บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

1. อุปกรณ์

- เครื่องวัดแรงตึงผิว (Ring Tensiometer) รุ่น K6 ของบริษัท Kruss, Germany
- เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) รุ่น Pro star ของบริษัท Varian, USA
- คอลัมน์ C18- AR Cosmosil 5 μm, 120 $^{\circ}$A ขนาด 4.6 x 150 มม. ของบริษัท Water
- เครื่องมือทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส (Agarose Gel Electrophoresis Apparatus) รุ่น Gelmate 2000 ของ บริษัท Toyobo, Japan
- เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Gene amplifier) รุ่น Gene Amp PCR system 2400 ของบริษัท Applied Biosystem, USA
- เครื่องอ่านเจล (Gel Reader) ของบริษัท Biorad, USA
- กล้องจุลทรรศน์ชนิด 2 ตา (Biocular compound microscope) รุ่น BH-2 ของบริษัท Olympus, Japan
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วควบคุมอุณหภูมิ (High speed refrigerated centrifuge) รุ่น J 2-21 ของบริษัท Beckman, USA
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิแบบตั้งโต๊ะ (Superspeed table-top centrifuge) รุ่น Biofuge Stratos ของบริษัท Sorvall, USA
- เครื่องปั่นเหวี่ยงสารปริมาณน้อยแบบตั้งโต๊ะ (Microcentrifuge) รุ่น KM-15200 ของบริษัท Kubota, Japan
- เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Rotary vaccuum evaporator) รุ่น N-N ของบริษัท Eyela, Japan
- เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Centrifuge evaporator) รุ่น R-300 ของบริษัท BUCHI, Switzerland
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys ของบริษัท Thermo Spectronic, USA

- ตู้นึ่งความดันไอฆ่าเชื้อแบบอัตโนมัติ (autoclave) รุ่น SS-325 ของบริษัท Tomy, Japan
- เครื่องเขย่า (Orbital Shaker) รุ่น Innova 2100 ของบริษัท New Brunswick Scientific, USA
- เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) รุ่น Innova 4330 ของบริษัท New Brunswick Scientific, USA
- ตู้อบ (Hot air Oven) รุ่น UE 600 ของบริษัท Memmert, Germany
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น BE 800 ของบริษัท Memmert, Germany
- ตู้แช่เยือกแข็งอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส รุ่น MDF-U356 D ของบริษัท Sanyo, Japan
- เครื่องชั่งหยาบ รุ่น PG 2002-S ของบริษัท Metler Toledo, Switzerland
- เครื่องชั่งละเอียด รุ่น AG 285 ของบริษัท Metler Toledo, Switzerland
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น Cyberscan 1000 ของบริษัท Eutech Cybernatics, Singapore
- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow cabinet) รุ่น 25 Manometer ของบริษัท Dwyer Instrument, USA
- เครื่องกรองน้ำบริสุทธิ์ระบบรีเวอร์สออซโมซิส รุ่น Option 3A ของบริษัท Elga, England
- เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) รุ่น K-550 GE ของบริษัท Scientific Indutries, USA
- เครื่องอุ่นสารละลาย (Dry-block heater) รุ่น TDB-120 ของบริษัท Biosan, Korea
- ไมโครปิเปต (Micropipette) รุ่น P10, P20, P100, P200, P1000 และ P5000 ของบริษัท Gilson, France

2. เคมีภัณฑ์

- สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.
- สารสกัดจากข้าวมอลต์ (Malt extract) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.
- ทริปโตน (Tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.
- แบคโตเปปโตน (Bactopeptone) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.
- สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.
- กลูโคส ของบริษัท E.Merck, Dramstadt, Germany
- แบคโตอะการ์ (Bacto agar) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.
- ไทรทอน เอ็กซ์- 100 (Triton X-100) ของบริษัท E.Merck, Dramstadt, Germany
- สารเคมีขจัดคราบน้ำมันเคมเทค 307 (Chemtec 307 dispersant) ของกรมวิทยาศาสตร์ทหารเรือ กองทัพเรือ ประเทศไทย
- น้ำมันดิบเมอร์บานชนิดเบา (Murban light crude-oil) จากบริษัทไทยออยส์จำกัด ประเทศไทย
- คีโรซีน (Kerosene) หรือน้ำมันก๊าด จากกรมวิทยาศาสตร์ทหารเรือ กองทัพเรือ
- น้ำมันปาล์ม บริษัทมรกตอินดัสตรีส์ จำกัด ประเทศไทย
- น้ำมันถั่วเหลือง บริษัทมรกตอินดัสตรีส์ จำกัด ประเทศไทย
- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท BDH Laboratory Supplies, England
- แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$) ของบริษัท Ajax Finechem, Australia
- เฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3.6H_2O$) ของบริษัท May and Baker, Germany
- แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) ของบริษัท E.Merck, Dramstadt, Germany
- โปแตสเซียมไนเตรต (KNO_3) ของบริษัท Riedel, Germany
- โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท E.Merck, Dramstadt, Germany
- แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) ของบริษัท Ajax Finechem, Australia
- อิโนซิทอล (Inositol) ของบริษัท Sigma, U.S.A.
- แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2 SO_4$) ของบริษัท E.Merck, Dramstadt, Germany
- ทริสมาเบส (Trisma base ; Tris[hydroxymetyhl] aminomethane)($C_4H_{11}NO_3$) ของบริษัท Sigma, U.S.A.
- ทริสไฮโดรคลอไรด์ (Tris HCl) ของบริษัท Sigma, U.S.A.
- ฟีนอลเรด (Phenol red) ของบริษัท Carlo Erba, Italy

- โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (anhydrous NA_2SO_4) ของบริษัท E.Merck, Dramstadt, Germany
- คาร์บอนเตตระคลอไรด์ (CCl_4) ของบริษัท Mallinckrodt, U.S.A.
- คาร์บอนไดซัลไฟด์ (CS_2) ของบริษัท E.Merck, Dramstadt, Germany
- คลอโรฟอร์ม (Chloroform) ของบริษัท Lab-scan, Ireland
- เมทานอล (Methanol) ของบริษัท E.Merck, Dramstadt, Germany
- เอทานอล (Ethanol) ของบริษัท E.Merck, Dramstadt, Germany
- เฮกเซน (Hexane) (C_6H_{14}) ของบริษัท E.Merck, Dramstadt, Germany
- พาราฟินออย (Paraffin oil) ของบริษัท Carlo Erba, Italy
- กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (Concentration HCl) ของบริษัท E.Merck, Dramstadt, Germany
- โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl) ของบริษัท E.Merck, Dramstadt, Germany
- คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) ของบริษัท BDH Laboratory Supplies, England
- แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.H_2O$) ของบริษัท JT Baker, U.S.A.
- ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$) ของบริษัท E.Merck, Dramstadt, Germany
- เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) ของบริษัท E.Merck, Dramstadt, Germany
- โคบอลต์คลอไรด์ ($CoCl_2.6H_2O$) ของบริษัท E.Merck, Dramstadt, Germany
- ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.12H_2O$) ของบริษัท E.Merck, Dramstadt, Germany
- โซเดียมโมลิบเดต ($Na_2MoO_4.2H_2O$) ของบริษัท BDH Laboratory Supplies, England
- แคลเซียมแพนโทีเนต (Cacium Pantothenate) ของบริษัท Sigma, U.S.A.
- อีดีทีเอ (EDTA; ethylenediaminetetraacetic acid), ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2.2H_2O$) ของบริษัท Sigma, U.S.A.
- ชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล (DNA elute kit) ของบริษัท Quigen, U.S.A.
- บรอมฟีนอลบลู (Bromphenolblue) ของบริษัท Fluka, Germany
- *Taq* DNA polymerase ของบริษัท Promega, U.S.A.
- Ribonuclease A (RNase A) ของบริษัท Sigma, U.S.A.
- โปรตีเนสเค (Proteinase K) ของบริษัท Qiagen, Germany
- ดีเอ็นทีพี (dNTP; Deoxynucleotidetriphosphate) ของบริษัท Promega, U.S.A.
- อะกาโรสเจล (Agarose gel) ของบริษัท IUAI, Japan

- CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide), $[C_{16}H_{32}N(CH_3)_3)Br]$ ของบริษัท TCI-EP, Japan
- SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), $(C_{12}H_{25}OSO_3Na)$ ของบริษัท Nacalai tesque, Japan
- ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (Isoamylalcohol) ของบริษัท E.Merck, Dramstadt, Germany
- ไอโซโพรพานอล (Isopropanol) ของบริษัท E.Merck, Dramstadt, Germany
- เอทิเดียมโบรไมด์ (EtBr) ของบริษัท Sigma, U.S.A.
- เอทิล อะซิเตต (Ethyl acetate) ของบริษัท E.Merck, Dramstadt, Germany
- อะซิโตรไนไตรท์ (Acetronitrile) HPLC grade ของบริษัท E.Merck, Dramstadt, Germany
- น้ำ HPLC grade ของบริษัท Lab-Scan, Thailand
- กรดไตรฟลูออโรอะซีติก (Trifluoroacetic acid) HPLC grade ของบริษัท Fluka, Switzerland
- ไอโอดีนชนิดเกล็ด ของบริษัท Univar, U.S.A.
- กระดาษกรอง 0.45 ไมครอน ของบริษัท Whatman, U.S.A.
- ชุดกรองขนาด 0.45 ไมครอน ของบริษัท Whatman, U.S.A.
- แผ่นโครมาโตกราฟีทินเลเยอร์ (Analytical Thin- layer Chromatography) Silica gel 60 ขนาด 20x20 ซม. หนา 0.2 มม. ของบริษัท บริษัท E.Merck, Dramstadt, Germany
- แผ่นโครมาโตกราฟีทินเลเยอร์ (Analytical Thin- layer Chromatography) Silica gel 60 ขนาด 20x20 ซม.หนา 2 มม. ของบริษัท บริษัท E.Merck, Dramstadt, Germany

3. วิธีดำเนินการทดลอง

การคัดเลือกยีสต์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.1 การคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้บนอาหารแข็ง

ทำการแยกเชื้อจากตัวอย่างที่เก็บมาจากแหล่งต่างๆ เช่น ดิน น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร อาหารหมักดอง ผลไม้ เป็นต้น โดยเจือจางตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นและเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าบนอาหารแข็ง YM (ปรับ pH 4.5) จากนั้นนำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้มาทดสอบความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยป้ายเชื้อที่มีอายุ 24 ชม. บนอาหารแข็ง PDA และ YM (ปรับ pH 4.5) ที่ปกคลุมด้วยน้ำมันดิบ 40 ไมโครลิตร บนจานเพาะเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$ ซ เป็นเวลา 1-7 วัน ถ้าสังเกตเห็นบริเวณใสไม่มีน้ำมันดิบบนผิวหน้าอาหารรอบ ๆ โคโลนี แสดงว่าโคโลนีนั้นสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ตามวิธีของ Morikawa และคณะ , 1993

3.2 การคัดเลือกเชื้อยีสต์เพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระดับขวดเขย่า

นำเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YM (pH 4.5) อายุ 24 ชม. ถ่ายหัวเชื้อ 6% (v/v) ลงในอาหารเหลวกำหนดสูตร (Hua และคณะ, 2003) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มล. ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$ซ เป็นเวลา 7 วัน ติดตามประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเปรียบเทียบกันแต่ละเชื้อ คัดเลือกเชื้อที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด

3.2.1 การติดตามประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระดับขวดเขย่า

3.2.1.1 การวัดค่าแรงตึงผิว

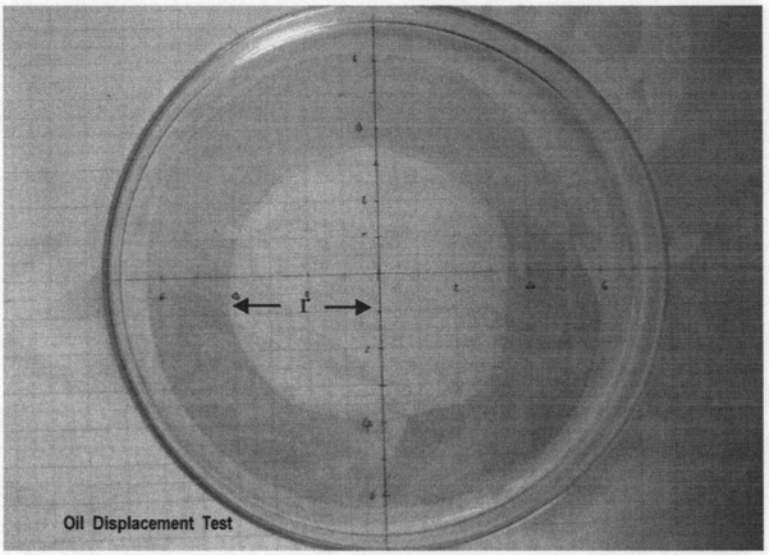
นำน้ำเลี้ยงเชื้อมาปั่นแยกเซลล์ออกโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ 4°ซ ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำส่วนน้ำใสมาวัดค่าแรงตึงผิวโดยวิธี Du Nuoy ring method ด้วยเครื่องวัดค่าแรงตึงผิว (Ring tensiometer K6, Kruss, Germany) แสดงหลักการและวิธีการใช้ในภาคผนวก ข

3.2.1.2 การวัดการกระจายตัวของน้ำมัน (Oil displacement test)

ตามวิธีของ Morikawa และคณะ, 1993

ตวงน้ำ 40 มล. ลงในจานแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 150 มม. ที่มีกระดาษกราฟรองอยู่เป็นมาตรวัดความกว้างของบริเวณใส (โดย 1 ช่องใหญ่ของกราฟมีค่าเท่ากับ 1 ซม.) หยดน้ำมันดิบ (crude oil) ปริมาตร 15 µl ลงบนผิวหน้าของน้ำจะเกิดเป็นแผ่นฟิล์มแผ่ทั่วผิวน้ำ จากนั้นหยดตัวอย่างที่ทำการเจือจางด้วย 50 มิลลิโมลาร์ของทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ค่าความ

เป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 8.0 ปริมาตร 10 µl ลงบนแผ่นฟิล์มของน้ำมันดิบ สังเกตบริเวณใสของการกระจายตัวของน้ำมันดิบดังรูปที่ 3.1 และคำนวณหาพื้นที่ของการกระจายน้ำมัน



รูปที่ 3.1 แสดงลักษณะการกระจายตัวของน้ำมัน (Morikawa และคณะ, 1993)

พื้นที่บริเวณใสของการกระจายน้ำมัน = πr^2

เมื่อ r เท่ากับรัศมีความกว้างของบริเวณใส (cm)

กำหนด 1 ตารางเซนติเมตรของการกระจายตัวของน้ำมันมีค่าเท่ากับ 1 หน่วย

วิธีการวัดค่าการกระจายตัวของน้ำมันนี้จะใช้ได้กับสารที่มีความเข้มข้นอย่างน้อย 10 µg หรือ 10 nmol ขึ้นไป

3.2.1.3 การวัดการเจริญของเชื้อโดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

นำน้ำเลี้ยงเชื้อมาปั่นแยกเซลล์ออกโดยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่ 4 °ซ ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที ทำการล้างเซลล์ด้วยเฮกเซนและน้ำกลั่นตามลำดับ จากนั้นนำเซลล์ไปอบที่อุณหภูมิ 70 °ซ แล้วนำไปชั่งเพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

3.3 การจำแนกสกุลของยีสต์ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ทางอนุกรมวิธาน

นำเชื้อยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงจากข้อ 3.2 มาศึกษาลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยา (morphological characteristics) การทดสอบสมบัติทางชีวเคมี (biochemical characteristics) อ้างอิงตาม The yeast a taxonomic study (Lodder

และคณะ, 1952) และ The chemistry and biology of yeasts (Cook, 1958) และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่ง ITS (internal transcribed spacer)

3.3.1 การศึกษาลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยา

1. เลี้ยงเชื้อยีสต์บนอาหารแข็ง YM ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3 วัน สังเกตลักษณะโคโลนี

2. เลี้ยงเชื้อยีสต์ในอาหารเหลว YM ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะการเจริญ การแตกหน่อ

3. เลี้ยงเชื้อยีสต์บนอาหาร Corn meal agar ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3 วัน เพื่อศึกษาการสร้าง mycelium pseudomycelium และ arthospore

4. เลี้ยงเชื้อยีสต์บนอาหาร Potassium acetate agar ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 14 วันเพื่อศึกษาการสร้าง spore

3.3.2 การทดสอบสมบัติของกระบวนการเมตาบอลิซึมหรือสมบัติทางชีวเคมี

โดยเลี้ยงเชื้อยีสต์บน YM slant เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงเพาะเชื้อลงในอาหารต่าง ๆ เพื่อทดสอบสมบัติทางชีวเคมี ดังนี้

- การทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ
- Glucose fermentation
- Sucrose fermentation
- Galactose fermentation
- Lactose fermentation
- Assimilation of glucose
- Assimilation of galactose
- Assimilation of L- sorbose
- Assimilation of sucrose
- Assimilation of maltose
- Assimilation of thehalose
- Assimilation of lactose
- Assimilation of soluble starch
- Assimilation of D- xylose
- Assimilation of D- ribose
- Assimilation of D- mannitol

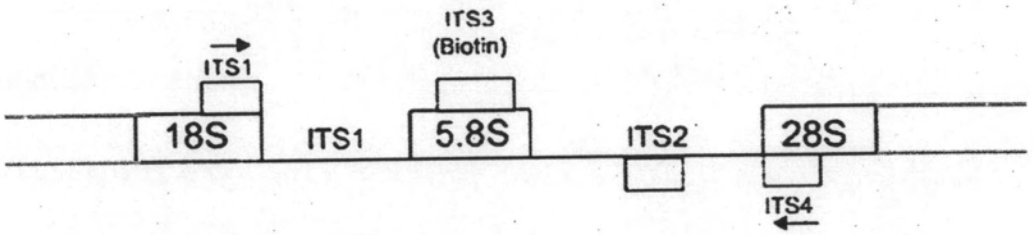
- Assimilation of glycerol
- Assimilation of ethanol
- Assimilation of inositol
- Assimilation of succinic acid
- Assimilation of citric acid
- Assimilation of D- glucuronic acid
- Assimilation of D- galacturonic
- Assimilation of nitrate
- Assimilation of nitrite
- Assimilation of L- lysine
- Assimilation of ammonium
- การทดสอบไลเปส บนอาหารแข็งไตรบูไทริน (ภาคผนวก ก)

จากนั้นบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ $30 \pm 2^{\circ}$ ซ เป็นเวลา 24- 48 ชั่วโมง และตรวจผลการทดสอบการทดสอบสมบัติทางชีวเคมี อ้างอิงตาม The yeast a taxonomic study (Cook, 1958)

3.3.3 การบ่งชี้ชนิดของราในระดับสปีชีส์โดยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ประมวลรหัสของตำแหน่ง internal transcribed spacer (ITS)

การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่ประมวลรหัสของไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอในการจัดจำแนกและศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราได้ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นบริเวณที่ประกอบด้วยบริเวณอนุรักษ์และบริเวณที่มีความแปรผันทางพันธุกรรม ซึ่งมีความจำเพาะในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณนี้ประกอบด้วยยีนประมวลรหัสของ large subunit และ small subunit ของไรโบโซม และมีบริเวณช่องว่างระหว่างสอง subunit (spacer regions) ซึ่งเรียกว่า internal transcribed spacers (ITS)

ITS ประกอบด้วย 2 บริเวณที่ไม่ประมวลรหัสใดๆ และมีความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์สูง ซึ่งมีตำแหน่งอยู่ในอาร์ดีเอ็นเอ (rDNA) ระหว่าง small subunit และ 5.8S subunit และ large subunit ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์อนุรักษ์สูง บริเวณ ITS นี้นิยมนำมาใช้ในการจำแนกลักษณะของราและยีสต์เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีขนาดเล็กประมาณ 500-800 เบส สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) โดยใช้คู่โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่เป็น universal primer และบริเวณ ITS นี้เป็นบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันอย่างชัดเจนในแต่ละสปีชีส์ (Esteve-Zarzoso และคณะ,1999)



รูปที่ 3.2 แสดงบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) และตำแหน่งจับของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ ITS1 (forward primer) และ ITS4 (reverse primer)

การสกัดดีเอ็นเอของยีสต์

การสกัดดีเอ็นเอของยีสต์โดยวิธีเลี้ยงยีสต์ในอาหารเหลว YEPD ที่ 30 $^{\circ}$ ซ นาน 2-3 วัน ปั่นแยกเซลล์ ที่ 10,000 รอบต่อ 5 วินาที แล้วล้างเซลล์โดยใช้น้ำ 500 ไมโครลิตร ปั่นแยกเซลล์อีกครั้งที่ 10,000 รอบต่อนาที นำเซลล์ที่ได้ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม 200 ไมโครลิตรของสารละลาย A (สารละลาย A ประกอบด้วย 2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8.0 และ 1 mM EDTA) 200 ไมโครลิตร ของ Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (25/24/1) และ 0.3 กรัมของเม็ดแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45-0.52 มิลลิเมตร หลังจากนั้นทำการเขย่าโดยใช้เครื่องเขย่าผสมเป็นเวลา 3.5 นาที แล้วจึงเติม TE บัฟเฟอร์ 200 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยง 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดเก็บชั้นน้ำ นำชั้นน้ำมาสกัดด้วย Phenol/Chloroform/isoamyl alcohol (25/24/1) ปั่นเหวี่ยง 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดเก็บชั้นน้ำ นำชั้นน้ำมาเติมเอทานอลบริสุทธิ์ 1 มิลลิลิตร ปั่นแยกตะกอนดีเอ็นเอที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้มาเติม 400 ไมโครลิตร TE บัฟเฟอร์ pH 8.0 และ RNase A 30 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 $^{\circ}$ ซ เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงปั่นแยกตะกอนดีเอ็นเอ ที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้มาล้างด้วย 70% เอทานอล ทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง และละลายตะกอนด้วย 50 ไมโครลิตร ของ TE บัฟเฟอร์

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอมาเพิ่มจำนวน ณ บริเวณ ITS (Internal Transcribed Spacer) ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ ซึ่งบริเวณ ITS เป็นบริเวณที่อยู่ระหว่าง 18S rDNA และ 28S rDNA ดังนั้น บริเวณ ITS จึงรวมถึง 5.8S rDNA ด้วยดังแสดงในรูปที่ 3.2 บริเวณ ITS นิยมใช้ในการจำแนกเชื้อ

ยีสต์และรา (Granchi และคณะ, 1999 ; Cappello และคณะ, 2004) ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส หรือเทคนิคพีซีอาร์ ได้ใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ซึ่งเป็น universal primers ของบริเวณ ITS โดยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 มีลำดับเบสดังนี้ 5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG- 3' และ 5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC- 3' ตามลำดับ โดยใช้สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสดังนี้

hot start	ที่อุณหภูมิ	94 °ซ	เป็นเวลา	5 นาที	
denaturation	ที่อุณหภูมิ	94 °ซ	เป็นเวลา	30 วินาที	35 รอบ
annealing	ที่อุณหภูมิ	57 °ซ	เป็นเวลา	30 วินาที	
extention	ที่อุณหภูมิ	72 °ซ	เป็นเวลา	1 นาที	
final extention	ที่อุณหภูมิ	72 °ซ	เป็นเวลา	5 นาที	

ดำเนินการเทคนิคพีซีอาร์ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Gene amplifier) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ทำโดยเตรียมอะกาโรสเข้มข้น 1.5% ซึ่งหลอมในบัฟเฟอร์ 1xTAE เทลงในแบบพิมพ์ที่มีหวีเสียบอยู่ ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปล่อยให้อะกาโรสเจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที วางชิ้นอะกาโรสเจลที่ได้ลงในแชมเบอร์ (chamber) เทบัฟเฟอร์ 1 x TAE ให้ท่วมสูงกว่าอะกาโรสเจลเล็กน้อย ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสีติดตาม ให้ความเข้มข้นของสีเป็น 1 เท่า โดยอาจจะปรับปริมาตรด้วยน้ำในกรณีใช้ปริมาตรของดีเอ็นเอน้อย หยอดสารผสมลงในช่องวิ่งและหยอดดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder จากนั้นทำอิเล็กโทรโฟเรซิสโดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ ทิ้งไว้จนกระทั่งสีน้ำเงินของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ลงมาจนสุดขอบอะกาโรสเจลอีกด้าน ย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมล. เป็นเวลา 10-15 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำพีซีอาร์มาแยกชิ้นผลิตภัณฑ์ที่ได้ ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส จากนั้นสกัดชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 600 bp ออกจากอะกาโรสด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, USA) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิตดังนี้ ตัดอะกาโรสเจลตรงบริเวณแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ ชั่งน้ำหนักชิ้นอะกาโรสเจลโดยใส่ไว้ในหลอดไมโครฟิวจ์ เติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตรเป็น 3 เท่าของปริมาตรชิ้นอะกาโรสเจล บ่มที่อุณหภูมิ 50 °ซ เป็นเวลา 10 นาที หรือกระทั่งอะกาโรสเจลละลายหมดได้เป็นสารละลายใสสีเหลือง นำสารละลาย

ดังกล่าวใส่ใน QIAquick spin column นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 0.5 มล.ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 0.75 มล. ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้งก่อนทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดบัฟเฟอร์ PE ที่เหลือติดคอลัมน์ออกให้หมด ย้ายคอลัมน์มายังหลอดไมโครฟิวจ์ใหม่ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อหรือบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 50-100 ไมโครลิตร ให้ลงตรงกลางแผ่นกรอง ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จะได้สารละลายดีเอ็นเออยู่ในส่วนน้ำใส (ประมาณ 100 ไมโครลิตร) เก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 °ซ

การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ดังกล่าวส่งไปวิเคราะห์ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ โดยใช้ไพร์เมอร์คือ ITS1 และ ITS4 ซึ่งเป็น universal primers ของบริเวณ ITS มีลำดับเบสดังนี้ 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' และ 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' ตามลำดับ นำข้อมูลลำดับ นิวคลีโอไทด์ที่ได้ประมาณ 600 bp มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม DNASIS และนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ใน Gen Bank ด้วยโปรแกรม Blast N ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) จากเว็บไซต์ http://www.ncbi.nlm. nih.gov/ เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ จะถูกนำมาใช้ในการจำแนกชนิดของเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้

3.4 การศึกษาการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอาหารเหลวกำหนดสูตร

ถ่ายหัวเชื้อยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YM อายุ 24 ชั่วโมง ลงในอาหารเหลวกำหนดสูตร (Hua และคณะ, 2003) ตามข้อ 3.2 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °ซ ภาวะขวดเขย่าด้วยอัตราเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง ติดตามการเจริญโดยหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และติดตามประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวด้วยการวัดค่าแรงตึงผิว ตามวิธีในข้อ 3.2.1.1 และการวัดค่าการกระจายตัวน้ำมัน ตามวิธีในข้อ 3.2.1.2

3.5 การศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.5.1 การหาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยเพาะเลี้ยงยีสต์ในอาหารเหลวกำหนดสูตร (Hua และคณะ, 2003) แปรผันแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส แป้งมันสำปะหลัง น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม และน้ำมันมะพร้าว โดยใช้ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเท่ากับ 8% (w/v) เพาะเลี้ยงเชื้อตามวิธีการในข้อ 3.2 ติดตามการเจริญของยีสต์โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (จากข้อ 3.2.1.3) ค่า pH และนำส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อมาทำการวัดค่าแรงตึงผิวและการกระจายน้ำมันโดยเปรียบเทียบชนิดของแหล่งคาร์บอน

3.5.2 การหาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้ในอาหารกำหนดสูตร โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อ 3.5.1 แปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเป็น 0 , 1 , 2 , 4 และ 8% ติดตามการเจริญของยีสต์โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่า pH และประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวัดค่าแรงตึงผิวและค่าการกระจายน้ำมัน

3.5.3 การศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยเลี้ยงยีสต์ในอาหารเหลวกำหนดสูตรโดยใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อ 3.5.2 แล้วแปรผันแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) และโซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) โดยปรับความเข้มข้นของไนโตรเจนให้เท่ากับ 0.2% w/v เพาะเลี้ยงเชื้อตามวิธีการในข้อ 3.2 ติดตามการเจริญของยีสต์โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่า pH และนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาทำการวัดค่าแรงตึงผิวและการกระจายน้ำมันโดยเปรียบเทียบชนิดของแหล่งไนโตรเจน

3.5.4 การหาปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้ในอาหารกำหนดสูตรที่มีแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม แปรผันความเข้มข้นของไนโตรเจนเป็น 0 , 0.1 , 0.2 , 0.3 , 0.4 และ 0.5% ติดตามการเจริญของยีสต์โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่า pH และประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยวัดค่าแรงตึงผิวและค่าการกระจายน้ำมัน

3.6 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงยีสต์ที่คัดแยกได้เพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.6.1 อุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

หาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์และการผลิตสารลดแรงตึง

ผิวชีวภาพโดยการเพาะเลี้ยงอาหารเหลวกำหนดสูตร (จากข้อ 3.5) ปรับอุณหภูมิเพาะเลี้ยงเป็น 20 , 25, 30 และ 40 °ซ เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน ติดตามประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยน้ำเลี้ยงเชื้อมาทำการวัดค่าแรงตึงผิวและค่าการกระจายน้ำมัน พร้อมทั้งติดตามการเจริญโดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และค่า pH ที่เปลี่ยนแปลงไป

3.6.2 ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

หาค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยการปรับค่า pH ของ อาหารเหลวกำหนดสูตร (จากข้อ 3.5) เป็น 3.5 , 4.5 , 5.5 , 6.5 และเพาะเลี้ยงในอุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 3.6.1 เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน ติดตามประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาวัดค่าแรงตึงผิวและค่าการกระจายน้ำมัน พร้อมทั้งติดตามการเจริญโดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้งและค่า pH ที่เปลี่ยนแปลงไป

3.7 การผลิตและการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

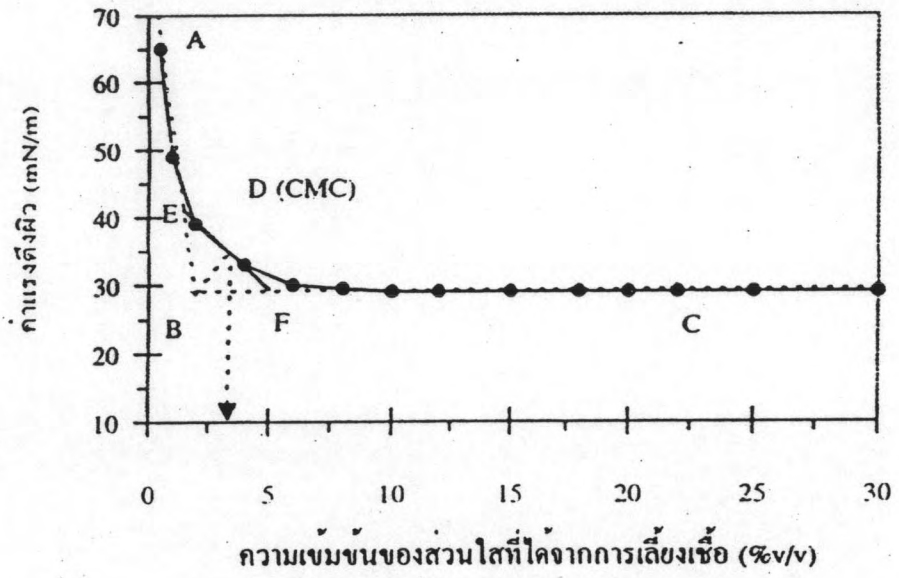
เลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้ในอาหารที่ปรับปรุงสูตรและมีภาวะที่ปรับให้เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ตามที่ได้ผลในข้อ 3.5 และ 3.6 นำน้ำเลี้ยงเชื้อไปปั่นแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่ 4 °ซ ด้วยความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำส่วนน้ำใสมาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต อัตราส่วน 1:2 โดยใช้กรวยแยก ทำการสกัดซ้ำ 3 ครั้ง นำส่วนล่างของสารละลายมาระเหยด้วยเครื่อง evaporator ระเหยแห้งภายใต้ภาวะสุญญากาศ ควบคุมอุณหภูมิที่ 40 °ซ สารสกัดที่ได้นี้ว่า สารบริสุทธิ์บางส่วน ทำการระเหยแห้งซ้ำอีกครั้งด้วยเครื่อง centrifuge evaporator ควบคุมอุณหภูมิ ที่ 45 °ซ นำบางส่วนของสารที่ได้มาทดสอบสมบัติการกระจายน้ำมัน และนำสารไปทำให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC HPLC และ LC-MS เพื่อหาน้ำหนักมวลโมเลกุลต่อไป

3.8 การศึกษาสมบัติทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

3.8.1 การหาค่า Critical micelle concentration

การหาจุดวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ในการทดลองนี้ เป็นการวัดหาค่าความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเทียบกับความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์โดยนำส่วนน้ำใสจากการเลี้ยง หรือ สารบริสุทธิ์บางส่วนที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ มาเจือจางด้วยน้ำกลั่น โดย ถ้าเป็นน้ำใสจากการเลี้ยงเชื้อจะคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของปริมาตรน้ำเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรรวมทั้งหมด ส่วนสารบริสุทธิ์บางส่วนจะเป็นความเข้มข้นมีหน่วยเป็น มก.ต่อ มล. แล้ววัดค่าแรงตึง

ผิว หาค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ เขียนกราฟระหว่างค่าแรงตึงผิวและความเข้มข้นของส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อหรือสารบริสุทธิ์บางส่วนตามวิธีของ Sheppard และ Mulligan (1987)



รูปที่ 3.3 วิธีการหาค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ โดยการวัดค่าแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ และทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

การหาค่า CMC ได้จากการคำนวณหาเส้นสัมผัส AB, BC และหาค่าจุดตัด B ด้วยสมการการถดถอยเชิงเส้น (Linear regression) เมื่อกำหนดให้

เส้นสัมผัส AB : $y_1 = b_1x_1 + a_1$

เส้นสัมผัส BC : $y_2 = b_2x_2 + a_2$

เมื่อเกิดจุดตัด B จะได้

$b_1x_1 + a_1 = b_2x_2 + a_2$ เมื่อ $y_1 = y_2$

$b_1x_1 - b_2x_2 = a_2 - a_1$

$x(b_1 - b_2) = a_2 - a_1$ เมื่อ $x_1 = x_2$

$x = (a_2 - a_1)/(b_1 - b_2)$

เพราะฉะนั้น จุดตัด B เท่ากับ $(a_2 - a_1)/(b_1 - b_2)$

เมื่อลากเส้นตรง BD ผ่านจุด B ให้ตั้งฉากกับเส้นสัมผัส EF ที่จุด D แล้วลากมาตัดแกน X ค่าที่ได้คือค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ [Critical Micelle Concentration (CMC)] และเมื่อลากมาตัดแกน Y ค่าที่ได้คือค่าแรงตึงผิว ณ จุดของการเกิดไมเซลล์ (γCMC) และความเข้มข้น

สัมพัทธ์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (CMC^{-1}) คือส่วนกลับของค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ (100/CMC)

เปรียบเทียบค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ (Critical Micelle Concentration ; CMC) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้กับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ ได้แก่ ไทรทอน เอกซ์ 100 (Triton X–100) และเคมเทค 307 เป็นต้น

3.8.2 การหาค่าการกระจายตัวของน้ำมัน

ทำตามวิธีในข้อ 3.2.1.2 โดยเปรียบเทียบค่าการกระจายตัวของน้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้กับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ ได้แก่ ไทรทอน เอ็กซ์ 100 (Triton X–100) และเคมเทค 307 เป็นต้น

3.9 การเตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยวิธีโครมาโตกราฟี

3.9.1 การเตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย analytical Thin–Layer Chromatography

ในการทดลองใช้แผ่นซิลิกาเจล 60 (บริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany ขนาด 20 x 20 ซม. หนา 0.2 มม.) ใช้เป็นเฟสคงที่ โดยมีสารละลายคลอโรฟอร์ม ต่อ เอทานอล ต่อ น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 65 : 25 : 4 เป็นเฟสเคลื่อนที่ นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เตรียมได้จากข้อ 3.7 มาจุดบนแผ่น TLC ปริมาตร 20 µl แล้วนำไปใส่ในภาชนะปิดที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่ 120 ml ทิ้งไว้ประมาณ 1-2 ชม. จนเฟสเคลื่อนที่ เคลื่อนที่ไปจนเกือบสุดแผ่น (เหลือขอบประมาณ 0.5-1 ซม.) จากนั้นนำแผ่น TLC มาผึ่งให้เฟสเคลื่อนที่ระเหยจนแห้ง จึงนำมาตรวจผล โดยนำไปอบด้วยไอของไอโอดีนในกล่องพลาสติกปิดสนิท (หรือทำการทดสอบสารประกอบคาร์โบไฮเดรตด้วยมอริส รีเอเจนต์) ทิ้งไว้ประมาณ 15-20 นาที เปิดฝากล่องแล้วทำเครื่องหมายบริเวณที่มีสีน้ำตาลเข้ม (หรือสีเขียวจากการทดสอบด้วยมอริส รีเอเจนต์) ทิ้งไว้ข้ามคืน เพื่อให้ไอโอดีนและมอริส รีเอเจนต์ระเหยหมด ขูดซิลิกาเจล 60 บริเวณที่ทำเครื่องหมายไว้ ทำการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเอทิลอะซิเตตซ้ำ 3 ครั้ง ระเหยแห้งด้วยเครื่อง centrifuge evaporator เติม 1 โมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร นำไปทดสอบสมบัติการกระจายน้ำมันตามข้อ 3.2.1.2

3.9.2 การเตรียมสารให้บริสุทธิ์ด้วย preparative Thin– Layer Chromatography

วิธีการทดลองมีขั้นตอนคล้ายกับการวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในข้อ 3.9.1 แต่จะใช้แผ่นซิลิกา 60 ที่มีความหนา 2 มม. ใช้สารที่สกัดได้เข้มข้น 10-20 mg/ml ปริมาตร 1 ml จุดเป็นเส้นตรงบนแผ่น TLC โดยสารบริสุทธิ์บางส่วน 1 ตัวอย่าง จะใช้แผ่น TLC 1 แผ่น สกัดแยกสารลดแรงตึงผิวออกจากซิลิกาเจล 60 ด้วยเอทิลอะซิเตต แล้วนำไประเหยแห้งโดยเครื่อง

evaporator ระเหยแห้งภายใต้ภาวะสุญญากาศ ทดสอบการกระจายน้ำมัน เก็บสารบริสุทธิ์ที่สกัดได้นี้ ไปวิเคราะห์ด้วย HPLC และ LC-MS เพื่อหาน้ำหนักมวลโมเลกุลต่อไป

3.9.3 การวิเคราะห์สารบริสุทธิ์ โดยวิธี HPLC

นำสารที่ทำบริสุทธิ์โดยวิธี preparartive TLC จากข้อ 3.9.2 ละลายในสารละลาย 100% อะซิโตไนไตรท์ เขย่าจนสารละลายจนหมด (ซึ่งในการทดลองได้ทำการเปรียบเทียบกับสาร sophorolipid) นำไปวิเคราะห์โดยวิธี HPLC ใช้คอลัมน์ C18- AR Cosmosil 5 µm, 120 ^{o}A ขนาด 4.6 x 150 มม. ของบริษัท Water มีลิเนียร์เกรเดียนท์ 0-100% ของตัวทำละลาย B ใน A โดยตัวพา A คือ 10% อะซิโตรไนไตรท์ + 0.1% กรดไตรฟลูออโรอะซีติก (TFA) และตัวพา B คือ 100% อะซิโตรไนไตรท์ + 0.1% กรดไตรฟลูออโรอะซีติก (TFA) โดยมีโปรแกรมของลิเนียร์เกรเดียนท์ดังนี้

เวลา (นาที)	% ของตัวพา A	% ของตัวพา B
0	70	30
5	30	70
20	10	90
35	0	100
45	0	100

ซึ่งมีอัตราการชะของตัวพาเท่ากับ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจผลด้วย UV- Detector ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร

จากนั้นเก็บลำดับส่วนตัวอย่างที่ได้แต่ละฟีก นำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง centrifuge evaporator เติม 1 โมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเป็นกรดด่าง เท่ากับ 8 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เขย่าด้วยเครื่องผสมสารนาน 5 นาที แล้วนำไปทดสอบสมบัติการกระจายน้ำมันตามข้อ 3.2.1.2 จากนั้นลำดับส่วนตัวอย่างที่ค่าการกระจายน้ำมันมากไปวิเคราะห์ด้วยวิธี LC-MS เพื่อหาน้ำหนักมวลโมเลกุล

3.9.4 การวิเคราะห์โครงสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวิธี LC- MS

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี HPLC โดยเลือกลำดับส่วนตัวอย่าง ณ RT ที่มีค่าการกระจายน้ำมันมาก และมีปริมาณมากพอ มาวิเคราะห์ด้วย LC- MS ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย