

การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Pichia anomala* PY1 ในถังหมักแบบแบตช์

นางสาวมาติกา อ้นแก้ว

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

BIOSURFACTANT PRODUCTION BY *Pichia anomala* PY1 IN BATCH FERMENTER

Miss Matika Aoenskaew

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 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย <i>Pichia anomala</i> PY1
	ในถังหมักแบบแบตช์
โดย	นางสาวมาติกา อ้นแก้ว
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธานีวัน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธานีวัน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธานีวัน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชนัญ ผลประไพ)

มาติกา อันแก้ว : การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Pichia anomala* PY1 ในถังหมักแบบแบตช์ (BIOSURFACTANT PRODUCTION BY *Pichia anomala* PY1 IN BATCH FERMENTER) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ. จิราภรณ์ ธนียวัน, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ผศ.ดร. สุชาดา จันทร์ประทีป, 124 หน้า.

Pichia anomala สายพันธุ์ PY1 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในอาหารเหลวปรับปรุงสูตรซึ่งมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 16:0.7 ประกอบด้วย กลูโคส 5.33% น้ำมันถั่วเหลือง 10.67% สารสกัดยีสต์ 0.35% NaNO_3 0.35% KH_2PO_4 0.02% และ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5 ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 2 vvm และอัตราเร็วใบกวน 400 รอบต่อนาที ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตรแบบแบตช์ เป็นเวลา 7 วัน โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มีค่าแรงตึงผิวต่ำสุด 30 mN/m ค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 76.42 ตารางเซนติเมตร และให้ผลผลิตเท่ากับ 1,353 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าการผลิตในระดับขวดเขย่า 42.4 % เมื่อศึกษาลักษณะสมบัติต่างๆ ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ พบว่า มีค่าความเข้มข้นวิกฤตการเกิดไมเซลล์ (CMC) เท่ากับ 162 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าHydrophilic-lipophilic balance (HLB) ในช่วง 10-13 แสดงว่าเป็นสารก่อกิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำได้ดี ทำให้มีสมบัติในการห่อหุ้มสารที่ไม่มีขั้วให้ละลายในสารมีขั้วได้ดีขึ้น เช่น การช่วยให้สีชูदान II ที่ไม่มีขั้วละลายในน้ำที่มีขั้วได้ นอกจากนี้ยังสามารถก่อกิมัลชันต่อน้ำมันที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น น้ำมันคาโนลา น้ำมันสลัด น้ำมันรำข้าว น้ำมันงา และน้ำมันถั่วเหลือง เป็นต้น สำหรับการวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้โดยทดสอบใน TLC พบว่ามีส่วนประกอบ 3 ส่วน มีอัตราเร็วการเคลื่อนที่ (R_f) เท่ากับ 0.88, 0.75 และ 0.66 (F1-F3) ตามลำดับ โดยสารที่สกัดจากตำแหน่ง F2 ให้ค่าการกระจายน้ำมันสูงสุดและยังมีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบในโมเลกุล จากนั้นนำสาร F2 ไปทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งด้วย HPLC เก็บแต่ละลำดับส่วน เพื่อมาตรวจผลด้วยการวัดค่าการกระจายน้ำมัน และนำไปวิเคราะห์ต่อด้วย MALDI-TOF MS ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 480, 492, 520 และ 548 ซึ่งเทียบเคียงได้กับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทไกลโคลิพิด ชนิดไซโฟโรลิพิด ที่โมเลกุลประกอบด้วยน้ำตาลไซโฟโรสกับกรดไขมันที่มีโครงสร้าง monoacetylate ได้แก่ $[\text{C}8]_{\text{Lactone}}$, $[\text{C}10]_{\text{Lactone}}$, $[\text{C}18]_{\text{Lactone}}$ รวมถึง $[\text{C}10:1]_{\text{Lactone}}$, $[\text{C}12:1]_{\text{Lactone}}$ และ $[\text{C}14:1]_{\text{Lactone}}$ ตามลำดับ

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่อ.....
 สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม..ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
 ปีการศึกษา..2553.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5072427623 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS: BIOSURFACTANT / *Pichia anomala* / CMC / HLB

MATIKA AOENKAEW : BIOSURFACTANT PRODUCTION BY *Pichia anomala* PY1. THESIS ADVISOR : ASSOC. JIRAPORN THANIVAVARN, THESIS CO-ADVISOR : ASST.PROF. SUCHADA CHANPRATEEP, Ph.D., 124 pp.

In the present study, the production and characterization of biosurfactant from yeast *Pichia anomala* strain PY1 were investigated. The highest efficiency for biosurfactant production was found when the organism was grown in modified medium with C:N ratios 16:0.7 consisting of glucose 5.33%, soybean oil 10.67%, yeast extract 0.35%, NaNO₃ 0.35%, KH₂PO₄ 0.02% and MgSO₄·7H₂O 0.02% (wt/vol). The cultivation was performed in batch fermenter using optimal condition at 30°C, control pH of 5.0 with aeration rate 2 vvm and agitation rate 400 rpm for 7 days. After 7 day of cultivation, *P. anomala* PY1 was able to produce biosurfactant up to 1,353 mg L⁻¹, a 42.4 % higher than what obtained from shake flask. The crude biosurfactant was able to reduce the surface tension of pure water to 30 mN/m, oil displacement activity of 75.39 cm² with a critical micelle concentration (CMC) of 162 mg/l, it exhibited HLB value of 10-13. It could also encapsulate Sudan II, a water insoluble dye suspended in hydrophilic solution. In addition, it could form stable oil in water emulsions with various types of vegetable oils such as canola oil, salad oil, rice bran oil, sesame oil and soybean oil etc. Result from TLC indicated that crude biosurfactant consist of 3 major bands with R_f values of 0.88, 0.75 and 0.66 (F1-F3), respectively. Among these, F2 gave highest oil displacement activity and gave positive test with sugar. Further, F2 was fractionated via HPLC in combination with MALDI-TOF MS, the chemical structure of the most relatively abundant fraction was identified as sophorolipid in nature containing sophorose dimeric sugar and fatty acid with monoacetylate [C8]_{Lactone}, [C10]_{Lactone}, [C18]_{Lactone} including nonacetylate [C10:1]_{Lactone}, [C12:1]_{Lactone} and [C14:1]_{Lactone}, respectively.

Department :Microbiology.....Student's Signature.....

Field of Study :Industrial Microbiology.....Advisor's Signature.....

Academic Year : ..2010.....Co-Advisor's Signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธานีวัน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา จันทร์ประทีป อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ซึ่งได้ให้ความรู้ ความเมตตา คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ในการทำวิจัย ตลอดจนตรวจแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธานีวัน ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการในการสอบ ตลอดจนให้คำแนะนำต่างๆ

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชกร และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชนัญ ผลประไพ ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบตลอดจนให้คำแนะนำต่างๆ และช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณ คณาจารย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ และอำนวยความสะดวกต่างๆ แก่ผู้วิจัย รวมถึงอาจารย์ทุกท่านที่ผ่านมาในชีวิต ที่ได้อบรมสั่งสอนมาจนสำเร็จการศึกษา

ขอขอบพระคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2553 ภายใต้โครงการวิจัยเรื่อง แผนงานวิจัยนวัตกรรมเพื่อยกระดับคุณภาพและความปลอดภัยทางอาหารสู่โครงสร้างเศรษฐกิจยุคใหม่

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านของบัณฑิตวิทยาลัย ที่ได้ช่วยอำนวยความสะดวกต่างๆ

ขอขอบคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ทุกคนในภาคจุลชีววิทยา โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ห้องปฏิบัติการ 402, 449, 452 และ 462 อ.จำรูญศรี พุ่มเทียน นางสาวศศิกันต์ บ่อผล และ นางสาววันกุศล ชนะสิทธิ์ สำหรับประสบการณ์ชีวิตที่ดี การแบ่งปันรอยยิ้ม เสียงหัวเราะ ความช่วยเหลือ กำลังใจ และความหวังดีที่มีให้เสมอมา

ท้ายที่สุดขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และน้องสาวที่อยู่เคียงข้าง ให้การสนับสนุน การช่วยเหลือ และแบ่งเบาความกังวลใจ รวมถึงให้กำลังใจเป็นอย่างดีในทุกๆ ด้านแก่ผู้วิจัยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ท
บทที่	
1. บทนำ.....	1
1.1 ประวัติความเป็นมา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
1.3 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
2. ทัศนวิสัยวรรณกรรม.....	4
2.1 ความหมายและความสำคัญของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	4
2.2 ชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	7
2.3 สมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	18
2.4 กระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	20
2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	23
2.6 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระดับขยายส่วน.....	26
2.7 การประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	29
2.8 การวิเคราะห์สมบัติสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	38
3. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการทดลอง.....	44
3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง.....	44
3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	46
3.3 วิธีการดำเนินการทดลอง.....	48
3.3.1 การหาอัตราส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสาร ลดแรงตึงผิวชีวภาพในขวดเขย่า.....	48

บทที่	หน้า
3.3.2 การหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในถังหมักแบบแบตช์.....	50
3.3.3 การผลิต สกัด และการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน.....	52
3.4 การศึกษาลักษณะสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	52
3.5 การทำบริสุทธิ์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธีโครมาโทกราฟี.....	55
3.6 วิเคราะห์โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้.....	57
4. ผลการทดลอง.....	58
4.1 อัตราส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในขวดเขย่า.....	58
4.2 ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในถังหมักแบบแบตช์.....	62
4.3 การผลิต สกัด และการทำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วน.....	68
4.4 ลักษณะสมบัติทางชีวเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้.....	70
4.4.1 ความเข้มข้นวิกฤติของการเกิดไมเซลล์.....	70
4.4.2 ค่าดัชนีการก่อกอิมัลชัน.....	73
4.4.3 ค่า Hydrophilic-lipophilic balance.....	74
4.4.4 ประสิทธิภาพในการห่อหุ้มของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	75
4.5 การทำบริสุทธิ์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธีโครมาโทกราฟี.....	77
4.5.1 การทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีทีนเลเยอร์โครมาโทกราฟี.....	77
4.5.2 การทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี.....	80
4.6 วิเคราะห์โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ด้วย MALDI-TOF.....	83
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	89
รายการอ้างอิง.....	94
ภาคผนวก.....	104
ภาคผนวก ก สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	105
ภาคผนวก ข สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	107
ภาคผนวก ค เครื่องมือและการวัดค่าแรงตึงผิว.....	108
ภาคผนวก ง ถังหมักที่ใช้ในการทดลอง.....	111
ภาคผนวก จ การเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่แบตช์ต่างๆ.....	113
ภาคผนวก ฉ กราฟมาตรฐาน.....	122
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	124

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า	
2.1	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ.....	17
2.2	การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทไซโฟโรลิพิดจากยีสต์ในแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ.....	28
2.3	หน้าที่ต่างๆของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์ในอาหารชนิดต่างๆ...	30
2.4	การประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดต่างๆ.....	34
2.5	ตัวอย่างการจดสิทธิบัตรสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดยยีสต์.....	36
3.1	ความสัมพันธ์ระหว่างค่า HLB กับลักษณะสารละลายของสารลดแรงตึงผิวในน้ำ.....	55
4.1	ผลการศึกษาการแปรผันอัตราส่วนแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย <i>P.anomala</i> PY1 ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในขวดเขย่า.....	59
4.2	ผลการศึกษาการแปรผันอัตราส่วนโซเดียมไนเตรตต่อสารสกัดยีสต์ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย <i>P.anomala</i> PY1 ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในขวดเขย่า.....	61
4.3	ผลการศึกษาการแปรผันอัตราการให้อากาศร่วมกับอัตราเร็วใบกวนต่างๆ ที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5 เป็นเวลา 7 วัน ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบแบตช์.....	63
4.4	ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้โดย <i>P. anomala</i> PY1 เมื่อแปรผันอัตราการให้อากาศ และอัตราเร็วใบกวนต่างๆ เป็นเวลา 7 วัน ในถังหมักแบบแบตช์.....	68
4.5	การเปรียบเทียบความเข้มข้นวิกฤติการเกิดไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้โดย <i>Pichia anomala</i> PY1 กับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์.....	70
4.6	แสดงค่าความเข้มข้นวิกฤติการเกิดไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดต่างๆ...	72
4.7	แสดงค่าการก่อกอิมัลชันและความเสถียรของการก่อกอิมัลชัน หรือค่าดัชนีการก่อกอิมัลชันที่เวลาต่างๆ ของความเข้มข้นวิกฤติการเกิดไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ต่อน้ำมันที่ใช้ในทางอาหารชนิดต่างๆ.....	73
4.8	อัตราการเคลื่อนที่ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จากการเลี้ยงเชื้อในแต่ละแบตช์ที่แปรผันอัตราการให้อากาศและอัตราเร็วใบกวนต่างๆ เมื่อทดสอบบน TLC...	77
4.9	ค่าการกระจายน้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จากแผ่น TLC ในแต่ละลำดับส่วน.....	79

ตาราง	หน้า
4.10 ค่าการกระจายน้ำมันของตัวอย่างตำแหน่ง F2 เมื่อผ่านการวิเคราะห์และทำให้บริสุทธิ์ด้วย HPLC.....	81
4.11 ค่าการกระจายน้ำมันของตัวอย่างตำแหน่ง F3 เมื่อผ่านการวิเคราะห์และทำให้บริสุทธิ์ด้วย HPLC.....	83
4.12 ผลการวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้ด้วยวิธี MALDI-TOF MS.....	87

สารบัญญภาพ

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิว.....	4
2.2 การกระจายตัวของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิว.....	4
2.3 การเกิดโครงสร้างไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในน้ำ.....	5
2.4 โครงสร้างและการจัดเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแบบต่างๆ.....	6
2.5 โครงสร้างของแรมโนลิพิด ชนิด R1, R2, R3, และ R4.....	7
2.6 โครงสร้างของ Trehalose ชนิด mono-dimycolate.....	8
2.7 โครงสร้างของ Trehalose lipid จาก <i>Arthrobacter</i> sp.	8
2.8 โครงสร้าง acidic และ lactonic form ของไซโฟโรลิพิด.....	9
2.9 โครงสร้างของไซโฟโรลิพิด (C22 hydroxy fatty acid) โดย <i>Candida bogoriensis</i>	10
2.10 โครงสร้างของ mannosylerythritol lipid.....	11
2.11 โครงสร้างของเซอร์แฟคติน.....	12
2.12 โครงสร้างของ lichenysin A.....	12
2.13 โครงสร้างของอาร์โทรแฟคติน จาก <i>Arthrobacter</i> sp. MIS38.....	13
2.14 โครงสร้างของ phosphatidylethanolamine จาก <i>Acinetobacter</i> sp.	14
2.15 โครงสร้างของอิมัลแซน จาก <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	15
2.17 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตึงผิว แรงตึงระหว่างผิวที่ประจัน และค่าการละลายกับ ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	38
2.18 โครมาโทแกรม HPLC ของไซโฟโรลิพิดบริสุทธิ์บางส่วน ที่ผลิตโดย <i>Torulopsis bombicola</i> และใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน.....	41
2.19 แมสสเปกตรัมของไซโฟโรลิพิดเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนต่างๆ.....	43
3.1 แสดงลักษณะการกระจายตัวของน้ำมัน.....	49
3.2 วิธีการหาความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ โดยการวัดค่าแรงตึงผิวของสารลดแรงตึง ผิวชีวภาพที่ผลิตได้.....	53
4.1 ค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก <i>P. anomala</i> PY1 เมื่อแปรผันอัตราส่วนแหล่ง คาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในขวดเขย่า.....	59

รูปที่	หน้า
4.2	การกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก <i>P. anomala</i> PY1 เมื่อแปรผันอัตราส่วนแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนต่างๆ ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในขวดเขย่า..... 60
4.3	ค่าแรงดึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก <i>P. anomala</i> PY1 เมื่อแปรผันแหล่งไนโตรเจนตามอัตราส่วนต่างๆ ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในขวดเขย่า..... 61
4.4	ค่าการกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก <i>P. anomala</i> PY1 เมื่อแปรผันแหล่งไนโตรเจนตามอัตราส่วนต่างๆ ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในขวดเขย่า..... 62
4.5	Δ ค่าแรงดึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก <i>P. anomala</i> PY1 เมื่อแปรผันอัตราการให้อากาศร่วมกับอัตราเร็วใบกวนต่างๆ ที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5 เป็นเวลา 7 วัน ในถังหมักแบบแบตช์..... 64
4.6	ค่าการกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก <i>P. anomala</i> PY1 เมื่อแปรผันอัตราการให้อากาศร่วมกับอัตราเร็วใบกวนต่างๆ ที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5 เป็นเวลา 7 วัน ในถังหมักแบบแบตช์..... 65
4.7	ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของ <i>P. anomala</i> PY1 และการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ น้ำมันถั่วเหลือง และปริมาณไนเตรท-ไนโตรเจนที่ถูกใช้ไป ที่อัตราการให้อากาศ 2 vvm และอัตราเร็วใบกวน 400 rpm ที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5 เป็นเวลา 7 วัน ในถังหมักแบบแบตช์..... 66
4.8	ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของ <i>P. anomala</i> PY1 และการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ ที่อัตราการให้อากาศ 2 vvm และอัตราเร็วใบกวน 400 rpm ที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5 เป็นเวลา 7 วัน ในถังหมักแบบแบตช์..... 67
4.9	ปริมาณสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้โดย <i>P. anomala</i> PY1 เมื่อแปรผันอัตราเร็วใบกวน และอัตราการให้อากาศต่างๆ ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 5 เป็นเวลา 7 วัน ในถังหมักแบบแบตช์..... 69
4.10	ค่า CMC ของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก <i>P. anomala</i> PY1 จากการเขียนกราฟระหว่างค่า log ความเข้มข้นของสารและค่าแรงดึงผิว..... 71
4.11	ค่า CMC ของสารลดแรงดึงผิวสังเคราะห์ โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต จากการเขียนกราฟระหว่างค่า log ความเข้มข้นของสารและค่าแรงดึงผิว..... 71

รูปที่	หน้า	
4.12	ค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ ไทรทอน เอ็กซ์ 100 จากการเขียนกราฟระหว่างค่า log ความเข้มข้นของสารและค่าแรงตึงผิว.....	72
4.13	ลักษณะของสารละลายสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบริสุทธิ์บางส่วนที่ผลิตโดย <i>P. anomala</i> PY1 เมื่อละลายในน้ำกรอง และน้ำดื่มตามลำดับ.....	75
4.14	ประสิทธิภาพการห่อหุ้มสีชูदान II ของสารประเภทต่างๆ.....	76
4.15	ประสิทธิภาพการห่อหุ้มสีชูदान II ของสารละลายสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบริสุทธิ์บางส่วนที่ผลิตโดย <i>P. anomala</i> PY1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	76
4.16	ผลการวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย <i>P. anomala</i> PY1 ในถังหมักแบบแบตช์ ที่อัตราการให้อากาศ 1, 1.5 และ 2 vvm ร่วมกับอัตราเร็วใบกวน 200, 300 และ 400 rpm ด้วยวิธี TLC เมื่อตรวจผลด้วยไอโอดีน.....	78
4.17	ผลการวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จากแผ่น TLC ในแต่ละลำดับส่วนเมื่อตรวจสอบผลด้วย มอริซ วีเอเจนท์.....	79
4.18	โครมาโทแกรมของตัวอย่างลำดับส่วน F2 จาก HPLC.....	80
4.19	ค่าการกระจายน้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบริสุทธิ์ที่ผลิตโดย <i>P. anomala</i> PY1 และพิกที่เก็บได้จาก HPLC เทียบกับทริสไฮโดรคลอไรด์และโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต.....	81
4.20	โครมาโทแกรมของตัวอย่างลำดับส่วน F3 จาก HPLC	82
4.21	โครมาโทแกรมของ MALDI-TOF MS จากตัวอย่างสาร P1.....	83
4.22	โครมาโทแกรมของ MALDI-TOF MS จากตัวอย่างสาร P2.....	84
4.23	โครมาโทแกรมของ MALDI-TOF MS จากตัวอย่างสาร P3.....	84
4.24	โครมาโทแกรมของ MALDI-TOF MS จากตัวอย่างสาร P4.....	85
4.25	โครมาโทแกรมของ MALDI-TOF MS จากตัวอย่างสาร P5.....	85
4.26	โครงสร้างของโซไฟโรลิพิดที่ประกอบด้วยน้ำตาลโซไฟโรสและกรดไขมันที่มีความยาวต่างๆ จากการวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF MS.....	86

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

$^{\circ}\text{C}$	=	องศาเซลเซียส
%	=	เปอร์เซ็นต์
rpm	=	รอบต่อนาที
vvm	=	ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรอากาศต่อนาที
g L^{-1}	=	กรัมต่อลิตร
:	=	อัตราส่วนต่อ
cm^2	=	ตารางเซนติเมตร
mN/m	=	มิลลินิวตันต่อเมตร
L min^{-1}	=	ลิตรต่อนาที

บทที่ 1

บทนำ

สารลดแรงตึงผิวเป็นสารที่พบพบสำคัญอย่างยิ่งในปัจจุบัน เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวนั้นถูกนำมาใช้เป็นส่วนประกอบในอุตสาหกรรมหลายภาคส่วน เช่น ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด อุตสาหกรรมกระดาษ อุตสาหกรรมสิ่งทอ เครื่องสำอาง อุตสาหกรรมเกษตร รวมไปถึงจนถึงทางการแพทย์และอาหาร เป็นต้น อย่างไรก็ตามสารลดแรงตึงผิวที่ใช้ส่วนใหญ่เป็นสารที่สังเคราะห์จากปิโตรเลียมโดยวิธีทางเคมี ซึ่งสารเหล่านี้มักมีความเป็นพิษ ย่อยสลายยาก ทำให้เกิดการตกค้าง เป็นสาเหตุให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม (Van Bogaert และคณะ, 2007) และเนื่องด้วยการตระหนักถึงปัญหาสิ่งแวดล้อมที่มากขึ้น การนำผลิตภัณฑ์ชีวภาพ (bioproducts) ซึ่งผลิตได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ มาทดแทนการใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี (chemical products) จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการช่วยลดปัญหามลพิษในด้านต่างๆ ด้วยเหตุนี้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจึงได้รับความสนใจมากขึ้นที่จะมาใช้ทดแทนสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมี ทั้งนี้เพราะสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความเป็นพิษต่ำ สามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ คงความมีประสิทธิภาพดีแม้ในภาวะไม่เหมาะสม เช่น ความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ และความเค็มสูง (Chen และคณะ, 2008) สามารถผลิตได้จากทั้งสารตั้งต้นที่มาจากทรัพยากรที่ผลิตทดแทนใหม่ได้ สารตั้งต้นที่มีราคาถูก (Nitschke และ Pastore, 2006) นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ และเป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างหลากหลาย ทำให้มีลักษณะเฉพาะตัว มีสมบัติทางกายภาพ เคมี และชีวภาพแตกต่างกัน ด้วยเหตุนี้จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้อย่างกว้างขวาง (Nitschke และ Costa, 2007)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ผลิตได้จากสิ่งมีชีวิตหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย รา และยีสต์ ซึ่งเป็นสารชีวโมเลกุลที่มีสมบัติในการลดแรงตึงผิว (surface active compounds) เนื่องจากโครงสร้างเป็นแบบแอมฟิฟิลิก (amphiphilic molecules) ที่ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่ชอบน้ำหรือมีขั้ว (hydrophilic หรือ polar group) ส่วนใหญ่ ได้แก่ โปรตีนและน้ำตาลที่มีหมู่คาร์บอกซิล หมู่ไฮดรอกซิล หมู่อะมิโน เป็นต้น อีกส่วนคือส่วนที่ไม่ชอบน้ำหรือไม่มีขั้ว (hydrophobic หรือ nonpolar group) ส่วนใหญ่เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนหรือกรดไขมัน (Pattanathu และคณะ, 2008) สามารถจัดจำแนกตามโครงสร้างทางเคมีเป็น 6 กลุ่ม ได้แก่ ไกลโคลิพิด (glycolipids) ไลโปเพปไทด์และไลโปโปรตีน (lipopeptides and lipoproteins) กรดไขมันและไขมัน (fatty acids and neutral lipids) ฟอสโฟลิพิด (phospholipids) สารลดแรงตึงผิวชนิดโพลิเมอร์ (polymeric surfactants) และสารลดแรงตึงผิวชนิดอนุภาค (particulate

biosurfactants) (Desai และ Banat, 1997) เมื่อสารลดแรงตึงผิวชีวภาพละลายในสารที่มีขี้ว เช่น น้ำ โมเลกุลจะเกิดการรวมตัวเป็นกลุ่ม โดยหันส่วนที่ไม่มีขี้วเข้าด้านใน และหันส่วนที่ไม่มีขี้วออกด้านนอกเพื่อยึดกับโมเลกุลของน้ำ เกิดเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า ไมเซลล์ (micelle) ซึ่งความเข้มข้นต่ำสุดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ทำให้เกิดการรวมตัวเป็นโครงสร้างไมเซลล์ เรียกว่า ความเข้มข้นวิกฤติการเกิดไมเซลล์ (Critical Micelle Concentration, CMC)

อย่างไรก็ตามแม้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะมีสมบัติที่ดีต่างๆมากมาย หากแต่การนำไปใช้ทดแทนสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมียังเป็นเพียงส่วนน้อย เนื่องจากการขยายกำลังการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจนถึงขั้นอุตสาหกรรมนั้นยังไม่ประสบความสำเร็จมากนัก และมีต้นทุนการผลิตสูง ทำให้ความสามารถในการแข่งขันทางด้านการตลาดด้อยกว่าสารสังเคราะห์ ดังนั้นเพื่อพัฒนากระบวนการผลิตเพื่อนำไปสู่ระดับอุตสาหกรรม จึงจำเป็นต้องพิจารณาปรับปรุงปัจจัยหลายประการ ได้แก่ การเลือกใช้สารตั้งต้นที่มีราคาถูก การพัฒนาสายพันธุ์ การลดค่าใช้จ่ายในการสกัดแยกผลิตภัณฑ์จากน้ำหมัก ตลอดจนการพัฒนากระบวนการหมัก จากเหตุผลดังกล่าวงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 ซึ่งเป็นยีสต์ที่มีความปลอดภัย คัดแยกได้จากอาหารหมักพื้นบ้าน และมีประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทไกลโคลิพิด เพื่อให้ทราบถึงปัจจัยต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิต ในระดับขวดเขย่าและในระดับถังหมักแบบแบตช์ ตลอดจนศึกษาสมบัติของสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้นำไปสู่การพัฒนากระบวนการหมักที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาถึงอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน ในระดับขวดเขย่า และภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบแบตช์

ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. การหาอัตราส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ในระดับขวดเขย่า
2. การหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบแบตช์
3. การผลิตและสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ
4. ลักษณะสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้
5. การทำบริสุทธิ์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธีโครมาโทกราฟี

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *P. anomala* PY1 ในถังหมักแบบแบตช์
2. เป็นทางเลือกหนึ่งในการลดปัญหาสิ่งแวดล้อมโดยใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ย่อยสลายได้
3. เป็นประโยชน์ในการพัฒนากระบวนการหมักแบบเฟดแบตช์ต่อไป

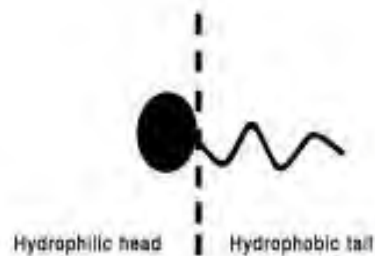
บทที่ 2

ปริทรรศน์วรรณกรรม

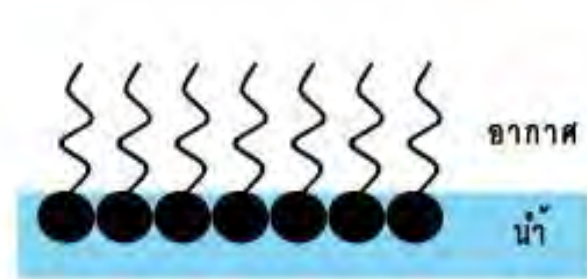
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactant)

2.1 ความหมายและความสำคัญของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ หมายถึง สารชีวโมเลกุลที่มีคุณสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิว (surface-active molecule) ผลิตได้จากเซลล์สิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะในกลุ่มของจุลินทรีย์ ทั้งแบคทีเรีย รา และยีสต์ (Lu และคณะ, 2007) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีโครงสร้างเป็นแบบแอมฟิฟิลิก (amphiphilic structure) ประกอบด้วยส่วนที่มีขั้ว (hydrophilic portion) ส่วนใหญ่ได้แก่คาร์โบไฮเดรต หมู่อะมิโน หมู่ฟอสเฟต หมู่เพปไทด์ เป็นต้น และส่วนที่ไม่มีขั้ว (hydrophobic portion) ได้แก่ โมเลกุลของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ซึ่งเป็นได้ทั้งกรดไขมันชนิดอิ่มตัว (saturated fatty acid) และไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) เป็นต้น มีทั้งขนาดและโครงสร้างที่หลากหลาย ส่งผลให้มีประสิทธิภาพแตกต่างกันออกไป (Muthusamy และคณะ, 2008) แสดงโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิว ดังรูปที่ 2.1



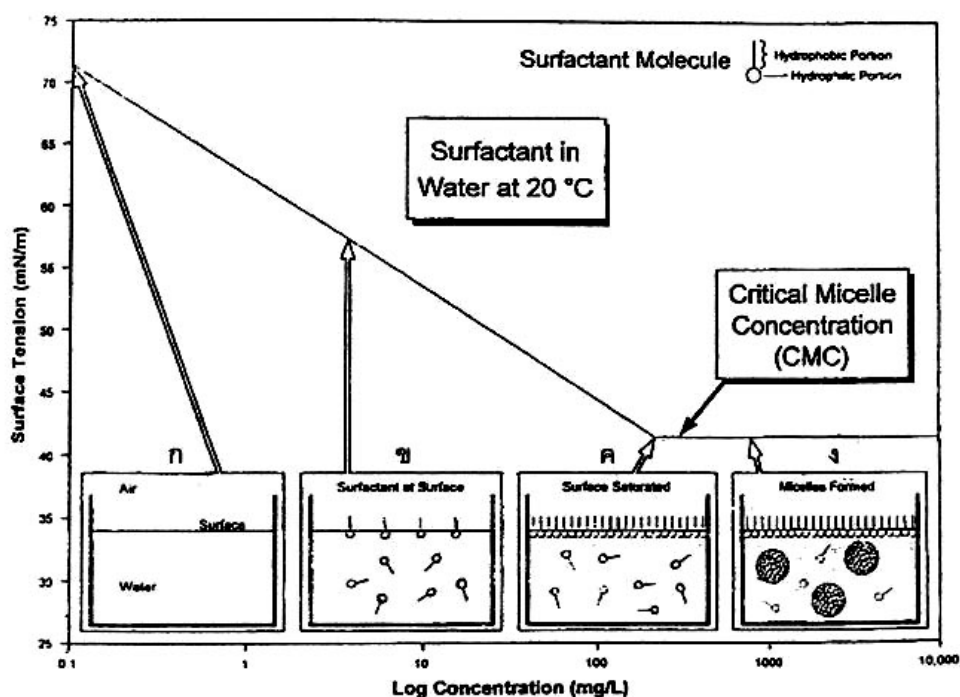
รูปที่ 2.1 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิว



รูปที่ 2.2 การกระจายตัวของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิว

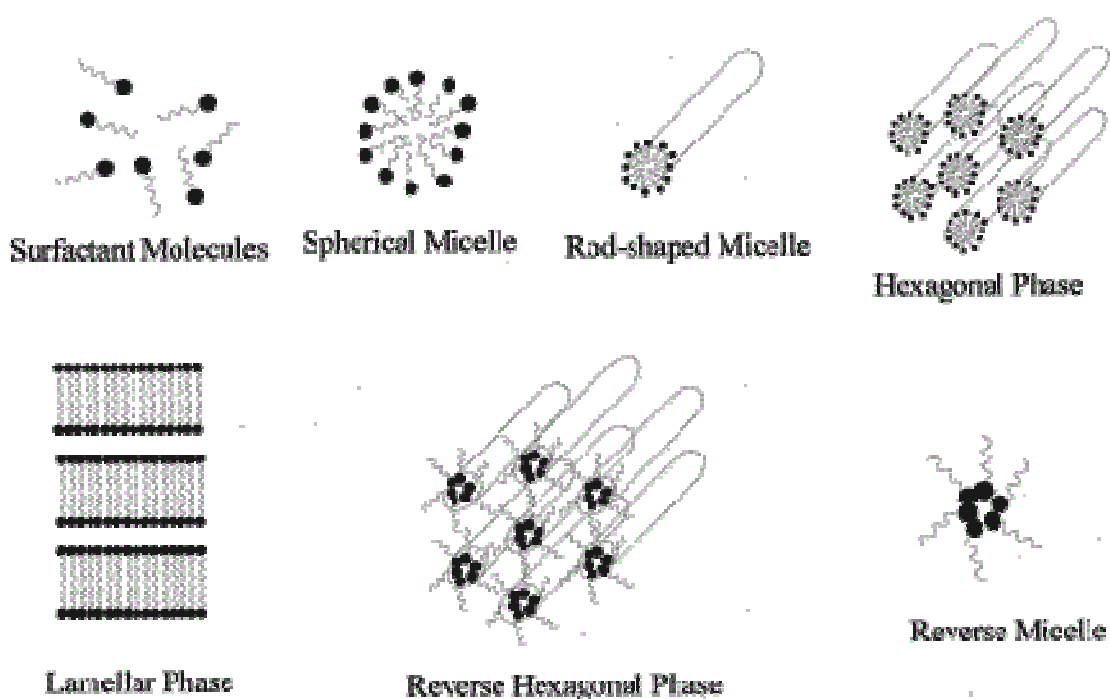
จากลักษณะโครงสร้างที่เป็นแบบแอมฟิฟิลิก ทำให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีสมบัติที่สำคัญ คือ ช่วยลดแรงตึงผิวระหว่างวัฏภาค (phase) สองชนิด โดยโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวจะไปสะสมระหว่างผิวสัมผัส ได้แก่ ผิวสัมผัสระหว่างของเหลวด้วยกัน ผิวสัมผัสระหว่างของเหลวกับแก๊ส หรือระหว่างของแข็งกับของเหลว ตัวอย่างเช่น การกระจายตัวของสารลดแรงตึงผิวระหว่างผิวสัมผัสของน้ำกับอากาศ โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวจะหันส่วนที่มีขั้วเข้าสู่ด้านโมเลกุลของน้ำ และหันส่วนที่ไม่มีขั้วออกด้านอากาศ โดยโมเลกุลจะกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอบนผิวน้ำของน้ำ ทำให้ลดแรงตึงผิวของน้ำได้ ดังแสดงในรูปที่ 2.2

เมื่อสารลดแรงตึงผิวละลายอยู่ในสารละลาย จะส่งผลให้ค่าแรงตึงผิวมีค่าลดลง เช่น น้ำกลั่นมีค่าแรงตึงผิว 72 mN/m เมื่อเติมสารลดแรงตึงผิวลงไป ค่าแรงตึงผิวจะลดลงเหลือ 30 mN/m สารลดแรงตึงผิวนี้อาจจะไปมีบทบาทในการลดแรงตึงผิวระหว่างน้ำกับอากาศ โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวเรื่อยๆ จะส่งผลให้สารลดแรงตึงผิวมีความเข้มข้นสูงขึ้นจนไม่สามารถแทรกตัวระหว่างผิวสัมผัสของสองวัฏภาคได้อีก โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวส่วนเกินจะจัดเรียงตัวเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า ไมเซลล์ (micelle) ซึ่งความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวน้อยที่สุดที่ทำให้เกิดการรวมตัวเป็นโครงสร้างไมเซลล์ เรียกว่า ความเข้มข้นวิกฤติการเกิดไมเซลล์ (critical micelle concentration, CMC) และหากเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวอีก ค่าแรงตึงผิวของสารละลายก็จะไม่มีการเปลี่ยนแปลง ดังแสดงในรูปที่ 2.3 ซึ่งค่า CMC นี้เป็นค่าที่บ่งชี้ถึงความสามารถการละลายของสารลดแรงตึงผิว และยังบอกถึงประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชนิดนั้นๆ ได้ โครงสร้างไมเซลล์ประกอบด้วยโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิว 20-200 โมเลกุล (Desai และ Banat, 1997)



รูปที่ 2.3 การเกิดโครงสร้างไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในน้ำเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจนถึงจุด Critical Micelle Concentration (CMC) ก) เป็นภาวะที่ไม่มีสารลดแรงตึงผิว ข) สารลดแรงตึงผิวละลายอยู่ในน้ำโดยหันส่วนที่ไม่ชอบน้ำออกสู่น้ำ ค) Critical Micelle Concentration (CMC) เป็นจุดที่โมเลกุลสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มขึ้นจนเต็มผิวสัมผัสของสองวัฏภาค เริ่มเกิดโครงสร้างไมเซลล์ และ ง) เมื่อเกิดเป็นโครงสร้างไมเซลล์แล้วค่าแรงตึงผิวมีค่าคงที่ไม่ลดลงอีกแม้ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะเพิ่มขึ้นก็ตาม (Gilman, 1993)

การจัดเรียงตัวของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวสามารถเกิดเป็นไมเซลล์ได้หลายรูปแบบ เช่น ไมเซลล์ทรงกลม ไมเซลล์ทรงกระบอก ไมเซลล์แบบลามลาร์ เป็นต้น ลักษณะการจัดเรียงตัวนั้น จะแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับความสมดุลของส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ เช่น สารลดแรงตึงผิว มีโครงสร้างโมเลกุลเป็นโซ่สายสั้นและส่วนมีหัวขนาดใหญ่จะเกิดการจัดเรียงตัวเป็นไมเซลล์แบบ ทรงกลม ถ้าส่วนมีหัวขนาดเล็กจะรวมตัวเป็นไมเซลล์แบบทรงกระบอก (รูปที่ 2.4) เป็นต้น และ รวมถึงแรงดูดหรือแรงผลักจากพันธะไฮโดรเจนในโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวอีกด้วย นอกจากนี้ อัตราของการรวมตัวเป็นไมเซลล์จะขึ้นกับค่าความเป็นกรดต่าง อุณหภูมิ และความแรงของประจุ (ionic strength)



รูปที่ 2.4 โครงสร้างและการจัดเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแบบต่างๆ

ที่มา: Lawrence และ Rees (2000)

2.2 ชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

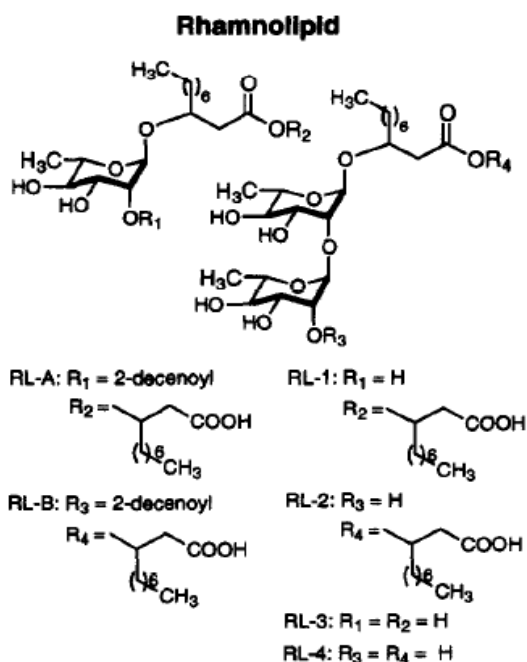
การจำแนกชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ตามโครงสร้างทางเคมี สามารถแบ่งได้ 6 กลุ่ม (Desai และ Banat, 1997) ได้แก่

1. ไกลโคลิพิด (glycolipid)

เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดที่เป็นที่รู้จักมากที่สุด ไม่มีประจุ ลักษณะโครงสร้างประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรต เช่น กลูโคส แมนโนส แรมโนส เชื่อมต่อกับไขมัน เช่น long-chain aliphatic acids หรือ hydroxyaliphatic acids ด้วยหมู่อีเทอร์ (ether) หรือ เอสเทอร์ (ester) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดไกลโคลิพิดที่สำคัญ ได้แก่ แรมโนลิพิด (rhamnolipid) ทรีฮาโลลิพิด (trehalolipid) โซโฟโรลิพิด (sophorolipid) (Karanth และคณะ, 1999)

1.1 แรมโนลิพิด (rhamnolipid)

โครงสร้างของแรมโนลิพิดประกอบด้วยน้ำตาลแรมโนส 1 หรือ 2 โมเลกุลเชื่อมต่อกับ β -hydroxydecanoic acid 1 หรือ 2 โมเลกุลด้วยพันธะไกลโคซิดิก จำแนกได้เป็น 6 ชนิดตามจำนวนของน้ำตาลแรมโนสและ β -hydroxydecanoic acid ดังรูปที่ 2.5 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มนี้มักผลิตได้โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ *Pseudomonas* sp. สามารถลดค่าแรงตึงผิวได้เท่ากับ 30-32 mN/m มีค่า CMC 5-65 mg/L และยังเป็นสารก่ออิมัลชันได้ดี (Van Dyke และคณะ, 1993)

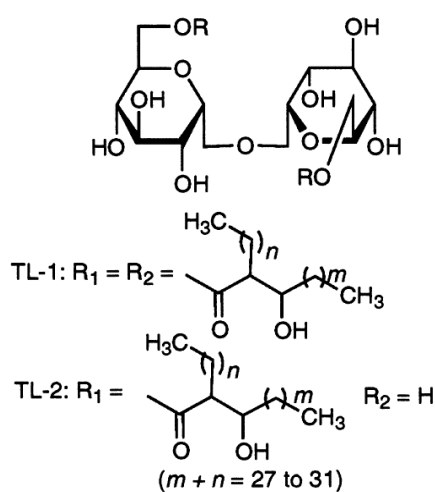


รูปที่ 2.5 โครงสร้างของแรมโนลิพิด ชนิด R1 R2 R3 R4 A และ B

ที่มา: Kitamoto และคณะ (2002)

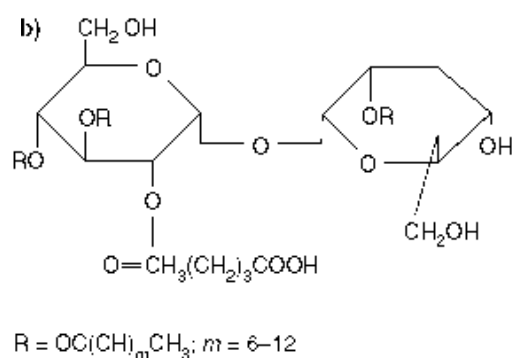
1.2 ทรีฮาโลลิพิด (trehalolipid)

ประกอบด้วยน้ำตาลไดแซคคาไรด์ ทรีฮาโลส เชื่อมต่อกับสายยาวของ mycolic acid (α -branched- β -hydroxy fatty acid) ที่ตำแหน่ง C-6 และ C-6' สามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น *Mycobacterium Norcardia Rhodococcus* (รูปที่ 2.6) *Arthrobacter* (รูปที่ 2.7) และ *Corynebacterium* ซึ่งสารที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ต่างชนิดกันจะมีขนาดและโครงสร้างของ mycolic acid แตกต่างกันไปตามจำนวนอะตอมของคาร์บอนและความไม่อิ่มตัวของทรีฮาโลลิพิดที่ผลิตโดย *Rhodococcus erythropolis* และ *Arthrobacter sp.* สามารถลดแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อได้เท่ากับ 25-40 mN/m (Li และคณะ, 1984)



รูปที่ 2.6 โครงสร้างของ Trehalose ชนิด mono- และ dimycolate

ที่มา: Desai และ Banat (1997)

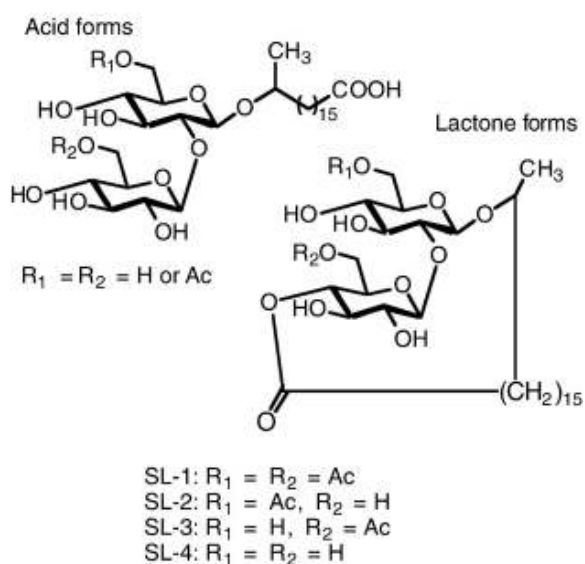


รูปที่ 2.7 โครงสร้างของ Trehalose lipid จาก *Arthrobacter sp.*

ที่มา: Christofi และ Ivshina (2002)

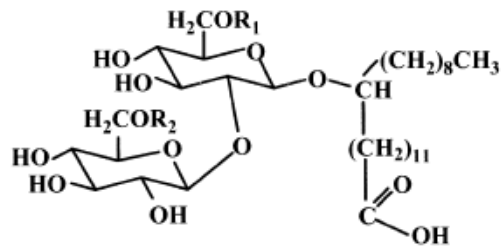
1.3 โซโฟโรลิพิด (sophorolipid)

เป็นกลุ่มของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากยีสต์ เช่น *Torulopsis bombicola*, *Centrolene petrophilum*, *Candida apicola*, *C. batistae*, *Rhodotorula bogoriensis* เป็นต้น โครงสร้างประกอบด้วยน้ำตาลโซโฟโรส ซึ่งเป็นไดเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสต่อกันด้วยพันธะ β -1,2 เชื่อมต่อกับสายยาวของ hydroxyl fatty acid ซึ่งส่วนใหญ่เป็นคาร์บอน 16-18 อะตอม ด้วยพันธะปีตา-ไกลโคซิดิก (Asmer และคณะ, 1988) จากการศึกษาของ Hu และ Ju (2001b) พบว่าโครงสร้างของโซโฟโรลิพิดแบ่งได้เป็น 2 ลักษณะ คือ acidic form ที่ปลายสายของ hydroxyl fatty acid เป็นปลายเปิด มีสมบัติในการทำให้เกิดฟองและการละลายดี ส่วน lactonic form ที่ปลายสายของ hydroxyl fatty acid จะเชื่อมเป็นวงกับน้ำตาลโซโฟโรสด้วยพันธะเอสเทอร์ มีสมบัติในการลดค่าแรงตึงผิว แรงตึงระหว่างผิวที่ประจันได้ดี รวมถึงสามารถต้านการเจริญของจุลินทรีย์ได้ นอกจากนี้หากเกิดการเติมหมู่อะซิติลที่น้ำตาลโซโฟโรส จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการต้านไวรัส และกระตุ้นการหลั่ง cytokine แสดงโครงสร้างดังรูปที่ 2.8 (Shah และคณะ, 2005) นอกจากนี้โซโฟโรลิพิดที่ผลิตโดย *C. bogoriensis* มีโครงสร้างในส่วนของ hydroxyl fatty acid ประกอบด้วยคาร์บอน 22 อะตอม ดังแสดงในรูปที่ 2.9 โซโฟโรลิพิดสามารถลดแรงตึงผิวและแรงตึงระหว่างผิวที่ประจันได้ดี โดยลดค่าแรงตึงผิวของน้ำเป็น 40 mN/m ค่า CMC อยู่ในช่วง 40-100 mg/L มีค่า HLB หลากหลายตามลักษณะโครงสร้าง ทำให้นำไปประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวาง นอกจากนี้ยังมีสมบัติในการก่ออิมัลชัน เป็นสารทำให้เปียก และเป็นสารทำความสะอาดได้ดี (Shete และคณะ, 2006)

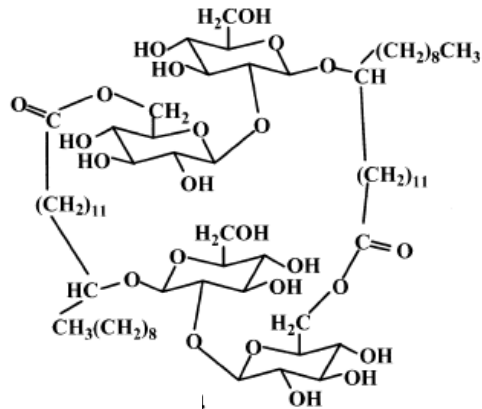


รูปที่ 2.8 โครงสร้าง acidic และ lactonic form ของโซโฟโรลิพิด

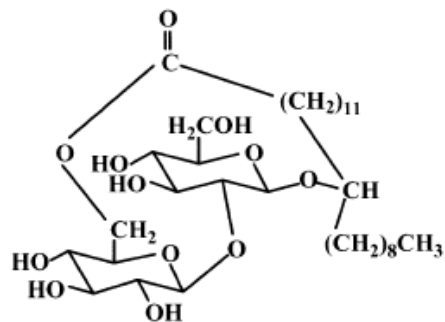
ที่มา: Kitamoto และคณะ, 2009



(ก)



(ข)



(ค)

รูปที่ 2.9 แสดงโครงสร้างไซโฟโรลิพิด (C22 hydroxy fatty acid) โดย *C. bogoriensis*

(ก) 1. $R_1 = R_2 = \text{COCH}_3$; (MW = 764)

2. $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{COCH}_3$; (MW = 722)

$R_1 = \text{COCH}_3$; $R_2 = \text{H}$ (MW = 722)

3. $R_1 = R_2 = \text{H}$; (MW = 680)

(ข) ไซโฟโรลิพิด 2 โมเลกุลต่อกันเป็นไดเมอร์ (dimer) รูปแบบ lactonic form

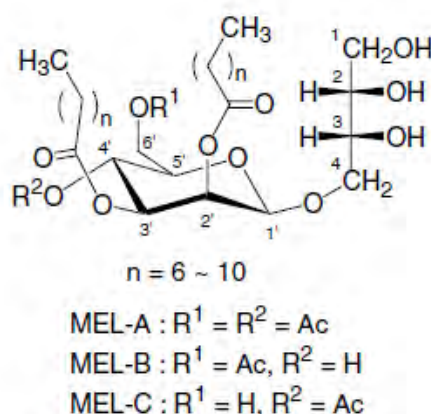
$[R_1 = R_2 = \text{H}; (\text{MW} = 1324)]$

(ค) ไซโฟโรลิพิดรูปแบบ lactonic form $[R_1 = R_2 = \text{H}; (\text{MW} = 662)]$

ที่มา: Nunez และคณะ (2004)

1.4 แมนโนซิลอิริทริทอล ลิพิด (mannosylerythritol lipid, MEL)

เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากยีสต์ *Pseudozyma* เช่น *Pseudozyma aphidis*, *P. Antarctica*, *P. rugurosa* เป็นต้น (Konishi และคณะ, 2007) โครงสร้างประกอบด้วย 4-O-β-D-mannopyranosyl-meso-erythritol เชื่อมต่อกับกรดไขมัน แบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด คือ MEL-A MEL-B และ MEL-C แสดงในรูปที่ 2.10 นอกจากนี้จะมีสมบัติในการลดแรงตึงระหว่างวัฏภาคที่ดีแล้ว ยังสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมลบอีกด้วย



รูปที่ 2.10 โครงสร้างของ mannosylerythritol lipid

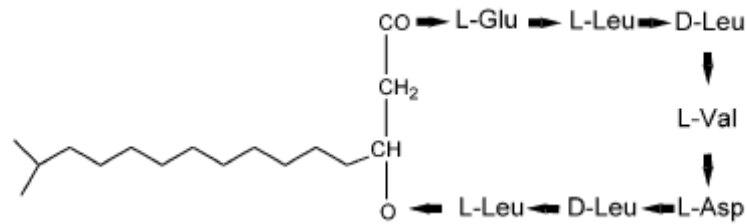
ที่มา: Fukuoka และคณะ (2008)

2. ไลโปเพปไทด์และไลโปโปรตีน (lipopeptide and lipoprotein)

เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สามารถผลิตได้จากแบคทีเรียหลายชนิด แต่มีเพียงไม่กี่ชนิดที่ได้มีการศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารลดแรงตึงผิว ซึ่งส่วนมากมีคุณสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะ เช่น กรามิซิดิน (gramicidin) เซอร์แฟคติน (surfactin) หรือซับทีไลซิน (subtilysin) จาก *Bacillus subtilis* เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูง มีโครงสร้างประกอบด้วยลิพิดเชื่อมต่อกับสายโพลิเพปไทด์

2.1 เซอร์แฟคติน (surfactin)

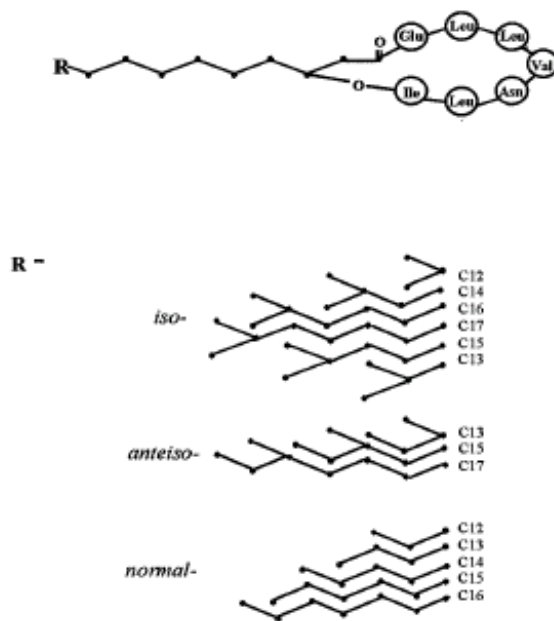
ผลิตได้จาก *Bacillus subtilis* มีโครงสร้างประกอบด้วย กรดอะมิโน 7 โมเลกุล เชื่อมต่อกับหมู่คาร์บอกซิล หมู่ไฮดรอกซิลของ β-hydroxyl fatty acid เป็นวง (รูปที่ 2.11) ด้วยพันธะโควาเลนต์สามารถลดค่าแรงตึงผิวของ NaHCO₃ เข้มข้น 0.1 โมลาร์จาก 71.6 mN/m เป็น 27.9 mN/m



รูปที่ 2.11 โครงสร้างของเซอร์แฟคติน
ที่มา: Lang (2002)

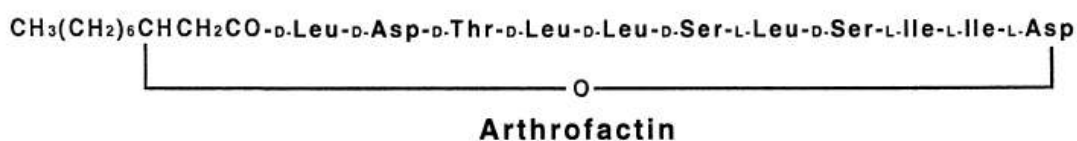
2.2 ไลเคโนซิน เอ (lichenysin A)

ผลิตได้จาก *B. licheniformis* ลักษณะโครงสร้างคล้ายกับเซอร์แฟคติน (รูปที่ 2.12) และมีสมบัติที่ดีแม้อยู่ในภาวะที่มีความเค็ม ความเป็นกรดต่าง และอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม สามารถลดค่าแรงตึงผิวของน้ำจาก 72 mN/m เป็น 24 mN/m นอกจากนี้ยังลดค่าแรงตึงระหว่างผิวที่ประจันของน้ำกับเฮกซาเดคเคนเป็น 0.36 mN/m



รูปที่ 2.12 โครงสร้างของ lichenysin A
ที่มา: Yakimov และคณะ (1995)

Morikawa และคณะ (1993) พบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดใหม่ คือ อาร์โทรแฟกติน (arthrofactin) ผลิตโดย *Arthrobacter* sp. MIS38 ซึ่งมีโครงสร้างประกอบด้วย 3-hydroxydecanosyl-D-leucyl-D-asparagyl-D-threonyl-D-leucyl-D-seryl-L-leucyl-D-seryl-L-isoleucyl-L-isoleucyl-L-asparagyl lactone (รูปที่ 2.13) มีประสิทธิภาพดีกว่าเซอร์แฟคติน 5-7 เท่า สามารถลดค่าแรงตึงผิวได้ต่ำสุด 24 mN/m และมีค่าการกระจายน้ำมันดีกว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ เช่น Triton X-100 และโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodiumdodecyl sulfate: SDS)



รูปที่ 2.13 โครงสร้างอาร์โทรแฟกติน จาก *Arthrobacter* sp. MIS38

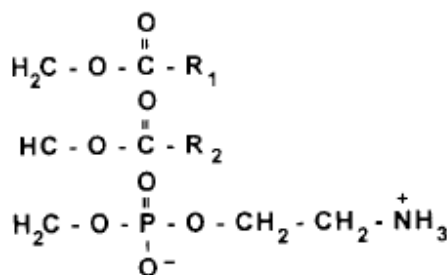
ที่มา: Morikawa และคณะ (1993)

3. กรดไขมันและไขมัน (fatty acid and neutral lipid)

ผลิตได้ในแบคทีเรียและยีสต์หลายชนิด เมื่อเจริญในอาหารที่มี n-alkanes จะผลิตและหลั่งออกนอกเซลล์เป็นปริมาณมาก กรดไขมันที่ผลิตออกมานั้นจะมีความซับซ้อน คือ มีหมู่ไฮดรอกซิลและสายอัลคิลเป็นส่วนประกอบ เช่น กรดโครีโนมัยโคลิก (corynomycolic acid) ค่า HLB ของกรดไขมันมีความสัมพันธ์กับความยาวของสายไฮโดรคาร์บอน ซึ่งกรดไขมันอิ่มตัวที่มีประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวและแรงตึงระหว่างผิวที่ประจันได้ดีจะมีจำนวนคาร์บอน 12-14 อะตอม (Rosenberg และ Ron, 1999) เช่น กรดโครีโนมัยโคลิก (corynomycolic acid) จาก *Corynebacterium lepus* ที่สามารถลดค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อเหลือ 30 mN/m ที่ความเข้มข้นของสารละลายกรดโครีโนมัยโคลิก 0.5 กรัมต่อลิตร จะลดค่าแรงตึงผิวเหลือ 40 mN/m และค่าแรงตึงระหว่างผิวที่ประจันต่อเฮกซาเดคเคนได้ 10 mN/m และรูบิเวทิน อาร์ 1 (rubiwettin R1) ซึ่งเป็นลิพิดที่ผลิตจาก *Serratia rubidaea* ATCC27593 เป็นลิพิดชนิด β -hydroxy fatty acid มีจำนวนคาร์บอน 10 อะตอมเชื่อมต่อกับ β -hydroxy fatty acid ที่มีจำนวนคาร์บอน 12 14 หรือ 16 อะตอมด้วยพันธะเอสเทอร์ (Matsuyama และคณะ, 1990)

4. ฟอสโฟลิพิด (phospholipid)

ฟอสโฟลิพิดเป็นส่วนประกอบหลักของเยื่อหุ้มในจุลินทรีย์ โดยโครงสร้างทั่วไปจะประกอบด้วยกลีเซอรอลเชื่อมต่อกับกรดไขมัน 2 หมู่ และฟอสเฟต 1 หมู่ ตัวอย่างเช่น *Acinetobacter* sp. สายพันธุ์ H01-N และ *Rhodococcus erythropolis* เมื่อเจริญในอาหารที่มีเฮกซาเดคเคน จะสามารถผลิตฟอสโฟลิพิด ชนิด phosphatidylethanolamine (รูปที่ 2.14) ซึ่งมีสมบัติในการลดแรงตึงระหว่างผิวที่ประจันของน้ำกับเฮกซาเดคเคนได้ดีกว่า 1 mN/m และมีค่า CMC 30 mg/L (Kretschner และคณะ, 1982) นอกจากนี้ยังมีจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่สามารถผลิตฟอสโฟลิพิดชนิดต่างๆ ได้ เช่น *Corynebacterium lepus*, *Corynebacterium alkanolyticum*, *Candida tropicalis*, *Micrococcus cerificans* เป็นต้น (Cooper และ Zajic, 1980) โดยฟอสโฟลิพิดที่ผลิตได้จะแตกต่างกันไปขึ้นกับสารตั้งต้นที่ใช้ในการเลี้ยงจุลินทรีย์



รูปที่ 2.14 โครงสร้างของ phosphatidylethanolamine จาก *Acinebator* sp.

R_1 และ R_2 คือสายไฮโดรคาร์บอนของกรดไขมัน

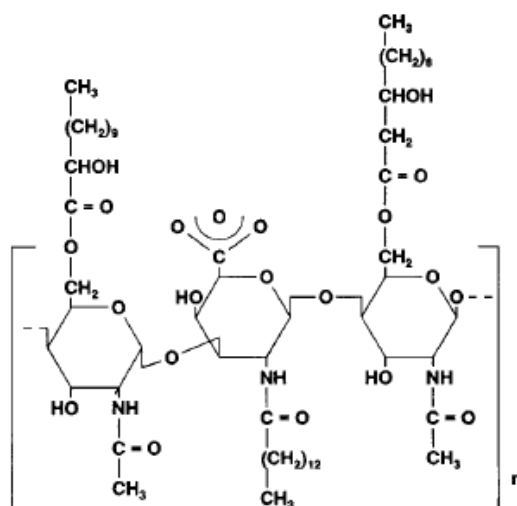
ที่มา: Desai และ Banat (1997)

5. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดพอลิเมอร์ (polymeric biosurfactants)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์ที่เป็นที่รู้จักกันทั่วไป คือ อิมัลชัน (emulsan) ไลโปแซน (liposan) แมนโนโปรตีน (mannoprotein) และสารประกอบเชิงซ้อนของพอลิแซคคาไรด์กับโปรตีน (polysaccharide-protein complex) มีรายงานว่า *Arthrobacter calcoaceticus* สายพันธุ์ RAG-1 สามารถผลิต polyanionic amphipathic heteropolysaccharide bioemulsifier หรือเรียกว่าอิมัลชัน (รูปที่ 2.15) โดยมีโครงสร้างสายหลักเป็นเฮเทอโรพอลิแซคคาไรด์ (heteropolysaccharide) ประกอบด้วยไตรแซคคาไรด์ของ N-acetyl-D-galactosamine N-acetylgalactosamine uronic acid และ unidentified N-acetyl amino sugar เชื่อมต่อกับกรดไขมันด้วยพันธะ O-ester อิมัลชันสามารถก่ออิมัลชันระหว่างสารประกอบไฮโดรคาร์บอนกับน้ำได้ดีที่ความเข้มข้นเพียง 0.001-0.01 เปอร์เซ็นต์ และยังเป็นสารช่วยรักษา

ความเสถียรของอิมัลชันด้วย และหากตั้งอิมัลชันไว้นานๆหลังจากทำการผสมสาร อิมัลชันจะแยกเป็นสองชั้น โดยชั้นบนจะมีลักษณะเป็นครีมที่เรียกว่า อิมัลชันโนโซล (emulsanosol) ที่ประกอบด้วยน้ำมัน 70-75 เปอร์เซ็นต์

ส่วนไลโปแซนสามารถผลิตได้จาก *Candida lipolytica* ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต 83 เปอร์เซ็นต์ และโปรตีน 17 เปอร์เซ็นต์ โดยส่วนของคาร์โบไฮเดรตเป็น heteropolysaccharide ที่ประกอบด้วยกลูโคส กาแลคโตส กาแลคโตซามีน และกรดกาแลคทูโรนิก (galacturonic acid) *Saccharomyces cerevisiae* สามารถผลิตแมนโนโปรตีนซึ่งเป็นสารก่ออิมัลชันที่ดีกับน้ำมัน อัลเคน และตัวทำละลายอินทรีย์ โดยประกอบด้วยน้ำตาลแมนโนส 44 เปอร์เซ็นต์ และโปรตีน 17 เปอร์เซ็นต์ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดโพลีเมอร์ชนิดอื่นๆ ได้แก่ ไบโอดีสเพอร์แซน (biodispersan) อะลาแซน (alasan) เป็นต้น



รูปที่ 2.15 โครงสร้างของอิมัลแซน (emulsin) จาก *Acinetobacter calcoaceticus*

ที่มา: Desai และ Banat (1997)

6. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดอนุภาค (particulate biosurfactants)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดอนุภาคเป็นส่วนหนึ่งของ extracellular membrane vesicle ที่รวมตัวกันเป็น microemulsion กับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ โดยมีบทบาทที่สำคัญในการนำอัลเคนเข้าสู่เซลล์ของจุลินทรีย์ พบว่า *Acinetobacter* sp. สายพันธุ์ HO1-N สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดอนุภาคขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 20-50 เซนติเมตร และมีความหนาแน่นการลอยตัว 1.158 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนี้ประกอบด้วยโปรตีน ฟอสโฟลิพิด และไลโปพอลิแซคคาไรด์ โดย membrane vesicle เหมือนกับ outer membrane ของจุลินทรีย์ที่ผลิตขึ้น (Desai และ Banat, 1997)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยทั่วไปจะมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 500-1500 ดาลตันจึงทำให้สามารถจำแนกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ตามน้ำหนักโมเลกุลได้เป็น 2 ชนิด คือ (Van Hamme และคณะ, 2006)

1. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (high molecular weight biosurfactant) ได้แก่ โพลีแซคคาไรด์ที่มีโครงสร้างแบบแอมฟิพาติก โปรตีน ไลโปโพลีแซคคาริไรด์ และไลโปโปรตีน อาจมีชื่อเรียกอีกอย่างว่า ไบโอบีมัลชัน (bioemulsan) หรือ ไบโอบีมัลซิไฟเออร์ (bioemulsifier) สารที่อยู่ในกลุ่มนี้มีความสามารถในการเพิ่มความเสถียรของอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ แต่ไม่มีประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิว

2. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (low molecular weight biosurfactant) ได้แก่ โกลโคลิพิด โกลโคเพปไทด์ ซึ่งในกลุ่มนี้จะมีประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวและแรงตึงระหว่างผิวที่ประจันได้ดี

ในธรรมชาติสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีบทบาทสำคัญทางด้านกายภาพของจุลินทรีย์ โดยจะไปเพิ่มความสามารถในการนำโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำเข้าสู่เซลล์ ช่วยในการเคลื่อนที่แบบกลุ่มของจุลินทรีย์ มีส่วนในกระบวนการทางด้านกายภาพของเซลล์ทั้งการส่งสัญญาณ และ differentiation นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างไบโอฟิล์ม (Kearns และ Losick, 2003) รวมทั้งพบว่ายีสต์ ผลิตภัณฑ์โพลีโพลิพิดเพื่อเปลี่ยนรูปร่างน้ำตาลและใช้เป็นแหล่งสะสมคาร์บอนภายนอกเซลล์ ในกรณีที่เจริญในภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง จากโครงสร้างที่เปลี่ยนไปทำให้จุลินทรีย์ชนิดอื่นนำน้ำตาลไปใช้ได้ยากขึ้น รวมทั้งยังมีสมบัติยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ทำให้จุลินทรีย์อื่นๆ ไม่สามารถนำน้ำตาลไปใช้ได้ (Van bogeart และคณะ, 2007)

ตารางที่ 2.1 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ (Desai และ Banat, 1997; Kitamoto และคณะ, 2009)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	จุลินทรีย์	Surface tension (mN/m)	CMC	Interfacial tension (mN/m)
Glycolipid				
Rhamnolipid	<i>P. aeruginosa</i>	29		0.25
	<i>Pseudomonas</i> sp.	25-30	0.1-10	1
Trehalolipid	<i>R. erythropolis</i>	32-36	4	14-17
	<i>N. erythropolis</i>	30	20	3.5
	<i>Mycobacterium</i> sp	38	0.3	15
Succinoyl-trehalose lipid	<i>R. erythropolis.</i>			
Sophorolipid	<i>C. bombicola</i>	33		1.8
	<i>C. apicola</i>	30		0.9
	<i>C. batistae</i>	39.3	138	
Mannosylerythritol lipid	<i>P. antarctica</i>	28.2		2.4
	<i>P. crassa</i>	26.5		
	<i>P. siamensis</i>	30.7		
	<i>P. shanxiensis</i>			
	<i>P. hubeiensis</i>	30.7		
Cellobiose lipid	<i>U. cynodontis</i>			
	<i>U. maydis</i>			
	<i>U. zeac</i>			
Oligosaccharide lipid	<i>Tsukamurells</i> sp.			
Lipopeptides and lipoproteins				
Peptide-lipid	<i>B. licheniformis</i>	27	12-20	0.1-0.3
Serrawettin	<i>S. marcescens</i>	28-33		
Viscosin	<i>P. fluorescens</i>	26.5	150	
Surfactin	<i>B. subtilis</i>	27-32	123-160	1
Subtilisin	<i>B. subtilis</i>			

ตารางที่ 2.1 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ (Desai และ Banat, 1997; Kitamoto และคณะ, 2009) (ต่อ)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	จุลินทรีย์	Surface tension (mN/m)	CMC	Interfacial tension (mN/m)
Fatty acid, neutral lipids, and phospholipids				
Fatty acids	<i>C. lepus</i>	30	150	2
Neutral lipids	<i>N. erythropolis</i>	32		3
Phospholipids	<i>T. thiooxidans</i>			
Corynomycolic acid	<i>C. insidibasseosum</i>			
Polymeric surfactants				
Emulsan	<i>A. calcoaceticus</i>			
Biodispersan	<i>A. calcoaceticus</i>			
Mannan-lipid-protein	<i>C. tropicalis</i>			
Liposan	<i>C. lipolytica</i>			
Carbohydrate-protein-lipid	<i>P. fluorescens</i>	27	10	
	<i>D. polymorphis</i>			
Alasan	<i>A. radioresistens</i>			
Particulate biosurfactants				
Vesicles and fimbriae	<i>A. calcoaceticus</i>			
Whole cells	Variety of bacteria			

2.3 สมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้รับความสนใจในการนำมาใช้ทางด้านการค้ามากขึ้นเรื่อยๆ ในปัจจุบัน เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีสมบัติที่ดีและปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อมมากกว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์จากทางเคมีหลายประการ (Muthusamy และคณะ, 2008) ดังนี้

1. มีประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวและแรงตึงระหว่างผิวที่ประจันได้ดี

สารลดแรงตึงผิวที่มีประสิทธิภาพดี ต้องสามารถลดแรงตึงผิวของน้ำจาก 72 mN/m เหลือ 35 mN/m และลดแรงตึงระหว่างผิวที่ประจันของน้ำกับเฮกซะเดคเคนจาก 40 mN/m เหลือ

1 mN/m (Mulligan, 2005) ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด เซอร์แฟคติน จาก *B. subtilis* สามารถลดแรงตึงผิวของน้ำเหลือเพียง 25 mN/m และลดแรงตึงระหว่างผิวที่ประจันของน้ำกับเฮกซะเดคเคนได้ต่ำกว่า 1 mN/m โซโฟโรลิพิคจาก *T. bombicola* ก็สามารถลดแรงตึงผิวของน้ำเหลือเพียง 33 mN/m เช่นกัน โดยทั่วไปแล้วสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีประสิทธิภาพมากกว่าและยังมีค่า CMC ต่ำกว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมี 10-40 เท่า นั่นคือสามารถใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในปริมาณน้อยกว่าในการทำให้ค่าแรงตึงผิวดลดลงถึงค่าที่น้อยที่สุด

2. มีประสิทธิภาพดีแม้ในอุณหภูมิ ความเป็นกรดต่าง และปริมาณไอออนที่ไม่เหมาะสม

ปัจจัยภายนอกต่างๆ เช่น อุณหภูมิและความเป็นกรดต่าง ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จากการศึกษาของ McInerney และคณะ (1990) พบว่า ไลเคโนซินที่ผลิตจาก *B. licheniformis* JF-2 ยังคงมีประสิทธิภาพดี แม้อยู่ในอุณหภูมิสูงเกิน 50 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดต่าง 4.5-9 ปริมาณโซเดียมคลอไรด์และแคลเซียมสูงถึง 50 และ 25 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า ไลโฟเพปไทด์ จาก *B. subtilis* LB5a ยังคงความเสถียรได้หลังจากผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และการเก็บภายใต้ อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 เดือน

3. สามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้

สารลดแรงตึงผิวที่ผลิตจากจุลินทรีย์นั้น สามารถย่อยสลายได้ง่ายทางชีวภาพ (biodegradability) จึงเหมาะสมสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ในสิ่งแวดล้อม ซึ่งต่างจากสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมีที่ย่อยสลายยาก ทำให้เกิดการตกค้างในสิ่งแวดล้อม

4. มีความเป็นพิษต่ำ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความเป็นพิษต่ำ เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีค่า LC50 สูงกว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ถึงสิบเท่า และเมื่อเปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *P. aeruginosa* กับ Marlon A-350 ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ที่ใช้ทั่วไปในโรงงานพบว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์นั้นนอกจากจะมีความเป็นพิษสูงกว่า แล้วยังเป็นสารก่อการกลายพันธุ์อีกด้วย ดังนั้น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจึงเหมาะสำหรับการนำไปใช้ทางด้านอาหาร ยา และเครื่องสำอาง

5. สามารถก่อกอิมัลชันได้ดี

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดที่มีมวลโมเลกุลสูงสามารถก่อกอหรือสลายอิมัลชันได้ดี ตัวอย่างเช่น ไลโฟแซน เป็นตัวอิมัลซิไฟเออร์ในน้ำมันที่รับประทานได้ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดโพลีเมอร์ สามารถเคลือบหยดน้ำมันได้ ทำให้อิมัลชันมีความเสถียร จากสมบัติข้อนี้จึงเหมาะในการนำไปประยุกต์ใช้ในการเกิดอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ สำหรับอุตสาหกรรมเครื่องสำอางและอาหาร นอกจากนี้ยังปลอดภัยต่อสิ่งมีชีวิตด้วยเนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็น Bio-compatibility

6. มีโครงสร้างหลากหลาย

มีโครงสร้างหลากหลาย ทำให้มีคุณสมบัติแตกต่างกันมากมาย เช่น ช่วยในการก่อกออิมัลชัน การแยกชั้นของวัฏภาค การทำให้เปียก การเกิดฟอง การละลาย ลดความหนืด ยับยั้งการกักกร่อน โดยลักษณะของโครงสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นจะขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์และสารตั้งต้นที่ใช้ผลิตสารนั้น ๆ ทำให้สามารถเลือกนำไปใช้ได้อย่างเหมาะสมกับอุตสาหกรรมหลายประเภท

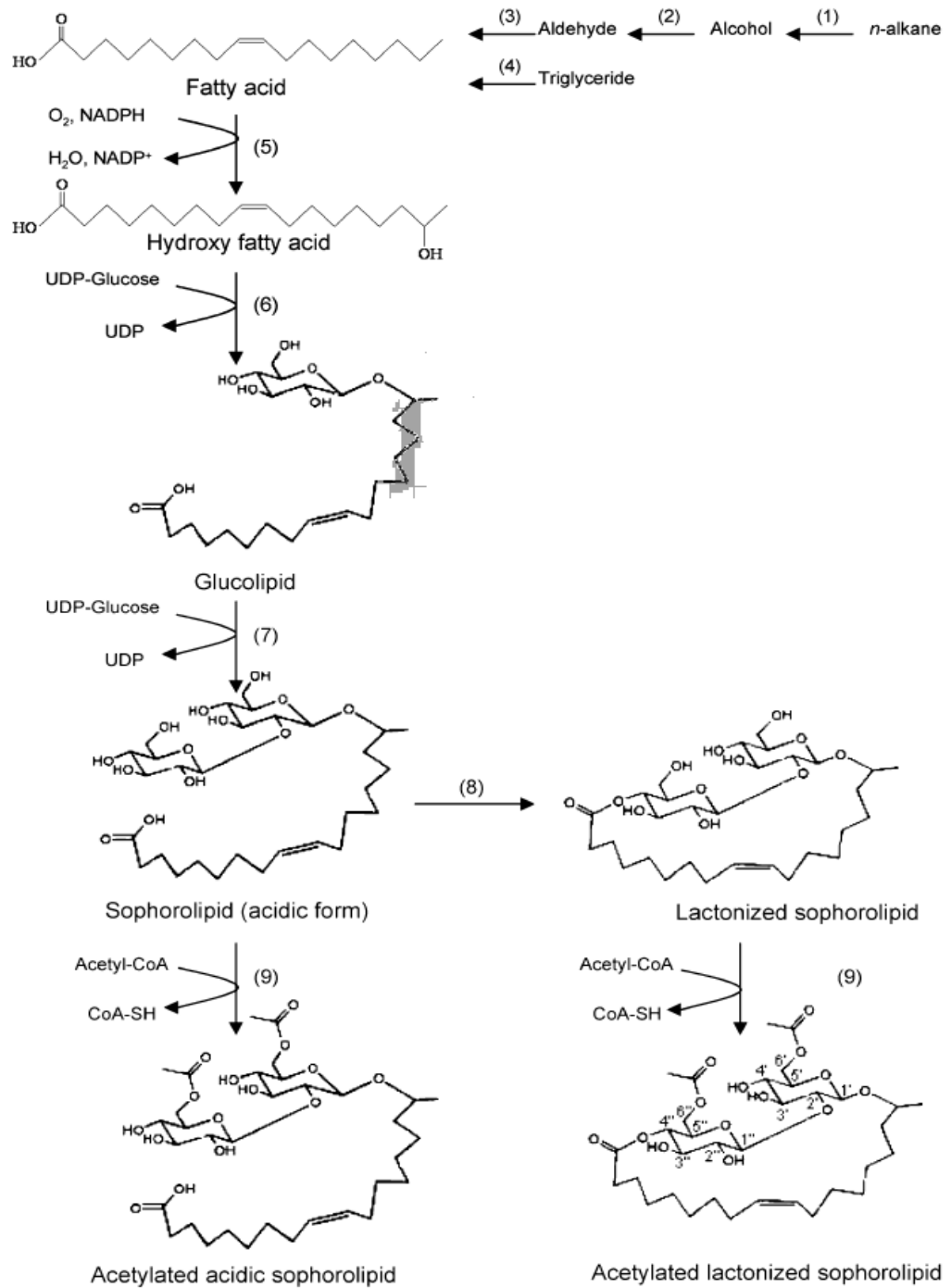
2.4 กระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

การจัดเรียงตัวของผนังเซลล์สิ่งมีชีวิต มีลักษณะเป็นลิพิดไบเลเยอร์ เกิดจากโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเรียงตัวเป็นผนังสองชั้น โดยหันส่วนที่ไม่มีขั้วหรือสายไฮโดรคาร์บอนเข้าหาส่วนที่ไม่มีขั้วเช่นเดียวกัน และหันส่วนที่มีขั้วออกนอกเซลล์ (extracellular) และไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ในเซลล์ จากลักษณะดังกล่าวทำให้การนำแหล่งอาหารคาร์บอนและกระบวนการขนย้าย (transport) ไฮโดรคาร์บอนเข้าสู่เซลล์ทำได้ง่ายขึ้น จากการรวมตัวระหว่างสารประกอบไฮโดรคาร์บอนกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ในการเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารลดแรงตึงผิว หรือจุลินทรีย์ผลิตขึ้นมาเอง ส่งผลให้การละลายและการกระจายตัวของโมเลกุลสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในสารละลายดีขึ้น กรณีที่สารประกอบไฮโดรคาร์บอนมีขนาดใหญ่กว่าขนาดของจุลินทรีย์ จุลินทรีย์จะเกาะล้อมรอบหยดสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยตรงและอาศัยสารลดแรงตึงผิวช่วยในการยึดเกาะ จากนั้นจึงเกิดการขนย้ายสารเข้าไปในเซลล์ โดยอาศัยการกระจายตัวของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนรวมตัวกับโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวในรูปของไมเซลล์ ทำให้สามารถขนย้ายผ่านผนังเซลล์ได้ (Sekelsky และ Shreve, 1999 และ Al-Tahhan และคณะ, 2000)

แหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน ย่อมมีลักษณะการนำไปใช้ของจุลินทรีย์แตกต่างกัน สำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นนิยมใช้ทั้งแหล่งคาร์บอนชนิดที่ละลายน้ำ และไม่ละลายน้ำ เป็นสารตั้งต้น หากเติมเฉพาะแหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำในการเลี้ยงจุลินทรีย์ กรดไขมันจะถูกสร้างจาก *de novo* โดยไพรูเวทที่ได้จากปฏิกิริยาไกลโคไลซิส ถูกเปลี่ยนเป็นอะซิติล โคเอ จากนั้นจึงถูกนำไปใช้ผ่านทางกระบวนการ บีตา ออกซิเดชัน เพื่อใช้สำหรับ cell maintenance ทำให้ขาดสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดไขมัน การแก้ไขปัญหาทำได้โดยการเติมแหล่งคาร์บอนชนิดไม่ละลายน้ำ เพื่อเป็นสารตั้งต้นสำหรับส่วนของกรดไขมันในการสร้างโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ตัวอย่างการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ชนิดแมนโนซิลอิทธิพรทอลลิพิด และไซโฟโรลิพิด เป็นสารลดแรงตึงผิวที่ยีสต์สามารถผลิตได้เป็นปริมาณมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งไซโฟโรลิพิดนั้นผลิตจากยีสต์ที่ไม่ก่อโรค จึงได้รับความสนใจเป็นอย่างยิ่ง โครงสร้างหลักของไซโฟโรลิพิด ประกอบด้วยกลูโคสและกรดไขมัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงควรมีแหล่งคาร์บอนทั้งสองชนิดนี้ ในขั้นตอนการผลิตหากใช้อัลเคนเป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อเอนไซม์ cytochrome P450 monooxygenase จะทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ปลายสายอัลเคน ได้เป็นแอลกอฮอล์ จากนั้นเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase) และเอนไซม์อัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (aldehyde dehydrogenase) จะเข้าทำปฏิกิริยาต่อ เกิดเป็นอัลดีไฮด์ (aldehyde) และกรดไขมันตามลำดับ ถ้าหากใช้สารตั้งต้นเป็นไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) เอนไซม์ไลเปส (lipase) จะเข้ามาทำปฏิกิริยาได้เป็นกรดไขมัน และกรดไขมันที่ได้จะเข้าสู่กระบวนการบีตาออกซิเดชันต่อไป

ขั้นแรก กรดไขมันจะถูกเติมหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งปลายสาย (ω) หรือ ตำแหน่งก่อนปลายสาย ($\omega-1$) ได้เป็น hydroxyl fatty acid จากการทำงานของ membrane bound NADP monooxygenase หรือเอนไซม์ cytochrome P450 monooxygenase จากนั้นเอนไซม์ glycosyltransferase I จะเติมกลูโคสจาก nucleotide-activate glucose [uridine diphosphate (UDP)-glucose] เข้าที่หมู่ไฮดรอกซิลของกรดไขมันที่ตำแหน่ง C1' ด้วยพันธะไกลโคซิดิก ได้เป็นกลูโคลิพิด (glucolipid) ต่อจากนั้นเอนไซม์ glycosyltransferase II จะทำการเติมกลูโคสตัวที่สองที่ตำแหน่ง C2' ของกลูโคสตัวแรก เกิดเป็นไซโฟโรลิพิดในรูปของ acidic form และไซโฟโรลิพิดเหล่านี้มักจะถูกเปลี่ยนแปลงต่อด้วยการทำปฏิกิริยา esterification ภายในเซลล์ ส่งผลให้หมู่คาร์บอกซิลที่ปลายกรดไขมันเชื่อมต่อกับหมู่ไฮดรอกซิลของน้ำตาลไซโฟไรส ที่ตำแหน่ง 4' หรือบางครั้งอาจเกิดที่ตำแหน่ง 6' หรือ 6'' เกิดเป็นวง เรียกว่า lactonic form และอาจเกิดปฏิกิริยาการเติมหมู่อะซิติลที่ส่วนหัวที่เป็นคาร์โบไฮเดรตที่ตำแหน่ง 6' และ/หรือ 6'' โดยเอนไซม์ acetyl transferase แสดงในรูปที่ 2.16



รูปที่ 2.16 แสดงกระบวนการผลิตโซไฟโรลิพิดจาก *Candida bombicola* ATCC 22214

- (1) cytochrome P450 monooxygenase
- (2) alcohol-dehydrogenase
- (3) aldehyde-dehydrogenase
- (4) lipase
- (5) cytochrome P450 monooxygenase
- (6) glycosyltransferase I
- (7) glycosyltransferase II
- (8) lactonesterase
- (9) acetyl transferase

ที่มา: Van Bogaert และคณะ (2007)

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

1. แหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนที่มักนำมาใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ แบ่งเป็น 2 กลุ่มหลักๆ คือ กลุ่มที่ละลายน้ำ (glycidic) ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต จำพวกกลูโคส ซูโครส กลีเซอรอล และกลุ่มที่ไม่ละลายน้ำ (lipidic) เช่น ไฮโดรคาร์บอน น้ำมันพืชชนิดต่างๆ ซึ่งสมบัติของแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิด ย่อมส่งผลต่อ ชนิด คุณภาพ และปริมาณของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ (Raza และคณะ, 2007) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการใช้แหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูก สามารถผลิตทดแทนใหม่ได้ และเหลือทิ้งจากทางเกษตร มาใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เพื่อลดต้นทุนการผลิตเช่นกัน ตัวอย่างเช่น ไขมันสัตว์ โมลาส แลคติกเวย์ เป็นต้น

การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยยีสต์นั้น หากมีการใช้แหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว เช่น กลูโคส หรือ อัลเคน อย่างใดอย่างหนึ่งนั้น พบว่าสามารถผลิตไซโฟโรลิพิดได้ แต่จะผลิตได้ในปริมาณน้อยกว่าการใช้แหล่งคาร์บอนสองชนิดร่วมกัน คือ ทั้งชนิดละลายน้ำและไม่ละลายน้ำ และเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสสามารถผลิตไซโฟโรลิพิดได้ปริมาณมากกว่าน้ำตาลซูโครส (Klekner และคณะ, 1991) และเมื่อใช้สารตั้งต้นเป็นกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอนแตกต่างกัน ปริมาณของไซโฟโรลิพิดที่ผลิตได้ก็แตกต่างกัน เช่น การผลิตไซโฟโรลิพิดจาก *Candida bombicola* ATCC22214 พบว่า เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกรดไขมันที่มีคาร์บอน 18 อะตอม ชนิดอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว 1 ตำแหน่ง ยีสต์สามารถผลิตไซโฟโรลิพิดได้ปริมาณมากกว่าการใช้กรดไขมันที่มีคาร์บอนน้อยกว่า 16 อะตอม และมากกว่า 20 อะตอมเป็นสารตั้งต้น (Felse และคณะ, 2007) นอกจากนี้ยังพบว่าส่วนของ hydroxyl fatty acid ของไซโฟโรลิพิดที่ใช้โดเดเคน (dodecane) เป็นสารตั้งต้น จะมีโครงสร้างเป็น hydroxydodecanoic fatty acid ซึ่งไม่พบในไซโฟโรลิพิดที่ผลิตได้จากสารตั้งต้นชนิดอื่น และในส่วนของกรดไขมันจะมีความยาวเพิ่มขึ้นตามความยาวของสายคาร์บอนของสารตั้งต้น (Cavalero และ Cooper, 2003)

2. แหล่งไนโตรเจน

องค์ประกอบอื่นๆ ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ คือ แหล่งไนโตรเจน ไนโตรเจนนั้นมีความจำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ โดยมีความสำคัญต่อกระบวนการสร้างโปรตีนและเอนไซม์ ซึ่งแหล่งไนโตรเจนที่ถูกใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยยีสต์มีหลายชนิด เช่น ยูเรีย แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรท โซเดียมไนเตรท เพปโตน สารสกัดมอลต์ สารสกัดเนื้อ และสารสกัดยีสต์ โดยเฉพาะสารสกัดยีสต์ได้ถูกนำมาใช้มากที่สุด ส่วนความเข้มข้นที่ใช้จะแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และอาหารเลี้ยง

เชื้อ จากงานวิจัยของ Casas และ Garcia-Ochoa (1999) พบว่า การผลิตไกลโคลิพิดโดยยีสต์ *C. bombicola* เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารสกัดยีสต์ที่สูง จะส่งผลให้ปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้น แต่การผลิตไกลโคลิพิดลดลง เนื่องจากแหล่งคาร์บอนได้ถูกใช้หมดไปสำหรับการเจริญของยีสต์ นอกจากนี้อีกหนึ่งปัจจัยที่สำคัญ คือ อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) เช่น *Pseudomonas fluorescens* สามารถผลิตแรมโนลิพิดได้ดีที่สุด เมื่อมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10 แต่จะให้ผลผลิตน้อยลงเมื่อมีอัตราส่วนเพิ่มขึ้นเป็น 30 และ 50 (Abouseoud และคณะ, 2008) แรมโนลิพิดสามารถผลิตได้ดีที่สุด เมื่อจำกัดปริมาณไนโตรเจนที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 16:1 และ 18:1 (Guerra-Santos และคณะ, 1984)

3. ความเป็นกรดต่างและอุณหภูมิ

จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีที่ความเป็นกรดต่างแตกต่างกัน เช่น ความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างยิ่งต่อการผลิตไซโฟโรลิพิด Bernardski และคณะ (2004) ได้ศึกษาปัจจัยของความเป็นกรดต่างต่อการผลิตไกลโคลิพิดโดย *C. antarctica* และ *C. apicola* พบว่า เมื่อควบคุมค่าความเป็นกรดต่างที่ 5.5 สามารถผลิตไกลโคลิพิดได้ปริมาณมาก ขณะที่ไม่มี การควบคุมความเป็นกรดต่างการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะลดลง เช่นเดียวกับ *Candida bombicola* ATCC 22214 สามารถผลิตได้ดีเมื่อมีความเป็นกรดต่างเริ่มต้นเท่ากับ 3.5 และควบคุมอุณหภูมิระหว่างการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งค่าความเป็นกรดต่างที่ต่ำนี้สามารถป้องกันการปนเปื้อนของน้ำเลี้ยงเชื้อ (Davila และคณะ, 1997) กระบวนการหมักของ *C. bombicola* ATCC 22214 ส่วนมากเลี้ยงที่ 25 หรือ 30 องศาเซลเซียส โดยไซโฟโรลิพิดที่ผลิตได้มีปริมาณใกล้เคียงกัน แต่ที่ 25 องศาเซลเซียส การเจริญของจุลินทรีย์ต่ำกว่าแต่มีอัตราการใช้กลูโคสสูงกว่าเมื่อเทียบกับ 30 องศาเซลเซียส (Casas และ Garcia-Ochoa, 1999) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าอุณหภูมิส่งผลเพียงเล็กน้อยต่อสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เช่น ค่าแรงตึงผิว ค่าแรงตึงระหว่างผิวที่ประจัน และประสิทธิภาพการก่ออิมัลชัน เป็นต้น (Desai และ Banat, 1997)

4. แหล่งแร่ธาตุและวิตามิน

แร่ธาตุและวิตามินเป็นปัจจัยสำคัญในการส่งเสริมหรือยับยั้งการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เช่น การเติมเหล็ก ฟอสเฟต และแมงกานีสในอาหารเลี้ยงเชื้อ ช่วยเพิ่มปริมาณการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *B. subtilis* (Wei, 2003) ความเข้มข้นของเกลือที่สูงเกินกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ส่งผลต่อการทำงานของเซลล์และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และมีผลต่อค่า CMC เล็กน้อย (Abu-Ruwaida และคณะ, 1991)

5. การให้อากาศ

การให้อากาศ และการกวน เป็นการเพิ่มปริมาณออกซิเจนและช่วยในการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอให้กับจุลินทรีย์และอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งการละลายของออกซิเจนนี้มีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ปริมาณออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อจะเป็นตัวควบคุมอัตราการเจริญและการผลิตสารเมตาบอไลต์ ซึ่งความต้องการจะแตกต่างกันออกไปในจุลินทรีย์แต่ละชนิด เช่น ในการเลี้ยง *Nocardia erythropolis* เมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศและอัตราเร็วการกวน จะมีอัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลดลงเนื่องจากแรงเฉือนที่มากเกินไปมีผลต่อการเจริญเซลล์ในทางตรงข้าม ยีสต์สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ในปริมาณที่สูงขึ้น เนื่องจากมีการละลายของออกซิเจนสูงขึ้น (Gautam และ Tyagi, 2005) การละลายของออกซิเจนยังส่งผลถึงโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้เช่นกัน เช่น เมื่อเลี้ยงยีสต์ในระดับขวดเขย่า จะสามารถผลิตไซโฟโรลิพิดแบบอะซิติกได้ปริมาณมากกว่าแบบแลคโตน ตรงข้ามกับการเลี้ยงเชื้อในถังหมักที่ผลิตไซโฟโรลิพิดแบบแลคโตนได้มากกว่า โดยปริมาณการละลายของออกซิเจนน่าจะเป็นปัจจัยสำคัญของการผลิตไซโฟโรลิพิดในรูปแบบต่างๆ (Davila และคณะ, 1992)

นอกจากนี้การผลิตเซอร์แฟคตินจาก *B. subtilis* ATCC21332 พบว่าที่อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm ความเร็วในการเขย่าที่ 300 รอบต่อนาที จะให้ผลผลิตสูงสุด (Yeh และคณะ, 2006) แต่การผลิตเซอร์แฟคตินจาก *B. licheniformis* JF-2 ได้ดีที่สุดในภาวะการจำกัดปริมาณออกซิเจน (Lin และคณะ, 1994) เป็นต้น ทั้งนี้จากการศึกษาของ Sheppard และ Cooper (1990) ได้สรุปว่าการถ่ายเทของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยสำคัญสำหรับการพัฒนากระบวนการหมักและการผลิตเซอร์แฟคตินในระดับขยายส่วน

การใช้กระบวนการหมักเพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระดับอุตสาหกรรม จำเป็นต้องทำให้ต้นทุนการผลิตต่ำที่สุด เพื่อให้ผลผลิตที่ได้มีราคาไม่สูงจนเกินไป และสามารถแข่งขันกับการผลิตโดยการใช้กระบวนการทางเคมีซึ่งมีราคาต่ำกว่า ปัจจัยที่สำคัญในการลดต้นทุนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ คือ การคัดเลือก การปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ การใช้แหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูก ซึ่งจะช่วยลดต้นทุนการผลิตได้ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ เช่น ของเสียจากโรงงานการเกษตร (Makkar และ Cameotra, 1999) หรือจากวัสดุที่ผลิตทดแทนใหม่ได้ เช่น น้ำมันพืช เป็นต้น การพัฒนากระบวนการผลิต รวมถึงการเลือกวิธี การออกแบบขั้นตอน ตลอดจนปัจจัยต่างๆ ในกระบวนการหมักให้เหมาะสม เพื่อให้จุลินทรีย์สามารถผลิตผลิตภัณฑ์ได้ในปริมาณมาก เพื่อลดต้นทุนและราคาในการจัดการ (Salihu และคณะ, 2009)

2.6 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระดับขยายส่วน

การศึกษาทดลองภายในห้องปฏิบัติการนั้น โดยทั่วไปนิยมเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในระดับขวดเขย่า เนื่องจากสามารถทำเป็นจำนวนมากหลายๆ การทดลองได้ ไม่ยุ่งยาก และมีโอกาสปนเปื้อนน้อย จึงช่วยให้สามารถศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารนั้นๆ ได้ง่าย อย่างไรก็ตามการเลี้ยงในระดับขวดเขย่าก็มีข้อจำกัดในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงเกี่ยวกับเมแทบอลิซึม ผลของอุณหภูมิ อัตราการให้อากาศ การเติมสารชนิดต่างๆ และการปรับความเป็นกรดต่างในระหว่างการเลี้ยงเชื้อดังนั้นก็ก่อนที่จะพัฒนากระบวนการหมักไปจนถึงระดับอุตสาหกรรมได้ จะต้องมีการศึกษาปัจจัยต่างๆ เหล่านี้ในถังหมักขนาดเล็กระดับห้องปฏิบัติการก่อน เนื่องจากถังหมักระดับห้องปฏิบัติการนี้มีลักษณะคล้ายกับถังหมักที่ใช้ในระดับอุตสาหกรรม เพียงแต่มีขนาดเล็กกว่า จึงทำให้สามารถศึกษาปรับปรุงภาวะต่างๆ ให้เหมาะสมได้ โดยที่เสียค่าใช้จ่ายไม่สูงนัก ก่อนที่จะขยายขนาดไปสู่การผลิตในระดับนำร่องและระดับอุตสาหกรรมต่อไป

กระบวนการหมักแบบแบคทีเรีย

กระบวนการหมักแบบแบคทีเรีย เป็นกระบวนการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในระบบปิด ซึ่งสามารถทำได้ทั้งในระดับขวดเขย่าหรือถังหมักที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญ และเลี้ยงเชื้อภายใต้ภาวะที่เหมาะสม กระบวนการหมักแบบนี้จะทำในระบบปิดที่มีสารอาหารเริ่มต้นปริมาณจำกัด และเมื่อใส่จุลินทรีย์ลงในระบบแล้วจะไม่มีสารอาหารใดๆ เพิ่มลงไปอีก เซลล์จะเจริญจนกระทั่งองค์ประกอบของสารอาหารที่จำเป็นหมดไป หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม เป็นต้น จากการเลี้ยงเชื้อแบบแบคทีเรียจะเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่ประโยชน์ในการพัฒนาการเลี้ยงเชื้อแบบเฟดแบคทีเรียต่อไป

สำหรับผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดไซโฟโวลีฟิดจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตได้ส่วนมากอยู่ในกลุ่มของยีสต์ เช่น *Candida bombicola* และ *Pichia anomala* ซึ่ง *P. anomala* สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีแป้งและไนโตรเจนเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ตามลำดับ และจัดเป็น facultative yeast โดยมีอัตราการเจริญและความหนาแน่นของเซลล์สูง ในภาวะที่มีออกซิเจนและความเข้มข้นของน้ำตาลสูง เพราะฉะนั้นในระหว่างกระบวนการเลี้ยง *P. anomala* ในถังหมักซึ่งต้องการให้เชื้อมีการแบ่งตัวจำนวนมาก จึงสามารถเติมน้ำตาลในความเข้มข้นสูงในอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นได้ (Walker, 2010) ในส่วนของสภาพแวดล้อมในการผลิตไซโฟโวลีฟิดในถังหมัก

Hommel และคณะ (1994) ได้ทำการผลิตไซโฟโวลีฟิดโดย *C. apicola* IMET 43747 ในถังหมักแบบแบคทีเรีย โดยมีภาวะที่เหมาะสมคือ ควบคุมอัตราการให้อากาศที่ 0.6 vvm อัตราเร็วใบกวนที่ 300 rpm อุณหภูมิ 25 ± 0.5 องศาเซลเซียส ผลผลิตที่ได้เท่ากับ 22 กรัมต่อลิตร

Kim และคณะ (1997) ได้ทำการผลิตไซโฟโรลิพิดโดย *Torulopsis bombicola* ATCC 22214 ในถังหมักแบบแบตช์ โดยใช้กลูโคสและน้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 vvm อัตราเร็วใบกวน 500 rpm และได้ผลผลิต 40-80 กรัมต่อลิตร

Hu และ Ju (2001a) ได้ทำการการผลิตไซโฟโรลิพิดโดยยีสต์ *C. bombicola* ATCC 22214 โดยใช้กลูโคสและน้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน ในถังหมักแบบแบตช์ ที่ควบคุมอัตราเร็วใบกวนที่ 500 rpm อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm และควบคุมอุณหภูมิ 30 ± 0.2 องศาเซลเซียส ได้ผลผลิตเท่ากับ 0.20 กรัมต่อกรัมของน้ำมันถั่วเหลือง โดยไซโฟโรลิพิดที่ผลิตได้มีโครงสร้างแบบแลคโตนเป็นส่วนมาก และพบส่วนหางที่เป็นกรดไขมัน C16 และ C18 ทั้งชนิดอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว

Shah และคณะ (2007) พบว่า การผลิตไซโฟโรลิพิดโดยยีสต์ *C. bombicola* ATCC 22214 ในถังหมักแบบแบตช์ ที่ควบคุมอัตราเร็วใบกวน 400 rpm และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถผลิตไซโฟโรลิพิดได้ 42 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีปริมาณสูงกว่าการเลี้ยงเชื้อในระดับขวดเขย่าที่เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm ที่ผลิตไซโฟโรลิพิดได้ 38 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้เนื่องจากกระบวนการหมักภายในถังหมักนั้นสามารถควบคุมภาวะต่างๆได้ดีกว่า ทั้งการควบคุมอุณหภูมิ ความเป็นกรดต่าง รวมถึงมีการกวนที่ช่วยให้จุลินทรีย์และสารอาหารภายในถังหมักโดยเฉพาะแหล่งคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำกระจายตัวได้อย่างสม่ำเสมอ และการให้อากาศเพื่อให้จุลินทรีย์ได้รับออกซิเจนอย่างเพียงพอ ส่งผลให้ค่าการละลายของออกซิเจนเพิ่มมากขึ้น

นอกจากนี้การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในถังหมักมักมีปัญหาเกี่ยวกับการเกิดฟอง แต่จากการศึกษาของ Rau และคณะ (2005) ได้ใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นทั้งแหล่งคาร์บอนและช่วยในการลดการเกิดฟอง ซึ่งช่วยเพิ่มปริมาณของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้อีกด้วย

ตารางที่ 2.2 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทไฮโฟรลิฟิดจากยีสต์ในแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

จุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน	ระดับการผลิต	ผลผลิต (กรัมต่อลิตร)	อ้างอิง
<i>Torulopsis apicola</i> IMET 43747	- กลูโคส และน้ำมันพืช	- ขวดเขย่า	5-90	Stüwer และคณะ, 1987
<i>Candida bombicola</i> CBS 6009	- กลูโคส และ Rapeseed ester	- ถังหมัก	320	Davila และคณะ, 1992
<i>Torulopsis bombicola</i> ATCC 22214	- กลูโคส และน้ำมันถั่วเหลือง	- ถังหมัก	40-80	Kim และคณะ, 1997
<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214	- Rapeseed oil และ whey	- ถังหมัก	280	Daniel และคณะ, 1998
<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214	- น้ำมันเหลือทิ้งจากร้านอาหาร - กรดโอเลอิก	- ขวดเขย่า - ถังหมัก แบบแบตช์ - ขวดเขย่า - ถังหมัก แบบแบตช์	30 34 38 42	Shah และคณะ, 2007
<i>Candida lipolytica</i> UCP 0988	- กลูโคส และน้ำมันคาโนลา	- ขวดเขย่า	8	Sarubbo และคณะ, 2007
<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214	- กรดโอเลอิก และ Soy molasses - กลูโคส และ Beef tallow	- ถังหมัก - ถังหมัก	53-75 32	Solaiman และคณะ, 2007
<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214	- กลูโคส และ Tallow fatty acid - กลูโคส และ Coconut fatty acid	- ขวดเขย่า - ขวดเขย่า	120 40	Felse และคณะ, 2007
<i>Starmerella bombicola</i> NRRL Y-17069	- น้ำมันถั่วเหลือง และ Sugarcane molasses	- ถังหมัก	63.7	Deverey และ Pakshirajan, 2009

2.7 การประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวส่วนใหญ่สังเคราะห์ได้จากสารเคมี จนกระทั่งในช่วงหลายปีที่ผ่านมาสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้เข้ามามีบทบาทในอุตสาหกรรมหลายภาคส่วนเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากมีสมบัติและโครงสร้างที่หลากหลาย ทำให้เลือกนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้อย่างเหมาะสมในอุตสาหกรรมด้านต่างๆ ดังนี้

1. อุตสาหกรรมอาหาร

มีการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อควบคุมการรวมตัวของหยดไขมันในอาหาร ส่งเสริมให้คุณภาพของแป้งสาลี มีผิวสัมผัสดีขึ้น ช่วยยืดอายุการเก็บผลิตภัณฑ์ที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบ ป้องกันการกระเด็นของน้ำมันระหว่างทอด นอกจากนี้ยังเพิ่มความเข้ากันเป็นเนื้อเดียวในผลิตภัณฑ์ที่มีไขมัน เช่น เบเกอรี่และไอศกรีม จะมีการใส่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อเพิ่มความเนียน เพิ่มการละลายของไขมัน และยังช่วยรักษาความเสถียรของไขมัน แรมนโนลิพิดยังสามารถช่วยเพิ่มคุณภาพของครีมเนย ครัวซองท์ และผลิตภัณฑ์แช่แข็ง รวมถึงใช้เป็นสารด้านการยึดเกาะของจุลินทรีย์ในบริเวณพื้นผิวที่ต้องสัมผัสกับอาหาร เพื่อป้องกันการเน่าเสียและการแพร่กระจายของเชื้อโรคในโรงงานอาหาร (Gautam และ Tyagi, 2006) โดยจากการศึกษาของ Meylheuc และคณะ (2006) พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดไม่มีประจุที่ผลิตโดย *Pseudomonas fluorescens* สามารถลดจำนวนของ *Listeria monocytogenes* LO28 บนพื้นผิวของสแตนเลส สตีล และ polytetrafluoroethylene ได้

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นประโยชน์หลายด้านในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากสมบัติในการลดการยึดเกาะ (anti-adhesive) ประกอบกับสามารถก่ออิมัลชัน และยังมีฤทธิ์ด้านจุลินทรีย์ ซึ่งน่าสนใจสำหรับใช้เป็นสารยับยั้งและทำลายการเกิดไบโอฟิล์มในพื้นที่ที่ต้องสัมผัสอาหาร รวมทั้งยังเป็นส่วนประกอบในอาหารที่มีสมบัติหลากหลาย อย่างไรก็ตาม การนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาใช้ในอาหารยังเป็นที่ถกเถียงถึงความปลอดภัย และราคาต้นทุนการผลิตสูง ดังนั้น จึงมีการนำวัสดุเหลือทิ้งจากภาคการเกษตรมาใช้เป็นสารตั้งต้นเพื่อลดต้นทุน รวมถึงการเลือกใช้จุลินทรีย์กลุ่ม *Lactobacilli* และยีสต์ ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ได้รับการยอมรับว่าเป็น GRAS จึงน่าสนใจอย่างยิ่งสำหรับการประยุกต์ใช้ในภาคอาหารและยาต่อไป

ตารางที่ 2.3 หน้าที่ต่างๆ ของสารลดแรงตึงผิวที่ใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์ในอาหารชนิดต่างๆ
(Kosaric, 1993)

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

2. ด้านเครื่องสำอาง

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดไกลโคลิพิด ได้รับความนิยมนำมาใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางในปริมาณมาก เนื่องจากสามารถเข้ากับผิวหนังได้ดี ไม่เกิดการระคายเคือง หรือเป็นอันตรายต่อผิวหนังมนุษย์ (Pomsunthorntawe และคณะ, 2009a) เช่น โซไฟโรลิพิดที่ผลิตโดย *Candida bombicola* มีสมบัติในการให้ความชุ่มชื้น ช่วยต่อต้านแบคทีเรีย เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และยังเชื่อว่ามีสมบัติในการกระตุ้นการสังเคราะห์เลปตินผ่านเซลล์ adipocytes ซึ่งจะช่วยลดไขมันส่วนเกินในผิวหนังชั้น subcutaneous ได้ (Pelleciar และ André, 2004) รวมไปถึงการนำโซไฟโรลิพิดไปใช้เป็นส่วนผสมสำคัญในเชิงพาณิชย์ ได้แก่ ผลิตภัณฑ์รักษาผิว แชมพูป้องกันรังแค ผลิตภัณฑ์ระงับกลิ่นกาย ในชื่อยี่ห้อ Sopholiance โดยบริษัท Groupe soliance ประเทศฝรั่งเศส แผ่นมาร์คหน้า สบู่ล้างหน้า สบู่เหลว ในชื่อยี่ห้อ Sopholine ประเทศเกาหลี และเป็นสารให้ความชุ่มชื้นใน ลิปสติก อายแชโดว์ แป้งอัดแข็ง ในชื่อยี่ห้อ Sofina โดยบริษัท Kao ประเทศญี่ปุ่น (Kawano และคณะ, 1981) เป็นต้น รวมถึงแมนโนซิลอิทธิฤทธิ์ทอล ลิพิด ก็มีการนำมาใช้เป็นตัวอิมัลซิไฟเออร์ในเครื่องสำอาง ซึ่งมีสมบัติในการต่อต้านริ้วรอย ช่วยให้ผิวเนียนเรียบ นอกจากนี้แบคทีเรียชนิดที่ผลิตโดย *Pseudomonas* sp. ยังมีสมบัติในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่งจำเป็นสำหรับเครื่องสำอางในการช่วยป้องกันการปนเปื้อนจากการสัมผัสเป็นประจำจากผู้ใช้ และมีสมบัติเป็นอิมัลซิไฟเออร์ที่ดี ช่วยเรื่องการเข้ากันและเนื้อสัมผัสที่ดีในเครื่องสำอางอีกด้วย (Lourith และ Kanlayavattanakul, 2009)

3. ด้านสิ่งแวดล้อม

การปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม เกิดจากโรงงานอุตสาหกรรมและสารพิษจากการเกษตร ปล่อยสารประกอบอินทรีย์ และอนินทรีย์ลงในสิ่งแวดล้อมทั้งทางตรงและทางอ้อม สารประกอบเหล่านี้ก่อให้เกิดปัญหาการตกค้างในสิ่งแวดล้อม ยากแก่การกำจัดทำลาย เนื่องจากสารเหล่านี้จับกับอนุภาคของดินได้ง่าย จึงมีการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการบำบัดสารพิษ การประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการกำจัดสารประกอบอินทรีย์ พวกไฮโดรคาร์บอนนั้น สารลดแรงตึงผิวสามารถช่วยรักษาความเสถียรระหว่างน้ำมันกับน้ำ ช่วยกำจัดสารปนเปื้อนด้วยวิธีการละลายแบบเทียม (pseudosolubilization) ช่วยในการเกิดอิมัลชันซึ่งจะช่วยเพิ่มค่าการละลายของไฮโดรคาร์บอนภายในไมเซลล์ ทำให้ผิวสัมผัสระหว่างน้ำมันกับน้ำเพิ่มขึ้น (Volkering และคณะ, 1998) ซึ่งจะเป็นการเพิ่มความสามารถในการเจริญของจุลินทรีย์บนไฮโดรคาร์บอน (bioavailability) เป็นการช่วยกำจัดไฮโดรคาร์บอนออกจากดินให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น (Banat และคณะ, 2010) ตัวอย่างเช่น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *R. erythropolis* 3C-9 ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัด n-hexadecane โดย *Alcanivorax dieselolei* และ

Psychrobacter celer ได้อย่างมีนัยสำคัญ (Noordman และ Janssen, 2002; Peng และคณะ, 2007) ส่วนการกำจัดสารประกอบอินทรีย์ เช่น โลหะหนัก สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะช่วยให้เกิดการรวมไอออน และกำจัดไอออนได้ง่ายขึ้น และจากการรายงานของ Wang และ Mulligan (2009) พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด bioemulsifier ที่ผลิตโดย *Gordonia* sp. BS29 มีประสิทธิภาพในการกำจัดสารหนูในกากแร่หรือในดินที่ปนเปื้อน ภายใต้สภาวะที่มีความเค็ม นอกจากนี้แรมโนลิพิด ยังมีความสามารถในการกำจัดแคดเมียม ตะกั่ว และสังกะสีออกจากดิน โดยการรวมตัวของโลหะหนักกับแรมโนลิพิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ผิวของเซลล์ จากนั้นเซลล์จะนำโลหะหนักเข้าภายในเซลล์จึงลดความเป็นพิษลงได้ และอิมัลชันที่ผลิตโดย *Alcanivorax calcoaceticus* สามารถจับกับยูเรเนียมได้ (Ron และ Rosenberg, 2001)

4. อุตสาหกรรมน้ำมัน

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในกระบวนการนำน้ำมันขึ้นมาใช้ การทำความสะอาดถังเก็บน้ำมัน และกระบวนการขนส่งน้ำมันผ่านท่อ โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายของสารประกอบต่างๆ ในปิโตรเลียมกับน้ำ ช่วยลดความหนืดของน้ำมัน ช่วยกำจัดน้ำออกจากน้ำมันก่อนเข้าสู่กระบวนการถัดไป นอกจากนี้ยังช่วยในการเกิดอิมัลชันของน้ำมัน รวมถึงลดการเกิดฟิล์มของน้ำมันกับชั้นหิน จากการศึกษากของ Makkar และ Cameotra (1998) พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *Bacillus licheniformis* JF-2 และ *B. subtilis* ซึ่งทนร้อนและทนเค็ม สามารถดึงน้ำมันขึ้นมาใช้ได้มากขึ้น 9.3-62 เปอร์เซ็นต์

5. ด้านการแพทย์

ปัจจุบันจุลินทรีย์ดื้อต่อยาปฏิชีวนะมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้การรักษาเป็นไปได้ยาก ดังนั้น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพซึ่งมีสมบัติในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบและรา อีกทั้งยังมีประสิทธิภาพและมีความปลอดภัย จึงเป็นอีกทางเลือกที่น่าสนใจอย่างยิ่งในวงการแพทย์ ตัวอย่างเช่น เซอร์แฟคติน สามารถต้านการอักเสบ ต้านไวรัส ชักนำให้เกิด apoptosis ในเซลล์ Human breast cancer MCF-7 ได้ (Cao, 2010) รวมถึงยับยั้งการเกิดไฟบรินคลอท ยับยั้ง cyclic adenosine monophosphate (cAMP) ไลโคไนซิน อิทุริน เอ แดปโตมายซิน พูมิลาซิดิน วิสโคซิงนาไมด์ มีสมบัติในการต้านไวรัสและราได้ (Baltz และคณะ, 2005) ไฮโฟโรลิพิด สามารถต้านเชื้อไวรัส HIV (Banat และคณะ, 2010) และยับยั้งการหลั่ง cytokine ได้ (Shah และคณะ, 2005) นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้ไลโปโซมและอนุพันธ์ของโคเลสเตอรอลที่ผลิตโดยแมนโนซิลอิทธิทธิทอลลิพิดสำหรับการขนถ่ายยีน ซึ่งมีประสิทธิภาพและปลอดภัยกว่าการใช้ไวรัสเป็นเวกเตอร์ (Singh และ Cameotra, 2004)

6. ด้านอื่นๆ

ด้านการเกษตร การที่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีสมบัติในการทำให้เปียก (wettability) จึงนำมาใช้ในเป็นส่วนผสมในปุ๋ยหรือยาฆ่าแมลง เพื่อช่วยให้การกระจายตัวในดินดีขึ้น นอกจากนี้ แร่โมลิบดีนัมยังมีสมบัติเป็นสารควบคุมทางชีวภาพ โดยการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ และยังสามารถทำลายซุสเปอร์ของจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในพืช เช่น *Pythium* sp., *Phytophthora* sp. และ *Plasmopara* sp. (Banat และคณะ, 2000)

บริษัท Saraya ประเทศญี่ปุ่นสามารถผลิตไซโฟโรลิพิดในเชิงพาณิชย์ได้โดยใช้เป็นสารทำความสะอาดในน้ำยาล้างจาน (Futura และคณะ, 2002) และจากคุณสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ จึงนำมาใช้เป็นส่วนผสมในการทำความสะดวกซักและผลไม้ (Pierce และ Heliman, 1998) นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมกระดาษ สี และเซรามิค โดยใช้เฮเทอโรพอลิแซคคาไรด์ จาก *Macrocystis pyrifera* และ *Azotobacter vinelandii* เป็นสารช่วยกระจายตัวในโรงงานผลิตเซรามิค (Pellerin และคณะ, 1991) ดังตารางที่ 2.4

ด้วยประโยชน์และสมบัติหลายประการที่กล่าวมาข้างต้นเกี่ยวกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ทำให้ปัจจุบันสารลดแรงตึงผิวได้รับความสนใจในการนำมาประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรม และในเชิงพาณิชย์มากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดไกลโคลิพิดที่มักพบได้ในผนังเซลล์ยีสต์ ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นได้มีการจดสิทธิบัตรแล้วทั่วโลกเป็นจำนวนถึง 225 สิทธิบัตร ในจำนวนนี้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดไซโฟโรลิพิดที่ผลิตจากยีสต์ได้ถูกจดสิทธิบัตรปริมาณมากที่สุดคือ 24 เปอร์เซนต์ (Shete และคณะ, 2006) ดังแสดงตัวอย่างของสิทธิบัตรในตารางที่ 2.5 ดังนั้น จึงได้มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากยีสต์มากขึ้น เนื่องจากยีสต์นั้นสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ในปริมาณสูง และหลังออกมาภายนอกเซลล์ง่ายต่อการเก็บเกี่ยว อย่างไรก็ตามเพื่อให้การผลิตมีประสิทธิภาพสูงสุด และต้นทุนการผลิตต่ำลง จำต้องมีการศึกษาพัฒนาแหล่งอาหารให้มีราคาถูกหรือจากวัสดุเหลือใช้ ภาวะการเลี้ยงเชื้อ และปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องในทุกขั้นตอนการผลิต ทั้งนี้หากสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีความคุ้มค่า และมีราคาไม่สูงจนเกินไปนัก จะทำให้สามารถแข่งขันเชิงเศรษฐศาสตร์กับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ได้ ซึ่งหากมีการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไปใช้ทดแทนสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมีมากขึ้นเท่าใด นั่นย่อมหมายความว่าช่วยลดการเกิดมลภาวะเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมมากยิ่งขึ้นเท่านั้น

ตารางที่ 2.4 การประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดต่างๆ (Kosaric, 2001)

Use	Effect of surfactant
Metals Concentration of ores Cutting and forming	Wetting and foaming, collectors and frothers Wetting, emulsification, lubrication and corrosion inhibition in rolling oils, cutting oils
Casting Rust and scale removal Plating	In pickling and electrolytic cleaning Wetting and foaming in electrolytic plating
Paper Pulp treatment Paper machine Calender	Deresinification, washing Defoaming, color leveling and dispersing Wetting and leveling, coating and coloring
Paint and protective coating Pigment preparation Latex paints	Dispersing and wetting of pigment during grinding Emulsification, dispersion of pigment, stabilize latex, retard sedimentation and pigment separation, rheology
Waxes and polishes	Emulsify waxes, stabilize emulsions, antistat
Petroleum production/product Drilling fluids	Emulsify oil, disperse solids, modify rheological properties of drilling fluids for oil and gas wells
Textiles Preparation of fibers Dyeing and printing	Detergent and emulsifier in raw wool scoring; dispersant in viscose rayon spinbath; lubricant and antistat in spinning of hydrophobic filaments Wetting, penetration, solubilization, emulsification, dye leveling, detergency and dispersion
Agricultural Phosphate fertilizers Spray application	Prevent caking during storage Wetting, dispersing, suspending of powdered pesticides and emulsification of pesticide solutions

ตารางที่ 2.4 การประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดต่างๆ (Kosaric, 2001) (ต่อ)

Use	Effect of surfactant
Building and construction	
Paving	Improve bond of asphalt to gravel and sand
Concrete	Promote air entertainment
Elastomers and plastics	
Emulsion polymerization	Solubilization, emulsification of monomers
Foamed polymers	Introduction of air, control of cell size
Latex adhesive	Promote wetting, improve bond strength
Plastic articles	Antistatic agents
Plastic coating and laminating	Wetting agent
Food and beverages	
Food processing plants	For cleaning sanitizing
Fruit and vegetables	Improve removal of pesticides, and in wax coating
Bekery and icecream	Solubilize flevor oils, control consistency, retard staling
Crystallization of sugar	Improve washing, reduce processing time
Cooking fat and oils	Prevent spattering due to super heat and water
Industrial cleaning	
Janitorial supplies	Detergent and sanitizing
Descaling	Wetting agents and corrosion inhibitors in acid cleaning of boiler tubes and heat exchangers
Soft goods	Detergents for laundry and dry cleaning
Leather	
Skins	Detergent and emulsifier in decreasing
Tanning	Promote weting and penetration
Hides	Emulsifiers in fat liquoring
Dyeing	Promote wetting and penetration

ตารางที่ 2.5 ตัวอย่างการจดสิทธิบัตรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดยยีสต์ (Shete และคณะ, 2006)

จุลินทรีย์	หัวข้อ	หมายเลขสิทธิบัตร	วันที่ตีพิมพ์	ผู้จดสิทธิบัตร
<i>T. bombicola</i>	ส่วนประกอบเครื่องสำอางสำหรับผิวและเส้นผม	US 4297340	27-10-1981	Abe Y., Inoue S., Ishida A.
Sophorolipid producers	วิธีปรับปรุงคุณภาพของผลิตภัณฑ์จากแป้งสาลี	JP 61205449	11-09-1986	Akira S., Akira Y.
<i>Candida</i> spp.	การใช้ไซโฟโรลิพิด ชนิดแลคโตน สำหรับรักษารังแคและระงับกลิ่นกาย	EP0209783,B1	28-01-1987	Rothlisberger R., Mager H., Wagner F.
<i>C. bombicola</i> 22214	อนุพันธ์ของไซโฟโรลิพิด	JP 06100581	12-04-1994	Yutaka I., Yasuo G., Masaru K.
<i>Micropolyspora</i>	เตตระกลูโคสและกรดไขมันชนิดเอสเตอร์	JP 06298784	25-10-1994	Ishigami Y., Gama Y., Someya J., Takamori Y., Ito T.
Sophorolipid producers	สารช่วยรักษาความสดของไม้ตัดดอก	US 5536155	16-07-1996	Futaki K., Shigeno K., Hoshi K.
Sophorolipid producers	การใช้ไซโฟโรลิพิดในเครื่องสำอางและการรักษาผิวหนัง	WO 97/01343	25-06-1996	Maingault M.
<i>C. bombicola</i>	กระบวนการผลิตไซโฟโรสโดย <i>C. bombicola</i>	ES 2103688	16-09-1997	Casas P. J. A., Garcia-Ochoa S.
Sophorolipid producers	การใช้ไซโฟโรลิพิดเป็นสารกระตุ้นเมตาบอลิซึมในผิวหนังชั้นไฟโบรบลาสต์	US 6057302	02-05-2000	Borziex F.
Sophorolipid producers	เป็นส่วนประกอบในการขนส่งแบบเยือกแข็ง	JP 2001131538	15-05-2001	Masaru K. Takahashi N., Yoji A., Kazuo N., Tatsu N., Sumiko T.,

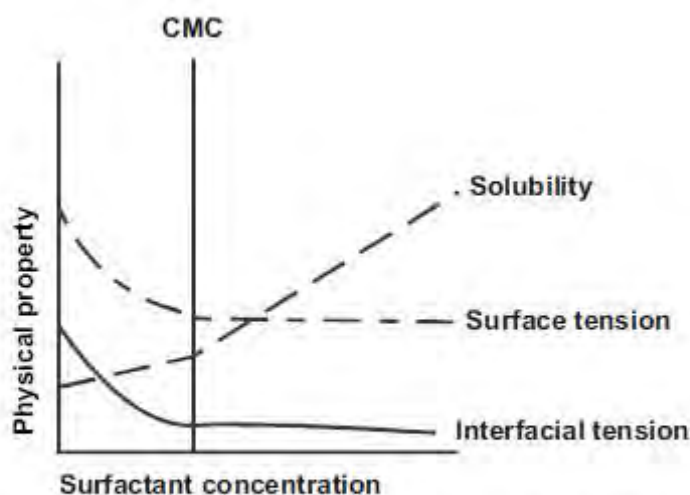
ตารางที่ 2.5 ตัวอย่างการจดสิทธิบัตรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดยยีสต์ (Shete และคณะ, 2006) (ต่อ)

จุลินทรีย์	หัวข้อ	หมายเลขสิทธิบัตร	วันที่ตีพิมพ์	ผู้จดสิทธิบัตร
<i>C. Antarctica</i> T-34	วิธีสำหรับรักษาน้ำมันซอสถั่วเหลือง	JP 2002101847	09-04-2002	Furubayashi M., Nakahara T., Nomura N., Okada K., Nakajima T.
<i>C. bombicola</i> <i>C. bogoriensis</i> <i>C. magnoliae</i> <i>C. apicola</i>	วิธีการผลิตและการนำไซโฟโรลิปิดไปใช้	US 6433152	13-08-2002	Lang S., Brakemeier A., Seiffert-Storicko A.
Sophorolipid producer	การใช้ไซโฟโรลิปิดในเครื่องสำอาง	CA 2192595	-	Hilliton G., Marchal R., Stoltz C., Borzeix F.
Sophorolipid producer	การใช้ไซโฟโรลิปิดเป็นสารกระตุ้นเมตาบอลิซึมในผิวหนังชั้นไฟโบรบลาสต์ และการสังเคราะห์คอลลาเจน	US 6596265	22-07-2003	Borzeix C. F.
<i>C. bombicola</i>	เป็นสารต้านอนุมูลอิสระและ/หรือสารต้านไวรัส	WO2005089522 US2004242501 US2005164955	29-09-2005	Gross R. A., Shah V., Doncel G. F.
Sophorolipid producer	ผงซักฟอก ชนิดฟองน้อยที่ย่อยสลายทางชีวภาพ และทนอุณหภูมิได้ในช่วงกว้าง	WO 03002700	09-01-2003	Furuta T., Igarashi K., Hirata Y.
Sophorolipid producer	ใช้เป็นสารลดสัดส่วน และ/หรือกระตุ้นการสังเคราะห์เลปตินผ่าน adipocyte และช่วยลดไขมันส่วนเกินในชั้น subcutaneous	WO2004108063	16-12-2004	Pellicier F., Andre P.

2.8 การวิเคราะห์สมบัติสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

1. ค่าแรงตึงผิว (surface tension)

หมายถึง แรงที่กระทำระหว่างของเหลวกับอากาศ มีหน่วยเป็น mN/m หรือ dyne/cm โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีโครงสร้างแบบแอมฟิฟิลิก จะสะสมบริเวณผิวน้ำของวัฏภาคที่แตกต่างกัน ทำให้แรงกระทำระหว่างของเหลวกับอากาศลดลง เมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มขึ้น ค่าแรงตึงผิวจะลดลงเรื่อยๆ โดยทั้งสองค่านี้จะมีความสัมพันธ์กันจนกระทั่งถึงจุดที่ความเข้มข้นมากพอจนเกิดการรวมตัวเป็นโครงสร้างไมเซลล์ เรียกว่า ความเข้มข้นวิกฤติการเกิดไมเซลล์ (critical micelle concentration, CMC) ที่จุดนี้เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ค่าแรงตึงผิวจะไม่เปลี่ยนแปลง ซึ่งค่า CMC สามารถบ่งบอกถึงประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชนิดนั้นๆได้ ดังแสดงในรูป 2.17 ความสามารถในการละลายสารที่ไม่ละลายน้ำจะเริ่มที่ CMC และค่อยๆ เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของไมเซลล์ การวัดค่าแรงตึงผิวทำได้โดยใช้เครื่อง tensiometer ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมอย่างกว้างขวาง เนื่องจากค่อนข้างแม่นยำ ไม่ยุ่งยาก ทำได้สะดวกและรวดเร็วในอุณหภูมิต่ำ ค่าแรงตึงผิวของน้ำบริสุทธิ์เท่ากับ 72 mN/m และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ถือว่ามีประสิทธิภาพดีจะทำให้ค่าแรงตึงผิวลดลงเหลือ 35 mN/m (Kosaric, 1993)



รูปที่ 2.17 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตึงผิว แรงตึงระหว่างผิวที่ประจัน และค่าการละลายกับความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ที่มา: Mulligan (2005)

2. ค่าแรงตึงระหว่างผิวที่ประจัน (interfacial tension)

หมายถึง แรงที่กระทำระหว่างของเหลวกับของเหลวที่มีของวิภูภาคต่างกัน มีหน่วยเป็น mN/m การวัดค่าแรงตึงระหว่างผิวที่ประจันจะวัดระหว่างน้ำและสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น น้ำมัน เฮกซาเดเคน หรือน้ำมันก๊าด โดยทั่วไปค่าแรงตึงระหว่างผิวที่ประจันของน้ำกับเฮกซาเดเคนมีค่าเท่ากับ 50 mN/m และค่าแรงตึงระหว่างผิวที่ประจันของน้ำกับน้ำมันก๊าดมีค่าเท่ากับ 30-40 mN/m ซึ่งเมื่อเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะสามารถลดแรงตึงระหว่างผิวที่ประจันลงเหลือ 0.1-1.0 mN/m (Gerson, 1993)

3. การก่ออิมัลชัน (emulsification)

อิมัลชันเป็นระบบที่ประกอบด้วยของเหลว 2 ชนิดที่เข้ากันไม่ได้ หรือไม่ละลายในกันและกัน โดยมีของเหลวชนิดหนึ่งกระจายตัวเป็นหยดเล็กๆอยู่ในของเหลวอีก เป็นระบบที่มีความคงตัวทางเทอร์โมไดนามิกส์ต่ำ จึงต้องมีการเติมสารลดแรงตึงผิวลงไปเพื่อลดแรงตึงระหว่างผิวของเหลวทั้งสอง และลดพลังงานอิสระที่พื้นที่ผิว เป็นการช่วยเพิ่มความคงตัวของอิมัลชัน โดยสามารถแบ่งตามชนิดของของเหลวที่เป็นวิภูภาคภายใน และวิภูภาคภายนอกได้เป็น 3 ชนิด คือ ชนิดน้ำในน้ำมัน (W/O emulsion) ชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W emulsion) และอิมัลชันเชิงซ้อน (multiple emulsion) โดยเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคมีขนาดระหว่าง 0.5-100 ไมโครเมตร (พิมพ์, 2551) การวัดประสิทธิภาพในการเกิดอิมัลชันอาจทำได้ด้วยการวัดค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน คือ การวัดอัตราส่วนระหว่างความสูงของอิมัลชันและความสูงของของเหลวในหลอดทั้งหมดเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง (Patel และ Desai, 1997) หรือค่าการดูดกลืนแสง (Shepherd และคณะ, 1995) และอาจวัดความเสถียรของอิมัลชันที่เกิดขึ้นโดยวัดค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันในระยะเวลานานออกไป

4. ค่าการกระจายตัวของน้ำมัน (oil displacement activity)

เป็นการวัดประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการทำให้แผ่นฟิล์มของน้ำมันสังเคราะห์บนผิวน้ำเกิดเป็นวงใส (clear zone) โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของพื้นที่วงใส แล้วคำนวณหาพื้นที่วงกลมตามสูตร πr^2 มีหน่วยเป็นตารางเซนติเมตร โดยกำหนด 1 ตารางเซนติเมตรของการกระจายตัวของน้ำมันสังเคราะห์เท่ากับ 1 หน่วย วิธีนี้เป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยากและประหยัดค่าใช้จ่าย และยังเป็นวิธีที่เหมาะสมในการวัดกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว เนื่องจากวิธีนี้ใช้สารปริมาณเพียงเล็กน้อยในการวิเคราะห์ คือ 10 ไมโครลิตรเท่านั้น (Morikawa และคณะ, 1993)

5. ค่า Hydrophilic-Lipophilic balance (HLB)

คือสมบัติที่ชอบน้ำและชอบน้ำมันในโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิว ตามทฤษฎีสารลดแรงตึงผิวที่มีค่า HLB สูงระหว่าง 8-18 จะให้อิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ และที่มีค่า HLB ต่ำระหว่าง 3-6 จะให้อิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน ค่า HLB นี้เป็นค่าเฉพาะตัว ซึ่งจะต่างกันออกไปตามโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชนิดนั้นๆ เช่น สารลดแรงตึงผิวชนิดโซโฟโรลิพิด มีค่า HLB เท่ากับ 10-13 (Van Bogaert และคณะ, 2007) ชนิดแมนโนซิลอิทธิทธิทอล ลิพิด ที่ผลิตโดย *Candida sp.* SY16 มีค่า HLB เท่ากับ 8.8 (Kim และคณะ, 2002) เป็นต้น

6. โครมาโทกราฟี (Chromatography)

เป็นเทคนิคที่เป็นประโยชน์ในการแยกสาร ตรวจสอบ และวิเคราะห์ชนิดของสาร โดยอาศัยหลักการการละลายของสารในตัวทำละลายและการถูกดูดซับที่แตกต่างกัน กล่าวคือ สารที่ละลายในตัวทำละลายได้ดีและถูกดูดซับน้อยจะเคลื่อนที่ออกมาก่อน ส่วนสารที่ละลายได้น้อยและถูกดูดซับได้ดีจะเคลื่อนที่ออกมาทีหลัง การแยกของสารนั้นอาศัยความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ระหว่างสารตัวอย่าง วิธีการนี้มีเฟส 2 เฟส คือ เฟสอยู่กับที่ (stationary phase) กับเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) (Skoog, 1988)

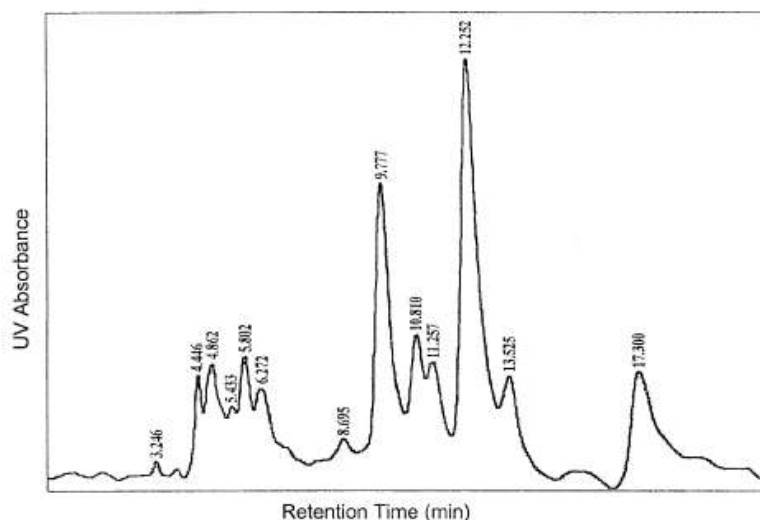
6.1 โครมาโทกราฟีแบบบาง (Thin-Layer Chromatography)

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยก การทำบริสุทธิ์สารประกอบอินทรีย์ที่มีขั้วแตกต่างกัน เฟสคงที่ที่นิยมใช้ คือ ซิลิกาเจลเคลือบบนแผ่นแก้ว เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้จะเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) เทคนิคการแยกทำได้โดยจุดสารตัวอย่างลงบนเฟสคงที่ จากนั้นนำไปใส่ในภาชนะที่บรรจุตัวทำละลาย สารจะเคลื่อนที่ผ่านเฟสคงที่ด้วยแรง capillary action อัตราเร็วที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับความสามารถในการกระจายตัวระหว่างเฟสคงที่และเฟสเคลื่อนที่ ซึ่งบนซิลิกาเจลนั้นจะมีหมู่ไฮดรอกซิลทำให้มีความเป็นขั้วสูง ทำให้สารที่มีขั้วจับบนอนุภาคของเจลได้ดีจึงเคลื่อนที่ได้ช้า ในขณะที่สารไม่มีขั้วจะจับได้น้อยจึงเคลื่อนที่ได้เร็ว ข้อดีของโครมาโทกราฟีชนิดนี้คือ ไม่ยุ่งยาก ต้องการอุปกรณ์น้อย สามารถตรวจแยกสารในปริมาณน้อย ๆ ได้ และสามารถแยกสารออกจากเฟสคงที่โดยสกัดด้วยตัวทำละลาย (Heyd และคณะ, 2008)

6.2 ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid chromatography)

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์สารประกอบที่อยู่ในรูปของเหลว โดยใช้เครื่องสูบล้างดันสูง (high pressure pump) สูบล้างตัวทำละลายซึ่งทำหน้าที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase)

พาสารถัวอย่างที่ถูกฉีดเข้าทางช่องฉีดสาร (injector) ผ่านอนุภาคที่เป็นเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) ซึ่งบรรจุอยู่ในคอลัมน์ (column) สารผสมตัวอย่างจะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์และถูกแยกออกมา สารจะถูกแยกออกมาในเวลาที่แตกต่างกัน โดยสารผสมที่อยู่ในตัวอย่างสามารถถูกแยกออกจากกันได้นั้น จะขึ้นอยู่กับความเร็วของการเคลื่อนที่ของสารประกอบนั้นกับเฟสคงที่ สารที่ดูดซับได้ดีในเฟสคงที่จะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ได้เร็ว สารนั้นก็就会被แยกออกมาก่อน ส่วนสารที่ดูดซับได้ดีในเฟสคงที่จะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ได้ช้าจะถูกแยกออกมาทีหลัง (Lindsay,1991) เพื่อผ่านเข้าสู่เครื่องตรวจวัด (detector) เช่น UV ELSD ในเวลาที่แตกต่างกัน สัญญาณที่วัดได้จะอยู่ในรูปสัญญาณไฟฟ้าตามเวลา และปริมาณของสารแต่ละตัวที่ตรวจวัดได้ จากนั้นสัญญาณจะถูกส่งไปยังเครื่องบันทึกสัญญาณ เพื่อแสดงผลออกมาเป็นโครมาโทแกรม เทคนิค HPLC แบ่งเป็น 2 แบบตามลักษณะการใช้เฟสเคลื่อนที่คือ การแยกโดยใช้องค์ประกอบของเฟสคงที่แบบเดียวตลอดการแยก (Isocratic) และการแยกโดยมีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของเฟสคงที่ในระหว่างการแยกแบบต่อเนื่องหรือแบบที่ไล่ขั้น (Gradient elution) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่จะนำมาแยกด้วยวิธีนี้ ต้องทำให้มีความบริสุทธิ์เบื้องต้นก่อน ตัวอย่างเช่น โซไฟโวลิปิดที่ได้จากกระบวนการหมัก ก่อนผ่านการแยกด้วย HPLC ได้ผ่านขั้นตอนการแยกบนโครมาโทกราฟีแบบบางมาแล้ว โดยการวิเคราะห์โซไฟลิปิดนั้นนิยมใช้คอลัมน์ C-18 เป็นเฟสคงที่ และใช้สารละลายอะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile) เป็นเฟสเคลื่อนที่ ตรวจวัดด้วยเครื่อง UV detector ที่ 207 นาโนเมตร อัตราการชะเท่ากับ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นโซไฟโวลิปิดที่มีโครงสร้างแบบต่างๆ จะแยกออกที่เวลาแตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 2.18 (Hu และ Ju, 2001a)

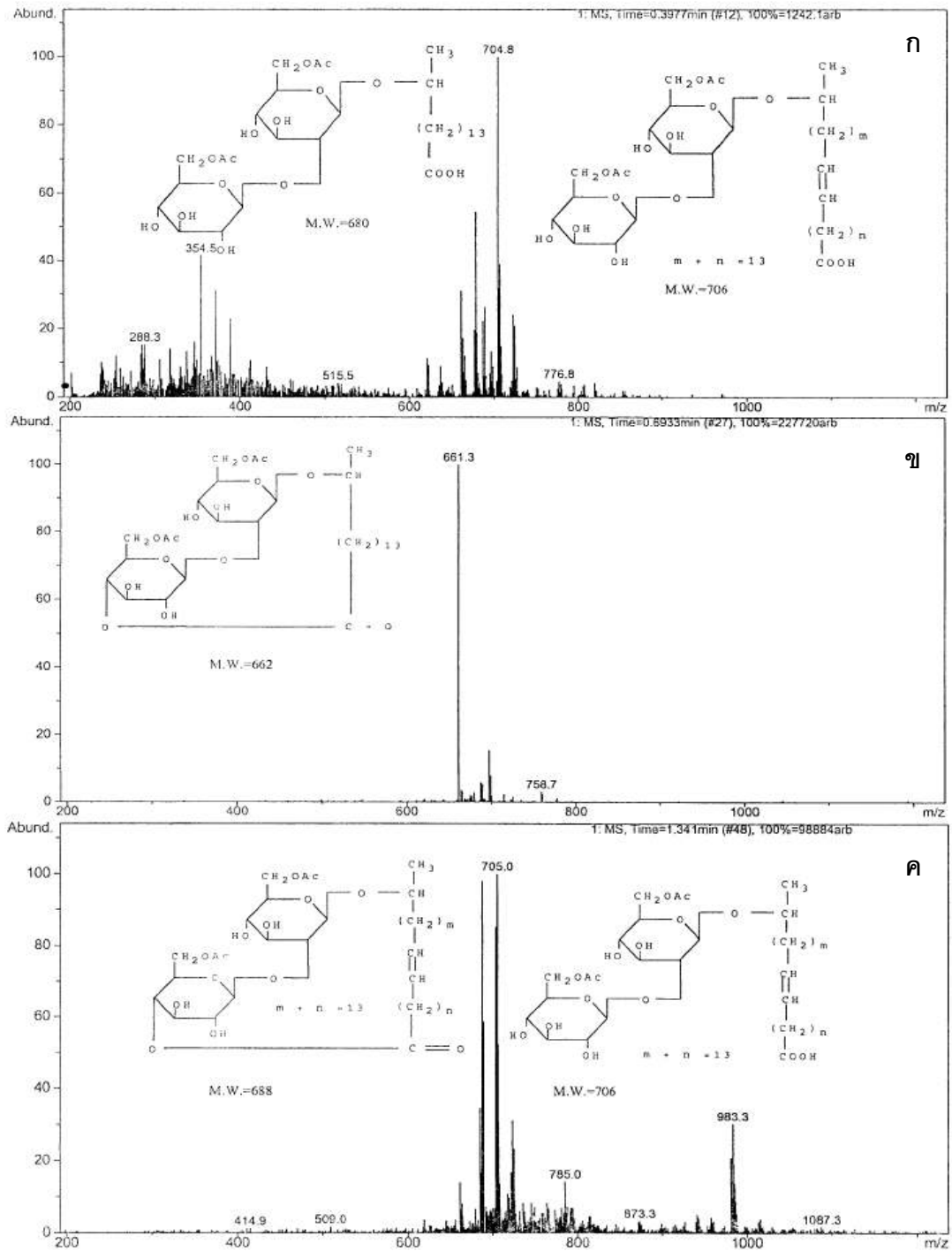


รูปที่ 2.18 โครมาโทแกรม HPLC ของโซไฟโวลิปิดบริสุทธิ์บางส่วนผลิตโดย *Torulopsis bombicola* และใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน
ที่มา: Hu และ Ju (2001a)

7. แมสสเปกโทรเมตรี (Mass spectrometry)

เป็นเทคนิคทางเคมีวิเคราะห์ที่ใช้วิเคราะห์สารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ เพื่อตรวจสอบข้อมูลโครงสร้าง มวลโมเลกุลของสาร ทำนายถึงปริมาณและองค์ประกอบในสารนั้นๆ โดยอ่านจากค่าสเปกตรัม วิธีนี้จัดเป็นเทคนิคขั้นสูงมีค่าความไว (sensitivity) ในการวิเคราะห์สูง สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งแบบเจาะจงและแบบทั่วไป ทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณ ด้วยการทำให้โมเลกุลแตกตัวเป็นไอออนด้วยวิธีต่างๆ เช่น electrosprey ionization (ESI) และ atmospheric pressure chemical ionization (APCI) ในระยะหลังได้พัฒนาการทำให้เกิดไอออนโดยใช้พลังงานต่ำ (soft ionization) เช่น matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) จะใช้ UV lasers เช่น ไนโตรเจนเลเซอร์ ที่ความยาวคลื่น 337 นาโนเมตร ซึ่งสามารถทำให้เกิดไอออนได้โดยสารไม่สลายตัว จึงเหมาะสำหรับการวิเคราะห์สารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ระเหยได้ยาก จำพวกสารชีวโมเลกุล เช่น โปรตีนเพปไทด์และน้ำตาล) ส่วนมวลของไอออนที่เกิดขึ้นสามารถวิเคราะห์ด้วยวิธีต่างๆ ดังนี้ time of flight (TOF), magnetic section ion trap ซึ่งจะทำให้เกิดสเปกตรัมของไอออนได้อย่างสมบูรณ์ การวิเคราะห์มวลด้วย TOF มีข้อดีที่แตกต่างจากวิธีอื่น คือสามารถบันทึกค่ามวลของไอออนได้ทั้งหมดในเวลาอันรวดเร็ว จึงช่วยลดระยะเวลาในการวิเคราะห์ และยังให้ผลการวิเคราะห์ที่เชื่อถือได้ แมสสเปกโทรเมตรีจะตรวจวัดไอออนที่เกิดขึ้นและปรากฏเป็นพีก (peak) บนสเปกตรัมตามขนาดมวลต่อประจุของไอออน (m/z)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่จะนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี MS นี้ ต้องผ่านการทำให้มีความบริสุทธิ์เบื้องต้นก่อน ตัวอย่างเช่น โซโฟโรลิพิดต้องผ่านการแยกด้วย TLC และ HPLC มาก่อน จึงนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ต่อไป จากการศึกษาของ Hu และ Ju (2001a) พบว่า โซโฟโรลิพิดที่ผลิตโดยใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน จะมีโครงสร้างทั้งรูปแบบแลคโตน ชนิด C18:0 C18:1 C18:2 และ C16:0 มีค่ามวลโมเลกุล (m/z) เท่ากับ 688.9 686.9 684.9 และ 661.2 ตามลำดับ และรูปแบบอะซิติก ชนิด C18:0 C18:1 C18:2 และ C16:0 มีค่ามวลโมเลกุล (m/z) เท่ากับ 707.0 705.0 703.0 และ 679.3 ตามลำดับ รวมถึงอาจเกิดการเติมหมู่อะซิติก 1-2 หมู่ และมีการขาดหายของกลูโคสในน้ำตาลโซโฟโรสได้เช่นกัน ดังแสดงในรูป 2.19



รูปที่ 2.19 แมสสเปกตรัมของไซไฟโรลิพิดเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนต่างๆ

ก) กลูโคสเพียงชนิดเดียว ข) กลูโคสร่วมกับเฮกซะเดเคน ค) กลูโคสร่วมกับน้ำมันถั่วเหลือง

ที่มา: Hu และ Ju (2001a)

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

1. อุปกรณ์

- ถังหมัก (fermenter) ขนาด 5 ลิตร รุ่น MBF-500ME ของบริษัท Eylea, Japan
- เครื่องวัดแรงตึงผิว (Ring Tensiometer) รุ่น K6 ของบริษัท Kruss, Germany
- เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิกวิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) รุ่น Pro star ของบริษัท Varian, USA
- คอลัมน์ C18- AR Cosmosil 5 μ m, 120 $^{\circ}$ A ขนาด 4.6 x 150 มม. ของบริษัท Water
- กล้องจุลทรรศน์ชนิด 2 ตา (Biocular compound microscope) รุ่น BH-2 ของบริษัท Olympus, Japan
- ถังน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) M-LAB ของบริษัท เมโทรโลยี เทคโนโลยี คอล, Thailand
- เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น SS-325 และรุ่น ES-315 ของบริษัท Tomy Seiko, Ltd., Japan, รุ่น MLS 3020 ของบริษัท Sanyo Co., Ltd., Japan และรุ่น HV-25 ของบริษัท Hirayama, Co., Ltd., Japan
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วควบคุมอุณหภูมิ (High - performance centrifuge) รุ่น Avanti[®] J-30I ของบริษัท Beckman Coulter, USA
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge) รุ่น KUBOTA 3700 ของบริษัท Kubota Corporation, Japan
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge) รุ่น KUBOTA 6500 ของบริษัท Kubota Corporation, Japan
- เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Rotary vacuum evaporator) รุ่น N-N ของบริษัท Eylea, Japan
- เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Centrifuge evaporator) รุ่น R-300 ของบริษัท BUCHI, Switzerland
- เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Centrifuge evaporator) รุ่น eppendorf concentrator 5301 ของบริษัท Modotech, Germany

- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys ของบริษัท Thermo Spectronic, USA
- เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) รุ่น Innova™ 4300 ของบริษัท New Brunswick Scientific, USA
- ตู้อบความร้อน (Hot air oven) รุ่น UE 600 ของบริษัท Memmert, Germany
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น BE 800 ของบริษัท Memmert, Germany
- เครื่องชั่งหยาบ รุ่น PG 2002-S ของบริษัท Metler Toledo, Switzerland
- เครื่องชั่งละเอียด รุ่น AG 285 ของบริษัท Metler Toledo, Switzerland
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ของบริษัท Metler Toledo, Switzerland
- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow cabinet) รุ่น 25 Manometer ของบริษัท Dwyer Instrument, USA
- เครื่องผสมสาร (Vortex-Genie2) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries Inc., USA
- ไมโครปิเปต (Micropipette) รุ่น P10, P20, P100, P200, P1000 และ P5000 ของบริษัท Gilson, France

2. เคมีภัณฑ์

- สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Bio Springer, France
- สารสกัดจากข้าวมอลต์ (Malt extract) ของบริษัท Labscan, Ireland
- แบคโตเปปโตน (Bactopeptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
- กลูโคส ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, Germany
- แบคโตอะการ์ (Bacto agar) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
- ไทรทอน เอ็กซ์-100 (Triton X-100) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, Germany
- สารเคมีขจัดคราบน้ำมันเคมี 307 (Chemtec 307 dispersant) ของกรมวิทยาศาสตร์ทหารเรือ กองทัพเรือ ประเทศไทย
- น้ำมันก๊วยเหลียง ของบริษัท น้ำมันไทย จำกัด, Thailand
- น้ำมันปาล์ม ของบริษัท มรกตอินดัสตรีส์ จำกัด, Thailand
- น้ำมันรำข้าว ของบริษัท อมรไทย จำกัด, Thailand
- น้ำมันมะกอก ของบริษัท อีโอส เด อิบาร์รา เอส เอ, Spain
- น้ำมันดอกคำฝอย ของบริษัท เซซาฮาล เอช เอ กัวดาลาฮารา ฮาล, Mexico
- น้ำมันคาโนลา ของบริษัท ไชม์ดาร์บี เอดิเบิ้ล โปรดักส์ ลิมิเต็ด, Singapore
- น้ำมันงา ตรากล้วยไม้ จังหวัดแม่ฮ่องสอน, Thailand
- น้ำมันเมล็ดฝ้าย ของบริษัท อุตสาหกรรมวิวัฒน์ จำกัด, Thailand
- น้ำมันสลัด ของบริษัท อุตสาหกรรมวิวัฒน์ จำกัด, Thailand
- น้ำมันมะรุม ของบริษัท EIMEM ordinary partnership, Thailand
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, Germany
- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, Germany
- แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, Germany
- โบรอนไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, Germany
- โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) ของบริษัท Carlo Erba, Italy
- โซเดียมอะซิเตท (CH_3COONa) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, Germany
- ทริสเบส (Tris base; Tris [hydroxymethyl] aminomethane) ($NH_2C(CH_2OH)_3$) ของบริษัท Fisher Scientific UK, UK
- ทริสไฮโดรคลอไรด์ (Tris HCl) ของบริษัท Sigma, USA
- คลอโรฟอร์ม (Chloroform) ของบริษัท RCI Labscan, Ireland
- เมทานอล (Methanol) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, Germany

- เอทานอล (Ethanol) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, Germany
- เฮกเซน (Hexane) (C₆H₁₄) ของบริษัท Mallinckrodt Baker, USA
- กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (Concentration HCl) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, Germany
- แอลฟา-แนฟทอล (α-naphtol) (C₁₀H₇OH) ของบริษัท Fluka, Switzerland
- กรดอะซิติก (acetic acid) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, Germany
- กรดซัลฟูริก (sulfuric acid) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, Germany
- SDS (Sodium dodecyl sulfate), (C₁₂H₂₅OSO₃Na) ของบริษัท Sigma, USA
- เอทิล อะซิเตต (Ethyl acetate) ของบริษัท Fisher Scientific UK, UK
- อะซิโตรไนไตรท์ (Acetonitrile) HPLC grade ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, Germany
- น้ำ HPLC grade ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, Germany
- กรดไตรฟลูอออโรอะซิติก (Trifluoroacetic acid) HPLC grade ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, Germany
- ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, Germany
- กระจาดกรอง (Nylon membrane) ขนาด 47 มม. 0.45 ไมครอน ของบริษัท Whatman, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- กระจาดกรอง หมายเลข 2 ขนาด 125 มม. ของบริษัท Whatman, USA
- แผ่นซิลิกาเจล 60 ขนาด 20 x 20 ซม., หนา 0.2 มม. (TLC silica gel 60, 0.2 mm.) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, Germany
- แผ่นซิลิกาเจล 60 ขนาด 20 x 20 ซม., หนา 2 มม. (TLC silica gel 60, 2 mm.) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, Germany
- สารกำจัดฟอง (antifoam A) ของบริษัท Fluka, Switzerland
- น้ำมันสังเคราะห์ (Synthetic oil) ของบริษัท Tokyo kasei, Japan
- บรูซีน ซัลเฟต (Brucine sulfate) ของบริษัท Fluka, Switzerland
- กรดซัลฟานิลิก (Sulfanilic acid) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, Germany
- ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane) ของบริษัท Mallinckrodt Baker, USA

3. วิธีดำเนินการทดลอง

Pichia anomala สายพันธุ์ PY1 ที่ใช้ในการทดลองนี้ คัดแยกได้จากอาหารหมักดองพื้นบ้าน (ข้าวหมาก) อำเภอพนสนิมคม จังหวัดชลบุรี มีลักษณะโคโลนีกลม สีขาวครีม ผิวด้านกลางโคโลนีมีผิวย่นเล็กน้อย ขอบเรียบ ย้อมติดสีแกรมบวก มีรูปร่างเป็นทรงกลมรี ขนาดกว้าง 2.0 - 4.8 ไมครอน ยาว 2.6 - 5.2 ไมครอน สร้างสปอร์ที่มีรูปทรงคล้ายหมวก (ธันสตา เชียงอุทัย, 2549) สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีในอาหารเหลวปรับปรุงสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง และกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน สารสกัดยีสต์และไซโตเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยให้ค่าการกระจายน้ำมันสูงสุด 75.39 ตารางเซนติเมตร ลดค่าแรงตึงผิวได้ต่ำสุด 33 mN/m และให้ผลผลิตเท่ากับ 0.95 กรัมต่อลิตร (ผกา มาศ ราชมณตรี, 2551)

3.1 การหาอัตราส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดย *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 ระดับขวดเขย่า

3.1.1 การหาอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ระดับขวดเขย่า

เตรียมหัวเชื้อในอาหารเหลว YM จนอายุ 18 ชั่วโมง มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร 0.9 - 1 ถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 8 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเหลวกำหนดสูตร (ปรับ pH 5) โดยกำหนดให้มีแหล่งคาร์บอนรวมคงที่ 16 เปอร์เซ็นต์ แบ่งเป็นความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลือง 10.67 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และกลูโคส 5.33 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) (ผกา มาศ ราชมณตรี, 2551) จากนั้นแปรผันอัตราส่วนแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจน ที่อัตราส่วน 16:0.25 16:0.5, 16:0.7, 16:1, 16:1.5 และ 16:2 ตามลำดับ (ในสัดส่วนความเข้มข้นไซโตเดียมไนเตรท และสารสกัดยีสต์ที่เท่ากันหรือในอัตราส่วน 1:1) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน และติดตามการเจริญของยีสต์โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง นำส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ มาวัดค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่องวัดค่าแรงตึงผิว (Ring tensiometer K6, Kruss, Germany) และค่าการกระจายน้ำมันตามวิธีของ Morikawa และคณะ (1993) ค่าความเป็นกรดต่างในแต่ละอัตราส่วนแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจน

การติดตามประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

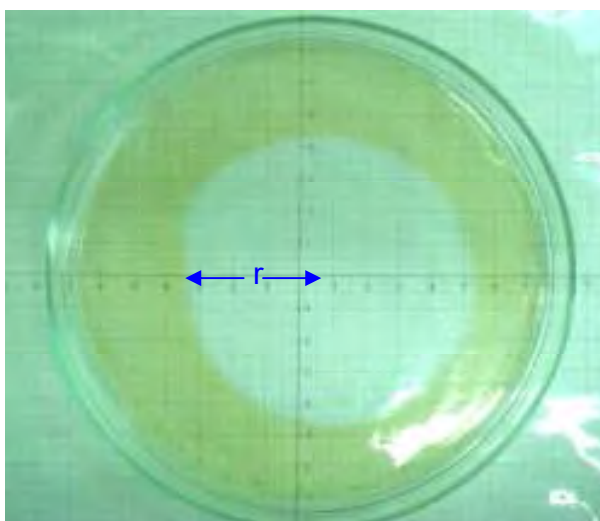
1) การวัดค่าแรงตึงผิว

ปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อ โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ถ่ายส่วนน้ำใสที่อาจมีน้ำมันถั่วเหลืองเหลืออยู่ ลงในกรวยแยก (Separating funnel) เดิมเฮกเซน 2 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที เพื่อให้ทั้งสองวัฏภาคแยกชั้น จากนั้นใช้เฉพาะส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อใสด้านล่างมาวัดค่าแรงตึงผิวโดยวิธี Du Noüy ring method ด้วยเครื่องวัดค่าแรงตึงผิว (Ring tensiometer K6, Kruss, Germany) แสดงหลักการและวิธีการใช้ในภาคผนวก ค

2) การวัดค่าการกระจายตัวของน้ำมัน (Oil displacement test)

ตามวิธีของ Morikawa และคณะ, 1993

หยดน้ำมันสังเคราะห์ (Synthesis oil) ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ลงในจานแก้ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 150 มิลลิเมตร ที่บรรจุน้ำ 40 มิลลิลิตร โดยใช้กระดาษกราฟรองใต้จาน เพื่อเป็นมาตรวัดความกว้างของบริเวณใส (1 ช่องใหญ่ของกราฟมีค่าเท่ากับ 1 เซนติเมตร) น้ำมันที่หยดลงไปนั้น จะกระจายตัวบนผิวหน้าของน้ำทำให้เกิดเป็นแผ่นฟิล์มแผ่ทั่วผิวน้ำ จากนั้นหยดตัวอย่างที่เป็นส่วนน้ำใส หรือสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบริสุทธิ์บางส่วนที่ได้จากการสกัด (crude extract) ที่เจือจางด้วย 50 มิลลิโมลาร์ของทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 8 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นฟิล์มของน้ำมันในแนวตั้งฉาก สังเกตและวัดบริเวณใสของการกระจายตัวของน้ำมันดังรูปที่ 3.1 และคำนวณหาพื้นที่ของการกระจายน้ำมัน



รูปที่ 3.1 แสดงลักษณะการกระจายตัวของน้ำมัน (Morikawa และคณะ, 1993)

พื้นที่ของการกระจายน้ำมันสามารถคำนวณได้จาก

$$\text{พื้นที่บริเวณสี่เหลี่ยมของการกระจายน้ำมัน} = \pi r^2$$

เมื่อ r เท่ากับรัศมีความกว้างของบริเวณสี่ (เซนติเมตร)

กำหนด 1 ตารางเซนติเมตรของการกระจายตัวของน้ำมันมีค่าเท่ากับ 1 หน่วย

วิธีการวัดค่าการกระจายตัวของน้ำมันนี้จะใช้ได้กับสารที่มีความเข้มข้นอย่างน้อย 10 μg หรือ 10 nmol ขึ้นไป

3) การวัดการเจริญของเชื้อโดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

ปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อ โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ทำการล้างเซลล์ด้วยเฮกเซน 2 รอบ และนำกรองตามลำดับ จากนั้นนำเซลล์ไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส แล้วนำไปชั่งเพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

3.1.2 การหาอัตราส่วนของไซโตเคมีไนโตรเจนและสารสกัดยีสต์ที่เหมาะสมต่อสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ระดับขวดเขย่า

ใช้อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมตามข้อ 3.1.1 ทำการแปรผันอัตราส่วนของไซโตเคมีไนโตรเจนและสารสกัดยีสต์ที่อัตราส่วน 0.1:0.6, 0.2:0.5, 0.3:0.4, 0.35:0.35, 0.4:0.3, 0.5:0.2 และ 0.6:0.1 ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน และติดตามการเจริญของยีสต์โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดต่าง และนำน้ำเลี้ยงเชื้อ มาวัดค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่องวัดค่าแรงตึงผิว และค่าการกระจายน้ำมัน

3.2 การหาภาวะที่เหมาะสมต่อสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 ระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

3.2.1 การหาอัตราการใช้อากาศและอัตราความเร็วใบกวนที่เหมาะสมต่อสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เตรียมหัวเชื้อในอาหารเหลว YM จนอายุ 18 ชั่วโมง ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรเป็น 0.9 – 1 จากนั้นถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 8 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในถัง

หมักที่มีอาหารเหลวปรับปรุงสูตรที่เหมาะสมตามข้อ 3.1.2 บรรจุอยู่ โดยให้ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อรวมทั้งหมดเป็น 2.5 ลิตร แปรผันอัตราการให้อากาศภายในถังหมักที่ 1 1.5 และ 2 vvm ตามลำดับ ร่วมกับแปรผันอัตราความเร็วใบกวนที่ 200, 300 และ 400 รอบต่อนาที ตามลำดับ ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5 เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน ติดตามการเจริญของยีสต์โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง การใช้น้ำตาล วัดค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่องวัดค่าแรงตึงผิว และค่าการกระจายน้ำมัน

3.2.2 การติดตามการเจริญและการใช้แหล่งคาร์บอนของยีสต์

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวปรับปรุงสูตรที่ได้จากข้อ 3.1.2 ใช้อัตราการให้อากาศและอัตราความเร็วใบกวนที่เหมาะสมต่อสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากข้อ 3.2.2 ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่าง 5 ติดตามการเจริญและการใช้แหล่งคาร์บอนของยีสต์ทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน โดยนำตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อมาปั่นแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นล้างส่วนตะกอนด้วยเฮกเซน 2 รอบ น้ำกรอง 1 รอบ เพื่อกำจัดน้ำมันส่วนเกินที่ติดอยู่ นำตะกอนที่ได้มาอบที่ 70 องศาเซลเซียสเพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ตรวจสอบปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองด้วยวิธี partition-gravimetric ใช้ไดคลอโรมีเทนเป็นตัวทำละลาย (APHA, AWWA, and WEF, 1992) โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อ มาเติม 1:1 กรดไฮโดรคลอริก จนมี pH 2 จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงเทใส่กรวยแยก เติมไดคลอโรมีเทน 30 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆเป็นเวลา 2 นาที เมื่อตั้งทิ้งไว้จะแยกออกเป็นสองวัฏภาค นำชั้นล่างซึ่งเป็นส่วนของตัวทำละลาย มาเทลงในกรวยที่บรรจุกระดาษกรอง และโซเดียมซัลเฟต 10 กรัม ส่วนชั้นบนเป็นส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อนำมาสกัดซ้ำ 2 รอบด้วยวิธีเดียวกัน สารละลายที่ผ่านการกรองแล้วจะนำมาระเหยไดคลอโรมีเทนออกที่ 70 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จากนั้นชั่งน้ำหนักส่วนของน้ำมันที่เหลืออยู่ และนำน้ำเลี้ยงเชื้อใสที่แยกส่วนของน้ำมันออกแล้ว มาตรวจหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เปลี่ยนแปลงโดยวิธี Dinitrosalicylic acid (Bernfield, 1955) และตรวจหาปริมาณไนโตรเจน-ไนโตรเจนโดยวิธี Brucine (APHA, AWWA and WEF No. 4500-NO₃⁻ E, 1998)

3.3 การผลิต สกัด และการทำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วน

3.3.1 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

เตรียมหัวเชื้อในอาหารเหลว YM เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ถ่ายหัวเชื้อลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่บรรจุอาหารเหลวปรับปรุงสูตรที่เหมาะสมจากข้อ 3.1.2 ปริมาตรรวม 2.5 ลิตร โดยใช้อัตราการใช้อากาศและอัตราความเร็วใบกวนที่เหมาะสมต่อสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากข้อ 3.2.2 และควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่าง 5 เป็นเวลา 7 วัน

3.3.2 การสกัดแยกและตรวจสอบชนิดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

นำน้ำเลี้ยงเชื้อจากข้อ 3.3.1 มาปั่นแยกเซลล์ออก ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อใส่นี้ ใสในกรวยแยก เติมหีกเซนปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้ไขมันและน้ำเลี้ยงเชื้อใสแยกชั้น จากนั้นใช้เอาเฉพาะส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อด้านล่างมาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตปริมาตร 1 เท่า นำส่วนล่างมาแยกสกัดซ้ำ 2 ครั้ง ครั้งละ 4 นาที เก็บส่วนน้ำใสชั้นบนซึ่งเป็นชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์ไว้ เพื่อนำมาระเหยเอทิลอะซิเตตออกด้วยเครื่องระเหย (Evaporator) ภายใต้สภาวะสุญญากาศ จากนั้นนำสารที่สกัดได้มาละลายด้วยเมทานอล และระเหยแห้งอีกครั้ง จะได้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วน ซึ่งมีสีน้ำตาลไหม้ เหนียวเหนียว นำสารนี้มาทดสอบการกระจายน้ำมัน น้ำหนักของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และตรวจสอบชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้เบื้องต้นด้วยวิธีโครมาโทกราฟี (Ito และ Inoue, 1982)

3.4 ลักษณะสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

3.4.1 เปรียบเทียบค่าความเข้มข้นวิกฤติของการเกิดไมเซลล์ (Critical micelle concentration; CMC)

เปรียบเทียบค่าความเข้มข้นวิกฤติของการเกิดไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้กับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ เช่น โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate; SDS) ไทรทอน เอกซ์ 100 (TritonX-100) เป็นต้น โดยนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้หรือสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ มาทำการเจือจางด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์

ที่มีความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8 ที่ความเข้มข้น 0.01-20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร นำแต่ละความเข้มข้นมาวัดค่าแรงตึงผิว เพื่อหาค่าความเข้มข้นวิกฤติของการเกิดไมเซลล์ โดยเขียนกราฟระหว่างค่าแรงตึงผิวและความเข้มข้น ดังแสดงในรูปที่ 3.2 ตามวิธีของ Sheppard และ Mulligan (1987)

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

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

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

เมื่อเกิดจุดตัด B จะได้

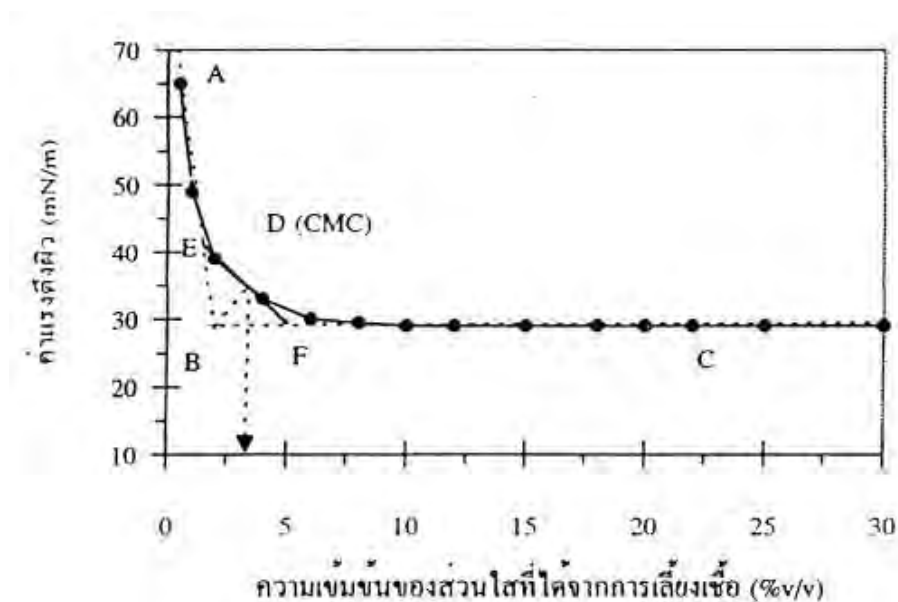
$$b_1x_1 + a_1 = b_2x_2 + a_2 \quad \text{เมื่อ } y_1 = y_2$$

$$b_1x_1 - b_2x_2 = a_2 - a_1$$

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

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

เพราะฉะนั้น จุดตัด B เท่ากับ $(a_2 - a_1)/(b_1 - b_2)$



รูปที่ 3.2 วิธีการหาค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ โดยการวัดค่าแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

ค่าความเข้มข้นวิกฤติของการเกิดไมเซลล์ (Critical Micelle Concentration, CMC) คือค่าที่เกิดเมื่อลากเส้นตรง BD ผ่านจุด B ให้ตั้งฉากกับเส้นสัมผัส EF ที่จุด D แล้วลากมาตัดแกน X

และเมื่อลากมาตัดแกน Y ค่าที่ได้คือค่าแรงตึงผิว ณ จุดของการเกิดไมเซลล์ (γ_{CMC}) และความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (CMC^{-1}) คือส่วนกลับของค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ ($100/CMC$)

3.4.2 วัดค่าดัชนีการก่ออิมัลชัน (Emulsion Index)

เปรียบเทียบค่าดัชนีการก่ออิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ ร่วมกับน้ำมันชนิดต่างๆ เช่น น้ำมันงา น้ำมันปาล์ม น้ำมันรำข้าว น้ำมันสลัด น้ำมันถั่วเหลือง เป็นต้น โดยนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.2 มาละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8 ให้มีความเข้มข้นเป็น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ร่วมกับเติมน้ำมันแต่ละชนิดที่ต้องการศึกษา ในอัตราส่วนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อน้ำมันเท่ากับ 60:40 (โดยน้ำหนัก) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเจือจาง 2 เท่าด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8 แล้วนำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตรทันที เพื่อหาค่าการก่ออิมัลชัน และส่วนที่เหลือตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 3, 5 และ 7 วัน เพื่อหาค่าความเสถียรของอิมัลชัน โดยดูดสารละลายส่วนล่างมาเจือจาง 2 เท่าด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8 แล้ววัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์ค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันหรือความเสถียรในการก่ออิมัลชันต่อไป (Shepherd และคณะ, 1995)

3.4.3 วัดค่า Hydrophilic-Lipophilic Balance (HLB)

วัดค่า Hydrophilic-Lipophilic Balance (HLB) เบื้องต้น ด้วยการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.2 มาละลายในน้ำกรองและน้ำดื่ม ซึ่งมีความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.5 และ 7 ตามลำดับ ให้มีความเข้มข้นเป็น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex mixer) เป็นเวลา 2 นาที ตั้งทิ้งไว้สักครู่จึงสังเกตลักษณะของสารละลายที่ได้เทียบกับตารางที่ 3.1

นอกจากนี้ค่า HLB ยังสามารถคำนวณได้จากสูตรโครงสร้างของโมเลกุล ดังนี้ $HLB = E/5$ เมื่อ E คือ น้ำหนักโมเลกุล (%) ของส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic content) ในโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวทั้งหมด (Kim และคณะ, 2002)

ตารางที่ 3.1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า HLB กับลักษณะสารละลายของสารลดแรงตึงผิวในน้ำ

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

3.4.4 ทดสอบประสิทธิภาพในการห่อหุ้ม (Encapsulation) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบริสุทธิ์บางส่วน

นำสีชูดาน (Sudan II) ซึ่งเป็นสีที่ไม่ละลายน้ำ ไปละลายในคลอโรฟอร์มเตรียมให้มีความเข้มข้น 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วจึงดูมา 100 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอดระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ภาวะสุญญากาศจนแห้ง จากนั้นเติมสารลดแรงตึงผิวบริสุทธิ์บางส่วนที่ละลายในทริสบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8 ที่มีความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร เป็นเวลา 2 นาที สังเกตการละลายของสีชูดาน เทียบกับสารชนิดต่างๆ

3.5 การทำบริสุทธิ์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธีโครมาโทกราฟี

3.5.1 การเตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย Analytical Thin-Layer Chromatography

โดยใช้เฟสคงที่เป็นแผ่นซิลิกาเจล ($\text{SiO}_2 \cdot \text{XH}_2\text{O}$) 60 ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, Germany ขนาด 20 x 20 ซม. หนา 0.2 มม. ส่วนเฟสเคลื่อนที่ใช้สารละลายคลอโรฟอร์ม เมทานอล และน้ำ ในอัตราส่วน 65:25:4 นำสารลดแรงตึงผิวที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.2 มาละลายด้วยเอทิลอะซิเตตที่ความเข้มข้น 10-20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาจุดบนแผ่น TLC ปริมาตรจุดละ 20 ไมโครลิตร ให้ห่างจากขอบล่าง ประมาณ 1.5 เซนติเมตร จากนั้นหย่อนแผ่น TLC ลงในแนวตั้งอย่างช้าๆ ในภาชนะปิดที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่สูงประมาณ 1 เซนติเมตร ทิ้งไว้

ประมาณ 1-2 ชั่วโมง จนเฟสเคลื่อนที่ไปเกือบสุดแผ่นหรือเหลือขอบประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร จากนั้นนำแผ่น TLC ออกมาทิ้งไว้จนแห้ง แล้วจึงตรวจหากรดไขมันด้วยการนำไปอบในภาชนะปิดสนิทที่อุณหภูมิด้วยไอของไอโอดีน ประมาณ 30 นาที เปิดภาชนะออกแล้วทำเครื่องหมายบริเวณที่เกิดสีน้ำตาลเข้ม และทิ้งไว้ข้ามคืนเพื่อให้ไอโอดีนระเหยจนหมด จึงทำการชุบซิลิกาเจล 60 บริเวณที่ทำเครื่องหมายไว้มาสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเอทิลอะซิเตต 3 ครั้ง และระเหยแห้งภายใต้ภาวะสุญญากาศ นำส่วนที่สกัดได้มาตรวจหาคาร์โบไฮเดรตด้วยวิธีมอริช รีเอเจนท์ โดยเจือจางสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยน้ำกลั่นที่ความเข้มข้นประมาณ 1-2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมมอริช รีเอเจนท์ (แอลฟา-แนฟทอล 0.5 กรัม ละลายใน 95% เอทานอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร) จำนวน 2 หยด ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเอียงหลอด แล้วค่อยๆ เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงไป โดยห้ามเขย่า ตั้งทิ้งไว้สังเกตสีที่เกิดขึ้น ซึ่งถ้าผลเป็นบวกจะเกิดสีม่วงหรือสีน้ำตาลแดงตรงกลางระหว่างชั้นของสารละลายและชั้นของกรด (Koch และ Hanke, 1953) และนำไปทดสอบค่าการกระจายน้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบริสุทธิ์บางส่วนที่สกัดได้จากซิลิกาเจล โดยเตรียมให้มีความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางด้วย 50 ไมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8

3.5.2 การเตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย Preparative Thin-Layer Chromatography

โดยทำการทดลองตามวิธีในข้อ 3.4.1 แต่ใช้แผ่นซิลิกาเจล 60 ที่มีความหนา 2 มม. และใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพละลายในเอทิลอะซิเตตที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรรวม 1 มิลลิลิตร จุดเป็นเส้นตรงบนแผ่น TLC โดยสูงจากขอบแผ่นซิลิกาเจล 60 ประมาณ 1.5 เซนติเมตร ทำการสกัดแยกสารลดแรงตึงผิวออกจากซิลิกาเจล 60 ด้วยเอทิลอะซิเตต 3 รอบ แล้วนำไประเหยแห้งโดยเครื่อง evaporator ระเหยแห้งภายใต้ภาวะสุญญากาศ และนำไปทดสอบค่าการกระจายน้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบริสุทธิ์บางส่วนที่สกัดได้

3.5.3 การวิเคราะห์สารด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

เตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบริสุทธิ์บางส่วนที่สกัดได้จากข้อ 3.3.2 ในสารละลายอะซิโตนไนโตรที่ 100% ที่ความเข้มข้น 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC รุ่น Pro star ของบริษัท Varian, USA คอลัมน์ C18-AR Cosmosil 5 μm , 120 $^{\circ}\text{A}$ ขนาด 4.6 \times 150 มิลลิเมตร ของบริษัท Water ลิเนียร์เกรเดียนท์ 0-100% ของตัวทำละลาย B ใน A โดย

ตัวพา A คือ 10% อะซิโตรไนโตรท์ + 0.1% กรดไตรฟลูออโรอะซีติก (TFA)

ตัวพา B คือ 100% อะซิโตรไนโตรท์ + 0.1% กรดไตรฟลูออโรอะซีติก (TFA)

โปรแกรมของลิเนียร์เกรเดียนท์ ดังนี้

เวลา (นาที)	% ของตัวพา A	% ของตัวพา B
0	70	30
5	30	70
15	20	80
20	10	90
35	0	100

อัตราการชะของตัวพาเท่ากับ 0.5 มิลลิเมตรต่อนาที ตรวจสอบด้วย UV Detector ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร

3.5.4 เก็บตัวอย่างแต่ละพีคที่ปรากฏในแต่ละ Retention time (RT) โดยเก็บหลังจากที่พีคเกิดขึ้นในกราฟเป็นเวลา 55 วินาที นำสารที่เก็บได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่อง Centrifuge evaporator เมื่อแห้งแล้วจึงละลายสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8 ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิเมตร เพื่อวัดค่าการกระจายน้ำมัน จากนั้นเลือกลำดับส่วนที่มีค่าการกระจายน้ำมันมากไปทดสอบต่อด้วยวิธีแมสสเปกโทรเมทรี (Mass Spectrometry, MS) เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุล

3.6 วิเคราะห์โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธีแมสสเปกโทรเมทรี (Matrix-assisted laser desorption/ionization-Time of flight mass spectrometry; MALDI-TOF)

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี TLC และ HPLC ซึ่งให้ค่าการกระจายน้ำมันมาก มาวิเคราะห์ด้วยเครื่องแมสสเปกโทรเมทรี โดยใช้เทคนิค MALDI-TOF ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

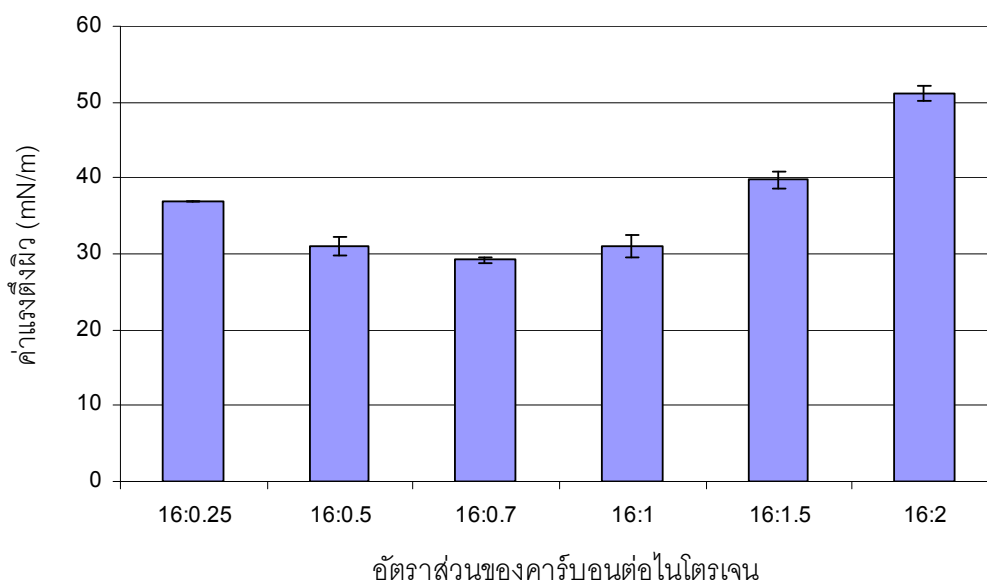
4.1 การหาอัตราส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 ระดับขวดเขย่า

ธนัสถา เชียงอุทัย (2549) ได้ทำการเลี้ยงเชื้อ *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 พบว่า แหล่งคาร์บอน คือน้ำมันถั่วเหลือง และแหล่งไนโตรเจน คือโซเดียมไนเตรท มีความเหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สุด ซึ่งในการทดลองดังกล่าวให้ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 0.26 กรัมต่อลิตร ต่อมางานวิจัยของ ผกามาศ ราชมนตรี (2551) ได้ศึกษาการเสริมน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *P. anomala* สายพันธุ์ PY1 ในระดับขวดเขย่า พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนสองชนิด ได้แก่ น้ำมันถั่วเหลือง 10.67 เปอร์เซ็นต์และกลูโคส 5.33 เปอร์เซ็นต์ รวมเป็น 16 เปอร์เซ็นต์ (W/V) คิดเป็นอัตราส่วน 2:1 และแหล่งไนโตรเจนสองชนิด ได้แก่ โซเดียมไนเตรทและสารสกัดยีสต์ สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มีประสิทธิภาพสูงสุด และให้ผลผลิตเท่ากับ 0.95 กรัมต่อลิตร ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงได้นำแหล่งคาร์บอน คือน้ำมันถั่วเหลือง และกลูโคส แหล่งไนโตรเจน คือ โซเดียมไนเตรทและสารสกัดยีสต์มาเป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมีวัตถุประสงค์ในการหาอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจน และอัตราส่วนของแหล่งไนโตรเจน (โซเดียมไนเตรทต่อสารสกัดยีสต์) ที่เหมาะสมที่สุด ระดับขวดเขย่า เพื่อหาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม สำหรับใช้เป็นข้อมูลที่จะนำไปสู่การปรับปรุงประสิทธิภาพและปริมาณการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *P. anomala* สายพันธุ์ PY1 ในระดับขยายส่วน หรือในระดับถังหมักต่อไป

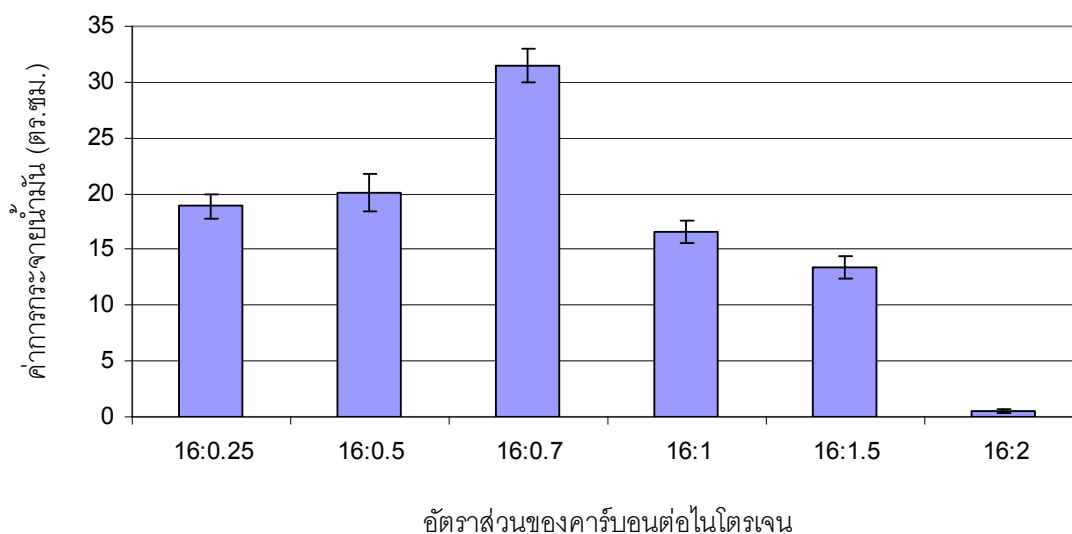
จากการทดลองเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่ได้ทำการแปรผันอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอัตราส่วนต่างๆ พบว่าที่อัตราส่วนความเข้มข้นแหล่งคาร์บอนรวม 16 เปอร์เซ็นต์ (จากงานวิจัยของ ผกามาศ ราชมนตรี ในอัตราส่วนน้ำมันถั่วเหลืองต่อกลูโคส เท่ากับ 2:1) ต่อความเข้มข้นแหล่งไนโตรเจน 0.7 เปอร์เซ็นต์ (W/V) (ในอัตราส่วนโซเดียมไนเตรทต่อสารสกัดยีสต์ เท่ากับ 1:1) ที่ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น 5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน เหมาะสมที่สุดในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยให้ค่าแรงตึงผิวต่ำสุดที่ 29 mN/m Δ ค่าแรงตึงผิว c_{ct} (ผลต่างของค่าแรงตึงผิว ณ เวลาเริ่มต้นและเมื่อสิ้นสุดการทดลอง) เท่ากับ 28 mN/m และมีค่าการกระจายน้ำมันมากที่สุดเท่ากับ 31.50 ตารางเซนติเมตร ดังแสดงผลในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ผลการศึกษาการแปรผันอัตราส่วนแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *P.anomala* PY1 ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในขวดเขย่า

อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน %/%(W/V)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g L^{-1})	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	Δ ค่าแรงตึงผิว $_{b-t}$ (mN/m)	ค่าการกระจายตัวของน้ำมัน (cm^2)	ค่า pH
16:0.25	20.62 ± 1.22	37 ± 0.00	15	18.86 ± 1.09	7.74 ± 0.22
16:0.5	15.45 ± 0.56	31 ± 1.14	20	20.04 ± 1.68	7.83 ± 0.21
16:0.7	16.92 ± 0.86	29 ± 0.29	28	31.50 ± 1.52	7.56 ± 0.25
16:1	14.49 ± 0.63	31 ± 1.41	20	16.62 ± 1.02	7.05 ± 0.37
16:1.5	7.08 ± 0.57	39 ± 1.06	10	13.42 ± 0.99	3.71 ± 0.02
16:2	8.29 ± 0.92	51 ± 1.04	10	0.52 ± 0.20	3.66 ± 0.05



รูปที่ 4.1 ค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก *P. anomala* สายพันธุ์ PY1 เมื่อแปรผันอัตราส่วนแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในขวดเขย่า

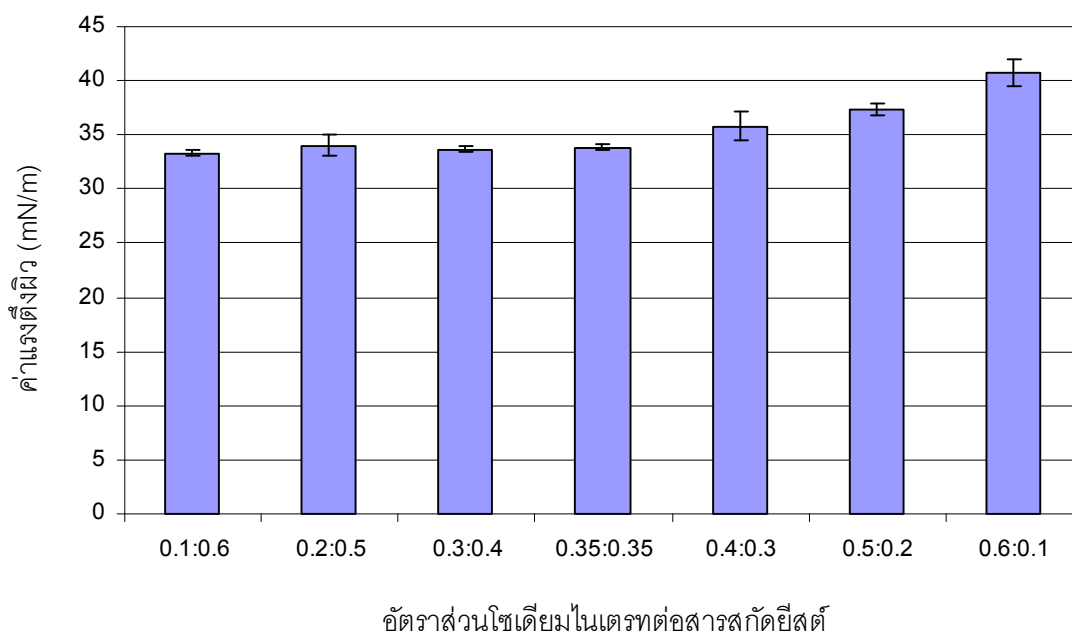


รูปที่ 4.2 การกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก *P. anomala* สายพันธุ์ PY1 เมื่อแปรผันอัตราส่วนแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนต่างๆ ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในขวดเขย่า

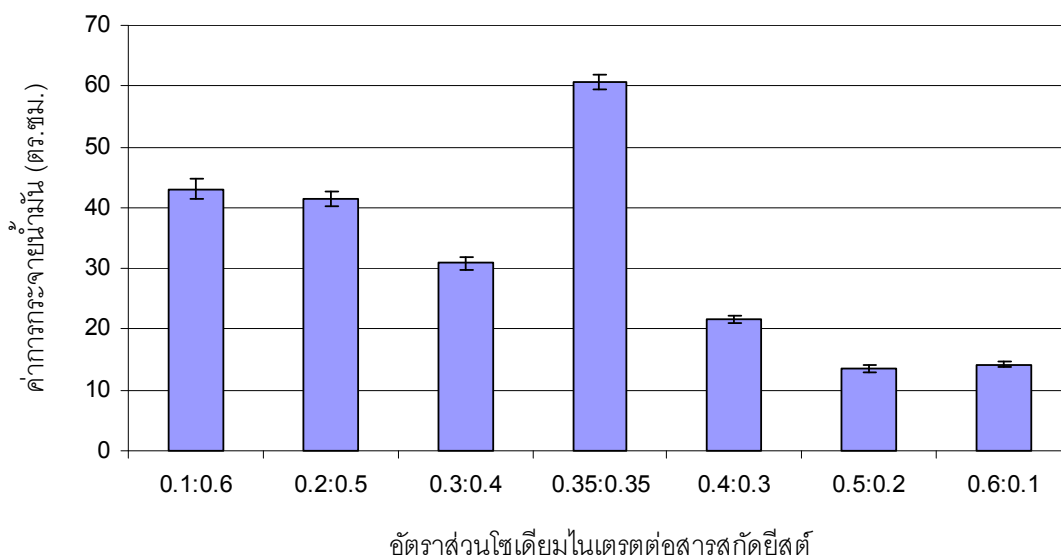
เมื่อได้อัตราส่วนแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมแล้ว จากนั้นจึงนำมาหาอัตราส่วนของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม เนื่องจากมีแหล่งไนโตรเจน 2 ชนิด คือ โซเดียมไนเตรทและสารสกัดยีสต์ โดยคงให้ปริมาณแหล่งไนโตรเจนทั้งสองในอาหารเลี้ยงเชื้อรวมกันเป็น 0.7 เปอร์เซ็นต์ พบว่าที่อัตราส่วนโซเดียมไนเตรทต่อสารสกัดยีสต์ 0.35:0.35 เปอร์เซ็นต์หรือ 1:1 ที่ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น 5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยให้ค่าแรงตึงผิว 33 mN/m และค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 60.73 ตารางเซนติเมตร ดังแสดงผลในตารางที่ 4.2 ซึ่งอัตราส่วนดังกล่าวนี้ได้ให้ค่าแรงตึงผิวต่ำที่สุด และมีค่าการกระจายน้ำมันมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราส่วนอื่นๆ ดังแสดงในรูป 4.3 และ 4.4 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.2 ผลการศึกษาการแปรผันอัตราส่วนไซเดียมไนเตรตต่อสารสกัดยีสต์ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *P.anomala* PY1 ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในขวดเขย่า

อัตราส่วน ไซเดียมไน เตรตต่อสาร สกัดยีสต์ %/%(W/V)	น้ำหนักเซลล์ แห้ง (g L ⁻¹)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	Δ ค่าแรงตึงผิว _{b-t} (mN/m)	ค่าการกระจาย ตัวของน้ำมัน (cm ²)	ค่า pH
0.1:0.6	23.64 ± 0.51	33 ± 0.29	21.50	42.99 ± 1.64	7.31 ± 0.20
0.2:0.5	19.96 ± 0.02	34 ± 1.00	17.67	41.46 ± 1.32	7.39 ± 0.08
0.3:0.4	19.54 ± 0.04	33 ± 0.29	18.66	30.83 ± 1.14	7.80 ± 0.11
0.35:0.35	17.09 ± 0.08	33 ± 0.29	19.00	60.73 ± 1.16	7.51 ± 0.17
0.4:0.3	16.81 ± 0.70	35 ± 1.26	16.37	21.64 ± 0.58	7.87 ± 0.12
0.5:0.2	14.98 ± 0.92	37 ± 0.58	14.34	13.52 ± 0.46	7.31 ± 0.17
0.6:0.1	11.83 ± 1.64	40 ± 1.26	11.33	14.18 ± 0.47	7.61 ± 0.19



รูปที่ 4.3 ค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก *P. anomala* สายพันธุ์ PY1 เมื่อแปรผันแหล่งไนโตรเจนตามอัตราส่วนต่างๆ ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในขวดเขย่า



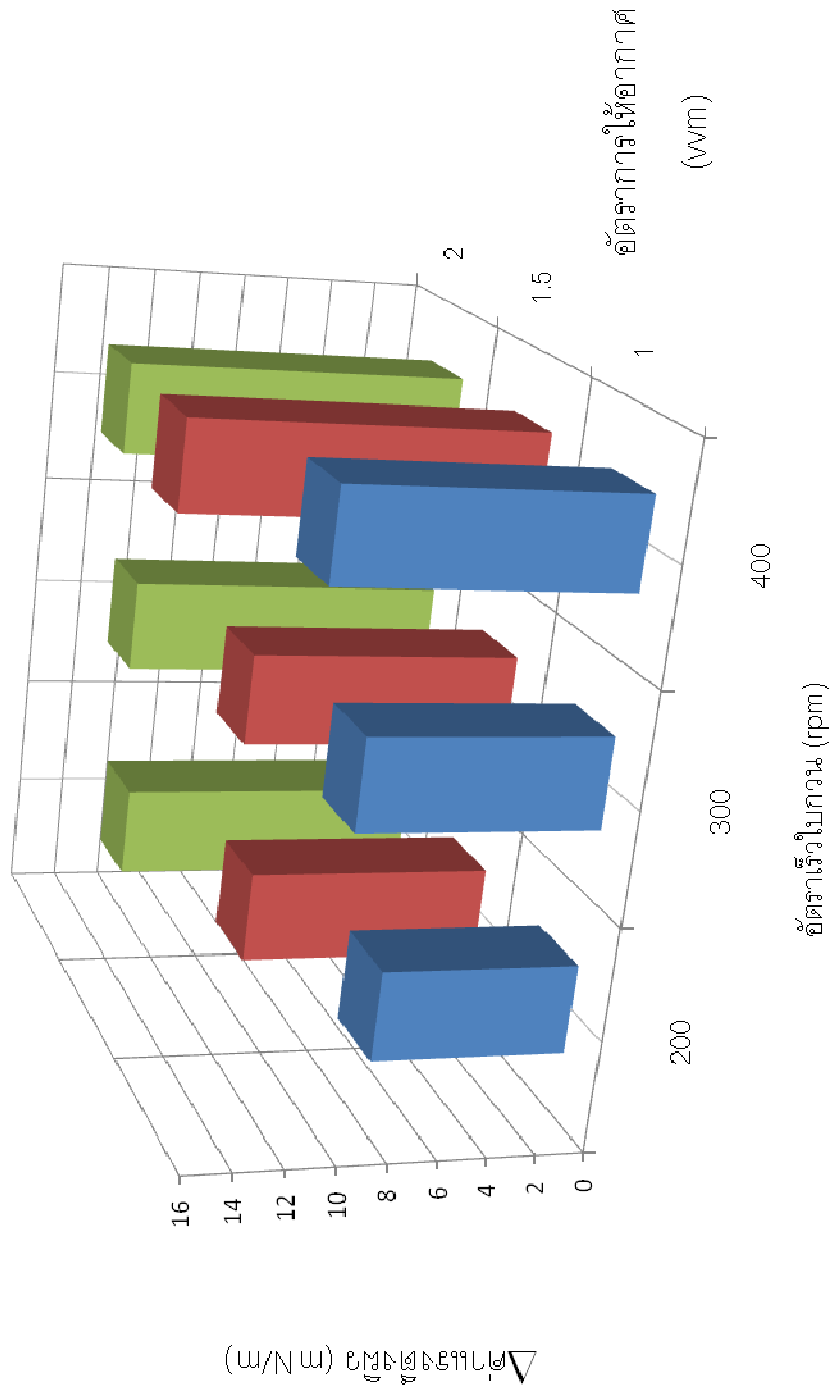
รูปที่ 4.4 ค่าการกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก *P. anomala* สายพันธุ์ PY1 เมื่อแปรผันแหล่งไนโตรเจนตามอัตราส่วนต่างๆ ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในขวดเขย่า

4.2 การหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 ระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

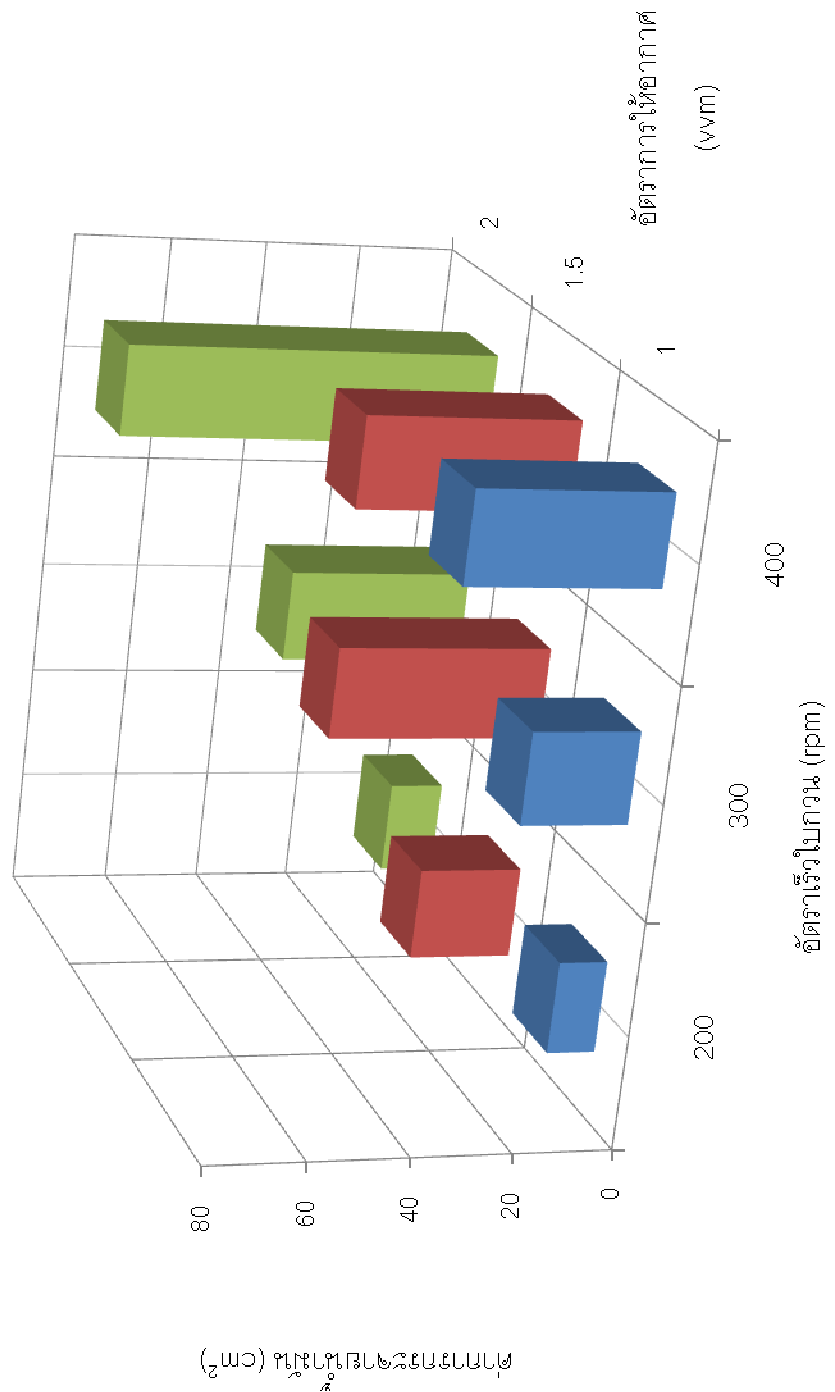
นำอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 16:0.7 เปอร์เซ็นต์ (W/V) ที่เหมาะสมจากข้อ 4.1 มาทำการทดลองในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยให้ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมักรวมเป็น 2.5 ลิตร และใช้กระบวนการหมักแบบแบตช์ คือ ไม่มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มลงไประหว่างการทดลอง ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการแปรผันอัตราการให้อากาศที่ 1, 1.5 และ 2 vvm ร่วมกับอัตราเร็วใบกวนที่ 200, 300 และ 400 rpm ตามลำดับติดตามการเจริญของยีสต์ และประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยการวัดค่าแรงตึงผิวและค่าการกระจายน้ำมันทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน จากผลการทดลองพบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มีประสิทธิภาพสูงสุดที่อัตราการให้อากาศ 2 vvm ร่วมกับอัตราเร็วใบกวน 400 rpm คือ มีค่าแรงตึงผิวต่ำสุดเท่ากับ 30 mN/m Δ ค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 14.5 mN/m และค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 76.42 ตารางเซนติเมตร ดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ผลการศึกษาการแปรผันอัตราการใช้อากาศร่วมกับอัตราเร็วใบกวนต่างๆ ที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5 เป็นเวลา 7 วัน ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบแบตช์

อัตราการใช้อากาศ		อัตราเร็ว ใบกวน (rpm)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	Δ ค่าแรงตึงผิว _{b-t} (mN/m)	ค่าการกระจาย ตัวของน้ำมัน (cm ²)
vvm	Flow rate L min ⁻¹				
1	2.5	200	34.00	8.00	9.61
1	2.5	300	32.17	9.83	21.35
1	2.5	400	31.00	12.00	38.62
1.5	3.75	200	30.00	10.17	20.69
1.5	3.75	300	30.17	11.16	43.14
1.5	3.75	400	29.33	14.84	43.38
2	5	200	31.20	12.80	10.94
2	5	300	31.00	13.33	37.73
2	5	400	30.00	14.5	76.42

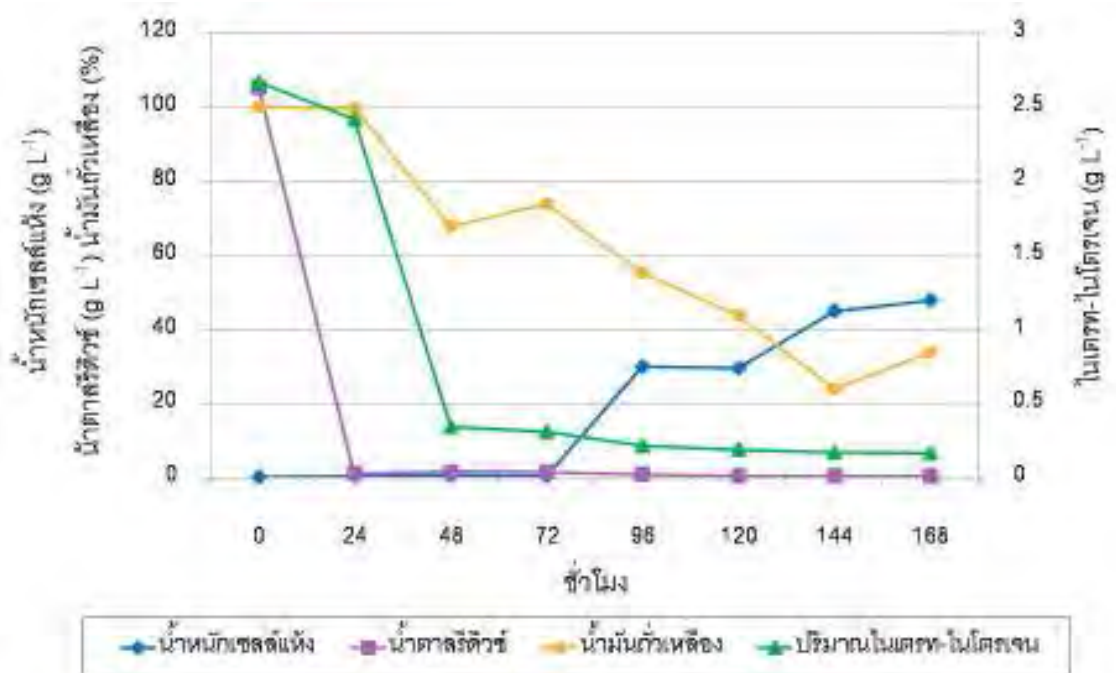


รูปที่ 4.5 Δ ค่าแรงตึงผิวของน้ำเพียงเชื้อจาก *P. anomala* PY1 เมื่อแปรผันอัตราการใช้อากาศร่วมกับอัตราเร็วไปทวนต่างๆ ที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความถี่เป็นกรดต่างเท่ากับ 5 เป็นเวลา 7 วัน ในถังหมักแบบแบตช์



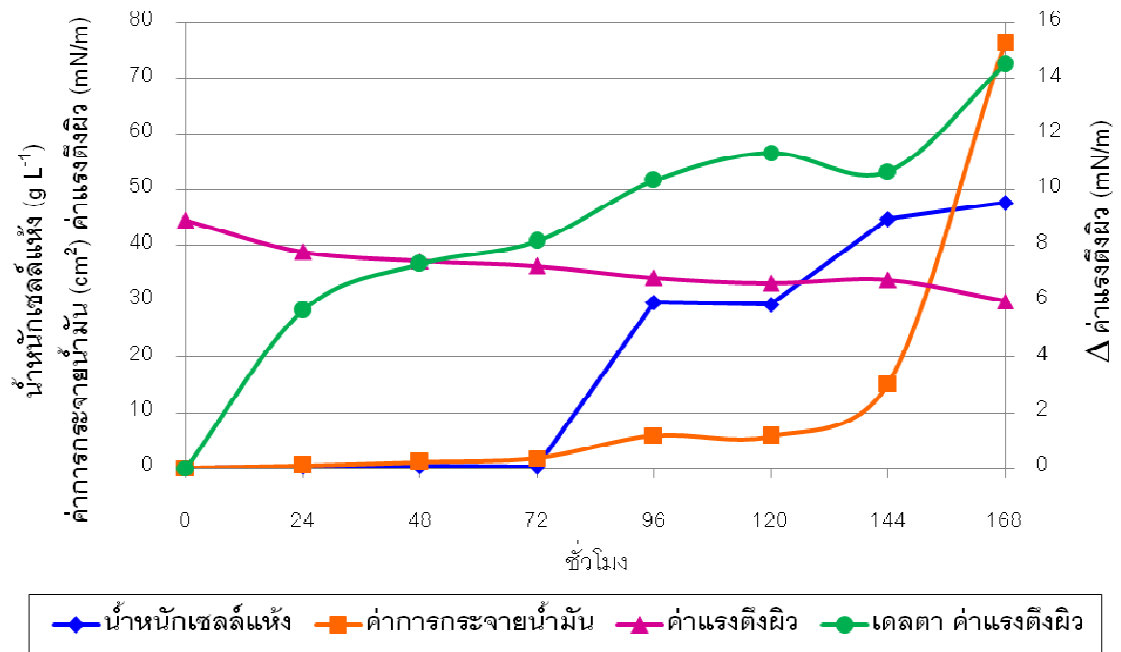
รูปที่ 4.6 ค่าการกระจายน้ำของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก *P. anomala* PY1 เมื่อแปรผันอัตราการให้อาการร่วมกับอัตราเร็วใบกวนต่างๆ ที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์เท่ากับ 5 เป็นเวลา 7 วัน ในถังหมักแบบแบตช์

จากการทดลองภายในถังหมักที่แปรผันอัตราการให้อากาศที่ 1, 1.5 และ 2 vvm และ อัตราเร็วใบกวน 200, 300 และ 400 rpm ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่าที่อัตราการให้อากาศ 2 vvm และอัตราเร็วใบกวน 400 rpm สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ดังนั้นจึงได้ศึกษาติดตามการเจริญของ *P. anomala* PY1 ในถังหมักแบบแบคทีเรียภายใต้ภาวะที่เหมาะสมดังที่กล่าวมา โดยทำการติดตามการเจริญของยีสต์ด้วยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง การใช้แหล่งอาหารชนิดต่างๆ รวมถึงประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทุก 12 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 4.7 พบว่า ในช่วง 72 ชั่วโมงแรกน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย แต่จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆอย่างรวดเร็ว หลังจากชั่วโมงที่ 72 ในส่วนของแหล่งคาร์บอน ยีสต์ใช้น้ำตาลอย่างรวดเร็วจนเกือบหมดภายใน 24 ชั่วโมงแรกของการทดลอง ส่วนน้ำมันถั่วเหลืองนั้นยีสต์เริ่มนำไปใช้หลังจาก 24 ชั่วโมง นั่นคือหลังจากที่กลูโคสถูกไปใช้จนหมด และปริมาณไนโตรเจน-ไนโตรเจนจะลดลงอย่างรวดเร็วใน 48 ชั่วโมงแรก และเริ่มคงที่ไปจนถึงสิ้นสุดการทดลอง



รูปที่ 4.7 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของ *P. anomala* PY1 และการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ น้ำมันถั่วเหลือง และปริมาณไนโตรเจน-ไนโตรเจนที่ถูกใช้ไป ที่อัตราการให้อากาศ 2 vvm และอัตราเร็วใบกวน 400 rpm ที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5 เป็นเวลา 7 วัน ในถังหมักแบบแบคทีเรีย

นอกจากนี้ที่อัตราการให้อากาศ 2 vvm และอัตราเร็วใบกวน 400 rpm ยังสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงสุดที่เวลา 7 วัน คือ ค่าแรงตึงผิวค่อยๆลดลงจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลองจะมีค่าแรงตึงผิวต่ำสุดเท่ากับ 30 mN/m Δ ค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 14.5 mN/m ส่วนค่าการกระจายน้ำมันจะค่อยๆเพิ่มขึ้นในช่วงแรก และเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากชั่วโมงที่ 132 จนถึงชั่วโมงที่ 168 จนมีค่าสูงสุดเท่ากับ 76.42 ตารางเซนติเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4.8



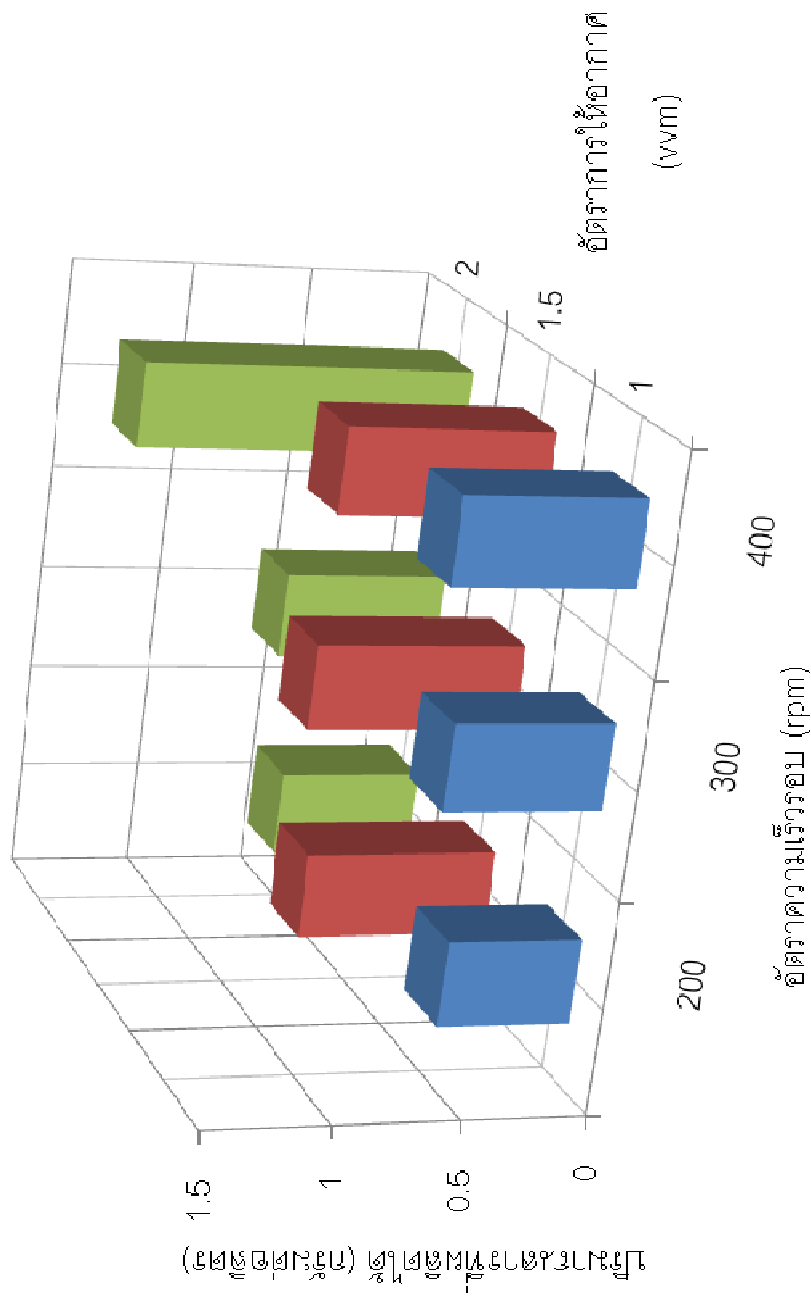
รูปที่ 4.8 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของ *P. anomala* PY1 และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ที่อัตราการให้อากาศ 2 vvm และอัตราเร็วใบกวน 400 rpm ที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5 เป็นเวลา 7 วัน ในถังหมักแบบแบตช์

4.3 การผลิตและสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

Pichia anomala สายพันธุ์ PY 1 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในอาหารเหลวปรับปรุงสูตรที่มีอัตราส่วนแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจน 16:0.7 แบ่งได้เป็นแหล่งคาร์บอน คือ น้ำมันถั่วเหลือง 10.67 เปอร์เซ็นต์ และกลูโคส 5.33 เปอร์เซ็นต์ แหล่งไนโตรเจน คือ สารสกัดยีสต์ 0.35 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมไนเตรท 0.35 เปอร์เซ็นต์ นำอัตราส่วนที่เหมาะสมนี้มาทำการทดลองภายในถังหมัก ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน และหลังจากนั้นจึงทำการสกัดด้วยสารละลายอินทรีย์ในแต่ละแบคทีเรียเพื่อหาปริมาณของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ โดยในแต่ละแบคทีเรียจะให้ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ดังแสดงในตารางที่ 4.4 จากการทดลองพบว่า เมื่อเลี้ยง *P. anomala* ในถังหมักที่มีอัตราการให้อากาศ 2 vvm อัตราเร็วใบกวนในถังหมัก 400 รอบต่อนาที สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ในปริมาณสูงที่สุด ที่ 1,353 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีค่า $Y_{p/s}$ เป็น 10.17 มิลลิกรัมต่อกรัมกลูโคส

ตารางที่ 4.4 ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้โดย *P. anomala* สายพันธุ์ PY1 เมื่อแปรผันอัตราการให้อากาศ และอัตราเร็วใบกวนต่างๆ เป็นเวลา 7 วัน ในถังหมักแบบแบคทีเรีย

อัตราการให้อากาศ		อัตราเร็วใบกวน (rpm)	ปริมาณสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้ (mg L ⁻¹)	อัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (mg L ⁻¹ h ⁻¹)	ปริมาณสารลดแรงตึงผิวต่อกลูโคส ($Y_{p/s}$) (mg per g glucose)
vvm	Flow rate L min ⁻¹				
1	2.5	200	526.4	3.13	3.96
1	2.5	300	624.0	3.71	4.69
1	2.5	400	714.0	4.25	5.37
1.5	3.75	200	773.9	4.61	5.81
1.5	3.75	300	841.2	5.01	6.32
1.5	3.75	400	830.0	4.94	6.24
2	5	200	582.0	3.46	4.38
2	5	300	667.0	3.97	5.02
2	5	400	1,353.0	8.05	10.17



รูปที่ 4.9 ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้โดย *P. anomala* สายพันธุ์ PY1

เมื่อแปรผันอัตราเร็วใบกวน และอัตราการให้อากาศต่างๆ ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 5 เป็นเวลา 7 วัน ในถังหมักแบบแบดซ์

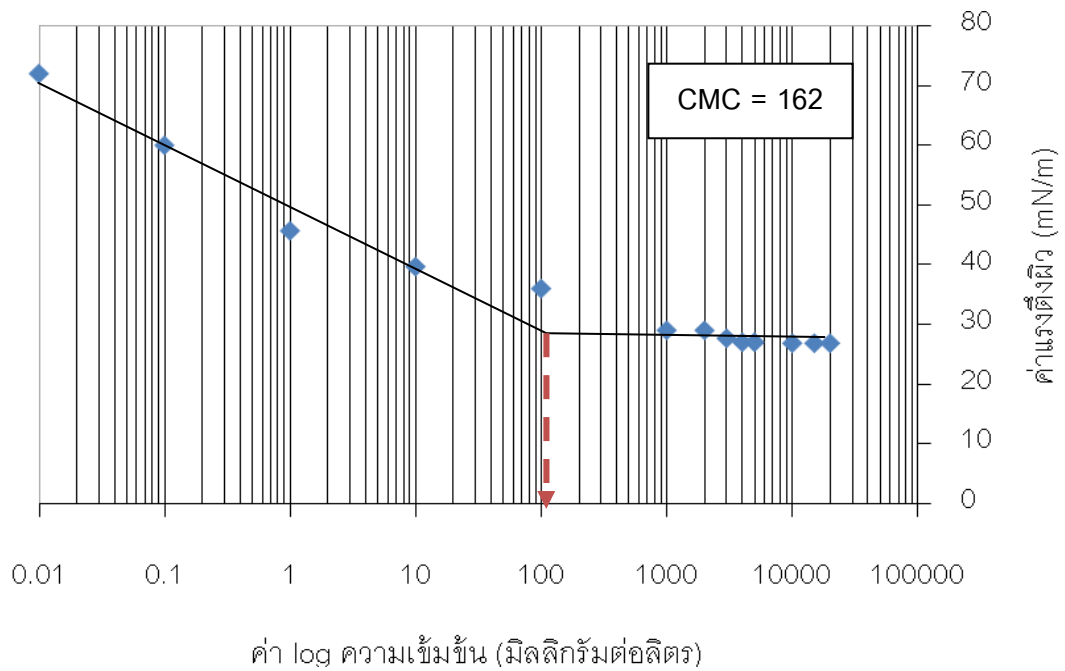
4.4 ลักษณะสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

4.4.1 ค่าความเข้มข้นวิกฤติของการเกิดไมเซลล์ (Critical micelle concentration; CMC)

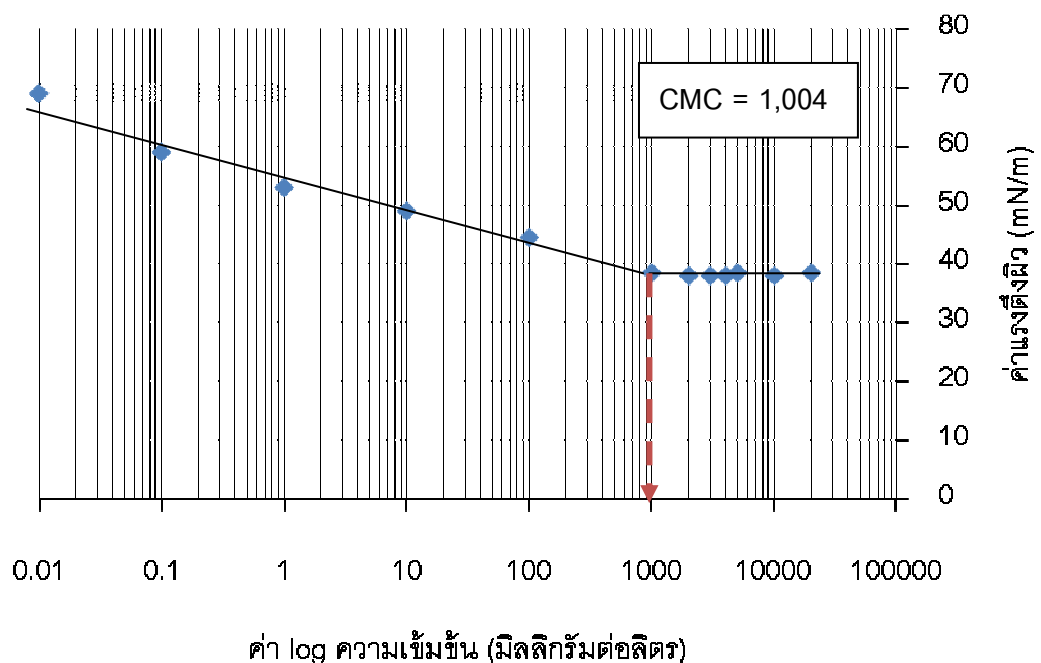
ค่าความเข้มข้นวิกฤติของการเกิดไมเซลล์หรือค่าจุดวิกฤตการเกิดไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ สามารถทำได้โดยเจือจางสารลดแรงตึงผิว ด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8 เตรียมให้มีความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0.01-20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร นำแต่ละความเข้มข้นไปวัดค่าแรงตึงผิวระหว่างของเหลวและอากาศที่ลดลง และนำไปเขียนกราฟเพื่อหาค่า CMC พบว่า ค่าแรงตึงผิวที่วัดได้สามารถแบ่งออกได้เป็นสองช่วง โดยในช่วงแรกค่าแรงตึงผิวจะมีค่าลดลงเรื่อยๆ ตามความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้น ส่วนในช่วงที่สองค่าแรงตึงผิวจะมีค่าค่อนข้างคงที่ ไม่ขึ้นกับความเข้มข้น ซึ่งความเข้มข้นวิกฤติของการเกิดไมเซลล์นี้เป็นค่าที่มีความจำเพาะในสารแต่ละชนิด และยังแสดงถึงประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชนิดนั้นๆ ได้ จากการหาค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ในการทดลองได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.5 โดยพบว่าค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *P. anomala* PY1 มีค่าเท่ากับ 162 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าแรงตึงผิว ณ การเกิดไมเซลล์ (γ CMC) เท่ากับ 29.5 mN/m ซึ่งมีค่า CMC และ γ CMC ต่ำกว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์สองชนิดคือ โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต และไทรทอน เอกซ์ 100 นอกจากนี้ค่าที่ได้ยังมีค่าอยู่ในช่วงใกล้เคียงกับสารลดแรงตึงผิวชนิดไซโฟโรลิพิดจาก *Candida bombicola* ดังแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.5 เปรียบเทียบค่าความเข้มข้นวิกฤติของการเกิดไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *P. anomala* PY1 กับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์

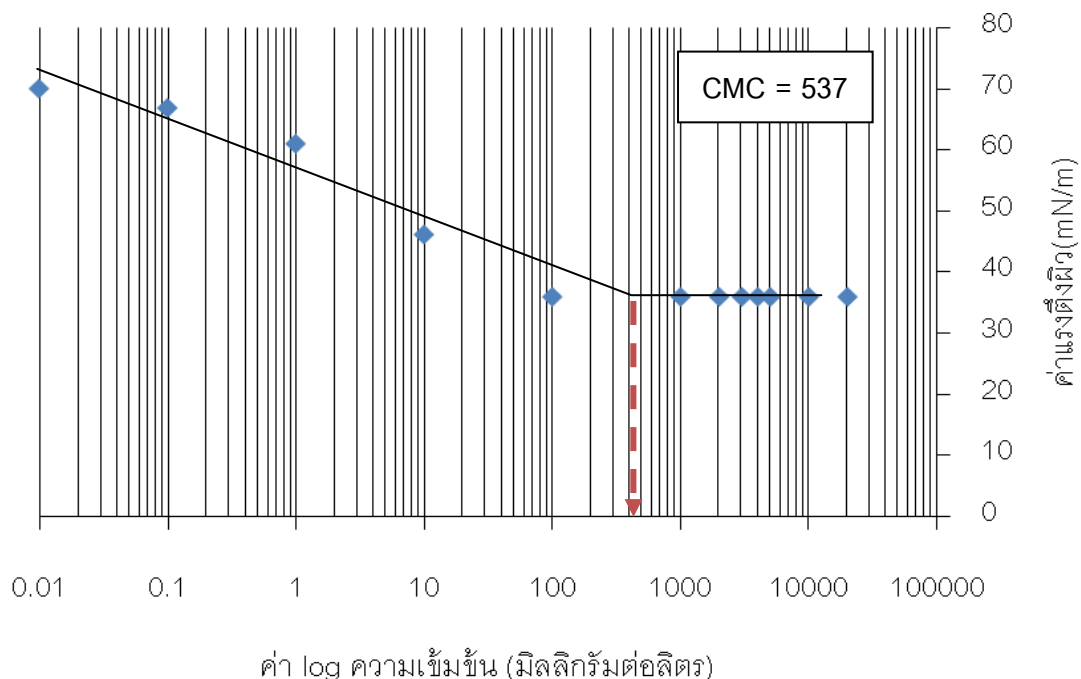
สารลดแรงตึงผิว	ค่า CMC (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่า γ CMC (แรงตึงผิว ณ การเกิดไมเซลล์) (mN/m)
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก <i>P. anomala</i> PY1	162	29.5
โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	1,004	38
ไทรทอน เอกซ์ 100	537	36



รูปที่ 4.10 ค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 จากการเขียนกราฟระหว่างค่า log ความเข้มข้นของสารและค่าแรงตึงผิว



รูปที่ 4.11 ค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต จากการเขียนกราฟระหว่างค่า log ความเข้มข้นของสารและค่าแรงตึงผิว



รูปที่ 4.12 ค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ ไทรทอนเอกซ์ 100 จากการเขียนกราฟระหว่างค่า log ความเข้มข้นของสารและค่าแรงตึงผิว

ตารางที่ 4.6 แสดงค่าความเข้มข้นวิกฤติของการเกิดไมเซลล์ (Critical micelle concentration; CMC) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดต่างๆ

จุลินทรีย์	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	CMC (มิลลิกรัมต่อลิตร)	อ้างอิง
<i>Pichia anomala</i> PY1	ไกลโคลิพิด	162	งานวิจัยนี้
<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214	ไซโฟโรลิพิด	130	Otto และคณะ, 1999
<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214	ไซโฟโรลิพิด	48-250	Ashby และคณะ, 2008
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SP4	แรมโนลิพิด	200	Pornsunthorntawee และคณะ, 2009b
<i>Pseudozyma aphidis</i> DSM 70725	แมนโนซิลอิทธิร-ทอลลิพิด	10	Rau และคณะ, 2005

4.4.2 ค่าดัชนีการก่อกอิมัลชัน (Emulsion Index)

วัดค่าดัชนีการก่อกอิมัลชัน เมื่อใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ร่วมกับน้ำมันที่ใช้ในทางอาหารชนิดต่างๆ เช่น น้ำมันงา น้ำมันสลัด น้ำมันถั่วเหลือง เป็นต้น ตามวิธีของ Shepherd และคณะ (1995) พบว่า ความสามารถในการก่อกอิมัลชัน (Emulsification activity) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ มีค่าใกล้เคียงกันคือ มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 0.3-0.5 และค่าความเสถียรในการก่อกอิมัลชัน (Emulsification stability) ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ เช่น น้ำมันสลัด น้ำมันมะกอก น้ำมันคาโนลา น้ำมันเมล็ดฝ้าย น้ำมันมะพร้าว และน้ำมันมะรุม ที่ 24 ชั่วโมง (E_{24}) มีค่ามากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำมันสลัด น้ำมันคาโนลา และน้ำมันมะพร้าวมีค่าดัชนีการก่อกอิมัลชันลดลงน้อยที่สุดใน 3 วันแรก (E_{72}) คือ 4-8 เปอร์เซ็นต์ ส่วนน้ำมันมะกอก น้ำมันเมล็ดฝ้าย น้ำมันมะรุม น้ำมันรำข้าว น้ำมันงา น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันปาล์ม ลดลง 10-30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังจากนั้นในน้ำมันทุกชนิดค่าความเสถียรจะค่อยๆ ลดลงไปประมาณ 30-40 เปอร์เซ็นต์ภายใน 7 วัน โดยเมื่อถึงวันที่ 7 พบว่า การก่อกอิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อน้ำมันคาโนลาและน้ำมันมะกอกมีความเสถียรของอิมัลชันมากที่สุดซึ่งคงมีความเสถียรของอิมัลชันที่ 75.84 และ 72.63 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 แสดงค่าการก่อกอิมัลชัน (Emulsification activity) และความเสถียรของการก่อกอิมัลชัน (Emulsification stability) หรือค่าดัชนีการก่อกอิมัลชัน (Emulsion index) ที่เวลาต่างๆ ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ต่อน้ำมันที่ใช้ในทางอาหารชนิดต่างๆ

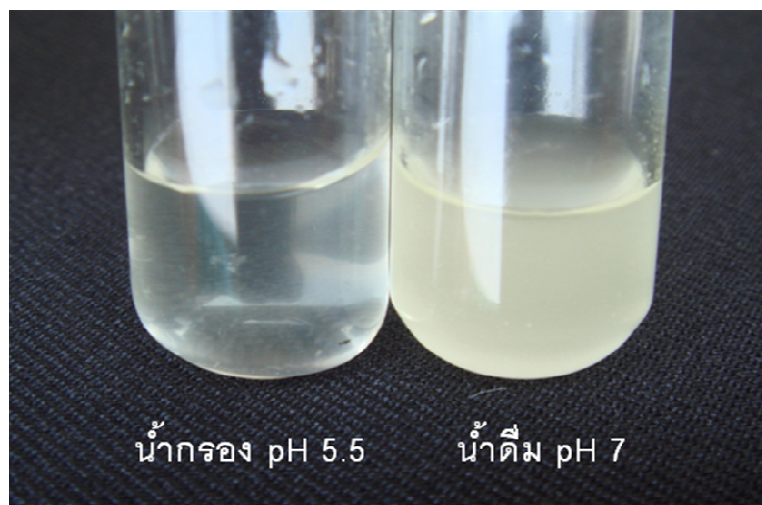
ชนิดน้ำมัน	ค่าการก่อกอิมัลชัน (OD units)	ค่าดัชนีความเสถียรของอิมัลชัน (%)			
		E_{24} (1 วัน)	E_{72} (3 วัน)	E_{120} (5 วัน)	E_{168} (7 วัน)
ทริสบัฟเฟอร์	0.235	97.14	92.51	88.55	81.50
น้ำมันงา	0.397	87.15	76.95	66.75	62.09
น้ำมันปาล์ม	0.484	88.31	70.22	70.01	60.60
น้ำมันรำข้าว	0.461	85.41	81.89	74.62	64.10
น้ำมันสลัด	0.405	98.15	92.35	91.36	69.75

ตารางที่ 4.7 แสดงค่าการก่ออิมัลชัน (Emulsification activity) และความเสถียรของการก่ออิมัลชัน (Emulsification stability) หรือค่าดัชนีการก่ออิมัลชัน (Emulsion index) ที่เวลาต่างๆ ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้น้ำมันที่ใช้ในทางอาหารชนิดต่างๆ (ต่อ)

ชนิดน้ำมัน	ค่าการก่ออิมัลชัน (OD units)	ค่าดัชนีความเสถียรของอิมัลชัน (%)			
		E ₂₄ (1 วัน)	E ₇₂ (3 วัน)	E ₁₂₀ (5 วัน)	E ₁₆₈ (7 วัน)
น้ำมันถั่วเหลือง	0.490	87.22	77.22	71.81	64.86
น้ำมันมะกอก	0.368	91.69	89.89	88.50	72.63
น้ำมันคาโนลา	0.425	94.92	94.10	90.97	75.84
น้ำมันเมล็ดฝ้าย	0.361	99.47	88.95	82.75	67.42
น้ำมันมะพร้าว	0.359	98.23	96.87	80.07	63.09
น้ำมันมะรุม	0.373	90.00	88.19	87.36	60.47

4.4.3 ค่า Hydrophilic-Lipophilic Balance (HLB)

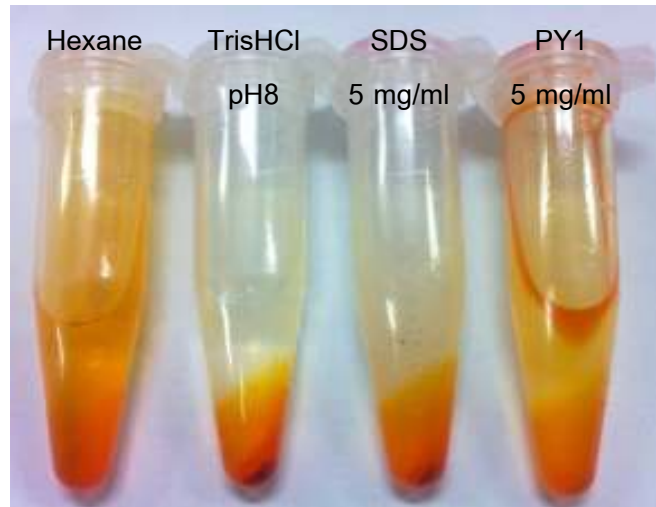
ค่า Hydrophilic-Lipophilic Balance คือ ค่าที่บอกถึงสมบัติที่ชอบน้ำและชอบน้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ ค่า HLB มีค่าตั้งแต่ 0-20 หากถ้ามีค่าเป็น 0 จะเป็นสารลดแรงตึงผิวที่ชอบน้ำมันทั้งโมเลกุล ในทางตรงข้ามหากมีค่าเป็น 20 จะชอบน้ำทั้งโมเลกุล โดยค่า HLB นี้ยังสามารถบอกถึงหน้าที่หรือประโยชน์ของสารลดแรงตึงผิวชนิดนั้นๆ ได้ จากการทดลองเมื่อนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบริสุทธิ์บางส่วนที่สกัดได้มาละลายในน้ำกรองและน้ำดื่มเพื่อสังเกตความสามารถในการละลายของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่า สารละลายที่ได้มีลักษณะโปร่งแสง และกระจายตัวได้ดีในน้ำ ดังรูปที่ 4.13 โดยลักษณะดังกล่าวสามารถบ่งชี้ถึงค่า HLB ได้ในช่วง 10-13 ที่บอกได้ว่าเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีสมบัติในการก่ออิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำได้ดี (ดังตารางที่ 3.1) ซึ่งสอดคล้องกับค่า HLB ที่ได้จากการคำนวณตามสูตรโครงสร้างของน้ำหนักมวลโมเลกุลส่วนที่ชอบน้ำเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลทั้งหมด มีค่าเท่ากับ 11-14



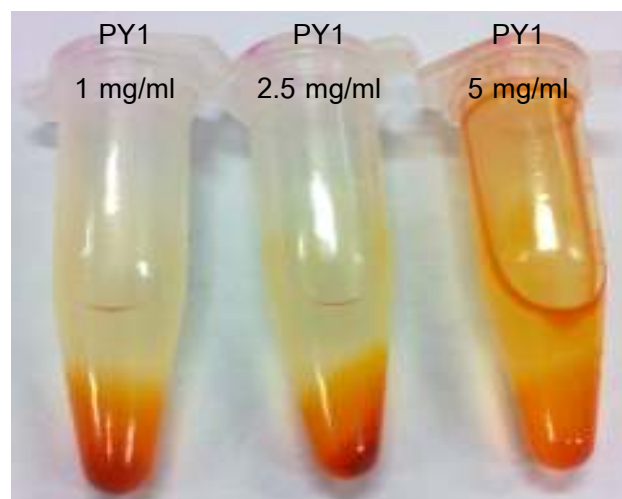
รูปที่ 4.13 ลักษณะของสารละลายสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบริสุทธิ์บางส่วนที่ผลิตโดย *P. anomala* PY1 เมื่อละลายในน้ำกรอง และน้ำดื่มตามลำดับ

4.4.4 ประสิทธิภาพในการห่อหุ้ม (Encapsulation) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบริสุทธิ์บางส่วน

ทดสอบประสิทธิภาพในการห่อหุ้ม (Encapsulation) สีชูดาน II ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบริสุทธิ์บางส่วน โดยสีชูดาน II นั้นไม่สามารถละลายได้ในน้ำ ดังนั้นหากเติมสารลดแรงตึงผิวที่ละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์ความเป็นกรดต่าง 8 แล้วมีการละลายของสีออกมา เกิดเป็นสารละลายสีส้มแสดงว่าสารลดแรงตึงผิวชนิดนั้นมีความสามารถในการห่อหุ้มสีภายในไมเซลล์ได้ดี จากรูปที่ 4.14 สีชูดานสามารถละลายได้ดีในเฮกเซนซึ่งเป็นสารไม่มีขั้ว แต่ไม่ละลายในทริสไฮโดรคลอไรด์ความเป็นกรดต่าง 8 ซึ่งเป็นสารมีขั้ว และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารละลายของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ คือ โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบริสุทธิ์บางส่วนจาก *P. anomala* PY1 ความเข้มข้นเท่ากันที่ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีประสิทธิภาพในการห่อหุ้มสีชูดาน II ได้ดีกว่าโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต ดังจะเห็นได้จากความเข้มข้นของสีส้มในสารละลายสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเข้มข้นกว่าในสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต ซึ่งเกิดฟองได้ดีกว่าแต่ห่อหุ้มสารไม่มีขั้วได้ไม่ดี นอกจากนี้ จากรูปที่ 4.15 จะเห็นได้ว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ สีชูดาน II สามารถละลายออกมาอยู่ในสารละลายได้มากยิ่งขึ้นตามไปด้วย



รูปที่ 4.14 ประสิทธิภาพการห่อหุ้มสีชูตาน II ของสารประเภทต่างๆ



รูปที่ 4.15 ประสิทธิภาพการห่อหุ้มสีชูตาน II ของสารละลายสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบริสุทธิ์
บางส่วนที่ผลิตโดย *P. anomala* PY1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ

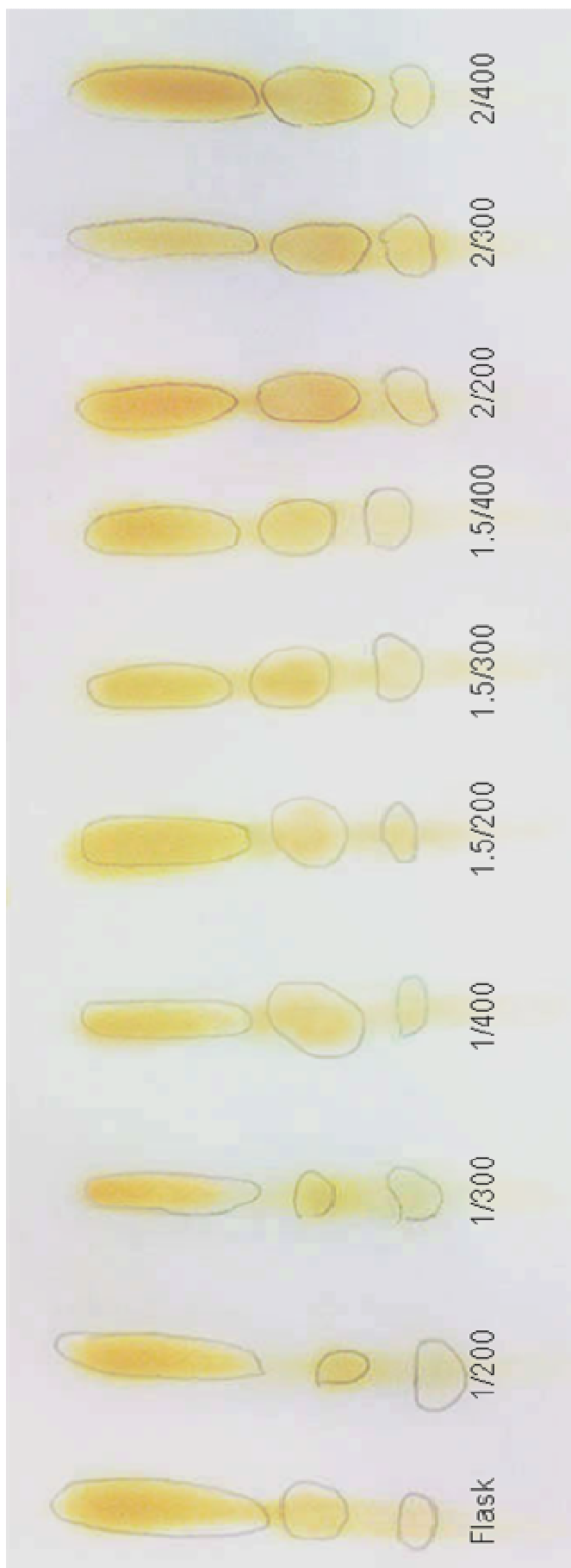
4.5 การทำบริสุทธิ์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธีโครมาโทกราฟี

4.5.1 การทำบริสุทธิ์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธีทีนเลเยอร์โครมาโทกราฟี (TLC)

ทดสอบและแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ในแต่ละแบคทีเรียจากข้อ 4.3 โดยใช้แผ่น TLC silica gel 60 เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยคลอโรฟอร์ม เมทานอล และน้ำ ในอัตราส่วน 65: 25: 4 ตามลำดับ แล้วจึงนำไปอังด้วยไอระเหยของไอโอดีนเพื่อวิเคราะห์หาส่วนที่มีพันธะคู่เป็นองค์ประกอบ พบว่า เมื่อนำสารที่สกัดได้ในแต่ละแบคทีเรียมาทดสอบ สามารถแยกสารออกได้เป็น 3 ลำดับส่วน เรียกว่า F1, F2 และ F3 ตามลำดับ โดยแต่ละแบคทีเรียที่ทำการแปรผันอัตราการให้อากาศและอัตราเร็วใบกวนต่าง ๆ นั้น จะมีลักษณะคล้ายกันดังแสดงในรูปที่ 4.16 และค่าคงที่ของอัตราส่วนการเคลื่อนที่ (R_f) มีค่าใกล้เคียงกันดังแสดงในตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 อัตราการเคลื่อนที่ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จากแต่ละแบคทีเรียที่แปรผันอัตราการให้อากาศและอัตราเร็วใบกวนต่าง ๆ เมื่อทดสอบบนแผ่น TLC

ชนิดการผลิต	อัตราการให้อากาศ (vvm)	อัตราเร็วใบกวน (rpm)	อัตราเร็วการเคลื่อนที่ของแถบ		
			F1	F2	F3
ขวดเขย่า	-	200	0.89	0.76	0.66
ถังหมัก	1	200	0.89	0.75	0.66
	1	300	0.89	0.75	0.66
	1	400	0.89	0.76	0.67
	1.5	200	0.89	0.77	0.68
	1.5	300	0.89	0.78	0.69
	1.5	400	0.89	0.78	0.69
	2	200	0.89	0.75	0.67
	2	300	0.88	0.75	0.67
	2	400	0.88	0.75	0.66



F1

F2

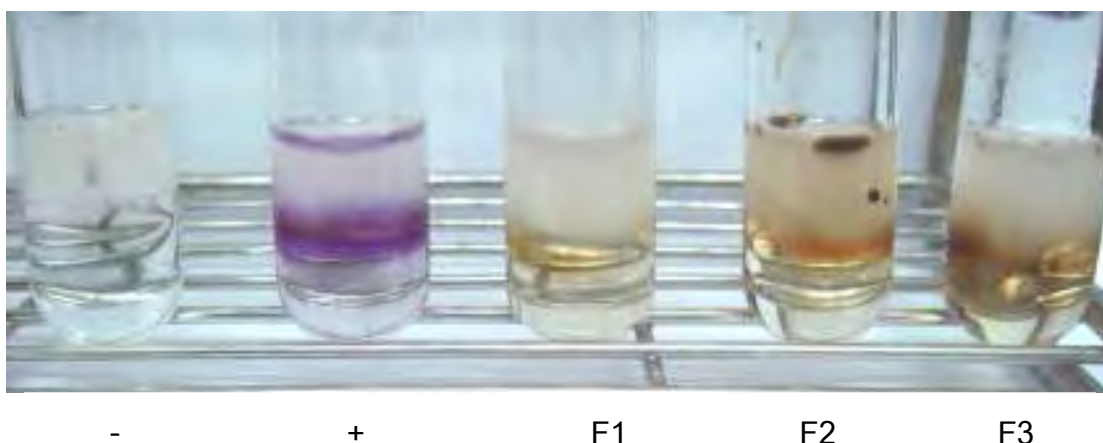
F3

รูปที่ 4.16 ผลการวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *P. anomala* PY1 ในถังหมักแบบแบคทีเรียที่อัตราการให้อากาศ 1, 1.5 และ 2 vvm ร่วมกับ อัตราเร็วใบกวน 200, 300 และ 400 rpm ด้วยวิธี Thin-layer Chromatography เมื่อตรวจสอบผลด้วยไอโอดีน

เมื่อสกัดแต่ละลำดับส่วนและนำมาเจือจางด้วย 50 มิลลิโมลาร์ทริสไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ความเป็นกรดต่าง 8 ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อนำมาตรวจสอบประสิทธิภาพด้วยการวัดค่าการกระจายน้ำมัน พบว่า F2 มีค่าการกระจายน้ำมันสูงที่สุด คือ 148.85 ตารางเซนติเมตร ดังแสดงในตารางที่ 4.9 และเมื่อตรวจสอบแต่ละลำดับส่วนด้วยการเจือจางในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้นประมาณ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อหาส่วนที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบด้วยมอริซ รีเอเจนท์ พบว่าลำดับส่วน F2 และ F3 ให้ผลบวก โดยเกิดเป็นสีน้ำตาลเข้มระหว่างชั้นของสารละลายกับชั้นของกรด ดังแสดงในรูปที่ 4.17 จึงสันนิษฐานได้ว่า *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหรือเป็นสารประเภทไกลโคลิพิด

ตารางที่ 4.9 ค่าการกระจายน้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จากแผ่น TLC ในแต่ละลำดับส่วน

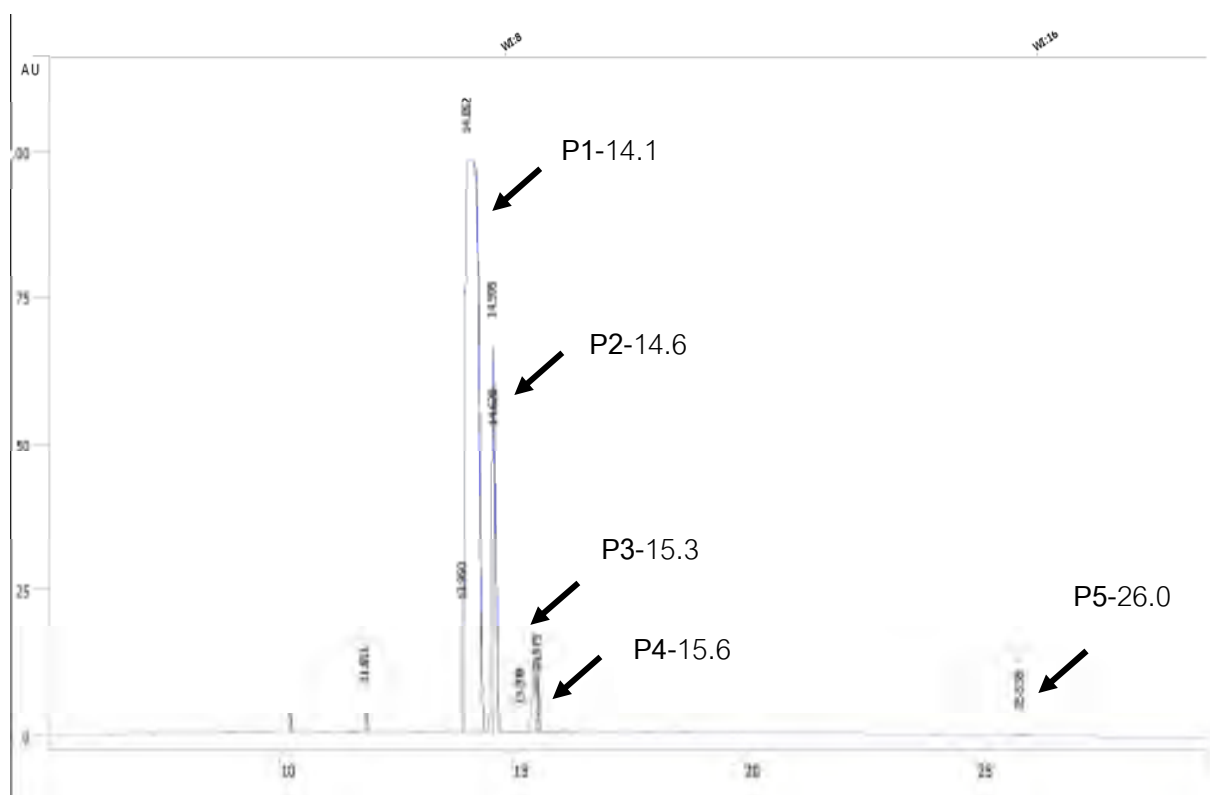
แถบที่	ค่าการกระจายน้ำมัน (cm ²)
F1	32.15
F2	148.85
F3	138.02



รูปที่ 4.17 ผลการวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จากแผ่น TLC ในแต่ละลำดับส่วน เมื่อตรวจสอบผลด้วย มอริซ รีเอเจนท์

4.5.2 การทำบริสุทธิ์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC)

จากนั้นทำการสกัดตัวอย่างสารจากตำแหน่ง F2 และ F3 ที่เตรียมได้จาก preparative TLC ซึ่งให้ผลบวกในการทดสอบด้วยมอริช รีเอเจนท์ และสามารถกระจายน้ำมันได้ดี มาวิเคราะห์และทำให้บริสุทธิ์ต่อยุทธวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) โดยละลายสารตัวอย่างด้วย 100 % อะซิโตรไนโตรลีสที่มีความเข้มข้น 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้ภาวะดังข้อ 3.5.3 และทำการเก็บลำดับส่วนของตัวอย่างตำแหน่ง F2 ที่ปรากฏจำนวน 5 ลำดับ ส่วน ดังแสดงในรูปที่ 4.18 ต่อจากนั้นจึงนำมาทำให้แห้งในภาวะสุญญากาศ แล้วเติม 50 มิลลิโมลาร์ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นแตกต่าง เท่ากับ 8 เจือจางให้มีความเข้มข้นเป็น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารที่เตรียมได้ไปวัดค่าการกระจายน้ำมัน ดังแสดงในตารางที่ 4.10 พบว่า หลังจากผ่าน HPLC ลำดับส่วนที่ 5 และ 1 ที่ RT 26 และ 14.1 นาที มีประสิทธิภาพในการกระจายน้ำมันได้ดีที่สุด คือ 134.71 และ 27.33 ตารางเซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนพิกที่เหลือให้ค่าการกระจายน้ำมันที่ใกล้เคียงกัน และกำหนดให้เรียกชื่อสารที่เก็บได้หลังจากผ่าน HPLC ของตำแหน่ง F2 ทั้ง 5 ลำดับส่วนนี้ว่า P1 ถึง P5 ตามลำดับ

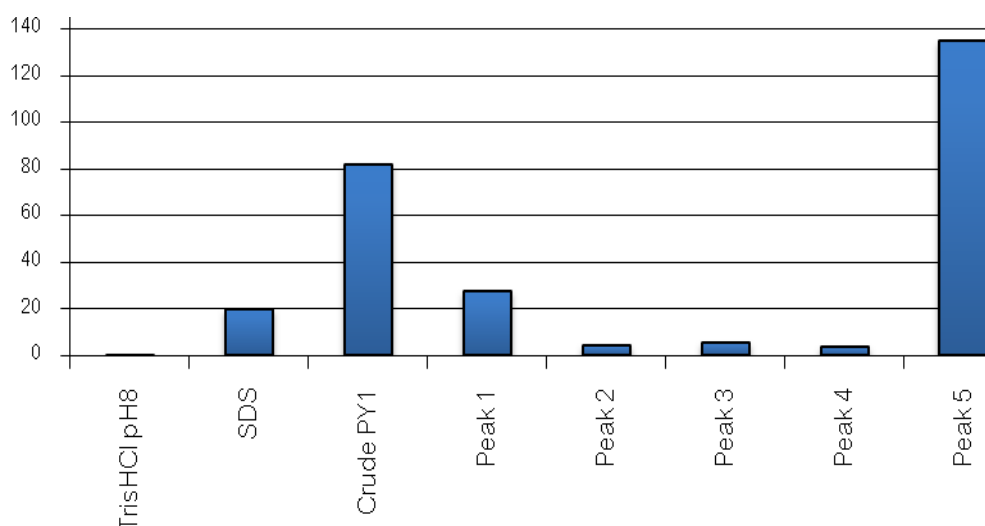


รูปที่ 4.18 โครมาโทแกรมของตัวอย่างลำดับส่วน F2 จาก HPLC โดยตำแหน่งที่เก็บตัวอย่างได้แก่ RT ที่ 14.1, 14.6, 15.3, 15.6 และ 26.0 นาที ตามลำดับ

ตารางที่ 4.10 ค่าการกระจายน้ำมันของตัวอย่างตำแหน่ง F2 ที่ผ่านการวิเคราะห์และทำให้บริสุทธิ์ด้วย HPLC

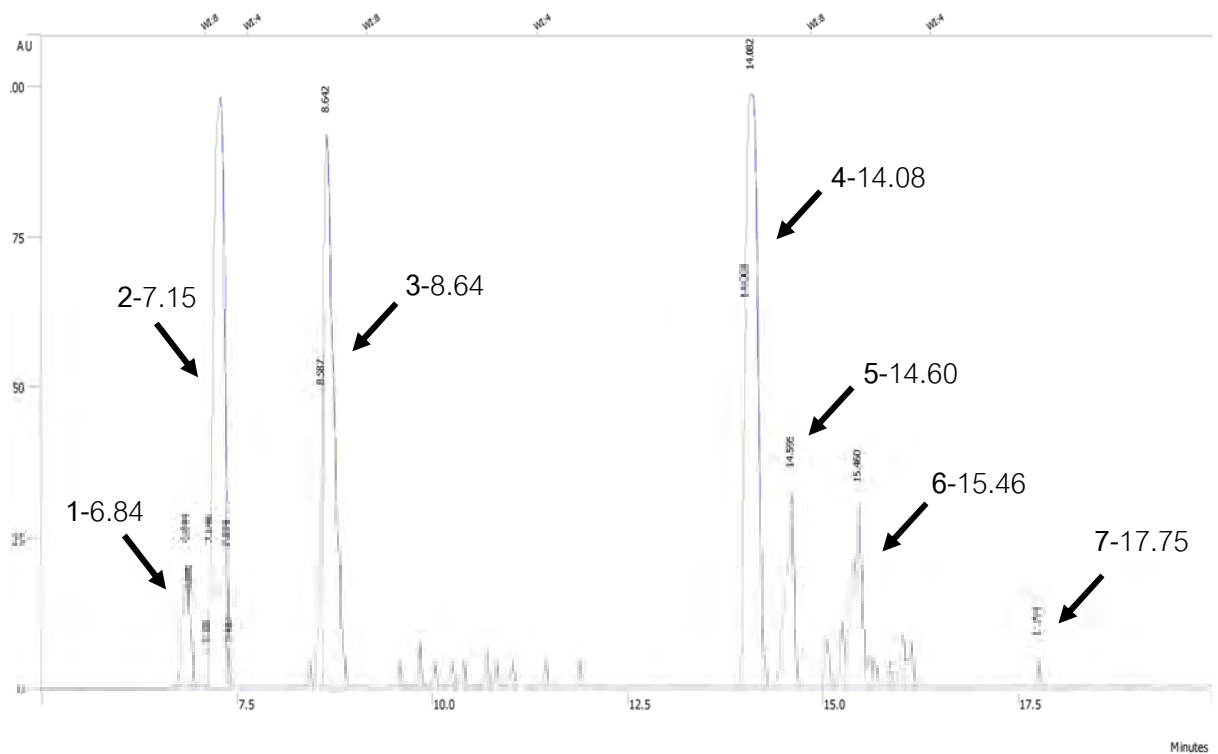
ตำแหน่งพีกจากลำดับส่วน F2	Retention time (RT) (นาที)	ค่าการกระจายน้ำมัน (cm ²)
1 (P1)	14.1	27.33
2 (P2)	14.6	4.15
3 (P3)	15.3	5.72
4 (P4)	15.6	3.46
5 (P5)	26.0	134.71

นำค่าการกระจายที่ได้ในแต่ละลำดับส่วนมาเขียนกราฟเทียบกับโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบริสุทธิ์บางส่วนที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.19 พบว่า ลำดับส่วนที่ 5 สามารถกระจายน้ำมันได้ดีที่สุดในขณะที่ทริสไฮโดรคลอไรด์ ความเป็นกรดต่าง 8 กระจายน้ำมันได้น้อยที่สุด นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพบริสุทธิ์บางส่วน และลำดับส่วนที่ 5 ยังสามารถกระจายน้ำมันได้ดีกว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต



รูปที่ 4.19 ค่าการกระจายน้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบริสุทธิ์บางส่วนที่ผลิตโดย *Pichia anomala* PY1 และตำแหน่งพีกที่เก็บได้หลังจากผ่าน HPLC เทียบกับทริสไฮโดรคลอไรด์และ SDS

เมื่อนำตัวอย่างสารจากตำแหน่ง F3 มาวิเคราะห์และทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) ด้วยวิธีเช่นเดียวกับตำแหน่ง F2 และทำการเก็บลำดับส่วนที่ปรากฏจำนวน 7 ลำดับส่วน ดังแสดงในรูปที่ 4.20 ต่อจากนั้นจึงนำมาทำให้แห้งในภาวะสุญญากาศและวัดค่าการกระจายน้ำมัน พบว่า ที่ตำแหน่งลำดับส่วนที่ 5 RT 14.6 นาที มีประสิทธิภาพในการกระจายน้ำมันได้ดีที่สุด คือ 6.60 ตารางเซนติเมตร ดังแสดงในตารางที่ 4.11 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าลำดับส่วนที่เก็บได้จาก HPLC ของ F3 มีประสิทธิภาพการกระจายน้ำมันได้ต่ำกว่าสารที่เก็บได้จาก F2 ดังนั้นจึงคัดเลือกเฉพาะลำดับส่วนที่เก็บได้จาก F2 เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อด้วยแมสสเปกโทเมตรีเพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลต่อไป



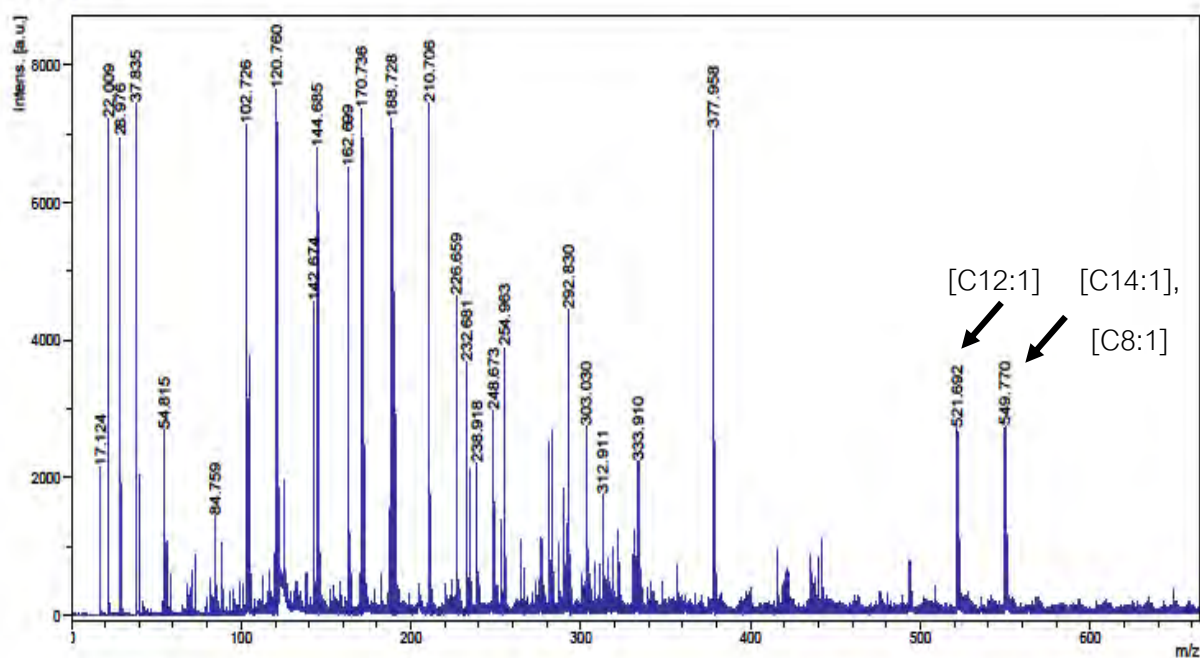
รูปที่ 4.20 โครมาโทแกรมของตัวอย่างลำดับส่วน F3 จาก HPLC โดยตำแหน่งที่เก็บตัวอย่างได้แก่ RT ที่ 6.84, 7.15, 8.64, 14.08, 14.60, 15.46 และ 17.75 นาที ตามลำดับ

ตารางที่ 4.11 ค่าการกระจายน้ำมันของตัวอย่างตำแหน่ง F3 ที่ผ่านการวิเคราะห์และทำให้บริสุทธิ์ด้วย HPLC

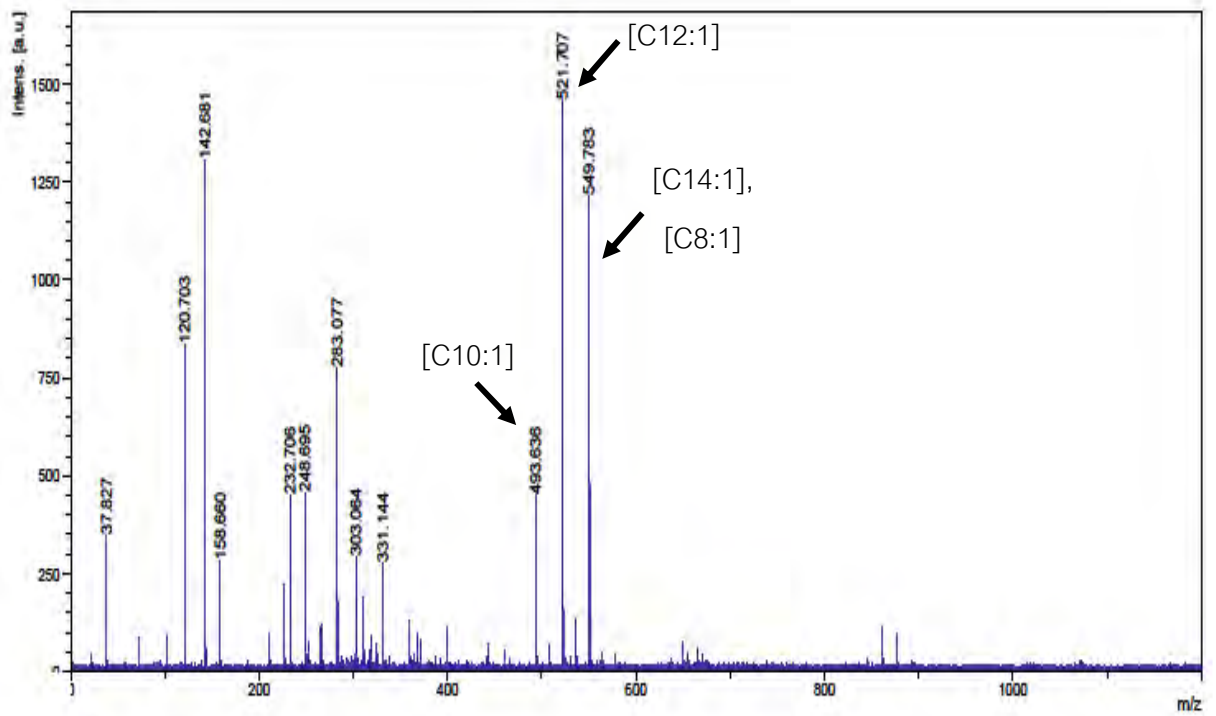
ตำแหน่งพิกจากลำดับส่วน F3	Retention time (RT) (นาที)	ค่าการกระจายน้ำมัน (cm ²)
1	6.84	0.50
2	7.15	1.33
3	8.64	3.80
4	14.08	1.54
5	14.60	6.60
6	15.46	1.77
7	17.75	3.46

4.6 วิเคราะห์โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้

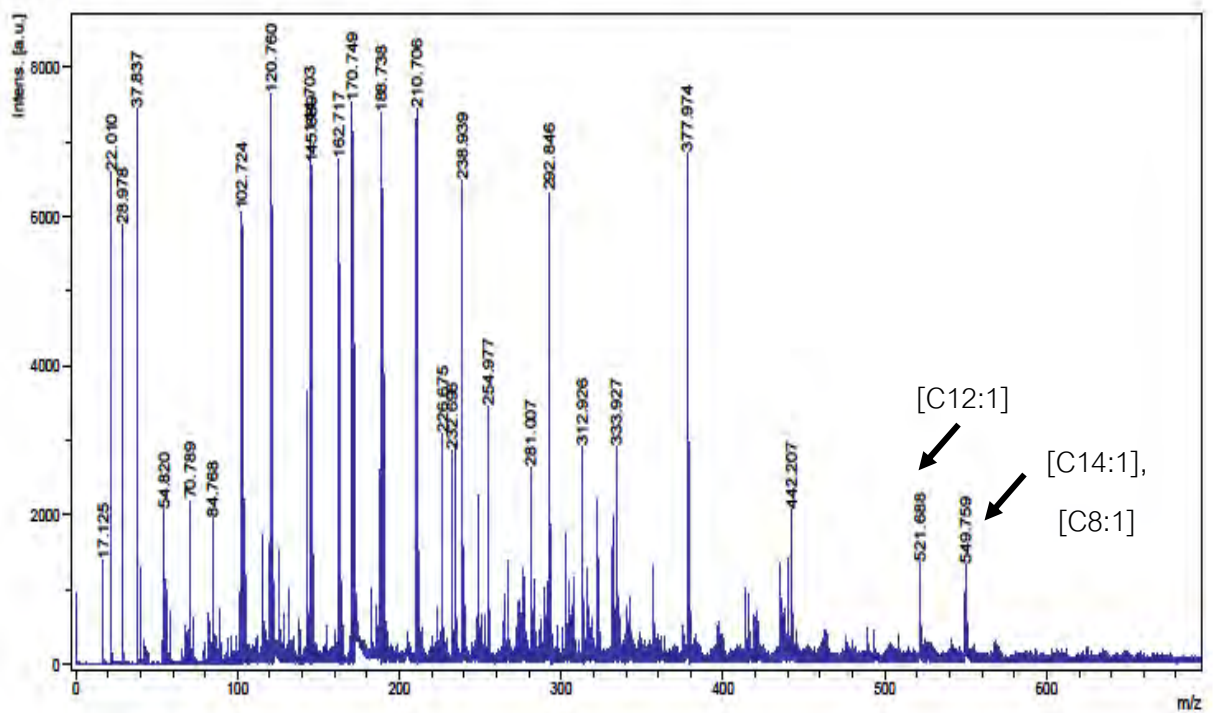
นำตัวอย่างสาร P1 ถึง P5 จากตำแหน่ง F2 ซึ่งผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย HPLC มาวิเคราะห์หาน้ำหนักมวลโมเลกุลด้วยวิธีแมสสเปกโทเมตรี โดยใช้เทคนิค MALDI-TOF ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



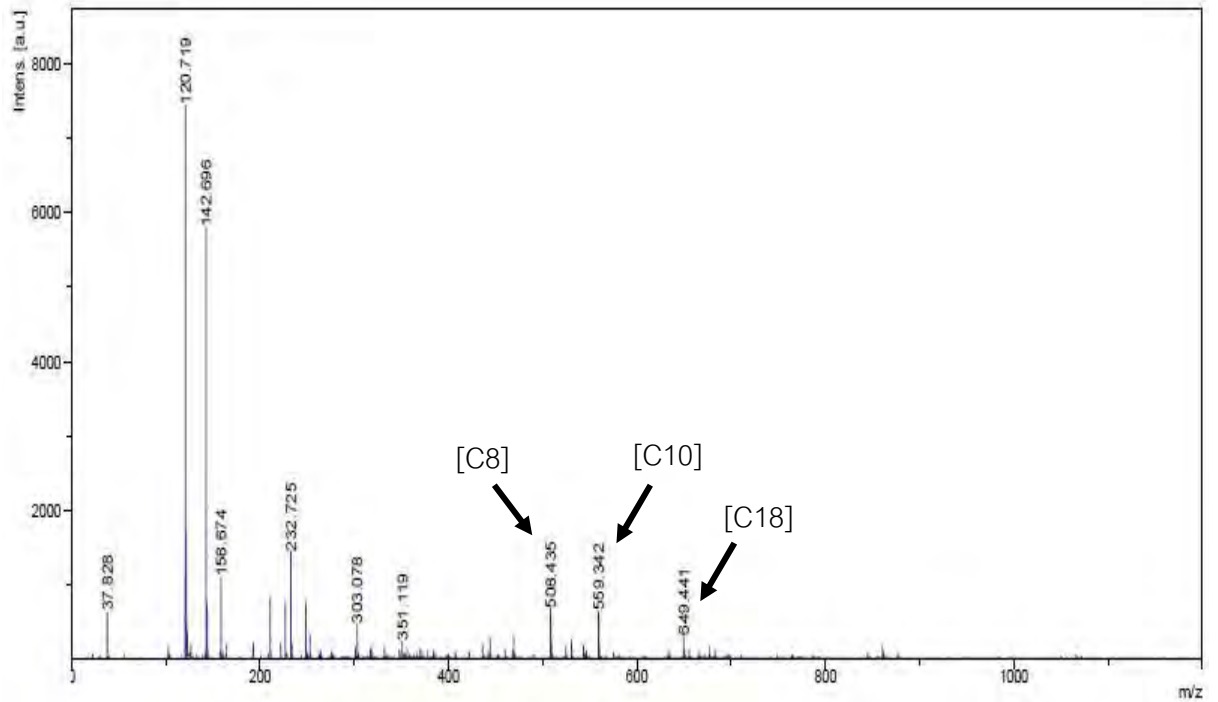
รูปที่ 4.21 โครมาโทแกรมของ MALDI-TOF MS จากตัวอย่างสาร P1



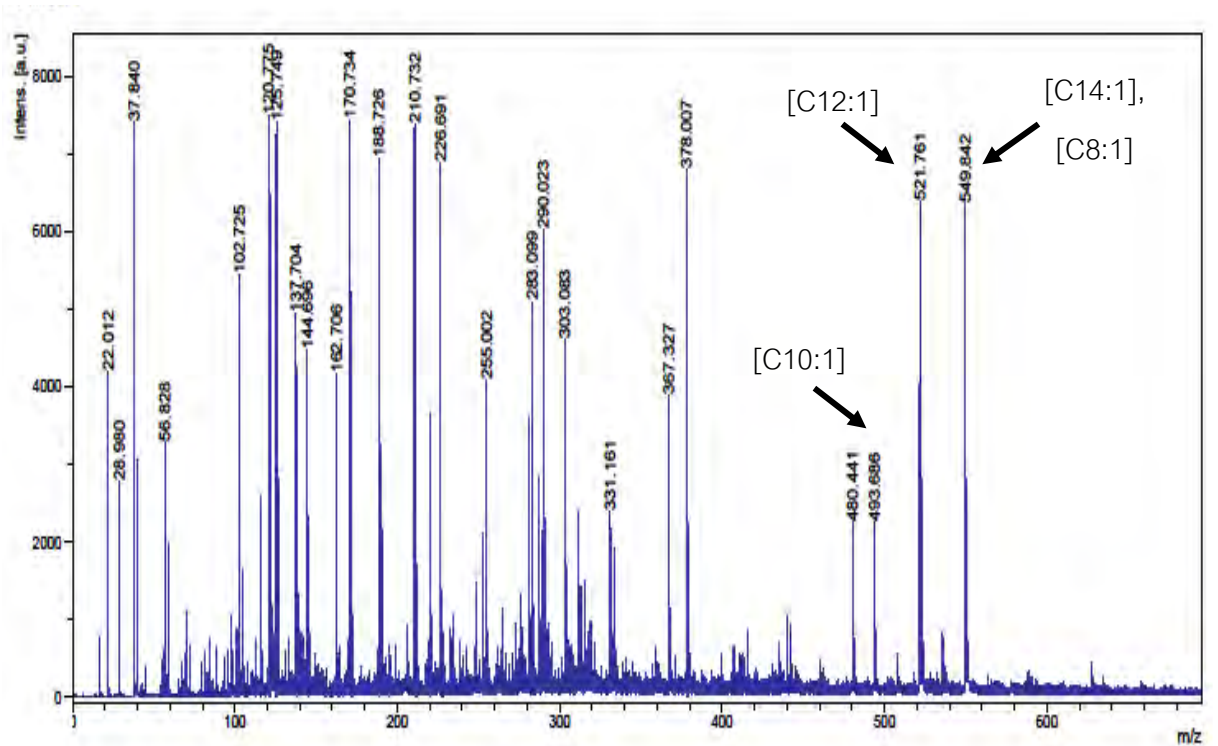
รูปที่ 4.22 โคโรมาโทแกรมของ MALDI-TOF MS จากตัวอย่างสาร P2



รูปที่ 4.23 โคโรมาโทแกรมของ MALDI-TOF MS จากตัวอย่างสาร P3

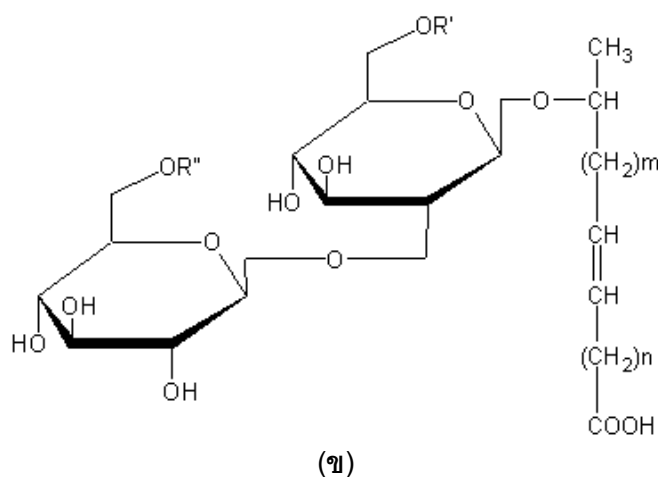
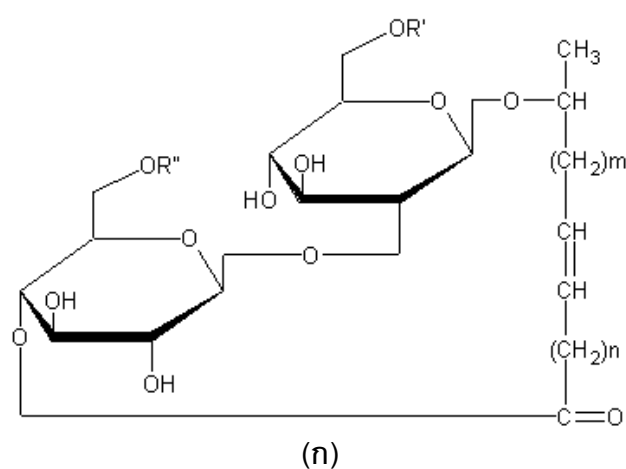


รูปที่ 4.24 โครมาโทแกรมของ MALDI-TOF MS จากตัวอย่างสาร P4



รูปที่ 4.25 โครมาโทแกรมของ MALDI-TOF MS จากตัวอย่างสาร P5

โครมาโทแกรมข้างต้นจากรูป 4.21-4.25 คือผลการวิเคราะห์แต่ละลำดับส่วนด้วยวิธี MALDI-TOF ซึ่งแสดงถึงค่ามวลต่อประจุของไอออน (m/z) ที่บ่งบอกถึงน้ำหนักโมเลกุลของสารจึงช่วยให้สามารถวิเคราะห์โครงสร้างของสารที่ผลิตได้ โดยการจากคำนวณสูตรโครงสร้าง ดังแสดงผลการวิเคราะห์ในตารางที่ 4.12 พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากยีสต์ *Pichia anomala* PY1 ในถังหมักแบบแบตช์ มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 492, 508, 520, 548, 558 และ 648 เทียบเคียงได้กับสารโซโฟโรลิพิดที่มีโครงสร้างในส่วนของกรดไขมันตั้งแต่ C8-C18 ทั้งชนิดอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว ส่วนใหญ่อยู่ในรูปแบบแลคโตน (lactonic form) และอาจมีการเติมหมู่อะซิติก 1 หรือ 2 ตำแหน่งก็ได้



รูปที่ 4.26 โครงสร้างของโซโฟโรลิพิดที่ประกอบด้วยน้ำตาลไซโทโรสและกรดไขมันที่มีความยาวต่างๆ จากการวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF MS (ก) รูปแบบแลคโตน (ข) รูปแบบแอซิด

ตารางที่ 4.12 ผลการวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้ ด้วยวิธี MALDI-TOF MS

ตัวอย่างสาร	ค่า RT (นาที) จาก HPLC	ค่า $[M+H]^+$ (m/z)	รูปแบบ	R/R"	สูตรโครงสร้างของ ส่วนกรดไขมัน	มวลโมเลกุลจาก การคำนวณ
P1	14.1	521.692	Lactone	OH/OH	[C12:1]	520
		549.770	Lactone	OH/OH	[C14:1]	548
			Lactone	acetate/acetate	[C8:1]	
P2	14.6	493.636	Lactone	OH/OH	[C10:1]	492
		521.707	Lactone	OH/OH	[C12:1]	520
			Lactone	OH/OH	[C14:1]	548
P3	15.3	521.688	Lactone	acetate/acetate	[C8:1]	
			Lactone	OH/OH	[C12:1]	520
		549.759	Lactone	OH/OH	[C14:1]	548
			Lactone	acetate/acetate	[C8:1]	

ตารางที่ 4.12 ผลการวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้ ด้วยวิธี MALDI-TOF MS (ต่อ)

ตัวอย่างสาร	ค่า RT (นาที) จาก HPLC	ค่า $[M+H]^+$ (m/z)	รูปแบบ	R/R"	สูตรโครงสร้างของ ส่วนกรดไขมัน	มวลโมเลกุลจาก การคำนวณ
P4	15.6	508.435	Lactone	acetate /OH หรือ OH/acetate	[C8]	508
		559.342	Lactone	acetate /OH+Na ⁺ หรือ OH/acetate+Na ⁺	[C10]	536
P5	26.0	649.441	Lactone	acetate /OH หรือ OH/acetate	[C18]	648
		493.636	Lactone	OH/OH	[C10:1]	492
		521.707	Lactone	OH/OH	[C12:1]	520
		549.783	Lactone	OH/OH acetate/acetate	[C14:1] [C8:1]	548

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ด้วยสมบัติที่หลากหลายและมีความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากจุลินทรีย์ จึงทำให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นประโยชน์อย่างมากต่ออุตสาหกรรมในหลายภาคส่วน ดังนั้น เพื่อตอบสนองความต้องการของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระดับอุตสาหกรรม งานวิจัยนี้จึงศึกษาผลของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน และปัจจัยต่างๆ ที่เหมาะสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในถังหมักแบบแบตช์ ตลอดจนศึกษาลักษณะสมบัติบางประการของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1

จากงานวิจัยของ Thaniyavarn และคณะ (2008) ได้รายงานไว้ว่า เมื่อใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน และ NaNO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจนเหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *P. anomala* PY1 ได้ดีที่สุด ต่อมาผกามาศ ราชมนตรี (2551) ได้รายงานไว้ว่า *P. anomala* PY1 สามารถเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเสริมน้ำตาลกลูโคส ร่วมกับน้ำมันถั่วเหลือง ปริมาณรวมทั้งหมด 16% ประกอบด้วยน้ำมันถั่วเหลือง 10.67 % และกลูโคส 5.33% (W/V) คิดเป็นอัตราส่วนระหว่างน้ำมันถั่วเหลืองต่อกลูโคสเท่ากับ 2:1 แหล่งไนโตรเจนที่ประกอบด้วย NaNO_3 0.4 % และสารสกัดยีสต์ 0.3% (W/V) ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้นำชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน จากงานวิจัยของผกามาศ ราชมนตรี (2551) เพื่อทำการศึกษาต่อถึงอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน รวมทั้งอัตราส่วนของ NaNO_3 ต่อสารสกัดยีสต์ ที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระดับขวดเขย่า พบว่า อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 16:0.7% ซึ่งประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน 2 ชนิด คือ น้ำมันถั่วเหลือง 10.67% และกลูโคส 5.33% รวมเป็น 16% (W/V) แหล่งไนโตรเจน 2 ชนิด คือ NaNO_3 0.35% และสารสกัดยีสต์ 0.35% รวมเป็น 0.7% (W/V) มีความเหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยน้ำส่วนใสจากการเลี้ยงเชื้อมีค่าการกระจายน้ำมันสูงสุด 31.50 ตารางเซนติเมตร มีค่าแรงตึงผิวต่ำสุด 29 mN/m และน้ำหนักเซลล์แห้ง 16.92 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูง ยีสต์สามารถเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สามารถลดค่าแรงตึงผิวอีกทั้งยังกระจายน้ำมันได้ดีกว่าภาวะที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Guerra-Santos และคณะ (1984) ที่รายงานไว้ว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะถูกผลิตได้ดีเมื่ออยู่ในภาวะที่จำกัดไนโตรเจน รวมถึงหากใช้แหล่งไนโตรเจนที่ประกอบด้วยสกัดยีสต์

มากกว่าไซเดียมไนเตรท ยีสต์จะเจริญและผลิตสารได้ดีกว่า สอดคล้องกับงานวิจัยของ Abu-Ruwaida และคณะ (1991) ที่รายงานว่าการเพิ่มความเข้มข้นของเกลือที่สูงเกินไปมีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เนื่องจากเกลือมีผลต่อกิจกรรมของเซลล์

จากการเลี้ยงเชื้อระดับถังหมักแบบแบตช์ ยีสต์ *P. anomala* สายพันธุ์ PY1 ในอาหารเหลวปรับปรุงสูตรที่ได้จากระดับขวดเขย่า สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงสุดที่ภาวะการเลี้ยงเชื้อควบคุมความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 2 vvm และอัตราเร็วใบกวน 400 รอบต่อนาทีตลอดการทดลอง เป็นเวลา 7 วัน โดยน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสมีค่าการกระจายน้ำมันสูงสุด 76.42 ตารางเซนติเมตร ค่าแรงตึงผิวต่ำสุดที่ 30 mN/m และน้ำหนักเซลล์แห้ง 47.72 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่ามากกว่าการเลี้ยงในขวดเขย่า และที่ภาวะการเลี้ยงเชื้อข้างต้นนี้ยังให้ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพปริมาณมากที่สุดเท่ากับ 1,353 มิลลิกรัมต่อลิตร อัตราการผลิต 8.05 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และค่า Y_p/s เท่ากับ 10.17 มิลลิกรัมต่อกรัมของกลูโคส เมื่อทำการเปรียบเทียบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยการเลี้ยงเชื้อในถังหมัก พบว่าให้ผลผลิตมากกว่าการเลี้ยงเชื้อในระดับขวดเขย่าถึง 42.4 เปอร์เซ็นต์ ที่ให้ผลผลิตเพียง 950 มิลลิกรัมต่อลิตร (ผกามาศ ราชมนตรี, 2551) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Shah และคณะ (2007) ที่รายงานว่าการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดไซโฟโรลิพิด โดย *C. bombicola* ในถังหมักทั้งแบบแบตช์ และเฟดแบตช์ มีปริมาณสูงกว่า การผลิตในระดับขวดเขย่า เนื่องจากถังหมักสามารถควบคุมปัจจัยต่างๆ ได้ดีกว่าทั้งอุณหภูมิ ความเป็นกรดต่าง มีการกวน และการให้อากาศ ทำให้มีค่าการละลายของออกซิเจนสูงขึ้น เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Gautam และ Tyagi (2006) ที่รายงานว่ายีสต์สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากขึ้น เมื่ออัตราการกวนและอัตราการให้อากาศสูงขึ้น โดยแรงเฉือนมีผลต่อการเจริญและการผลิตสารของยีสต์เพียงเล็กน้อย

จากการติดตามการเจริญ การใช้แหล่งคาร์บอนทั้งกลูโคสและน้ำมันถั่วเหลือง รวมถึงไนเตรท พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ยีสต์ใช้กลูโคสไปจนเกือบหมด หลังจากนั้นน้ำมันถั่วเหลืองจึงถูกนำไปใช้ ส่วนไนเตรท-ไนโตรเจนได้ถูกใช้ไปอย่างรวดเร็วในช่วง 24 ชั่วโมงแรกแล้วจึงค่อยๆ ลดลงตามลำดับ ในส่วนของน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากชั่วโมงที่ 72 อาจเป็นเพราะน้ำมันถั่วเหลืองมีผลต่อการเจริญในช่วงแรก สำหรับค่าการกระจายน้ำมัน และ Δ ค่าแรงตึงผิว จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากชั่วโมงที่ 120 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Hu และ Ju (2001b) ที่รายงานว่ายีสต์ *Torulopsis bombicola* จะใช้กลูโคสหมดอย่างรวดเร็วเพื่อใช้ในการเจริญของ

เซลล์ จากนั้นจึงค่อนำน้ำมันถั่วเหลืองมาใช้เป็นลำดับต่อมา และยังพบว่าไซโฟโรลิพิติกสังเคราะห์มากในช่วงท้ายหรือช่วงพักตัวของยีสต์ (Casas และคณะ, 1997)

การวิเคราะห์ลักษณะสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ จากการทดลองพบว่า ค่าความเข้มข้นวิกฤติการเกิดไมเซลล์ (CMC) เท่ากับ 162 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าแรงตึงผิว ณ การเกิดไมเซลล์ (γ CMC) เท่ากับ 29.5 mN/m ซึ่งมีค่าต่ำกว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ที่นำมาเปรียบเทียบ คือ โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต และไทรทอน เอกซ์ 100 โดยจากการศึกษาของผกาภาศ ราชมนตรี (2551) ที่ใช้จุลินทรีย์และแหล่งคาร์บอนชนิดเดียวกันในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพพบว่า มีค่า CMC ต่างกันเล็กน้อย นอกจากนี้ Ashby และคณะ (2008) ยังรายงานค่า CMC ของไซโฟโรลิพิติกอยู่ในช่วง 48-250 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยจะแตกต่างกันออกไปตามโครงสร้างของไซโฟโรลิพิติก และยังเป็นค่าเฉพาะตัวที่แสดงถึงประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชนิดนั้นๆ ได้อีกด้วย

การศึกษาความสามารถในการก่อกิมล์ชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้โดยการวัดค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน (Emulsion Index) ต่อน้ำมันที่ใช้ในอาหารชนิดต่างๆ พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 0.3-0.5 โดยก่อกิมล์ชันได้ดีที่สุดในน้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม น้ำมันรำข้าว และน้ำมันคาโนลา ตามลำดับ และค่าความเสถียรในการก่อกิมล์ชัน (Emulsification stability) ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ เช่น น้ำมันสลัด น้ำมันมะกอก น้ำมันคาโนลา น้ำมันเมล็ดฝ้าย น้ำมันมะพร้าว และน้ำมันมะรุม ที่ 24 ชั่วโมง (E_{24}) มีค่ามากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำมันสลัด น้ำมันคาโนลา และน้ำมันมะพร้าวมีค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันลดลงน้อยที่สุดใน 3 วันแรก (E_{72}) คือ 4-8 เปอร์เซ็นต์ ส่วนน้ำมันมะกอก น้ำมันเมล็ดฝ้าย น้ำมันมะรุม น้ำมันรำข้าว น้ำมันงา น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันปาล์ม ลดลง 10-30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังจากนั้นในน้ำมันทุกชนิดค่าความเสถียรจะค่อยๆ ลดลงไปประมาณ 30-40 เปอร์เซ็นต์ภายใน 7 วัน โดยเมื่อถึงวันที่ 7 พบว่า การก่อกิมล์ชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อน้ำมันคาโนลาและน้ำมันมะกอกมีความเสถียรของอิมัลชันมากที่สุดซึ่งคงมีความเสถียรของอิมัลชันที่ 75.84 และ 72.63 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของผกาภาศ ราชมนตรี (2551) ที่รายงานว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้โดย *P. anomala* PY1 สามารถก่อกิมล์ชันได้ดีต่อน้ำมันพืชชนิดต่างๆ เช่น น้ำมันคาโนลา น้ำมันงา น้ำมันสลัด น้ำมันรำข้าว น้ำมันดอกคำฝอย และน้ำมันถั่วเหลืองได้ดี อีกทั้งในงานวิจัยนี้ยังมีค่าความเสถียรของอิมัลชันหลังจากตั้งทิ้งไว้ 7 วันเพิ่มสูงขึ้นกว่างานวิจัยก่อนหน้าถึง 30% นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาสมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของสารลด

แรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากยีสต์ ที่พบว่าสามารถก่อกอิมัลชันในน้ำมันพืช เช่น น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันมะกอกได้ดี (Kim และคณะ, 2002)

ค่า Hydrophilic-lipophilic balance (HLB) เป็นค่าที่แสดงถึงสมบัติความชอบน้ำหรือไม่ชอบน้ำสารลดแรงตึงผิว ซึ่งแตกต่างกันออกไปตามโครงสร้างของโมเลกุล โดยเป็นสมบัติเฉพาะของสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิดในการละลายน้ำ จากการทดลองพบว่าค่า HLB ของสารที่ผลิตได้มีค่าอยู่ในช่วง 10-13 ซึ่งใกล้เคียงกับค่า HLB ที่ได้จากการคำนวณตามสูตรโครงสร้างของน้ำหนักรวมของโมเลกุลส่วนที่ชอบน้ำเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลทั้งหมด ที่มีค่าเท่ากับ 11-14 และอยู่ในช่วงเดียวกับค่า HLB ที่น้ำมันพืชต้องการในการก่อกอิมัลชัน จึงมีประสิทธิภาพในการก่อกอิมัลชันกับน้ำมันพืชต่างๆ ได้ดี อีกทั้งยังสอดคล้องกับ Van Bogaert และคณะ (2007) ที่รายงานว่า ค่า HLB ของโซโฟโรลิพิดอยู่ในช่วง 10-13 เช่นกัน ซึ่งมีประโยชน์สำหรับใช้เป็นสารชักฟอก หรือสารช่วยคงความเสถียรของอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ยังมีสมบัติในการห่อหุ้มสารไม่มีขั้วให้สามารถละลายในสารมีขั้วได้ดีกว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ไฮเดียมโคเดซิลซัลเฟต และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะส่งผลให้ประสิทธิภาพในการห่อหุ้มสูงขึ้น เนื่องจากมีการละลายของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมากขึ้น จึงเกิดการรวมตัวเป็นโครงสร้างไมเซลล์ได้มากยิ่งขึ้นตามไปด้วย

เมื่อวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธีทีนเลเยอร์โครมาโทกราฟี (TLC) ด้วยไอระเหยของไอโอดีน พบว่าสามารถแยกสารออกได้เป็น 3 ลำดับส่วน คือ F1 ถึง F3 โดยมีค่า R_f เท่ากับ 0.88, 0.75 และ 0.66 ตามลำดับ ซึ่งค่าการกระจายน้ำมันตามลำดับดังนี้ $F2 > F3 > F1$ เมื่อตรวจสอบด้วยมอริซรีเอเจนท์เพื่อตรวจสอบสารที่มีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบ พบว่า F2 และ F3 ให้ผลบวก จึงสันนิษฐานได้ว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 ผลิตได้มีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบหรือเป็นสารประเภทไกลโคลิพิด จากนั้นจึงทำบริสุทธิ์ F2 และ F3 ต่อด้วยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) แล้วเก็บตัวอย่างจากลำดับส่วนที่ปรากฏจาก F2 จำนวน 5 ลำดับส่วน และจาก F3 จำนวน 7 ลำดับส่วน เพื่อนำมาหาค่าการกระจายน้ำมัน ซึ่งลำดับส่วนจาก F2 ให้ค่าการกระจายน้ำมันได้ดีกว่าตัวอย่างลำดับส่วนจาก F3 ดังนั้นจึงคัดเลือกเฉพาะลำดับส่วนจาก F2 โดยให้ชื่อว่าตัวอย่าง P1-P5 ตามลำดับ ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี MALDI-TOF MS ต่อไป จากผลการวิเคราะห์หีบออกได้ถึงน้ำหนักโมเลกุล โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 ในถังหมักแบบแบตช์ มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 492, 508, 520, 548, 558 และ 648 เทียบเคียงได้กับสารโซโฟโรลิพิดที่มีโครงสร้างในส่วนหางของกรดไขมันตั้งแต่ C8-C18 ทั้งชนิดอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว ส่วนใหญ่อยู่ในรูปแบบแลคโตน (lactonic form) และอาจมี

การเติมหมู่อะซิติก 1 หรือ 2 ตำแหน่งก็ได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Davila และคณะ (1992) ที่รายงานว่า เมื่อเลี้ยงยีสต์ในถังหมักสามารถผลิตไซโฟโรลิพิด์รูปแบบแลคโตนได้มากกว่าในขวดเขย่า โดยปริมาณการละลายของออกซิเจนน่าจะเป็นปัจจัยสำคัญของการผลิตไซโฟโรลิพิด์ในรูปแบบต่างๆ ซึ่งไซโฟโรลิพิด์รูปแบบแลคโตนนี้จะมีประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวได้ดีและยังมีสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์อีกด้วย (Van Bogeart และคณะ, 2007)

โดยสรุปจากงานวิจัยนี้ พบว่ายีสต์ *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่เหมาะสม โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อปรับปรุงสูตรที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 16:0.7 อัตราการให้อากาศ 2 vvm อัตราเร็วใบกวน 400 rpm ควบคุมความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในถังหมักแบบแบตช์นั้น สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพดีและปริมาณสูงกว่าเมื่อเทียบกับระดับขวดเขย่า อีกทั้งยังมีสมบัติในการก่อและห่อหุ้มอิมัลชันต่อน้ำมันพืชได้หลายชนิด สามารถจะประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ในอนาคต นอกจากนี้ยังมีโครงสร้างหลายรูปแบบทำให้มีสมบัติหลายประการ เช่น ลดค่าแรงตึงผิวได้ดี ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ยับยั้งเชื้อไวรัส เป็นต้น และงานวิจัยนี้ยังเป็นการศึกษาการผลิตในระดับขยายส่วนและคุณสมบัติทางชีวเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพฉบับแรกที่ผลิตได้จากยีสต์ *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีความปลอดภัยและใช้ได้ ในอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับอาหาร ยา และเครื่องสำอาง

ข้อเสนอแนะ

1. งานวิจัยนี้เป็นประโยชน์ในการนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดย *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 ในระดับถังหมักแบบแบตช์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและผลผลิตให้ได้ในปริมาณสูงขึ้น ให้สามารถผลิตได้ในเชิงพาณิชย์และเพียงพอกับความต้องการของตลาดที่กำลังขยายตัวสูงขึ้น

2. แม้ว่าการวิเคราะห์มวลโมเลกุลโดย MALDI-TOF จะสามารถวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ แต่ก็ไม่สามารถบอกได้ถึงตำแหน่งของไฮโดรเมอรัลหรือพันธู่ ด้วยเหตุนี้เพื่อให้ทราบตำแหน่งที่ถูกต้องในโมเลกุลอาจต้องทำสารให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นแล้ววิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีเพิ่มเติม เช่น ด้วย NMR

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- ธนัสดา เชียงอุทัย. 2549. การผลิตและลักษณะสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากยีสต์ที่คัดเลือกได้ วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- ผกามาศ ราชมন্ত্রী. 2551. ผลของการเสริมน้ำตาลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Pichia anomala* PY1 และลักษณะของสารที่ได้ วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- พิมพ์พร ลีลาพิสิทธิ. 2551. เครื่องสำอางสำหรับผิวหน้า. กรุงเทพมหานคร: โอเดียนสโตร์,

ภาษาอังกฤษ

- Abouseoud, M., Machi, R., Amrane, A., Boudergua, S. and Nabi, A. 2008. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. Desalination. 223: 143-151.
- Abu-Ruwaida, A. S., Banat, I. M., Haditirto, S., Salem, S. and Kadri, M. 1991. Isolation of biosurfactant producing bacteria-product characterization and evaluation. Acta Biotech-nol. 11: 315-324.
- Al-Tahhan, R. A., Sandrin, T. R., Bodor, A. A. and Maier, R. M. 2000. Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: Effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. Appl. Environ. Microbiol. 66: 3262-3268.
- Ashby, R. D., Solaiman, D. K. Y. and Foglia, T. A. 2008. Property control of sophorolipids: Influence of fatty acid substrate and blending. Biotechnol. Lett. 30: 1093-1100.
- Asmer, H. J., Siegmund, L., Fritz, W. and Wrey, V. 1988. Microbial production, Structure elucidation and bioconversion of sophorose lipid. J. Am. Oil Chem. Soc. 65: 1460-1466.
- APHA, AWWA, and WEF, 1992. Standard methods for the examination of water and wastewater. American public health and association. Washington, DC.

- APHA, AWWA, and WEF, No.4500-NO₃⁻, 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. American public health and association. Washington, DC.
- Baltz, R. H., Miao. V. and Wrigley S. K. 2005. Natural products to drugs: Daptomycin and related lipopeptide antibiotics. Nat. Prod. Rep. 22: 717-741.
- Banat, I. M., Makkar R. S. and Cameotra, S. S. 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. Appl. Microbiol. Biotechnol. 53: 495-508.
- Banat, I. M., Franzetti, A., Grandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M. G., Fracchia, L., Smyth, T. J. and Marchant, R. 2010. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. Appl Microbiol Biotechnol. 87: 427-444.
- Bernardski, W., Adamczak, M. and Tomazik, J. 2004. Application of oil refinery waste in the biosynthesis of glycolipids by yeast. Bioresour. Technol. 95: 15-18.
- Bernfeld, P. Colowick, S. P. and Kaplan, N. D. 1955. Methods Enzymol. In Amylases, a and b; 1st ed. pp.149–158.
- Cao, X. H. Wang, A. H. Wang, C. L. Mao, D. Z., Lu., M. F., Cui, Y. Q. and Jiao, R. Z. 2010. Surfactin induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through a ROS/JNK-mediated mitochondrial/caspase pathway. Chem. Biol. Interact. 183: 357-362.
- Casas, J. A., de Lara, G. and Garcia-Ochoa, F. 1997. Optimization of synthetic medium for *Candida bombicola* growth using factorial design of experiments. Enz. Microb. Technol. 21: 221-229.
- Casas, J. A., and Garcia-Ochoa, F. 1999. Sophorolipid production by *Candida bombicola*: Medium composition and culture methods. J. Biosci. Bioeng. 88: 488-494.
- Cavalero, D. A. and Cooper D. G. 2003. The effect of medium composition on the structure and physical state of sophorolipids produced by *Candida bombicola* ATCC 22214. J. Biotechnol. 103: 31-41.
- Chen, H. L., Chen, Y. S. and Juang, R. S. 2008. Recovery of surfactant from fermentation broths by a hybrid salting out and membrane filtration process. Separ. Purif. Tech. 59: 244-252.
- Christofi, N. and Ivshina, I. B. 2002. A review: Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation, J. Appl. Microbiol. 93: 915-129.

- Cooper, D. G. and Zajic, J. E. 1980. Surface-active compounds from microorganism. Adv. Appl. Microbiol. 26: 229-253.
- Daniel, H. J., Reuss, M. and Styldatk, C. 1998. Production of sophorolipids in high concentration from deproteinized whey and rapeseed oil in a two stage fed batch process using *Candida bombicola* ATCC 22214 and *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509. Biotechnol. Lett. 20(12): 1553-1556.
- Daverey, A. and Pakshirajan, K. 2009. Production, characterization, and properties of sophorolipids from the yeast *Candida bombicola* using a low-cost fermentative medium. Appl. Biochem. Biotechnol. 158: 663-674.
- Davila, A. M., Marchal, R. and Vandecasteele, J. P. 1992. Kinetics and balance of a fermentation free from product inhibition-sophorose lipid production by *Candida bombicola*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 38: 6-11.
- Davila, A. M., Marchal, R. and Vandecasteele, J. P. 1997. Sophorose lipid fermentation with differentiated substrate supply for grown and production rate. Appl Microbiol. Biotechnol. 47: 496-501.
- Desai, J. D. and Banat, I. M. 1997. Microbial production of surfactant and their commercial potential. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61: 47-64.
- Felse, P. A., Shah, V., Chan, J., Rao, K. J. and Gross, R .A. 2007. Sophorolipid biosynthesis by *Candida bombicola* from industrial fatty acid residues. Environ. Microb. Technol. 40: 316-323.
- Fukuoka, T., Morita, T., Konishi, M., Imura, T. and Kitamo, D. 2008. A basidiomycetous yeast, *Pseudozyma tsukubaensis*, efficiently produces a novel glycolipid biosurfactant. the identification of a new diastereomer of mannosylethritol lipid-B. Carbohydrate Res. 343: 555-560.
- Furata, T. Igarashi, K. and Hiyata, T. 2002. Low-foaming detergent compositions. World patent 03/002700. Saraya Co., Ltd., Osaka.
- Gautam, K. K. and Tyagi, V. K. 2006. Microbial surfactants: A review. J. Oleo sci. 55(4): 155-166.

- Gerson, D. F. 1993. The biophysics of microbial surfactants: Growth on concentration, but also on surface property of cells and insoluble substrates. P.257-268. In Kosaric, N., Biosurfactants: Production, properties, application. Marcel Dekker, New York.
- Gillman, L. B. 1993. A review of instruments for static and dynamic surface and interfacial tension measurement. Present at the seminar by Kruss Gmtt and scientefic promotion Co., Ltd., at Indra Regent Hotel, BKK. Thailand, October 30, 1997.
- Guerra-Santos, L. H., Kappeli, O. and Fiecher, A. 1984. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. Appl Microbiol. Biotechnol. 48: 301-305.
- Heyd, M., Kohnert, A., Tan, T.H., Nusser, M., Kirschnöfer, F., Brenner-Weiss, G, Franzreb, M. and Barensmeyer, S. 2008. Development and trends of biosurfactant analysis and purification using rhamnolipids as an example. Anal. Bioanal. Chem. 391: 1579-1590.
- Hommel, R. K., Stegner, S., Weber, L. and Kieber, H. P. 1994. Effect of ammonium ions on glycolipid production by *Candida (Torulopsis) apicola*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 42: 192-197.
- Hu, Y. and Ju, L. K. 2001a. Sophorolipid production from different lipid precursors observed with LC-MS. Enz. Microb. Technol. 29: 531-601.
- Hu, Y. and Ju., L. K., 2001b. Purification of lactonic sophorolipids by crystallization. J. Biotechnol. 87(3): 263-272.
- Ito, S. and Inoue, S. 1982. Sophorolipids from *Torulopsis bombicola*: possible relation to alkane uptake. Appl. Environ. Microbiol. 43: 1278-1283.
- Karant, N. G. K., Deo, P. G. and Veenenedig, N. K. 1999. Microbial production of biosurfactants and their importance. Curr. Sci. 77(1): 116-126.
- Kawano, J., Suzuki, T., Inoue, S. And Hayashi, S. 1981. Powered compressed cosmetic material. US Patent 4 305 931. Kao Soap Co., Ltd., Tokyo,
- Kearns, D. B., Losick, R. 2003. Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. 49: 581-590.

- Kim, S. Y., Oh, D. K., Lee, K. H. and Kim, J. H. 1997. Effect of soybean oil and glucose on sophorose lipid fermentation by *Torulopsis bombicola* in continuous culture. Appl. Microbiol. Biotechnol. 48: 23-26.
- Kim, H. S., Jeon, J. W., Kim, S. B., Oh, H. M. Kwon, T. J. and Yoon, B.,D. 2002. Surface and physico-chemical properties of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, from *Candida antartica*. Biotechnol. Lett. 24: 1637-1641.
- Kitamoto, D., Isoda, H. and Nakahara, T. 2002. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants-from Energy-Saving materials to Gene Delivery Carriers. J. Biosci. Bioeng. 94(3):187-201.
- Kitamoto, D., Morita, T., Fukuoka, T. Konishi, M. and Imura, T. 2009. Self-assembling properties of glycolipid biosurfactants and their potential applications. Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 14: 315-328.
- Klekner, V., Kosaric, N. and Zhou, Q. H. 1991 Sophorose lipids produced from sucrose. Biotechnol Lett. 13: 345-348.
- Koch, F. C. and Hanke, M. E. 1953. Practical methods in biochemistry 6th Ed, p.537. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, Md.
- Konishi, M., Imura, T., Fukuoka, T., Morita, T. and Kitamoto, D. 2007. A yeast glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipids, shows high binding affinity towards lectins on a self-assembled monolayer system. Biotechnol. Lett. 29: 473-480.
- Kosaric, N. 1993. Biosurfactants Production Applications. Surfactant Science Series: vol 48. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Kosaric, N. 2001. Biosurfactants and their application for soil bioremediation. Food Technol. Biotechnol. 39(4): 295-304.
- Kretschner, A., Block, H. and Wagner, F. 1982. Chemical and physical characterization of interfacial-active lipids from *Rhodococcus erythropolis* grown on *n*-alkane. Appl. Environ. Microbiol. 44: 864-870.
- Lang, S. 2002. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). Curr. Opin. Colloid. Interface Sci. 7: 12-20.
- Lawrence, M. J. and Gareth, D. Rees. 2000. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. Adv. Drug Delivery Rev. 45(1): 89-121.

- Li, Z. Y., Lang, S., Wagner, F., Witte, L. and Wray, V. 1984. Formation and identification of interfacial-active glycolipids from resting microbial cells of *Arthrobacter* sp. and potential use in tertiary oil recovery. Appl. Environ. Microbiol. 48(3): 610-617.
- Lin, S. C. Carswell, K. S. Shar, M. M. and Georgio, U. 1994. Continuous production of the lipopeptide biosurfactant of *Bacillus licheniformis* JF-2. Appl. Microbiol. Biotechnol. 41: 281-285.
- Lin, S. C. Biosurfactants: recent advances. 1996. J. Chem. Technol. Biotechnol. 66: 109-120.
- Lindsay, S. 1991. High Performance Liquid Chromatography : Analytical chemistry by open learning. Singapore : John Wiley and Sons.
- Lourith, N. and Kanlayavattanukul, M. 2009. Natural surfactants used in cosmetics: glycolipids. Int. J. Cosmet. Sci. 31: 225-261.
- Lu, J. R., Zhao, X. B. and Yaseen, M. 2007. Biomimetic amphiphiles: biosurfactants. Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 12(2): 60-67.
- Makkar, R. S. and Cameotra, S. S. 1998. Production of biosurfactants at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 20: 48-52.
- Makkar, R. S. and Cameotra, S. S. 1999. Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources. J. Surfactants Detergents. 2(2): 237-241.
- Matsuyama, T., Kaneda, K., Ishizuma, I., Toida, T. and Yano I. 1990. Surface-active novel glycolipid and linked 3-hydroxy fatty acids produced by *Serratia rubidaea*. J. Bacteriol. 172: 3015-3022.
- McInerney, M. J., Javaheri, M. and Nagle, D. P. 1990. Properties of the biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* strain JF-2. J. Ind. Microbiol. 5: 95-102.
- Meylheuc, T., Renault, M. and Bellon-Fontaine, M. N. 2006. Adsorption of a biosurfactant on surfaces to enhance the disinfection of surfaces contaminated with *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food microbial. 109: 71-78.
- Morikawa, M., Daido, H., Takao, T., Murata, S., Shimonishi, Y. and Imanaka, T. 1993. A new lipopeptide biosurfactant produce by *Arthrobacter* sp. Strain MIS 38. J. Bacteriol. 175: 6459-6466.

- Mulligan, C. N. 2005. Environmental applications for biosurfactants. Environ. Pollut. 133: 183-198.
- Muthusamy, K., Gopalakrishnan, S., Ravi, T. K. and Sivachidambaram, P. 2008. Biosurfactants: Properties, commercial production and application. Curr. Sci. 94(6): 736-747.
- Nitschke, M. and Pastore, G. M. 2006. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. Biores Technol. 97: 336-341.
- Nitschke, M. and Costa, S. G. V. A. O. 2007. Biosurfactants in food industry. Trends food Sci. Technol. 18: 252-259.
- Noordman, W. H. and Janssen, B. B. 2002. Rhamnolipid stimulates uptake of hydrophobic compounds by *Pseudomonas aeruginosa*. Appl Environ Microbiol. 68: 4502-4508.
- Nunez, A., Ashby, R., Foglia, T. A., and Solaiman, D. K. Y. 2004. LC/MS analysis and lipase modification of the sophorolipids produced by *Rhodotorula bogoriensis*. Biotechnol. Lett. 26: 1087-1093.
- Otto, R. T., Daniel, H. J. Pekin, G., Muller-Decker, K. Furstenberge, G., Reuss, M. and Syldatk, C. 1999. Production of sophorolipids from whey. Appl. Microbiol. Biotechnol. 52: 495-501.
- Patel, R. M. and Desai, A. J. 1997. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. Lett. Appl. Microbiol. 25:91-94.
- Pattanathu, K. S., Rahman, M. and Gakpe, E. 2008. Production characterization and applications of biosurfactants-Review. Biotechnol. 7(2): 360-370.
- Pellecier, F. and André, P. 2004. Cosmetic use of sophorolipids as subcutaneous adipose cushion regulation agents and slimming application. World patent 2004/108063.
- Pellerin, N., Staley J. T., Ren, T., Graff, G. L., Treadwell, D. R. and Aksay, I. A. 1991. Acidic biopolymers as dispersants for ceramic processing. Mater. Res. Soc. Symp. Proc. 218: 123-128.

- Peng, F., Liu, Z., Wang, L. and Shao, Z. 2007. An oil-degrading bacterium: *Rhodococcus erythropolis* strain BC-9 and its biosurfactants. J. Appl. Microbiol. 102: 1603-1611.
- Pierce, D. and Heliman, T. J. 1998. Germicidal composition. World patent 02/062495.
- Pornsunthorntawee, O., Chavadej, S. and Rujiravanit, R. 2009a. Solution properties and vesicle formation of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4. Colloids Surf. B: Biointerfaces.
- Pornsunthorntawee, O., Maksung, S., Huayyai, O., Rujiravanit, R., Chavadej, S. 2009b. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 using sequencing batch reactors: effect of oil loading rate and cycle time. Biores. Technol. 100: 812-818.
- Rau, U., Nguyen, L. A., Roeper, H., Koch, H. and Lang, S. 2005. Fed-batch bioreactor production of mannosylerythritol lipids secreted by *Pseudozyma aphidis*. App. Microbiol. Biotechnol. 68:607-613.
- Raza, Z. A., Rehman, A., Khan, M. S. and Khalid, Z. M. 2007. Improved production of biosurfactant by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant using vegetable oil refinery wastes. Biodegradation. 18(1): 115-121.
- Ron, E. Z. and Rosenberg, E. 2001. Natural Role of biosurfactants. Environ. Microbiol. 3: 299-236.
- Rosenberg, E. and Ron, E. Z. 1999. High and Low molecular-mass microbial surfactants. Appl. Microbiol. Biotechnol. 52(2): 154-162.
- Salihu, A., Abdulkadir, I. and Almstapha, M. N. 2009. An Investigation for potential development on biosurfactants. Biotechnol. Mol. Biol. Rev. 3(5): 111-117.
- Sarubbo, L. A., Farias, C. B. B. and Takaki, G. M. 2007. Co-utilization of canola oil and glucose on the production of a surfactant by *Candida lipolytica*. Curr. Microbiol. 54: 68-73.
- Sekelsky, A. M. and Shreve, G. S. 1999. Kinetic model of biosurfactant-enhanced hexadecane biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa*. Biotechnol. Bioeng. 63: 401-409.

- Shah, V., Doncel, G. F., Seyoum, T., Eaton, K. M., Zalenskaya, I., Hagver, R., Azim, A. and Gross, R. 2005. Sophorolipids, microbial glycolipid with anti-human immunodeficiency virus and sperm immobilizing activities. Antimicrob. Agents Chemother. 49: 4083-4100.
- Shah, V., Jurjevic, M. and Badia, D. 2007. Utilization of restaurant Waste oil as a precursor for sophorolipid production. Biotechnol. Prog. 23: 512-515.
- Sheppard, J. D. and Cooper, D. G. 1990. The effect of a biosurfactant on oxygen transfer in a cyclone column reactor. J. Chem. Tech. Biotechnol. 48: 325-336.
- Shepherd, R., Rockey, J., Sutherland, I. W. and Roller, S., 1995. Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods. J. Biotechnol. 40: 207-217.
- Shete, A. M., Wadhawa, G., Banat, I. M. and Chopade, B. A. 2006. Mapping of patents on bioemulsifier and biosurfactant: a review. J. Sci. Ind. Res. 65: 91-115.
- Singh, P. and Cameotra S. S. 2004. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. TRENDS Biotechnol. 22(3): 142-146.
- Skoog, D. A., West, D. M. and Holler F. J. 1988. Analytical Chemistry, 5th ed. The United States of America : Saunders College.
- Solaiman, D. K. Y., Ashby, R. D., Zerkowski, J. A. and Foglia, T. A. 2007. Simplified soy molasses-based medium for reduced-cost production of sophorolipids by *Candida bombicola*. Biotechnol. Lett. 29: 1341-1347.
- Stüwer, O., Hommel, R., Haferbug, D. and Kleber, H. P. 1987. Production of crystalline surface-active glycolipids by a strain of *Torulopsis apicola*. J. Biotechnol. 27: 259-269.
- Thaniyavarn, J., Chianguthai, T., Sangvanish, P., Roongsawang, N., Washio, K., Morikawa, M. and Thaniyavarn, S. 2008. Production of sophorolipid biosurfactant by *Pichia anomala*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 72(8): 2061-2068.
- Van Bogaert, I. N. A., Saerens, K., Muynck, C. D., Develter, D., Soetacrt, W. and Vandamme, E. J. 2007. Microbial production and application of Sophorolipids. Appl. Microbiol. Biotechnol. 76: 23-34.

- Van Dyke, M. I., Couture, P., Brauer, M., Lee, H. and Trevors, J. T. 1993. *Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactant: structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil. Can. J. Microbiol. 39(11): 1071-1078.
- Van Hamme, J. D., Singh, A. and Ward, O. P. 2006. Physiological aspects: Part1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. Biotechnol. Adv. 24: 604-620.
- Volkering, F., Breure, A. M. and Rulkens, W. H. 1998. Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. Biodegradation. 8: 401-417.
- Walker, G. M. 2010. *Pichia anomala*: cell physiology and biotechnology relative to other yeasts. Antonie Van Leeuwenhoek.
- Wang, S. L. and Mulligan, C. N. 2009. Arsenic mobilization from mono tailings in the presence of a biosurfactant. Appl. Geochem. 24: 928-935.
- Wei, Y. H., 2003. Identification of induced acidification in iron enriched cultures of *Bacillus subtilis* during biosurfactant fermentation. J. Biosci. Bioeng. 96: 174-178.
- Yakimov M. M., Timmis, N. K., Wray, V. and Fredrickson, H. L. 1995. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS550. Appl. Environ. Microbiol. 61(5):1706-1713.
- Yeh, M. S., Wei, Y. H. and Chang, J. S. 2006. Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*. Process Biochem. 41: 1779-1805.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเหลวจากสารสกัดยีสต์และมอลต์ (YM broth)

สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)	3.0	กรัม
สารสกัดมอลต์ (Malt extract)	3.0	กรัม
เพปโตน (Peptone)	5.0	กรัม
กลูโคส	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ผสมสารให้เข้ากัน ปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 4.5 หนึ่งชั่วโมงด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารแข็งจากสารสกัดยีสต์และมอลต์ (YM agar)

สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)	3.0	กรัม
สารสกัดมอลต์ (Malt extract)	3.0	กรัม
เพปโตน (Peptone)	5.0	กรัม
กลูโคส	10.0	กรัม
วุ้นผง (Agar)	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ผสมสารให้เข้ากัน ปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 4.5 หนึ่งชั่วโมงด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารเหลวกำหนดสูตร (ผกามาศ ราชมณตรี, 2551)

โซเดียมไนเตรท (NaNO_3)	0.4	% (N-content)
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.02	%
แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.02	%
สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)	0.3	%
น้ำมันถั่วเหลือง	10.67	% (w/v)
กลูโคส	5.33	% (C-content)
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5 หนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารเหลวปรับปรุงสูตร

โซเดียมไนเตรท (NaNO_3)	0.35	% (N-content)
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.02	%
แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.02	%
สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)	0.35	%
น้ำมันถั่วเหลือง	10.67	% (w/v)
กลูโคส	5.33	% (C-content)
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5 หนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที โดยแยกหนึ่งฆ่าเชื้อกลูโคส ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. มอริช รีเอเจนท์ (Molisch's reagent)

แอลฟา-แนฟทอล (α -naphthol)	0.5	กรัม
เอทานอล (Ethanol)	10.0	มล.

ละลายแอลฟา-แนฟทอลในเอทานอลแล้วเติมในตัวอย่างที่จะทำการทดสอบปริมาตร 0.2 มล. จากนั้นเติมกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) 0.5 มล. ตั้งทิ้งไว้โดยห้ามเขย่า

2. สารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8 (50 mM Tris-HCl buffer pH 8)

ทริส เบส (Tris base)	0.61	กรัม
น้ำกลั่น	80	มล.

ปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น ถ้าหาต้องการทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรดต่างอื่นๆ ก็ใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นปรับให้มีค่าความเป็นกรดต่างนั้นๆ

3. สารละลายบรูซีน-กรดซัลฟานิลิก (Brucine-Sulfanilic acid solution)

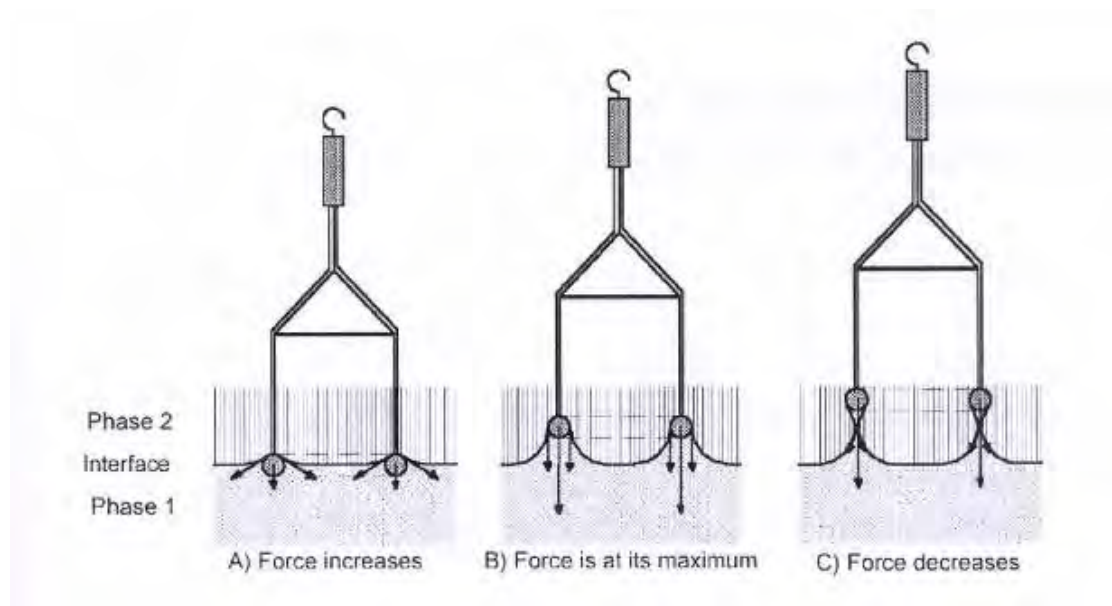
บรูซีนซัลเฟต (Brucine Sulfate)	1	กรัม
กรดซัลฟานิลิก	0.1	กรัม

ละลายสารด้วยน้ำร้อน 70 มล. จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 3 มล. ทำให้เย็น แล้วจึงปรับปริมาตรด้วยน้ำให้เป็น 100 มล. ในขวดวัดปริมาตร

ภาคผนวก ค

หลักการการวัดค่าแรงตึงผิวด้วยวิธี Du Nouy Ring

การวัดค่าแรงตึงผิวด้วยวิธี ring method หรือ Du Nouy Ring method ค้นคิดโดย Lecomte Du Nouy ในปี 1919 ซึ่งวิธีนี้จะพิจารณาวงแหวนทองคำขาว (platinum ring) ในแนวระนาบโดยวงแหวนทองคำขาวจะจมในของเหลว และถูกยกขึ้น แรงสูงสุดที่ใช้ในการดึงวงแหวนทองคำขาวของเหลว คือ ค่าแรงตึงผิว (surface tension) คุณสมบัติของวงแหวนทองคำขาวก็คือ ความยาวที่ถูกทำให้เปียก (wetted length) ซึ่งรวมทั้งรัศมีด้านในและด้านนอกของวงแหวนทองคำขาวที่ทำให้เปียกโดยของเหลว



ภาพแสดงขั้นตอนการวัดค่าแรงตึงผิวด้วยวิธี Du Nouy Ring

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวัดค่าแรงตึงผิว

ลักษณะและองค์ประกอบของเครื่องวัดค่าแรงตึงผิว (Tensiometer) รุ่น K6 ของบริษัท KRUSS ประเทศเยอรมัน เครื่องวัดค่าแรงตึงผิวนี้ทำการวัดที่อุณหภูมิ 25 ± 2 °C ตลอดทำการทดลอง

ขั้นตอนการวัดค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่องวัดค่าแรงตึงผิว มีดังนี้

1. ปรับ handwheel with point (2) ให้สเกลมีค่าศูนย์
2. ปรับ zero adjustment (8) โดยหมุนทวนเข็มนาฬิกาให้ balance beam (9) อยู่ในตำแหน่งสมดุลกึ่งกลางของ mask (7)
3. ปรับระดับที่วางสารตัวอย่างโดยหมุน (10) แล้วยกขึ้นให้อยู่ในระดับที่ต้องการ
4. แขนวน ring ลงใน balance beam(9) ปรับให้อยู่ในตำแหน่งสมดุลโดยหมุน zero adjustment (8) ตามเข็มนาฬิกา
5. ใส่สารตัวอย่างในที่ใส่สารตัวอย่างประมาณ 10-15 มล. วางลงบน sample table (6) แล้วหมุน micrometer screw (5) ตามเข็มนาฬิกาเพื่อยกที่ใส่สารตัวอย่างขึ้นให้สัมผัสกับ ring โดยให้ ring จมอยู่ในตัวอย่างไม่น้อยกว่า 5 มม.
6. เมื่อ ring สัมผัสกับตัวอย่างแล้วอาจต้องปรับ balance (9) อยู่ในตำแหน่งสมดุลอีกครั้ง โดยหมุน zero adjustment (8) ทวนเข็มนาฬิกา
7. เริ่มวัดค่าแรงตึงผิวโดยหมุน micrometer screw (5) ทวนเข็มนาฬิกาอย่างช้าๆ ในขณะที่เดียวกันก็หมุน pointer (2) ตามเข็มนาฬิกาอย่างช้าๆ โดยรักษาให้ balance beam (9) อยู่ในตำแหน่งสมดุล
8. เมื่อ ring หลุดออกจากตัวอย่างอ่านค่าแรงตึงผิวตามสเกล (1) มีหน่วยเป็น mN/m
9. เมื่อเสร็จการทดลองล้าง ring ด้วยน้ำกลั่น สะบัดให้แห้ง (หรือผ่านเปลวไฟ) เก็บเข้ากล่องไม้ ส่วน vessel ล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น(หรือ acetone) ซับให้แห้งหรือผ่านเปลวไฟ
10. การเก็บเครื่องจะต้องปรับ zero adjustment (8) ให้ balance beam (9) ยกขึ้น เพื่อป้องกันการแกว่งของ balance beam ปรับที่วางสารตัวอย่างให้อยู่ในระดับเดิม แล้วหมุนเข้าหาตัวเครื่อง

ข้อควรระวัง

1. ห้ามกดปุ่มที่อยู่ด้านหลังของ zero adjustment (8) เด็ดขาด เพราะจะทำให้ wire หลุดได้
2. ห้ามหมุน zero adjustment (8) เกิน 1 รอบเด็ดขาด
3. การใช้ ring ต้องใช้ด้วยความระมัดระวังอย่าให้บิดเบี้ยว เพราะถ้า ring เสียรูปจะทำให้การวัดค่าผิดไปได้
4. การใช้ vessel ต้องใช้ด้วยความระมัดระวังเช่นกัน

ข้อแนะนำ

1. ขณะวัดค่าแรงตึงผิวตามข้อ 7 ถ้าทำการหมุน micrometer screw(5) และ pointer (2) อย่างช้าๆ จะทำให้เกิดความผิดพลาดน้อย
2. ring, vessel มีคุณสมบัติทนไฟ สามารถผ่านเปลวไฟได้ ในกรณีที่จำเป็น
3. ขณะแขวน ring ลงบน balance beam (9) อาจต้องใช้มือช่วยเล็กน้อย



แสดงองค์ประกอบของเครื่องวัดค่าแรงตึงผิวรุ่น K6 บริษัท KRUSS ประเทศเยอรมัน

- | | |
|---------------------------------------|---------------------------------------|
| 1. Scale in mN/m | 7. Mark |
| 2. Handwheel with pointer | 8. Handwheel for zero-adjustment |
| 3. Screws for regulation of the level | 9. Balance-beam |
| 4. Box level | 10. Handwheel for fixing the crossbar |
| 5. Micrometer screw | 11. Carrier of sample-table |
| 6. Sample table | 12. Handwheel for fixing the crossbar |

ภาคผนวก ง



ถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ ขนาด 5 ลิตร รุ่น MBF-500ME บริษัท Eyela, ประเทศญี่ปุ่น



องค์ประกอบภายในถังหมัก ขนาด 5 ลิตร รุ่น MBF-500ME บริษัท Eyela, ประเทศญี่ปุ่น

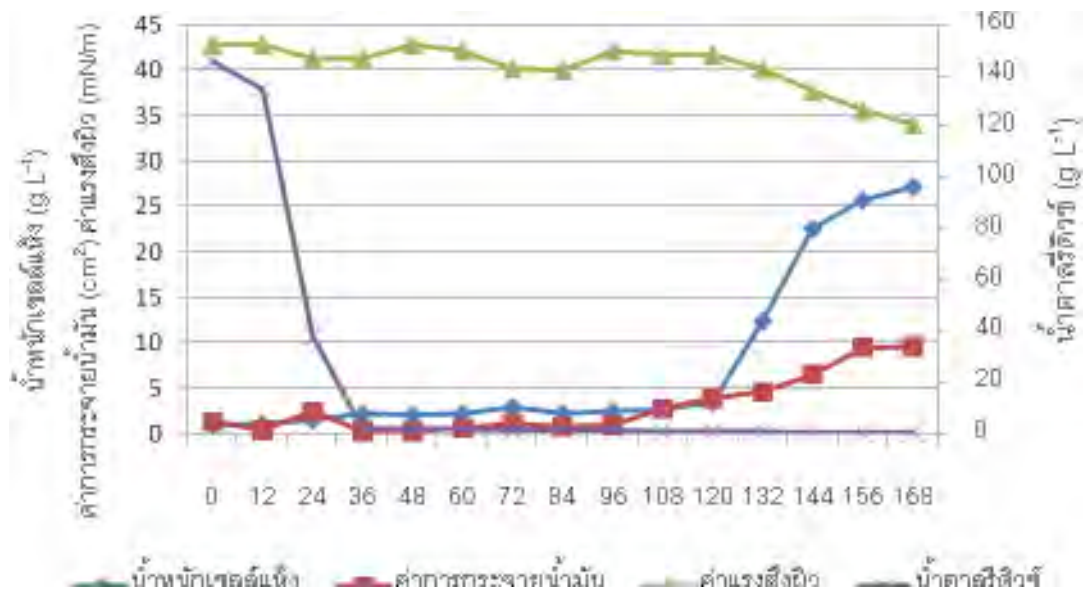
รายละเอียดถังหมัก ขนาด 5 ลิตร รุ่น MBF-500ME บริษัท Eyela, ประเทศญี่ปุ่น

ตัวถังหมัก (Vessel)	: ทำจากแก้วหนา 2 ชั้น
การหมุนแกนใบพัด (Drive shaft)	: พลังงานแม่เหล็ก (Magnetically coupled drive)
ช่วงการควบคุมอุณหภูมิ	: ควบคุมอุณหภูมิด้วยน้ำหล่อเย็น ในช่วง 5 ถึง 60 องศาเซลเซียส
ช่วงความเร็วใบพัด	: 80 – 800 รอบต่อนาที
การตั้งค่าอุณหภูมิ	: volume setting
ฮีตเตอร์	: 300 วัตต์
มอเตอร์ใบพัด	: 40 วัตต์
ชนิดใบพัด (Impeller)	: Turbine
ขนาดถังหมัก (มม.)	: 300W x 470D x 865H
น้ำหนักรวม	: 35 กิโลกรัม

ภาคผนวก จ

ตารางที่ 1 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *P. anomala* PY1 ในถังหมักแบบแบตช์ ที่อัตราการให้อากาศ 1 vvm อัตราเร็วใบกวน 200 rpm pH 5 เป็นเวลา 7 วัน

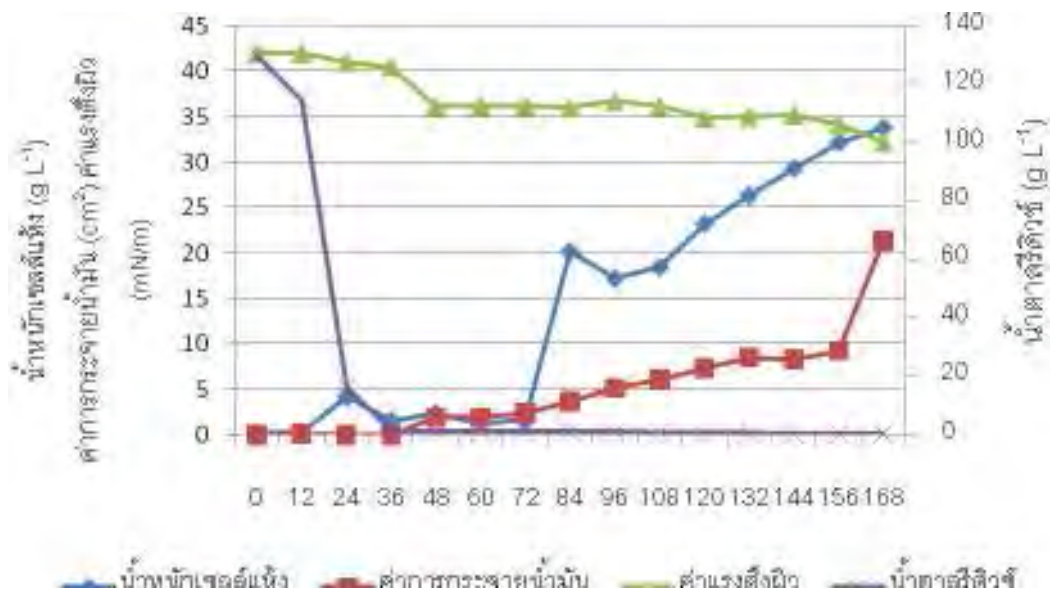
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g L ⁻¹)	ค่าการกระจายตัวของน้ำมัน (cm ²)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	Δ ค่าแรงตึงผิว _{b-t} (mN/m)	น้ำตาลรีดิวซ์ (g L ⁻¹)
0	0.94	1.33	42.83	0.00	145.98
12	1.08	0.38	42.83	0.00	134.80
24	1.54	2.45	41.33	1.50	38.06
36	2.15	0.25	41.33	1.50	0.49
48	2.07	0.25	42.83	0.00	0.49
60	2.20	0.64	42.17	0.66	1.23
72	2.95	1.13	40.17	2.66	2.18
84	2.21	0.79	40.00	2.83	1.51
96	2.44	1.01	42.17	0.66	1.94
108	2.67	2.74	41.67	1.16	5.27
120	3.47	3.92	41.67	1.16	7.55
132	12.35	4.58	40.12	2.71	8.83
144	22.55	6.54	37.65	5.18	12.61
156	25.65	9.53	35.61	7.22	18.37
168	27.12	9.61	34.00	8.83	18.52



รูปที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของ *P. anomala* PY1 และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในถังหมักแบบแบตช์ ที่อัตราการให้อากาศ 1 vvm อัตราเร็วใบกวน 200 rpm

ตารางที่ 2 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *P. anomala* PY1 ในถังหมักแบบแบตช์ ที่อัตราการให้อากาศ 1 vvm อัตราเร็วใบกวน 300 rpm pH 5 เป็นเวลา 7 วัน

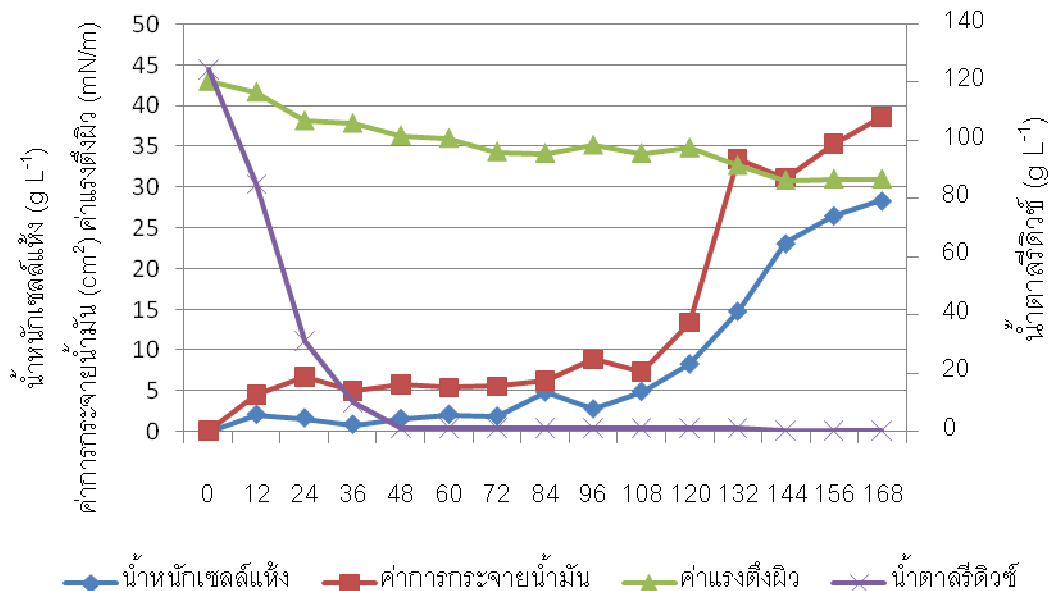
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g L ⁻¹)	ค่าการกระจาย ตัวของน้ำมัน (cm ²)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	Δ ค่าแรงตึงผิว _{b-t} (mN/m)	น้ำตาลรีดิวซ์ (g L ⁻¹)
0	0.24	0.01	42.00	0.00	129.70
12	0.28	0.22	42.00	0.00	114.47
24	4.15	0.07	41.00	1.00	16.33
36	1.53	0.06	40.50	1.50	1.21
48	2.36	1.93	36.17	5.83	1.13
60	1.23	1.93	36.17	5.83	1.24
72	1.61	2.45	36.17	5.83	1.20
84	20.13	3.69	36.00	6.00	1.14
96	17.17	5.17	36.67	5.33	1.07
108	18.44	6.15	36.17	5.83	0.99
120	23.21	7.38	34.83	7.17	0.59
132	26.30	8.55	35.00	7.00	0.67
144	29.26	8.38	35.17	6.83	0.42
156	32.11	9.25	34.17	7.83	0.41
168	33.78	21.35	32.17	9.83	0.36



รูปที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของ *P. anomala* PY1 และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในถังหมักแบบแบตช์ ที่อัตราการให้อากาศ 1 vvm อัตราเร็วใบกวน 300 rpm

ตารางที่ 3 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *P. anomala* PY1 ในถังหมักแบบแบตช์
ที่อัตราการให้อากาศ 1 vvm อัตราเร็วใบกวน 400 rpm pH 5 เป็นเวลา 7 วัน

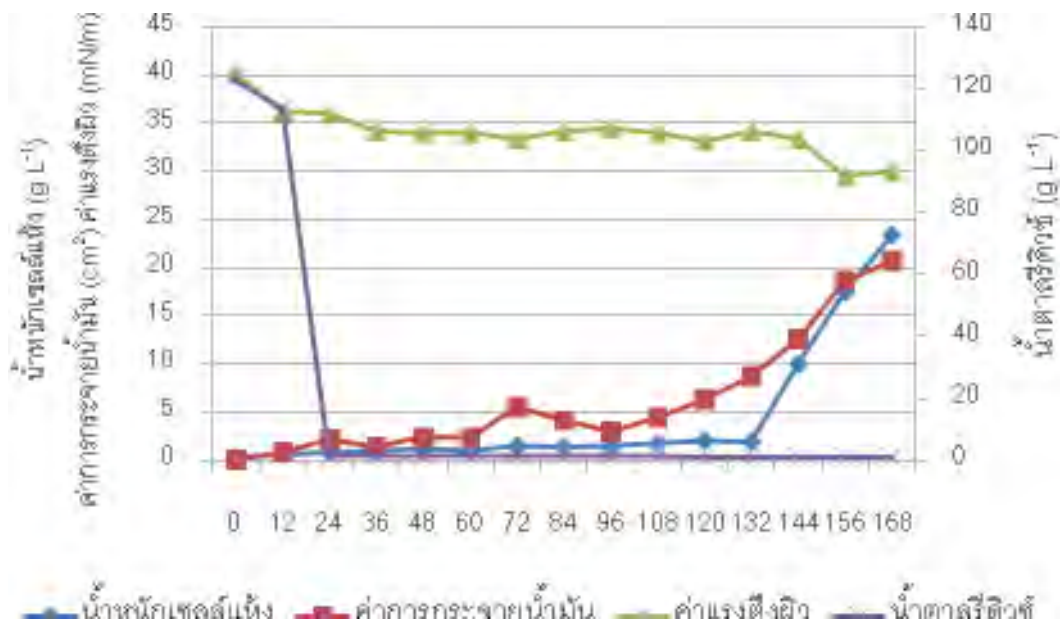
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g L ⁻¹)	ค่าการกระจาย ตัวของน้ำมัน (cm ²)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	Δ ค่าแรงตึงผิว _{b-t} (mN/m)	น้ำตาลรีดิวซ์ (g L ⁻¹)
0	0.07	0.15	43.00	0.00	124.40
12	2.13	4.52	41.67	1.33	85.08
24	1.68	6.75	38.17	4.83	31.32
36	0.90	5.04	37.83	5.17	10.31
48	1.60	5.86	36.33	6.67	1.53
60	2.13	5.44	36.00	7.00	1.53
72	1.89	5.58	34.33	8.67	1.56
84	4.86	6.30	34.17	8.83	1.54
96	2.80	8.90	35.17	7.83	1.48
108	4.95	7.38	34.17	8.83	1.52
120	8.33	13.41	34.83	8.17	1.46
132	14.79	33.45	32.67	10.33	1.52
144	23.12	31.16	30.83	12.17	0.73
156	26.54	35.34	31.00	12.00	0.60
168	28.35	38.62	31.00	12.00	0.52



รูปที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของ *P. anomala* PY1 และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในถังหมักแบบแบตช์ ที่อัตราการให้อากาศ 1 vvm อัตราเร็วใบกวน 400 rpm

ตารางที่ 4 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *P. anomala* PY1 ในถังหมักแบบแบตช์
ที่อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm อัตราเร็วใบกวน 200 rpm pH 5 เป็นเวลา 7 วัน

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g L ⁻¹)	ค่าการกระจาย ตัวของน้ำมัน (cm ²)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	Δ ค่าแรงตึงผิว _{b-t} (mN/m)	น้ำตาลรีดิวซ์ (g L ⁻¹)
0	0.30	0.09	40.17	0.00	122.86
12	0.63	0.89	36.17	4.00	113.51
24	0.84	2.27	36.00	4.17	1.27
36	0.91	1.47	34.17	6.00	1.36
48	1.18	2.45	34.00	6.17	1.35
60	1.03	2.36	34.00	6.17	1.21
72	1.56	5.58	33.33	6.83	1.43
84	1.38	4.15	34.17	6.00	1.34
96	1.46	3.04	34.50	5.67	1.24
108	1.78	4.52	34.00	6.17	1.29
120	2.03	6.30	33.17	7.00	1.03
132	1.95	8.72	34.17	6.00	0.93
144	9.99	12.56	33.33	6.83	1.02
156	17.42	18.59	29.50	10.67	1.07
168	23.35	20.69	30.00	10.17	1.03



รูปที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของ *P. anomala* PY1 และการผลิตสารลดแรงตึงผิว
ชีวภาพในถังหมักแบบแบตช์ ที่อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm อัตราเร็วใบกวน 200 rpm

ตารางที่ 5 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *P. anomala* PY1 ในถังหมักแบบแบตช์ ที่อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm อัตราเร็วใบกวน 300 rpm pH 5 เป็นเวลา 7 วัน

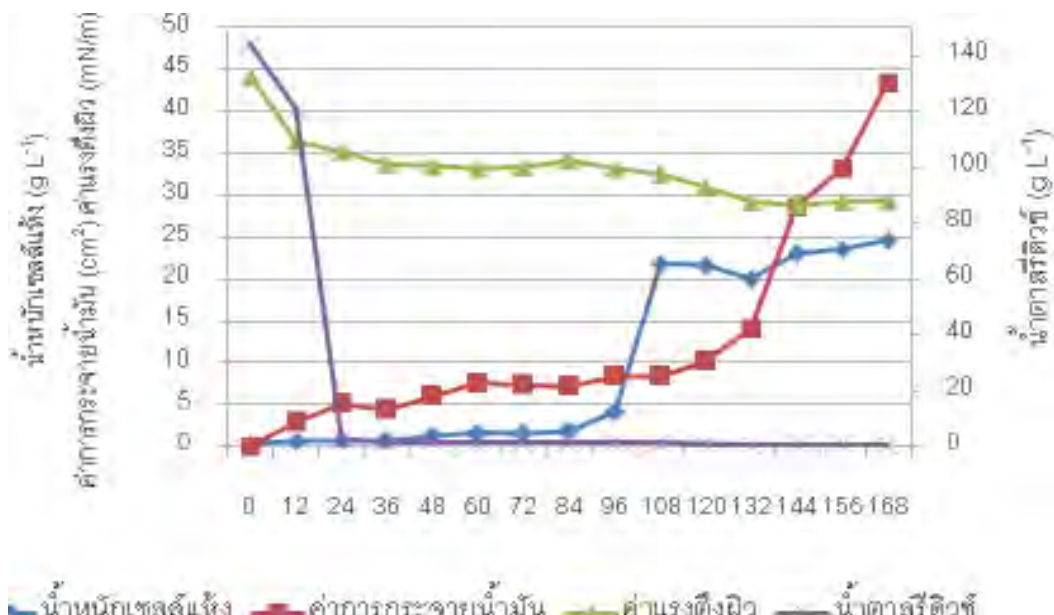
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g L ⁻¹)	ค่าการกระจาย ตัวของน้ำมัน (cm ²)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	Δ ค่าแรงตึงผิว _{b-t} (mN/m)	น้ำตาลรีดิวซ์ (g L ⁻¹)
0	0.10	0.09	41.33	0.00	126.13
12	0.48	0.46	40.17	1.17	132.49
24	0.35	5.86	37.00	4.33	53.96
36	0.47	1.93	35.83	5.50	1.41
48	0.68	2.74	37.33	4.00	1.27
60	0.84	2.01	35.67	5.67	1.34
72	1.89	6.01	35.00	6.33	1.36
84	1.28	8.21	34.83	6.50	1.40
96	1.80	12.14	34.17	7.17	1.11
108	15.98	20.96	33.33	8.00	1.08
120	19.01	31.82	33.33	8.00	0.99
132	17.61	37.37	32.50	8.83	1.00
144	24.41	39.20	31.83	9.50	0.83
156	28.44	40.61	30.50	10.83	0.53
168	31.97	43.14	30.17	11.17	0.63



รูปที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของ *P. anomala* PY1 และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในถังหมักแบบแบตช์ ที่อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm อัตราเร็วใบกวน 300 rpm

ตารางที่ 6 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *P. anomala* PY1 ในถังหมักแบบแบตช์ ที่อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm อัตราเร็วใบกวน 400 rpm pH 5 เป็นเวลา 7 วัน

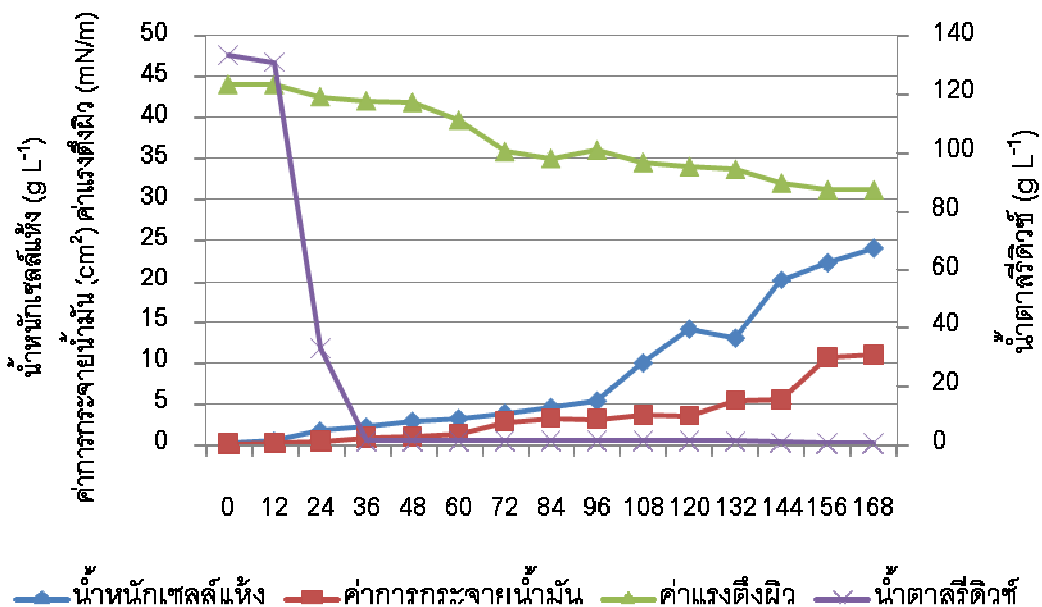
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g L ⁻¹)	ค่าการกระจายตัวของน้ำมัน (cm ²)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	Δ ค่าแรงตึงผิว _{b-t} (mN/m)	น้ำตาลรีดิวซ์ (g L ⁻¹)
0	0.33	0.04	44.17	0.00	143.96
12	0.63	2.93	36.50	7.67	120.83
24	0.72	5.17	35.17	9.00	2.68
36	0.69	4.40	33.67	10.50	1.68
48	1.29	6.01	33.50	10.67	1.61
60	1.66	7.54	33.17	11.00	1.53
72	1.62	7.38	33.33	10.83	1.43
84	1.88	7.22	34.17	10.00	1.45
96	4.18	8.38	33.17	11.00	1.42
108	21.80	8.38	32.50	11.67	1.35
120	21.61	10.17	31.00	13.17	0.95
132	20.01	14.07	29.17	15.00	0.56
144	23.04	28.57	28.83	15.33	0.75
156	23.59	33.17	29.17	15.00	0.74
168	24.60	43.37	29.33	14.83	0.61



รูปที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของ *P. anomala* PY1 และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในถังหมักแบบแบตช์ ที่อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm อัตราเร็วใบกวน 400 rpm

ตารางที่ 7 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *P. anomala* PY1 ในถังหมักแบบแบตช์ ที่อัตราการให้อากาศ 2 vvm อัตราเร็วใบกวน 200 rpm pH 5 เป็นเวลา 7 วัน

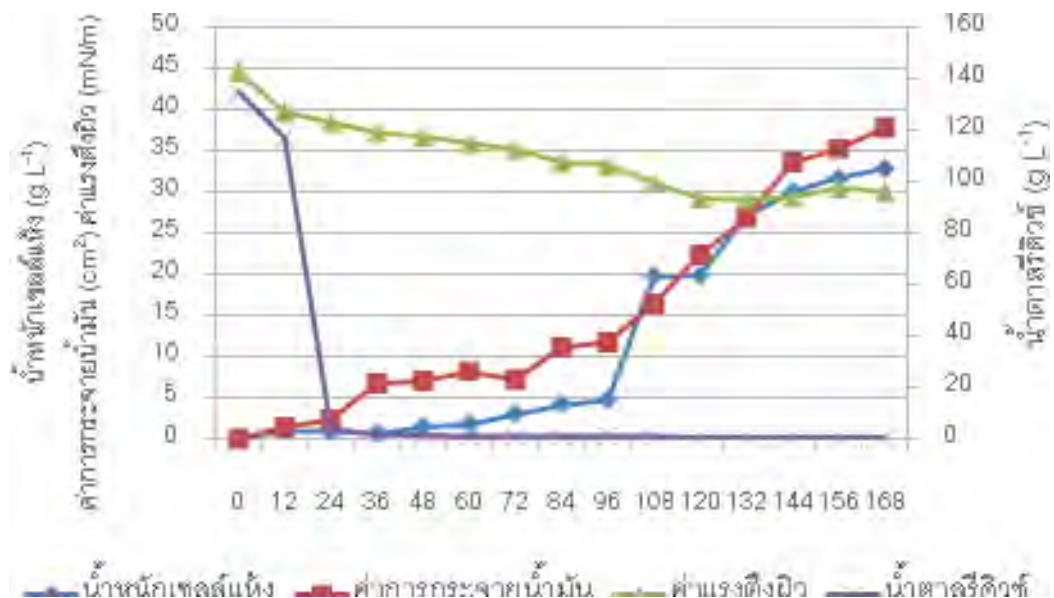
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g L ⁻¹)	ค่าการกระจายตัวของน้ำมัน (cm ²)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	Δ ค่าแรงตึงผิว _{b-t} (mN/m)	น้ำตาลรีดิวซ์ (g L ⁻¹)
0	0.15	0.06	44.00	0.00	133.17
12	0.40	0.15	44.00	0.00	130.76
24	1.64	0.42	42.50	1.50	32.67
36	2.11	0.89	42.00	2.00	1.20
48	2.85	0.95	41.83	2.17	1.43
60	3.16	1.26	39.67	4.33	1.27
72	3.81	2.74	35.83	8.17	1.35
84	4.51	3.14	35.00	9.00	1.28
96	5.29	3.04	36.00	8.00	1.30
108	9.93	3.57	34.50	9.50	1.30
120	14.06	3.46	34.00	10.00	1.31
132	12.96	5.31	33.67	10.33	1.09
144	20.13	5.44	32.00	12.00	0.79
156	22.29	10.55	31.17	12.83	0.55
168	24.06	10.94	31.17	12.83	0.40



รูปที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของ *P. anomala* PY1 และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในถังหมักแบบแบตช์ ที่อัตราการให้อากาศ 2 vvm อัตราเร็วใบกวน 200 rpm

ตารางที่ 8 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *P. anomala* PY1 ในถังหมักแบบแบตช์ ที่อัตราการให้อากาศ 2 vvm อัตราเร็วใบกวน 300 rpm pH 5 เป็นเวลา 7 วัน

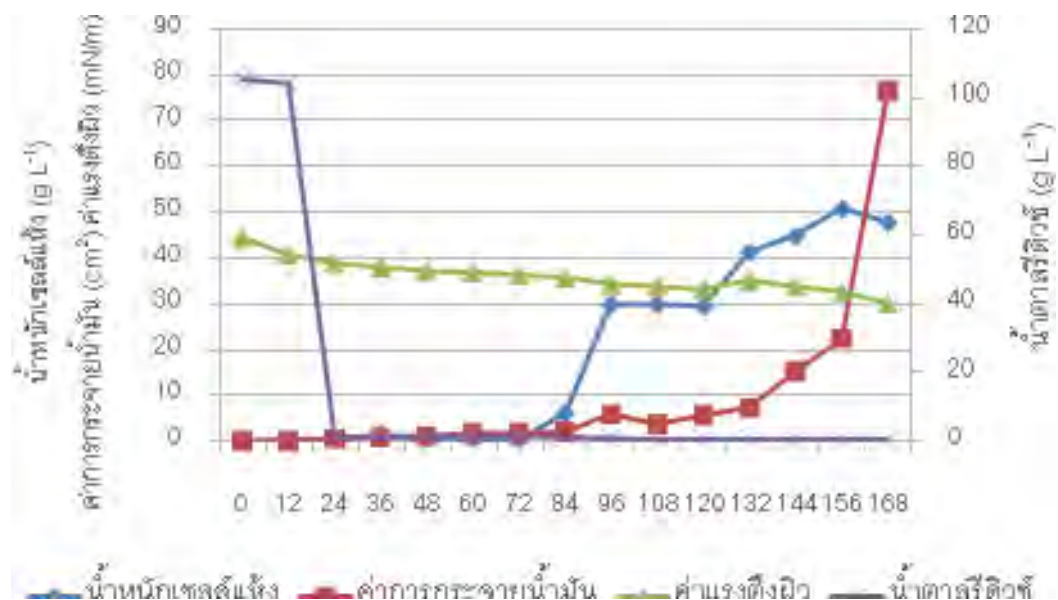
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g L ⁻¹)	ค่าการกระจาย ตัวของน้ำมัน (cm ²)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	Δ ค่าแรงตึงผิว _{b-t} (mN/m)	น้ำตาลรีดิวซ์ (g L ⁻¹)
0	0.21	0.04	44.50	0.00	134.61
12	0.99	1.47	39.67	4.83	116.88
24	0.95	2.45	38.33	6.17	3.94
36	0.61	6.75	37.17	7.33	1.17
48	1.43	7.07	36.67	7.83	1.07
60	1.81	8.21	35.83	8.67	0.95
72	2.99	7.22	35.17	9.33	0.77
84	4.18	11.14	33.50	11.00	0.71
96	4.74	11.74	33.17	11.33	0.81
108	19.75	16.37	31.00	13.50	0.71
120	19.81	22.33	29.17	15.33	0.47
132	27.04	26.71	29.00	15.50	0.43
144	29.98	33.51	29.33	15.17	0.44
156	31.60	35.12	30.33	14.17	0.39
168	32.75	37.73	31.00	13.50	0.32



รูปที่ 8 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของ *P. anomala* PY1 และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในถังหมักแบบแบตช์ ที่อัตราการให้อากาศ 2 vvm อัตราเร็วใบกวน 300 rpm

ตารางที่ 9 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *P. anomala* PY1 ในถังหมักแบบแบตช์
ที่อัตราการให้อากาศ 2 vvm อัตราเร็วใบกวน 400 rpm pH 5 เป็นเวลา 7 วัน

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g L ⁻¹)	ค่าการกระจาย ตัวของน้ำมัน (cm ²)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	Δ ค่าแรงตึงผิว _{b-t} (mN/m)	น้ำตาลรีดิวซ์ (g L ⁻¹)
0	0.05	0.03	44.50	0.00	105.32
12	0.44	0.11	40.67	3.83	104.16
24	0.32	0.55	38.83	5.67	0.99
36	1.53	0.84	38.00	6.50	0.93
48	0.44	1.07	37.17	7.33	1.50
60	0.61	1.69	36.83	7.67	1.54
72	0.32	1.77	36.33	8.17	1.45
84	6.13	2.09	35.67	8.83	0.99
96	29.81	5.86	34.17	10.33	0.70
108	29.86	3.80	33.83	10.67	0.38
120	29.40	5.72	33.17	11.33	0.33
132	41.24	7.22	35.00	9.50	0.30
144	44.80	15.20	33.83	10.67	0.28
156	50.72	22.33	32.50	12.00	0.31
168	47.72	76.42	30.00	14.50	0.25

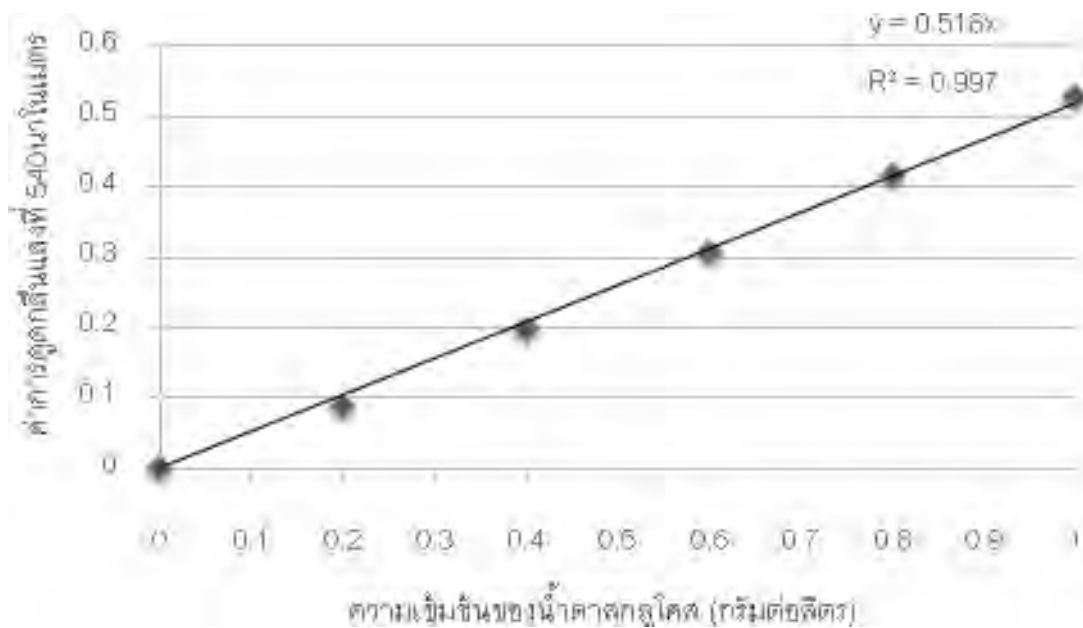


รูปที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของ *P. anomala* PY1 และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในถังหมักแบบแบตช์ ที่อัตราการให้อากาศ 2 vvm อัตราเร็วใบกวน 400 rpm

ภาคผนวก จ

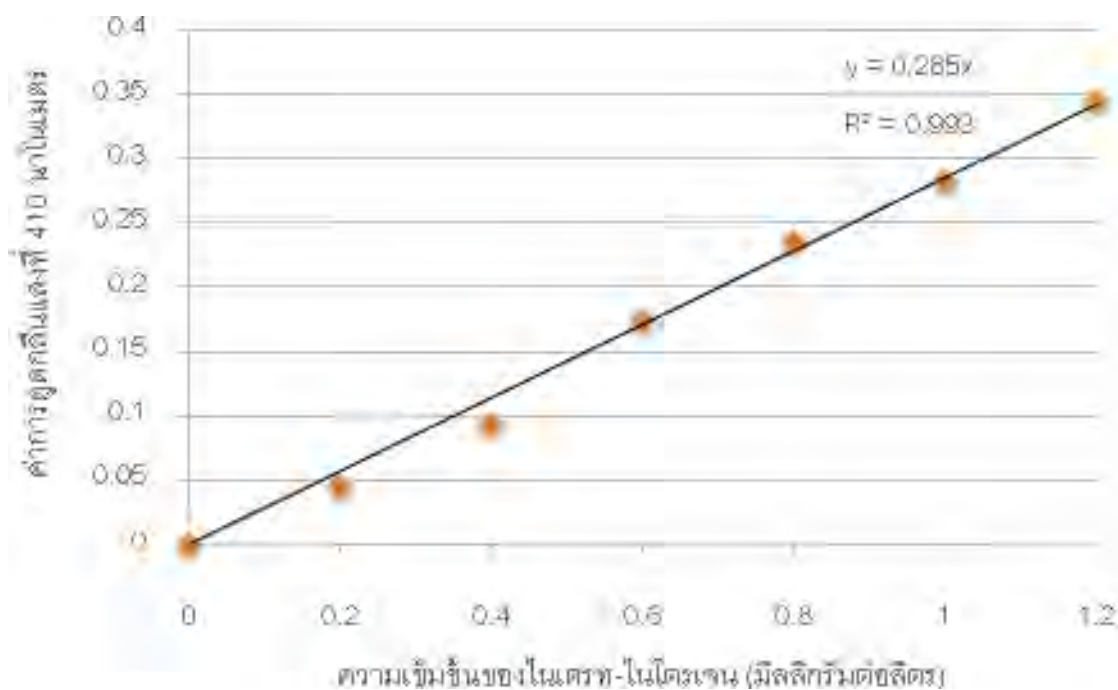
กราฟมาตรฐาน

กราฟมาตรฐานน้ำตาลรีดิวซ์เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (Bernfield, 1955)



กราฟมาตรฐานแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร
กับน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0-1 กรัมต่อลิตร

กราฟมาตรฐานปริมาณไนเตรท-ไนโตรเจนเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Brucine (APHA, AWWA and WEF No. 4500-NO₃⁻E, 1998)



กราฟมาตรฐานแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร
กับไนเตรท-ไนโตรเจนความเข้มข้น 0-1.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวมาติกา อ้นแก้ว เกิดเมื่อวันที่ 3 กรกฎาคม พ.ศ. 2528 ที่จังหวัดนครราชสีมา สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ในปีการศึกษา 2549 และเข้ารับการศึกษาคณะบริหารศึกษาศาสตร์ สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2550 ที่อยู่ปัจจุบัน 207/10 หมู่ 2 ถ.สีคิ้ว-ชัยภูมิ ต.มิตรภาพ อ.สีคิ้ว จ.นครราชสีมา 30140

ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่

ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ได้เข้าร่วมเสนอผลงานการประชุมทางวิชาการระดับนานาชาติในงาน Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON) 2010 ระหว่างวันที่ 21-23 มกราคม 2553 ณ จังหวัดอุบลราชธานี ในหัวข้อเรื่อง "Biosurfactant production by *Pichia anomala* PY1 in batch fermenter"