

รายงานการวิจัยเรื่อง การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากจุลินทรีย์
เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

Biosurfactant production by microorganism for food industry

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ผู้วิจัย

รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธานีวัน และคณะ

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประจำปี 2551

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่องนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก เงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี งบประมาณ 2550 ภายใต้โครงการวิจัยเรื่อง แผนงานวิจัยนวัตกรรมเพื่อยกระดับคุณภาพและความปลอดภัยทางอาหารสู่โครงสร้างเศรษฐกิจยุคใหม่ : 2.4 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยมี Prof. Maasaki Morikawa แห่งมหาวิทยาลัย Hokkaido ประเทศญี่ปุ่นเป็นที่ปรึกษาโครงการวิจัย คณะผู้วิจัยประกอบด้วย รศ.จิราภรณ์ ธนियวัน รศ.ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ รศ.ดร.สุเทพ ธนियวัน อ.ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป และรศ.ดร.วรรณดา ตุลยธัญ และผู้ช่วยวิจัยประกอบด้วย นางสาวธันสดา เชียงอุทัย นางสาวผกามาศ ราชมন্ত্রী นางสาวอภิษฎา เตชะวรัญญู และนางสาวศิตา วีรกุล



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

การศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยยีสต์ *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 3 ชนิด คือ 4% กลูโคส 4% น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันถั่วเหลืองร่วมกับกลูโคส พบว่ายีสต์สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในอาหารเหลวปรับปรุงสูตรที่ประกอบด้วย 0.02% KH_2PO_4 , 0.02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.4% NaNO_3 , 0.3% สารสกัดยีสต์, 10.67% น้ำมันถั่วเหลือง และ 5.33% กลูโคส (อัตราส่วน 2:1) ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 โดยมีภาวะการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C ในระดับขวดเขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน โดยมีค่าแรงตึงผิวต่ำสุด 33 mN/m ค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 75.39 cm^2 และให้ผลผลิตเท่ากับ 0.95 g/l จากนั้นวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้โดยใช้ analytical TLC พบว่ามีส่วนประกอบ 3 ส่วน ที่มีค่า R_f เท่ากับ 0.88, 0.72 และ 0.62 (F1a-F3a) ตามลำดับ ซึ่ง F2a ให้ค่าการกระจายน้ำมันสูงสุดและถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งด้วย preparative TLC และ HPLC และตรวจผลแต่ละลำดับส่วนของตัวอย่างสารตำแหน่ง F2a จาก HPLC ที่มีค่าการกระจายน้ำมันมากจะถูกวิเคราะห์ต่อไปด้วย LC-MS แสดงค่ามวลโมเลกุลของสารส่วนใหญ่มีค่าเท่ากับ 685 725 และ 805 ซึ่งเทียบเคียงได้กับสารไซโฟโรลิติดที่มีโครงสร้างที่มีกรดไขมันเป็นองค์ประกอบของ C22 ที่เป็น acidic และ lactonic form และเมื่อศึกษาลักษณะสมบัติทางชีวเคมีพบว่าสามารถทำงานได้ดี และมีความเสถียรที่ความเป็นกรดต่างเท่ากับ 2-9 มีความเสถียรต่ออุณหภูมิต่างๆ ได้จนถึงอุณหภูมิ 121°C และยังคงความเสถียรได้ดีในภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5-5.0 % นอกจากนี้ยังสามารถกักอิมัลชันต่อน้ำมัน และสารประกอบไฮโดรคาร์บอนต่างๆ เช่น น้ำมันคาโนลา น้ำมันงา น้ำมันสลัด น้ำมันรำข้าว น้ำมันดอกคำฝอย น้ำมันถั่วเหลือง ไอโซพรีนอล ไมริสเตท เฮกซาเดเคน และเอทิล โอเลเอท เป็นต้น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีค่าจุดวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ (CMC) เท่ากับ 132 mg/l ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเป็นสารที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Abstract

Biosurfactant production by *Pichia anomala* strain PY1 was studied in three different media which contained glucose, soybean oil and soybean oil mix with glucose as carbon sources. The highest efficiency for biosurfactant production was found in modified medium consisting of 0.02% KH_2PO_4 , 0.02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.4% NaNO_3 , 0.3% yeast extract, 10.67% soybean oil and 5.33% glucose with initial pH of 5.0. The cultivation was performed at 30°C in shaking flask at 200 rpm. After 7 days cultivation the biosurfactant produced possessed minimum surface tension of 33 mN/m, oil displacement activity of 75.39 cm^2 and yield of 0.95 g/l. Analysis via analytical TLC showed 3 major peaks with R_f of 0.88, 0.72 and 0.62 (F1a-F3a), respectively. Among this F2a gave the highest oil displacement activity and upon further purification by preparative thin layer and high performance liquid chromatography. A series of peaks belong to F2a were isolated with molecular masses of 685, 725 and 805 as indicated by their LC-MS spectrum correspond to sophorolipid compound containing fatty acid of C22 in acidic and lactonic form. The biochemical studies of the product obtained revealed that this biosurfactant has optimum pH and pH stability at pH 2-9. The same product was stabilized to temperature up to 121°C and could tolerate NaCl at 0.5-5.0%. In addition, it could form emulsion with oil and various hydrocarbons including canola oil, sesame oil, salad oil, rice bran oil, safflower oil, soybean oil, isopropyl myristate, n-hexadecane, and ethyl oleate etc. The critical micelle concentration (CMC) of 132 mg/l, which was indicated that it has higher activity than synthetic surfactants.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ช
บทที่	
1. บทนำ	1
2. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง	23
3. ผลการทดลอง	34
4. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	63
5. ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป.....	66
รายการอ้างอิง	68
ภาคผนวก.....	81

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง (List of tables)

ตารางที่	หน้า	
1.1	หน้าที่แตกต่างกัน ของสารลดแรงตึงผิวที่ใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์ในอาหารชนิดต่างๆ.....	20
1.2	ตัวอย่างสิทธิบัตรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตด้วยจุลินทรีย์.....	21
1.3	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากยีสต์ในแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน.....	22
3.1	อัตราการเคลื่อนที่ และค่าการกระจายน้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากการเลี้ยงเชื้อโดยมี 4 % น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนบนแผ่น TLC.....	35
3.2	อัตราการเคลื่อนที่ และค่าการกระจายน้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากการเลี้ยงเชื้อโดยมีน้ำตาล glucose เป็นแหล่งคาร์บอนบนแผ่น TLC.....	37
3.3	อัตราการเคลื่อนที่ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากการเลี้ยงเชื้อโดยมีน้ำมันถั่วเหลืองและน้ำตาลกลูโคส อัตราส่วน 2:1 เป็นแหล่งคาร์บอนบนแผ่น TLC และค่าการกระจายน้ำมันแต่ละลำดับส่วน.....	38
3.4	แสดงผลการวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ด้วย LC- MS	49
3.5	แสดงผลการวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากน้ำมันถั่วเหลืองและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนด้วยวิธี LC- MS.....	50
3.6	ผลของค่าความเป็นกรดต่างๆ ต่อค่าแรงตึงผิวและความเสถียรของค่าแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก <i>Pichia anomala</i> สายพันธุ์ PY 1.....	54
3.7	ผลของค่าความเป็นกรดต่างๆ ต่อค่าการกระจายน้ำมันและความเสถียรของค่าการกระจายน้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก <i>Pichia anomala</i> สายพันธุ์ PY 1	55
3.8	ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของค่าการกระจายน้ำมันและค่าแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก <i>Pichia anomala</i> สายพันธุ์ PY 1 ที่อุณหภูมิ 60 และ 100 องศาเซลเซียส.....	56
3.9	ผลของค่าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อค่าแรงตึงผิวและความเสถียรของค่าแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก <i>Pichia anomala</i> สายพันธุ์ PY 1	57
3.10	ผลของค่าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อค่าการกระจายน้ำมันและความเสถียรของค่าการกระจายน้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก <i>Pichia anomala</i> สายพันธุ์ PY 1	58

ตารางที่		หน้า
3.11	แสดงค่ากิจกรรมการก่ออิมัลชัน (Emulsification activity) และความเสถียรของการก่ออิมัลชัน	59
3.12	แสดงค่าจุดวิกฤติของความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ (Critical micelle concentration ; CMC) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดต่างๆ	62
3.13	สรุปรายงานการวิจัยที่ได้ดำเนินการไปแล้วในปี 2550 และ 2551	81



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป (List of illustration)

รูปที่	หน้า	
1.1	ลักษณะโครงสร้างทั่วไปของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	4
1.2	การเกิดโครงสร้างไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในน้ำเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจนถึงจุด Critical Micelle Concentration (CMC) ก) เป็นภาวะที่ไม่มีสารลดแรงตึงผิว ข) สารลดแรงตึงผิวละลายอยู่ในน้ำโดยหันส่วนที่ไม่ชอบน้ำออกสู่น้ำ ค) Critical Micelle Concentration (CMC) เป็นจุดที่ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มขึ้นจนถึงระดับที่ก่อให้เกิดโครงสร้างไมเซลล์ และ ง) เมื่อเกิดเป็นโครงสร้างไมเซลล์แล้วค่าแรงตึงผิวมีค่าคงที่ไม่ลดลงอีกแม้ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะเพิ่มขึ้นก็ตาม.....	5
1.3	โครงสร้างและการจัดเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	6
1.4	โครงสร้างของแรมโนลิพิด ชนิด R1, R2, R3, R4, A และ B ที่ผลิตโดย <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
1.5	โครงสร้างของ Trehalose dimycolate จาก <i>Rhodococcus erythropolis</i>	9
1.6	โครงสร้างของไซโฟโรลิพิดจาก <i>Torulopsis bombicola</i> แสดงโคเมอริกไซโฟโรสที่เชื่อมต่อกับสายยาวของ hydroxyl fatty acid (C18).....	10
1.7	โครงสร้างของไซโฟโรลิพิดจาก <i>Torulopsis bombicola</i>	10
1.8	โครงสร้างของไซโฟโรลิพิดจาก <i>Candida bombicola</i> ซึ่งแสดงโครงสร้างของ Lactonic form และ Acid form.....	11
1.9	โครงสร้างของ α -diglucosyldiglyceride , R = หมู่อัลคิล.....	11
1.10	โครงสร้างของ Mannosylerythritol lipid (MEL) จาก <i>Pseudozyma (Candida) antarctica</i> T- 34	12
1.11	โครงสร้างของ cellobiose lipid จาก <i>Ustilago maydis</i> ATCC 14826	12
1.12	รูปแบบการเจริญของเชื้อแบบต่าง ๆ.....	14
2.1	วิธีการหาค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ โดยการวัดค่าแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ และทำให้บริสุทธิ์บางส่วน.....	33

รูปที่	หน้า
3.1 ผลการวิเคราะห์เมื่อนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอนมาวิเคราะห์และแยกให้บริสุทธิ์โดยวิธี analytical TLC ตรวจสอบผลด้วย a) ไอโอดีน และ b) มอริสรีเอเจนต์.....	35
3.2 ผลการวิเคราะห์เมื่อนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากกลูโคส 4% เป็นแหล่งคาร์บอนมาวิเคราะห์และแยกให้บริสุทธิ์โดยวิธี analytical TLC ตรวจสอบผลด้วย a) ไอโอดีน และ b) มอริสรีเอเจนต์.....	36
3.3 ผลการวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ด้วยวิธี analytical TLC แล้วทำการตรวจสอบผลด้วย (ก) ไอโอดีน และ (ข) มอริสรีเอเจนต์.....	38
3.4 โครมาโตแกรมของ HPLC จากสารโซไฟโวลีพิดที่ใช้เป็นสารเปรียบเทียบ.....	39
3.5 โครมาโตแกรมของ HPLC จากตัวอย่างตำแหน่ง F2.....	40
3.6 โครมาโตแกรมของ HPLC จากตัวอย่างตำแหน่ง F2g.....	41
3.7 โครมาโตแกรมของ HPLC จากตัวอย่างตำแหน่ง F2a.....	42
3.8 โครมาโตแกรมของ LC-MS ของสารโซไฟโวลีพิดที่ใช้เป็นสารเปรียบเทียบ.....	43
3.9 โครมาโตแกรมของ LC-MS ของตัวอย่างสาร A.....	43
3.10 โครมาโตแกรมของ LC-MS ของตัวอย่างสาร B.....	44
3.11 โครมาโตแกรมของ LC-MS ของตัวอย่างสาร C.....	44
3.12 โครมาโตแกรมของ LC-MS ของตัวอย่างสาร D.....	45
3.13 โครมาโตแกรมของ LC-MS ของตัวอย่างสาร E.....	45
3.14 โครมาโตแกรมของ LC-MS ของตัวอย่างสาร F.....	46
3.15 โครมาโตแกรมของ LC-MS ของตัวอย่างสาร G.....	46
3.16 โครมาโตแกรมของ LC-MS ของตัวอย่างสาร H.....	47
3.17 โครมาโตแกรมของ LC-MS ของตัวอย่างสาร I.....	47
3.18 โครมาโตแกรมของ LC-MS ของตัวอย่างสาร J.....	48
3.19 โครมาโตแกรมของ LC-MS ของตัวอย่างสาร K.....	48
3.20 ¹ H-NMR spectrum resonance ของสารโซไฟโวลีพิดที่ใช้เป็นสารเปรียบเทียบ.....	52
3.21 ¹ H-NMR spectrum resonance ของตัวอย่าง K.....	53
3.22 กราฟแสดงค่าการกระจายน้ำมันและค่าแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก <i>Pichia anomala</i> สายพันธุ์ PY 1 ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส.....	56
3.23 แสดงการหาค่า CMC ซึ่งเขียนกราฟระหว่างค่าแรงตึงผิวและ log ของความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก <i>Pichia anomala</i> สายพันธุ์ PY1.....	60

รูปที่	หน้า
3.24 แสดงการหาค่า CMC ซึ่งเขียนกราฟระหว่างค่าแรงดึงผิวและ log ของความเข้มข้นของสารลดแรงดึงผิวสังเคราะห์ เคมเทค 307.....	61
3.25 แสดงการหาค่า CMC ซึ่งเขียนกราฟระหว่างค่าแรงดึงผิวและ log ของความเข้มข้นของสารลดแรงดึงผิวสังเคราะห์ ไทรทอน เอ็กซ์ 100.....	61
3.26 แสดงการหาค่า CMC ซึ่งเขียนกราฟระหว่างค่าแรงดึงผิวและ log ของความเข้มข้นของสารลดแรงดึงผิวสังเคราะห์โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต.....	62



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

เนื่องจากความต้องการของผู้บริโภคในปัจจุบัน มีความต้องการสารอาหารที่เป็นสารจากธรรมชาติ ซึ่งสารธรรมชาติต่างๆเหล่านี้กำลังทวีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหารมากขึ้นกว่าสารสังเคราะห์ทางเคมี และความสนใจเกี่ยวกับสุขภาพ ราคาต้นทุนก็เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดความต้องการสารที่มาจากธรรมชาติมากขึ้น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นสารชีวโมเลกุลที่สามารถก่ออิมัลชันได้ดี สร้างได้จากแบคทีเรีย รา และยีสต์บางชนิด โดยเข้ามามีส่วนแบ่งในตลาดของสารที่สังเคราะห์ทางเคมี มีโครงสร้างหลากหลาย มีโครงสร้างเป็นแอมฟิพาติก (Amphiphatic structure) ทำให้มีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน และยังคงมีคุณสมบัติที่ดี คงทนได้อยู่ใน pH ช่วงกว้าง อุณหภูมิและเกลือความเข้มข้นต่างๆ เป็นผลให้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อาหาร ยา เครื่องสำอาง และ ปิโตรเคมี นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นสารที่ย่อยสลายได้ ในธรรมชาติ มีความเป็นพิษต่ำ และสามารถผลิตได้จากวัสดุทางการเกษตรภายในประเทศ จึงมีความเป็นไปได้สูงที่จะนำการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากจุลินทรีย์เพื่อมาใช้ในการพัฒนากระบวนการผลิตอาหารเพื่อสุขภาพชนิดใหม่ เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพดี และมีความปลอดภัยสูง

อาหารบางชนิดที่เกิดจากการผสมของเฟสที่เป็นน้ำ (aqueous) และส่วนที่มีลักษณะน้ำมัน เช่น ครีม น้ำสลัด มายองเนส ผลิตภัณฑ์จากนม เนย ชนมหวาน และเบเกอรี่ต่างๆ โดยผลิตภัณฑ์นั้นต้องอยู่ในรูปของอิมัลชัน อีกทั้งเมื่อเกิดแล้วลักษณะดังกล่าวต้องมีความเสถียรจึงจะอยู่ในรูปลักษณะและลักษณะเมื่อรับประทานที่เป็นที่ยอมรับโดยผู้บริโภค ลักษณะอิมัลชันดังกล่าวเกิดจากการลดความตึงระหว่างผิวประจัน (intersurface tension) ระหว่างทั้งสองเฟสจนได้เป็นอิมัลชันขึ้น โดยกระบวนการทำให้เกิดอิมัลชันนั้นมีบทบาททำให้อาหารเหนียวข้นและดูมีเนื้อมากขึ้น

การที่จะให้เกิดอิมัลชันในอาหารนั้นต้องการสารก่ออิมัลชันที่เรียกว่าอิมัลซิไฟเออร์ซึ่งการทำงานนั้นขึ้นกับสมดุลย์ ความชอบน้ำ (hydrophilic)/ ความไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) สารที่สามารถใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์ในอาหารมีหลายชนิด อาทิ เอสเทอร์ของกรดไขมันของกลีเซอรอล เลซิธินและอนุพันธ์ของเลซิธิน เอสเทอร์ของกรดไขมันของซอร์บิทัน เป็นต้น ปัจจุบันสามารถผลิตสารก่ออิมัลชันได้จากจุลินทรีย์ที่เรียกกันว่า ไบโอบิโอฟแอสแตนท์ (biosurfactant) หรือสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งการที่จุลินทรีย์ผลิตสารขึ้นเพื่อการสลายและนำสารอาหารเข้าเซลล์นั้น

เป็นสิ่งที่ได้รับความสนใจเป็นพิเศษ เนื่องจากการผลิตที่ง่าย รวดเร็ว ใช้ต้นทุนต่ำ และไม่ก่อปัญหาทางสิ่งแวดล้อม ตัวอย่างของไบโอเซอร์แฟคแตนท์ที่เป็นที่รู้จักกันได้แก่ ไกลโคลิพิดจาก *Arthrobacter* sp. โซไฟโพรสิลิตจาก *Torulopsis bombicola* แรมโนลิพิดจาก *Pseudomonas* spp. อิมัลชัน จาก *Acinetobacter calcoaceticus* และ ไลโฟโปรตีน (เซอร์แฟคติน) โดย *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* เป็นต้น สารเหล่านี้ได้ถูกใช้ทดแทนสารลดแรงตึงผิวชนิดสังเคราะห์ทางเคมีในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ตัวอย่างเช่น การใช้ ไกลโคลิพิดไบโอเซอร์แฟคแตนท์ (glycolipid biosurfactant) แทนเอสเทอร์กรดไขมันของโมโนและโอลิโกแซคคาไรด์ เป็นอิมัลซิไฟเออร์ในอาหาร การใช้โซไฟโพรสิลิตไบโอเซอร์แฟคแตนท์และอนุพันธ์เอซิลและแอลคอกซิล (acylated and alkoxyated derivatives) ของสารดังกล่าวในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ในทางอุตสาหกรรมอาหารมีการจดสิทธิบัตรการใช้โซไฟโพรสิลิตกับแป้งเพื่อสร้างคุณภาพและยืดอายุการเก็บอาหาร มีสิทธิบัตรการใช้ผนังเซลล์ที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ของยีสต์ (*Saccharomyces uvarum*) เพื่อผลิตมาการ์ริน เป็นต้น

จากสถิติการนำเข้าสารลดแรงตึงผิว สารก่ออิมัลชันและสารอนุพันธ์จากกรมศุลกากรประจำปี 2547 พบว่ามีการนำเข้าเป็นมูลค่ากว่า 105 ล้านบาทต่อปี และมีแนวโน้มสูงขึ้น เพื่อเป็นการทดแทนการนำเข้า อีกทั้งเพื่อเป็นการพึ่งตนเองได้ จึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการค้นคว้าและผลิตสารชีวโมเลกุลที่สามารถลดแรงตึงผิวและก่ออิมัลชันได้ดี เพื่อทดแทนสารดังกล่าวมาใช้ ซึ่งเป็นผลให้ประเทศสามารถผลิตอาหารที่มีมาตรฐานสูงขึ้น สามารถแข่งขันกับสินค้าจากต่างประเทศและยังเป็นการส่งเสริมการตลาดภายใน และภายนอกประเทศอีกด้วย

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย (ปีที่ 1-4)

คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีคุณสมบัติเป็นที่ต้องการในอุตสาหกรรมอาหาร ศึกษาถึงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะที่เหมาะสมเพื่อการผลิตสาร ศึกษาคุณลักษณะสมบัติของสาร การกลายพันธุ์จุลินทรีย์ให้มีประสิทธิภาพในการผลิตสูงขึ้น ตลอดจนทราบกระบวนการในการผลิตสารในระดับขยายส่วน

ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ (ปีที่ 1)
2. ศึกษาถึงอาหารแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้ได้ปริมาณสูงสุด (ปีที่ 1-2)

3. ศึกษาลักษณะสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ และวิเคราะห์โครงสร้างของสาร(ปีที่ 2)
4. การกลายพันธุ์จุลินทรีย์ให้มีประสิทธิภาพในการผลิตสูงขึ้น(ปีที่ 3)
5. ทำการผลิตในระดับขยายส่วน(ปีที่ 4)
6. ศึกษาความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร(ปีที่ 4)

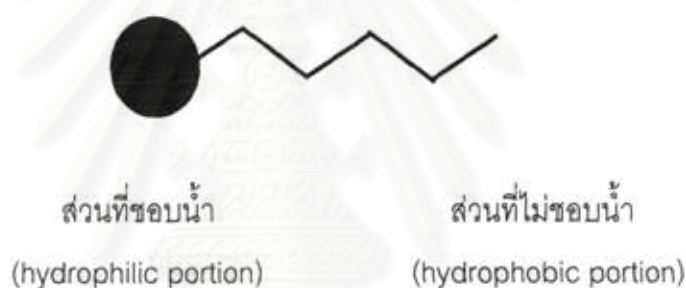
ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

อาหารบางชนิดที่เกิดจากการผสมของเฟสที่เป็นน้ำ และส่วนที่มีลักษณะน้ำมัน เช่น ครีม น้ำสลัด มายองเนส ผลิตภัณฑ์นม เนย ขนมหวานและเบเกอรี่ต่างๆ นั้นต้องอยู่ในรูปของอิมัลชัน อีกทั้งเมื่อเกิดแล้วลักษณะดังกล่าวต้องมีความเสถียรจึงจะอยู่ในรูปลักษณะและลักษณะเมื่อรับประทานที่เป็นที่ยอมรับโดยผู้บริโภค ลักษณะอิมัลชันดังกล่าวเกิดจากการลดความตึงระหว่างผิวประจัน (intersurface tension) ระหว่างทั้งสองเฟสจนได้เป็นอิมัลชันขึ้น โดยกระบวนการทำให้เกิดอิมัลชันนั้นมีบทบาททำให้อาหารเหนียวข้นและคูมีเนื้อมากขึ้น การที่จะให้เกิดอิมัลชันในอาหารนั้นต้องการสารก่ออิมัลชันที่เรียกว่าอิมัลซิไฟเออร์ซึ่งการทำงานนั้นขึ้นกับสมดุลย์ ความชอบน้ำ (hydrophilic)/ ความไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ปัจจุบันสารก่ออิมัลชันได้จากจุลินทรีย์ที่เรียกกันว่า ไบโอบิโอฟิล์ม (biosurfactant) หรือสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งการที่จุลินทรีย์ผลิตสารขึ้นเพื่อการสลายและนำสารอาหารเข้าเซลล์นั้น เป็นสิ่งที่ได้รับความสนใจเป็นพิเศษ เนื่องจากเป็นการผลิตที่ง่าย รวดเร็ว ใช้ต้นทุนต่ำจากวัสดุทางการเกษตรภายในประเทศ และไม่ก่อปัญหาทางสิ่งแวดล้อม จึงมีความเป็นไปได้สูงที่จะนำการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากจุลินทรีย์เพื่อมาใช้เป็นตัวเพิ่มการเข้ากันได้ของสารที่มีขั้วต่างกันเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารหรือเป็นนวัตกรรมการผลิตอาหารเพื่อสุขภาพชนิดใหม่ และการพัฒนาการผลิตให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพดีและมีความปลอดภัยสูง

งานวิจัยการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารในประเทศไทยยังไม่มีผู้ใดรายงาน ส่วนงานวิจัยในต่างประเทศ มีการศึกษาการวิจัยบ้าง ตลอดจนมีการจดสิทธิบัตร ดังที่ได้กล่าวมาแล้วในบทบทวนเอกสาร แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ของการใช้สารลดแรงตึงผิวจากจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรมอาหาร จึงเห็นความจำเป็นที่จะต้องมีการค้นคว้าและวิจัยเพื่อความสามารถในการพึ่งตนเองได้ของประเทศ นำไปสู่การผลิตอาหารที่มาตรฐานสูงขึ้น เพื่อการแข่งขันกับต่างประเทศ

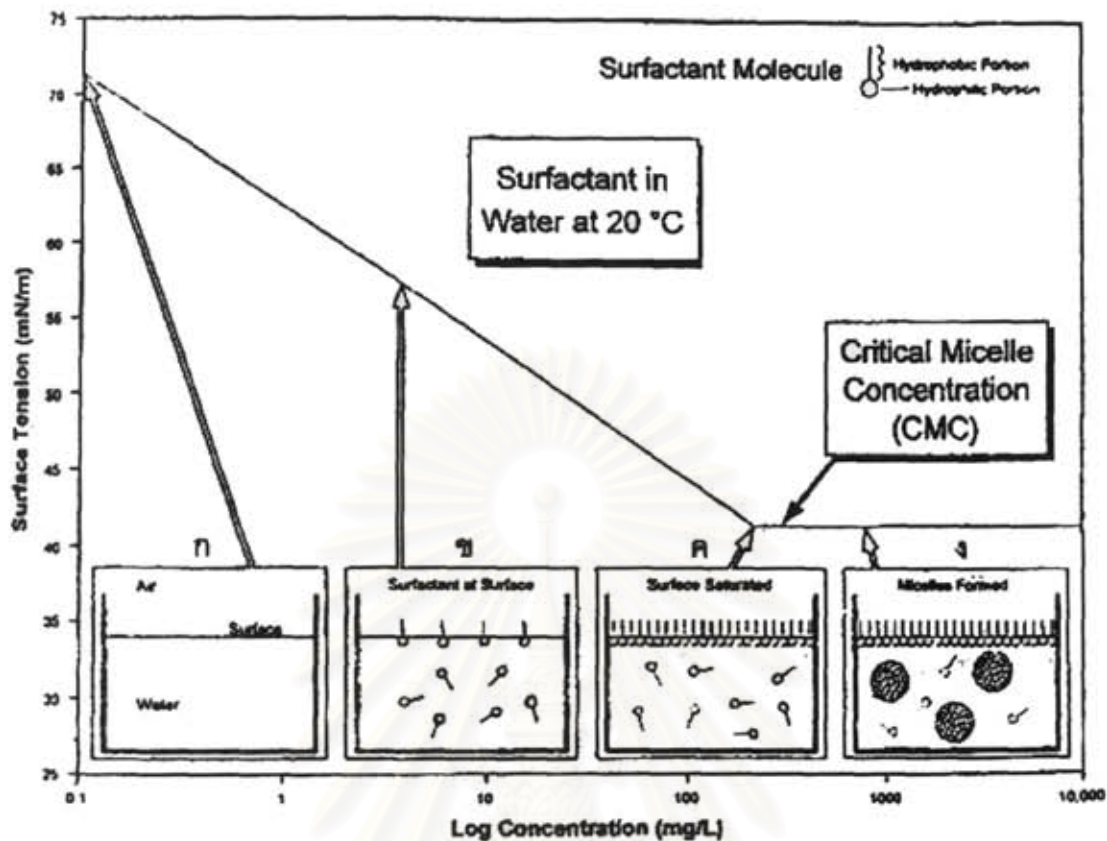
การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactant) หมายถึง สารชีวโมเลกุลที่มีสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิว (surface-active substance) ซึ่งสร้างจากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เช่น แบคทีเรีย รา และ ยีสต์บางชนิด (Cooper และ Zajic, 1980) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีโครงสร้างแตกต่างกัน แต่มีลักษณะโมเลกุลหลักที่มีโครงสร้างเป็นแอมฟิพาติก ประกอบด้วยส่วนที่มีขั้ว (hydrophilic portion) ได้แก่ โปรตีน และน้ำตาล ซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีหมู่คาร์บอกซิลิก หมู่ไฮดรอกซิล หมู่อะมิโน หมู่ฟอสเฟต เป็นต้น ส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic portion) หรือส่วนที่ชอบไขมัน (lipophilic portion) ซึ่งเป็นโมเลกุลพวกไฮโดรคาร์บอน เช่น กรดไขมันทั้งชนิดอิ่มตัว (saturated fatty acid) และกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) มีทั้งโมเลกุลใหญ่และโมเลกุลเล็ก ซึ่งจะทำให้ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแตกต่างกันไป ดังรูปที่ 1.1 แสดงโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เป็นแบบแอมฟิพาติก



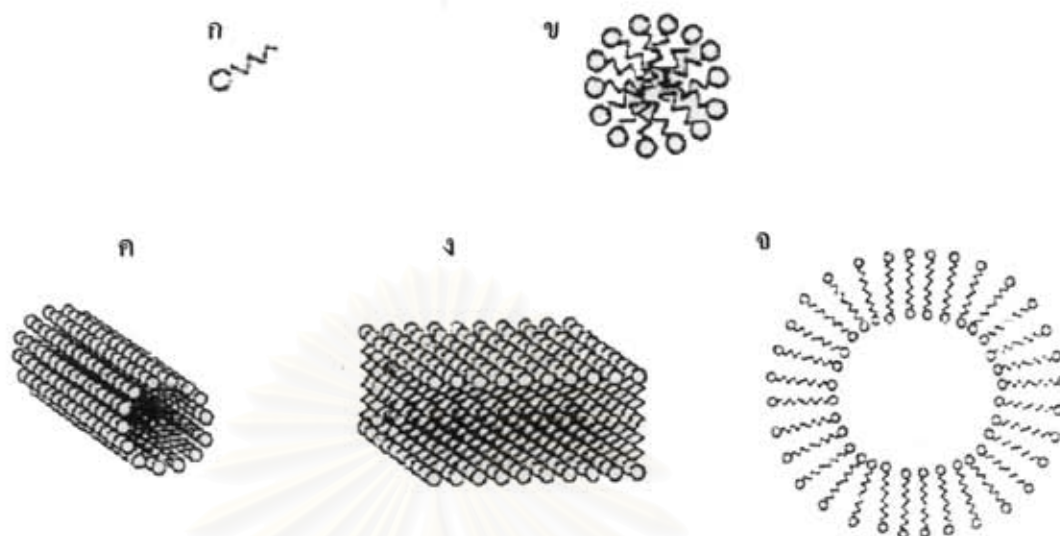
รูปที่ 1.1 ลักษณะโครงสร้างทั่วไปของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Fiechter, 1992)

จากสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีโครงสร้างเป็นแอมฟิพาติก เมื่อสารลดแรงตึงผิวอยู่ในน้ำ ส่วนที่ชอบน้ำจะละลายน้ำได้และส่วนที่ไม่ชอบน้ำจะอยู่บริเวณรอยต่อระหว่างน้ำกับอากาศ การที่สารลดแรงตึงผิวไปอยู่ที่รอยต่อนี้จะทำให้ลดค่าแรงตึงผิวของสารละลายนั้นได้ และโดยส่วนใหญ่แล้วสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะลดค่าแรงตึงผิวของน้ำจาก 72 mN/m เป็น 30 ± 5 mN/m ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ สารลดแรงตึงผิวสามารถละลายอยู่ในตัวทำละลายทั้งชนิดมีขั้วและไม่มีขั้ว เมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวมากขึ้นก็จะไปลดค่าแรงตึงผิวของสารละลาย จนถึงความเข้มข้นหนึ่งที่ทำให้เกิดโครงสร้างที่เรียกว่าไมเซลล์ (micelle) และค่าแรงตึงผิวของสารละลายนั้นจะคงที่ไม่ลดลงไปอีกแม้จะเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลงไปอีกเท่าใดก็ตามดังแสดงในรูปที่ 1.2



รูปที่ 1.2 การเกิดโครงสร้างไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในน้ำเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจนถึงจุด Critical Micelle Concentration (CMC) ก) เป็นภาวะที่ไม่มีสารลดแรงตึงผิว ข) สารลดแรงตึงผิวละลายอยู่ในน้ำโดยหันส่วนที่ไม่ชอบน้ำออกสู่น้ำ ค) Critical Micelle Concentration (CMC) เป็นจุดที่ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มขึ้นจนถึงระดับที่ก่อให้เกิดโครงสร้างไมเซลล์ และ ง) เมื่อเกิดเป็นโครงสร้างไมเซลล์แล้วค่าแรงตึงผิวมีค่าคงที่ไม่ลดลงอีกแม้ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะเพิ่มขึ้นก็ตาม (Gilman, 1993)

ความเข้มข้นที่ทำให้เกิดโครงสร้างไมเซลล์ เรียกว่า Critical Micelle Concentration (CMC) คือ ค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ทำให้สารลดแรงตึงผิวเกิดการรวมตัวเป็นโครงสร้างไมเซลล์ ซึ่งใช้เป็นตัวบ่งถึงประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวได้ โครงสร้างไมเซลล์จะประกอบไปด้วยโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิว 20-200 โมเลกุล ค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิดจะมีค่าต่างกันและขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ (Desai และ Banat, 1997) นอกจากนี้ค่า CMC ยังสามารถบอกโครงสร้างทุติยภูมิของสารลดแรงตึงผิวได้ เช่น ไมเซลล์ไบเลเยอร์ (bilayer) และไมเซลล์เวสสิเคิล (vesicles) เป็นต้น ดังแสดงในรูปที่ 1.3



รูปที่ 1.3 โครงสร้างและการจัดเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Fiechter, 1992)

- ก) โครงสร้างโมโนเมอร์ (monomer) ของแอมฟิฟาทิกโมเลกุล
- ข) โครงสร้างไมเซลล์แบบกลม
- ค) โครงสร้างไมเซลล์แบบแท่ง
- ง) โครงสร้างไมเซลล์แบบเลเยอร์
- จ) โครงสร้างไมเซลล์แบบเวสสิเคิล

การที่จะเกิดการจัดเรียงตัวของโครงสร้างไมเซลล์เป็นแบบใดนั้นนอกจากแรงกระทำระหว่างโมเลกุลแล้วยังขึ้นกับชนิดของสารลดแรงตึงผิวว่ามีโครงสร้างแบบใด เช่น โมเลกุลมีลักษณะเป็นโซ่สายสั้นและส่วนหัวที่มีขั้วใหญ่จะเกิดการจัดเรียงตัวเป็นแบบไมเซลล์ทรงกลม ถ้าส่วนหัวมีขนาดเล็กก็จะรวมตัวเป็นไมเซลล์แบบทรงกระบอก หรือส่วนไม่ชอบน้ำเป็นสายยาวก็จะรวมตัวเกิดเป็นไบเลเยอร์ เป็นต้น ด้วยสมบัติที่หลากหลายของโครงสร้างไมเซลล์จึงสามารถนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไปประยุกต์ใช้ในงานต่างๆ ได้อย่างกว้างขวาง

ค่าที่แสดงถึงประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ นอกจากค่า CMC ที่กล่าวข้างต้นแล้วยังมีอีกหลายค่าได้แก่

1. ค่าแรงตึงผิว (Surface tension)

หมายถึง แรงที่กระทำระหว่างของเหลวและอากาศ ค่าแรงตึงผิวมีหน่วยเป็นมิลลินิวตัน

ต่อเมตร (mN/m) หรือ ดายน์ต่อเซนติเมตร (dyne/cm) ซึ่งค่าแรงตึงผิวของน้ำกลั่นมีค่าเท่ากับ 72 mN/m และสารลดแรงตึงผิวที่ถือว่ามีประสิทธิภาพดีจะทำให้ค่าแรงตึงผิวลดลงต่ำกว่า 35 mN/m (Kosaric, 1993)

2. ค่าแรงตึงผิวระหว่างผิวที่ประจัน (interfacial tension)

หมายถึง แรงที่กระทำระหว่างของเหลวกับของเหลวที่มีเฟสต่างกัน มีหน่วยเป็น mN/m การวัดแรงตึงผิวระหว่างผิวที่ประจันจะวัดระหว่างน้ำและสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น น้ำมัน เฮกซาเดเคน หรือ น้ำมันก๊าด โดยทั่วไปค่าแรงตึงผิวระหว่างผิวที่ประจันของน้ำกับเฮกซาเดเคน มีค่าเท่ากับ 50 mN/m และค่าแรงตึงผิวระหว่างผิวที่ประจันของน้ำกับน้ำมันก๊าดมีค่าเท่ากับ 30-40 mN/m ซึ่งเมื่อเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะสามารถลดแรงตึงผิวที่ประจันลงเหลือ 0.1-1.0 mN/m (Gerson, 1993)

3. การก่อเกิดอิมัลชัน (Emulsification)

คือ ความสามารถในการทำให้น้ำและสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น สารละลายอินทรีย์ น้ำมันปิโตรเลียม และน้ำมันพืชชนิดต่างๆ รวมตัวเป็นเนื้อเดียวกัน ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะทำให้เกิดอิมัลชันระหว่างน้ำกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เป็นผลทำให้น้ำมันมีสภาพเป็นหยดเล็กๆ อยู่ในน้ำ เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวระหว่างน้ำและสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Cooper และ Zajic, 1980) การวัดประสิทธิภาพในการเกิดอิมัลชันอาจทำได้โดยการวัดค่าดัชนีการก่อเกิดอิมัลชัน (emulsion index) คือ การวัดอัตราส่วนระหว่างความสูงของอิมัลชันและความสูงของเหลวในหลอดทั้งหมด เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง (Patel และ Desai, 1997) และอาจวัดความเสถียรของอิมัลชันที่เกิดขึ้นโดยวัดค่าดัชนีการก่อเกิดอิมัลชันในระยะเวลาที่นานออกไป

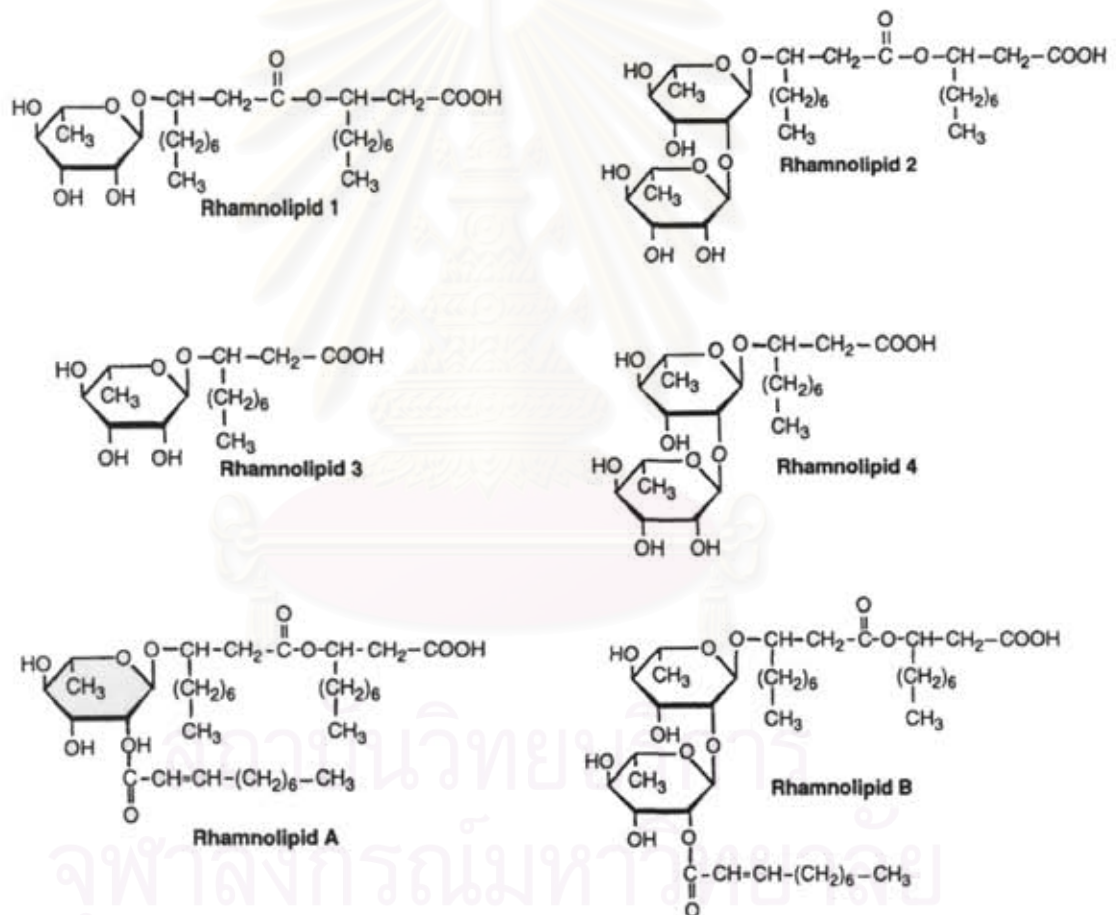
4. ค่าการกระจายตัวของน้ำมัน (oil displacement activity)

เป็นการวัดประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการทำให้แผ่นฟิล์มของน้ำมันบนผิวน้ำเป็นวงใส (clear zone) โดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของพื้นที่วงใส คำนวณหาพื้นที่ตามสูตร πr^2 มีหน่วยเป็นตารางเซนติเมตร โดยกำหนด 1 ตารางเซนติเมตรของการกระจายตัวของน้ำมันดิบ เท่ากับ 1 หน่วย นอกจากการวัดค่าการกระจายตัวของน้ำมันจะทำการวัดในสื่อน้ำใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยากและประหยัดค่าใช้จ่าย และยังเป็นวิธีที่เหมาะสมในการวัดกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว เนื่องจากวิธีนี้ใช้สารปริมาณเล็กน้อยในการวิเคราะห์เพียง 10 ไมโครลิตรเท่านั้น (Morikawa และคณะ, 1993)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดไกลโคลิพิด

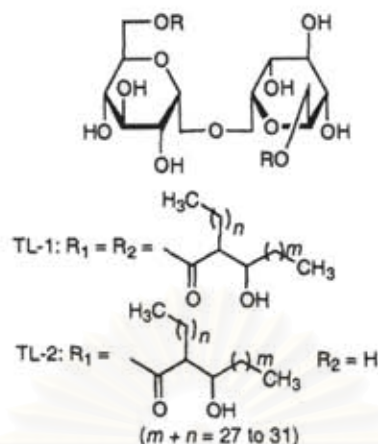
สารลดแรงตึงผิวชนิดไกลโคลิพิดประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต เช่น กลูโคส แมนโนส กาแล็กโตส กรดกลูคูโรนิก แรมโนส เชื่อมต่อกับไขมัน เช่น กรดอะลิฟาติกและหมู่ไฮดรอกซี สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่จัดเป็นไกลโคลิพิด ได้แก่ แรมโนลิพิด ทรีฮาโรลิพิด และโซโฟโรลิพิด

1.1 แรมโนลิพิด (rhamnolipid) เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ประกอบด้วยน้ำตาลแรมโนส 1 หรือ 2 โมเลกุลเชื่อมต่อกับ 1 หรือ 2 โมเลกุลของ β -hydroxydecanoic acid ดังในรูปที่ 1.4 ซึ่งแรมโนลิพิดมีสูตรโครงสร้างต่างกัน 6 แบบที่มีจำนวนแรมโนสและส่วนของ β -hydroxydecanoic acid แตกต่างกัน แรมโนลิพิดเป็นไกลโคลิพิดที่มีการศึกษาวิจัยมากที่สุด ซึ่งการผลิตไกลโคลิพิดที่มีแรมโนสเป็นองค์ประกอบโดย *Pseudomonas aeruginosa*



รูปที่ 1.4 โครงสร้างของแรมโนลิพิด ชนิด R1, R2, R3, R4, A และ B ที่ผลิตโดย *Pseudomonas aeruginosa* (Lang และ Wullbrandt, 1999)

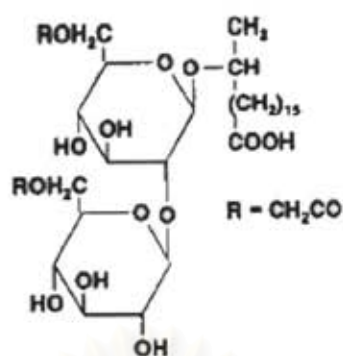
1.2 ทรีฮาโรลิพิด (trehalolipid) โครงสร้างโดยทั่วไปของทรีฮาโรลิพิดประกอบด้วย disaccharide trehalose เชื่อมต่อกับกรดไมโคลิก (mycolic acid) ที่ตำแหน่ง C-6 และ C-6-OH ซึ่งผลิตโดย *Mycobacterium*, *Nocardia* และ *Corynebacterium* sp.



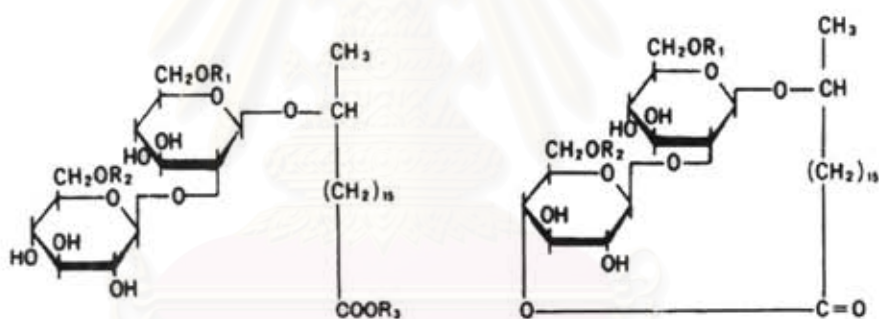
รูปที่ 1.5 โครงสร้างของ Trehalose dimycolate จาก *Rhodococcus erythropolis* (Desai และ Banat, 1997)

ทรีฮาโลลิพิดที่ผลิตจากสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันจะมีขนาดและโครงสร้างของกรดไมโคลิกต่างกัน ซึ่งต่างกันที่จำนวนอะตอมของคาร์บอน และความแรงของประจุของสารทรีฮาโลลิพิดจาก *R. erythropolis* และ *Arthrobacter* sp. ให้ค่าแรงดึงผิวต่ำสุดอยู่ในช่วง 25-40 mN/m และค่าแรงดึงผิวระหว่างสารกับเฮกซาเดกเคนอยู่ในช่วง 1-5 mN/m

1.3 โซโฟโรลิพิด (sophorolipids) เป็นไกลโคลิพิดที่คล้ายกับแรมโนลิพิดผลิตโดยเชื้อจุลินทรีย์พวกยีสต์เป็นส่วนใหญ่ เช่น *Torulopsis bombicala* (Inoue และ Itoh, 1982) และ *T. petrophilium* (Cooper และ Paddock, 1983) *T. apicola* (Tulloch และคณะ, 1967) ประกอบด้วยไดเมอริกโซไฟโรสเชื่อมต่อกับสายยาวของ hydroxy fatty acid ที่ตำแหน่ง C-6 และ C-6' ด้วยพันธะไกลโคซิดิก โซโฟโรลิพิดที่ผลิตได้จากยีสต์ข้างต้น สามารถใช้สารตั้งต้นได้หลากหลายชนิด ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต (กลูโคส ฟรุคโตส ซูโครส แลคโตส) น้ำมันจากพืช น้ำมันจากสัตว์ และสารประกอบพวกอัลเคน เป็นต้น (Kitamoto และคณะ, 2002) Cutler และ Light, 1979 (อ้างอิงใน Desai และ Banat, 1997) รายงานว่า *Candida bogoriensis* ผลิตไกลโคลิพิดที่มีน้ำตาลโซไฟโรสเชื่อมอยู่กับ docosanoic acid diacetate นอกจากนั้นยังมี *T. petrophilium* ที่ผลิตโซไฟโรลิพิดได้โดยใช้สารตั้งต้นที่เป็นสารประกอบพวกอัลเคน น้ำมันพืช (Cooper และ Paddock, 1983) ทั้ง lactonic และ acidic sophorolipids จะให้ค่าแรงดึงผิวระหว่างสารกับเฮกซาเดกเคนจาก 40 mN/m เป็น 5 mN/m และยังคงตัวอยู่ได้เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่างและอุณหภูมิ



รูปที่ 1.6 โครงสร้างของไซโฟโรลิพิดจาก *Torulopsis bombicola* แสดงโตเมอร์ริกไซโฟโรสที่เชื่อมต่อกับสายยาวของ hydroxyl fatty acid (C18) (Desai และ Banat, 1997)



I : $R_1 = R_2 = \text{Ac}$, $R_3 = \text{H}$

Acid-SL : $R_1 = R_2 = R_3 = \text{H}$

Methyl-SL : $R_1 = R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{Me}$

II : $R_1 = R_2 = \text{Ac}$

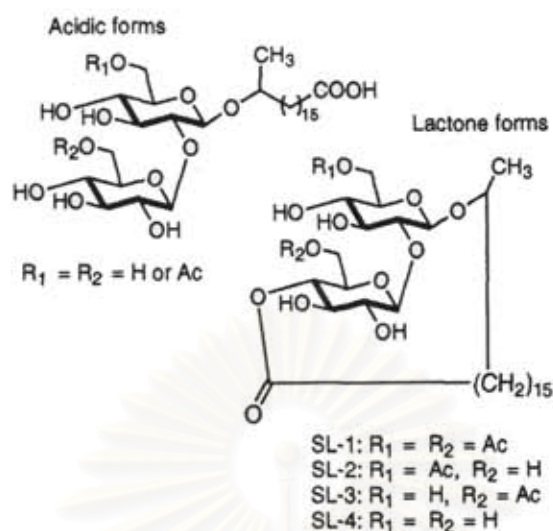
III : $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{Ac}$

รูปที่ 1.7 โครงสร้างของไซโฟโรลิพิดจาก *Torulopsis bombicola* (Inoue และ Itoh, 1982)

I: 17-L-[(2'-O-P-D-glucopyranosyl-3-D-glucopyranosyl)]octadecanoic acid 6',6"-diacetate

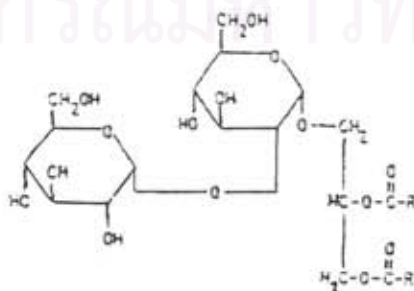
II: 1,4"-lactone of type I

III: 6'-deacetylated derivative of type II



รูปที่ 1.8 โครงสร้างของไซโฟโรลิพิดจาก *Candida bombicola* ซึ่งแสดงโครงสร้างของ lactonic form และ acid form (Kitamoto และคณะ, 2002)

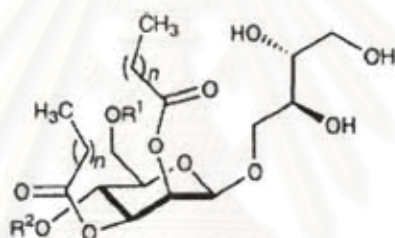
ไดไกลโคซิล ไดกลีเซอไรด์ (diglycosyl diglycerides) เป็นไกลโคลิพิดชนิดที่พบทั่วไปในจุลินทรีย์ มีสูตรโครงสร้างประกอบด้วยไดไกลโคซิลกับไดกลีเซอไรด์ ที่แตกต่างกัน 5 หมู่ คือ แอลฟา-ไดกลูโคซิลไดกลีเซอไรด์ (α -diglycosyldiglyceride) บีตา-ไดกลูโคซิล- (β -diglycosyl-) ไดแมนโนซิล (dimannosyl-) ไดกาแลคโตซิล- (digalactosyl-) และกาแลคโตซิล- ไดกลูโคซิลไดกลีเซอไรด์ (galactosylglucosyldiglycerides) สมบัติของสารไกลโคซิลไดกลีเซอไรด์ ยังไม่ค่อยได้รับการศึกษามากนัก อย่างไรก็ตาม Brundish และคณะ, 1967 (อ้างอิงใน Cooper และ Zajic, 1980) ได้เสนอว่าสารนี้จัดเป็นสารลดแรงตึงผิว เพราะโมเลกุลของสารมีส่วนที่มีขั้วซึ่งชอบน้ำ และมีส่วนไม่มีขั้วเป็นหมู่อัลคิล 2 หมู่ นอกจากนี้ Wichken และ Know (1970) รายงานว่า สารไกลโคซิลไดกลีเซอไรด์ที่แยกได้จาก *Lactobacillus fermenti* สามารถก่อรูปเป็นไมเซลล์ได้



รูปที่ 1.9 โครงสร้างของ α -diglycosyldiglyceride , R = หมู่อัลคิล (Cooper และ Zajic, 1980)

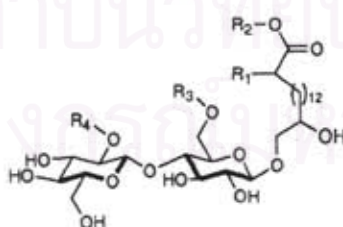
1.5 สารประกอบพอลิแซคคาไรด์ – ลิพิด (Polysaccharide – lipid complex)

Kappeli และ Fiechter (1977) พบว่าสารประกอบพอลิแซคคาไรด์- ลิพิด จับกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เป็นสารตั้งต้นของยีสต์ *Candida tropicalis* ซึ่งสารประกอบเชิงซ้อนนี้แยกได้จากผนังเซลล์ของยีสต์ และพบว่าสามารถก่อเกิดอิมัลชันกับเฮกซาเดเคนและน้ำได้ ในการผลิตสารนี้เมื่อใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนเป็นสารตั้งต้นจะให้ผลผลิตถึง 2.5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์ แต่เมื่อใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้นจะให้ผลผลิตเพียง 0.1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์ ส่วนที่เป็นไขมันของสารประกอบเชิงซ้อนมีทั้งที่เป็นกรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว ส่วนใหญ่มีจำนวนคาร์บอนอะตอม 14 16 และ 18 อะตอม Frautz และคณะ (1986) รายงานว่า *Ustilago maydis* ATCC14826 สามารถผลิต cellobiose lipid ซึ่งเป็นสารประกอบพอลิแซคคาไรด์-ลิพิด ชนิดหนึ่ง โดยใช้น้ำมันมะพร้าวเป็นสารตั้งต้น นอกจากนี้ Kitamoto และคณะ, 2002 ยังรายงานว่ *Pseudozyma (Candida) antarctica* T- 34 สามารถผลิต Mannosylerythritol lipid (MEL)



MEL-A: $R^1 = R^2 = \text{Ac}$
 MEL-B: $R^1 = \text{Ac}, R^2 = \text{H}$
 MEL-C: $R^1 = \text{H}, R^2 = \text{Ac}$
 ($n = 6-10$)

รูปที่ 1.10 โครงสร้างของ Mannosylerythritol lipid (MEL) จาก *Pseudozyma (Candida) antarctica* T- 34 (Kitamoto และคณะ, 2002)



CL-A: $R_1 = \text{OH or H}, R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$
 CL-B: $R_1 = \text{OH or H}, R_2 = \text{H}, R_3 = \text{Ac}$
 $R_4 = \text{O} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}(\text{OH}) \text{---} (\text{CH}_2)_n \text{CH}_3$ ($n = 2 \text{ or } 4$)
 CL-C: $R_1 = \text{OH or H}, R_2 = \text{CH}_3, R_3 = \text{Ac}$
 $R_4 = \text{O} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}(\text{OH}) \text{---} (\text{CH}_2)_n \text{CH}_3$ ($n = 2 \text{ or } 4$)

รูปที่ 1.11 โครงสร้างของ cellobiose lipid จาก *Ustilago maydis* ATCC 14826 (Frautz และคณะ, 1986)

จลนศาสตร์การหมักสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Kinetics of fermentative production)

จลนศาสตร์การหมักสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นมีหลายรูปแบบตามการแปรผันของระบบที่ใช้ในการหมัก ซึ่งสรุปได้ 4 รูปแบบ ดังนี้

1. การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพควบคู่กับการเจริญของเซลล์

(Growth - associated production)

โดยการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นจะควบคู่ไปกับการเจริญของจุลชีพ ดังรูปที่ 1.12 ก ตัวอย่างการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแบบนี้ได้แก่ การผลิตไกลโคลิพิดจาก *Torulopsis bombicola* พบว่าจะเกิดขึ้นในช่วง exponential phase ของการเจริญ โดยมีกลูโคสและน้ำมันจากพืชเป็นแหล่งคาร์บอน (Cooper และ Paddock, 1984)

2. การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในภาวะจำกัดการเจริญ

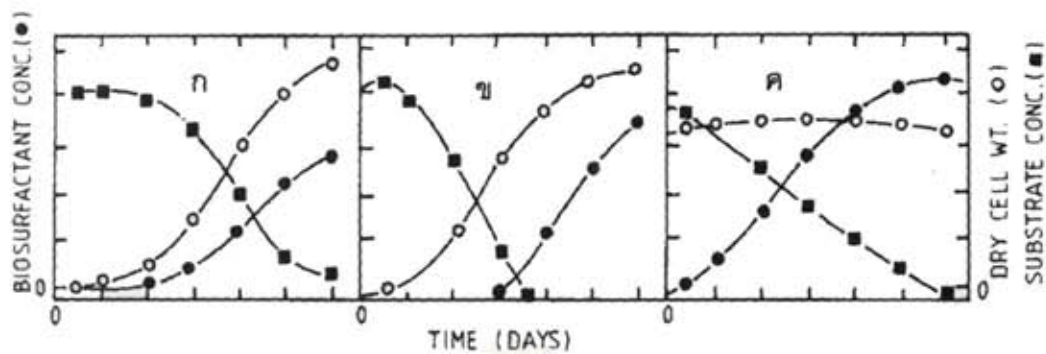
(Growth - limiting conditions)

การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพภายใต้ภาวะเลี้ยงเชื้อที่มีการจำกัดสารตั้งต้น เช่น แหล่งไนโตรเจน โดยเมื่อสารตั้งต้นเหล่านั้นถูกใช้โดยเชื้อจุลินทรีย์หมดลงการผลิตสารลดแรงตึงผิวก็เพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว ดังแสดงในรูปที่ 1.12 ข ตัวอย่างเช่น การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Torulopsis apicola* การผลิตไกลโคลิพิดจาก *Norcadia* sp. SFC-D และการผลิตสารที่มีสมบัติเป็นอิมัลซิไฟเออร์จาก *Candida tropicalis* IIP-4 เมื่อเลี้ยงเชื้อเจริญมาถึงระยะหนึ่งจนการเจริญคงที่ ปริมาณของไนโตรเจนและแร่เหล็กลดลงจนเกือบหมด แล้วจึงมีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Desai และ Banat, 1997)

3. การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในช่วงระยะพักของเซลล์

(Resting cells or immobilized cells)

เป็นภาวะการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้เชื้อที่อยู่ในระยะพักเป็นหัวเชื้อ ในขณะที่เชื้อยังสามารถใช้แหล่งคาร์บอนและสังเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ โดยการเจริญของเชื้อจะคงที่และรักษาระดับอยู่ตลอดเวลาในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ รูปแบบการเจริญแสดงในรูปที่ 1.12 ค ตัวอย่างการผลิตเช่น การผลิตแรมโนลิพิดโดย *Pseudomonas* spp. และ *P.aeruginosa* CFTR-6 (Ramana และ Karanth, 1989) การผลิตไซโฟโรลิพิดโดย *Torulopsis bombicola* (Inoue และ Itoh, 1982) และ *Candida apicola* (Hommel และ Huse, 1993) และการผลิต mannosylerythritol lipid โดย *Candida antarctica* strain T-34 (Kitamoto และคณะ, 1992) เป็นต้น



รูปที่ 1.12 รูปแบบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียต่าง ๆ

- ก) การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพควบคู่กับการเจริญ (Growth – associated production)
- ข) การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพภายใต้ภาวะที่มีการจำกัดการเจริญ (Production under growth limited condition)
- ค) การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้เชื้อในระยะพักหรือเซลล์ตรึง (Production by resting or immobilized cells)

4. การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยมีการเติมสารตั้งต้น (Precursor supplementation)

เป็นการเติมสารตั้งต้นสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อเพิ่มการผลิตสารลดแรงตึงผิว โดยทำให้ผลผลิตมีการเปลี่ยนแปลงทั้งปริมาณและคุณภาพ เช่น การเติมสารประกอบไลโปฟิลิกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ *T. bombicola* (Cooper และ Paddock, 1984) มีผลทำให้มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ 120-150 กรัมต่อลิตร (Lee และ Kim, 1993) ซึ่งมีค่ามากขึ้นจากเดิม เป็นต้น

แหล่งอาหารที่มีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

1. แหล่งคาร์บอน

ความยาวของสายไฮโดรคาร์บอนที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ตัวอย่างเช่น *Corynebacterium hydrocarboclastus* และ *Rhodococcus erythropolis* สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดี เมื่อเจริญบนไฮโดรคาร์บอนสายตรง (n-alkanes) ที่มีจำนวนคาร์บอนอะตอม C12 ถึง C14 และ C12 ถึง C18 ตามลำดับ ในขณะที่ *Acinetobacter* sp. ต้องการแหล่งคาร์บอนที่เป็น cyclic และ aliphatic carbon เพื่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และหากความยาวของ n-alkanes เพิ่มขึ้นจาก C10 ถึง C17 ความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะลดลง (Ristau และ Wagner, 1983; Rosenberg และ

คณะ, 1979) แหล่งคาร์บอนบางชนิดสามารถชักนำให้จุลินทรีย์ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เช่น กรดไขมัน สารประกอบไฮโดรคาร์บอน หรือกลีเซอรอล จะชักนำให้ *Torulopsis magnoliae* ผลิตไซโทโวลินได้มากขึ้น (Tulloch และคณะ, 1962) ในขณะเดียวกันแหล่งคาร์บอนบางชนิดอาจมีผลยับยั้งกระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ เช่น การผลิตไลโปแซนจาก *Candida lipolytica* จะให้ผลผลิตต่ำเมื่อใช้กลูโคส อะซิเตต และกรดไตรคาร์บอกซิลิกเป็นแหล่งคาร์บอน (Cirigliano และ Carman, 1988)

2. แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนมีความสำคัญต่อเมตาบอลิซึมของเซลล์รวมถึงการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วย แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและชนิดของจุลินทรีย์ Cooper และ Paddock (1984) ได้ทดลองการผลิตไกลโคลิพิดโดย *Torulopsis bombicola* พบว่า $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์สูงสุด 10.14 g/l และให้ค่าแรงตึงผิว 34 mN/m แต่เมื่อใช้ NH_4Cl เป็นแหล่งไนโตรเจน จะให้ค่าแรงตึงผิวต่ำสุดที่ 31 mN/m เป็นต้น

นอกจากนี้ปริมาณไนโตรเจนที่ใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะต้องได้สัดส่วนกับคาร์บอน คือต้องศึกษาหาค่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจน (C/N ratio) ให้เหมาะสม พบว่าถ้าอัตราส่วนนี้สูงขึ้น การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะเพิ่มมากขึ้น (Ristau และ Wagner, 1983)

การจำกัดปริมาณไนโตรเจนไม่เพียงแต่จะเป็นสาเหตุให้มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพออกมาได้มากกว่าปกติเท่านั้น เช่น การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *C. tropicalis* IIP-4 (Desai และ Banat, 1997) แต่ยังสามารถเปลี่ยนองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตขึ้นอีกด้วย เช่น ในการเจริญของ *R. erythopolis* ในภาวะปกติเชื่อมีการผลิตทริฮาโลสโครีโนมายโคเลทที่ไร้ประจุ ในขณะที่จำกัดปริมาณไนโตรเจนเชื่อจะมีการผลิตทริฮาโลสโคเตตระเอสเทอร์ที่มีประจุลบขึ้นแทน (Ristau และ Wagner, 1983 ; Kosaric, 1993)

3. แหล่งเกลือแร่และวิตามิน

เกลือแร่และวิตามิน เป็นปัจจัยหนึ่งที่จุลินทรีย์ต้องการใช้เพื่อการเจริญเติบโต นอกเหนือจากแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน นอกจากนี้ยังมีผลในการกระตุ้นหรือลดการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ Guerra- Santos และคณะ (1986) แสดงให้เห็นว่าการจำกัดปริมาณของ Fe^{2+} Mg^{2+} หรือ Ca^{2+} จะมีผลกระตุ้นการผลิตแรมโนลิพิดได้เพิ่มมากขึ้นโดย *Pseudomonas* sp. ในทางตรง

ข้ามการผลิตเซอร์แฟกตินโดย *B. subtilis* พบว่าสามารถถูกกระตุ้นได้โดยการเติมเหล็กและเกลือแมงกานีสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Cooper และคณะ, 1981)

ปัจจัยทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

1. ความเป็นกรด-ด่าง

การเจริญของจุลินทรีย์หรือสิ่งมีชีวิตต่างๆ ถูกควบคุมโดยกระบวนการเมตาบอลิซึมมีเอนไซม์เป็นตัวสำคัญและการทำงานของเอนไซม์จะได้รับผลกระทบจากความเป็นกรดต่างองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยสำคัญอันหนึ่งที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่างในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากจุลินทรีย์จะมีการย่อยสลายสารอาหารเพื่อเป็นแหล่งพลังงาน ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีองค์ประกอบที่เป็นโปรตีน และไนโตรเจน เมื่อถูกย่อยสลายจะปลดปล่อยสารที่เป็นแอมโมเนีย หรือ อัดคาโลนอื่นๆ ออกมา แต่ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีองค์ประกอบที่เป็นคาร์โบไฮเดรต เมื่อถูกย่อยสลายจะขับสารที่เป็นกรดอินทรีย์ออกมา ซึ่งสิ่งที่ขับออกมานี้ จะทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเปลี่ยนแปลงไป จนอยู่ในสภาพที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ และมีความสำคัญในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของจุลินทรีย์

2. อุณหภูมิ

พบว่าอุณหภูมิสามารถเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตขึ้นได้คล้ายกับแหล่งคาร์บอน อุณหภูมิมีผลกระทบต่อกระบวนการสร้างไขมัน นอกเหนือจากระดับของความไม่อิ่มตัว ตัวอย่างเช่น มีผลเปลี่ยนแปลงความยาวของสารกรดไขมัน มีผลต่อระดับของกิ่งของกรดไขมัน (fatty acid branching) และ cyclization มีผลต่อการกระจายตัวและความแตกต่างของสัดส่วนระหว่างไกลโคลิพิด และฟอสโฟลิพิดที่เกิดเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ โดยอุณหภูมิมีผลต่อปริมาณของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *A. parvius* ATCC 19558, *Rhodococcus erythropolis* และ *Pseudomonas* sp. DSM-2874 (Guerra- Santos และคณะ 1986 ; Kosaric และคณะ, 1984)

3. การให้อากาศ

การให้อากาศ การกวน เป็นการเพิ่มปริมาณออกซิเจนให้กับจุลินทรีย์เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมทางหนึ่ง นอกจากนี้ยังเป็นการช่วยให้จุลินทรีย์อยู่ในสภาพแขวนลอยสามารถดูดซึมปริมาณออกซิเจนเพื่อนำไปใช้ได้มากขึ้น ออกซิเจนที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้นั้นต้องอยู่ในรูปของโมเลกุลออกซิเจนที่ละลายหรืออยู่ในรูปของเหลว การละลายของออกซิเจนในน้ำมีปริมาณจำกัด ออกซิเจนสามารถละลายในสื่อกลางที่เป็นน้ำได้เพียงไม่กี่มิลลิกรัมต่อลิตร

ด้วยอากาศที่ความดัน 1 บรรยากาศ นับว่าน้อยมากเมื่อเทียบกับปริมาณออกซิเจนที่จุลินทรีย์ต้องการ ดังนั้นจำเป็นต้องทำให้มีออกซิเจนละลายเข้าไปในอาหารเหลวอยู่ตลอดเวลาโดยการถ่ายเทจากอากาศ ซึ่งช่วยให้จุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศเจริญได้ด้วยความหนาแน่นสูงภายใต้ภาวะที่เป็นอันหนึ่งอันเดียวกัน ดังนั้นจะเห็นว่าในขั้นตอนของกระบวนการหมักจึงต้องมีการให้อากาศตลอดเวลา Papanikolaou และคณะ (2002) พบว่าอัตราการถ่ายเทอากาศเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญสำหรับการผลิต Single cell oil ของยีสต์ *Y. lipolytica* พบว่าที่ความอิมตัวของออกซิเจน 5-15% จะให้ผลผลิตของไขมันเท่ากับ 3 g/l ในขณะที่ความอิมตัวของออกซิเจนสูงถึง 60-70% จะไม่สามารถผลิตไขมันได้

ประโยชน์และการประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ปัจจุบันมีผู้สนใจนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไปใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทำหน้าที่ได้หลายประการ ได้แก่

1. สารก่อเกิดอิมัลชัน (emulsification) เป็นสารที่ช่วยทำให้เกิดอิมัลชันหรือทำให้สารที่มีขั้วต่างกันผสมกันได้ดีขึ้น
2. สารแยกเฟส (phase separation) เป็นสารที่ช่วยแยกเฟสสองเฟสที่ต่างกันออกจากกัน
3. สารเปียก (wetting agent) เป็นสารที่ช่วยให้มีความเปียกชื้นอยู่เสมอ
4. สารก่อฟอง (foaming agent) เป็นสารที่ช่วยทำให้เกิดฟองในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง
5. สารช่วยเพิ่มการละลาย (solubilization) เป็นสารที่ช่วยทำให้สารบางชนิดเกิดการละลายได้ดีขึ้น
6. สารลดการเกิดสนิม (corrosion-inhibition) เป็นสารที่ช่วยดูดซับความชื้นยับยั้งการกัดกร่อนที่เกิดจากสนิม
7. สารลดความหนืด (viscosity-reduction)

สารลดแรงตึงผิว (surfactant) ถูกใช้อย่างแพร่หลายทั้งในอุตสาหกรรมปิโตรเลียม สิ่งทอ เครื่องจักร กระจก พอลิเมอร์ พลาสติก ยา เครื่องสำอาง และอาหาร เป็นต้น สารลดแรงตึงผิวที่ใช้ในอุตสาหกรรมดังกล่าวมีอยู่มากมายหลายชนิด แต่ก็ยังคงมีการพัฒนาเพื่อให้ได้สารใหม่ที่มีประสิทธิภาพมากกว่าเดิม (Cameotra และ Makkar, 1998) ในปี 1997 อุตสาหกรรมการผลิตสารลดแรงตึงผิวมีมูลค่ามากกว่า 9 พันล้านเหรียญอเมริกาต่อปี (Desai และ Banat, 1997) สารลดแรงตึงผิวเหล่านี้ส่วนใหญ่แล้วสังเคราะห์ขึ้นโดยผ่านกระบวนการทางเคมีโดยใช้ปิโตรเลียมเป็นสาร

ตั้งต้น มีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ย่อยสลายทางธรรมชาติได้ยาก และกระบวนการในการผลิตยังเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย ทำให้มีการออกกฎหมายให้ใช้สารลดแรงตึงผิวที่เข้ากันได้และไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม (Maier และ Soberon- Chavez, 2000) ต่อมาสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจึงเป็นที่สนใจมากขึ้น เนื่องจากมันสามารถย่อยสลายเองได้ในธรรมชาติ มีความเป็นพิษต่ำ สามารถเข้ากันได้กับสิ่งแวดล้อม อีกทั้งสามารถผลิตจากสารตั้งต้นที่มีราคาถูกและมาจากทรัพยากรที่นำกลับมาใช้ใหม่ได้ (Mercade และคณะ, 1993; Babu และคณะ, 1996; Ishigami, 1997; Daniel และคณะ, 1998)

ในอุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งนิยมใช้สารลดแรงตึงผิวในอาหารต่างๆ เช่น จำพวกเครื่องดื่ม ใช้เป็นสารช่วยในการละลาย ช่วยทำให้อาหารนำรับประทานด้วยการทำให้แวววาว อาหารพวกของอบโดยช่วยให้เป็นเนื้อเดียวกันจากคุณสมบัติเป็นอิมัลซิไฟเออร์ อาหารพวกที่มีนม ไข่ และไขมันเป็นองค์ประกอบ จะช่วยทำให้เกิดเจลลาติน ทำให้เกิดการรวมตัวกัน ช่วยทำให้เกิดโฟม หรือเป็น fat stabilizer อาหารพวกซูปและน้ำเกรวี่ จะช่วยเพิ่มความหนืด เป็นอิมัลซิไฟเออร์ดูดซับน้ำ รวมทั้งพวกที่ใช้ตกแต่งอาหารเช่น ทอปปิงต่างๆ จากคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวข้างต้น ทำให้สารลดแรงตึงผิวเป็นที่แพร่หลาย ตารางที่ 1.1 จะแสดงตัวอย่างของคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวที่ใช้ในอาหารชนิดต่างๆ และต่อไปนี้เป็นตัวอย่างที่ใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์ในอาหาร เช่น lecithin และ lecithin derivative, glycerol fatty acid ester, hydroxylic acid และ fatty acid ester, lactylate fatty acid ester, polyglycerol fatty acid ester, ethylene หรือ propylene glycol fatty acid ester, ethoxylated derivative of monoglycerides, sorbitan fatty acid ester และ miscellaneous derivative ในประเทศญี่ปุ่นอนุญาตให้ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากจุลินทรีย์กับอาหารได้ เช่น sophorolipid โดยใช้เป็น additive ในแป้งเพื่อเพิ่มอายุของการวางขาย (shelf life) ของขนมอบ (Fiechter, 1992 และ Kosaric, 1993)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพส่วนใหญ่ที่นำมาใช้อย่างแพร่หลายทั้งในอุตสาหกรรมและบ้านเรือนเป็นสารประเภทไกลโคลิพิด เช่น โซโฟโรลิพิด มีสมบัติเป็นอิมัลซิไฟเออร์ ใช้เป็นส่วนประกอบในเครื่องอุปโภคและบริโภค ซึ่งถือว่ามีค่าสำคัญต่อมนุษย์มากที่สุด ไกลโคลิพิดเป็นสารธรรมชาติที่มักพบได้ในผนังเซลล์ของจุลินทรีย์จำพวกยีสต์และรา ดังนั้นการนำจุลินทรีย์เหล่านี้มาผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระดับอุตสาหกรรมจึงเป็นที่สนใจมากขึ้น เนื่องจากความหลากหลายของสายพันธุ์ สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้โดยใช้แหล่งอาหารได้หลากหลาย หาได้ง่าย ราคาถูก รวมถึงแหล่งอาหารที่จากวัสดุเหลือใช้จากเกษตรกรรม เช่น คาร์โบไฮเดรต กรดไขมันและ น้ำมันจากพืชผัก ดังแสดงในตารางที่ 1.3 ซึ่งเป็นผลดีและเป็นทางเลือกหนึ่งในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้ได้ในราคาต้นทุนการผลิตต่ำ รวมทั้งจะต้องพัฒนาคุณภาพให้ดีขึ้นเรื่อย ๆ โดยการหาแหล่งอาหาร ภาวะการเลี้ยงเชื้อ และปัจจัยต่าง ๆ ที่

เกี่ยวข้องกับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้เหมาะสมเพื่อให้ได้ผลผลิตสูงสุดที่จะนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่อไป



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1.1 หน้าที่ต่างๆของสารลดแรงตึงผิวที่ใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์ในอาหารชนิดต่างๆ
(Kosaric, 1993)

Functions	Product examples
Emulsification (water-in-oil)	Margarine
Emulsification (oil-in-water)	Mayonnaise
Aeration	Whipped toppings
Improvement of whippability	Whipped toppings
Inhibition of fat crystallization	Candy
Softening	Candy
Antistaling	Bread
Dough conditioning	Bread dough
Improvement of loaf volume	Bread
Reduction of shortening requirements	Bread
Pan release agent	Yeast-leavened and other dough and batter products
Fat stabilizer	Food oil
Antispattering agent	Margarine and frying oils
Antisticking agent	Caramel candy
Protective coating	Fresh fruits and vegetables
Surfactant	Molasses
Viscosity control	Molten chocolate
Improvement of solubility	Instant drinks
Starch complexation	Instant potatoes
Humectant	Cake icing
Plasticizer	Cake icing
Defoaming agent	Sugar production
Stabilization of flavor oils	Flavor emulsification

ตารางที่ 1.2 ตัวอย่างสิทธิบัตรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตด้วยจุลินทรีย์ (Kosaric, 1993)

Product	Microorganism	Patent
Fructose lipids	<i>Arthrobacter paraffineus</i> ATCC 15591	Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd. DE 2,440,942 (1975)
Spiculisporic acid	<i>Penicillium spiculisporum</i> ATCC 16071	Kobayashi, Y., Tabuchi, T., US 3,625,826 (1971)
Biosurfactant	<i>Thiobacillus, Bacillus,</i> <i>Nocardia, Pseudomonas</i>	Philips Petroleum Co. US 2,907,389 (1959) US 3,185,216 (1965)
Emulsan	<i>Acinetobacter sp.</i> ATCC 31012	Petroleum Fermentation N.V. US 4,311,829 (1982) US 4,311,832 (1965)
Sophorose lipid	<i>Torulopsis magnoliae</i> <i>Torulopsis apicola</i>	Spencer, J.F.T., Tullich, A.P., Gorin, P.A.J. US 3,205,150 (1965)
Surfactin	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21331	Takeda Chemical Ind. Ltd. US 3,687,926 (1972)
Biosurfactant	<i>Candida sp.</i>	VEB Petri-chemisches
Biosurfactant	<i>Candida, Pichia, Nocardia,</i> <i>Mycobacterium,</i> <i>Pseudomonas</i>	Kombinant Schedt, DD 139,069 (1979) Wintershall AG, DE 2,401,267 (1975)
Trehalose lipid	<i>Rhodococcus erythropolis</i> DSM 43215	DE 2,843,685 (1980) DE 2,911,016 (1980)
Biosurfactant	<i>Corynebacterium salvinum</i>	Wintershall AG, DE 3,248,167 (1984) Zajic, J.E., Gerson, R.K. US 4,355,109 (1982)

ตารางที่ 1.3 สารลดแรงตึงผิวภาพที่ผลิตได้จากยีสต์ในแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน

จุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวภาพ	ประเภทของสารลดแรงตึงผิวภาพ	อ้างอิง
<i>Torulopsis bombicola</i> ATCC 22214	คาร์โบไฮเดรต และ น้ำมันจากพืชผัก	โกลโคลิพิด	Cooper และ Paddock (1984)
<i>Candida antarctica</i> T-34	กรดโอเลอิก และ Rapeseed oil	(Mannosylethritol)	Kitamoto และ คณะ (1990b)
<i>Candida antarctica</i> T-34	น้ำมันถั่วเหลือง (soybean oil)	(Mannosylethritol)	Kitamoto และ คณะ (1993)
<i>Candida bombicola</i>	ไขมันจากสัตว์	ไซโฟโรลิพิด	Deshpande และ Daniels (1995)
<i>Candida bombicola</i>	น้ำมันดอกทานตะวัน (hexadecane)	ไซโฟโรลิพิด	Mccaffrey และ Cooper (1995)
<i>Candida bombicola</i>	Canola oil (มีกลูโคสและกาแลคโตส)	ไซโฟโรลิพิด	Zhou และ Kosaric (1995)
<i>Candida</i> sp. SY 16	น้ำมันถั่วเหลือง (soybean oil)	(Mannosylethritol)	Kim และ คณะ (1999)
<i>Candida antarctica</i> KCTC 7804			
<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214	กรดโอเลอิก และ Rapeseed oil	ไซโฟโรลิพิด	Rau และ Hammen (2001)
<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214	Lipophilic carbon	ไซโฟโรลิพิด	Cavalero และ Cooper (2003)
<i>Candida ishiwadae</i>	น้ำมันถั่วเหลือง (soybean oil)	(Monoacylglycerols)	Thanomsab และ คณะ (2004)

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

1. อุปกรณ์

- เครื่องวัดแรงตึงผิว (Ring Tensiometer) รุ่น K6 ของบริษัท Kruss, Germany
- เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) รุ่น Pro star ของบริษัท Varian, U.S.A
- คอลัมน์ C18- AR Cosmosil 5 μ m, 120 $^{\circ}$ A ขนาด 4.6 x 150 มม. ของบริษัท Water
- กล้องจุลทรรศน์ชนิด 2 ตา (Biocular compound microscope) รุ่น BH-2 ของบริษัท Olympus, Japan
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วควบคุมอุณหภูมิ (High - performance centrifuge) รุ่น Avanti[®] J-30I ของบริษัท Beckman Coulter, U.S.A
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge) รุ่น KUBOTA 3700 ของบริษัท Kubota Corporation, Japan
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge) รุ่น KUBOTA 6500 ของบริษัท Kubota Corporation, Japan
- เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Rotary vacuum evaporator) รุ่น N-N ของบริษัท Eyela, Japan
- เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Centrifuge evaporator) รุ่น R-300 ของบริษัท BUCHI, Switzerland
- เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Centrifuge evaporator) รุ่น eppendorf concentrator 5301 ของบริษัท Modotech ,Germany
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys ของบริษัท Thermo Spectronic, U.S.A
- ตู้เพิ่มความดันไอระเหยแบบอัตโนมัติ (Autoclave) รุ่น SS-325 ของบริษัท Tomy, Japan
- เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) รุ่น Innova™ 4300 ของบริษัท New Brunswick Scientific, U.S.A

- ตู้อบ (Hot air oven) รุ่น UE 600 ของบริษัท Memmert, Germany
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น BE 800 ของบริษัท Memmert, Germany
- 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, U.S.A
- เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) รุ่น K-550 GE ของบริษัท Scientific Industries, U.S.A
- เครื่องอุ่นสารละลาย (Dry-block heater) รุ่น TDB-120 ของบริษัท Biosan, Korea
- ไมโครปิเปต (Micropipette) รุ่น P10, P20, P100, P200, P1000 และ P5000 ของบริษัท Gilson, France



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. เคมีภัณฑ์

- สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A
- สารสกัดจากข้าวมอลต์ (Malt extract) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A
- แบคโตเปปโตน (Bactopeptone) บริษัท Difco Laboratories, U.S.A
- กลูโคส ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- กาแลคโตส ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A
- น้ำตาลทราย (ซูโครส) ของบริษัทน้ำตาลทรายมิตรผล จำกัด
- แบคโตอะการ์ (Bacto agar) บริษัท Difco Laboratories, U.S.A
- ไทรทอน เอ็กซ์-100 (Triton X-100) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- สารเคมีขจัดคราบน้ำมันเคมีเทคนิค 307 (Chemtec 307 dispersant) ของกรมวิทยาศาสตร์ทหารเรือ กองทัพเรือ ประเทศไทย
- น้ำมันดิบเมอร์บานชนิดเบา (Murban light crude-oil) จากบริษัทไทยออยส์จำกัด ประเทศไทย
- น้ำมันถั่วเหลือง บริษัททรกตอินดัสตรีส์ จำกัด ประเทศไทย
- น้ำมันปาล์ม บริษัททรกตอินดัสตรีส์ จำกัด ประเทศไทย
- น้ำมันรำข้าว บริษัทอมรชัย จำกัด ประเทศไทย
- น้ำมันมะกอก บริษัทอริโฮส เด อิบาร์รา เอส เอ ประเทศสเปน
- น้ำมันดอกคำฝอย บริษัทเซซาฮาล เอส เอ กัวดาลาฮารา ฮาล ประเทศเม็กซิโก
- น้ำมันคาโนลา บริษัทไซม์ดาร์บี เอ็ดมิเบิล โปรดักส์ ลิมิเตด ประเทศสิงคโปร์
- น้ำมันงา ตรากล้วยไม้ จังหวัดแม่ฮ่องสอน ประเทศไทย
- น้ำมันเมล็ดฝ้าย บริษัทอุตสาหกรรมวิวัฒน์ จำกัด ประเทศไทย
- น้ำมันสลัด บริษัทอุตสาหกรรมวิวัฒน์ จำกัด ประเทศไทย
- น้ำมันใจใจป่า ประเทศไทย
- พาราฟินออย (Paraffin oil) ของบริษัท Carlo Erba, Italy
- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท BDH Laboratory Supplies, England
- แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- โพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) E.Merck, Darmstadt, Germany
- โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) ของบริษัท Ajax Finechem, Australia
- ทริสมาเบส (Trisma base; Tris[hydroxymethyl] aminomethane)($C_4H_{11}NO_3$) ของบริษัท Sigma, U.S.A
- ทริสไฮโดรคลอไรด์ (Tris HCl) ของบริษัท Sigma, U.S.A

- คลอโรฟอร์ม (Chloroform) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- เมทานอล (Methanol) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- เอทานอล (Ethanol) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- เฮกเซน (Hexane) (C_6H_{14}) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (Concentration HCl) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- แอลฟา-แนฟทอล (α -naphthol) ของบริษัท Fluka, Switzerland
- กรดอะซิติก (acetic acid) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- กรดซัลฟูริก (sulfuric acid) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- เบนซีน (benzene) ของบริษัท J.T.Baker, U.S.A
- กรดบอริก (Boric acid) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- โดดีเคน (Dodecane) ของบริษัท Acros Organics, U.S.A
- ไสโคลเฮกเซน (Cyclohexane) ของบริษัท May & Baker, England
- ไกซีน (Xylene) ของบริษัท Mallinckrodt Chemical Works, U.S.A
- เฮกซาเดเคน (n-hexadecane) ของบริษัท Acros Organics, U.S.A
- ฟีนอล (Phenol) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- SDS (Sodium dodecyl sulfate), ($C_{12}H_{25}OSO_3Na$) ของบริษัท Nacalai tesque, Japan
- เอทิล อะซิเตต (Ethyl acetate) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- อะซิโตรไนไตรท์ (Acetonitrile) HPLC grade ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- น้ำ HPLC grade ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- กรดไตรฟลูออโรอะซิติก (Trifluoroacetic acid) HPLC grade ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- เฮปเทน (Heptane) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- เอทิล โอลิเอต (Ethyl oleate) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- ไอโซโพรพิล ไมริสเตท (Isopropyl myristate) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- ดีคานอล (Decanol) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- ไอโอดีนชนิดเกล็ด ของบริษัท Univar, U.S.A

- กระดาษกรองขนาด (Nylon membrane) ขนาด 47 มม. 0.45 ไมครอน ของบริษัท Whatman, U.S.A
- กระดาษกรองขนาด (Cellulose acetate membrane) ขนาด 47 มม. 0.45 ไมครอน ของบริษัท Whatman, U.S.A
- แผ่นซิลิกาเจล 60 ขนาด 20x20 ซม.,หนา 0.2 มม. (TLC silica gel 60, 0.2mm.) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- แผ่นซิลิกาเจล 60 ขนาด 20x20 ซม., หนา 2 มม. (PLC silica gel 60, 2mm.) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany

3. วิธีดำเนินการทดลอง

ในปีที่ 1 ได้ทำการคัดเลือกยีสต์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแหล่งต่างๆ สามารถแยกยีสต์สายพันธุ์ PY1 จากอาหารหมักคองพื้นบ้านของประเทศไทย จากอำเภอพนัสนิคม จังหวัดชลบุรี มีสามารถสูงสุดในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เมื่อจำแนกสายพันธุ์โดยการศึกษาลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยา การทดสอบสมบัติของกระบวนการเมตาบอลิซึมหรือสมบัติทางชีวเคมี การบ่งชี้ชนิดของราในระดับสปีชีส์โดยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ประมวลรหัสของตำแหน่ง ITS พบว่าเป็น *Pichia anomala* และ *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี 4% น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน และ 0.4% NaNO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด และเมื่อใช้อาหารปรับปรุงสูตรที่ประกอบด้วย 10.67% น้ำมันถั่วเหลือง และ 5.33% กลูโคส ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 ° ซ ในระดับขวดเขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน จะให้ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวเพิ่มเป็น 0.95 กรัมต่อลิตร สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มีค่าแรงตึงผิวต่ำสุด 33 mN/m และค่าการกระจายน้ำมัน เท่ากับ 75.39cm^2 การศึกษาการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอาหารเหลวกำหนดสูตรของ *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 พบว่าเชื้อยีสต์สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพควบคู่ไปกับการเจริญของเชื้อ

3.1 วิธีดำเนินการทดลองในปีที่ 2

3.1.1 การผลิตและการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดเดียวซึ่งประกอบด้วย 0.02% KH_2PO_4 0.02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1% สารสกัดยีสต์ 0.4% NaNO_3 และ 4% น้ำมันถั่วเหลือง หรือ 4% น้ำตาลกลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 ที่ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 ° ซ ในระดับขวดเขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที

เป็นเวลา 7 วัน นอกจากนี้ยังทดลองเลี้ยงเชื้อโดยใช้แหล่งคาร์บอน 2 ชนิด โดยมีอาหารปรับปรุงสูตรที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ประกอบด้วย $0.02\% \text{KH}_2\text{PO}_4$ $0.02\% \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3% สารสกัดยีสต์ 0.4% NaNO_3 10.67% น้ำมันถั่วเหลือง และ 5.33% กลูโคส (อัตราส่วน 2:1) ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในระดับขวดเขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน

นำน้ำเลี้ยงเชื้อไปปั่นแยกเซลล์ออก ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่ 4°C ด้วยความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำส่วนน้ำใสมาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต อัตราส่วน 1:2 โดยใช้กรวยแยก ทำการสกัดซ้ำ 3 ครั้ง นำส่วนล่างของสารละลายมาระเหยด้วยเครื่อง evaporator ระเหยแห้งภายใต้ภาวะสุญญากาศ ควบคุมอุณหภูมิที่ 40°C แล้วนำบางส่วนของสารที่ได้มาทดสอบสมบัติการกระจายน้ำมัน นำสารไปทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธีโครมาโตกราฟีต่อไป

3.1.2 การเตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโตกราฟี

3.1.2.1 การเตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์ด้วย analytical Thin-Layer Chromatography

ในการทดลองใช้แผ่นซิลิกาเจล 60 (บริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany ขนาด 20×20 ซม. หนา 0.2 มม.) ใช้เป็นเฟสคงที่ โดยมีสารละลายคลอโรฟอร์ม ต่อ เอทานอล ต่อ น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 65 : 25 : 4 เป็นเฟสเคลื่อนที่ นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เตรียมได้จากข้อ 3.1.1 มาจุดบนแผ่น TLC ปริมาตร $20 \mu\text{l}$ แล้วนำไปใส่ในภาชนะปิดที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่ 120 ml ที่ทิ้งไว้ประมาณ 1-2 ซม. จนเฟสเคลื่อนที่ เคลื่อนที่ไปจนเกือบสุดแผ่นจากนั้นนำแผ่น TLC มาฝังให้เฟสเคลื่อนที่ระเหยจนแห้ง จึงนำมาตรวจผล โดยนำไปอบด้วยไอของไอโอดีนในกล่องพลาสติกปิดสนิท (หรือทำการทดสอบสารประกอบคาร์โบไฮเดรตด้วยมอร์ริส รีเอเจนต์) ที่ทิ้งไว้ประมาณ 15-20 นาที เปิดฝากล่องแล้วทำเครื่องหมายบริเวณที่มีสีน้ำตาลเข้ม (หรือสีเขียวจากการทดสอบด้วยมอร์ริส รีเอเจนต์) ที่ทิ้งไว้ข้ามคืน เพื่อให้ไอโอดีนและมอร์ริส รีเอเจนต์ระเหยหมด ชุดซิลิกาเจล 60 บริเวณที่ทำเครื่องหมายไว้ เพื่อนำมาสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยสารละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ และทดสอบสมบัติการกระจายน้ำมัน

3.1.2.2 การเตรียมสารให้บริสุทธิ์ด้วย preparative Thin-Layer Chromatography

วิธีการทดลองมีขั้นตอนคล้ายกับการวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในข้อ 3.1.2.1 แต่จะใช้แผ่นซิลิกา 60 ที่มีความหนา 2 มม. ใช้สารที่สกัดได้เข้มข้น $10\text{-}20 \text{ mg/ml}$ ปริมาตร

1 ml จุดเป็นเส้นตรงบนแผ่น TLC โดยสารบริสุทธิ์ สกัดแยกสารลดแรงดึงผิวออกจากซิลิกาเจล 60 ด้วยสารละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ แล้วนำไประเหยแห้งโดยเครื่อง evaporator ระเหยแห้งภายใต้ภาวะสูญญากาศ ทดสอบการกระจายน้ำมัน เก็บสารที่สกัดได้นี้ ไปวิเคราะห์ด้วย HPLC ต่อไป

3.1.2.3 การวิเคราะห์สารบริสุทธิ์โดยวิธี HPLC

นำสารที่ทำบริสุทธิ์โดยวิธี preparative TLC จากข้อ 3.1.2.2 ละลายในสารละลาย 100% อะซิโตนไทรทรี เขย่าจนสารละลายจนหมด (ซึ่งในการทดลองได้ทำการเปรียบเทียบกับสาร มาตรฐานโซไฟโรลิติด) นำไปวิเคราะห์โดยวิธี HPLC ใช้คอลัมน์ C18- AR Cosmosil 5 μm , 120 $^{\circ}\text{A}$ ขนาด 4.6 x 150 มม. ของบริษัท Water มิลิเนียร์เกรดเดียนท์ 0-100% ของตัวทำละลาย B ใน A โดยตัวพา A คือ 10% อะซิโตนไทรทรี + 0.1% กรดไตรฟลูออโรอะซิติก (TFA) และตัวพา B คือ 100% อะซิโตนไทรทรี + 0.1% กรดไตรฟลูออโรอะซิติก (TFA) โดยมีโปรแกรมของลิเนียร์เกรดเดียนท์ดังนี้

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 ตรวจผลด้วยเครื่องตรวจวัดแสงยูวี (UV-Detector) ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร

จากนั้นเก็บลำดับส่วนตัวอย่างที่ได้แต่ละฟีก ไประเหยแห้งด้วยเครื่อง (centrifuge evaporator) เติม 1 โมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเป็นกรดต่าง เท่ากับ 8 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร แล้วนำไปทดสอบสมบัติการกระจายน้ำมัน เพื่อเก็บลำดับส่วนที่มีค่าการกระจายน้ำมันสูงไว้ทดสอบต่อไป

3.1.3 วิเคราะห์โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

3.1.3.1 การวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธี

แมสสเปกโตรเมทรี (Liquid chromatography-mass spectrometry: LC-MS)

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี HPLC โดยเลือกลำดับส่วนตัวอย่าง ณ Retention Time ที่มีค่าการกระจายน้ำมันมาก และมีปริมาณมากพอ มาวิเคราะห์ด้วยวิธี LC-MS ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.2 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธี

นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR)

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี HPLC โดยเลือกลำดับส่วนตัวอย่าง ณ Retention Time ที่มีค่าการกระจายน้ำมันมาก และมีปริมาณ 1 มิลลิกรัม มาวิเคราะห์ $^1\text{H-NMR}$ ด้วยวิธี NMR โดยใช้เครื่อง Varian Model YH400 Spectrometer ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.4 ลักษณะสมบัติทางชีวเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

เพื่อเป็นการศึกษาลักษณะสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้ ต่อค่าความเป็นกรดต่าง อุณหภูมิ ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในช่วงต่างๆ จึงได้ทำการทดลอง โดยใช้ crude ที่เตรียมได้จากข้อ 3.1.1 มาดำเนินการดังต่อไปนี้

3.1.4.1 ค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของสารลดแรงตึงผิว

ชีวภาพ

โดยนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เตรียมได้จากข้อ 3.1.1 มาละลายด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดต่างตั้งแต่ 2-12 ที่ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาเจือจาง 100 เท่าด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดต่าง 2-12 แล้วนำมาวัดค่าการกระจายน้ำมันและค่าแรงตึงผิว (Sarubbo และคณะ, 2006) ในเวลา 24 ชั่วโมง

3.1.4.2 ผลของค่าความเป็นกรดต่างต่อความเสถียรของทำงานของสารลดแรงตึง

ผิวชีวภาพ

โดยนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เตรียมได้จากข้อ 3.1.1 มาละลายด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดต่างตั้งแต่ 2-12 ที่ความเข้มข้น 40

มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำมาเจือจาง 100 เท่าด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดต่าง 2-12 แล้วนำมาวัดค่าการกระจายน้ำมันและค่าแรงตึงผิว ทุกๆ 10 วัน เป็นเวลา 3 เดือน

3.1.4.3 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของทำงานของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

โดยนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากข้อ 3.1.1 มาละลายด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8 ที่ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 60 และ 100 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 15 ชั่วโมง และที่ 121 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 15 นาที เป็นเวลา 5 รอบ นำมาวัดค่าการกระจายน้ำมันและค่าแรงตึงผิว โดยเจือจาง 100 เท่าด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8

3.1.4.4 ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการทำงานของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

โดยนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เตรียมได้จากข้อ 3.1.1 มาละลายด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8 ซึ่งแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ตั้งแต่ 0.5-5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำมาทดสอบค่าการกระจายน้ำมัน และค่าแรงตึงผิวโดยเจือจาง 100 เท่าด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8 ซึ่งแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ตั้งแต่ 0.5-5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) เช่นกัน

3.1.4.5 ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อความเสถียรของทำงานของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

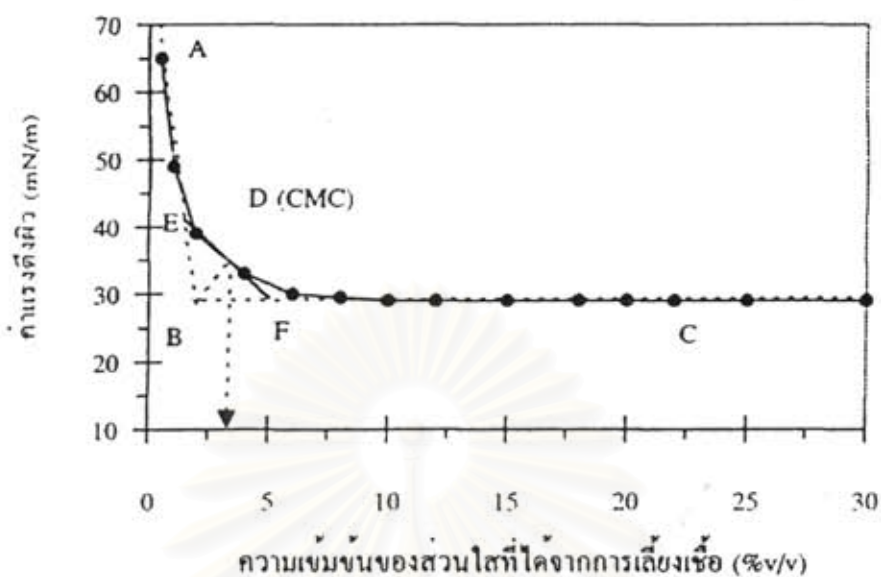
โดยนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เตรียมได้จากข้อ 3.1.1 มาละลายด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8 ซึ่งแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ตั้งแต่ 0.5-5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำมาทดสอบค่าการกระจายน้ำมัน และค่าแรงตึงผิว ทุก 10 วันเป็นเวลา 3 เดือน โดยเจือจาง 100 เท่าด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8 ซึ่งแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ตั้งแต่ 0.5-5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) เช่นกัน

3.1.4.6 วัดค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน (Emulsion Index)

โดยเปรียบเทียบกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนและน้ำมันชนิดต่างๆ เช่น เฮกซาเดกเคน ไชโคลเฮกเซน น้ำมันพาราฟิน (paraffin oil) น้ำมันปาล์ม น้ำมันสลัด น้ำมันดอกคำฝอย น้ำมันงา เป็นต้น โดยนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เตรียมได้จากข้อ 3.1.1 มาละลายด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8 ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนและน้ำมันแต่ละชนิด ในอัตราส่วนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อสารประกอบไฮโดรคาร์บอนหรือน้ำมันเท่ากับ 60:40 (โดยน้ำหนัก) นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเจือจาง 2 เท่าด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8 นำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตรทันทีเพื่อหาค่ากิจกรรมการก่ออิมัลชัน และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 3 5 7 และ 30 วัน จากนั้นดูดสารละลายส่วนล่างมาเจือจาง 2 เท่าด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8 แล้ววัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตรทันทีเพื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์ความเสถียรในการก่ออิมัลชัน (Shepherd และคณะ, 1995)

3.1.4.7 การหาค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ (Critical micelle concentration; CMC)

เปรียบเทียบค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้กับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ เช่น เคมเทค 307 โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate; SDS) ไทรทอน เอกซ์ 100 (TritonX-100) เป็นต้น โดยนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้กับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ความเข้มข้นต่างๆ มีหน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อลิตร แล้ววัดค่าแรงตึงผิว หาค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ เขียนกราฟระหว่างค่าแรงตึงผิวและความเข้มข้น ดังแสดงในรูปที่ 2.1 ตามวิธีของ Sheppard และ Mulligan (1987)



รูปที่ 2.1 วิธีการหาค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ โดยการวัดค่าแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

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

$$\text{เส้นสัมผัส AB : } y_1 = b_1x_1 + a_1$$

$$\text{เส้นสัมผัส BC : } y_2 = b_2x_2 + a_2$$

เมื่อเกิดจุดตัด B จะได้

$$b_1x_1 + a_1 = b_2x_2 + a_2 \quad \text{เมื่อ } y_1 = y_2$$

$$b_1x_1 - b_2x_2 = a_2 - a_1$$

$$x(b_1 - b_2) = a_2 - a_1 \quad \text{เมื่อ } x_1 = x_2$$

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

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 (γ_{CMC}) และความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (CMC^{-1}) คือส่วนกลับของค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ ($100/CMC$)

บทที่ 3

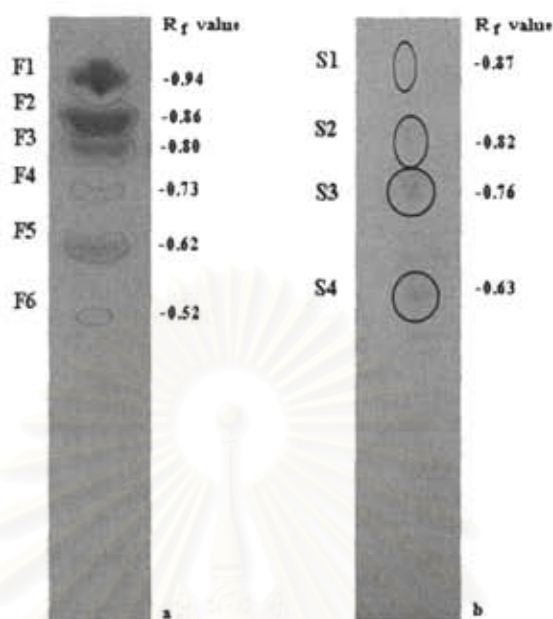
ผลการทดลอง

3.1 การผลิตและการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากยีสต์ *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 7 วัน พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จะลดค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก 47 mN/m เป็น 29 mN/m และมีค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 69.43 cm² หลังจากทำการสกัดด้วยสารละลายอินทรีย์จะให้ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เท่ากับ 0.26 กรัมต่อลิตร ส่วนในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน สารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้ จะลดค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก 50 mN/m เป็น 42 mN/m และมีค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 3.14 cm² และเมื่อสกัดด้วยสารละลายอินทรีย์จะให้ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเท่ากับ 0.06 กรัมต่อลิตร และเมื่อใช้น้ำมันถั่วเหลืองร่วมกับกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 7 วัน พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จะลดค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก 57 mN/m เป็น 33 mN/m และมีค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 75.39 cm² หลังจากทำการสกัดด้วยสารละลายอินทรีย์จะให้ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เท่ากับ 0.95 กรัมต่อลิตร

3.2 การเตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์องค์ประกอบของสารโดยวิธีโครมาโตกราฟี

การเตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี analytical TLC โดยนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เตรียมได้จากข้อ 3.1 มาตรวจสอบบนแผ่น TLC silica gel 60 เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยคลอโรฟอร์ม ต่อ เมทานอล ต่อ น้ำ (65: 25: 4) แล้วทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารด้วยไอระเหยของไอโอดีน และมอริส รีเอเจนต์ (Passeri และคณะ, 1992) พบว่าสามารถแยกสารออกได้เป็น 6 ลำดับส่วน เรียกว่า F1 ถึง F6 ดังแสดงในรูปที่ 3.1 โดยมีค่าคงที่ของอัตราส่วนการเคลื่อนที่ (R_f) เป็น 0.94, 0.86, 0.80, 0.73, 0.62 และ 0.52 ตามลำดับ เมื่อทดสอบด้วยมอริส รีเอเจนต์ พบว่าเกิดจุดสีเขียวน้ำที่มีอัตราการเคลื่อนที่ (R_f) 0.87, 0.82, 0.76 และ 0.63 (S1- S4) ตามลำดับ และแสดงค่าการกระจายน้ำมันของแต่ละลำดับส่วนในตารางที่ 3.1

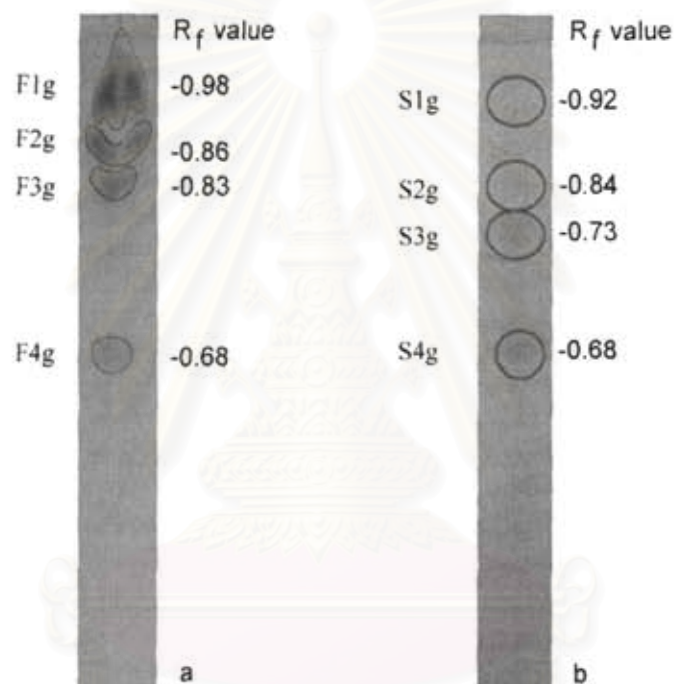


รูปที่ 3.1 ผลการวิเคราะห์เมื่อนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอนมาวิเคราะห์และแยกให้บริสุทธิ์โดยวิธี analytical TLC ตรวจสอบผลด้วย a) ไอโอดีน และ b) มอริสรีเอเจนต์

ตารางที่ 3.1 อัตราการเคลื่อนที่ และค่าการกระจายน้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากการเลี้ยงเชื้อโดยมี 4 % น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนบนแผ่น TLC

แถบที่	อัตราการเคลื่อนที่ (R_f)	ค่าการกระจายน้ำมัน (cm^2)
F1	0.94	56.77
F2	0.86	56.77
F3	0.80	28.26
F4	0.73	28.26
F5	0.62	19.65
F6	0.52	12.58
S1	0.87	31.18
S2	0.82	40.73
S3	0.76	1.13
S4	0.63	0.50

เมื่อทำการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มี 4% น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน แล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วยTLC พบว่าสามารถแยกสารออกได้เป็น 4 ลำดับส่วน เรียกว่า F1g ถึง F4g ดังแสดงในรูปที่ 3.2 โดยมีค่าคงที่ของอัตราส่วนการเคลื่อนที่ (R_f) เป็น 0.98, 0.86, 0.83, และ 0.68 ตามลำดับ เมื่อทดสอบด้วยมอริส รีเอเจนต์ พบว่าเกิดจุดสีเขียว ที่มีอัตราการเคลื่อนที่ (R_f) 0.92, 0.84, 0.73 และ 0.68 (S1g- S4g) ตามลำดับ ลำดับส่วนใน ตำแหน่งต่างๆ บน TLC ได้ถูกนำมาทดสอบการกระจายน้ำมัน และพบว่า F2g จะให้ค่าการกระจายน้ำมันสูงสุดเท่ากับ 3.14 ตารางเซนติเมตร ดังแสดงในตารางที่ 3.2

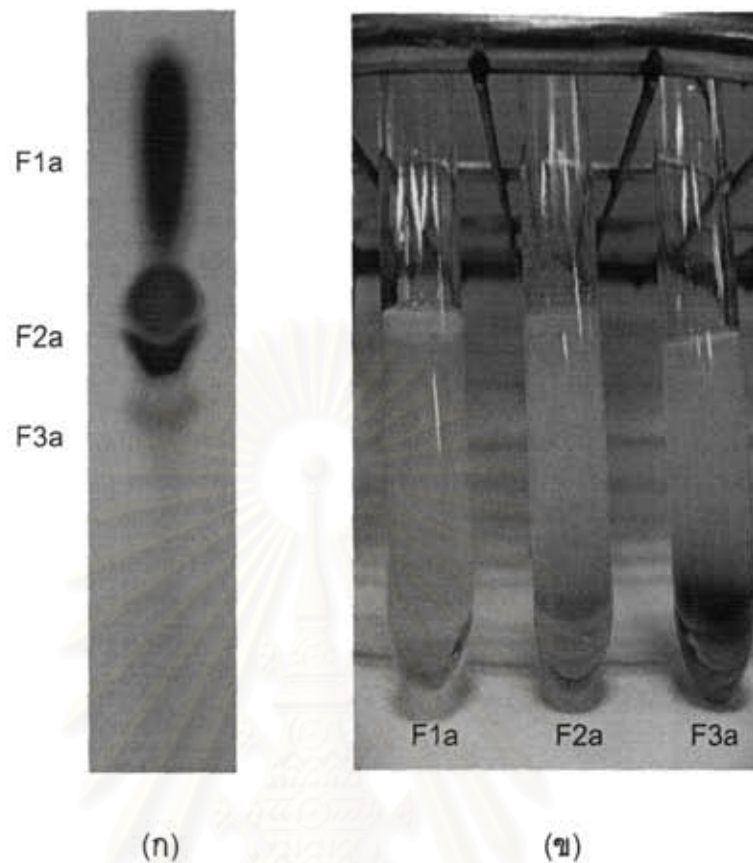


รูปที่ 3.2 ผลการวิเคราะห์เมื่อนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากกลูโคส 4% เป็นแหล่งคาร์บอนมาวิเคราะห์และแยกให้บริสุทธิ์โดยวิธี analytical TLC ตรวจสอบผลด้วย a)ไอโอดีน และ b)มอริสรีเอเจนต์

ตารางที่ 3.2 อัตราการเคลื่อนที่ และค่าการกระจายน้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากการเลี้ยงเชื้อโดยมีน้ำตาล glucose เป็นแหล่งคาร์บอนบนแผ่น TLC

แถบที่	อัตราการเคลื่อนที่ (R_f)	ค่าการกระจายน้ำมัน (cm^2)
F1g	0.92	1.13
F2g	0.84	3.14
F3g	0.73	1.13
F4g	0.58	2.55
S1g	0.92	<1
S2g	0.84	<1
S3g	0.73	<1
S4g	0.68	<1

ทำนองเดียวกัน เมื่อทำการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีน้ำมันถั่วเหลืองร่วมกับน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสามารถแยกสารออกได้เป็น 3 ลำดับส่วน เรียกว่า F1a ถึง F3a โดยมีค่าคงที่ของอัตราส่วนการเคลื่อนที่ (R_f) เป็น 0.88, 0.72 และ 0.62 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 3.3 (ก) เมื่อนำแต่ละลำดับส่วนมาตรวจสอบประสิทธิภาพด้วยการวัดค่าการกระจายน้ำมัน พบว่า F2a มีค่าการกระจายน้ำมันสูงสุด ดังแสดงในตารางที่ 3.3 เมื่อตรวจสอบหาปริมาณน้ำตาลด้วยมอริส รีเอเจนท์ (ด้วยวิธีเจือจางสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแต่ละลำดับส่วนด้วยน้ำกลั่นที่ความเข้มข้นประมาณ 1-2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมมอริส รีเอเจนท์ (แอลฟา-แนฟทอล 0.5 กรัม ละลายใน 95% เอทานอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร) จำนวน 2 หยด ผสมให้เข้ากันดี แล้วค่อยๆ เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร โดยห้ามเขย่าและตั้งทิ้งไว้สังเกตสีที่เกิดขึ้น ซึ่งถ้าผลเป็นบวกจะเกิดสีม่วงตรงกลางระหว่างชั้นของสารละลายและชั้นของกรด) พบว่า F2a และ F3a ให้ผลบวก ดังแสดงในรูปที่ 3.3 (ข)



รูปที่ 3.3 ผลการวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ด้วยวิธี analytical TLC แล้วทำการตรวจสอบผลด้วย (ก) ไอโอดีน และ (ข) มอร์ส รีเอเจนท์

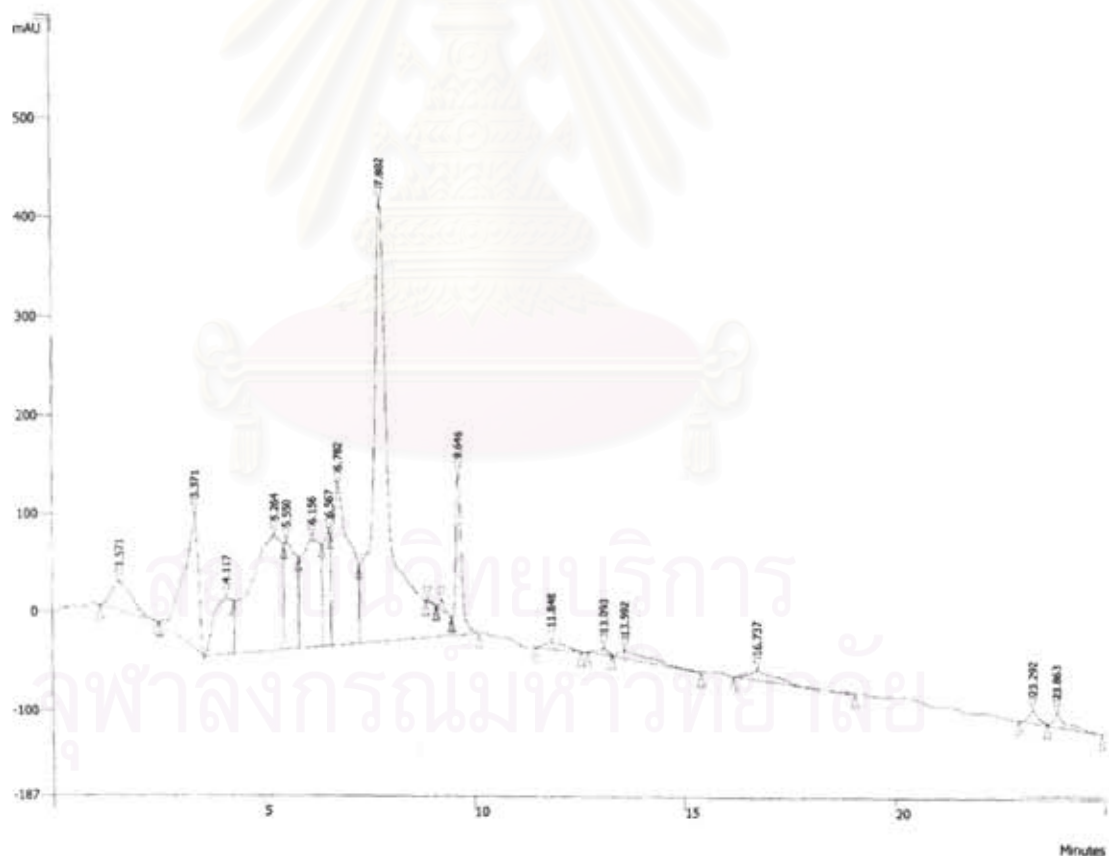
ตารางที่ 3.3 อัตราการเคลื่อนที่ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากการเลี้ยงเชื้อโดยมีน้ำมันถั่วเหลืองและน้ำตาลกลูโคส อัตราส่วน 2:1 เป็นแหล่งคาร์บอนบนแผ่น TLC และค่าการกระจายน้ำมันแต่ละลำดับส่วน

แถบที่	อัตราการเคลื่อนที่ (R_f)	ค่าการกระจายน้ำมัน (cm^2)
F1a	0.88	4.91
F2a	0.72	134.71
F3a	0.62	83.28

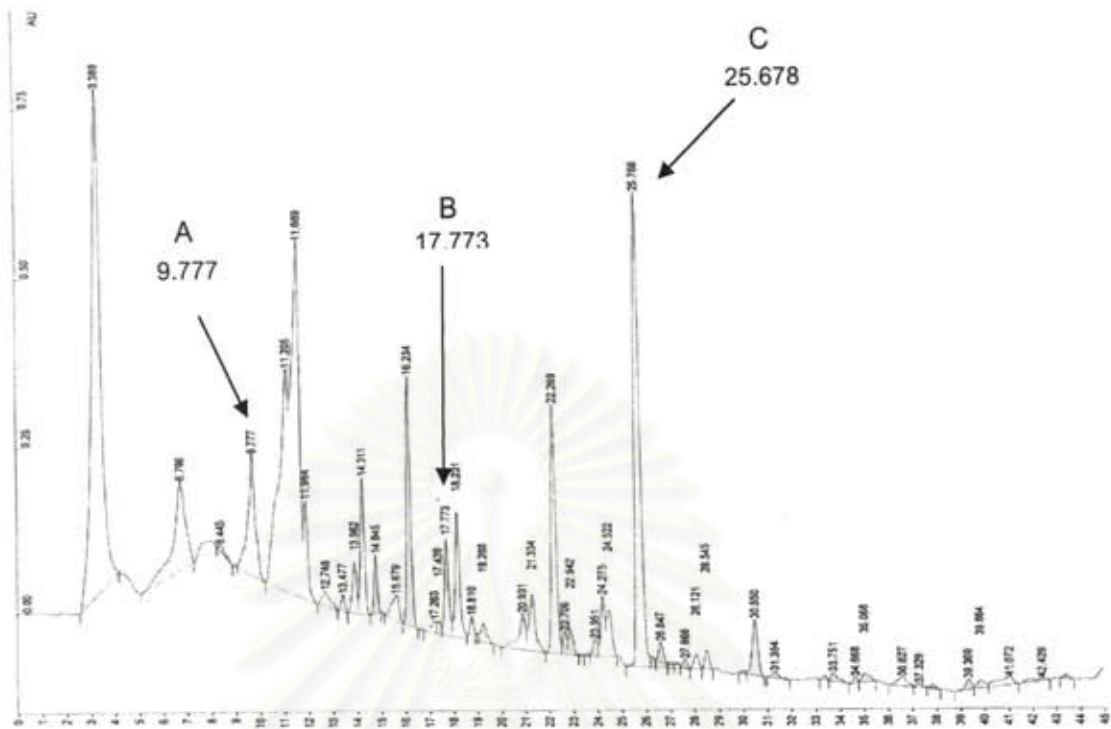
จากผลการทดลองข้างต้น (รูปที่ 3.1-3.3) พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 ผลิตได้จะมีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบหรือเป็นสารประเภทไกลโคลิพิด

เนื่องจากสารที่วิเคราะห์ได้บน TLC ให้ผลบวกเมื่อตรวจสอบด้วยไอระเหยของไอโอดีนและมอร์สรีเอเจนท์

จากนั้นนำตัวอย่างสารตำแหน่ง F2 F2g และ F2a (เนื่องจากเป็นตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้งไอโอดีนและมอร์สรีเอเจนต์ และมีค่าการกระจายน้ำมันมาก) ที่เตรียมจาก preparative TLC มาวิเคราะห์สารและทำให้บริสุทธิ์ด้วย HPLC ด้วยภาวะตามข้อ 3.1.2.3 และทำการเก็บลำดับส่วนตัวอย่างจากทุกพิกที่ปรากฏ ดังแสดงในรูปที่ 3.5-3.7 เทียบกับสารไซโฟโรลิติดที่ใช้เป็นสารเปรียบเทียบ ดังแสดงในรูปที่ 3.4 และนำมาทำให้แห้ง แล้วเติม 1 ไมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดต่าง เท่ากับ 8 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร นำตัวอย่างที่ได้ไปวัดค่าการกระจายน้ำมัน

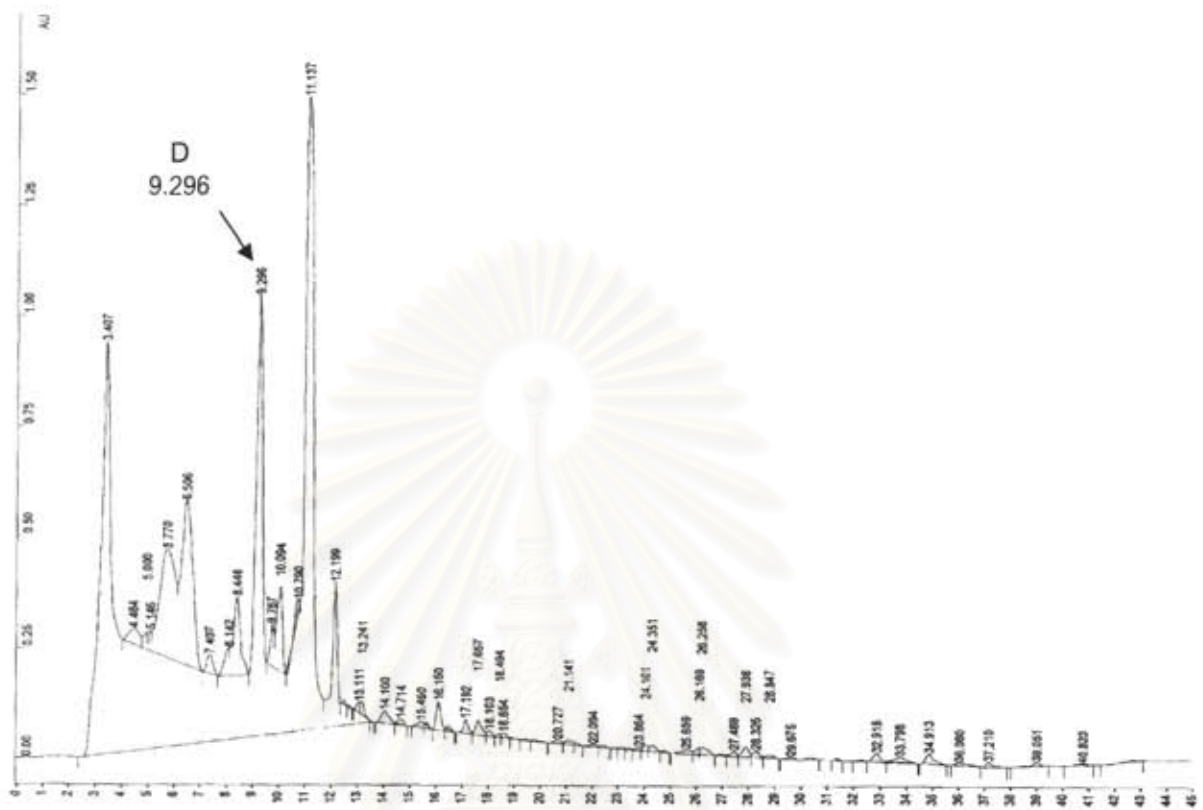


รูปที่ 3.4 โครมาโตแกรมของ HPLC จากสารไซโฟโรลิติดที่ใช้เป็นสารเปรียบเทียบ



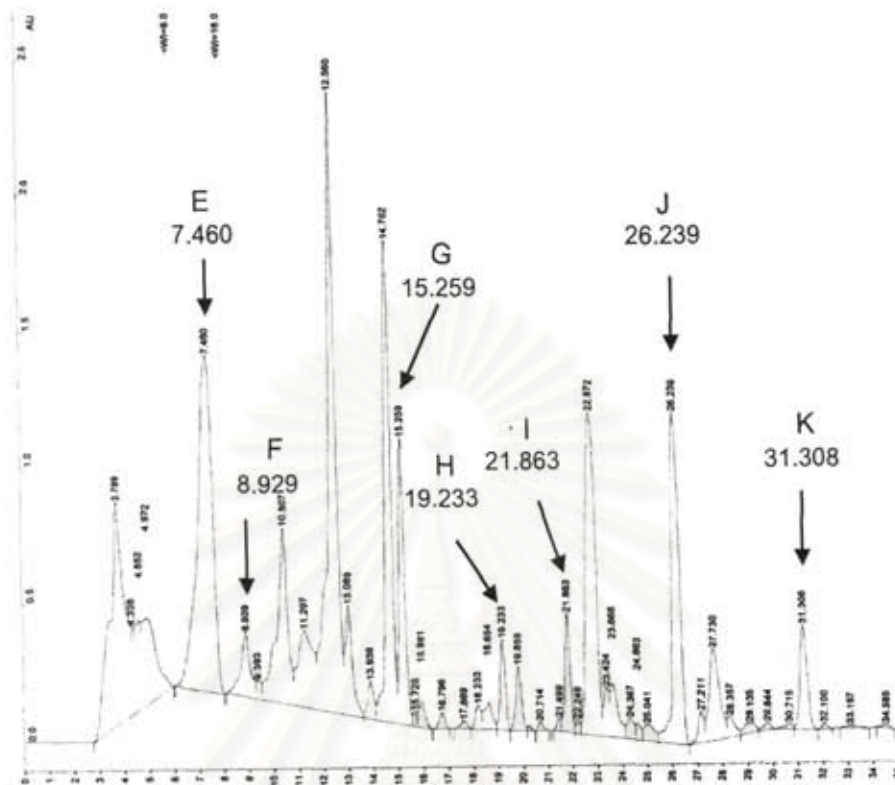
รูปที่ 3.5 โครมาโตแกรมของ HPLC จากตัวอย่างตำแหน่ง F2
 ค่า RT ของพีกที่มีค่าการกระจายตัวของน้ำมันมาก ได้แก่ 9.777, 17.773 และ 25.678 นาที
 (ตัวอย่าง A B และ C ตามลำดับ) ซึ่งมีค่าการกระจายตัวของน้ำมันเท่ากับ 2.270, 2.011 และ
 11.346 cm^2 ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.6 โครมาโตแกรมของ HPLC จากตัวอย่างตำแหน่ง F2g
ค่า RT ของพีคที่มีค่าการกระจายตัวของน้ำมันสูงสุดที่ 9.296 นาที (ตัวอย่าง D)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

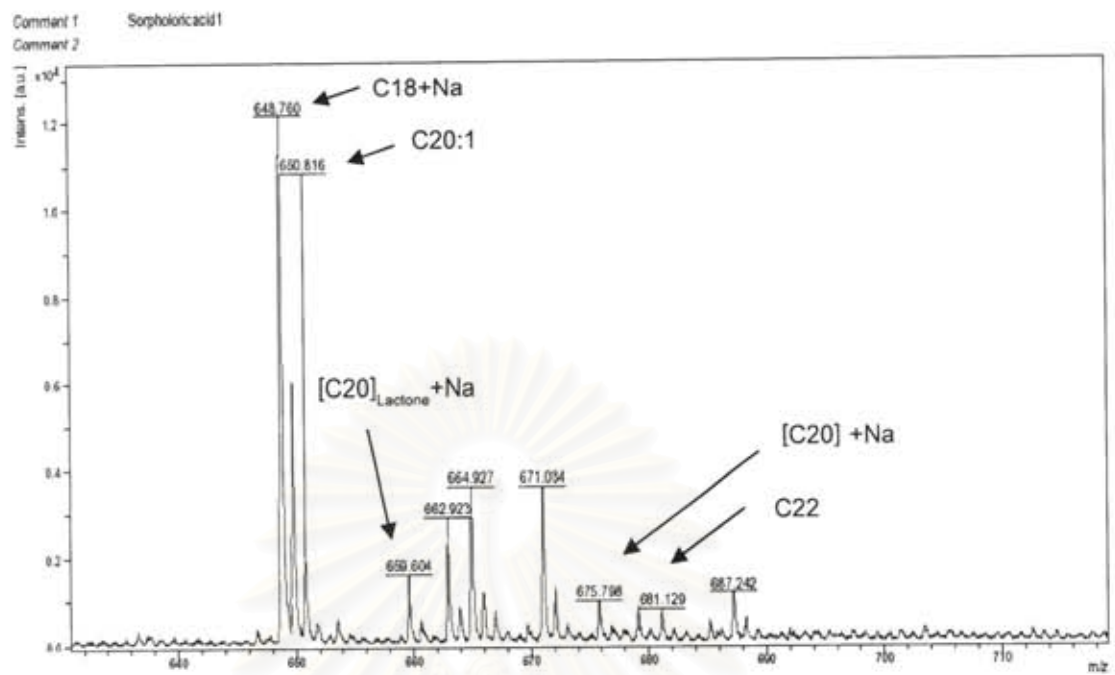


รูปที่ 3.7 โครมาโตแกรมของ HPLC จากตัวอย่างตำแหน่ง F2a

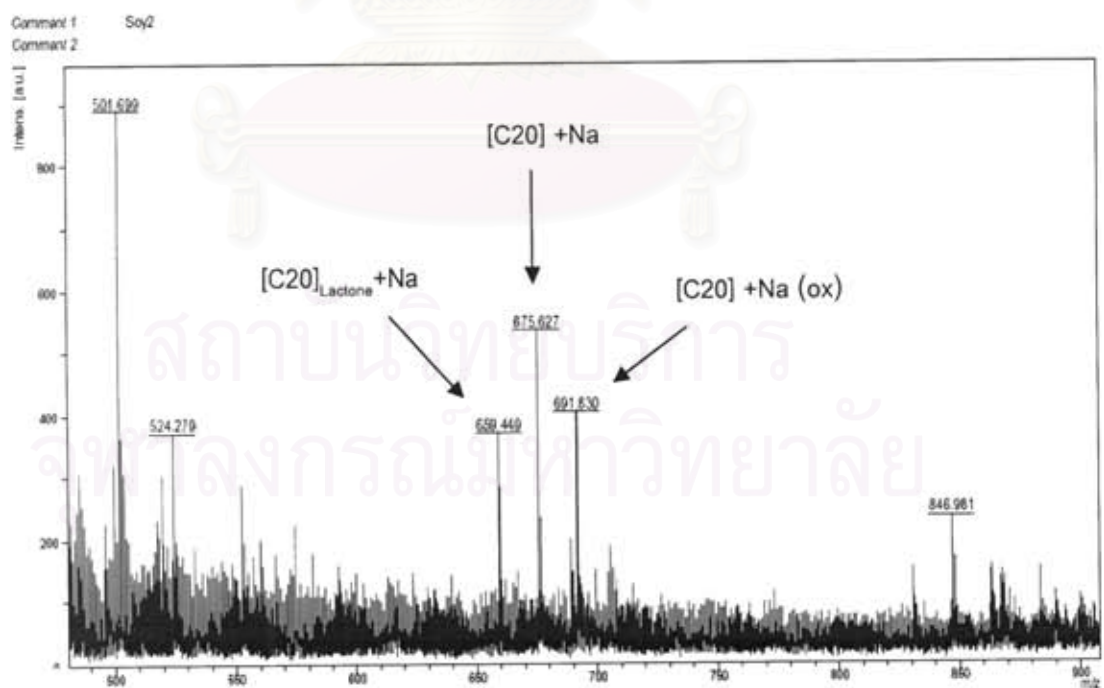
ค่า RT ของพีกที่มีค่าการกระจายตัวของน้ำมันมาก ได้แก่ 7.460, 8.929, 15.259, 19.233, 21.863, 26.239 และ 31.431 นาที (ตัวอย่าง E-K ตามลำดับ) ซึ่งมีค่าการกระจายตัวของน้ำมันเท่ากับ 3.8, 9.07, 63.59, 103.82, 94.99, 102.02 และ 81.67 ตารางเซนติเมตร ตามลำดับ

3.3 วิเคราะห์โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

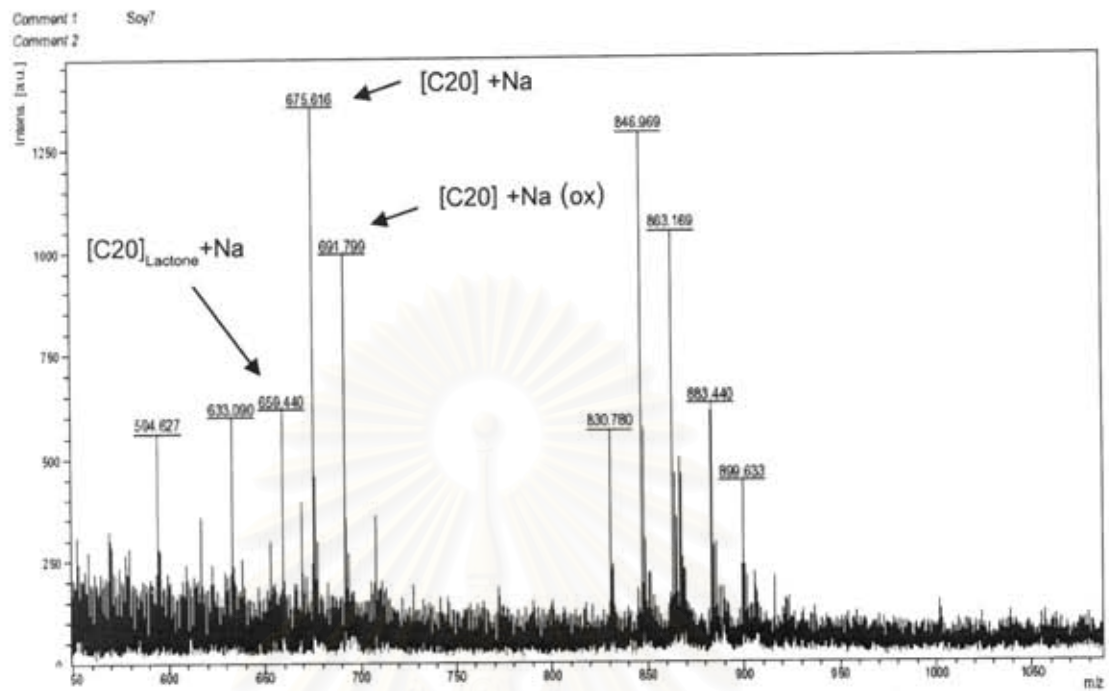
นำตัวอย่างสาร A ถึง K มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย HPLC และนำไปทำการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมลโมเลกุลด้วยวิธี Liquid Chromatography - Mass Spectrometry (LC-MS) ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ดังแสดงแผนภาพโครมาโตแกรมในรูปที่ 3.9-3.19 เทียบกับสารเปรียบเทียบกับโพลีโรลิตรูปที่ 3.8



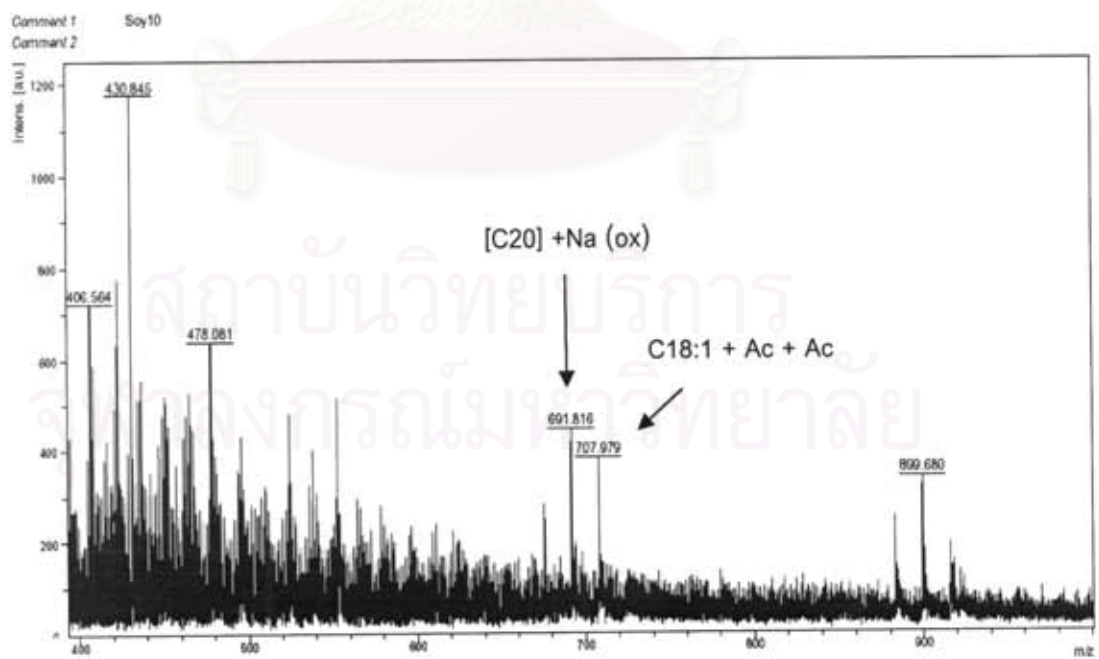
รูปที่ 3.8 โคโรมาโตแกรมของ LC-MS ของสารโซโรโลริคัสที่ใช้เป็นสารเปรียบเทียบ



รูปที่ 3.9 โคโรมาโตแกรมของ LC-MS ของตัวอย่างสาร A

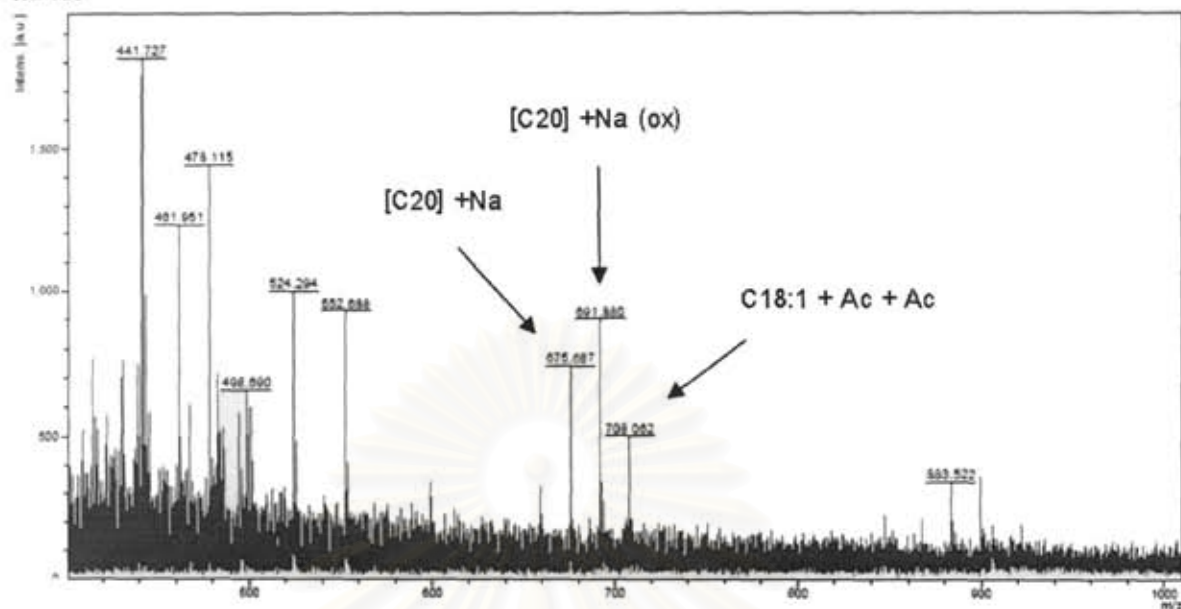


รูปที่ 3.10 โครมาโตแกรมของ LC-MS ของตัวอย่างสาร B

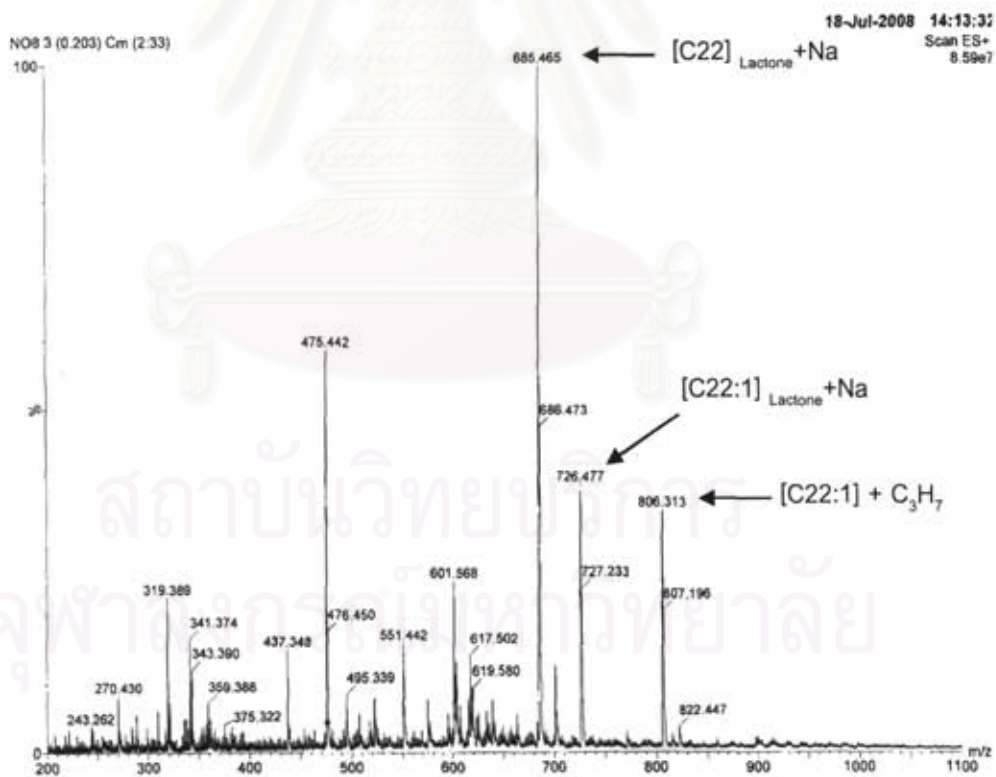


รูปที่ 3.11 โครมาโตแกรมของ LC-MS ของตัวอย่างสาร C

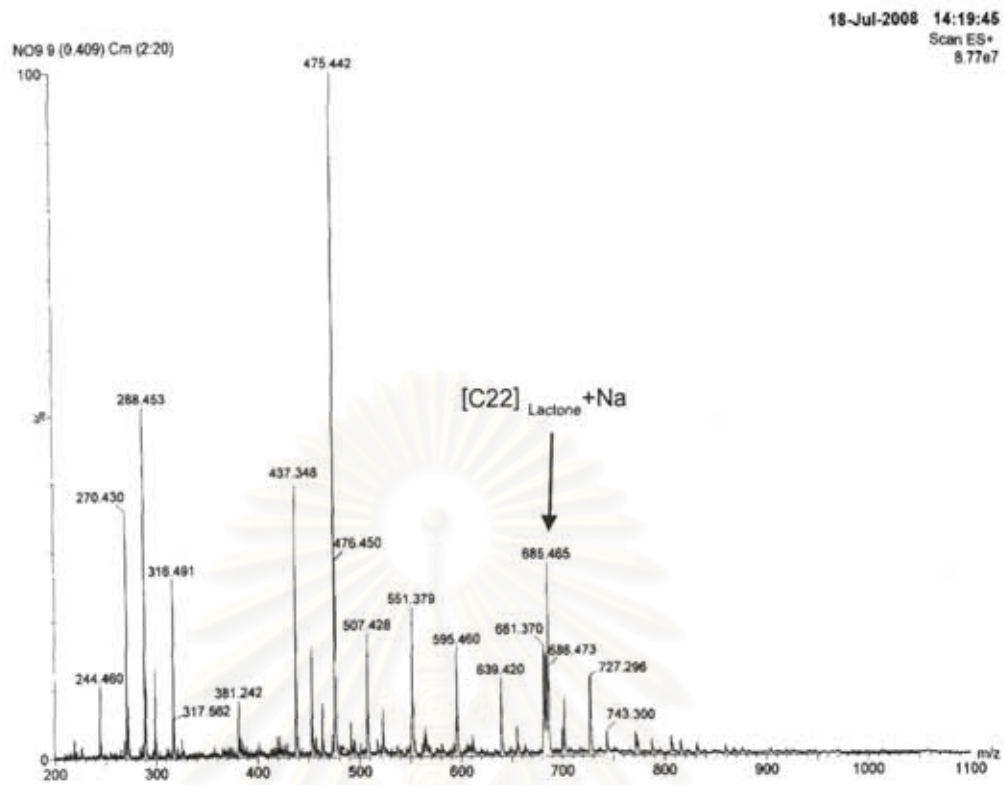
Comment 1 Glu5
Comment 2



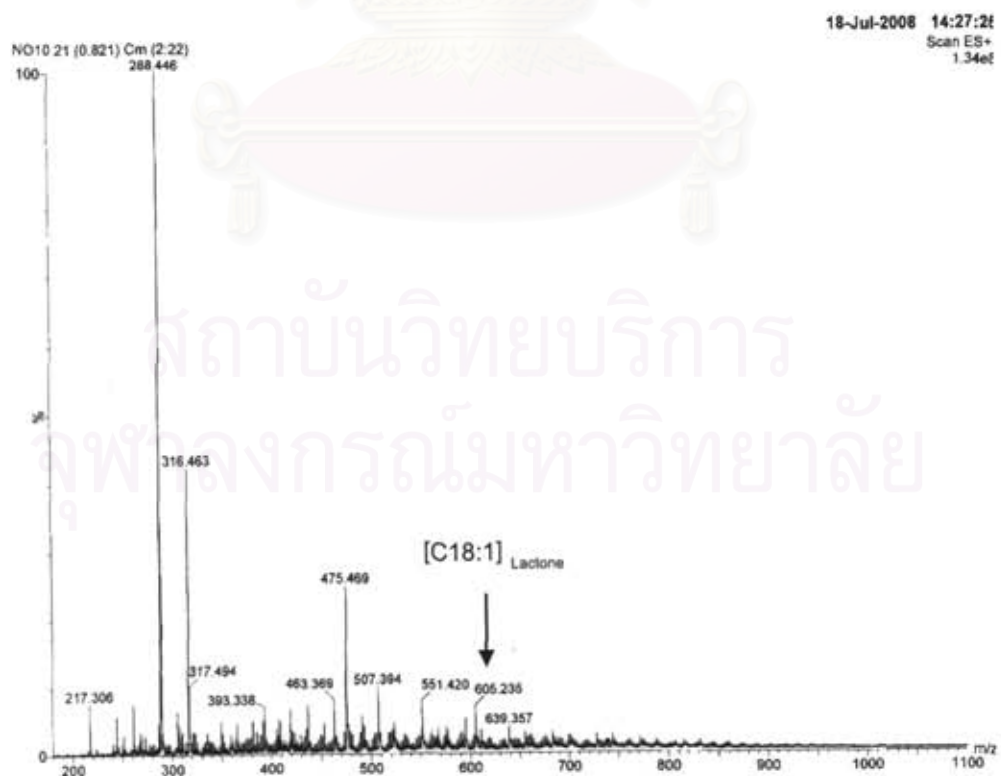
รูปที่ 3.12 โครมาโตแกรมของ LC-MS ของตัวอย่างสาร D



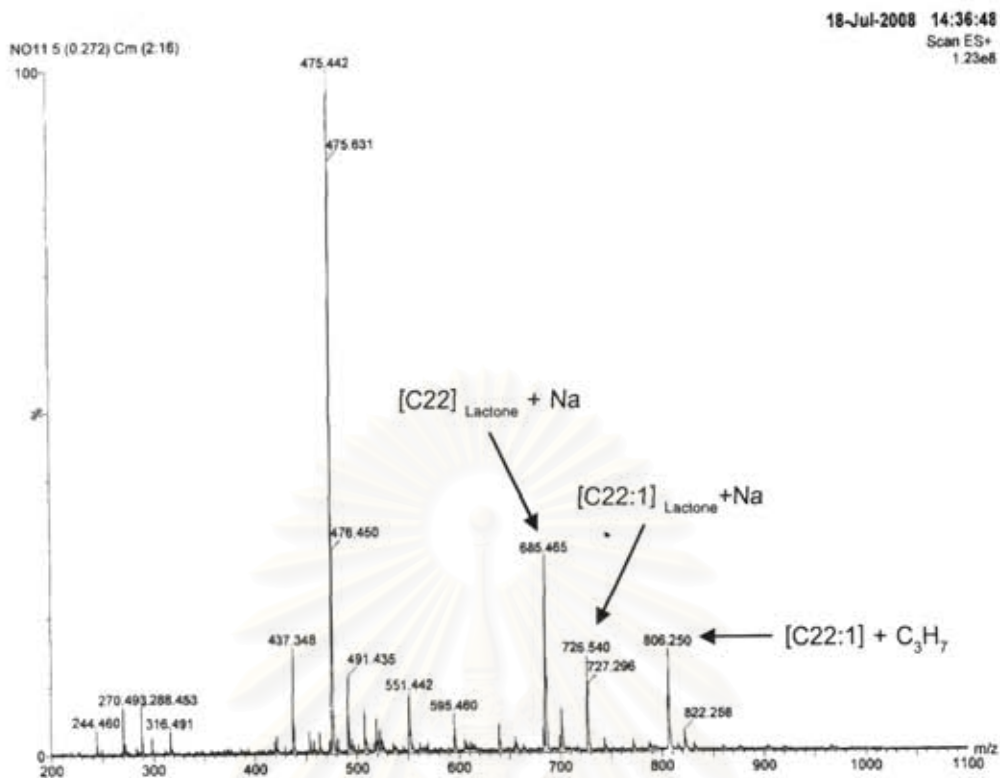
รูปที่ 3.13 โครมาโตแกรมของ LC-MS ของตัวอย่างสาร E



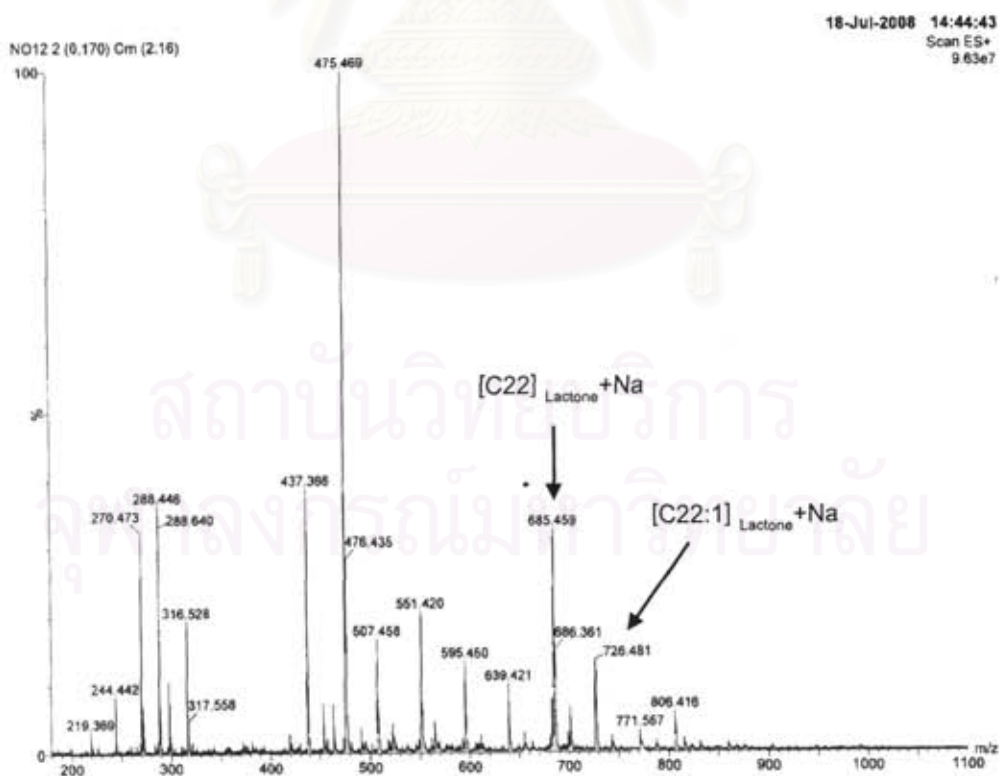
รูปที่ 3.14 โครมาโตแกรมของ LC-MS ของตัวอย่างสาร F



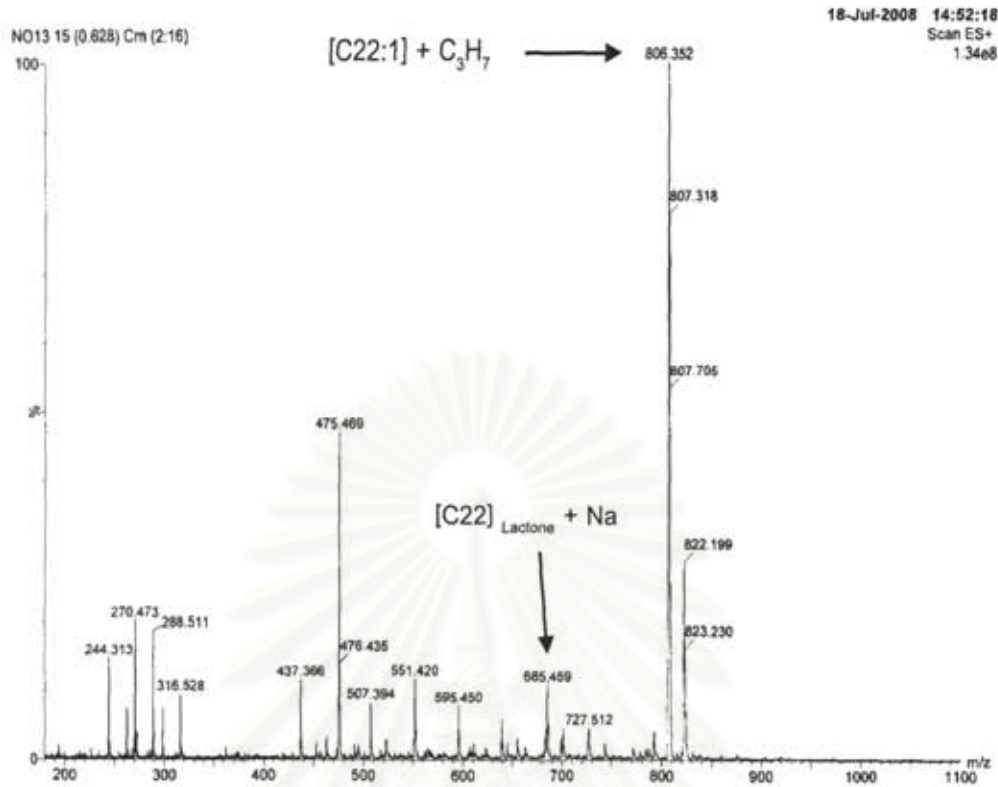
รูปที่ 3.15 โครมาโตแกรมของ LC-MS ของตัวอย่างสาร G



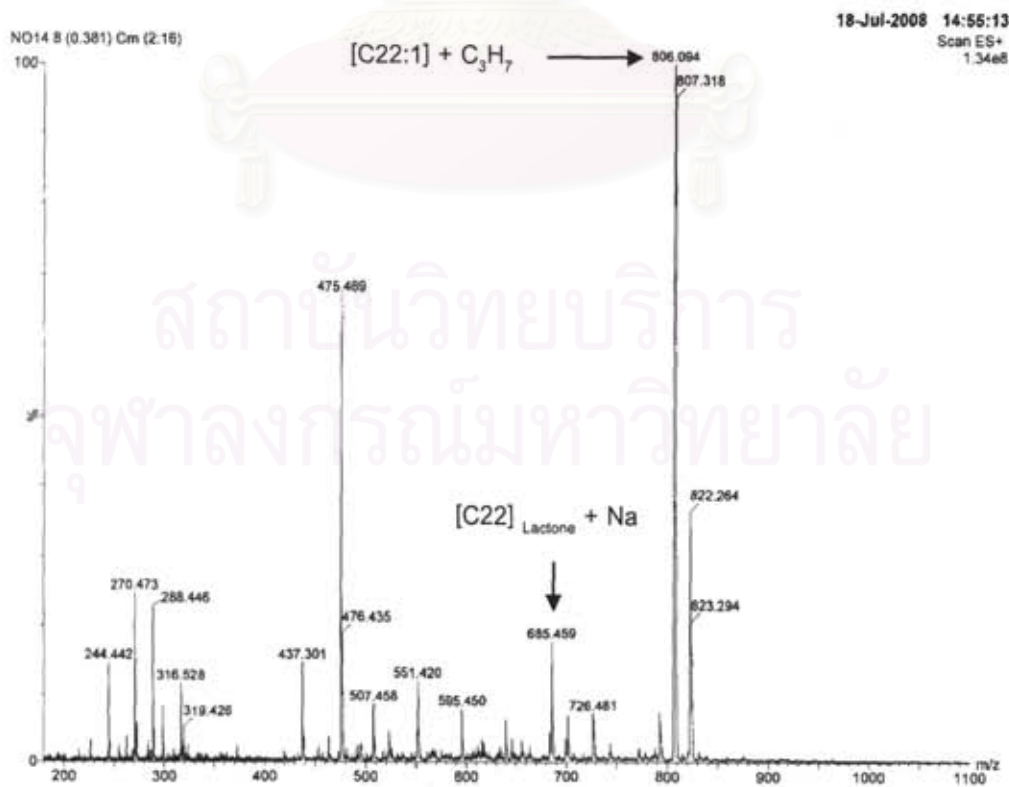
รูปที่ 3.16 โคจรมาโตแกรมของ LC-MS ของตัวอย่างสาร H



รูปที่ 3.17 โคจรมาโตแกรมของ LC-MS ของตัวอย่างสาร I



รูปที่ 3.18 โครมาโตแกรมของ LC-MS ของตัวอย่างสาร J



รูปที่ 3.19 โครมาโตแกรมของ LC-MS ของตัวอย่างสาร K

จากผลการวิเคราะห์สารด้วย LC-MS ข้างต้นบ่งบอกถึงน้ำหนักมวลโมเลกุลของสารและสามารถวิเคราะห์โครงสร้างของสารที่ผลิตได้ ดังแสดงผลการวิเคราะห์ในตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 แสดงผลการวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ด้วย LC- MS

ตัวอย่างสาร	ค่า RT (นาที) จาก HPLC	m/z	มวล โมเลกุล	โครงสร้างสารไซโฟโร ลิพิด
ไซโฟโรลิพิด				
		648.760	647	C18 + Na
		650.816	650	C20:1
		675.798	675	C20 + Na
		681.129	680	C22
สารที่ผลิตได้จากยีสต์ สายพันธุ์ PY1				
ตัวอย่างสาร A	9.779	659.499	658	[C20] _{Lactone} + Na
		675.627	675	C20 + Na
		691.830	691	C20 + Na (OX)
ตัวอย่างสาร B	17.773	659.440	658	[C20] _{Lactone} + Na
		675.616	675	C20 + Na
		691.799	691	C20 + Na (OX)
ตัวอย่างสาร C	25.768	691.816	691	C20 + Na (OX)
		707.979	707	C18:1 + Ac + Ac
ตัวอย่างสาร D	9.296	675.687	675	C20 + Na
		691.880	691	C20 + Na (OX)
		708.062	707	C18:1 + Ac + Ac

หมายเหตุ: (OX) หมายถึง oxidized form

AC หมายถึง เกิดการ acetylation

ตารางที่ 3.5 แสดงผลการวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากน้ำมันถั่วเหลืองและ
กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนด้วยวิธี LC- MS

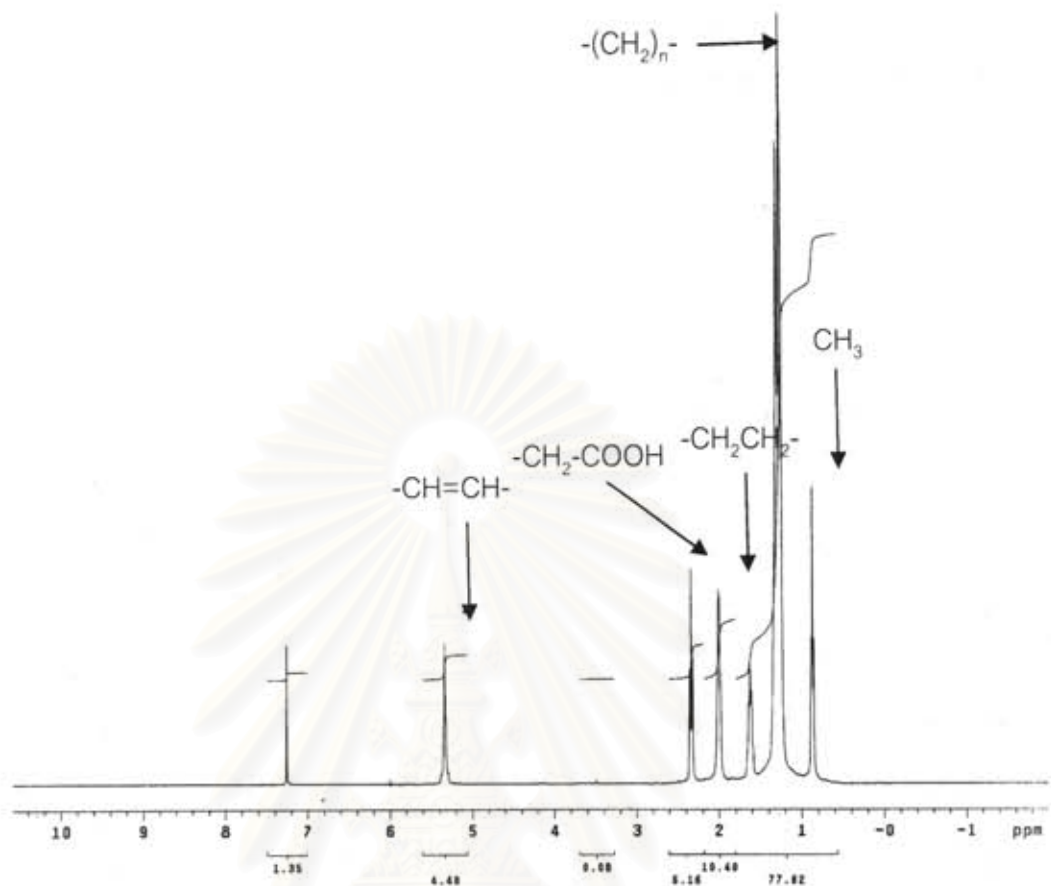
ตัวอย่างสาร	ค่า RT (นาที) จาก HPLC	m/z	มวลโมเลกุล	โครงสร้างสารโซโฟโรลิพิด
ตัวอย่างสาร E	7.460	685.465	685	$[C_{22}]_{Lactone} + Na$ (R1=R2=H)
		726.477	725	$[C_{22:1}]_{Lactone} + Na$ (R1=H, R2=COCH ₃ หรือ R1= COCH ₃ , R2=H)
		806.313	805	$[C_{22:1}] + C_3H_7$ (R1=R2=COCH ₃)
ตัวอย่างสาร F	8.929	685.465	685	$[C_{22}]_{Lactone} + Na$ (R1=R2=H)
ตัวอย่างสาร G	15.259	605.235	604	$[C_{18:1}]_{Lactone}$ (R1=R2=H)
ตัวอย่างสาร H	19.233	685.465	685	$[C_{22}]_{Lactone} + Na$ (R1=R2=H)
		726.540	725	$[C_{22:1}]_{Lactone} + Na$ (R1=H, R2=COCH ₃ หรือ R1= COCH ₃ , R2=H)
		806.250	805	$[C_{22:1}] + C_3H_7$ (R1=R2=COCH ₃)
ตัวอย่างสาร I	21.863	685.465	685	$[C_{22}]_{Lactone} + Na$ (R1=R2=H)
		726.481	725	$[C_{22:1}]_{Lactone} + Na$ (R1=H, R2=COCH ₃ หรือ R1= COCH ₃ , R2=H)

ตารางที่ 3.5 แสดงผลการวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากน้ำมันถั่วเหลืองและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนด้วยวิธี LC- MS (ต่อ)

ตัวอย่างสาร	ค่า RT (นาที) จาก HPLC	m/z	มวลโมเลกุล	โครงสร้างสารไซโฟโรลิดิต
ตัวอย่างสาร J	26.239	685.459	685	[C22] _{Lactone} +Na (R1=R2=H)
		806.352	805	[C22:1]+C ₃ H ₇ (R1=R2=COCH ₃)
ตัวอย่างสาร K	31.308	685.459	685	[C22] _{Lactone} +Na (R1=R2=H)
		806.094	805	[C22:1]+C ₃ H ₇ (R1=R2=COCH ₃)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากยีสต์ *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 โดยใช้ไขมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนส่วนใหญ่มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 658, 674 และ 691 ส่วนที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 675 691 และ 707 ซึ่งเทียบเคียงได้กับสารไซโฟโรลิดิตที่มีโครงสร้างที่มีกรดไขมันเป็นองค์ประกอบของ C20 และ C18:1 ทั้งในรูป Acidic และ Lactonic form และที่ผลิตได้จากน้ำมันถั่วเหลืองและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่ามีมวลโมเลกุลเท่ากับ 685 725 และ 805 ซึ่งเทียบเคียงได้กับสารไซโฟโรลิดิตที่มีโครงสร้างที่มีกรดไขมันเป็นองค์ประกอบของ C22 และ C22:1 ทั้งในรูป Acidic และ Lactonic form ที่มี R1 และ R2 เป็นทั้ง H และ COCH₃ และปลายสายของไฮโดรคาร์บอนที่มี Na และ C₃H₇

จากนั้นนำตัวอย่างสาร K ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี ¹H-NMR ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเทียบกับ ¹H-NMR spectrum resonance ของสารไซโฟโรลิดิตที่ใช้เป็นสารเปรียบเทียบ (รูปที่ 3.20) พบว่ามี ¹H-NMR spectrum resonance ดังแสดงในรูปที่ 3.21 ซึ่งผลการทดลองพบว่ามีฟีกปรากฏในช่วง chemical shift ที่ 0.9 เป็นหมู่เมทิล (-CH₃) ที่ 1.2 และ 2.0 ppm จะเป็นสายยาวไฮโดรคาร์บอน (-CH₂)_n ที่ 2.4 ppm เป็น -CH₂-COOH และพบพันธะคู่ -CH=CH- ที่ chemical shift ที่ 5.4 ppm



รูปที่ 3.21 $^1\text{H-NMR}$ spectrum resonance ของตัวอย่าง K

3.4 ลักษณะสมบัติทางชีวเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

การศึกษาค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานและความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ และเมื่อพิจารณาจากค่าเฉลี่ยและค่า Standard Deviation (SD) พบว่าที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 2-9 จะเหมาะสมต่อการทำงานของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมากที่สุด ซึ่งให้ค่าแรงตึงผิวต่ำที่สุดในวันแรกเท่ากับ 34-35 mN/m และค่าแรงตึงผิวมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วัน ดังแสดงในตารางที่ 3.6

ส่วนค่าการกระจายน้ำมันยังคงมีค่าเท่ากับ 6.84-7.57 ตารางเซนติเมตร ในวันแรก-30 วัน ที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 3-8 ดังแสดงในตารางที่ 3.7

ตารางที่ 3.6 ผลของค่าความเป็นกรดต่างต่างๆ ต่อค่าแรงตึงผิวและความเสถียรของค่าแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY 1 เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในเวลา 30 วัน

วัน	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)										
	ค่าความเป็นกรดต่าง										
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
C*	43	44	43	43	43	43	53	54	54	51.5	56
1	35	34	35.5	36	34	34	34	35.5	39	39.5	41
10	35	34	36	35	35	33	33	36.5	40	39.5	40
20	34	35	35	35.5	34	33	33.5	35	38	40	41
30	36	34	40	34	33.5	35	33	35	38	41	39
Ave	35	34.25	36.63	35.13	34.13	33.75	33.38	35.5	38.75	40	40.25
SD	0.82	0.5	2.9	0.85	0.63	0.96	0.48	0.71	0.96	0.71	0.96

(*C คือ ตัวควบคุม หมายถึง Tris Buffer ที่ความเป็นกรดเบสต่างๆ)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.7 ผลของค่าความเป็นกรดต่างต่างๆ ต่อค่าการกระจายน้ำมันและความเสถียรของค่าการกระจายน้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY 1 เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในเวลา 30 วัน

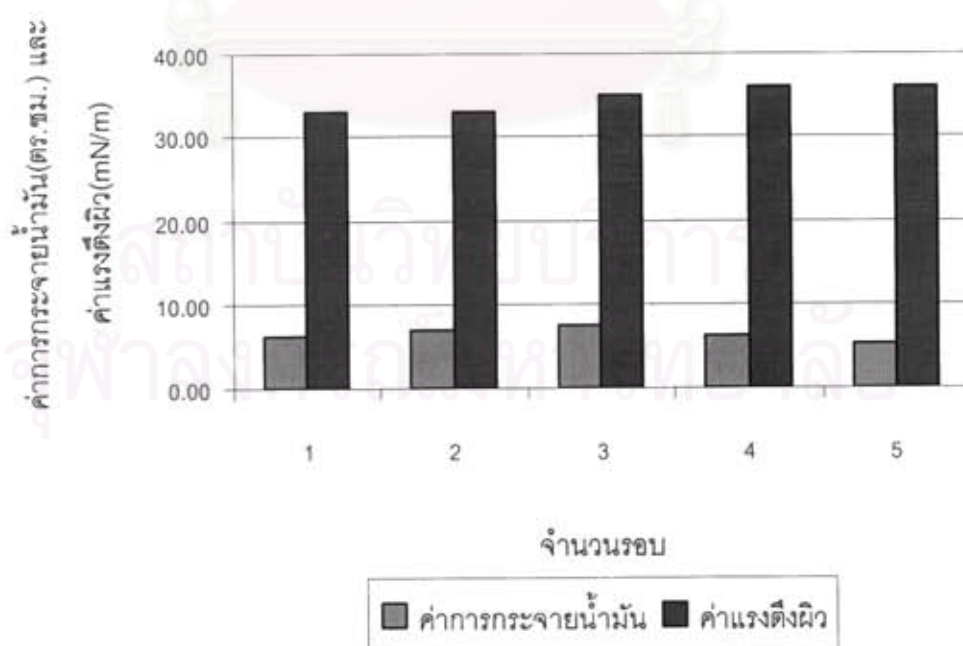
วัน	ค่าการกระจายน้ำมัน (ตารางเซนติเมตร)										
	ค่าความเป็นกรดต่าง										
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
C*	0.50	0.28	0.28	0.28	0.28	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.28
1	4.52	7.07	7.07	5.31	5.31	6.15	7.07	5.31	3.80	2.01	2.01
10	3.80	7.07	5.31	7.07	5.31	5.31	7.07	3.14	3.14	2.01	2.01
20	3.14	6.15	7.07	5.31	6.15	6.15	7.07	3.80	3.14	2.54	2.01
30	4.52	7.07	7.07	5.31	5.31	8.04	9.07	2.54	2.54	2.01	1.54
Ave	4	6.84	6.63	5.75	5.52	6.41	7.57	3.7	3.16	2.14	1.89
SD	0.66	0.46	0.88	0.88	0.42	1.16	1	1.19	0.51	0.27	0.24

(*C คือ ตัวควบคุม หมายถึง Tris Buffer ที่ความเป็นกรดเบสต่างๆ)

ศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิต่อความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ที่ 60 และ 100 องศาเซลเซียส โดยทำการบ่มที่อุณหภูมิ 60 และ 100 องศาเซลเซียส นำออกมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสแล้วทำการวัดค่าการกระจายน้ำมันและค่าแรงตึงผิว พบว่าทั้งที่อุณหภูมิ 60 และ 100 องศาเซลเซียส สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้สามารถทำงานได้ดีและคงความเสถียรได้จนเวลาผ่านไป 15 ชั่วโมง โดยมีค่าการกระจายน้ำมัน 3-6 ตารางเซนติเมตร และมีค่าแรงตึงผิว 33-35 mN/m ดังแสดงในตารางที่ 3.8 และยังทำการทดลองที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส รอบละ 15 นาที เป็นเวลา 5 รอบ พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้สามารถทำงานและคงความเสถียรได้ดี โดยมีค่าการกระจายน้ำมัน 5-7 ตารางเซนติเมตร และมีค่าแรงตึงผิว 33-36 mN/m ดังแสดงในรูปที่ 3.22 แสดงว่าอุณหภูมิที่ 60-121 องศาเซลเซียส จะไม่มีผลต่อโครงสร้างของสาร หรือไม่ทำให้สารแตกสลาย ทั้งนี้การทดลองนี้ไม่ได้วัดประสิทธิภาพการทำงานของสารลดแรงตึงผิวที่อุณหภูมิดังกล่าว เนื่องจากการวัดค่าแรงตึงผิว และค่าการกระจายน้ำมันจะทำการวัดที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 3.8 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของค่าการกระจายน้ำมันและค่าแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY 1 ที่อุณหภูมิ 60 และ 100 องศาเซลเซียส

เวลา (ชั่วโมง)	60 องศาเซลเซียส		100 องศาเซลเซียส	
	ค่าการกระจาย น้ำมัน(ตร.ชม.)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	ค่าการกระจาย น้ำมัน(ตร.ชม.)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)
1	6.15	33	5.72	33
3	4.91	33	5.31	34
5	5.31	34	5.31	34
7	6.15	35	3.8	34
9	5.31	35	5.31	33
11	6.15	33	6.6	33
13	5.31	34	4.52	33
15	5.72	33	3.46	35



รูปที่ 3.22 กราฟแสดงค่าการกระจายน้ำมันและค่าแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY 1 ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส

การศึกษาผลของค่าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการทำงานและความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ พบว่าที่ค่าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.5-5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ค่าแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้เริ่มต้นเท่ากับ 32-34.5 mN/m ดังแสดงในตารางที่ 3.9 และยังคงความเสถียรของการทำงานไปจนถึง 30 วัน เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ดังแสดงในตารางที่ 3.9 ส่วนค่าการกระจายน้ำมันเริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 9.07-13.85 ตารางเซนติเมตร และเมื่อเวลาผ่านไป 30 วัน พบว่าค่าการกระจายน้ำมันค่าลดลงเพียงเล็กน้อย ดังแสดงในตารางที่ 3.10

ตารางที่ 3.9 ผลของค่าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อค่าแรงตึงผิวและความเสถียรของค่าแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY 1 เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในเวลา 30 วัน

วัน	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)									
	ค่าความเข้มข้นของเกลือ (เปอร์เซ็นต์)									
	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5
C*	50	49	50.5	50	47	48.5	48	49.5	49	48.5
1	34.5	33	33	32	33	33	34	34	34	34
10	33	33	33	32	32	32.5	33	33	33.5	33.5
20	34	36	33.5	32	32	32	32	33	32	32
30	36	36.5	37	33	35	33	32	32	32	34
Ave	34.38	34.63	34.13	32.25	33.0	32.63	32.75	33	32.88	33.38
SD	1.25	1.89	1.93	0.5	1.41	0.48	0.96	0.82	1.03	0.95

(*C คือ ตัวควบคุม หมายถึง Tris Buffer ที่ความเข้มข้นของเกลือต่างๆ)

ตารางที่ 3.10 ผลของค่าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อค่าการกระจายน้ำมันและความเสถียรของค่าการกระจายน้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY 1 เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในเวลา 30 วัน

วัน	ค่าการกระจายน้ำมัน (ตารางเซนติเมตร)									
	ค่าความเข้มข้นของเกลือ (เปอร์เซ็นต์)									
	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5
C*	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12
1	12.56	11.34	13.85	11.34	12.56	11.34	9.07	12.56	12.56	12.56
10	12.56	9.07	11.34	11.34	11.34	12.56	12.56	10.17	11.34	11.34
20	12.56	8.04	11.34	8.04	12.56	11.34	12.56	12.56	10.17	7.07
30	11.34	8.04	9.07	7.07	7.07	10.17	10.17	9.07	12.56	8.04
Ave	12.26	9.12	11.4	9.45	10.88	11.35	11.09	11.09	11.66	9.75
SD	0.61	1.56	1.95	2.22	2.60	0.98	1.76	1.76	1.15	2.62

(*C คือ ตัวควบคุม หมายถึง Tris Buffer ที่ความเข้มข้นของเกลือต่างๆ)

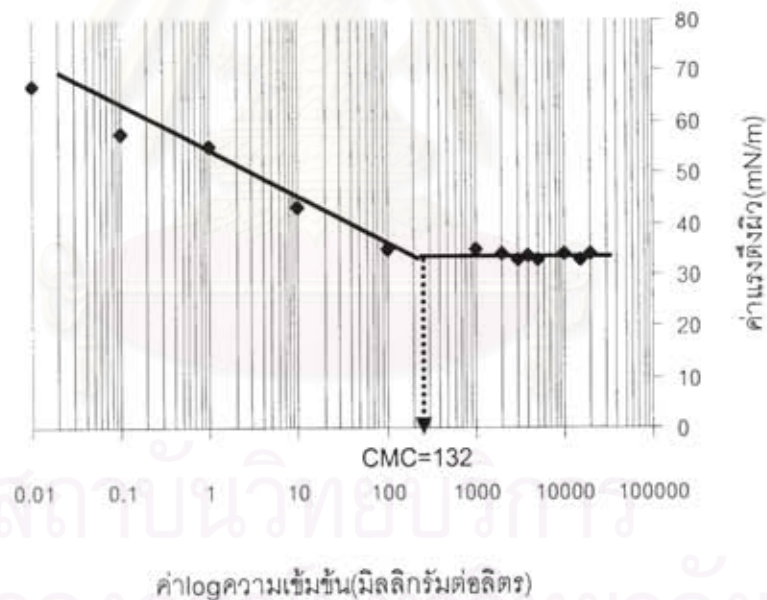
วัดค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน (Emulsion Index) เปรียบเทียบกับน้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ เช่น น้ำมันปาล์ม น้ำมันสลัด น้ำมันดอกคำฝอย น้ำมันงา เฮกซาเดเคนไฮโคซิลเฮกเซน น้ำมันพาราฟิน (paraffin oil) เป็นต้น ตามวิธีของ Shepherd และคณะ (1995) พบว่าความสามารถในการก่ออิมัลชัน (Emulsification activity) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ มีค่าใกล้เคียงกันคือ มีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร ประมาณ 0.443-0.566 และค่าความเสถียรในการก่ออิมัลชัน (Emulsification stability) ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ เช่น น้ำมันคาโนลา น้ำมันงา น้ำมันสลัด น้ำมันรำข้าว น้ำมันดอกคำฝอยและน้ำมันถั่วเหลือง ที่ 24 ชั่วโมง มีค่ามากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำมันคาโนลาและน้ำมันดอกคำฝอยมีค่าความเสถียรลดลงน้อยที่สุดใน 3 วันแรก คือ 10 เปอร์เซ็นต์ น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันรำข้าว น้ำมันสลัดและน้ำมันงา ลดลง 15-25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากนั้นลดลงประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ใน 5 วัน และลดลง 60-70 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 7 วัน ในน้ำมันทุกชนิด ส่วนความสามารถในการก่ออิมัลชันต่อสารประกอบไฮโดรคาร์บอนมีค่าใกล้เคียงกันคือ มีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร ประมาณ 0.487-0.584 ยกเว้น เฮปแทนที่มีค่า 0.728 แต่ไม่เสถียรในการก่ออิมัลชัน มีเพียง ไอโซโพรพิล ไมริสเตท เฮกซาเดเคนและเอทิล โอเลเอท ที่มีค่าความเสถียรการก่ออิมัลชันที่ 24 ชั่วโมง มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ และลดลงเรื่อยๆ จนต่ำกว่า 40

เปอร์เซ็นต์ ในสารประกอบไฮโดรคาร์บอนทุกชนิดภายในเวลา 7 วัน และต่ำกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ ใน น้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนทุกชนิดในการทดลองภายใน 30 วัน ดังแสดงในตารางที่ 3.11

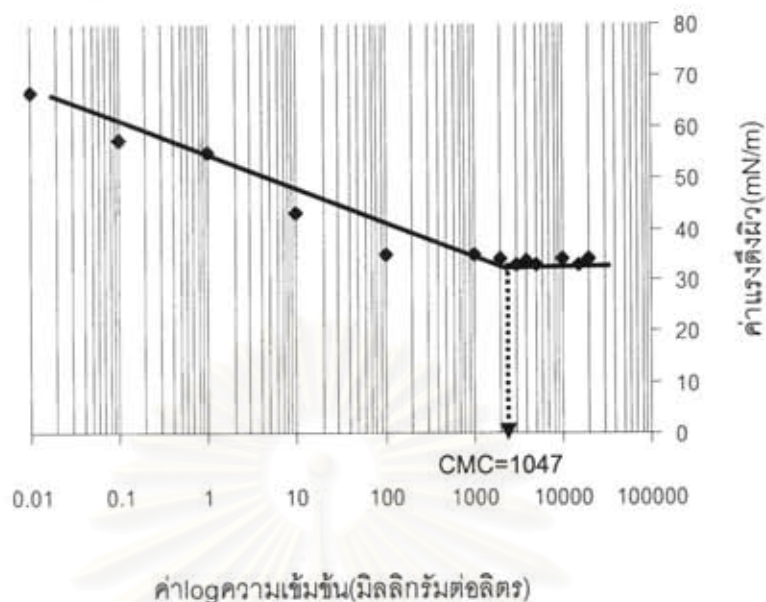
ตารางที่ 3.11 แสดงค่ากิจกรรมการก่ออิมัลชัน (Emulsification activity) และความเสถียรของการก่ออิมัลชัน (Emulsification stability) ที่เวลาต่างๆ ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้น้ำมัน และสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ

น้ำมันและ สารประกอบ ไฮโดรคาร์บอน	Emulsification activity (OD units)	Emulsification stability (%)			
		E24 (1 วัน)	E72 (3 วัน)	E120 (5 วัน)	E168 (7 วัน)
น้ำมันโจโจ้บา	0.462	75.32	62.77	36.80	25.54
น้ำมันคาโนลา	0.505	93.07	83.17	40.79	32.08
น้ำมันงา	0.443	91.87	66.59	46.95	31.38
น้ำมันสลัด	0.566	91.87	68.55	38.34	24.91
น้ำมันรำข้าว	0.488	92.62	70.08	38.93	25.82
น้ำมันมะกอก	0.464	82.33	58.84	35.99	23.92
น้ำมันปาล์ม	0.487	62.83	61.40	40.86	23.00
น้ำมันดอกคำฝอย	0.462	92.21	83.33	31.17	26.19
น้ำมันถั่วเหลือง	0.482	93.98	78.22	35.68	23.86
น้ำมันเมล็ดฝ้าย	0.565	77.52	56.64	32.21	24.07
น้ำมันพาราฟิน	0.584	85.62	74.83	47.09	32.88
เฮปเทน	0.728	71.84	48.35	34.89	30.63
ไอโซไพริทิล ไมริสเตท	0.563	93.78	71.94	49.20	31.62
โดดีเคน	0.505	86.34	77.82	43.76	37.03
ดีคานอล	0.487	77.82	74.95	34.50	25.67
เฮกซาเดคเคน	0.538	93.68	84.94	41.64	33.09
เอทิล โอเลเอท	0.582	95.36	71.13	36.43	27.32

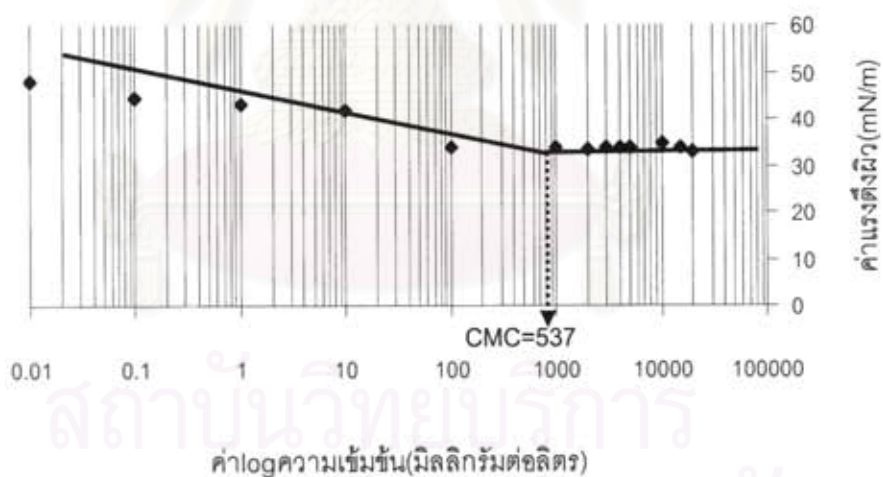
การหาค่าจุดวิกฤติของความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ (Critical micelle concentration; CMC) จากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ โดยละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ ความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8 เตรียมให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ กัน ตั้งแต่ 0.01-20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าแรงตึงผิว และคำนวณหาค่า CMC พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY 1 มีค่า CMC เท่ากับ 132 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าแรงตึงผิว ณ การเกิดไมเซลล์ (γ_{CMC}) เท่ากับ 35 mN/m เปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ เคมเทค 307 ไทรทอน เอ็กซ์ 100 และโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต มีค่า CMC เท่ากับ 1047 537 และ 2630 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีค่าแรงตึงผิว ณ การเกิดไมเซลล์ (γ_{CMC}) เท่ากับ 34 34 และ 41 mN/m ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 3.23-3.26 นอกจากนี้ยังมีค่าใกล้เคียงกับโซโฟโรลิพิด (Otto และคณะ, 1999) และเซอร์แฟคติน (อ้างอิงใน Makkar และ Cameotra, 2002) ด้วย ดังแสดงในตารางที่ 3.12



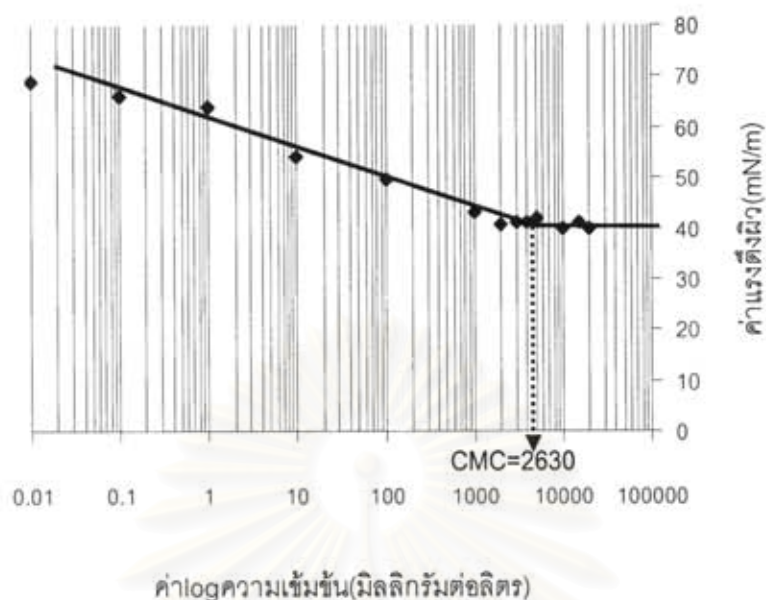
รูปที่ 3.23 แสดงการหาค่า CMC ซึ่งเขียนกราฟระหว่างค่าแรงตึงผิวและ log ของความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1



รูปที่ 3.24 แสดงการหาค่า CMC ซึ่งเขียนกราฟระหว่างค่าแรงตึงผิวและ log ของความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ เคมีเทค 307



รูปที่ 3.25 แสดงการหาค่า CMC ซึ่งเขียนกราฟระหว่างค่าแรงตึงผิวและ log ของความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ ไทรทอน เอ็กซ์ 100



รูปที่ 3.26 แสดงการหาค่า CMC ซึ่งเขียนกราฟระหว่างค่าแรงตึงผิวและ log ของความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต

ตารางที่ 3.12 แสดงค่าจุดวิกฤติของความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ (Critical micelle concentration ; CMC) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดต่างๆ

จุลินทรีย์	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	CMC (มิลลิกรัมต่อลิตร)	อ้างอิง
<i>Pichia anomala</i> PY1	ไกลโคลิพิด	132	การวิจัยนี้
<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214	ไซโฟโวลีพิด	130	Otto และคณะ, 1999
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SP4	แรมโนลิพิด	200	Pornsunthorntawee และคณะ, 2007
<i>Bacillus subtilis</i> LB5a	เซอร์แฟคติน	33	Nitschke และ Pastor, 2006
<i>Pseudozyma aphidis</i> DSM 70725	แมนโนซิลเออร์โททอลลิพิด	10	Rau และคณะ, 2005

บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ทำการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากยีสต์ *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 ในอาหารเหลว ปรับปรุงสูตรที่แหล่งคาร์บอนชนิดเดียวประกอบด้วย 0.02% KH_2PO_4 , 0.02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1% สารสกัดยีสต์, 0.4% NaNO_3 และ 4% น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.5 โดยมีภาวะการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในระดับขดเขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จะลดค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก 50 mN/m เป็น 42 mN/m มีค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 3.14 cm^2 และให้ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เท่ากับ 0.06 กรัมต่อลิตร และเมื่อใช้ 4% น้ำมันก๊วยเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเท่ากับ 0.26 กรัมต่อลิตร โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จะลดค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก 47 mN/m เป็น 29 mN/m และค่าการกระจายน้ำมัน เท่ากับ 69.43 cm^2 และอาหารเหลวปรับปรุงสูตรที่เหมาะสมมากที่สุดต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Pichia anomala* PY1 คือ การใช้แหล่งคาร์บอน 2 ชนิดซึ่งประกอบด้วย 0.02 % KH_2PO_4 0.02 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 % สารสกัดยีสต์ 0.4 % NaNO_3 10.67 % น้ำมันก๊วยเหลือง และ 5.33 % กลูโคส (อัตราส่วน 2:1) ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในระดับขดเขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน จะให้ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 0.95 กรัมต่อลิตร โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จะลดค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก 57 mN/m เป็น 33 mN/m และค่าการกระจายน้ำมัน เท่ากับ 75.39 cm^2

เมื่อนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มาทำการเตรียมสารให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์ชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธี analytical TLC พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 ผลิตได้มีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบหรือเป็นสารประเภทไกลโคลิพิด เนื่องจากสารที่วิเคราะห์ได้บน TLC ให้ผลบวกเมื่อตรวจสอบด้วยไอระเหยของไอโอดีนและมอร์ริสรีเอเจนท์

จากนั้นนำตัวอย่างสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้จากน้ำมันก๊วยเหลืองไปวิเคราะห์ด้วยวิธี LC-MS พบว่ามวลโมเลกุลของสารส่วนใหญ่มีค่าเท่ากับ 658, 674 และ 691 ซึ่งเทียบเคียงได้กับสารไซโฟโรลิพิดที่มีกรดไขมันเป็นองค์ประกอบ มีโครงสร้างเป็น $[\text{C}_{20}]_{\text{Lactone}} + \text{Na}$, $\text{C}_{20} + \text{Na}$ และ $\text{C}_{20} + \text{Na}$ (oxidized form) ตามลำดับ ส่วนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามวลโมเลกุลของสารส่วนใหญ่มีค่าเท่ากับ 675, 691 และ

707 ซึ่งเทียบเคียงได้กับสารโซไฟโรลิพิดที่มีกรดไขมันเป็นองค์ประกอบ มีโครงสร้างเป็น C20+Na, C20+Na (oxidized form) และ C18:1+Ac+Ac ในรูป acidic form และทำการวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากน้ำมันถั่วเหลืองร่วมกับกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามวลโมเลกุลของสารส่วนใหญ่มีค่าเท่ากับ 685 725 และ 805 ซึ่งเทียบเคียงได้กับสารโซไฟโรลิพิดที่มีโครงสร้างที่มีกรดไขมันเป็นองค์ประกอบของ $[C22]_{Lactone} + Na$, $[C22:1]_{Lactone} + Na$, $[C22:1]_{Lactone} + C_3H_7$ ตามลำดับ จากนั้นนำตัวอย่างสาร K ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี ^1H-NMR โดยเทียบกับ ^1H-NMR spectrum resonance ของสารโซไฟโรลิพิดที่ใช้เป็นสารเปรียบเทียบ พบว่ามีพิกปรากฏในช่วง chemical shift ที่ 0.9 เป็นหมู่เมทิล ($-CH_3$) ที่ 1.2 และ 2.0 ppm จะเป็นสายยาวของไฮโดรคาร์บอน ($-CH_2$)_n ที่ 2.4 ppm เป็น $-CH_2-COOH$ และพบพันธะคู่ $-CH=CH-$ ที่ chemical shift ที่ 5.4 ppm ซึ่งเป็นส่วนที่คล้ายคลึงกับส่วนของสายไฮโดรคาร์บอนที่ปรากฏใน ^1H-NMR spectrum resonance ของสารโซไฟโรลิพิดที่ใช้เป็นสารเปรียบเทียบที่ chemical shift ที่ 1.2 2.0 และ 5.4 ppm แต่ก็ยังไม่สามารถระบุโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้อย่างชัดเจน เนื่องจากส่วนของน้ำตาลอาจถูกไฮโดรไลซ์ออกจากโครงสร้างหลักระหว่างการสกัด

การศึกษาลักษณะสมบัติทางชีวเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานและความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้คือ 8.0 ซึ่งให้ค่าแรงตึงผิวต่ำที่สุดเท่ากับ 34 mN/m และค่าการกระจายน้ำมันสูงสุด 7.07 ตารางเซนติเมตร ในวันแรกจนถึง 30 วันของการทดลอง และผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังสามารถทำงานได้ดีเมื่อป่มที่อุณหภูมิ 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

การศึกษาความสามารถในการก่ออิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากน้ำมันถั่วเหลืองร่วมกับกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยการวัดค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน (Emulsion Index) เปรียบเทียบกับน้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนต่างๆ พบว่าค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันที่ 24 ชั่วโมง ต่อน้ำมันคาโนลา น้ำมันงา น้ำมันสลัด น้ำมันรำข้าว น้ำมันดอกคำฝอยและน้ำมันถั่วเหลือง มีค่ามากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำมันคาโนลาและน้ำมันดอกคำฝอยมีค่าความเสถียรลดลงน้อยที่สุดใน 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 เฮกซาเดคเคนและเฮทิล โอลิเอท ก็มีค่ามากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ เช่นกัน และลดลงจนค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันต่ำกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ ในสารประกอบไฮโดรคาร์บอนทุกชนิดภายในเวลา 7 วัน

นอกจากนี้การหาค่าจุดวิกฤติของความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ (Critical micelle concentration; CMC) จากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกึ่งบริสุทธิ์ที่ผลิตได้ พบว่ามีค่าเท่ากับ 132 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าแรงตึงผิว ณ การเกิดไมเซลล์ (γ_{CMC}) เท่ากับ 35 mN/m ซึ่งมีค่าต่ำกว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ที่นำมาเปรียบเทียบ คือ เคมเทค 307 ไทรทอน เอกซ์ 100 และโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต และยังมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดอื่น เช่น เซอร์แฟคตินและแรมโนลิพิดที่มีค่า CMC เท่ากับ 130 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Otto และคณะ, 1999; Pornsunthorntawe และคณะ, 2008)

จากงานวิจัยนี้พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากยีสต์ *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 โดยใช้แหล่งคาร์บอน 2 ชนิดร่วมกันคือ กลูโคสและน้ำมันถั่วเหลือง ซึ่งยีสต์สามารถเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ปริมาณมากกว่าถึง 4 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ไขมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้เป็นสารลดแรงตึงผิวประเภทไกลโคลิพิด ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ ที่ประกอบด้วยกรดไขมันที่มีโครงสร้างเป็น C22 อะตอม โดยจะแตกต่างจากงานวิจัยของผู้อื่นที่ส่วนมากรายงานกรดไขมันที่เป็นชนิด C18 และ C20 อะตอม จากโครงสร้างนี้ทำให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มีค่า CMC ที่ต่ำกว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์บางชนิดและต่ำกว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากยีสต์ *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียวตามรายงานของ ธนัสถา เชียงอุทัย (2549) ที่รายงานมาก่อนหน้านั้น นอกจากนี้ยังสามารถอิมัลชันกับน้ำมันพืชได้หลากหลายชนิด สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ในอนาคต และงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพฉบับแรกที่ผลิตได้จากยีสต์ *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีความปลอดภัยและใช้ได้ ในอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับอาหาร

บทที่ 5

ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไปตลอดจนประโยชน์ในการประยุกต์ใช้

ปัจจุบันสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากขึ้น และมีการนำมาใช้แทนสารลดแรงตึงผิวจากการสังเคราะห์ทางเคมี เนื่องจากถูกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม มีความเป็นพิษต่ำ อีกทั้งสามารถผลิตจากสารตั้งต้นที่มาจากทรัพยากรที่นำกลับมาใช้ใหม่ได้ (Kosaric และคณะ, 1984; Mercade และคณะ, 1993; Babu และคณะ, 1996; Daniel และคณะ, 1998) จึงทำให้กระบวนการพัฒนาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะอย่างยิ่งการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากยีสต์ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีการเจริญเติบโตเร็ว และสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดไกลโคลิพิดที่มีสูตรโครงสร้างหลากหลาย ได้แก่ ทรีฮาโรลิพิด (trehalolipid) โซโฟโรลิพิด (sophorolipid) ไดไกลโคซิลไดกลีเซอไรด์ (diglycosyl diglyceride) และสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ - ลิพิด (polysaccharide - lipid complex) เช่น สาร Mannosylerythritol lipid (MEL) ที่กำลังได้รับการสนใจและมีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย เพราะยีสต์สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดนี้ได้ ในปริมาณสูงกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น เนื่องจากสมบัติทางด้านสรีรวิทยาของยีสต์ที่มีผนังเซลล์หนาและแข็งแรง (Kim และคณะ, 1999) ซึ่งทนต่อความเข้มข้นสูง ๆ ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ยีสต์ผลิตขึ้นเองได้ นอกจากนี้ยีสต์ยังสามารถใช้แหล่งอาหารได้หลายชนิด ดังนั้นโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากยีสต์จึงมีความหลากหลายขึ้นอยู่กับแหล่งอาหารที่ยีสต์นำไปใช้

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากยีสต์ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมมากขึ้น ตัวอย่างเช่น การใช้ไกลโคลิพิดไบโอเซอร์แฟคแตนท์ (glycolipid biosurfactant) แทนเอสเทอร์กรดไขมันของโมโนและโอลิโกแซ็กคาไรด์ เป็นอิมัลซิไฟเออร์ในอาหาร (Kitahata, 1989) การใช้โซโฟโรลิพิดกับแป้งเพื่อให้แป้งมีคุณภาพดีและยืดอายุการเก็บรักษา (Shigeta และ Yamashita, 1986) นอกจากนี้ยังมีสิทธิบัตรของการใช้ผนังเซลล์ที่ได้รับการไฮโดรไลซ์ของยีสต์ (*Saccharomyces uvarum*) ในการผลิตมาการ์น (Ishigami และคณะ, 1988)

ถึงแม้ว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะมีคุณประโยชน์และมีหลายชนิดให้เลือกใช้ อีกทั้งไม่ก่อให้เกิดผลเสียกับสิ่งแวดล้อม แต่ปริมาณการใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังมีน้อยอยู่ เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวดังกล่าวมีต้นทุนการผลิตที่สูง ทั้งนี้ Kosaric และคณะ 1984 ได้แนะนำว่าปัจจัยที่มีผลทำให้ลดต้นทุนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้คือ การคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพและปริมาณสูง และการพัฒนากระบวนการผลิตซึ่งรวม

ไปถึงการเลือกใช้วัตถุดิบราคาถูกและสามารถหาได้ง่าย จะเป็นการเพิ่มความคุ้มค่าและการพัฒนาอุตสาหกรรมการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้

การวิจัยในขั้นต่อไป

การกลายพันธุ์จุลินทรีย์

1. การกลายพันธุ์จุลินทรีย์ให้มีประสิทธิภาพในการผลิตสูงขึ้น และศึกษาคุณสมบัติของสารที่

ผลิตได้

1.1 การกลายพันธุ์ นำจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้มาทำการกลายพันธุ์โดยใช้แสง UV และ/หรือสารเคมี โดยให้จุลินทรีย์ได้รับแสง UV และ สารเคมี ในความเข้มข้นและช่วงเวลาที่เหมาะสม หาค่าการรอดชีวิต

1.2 การคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่สามารถเจริญและให้ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีคุณสมบัติตามต้องการ และทดสอบความเสถียรของการกลายพันธุ์

1.3 ตรวจสอบความสามารถในการผลิตเมื่อเทียบกับเชื้อดั้งเดิมแล้วทำการปรับสภาพที่เหมาะสมต่าง ๆ เพื่อให้ได้ผลผลิตของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สูงขึ้น

- 1.4 ศึกษาลักษณะและสมบัติของสารที่ผลิตได้จากสายพันธุ์กลาย

ประโยชน์และการประยุกต์ใช้ของงานวิจัย

สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีคุณสมบัติทางชีวเคมีที่ดี คือ สามารถทำงานได้ดี และมีความเสถียรที่ความเป็นกรดต่างที่ 3.0-8.0 ทนต่ออุณหภูมิได้จนถึง 121 องศาเซลเซียส และยังสามารถทำงานได้ดีในภาวะที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ 0.5-5.0 เปอร์เซ็นต์ สามารถก่อการเกิดอิมัลชันต่อน้ำมันชนิดต่างๆ ได้ดีเช่น น้ำมันคาโนลา น้ำมันงา น้ำมันสลัด น้ำมันรำข้าว น้ำมันดอกคำฝอยและน้ำมันถั่วเหลือง เป็นต้น และมีค่าจุดวิกฤติของความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ (Critical micelle concentration; CMC) ใกล้เคียงกับโซโฟโรลิพิดที่ผลิตได้จาก *Candida bombicola* และแรมโนลิพิดที่ผลิตได้จาก *Pseudomonas aeruginosa*

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ธนัสถา เชียงอุทัย. 2549. การผลิตและลักษณะสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากยีสต์ที่คัดเลือกได้ วิทยานิพนธ์ ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาษาอังกฤษ

- Abu-Runaida, A.S., I.M. Banat, S. Haditirto, and A. Khamis. 1991. Nutritional requirements and growth characteristics of a biosurfactant-producing *Rhodococcus* bacterium. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 7: 53-61.
- Akari, S. and Y. Akari. 1987. Method of modifying quality of wheat flour product. *Japanese patent 61205449.*
- Amezcu-Vega, C., H.M. Poggi-Varaldo, F. Esparza-Garcia, E. Rios-Leal, and R. Rodriguez-Vazquez. 2007. Effect of culture conditions on fatty acids composition of a biosurfactant produced by *Candida ingens* and change of surface tension of culture media. *Biores. Technol.* 98: 237-240.
- Arino, S., R. Marchal, and J.P. Vandecasteele. 1996. Identification and production of a rhamnolipidic biosurfactant by a *Pseudomonas* species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45: 162-168.
- Ashby, R.D., A. Nunez, D.K.Y. Solaiman, and T.A. Foglia. 2005. Sophorolipid biosynthesis from a biodiesel co-product stream. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 82: 625-630.
- Banat, I.M., R.S. Makkar, and S.S. Cameotra. 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53: 495-508.
- Baviere, M., D. Degouy, and J. Lecourtier. 1994. Process for washing solid particles comprising a sophoroside solution. *US patent 5326407.*
- Bednarski, W., M.Adamczak, J.Tomasik, and M.Plaszczyk. 2004. Application of oil refinery waste in the biosynthesis of glycolipids by yeast. *Bioresour. Technol.* 95: 15-18.

- Bertrand, J.C., P. Bonin, M. Goutex, and G. Mille. 1994. The potential application of biosurfactant in combating hydrocarbon pollution in marine environments. *Res. Microbiol.* **145**: 53-56.
- Brakemeier, A., S. Lang, D. Wullbrandt, L. Merschel, A. Benninghoven, N. Buschmann, and F. Wagner. 1995. Novel sophorose lipids from microbial conversion of 2-alkanols. *Biotechnol. Lett.* **17**: 1183-1188.
- Brown, M. J. 1991. Biosurfactants for cosmetic applications. *Int. J. Cosmet. Sci.* **13**: 61-64.
- Brundish, D.E., N. Shaw, and J. Baddiley. 1967. *Biochem. Biophys. Acta.* **120**: 148-155.
- In Cooper, D. G. and Zajic, J. E. 1980. Surface active compounds from microorganisms. *Adv. Appl. Microbiol.* **26**: 229-256.
- Cameron, D. R., D.G. Cooper, and R.J. Neufeld. 1988. The monoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 1420-1425.
- Casas, J.A., S. Garcia de Lara, and F. Garcia-Ochoa. 1997. Optimization of a synthetic medium for *Candida bombicola* growth using factorial design of experiments. *Enz. Microb. Technol.* **21**: 221-229.
- Casas, J.A. and F. Garcia-Ochoa. 1999. Sophorolipid production by *Candida bombicola* ; medium composition and culture methods. *J. Biosci. Bioeng.* **88**: 488-494.
- Cavalero, D.A. and D.G. Cooper. 2003. The effect of medium composition on the structure and physical state of sophorolipids produced by *Candida bombicola* ATCC 22214. *J. Biotechnol.* **103**: 31-41.
- Chen, J., X. Song, H. Zhang, Y. Qu, and J. Miao. 2006. Sophorolipid produced from the new yeast strain *Wickerhamiella domercqiae* induces apoptosis in H7402 human liver cancer cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**: 52-59.
- Christofi, N. and I.B. Ivshina. 2002. A review: microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *J. Appl. Microbiol.* **93**: 915-929.
- Cooper, D.G. and J.E. Zajic. 1980. Surface-active compounds from microorganism. *Adv. Appl. Microbiol.* **26**: 229-253.
- Cooper, D. G., and D.A. Paddock. 1983. *Torulopsis petrophilum* and surface activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 1426-1429.

- Cooper, D.G. and D.A. Paddock. 1984. Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 173-176.
- Cooper, D.G. and B.G. Goldenberge. 1987. Surface active agents from two *Bacillus* species. *Adv. Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 224-229.
- Culter, A. J. and R.J. Light. 1979. Regulation of hydroxydocosanoic and sophorolipid production in *Candida bogoriensis* by the level of glucose and yeast extract in the growth medium. *J. Biol. Chem.* **254**: 1944-1950.
- David, D.A., H.C. Lynch, and J. Varley. 1999. The production of surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. *Enz. Microb. Technol.* **25**: 322-329.
- Davila, A.M., R. Marchal, and J.P. Vandecasteele. 1992. Kinetics and balance of a fermentation free from product inhibition: sophorolipid production by *Candida bombicola*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 6-11.
- Davila, A.M., R. Marchal, and J.P. Vandecasteele. 1994. Sophorolipid production from lipidic precursors: predictive evaluation of industrial substrates. *J. Ind. Microbiol.* **13**: 249-257.
- Davila, A.M., R. Marchal, and J.P. Vandecasteele. 1997. Sophorolipid fermentation with differentiated substrate supply for growth and production phases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**: 496-501.
- Desai, J.D. and I.M. Banat. 1997. Microbial production of surfactant and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 47-64.
- Deshpande, M. and L. Daniels. 1995. Evaluation of sophorolipid biosurfactant production by *Candida bombicola* using animal fat. *Biores. Technol.* **54**: 143-150.
- Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**: 350.
- Ducreux, J., D. Ballerini, M. Baviere, C. Bocard, and N. Monin. 1997. Composition containing a surface active compound and glycolipids and decontamination process for a porous medium polluted by hydrocarbon. *US patent 5654192*.

- Espuny, M.J., S. Egido, I.R.A. Manresa, and M.E. Mercade. 1996. Nutritional requirements of a biosurfactant producing strain *Rhodococcus* sp. 51T7. *Biotechnol. Lett.* **18**: 521-526.
- Felse, P.A., V. Shah, J. Chan, K.J. Rao, and R.A. Gross. 2007. Sophorolipid biosynthesis by *Candida bombicola* from industrial fatty acid residues. *Enz. Microb. Technol.* **40**: 316-323.
- Fiechter, A. 1992. Biosurfactant: moving towards industrial application. *Trends. Biotechnol.* **10**: 208-217.
- Frautz, B., S. Lang, and F. Wagner. 1986. Formation of cellobiose lipids by growing and resting cells of *Ustilago maydis*. *Biotechnol. Lett.* **8**: 757-760.
- Gautam, K.K. and V.K. Tyagi. 2006. Microbial surfactants: a review. *J. Oleo Sci.* **55**: 155-166.
- Gerson, D.F. 1993. Biosurfactants: Production, properties, application. p. 257-268. In Kosaric, N., The biophysics of microbial surfactants: Growth on concentration, but also on surface property of cells and insoluble substrates. Marcel Dekker, New York.
- Gi, K.E. 2004. Redtide inhibiting agent comprising yellow earth and biodegradable sophorolipid. *Korean patent 20040083614*.
- Gillman, L. B. 1993. A review of instruments for static and dynamic surface and interfacial tension measurement. Present at the seminar by Kruss GmbH and Scientific promotion Co., Ltd., at Indra Regent Hotel, BK. Thailand, October 30, 1997.
- Gobbert, U., S. Lang, and F. Wagner. 1984. Sophorose lipid formation by resting cells of *Torulopsis bombicola*. *Biotechnol. Lett.* **6**: 225-230.
- Gorin, P.A.J., J.F.T. Spencer, and A.P. Tulloch. 1961. Hydroxy fatty acid glycosides of sophorose from *Torulopsis magnoliae*. *Can. J. Chem.* **39**: 846-855.
- Guerra-Santos, L.H., O. Kappeli, and A. Fiechter. 1984. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**: 301-305.

- Guerra-Santos, L.H., O. Kappeli, and A. Fiechter. 1986. Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 443-448.
- Guilmanov, V., A. Ballistreri, G. Impallomeni, and R.A. Gross. 2002. Oxygen transfer rate and sophorose lipid production by *Candida bombicola*. *Biotechnol. Bioeng.* **77**: 489-494.
- Gumienna, M., M. Czamecka, and Z. Czarnecki. 2005. Effect of selected lipid substrates on the process of biosynthesis of surfactant-active compounds by the *Candida bombicola* yeasts. [Online]. <http://www.ejpau.media.pl/volume8/issue2/art-12.html>.
- Hall, P.J., J. Haverkamp, C.G. Van Kralingen, and M. Schmidt. 1996. Laundry detergent composition containing synergistic combination of sophorose lipid and nonionic surfactant. *US patent 5520839*.
- Hewald, S., K. Josephs, and M. Bölker. 2005. Genetic analysis of biosurfactant production in *Ustilago maydis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 3033-3040.
- Hisatsuka, K., T. Nakahara, Y. Minoda, and K. Yamada. 1971. Formation of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*: its function in hydrocarbon fermentations. *Agric. Biol. Chem.* **35**: 686-692.
- Hommel, P.K., O. Stüwer, W. Stuber, D. Haferburg, and H.P. Kleber. 1987. Production of water-soluble surface-active exolipids by *Torulopsis apicola*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 199-205.
- Hommel, P.K. and K. Huse. 1993. Regulation of sophorose lipid production by *Candida (Torulopsis) apicola*. *Biotechnol. Lett.* **15**: 853-858.
- Hommel, P.K., L. Weber, L. Weiss, U. Himmelreich, O. Rilke, and H.P. Kleber. 1994. Production of sophorose lipid by *Candida (Torulopsis) apicola* grown on glucose. *J. Biotechnol.* **33**: 147-155.
- Hudak, A.J. and D.P. Cassidy. 2004. Stimulating in-soil rhamnolipid production in a bioslurry reactor by limiting nitrogen. *Biotechnol. Bioeng.* **30**: 361-368.
- Inge, N.A., V. Bogaert, K. Saerens, C.D. Muynck, D. Develter, W. Soetaert, and E.J. Vandamme. 2007. Microbial production and application of sophorolipids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76**: 23-34.

- Inoue, S. and S. Itoh. 1982. Sophorolipids from *Torulopsis bombicola* as microbial surfactants in alkane fermentation. *Biotechnol. Lett.* **4**: 3-8.
- Ishigami, Y. and S. Suzuki. 1997. Development of biochemicals- functionalization of biosurfactants and natural dyes. *Prog. Org. Coat.* **31**: 51- 61.
- Isoda, H., D. Kitamoto, H. Shinmoto, M. Matsumura, and T. Nakahara. 1997. Microbial extracellular glycolipid induction of differentiation and inhibition of the protein kinase C activity of human promyelocytic leukemia cell line HL60. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**: 609-614.
- Ito, S. and S. Inoue. 1982. Sophorolipids from *Torulopsis bombicola*: possible relation to alkane uptake. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**: 1278-1283.
- Jarvis, F.G. and M.J. Johnson. 1949. A glycolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Am. Chem. Soc.* **71**: 4124-4126.
- Jing, C., S. Xin, Z. Hui, and Q. Yinbo. 2006. Production, structure elucidation and anticancer properties of sophorolipid from *Wickerhamiella domercqiae*. *Enzyme Microbial Technol.* **39**: 501-506.
- Kappeli, O. and A. Fiechter. 1977. Component from the cell surface of the hydrocarbon-utilizing yeast *Candida tropicalis* with possible relation to hydrocarbon transport. *J. Bacteriol.* **131**: 917- 921.
- Kappeli, O., M. Muller, and A. Fiechter. 1978. Chemical and structural alterations at the cell surface of *Candida tropicalis*, induced by hydrocarbon substrate. *J. Bacteriol.* **133**: 952-958.
- Kim, H.S., B.D. Yoon, D.H. Choung, H.M. Oh, T. Katsuragi, and Y. Tani. 1999. Characterization of a biosurfactant, monosylerythritol lipid produced from *Candida* sp. SY16. *Appl. Microb. Biotechnol.* **52**: 713-721.
- Kim, H.S., J.E. Jeon, H.W. Lee, Y.I. Park, W.T. Seo, H.M. Oh, T. Katsuragi, Y. Tani, and B.D. Yoon. 2002. Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid from *Candida Antarctica*. *Biotechnol. Lett.* **24**: 225-229.

- Kitamoto, D., S. Akiba, C. Hioki, and T. Tabuchi. 1990. Extracellular accumulation of mannosylerythritol lipids by a strain of *Candida antarctica*. *Agric. Biol. Chem.* **54**(1): 31-36.
- Kitamoto, D., T. Fuzishiro, H. Yanagishita, T. Nakane, and T. Nakahara. 1992. Production of mannosylerythritol lipids as biosurfactants by resting cells of *Candida Antarctica*. *Biotechnol. Lett.* **14**: 305-310.
- Kitamoto, D., H. Isoda, and T. Nakahara. 2002. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants from energy-saving materials to gene delivery carriers. *J. Biosci. Bioeng.* **94**:187-201.
- Klekner, V., N. Kosaric, and Q.H. Zhou. 1991. Sophorose lipids produced from sucrose. *Biotechnol. Lett.* **13**: 345-348.
- Konishi, M., T. Fukuoka, T. Morita, T. Imura, and D. Kitamoto. 2008. Production of new types of sophorolipids by *Candida batistae*. *J. Oleo Sci.* **57**: 359-369.
- Kosaric, N., W.L. Cairns, N.C.C. Gray, D. Stechey, and J. Wood. 1984. The role of nitrogen in multiorganism strategies for biosurfactant production. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **61**: 1735-1743.
- Kosaric, N., W.L. Cairns, N.C. C. Gray. 1987. Biosurfactants and biotechnology, p. 247-321. In Kosaric, N., W.L. Cairns, and N.C.C. Gray (ed.), *Microbial de-emulsifiers*. Marcel Dekker, New York.
- Kosaric, N. 1992. Biosurfactants in industry. *Pure Appl. Chem.* **64**: 1731-1737.
- Kosaric, N. 1993. Biosurfactants Production Applications. Surfactant Science Series: vol 48. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Kosaric, N. 2001. Biosurfactants and their application for soil bioremediation. *Food Technol. Biotechnol.* **39**: 295-304.
- Kretschmer, A., H. Bock, and F. Wagner. 1982. Chemical and physical characterization of interfacial-active lipids from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 864-870.
- Koch, F.C. and M.E. Hanke. 1953. Practical methods in biochemistry 6th Ed, p. 537. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, Md.
- Lang, S. and D. Wullbrandt. 1999. Rhamnose lipid-biosynthesis, microbial production and application potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**: 22-32.

- Lee, K.H. and J.H. Kim. 1993. Distribution of substrates carbon in sophorose lipid production by *Torulopsis bombicola*. *Biotechnol. Lett.* **15**: 263-266.
- Lin, S.C., K.S. Carswell, M.M. Sharma, and G. Georgiou. 1994. Continuous production of the lipopeptide biosurfactant of *Bacillus licheniformis* JF-2. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41**: 281-285.
- Lindum, P. W., U. Anthoni, C. Christoffersen, L. Eberl, S. Molin and M. Givskov. 1998. N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers control production of an extracellular surface active lipopeptide required for swarming motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *J. Bacteriol.* **180**: 6384-6388.
- Maget-Dana, R. and F. Peypoux. 1994. Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties. *Toxicology.* **87**: 151-174.
- Makkar, R.S. and S.S. Cameotra. 1999. Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources – a review. *J. Surf. Det.* **2**: 237-241.
- Mann, R.M. and M.R. Boddy. 2000. Biodegradation of a nonylphenol ethoxylate by the autochthonous microflora in lake water with observations on the influence of light. *Chemosphere.* **41**: 1361-1369.
- Mann, R.M. and J.R. Bidwell. 2001. The acute toxicity of agricultural surfactants to the tadpoles of four Australian and two exotic frogs. *Environ. Pollut.* **114**: 195-205.
- Masaru, K., N. Takashi, A. Yoji, N. Kazuo, N. Tatsu, T. Sumiko, and N. Jotaro. 2001. Composition for high-density cold storage transportation. *Japanese patent 2001131538*.
- Matsumiya, Y., D. Wakita, A. Kimura, S. Sanpa, and M. Kubo. 2007. Isolation and characterization of a lipid-degrading bacterium and its application to lipid-containing wastewater treatment. *J. Biosci. Bioeng.* **103**: 325-330.
- Matsuyama, T., K. Kaneda, I. Ishizuma, T. Toida, and I. Yano. 1990. Surface-active novel glycolipid and linked 3-hydroxyl fatty acids produced by *Serratia rubidaea*. *J. Bacteriol.* **172**: 3015-3022.
- Mercade, M.E., M.E. Manresa, M. Robert, M.J. Espuny, C. De Andres, and J. Guinea. 1993. Olive mill effluent (OOME) new substrate for biosurfactant production. *Bioresour. Technol.* **43**: 1-6.

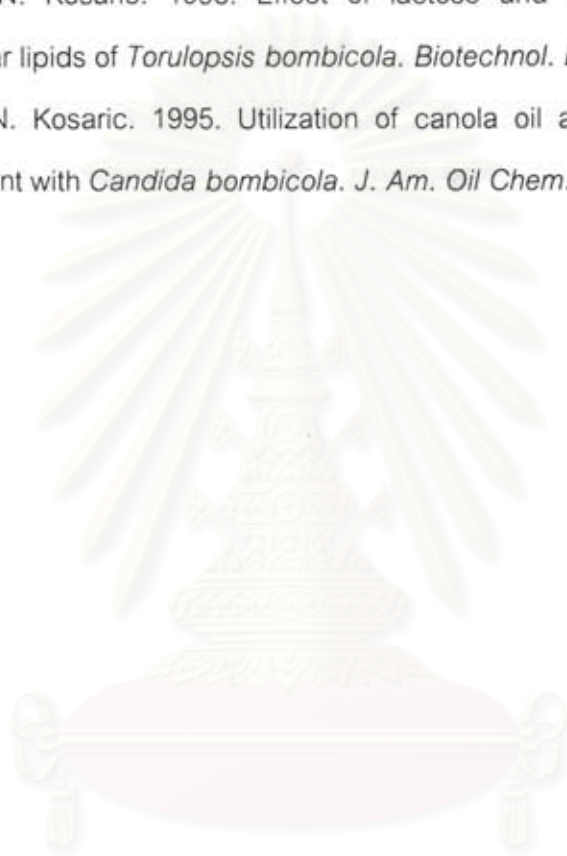
- Morikawa, M., H. Daido, T. Takao, S. Murata, Y. Shimonishi, and T. Imanaka. 1993. A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. Strain MIS 38. *J. Bacteriol.* **175**: 6459–6466.
- Mulligan, C.N. and B.F. Gibbs. 1989. Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 3016-3019.
- Mulligan, C.N., R.N. Yong, and B.F. Gibbs. 2001. Heavy metal removal from sediments by biosurfactants. *J. Hazard Mater.* **85**: 111-125.
- Navonvenezia, S., Z. Zosim, A. Gottlieb, R. Legmann, S. Carmeli, E.Z. Ron, and E. Rosenberge. 1995. Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3240-3244.
- Nitschke, M. and G.M. Pastor. 2006. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. *Biores. Technol.* **97**: 336-341.
- Nunez, A., R. Ashby, T.A. Foglia, and D.K.Y. Solaiman. 2004. LC/MS analysis and lipase modification of the sophorolipids produced by *Rhodotorula bogoriensis*. *Biotechnol. Lett.* **26**: 1087-1093.
- Otto, R.T., H.J. Daniel, G. Pekin, K. Muller-Decker, G. Furstenberge, M. Reuss, and C. Sylдатk. 1999. Production of sophorolipids from whey. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 495-501.
- Patel, R. M. and A.J. Desai. 1997. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. *Lett. Appl. Microbiol.* **25**: 91- 94.
- Persson, A., E. Oesterberg, and M. Dostalek. 1988. Biosurfactant production by *Pseudomonas fluorescens* 378: growth and product characteristics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 1-4.
- Persson, A., G. Molin, and C. Weibull. 1990. physiological and morphological changes induced by nutrient limitation of *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 686-692.
- Pesce, L. 2002. A biotechnological method for the regeneration of hydrocarbons from dregs and muds, on the base of biosurfactants. *World patent 02/062495*.
- Pierce, D. and T.J. Heilman. 1998. Germicidal composition. *World patent 98/16192*.

- Plaza, G.A., I. Zjawiony, and I.M. Banat. 2006. Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated and bioremediated soils. *J. Petrol. Sci. Eng.* **50**: 71-77.
- Pornsunthorntawe, O., P. Wongpanit, S. Chavadej, M. Abe, and R. Rujiravanit. 2008. Structural and physicochemical characterization of crude biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 isolated from petroleum-contaminated soil. *Biores. Technol.* **99**: 1589-1595.
- Ramana. K.V. and N.G. Karanth. 1989. Production of biosurfactants by the resting cells of *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6. *Biotechnol. Lett.* **11**: 437-442.
- Rau, U., C. Manzke, and F. Wagner. 1996. Influence of substrate supply on the production of sophorose lipids by *Candida bombicola* ATCC 22214. *Biotechnol. Lett.* **18**: 149-154.
- Rau, U., S. Hammen, R. Heckmann, V. Wray, and S. Lang. 2001. Sophorolipids: a source for novel compounds. *Ind. Crops Products.* **13**: 85-92.
- Rau, U., L.A. Nguyen, S. Schulz, V. Wray, M. Nimtz, H. Roeper, H. Koch, and S. Lang. 2005. Formation and analysis of mannosylerythritol lipids secreted by *Pseudozyma aphidis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66**: 551-559.
- Reiling, H.E., U.T. Wyasa, L.H. Guerra-Santos, R. Hirt, O.Kappeli, and A. Fiechter. 1986. Pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 985-989.
- Robert, M., M.E. Mercade, M.P. Bosch, J.L. Perra, M.J. Espuny, M.A. Manresa, and J. Guinea. 1989. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T. *Biotechnol. Lett.* **11**: 871-874.
- Rosenberg, E. 1986. Microbial surfactants. *Crit. Rev. Biotechnol.* **3**: 109-132.
- Rosenberg, E. and E. Z. Ron. 1999. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**:154-162.
- Sarubbo, L.A., J.M. de Luna, and G.M. de Campos-Takaki. 2006. Production and stability studies of the bioemulsifier obtained from a new strain of *Candida glabrata* UCP 1002. [Online]. <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol9/issue4/full/6/>.

- Sarubbo, L.A., C.B.B. Farias, and G.M.C. Takaki. 2007. Co-utilization of canola oil and glucose on the production of a surfactant by *Candida lipolytica*. *Curr. Microbiol.* **54**: 68-73.
- Shah, V., G.F. Doncel, T. Seyoum, K.M. Eaton, I. Zalenskaya, R. Hagver, A. Azim, and R. Gross. 2005. Sophorolipids, microbial glycolipids with anti-human immunodeficiency virus and sperm-immobilizing activities. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 4093-4100.
- Sheppard, J. D. and C.N. Mulligan. 1987. The production of surfactant by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 110- 116.
- Shepherd, R., J. Rockey, I.W. Sutherland, and S. Roller. 1995. Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods. *J. Biotechnol.* **40**: 207-217.
- Singh, M., V. Saini, D.K. Adhikari, J.D. Desai, and V.R. Sista. 1990. Production of bioemulsifier by SCP producing strain of *Candida tropicalis* during hydrocarbon fermentation. *Biotechnol. Lett.* **12**: 743-746.
- Solaiman, D.K.Y., R.D. Ashby, A. Nunez, and T.A. Forlia. 2004. Production of sophorolipids by *Candida bombicola* grown on soy molasses as substrate. *Biotechnol. Lett.* **26**: 1241-1245.
- Solaiman, D.K.Y., R.D. Ashby, J.A. Zerkowski, and T.A. Foglia. 2007. Simplified soy molasses-based medium for reduced-cost production of sophorolipids by *Candida bombicola*. *Biotechnol Lett.* **29**: 1341-1347.
- Spencer, J.F.T., P.A.J. Gorin, and A.P. Tulloch. 1970. *Torulopsis bombicola* sp. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **36**: 129-133.
- Stuwer, O., R. Hommel, D. Haferburg, and H.P. Kleber. 1987. Production of crystalline surface-active glycolipids by a strain of *Torulopsis apicola*. *J. Biotechnol.* **6**: 259-269.
- Thanomsub, B., T. Watcharachaipong, K. Chotelersak, P. Arunrattiyakorn, T. Nitoda, and H. Hanzaki. 2004. Monoacylglycerols: glycolipid biosurfactants produced by a thermotolerant yeast, *Candida ishiwadae*. *J. Appl. Microbiol.* **96**: 588-592.
- Tulloch, A.P., J.F.T. Spencer, and P.A.J. Gorin. 1962. The fermentation of long-chain compounds by *Torulopsis magnoliae*. *Can. J. Chem.* **40**: 1326-1338.

- Tulloch, A.P. and J.F.T. Spencer. 1968. Fermentation of long-chain compounds by *Torulopsis apicola*. IV. Products from esters and hydrocarbons with 14 and 15 carbon atoms and from methyl palmitoleate. *Can. J. Chem.* **46**: 1523-1528.
- Tulloch, A.P., J.F.T. Spencer, and M.H. Deinema. 1968a. A new hydroxyl fatty acid sophoroside from *Candida bogoriensis*. *Can. J. Chem.* **46**: 345-348.
- Van Bogaert, I.N.T., K. Saerens, C. De Muyneck, D. Develter, W. Soetaert, and E.J. Vandamme. 2007. Microbial production and application of sophorolipids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76**: 23-34.
- Vater, P.J. 1986a. Biosurfactants-production, properties and applications. p. 419-446. In Kosaric N. (ed), Lipopeptides in food application. Dekker, New York.
- Wichken, A. J. and K.W. Knox. 1970. Surface active compounds from microorganisms. *Adv. Appl. Microbiol.* **26**: 229-256.
- Wu, J. and L.K. Ju. 1998. Extracellular particles of polymeric material formed in n-hexadecane fermentation by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biotechnol.* **59**: 193-202.
- Yamane, T. 1987. Enzyme technology for the lipid industry. An engineering overview. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **64**: 1657-1662.
- Yaminov, M. M., K. N. Timmis, V. Wray, and H. L. Fredrickson. 1995. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Appl. Environ. Microbiol.* **61(5)**: 1706-1713.
- Yakimov, M.M., H.L. Fredickson, and K.N. Timmis. 1996. Effect of heterogeneity of hydrophobic moieties on surface activity of lichenysin A, a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus licheniformis* BAS50. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **23**: 13-18.
- Yeh, M.S., Y.H. Wei, and J.S. Chang. 2006. Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*. *Process Biochem.* **41**: 1779-1805.
- Yoo, D.S., B.S. Lee, and E.K. Kim. 2005. Characteristics of microbial biosurfactant as an antifungal agent against plant pathogenic fungus. *J. Microbiol. Biotechnol.* **15**: 1164-1169.

- Zhang, L., P. Somasundaran, S.K. Singh, A.P. Felse, and R. Gross. 2004. Synthesis and interfacial properties of sophorolipid derivatives. *Colloid Surf.* **240**: 75-82.
- Zhou, Q.H., V. Klekner, and N. Kosaric. 1992. Short communications: production of sophorose lipids by *Torulopsis bombicola* from safflower oil and glucose. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **69**: 89-91.
- Zhou, Q.H. and N. Kosaric. 1993. Effect of lactose and olive oil on intra- and extracellular lipids of *Torulopsis bombicola*. *Biotechnol. Lett.* **15**: 477-482.
- Zhou, Q.H. and N. Kosaric. 1995. Utilization of canola oil and lactose to produce biosurfactant with *Candida bombicola*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **72**: 67-71.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ตารางที่ 3.13 สรุปรายงานการวิจัยที่ได้ดำเนินการไปแล้วในปี 2550 และ 2551

วิธีดำเนินการวิจัยที่เสนอในปี 2550	รายงานการวิจัยที่ได้ดำเนินการไปแล้วในปี 2550
<p>1.เก็บตัวอย่างต่าง ๆ เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ</p> <p>2.จำแนกสกุลของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ทางอนุกรมวิธาน โดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การทดสอบสมบัติทางชีวเคมี และจำแนกโดยใช้เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์</p> <p>3.การศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะที่เหมาะสมที่เหมาะสมในการเลี้ยงจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้เพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ</p> <p>การหาชนิดของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ</p> <p>ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ ค่าความเป็นกรดค่าเริ่มต้น และอุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ</p> <p>4. การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ในภาวะที่เหมาะสม</p>	<p>1.การคัดเลือกยีสต์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแหล่งต่างๆ สามารถแยกยีสต์สายพันธุ์ PY1 จากอาหารหมักคองพื้นบ้านของประเทศไทย จากอำเภอพนัสนิคม จังหวัดชลบุรี มีสามารถสูงสุดในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ</p> <p>2.เมื่อจำแนกสายพันธุ์โดยการศึกษา ลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยา การทดสอบสมบัติของกระบวนการเมตาบอลิซึมหรือสมบัติทางชีวเคมี การบ่งชี้ชนิดของราในระดับสปีชีส์โดยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ประมวลรหัสของตำแหน่ง ITS พบว่าเป็น <i>Pichia anomala</i></p> <p>3. <i>Pichia anomala</i> สายพันธุ์ PY1 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี4% น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน และ 0.4% NaNO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด และเมื่อใช้อาหารปรับปรุงสูตรที่ประกอบด้วย10.67% น้ำมันถั่วเหลือง และ 5.33% กลูโคส ค่าความเป็นกรดค่าเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 ° ซ ในระดับขวดเขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน จะให้ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวเพิ่มเป็น 0.95 กรัมต่อลิตร สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มีค่าแรงตึงผิวต่ำสุด 33 mN/m และค่าการกระจายน้ำมัน เท่ากับ 75.39cm^2</p> <p>4.การศึกษาการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอาหารเหลวกำหนดสูตร ของ <i>Pichia anomala</i> สายพันธุ์ PY1 พบว่าเชื้อยีสต์สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพควบคู่ไปกับการเจริญของเชื้อ</p>

ตารางที่ 3.13 (ต่อ)

วิธีดำเนินการวิจัยที่เสนอในปี 2551	รายงานการวิจัยที่ได้ดำเนินการไปแล้วในปี 2551
<p>1.การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและการสกัดแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ</p> <p>2.การเตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธีโครมาโตกราฟี วิเคราะห์โครงสร้างและวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของสาร</p> <p>3.การศึกษาสมบัติเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ทดสอบความสามารถและทดสอบความเสถียรของสารในช่วง pH อุณหภูมิ และ NaCl ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน และทดสอบคุณสมบัติการก่ออิมัลชันต่อไขมันที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร และเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ (Critical Micelle Concentration ; CMC) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้กับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์บางชนิด</p>	<p>1.สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มีค่าแรงตึงผิวต่ำสุด 33 mN/m ค่าจุดวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ (CMC) เท่ากับ 132 mg/l ค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 75.39 cm² และให้ผลผลิตเท่ากับ 0.95 กรัมต่อลิตร</p> <p>2.ทำการเตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วน เมื่อทำการวิเคราะห์โครงสร้างของสารพบว่าเป็นสารประเภทไกลโคลิปิด และเมื่อวิเคราะห์สาร ด้วย LC- MS แสดงค่ามวลโมเลกุลลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ ส่วนใหญ่มีค่าเท่ากับ 685 725 และ 805 ซึ่งเทียบเคียงได้กับสารโซโฟโรลิปิดที่มีโครงสร้างที่มีกรดไขมันเป็นองค์ประกอบของ C22 ที่เป็น acidic และ lactic</p> <p>3.เมื่อศึกษาลักษณะสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพพบว่าสามารถทำงานได้ดี และมีความเสถียรที่ความเป็นกรดต่างเท่ากับ 2-9 มีความเสถียรต่ออุณหภูมิต่างๆ ได้จนถึงอุณหภูมิ 121^o ซ และยังคงความเสถียรได้ดีในภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5-5.0 % และสามารถก่ออิมัลชันต่อน้ำมันพืชได้ดี เช่น น้ำมันคาโนลาน้ำมันงา น้ำมันสลัด น้ำมันรำข้าว น้ำมันดอกคำฝอย และน้ำมันถั่วเหลือง เป็นต้น</p>

โครงการวิจัยนี้ได้บรรลุวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ในปีที่สองของการศึกษาตามที่เสนอไว้ในข้อเสนอการวิจัย คือการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในภาวะที่เหมาะสม การวิเคราะห์โครงสร้างของสาร และศึกษาลักษณะสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 ในปีนี้ ประสบผลสำเร็จตามที่ได้เสนอไว้ ดังแสดงสรุปรายงานการวิจัยที่ได้ดำเนินการวิจัยไว้แล้ว ในปีที่ 1 และปีที่ 2 ดังตารางที่ 3.13



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นางจิราภรณ์ ธนียวัน (รองศาสตราจารย์)
ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mrs.THANIYAVARN JIRAPORN
2. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์
3. หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร e-mail
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท เขต
ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทร 0-2218-5070 โทรสาร 0-2252-7576
E-mail : jiraporn.Th@chula.ac.th
4. ประวัติการศึกษา

2521	B.Sc. Chulalongkorn university, Bangkok, Thailand Professor Tab's Gold Medal Award
2525	M.Sc. Kasetsart university, Bangkok, Thailand
2527	Research activities on restriction mapping of the cloning β - glucosidase gene at Hiroshima university, Japan.(JSPS)
2527	Training in genetic engineering techniques in tropical diseases research. International laboratory workshop at Mahidol university, Thailand.
2538	Training in AMBO course on genetics and molecular biology of yeast at Osaka university, Japan.
2540	Exploitation of transformation system in <i>Bacillus subtilis</i> 3/38 and its surfactin production.
2542	Production and structural analysis of biosurfactant produced by microorganisms. Osaka university, Japan. (JSPS)
2543	Research activities on detection of <i>E.coli</i> O157 by using molecular biology technique and training in food testing lab.at Kyoto biseibutu kenkyusho and Kyoto city institute of health and environmental sciences. (OECF)
2549	Research activities on Microbial resource project : structural analysis of biosurfactants in Hokkaido university, Japan.(JSPS)

5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิมัธยมศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
Microbial products, Industrial microbiology,
Food microbiology
6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุ
สถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัยหรือผู้
ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย
 - 6.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อแผนงานวิจัย-
 - 6.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย
 - 6.2.1 การผลิตสารไบโอเซอแฟคแตนท์เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร
 - 6.2.2.การตรวจหาenterotoxin A ยีนของ *S.aureus* ในอาหารโดยวิธี
loop LAMP
7. งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่
 1. Thaniyavarn J, Chianguthai, T., Sangvanich, P., Roongsawang, N., Washio, K.,
Morikawa, M., and Thaniyavarn, S. 2008. Production of sophorolipid by
Pichia anomala. Biosci. Biotechnol. Biochem. 72(8): 2061-2068.
 2. Visetsripong A, Pattaragulwanit K, Thaniyavarn J, Matsuura R, Kuroda A and
Sutheinkul O. 2007 Detection of *Escherichia coli* O157: H7 vt and rfb(O157) by
multiplex polymerase chain reaction. Southeast Asian J Trop Med Public
Health. 38(1): 82-90
 3. Thaniyavarn J, Chongchin A, Wanitsuksombut N, Thanivavarn S,
Pinphanichakarn P, Leepipatpiboon N, Morikawa M and Kanaya S. 2006.
Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* A41 using palm oil as
carbon source. J. Gen. Appl. Microbiol. 52: 215-222
 4. Wongnikorn K, Pattaragulwanit K and Thaniyavarn J. 2004. Cloning and
characterization of the gene cluster encoding rhamnolipid biosynthesis of
Pseudomonas sp. A41. Abstract : 15th Annual Meeting of the Thai Society for
Biotechnology on "Sustainable Development of SMEs through Biotechnology,
(3-6Feb): 78
 5. Thaniyavarn J, Roongsawang N, Kameyama T, Haruki M, Imanaka T, Morikawa

- M and Kanaya S. 2003 : Production and characterization of biosurfactants from *Bacillus licheniformis* F2.2. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67(6): 1239-1244
6. Roongsawang N, Thaniyavarn J, Thaniyavarn S, Pinphanichakarn P, Morikawa M and Kanaya S. 2003. Production and Properties of *Bacillus subtilis* BKK-1 Biosurfactant. *Thai J. Biotechnol.* 4(1): 1-8
 7. Roongsawang N, Thaniyavarn J, Thaniyavarn S, Kameyama T, Haruki M, Imanaka T, Morikawa M and Kanaya S. 2002 : Isolation and characterization of a halotolerant *Bacillus subtilis* BBK-1 which produces three kinds of lipopeptides : bacillomycin L, plipastatin, and surfactin. *Extremophiles*, 6:499-506
 8. Thaniyavarn J, Chongchin A, Wanitsusombut N, Thaniyavarn S, Pinphanichakarn P, Petsom A, Roongsawang N, Kameyama T, Morikawa M and Kanaya S. 2001. Production, Properties and Structural Analyses of Biosurfactant Produced from *Pseudomonas* sp. A41 using Palm Oil as Carbon Source. *Biotechnology for Sustainable Utilization of Biological Resources in the Tropics* Vol. 15 JSPS- NRCT/DOST/LIPID/VCC Joint Seminar November 7-9 Bangkok Thailand.
 9. Thaniyavarn J, Roongsawang N, Morikawa M, Haruki M, Imanaka T and Kanaya S. 1999. Isolation of *Bacillus licheniformis* F2.2 which produces alkyl phenylether type biosurfactants. Poster presented at the Annual Meeting of Japan Society for Bioscience, Biotechnology and Agrochemistry, 30-1 March/April, Fukuoka, Japan, Abstracts book. p.322
 10. Roongsawang N, Thaniyavarn J, Morikawa M, Haruki M, Imanaka T and Kanaya S. 1999. Isolation of Halotolerant *Bacillus*, which produced three types of lipopeptide, type biosurfactant. Poster presented at the Annual Meeting of Japan Society for Bioscience, Biotechnol. and Agrochem. , 30-1 March/April, Fukuoka, Japan, Abstracts book. p. 321
 11. Sutthivanitchakul B, Thaniyavarn J. and Thaniyavarn S. 1999. Biosurfactant production by *Bacillus licheniformis* F2.2 *Thai J. Biotechnol.* 1: 46-53.

12. Roongsawang N, Thaniyavarn J. and Thaniyavarn S. 1999. Properties of Biosurfactant production by *Bacillus* sp. KP-2. Thai J. Biotechnol. 1: 54-60
13. Thaniyavarn J, Morikawa M, Hamura T and Imanaka T. 1992. Exploitation of transformation system in *Bacillus subtilis* 3/38 and its surfactin production. Microbial utilization of renewable resource, NRCT-NUS-DOST-JSPS seminar, Vol. 8. Oct. 29-31, Bangkok, Thailand.

ประวัติคณะผู้วิจัย

1. ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นาย สุเทพ ธานีวัน
ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. SUTHEP THANIYAVARN
2. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์
3. หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร e-mail
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท เขต
ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทร 0-2218-5070 โทรสาร 0-2252-7576
E-mail : tsutep@chula.ac.th
4. ประวัติการศึกษา

2516	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยมหิดล
2520	M.S. (Microbiology and Immunology) จาก University of Louisville ประเทศสหรัฐอเมริกา
2525	Ph.D. (Microbiology and Immunology) จาก University of Louisville ประเทศสหรัฐอเมริกา
2525 – 2527	Postdoctoral Fellow, Department of Biochemistry University of Illinois at Urbana - Champaign ประเทศสหรัฐอเมริกา
5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ เอนไซม์จากจุลินทรีย์
การจัดการของเสียอันตรายโดยชีววิธี (Bioremediation)
6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย
 - 6.1 หัวหน้าโครงการวิจัย :
 - 6.1.1 เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียและจีนที่ ประมวลรหัสของมัน

6.1.2 การบำบัดสาร PAHs โดยชีววิธี

6.2 ผู้ร่วมวิจัย: การผลิตสารไบโอเซอร์แฟคติน

6.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :

6.3.1 เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากรา *Penicillium* ทนงบประมาณแผ่นดิน

6.3.2 การผลิตสารไบโอเซอร์แฟคติน ทน NRCT-JSPS

1. Thaniyavarn J, Chongchin A, Wanitsuksombut N, Thanivavarn S, Pinphanichakarn P, Leepipatpiboon N, Morikawa M and Kanaya S. 2006. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* A41 using palm oil as carbon source. J. Gen. Appl. Microbiol. 52: 215-222
2. Roongsawang N, Thaniyavarn J, Thaniyavarn S, Kameyama T, Haruki M, Imanaka T, Morikawa M and Kanaya S. 2002 : Isolation and characterization of a halotolerant *Bacillus subtilis* BBK-1 which produces three kinds of lipopeptides : bacillomycin L, plipastatin, and surfactin. Extremophiles, 6:499-506

6.3.3 การผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียและยีสที่ประมวลรหัสของมัน
ทน NRCT-JSPS

1. Jiranuntiporn, S., Chareonpornwattana, S., Thaniyavarn, J., and S. Thaniyavarn. (2000) Mutation of Bacteria strain AG2 to enhance Dextranase Production. Abstract in the 12th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. Kanchanaburi, Thailand, pp.108
2. Jiranuntipon, S., Chareonpornwattana and S.Thaniyavarn (2003) Mutation of *Arthrobacter* sp. Strain AG-2 for Enhancing Dextranase Production. J. of Science Res. 28 (2): 99-109

ประวัติคณะผู้วิจัย

1. ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นางไพเราะ ปิ่นพานิชการ
ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Name (Mrs.) Pairoh Pinphanichakarn
2. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์
3. หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร e-mail

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท เขต
ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทร 0-2218-5070 โทรสาร 0-2252-7576

4. ประวัติการศึกษา

1969 B.Sc. (Hons.) in Chemistry, Chulalongkorn University, Thailand.

1971 M.Sc. in Chemistry, Chulalongkorn University, Thailand.

1977 Ph.D. in Biochemistry, The University of Texas at Austin, U.S.A.

5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย

6.1 หัวหน้าโครงการวิจัย :

6.2 ผู้ร่วมวิจัย:

7. งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :

1. Wateewuthajarn, K., and Pinphanichakarn, P. 2000. Purification and characterization of xylanases from *Streptomyces* sp. PC22. *Sci.Res.Chula.Univ.* 25(2), 245- 256.

2. Pinyakong, O., Habe, H., Supaka, N., Pinphanichakarn, P., Juntongjin, K., Yoshida, T., Furihata, K., Nojiri, H., Yamane, H., and Omori, T. 2000.

Identification of novel metabolites in the degradation of phenanthrene by *Sphingomonas* sp. Strain P2. *FEMS Microbiol. Lett.* 191, 115-121.

3. Supaka, N., Pinphanichakarn, P., Pattaragulwanit, K., Thaniyavarn, S., Omori, T., and Juntongjin, K. 2001. Isolation and characterization of a phenanthrene-degrading *Sphingomonas* sp. Strain P2 and its ability to degrade fluoranthene and pyrene via cometabolism. *Sci.Asia.* 27(1), 21-28.

4. Ungchaitam, S., Thana, C., Talawanich, W., and Pinphanichakarn, P. 2001. β -xylosidase from *Streptomyces* sp. CH7 and its gene cloning and expression in *Escherichia coli*. *J.Sci. Res. Chula. Univ.* 26(2), 107-116.

5. Ruangtaep, J., Chungool, W., and Pinphanichakarn, P. 2002. Preliminary study of xylan-binding properties of xylanase I and II from *Streptomyces* sp. PC22 for their purification potential. *J.Sci.Res.Chula.Univ.* 27(2), 175-182.

6. Charoenchang, N., Pinphanichakarn, P., Pattarakulwanich, K., Thaniyavarn, S., and Juntongjin, K. 2003. Utilization of agricultural materials to enhance

microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil.

J.Sci.Res.Chula.Univ. 28, Special Issue I, 1-23.

7. Roongsawang, N., Thaniyavarn, J., Thaniyawarn, S., Pinphanichakarn, P., Morikawa, M., and Kanaya, S. 2003. Production and properties of *Bacillus subtilis* BBK-1 Biosurfactant. Thai. J. Biotechnol. 4(1), 1-8.

8. Pinphanichakarn, P., Tangsakul, T., Tongnumwon, T., Talawanich, Y., and Thamchaipenet, A. 2004. Purification and characterization of β -xylosidase from *Streptomyces* sp. CH7 and Its gene sequence analysis. World J. Microbiol. And Biotechnol. 20, 727-733.

ประวัติคณะผู้วิจัย

1. ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) ดร.วรรณา ตูลยธัน
ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Dr.Vanna Tulyathan
2. ตำแหน่งปัจจุบัน (อาจารย์, ผศ., รศ., ศ.) รองศาสตราจารย์
3. หน่วยงานที่ติดต่อได้สะดวก ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทรศัพท์ 02-2185515 โทรสาร 02-2544314 Email vanna_tt@sc.chula.ac.th
4. ประวัติการศึกษา

สาขา

สถาบัน

ปีที่จบ

ปริญญาตรี	วท.บ(เคมีเทคนิค)	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2513		
ปริญญาโท	M.S.(Food Tech)	Iowa State Univ. Ames
2516		
ปริญญาเอก	Ph.D.(Ag.Chem)	Univ. of California
2527		
อื่นๆ(ระบุ)	Diploma in Biotechnology	Osaka Univ.
2521		

5. สาขาวิชาที่เกี่ยวข้อง

Food Chemistry , Food phenolics, Food carbohydrates

6. โครงการที่ผู้สมัครกำลังดำเนินการอยู่

6.1 ชื่อโครงการ การเพิ่มคุณภาพการสีข้าวโดยใช้จุลธาตุฯ
 ระยะเวลาโครงการ 3 ปี ตั้งแต่ 2546 ถึง 2549
 แหล่งทุนที่ให้การสนับสนุน สกว. (โครงการร่วมกับ ม.เชียงใหม่)
 สถานะ หัวหน้าโครงการ ผู้ร่วม

7. ผลงานวิจัย/สิ่งตีพิมพ์

1. Vanna Tulyathan, Chaiyuth Thunpithayakul and Wechayan Thanabodeepat. 1990. Effect of varieties and age on physicochemical properties of starch for sweet potatoes grown in Thailand *J. Science Society of Thailand* 16(2): 89-96
2. Vanna Tulyathan, Thaneek Trakulintra and Sakda Jongkaewattana . 1992 Sodium hexametaphosphate and EDTA extraction of pomelo pectins *Thai J of Agricultural Science* 25 (1):75-86
3. Vanna Tulyathan , Kiattisak Duangmal and Chaiyuth Thunpittayakul." 1993. Anthocyanin extractive from blue pea flowers (*Clitoria ternatea*). *Thail J. of Agricultural Science* 26 (4):171-183
4. Vanna Tulyathan, Kanitha Tanawong, Prapa Songjinda and Nongnuj Jaibonn. 2002. Some physicochemical properties of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus Lam*) seed flout and starch. *Science Asia* 28 (2002):37-41.
5. V. Siriwong, V. Tulyathan and Y.Waiprib. 2003. Isolation and physicochemical characterization of starches from different banana varieties. *J. Food Biochemistry*.27, 471-484

บริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย