บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. การศึกษาองค์ประกอบที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงหัวเชื้อในการเจริญของ *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 ในขวดรูปชมพู่

จากรายงานต่าง ๆ ได้มีการเลี้ยง *Mycobacterium sp.* ในอาหารเลี้ยงหัวเชื้อต่าง ๆ กัน ดังนี้

1. นิวเตรียนบรอทที่เสริมผงสกัดยีสต์ (Marsheck และคณะ, 1972)
2. นิวเตรียนบรอทที่เสริมผงสกัดยีสต์และกลีเซอรอล (Wovcha และ Biggs, 1981)
3. นิวเตรียนบรอทที่เสริมผงสกัดยีสต์ กลีเซอรอล และทวีน 80 (Wovcha และ Brooks, 1979)
4. โลเวนสไตน์เจนเซน มีเดียม เบส (Lowenstein, 1953)

ดังนั้นในการทดลองนี้จึงจะเลือกอาหารเลี้ยงหัวเชื้อที่เหมาะสมในการเลี้ยง *M. fortuitum* CBS 313.79 ในขวดรูปชมพู่ตามวิธีการวิจัยในบทที่ 2 ข้อ 2.3 และ 2.4 ทั้งในระบบการเขย่าแบบวงกลม (rotary shaker) และระบบการเขย่าแบบเส้นตรง (reciprocal shaker) เป็นเวลา 3 วัน (Wovcha และคณะ, 1978) โดยเปรียบเทียบการเจริญในอาหารเลี้ยงหัวเชื้อทั้ง 4 ชนิดนี้ โดยขั้นแรกจะเปรียบเทียบการเจริญในอาหารเลี้ยงหัวเชื้อ 3 ชนิด คือ นิวเตรียนบรอทที่เสริมผงสกัดยีสต์ นิวเตรียนบรอทที่เสริมผงสกัดยีสต์และกลีเซอรอล และนิวเตรียนบรอทที่เสริมผงสกัดยีสต์ กลีเซอรอลและทวีน 80 ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงหัวเชื้อที่มีลักษณะใส ดังนั้นการติดตามการเจริญจึงทำโดยการวัดความขุ่นโดยดูการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ผลการทดลองในตารางที่ 3 และ 4 พบว่า นิวเตรียนบรอทที่เสริมผงสกัดยีสต์ กลีเซอรอล และทวีน 80 จะให้การเจริญของเชื้อสูงสุดในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 3 ผลของการใช้อาหารเลี้ยงหัวเชื้อชนิดต่าง ๆ ต่อการเจริญของ *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 เมื่อเลี้ยงเชื้อในระบบการเขย่าแบบวงกลมเป็นเวลา 3 วัน

อาหารเลี้ยงหัวเชื้อ	ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร
นิวเตรียนบรอทที่เสริมผงสกัดยีสต์	5.05
นิวเตรียนบรอทที่เสริมผงสกัดยีสต์และกลีเซอรอล	5.25
นิวเตรียนบรอทที่เสริมผงสกัดยีสต์ กลีเซอรอลและทวีน 80	**5.60**

ตารางที่ 4 ผลของการใช้อาหารเลี้ยงหัวเชื้อชนิดต่าง ๆ ต่อการเจริญของ *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 เมื่อเลี้ยงเชื้อในระบบการเขย่าแบบเส้นตรงเป็นเวลา 3 วัน

อาหารเลี้ยงหัวเชื้อ	ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร
นิวเตรียนบรอทที่เสริมผงสกัดยีสต์	2.62
นิวเตรียนบรอทที่เสริมผงสกัดยีสต์และกลีเซอรอล	2.81
นิวเตรียนบรอทที่เสริมผงสกัดยีสต์ กลีเซอรอลและทวีน 80	**3.16**

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ดังนั้นขั้นต่อไปจึงเปรียบเทียบการเจริญของ *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 เมื่อเลี้ยงในนิวเตรียนบรอทที่เสริมผงสกัดยีสต์ กลีเซอรอลและทวีน 80 กับโลเวนสไตน์เจนเซน มีเดียม เบส ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขุ่น ดังนั้นการวัดการเจริญจึงทำโดยติดตามปริมาณดีเอนเอ (วิธีวิจัยในบทที่ 2 ข้อ 3.1) พบว่าเชื้อจะมีการเจริญในอาหารเลี้ยงหัวเชื้อนิวเตรียนบรอทที่เสริมผงสกัดยีสต์ กลีเซอรอลและทวีน 80 สูงกว่าในโลเวนสไตน์เจนเซน มีเดียม เบส (ตารางที่ 5 และ 6) ในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นจึงเลือกอาหารเลี้ยงหัวเชื้อนิวเตรียนบรอทที่เสริมผงสกัดยีสต์ กลีเซอรอล และทวีน 80 ในการเลี้ยงหัวเชื้อสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 5 ผลของการใช้อาหารเลี้ยงหัวเชื้อชนิดต่าง ๆ ต่อการเจริญของ *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 เมื่อเลี้ยงเชื้อในระบบการเขย่าแบบวงกลมเป็นเวลา 3 วัน

อาหารเลี้ยงหัวเชื้อ	ปริมาณดีเอนเอ (มก./50 มล.)
นิวเตรียนบรอทที่เสริมผงสกัดยีสต์ กลีเซอรอลและทวีน 80	**1.28**
โลเวนสไตน์เจนเซน มีเดียม เบส	0.76

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 ผลของการใช้อาหารเลี้ยงหัวเชื้อชนิดต่าง ๆ ต่อการเจริญของ *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 เมื่อเลี้ยงเชื้อในระบบการเขย่าแบบเส้นตรงเป็นเวลา 3 วัน

อาหารเลี้ยงหัวเชื้อ	ปริมาณดีเอนเอ (มก./50 มล.)
นิวเตรียนบรอทที่เสริมผงสกัดยีสต์ กลีเซอรอลและทวีน 80	**0.54**
โลเวนสไตน์เจนเซน มีเดียม เบส	0.34

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

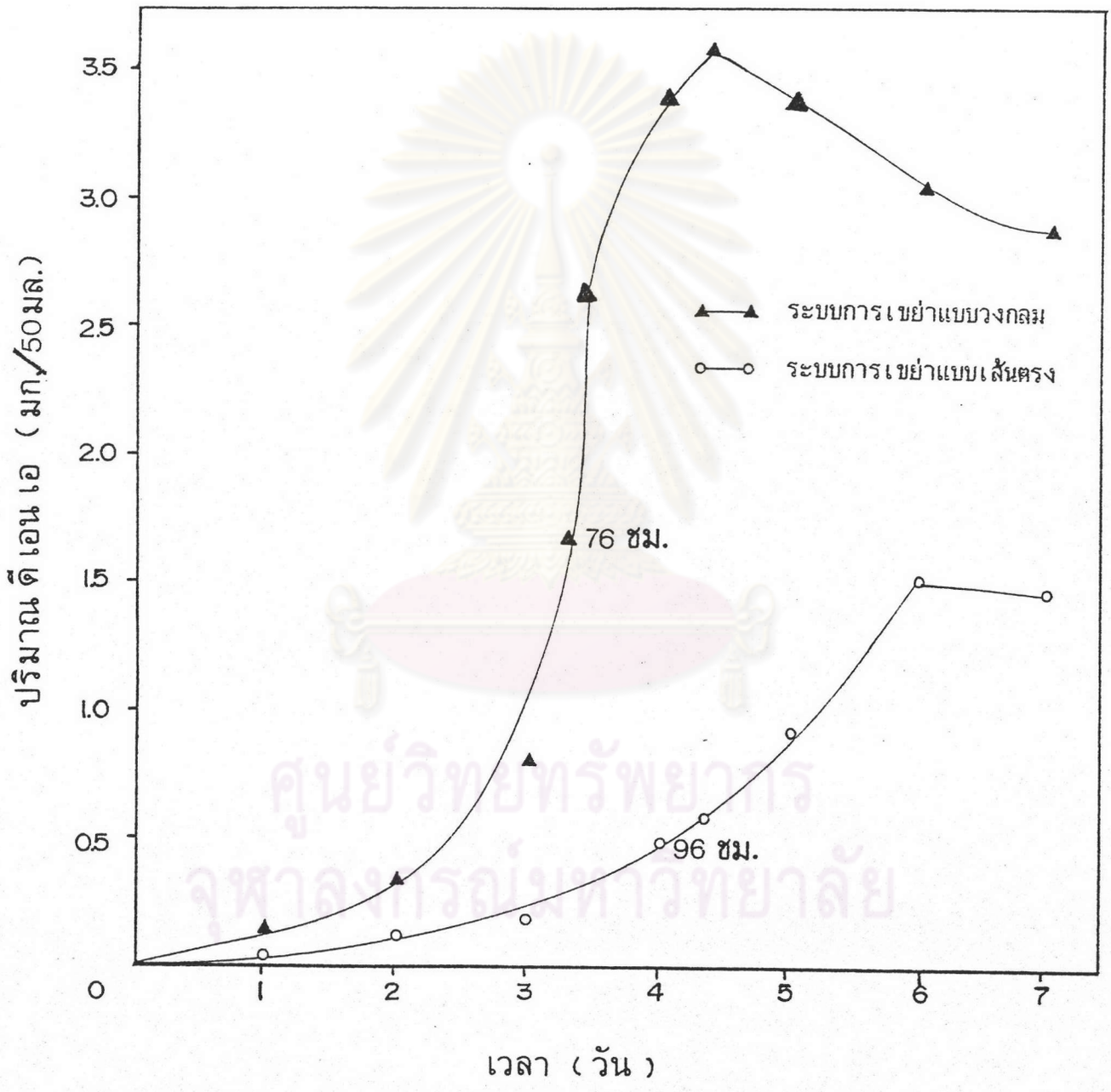
2. ระบบการเขย่าที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต AD ของ *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79

2.1 การเจริญของ *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 ในระบบการเขย่าแบบวงกลม และแบบเส้นตรงเมื่อเตรียมเป็นหัวเชื้อรุ่นที่ 2

เมื่อทำการเลี้ยง *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 ในอาหารเลี้ยงหัวเชื้อนิวเตรียนบรอท ที่เสริมผงสกัดยีสต์ กลีเซอรอลและทวีน 80 ตามวิธีการวิจัยในบทที่ 2 ข้อ 2.3 และ 2.4 ใช้ระบบการเขย่าแบบวงกลมและแบบเส้นตรง ผลการทดลอง (รูปที่ 6) พบว่า *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 มีการเจริญในระบบการเขย่าแบบวงกลมสูงกว่าในระบบการเขย่าแบบเส้นตรง และในระบบการเขย่าแบบวงกลมนี้เชื้อจะเจริญเข้าสู่กลางระยะ log phase ในเวลาที่เร็วกว่าคือที่เวลา 76 ชม. ส่วนในระบบการเขย่าแบบเส้นตรงเชื้อจะเจริญเข้าสู่กลางระยะ log phase ที่เวลา 96 ชม. ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้เซลที่มีการเจริญในอาหารเลี้ยงหัวเชื้อนิวเตรียนบรอทที่เสริมผงสกัดยีสต์ กลีเซอรอลและทวีน 80 ด้วยระบบการเขย่าแบบวงกลมเมื่อเจริญเข้าสู่กลางระยะ log phase ที่เวลา 76 ชม. เป็นหัวเชื้อเพื่อการสร้าง AD

