

การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยยีสต์และราคล้ายยีสต์ที่แยกได้จากบริเวณชายฝั่งเกาะสีชัง



นางสาวสุตารัตน์ ลือพงศ์พัฒนา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR) are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2557

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

BIOSURFACTANT PRODUCTION BY YEAST AND YEAST-  
LIKE FUNGI ISOLATED FROM COASTAL AREAS OF KOH SI CHANG

Miss Sudarat Luepongattana



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2014

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยยีสต์และราคล้ายยีสต์ ที่แยกได้จากบริเวณชายฝั่งเกาะสีชัง
โดย	นางสาวสุภารัตน์ ลือพงศ์พัฒนา
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธานีวัน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร.ศศิธร จินตามรกฏ

---

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชูลี ยมภักดี)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธานีวัน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(ดร.ศศิธร จินตามรกฏ)

.....กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกวิทย์ ลือพร้อมชัย)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(ศาสตราจารย์ ดร. สาวิตรี ลิ้มทอง)

สุดารัตน์ ลือพงศ์พัฒนนะ : การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยยีสต์และราคล้ายยีสต์ที่แยกได้จากบริเวณชายฝั่งเกาะสีชัง (BIOSURFACTANT PRODUCTION BY YEAST AND YEAST-LIKE FUNGI ISOLATED FROM COASTAL AREAS OF KOH SI CHANG) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. จิราภรณ์ ธนียวัน, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ดร.ศศิธร จินตามรรกฎ, 132 หน้า.

การคัดเลือกยีสต์และราคล้ายยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่คัดแยกได้จากบริเวณชายฝั่งเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี ราคล้ายยีสต์สายพันธุ์ *Aureobasidium pullulans* YTP6-14 มีประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมากที่สุด และเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อปรับปรุงสูตรที่ประกอบด้วยอัตราส่วนระหว่างกลูโคส 2.5 เปอร์เซ็นต์ และกลีเซอรอล 2.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน เปปโตเนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่อัตราส่วน C:N เท่ากับ 300 ค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 6.5 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า เท่ากับ 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่าค่าแรงตึงผิวในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงจาก 53 มิลลินิวตันต่อเมตร เหลือ 32 มิลลินิวตันต่อเมตร หรือมีค่าผลต่างแรงตึงผิว เท่ากับ 37 เปอร์เซ็นต์ และค่าการกระจายน้ำมันสูงสุด เท่ากับ  $43.34 \pm 2.5$  ตารางเซนติเมตร จากการศึกษาลักษณะคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่า มีค่าความเข้มข้นวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ หรือ ค่า critical micelle concentration (CMC) เท่ากับ 39 มิลลิกรัมต่อเมตร ค่า Hydrophilic-lipophilic balance (HLB) เท่ากับ 10 - 14.27 และสามารถก่ออิมัลชันร่วมกับน้ำมันรำข้าวได้ดีที่สุด จากการศึกษาความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความเสถียรต่อภาวะต่างๆ เช่น ความเข้มข้นเกลือ (1-12 เปอร์เซ็นต์) ค่าพีเอช (2-12) และอุณหภูมิ (4-100 องศาเซลเซียส) เมื่อเตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยเทคนิค preparative TLC พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถแบ่งเป็น 3 ลำดับส่วน ได้แก่ F1, F2 และ F3 ซึ่งลำดับส่วนที่ F2 และ F3 มีค่าการกระจายน้ำมันสูง จึงได้เลือกมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค HPLC และจากการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเทคนิค FI-MS และ 2D-NMR พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพลำดับส่วนที่ F2-3 มีน้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 168 ซึ่งคือสาร 5-hydroxy-2-decenoic acid delta-lactone หรือ Massoia lactone โดยถือเป็นการรายงานครั้งแรกที่พบว่าสาร Massoia lactone มีคุณสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากราคล้ายยีสต์

ภาควิชา	จุลชีววิทยา	ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....
ปีการศึกษา	2557	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

# # 5572147323 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS: BIOSURFACTANT / KOH SICHANG / AUREOBASIDIUM PULLULANS

SUDARAT LUEPONGPATTANA: BIOSURFACTANT PRODUCTION BY YEAST AND YEAST-LIKE FUNGI ISOLATED FROM COASTAL AREAS OF KOH SI CHANG. ADVISOR: ASSOC. PROF. JIRAPORN THANIVAVARN, CO-ADVISOR: DR.SASITORN JINDAMORAKOT, 132 pp.

Screening of the efficient biosurfactant producing yeasts and yeast-like fungi isolated from coastal areas of Koh Sichang, *Aureobasidium pullulans* YTP6-14 was the most efficient biosurfactant producing yeast-like fungi and further investigated for optimizing the nutritional and environmental condition for biosurfactant production. The highest biosurfactant production was obtained when cultivating with 2.5 % (w/v) glucose supplemented with 2.5 % (w/v) glycerol as a carbon source and peptone as a nitrogen source with C:N ratio of 300, pH 6.5, at 30 °C within a shake flask at 200 rpm After cultivation for 7 days, it shown the surface tension of culture medium was decreased from 53 mN/m to 32 mN/m or 37% and oil displacement in medium 43.34 cm<sup>2</sup>. The physicochemical study of the biosurfactant, the CMC value is 39 mg/L, the HLB value is 10-14.27 and best form emulsion with rice bran oil. The study of stability test, it remained unchanged properties of the biosurfactant within a wide range of environmental condition such as pH (2-12), temperature (4-100 °C) and NaCl concentration (2-10 %). It display three major biosurfactants, namely F1, F2 and F3. F2 and F3 shown high biosurfactant activity by oil displacement assay and futher analysis via HPLC. In addition, the chemical structure of biosurfactant by FI-MS and 2D-NMR. The molecular mass of 168 was obtained and this was clearly shown that F2-3 is 5-hydroxy-2-decenoic acid delta lactone, massoia lactone. This is the first report natural production of Massoia Lactone which has surfactant activity by yeast-like fungi.

Department: Microbiology

Student's Signature .....

Field of Study: Industrial Microbiology

Advisor's Signature .....

Academic Year: 2014

Co-Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีด้วยความช่วยเหลือเป็นอย่างยิ่งของรองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ ดร. ศศิธร จินตมารกฏ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆในระหว่างการทำงานวิจัย ตลอดจนแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์ ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชูลี ยมภักดี ประธานในการสอบศาสตราจารย์ ดร. สาวิตรี ลิ้มทอง, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย คณะกรรมการในการสอบที่กรุณาให้คำแนะนำและช่วยแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ คุณสมจิต อ่ำอินทร์ เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการเก็บรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือในการจัดจำแนกจุลินทรีย์ทางด้านสรีรวิทยาและชีวเคมี

ขอขอบพระคุณ Professor Dr. Masaaki Morikawa สำหรับความกรุณาให้คำแนะนำและช่วยเหลือในการวิเคราะห์โครงสร้างสารด้วยเทคนิค MS และ NMR

ขอขอบพระคุณ คุณสุนันท์ เจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความกรุณาให้คำแนะนำและช่วยเหลือในการวิเคราะห์สารด้วยเทคนิค HPLC

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ทุกคนในภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับการสั่งสอน อบรมรายวิชาต่างๆ รวมถึงให้การช่วยเหลือ แนะนำ ตลอดจนอำนวยความสะดวกในการวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณแหล่งเงินทุนสนับสนุนในการดำเนินงานวิจัย "ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย" จากกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รุ่นที่ 26 ครั้งที่ 1/2558 ปีงบประมาณ 2558

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ในภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับการช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา และให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง พี่ๆ น้องๆ ในห้องปฏิบัติการ 1804/14 และเพื่อนๆในกลุ่มทุกคน

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและความเป็นมา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขั้นตอนการดำเนินงาน.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย.....	3
บทที่ 2 ปริทัศน์วรรณกรรม.....	4
2.1 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	4
2.3 ข้อดีสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	8
2.4 ประเภทของสารลดแรงตึงผิว.....	10
2.5 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	21
2.6 ประโยชน์และการประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	25
2.7 ความหลากหลายทางชีวภาพของยีสต์จากสิ่งแวดล้อมทางทะเล.....	32
บทที่ 3 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย.....	44
3.1 อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์.....	44
3.2 วิธีดำเนินการวิจัย.....	48
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	60

4.1 การคัดเลือกยีสต์และราคล้ายยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพบนอาหารแข็ง .....	60
4.2 การคัดเลือกยีสต์และราคล้ายยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพระดับขวดเขย่า .....	60
4.3 การอธิบายสปีชีส์ใหม่ของยีสต์ <i>Candida sp. YTW5-4</i> .....	63
4.4 ศึกษาองค์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยยีสต์ในระดับขวดเขย่า .....	75
4.5 การผลิตและสกัดแยกสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ .....	81
4.6 การติดตามความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ .....	82
4.7 การเปรียบเทียบรูปแบบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและพอลิแซคคาไรด์พุลูลูแลน .....	83
4.8 ศึกษาลักษณะสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ .....	84
4.9 เตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วน .....	91
4.10 วิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ .....	98
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง .....	103
รายการอ้างอิง .....	110
ภาคผนวก ก .....	127
ภาคผนวก ข .....	130
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	132



## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ช่วงค่า HLB ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและการนำไปประยุกต์ใช้ .....	8
ตารางที่ 2 จุลินทรีย์และชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมวลโมเลกุลต่ำ .....	20
ตารางที่ 3 จุลินทรีย์และชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมวลโมเลกุลสูง .....	21
ตารางที่ 4 ตัวอย่างลักษณะการนำจุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไปประยุกต์ใช้ใน อุตสาหกรรมต่างๆ .....	30
ตารางที่ 5 การนำยีสต์จากทะเลมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม .....	35
ตารางที่ 6 การจัดจำแนกยีสต์สายพันธุ์ที่เคยมีรายงานแล้ว และสปีชีส์ใหม่จากบริเวณชายฝั่งเกาะ สีซัง .....	38
ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์ความถี่ของการพบยีสต์ที่แยกได้จากบริเวณชายฝั่งของเกาะสีซัง .....	42
ตารางที่ 8 เปรียบเทียบลักษณะการละลายของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในน้ำที่เกิดขึ้นและค่า HLB ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ .....	55
ตารางที่ 9 ช่วงของ HLB และการนำไปประยุกต์ใช้ .....	56
ตารางที่ 10 ยีสต์และราคล้ายยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพบน อาหารแข็ง Ym agar ที่ปกคลุมด้วยน้ำมันดิบ .....	61
ตารางที่ 11 ยีสต์และราคล้ายยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพระดับ ขวดเขย่า .....	62
ตารางที่ 12 แสดงผลลำดับนิวคลีโอไทด์ และการแทนที่นิวคลีโอไทด์ของสายพันธุ์ที่มีความ ใกล้เคียงกับ <i>Candida</i> sp. YTW5-4 .....	64
ตารางที่ 13 การใช้สารประกอบคาร์บอนของยีสต์สายพันธุ์ <i>Candida</i> sp. YTW5-4 .....	69
ตารางที่ 14 การใช้สารประกอบไนโตรเจนของยีสต์สายพันธุ์ <i>Candida</i> sp. YTW 5-4 .....	71

ตารางที่ 15 การหมักคาร์โบไฮเดรตของยีสต์สายพันธุ์ <i>Candida</i> sp. YTW5-4.....	71
ตารางที่ 16 การทดสอบลักษณะอื่นๆของยีสต์สายพันธุ์ <i>Candida</i> sp. YTW5-4.....	72
ตารางที่ 17 ค่าการก่อกอิมัลชัน (E24) และค่าความเสถียรในการก่อกอิมัลชัน ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกับน้ำมันชนิดต่างๆ ในระยะเวลา 24-168 ชั่วโมง.....	88
ตารางที่ 18 อัตราการเคลื่อนที่ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและค่าการกระจายน้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จากวิธี Preparative thin layer chromatography.....	93
ตารางที่ 19 สรุปค่าการกระจายน้ำมันของตัวอย่างลำดับส่วนที่ F2 ซึ่งผ่านการวิเคราะห์และทำให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่อง HPLC.....	95
ตารางที่ 20 สรุปค่าการกระจายน้ำมันของตัวอย่างลำดับส่วนที่ F3 ซึ่งผ่านการวิเคราะห์และทำให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่อง HPLC.....	96
ตารางที่ 21 ตำแหน่งสัญญาณโปรตอนจาก $^1\text{H-NMR}$ จากสเปกตรัมของ Massoia Lactone ที่ผลิตได้จาก <i>A. pullulans</i> YTP6-14.....	100

## สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและการจัดเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ระหว่างวัฏภาคสองชนิด .....	4
รูปที่ 2 การวัดค่าการกระจายน้ำมัน โดยวัดพื้นที่ของการเกิดวงใส .....	5
รูปที่ 3 ความเข้มข้นวิกฤตในการเกิดไมเซลล์ (Critical micelle concentration, CMC).....	6
รูปที่ 4 ลักษณะของอิมัลชัน.....	7
รูปที่ 5 โครงสร้างแรมโนลิพิด .....	12
รูปที่ 6 โครงสร้างของโซโฟโรลิพิด .....	13
รูปที่ 7 โครงสร้างแมนโนซิลอีรีทรโทลลิพิด.....	13
รูปที่ 8 โครงสร้างของทรีฮาโรสลิพิด.....	14
รูปที่ 9 โครงสร้างลิโมซินและเอ็กโซฟิลิน.....	15
รูปที่ 10 โครงสร้าง surfactin, Inturin, Fengycin .....	17
รูปที่ 11 โครงสร้างของอิมัลแซน .....	18
รูปที่ 12 โครงสร้าง phosphatidylethanolamin.....	19
รูปที่ 13 จุดเก็บตัวอย่างน้ำทะเลและอินทรียัตถูรอบเกาะสี่ซัง .....	41
รูปที่ 14 การวัดค่าการกระจายน้ำมัน .....	49
รูปที่ 15 แผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการของ <i>Candida</i> sp. YTW5-4 และสปีชีส์ที่มีความใกล้เคียง กันโดยเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ LSU 26S rDNA .....	65
รูปที่ 16 แผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการของ <i>Candida</i> sp. YTW5-4 และสปีชีส์ที่มีความใกล้เคียง กันโดยเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS .....	66
รูปที่ 17 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ <i>Candida</i> sp. YTW5-4.....	68
รูปที่ 18 แผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการของ <i>Candida</i> sp. YTW5-4, <i>Metschnikowia</i> sp. IMT- Y-2365 และสปีชีส์ที่มีความใกล้เคียงกัน โดยเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ....	74

รูปที่ 19 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยรา คล้ายยีสต์สายพันธุ์ <i>A. pullulans</i> YTP6-14.....	75
รูปที่ 20 ผลของความเข้มข้นของกลูโคสต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยรา คล้ายยีสต์สายพันธุ์ <i>A. pullulans</i> YTP6-14.....	76
รูปที่ 21 ผลของอัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นกลูโคสและกลีเซอรอลหรือน้ำมันพืชต่อการเจริญ และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยราคล้ายยีสต์สายพันธุ์ <i>A. pullulans</i> YTP6-14 ..	77
รูปที่ 22 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยราคล้าย ยีสต์สายพันธุ์ <i>A. pullulans</i> YTP6-14.....	78
รูปที่ 23 ผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึง ผิวชีวภาพโดยราคล้ายยีสต์สายพันธุ์ <i>A. pullulans</i> YTP6-14 .....	79
รูปที่ 24 ผลของค่าพีเอชต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยราคล้ายยีสต์สาย พันธุ์ <i>A. pullulans</i> YTP6-14 .....	80
รูปที่ 25 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยราคล้ายยีสต์สาย พันธุ์ <i>A. pullulans</i> YTP6-14 .....	81
รูปที่ 26 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ที่ผลิตได้จาก <i>A. pullulans</i> YTP6-14.....	82
รูปที่ 27 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก <i>A.</i> <i>pullulans</i> YTP6-14 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อปรับปรุงสูตร เป็นระยะเวลา 1 3 5 และ 7 วัน.....	83
รูปที่ 28 ความสัมพันธ์ระหว่างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและพอลิแซคคาไรด์พอลูลูแลนที่ผลิตได้จาก <i>A. pullulans</i> YTP6-14.....	84
รูปที่ 29 ค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก <i>A. pullulans</i> YTP6-14.....	85
รูปที่ 30 ลักษณะของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเมื่อละลายในน้ำค่าพีเอชเท่ากับ 5.5 และ 7 .....	86
รูปที่ 31 การก่ออิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก <i>A. pullulans</i> YTP6-14 กับ น้ำมันชนิดต่างๆ ที่ 24 ชั่วโมงแรก (E24) .....	87
รูปที่ 32 การศึกษาความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก <i>A. pullulans</i> YTP6- 14.....	90

รูปที่ 33 การแยกสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก <i>A. pullulans</i> YTP6-14 ด้วย Analytical TLC โดยใช้โครมาโตกราฟีชนิดแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography).....	91
รูปที่ 34 การแยกสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก <i>A. pullulans</i> YTP6-14 ด้วย Preparative thin layer chromatography.....	92
รูปที่ 35 การทดสอบคาร์โบไฮเดรตในโครงสร้างของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพด้วยวิธีมอริส โดยใช้สารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยวิธีการ Preparative thin layer chromatography.....	93
รูปที่ 36 โครมาโตแกรมของ HPLC จากตัวอย่างลำดับที่ F2 เก็บตัวอย่างพีคที่เวลาต่างๆ.....	94
รูปที่ 37 โครมาโตแกรมของ HPLC จากตัวอย่างลำดับส่วนที่ F3 เก็บตัวอย่างพีคที่เวลาต่างๆ.....	96
รูปที่ 38 โครมาโตแกรมของ HPLC จากตัวอย่างผสมพีคที่ F 2-3 และ F 3-4.....	97
รูปที่ 39 สเปกตรัมมวลของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพชนิด Massoia lactone .....	98
รูปที่ 40 สเปกตรัมมวลของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพชนิด Massoia lactone .....	99
รูปที่ 41 โครงสร้างของโมเลกุลสาร Massoia lactone และ <sup>1</sup> H-NMR สเปกตรัมของ Massoia lactone ที่ผลิตได้จาก <i>A. pullulans</i> YTP6-14.....	101
รูปที่ 42 <sup>1</sup> H-NMR แบบ 2 มิติ ของสเปกตรัมของ Massoia lactone ที่ผลิตได้จาก <i>A. pullulans</i> YTP6-14.....	102

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความสำคัญและความเป็นมา

สารลดแรงตึงผิวเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญในชีวิตประจำวัน เนื่องจากถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ อย่างกว้างขวาง เช่น อุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันและปิโตรเลียม อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม เครื่องสำอาง อุตสาหกรรมยา กระดาษ ผนัง สิ่งทอ และเซรามิก นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวยังสามารถนำไปใช้ทางด้านสิ่งแวดล้อมได้อีกด้วย เช่น การบำบัดน้ำเสีย การขจัดคราบน้ำมันปนเปื้อน เป็นต้น (Banat และคณะ, 2010) จึงทำให้ปริมาณความต้องการของสารลดแรงตึงผิวเพิ่มมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามการนำสารลดแรงตึงผิวไปใช้ประโยชน์ ต้องคำนึงถึงชนิดและความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวให้เหมาะสมกับลักษณะงานที่นำไปใช้ เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวเป็นสารสังเคราะห์ทางเคมี (chemical surfactant) ที่ย่อยสลายได้ยาก อาจจะเป็นสาเหตุทำให้เกิดการตกค้างและก่อสารมลพิษแก่สิ่งแวดล้อม หรือสะสมอยู่ในสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะอย่างยิ่งในระบบนิเวศแหล่งน้ำ (Salihu และคณะ, 2009; Van Bogaert และคณะ, 2011) ในปัจจุบันมีการตระหนักและให้ความสำคัญเกี่ยวกับปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อมมากยิ่งขึ้น จึงนำไปสู่การวิจัยและพัฒนาการใช้ผลิตภัณฑ์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น แบคทีเรีย รา และยีสต์ โดยเป็นอีกทางเลือกในการทดแทนการใช้สารลดแรงตึงผิวเคมี ซึ่งข้อดีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ คือสามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ มีความเป็นพิษต่ำ สามารถคงประสิทธิภาพที่ดีได้แม้อยู่ภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น อุณหภูมิ ค่าพีเอช และความเข้มข้นของเกลือ (Kitamoto และคณะ, 2002; Makkar และคณะ, 2011) และมีคุณสมบัติในการแทรกซึมเข้าสู่ผิวได้ ก่อให้เกิดการอาการระคายเคืองน้อย ถึงแม้ว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะมีคุณสมบัติที่ดีหลายประการและมีความเป็นมิตรแก่สิ่งแวดล้อม แต่การนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาใช้ยังไม่สามารถทดแทนสารลดแรงตึงผิวทางเคมีได้ทั้งหมด เนื่องจากมีผลผลิตต่ำและต้นทุนในการผลิตค่อนข้างสูง (Pornsunthorntawee และคณะ, 2009; Panesar และคณะ, 2011) จึงต้องมีการพัฒนากระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เพื่อควบคุมและลดต้นทุนในการผลิต โดยคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และพัฒนาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมต่อการผลิตและการเลือกแหล่งอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราคาถูกลงถือเป็นปัจจัยหลักที่มีอิทธิพลต่อการลดต้นทุนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นอย่างมาก (Pal และคณะ, 2009; Panesar และคณะ, 2011)

จากปัญหาขยะทั่วโลกที่มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นทุกปี จึงจำเป็นต้องมีระบบการจัดการทางด้านสิ่งแวดล้อมที่ดีเข้ามาช่วยเพื่อลดปริมาณขยะที่เป็นมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม โดยวิธีการนำขยะวัสดุหรือสิ่งที่ไม่ใช้แล้วกลับมาใช้ใหม่ เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่สามารถช่วยลดปริมาณขยะได้ (Makkar และ Cameotra, 2002; Panesar และคณะ, 2011) วัสดุที่สามารถนำกลับมาใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีหลายชนิด ได้แก่ สิ่งเหลือใช้ทางการเกษตร หรือผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมต่างๆ เนื่องจากยังคงมีปริมาณของคาร์โบไฮเดรต ไขมันและสารอาหารอื่นๆ ที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารเลี้ยงเชื้อได้ (Panesar และคณะ, 2011; Banat และคณะ, 2010)

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เช่น *Candida* sp., *Pseudozyma* sp. และ *Yarrowia* sp. ซึ่งส่วนใหญ่แยกได้จากบริเวณระบบนิเวศพื้นดิน เช่น ผิวน้ำในบึง พื้นดิน โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากยีสต์ มีรายงานว่านำไปใช้ในอุตสาหกรรมไม่ค่อยแพร่หลาย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องค้นหายีสต์จากแหล่งใหม่ๆ ที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อพัฒนาศักยภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

จากโครงการศึกษาความหลากหลายของยีสต์ที่แยกจากบริเวณพื้นที่ชายฝั่งของเกาะสีชัง อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี เก็บตัวอย่างน้ำทะเลหรืออินทรีย์วัตถุ 5 จุด ได้แก่ หาดถ้ำพัง หาดท่าวัง หาดท่ายายทิม ท่าเรือเทววงษ์ และท่าเรือภานุรังษี เมื่อปี พ.ศ. 2554-2555 (Thaniyavarn และคณะ, 2013) ได้ทำการคัดแยกยีสต์จากบริเวณพื้นที่ชายฝั่งทะเลเกาะสีชัง และจัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นร่วมกับวิธีการอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล (molecular taxonomy) โดยศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26s rDNA เพื่อจัดจำแนกและศึกษาความหลากหลายของยีสต์และรากล้ายยีสต์บริเวณพื้นที่ชายฝั่งของเกาะสีชัง ซึ่งเป็นบริเวณที่มีอินทรีย์วัตถุและสารอาหารต่างๆ ที่เหมาะสมกับการเจริญของยีสต์ ทำให้เกิดความหลากหลายทางชีวภาพสูง อีกทั้งอาจจะมีการผลิตสารเมแทบอลิต์ชนิดใหม่ๆ ที่มีความหลากหลาย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งคัดแยกยีสต์และรากล้ายยีสต์ที่มีศักยภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่แยกได้จากบริเวณชายฝั่งของเกาะสีชัง เพื่อพัฒนาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยศึกษาหาลำดับประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากยีสต์ที่คัดเลือกให้เหมาะสม เพื่อเพิ่มผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้ได้ปริมาณมาก ศึกษาคุณสมบัติและวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ต่อไป

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 คัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์และรากล้ายยีสต์ที่แยกได้จากบริเวณชายฝั่งของเกาะสีชัง ที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ

1.2.2 ศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพจากสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้

1.2.3 ศึกษาสมบัติและวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

### 1.3 ขั้นตอนการดำเนินงาน

1.3.1 คัดเลือกยีสต์ที่แยกได้จากบริเวณชายฝั่งเกาะสีชังที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ

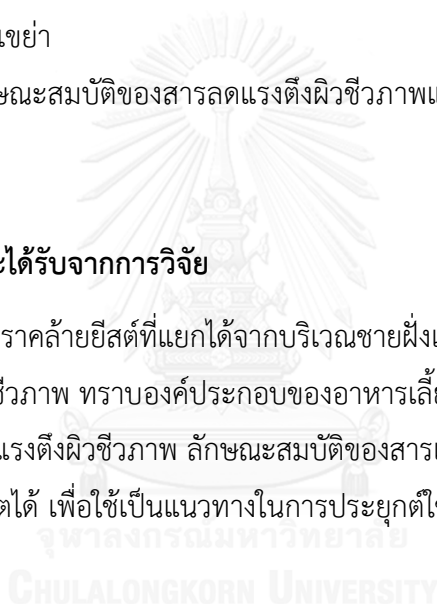
1.3.2 การจัดจำแนกสกุลของยีสต์และวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

1.3.3 ศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะที่เหมาะสมและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระดับขวดเขย่า

1.3.4 ศึกษาลักษณะสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้

### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

คัดเลือกยีสต์และรากล้ายีสต์ที่แยกได้จากบริเวณชายฝั่งเกาะสีชัง ที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ ทราบองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ลักษณะสมบัติของสารและโครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตได้ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพในอุตสาหกรรมต่อไป



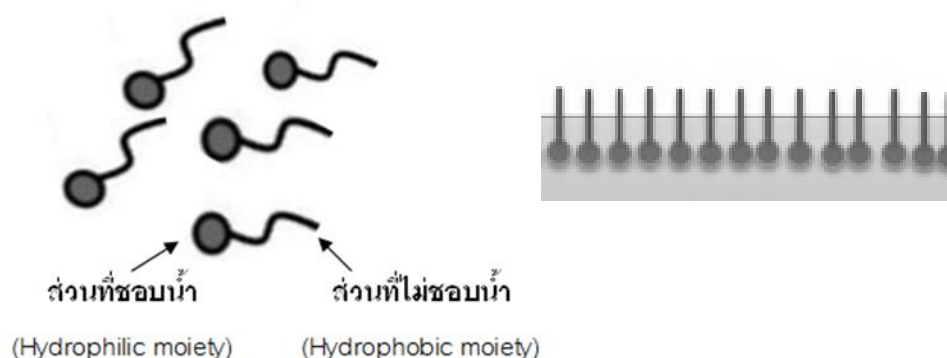


## บทที่ 2

### ปรีทัศน์วรรณกรรม

#### 2.1 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ คือ สารชีวโมเลกุลที่มีคุณสมบัติในการลดค่าแรงตึงผิว (Surface-active compound) ซึ่งผลิตจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น แบคทีเรีย รา และยีสต์ โดยจุลินทรีย์จะผลิตและหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ (Abouseoud และคณะ, 2008) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีโครงสร้างแบบแอมฟิฟิลิก (Amphiphilic molecules) ดังรูปที่ 1 ซึ่งประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic moiety) ได้แก่ กรดอะมิโนหรือเปปไทด์ คาร์โบไฮเดรต หมู่ฟอสโฟริล หมู่แอลกอฮอล์ หมู่ไฮดรอกซิล และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic moiety) ได้แก่ กรดไขมันอิ่มตัวหรือกรดไขมันไม่อิ่มตัว และเอสเทอร์ของกรดไขมันไขมัน (Burgos-Diaz และคณะ, 2012; Kitamoto และคณะ, 2002; Saharan และคณะ, 2011) จากโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพดังกล่าว ทำให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถละลายได้ทั้งในน้ำและน้ำมัน โดยโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะหันส่วนที่มีขั้วเข้าสู่โมเลกุลของน้ำและหันส่วนที่ไม่มีขั้วเข้าสู่โมเลกุลของน้ำมันหรืออากาศ ทำให้เกิดการลดค่าแรงตึงผิวระหว่างวัฏภาคทั้งสองชนิด เช่น การลดค่าแรงตึงผิวระหว่างโมเลกุลน้ำและอากาศ (surface tension) การลดค่าแรงตึงผิวระหว่างโมเลกุลน้ำและน้ำมัน (interfacial tension)



รูปที่ 1 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและการจัดเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพระหว่างวัฏภาคสองชนิด (ดัดแปลงจาก (Pacwa-Plociniczak และคณะ, 2011)

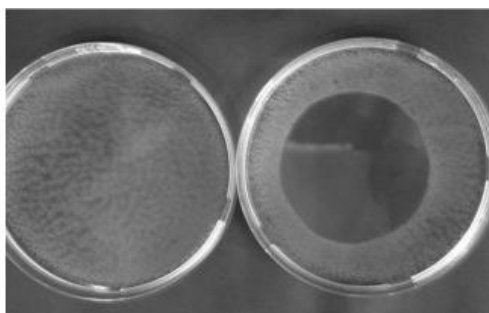
## 2.2 คุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

### 2.2.1 แรงตึงผิว (surface tension)

แรงตึงผิว คือ แรงที่กระทำต่อผิวหน้าของของเหลวซึ่งทำให้เกิดการลดค่าแรงตึงผิวของของเหลวให้เหลือพื้นที่น้อยที่สุด แรงตึงผิวสามารถแบ่งได้ 2 ชนิด คือ แรงตึงผิวระหว่างของเหลวและอากาศ (Surface tension) และแรงระหว่างผิวประจันของของเหลว 2 ชนิด หรือระหว่างของเหลวและของเหลว (Interfacial tension) ค่าแรงตึงผิวสามารถวัดค่าได้โดยใช้เครื่องเทนซิโอมิเตอร์ (tensiometer) มีหน่วยเป็นมิลลินิวตันต่อเมตร (mN/m) หรือ ดายน์ต่อเซนติเมตร (dyne/cm) (Nitschke และ Costa, 2007; Rahman และ Gakpe, 2008) สารลดแรงตึงผิวที่มีประสิทธิภาพจะสามารถลดค่าแรงตึงผิวในน้ำจาก 72 มิลลินิวตันต่อเมตร เหลือต่ำกว่า 30 มิลลินิวตันต่อเมตร และลดค่าแรงระหว่างผิวประจันของน้ำและเอ็นเฮกซะเดคเคนจาก 40 มิลลินิวตันต่อเมตร เหลือเพียง 1 มิลลินิวตันต่อเมตร (Mulligan, 2005) เซอร์แฟกตินเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดหนึ่งที่สามารถลดค่าแรงตึงผิวในน้ำจาก 72 มิลลินิวตันต่อเมตร เหลือเท่ากับ 27 มิลลินิวตันต่อเมตร โดยค่าแรงตึงผิวจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว และจะมีค่าคงที่เมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวถึงจุดวิกฤตในการเกิดไมเซลล์ (The critical micelle concentration) (Mulligan และ Gibbs, 2004; Fracchia และคณะ, 2012)

### 2.2.2 ค่าการกระจายน้ำมัน (oil displacement test)

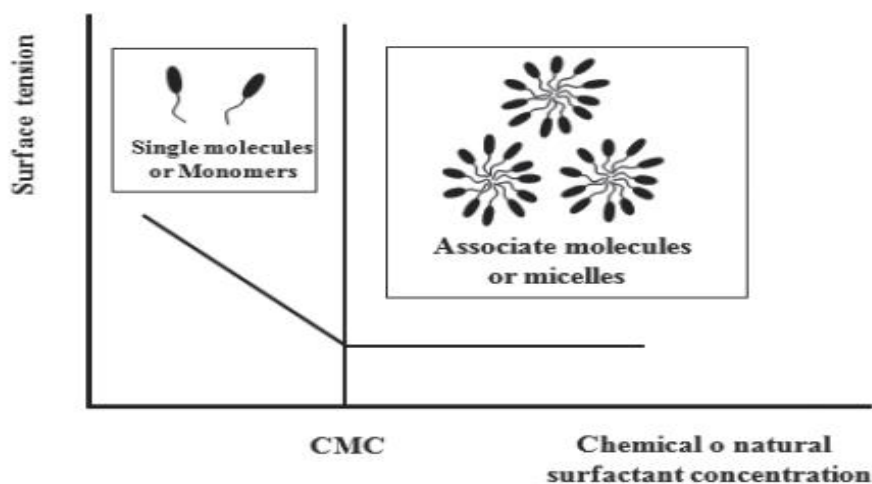
ค่าการกระจายน้ำมันเป็นการวัดประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิว สามารถหาได้โดยวัดขนาดของพื้นที่วงใส (clear zone) ที่เกิดแทนที่แผ่นฟิล์มของน้ำมันที่ปกคลุมอยู่บนผิวน้ำน้ำ ดังรูปที่ 2 โดยพื้นที่ของการกระจายน้ำมันสามารถคำนวณจากขนาดของพื้นที่วงใส เท่ากับ  $\pi r^2$  มีหน่วยเป็นตารางเซนติเมตร ซึ่งค่าการกระจายน้ำมันจะแปรผันโดยตรงกับปริมาณความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว (Morikawa และคณะ, 2000)



รูปที่ 2 การวัดค่าการกระจายน้ำมัน โดยวัดพื้นที่ของการเกิดวงใส (Fracchia และคณะ, 2012)

### 2.2.3 ค่าความเข้มข้นวิกฤตในการเกิดไมเซลล์ (Critical micelle concentration, CMC)

ค่าความเข้มข้นวิกฤตในการเกิดไมเซลล์ คือ ค่าความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวที่น้อยที่สุดที่ทำให้สารลดแรงตึงผิวเกิดการจัดเรียงตัวเป็นรูปร่างไมเซลล์ (micelle) ในสารละลาย โดย ณ จุดที่ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวต่ำกว่าค่า CMC โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวจะเกาะกันแบบหลวมๆ เรียงตัวกันเป็นรูปแบบมอนอเมอร์ (monomer) ในสารละลาย ค่าแรงตึงผิวหรือแรงระหว่างผิวประจันในสารละลายจะลดลงเรื่อยๆ จนกระทั่งความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวถึงจุด CMC สารลดแรงตึงผิวจะเกาะกลุ่มกันเกิดเป็นรูปร่างไมเซลล์ อาจจะมีลักษณะเป็นแบบทรงกลม (spherical form) หรือเรียงตัวเป็นชั้น (lamellar form) โดยจุดที่ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวมากกว่าค่า CMC จะมีแรงตึงผิวหรือแรงระหว่างผิวประจันในสารละลายคงที่ (Fracchia และคณะ, 2012) นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการรวมตัวเป็นไมเซลล์จะขึ้นอยู่กับค่าพีเอช อุณหภูมิ และความแรงของประจุ โดยที่ค่า CMC จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางกายภาพของแรงตึงผิวในสารละลาย เช่น ค่าการนำไฟฟ้า ความหนืด ความหนาแน่น และความขุ่น เป็นต้น (Lawrence และ Reesb, 2000)

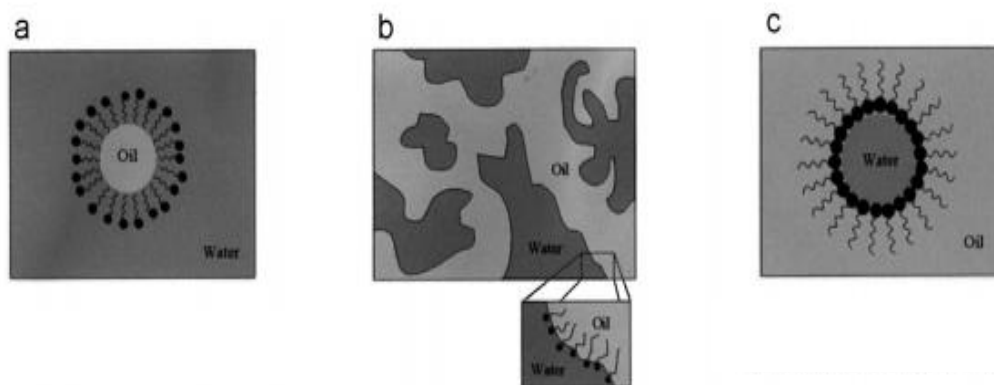


### รูปที่ 3 ค่าความเข้มข้นวิกฤตในการเกิดไมเซลล์ (Critical micelle concentration, CMC)

(Bustamante และคณะ, 2012)

#### 2.2.4 การก่ออิมัลชัน (Emulsification)

อิมัลชันเป็นระบบคอลลอยด์ (colloid) ประกอบด้วยของเหลวสองชนิดที่ไม่สามารถละลายรวมเป็นเนื้อสารเดียวกันได้ เช่น น้ำและสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Satpute และคณะ, 2010) โดยของเหลวชนิดหนึ่งเป็นวัฏภาคภายใน (Disperse phase) จะแตกตัวเป็นหยดเล็กๆ และกระจายตัวอยู่ในของเหลวอีกชนิดหนึ่งซึ่งเป็นวัฏภาคภายนอก (Continuous phase) อิมัลชันเป็นระบบอุณหพลศาสตร์ (Thermodynamic) ที่มีความเสถียรต่ำ ดังนั้นจึงต้องเติมสารลดแรงตึงผิวเข้าไปในระบบ ซึ่งสารลดแรงตึงผิวเป็นสารที่มีคุณสมบัติอิมัลซิไฟเออร์ (emulsifier) จะช่วยลดแรงตึงผิวระหว่างของเหลวทั้งสองชนิด ทำให้อิมัลชันมีความเสถียรมากขึ้น โดยทั่วไปอิมัลชันแบ่งเป็น 2 ชนิด ได้แก่ อิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ หรือ oil-in-water (O/W) และอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน หรือ water-in-oil (W/O) อิมัลชันน้ำมันในน้ำ คือ อิมัลชันที่มีน้ำมันกระจายตัวเป็นวัฏภาคภายในและวัฏภาคภายนอกเป็นน้ำ ส่วนอิมัลชันน้ำในน้ำมัน คือ อิมัลชันที่มีน้ำกระจายตัวเป็นวัฏภาคภายในและวัฏภาคภายนอกเป็นน้ำมัน (Madaan และคณะ, 2014) นอกจากนี้ยังมีอิมัลชันประเภทอิมัลชันเชิงซ้อน (multiple emulsion) ซึ่งเป็นระบบที่ประกอบด้วยน้ำเป็นอนุภาคเล็กๆ กระจายอยู่ในอนุภาคของน้ำมัน ซึ่งน้ำมันกระจายตัวอยู่ในน้ำที่เป็นวัฏภาคภายนอกสุด หรือ อิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันในน้ำ water-in-oil-in-water (W/O/W) และ ระบบที่ประกอบด้วยน้ำมันเป็นอนุภาคเล็กๆ กระจายอยู่ในอนุภาคของน้ำ และน้ำกระจายตัวอยู่ในน้ำมันซึ่งเป็นวัฏภาคภายนอกสุด หรือ อิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำในน้ำมัน (oil-in-water-in-oil (O/W/O))



**รูปที่ 4** ลักษณะของอิมัลชัน a) อิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำมัน b) ลักษณะโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวเกาะอยู่ระหว่างวัฏภาคน้ำและวัฏภาคน้ำมัน C) อิมัลชันน้ำในน้ำมัน (Lawrence และ Reesb, 2000)

### 2.2.5 ค่าเอชแอลบี (hydrophilic-lipophilic balance (HLB))

ค่าเอชแอลบี คือ ค่าที่แสดงสัดส่วนระหว่างส่วนชอบน้ำและไม่ชอบน้ำในโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิว (Zhang และคณะ, 2014 ) มีค่าระหว่าง 0-20 ค่าเอชแอลบีของสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิดจะสามารถบ่งบอกแนวโน้มชนิดของอิมัลชันและการนำไปประยุกต์ใช้ได้ โดยถ้าค่าเอชแอลบีมีค่าน้อยกว่า 6 แสดงว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดนั้นมีแนวโน้มจะเกิดอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน ขณะที่ค่าเอชแอลบีมีค่าระหว่าง 8-18 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีแนวโน้มจะเกิดอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (Plaza และคณะ, 2014) ดังตารางที่ 1

**ตารางที่ 1** ช่วงค่า HLB ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและการนำไปประยุกต์ใช้ (Tadors, 2009)

ช่วงของ HLB	การนำไปประยุกต์ใช้
3-6	อิมัลซิไฟเออร์ชนิด น้ำ-ใน-น้ำมัน (Oil-in-water emulsifier)
7-9	สารทำให้เปียก (Wetting agent)
8-18	อิมัลซิไฟเออร์ชนิด น้ำมัน-ใน-น้ำ (Water-in-water emulsifier)
13-15	สารทำความสะอาด (Detergent)
15-18	สารละลาย (Solubilizer)

### 2.3 ข้อดีสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์เป็นสารที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างยิ่งในปัจจุบัน เนื่องจากมีความเป็นพิษต่ำ สามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้ และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม มีคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวที่ดีแม้อยู่ในสภาวะไม่เหมาะสม เช่น ความเข้มข้นเกลือ ค่าพีเอช และอุณหภูมิ มีโครงสร้างทางเคมีที่หลากหลาย อีกทั้งยังสามารถใช้แหล่งอาหารที่มีราคาถูกในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้อีกด้วย (Banat และคณะ, 2000; Abouseoud และคณะ, 2008; Cooklin และคณะ, 2013)

#### 2.3.1 มีความเป็นพิษต่ำ

มีรายงานว่าเกี่ยวกับความเป็นพิษของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพอยู่น้อย โดยทั่วไปสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความเป็นพิษต่ำหรืออาจจะไม่ก่อความเป็นพิษเลย เมื่อเปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวเคมี (chemical surfactant) (Klosowska-Chomiczewska และคณะ, 2010) จึงเหมาะกับการนำไปประยุกต์ใช้กับงานทางด้านเภสัชกรรม เครื่องสำอางและอาหาร (Nitschke และ Costa, 2007) Corexit เป็นสารลดแรงตึงผิวเคมีที่มีค่า LD50 ของ *Photobacterium phosphoreum* น้อยกว่าสาร

ลดแรงดึงผิวชีวภาพชนิดแรมโนลิพิด 10 เท่า ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสาร Corexit เป็นสารลดแรงดึงผิวเคมีที่มีความเป็นพิษสูง (Kapadia Sanket และ Yagnik, 2013)

### 2.3.2 ย่อยสลายทางชีวภาพได้

Hirata และคณะ (2009) ทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพชนิดโซโฟโรลิพิดที่ผลิตได้จาก *Candida bombicola* ตามขั้นตอนของ OECD พบว่า สารลดแรงดึงผิวชีวภาพจะถูกย่อยสลายทันทีหลังจากทดสอบ และหลังทดสอบ 8 วัน โซโฟโรลิพิดถูกย่อยสลายลดลงถึง 61 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับสารลดแรงดึงผิวชีวภาพชนิดเซอร์เฟกตินและแอนโทรเฟกติน ถูกย่อยสลายทางชีวภาพได้ง่าย ในขณะที่สารลดแรงดึงผิวเคมีไม่สามารถย่อยสลายได้ เมื่อระยะเวลาผ่านไป 8 วัน จากปัญหาสิ่งแวดล้อมที่เพิ่มมากขึ้น ทำให้ผู้บริโภคมองหนักถึงผลกระทบที่เกิดจากปัญหาสิ่งแวดล้อมมากขึ้น รวมทั้งกฎหมายที่คุ้มครองเกี่ยวข้องกับปัญหาสิ่งแวดล้อมมีความเข้มงวด ดังนั้นจึงมีการเลือกใช้สารลดแรงดึงผิวชีวภาพมาประยุกต์กับงานทางด้านสิ่งแวดล้อมมากขึ้น เนื่องจากเป็นสารที่ถูกย่อยสลายทางชีวภาพได้ง่าย (Nitschke และคณะ, Costa, 2007)

### 2.3.3 ทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสม

ในอุตสาหกรรมขั้นตอนการผลิตจะต้องผ่านกรรมวิธีการต่างๆ ที่มีภาวะแตกต่างกัน เช่น ความร้อน ความดัน พีเอช และไอออนต่างๆ ดังนั้นเพื่อให้กระบวนการสามารถดำเนินต่อไป จำเป็นจะต้องใช้สารตั้งต้นในการผลิตที่สามารถทนต่อสภาวะเหล่านั้นได้ สารลดแรงดึงผิวชีวภาพหลายชนิดมีคุณสมบัติที่สามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมต่างๆ ได้ จึงเป็นสารที่มีความน่าสนใจในการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเป็นอย่างยิ่ง (Nitschke และ Costa, 2007) Sarubbo และคณะ (2007) รายงานว่า ประสิทธิภาพของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *Candida glabrata* ยังคงมีความเสถียรในภาวะที่มีค่าพีเอช ในช่วง 2-12 ที่อุณหภูมิ 4-80 องศาเซลเซียส และภายใต้ความเข้มข้นของเกลือสูงกว่า 10 เปอร์เซ็นต์

### 2.3.4 ก่ออิมัลชันที่มีความเสถียร

สารลดแรงดึงผิวชีวภาพมีคุณสมบัติในการก่ออิมัลชันที่มีความเสถียร โดยทั่วไปสารลดแรงดึงผิวชีวภาพมวลโมเลกุลสูงจะมีคุณสมบัติเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ได้ดีกว่าสารลดแรงดึงผิวชีวภาพมวลโมเลกุลต่ำ โซโฟโรลิพิดที่ผลิตได้จาก *Torulopsis bombicola* มีคุณสมบัติในการลดค่าแรงดึงผิวและแรงระหว่างผิวประจันได้ดีกว่าเป็นสารอิมัลซิไฟด์เออร์ ในขณะที่ลิโปแซนเป็นสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่มีมวลโมเลกุลสูง มีคุณสมบัติเป็นสารอิมัลซิไฟด์เออร์ที่มีประสิทธิภาพ สารลดแรงดึงผิวชีวภาพชนิดพอลิเมอร์ สามารถเคลือบอยู่ที่ผิวของหยดน้ำมัน ทำให้เกิดอิมัลชันที่มีความเสถียร ซึ่งจากคุณสมบัติที่

ดีนี้ทำให้สามารถนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอางได้ (Kapadia Sanket และ Yagnik, 2013)

### 2.3.5 โครงสร้างหลากหลาย

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีโครงสร้างทางเคมีที่หลากหลาย ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และสารตั้งต้นที่ใช้ในกระบวนการผลิต (Nitschke และ Costa, 2007) ซึ่งทำให้สารแต่ละชนิดมีคุณสมบัติที่จำเพาะ จึงสามารถเลือกนำไปประยุกต์ใช้กับงานที่เหมาะสมได้ (Kapadia Sanket และ Yagnik, 2013)

### 2.3.6 ใช้แหล่งอาหารในการผลิตที่มีราคาถูก

กระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถผลิตจากแหล่งอาหารที่มีราคาถูก เช่น วัตถุดิบเหลือใช้ทางการเกษตร ของเสียและผลพลอยได้ทางอุตสาหกรรม (by products) เนื่องจากมีปริมาณมาก ราคาถูก และถือว่าเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สามารถลดต้นทุนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ อีกทั้งยังเป็นแหล่งอาหารที่มีปริมาณของคาร์โบไฮเดรตและไขมันที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพอีกด้วย (Nitschke และ Costa, 2007)

## 2.4 ประเภทของสารลดแรงตึงผิว

การจัดจำแนกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ แบ่งประเภทตามน้ำหนักโมเลกุล (Molecular mass) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ได้แก่ มวลโมเลกุลต่ำ และมวลโมเลกุลสูง สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมวลโมเลกุลต่ำ เช่น โกลโคลิพิด (Glycolipids) ไลโปเปปไทด์ (lipopeptides) กรดไขมันและไขมัน ฟอสโฟลิพิด (Fatty acid, neutral lipid และ phospholipid) ส่วนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมวลโมเลกุลสูง ได้แก่ สารลดแรงตึงผิวชนิดพอลิเมอร์ (polymeric surfactant) และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดอนุภาค (particulate biosurfactant) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมวลโมเลกุลต่ำ จะมีคุณสมบัติในการลดค่าแรงตึงผิวได้ดี (25-30 มิลลินิวตันต่อเมตร) ในขณะที่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมวลโมเลกุลสูงจะมีความสามารถในการเพิ่มความเสถียรของอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ หรือเรียกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดนี้ว่า ไบโอบิโอมัลซิไฟเออร์ (bioemulsifier) (Rosenberg และ Ron, 1999; Muthusamy และคณะ, 2008; Burgos-Diaz และคณะ, 2012)

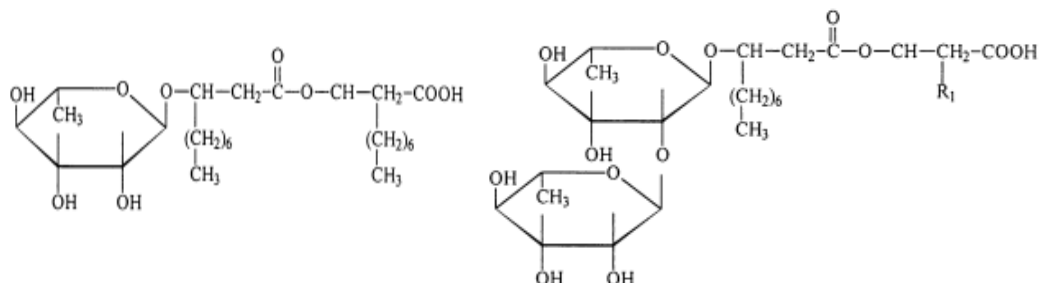
## 2.4.1 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมวลโมเลกุลต่ำ

### 2.4.1.1 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดไกลโคลิพิด (Glycolipid)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่พบส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ โดยมีโครงสร้างประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต เช่น กลูโคส ซูโคส แมนโนส แรมโนสและทรีฮาโรส เชื่อมต่อกับกรดไขมันสายยาว (long chain fatty acids) หรือ กรดไขมันที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl fatty acids) ด้วยพันธะไกลโคซิดิก (Kaloorazi และ Choobari, 2013) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดไกลโคลิพิดที่นิยมศึกษามากที่สุด ได้แก่ Rhamnolipids, Mannosylerythritol lipids (MELs) และ Sophorolipids, Trehalolipids เป็นต้น

แรมโนลิพิด (Rhamnolipid) เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดที่ประกอบด้วย น้ำตาลแรมโนส จำนวน 1 หรือ 2 โมเลกุล เชื่อมต่อกับ  $\beta$ -hydroxydecanoic acid จำนวน 1 หรือ 2 โมเลกุล ด้วยพันธะไกลโคซิดิก รูปที่ 5 (Kaloorazi และ Choobari, 2013; Kapadia Sanket และ Yagnik, 2013) ส่วนใหญ่พบว่าผลิตในแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* และแบคทีเรียสปีชีส์อื่นๆ ได้แก่ *P. chlororaphis*, *P. plantarii*, *P. putida*, และ *P. fluorescens* (Maier และ Soberon-Chavez, 2000; Abdel-Mawgoud และคณะ, 2011; Fracchia และคณะ, 2012; Sekhon-Randhawa และ Randhman, 2014) แรมโนลิพิดเป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการลดค่าแรงตึงผิว และสามารถละลายได้ดีในสารประกอบไฮโดรคาร์บอน จึงมักนำมาประยุกต์ใช้กับงานทางด้านสิ่งแวดล้อม ได้แก่ การบำบัดสารมลพิษทางชีวภาพ (bioremediation) และการย่อยสลายทางชีวภาพ (biodegradation) (Abdel-Mawgoud และคณะ, 2011) นอกจากนี้แรมโนลิพิดที่หลั่งออกมาจาก *Pseudomonas aeruginosa* มีสารฮีโมไลซิน (hemolysin) ซึ่งมีคุณสมบัติในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือดแดง ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก จึงนำมาใช้ต้านจุลชีพต่างๆได้ เช่น สารต้านแบคทีเรีย (antibacterial) สารต้านรา (antifungal) สารต้านไวรัส (antiviral) เป็นต้น (Abdel-Mawgoud และคณะ, 2010)



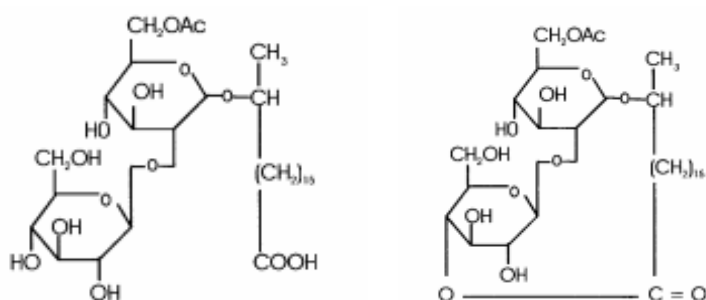


รูปที่ 5 โครงสร้างแรมโนลิพิด จากเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* UG2.

(1) Monorhamnolipid ( $RhC_{10}C_{10}$ ) (2) Dirhamnolipid ( $Rh_2C_{10}C_n$ )  $n = 8, 10, 12$

(Mata-Sandoval และคณะ, 2001)

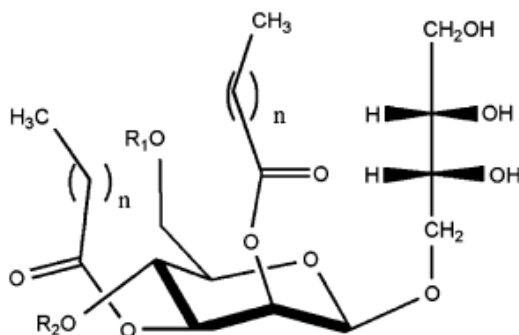
โซโฟโรลิพิด (Sopborolipids) มีโครงสร้างประกอบด้วยน้ำตาลโซโฟโรสเชื่อมต่อกับกรดไขมันสายยาวที่มีจำนวนคาร์บอน 16-18 อะตอม ด้วยพันธะไกลโคซิดิก โดยกรดไขมันจะประกอบด้วยพันธะไม่อิ่มตัวจำนวนหนึ่งพันธะหรือมากกว่าหนึ่งพันธะ รูปแบบโครงสร้างของโซโฟโรลิพิด มี 2 ชนิด คือ รูปแบบแลตโตนิก (lactonic) คือ หมูไฮดรอกซิลที่ปลายสายของกรดไขมันจะสร้างพันธะโควาเลนต์ (covalent) เชื่อมต่อระหว่างน้ำตาลโซโฟโรสทำให้มีลักษณะเป็นวงปิด ส่วนรูปแบบแอซิดิก (acidic) จะมีลักษณะเป็นวงเปิด เนื่องจากหมูไฮดรอกซิลที่ปลายสายของกรดไขมันจะอยู่แบบอิสระ ดังรูปที่ 6 โครงสร้างของโซโฟโรลิพิดมีหลากหลายรูปแบบทำให้มีคุณสมบัติทางด้านชีวภาพและทางเคมีกายภาพแตกต่างกัน โดยทั่วไปโซโฟโรลิพิดรูปแบบแลตโตนิก จะมีคุณสมบัติในการลดค่าแรงตึงผิวและยับยั้งจุลชีพได้ดีกว่า ส่วนโซโฟโรลิพิดรูปแบบแอซิดิกจะมีคุณสมบัติในการละลายน้ำและการเกิดฟองได้ดี (Van Bogaert และ Soetaert, 2011) Gorin และ colleagues (1961) ค้นพบโครงสร้างแรกของโซโฟโรลิพิด ในยีสต์ *Torulopsis magnolia* ในปัจจุบันพบว่ายีสต์ *Candida bombicola* (*Starmerella bombicola*) เป็นที่รู้จักกันในการผลิตโซโฟโรลิพิด เนื่องจากสามารถผลิตโซโฟโรลิพิดได้จำนวนมาก (400 กรัมต่อลิตร) และมีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวาง (Van Bogaert และคณะ, 2007; Van Bogaert และคณะ, 2011)



**รูปที่ 6** โครงสร้างของไซโฟโรลิพิด จากเชื้อ *Candida bombicola* (Mulligan และ Gibbs, 2004)

(1) ไซโฟโรลิพิดรูปแบบแอสติก (2) ไซโฟโรลิพิดรูปแบบแลตโตนิค

แมนโนซิลอีรีทริทอลลิพิด (Mannosylerythritol lipids, MELs) ผลิตในจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Pseudozyma* sp. และ *Ustilago* sp. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดนี้ ประกอบด้วย 4-O-β D-mannopyranosylmeso-erythritol เชื่อมต่อกับกรดไขมันชนิดสายสั้นที่มีจำนวนคาร์บอน 2-8 อะตอม หรือกรดไขมันชนิดสายยาวที่มีจำนวนคาร์บอน 10-18 อะตอม โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดแมนโนซิลอีรีทริทอลลิพิดมีโครงสร้างที่หลากหลาย ดังรูปที่ 7 ขึ้นอยู่กับจำนวนและตำแหน่งของหมู่เอซิลที่เกาะกับน้ำตาลแมนโนสหรืออีรีทริทอลและความยาวของกรดไขมัน (Arutchelvi และคณะ, 2008; Morita และคณะ, 2007) แมนโนซิลอีรีทริทอลลิพิดจะเริ่มมีการผลิตเมื่อยีสต์อยู่ในระยะที่เซลล์คงที่ (stationary phase) และจะเก็บสะสมภายในเซลล์คล้ายกับไตรเอซิลกลีเซอรอล (Triacylglycerols) โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดนี้มีความน่าสนใจ เนื่องจากสามารถนำมาประยุกต์ใช้งานทางการแพทย์ได้ เช่น สารต้านมะเร็ง (antitumor) และสารต้านการแบ่งเซลล์ของมะเร็งเม็ดเลือดขาว (against human leukemia cells) เป็นต้น (Arutchelvi และคณะ, 2008)

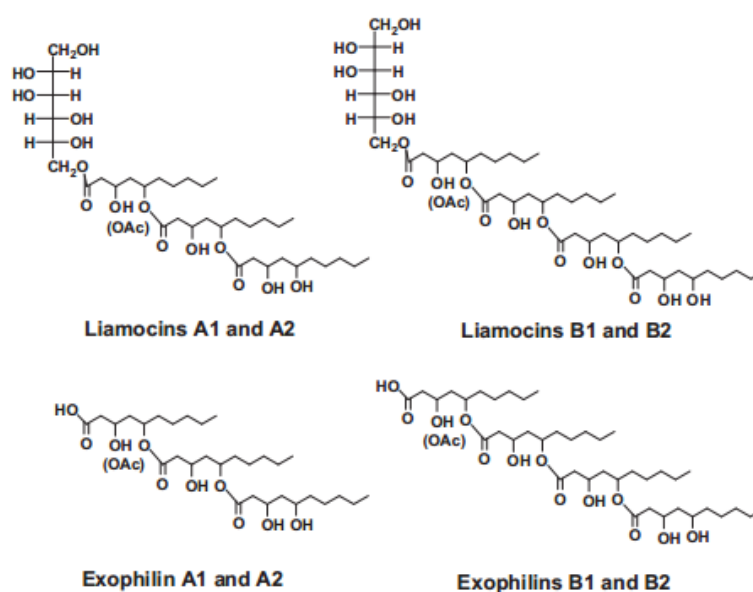


**รูปที่ 7** โครงสร้างแมนโนซิลอีรีทริทอลลิพิด (MEL-A: R1 = R2 = Ac; MEL-B: R1 = Ac, R2 = H;

MEL-C: R1 = H, R2 = Ac: n = 6–10) (Arutchelvi และคณะ, 2008)



นอกจากนี้ยังพบโครงสร้าง 3,5 dihydroxy-decanoic ester ที่ไม่มีส่วนของน้ำตาลแมนนิทอล ได้แก่ เอ็กโซฟิลิน (Exophilins) เอ1, เอ็กโซฟิลิน เอ2, เอ็กโซฟิลิน บี1 และเอ็กโซฟิลิน บี2 Manitchotpisit และคณะ (2011) รายงานว่า ลิมโมซินที่ผลิตจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ RSU 9 และ RSU 21 มีคุณสมบัติในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมและมะเร็งปากมดลูก โดยมีค่า IC50 เท่ากับ  $0.32.2 \pm 1.4$  ถึง  $63.1 \pm 2.4$   $\mu\text{g}$  liamocins/ml Doshida และคณะ (1996) รายงานว่า เอ็กโซฟิลิน เอ ที่ผลิตได้จากยีสต์ *Exophiala pisciphila* เป็นสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ (Doshida และคณะ, 1996; Price และคณะ, 2013)



CHULALONGKORN UNIVERSITY

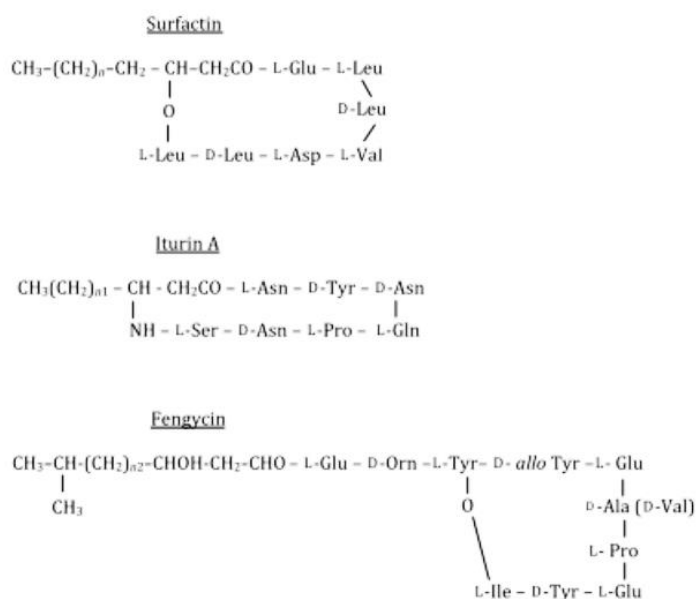
**รูปที่ 9** โครงสร้างลิมโมซินและเอ็กโซฟิลินที่ผลิตได้จากราคล้ายยีสต์สายพันธุ์ *A. pullulans* (Price และคณะ, 2013)

Kim และคณะ (2015) รายงานโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โครงสร้างใหม่ที่ผลิตจาก *A. pullulans* L3-GPY จากการศึกษาโครงสร้างด้วยเทคนิค MS และ NMR พบว่า สารมีน้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 650 ( $\text{C}_{33}\text{H}_{62}\text{O}_{12}$ ) โดยมีโครงสร้างบางส่วนคล้ายกับ Exophilin A ที่ผลิตจาก *Exophiala pisciphila* NI10102 และ Liamocin ที่ผลิตจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 50380 สามารถจัดจำแนกเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด glycerol-liamocin มีโครงสร้างประกอบด้วย glycerol เชื่อมต่อกับ 3,5-dihydroxydecanoic polyester จำนวน 3 กลุ่ม โดยสาร

ลดแรงดึงผิวชีวภาพชนิด glycerol-laimocin เป็นสารที่มีลักษณะใส ไม่มีสี คล้ายกับ glycerol โดยสามารถลดแรงดึงผิวได้ 31 มิลลินิวตันต่อเมตร

#### 2.4.1.2 สารลดแรงดึงผิวชีวภาพชนิดไลโปเปปไทด์ (Lipopeptides)

แบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus* เป็นกลุ่มที่ผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพชนิดไลโปเปปไทด์ โดยมีโครงสร้างเป็นสายเปปไทด์จับกับกรดไขมัน โดยไลโปเปปไทด์เป็นสารลดแรงดึงผิวที่มีประสิทธิภาพและยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์อีกด้วย (Burgos-Díaz และคณะ, 2012) ซึ่งจำแนกตามลักษณะโครงสร้างได้ 4 รูปแบบ คือ Surfactins, iturins, fengycins (plipastatins) และ kurstakins ดังรูปที่ 10 (Jacques, 2011; Raaijmakers และคณะ, 2010) แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ผลิต surfactins ซึ่งประกอบด้วย  $\beta$ -hydroxy-fatty acid ที่มีคาร์บอนจำนวน 13-15 อะตอม เชื่อมต่อกับกรดอะมิโนจำนวน 7 โมเลกุล (L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-Leu) (Youssef และคณะ, 2005) Surfactins มีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งการแข็งตัวของเม็ดเลือด สารยับยั้งจุลินทรีย์และสารต้านมะเร็ง (Gong และคณะ, 2009; Jeong และคณะ, 2003; Fernandes และคณะ, 2007) ตัวอย่างอนุพันธ์อื่นๆ ในกลุ่มของ surfactins เช่น lichenysin จาก *Bacillus licheniformis* มีคุณสมบัติเป็นสารลดแรงดึงผิวที่ดี (ค่าแรงดึงผิว 28 มิลลินิวตันต่อเมตร, ค่า CMC 12 มิลลิกรัมต่อลิตร) และเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ดีอีกด้วย (Burgos-Díaz และคณะ, 2012) iturins A ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 7 โมเลกุล เชื่อมต่อกันเป็นวงและเชื่อมต่อกับกรดไขมันที่มีคาร์บอนจำนวน 14-17 อะตอม (Kumar และ Johri, 2012) โดยสาร Mycosubtilin ที่อยู่ใน iturins เป็นสารกลุ่มแรกของไลโปเปปไทด์ ที่พบว่ามีคุณสมบัติในการสารต้านเชื้อรา (antifungal) (Jacques, 2011) สำหรับ Fengycins มีกรดอะมิโน 10 โมเลกุล เรียงต่อกัน (Glu<sup>1,5</sup>, Orn<sup>2</sup>, Tyr<sup>3,9</sup>, Thr<sup>4</sup>, Ala/Val/Ile/Leu<sup>6</sup>, Pro<sup>7</sup>, Gln/Glu<sup>8</sup>, Val/Ile/Leu<sup>10</sup>) และโมเลกุลกรดไขมันมีจำนวนคาร์บอน 14-21 อะตอม Fengycins เป็นกรดอะมิโนชนิด unusual amino acids เช่น ornithine และ allo-threonine. ซึ่งแตกต่างกับ iturins และ surfactin (Pathak และคณะ, 2012)

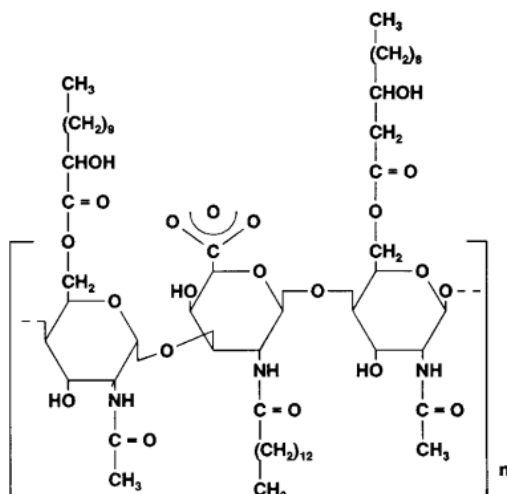


รูปที่ 10 โครงสร้าง surfactin, Inturin, Fengycin (Marvasi และคณะ, 2010)

## 2.4.2 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมวลโมเลกุลสูง

### 2.4.2.1 สารลดแรงตึงผิวชนิดพอลิเมอร์ (Polymeric surfactant)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดพอลิเมอร์ ได้แก่ อิมัลชัน (emulsan) ไลโปแซน (liposan) แมนโนโปรตีน (mannoprotein) และสารประกอบเชิงซ้อนของพอลิเมอร์กับโปรตีน (polysaccharide-protein complexes) (Singh, 2012) แบคทีเรีย *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 ผลิตสารลดแรงตึงผิวชนิดพอลิเมอร์ชนิด polyanionic amphipathic heteropolysaccharide bioemulsifier หรือ อิมัลชัน โดยสายของเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ ประกอบด้วยกลีเซอไรด์ 3 ชนิด ได้แก่ N-acetyl-D-galactosamine, N-acetylgalactosamine uronic acid และ an unidentified N-acetyl amino sugar มีกรดไขมันเป็นตัวเชื่อมต่อระหว่างพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยพันธะเอสเตอร์ ดังรูปที่ 11 (Desai และ Banat, 1997) ไลโปแซน (Liposan) เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สามารถอิมัลชันได้ดี ผลิตจากยีสต์ *Yarrowia lipolytica* โดยโครงสร้างมีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ 83 % ซึ่งเป็นสายของเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ ได้แก่ กลูโคส กาแลกโตส กาแลกโตซามีน และ กรดกาแลคโทโรนิก และมีโปรตีน 17 % (Cirigliano และ Carman, 1984) แมนโนโปรตีนที่ผลิตจาก *Saccharomyces cerevisiae* เป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ (emulsifier) กับน้ำมันหลายชนิด แอลเคน และตัวทำละลาย (Gautam และ Tyagi, 2006)



รูปที่ 11 โครงสร้างของอิมัลแซน จากเชื้อ *Acinetobacter calcoaceticus* ( $n=9-11$ ) (Desal และ Banat, 1997)

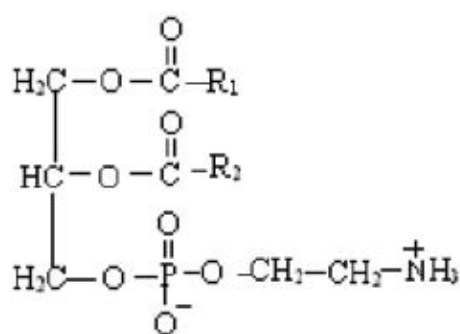
#### 2.4.2.2 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดอนุภาค (particulate biosurfactant)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดอนุภาคมี 2 ชนิด ได้แก่ Extracellular membrane vesicles และ Whole microbial cell โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด Extracellular membrane vesicles จะสามารถรวมตัวกันเป็นไมโครอิมัลชันกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการนำแอลเคนเข้าสู่เซลล์ (Shoeb และคณะ, 2013) และจะสะสมอยู่บริเวณเวสิเคิลของเซลล์แบคทีเรีย แบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HO1-N ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดอนุภาคมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเวสิเคิล 20-50 นาโนเมตร ซึ่งประกอบด้วย โปรตีน ฟอสโฟลิพิด และไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ (Kappeli และ Finnerty, 1979)

#### 2.4.2.3 กรดไขมันและไขมัน ฟอสโฟลิพิด (Fatty acid, neutral lipid และ phospholipid)

แบคทีเรียและยีสต์หลายชนิดสามารถผลิตกรดไขมันและไขมันจำนวนมากระหว่างการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอลเคนเป็นองค์ประกอบ ความยาวของกรดไขมัน ขึ้นอยู่กับการออกซิเดชันของสายแอลเคน โดยค่าเอชแอลบี (hydrophilic/lipophilic balance) จะบ่งบอกเป็นความยาวของสายไฮโดรคาร์บอนของโครงสร้างได้ จุลินทรีย์สามารถผลิตกรดไขมันที่มีความซับซ้อน (complex fatty acids) ซึ่งประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิลและหมู่แอลคิล เช่น corynomycolic acids ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีประสิทธิภาพ (Rosenberg และ Ron, 1999)

สำหรับฟอสโฟลิพิดเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ของเยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อจุลินทรีย์เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอลเคนเป็นองค์ประกอบ ตัวอย่างเช่น *Acinetobacter* sp. HO1-N เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเฮกซะดีเคน จะผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด phosphatidylethanolamin ไว้ในถุงเวซิเคิลจำนวนมาก ซึ่งจะทำให้เกิดเป็นไมโครอิมัลชันในน้ำ *Rhodococcus erythropolis* ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด phosphatidylethanolamin ดังรูปที่ 12 มีคุณสมบัติในการลดค่าแรงตึงผิวประจันระหว่างน้ำและเฮกซะดีเคนได้น้อยกว่า 1 มิลลินิวตันต่อเมตร และมีค่า CMC เท่ากับ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร (Rosenberg และ Ron, 1999; Gautam และ Tyagi, 2006)



รูปที่ 12 โครงสร้าง phosphatidylethanolamin (Gautam และ Tyagi, 2006)





ตารางที่ 2 จุลินทรีย์และชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมวลโมเลกุลต่ำ (Desai และ Banat, 1997; Rosenberg และ Ron, 1999; Muthusamy และคณะ, 2008)

ชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	จุลินทรีย์ที่ผลิต
<b>ไกลโคลิพิด</b>	
Rhamnolipids	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Trehalose lipids	<i>Arthrobacter</i> sp., <i>Mycobacterium</i> sp., <i>Rhodococcus erythropolis</i>
Sophorolipids	<i>Candida bombicola</i> , <i>C. apicola</i>
Mannosylerythritol lipids	<i>Pseudozyma</i> sp. <i>Ustilago</i> sp.
<b>ไลโปเปปไทด์</b>	
Surfactin/iturin/fengycin	<i>Bacillus subtilis</i>
Phospholipids	<i>Acinetobacter</i> sp.
Polymyxin	<i>Corynebacterium lepus</i> <i>B. polymyxa</i>
<b>กรดไขมันและไขมัน ฟอสโฟลิพิด</b>	
Fatty acids	<i>Corynebacterium lepus</i>
Neutral lipids	<i>Nocardia erythropolis</i>
Phospholipids	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Phosphatidylethanolamin	<i>Rhodococcus erythropolis</i>

**ตารางที่ 3** จุลินทรีย์และชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมวลโมเลกุลสูง (Desai และ Banat, 1997; Rosenberg และ Ron, 1999; Muthusamy และคณะ, 2008)

ชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	จุลินทรีย์ที่ผลิต
<b>สารลดแรงตึงผิวชนิดพอลิเมอร์</b>	
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Alasan	<i>A. radioresistens</i>
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
Lipomanan	<i>C. tropicalis</i>
<b>สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดอนุภาค</b>	
Vesicles	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Whole microbial cells	<i>Cyanobacteria</i> sp.
Particulate surfactant	<i>Pseudomonas marginalis</i>

## 2.5 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์มีคุณสมบัติที่ดีหลายประการและมีความเป็นมิตรแก่สิ่งแวดล้อม แต่การนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาประยุกต์ใช้ยังมีข้อจำกัด เนื่องจากต้นทุนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวทางเคมีและได้ผลผลิตต่ำ (Pornsunthorntawee และคณะ, 2009; Panesar และคณะ, 2011) ทำให้นักวิจัยจำนวนมากศึกษาและการพัฒนากระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยพัฒนาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและหาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งการเลือกแหล่งอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราคาถูก ถือเป็นปัจจัยหลักที่มีอิทธิพลต่อการลดต้นทุนในกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพเป็นอย่างมาก (Muthusamy และคณะ, 2008)

### 2.5.1 ปัจจัยที่ส่งผลต่อกระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

#### 2.5.1.1 แหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนเป็นสารประกอบอินทรีย์ในอาหารที่มีความสำคัญสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแบ่งเป็น 3 ประเภท ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต สารประกอบไฮโดรคาร์บอน และน้ำมัน

พืช จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่แตกต่างกัน โดยอาจจะใช้แหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียวหรือหลายๆแหล่งรวมกันในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Gautam และ Tyagi, 2006; Bhardwaj และ คณะ, 2013a)

การนำวัสดุที่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ (renewable resources) มาเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์และผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่มีบทบาทในการลดต้นทุนในอุตสาหกรรมการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และมีส่วนช่วยรักษาสิ่งแวดล้อมเป็นอย่างมาก เนื่องจากเป็นทรัพยากรที่มีอยู่ในปริมาณมากและราคาถูก ของเสียหรือสิ่งเหลือใช้ทางการเกษตร หรือผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตทางอุตสาหกรรมต่างๆ เป็นแหล่งที่มีปริมาณของคาร์โบไฮเดรต โปรตีนและไขมันจำนวนมาก ซึ่งเหมาะสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ แต่อย่างไรก็ตามการนำวัสดุดังกล่าวกลับมาใช้ใหม่จำเป็นต้องมีการคัดเลือกวัสดุที่มีสารอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Deleu และ Paquot, 2004; Silva และคณะ, 2010; Panesar และคณะ, 2011)

กากน้ำตาลเป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมผลิตน้ำตาลจากอ้อยหรือบีท และเป็นวัสดุหลักในการผลิตยีสต์สำหรับทำขนมปัง (baker's yeast) กรดซิตริก อะซิโตน และกรดอะมิโน ซึ่งกากน้ำตาลมีราคาถูกกว่าวัสดุหลักแหล่งอื่นๆ และยังคงมีสารอาหารอยู่มากมาย เช่น น้ำตาลซูโครส สารประกอบอินทรีย์ โปรตีน แมกนีเซียม โพแทสเซียม แคลเซียม และฟอสฟอรัส เป็นต้น (Makkar และ Cameotra, 2002) ยีสต์ *Starmarella bombicola* NBRC 10243 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระดับขวดเขย่า พบว่าสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดโซโฟโวลิตได้ เท่ากับ 14.4 กรัมต่อลิตรหลังจากบ่ม 120 ชั่วโมง (Takahashi และคณะ, 2011)

กลีเซอรอลเป็นของเสียหรือผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล (biodiesel) และอุตสาหกรรมโอเลโอเคมีอื่นๆ (oleochemical) ที่มีแนวโน้มจะเพิ่มสูงขึ้นทุกปี (Silva และคณะ, 2010) กลีเซอรอลเป็นกรดไขมันสายสั้นๆ ในโมเลกุลมีหมู่ไฮดรอกซิล ทำให้สามารถละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดี จุลินทรีย์จึงสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ง่าย (Hamzah และคณะ, 2013) ยีสต์ *Pseudozyma antarctica* JCM 10317 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน ในระดับขวดเขย่า และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดแมนโนซิลอิทธิทธิทอลิตได้ 12.6 กรัมต่อลิตร (Morita และคณะ, 2007)

น้ำมันพืชเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีจำนวนคาร์บอน 16-18 อะตอม เช่น น้ำมันคาโนลา น้ำมันข้าวโพด น้ำมันดอกทานตะวัน

น้ำมันดอกคำฝอย น้ำมันปาล์ม และน้ำมันถั่วเหลือง เป็นต้น (Makkar และคณะ, 2011) โดยทั่วไป น้ำมันแบบหยาบที่สกัดจากพืช (crude) หรือ น้ำมันที่ยังไม่ผ่านกรรมวิธี (unrefined oils) จะมีกรดไขมันอิสระจำนวนมาก เช่น สารประกอบกลีเซอไรด์ ฟอสโฟไลต์ กลีเซอรอล โทโคฟีรอล (tocopherols) เม็ดสี และแร่ธาตุต่างๆ เป็นต้น (Dumont และ Narine, 2007) ซึ่งเป็นวัสดุคิบที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและมีราคาถูก Vollbrecht และคณะ (1999) พบว่า *Tsukamurella spec* DSM 44370 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันพืชเป็นองค์ประกอบ สามารถเจริญเติบโตและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดโซโฟโวลิตได้ดีกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็น complex หรือสารประกอบไฮโดรคาร์บอน และเมื่อเลี้ยงในน้ำมันที่มีกรดโอเลอิกและน้ำมันคาโนล่า (Canola) (C22:1) จะทำให้สามารถผลิตโซโฟโวลิตได้ดีที่สุด

Cooper และ Paddock (1984) รายงานว่า การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ ยีสต์ *Torulopsis bombicola* ขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคส หรือน้ำมันพืชเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียวจะทำให้ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้น้อย แต่ถ้าเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีทั้งกลูโคสและน้ำมันพืชเป็นแหล่งคาร์บอนจะทำให้เชื้อสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้ถึง 70 กรัมต่อลิตร ยีสต์ *Candida lipolytica* เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันคาโนล่าและกลูโคสเป็นองค์ประกอบ และบ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 วัน พบว่าผลิตโซโฟโวลิตได้สูงสุด (8 กรัมต่อลิตร) และสามารถลดค่าแรงตึงผิวในอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 71 มิลลิวัตต์ต่อเมตร เหลือเท่ากับ 34 มิลลิวัตต์ต่อเมตร (Sarubbo และคณะ, 2007)

#### 2.5.1.2. แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อมีบทบาทสำคัญต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จุลินทรีย์ต้องการไนโตรเจนเพื่อนำมาใช้ในการสร้างโปรตีนซึ่งเป็นองค์ประกอบของเซลล์ รวมทั้งผลิตเอนไซม์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ได้แก่ ไนโตรเจนที่อยู่ในรูปสารอินทรีย์ (organic nitrogen) เช่น ยูเรีย เพปโตเน สารสกัดจากมอลต์ และสารสกัดจากยีสต์ เป็นต้น และไนโตรเจนที่อยู่ในรูปสารอนินทรีย์ (inorganic nitrogen) เช่น โซเดียมไนเตรท แอมโมเนียมไนเตรท และแอมโมเนียมซัลเฟต เป็นต้น (Bhardwaj และคณะ, 2013) จุลินทรีย์ชนิดต่างๆ จะมีความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน เช่น โปแทสเซียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของยีสต์ *Rhodotorula glutinis* IIP-30 เมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่นๆ (แอมโมเนียมไนเตรทและยูเรีย) (Johnson และคณะ, 1992)

จุลินทรีย์จะเริ่มมีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เมื่อแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณจำกัด หรือจุลินทรีย์เข้าสู่ระยะคงตัว (stationary phase) ซึ่งส่งผลทำให้เกิดการยับยั้งกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆภายในเซลล์ (Kim และคณะ, 2006) และทำให้เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น (Daverey และ Pakshirajan, 2010) Kim และคณะ (2006) เปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของยีสต์ *Candida* sp. SY16 โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ ได้แก่ เปปโตเน และแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ ได้แก่ แอมโมเนียมไนเตรท ในระดับถึงหมักพบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปปโตเนแหล่งไนโตรเจน เป็นระยะเวลา 190 ชั่วโมง ทำให้เชื้อสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีที่สุด 20 กรัมต่อลิตร

## 2.5.2 ปัจจัยทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

การศึกษาสภาวะแวดล้อมทางด้านกายภาพเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เนื่องจากปัจจัยทางด้านกายภาพ เช่น ค่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสม จะส่งผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ และทำให้เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพถูกกระตุ้นให้ทำงานอย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น (Amaral และคณะ, 2008)

### 2.5.2.1 ค่าพีเอช

ยีสต์ *Candida apicola* สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าพีเอชมากกว่า 2 และค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดไกลโคลิพิด เท่ากับ 5.5 ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเป็นกรด เท่ากับ 5.5 จึงเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงยีสต์ *Candida apicola* เนื่องจากเป็นค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของยีสต์และผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพอีกด้วย (Bednarski และคณะ, 2004)

### 2.5.2.2. อุณหภูมิ

อุณหภูมิมิมีผลต่อการควบคุมกระบวนการเมตาบอลิซึมต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เนื่องจากเอนไซม์จะทำงานได้ดีที่สุดในภาวะที่อุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum temperature) (Auhim และ Mohamed, 2013) มีรายงานว่าการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะผลิตได้ดีในช่วงอุณหภูมิเท่ากับ 25-30 องศาเซลเซียส (Okoliegbe และ Agarry, 2012)

## 2.6 ประโยชน์และการประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

มีรายงานวิจัยและเผยแพร่เกี่ยวกับการนำสารลดแรงตึงผิวไปประยุกต์ใช้จำนวนมาก โดยพบว่าสารลดแรงตึงผิวถูกนำมาใช้ในชีวิตประจำวันต่างๆของมนุษย์ ซึ่งทำให้ความต้องการของตลาดสารลดแรงตึงผิวมีเพิ่มขึ้น (Gakpe และคณะ, 2007) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ มีโครงสร้างทางเคมีและคุณสมบัติที่หลากหลาย ทำให้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ให้เหมาะสมกับงานได้หลากหลายเช่นกัน (Shete และคณะ, 2006; Muthusamy และคณะ, 2008) และจากคุณสมบัติที่ดีของสารที่กล่าวไปแล้วข้างต้น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจึงเหมาะกับการนำไปประยุกต์ใช้กับงานทางด้านสิ่งแวดล้อม อุตสาหกรรมน้ำมัน อุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอางและเภสัชกรรม (Nitschke และ Costa, 2007) นอกจากนี้ยังพบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบางชนิดมีคุณสมบัติในการต้านจุลชีพ จึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ได้อีกด้วย (Muthusamy และคณะ, 2008)

### 2.6.1 ด้านอุตสาหกรรมน้ำมัน

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นสารที่มีบทบาทในการช่วยเก็บเกี่ยวน้ำมันดิบ โดยจะช่วยเพิ่มการผลิตน้ำมันดิบผ่านกระบวนการทางจุลชีววิทยา (microbial-enhanced oil recovery, MEOR) จุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จะสามารถลดค่าแรงตึงผิวและความหนืดระหว่างน้ำมันกับหิน ทำให้น้ำมันดิบในชั้นหินเคลื่อนตัวได้ดีขึ้น (de Cassia และคณะ, 2014) จากคุณสมบัติอิมัลซิไฟเออร์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ทำให้สามารถช่วยขนส่งน้ำมันดิบไปตามท่อขนส่งและทำความสะอาดถังเก็บน้ำมันดิบได้ เช่น อิมัลชัน (Emulsam) เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สามารถเกิดอิมัลชันกับน้ำมันดิบ เพื่อลดความหนืดของน้ำมันดิบระหว่างการขนส่งน้ำมันดิบผ่านท่อ (Perfumo และคณะ, 2008) Diab และ El Din (2013) ศึกษาผลของน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* SH 29 ในการทำความสะอาดถังเก็บน้ำมัน หลังจาก 15 นาทีที่เติมน้ำเลี้ยงเชื้อ พบว่าน้ำมันหลุดออกจากบริเวณด้านล่างและผนังของถังเก็บน้ำมัน โดยน้ำมันดิบลอยขึ้นมายังชั้นของน้ำเลี้ยงเชื้อ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า น้ำเลี้ยงเชื้อของ *P. aeruginosa* SH 29 มีประสิทธิภาพในการทำความสะอาดถังเก็บน้ำมันได้

### 2.6.2 ด้านสิ่งแวดล้อม

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถนำมาประยุกต์ใช้ทางด้านสิ่งแวดล้อมได้ เช่น การย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอน การบำบัดโลหะหนักและยาฆ่าแมลง (Thavasi, 2011) การปนเปื้อนของปิโตรเลียมและผลพลอยได้จากปิโตรเลียมในสิ่งแวดล้อมเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดมลพิษทั่วโลกและกลายเป็นปัญหาที่สำคัญของประเทศอุตสาหกรรมและประเทศกำลังพัฒนา เนื่องจากการปนเปื้อนจะแพร่กระจายไปยังสิ่งแวดล้อมต่างๆ รวมถึง ดิน น้ำใต้ดิน และอากาศ ซึ่งสาเหตุของการปนเปื้อนมัก

เกิดจากอุบัติเหตุระหว่างการขนส่งเชื้อเพลิงทางเรือหรือรถบรรทุก การรั่วไหลของถังเก็บน้ำมัน เนื่องจากการกักกรอง เช่น สถานีบริการน้ำมัน เป็นต้น (de Cassia และคณะ, 2014)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะช่วยให้แบคทีเรียที่ย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนสามารถเข้าถึงสารมลพิษได้ โดยลดค่าแรงตึงผิวระหว่างผนังเซลล์ของแบคทีเรียและโมเลกุลของไฮโดรคาร์บอน อีกทั้งยังช่วยในการกระจายตัวของสารไฮโดรคาร์บอนโดยหุ้มห่อสารไว้ภายในโครงสร้างของไมเซลล์ (Aparna และคณะ, 2011) มีรายงานเกี่ยวกับการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไปใช้ในการกำจัดสิ่งปนเปื้อนในด้านสิ่งแวดล้อมจำนวนมาก Sobrinho และคณะ (2008) รายงานว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *Candida sphaerica* สามารถย่อยสลายน้ำมันเครื่องยนต์จากดินและสาหร่ายที่ปนเปื้อนได้ โดยสามารถย่อยสลายได้ 75 และ 92 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แรมโนลิพิดสามารถกำจัดสารสไตรีน (Styrene) ออกจากดินที่ปนเปื้อนได้ 90 เปอร์เซ็นต์ หลังจาก 5 วัน โดยแรมโนลิพิดมีส่วนช่วยเพิ่มอัตราการละลายของสารสไตรีน 0.29 กรัมต่อกรัมของแรมโนลิพิด และหลังจากสารสไตรีนถูกกำจัดออกจากดินที่ปนเปื้อนแล้ว 70 เปอร์เซ็นต์ของสารสไตรีนจะถูกย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ในสภาวะไร้ออกซิเจน (Mulligan, 2009)

Mulligan และคณะ (2005) ศึกษาการบำบัดโลหะหนักด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่า เซอร์เฟกดิน แรมโนลิพิด และ โซโฟโรลิพิด มีประสิทธิภาพในการกำจัดทองแดงและสังกะสีออกจากดินตะกอนได้ โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถดูดซับอยู่บนผิวดินตะกอนที่ปนเปื้อนโลหะหนักและโครงสร้างไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะเกิดการรวมตัวกันกับโลหะหนัก ซึ่งจะสามารถกำจัดโลหะหนักออกจากดินตะกอนได้

### 2.6.3 อุตสาหกรรมอาหาร

ในขั้นตอนกระบวนการผลิตของอุตสาหกรรมอาหารไม่เพียงแต่ต้องคำนึงถึงด้านความปลอดภัยของผู้บริโภค แต่ยังต้องคำนึงถึงลักษณะรูปร่าง รสชาติ และกลิ่นรสที่ปรุงแต่งให้มีความใกล้เคียงกับอาหารที่ปรุงสดใหม่ ดังนั้นจึงต้องมีการเติมสารเติมแต่งอาหาร (food additives) เพื่อรักษาคุณภาพและชะลอความสดใหม่ของอาหาร จากคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifier) สารที่ป้องกันการยึดเกาะของจุลินทรีย์ (antiadhesive) และมีคุณสมบัติในการต้านจุลชีพ (antimicrobial) ทำให้สามารถนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาประยุกต์ในอุตสาหกรรมอาหารได้หลากหลาย เช่น ขนมหั้วบ ผลิตภัณฑ์นม น้ำสลัด และเนยเทียม เป็นต้น (Ranasalva และคณะ, 2014) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดแรมโนลิพิดเป็นตัวควบคุมความเหนียวข้น ชะลอการเน่าเสียของไอศกรีมและขนมปัง และช่วยเพิ่มการละลายในไขมันที่ใช้ในการปรุงแต่งรสชาติได้ (Maqsood และ Seddig-Shams, 2014; Ranasalva และคณะ, 2014) นอกจากนี้สารลด

แรงดึงผิวชีวภาพถูกนำมาใช้ในการควบคุมการจับตัวเป็นก้อนของไขมันต่างๆ การพัฒนาเนื้อสัมผัสและยืดระยะเวลาในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบได้ (Nitschke และ Costa, 2007)

การปนเปื้อนของแบคทีเรียชนิดสร้างไบโอฟิล์มในอุตสาหกรรมอาหาร เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการเน่าเสียและอาจก่อให้เกิดโรคที่รุนแรงได้ ดังนั้นการควบคุมการยึดเกาะของแบคทีเรียชนิดสร้างไบโอฟิล์มในผิวหน้าของอาหารจึงเป็นขั้นตอนที่สำคัญ เพื่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหารและความปลอดภัยต่อผู้บริโภค โดยมีรายงานว่ามีการนำสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *Streptococcus thermophilus* มาเคลือบยางซิลิโคน (Silicone rubber) จะทำให้ยับยั้งการยึดเกาะของ *Candida albicans* 85 % (Nitschke และ Costa, 2007; Muthusamy และคณะ, 2008) สารลดแรงดึงผิวชีวภาพชนิดเซอร์เฟกติน มีคุณสมบัติในการลดการก่อตัวของไบโอฟิล์มที่ผลิตจาก *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica*, *E. coli* และ *Proteus mirabilis* ในแผ่นพลาสติกพีวีซีได้

#### 2.6.4 ด้านเครื่องสำอาง

สารลดแรงดึงผิวชีวภาพชนิดไกลโคลิพิด เช่น โซโฟโรลิพิด แรมโนลิพิดและแมนโนซิลอิทธิทธิทอลลิพิด เป็นสารที่นิยมนำมาประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรมเครื่องสำอางอย่างกว้างขวาง เช่น โซโฟโรลิพิดเป็นสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่มีคุณสมบัติเข้ากับผิว ให้ความชุ่มชื้นแก่ผิว และยับยั้งแบคทีเรีย ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นส่วนผสมในยารักษาสิว ขจัดรังแค และดับกลิ่นกายได้ (Lourith และ Kanlayavattanukul, 2009) นอกจากนี้โซโฟโรลิพิดสามารถช่วยลดไขมันส่วนเกินได้ โดยกระตุ้นฮอร์โมนเลปติน (leptin) ในเซลล์ไขมัน (dipocytes) ซึ่งทำหน้าที่ในการส่งสัญญาณไปยังสมองเพื่อให้ร่างกายรู้สึกอิ่ม (Friedman, 2002) บริษัท Kao Co. Ltd. นำโซโฟโรลิพิดมาใช้เป็นส่วนผสมที่ให้ความชุ่มชื้นในเครื่องสำอาง เช่น ลิปสติก ดินสอเขียนขอบปาก ภายใต้อีโก้ Sofina และ Soliance (Irfan-Maqsood และ Seddig-Shams, 2014) แรมโนลิพิดถูกนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์ดูแลสุขภาพต่างๆ เช่น ยาลดกรด แผ่นแปะสิว ผลิตภัณฑ์ขจัดรังแค ผลิตภัณฑ์ระงับกลิ่นกาย ผลิตภัณฑ์ดูแลเล็บ และยาสีฟัน ในแง่เครื่องสำอาง มีการจดสิทธิเกี่ยวกับการนำแรมโนลิพิดมาใช้เป็นสารต่อต้านริ้วรอย ซึ่งถูกใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางหลายชนิด เนื่องจากคุณสมบัติที่สามารถเข้ากับผิว และก่อให้เกิดอาการระคายเคืองผิวน้อย (Lourith และ Kanlayavattanukul, 2009) Morita และคณะ (2007) รายงานว่า แมนโนซิลอิทธิทธิทอลลิพิด มีคุณสมบัติที่ดีสามารถนำไปเป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางได้ เช่น เป็นสารให้ความชุ่มชื้นแก่ผิว ซ่อมแซมผมแห้งเสีย ปกป้องเซลล์ผิวและเป็นสารแอนติออกซิแดนท์



### 2.6.5 ด้านการเกษตร

จุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถย่อยสลายสารมลพิษในดินได้ เช่น สารปนเปื้อนไฮโดรคาร์บอน เพื่อเป็นการพัฒนาและปรับปรุงคุณภาพดินที่ใช้ทางด้านการเกษตร (Sachdev และ Cameotra, 2013) Mani และคณะ (2011) รายงานว่าแรมโนลิพิทที่ผลิตได้จาก *Pseudomonas aeruginosa* สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนคลอรีน (Endosulfan) ที่ปนเปื้อนในดินได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ หลังจาก 7 วัน แรมโนลิพิทและเซอร์เฟกติน สามารถย่อยสลายโลหะหนักที่ปนเปื้อนในดินได้ เช่น Ni, Cd, Mg, Mn, Ca, Ba, Li, Cu, และ Zn (ions) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถยับยั้งการผลิตสารแอลฟาทรอกซินจาก *Apergillus sp.* ที่ปนเปื้อนอยู่ในเมล็ดฝ้าย ข้าวโพดและถั่วลิสง ระหว่างเก็บรักษาได้ นอกจากนี้ยังมีส่วนช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เนื่องจากทำให้สารอาหารสามารถเข้าถึงรากพืชได้ มีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโรคพืช และมีส่วนช่วยเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อต้นพืชอีกด้วย (Sachdev และ Cameotra, 2013)

### 2.6.6 ด้านการแพทย์

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพบางชนิดมีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรีย (antibacterial) รา (antifungal) และไวรัส (antivirus) โดยอาจจะสามารถเทียบเคียงได้กับยารักษาโรคแบบสังเคราะห์ ซึ่งมีประสิทธิภาพและความปลอดภัยในการรักษาโรค (Gudina และคณะ, 2011) มีรายงานว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดอินทูลินและเซอร์เฟกตินมีคุณสมบัติเป็นยาปฏิชีวนะ ยาต้านไวรัส ยาต้านมะเร็ง และสารยับยั้งการสร้างเอมไซม์ได้ (Das และคณะ, 2010) เซอร์เฟกตินที่ผลิตจาก *Bacillus circulans* มีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทั้งแกรมบวกและแกรมลบ เช่น *Mycobacterium smegmatis*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Proteus vulgaris*, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*, *Alcaligenes faecalis*, *Acetobacter calcoaceticus*, *Bordetella bronchiseptica*, *Klebsiella aerogenes* และ *Enterobacter cloacae* (Fracchia และคณะ, 2012) แบคทีเรีย *Bacillus pumilis* ผลิต pumilacidin A, B, C, G, E, F และ G ซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านไวรัสชนิด HSV-1 และนอกจากนี้ยังพบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Lactococcus lactis* 53 และ *Streptococcus thermophilus* A สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์หลายชนิดที่อยู่ในเครื่องมือแพทย์ (voice prosthese) (Rodrigue และคณะ, 2006)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถนำมาใช้เป็นสารยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม (antibiofilm) สารป้องกันการยึดเกาะของจุลินทรีย์ (antiadhesive) สารส่งผ่านยีน (gene transfection) สารยับยั้งการแข็งตัวของเลือด (fibrin clot formation) (Gudina และคณะ, 2013)

แบคทีเรียสร้างไบโอฟิล์ม คือ กลุ่มของแบคทีเรียสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ มีลักษณะเป็นแผ่นฟิล์มบางๆ เพื่อเป็นที่อยู่อาศัยของแบคทีเรีย โดยไบโอฟิล์มจะทำให้ประสิทธิภาพของยารักษาโรคลดลง เนื่องจากไม่สามารถเข้าไปทำลายแบคทีเรียได้ ซึ่งการที่แบคทีเรียสร้างไบโอฟิล์มเป็นปัญหาที่สำคัญทางการแพทย์ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีคุณสมบัติรบกวนการสร้างไบโอฟิล์มของกลุ่มแบคทีเรียและลดการยึดเกาะของแบคทีเรียดังกล่าวได้ มีรายงานว่า เซอร์เฟกตินสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *Salmonella typhimurium*, *S. enterica*, *E. coli* และ *Proteus mirabilis* ในสายท่อปัสสาวะของผู้ป่วยได้ (Mireles และคณะ, 2001) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย *Lactobacillus acidophilus* สามารถลดการยึดเกาะของแบคทีเรียก่อโรคใน แก้ว ยาง เนื้อเยื่อที่ปลูกถ่ายของกล่องเสียง และอุปกรณ์การแพทย์ได้ (Sambanthamoorthy และคณะ, 2014) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการยับยั้งเซลล์มะเร็งจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพอีกด้วย ได้แก่ แมนโนซิลอีรีทิทอลชนิดเอ และ บี สามารถยับยั้งการเจริญและแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวได้หลายชนิด (Arutchelvi และ Doble, 2011) โขโฟโรลิพิดที่ผลิตจากยีสต์ *Wickerhamiella domercqiae* สามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งที่ดับ H7402 ตายได้ (Chen และคณะ, 2006)

**ตารางที่ 4** ตัวอย่างลิขสิทธิ์ของการนำจุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ (Bhardwaj และคณะ, 2013;Shete และคณะ, 2006)

No.	Microorganisms/ Type of biosurfactant	Title	Patent No.	Publication Date	Inventor
1.	<i>Pseudomonas</i> strain	Pharmaceutical preparation based on rhamnolipid	US 5455232	3-10-1995	Piljac G, Piljac V
2.	<i>Pseudomonas</i>	Method for inhibiting eukaryotic protein kinases	US 6319898	20-11-2001	Davies J E, Waters B, Saxena G
3.	<i>Bacillus</i> 60A	Used for preparing compost from lift garbage to improve efficiency and quality of compost.	JP 2005202510	21-4-2005	Mayama S, Tosa Y, Otsu Y,
4.	<i>P. aeruginosa</i>	A process for recovery of biosurfactant from distillery waste	CN 1431036		Toyada H, Matsuda K, Nonomura T.
5.	Not available	Possesses anti-microbial properties including the ability to selectively bind to collagen and inhibit infections around wounds and at the site of	IN 225343	23-7-2003	Shi J, Yuan X, Zeng G
6.	<i>Streptococcus</i> spp, <i>Bifidobacterium</i> spp. and <i>lactic acid bacteria</i>	implants and biofilm associated with infection in mammals	US 6727223	28-11-2008	Dubey K V, Juwaukau A A
				27-4-2004	Howard J, Reid G, Gan B S

**ตารางที่ 4** ตัวอย่างลิขสิทธิ์ของการนำจุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวภาพไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ (Bhardwaj และคณะ, 2013; Shete และคณะ, 2006)

No.	Microorganisms/ Type of biosurfactant	Title	Patent No.	Publication Date	Inventor
7.	<i>Rhodococcus ruber</i> EM	Increase the solubility of paraffin and polycyclic anyhydrocarbon in water	CN 1519312	11-8-2004	Liu Z, Li X, Liu S
8.	Sophorolipid producer	Mild to the skin, foaming detergent composition	WO 2011120776 A1	6-10-2011	Cox T F, Crawford R J, Gregory LG, Hosking S
9.	<i>Candida albican</i> , <i>C.rugosa</i> <i>C.tropicalis</i> , <i>C. lipolytica</i> , <i>C. torulopsis</i>	Biosurfactant as agents for controlling pets For coating of medical devices adapted for long term implantations	US 20050266036 A1 US 6921390	1-12-2005	K, Kotsakis P Awada S, spendlove R, Awada M
10.	Any biosurfactant producer	Help for treating a surface of an apparatus with an electrocoating operation to remove or prevent	US 2004231982,	26-7-2005	Bucay-Couto W, Li J
11.	Biosurfactant producers	sessile microorganism growth on the apparatus	WO2004078222	25-11-2004	Contons M A, Bourdeau M J, Pilar LL

## 2.7 ความหลากหลายทางชีวภาพของยีสต์จากสิ่งแวดล้อมทางทะเล

ยีสต์คือกลุ่มของจุลินทรีย์ที่อยู่ในอาณาจักรฟังไจ (Fungi Kingdom) มีลักษณะเซลล์เป็นเซลล์เดี่ยว (unicellular fungi) การจัดจำแนกประเภท (classification) แบ่งเป็น 2 ไฟลัม ได้แก่ เบสิดิโอไมยโคตา (Basidiomycota) และ แอสโคไมยโคตา (Ascomycota) ปัจจุบันมียีสต์ถูกค้นพบแล้ว 149 สกุล ประมาณ 1500 สปีชีส์ หรือ มีเพียงประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ของประชากรของยีสต์ทั้งหมดในธรรมชาติที่ถูกค้นพบ ยีสต์มีบทบาทสำคัญต่อมนุษย์มาหลายศตวรรษ โดยเริ่มจากการนำยีสต์มาใช้ในกระบวนการหมัก ทำเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ขนมปัง และอาหารสัตว์ เนื่องจากเป็นแหล่งของโปรตีน วิตามิน เอมไซม์สูง ในแง่อุตสาหกรรมอาหารนำยีสต์มาใช้เป็นสารเติมแต่ง (food additives) สารเติมแต่งกลิ่นรส (flavouring agents) และอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยีสต์ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆได้ เช่น การผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ (Production of biofuel) การย่อยสลายสารมลพิษด้วยวิธีทางชีวภาพ (Biodegradation) (Kutty และ Philip, 2008; Bekatorou และคณะ, 2006; Chen และคณะ, 2009) การควบคุมศัตรูพืชด้วยชีววิถี (Biocontrol) เป็นต้น ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถพบได้ทุกหนทุกแห่งในสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติ เช่น น้ำ ดิน ตะกอน ต้นไม้ สัตว์ แม่น้ำ ทะเล ทะเลสาบ บริเวณปากแม่น้ำหรือน้ำกร่อย และป่าชายเลน เป็นต้น ซึ่งการแพร่กระจายของประชากรและความหลากหลายของยีสต์ขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของสารอินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมทางกายภาพ เช่น อุณหภูมิ แสง ความดัน และ ค่าพีเอช (Kutty และ Philip, 2008; Nagahaman, 2006; Gadanho และคณะ, 2013; Kutty และคณะ, 2013)

สิ่งแวดล้อมทางทะเลเป็นแหล่งที่รวบรวมความหลากหลายทางชีวภาพสูง โดยท้องทะเลมีพื้นที่ปกคลุมกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ของพื้นผิวโลก เป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของสิ่งมีชีวิตต่างๆใต้ท้องทะเล รวมถึงจุลินทรีย์ที่มีความน่าสนใจ (Gonzalez-Parraga และคณะ, 2011) จากการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ พบว่ายีสต์จะดำรงชีวิตอยู่ในทะเลมากกว่าราชนิดอื่นๆ เนื่องจากระบบนิเวศทางทะเลมีปริมาณของสารอินทรีย์ที่เพียงพอและเหมาะสมสำหรับการเจริญของยีสต์ ยีสต์จากทะเลมีศักยภาพในการผลิตสารที่มีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compound) เช่น กรดอะมิโน กลูแคน กลูต้าไทโอน สารพิษ เอนไซม์ ไฟเตต แคโรทีนอยด์ และวิตามิน ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ในอุตสาหกรรมได้หลากหลาย เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง และ อุตสาหกรรมเคมี ดังตารางที่ 5 (Chi และคณะ, 2006; Nagahaman, 2006; Zaky และคณะ, 2014)

ยีสต์จากทะเลถูกค้นพบครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1894 โดย Fisher ได้คัดแยกยีสต์ที่มีโคโลนีสีขาวและสีแดง จากมหาสมุทรแอตแลนติก และนำมาจัดจำแนก พบว่า คือ ยีสต์ *Torula* sp. และ

*Mycoderma* sp. จากการค้นพบยีสต์ทะเลของ Fisher ทำให้มีนักวิจัยจำนวนมากสนใจคัดแยกยีสต์ทะเลจากแหล่งต่างๆ เช่น น้ำทะเล สิ่งทับถมในทะเล สาหร่าย ปลา และ สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทางทะเล ยีสต์ทะเลสามารถจัดจำแนกเป็น 2 กลุ่ม คือ ยีสต์กลุ่มที่เจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ หรือไม่มีออกซิเจนเท่านั้น (obligate หรือ indigenous marine yeasts) ซึ่งสามารถพบยีสต์กลุ่มนี้ได้ในพื้นที่สิ่งแวดล้อมทางทะเลเท่านั้น ส่วนยีสต์กลุ่มที่สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน (facultative marine yeast) มักเป็นกลุ่มยีสต์สายพันธุ์เดียวกับที่สามารถพบได้ในระบบนิเวศทั่วไป (Kutty และ Philip, 2008; Zaky และคณะ, 2014) Kutty และ Philip (2008) รายงานว่า ยีสต์ที่คัดแยกมาจาก ผลไม้ ดิน สัตว์ และ มนุษย์ สามารถดำรงชีวิตอยู่ในแหล่งน้ำและทะเลได้ หรือ ยีสต์บางชนิดที่สามารถพบได้บ่อยในน้ำทะเล อาจเป็นยีสต์ที่ปนเปื้อนมาจากสิ่งแวดล้อมทางบก และสามารถอยู่รอดในน้ำทะเลได้ เช่น สกุล *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Hanesnula*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Trichosporon* และ *Torulopsis* (Gadanh และคณะ, 2013)

ยีสต์ที่อาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมทางทะเลจะมีจำนวนประชากรลดลง ในบริเวณที่ระยะห่างจากชายฝั่งทะเลมากขึ้น เนื่องจากบริเวณชายฝั่งทะเลมีสารอินทรีย์ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของยีสต์ โดยพบว่าบริเวณใกล้ชายฝั่งทะเลจะพบยีสต์อาศัยอยู่ประมาณ 10-1000 เซลล์ต่อลิตร และจะพบแอสโคไมซีตส์ยีสต์ เช่น *Candida*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia* และ *Saccharomyces* ในขณะที่บริเวณที่อยู่ห่างจากชายฝั่งออกไปหรือน้ำทะเลลึกเป็นบริเวณที่มีปริมาณของสารอินทรีย์อยู่น้อย จะพบยีสต์เพียง 10 หรือน้อยกว่า 10 เซลล์ต่อลิตร โดยจะสามารถพบเบสิดิโอมัยซีตส์ยีสต์ เช่น *Cryptococcus*, *Rhodospordium*, *Rhodotorula*, และ *Sporobolomyces* เป็นต้น (Kutty และ Philip 2008; Kutty และคณะ, 2013) นอกจากนี้ยังพบว่า ปรากฏการณ์ต่างๆ ที่เกิดขึ้นในน้ำทะเล ส่งผลต่อจำนวนประชากรและความหลากหลายของยีสต์ เช่น ปรากฏการณ์น้ำทะเลลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็ว (Thermoclines) ปรากฏการณ์น้ำทะเลเปลี่ยนสี (Plankton Bloom) และน้ำมันเคลือบอยู่ที่ผิวหน้าของน้ำทะเล (surface slicks) เป็นต้น (Gadanh และคณะ, 2013)

ในสิ่งแวดล้อมทางทะเลมีการปนเปื้อนด้วยมลพิษต่างๆ เช่น สารอินทรีย์ โลหะหนัก โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารไฮโดรคาร์บอน ยีสต์ที่อาศัยอยู่ในทะเลมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารมลพิษทางผ่านกระบวนการทางชีวภาพ (biodegradation) ย่อยสลายสารประกอบที่ย่อยสลายยาก (Recalcitrant compounds) หมุนเวียนสารอินทรีย์ในระบบนิเวศ (Nutrient-recycling phenomena) Kutty และคณะ, 2013 เป็นต้น มีรายงานว่ายีสต์จากทะเลสามารถย่อยสลายอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันดิบได้ เช่น *Candida parapsilosis*, *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *Y.*

*lipolytica*, *C. tropicalis* และ *C. intermedia* โดยยีสต์ *Yarrowia lipolytica* มีศักยภาพในการย่อยสลายได้ดีที่สุด (78 เปอร์เซ็นต์) (Chi และคณะ, 2010)

กระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ ในขั้นตอนการย่อยสลายสารมลพิษจะมีประสิทธิภาพเมื่อสารมลพิษมีลักษณะกระจายตัว ละลาย หรือ ก่อตัวเป็นอิมัลชัน (Maneerat, 2005) Olivera และคณะ, 2003 รายงานว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดเซอร์เฟกตินสามารถจับกับสารไฮโดรคาร์บอนและช่วยส่งเสริมการละลายของไฮโดรคาร์บอนได้ Amaral และคณะ, 2006 พบว่า ยีสต์สายพันธุ์ *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด Yansan ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารก่ออิมัลชันทางชีวภาพ (bioemulsifier) สามารถก่ออิมัลชันกับสารอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนและอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอนที่มีความเสถียรในช่วงพีเอช 3-9 ทำให้สามารถย่อยสลายสารมลพิษได้ดี



**ตารางที่ 5** การนำยีสต์จากทะเลมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ (Chi และคณะ, 2010; Zaky และคณะ, 2014)

Product	Marine yeast species	Application
Bio-ethanol	<i>Candida albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Geotrichum</i> , <i>Pichia fermentans</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Biofuel industries
Microbial oil	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i>	Biodiesel industries
Riboflavin	<i>C. membranifaciens</i> subsp. <i>flavinogenic</i> <i>C. tropicalis</i> <i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Leucosporidium scottii</i>	Food and Pharmaceutical industries Chemical industries
Lipases	<i>Cryptococcus adeliensis</i> <i>Kodamea ohmeri</i> <i>P. guilliermondii</i>	Feed industries Food and fuel industries
Phytase	<i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>D. hansenii</i> ,	Biomaterial industry
Inulinase	<i>Geotrichum</i> sp. <i>P. capsulata</i> , <i>P.</i>	
Silver	<i>fermentans</i> , <i>P. salicaria</i> , <i>R. minuta</i>	Bioremediation,
Nanoparticles	<i>Y. lipolytica</i> <i>A. pullulans</i>	Hydrocarbon degradation
Degrader of	<i>S. cerevisiae</i> , <i>Y. lipolytica</i>	Hydrolysis of lipid
pollutants	<i>Williopsis saturnus</i> WC91-2,	Antibody
Lipase	<i>P. anomala</i> YF076	Killing of pathogens
Vaccine	<i>Metschnikowia reukaufii</i>	Hydrolysis of protein
Killer toxins	<i>Rhodotorula</i> sp. <i>Rhodotorula</i> <i>mucilaginosa</i> , <i>Arxula adenivorans</i>	Food coloring Inhibition of pathogen
Acid protease	<i>A. pullulans</i> HN6.2	
Carotene		
Siderophore		



### 2.7.1 ความหลากหลายทางชีวภาพของเกาะสีชัง

เกาะสีชัง เป็นเกาะที่ตั้งอยู่บริเวณตามแนวชายฝั่งทะเลตะวันออกของอ่าวไทย อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี โดยเกาะสีชังเคยเป็นพระราชวังฤดูร้อนในพระบาทสมเด็จพระจุลจอมเกล้าเจ้าอยู่หัว (รัชกาลที่ 5) และเป็นเคยที่พระทับของรัชกาลที่ 4-6 นอกจากนี้ยังเป็นเส้นทางการขนส่งสินค้าทางเรือของในและต่างประเทศที่สำคัญตั้งแต่ปีที่ 1800 (Wattayakorn และ Boopern, 2014; Somboonna และคณะ, 2012) ในปัจจุบันเกาะสีชังเป็นสถานที่ท่องเที่ยวที่มีทรัพยากรธรรมชาติทางทะเลที่มีความสวยงาม ประกอบด้วย 5 หาด ได้แก่ หาดท่าวัง หาดทรายแก้ว หาดถ้ำพัง หาดหินกลม และหาดถ้ำทราย เกาะน้อยใหญ่ 8 เกาะ ได้แก่ เกาะยายท้าว เกาะคางคาว เกาะท้ายตาหมื่น เกาะขามใหญ่ เกาะขามน้อย เกาะส้มป่นย้อย เกาะปรัง และเกาะร้านดอกไม้ (ภัทรกุล ศรีสุข, 2548) นอกจากนี้ยังมีแหล่งท่องเที่ยวทางด้านประวัติศาสตร์ที่สำคัญ ได้แก่ พระจุฑาธุชราชฐาน รอยพระพุทธรูปบาทจำลอง และโบสถ์พระแก้ว เป็นต้น ทำให้มีการขยายตัวของชุมชนเพิ่มมากขึ้น มีการประกอบธุรกิจการค้าขาย ที่พักอาศัย มีอุตสาหกรรมต่างๆ มากมาย รวมทั้งกิจกรรมทางทะเลต่างๆ และเกาะสีชังยังเป็นที่สำหรับขนถ่ายสินค้าทางการเกษตรผ่านการประมงน้ำลึก ได้แก่ แป้งมันสำปะหลัง ข้าว โดยขนถ่ายสินค้ากลางทะเลสู่เรือใหญ่อีกทอดหนึ่ง (ณัฐวรรธน์ ปภาสสิทธิ์, 2546) ซึ่งจากข้อมูลและสถิติของกรมเจ้าท่าในปี 2009 (Marine Department of Thailand) พบว่าเกิดเหตุการณ์น้ำมันดิบรั่วไหลที่เกาะสีชังมากกว่า 20 ครั้งภายใน 2 ศตวรรษ ซึ่งมลพิษจากน้ำมันปนเปื้อนจะส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมทางทะเลและสัตว์ที่อยู่บริเวณหน้าดิน (Wattayakorn และ Rungsapa, 2012; Wattayakorn และ Boopern, 2014)

การประกอบอุตสาหกรรม การขนส่งสินค้าทางเรือ การก่อสร้างสาธารณูปโภคเพื่อรองรับการท่องเที่ยว ตลอดจนเหตุการณ์การรั่วไหลของน้ำมันดิบระหว่างการขนส่งสินค้า หากปัจจัยเหล่านี้เกิดขึ้นโดยมิได้คำนึงถึงความเหมาะสมและการจัดการแก้ไขด้วยวิธีถูกต้อง จะส่งผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงและความเสื่อมโทรมของระบบนิเวศทางทะเล คุณภาพของน้ำทะเล และผลกระทบต่อหลากหลายของสิ่งมีชีวิตบริเวณชายฝั่งของเกาะสีชัง (ภัทรกุล ศรีสุข, 2548) การศึกษาชนิดและความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่บริเวณพื้นที่ชายฝั่งของเกาะสีชัง จะเป็นข้อมูลพื้นฐานทำให้ทราบถึงความเปลี่ยนแปลงและสามารถบ่งชี้ภาวะที่เกิดขึ้นในระบบนิเวศของเกาะสีชังได้ ซึ่งจะเป็นแนวทางอนุรักษ์พันธุ์ของสิ่งมีชีวิตและระบบนิเวศต่อไป

จากโครงการวิจัยในหัวข้อเรื่องความหลากหลายของยีสต์และราคล้ายยีสต์จากบริเวณพื้นที่ชายฝั่งของเกาะสีชัง อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี 5 จุด ได้แก่ หาดถ้ำพัง หาดท่าวัง หาดท้ายตาหมื่น ท่าล่าง (ท่าเรือเทววงษ์) และท่าบน (ท่าเรือภานุรังสี) เมื่อปี พ.ศ.2554-2555 (Thaniyavarn และคณะ, 2013) ได้ทำการคัดแยกยีสต์จากบริเวณพื้นที่ชายฝั่งทะเลเกาะสีชัง โดยอาศัยลักษณะสัญญาณ

วิทยาเบื้องต้นร่วมกับวิธีการอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล (molecular technique) ตามวิธีของ Kurtzman และคณะ, 2011 เพื่อจัดจำแนกและศึกษาความหลากหลายของยีสต์และราคล้ายยีสต์ บริเวณพื้นที่ชายฝั่งของเกาะสีชัง พบว่า แยกยีสต์ได้ทั้งหมด 246 ไอโซเลต จาก 41 ตัวอย่าง และนำ 50 ไอโซเลต มาพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธีอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA ซึ่งผลจากการจัดจำแนกสายพันธุ์ยีสต์แสดงในตารางที่ 6

จากการศึกษาความหลากหลายของยีสต์และราคล้ายยีสต์ที่คัดแยกได้ มีเปอร์เซ็นต์ความถี่ของการพบสายพันธุ์ยีสต์ ดังตารางที่ 7 พบว่า มีแอสโคไมยซีตัสยีสต์ 82 เปอร์เซ็นต์ และ เบสิดิโอไมยซีตัสยีสต์ 18 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์สกุลที่รู้จักแล้ว ทั้งหมด 15 สกุล ได้แก่ *Candida*, *Pichia*, *Wickerhamomyces*, *Rhodospiridium*, *Aureobasidium*, *Clavispora*, *Sporidiobolus*, *Issatchenkia*, *Hanseniaspora*, *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Astermella* และ *Sporidiobolus* ยีสต์ที่พบส่วนใหญ่เป็นแอสโคไมยซีตัสยีสต์ ได้แก่ *Aureobasidium pullulans*, *Candida fermentati*, *C. glabrata*, *C. hawaiiiana*, *C. metapsilosis*, *C. thaimueangensis*, *C. tropicalis*, *C. orthopsilosis*, *C. parapsilosis*, *C. rugosa*, *Clavispora lusitaniae*, *Debaryomyces nepalensis*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Pichia cijferrii*, *Pichia terricola*, *P. kudriavzevii*, *P. caribbica*, *M. guilliermondii*, *Rhodospiridium poludigenum*, *Issatchenkia terricola*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Wickerhamomyces siamensis* และ *W. anomalus* และพบเบสิดิโอไมยซีตัสยีสต์เพียง 18 เปอร์เซ็นต์ของความถี่การพบยีสต์ ได้แก่ *Asterotremella humicola*, *Rhodospiridium azoricum*, *R. mucilaginosa*, *R. paludigenum* และ *Sporidiobolus ruineniae* นอกจากนี้ยังพบว่ามียีสต์สปีชีส์ใหม่หรือสปีชีส์ที่ยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อน 1 สายพันธุ์ ได้แก่ *Candida* sp. YTW5-4 ซึ่งคัดแยกได้น้ำทะเลบริเวณหาดท่าวัง

**ตารางที่ 6** การจัดจำแนกยีสต์สายพันธุ์ที่เคยมีรายงานแล้ว และสปีชีส์ใหม่จากบริเวณชายฝั่งเกาะสีชัง

No.	Strain	Closest species (Accession number)	Nucleotide identity in D1/D2			Nucleotide different in D1/D2			Result of identification
			domain			domain			
			no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of nucleotide substitutions	no. of nucleotide substitutions	% substitution	no. of gap	
1	OTP 9-2	<i>Candida rugosa</i> CBS613 <sup>T</sup> (GU144663)	490/490	100	0	0	0	<i>Candida rugosa</i>	
2	OTP 12-2	<i>Pichia kudriavzevii</i> CBS 5147 <sup>T</sup> (EF550222)	572/572	100	0	0	0	<i>Pichia kudriavzevii</i>	
3	OTW 6-2	<i>Rhodospiridium paludigenum</i> CBS 6566 <sup>T</sup> (AF363640)	581/581	100	0	0	0	<i>Rhodospiridium paludigenum</i>	
4	OTW 7-2	<i>Pichia caribbica</i> CBS 9966 <sup>T</sup>	578/578	100	0	0	0	<i>Pichia caribbica</i>	
5	OTW 8-2	<i>Candida tropicalis</i> CBS 94 <sup>T</sup> (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>	
6	YTD 12-2	<i>Candida parapsilosis</i> CBS 604 <sup>T</sup> (U45754)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida parapsilosis</i>	
7	YTP 11-30	<i>Clavispora lusitanae</i> CBS 4413 <sup>T</sup> (AJ508571)	516/517	99.8	1	0.2	0	<i>Clavispora lusitanae</i>	
8	YTP 11-45	<i>Pichia caribbica</i> CBS 9966 <sup>T</sup>	578/578	100	0	0	0	<i>Pichia caribbica</i>	
9	YTP 11-58	<i>Candida tropicalis</i> CBS 94 <sup>T</sup> (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>	
10	YTP 11-61	<i>Sporidiobolus ruineniae</i> var. <i>ruineniae</i> CBS 5001 <sup>T</sup> (AF070438)	581/581	100	0	0	0	<i>Sporidiobolus ruineniae</i> var. <i>ruineniae</i>	
11	YTP 11-68	<i>Issatchenkia terricola</i> CBS 2617 <sup>T</sup> (EF550233)	558/560	99.6	2	0.4	0	<i>Issatchenkia terricola</i>	
12	YTP 11-24	<i>Aureobasidium pullulans</i> (AB104687)	579/579	100	0	0	0	<i>Aureobasidium pullulans</i>	
13	YTP 11-62	<i>Aureobasidium pullulans</i> (AB104687)	579/579	100	2	0.4	0	<i>Aureobasidium pullulans</i>	
14	YTP 11-8	<i>Candida metapsilosis</i> CBS 10907 <sup>T</sup> (FJ746055)	561/562	99.8	0	0	0	<i>Candida metapsilosis</i>	
15	YTP 13-1	<i>Candida parapsilosis</i> CBS 604 <sup>T</sup> (U45754)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida parapsilosis</i>	
16	OTP 11-2	<i>Candida tropicalis</i> CBS 94 <sup>T</sup> (U45749)	570/570	100	1	0.2	0	<i>Candida tropicalis</i>	
17	OTP 12-3	<i>Candida tropicalis</i> CBS 94 <sup>T</sup> (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>	
18	YTP 10-1	<i>Candida parapsilosis</i> CBS 604 <sup>T</sup> (U45754)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida parapsilosis</i>	

**ตารางที่ 6** การจัดทำแมยีสต์สายพันธุ์ที่เคยมีรายงานแล้ว และสปีชีส์ใหม่จากบริเวณชายฝั่งเกาะสีชัง

No.	Strain	Closest species (Accession number)	Nucleotide identity in D1/D2			Nucleotide different in D1/D2			Result of identification
			domain			domain			
			no. of nucleotides	% identity	% nucleotide substitutions	no. of nucleotides	% substitution	no. of gap	
19	YTD8-1	<i>Candida orthopsilosis</i> CBS 5147 <sup>T</sup> (FJ746056)	574/576	99.7	1	0.2	1	<i>Candida orthopsilosis</i>	
20	YTD8-2	<i>Wickerhamomyces anomalus</i> CBS 5759 <sup>T</sup> (U74592)	571/573	99.7	2	0.3	0	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	
21	YTD8-7	<i>Candida tropicalis</i> CBS 94 <sup>T</sup> (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>	
22	YTD8-10	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CBS 316 <sup>T</sup> (AF070432)	577/577	100	0	0	0	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	
23	YTD8-17	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CBS 316 <sup>T</sup> (AF070432)	578/579	99.8	1	0	0	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	
24	YTD8-20	<i>Candida thaimueangensis</i> CBS 10360 <sup>T</sup> (AB264009)	548/560	99.6	2	0.4	10	<i>Candida thaimueangensis</i>	
25	YTD8-23	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CBS 316 <sup>T</sup> (AF070432)	575/575	100	0	0	0	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	
26	YTP6-4	<i>Candida tropicalis</i> CBS 94 <sup>T</sup> (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>	
27	YTP6-5	<i>Candida glabrata</i> CBS 138 <sup>T</sup> (U44808)	580/581	99.8	1	0.2	0	<i>Candida glabrata</i>	
28	YTP6-6	<i>Candida orthopsilosis</i> CBS 5147 <sup>T</sup> (FJ746056)	575/577	99.7	1	0.2	1	<i>Candida orthopsilosis</i>	
29	YTP6-14	<i>Aureobasidium pullulans</i> SN22 (FJ515219)	579/579	100	0	0	0	<i>Aureobasidium pullulans</i>	
30	YTU9-6	<i>Hanseniaspora opuntiae</i> CBS 8733 <sup>T</sup> (AJ512453)	572/572	100	0	0	0	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	
31	YTU9-18	<i>Candida tropicalis</i> CBS 94 <sup>T</sup> (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>	
32	YTU9-23	<i>Candida tropicalis</i> CBS 94 <sup>T</sup> (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>	
33	YTU9-27	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CBS 1171 <sup>T</sup> (AY048154)	578/578	100	0	0	0	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
34	YTU9-34	<i>Candida tropicalis</i> CBS 94 <sup>T</sup> (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>	

**ตารางที่ 6** การจัดจำแนกยีสต์สายพันธุ์ที่เคยมีรายงานแล้ว และสปีชีส์ใหม่จากบริเวณชายฝั่งเกาะสี่ซัง

No.	Strain	Closest species (Accession number)	Nucleotide identity in D1/D2		Nucleotide different in D1/D2		Result of identification
			domain		domain		
			no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of nucleotide substitutions	% substitution	
35	YTW5-2	<i>Hanseniaspora opuntiae</i> CBS 8733 <sup>T</sup> (AJ512453)	572/572	100	0	0	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>
36	YTW5-4	<i>Candida hawaiiensis</i> CBS 9146 <sup>T</sup> (AF514293)	443/533	89.3	27	57	<i>Candida</i> sp. nov.
37	YTW5-5	<i>Cryptococcus humicola</i> CBS 571 <sup>T</sup> (FJ534906)	560/560	100	0	0	<i>Cryptococcus humicola</i>
38	YTY7-1	<i>Debaryomyces nepalensis</i> CBS 5921 <sup>T</sup> (U45839)	570/570	100	0	0	<i>Debaryomyces nepalensis</i>
39	LEN1	<i>Pichia caribbica</i> strain NRRL Y-27274 <sup>T</sup>	570/570	100	0	0	<i>Pichia caribbica</i>
40	LEN2	<i>Candida tropicalis</i> (U45749)	570/570	100	0	0	<i>Candida tropicalis</i>
41	SHN1	<i>Pichia ciferrii</i> NRRL Y-1031	570/577	99	3	0.5	<i>Pichia ciferrii</i>
42	TP1-1N5	<i>Candida tropicalis</i> (U45749)	569/570	99	0	1	<i>Candida tropicalis</i>
43	TP1-2N1	<i>Rhodospiridium paludigenum</i> CBS 6566 <sup>T</sup> (AF363640)	580/580	100	0	0	<i>Rhodospiridium paludigenum</i>
44	TP1-2N2	<i>Candida parapsilosis</i> (U45754)	570/570	100	0	0	<i>Candida parapsilosis</i>
45	TP1-2N4	<i>Candida tropicalis</i> (U45749)	570/570	100	0	0	<i>Candida tropicalis</i>
46	TP1-2N10	<i>Rhodospiridium azoricum</i> IGC 5062 <sup>T</sup> (U45709)	574/574	100	0	0	<i>Rhodospiridium azoricum</i>
47	TW1-1N6	<i>Pichia guilliermondii</i> (AY497675)	568/570	99	2	0.3	<i>Pichia guilliermondii</i>
48	TW1-1N7	<i>Sporidiobolus ruineniae</i> CBS 5001 <sup>T</sup> (AF070438)	579/580	99	1	0.2	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>
49	TW1-1N11	<i>Candida parapsilosis</i> (U45754)	570/570	100	0	0	<i>Candida parapsilosis</i>
50	TW3-1N1	<i>Pichia caribbica</i> strain NRRL Y-27274 <sup>T</sup>	570/570	100	0	0	<i>Pichia caribbica</i>



**รูปที่ 13** จุดเก็บตัวอย่างน้ำทะเลและอินทรีย์วัตถุรอบเกาะสีซัง (Thaniyavarn และคณะ, 2013) ทิศตะวันออกของ ได้แก่ หาดท่าวัง, ท่าล่าง (ท่าเทววงศ์), ท่าบน (ท่าภาณุรังษี), ท่ายายทิม ทิศตะวันตก ได้แก่ หาดถ้ำพัง

จากการศึกษาพบยีสต์สกุล *Candida* มากที่สุด Kutty และ Phillip (2008) รายงานว่า ยีสต์สกุล *Candida* สามารถพบได้บ่อยในบริเวณปนเปื้อนด้วยสารมลพิษและการพบยีสต์สกุลนี้ สามารถเป็นตัวบ่งชี้ปริมาณของมลพิษที่เกิดขึ้นบริเวณชายฝั่งทะเลได้ ส่วนสปีชีส์ที่พบมากที่สุด ได้แก่ *Candida tropicalis* 12 ไอโซเลต (24%) และ *C. si parapsilosis* 5 ไอโซเลต (10%) *Aureobasidium pullulans* 3 ไอโซเลต (6%), *Rhodotorula mucilaginosa* 3 ไอโซเลต (6%) เช่นเดียวกับ Yan และคณะ (2010) พบว่า ยีสต์สายพันธุ์ *C. tropicalis* มีการแพร่กระจายทั่วระบบนิเวศทางทะเลหลายแห่งของประเทศจีนและในตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไต้หวัน โดยสันนิษฐานว่าบริเวณชายฝั่งทะเลอาจจะมีแหล่งอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของ *C. tropicalis* ทำให้พบการแพร่กระจายของยีสต์สปีชีส์นี้ในระบบนิเวศทางทะเลจำนวนมาก (Chen และคณะ, 2009) *A. pullulans* เป็นราคล้ายยีสต์ที่มักจะพบในผิวพืชที่อยู่เหนือดิน (phytoplankton) บริเวณที่มีความเค็ม (hypersaline habitats) บริเวณชายฝั่งทะเล ซึ่งมีบทบาทเป็นผู้ย่อยสลายสารอินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม (Liu และคณะ, 2009)

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์ความถี่ของการพบยีสต์ที่แยกได้จากบริเวณชายฝั่งของเกาะสีชัง

Yeast Species	% frequency occurrence (FO )*					Total
	TW	TP	TU	TD	TY	
Ascomycota						
<i>Aureobasidium pullulans</i>	-	6	-	-	-	6
<i>Candida fermentati</i>	2	2	-	-	-	4
<i>C. glabrata</i>	-	2	-	-	-	2
<i>C. hawaiiiana</i>	2	-	-	-	-	2
<i>C. metapsilosis</i>	-	2	-	-	-	2
<i>C. thaimueangensis</i>	-	-	-	2	-	2
<i>C. tropicalis</i>	4	12	6	2	-	24
<i>C. orthopsilosis</i>	-	2	-	2	-	4
<i>C. parapsilosis</i>	4	2	2	2	-	10
<i>C. rugosa</i>	-	2	-	-	-	2
<i>Clavispora lusitaniae</i>	-	2	-	-	-	2
<i>Debaryomyces nepalensis</i>	-	-	-	-	2	2
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	2	-	2	-	-	4
<i>Issatchenkia terricola</i>	-	2	-	-	-	2
<i>Meyerozyma caribbica</i>	4	-	-	-	-	4
<i>M. guilliermondii</i>	2	-	-	-	-	2
<i>Pichia kudriavzevii</i>	-	2	-	-	-	2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	2	-	-	2
<i>Wickerhamomyces siamensis</i>	2	-	-	-	-	2
<i>W. anomalus</i>	-	-	-	2	-	2
Basidiomycota						
<i>Asterotremella humicola</i>	2	-	-	-	-	2
<i>Rhodospordium azoricum</i>	-	2	-	-	-	2
<i>R. mucilaginoso</i>	-	-	-	6	-	6
<i>R. paludigenum</i>	2	2	-	-	-	4
<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	2	2	-	-	-	4
Total	28	42	12	16	2	100

หมายเหตุ : จุดเก็บตัวอย่าง :TW= หาดท่าวัง, TP= หาดถ้ำพัง, TU = ท่าบน, TD = ท่าล่าง, TY= ท่า  
 ยายทิม \* % ความถี่ของการพบสายพันธุ์ยีสต์ A= (จำนวนสายพันธุ์ยีสต์ A X 100) /จำนวนยีสต์  
 ทั้งหมดที่พบ

เมื่อเปรียบเทียบประชากรและความหลากหลายของยีสต์และราคล้ายยีสต์ที่แยกได้จากหาดถ้ำพังซึ่งอยู่ทางด้านทิศตะวันตกของเกาะสีชังและหาดท่าวังที่ตั้งอยู่ด้านทิศตะวันออกของเกาะสีชังพบว่า หาดถ้ำพังมีประชากรและความหลากหลายของยีสต์มากกว่าหาดท่าวัง โดยพบยีสต์ 42% และ 28% ของความถี่ในการพบยีสต์ ตามลำดับ ในบริเวณหาดท่าวังมักเป็นบริเวณที่มีประชากรอาศัยอยู่อย่างหนาแน่น มีที่พักอาศัย ท่าเทียบเรือ ตลอดจนมีกิจกรรมทางทะเลต่างๆ ทำให้เป็นที่สนใจของนักท่องเที่ยวจำนวนมากขึ้น ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศชายหาด เนื่องจากมีปริมาณของขยะที่ถูกทิ้งจำนวนมาก (ปิยา รพีธรรม, 2553) ขยะบางชนิดเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตและสะสมมลสารอยู่บริเวณระบบนิเวศทางทะเล ซึ่งอาจจะส่งผลกระทบต่อความหลากหลายในการพบสกุลและสปีชีส์ของยีสต์ในบางชนิด ส่วนหาดถ้ำพัง มีลักษณะภูมิทัศน์ส่วนใหญ่เป็นโขดหิน มีประชากรอาศัยไม่มากนัก ระบบนิเวศทางทะเลจึงไม่ถูกรบกวน ทำให้มีความหลากหลายของปริมาณและสปีชีส์ของยีสต์ที่อาศัยอยู่บริเวณหาดถ้ำพัง





## บทที่ 3

### อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

##### 3.1.1. อุปกรณ์

- เครื่องวัดแรงตึงผิว (Ring tensiometer) รุ่น K6 ของบริษัท Kruss, Germany
- เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิกวิดโครมาโตกราฟี (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) รุ่น Pro star บริษัท Varian, USA
- คอลัมน์ C18-AR Cosmosil 5  $\mu\text{m}$ , A<sup>o</sup> ขนาด 4.6 x 150 มม. ของบริษัท Water
- กล้องจุลทรรศน์ชนิดสองตา (Binocular compound microscope) รุ่น Olympus ของบริษัท รุ่น BH-2 ของบริษัท Olympus, japan
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วควบคุมอุณหภูมิ (High speed refrigerated centrifuge) รุ่น Avanti J-301 ของบริษัท Beckman Coulter, USA
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิแบบตั้งโต๊ะ (Superspeed table-top centrifuge) รุ่น KUBOTA 3700 ของ บริษัท Kubota Corporation, Japan
- เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Rotary vaccum evaporator) รุ่น N-N ของบริษัท Eyela, Japan
- เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Centrifuge evaporator) รุ่น R-300 ของบริษัท BUCHI, Switzerland
- เครื่องทำให้แห้งด้วยระบบสุญญากาศ (Freeze dry F0-1) ของบริษัท Tokyo Rikakikai, Co, LTD. Japan
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys ของบริษัท Thermo Spectronic, USA
- เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (Nano drop) รุ่น nanodrop 2000 ของบริษัท thermo scientific

- ตู้ความดันไอน้ำเชื้อแบบอัตโนมัติ (Autoclave) รุ่น SS-35 และรุ่น ES-315 ของบริษัท Tomy Seiko, Ltd., Japan, รุ่น MLS 3020 ของบริษัท Sany Co., Ltd., Japan และรุ่น HV-25 ของบริษัท Hirayama, Co., Ltd., Japan
- เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated incubator shaker) รุ่น Innova™ 4300 ของบริษัท New Brunswick Scientific, USA
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น M-LAB ของบริษัท เมโทรโลยี เทคโนโลยี เทคนิคคอล
- อ่างอัลตราโซนิก หรือ เครื่องดูดสูญญากาศ รุ่น Bandelin Sonorex PK 100 ของบริษัท Bandelin electronic, เยอรมนี
- ตู้บเพาะเชื้อ (Incubator) รุ่น memmert BE 600 ของบริษัท Jepsen & Jessen
- เครื่องชั่งหยاب รุ่น PG 2002-S ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland
- เครื่องชั่งละเอียด รุ่น AG 285 ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland
- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow cabinet) รุ่น 25 Manometer ของบริษัท Dwyer Instrument, USA
- ตู้ดูดควัน (Air flow Hood) ของบริษัท Flexlab
- เครื่องผสมสาร (Vortex mixer2) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries Inc., USA
- ไมโครปิเปต (Micropipette) รุ่น P10, P20, P100, P1000 และ P5000 ของบริษัท Gilson, France

### 3.1.2. เคมีภัณฑ์

- สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.
- สารสกัดจากข้าวมอลต์ (Malt extract) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.
- ทริปโตเนน (Tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.
- แบคโตเปปโตเนน (Bactopeptone) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.
- กลูโคส (Glucose) ของบริษัท E.Merck, Dramstadt, Germany
- น้ำมันสังเคราะห์ (Synthetic crude-oil) ของบริษัท Japan Petroleum Institute, Japan

- ทริสมาเบส (Trisma base; Tris [hydroxymethyl] aminomethane)(C<sub>4</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>3</sub>) ของบริษัท Sigma, U.S.A.
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) Merck ของบริษัท E. Merk, Dreamstadt Germany
- กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (HCl) Merck ของบริษัท E. Merk, Dreamstadt Germany
- โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS; sodium dodecyl sulfate) ของบริษัท E. Merk, Dreamstadt Germany
- โพแทสเซียมอะซิเตท (CH<sub>3</sub>COOK) ของบริษัท E. Merk, Dreamstadt Germany
- คลอโรฟอร์ม (Chloroform) ของบริษัท BHD-Prolabo, England
- ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (isoamylalcohol; 3-Methylbutanal of molecular biology) ของบริษัท ajaxfinechem, Australia
- ไอโซโพรพานอล (Isopropanol) ของบริษัท E. Merk, Dreamstadt Germany
- เอทานอล (Ethanol) ของบริษัท E. Merk, Dreamstadt, Germany
- เอทานอลบริสุทธิ์ (Absoluteethanol) ของบริษัท E. Merk, Dreamstadt Germany
- พีดีบี (PDB, Potato dextrose broth) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.
- โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ของบริษัท E. Merk, Dreamstadt Germany
- คอร์นมีล (Corn Meal) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.
- โซเดียมไนเตรท (NaNO<sub>3</sub>) ของบริษัท E. Merk, Dreamstadt Germany
- โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) ของบริษัท E. Merk, DreamstadtGermany
- แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O) ของบริษัท E. Merk, DreamstadtGermany
- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัทบริษัท Promega, U.S.A.
- ชูโครส บริษัทวังนายคอนสตรัคชั่นจำกัดประเทศไทย
- น้ำมันปาล์ม บริษัทมรกตอินดัสตรีส์ จำกัด ประเทศไทย
- น้ำมันถั่วเหลือง บริษัทมรกตอินดัสตรีส์ จำกัด ประเทศไทย
- น้ำมันงา บริษัท ลำสูง จำกัด ประเทศไทย
- น้ำคาโนล่า (conola) Singapore บริษัท ไช่ผิง เอ็ดดิ้ง โปรดักส์ ลิมิเต็ด จำกัด

- น้ำมันมะกอก (olive oil) Naturel บริษัท ลำสูง จำกัด ประเทศไทย
- น้ำดอกทานตะวัน (Sunflower) บริษัท ธนากรผลิตภัณฑ์ น้ำมันพืช จำกัด
- น้ำมันข้าวโพด (corn oil) บริษัท ลำสูง จำกัด ประเทศไทย
- น้ำมันปาล์ม (Palm oil) ของบริษัท มรกต อินดัสตริ่งส์ จำกัด (มหาชน)
- น้ำมันถั่วเหลือง (Soybean) ของบริษัท น้ำมันพืชไทย จำกัด (มหาชน)
- Mineral oil ของบริษัท E. Merk, Dreamstadt Germany
- น้ำมันรำข้าว (Rice bran oil) ของบริษัท กลีสูรีรี่ จำกัด
- Heedecane ของบริษัท ACROS organics, Belgium
- Dodecane ของบริษัท ACROS organics, Belgium
- Toluene ของบริษัท ACROS organics, Belgium
- กลีเซอรอล (glycerol) ของบริษัท E. Merk, DreamstadtGermany
- แอมโมเนียมไนเตรด ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) ของบริษัท E. Merk, DreamstadtGermany
- แอมโมเนียมซัลเฟต ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) ของบริษัท E. Merk, Dreamstadt Germany
- แอมโมเนียมคลอไรด์ ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) ของบริษัท E. Merk, Dreamstadt Germany
- เฮกเซน (Hexane,  $\text{C}_6\text{H}_{14}$ ) ของบริษัท Macron, U.S.A.
- กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (Concentration HCl) ของบริษัท E. Merk, DreamstadtGermany
- เอทิลอะซิเตต ( $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ ) Macron Fine Chemicals ของบริษัท Avantor Performance Materials สหรัฐอเมริกา - แอลฟา-แนฟทอล (naphtol) ของบริษัท Fluka, Switzerland
- อะซิโตรไนไตรล์ (Acetonitrile) HPLC grade ของบริษัท E. Merk, DreamstadtGermany
- น้ำ HPLC grade ของบริษัท E. Merk Dramstadt, Germany
- กรดไตรฟลูออโรอะซิติก (Trifluoroacetic acid) HPLC grade ของบริษัท E. Merk, Dreamstadt, Germany

- กระดาษกรองขนาด 47 มม. 0.45 ไมครอน (Cellulose acetate membrane) ของบริษัท Whatman, USA
- ไอโอดีนชนิดเกล็ด ของบริษัท Univar, U.S.A.
- แผ่นโครมาโตกราฟีทินเลเยอร์ (Analytical Thin-layer Chromatography) Sillica gel 60 ขนาด 20x20 ซม. หนา 0.2 มิลลิเมตร ของบริษัท E. Merk, DreamstadtGermany
- แผ่นโครมาโตกราฟีทินเลเยอร์ (Preparative Thin-layer Chromatography) Sillica gel 60 ขนาด 20x20 ซม. หนา 2 มิลลิเมตร ของบริษัท E. Merk, DreamstadtGermany

### 3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.2.1 คัดเลือกยีสต์และรากล้ายยีสต์ที่แยกได้จากบริเวณชายฝั่งเกาะสีชังที่มี

##### ความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ

3.2.1.1 การคัดเลือกยีสต์และรากล้ายยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบนอาหารแข็ง

นำยีสต์และรากล้ายยีสต์ที่แยกจากบริเวณชายฝั่งของเกาะสีชัง อำเภอสัตหีบราช จังหวัดชลบุรีที่เคยมีรายงานการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำนวน 16 สายพันธุ์ (Thaniyavarn และคณะ, 2013) มาทดสอบความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยขีดเชื้ออายุ 24 ชั่วโมง บนอาหารแข็ง Yeast Malt Extract agar (YM agar) ที่ปกคลุมด้วยน้ำดิบ 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส คัดเลือกยีสต์และรากล้ายยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยสังเกตการสร้างบริเวณวงใสรอบโคโลนีบนอาหารแข็งทุกๆ 1, 3, 5 และ 7 วัน ตามวิธีการของ Morikawa และคณะ (1993)

3.2.1.2 การคัดเลือกยีสต์และรากล้ายยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพระดับขวดเขย่า

นำเชื้อยีสต์และรากล้ายยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบนอาหารแข็ง มาทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด โดยการนำยีสต์และรากล้ายยีสต์แต่ละสายพันธุ์มาเลี้ยงในอาหารเหลว YM บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราเร็วเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อใช้สำหรับเตรียมหัวเชื้อและถ่ายหัวเชื้อ 10 % ปริมาตรต่อปริมาตร ลงในอาหารเหลวกำหนดสูตรโดย

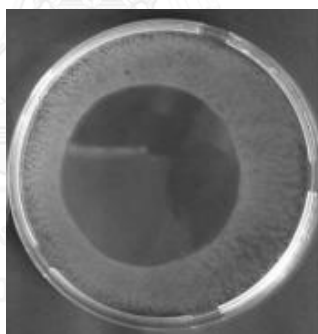
ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (ธันสลา เชียงอุทัย, 2549) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราเร็วเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 7 วัน

### 3.2.1.3 การติดตามประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

นำน้ำเลี้ยงเชื้อมาปั่นแยกเซลล์ออกโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที และควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 20 นาที จากนั้นนำส่วนใสมาวัดประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ

#### 3.2.1.3.1 การวัดค่าการกระจายน้ำมัน (Oil displacement activity)

ดำเนินการตามวิธีของ Morikawa และคณะ (2000) ตวงน้ำกลั่นปริมาตร 40 มิลลิลิตรลงในจานแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 150 มิลลิเมตรที่มีกระดาษกราฟรองอยู่เพื่อใช้สำหรับเป็นมาตรวัด หยดน้ำมันดิบ (crude oil) ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ลงผิวหน้าของน้ำจะเกิดเป็นแผ่นฟิล์มบางๆปกคลุมทั่วผิวน้ำ จากนั้นหยดตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงบนแผ่นฟิล์มของน้ำมันดิบ สังเกตบริเวณใสของการกระจายน้ำมัน และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสและคำนวณหาพื้นที่ของการกระจายน้ำมัน



**รูปที่ 14** การวัดค่าการกระจายน้ำมัน พื้นที่บริเวณใสของการกระจายน้ำมัน =  $\pi r^2$   
เมื่อ r คือรัศมีมีความกว้างของพื้นที่บริเวณใส มีหน่วยเป็นตารางเซนติเมตร (cm<sup>2</sup>)

โดยกำหนดให้ 1 ตารางเซนติเมตรของการกระจายน้ำมันมีค่าเท่ากับ 1 หน่วย

#### 3.2.1.3.2 การวัดค่าแรงตึงผิว (Surface tension activity)

นำตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อมาวัดค่าแรงตึงผิวตามวิธี Du Nuoy Ring โดยใช้เครื่องวัดค่าแรงตึงผิว (Ring tensiometer K6, Kruss Germany) ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส และคำนวณเปอร์เซ็นต์ผลต่างแรงตึงผิวตามสูตรดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ผลต่างแรงตึงผิว} = \frac{\text{ค่าแรงตึงผิวเริ่มต้น} - \text{ค่าแรงตึงผิวที่วัดได้}}{\text{ค่าแรงตึงผิวเริ่มต้น}} \times 100$$

### 3.1.3.3.3 การวัดการเจริญของเชื้อโดยหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (Dry cell weight)

แยกเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที และควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 20 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 รอบ จากนั้นนำเซลล์ไปอบที่อุณหภูมิ  $65 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงหรือจนกว่าจะแห้ง และชั่งน้ำหนักเซลล์แห้งด้วยเครื่องชั่งละเอียด

## 3.2 การจัดทำแนกยีสต์

### 3.2.2.1 จัดทำแนกยีสต์โดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล ด้วยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS

#### 3.2.2.1.1 สกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอจากจุลินทรีย์ตามวิธีการของ Jindamorakot (2006) เตรียมเซลล์แขวนลอย โดยชุดเซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง YM อายุไม่เกิน 48 ชั่วโมง ใส่ในไลซิสบัฟเฟอร์ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 15 นาที เติมนโปแทสเซียมอะซิเตต ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และแช่ในตู้แช่แข็ง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และดูดส่วนใสด้านบนมาสกัดโดยเติมคลอโรฟอร์ม: ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) ปริมาตรเท่าตัวของส่วนใส 2 รอบ จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยไอโซโพรพานอล และล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 และ 90 % ตามลำดับ และละลายในน้ำ nano pure เก็บรักษาไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ  $-20$  องศาเซลเซียส การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอโดยนำตัวอย่างสารละลายดีเอ็นเอส่งไปวิเคราะห์ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี

#### 3.2.2.1.2 จัดทำแนกจุลินทรีย์โดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล

จัดทำแนกโดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล โดยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26s rDNA เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีสต์สปีชีส์ที่มีความใกล้เคียงกันมากที่สุดในฐานข้อมูลและใช้โปรแกรม BLASTn (Altschul และคณะ, 1997)

สำหรับสปีชีส์ที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน หรือสปีชีส์ใหม่ จัดทำแนกโดยอาศัยหลักเกณฑ์ตาม Kurtzman และคณะ, 2011 นำมาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS (internal transcribed spacers) เพื่อจัดทำแนกยีสต์ตามอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล

การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีสต์ โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณโดเมน D1/D2 และบริเวณ ITS โดยการใช้โปรแกรม ClustalXver 1.8 (Larkin และคณะ, 2007) เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับสปีชีส์ที่มีความใกล้เคียงกัน และสร้างแผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) โดยใช้วิธีการ Neighbor-Joining (Saitou และ Nei, 1987) และประเมินความน่าเชื่อถือด้วยการวิเคราะห์ค่า bootstrap (Felsenstein, 1985)

### 3.2.2.1.3 การจัดจำแนกยีสต์สปีชีส์ใหม่ด้วยอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิมและอนุกรมวิธานเคมี

วิธีการจัดจำแนกประเภทของยีสต์ที่ใช้เป็นมาตรฐาน ทำตามวิธีการ Kurtzman และคณะ ในหนังสือ The Yeast, A Taxonomic Study ฉบับพิมพ์ครั้งที่ 5 (2011) โดยนำยีสต์มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง YM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำยีสต์มาทดสอบลักษณะต่างๆดังนี้

#### ศึกษาลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยา

##### 1. ศึกษาการเจริญของยีสต์ในอาหารเหลว

เลี้ยงยีสต์ในอาหารเหลว YM บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน สังเกตลักษณะการเจริญในอาหารเหลว และศึกษารูปร่าง ขนาด ลักษณะการแตกหน่อ และการจัดเรียงตัวของเซลล์ยีสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

##### 2. ศึกษาการเจริญของยีสต์ในอาหารแข็ง

เลี้ยงยีสต์ในอาหารแข็ง YM บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน จากนั้นตรวจสอบลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้นโดยสังเกตจากผิวหน้าของโคโลนี การนูนของโคโลนี และขอบโคโลนี

##### 3. การสร้างแอสโคสปอร์

เลี้ยงยีสต์บนอาหารแข็ง YM agar, Acetate agar (fowell), Malt extract agar, Potato dextrose agar (PDA) และ Acetate agar บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ตรวจสอบการสร้างแอสโคสปอร์ รูปร่าง พื้นผิวและจำนวนของแอสโคสปอร์ ทุกๆ 7 วัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

##### 4. การสร้างเส้นใยแท้และเส้นใยเทียม

ศึกษาการสร้างเส้นใยแท้และเส้นใยเทียมด้วยวิธีเทคนิค Dalmau plate ในอาหารแข็ง YM agar, PDA และ Bacto corn meal agar (CMA) โดยเทอาหารเลี้ยงเชื้อลงบน



แผ่นสไลด์ที่อยู่ในงานเพาะเลี้ยงเชื้อ จากนั้นขีดเชื้อเป็นเส้นตรงและใช้กระจกปิดสไลด์ปลอดเชื้อปิดทับ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3-7 วัน สังเกตจากสร้างเส้นใยแท้และเส้นใยเทียมจากกระจกปิดสไลด์และแผ่นสไลด์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ศึกษาลักษณะทางด้านสรีรวิทยาและชีวเคมี

ศึกษาลักษณะทางด้านสรีรวิทยาและชีวเคมี และการทดสอบลักษณะอื่นๆ ของสายพันธุ์ยีสต์ ได้แก่ การใช้สารประกอบคาร์บอน การใช้สารประกอบไนโตรเจน การหมักคาร์โบไฮเดรต เป็นต้น

### 3.2.3 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยยีสต์ในระดับขวดเย่า

3.2.3.1 ศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.2.3.1.1 ชนิดของแหล่งคาร์บอนและปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่คัดเลือกในอาหารเหลวกำหนดสูตร Manitchotpisit และคณะ (2011) และแปรผันแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส ซูโครส กลีเซอรอล น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันปาล์ม โดยใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของแหล่งคาร์บอน เท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ (มวลต่อปริมาตร) และเพาะเลี้ยงยีสต์ตามวิธีการในข้อที่ 3.2.1.2 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน ติดตามการเจริญของยีสต์จากน้ำหนักเซลล์แห้งและค่าพีเอช และนำตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อมาทดสอบหาค่าการกระจายน้ำมันและค่าแรงตึงผิว จากนั้นใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน เท่ากับ 2.5, 5, 7.5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเปรียบเทียบหาปริมาณความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.2.3.1.2 ศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนและอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนเหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลวกำหนดสูตร Manitchotpisit และคณะ (2011) และแปรผันแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ เปปโตน สารสกัดจากมอลต์ แอมโมเนียมไนเตรท ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) แอมโมเนียมซัลเฟต ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) แอมโมเนียมคลอไรด์ ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) และโซเดียมไนเตรท ( $\text{NaNO}_3$ ) โดยใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของไนโตรเจน เท่ากับ 0.06 เปอร์เซ็นต์ (มวลต่อปริมาตร) เพาะเลี้ยงยีสต์ตามวิธีการในข้อที่ 3.2.1.2 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน

ติดตามการเจริญของยีสต์จากน้ำหมักเซลล์แห้งและค่าพีเอช และนำตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อมาทดสอบหาค่าการกระจายน้ำมันและค่าแรงตึงผิว จากนั้นใช้แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ศึกษาหาอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสม (C:N) โดยแปรผันอัตราส่วนดังนี้ C:N 100, 200, 300 และ 400 เพื่อเปรียบเทียบหาอัตราส่วนของคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.2.3.1.3 ศึกษาค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมและแปรผันค่าพีเอชในอาหารเริ่มต้น เท่ากับ 3.5, 4.5, 5.5, 6.5 และ 7.5 เพาะเลี้ยงยีสต์ตามวิธีการในข้อที่ 3.2.1.2 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน ติดตามการเจริญของยีสต์จากน้ำหมักเซลล์แห้งและค่าพีเอช และนำตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อมาทดสอบหาค่าการกระจายน้ำมันและค่าแรงตึงผิว เพื่อหาค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.2.3.1.4 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและค่าพีเอชที่เหมาะสม แปรผันอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง เท่ากับ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงยีสต์ตามวิธีการในข้อที่ 3.2.1.2 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน ติดตามการเจริญของยีสต์จากน้ำหมักเซลล์แห้งและค่าพีเอช และนำตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อมาทดสอบหาค่าการกระจายน้ำมันและค่าแรงตึงผิว เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

### 3.2.4 การผลิตและการสกัดแยกสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตได้ให้บริสุทธิ์บางส่วน

เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อปรับปรุงสูตรที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 7 วัน นำน้ำเลี้ยงเชื้อมาปั่นแยกเซลล์ออก จากนั้นสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเอทิลอะซิเตทในอัตราส่วน 1:1 จำนวน 3 ครั้ง นำส่วนบนของสารละลายมาระเหยเอทิลอะซิเตทออกด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสูญญากาศ (Evaporator) จากนั้นทำการระเหยแห้งอีกครั้งด้วยเครื่อง Centrifuge evaporator และหาน้ำหนักของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยวัดค่าการกระจายน้ำมันและค่าแรงตึงผิว

### 3.2.5 การติดตามการเจริญ ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อปรับปรุงสูตร และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที โดยเก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 1, 3, 5 และ 7 ติดตามการเจริญของยีสต์ ทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อปั่นแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ แยกส่วนเซลล์ไปหาน้ำหนักแห้งเพื่อติดตามการเจริญของเซลล์ และนำส่วนน้ำใสมาทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยวัดค่าการกระจายน้ำมัน ค่าแรงตึงผิว และติดตามสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ โดยการสกัดสารและคำนวณหาน้ำหนักของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

### 3.2.6 ศึกษาลักษณะสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

#### 3.2.6.1 การหาค่าความเข้มข้นวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ (Critical micelle concentration)

เป็นการหาค่าความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่น้อยที่สุดที่ทำให้สารลดแรงตึงผิวเกิดการรวมตัวเป็นไมเซลล์ โดยนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ มาเจือจางให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.01-10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยสารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ พีเอช 8 จากนั้นวัดค่าแรงตึงผิวและเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตึงผิวและค่า  $\log$  ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เพื่อคำนวณหาจุดวิกฤตในการเกิดไมเซลล์

#### 3.2.6.2 วัดค่า Hydrophilic-Lipophilic Balance (HLB) เบื้องต้น (Kim และคณะ, 2002)

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้มาละลายในน้ำ ให้มีค่าความเข้มข้นเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และปรับค่าพีเอชเท่ากับ 5.5 และ 7 ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex mixer) เป็นระยะเวลา 2 นาที สังเกตลักษณะการละลายของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในน้ำที่เกิดขึ้น และเปรียบเทียบค่า HLB จากตารางที่ 8

**ตารางที่ 8** เปรียบเทียบลักษณะการละลายของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในน้ำที่เกิดขึ้นและค่า HLB ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ลักษณะการละลายของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในน้ำ	ค่า HLB
ไม่ละลาย	1-4
ละลายได้น้อย	3-6
กระจายตัวได้เล็กน้อยสีขาวขุ่น ไม่เสถียร	6-8
กระจายตัวสีขาวขุ่น เสถียร	8-10
กระจายตัวได้ดี สารละลายโปร่งแสง	10-13
กระจายตัวได้ดี สารละลายโปร่งใส	13

การหาค่า HLB ตามวิธีของ Chun และคณะ, 1960 หาค่าได้จากการวัด interfacial tension โดยเจือจางสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ด้วยทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ให้มีความเข้มข้น เท่ากับ 10 เท่าของค่า CMC เทสารโทลูอิน (Toluene) ให้อยู่ชั้นบนของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากนั้นวัดค่า interfacial tension ระหว่างของเหลวทั้ง 2 ชนิด คำนวณหาค่า HLB และเปรียบเทียบการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไปประยุกต์ใช้ดังตารางที่ 9

คำนวณหาค่า HLB ตามสูตร ดังนี้

$$HLB = -(a-45.7)/2.36$$

$a$  คือค่า interfacial tension ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสารโทลูอิน

ตารางที่ 9 ช่วงของ HLB และการนำไปประยุกต์ใช้ (Tadros, 2009)

ช่วงของ HLB	การนำไปประยุกต์
3-6	อิมัลซิไฟเออร์ชนิดน้ำมันในน้ำ (Oil-in-water emulsifier)
7-9	สารทำให้เปียก (Wetting agent)
8-18	อิมัลซิไฟเออร์ชนิดน้ำในน้ำมัน (Water-in-oil emulsifier)
13-15	สารทำความสะอาด (Detergent)
15-18	สารละลาย (Solubilizer)

### 3.2.6.3 การวัดค่าดัชนีการก่ออิมัลชัน (Emulsion Index)

การวัดค่าดัชนีการก่ออิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวภาพร่วมกับน้ำมันพืชชนิดต่างๆ และน้ำมันดีเซล เช่น น้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันงา น้ำมันคาโนลา น้ำมันมะกอก น้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันข้าวโพด น้ำมันรำข้าว น้ำมันมิเนอร์อล (Mineral oil) เฮกซะดีเคน (Hexadecane) และเดเคน (Decane) นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาเจือจางในทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร ผสมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและน้ำมัน ในอัตราส่วน 1:1 โดยเครื่องผสมสาร (vortex) ความเร็วสูงสุด เป็นระยะเวลา 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นวัดความสูงของอิมัลชันที่เกิดขึ้นหลังจากบ่ม 24 ชั่วโมงและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ค่าดัชนีการก่ออิมัลชันและวัดค่าความเสถียรในการก่ออิมัลชันจากสูตรดังนี้

$$\text{การวัดค่าดัชนีการก่ออิมัลชัน (E}_{24}\text{)} = \frac{\text{ความสูงของชั้นอิมัลชัน}}{\text{ความสูงของสารละลายทั้งหมด}} \times 100$$

### 3.2.6.4 การศึกษาความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Stability of biosurfactant)

การศึกษาความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในภาวะต่างๆ นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาเจือจางด้วยทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทดสอบความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อความเข้มข้นเกลือเท่ากับ 1-12 เปอร์เซ็นต์ (มวลต่อปริมาตร) ค่าพีเอช 2-12 และอุณหภูมิ 4, 30, 60 และ 100 องศาเซลเซียส และนอกจากนี้ยังทดสอบความเสถียรภายใต้สภาวะฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปาสคาล เป็นระยะเวลา 15 นาที บ่มในภาชนะดังกล่าว และวัดค่าแรงตึงผิว เพื่อเปรียบเทียบความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

### 3.2.7 เตรียมสารลดแรงดึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนและวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ

3.2.7.1 เตรียมสารลดแรงดึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography)

การเตรียมสารลดแรงดึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยใช้เฟสคงที่เป็นแผ่นซิลิกาเจล 60 ขนาด 20x20 เซนติเมตร หนา 0.2 มิลลิเมตร และเฟสเคลื่อนที่ คือ สารละลายคลอโรฟอร์มเมทานอล และน้ำ ในอัตราส่วน 65:25:4 นำสารลดแรงดึงผิวชีวภาพมาเจือจางให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยเมทานอล จากนั้นจุดบนแผ่นซิลิกาเจลปริมาตร 140 ไมโครลิตร และนำไปใส่ในภาชนะปิดที่บรรจุด้วยเฟสเคลื่อนที่ ที่วิ่งไปประมาณ 1-2 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งสารละลายเคลื่อนที่จนเกือบสุดปลายแผ่นซิลิกาเจล (solvent front) จากนั้นนำแผ่นซิลิกาเจลมาระเหยจนแห้ง และนำไปอบด้วยไอระเหยของไอโอดีนที่อุณหภูมิในภาชนะที่มีฝาปิดสนิท ประมาณ 15-20 นาที ทำเครื่องหมายในตำแหน่งที่เห็นสารในแผ่นซิลิกาเจล และคำนวณหาค่าอัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (Retention factor, R<sub>f</sub>)

$$\text{อัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (R}_f\text{)} = \frac{\text{ระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่}}{\text{ระยะที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

3.2.7.2 เตรียมสารลดแรงดึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธี Preparative Thin Layer Chromatography

ในการเตรียมสารลดแรงดึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธี Preparative Thin Layer Chromatography ทำตามวิธีในข้อ 3.2.7.1 แต่เปลี่ยนเฟสคงที่เป็นแผ่นซิลิกาเจลที่มีความหนา 2 มิลลิเมตรและจุดบนแผ่นซิลิกาเจลปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร คำนวณหาค่าอัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (Retention factor, R<sub>f</sub>) จากนั้นจุดสารออกจากแผ่นซิลิกาเจล และสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท ในอัตราส่วน 1:1 จำนวน 3 ครั้ง ระเหยสารสกัดด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสูญญากาศ นำแต่ละลำดับส่วนที่สกัดได้จากแผ่นซิลิกาเจล มาทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพจากค่ากระจายน้ำมันและตรวจสอบคาร์โบไฮเดรตด้วยวิธีมอริส (molisch test)

### 3.2.7.3 การทดสอบคาร์โบไฮเดรตด้วยวิธีมอริส (Molisch test)

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแต่ละลำดับส่วนมาเจือจางด้วยน้ำ ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1-2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นหยดสารมอริส 2 หยดลงในตัวอย่าง ผสมให้เข้ากัน เอียงหลอดทดลอง และค่อยๆเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร สังเกตสีที่เกิดขึ้นในหลอดทดลอง โดยผลการทดสอบจะให้ผลบวก เมื่อสังเกตเห็นสีม่วงหรือสีน้ำตาลแดงเกิดขึ้นตรงกลางระหว่างชั้นของสารละลายและชั้นของกรด

### 3.2.7.4 การทำให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพบริสุทธิ์ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิ

ควิดโครโมโตกราฟี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจากข้อ 3.2.7.2 มาละลายในอะซิโตไนโตรล์ 100 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปวิเคราะห์และแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ C18 reversed phase เป็นเฟสคงที่ (stationary phase) และใช้สารชะหรือเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็นสารที่มีการปรับอัตราส่วนตามเวลาที่เปลี่ยนไป (gradient elution) ได้แก่ สารละลาย A (อะซิโตไนโตรล์ 10 % + กรดไตรฟลูออโรอะซิติก 0.1 %) และสารละลาย B (อะซิโตไนโตรล์ 100 % + กรดไตรฟลูออโรอะซิติก 0.1%) โดยกำจัดแก๊สออกจากสารละลายก่อนใช้งานทุกครั้งด้วยอ่างอัลตราโซนิก หรือ เครื่องดูดสูญญากาศ

โปรแกรมของลิเนียร์เกรเดียนท์เท่ากับ 0 ถึง 100 % ภายใน 30 นาที มีดังนี้

เวลา (นาที)	% ของสารละลาย A	% ของสารละลาย B
0	70	30
5	30	70
15	20	80
20	10	90
30	0	100

โดยมีอัตราเร็วของการชะสารละลาย เท่ากับ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดสารที่ออกมาจากคอลัมน์ด้วย UV Detector ที่ความยาวคลื่น เท่ากับ 210 นาโนเมตร

เก็บตัวอย่างจากพีคที่ปรากฏบนโครมาโตแกรมในแต่ละช่วงเวลา (Retention time) จากนั้นนำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสูญญากาศ (Centrifuge evaporator) และนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่แยกได้มาวิเคราะห์ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยเจือจองในสารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วัดค่าการกระจายน้ำมัน และคัดเลือกพีคที่ให้ค่าการกระจายน้ำมันสูงสุดไปทดสอบ เพื่อวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

### 3.2.7.5 วิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

วิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธี FI-MS ร่วมกับวิธี NMR ทำการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารด้วยเครื่องสเปกโตรมิเตอร์มวล (Mass Spectrometer) รุ่น LMS-T100GCV (JEOL) ทำให้เกิดไอออนในเซชันแบบ FD/FI (field desorption/ field ionization) วิเคราะห์อิเล็กตรอนไอออนไนเซชัน (electron ionization, EI) เพื่อศึกษาไอออนของบางโมเลกุลที่แตกหัก และวิเคราะห์องค์ประกอบของโครงสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเครื่อง NMR สเปกโตรมิเตอร์ รุ่น Bruker Avance spectrometer AMX 500 (Bruker): MMS-0025 2.5 mm ID (Shigemii) ที่มหาวิทยาลัยฮอกไกโด ประเทศญี่ปุ่น



## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 การคัดเลือกยีสต์และราคล้ายยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ บนอาหารแข็ง

นำยีสต์และราคล้ายยีสต์ที่คัดแยกได้จากบริเวณชายฝั่งเกาะสีชัง 16 สายพันธุ์ที่เคยมีรายงานการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ มาทดสอบความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบนอาหารแข็ง โดยขีดเชื้อยีสต์หรือราคล้ายยีสต์บนอาหารแข็ง YM ที่ปกคลุมด้วยน้ำดิบ 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สังเกตวงใสรอบๆ โคลินี่ที่เกิดขึ้น ทุกๆ 1, 3, 5 และ 7 วัน เพื่อคัดเลือกยีสต์และราคล้ายยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่า ยีสต์และราคล้ายยีสต์ที่นำมาทดสอบทั้งหมดมีความสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ โดยสังเกตเห็นวงใสรอบๆ โคลินี่ที่เกิดขึ้น เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน ดังตารางที่ 10 จึงนำเชื้อทั้งหมดมาทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระดับขวดเขย่าต่อไป

#### 4.2 การคัดเลือกยีสต์และราคล้ายยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ ระดับขวดเขย่า

นำยีสต์และราคล้ายยีสต์มาทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระดับขวดเขย่า โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อทั้งหมดในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (ธัญญา เชียงอุทัย, 2549) และติดตามประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวัดค่าการกระจายน้ำมัน และค่าแรงตึงผิวชีวภาพ จากการทดสอบพบว่า ราคล้ายยีสต์สายพันธุ์ *Aureobasidium pullulans* YTP6-14 มีประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระดับขวดเขย่ามากที่สุด โดยมีค่าการกระจายน้ำมันสูงสุดเท่ากับ  $5.10 \pm 0.63$  ตารางเซนติเมตร และสามารถลดค่าแรงตึงผิวในน้ำเลี้ยงเชื้อจาก 57.5 มิลลินิวตันต่อเมตร เหลือเท่ากับ  $38.4 \pm 0.40$  มิลลินิวตันต่อเมตร ซึ่งมีผลต่างแรงตึงผิวเท่ากับ 33.22 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 11 จึงคัดเลือกราคล้ายยีสต์สายพันธุ์ *A. pullulans* YTP6-14 ไปทำการทดลองเพื่อศึกษาหาลักษณะประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อไป

ตารางที่ 10 ยีสต์และราคล้ายยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพบนอาหาร  
แข็ง Ym agar ที่ปกคลุมด้วยน้ำมันดิบ

สายพันธุ์ยีสต์	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7
<i>Aureobasidium pullulans</i> YTP6-14	+	+++	+++	+++
<i>Candida</i> sp. YTW5-4	+	++	++	+++
<i>Candida glabrata</i> YTP6-5	+	++	+++	+++
<i>Rhodotorula mucilaginase</i> YTD8-10	+	++	+++	+++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> YTU9-24	+	+	++	++
<i>Wickernamomyces anomalus</i> YTD8-2	+++	+++	+++	+++
<i>Candida rugosa</i> OTP9-2	+	++	+++	+++
<i>Issatcheka terricola</i> YTP11-68	-	+	+	+
<i>Pichia kudruavarii</i> OTP12-2	++	++	++	++
<i>Wickernamomyces siamensis</i> SHN1	+	+	++	++
<i>Candida metasilosis</i> YTP11-8	+	+	+	+
<i>Myerozyma caribbica</i> LEN1	+	+	+	+
<i>Hanseniaspora opuntiae</i> YTU9-6	+	+	+	+
<i>Debaryomyces nepalensis</i> YTY7-1	+	+	+	+
<i>Candida tropicalis</i> TP1-1N5	-	-	+	+
<i>Rhodotorula azeoricum</i> TP1-2N10	+	++	+++	+++

หมายเหตุ: ความกว้างของวงใสของโคโลนี

2-4 มิลลิเมตร เครื่องหมาย +

5-10 มิลลิเมตร เครื่องหมาย ++

11-15 มิลลิเมตร เครื่องหมาย +++

**ตารางที่ 11** ยีสต์และราคล้ายยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพระดับขวด  
เขย่า

สายพันธุ์ยีสต์	ค่าการกระจาย น้ำมัน (ตารางเซนติเมตร)	ค่าแรงตึงผิว (มิลลินิวตันต่อ เมตร)	% ผลต่าง ค่าแรงตึงผิว
<i>Aureobasidium pullulans</i> YTP6-14	5.10±0.63	38.4±0.40	33.22
<i>Candida</i> sp. YTW5-4	0.13±0.03	46.7±0.20	18.73
<i>Candida glabrata</i> YTP6-5	0.07±0.00	48.5±0.30	15.61
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> YTD8-10	0.04±0.13	54.0±0.78	6.12
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> YTU9-27	0.05±0.00	55.3±0.29	3.87
<i>Wickramomyces anomalus</i> YTD8-2	0.56±0.07	42.3±0.49	23.48
<i>Candida rugosa</i> OTP9-2	0.19±0.01	48.6±0.55	14.75
<i>Issatchekia terricola</i> YTP11-68	0.14±0.01	50.3±0.53	12.51
<i>Pichia kudruavarii</i> OTP12-2	0.11±0.02	52.7±0.12	8.29
<i>Wickramomyces siamensis</i> SHN1	0.28±0.03	46.5±0.33	17.99
<i>Candida metasilosis</i> YTP11-8	0.07±0.03	53.3±0.55	6.39
<i>Myerozyma caribbica</i> LEN1	0.09±0.02	54.8±0.23	5.52
<i>Hanseniaspora opuntiae</i> YTU9-6	0.11±0.02	51.2±0.29	10.23
<i>Debaryomyces nepalensis</i> YTY7-1	0.32±0.06	54.6±0.36	5.04
<i>Candida tropicalis</i> TP1-1N5	0.05±0.02	52.3±0.43	9.13
<i>Rhodotorula azeoricum</i> TP1-2N10	0.87±0.07	44.2±0.12	21.19

### 4.3 การอธิบายสปีชีส์ใหม่ของยีสต์ *Candida sp. YTW5-4*

จากการศึกษาความหลากหลายของยีสต์และราคล้ายยีสต์ที่แยกได้จากบริเวณชายฝั่งของเกาะสีชัง สามารถแยกยีสต์ได้ทั้งหมด 246 ไอโซเลต จาก 41 ตัวอย่าง และนำ 50 ไอโซเลต มาพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธีอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล โดยศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA (Thaniyavarn และคณะ, 2013) โดยพบยีสต์สปีชีส์ที่ยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อนหรือยีสต์สปีชีส์ใหม่ 1 สายพันธุ์ ได้แก่ *Candida sp. YTW5-4* ซึ่งคัดแยกได้จากน้ำทะเลบริเวณหาดท่าวัง เกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี

สำหรับแอสโคไมซีตยีสต์สปีชีส์ที่ยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อนมาหรือยีสต์สปีชีส์ใหม่ ตามวิธีการของ Kurtzman และคณะ, 2011 รายงานว่า สปีชีส์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันมากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์หรือมีการแทนที่ด้วยนิวคลีโอไทด์ 6 นิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26s rDNA จัดเป็นสปีชีส์ใหม่หรือ สปีชีส์ที่ยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อน (Novel species) และสปีชีส์ที่มีการแทนที่ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ 0-3 นิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA จัดเป็นสปีชีส์ที่เคยมีรายงานแล้ว (described species) หรือเป็นสปีชีส์ที่มีความใกล้ชิดกันมาก (sister species) โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA กับสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกันจากฐานข้อมูล Genbank ในการระบุถึงสปีชีส์ใหม่หรือเป็นสปีชีส์ที่ยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อน (kurtzman และ Robnett, 1998) จะต้องศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม อนุกรมวิธานทางชีวเคมี และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของยีสต์

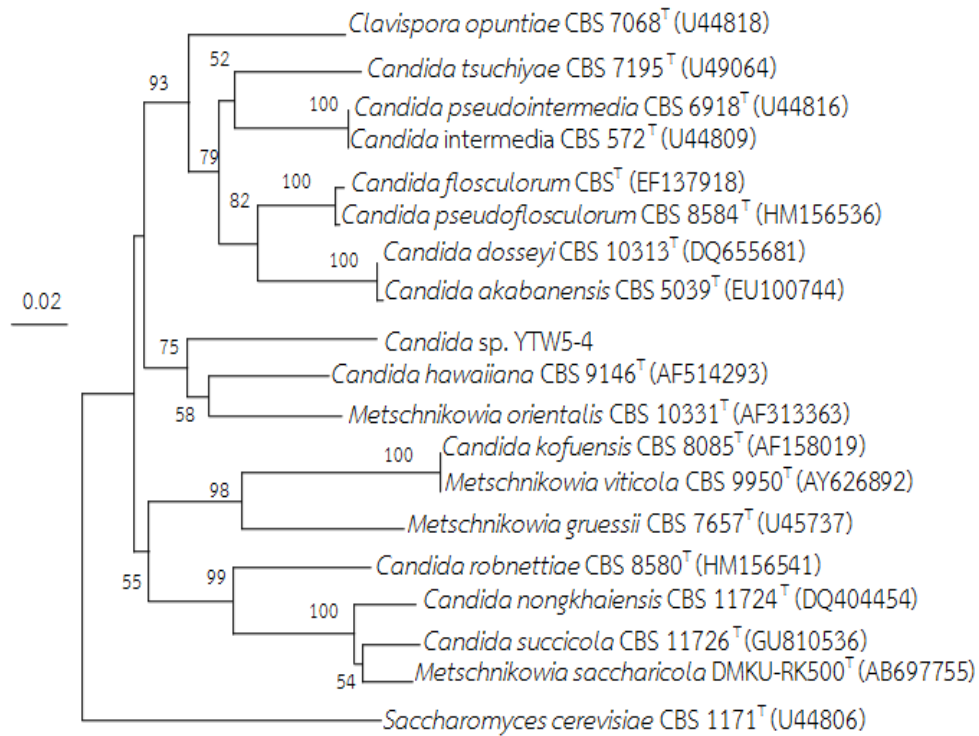
#### 4.3.1. อนุกรมวิธานระดับโมเลกุล

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ของ *Candida sp. YTW5-4* เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกันจากฐานข้อมูล Genbank พบว่า *Candida sp. YTW5-4* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 512 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกันมากที่สุด คือ *Candida hawaiiensis* CBS 9146<sup>T</sup> โดยพบว่ามี การแทนที่นิวคลีโอไทด์ เท่ากับ 10.7 เปอร์เซ็นต์ (57 ใน 533 นิวคลีโอไทด์) ดังตารางที่ 12 นอกจากนี้ยังทำการยืนยันโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS พบว่า *Candida sp. YTW5-4* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 359 นิวคลีโอไทด์ และมีความใกล้เคียงกับ *Candida hawaiiensis* CBS 9146<sup>T</sup> มากที่สุด สอดคล้องกับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณ D1/D2 โดยมีการแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณ ITS เท่ากับ 7.56 เปอร์เซ็นต์ (14 ใน 185) ดังตารางที่ 12 ซึ่งจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA และบริเวณ ITS พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ของการแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ จึงจำแนกให้ *Candida sp. YTW4-5* เป็นสปีชีส์ใหม่

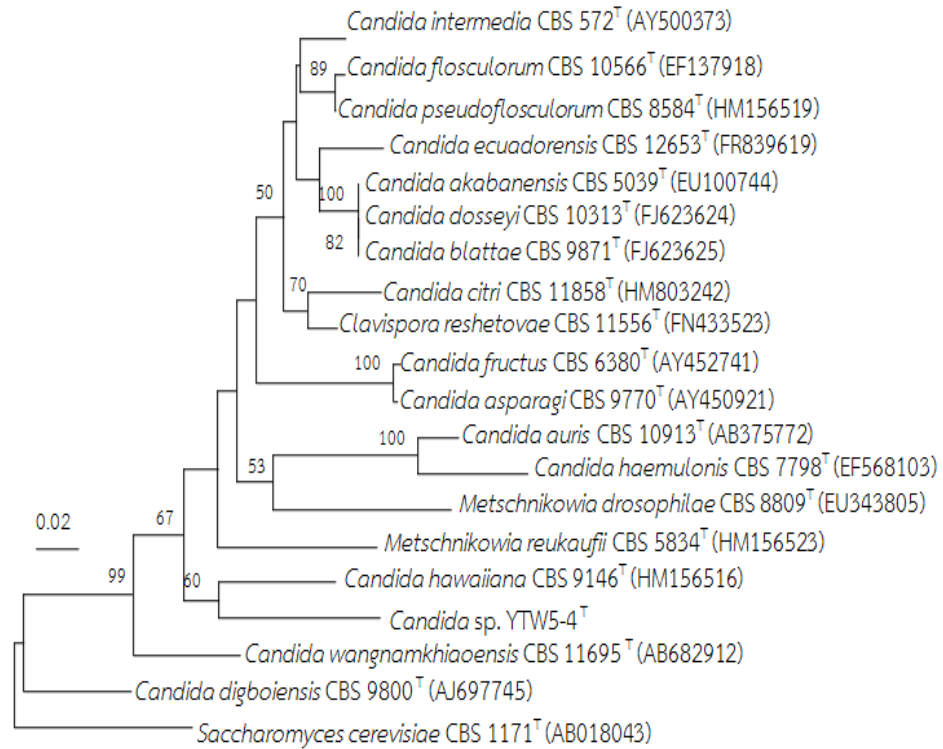
**ตารางที่ 12** แสดงผลลำดับนิวคลีโอไทด์ และการแทนที่นิวคลีโอไทด์ของสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกับ *Candida* sp. YTW5-4

Nucleotide	Accession No.	BLASTn results	Nucleotide identity in D1/D2		Nucleotide different in D1/D2 domain		
			total nucleotide	% identity	No. of gap	No. of nucleotide Substitutions	% nucleotide substitution
D1/D2	AF514293	<i>Candida hawaiiensis</i> CBS 9146 <sup>T</sup>	449/533	89.30	27	57	10.7
ITS	HM156516	<i>Candida hawaiiensis</i> CBS 9146 <sup>T</sup>	169/185	92.43	2	14	7.56

การศึกษาไฟโลจีนีระดับโมเลกุล (molecular phylogeny) เป็นการจัดกลุ่มของสิ่งมีชีวิตตามความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในดีเอ็นเอ สามารถแสดงถึงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้ชิดและมีความแตกต่างกันได้ การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยการสร้างแผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ของ *Candida* sp. YTW5-4 โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ LSU 26S rDNA และบริเวณ ITS กับสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกัน โดยใช้วิธีการ Neighbor-Joining (Saitou และ Nei, 1987) และประเมินความน่าเชื่อถือด้วยการวิเคราะห์ค่า bootstrap (Felsenstein, 1987) ผลจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU 26S rDNA พบว่า *Candida* sp. YTW5-4 สร้างคลัสเตอร์เดียวกันกับ *Candida hawaiiensis* CBS 9146<sup>T</sup> ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่มีความใกล้เคียงกันมากที่สุด ดังรูปที่ 15 สำหรับแผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ของ *Candida* sp. YTW5-4 บริเวณ ITS พบว่า *Candida* sp. YTW5-4 สร้างคลัสเตอร์เดียวกับ *Candida hawaiiensis* CBS 9146<sup>T</sup> เช่นเดียวกัน ดังรูปที่ 16 เมื่อเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA และบริเวณ ITS กับสปีชีส์ที่เคยมีรายงานแล้ว ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันว่า *Candida* sp. YTW5-4 เป็นสปีชีส์ใหม่ จึงนำศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิมอนุกรมทางชีวเคมีเพื่ออธิบายลักษณะต่างๆของสปีชีส์ใหม่ต่อไป



รูปที่ 15 แผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการของ *Candida sp.* YTW5-4 และสปีชีส์ที่มีความใกล้เคียงกัน โดยเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ LSU 26S rDNA สร้างโดยวิธี neighbor-joining method (Saitou และ Nei, 1997) และประเมินความน่าเชื่อถือโดยวิเคราะห์จากค่า bootstrap (Felsenstein, 1995)



**รูปที่ 16** แผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการของ *Candida* sp. YTW5-4 และสปีชีส์ที่มีความใกล้เคียงกัน โดยเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS สร้างโดยวิธี neighbor-joining method (Saitou และ Nei, 1997) และประเมินความน่าเชื่อถือโดยวิเคราะห์จากค่า bootstrap (Felsenstein, 1995)

#### 4.3.2 การจัดจำแนกยีสต์สปีชีส์ใหม่ด้วยอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิมและอนุกรมวิธานทางเคมี

การศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม อนุกรมวิธานทางชีวเคมี เพื่อจัดจำแนกยีสต์สปีชีส์ใหม่ ปัจจุบันทำตามวิธีมาตรฐานของ Kurtzman และคณะ ในหนังสือ *The Yeast, A Taxonomic Study* ฉบับพิมพ์ที่ 5 (2011) โดยการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ สรีรวิทยา และลักษณะทางชีวเคมี ดังต่อไปนี้

##### 4.3.2.1. ลักษณะอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิมของ *Candida* sp. YTW5-4

###### 4.3.2.1.1 สัณฐานวิทยาของยีสต์ในอาหารเหลว

ศึกษาการเจริญบนอาหารเหลว YM บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน พบว่า เซลล์จับกลุ่มตกตะกอนอยู่ด้านล่างหลอดทดลองมีลักษณะเป็นสีขาว เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า เซลล์รูปร่างกลมรีมีขนาด 2.5-4.16 X 2.5-5.83 ไมโครเมตร และมักจะอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือเป็นสายสั้นๆ ลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อแบบหลายทิศทาง (Multilateral budding)

###### 4.3.1.1.2 สัณฐานวิทยาของยีสต์ในอาหารแข็ง

ศึกษาการเจริญบนอาหารแข็ง YM บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน พบว่า ลักษณะของโคโลนีมีสีขาวครีม รูปร่างกลม ริมขอบโคโลนีหยักเล็กน้อย ผิวหน้าโคโลนีเรียบ มีความมันวาว (glossy) บริเวณตรงกลางหนูนกว่าบริเวณขอบขึ้นเล็กน้อย (convex) และมีสีที่ทึบกว่าบริเวณขอบ

###### 4.3.1.1.3 การสร้างแอสโคสปอร์ (ascospore)

ศึกษาการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ หรือการสร้างแอสโคสปอร์ โดยเลี้ยงยีสต์บนอาหารแข็ง YM agar, Acetate agar (fowell), Malt extract agar, Potato dextrose agar (PDA), Acetate agar บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ไม่มีการสร้างแอสโคสปอร์

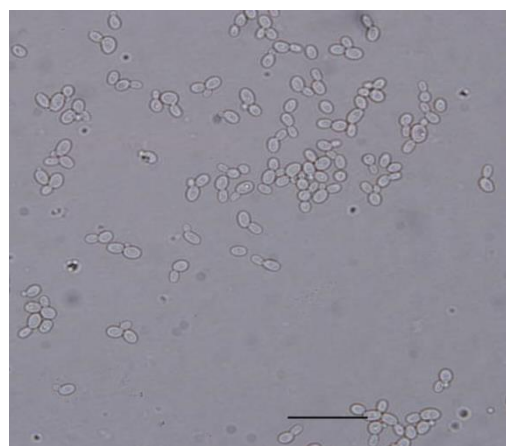
###### 4.3.1.1.3 การสร้างเส้นใยแท้และเส้นใยเทียม (true mycelium และ pseudomycelium)

ศึกษาสร้างเส้นใยแท้และเส้นใยเทียมของยีสต์ โดยเลี้ยงบนอาหาร YM agar, PDA, CMA ด้วยเทคนิคเลี้ยงเข็บบนสไลด์ (Dalmau plate technique) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3-7 วัน พบว่า ยีสต์ไม่มีการสร้างเส้นใยแท้และเส้นใยเทียม





(ก.)

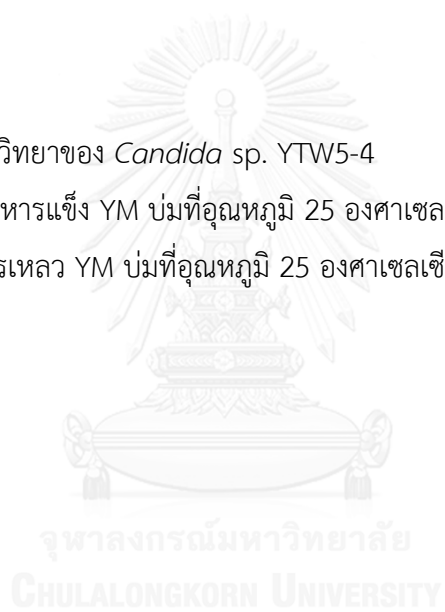


(ข.)

**รูปที่ 17** ลักษณะสัณฐานวิทยาของ *Candida* sp. YTW5-4

(ก.) โคลนีที่เกิดขึ้นบนอาหารแข็ง YM บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน

(ข.) เซลล์ที่เจริญในอาหารเหลว YM บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)



4.3.2.2. ลักษณะอนุกรมวิธานทางชีวเคมีของ *Candida* sp. YTW5-4ตารางที่ 13 การใช้สารประกอบคาร์บอนของยีสต์สายพันธุ์ *Candida* sp. YTW5-4

การใช้สารประกอบคาร์บอน	<i>Candida</i> sp. YTW5-4	<i>Candida hawaiiiana</i> CBS 9146 <sup>T</sup>
Glucose	+	+
Galactose	+	+
L-Sorbose	+	+
Sucrose	+	+
Maltose	+	+
Cellobiose	+	+
Trehalose	+	S/W
Lactose	-	-
Melibiose	-	-
Raffinose	-	-
Melizitose	+	+
Inulin	W	-
Soluble strach	W	-
D-Xylose	+	+
L-Arabinose	-	-
D-Arabinose	W	-/W
D-Ribose	S	-/W
L-Rhamnose	-	-
Ethanol	+	V
Glycerol	+	+/S
Erythritol	-	-
Ribitol	+	S/W
Galactitol	-	-

ตารางที่ 13 การใช้สารประกอบคาร์บอนของยีสต์สายพันธุ์ *Candida* sp. YTW5-4

การใช้สารประกอบคาร์บอน	<i>Candida</i> sp. YTW5-4	<i>Candida hawaiiiana</i> CBS 9146 <sup>T</sup>
D-Manitol	+	+
D-Glucitol	+	+
Methyl- $\alpha$ -D glucoside	-	-
Salicin	+	+
D-Glucono1,5-lactone	+	ND
2-Keto-D-gluconic acid	+	+
5-Keto-D-gluconic acid	W	ND
DL-Lactic acid	+	ND
Succinic acid	+	+
Citric acid	+	+/S
Inositol	-	ND
D-Glucuronic acid	-	ND
D-Galacturonic acid	-	ND
Xylitol	+	+
L-Arabinitol	-	ND
D-Gluconic acid	+	S/W
D-Glucosamine	+	S
N-Acetyl-D-glucosamine	+	+
Propane-1,2-diol	L	+
Bupane-2,3-diol	-	ND
Methanol	-	-
Hexadecane	-	S

ตารางที่ 14 การใช้สารประกอบไนโตรเจนของยีสต์สายพันธุ์ *Candida* sp. YTW 5-4

การใช้สารประกอบไนโตรเจน	<i>Candida</i> sp. YTW5-4	<i>Candida hawaiiiana</i> CBS 9146 <sup>T</sup>
Amonium sulfate	+	ND
Potassium nitrate	+	ND
Sodium nitrite	+	-
Ethylamine-HCl	+	+
Lysine-HCl	+	+
Cadaverine	+	+

ตารางที่ 15 การหมักคาร์โบไฮเดรตของยีสต์สายพันธุ์ *Candida* sp. YTW5-4

การหมักคาร์โบไฮเดรต	<i>Candida</i> sp. YTW5-4	<i>Candida hawaiiiana</i> CBS 9146 <sup>T</sup>
Glucose	+	+
Galactose	+	ND
Sucrose	-	ND
Maltose	-	ND
Raffinose	-	ND
Melibiose	-	ND
Melzitose	-	ND

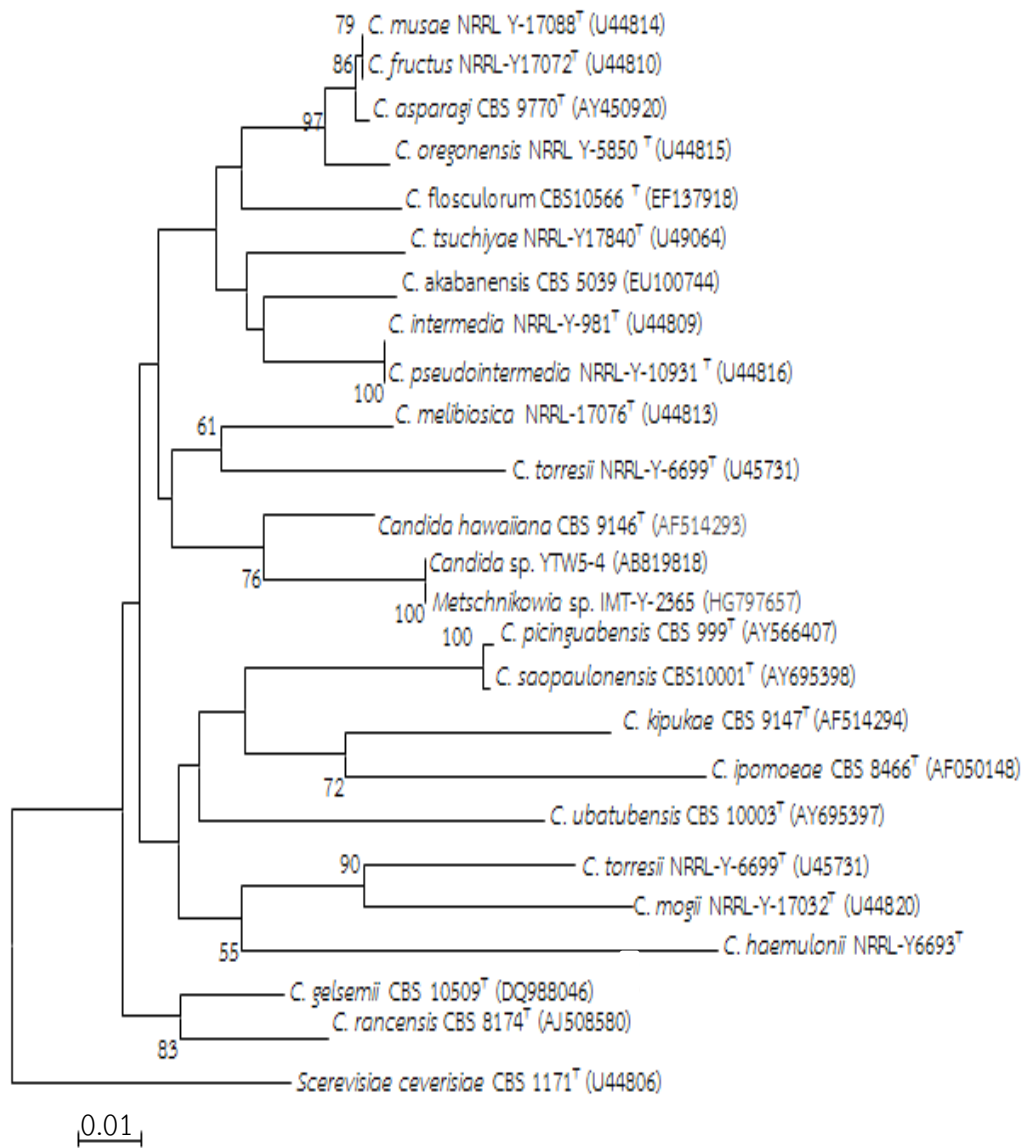
ตารางที่ 16 การทดสอบลักษณะอื่นๆของยีสต์สายพันธุ์ *Candida* sp. YTW5-4

การทดสอบลักษณะอื่นๆ	<i>Candida</i> sp.YTW5-4	<i>Candida awaiiana</i> CBS 9146 <sup>T</sup>
การสร้างเอนไซม์ยูเรียเอส	-	ND
การทำปฏิกิริยากับสปีโดอะโซเนียมบลูปี	-	-
การสร้างสารประกอบอะมัยลอยด์ภายนอกเซลล์	-	ND
การสร้างกรดจากการใช้กลูโคส	-	-
การย่อยเจลาติน	-	-
การเจริญในอาหารที่ปราศจากวิตามิน	+	-
การเจริญบนอาหารกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์	+	+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 60 เปอร์เซ็นต์	+	ND
การเจริญในไฮโคลเฮกซีไมด์ 0.01 เปอร์เซ็นต์	-	ND
การเจริญในไฮโคลเฮกซีไมด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์	-	-
การเจริญอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ + เกลือ 10 เปอร์เซ็นต์	+	ND
การเจริญอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ + เกลือ 15 เปอร์เซ็นต์	+	ND
การเจริญที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส	+	ND
การเจริญที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	+	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส	+	ND
การเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	-	-
การเจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	-	ND
การเจริญที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส	-	ND
สารประกอบยูบิควิโนน	Q9	ND

หมายเหตุ :	+	=	การเจริญเป็นบวก (positive)
	L	=	การเจริญเป็นบวกล่าช้า (delayed positive, latent)
	s	=	การเจริญเป็นบวกช้า (slow positive)
	w	=	การเจริญเป็นบวกอ่อน (weak positive)
	-	=	ไม่มีการเจริญ อ่านผลเป็นลบ
	V	=	การแปรผัน บางสายพันธุ์เป็นบวกและบางสายพันธุ์เป็นลบ
	ND	=	ไม่พบผลการทดลอง

จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และลักษณะทางชีวเคมี พบว่า *Candida* sp. YTW5-4 มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศแบบแตกหน่อแบบหลายทิศทาง ไม่มีการสร้างแอสโคสปอร์ ไม่สร้างเส้นใยแท้และเส้นใยเทียม ที่ผนังเซลล์ของยีสต์ไม่มีการทำปฏิกิริยากับสีไดอะโซเนียมบลูปี และไม่สร้างเอนไซม์ยูเรียเอส ซึ่งเป็นลักษณะของแอสโคมัยซิตัสยีสต์ และพบว่า *Candida* sp. YTW5-4 สามารถใช้โซเดียมไนไตรท์ในการเจริญได้ ในขณะที่ *Candida hawaiiensis* CBS 9146<sup>T</sup> ไม่สามารถใช้โซเดียมไนไตรท์ได้ และจากการทดสอบคุณลักษณะอื่นๆ พบว่า *Candida* sp. YTW5-4 สามารถเจริญในอาหารที่ปราศจากวิตามินได้ ในขณะที่ *Candida hawaiiensis* CBS 9146<sup>T</sup> ไม่สามารถเจริญได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *Candida* sp. YTW5-4 มีความแตกต่างกับ *Candida hawaiiensis* CBS 9146<sup>T</sup> ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกันมากที่สุด

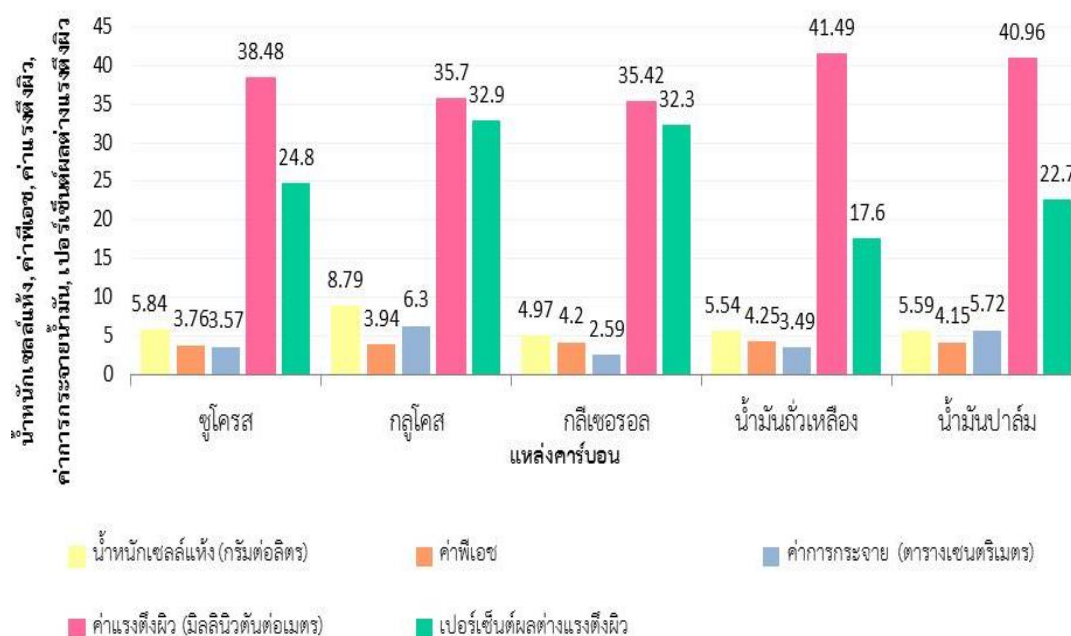
จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ *Candida* sp. YTW5-4 และลักษณะสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และลักษณะทางชีวเคมี สามารถจัดจำแนกยีสต์รหัส YTW5-4 เป็นสปีชีส์ใหม่ แต่ในระหว่างการเตรียมข้อมูลเพื่อจัดทำ manuscript เพื่อเสนอสปีชีส์ใหม่ พบว่า ยีสต์รหัส YTW5-4 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ ยีสต์รหัส IMT-Y-2365 100 เปอร์เซ็นต์และยังมีตำแหน่งเดียวกันบนแผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการอีกด้วย (รูปที่ 18) จึงสรุปว่ายีสต์รหัส YTW5-4 และยีสต์รหัส IMT-Y-2365 เป็นสปีชีส์เดียวกัน อย่างไรก็ตามทราบจาก Dr. Gouri Shankar Prasad นักวิจัยจากประเทศอินเดีย ซึ่งเป็นผู้ศึกษายีสต์รหัส IMT-Y-2365 ได้มีการจัดเตรียม manuscript เพื่ออธิบายยีสต์รหัส IMT-Y-2365 เป็นสปีชีส์ใหม่แล้ว จึงไม่ได้เสนอยีสต์รหัส YTW5-4 เป็นสปีชีส์ใหม่



**รูปที่ 18** แผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการของ *Candida* sp. YTW5-4, *Metschnikowia* sp. IMT-Y-2365 และสปีชีส์ที่มีความใกล้เคียงกัน โดยเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26s rDNA สร้างโดยวิธี neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1997) และประเมินความน่าเชื่อถือโดยวิเคราะห์จากค่า bootstrap (Felsenstein, 1995)

#### 4.4 ศึกษาองค์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยยีสต์ในระดับขวดเขย่า

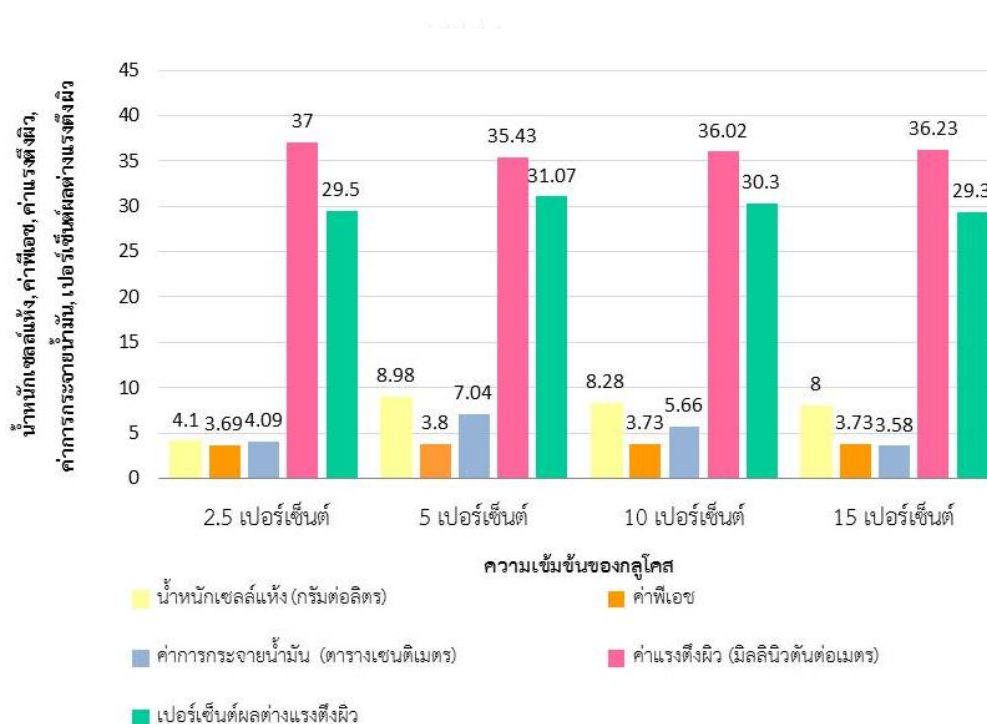
ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Aureobasidium pullulans* YTP6-14 โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อปรับปรุงสูตรของ Manitchotpsit และคณะ (2011) ที่มีการแปรผันแหล่งคาร์บอน ได้แก่ ซูโครส กลูโคส กลีเซอรอล น้ำมันปาล์ม และน้ำมันถั่วเหลือง ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่า กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ โดยเมื่อเลี้ยง *A. pullulans* YTP6-14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนจะมีการเจริญสูงสุด มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ  $8.79 \pm 0.07$  กรัมต่อลิตร และเมื่อพิจารณาประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากค่าผลต่างแรงตึงผิว และค่าการกระจายน้ำมัน พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนมีประสิทธิภาพดีที่สุดเช่นกัน โดยมีค่าผลต่างแรงตึงผิวสูงสุดเท่ากับ 32.9 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าการกระจายน้ำมันสูงสุด เท่ากับ  $6.30 \pm 0.31$  ตารางเซนติเมตร รูปที่ 19



รูปที่ 19 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยราค่ายีสต์สายพันธุ์ *A. pullulans* YTP6-14 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน

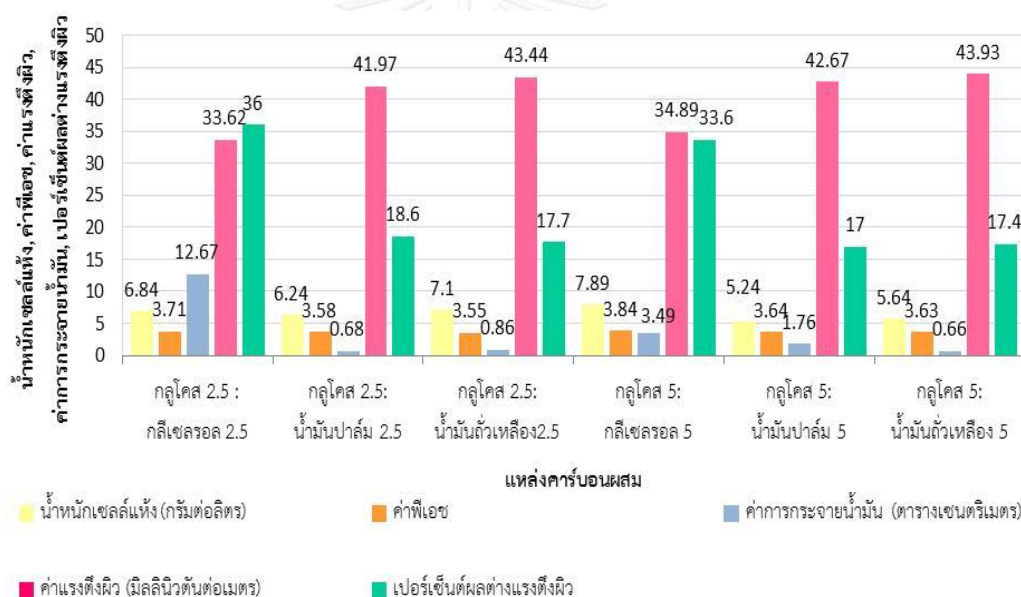


ศึกษาหาความเข้มข้นของกลูโคสที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *A. pullulans* YTP6-14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อปรับปรุงสูตรที่มีการแปรผันความเข้มข้นของกลูโคสเท่ากับ 2.5, 5, 7.5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (มวลต่อปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน จากการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ดังรูปที่ 20 โดย *A. pullulans* YTP6-14 มีการเจริญสูงสุด น้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ  $8.98 \pm 0.0$  กรัมต่อลิตร ส่วนประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่า ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์มีประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเช่นกัน โดยมีค่าผลต่างแรงตึงผิวสูงสุดเท่ากับ 31.07 เปอร์เซ็นต์ และค่าการกระจายน้ำมัน สูงสุด เท่ากับ  $7.04 \pm 0.61$  ตารางเซนติเมตร



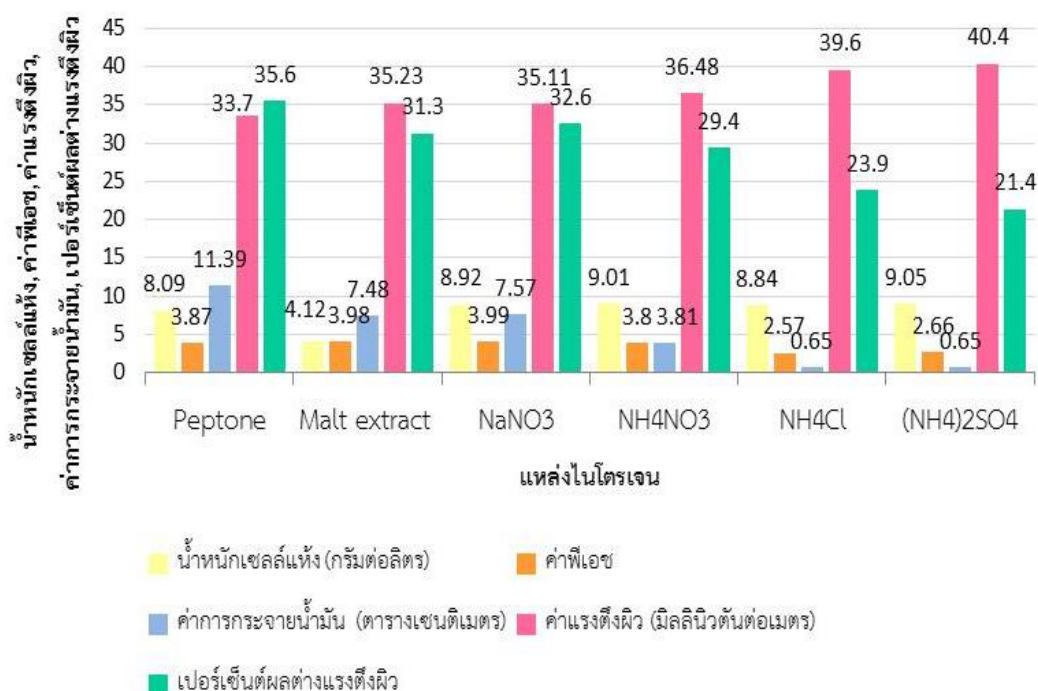
รูปที่ 20 ผลของความเข้มข้นของกลูโคสต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยรา คล้ายยีสต์สายพันธุ์ *A. pullulans* YTP6-14 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน

ศึกษาอัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นกลูโคสและกลีเซอรอลหรือน้ำมันพืชที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *A. pullulans* YTP6-14 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อปรับปรุงสูตรที่มีการแปรผันอัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นกลูโคสและกลีเซอรอลหรือน้ำมันพืชในอัตราส่วนต่างๆ ได้แก่ กลูโคส 2.5 : กลีเซอรอล 2.5, กลูโคส 2.5 : น้ำมันปาล์ม 2.5, กลูโคส 2.5 : น้ำมันถั่วเหลือง 2.5, กลูโคส 5 : กลีเซอรอล 5, กลูโคส 5 : น้ำมันปาล์ม 5, กลูโคส 5 : น้ำมันถั่วเหลือง 5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอัตราส่วนความเข้มข้นระหว่างกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ ต่อกลีเซอรอล 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นอัตราส่วนที่ทำให้เชื้อมีการเจริญสูงสุด โดยมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ  $7.89 \pm 0.04$  กรัมต่อลิตร แต่เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่าที่ความเข้มข้นของกลูโคสเท่ากับ 2.5 เปอร์เซ็นต์ต่อกลีเซอรอล 2.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุด โดยมีค่าผลต่างของแรงตึงผิวสูงสุด เท่ากับ 36.00 เปอร์เซ็นต์ และค่าการกระจายน้ำมันสูงสุด เท่ากับ  $12.67 \pm 1.08$  ตารางเซนติเมตร ดังรูปที่ 21



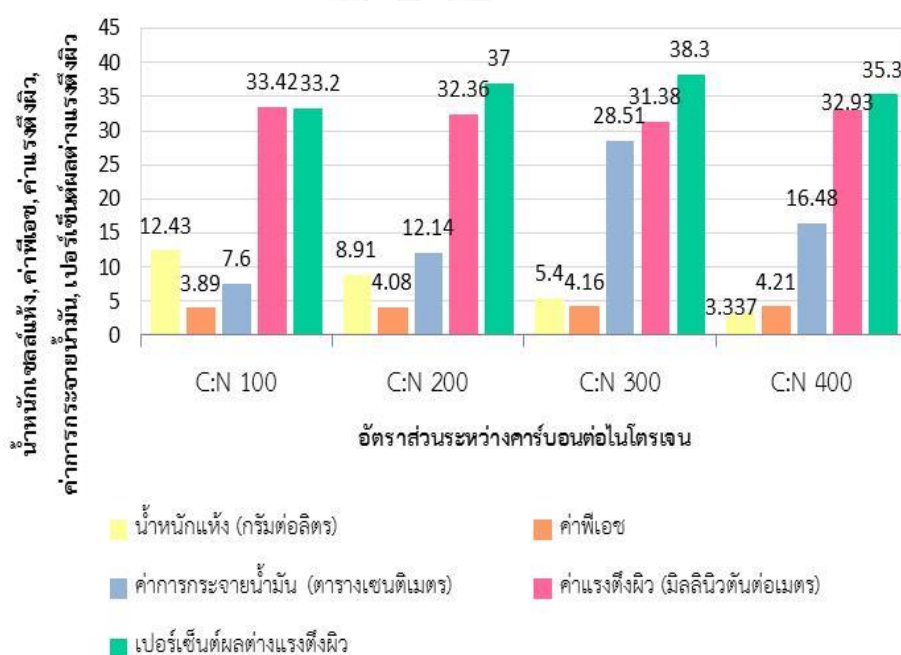
**รูปที่ 21** ผลของอัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นกลูโคสและกลีเซอรอลหรือน้ำมันพืชต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยราคล้ายยีสต์สายพันธุ์ *A. pullulans* YTP6-14 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน

ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยเลี้ยง *A. pullulans* YTP6-14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อปรับปรุงสูตรที่มีแหล่งคาร์บอนประกอบด้วยอัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นกลูโคส 2.5 เปอร์เซ็นต์ และกลีเซอรอล 2.5 เปอร์เซ็นต์ และแปรผันแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ เปปโตน สารสกัดจากมอลต์ (malt extract) แอมโมเนียมไนเตรท ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) แอมโมเนียมซัลเฟต ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) แอมโมเนียมคลอไรด์ ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) และโซเดียมไนเตรท ( $\text{NaNO}_3$ ) ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 0.06 เปอร์เซ็นต์ (มวลต่อปริมาตร) และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน จากการทดลองพบว่า แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรท และโซเดียมไนเตรท เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ทำให้ *A. pullulans* YTP6-14 สามารถเจริญเติบโตได้ดี โดยมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ  $9.05 \pm 0.01$ ,  $9.01 \pm 0.02$  และ  $8.92 \pm 0.01$  กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่า แหล่งไนโตรเจนทั้ง 3 ชนิด มีค่าน้อยกว่า เปปโตน เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน มีค่าผลต่างของแรงตึงผิวในอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 35.6 เปอร์เซ็นต์และค่าการกระจายน้ำมันสูงสุด เท่ากับ  $11.39 \pm 0.8$  ตารางเซนติเมตร ดังรูปที่ 22 ดังนั้น จึงเลือกเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ



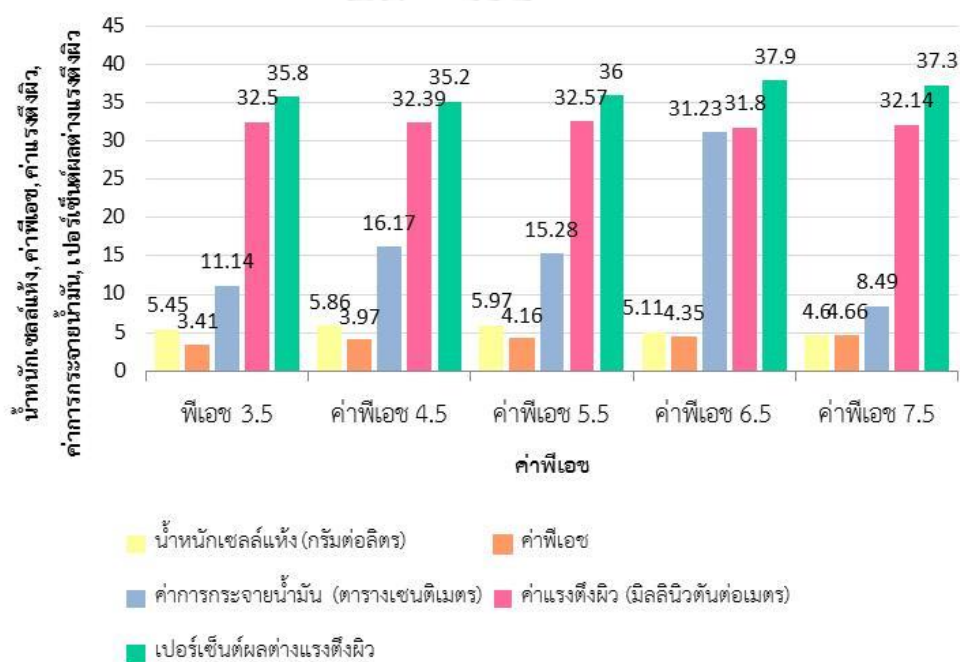
รูปที่ 22 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยยีสต์สายพันธุ์ *A. pullulans* YTP6-14 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน

ศึกษาอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสม (C:N) สำหรับการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *A. pullulans* YTP6-14 โดยแปรผันอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจน ดังนี้ C:N 100, 200, 300 และ 400 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่า อัตราส่วน C:N เท่ากับ 100 ทำให้ *A. pullulans* YTP6-14 มีการเจริญสูงสุด โดยมีค่าน้ำหนักแห้ง เท่ากับ  $12.43 \pm 0.05$  กรัมต่อลิตร แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่ามีค่าน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราส่วน C:N 300 ซึ่งมีค่าผลต่างแรงตึงผิว เท่ากับ 38.3 เปอร์เซ็นต์ และค่าการกระจายน้ำมันสูงสุด  $28.51 \pm 1.02$  ตารางเซนติเมตร ดังรูปที่ 23 จึงเลือกอัตราส่วน C:N 300 ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งหลังจากการเลี้ยง *A. pullulans* YTP6-14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อปรับปรุงสูตรที่มีอัตราส่วน C:N เท่ากับ 300 พบว่า *A. pullulans* YTP6-14 มีประสิทธิภาพให้การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมากขึ้น สืบเนื่องจากมีค่าการกระจายน้ำมันที่สูงกว่าเดิม ประมาณ 2.5 เท่า



**รูปที่ 23** ผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยราคล้ายยีสต์สายพันธุ์ *A. pullulans* YTP6-14 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน

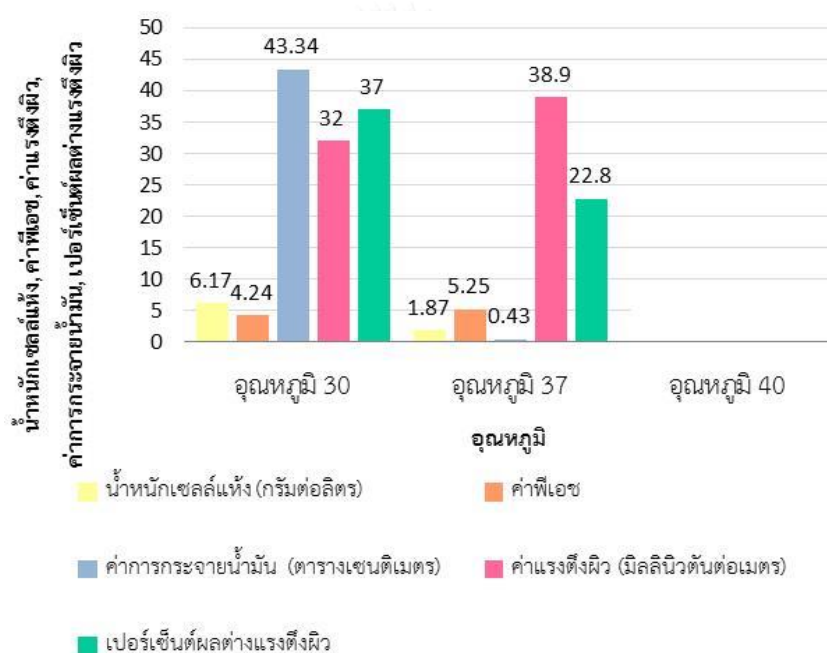
ศึกษาค่าพีเอชที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *A. pullulans* YTP6-14 โดยแปรผันค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อปรับปรุงสูตรที่มีอัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นกลูโคส 2.5 เปอร์เซ็นต์ และกลีเซอรอล 2.5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน และเปปโตเนเป็นแหล่งไนโตรเจนในอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 300 ดังนี้ เท่ากับ 3.5, 4.5, 5.5, 6.5 และ 7.5 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่า พีเอช 5.5 เป็นค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของ *A. pullulans* YTP6-14 มากที่สุด โดยมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ  $5.97 \pm 0.0$  กรัมต่อลิตร แต่เมื่อติดตามประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่า มีประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวน้อยกว่าค่าพีเอช เท่ากับ 6.5 ซึ่งมีค่าผลต่างแรงตึงผิว เท่ากับ 37.9 เปอร์เซ็นต์ และค่าการกระจายน้ำมันสูงสุด เท่ากับ  $31.8 \pm 1.4$  ตารางเซนติเมตร ดังรูปที่ 24 ดังนั้นจึงเลือกค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อปรับปรุงสูตรที่เหมาะสมเท่ากับ 6.5 ไปทำการทดลองถัดไป



**รูปที่ 24** ผลของค่าพีเอชต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยราคล้ายยีสต์สายพันธุ์ *A. pullulans* YTP6-14 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน

ศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *A. pullulans* YTP6-14 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อปรับปรุงสูตรที่เหมาะสมซึ่งมีอัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นกลูโคส 2.5 เปอร์เซ็นต์ และกลีเซอรอล 2.5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน และเปปโตเนเป็นแหล่งไนโตรเจน ในอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 300 และปรับค่าพีเอชในอาหารเลี้ยง

เชื้อเท่ากับ 6.5 และแปรผันอุณหภูมิตั้งในการเพาะเลี้ยง ดังนี้ อุณหภูมิ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส จากการทดลองพบว่า ที่อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง เท่ากับ 40 องศาเซลเซียส *A. pullulans* YTP6-14 ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ในขณะที่อุณหภูมิ เท่ากับ 37 องศาเซลเซียส เชื้อมีการเจริญได้เพียง 1.67 กรัมต่อลิตร ซึ่งส่งผลทำให้สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพน้อยเช่นกัน เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จากค่าการกระจายน้ำมัน พบว่ามีค่าเพียง  $0.43 \pm 0.02$  ตารางเซนติเมตร ส่วนที่อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง เท่ากับ 30 องศาเซลเซียส พบว่า *A. pullulans* YTP6-14 เจริญได้ดีที่สุด โดยมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ  $6.17 \pm 0.00$  กรัมต่อลิตร และมีค่าประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวดีที่สุดเช่นกัน ซึ่งมีค่าผลต่างแรงตึงผิวเท่ากับ 37 เปอร์เซ็นต์ และค่าการกระจายน้ำมันสูงสุดเท่ากับ  $43.34 \pm 2.5$  ตารางเซนติเมตร ดังรูปที่ 25



รูปที่ 25 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยราคล้ายยีสต์สายพันธุ์ *A. pullulans* YTP6-14 เป็นระยะเวลา 7 วัน

#### 4.5 การผลิตและสกัดแยกสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ

เพาะเลี้ยง *A. pullulans* YTP6-14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปรับปรุงสูตรที่เหมาะสมซึ่งมีอัตราส่วนระหว่างกลูโคส 2.5 เปอร์เซ็นต์ และกลีเซอรอล 2.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนและเปปโตเนเป็นแหล่งไนโตรเจนในอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 300 ค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.5 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 7 วัน สกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้เอทิลอะซิเตท และระเหยเอทิลอะซิเตทออก



ภายใต้สภาวะอากาศ จะได้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 1.26 กรัมต่อลิตร มีลักษณะหนืด มีสีน้ำตาลเข้ม ดังรูป 26 และนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ (crude biosurfactant) มาวัดประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยนำสารมาละลายด้วยทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ให้มีความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร และนำมาวัดค่าการกระจายน้ำมันและค่าแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* YTP6-14 มีค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 176.78 ตารางเซนติเมตร และค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 32 มิลลินิวตันต่อเมตร

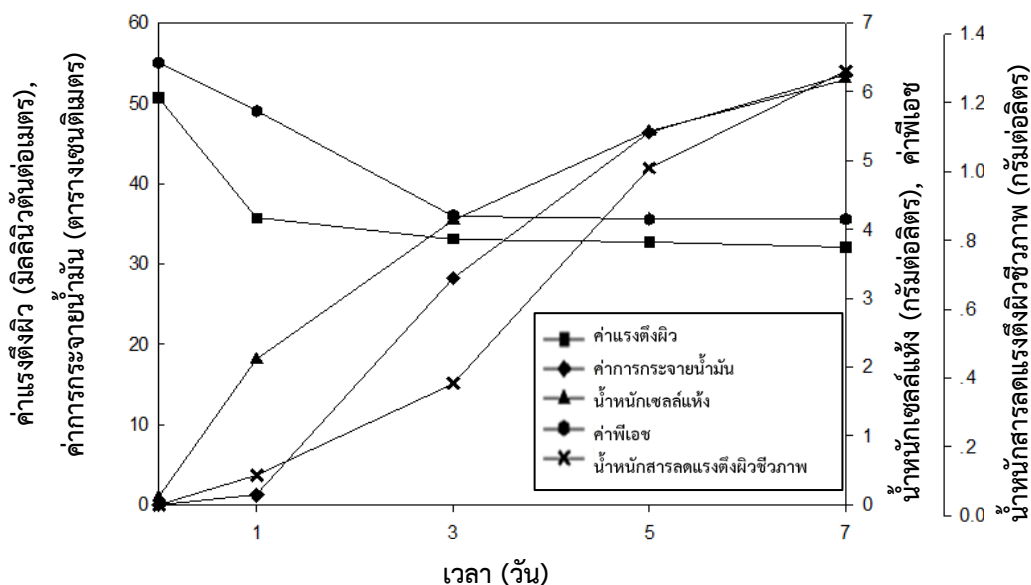


รูปที่ 26 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (crude biosurfactant) ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* YTP6-14

#### 4.6 การติดตามความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เพาะเลี้ยง *A. pullulans* YTP6-14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อปรับปรุงสูตรที่เหมาะสมซึ่งมีอัตราส่วนระหว่างกลูโคส 2.5 เปอร์เซ็นต์ และกลีเซอรอล 2.5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอนและเปปโตเนเป็นแหล่งไนโตรเจนในอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 300 ค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.5 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 7 วัน ติดตามการเจริญของ *A. pullulans* YTP6-14 จากน้ำหนักแห้งของเซลล์และค่าพีเอช ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากค่าการกระจายน้ำมันและค่าแรงตึงผิว และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ เป็นระยะเวลา 1 3 5 และ 7 วัน พบว่า *A. pullulans* YTP6-14 เจริญได้ดีที่สุดในวันที่ 7 (5.62 กรัมต่อลิตร) โดยค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงวันที่ 1-3 ของการเจริญ และจะมีค่าคงที่จนถึงวันที่ 7 ของการเจริญ โดย *A. pullulans* YTP6-14 จะเริ่มมีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพตั้งแต่แรกของการเจริญ และเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงวันที่ 3-

5 และสามารถผลิตได้ดีที่สุดในวันที่ 7 ของการเจริญ (1.26 กรัมต่อลิตร) ซึ่งสัมพันธ์กับค่าแรงดึงผิว และค่าการกระจายน้ำมันที่วัดค่าได้ โดยค่าแรงดึงผิวจะลดลงตั้งแต่วันแรกของการทดลอง และจะเริ่มค่าคงที่เมื่อเข้าวันที่ 3 ถึงวันที่ 7 (32.1 มิลลินิวตันต่อเมตร) ส่วนค่าการกระจายน้ำมันจะค่อยๆเพิ่มขึ้นจนกระทั่งสูงสุดในวันที่ 7 (53.33 ตารางเซนติเมตร) ของการทดลองเช่นกัน ดังรูปที่ 27



รูปที่ 27 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* YTP6-14 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อปรับปรุงสูตร เป็นระยะเวลา 1 3 5 และ 7 วัน

CHULALONGKORN UNIVERSITY

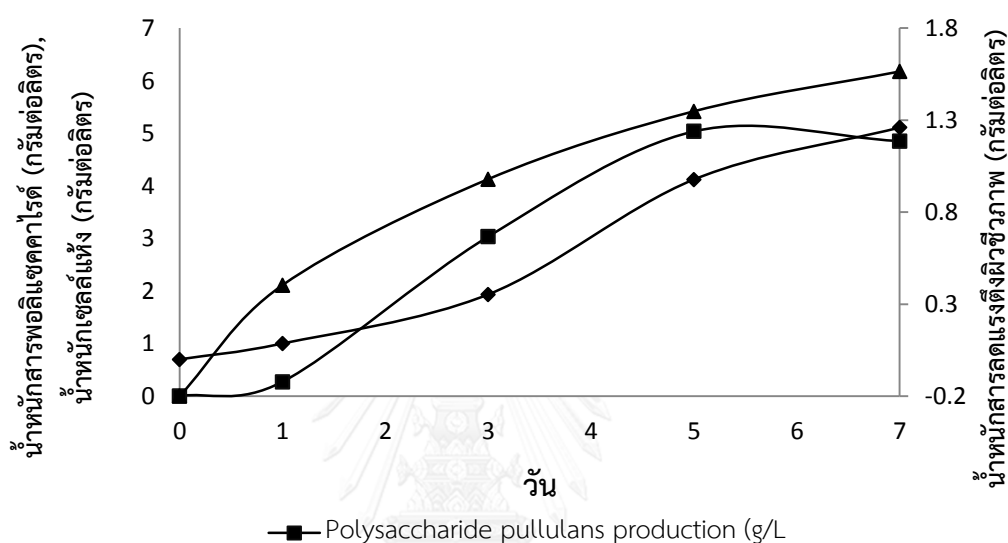
#### 4.7 การเปรียบเทียบรูปแบบการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพและพอลิแซคคาไรด์พุลลูแลน

มีรายงานเกี่ยวกับการผลิตพอลิแซคคาไรด์พุลลูแลนจาก *A. pullulans* จำนวนมาก (Gaur และคณะ, 2010; Chi และคณะ, 2009; Oliveria และคณะ, 2015) ซึ่งพอลิแซคคาไรด์พุลลูแลนสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้หลากหลาย เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมเคมี และทางด้านการเกษตร เป็นต้น

ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจเปรียบเทียบรูปแบบการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพและพอลิแซคคาไรด์พุลลูแลนที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* YTP6-14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปรับปรุงสูตรที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ โดยขั้นตอนตกตะกอนพอลิแซคคาไรด์พุลลูแลนดัดแปลงจากวิธีการของ Gniewosz และ Synowiec (2011) ติดตามรูปแบบการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพและพอลิแซคคาไรด์พุลลูแลนจาก *A. pullulans* YTP6-14 เป็นระยะเวลา 1 3 5 และ 7 วัน พบว่า *A.*



*pullulans* YTP6-14 จะเริ่มผลิตพอลิแซ็กคาไรด์พุลลูแลนตั้งแต่วันแรกของการเจริญ และจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงวันที่ 1-5 ของวันที่ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์พุลลูแลน โดยจะผลิตสูงสุดในวันที่ 5 (5.036 กรัมต่อลิตร) ขณะที่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเริ่มผลิตตั้งแต่วันแรกของการเจริญเช่นกัน แต่จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงวันที่ 3-5 และผลิตสูงสุดในวันที่ 7 ของการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (1.26 กรัมต่อลิตร)

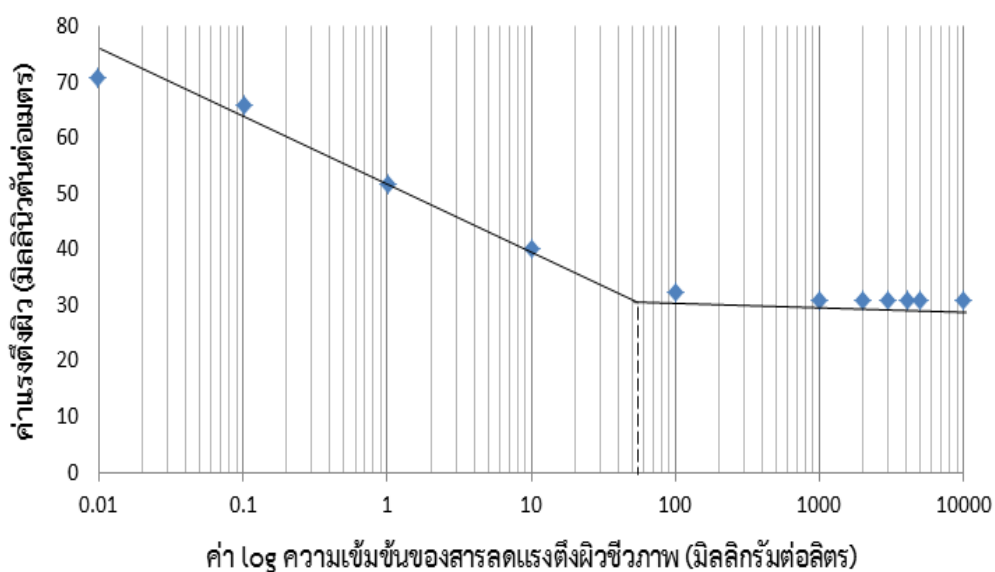


**รูปที่ 28** ความสัมพันธ์ระหว่างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและพอลิแซ็กคาไรด์พุลลูแลนที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* YTP6-14 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงปรับปรุงสูตรระยะเวลา 1 3 5 และ 7 วัน

#### 4.8 ศึกษาลักษณะสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

##### 4.8.1 ค่าความเข้มข้นวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ (Critical micelle concentration, CMC)

ค่าความเข้มข้นวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เป็นค่าความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่น้อยที่สุดที่ทำให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพก่อตัวเป็นไมเซลล์ได้ สามารถหาค่าความเข้มข้นวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ โดยนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ มาเจือจางด้วยทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.01-10,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นวัดค่าแรงตึงผิวด้วยวิธี Du Nuoy Ring และเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตึงผิวและค่า  $\log$  ของความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่วัดค่าได้ เพื่อหาความเข้มข้นวิกฤตของการเกิดไมเซลล์จากการทดลองพบว่า ความเข้มข้นวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 มีค่าเท่ากับ 39 มิลลิกรัมต่อเมตร และมีค่าแรงตึงผิว ณ ความเข้มข้นวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ หรือค่า  $\gamma_{CMC}$  เท่ากับ 31.6 มิลลินิวตันต่อเมตร ดังรูปที่ 29

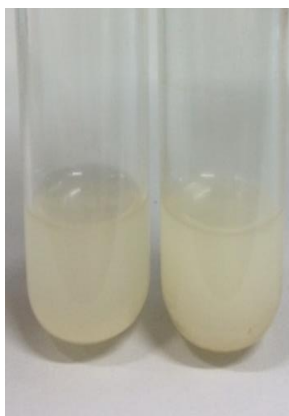


รูปที่ 29 ค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* YTP6-14

#### 4.8.2 ค่า Hydrophilic-Lipophilic Balance (HLB)

##### 4.8.2.1 วัดค่า Hydrophilic-Lipophilic Balance (HLB) เบื้องต้น

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้มาเจือจางในน้ำ ให้มีค่าความเข้มข้นเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และปรับค่าพีเอชเท่ากับ 5.5 และ 7 ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex mixer) เป็นระยะเวลา 2 นาที สังเกตลักษณะการละลายของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในน้ำที่เกิดขึ้น และเปรียบเทียบค่า HLB พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเมื่อนำไปเจือจางในน้ำที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 5.5 และ 7 จะมีลักษณะละลายน้ำและมีการกระจายตัวได้ดี มองเห็นเป็นสารละลายโปร่งแสง ซึ่งตรงกับค่า HLB ในช่วง 10-13 ดังรูป 30



น้ำพีเอช 5.5    น้ำพีเอช 7

**รูปที่ 30** ลักษณะของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเมื่อละลายในน้ำค่าพีเอชเท่ากับ 5.5 และ 7

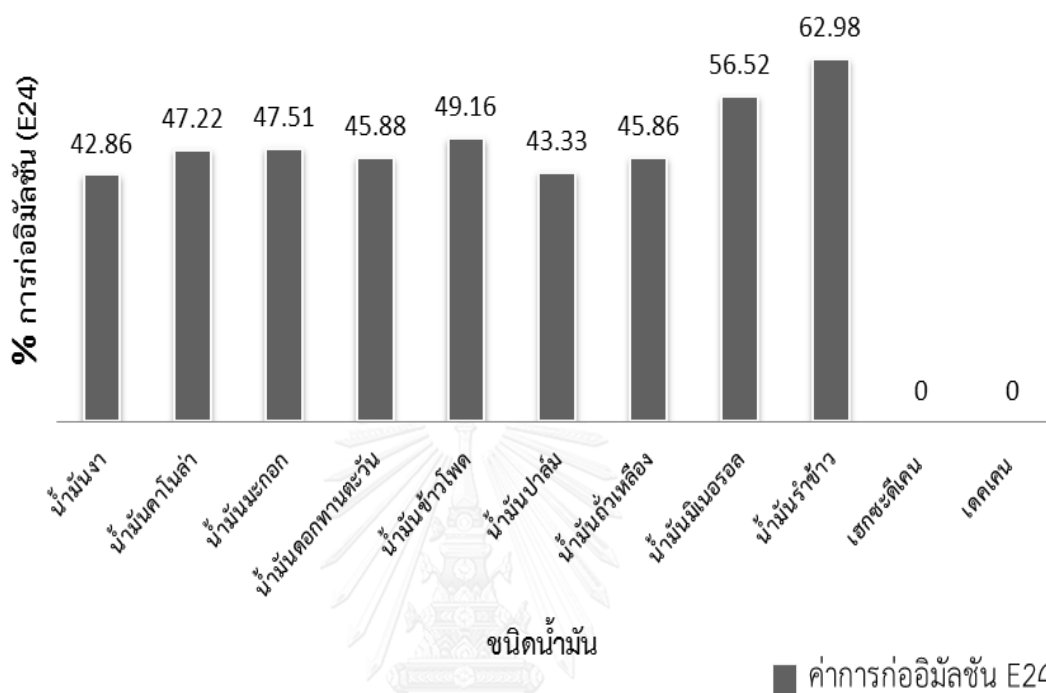
#### 4.8.2.2 วิธีหาค่า HLB ตามวิธีของ Chun และคณะ, 1960

วัดจากการวัดค่า interfacial tension โดยเจือจางสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ด้วยทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ให้มีความเข้มข้น เท่ากับ 10 เท่าของค่า CMC (39.18 มิลลิกรัมต่อลิตร) เทสารโทลูอีน (Toluene) ให้อยู่ชั้นบนของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จากนั้นวัดค่า interfacial tension ระหว่างของเหลวทั้ง 2 ชนิด และคำนวณหาค่า HLB จากการทดลองพบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีค่า interfacial tension เท่ากับ 12 มิลลินิวตันต่อเมตร และนำไปคำนวณค่า HLB ตามสูตร ซึ่งมีค่าเท่ากับ 14.27 ดังนั้นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* YTP6-14 จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (water-in-oil emulsifier)

#### 4.8.3 การวัดค่าดัชนีการก่ออิมัลชัน (Emulsion Index)

การวัดค่าดัชนีการก่ออิมัลชัน (Emulsification Index) และศึกษาความเสถียรในการก่ออิมัลชัน (Emulsification stability) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* YTP6-14 ร่วมกับน้ำมันพืชชนิดต่างๆที่ใช้ประกอบอาหารและน้ำมันดีเคน เช่น น้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันงา น้ำมันคาโนล่า น้ำมันมะกอก น้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันข้าวโพด น้ำมันรำข้าว น้ำมันมิเนอร์อล (Mineral oil) เฮกซะดีเคน (Hexadecane) เดคเคน (Decane) ที่การก่ออิมัลชันที่ซึ่งโมเมนต์ 24 (E24) พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถก่ออิมัลชันร่วมกับน้ำมันได้ทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบ ยกเว้น น้ำมันดีเคน (เฮกซะดีเคน และ เดคเคน) โดยน้ำมันรำข้าว มีเปอร์เซ็นต์การก่ออิมัลชันได้สูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 62.98 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 31 และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถก่ออิมัลชันกับน้ำมันชนิดอื่นๆโดยมีค่าการก่ออิมัลชันในช่วง 40-45 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 31 และจากการศึกษาความ

เสถียรของอิมัลชัน พบว่า น้ำมันพืชเกือบทุกชนิดมีความเสถียรของอิมัลชันมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำมันรำข้าวมีความเสถียรในการก่ออิมัลชันมากที่สุดมีค่าเท่ากับ 95.58 เปอร์เซ็นต์ ที่ซึ่งโมเมนต์ 168 ดังตารางที่ 17



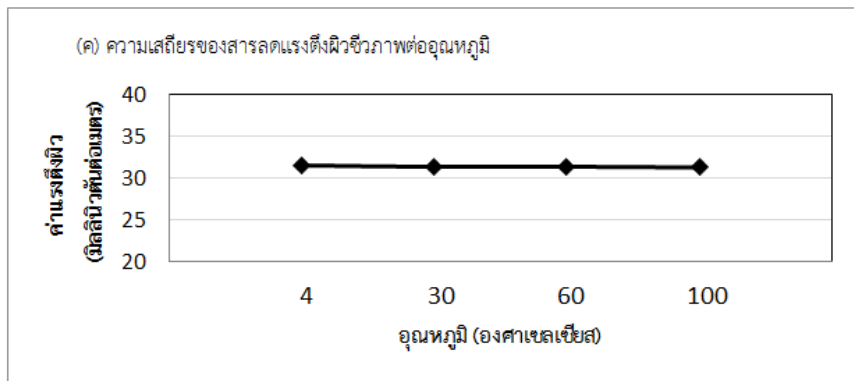
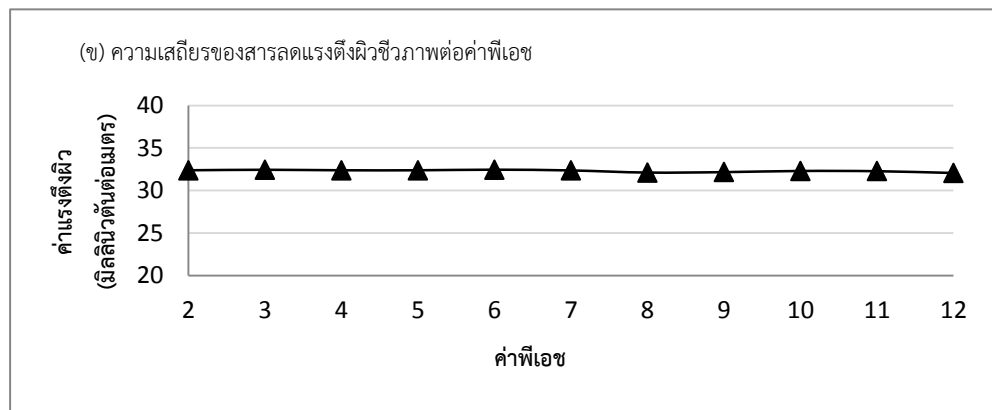
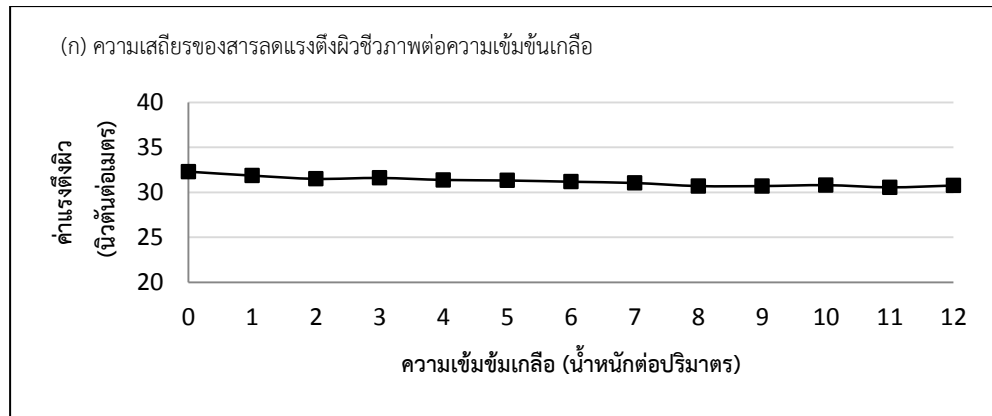
รูปที่ 31 การก่ออิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* YTP6-14 กับน้ำมันชนิดต่างๆ ที่ 24 ชั่วโมงแรก (E24)

ตารางที่ 17 ค่าการก่อก๊าซ (E24) และค่าความเสถียรในการก่อก๊าซ ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกับน้ำมันชนิดต่างๆ ในระยะเวลา 24-168 ชั่วโมง

ชนิดน้ำมัน	ค่าการก่อก๊าซ อีมีลชัน (E24)	ค่าความเสถียรของอีมีลชัน (ชั่วโมง)						
		24	48	72	96	120	144	168
น้ำมันงา	42.86	100	100	92.3	86.56	82.68	80.77	78.16
น้ำมันคาโนล่า	47.22	100	91.3	90.59	90.59	87.06	86.46	85.98
น้ำมันมะกอก	47.51	100	91.3	90.71	90.12	88.38	87.79	86.71
น้ำมันดอกทานตะวัน	45.88	100	90.5	88.62	88.62	87.42	86.22	85
น้ำมันข้าวโพด	49.16	100	91.4	90.84	90.84	89.13	89.13	88.48
น้ำมันปาล์ม	43.33	100	92.3	90.46	88.46	88.46	87.19	85.85
น้ำมันถั่วเหลือง	45.86	100	91	91.56	91.27	91.27	89.91	89.81
น้ำมันมิเนอรอล	56.52	100	100	99.25	99.25	93.08	91.66	90.76
น้ำมันรำข้าว	62.98	100	100	99.57	99.07	98.25	96.49	95.58
เฮกซะดีเคน	0	0	0	0	0	0	0	0
เดคเคน	0	0	0	0	0	0	0	0

#### 4.8.4. ความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อความเข้มข้นของเกลือ ค่าพีเอช และ อุณหภูมิ

การศึกษาความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* YTP 6-14 ต่อความเข้มข้นเกลือ ค่าพีเอช และอุณหภูมิ เจือจางสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยทริสไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทดสอบความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อความเข้มข้นเกลือเท่ากับ 1-12 เปอร์เซ็นต์ (มวลต่อปริมาตร) โดยวัดจากค่าแรงตึงผิว ณ สถานะต่างๆ พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังคงมีประสิทธิภาพได้ดีแม้มีการแปรผันความเข้มข้นของเกลือ ดังรูป 32 (ก.) การทดสอบความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อค่าพีเอชในช่วง 2-12 พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถทนต่อค่าพีเอชได้ โดยมีประสิทธิภาพไม่เปลี่ยนแปลงทั้งในสถานะที่เป็นกรดและเบส ดังรูป 32 (ข.) การทดสอบความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่ออุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 4, 30, 60 และ 100 องศาเซลเซียส พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถทนต่ออุณหภูมิในช่วงกว้างได้ โดยยังคงมีประสิทธิภาพไม่เปลี่ยนแปลงที่อุณหภูมิ ต่างๆ ดังรูป 32 (ค.) นอกจากนี้ยังนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไปทดสอบความเสถียรภายใต้สภาวะฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปาสคาล เป็นระยะเวลา 15 นาที พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถทนต่ออุณหภูมิสูง โดยยังคงมีประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวไม่เปลี่ยนแปลง



รูปที่ 32 การศึกษาความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* YTP6-14

(ก) ความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อความเข้มข้นเกลือ

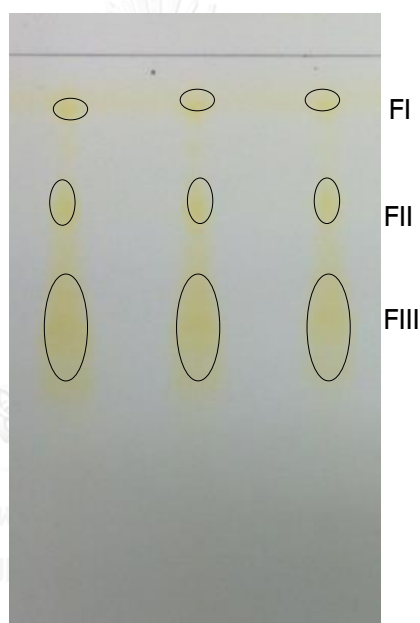
(ข) ความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อค่าพีเอช

(ค) ความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพอุณหภูมิ

#### 4.9 เตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วน

##### 4.9.1 เตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธี Analytical TLC

เตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธี Analytical TLC โดยนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 140 ไมโครลิตร มาจุดบนแผ่นซิลิกาเจล 60 ขนาด 20x20 ซม. หนา 0.2 มิลลิเมตร โดยมีคลอโรฟอร์ม เอทานอล และน้ำ (65: 25: 4) เป็นเฟสเคลื่อนที่ จากนั้นวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเบื้องต้น โดยนำแผ่นซิลิกาเจลไปอบด้วยไอระเหยของไอโอดีน พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถแยกเป็น 3 ลำดับส่วน ได้แก่ FI, FII และ FIII ดังรูปที่ 33 และหาค่าอัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (Retention factor,  $R_f$ ) ได้เท่ากับ 0.93, 0.80 และ 0.66 ตามลำดับ

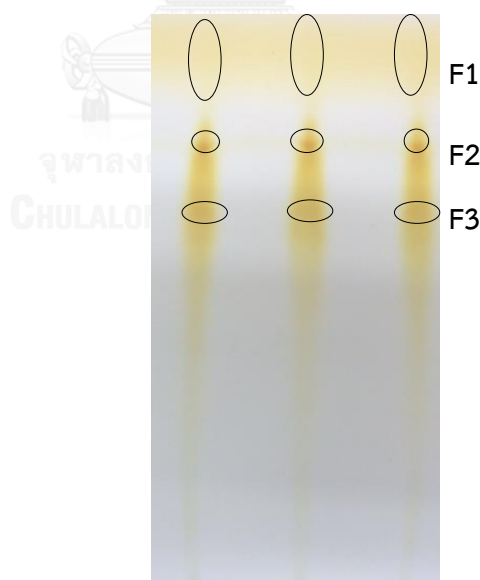


**รูปที่ 33** การแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* YTP6-14 ด้วย Analytical TLC โดยใช้โครมาโตกราฟีชนิดแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography) สามารถแยกได้ 3 ลำดับส่วน ได้แก่ FI, FII และ FIII ตามลำดับ



#### 4.9.2. เตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยวิธี Preparative thin layer chromatography

แยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธีการ Preparative thin layer chromatography ซึ่งเป็นเทคนิคแยกสารที่ต้องการในปริมาณมาก โดยนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร มาจุดบนแผ่นซิลิกาเจลหนา 2 มิลลิเมตร และคลอโรฟอร์ม เอทานอล และน้ำ (65: 25: 4) เป็นเฟสเคลื่อนที่ จากนั้นวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเบื้องต้น โดยนำแผ่นซิลิกาเจลไปอบด้วยไอระเหยของไอโอดีน พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถแยกเป็น 3 ลำดับส่วน ได้แก่ F1, F2 และ F3 ดังรูปที่ 34 และมีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.90, 0.77 และ 0.66 ตามลำดับ และนำตัวอย่างแต่ละลำดับส่วนของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้มาทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่า F2 และ F3 มีค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 124.74 และ 176.78 ตารางเซนติเมตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 18 ดังนั้นจึงทำการแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลำดับส่วนที่ F2 และ F3 ด้วยวิธี Preparative thin layer chromatography และทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครโมโตกราฟี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ในการทดลองต่อไป



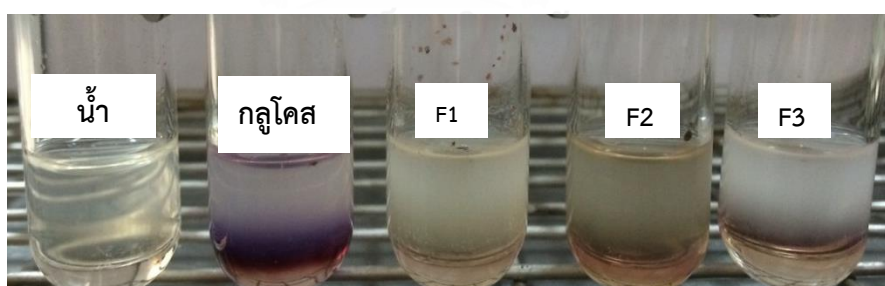
**รูปที่ 34** การแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* YTP6-14 ด้วย Preparative thin layer chromatography สามารถแยกได้ 3 ลำดับส่วน ได้แก่ F1, F2 และ F3 ตามลำดับ

**ตารางที่ 18** อัตราการเคลื่อนที่ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและค่าการกระจายน้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จากวิธี Preparative thin layer chromatography

แถบที่	อัตราการเคลื่อนที่ของสาร ( $R_f$ )	ค่าการกระจายน้ำมัน (ตารางเซนติเมตร)
F1	0.90	10.18
F2	0.77	124.74
F3	0.66	176.78

#### 4.9.3. การทดสอบคาร์โบไฮเดรตด้วยวิธีมอริส

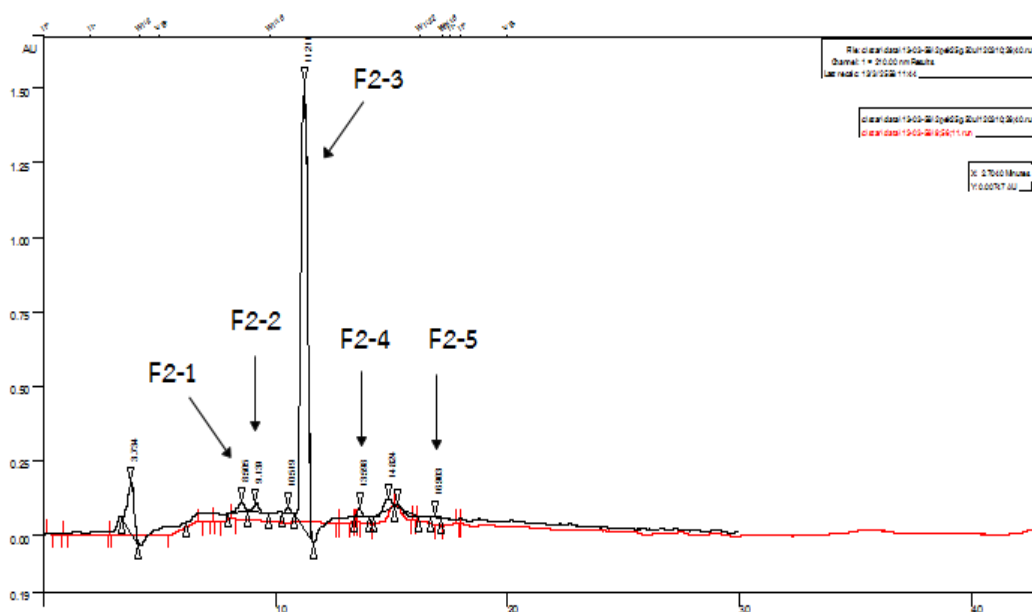
ทดสอบคาร์โบไฮเดรตจากโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยวิธีการ Preparative thin layer chromatography พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพลำดับส่วนที่ F1, F2 และ F3 ให้ผลบวกในการทดสอบ โดยมีลักษณะสีม่วงเกิดขึ้นตรงกลางระหว่างชั้นของสารละลายและชั้นของกรด ดังรูปที่ 35 ดังนั้นจึงสามารถคาดคะเนได้ว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นสารที่มีหมู่แอลดีไฮด์หรือคีโตนเป็นองค์ประกอบในโครงสร้าง ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับสารมอริส จะเกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีม่วง



**รูปที่ 35** การทดสอบคาร์โบไฮเดรตในโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธีมอริส โดยใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยวิธีการ Preparative thin layer chromatography

#### 4.9.4. การทำให้สารบริสุทธิ์ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครโมโตกราฟี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนที่สกัดได้จากข้อ 4.9.2 มาวิเคราะห์และแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่อง HPLC โดยนำตัวอย่างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลำดับที่ F2 และ F3 มาวิเคราะห์ พิกที่เวลา (Retention time) ต่างๆของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลำดับที่ F2 แสดงบนโครมาโตแกรม ดังรูปที่ 36 โดยเก็บตัวอย่างพิกที่เวลาต่างๆ 5 ตัวอย่าง ได้แก่ F2-1, F2-2, F2-3, F2-4 และ F2-5 โดยแต่ละตัวอย่างพิกออกมาที่เวลา เท่ากับ 8.505, 8.139, 11.211, 13.598 และ 16.903 นาที ตามลำดับ จากนั้นนำไปวิเคราะห์ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยวัดจากค่าการกระจายน้ำมัน ดังตารางที่ 19 พบว่า ตัวอย่างสารพิกที่ F2-3 ที่เวลา เท่ากับ 11.211 นาที ให้ค่าการกระจายน้ำมันสูงสุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 11.13 ตารางเซนติเมตร

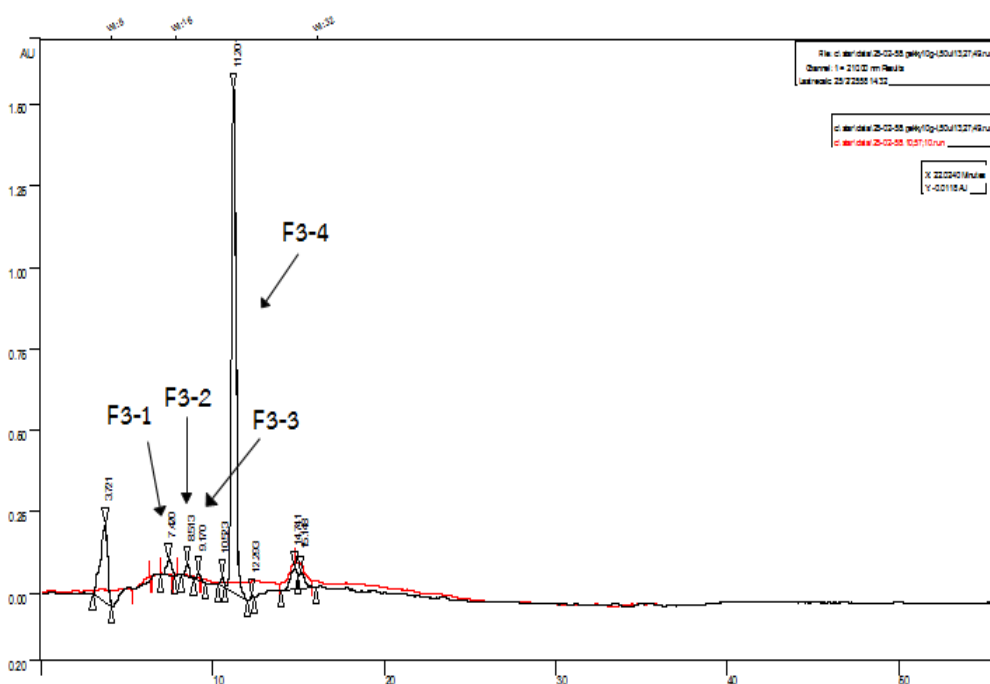


รูปที่ 36 โครมาโตแกรมของ HPLC จากตัวอย่างลำดับที่ F2 เก็บตัวอย่างพิกที่เวลาต่างๆ (Retention time) จำนวน 5 ตัวอย่าง ได้แก่ F 2-1, F 2-2, F 2 -3, F 2-4 และ F 2-5

**ตารางที่ 19** สรุปค่าการกระจายน้ำมันของตัวอย่างลำดับส่วนที่ F2 ซึ่งผ่านการวิเคราะห์และทำให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่อง HPLC

ตำแหน่งพีกจาก F2	เวลา (นาที)	ค่าการกระจายน้ำมัน (ตารางเซนติเมตร)
F 2-1	8.505	7.07
F 2-2	8.139	6.16
F 2-3	11.211	11.34
F 2-4	13.598	10.18
F 2-5	16.903	3.14

นำตัวอย่างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลำดับที่ F3 มาวิเคราะห์และแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่อง HPLC ตัวอย่างพีกที่เวลาต่างๆ ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลำดับที่ F3 แสดงบนโครมาโตแกรม ดังรูปที่ 37 เก็บตัวอย่างพีกที่เวลาต่างๆ จำนวน 4 ตัวอย่าง ได้แก่ F3-1, F3-2, F3-3 และ F3-4 โดยแต่ละตัวอย่างพีกออกมาที่เวลา เท่ากับ 7.420, 8.513, 9.170 และ 11.201 นาที ตามลำดับ จากนั้นนำไปวิเคราะห์ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยวัดจากค่าการกระจายน้ำมัน ดังตารางที่ 20 พบว่า ตัวอย่างพีกที่ F3-4 ที่เวลาเท่ากับ 11.201 นาที ให้ค่าการกระจายน้ำมันสูงสุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2.27 ตารางเซนติเมตร



รูปที่ 37 โครมาโตแกรมของ HPLC จากตัวอย่างลำดับส่วนที่ F3 เก็บตัวอย่างพีกที่เวลาต่างๆ (Retention time) จำนวน 4 ตัวอย่าง ได้แก่ F3-1, F3-2, F3-3 และ F3-4

ตารางที่ 20 สรุปค่าการกระจายน้ำมันของตัวอย่างลำดับส่วนที่ F3 ซึ่งผ่านการวิเคราะห์และทำให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่อง HPLC

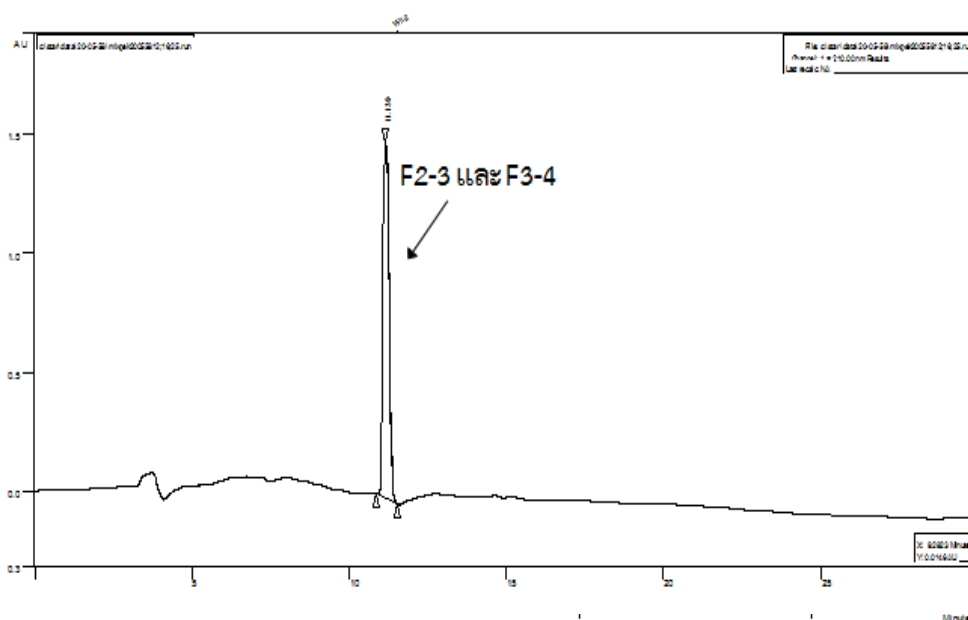
ตำแหน่งพีกจาก F3	เวลา (นาที)	ค่าการกระจายน้ำมัน (ตารางเซนติเมตร)
F 3-1	7.420	0.28
F 3-2	8.513	0.39
F 3-3	9.170	0.24
F 3-4	11.201	2.27

จากการวิเคราะห์และแยกตัวอย่างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลำดับที่ F2 และ F3 และเลือกตำแหน่งพีกที่ให้ค่าการกระจายน้ำมันสูงสุดจากโครมาโตแกรมของ HPLC มีดังนี้

ตัวอย่างพีกที่ F2-3 ที่ตำแหน่งเวลาเท่ากับ 11.211 นาที มีค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 11.34 ตารางเซนติเมตร

ตัวอย่างพิกที่ F3-4 ที่ตำแหน่งเวลาเท่ากับ 11.201 นาที มีค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 2.27 ตารางเซนติเมตร

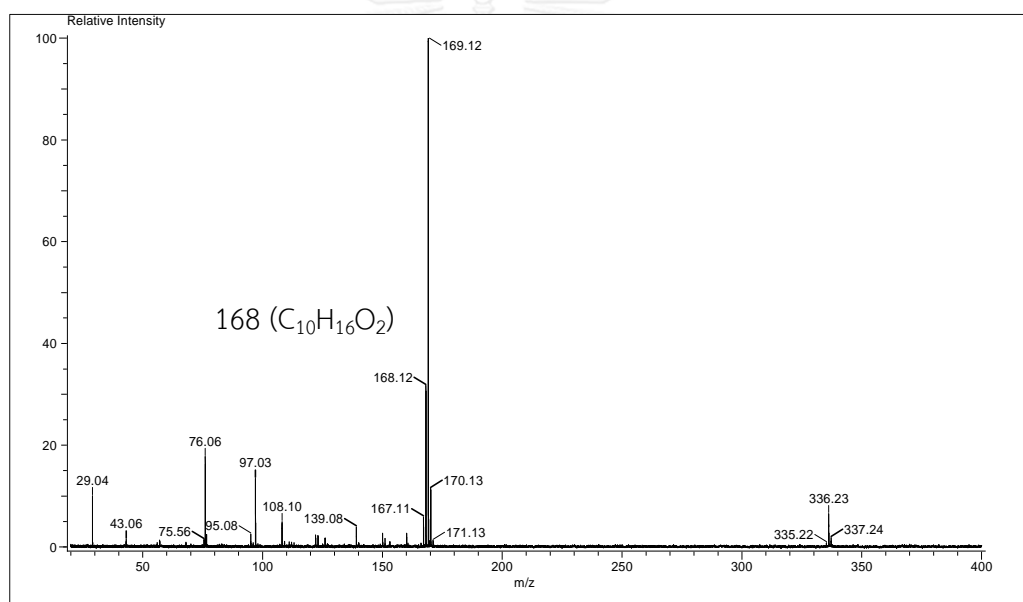
โดยทั้งสองตัวอย่างออกมาที่เวลาใกล้เคียงกัน คือ 11.211 และ 11.201 นาที ดังนั้นจึงทำการวิเคราะห์ตัวอย่างพิกที่ F 2-3 และ F 3-4 โดยนำทั้งสองตัวอย่างมาผสมกัน และทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC อีกครั้ง พบว่าสารตัวอย่างทั้งสองชนิดออกมาที่เวลาเดียวกัน คือ 11.139 นาที ดังรูปที่ 38 สันนิษฐานว่าน่าจะเป็นสารชนิดเดียวกัน จึงคัดเลือกตัวอย่างพิกที่ F2-3 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่อง HPLC เนื่องจากมีค่าการกระจายน้ำมันสูงสุด และนำไปทำการวิเคราะห์หาน้ำหนักมวลโมเลกุลด้วยวิธีแมสสเปกโตรเมตรี และเครื่องโปรตอน-นิวเคลียร์ แมกเนติกเรโซแนนซ์ สเปคโตรสโคปี ( $^1\text{H}$ -Nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR) ในการทดลองถัดไป



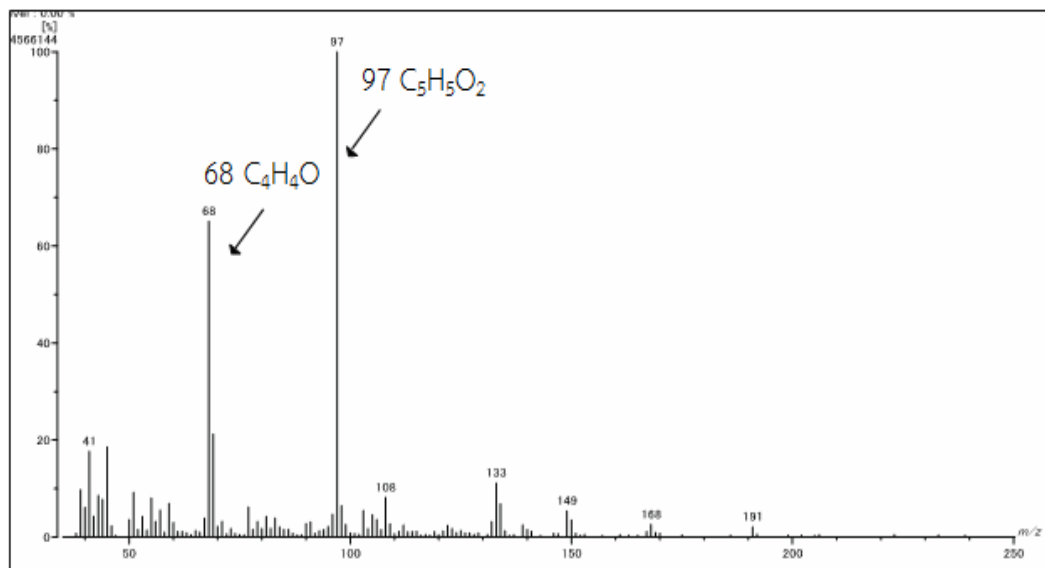
รูปที่ 38 โครมาโตแกรมของ HPLC จากตัวอย่างผสมพิกที่ F 2-3 และ F 3-4 ที่เวลาเท่ากับ 11.139 นาที

#### 4.10 วิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* YTP6-14 ด้วยวิธีแมสสเปกโตรเมตรี โดยเทคนิคทำให้เกิดไอออนเซชันแบบ FD/FI จากการวิเคราะห์สเปกตรัมมวลของตัวอย่าง F2-3 ปรากฏบนโครมาโตแกรม ดังรูปที่ 39 ซึ่งแสดงค่าไอออนมวลต่อประจุไอออน ( $m/z$ ) เท่ากับ 169.12 โดยสามารถบ่งบอกน้ำหนักโมเลกุลของสารและทำให้สามารถวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ จากการคำนวณสูตรโครงสร้างโมเลกุลของสารได้ เท่ากับ  $168 (C_{10}H_{16}O_2)$  และจากการวิเคราะห์สเปกตรัมมวลโดยใช้เทคนิคอิเล็กตรอนไอออนเซชัน (electron ionization, EI) ทำให้พบไอออนโมเลกุลบางส่วนมีการแตกย่อยเป็นไอออนย่อย (fragment ion) ปรากฏบนโครมาโตแกรม ซึ่งมีค่าไอออนมวลต่อประจุมวลไอออน ( $m/z$ ) เท่ากับ 97 ( $C_5H_5O$ ) และ 68 ( $C_4H_4O$ ) ตามลำดับ ดังรูป 40



รูปที่ 39 สเปกตรัมมวลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* YTP6-14 ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธีแมสสเปกโตรเมตรี (แหล่งกำเนิดไอออนชนิดแบบ FD/FI)



รูปที่ 40 สเปกตรัมมวลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* YTP6-14 ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธีแมสสเปกโตรเมตรี (แหล่งกำเนิดไอออนชนิดแบบ Electron ionization, EI)

และเมื่อทำการวิเคราะห์โครงสร้างโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ  $^1H$ -NMR ที่ 500 mHz สามารถระบุตำแหน่งของสัญญาณหลักของโปรตอนได้ดังนี้ ค่าเคมีคอลชิฟท์ที่ 0.9 (พีค a) เป็นพีคโปรตอนของหมู่เมทิล ( $-CH_3$ ) จะเกิด triple resonance ค่าเคมีคอลชิฟท์ที่ 1.35-1.78 (พีค b-c, d-e) เป็นพีคโปรตอนของหมู่เมทิลีน ( $-CH_2$ ) เกิด multiple resonance ค่าเคมีคอลชิฟท์ที่ 2.38-2.42 (พีค f) เป็นพีคที่มีการซ้อนทับของโปรตอนของหมู่เมไธน์ ( $-CH$ ) เกิด multiple resonance ค่าเคมีคอลชิฟท์ที่ 4.45 (พีค g) เป็นพีคโปรตอนของหมู่เมไธน์ ( $-CH$ ) เกิด multiple resonance ค่าเคมีคอลชิฟท์ที่ 5.95 (พีค h) เป็นพีคโปรตอนของหมู่เมไธน์ ( $-CH$ ) เกิด double resonance ซึ่งอยู่ตำแหน่งแอลฟา ( $\alpha$ ) ของพันธะคู่ของคาร์บอนนิล และค่าเคมีคอลชิฟท์ที่ 7.01 (พีค i) เป็นพีคโปรตอนของหมู่เมไธน์ ( $-CH$ ) เกิด double resonance อยู่ตำแหน่งเบต้า ( $\beta$ ) ของพันธะคู่ของคาร์บอนนิล ดังตารางที่ 21

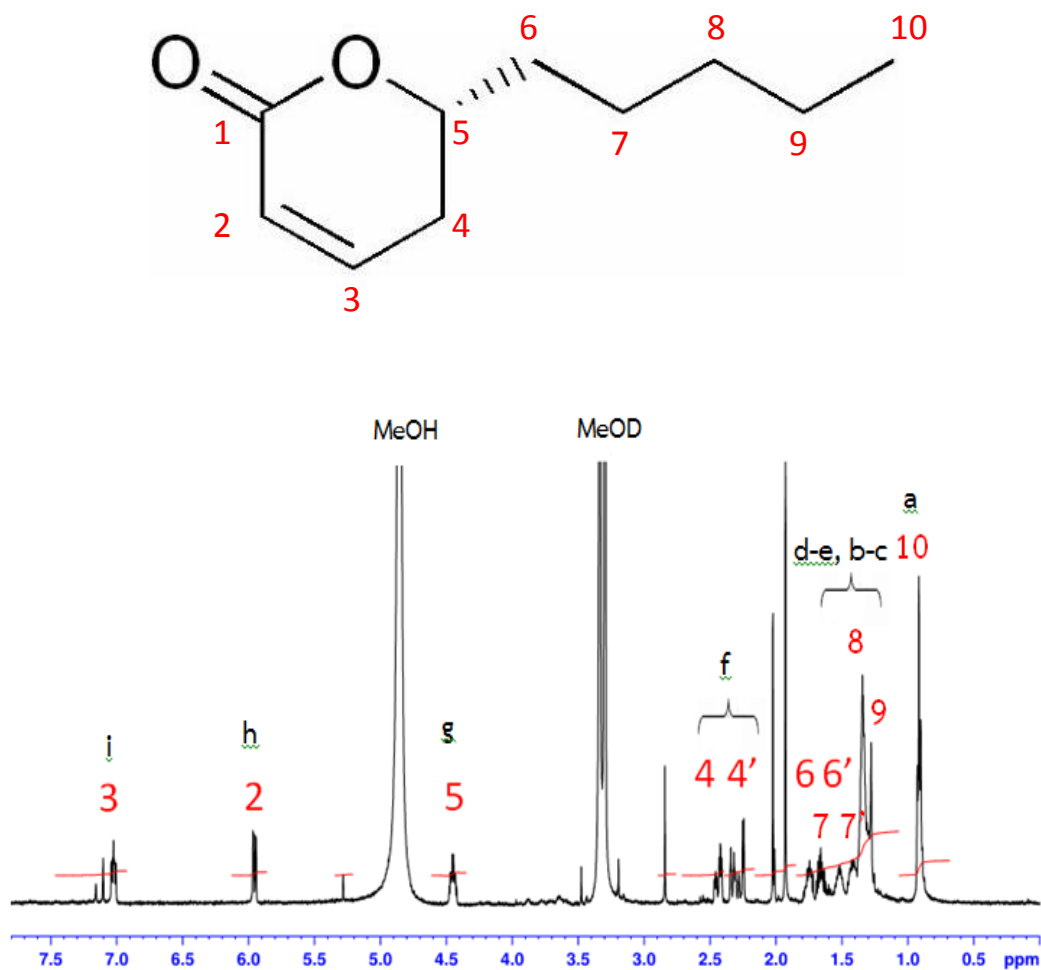


จากการศึกษาน้ำหนักมวลโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธีแมสสเปกโตรเมตรีและการวิเคราะห์โครงสร้างสารด้วย  $^1\text{H-NMR}$  สามารถระบุได้ว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 ซึ่งคือสาร 5-hydroxy-2-decenoic acid delta-lactone หรือ Massoia Lactone

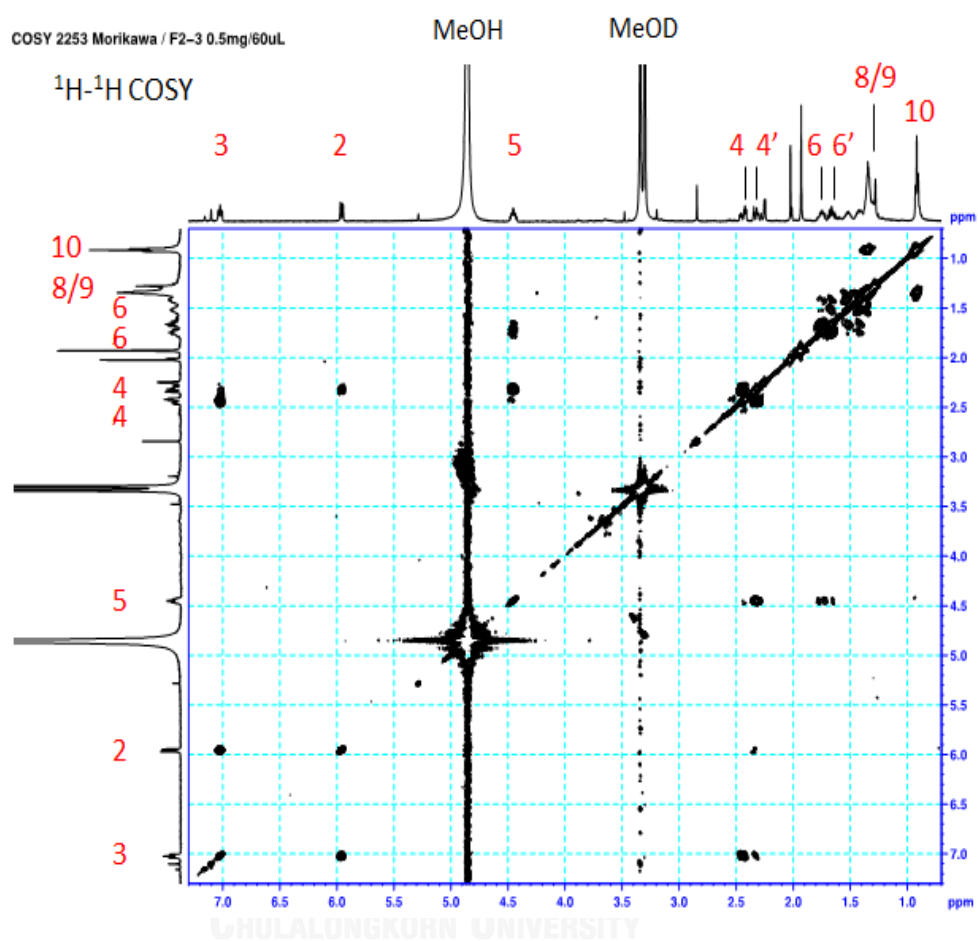
**ตารางที่ 21** ตำแหน่งสัญญาณโปรตอนจาก  $^1\text{H-NMR}$  จากสเปกตรัมของ Massoia Lactone ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* YTP6-14

สัญลักษณ์โปรตอน	ค่าเคมีเคิลชิฟท์ (ppm)
a	0.9
b-c, d-e	1.35-1.78
f	2.38-2.42
g	4.45
h	5.95
i	7.01





รูปที่ 41 โครงสร้างของโมเลกุลสาร Massoia lactone และ  $^1\text{H-NMR}$  สเปกตรัมของ Massoia lactone ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* YTP6-14



รูปที่ 42  $^1\text{H}$ -NMR แบบ 2 มิติ ของสเปกตรัมของ Massoia lactone ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans*  
YTP6-14

## บทที่ 5

### สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากโครงการศึกษาความหลากหลายของยีสต์บริเวณชายฝั่งเกาะสีชัง อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี ปี พ.ศ. 2554-2555 Thaniyavarn และคณะ (2013) แยกยีสต์ได้ทั้งหมด 246 ไอโซเลต จาก 41 ตัวอย่าง และนำ 50 ไอโซเลต มาพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธีอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล โดยศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA ในงานวิจัยนี้ นำยีสต์และราคล้ายยีสต์ 16 สายพันธุ์ที่เคยมีรายงานการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ มาทดสอบเพื่อคัดเลือกยีสต์และราคล้ายยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยทดสอบเบื้องต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YM ที่ปกคลุมด้วยน้ำมันดิบ (Morikawa และคณะ, 1993) และนำมาทดสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพระดับขวดเขย่าในอาหารเลี้ยงเหลวกำหนดสูตร (ธนัสถา เชียงอุทัย, 2549) พิจารณาประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จากค่าแรงตึงผิวและค่าการกระจายน้ำมันของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า ราคล้ายยีสต์สายพันธุ์ *A. pullulans* YTP6-14 ซึ่งแยกได้จากน้ำทะเล บริเวณหาดถ้ำพัง เกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี มีประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระดับขวดเขย่ามากที่สุด โดยลดค่าแรงตึงผิวในน้ำเลี้ยงเชื้อจาก 57.5 มิลลินิวตันต่อเมตร เหลือเท่ากับ  $38.4 \pm 0.40$  มิลลินิวตันต่อเมตร ซึ่งมีค่าผลต่างแรงตึงผิวเท่ากับ 33.22 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าการกระจายน้ำมันสูงสุด เท่ากับ  $5.10 \pm 0.63$  ตารางเซนติเมตร จากการคัดเลือกยีสต์สอดคล้องกับ Hamzah และคณะ, 2013 รายงานเกณฑ์ในการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยจะคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและลดค่าแรงตึงผิวในอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำกว่า 40 มิลลินิวตันต่อเมตร

การศึกษาความหลากหลายของยีสต์และราคล้ายยีสต์ที่แยกได้จากบริเวณชายฝั่งของเกาะสีชัง พบยีสต์สปีชีส์ที่ยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อนหรือยีสต์สปีชีส์ใหม่ 1 สายพันธุ์ ได้แก่ *Candida* sp. YTW5-4 ซึ่งคัดแยกได้จากน้ำทะเลบริเวณหาดท่าวัง เกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ของ *Candida* sp. YTW5-4 และลักษณะสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และลักษณะทางชีวเคมี สามารถจัดจำแนกยีสต์รหัส YTW5-4 เป็นสปีชีส์ใหม่ แต่ในระหว่างการเตรียมข้อมูลเพื่อจัดทำ manuscript เพื่อเสนอสปีชีส์ใหม่ พบว่า ยีสต์รหัส YTW5-4 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ ยีสต์รหัส IMT-Y-2365 100 เปอร์เซ็นต์ และยังมีตำแหน่งเดียวกันบนแผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการอีกด้วย จึงสรุปว่ายีสต์รหัส YTW5-4 และยีสต์รหัส IMT-Y-2365 เป็นสปีชีส์เดียวกัน และทราบจาก Dr. Gouri Shankar Prasad นักวิจัยจากประเทศอินเดีย ซึ่งเป็นผู้ศึกษา

ยีสต์รหัส IMT-Y-2365 ได้มีการจัดเตรียม manuscript เพื่ออธิบายยีสต์รหัส IMT-Y-2365 เป็นสปีชีส์ใหม่แล้ว จึงไม่ได้ทำการเสนอยีสต์รหัส YTW5-4 เป็นสปีชีส์ใหม่

การศึกษาหาค่าองค์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะในการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *A. pullulans* YTP6-14 พบว่า เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงปรับปรุงสูตร (Manitchotpisit และคณะ, 2011) ที่ประกอบด้วยอัตราส่วนระหว่างกลูโคส 2.5 เปอร์เซ็นต์ และกลีเซอรอล 2.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน เป็นแหล่งคาร์บอนเหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมากที่สุดในงานวิจัยนี้ ซึ่งการใช้แหล่งคาร์บอนผสมในการเลี้ยงเชื้อสอดคล้องกับงานวิจัยของ Bhardwaj และคณะ (2013b) รายงานว่า เมื่อใช้กลูโคสหรือน้ำมันพืชเพียงชนิดเดียวเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยยีสต์ *Torulopsis bombicala* จะผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้น้อยเมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนที่ผสมระหว่างกลูโคสและน้ำมันพืช Fontes และคณะ (2010) รายงานว่าองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของยีสต์ *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนคือ กลูโคส 4 เปอร์เซ็นต์ และ กลีเซอรอล 2 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยมีค่าผลต่างแรงตึงผิวเท่ากับ 19.5 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอลเป็นสารประกอบอินทรีย์สายสั้นๆ ที่มีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ดี ดังนั้นกลีเซอรอลจึงเป็นแหล่งคาร์บอนที่ง่ายต่อการนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานสำหรับการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Hamzah และคณะ, 2013)

สำหรับแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *A. pullulans* YTP6-14 คือ เปปโตเน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rocha และคณะ (2007) ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Pseudomonas aeruginosa* โดยใช้เนื้อมะม่วงหิมพานต์ (Cashew Apple Juice) เป็นแหล่งคาร์บอนและเปปโตเนเป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีส่งผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดในงานวิจัยนี้ คือ อัตราส่วน C:N เท่ากับ 300 โดยเป็นค่าที่ทำให้มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมากขึ้น สังเกตจากค่าการกระจายน้ำมันที่มากขึ้นกว่าเดิม 2.5 เท่า ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยหลายงานที่มีการรายงานว่า จุลินทรีย์จะมีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่มีการจำกัดปริมาณของไนโตรเจน (Gonzalez-Parraga และคณะ, 2011; Abouseoud และคณะ, 2008; Saimmai และคณะ, 2012)

การศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่าเมื่อเลี้ยง *A. pullulans* YTP6-14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อปรับปรุงสูตรที่เหมาะสม ที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 6.5 ซึ่งค่าพีเอชที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ สอดคล้องกับงานวิจัยของ

Manitchotpisit และคณะ (2011) เลี้ยง *A. pullulans* CU 43 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าพีเอชเริ่มต้น ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 6.5 ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *A. pullulans* YTP6-14 โดยเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อปรับปรุงสูตร ที่ค่าพีเอช เริ่มต้นเท่ากับ 6.5 พบว่า เมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ เท่ากับ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบ ต่อนาที เป็นระยะเวลา 7 วัน เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สุด โดยมีค่าการกระจายน้ำมันสูงสุด เท่ากับ  $43.34 \pm 2.5$  ตารางเซนติเมตร ค่าแรงตึงผิว เท่ากับ  $32 \pm 0.00$  มิลลินิวตันต่อเมตร และมีค่าผลต่างแรงตึงสูงสุด เท่ากับ 37 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อ ทำการศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะที่เหมาะสมแล้ว พบว่า *A. pullulans* YTP6-14 มีผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มมากขึ้น 6.422 เท่า จากอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดิมที่ยังไม่ได้ทำ การปรับปรุงสูตร โดยมีผลผลิตของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มขึ้นจาก 0.1962 กรัมต่อลิตร เป็น 1.26 กรัมต่อลิตร

การติดตามความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และ การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยเลี้ยง *A. pullulans* YTP6-14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อปรับปรุงสูตรที่ เหมาะสม พบว่า เชื้อมีการเจริญสูงสุดวันที่ 7 และจะมีการผลิตสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพตั้งแต่วัน แรกของการเจริญ โดยสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีที่สุดในวันที่ 7 เช่นกัน ซึ่งการผลิตสาร ลดแรงตึงผิวชีวภาพมีรูปแบบความสัมพันธ์กับการเจริญของเชื้อ (Growth associated production) มีค่าเท่ากับ 1.26 กรัมต่อลิตร โดยใช้วิธีการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากน้ำเลี้ยงเชื้อ ซึ่งสอดคล้อง กับงานวิจัยของ Manitchotpisit และคณะ, 2010 รายงานว่า *A. pullulans* หลายสายพันธุ์ เมื่อ เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด ลิโมซินได้ในช่วง 0.5-6 กรัมต่อลิตร โดยใช้วิธีการสกัดสารพร้อมเซลล์ Kim และคณะ, 2015 รายงานว่าเมื่อเพาะเลี้ยง *A. pullulans* L3-GPY ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GPY ที่มีกลูโคสเป็นแหล่ง คาร์บอน พบว่า สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดกลีเซอรอลลิโมซินซึ่งมีผลผลิตต่ำกว่า *A. pullulans* YTP6-14 มีค่าเท่ากับ 0.37 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้วิธีการสกัดสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อ และ นอกจากจะผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแล้ว *A. pullulans* YTP6-14 อาจจะมีการผลิตสารอื่นๆอีก ที่ยังไม่ได้ทำการศึกษา แต่เนื่องจากมีรายงานจำนวนมากเกี่ยวกับการผลิตสารพอลิแซคคาไรด์พุลลู แลนโดย *A. pullulans* (Chi และคณะ, 2009; Gaur และคณะ, 2010; Oliveria และคณะ, 2015) ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษารูปแบบการผลิตสารพอลิแซคคาไรด์พุลลูแลนจาก *A. pullulans* YTP6-14 โดยพบว่าเชื้อจะเริ่มผลิตสารพอลิแซคคาไรด์พุลลูแลนตั้งแต่วันแรกของการเจริญ และจะ เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วสูงสุดที่วันที่ 5 (5.036 กรัมต่อลิตร) ซึ่งการผลิตสารพอลิแซคคาไรด์พุลลูแลนของ *A. pullulans* YTP6-14 มีความสัมพันธ์กับการเจริญของเชื้อเช่นกัน

ลักษณะคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพขึ้นอยู่กับความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิว ค่า CMC และความเสถียรในการก่ออิมัลชัน โดยความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิวจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จากการทดลองหาค่าความเข้มข้นวิกฤตในการเกิดไมเซลล์ (CMC) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 พบว่า มีค่า CMC เท่ากับ 39 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีค่า  $\gamma$ CMC เท่ากับ 31.6 มิลลินิวตันต่อเมตร ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดอื่นๆ พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* YTP6-14 มีค่า CMC ต่ำกว่า เช่น *Candida antarctica* (35 มิลลินิวตันต่อเมตร) (Adamczak และ Bednarski, 2000), *Candida bombicola* (34.18 มิลลินิวตันต่อเมตร) (Daverey และ Pakshian, 2010) และเมื่อทำการเปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์พบว่ามีค่า CMC มีต่ำกว่า เช่น โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (1,004 มิลลิกรัมต่อลิตร) และไทรทอน เอ็กซ์ 100 (537 มิลลิกรัมต่อลิตร) (มาติกา อันแก้ว, 2553) โดยสารลดแรงตึงผิวที่มีประสิทธิภาพดีจะมีค่า CMC ต่ำ เนื่องจากใช้ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวน้อยในการลดค่าแรงตึงผิว (Silva และคณะ, 2010; Ranasalva และคณะ, 2014 )

การวัดค่าดัชนีการก่ออิมัลชัน (Emulsification Index) และศึกษาความเสถียรในการก่ออิมัลชัน (Emulsification stability) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* YTP6-14 ร่วมกับน้ำมันพืชชนิดต่างๆที่ใช้ประกอบอาหารและน้ำมันดีเคน พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถก่ออิมัลชันร่วมกับน้ำมันได้ทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบ ยกเว้น น้ำมันดีเคน (เฮกซะดีเคน และ เดคเคน) โดยน้ำมันรำข้าวมีเปอร์เซ็นต์การก่ออิมัลชันได้สูงสุด มีค่าเท่ากับ 62.98 เปอร์เซ็นต์ที่ 24 ชั่วโมงแรก สอดคล้องกับผลการทดลองของ Katemai และคณะ (2010) รายงานว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Issatchenkia orientalis* PO1.2 สามารถก่ออิมัลชันร่วมกับน้ำมันรำข้าวได้ดีที่สุด (71.67 เปอร์เซ็นต์) และจากการศึกษาความเสถียรของอิมัลชัน พบว่าน้ำมันพืชเกือบทุกชนิดมีความเสถียรของอิมัลชันมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำมันรำข้าวมีความเสถียรในการก่ออิมัลชันมากที่สุดมีค่าเท่ากับ 95.58 เปอร์เซ็นต์ ที่ 168 ชั่วโมง น้ำมันรำข้าวเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการสีข้าว ซึ่งน้ำมันรำข้าวใช้ในการประกอบอาหาร ทำน้ำสลัด (Charoen และคณะ, 2011) อุดมไปด้วยวิตามินอี โทโคฟีโนล โทโคไตรอินอล และยังประกอบด้วยสารแอนติออกซิแดนซ์ เช่น แกรมมา โอริซานอล (Hoed และคณะ, 2006) โดยในปัจจุบันนิยมนำน้ำมันรำข้าวมาทำเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูง เช่น ผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับทางด้านเภสัช ผลิตภัณฑ์อาหารเสริม และเครื่องสำอาง (Patel และ Naik, 2004) Bernardi และคณะ (2011) เตรียมนาโนอิมัลชันจากน้ำมันรำข้าวและนำมาประยุกต์ใช้ในการทำครีมทาผิว จากการศึกษาความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* YTP 6-14 ในภาวะต่างๆ พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถทนต่อความเข้มข้นเกลือ (1-12 เปอร์เซ็นต์) ค่าพีเอช (2-12) และอุณหภูมิ (4, 30, 60, 100 องศาเซลเซียส)ได้ นอกจากนี้ยังนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ไปทดสอบความเสถียรภายใต้สภาวะฆ่าเชื้อในหม้อนิ่งฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปาสคาล เป็นระยะเวลา 15 นาที พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถทนต่ออุณหภูมิสูง โดยยังคงมีประสิทธิของสารลดแรงตึงผิวไม่เปลี่ยนแปลง ดังนั้นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* YTP6-14 สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับงานทางด้านสิ่งแวดล้อม รวมทั้งอุตสาหกรรมได้หลากหลาย

การเตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยเทคนิค Analytical TLC พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถแยกเป็น 3 ลำดับส่วน ได้แก่ FI, FII และ FIII และมีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.93, 0.80 และ 0.66 ตามลำดับ จากนั้นเตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนให้ได้ปริมาณมากขึ้นด้วยเทคนิค preparative TLC พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถแยกเป็น 3 ลำดับส่วน ได้แก่ F1, F2 และ F3 และมีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.90, 0.77 และ 0.66 ตามลำดับ โดย F2 และ F3 มีค่าการกระจายน้ำมันสูง จึงเลือกมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค HPLC และพบว่า ตัวอย่างพิกที่ F2-3 และตัวอย่างพิกที่ F3-4 เป็นตำแหน่งพิกที่ให้ค่าการกระจายน้ำมันสูงสุด ซึ่งมีเวลาใกล้เคียงกัน คือ 11.211 และ 11.201 นาที ตามลำดับ ดังนั้นจึงทำการวิเคราะห์ตัวอย่างพิกที่ F 2-3 และ F 3-4 โดยนำทั้งสองตัวอย่างมาผสมกันและวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC อีกครั้ง พบว่าสารตัวอย่างทั้งสองชนิดออกมาที่เวลาเดียวกัน คือ 11.139 นาที สันนิษฐานว่าน่าจะเป็นสารชนิดเดียวกัน จึงได้คัดเลือกตัวอย่างพิกที่ F2-3 เนื่องจากมีค่าการกระจายน้ำมันสูงสุด และนำมาวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* YTP6-14 ด้วยวิธี FI-MS และ  $^1\text{H-NMR}$  แบบ 2 มิติ พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีน้ำหนักมวลโมเลกุลของสาร เท่ากับ 168 ( $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_2$ ) และพบว่า คือ สาร 5-hydroxy-2-decenoic acid delta-lactone หรือ Massoia lactone ซึ่งจากการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่าโครงสร้าง Massoia lactone ไม่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ แต่ให้ผลบวกในการทดสอบมอริส เป็นไปได้ว่ากรดซัลฟูริกทำปฏิกิริยากับหมู่คีโตนในโครงสร้างวงแลคโตน ทำให้เกิดเป็นสารที่เป็นอนุพันธ์เฟอร์ฟูรอล (Furfural) และเมื่อทำปฏิกิริยากับมอริส จึงทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีม่วง

สาร Massoia lactone ถูกพบครั้งแรกโดย Abe และคณะ ในปี 1993 โดยแยกได้จากเปลือกไม้ของต้น *Cryptocarya massoia* ประเทศปาปัวนิวกินี (New Guinea) ซึ่งมีรายงานว่ามีการนำ Massoia lactone มาประยุกต์ใช้เป็นยารักษาโรค นอกจากนี้ยังสามารถแยกสาร Massoia lactone ได้จากกากน้ำตาลจากอ้อย (cane molasses) และดอกมะลิ และพบว่าสาร Massoia lactone หลั่งออกมาจากมดในสกุล *Componotus* ที่พบในประเทศออสเตรเลีย (Gupta และคณะ, 2004)



Vesonder และคณะ (1979) พบสาร  $\delta$ -Lactone of 3,5-dihydroxydecanoic acid จากราสายพันธุ์ *Cephalosporium recifei* และเมื่อทำปฏิกิริยา dehydration ด้วยกรด *p*-tolulene-sulfonic จะได้สาร 5-hydroxy-2-decenoic acid delta-lactone ซึ่งเป็นโครงสร้างแลคโตนที่มี Unsaturated มีกลิ่นหอมคล้ายเนย ซึ่งสอดคล้องกับ Nago และคณะ (2014) ได้ทำการสังเคราะห์สาร Massoia lactone ด้วยปฏิกิริยาทางเคมี พบว่าได้สารที่มีกลิ่นหอมคล้ายกับกลิ่นของมะพร้าว โดยสันนิษฐานว่าสารที่มีรูปแบบโครงสร้างเป็นแลคโตน มักจะเป็นสารที่ให้กลิ่นหอมเนื่องจากมีพันธะคู่ที่ตำแหน่งแอลฟาของวงแลคโตน

ในงานวิจัยนี้ พบว่า *A. pullulans* YTP6-14 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อปรับปรุงสูตรที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งประกอบด้วยอัตราส่วนระหว่าง กลูโคส 2.5 เปอร์เซ็นต์ และกลีเซอรอล 2.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนและเปปโตเนนเป็นแหล่ง ไนโตรเจนที่อัตราส่วน C:N เท่ากับ 300 ค่าพีเอชเท่ากับ 6.5 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน ในระดับขวดเขย่า สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ 1.26 กรัมต่อลิตร ซึ่งจากการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* YTP6-14 มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 168 ซึ่งมีชื่อเรียกว่า 5-hydroxy-2-decenoic acid delta-lactone หรือ Massoia lactone และจากการศึกษาคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เช่น ค่า CMC HLB การก่ออิมัลชัน และความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในภาวะต่างๆ พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* YTP6-14 เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งจะสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการนำสาร Massoia lactone ไปประยุกต์ใช้ในงานด้านต่างๆต่อไป โดยพบว่าเป็นครั้งแรกที่มีการการศึกษาหาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและลักษณะสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* YTP6-14 และในงานวิจัยนี้ถือเป็นการรายงานครั้งแรกที่พบว่าสาร Massoia lactone หรือ 5-hydroxy-2-decenoic acid delta-lactone มีคุณสมบัติในการเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากราคัลลาเยีสต์

### ข้อเสนอแนะ

1. ควรเพิ่มผลผลิตของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้มีปริมาณที่สูงขึ้น เช่น เลี้ยงเชื้อในระดับถังหมัก พัฒนาสายพันธุ์ *A. pullulans* YTP6-14 ให้เป็นสายพันธุ์กลายที่มีการผลิตเพิ่มขึ้น
2. ศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่ราคาถูกลง เช่น นำของเหลือใช้ทางการเกษตร หรือผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนหรือไนโตรเจน เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ
3. มีรายงานว่าสาร Massoia lactone สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นยารักษาโรค ดังนั้นควรศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ของสาร Massoia lactone ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* YTP6-14 ต่อไป



## รายการอ้างอิง

- Abdel-Mawgoud, A. M., R. Hausmann, F. Le´pine, M. M. Meuller and E. De´ziel (2011). "Rhamnolipids: Detection, Analysis, Biosynthesis, Genetic Regulation, and Bioengineering of Production." Microbiology Monographs 20: 13-55.
- Abdel-Mawgoud, A. M., F. Lepine and E. Deziel (2010). "Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles." Applied Microbiology and Biotechnology 86(5): 1323–1336.
- Abouseoud, M., R. Maachi, A. Amrane, S. Boudergua and A. Nabi (2008). "Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*." Desalination 223: 143-151.
- Adamczak, M. and W. Bednarski (2000). "Influence of medium composition and aeration on the synthesis of biosurfactants produced by *Candida antarctica*." Biotechnology Letters 3(2): 313-316.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. J. Lipman (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." Nucleic Acids Research 25(17): 3389-3402.
- Amaral, P. F., M. Lehocky, A. M. Barros-Timmons, M. H. Rocha-Leao, M. A. Coelho and J. A. Coutinho (2006). "Cell surface characterization of *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682." Yeast 23(12): 867-877.
- Amaral, P. F. F., M. A. Z. Coelho, I. M. Marrucho and J. A. P. Coutinho (2008). "Biosurfactants from Yeasts: Characteristics, Production and Application." Landes Bioscience: 236-247.
- Aparna, A., G. Srinikethan and S. Hegde (2011). "Effect of Addition of Biosurfactant Produced by *Pseudomonas* sps. on biodegradation of crude oil." International Conference on Environmental Science and Technology 6: 71-75.
- Arutchelvi, J. and M. Doble (2011). "Mannosylerythritol Lipids: Microbial Production and Their Applications." Microbiology Monographs 20: 145-177.

- Arutchelvi, J. I., S. Bhaduri, P. V. Uppara and M. Doble (2008). "Mannosylerythritol lipids: a review." Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 35(12): 1559–1570.
- Auhim, H. S. and A. I. Mohamed (2013). "Effect of Different Environmental and Nutritional Factors on Biosurfactant Production from *Azotobacter chroococcum*." International Journal of advances in Pharmacy, Biology and Chemistry 2(3): 477-481.
- Banat, I. M., A. Franzetti, I. Gandolfi, G. Bestetti, M. G. Martinotti, L. Fracchia, T. J. Smyth and R. Marchant (2010). "Microbial biosurfactants production, applications and future potential." Applied Microbiology and Biotechnology 87(2): 427-444.
- Banat, I. M., R. S. Makkar and S. S. Cameotra (2000). "Potential commercial applications of microbial surfactants." Applied Microbiology and Biotechnology 53: 495-508.
- 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(1): 15-18.
- Bekatorou, A., C. Psarianos and A. A. Koutinas (2006). "Production of Food Grade Yeasts." Food Technology and Biotechnology 44(5): 407-415.
- Bernardi, D. S., T. A. Pereira, N. R. Maciel, J. Bortoloto, G. S. Viera, G. C. Oliveira and P. A. Rocha-Filho (2011). "Formation and stability of oil-in-water nanoemulsions containing rice bran oil: in vitro and in vivo assessments." Journal of Nanobiotechnology 9: 44-52.
- Bhardwaj, G., S. S. Cameotra and H. K. Chopra (2013). "Biosurfactants from Fungi: A Review." Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology 4(6): 1-6.
- Bhardwaj, G., S. S. Cameotra and H. K. Chopra (2013). "Utilization of oleo-chemical industry by-products for biosurfactant production." AMB Express 3(68): 1-5.
- Burgos-Diaz, C., N. Pique, A. Manresa and A. M. Marques (2012). "Advances in the research of new biosurfactants and their potential use in the biomedical and pharmaceutical industry." Recent Advances in Pharmaceutical Sciences II 2: 151-167.

- Burgos-Díaz, C., N. Piqué, A. Manresa and A. M. Marqués (2012). "Advances in the research of new biosurfactants and their potential use in the biomedical and pharmaceutical industry." Recent Advances in Pharmaceutical Sciences II: 151-167.
- Bustamante, M., N. Durán and M. C. Diez (2012). "Biosurfactants are useful tools for the bioremediation of contaminated soil: a review." Journal of Soil Science and Plant Nutrition 12(4): 667-687.
- Charoen, R., A. Jangchud, K. Jangchud, T. Harnsilawat, O. Naivikul and D. J. McClements (2011). "Influence of biopolymer emulsifier type on formation and stability of rice bran oil-in-water emulsions: whey protein, gum arabic, and modified starch." Journal of Food Sciences 76(1): 165-172.
- Chen, J., X. Song, H. Zhang, Y. B. Qu and J. Y. Miao (2006). "Sophorolipid produced from the new yeast strain *Wickerhamiella domercqiae* induces apoptosis in H7402 human liver cancer cells." Applied Microbiology and Biotechnology 72(1): 52-59.
- Chen, Y. S., F. Yanagida and L. Y. Chen (2009). "Isolation of marine yeasts from coastal waters of northeastern Taiwan." Aquatic Biology 8: 55-60.
- Chi, Z., F. Wang, Z. Chi, L. Yue, G. Liu and T. Zhang (2009). "Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast." Appl Microbiol Biotechnol 82(5): 793-804.
- Chi, Z. M., G. Liu, S. Zhao, J. Li and Y. Peng (2010). "Marine yeasts as biocontrol agents and producers of bio-products." Applied Microbiology and Biotechnology 86(5): 1227-12241.
- Chooklin, C. S., S. Phertmean, B. Cheirsilp, S. Maneerat and A. Saimmai (2013). "Utilization of palm oil mill effluent as a novel and promising substrate for biosurfactant production by *Nevskia ramosa* NA3." Songklanakarin Journal of Science and Technology 35: 167-176.
- Cirigliano, M. C. and G. M. Carman (1984). "Isolation of a Bioemulsifier from *Candida lipolytica*." Applied and Environmental Microbiology 48(4): 747-750.
- Cooper, D. G. and A. Paddockd (1984). "Production of a Biosurfactant from *Torulopsis bombicola*" Applied and eEnvironmental Microbiology 47: 173-176.

- Das, P., S. Mukherjee, C. Sivapathasekara and R. Sen (2010). "Microbial Surfactants of Marine Origin: Potentials and Prospects." Advances in Experimental Medicine and Biology 672: 88-101.
- Daverey, A. and K. Pakshirajan (2010). "Sopporolipids from *Candida bombicola* using mixed hydrophilic substrates: production, purification and characterization." Colloids Surf B Biointerfaces 79(1): 246-253.
- Daverey, A. and K. Pakshirajan (2010). "Sopporolipids from *Candida bombicola* using mixed hydrophilic substrates: production, purification and characterization." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 79(1): 246-253.
- de Cassia, F. S. S. R., D. G. Almeida, R. D. Rufino, J. M. Luna, V. A. Santos and L. A. Sarubbo (2014). "Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills." Internation of Journal Molecular Sciences 15(7): 12523-12542.
- de Sousa, M., I. T. Dantas, A. K. F. Nogueira, H. B. de Sant'Ana, V. M. Maciel Melo and L. R. B. Gonçalves (2014). "Crude Glycerol from Biodiesel Industry as Substrate for Biosurfactant Production by *Bacillus subtilis* ATCC." Bazilian Archives of Biology and Technology 57(2): 295-301.
- Deleu, M. and M. Paquot (2004). "From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants." Comptes Rendus Chimie 7(6-7): 641-646.
- Desai, J. D. and I. M. Banat (1997). "Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential." Microbiology and Moleccular Biology Reviews. 61(1): 47-64.
- Diab, A. and S. G. El Din (2013). "Application of the biosurfactants produced by *Bacillus* spp. (SH 20 and SH 26) and *Pseudomonas aeruginosa* SH 29 isolated from the rhizosphere soil of an Egyptian salt marsh plant for the cleaning of oil - contaminataed vessels and enhancing the biodegradation of oily sludge." African Journal of Environmental Science and Technology 7: 671-679.

- Doshida, J., H. Hasegawa and H. Onuki (1996). "Exophilin A, a New Antibiotic from a Marine Microorganism *Exophiala pisciphila*." The Journal of antibiotics 49(11): 1105-1109.
- Dumont, M.-J. and S. S. Narine (2007). "Soapstock and deodorizer distillates from North American vegetable oils: Review on their characterization, extraction and utilization." Food Research International 40(8): 957-974.
- Felsenstein, J. (1985). "Phylogenies and the Comparative Method." The American Naturalist 1: 1-15.
- Fernandes, P. A. V., I. R. d. Arruda, A. F. A. B. dos Santos, A. A. de Araújo, A. M. Souto Maior and E. A. Ximenes (2007). "Antimicrobial activity of surfactant production by *Bacillus subtilis* R14 against multidrug-resistant bacteria" Brazilian Journal of Microbiology 38: 704-709.
- Fontes, G. C., P. F. F. Amaral, M. Nele and M. A. Z. Coelho (2010). "Factorial design to optimize biosurfactant production by *Yarrowia lipolytica*." Journal of Biomedicine and Biotechnology 2010.
- Fracchia, L., M. Cavallo, G. Allegrone and G. Martinotti (2010). "A Lactobacillus-derived biosurfactant inhibits biofilm formation of human pathogenic *Candida albicans* biofilm producers." Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology: 827-836.
- Fracchia, L., M. Cavallo, M. G. Martinotti and I. M. Banat (2012a). "Biosurfactants and bioemulsifiers biomedical and related applications present status and future potentials." Biomedical Science, Engineering and Technology 325-370.
- Fracchia, L., M. G. Martiotti and I. M. Banat (2012b). "Biosurfactants and Bioemulsifiers Biomedical and Related Applications-Present Status and Future Potentials." Biomedical Science, Engineering and Technology 1: 326-370.
- Franzetti, A., I. Gandolfi, G. Bestetti, T. J. P. Smyth and I. M. Banat (2010). "Production and application of Trehalose lipid biosurfactant." European Journal of Lipid Science and Technology(1-27).
- Friedman, J. M. (2002). "The Function of Leptin in Nutrition, Weight, and Physiology." Nutrition Review 60: 1-14.

- Gadanh, M., J. M. Almeida and J. P. Sampaio (2013). "Assessment of yeast diversity in a marine environment in the south of Portugal by microsatellite-primed PCR." Antonie van Leeuwenhoek 84: 217-227.
- Gakpe, E., P. K. S. M. Rahman and A. A. M. Hatha (2007). "Microbial Biosurfactants – Review." Journal of Marine and Atmospheric Research 3(2): 1-17.
- Gaur, R., R. Singh, M. Gupta and G. Kumar (2010). "Aureobasidium pullulans, an economically important polymorphic yeast with special reference to pullulan." African Journal of Biotechnology 9(47): 7987-7997.
- Gautam, K. K. and V. K. Tyagi (2006). "Microbial surfactant: A review." Journal of Oleo Science 55(4): 155-166.
- Gniewosz, M. and A. Synowiec (2011). "Antibacterial activity of pullulan films containing thymol." Flavour and Fragrance Journal 26(6): 389-395.
- Gong, G., Z. Z., H. Chen, C. Yuan, P. Wang, L. Yao and Y. Z. (2009). "Enhanced Production of Surfactin by Bacillus subtilis E8 Mutant Obtained by Ion Beam Implantation." Food Technology and Biotechnology 47(1): 27–31.
- González-Párraga, P., A. Cuesta, J. Meseguer and M. A. Esteban (2011). "Marine microorganisms: the world also changes." Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances 11: 1281 – 1292.
- Gorin, P. A. J., J. F. T. Spencer and A. P. Tulloch (1961). "Hydroxy fatty acid glycosides of sophorose from *Torulopsis manoliae*." The Canadian Journal of Chemical Engineering 39: 846-855.
- Gudina, E. J., V. Rangarajan, R. Sen and L. R. Rodrigues (2013). "Potential therapeutic applications of biosurfactants." Trends Pharmacological Sciences 34(12): 667-675.
- Gudiña, E. J., J. A. Teixeira and L. R. Rodrigues (2011). "Biosurfactant-Producing Lactobacilli: Screening, Production Profiles, and Effect of Medium Composition." Applied and Environmental Soil Science 2011: 1-9.
- Hamzah, A., N. Sabturani and S. Radiman (2013). "Screening and Optimization of Biosurfactant Production by the Hydrocarbon-degrading Bacteria." Sains Malaysiana 42(5): 615-623.



- Hamzah, A., N. Sabturani and S. Radiman (2013). "Screening and Optimization of Biosurfactant Production by the Hydrocarbon-degrading Bacteria." Sains Malaysiana 42(5): 615–623.
- Hirata, Y., M. Ryu, Y. Oda, K. Igarashi, A. Nagatsuka, T. Furuta and M. Sugiura (2009). "Novel characteristics of sophorolipids, yeast glycolipid biosurfactants, as biodegradable low-foaming surfactants." Journal of Bioscience and Bioengineering 108(2): 142-146.
- Hoed, V. V., G. Depaemelaere, J. V. Ayala, P. Santiwattana, R. Verhe and W. D. Greyl (2006). "Influence of Chemical Refining on the Major and Minor Components of Rice Bran Oil." Journal of the American oil chemists Society 83(4): 315-321.
- Irfan-Maqsood, M. and M. Seddiq-Shams (2014). "Rhamnolipids: Well-Characterized Glycolipids with Potential Broad Applicability as Biosurfactants." Industrial Biotechnology 10(4): 285-291.
- Jacques, P. (2011). "Surfactin and Other Lipopeptides from *Bacillus* spp." Biosurfactant from Genes for Applications 20: 57-91.
- Jindamorakot, S. (2006). The species diversity of yeasts in some natural habitats of Thailand. Master thesis, Microbiology program, Kasetsart University, Bangkok.
- Johnson, V., M. Singh and V. S. Saini (1992). "Bioemulsifier Production by an Oleaginous Yeast *Rhodotorula lutinis* IIP-30." Biotechnology Letters 14(6): 487-490.
- Kaloorazi, N. A. and F. S. Choobari (2013). "Biosurfactant: Properties and Application." Journal of Biology and today's world 2: 235-241.
- Kapadia Sanket, G. and B. N. Yagnik (2013). "Current Trend and Potential for Microbial Biosurfactants." Asian Journal of Experimental Biological Sciences 4: 1-8.
- Kappeli, O. and W. R. Finnerty (1979). "Partition of Alkane by an Extracellular Vesicle Derived from Hexadecane-Grown *Acinetobacter*." Journal of Bacteriology 140(2): 707-712.
- Katamai, W., S. Kaewsuksai and L. Yaen (2010). "Isolation of Waste Lubricating Oil-degrading Microorganisms." Journal of Thaksin 12: 202-213.

- Kim, H. S., J. W. Jeon, B. H. Kim, C. Y. Ahn, H. M. Oh and B. D. Yoon (2006). "Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, by *Candida* sp. SY16 using fed-batch fermentation." Applied and Environmental Soil Science 70(4): 391-396.
- Kim, H. S., J. W. Jeon, S. B. Kim, H. M. Oh, T. J. Kwon and B. D. Yoon (2002). "Surface and physico-chemical properties of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, from *Candida antarctica*." Biotechnology Letters 24: 1637-1641.
- Kim, J. S., I. K. Lee and B. S. Yun (2015). "A novel biosurfactant produced by *Aureobasidium pullulans* L3-GPY from a tiger lily wild flower, *Lilium lancifolium* Thunb." PLoS One 10(4): 1-12.
- Kitamoto, D., H. Isoda and T. Nakahara (2002). "Functions and Potential Applications of Glycolipid Biosurfactants- from Energy-Saving Materials to Gene Delivery Carriers." Journal of Bioscience and Bioengineering 94(3): 187-2002.
- Klosowska-Chomiczewska, I. E., K. Medrzycka and E. Karpenko (2010). "Biosurfactants- biodegradability, toxicity, efficiency in comparison with synthetic surfactants."
- Kumar, A. and B. N. Johri (2012). "Antimicrobial Lipopeptides of *Bacillus* : Natural Weapons for Biocontrol of Plant Pathogens." Microorganisms in Sustainable Agriculture and Biotechnology: 91-111.
- Kurtzman, C. P. and C. J. Robnett (1998). "Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences." Antonie van Leeuwenhoek 73: 331-371.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W., and Boekhout, T. (2011). *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 5th ed. Vol.2 Elsevier, Amsterdam.
- Kutty, S. N. and R. Philip (2008). "Marine yeasts-a review." Yeast 25(7): 465-483.
- Kutty, S. N., R. Philip and R. Damodaran (2013). "Marine yeasts in the slope sediments of Arabian sea and bay of Bengal." European Journal of Experimental Biology 3(3): 311-327.
- Larkin, M. A., G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson

- and D. G. Higgins (2007). "Clustal W and Clustal X version 2.0." Bioinformatics 23(21): 2947-2948.
- Lawrence, M. J. and G. D. Reesb (2000). "Microemulsion-based media as novel drug delivery systems " Advanced Drug Delivery Reviews 45: 89–121.
- Liu, J., Z. Liu, Z. Chi, L. Zhang and D. Zhang (2009). "Intraspecific diversity of *Aureobasidium pullulans* strains from different marine environments." Journal of Ocean University of China 8(3): 241-246.
- Lourith, N. and M. Kanlayavattanakul (2009). "Natural surfactants used in cosmetics: glycolipids." International of Journal Cosmetic Sciences 31(4): 255-261.
- Madaan, V., A. chanana, M. K. Kataria and A. Bilandi (2014). "Emulsion Technology and Recent Trends in Emulsion Applications." International Research Journal of Pharmacy 5(7): 533-542.
- Maier, R. M. and G. Soberon-chavez (2000). "*Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids biosynthesis and potential " Applied and Environmental Microbiology 54: 625-633.
- Makkar, R. S. and S. S. Cameotra (2002). "An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications." Applied and Environmental Microbiology 58(4): 428-434.
- Makkar, R. S., S. S. Cameotra and I. M. Banat (2011). "Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production." AMB Express 1(5).
- Maneerat, S. (2005). "Biosurfactants from marine microorganisms." Songklanakarin Journal of Science and Technology 27(6): 1263-1272.
- Mani, A., S. S. Hameed, S. Ramlingam and R. Kaliamoorthi (2011). "Effect of rhamnolipid potential on biodegradation of endosulfan by *Pseudomonas aeruginosa* in batch studies." Journal of Bioscience and Technology 2: 268-278.
- Manitchotpisit, P., N. P. J. Price, T. D. Leathers and H. Punnapayak (2011). "Heavy oils produced by *Aureobasidium pullulans*." Biotechnology Letters 33(6): 1151-1157.
- Maqsood, M. I. and A. Jamal (2011). "Factors affecting the rhamnolipid biosurfactant production." Pakistan Journal of Biotechnology 8(8): 1-5.

- Marvasi, M., P. T. Visscher and L. Casillas Martinez (2010). "Exopolymeric substances (EPS) from *Bacillus subtilis*: polymers and genes encoding their synthesis." FEMS Microbiol Lett 313(1): 1-9.
- Mata-Sandoval, J. C., J. Karns and A. Torrents (2001). "Effect of nutritional and environmental conditions on the production and composition of rhamnolipids by *P. aeruginosa* UG2." Microbiological Research 155(4): 249-256.
- Mireles, J. R., A. Toguchi and R. M. Harshey (2001). "Salmonella enterica serovar typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation." Jornal of Bacteriology 183(20): 5848-5854.
- Morikawa, M., H. Daido, T. Takao, S. Murata, Y. Shimonishi and T. Imanka (1993). "A New Lipopeptide Biosurfactant Produced by *Arthrobacter* sp. Strain MIS38." Journal of Bacteriology 175(20): 6459-6466.
- Morikawa, M., Y. Hirata and T. Imanka (2000). "A study on the structure function relationship of lipopeptide biosurfactants." Biochimica et Biophysica Acta 1488: 211-218.
- Mulligan, C. N. (2005). "Environmental applications for biosurfactants." Environmetal Pollutant 133(2): 183-198.
- Mulligan, C. N. (2009). "Recent advances in the environmental applications of biosurfactants." Current Opinion in Colloid & Interface Science 14(5): 372-378.
- Mulligan, C. N. and B. F. Gibbs (2004). "Type, production and applications of biosurfactants " Proceedings of the National Academy of Sciences 1(70): 31-55.
- Mulligan, C. N., R. Yong, N. and B. F. Gibbs (2001). "Heavy metal removal from sediments by biosurfactants." Journal of Hazardous Material 85: 111-125.
- Muthusamy, K., S. Gopalakrishnan, T. Kochupappy Ravi and P. Sivachidambaram (2008). "Biosurfactants: Properties, commercial production and application." Current science 94(6): 736-747.

- Nago, H., M. Matsumoto and S. Nakai (2014). "2-Deceno- $\delta$ -lactone-producing Fungi, Strains of *Fusarium solani*, Isolated by Using a Medium Containing Decano- $\delta$ -lactone as the Sole Carbon Source." Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 57(12): 2107-2110.
- Nitschke, M. and S. G. V. A. O. Costa (2007). "Biosurfactants in food industry." Trends in Food Science & Technology 18(5): 252-259.
- Okoliegbe, I. N. and O. O. Agarry (2012). "Application of microbial surfactant (a review)." Scholarly Journals of Biotechnology 1(1): 15-23.
- Oliveira, J. D., L. M. A. Lopesb, F. D. Pimentac and E. F. C. Servulod (2015). "Low Cost Production of Pullulan Obtained From Granulated Sugar and Different Nitrogen Sources." International Journal of Engineering & Technology 15(1): 11-18.
- Olivera, N. L., M. G. Commendatore, O. Delgado and J. L. Esteves (2003). "Microbial characterization and hydrocarbon biodegradation potential of natural bilge waste microflora." Journal of Industrial Microbiology Biotechnology 30(9): 542-548.
- Pacwa-Plociniczak, M., G. A. Plaza, Z. Piotrowska-Seget and S. S. Cameotra (2011). "Environmental applications of biosurfactants: recent advances." International of Jounar Molecular Sciences 12(1): 633-654.
- Pal, M. P., B. K. Vaidya, K. M. Desai, R. M. Joshi, S. N. Nene and B. D. Kulkarni (2009). "Media optimization for biosurfactant production by *Rhodococcus erythropolis* MTCC 2794: artificial intelligence versus a statistical approach." Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 36(5): 747-756.
- Panesar, R., P. S. Panesar and M. B. Bera (2011). "Development of low cost Medium for the production of biosurfactant." Asian Journal of Biotechnology.
- Patel, M. and S. N. Naik (2004). "Gamma-oryzanal from rice bran oil-A review." Journal of Scientific & Industrial Research 63: 569-578.
- Pathak, K. V., H. Keharia, K. Gupta, S. S. Thakur and P. Balaram (2012). "Lipopeptides from the banyan endophyte, *Bacillus subtilis* K1: mass spectrometric

- characterization of a library of fengycins." Journal of American Society for Mass Spectrometry 23(10): 1716-1728.
- Peng, F., Z. Liu, L. Wang and Z. Shao (2007). "An oil-degrading bacterium: *Rhodococcus erythropolis* strain 3C-9 and its biosurfactants." Journal of Applied Microbiology 102(6): 1603-1611.
- Perfumo, A., I. Rancich and I. M. Banat (2008). "Possibilities and challenges for biosurfactants uses in petroleum industry." Landes Bioscience 1: 1-11.
- Plaza, G. A., J. Chojniak and I. M. Banat (2014). "Biosurfactant mediated biosynthesis of selected metallic nanoparticles." International of Journal Molecular Sciences 15(8): 13720-13737.
- Pornsunthorntawe, O., S. Maksung, O. Huayyai, R. Rujiravanit and S. Chavadej (2009). "Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 using sequencing batch reactors: effects of oil loading rate and cycle time." Bioresource Technology 100(2): 812--818.
- Price, N. P., P. Manitchotpisit, K. E. Vermillion, M. J. Bowman and T. D. Leathers (2013). "Structural characterization of novel extracellular liamocins (mannitol oils) produced by *Aureobasidium pullulans* strain NRRL 50380." Carbohydrate Research 370: 24-32.
- Raaijmakers, J. M., I. De Bruijn, O. Nybroe and M. Ongena (2010). "Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics." FEMS Microbioloy Reviews 34(6): 1037-1062.
- Rahman, P. K. S. M. and E. Gakpe (2008). "Production, Characterisation and Applications of Biosurfactants-Review." Biotechnology(Faisalabad) 7(2): 360-370.
- Ranasalva, N., R. Sunil and G. Poovarasana (2014). "Importance of Biosurfactant in Food Industry." Journal of Agriculture and Veterinary Science 7(5): 6-9.
- Rocha, M. V. P., M. C. M. Souza, S. C. L. Benedicto, M. S. Bezerra, G. R. Macedo, G. A. S. Pinto and L. R. B. Goncalves (2007). "Production of Biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* Grown on Cashew Apple Juice." Applied Biochemistry and Biotechnology 136-140: 186-194.

- Rodrigues, L., I. M. Banat, J. Teixeira and R. Oliveira (2006). "Biosurfactants: potential applications in medicine." Journal of Antimicrobial Chemotherapy 57(4): 609-618.
- Rosenberg, E. and E. Z. Ron (1999). "High- and low-molecular-mass microbial surfactants." Applied and Environmental Microbiology 52: 154-162.
- Sachdev, D. P. and S. S. Cameotra (2013). "Biosurfactants in agriculture." Applied and Environmental Microbiology 97(3): 1005-1016.
- Saharan, B. B., R. K. Sahu and D. Sharma (2011). "Review on Biosurfactants: Fermentation, Current Developments and Perspectives." Genetic Engineering and Biotechnology Journal 7.
- Saimmai, A., O. Rukadee, V. Sobhon and M. Suppasil (2012). "Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* TD4 and *Pseudomonas aeruginosa* SU7 grown on crude glycerol obtained from biodiesel production plant as sole carbon source " Journal of Scientific & Industrial Research 71: 396-406.
- Saitou, N. and M. Nei (1987). "The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees." Molecular Biology and Evolution 4(4): 406-425.
- Salihu, A., I. Abdulkadir and M. N. Almustapha (2009). "An investigation for potential development on biosurfactants." Biotechnology and Molecular Biology Review 3(5): 111-117.
- Sambanthamoorthy, K., X. Feng, R. Patel, S. Patel and C. Parnavitana (2014). "Antimicrobial and antibiofilm potential of biosurfactants isolated from lactobacilli against multi-drug-resistant pathogens." BMC Microbiology 14: 1-9.
- Sarubbo, L. A., C. B. Farias and G. M. Campos-Takaki (2007). "Co-utilization of canola oil and glucose on the production of a surfactant by *Candida lipolytica*." Current Microbiology 54(1): 68-73.
- Satpute, S. K., A. G. Banpurkar, P. K. Dhakephalkar, I. M. Banat and B. A. Chopade (2010). "Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review." Critical Review Biotechnology 30(2): 127-144.

- Sekhon Randhawa, K. K. and P. K. Rahman (2014). "Rhamnolipid biosurfactants-past, present, and future scenario of global market." Frontier Microbiology 5: 454-460.
- Shete, M. A., G. Wadhana, I. M. Banat and B. A. Chopade (2006). "Mapping of patents on bioemulsifier and biosurfactant: A review." Journal of Scientific & Industrial Research 65: 91-115.
- Shoeb, E., F. Akhlaq, U. Badar, J. Akhter and S. Imtiaz (2013). "Classification and Industrial applications of biosurfactants." Natural and Applied Sciences 4(3): 243- 252.
- Silva, S. N., C. B. Farias, R. D. Rufino, J. M. Luna and L. A. Sarubbo (2010). "Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 79(1): 174-183.
- Singh, V. (2012). "Biosurfactant – Isolation, Production, Purification & Significance." International Journal of Scientific and Research Publications 2(7): 1-4.
- Sobrinho, H. B. S., R. D. Rufino, J. M. Luna, A. A. Salgueiro, G. M. Campos-Takaki, L. F. C. Leite and L. A. Sarubbo (2008). "Utilization of two agroindustrial by-products for the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995." Process Biochemistry 43(9): 912-917.
- Somboonna, N., A. Assawamakin, A. Wilantho, S. Tangphatsornruang and S. Tongsimma (2012). "Metagenomic profiles of free-living archaea, bacteria and small eukaryotes in coastal areas of Sichang island, Thailand." BMC Genomics 13 (7): S29.
- Tadros, T. F. (2009). "Emulsion Science and Technology: A General Introduction." wiley-vch verlag gmbh & co. kga 1: 1-56.
- Takahashi, M., T. Morita, K. Wada, N. Hirose., T. Fukuoka, Mura. T. and D. Kitamoto (2011). "Production of Sophololipid Glycolipid Biosurfactants from Sugarcane molasses using *Starmerella bombicola* NBRC 10243." Journal of Oleo Science 60(5): 267-273.
- Thaniyavarn, J., S. Jindamorakot, S. Am-in, S. Luepongpatana, T. Yoochang, J. Poomtein, S. Niyomrit, S. Limtong and S. Thaniyavarn (2013). "Yeast biodiversity in the coastal area of Koh Si Chang and their potential as



- biosurfactant producers." The 25th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference: 281-290.
- Thavasi, R. (2011). "Microbial biosurfactants: from an environmental application point of view." Journal of Bioremediation & Biodegradation 2(5): 672-679.
- Van Bogaert, I., S. Fleurackers, S. Van Kerrebroeck, D. Develter and W. Soetaert (2011). "Production of new-to-nature sophorolipids by cultivating the yeast *Candida bombicola* on unconventional hydrophobic substrates." Biotechnology Bioengineering 108(4): 734-741.
- Van Bogaert, I. N., K. Saerens, C. De Muynck, D. Develter, W. Soetaert and E. J. Vandamme (2007). "Microbial production and application of sophorolipids." Applied and Environmental Microbiology 76(1): 23-34.
- Van Bogaert, I. N. A. and W. Soetaert (2011). "Sophorolipid." Springer-Verlag Berlin Heidelberg 20: 179-210.
- Vesonder, R. F., F. H. Stodola and W. K. Rohwedder (1979). "Formation of the Lactane of 3,5-Dihydroxydecanoic Acid by the fungus *Cephalosporium recifei*" Canadian Journal of Biochemistry 5.
- Vollbrecht, E., U. Rau and L. S (1999). "Microbial conversion of vegetable oils into surface-active di-, tri-, and tetrasaccharide lipids (biosurfactants) by the bacterial strain *Tsukamurella spec.*" Fett/Lipid Journal 101: 389-394.
- Wattayakorn, G. and C. Boonpern (2014). "Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediment of Koh Dichang anchorage area in thailand." European Chemical Bulletin 3: 70-75.
- Wattayakorn, G. and S. Rungsapa (2012). "Petroleum hydrocarbon residus in the marine environment of Koh Sichang-Sriracha, Thailand." Coastal Marine Science 35: 122-128.
- Yan, K., Y. Zhang and Z. Chi (2010). "Distribution and diversity of *Candida tropicalis* strains in different marine environments." Journal of Ocean University of China 9(2): 139-144.
- Youssef, N. H., K. E. Duncan and M. J. McInerney (2005). "Importance of 3-Hydroxy Fatty Acid Composition of Lipopeptides for Biosurfactant Activity." Applied and Environmental Microbiology 71(12): 7690-7695.

Zhang, L., Z. Peng and S. Wang (2014). "The Effect of Different Brine to Electric Properties of Heavy Oil Emulsion by HLB Scan." Open Access Library Journal 1(2): 1-9.

ณัฐารัตน์ ปภาวสิทธิ์, 2546 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงระบบนิเวศแนวปะการัง เกาะสีซัง จังหวัดชลบุรี. สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
 ธนัสถา เชียงอุทัย. 2549. การผลิตและลักษณะสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากยีสต์ที่คัดเลือกได้. ใน จุลชีววิทยา. บัณฑิตวิทยาลัย: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ปิยา รพีธรรม. 2553. การศึกษาเปรียบเทียบขยะและสารอินทรีย์ในระบบนิเวศหาดทรายชายฝั่งทะเล เกาะสีซัง จังหวัดชลบุรี. สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภัทรกุล ศรีสุข, 2548. การประเมินคุณภาพน้ำ และความคิดเห็นของนักท่องเที่ยวและชุมชน เพื่อการพัฒนาการท่องเที่ยว: กรณีศึกษา เกาะสีซัง จังหวัดชลบุรี ใน จุลชีววิทยา. บัณฑิตวิทยาลัย: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มาติกา อ้นแก้ว. 2553. การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Pichia anomala* PY1 ในถังหมักแบบแบตช์. ใน จุลชีววิทยา. บัณฑิตวิทยาลัย: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

## ภาคผนวก ก

## อาหารเลี้ยงเชื้อ

## 1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM

สารสกัดยีสต์	3	กรัม
สารสกัดมอลต์	3	กรัม
เพปโตน	5	กรัม
กลูโคส	10	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ผสมสารให้เข้ากันและปรับค่าพีเอชเท่ากับ 4.5 จากนั้นฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที

## 2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YM

สารสกัดยีสต์	3	กรัม
สารสกัดมอลต์	3	กรัม
เพปโตน	5	กรัม
กลูโคส	10	กรัม
ผงวุ้น	20	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ผสมสารให้เข้ากันและปรับค่าพีเอชเท่ากับ 4.5 จากนั้นฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที

## 3. อาหารเลี้ยงเชื้อกำหนดสูตร (รณสธา เชียงอุทัย, 2549)

โซเดียมไนเตรท	0.40	กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.02	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.02	กรัม
สารสกัดยีสต์	0.10	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ผสมสารให้เข้ากัน จากนั้นฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ (Manitchotpisit และคณะ, 2011)

น้ำตาลซูโคส	50	กรัม
เพปโตน	0.6	กรัม
สารสกัดยีสต์	0.4	กรัม
โบแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.4	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	1	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ผสมสารให้เข้ากัน จากนั้นฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ เป็นเวลา 10 นาที

5. Corn meal agar

Corn meal	50	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับค่าพีเอช 6

ผสมสารให้เข้ากัน จากนั้นฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที

6. 5% malt extract agar

มอลต์เอ็กซ์แทรกซ์	50	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	กรัม

ผสมสารให้เข้ากัน จากนั้นฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที

7. Potato dextrose agar

Potato dextrose broth	24	กรัม
-----------------------	----	------

วุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	กรัม

ผสมสารให้เข้ากัน จากนั้นฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที

#### 8. Fowell's acetate agar

Sodium acetate trihydrate	5	กรัม
วุ้น	20	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	กรัม

ผสมสารให้เข้ากัน จากนั้นฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที

#### 9. Acetate agar

Glucose	1	กรัม
Potassium chloride	1.8	กรัม
Yeast extracts	2.5	กรัม
วุ้น	1.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	กรัม

ผสมสารให้เข้ากัน จากนั้นฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที

## ภาคผนวก ข

## สารเคมี

## 1. Lysis buffer

Tris	100 mM	pH 8	20	มิลลิลิตร
EDTA	30 mM	pH 8	30	มิลลิลิตร
SDS	5%		10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น			100	มิลลิลิตร

ผสมสารละลายผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร และจากนั้นฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที

## 2. Potassium acetate 2.5 mole

Potassium acetate			12.27	กรัม
น้ำกลั่น			50	มิลลิลิตร

ผสมสารให้เข้ากัน จากนั้นฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที

## 3. 50 mM มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ พีเอช 8

ทริส			0.61	กรัม
น้ำกลั่น			100	มิลลิลิตร

ผสมสารให้เข้ากันและปรับค่าพีเอชเท่ากับ 8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที

## 4. มอริส รีเอเจนท์

แอลฟา-แนฟทอล	0.5	กรัม
95% เอทานอล	10	มิลลิลิตร

## วิธีทดสอบ

หยดมอริส รีเอเจนท์ จำนวน 2 หยด ลงในตัวอย่างปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเอียงหลอดทดลอง และค่อยๆเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงไป โดยห้ามเขย่า





### ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสุดารัตน์ ลือพงศ์พัฒนา เกิดวันที่ 9 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2533 ที่จังหวัดนครราชสีมา ที่อยู่ 629 ถนน พายัพทิศ ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000 สำเร็จการศึกษาปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปีการศึกษา 2555 ต่อมาปีการศึกษา 2555 ศึกษาต่อในระดับปริญญาโทบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

งานวิจัยได้เข้าร่วมเสนอผลงานการประชุมวิชาการระดับนานาชาติในงาน The 25th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference (TSB 2013) ในหัวข้อ “Yeast biodiversity in the coastal area of Koh Si Chang and their potential as biosurfactant producers” ระหว่างวันที่ 16 -19 ตุลาคม 2556 ณ โรงแรมดิเอ็มเมอรัลด์ กรุงเทพมหานคร และ งานประชุมวิชาการระดับนานาชาติในงาน The 26th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference (TSB 2014) ในหัวข้อ “Screening and biosurfactant production by yeast and yeast-like fungi isolated from the coastal areas of Koh Si Chang” ระหว่างวันที่ 26 ถึง 29 พฤศจิกายน 2557 ณ มหาลัยแม่ฟ้าหลวง จังหวัดเชียงราย