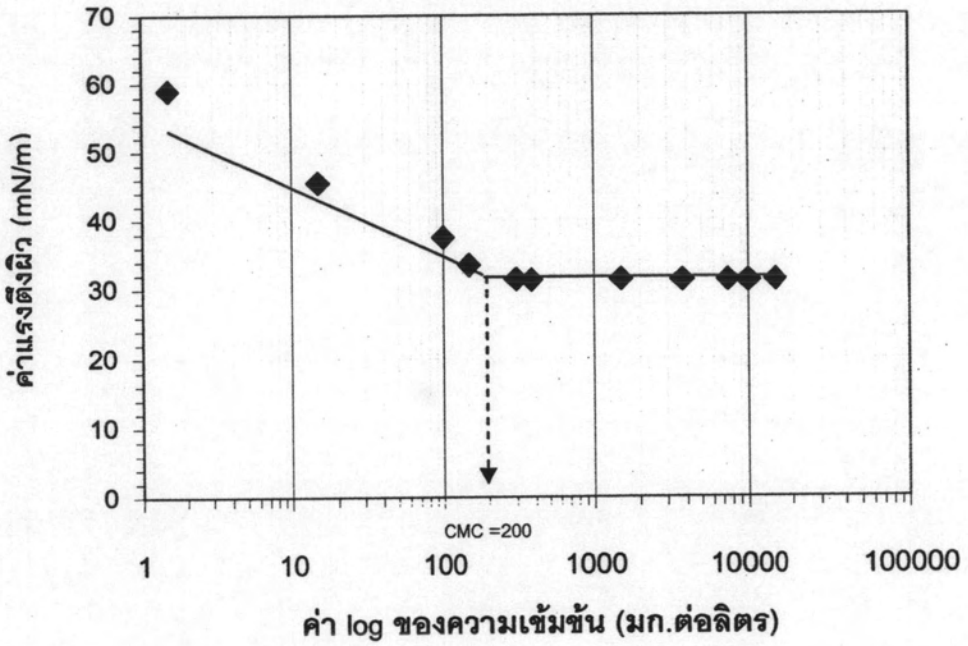
การหาค่าจุดวิกฤติของความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ (Critical micelle concentration; CMC) จากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน ซึ่งเตรียมได้จากข้อ 3.7 นำมาชั่งน้ำหนักและละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8 เตรียมให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ กัน ตั้งแต่ 1-100,000 มก.ต่อลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าแรงตึงผิว และคำนวณหาค่า CMC



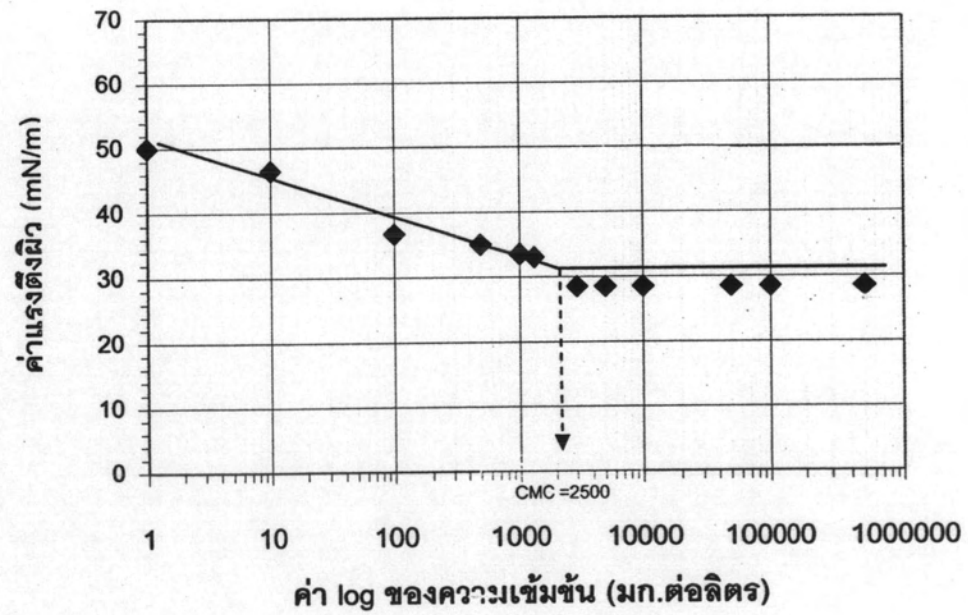
รูปที่ 4.22 แสดงการหาค่า CMC ซึ่งเขียนกราฟระหว่างค่าแรงตึงผิวและ log ของความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1

จากรูปที่ 4.22 เมื่อลากเส้นตรงจากจุด D ตั้งฉากกับแกน X จะได้ค่า CMC เท่ากับ 180 mg/l และค่าแรงตึงผิว ณ การเกิดไมเซลล์ (γCMC) เท่ากับ 29.5 mN/m

ไทรทอน เอกซ์ 100



เคมเทค 307



รูปที่ 4.23 แสดงค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์

ไทรทอน เอกซ์ 100 มีค่า CMC เท่ากับ 200 มก.ต่อลิตร

เคมเทค 307 มีค่า CMC เท่ากับ 2,500 มก.ต่อลิตร

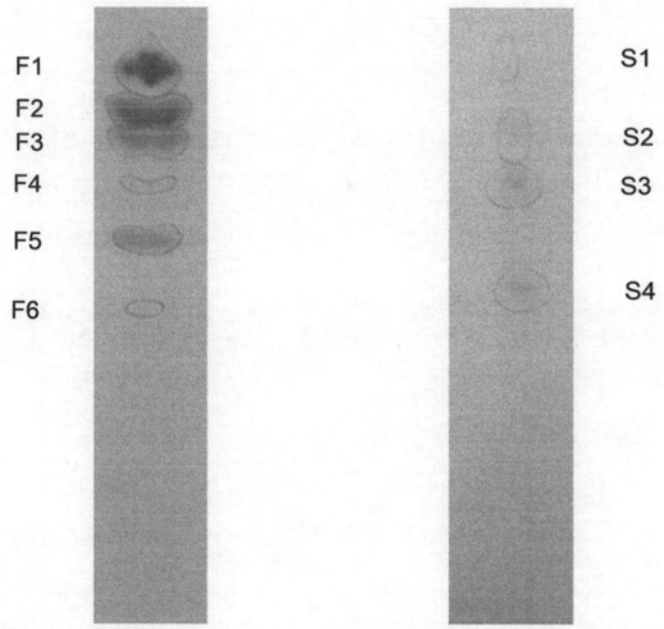
ตารางที่ 4.12 เปรียบเทียบลักษณะสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้กับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ที่ความเข้มข้น 1,000 มก.ต่อลิตร

สารลดแรงตึงผิว	ค่า CMC (mg/l)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	ค่าการกระจายตัวของน้ำมัน (cm^2)
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1	180	29.5	12.57
ไทรทอน เอกซ์ 100	200	31.3	28.30
เคมเทค 307	2,500	28.5	3.80

จากตารางที่ 4.12 การทดสอบการกระจายตัวของน้ำมัน ในการทดลองใช้ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว เท่ากับ 1,000 มก.ต่อลิตร ผลการทดลองพบว่าไทรทอน เอกซ์ 100 ให้ค่าการกระจายสูงสุด 28.30 cm^2 รองลงมาได้แก่ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 และเคมเทค 307 ตามลำดับ ส่วนการวิเคราะห์ค่าจุดวิกฤตการเกิดไมเซลล์หรือค่า CMC พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 ให้ค่า CMC (180 มก. ต่อลิตร) ต่ำกว่าไทรทอน เอกซ์ 100 และเคมเทค 307 และค่าแรงตึงผิว ณ การเกิดไมเซลล์ (γCMC) เท่ากับ 29.5 mN/m

4.9 การเตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนและวิเคราะห์องค์ประกอบของสารโดยวิธีโครมาโตกราฟี

การเตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธี analytical TLC โดยนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนมาตรวจสอบบนแผ่น TLC silica gel 60 เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยคลอโรฟอร์ม ต่อ เมทานอล ต่อ น้ำ (65: 25: 4) แล้วทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารด้วยไอระเหยของไอโอดีน และมอริส รีเอเจนต์ (Passeri และคณะ, 1992) พบว่าสามารถแยกสารออกได้เป็น 6 ลำดับส่วน เรียกว่า F1 ถึง F6 โดยมีค่าคงที่ของอัตราส่วนการเคลื่อนที่ (R_f) เป็น 0.94, 0.86, 0.80, 0.73, 0.62 และ 0.52 ตามลำดับ เมื่อทดสอบด้วยมอริส รีเอเจนต์ พบว่าเกิดจุดสีเขียวที่มีอัตราการเคลื่อนที่ (R_f) 0.94, 0.80, 0.73 และ 0.52 (S1- S4) ตามลำดับ จึงสันนิษฐานได้ว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 ผลิตได้มีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบหรืออาจเป็นสารประเภทไกลโคลิพิด



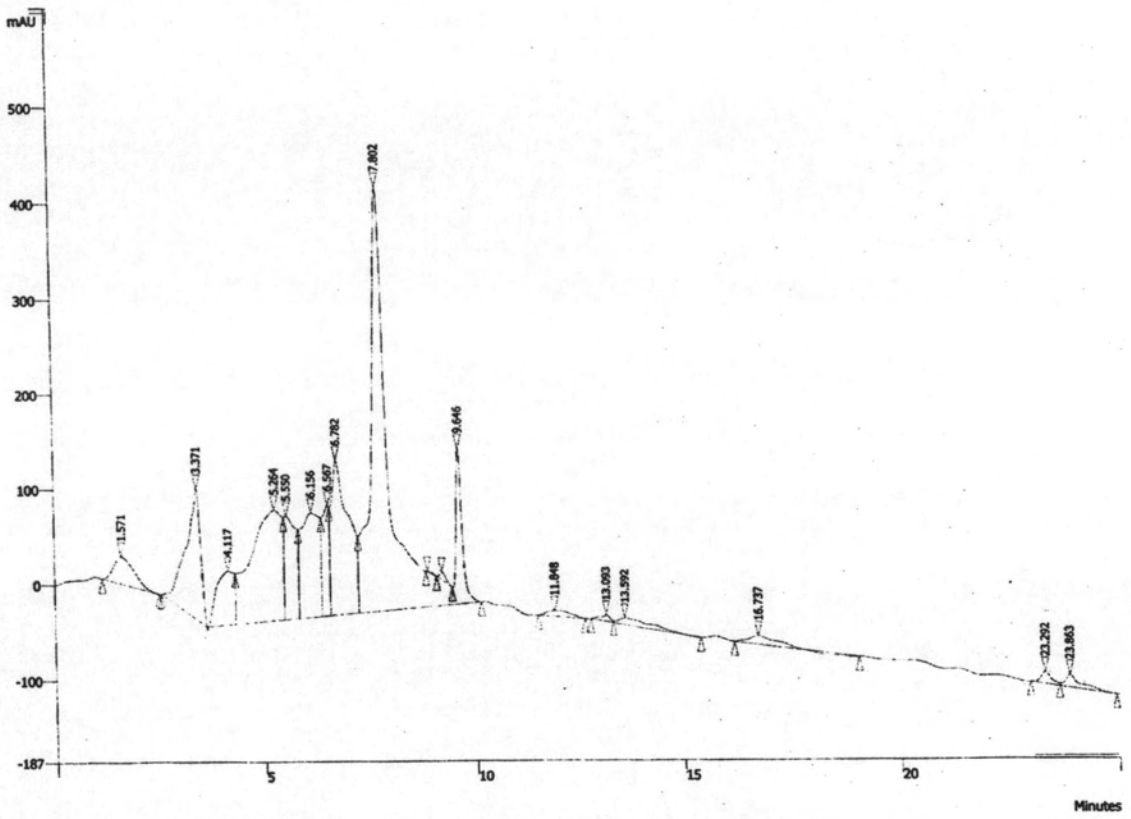
ตรวจสอบด้วยไอโอดีน ตรวจสอบด้วยมอริส รีเอเจนต์

รูปที่ 4.24 ผลการวิเคราะห์เมื่อนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มาวิเคราะห์และแยกให้บริสุทธิ์โดยวิธี analytical TLC ตรวจสอบผลด้วยไอโอดีน และมอริส รีเอเจนต์

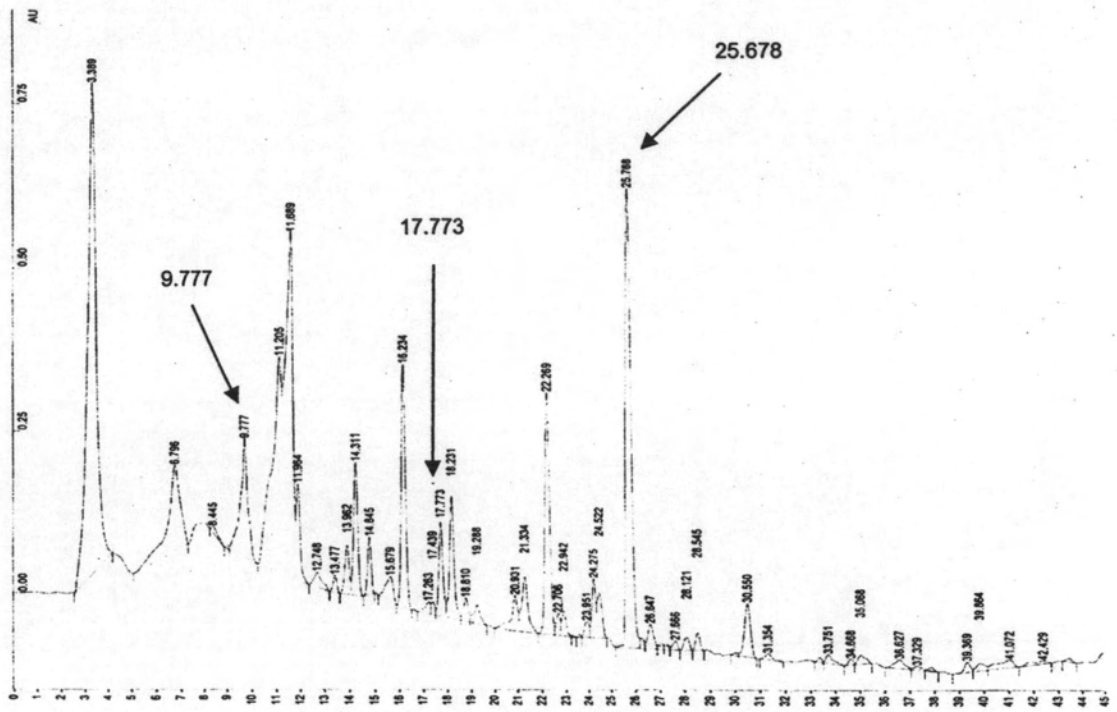
ตารางที่ 4.13 อัตราการเคลื่อนที่ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากการเลี้ยงเชื้อโดยมีน้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนบนแผ่น TLC และค่าการกระจายน้ำมัน

แถบที่	อัตราการเคลื่อนที่ (R_f)	ค่าการกระจายน้ำมัน (cm^2)
F1	0.94	56.77
F2	0.86	56.77
F3	0.80	28.26
F4	0.73	28.26
F5	0.62	19.65
F6	0.52	12.58
S1	0.94	31.18
S2	0.80	40.73
S3	0.73	1.13
S4	0.52	0.50

จากนั้นนำตัวอย่างสารตำแหน่ง F2 (R_f เท่ากับ 0.86) ที่เตรียมจาก preparative TLC มาวิเคราะห์สารและทำให้บริสุทธิ์ด้วย HPLC ด้วยภาวะตามข้อ 3.9.3 และทำการเก็บลำดับส่วนตัวอย่างจากทุกพีกที่ปรากฏและนำมาทำให้แห้งแล้วเติม 1 โมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง เท่ากับ 8 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร นำตัวอย่างที่ได้ไปวัดค่าการกระจายน้ำมันดังแสดงผลค่าการกระจายน้ำมันในตารางที่ 4.14



รูปที่ 4.25 โครมาโตแกรมของ HPLC จากสารโซโฟโรลิพิดที่ใช้เป็นสารเปรียบเทียบ



รูปที่ 4.26 โครมาโตแกรมของ HPLC จากตัวอย่างตำแหน่ง F2
ค่า RT ของพีกที่มีค่าการกระจายตัวของน้ำมันมาก ได้แก่ 9.777, 17.773 และ 25.768 นาที ซึ่งมีค่าการกระจายตัวของน้ำมันเท่ากับ 2.270, 2.011 และ 11.346 cm^2 ตามลำดับ

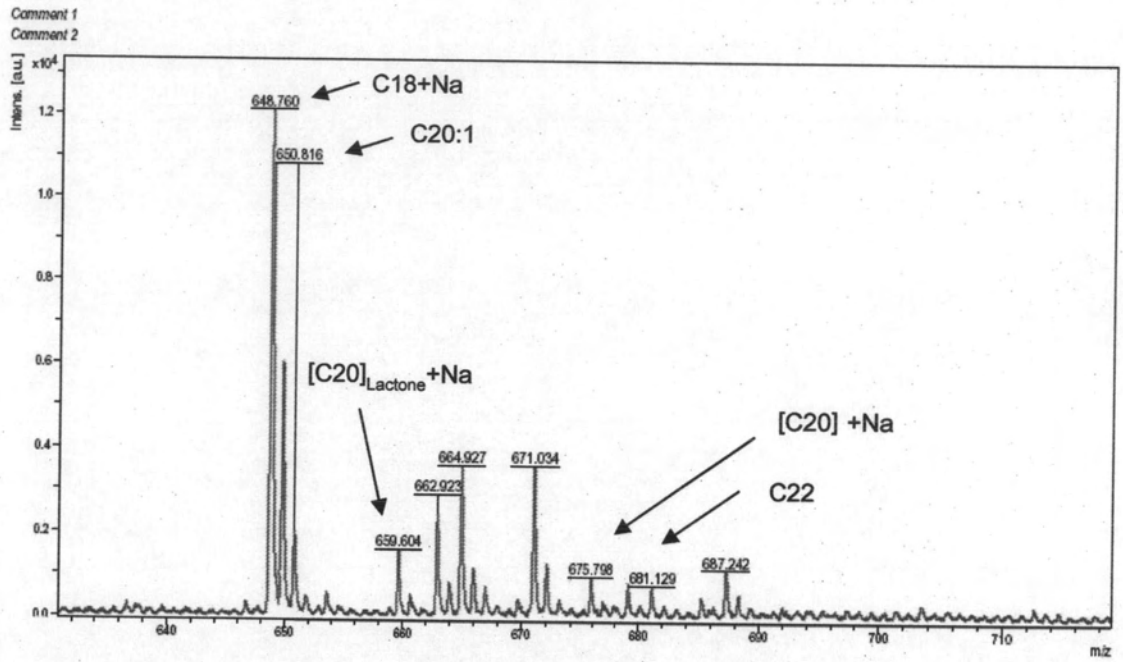
ตารางที่ 4.14 สรุปค่าการกระจายน้ำมันของตัวอย่างตำแหน่ง F2 เมื่อผ่านการวิเคราะห์และทำให้บริสุทธิ์ด้วย HPLC

ตำแหน่งพีกจากสารตำแหน่ง F2	Retention time (RT) (min)	ค่าการกระจายน้ำมัน (cm^2)
1	6.796	0.196
2	9.777	2.270
3	11.689	0.503
4	14.311	0.786
5	14.845	0
6	16.234	0
7	17.773	2.011
8	18.231	1.540
9	22.269	0.786
10	25.768	11.346
11	30.550	0.786

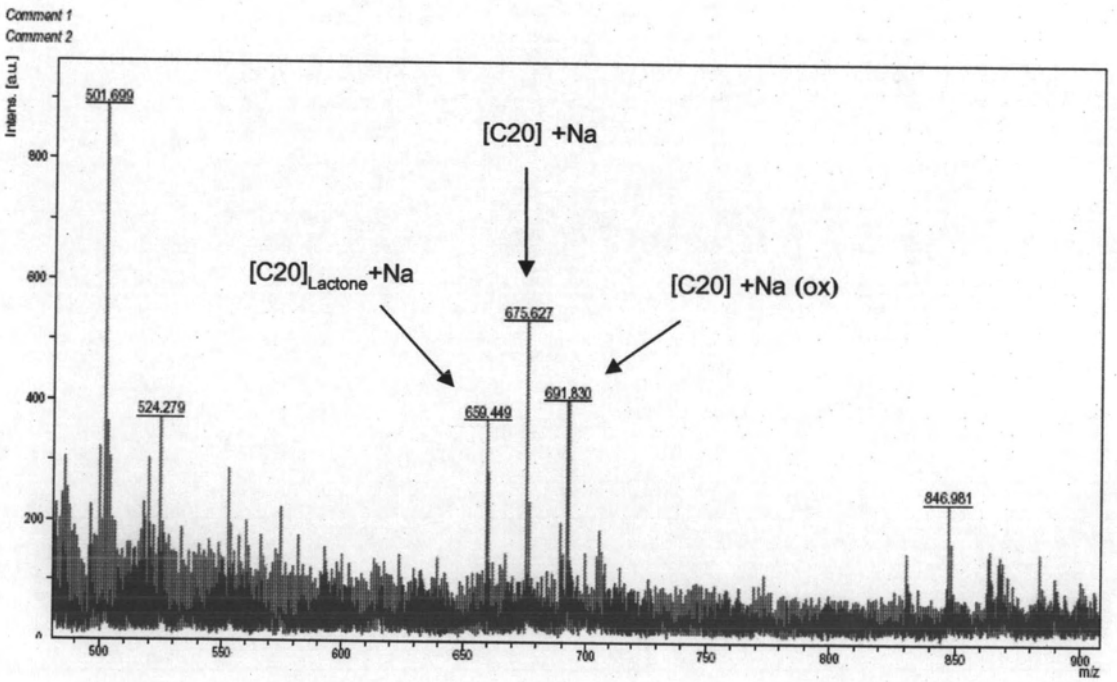
จากตารางที่ 4.12 ได้เลือกตำแหน่งพีกที่มีค่าการกระจายน้ำมันสูงสุด จากโครมาโตแกรมของ HPLC ได้ 3 ตัวอย่าง ดังนี้

- ตำแหน่งพีกที่ 2 เรียกว่า ตัวอย่างสาร A คือ ตำแหน่งที่ RT 9.777 นาที มีค่าการกระจายน้ำมัน 2.270 cm^2
- ตำแหน่งพีกที่ 7 เรียกว่า ตัวอย่างสาร B คือ ตำแหน่งที่ RT 17.773 นาที มีค่าการกระจายน้ำมัน 2.011 cm^2
- ตำแหน่งพีกที่ 10 เรียกว่า ตัวอย่างสาร C คือ ตำแหน่งที่ RT 25.768 นาที มีค่าการกระจายน้ำมัน 11.346 cm^2

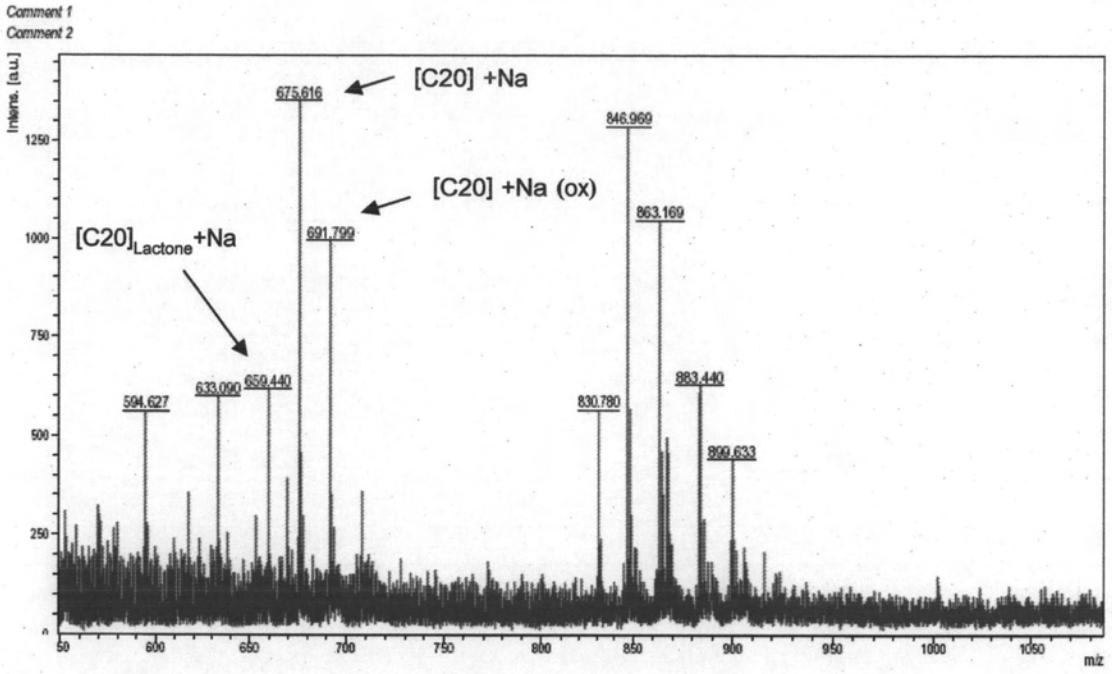
นำตัวอย่างสาร A B และ C มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย HPLC และนำไปทำการวิเคราะห์หาน้ำหนักมวลโมเลกุลด้วย LC-MS (Liquid Chromatography- Mass Spectrometry) ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



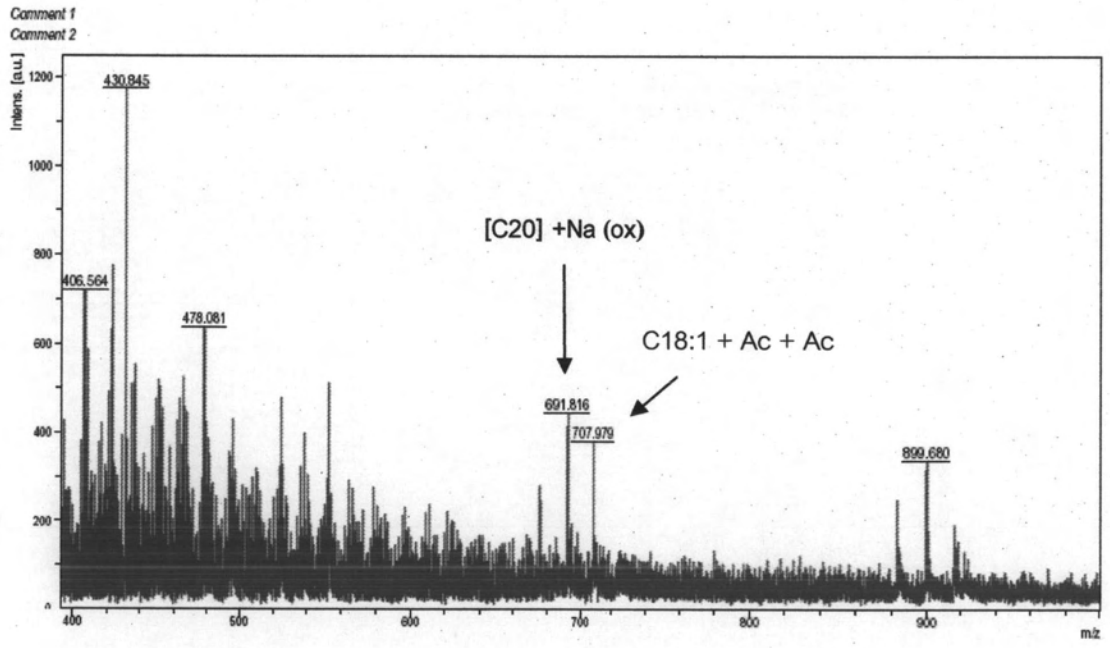
รูปที่ 4.27 โครมาโตแกรมของ LC-MS ของสารโซโฟโรลิพิดที่ใช้เป็นสารเปรียบเทียบ



รูปที่ 4.28 โครมาโตแกรมของ LC-MS ของตัวอย่างสาร A



รูปที่ 4.29 โครมาโตแกรมของ LC-MS ของตัวอย่างสาร B



รูปที่ 4.30 โครมาโตแกรมของ LC-MS ของตัวอย่างสาร C

จากผลการวิเคราะห์สารด้วย LC-MS ข้างต้นบ่งบอกถึงน้ำหนักมวลโมเลกุลของสารและสามารถวิเคราะห์โครงสร้างของสารที่ผลิตได้ ดังแสดงผลการวิเคราะห์ในตารางที่ 4.13

ตารางที่ 4.15 แสดงผลการวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ด้วย LC- MS

ตัวอย่างสาร	ค่า RT (นาที) จาก HPLC	$[M+H^+]$	มวลโมเลกุล	โครงสร้างสารโซโฟโรลิพิด
โซโฟโรลิพิด				
		648.760	647	C18 + Na
		650.816	650	C20:1
-		675.798	675	C20 + Na
		681.129	680	C22
สารที่ผลิตได้จากยีสต์สายพันธุ์ PY1				
ตัวอย่างสาร A	9.779	659.499	658	$[C20]_{Lactone}$ + Na
		675.627	675	C20 + Na
		691.830	691	C20 + Na (OX)
ตัวอย่างสาร B	17.773	659.440	658	$[C20]_{Lactone}$ + Na
		675.616	675	C20 + Na
		691.799	691	C20 + Na (OX)
ตัวอย่างสาร C	25.768	691.816	691	C20 + Na (OX)
		707.979	707	C18:1 + Ac + Ac

หมายเหตุ: (OX) หมายถึง oxidized form

AC หมายถึง เกิดการ acetylation

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากยีสต์ *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 ส่วนใหญ่มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 658, 674 และ 691 ซึ่งเทียบเคียงได้กับสารโซโฟโรลิพิดที่มีโครงสร้างที่มีส่วนประกอบของกรดไขมันเป็น C20 ทั้งในรูป Acidic และ Lactonic form