

การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยแบคทีเรียตรึงบนโคโคซานในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบด



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2559
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

BIOSURFACTANT PRODUCTION BY CHITOSAN-IMMOBILIZED BACTERIA IN PACKED BED
BIOREACTOR

Mr. Nutthiwut Khun-arwut



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Microbiology and Microbial Technology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยแบคทีเรียตรึงบนไคโตซานในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบด
โดย	นายณัฐวุฒิ ชุนอาวุธ
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)
.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. อรุทัย ภิญญาคง)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา จันทร์ประทีป นภธร)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร. สุวัฒน์ สูงเลิศสงฟ้า)

ณัฐวุฒิ ขุนอาวุธ : การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยแบคทีเรียตรึงบนโคโตซานในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเกจ (BIOSURFACTANT PRODUCTION BY CHITOSAN-IMMOBILIZED BACTERIA IN PACKED BED BIOREACTOR) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
 หลัก: รศ. ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย, 141 หน้า.

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อเพิ่มผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus subtilis* GY30 ด้วยการใส่เซลล์ตรึงบนโคโตซานในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเกจ และปรับปรุงสูตรอาหารสำหรับการผลิตด้วยวิธีการวิเคราะห์การตอบสนองเชิงพื้นผิว ทั้งนี้ได้คัดเลือก *B. subtilis* GY30 มาศึกษา เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้สูงกว่าแบคทีเรียที่นำมาทดสอบสายพันธุ์อื่น คือ 0.96 กรัมต่อลิตร และเป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรค เมื่อใช้อาหารเบสล์ที่มีปริมาณน้ำมันถั่วเหลือง 2%v/v เป็นแหล่งคาร์บอน ในขวดเขย่า พบว่าเซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพการผลิตสูงกว่าเซลล์อิสระ 43% ผลการออกแบบการทดลองแบบบล็อก-เบทน์เคนพบว่าอาหารที่เหมาะสมประกอบด้วย น้ำมันถั่วเหลือง 2.7% v/v สัดส่วนแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจน 14.75:1 เหล็กซัลเฟต 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และแมงกานีสซัลเฟต 0.3 กรัมต่อลิตร ซึ่งให้ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มขึ้นเป็น 1.64 กรัมต่อลิตร หลังจากผลิต 3 วัน เมื่อนำสูตรอาหารนี้มาใช้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเกจ ขนาด 2 ลิตร โดยกำหนดอัตราการให้อากาศ 1.5 vvm อัตราการไหลของอาหารผ่านแพคเกจคอลัมน์ 0.6 มิลลิเมตรต่อนาที และปริมาณโคโตซานในแพคเกจคอลัมน์ 80 กรัม พบว่าได้ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเท่ากับในขวดเขย่า แต่ใช้เวลาลดลงเหลือ 1 วัน อย่างไรก็ตามเมื่อนำส่วนของเซลล์ตรึงที่อยู่ในแพคเกจคอลัมน์มาใช้ผลิตซ้ำ พบว่าได้ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงขึ้นเป็น 1.81 กรัมต่อลิตร จึงมีแนวโน้มที่จะผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแบบต่อเนื่องได้ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *B. subtilis* GY30 มีสมบัติการเป็นสารก่ออิมัลชันและสารกระจายน้ำมันที่ดีกับน้ำมันพืชและน้ำมันดิบ มีค่าความเข้มข้นวิกฤตไมเซลล์เท่ากับ 420.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีประสิทธิภาพในภาวะตั้งแต่ pH 6 ถึง 10 อุณหภูมิ -20 ถึง 121 องศาเซลเซียส และความเข้มข้นเกลือ 0 ถึง 10 % w/v สมบัติเหล่านี้แสดงว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานด้านต่างๆได้

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต
 สาขาวิชา จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก
 ปีการศึกษา 2559

5771987123 : MAJOR MICROBIOLOGY AND MICROBIAL TECHNOLOGY

KEYWORDS: BIOSURFACTANT / BIOSURFACTANT PRODUCTION / RSM / PACKED BED BIOREACTOR / IMMOBILIZED CELLS

NUTTHIWUT KHUN-ARWUT: BIOSURFACTANT PRODUCTION BY CHITOSAN-IMMOBILIZED BACTERIA IN PACKED BED BIOREACTOR. ADVISOR: ASSOC. PROF. EKAWAN LUEPROMCHAI, Ph.D., 141 pp.

This study aimed to improve the biosurfactant yield of *Bacillus subtilis* GY30 by using chitosan-immobilized cells in packed bed bioreactor and to optimize the components of productive medium by response surface methodology. *B. subtilis* GY30 was selected because its biosurfactant yield at 0.96 g/L was higher than other tested bacteria and it was a non-pathogenic bacterium. When using 2% v/v soybean oil as carbon source in shaking flasks, the biosurfactant yield obtained from chitosan-immobilized GY30 was 43% higher than that of free cells. The results from Box-Behnken design showed that the optimized medium containing 2.7% v/v soybean oil, 14.75:1 C/N ratio, 50 mg/L ferrous sulfate and 0.3 g/L manganese (II) sulfate could increase the biosurfactant yield to 1.64 g/L after 3 days. Consequently, this medium was used for biosurfactant production in a 2 L packed bed bioreactor. The operation conditions were 1.5 vvm aeration rate, 0.6 ml/min medium flow rate and 80 g chitosan in the packed column. The acquired biosurfactant yield was similar to the shaking flasks but the production time was reduced to 1 day. Nonetheless, the packed column was reused for production and the biosurfactant yield was increased to 1.81 g/L. The result suggested that the biosurfactant production could be carried out continuously. *B. subtilis* GY30 biosurfactant had the critical micelle concentration of 420.5 mg/L and had good oil displacement and emulsification activity with both vegetable and crude oils. It was active under a wide range of conditions including pH at 6-10, temperature at -20 – 121 °C and sodium chloride concentrations at 0 – 10 % w/v. These properties demonstrated that the biosurfactant is a good candidate for various applications.

Department: Microbiology Student's Signature

Field of Study: Microbiology and Microbial Technology Advisor's Signature

Academic Year: 2016

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ รองศาสตราจารย์ เอกวัล ลือพร้อมชัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งได้ให้ความรู้ ความเมตตา คำแนะนำและ ข้อคิดเห็นต่างๆ ในการทำวิจัย ตลอดจนตรวจแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ ซึ่งผู้วิจัย ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรากุลวณิชย์ ที่กรุณาได้รับเป็น ประธานกรรมการในการสอบ ตลอดจนให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ รวมทั้งช่วยปรับปรุงและ แก้ไขเล่มวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. อรรถชัย ภิญญาคง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา จันทร์ประทีป นภاطر และดร. สุวัฒน์ สูงเลิศสง่าฟ้า ที่กรุณาได้รับเป็นกรรมการในการสอบ ตลอดจนให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ และช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณทุน 72 พรรษา จากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา สำหรับการช่วยเหลือและคำแนะนำต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อการวิจัย

ขอขอบคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนในภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย โดยเฉพาะอย่างยิ่งห้องปฏิบัติการ 1704/14 ตึกมหาวชิรุณหิศ สำหรับการช่วยเหลือ กำลังใจ และความหวังดีที่มีให้เสมอมา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านของบัณฑิตวิทยาลัย ที่ช่วยอำนวยความสะดวกต่างๆ

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัว ที่ให้การสนับสนุน ช่วยเหลือ รวมถึงให้กำลังใจเป็นอย่างดีในทุกด้านแก่ผู้วิจัยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษาไปได้ด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญรูป	ฑ
สารบัญตาราง.....	ด
สารบัญสมการ.....	ถ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์	4
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2 วารสารปริทรรศน์.....	5
2.1 สารลดแรงตึงผิว.....	5
2.2 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	6
2.2.1 ชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแบ่งชนิดโครงสร้าง	8
2.2.1.1 ลิโปเปปไทด์.....	8
2.2.1.2 ฟอสโฟลิพิด.....	8
2.2.1.3 กรดไขมัน	8
2.2.1.4 สารประกอบพอลิเมอร์.....	8
2.2.1.5 ไกลโคลิพิด	9
2.2.2 ชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่แบ่งตามสภาพขั้ว	9
2.2.3 ชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแบ่งตามน้ำหนักโมเลกุล.....	10

2.2.4 สมบัติของสารลดแรงตึงผิว	11
2.2.4.1 ค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์ (Critical micelle concentration, CMC).....	11
2.2.4.2 ความเสถียรต่ออุณหภูมิ ความเป็นกรดเบสและความเข้มข้นประจุ	11
2.2.4.3 ความเป็นพิษต่ำ.....	12
2.2.4.4 สามารถย่อยสลายได้	12
2.3 การคัดแยกและสมบัติที่ใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	13
2.3.1 แหล่งที่มาของจุลินทรีย์ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	13
2.3.2 เทคนิคการคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	13
2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	15
2.4.1. สายพันธุ์จุลินทรีย์	15
2.4.2 สภาวะในการผลิตสารลดแรงตึงผิว	16
2.4.2.1 เทคนิคการเลี้ยงเซลล์	16
2.4.2.1.1 เลี้ยงเซลล์แบบเซลล์อิสระ	16
2.4.2.1.2 เลี้ยงเซลล์แบบเซลล์ตรึง	17
2.4.2.2 ปัจจัยทางกายภาพของสิ่งแวดล้อม.....	18
2.4.3 สารอาหารที่เป็นส่วนประกอบของอาหาร	19
2.4.3.1 ศึกษาความเข้มข้นอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญ.....	22
2.4.3.1.1 การทดลองครั้งละปัจจัย (one factor at a time)	23
2.4.3.1.2 การออกแบบการทดลอง (design of experiment)	23
2.4.3.2.2.1 การคัดเลือกและกลั่นกรองปัจจัย	24
2.4.3.2.2.2 การคัดเลือกวิธีการออกแบบการทดลอง.....	24
2.4.3.2.2.2.1 การออกแบบแฟคทอเรียลเต็มรูปแบบ (full factorial design).....	25

2.4.3.2.2.2 การออกแบบ Box-benhken	25
2.4.3.2.2.3 Central composite design (CCD)	26
2.4.3.2.2.3 วิเคราะห์สมการความสัมพันธ์ของแต่ละปัจจัย	26
2.5 เทคโนโลยีการผลิตสารประกอบทางชีวภาพ	28
2.5.1 ประเภทถังปฏิกรณ์	28
2.5.1.1 ถังปฏิกรณ์แบบกวน (stirred tank reactor, STR)	28
2.5.1.2 ถังปฏิกรณ์แบบแพคเบด (packed bed reactor, PBR)	28
2.5.1.3 ถังปฏิกรณ์แบบฟลูอิดไคซ์เบด (fluidized bed reactor)	29
2.5.1.4 ถังปฏิกรณ์แบบบับเบิล (bubble column reactor)	30
2.5.1.5 ถังปฏิกรณ์แบบอากาศลอยตัว (airlift reactor)	30
2.5.2 วิธีการเลี้ยงจุลินทรีย์	32
2.5.2.1 การเลี้ยงจุลินทรีย์แบบแบตช์หรือแบบไม่ต่อเนื่อง (Batch)	32
2.5.2.2 การเลี้ยงจุลินทรีย์แบบเฟดแบตช์ หรือกึ่งต่อเนื่อง (fed-batch)	32
2.5.2.3 การเลี้ยงจุลินทรีย์แบบต่อเนื่อง (continuous)	32
2.6 ประโยชน์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและการประยุกต์ใช้	33
2.6.1 ความสามารถในการก่ออิมัลชัน	34
2.6.2 ความสามารถในการละลาย	35
2.6.3 สารลดแรงตึงผิวที่มีประจุที่ส่งเสริมการจับกับโลหะหนัก	36
2.6.4 ความสามารถในการละลายชั้นไขมันและแทรกตัวในชั้นลิพิดไบเลเยอร์ของเยื่อหุ้ม เซลล์	37
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	38
3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ	38
3.2 เคมีภัณฑ์	39

3.3 แผนผังการดำเนินการวิจัย	41
3.4 จุลินทรีย์	42
3.5 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบด	42
3.6 ขั้นตอนการดำเนินการทดลอง.....	45
3.6.1 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระดับขวดเขย่าและการวัดปริมาณการผลิตสาร ลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	45
3.6.1.1 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเซลล์อิสระ	45
3.6.1.2 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเซลล์ตรึงบนไคโตซาน.....	46
3.6.1.3 การสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	46
3.6.1.4 การวัดค่าแรงตึงผิว	47
3.6.2 การระบุชนิดสายพันธุ์ของแบคทีเรีย	48
3.6.3 การศึกษาองค์ประกอบของอาหารที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรง ตึงผิวชีวภาพ	48
3.6.4 การศึกษาความเข้มข้นของสารอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิว ชีวภาพ ด้วยวิธีการตอบสนองเชิงพื้นผิว	49
3.6.4.1 การศึกษาองค์ประกอบอาหารที่มีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพใน เชิงบวกด้วยวิธีการออกแบบแบบ Plackett-Burman.....	49
3.6.4.2 การศึกษาองค์ประกอบของสารอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรง ตึงผิวชีวภาพด้วยการออกแบบการทดลองวิธีบ็อก-เบห์นเคน (Box Behnken).....	50
3.6.5 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบด	55
3.6.5.1 การเตรียมเซลล์ตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ	55
3.6.5.2 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบด	56
3.6.6 การศึกษาสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	57

3.6.6.1 การเตรียมตัวอย่างสารละลายสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	57
3.6.6.2 การวิเคราะห์ส่วนประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรียที่ คัดเลือก	58
3.6.6.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน โดยวิธี sulfo-phospho-vanillin	58
3.6.6.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay	58
3.6.6.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี phenol-sulfuric acid	59
3.6.6.2.4 Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)	59
3.6.6.3 การวิเคราะห์สมบัติการก่ออิมัลชัน Emulsification index (E ₂₄)	60
3.6.6.4 การวิเคราะห์สมบัติการกระจายน้ำมัน	61
3.6.6.5 การวิเคราะห์ความเสถียรที่สภาวะต่างๆ	61
3.6.6.5.1 การศึกษาการทนต่ออุณหภูมิ	61
3.6.6.5.2 การศึกษาความทนต่อภาวะกรดเบส	62
3.6.6.5.3 การศึกษาการต่อความเข้มข้นเกลือ	62
3.6.6.6 การวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์ (critical micelle concentration, CMC)	62
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	63
4.1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	63
4.2 การพัฒนาและปรับปรุงการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก <i>B. subtilis</i> GY30 ในระดับ ขวดเย้า	67
4.2.1 เปรียบเทียบการผลิตสารลดแรงตึงผิวด้วยวิธีการเลี้ยงแบบเซลล์อิสระและเซลล์ตรึง ..	67
4.2.2 ศึกษาองค์ประกอบของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	68
4.3 การขยายขนาดการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก <i>B. subtilis</i> GY30 ในถังปฏิกรณ์ ชีวภาพแบบแพคเบด	85

4.3.1 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบดเมื่อควบคุม อัตราการใช้อากาศเท่ากับ 0.5 vvm	85
4.3.2 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบดเมื่อควบคุม อัตราการใช้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm และนำเซลล์ตรึงในแพคคอลัมน์กลับมาใช้ ผลิตสารลดแรงตึงผิวซ้ำ.....	87
4.4 ลักษณะสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ <i>B. subtilis</i> GY30	90
4.4.1 ส่วนประกอบทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก <i>B. subtilis</i> GY30.....	90
4.4.2 ค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์ (CMC).....	93
4.4.3 สมบัติการก่ออิมัลชัน	94
4.4.4 สมบัติการกระจายน้ำมัน.....	95
4.4.5 ความเสถียรที่สภาวะต่างๆ.....	98
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	100
5.1 สรุปผลการวิจัย	100
5.2 ข้อเสนอแนะ	102
รายการอ้างอิง	105
ภาคผนวก.....	113
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีคำนวณปริมาณคาร์บอนและไนโตรเจน.....	114
ภาคผนวก ข สารเคมี.....	118
ภาคผนวก ค ข้อมูลดิบต่าง ในการคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรีย และเปรียบเทียบวิธีการผลิตแบบ ตรึงเซลล์และเซลล์อิสระ.....	120
ภาคผนวก ง ข้อมูลดิบต่างๆ สำหรับการหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตที่ให้ปริมาณสารลด แรงตึงผิวชีวภาพสูงสุด.....	128
ภาคผนวก จ ข้อมูลดิบต่างๆ ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพค เบด	133

ภาคผนวก ฉ ข้อมูลดิบต่างๆ สำหรับการศึกษาลักษณะสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ GY30	135
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	141



สารบัญรูป

รูปที่ 2.1 โครงสร้างทั่วไปของสารลดแรงตึงผิวและสมบัติการลดแรงตึงผิว.....	5
รูปที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเซอพกดินที่ผลิตจาก <i>Bacillus subtilis</i>	8
รูปที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแรมโนลิพิทที่มีโครงสร้างของส่วนที่ละลายน้ำได้ต่างกัน	9
รูปที่ 2.4 โครงสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สภาพประจุต่างๆ.....	10
รูปที่ 2.5 เทคนิคการตรึงเซลล์.....	18
รูปที่ 2.6 สมการความสัมพันธ์ระหว่างค่าตอบสนอง (y) และปัจจัยต่างๆที่ส่งผลต่อการผลิต (x) 1) สมการแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้น 2) สมการแสดงความสัมพันธ์อันดับสอง และ 3) สมการแสดงความสัมพันธ์กำลังสอง	25
รูปที่ 2.7 รูปแบบกราฟตอบสนองเชิงพื้นผิว	27
รูปที่ 2.8 แผนภาพของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบด	29
รูปที่ 2.9 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเซอพกดิน จาก <i>Bacillus subtilis</i> โดยใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแอร์ลิฟต์.....	31
รูปที่ 2.10 การประยุกต์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อเพิ่มปริมาณการเกี่ยวเก็บน้ำมันปิโตรเลียม	35
รูปที่ 2.11 กลไกการทำงานของสารกระจายคราบน้ำมันในการบำบัดพื้นที่ปนเปื้อน.....	36
รูปที่ 2.12 กลไกการกำจัดโลหะหนักโดยใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	37
รูปที่ 3.1 แผนงานวิจัย.....	41
รูปที่ 3.2 แบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ ที่ใช้ในงานวิจัยเมื่อเจริญบนอาหาร 25%LB.....	42
รูปที่ 3.3 แผนผังถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบดที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งปรับปรุงแผนผังมาจากบริษัท Medorex e.K. ประเทศเยอรมัน.....	43
รูปที่ 3.4 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบดและอุปกรณ์ควบคุมภาวะการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	44
รูปที่ 3.5 ไคโตซานจากแกนปลาหมึกบดชนิดเกล็ดขนาด 1-3 มิลลิเมตร ที่ใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธีการตรึงเซลล์	46

รูปที่ 3.6 ลักษณะของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ในรูปของสารสกัดหยาบ	47
รูปที่ 3.7 ตัวอย่างตาราง ANOVA จากโปรแกรมวิเคราะห์ สำหรับวิเคราะห์ปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิว	54
รูปที่ 3.8 ตัวอย่างตาราง ANOVA สำหรับใช้อธิบายความสัมพันธ์ของแต่ละปัจจัยและการสร้างสมการแสดงความสัมพันธ์	54
รูปที่ 3.9 ตัวอย่างตาราง ANOVA แสดงค่า Lack of Fit และค่า Pure Error	55
รูปที่ 3.10 เครื่อง FT-IR Spectrometer รุ่น Nicolet iS5 จากบริษัท Thermo Scientific	60
รูปที่ 4.1 การเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของจุลินทรีย์ 4 สายพันธุ์	64
รูปที่ 4.2 การย้อมติดสีแกรม	66
รูปที่ 4.3 การย้อมสีเอนโดสปอร์ด้วยมาลาไคท์กรีน	66
รูปที่ 4.4 เปรียบเทียบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	68
รูปที่ 4.5 ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชีวภาพจากการออกแบบการทดสอบแบบ one factor at a time	70
รูปที่ 4.6 ปริมาณเซลล์ทั้งหมดในระบบจากการออกแบบการทดสอบแบบ one factor at a time	71
รูปที่ 4.7 การวิเคราะห์องค์ประกอบของอาหารที่ส่งผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	74
รูปที่ 4.8 กราฟการตอบสนองเชิงพื้นผิวโดยวัดค่าผลผลิตโดยเปรียบเทียบของปัจจัย 2 ปัจจัย	81
รูปที่ 4.9 เปรียบเทียบปริมาณแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน เหล็กและแมงกานีสที่ให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูง	83
รูปที่ 4.10 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ปริมาณเซลล์ในน้ำเลี้ยงเซลล์และปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองที่เหลือในน้ำเลี้ยง ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบดเมื่อควบคุมอัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.5 vvm และค่า HRT เท่ากับ 12 ชั่วโมง	86
รูปที่ 4.11 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบดเมื่อควบคุมอัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.5 vvm และค่า HRT เท่ากับ 12 ชั่วโมง	86

รูปที่ 4.12 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *B. subtilis* GY30 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ
 แพคเบต ควบคุมสภาวะให้อากาศที่ 1.5 vvm ค่า HRT เท่ากับ 12 ชั่วโมง และการผลิตสารลด
 แรงตึงผิวโดยใช้แพคเบตซ้ำโดยควบคุมสภาวะเดิม..... 89

รูปที่ 4.13 การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเครื่อง FT-IR
 Spectrometer โดยวัดการดูดกลืนแสงในช่วงคลื่นตั้งแต่ 400-4000 cm^{-1} 92

รูปที่ 4.14 ค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ *B. subtilis* GY30..... 94

รูปที่ 4.15 สมบัติการก่ออิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวกับตัวอย่างน้ำมันพืชและน้ำมันปิโตรเลียม 95

รูปที่ 4.16 สมบัติการกระจายน้ำมันโดยใช้ตัวอย่างน้ำมันพืชและน้ำมันปิโตรเลียม 97

รูปที่ 4.17 ความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สภาวะต่างๆ 99



สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1 ประเภทของสารลดแรงตึงผิวชนิดต่างๆที่จุลินทรีย์สามารถผลิตได้	7
ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดต่างๆ ตามน้ำหนักโมเลกุล	11
ตารางที่ 2.3 การศึกษาการคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	14
ตารางที่ 2.4 จุลินทรีย์สายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	16
ตารางที่ 2.5 เทคนิคการตรึงเซลล์ด้วยวัสดุตรึงชนิดต่างๆ	18
ตารางที่ 2.6 ตัวอย่างแหล่งคาร์บอนที่สามารถนำมาใช้ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	20
ตารางที่ 2.7 ตัวอย่างการประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในงานด้านต่างๆ	34
ตารางที่ 3.1 ชุดทดลองของความเข้มข้นขององค์ประกอบของอาหารชนิดต่างๆที่ออกแบบโดย การทดลองด้วย Plackett-Burman	50
ตารางที่ 3.2 ชุดการทดลองจากการออกแบบการทดลองแบบบล็อก-เบห์นเคน โดยมีตัวแปรอิสระ 4 ตัวแปร	52
ตารางที่ 4.1 ชุดทดลองของความเข้มข้นขององค์ประกอบของอาหารชนิดต่างๆ ที่ออกแบบการ ทดลองด้วย Plackett-Burman และปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ในแต่ละชุด	73
ตารางที่ 4.2 การอธิบายปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวในเบื้องต้นจากการออกแบบ Plackett-Burman	74
ตารางที่ 4.3 การออกแบบการทดลองแบบบล็อก-เบห์นเคน โดยมีตัวแปรอิสระ 4 ตัวแปร	77
ตารางที่ 4.4 การอธิบายปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตด้วยวิธีการออกแบบการทดลองแบบบล็อก-เบห์ นเคน	78
ตารางที่ 4.5 การอธิบายปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและความเหมาะสมของ สมการความสัมพันธ์	79
ตารางที่ 4.6 การวิเคราะห์สำหรับสร้างสมการความสัมพันธ์	80
ตารางที่ 4.7 การตรวจสอบความแม่นยำของสมการแสดงความสัมพันธ์	82
ตารางที่ 4.8 เปรียบเทียบองค์ประกอบอาหารเบซัลก่อนและหลังปรับปรุงสูตรอาหาร	84

ตารางที่ 4.9 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่อยู่ในรูปสารสกัดหยาบ จาก <i>B. subtilis</i> GY30 และเปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ อื่น.....	91
--	----



สารบัญสมการ

สมการที่ 3.1 รูปทั่วไปของสมการแสดงความสัมพันธ์แบบยกกำลังของความสัมพันธ์ลำดับสอง.....	51
สมการที่ 3.2 การคำนวณค่า E_{24}	61
สมการที่ 3.3 การคำนวณการกระจายน้ำมัน.....	61
สมการที่ 4.1 สมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำมันถั่วเหลือง (X_1) อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (X_2) ปริมาณเหล็ก (X_3) และปริมาณแมงกานีส (X_4).....	80



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นสารประกอบทางชีวภาพ ที่มีสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิวและแรงระหว่างผิว สามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์ ได้แก่ รา ยีสต์ และแบคทีเรีย โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นสารประเภทสารประกอบแอมฟิฟิลิก คือ ประกอบด้วยส่วนที่ละลายน้ำ และส่วนที่ไม่ละลายน้ำ (Pacheco และคณะ, 2010) โดยสามารถแบ่งตามองค์ประกอบของสารชีวภาพได้เป็น 5 ชนิด คือ ลิโปเปปไทด์ ฟอสโฟลิพิด กรดไขมัน สารประกอบพอลิเมอร์ และ ไกลโคลิพิด เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้กับงานหลายประเภท จึงมีความต้องการในการใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มมากขึ้น แต่การผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพในปัจจุบันนั้น มีประสิทธิภาพในการผลิตต่ำ ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่มีสารประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีราคาค่อนข้างสูง เมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิวทางเคมี ดังนั้นการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจึงเป็นแนวทางที่สำคัญในการศึกษาและนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไปประยุกต์ใช้ในงานด้านต่างๆ โดยการเพิ่มผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ คัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ การปรับปรุงอาหารที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต การเลือกวัตถุดิบที่มีราคาถูก และการเลือกสภาวะที่เหมาะสมต่อกระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Kim และคณะ, 2006, Luna และคณะ, 2011)

การตรึงเซลล์จุลินทรีย์เป็นเทคนิคที่เลือกใช้กันแพร่หลายในการผลิตทางเทคโนโลยีชีวภาพ รวมถึงการเพิ่มประสิทธิภาพในการสลายสารปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม ซึ่งการตรึงเป็นเทคนิคที่ช่วยในการเลียนแบบการเจริญในธรรมชาติของจุลินทรีย์ โดยเซลล์จะเจริญแบบกลุ่มบนพื้นผิวของวัสดุตรึงบริเวณที่มีการเจริญของเซลล์ดังกล่าวสามารถช่วยรักษาสภาพเซลล์ ทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตของเซลล์หรือการทำงานของเซลล์มีประสิทธิภาพคงที่ ซึ่งมีข้อดีคือ ปริมาณเซลล์ในระบบเพิ่มมากขึ้น ประสิทธิภาพของเซลล์มีความเสถียร และสามารถนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ในการผลิตได้จึงช่วยลดต้นทุนการผลิต (Kourkoutas และคณะ 2004, Hou และคณะ 2013, Perez-Bibbins และคณะ 2015) ทั้งนี้ควรเลือกวัสดุตรึงที่มีราคาถูก ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ สามารถกระตุ้นประสิทธิภาพการผลิตได้ดี ง่ายต่อการควบคุมการผลิต และสามารถรักษาเซลล์ให้สามารถใช้ได้ระยะเวลานานขึ้น วัสดุที่นำมาใช้ในการตรึงเซลล์ส่วนใหญ่เป็นวัสดุทางการเกษตร (Kourkoutas และคณะ, 2004) เทคนิคการตรึงสามารถแบ่งออกได้ 2 แบบ ตามลักษณะการตรึง คือการตรึงบนพื้นผิวของวัสดุตรึง และการตรึง

อยู่ภายในวัสดุแข็ง ตัวอย่างของวัสดุแข็งที่มีรายงานการใช้ก่อนหน้าเช่น โคโดซาน (Khondee และคณะ, 2012) อัลจินต (Abouseoud และคณะ, 2007) ถ่านกัมมันต์ (Yeh และคณะ, 2006) ไครโอเจล (Christovaa และคณะ, 2013) ซึ่งงานวิจัยของ Khondee และคณะ (2015), Abouseoud และคณะ (2007), Yeh และคณะ (2006), และ Christovaa และคณะ (2013) ใช้เซลล์ตรึงเพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นมีหลายปัจจัย ได้แก่ อุณหภูมิ การให้อากาศ ค่าความเป็นกรดเบส เป็นต้น นอกจากนี้องค์ประกอบต่างๆ ในอาหารยังส่งผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน โคแฟกเตอร์ และอื่นๆ จากการศึกษาองค์ประกอบของอาหารที่มีผลต่อการผลิตนั้นพบว่า กลีเซอรอล โซเดียมไนเตรต แมกนีเซียมซัลเฟต และสารสกัดจากยีสต์ มีผลต่อการผลิตของ *Rhodococcus erythropolis* (Pacheco และคณะ, 2010) และในภายหลังได้มีการศึกษาแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และโคแฟกเตอร์ต่างๆ ที่ส่งผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ พบว่า แหล่งคาร์บอนที่ส่งผลต่อการเพิ่มผลผลิตสารลดแรงตึงผิวมากที่สุดคือ น้ำมันพืช โดยปริมาณที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพอยู่ในช่วง 0.5 - 10%v/v (Luna และคณะ, 2011, Khondee และคณะ, 2015) แหล่งไนโตรเจนได้แก่ โซเดียมไนเตรต เนื่องจากงานวิจัยของ Raza และคณะ (2007) พบว่าการจำกัดปริมาณแหล่งไนโตรเจนจะช่วยเพิ่มการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และโซเดียมไนเตรตยังเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ให้ผลผลิตที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับแอมโมเนียมไนเตรตและแอมโมเนียมซัลเฟต โดยอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 10:1 - 20:1 (Abouseoud และคณะ, 2007, Kumar และคณะ, 2012) สำหรับ *Bacillus subtilis* มีรายงานว่าเหล็กในอาหารเป็นโคแฟกเตอร์ในการเจริญ และช่วยกระตุ้นการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยปริมาณเหล็กในช่วง 10-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วยส่งเสริมการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ แต่ถ้าความเข้มข้นมากเกินไปจะยับยั้งการผลิต เนื่องจากเหล็กจะเป็นพิษต่อเซลล์ได้ (Kiran และคณะ, 2014) และ แมงกานีสในปริมาณ 0.2 มิลลิโมลาร์ สามารถช่วยส่งเสริมการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus subtilis* ได้ (Gudina และคณะ, 2015)

การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้น จำเป็นต้องมีการออกแบบการทดลองเพื่อให้สามารถแปรผันปัจจัยต่างๆ ได้ โดยการออกแบบการทดลองที่นิยมใช้ คือ การออกแบบแฟคทอเรียลเต็มรูปแบบ (full factorial design) เช่น การศึกษาหาปัจจัยทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pseudomonas aeruginosa* RS29 (Saikia และคณะ, 2012) และการศึกษาปัจจัยของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวจาก *Sphingobacterium detergens* เพื่อให้ได้ผลผลิตสูงสุด (Burgos-Diaz และคณะ, 2013) แต่การใช้การออกแบบแฟคทอเรียลเต็มรูปแบบ นั้นมีข้อเสียทางด้านระยะเวลาในการศึกษา จำนวนชุดการทดลองที่

มีจำนวนมาก รวมถึงการใช้งบประมาณจำนวนมาก จากปัจจัยข้อจำกัดดังกล่าวจึงมีการใช้วิธีตอบสนองเชิงพื้นผิว (response surface methodology, RSM) เข้ามาช่วยในการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เพื่อช่วยลดจำนวนชุดการทดลอง ซึ่งทำให้ระยะเวลาและงบประมาณในการศึกษาลดน้อยลง เช่น การศึกษาหาปัจจัยของอาหารที่มีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pseudomonas aeruginosa* MA01 (Abbasi และคณะ, 2013) และ ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มไกลโคลิพิด จาก *Streptomyces* sp. MAB36 (Manivasagan และคณะ, 2014) ขั้นตอนของการออกแบบการทดลองโดยใช้วิธีตอบสนองเชิงพื้นผิว ในการออกแบบนั้น คือ การคัดเลือกและกลั่นกรองปัจจัยที่มีความสำคัญต่อตัวแปรตาม และการศึกษาความสัมพันธ์ของปัจจัยที่สำคัญกับค่าตอบสนองในรูปของสมการแสดงความสัมพันธ์ แบ่งเป็นความสัมพันธ์เชิงเส้น (linear regression) และความสัมพันธ์ยกกำลัง (quadratic regression) จากนั้นหาสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยที่มีความสำคัญจากความสัมพันธ์โดยการสร้างกราฟพื้นผิวตอบสนอง ซึ่งจะทำให้ทราบถึงค่าที่เหมาะสมที่สุดของแต่ละปัจจัยสำคัญ

นอกจากการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพ การหาเทคนิคการเลี้ยงจุลินทรีย์ และการหาองค์ประกอบของอาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแล้วยังมีการรายงานเกี่ยวกับการขยายขนาดการผลิตในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่สามารถเพิ่มผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากขึ้น (Raza และคณะ, 2006, Marti และคณะ, 2014) การผลิตสารทางชีวภาพโดยถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบต นั้นเหมาะสำหรับการผลิตสารทางชีวภาพโดยใช้เซลล์ตรึง พบว่าการใช้ถังรูปแบบแพคเบต สามารถเลี้ยงเซลล์ซึ่งให้จำนวนเซลล์ที่มากขึ้น ส่งผลให้ได้สารประกอบชีวภาพที่ต้องการเพิ่มขึ้น ทั้งนี้ยังสามารถลดความเสียหายของเซลล์ที่เกิดจากแรงเฉือนที่เกิดขึ้นเมื่อใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกวนผสม นอกจากนี้การผลิตโดยใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบตมีค่าใช้จ่ายในกระบวนการผลิตและการควบคุมถึงน้อยกว่าถังประเภทอื่น และสามารถผลิตได้อย่างต่อเนื่อง (Hussain และคณะ, 2015) แต่พบว่าถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบตนั้นมีข้อจำกัดอยู่คือ ข้อจำกัดของการถ่ายโอนมวล ซึ่งอาจลดปริมาณผลผลิตได้ จึงจำเป็นต้องแปรผันปัจจัยที่เกี่ยวข้อง เช่น อัตราการไหลของสารอาหาร และอัตราการให้อากาศ ต่อไป

จากโครงการ “การคัดแยกแบคทีเรียผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สามารถใช้ไขมัน น้ำมัน หรือกลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้น” ของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนโดย บริษัท ปตท. จำกัด (มหาชน) พ.ศ. 2553 ได้มีการคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแหล่งดินแหล่งน้ำที่มีการเปื้อนน้ำมันและจากแหล่งดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ โดยสามารถคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีโดยมีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน จำนวน 38 สายพันธุ์ ซึ่งในครั้งนั้นได้ศึกษาจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้เพียง

บางส่วน จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะนำแบคทีเรียที่เหลือในคลังมาศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวและ พัฒนาระบวนการผลิตต่อไป ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเริ่มจากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต สารลดแรงตึงผิวชีวภาพของแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ คือ GY30, GY33, GY36 และ GY40 หลังจากนั้น คัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพการผลิตสูงที่สุด มาเพิ่มผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้ เทคนิคการตรึงเซลล์ การหาสัดส่วนขององค์ประกอบของอาหารที่เหมาะสมด้วยวิธีตอบสนองเชิง พื้นผิว และการเพิ่มขนาดการผลิตในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบด

1.2 วัตถุประสงค์

วัตถุประสงค์หลักของงานวิจัยนี้ คือ การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยแบคทีเรียตรึงบนไค โตซานในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบด และวัตถุประสงค์ย่อยได้แก่

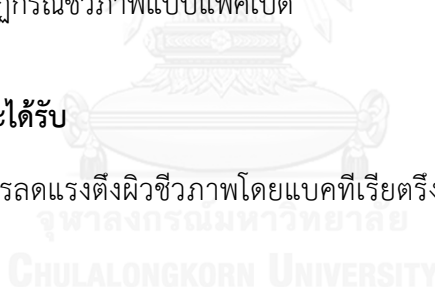
1.2.1 คัดเลือกชนิดของแบคทีเรียที่เหมาะสมต่อการนำมาผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

1.2.2 ศึกษาองค์ประกอบอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ แบคทีเรียที่คัดเลือกในรูปแบบแบคทีเรียตรึงบนไคโตซาน โดยใช้วิธีตอบสนองเชิงพื้นผิว

1.2.3 เพิ่มปริมาณการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของแบคทีเรียตรึงบนไคโตซาน โดยการ เพิ่มขนาดการผลิตในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบด

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้วิธีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยแบคทีเรียตรึงบนไคโตซานในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ แบบแพคเบด

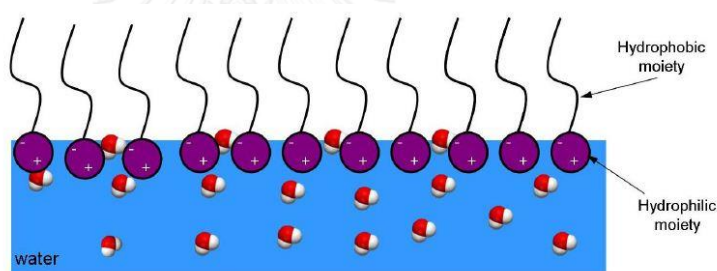


บทที่ 2

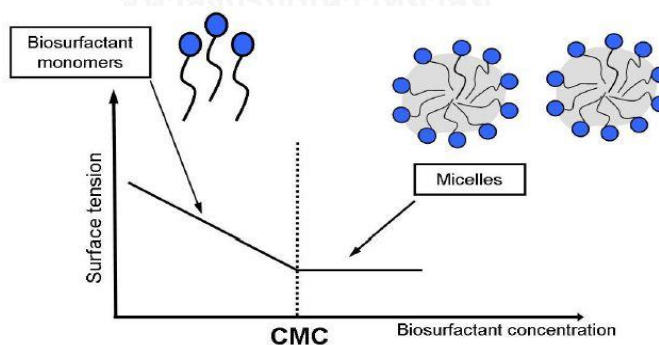
วารสารปริทรรศน์

2.1 สารลดแรงตึงผิว

สารลดแรงตึงผิวเป็นสารที่มีสมบัติในการลดแรงตึงผิวและแรงระหว่างผิวของสารสองสถานะ ซึ่งช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายระหว่างของแข็งกับของเหลว ทำให้เกิดการก่ออิมัลชันระหว่างของเหลวสองชนิด และลดแรงระหว่างผิวของสถานะก๊าซและของเหลวซึ่งก่อให้เกิดฟอง (Mnif และ Ghribi, 2015) โครงสร้างทั่วไปของสารลดแรงตึงผิวประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนหัวที่สามารถละลายน้ำและส่วนหางที่ไม่ละลายในน้ำ ตามรูปที่ 2.1ก จากโครงสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทำให้ช่วยละลายสารที่ไม่ละลายน้ำให้ละลายได้มากขึ้น โดยการสร้างไมเซลล์ ซึ่งการสร้างไมเซลล์จำเป็นต้องมีความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวมากพอให้เกิดการรวมตัวของสารลดแรงตึงผิวอยู่ในรูปของไมเซลล์ดังรูปที่ 2.1ข



(ก)



(ข)

รูปที่ 2.1 โครงสร้างทั่วไปของสารลดแรงตึงผิวและสมบัติการลดแรงตึงผิว (ก) และ แรงระหว่างผิวของสารลดแรงตึงผิวเมื่อมีปริมาณมากขึ้น (ข) (Pacwa-Plociniczak และคณะ, 2011)

ในปัจจุบันสารลดแรงตึงผิวมีบทบาทสำคัญและนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย ทั้งด้านอุตสาหกรรม การเกษตร รวมถึงกิจกรรมภายในครัวเรือน ซึ่งมีความต้องการใช้และการนำไปใช้ใน

ปริมาณมาก ซึ่งเป็นสาเหตุให้พบสารลดแรงตึงผิวตกค้างในสิ่งแวดล้อม เนื่องด้วยสารลดแรงตึงผิวที่ใช้ส่วนใหญ่เป็นสารลดแรงตึงผิวทางเคมีซึ่งย่อยสลายเองตามธรรมชาติได้ยาก เพื่อเป็นการแก้ไขปัญหาดังกล่าว จึงเกิดความสนใจในการศึกษาสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เนื่องจากมีสมบัติทางกายภาพที่หลากหลาย มีประสิทธิภาพในการทำงานได้หลายสภาวะ และมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับสารลดแรงตึงผิวเคมี นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม สามารถย่อยสลายได้และมีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตต่ำ และมีสมบัติต่างๆที่มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับสารลดแรงตึงผิวทางเคมี ทั้งความสามารถในการกระจายน้ำมัน การก่ออิมัลชัน มีฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ จึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับงานด้านต่างๆ เช่น การบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนน้ำมัน อุตสาหกรรมอาหาร ยา และเครื่องสำอาง การแพทย์ใช้เป็นสารต้านไวรัส สารต้านมะเร็ง ด้านการเกษตร สามารถใช้เป็นสารควบคุมทางชีวภาพ คือสารยับยั้งการเจริญของศัตรูพืชทางการเกษตร (Geys และคณะ, 2014) ทั้งยังมีบทบาทในการเพิ่มการเก็บเกี่ยวน้ำมัน

2.2 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพเป็นสารประกอบทางชีวภาพซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นทางการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ได้แก่ ยีสต์ ราสายใย และแบคทีเรีย สามารถพบได้ในรูปของสารที่ผลิตสู่ภายนอกเซลล์ หรือสารประกอบที่ยึดเกาะอยู่บริเวณผิวเซลล์ (Rahman และ Gakpe, 2008) มีโครงสร้างที่หลากหลายในธรรมชาติ มีสมบัติเป็นสารประเภทแอมฟิฟิลิก กล่าวได้ว่า ส่วนประกอบของสารลดแรงตึงผิวแบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนที่หนึ่งคือส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic head) ได้แก่ น้ำตาล คาร์โบไฮเดรต ฟอสเฟต เปปไทด์ กรดคาร์บอกซิลิก พอลิแซ็กคาไรด์ และแอลกอฮอล์ สำหรับส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic tail) ได้แก่ กรดไขมัน (มีส่วนประกอบของคาร์บอนอะตอมตั้งแต่ 8-22 อะตอม โดยที่โครงสร้างเป็นได้ทั้งเป็นเส้นตรงและแบบกึ่ง) ผลิตได้จากจุลินทรีย์ที่ประเภทที่ก่อโรคและไม่ก่อโรค (Uzoigwe และคณะ, 2015) สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพนั้นสามารถเป็นประเภทตามองค์ประกอบได้ดังนี้ คือ 1) ลิโปเปปไทด์ 2) กรดไขมัน 3) ฟอสโฟลิพิด 4) สารประกอบพอลิเมอร์ และ 5) ไกลโคลิพิด และในแต่ละประเภทของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ นั้นสามารถแบ่งออกได้ ตามโครงสร้าง ตามประเภทของสารประกอบต่างๆ ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละชนิดสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้แตกต่างกันไป และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแต่ละชนิดสามารถผลิตได้จากหลายสายพันธุ์จุลินทรีย์ดังตารางที่ 2.1

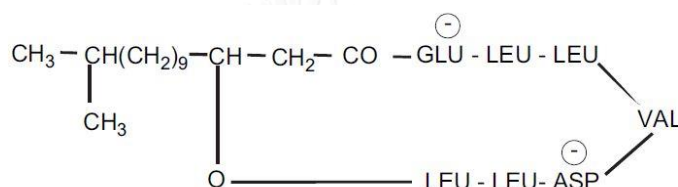
ตารางที่ 2.1 ประเภทของสารลดแรงตึงผิวชนิดต่างๆที่จุลินทรีย์สามารถผลิตได้ (Mulligan, 2005, Rahman และ Gakpe, 2008, Uzoigwe และคณะ, 2015)

ประเภทสารลดแรงตึงผิว	จุลินทรีย์ที่ผลิต
ไกลโคลิพิด	<i>Alcanivorax borkumensis</i> , <i>Arthrobacter</i> sp. <i>Corynebacterium</i> sp., <i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Serratia marcescens</i> , <i>Tsukamurella</i> sp. <i>Streptococcus thermophilus</i> A <i>Lactococcus lactis</i> 53, <i>Lactobacillus delbrueckii</i>
เทอร์ฮาโลลิพิด	<i>Arthrobacter paraffineus</i> , <i>Corynebacterium</i> sp. <i>Mycobacterium</i> sp., <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Nocardia</i> sp.
แรมโนลิพิด	<i>Rhodococcus ruber</i> Z25 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Serratia rubidea</i> , <i>Enterobacter asburiae</i> , <i>Thermus</i>
ไซโทโรลิพิด	<i>aquaticus</i> <i>Tetragenococcus koreensis</i> , <i>Meiothermus ruber</i>
เซลโลไบโอสลิพิด	<i>Candida apicola</i> , <i>Candida bombicola</i>
เซอเฟกติน	<i>Candida lipolytica</i> , <i>Candida bogoriensis</i>
ฟอสโพลีพิด	<i>Ustilago maydis</i>
กรดไขมัน	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus pumilus</i> <i>Acinetobacter</i> sp., <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Capnocytophaga</i> sp., <i>Penicillium spiculisporum</i>
ลิโปเปปไทด์	<i>Corynebacterium lepus</i> , <i>Arthrobacter paraffineus</i> <i>Talaromyces trachyspermus</i> , <i>Nocardia erythropolis</i> <i>Serratia marcescens</i> , <i>Inquilingus limosus</i> KB3 <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Selenomonas ruminantium</i> <i>Brevibacterium aureum</i> MSA13 <i>Corynebacterium kutschri</i>

2.2.1 ชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแบ่งชนิดโครงสร้าง

2.2.1.1 ลิโปเปปไทด์

สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มของลิโปเปปไทด์ ได้แก่ *Bacillus* sp. และ *Pseudomonas* sp. โครงสร้างทางเคมีประกอบด้วย เปปไทด์สายสั้นเป็นได้ทั้งเส้นตรงและเชื่อมต่อกันเป็นวง ซึ่งสายเปปไทด์เชื่อมต่อกับกรดไขมัน (Geys และคณะ, 2014) สารลดแรงตึงผิวลิโปเปปไทด์ เช่น เซอเฟกติน มีส่วนประกอบอะมิโน 7 โมเลกุลต่อกับกรดไขมัน ดังรูปที่ 2.2 โดยส่วนใหญ่สารลดแรงตึงผิวลิโปเปปไทด์นั้นจะมีฤทธิ์เป็นสารต้านการเจริญของจุลินทรีย์ การสังเคราะห์ลิโปเปปไทด์จะใช้การควบคุมการสังเคราะห์ด้วยเอนไซม์ในกลุ่มสังเคราะห์เปปไทด์แบบไม่ใช้ไรโบโซม (Nonribosomal peptide synthase, NRPS) (Geys และคณะ, 2014)



รูปที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเซอเฟกตินที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* (Mulligan, 2005)

2.2.1.2 ฟอสโฟลิพิด

ฟอสโฟลิพิดเป็นส่วนประกอบหลักของเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ เมื่อเลี้ยงจุลินทรีย์ที่สามารถใช้สารจำพวกไฮโดรคาร์บอนเป็นสารตั้งต้น ทำให้ปริมาณของฟอสโฟลิพิดของเซลล์จะมีเพิ่มมากขึ้น และอยู่ในรูปเวสิเคิลของ Phosphatidylethanolamine ซึ่งพบว่ามีแรงระหว่างผิวมีค่าต่ำ (Rahman และ Gakpe, 2008) โดยตัวอย่างจุลินทรีย์ที่ผลิตได้แก่ *Acinetobacter* sp. และ *Klebsiella pneumonia* (Mulligan, 2005, Uzoigwe และคณะ, 2015)

2.2.1.3 กรดไขมัน

กรดไขมันเกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของแอลเคน (สายตรงและสายกิ่ง) ซึ่งมีสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิวได้ ตัวอย่างเช่น Corynomucolic acids (Rahman และ Gakpe, 2008) และโดยส่วนใหญ่กรดไขมันที่ให้ค่าแรงตึงผิวและแรงระหว่างผิวที่ต่ำคือ กรดไขมันอิ่มตัวที่มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 12-14 อะตอม จุลินทรีย์ที่ผลิตได้แก่ *Capnocytophaga* sp. *Corynebacterium lepus* และ *Norcadia erythropolis* (Mulligan, 2005, Uzoigwe และคณะ, 2015)

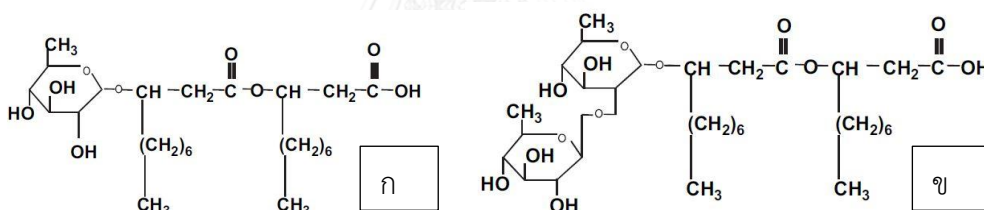
2.2.1.4 สารประกอบพอลิเมอร์

สารประกอบพอลิเมอร์เป็นสารประกอบทางชีวภาพที่มีสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิวที่ส่วนใหญ่ประกอบด้วยหน่วยของน้ำตาลและโปรตีน ได้แก่ อิมัลแซน จาก *Acinetobacter*

calcoaceticus RAG-1 ส่วนประกอบของน้ำตาลลิโพแซนจาก *Candida lipolytica* แมนโนโปรตีนจาก *Saccharomyces cerevisiae* และสารประกอบระหว่างพอลิแซ็กคาไรด์กับโปรตีน (Rahman และ Gakpe, 2008) ประโยชน์ส่วนใหญ่ใช้เป็นสารก่ออิมัลชันในอาหารได้แก่ ไบโอดีสเปอแซนและอะลาแซน เป็นต้น

2.2.1.5 ไกลโคลิพิด

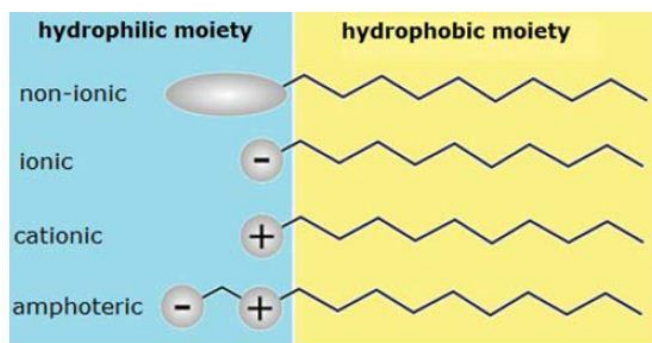
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพไกลโคลิพิด เป็นสารประกอบจากน้ำตาลและไขมัน โดยโครงสร้างของน้ำตาลสามารถประกอบได้จากน้ำตาลตั้งแต่ 1-4 โมเลกุล (Rahman และ Gakpe, 2008) ดังแสดงในรูปที่ 2.3 น้ำตาลแรมโนส 1 และ 2 โมเลกุลที่เป็นส่วนประกอบของแรมโนลิพิด น้ำตาลส่วนใหญ่ที่พบได้แก่ กลูโคส แมนโนส กาแลกโตส กรดกลูคูโรนิก แรมโนส และกาแลกโตสซัลเฟส (Rahman และ Gakpe, 2008) และในส่วนของกรดไขมันนั้นส่วนใหญ่จะมีของสร้างของไขมันที่เหมือนกับฟอสโฟลิพิดของแต่ละสายพันธุ์จุลินทรีย์ (Mnif และ Ghribi, 2016) ซึ่งเป็นได้ทั้งไฮโดรคาร์บอนสายยาว และไฮโดรคาร์บอนที่มีหมู่คาร์บอกซิล โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มของไกลโคลิพิดที่เป็นที่รู้จัก ได้แก่ แรมโนลิพิด ซอพอโรลิพิด เทรฮาโลลิพิด เป็นต้น (Rahman และ Gakpe, 2008)



รูปที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแรมโนลิพิดที่มีโครงสร้างของส่วนที่ละลายน้ำได้ต่างกัน (ก) น้ำตาลแรมโนส 1 โมเลกุล และ (ข) น้ำตาลแรมโนส 2 โมเลกุล (Mulligan, 2005)

2.2.2 ชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่แบ่งตามสภาพขั้ว

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพนอกจากการแบ่งประเภทตามองค์ประกอบโครงสร้าง สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถแบ่งประเภทได้ตามสภาพขั้วของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ นั่นคือ ประจุลบ (anionic), ประจุกลาง (non-ionic) ประจุบวก (cationic) (Van Hamme และคณะ, 2006) และแอมโฟเทอริกหรือมีทั้งประจุบวกและลบ ดังแสดงในรูปที่ 2.4 ซึ่งการแบ่งประเภทตามสภาพขั้วทำให้ทราบถึงประจุของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิด ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการนำไปประยุกต์ใช้ เช่น การเติมสารละลายที่มีสภาพขั้วตรงข้ามกับสารลดแรงตึงผิวเพิ่มเพิ่มประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ หรือเติมสารลดแรงตึงผิวต่างชนิดที่มีสภาพขั้วต่างกันเพื่อใช้เป็นสารเพิ่มประสิทธิภาพ และใช้ความเป็นประจุของสารลดแรงตึงผิวในการจับกับไอออนของโลหะหนักที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม (Rizzo และคณะ, 2015)



รูปที่ 2.4 โครงสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สภาพประจุต่างๆ (Campos และคณะ, 2013)

2.2.3 ชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแบ่งตามน้ำหนักโมเลกุล

รวมถึงการแบ่งประเภทตามน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight, MW) แบ่งได้เป็นสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่มีมวลโมเลกุลต่ำ เช่น โกลโคลิพิด แรมโนลิพิด และ ลิโปเปปไทด์ ส่วนสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่มีมวลโมเลกุลสูงนั้น เช่น แอมฟิฟาทิกพอลิแซ็กคาไรด์ ลิพอพอลิแซ็กคาไรด์ และลิโปโปรตีน (Van Hamme และคณะ, 2006) โดยแต่ละชนิดสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์ดังแสดงในตารางที่ 2.2 ขนาดโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยทั่วไปมีขนาดตั้งแต่ 500-1500 ดาลตัน สมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีมวลโมเลกุลต่ำนั้นจะมีประสิทธิภาพของสมบัติในการลดแรงตึงผิวที่ดีกว่า คือให้ค่าแรงตึงผิวและแรงระหว่างผิวที่ต่ำ (Van Hamme และคณะ, 2006) ส่วนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีมวลโมเลกุลสูงนั้นส่วนใหญ่นิยมใช้เป็นสารกระจายคราบหรือใช้เป็นตัวทำอิมัลชันในอุตสาหกรรมอาหาร (Rahman และ Gakpe, 2008)

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดต่างๆ ตามน้ำหนักรวมโมเลกุล (Van Hamme และคณะ, 2006)

ประเภทตามมวลโมเลกุล	ชนิดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	จุลินทรีย์ที่ผลิต
มวลโมเลกุลต่ำ	แรมโนลิพิท	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	โซฟอโรลิพิท	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
	เซลโลไบโอสลิพิท	<i>Ustilago maydis</i>
	ลิโปเปปไทด์	<i>Bacillus subtilis</i>
	ฟอสโฟลิพิท	<i>Acinetobacter</i>
มวลโมเลกุลสูง	อะลาแซน	<i>A. radioresistens</i>
	อีมีลแซน	<i>A. calcoacetucus</i>
	ลิโปแซน	<i>Candida lipolytica</i>

2.2.4 สมบัติของสารลดแรงตึงผิว

2.2.4.1 ค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์ (Critical micelle concentration, CMC)

ค่าความเข้มข้นเริ่มต้นที่ก่อในการการรวมตัวเป็นไมเซลล์ ที่ค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์ จะเป็นค่าที่ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ทำให้ได้ค่าแรงตึงผิวลดลงต่ำที่สุด ซึ่งเป็นกลไกหนึ่งซึ่งช่วยให้สามารถกำจัดสารที่ไม่ละลายน้ำได้ โดยค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์สามารถเปลี่ยนแปลงได้ หากความยาวของกรดไขมันในส่วนที่ไม่ละลายน้ำของสารลดแรงตึงผิวมีความยาว (จำนวนคาร์บอน) เพิ่มขึ้นจะทำให้มีค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์ลดลง (Mnif และ Ghribi, 2015) และหากเพิ่มในส่วนของกิ่งคาร์บอนหรือพันธะคู่ระหว่างคาร์บอนในกรดไขมันจะช่วยทำให้ค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวนั้นมีค่าลดลง (Mnif และ Ghribi, 2015) นอกจากนั้นค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์สามารถลดลงได้จากความเข้มข้นของไอออนที่สามารถช่วยลดแรงผลักระหว่างส่วนที่ชอบน้ำของสารลดแรงตึงผิวเพิ่มขึ้นสามารถช่วยให้สารลดแรงตึงผิวมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Mnif และ Ghribi, 2015)

2.2.4.2 ความเสถียรต่ออุณหภูมิ ความเป็นกรดเบสและความเข้มข้นประจุ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถประยุกต์ใช้ได้กับงานด้านต่างๆ เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมได้ในช่วงกว้าง ทั้งอุณหภูมิที่สูงและต่ำ ค่าความเป็นกรดเบสในช่วงกว้าง รวมถึงสามารถทนต่อสภาพที่มีความเข้มข้นของสารละลายที่สูงได้ (Mnif และ Ghribi,

2015) โดยสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเมื่ออยู่ในสภาวะดังกล่าวนี้ยังสามารถลดค่าแรงตึงผิวและหรือแรงระหว่างผิวได้ดั้งเดิม เช่น การประยุกต์ในอุตสาหกรรมอาหารที่ผ่านกระบวนการความร้อนสูง สมบัติการก่อกอิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นยังคงมีอยู่ รวมถึงการใช้ในการกระจายคราบน้ำมันและเพิ่มผลผลิตการเก็บเกี่ยวน้ำมันซึ่งมีความร้อนและปริมาณเกลือที่สูง ผลของการใช้สารลดแรงตึงผิวก็ยังคงมีประสิทธิภาพ

2.2.4.3 ความเป็นพิษต่ำ

จากประโยชน์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้กับงานทางด้าน การแพทย์ อาหาร และการเกษตร ซึ่งเป็นงานที่ส่งผลต่อเซลล์มนุษย์ สัตว์และพืช จึงต่อระมัดระวังด้านความปลอดภัยที่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะส่งผลต่อเซลล์สิ่งมีชีวิตต่างๆ พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่าสารลดแรงตึงผิวเคมี เช่น Triton-x, CTAB, TTAB, BC และ SDS เป็นต้น (Mnif และ Ghribi, 2015) โดยสามารถนำมาใช้กับงานทางด้านสิ่งแวดล้อมได้ โดยไม่ส่งผลกระทบต่อการพัฒนาของตัวอ่อนกุ้งและปลาที่ใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาการเป็นพิษของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อสัตว์ทะเล (Mnif และ Ghribi, 2015) อีกทั้งงานทางด้านเกษตรที่ใช้สารลดแรงตึงผิวในการด้านการเจริญของตัวอ่อนแมลงศัตรูพืช แต่ไม่ส่งผลกระทบต่อการงอกของเมล็ดพืช รวมถึงการนำมาทดลองเป็นสารต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค สารต้านมะเร็ง สารต้านไวรัส ทั้งแบบในหลอดทดลองและในสิ่งมีชีวิตทดลอง (Mnif และ Ghribi, 2015) ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นมีฤทธิ์ต่างๆ และไม่ทำลายเซลล์ของพืชและสัตว์

2.2.4.4 สามารถย่อยสลายได้

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากจุลินทรีย์นั้นสามารถย่อยสลายได้ง่าย ซึ่งต่างจากสารลดแรงตึงผิวเคมี เมื่อเปรียบเทียบการย่อยสลายทั้งในภาวะที่มีอากาศและภาวะที่ไม่มีอากาศ โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นสามารถย่อยได้ทั้ง 2 ภาวะ (Mnif และ Ghribi, 2015) ส่วนสารลดแรงตึงผิวทางเคมีนั้นย่อยสลายได้เล็กน้อยในภาวะที่มีอากาศ ส่วนภาวะที่ไม่มีอากาศไม่สามารถย่อยสลายได้ภายในระยะเวลามากกว่า 8 วัน

2.3 การคัดแยกและสมบัติที่ใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

จากความสำคัญและสมบัติของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่เป็นผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ การคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จึงเป็นการศึกษาเริ่มต้นของงานวิจัยที่ประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในงานด้านต่างๆ การคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นสิ่งที่พึงคำนึงถึงได้แก่ แหล่งที่มาของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิว เทคนิคการแยกจุลินทรีย์ และเทคนิคการวัดประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Mnif และ Ghribi, 2015) เพื่อค้นหาสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงและค้นหาสายพันธุ์ที่สามารถให้ผลผลิตสูง

2.3.1 แหล่งที่มาของจุลินทรีย์ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

จากงานวิจัยการคัดแยกจุลินทรีย์และผลิตสารลดแรงตึงผิวส่วนใหญ่ คัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากแหล่งปนเปื้อนน้ำมันทั้งน้ำมันปิโตรเลียม น้ำมันพืช รวมถึงแหล่งปนเปื้อนโลหะหนักและสารเคมีไม่ละลายน้ำอื่นๆ (Cai และคณะ, 2014) ซึ่งคาดว่าจุลินทรีย์เหล่านั้นที่สามารถเจริญอยู่ในสภาพปนเปื้อนนั้นได้ แสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการอยู่รอด นั่นคือสามารถนำสิ่งปนเปื้อนมาใช้ในการเจริญได้ ซึ่งจำเป็นต้องมีสารที่ช่วยในสามารถนำสารปนเปื้อนเข้าสู่เซลล์นั่นคือ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ต่อมาเมื่อมีเทคนิคการเลี้ยงจุลินทรีย์และการคัดแยกจุลินทรีย์ที่ดีขึ้นแหล่งที่มาของจุลินทรีย์จึงเป็นบริเวณทั่วไปในธรรมชาติ ทั้งในดินที่อุดมสมบูรณ์ น้ำทะเล ตะกอนดินแม่น้ำ และแหล่งอื่นๆ (Khondee และคณะ, 2015, Mousavi และคณะ, 2015, Mohanram และคณะ, 2016) ตามตัวอย่างงานวิจัยในตารางที่ 2.3 ที่ได้คัดเลือกจุลินทรีย์จากธรรมชาติทั่วไปและที่มีสิ่งปนเปื้อน

2.3.2 เทคนิคการคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

โดยทั่วไปการคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนิยมใช้การวัดค่าทางกายภาพที่เป็นผลมาจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยตรงนั่นคือ ความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิวจากเครื่องวัดแรงตึงผิวด้วยวิธีวงแหวนดูนอย du-Nouy ring, stalagmometric method และ wilhelmy plate (Mohanram และคณะ, 2016) และ วัดแรงระหว่างผิวด้วยเทคนิคและ axisymmetric drop shape analysis (Mnif และ Ghribi, 2015) ดังตารางที่ 2.3 ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและนิยมใช้ต่อการวัดผลซึ่งวัดได้ทั้งปริมาณและคุณภาพ และใช้ความสามารถในการละลายของเซลล์ในสารไม่ละลายน้ำ โดยเซลล์จุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชนิดติดอยู่กับผิวเซลล์จะมีค่า hydrophobicity สูง แต่ถ้าผลิตสารลดแรงตึงผิวชนิดปล่อยออกภายนอกเซลล์เซลล์ จะมีค่า hydrophobicity ต่ำ ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้เพียงเบื้องต้น (Mnif และ Ghribi, 2015) มีวิธีทดสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวจากการทดสอบสมบัติของสารลดแรงตึงผิวเพื่อใช้คัดแยกจุลินทรีย์ในปริมาณมาก เช่น การกระจายน้ำมันและการก่ออิมัลชันของน้ำเลี้ยงเซลล์ เป็นต้น โดยปริมาณของสารลดแรงตึงผิว

ที่เพิ่มมากขึ้นหรือขึ้นกับประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชนิดนั้น (Mnif และ Ghribi, 2015) ซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถวัดค่าได้ง่ายและรวดเร็ว เหมาะแก่การคัดแยกจุลินทรีย์ให้ได้ปริมาณมากแต่บอกได้เพียงข้อมูลเชิงคุณภาพเท่านั้น นอกจากนี้มีวิธีการคัดแยกโดยใช้เทคนิคที่จำเพาะต่อการทดสอบจุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเฉพาะกลุ่ม เช่น blue agar plate method จะให้ผลเฉพาะสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มไกลโคลิพิทและสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประจุเป็นลบเท่านั้น (Mnif และ Ghribi, 2015) และ Blood agar method สามารถใช้ตรวจสอบสารลดแรงตึงผิวได้ (Mohanram และคณะ, 2016) ซึ่งเป็นเทคนิคที่พัฒนามาเพื่อง่ายต่อการวิเคราะห์การผลิตสารลดแรงตึงผิวในเบื้องต้น

ตารางที่ 2.3 การศึกษาการคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิว	จุลินทรีย์ที่ผลิต	แหล่งที่คัดแยก	วิธีการคัดแยก	อ้างอิง
ไกลโคลิพิท	<i>Gordonia</i> sp. M22, BS25 และ BS29	ดินปนเปื้อน น้ำมันดีเซล	- วัดแรงตึงผิวด้วยวิธีวงแหวน	Franzetti และคณะ, 2009
ลิโปเปปไทด์	<i>Bacillus</i> sp. GY19	ดิน ปุ๋ย	- วัดแรงตึงผิวด้วยวิธีเพลท - การก่อกอิมัลชัน	Khondee และคณะ, 2015
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	<i>B. licheniformis</i>	ดินปนเปื้อน น้ำมันและ โลหะหนัก	- การก่อกอิมัลชัน - วัดค่าแรงตึงผิว	Liu และคณะ, 2016
Sophorolipid	<i>Lachancea thermotolerans</i> BBMCZ7FA20	น้ำผึ้ง	- การแตกตัวเม็ดเลือดแดง - การกระจายน้ำมัน	Mousavi และคณะ, 2015
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	<i>Joostella</i> strain A8	น้ำมันดิบ	- การก่อกอิมัลชัน - วัดค่าแรงตึงผิว	Rizzo และคณะ, 2015
ไกลโคลิพิท	<i>Rouxiella</i> sp. DSM 100043	พีท ดิน	- วัดค่าแรงตึงผิว	Kugler และคณะ, 2015

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

การศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวนั้นมุ่งเน้นศึกษาเพื่อที่จะพัฒนาการผลิตให้มีปริมาณของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สูง เพื่อให้เพียงพอต่อการนำมาใช้งานในด้านต่างๆ

2.4.1. สายพันธุ์จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ บางสายพันธุ์สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวที่มีสมบัติที่ดี แต่มีความสามารถในการผลิตสารได้ในปริมาณต่ำ จึงมีการปรับปรุงและพัฒนาสายพันธุ์ วิธีการปรับปรุงสายพันธุ์สามารถทำได้ทั้งการตัดต่อพันธุกรรม การกลายพันธุ์ กระตุ้นกระบวนการผลิตโดยการเหนี่ยวนำ โดยมีงานวิจัยที่สนใจการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ ด้วยวิธีที่หลากหลาย เช่น การกลายพันธุ์แบบสุ่มด้วยสารเหนี่ยวนำการกลายพันธุ์ และการตัดต่อพันธุกรรมของยีนที่เกี่ยวข้องหรือสนับสนุนการผลิตสารลดแรงตึงผิว เป็นต้น ดังตารางที่ 2.4 (Mukherjee และคณะ, 2006)

การศึกษาการปรับปรุงสายพันธุ์ของ *Gordonia amarae* โดยการตัดต่อยีน *vgh* ซึ่งควบคุมการแสดงออกของฮีโมโกลบินของ *Vitreoscilla* sp. ภายหลังจากการตัดต่อยีน *vgh* เข้าสู่พลาสมิด pSC160 และถ่ายทอดเข้าสู่ *Gordonia amarae* พบว่า *G. amarae* สายพันธุ์กลายสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด เทรฮาโลสลิพิด และ ไกลโคลิพิด ได้สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม และสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้นั้นมีความเสถียรที่คล้ายกับสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตจากสายพันธุ์ดั้งเดิม นอกจากนี้ยังพบว่าผลการทดลองของทั้งสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายนั้นเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่มีออกซิเจนมากเกินพอ สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้มากกว่าการเลี้ยงในสภาวะกำจัดออกซิเจน จากงานวิจัยนี้สามารถสรุปได้ว่าหากมีการตัดต่อยีน *vgh* และเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนเพียงพอต่อการเจริญ (100 มิลลิลิตรต่อ 200 rpm) โดยใช้ น้ำมันเฮกซะเดคเคน เป็นตัวเหนี่ยวนำและแหล่งคาร์บอนให้เกิดการผลิตสารลดแรงตึงผิว (Dogan และคณะ, 2006)

แต่ข้อด้อยของการใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์กลาย คือ มีความเสถียรของสายพันธุ์ต่ำ ทำให้เกิดการสูญหายของยีนเมื่อมีการตัดต่อพันธุกรรมแบบใช้พลาสมิด และเกิดการกลายพันธุ์ย้อนกลับในสายพันธุ์ที่ใช้สารเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ เช่น รังสีอัลตราไวโอเล็ต เป็นต้น (O'Sullivan และคณะ 2006) จากข้อด้อยดังกล่าวเป็นสิ่งที่สำคัญมากในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เนื่องจากการขยายขนาดการผลิตและการพัฒนาระบบการผลิตให้ได้ปริมาณสารลดแรงตึงผิวในระดับสูง จำเป็นต้องมีการเลี้ยงจุลินทรีย์เป็นเวลานานและมีการนำกลับมาใช้ใหม่ ซึ่งหากสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตไม่มีความเสถียรจะส่งผลเสียต่อกระบวนการผลิตต่อไป ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจพัฒนาการผลิตสารลดแรงตึงผิวเพื่อใช้เป็นต้นแบบสำหรับจุลินทรีย์ทั่วไป ซึ่งการตัดต่อยีนนั้นเหมาะสำหรับการ

พัฒนาที่ทราบรายละเอียดที่แน่ชัด ที่สามารถส่งเสริมการส่งออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ตารางที่ 2.4 จุลินทรีย์สายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (สรุปจาก Mukherjee และคณะ, 2006)

สายพันธุ์กลาย	ชนิดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	ปริมาณหรือประสิทธิภาพ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ เพิ่มขึ้น
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 59C7	Transposon Tn5-GM เหนี่ยวนำ การกลายพันธุ์ของ <i>P. aeruginosa</i> PG201	เพิ่มขึ้น 2 เท่า
<i>B. subtilis</i> ATCC 55033	กลายพันธุ์แบบสุ่มโดยใช้ N- methyl-N0-nitro- Nnitrosoguanidine	เพิ่มขึ้น 4-6 เท่า (2-4 g/L)
<i>B. subtilis</i> Suf-1	กลายพันธุ์แบบสุ่มโดยใช้รังสีอัลตรา ไวโอเล็ตใน <i>B. subtilis</i> ATCC 21332	เพิ่มขึ้น 3-4 เท่า
Recombinant <i>B. subtilis</i> MI 113	ใส่พลาสมิดที่มียีน <i>lpa-14</i>	เพิ่มขึ้น 8 เท่า
Recombinant <i>Gordonia Amarae</i>	เพิ่มยีน <i>Vitreoscilla hemoglobin</i> (<i>vgb</i>) โดยอาศัยพลาสมิด	เพิ่มขึ้น 4 เท่า

2.4.2 สถานะในการผลิตสารลดแรงตึงผิว

2.4.2.1 เทคนิคการเลี้ยงเซลล์

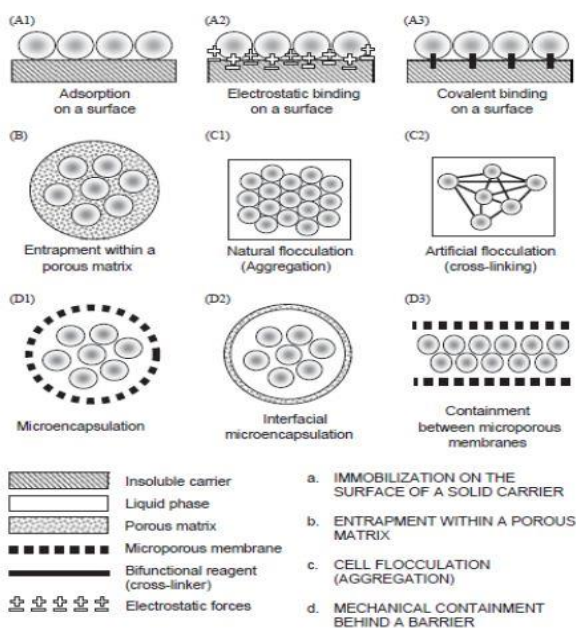
2.4.2.1.1 เลี้ยงเซลล์แบบเซลล์อิสระ

โดยทั่วไปการเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตสารทางชีวภาพจะเลี้ยงจุลินทรีย์ในรูปของเซลล์อิสระ สามารถเลี้ยงจุลินทรีย์ได้ทั้งในระดับขวดเขย่าและระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ซึ่งเป็นการเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ง่ายต่อการผลิต และให้ข้อมูลพื้นฐานเพื่อนำมาให้พัฒนาการผลิตต่อไป

2.4.2.1.2 เลี้ยงเซลล์แบบเซลล์ตรึง

การตรึงเซลล์เป็นเทคนิคการเลี้ยงเซลล์จุลินทรีย์อีกรูปแบบหนึ่ง โดยเลี้ยงเซลล์ให้เจริญอยู่กับวัสดุตรึง เป็นบริเวณที่ทำให้เซลล์รักษาสมบัติบางอย่างไว้ การเจริญในบริเวณดังกล่าวส่งผลให้เซลล์ได้รับการป้องกันจากเซลล์ที่เจริญเป็นกลุ่มเซลล์ ทำให้เซลล์มีการรักษาสภาพและสามารถอยู่รอด นอกจากนั้นจุลินทรีย์ที่เจริญแบบกลุ่มกับวัสดุตรึงยังความสามารถให้การผลิตสารหรือสลายสารที่ต้องการได้ดี (Hou และคณะ, 2013) เทคนิคการตรึงเซลล์สามารถแบ่งย่อยออกเป็น 2 ลักษณะ ดังรูปที่ 2.5 คือ จุลินทรีย์ยึดเกาะบนผิววัสดุตรึง ได้แก่ เกาะพื้นผิว สร้างพันธะโควาเลนต์ สร้างพันธะจากสภาพขั้ว และจุลินทรีย์เจริญในวัสดุตรึง ได้แก่ เจริญในวัสดุที่มีรูพรุน ได้แก่ ฟองน้ำ เซรามิก ซิลิกอนคาร์ไบด์ โฟมพอลิยูรีเทน และอื่นๆ เจริญภายในเนื้อวัสดุตรึงที่เป็นรูพรุนของเนื้อเจล ได้แก่ แอลจิแนน คาราจีแนน เจลาติน เป็นต้น (Perez-Bibbins และคณะ, 2016) ซึ่งวัสดุตรึงที่ใช้ส่วนใหญ่จะไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ราคาถูก หาได้ง่าย ทนต่อสภาวะต่างๆในสิ่งแวดล้อม สามารถควบคุมได้ง่ายในการผลิต สามารถป้องกันเซลล์เพิ่มให้เซลล์มีระยะเวลาการใช้งานมากขึ้น เพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต และได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความเสถียร นอกจากการเพิ่มผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์หรือการเพิ่มอัตราการสลายสาร การตรึงเซลล์สามารถลดราคาเวลาการผลิตและต้นทุนการผลิต เนื่องจากเซลล์ตรึงนั้นสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้ (Kourkoutas และคณะ, 2004) ซึ่งมีงานวิจัยได้นำวัสดุตรึงชนิดต่างๆใช้สำหรับการตรึงเซลล์เพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพดังตารางที่ 2.5

การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในงานวิจัยนี้เลือกการพัฒนาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยแบคทีเรียตรึงบนไคโตซานที่ผลิตจากแกนปลาหมึกบด ดังในงานวิจัยของ Khondee และคณะ, (2012) ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ดีกว่า ไคโตซานจากเปลือกปู และเปลือกกุ้ง นอกจากการเพิ่มปริมาณการผลิตแล้วการใช้เซลล์ตรึงยังสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ ซึ่งเป็นการลดต้นทุนการผลิตแนวทางหนึ่ง



รูปที่ 2.5 เทคนิคการตรึงเซลล์ (Kourkoutas และคณะ, 2004)

ตารางที่ 2.5 เทคนิคการตรึงเซลล์ด้วยวัสดุตรึงชนิดต่างๆ

เทคนิคการตรึงเซลล์	วัสดุตรึง	สารผลิตภัณฑ์	อ้างอิง
ยึดเกาะพื้นผิววัสดุตรึง	โคโตซาน	ลิโพเปปไทด์	(Khondee และคณะ, 2012)
ตรึงในวัสดุตรึง	อัลจิเนต	แรมโนลิพิด	(Abouseoud และคณะ, 2007)
ยึดเกาะพื้นผิววัสดุตรึง	ถ่านกัมมันต์	เซอร์แฟคติน	(Yeh และคณะ, 2006)
ตรึงในวัสดุตรึง	โครโอเจล	แรมโนลิพิด	(Christovaa และคณะ, 2013)

2.4.2.2 ปัจจัยทางกายภาพของสิ่งแวดล้อม

ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมเป็นสาเหตุสำคัญอย่างหนึ่งที่ส่งผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยปัจจัยที่สำคัญที่ส่งผลต่อการผลิตได้แก่ อุณหภูมิ ความเป็นกรดเบส ปริมาณอากาศหรืออัตราการกวนผสม โดยจะต้องมีค่าที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตของสารลดแรงตึงผิว ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 25-30 องศาเซลเซียส ค่า pH อยู่ระหว่าง 7-8 (Fakruddin, 2012) ส่วนอัตราการให้อากาศและการกวนผสมจะช่วยให้ออกซิเจนในอากาศสามารถละลายลงสู่อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์

ซึ่งมีผลต่อการเกิดฟองของอาหารและส่งผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยผลของอากาศที่ทำให้จะมีผลส่งการเจริญของจุลินทรีย์และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Yao และคณะ, 2015)

2.4.3 สารอาหารที่เป็นส่วนประกอบของอาหาร

ปัจจัยสำคัญอีกอย่างหนึ่งของการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้น คือ องค์ประกอบภายในอาหาร ทั้งปริมาณสารอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน แร่ธาตุที่มีส่วนช่วยในการเจริญที่ทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ต่างๆของเซลล์ นอกจากนี้ยังมีสารที่ช่วยเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เช่น น้ำมันพืชหรือน้ำมันปิโตรเลียม ซึ่งจุลินทรีย์ยังใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้อีกด้วย จากการศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพพบว่าการเลี้ยงจุลินทรีย์ด้วยสารอาหารที่มีไนโตรเจนในปริมาณจำกัด สามารถเหนี่ยวนำให้จุลินทรีย์เข้าสู่วิถีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมากขึ้น (Raza และคณะ, 2006)

สำหรับแหล่งคาร์บอนสามารถนำมาใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวนั้นมีหลากหลายประเภท ดังแสดงในตารางที่ 2.6 แต่สามารถแบ่งประเภทใหญ่ๆเป็น 2 ประเภทคือ แหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำ และแหล่งคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำ (Rahman และ Gakpe, 2008) โดยบทบาทของแหล่งคาร์บอนทั้งสองจะแตกต่างกันออกไปคือ คาร์บอนที่ละลายน้ำ เช่น กลูโคส ช่วยในการเพิ่มปริมาณเซลล์ ส่วนคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำ ได้แก่ สารประกอบไฮโดรคาร์บอนต่างๆ ช่วยเหนี่ยวนำให้เซลล์ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพรวมถึงใช้เป็นสารตั้งต้นของสารลดแรงตึงผิว โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากแหล่งคาร์บอนจำพวกน้ำมันจะให้ผลผลิตที่สูงกว่าการผลิตโดยใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนเมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนการผลิตต่อปริมาณสารตั้งต้น (Rahman และ Gakpe, 2008) นอกจากนี้ยังสามารถนำน้ำมันที่ใช้แล้ว น้ำทิ้งจากโรงงานที่มีส่วนประกอบของน้ำมัน มาเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ (Banat และคณะ, 2014)

ตารางที่ 2.6 ตัวอย่างแหล่งคาร์บอนที่สามารถนำมาใช้ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

แหล่งคาร์บอน	ชนิดคาร์บอน	จุลินทรีย์	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	อ้างอิง
เฮกซะเดกแคน	ไม่ละลายน้ำ	<i>Rhodococcus</i> spp. MTCC 2574	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	Mutalik และคณะ, 2008
กลีเซอรอลเหลือทิ้ง	ไม่ละลายน้ำ	<i>Bacillus</i> sp.GY19	ลิโปเปปไทด์	Khondee และคณะ, 2015
กลีเซอรอล	ละลายน้ำ	<i>P. aeruginosa</i> EM1	แรมโนลิพิด	Wu และคณะ, 2008
น้ำมันมะกอก	ไม่ละลายน้ำ	<i>P. fluorescens</i> Migula 1895- DSMZ	แรมโนลิพิด	Abouseoud และคณะ, 2007
น้ำมันถั่วเหลือง	ไม่ละลายน้ำ	<i>Candida</i> sp. SY169545	แมนโนซิลอิทธิรทอลลิพิด	Banat และคณะ, 2014
น้ำตาลกลูโคส	ละลายน้ำ	<i>B. licheniformis</i> R2	ลิเซนไนซิน	Joshi และคณะ, 2008
น้ำตาลซูโครส	ละลายน้ำ	<i>Paenibacillus alvei</i> ARN63	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	Najafi และคณะ, 2011
น้ำตาลแมนนิทอล	ละลายน้ำ	<i>Serratia rubidaea</i> SNAU02	ไดแรมโนลิพิด	(Nalini และ Parthasarathi, 2013)

จากการศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพพบว่าการเลี้ยงจุลินทรีย์ด้วยสารอาหารที่มีไนโตรเจนในปริมาณจำกัด สามารถเหนี่ยวนำให้จุลินทรีย์เข้าสู่วิถีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมากขึ้น (Raza และคณะ, 2006) โดยอัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอนและไนโตรเจนในอาหารมีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เหมาะสมอยู่ที่ 10:1- 20:1 และ 10:1-200:1 สำหรับแบคทีเรียและยีสต์ตามลำดับ (Abouseoud และคณะ, 2007 และ Kumar และคณะ, 2012) และจากการศึกษา

Raza และคณะ (2007) พบว่า โซเดียมไนเตรตสามารถเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ให้ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตโดยใช้แอมโมเนียมไนเตรตและแอมโมเนียมซัลเฟต

นอกจากแหล่งสารอาหารแหล่งอย่างคาร์บอนและไนโตรเจนแล้ว จุลินทรีย์ต้องการสารอื่นๆ ซึ่งมีหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ผ่านในเซลล์ ทำให้เซลล์สามารถเจริญหรือผลิตสารที่ต้องการได้ดีขึ้น (Gudina และคณะ, 2015) โดยไอออนของเหล็กและแมงกานีสนั้นเป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ลิโปออกซิจีเนส และไรโบนิวคลีโอไทด์รีดักเทส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ช่วยสร้างไรโบนิวคลีโอไทด์จากดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ ด้วยทำหน้าที่เป็นตัวนำรหัสทางพันธุกรรมไปสังเคราะห์เป็นโปรตีนที่ใช้ในการเจริญต่างๆ งานวิจัยของ Kiran และคณะ (2014) ได้เติมอนุภาคนาโนของเหล็กเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Nocardiopsis* sp. MSA13A พบว่าสามารถใช้ออนุภาคนาโนเหล็กในการเพิ่มปริมาณการผลิตของสารลดแรงตึงผิวได้มากถึง 80% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมอนุภาคนาโน นอกจากนี้ Gudina และคณะ (2015) ได้ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus subtilis* โดยใช้น้ำแช่ข้าวโพดจากโรงงานแป่งข้าวโพด หาปริมาณที่เหมาะสมต่อสารที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตได้แก่ เหล็กซัลเฟต แมกนีเซียมซัลเฟต และแมงกานีสซัลเฟต พบว่าภายหลังการศึกษาสามารถเพิ่มการผลิตสารลดแรงตึงผิวได้เพิ่มขึ้นประมาณ 4 เท่าจากเดิมที่ผลิตได้ 1.3 กรัมต่อลิตร โดยความเข้มข้นของเหล็กซัลเฟต แมกนีเซียมซัลเฟต และแมงกานีสซัลเฟต คือ 2.0 0.8 และ 0.2 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยอื่นที่เติมสารที่เป็นส่วนประกอบของเซลล์เพื่อช่วยเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตสารลดแรงตึงผิวที่สูงขึ้น ดังตัวอย่างงานวิจัยของ (Lee และคณะ, 2005) ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการบำบัดน้ำมันดีเซลโดยใช้ *Gordonia nitida* LE31 ในงานวิจัยนี้ได้เติมสารลดแรงตึงผิวกรดไมโคลิก ซึ่งกรดไมโคลิกนั้นเป็นส่วนประกอบหนึ่งบนผนังเซลล์ของ *Gordonia* sp. จากการทดลองพบว่าเมื่อเติมกรดไมโคลิกไป สามารถกระตุ้นให้เกิดการบำบัดน้ำมันดีเซลได้มากขึ้นจากเดิมคือความเข้มข้นน้ำมันดีเซล มากกว่า 15,000 ppm จากการบำบัดน้ำมันดีเซล ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตออกมามากขึ้น จากงานวิจัยนี้จึงสันนิษฐานว่าการเติมกรดไมโคลิกสามารถช่วยให้การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Gordonia* sp. เพิ่มมากขึ้น

จากการศึกษาองค์ประกอบของอาหารที่ส่งเสริมการผลิตสารลดแรงตึงผิวพบว่าองค์ประกอบที่สำคัญต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพคือปริมาณคาร์บอนและการจำกัดปริมาณไนโตรเจน ได้แก่ น้ำมันถั่วเหลือง (Khondee และคณะ, 2015 และ Luna และคณะ, 2011) และโซเดียมไนเตรต (Abouseoud และคณะ, 2007) โดยมีสารอาหารที่เป็นโคแฟกเตอร์เป็นองค์ประกอบเสริมงานวิจัยนี้จึงเลือกแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่ส่งเสริมการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาศึกษาปริมาณที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณการผลิต ร่วมกับองค์ประกอบที่เป็นโคแฟกเตอร์อย่างเหล็กและแมงกานีส

2.4.3.1 ศึกษาความเข้มข้นอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญ

การหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตมีเทคนิคที่ช่วยให้สามารถหาภาวะที่เหมาะสมได้ คือการออกแบบการทดลอง ซึ่งการออกแบบการทดลองนั้นสามารถทำได้ทั้งแบบ การออกแบบแฟคทอเรียลเต็มรูป (full factorial design) หรือ การออกแบบแฟคทอเรียลแบ่งส่วน (fractional factorial design) ภาวะที่ออกแบบแต่ละชุดการทดลองเกิดจากการจับคู่ระดับต่างๆของแต่ละปัจจัยที่คาดว่า มีผลต่อการผลิต โดยการกำหนดชุดการทดลองจะจับคู่ทุกระดับของแต่ละปัจจัยทุกปัจจัยมาจับคู่ ทำให้มีชุดการทดลองเป็นจำนวนมาก (Bezerra และคณะ, 2008) การวิเคราะห์ผลการทดลองทำให้ทราบว่าคุณสมบัติการทดลองที่ดีที่สุดที่มีผลต่อการผลิต โดยอาศัยการวิเคราะห์ความแตกต่างของผลผลิตตามหลักสถิติ หรือใช้การออกแบบการทดลองแบบที่ใช้สถิติเข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น วิธีการวิเคราะห์การตอบสนองเชิงพื้นผิว (response surface methodology, RSM) ซึ่งเป็นวิธีการออกแบบที่สามารถลดจำนวนชุดการทดลองให้น้อยลง แต่ยังคงครอบคลุมระดับของแต่ละปัจจัย (Bezerra และคณะ, 2008) ทำให้สามารถลดปัญหาด้านต้นทุนในการทดลองได้ นั่นคือประหยัดเวลาการทดลองและต้นทุนในการทดลอง จึงมีผู้วิจัยมากมายได้นำการออกแบบการทดลองดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยด้านการผลิตและการหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารทางชีวภาพ รวมถึงสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ตัวอย่างการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เช่น งานวิจัยของ (Saikia และคณะ, 2012) ได้ใช้ศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ แรมโนลิฟิดจาก *P. aeruginosa* RS29 และ งานวิจัยของ (Abbasi และคณะ, 2013) ได้ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ *P. aeruginosa* MA01 โดยพบว่าสามารถใช้วิธีการออกแบบการวิเคราะห์การตอบสนองเชิงพื้นผิวเข้ามาช่วยเลือกแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่ให้ผลผลิตดีที่สุด และทราบถึงปริมาณของสารอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตที่ให้ปริมาณการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงที่สุด และในงานของ Franzetti ในปี ค.ศ.2009 ได้ศึกษาปัจจัยที่ส่งผลให้การผลิตสารลดแรงตึงผิวของ *Gordonia* sp. BS29 ให้ได้ปริมาณสูงโดยใช้การออกแบบการทดลองแบบแฟคทอเรียลเต็มรูป ในการหาปัจจัยในอาหารที่ส่งผลต่อการผลิต ทำให้ตัดปัจจัยที่ไม่ส่งเสริมการผลิตออก แล้วจึงใช้การออกแบบการทดลองด้วยวิธีการตอบสนองเชิงพื้นผิวเป็นเครื่องมือในการหาสภาวะหรือปริมาณที่เหมาะสมต่อการผลิตสารในปริมาณสูงสุดต่อไป

สำหรับงานวิจัยนี้ได้เริ่มจากการออกแบบการทดลองโดยใช้วิธี One factor at a time ซึ่งเป็นการออกแบบการทดลองที่เข้าใจง่าย เหมาะสำหรับการหาข้อมูลเบื้องต้นของปริมาณสารที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงสุด โดยข้อมูลเบื้องต้นที่ได้สามารถนำมาเป็นตัวกำหนดระดับของปัจจัยสำหรับการออกแบบการทดลองโดยใช้วิธี RSM โดยเลือกทดสอบปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตในเบื้องต้น ซึ่งใช้การออกแบบการทดลองวิธี Plackett-Burman ผลที่ได้สามารถบอกได้ว่าปัจจัยใดไม่

ส่งผลต่อการผลิต จากนั้นนำปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตมาออกแบบการทดลองอีกครั้งด้วย Box-benhken design ซึ่งเป็นการทดลองที่เหมาะสมกับปัจจัยมากกว่า 3 ปัจจัยขึ้นไป และแต่ละปัจจัยมีระดับที่แปรผัน 3 ค่า ซึ่งเป็นวิธีที่ตรงกับองค์ประกอบของอาหารที่วางแผนไว้คือ ปริมาณคาร์บอน ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณเหล็ก และปริมาณแมงกานีส

2.4.3.1.1 การทดลองครั้งละปัจจัย (one factor at a time)

การทดลองทีละปัจจัย คือ การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตที่นิยมใช้ทั่วไป เนื่องจากมีขั้นตอนการศึกษาที่ง่ายสะดวกต่อการทำความเข้าใจในการออกแบบการศึกษา ซึ่งทำให้เข้าใจถึงข้อมูลพื้นฐานของปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิต ทั้งปัจจัยทางกายภาพที่เกี่ยวข้องกับการผลิต ความเข้มข้นขององค์ประกอบอาหาร โดยการแปรผันค่าพารามิเตอร์หนึ่งซึ่งส่งผลต่อการผลิต และกำหนดค่าพารามิเตอร์อื่นเป็นค่าคงที่ แต่วิธีการหาสภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธีการทดลองครั้งละปัจจัยนั้นใช้ระยะเวลาในการศึกษาเป็นเวลานาน เนื่องจากมีชุดการทดลองจำนวนมาก (Bezerra และคณะ, 2008) ส่งผลให้เกิดการลงทุนที่สูงทั้งวัสดุและสารที่ใช้ผลิต อีกเหตุผลหลักคือการศึกษาด้วยวิธีนี้ได้ค่าระดับของพารามิเตอร์ที่ดีที่สุดที่ให้ผลผลิตสูงสุด แต่พารามิเตอร์ที่ศึกษาไม่ได้อธิบายถึงความสัมพันธ์ของแต่ละพารามิเตอร์ จึงมีการพัฒนาการออกแบบการทดลองเพื่อใช้แก้ปัญหาของการใช้วิธีการทดลองครั้งละปัจจัย (Baş และ Boyaci, 2007)

2.4.3.2.2 การออกแบบการทดลอง (design of experiment)

การออกแบบการทดลองอาศัยหลักการการวิเคราะห์การตอบสนองเชิงพื้นผิว เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต เป็นวิธีที่ใช้หลักทางคณิตศาสตร์และสถิติเข้ามาช่วยอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรแต่ละตัวแปรที่มีผลต่อการผลิตสารที่สนใจ และการออกแบบการทดลอง ทำให้สามารถแก้ไขปัญหาจากวิธีการทดลองครั้งละปัจจัย ที่ไม่อธิบายความสัมพันธ์ของแต่ละปัจจัยได้ (Bezerra และคณะ, 2008) โดยการอธิบายความสัมพันธ์ของแต่ละปัจจัยที่ได้จากการวิเคราะห์การตอบสนองเชิงพื้นผิวนั้น จะอธิบายในรูปแบบสมการแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นและสมการความสัมพันธ์กำลังสองที่ได้จากผลการทดลองจากชุดการทดลองที่ออกแบบตามหลักสถิติ (Baş และ Boyaci, 2007) ซึ่งทำให้จำนวนชุดการทดลองลดน้อยลง แต่สามารถอธิบายระดับของตัวแปรได้อย่างครอบคลุม ขั้นตอนของการวิเคราะห์การตอบสนองเชิงพื้นผิว ได้แก่ การคัดเลือกและกลั่นกรองปัจจัยหลักที่ส่งผลในเชิงบวกต่อการผลิต เลือกวิธีการออกแบบการทดลอง ตรวจสอบความสัมพันธ์ของตัวแปรที่วิเคราะห์ได้ วิเคราะห์สมการความสัมพันธ์ของตัวแปรที่เหมาะสมต่อการผลิต (Bezerra และคณะ, 2008) โดยมีงานวิจัยทางด้านกระบวนการทางชีวภาพ เช่น การผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน

จาก *Bacillus mojavensis* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (Baş และ Boyacı, 2007)

2.4.3.2.2.1 การคัดเลือกและกลั่นกรองปัจจัย

การคัดเลือกและกลั่นกรองปัจจัยเป็นขั้นตอนเพื่อพิสูจน์ว่าปัจจัยใดที่มีผลในเชิงบวกต่อการผลิต ซึ่งสามารถศึกษาได้โดยการออกแบบแฟคทอเรียลเต็มรูปแบบ (full factorial design) หรือ การออกแบบแฟคทอเรียลแบ่งส่วน ซึ่งเป็นวิธีพื้นฐานที่เปรียบเทียบการผลิตของปัจจัยแต่ละปัจจัย (Baş และ Boyacı, 2007) และวิธี Plackett-Burman ซึ่งเป็นวิธีการออกแบบชุดทดลองที่อาศัยหลักทางสถิติ เพื่อใช้ข้อมูลจากแต่ละชุดทดลองในการเปรียบเทียบผลของแต่ละปัจจัยที่สนใจศึกษา (Bezerra และคณะ, 2008) เมื่อผ่านการวิเคราะห์ผลจะทราบถึงปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต และนำข้อมูลใช้สำหรับศึกษาการหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตต่อไป ขั้นตอนการคัดเลือกปัจจัยนั้นคำนึงถึงประสิทธิภาพและความคุ้มค่า

2.4.3.2.2.2 การคัดเลือกวิธีการออกแบบการทดลอง

การผลิตมีได้หลากหลายรูปแบบทำให้มีปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตแตกต่างกันไป ซึ่งแต่ละปัจจัยที่ศึกษามีช่วงระดับที่ส่งผลไม่เท่ากัน ทำให้การออกแบบการทดลองของแต่ละงานวิจัยมีความเหมาะสมที่แตกต่างกัน ขึ้นกับ จำนวนปัจจัยที่ส่งผลในเชิงบวก และระดับของปัจจัยที่ศึกษา (Baş และ Boyacı, 2007)

ความสัมพันธ์ของตัวแปรสามารถอธิบายอย่างง่ายได้โดยสมการเชิงเส้น แต่บางปัจจัย ความสัมพันธ์ของปัจจัยไม่สามารถอธิบายเป็นความสัมพันธ์ลำดับหนึ่งหรือด้วยสมการเส้นตรงได้ แต่เป็นความสัมพันธ์ลำดับสองซึ่งใช้สมการลำดับที่สองของปัจจัยหนึ่ง หรือสมการกำลังสองอธิบายความสัมพันธ์ที่มีความสัมพันธ์กันแบบทวิคูณระหว่างปัจจัย 2 ปัจจัยที่มีผลร่วมกัน (Bezerra และคณะ, 2008) (รูปที่ 2.6)

$$y = \beta_0 \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \varepsilon$$

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{1 \leq i \leq j}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{1 \leq i \leq j}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

รูปที่ 2.6 สมการความสัมพันธ์ระหว่างค่าตอบสนอง (y) และปัจจัยต่างๆที่ส่งผลต่อการผลิต (x) 1) สมการแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้น 2) สมการแสดงความสัมพันธ์อันดับสอง และ 3) สมการแสดงความสัมพันธ์กำลังสอง (Bezerra และคณะ, 2008) เมื่อค่า k เท่ากับจำนวนปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต β_0 คือค่าคงที่ β_i , β_{ii} , β_{ij} คือสัมประสิทธิ์ของตัวแปรในสมการ X_i , X_j คือตัวแปร (ปัจจัย) (Baş และ Boyacı, 2007, Bezerra และคณะ, 2008)

โดยการออกแบบการทดลองสำหรับสมการความสัมพันธ์ลำดับสองและความสัมพันธ์แบบกำลังสองสามารถใช้วิธีการออกแบบได้หลายรูปแบบ ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของจำนวนและระดับของปัจจัย ดังต่อไปนี้

2.4.3.2.2.1 การออกแบบแฟคทอเรียลเต็มรูป (full factorial design)

การออกแบบโดยใช้การออกแบบแฟคทอเรียลเต็มรูป คือ การสร้างเมทริกของปัจจัยที่เลือก โดยทำให้ได้จำนวนชุดการทดลองเป็นจำนวนมาก (หากมีปัจจัยมากกว่า 2 ปัจจัยขึ้นไป)และยังส่งผลต่อประสิทธิภาพของสมการแสดงความสัมพันธ์ลดลง เนื่องจากการรวบรวมผลข้อมูลจากชุดการทดลองที่มีจำนวนมากทำให้เกิดข้อผิดพลาดที่สูง (Bezerra และคณะ, 2008) ทั้งยังเสียเวลารวมถึงต้นทุนให้การทดลอง การออกแบบโดยการออกแบบแฟคทอเรียลเต็มรูป นั้นเหมาะสมต่อการทดลองที่มีปัจจัย 2 ปัจจัย ซึ่งหากมีปัจจัยมากกว่านั้นนิยมใช้วิธีการออกแบบการทดลองอื่น เช่น Box-behnken Central composite design และ Doehert ซึ่งสามารถใช้ออกแบบการทดลองที่มีปัจจัยมากกว่า 3 ปัจจัยขึ้นไป โดยมีจำนวนชุดการทดลองที่น้อยกว่าการออกแบบแฟคทอเรียลเต็มรูป แต่สามารถอธิบายและวิเคราะห์ผลการทดลองได้อย่างครอบคลุม (Bezerra และคณะ, 2008)

2.4.3.2.2.2 การออกแบบ Box-benhken

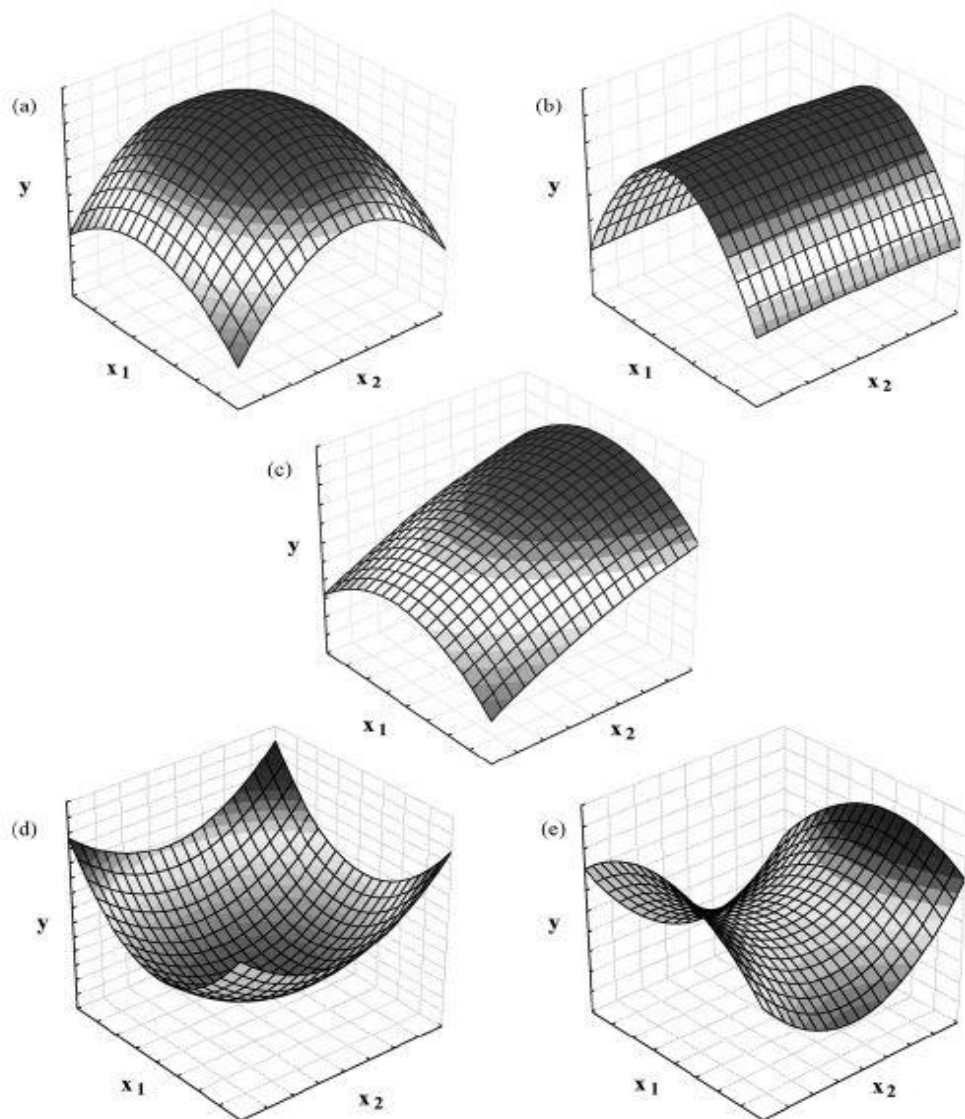
การออกแบบด้วย Box-benhken เป็นการออกแบบการทดลองที่แนะนำให้ใช้สำหรับการทดลองตั้งแต่ 3 ปัจจัยขึ้นไป และแต่ละปัจจัยมีระดับ 3 ระดับ ได้แก่ ระดับต่ำ (-1) ระดับกลาง (0) และระดับสูง (+1) ซึ่งสามารถออกแบบให้รองรับกับการสมการแสดงความสัมพันธ์ทั้งในรูปสมการเชิงเส้นตรงและสมการกำลังสอง (Bezerra และคณะ, 2008)

2.4.3.2.2.3 Central composite design (CCD)

การออกแบบการทดลองแบบ CCD จะมีการกำหนดค่ากลางที่คาดว่าให้ค่าตอบสนองสูงที่สุด โดยจะมีจำนวนชุดการทดลอง ($N=k^2+2k+C_p$) โดย k คือจำนวนปัจจัยและ C_p คือจำนวนซ้ำของค่ากลาง ซึ่งจำนวนชุดการทดลองที่ได้จะมีจำนวนชุดการทดลองน้อยกว่าการออกแบบแฟคทอเรียลเต็มรูปแบบ (Bezerra และคณะ, 2008) แต่จะมีชุดการทดลองมากกว่าการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box-benhken การออกแบบการทดลองแบบ CCD นั้นเหมาะสมกับการออกแบบการทดลองตั้งแต่สองถึงสี่ปัจจัยและแต่ละปัจจัยมีค่าระดับของปัจจัย 5 ระดับ ($-a,-1,0,+1,+a$) ค่า a คือค่าความแปรปรวนที่กำหนดค่าระดับของปัจจัยให้มีความห่างออกจากค่ากลาง ถ้ามีปัจจัย 2 3 และ 4 ปัจจัยจะมีค่า a คือ 1.41, 1.68, และ 2.00 ตามลำดับ Bezerra และคณะ, 2008)

2.4.3.2.2.3 วิเคราะห์สมการความสัมพันธ์ของแต่ละปัจจัย

สมการความสัมพันธ์ที่ได้จากการวิเคราะห์ผลการทดลองแต่ละชุดการทดลองนั้น ก่อนนำมาใช้อธิบายความสัมพันธ์จำเป็นต้องตรวจสอบความถูกต้องของสมการโดยการวิเคราะห์ด้วยตาราง ANOVA (analysis of variance) (Bezerra และคณะ, 2008) โดยหลักการของ ANOVA คือการเปรียบเทียบความแปรปรวนของชุดการทดลองกับความแปรปรวนของค่าที่ได้จากสมการที่ส่งผลต่อค่าตอบสนอง (ตัวแปรตาม) จากนั้นเมื่อพิสูจน์ได้ว่าสมการความสัมพันธ์สามารถใช้อธิบายความสัมพันธ์ได้ นำสมการดังกล่าวมาคำนวณหาค่าระดับของแต่ละปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิต โดยใช้ค่าวิกฤตของแต่ละปัจจัย (ค่าที่ให้ผลผลิตต่ำสุดหรือสูงสุดของแต่ละปัจจัย) และสามารถอธิบายออกมาเป็นกราฟตอบสนองเชิงพื้นผิว ซึ่งสร้างจากปัจจัยสองปัจจัยจับคู่กัน (Baş และ Boyacı, 2007) สามารถแสดงให้เห็นถึงค่าวิกฤต (critical value) ของสองปัจจัยที่นำมาสร้างกราฟได้ง่ายขึ้น โดยรูปแบบของกราฟตอบสนองเชิงพื้นผิวมีได้หลายลักษณะดังแสดงตามรูป 2.7



รูปที่ 2.7 รูปแบบกราฟตอบสนองเชิงพื้นผิว a) แสดงจุดสูงสุด b) ปริมาณของปัจจัยหนึ่งในช่วงที่เลือกไม่ส่งผลต่อค่าตอบสนอง c) จุดสูงสุดอยู่นอกเหนือช่วงทดลอง d) แสดงจุดต่ำสุด และ e) อานม้า แสดงถึงจุดสูงสุดที่ได้จากระดับค่าที่ต่ำและสูงที่สุดของปัจจัย (Bezerra และคณะ, 2008)

2.5 เทคโนโลยีการผลิตสารประกอบทางชีวภาพ

เมื่อต้องการผลิตสารทางชีวภาพในปริมาณมากจำเป็นต้องใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเป็นอุปกรณ์ที่ช่วยในการขยายขนาดการผลิต (Hussain และคณะ, 2015) และสามารถควบคุมปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตได้ดีกว่าการผลิตแบบขวดเขย่า เช่น ความเป็นกรดเบส อุณหภูมิ และการให้อากาศ ซึ่งเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญและการผลิตสารทางชีวภาพที่สนใจของจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้น (Perez-Bibbins และคณะ, 2016) ประเภทของถังปฏิกรณ์ชีวภาพมีหลายประเภท ได้แก่ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกวน ฟองอากาศ tapered column, air-lift และ pressure cycle และนอกจากนี้ยังมีวิธีการเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมต่อการเจริญและเพิ่มปริมาณผลผลิตที่ต้องการ (Perez-Bibbins และคณะ, 2016)

2.5.1 ประเภทถังปฏิกรณ์

ถังปฏิกรณ์แต่ละประเภทมีข้อดีข้อจำกัดสำหรับกระบวนการผลิตที่ต่างกัน เช่น ให้อากาศได้ดี มีประสิทธิภาพในการคายความร้อนออกจากระบบ เหมาะสำหรับเซลล์ตรึง การผสมของจุลินทรีย์กับแหล่งอาหาร การหมุนวนอากาศและอาหาร โดยการแบ่งแย่งประเภทของถังปฏิกรณ์แยกได้ตามขนาดของตัวถัง ท่อทรงกระบอก และมีท่อวนอาหารภายใน และแยกความแตกต่างของถังและท่อทรงกระบอกได้จากอัตราส่วนระหว่างความสูงของตัวถังต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของตัวถัง (Perez-Bibbins และคณะ, 2016)

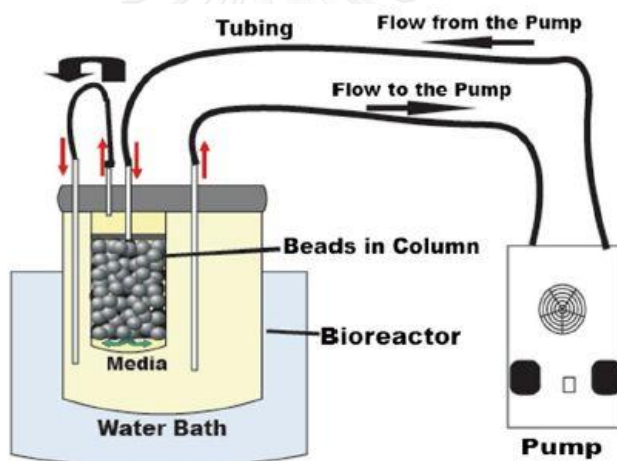
2.5.1.1 ถังปฏิกรณ์แบบกวน (stirred tank reactor, STR)

ถังปฏิกรณ์แบบกวนเป็นถังปฏิกรณ์ที่มีระบบที่ง่ายที่สุดที่ใช้ในกระบวนการผลิตสารทางชีวภาพ สามารถใช้ได้ทั้งการผลิตแบบใช้อากาศและไม่ต้องการอากาศ สามารถใช้ได้กับระบบการเลี้ยงเซลล์ทั้งแบบแบคทีเรีย เฟดแบคทีเรีย และแบบต่อเนื่อง โดยถังปฏิกรณ์ขนาดเล็กจะผลิตจากแก้ว ซึ่งใช้ในระดับห้องปฏิบัติการทดลอง และหากเป็นถังปฏิกรณ์ขนาดใหญ่จะใช้โลหะสแตนเลสสำหรับใช้ระดับใหญ่และระดับอุตสาหกรรม (Perez-Bibbins และคณะ, 2016) ข้อเสียของถังประเภทนี้ คือต้องการพลังงานในการควบคุมระบบที่สูงและมีแรงเฉือนซึ่งทำให้เซลล์ได้รับความเสียหาย (Hussain และคณะ, 2015) แต่สามารถเพิ่มการถ่ายเทมวลที่สูงจากระบบการกวน โดยมีใบพัดกวนเป็นอุปกรณ์ใช้กวน และมีแผ่นกั้น (Baffles) เป็นอุปกรณ์ที่ใช้ช่วยลดจุดที่ไม่เกิดการผสมของสารอาหารและเซลล์ (Perez-Bibbins และคณะ, 2016)

2.5.1.2 ถังปฏิกรณ์แบบแพคเบด (packed bed reactor, PBR)

ถังปฏิกรณ์ที่มีคอลัมน์ที่บรรจุวัสดุตรึงที่ใช้สำหรับตรึงเซลล์ ซึ่งให้อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ไหลผ่าน การไหลผ่านของอาหารสามารถไหลผ่านทั้งจากส่วนบนคอลัมน์ผ่านลงสู่ส่วนล่างคอลัมน์หรือไหล

จากล่างสู่ส่วนบนของคอลัมน์ (Perez-Bibbins และคณะ, 2016) ซึ่งการไหลของอาหารผ่านคอลัมน์ของเซลล์ตรึงนั้นทำให้เกิดการอุดตันของคอลัมน์ได้จากการเจริญของเซลล์ ถึงปฏิกรณ์ประเภทนี้เหมาะสำหรับการผลิตที่สารผลิตภัณฑ์ลดประสิทธิภาพการผลิต แต่ปริมาณสารตั้งต้นไม่เป็นพิษสำหรับเซลล์รวมถึงไม่ยับยั้งการผลิต (Perez-Bibbins และคณะ, 2016) แต่ข้อเสียของถังปฏิกรณ์ชนิดนี้คือมีขีดจำกัดการถ่ายเทมวล (Hussain และคณะ, 2015) สำหรับวัสดุตรึงที่ใช้ในการผลิตสารด้วยถังปฏิกรณ์แบบแพคเบต โดยส่วนใหญ่นิยมใช้วัสดุตรึงที่มีรูพรุนที่มีพื้นที่ผิวมากพอให้เซลล์สามารถยึดเกาะได้ แต่จากความหนาแน่นของวัสดุตรึงและการอัดแน่นของวัสดุตรึงในคอลัมน์ทำให้เกิดบริเวณที่มีความดันลดลง การถ่ายเทมวลและการแพร่ผ่านของสารอาหารลดลง (Hussain และคณะ, 2015) ทำให้ถังปฏิกรณ์นี้เหมาะสำหรับการผลิตที่ต้องการอากาศ ทนต่อสารความเข้มข้นสูงได้ไม่เป็นพิษ ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ มีความทนทาน และราคาต่ำ (Perez-Bibbins และคณะ, 2016) รูปแบบหนึ่งของถังปฏิกรณ์แบบแพคเบต คือมีส่วนแพคคอลัมน์อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (รูปที่ 2.8) จึงสามารถลดความเสี่ยงการปนเปื้อนได้



รูปที่ 2.8 แผนภาพของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบต (Hussain และคณะ, 2015)

2.5.1.3 ถังปฏิกรณ์แบบฟลูอิดไธซ์เบต (fluidized bed reactor)

ถังประเภทนี้เป็นถังประเภทคอลัมน์ (ทรงกระบอก) ที่ประกอบด้วยเซลล์ตรึงที่เป็นสถานะของแข็งอยู่ในภาวะคอลลอยต์ในของเหลว (อาหารเลี้ยงเชื้อ) และมีการควบคุมการไหลของอาหารและเซลล์ตรึง โดยการไหลของอากาศผ่านทางท่อให้อากาศที่อยู่ส่วนล่างของถังปฏิกรณ์ (Perez-Bibbins และคณะ, 2016) ข้อดีของการเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ประเภทนี้ คือให้อัตราของถ่ายเทมวลและออกซิเจนที่สูง เมื่อเทียบกับการเลี้ยงในถังปฏิกรณ์แบบกวนและแพคเบต และสามารถหลีกเลี่ยงเซลล์ได้รับความเสียหายจากแรงเฉือนได้ แต่เพื่อให้อาหารและเซลล์ไหลผสมกันได้ดีจำเป็นต้องมีอุปกรณ์ที่ให้อากาศและตัวปล่อยแรงดันอากาศ ซึ่งมีผลให้ถังปฏิกรณ์ประเภทนี้ใช้พลังงานสูงในการผลิต แต่ในทางกลับกันการใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพประเภทนี้สามารถเลือกวัสดุตรึงที่กระจายตัวได้ง่าย

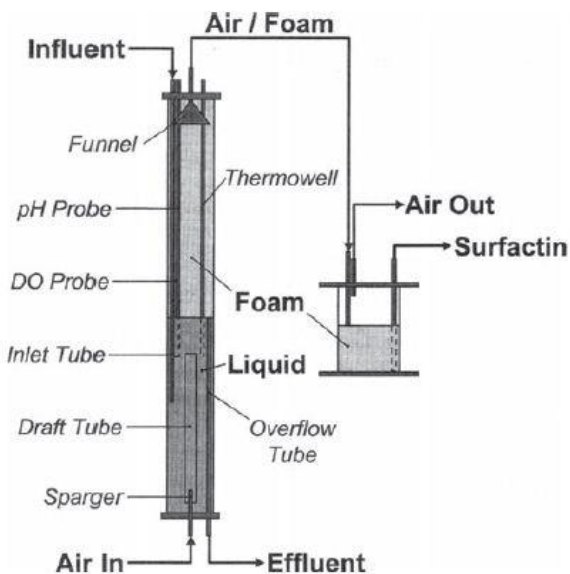
และกำหนดความหนาแน่นของวัสดุตั้งให้พอดีไม่แน่นจนเกินไป ทำให้สามารถลดการให้อากาศ เพื่อให้เกิดการผสมของอาหารได้ ส่งผลถึงปริมาณอากาศที่ลดลงและพลังงานสำหรับการให้อากาศ ลดลงเช่นกัน (Perez-Bibbins และคณะ, 2016)

2.5.1.4 ถังปฏิกรณ์แบบบับเบิล (bubble column reactor)

ถังปฏิกรณ์ทรงกระบอกยาวมีท่อให้อากาศในส่วนล่างของถังปฏิกรณ์ มีการผสมของอาหาร โดยใช้การไหลวนของฟองอากาศภายในถังปฏิกรณ์ ทำให้การเลี้ยงในถังปฏิกรณ์นี้เหมาะแก่การเลี้ยง เซลล์ที่มีความต้องการอากาศสูงในการเจริญ จากการอาศัยการไหลของอากาศทำให้เกิดการผสมของ อาหารทำให้การผลิตในถังปฏิกรณ์นี้ลดการเกิดแรงเฉือนที่ทำลายเซลล์ แต่การเลี้ยงแบบนี้ยังมีข้อเสีย เมื่อสารที่ผลิตเป็นสารที่ก่อให้เกิดฟองซึ่งทำให้ฟองอากาศเพิ่มมากขึ้น และการเกิดฟองยังส่งผลให้ ประสิทธิภาพการผลิตหรือปริมาณผลิตภัณฑ์ลดลง (Perez-Bibbins และคณะ, 2016)

2.5.1.5 ถังปฏิกรณ์แบบอากาศลอยตัว (airlift reactor)

หลักการและการออกแบบของถังประเภทนี้มีส่วนที่คล้ายคลึงกับถังปฏิกรณ์แบบบับเบิล แต่ จะมีส่วนของท่อที่ช่วยให้การไหลวนของอาหาร รวมถึงสามารถกำหนดทิศทางการไหลวนของอาหาร ได้ ซึ่งท่อดังกล่าวสามารถอยู่ได้ทั้ง ภายในตัวคอลัมน์จะเรียกว่า อินเทอนอลลูป และท่อเชื่อมต่อ ภายนอกตัวคอลัมน์จะเรียกว่า เอ็กเทอนอลลูป นอกจากช่วยเรื่องการไหลวนของอาหารแล้วยังช่วย ปรับปรุงข้อด้อยของถังแบบบับเบิลคอลัมน์คือ สามารถลดการเกิดฟองได้เมื่อเทียบกับบับเบิลคอลัมน์ (Perez-Bibbins และคณะ, 2016) ข้อเสียที่สำคัญของถังปฏิกรณ์ชนิดนี้ คือต้องใช้พลังงานในการ ควบคุมระบบสูง อย่างเช่นงานวิจัยของ (Noah และคณะ, 2002) ได้ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เซอเพกตินโดยใช้มันฝรั่งเป็นแหล่งคาร์บอน โดยผลิตในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแอร์ลิฟต์ (รูปที่ 2.9) และดำเนินการผลิตรวมกับการทำบริสุทธิ์ด้วยหลักการแยกด้วยโฟมฟอง (foam fractionation) ซึ่ง ทำให้ง่ายต่อการเก็บผลผลิตและได้ผลผลิตที่ดี ซึ่งการผลิตด้วยวิธีนี้เหมาะกับการผลิตสารลดแรงตึงผิว ที่ก่อให้เกิดฟองได้ง่าย



รูปที่ 2.9 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเซอเฟกติน จาก *Bacillus subtilis* โดยใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแอร์ลิปต์ (Noah และคณะ, 2002)

จากรูปแบบทั้งหมดของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ถังปฏิกรณ์แบบกวนนั้นเหมาะสำหรับการผลิตในเบื้องต้น แต่สำหรับงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยพัฒนาระบบการผลิตด้วยการตรึงเซลล์บนโคโตซาน ทำให้รูปแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่เหมาะสมคือถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบต เนื่องจากวัสดุที่ใช้คือโคโตซานซึ่งมีลักษณะที่ไม่ลอยน้ำ หากใช้การผลิตแบบถังฟลูอิดไคซ์เบตจำเป็นต้องใช้แรงดันอากาศสูงสำหรับการผสมวัสดุให้เป็นเนื้อเดียวกัน ส่วนถังปฏิกรณ์แบบกวนอาจพบลดปัญหาการจมตัวของโคโตซานได้ ซึ่งอาจแก้ปัญหาโดยการเพิ่มรอบการกวน แต่ผลที่ตามมาคือแรงเฉือนที่สูงขึ้นทำให้เซลล์ได้รับความเสียหายได้ สำหรับถังปฏิกรณ์แบบแพคเบตนั้นมีจุดที่ต้องคำนึงคือปริมาณออกซิเจนในอาหารที่อาจไม่เพียงพอต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิว

2.5.2 วิธีการเลี้ยงจุลินทรีย์

การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบดในงานวิจัยนี้ เลือกศึกษาระบบการเลี้ยงจุลินทรีย์แบบแบตช์ เนื่องจากเป็นระบบการเลี้ยงเพื่อให้ได้ข้อมูลอัตราการเจริญและอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ในขั้นพื้นฐานของถังปฏิกรณ์ชนิดนั้น ซึ่งสามารถนำข้อมูลดังกล่าวมาประยุกต์แบบออกแบบการผลิตด้วยระบบการเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์และแบบต่อเนื่องได้ต่อไป

2.5.2.1 การเลี้ยงจุลินทรีย์แบบแบตช์หรือแบบไม่ต่อเนื่อง (Batch)

การเลี้ยงจุลินทรีย์แบบแบตช์เป็นระบบการเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ง่ายที่สุด เป็นวิธีเลี้ยงที่ทำให้เซลล์เปลี่ยนสารตั้งต้นให้เป็นผลิตภัณฑ์ได้สูง (Perez-Bibbins และคณะ, 2016) และสามารถใช้เพิ่มปริมาณการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จากงาน Khondee และคณะ, 2015 และ Solaiman และคณะ, 2015 ได้เปรียบเทียบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทลิโปเปปไทด์และซอพฟอโรลิพิดตามลำดับ ด้วยการผลิตแบบขวดเขย่าและถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกวนผสม พบว่าการใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพสามารถเพิ่มการผลิตได้ และมีการเลี้ยงจุลินทรีย์แบบแบตช์ ซึ่งง่ายต่อการควบคุมการเจริญ และสามารถให้เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการเลี้ยงจุลินทรีย์แบบเฟดแบตช์และแบบต่อเนื่องต่อไป

2.5.2.2 การเลี้ยงจุลินทรีย์แบบเฟดแบตช์ หรือกึ่งต่อเนื่อง (fed-batch)

ระบบการหมักโดยวิธีนี้จะมีการเติมสารอาหารและสารตั้งต้นที่มีไว้ให้เซลล์เปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์อย่างต่อเนื่องลงในระบบ แต่จะไม่มีเมื่อนำเอาสารผลิตภัณฑ์ออกจากระบบ โดยระบบการเลี้ยงเซลล์แบบเฟดแบตช์เหมาะสำหรับการเลี้ยงเซลล์ที่ปริมาณสารตั้งต้นหรือสารผลิตภัณฑ์ที่เข้มข้นสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Ozturk และคณะ, 2016) ดังนั้นการควบคุมอัตราการให้สารอาหารจะทำให้เซลล์เจริญได้ดีขึ้น โดยเฟดแบตช์เป็นวิธีที่เหมาะสมกับการผลิตโดยใช้เซลล์อิสระให้การผลิตสารทางชีวภาพ (Perez-Bibbins และคณะ, 2016) แต่มีจำกัดในเรื่องการให้ปริมาณออกซิเจน มีการยับยั้งการเจริญจากผลิตภัณฑ์ร่วม และข้อจำกัดของการกระจายความร้อน เป็นต้น (Ozturk และคณะ, 2016)

2.5.2.3 การเลี้ยงจุลินทรีย์แบบต่อเนื่อง (continuous)

การเลี้ยงแบบต่อเนื่องสามารถลดต้นทุนในการผลิตได้มากกว่าการเลี้ยงแบบแบตช์ เนื่องจากสามารถลดช่วงเวลาการผลิตของการให้พลังงานแต่เซลล์ที่เพิ่มมากขึ้น นอกจากการแก้ไขปัญหาการใช้พลังงานแล้วยังสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตได้ (Perez-Bibbins และคณะ, 2016) เมื่อเลี้ยงกับระบบที่มีปริมาณเซลล์สูง มีข้อเสียคือ หากเลี้ยงเป็นเวลานานจะทำให้พบปัญหาการปนเปื้อน และการกลายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ใช้ผลิต และเสียเซลล์ออกจากระบบอย่างต่อเนื่อง เพื่อแก้ไขการสูญเสียเซลล์ การเลี้ยงแบบต่อเนื่อง จึงต้องคำนวณอัตราการให้สารอาหารและอัตราการนำผลิตภัณฑ์ออกจาก

ระบบให้มีความสมดุลกัน ซึ่งทำให้อัตราการสร้างสารและปริมาณเซลล์สัมพันธ์กัน แต่สำหรับการเลี้ยงแบบต่อเนื่องที่เลี้ยงเซลล์ด้วยการตรึงเซลล์จะสามารถใช้อัตราการให้อาหารที่เร็วกว่าเซลล์อิสระ เนื่องจากการตรึงเซลล์สามารถรักษาปริมาณเซลล์ได้ดีกว่าเซลล์อิสระ (Perez-Bibbins และคณะ, 2016)

2.6 ประโยชน์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและการประยุกต์ใช้

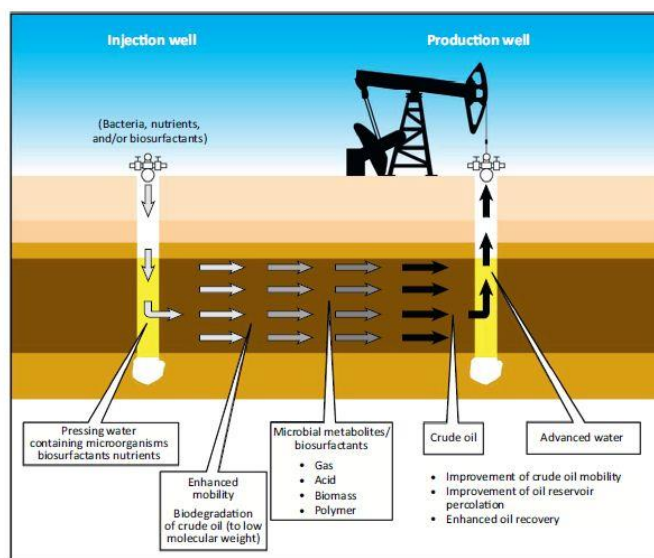
จากที่ทราบแล้วว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นสามารถลดแรงตึงผิวและแรงระหว่างผิวของสารสองสถานะได้แล้ว สารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังมีสมบัติอื่น ซึ่งนำไปสู่การประยุกต์ใช้และพัฒนาสารลดแรงตึงผิวในด้านต่างๆ (ตารางที่ 2.7) เช่น ความสามารถในการก่ออิมัลชันและการเกิดฟอง และความสามารถในการช่วยเพิ่มการละลาย ทำให้ใช้เป็นสารช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันไฮโดรคาร์บอนซึ่งเป็นน้ำมันที่สามารถปนเปื้อนได้ตามธรรมชาติ เหตุจากการรบกวนไหล การเดินเรือ และอื่นๆ (Souza และคณะ, 2014) นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประจุเป็นลบสามารถนำสมบัติดังกล่าวมาใช้ในการบำบัดการปนเปื้อนของโลหะหนัก (Rizzo และคณะ, 2015) และยังสามารถใช้เป็นสารต้านการเจริญของจุลินทรีย์และสารต้านการเจริญของศัตรูพืชได้ จากสมบัติที่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถแทรกตัวในเยื่อหุ้มเซลล์ลิวติคไบเลเยอร์ ทำให้ความสมดุลของเซลล์ลดลงจนเซลล์ได้รับความเสียหาย (Mnif และ Ghribi, 2015) โดยสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เป็นสมบัตินี้พื้นฐานของสารลดแรงตึงผิวนั้นคือ การลดค่าแรงตึงผิว ส่งผลให้เกิดการก่ออิมัลชันและการกระจายน้ำมันได้ หากมีปริมาณมากพอให้เกิดไมเซลล์ งานวิจัยนี้ได้ทดสอบการก่ออิมัลชัน การกระจายน้ำมัน รวมถึงความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวเมื่ออยู่ในภาวะต่างๆ เพื่อใช้เป็นข้อมูลสำหรับการเลือกประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้เหมาะสมกับสมบัติที่โดดเด่นต่อไป

ตารางที่ 2.7 ตัวอย่างการประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในงานด้านต่างๆ

สารลดแรงตึงผิว	การประยุกต์ใช้	จุลินทรีย์	อ้างอิง
สารลดแรงตึงผิว	เพิ่มประสิทธิภาพ	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Pacheco และคณะ, 2010
ผิวชีวภาพ	การเก็บเกี่ยวน้ำมัน		
เซอเฟกติน	สลายน้ำมันไฮโดรคาร์บอน	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC21332	Whang และคณะ 2008
ไกลโคลิพิด	ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> S9	Pradhan และคณะ 2014
ลิโปเปปไทด์	สารต้านการเจริญของจุลินทรีย์	<i>Streptomyces amritsarensis</i> sp. nov.	Sharma และคณะ 2014
เซอเฟกติน	สารควบคุมทางชีวภาพ	<i>Bacillus mojavenis</i>	Snook และคณะ 2009
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	สารก่ออิมัลชันในอุตสาหกรรมอาหาร	<i>Candida utilis</i>	Campos และคณะ 2014

2.6.1 ความสามารถในการก่ออิมัลชัน

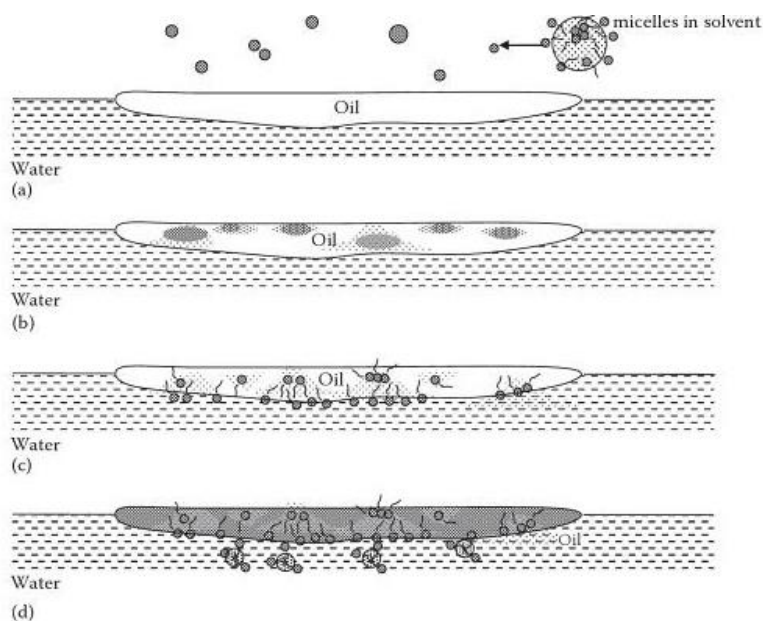
ความสามารถในการก่ออิมัลชันนั้นส่งผลให้เกิดการกระจายตัวของของเหลวสองชนิดที่ไม่สามารถผสมรวมกันได้ ให้สามารถผสมกันได้มากขึ้นในรูปของหยดสารนั้นๆ (Mnif และ Ghribi, 2015) โดยส่วนใหญ่สมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนี้จะนำมาใช้ให้เกิดอิมัลชันของน้ำและน้ำมันสำหรับการบำบัดในธรรมชาติ อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง และอาหาร โดย สารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิดก็มีประสิทธิภาพในการก่ออิมัลชันของน้ำมันแต่ละชนิดกับน้ำที่แตกต่างกันออกไป รวมถึงการชะน้ำมันออกจากดินหรือหินซึ่งสามารถใช้เป็นสารเพิ่มปริมาณเก็บเกี่ยวน้ำมันดังรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 การประยุกต์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อเพิ่มปริมาณการเกี่ยวเก็บน้ำมันปิโตรเลียม (Marchant และ Banat, 2012)

2.6.2 ความสามารถในการละลาย

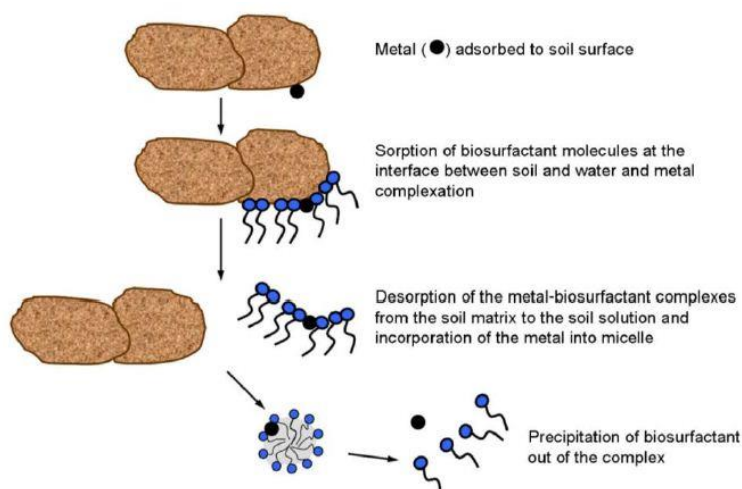
สารปนเปื้อนในธรรมชาติส่วนใหญ่อยู่ในรูปของสารที่ไม่ละลายน้ำ เช่น โลหะหนัก น้ำมันไฮโดรคาร์บอน เป็นต้น ซึ่งเป็นปัญหาต่อการบำบัดด้วยจุลินทรีย์ แต่สามารถแก้ไขได้โดยการเติมสารลดแรงตึงผิว ซึ่งช่วยลดค่าแรงตึงผิวและแรงระหว่างผิวของน้ำ ทำให้สารปนเปื้อนที่ไม่ละลายน้ำจะจับกับส่วนที่ไม่ละลายน้ำของสารลดแรงตึงผิวซึ่งอยู่ภายในไมเซลล์ ซึ่งสามารถช่วยให้สารที่ไม่ละลายน้ำสามารถละลายน้ำได้ดีขึ้น (Bustamante และคณะ, 2012) และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการบำบัดสารปนเปื้อน เช่น น้ำมันไฮโดรคาร์บอน คือช่วยให้น้ำมันไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนอยู่ในธรรมชาติละลายออกจากดินลงมาอยู่ในน้ำในรูปของอิมัลชัน ทำให้แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายน้ำมันไฮโดรคาร์บอนสามารถเข้าถึงและย่อยสลายได้ (Mnif และ Ghribi, 2015) ดังรูปที่ 2.11 ที่อธิบายกลไกการกระจายและเพิ่มความสามารถในการละลายของคราบน้ำมันในธรรมชาติ นอกจากนี้หากความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวมีค่าสูงกว่าค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์สามารถช่วยกระจายน้ำมันให้มีขนาดเล็กช่วยให้การละลายดีขึ้น (Pacwa-Plociniczak และคณะ, 2011)



รูปที่ 2.11 กลไกการทำงานของสารกระจายคราบน้ำมันในการบำบัดพื้นที่ปนเปื้อน (a) สารกระจายคราบน้ำมันถูกสเปรย์ลงสู่ทะเล (b) สารกระจายคราบน้ำมันเข้ารวมตัวกับน้ำมัน (c) ตัวทำละลายละลายตัวเข้าสู่ น้ำมัน (d) สารลดแรงตึงผิวในสารกระจายคราบน้ำมันเข้าไปรวมกับน้ำมันและกระจายคราบน้ำมันให้เป็ นหยดเล็ก (Mulligan และคณะ, 2005)

2.6.3 สารลดแรงตึงผิวที่มีประจุที่ส่งเสริมการจับกับโลหะหนัก

ใช้ในการบำบัดโลหะหนักที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม จากการใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีข้อดี คือไม่จำเป็นต้องใช้จุลินทรีย์ที่สามารถอยู่รอดได้ในภาวะที่มีโลหะหนักซึ่งเป็นภาวะที่ไม่เหมาะต่อการ เจริญของจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามการใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมากำจัดโลหะหนักปนเปื้อนจะเป็น ต้องมีการเติมสารลดแรงตึงผิวอย่างต่อเนื่อง (Pacwa-Plociniczak และคณะ, 2011) โดยสารลดแรง ตึงผิวชีวภาพที่นำมาใช้กำจัดโลหะหนักปนเปื้อนส่วนใหญ่มีประจุเป็นลบ ซึ่งทำให้จับเป็นสารประกอบ เองซ้อนระหว่างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกับโลหะหนักได้ โดยนำส่วนหัวที่มีประจุลบจับกับไอออนของ โลหะหนักในรูปของไมเซล ทำให้สามารถชะโลหะหนักที่เกาะอยู่ในชั้นดินได้ ดังรูปที่ 2.12 (Mnif และ Ghribi, 2015) ส่วนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประจุเป็นบวกสามารถกำจัดโลหะหนักได้บางชนิดโดย อาศัยกลไกการแลกเปลี่ยนประจุ ซึ่งจะแย่งจับแทนที่โลหะหนักทำให้โลหะหนักหลุดออกจากดินที่ ปนเปื้อน (Pacwa-Plociniczak และคณะ, 2011)



รูปที่ 2.12 กลไกการกำจัดโลหะหนักโดยใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Pacwa-Plociniczak และคณะ, 2011)

2.6.4 ความสามารถในการละลายชั้นไขมันและแทรกตัวในชั้นลิพิดไบเลเยอร์ของเยื่อหุ้มเซลล์

สามารถใช้เป็นสารต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรครวมถึงศัตรูพืชสำหรับงานด้านการเกษตร (Fakruddin, 2012) เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างรูและช่องแกลกเปลี่ยนไอออน ซึ่งจะรบกวนการรักษาสมดุลของเซลล์จนเซลล์ได้รับความเสียหายกระทั่งไม่สามารถรักษาสภาพของเซลล์ได้ (Fakruddin, 2012, Mnif และ Ghribi, 2015) ตัวอย่างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ฤทธิ์ด้านการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มของลิโปเปปไทด์ ซึ่งส่วนใหญ่มีฤทธิ์ด้านการเจริญจุลินทรีย์รวมถึง สารลดแรงตึงผิวลิโปเปปไทด์จาก *Streptomyces amritsarensis* sp. nov. ซึ่งทำให้เกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้โซเดียมไอออนและโพแทสเซียมไอออนในเซลล์ไม่สมดุล จนกระทั่งเซลล์ไม่สามารถเจริญได้และตายในที่สุด (Sharma, และคณะ 2014)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบด ขนาด 2 ลิตร ต้นแบบจาก บริษัท Medorex e.K. จากประเทศเยอรมัน ผลิตโดยบริษัท พี.อี. มารูบิชิ (ประเทศไทย) จำกัด
- เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น ss-325 และรุ่น ES-315 ของบริษัท Tomy Seiko, Ltd. รุ่น MLS 3020 ของบริษัท Sanyo Co., Ltd. และรุ่น HV-25 ของบริษัท Hirayama, Co., Ltd., Japan
- เครื่องชั่งหยาบ รุ่น PG 2002-S ของบริษัท Metler Toledo, Switzerland
- เครื่องชั่งละเอียด รุ่น AG 285 ของบริษัท Metler Toledo, Switzerland
- ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น BE 800 ของบริษัท Memmert, Germany
- เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) รุ่น Innova™ 4300 ของบริษัท New Brunswick Scientific, UK
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น J2-21 ของบริษัท BECKMAN, USA
- เครื่องวัดค่าแรงตึงผิวแบบอัตโนมัติ (digital tensiometer) ของบริษัท Kruss, Germany
- เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter) ของบริษัท Metler Toledo, Switzerland
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys ของบริษัท Thermo Spectronic, USA
- เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (rotary vacuum evaporator) รุ่น N-N ของบริษัท Eyela, Japan
- เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (centrifuge evaporator) รุ่น eppendorf concentrator 5301 ของบริษัท Modotech, Germany
- ตู้อบ (hot air oven) รุ่น UE 600 ของบริษัท Memmert, Germany
- ไมโครปิเปต (micropipette) รุ่น P10, P20, P100, P200, P1000 และ P5000 ของบริษัท Gilson, USA
- อ่างคลื่นความถี่สูง (ultrasonic bath) ของบริษัท Elma Schmidbauer GmbH, Germany
- เครื่องเขย่าสาร (vortex) ของบริษัท Scientific Industries, USA
- แผ่นเมมเบรน ของบริษัท Sartorius AG, Germany

- ปั๊มดูดจ่ายสารละลายแบบปริตพ้อ (peristaltic pump) ของบริษัท Baoding Longer Precision Pump, China
- เครื่อง FT-IR spectrometer รุ่น Nicolet iS5 จากบริษัท ThermoScientific

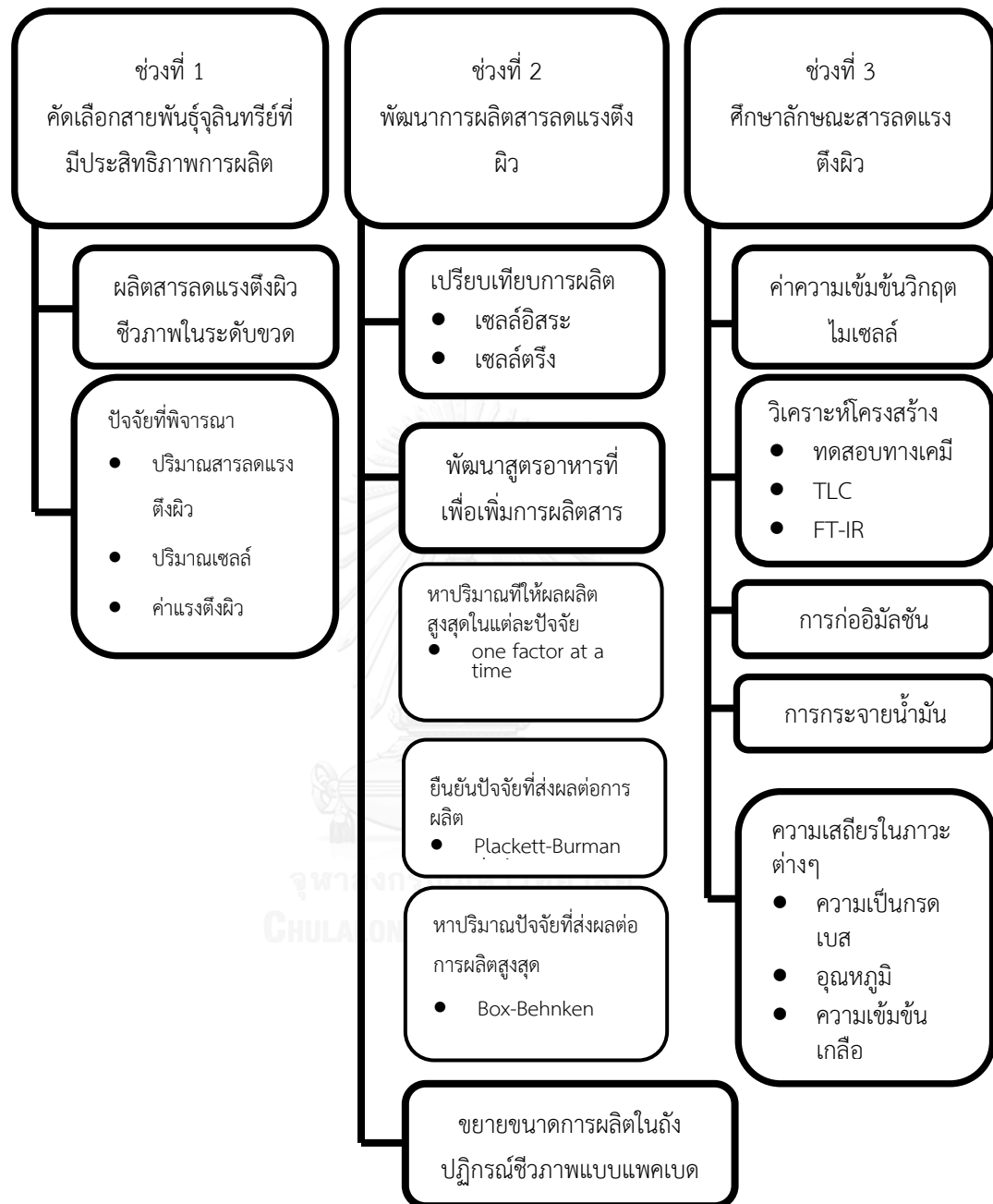
3.2 เคมีภัณฑ์

- กลูโคส ของบริษัท E. Merk, Dramstadt, Germany
- สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Himedia Laboratories, India
- โซเดียมไนเตรต (NaNO_3) บริษัท Ajax Finechem, Australia
- โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ของบริษัท E. Merk, Dramstadt, Germany
- โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) บริษัท Ajax Finechem, Australia
- โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ของบริษัท E. Merk, Dramstadt, Germany
- โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ของบริษัท E. Merk, Dramstadt, Germany
- แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) บริษัท Ajax Finechem, Australia
- แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) ของบริษัท E. Merk, Dramstadt, Germany
- เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท E. Merk, Dramstadt, Germany
- กรดบอริก (H_3BO_3) บริษัท Ajax Finechem, Australia
- คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท E. Merk, Dramstadt, Germany
- แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Carlo Erba reagent, Italy
- โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($\text{MoNa}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Carlo Erba reagent, Italy
- ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Carlo Erba reagent, Italy
- อาหารเลี้ยงเชื้อ LB ของบริษัท Difco Laboratories, USA
- ทริสไฮโดรคลอริก ของบริษัท Sigma Chemical Co., USA
- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Fisher Chemical, Belgium
- คลอโรฟอร์ม ของบริษัท E. Merk, Dramstadt, Germany
- เมทานอล ของบริษัท E. Merk, Dramstadt, Germany
- กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (35% w/w) ของบริษัท E. Merk, Dramstadt, Germany
- กรดฟอสฟอริก ของบริษัท E. Merk, Dramstadt, Germany
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท E. Merk, Dramstadt, Germany
- Brilliant Blue G ของบริษัท Sigma Chemical Co., USA
- Dehydol LS7 ของบริษัท Mega World Wide, Thailand

- โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) ของบริษัท E. Merk, Dramstadt, Germany
- ไคโตซานชนิดเกล็ด จากบริษัท อีแลนค์คอร์ปอเรชัน จำกัด
- น้ำมันถั่วเหลือง ตรา อุ่น จากบริษัท น้ำมันพืชไทย จำกัด (มหาชน)
- น้ำมันปาล์ม ตรา แวว จากบริษัท ปาล์ม ออยล์ เอ็นเนอร์ยี จำกัด
- น้ำมันคาโนลา จากบริษัท ลำสูง (ประเทศไทย) จำกัด (มหาชน)
- น้ำมันดิบบงกช สนับสนุนจากบริษัท ไทยออยล์ จำกัด
- น้ำมันดิบอาราเบียน สนับสนุนจากบริษัท ไทยออยล์ จำกัด
- น้ำมันดีเซล สนับสนุนจากบริษัท ปตท. จำกัด (มหาชน)
- น้ำมันเตา สนับสนุนจากบริษัท ปตท. จำกัด (มหาชน)



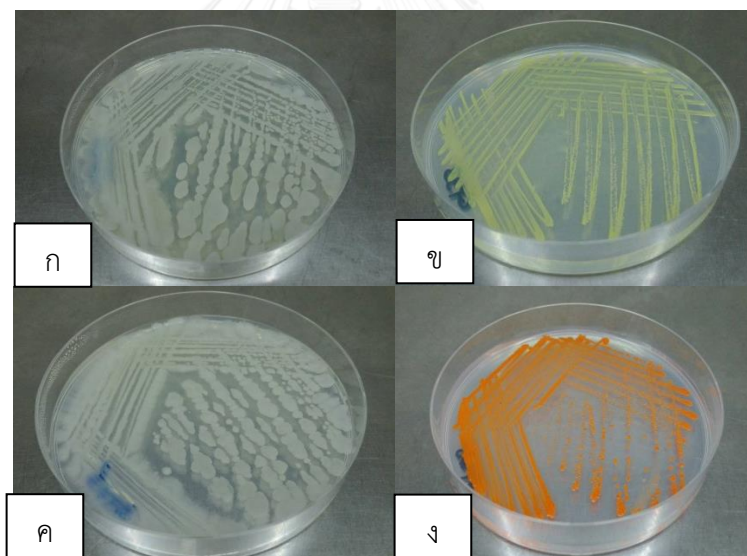
3.3 แผนผังการดำเนินการวิจัย



รูปที่ 3.1 แผนงานวิจัย

3.4 จุลินทรีย์

ในงานวิจัยนี้จะศึกษาแบคทีเรียทั้งหมด 4 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ GY30 สายพันธุ์ GY33 สายพันธุ์ GY36 และ สายพันธุ์ GY40 (รูปที่ 3.1) ซึ่งได้คัดแยกจากดินที่อุดมสมบูรณ์ในประเทศไทย จากโครงการ “การคัดแยกแบคทีเรียผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สามารถใช้ไขมัน น้ำมันหรือ กลีเซอรอล เป็นสารตั้งต้น” ที่สนับสนุนโดยบริษัท ปตท. จำกัด (มหาชน) โดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่ง คาร์บอน โดยสิ่งที่น่าสนใจจากแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ คือเป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรง ตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพที่สูง โดยสามารถลดค่าแรงตึงผิวของอาหารได้ถึง 28 33 31 และ 37 มิลลิวัตต์ต่อเมตร ตามลำดับ และสายพันธุ์ GY30 GY33 และ GY36 มีสมบัติการก่อกอิมัลชันกับ น้ำมันพืชได้ถึง 66 62 และ 56% ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์ GY40 นั้นยังไม่มีข้อมูลของการก่อกอิมัลชัน งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาการเพิ่มผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ แล้วคัดเลือกเพียงหนึ่งสายพันธุ์จาก ทั้งหมดมาศึกษาอย่างละเอียด และใช้เป็นต้นแบบในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อไป โดย แบคทีเรียทั้งหมดได้เก็บรักษาไว้ในคลังจุลินทรีย์ของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

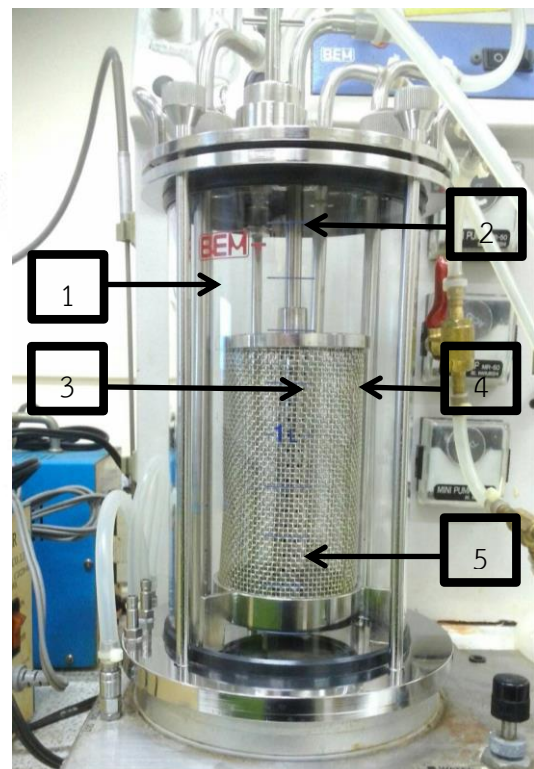
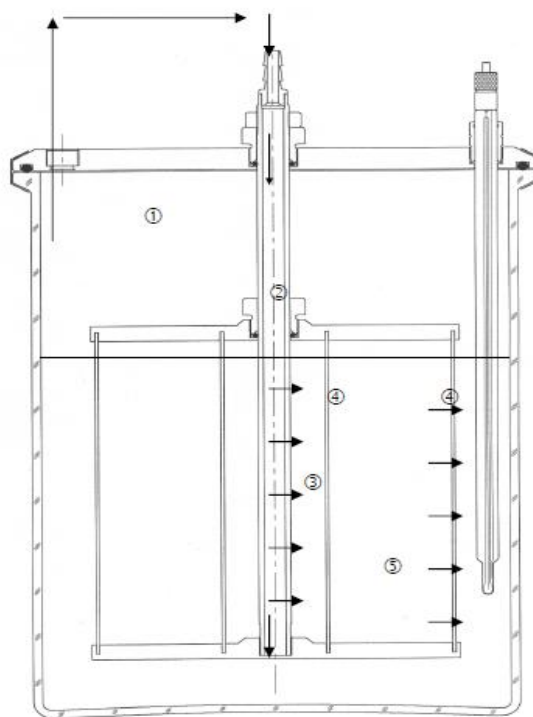


รูปที่ 3.2 แบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ ที่ใช้ในงานวิจัยเมื่อเจริญบนอาหาร 25%LB ก. สายพันธุ์ GY30 ข. สายพันธุ์ GY33 ค. สายพันธุ์ GY36 และ ง. สายพันธุ์ GY40

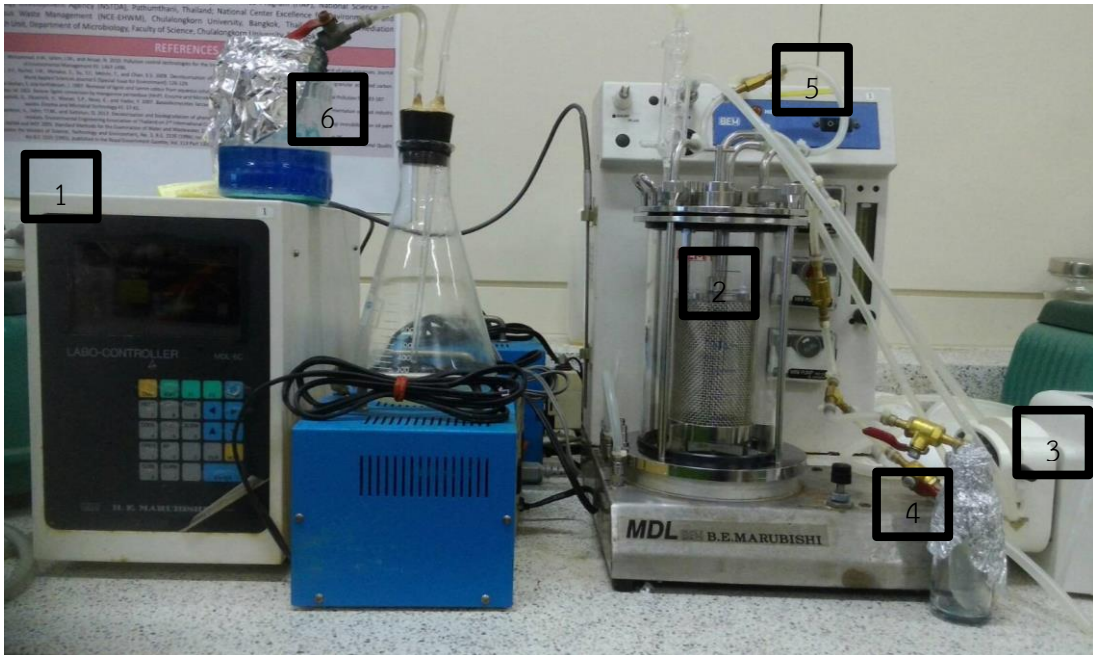
3.5 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบด

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบดขนาด 2 ลิตร ที่ใช้ในการทดลองการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนี้ ได้รับการปรับปรุงรูปแบบจากแผนผังเดิมของบริษัท Medorex e.K. จากประเทศเยอรมัน ถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้ในการทดลองมีส่วนแพคเบดคอลัมน์ทรงกระบอกที่ใช้บรรจุวัสดุตรึง มีขนาด

460 ลูกบาศก์เซนติเมตร อยู่ในตัวถังปฏิกรณ์ชีวภาพอีกครั้งดังรูปที่ 3.3 มีการให้อากาศทางท่อให้อากาศ และมีการไหลเวียนของอาหารจากตัวถังปฏิกรณ์ชีวภาพผ่านทางท่อกลาง (central pipe) ตามหมายเลข 2 จากรูปที่ 3.2 เข้าสู่ภายในแพคเบดคอลัมน์ อาศัยปั๊มเป็นตัวกำหนดอัตราการไหลของอาหารผ่านแพคเบดคอลัมน์ ซึ่งการกำหนดอัตราไหลของอาหารคิดจากระยะเวลากักเก็บอาหาร (hydraulic retention time, HRT) ภายในแพคเบดที่ต้องการ และการออกแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบดในลักษณะดังกล่าว สามารถช่วยลดข้อจำกัดการถ่ายโอนมวลลงได้ ทั้งยังลดปัญหาการปนเปื้อนจุลินทรีย์ระหว่างการผลิตได้



รูปที่ 3.3 แผนผังถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบดที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งปรับปรุงแผนผังมาจากบริษัท Medorex e.K. ประเทศเยอรมัน 1) ตัวถัง 2) ท่อกลางสำหรับวนอาหารเข้าสู่แพคคอลัมน์ 3) ช่องว่างระหว่างแพคคอลัมน์กับท่อกลาง 4) ผนังกันวัสดุตรึงมีลักษณะเป็นตะแกรงกัน และ 5) แพคคอลัมน์ที่บรรจุวัสดุตรึง



รูปที่ 3.4 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเพดและอุปกรณ์ควบคุมภาวะการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ
 1) เครื่องควบคุม 2) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ 3) เครื่องดูจ่ายสารละลาย 4) ช่องเก็บตัวอย่าง 5) ช่อง
 อากาศเข้า 6) ช่องอากาศออก

3.6 ขั้นตอนการดำเนินการทดลอง

3.6.1 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระดับขวดเขย่าและการวัดปริมาณการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

การศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพระดับขวดเขย่า ศึกษาการผลิตด้วยแบคทีเรียแบบเซลล์อิสระ สำหรับการคัดเลือกแบคทีเรียจากทั้งหมด 4 สายพันธุ์ (GY30 GY33 GY36 และ GY40) ที่มีประสิทธิภาพ โดยใช้อาหารเบซัล (basal medium, BM) ที่ดัดแปลงมาจาก Abbasi และคณะ (2013) และใช้น้ำมันถั่วเหลืองปริมาณ 2 % (v/v) เป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจากหาได้ง่ายและมีราคาไม่แพง นอกจากนี้งานวิจัยของ Mukherjee และคณะ (2006) และ Luna และคณะ (2011) พบว่า น้ำมันถั่วเหลืองนั้นเป็นหนึ่งในสารตั้งต้นที่เหมาะสมของการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย หลักเกณฑ์การคัดเลือกคืออัตราการเจริญ ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในรูปสารสกัดหยาบ รวมไปถึงต้องไม่เป็นแบคทีเรียก่อโรคตามพระราชบัญญัติเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ. 2558 กล่าวคือจะต้องไม่เป็นเชื้อก่อโรคให้กลุ่มที่ 1 2 3 และ 4 เพื่อให้สามารถนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไปประยุกต์ใช้กับงานด้านอุตสาหกรรมอาหารและสิ่งแวดล้อมได้ โดยนำแบคทีเรียที่คัดเลือกมาศึกษาการเพิ่มผลผลิตสารลดแรงตึงผิวต่อไป นอกจากการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธีเลี้ยงเซลล์แบบเซลล์อิสระในระดับขวดเขย่าแล้ว ได้ศึกษาการเพิ่มผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยเปรียบเทียบปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในรูปของสารสกัดหยาบจากวิธีการเลี้ยงแบคทีเรียแบบเซลล์อิสระและวิธีการเลี้ยงแบคทีเรียแบบเซลล์ตรึง

3.6.1.1 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเซลล์อิสระ

เตรียมหัวเชื้อโดยเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียบนอาหารแข็ง 25% Luria-Bertani (LB) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำโคโลนีใสในอาหารเหลว 25% LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนกระทั่งอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) เท่ากับ 0.5 หรือมีปริมาณเซลล์เท่ากับ 10^8 CFU/มิลลิลิตร จากนั้นเติมหัวเชื้อปริมาณ 1% (v/v) สำหรับการคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียและการศึกษาลักษณะการเจริญของแบคทีเรีย ในอาหาร BM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีน้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน เก็บตัวอย่างที่ 0 6 12 24 36 48 72 96 และ 120 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และวิเคราะห์การเจริญ โดยการนับเซลล์ใช้เทคนิค Viable cell count โดยเจือจางเป็นลำดับส่วน 10 เท่า และนับแบคทีเรียด้วยวิธีตรอปเพลท 10 ไมโครลิตร ลงบนอาหารแข็ง LB

3.6.1.2 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเซลล์ตรึงบนโคโตซาน

เลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกบนอาหารแข็ง 25% LB เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อจากอาหารแข็งลงในอาหารเหลว 25% LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยโคโตซาน 8% (w/v) เป็นเวลา 2 วัน (Khondee และคณะ 2015) โดยโคโตซานที่ใช้คือโคโตซานชนิดเกล็ด ที่ผลิตจากแกนปลาหมึกบด ผลิตโดยบริษัท อีแลนด์คอร์ปอเรชัน จำกัด มีขนาดประมาณ 1-3 มิลลิเมตร (รูปที่ 3.5) แบคทีเรียตรึงมีปริมาณเซลล์เริ่มต้นเฉลี่ย 2.90×10^7 CFU/กรัมโคโตซาน หลังจากนั้นเทอาหาร 25% LB ออกจากขวดเขย่า ล้างโคโตซานที่ตรึงเซลล์ด้วย สารละลาย 0.85% w/v โซเดียมคลอไรด์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร 2 รอบ เติมอาหาร BM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยน้ำมันถั่วเหลือง 2% (v/v) ใช้ระยะเวลาผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 3 วัน ตามระยะเวลาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงสุดของสายพันธุ์ที่คัดเลือก



รูปที่ 3.5 โคโตซานจากแกนปลาหมึกชนิดเกล็ดขนาด 1-3 มิลลิเมตร ที่ใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธีการตรึงเซลล์

การวัดปริมาณเซลล์ตรึงบนโคโตซาน ทำโดยนำโคโตซานที่ผ่านการตรึงแบคทีเรียใส่ลงในน้ำเกลือ 0.85 % (w/v) โซเดียมคลอไรด์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำโคโตซานที่มีแบคทีเรียตรึงไปนับจำนวนแบคทีเรียที่ถูกตรึงโดยใช้อ่างคลื่นความถี่สูง (ultrasonic bath) เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นปั่นผสมด้วยเครื่องเขย่าสาร (vortex) เป็นเวลา 2 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง นับปริมาณเซลล์แบคทีเรียที่อยู่ในน้ำเกลือด้วยเทคนิค Viable cell count โดยเจือจางเป็นลำดับส่วน 10 เท่า และนับแบคทีเรียด้วยวิธีทรอปเพลทปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนอาหารแข็ง LB

3.6.1.3 การสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

การสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยตัวทำละลาย เริ่มจากปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ 8000 rpm ทำให้ได้น้ำเลี้ยงปราศจากเซลล์ นำน้ำเลี้ยงปราศจากเซลล์มาสกัดด้วยเฮกเซนเพื่อ

กำจัดน้ำมันเหลือใช้จากการผลิตออก โดยใช้เฮกเซนปริมาณ 5 มิลลิลิตรต่อน้ำเลี้ยงปราศจากเซลล์ 50 มิลลิลิตร แยกชั้นน้ำเลี้ยงปราศจากเซลล์และน้ำมันออกจากชั้นเฮกเซน ซึ่งเรียกว่าสารตัวอย่าง นำสารตัวอย่างผสมกับตัวทำละลาย (คลอโรฟอร์มกับเมทานอลในอัตราส่วน 2 ต่อ 1) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 เขย่าสารให้เข้ากันเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แยกชั้นสารตัวอย่างออกจากตัวทำละลาย นำชั้นตัวทำละลายมาระเหย ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเหลืองหนืด เติมเมทานอลเพื่อชะสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ดูดเมทานอลลงในถ้วยอลูมิเนียมฟอยด์ที่ผ่านการอบแห้งและชั่งน้ำหนักด้วยอูมิเนียมฟอยด์อบแห้ง เพื่อวัดปริมาณสารลดแรงตึงผิวในรูปสารสกัดหยาบ โดยระเหยเมทานอลออกเพื่อชั่งน้ำหนักสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในรูปสารสกัดหยาบ หรือดูดเมทานอลลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ระเหยเมทานอลออกด้วยเครื่องทำสารละลายให้เข้มข้นโดยใช้สุญญากาศแบบปั่นเหวี่ยง (centrivap vacuum concentrator) เพื่อเก็บสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในรูปสารสกัดหยาบ ดังรูปที่ 3.6

สำหรับการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Bacillus* sp. ก่อนการสกัดด้วยตัวละลาย ให้ตกตะกอนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 6 โมลาร์ ให้มีค่า pH เท่ากับ 2 จากนั้นจึงผสมตัวทำละลายและเข้าสู่ขั้นตอนการสกัดปกติ (Khondee และคณะ, 2015)



รูปที่ 3.6 ลักษณะของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ในรูปของสารสกัดหยาบ

3.6.1.4 การวัดค่าแรงตึงผิว

นำตัวอย่างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่อยู่ในรูปน้ำเลี้ยงเซลล์หรือสารละลายของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากสารสกัดหยาบ ปริมาณ 20 มิลลิลิตร มาวัดค่าแรงตึงผิว ด้วยวิธีเพลท ด้วยเครื่องวัดแรงตึงผิวแบบอัตโนมัติ (Kruss, Germany) ที่ 25 องศาเซลเซียส

3.6.2 การระบุชนิดสายพันธุ์ของแบคทีเรีย

ระบุชนิดของแบคทีเรียด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rRNA ซึ่งข้อมูลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ได้จากการส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริษัท MacroGen ประเทศเกาหลีใต้ จากนั้นนำผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียแต่ละชนิดมาระบุชนิดสายพันธุ์แบคทีเรีย โดยการเปรียบเทียบลำดับ 16s rDNA ของแต่ละสายพันธุ์กับข้อมูลในฐานข้อมูลของ GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) จากนั้นตรวจสอบการย้อมติดสีแกรม การสร้างสปอร์ เพื่อยืนยันผลของการเปรียบเทียบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์

3.6.3 การศึกษาองค์ประกอบของอาหารที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

นำแบคทีเรียตรึงบนไคโตซานมาผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอาหารเบซัล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่แปรผันองค์ประกอบของอาหาร ได้แก่ ปริมาณน้ำมันถั่วเหลือง ปริมาณโซเดียมไนเตรต ปริมาณเหล็กซัลเฟต และปริมาณแมงกานีสซัลเฟต โดยการแปรผันปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอน 0.5 1.5 3.5 5 10 % (v/v) (Luna และคณะ, 2011, Khondee และคณะ, 2015) แปรผันปริมาณโซเดียมไนเตรตซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจน ได้แปรผันเป็นอัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอนต่อไนโตรเจน 10:1 15:1 และ 25:1 (Abouseoud และคณะ, 2007, Kumar และคณะ, 2012) แปรผันปริมาณเหล็กซัลเฟตคือ 0 1 10 100 และ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร (Kiran และคณะ, 2014) สุกทำยทำการแปรผันปริมาณแมงกานีสซัลเฟต 0 0.02 0.2 2.0 และ 20 มิลลิโมลาร์ (Gudina และคณะ, 2015) โดยการศึกษาหาปริมาณที่เหมาะสมของสารอาหารแต่ละชนิด ได้แปรผันองค์ประกอบครั้งละ 1 ชนิด และให้ปริมาณองค์ประกอบชนิดอื่นให้เป็นค่าคงที่ หรือที่เรียกว่าการทดลองครั้งละปัจจัย

วิเคราะห์ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในรูปสารสกัดหยาบของแต่ละชุดการทดลองเพื่อหาชุดทดลองที่ให้ปริมาณสูงสุด และปริมาณเซลล์ในระบบ โดยเลือกปัจจัยความเข้มข้นที่ให้ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในรูปสารสกัดหยาบที่สูงที่สุดของแต่ละปัจจัย เพื่อใช้ปริมาณองค์ประกอบของอาหารที่ให้ปริมาณสารลดแรงตึงผิวสูงสุดเป็นค่าระดับสูง (+1) และระดับกลาง (0) สำหรับการออกแบบการทดลองด้วย Plackett-Burman และบล็อก-เบฮันเคน ตามลำดับ และทำให้เลือกช่วงความเข้มข้นขององค์ประกอบของอาหารแต่ละองค์ประกอบได้อย่างเหมาะสมสำหรับการเลือกปัจจัยที่ระดับต่ำ (-1) ซึ่งเป็นค่าที่ให้ผลการผลิตต่ำ สำหรับการออกแบบการทดลองด้วย Plackett-Burman และ เลือกปัจจัยที่ระดับต่ำ (-1) และสูง (+1) ที่มีความเข้มข้นขององค์ประกอบครอบคลุมค่ากลาง สำหรับการออกแบบแบบบล็อก-เบฮันเคน

3.6.4 การศึกษาความเข้มข้นของสารอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ด้วยวิธีการตอบสนองเชิงพื้นผิว

การออกแบบการทดลองสำหรับผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธีการตอบสนองเชิงพื้นผิวนั้นแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน คือ 1) การคัดเลือกและกลั่นกรองปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งใช้วิธีการออกแบบแบบ Plackett-Burman 2) การหาความสัมพันธ์ของปัจจัยแต่ละปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งอธิบายความสัมพันธ์ในรูปแบบสมการและสามารถระบุค่าที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ โดยใช้การออกแบบแบบบล็อก-เบห์นเคน ซึ่งเหมาะสมต่อการวิเคราะห์ปัจจัยตั้งแต่ 3 ปัจจัยขึ้นไปและแต่ละปัจจัยมีระดับของปัจจัยที่ 3 ระดับคือค่าต่ำ ค่ากลางและค่าสูง และ 3) การวิเคราะห์ข้อมูลโดยการอธิบายตาราง ANOVA (analysis of variance) จากการวิเคราะห์ข้อมูลจากการออกแบบแบบ Plackett-Burman และการออกแบบแบบบล็อก-เบห์นเคน

3.6.4.1 การศึกษาองค์ประกอบอาหารที่มีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในเชิงบวกด้วยวิธีการออกแบบแบบ Plackett-Burman

เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมขององค์ประกอบของอาหารด้วยวิธีตอบสนองเชิงพื้นผิวใช้วิธีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแบบเซลล์ตรึงบนโคโคซาน ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ตามขั้นตอนที่ 3.6.1.2 แล้วเปลี่ยนแปลงสูตรอาหารดังตารางที่ 3.1 ด้วยวิธีการออกแบบการทดลองแบบ Plackett-Burman ใช้การวิเคราะห์ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในรูปแบบสารสกัดหยาบโดยใช้หลักการทางสถิติ (Manivasagan และคณะ, 2014) เปรียบเทียบผลของการผลิตของชุดควบคุมกับชุดทดลองที่เติมองค์ประกอบอาหารแต่ละชนิด ผลที่ได้สามารถบอกได้ว่าสารอาหารชนิดใดที่ส่งเสริมการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งพิจารณาจากค่า p (P value) ในตาราง ANOVA หากค่า p มีค่าน้อยกว่า 0.05 แสดงว่าปัจจัยนั้นสามารถวิเคราะห์ได้ว่า ปฏิเสธสมมติฐานที่ 0 ได้ว่าเป็นการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของชุดควบคุมกับชุดทดลองที่เติมองค์ประกอบอาหารแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95%

ตารางที่ 3.1 ชุดทดลองของความเข้มข้นขององค์ประกอบของอาหารชนิดต่างๆที่ออกแบบโดยการทดลองด้วย Plackett-Burman

ชุดทดลอง	ระดับความสำคัญ			
	X_1	X_2	X_3	X_4
1	-1 (0.5)	-1 (10:1)	-1 (0.01)	+1 (0.002)
2	+1 (5)	-1 (10:1)	-1 (0.01)	-1 (0.000002)
3	-1 (0.5)	+1 (15:1)	-1 (0.01)	-1 (0.000002)
4	+1 (5)	+1 (15:1)	-1 (0.01)	+1 (0.002)
5	-1 (0.5)	-1 (10:1)	+1 (10)	+1 (0.002)
6	+1 (5)	-1 (10:1)	+1 (10)	-1 (0.000002)
7	-1 (0.5)	+1 (15:1)	+1 (10)	-1 (0.000002)
8	+1 (5)	+1 (15:1)	+1 (10)	+1 (0.002)

หมายเหตุ : X_1 คือ น้ำมันถั่วเหลือง (% v/v), X_2 คือ อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (กรัมคาร์บอนต่อกรัมไนโตรเจน), X_3 คือ ความเข้มข้นเหล็ก (มิลลิกรัมต่อลิตร) และ X_4 คือ ความเข้มข้นของแมงกานีส (โมลาร์)

องค์ประกอบของอาหารที่เลือกใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวนั้น มีการรายงานว่าสามารถช่วยส่งเสริมการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยแบคทีเรียได้ ได้แก่ น้ำมันถั่วเหลือง โซเดียมไนเตรต ปริมาณเหล็ก และปริมาณแมงกานีส เป็นปัจจัยที่สำคัญที่ส่งผลต่อการเพิ่มการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Luna และคณะ, 2011, Kumar และคณะ, 2012, Kiran และคณะ, 2014, Gudina และคณะ, 2015) ซึ่งใช้ผลการคัดเลือกและกลั่นกรององค์ประกอบที่มีความสำคัญต่อการส่งเสริมการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยอาศัยการออกแบบการทดลองด้วย Plackett-Burman สำหรับยืนยันข้อมูลดังกล่าวได้

3.6.4.2 การศึกษาองค์ประกอบของสารอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยการออกแบบการทดลองวิธีบ็อก-เบห์นเคน (Box Behnken)

เมื่อทราบถึงองค์ประกอบของอาหารที่สำคัญต่อการผลิตแล้ว จึงหาความสัมพันธ์ของปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในรูปสารสกัดหยาบ (ค่าตอบสนอง) กับองค์ประกอบของอาหารที่สำคัญต่อการผลิต (ตัวแปรอิสระ) โดยความสัมพันธ์ของค่าตอบสนองต่อองค์ประกอบของอาหารชนิดต่างๆ สามารถประมาณค่าได้จาก สมการเชิงถดถอยกำลังสอง (quadratic regression equation) (Manivasagan และคณะ, 2014) ดังสมการ 3.1

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{1 \leq i < j \leq k} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

สมการที่ 3.1 รูปทั่วไปของสมการแสดงความสัมพันธ์แบบยกกำลังของความสัมพันธ์ลำดับสอง

โดยการเลือกแปรผันตัวแปรอิสระนั้นใช้การออกแบบการทดลองแบบบล็อก-เบห์นเคน (Bezerra และคณะ, 2008) ซึ่งแต่ละตัวแปรอิสระมีความสำคัญ 3 ระดับ คือ ระดับต่ำ (-1), ระดับกลาง (0) และระดับสูง (+1) โดยเลือกค่ากลางจากปริมาณที่เหมาะสมของแต่ละองค์ประกอบของอาหารตามที่ได้ศึกษาจากข้อที่ 3.6.3 ส่วนระดับสูงและต่ำ โดยเลือกจากค่าที่อยู่นอกช่วงปริมาณที่ให้ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงสุดจากการออกแบบการทดลองครั้งละปัจจัย โดยแปรผันปริมาณน้ำมันถั่วเหลือง 1 (-1) 3 (0) และ 5 (+1) % (v/v) แปรผันสัดส่วนปริมาณคาร์บอนต่อนโตรเจนที่อัตราส่วน 10:1 (-1) 15:1 (0) และ 20:1 (+1) (กรัมคาร์บอนต่อกรัมไนโตรเจน) แปรผันปริมาณเหล็กซัลเฟตที่ 1 (-1) 50 (0) และ 100 (+1) มิลลิกรัมต่อลิตร และแปรผันปริมาณแมงกานีสซัลเฟตที่ 0.00002 (-1) 0.0002 (0) และ 0.002 (+1) โมลาร์ ตามตารางที่ 3.2 ภายหลังจากการออกแบบการทดลองใช้สูตรอาหารตามตารางที่ 3.2 เพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแต่ละภาวะ และทำการทดลองชุดละ 2 ซ้ำ โดยวิเคราะห์ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่อยู่ในรูปสารสกัดหยาบ จากนั้นใช้การวิเคราะห์ทางสถิติ ด้วย Analysis of variance (ANOVA) แบบ unpaired student t-test และหาค่า P ในแต่ละปัจจัย และการวิเคราะห์การถดถอย (regression analysis) ซึ่งจะช่วยให้ได้สมการความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (ค่าตอบสนอง) กับองค์ประกอบของอาหารที่สำคัญ (ตัวแปรอิสระ) (response surface regression) จากนั้นนำสมการความสัมพันธ์มาใช้สำหรับสร้างกราฟตอบสนองเชิงพื้นผิว เพื่อใช้อธิบายปริมาณที่เหมาะสมของแต่ละตัวแปรอิสระที่ทำให้ได้ค่าตอบสนองสูงสุด และแสดงความสัมพันธ์ของแต่ละปัจจัย (Manivasagan และคณะ, 2014)

ตารางที่ 3.2 ชุดการทดลองจากการออกแบบการทดลองแบบบล็อก-เบห์นเคน โดยมีตัวแปรอิสระ 4 ตัวแปร ได้แก่ น้ำมันถั่วเหลือง อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจน เหล็ก และแมงกานีส โดยแต่ละตัวแปรอิสระมีระดับความสำคัญ 3 ระดับ

ชุดทดลอง	บล็อก	ระดับความสำคัญ			
		X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
1	1	-1 (1)	-1 (10:1)	0 (50)	0 (0.0002)
2	1	+1 (5)	-1 (10:1)	0 (50)	0 (0.0002)
3	1	-1 (1)	+1 (20:1)	0 (50)	0 (0.0002)
4	1	+1 (5)	+1 (20:1)	0 (50)	0 (0.0002)
5	1	0 (3)	0 (15:1)	-1 (1)	-1 (0.00002)
6	1	0 (3)	0 (15:1)	+1 (100)	-1 (0.00002)
7	1	0 (3)	0 (15:1)	-1 (1)	+1 (0.002)
8	1	0 (3)	0 (15:1)	+1 (100)	+1 (0.002)
9	1	0 (3)	0 (15:1)	0 (50)	0 (0.0002)
10	2	-1 (1)	0 (15:1)	0 (50)	-1 (0.00002)
11	2	+1 (5)	0 (15:1)	0 (50)	-1 (0.00002)
12	2	-1 (1)	0 (15:1)	0 (50)	+1 (0.002)
13	2	+1 (5)	0 (15:1)	0 (50)	+1 (0.002)
14	2	0 (3)	-1 (10:1)	-1 (1)	0 (0.0002)
15	2	0 (3)	+1 (20:1)	-1 (1)	0 (0.0002)
16	2	0 (3)	-1 (10:1)	+1 (100)	0 (0.0002)
17	2	0 (3)	+1 (20:1)	+1 (100)	0 (0.0002)
18	2	0 (3)	0 (15:1)	0 (50)	0 (0.0002)
19	3	-1 (1)	0 (15:1)	-1 (1)	0 (0.0002)
20	3	+1 (5)	0 (15:1)	-1 (1)	0 (0.0002)
21	3	-1 (1)	0 (15:1)	+1 (100)	0 (0.0002)
22	3	+1 (5)	0 (15:1)	+1 (100)	0 (0.0002)
23	3	0 (3)	-1 (10:1)	0 (50)	-1 (0.00002)
24	3	0 (3)	+1 (20:1)	0 (50)	-1 (0.00002)
25	3	0 (3)	-1 (10:1)	0 (50)	+1 (0.002)
26	3	0 (3)	+1 (20:1)	0 (50)	+1 (0.002)
27	3	0 (3)	0 (15:1)	0 (50)	0 (0.0002)

หมายเหตุ : X₁ คือ น้ำมันถั่วเหลือง (% v/v), X₂ คือ อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน, X₃ คือ ความเข้มข้นเหล็ก (มิลลิกรัมต่อลิตร) และ X₄ คือ ความเข้มข้นของแมงกานีส (โมลาร์)

3.6.4.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ผลทางสถิติทั้งการออกแบบด้วยวิธี Plackett-Burman เพื่อหาปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และการออกแบบการทดลองด้วย บ็อก-เบห์นเคน เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยหลัก นั้นวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ STATISTICA 8 โดยขั้นตอนการวิเคราะห์จะใช้หลังจากทราบผลปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่อยู่ในรูปสารสกัดหยาบของแต่ละภาวะ โดยกรอกข้อมูลปริมาณสารลดแรงตึงผิวลงในแต่ละภาวะ จากนั้นวิเคราะห์ผลกำหนดให้ค่าปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในรูปสารสกัดหยาบ (yield) เป็นตัวแปรตาม (dependent value) และองค์ประกอบของอาหาร ได้แก่ ปริมาณน้ำมันถั่วเหลือง (C) อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N) ปริมาณเหล็ก (Fe) และปริมาณแมงกานีส (Mn) เป็นตัวแปรต้น (independent value) จากนั้นวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม STATISTICA 8 ได้ผลการวิเคราะห์เป็นตาราง ANOVA สำหรับอธิบายปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวในเบื้องต้น และ ตาราง ANOVA สำหรับอธิบายปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและความเหมาะสมของสมการความสัมพันธ์

สำหรับการวิเคราะห์ตาราง ANOVA เพื่อใช้อธิบายปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวในเบื้องต้น และ ตาราง ANOVA เพื่อใช้อธิบายปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและใช้อธิบายความเหมาะสมของสมการความสัมพันธ์ การวิเคราะห์ทางสถิติทั้งหมดต้องตั้งสมมติฐานเพื่อใช้สำหรับอธิบายตาราง ANOVA ได้อย่างถูกต้อง โดยการตั้งสมมติฐานกำหนดให้

H0: ปัจจัยแต่ละปัจจัยไม่ส่งผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ หรือปริมาณการผลิตสารลดแรงตึงผิวที่ได้เท่ากันในทุกภาวะ (ค่าเฉลี่ยภาวะที่ 1 เท่ากับค่าเฉลี่ยภาวะที่ 2)

H1: ปัจจัยแต่ละปัจจัยส่งผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ หรือปริมาณการผลิตสารลดแรงตึงผิวที่ได้ไม่เท่ากัน (ค่าเฉลี่ยภาวะที่ 1 ไม่เท่ากับค่าเฉลี่ยภาวะที่ 2)

จากนั้นเมื่อได้ตาราง ANOVA ซึ่งแสดงค่า P ของแต่ละปัจจัย หากค่า P มีค่ามากกว่า 0.05 ให้ยอมรับ H0 และหากค่า P มีค่าน้อยกว่า 0.05 ให้ปฏิเสธ H0 แล้วยอมรับ H1 แสดงว่าหากค่า P มีค่าน้อยกว่า 0.05 ปัจจัยนั้นส่งผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (รูปที่ 3.7)

ANOVA; Var.:Yield; R-sqr=.87602; Adj:.8309 4 Factor Screening Design; MS Residual=.01 DV: Yield					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)Soybean oil	0.43824	1	0.43824	29.5544	0.00020
(2)CN ratio	0.17139	1	0.17139	11.5586	0.00593
(3)Fe	0.07507	1	0.07507	5.0630	0.04588
(4)Mn	0.46785	1	0.46785	31.5514	0.00015
Error	0.16311	11	0.01482		
Total SS	1.31568	15			

รูปที่ 3.7 ตัวอย่างตาราง ANOVA จากโปรแกรมวิเคราะห์ สำหรับวิเคราะห์ปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิว

สำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์และการสร้างสมการใช้หลักการวิเคราะห์เดียวกับการวิเคราะห์ปัจจัยแต่ละปัจจัย คือมีตาราง ANOVA สำหรับการบอกความสัมพันธ์ของแต่ละปัจจัยและสำหรับการสร้างสมการ (รูปที่ 3.8) โดยสมมติฐานที่จำเป็นต้องตั้งสำหรับการวิเคราะห์ คือ

การตั้งสมมติฐานสำหรับแสดงความสัมพันธ์

H0: ปัจจัยแต่ละปัจจัยไม่เกี่ยวข้องกัน

H1: ปัจจัยแต่ละปัจจัยไม่เกี่ยวข้องกัน

และวิเคราะห์ด้วยค่า P ของหัวข้อ Mean/interact

Regr. Coefficients; Var.:Yield; R-sqr=.86774; Adj:.81055 (Spreads 4 3-level factors, 3 Blocks, 54 Runs; MS Pure Error=.0063658 DV: Yield						
Factor	Regressn Coeff.	Std.Err. Pure Err	t(27)	p	-95.% Cnf.Limt	+95.% Cnf.Limt
Mean/Interc.	-0.9712	0.30	-3.26936	0.002940	-2	-0.4
block(1)	0.0000	0.02	0.00000	1.000000	-0	0.0
block(2)	0.0000	0.02	0.00000	1.000000	-0	0.0
(1)Carbon (L)	0.3066	0.06	5.23100	0.000016	0	0.4
Carbon (Q)	-0.0483	0.01	-7.90949	0.000000	-0	-0.0
(2)CN (L)	0.2708	0.03	8.65244	0.000000	0	0.3
CN (Q)	-0.0089	0.00	-9.11698	0.000000	-0	-0.0
(3)Fe (L)	-0.0000	0.00	-0.00000	1.000000	-0	0.0
Fe (Q)	0.0000	0.00	0.00000	1.000000	-0	0.0
(4)Mn (L)	179.6431	199.99	0.89827	0.376981	-231	590.0
Mn (Q)	0.0000	85886.41	0.00000	1.000000	-176224	176224.4
1L by 2L	0.0000	0.00	0.00000	1.000000	-0	0.0
1L by 3L	-0.0000	0.00	-0.00000	1.000000	-0	0.0
1L by 4L	-51.6266	11.85	-4.35795	0.000171	-76	-27.3
2L by 3L	0.0000	0.00	0.00000	1.000000	-0	0.0
2L by 4L	0.0000	4.74	0.00000	1.000000	-10	9.7
3L by 4L	0.0000	0.48	0.00000	1.000000	-1	1.0

รูปที่ 3.8 ตัวอย่างตาราง ANOVA สำหรับใช้อธิบายความสัมพันธ์ของแต่ละปัจจัยและการสร้างสมการแสดงความสัมพันธ์

การสร้างสมการจะได้ว่า ค่าตอบสนอง (ผลผลิต) มีค่าเท่ากับ ผลรวมของค่า Regressn Coeff. ของแต่ละปัจจัยคูณกับปริมาณปัจจัย ซึ่งตารางดังกล่าวนอกจากสามารถสร้างสมการความสัมพันธ์ได้แล้ว ยังสามารถใช้อธิบายว่าปัจจัยใดที่ส่งผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ และสุดท้ายสำหรับการวิเคราะห์ คือความเหมาะสมของสมการแสดงความสัมพันธ์ โดยอธิบายได้จาก ค่า SS ของ Lack of Fit (SS_{Lof}) หารด้วย ค่า SS ของ Pure Error (SS_{Pe}) แล้วเปรียบเทียบกับค่า F จากตาราง F ที่ 0.05 โดยใช้ค่า degree of freedom (df) ใช้สำหรับเปิดเทียบค่า F จากตาราง ซึ่งหาก ค่า SS_{Lof}/SS_{Pe} มีค่ามากกว่าค่า $F(df_L/df_P)$ จากตารางให้ผลคือ สมการแสดงความสัมพันธ์มีความไม่เหมาะสมต้องปรับปรุง (Bezerra และคณะ, 2008) (รูปที่ 3.9)

ANOVA; Var.:Yield; R-sqr=.86774; Adj:.81055 (Spreadsheet3)					
4 3-level factors, 3 Blocks, 54 Runs; MS Pure Error=.0063658					
DV: Yield					
Factor	SS	df	MS	F	p
Blocks	0.000000	2	0.000000	0.00000	1.000000
(1)Carbon L+Q	0.472582	2	0.236291	37.11881	0.000000
(2)CN L+Q	0.533674	2	0.266837	41.91726	0.000000
(3)Fe L+Q	0.000000	2	0.000000	0.00000	1.000000
(4)Mn L+Q	0.018714	2	0.009357	1.46985	0.247782
1*2	0.000000	1	0.000000	0.00000	1.000000
1*3	0.000000	1	0.000000	0.00000	1.000000
1*4	0.120898	1	0.120898	18.99175	0.000171
2*3	0.000000	1	0.000000	0.00000	1.000000
2*4	0.000000	1	0.000000	0.00000	1.000000
3*4	0.000000	1	0.000000	0.00000	1.000000
Lack of Fit	-0.000000	10	-0.000000	-0.00000	
Pure Error	0.171877	27	0.006366		
Total SS	1.299528	53			

รูปที่ 3.9 ตัวอย่างตาราง ANOVA แสดงค่า Lack of Fit และค่า Pure Error

3.6.5 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบด

การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบดขนาด 2 ลิตร สามารถแบ่งขั้นตอนการผลิตได้เป็นสองขั้นตอน คือ ขั้นตอนการเตรียมเซลล์ตรึงบนโคโตซาน และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.6.5.1 การเตรียมเซลล์ตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

เลี้ยงแบคทีเรียลงบนอาหารแข็ง 25%LB เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว 25% LB บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้น จากนั้นเติมหัวเชื้อตั้งต้นปริมาตร 10 % (v/v) ในอาหาร 25% LB ที่มีค่า pH เท่ากับ 6 เพื่อเพิ่มประจุให้กับโคโตซานทำให้การยึดเกาะของแบคทีเรียดีขึ้น โดยมีปริมาณโคโตซานในแพคเบด 80 กรัม ปริมาตรของแพคเบด

เท่ากับ 460 ลูกบาศก์เซนติเมตร ซึ่งเป็นสัดส่วนระหว่างปริมาณโคโคซานต่ออาหารเบซัลที่ใช้ผลิต มีค่าเท่ากับการผลิตในระดับขวดเขย่าที่มีเซลล์ตรึงบนโคโคซาน ควบคุมอัตราการไหลของอาหารผ่านแพคเกจเท่ากับ 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที เพื่อให้แบคทีเรียในแพคเกจได้รับสารอาหารเพียงพอต่อการเจริญและไม่เร็วจนแบคทีเรียนำอาหารมาใช้ไม่ทัน และควบคุมอัตราการให้อากาศที่ 1 vvm เป็นระยะเวลา 3 วัน โดยเปลี่ยนอาหารออกทุก 1 วันแล้วเติม 25% LB ที่มีค่า pH เท่ากับ 6 ใหม่ลงไป ทำซ้ำ 2 รอบ ซึ่งจะทำให้ได้ปริมาณเซลล์ที่ตรึงบนโคโคซานเฉลี่ยเท่ากับ 4.04×10^9 มากกว่าการตรึงตามขั้นตอนที่ 3.6.1.2

3.6.5.2 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเกจ

หลังจากเตรียมเซลล์ตรึงบนโคโคซานตามขั้นตอนที่ 3.6.5.1 เข้าสู่กระบวนการผลิตโดยเปลี่ยนอาหาร LB สำหรับตรึงออก แล้วเติมอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพตามขั้นตอนที่ 3.6.4 โดยตัวแปรในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเกจที่ควบคุมภาวะการผลิต ได้แก่ อัตราการไหลของอาหารที่ผ่านแพคเกจ โดยกำหนดอัตราการไหลของอาหารเป็น 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที หรือค่า HRT เท่ากับ 12 ชั่วโมง ซึ่งอ้างอิงจากระยะเวลาการเจริญของ GY30 ในอาหารเบซัลที่เข้าสู่ช่วงกลางของระยะแบ่งตัวทวีคูณ (mid log phase) ในระยะเวลา 12 ชั่วโมง ตำแหน่งของการให้อากาศกำหนดให้เป็นส่วนล่างของถังปฏิกรณ์ โดยการให้อาหารที่ส่วนล่างของถังปฏิกรณ์จะให้อากาศได้ทั่วถึง ทำให้การเจริญและการผลิตของแบคทีเรียที่เลือกดีกว่าการให้อากาศบริเวณส่วนบนของถังปฏิกรณ์รวมถึงช่วยให้อาหารผสมเข้ากัน และเปรียบเทียบอัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิว จากการแปรผันอัตราการให้อากาศ คือ 0.5 และ 1.5 vvm (ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหาร 1 ลิตรต่อนาที) (Yeh และคณะ, 2006) เพื่อหาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเซลล์ ก่อให้เกิดปริมาณฟองต่ำ และการผสมของอาหารทั่วถึง

โดยวิเคราะห์ปริมาณสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้ ค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเซลล์ และปริมาณเซลล์อิสระในน้ำเลี้ยงเซลล์ ทุกๆวัน เพื่อใช้อธิบายลักษณะการผลิตสารลดแรงตึงผิวในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ รวมถึงวัดปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองที่เหลือใช้จากการผลิตโดยการระเหยสารสกัดเฮกเซนในข้อ 3.6.1.3 และชั่งน้ำหนักน้ำมันถั่วเหลืองที่เหลืออยู่ เพื่อใช้ในการวิเคราะห์และเปรียบเทียบภาวะการให้อากาศที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เก็บตัวอย่างปริมาตร 60 มิลลิลิตร ทุก 1 วัน เป็นเวลา 5 วัน เพื่อนำตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณสารลดแรงตึงผิวและปริมาณเซลล์

เมื่อทราบระยะเวลาและอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ได้ศึกษาการใช้เซลล์ตรึงซ้ำ โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออกและเติมอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตจากข้อ 3.6.4 ใหม่ โดยควบคุมภาวะอัตราการให้อากาศ 1.5 vvm อัตราการไหลอาหารที่ 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที เพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิว จากนั้นเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 60 มิลลิลิตรทุก

1 วัน เป็นเวลา 3 วัน มาวิเคราะห์ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ปริมาณน้ำมันที่เหลือ และปริมาณเซลล์ เปลี่ยนอาหารสำหรับผลิตสารลดแรงตึงผิวใหม่เมื่อครบระยะเวลา 3 วัน ทำซ้ำ 2 รอบ เพื่อพิสูจน์ว่าเซลล์ตรึงที่ใช้ในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพสามารถใช้ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพซ้ำได้

3.6.6 การศึกษาสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

วิเคราะห์ส่วนประกอบโครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตขึ้น โดยวิเคราะห์ปริมาณไขมันด้วยวิธี Sulfo-phospho-vanillin วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol-sulfuric acid (Khondee และคณะ, 2015) และหาค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซล (critical micelle concentration, CMC) เพื่อหาความเข้มข้นที่ต่ำสุดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สามารถทำให้เกิดการก่อไมเซล โดยใช้การวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่อยู่ในรูปสารสกัดหยาบ นอกจากนี้ศึกษาสมบัติการก่ออิมัลชัน (Manivasagan และคณะ, 2014) และสมบัติการกระจายน้ำมัน (Khondee และคณะ, 2015) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่อยู่ในรูปน้ำเลี้ยง น้ำเลี้ยงเซลล์เข้มข้นผ่านการกรองด้วยเมมเบรน และสารลดแรงตึงผิวในรูปสารสกัดหยาบในบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอริกกับน้ำมันชนิดต่างๆ และศึกษาความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในสภาวะต่างๆ (Khondee และคณะ, 2015) ได้แก่ อุณหภูมิ ความเป็นกรดเบส และความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ ซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลสำหรับการประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* GY30

3.6.6.1 การเตรียมตัวอย่างสารละลายสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สำหรับตัวอย่างที่ใช้ทดสอบส่วนประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้น ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่อยู่ในรูปสารสกัดหยาบตามการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในขั้นตอนที่ 3.6.1.3 ส่วนตัวอย่างที่ใช้ทดสอบสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้น ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่อยู่ในรูปสารสกัดหยาบที่ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอริก เตรียมความเข้มข้นให้เหมาะสมต่อการทดสอบ แล้วเปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในรูปน้ำเลี้ยงเซลล์ ความเข้มข้น 2-3 CMC และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในรูปน้ำเลี้ยงเซลล์เข้มข้น เตรียมความเข้มข้นให้เหมาะสมแก่การทดสอบ นอกจากนี้ได้ศึกษาสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในรูปน้ำเลี้ยงเซลล์เข้มข้นโดยใช้การกรองผ่านเมมเบรน โดยนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในรูปน้ำเลี้ยงเซลล์มากรองผ่านแผ่นเมมเบรน ขนาด 30 กิโลดาลตัน ภายใต้อัตราดัน 1 บาร์ ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีขนาดใหญ่กว่าขนาดช่องการผ่านกรองทำให้ปริมาตรของน้ำเลี้ยงเซลล์ลดลงแต่ปริมาณสารลดแรงตึงผิวเท่าเดิม ทำให้มีความเข้มข้นมากขึ้น โดยสามารถทำให้น้ำเลี้ยงเซลล์มีความเข้มข้นขึ้นสูงสุด 10 เท่า

3.6.6.2 การวิเคราะห์ส่วนประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรียที่คัดเลือก

3.6.6.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน โดยวิธี sulfo-phospho-vanillin

เตรียมสารละลายสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Bacillus* sp. GY30 ที่อยู่ในรูปสารสกัดหยาบในสารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอริกฟอสเฟตที่ปรับค่าความเป็นกรดเบสที่ 8 ให้ได้ความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เตรียมมา 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น ปริมาณ 2 มิลลิลิตร ต้มในน้ำร้อน 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลาวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติมสารละลาย phospho-vanillin ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำมาต้มในน้ำอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้กับกราฟมาตรฐาน เพื่อคำนวณปริมาณไขมัน โดยใช้สารไตรโอสีน เป็นสารมาตรฐานสำหรับการวัดปริมาณไขมัน

โดยการเตรียมสารมาตรฐาน ให้ละลายไตรโอสีนความเข้มข้น 0 50 100 200 300 400 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทดสอบตามวิธี sulfo-phospho-vanillin วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตร ของความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้น

3.6.6.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay

เตรียมสารละลายสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Bacillus* sp. GY30 ที่อยู่ในรูปสารสกัดหยาบในสารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอริกฟอสเฟตที่ปรับค่าความเป็นกรดเบสที่ 8 ให้ได้ความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายสารลดแรงตึงผิวชีวภาพปริมาณ 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.15 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.15 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย Coomassie reagent ปริมาตร 5 มิลลิลิตร วางให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำสารผสมมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้กับกราฟมาตรฐาน เพื่อคำนวณปริมาณโปรตีน โดยใช้สารโบวีนซีรัมแอลบูมิน เป็นสารมาตรฐานสำหรับการวัดปริมาณโปรตีน

โดยการเตรียมสารมาตรฐาน ให้ละลายสารโบวินซีรัมแอลบูมินความเข้มข้น 0 25 50 125 250 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทดสอบตามวิธี Bradford assay วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร ของความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้น

3.6.6.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี phenol-sulfuric acid

เตรียมสารละลายสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Bacillus* sp. GY30 ที่อยู่ในรูปสารสกัดหยาบในสารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอริกฟอสเฟตที่ปรับค่าความเป็นกรดเบสที่ 8 ให้ได้ความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายสารลดแรงตึงผิวชีวภาพปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมกับฟีนอลปริมาตร 25 ไมโครลิตร และกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำสารผสมมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 485 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้กับกราฟมาตรฐาน เพื่อคำนวณปริมาณโปรตีน โดยใช้กลูโคส เป็นสารมาตรฐานสำหรับการวัดปริมาณน้ำตาล

โดยการเตรียมสารมาตรฐาน ให้ละลายกลูโคสความเข้มข้น 0 10 20 40 60 80 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทดสอบตามวิธี phenol-sulfuric acid วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 485 นาโนเมตร ของความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้น

3.6.6.2.4 Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)

เพื่อตรวจสอบหมู่ฟังก์ชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่อยู่ในรูปสารสกัดหยาบ 10 ไมโครลิตรเพื่อตรวจสอบโดยใช้เครื่อง FT-IR Spectrometer รุ่น Nicolet iS5 จากบริษัท Thermo Scientific (รูปที่ 3.10) โดยวัดในช่วงสเปกตรัม 4000-400 ต่อเซนติเมตร



รูปที่ 3.10 เครื่อง FT-IR Spectrometer รุ่น Nicolet iS5 จากบริษัท Thermo Scientific

3.6.6.3 การวิเคราะห์สมบัติการก่ออิมัลชัน Emulsification index (E_{24})

ผสมสารตัวอย่างและน้ำมันชนิดต่างๆ ในอัตราส่วน 1:1 ในหลอดทดลอง ปั่นผสมเป็นเวลา 2 นาที ตั้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นวัดชั้นอิมัลชันและชั้นสารละลายทั้งหมด เพื่อคำนวณหาค่าก่ออิมัลชัน (Emulsification index, E_{24}) (Manivasagan และคณะ, 2014) โดยการศึกษาสมบัตินี้ด้วยสารลดแรงตึงผิวที่อยู่ในรูปน้ำเลี้ยงเซลล์ น้ำเลี้ยงเซลล์เข้มข้นที่ผ่านการกรองด้วยเมมเบรน และสารละลายสารลดแรงตึงผิวในรูปสารสกัดหยาบในบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอริก เพราะเมื่อนำไปประยุกต์ใช้จริงส่วนใหญ่นิยมใช้ในรูปแบบสารละลาย โดยน้ำมันที่นำมาใช้ศึกษา ได้แก่ น้ำมันดิบงอกช น้ำมันดิบอาราเบียน เป็นตัวแทนน้ำมันปิโตรเลียม และใช้น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม น้ำมันคาโนลา เป็นตัวแทนน้ำมันพืช ผสมสเตรโอเพนลงในน้ำมันแต่ละชนิดเพิ่มการสังเกตที่ชัดเจน เปรียบเทียบประสิทธิภาพการก่ออิมัลชันกับน้ำกลั่นซึ่งเป็นชุดควบคุมที่ให้ผลลบ และโซเดียมโดเดคซิล ซัลเฟต (SDS) ความเข้มข้น 1 CMC และ Dehydol LS7 ความเข้มข้น 5 CMC เป็นชุดควบคุมที่ให้ผลบวก

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

สมการที่ 3.2 การคำนวณค่า E₂₄

3.6.6.4 การวิเคราะห์สมบัติการกระจายน้ำมัน

ศึกษาการกระจายน้ำมันโดยเติมน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในงานเพาะเชื้อ จากนั้นเติมน้ำมันปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้า น้ำ และหยดสารลดแรงตึงผิวที่อยู่ในรูปน้ำเลี้ยงเซลล์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนชั้นน้ำมันที่เคลือบบนผิวหน้าชั้นน้ำ จากนั้นวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของชั้นน้ำมันที่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถกระจายได้ โดยทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการก่อกิมัลชันกับน้ำกลั่นซึ่งเป็นชุดควบคุมที่ให้ผลลบ และ SDS ความเข้มข้น 1 CMC และ Dehydol Ls7 ความเข้มข้น 5 CMC เป็นชุดควบคุมที่ให้ผลบวก และคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การกระจายน้ำมัน (Khondee และคณะ, 2015) โดยน้ำมันที่นำมาใช้ศึกษา ได้แก่ น้ำมันดิบบงกช น้ำมันดิบอาราเบียน เป็นตัวแทนน้ำมันปิโตรเลียม และใช้น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม น้ำมันคาโนลา เป็นตัวแทนน้ำมันพืชผสมสีเรดโอเพิ่มลงในน้ำมันแต่ละชนิดเพิ่มการสังเกตที่ชัดเจน

$$\text{การกระจายน้ำมัน (\%)} = \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของการกระจายด้วยสารทดสอบ}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของผิวหน้า}} \times 100$$

สมการที่ 3.3 การคำนวณการกระจายน้ำมัน

3.6.6.5 การวิเคราะห์ความเสถียรที่สภาวะต่างๆ

เนื่องจากการใช้งานตามธรรมชาติสารลดแรงตึงผิวจะพบกับการแปรปรวนของสภาวะต่างๆ จึงต้องศึกษาความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตขึ้น โดยการศึกษาความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *Bacillus subtilis* GY30 จะศึกษาในรูปของสารละลายสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ความเข้มข้นเท่ากับ 480 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1 CMC ซึ่งค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลที่นำมาใช้ได้จากการทดลองในข้อที่ 3.6.6.5

3.6.6.5.1 การศึกษาการทนต่ออุณหภูมิ

ศึกษาการทนการทนต่ออุณหภูมิโดยนำสารละลายสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวที่อยู่ในรูปน้ำเลี้ยงเซลล์มาให้อุณหภูมิ 0 4 30 80 100 และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นวัดค่าแรงตึงผิวที่เปลี่ยนแปลงไปตามขั้นตอนที่ 3.6.1.4

3.6.6.5.2 การศึกษาความทนต่อภาวะกรดเบส

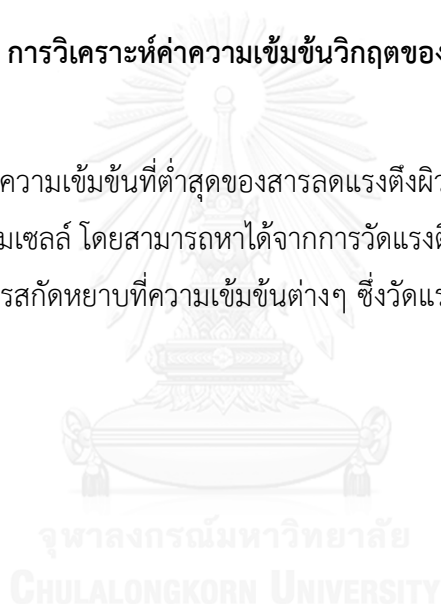
นำสารละลายสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวที่อยู่ในรูปน้ำเลี้ยงเซลล์มาปรับค่าความเป็นกรดเบสของน้ำเลี้ยงเซลล์ด้วย 1 N ไฮโดรคลอริก และ 1 N โซเดียมไฮดรอกไซด์ ให้ได้ค่าความเป็นกรดเบส เท่ากับ 2 4 6 7 8 และ 10 จากนั้นวัดค่าแรงตึงผิวที่เปลี่ยนแปลงไปตามขั้นตอนที่ 3.6.1.4

3.6.6.5.3 การศึกษาการต่อความเข้มข้นเกลือ

ศึกษาการทนเกลือโดยเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0 2 4 6 8 และ 10% w/v ในรูปน้ำเลี้ยงเซลล์และสารละลายสารลดแรงตึงผิว แล้ววัดคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวตามขั้นตอนที่ 3.6.1.4

3.6.6.6 การวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์ (critical micelle concentration, CMC)

การศึกษาเพื่อหาความเข้มข้นที่ต่ำสุดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่อยู่ในรูปสารสกัดหยาบที่สามารถทำให้เกิดการก่อไมเซลล์ โดยสามารถหาได้จากการวัดแรงตึงผิวของสารละลายของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่อยู่ในรูปสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งวัดแรงตึงผิวของสารละลายตามขั้นตอนที่ 3.6.1.4

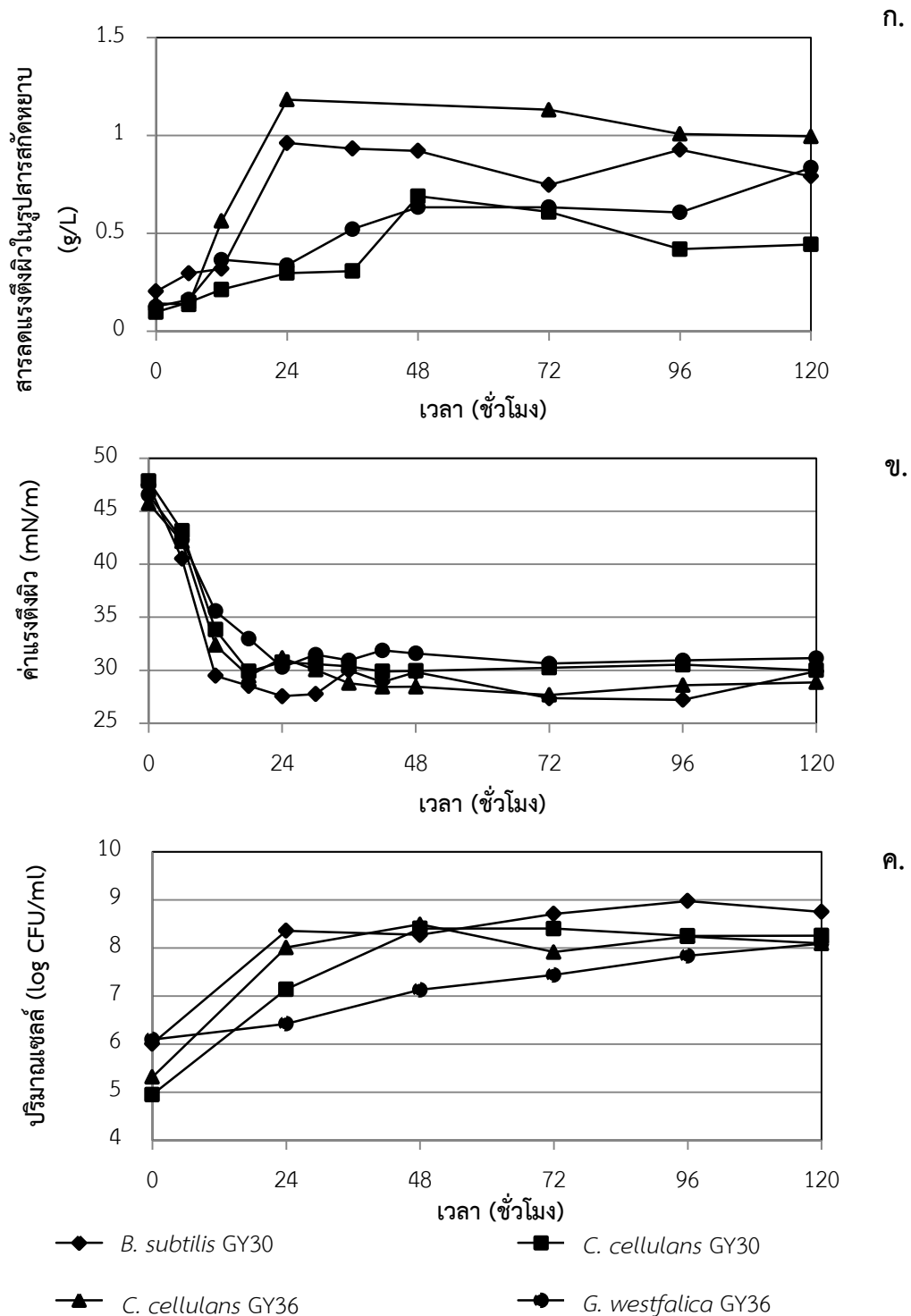


บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

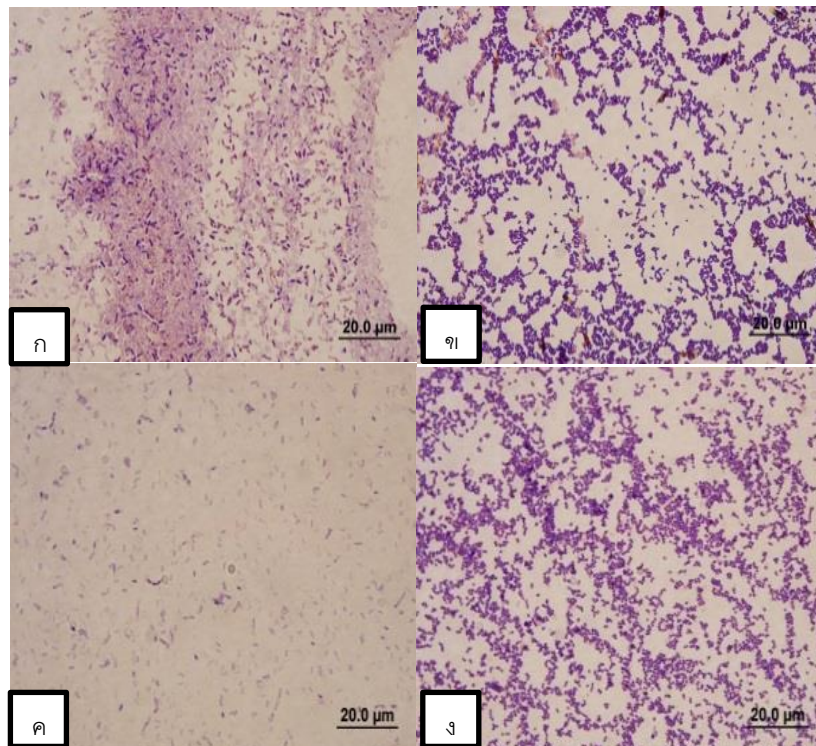
เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ GY30 GY33 GY36 และ GY40 มาศึกษาการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเบซัล ที่ประกอบด้วยน้ำมันถั่วเหลืองปริมาณ 2 % (v/v) แล้วตรวจสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธีการวัดค่าแรงตึงผิวของอาหาร BM และวัดปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในรูปสารสกัดหยาบจากการสกัดด้วยตัวทำละลายคลอโรฟอร์มเมทานอลอัตราส่วน 2 ต่อ 1 ภายหลังจากผลิตในช่วงเวลา 1 2 3 4 และ 5 วัน พบว่าสายพันธุ์ GY30 และ GY36 สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์เข้าสู่ช่วงระยะ stationary ได้ภายใน 24 ชั่วโมง ซึ่งเร็วกว่าสายพันธุ์ GY33 และ GY40 ที่เข้าสู่ช่วง stationary ที่ 48 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ ดังรูปที่ 4.1ค การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นการผลิตสารเมทาบอลิต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) เมื่อเซลล์เข้าสู่ช่วงท้ายของระยะการแบ่งตัวแบบทวีคูณ (late log phase) เร็ว จะทำให้ผลิตสารลดแรงตึงผิวได้เร็ว (Pruthi และ Cameotra, 2003) และปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแปรผันตามจำนวนเซลล์แบคทีเรีย (Khondee และคณะ, 2015, Musale และ Thakar, 2015) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในรูปของสารสกัดหยาบ พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ GY30 และ GY36 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ 0.96 และ 1.18 กรัมต่อลิตร ตามลำดับภายใน 24 ชั่วโมง ซึ่งมากกว่าสายพันธุ์ GY33 และ GY40 ตามรูปที่ 4.1ก นอกจากนี้แบคทีเรียสายพันธุ์ GY30 GY33 GY36 และ GY40 สามารถลดค่าแรงตึงผิวของอาหารเบซัลจาก 56 มิลลินิวตันต่อเมตร เป็น 27.5 29.8 28.7 และ 30.2 มิลลินิวตันต่อเมตร ตามลำดับ รูปที่ 4.1ข โดยพบค่าแรงตึงผิวลดต่ำลงก่อนที่แบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ จะเข้าสู่ช่วงการผลิตสารลดแรงตึงผิวที่สูงสุด เนื่องจากแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้ผลิตสารลดแรงตึงผิวในปริมาณที่มากกว่าค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวชนิดนั้นแล้ว การพิจารณาเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวในงานวิจัยนี้ จึงคัดเลือกจากปริมาณสารลดแรงตึงผิวในรูปสารสกัดหยาบและอัตราการเจริญของแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ในปริมาณสูงได้แก่ GY30 และ GY36



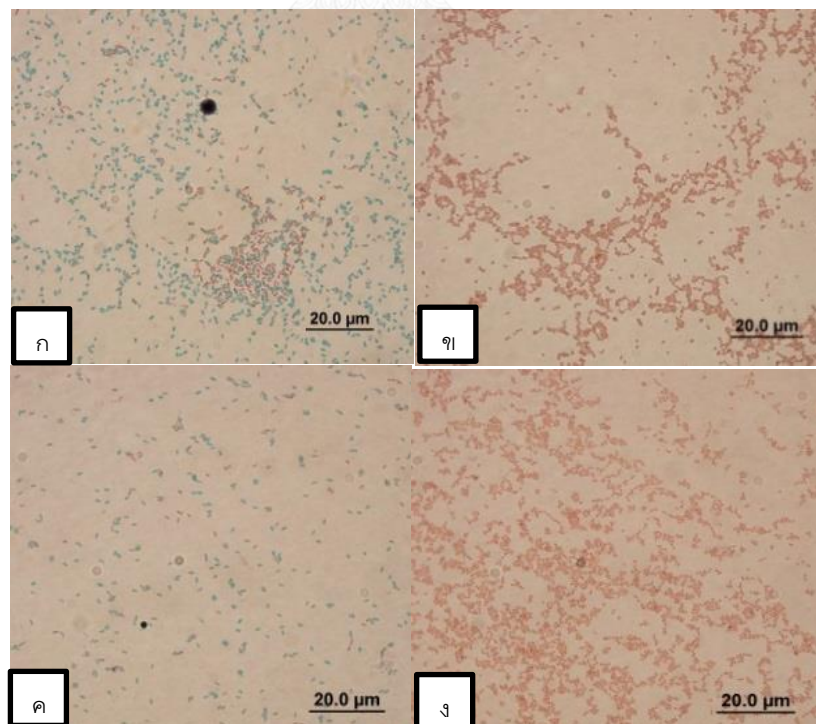
รูปที่ 4.1 การเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของจุลินทรีย์ 4 สายพันธุ์ โดย ก.เปรียบเทียบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในรูปสารสกัดหยาบ ข. เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวัดค่าแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเซลล์ และ ค. เปรียบเทียบปริมาณเซลล์

จากการสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณยีน 16s rRNA เพื่อระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอของยีน 16s rRNA จากคลังข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) สามารถระบุสายพันธุ์แบคทีเรีย GY30 GY33 GY36 และ GY40 ได้ คือ *Bacillus subtilis* GY30 *Cellulosimicrobium cellulans* GY33 *Cellulosimicrobium cellulans* GY36 และ *Gordonia westfalica* GY40 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (Identities) เท่ากับ 99 99 99 และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อทดสอบการย้อมติดสีแกรม แบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (รูปที่ 4.2) ซึ่งเป็นผลที่สอดคล้องกับการจำแนกแบคทีเรียแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* *Cellulosimicrobium* และ *Gordonia* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกทั้งสิ้น และผลจากการทดสอบการย้อมสปอร์ สายพันธุ์ GY30 สามารถสร้างสปอร์อยู่ภายในเซลล์ (endospore) (รูปที่ 4.3ก) ซึ่งเป็นลักษณะเด่นของแบคทีเรียในกลุ่มของ *Bacillus* นอกจากนั้นยังพบเซลล์ติดทั้งสีเขียวและแดงจากสายพันธุ์ GY36 แต่ไม่พบสปอร์ที่อยู่ภายในเซลล์ เนื่องจากไม่เคยมีรายงานว่า *C. cellulans* สร้างสปอร์ จึงคาดว่าจะจะเป็นโครงสร้างอื่น (รูปที่ 4.3 ค)

จากข้อมูลการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ อัตราการเจริญ และสมบัติการลดแรงตึงผิว พบว่าแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ คือ *B. subtilis* GY30 และ *C. cellulans* GY36 แต่เมื่อพิจารณาตามพระราชบัญญัติเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ. 2558 กล่าวคือจะต้องไม่เป็นเชื้อก่อโรคให้กลุ่มที่ 1 2 3 และ 4 หรือมีความเสี่ยงต่อการก่อโรค รวมกับความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จึงสรุปได้ว่า *B. subtilis* GY30 เป็นสายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการนำมาศึกษาและปรับปรุงกระบวนการผลิตต่อ เนื่องจาก *C. cellulans* GY36 เป็นเชื้อฉวยโอกาสซึ่งสามารถก่อให้เกิดโรคได้ในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ (Rowlinson และคณะ, 2006, Petkar และคณะ, 2011) ดังนั้นจึงเลือก *B. subtilis* GY30 สำหรับศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในขั้นต่อไป



รูปที่ 4.2 การย้อมติดสีแกรมของ ก. *B. subtilis* GY30 ข. *C. cellulans* GY33 ค. *C. cellulans* GY36 และ ง. *G. westfalica* GY40



รูปที่ 4.3 การย้อมสีเอนโดสปอร์ด้วยมาลาโคทกรีน ของ ก. *B. subtilis* GY30 ข. *C. cellulans* GY33 ค. *C. cellulans* GY36 และ ง. *G. westfalica* GY40

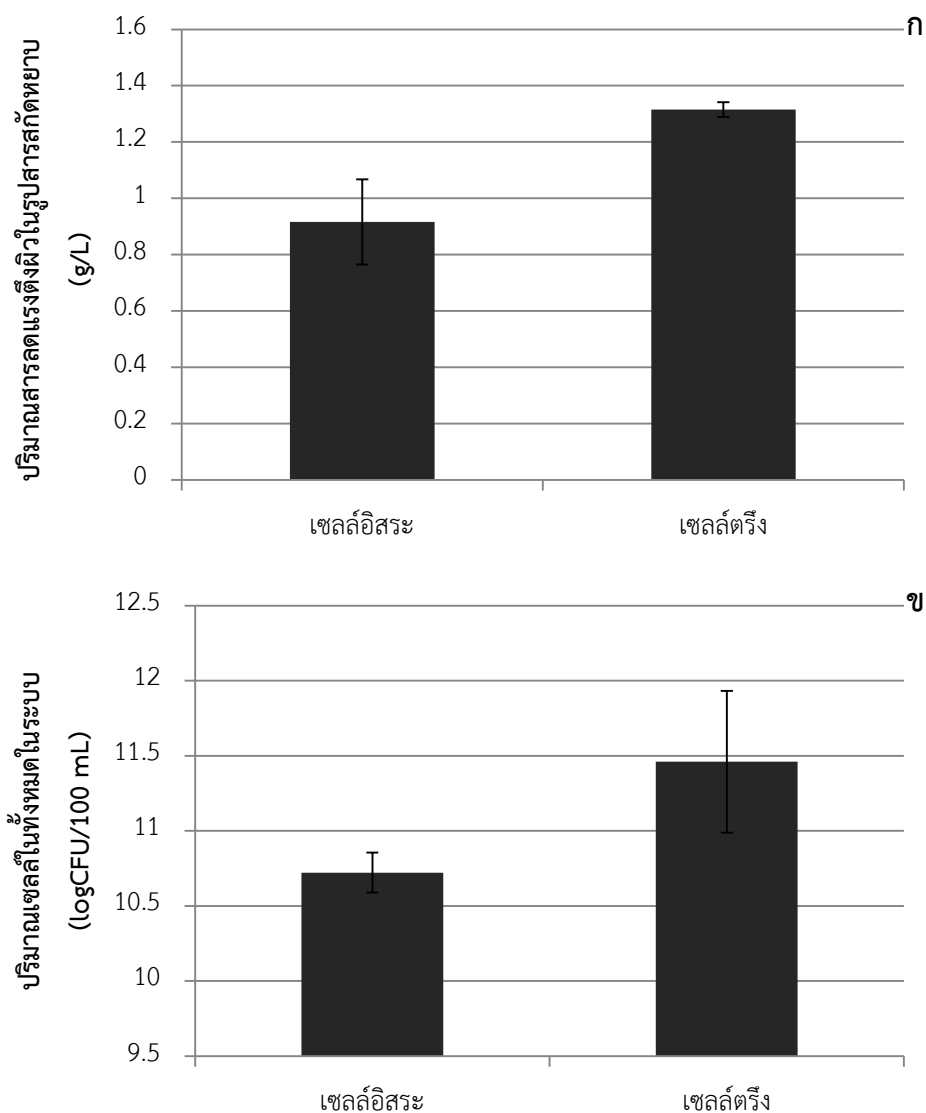
4.2 การพัฒนาและปรับปรุงการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพจาก *B. subtilis* GY30 ในระดับขวดเขย่า

ขั้นตอนการพัฒนาการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพในระดับขวดเขย่า ประกอบด้วย การเปรียบเทียบวิธีการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพด้วยเซลล์แบบเซลล์อิสระและแบบเซลล์ตรึงบนโคโตซาน และการปรับปรุงสูตรอาหารเบซัลให้มีความเข้มข้นของสารอาหารที่เป็นองค์ประกอบที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพจาก *B. subtilis* GY30 ให้ได้ปริมาณสูงสุด โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์การตอบสนองเชิงพื้นผิว

4.2.1 เปรียบเทียบการผลิตสารลดแรงดึงผิวด้วยวิธีการเลี้ยงแบบเซลล์อิสระและเซลล์ตรึง

การเปรียบเทียบการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพโดยวิธีการเลี้ยงเซลล์แบบเซลล์อิสระและวิธีการเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีตรึงเซลล์บนโคโตซาน ใช้อาหารเบซัลและใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นสารตั้งต้น ปริมาณ 2 % (v/v) และระยะเวลาการผลิต 3 วัน โดยการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพโดยเซลล์อิสระสามารถผลิตสารลดแรงดึงผิวได้ 0.92 ± 0.15 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพโดยเซลล์ตรึงสามารถผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพได้ 1.32 ± 0.03 กรัมต่อลิตร ตามรูปที่ 4.4ก พบว่าการผลิตด้วยวิธีการตรึงเซลล์บนโคโตซานสามารถผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพได้มากกว่าวิธีการเลี้ยงแบบเซลล์อิสระ โดยมีปริมาณสารลดแรงดึงผิวชีวภาพเพิ่มขึ้น 43.48% จากเดิมที่ผลิตได้ 0.92 กรัมต่อลิตร (1.43 เท่า) ซึ่งยืนยันได้ว่าเซลล์ตรึงสามารถผลิตสารลดแรงดึงผิวได้มากกว่าการผลิตแบบเซลล์อิสระ เมื่อพิจารณาในด้านจำนวนเซลล์ในระบบการผลิตระหว่างการผลิตแบบเซลล์ตรึงและเซลล์อิสระ พบว่าระบบการเลี้ยงเซลล์แบบเซลล์ตรึงมีจำนวนเซลล์รวมในระบบ (ปริมาณเซลล์ทั้งหมดบนโคโตซาน 8 กรัม รวมกับปริมาณเซลล์ทั้งหมดในน้ำเลี้ยงเซลล์ 100 มิลลิลิตร) มากกว่าการเลี้ยงเซลล์แบบเซลล์อิสระ (ปริมาณเซลล์ทั้งหมดในน้ำเลี้ยงเซลล์ 100 มิลลิลิตร) โดยมีจำนวนเซลล์รวมในระบบ 11.46 และ 10.72 log CFU ตามลำดับ (รูปที่ 4.4ข) ซึ่ง Khondee และคณะ (2015) รายงานว่าปริมาณเซลล์ที่ตรึงบนโคโตซานมีมากกว่าระบบการเลี้ยงแบบเซลล์อิสระ เนื่องจากเซลล์ที่ยึดเกาะบนพื้นผิวโคโตซานมีความหนาแน่น ซึ่งเป็นผลที่สอดคล้องกับผลปริมาณสารลดแรงดึงผิวชีวภาพในรูปของสารสกัดหยาบ นอกจากนี้สารลดแรงดึงผิวชีวภาพถือว่าเป็นสารเมทาบอลิต์ทุติยภูมิและเป็นสารสะสมเพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารสำรอง (Van Hamme และคณะ, 2006) การผลิตด้วยเซลล์ตรึงนั้นมีปริมาณเซลล์ที่คงที่บนพื้นผิวของวัสดุตรึง ทำให้เซลล์อยู่ในช่วงการเจริญแบบ stationary เมื่อแบคทีเรียสัมผัสกับแหล่งคาร์บอนจึงสร้างสารเมทาบอลิต์ทุติยภูมิ แทนการนำแหล่งคาร์บอนมาใช้เพิ่มจำนวนเซลล์ ดังนั้นจึงเลือกการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพด้วยเซลล์ตรึงบน

โคโตซาน เพื่อการศึกษาองค์ประกอบของสารอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จาก *B. subtilis* GY30 ต่อไป



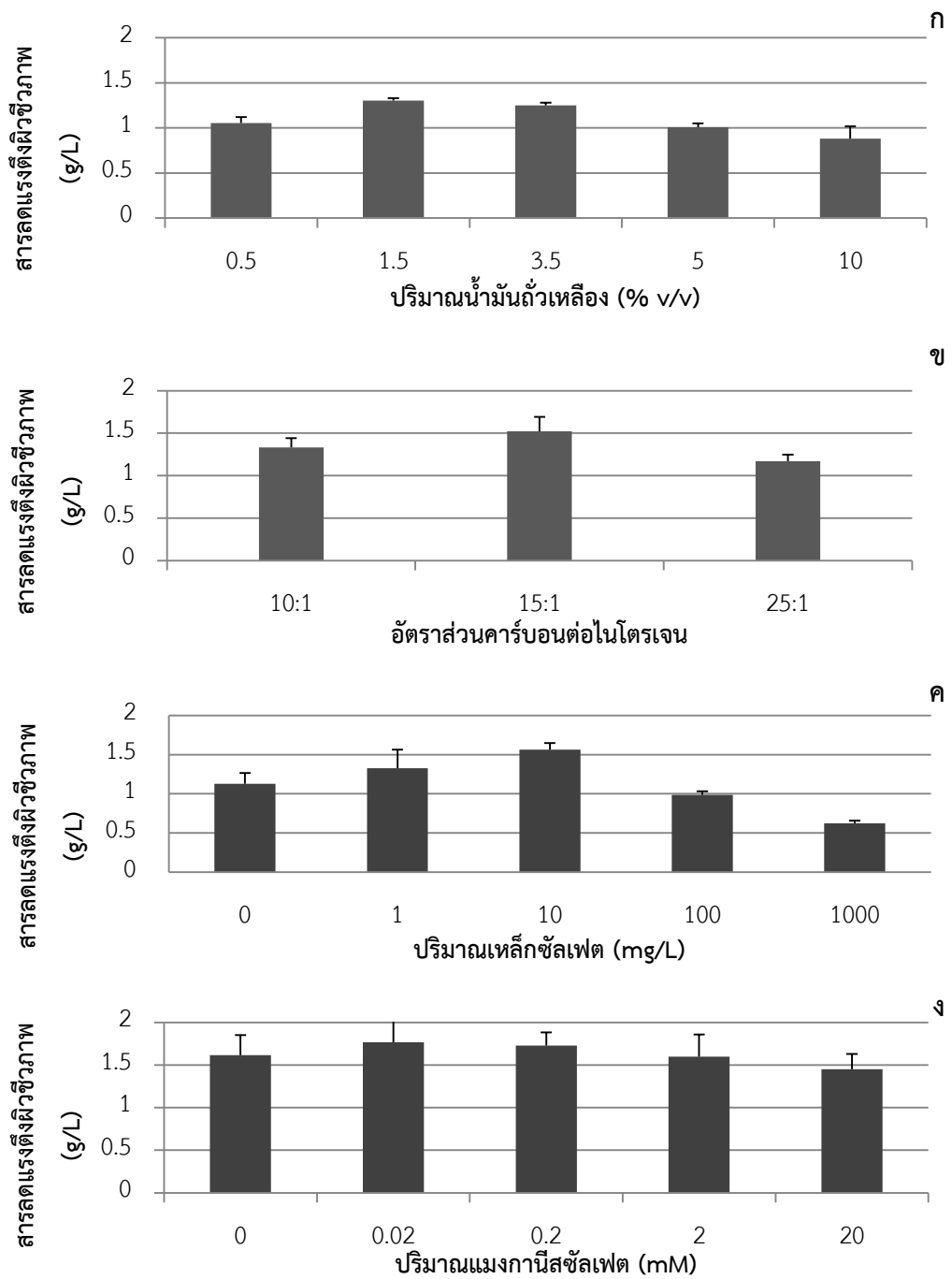
รูปที่ 4.4 เปรียบเทียบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (ก) และจำนวนเซลล์ทั้งหมดในระบบของ *B. subtilis* GY30 (ข) ด้วยวิธีการเลี้ยงแบบเซลล์อิสระและเซลล์ตรึง

4.2.2 ศึกษาองค์ประกอบของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

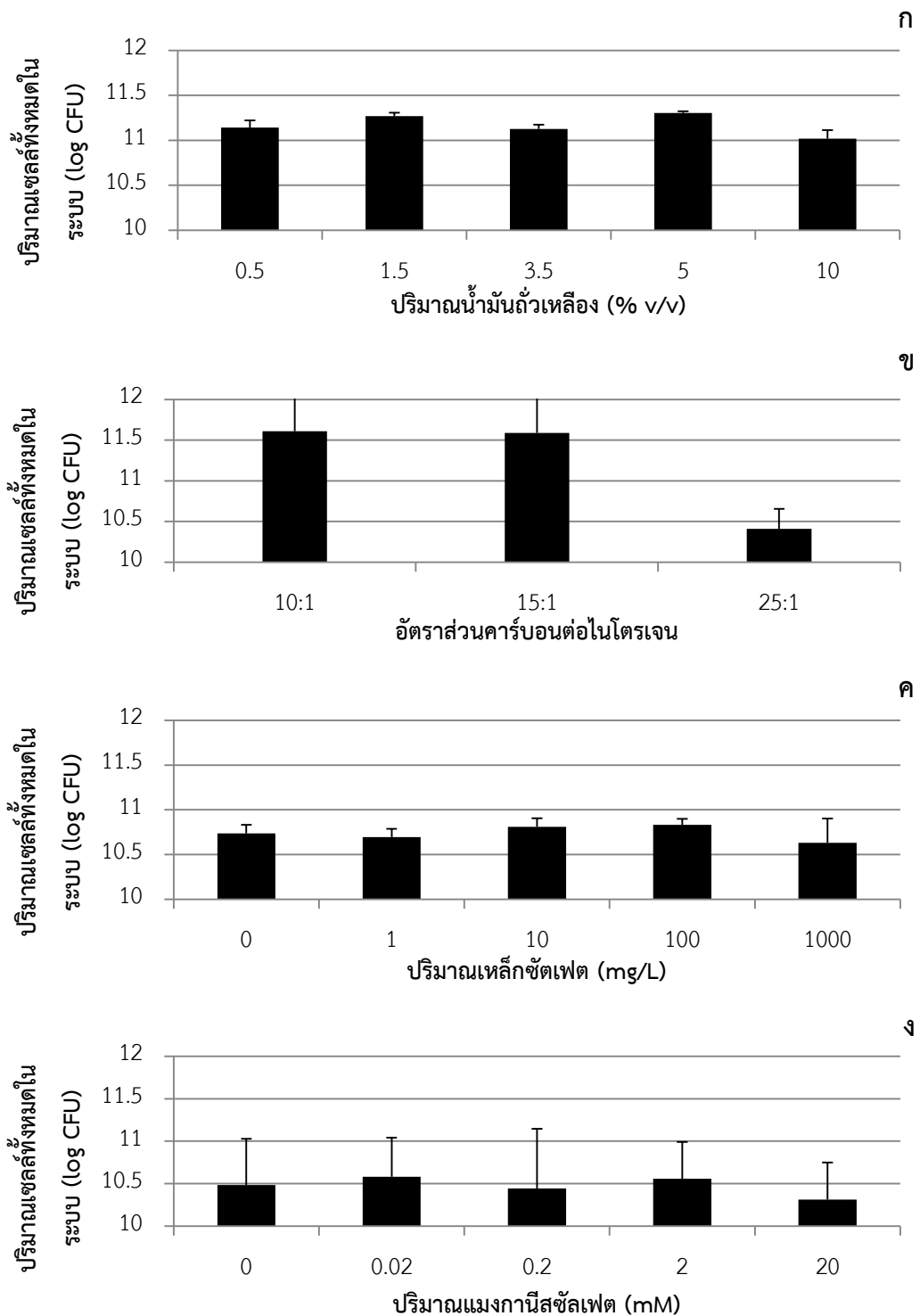
ในขั้นแรกได้ศึกษาองค์ประกอบของอาหารที่มีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวจาก *B. subtilis* GY30 โดยแปรผันปริมาณสารอาหารดังต่อไปนี้ คือ ปริมาณน้ำมันถั่วเหลือง ในช่วง 0 - 10 % (v/v) (Luna และคณะ, 2011) ปริมาณไซเตียมไนเตรตโดยแปรผันตามสัดส่วน คาร์บอนต่อไนโตรเจน ตั้งแต่ 10:1 - 25:1 กรัมคาร์บอนต่อกรัมไนโตรเจน (Kumar และคณะ, 2012)

ปริมาณเหล็กซัลเฟตในช่วง 0 - 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร (Kiran และคณะ, 2014, Gudina และคณะ, 2015) และปริมาณแมงกานีสซัลเฟต 0 - 20 มิลลิโมลาร์ (Gudina และคณะ, 2015) โดยการแปรผันปริมาณสารดังกล่าวใช้วิธีการออกแบบการทดลองแบบ One factor at a time ถึงแม้ว่าการออกแบบการทดลองแบบ One factor at a time จะไม่สามารถอธิบายความสัมพันธ์ของปัจจัยแต่ละปัจจัย (Bezerra และคณะ, 2008) แต่เป็นการออกแบบการทดลองที่เข้าใจได้ง่ายและไม่ซับซ้อน จึงนำมาใช้ออกแบบเพื่อนำข้อมูลไปเลือกช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman และบล็อก-เบห์นเคน สำหรับการวิเคราะห์หาค่าประจักษ์ที่มีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในเชิงบวกและการวิเคราะห์หาปริมาณสารอาหารที่ทำให้เกิดการผลิตสารลดแรงตึงผิวที่สูงที่สุดตามลำดับ เนื่องจากปัญหาที่พบส่วนใหญ่ของการวิเคราะห์การตอบสนองเชิงพื้นผิว คือ การเลือกช่วงที่ผิดพลาดส่งผลให้ปัจจัยบางปัจจัยถูกตัดออกจากการทดลอง (Baş และ Boyacı, 2007)

การแปรผันปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองสำหรับแหล่งคาร์บอนอยู่ในช่วง 0.5 1.5 3.5 5 10 %v/v (Luna และคณะ, 2011, Khondee และคณะ, 2015) ผลที่ได้พบว่าปริมาณน้ำมันถั่วเหลือง 1.5 % v/v สามารถให้การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้สูงที่สุดคือ 1.30 กรัมต่อลิตร จากรูปที่ 4.5ก จากนั้นได้แปรผันปริมาณโซเดียมไนเตรตสำหรับสัดส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนให้อยู่ในช่วง 10:1 15:1 และ 25:1 (Kumar และคณะ, 2012) โดยกำหนดปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองเท่ากับ 1.5 % v/v ปริมาณเหล็กและแมงกานีสปริมาณตามสูงอาหารเบซัลเดียม การคำนวณสัดส่วนคาร์บอนและไนโตรเจนคิดเป็นปริมาณคาร์บอนอะตอม (กรัม) ในระบบซึ่งมีจากน้ำตาลกลูโคสและน้ำมันถั่วเหลืองต่อปริมาณของไนโตรเจนอะตอม (กรัม) จากโซเดียมไนเตรตและสารสกัดยีสต์ (ภาคผนวก ก) ผลการศึกษาสัดส่วนที่ให้ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงสุดคือ สัดส่วนแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ 15:1 ซึ่งผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ 1.52 กรัมต่อลิตร ดังรูปที่ 4.5ข หลังจากทราบปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองและสัดส่วนปริมาณแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนแล้ว ได้แปรผันปริมาณเหล็ก โดยใช้เหล็กซัลเฟตซึ่งมีผลต่อการเพิ่มปริมาณเซลล์และการผลิตสารลดแรงตึงผิวมากกว่าการใช้เหล็กคลอไรด์ (Maqsood และคณะ, 2011, Gaensly และคณะ, 2014) โดยแปรผันปริมาณเหล็กในช่วงความเข้มข้น 0 1 10 100 และ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ว่าความเข้มข้นเหล็กซัลเฟต 10 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มปริมาณการผลิตสารลดแรงตึงผิวได้โดยผลิตได้ในปริมาณ 1.56 กรัมต่อลิตร ดังรูปที่ 4.5ค และสุดท้ายแปรผันความเข้มข้นแมงกานีสในช่วง 0 0.02 0.2 2.0 และ 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงสุดที่ผลิตได้คือ 1.7 กรัมต่อลิตร ที่ความเข้มข้นแมงกานีสเท่ากับ 0.02 และ 0.2 มิลลิโมลาร์ ตามรูปที่ 4.5ง



รูปที่ 4.5 ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชีวภาพจากการออกแบบการทดสอบแบบ one factor at a time ก. แปรผันปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองในช่วง 0 - 10 % v/v ข. แปรผันอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนตั้งแต่ 10:1 - 25:1 ค. แปรผันปริมาณเหล็กซัลเฟตตั้งแต่ 0 - 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ง. แปรผันปริมาณแมงกานีสซัลเฟตตั้งแต่ 0 - 20 มิลลิโมลาร์



รูปที่ 4.6 ปริมาณเซลล์ทั้งหมดในระบบจากการออกแบบการทดสอบแบบ one factor at a time ก. แปรผันปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองในช่วง 0 - 10 % v/v ข. แปรผันอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน ตั้งแต่ 10:1 - 25:1 ค. แปรผันปริมาณเล็คทีนตั้งแต่ 0 - 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ง. แปรผันปริมาณแมงกานีสซัลเฟตในช่วง 0 - 20 มิลลิโมลาร์ ทดลองทดลอง 2 ชุดการทดลอง

จากการแปรผันปริมาณน้ำมันถั่วเหลือง ปริมาณโซเดียมไนเตรต (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน) ปริมาณเหล็กและปริมาณแมงกานีสในอาหารเบซัลที่ใช้ผลิตสารลดแรงตึงผิว ได้ปริมาณที่ทำให้มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวได้สูงที่สุดในแต่ละปัจจัยคือ 1.5 %v/v 15:1 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 0.02 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งค่าปริมาณที่ให้ผลดีที่สุดของแต่ละปัจจัยสามารถนำมาเป็นค่าสูง (+1) และค่ากลาง (0) ของระดับปริมาณ เมื่อใช้ออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman และบล็อก-เบห์นเคน

เพื่อยืนยันผลขององค์ประกอบของอาหารที่มีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในเชิงบวก ผู้วิจัยใช้วิธีการออกแบบแบบ Plackett-Burman สำหรับการเลือกปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิต ผลการลดแรงตึงผิวชีวภาพจากปริมาณองค์ประกอบสารอาหารที่แตกต่างกันตามการออกแบบ ดังตารางที่ 4.1 พบว่าปัจจัยขององค์ประกอบของอาหารที่มีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพคือ น้ำมันถั่วเหลืองซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาณโซเดียมไนเตรตใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน ปริมาณเหล็กซัลเฟต และปริมาณแมงกานีสซัลเฟต โดยมีค่า P เท่ากับ 0.000205 0.005931 0.045881 และ 0.000156 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.2 ซึ่งมีค่าน้อยกว่า 0.05 ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าการปริมาณน้ำมันถั่วเหลือง สัดส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสม ปริมาณเหล็กซัลเฟตและปริมาณแมงกานีสซัลเฟต ช่วยเพิ่มความแตกต่างของปริมาณการผลิตสารลดแรงตึงผิว จากการเปรียบเทียบปริมาณความเข้มข้นที่ระดับต่ำ (-1) ซึ่งให้ผลการผลิตสารลดแรงตึงปริมาณต่ำ และความเข้มข้นที่ระดับสูง (+1) ที่ให้ผลการผลิตสารลดแรงตึงผิวที่สูง ซึ่งมีการผลิตที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% แสดงว่าปัจจัยขององค์ประกอบอาหารทั้ง 4 ปัจจัย ที่เลือกมาศึกษาการส่งผลต่อปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *B. subtilis* GY30 และสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวได้อย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 4.1 ชุดทดลองของความเข้มข้นขององค์ประกอบของอาหารชนิดต่างๆ ที่ออกแบบการทดลองด้วย Plackett-Burman และปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ในแต่ละชุด

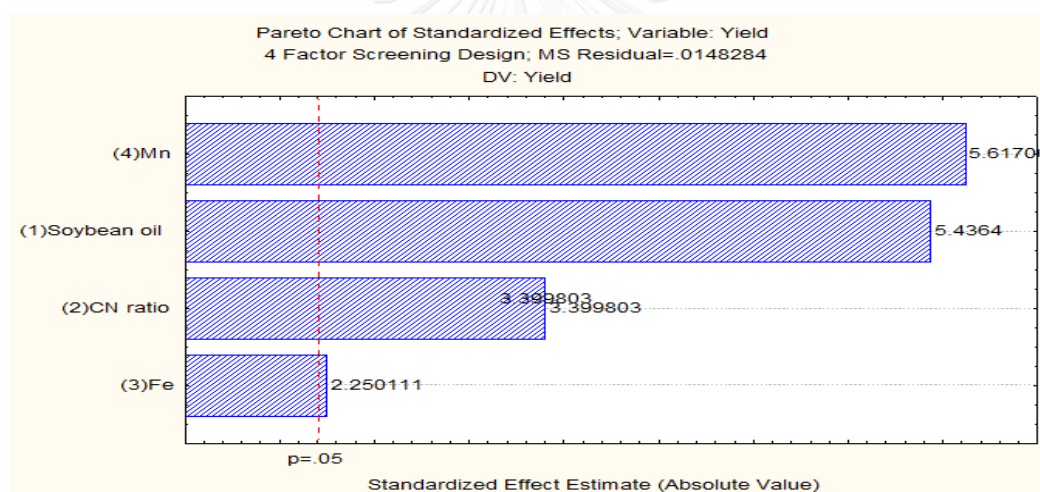
ชุดทดลอง	ระดับความสำคัญ				ผลผลิต (กรัมต่อลิตร)	
	X_1	X_2	X_3	X_4	ค่าจริง	ค่าทำนาย
1	-1 (0.5)	-1 (10:1)	-1 (0.01)	+1 (0.002)	1.19	1.189
2	+1 (5)	-1 (10:1)	-1 (0.01)	-1 (0.000002)	1.08	1.178
3	-1 (0.5)	+1 (15:1)	-1 (0.01)	-1 (0.000002)	1.06	1.060
4	+1 (5)	+1 (15:1)	-1 (0.01)	+1 (0.002)	1.67	1.673
5	-1 (0.5)	-1 (10:1)	+1 (10)	+1 (0.002)	1.25	1.252
6	+1 (5)	-1 (10:1)	+1 (10)	-1 (0.000002)	1.34	1.341
7	-1 (0.5)	+1 (15:1)	+1 (10)	-1 (0.000002)	1.11	1.111
8	+1 (5)	+1 (15:1)	+1 (10)	+1 (0.002)	1.84	1.844

หมายเหตุ : X_1 คือ น้ำมันถั่วเหลือง (% v/v), X_2 คือ อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนไดออกไซด์ (กรัมคาร์บอนต่อกรัมไนโตรเจน), X_3 คือ ความเข้มข้นเหล็กซัลเฟต (มิลลิกรัมต่อลิตร) และ X_4 คือ ความเข้มข้นของแมงกานีสซัลเฟต (โมลาร์) และค่าผลผลิตค่าจริงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 ชุดการทดลอง

ตารางที่ 4.2 การอธิบายปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวในเบื้องต้นจากการออกแบบ Plackett-Burman

ANOVA; Var.:yield; R-sqr=.87602; Adj:.83094 4 Factor Screening Design; MS Residual=.0320499 DV: yield

Factor	SS	df	MS	F value	p value
น้ำมันถั่วเหลือง	0.438244	1	0.438244	29.55444	0.000205
อัตราส่วนคาร์บอนไนโตรเจน	0.171396	1	0.171396	11.55866	0.005931
เหล็กซัลเฟต	0.075076	1	0.075076	5.06300	0.045881
แมงกานีสซัลเฟต	0.467856	1	0.467856	31.55142	0.000156
Error	0.163112	11	0.014828		
Total SS	1.315684	15			



รูปที่ 4.7 การวิเคราะห์องค์ประกอบของอาหารที่ส่งผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *B. subtilis* GY30 แบบเซลล์ตรึงบนโคโตซานในระดับขวดเขย่า ด้วยวิธีการออกแบบการทดลองแบบ Plackett-Burman ทำให้ทราบว่าปริมาณน้ำมันถั่วเหลือง ปริมาณโซเดียมไนเตรตที่เป็นสัดส่วนกับน้ำมันถั่วเหลือง ปริมาณเหล็กซัลเฟต และปริมาณแมงกานีสซัลเฟต มีผลต่อการเพิ่มปริมาณการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *B. subtilis* GY30 และเพื่อทราบปริมาณที่เหมาะสมขององค์ประกอบอาหารทั้ง 4 ชนิด ที่ส่งผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในปริมาณสูงสุด จึงได้ออกแบบการทดลองโดยใช้วิธีบล็อก-เบห์นเคน เพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมของแต่ละองค์ประกอบ ซึ่งได้จำนวนชุดการทดลองทั้งหมด 27 ชุดการทดลอง และผลการผลิตการทดลองในแต่ละชุดการทดลองดังตารางที่ 4.3 เมื่อวิเคราะห์ด้วยหลักสถิติซึ่งได้ตาราง

ANOVA ตามตารางที่ 4.4 สามารถอธิบายได้ว่าการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นมีปัจจัยที่ส่งผล คือ ปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองและอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน จากการอ่านค่า P ของตาราง ANOVA มีค่าเท่ากับ 0.000 และ 0.000 ซึ่งมีค่าน้อยกว่า 0.05 ทำให้ปฏิเสธสมมติฐาน H_0 แล้วยอมรับ H_1 คือ ปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองและอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนมีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิว และเมื่อพิจารณาตาราง ANOVA ตารางที่ 4.5 เพื่อสร้างสมการความสัมพันธ์ของทั้งสี่ปัจจัย และปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิต พบว่าปริมาณน้ำมันถั่วเหลือง อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน และปัจจัยร่วมระหว่างปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองกับปริมาณแอมกานีส มีค่า P เท่ากับ 0.00 0.00 และ 0.000171 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 นั่นคือ เป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และเมื่อพิจารณาค่า SS (Lack of Fit) ต่อ SS (Pure Error) เท่ากับ 0.000 พบว่ามีค่าน้อยกว่าค่า Fisher variance ratio ($F_{0.05(10, 27)} = 2.205$) จากตารางค่า F จาก df เท่ากับ 10 และ 27 ที่ระดับ 5% อธิบายได้ว่าให้ปฏิเสธ H_0 สมการมีความไม่เหมาะสม และยอมรับ H_1 สมการไม่มีความไม่เหมาะสม นั้นแสดงว่าสมการที่สร้างมีความเหมาะสมกับข้อมูลจริง โดยสมการความสัมพันธ์ที่ได้ตั้งในสมการที่ 4.1 สามารถสร้างได้จากข้อมูลตารางที่ 4.6 และใช้อธิบายความสัมพันธ์ดังรูปที่ 4.8 สำหรับกราฟตอบสนองเชิงพื้นผิว ซึ่งผลจากการสมการและกราฟตอบสนองเชิงพื้นผิวสามารถอธิบายได้ว่าปริมาณ น้ำมันถั่วเหลือง (2.70 % v/v) สัดส่วนแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจน (14.75:1) ปริมาณเหล็ก (50 มิลลิกรัมต่อลิตร) และปริมาณแอมกานีส (0.002 โมลาร์) เป็นความเข้มข้นขององค์ประกอบที่ให้การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงสุดคือ 1.643 กรัมต่อลิตร จากการทำนายโดยใช้สมการความสัมพันธ์ (สมการที่ 4.1) ซึ่งสามารถอธิบายความสัมพันธ์ขององค์ประกอบทั้ง 4 ปัจจัยได้ด้วยสมการแสดงความสัมพันธ์ที่อยู่ในรูปความสัมพันธ์ยกกำลังซึ่งมีค่า R^2 เท่ากับ 0.86774 สามารถบอกได้ว่าสมการแสดงความสัมพันธ์ดังกล่าวที่ได้มีค่าทดลองจริงของชุดข้อมูลกับค่าทำนายที่สัมพันธ์กัน นอกจากการทำนายค่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สามารถผลิตได้เมื่อปริมาณของคาร์บอน ไนโตรเจน เหล็ก และแอมกานีส แปรผันในช่วงที่ได้ออกแบบการทดลองไว้ สมการแสดงความสัมพันธ์ของปัจจัยทั้งสี่ที่ได้จากการออกแบบแบบบล็อก-เบย์นเคน สามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้กับงานด้านการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแหล่งอาหารที่ทราบปริมาณองค์ประกอบสารอาหารหรือแหล่งคาร์บอนที่เป็นของเสียเหลือใช้จากการเกษตรหรืออุตสาหกรรม เพื่อประเมินค่าการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ควรจะได้ผลิตได้ โดยใช้ *B. subtilis* GY30 โดยใช้สมการความสัมพันธ์กำลังสองที่ได้จากการทดลอง เช่นเดียวกับงานวิจัยของ (Sen และ Swaminathan, 2004) ได้ศึกษาระยะเวลาการบ่มหัวเชื้อและปริมาณหัวเชื้อที่ใช้ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วย *B. subtilis* DSM 3256 และได้สมการแสดงความสัมพันธ์กำลังสอง สำหรับใช้อธิบายปริมาณและระยะเวลาบ่มให้มีค่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงสุด นอกจากนั้น Sen และ Swaminathan (2004) ได้นำระยะเวลาและปริมาณหัวเชื้อที่ได้จากสมการความสัมพันธ์มาใช้ในการทดลองซึ่งสามารถให้ผลการผลิตที่สูง ดังนั้นสมการความสัมพันธ์กำลังสอง

จากการทดลอง สามารถนำมาใช้ประเมินปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *B. subtilis* GY30 ได้ ในอนาคต ส่วนการนำสมการดังกล่าวมาประยุกต์ใช้กับแบคทีเรียชนิดอื่น สำหรับการใส่แบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp. ด้วยกัน คาดว่าสามารถใช้สมการในการประเมินปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ ส่วนการนำไปใช้กับแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น อาจต้องเริ่มศึกษาจากการกำหนดปริมาณสารอาหาร และเปรียบเทียบวัดผลผลิตที่ได้จากการทดลอง กับแนวโน้มของผลผลิตจากสมการหรือจากกราฟการตอบสนองเชิงพื้นผิว หากค่าที่ได้มีแนวโน้มการผลิตในทิศทางเดียวกัน ก็สามารถนำสมการความสัมพันธ์มาใช้คาดการณ์การผลิตสารลดแรงตึงผิวได้ แต่ถ้าแนวโน้มการผลิตของแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นไม่เป็นไปในทิศทางเดียวกัน ก็จำเป็นต้องเริ่มศึกษาในส่วนของ การคัดเลือกและกลั่นกรองปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต ซึ่งอาจใช้ค่าสำหรับการระบุระดับของปัจจัยจากรายงานก่อนหน้าในสายพันธุ์เดียวกันได้



ตารางที่ 4.3 การออกแบบการทดลองแบบบล็อก-เบห์นเคน โดยมีตัวแปรอิสระ 4 ตัวแปร ได้แก่ น้ำมัน ถั่วเหลือง อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจน เหล็ก และแมงกานีส โดยแต่ละตัวแปรอิสระมีระดับความสำคัญ 3 ระดับ และปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ในแต่ละชุดการทดลอง

ชุดทดลอง	บล็อก	ระดับความสำคัญ				ผลผลิต (กรัมต่อลิตร)	
		X_1	X_2	X_3	X_4	ค่าจริง	ค่าทำนาย
1	1	-1 (1)	-1 (10:1)	0 (50)	0 (0.0002)	1.130	1.131
2	1	+1 (5)	-1 (10:1)	0 (50)	0 (0.0002)	1.155	1.157
3	1	-1 (1)	+1 (20:1)	0 (50)	0 (0.0002)	1.165	1.169
4	1	+1 (5)	+1 (20:1)	0 (50)	0 (0.0002)	1.190	1.195
5	1	0 (3)	0 (15:1)	-1 (1)	-1 (0.00002)	1.571	1.574
6	1	0 (3)	0 (15:1)	+1 (100)	-1 (0.00002)	1.571	1.574
7	1	0 (3)	0 (15:1)	-1 (1)	+1 (0.002)	1.620	1.623
8	1	0 (3)	0 (15:1)	+1 (100)	+1 (0.002)	1.620	1.623
9	1	0 (3)	0 (15:1)	0 (50)	0 (0.0002)	1.576	1.578
10	2	-1 (1)	0 (15:1)	0 (50)	-1 (0.00002)	1.347	1.349
11	2	+1 (5)	0 (15:1)	0 (50)	-1 (0.00002)	1.410	1.412
12	2	-1 (1)	0 (15:1)	0 (50)	+1 (0.002)	1.600	1.603
13	2	+1 (5)	0 (15:1)	0 (50)	+1 (0.002)	1.254	1.257
14	2	0 (3)	-1 (10:1)	-1 (1)	0 (0.0002)	1.336	1.337
15	2	0 (3)	+1 (20:1)	-1 (1)	0 (0.0002)	1.371	1.375
16	2	0 (3)	-1 (10:1)	+1 (100)	0 (0.0002)	1.336	1.337
17	2	0 (3)	+1 (20:1)	+1 (100)	0 (0.0002)	1.371	1.375
18	2	0 (3)	0 (15:1)	0 (50)	0 (0.0002)	1.576	1.578
19	3	-1 (1)	0 (15:1)	-1 (1)	0 (0.0002)	1.370	1.372
20	3	+1 (5)	0 (15:1)	-1 (1)	0 (0.0002)	1.395	1.398
21	3	-1 (1)	0 (15:1)	+1 (100)	0 (0.0002)	1.370	1.372
22	3	+1 (5)	0 (15:1)	+1 (100)	0 (0.0002)	1.395	1.398
23	3	0 (3)	-1 (10:1)	0 (50)	-1 (0.00002)	1.331	1.332
24	3	0 (3)	+1 (20:1)	0 (50)	-1 (0.00002)	1.366	1.370
25	3	0 (3)	-1 (10:1)	0 (50)	+1 (0.002)	1.380	1.381
26	3	0 (3)	+1 (20:1)	0 (50)	+1 (0.002)	1.415	1.419
27	3	0 (3)	0 (15:1)	0 (50)	0 (0.0002)	1.576	1.578

หมายเหตุ : X_1 คือ น้ำมันถั่วเหลือง (% v/v), X_2 คือ อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (กรัมคาร์บอนต่อกรัมไนโตรเจน), X_3 คือ ความเข้มข้นเหล็กซัลเฟต (มิลลิกรัมต่อลิตร) และ X_4 คือ ความเข้มข้นของแมงกานีสซัลเฟต (โมลาร์) และค่าผลผลิตค่าจริงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 ชุดการทดลอง

ตารางที่ 4.4 การอธิบายปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตด้วยวิธีการออกแบบการทดลองแบบบล็อก-เบย์นเคน ANOVA; Var.:yield; R-sqr=.77471; Adj:.72231 4 3-level Factors, 3 blocks, 54 Runs; MS Residual=.0068087 DV: yield

Factor	SS	df	MS	F value	p value
Blocks	0.000000	2	0.000000	0.00000	1.000000
น้ำมันถั่วเหลือง L+Q	0.403661	2	0.201830	29.64289	0.000000
อัตราส่วนคาร์บอนไนโตรเจน L+Q	0.536486	2	0.268243	39.39695	0.000000
เหล็กซัลเฟต L+Q	0.000000	2	0.000000	0.00000	1.000000
แมงกานีสซัลเฟต L+Q	0.018716	2	0.009358	1.37440	0.263880
Error	0.292775	43	0.006809		
Total SS	1.299528	53			



ตารางที่ 4.5 การอธิบายปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและความเหมาะสมของ
สมการความสัมพันธ์

ANOVA; Var.:yield; R-sqr=.86774; Adj:.81055 4 3-level Factors, 3 blocks, 54 Runs; MS
Pure Error=.0063658 DV: yield

Factor	SS	df	MS	F value	p value
Blocks	0.000000	2	0.000000	0.00000	1.000000
น้ำมันถั่วเหลือง L+Q	0.472582	2	0.236291	37.11881	0.000000
อัตราส่วนคาร์บอนไนโตรเจน L+Q	0.533674	2	0.266837	41.91726	0.000000
เหล็กซัลเฟต L+Q	0.000000	2	0.000000	0.00000	1.000000
แมงกานีสซัลเฟต L+Q	0.018714	2	0.009357	1.46985	0.247782
1*2	0.000000	1	0.000000	0.00000	1.000000
1*3	0.000000	1	0.000000	0.00000	1.000000
1*4	0.120898	1	0.120898	18.99175	0.000171
2*3	0.000000	1	0.000000	0.00000	1.000000
2*4	0.000000	1	0.000000	0.00000	1.000000
3*4	0.000000	1	0.000000	0.00000	1.000000
Lack of Fit	-	10	-	-0.00000	
	0.000000		0.000000		
Pure Error	0.292775	27	0.006809		
Total SS	1.299528	53			

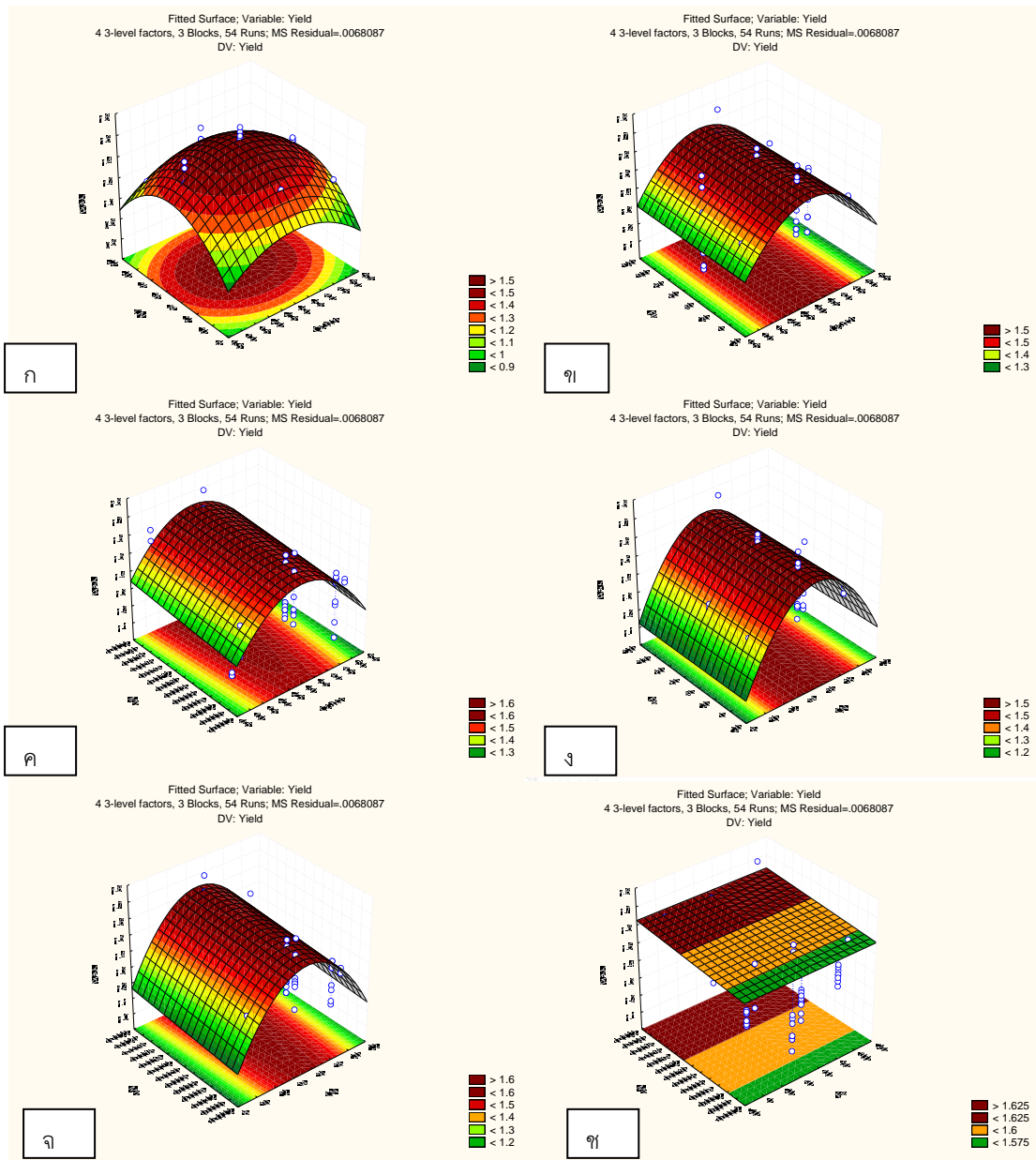
ตารางที่ 4.6 การวิเคราะห์สำหรับสร้างสมการความสัมพันธ์

Regr. Corfficients; Var.:yield; R-sqr=.86774; Adj.:.81055 4 3-level Factors, 3 blocks, 54
Runs; MS Pure Error=.0063658 DV: yield

Factor	Regressn Coeff.	Std.Err. Pure Err.	t(27)	P value
Mean/Interc.	-0.9712	0.30	-3.26936	0.002940
Block1	0.0000	0.02	0.00000	1.000000
Block2	0.0000	0.02	0.00000	1.000000
น้ำมันถั่วเหลือง L	0.3066	0.06	5.23100	0.000016
น้ำมันถั่วเหลือง Q	-0.0483	0.01	-7.90949	0.000000
อัตราส่วนคาร์บอนไนโตรเจน L	0.2708	0.03	8.65244	0.000000
อัตราส่วนคาร์บอนไนโตรเจน Q	-0.0089	0.00	-9.11698	0.000000
เหล็กซัลเฟต L	0.0000	0.00	-0.00000	1.000000
เหล็กซัลเฟต Q	-0.0000	0.00	-0.00000	1.000000
แมงกานีสซัลเฟต L	179.6431	199.99	0.89827	0.376981
แมงกานีสซัลเฟต Q	0.0000	85886.41	0.00000	1.000000
1*2	0.0000	0.00	0.00000	1.000000
1*3	0.0000	0.00	-0.00000	1.000000
1*4	-51.6266	11.85	-4.35795	0.000171
2*3	0.0000	0.00	0.00000	1.000000
2*4	0.0000	4.74	0.00000	1.000000
3*4	0.0000	0.48	0.00000	1.000000

$$Y = -0.9712 + 0.3066X_1 - 0.0483X_1^2 + 0.2708X_2 - 0.0089X_2^2 - 0X_3 + 0X_3^2 + 179.6431X_4 - 51.6266X_1X_4$$

สมการที่ 4.1 สมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำมันถั่วเหลือง (X_1) อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (X_2) ปริมาณเหล็ก (X_3) และปริมาณแมงกานีส (X_4)



รูปที่ 4.8 กราฟการตอบสนองเชิงพื้นผิวโดยวัดค่าผลผลิตโดยเปรียบเทียบของปัจจัย 2 ปัจจัย ก. น้ำมันถั่วเหลืองต่ออัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน ข. น้ำมันถั่วเหลืองต่อปริมาณเหล็ก ค. น้ำมันถั่วเหลืองต่อปริมาณแมงกานีส ง. อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อปริมาณเหล็ก จ. อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อปริมาณแมงกานีส และ ช. ปริมาณเหล็กต่อปริมาณแมงกานีส

ต่อมาได้เลือกกำหนดค่าปัจจัยองค์ประกอบทั้ง 4 ปัจจัย สำหรับผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เพื่อเป็นการตรวจสอบความแม่นยำของสมการความสัมพันธ์สำหรับใช้ทำนายปริมาณการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ผลดังตารางที่ 4.7 ผลปรากฏว่าปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากการทดลองมีค่าที่ใกล้เคียงกับผลจากการทำนายจากสมการแสดงความสัมพันธ์ ทำให้สามารถยืนยันได้ว่าปริมาณองค์ประกอบของสารอาหารที่มีปริมาณที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ให้ผลผลิตสูงสุด ได้แก่ น้ำมันถั่วเหลือง (2.70 % v/v) สัดส่วนแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจน (14.75:1) ปริมาณเหล็ก (50 มิลลิกรัมต่อลิตร) และปริมาณแมงกานีส (0.002 โมลาร์) สามารถให้ปริมาณการผลิตที่สูงสุด 1.63 กรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้มากกว่าก่อนปรับสูตรอาหารเบซัลถึง 1.25 เท่า ซึ่งปริมาณสารอาหารที่ผ่านการปรับปรุงจากการออกแบบการทดลองด้วยบล็อก-เบสคอนได้สูตรอาหารเบซัลที่เปลี่ยนไปตามตารางที่ 4.8 และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณคาร์บอนไนโตรเจน เหล็ก และแมงกานีส กับงานวิจัยอื่น (รูปที่ 4.9) พบว่าปริมาณตั้งต้นของแหล่งคาร์บอนมีปริมาณที่แตกต่างกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบเป็นอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนอะตอมพบว่าอยู่ในช่วง 5:1 ถึง 50:1 ซึ่งใกล้เคียงกัน ส่วนปริมาณเหล็กและแมงกานีสใช้ปริมาณที่หลากหลาย ซึ่งเป็นปริมาณที่ส่งเสริมการเจริญและการผลิตของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ โดยได้นำสูตรอาหารเบซัลที่ปรับปรุงแล้วมาใช้ในการขยายการผลิตในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบดต่อไป

ตารางที่ 4.7 การตรวจสอบความแม่นยำของสมการแสดงความสัมพันธ์

ชุดทดลอง	ปริมาณสาร				ผลผลิต (กรัมต่อลิตร)	
	X_1	X_2	X_3	X_4	ค่าจริง	ค่าทำนาย
1	1	17:1	50	0.002	1.621	1.575
2	3	13:1	50	0.0002	1.518	1.535
3	5	12:1	50	0.001	1.086	1.244

หมายเหตุ : X_1 คือ น้ำมันถั่วเหลือง (% v/v), X_2 คือ อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (กรัมคาร์บอนต่อกรัมไนโตรเจน), X_3 คือ ความเข้มข้นเหล็กซัลเฟต (มิลลิกรัมต่อลิตร) และ X_4 คือ ความเข้มข้นของแมงกานีสซัลเฟต (โมลาร์) และค่าผลผลิตค่าจริงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 ชุดการทดลอง

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้	สายพันธุ์จุลินทรีย์	สารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้	ปริมาณคาร์บอน (%คาร์บอน)	ปริมาณไนโตรเจน (%ไนโตรเจน)	ปริมาณเหล็ก	ปริมาณแมงกานีส	อ้างอิง
Mineral salt	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2 g/L (72 ชั่วโมง)	Olive oil 2% w/v (73.19)	NH ₄ NO ₃ 1 g/L (34.99) (yeast extract 0.02 g/L)	FeSO ₄ · 7H ₂ O 0.01 mg/L	MnSO ₄ · 4H ₂ O 1.78 mg/L	Abouseoud และคณะ 2008
Medium (One factor at a time)	<i>Misgula</i> 1895-DSMZ			(10%)			
Glucose-based minimal medium (RSM)	<i>Bacillus licheniformis</i> R2	เพิ่มขึ้น 4 เท่า (72 ชั่วโมง)	Glucose 34 g/L (40)	NH ₄ NO ₃ 1.0 g/L (34.99)	FeSO ₄ ·7H ₂ O 1.65 mg/L	MnSO ₄ ·4H ₂ O 1.5 mg/L	Joshi และคณะ 2008
Mineral salt	<i>Rhodococcus</i> spp. MTCC 2574	10.9 g/L	Mannitol 1.6 g/L (39.55)	Yeast extract 6.92 g/L, (10%)	FeCl ₃ ·6H ₂ O 0.1 mg/L	MnCl ₂ 4H ₂ O 0.1 mg/L	Mutalik และคณะ 2008
Medium (RSM)		เพิ่มขึ้น 3 – 4 เท่า (28 ชั่วโมง)	n-hexadecane 63.8 g/L (84.86)	Meat peptone 19.65 g/L (15%)			
Mineral salt	<i>Serratia rubidoea</i> SNAU02	(72 ชั่วโมง)	Mannitol 29.31 g/L (39.55)	Yeast extract 2.06 g/L (10%)	FeSO ₄ ·7H ₂ O 0.6 mg/L	MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.01 g/L	Nalini และ Parthasarathi 2013
Mineral salt	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> NBS-11	เพิ่มขึ้น 2.1 เท่า (96 ชั่วโมง)	Dextrose 2% (40)	Peptone 1% (15%)	FeSO ₄ 0.2 mg/L	MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.01 g/L	Hemlata และคณะ, 2015
Mineral salt	<i>Bacillus subtilis</i> F29-3	3.5 g/L (96 ชั่วโมง)	Mannitol 26.2 g/L (39.55)	Soybean meal 21.9 g/L (7%)	FeCl ₃ 4H ₂ O (ไม่ใส่)	MnSO ₄ ·4H ₂ O 0.2 g/L	Wei และคณะ, 2010
Basal medium (RSM)	<i>Bacillus subtilis</i> GY30	1.6 g/L (24 ชั่วโมง)	Soybean oil 2.75 % (80%)	NaNO ₃ 3.1 g/L (16.48)	FeSO ₄ 50 mg/L	MnSO ₄ ·4H ₂ O 0.302 g/L	งานวิจัยนี้
				Yeast extract 0.01 g/L			

รูปที่ 4.9 เปรียบเทียบปริมาณแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน เหล็กและแมงกานีสที่ให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูง

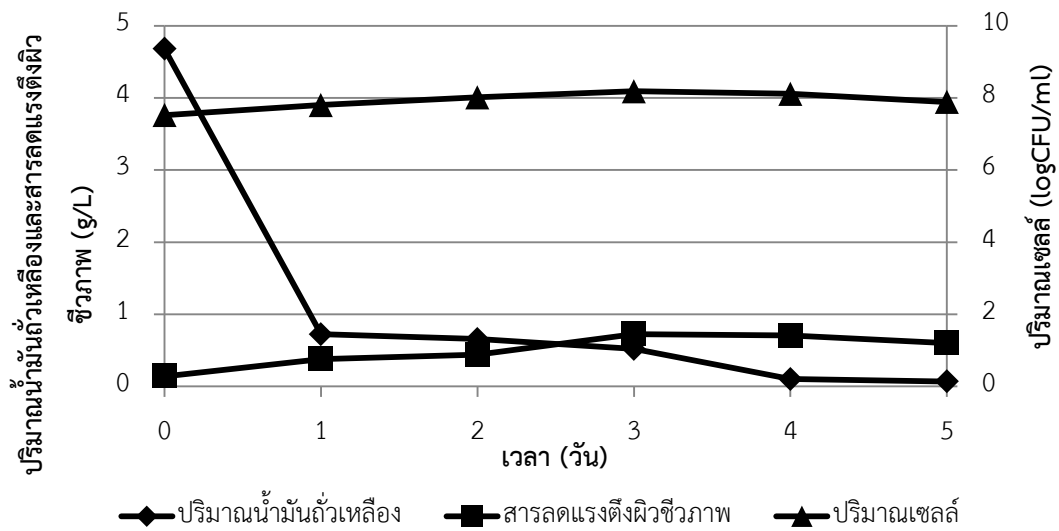
ตารางที่ 4.8 เปรียบเทียบองค์ประกอบอาหารเบซัลก่อนและหลังปรับปรุงสูตรอาหาร

สารอาหาร	ก่อนปรับปรุงสูตร	หลังปรับปรุงสูตร
น้ำมันถั่วเหลือง	2% v/v	2.70% v/v
NaNO ₃	7 g	10.17 g
K ₂ HPO ₄	1.0 g	1.0 g
KH ₂ PO ₄	0.5 g	0.5 g
KCl	0.1 g	0.1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5 g	5 g
CaCl ₂	0.01 g	0.01
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01 g	0.06 g
ผงสกัดจากยีสต์	0.1 g	0.1 g
กลูโคส	5 g	5 g
H ₃ BO ₃	0.013 g	0.013 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025 g	0.025 g
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.025 g	0.326 g
MoNa ₂ O ₄ ·2H ₂ O	0.003 g	0.003 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.035 g	0.035 g

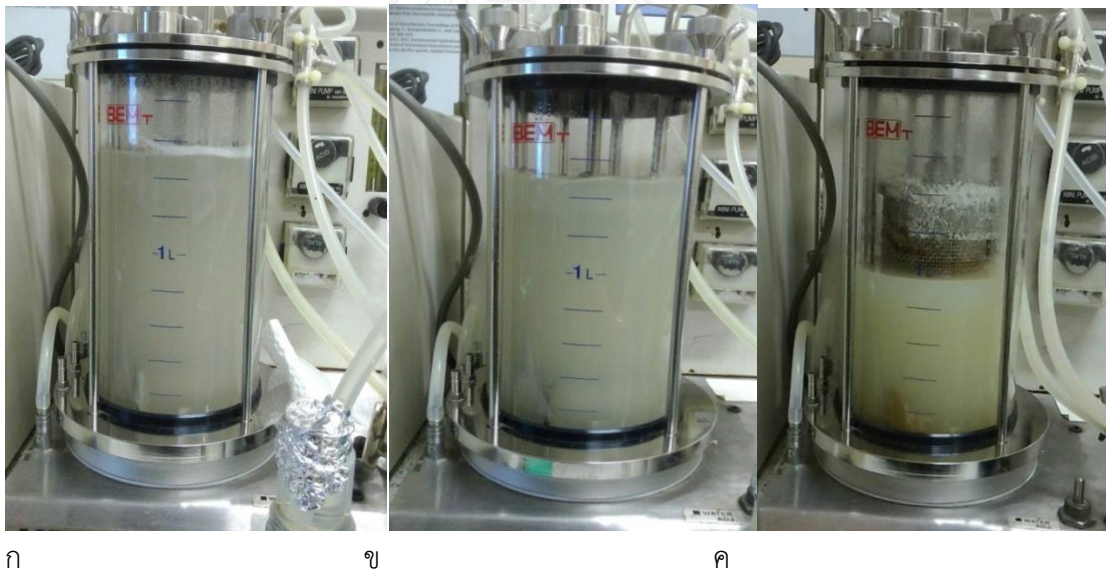
4.3 การขยายขนาดการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *B. subtilis* GY30 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบด

4.3.1 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบดเมื่อควบคุมอัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.5 vvm

การขยายขนาดการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบด ใช้ *B. subtilis* GY30 แบบเซลล์ตรึงบนโคโคซาน และใช้สูตรอาหารเบซัลที่ปรับปรุงปริมาณองค์ประกอบสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้สูงสุด ทั้งนี้ได้ศึกษาอัตราการให้อากาศที่ 0.5 และ 1.5 vvm โดยมีปริมาณโคโคซานในแพคคอลัมน์ 80 กรัม และกำหนดอัตราการไหลของอาหารผ่านแพคคอลัมน์ที่ 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งได้จากการคำนวณจากค่าระยะเวลาการกักเก็บ (hydraulic retention time, HRT) ปริมาตร 460 มิลลิลิตร ในแพคคอลัมน์เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ตามการคำนวณกราฟมาตรฐาน ภาคผนวก จ พบว่าการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในภาวะการให้อากาศ 0.5 vvm ให้การผลิตที่สูงที่สุด คือ 0.7 กรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 4 วัน ดังรูปที่ 4.10 และมีแนวโน้มที่ลดลงในวันที่ 5 ของการผลิต เนื่องจากปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองไม่เพียงพอต่อการเจริญ สังเกตได้จากปริมาณเซลล์ที่ลดลงเช่นกันในช่วงวันที่ 5 ทั้งนี้มีรายงานว่าแบคทีเรียสามารถใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตเป็นแหล่งคาร์บอนสำรอง (Van Hamme และคณะ, 2006) ซึ่งปริมาณการผลิตที่ได้ก็น้อยกว่าปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้สูงสุดในระดับขวดเขย่า ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณอาหาร 0.5 vvm เป็นอัตราการให้อากาศที่ไม่เพียงพอต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดย Yao และคณะ, 2015 รายงานว่าอัตราการให้อากาศที่ 1.0 และ 1.5 vvm รวมกับอัตราการกวน ส่งผลให้เพิ่มการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *B. amyloliquefaciens* fmb50 โดยผลิตสารลดแรงตึงผิวเซอเฟกตินได้มากกว่า 4 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 4.10 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ปริมาณเซลล์ในน้ำเลี้ยงเซลล์และปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองที่เหลือในน้ำเลี้ยง ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบดเมื่อควบคุมอัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.5 vvm และค่า HRT เท่ากับ 12 ชั่วโมง



รูปที่ 4.11 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบดเมื่อควบคุมอัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.5 vvm และค่า HRT เท่ากับ 12 ชั่วโมง ก. วันที่ 0 ข. วันที่ 2 และ ค. วันที่ 5

4.3.2 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบดเมื่อควบคุม อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm และนำเซลล์ตรึงในแพคคอลัมน์กลับมาใช้ผลิตสารลดแรงตึงผิวซ้ำ

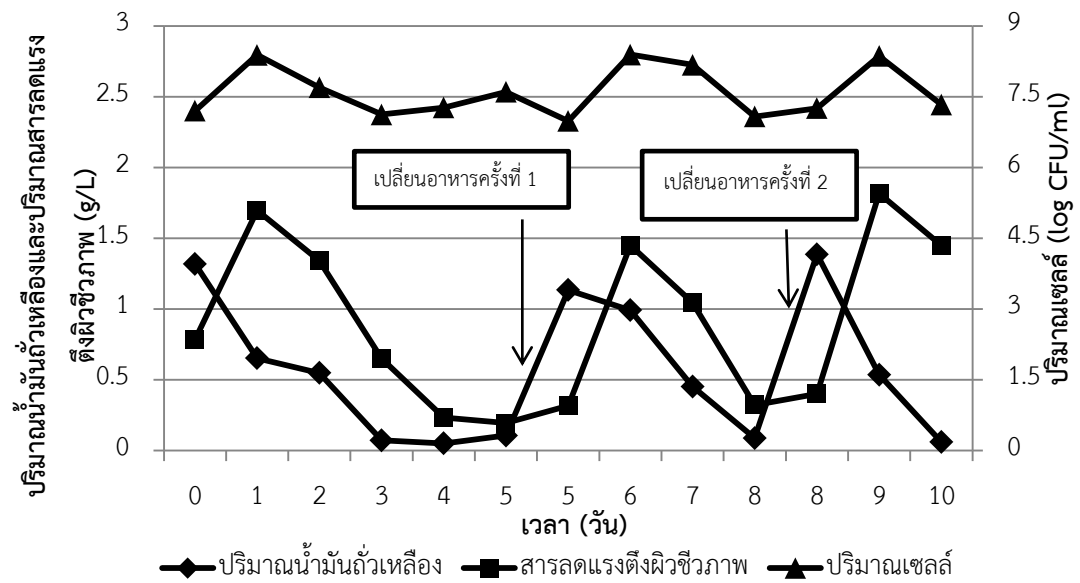
เมื่อปรับเปลี่ยนอัตราการให้อากาศจาก 0.5 เป็น 1.5 vvm และให้อัตราการไหลอาหารผ่านแพคคอลัมน์ 0.6 มิลลิลิตรต่อลูกบาศก์เซนติเมตร พบว่าปริมาณสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้สูงสุดเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 1.65 กรัมต่อลิตร ภายในเวลา 1 วัน โดยเหตุที่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพลดปริมาณลงหลังจากการผลิตวันที่ 1 เนื่องจากเซลล์ที่อยู่ในรูปเซลล์อิสระนั้นอยู่ในสภาพที่ขาดแหล่งอาหาร สังเกตจากเส้นกราฟปริมาณน้ำมันถั่วเหลือง (แหล่งคาร์บอน) ในน้ำเลี้ยงเซลล์มีปริมาณลดลง อีกทั้งปริมาณเซลล์เริ่มลดลงแสดงถึงแหล่งอาหารขาดแคลน ทำให้เซลล์ใช้แหล่งอาหารอื่นในระบบมาเพิ่มจำนวน ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิต สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนได้ ทำให้ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลดลง ดังรูปที่ 4.12 โดยปริมาณสารลดแรงตึงผิวสูงสุดมีปริมาณการผลิตสารลดแรงตึงผิวที่ใกล้เคียงกับการผลิตในระดับขวดเขย่า แต่ช่วงระยะเวลาการผลิตเร็วกว่า ทำให้สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้เพิ่มมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบจำนวนวันในการผลิต การเพิ่มอัตราการให้อากาศเป็น 1.5 vvm ให้ผลที่สอดคล้องกับงานวิจัยของ (Amani และคณะ, 2010) ซึ่งผลิตสารลดแรงตึงผิวด้วย *B. subtilis* ที่ภาวะอัตราการให้อากาศ 1.5 vvm พบว่าสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ 2.8 กรัมต่อลิตร โดยเพิ่มขึ้นคิดเป็นร้อยละ 28 จากการผลิตในระดับขวดเขย่า ภายในเวลา 2 วัน

ต่อมาได้ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้วัสดุตรึงซ้ำ ซึ่งศึกษาต่อเนื่องจากภาวะอัตราการให้อากาศจาก 1.5 vvm และให้อัตราการไหลอาหารผ่านแพคคอลัมน์ 0.6 มิลลิลิตรต่อลูกบาศก์เซนติเมตร เป็นเวลา 10 วัน ภายหลังจากการผลิตไปแล้ว 5 วัน ได้เก็บอาหารเก่าออก แล้วเติมอาหารเบซัลใหม่ลงไป เพื่อศึกษาการใช้ซ้ำรอบแรก ศึกษาผลของการผลิตต่อไปอีก 3 วัน (วันที่ 8) จึงเปลี่ยนอาหารเบซัลรอบที่ 2 จากนั้นศึกษาการผลิตไปอีก 3 วัน (วันที่ 10) เพื่อยืนยันผลของการใช้ซ้ำและประสิทธิภาพการผลิต พบว่าการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบดโดยใช้ส่วนของเซลล์ตรึงในแพคคอลัมน์ซ้ำ ใช้ระยะเวลาการผลิตที่ให้ผลผลิตสูงสุดใช้เวลา 1 วัน และปริมาณสูงสุดที่ผลิตได้ในการใช้แพคคอลัมน์ซ้ำครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 คือ 1.45 และ 1.81 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ตามรูปที่ 4.12 จากการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและการผลิตโดยใช้วัสดุตรึงซ้ำ พบว่า *B. subtilis* GY30 ที่เกาะอยู่บนพื้นผิวโคโตะซานนั้นยังคงประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ อีกทั้งปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองที่ใช้เป็นสารตั้งต้น ซึ่งมีปริมาณมากและถูกดูดซับอยู่ในโคโตะซาน ก็ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ แต่ทำให้เซลล์อิสระนอกแพคคอลัมน์ไม่มีสารตั้งต้นที่ใช้เจริญ เซลล์จึงนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเซลล์ในแพคคอลัมน์มาใช้ สังเกตได้จากรูปที่ 4.12 ในวันผลิตที่ 2-5 ของ

การผลิตรอบแรก และช่วงวันผลิตที่ 2-3 ของการใช้แพคคอลลัมน์ซ้ำ มีปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลดลง เมื่อปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองลดน้อยลง แสดงให้เห็นว่าอัตราการให้อากาศที่เพียงพอต่อการเจริญ (1.5 vvm) ทำให้เซลล์เจริญและใช้สารตั้งต้นอย่างรวดเร็ว จนกระทั่งแหล่งอาหารขาดแคลนจนเซลล์ลดจำนวนลง ทำให้เซลล์ที่เหลือใช้สารลดแรงตึงผิวเป็นแหล่งคาร์บอน จากผลการศึกษากการผลิตทำให้ทราบว่าปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงสุดที่ผลิตได้อยู่ในช่วงวันที่ 1 ภายหลังจากการเปลี่ยนอาหาร ดังนั้นในการผลิตเพื่อให้ได้ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงสุดควรเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์หลังจากบ่มครบ 1 วัน แล้วเติมอาหารเบซัลสำหรับการผลิตซ้ำในรอบต่อไป หรือปรับปรุงระบบเลี้ยงเซลล์จากแบคทีเรียเป็นเฟด-แบคทีเรียหรือแบบต่อเนื่อง เช่น งานวิจัยของ Jin และคณะ, 2015 ได้ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวจาก *B. subtilis* ด้วยวิธีเลี้ยงเซลล์แบบเฟด-แบคทีเรีย โดยการแบ่งเติมน้ำตาลกลูโคสออกเป็น 2 ช่วง ทำให้การผลิตสารลดแรงตึงผิวเพิ่มขึ้น 35.7 % จากการเลี้ยงแบบแบคทีเรีย

การผลิตในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบตสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในปริมาณสูงได้ ซึ่งช่วยลดต้นทุนการผลิตลง ทั้งนี้ยังมีแนวโน้มสำหรับการพัฒนาเพื่อเพิ่มผลผลิตในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบต โดยศึกษาปัจจัยอื่นนอกเหนือจากอัตราการให้อากาศที่ส่งผลต่อการผลิตและการเจริญของแบคทีเรีย ได้แก่ อัตราการไหลของอาหาร โดย (Liu และคณะ, 2016) พบว่าเมื่อลดค่า HRT ลง จะสามารถช่วยให้มีการเจริญของเซลล์และเซลล์อยู่ในช่วง stationary ทำให้สามารถผลิตสารเมทาบอลไลท์ลำดับสองได้ดีขึ้น และเมื่อเปรียบเทียบประเด็นค่า HRT ที่ลดลงสำหรับการผลิตในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบต เซลล์บนโคโตนานที่ดูดซับน้ำมันถั่วเหลืองไว้ เมื่อค่า HRT ลดลง สารอาหารที่อยู่ภายนอกแพคคอลลัมน์สามารถไหลเข้าสู่แพคคอลลัมน์ได้เร็วขึ้น ทำให้เซลล์ในแพคคอลลัมน์ได้รับสารอาหารซึ่งจะช่วยกระตุ้นให้เกิดการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (สารเมทาบอลไลท์ลำดับสอง) เช่นเดียวกับ (Liu และคณะ, 2016) ในทางกลับกันเซลล์อาจได้รับสารอาหารมากจนเซลล์เข้าสู่การเจริญเพิ่มจำนวนแทนการผลิตสารลดแรงตึงผิว

แนวทางการพัฒนาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบตด้วย *B. subtilis* GY30 เพื่อให้ได้ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เพิ่มขึ้นควรศึกษากภาวะอื่นเพิ่มเติม เช่น อัตราไหลของอาหารที่ผ่านส่วนแพคคอลลัมน์ที่เร็วขึ้น และเมื่อทราบถึงภาวะที่ส่งเสริมการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในถังปฏิกรณ์ได้สูงสุดแล้ว จึงปรับเปลี่ยนวิธีการเลี้ยงจากแบคทีเรียเป็นเฟดแบคทีเรีย และใช้ส่วนของแพคคอลลัมน์ในการผลิตซ้ำ



รูปที่ 4.12 การผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพจาก *B. subtilis* GY30 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบต ควบคุมสภาวะให้อากาศที่ 1.5 vvm ค่า HRT เท่ากับ 12 ชั่วโมง และการผลิตสารลดแรงดึงผิวโดยใช้แพคเบตซ้ำโดยควบคุมสภาวะเดิม

4.4 ลักษณะสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *B. subtilis* GY30

การศึกษาลักษณะและสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ประกอบด้วย สมบัติการลดค่าแรงตึงผิวและความปริมาณที่ก่อให้เกิดไมเซลล์ (CMC) รวมถึงการศึกษาความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในสภาวะต่างๆ สมบัติการกระจายน้ำมัน และสมบัติการก่ออิมัลชัน

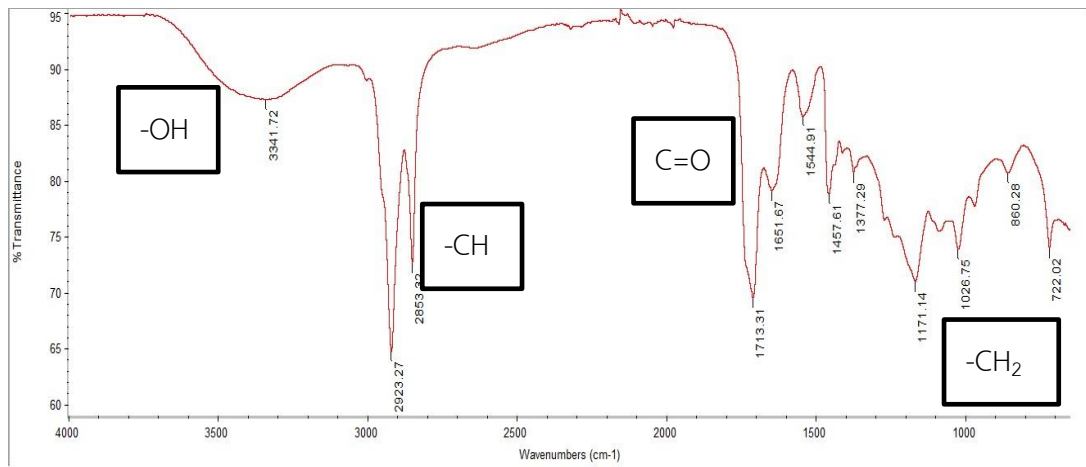
4.4.1 ส่วนประกอบทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *B. subtilis* GY30

การวิเคราะห์ส่วนประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเบื้องต้น โดยวิเคราะห์ปริมาณไขมัน ด้วยวิธี Sulfo-phospho-vanillin วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol-sulfuric acid พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *B. subtilis* GY30 ที่อยู่ในรูปสารสกัดหยาบ ซึ่งได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายคลอโรฟอร์มเมทานอล มีอัตราส่วนของไขมัน โปรตีน และน้ำตาล คือ 19:2:66 ตามตารางที่ 4.9 แสดงว่าส่วนประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *B. subtilis* GY30 นั้น เป็นสารจำพวกน้ำตาลและไขมัน ซึ่งแตกต่างจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์อื่นๆ อยู่ในกลุ่มของลิโปเปปไทด์ (Geys และคณะ, 2014) อย่างไรก็ตามมีรายงานแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไกลโคลิพิดได้เช่นกัน เช่น *B. subtilis* TU2 (Cheng, 2013) และ *B. megaterium* (Thavasi และคณะ, 2007) ตารางที่ 4.9 เพื่อยืนยันผลของโครงสร้างของส่วนประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *B. subtilis* GY30 นั้น ผู้วิจัยได้นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *B. subtilis* GY30 ในรูปสารสกัดหยาบมาตรวจสอบหมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ FT-IR พบช่วงการดูดกลืนในช่วงกว้างในช่วง $2800-3500\text{ cm}^{-1}$ มีจุดยอดอยู่ที่ 3341.72 cm^{-1} ซึ่งแสดงว่าประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (O-H) จากพอลิแซ็กคาไรด์ และมีการดูดกลืนที่ 1713 cm^{-1} และ 1651 cm^{-1} แสดงถึงพันธะระหว่างคาร์บอนและออกซิเจนอะตอม (C=O) จากหมู่เอสเทอร์ และหมู่เอไมด์ที่การดูดกลืนที่ 1457 cm^{-1} นอกจากนั้นที่การดูดกลืนที่ 1026.75 cm^{-1} 860.28 cm^{-1} และ 722.02 cm^{-1} แสดงถึงหมู่ CH_2 (Kiran และคณะ, 2010) (รูปที่ 4.13) เมื่อพิจารณาผลร่วมกันระหว่างองค์ประกอบจากโครงสร้างเคมีพื้นฐาน และเทคนิค FT-IR สามารถสรุปได้ว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *B. subtilis* GY30 ที่อยู่ในรูปสารสกัดหยาบนั้น เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มไกลโคลิพิด

ตารางที่ 4.9 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่อยู่ในรูปสารสกัดหยาบจาก *B. subtilis* GY30 และเปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์อื่น

สายพันธุ์	สัดส่วนองค์ประกอบโครงสร้าง			ประเภทสารลดแรงตึงผิว	อ้างอิง
	ไขมัน	โปรตีน	น้ำตาล		
<i>B. subtilis</i> GY30	19.01±1.22	1.94±0.16	66.44±2.65	ไกลโคลิพิด	งานวิจัยนี้
<i>Bacillus</i> sp. GY19	54	20	4	ลิโปเปปไทด์	Khondee และคณะ, 2015
<i>B. subtilis</i> LB5a	53.6	38.5	-	ลิโปเปปไทด์	Nitschke และ Pastore, 2006
<i>B. subtilis</i> TU2	ไม่รายงาน	ไม่รายงาน	ไม่รายงาน	ไกลโคลิพิด ลิโปเปปไทด์	Cheng, 2013
<i>B. megaterium</i>	70	-	28	ไกลโคลิพิด	Thavasi และคณะ, 2007
<i>B. circulans</i>	ไม่รายงาน	ไม่รายงาน	ไม่รายงาน	ลิโปเปปไทด์	Das และคณะ, 2008

หมายเหตุ สารลดแรงตึงผิวในงานวิจัยไม่มีรายงานสัดส่วนองค์ประกอบโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิว เนื่องจากงานวิจัยดังกล่าวไม่ได้ศึกษาองค์ประกอบด้วยการทดสอบทางเคมี แต่วิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีแทนจึงสามารถระบุประเภทของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้เช่นกัน

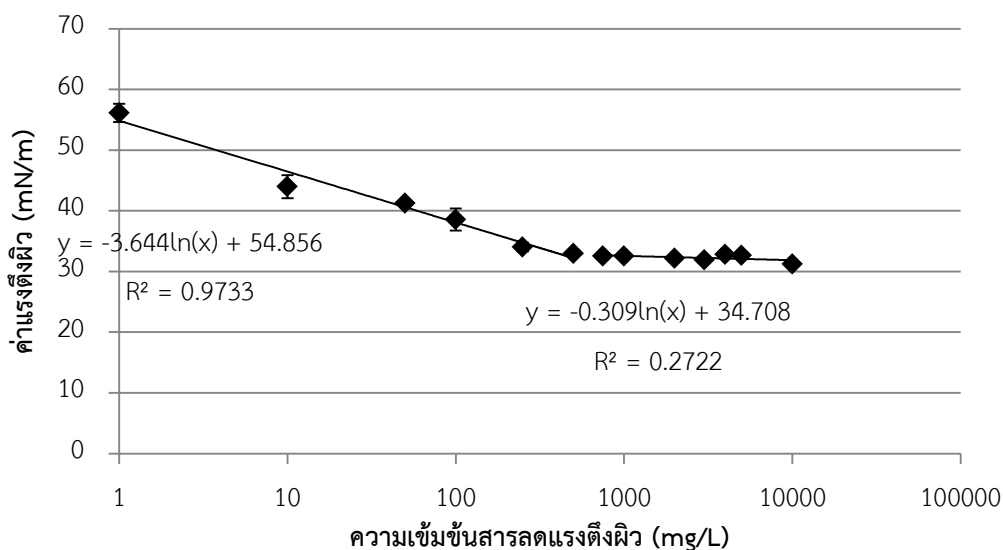


รูปที่ 4.13 การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเครื่อง FT-IR Spectrometer โดยวัดการดูดกลืนแสงในช่วงคลื่นตั้งแต่ 400-4000 cm^{-1}



4.4.2 ค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์ (CMC)

ค่า CMC เป็นสมบัติที่สำคัญอย่างหนึ่งสำหรับการอธิบายการลดแรงตึงผิว และใช้อธิบายปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ต่ำที่สุดซึ่งก่อให้เกิดการสร้างไมเซลล์ เมื่อทราบถึงค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิว ทำให้สามารถประมาณความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเมื่อนำไปประยุกต์ใช้กับงานต่างๆ ได้ ทั้งด้านการบำบัดสารปนเปื้อน การกระจายคราบน้ำมัน และการก่อกอิมัลชัน โดยปริมาณของสารลดแรงตึงผิวที่มากขึ้นจะส่งผลให้มีประสิทธิภาพของสมบัติต่างๆ สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (Liu และคณะ, 2016) แต่สำหรับบางงานวิจัยที่ประยุกต์ใช้ทางด้านการบำบัดสารปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม จะจำกัดปริมาณสารลดแรงตึงผิวที่ใช้ เนื่องจากปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มากเกินไป ค่า CMC สามารถช่วยในสารปนเปื้อนมีความสามารถในการละลายได้ดีขึ้น ซึ่งเป็นผลให้เกิดการปนเปื้อนในวงกว้างได้ หากต้องการยับยั้งการเคลื่อนที่ของสารปนเปื้อน นิยมใช้ความเข้มข้นสารลดแรงตึงผิวที่น้อยกว่าค่า CMC (Bustamante และคณะ, 2012) จากการวิเคราะห์ค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *B. subtilis* GY30 ที่อยู่ในรูปสารสกัดหยาบนั้นมีค่า CMC ที่ 420.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถลดค่าแรงตึงผิวของน้ำลงจาก 72 มิลลินิวตันต่อเมตร เป็น 31.24 มิลลินิวตันต่อเมตร ตามรูปที่ 4.14 แต่ค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *B. subtilis* GY30 ยังมีค่าที่สูงกว่าสารลดแรงตึงผิวทางเคมี เช่น SDS และ Dehydol LS7 ทำให้การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิว GY30 กับสารลดแรงตึงผิวทางเคมีในปริมาณที่เท่ากัน สารลดแรงตึงผิวทางเคมีที่มีค่า CMC ต่ำกว่าก็จะให้ประสิทธิภาพที่ดีกว่า และหากต้องการให้ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ GY30 ใกล้เคียงกับสารลดแรงตึงผิวทางเคมี จำเป็นต้องใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ GY30 ในปริมาณที่สูงกว่าสารลดแรงตึงผิวเคมี เช่นเดียวกับงานวิจัย Urum และคณะ (2006) ได้ศึกษาประสิทธิภาพการชะน้ำมันดิบออกจากดิน โดยเปรียบเทียบผลจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแรมโนลิพิดซาโปนิน และสารลดแรงตึงผิวทางเคมี SDS พบว่าสารลดแรงตึงผิว SDS และแรมโนลิพิดให้ผลการชะน้ำมันได้ดีกว่า ซาโปนินซึ่งมีค่า CMC ที่สูงกว่าค่า CMC ของ SDS และแรมโนลิพิด

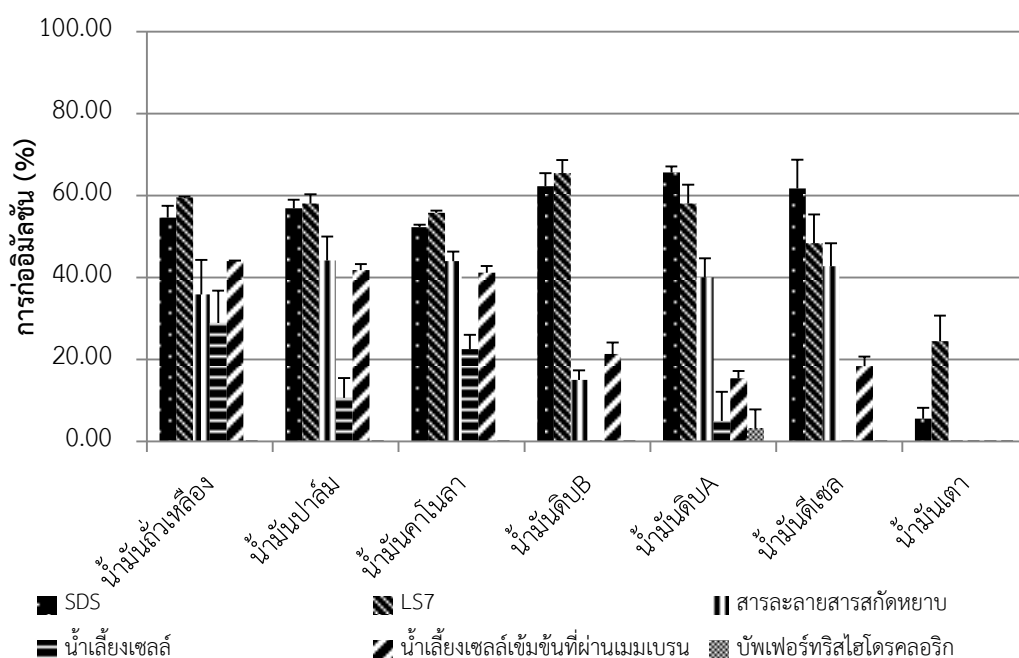


รูปที่ 4.14 ค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ *B. subtilis* GY30 โดยแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ

4.4.3 สมบัติการก่ออิมัลชัน

จากการทดสอบสมบัติการก่ออิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *B. subtilis* GY30 ที่อยู่ในรูปสารสกัดหยาบ รูปน้ำเลี้ยงเซลล์ และรูปน้ำเลี้ยงเซลล์เข้มข้นที่ผ่านเมมเบรน ที่มีความเข้มข้น 2 CMC, 900 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีสารลดแรงตึงผิวทางเคมี ได้แก่ SDS และ Dehydrol LS7 ความเข้มข้น 2 CMC เป็นชุดควบคุมเชิงบวก ได้ทดสอบสมบัติการก่ออิมัลชันในน้ำมันพืช ได้แก่ น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม และน้ำมันคาโนลา และน้ำมันปิโตรเลียม ได้แก่ น้ำมันดิบบงกช (น้ำมันดิบ B) และน้ำมันดิบอาราเบียน (น้ำมันดิบ A) น้ำมันดีเซล และน้ำมันเตา (รูปที่ 4.15) ซึ่งใช้เป็นตัวแทนสำหรับอธิบายการนำไปใช้ในการบำบัดและการประยุกต์ใช้ในรูปแบบอื่น เช่น การก่ออิมัลชันในอาหาร เป็นต้น พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ GY30 นั้นสามารถก่อให้เกิดอิมัลชันในน้ำมันพืชได้ดีกว่าน้ำมันปิโตรเลียม และรูปแบบที่ก่ออิมัลชันได้ดีกับน้ำมันพืชและน้ำมันปิโตรเลียม คือ น้ำเลี้ยงเซลล์เข้มข้นที่ผ่านเมมเบรน และสารละลายสารลดแรงตึงผิวในรูปสารสกัดหยาบ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ GY30 สามารถก่ออิมัลชันได้ดีในน้ำมันพืช ซึ่งมีค่าอิมัลชันใกล้เคียงกับสารลดแรงตึงผิวที่ใช้เป็นชุดทดลองเชิงบวกอย่าง SDS และ Dehydrol LS7 แต่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในรูปน้ำเลี้ยงเซลล์ไม่สามารถก่อให้เกิดอิมัลชันได้ และเมื่อเปรียบเทียบการก่ออิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ GY30 ต่อประเภทน้ำมันที่ให้ค่าการก่ออิมัลชันที่สูงกว่า พบว่าให้ผลการก่ออิมัลชันที่ใกล้เคียงกันในน้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม และน้ำมันคาโนลา ส่วนน้ำมันปิโตรเลียมให้ผลการก่ออิมัลชันที่สูงในน้ำมันดิบอาราเบียนและน้ำมันดีเซล ซึ่งมีสัดส่วนองค์ประกอบน้ำมันประเภทคาร์บอนสายยาวสูง จากผลการทดลอง

เพิ่มเติมโดยใช้ปริมาณสารลดแรงตึงผิวมากขึ้นแสดงให้เห็นว่า เมื่อเพิ่มปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีมากพอสำหรับการก่ออิมัลชัน ประสิทธิภาพที่ได้จากสารลดแรงตึงผิว GY30 มีประสิทธิภาพที่ใกล้เคียงกับสารลดแรงตึงผิวทางเคมีอย่าง SDS และ Dehydrol LS7 และมีค่าการก่ออิมัลชันที่สูงขึ้น ดัง รูปที่ ๔.๒ (ภาคผนวก ๔) ดังนั้นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสำหรับใช้เกิดสารก่ออิมัลชันสามารถประยุกต์ได้กับงานที่เกี่ยวข้องกับน้ำมันพืชและน้ำมันปิโตรเลียมได้ โดยใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ทั้งในรูปสารสกัดหยาบละลายในบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอริก และน้ำเลี้ยงเซลล์เข้มข้นที่ผ่านเมมเบรน และมีความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มากพอต่อการก่ออิมัลชันที่ดี (มากกว่า 2 CMC)

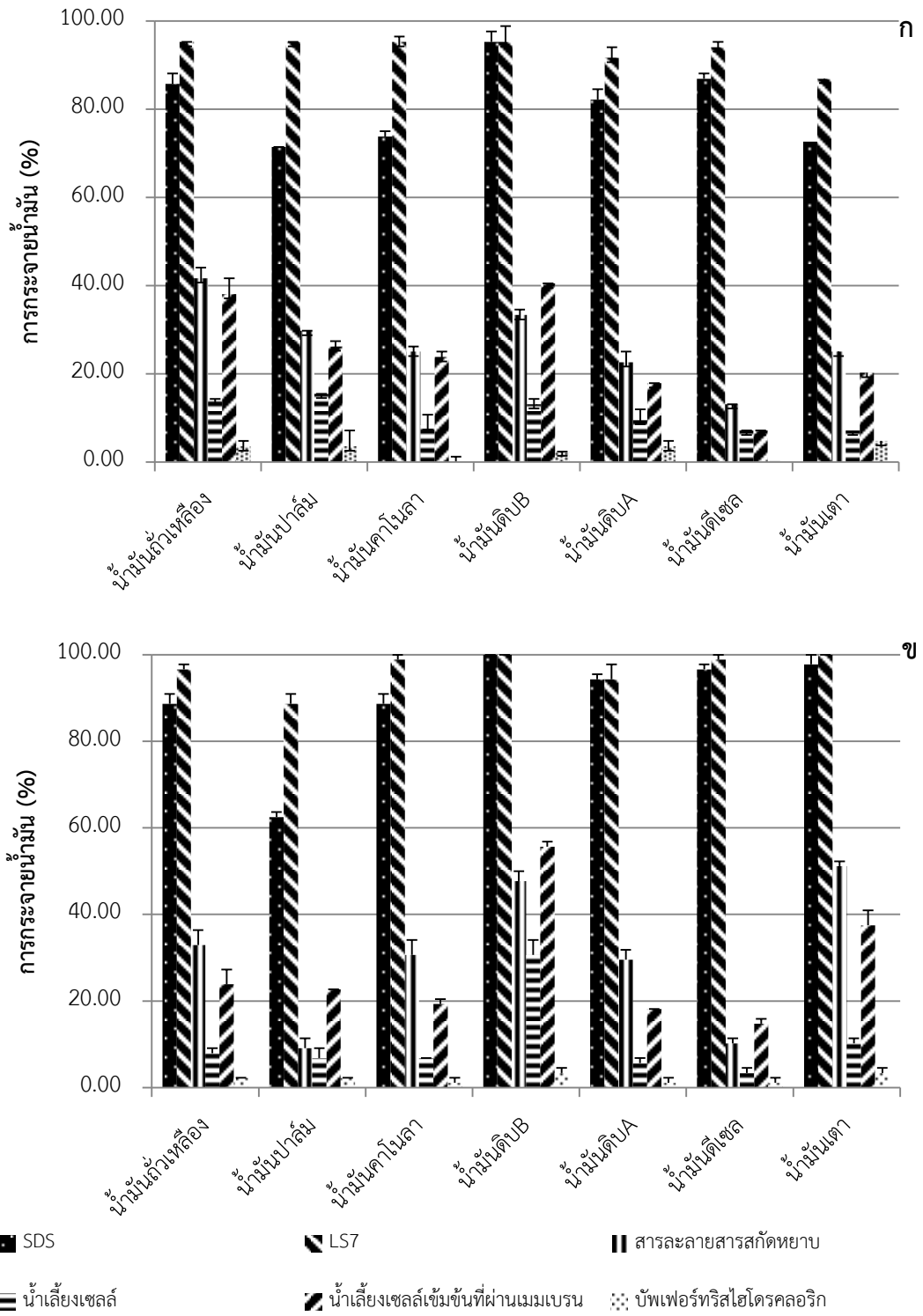


รูปที่ 4.15 สมบัติการก่ออิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวกับตัวอย่างน้ำมันพืชและน้ำมันปิโตรเลียม

4.4.4 สมบัติการกระจายน้ำมัน

การทดสอบสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการกระจายน้ำมันพืชและน้ำมันดิบในสภาพน้ำกลั่นและน้ำทะเล เพื่อเปรียบเทียบการกระจายน้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในภาวะที่ไม่มีไอออนของเกลือ (น้ำกลั่น) และภาวะที่มีไอออนเกลือ (น้ำทะเล) โดยงานวิจัยนี้เปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างสารลดแรงตึงผิวทางเคมีกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในรูปสารสกัดหยาบ น้ำเลี้ยงเซลล์ และน้ำเลี้ยงเซลล์เข้มข้นที่ผ่านเมมเบรน โดยผลจากการทดสอบประสิทธิภาพให้ผลการกระจายน้ำมันที่ไม่แตกต่างกันระหว่างในน้ำกลั่นและน้ำทะเล ซึ่งทำให้ยืนยันได้ว่าความเข้มข้นของเกลือในน้ำทะเลไม่ส่งผลต่อการลดประสิทธิภาพสารลดแรงตึงผิว ซึ่งผลการทดสอบพบว่าสารลดแรงตึงผิว

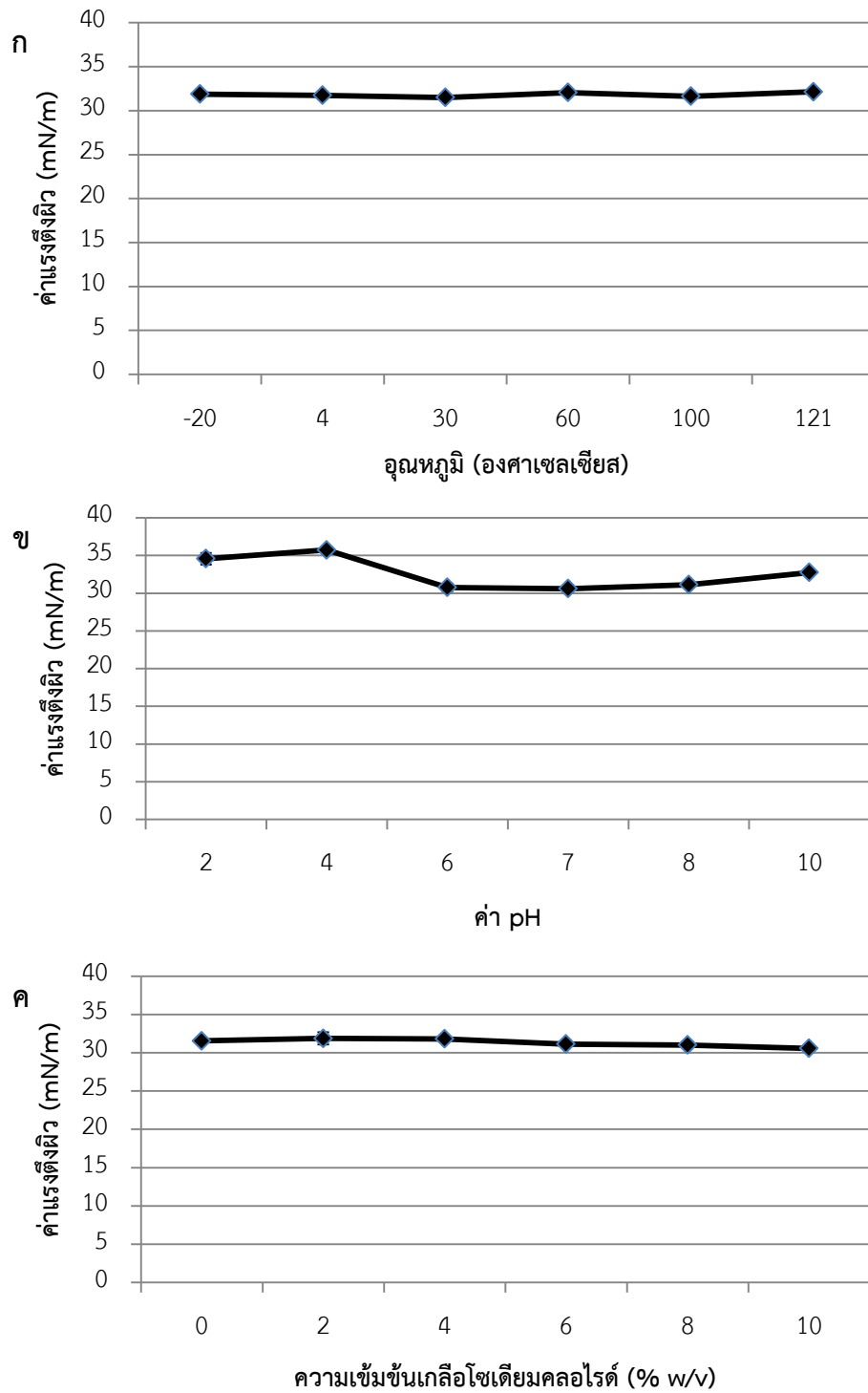
ชีวภาพในรูปแบบสารสกัดหยาบและน้ำเลี้ยงเซลล์เข้มข้นที่ผ่านเมมเบรน ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 2 CMC สามารถกระจายน้ำมันพืชและน้ำมันปิโตรเลียมได้ มีการกระจายน้ำมันพืชทั้ง 3 ชนิดและน้ำมันดิบบงกชได้ดี ตั้งแต่ช่วง 20 – 40% การกระจายน้ำมัน ในภาชนะน้ำกลั่น (รูปที่ 4.16ก) และเมื่อทดสอบการกระจายน้ำมันในภาชนะน้ำทะเลพบว่าประสิทธิภาพการกระจายน้ำมันในกลุ่มน้ำมันปิโตรเลียมเพิ่มขึ้น ทั้ง 4 ชนิดน้ำมันที่ทดสอบ เมื่อเปรียบเทียบกับภาชนะน้ำกลั่น (รูปที่ 4.16ข) เนื่องจากปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่นำมาใช้ทดสอบนั้นมีปริมาณที่ไม่น้อยการกระจายน้ำมันจึงมีค่าการกระจายน้ำมันที่ต่ำ Peter และ Singh (2014) ได้กล่าวว่าขนาดของการกระจายน้ำมันแปรผันตามปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยมีความสัมพันธ์แบบเส้นตรง และเมื่อทดสอบการกระจายน้ำมันทั้ง 2 ประเภทในสถานะที่เป็นน้ำกลั่นและน้ำทะเล โดยเพิ่มความเข้มข้นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพตามรูปที่ ๓ (ภาคผนวก ๓) พบว่าประสิทธิภาพการกระจายน้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในรูปแบบสารสกัดหยาบและน้ำเลี้ยงเซลล์เข้มข้นที่ผ่านเมมเบรนยังคงมีสมบัติการกระจายน้ำมันและมีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น ดังนั้นหากต้องการประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus subtilis* GY30 กับงานกำจัดหรือชะล้างน้ำมันพืชและน้ำมันปิโตรเลียมที่ปนเปื้อนในธรรมชาติทางน้ำทั้งน้ำจืดและน้ำทะเลได้ โดยต้องมีความเข้มข้นมากกว่า 2 CMC ทั้งนี้คาดว่าสามารถนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ GY30 มาใช้เป็นตัวช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดน้ำมัน หากเกิดการรั่วไหลของน้ำมันในทะเล หรือพบการปนเปื้อนของน้ำมันในแม่น้ำจากการทิ้งอาหารหรือการรั่วไหลของน้ำมันเครื่องยนต์ได้



รูปที่ 4.16 สมบัติการกระจายน้ำมันโดยใช้ตัวอย่างน้ำมันพืชและน้ำมันปิโตรเลียม ก. ศึกษาการกระจายในภาชนะน้ำทั่วไป และ ข. ศึกษาการกระจายน้ำมันในภาชนะน้ำทะเล

4.4.5 ความเสถียรที่สภาวะต่างๆ

การศึกษาความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่อยู่ในรูปสารสกัดหยาบที่ละลายในบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอริก โดยมีความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเท่ากับ 1 CMC หรือ 450 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยแปรผันสภาวะอุณหภูมิตั้งแต่ -20 ถึง 121 องศาเซลเซียส ค่า pH ตั้งแต่ 2 ถึง 10 และความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ตั้งแต่ 0 ถึง 10 % w/v ซึ่งแสดงถึงความแปรผันของสภาวะต่างๆ ตามธรรมชาติที่สามารถเกิดขึ้นได้ เพื่อนำเป็นข้อมูลสำหรับการประยุกต์สารลดแรงตึงผิวที่เหมาะสม ผลการศึกษาความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ *B. subtilis* GY30 สามารถลดค่าแรงตึงผิวของบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอริกจาก 69.1 มิลลินิวตันต่อเมตร ลงมาในช่วง 30-31 มิลลินิวตันต่อเมตร จากรูปที่ 4.17ก แสดงว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ *B. subtilis* GY30 นั้นสามารถทนต่อสภาวะของอุณหภูมิตั้งแต่ -20 จนถึง 121 องศาเซลเซียสได้ ทำให้สามารถสารลดแรงตึงผิวไปใช้ในรูปการนำเลี้ยงเซลล์ปลอดเชื้อ หลังจากการฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อและเก็บรักษาที่อุณหภูมิด้วยวิธีการแช่แข็ง โดยไม่ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ GY30 ในส่วนของผลกระทบจากความเป็นกรดเบสต่อประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่าในช่วงที่มีค่า pH เป็นกรดคือ 2-4 มีผลกระทบให้ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวลดลง คือ ค่าแรงตึงผิวที่วัดได้สูงขึ้นเป็น 35 มิลลินิวตันต่อเมตร ตามรูปที่ 4.17ข เพราะโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่อยู่ในกลุ่มไกลโคลิพิดมีประจุเป็นลบ เมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกรดจึงมีประจุสภาพลดลง ซึ่งเกิดจากการตกตะกอนโดยส่วนของประจุลบของสารลดแรงตึงผิวเกิดพันธะกับไฮโดรเจนไอออนจากกรดไฮโดรคลอริก (Laorrattanasak และคณะ, 2016) เช่นเดียวกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มลิโปเปปไทด์ที่มีประจุลบ นั้นมีประสิทธิภาพที่ลดลงเช่นกันเมื่ออยู่ในภาวะที่เป็นกรด (Morikawa และคณะ, 2000) นอกจากนี้พบว่าเมื่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพดีขึ้นเล็กน้อย คือสามารถลดค่าแรงตึงผิวจาก 32 มิลลินิวตันต่อเมตร เป็น 30.5 มิลลินิวตันต่อเมตร ที่ความเข้มข้นเกลือเท่ากับ 2 และ 10 %w/v ตามลำดับ จากรูปที่ 4.17ค โดยประสิทธิภาพที่สูงขึ้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้น เกิดจากปริมาณประจุของเกลือมีผลต่อสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประจุเป็นลบ ซึ่งช่วยให้เกิดการจัดเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิวในรูปไมเซลล์ที่มีปริมาณสารลดแรงตึงผิวมากขึ้น ส่งผลให้มีปริมาณสารลดแรงตึงผิวต่อหน่วยพื้นที่สูงขึ้น และเมื่อปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อหน่วยพื้นที่สูงขึ้น ทำให้ค่าแรงตึงผิวหรือประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวนั้นดีขึ้น เช่นเดียวงานวิจัยของ Laorrattanasak และคณะ, 2016 ที่ได้ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มไกลโคลิพิดที่มีประจุลบ พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณเกลือโซเดียม ทำให้ค่าแรงตึงผิวที่วัดได้ดีขึ้นจาก 35 มิลลินิวตันต่อเมตร เป็น 32 มิลลินิวตันต่อเมตร



รูปที่ 4.17 ความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สภาวะต่างๆ ก. อุณหภูมิ ข. ค่า pH และ ค. ความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ โดยแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ครั้ง

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

ในขั้นแรกได้ศึกษาการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. subtilis* GY30 *C. cellulana* GY33 *C. cellulana* GY36 และ *G. westfalica* GY40 ในอาหารเบซัล ที่ประกอบด้วยน้ำมันถั่วเหลืองปริมาณ 2 % (v/v) แล้วคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้เร็วและผลิตได้ในปริมาณสูง โดยสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสูงสุดและไม่เป็นเชื้อก่อโรคตามพระราชบัญญัติเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ. 2558 คือ *B. subtilis* GY30 ซึ่งผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้อาหารเบซัลที่มีน้ำมันถั่วเหลืองปริมาณ 2 % (v/v) ได้ 0.92 กรัมต่อลิตร ในเวลา 3 วัน จากนั้นได้ปรับปรุงวิธีการผลิตสารลดแรงตึงผิวด้วยการตรึงเซลล์บนไคโตซาน ซึ่งวิธีการตรึงเซลล์สามารถเพิ่มการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *B. subtilis* GY30 จากเดิม 0.92 กรัมต่อลิตร เป็น 1.32 กรัมต่อลิตร ซึ่งเพิ่มขึ้น 43.48% หรือคิดเป็นได้ 1.43 เท่า

หลังจากนั้นจึงศึกษาองค์ประกอบของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยแปรผันปริมาณองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเซลล์ได้แก่ ปริมาณน้ำมันถั่วเหลือง ปริมาณโซเดียมไนเตรตที่คิดเป็นสัดส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนอะตอม ปริมาณเหล็กซัลเฟต และปริมาณแมงกานีสซัลเฟต โดยการศึกษาแบ่งออกเป็น การทดลองครั้งละปัจจัย (one factor at a time) สำหรับหาช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเลือกกำหนดค่าต่ำ ค่ากลาง และค่าสูงของระดับของปัจจัยที่ใช้การออกแบบการทดลอง พบว่าช่วงที่เหมาะสมต่อการเลือกกำหนดระดับของแต่ละปัจจัยได้แก่ ปริมาณน้ำมันถั่วเหลือง 1-5% v/v อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 10:1-25:1 ปริมาณเหล็กซัลเฟต 1-100 มิลลิกรัมต่อลิตร และปริมาณแมงกานีสซัลเฟต 0.02-2 มิลลิโมลาร์ (0.00302 - 0.302 กรัมต่อลิตร) ต่อมาใช้ในการออกแบบการทดลองด้วย Plackett-Burman สำหรับการคัดกรองปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตในเบื้องต้น สามารถระบุได้ว่าน้ำมันถั่วเหลือง อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน เหล็กซัลเฟต และแมงกานีสซัลเฟต เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณการผลิตสารลดแรงตึงผิว จากนั้นได้หาปริมาณองค์ประกอบอาหารที่เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวสูงสุด โดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธีบล็อก-เบห์นเคน พบว่าปริมาณน้ำมันถั่วเหลือง (2.70 % v/v) สัดส่วนแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจน (14.75:1) ปริมาณเหล็ก (50 มิลลิกรัมต่อลิตร) และปริมาณแมงกานีส (0.002 โมลาร์ หรือ 0.302 กรัมต่อลิตร) ให้การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงสุด คือ 1.64 กรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้เพิ่มขึ้น 24.24% จากสูตรอาหารเดิม (1.24 เท่า) โดยการผลิตสารลดแรงตึงผิว

ชีวภาพสูงสุดเป็นผลมาจากปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองและอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็นหลัก การผลิตในขั้นตอนนี้ใช้ระยะเวลาการผลิต 3 วัน

ต่อมา นำสูตรอาหารที่สามารถเพิ่มปริมาณการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้สูงสุด มาใช้ ระหว่างการขยายขนาดการผลิตในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบด โดยพบว่า *B. subtilis* GY30 ที่ ตรีงบนโคโตซานสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ 1.65 กรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 1 วัน เมื่อควบคุมภาวะการผลิต คือ อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm อัตราการไหลของอาหารผ่านแพคคอลัมน์เท่ากับ 0.6 มิลลิเมตรต่อลูกบาศก์เซนติเมตร และปริมาณโคโตซานในแพคคอลัมน์เท่ากับ 80 กรัม นอกจากนี้การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบดสามารถใช้ส่วนแพคคอลัมน์ในการผลิตซ้ำได้ โดยปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเมื่อผลิตซ้ำรอบที่ 1 และ 2 ได้ ปริมาณเท่ากับ 1.45 และ 1.81 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งการผลิตในถังปฏิกรณ์ชีวภาพนั้นสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ในปริมาณใกล้เคียงกับระดับขวดเขย่า แต่ใช้ระยะเวลาการผลิตสั้นกว่า แสดงว่าการผลิตในถังปฏิกรณ์ชีวภาพสามารถเพิ่มผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้

จากการศึกษาสมบัติสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ GY30 พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนี้อยู่ในกลุ่มของไกลโคลิพิด ที่มีค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์เท่ากับ 420.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และสามารถใส่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในรูปน้ำเลี้ยงเซลล์เข้มข้นที่ผ่านเมมเบรนเป็นสารก่ออิมัลชันและสารกระจายคราบน้ำมัน ทั้งน้ำมันดิบและน้ำมันพืชได้ดี นอกจากนั้นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ GY30 สามารถประยุกต์กับงานด้านสิ่งแวดล้อมที่มีสภาวะที่หลากหลาย เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ GY30 มีความเสถียรในช่วง pH 6 - 10 อุณหภูมิ -20 ถึง 121 องศาเซลเซียส และความเข้มข้นเกลือ 0 ถึง 10 % w/v

จากงานวิจัยทั้งหมดสรุปได้ว่าควรผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเซลล์ตรีงบนโคโตซาน ซึ่งสามารถให้ผลผลิตที่สูงกว่าการผลิตด้วยเซลล์อิสระเพิ่มขึ้น 43.48% และเมื่อใช้วิธีการผลิตด้วยเซลล์ตรีงรวมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีปริมาณองค์ประกอบของอาหารที่เหมาะสม พบว่าปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้เพิ่มขึ้นจากเดิมอีก 24.24% โดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธีการวิเคราะห์การตอบสนองเชิงพื้นผิวใช้จำนวนชุดการทดลองที่น้อยกว่าการทดลองแบบที่ละเอียด แต่ผลที่ได้ค่อนข้างใกล้เคียงกัน นอกจากนี้การขยายขนาดการผลิตในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบดให้ผลผลิตสูงสุด คือ 1.81 กรัมต่อลิตร จากการใช้แพคคอลัมน์ซ้ำ และสามารถลดระยะเวลาการผลิตลงจากการผลิตในระดับขวดเขย่า ทำให้สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากขึ้นในระยะเวลาเท่าเดิม และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารลดแรงตึงผิวจาก *B. subtilis* GY30 ก่อนการพัฒนาการผลิต คือ 0.92 กรัมต่อลิตร เป็นที่ 1.81 กรัมต่อลิตร ภายหลังการพัฒนาการผลิต จะเห็นว่าสามารถเพิ่มผลผลิตสารลดแรงตึงผิวได้เพิ่มขึ้น 96.74% เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตก่อนการพัฒนาการผลิต (1.96 เท่า)

โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้นั้นมีประสิทธิภาพที่น่าสนใจต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ เนื่องจากมีสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ดี

แนวทางในการศึกษาวิจัยสำหรับการพัฒนาการผลิตในขั้นต่อไปในการผลิตในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบดคือ ศึกษาในส่วนของอัตราการไหลของอาหารและปริมาณโคโคซานในแพคคอลัมน์ จากนั้นจึงศึกษาการผลิตต่อในรูปแบบการผลิตแบบเฟดแบตช์ ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณการผลิตสารลดแรงตึงผิวได้มากขึ้นจากการผลิตแบบแบตช์ ส่วนการประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ GY30 เหมาะสมสำหรับใช้เป็นสารกระจายน้ำมัน ซึ่งมีสมบัติการกระจายน้ำมันที่ดี ทั้งน้ำมันพืชและน้ำมันปิโตรเลียม และสารก่ออิมัลชัน แต่ในการประยุกต์ใช้ในการก่ออิมัลชันจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องของปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

5.2 ข้อเสนอแนะ

การพัฒนาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรียที่คัดเลือก ในขั้นตอนการศึกษาปริมาณองค์ประกอบสารอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตด้วยวิเคราะห์การตอบสนองเชิงพื้นผิวด้วยวิธี Plackett-Burman เหมาะสำหรับการคัดเลือกปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตที่มีปริมาณมาก เช่น ประเภทคาร์บอน ประเภทไนโตรเจนที่ให้การผลิตที่สูงสุด เป็นต้น ทั้งนี้สามารถใช้ข้อมูลจากการอ้างอิงปริมาณสารต่างๆ จากรายงานวิจัยก่อนหน้า ดังงานวิจัย Joshi และคณะ, 2008 ที่ศึกษาปัจจัยหลายปัจจัยที่พร้อมกันเพื่อเลือกปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตในเชิงบวก ซึ่งทำให้สามารถลดระยะเวลาการศึกษาจากช่วงที่เป็นการออกแบบการทดลองครั้งละปัจจัยได้ ส่วนการศึกษาหาปริมาณปัจจัยที่ส่งเสริมการผลิตสูงสุดด้วยวิธีบล็อก-เบย์นเคนนั้น เหมาะสมต่อการศึกษาต่อจากวิธีของ Plackett-Burman ตามที่งานวิจัยนี้ได้ศึกษา และผลที่ได้จากการศึกษาทั้งส่วนที่เป็นสมการแสดงความสัมพันธ์ของปัจจัยและกราฟตอบสนองเชิงพื้นผิว สามารถนำมาใช้ประยุกต์ใช้ได้กับงานวิจัยที่ต่อเนื่องกันโดยใช้แบคทีเรีย *B. subtilis* GY30 เช่น การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแหล่งคาร์บอนที่เหลือใช้จากการเกษตรหรือของเสียจากอุตสาหกรรม โดยการวิเคราะห์ปริมาณปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตในแหล่งอาหารเหล่านั้น ได้แก่ ปริมาณคาร์บอน ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณเหล็ก และปริมาณแมงกานีส เพื่อทราบถึงแนวโน้มการผลิตและความเป็นไปได้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวจาก *B. subtilis* GY30

สำหรับการนำสมการความสัมพันธ์ของปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวจาก *B. subtilis* GY30 มาประยุกต์ใช้กับการผลิตสารลดแรงตึงผิวด้วยแบคทีเรียชนิดอื่น จำเป็นต้องตรวจสอบว่าสมการทำนายดังกล่าวสามารถใช้กับแบคทีเรียชนิดนั้นได้ โดยทดสอบการผลิตจากการกำหนดปริมาณปัจจัยที่ให้ผลตั้งแต่จุดที่ผลิตได้สูงที่สุด จนถึงจุดที่ผลิตได้น้อยที่สุด (จากค่าทำนาย)

เปรียบเทียบกับปริมาณที่ผลิตได้จริง ซึ่งทำให้ทราบแนวโน้มของการผลิตของแบคทีเรียชนิดอื่นว่ามีแนวโน้มการใช้สารอาหารในการผลิตเหมือนกับ *B. subtilis* GY30 หรือไม่ หากสมการทำนายไม่เหมาะสมต่อการผลิตของแบคทีเรียอื่นที่สนใจศึกษา ให้เริ่มต้นการปรับปรุงสูตรการผลิตใหม่ โดยเริ่มการศึกษาจากหาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตด้วยวิธี Plackett-Burman โดยใช้ข้อมูลพื้นฐานจากงานวิจัยก่อนหน้าแทนขั้นตอนของการศึกษาการออกแบบการทดลองครั้งละปัจจัย แต่สำหรับแบคทีเรียที่มีข้อมูลพื้นฐานน้อยการศึกษาการออกแบบการทดลองครั้งละปัจจัย เป็นทางเลือกหนึ่งที่ดีเนื่องจากเข้าใจผลการทดลองได้ง่าย

การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยการตรึงเซลล์จุลินทรีย์บนโคโตซานในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบต มีแนวโน้มในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้เร็ว ทั้งนี้ต้องมีปริมาณอากาศที่มากพอสำหรับการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิว คือ ใช้อัตราการให้อากาศที่ 1.5 vvm ซึ่งเป็นอัตราให้อากาศที่สูงเมื่อเทียบกับการผลิตในถังปฏิกรณ์แบบกวน เนื่องจากระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบตในงานวิจัยนี้ไม่มีส่วนประกอบของใบกวนทำให้การละลายของออกซิเจนน้อยกว่าการใช้ถังปฏิกรณ์แบบกวน เช่น งานวิจัยของ Yao และคณะ (2015) ได้ศึกษาในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกวนพบว่าอัตราการให้อากาศ 1.0 vvm เป็นอัตราที่เหมาะสมต่อการผลิต ซึ่งต่างจากถังปฏิกรณ์แบบแพคเบตที่ได้ศึกษาที่ใช้อัตราการให้อากาศถึง 1.5 vvm ซึ่งไม่มีใบพัดกวน อาศัยการละลายของออกซิเจนจากฟองอากาศเท่านั้น เมื่อขยายขนาดการผลิตให้สูงขึ้นจำเป็นต้องใช้พลังงานในการการอัดอากาศที่สูงขึ้น (Perez-Bibbins และคณะ 2016) เมื่อใช้อัตราการให้อากาศที่สูง จึงส่งผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวที่เกิดฟองได้ เนื่องจากสูญเสียผลผลิตไปกับส่วนของฟอง แต่จะไม่พบปัญหานี้กับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตไม่ก่อให้เกิดฟอง เช่น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *B. subtilis* GY30 จึงเหมาะต่อการศึกษาต่อไป โดยสิ่งที่เป็นจุดเด่นของการผลิตโดยใช้ถังปฏิกรณ์แบบแพคเบต คือ สามารถใช้เซลล์ในแพคคอลลัมน์สำหรับการใช้ผลิตซ้ำได้ โดยมีปริมาณเซลล์บนวัสดุตรึงที่สูง เนื่องจากเซลล์แบคทีเรียที่ยึดเกาะบนโคโตซานไม่โดนแรงปั่นหรือแรงเหวี่ยงจากการกวน ทำให้การผลิตในรอบต่อไปใช้ระยะเวลาการผลิตที่เร็วและใกล้เคียงกับการผลิตในรอบแรก เพราะแบคทีเรียที่อยู่บนโคโตซานเมื่อพบสารอาหารใหม่จะเข้าสู่การผลิตสารลดแรงตึงผิวแทนการเพิ่มจำนวนเซลล์ เพื่อยืนยันความสามารถในการใช้เซลล์ตรึงในแพคคอลลัมน์ซ้ำ ควรเพิ่มรอบการผลิตซ้ำอีกหลายรอบ ซึ่งทำให้ทราบถึงความเสถียรของเซลล์ตรึงที่อยู่ในแพคคอลลัมน์ด้วยว่าสามารถใช้ซ้ำได้นานมากน้อยเพียงใด ถ้าสามารถใช้แพคคอลลัมน์ซ้ำได้มากต้นทุนการผลิตก็สามารถลดลงได้ เนื่องจากสามารถลดขั้นตอนการตรึงเซลล์ได้

ในการเพิ่มปริมาณการผลิตสารลดแรงตึงผิวในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบตต่อไป สามารถทำได้ เพิ่มอัตราการไหลของสารอาหารที่ผ่านแพคคอลลัมน์ เนื่องจากในช่วงต้นของการผลิตสารลดแรงตึงผิว ยังพบปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนของแบคทีเรีย เมื่อเวลาผ่านไปน้ำมันถั่ว

เหลืองได้เข้าไปอยู่ในส่วนของแพคคอลลัมน์ ทำให้แบคทีเรียที่อยู่นอกแพคคอลลัมน์ในรูปเซลล์อิสระขาดแหล่งคาร์บอน แต่ในระบบมีการผลิตสารลดแรงตึงผิวซึ่งเป็นแหล่งอาหารสำรองได้ แบคทีเรียในรูปเซลล์อิสระจึงใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพแทนน้ำมันถั่วเหลือง เพื่อแก้ไขปัญหาการใช้สารลดแรงตึงผิวแทนแหล่งคาร์บอน อาจต้องเลือกใช้กระบวนการผลิตจากแบคทีเรียเป็นกึ่งต่อเนื่องแทน จากงานวิจัยของ Jin และคณะ (2015) ได้ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวจาก *B. subtilis* โดยการแบ่งเติมสารตั้งต้นออกเป็น 2 ช่วง ทำให้การผลิตสารลดแรงตึงผิวเพิ่มขึ้น ซึ่งคาดว่า การเติมสารอาหารแบ่งช่วงสามารถช่วยลดการสะสมของแหล่งคาร์บอนในแพคคอลลัมน์ นอกจากนี้การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยแบคทีเรียอื่นในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบดมีแนวโน้มที่จะสามารถผลิตได้ จากงานวิจัย Khondee และคณะ (2015) และ Laorrattanasak และคณะ (2016) ได้ตรึง *Bacillus* sp. GY19 และ *Gordonia westfalica* บนโคโตซานเพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิว ตามลำดับ ทำให้ยืนยันได้ว่าโคโตซานสามารถใช้เป็นวัสดุตรึงได้นอกเหนือจาก *B. subtilis* GY30 แต่ภาวะที่ควบคุมการผลิตจะปรับเปลี่ยนให้เหมาะสมต่อการชนิดของแบคทีเรานั้นต่อไป

รายการอ้างอิง

- Abbasi H, Sharafi H, Alidost L, Bodagh A, Zahiri HS & Noghabi KA (2013) Response surface optimization of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* MA01 isolated from spoiled apples. *Prep Biochem Biotechnol* 43: 398-414.
- Abouseoud M, Maachi R & Amrane A (2007) Biosurfactant production from olive oil by *Pseudomonas fluorescens*. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*.
- Amani H, Mehrnia MR, Sarrafzadeh MH, Haghghi M & Soudi MR (2010) Scale up and application of biosurfactant from *Bacillus subtilis* in enhanced oil recovery. *Appl Biochem Biotechnol* 162: 510-523.
- Banat IM, Satpute SK, Cameotra SS, Patil R & Nyayanit NV (2014) Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. *Front Microbiol* 5: 697.
- Baş D & Boyacı IH (2007) Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *J Food Eng* 78: 836-845.
- Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS & Escalera LA (2008) Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 76: 965-977.
- Burgos-Diaz C, Pons R, Teruel JA, Aranda FJ, Ortiz A, Manresa A & Marques AM (2013) The production and physicochemical properties of a biosurfactant mixture obtained from *Sphingobacterium detergens*. *J Colloid Interface Sci* 394: 368-379.
- Bustamante M, Durán N & Diez MC (2012) Biosurfactants are useful tools for the bioremediation of contaminated soil: A review. *J Soil Sci Plant Nutr* 12: 667-687.
- Cai Q, Zhang B, Chen B, Zhu Z, Lin W & Cao T (2014) Screening of biosurfactant producers from petroleum hydrocarbon contaminated sources in cold marine environments. *Mar Pollut Bull* 86: 402-410.

- Campos JM, Stamford TL, Sarubbo LA, de Luna JM, Rufino RD & Banat IM (2013) Microbial biosurfactants as additives for food industries. *Biotechnol Prog* 29: 1097-1108.
- Cheng F (2013) Characterization of a blend-biosurfactant of glycolipid and lipopeptide produced by *Bacillus subtilis* TU2 isolated from underground oil-extraction wastewater. *JMB* 23: 390-396.
- Christovaa N, Petrovb P & Kabaivanova L (2013) Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* BN10 cells entrapped in cryogels. *Naturforsch* 68 c: 47 – 52.
- Das P, Mukherjee S & Sen R (2008) Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. *J Appl Microbiol* 104: 1675-1684.
- Dogan I, Pagilla KR, Webster DA & Stark BC (2006) Expression of *Vitreoscilla hemoglobin* in *Gordonia amarae* enhances biosurfactant production. *J Ind Microbiol Biotechnol* 33: 693-700.
- Fakruddin M (2012) Conceptual reference evapotranspiration models for different time steps. *J Pet Environ Biotechnol* 3.
- Franzetti A, Caredda P, La Colla P, Pintus M, Tamburini E, Papacchini M & Bestetti G (2009) Cultural factors affecting biosurfactant production by *Gordonia* sp. BS29. *Int Biodeterior Biodegradation* 63: 943-947.
- Gaensly F, Picheth G, Brand D & Bonfim TMB (2014) The uptake of different iron salts by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Braz J Microbiol* 45: 491-494.
- Geys R, Soetaert W & Van Bogaert I (2014) Biotechnological opportunities in biosurfactant production. *Curr Opin Biotechnol* 30: 66-72.
- Gudina EJ, Fernandes EC, Rodrigues AI, Teixeira JA & Rodrigues LR (2015) Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using corn steep liquor as culture medium. *Front Microbiol* 6: 59.
- Hou D, Shen X, Luo Q, He Y, Wang Q & Liu Q (2013) Enhancement of the diesel oil degradation ability of a marine bacterial strain by immobilization on a novel compound carrier material. *Mar Pollut Bull* 67: 146-151.

- Hussain A, Kangwa M, Abo-Elwafa AG & Fernandez-Lahore M (2015) Influence of operational parameters on the fluid-side mass transfer resistance observed in a packed bed bioreactor. *AMB Express* 5: 25.
- Israelachvili J (1994) The science and applications of emulsions - an overview. *Colloids Surf, A* 91: 1-8.
- Jin H, Li K, Niu Y, Guo M, Hu C, Chen S & Huang F (2015) Continuous enhancement of iturin A production by *Bacillus subtilis* with a stepwise two-stage glucose feeding strategy. *BMC Biotechnol* 15: 53.
- Joshi S, Yadav S & Desai AJ (2008) Application of response-surface methodology to evaluate the optimum medium components for the enhanced production of lichenysin by *Bacillus licheniformis* R2. *Biochem Eng J* 41: 122-127.
- Khondee N, Tathong S, Pinyakong O, Powtongsookd S, Chatchuponge T, Ruangchainikome C & Luepromchai E (2012) Airlift bioreactor containing chitosan-immobilized *Sphingobium* sp. P2 for treatment of lubricants in wastewater. *J Hazard Mater* 213– 214: 466– 473.
- Khondee N, Tathong S, Pinyakong O, Müller R, Soonglerdsongpha S, Ruangchainikom C, Tongcumpou C & Luepromchai E (2015) Lipopeptide biosurfactant production by chitosan-immobilized *Bacillus* sp. GY19 and their recovery by foam fractionation. *Biochem Eng J* 93: 47-54.
- Kim HS, Jeon JW, Kim BH, Ahn CY, Oh HM & Yoon BD (2006) Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, by *Candida* sp. SY16 using fed-batch fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 70: 391–396.
- Kiran GS, Sabu A & Selvin J (2010) Synthesis of silver nanoparticles by glycolipid biosurfactant produced from marine *Brevibacterium casei* MSA19. *J Biotechnol* 148: 221-225.
- Kiran GS, Nishanth LA, Priyadharshini S, Anitha K & Selvin J (2014) Effect of Fe nanoparticle on growth and glycolipid biosurfactant production under solid state culture by marine *Nocardiopsis* sp. MSA13A. *BMC Biotechnol* 14: 48.
- Kourkoutas Y, Bekatorou A, Banat IM, Marchant R & Koutinas AA (2004) Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiol* 21: 377-397.

- Kugler JH, Muhle-Goll C, Hansen SH, Volp AR, Kirschhofer F, Kuhl B, Brenner-Weiss G, Luy B, Syltatk C & Hausmann R (2015) Glycolipids produced by *Rouxiella* sp. DSM 100043 and isolation of the biosurfactants via foam-fractionation. *AMB Express* 5: 82.
- Kumar CG, Mamidyala SK, Sujitha P, Muluka H & Akkenapally S (2012) Evaluation of critical nutritional parameters and their significance in the production of rhamnolipid biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* BS-161R. *Biotechnol Prog* 28: 1507-1516.
- Laorrattanasak S, Rongsayamanont W, Khondee N, Paorach N, Soonglerdsongpha S, Pinyakong O & Luepromchai E (2016) Production and application of *Gordonia westfalica* GY40 biosurfactant for remediation of fuel oil spill. *Water Air Soil Pollut* 227.
- Lee M, Kim MK, Kwon MJ, Park BD, Kim MH, Goodfellow M & Lee ST (2005) Effect of the synthesized mycolic acid on the biodegradation of diesel oil by *Gordonia nitida* strain LE31. *J Biosci Bioeng* 100: 429-436.
- Liu B, Liu J, Ju M, Li X & Yu Q (2016) Purification and characterization of biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* Y-1 and its application in remediation of petroleum contaminated soil. *Mar Pollut Bull* 107: 46-51.
- Lovaglio RB, dos Santos FJ, Jafelicci M, Jr. & Contiero J (2011) Rhamnolipid emulsifying activity and emulsion stability: pH rules. *Colloids Surf, B* 85: 301-305.
- Luna JM, Rufino RD, Albuquerque CDC, Sarubbo LA & Campos-Takaki GM (2011) Economic optimized medium for tensio-active agent production by *Candida sphaerica* UCP0995 and application in the removal of hydrophobic contaminant from sand. *Int J Mol Sci* 12: 2463-2476.
- Manivasagan P, Sivasankar P, Venkatesan J, Sivakumar K & Kim SK (2014) Optimization, production and characterization of glycolipid biosurfactant from the marine actinobacterium, *Streptomyces* sp. MAB36. *Bioprocess Biosyst Eng* 37: 783-797.
- Maqsood MI, Jamal A & Azeem HA (2011) Effects of iron salts on rhamnolipid biosurfactant production. *BIOLOGIA (PAKISTAN)* 57: 121-132.

- Marchant R & Banat IM (2012) Microbial biosurfactants: Challenges and opportunities for future exploitation. *Trends Biotechnol* 30: 558-565.
- Marti ME, Colonna WJ, Patra P, Zhang H, Green C, Reznik G, Pynn M, Jarrell K, Nyman JA, Somasundaran P, Glatz CE & Lamsal BP (2014) Production and characterization of microbial biosurfactants for potential use in oil-spill remediation. *Enzyme Microb Technol* 55: 31-39.
- Mnif I & Ghribi D (2015) Microbial derived surface active compounds: properties and screening concept. *World J Microbiol Biotechnol* 31: 1001-1020.
- Mnif I & Ghribi D (2016) Glycolipid biosurfactants: main properties and potential applications in agriculture and food industry. *J Sci Food Agric* 96: 4310-4320.
- Mohanram R, Jagtap C & Kumar P (2016) Isolation, screening, and characterization of surface-active agent-producing, oil-degrading marine bacteria of Mumbai Harbor. *Mar Pollut Bull* 105: 131-138.
- Morikawa M, Hirata Y & Imanaka T (2000) A study on the structure function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1488: 211-218.
- Mousavi F, Beheshti-Maal K & Massah A (2015) Production of sophorolipid from an identified current yeast, *Lachancea thermotolerans* BBMCZ7FA20, isolated from honey bee. *Curr Microbiol* 71: 303-310.
- Mukherjee S, Das P & Sen R (2006) Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends Biotechnol* 24: 509-515.
- Mulligan CN (2005) Environmental applications for biosurfactants. *Environ Pollut* 133: 183-198.
- Musale V & Thakar SB (2015) Review: Biosurfactant and hydrocarbon degradation. *Life Science Informatics Publication* 1-25.
- Mutalik SR, Vaidya BK, Joshi RM, Desai KM & Nene SN (2008) Use of response surface optimization for the production of biosurfactant from *Rhodococcus* spp. MTCC 2574. *Bioresour Technol* 99: 7875-7880.
- Najafi AR, Rahimpour MR, Jahanmiri AH, Roostaazad R, Arabian D, Soleimani M & Jamshidnejad Z (2011) Interactive optimization of biosurfactant production

- by *Paenibacillus alvei* ARN63 isolated from an Iranian oil well. *Colloids Surf, B* 82: 33-39.
- Nalini S & Parthasarathi R (2013) Biosurfactant production by *Serratia rubidaea* SNAU02 isolated from hydrocarbon contaminated soil and its physico-chemical characterization. *Bioresour Technol* 147: 619-622.
- Nitschke M & Pastore GM (2006) Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. *Bioresour Technol* 97: 336-341.
- Noah KS, Fox SL, Bruhn DF, Thompson DN & Bata GA (2002) Development of continuous surfactin production from potato process effluent by *Bacillus subtilis* in an airlift reactor. *Appl Biochem Biotechnol* 98-100: 803-813.
- O'Sullivan GJ, O'Tuathaigh CM, Clifford JJ, O'Meara GF, Croke DT & Waddington JL (2006) Potential and limitations of genetic manipulation in animals. *Drug Discov Today Technol* 3: 173-180.
- Ozturk S, Calik P & Ozdamar TH (2016) Fed-Batch Biomolecule Production by *Bacillus subtilis*: A State of the Art Review. *Trends Biotechnol* 34: 329-345.
- Pacheco GJ, Ciapina EMP, Gomes EB & Pereira N Jr. (2010) Biosurfactant production by *Rhodococcus erythropolis* and its application to oil removal. *Braz J Microbiol* 41: 685-693.
- Pacwa-Plociniczak M, Plaza GA, Piotrowska-Seget Z & Cameotra SS (2011) Environmental applications of biosurfactants: Recent advances. *Int J Mol Sci* 12: 633-654.
- Perez-Bibbins B, Torrado-Agrasar A, Salgado JM, Mussatto SI & Dominguez JM (2016) Xylitol production in immobilized cultures: a recent review. *Crit Rev Biotechnol* 36: 691-704.
- Peter JK & Singh DP (2014) Characterization of emulsification activity of partially purified rhamnolipids from *Pseudomonas fluorescens*. *IJISR* 3: 88-100.
- Petkar H, Li A, Bunce N, Duffy K, Malnick H & Shah JJ (2011) *Cellulosimicrobium funkei*: first report of infection in a nonimmunocompromised patient and useful phenotypic tests for differentiation from *Cellulosimicrobium cellulans* and *Cellulosimicrobium terreum*. *J Clin Microbiol* 49: 1175-1178.

- Pruthi V & Cameotra SS (2003) Effect of nutrients on optimal production of biosurfactants by *Pseudomonas putida*—A gujarat oil field isolate. *J Surfactants Deterg* 6: 65-68.
- Rahman PKSM & Gakpe E (2008) Production, characterisation and application of biosurfactants-review. *Biotechnology* 7: 360-370.
- Raza ZA, Khan MS, Khalid ZM & Rehman A (2006) Production kinetics and tensioactive characteristics of biosurfactant from a *Pseudomonas aeruginosa* mutant grown on waste frying oils. *Biotechnol Lett* 28: 1623-1631.
- Rizzo C, Michaud L, Graziano M, De Domenico E, Sylatak C, Hausmann R & Giudice LA (2015) Biosurfactant activity, heavy metal tolerance and characterization of *Joostella* strain A8 from the Mediterranean polychaete *Megalomma claparedei* (Gravier, 1906). *Ecotoxicology* 24: 1294-1304.
- Rowlinson MC, Bruckner DA, Hinnebusch C, Nielsen K & Deville JG (2006) Clearance of *Cellulosimicrobium cellulans* bacteremia in a child without central venous catheter removal. *J Clin Microbiol* 44: 2650-2654.
- Saikia RR, Deka S, Deka M & Sarma H (2012) Optimization of environmental factors for improved production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* RS29 on glycerol. *J Basic Microbiol* 52: 446-457.
- Sen R & Swaminathan T (2004) Response surface modeling and optimization to elucidate and analyze the effects of inoculum age and size on surfactin production. *Biochem Eng J* 21: 141-148.
- Sharma D, Mandal MS & Manhas RK (2014) Purification and characterization of a novel lipopeptide from *Streptomyces amritsarensis* sp. nov. active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *AMB Express* 4: 1-9.
- Solaiman DK, Ashby RD & Crocker NV (2015) High-titer production and strong antimicrobial activity of sophorolipids from *Rhodotorula bogoriensis*. *Biotechnol Prog* 31: 867-874.
- Souza EC, Vessoni-Penna TC & de Souza Oliveira RP (2014) Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview. *Int Biodeterior Biodegradation* 89: 88-94.

- Thavasi R, Jayalakshmi S, Balasubramanian T & Banat IM (2007) Production and characterization of a glycolipid biosurfactant from *Bacillus megaterium* using economically cheaper sources. *World J Microbiol Biotechnol* 24: 917-925.
- Urum K, Grigson S, Pekdemir T & McMenemy S (2006) A comparison of the efficiency of different surfactants for removal of crude oil from contaminated soils. *Chemosphere* 62: 1403-1410.
- Uzoigwe C, Ennis CJ & Rahman PKSM (2015) Production of Biosurfactants Using Eco-friendly Microorganisms. 185-204.
- Van Hamme JD, Singh A & Ward OP (2006) Physiological aspects. Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnol Adv* 24: 604-620.
- Wu JY, Yeh KL, Lu WB, Lin CL & Chang JS (2008) Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* EM1 isolated from oil-contaminated site. *Bioresour Technol* 99: 1157-1164.
- Yao S, Zhao S, Lu Z, Gao Y, Lv F & Bie X (2015) Control of agitation and aeration rates in the production of surfactin in foam overflowing fed-batch culture with industrial fermentation. *Rev Argent Microbiol* 47: 344-349.
- Yeh MS, Wei YH & Chang JS (2006) Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*. *Process Biochem* 41: 1799-1805.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีคำนวณปริมาณคาร์บอนและไนโตรเจน

อาหารเลี้ยงเชื้อเบซัล

โซเดียมไนเตรต (NaNO_3)	7 กรัม
โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	1 กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.5 กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.1 กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	5 กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2)	0.01 กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.01 กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	0.1 กรัม
กลูโคส	5 กรัม
สารอาหารอื่นๆ	0.05 มิลลิลิตร

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับความเป็นกรด-ด่าง จนมีค่าเท่ากับ 7 และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารอาหารสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อเบซัล

กรดบอริก (H_3BO_3)	0.26 กรัม
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	0.5 กรัม
แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต ($MnSO_4 \cdot H_2O$)	0.5 กรัม
โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($MoNa_2O_4 \cdot 2H_2O$)	0.06 กรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.7 กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับความเป็นกรด-ด่าง จนมีค่าเท่ากับ 7 และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บรักษาในขวดสีชา

อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB)

ทริปโตเน (Tryptone)	10 กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5 กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5 กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับความเป็นกรด-ด่าง จนมีค่าเท่ากับ 7 และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง เตรียมโดยละลายผงวุ้น 18 กรัม ในอาหารเหลว 1,000 มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani เจือจาง 4 เท่า (25% LB)

ผสมอาหารเหลว LB ปริมาตร 250 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น ปริมาตร 750 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani เจือจาง 4 เท่า pH 6 (25% LB, pH 6)

ผสมอาหารเหลว LB ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรดเบส จนมีค่าเท่ากับ 6 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรเท่ากับ 750 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

คำนวณปริมาณคาร์บอนในอาหารเบซัล

ในอาหารมีส่วนประกอบที่เป็นแหล่งคาร์บอน 2 ส่วนคือ กลูโคสและน้ำมันถั่วเหลือง โดยปริมาณกลูโคสจะเป็นค่าคงที่

ปริมาณคาร์บอนในกลูโคส

กลูโคส 5 กรัม คิดเป็น 0.0278 โมล ซึ่งในกลูโคส 0.0278 โมล มีปริมาณคาร์บอนเท่ากับ 2.00016 กรัม

ปริมาณคาร์บอนในน้ำมันถั่วเหลือง

ปริมาณคาร์บอนจากน้ำมันถั่วเหลือง a กรัม เท่ากับ $(a/879.4) \times 12 \times 57$ กรัมคาร์บอน

ปริมาณคาร์บอนทั้งหมดในอาหาร

ปริมาณคาร์บอนทั้งหมดในอาหาร เท่ากับ $2.00016 + ((a/879.4) \times 12 \times 57)$ กรัมคาร์บอน

คำนวณปริมาณไนโตรเจน

ในอาหารมีส่วนประกอบของไนโตรเจน 2 ส่วนคือ โซเดียมไนเตรต และสารสกัดจากยีสต์ (คงที่)

ปริมาณไนโตรเจนจากสารสกัดยีสต์

สารสกัดยีสต์ มีส่วนประกอบไนโตรเจนประมาณ 10 % หากใช้ปริมาณ 0.1 กรัม มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.01 กรัม

ปริมาณไนโตรเจนจากโซเดียมไนเตรต

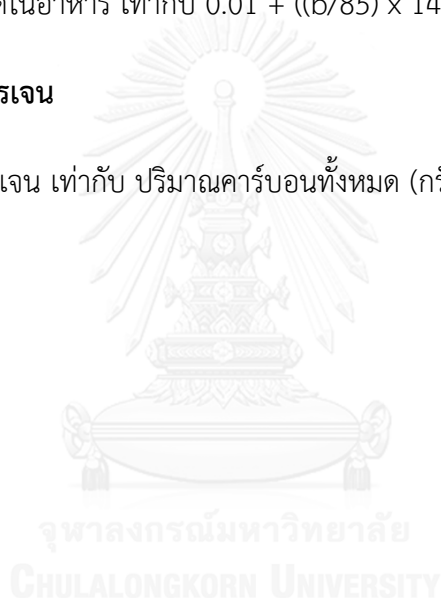
ปริมาณไนโตรเจนจากโซเดียมไนเตรต b กรัม เท่ากับ $(b/85) \times 14$ กรัมไนโตรเจน

ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในอาหาร

ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในอาหาร เท่ากับ $0.01 + ((b/85) \times 14)$ กรัมไนโตรเจน

สัดส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน

สัดส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ ปริมาณคาร์บอนทั้งหมด (กรัมคาร์บอน) / ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (กรัมไนโตรเจน)



ภาคผนวก ข

สารเคมี

สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8.5 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม : เมทานอล (2:1)

คลอโรฟอร์ม	100 มิลลิลิตร
เมทานอล	50 มิลลิลิตร

6 โมลาร์ กรดไฮโดรคลอริก

กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (35% w/w)	525 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	475 มิลลิลิตร

สารทดสอบ Phospho vanilline

Vanilline	0.6 กรัม
-----------	----------

ละลายสารในน้ำกลั่นปริมาณ 100 มิลลิลิตร ได้สารละลาย vanilline

สารละลาย vanilline	35 มิลลิลิตร
กรดฟอสฟอริก	60 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	5 มิลลิลิตร

ผสมสารให้เข้ากัน เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องในขวดสีชา

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.15 โมลาร์

โซเดียมไฮดรอกไซด์	6.0 กรัม
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	1000 มิลลิลิตร

สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.15 โมลาร์

โซเดียมคลอไรด์	14.08 กรัม
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	1000 มิลลิลิตร

สารละลาย Coomessie

Brilliant Blue G	10 มิลลิกรัม
เมทานอล	4.7 มิลลิลิตร
กรดฟอสฟอริก 85%	8.5 มิลลิลิตร

ผสมสารให้เข้ากัน เมื่อผสมกันสมบูรณ์ จากนั้นปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

สารละลายเคลื่อนที่คลอโรฟอร์ม:เมทานอล:กรดอะซิติก

คลอโรฟอร์ม	65 มิลลิลิตร
เมทานอล	25 มิลลิลิตร
กรดอะซิติก	4 มิลลิลิตร

สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต เข้มข้น 1 CMC

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS)	0.0288 กรัม
น้ำปลอดประจุปราศจากเชื้อ	100 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค ข้อมูลดิบต่าง ในการคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรีย และเปรียบเทียบวิธีการ
ผลิตแบบตรึงเซลล์และเซลล์อิสระ

ตารางที่ ค1 การศึกษาปริมาณเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์เพื่อใช้คัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีที่สุด โดยศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวด้วยอาหารเบซัลที่มีน้ำมันถั่วเหลือง ปริมาณ 2% v/v เป็นสารตั้งต้น

เวลา (ชั่วโมง)	<i>Bacillus subtilis</i> GY30			จำนวน เซลล์ (log CFU/ml)
	จำนวนโคโลนีเฉลี่ย	Dilution factor	จำนวนเซลล์	
0	10.25	3	1.03E+06	6.010724
24	22.88	5	2.29E+08	8.359361
48	18.75	5	1.88E+08	8.273001
72	5.13	6	5.13E+08	8.709694
96	9.50	6	9.50E+08	8.977724
120	5.63	6	5.63E+08	8.750123
เวลา (ชั่วโมง)	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i> GY33			จำนวน เซลล์ (log CFU/ml)
	จำนวนโคโลนีเฉลี่ย	Dilution factor	จำนวนเซลล์	
0	9.00	2	9.00E+04	4.954243
24	13.89	4	1.39E+07	7.142668
48	2.56	6	2.56E+08	8.407485
72	25.33	5	2.53E+08	8.403692
96	17.89	5	1.79E+08	8.252583
120	18.11	5	1.81E+08	8.257945
เวลา (ชั่วโมง)	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i> GY36			จำนวน เซลล์ (log CFU/ml)
	จำนวนโคโลนีเฉลี่ย	Dilution factor	จำนวนเซลล์	
0	20.78	2	2.08E+05	5.317599
24	10.22	5	1.02E+08	8.009545
48	3.11	6	3.11E+08	8.492916

72	8.22	5	8.22E+07	7.914989
96	17.33	5	1.73E+08	8.238882
120	12.44	5	1.24E+08	8.094976
<i>Gordonia westfalica</i> GY40				
เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนโคโลนีเฉลี่ย	Dilution factor	จำนวนเซลล์	จำนวน เซลล์ (log CFU/ml)
0	12.5	3	1.25E+06	6.09691
24	26.7	3	2.67E+06	6.426511
48	13.54	4	1.35E+07	7.131619
72	27.5	4	2.75E+07	7.439333
96	6.87	5	6.87E+07	7.836957
120	12.3	5	1.23E+08	8.089905

ตารางที่ ค2 ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในช่วงเวลา 5 วันการผลิตโดยใช้อาหารเบซัลที่มีน้ำมัน
ถั่วเหลือง 2 % v/v เป็นแหล่งคาร์บอน

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	<i>Bacillus subtilis</i> GY30		สารลด แรงตึง ผิว (g/L)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)
	น้ำหนักพรอยก่อน	น้ำหนักพรอยหลัง		
	(กรัม)	(กรัม)		
0	0.229	0.2392	0.204	47.481
6	0.769	0.7838	0.296	40.526
12	0.2304	0.2464	0.32	29.487
24	0.2306	0.2787	0.962	27.552
36	0.2304	0.2771	0.934	29.984
48	0.2301	0.2762	0.922	29.817
72	0.2309	0.2683	0.748	27.366
96	0.232	0.2784	0.928	27.218
120	0.2277	0.2673	0.792	29.897

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i> GY33		สารลด แรงตึง ผิว (g/L)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)
	น้ำหนักพรอยก่อน (กรัม)	น้ำหนักพรอยหลัง (กรัม)		
0	0.224	0.2289	0.098	47.853
6	0.2304	0.2378	0.148	43.157
12	0.228	0.2387	0.214	33.837
24	0.2362	0.2511	0.298	30.761
36	0.2388	0.2542	0.308	30.372
48	0.2218	0.2563	0.69	29.94
72	0.2208	0.2513	0.61	30.245
96	0.2208	0.2418	0.42	30.521
120	0.231	0.2532	0.444	29.998
ระยะเวลา (ชั่วโมง)	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i> GY36		สารลด แรงตึง ผิว (g/L)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)
	น้ำหนักพรอยก่อน (กรัม)	น้ำหนักพรอยหลัง (กรัม)		
0	0.5253	0.5324	0.142	45.733
6	0.2274	0.2343	0.138	42.167
12	0.5544	0.5826	0.564	32.374
24	0.2271	0.2863	1.184	31.152
36	0.2245	0.2642	0.794	28.78
48	0.2269	0.2624	0.71	28.438
72	0.5478	0.6044	1.132	27.677
96	0.542	0.5924	1.008	28.59
120	0.2291	0.2789	0.996	28.86
ระยะเวลา (ชั่วโมง)	<i>Gordonia westfalica</i> GY40		สารลด แรงตึง ผิว (g/L)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)
	น้ำหนักพรอยก่อน (กรัม)	น้ำหนักพรอยหลัง (กรัม)		
0	0.2278	0.2341	0.126	46.547
6	0.2435	0.2516	0.162	42.324
12	0.2281	0.2464	0.366	35.587

24	0.2341	0.251	0.338	30.289
36	0.231	0.2571	0.522	30.923
48	0.2301	0.2618	0.634	31.583
72	0.228	0.2597	0.634	30.629
96	0.2381	0.2685	0.608	30.93
120	0.2276	0.2694	0.836	31.148

ตารางที่ ค3 การเปรียบเทียบการผลิตโดยเซลล์อิสระและเซลล์ตรึง

วิธีการผลิต	ปริมาณสารลดแรงตึงผิว (g/L)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	ปริมาณเซลล์ในระบบ log CFU
เซลล์อิสระ	0.917±0.15	27.556±0.19	10.722±0.13
เซลล์ตรึง	1.315±0.03	29.087±0.70	11.460±0.47

ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

สายพันธุ์ GY30

>Contig1

TGCTCCCTGATGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGAC
TGGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTGTTGAACCGCATGGTTCA
AAACATAAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGT
TGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCC
ACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGC
AATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAA
GCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTA
ACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT
TGTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGC
CCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAG
TGGAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGA
AGGCGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGAT
TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTTCCGCC
CCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGA
AACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGC
AACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCC
CTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTG
GGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACT
CTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCC
CCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGAAACCGCG
AGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGC
GTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCA//

สายพันธุ์ GY33

>Contig1

AGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGATGCCCAGCTTGCT
GGGCGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTTGACTTCGGGAT
AACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATATGAGCCGTCCTCGCATGGGGGTGGTTGGA
AAGTTTTTCGGTCAGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGATGGCCTA
CCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
GGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGAT
GCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAG
AAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG
TAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGATTATTGGGCGTAAGAGCTCGTAGGCGGTT
TGTCGCGTCTGGTGTGAAAACTCGAGGCTCAACCTCGAGCTTGCATCGGGTACGGGCAGA
CTAGAGTGCGGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAG
GAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCCGCAACTGACGCTGAGAGCGAAAGC
ATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGTTGGGCACTAGG
TGTGGGGCTCATTCCACGAGTTCCTGTCGCGCAGCAAACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGG
AGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCGCACAAGCGGCGGAGC
ATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGCACGAGAAGC
CACCAGAGATGGTGGTCTCTTTGGACACTCGTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGC
TCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTCCCATGTTGCC
AGCGGGTTATGCCGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGA
TGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGTCTTGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTA
CAAAGGGCTGCGATACCGTAAGGTGGAGCGAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATT
GGGGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCACGCTGC
GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACCACCGCCCGGTCAGTCACGAAAGTCGGTAACAC
CCGGAGGCCATGGCCACCGTCCCGGGGGGA//

สายพันธุ์ GY36

>Contig1

GGAGCCCCCCCCCGTGGCGCCACGTTTTTCGCCCTTTATATGTTTTTTTTTTCTGCT
CAGGACGACGCTGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGATGCCAGCTTGCTG
GGCGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTTGACTTCGGGATA
ACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATATGAGCCGTCCTCGCATGGGGGTGGTTGGAA
AGTTTTTCGGTCAGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGATGGCCTAC
CAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATG
CAGCGACGCCGCGTGAGGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGA
AGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT
AATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTT
GTCGCGTCTGGTGTGAAAACCTCGAGGCTCAACCTCGAGCTTGCATCGGGTACGGGCAGAC
TAGAGTGCGGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGG
AGGAACACCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCCGCAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCA
TGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGTTGGGCACTAGGT
GTGGGGCTCATTCCACGAGTTCCGTGCCGAGCAAACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGA
GTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGCGGAGCA
TGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGCACGAGAAGCC
ACCAGAGATGGTGGTCTCTTTGGACACTCGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCT
CGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTCCCATGTTGCCA
GCGGGTTATGCCGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGAT
GACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTTGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCCCGTAC
AAAGGGCTGCGATACCGTAAGGTGAGCGAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGG
GGTCTGCAACTCGACCTCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGC
GTGAA//

สายพันธุ์ GY40

>Contig1

AACGGAAAGGCCTAGCTTGCTGGGTA CT CGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTG
ATCTGCCCTGAACTCTGGGATAAGCCTGGGAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTTG
GAGTGCATGCTCTGGGGTGGAAAAGCTTTTGC GGTT CAGGATGGGGCCCGCGGCCTATCA
GCTTGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGACCTGAGAGGGTG
ATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT
ATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGG
TTGTAAACCTCTTTCACCAGGGACGAAGCGTGAGTGACGGTACCTGGAGAAGAAGCACCG
GCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTACT
GGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCCGTTTTGTGCGCTYGTCTGTGAAATTCTGCAACTCAATTG
TAGGCGTGCAGGCGATACGGGCAGACTTGAGTACTACAGGGAGACTGGAATTCCTGGTG
TAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGTA
GTA ACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
CACGCCGTAAACGGTGGGTACTAGGTGTGGGGCTCATTTACGAGTTCCGTGCCGTAGCT
AACGCATTAAGTACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAA ACTCAAAGGAATTGA
CGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTA
CCTGGGTTTTGACATACACCAGACGCATTCAGAGATGGATGTTCCCTTGTGGTTGGTGTAC
AGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGA
GCGCAACCCTTGTCTGTATTGCCAGCGTGTATGCCGGGGACTTGCAGGAGACTGCCGG
GGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCT
TCACACATGCTACAATGGCTGGTACAGAGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCC
TTAAAGCCAGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCAGAGTCGC\

ภาคผนวก ง ข้อมูลดิบต่างๆ สำหรับการหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตที่ให้
ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงสุด

ตารางที่ ง1 ปริมาณสารลดแรงตึงผิวจาก *Bacillus subtilis* GY30 ด้วยการออกแบบการทดลอง
แบบ One factor at a time

ปริมาณน้ำมันถั่วเหลือง (% v/v)	ปริมาณสารลดแรงตึงผิว (g/L)	SD
0.5	1.05	0.07
1.5	1.30	0.03
3.5	1.25	0.03
5	1.01	0.04
10	0.88	0.14
สัดส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน	ปริมาณสารลดแรงตึงผิว (g/L)	SD
10:1	1.33	0.11
15:1	1.52	0.17
25:1	1.17	0.08
ปริมาณเหล็กซัลเฟต (mg/L)	ปริมาณสารลดแรงตึงผิว (g/L)	SD
0	1.13	0.14
1	1.33	0.24
10	1.56	0.09
100	0.99	0.05
1000	0.62	0.04
ปริมาณแมงกานีสซัลเฟต (ไมลาร์)	ปริมาณสารลดแรงตึงผิว (g/L)	SD
0	1.62	0.24
0.02	1.77	0.32
0.2	1.73	0.16
2	1.60	0.26
20	1.45	0.18

ตารางที่ ๖2 ปริมาณเซลล์ของ *Bacillus subtilis* GY30 ด้วยการออกแบบการทดลองแบบ One factor at a time

น้ำมันถั่ว เหลือง (%v/v)	จำนวนเซลล์บน ไคโตซาน (CFU/g chitosan)	จำนวนเซลล์ อิสระ (CFU/ml)	ปริมาณ เซลล์ ทั้งหมด (CFU)	ปริมาณ เซลล์ ทั้งหมด (log CFU)	SD
0.5	1.63E+09	1.37E+11	1.38E+11	11.14	0.08
1.5	1.95E+09	1.83E+11	1.85E+11	11.27	0.04
3.5	2.05E+09	1.32E+11	1.34E+11	11.13	0.05
5	7.38E+08	2.00E+11	2.01E+11	11.30	0.02
10	6.97E+08	1.03E+11	1.04E+11	11.02	0.10
สัดส่วน คาร์บอนต่อ ไนโตรเจน	จำนวนเซลล์บน ไคโตซาน (CFU/g chitosan)	จำนวนเซลล์ อิสระ (CFU/ml)	ปริมาณ เซลล์ ทั้งหมด (CFU)	ปริมาณ เซลล์ ทั้งหมด (log CFU)	SD
10:1	1.28E+08	4.09E+11	4.09E+11	11.61	0.77
15:1	6.74E+08	3.88E+11	3.88E+11	11.59	0.90
25:1	2.53E+08	2.56E+10	2.58E+10	10.41	0.24
ปริมาณ เหล็กซัลเฟต (mg/L)	จำนวนเซลล์บน ไคโตซาน (CFU/g chitosan)	จำนวนเซลล์ อิสระ (CFU/ml)	ปริมาณ เซลล์ ทั้งหมด (CFU)	ปริมาณ เซลล์ ทั้งหมด (log CFU)	SD
0	1.23E+09	5.33E+10	5.46E+10	10.73692	0.094426
1	1.07E+09	4.83E+10	4.94E+10	10.69372	0.093441
10	1.33E+09	6.33E+10	6.47E+10	10.81064	0.09441
100	1.43E+09	6.67E+10	6.81E+10	10.83312	0.064366
1000	9.27E+08	4.17E+10	4.26E+10	10.62935	0.271603
ปริมาณ แมงกานีส ซัลเฟต (โม)	จำนวนเซลล์บน ไคโตซาน (CFU/g)	จำนวนเซลล์ อิสระ (CFU/ml)	ปริมาณ เซลล์ ทั้งหมด	ปริมาณ เซลล์ ทั้งหมด (log)	SD

สารี)	chitosan)	(CFU)	CFU)		
0	2.01E+09	2.83E+10	3.03E+10	10.48	0.55
0.02	3.12E+09	3.50E+10	3.81E+10	10.58	0.46
0.2	1.00E+09	2.67E+10	2.77E+10	10.44	0.71
2	1.10E+09	3.50E+10	3.61E+10	10.56	0.43
20	1.49E+09	1.90E+10	2.05E+10	10.31	0.44



ตารางที่ 3 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพแต่ละชุดการทดลองจากการออกแบบการทดลองแบบ Plackett-Burman

ชุดทดลอง ครั้งที่ 1	น้ำหนักพรอยก่อน (g)	น้ำหนักพรอยหลัง (g)	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (g/L)
1	0.3314	0.3863	1.10
2	0.3295	0.3808	1.03
3	0.3255	0.379	1.07
4	0.3246	0.4105	1.72
5	0.3236	0.3807	1.14
6	0.3252	0.3976	1.45
7	0.3254	0.3723	0.94
8	0.3243	0.4167	1.85

ชุดทดลอง ครั้งที่ 2	น้ำหนักพรอยก่อน (g)	น้ำหนักพรอยหลัง (g)	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (g/L)
1	0.3257	0.3897	1.28
2	0.3264	0.3829	1.13
3	0.3234	0.3759	1.05
4	0.326	0.4074	1.63
5	0.3253	0.3934	1.36
6	0.3254	0.3871	1.23
7	0.3235	0.3877	1.28
8	0.3237	0.4157	1.84

ตารางที่ 4 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพแต่ละชุดการทดลองจากการออกแบบการทดลองแบบบล็อก-เบย์นเคน

ชุดการทดลอง	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ครั้งที่ 1	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ครั้งที่ 2
	(g/L)	(g/L)
1	1.12	1.14
2	1.05	1.26
3	1.12	1.21
4	1.24	1.14
5	1.45	1.69
6	1.59	1.55
7	1.61	1.63
8	1.51	1.73
9	1.58	1.57
10	1.43	1.26
11	1.42	1.40
12	1.63	1.57
13	1.14	1.37
14	1.32	1.35
15	1.35	1.39
16	1.30	1.37
17	1.39	1.35
18	1.61	1.54
19	1.33	1.41
20	1.39	1.40
21	1.33	1.41
22	1.37	1.42
23	1.36	1.30
24	1.38	1.35
25	1.37	1.39
26	1.33	1.50
27	1.50	1.65

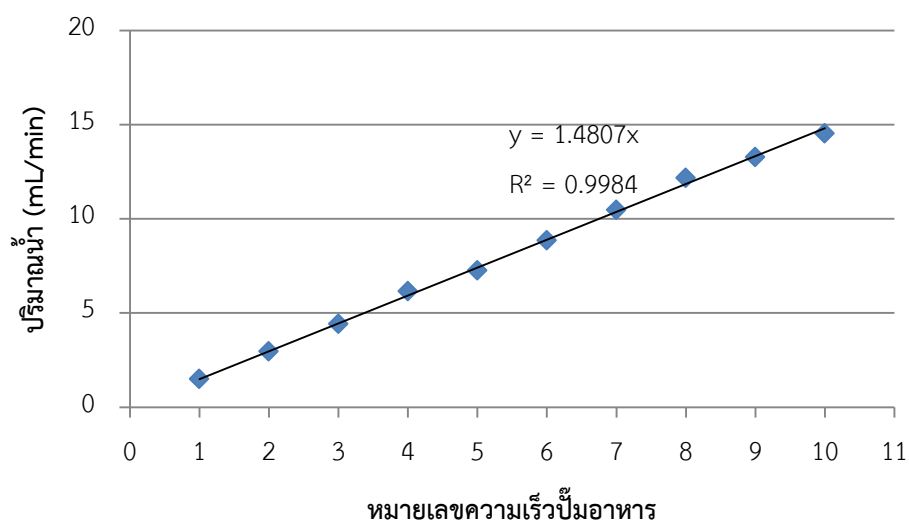
ภาคผนวก จ ข้อมูลดิบต่างๆ ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในถังปฏิกรณ์
ชีวภาพแบบแพคเบด

ตารางที่ จ1 การผลิตสารลดแรงตึงผิวในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ควบคุมภาวะการผลิตที่อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm เป็นเวลา 5 วัน

วันที่	ปริมาณน้ำมัน (g/L)	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (g/L)	ปริมาณเซลล์อิสระ (logCFU/mL)
0	4.68	0.14	7.52
1	0.72	0.38	7.80
2	0.66	0.44	8.01
3	0.52	0.73	8.19
4	0.10	0.71	8.11
5	0.07	0.60	7.88

ตารางที่ จ2 การผลิตสารลดแรงตึงผิวในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ควบคุมภาวะการผลิตที่อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm และการผลิตโดยใช้แพคคอลัมน์ซ้ำ 2 รอบ รวมเวลาผลิต 10 วัน

วันที่	ปริมาณน้ำมัน (g/L)	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (g/L)	ปริมาณเซลล์อิสระ (logCFU/mL)
0	1.32	0.78	7.20
1	0.65	1.70	8.39
2	0.55	1.34	7.70
3	0.07	0.65	7.12
4	0.05	0.23	7.27
5	0.11	0.19	7.60
5	1.13	0.32	6.99
6	0.99	1.45	8.39
7	0.45	1.05	8.18
8	0.09	0.32	7.08
8	1.39	0.40	7.26
9	0.54	1.82	8.36
10	0.06	1.45	7.34



รูปที่ จ1 กราฟมาตรฐานอัตราการไหลของอาหารผ่านแพคคอลัมน์



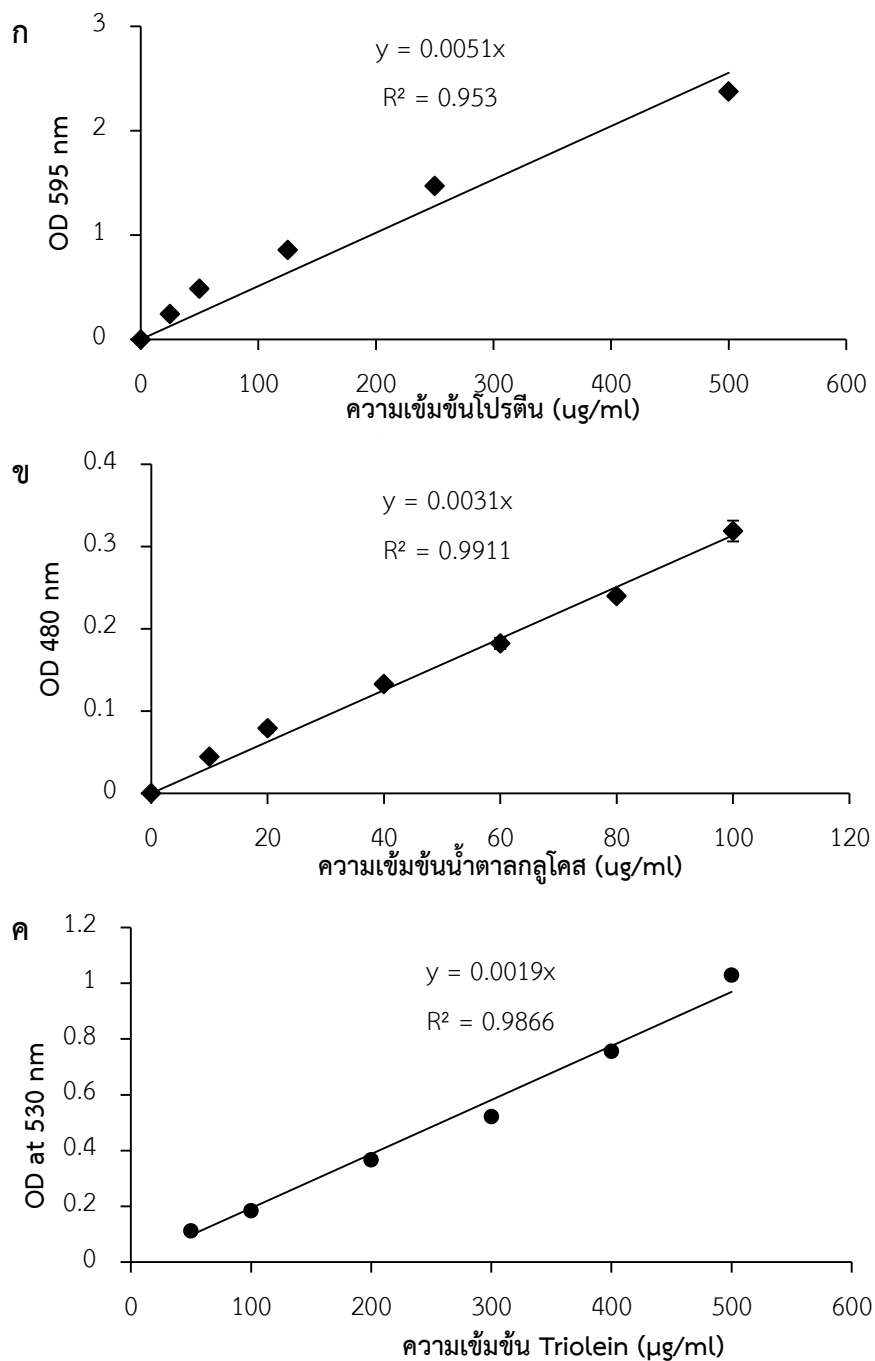
ภาคผนวก ฉ ข้อมูลดิบต่างๆ สำหรับการศึกษาลักษณะสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ GY30

ตารางที่ ฉ1 น้ำหนักสารลดแรงตึงผิวเริ่มต้นสำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

ตัวอย่างสารลดแรงตึงผิว	น้ำหนักสารลดแรงตึงผิวเริ่มต้น (g/10ml)	ปริมาณรวม (จากตารางที่ ฉ2)
GY30 เจือจาง 5 เท่า	0.0659	0.067117
GY30	0.0659	0.051521
GY30 เจือจาง 5 เท่า	0.0648	0.074412
GY30	0.0648	0.037314

ตารางที่ ฉ2 ปริมาณองค์ประกอบเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ GY30

ตัวอย่างสารลดแรงตึงผิว	ไขมัน		
	OD530	Dilution factor	กรัม/10mL
GY30 เจือจาง 5 เท่า	0.370	2	0.019474
GY30	0.319	4	0.006716
GY30 เจือจาง 5 เท่า	0.338	2	0.017789
GY30	0.291	4	0.006126
ตัวอย่างสารลดแรงตึงผิว	โปรตีน		
	OD595	Dilution factor	กรัม/10mL
GY30 เจือจาง 5 เท่า	0.161	1	0.001578
GY30	0.212	2	0.000831
GY30 เจือจาง 5 เท่า	0.182	1	0.001784
GY30	0.237	2	0.000929
ตัวอย่างสารลดแรงตึงผิว	น้ำตาล		
	OD485	Dilution factor	กรัม/10mL
GY30 เจือจาง 5 เท่า	0.357	8	0.046064516
GY30	0.852	16	0.043974194
GY30 เจือจาง 5 เท่า	0.425	8	0.05483871
GY30	0.469	20	0.030258065



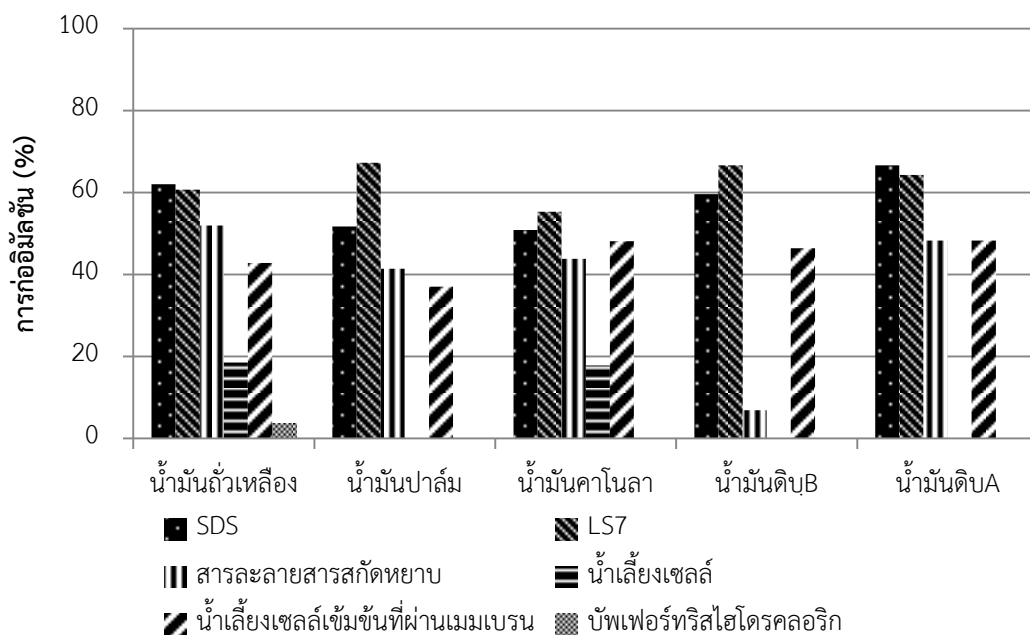
รูปที่ ๑1 กราฟมาตรฐาน ก. โปรตีน ข. กลูโคส และ ค. ไชมัน แต่ละจุดข้อมูลมาจากการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางที่ ๓3 ค่าแรงตึงผิวที่ความเข้มข้นต่างๆเพื่อหาค่า CMC

ความเข้มข้น (mg/L)	ครั้งที่ 1 (mN/m)	ครั้งที่ 2 (mN/m)
1	57.187	55.069
10	42.651	45.323
50	40.962	41.528
100	39.851	37.285
250	34.522	33.526
500	32.879	33.095
750	32.163	32.947
1000	32.635	32.441
2000	32.39	31.976
3000	32.189	31.695
4000	32.942	32.65
5000	32.725	32.587
10000	30.985	31.505

ตารางที่ ๓4 เปอร์เซ็นต์การก่ออิมัลชันระหว่างสารตัวอย่างและน้ำมันชนิดต่างๆ

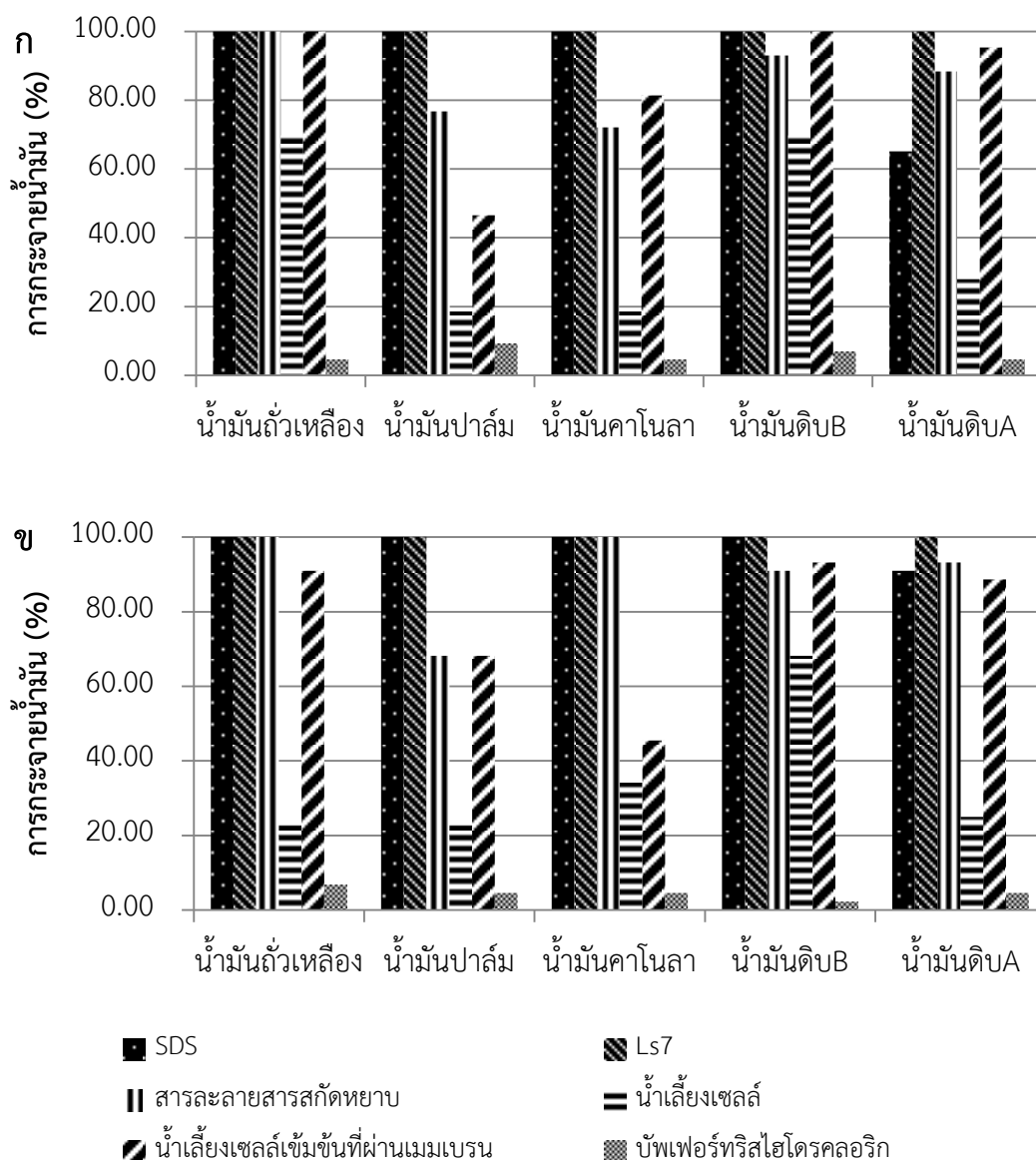
สารตัวอย่าง	น้ำมันถั่วเหลือง	น้ำมันปาล์ม	น้ำมันคาโนลา	น้ำมันดิบ B	น้ำมันดิบ A
SDS	62.07	51.72	50.88	59.65	66.67
LS7	60.71	67.24	55.36	66.67	64.29
สารละลายสารสกัด หยาบ	52.00	41.38	43.86	6.90	48.28
น้ำเลี้ยงเซลล์	18.52	0.00	17.86	0.00	0.00
น้ำเลี้ยงเซลล์เข้มข้นที่ ผ่านเมมเบรน	42.86	37.04	48.15	46.43	48.28
บัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอไรด์	3.57	0.00	0.00	0.00	0.00



รูปที่ ๑2 เปรียบเทียบการก่อดั้มลพิษโดยใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ความเข้มข้นต่างๆ (SDS 1 CMC, LS7 5 CMC, สารละลายสารสกัดหยาบ 5 CMC, น้ำเลียงเซลล์ 2 CMC และ น้ำเลียงเซลล์เข้มข้นที่ผ่านเมมเบรน 10 CMC)

ตารางที่ ๑5 เปรี่เซ็นต์การกระจายระหว่างสารตัวอย่างและน้ำมันชนิดต่างๆ

สารตัวอย่าง	น้ำมันถั่วเหลือง	น้ำมันปาล์ม	น้ำมันคาโนลา	น้ำมันดิบ B	น้ำมันดิบ A
SDS	100.00	100.00	100.00	100.00	90.91
LT7	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
สารละลายสารสกัดหยาบ	100.00	68.18	100.00	90.91	93.18
น้ำเลียงเซลล์	22.73	22.73	34.09	68.18	25.00
น้ำเลียงเซลล์เข้มข้นที่ผ่านเมมเบรน	90.91	68.18	45.45	93.18	88.64
บัพเฟอร์ทริสไฮโดรคลอริก	6.82	4.55	4.55	2.27	4.55



รูปที่ ๓3 เปรียบเทียบการกระจายน้ำมัน ก) น้ำมันถั่วเหลือง และ ข) น้ำมันดิบ โดยใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ความเข้มข้นต่างๆ (SDS 1 CMC, LS7 5 CMC, สารละลายสารสกัดหยาบ 5 CMC, น้ำเลียงเซลล์ 2 CMC และ น้ำเลียงเซลล์เข้มข้นที่ผ่านเมมเบรน 10 CMC)

ตารางที่ ๑๖ ค่าแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ละลายในบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอริก
ความเข้มข้น 1 CMC ที่อุณหภูมิ ความเป็นกรดเบส และความเข้มข้นเกลือต่างๆ

อุณหภูมิ	ค่าแรงตึงผิวครั้งที่ 1 และ 2		ค่าแรงตึงผิวเฉลี่ย (mN/m)	SD
	(mN/m)			
-20	31.78	31.98	31.88	0.141421
4	31.87	31.61	31.74	0.183848
30	31.56	31.42	31.49	0.098995
60	31.89	32.21	32.05	0.226274
100	31.56	31.72	31.64	0.113137
121	31.89	32.392	32.141	0.354968
pH	ค่าแรงตึงผิวครั้งที่ 1 และ 2		ค่าแรงตึงผิวเฉลี่ย (mN/m)	SD
	(mN/m)			
2	35.12	34.02	34.57	0.777817
4	35.82	35.64	35.73	0.127279
6	31.12	30.4	30.76	0.509117
7	30.32	30.872	30.596	0.390323
8	31.23	31.01	31.12	0.155563
10	32.95	32.57	32.76	0.268701
ความเข้มข้น เกลือ (%w/v)	ค่าแรงตึงผิวครั้งที่ 1 และ 2		ค่าแรงตึงผิวเฉลี่ย (mN/m)	SD
	(mN/m)			
0	31.56	31.16	31.36	0.282843
2	31.89	33.03	32.46	0.806102
4	31.82	31.64	31.73	0.127279
6	31.15	31.27	31.21	0.084853
8	31.02	30.574	30.797	0.31537
10	30.59	30.426	30.508	0.115966

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายณัฐวุฒิ ชุนอาวุธ เกิดเมื่อวันที่ 29 พฤษภาคม พ.ศ. 2534 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ (เกียรตินิยมอันดับ 1) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปี พ.ศ. 2556 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีพ.ศ. 2557

ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่

ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ได้เข้าร่วมเสนอผลงานในการประชุมทางวิชาการระดับนานาชาติในงาน The 27th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference Innovative Biotechnology ระหว่างวันที่ 17-20 พฤศจิกายน 2558 ณ โรงแรมแมนดาริน จังหวัดกรุงเทพฯ ในหัวข้อเรื่อง “Production of biosurfactant from chitosan-immobilized *Bacillus* sp. GY30” (Proceeding)