# บทที่ 4

## บทสรุปและวิจารณ์

จากการศึกษาองค์ประกอบที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงหัวเชื้อทั้ง 4 ชนิด สำหรับ *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 ในระดับขวดเขย่า พบว่า นิวเตรียนบรอทที่เสริมผงสกัดยีสต์ กลีเซอรอล และทวีน 80 เป็นอาหารเลี้ยงหัวเชื้อที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญเมื่อเลี้ยงทั้งในระบบการเขย่าแบบวงกลมและแบบเส้นตรงเป็นเวลา 3 วัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเป็นอาหารเลี้ยงหัวเชื้อที่สมบูรณ์มากกว่าและมีทวีน 80 ประกอบอยู่ด้วย ซึ่งทวีน 80 นี้เป็นสารลดแรงตึงผิว ทำให้ลดการเกาะกันของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงหัวเชื้อ (Martin, 1984) เชื้อจึงกระจายตัวในอาหารเลี้ยงหัวเชื้อ และเจริญได้รวดเร็วกว่าในอาหารเลี้ยงหัวเชื้อชนิดอื่น และจากการศึกษาเพื่อเลือกระบบการเขย่าที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 โดยใช้ระบบการเขย่าแบบวงกลมและแบบเส้นตรง พบว่า *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 มีการเจริญในระบบการเขย่าแบบวงกลมสูงกว่า และเร็วกว่าในระบบการเขย่าแบบเส้นตรง โดยพบว่าในระบบการเขย่าแบบวงกลมเชื้อจะเจริญเข้าสู่กลางระยะ log phase ที่เวลา 76 ชม. ส่วนในระบบการเขย่าแบบเส้นตรงเชื้อจะเจริญเข้าสู่กลางระยะ log phase ที่เวลา 96 ชม. ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในระบบการเขย่าแบบวงกลมจะให้ปริมาณออกซิเจนสูงกว่าระบบการเขย่าแบบเส้นตรง (Sikyta,1983) ซึ่งจะเหมาะกับ *Mycobacterium sp.* ที่เป็นเชื้อที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (Runyon และคณะ, 1974) เชื้อจึงมีอัตราการเจริญสูงกว่าในระบบที่มีปริมาณออกซิเจนต่ำกว่า และจากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิต AD จากสเตียรอลในอาหารเหลวที่ใช้ผลิต AD (ภาคผนวกที่ 1.3) เป็นเวลา 7 วัน พบว่าการผลิต AD จะเกิดควบคู่ไปกับการเจริญของเชื้อ และการผลิต AD จะมีระดับสูงสุดเมื่อการเจริญเติบโตของเชื้อเข้าสู่ระยะ stationary phase โดยพบว่าในทั้ง 2 ระบบของการเขย่าการเปลี่ยนสเตียรอลไปเป็น AD จะสูงสุดในวันที่ 5 เช่นกัน แต่อย่างไรก็ตามในระบบการเขย่าแบบเส้นตรง เชื้อจะมีการเจริญต่ำกว่าแต่กลับสามารถผลิต AD ได้สูงกว่า โดยเชื้อที่เจริญในระบบเขย่าแบบเส้นตรงให้ค่าการเปลี่ยนสเตียรอลไปเป็น

AD ได้สูงสุด 59.1 % แต่เชื้อที่เจริญในระบบเขย่าแบบวงกลมให้ค่าการเปลี่ยนสเตียรอลไปเป็น AD ได้สูงสุดเพียง 36.8 %

จากรายงานการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต AD และ ADD จากสเตียรอลโดยจุลินทรีย์นั้น ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อจะแตกต่างกันไป ดังที่มีผู้รายงานไว้ว่ากลูโคสที่ความเข้มข้น 10.0 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการเปลี่ยนเบตา-ซิโตสเตียรอลเป็นสาร AD และ ADD โดย *Nocardia sp.* M.29 (Martin และ Wagner, 1976) กลีเซอรอลเข้มข้น 10.0 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการเปลี่ยนเบตา-ซิโตสเตียรอลไปเป็น AD และ ADD โดย *Mycobacterium fortuitum* สายพันธุ์ที่ผ่าเหล่าแล้ว (Wovcha และ คณะ, 1978) คอร์นสตีพลิเคอร์และกากน้ำตาล (molassess) ที่ความเข้มข้น 10.0 กรัม/ลิตร และ 5.0 กรัม/ลิตร ตามลำดับ เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการเปลี่ยนคอเลสเตียรอลไปเป็น ADD โดย *Arthrobacter simplex* IAM 1660 (Nagasawa และคณะ, 1970) เป็นต้น สำหรับในประเทศไทยสารละลายแป้งที่ย่อยด้วยเอนไซม์เทอร์มามิลน่าจะเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนชนิดหนึ่งที่ควรศึกษา เพราะสามารถผลิตได้ง่ายจากแป้งมันสำปะหลังที่มีราคาถูก โดยนำมาผ่านกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์เทอร์มามิลที่สามารถย่อยโมเลกุลของแป้งให้เป็นเดกซ์ตริน และโอลิโกแซคคาไรด์ ( oligosaccharide ) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทดลองใช้สารละลายแป้งที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เทอร์มามิลเป็นแหล่งคาร์บอน เปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นที่มีผู้รายงานมาแล้ว ในการเลี้ยง *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 เพื่อผลิต AD จากสเตียรอล ผลการทดลอง พบว่า สารละลายแป้งที่ย่อยด้วยเอนไซม์เทอร์มามิล ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ประมาณ 20 % (นน./นน.) หรือปริมาณกลูโคส 0.8 % (นน./นน.)ในปริมาณของแป้ง 5.0 กรัม/ลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งทำให้ *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 สามารถเปลี่ยนสเตียรอลเป็น AD ได้สูงสุด คือ 74.0 %

สำหรับแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมนั้นได้มีผู้รายงานว่า คอร์นสตีพลิเคอร์และสารสกัดจากเนื้อ (meat extract) ที่ความเข้มข้น 10.0 กรัม/ลิตร และ 2.0 กรัม/ลิตร ตามลำดับเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการเปลี่ยนคอเลสเตียรอลเป็น ADD โดย *Arthrobacter simplex* IAM 1660 หรือ *Nocardia corallina* IFO 3338 (Nagasawa และคณะ, 1970) ส่วนแหล่งไนโตรเจนอื่น ๆ ได้แก่ แอมโมเนียมคลอไรด์

1.0 กรัม/ลิตร ยูเรีย 0.05 กรัม/ลิตร และแป้งถั่วเหลือง 1.0 กรัม/ลิตร ในการเปลี่ยนเบตา-ซิโตสเตียรอล โดย *Mycobacterium fortuitum* สายพันธุ์ที่ผ่าเหล่าแล้ว (Wovcha และคณะ, 1978) เป็นต้น สำหรับงานวิจัยนี้ พบว่า คอร์นสตีพลิเคอร์เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ไม่เหมาะสมสำหรับ *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 โดยจะยับยั้งการผลิต AD ทำให้ผลิตผล AD ที่ได้ต่ำลง และพบว่าไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนทั้งหมด 0.50 กรัม/ลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งทำให้ *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 สามารถเปลี่ยนสเตียรอลไปเป็น AD ได้สูงประมาณ 81.6 %

ในการศึกษาผลของปริมาณเกลือแร่แต่ละชนิดต่อการเปลี่ยนสเตียรอลไปเป็น AD โดยจุลินทรีย์ดังกล่าว พบว่า ความเข้มข้นของโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตปริมาณ 0.50 กรัม/ลิตร แคลเซียมคาร์บอเนตปริมาณ 3.0 กรัม/ลิตร มักเนเซียมซัลเฟตปริมาณ 2.0 กรัม/ลิตร และโซเดียมคลอไรด์ปริมาณ 0.4 กรัม/ลิตร คือ ปริมาณที่เหมาะสมที่สุดซึ่งเป็นปริมาณที่เท่ากับที่มีในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อตามภาคผนวกที่ 1.6 โดยจะให้การเปลี่ยนสเตียรอลเป็นสาร AD โดย *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 ได้สูงสุดประมาณ 79.7 % ในเวลา 5 วัน

ในการเตรียมสเตียรอลเพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการเปลี่ยนเป็น AD นั้น ได้มีผู้รายงานว่าเพื่อให้สเตียรอลกระจายได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อทำได้โดยละลายสเตียรอลในตัวทำละลายอินทรีย์ก่อนเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะทำให้การสร้างผลิตภัณฑ์สูงขึ้น (Watanabe และ คณะ, 1986) ในการวิจัยนี้ได้ทดลองใช้คลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลายสเตียรอล และในการวิจัยนี้ก็ได้ผลเช่นเดียวกับการทดลองของ Martin และ Wagner (1976) คือ ที่ความเข้มข้นสเตียรอลต่ำ การเปลี่ยนสเตียรอลไปเป็น AD โดย *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 จะสูงกว่าเมื่อมีสเตียรอลสูง และพบว่าที่ความเข้มข้นสเตียรอล 0.42-0.84 มก./มล. เป็นปริมาณที่เหมาะสมที่สุดในการเปลี่ยนซึ่งได้ AD สูงสุดประมาณ 80.3 % ในเวลา 5 วัน ถ้าปริมาณสเตียรอลสูงหรือต่ำกว่านี้การเปลี่ยนสเตียรอลเป็น AD จะต่ำลง โดยเฉพาะเมื่อปริมาณสเตียรอลสูงขึ้นเป็น 2.10 และ 2.52 มก./มล. การเปลี่ยนสเตียรอลเป็น AD จะต่ำลงมาก คือ 56.0 % และ 48.9 % ตามลำดับ ทั้งนี้ Imschenetskii และคณะ (1968) ได้รายงานไว้ว่า ความเข้มข้นสารตั้งต้นสเตียรอลที่สูงๆ จะมีผลยับยั้งต่อเอนไซม์ที่ใช้สลายสเตียรอล โดยได้ทดลอง

ให้เห็นว่าที่ความเข้มข้นคอเลสเตียรอลต่ำๆ คือ 0.75 ไมโครโมล/มล. คอเลสเตียรอลจะถูกสลายไป 78 % โดย Mycobacteria ในเวลา 18 ชม. ในขณะที่ความเข้มข้นคอเลสเตียรอลสูง ๆ คือ 4 ไมโครโมล/มล. จะถูกสลายไปเพียง 27 %

สำหรับสภาวะทางกายภาพที่เหมาะสมที่สุดในการเปลี่ยนสเตียรอลไปเป็นสาร AD ได้แก่ ความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ และระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อนั้นได้มี ผู้รายงานว่า ความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อในการเจริญของแบคทีเรียและ Actinomycetes เพื่อผลิต AD คือ 7.0 ส่วนในการเจริญของรา และยีสต์เพื่อผลิต AD คือ 6.0 (Arima และคณะ, 1969) และอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิต AD และ ADD อยู่ในช่วง 25 ถึง 37° ซ.(Wovcha และคณะ, 1982) สำหรับระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อผลิต AD และ ADD มีรายงานว่า ตั้งแต่ 72 ชม. ถึง 15 วัน หรือมากกว่า (Wovcha และคณะ, 1982) สำหรับการวิจัยนี้พบว่า ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเปลี่ยนสเตียรอลไปเป็น AD โดย *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 คือ 7.0-8.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30° ซ. และระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเพื่อการสร้าง AD คือ 5 วัน ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยที่ได้มีผู้รายงานไว้ และภายใต้สภาวะดังกล่าวจะได้ปริมาณ AD สูงสุด คือ 83.6 %

จากการศึกษาการสกัดแยกและทำ AD ให้บริสุทธิ์นั้น การแยก AD จากน้ำหมักทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย มีรายงานว่าตัวทำละลายที่ใช้ได้แก่ ไดคลอโรมีเทน คลอโรฟอร์ม คาร์บอนเตตระคลอไรด์ เอทธิลีนคลอไรด์ เป็นต้น (Wovcha และคณะ, 1981) แต่มีหลายรายงานที่กล่าวถึง การใช้ไดคลอโรมีเทนและเอทธิลอะซีเตทในการสกัดโดย Marsheck และคณะ (1972) ใช้ไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วนปริมาตรน้ำหมักต่อไดคลอโรมีเทนเท่ากับ 1 ต่อ 3 สกัดซ้ำ 2 ครั้ง ได้ ผลิตผล ADD เท่ากับ 48 % ( % เทียบกับสารตั้งต้นซิโตสเตียรอลที่ใช้ไป) Wovcha และคณะ (1978) รายงานว่าใช้อัตราส่วนน้ำหมักต่อไดคลอโรมีเทนเท่ากับ 1 ต่อ 4 ได้ผลิตผล 9 แอลฟา-ไฮดรอกซี 4-แอนโดรสตีน-3,17-ไดโอนเท่ากับ 40 % Nagasawa และคณะ (1970) รายงานการใช้เอทธิลอะซีเตทเป็นตัวทำละลายในการสกัด ADD จากน้ำหมักในอัตราส่วนปริมาตรน้ำหมักต่อเอทธิลอะซีเตทเท่ากับ 1 ต่อ 1 โดยสกัดซ้ำ 3 ครั้งได้ผลิตผล ADD เท่ากับ 11.02 % ต่อมามีผู้รายงานถึงการใช้ตัวทำละลายชนิดเดียวกันนี้ในการแยก ADD จากน้ำหมักแต่ใช้อัตราส่วนเท่ากับ 1 ต่อ 2 ได้ผลิตผล ADD เท่ากับ 54 % (Srivastava และคณะ, 1985)

และยังมีผู้รายงานถึงการปรับค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมักให้เป็น 1-2 ก่อนการสกัดด้วยตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม แล้วจึงสกัดด้วยอัตราส่วนปริมาตรน้ำหมักต่อคลอโรฟอร์มเท่ากับ 1 ต่อ 1 สกัดซ้ำ 3 ครั้ง ได้ผลิตผล AD และ ADD เท่ากับ 22 % (Martin และ Wagner, 1976) ส่วนตัวทำละลายที่ไม่เหมาะสมในการสกัด ได้แก่ ผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียม อีเทอร์และเบนซีนเพราะตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดมีความเป็นขั้วต่ำ แต่ AD และ ADD จะละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีความเป็นขั้วสูง (Murray, 1976)

จากการวิจัยนี้เมื่อใช้อัตราส่วนปริมาตรน้ำหมักต่อเอทธิลอะซีเตท เท่ากับ 1 ต่อ 2 ในการสกัด AD จากน้ำหมักจะได้ผลิตผล AD เท่ากับ 83.6 % (% เทียบกับสารตั้งต้น) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองที่มีผู้รายงานไว้ดังกล่าวข้างต้น เปอร์เซนต์ผลิตผล AD ที่ได้จะมีค่าสูงกว่า ในการวิจัยนี้พบว่าตัวทำละลายที่เหมาะสมที่มีประสิทธิภาพในการสกัด AD จากน้ำหมัก ได้แก่ เอทธิลอะซีเตทและไดคลอโรมีเทน ซึ่งให้ค่า % AD ที่สกัดได้เทียบกับที่มีในน้ำหมักเริ่มต้นเท่ากับ 96.49 และ 95.97 ตามลำดับ เมื่อสกัด 1 ครั้ง โดยใช้อัตราส่วนน้ำหมักต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1ต่อ 2 เป็นเวลา 10 นาที และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างเอทธิลอะซีเตทและไดคลอโรมีเทน โดยใช้ปริมาตรตัวทำละลายและเวลาในการสกัด AD จากน้ำหมักได้สูง คือ อัตราส่วนน้ำหมักต่อเอทธิลอะซีเตทเท่ากับ 1 ต่อ 2 เป็นเวลา 15 นาที และอัตราส่วนน้ำหมักต่อไดคลอโรมีนเทน เท่ากับ 1 ต่อ 3 เป็นเวลา 10 นาที สกัดเป็นจำนวน 2 ครั้งเช่นเดียวกัน ภายใต้สภาวะนี้จะให้ % AD ที่สกัดได้เทียบกับที่มีในน้ำหมักเริ่มต้นเท่ากับ 97.99 และ 93.31 % ตามลำดับ โดยที่ในการสกัดนั้น % AD ที่สกัดได้ใกล้เคียงกับการสกัดที่ต้องปรับค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมักเท่ากับ 2 สำหรับการสกัดในระดับอุตสาหกรรมนั้น อัตราส่วนระหว่างน้ำหมักต่อเอทธิลอะซีเตท และอัตราส่วนระหว่างน้ำหมักต่อไดคลอโรมีเทน (โดยปริมาตร) ที่เหมาะสม คือ 1 ต่อ 1 เพื่อเป็นการไม่สิ้นเปลืองตัวทำละลายในการสกัด และพลังงานในการระเหยในขั้นตอนการตกผลึก และควรสกัดเพียงครั้งเดียว เพราะ % AD ที่เพิ่มขึ้นจากการสกัดครั้งที่ 2 ต่ำไม่คุ้มกับค่าใช้จ่ายในการใช้ตัวทำละลายในการสกัดอีกครั้ง แต่ในการวิจัยนี้เราทำการศึกษาการสกัด AD จากน้ำหมักให้ได้มากที่สุดจึงสกัดมากกว่า 1 ครั้ง สำหรับในแง่การนำสารกลับมาใช้เมื่อเปรียบเทียบระหว่างตัวทำละลายทั้งสองชนิด พบว่า เอทธิลอะซีเตทมี % การนำกลับมาใช้สูงกว่าไดคลอโรมีเทน เพราะเอทธิลอะซีเตทมีจุดเดือดสูงกว่าไดคลอโรมีเทนโดยเอทธิลอะซีเตทมีจุดเดือด 77° ซ. และไดคลอโรมีเทนมีจุดเดือด 39.75° ซ. ดังนั้นการสูญเสีย

ในระหว่างการนำกลับมาใช้ของเอทธิลอะซีเตทจะต่ำกว่าไดคลอโรมีเทน ฉะนั้นเมื่อเปรียบเทียบทั้งในแง่ประสิทธิภาพการสกัด และ % การนำสารกลับมาใช้ เอทธิลอะซีเตทจะเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมกว่าไดคลอโรมีเทน

ในขั้นตอนการทำ AD ให้บริสุทธิ์นั้นต้องหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม ในการแยก AD ออกจากสารเจือปนที่สกัดออกมาจากน้ำหมักโดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบดูดซับโดยมีซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ จากรายงานหลายฉบับมีการใช้ระบบตัวทำละลายต่าง ๆ กันในการแยก AD จากสิ่งเจือปน ซึ่งในการวิจัยนี้ได้วิเคราะห์ความสามารถของระบบตัวทำละลายที่จะแยก AD ออกจากสิ่งเจือปน โดยดูจากจำนวนจุดที่ปรากฏบนแผ่นทินเลเยอร์โครมาโตกราฟีที่แต่ละระบบตัวทำละลายแยกได้ และค่าความสามารถในการแยกสาร AD จากสิ่งเจือปนที่อยู่ใกล้กัน พบว่าระบบตัวทำละลายเอทธิลอะซีเตทต่อคลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วนโดยปริมาตร คือ 15 ต่อ 85 ตามรายงานของ Wovcha และคณะ (1978) สามารถแยกสารในน้ำหมักได้ 3 จุด และมีค่าความสามารถในการแยกสาร AD กับสิ่งเจือปนที่อยู่ใกล้กันได้สูงกว่าระบบตัวทำละลายอื่นให้ค่าเท่ากับ 0.14 จึงเลือกใช้ระบบตัวทำละลายนี้ในการทำ AD ให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี ซึ่งเมื่อนำไปตรวจวัดความบริสุทธิ์และปริมาณ AD โดยวิธีแกสโครมาโตกราฟี พบว่า มีความบริสุทธิ์ 57.3 % และมีผลิตผล AD เท่ากับ 82.6 % ของปริมาณ AD ตั้งต้น แต่เมื่อพิจารณาความบริสุทธิ์แล้วค่าที่ได้ยังต่ำจึงเลือกใช้ระบบตัวทำละลายไซโคลเฮกเซนต่อเอทธิลอะซีเตท ซึ่งเป็นอีกระบบหนึ่งที่แยก AD ออกจากสิ่งเจือปนได้สูง โดยใช้อัตราส่วนโดยปริมาตร 4 ต่อ 1 ในการทำให้ความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น พบว่าสารที่ได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 68 % และผลิตผล AD ลดลงเหลือเท่ากับ 54.1% ของ AD ตั้งต้น โดยที่ในการวิจัยนี้เราต้องการให้ได้ผลึก AD ที่มีความบริสุทธิ์สูงเพื่อนำไปศึกษาคุณสมบัติทางเคมี จึงต้องทำโครมาโตกราฟีบนซิลิกาเจลคอลัมน์ 2 ครั้ง สำหรับในระดับอุตสาหกรรมการเลือกใช้ระบบตัวทำละลายไซโคลเฮกเซนต่อเอทธิลอะซีเตท อัตราส่วนโดยปริมาตร 4 ต่อ 1 ในการทำให้บริสุทธิ์เพียงระบบเดียวน่าจะเหมาะสมกว่าเพื่อให้ได้เปอร์เซนต์ผลิตผล (% yield) AD สูง แล้วจึงมาทำการตกผลึก ในการทดลองนี้เมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นอีกด้วยการตกผลึกในสารละลายเอทธิลอะซีเตท-เฮกเซน จะได้ผลึกสีขาวที่มีความบริสุทธิ์สูงถึง 97 % เมื่อนำผลึกที่ได้นี้ไปพิสูจน์เอกลักษณ์โดยวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพ และโครงสร้างทางเคมี คือ หาจุดหลอมเหลว ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี แกสโครมาโตกราฟี แมสสเปกโตรมิเตอร์ อินฟราเรดสเปกโตมิเตอร์ และนิวเคลียร์

แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรมิเตอร์ พบว่า มีคุณสมบัติตรงตามสาร AD มาตรฐาน สำหรับงานวิจัยต่อไป ควรศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มประสิทธิภาพของ *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 ต่อการเปลี่ยนสเตียรอลไปเป็น AD ในถังหมักให้ได้ปริมาณสูงสุดเพื่อสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตสเตียรอลต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย