

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกกรดจิบเบอเรลลิก ออกจากน้ำหมักด้วยเรซินแลกเปลี่ยนไอออน และภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตกผลึกกรดจิบเบอเรลลิก จากสารละลายที่ใช้ชะกรดจิบเบอเรลลิกออกจากเรซิน น้ำหมักที่ใช้ในงานวิจัย ได้จากการเลี้ยงเชื้อรา *Gibberella fujikuroi* N9-34 ในถังหมัก 30 ลิตร โดยใช้สูตรอาหารและภาวะการผลิตของ สันติ เหมศรี (2539) มีการปรับปรุงสูตรอาหารสำหรับการสร้างสปอร์ จากอาหารแข็งเอียง อะซิเตด มาเป็นอาหารแข็งเอียงของน้ำต้มค้นข้าวโพด ทำให้เชื้อรา *G. fujikuroi* N9-34 สร้าง สปอร์ ได้มากขึ้น เมื่อทำการเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน และปั่นแยกเซลล์เชื้อราออก ได้น้ำหมักของกรดจิบเบอเรลลิก มีลักษณะเป็นสีเหลืองทอง มีปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกประมาณ 800-1,100 มิลลิกรัมต่อลิตร

ก่อนนำน้ำหมักไปผ่านกระบวนการแยกกรดจิบเบอเรลลิก ได้ทำการศึกษาการสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลิก ในภาวะที่เกี่ยวข้องกับการเก็บรักษา การแยก และการตกผลึกกรดจิบเบอเรลลิก พบว่า กรดจิบเบอเรลลิกที่ละลายอยู่ในน้ำหมัก พีเอช 3.4 จะเกิดการสลายตัวได้มากขึ้นเมื่ออุณหภูมิของน้ำหมักสูงขึ้น พิจารณาจากค่าคงที่ของอัตราการเกิดปฏิกิริยา (reaction rate constant ; k) ที่มีค่าสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น และค่าครึ่งชีวิตของปฏิกิริยา (half-life of a reaction ; $t_{1/2}$) ที่มีค่าลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น โดยความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิกับค่าคงที่ของอัตราการเกิดปฏิกิริยาการสลายตัวของของกรดจิบเบอเรลลิกในน้ำหมัก เป็นไปตามสมการอาร์เรเนียส คือ

$$k = 8.1233 \times 10^9 \cdot e^{-92.8341 / RT}$$

ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ซึ่งใช้ในการเก็บรักษาน้ำหมัก มีค่าครึ่งชีวิตของปฏิกิริยาที่คำนวณตามสมการอาร์เรเนียส สูงถึงประมาณ 2 ล้านปี ดังนั้นน้ำหมักจึงคงสภาพได้ดีเมื่ออยู่ในภาวะนี้ ส่วนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้องของประเทศไทย มีค่าครึ่งชีวิตของปฏิกิริยาประมาณ 9 วัน

กรดจิบเบอเรลลิกที่ละลายอยู่ในสารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลาย เมื่อพีเอชของสารละลายสูงขึ้น การสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลิกก็จะสูงขึ้นด้วย ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส กรดจิบเบอเรลลิกที่ละลายอยู่ในน้ำหมัก พีเอช 3 มีค่าครึ่งชีวิต ประมาณ 211 ชั่วโมง เมื่อกรด

จับเบอเรลติกสลายอยู่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7 จะมีค่าครึ่งชีวิตลดลงเป็น 156 ชั่วโมง และเมื่อสารละลายเป็นเบสมากขึ้นการสลายตัวจะเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว ที่พีเอช 8 กรดจับเบอเรลติก มีค่าครึ่งชีวิตของปฏิกิริยาประมาณ 134 ชั่วโมง และเมื่อละลายอยู่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เจือจาง พีเอช 11 ค่าครึ่งชีวิตลดลงเหลือเพียง 39 นาทีเท่านั้น ขณะที่ใช้อุณหภูมิให้การทดลองที่ 20 องศาเซลเซียส ดังนั้นในการชะกรดจับเบอเรลติกออกจากเรซินแลกเปลี่ยนไอออน ไม่สมควรจะใช้ สารละลายเบสเป็นตัวชะ ถึงแม้ว่าสารละลายเบสจะสามารถแตกตัวให้ไอออนลบ เช่น ไฮดรอกไซด์ ไอออน เพื่อเข้าแลกที่กับกรดจับเบอเรลติกในเรซินได้ แต่ก็ทำลายเสถียรภาพของกรดจับเบอเรลติก ได้อย่างรวดเร็วด้วย

การศึกษาการสลายตัวของกรดจับเบอเรลติกในสารละลายเมธานอลในน้ำที่ปรับพีเอชเป็น 3 ด้วยกรดอะซิติก ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า กรดจับเบอเรลติกสลายตัวอย่างช้า ๆ ในสารละลายนี้ มีค่าครึ่งชีวิตของปฏิกิริยาประมาณ 200 วัน ในขณะที่ในสารละลายเมธานอลในน้ำที่เติม กรดไฮโดรคลอริก 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักกรดเข้มข้นต่อปริมาตรสารละลาย กรดจับเบอเรลติกมีค่า ครึ่งชีวิตเพียง 2 วันเท่านั้น สารทั้ง 2 ชนิดเป็นสารที่มีรายงานว่าสามารถใช้ชะกรดจับเบอเรลติก ออกจากเรซินแลกเปลี่ยนไอออนได้ (Merck & Co., 1960) ดังนั้น ในงานวิจัยนี้ จึงเลือกสารละลาย เมธานอลในน้ำที่ปรับพีเอชเป็น 3 ด้วยกรดอะซิติก เป็นสารละลายที่ใช้ชะกรดจับเบอเรลติกออกจากเรซิน

ในการหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับแยกกรดจับเบอเรลติกออกจากน้ำหมักด้วยเรซินแลกเปลี่ยนไอออน ทำการทดลองโดยใช้คอลัมน์บรรจุเรซินแลกเปลี่ยนไอออนลบชนิดแรง (strong anion exchange resin) Amberlite IRA-400 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มีปริมาตรว่างระหว่างเรซิน (void volume) เท่ากับ 3.6 มิลลิลิตร มีคลอไรด์ไอออน (Cl⁻) ทำหน้าที่เป็นแคตไอออน เส้นผ่านศูนย์กลางคอลัมน์เท่ากับ 0.8 เซนติเมตร ควบคุมอุณหภูมิตลอดการทดลองที่ 30 องศาเซลเซียส สำหรับการดูดซับกรดจับเบอเรลติกของคอลัมน์ มีการแปรลักษณะของสารละลายกรดจับเบอเรลติกที่ผ่านเข้าคอลัมน์ พบว่า น้ำหมักที่ปรับพีเอชเป็น 7 ให้ผลการดูดซับที่ดีกว่าน้ำหมักพีเอช 3 เนื่องจากที่พีเอชสูงขึ้น กรดจับเบอเรลติกจะแตกตัวได้มากขึ้น ทำให้มีไอออนที่จะเกิดการแลกที่ได้มากขึ้น เมื่อนำน้ำหมักมาสกัดแยกสิ่งเจือปนออกด้วยเอทิลอะซิเตต และสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตแล้วตามด้วย สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7 เข้มข้น 0.05 โมลาร์ จะให้การดูดซับที่ดีเพิ่มขึ้นตามลำดับ เนื่องจาก การสกัดทำให้ได้สารละลายกรดจับเบอเรลติกที่มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น มีไอออนเจือปนที่จะแย่งจับกับเรซินน้อยลง กรดจับเบอเรลติกจึงถูกดูดซับได้มากขึ้น แต่เมื่อความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เพิ่มเป็น 0.1 โมลาร์ กลับให้ผลการดูดซับต่ำลง เนื่องจากไอออนที่เกิดจากการแตกตัวของเกลือในบัฟเฟอร์มีเพิ่มขึ้น มีโอกาสแย่งจับกับเรซินได้มากขึ้น อย่างไรก็ตามในงาน

วิจัยนี้เลือกที่จะศึกษาการดูดซับกรดจิบเบอเรลลิกจากน้ำหมักพืช 7 เนื่องจากไม่ต้องผ่านกระบวนการสกัดที่ต้องใช้ตัวทำละลายและสารเคมีอื่น ๆ

แปรอัตราการไหลของน้ำหมัก พืช 7 ที่ผ่านเข้าคอลัมน์ พบว่า ที่อัตราการไหล 2.5 มิลลิลิตร/ชั่วโมง ต่อ มิลลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน เป็นอัตราการไหลที่เหมาะสมสำหรับการดูดซับกรดจิบเบอเรลลิกของคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน เนื่องจากที่อัตราการไหลสูงกว่านี้ ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ถูกดูดซับจะลดลงอย่างมาก แต่ที่อัตราการไหลต่ำกว่านี้ ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ถูกดูดซับกลับไม่เพิ่มขึ้นมากนัก อธิบายได้ว่า ที่อัตราการไหล 2.5 มิลลิลิตร/ชั่วโมง ต่อ มิลลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน มีเวลาที่กรดจิบเบอเรลลิกสัมผัสกับเรซินมากพอที่จะทำให้เรซินเกิดการแลกเปลี่ยนไอออนได้จนถึงจุดอิ่มตัวของเรซิน ดังนั้นเรซินจึงจับกรดจิบเบอเรลลิกได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด ถึงแม้ว่าอัตราการไหลจะต่ำกว่านี้ เรซินก็จะเกิดการดูดซับกรดจิบเบอเรลลิกได้ในปริมาณใกล้เคียงกัน แต่เวลาที่ใช้ในการทดลองจะเพิ่มขึ้น

หลังขั้นตอนการดูดซับ จะล้างคอลัมน์ด้วยเมธานอล เพื่อให้ละลายกรดจิบเบอเรลลิกที่ไม่ถูกดูดซับออก ตามด้วยขั้นตอนการชะกรดจิบเบอเรลลิกออกจากคอลัมน์ ด้วยสารละลายเมธานอลในน้ำที่เติมกรดอะซิติก เพื่อปรับพีเอชเป็น 3 มีการแปรเปอร์เซ็นต์เมธานอลในน้ำอยู่ในช่วง 70 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นช่วงความเข้มข้นที่อ้างถึงในเอกสารสิทธิบัตรของบริษัท Merck & Co.(1960) พบว่า สารละลายเมธานอลในน้ำทุกสัดส่วนของเมธานอล สามารถชะกรดจิบเบอเรลลิกออกจากคอลัมน์ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ปริมาณตัวทำละลายที่ใช้ในการชะแตกต่างกันไป คือ เมื่อเปอร์เซ็นต์เมธานอลสูงขึ้นจาก 70 เป็น 80 และ 93 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ชะได้ต่อปริมาตรตัวชะก็จะสูงขึ้นตามลำดับ แต่เมื่อใช้ เมธานอล 100 เปอร์เซ็นต์ชะคอลัมน์ ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ชะได้ต่อปริมาตรตัวชะกลับมีค่าที่ต่ำที่สุด เนื่องจากเมธานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีน้ำเป็นตัวทำละลายร่วมจึงมีสภาพกรดมากกว่าตัวชะอื่น ๆ ทำให้กรดอะซิติกแตกตัวได้น้อยลง การเข้าแลกเปลี่ยนไอออนของอะซิเตตไอออนกับไอออนของกรดจิบเบอเรลลิกจึงเกิดได้ช้าลงด้วย ดังนั้นสารละลายตัวชะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับชะกรดจิบเบอเรลลิกออกจากคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน คือ สารละลาย 93 % เมธานอลในน้ำ ที่เติมกรดอะซิติกเพื่อปรับพีเอชเป็น 3

ทดลองชะคอลัมน์ที่ดูดซับกรดจิบเบอเรลลิก ด้วยสารละลาย 93 % เมธานอลในน้ำ ที่เติมกรดอะซิติก พีเอช 3 ที่อัตราการไหลต่าง ๆ พบว่า การผ่านสารละลายตัวชะปริมาตรเท่ากันเข้าคอลัมน์ เมื่ออัตราการไหลต่ำลงจะสามารถชะกรดจิบเบอเรลลิกออกจากคอลัมน์ได้มากขึ้น อัตราการไหลที่เหมาะสมสำหรับการชะกรดจิบเบอเรลลิก ที่ทดลองได้ คือ 0.28 มิลลิลิตร/ชั่วโมง ต่อ มิลลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน การลดอัตราการไหลให้ต่ำกว่านี้ อาจทำให้ประสิทธิภาพในชะกรด

จิบเบอเรลลินเพิ่มสูงขึ้น แต่เนื่องจากความจำกัดของปั๊มและเครื่องมือเก็บตัวอย่าง ทำให้ไม่สามารถทดลองใช้อัตราการไหลที่ต่ำกว่านี้ได้ อย่างไรก็ตาม จากการทดลองหาเวลาที่ถึงจุดอิ่มตัวของการชะกรดจิบเบอเรลลินออกจากเรซินในระบบแบบพี พบว่า เวลาที่ถึงจุดอิ่มตัวของการชะอยู่ที่ 220 นาที ในคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนที่มีปริมาตรว่างระหว่างเรซิน 3.6 มิลลิลิตร การทำให้สารละลายกรดจิบเบอเรลลินสัมผัสกับเรซินได้นานถึง 220 นาที ต้องใช้อัตราการไหลต่ำกว่าหรือเท่ากับ 0.28 มิลลิลิตร/ชั่วโมง ต่อ มิลลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน ดังนั้นที่อัตราการไหลที่ต่ำกว่านี้ อาจให้ผลการชะที่ไม่แตกต่างกันมากนัก

สรุปได้ว่า การผ่านน้ำหมักที่ปรับพีเอชเป็น 7 เข้าคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนลบชนิดแรง Amberlite IRA-400 ที่มีปริมาตรว่างระหว่างเรซิน 3.6 มิลลิลิตร เส้นผ่านศูนย์กลางคอลัมน์เท่ากับ 0.8 เซนติเมตร ด้วยอัตราการไหล 2.5 มิลลิลิตร/ชั่วโมง ต่อ มิลลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน ในขั้นตอนการดูดซับ และชะกรดจิบเบอเรลลินออกจากคอลัมน์ด้วยสารละลาย 93 % เมทานอลในน้ำ ที่เติมกรดอะซิติก พีเอช 3 ด้วยอัตราการไหล 0.28 มิลลิลิตร/ชั่วโมง ต่อ มิลลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน เป็นภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการแยกกรดจิบเบอเรลลินออกจากรูปร่างที่ทดลองได้ในงานวิจัยนี้

ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการตกผลึกกรดจิบเบอเรลลิน จากสารละลายที่ชะได้จากคอลัมน์ พบว่า การตกผลึกด้วยวิธีเตรียมสารละลายอิ่มตัวของกรดจิบเบอเรลลินในเอทิลอะซิเตตที่จุดเดือดของสารละลายแล้วลดอุณหภูมิเพื่อตกผลึก เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับตกผลึกกรดจิบเบอเรลลินมากกว่าวิธีระเหยตัวทำละลายให้แห้งแล้วเติมเอทิลอะซิเตตเพื่อตกผลึก พิจารณาจากความสำเร็จของผลึกและปริมาณกรดจิบเบอเรลลินที่ตกผลึก ซึ่งมีค่าสูงกว่าเมื่อตกผลึกด้วยวิธีแรก คือ ความสำเร็จของผลึก 87 % ซึ่งใกล้เคียงกับความสำเร็จของผลึกมาตรฐาน จากบริษัท SIGMA (ความสำเร็จ 90 %) ได้ผลิตผลของกรดจิบเบอเรลลิน 72 % เมื่อเทียบกับปริมาณกรดจิบเบอเรลลินในสารละลายที่ชะได้จากคอลัมน์ ขณะที่วิธีที่สองให้ผลึกที่ประสบความสำเร็จ 81 % ได้ผลิตผลของกรดจิบเบอเรลลิน 65 %

สำหรับการลดอุณหภูมิเพื่อตกผลึก การลดอุณหภูมิจากจุดเดือดของสารละลายกรดจิบเบอเรลลินในเอทิลอะซิเตต ที่ 77 องศาเซลเซียส มาเป็น 30 องศาเซลเซียส เหมาะสมที่สุดในการตกผลึกกรดจิบเบอเรลลิน เนื่องจากที่อุณหภูมิสูงกว่านี้ การตกผลึกจะเกิดขึ้นน้อยมาก และที่อุณหภูมิต่ำกว่านี้ ก็ไม่ให้เกิดการตกผลึกที่ดีขึ้นอย่างชัดเจน ทั้งในด้านของปริมาณและความสำเร็จของผลึก แต่กลับต้องสูญเสียพลังงานในการควบคุมระบบมากขึ้น

ผลึกที่ตกได้จากการทดลอง มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีขาว คล้ายกับผลึกของกรดจิบเบอเรลลินมาตรฐาน แต่มีความขาวน้อยกว่า มีลักษณะโครมาโทแกรมจากการวิเคราะห์ด้วย

HPLC และลักษณะสเปกตรัมจากการวิเคราะห์ด้วย NMR เหมือนกัน เป็นการพิสูจน์ว่าผลึกที่ตกได้ เป็นผลึกของกรดจิบเบอเรลลิก จากการตรวจสอบจุดหลอมเหลวของผลึก พบว่า ผลึกที่ตกได้จากการ ทดลองมีจุดหลอมเหลว 219-222 องศาเซลเซียส ต่ำกว่าจุดหลอมเหลวของผลึกกรดจิบเบอเรลลิก บริสุทธิ์ ซึ่งมีจุดหลอมเหลว 232-235 องศาเซลเซียส สันนิษฐานได้ว่า ผลึกกรดจิบเบอเรลลิกที่ตก ผลึกได้มีการปนเปื้อนของกรดจิบเบอเรลลินิก ซึ่งเป็นสารเจือปนที่มักพบในน้ำหมักและในผลึกกรด จิบเบอเรลลิกอยู่เสมอ และมีรายงานกล่าวว่า ผลึกกรดจิบเบอเรลลิกที่มีกรดจิบเบอเรลลินิกเจือปนอยู่ 2.1 % จะมีจุดหลอมเหลวลดลงมาอยู่ในช่วง 218-220 องศาเซลเซียส ซึ่งใกล้เคียงกับจุดหลอมเหลว ของผลึกกรดจิบเบอเรลลิกที่ตรวจสอบได้ (Kavanage and Kuzel, 1958 ; Moffatt, 1960 ; Cross, et al., 1961) อย่างไรก็ตาม Cross และคณะได้เสนอวิธีแก้ไขการปนเปื้อนของกรดจิบเบอเรลลินิกในผลึก ของกรดจิบเบอเรลลิก ด้วยการละลายผลึกในเมธานอล แล้วเติมน้ำลงในสารละลาย นำไปควบคุม อุณหภูมิให้ตกผลึกที่ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณประมาณ 18 ชั่วโมง จะได้ผลึกกรด จิบเบอเรลลิกที่บริสุทธิ์ตกออกมา

ผลของงานวิจัยนี้ ทำให้ทราบถึงภาวะที่เหมาะสมส่วนหนึ่งในการแยกกรดจิบเบอเรลลิก ออกจากน้ำหมักด้วยกระบวนการแลกเปลี่ยนไอออน ซึ่งให้เห็นถึงปัจจัยที่มีผลกระทบต่อประสิทธิภาพ ในการแยกกรดจิบเบอเรลลิกด้วยเรซินแลกเปลี่ยนไอออน ได้แก่ ความบริสุทธิ์ของน้ำหมักที่ผ่านเข้า คอลัมน์ อัตราการไหลของสารละลายทั้งในขั้นตอนการดูดซับและการชะและ ชนิดของสารละลายตัว ชะ ทำให้ทราบถึงภาวะที่เหมาะสมส่วนหนึ่งในการตกผลึกกรดจิบเบอเรลลิก รวมทั้งภาวะที่มีผลต่อ เสถียรภาพของกรดจิบเบอเรลลิก ซึ่งอาจนำไปใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนากระบวนการแยก และตกผลึกกรดจิบเบอเรลลิกได้ อย่างไรก็ตาม ผลของงานวิจัยนี้เป็นเพียงข้อมูลส่วนหนึ่ง ยังมีปัจจัย อีกหลากหลายที่อาจส่งผลกระทบต่อกระบวนการแยกกรดจิบเบอเรลลิกด้วยเรซินแลกเปลี่ยนไอออนและ กระบวนการตกผลึกกรดจิบเบอเรลลิก ควรที่จะมีการวิจัยเพื่อค้นหาภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการ แยกและตกผลึกกรดจิบเบอเรลลิกจากน้ำหมักอย่างต่อเนื่องต่อไป