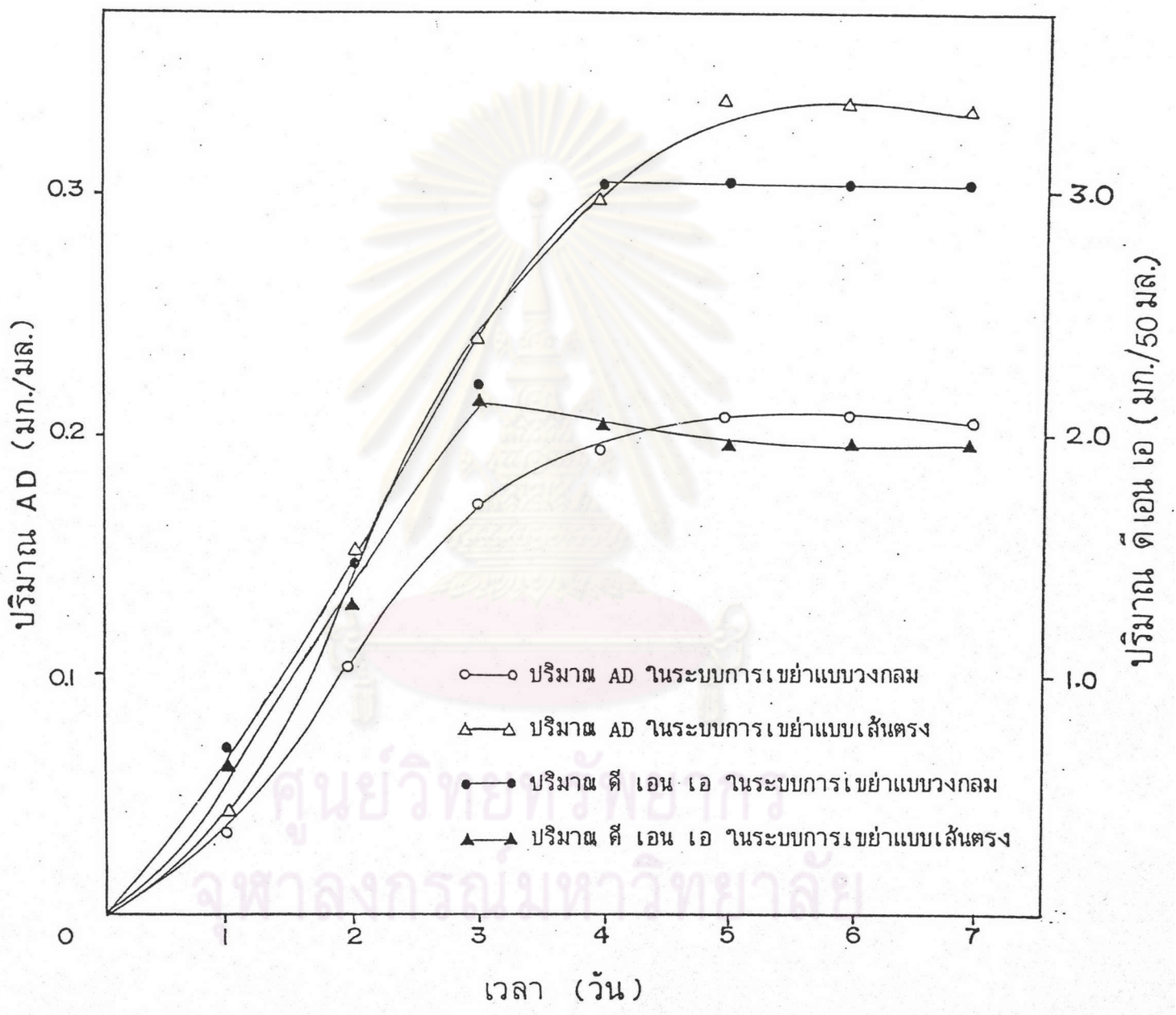
2.2 ศึกษาการเจริญและการผลิต AD ของ *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 เมื่อเลี้ยงในระบบการเขย่าแบบวงกลมและแบบเส้นตรง

จากการติดตามการเจริญโดยวิเคราะห์ปริมาณ ดีเอนเอ และวิเคราะห์ปริมาณ AD ด้วยเทคนิคของแกสโครมาโตกราฟี (วิธีวิจัยในบทที่ 2 ข้อ 3.8) ที่เกิดจากการเปลี่ยนสเตียรอลโดย *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 ในอาหารเหลวที่ใช้ผลิต AD (ภาคผนวกที่ 1.3) เป็นเวลา 7 วัน (Arima และคณะ 1969) ในระบบการเขย่าแบบวงกลมและแบบเส้นตรง ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 7 พบว่าในระบบการเขย่าแบบเส้นตรงนั้น *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 มีการเจริญต่ำกว่า แต่สามารถผลิต AD ได้สูงกว่าเมื่อเลี้ยงในระบบการเขย่าแบบวงกลม ผลการวิเคราะห์ร้อยละของการเปลี่ยนสเตียรอลไปเป็น AD (Percent conversion) ดังแสดงในตารางที่ 7 พบว่าการเลี้ยงในระบบเขย่าทั้ง 2 ระบบให้การเปลี่ยนสเตียรอลไปเป็น AD สูงสุดในวันที่ 5 เช่นกัน โดยการเลี้ยงในระบบเขย่าแบบเส้นตรงให้ค่าสูงกว่าคือ 59.1 % ขณะที่การเลี้ยงในระบบเขย่าแบบวงกลมให้ค่าการเปลี่ยนสเตียรอลไปเป็น AD เพียง 36.8 %



รูปที่ 6 กราฟแสดงการเจริญของเชื้อ *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 ในอาหารเลี้ยงหัวเชื้อนิวเตรียนบรอทที่เสริมผงสกัดยีสต์ กลีเซอรอล และทวีน 80 ในระบบการเขย่าแบบวงกลมและแบบเส้นตรง

I10313035



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 7 กราฟแสดงการเจริญและการผลิต AD ของ *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 ในอาหารเหลวที่ใช้ในการผลิต AD ในระบบการเขย่าแบบวงกลมและแบบเส้นตรง

ดังนั้นในการทดลองต่อไปเพื่อผลิต AD จากสเตียรอลนั้นจะเลี้ยง *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 ในอาหารเลี้ยงหัวเชื้อนิวเตรียนบรอทที่เสริมผงสกัดยีสต์ กลีเซอรอลและทวีน 80 ในระบบการเขย่าแบบวงกลมจนเชื้อเจริญเข้าสู่ระยะ log phase ที่เวลา 76 ชม. แล้วจึงนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิต AD ในระบบการเขย่าแบบเส้นตรงโดยวิเคราะห์ปริมาณ AD หลังจากหมักเชื้อเป็นเวลา 5 วัน

ตารางที่ 7 ผลการวิเคราะห์ร้อยละของการเปลี่ยนสเตียรอลไปเป็น AD โดย *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 เป็นเวลา 7 วัน ในระบบการเขย่าแบบวงกลมและแบบเส้นตรง

วันที่	ปริมาณ AD (% เมื่อเทียบกับสารตั้งต้น)	
	ระบบการเขย่าแบบวงกลม	ระบบการเขย่าแบบเส้นตรง
1	6.1	8.0
2	18.9	29.9
3	29.2	42.0
4	31.7	50.5
5	**36.8**	**59.1**
6	36.8	54.8
7	36.5	53.1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต AD จากสเตียรอล โดย *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 ในขวดก้นบุบ

3.1 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.1 ชนิดของแหล่งคาร์บอน

เลี้ยง *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 ในขวดก้นบุบ ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 2.5 โดยใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อตามภาคผนวกที่ 1.4 ใช้ไดแอมโมเนียมซิเตรทปริมาณ 2.3 กรัม/ลิตร แอมโมเนียมคลอไรด์ 2.0 กรัม/ลิตร ยูเรีย 0.5 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน และใช้แหล่งคาร์บอนปริมาณ 5.0 กรัม/ลิตร โดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆกัน 6 ชนิด ได้แก่ คอร์นสตีพลิเคอร์ แป้งมันสำปะหลัง กลูโคส กลีเซอรอล สารละลายแป้งย่อยด้วยเอนไซม์เทอร์มามิล ซูโครส วิเคราะห์ปริมาณ AD หลังจากหมักเชื้อเป็นเวลา 5 วัน ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 3.8 ผลการทดลอง (ตารางที่ 8) พบว่า สารละลายแป้งที่ย่อยด้วยเอนไซม์เทอร์มามิล (liquified starch) ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ 20.8 % (นน./นน.) และปริมาณกลูโคส 0.8 % (นน./นน.) ให้ปริมาณ AD สูงสุดเมื่อเทียบกับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น ดังนั้นจึงเลือกใช้สารละลายแป้งที่ย่อยด้วยเอนไซม์เทอร์มามิล เป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 ผลของการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ต่อการผลิต AD จากสเตียรอลโดย *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 หลังจากหมักเชื้อเป็นเวลา 5 วัน

ชนิดของแหล่งคาร์บอน	ปริมาณ AD (% เมื่อเทียบกับสารตั้งต้น)
คอร์นสตีพลิเคอร์	59.2
แป้งมันสำปะหลัง	70.3
กลูโคส	71.2
กลีเซอรอล	56.7
สารละลายแป้งย่อยด้วยเอนไซม์เทอร์มามิล	75.1
ซูโครส	61.6

3.1.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เหมาะสมของสารละลายแป้งย่อยด้วยเอนไซม์เทอร์มามิลซึ่งเป็นสารแหล่งคาร์บอน

เลี้ยงเชื้อ *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 ในขวดก้นบุบตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 2.5 ใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อตามภาคผนวกที่ 1.4 ผันแปรเปอร์เซนต์ของน้ำตาลรีดิวส์ (นน./นน.) ในสารละลายแป้ง โดยใช้สารละลายแป้งที่ย่อยด้วยเอนไซม์เทอร์มามิลเป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งมีเปอร์เซนต์ของน้ำตาลรีดิวส์ (นน./นน.) 7.9 15.6 20.8 28.8 ตามลำดับ ปริมาณคาร์บอนที่ใช้ 5.0 กรัม/ลิตร ซึ่งให้ความเข้มข้นสุดท้ายของน้ำตาลรีดิวส์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 0.4 0.8 1.0 1.4 กรัม/ลิตร วิเคราะห์ปริมาณของ AD หลังจากหมักเชื้อเป็นเวลา 5 วัน ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 3.8 ผลการทดลอง (ตารางที่ 9) พบว่า สารละลายแป้งที่ย่อยด้วยเอนไซม์เทอร์มามิลที่มีเปอร์เซนต์ของน้ำตาลรีดิวส์ (นน./นน.) 20.8 และความเข้มข้นสุดท้ายของ

น้ำตาลรีดิวส์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 1.0 กรัม/ลิตร จะให้ปริมาณ AD สูงที่สุดคือ 73.2 % จึงเลือกใช้สารละลายแป้งดังกล่าวนี้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 9 ผลการผันแปรเปอร์เซนต์ของน้ำตาลรีดิวส์ (นน./นน.) ในสารละลายแป้งย่อยด้วยเอนไซม์เทอร์มามิล ซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต่อการผลิต AD จากสเตียรอลโดย *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 หลังจากหมักเชื้อเป็นเวลา 5 วัน

เปอร์เซนต์ของน้ำตาลรีดิวส์ (นน./นน.) ในสารละลายแป้งย่อยด้วยเอนไซม์เทอร์มามิล	ความเข้มข้นสุดท้ายของน้ำตาลรีดิวส์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (กรัม/ลิตร)	ปริมาณ AD (% เมื่อเทียบกับสารตั้งต้น)
7.9	0.4	44.8
15.6	0.8	52.0
20.8	**1.0**	**73.2**
28.8	1.4	52.8

3.1.3 ปริมาณของแข็ง (solid content) ที่เหมาะสมของสารละลายแป้งที่ย่อยด้วยเอนไซม์เทอร์มามิลซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอน

เลี้ยง *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 ในขวดก้นบุบตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 2.5 ใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อตามภาคผนวกที่ 1.4 โดยใช้สารละลายแป้งที่มีปริมาณของน้ำตาลรีดิวส์ 20.8 % (นน./นน.) เป็นแหล่งคาร์บอน ผันแปรปริมาณของแข็งในสารละลายแป้งดังกล่าวเป็น 0 - 30.0กรัม/ลิตร วิเคราะห์ปริมาณ AD หลังจากหมักเชื้อเป็นเวลา 5 วัน ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 3.8 ผลการทดลอง

