บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

งานวิจัยนี้รายงานการศึกษาผลของการเสริมน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับน้ำมันถั่วเหลืองต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและศึกษาลักษณะสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดยยีสต์ *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1

ในการศึกษาผลของการเสริมน้ำตาลร่วมกับน้ำมันถั่วเหลืองที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่ากลูโคสเป็นน้ำตาลที่เหมาะสมที่สุดเมื่อใช้ร่วมกับน้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้แหล่งคาร์บอนปริมาณรวมทั้งหมด 16 เปอร์เซ็นต์ แบ่งเป็นอัตราส่วนระหว่างน้ำมันถั่วเหลืองต่อกลูโคสเป็น 2:1 คือประกอบด้วยน้ำมันถั่วเหลือง 10.67 และกลูโคส 5.33 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของสารสกัดยีสต์ อายุหัวเชื้อและความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่าที่ความเข้มข้นสารสกัดยีสต์ 0.3 เปอร์เซ็นต์ อายุหัวเชื้อ 18 ชั่วโมง และค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 เหมาะสมที่สุดต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยน้ำส่วนใสจากการเลี้ยงเชื้อมีค่าการกระจายน้ำมันสูงสุด 75.39 ตารางเซนติเมตร มีค่าแรงตึงผิวต่ำสุด 33 mN/m และน้ำหนักเซลล์แห้ง 26.81 กรัมต่อลิตร และเมื่อติดตามการเจริญและการใช้แหล่งคาร์บอนทั้งน้ำมันถั่วเหลืองและกลูโคสของยีสต์ พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมงยีสต์จะใช้กลูโคสไปจนเกือบหมด และน้ำหนักเซลล์แห้งก็เพิ่มขึ้นตามลำดับจนคงที่ และน้ำมันถั่วเหลืองก็ลดลงต่ำสุดจนคงที่เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง สอดคล้องกับการทดลองของ Hu และ Ju (2001b) ที่รายงานว่าช่วงแรกการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยยีสต์ *Torulopsis bombicola* จะใช้กลูโคสหมดลงอย่างรวดเร็วเพื่อการเจริญของเซลล์ หลังจากนั้นน้ำมันถั่วเหลืองจะถูกนำมาใช้จนเกือบหมดเป็นลำดับต่อมา

การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยยีสต์ *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในอาหารเหลวปรับปรุงสูตรที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.02 เปอร์เซ็นต์ $MgSO_4.7H_2O$ 0.02 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดยีสต์ 0.3 เปอร์เซ็นต์ $NaNO_3$ 0.4 เปอร์เซ็นต์ น้ำมันถั่วเหลือง 10.67 เปอร์เซ็นต์ และกลูโคส 5.33 เปอร์เซ็นต์ ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 โดยมีภาวะการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในระดับขวดเขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน โดย *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 ให้ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเท่ากับ 0.95 กรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 ที่ใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนเพียง

ชนิดเดียว คือให้ผลผลิต 0.26 กรัมต่อลิตร (ธนัสถา เชียงอุทัย, 2549) สอดคล้องกับการทดลองก่อนหน้านี้ที่รายงานว่า เมื่อทำการเปรียบเทียบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้สารตั้งต้นเป็นคาร์โบไฮเดรตร่วมกับสารที่ไม่ชอบน้ำหรือสารที่ชอบไขมันจะให้ผลผลิตมากกว่าการใช้แหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว (Linton, 1991; Hommel และคณะ, 1994) โดยยีสต์จะใช้น้ำตาลในขบวนการเมทาบอลิซึมขั้นแรกของเซลล์ และสังเคราะห์ส่วนของ hydroxyl fatty acid ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากสารตั้งต้นที่เป็นสารที่ไม่ชอบน้ำหรือสารที่ชอบไขมัน และเชื่อมต่อโดยตรงกับส่วนที่เป็นน้ำตาลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทไกลโคลิพิด (Webber และคณะ, 1992) ผลผลิตที่ได้ก็จะมีลักษณะคล้ายน้ำมัน เพราะสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากสารตั้งต้นที่เป็นน้ำมันพืชส่วนมากจะเป็น lactonic form ที่ไม่บริสุทธิ์ (Hu และ Ju, 2001a)

การศึกษาลักษณะสมบัติทางชีวเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ โดยเตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วทำการเจือจาง 100 เท่าด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ พบว่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานและความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เป็นสารสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากข้อ 3.2.2 เท่ากับ 8.0 ซึ่งให้ค่าแรงตึงผิวต่ำที่สุดเท่ากับ 34 mN/m และค่าการกระจายน้ำมันสูงสุด 7.07 ตารางเซนติเมตร (มีสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 0.004 มิลลิกรัมในบัฟเฟอร์ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ที่ใช้ในการทดสอบ) ในวันแรกจนถึง 30 วันของการทดลอง และผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังสามารถทำงานได้ดีเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 60 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง โดยมีค่าแรงตึงผิว 33-34 mN/m และค่าการกระจายน้ำมัน 3.0-6.0 ตารางเซนติเมตร และยังคงความเสถียรได้จนถึงที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส อีกด้วย นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ยังสามารถทำงานและคงความเสถียรได้ดีที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5-5.0 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าแรงตึงผิวเริ่มต้น 32-34 mN/m และค่าการกระจายน้ำมัน 9.0-14.0 ตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 30 วัน

การศึกษาความสามารถในการก่ออิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้โดยการวัดค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน (Emulsion Index) เปรียบเทียบกับน้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ พบว่าค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันที่ 24 ชั่วโมง ต่อน้ำมันคาโนลา น้ำมันงา น้ำมันสลัด น้ำมันรำข้าว น้ำมันดอกคำฝอยและน้ำมันถั่วเหลือง มีค่ามากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำมันคาโนลา และน้ำมันดอกคำฝอยมีค่าความเสถียรลดลงน้อยที่สุดใน 3 วันแรก คือ 10 เปอร์เซ็นต์ น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันรำข้าว น้ำมันสลัดและน้ำมันงา ลดลง 15-25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับและลดลงประมาณ 60-70 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 7 วัน ในน้ำมันทุกชนิดดังกล่าว ส่วนค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันต่อสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ 24 ชั่วโมง ต่อไอโซโพรพิล ไมรีสเตท เฮกซาเดกเคนและเอทิล

โอเลเอท ก็มีค่ามากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์เช่นกัน และลดลงจนค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันต่ำกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ ในสารประกอบไฮโดรคาร์บอนทุกชนิดภายในเวลา 7 วัน

นอกจากนี้การหาค่าจุดวิกฤติของความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ (Critical micelle concentration; CMC) จากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ พบว่ามีค่าเท่ากับ 132 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าแรงตึงผิว ณ การเกิดไมเซลล์ (γCMC) เท่ากับ 35 mN/m ซึ่งมีค่าต่ำกว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ที่นำมาเปรียบเทียบ คือ เคมเทค 307 ไทรทอน เอกซ์ 100 และโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต และยังมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดอื่น เช่น โซโฟโรลิพิดจาก *Candida bombicola* และแรมโนลิพิดจาก *Pseudomonas aeruginosa* ที่มีค่า CMC เท่ากับ 130 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Otto และคณะ, 1999; Pornsunthorntawee และคณะ, 2008)

การวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธี analytical TLC ด้วยไอระเหยของไอโอดีนและมอรีส รีเอเจนท์ พบว่าสามารถแยกสารออกได้เป็น 3 ลำดับส่วน คือ F1 ถึง F3 โดยมีค่าคงที่ของอัตราส่วนการเคลื่อนที่ (R_f) เป็น 0.88, 0.72 และ 0.62 ตามลำดับ ซึ่ง F2 มีค่าการกระจายน้ำมันสูงที่สุด และเมื่อตรวจสอบด้วยมอรีส รีเอเจนท์พบว่า F2 และ F3 ให้ผลบวก จึงสันนิษฐานได้ว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 ผลิตได้มีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบหรือเป็นสารประเภทไกลโคลิพิด จากนั้นเตรียมสาร F2 ด้วย preparative TLC เพื่อนำมาวิเคราะห์สารและทำให้บริสุทธิ์ด้วย HPLC พบว่าลำดับส่วนที่เก็บได้จาก RT ที่ 15.3, 19.2, 21.9, 26.2 และ 31.4 นาที ให้ชื่อว่าตัวอย่าง C D E F และ G ตามลำดับ ซึ่งให้ค่าการกระจายน้ำมันมาก และอีกสองลำดับส่วนที่มี RT ใกล้เคียงกับโครมาโตแกรมของ HPLC จากสารโซโฟโรลิพิดที่ใช้เป็นสารเปรียบเทียบ (ภาคผนวก ง) คือ RT ที่ 7.5 และ 8.9 นาที โดยให้ชื่อว่าตัวอย่าง A และ B ตามลำดับ จึงนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี LC-MS ต่อไป จากผลการวิเคราะห์สารด้วยวิธี LC-MS บอกถึงน้ำหนักมวลโมเลกุลของสารและสามารถวิเคราะห์โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ ในการทดลองพบว่ามวลโมเลกุลของสารส่วนใหญ่มีค่าเท่ากับ 662 702 และ 762 ซึ่งเทียบเคียงได้กับสารโซโฟโรลิพิดที่มีโครงสร้างที่มีกรดไขมันเป็นองค์ประกอบของ $[C22]_{Lactone}$ และ $[C22:1]_{Lactone}$ โดยสอดคล้องกับโครงสร้างโซโฟโรลิพิดจาก *Candida bogoriensis* ที่มีรายงานของ Nunez และคณะ (2004) และจากรายงานของ Shah และคณะ (2005) จากนั้นนำตัวอย่างสาร G ที่มีปริมาณมากพอไปวิเคราะห์ด้วยวิธี NMR พบว่า ^{1}H-NMR spectrum มีพีกปรากฏในช่วง chemical shift ที่ 0.9 ppm เป็นหมู่เมทิล ($-CH_3$) ที่ 1.2 และ 2.0 ppm จะเป็นสายยาวไฮโดรคาร์บอน $(-CH_2)_n$ ที่ 2.4 ppm เป็น $-CH_2$-COOH และพบพันธะคู่ -CH=CH- ที่ chemical shift ที่ 5.4 ppm ซึ่งเป็นส่วนที่คล้ายคลึงกับส่วนของสายไฮโดรคาร์บอนที่ปรากฏใน ^{1}H-NMR spectrum ของสารโซโฟโรลิพิดที่ใช้เป็นสารเปรียบเทียบ (ภาคผนวก ง) ที่ chemical shift ที่ 1.2 2.0 และ 5.4 ppm แต่ก็ยังไม่

1.2 2.0 และ 5.4 ppm แต่ก็ยังไม่สามารถระบุโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้อย่างชัดเจน เนื่องจากส่วนของน้ำตาลถูกไฮโดรไลซ์จากโครงสร้างหลักระหว่างการสกัด จึงควรทำการวิเคราะห์ซ้ำด้วยวิธี NMR (Nuclear Magnetic Resonance) และวิธีทางเคมีอื่นๆ ต่อไป

จากงานวิจัยนี้พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากยีสต์ *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 โดยใช้แหล่งคาร์บอน 2 ชนิดร่วมกันคือ กลูโคสและน้ำมันถั่วเหลือง ซึ่งยีสต์สามารถเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ปริมาณมากกว่าถึง 4 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้เป็นสารลดแรงตึงผิวประเภทไกลโคลิพิดที่ประกอบด้วยกรดไขมันที่มีโครงสร้างเป็น C22 อะตอม ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยของผู้อื่นที่ส่วนมากจะรายงานกรดไขมันที่เป็นชนิด C18 และ C20 อะตอม จากโครงสร้างนี้ทำให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มีค่า CMC ที่ต่ำกว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์บางชนิด และต่ำกว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากยีสต์ *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 ในรายงานของ ธนัสถา เชียงอุทัย (2549) ที่รายงานมาก่อนหน้านี้ นอกจากนี้ยังสามารถก่ออิมัลชันกับน้ำมันพืชได้หลากหลายชนิด สามารถจะประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ในอนาคต และงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพฉบับแรกที่ผลิตได้จากยีสต์ *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีความปลอดภัยและใช้ได้ในอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับอาหาร

ข้ออเสนอแนะ

1. ควรศึกษาด้านพันธุศาสตร์ของ *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 โดยการพัฒนาทางพันธุวิศวกรรม เพื่อนำไปใช้เพิ่มประสทธิภาพและผลผลิตของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้

2. ควรมีการศึกษาถึงแหล่งอาหารที่สามารถลดต้นทุนการผลิตและที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระดับขยายส่วน เพื่อเพิ่มผลผลิตของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ให้มากขึ้น เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการนำไปประยุกต์ใช้ในงานต่างๆ