(ตารางที่ 10) พบว่า สารละลายแป้งที่ย่อยด้วยเอนไซม์เทอร์มามิล ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ 20.8 % (นน./นน.) ในปริมาณของแข็ง 5.0 10.0 15.0 20.0 25.0 30.0 กรัม/ลิตร ให้ปริมาณ AD สูงใกล้เคียงกัน คือ 74.0 72.3 72.4 72.2 72.1 และ 71.2% ตามลำดับ ดังนั้นสารละลายแป้งดังกล่าวข้างต้นในปริมาณของแข็ง 5.0 กรัม/ลิตร จึงเป็นค่าที่เหมาะสมที่สุด เพราะในปริมาณของแข็ง 5.0 กรัม/ลิตรก็เพียงพอแล้ว ถึงใช้ปริมาณของแข็งที่สูงกว่า 5.0 กรัม/ลิตร ก็ไม่ได้ทำให้ปริมาณ AD สูงขึ้น ในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้ สารละลายแป้งที่ย่อยด้วยเอนไซม์เทอร์มามิล ที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ 20.8 % (นน./นน.) ในปริมาณของแข็ง 5.0 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 10 ผลการผันแปรปริมาณของแข็งของสารละลายแป้งที่ย่อยด้วยเอนไซม์เทอร์มามิล ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ 20.8 % (นน./นน.) ต่อการผลิต AD จากสเตียรอล โดย *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 หลังจากหมักเชื้อเป็นเวลา 5 วัน

ปริมาณของแข็งของสารละลายแป้งย่อยด้วยเอนไซม์เทอร์มามิลซึ่งมีปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ 20.8 %(นน./นน.) (กรัม/ลิตร)	ปริมาณ AD (% เมื่อเทียบกับสารตั้งต้น)
0	65.3
2.5	66.7
5.0	**74.0**
10.0	72.3
15.0	72.4
20.0	72.2
25.0	72.1
30.0	71.2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.4 ชนิดและปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจน

เลี้ยง *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 ในขวดก้นบุบ ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 2.5 โดยใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อตามภาคผนวกที่ 1.5 ใช้สารละลายแป้งที่ย่อยด้วยเอนไซม์เทอร์มามิล ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ 20.8 %(นน./นน.) ในปริมาณของแข็ง 5.0 กรัม/ลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับแหล่งไนโตรเจนจากรายงานต่าง ๆ มีการใช้คอร์นสตีพลิเคอร์ (Nagasawa และคณะ, 1970) แอมโมเนียมคลอไรด์ร่วมกับยูเรีย (Wovcha และ Brooks, 1979) และ เกลือแอมโมเนียม (Martin และ Wagner, 1976) Wovcha และ Biggs (1981) ได้ดัดแปลงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิต AD โดยใช้แหล่งไนโตรเจนผสมทั้งอินทรีย์ไนโตรเจนและอนินทรีย์ไนโตรเจน ดังแสดงในภาคผนวกที่ 1.3

การทดลองนี้จะดัดแปลงองค์ประกอบไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อภาคผนวกที่ 1.3 เพื่อให้ได้แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิต AD โดย *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 โดยมีรายละเอียดการแปรผันดังนี้

1. คอร์นสตีพลิเคอร์ปริมาณ 5.0 กรัม/ลิตร ร่วมกับ ยูเรีย 0.5 กรัม/ลิตร ไดแอมโมเนียนซิเตรท 2.3 กรัม/ลิตร และแอมโมเนียมคลอไรด์ 2.0 กรัม/ลิตร ซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 1.25 กรัม/ลิตร

2. ยูเรีย 0.5 กรัม/ลิตร ร่วมกับ ไดแอมโมเนียมซิเตรท 2.3 กรัม/ลิตร และแอมโมเนียมคลอไรด์ 2.0 กรัม/ลิตร ซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 1.03 กรัม/ลิตร

3. ยูเรีย 0.5 กรัม/ลิตร ร่วมกับ ไดแอมโมเนียมซิเตรท 2.3 กรัม/ลิตร ซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 0.51 กรัม/ลิตร

4. ยูเรีย 0.5 กรัม/ลิตร ร่วมกับ แอมโมเนียมคลอไรด์ 2.0 กรัม/ลิตร ซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 0.76 กรัม/ลิตร

5. ไดแอมโมเนียมซิเตรท 2.3 กรัม/ลิตร ร่วมกับแอมโมเนียมคลอไรด์ 2.0 กรัม/ลิตร ซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 0.80 กรัม/ลิตร

วิเคราะห์ปริมาณ AD หลังจากหมักเชื้อเป็นเวลา 5 วัน ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 3.8 ผลการทดลอง (ตารางที่ 11) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างแหล่งไนโตรเจนที่ 1 และ 2 พบว่า คอร์นสตีพลิเคอร์เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เกินพอ ไม่มีความจำเป็นต้องเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ อีกทั้งยับยั้งการผลิต AD คือ ทำให้ผลิตผล AD ต่ำลง และจากข้อมูลในตารางที่ 11 พบว่า แหล่งไนโตรเจนที่ 2 3 4 และ 5 จะให้ปริมาณ AD ใกล้เคียงกัน สำหรับแหล่งไนโตรเจนที่ 3 ให้ปริมาณ AD ต่ำกว่า แต่ไม่ได้หมายความว่าเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ด้อยกว่า การที่ปริมาณ AD ต่ำกว่าเป็นเพราะปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่ใช้ คือ 0.51กรัม/ลิตร นั้นต่ำเกินไป ปริมาณดังกล่าวนี้อาจจะไม่เพียงพอ ส่วนปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในแหล่งไนโตรเจนที่ 2 คือ 1.03 กรัม/ลิตร นั้นก็มากเกินพอ ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปค่าปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่จะใช้ในแหล่งไนโตรเจนต่างๆ คือประมาณ 0.80 กรัม/ลิตร

ตารางที่ 11 ผลการผันแปรไนโตรเจนทั้งหมดในองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิต AD ตามภาคผนวกที่ 1.3 ต่อการสร้าง AD จากสเตียรอลโดย *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 หลังจากหมักเชื้อเป็นเวลา 5 วัน

ชนิดของแหล่งไนโตรเจน	ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (กรัม/ลิตร)	ปริมาณ AD (%เมื่อเทียบกับสารตั้งต้น)
1. คอร์นสตีพลิเคอร์ร่วมกับยูเรีย ไดแอมโมเนียมซิเตรทและแอมโมเนียมคลอไรด์	1.25	59.2
2. ยูเรียร่วมกับไดแอมโมเนียมซิเตรทและแอมโมเนียมคลอไรด์	1.03	75.1
3. ยูเรียร่วมกับไดแอมโมเนียมซิเตรท	0.51	71.3
4. ยูเรียร่วมกับแอมโมเนียมคลอไรด์	0.76	75.7
5. ไดแอมโมเนียมซิเตรทร่วมกับแอมโมเนียมคลอไรด์	**0.80**	**75.9**

3.1.5 ชนิดของแหล่งไนโตรเจน

เลี้ยงเชื้อ *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 ในขวดก้นบุบตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 2.5 โดยใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อตามภาคผนวกที่ 1.5 ใช้สารละลายแป้งที่ย่อยด้วยเอนไซม์เทอร์มามิล ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ 20.8 % (นน./นน.) ในปริมาณของแป้ง 5.0 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ในการทดลองนี้จะผันแปรแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ กัน 5 ชนิด โดยให้มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 0.80 กรัม/ลิตร เมื่อวิเคราะห์ปริมาณ AD หลังจากหมักเชื้อเป็นเวลา 5 วัน ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 3.8 ผลการทดลอง (ตารางที่ 12) พบว่า ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตให้ปริมาณ AD สูงสุด คือ 80.6 % ดังนั้นจึงเลือกไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนในการเลี้ยงเชื้อสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 12 ผลของการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ต่อการผลิต AD จากสเตียรอล โดย *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 หลังจากหมักเชื้อเป็นเวลา 5 วัน

ชนิดของแหล่งไนโตรเจน	ปริมาณ AD (% เมื่อเทียบกับสารตั้งต้น)
ไดแอมโมเนียมซิเตรทร่วมกับแอมโมเนียมคลอไรด์	76.0
ไดแอมโมเนียมซิเตรท	72.3
แอมโมเนียมคลอไรด์	66.9
ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	**80.6**
แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	78.4

3.1.6 <u>ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่เหมาะสมของไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ซึ่งใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน</u>

เลี้ยงเชื้อ *Mycobacterium fortuiutm* CBS 313.79 ในขวดก้นบุบตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 2.5 โดยใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อตามภาคผนวกที่ 1.5 ใช้สารละลายแป้งที่ย่อยด้วยเอนไซม์เทอร์มามิลซึ่งมีปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ 20.8 %(นน./นน.) ในปริมาณของแข็ง 5.0 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน จากการทดลองที่ 3.1.5 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่ให้ปริมาณ AD สูงสุด คือ ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ดังนั้นการทดลองนี้จะหาปริมาณที่เหมาะสมต่อการผลิต AD ซึ่งทำโดยผันแปรปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดของไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ตั้งแต่ 0-1.0 กรัม/ลิตร วิเคราะห์ปริมาณ AD หลังจากหมักเชื้อเป็นเวลา 5 วัน ตามวิธีการวิจัยในบทที่ 2 ข้อ 3.8 ผลการทดลอง (ตารางที่ 13) พบว่าไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 0.50 0.65 และ 0.80 กรัม/ลิตร ให้ปริมาณ AD สูงใกล้เคียงกันคือ 81.6 80.7 และ 80.4% ดังนั้นปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 0.50 กรัม/ลิตร จึงเป็นค่าที่เหมาะสมที่สุด จึงเลือกไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 0.50กรัม/ลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 13 ผลการผันแปรปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดของไดแอมโมเนียมไฮโตรเจนฟอสเฟต ต่อการผลิต AD จากสเตียรอล โดย *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 หลังจากหมักเชื้อเป็นเวลา 5 วัน

ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดของไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (กรัม/ลิตร)	ปริมาณ AD (% เมื่อเทียบกับสารตั้งต้น)
0	41.9
0.40	77.2
0.50	**81.6**
0.65	80.7
0.80	80.4
0.90	76.1
1.00	72.8

3.1.7 ปริมาณที่เหมาะสมของเกลือแร่ชนิดต่าง ๆ

เลี้ยง *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 2.5 โดยใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อตามภาคผนวกที่ 1.6 แปรผันปริมาณเกลือแร่ทีละชนิด ส่วนเกลือแร่อื่นๆในสูตรอาหารนี้คงที่ตามสูตรในภาคผนวกที่ 1.6 ได้แก่ โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ผันแปรปริมาณตั้งแต่ 0-0.60 กรัม/ลิตร แคลเซียมคาร์บอเนตผันแปรปริมาณตั้งแต่ 0-5.0 กรัม/ลิตร มักเนเซียมซัลเฟตผันแปรปริมาณตั้งแต่ 0-4.0 กรัม/ลิตร และโซเดียมคลอไรด์ผันแปรปริมาณตั้งแต่ 0-0.5 กรัม/ลิตร วิเคราะห์ปริมาณ AD หลังจากหมักเชื้อเป็นเวลา 5 วัน ตามวิธีวิจัยในบทที่ 2 ข้อ 3.8 ผลการทดลอง (ตารางที่ 14) พบว่า โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตปริมาณ 0.50-0.60 กรัม/ลิตร ให้ปริมาณ AD สูงใกล้เคียงกัน คือ 81.0 และ 80.0 % ตามลำดับ และสูงกว่า

ค่าอื่น ดังนั้นโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตปริมาณ 0.50 กรัม/ลิตรจึงเป็นค่าที่เหมาะสมที่สุด แคลเซียมคาร์บอเนตปริมาณ 3.0 กรัม/ลิตรเป็นปริมาณที่เหมาะสมที่สุดให้ปริมาณ AD สูงสุด เท่ากับ 79.1 % มักเนเซียมซัลเฟตปริมาณ 1.5-2.0 กรัม/ลิตร ให้ปริมาณ AD สูงใกล้เคียงกัน คือ 77.8 และ 78.4 % ตามลำดับ และสูงกว่าค่าอื่น สำหรับการเลี้ยงเชื้อในการทดลองขั้นต่อไปเลือกใช้มักเนเซียมซัลเฟตปริมาณ 2.0 กรัม/ลิตร และโซเดียมคลอไรด์ ปริมาณ 0.4 กรัม/ลิตร เป็นปริมาณที่เหมาะสมที่สุด ให้ปริมาณ AD สูงสุดเท่ากับ 80.1 % ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้เกลือแร่ชนิดต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้นที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 14 ผลการผันแปรปริมาณเกลือแร่แต่ละชนิดต่อการผลิต AD จากสเตียรอล โดย *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 หลังจากหมักเชื้อเป็นเวลา 5 วัน โดยให้ปริมาณของเกลือแร่ชนิดอื่น ๆ เท่ากับในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อตามภาคผนวกที่ 1.6

เกลือแร่		ปริมาณ AD (% เมื่อเทียบกับสารตั้งต้น)
ชนิด	ปริมาณ (กรัม/ลิตร)	
โปตัสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0	66.4
	0.15	70.6
	0.30	75.7
	0.40	76.6
	0.50	**81.0**
	0.60	80.0

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 14 (ต่อ)

เกลือแร่		ปริมาณ AD
ชนิด	ปริมาณ (กรัม/ลิตร)	(% เมื่อเทียบกับสารตั้งต้น)
แคลเซียมคาร์บอเนต	0	63.7
	1.0	71.7
	2.0	75.8
	3.0	**79.1**
	4.0	76.0
	5.0	75.4
มักเนเซียมซัลเฟต	0	61.7
	1.0	75.0
	1.5	77.8
	2.0	**78.4**
	3.0	74.8
	4.0	73.4
โซเดียมคลอไรด์	0	65.2
	0.1	71.0
	0.2	73.4
	0.3	75.5
	0.4	**80.1**
	0.5	74.1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.11 <u>ปริมาณที่เหมาะสมของสเตียรอลที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิต</u> AD

จากการเลี้ยง *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 ในขวดก้นบุบโดยใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อตามภาคผนวกที่ 1.6 แต่ผันแปรปริมาณสเตียรอลตั้งแต่ 0 - 2.52 มก./มล. ผลการทดลองดังในตารางที่ 15 พบว่าความเข้มข้นของสเตียรอลต่ำๆ คือ 0.42 และ 0.84 มก./มล. เป็นปริมาณที่เหมาะสมที่สุดโดย *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 สามารถเปลี่ยนรูปสเตียรอลไปเป็น AD ได้สูงใกล้เคียงกัน คือ 78.9 และ 81.7% ตามลำดับ หลังจากหมักเชื้อเป็นเวลา 5 วัน และสูงกว่าเมื่อมีสเตียรอลสูง ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Martin และ Wagner (1976) ที่รายงาน เกี่ยวกับความเข้มข้นสเตียรอลที่เหมาะสมที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิต AD ว่า เบตาซิโตสเตียรอลที่ความเข้มข้นต่ำ คือ 0.20 มก./มล. จะมีผลให้ผลิตผล AD และ ADD สูงกว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นสูงขึ้น สำหรับในการทดลองขั้นต่อไปเลือกใช้สเตียรอลในความเข้มข้น 0.84 มก./มล. ในการเลี้ยงเชื้อสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

<u>ตารางที่ 15</u> ผลการผันแปรปริมาณสเตียรอลที่ใช้เป็นสารตั้งต้นต่อการผลิต AD โดย *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 หลังจากหมักเชื้อเป็นเวลา 5 วัน

ปริมาณสเตียรอล (มก./มล.)	ปริมาณ AD (% เมื่อเทียบกับสารตั้งต้น)
0	0
0.42	78.9
0.84	**81.7**
1.26	64.9
1.68	61.6
2.10	56.0
2.52	48.9

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 สภาวะทางกายภาพในการเลี้ยงเชื้อ

3.2.1 ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรในข้อ 1.6 โดยผันแปรค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นตั้งแต่ 5.0-8.0 นำมาเลี้ยงเชื้อ *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 ในขวดก้นบุบตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 2.5 วิเคราะห์ปริมาณ AD หลังจากหมักเชื้อเป็นเวลา 5 วัน ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 3.8 ผลการทดลอง (ตารางที่ 16) พบว่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตสาร AD อยู่ระหว่าง 7.0-8.0 โดยได้ปริมาณสาร AD สูงสุดเท่ากับ 81.5 % และ 81.1 % ตามลำดับ

ตารางที่ 16 ผลของความเป็นกรด - ด่าง เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิต AD จากสเตียรอล โดย *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 หลังจากหมักเชื้อเป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 30° ซ.

ระดับความเป็นกรด - ด่าง (pH)	ปริมาณ AD (% เมื่อเทียบกับสารตั้งต้น)
5.0	61.7
6.0	68.8
7.0	81.5
8.0	81.1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.2 อุณหภูมิ

จากการเลี้ยงเชื้อ *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 ในขวดก้นบุบตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 2.5 โดยใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อตามภาคผนวกที่ 1.6 ปรับความเป็นกรด - ด่าง เริ่มต้นเป็น 7.0 ผันแปรอุณหภูมิที่ใช้การเลี้ยงเชื้อคือ 25° 30° และ 35° ซ. เฉพาะการทดลองนี้เนื่องจากความจำกัดของเครื่องมือระบบการเขย่าในการทดลองนี้ใช้การเขย่าแบบวงกลม (rotary shaker) แทนระบบการเขย่าแบบเส้นตรง (reciprocal shaker) ดังที่ใช้ในการทดลองที่ผ่านมา และความเร็วรอบในการเขย่า คือ 200 รอบ/นาที ปริมาณ AD หลังจากหมักเชื้อเป็นเวลา 5 วัน ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 3.8 ผลการทดลอง (ตารางที่ 17) พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อเพื่อผลิตสาร AD คือที่ 30° ซ. โดยได้ปริมาณสาร AD 57.5 %

ตารางที่ 17 ผลของอุณหภูมิต่อการเลี้ยงเชื้อต่อการผลิต AD จากสเตียรอล โดย *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 หลังจากหมักเชื้อเป็นเวลา 5 วัน เมื่อความเป็นกรด - ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0

ระดับอุณหภูมิ (° ซ.)	ปริมาณ AD (% เมื่อเทียบกับสารตั้งต้น)
25	19.3
30	**57.5**
35	52.3

หมายเหตุ การเขย่าเชื้อเป็นแบบวงกลม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.3 ช่วงระยะเวลาของการเจริญที่เหมาะสมในการสร้าง AD จากสเตียรอล

จากการเลี้ยง *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 ในขวดก้นบุบตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 2.5 โดยใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อตามภาคผนวกที่ 1.6 ปรับความเป็นกรด - ด่างเริ่มต้นเป็น 7.0 และอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ 30° ซ.ผันแปรระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ 1-7 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุก ๆวัน แล้ววิเคราะห์หาปริมาณ AD ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 3.8 สำหรับการทดลองนี้ได้ใช้สภาวะเหมาะสมที่สุดสำหรับการสร้าง AD จากผลการทดลองที่ทำมาข้างต้น ส่วนการวิเคราะห์หาปริมาณ AD ใช้กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณ AD ที่ผ่านการสกัดแล้ว ทั้งนี้เพื่อให้ได้ค่าวิเคราะห์ที่แม่นยำ ผลการทดลอง (ตารางที่ 18) พบว่าในวันที่ 5 และ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ สเตียรอลถูกเปลี่ยนเป็นสาร AD ได้สูงใกล้เคียงกัน คือ 83.6 และ 82.9 % ตามลำดับ และสูงกว่าค่าอื่น ดังนั้นระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อ 5 วัน จึงเป็นค่าที่เหมาะสมที่สุด

ตารางที่ 18 เปรียบเทียบปริมาณ AD ที่ได้จากสเตียรอลโดย *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 เมื่อผันแปรระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ

ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ (วัน)	ปริมาณ AD (% เมื่อเทียบกับสารตั้งต้น)
1	17.1
2	35.7
3	64.6
4	72.1
5	83.6
6	82.9
7	81.2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>สรุป</u> สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 ที่เหมาะสมเพื่อสร้าง AD สูงสุด ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

สารละลายแป้งย่อยด้วยเอนไซม์	5.0	กรัม
(ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ 20.8 % นน./นน. และปริมาณกลูโคส 0.8 % นน./นน.)		
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.50	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต	3.0	กรัม
มักเนเซียมซัลเฟต	2.0	กรัม
ทวีน 80	2.0	กรัม
ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	2.36	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	0.4	กรัม
ผลึกสเตียรอล 1.0 กรัม มีปริมาณสเตียรอล	0.84	กรัม (ละลายในคลอโรฟอร์มปริมาตร 20 มล.)

สภาวะที่เหมาะสมคือ ความเป็นกรดด่าง 7.0-8.0

อุณหภูมิ 30° ซ.

ระบบการเขย่าแบบเส้นตรงด้วยความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที

และระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเพื่อการสร้าง AD 5 วัน

ภายใต้สภาวะดังกล่าว *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 สามารถเปลี่ยนสเตียรอลไปเป็นสารประกอบ AD ได้ประมาณ 83.6 %

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. ศึกษาวิธีการสกัดแยกและทำ AD ให้บริสุทธิ์

4.1 การสกัดแยก

4.1.1 ชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสมที่ใช้สกัด

จากการนำน้ำหมักมาสกัด AD ตามวิธีการวิจัยในบทที่ 2 ข้อ 4 ด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ดังนี้ เอทธิลอะซีเตท ไดเอทธิลอีเทอร์ เบนซีน ไดคลอโรมีเทน คาร์บอนเตตระคลอไรด์ และคลอโรฟอร์ม พบว่า ตัวทำละลายที่ให้ประสิทธิภาพสูงในการสกัดโดยเรียงจากมากไปหาน้อย ได้แก่ เอทธิลอะซีเตท ไดคลอโรมีเทน ไดเอทธิลอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม คาร์บอนเตตระคลอไรด์ เบนซีน (ตารางที่ 19)

ดังนั้นจึงเลือกเอทธิลอะซีเตทและไดคลอโรมีเทนเป็นตัวทำละลายมาศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสกัดขั้นต่อไป

ตารางที่ 19 ประสิทธิภาพของตัวทำละลายชนิดต่างๆในการสกัด AD จากน้ำหมัก

ชนิดของตัวทำละลาย	% AD ที่สกัดได้เทียบกับที่มีในน้ำหมักเริ่มต้น
เอทธิลอะซีเตท	**96.49**
ไดเอทธิลอีเทอร์	94.97
เบนซีน	89.41
ไดคลอโรมีเทน	**95.97**
คาร์บอนเตตระคลอไรด์	91.92
คลอโรฟอร์ม	93.95

4.1.2 ปริมาตรตัวทำละลายที่เหมาะสมที่ใช้สกัด

สกัด AD จากน้ำหมักด้วยตัวทำละลายเอทธิลอะซีเตทและไดคลอโรมีเทน ตามวิธีการวิจัยในบทที่ 2 ข้อ 4 ผันแปรปริมาตรเอทธิลอะซีเตทและไดคลอโรมีเทนที่ใช้สกัด ดังนี้คือ อัตราส่วนน้ำหมักต่อตัวทำละลายเป็น 1 ต่อ 1 1 ต่อ 2 1 ต่อ 3 และ1 ต่อ 4 ตามลำดับ (ตารางที่ 20) พบว่า อัตราส่วนระหว่างน้ำหมักต่อเอทธิลอะซีเตท (โดยปริมาตร) คือ 1 ต่อ 1 1 ต่อ 2 1 ต่อ 3 และ1 ต่อ 4 จะสกัด AD ได้สูงใกล้เคียงกัน คือ 94.46 96.49 96.97 และ97.49 % ตามลำดับ และอัตราส่วนระหว่างน้ำหมักต่อไดคลอโรมีเทน (โดยปริมาตร) คือ 1 ต่อ 1 1 ต่อ 2 1 ต่อ 3 และ1 ต่อ 4 ก็สามารถสกัด ADได้สูงใกล้เคียงกัน คือ 92.95 95.97 96.97 และ 97.49 % ตามลำดับ สำหรับในการทดลองขั้นต่อไปจะศึกษาเวลาที่เหมาะสมของเอทธิลอะซีเตท และไดคลอโรมีเทนในการสกัด AD จากน้ำหมัก เมื่อใช้อัตราส่วนน้ำหมักต่อเอทธิลอะซีเตท 1 ต่อ 2 และอัตราส่วนน้ำหมักต่อไดคลอโรมีเทน 1 ต่อ 3 ซึ่งในทางปฏิบัติในระดับอุตสาหกรรมนั้น อัตราส่วนระหว่างน้ำหมักต่อเอทธิลอะซีเตท และอัตราส่วนระหว่างน้ำหมักต่อไดคลอโรมีเทน (โดยปริมาตร) ที่เหมาะสม คือ 1 ต่อ 1เพราะในอัตราส่วน 1 ต่อ 1นี้สามารถสกัด AD จากน้ำหมักได้สูงแล้ว ไม่จำเป็นที่จะใช้ปริมาตรตัวทำละลายสูงกว่านี้ในการสกัด เพื่อเป็นการประหยัดตัวทำละลายในการสกัดและประหยัดพลังงานในการระเหยในขั้นตอนการตกผลึก

ตารางที่ 20 ผลการผันแปรปริมาตรเอทธิลอะซีเตทและไดคลอโรมีเทนในการสกัด AD จากน้ำหมัก

อัตราส่วนน้ำหมัก : ตัวทำละลาย (โดยปริมาตร	% AD ที่สกัดได้เทียบกับที่มีในน้ำหมักเริ่มต้นเมื่อใช้ตัวทำละลาย	
	เอทธิลอะซีเตท	ไดคลอโรมีเทน
1 : 1	94.46	92.95
1 : 2	**96.49**	95.97
1 : 3	96.97	**96.97**
1 : 4	97.49	97.49

4.1.3 เวลาที่เหมาะสมในการสกัด

สกัด AD จากน้ำหมักใช้อัตราส่วนน้ำหมักต่อเอทธิลอะซีเตท (โดยปริมาตร) คือ 1 ต่อ 2 และอัตราส่วนน้ำหมักต่อไดคลอโรมีเทน (โดยปริมาตร) คือ 1 ต่อ 3 ตามวิธีการวิจัยในบทที่ 2 ข้อ 4 ผันแปรเวลาในการสกัดดังนี้ 5 10 15 และ 20 นาที (ตารางที่ 21) พบว่า เวลาน้อยสุดในการสกัด AD จากน้ำหมักด้วยเอทธิลอะซีเตท คือ 15 นาที และไดคลอโรมีเทน คือ 10 นาที ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงใช้เวลาในการสกัด AD จากน้ำหมักด้วยเอทธิลอะซีเตท คือ 15 นาที และไดคลอโรมีเทน คือ 10 นาที

ตารางที่ 21 ผลการผันแปรเวลาในการสกัด AD จากน้ำหมักด้วยเอทธิลอะซีเตทและไดคลอโรมีเทน

เวลาในการสกัด (นาที)	% AD ที่สกัดได้เทียบกับที่มีในน้ำหมักเริ่มต้นเมื่อใช้ตัวทำละลาย	
	เอทธิลอะซีเตท	ไดคลอโรมีเทน
5	92.44	94.46
10	96.49	**96.97**
15	**98.51**	96.97
20	98.51	96.97

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.1.4 ผลของความเป็นกรด-ด่างในการสกัด

มีผู้รายงานว่าก่อนสกัด AD และ ADD จากน้ำหมักจะปรับความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักให้เท่ากับ 1 ถึง 2 ด้วยกรดซัลฟูริคเข้มข้น 10% (ปริมาตรต่อปริมาตร) หลังจากนั้นสกัดน้ำหมักด้วยคลอโรฟอร์มในอัตราส่วนน้ำหมักต่อคลอโรฟอร์มเท่ากับ 1 ต่อ 1 สกัดเป็นจำนวน 3 ครั้ง (Martin และ Wagner, 1976) ดังนั้นจึงทำการทดลองดูผลของความเป็นกรด-ด่างในการสกัด AD จากน้ำหมัก ซึ่งในการทดลองนี้ก่อนสกัด AD จากน้ำหมักด้วยเอทธิลอะซีเตทและไดคลอโรมีเทนจะปรับความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักให้เท่ากับ 2 ด้วยกรดซัลฟูริคเข้มข้น 10% (ปริมาตรต่อปริมาตร) จากนั้นสกัด AD จากน้ำหมักใช้อัตราส่วนน้ำหมักต่อเอทธิลอะซีเตทเท่ากับ 1 ต่อ 2 เป็นเวลา 15 นาที และอัตราส่วนน้ำหมักต่อไดคลอโรมีเทน คือ 1 ต่อ 3 เป็นเวลา 10 นาที ตามวิธีการวิจัยในบทที่ 2 ข้อ 4 ผลการทดลองในตารางที่ 22 พบว่า % AD ที่สกัดได้มีค่าใกล้เคียงกับการสกัดโดยไม่ต้องปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมัก (ประมาณ 7) ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงไม่จำเป็นต้องปรับความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักก่อนสกัด

ตารางที่ 22 ผลของความเป็นกรด-ด่างในการสกัด AD จากน้ำหมักด้วยเอทธิลอะซีเตทและไดคลอโรมีเทน

ชนิดของตัวทำละลาย	% AD ที่สกัดได้เทียบกับที่มีในน้ำหมักเริ่มต้น	
	ความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมัก	
	ที่ไม่ได้ปรับ (ประมาณ 7)	ที่ปรับแล้วเท่ากับ 2
เอทธิลอะซีเตท	96.97	95.47
ไดคลอโรมีเทน	93.45	91.92

4.1.5 จำนวนครั้งที่เหมาะสมในการสกัด

สกัด AD จากน้ำหมักใช้อัตราส่วนน้ำหมักต่อเอทธิลอะซีเตท (โดยปริมาตร) คือ 1 ต่อ 2 เป็นเวลา 15 นาที และอัตราส่วนน้ำหมักต่อไดคลอโรมีเทน (โดยปริมาตร) คือ 1 ต่อ 3 เป็นเวลา 10 นาที ตามวิธีการวิจัยในบทที่ 2 ข้อ 4 ผันแปรจำนวนครั้งที่ใช้สกัดเป็น 1 และ 2 ครั้งได้ผลดังตารางที่ 23 เมื่อเปรียบเทียบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด AD จากน้ำหมักระหว่างเอทธิลอะซีเตท กับไดคลอโรมีเทน พบว่า % AD ที่สกัดได้เทียบกับที่มีในน้ำหมักเริ่มต้นเมื่อใช้เอทธิลอะซีเตทเป็นตัวทำละลายในการสกัดทั้งหมด 2 ครั้งที่มีค่าเท่ากับ 97.99 จะมีค่าสูงกว่า % AD ที่สกัดได้เทียบกับที่มีในน้ำหมักเริ่มต้นเมื่อใช้ไดคลอโรมีเทนในการสกัดทั้งหมด 2 ครั้งที่มีค่าเท่ากับ 93.31 (ตารางที่ 23) สำหรับการสกัดในระดับอุตสาหกรรม การสกัดเพียงครั้งเดียวจะเหมาะสมกว่าการสกัด 2 ครั้งเพราะการสกัดครั้งที่ 1 ก็ให้ % AD ที่สกัดได้สูงมากแล้วไม่จำเป็นต้องสกัดครั้งที่ 2 ซึ่งจะสิ้นเปลืองตัวทำละลายในการสกัดไม่คุ้มกับค่าใช้จ่าย แต่ในการวิจัยนี้เราต้องการสกัดสาร AD จากน้ำหมักให้ได้มากที่สุด สำหรับในแง่การนำสารกลับมาใช้เมื่อเปรียบเทียบระหว่างตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิด พบว่า เอทธิลอะซีเตทมี % การนำกลับมาใช้สูงกว่าไดคลอโรมีเทน เพราะเอทธิลอะซีเตทมีจุดเดือดสูงกว่าไดคลอโรมีเทน โดยเอทธิลอะซีเตทมีจุดเดือด 77° ซ. และไดคลอโรมีเทนมีจุดเดือด 39.75° ซ. ดังนั้นการสูญเสียในระหว่างการนำกลับมาใช้ของเอทธิลอะซีเตทจะต่ำกว่าไดคลอโรมีเทน ฉะนั้นตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด AD จากน้ำหมัก คือ เอทธิลอะซีเตท

ตารางที่ 23 ผลการผันแปรจำนวนครั้งในการสกัด AD จากน้ำหมักด้วยเอทธิลอะซีเตทหรือไดคลอโรมีเทน

การสกัด	% AD ที่สกัดได้เทียบกับที่มีในน้ำหมักเริ่มต้นเมื่อใช้ตัวทำละลาย	
	เอทธิลอะซีเตท	ไดคลอโรมีเทน
ครั้งที่ 1	97.48	92.80
ครั้งที่ 2	0.51	0.51
ผลรวมของการสกัด 2 ครั้ง	**97.99**	**93.31**

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปกระบวนการสกัด AD จากน้ำหมักที่ให้ประสิทธิภาพสูงสุดทำโดยใช้เอทธิลอะซีเตทเป็นตัวทำละลาย ในอัตราส่วนน้ำหมักต่อเอทธิลอะซีเตท (โดยปริมาตร) เท่ากับ 1:2 เป็นเวลา 15 นาที 2 ครั้ง ภายใต้สภาวะนี้จะให้ % AD ที่สกัดได้เทียบกับที่มีในน้ำหมักเริ่มต้นเท่ากับ 97.99

4.2 การทำ AD ให้บริสุทธิ์

4.2.1 การเลือกระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการแยก AD

ในการทำให้ AD บริสุทธิ์จากสารเจือปนที่สกัดออกมาจากน้ำหมัก เลือกใช้วิธีโครมาโตกราฟีแบบดูดซับ โดยมีซีลิกาเจลเป็นตัวดูดซับและใช้ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมเป็นตัวชะสาร (eluent) การเลือกระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมทำโดยใช้วิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี โดยเลือกระบบตัวทำละลายที่สามารถแยกสาร AD ออกจากสิ่งเจือปนอื่นๆ ซึ่งพิจารณาจากค่าความสามารถในการแยกสาร AD จากสิ่งเจือปนที่อยู่ใกล้กัน (resolution) ระบบตัวทำละลายที่ใช้ในการแยกสารโดยวิธีโครมาโตกราฟีบนแผ่นทินเลเยอร์ได้แสดงไว้ในตารางที่ 24 ค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (R_f) ของสาร AD และค่าความสามารถในการแยกสาร AD จากสิ่งเจือปนที่อยู่ใกล้กันโดยระบบตัวทำละลายต่างๆได้แสดงไว้ในตารางที่ 25

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 24 ระบบตัวทำละลายที่ใช้ในการแยกสารโดยวิธีโครมาโตกราฟีบนแผ่นทินเลเยอร์

ชื่อ	องค์ประกอบของระบบตัวทำละลาย	อัตราส่วนโดยปริมาตร	เอกสารอ้างอิง
A	เอทธานอล ต่อ เบนซีน	4 ต่อ 6	(Marsheck และคณะ, 1972)
B	ไซโคลเฮกเซน ต่อ เอทธิลอะซีเตท	3 ต่อ 2	(Wovcha และคณะ, 1978)
C	คลอโรฟอร์ม ต่อ เมทธานอล	19 ต่อ 1	(Wovcha และคณะ, 1978)
D	คลอโรฟอร์ม ต่อ เมทธานอล	98 ต่อ 2	(Wovcha และคณะ, 1978)
E	คลอโรฟอร์ม ต่อ ไดเอทธิลอีเทอร์	10 ต่อ 1	(Arima และคณะ, 1969)
F	คลอโรฟอร์ม ต่อ ไดเอทธิลอีเทอร์	4 ต่อ 1	(Martin และ Wagner,1976)
G	เอทธิลอะซีเตท ต่อ เมทธานอล	9 ต่อ 1	(Wovcha และคณะ, 1978)
H	เอทธิลอะซีเตท ต่อ เบนซีน	20 ต่อ 80	(Wovcha และคณะ, 1982)
I	เอทธิลอะซีเตท ต่อ เบนซีน	1 ต่อ 5	(Srivastava และคณะ,1985)
J	เอทธิลอะซีเตท ต่อ คลอโรฟอร์ม	15 ต่อ 85	(Wovcha และคณะ, 1978)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 25 ค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (R_f) ของสาร AD และความสามารถในการแยกสาร AD กับสิ่งเจือปนที่อยู่ใกล้กันบนแผ่นโครมาโตแกรม

ระบบตัวทำละลาย	ค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (R_f)		จำนวนจุดที่แยกได้	ความสามารถในการแยกสาร AD กับสิ่งเจือปนที่อยู่ใกล้กัน
	สาร AD	สิ่งเจือปนที่อยู่ใกล้กัน		
A	0.80	0.86	2	0.06
B	0.21	0.13	4	0.08
C	0.64	0.51	3	0.13
D	0.39	0.27	3	0.12
E	0.25	0.16	4	0.09
F	0.33	0.22	4	0.11
G	0.63	0.74	2	0.11
H	0.19	0.31	4	0.12
I	0.17	0.25	4	0.08
J	0.41	0.27	3	0.14

* ความสามารถในการแยกสาร AD กับสิ่งเจือปนที่อยู่ใกล้กัน = ผลต่างระหว่างค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของสาร AD กับสิ่งเจือปนที่อยู่ใกล้กันในระบบตัวทำละลายที่กำหนด

เนื่องจากค่าความสามารถการแยกสาร AD จากสิ่งเจือปนที่อยู่ใกล้กันจะบ่งบอกความสามารถของระบบตัวทำละลายที่จะแยก AD ออกจากสิ่งเจือปนโดยมี AD มาตรฐานเป็นจุดที่ใช้เทียบเคียงบนแผ่นโครมาโตแกรม ระบบตัวทำละลายที่สามารถแยกสารสกัดได้เป็น 4 จุด มี 5 ระบบ คือ B E F H และ I ระบบตัวทำละลายที่สามารถแยกสารสกัดได้เป็น 4 จุดและมีค่าความสามารถในการแยกสาร AD ออกจากสิ่งเจือปนที่อยู่ใกล้กันได้ดี คือ ระบบตัวทำละลาย F และ H ระบบตัวทำละลาย E และ F ประกอบด้วยตัวทำ

ละลายอินทรีย์ที่ระเหยง่าย คือ ไดเอทธิลอีเทอร์ การนำมาใช้เป็นระบบตัวทำละลายสำหรับชะสารมีปัญหา คือ เกิดฟองแกสดันให้ซิลิกาเจลที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์แยกออกจากกันเมื่อตั้งทิ้งไว้ จึงไม่เลือกระบบตัวทำละลายนี้ ส่วนระบบตัวทำละลาย H และ I ประกอบด้วย เบนซีน ซึ่งมีความเป็นพิษสูง (Kimura, 1983) ดังนั้นจึงเลือกระบบตัวทำละลาย B ในการชะสาร แต่เนื่องจากความสามารถในการแยกสาร AD กับสิ่งเจือปนจะต่ำกว่าระบบตัวทำละลาย E F และ H จึงใช้เป็นตัวชะสารร่วมกับระบบตัวทำละลาย J ซึ่งสามารถแยกสาร AD จากสิ่งเจือปนได้ดีและมีผู้รายงานว่าใช้ระบบตัวทำละลาย J นี้ในการแยก AD และ ADD ออกจากซิลิกาเจลได้ (Wovcha และ Brooks, 1979) ในการวิจัยนี้เราต้องการให้ได้ผลึก AD ที่มีความบริสุทธิ์สูงเพื่อนำไปศึกษาคุณสมบัติทางเคมีต่อไป ในการทดลองขั้นต่อไปจะใช้ระบบตัวทำละลาย J ชะสาร AD ออกจากสิ่งเจือปนก่อนโดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดยผ่านคอลัมน์อีกครั้ง ใช้ระบบตัวทำละลาย B ซึ่งประกอบด้วยไซโคลเฮกเซน ต่อ เอทธิลอะซีเตท อัตราส่วน 3 ต่อ 2 แต่ในการชะสารในคอลัมน์นั้น การเคลื่อนที่ของสารละลายจะเป็นระบบเคลื่อนลงซึ่งต่างจากระบบทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี ดังนั้นจึงทำให้การเคลื่อนที่ของสารในซิลิกาเจลคอลัมน์เร็วกว่าปกติ เพื่อให้การแยก AD จากสิ่งเจือปนมีประสิทธิภาพสูง จึงปรับอัตราส่วนโดยการเพิ่ม hydrophobicity ของระบบตัวทำละลายโดยการเพิ่มอัตราส่วนของไซโคลเฮกเซน ต่อ เอทธิลอะซีเตท เป็น 4 ต่อ 1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2.2 การทำ AD ให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี

นำสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 ตามวิธีการวิจัยในบทที่ 2 ข้อ 2.3 2.4 และ 2.5 ปริมาณ 0.2724 กรัมมาผ่านลงในคอลัมน์ที่บรรจุซิลิกาเจล (ขนาดของคอลัมน์ 0.8 ซม. X 30 ซม). ระบบตัวทำละลายที่ใช้ในการชะสาร คือ ระบบตัวทำละลายเอทธิลอะซีเตทต่อคลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน 15:85 เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 1 มล. ตรวจหา AD โดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟีตามวิธีการวิจัย ในบทที่ 2 ข้อ 3.7 รวมลำดับส่วนที่มี ADเข้าด้วยกัน แล้วตรวจวัดปริมาณและความบริสุทธิ์โดยวิธีแกสโครมาโตกราฟี พบว่า มีความบริสุทธิ์ 57.3 % และมีผลิตผล AD รวม 82.6 % ของปริมาณสารตั้งต้น ดังแสดงในตารางที่ 26 แต่ความบริสุทธิ์ดังกล่าวยังไม่เพียงพอที่จะนำมาตรวจสอบคุณสมบัติต่างๆ จึงทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น โดยนำมาผ่านคอลัมน์ซ้ำอีกครั้ง ชะสารในคอลัมน์ด้วยระบบตัวทำละลายไซโคลเฮกเซนต่อเอทธิลอะซีเตท ในอัตราส่วน 4:1 ซึ่งเป็นระบบตัวทำละลายที่พบว่าสามารถแยก AD ออกจากสิ่งเจือปนได้ดี สาร AD ที่ผ่านคอลัมน์ครั้งที่ 2 พบว่า มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 68 % และมีปริมาณสาร AD เหลือ 54.1 % ดังแสดงในตาราง ที่ 26

4.2.3 การเพิ่มความบริสุทธิ์ของ AD โดยการตกผลึก

นำสาร AD ที่ผ่านคอลัมน์ครั้งที่ 2 มาทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นด้วยการผลึกในสารละลายเอทธิลอะซีเตท-เฮกเซน ตามวิธีวิจัยในบทที่ 2 ข้อ 5.2 ได้ผลึกสีขาวที่มีความบริสุทธิ์ 97 % และมีผลิตผล AD เท่ากับ 18.6 % ของปริมาณสารตั้งต้น สารละลายที่เหลือจากการตกผลึกครั้งที่ 1 นำมาตกผลึกซ้ำซึ่งผลึกที่ได้จากการตกผลึกครั้งที่ 2 จะมีความบริสุทธิ์ 89.4 % และมีผลิตผล AD เท่ากับ 6.2 % ของปริมาณสารตั้งต้น สุดท้ายสารที่เหลืออยู่ในของเหลวหลังจากการตกผลึกรอบ 2 ความบริสุทธิ์ 46.1 % และมีผลิตผล AD เท่ากับ 24.8 % ของปริมาณสารตั้งต้น (ตารางที่ 26)

ตารางที่ 26 ความบริสุทธิ์ของสาร AD และเปอร์เซนต์ผลิตผล (% yield) ในขั้นตอนต่างๆ ของการทำให้บริสุทธิ์

ขั้นตอนในการทำให้สาร AD บริสุทธิ์	นน.สาร (กรัม)	ความบริสุทธิ์ของสาร (เปอร์เซนต์)	ผลิตผล AD (คิดเป็นเปอร์เซนต์ของปริมาณสารตั้งต้น)
สารสกัดของ AD	0.2724	50.9	100.0
หลังจากผ่านคอลัมน์ที่ 1	0.2250	57.3	82.6
หลังจากผ่านคอลัมน์ที่ 2	0.1474	68.0	54.1
ผลึกที่ได้จากการตกผลึกครั้งที่ 1	0.0507	97.0	18.6
ผลึกที่ได้จากการตกผลึกครั้งที่ 2	0.0169	89.4	6.2
สารที่เหลือจากการตกผลึกรอบ 2	0.0678	46.1	24.8

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของผลึก AD

4.3.1 วิธีการหาจุดหลอมเหลว

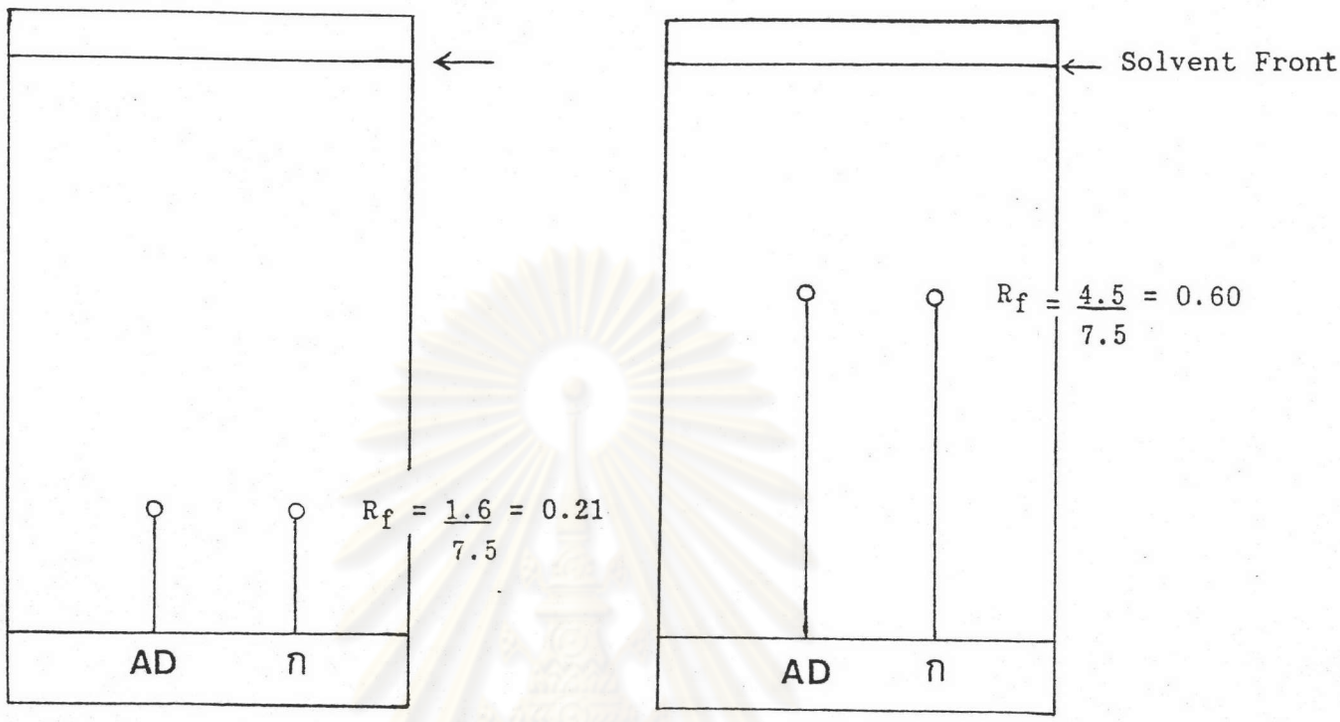
นำผลึกสารตัวอย่างที่บริสุทธิ์ 97 % มาตรวจหาจุดหลอมเหลว ตามวิธีวิจัยในบทที่ 2 ข้อ 3.9 พบว่าผลึก AD บริสุทธิ์ที่เตรียมได้มีจุดหลอมเหลวอยู่ในช่วงระหว่าง 169-172° ซ. และมีค่าใกล้เคียงกับจุดหลอมเหลวของสาร AD มาตรฐาน ซึ่ง Marsheck (1972) ได้รายงานว่ามีค่าจุดจุดหลอมเหลวเท่ากับ 170-172° ซ.

การที่ผลึก AD ที่บริสุทธิ์มีจุดหลอมเหลวเป็นช่วงต่างกัน 3° ซ. แสดงว่าผลึก AD ที่เตรียมได้นี้ยังมีสิ่งเจือปนอยู่บ้าง

4.3.2 วิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี

จากการตรวจโดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี ตามวิธีวิจัยในบทที่ 2 ข้อ 3.10 โดยใช้ระบบตัวทำละลายกลุ่มเดียวกับที่ใช้ศึกษาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการแยก AD จากสิ่งเจือปน ซึ่งกล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 3.7 พบว่าผลึกสารตัวอย่างที่บริสุทธิ์ 97 % จะปรากฏจุดเพียง 1 จุด และมีค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (R_f) เท่ากับของสาร AD มาตรฐานในระบบตัวทำละลายทุกระบบ ดังแสดงในรูปที่ 8

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 8 ค่า R_f ของสารมาตรฐาน AD และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการแปลงรูปทางชีวภาพของสเตียรอลโดย *Mycobacterium fortuifum* CBS 313.79 เพื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีทินเลเยอร์โครมาทกราฟี ในระบบตัวทำละลาย 2 ระบบ

AD : สารมาตรฐาน 4-แอนโดรสตีน -3,17-ไดโอน

ก : ผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79

A : ไซโคลเฮกเซน ต่อเอทธิลอะซีเตทในอัตราส่วน 3:2

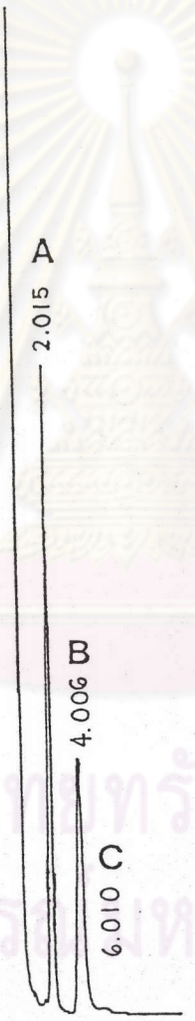
B : คลอโรฟอร์ม ต่อ เมทธานอล ในอัตราส่วน 19:1

4.3.3 วิธีแกสโครมาโตกราฟี

ตรวจหาความบริสุทธิ์ตามวิธีแกสโครมาโตกราฟี ตามวิธีวิจัยในบทที่ 2 ข้อ 3.11 พบว่า มีพีคปรากฏ 2 พีค คือ พีคของสาร AD และ พีคสิ่งเจือปน คำนวณความบริสุทธิ์ของผลึกสารตัวอย่างที่บริสุทธิ์ได้เท่ากับ 97 % และพบว่าตำแหน่งของพีคสาร AD ที่บริสุทธิ์ตรงกับพีคของสาร AD มาตรฐาน คือ เวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) ของ AD 2.015 นาที และพีคของสิ่งเจือปนตรงกับพีคของ สติกมาสเตียรอล คือ เวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) 6.010 นาที ดังแสดงในรูปที่ 9

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 9 ลักษณะของแกสโครมาโตแกรมของสาร AD ที่ได้จากการแปลงรูปทางชีวภาพของสเตียรอลโดย *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79



A คือ สารประกอบ AD

B คือ สารมาตรฐานเปรียบเทียบคอเลสเตียรอล

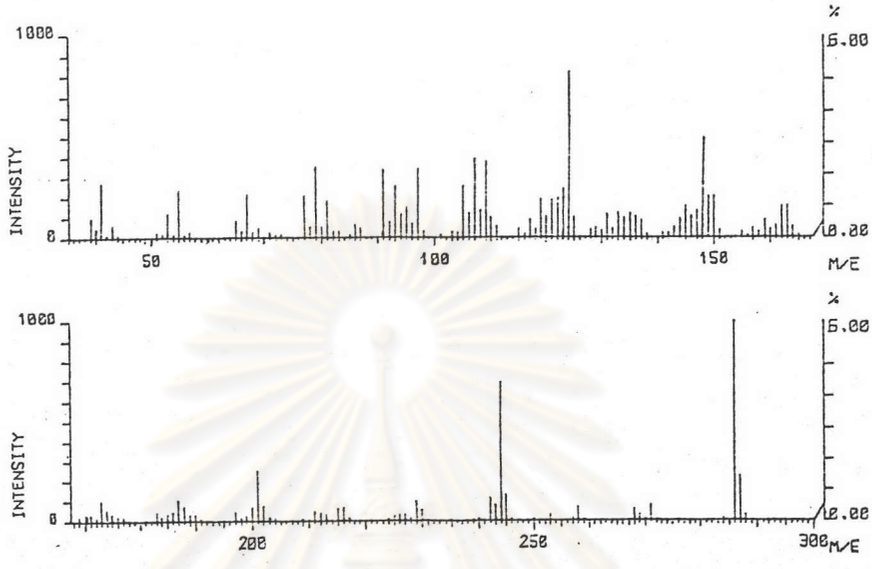
C คือ สารสติกมาสเตียรอล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

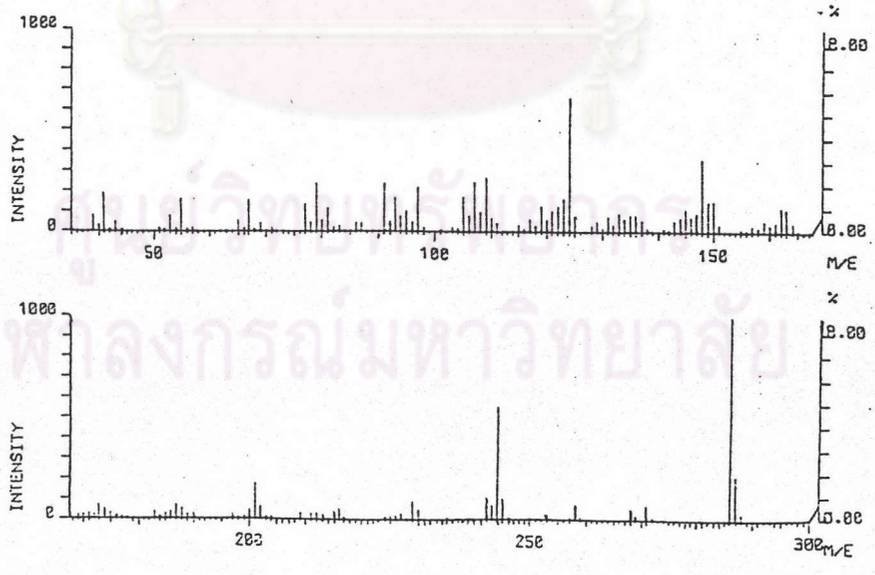
4.3.4 <u>ตรวจโครงสร้างของโมเลกุล AD ด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์</u>

จากการวิเคราะห์สารตัวอย่างที่บริสุทธิ์ 97 % ด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 3.13 พบว่าสารตัวอย่างมีมวลโมเลกุล 286 ซึ่งเท่ากับมวลโมเลกุลของ AD และรูปแบบการแตกตัวเหมือนกันทุกประการกับรูปแแบบการแตกตัวของสารมาตรฐาน AD ดังแสดงในรูปที่ 10 ก และ ข

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 10 ก แมสสเปกตรัมของสารมาตรฐาน AD



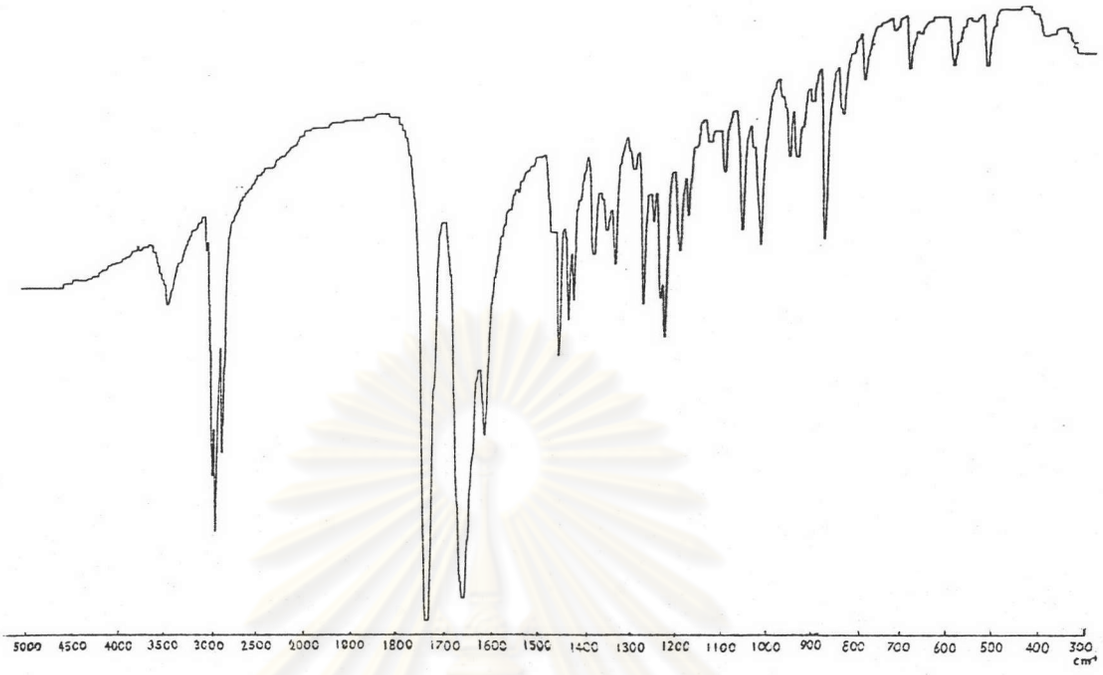
รูปที่ 10 ข แมสสเปกตรัมของสารตัวอย่างที่บริสุทธิ์ที่ผลิตโดย

Mycobacterium fortuitum

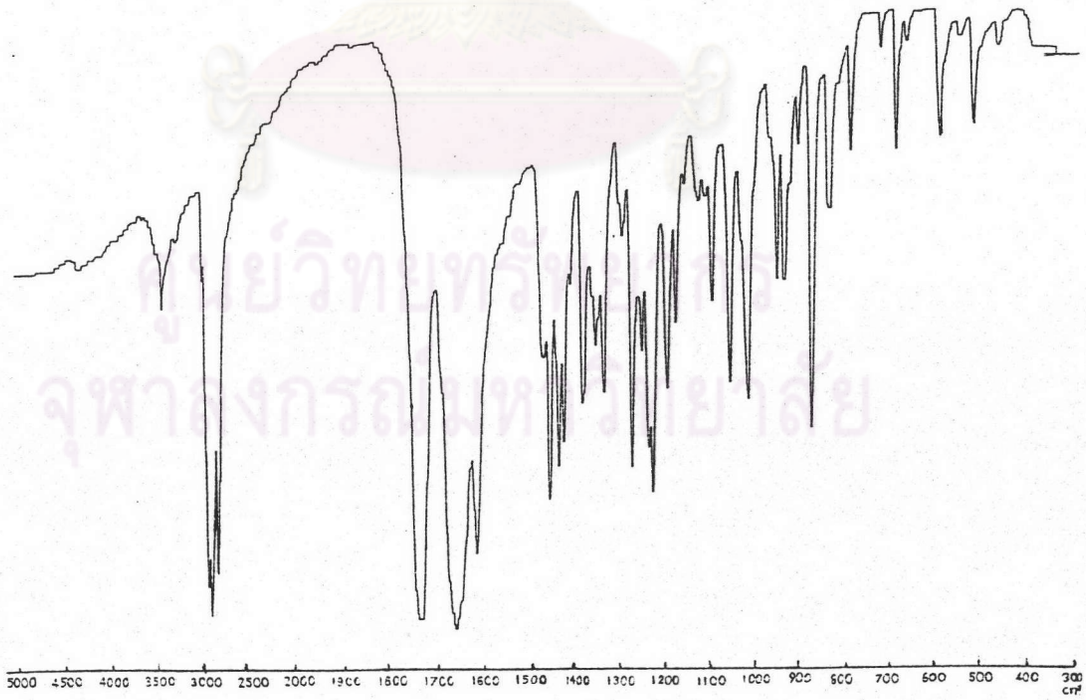
4.3.5 <u>ตรวจโครงสร้างของโมเลกุลโดยเครื่องอินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์</u>

จากการวิเคราะห์อินฟราเรดสเปกตรัมของสารตัวอย่างที่บริสุทธิ์ 97 % ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 3.12 (รูปที่ 11 ข) พบว่าสารตัวอย่างมีการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่สำคัญ คือ 1745 ซม.$^{-1}$ ($-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-$), 1667 ซม.$^{-1}$ (conjugated $-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-$) และที่ 1620 ซม.$^{-1}$ (c=c) (Nagasawa และคณะ, 1970) และเมื่อเปรียบเทียบกับอินฟราเรดสเปกตรัมของสารมาตรฐาน AD (รูปที่ 11 ก) พบว่า อินฟราเรดสเปกตรัมทั้งสองคล้ายคลึงกันทุกประการ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 11 ก อินฟราเรดสเปกตรัมของสารมาตรฐาน AD



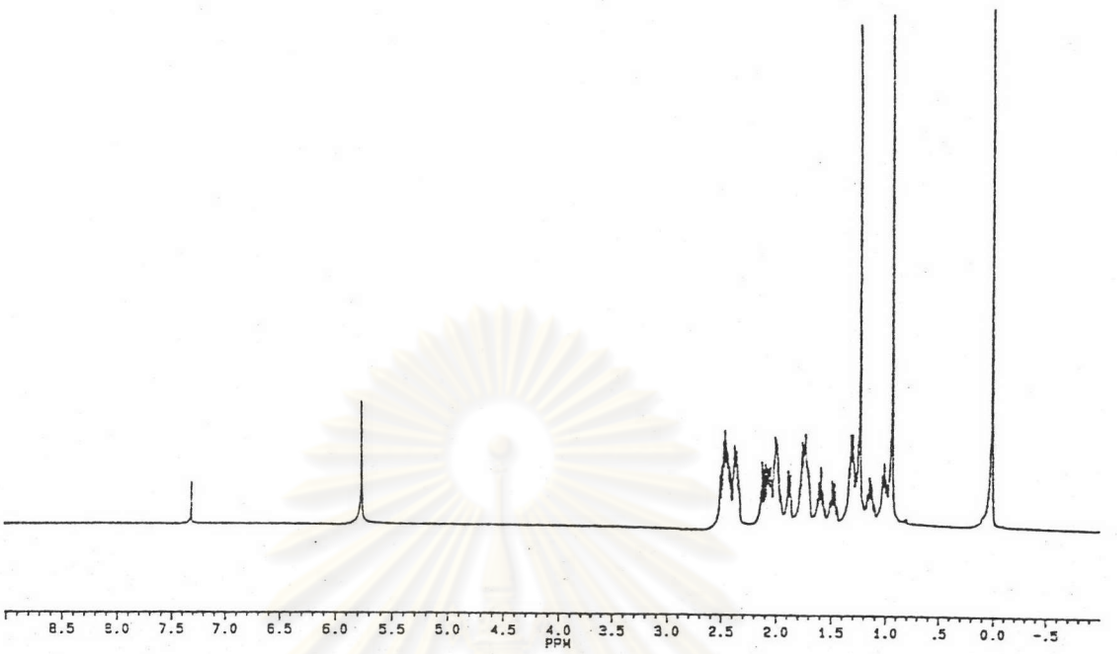
รูปที่ 11 ข อินฟราเรดสเปกตรัมของสารตัวอย่างที่บริสุทธิ์ที่ผลิตโดย

Mycobacterium fortuitum

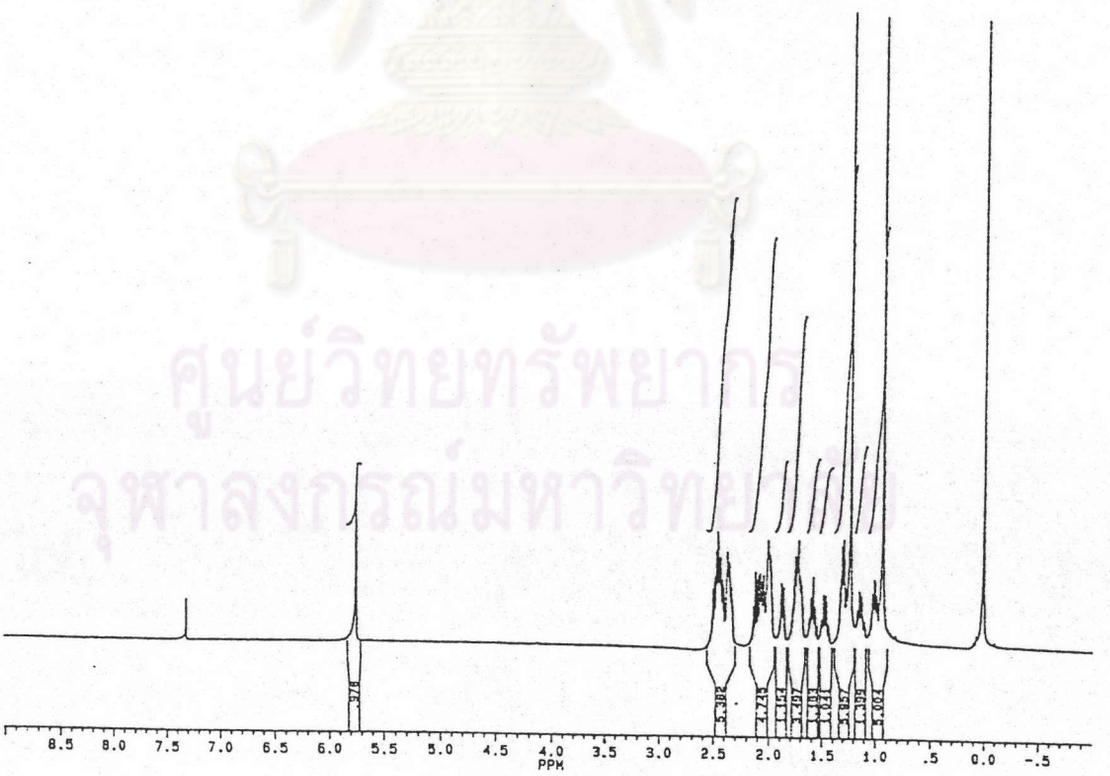
4.3.6 <u>ตรวจโครงสร้างของโมเลกุลด้วยเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรมิเตอร์</u>

ผลการวิเคราะห์สารตัวอย่างที่บริสุทธิ์ 97 % ด้วยเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรมิเตอร์ ตามวิธีการที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 3.14 พบว่า สเปคตรัมของโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (^{1}H-NMR) ของสารตัวอย่างที่บริสุทธิ์ 97 % มีหมู่เมธิลสองหมู่ คือ ที่ 0.92 พีพีเอม (3H, S) และ 1.25 พีพีเอม (3H, S) มีโปรตอนในวงแหวนที่ 1.00 พีพีเอม (1H, m) 1.15 พีพีเอม (1H, m) 1.30 พีพีเอม (2H, m) 1.45 พีพีเอม (1H, m) 1.60 พีพีเอม (1H, m) 1.75 พีพีเอม (3H, m) 1.90 พีพีเอม (1H, m) 2.00 พีพีเอม (2H, m) 2.05 พีพีเอม (2H, m) 2.35 พีพีเอม (2H,m) 2.45 พีพีเอม (3H, m) และมีโอเลฟินิกโปรตอนที่ 5.75 พีพีเอม (1H, S) จาก ^{1}H-NMR สเปกตรัมของสารตัวอย่างที่บริสุทธิ์ 97 % มีลักษณะเหมือนกันทุกประการกับ ^{1}H-NMR สเปกตรัมของสารมาตรฐาน AD ดังรูปที่ 12 ก และ ข จากผลการวิเคราะห์ทางเคมีของสารที่เตรียมได้นี้ยืนยันว่าสารที่เตรียมได้ คือ 4-แอนโดรสตีน-3,17-ไดโอน (4-androstene-3, 17-dione, AD)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



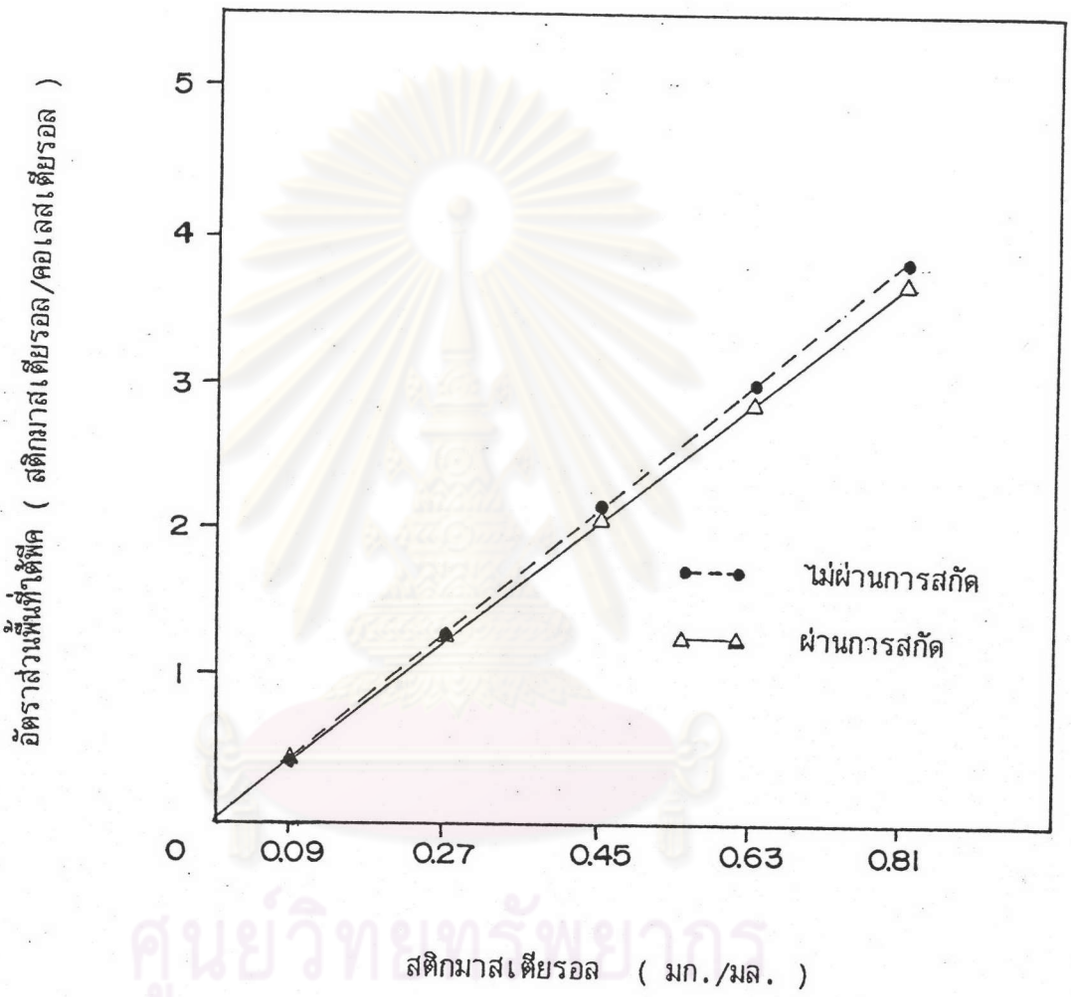
รูปที่ 12 ก NMR สเปกตรัมของสารมาตรฐาน AD (วัดด้วย ^{1}H-NMR)



รูปที่ 12 ข NMR สเปกตรัมของสารตัวอย่างที่บริสุทธิ์ที่ผลิตโดย

Mycobacterium fortuitum

12. กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณสติกมาสเตียรอล



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย