รายงานการวิจัยเรื่อง การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากจุลินทรีย์เพื่อใช้ในอุสาหกรรมอาหาร

Biosurfactant production by microorganism for food industry

ผู้วิจัย

รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน และคณะ

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประจำปี 2552

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่องนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก เงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2552 ภายใต้โครงการวิจัยเรื่อง แผนงานวิจัยนวัตกรรมเพื่อยกระดับคุณภาพและความปลอดภัยทางอาหารสู่โครงสร้างเศรษฐกิจยุคใหม่ : 2.4 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร : การกลายพันธุ์จุลินทรีย์ให้มีประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้สูงขึ้น โดยมี Prof. Maasaki Morikawa แห่งมหาวิทยาลัย Hokkaido ประเทศญี่ปุ่นเป็นที่ปรึกษาโครงการวิจัย คณะผู้วิจัยประกอบด้วย รศ.จิราภรณ์ ธนียวัน รศ.ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ รศ.ดร.สุเทพ ธนียวัน อ.ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป และรศ.ดร.วรรณา ตุลยธัญ และผู้ช่วยวิจัย ประกอบด้วย นางสาวศิตา วีรกุล นางสาวพรทิพย์ ศิริเรืองสกุล นางสาวชนาภา เดชวัฒนาโกมล และนางสาวรจนา บุญมี และได้ไปเผยแพร่ผลงานวิจัยในระดับนานาชาติแบบโปสเตอร์ที่การประชุม Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON 2010) จังหวัดอุบลราชธานี

บทคัดย่อ

ยีสต์ *Pichia anomala* PY1 ที่ใช้ในการทดลองนี้ถูกแยกมาจากข้าวหมากที่อำเภอ พนัสนิคม จังหวัด ชลบุรี จากการศึกาการเจริญ และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน มี $NaNO_3$ 0.4 % เป็นแหล่งไนโตรเจน ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน โดยส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเซลล์ มีค่าการกระจายน้ำมันสูงสุด 5.07 ตารางเซนติเมตร มีค่าแรงตึงผิวต่ำสุดในวันที่ 7 เท่ากับ 38 มิลลินิวตันต่อเมตร และเมื่อทำการก่อการกลายพันธุ์เพื่อเพิ่มการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยสาร Ethylmethane sulfonate คัดเลือกได้ยีสต์สายพันธุ์กลาย PY 12, PY 44, PY 189 พบว่ายีสต์สายพันธุ์กลายสามารถให้พื้นที่กระจายน้ำมันได้ดีกว่าประมาณ 1.14 1.69 และ 2.15 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ PY 1 ตามลำดับ และให้ค่า ΔST อยู่ในช่วง 24-26 มิลลินิวตันต่อเมตร และทำการกลายพันธุ์ *Pichia anomala* PY1 ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสาร Ethylmethane sulfonate คัดเลือกได้ยีสต์สายพันธุ์กลาย MUE24 ยีสต์สายพันธุ์กลายสามารถให้พื้นที่กระจายน้ำมันได้ดี 3-5 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ PY1 ให้ค่า ΔST ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ PY1 คือเท่ากับ 21 มิลลินิวตันต่อเมตร จากการวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากยีสต์สายพันธุ์กลายทั้ง 4 สายพันธุ์ ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบ Analytical Thin-Layer Chromatography พบว่า มีจำนวนลำดับส่วนไม่เท่ากัน และลำดับส่วนที่มีการกระจายน้ำมันสูงสุดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากยีสต์สายพันธุ์กลายแต่ละสายพันธุ์จะมีค่าคงที่ของอัตราส่วนการเคลื่อนที่ (R_f) ที่ต่างจากของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และการศึกษาความสามารถในการก่ออิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้โดยการวัดค่าความเสถียรในการก่ออิมัลชัน (Emulsification stability) และค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน (Emulsion Index) ต่อน้ำมัน 2 ชนิดได้แก่ น้ำมันคาโนลา และน้ำมันถั่วเหลืองที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งให้ค่าค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำมันคาโนลา คือ ยีสต์สายพันธุ์กลาย PY 12, PY 44, PY 189 และ MUE 24 และให้ค่าค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันมากกว่า 80-90 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำมันถั่วเหลือง คือยีสต์สายพันธุ์กลาย PY 44 และ MUE 24

Abstract

Pichia anomala PY1 employed in the present study was isolated from_Khao Mak_obtained from Amphor Panasnikhom, Cholburi Province. Its growth and biosurfactant production was carried out in defined medium consists of 4% soil bean oil as carbon source, 0.4% $NaNO_2$ as nitrogen source at initial pH of 5.5, 30 degree Celsius and agitation rate of 200 rpm. After 7 days, its supernatant fluid showed maximum oil dispersion activity of 5.7 cm^2 and lowest surface tension on the same day at 38 millinewton/meter. Mutagenesis of this strain by ethylmethane sulfonate (EMS) yields a number of mutants, among these strain PY12, PY44 and PY189 revealed better oil dispersion activities of 1.14, 1.69 and 2.15 times more than their respective parental strain PY1 while the Δ ST were in the range of 24-26 milli-newton/meter. The wild type strain was further subjected to UV-induced and EMS mutagenesis. Among the mutants isolated, strain MUE24 revealed a 3-5 folds increased in oil dispersion activity compared to parental strain PY1 with Δ ST close to PY1 at 21 milli-newton/meter. Analysis of the biosurfactants produced via analytical TLC demonstrated that the 4 strains possess different patterns of bands, in addition the active band for each biosurfactant with oil dispersion activity were of different Rf and were differed from that of parental; *Pichia anomala* PY1. Emulsification stability and emulsifying index at 24 hours toward canola oil were higher than 90% in all of the 4 strains; PY12, PY44, PY189 and MUE24 and in between 80-90% in soy bean oil by strains PY44 and MUE24.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ..... ก

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ข

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ค

สารบัญ ..... ง

สารบัญตาราง ..... จ

สารบัญรูป ..... ซ

บทที่

1. บทนำ 1
2. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง 28
3. ผลการทดลอง 40
4. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 99

รายการอ้างอิง 102

ภาคผนวก 108

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	หน้าที่ต่างๆของสารลดแรงตึงผิวที่ใช้เป็นอิมัลสิไฟเออร์ในอาหารชนิดต่างๆ	19
1.2	ตัวอย่างสิทธิบัตรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตด้วยจุลินทรีย์	20
1.3	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากยีสต์ในแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน	21
3.1	ความกว้างของบริเวณใส และขนาดโคโลนีของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 เมื่อบ่มบนอาหารแข็ง Yeast Malt Extract ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 3, 5 และ 7 วัน	40
3.2	ค่าน้ำหนักแห้ง ค่าความเป็นกรดด่าง และพื้นที่การกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเซลล์ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ *Pichia anomala* PY1 ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน มี $NaNO_3$ 0.4 % เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน	41
3.3	ค่า CFU/ml. ของชุดควบคุม	42
3.4	ค่า CFU/ml. ของชุดที่ก่อการกลายพันธุ์	42
3.5	การทดสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบนอาหารแข็ง Yeast Malt Extract ของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และสายพันธุ์กลาย	43
3.6	การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของยีสต์สายพันธุ์กลายเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ PY1 ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีกลูโคส 8% เป็นแหล่งคาร์บอนเป็นเวลา 7 วัน	51
3.7	พื้นที่การกระจายน้ำมัน ค่าแรงตึงผิวในของน้ำเลี้ยงเชื้อ ค่าความเป็นกรดด่างและค่าน้ำหนักแห้ง เมื่อทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และสายพันธุ์กลายในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน	54
3.8	บริเวณใสบนอาหารแข็ง Yeast Malt Extract ของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และสายพันธุ์กลายในแต่ละรุ่น	58
3.9	ค่า CFU/ml. ของชุดควบคุม	60
3.10	ค่า CFU/ml. ของชุดที่ก่อการกลายพันธุ์	60
3.11	ความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบนอาหารแข็ง Yeast Malt Extract ของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และยีสต์สายพันธุ์กลาย บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	61
3.12	ค่า ΔST ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้โดยของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และยีสต์สายพันธุ์กลายในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 7 วัน	64

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
3.13	การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของยีสต์ *Pichia anomala* PY1และยีสต์สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอนเป็นเวลา 1ถึง 7 วัน	65
3.14	บริเวณใสบนอาหารแข็ง Yeast Malt Extract ของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้ในรุ่นที่1-5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชม.	70
3.15	น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าแรงตึงผิว ค่าการกระจายน้ำมัน และค่า pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย PY 189 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ที่ 30°C เป็นเวลา 7 วัน	71
3.16	น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าแรงตึงผิว ค่าการกระจายน้ำมัน และค่า pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย PY 189 เมื่อแปรผันความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลือง	73
3.17	น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าแรงตึงผิว ค่าการกระจายน้ำมัน และค่า pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย PY 189 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ที่ 30°C เป็นเวลา 7 วัน	76
3.18	น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าแรงตึงผิว ค่าการกระจายน้ำมัน และค่า pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย PY 189 เมื่อแปรผันความเข้มข้นของ $NaNO_3$	78
3.19	ค่าน้ำหนักแห้ง และพื้นที่การกระจายน้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดด้วยสารละลายอินทรีย์แล้วของ *Pichia anomala* PY1 ยีสต์สายพันธุ์กลาย PY 12, PY 44 และ PY 189	81
3.20	อัตราการเคลื่อนที่ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และยีสต์สายพันธุ์กลาย ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน บนแผ่น TLC และค่าการกระจายน้ำมันแต่ละลำดับส่วน	83
3.21	ค่า CFU/ml. ของชุดควบคุม	84
3.22	ค่า CFU/ml. ของชุดที่ก่อการกลายพันธุ์	85
3.23	การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของยีสต์สายพันธุ์กลายเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ PY1 ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีกลูโคส 8% เป็นแหล่งคาร์บอนเป็นเวลา 7 วัน	85
3.24	ค่าแรงตึงผิว ค่าการกระจายน้ำมัน และค่า pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย MUE 24 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ที่ 30°C เป็นเวลา 5 วัน	89
3.25	น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าแรงตึงผิว ค่าการกระจายน้ำมัน และค่า pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย MUE 24 เมื่อแปรผันความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลือง	91

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
3.26	น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าแรงตึงผิว ค่าการกระจายน้ำมัน และค่า pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย MUE 24 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ที่ 30°C เป็นเวลา 5 วัน	93
3.27	อัตราการเคลื่อนที่ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และยีสต์สายพันธุ์กลาย ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน บนแผ่น TLC และค่าการกระจายน้ำมันแต่ละลำดับส่วน	97
3.28	ค่าการก่ออิมัลชัน (Emulsification activity) และความเสถียรของการก่ออิมัลชัน (Emulsification stability) หรือค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน (Emulsion Index) ที่เวลา 24 ชั่วโมง ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ต่อน้ำมันคาโนลา และน้ำมันถั่วเหลือง	98

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	ลักษณะโครงสร้างทั่วไปของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	4
1.2	การเกิดโครงสร้างไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในน้ำเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจนถึงจุด Critical Micelle Concentration (CMC)	5
1.3	โครงสร้างและการจัดเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	6
1.4	โครงสร้างของแรมโนลิพิด ชนิด R1, R2, R3, R4, A และ B ที่ผลิตโดย *Pseudomonas aeruginosa*	8
1.5	โครงสร้างของ Trehalose dimycolate จาก *Rhodococcus erythropolis*	9
1.6	โครงสร้างของโซโฟโรลิพิดจาก *Torulopsis bombicola* แสดงไดเมอริกโซโฟโรสที่เชื่อมต่อกับสายยาวของ hydroxyl fatty acid (C18)	10
1.7	โครงสร้างของโซโฟโรลิพิดจาก *Torulopsis bombicola*	10
1.8	โครงสร้างของโซโฟโรลิพิดจาก *Candida bombicola* ซึ่งแสดงโครงสร้างของ lactonic form และ acid form	11
1.9	โครงสร้างของ α-diglucosyldiglyceride , R = หมู่อัลคิล	11
1.10	โครงสร้างของ Mannosylerythritol lipid (MEL) จาก *Pseudozyma (Candida) antarctica* T- 34	12
1.11	โครงสร้างของ cellobiose lipid จาก *Ustilago maydis* ATCC 14826	13
1.12	รูปแบบการเจริญของเชื้อแบบต่าง ๆ	14
1.13	การเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยรังสียูวี	23
1.14	โครงสร้างทางเคมีของสาร Ethylmethanesulphonate	25
1.15	การเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยสาร EMS	25
3.1	ค่าน้ำหนักแห้ง ค่าความเป็นกรดด่าง พื้นที่การกระจายน้ำมัน และค่าแรงตึงผิวในของน้ำเลี้ยงเชื้อ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ *Pichia anomala* PY1 ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน	41
3.2	กราฟแสดงร้อยละการรอดของ *Pichia anomala* PY1 ที่ก่อการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต ที่ช่วงเวลาต่างๆ	43
3.3	ค่าพื้นที่การกระจายน้ำมันของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และสายพันธุ์กลายในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน	56

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่		หน้า
3.4	ค่าแรงตึงผิวในแต่ละวันของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และสายพันธุ์กลายในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน	56
3.5	ค่าความเป็นกรดด่างในแต่ละวันของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และสายพันธุ์กลายในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน	57
3.6	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งในแต่ละวันของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และสายพันธุ์กลายในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน	57
3.7	กราฟแสดงน้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ *Pichia anomala* PY1และยีสต์สายพันธุ์กลายในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอนเป็นเวลา1- 7 วัน	67
3.8	กราฟแสดงค่าความเป็นกรดด่างของยีสต์ *Pichia anomala* PY1และยีสต์สายพันธุ์กลายที่เปลี่ยนแปลงในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอนเป็นเวลา1-7 วัน	67
3.9	กราฟแสดงการกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเซลล์ของยีสต์ *Pichia anomala* PY1และยีสต์สายพันธุ์กลายในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอนเป็นเวลา1-7 วัน	68
3.10	กราฟแสดงค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเซลล์ของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และยีสต์สายพันธุ์กลายในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอนเป็นเวลา1-7 วัน	68
3.11	ค่าการกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย PY 189 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ	71
3.12	ค่าแรงตึงของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย PY 189 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ	72
3.13	ค่า pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย PY 189 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ	72
3.14	ค่าน้ำหนักเซลล์ของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย PY 189 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ	73
3.15	ค่าการกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย PY 189 เมื่อใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนที่แปรผันความเข้มข้นต่างๆ	74
3.16	ค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย PY 189 เมื่อใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนที่แปรผันความเข้มข้นต่างๆ	74

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่		หน้า
3.17	ค่า pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย PY 189 เมื่อใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนที่แปรผันความเข้มข้นต่างๆ	75
3.18	น้ำหนักเซลล์แห้งของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย PY 189 เมื่อใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนที่แปรผันความเข้มข้นต่างๆ	75
3.19	ค่าการกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย PY 189 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนต่างๆ	76
3.20	ค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย PY 189 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนต่างๆ	77
3.21	ค่า pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย PY 189 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนต่างๆ	77
3.22	น้ำหนักเซลล์แห้งของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย PY 189 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนต่างๆ	78
3.23	ค่าการกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย PY 189 เมื่อใช้ $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่แปรผันความเข้มข้นต่างๆ	79
3.24	ค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย PY 189 เมื่อใช้ $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่แปรผันความเข้มข้นต่างๆ	79
3.25	ค่า pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย PY 189 เมื่อใช้ $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่แปรผันความเข้มข้นต่างๆ	80
3.26	น้ำหนักเซลล์แห้งของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย PY 189 เมื่อใช้ $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่แปรผันความเข้มข้นต่างๆ	80
3.27	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากยีสต์ *Pichia anomala* PY1และยีสต์สายพันธุ์กลาย PY12 PY 44 และ PY 189 ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน	81
3.28	การวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และยีสต์สายพันธุ์กลาย PY 12, PY 44 และ PY 189 ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบ analytical Thin-Layer Chromatography	82

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่		หน้า
3.29	ค่าการกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย MUE24 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ	89
3.30	ค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย MUE24 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ	90
3.31	ค่า pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย MUE24 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ	90
3.32	ค่าการกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย MUE24 เมื่อใช้น้ำมันถั่วเหลืองแหล่งคาร์บอนที่แปรผันความเข้มข้นต่างๆ	91
3.33	ค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย MUE24 เมื่อใช้น้ำมันถั่วเหลืองแหล่งคาร์บอนที่แปรผันความเข้มข้นต่างๆ	92
3.34	ค่า pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย MUE24 เมื่อใช้น้ำมันถั่วเหลืองแหล่งคาร์บอนที่แปรผันความเข้มข้นต่างๆ	92
3.35	น้ำหนักเซลล์แห้งของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย MUE24 เมื่อใช้น้ำมันถั่วเหลืองแหล่งคาร์บอนที่แปรผันความเข้มข้นต่างๆ	93
3.36	ค่าการกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย MUE24 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนต่างๆ	94
3.37	ค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย MUE24 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนต่างๆ	94
3.38	ค่า pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย MUE24 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนต่างๆ	95
3.39	น้ำหนักเซลล์แห้งของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย MUE24 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนต่างๆ	95
3.40	การวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากยีสต์สายพันธุ์กลาย MUE24 ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบ analytical Thin-Layer Chromatography	96

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

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

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

การที่จะให้เกิดอิมัลชันในอาหารนั้นต้องการสารก่ออิมัลชันที่เรียกว่าอีมัลสิไฟเออร์ซึ่งการทำงานนั้นขึ้นกับสมดุลย์ ความชอบน้ำ (hydrophilic)/ ความไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) สารที่สามารถใช้เป็นอิมัลสิไฟเออร์ในอาหารมีหลายชนิด อาทิ เอสเทอร์ของกรดไขมันของกลีเซอรอล เลซิธินและอนุพันธ์ของเลซิธิน เอสเทอร์ของกรดไขมันของซอร์บิแทน เป็นต้น ปัจจุบันสามารถผลิตสารก่ออิมัลชันได้จากจุลินทรีย์ที่เรียกกันว่า ไบโอเซอร์แฟคแตนท์ (biosurfactant) หรือสารลดแรง

ตึงผิวชีวภาพ ซึ่งการที่จุลินทรีย์ผลิตสารขึ้นเพื่อการสลายและนำสารอาหารเข้าเซลล์นั้นเป็นสิ่งที่ได้รับความสนใจเป็นพิเศษ เนื่องจากเป็นการผลิตที่ง่าย รวดเร็ว ใช้ต้นทุนต่ำ และไม่ก่อปัญหาทางสิ่งแวดล้อม ตัวอย่างของไบโอเซอร์แฟคแตนท์ที่เป็นที่รู้จักกันได้แก่ ไกลโคลิพิดจาก *Arthrobacter* sp. โซโฟโรสลิพิดจาก *Torulopsis bombicola* แรมโนลิพิดจาก *Pseudomonas* spp. อีมัลแซนจาก *Acinetobacter calcoaceticus* และ ไลโพโปรตีน (เซอร์แฟคติน) โดย *Bacillus subtilis, Bacillus licheniformis* เป็นต้น สารเหล่านี้ได้ถูกใช้ทดแทนสารลดแรงตึงผิวชนิดสังเคราะห์ทางเคมีในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ตัวอย่างเช่น การใช้ไกลโคลิพิดไบโอเซอร์แฟคแตนท์ (glycolipid biosurfactant) แทนเอสเทอร์กรดไขมันของโมโนและโอลิโกแซคคาไรด์ เป็นอิมัลสิไฟเออร์ในอาหาร การใช้โซโฟโรลิพิดไบโอเซอร์แฟคแตนท์และอนุพันธ์เอซิเลทและแอลคอกสิเลท (acylated and alkoxylated derivatives) ของสารดังกล่าวในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ในทางอุตสาหกรรมอาหารมีการจดสิทธิบัตรการใช้โซโฟลิพิดกับแป้งเพื่อสร้างคุณภาพและยืดอายุการเก็บอาหาร มีสิทธิบัตรการใช้ผนังเซลล์ที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ของยีสต์ (*Saccharomyces uvarum*) เพื่อผลิตมาการีน เป็นต้น

จากสถิติการนำเข้าสารลดแรงตึงผิว สารก่ออิมัลชัน และสารอนุพันธุ์จากกรมศุลการกรประจำปี 2547 พบว่ามีการนำเข้าเป็นมูลค่ากว่า 105 ล้านบาทต่อปี และมีแนวโน้มสูงขึ้นเพื่อเป็นการทดแทนการนำเข้า อีกทั้งเพื่อเป็นการพึ่งตนเองได้ จึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการค้นคว้าและผลิตสารชีวโมเลกุลที่สามารถลดแรงตึงผิวและก่ออิมัลชั่นได้ดี เพื่อทดแทนสารดังกล่าวมาใช้ ซึ่งเป็นผลให้ประเทศสามารถผลิตอาหารที่มีมาตรฐานสูงขึ้นสามารถแข่งขันกับสินค้าจากต่างประเทศ และยังเป็นการส่งเสริมการตลาดภายใน และภายนอกประเทศอีกด้วย

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย (ปีที่ 1-4)

คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีคุณสมบัติเป็นที่ต้องการในอุตสาหกรรมอาหาร ศึกษาถึงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะที่เหมาะสมเพื่อการผลิตสาร ศึกษาคุณลักษณะสมบัติของสาร การกลายพันธุ์จุลินทรีย์ให้มีประสิทธิภาพในการผลิตสูงขึ้น ตลอดจนทราบกระบวนการในการผลิตสารในระดับขยายส่วน

ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ (ปีที่1)

2. ศึกษาถึงอาหารแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้ได้ปริมาณสูงสุด (ปีที่ 1-2)
3. ศึกษาลักษณะสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ และวิเคราะห์โครงสร้างของสาร(ปีที่ 2)
4. การกลายพันธุ์จุลินทรีย์ให้มีประสิทธิภาพในการผลิตสูงขึ้น(ปีที่ 3)
5. ทำการผลิตในระดับขยายส่วน และศึกษาความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร(ปีที่ 4)

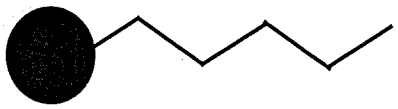
ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

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

งานวิจัยการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารในประเทศยังไม่มีผู้ใดรายงาน ส่วนงานวิจัยในต่างประเทศ มีการศึกษาการวิจัยบ้าง ตลอดจนมีการจดสิทธิบัตร ดังที่ได้กล่าวมาแล้วในบททบทวนเอกสาร แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ของการใช้สารลดแรงตึงผิวจากจุลินทรีย์ในอุสาหกรรมอาหาร จึงเห็นความจำเป็นที่จะต้องมีการค้นคว้าและวิจัยเพื่อความสามารถในการพึ่งตนเองได้ของประเทศนำไปสู่การผลิตอาหารที่มาตรฐานสูงขึ้นเพื่อการแข่งขันกับต่างประเทศ

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

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

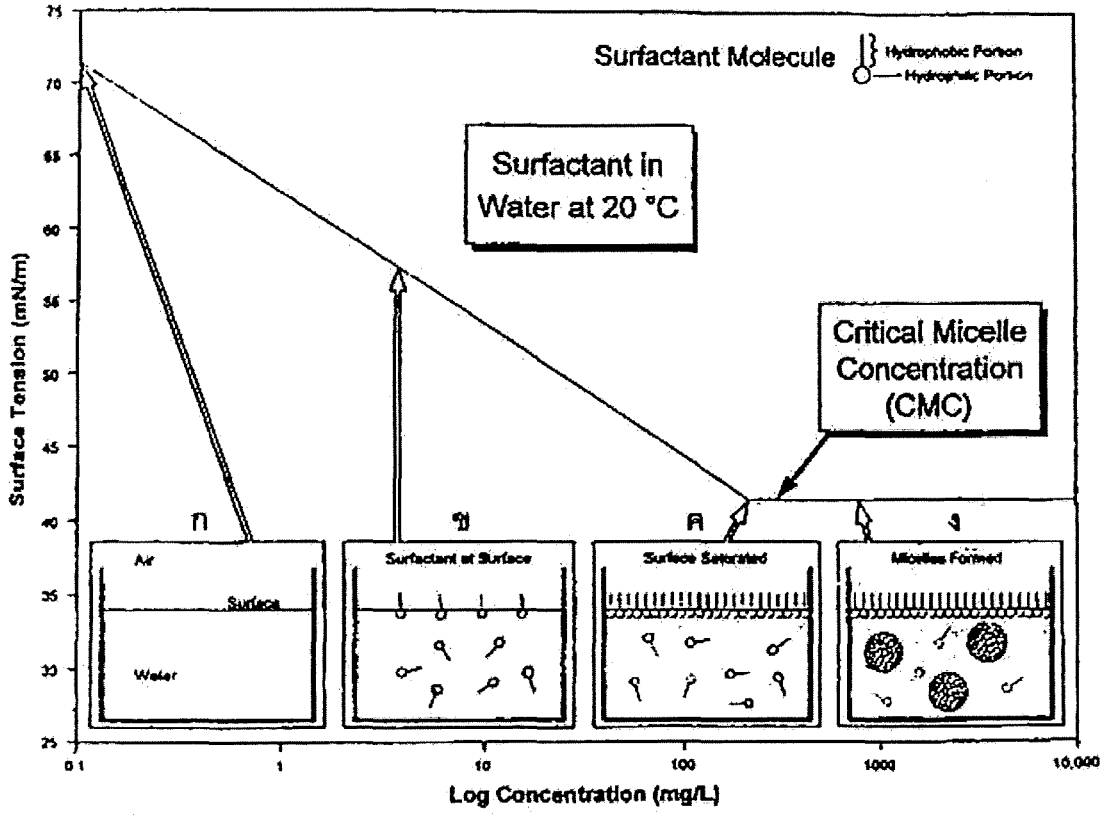


ส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic portion) ส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic portion)

รูปที่ 1.1 ลักษณะโครงสร้างทั่วไปของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Fiechter, 1992)

จากสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีโครงสร้างเป็นแอมฟิฟาติก เมื่อสารลดแรงตึงผิวอยู่ในน้ำ ส่วนที่ชอบน้ำจะละลายน้ำได้และส่วนที่ไม่ชอบน้ำจะอยู่บริเวณรอยต่อระหว่างน้ำกับอากาศ การที่สารลดแรงตึงผิวไปอยู่ที่รอยต่อนี้จะทำให้ลดค่าแรงตึงผิวของสารละลายนั้นได้ และโดยส่วนใหญ่แล้วสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะลดค่าแรงตึงผิวของน้ำจาก 72 mN/m เป็น 30 $\pm$ 5 mN/m ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ สารลดแรงตึงผิวสามารถละลายอยู่ในตัวทำละลายทั้งชนิดมีขั้วและไม่มีขั้ว เมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวมากขึ้นก็จะไปลดค่าแรงตึงผิวของสารละลาย จนถึงความเข้มข้นหนึ่งที่ทำให้เกิดโครงสร้างที่เรียกว่าไมเซลล์

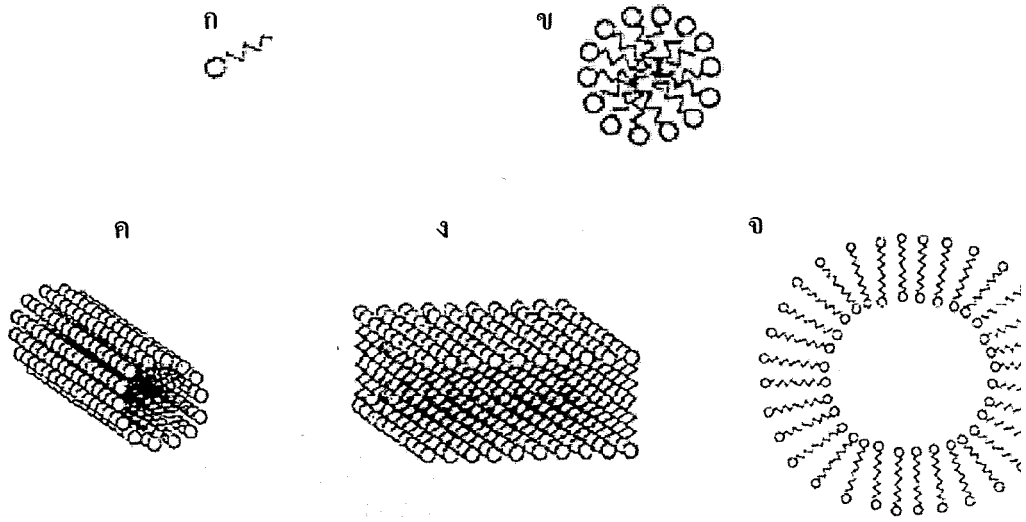
(micelle) และค่าแรงตึงผิวของสารละลายนั้นจะคงที่ไม่ลดลงไปอีกแม้จะเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลงไปอีกเท่าใดก็ตามดังแสดงในรูปที่ 1.2



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

ความเข้มข้นที่ทำให้เกิดโครงสร้างไมเซลล์ เรียกว่า Critical Micelle Concentration (CMC) คือ ค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ทำให้สารลดแรงตึงผิวเกิดการรวมตัวเป็นโครงสร้างไมเซลล์ ซึ่งใช้เป็นตัวบ่งถึงประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวได้ โครงสร้างไมเซลล์จะประกอบไปด้วยโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิว 20–200 โมเลกุล ค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิดจะมีค่า

ต่างกันและขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ (Desai และ Banat, 1997) นอกจากนี้ค่า CMC ยังสามารถบอ
โครงสร้างทุติยภูมิของสารลดแรงตึงผิวได้ เช่น ไมเซลล์ไบเลเยอร์ (bilayer) และไมเซลล์เวสสิเคิ
(vesicles) เป็นต้น ดังแสดงในรูปที่ 1.3



รูปที่ 1.3 **โครงสร้างและการจัดเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ** (Fiechter, 1992)

ก) โครงสร้างโมโนเมอร์ (monomer) ของแอมฟิฟาติกโมเลกุล

ข) โครงสร้างไมเซลล์แบบกลม

ค) โครงสร้างไมเซลล์แบบแท่ง

ง) โครงสร้างไมเซลล์แบบเลเยอร์

จ) โครงสร้างไมเซลล์แบบเวสสิเคิล

การที่จะเกิดการจัดเรียงตัวของโครงสร้างไมเซลล์เป็นแบบใดนั้นนอกจากแรงกระท
ระหว่างโมเลกุลแล้วยังขึ้นกับชนิดของสารลดแรงตึงผิวว่ามีโครงสร้างแบบใด เช่น โมเลกุล
ลักษณะเป็นโซ่สายสั้นและส่วนหัวที่มีขั้วใหญ่จะเกิดการจัดเรียงตัวเป็นแบบไมเซลล์ทรงกลม ถ้
ส่วนหัวมีขนาดเล็กก็จะรวมตัวเป็นไมเซลล์แบบทรงกระบอก หรือส่วนไม่ชอบน้ำเป็นสายยาวก็จ
รวมตัวเกิดเป็นไบเลเยอร์ เป็นต้น ด้วยสมบัติที่หลากหลายของโครงสร้างไมเซลล์จึงสามารถนำสา
ลดแรงตึงผิวชีวภาพไปประยุกต์ใช้ในงานต่างๆ ได้อย่างกว้างขวาง

ค่าที่แสดงถึงประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ นอกจากค่า CMC ที่กล่าวข้างต้นแล้วยังมีอีกหลายค่าได้แก่

1. **ค่าแรงตึงผิว** (Surface tension)

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

2. **ค่าแรงตึงผิวระหว่างผิวที่ประจัน** (interfacial tension)

หมายถึง แรงที่กระทำระหว่างของเหลวกับของเหลวที่มีเฟสต่างกัน มีหน่วยเป็น mN/m การวัดแรงตึงระหว่างผิวที่ประจันจะวัดระหว่างน้ำ และสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น น้ำมันเฮกซาเดกเคน หรือ น้ำมันก๊าด โดยทั่วไปค่าแรงตึงระหว่างผิวที่ประจันของน้ำกับเฮกซาเดกเคนมีค่าเท่ากับ 50 mN/m และค่าแรงตึงระหว่างผิวที่ประจันของน้ำกับน้ำมันก๊าดมีค่าเท่ากับ 30-40 mN/m ซึ่งเมื่อเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะสามารถลดแรงตึงผิวที่ประจันลงเหลือ 0.1-1.0 mN/m (Gerson, 1993)

3. **การก่อเกิดอิมัลชัน** (Emulsification)

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

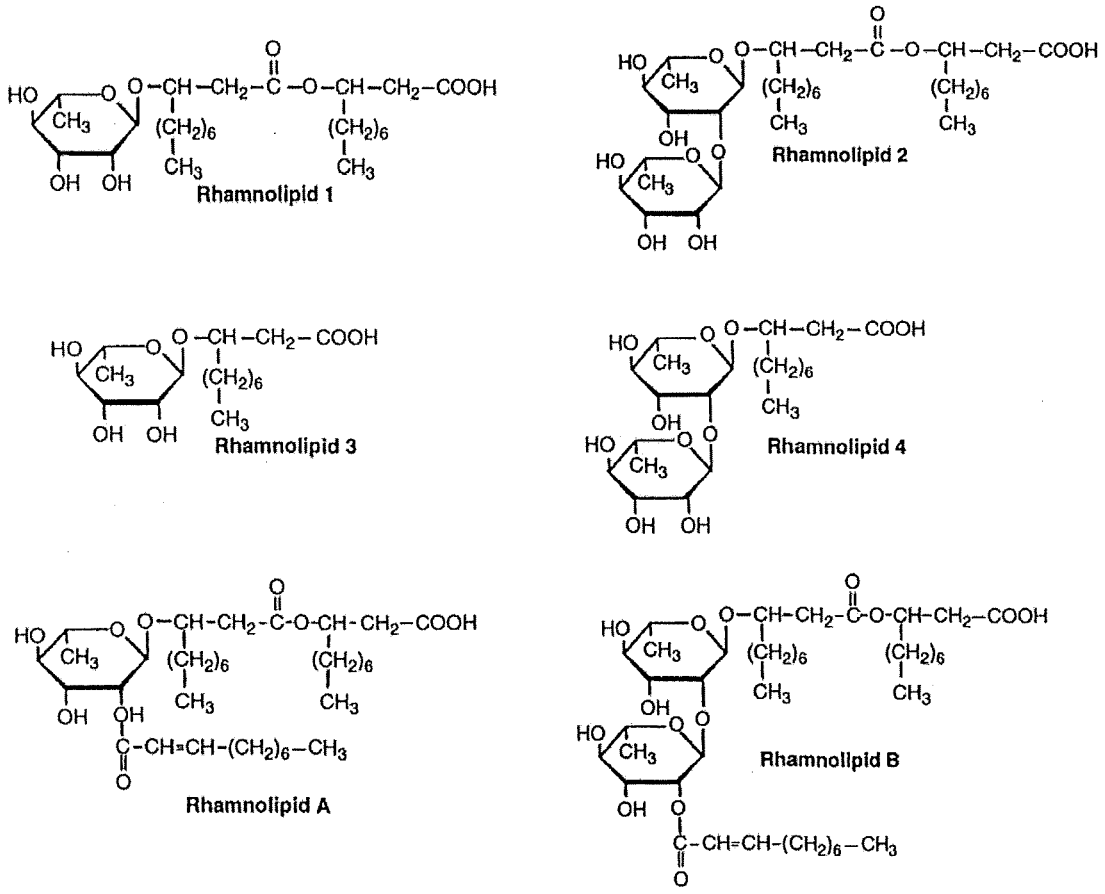
4. **ค่าการกระจายตัวของน้ำมัน** (oil displacement activity)

เป็นการวัดประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการทำให้แผ่นฟิมล์มของน้ำมันบนผิวน้ำเป็นวงใส (clear zone) โดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของพื้นที่วงใส คำนวณหาพื้นที่ตามสูตร πr^2 มีหน่วยเป็นตารางเซนติเมตร โดยกำหนด 1 ตารางเซนติเมตรของการกระจายตัวของ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดไกลโคลิพิด

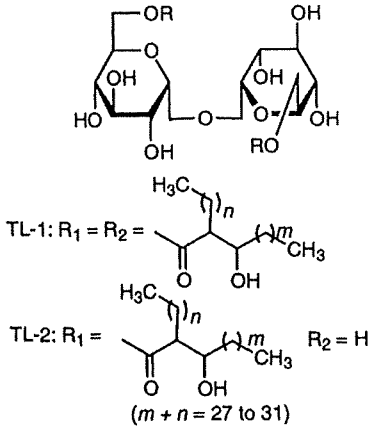
สารลดแรงตึงผิวชนิดไกลโคลิพิดประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต เช่น กลูโคส แมนโนส กาแล็กโตส กรดกลูคูโรนิก แรมโนส เชื่อมต่อกับไขมัน เช่น กรดอะลิฟาติกและหมู่ไฮดรอกซี สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่จัดเป็นไกลโคลิพิด ได้แก่ แรมโนลิพิด ทรีฮาโรลิพิด และโซโฟโรลิพิด

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



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

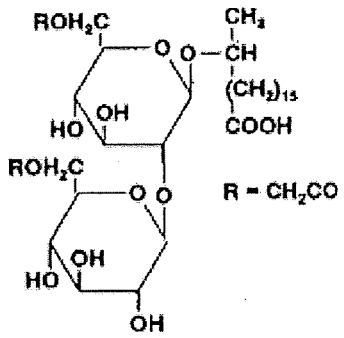
1.2 ทรีฮาโรลิพิด (trehalolipid) โครงสร้างโดยทั่วไปของทรีฮาโรลิพิดประกอบด้วย disaccharide trehalose เชื่อมต่อกับกรดไมโคลิก (mycolic acid) ที่ตำแหน่ง C-6 และ C-6-OH ซึ่งผลิตโดย *Mycobacterium* , *Nocardia* และ *Corynebacterium* sp.



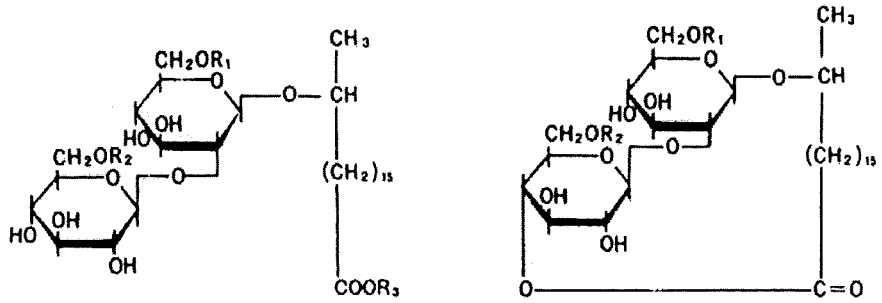
รูปที่ 1.5 **โครงสร้างของ** Trehalose dimycolate **จาก** *Rhodococcus erythropolis* (Desai **และ** Banat, 1997)

ทรีฮาโรลิพิดที่ผลิตจากสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันจะมีขนาดและโครงสร้างของกรดไมโคลิกต่างกัน ซึ่งต่างกันที่จำนวนอะตอมของคาร์บอน และความแรงของประจุของสารทรีฮาโรลิพิดจาก *R. erythropolis* และ *Arthrobacter* sp. ให้ค่าแรงตึงผิวต่ำสุดอยู่ในช่วง 25-40 mN/m และค่าแรงตึงผิวระหว่างสารกับเฮกซาเดกเคนอยู่ในช่วง 1-5 mN/m

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



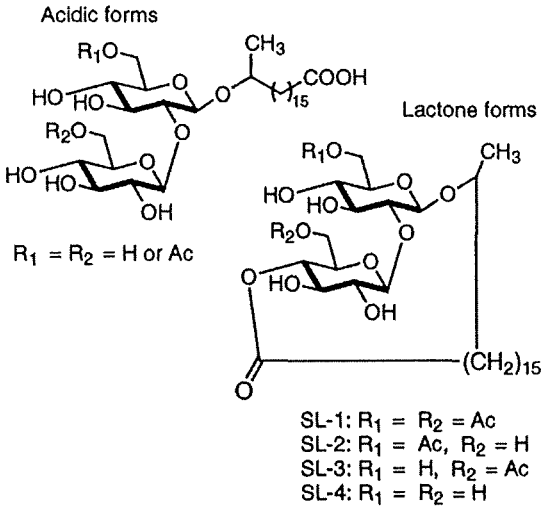
รูปที่ 1.6 โครงสร้างของโซโฟโรลิพิดจาก *Torulopsis bombicola* แสดงไดเมอริกโซโฟโรสที่เชื่อมต่อกับสายยาวของ hydroxyl fatty acid (C18) (Desai และ Banat, 1997)



I : $R_1 = R_2 = Ac$, $R_3 = H$
Acid-SL : $R_1 = R_2 = R_3 = H$
Methyl-SL : $R_1 = R_2 = H$, $R_3 = Me$

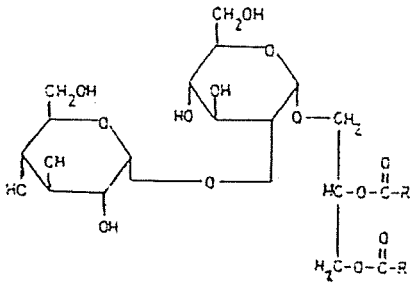
II : $R_1 = R_2 = Ac$
III : $R_1 = H$, $R_2 = Ac$

รูปที่ 1.7 โครงสร้างของโซโฟโรลิพิดจาก *Torulopsis bombicola* (Inoue และ Itoh, 1982)
I: 17-L-[(2'-O-P-D-glucopyranosyl-3-D-glucopyranosyl)]octadecanoic acid 6',6"-diacetate
II: 1,4"-lactone of type I
III: 6'-deacetylated derivative of type II



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

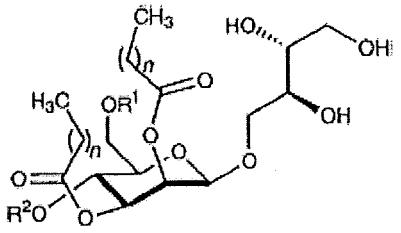
ไดไกลโคซิล ไดกลีเซอไรด์ (diglycosyl diglycerides) เป็นไกลโคลิพิดชนิดที่พบทั่วไปในจุลินทรีย์ มีสูตรโครงสร้างประกอบด้วยไดไกลโคซิลกับไดกลีเซอไรด์ที่แตกต่างกัน 5 หมู่ คือ แอลฟา-ไดกลูโคซิลไดกลีเซอไรด์ (α- diglucosyldiglyceride) บีตา- ไดกลูโคซิล- (β- diglucosyl-) ไดแมนโนซิล (dimannosyl-) ไดกาแลคโตซิล- (digalactosyl-)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



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

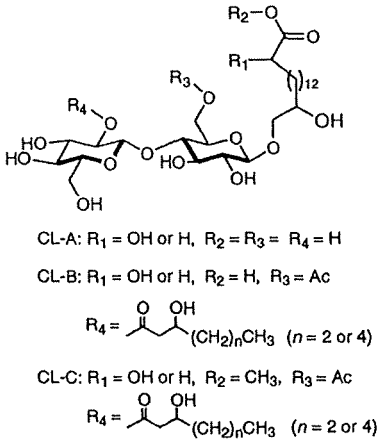
1.5 สารประกอบพอลิแซคคาไรด์ – ลิพิด (Polysaccharide – lipid complex)

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



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

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



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

<u>จลนศาสตร์การหมักสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ</u> (Kinetics of fermentative production)

จลนศาสตร์การหมักสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นมีหลายรูปแบบตามการแปรผันของระบบที่ใช้ในการหมัก ซึ่งสรุปได้ 4 รูปแบบ ดังนี้

1. การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพควบคู่กับการเจริญของเซลล์
   (Growth - associated production)

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

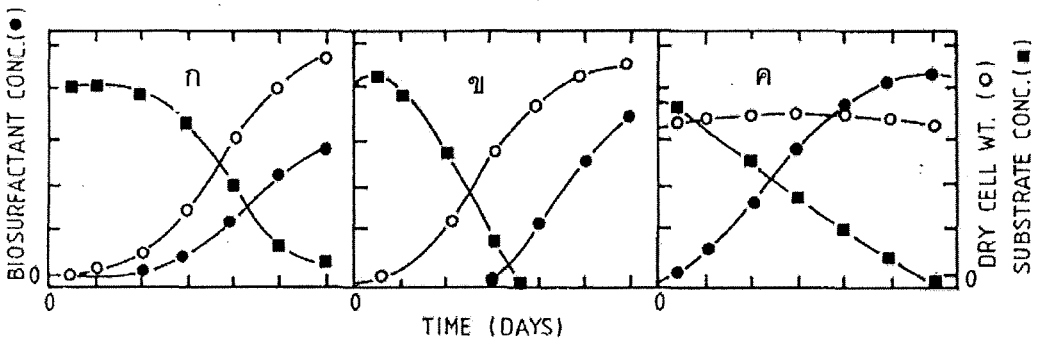
2. การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในภาวะจำกัดการเจริญ
   (Growth - limiting conditions)

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

3. การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในช่วงระยะพักของเซลล์

(Resting cells or immobilized cells)

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



รูปที่ 1.12 รูปแบบการเจริญของเชื้อแบบต่าง ๆ

ก) การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพควบคู่กับการเจริญ (Growth – associated production)

ข) การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพภายใต้ภาวะที่มีการจำกัดการเจริญ (Production under growth limited condition)

ค) การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้เชื้อในระยะพักหรือเซลล์ตรึง (Production by resting or immobilized cells)

4. การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยมีการเติมสารตั้งต้น

(Precursor supplementation)

เป็นการเติมสารตั้งต้นสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อเพิ่มการผลิตสารลดแรงตึงผิว โดยทำให้ผลผลิตมีการเปลี่ยนแปลงทั้งปริมาณและคุณภาพ เช่น การเติมสารประกอบไลโพฟิลิกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ *T. bombicola* (Cooper และ

Paddock, 1984) มีผลทำให้มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ 120-150 กรัมต่อลิตร (Lee และ Kim, 1993) ซึ่งมีค่ามากขึ้นจากเดิม เป็นต้น

แหล่งอาหารที่มีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

1. แหล่งคาร์บอน

ความยาวของสายไฮโดรคาร์บอนที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ตัวอย่างเช่น *Corynebacterium hydrocarboclastus* และ *Rhodococus erythropolis* สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดี เมื่อเจริญบนไฮโดรคาร์บอนสายตรง (n-alkanes) ที่มีจำนวนคาร์บอนอะตอม C12 ถึง C14 และ C12 ถึง C18 ตามลำดับ ในขณะที่ *Acinetobacter* sp. ต้องการแหล่งคาร์บอนที่เป็น cyclic และ aliphatic carbon เพื่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และหากความยาวของ n- alkanes เพิ่มขึ้นจาก C10 ถึง C17 ความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะลดลง (Ristau และ Wagner, 1983; Rosenberg และคณะ , 1979) แหล่งคาร์บอนบางชนิดสามารถชักนำให้จุลินทรีย์ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เช่น กรดไขมัน สารประกอบไฮโดรคาร์บอน หรือกลีเซอร์ไรด์ จะชักนำให้ *Torulopsis magnoliae* ผลิตโซโฟโรลิพิดได้มากขึ้น (Tulloch และคณะ, 1962) ในขณะเดียวกันแหล่งคาร์บอนบางชนิดอาจมีผลยับยั้งกระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ เช่น การผลิตไลโบแซนจาก *Candida lipolytica* จะให้ผลผลิตต่ำเมื่อใช้กลูโคส อะซิเตต และกรดไตรคาร์บอกซิลิกเป็นแหล่งคาร์บอน (Cirigliano และ Carman, 1988)

2. แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนมีความสำคัญต่อเมตาบอลิซึมของเซลล์รวมถึงการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วย แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและชนิดของจุลินทรีย์ Cooper และ Paddock (1984) ได้ทดลองการผลิตไกลโคลิพิดโดย *Torulopsis bombicola* พบว่า $(NH_2)_2CO$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์สูงสุด 10.14 g/l และให้ค่าแรงตึงผิว 34 mN/m แต่เมื่อใช้ NH_4Cl เป็นแหล่งไนโตรเจน จะให้ค่าแรงตึงผิวต่ำสุดที่ 31 mN/m เป็นต้น

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

ปัจจัยทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

1. ความเป็นกรด-ด่าง

การเจริญของจุลินทรีย์หรือสิ่งมีชีวิตต่างๆ ถูกควบคุมโดยกระบวนการเมตาบอลิซึมมีเอนไซม์เป็นตัวสำคัญ และการทำงานของเอนไซม์จะได้รับผลกระทบจากความเป็นกรดด่าง องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยสำคัญอันหนึ่งที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่างในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากจุลินทรีย์จะมีการย่อยสลายสารอาหารเพื่อเป็นแหล่งพลังงาน ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีองค์ประกอบที่เป็นโปรตีน และไนโตรเจน เมื่อถูกย่อยสลายจะปลดปล่อยสารที่เป็นแอมโมเนีย หรือ อัคคาไลน์อื่นๆ ออกมา แต่ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีองค์ประกอบที่เป็นคาร์โบไฮเดรต เมื่อถูกย่อยสลายจะขับสารที่เป็นกรดอินทรีย์ออกมา ซึ่งสิ่งที่ขับออกมานี้ จะทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเปลี่ยนแปลงไป จนอยู่ในสภาพที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ และมีความสำคัญในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของจุลินทรีย์

2. อุณหภูมิ

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

3. การให้อากาศ

การให้อากาศ การกวน เป็นการเพิ่มปริมาณออกซิเจนให้กับจุลินทรีย์เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมทางหนึ่ง นอกจากนี้ยังเป็นการช่วยให้จุลินทรีย์อยู่ในสภาพแขวนลอย สามารถดูดซึมปริมาณออกซิเจนเพื่อนำไปใช้ได้มากขึ้น ออกซิเจนที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้นั้นต้องอยู่ในรูปของโมเลกุลออกซิเจนที่ละลายหรืออยู่ในรูปของเหลว การละลายของออกซิเจนในน้ำมีปริมาณจำกัด ออกซิเจนสามารถละลายในสื่อกลางที่เป็นน้ำได้เพียงไม่กี่มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยอากาศที่ความดัน 1 บรรยากาศ นับว่าน้อยมากเมื่อเทียบกับปริมาณออกซิเจนที่จุลินทรีย์ต้องการ ดังนั้นจำเป็นต้องทำให้มีออกซิเจนละลายเข้าไปในอาหารเหลวอยู่ตลอดเวลาโดยการถ่ายเทจากอากาศ ซึ่งช่วยให้จุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศเจริญได้ด้วยความหนาแน่นสูงภายใต้ภาวะที่เป็น

อันหนึ่งอันเดียวกัน ดังนั้นจะเห็นว่าในขั้นตอนของกระบวนการหมักจึงต้องมีการให้อากาศตลอดเวลา Papanikolaou และคณะ (2002) พบว่าอัตราการถ่ายเทอากาศเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญสำหรับการผลิต Single cell oil ของยีสต์ *Y. lipolytica* พบว่าที่ความอิ่มตัวของออกซิเจน 5-15% จะให้ผลผลิตของไขมันเท่ากับ 3 g/l ในขณะที่ความอิ่มตัวของออกซิเจนสูงถึง 60-70% จะไม่สามารถผลิตไขมันได้

ประโยชน์และการประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ปัจจุบันมีผู้สนใจนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไปใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทำหน้าที่ได้หลายประการ ได้แก่

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

สารลดแรงตึงผิว (surfactant) ถูกใช้อย่างแพร่หลายทั้งในอุตสาหกรรมปิโตรเลียม สิ่งทอ เครื่องจักร กระดาษ พอลิเมอร์ พลาสติก ยา เครื่องสำอาง และอาหาร เป็นต้น สารลดแรงตึงผิวที่ใช้ในอุตสาหกรรมดังกล่าวมีอยู่มากมายหลายชนิด แต่ก็ยังคงมีการพัฒนาเพื่อให้ได้สารใหม่ที่มีประสิทธิภาพมากกว่าเดิม (Cameotra และ Makkar, 1998) ในปี 1997 อุตสาหกรรมการผลิตสารลดแรงตึงผิวมีมูลค่ามากกว่า 9 พันล้านเหรียญอเมริกาต่อปี (Desai และ Banat, 1997) สารลดแรงตึงผิวเหล่านี้ส่วนใหญ่แล้วสังเคราะห์ขึ้นโดยผ่านกระบวนการทางเคมีโดยใช้ปิโตรเลียมเป็นสารตั้งต้น มีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ย่อยสลายทางธรรมชาติได้ยาก และกระบวนการในการผลิตยังเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย ทำให้มีการออกกฎหมายให้ใช้สารลดแรงตึงผิวที่เข้ากันได้และไม่

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

ในอุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งนิยมใช้สารลดแรงตึงผิวในอาหารต่างๆเช่น จำพวกเครื่องดื่ม ใช้เป็นสารช่วยในการละลาย ช่วยทำให้อาหารน่ารับประทานด้วยการทำให้แวววาว อาหารพวกของอบโดยช่วยให้เป็นเนื้อเดียวกันจากคุณสมบัติเป็นอิมัลสิไฟเออร์ อาหารพวกที่มีนม ไข่ และไขมันเป็นองค์ประกอบ จะช่วยทำให้เกิดเจลาติน ทำให้เกิดการรวมตัวกัน ช่วยทำให้เกิดโฟม หรือเป็น fat stabilizer อาหารพวกซุปและน้ำเกรวี่ จะช่วยเพิ่มความหนืด เป็นอิมัลสิไฟเออร์ดูดซับน้ำ รวมทั้งพวกที่ใช้ตบแต่งอาหารเช่น ทอปปิ้งต่างๆ จากคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวข้างต้น ทำให้สารลดแรงตึงผิวเป็นที่แพร่หลาย ตารางที่ 1.1 จะแสดงตัวอย่างของคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวที่ใช้ในอาหารชนิดต่างๆ และต่อไปนี้คือตัวอย่างที่ใช้เป็นอิมัลสิไฟเออร์ในอาหาร เช่น lecithin และ lecithin derivative, glycerol fatty acid ester, hydroxylic acid และ fatty acid ester, lactylate fatty acid ester, polyglycerol fatty acid ester, ethylene หรือ propylene glycol fatty acid ester, ethoxylated derivative of monoglycerides, sorbitan fatty acid ester และ miscellaneous derivative ในประเทศญี่ปุ่นอนุญาตให้ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากจุลินทรีย์กับอาหารได้ เช่น sophorolipid โดยใช้เป็น additive ในแป้งเพื่อเพิ่มอายุของการวางขาย (shelf life) ของขนมอบ (Fiechter, 1992 และ Kosaric, 1993)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพส่วนใหญ่ที่นำมาใช้อย่างแพร่หลายทั้งในอุตสาหกรรมและบ้านเรือนเป็นสารประเภทไกลโคลิพิด เช่น โซโฟโรลิพิด มีสมบัติเป็นอิมัลซิไฟเออร์ ใช้เป็นส่วนประกอบในเครื่องอุปโภคและบริโภค ซึ่งถือว่ามีความสำคัญต่อมนุษย์มากที่สุด ไกลโคลิพิดเป็นสารธรรมชาติที่มักพบได้ในผนังเซลล์ของจุลินทรีย์จำพวกยีสต์และรา ดังนั้นการนำจุลินทรีย์เหล่านี้มาผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระดับอุตสาหกรรมจึงเป็นที่สนใจมากขึ้น เนื่องจากความหลากหลายของสายพันธุ์ สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้โดยใช้แหล่งอาหารได้หลากหลาย รวมถึงแหล่งอาหารที่จากวัสดุเหลือใช้จากเกษตรกรรม เช่นคาร์โบไฮเดรต กรดไขมัน และ น้ำมันจากพืชผัก ดังแสดงในตารางที่ 1.3

ตารางที่ 1.1 หน้าที่ต่างๆของสารลดแรงตึงผิวที่ใช้เป็นอิมัลสิไฟเออร์ในอาหารชนิดต่างๆ (Kosaric, 1993)

Functions	Product examples
Emulsification (water-in-oil)	Margarine
Emulsification (oil-in-water)	Mayonnaise
Softening	Candy
Improvement of loaf volume	Bread
Reduction of shortening requirements	Bread
Fat stabilizer	Food oil
Viscosity control	Molten chocolate
Improvement of solubility	Instant drinks
Humectant	Cake icing
Plasticizer	Cake icing
Defoaming agent	Sugar production
Stabilization of flavor oils	Flavor emulsification

ตารางที่ 1.2 ตัวอย่างสิทธิบัตรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตด้วยจุลินทรีย์ (Kosaric, 1993)

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

ตารางที่ 1.3 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากยีสต์ในแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน

จุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	ประเภทของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	อ้างอิง
Torulopsis bombicola ATCC 22214	คาร์โบไฮเดรต และ น้ำมันจากพืชผัก	ไกลโคลิพิด	Cooper และ Paddock (1984)
Candida antractica T-34	กรดโอเลอิก และ Rapeseed oil	(Mannosyleryt hritol)	Kitamoto และคณะ (1990)
Candida antractica T-34	น้ำมันถั่วเหลือง (soybean oil)	(Mannosyleryt hritol)	Kitamoto และคณะ (1993)
Candida bombicola	ไขมันจากสัตว์	โซโฟโรลิพิด	Deshpande และ Daniels (1995)
Candida bombicola	น้ำมันดอกทานตะวัน (hexadecane)	โซโฟโรลิพิด	Mccaffrey และ Cooper (1995)
Candida bombicola	Canola oil (มีกลูโคสและกาแลคโตส)	โซโฟโรลิพิด	Zhou และ Kosaric (1995)
Candida sp. SY 16 *Candida antractica* KCTC 7804	น้ำมันถั่วเหลือง (soybean oil)	(Mannosyleryt hritol)	Kim และ คณะ (1999)
Candida bombicola ATCC 22214	กรดโอเลอิก และ Rapeseed oil	โซโฟโรลิพิด	Rau และ Hammen (2001)
Candida bombicola ATCC 22214	Lipophilic carbon	โซโฟโรลิพิด	Cavalero และ Cooper (2003)
Candida ishiwadae	น้ำมันถั่วเหลือง (soybean oil)	(Monoacylgly cerols)	Thanomsub และคณะ (2004)

การกลายพันธุ์ (Mutation) สามารถเกิดได้เองทั้งตามธรรมชาติและจากการกระตุ้นด้วยสารเคมี หรือสิ่งเร้าอื่นๆ การกลายพันธุ์อาจทำให้เกิดการพัฒนาที่ดีขึ้นหรือแย่ลงในสิ่งมีชีวิตก็ได้ แต่ในบางครั้งหากเกิดการกลายพันธุ์ในตำแหน่งยีนที่สำคัญต่อการดำรงชีวิตก็อาจจะทำให้เซลล์ไม่สามารถอยู่รอดได้

ชนิดของการเกิดการกลายพันธุ์

1. Point mutation

   เกิดจากการที่เบสในสายดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไป 1 ตำแหน่ง ทำให้การอ่านลำดับเบสผิดไป เกิดเป็นกรดอะมิโนตัวใหม่ (Altering amino acid sequence) เช่น

เดิม	CTC AGC	เป็น	Leucine Serine
เกิดการกลายพันธุ์	GTC AGC	เป็น	Phenylalanine Serine

2. Insertion mutation

   เกิดจากการที่มีเบส 1 ตัว หรือ หลายตัวแทรกเข้าไปในสายดีเอ็นเอเดิม ทำให้การอ่านลำดับเบสเปลี่ยนไป (Frame shift) หรือ เกิดการหยุดการสังเคราะห์โปรตีนได้ (Premature termination) เช่น

เดิม	CTC AGC	เป็น	Leucine Serine
เกิดการกลายพันธุ์	CTC GTC AGC	เป็น	Leucine Phenylalanine Serine
เกิดการกลายพันธุ์	CTC TAG CAG C	เป็น	Leucine หยุด

3. Deletion mutation

   เกิดจากการที่เบสในสายดีเอ็นเอถูกกำจัดออกไป ทำให้การอ่านลำดับเบสเปลี่ยนไปหรือหายไป (Frame shift)

เดิม	CTC GTC AGC	เป็น	Leucine Phenylalanine Serine
เกิดการกลายพันธุ์	CTC AGC	เป็น	Leucine Serine

4. Silent mutation

   เกิดจากการที่เบสในสายดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไป 1 ตำแหน่ง แต่ไม่ทำให้การอ่านลำดับเบสผิดไป เนื่องจากเบสหนึ่งตัวมักจะมีลำดับเบสได้หลากหลาย จึงยังคงสามารถอ่านได้เป็นกรดอะมิโนตัวเดิม

เดิม	CTC AGC	เป็น	Leucine Serine
เกิดการกลายพันธุ์	CTA AGC	เป็น	Leucine Serine

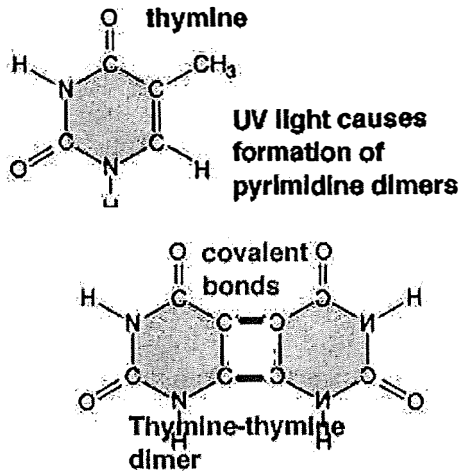
การกลายพันธุ์โดยธรรมชาติ มีโอกาสเกิดขึ้นในอัตราที่ต่ำมากคือประมาณ 10^{-6} ต่อยีน 1 ยีน ตัวอย่างของสาเหตุส่วนใหญ่ที่ทำให้การเกิดการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติคือ การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ การสะสมของรังสีที่ได้รับในตลอดช่วงอายุ หรือเกิดจากความผิดพลาดในการจำลองตัวเองของสารพันธุกรรมในขณะที่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็ว

ส่วนการกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์นั้น เบสทุกตัวทั้ง Adenine, Thymine, Cytosine และ Guanine จะสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ แต่จะมีเพียงบางตำแหน่งเท่านั้นที่จะเป็นบริเวณที่มักจะเกิดการกลายพันธุ์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสารกระตุ้นที่ใช้และเบสบริเวณข้างเคียง การกระตุ้นให้ยีนเกิดการเปลี่ยนแปลง สามารถทำได้ 2 วิธีคือ

1. การใช้รังสี

   1.1 รังสียูวี

   รังสียูวีมักจะทำให้เกิดพันธะจากการเข้าคู่กันของเบส Thymine เป็น Thymine-Thymine dimer จากนั้นจะเกิดการซ่อมแซมตัวเองโดยการตัด Thymine-Thymine dimer ออกแล้วเติมเบสเข้าแทนที่แบบซุ่ม การเติมเบสเข้าแบบซุ่มนี้เองจะทำให้ยีนเกิดการเปลี่ยนแปลงจากการใส่ชนิดเบสที่ผิด ทั้งนี้การก่อการกลายพันธุ์ด้วยรังสียูวีมักจะทำให้เกิดการตายของเซลล์มากกว่าการมีพันธุกรรมที่เปลี่ยนไป และยังจะสามารถเกิดการซ่อมแซมลำดับเบสที่ใส่ผิดไปได้ด้วย



รูปที่1.13 แสดงการเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยรังสียูวี

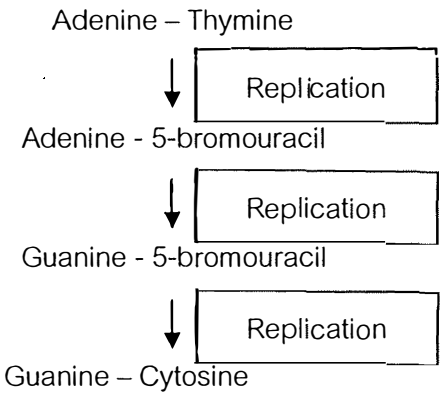
1.2 รังสีเอกซ์และแกมมา

รังสีเอกซ์และแกมมาจะทำให้พันธะฟอสโฟไดเอสเตอในสายดีเอ็นเอหัก ทำให้เกิดการขาดหายไปของรหัสพันธุกรรม และอาจจะทำให้เกิดการตัดหมู่อะมิโนหรือหมู่ไฮดรอกซิลของดีเอ็นเอทิ้ง

2. การใช้สารเคมี

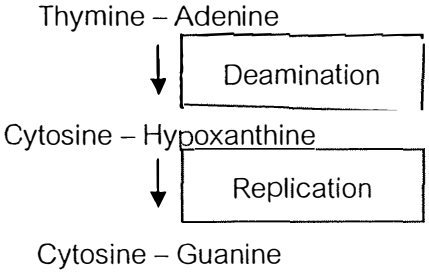
2.1 Base analogues

เป็นสารเคมีที่มีโครงสร้างคล้ายเบสในสายดีเอ็นเอ เมื่อเข้าไปอยู่ในสายดีเอ็นเอจะทำให้การเข้าคู่ของเบสเปลี่ยนแปลงไป ตัวอย่างของสารเคมีในกลุ่มนี้คือ 5-bromouracil, 5-deoxyuridine, 2-aminopurine เป็นต้น



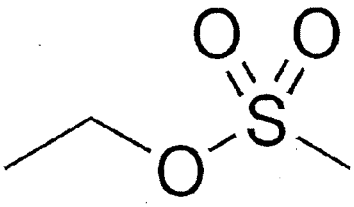
2.2 Deaminating agents

เป็นสารเคมีที่ทำให้เบส Adenine เปลี่ยนแปลงเป็นสารใหม่ชื่อ Hypoxanthine เบสที่เปลี่ยนไปนั้นจะเข้าคู่กับ Cytosine แทน Thymine ตัวอย่างของสารเคมีคือ Nitrous acid

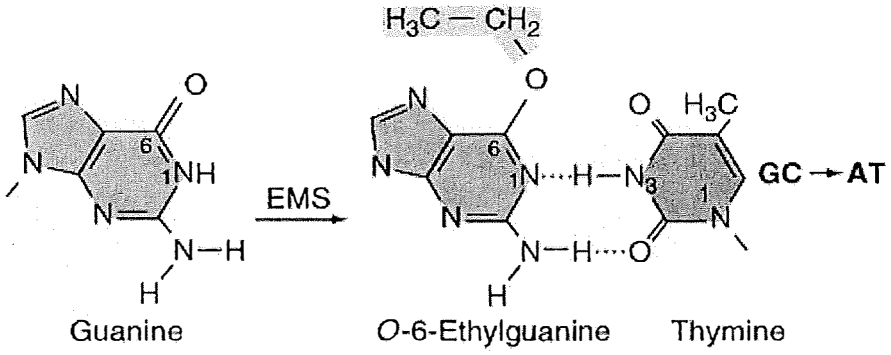


2.3 Alkylating agent

จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงได้ 3 ลักษณะคือ เป็นสารเคมีที่ทำให้มีการเติมหมู่แอลคิลเข้าที่เบส ทำให้สายดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักมากขึ้นหักและเกิดการขาดหายไปของรหัสพันธุกรรม หรือทำให้เกิดการเข้าคู่ของเบสในแนวข้ามคู่กัน (Cross bridge) ทำให้ไม่สามารถมีการเพิ่มจำนวนสายดีเอ็นเอหรือเกิดการถอดรหัสเป็นโปรตีนได้ ในลักษณะสุดท้ายคือ การทำให้เกิดการเข้าคู่ที่ผิดของเบส หากไม่มีการซ่อมแซมก็จะทำให้อ่านกรดอะมิโนผิดชนิดได้ ตัวอย่างของสารเคมีในกลุ่มนี้คือ Ethylethanesulphonate, Ethylmethanesulphonate, Methylmethanesulphonate และ Nitrosoguanidine เป็นต้น โดยสารเคมีในกลุ่มนี้เหมาะที่จะใช้ในการกระตุ้นการกลายพันธุ์ที่นิวเคลียสของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากจะทำให้เกิดการกลายพันธุ์มากกว่าทำให้เซลล์ตาย



รูปที่1.14 โครงสร้างทางเคมีของสาร Ethylmethanesulphonate



รูปที่1.15 แสดงการเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยสาร EMS

Mulligan และคณะ (1989) รายงานว่าว่า เมื่อทำการกลายพันธุ์ *Bacillus subtilis* ATCC 21332 ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต พบว่าสายพันธุ์กลายที่ได้นั้นสามารถผลิตเซอร์เฟกตินได้มากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมประมาณ 3 เท่า

Iqbal และคณะ (1995) รายงานว่าเมื่อทำการกลายพันธุ์ *Pseudomonas aeruginosa* EBN-8 ด้วยรังสีแกรมมาพบว่าสายพันธุ์กลายสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ 2.60 mg ml^{-1} ซึ่งมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมประมาณ 2-3 เท่า

Lin และคณะ (1998) รายงานว่า เมื่อทำการกลายพันธุ์ *Bacillus licheniformis* ด้วย N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine แล้วพบว่าสายพันธุ์กลายสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ 391 mg l^{-1} ซึ่งมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมประมาณ 12 เท่า

Mahmoud และคณะ (1999) รายงานว่า Ethyl methanesulfonate ที่ความเข้มข้น 60 80 และ 100 ppm จะเพิ่มการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ใน *Candida tropicalis* มากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนที่ผลิต และมวลเซลล์จะเพิ่มขึ้นสูงสุดเมื่อใช้ Ethyl methanesulfonate ที่ความเข้มข้น 60 80 และ 100 ppm

Tahzibi และคณะ (2004) รายงานว่าหลังจากทำการกลายพันธุ์ *Pseudomonas aeruginosa* PTCC 1637 ด้วย N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine แล้วพบว่าสายพันธุ์กลายสามารถผลิตแรมโนลิพิดได้ 12.5 g L^{-1} ซึ่งมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมประมาณ 10 เท่า รวมถึงให้ค่าการกระจาย และ ลดค่าแรงตึงผิวได้ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ดั้งเดิม

แนวทางในการพัฒนากระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพคือ หาวัตถุดิบที่มีราคาถูก หากระบวนการในการผลิตและการแยกสารที่ผลิตได้ที่ราคาถูกและเหมาะสม และการพัฒนาสายพันธุ์ให้ได้สายพันธุ์กลายที่มีการผลิตได้มาก หรือการพัฒนาให้เป็นรีคอมบิแน้นท์ (Recombinant strain) ในสองหัวข้อแรกนั้นได้มีการศึกษา และใช้กันอย่างกว้างขวางแล้วในระดับอุตสาหกรรม แต่การพัฒนาสายพันธุ์ยังมีเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (Mukherjee และคณะ, 2006) จากเหตุผลดังกล่าวข้นต้น จึงนำมาสู่หัวข้อการวิจัยการพัฒนาสายพันธุ์โดยการการกลายพันธุ์ *Pichia anomala* PY1 เพื่อเพิ่มการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

Pichia anomala PY1 เป็นยีสต์สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่คัดแยกได้จากอาหารหมักพื้นบ้าน (ข้าวหมาก) ที่อำเภอพนัสนิคม จังหวัดชลบุรี (ธนัสถา เชียงอุทัย 2549) ซึ่งเป็นยีสต์ทนร้อนที่สามารถเจริญ และผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 40 องศาเซลเซียส

Thaniyavarn (2008) และคณะ รายงานว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *Pichia anomala* PY1 ที่ใช้น้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน มีค่าแรงตึงผิวต่ำสุด 29-30 mN/m ค่าการกระจายน้ำมัน 69.43 ตารางเซนติเมตร ค่าจุดวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ (CMC) 180 มิลลิกรัมต่อลิตร และให้ผลผลิต 0.26 กรัมต่อลิตร เป็นสารลดแรงตึงผิวประเภทไกลโคลิพิด และมีมวลโมเลกุลเทียบเคียงกับโซโฟโรลิพิด

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

1. อุปกรณ์

- เครื่องวัดแรงตึงผิว (Ring Tensiometer) รุ่น K6 ของบริษัท Kruss, Germany
- กล้องจุลทรรศน์ชนิด 2 ตา (Biocular compound microscope) รุ่น BH-2 ของบริษัท Olympus, Japan
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วควบคุมอุณหภูมิ (High - performance centrifuge) รุ่น Avanti® J-30I ของบริษัท Beckman Coulter, U.S.A
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge) รุ่น KUBOTA 3700 ของบริษัท Kubota Corporation, Japan
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge) รุ่น KUBOTA 6500 ของบริษัท Kubota Corporation, Japan
- เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Rotary vacuum evaporator) รุ่น N-N ของบริษัท Eyela, Japan
- เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Centrifuge evaporator) รุ่น R-300 ของบริษัท BUCHI, Switzerland
- เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Centrifuge evaporator) รุ่น eppendorf concentrator 5301 ของบริษัท Modotech ,Germany
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys ของบริษัท Thermo Spectronic, U.S.A
- ตู้นึ่งความดันไอฆ่าเชื้อแบบอัตโนมัติ (Autoclave) รุ่น SS-325 ของบริษัท Tomy,Japan
- เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) รุ่น Innova™ 4300 ของบริษัท New Brunswick Scientific, U.S.A
- ตู้อบ (Hot air oven) รุ่น UE 600 ของบริษัท Memmert, Germany
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น BE 800 ของบริษัท Memmert, Germany
- เครื่องชั่งหยาบ รุ่น PG 2002-S ของบริษัท Metler Toledo, Switzerland
- เครื่องชั่งละเอียด รุ่น AG 285 ของบริษัท Metler Toledo, Switzerland

- เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น Cyberscan 1000 ของบริษัท Eutech Cybernatics, Singapore
- ตู้ปลอดเชื้อ (Larminar flow cabinet) รุ่น 25 Manometer ของบริษัท Dwyer Instrument, U.S.A
- เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) รุ่น K-550 GE ของบริษัท Scientific Industries, U.S.A
- เครื่องอุ่นสารละลาย (Dry-block heater) รุ่น TDB-120 ของบริษัท Biosan, Korea
- ไมโครปิเปต (Micropipette) รุ่น P10, P20, P100, P200, P1000 และ P5000 ของบริษัท Gilson, France

2. เคมีภัณฑ์

- สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A
- สารสกัดจากข้าวมอลต์ (Malt extract) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A
- แบคโตเปปโตน (Bactopeptone) บริษัท Difco Laboratories, U.S.A
- กลูโคส ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- น้ำตาลทราย (ซูโครส) ของบริษัทน้ำตาลทรายมิตรผล จำกัด
- น้ำมันดิบเมอร์บานชนิดเบา (Murban light crude-oil) จากบริษัทไทยออยส์จำกัด ประเทศไทย
- น้ำมันถั่วเหลือง บริษัทมรกตอินดัสตรีส์ จำกัด ประเทศไทย
- น้ำมันปาล์ม บริษัทมรกตอินดัสตรีส์ จำกัด ประเทศไทย
- น้ำมันคาโนลา บริษัทไซม์ดาร์บี้ เอดิเบิ้ล โปรดักส์ ลิมิเต็ด ประเทศสิงคโปร์
- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท BDH Laboratory Supplies, Englang
- แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) E.Merck, Darmstadt, Germany
- โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) ของบริษัท Ajax Finechem, Australia
- ทริสมาเบส (Trisma base; Tris[hydroxymethl] aminomethane)($C_4H_{11}NO_3$) ของบริษัท Sigma, U.S.A
- ทริสไฮโดรคลอไรด์ (Tris HCl) ของบริษัท Sigma, U.S.A
- คลอโรฟอร์ม (Chloroform) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- เมทานอล (Methanol) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- เอทานอล (Ethanol) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- เฮกเซน (Hexane) (C_6H_{14}) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (Concentration HCl) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- กรดอะซิติก (acetic acid) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- SDS (Sodium dodecyl sulfate), ($C_{12}H_{25}OSO_3Na$) ของบริษัท Nacalai tesque, Japan
- เอทิล อะซิเตต (Ethyl acetate) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- ไอโอดีนชนิดเกล็ด ของบริษัท Univar, U.S.A
- กระดาษกรองขนาด (Cellulose acetate membrane) ขนาด 47 มม. 0.45 ไมครอน ของบริษัท Whatman, U.S.A
- แผ่นซิลิกาเจล 60 ขนาด 20x20 ซม.,หนา 0.2 มม. (TLC silica gel 60, 0.2mm.) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany

- แผ่นซิลิกาเจล 60 ขนาด 20x20 ซม., หนา 2 มม. (PLC silica gel 60, 2mm.) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany

3. วิธีดำเนินการทดลอง

1. การทดสอบความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 บนอาหารแข็ง Yeast Malt Extract

นำยีสต์สายพันธุ์ *Pichia anomala* PY1 เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด Yeast Malt Extract บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงมาขีดเป็นรูปกากบาดบนอาหารแข็ง Yeast Malt Extract ที่มีน้ำมันดิบปริมาตร 20 ไมโครลิตร กระจายตัวอยู่ทั่วบนผิวหน้าอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 3 5 และ 7 วัน แล้วทำการวัดความแตกต่างระหว่างบริเวณใสกับบริเวณที่มีเชื้อเจริญ

2. การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 ในอาหารเหลวกำหนดสูตร

2.1 การเตรียมหัวเชื้อ

นำยีสต์ *Pichia anomala* PY1 เพาะเลี้ยงไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด Yeast Malt Extract บ่มที่อุณหมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงมา 1 ลูป ลงในอาหารเหลว Yeast Malt Extract ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทำการบ่มในตู้บ่มเชื้อที่มีการเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

2.2 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอาหารเหลวกำหนดสูตร

นำหัวเชื้อที่ครบอายุ 18 ชั่วโมง 5 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน มี $NaNO_3$ 0.4 % เป็นแหล่งไนโตรเจน ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วทำการบ่มในตู้บ่มเชื้อที่มีการเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างเมื่อเวลา 7 วัน

2.3 การหาน้ำหนักแห้งของเซลล์

นำตัวอย่างที่เก็บได้มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที และควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนของเหลวที่ได้แยกเก็บไว้ ส่วนเซลล์แยกมาอบในถ้วยฟอร์ยที่รู้น้ำหนักแน่นอนแล้วที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงหรือจนกว่า

น้ำหนักจะคงที่ เมื่อครบเวลานำถ้วยฟอร์ยมาใส่ในโถดูด ความชื้น แล้วชั่งด้วยเครื่องชั่งละเอียด และคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้งเป็นกรัมต่อลิตร

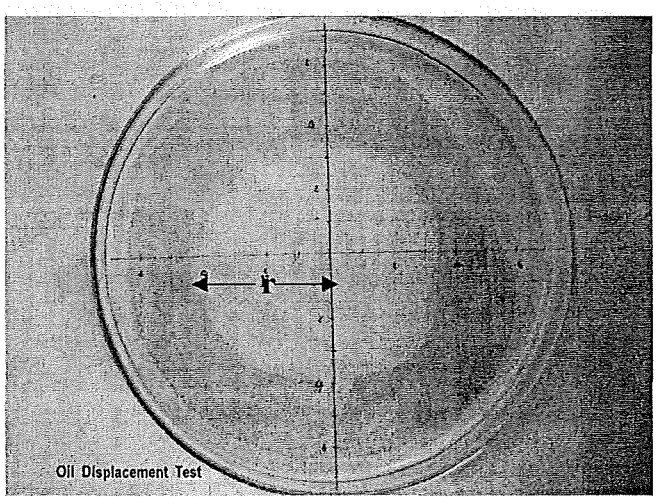
2.4 การวัดค่าความเป็นกรดด่าง

นำส่วนของเหลวที่ได้มาวัดค่าความเป็นกรดด่างด้วยเครื่อง (pH meter) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

2.5 การทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

2.5.1 การวัดค่าการกระจายน้ำมัน (Oil displacement test)

ทดสอบการกระจายน้ำมันตามวิธีของ Morikawa และคณะ, 1993 โดยตวงน้ำ 40 มิลลิลิตร ลงในจานแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 150 มิลลิเมตร ที่มีกระดาษกราฟรองอยู่เป็นมาตรวัดความกว้างของบริเวณใส (โดย 1 ช่องใหญ่ของกราฟมีค่าเท่ากับ 1 เซนติเมตร) หยดน้ำมันดิบ (crude oil) ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าของน้ำจะเกิดเป็นแผ่นฟิล์มแผ่ทั่วผิวน้ำ จากนั้นหยดตัวอย่างที่เป็นส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเซลล์ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นฟิล์มของน้ำมันดิบทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสของการกระจายตัวของน้ำมันที่ได้และคำนวณหาพื้นที่ของการกระจายน้ำมัน (Morikawa และคณะ, 1993)



รูปที่ 1.1 แสดงลักษณะการกระจายตัวของน้ำมัน (Morikawa และคณะ, 1993)

2.5.2 การวัดค่าแรงตึงผิว (Surface tension)

นำส่วนของของเหลวที่ไม่มีเซลล์มาวัดค่าแรงตึงผิวด้วยวิธี Du Nuoy Ring จากเครื่องวัดค่าแรงตึงผิว (Tensiometer) รุ่น K6 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับน้ำบริสุทธิ์ที่มีค่าแรงตึงผิว เป็น 72 mN/m

3. การกลายพันธุ์จุลินทรีย์

3.1 การกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต

3.1.1 นำยีสต์ *Pichia anomala* PY1 ที่เพาะเลี้ยงไว้บนอาหารแข็งจากสารสกัดยีสต์ และมอลต์ (YM agar) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงมา 1 ลูป ลงในอาหารเหลววายเอ็ม (YM broth) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทำการบ่มในตู้บ่มเชื้อที่มีการเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

3.1.2 นำตัวอย่างที่เก็บได้มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที และควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนของเหลวที่ได้ทิ้ง ส่วนเซลล์แยกมาทำการล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง จากนั้นทำให้เซลล์แขวนลอยอยู่ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 และปรับความหนาแน่นของเซลล์ให้อยู่ในช่วง 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตรด้วย Hemacytometer

3.1.3 นำเซลล์แขวนลอยปริมาตร 2 มิลลิลิตรไปฉายแสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ระยะห่างจากแสง 10 เซนติเมตร โดยมีระยะเวลาให้การฉายแสงต่างๆกันที่ 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12 และ 14 วินาที

3.1.4 กระจายเซลล์แขวนลอย 0.1 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตบนอาหารแข็งจากสารสกัดยีสต์ และมอลต์ ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งโคโลนีที่ได้ควรอยู่ในช่วง 100-300 โคโลนี

3.1.5 นับจำนวนโคโลนีที่เจริญ และคำนวณร้อยละการรอดชีวิต

3.1.6 นำโคโลนีที่เจริญไปทำการคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ตามวิธีในข้อ 4

3.2 การกลายพันธุ์ ด้วยสาร Ethyl methanesulfonate (EMS)

3.2.1 นำยีสต์ *Pichia anomala* PY1 ที่เพาะเลี้ยงไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด Yeast Malt Extract บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงมา 1 ลูป ลงในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทำการบ่มในตู้บ่มเชื้อที่มีการเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

3.2.2 นำหัวเชื้อที่อายุครบ 18 ชั่วโมงปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในหลอด eppendroff 2 หลอด ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนน้ำใสแล้วละลายเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อล้างเซลล์ให้อาหารที่คงเหลือหมด ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทำการล้างเซลล์อีกครั้งหนึ่ง

3.2.3 นำเซลล์ที่ได้ละลายด้วยฟอสเฟสบัฟเฟอร์ pH 7.0 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรแล้วนำไปนับด้วย Hemacytometer จากนั้นเจือจางให้ได้ความเข้มข้นเซลล์ประมาณ 1.0×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

3.2.4 เซลล์ประมาณ 1.0×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หลอดหนึ่งใช้เป็นชุดควบคุม ส่วนอีกหลอดหนึ่งเติมสาร Ethylmethane sulfonate ปริมาตร 20-40 ไมโครลิตร นำทั้งสองหลอดใส่เครื่องเขย่าหลอด eppendroff (Thermomixer) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนน้ำใสลงใน 0.5% โซเดียมไทโอซัลเฟต เพื่อหยุดปฏิกิริยาของสาร Ethylmethane sulfonate ละลายเซลล์ด้วย 5.0% โซเดียมไทโอซัลเฟตปราศจากเชื้อปริมาตร 200 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาของสาร Ethylmethane sulfonate แล้วย้ายสารละลายเซลล์ไปยังหลอด eppendroff ใหม่ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนน้ำใสลงใน 0.5% โซเดียมไทโอซัลเฟต เพื่อหยุดปฏิกิริยาของสาร Ethylmethane sulfonate หยุดปฏิกิริยาของสาร Ethylmethane sulfonate ในเซลล์อีก 2 ครั้ง ละลายเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร

3.2.5 ทำการเจือจางเชื้อทั้งชุดควบคุมและชุดที่ก่อการกลายพันธุ์ให้ได้โคโลนีประมาณ 30 – 300 โคโลนีต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ หยดสารละลายเซลล์ 100 ไมโครลิตร แล้วเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงแล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดและนำไปคัดเลือกหาสายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีขึ้นตามวิธีในข้อ 4

4. การทดสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของสายพันธุ์กลาย

4.1 การทดสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของสายพันธุ์กลายบนอาหารแข็ง

โดยนำสายพันธุ์กลายจากจานเพาะเลี้ยงเชื้อในข้อ 3 (ที่มีค่าร้อยละการรอดในช่วง 0.1 - 1%สำหรับกากลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต และ 35% สำหรับการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี) ที่ต้องการทดสอบมาขีดเป็นรูปกากบาดบนอาหารจากสารสกัดยีสต์ และมอลต์ ที่มีน้ำมันสังเคราะห์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร กระจายตัวอยู่ทั่ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วทำการวัดความกว้างบริเวณใสกับบริเวณที่มีเชื้อเจริญ คัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้ความกว้างของบริเวณใสมากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น จากนั้นนำมาคัดเลือกในข้อ 4.2

4.2 การทดสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของสายพันธุ์กลายในอาหารเหลว

การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของยีสต์สายพันธุ์กลายในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีกลูโคส 8% เป็นแหล่งคาร์บอน และ น้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน

นำยีสต์สายพันธุ์กลายที่เจริญบนอาหารแข็ง Yeast Malt Extract อายุ 24 ชั่วโมงมา 1 ลูป ลงในอาหารเหลว Yeast Malt Extract ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทำการบ่มในตู้บ่มเชื้อที่มีการเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำหัวเชื้อที่อายุ 18 ชั่วโมง 5 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลวกำหนดสูตรปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทำการบ่มในตู้บ่มเชื้อที่มีการเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่ 7 วันแล้วนำตัวอย่างที่เก็บได้มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้โดยนำส่วนของของเหลวไปทดสอบการกระจายน้ำมัน (Oil displacement test) และค่าแรงตึงผิว (Surface tension) เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงกว่าสายพันธุ์เดิมไว้ศึกษาต่อไป

4.3 ติดตามความเสถียรของยีสต์สายพันธุ์กลาย

นำยีสต์สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกจากข้อ 4.2 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Yeast Malt Extract มาขีดเป็นรูปกากบาทบนอาหารแข็ง Yeast Malt Extract ที่มีน้ำมันสังเคราะห์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร กระจายตัวอยู่ทั่ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วทำการวัดความแตกต่างระหว่างบริเวณใสกับบริเวณที่มีเชื้อเจริญ ทำเช่นนี้ไปหลายๆรุ่น (5 รุ่น) เพื่อดูความเสถียรในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

5. การติดตามการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของยีสต์สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้

5.1 การเตรียมหัวเชื้อและการผลิต

นำยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และยีสต์สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้ ที่ครบอายุ 18 ชั่วโมง 5 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลวกำหนดสูตร ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วทำการบ่มในตู้บ่มเชื้อที่มีการเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน

5.2 การติดตามการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และยีสต์สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้

นำตัวอย่างที่เก็บได้มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที และควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาทีนำส่วนของเซลล์ที่ได้แยกเก็บไว้เพื่อนำมาหาค่าน้ำหนักแห้ง ส่วนของเหลวมาทดสอบการวัดค่าความเป็นกรดด่าง การวัดค่าการกระจายน้ำมัน (Oil displacement test) และการวัดค่าแรงตึงผิว (Surface tension) ทำการทดลองทำนองเดียวกับวิธีในข้อที่ 2

6. หาภาวะที่เหมาะสมต่าง ๆในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของสายพันธุ์กลาย

6.1 การหาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงชีวภาพ

ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวิภาพ โดยเฉพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารกำหนดสูตรที่แปรผันแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส ซูโครส น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม และน้ำมันมะพร้าว โดยใช้ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเท่ากับ 4% เพาะเลี้ยงเชื้อตามวิธีการในข้อ 2.2 ติดตามการเจริญของจุลินทรีย์ โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดด่าง และนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาทำการวัดค่าแรงตึงผิว และการกระจายน้ำมัน โดยเปรียบเทียบชนิดของแหล่งคาร์บอน

6.2 การหาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้ในอาหารกำหนดสูตรโดยใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อ 6.1 แปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเป็น 0, 1, 2, 4 และ 8% ติดตามการเจริญของจุลินทรีย์โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น และประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยวัดค่าแรงตึงผิวและค่าการกระจายน้ำมัน

6.3 การหาชนิดแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารกำหนดสูตร โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อ 6.2 แปรผันแหล่งไนโตรเจนได้แก่ แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) และโซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) โดยใช้ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 0.4% เพาะเลี้ยงเชื้อตามวิธีในข้อ 6.2 ติดตามการเจริญของจุลินทรีย์ โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่า pH และนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาทำการวัดค่าแรงตึงผิวและการกระจายน้ำมันโดยเปรียบเทียบชนิดของแหล่งไนโตรเจน

6.4 การหาปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้ในอาหารกำหนดสูตร โดยใช้แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 6.3 แปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนเป็น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5% เพาะเลี้ยงเชื้อตามวิธีในข้อ 2.2 ติดตามการเจริญของจุลินทรีย์โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดด่าง และประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยวัดค่าแรงตึงผิวและค่าการกระจายน้ำมัน

7. การผลิตและสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

7.1 การเตรียมหัวเชื้อและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

นำยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และยีสต์สายพันธุ์กลาย ที่เพาะเลี้ยงไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด Yeast Malt Extract บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วทำการบ่มในตู้บ่มเชื้อที่มีการเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ตามระยะเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 2.2

7.2 การสกัดแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อจากข้อ 7.1 มาปั่นแยกเซลล์ออก ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำน้ำส่วนใสมาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตปริมาตร 1 เท่า นำส่วนล่างมาแยกสกัด 3 ครั้ง แล้วนำส่วนบนมาระเหยเอทิลอะซิเตต ออกด้วยเครื่อง evaporator ภายใต้สภาวะสุญญากาศ จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาละลายด้วยเมทานอล และล้างด้วยเฮกเซน 2 รอบ เพื่อกำจัดน้ำมันส่วนเกินออกไป (Thanomsub และคณะ, 2004) ระเหยเฮกเซนออกด้วยเครื่อง evaporator แล้วนำสารที่ได้มาหาน้ำหนักของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และนำสารที่ได้มาทดสอบการกระจายน้ำมัน จากนั้นตรวจสอบชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้เบื้องต้นด้วยวิธีโครมาโตกราฟี (Ito และ Inoue, 1982)

8. การทำบริสุทธิ์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธีโครมาโตกราฟี

8.1 การเตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย analytical Thin-Layer Chromatography

โดยใช้เฟสคงที่เป็นแผ่นซิลิกาเจล 60 ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, ประเทศเยอรมัน ขนาด 20x20 ซม. หนา 0.2 มม. และมีสารละลายคลอโรฟอร์มต่อเมทานอลต่อน้ำ ในอัตราส่วน 65:25:4 เป็นเฟสเคลื่อนที่ นำสารลดแรงตึงผิวที่เตรียมได้จากข้อ 7.2 มาละลายด้วยเอทิลอะซิเตตที่ความเข้มข้น 10-20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาจุดบนแผ่น TLC ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วนำไปใส่ภาชนะปิดที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่สูงประมาณ 1 เซนติเมตร ทิ้งไว้ประมาณ 1-2 ชั่วโมง จนเฟสเคลื่อนที่ไปเกือบสุดแผ่นหรือเหลือขอบประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร จากนั้นนำแผ่น TLC ออกมาทิ้งไว้จนแห้งนำมาตรวจผลหากรดไขมันด้วยการไปอบด้วยไอของไอโอดีนในภาชนะปิดสนิททิ้งไว้ประมาณ 15-20 นาที เปิดภาชนะทำเครื่องหมายบริเวณที่เกิดสีน้ำตาลเข้ม และทิ้งข้ามคืนให้ไอโอดีนระเหยจนหมด

จากนั้นขูดซิลิกาเจล 60 บริเวณที่ทำเครื่องหมายไว้มาสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเอทิลอะซิเตต 3 ครั้ง และวัดค่าการกระจายน้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบริสุทธิ์บางส่วนที่สกัดได้

9. การวัดค่าดรรชนีการเกิดอิมัลชัน (Emulsion Index)ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จากสายพันธุ์กลาย

การวัดค่าดรรชนีการเกิดอิมัลชัน (Emulsion Index) โดยทดสอบกับน้ำมันชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำมันคาโนลา และน้ำมันถั่วเหลือง นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เตรียมได้จากข้อ 7.2 มาละลายด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัพเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8 ที่มีความเข้มข้นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับน้ำมันแต่ละชนิด ในอัตราส่วนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อน้ำมันเท่ากับ 60:40 (โดยน้ำหนัก) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเจือจาง 2 เท่าด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัพเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8 นำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตรทันที เพื่อหาค่าการก่ออิมัลชัน และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายส่วนล่างมาเจือจาง 2 เท่าด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัพเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8 แล้ววัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร เพื่อคำนวนเปอร์เซ็นความเสถียรในการก่ออิมัลชัน (Emulsification stability) หรือค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน (Emulsion Index) (Shepherd และคณะ, 1995)

ผลการทดลอง

1. **การทดสอบความสามารถในการผลิตของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของยีสต์** *Pichia anomala* PY1 **บนอาหารแข็ง** Yeast Malt Extract

นำยีสต์ *Pichia anomala* PY1 เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Yeast Malt Extract ที่มีน้ำมันดิบปริมาตร 20 ไมโครลิตร กระจายตัวอยู่ทั่วบนผิวหน้าอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 3 5 และ7 วัน แล้วทำการวัดความกว้างบริเวณใสกับบริเวณที่มีเชื้อเจริญ เพื่อดูความสามารถในการผลิตของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ดังตารางที่ 3.1 แสดงบริเวณใสบนอาหารแข็ง Yeast Malt Extract ของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 บ่มที่อุณหภูมิ 30องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 3, 5 และ 7 วัน

ตารางที่ 3.1 ความกว้างของบริเวณใส และขนาดโคโลนีของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 เมื่อบ่มบนอาหารแข็ง Yeast Malt Extract ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 3, 5 และ 7 วัน

สายพันธุ์	ความกว้าง (ซม.)	การบ่มเชื้อ (วัน)			
		1	3	5	7
PY1	บริเวณใส	0	1.07	1.60	1.60
	ขนาดโคโลนี	0.32	0.53	0.80	0.80

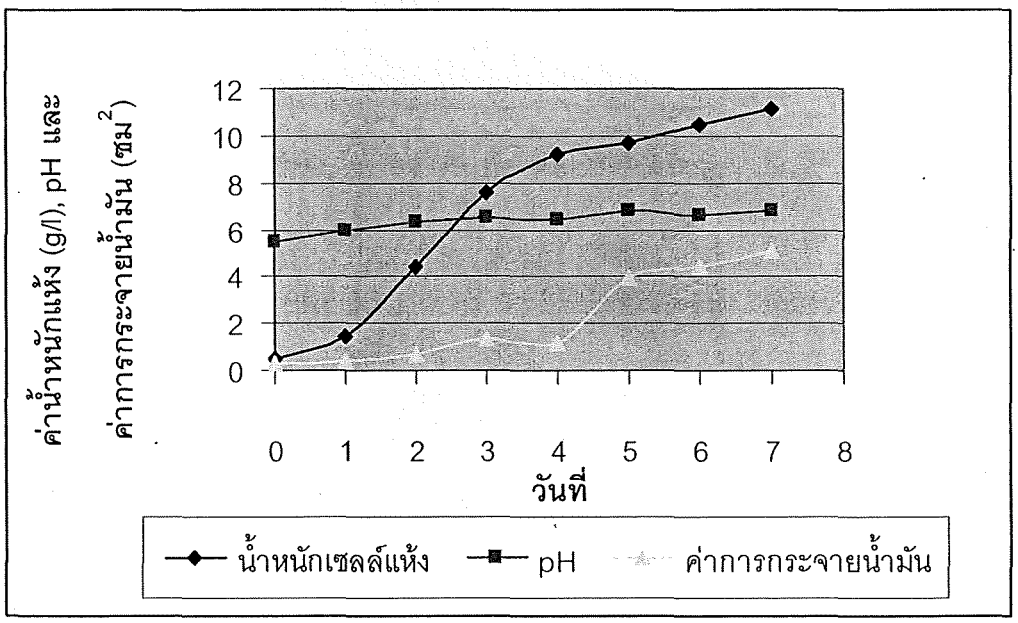
เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ *Pichia anomala* PY1 บนอาหารแข็ง Yeast Malt Extract สังเกตเห็นบริเวณใสได้ภายในเวลา 3 วัน และเมื่อบ่มเป็นเวลา 5-7 วัน บริเวณใสจะมีความกว้างมากขึ้นและคงที่ ในขณะที่ขนาดความกว้างของเชื้อที่เจริญบนอาหารจะเพิ่มขึ้นตั้งแต่ 1-3 วัน สูงสุดในวันที่ 5 และคงที่ไปจนถึงวันที่ 7

2. **การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของยีสต์** *Pichia anomala* PY1**ในอาหารเหลวกำหนดสูตร**

นำยีสต์ *Pichia anomala* PY1 ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน มี $NaNO_3$ 0.4 % เป็นแหล่งไนโตรเจน ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน วัดการเจริญของเชื้อโดยการทดสอบหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ วัดค่าความเป็นกรดด่าง และทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้โดย วัดพื้นที่การกระจายน้ำมัน (Oil displacement test) และการวัดค่าแรงตึงผิว (Surface tension)

ตารางที่ 3.2 แสดงค่าน้ำหนักแห้ง ค่าความเป็นกรดด่าง และพื้นที่การกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเซลล์ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ *Pichia anomala* PY1 ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน มี $NaNO_3$ 0.4 % เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา0 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน

วันที่	น้ำหนักเซลล์แห้ง(g/l)	pH	พื้นที่การกระจายน้ำมัน (cm^2)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)
0	0.46	5.50	0.30	62.00
1	1.47	5.99	0.41	60.48
2	4.38	6.33	0.69	52.89
3	7.59	6.54	1.33	50.7
4	9.18	6.39	1.17	49.94
5	9.72	6.79	3.94	36.83
6	10.43	6.63	4.37	37.25
7	11.16	6.81	5.07	38.1



รูปที่ 3.1 แสดงค่าน้ำหนักแห้ง ค่าความเป็นกรดด่าง พื้นที่การกระจายน้ำมัน และค่าแรงตึงผิวในของน้ำเลี้ยงเชื้อ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ *Pichia anomala* PY1 ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน มี $NaNO_3$ 0.4 % เป็นแหล่งไนโตรเจน

จากการทดลองพบว่าเซลล์จะเพิ่มจำนวนตั้งแต่วันที่ 0 จนถึงวันที่ 4 แล้วจะเริ่มคงที่ ตั้งแต่วันที่ 3 ถึงวันที่ 7 เซลล์สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดี โดยความสามารถในการกระจายน้ำมันของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 เริ่มสูงขึ้นในวันที่ 3-4 และให้พื้นที่การกระจายน้ำมันสูงสุดในวันที่ 7 เท่ากับ 5.07 ตารางเซนติเมตรและ มีค่าแรงตึงผิวต่ำสุดในวันที่ 5-7 เท่ากับ 36.83-38.1 มิลลินิวตันต่อเมตร

3. **การกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต**

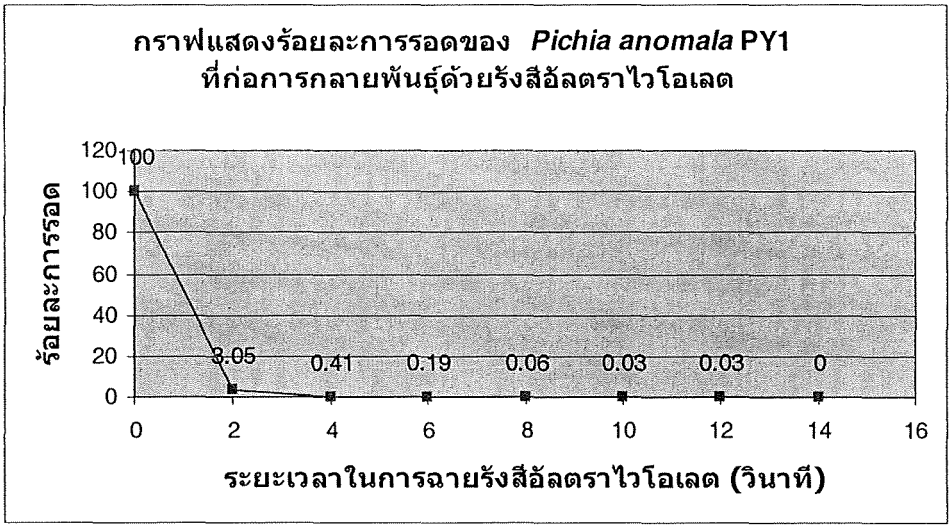
เมื่อทำการเจือจางเชื้อทั้งชุดควบคุมและชุดที่ก่อการกลายพันธุ์ที่เหมาะสมแล้วนำไปเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบเชื้อเจริญในชุดควบคุมและชุดที่ก่อการกลายพันธุ์ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3.3 และ 3.4

ตารางที่ 3.3 แสดงค่า CFU/ml. ของชุดควบคุม

ชุดควบคุม	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	เฉลี่ย
จำนวนโคโลนีต่อเพลท	311	450	380

ตารางที่ 3.4 แสดงค่า CFU/ml. ของชุดที่ก่อการกลายพันธุ์

ชุดก่อการกลายพันธุ์ที่ระยะเวลาต่างๆ (วินาที)	จำนวนโคโลนีต่อเพลท	ร้อยละการอยู่รอด
0	380	100
2	95	3.05
4	13	0.41
6	6	0.19
8	2	0.06
10	1	0.03
12	1	0.03
14	0	0



รูปที่ 3.2 แสดงกราฟแสดงร้อยละการรอดของ *Pichia anomala* PY1 ที่ก่อการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต ที่ช่วงเวลาต่างๆ

4. การทดสอบความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของยีสต์สายพันธุ์กลาย

4.1 การเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pichia anomala* PY1 และสายพันธุ์กลายบนอาหารแข็ง Yeast Malt Extract

นำสายพันธุ์กลาย MU จำนวน 104 สายพันธุ์มาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Yeast Malt Extract ที่มีน้ำมันดิบปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้ววัดความกว้างบริเวณใส และขนาดของโคโลนี เมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนอาหารแข็งเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ดังแสดงผลการทดลองในตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.5 การทดสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบนอาหารแข็ง Yeast Malt Extract ของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และสายพันธุ์กลาย

สายพันธุ์	ความกว้าง (ซม.)		ความต่าง (ซม.)
PY1	บริเวณใส	1.65	0.25
	ขนาดโคโลนี	1.4	
MU1	บริเวณใส	1.65	0.25
	ขนาดโคโลนี	1.4	
MU2	บริเวณใส	1.7	0.25
	ขนาดโคโลนี	1.45	

สายพันธุ์	ความกว้าง (ซม.)		ความต่าง (ซม.)
MU3	บริเวณใส	2	0.3
	ขนาดโคโลนี	1.7	
MU5	บริเวณใส	1.7	0.2
	ขนาดโคโลนี	1.5	
MU6	บริเวณใส	1.6	0
	ขนาดโคโลนี	1.6	
MU7	บริเวณใส	1.9	0.2
	ขนาดโคโลนี	1.7	
MU8	บริเวณใส	1.65	0.15
	ขนาดโคโลนี	1.5	
MU9	บริเวณใส	1.7	0.25
	ขนาดโคโลนี	1.45	
MU10	บริเวณใส	1.4	0.1
	ขนาดโคโลนี	1.3	
MU11	บริเวณใส	1.8	0.3
	ขนาดโคโลนี	1.5	
MU12	บริเวณใส	1.7	0.3
	ขนาดโคโลนี	1.4	
MU13	บริเวณใส	1.4	0.2
	ขนาดโคโลนี	1.2	
MU14	บริเวณใส	1.7	0.3
	ขนาดโคโลนี	1.4	
MU15	บริเวณใส	1.6	0
	ขนาดโคโลนี	1.6	
MU16	บริเวณใส	1.4	0
	ขนาดโคโลนี	1.4	

สายพันธุ์	ความกว้าง (ซม.)		ความต่าง (ซม.)
MU17	บริเวณใส	1.5	
	ขนาดโคโลนี	1.5	0
MU18	บริเวณใส	1.5	
	ขนาดโคโลนี	1.5	0
MU19	บริเวณใส	1.5	
	ขนาดโคโลนี	1.5	0
MU20	บริเวณใส	1.35	
	ขนาดโคโลนี	1.35	0
MU21	บริเวณใส	1.55	
	ขนาดโคโลนี	1.4	0.15
MU22	บริเวณใส	1.6	
	ขนาดโคโลนี	1.4	0.2
MU23	บริเวณใส	1.55	
	ขนาดโคโลนี	1.35	0.2
MU24	บริเวณใส	1.55	
	ขนาดโคโลนี	1.4	0.15
MU25	บริเวณใส	1.75	
	ขนาดโคโลนี	1.45	0.3
MU26	บริเวณใส	1.45	
	ขนาดโคโลนี	1.3	0.15
MU27	บริเวณใส	1.7	
	ขนาดโคโลนี	1.45	0.25
MU28	บริเวณใส	1.85	
	ขนาดโคโลนี	1.6	0.25
MU29	บริเวณใส	1.45	
	ขนาดโคโลนี	1.2	0.25

สายพันธุ์	ความกว้าง (ซม.)		ความต่าง (ซม.)
MU30	บริเวณใส	1.5	
	ขนาดโคโลนี	1.35	0.15
MU31	บริเวณใส	1.6	
	ขนาดโคโลนี	1.4	0.2
MU32	บริเวณใส	1.5	
	ขนาดโคโลนี	1.3	0.2
MU33	บริเวณใส	1.6	
	ขนาดโคโลนี	1.4	0.2
MU34	บริเวณใส	1.5	
	ขนาดโคโลนี	1.45	0.05
MU35	บริเวณใส	1.7	
	ขนาดโคโลนี	1.5	0.2
MU36	บริเวณใส	1.55	
	ขนาดโคโลนี	1.45	0.1
MU37	บริเวณใส	1.7	
	ขนาดโคโลนี	1.6	0.1
MU38	บริเวณใส	1.55	
	ขนาดโคโลนี	1.4	0.15
MU39	บริเวณใส	1.4	
	ขนาดโคโลนี	1.3	0.1
MU40	บริเวณใส	1.3	
	ขนาดโคโลนี	1.3	0
MU41	บริเวณใส	1.6	
	ขนาดโคโลนี	1.45	0.15
MU42	บริเวณใส	1.6	
	ขนาดโคโลนี	1.45	0.15

สายพันธุ์	ความกว้าง (ซม.)		ความต่าง (ซม.)
MU43	บริเวณใส	1.7	
	ขนาดโคโลนี	1.45	0.25
MU44	บริเวณใส	1.45	
	ขนาดโคโลนี	1.4	0.05
MU45	บริเวณใส	1.95	
	ขนาดโคโลนี	1.55	0.4
MU46	บริเวณใส	2.2	
	ขนาดโคโลนี	1.5	0.7
MU47	บริเวณใส	2.1	
	ขนาดโคโลนี	1.5	0.6
MU48	บริเวณใส	1.7	
	ขนาดโคโลนี	1.35	0.35
MU49	บริเวณใส	1.9	
	ขนาดโคโลนี	1.45	0.45
MU50	บริเวณใส	1.6	
	ขนาดโคโลนี	1.4	0.2
MU51	บริเวณใส	1.75	
	ขนาดโคโลนี	1.6	0.15
MU52	บริเวณใส	1.8	
	ขนาดโคโลนี	1.5	0.3
MU53	บริเวณใส	1.9	
	ขนาดโคโลนี	1.5	0.4
MU54	บริเวณใส	1.5	
	ขนาดโคโลนี	1.55	0.05
MU55	บริเวณใส	1.6	
	ขนาดโคโลนี	1.4	0.2

สายพันธุ์	ความกว้าง (ซม.)		ความต่าง (ซม.)
MU56	บริเวณใส	1.8	0.3
	ขนาดโคโลนี	1.5	
MU57	บริเวณใส	1.75	0.25
	ขนาดโคโลนี	1.5	
MU58	บริเวณใส	1.8	0.2
	ขนาดโคโลนี	1.6	
MU59	บริเวณใส	1.8	0.3
	ขนาดโคโลนี	1.5	
MU60	บริเวณใส	1.7	0.2
	ขนาดโคโลนี	1.5	
MU61	บริเวณใส	1.95	0.5
	ขนาดโคโลนี	1.45	
MU62	บริเวณใส	1.8	0.2
	ขนาดโคโลนี	1.6	
MU63	บริเวณใส	1.9	0.3
	ขนาดโคโลนี	1.6	
MU64	บริเวณใส	1.8	0.2
	ขนาดโคโลนี	1.6	
MU65	บริเวณใส	1.6	0.2
	ขนาดโคโลนี	1.4	
MU66	บริเวณใส	1.6	0.3
	ขนาดโคโลนี	1.3	
MU67	บริเวณใส	1.7	0.2
	ขนาดโคโลนี	1.5	
MU73	บริเวณใส	2.0	0.4
	ขนาดโคโลนี	1.6	

สายพันธุ์	ความกว้าง (ซม.)		ความต่าง (ซม.)
MU74	บริเวณใส	1.8	0.2
	ขนาดโคโลนี	1.6	
MU75	บริเวณใส	2.4	0.75
	ขนาดโคโลนี	1.65	
MU76	บริเวณใส	1.75	0.25
	ขนาดโคโลนี	1.5	
MU77	บริเวณใส	2.1	0.4
	ขนาดโคโลนี	1.7	
MU78	บริเวณใส	1.8	0.2
	ขนาดโคโลนี	1.6	
MU79	บริเวณใส	1.8	0.3
	ขนาดโคโลนี	1.5	
MU80	บริเวณใส	2.0	0.3
	ขนาดโคโลนี	1.7	
MU81	บริเวณใส	2.0	0.2
	ขนาดโคโลนี	1.8	
MU82	บริเวณใส	1.7	0.3
	ขนาดโคโลนี	1.4	
MU83	บริเวณใส	1.8	0.3
	ขนาดโคโลนี	1.5	
MU84	บริเวณใส	1.8	0.3
	ขนาดโคโลนี	1.5	
MU85	บริเวณใส	1.6	0.2
	ขนาดโคโลนี	1.4	
MU86	บริเวณใส	1.9	0.4
	ขนาดโคโลนี	1.5	

สายพันธุ์	ความกว้าง (ซม.)		ความต่าง (ซม.)
MU87	บริเวณใส	1.9	
	ขนาดโคโลนี	1.55	0.35
MU88	บริเวณใส	1.7	
	ขนาดโคโลนี	1.6	0.1
MU89	บริเวณใส	1.8	
	ขนาดโคโลนี	1.6	0.2
MU90	บริเวณใส	1.8	
	ขนาดโคโลนี	1.6	0.2
MU91	บริเวณใส	1.8	
	ขนาดโคโลนี	1.7	0.1
MU92	บริเวณใส	2.0	
	ขนาดโคโลนี	1.8	0.2
MU93	บริเวณใส	1.8	
	ขนาดโคโลนี	1.5	0.3
MU94	บริเวณใส	1.9	
	ขนาดโคโลนี	1.4	0.5
MU95	บริเวณใส	1.7	
	ขนาดโคโลนี	1.7	0
MU96	บริเวณใส	1.65	
	ขนาดโคโลนี	1.45	0.2
MU97	บริเวณใส	1.9	
	ขนาดโคโลนี	1.8	0.1
MU98	บริเวณใส	1.9	
	ขนาดโคโลนี	1.7	0.2
MU99	บริเวณใส	1.8	
	ขนาดโคโลนี	1.7	0.1

สายพันธุ์	ความกว้าง (ซม.)		ความต่าง (ซม.)
MU100	บริเวณใส	2.0	
	ขนาดโคโลนี	1.7	0.3
MU101	บริเวณใส	1.7	
	ขนาดโคโลนี	1.5	0.2
MU102	บริเวณใส	1.8	
	ขนาดโคโลนี	1.5	0.3
MU103	บริเวณใส	1.65	
	ขนาดโคโลนี	1.6	0.05
MU104	บริเวณใส	1.65	
	ขนาดโคโลนี	1.5	0.15

4.2 การเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pichia anomala* PY1 และสายพันธุ์กลายในอาหารเหลว

4.2.1 อาหารเหลวที่มีกลูโคส 8% เป็นแหล่งคาร์บอน

เมื่อได้ทำการเลี้ยงเชื้อยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และสายพันธุ์กลาย ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีกลูโคส 8% เป็นแหล่งคาร์บอน แล้วทำการบ่มในตู้บ่มเชื้อที่มีการเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่ 7 วัน เพื่อติดตามการการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยการวัดพื้นที่การกระจายน้ำมัน และค่าแรงตึงผิว ดังแสดงในตารางที่ 3.6

ตารางที่ 3.6 แสดงการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของยีสต์สายพันธุ์กลายเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ PY1 ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีกลูโคส 8% เป็นแหล่งคาร์บอนเป็นเวลา 7 วัน

สายพันธุ์	พื้นที่การกระจายน้ำมัน (cm^2)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	ΔST (mN/m)
PY1	1.13	52.5	5
MU 1	0.79	53	4.5
MU 2	0.38	54	3.5
MU 3	0.95	51	6.5

สายพันธุ์	พื้นที่การกระจายน้ำมัน (cm^2)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	ΔST (mN/m)
MU 5	0.38	53.75	3.75
MU 6	0.95	55.15	2.35
MU 7	0.07	51.5	6
MU 8	0.07	52.5	5
MU 9	0.5	51.85	5.65
MU 10	1.77	49.5	8
MU 11	0.28	52.05	5.45
MU 12	0.64	45	12.5
MU 13	0.79	48.9	8.6
MU 14	1.33	48.65	8.85
MU 15	0.5	44.4	13.1
MU 16	0.95	45.4	12.1
MU 17	1.13	47.25	10.25
MU 18	0.79	44.25	13.25
MU 19	1.33	45.45	12.05
MU 20	1.13	50.3	7.2
MU 21	4.52	52.35	5.15
MU 22	1.13	54.5	3
MU 23	2.83	50.55	6.95
MU 24	2.54	49.5	8
MU 25	0.95	47.65	9.85
MU 26	1.13	53.25	4.25
MU 27	0.64	50	7.5
MU 28	2.01	44	13.5
MU 29	0.5	49.15	8.35
MU 30	0.79	44.75	12.75

สายพันธุ์	พื้นที่การกระจายน้ำมัน (cm^2)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	ΔST (mN/m)
MU 31	0.5	53.2	4.3
MU 32	0.64	49.75	7.75
MU 33	0.38	51.35	6.15
MU 34	0.79	51.1	6.4
MU 35	0.64	49.35	8.15
MU 36	0.38	52.25	5.25
MU 37	0.79	47	10.5
MU 38	0.5	46	11.5
MU 39	0.79	56.25	1.25
MU 40	1.13	55	2.5
MU 41	0.95	49	8.5
MU 42	0.64	52.4	5.1
MU 43	0.79	49.5	8
MU 44	0.79	49.5	8

* ΔST คือค่าความแตกต่างของแรงตึงผิวเมื่อเทียบกับวันที่ 0 (57.5mN/m)

เมื่อทำการก่อการกลายพันธุ์ *Pichia anomala* PY1 ที่มีความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นประมาณ 1.0 x 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตรด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต ที่ช่วงเวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 14 วินาที พบว่าจะได้สายพันธุ์กลายที่มีค่าการอยู่รอดอยู่ในช่วงที่เหมาะสมที่เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต คือ 0.1-1 % (ตารางที่ 3.4) โดยทำการคัดเลือกสายพันธุ์กลายเบื้องต้น 104 สายพันธุ์จากบนอาหารแข็ง Yeast Malt Extract ที่มีน้ำมันดิบปริมาตร 20 ไมโครลิตรกระจายตัวอยู่ทั่ว

จากนั้นทำการสุ่มสายพันธุ์กลายจำนวน 44 สายพันธุ์มาทดลองเลี้ยงในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีกลูโคส 8% เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มในตู้บ่มเชื้อที่มีการเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน พบว่ามีสายพันธุ์กลาย 7 สายพันธุ์คือ MU10, MU14, MU19, MU21, MU23, MU24 และ MU28 ให้พื้นที่การกระจายน้ำมันสูงกว่าสายพันธุ์ PY1 ดังแสดงในตารางที่ 3.6

ในจำนวนนี้พบว่ามี 26 สายพันธุ์ ที่ให้ ΔST ของน้ำเลี้ยงเชื้อสูงกว่าสายพันธุ์ PY1 ดังแสดงในตารางที่ 3.6 จึงทำการคัดเลือกสายพันธุ์ MU14, MU19, MU21, MU23, MU24 และ MU28 ไว้ศึกษาต่อไป

4.2.2 อาหารเหลวที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน

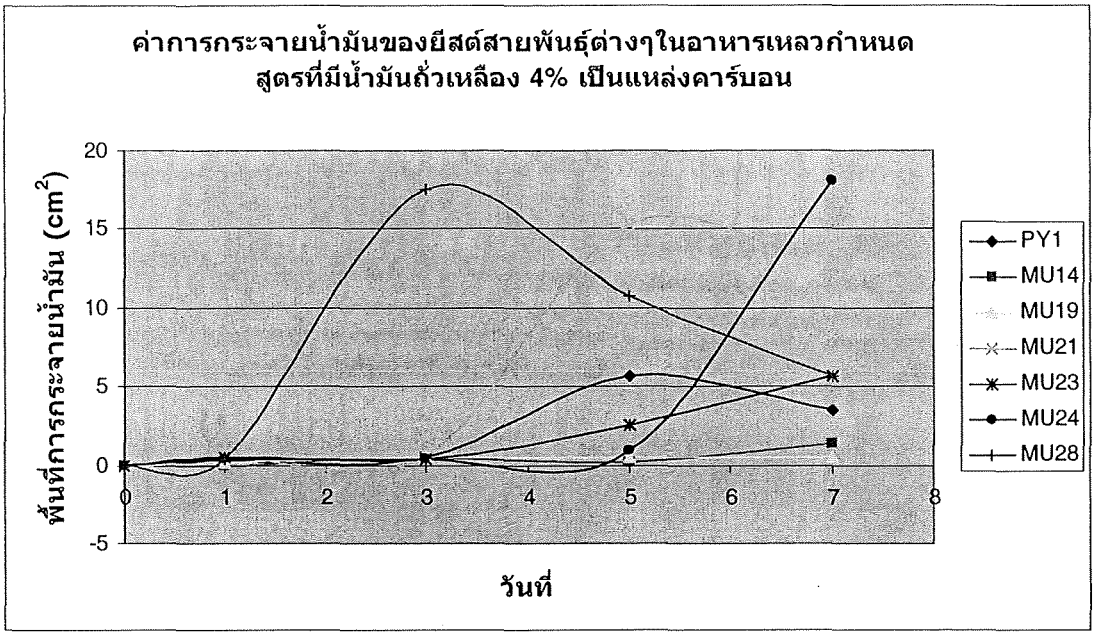
โดยเมื่อได้ทำการเลี้ยงเชื้อยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และสายพันธุ์กลาย MU14, MU19, MU21, MU23, MU24 และ MU28 ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน แล้วทำการบ่มในตู้บ่มเชื้อที่มีการเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่ 1, 3, 5 และ 7 วัน เพื่อติดตามการเจริญโดยการหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดด่าง และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยการวัดพื้นที่การกระจายน้ำมัน และค่าแรงตึงผิว ดังแสดงในตารางที่ 3.7

ตารางที่ 3.7 แสดง พื้นที่การกระจายน้ำมัน ค่าแรงตึงผิวในของน้ำเลี้ยงเชื้อ ค่าความเป็นกรดด่างและค่าน้ำหนักแห้ง เมื่อทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และสายพันธุ์กลายในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน

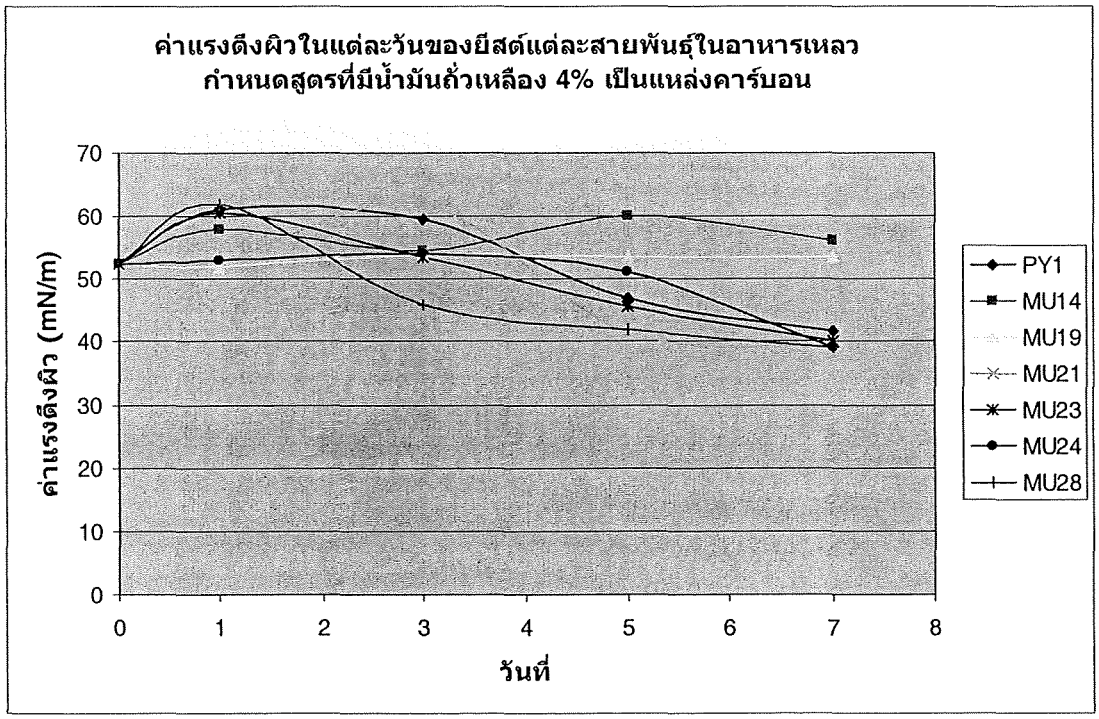
สายพันธุ์	วันที่	พื้นที่การกระจายน้ำมัน (cm^2)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	ΔST (mN/m)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l)
PY1	1	0.23	61	8.5	5.9	2.506
	3	0.5	59.5	7	6.04	6.595
	5	5.72	46.8	5.7	6.76	10.183
	7	3.46	41.7	10.8	7.2	11.414
MU14	1	0	58	5.5	5.84	1.921
	3	0.5	54.5	2	6.01	6.657
	5	0.2	60	7.5	6.26	10.068
	7	1.33	56	3.5	6.82	10.411
MU19	1	0.13	52	0.5	6.21	2.43
	3	0.5	54	1.5	6.01	7.26
	5	0.5	53.5	1	6.2	10.84
	7	0.5	53.5	1	6.75	8.46

สายพันธุ์	วันที่	พื้นที่การกระจายน้ำมัน (cm^2)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	ΔST (mN/m)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l)
MU21	1	0.64	53	0.5	6	2.81
	3	0.64	62	9.5	6.1	8.45
	5	15.26	41.5	11	7.19	9.13
	7	12.56	39	13.5	7.72	15.59
MU23	1	0.5	60.5	8	5.91	2.45
	3	0.38	53.5	1	6.25	6.49
	5	2.54	45.5	7	7.02	12.23
	7	5.72	40	12.5	7.21	14.35
MU24	1	0.38	53	0.5	5.98	3.15
	3	0.38	54	1.5	6.1	9.43
	5	0.95	51	1.5	7.16	10.1
	7	18.09	39	13.5	7.39	11.97
MU28	1	0.38	62	9.5	5.91	2.75
	3	17.56	46	6.5	6.53	7.738
	5	10.75	42	10.5	7.22	10.5
	7	5.72	39	13.5	7.62	13.082

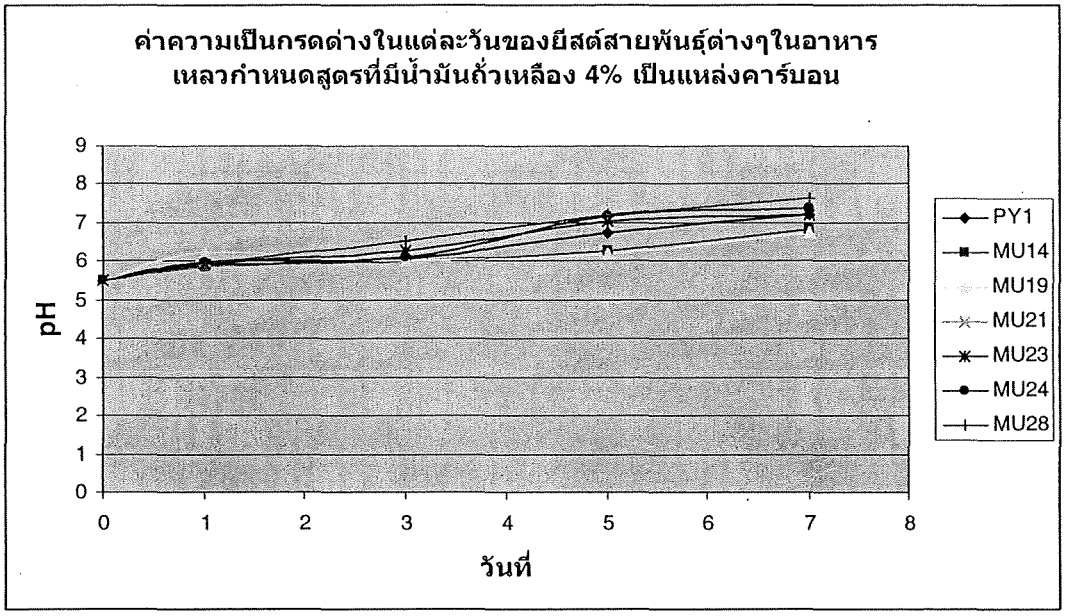
* ΔST คือค่าความแตกต่างของแรงตึงผิวเมื่อเทียบกับวันที่ 0 (52.5mN/m)



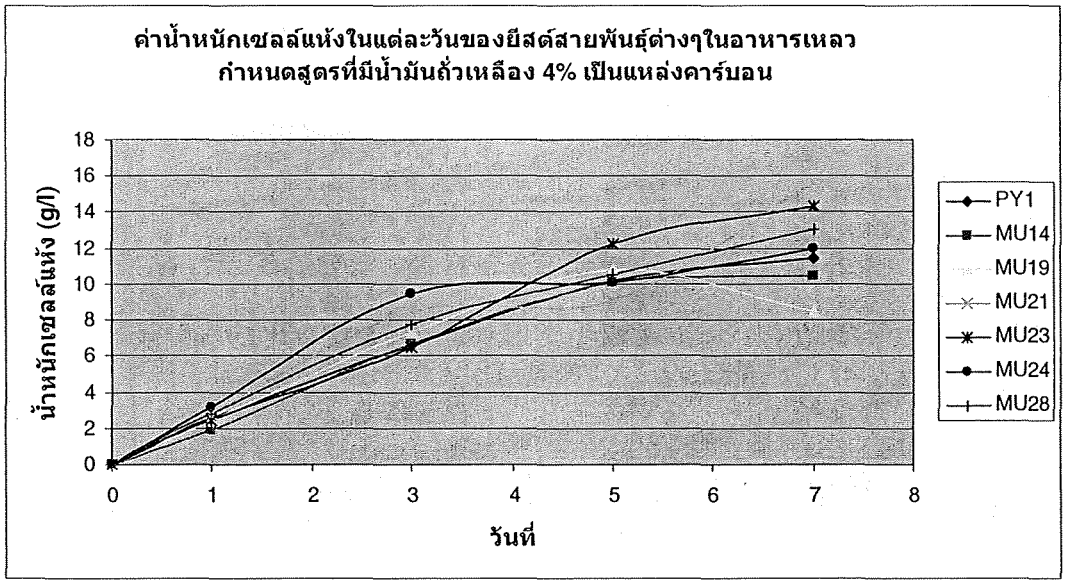
รูปที่ 3.3 แสดงค่าพื้นที่การกระจายน้ำมันของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และสายพันธุ์กลายในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 3.4 แสดงค่าแรงดึงผิวในแต่ละวันของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และสายพันธุ์กลายในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 3.5 แสดงค่าความเป็นกรดด่างในแต่ละวันของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และสายพันธุ์กลายในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 3.6 แสดงค่าน้ำหนักเซลล์แห้งในแต่ละวันของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และสายพันธุ์กลายในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน

จากการทดลองเลี้ยงสายพันธุ์ PY1 และสายพันธุ์กลายในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4%เป็นแหล่งคาร์บอนพบว่ายีสต์สายพันธุ์ PY1 และสายพันธุ์กลายสามารถให้พื้นที่การกระจายน้ำมันได้ดีมากกว่าการใช้อาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีกลูโคส 8% เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งผลการทดลองพบว่าสายพันธุ์กลาย MU21 สามารถให้พื้นที่กระจายน้ำมันได้ดีที่สุดในวันที่ 5 เป็น 15.26 ตาราง

เซนติเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ PY1 แล้ว MU21 สามารถให้พื้นที่กระจายน้ำมันได้ดีกว่า PY1 ประมาณ 2.67 เท่า และลดค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก 52.5 มิลลินิวตันต่อเมตรเป็น 41.5 มิลลินิวตันต่อเมตร สายพันธุ์กลาย MU24 สามารถให้พื้นที่กระจายน้ำมันได้ดีที่สุดในวันที่ 7 เป็น 18.09 ตารางเซนติเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ PY1 แล้วสามารถให้พื้นที่กระจายน้ำมันได้ดีกว่า PY1 ประมาณ 3.16 เท่า และลดค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก 52.5 มิลลินิวตันต่อเมตรเป็น 39 มิลลินิวตันต่อเมตร ส่วนสายพันธุ์กลาย MU28 สามารถลดค่าแรงตึงผิวได้มากที่สุดในวันที่ 7 จาก 52.5 มิลลินิวตันต่อเมตร เป็น 39 มิลลินิวตันต่อเมตร ขณะที่ให้พื้นที่กระจายน้ำมันสูงสุดเท่ากับ 17.56 ตารางเซนติเมตรในวันที่3 ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน และเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ PY1 แล้วสามารถให้พื้นที่กระจายน้ำมันได้ดีกว่า PY1 ประมาณ 3.1 เท่า

5. ติดตามความเสถียรของยีสต์สายพันธุ์กลาย

นำสายพันธุ์กลาย MU14 ถึง MU28 จำนวน 6 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ PY1 มาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Yeast Malt Extract ที่มีน้ำมันดิบปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้ววัดค่าบริเวณใสนอกสุด และขนาดของโคโลนี (มีหน่วยเป็นเซนติเมตร) เปรียบเทียบความสามารถในการกระจายน้ำมันบนอาหารแข็งในแต่ละรุ่น ดังแสดงในตารางที่ 3.8

ตารางที่ 3.8 แสดงบริเวณใสบนอาหารแข็ง Yeast Malt Extract ของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และายพันธุ์กลายในแต่ละรุ่น

สายพันธุ์	ความกว้าง (ซม.)	รุ่น									
		1	ความต่าง (ซม.)	2	ความต่าง (ซม.)	3	ความต่าง (ซม.)	4	ความต่าง (ซม.)	5	ความต่าง (ซม.)
PY1	บริเวณใส	1.6	0.2	1.6	0.2	1.55	0.25	1.9	0.5	1.65	0.25
	ขนาดโคโลนี	1.4		1.4		1.3		1.4		1.4	
MU14	บริเวณใส	1.5	0.3	1.55	0.2	1.6	0.15	1.7	0.25	1.7	0.3
	ขนาดโคโลนี	1.2		1.3		1.45		1.45		1.4	

สายพันธุ์	ความกว้าง (ซม.)	รุ่น									
		1	ความต่าง (ซม.)	2	ความต่าง (ซม.)	3	ความต่าง (ซม.)	4	ความต่าง (ซม.)	5	ความต่าง (ซม.)
MU19	บริเวณใส	1.85	0.25	1.5	0.1	1.6	0.15	1.7	0.25	1.5	0
	ขนาดโคโลนี	1.6		1.4		1.45		1.45		1.5	
MU21	บริเวณใส	1.7	0.2	1.4	0.1	1.4	0.15	1.8	0.2	1.55	0.15
	ขนาดโคโลนี	1.5		1.3		1.25		1.6		1.4	
MU23	บริเวณใส	1.5	0.2	1.65	0.2	1.6	0.2	1.8	0.4	1.55	0.2
	ขนาดโคโลนี	1.3		1.45		1.4		1.4		1.35	
MU24	บริเวณใส	1.8	0.35	1.65	0.25	1.5	0.2	1.6	0.15	1.55	0.15
	ขนาดโคโลนี	1.45		1.4		1.3		1.45		1.4	
MU28	บริเวณใส	1.75	0.25	1.5	0.1	1.6	0.1	1.7	0.1	1.85	0.25
	ขนาดโคโลนี	1.5		1.4		1.5		1.6		1.6	

จากการทดลองพบว่าทั้งนี้ยีสต์สายพันธุ์กลายทั้ง 6 สายพันธุ์สามารถให้บริเวณใสบนอาหารแข็ง Yeast Malt Extract ที่มีน้ำมันดิบกระจายอยู่ทั่วทั้ง 5 รุ่นมีค่า 1.3 ถึง 1.8 เซนติเมตร และมีค่าความต่างเฉลี่ยเท่ากับ 0.25

6. **การกลายพันธุ์ด้วยสาร** Ethylmethane sulfonate

เมื่อทำการเจือจางเชื้อทั้งชุดควบคุมและชุดที่ก่อการกลายพันธุ์ที่เหมาะสมแล้วนำไปเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบเชื้อเจริญในชุดควบคุมและชุดที่ก่อการกลายพันธุ์ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3.9 และ 3.10

ตารางที่ 3.9 แสดงค่า CFU/ml. ของชุดควบคุม

ชุดควบคุม	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 3	เฉลี่ย
จำนวนโคโลนีต่อเพลท	210	200	233	214

ตารางที่ 3.10 แสดงค่า CFU/ml. ของชุดที่ก่อการกลายพันธุ์

ชุดก่อการกลายพันธุ์	จำนวนโคโลนีต่อเพลท
ชุดที่ 1	75
ชุดที่ 2	87
ชุดที่ 3	94
ชุดที่ 4	83
ชุดที่ 5	56
ชุดที่ 6	47
ชุดที่ 7	87
ชุดที่ 8	67
ชุดที่ 9	84
รวม	680
เฉลี่ย	76

จำนวนเซลล์ในชุดที่ก่อการกลายพันธุ์ 7.6×10^7 CFU/ml

อัตราการอยู่รอดคิดเป็น $\frac{76}{214} \times 100 = 35.5\ \%$

7. การทดสอบความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของยีสต์สายพันธุ์กลาย

7.1 การทดสอบความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของยีสต์สายพันธุ์กลายบนอาหารแข็ง Yeast Malt Extract

โดยนำยีสต์สายพันธุ์ *Pichia anomala* PY1 และยีสต์สายพันธุ์กลายเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด Yeast Malt Extract บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงมาขีดเป็นรูปกากบาดบนอาหารแข็ง Yeast Malt Extract ที่มีน้ำมันดิบปริมาตร 20 ไมโครลิตร กระจายตัวอยู่ทั่วบนผิวหน้าอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วทำการวัดความกว้างของบริเวณใสกับบริเวณที่มีเชื้อเจริญ

ตารางที่ 3.11 ทดสอบความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบนอาหารแข็ง Yeast Malt Extract ของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และยีสต์สายพันธุ์กลาย บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

สายพันธุ์	ความกว้าง (ซม.)		ความต่าง (ซม.)
PY1	บริเวณใส	1.07	0.54
	ขนาดโคโลนี	0.53	
PY 12	บริเวณใส	1.23	0.75
	ขนาดโคโลนี	0.48	
PY 19	บริเวณใส	1.3	0.8
	ขนาดโคโลนี	0.5	
PY 37	บริเวณใส	0.9	0.55
	ขนาดโคโลนี	0.35	
PY 44	บริเวณใส	1.27	0.67
	ขนาดโคโลนี	0.6	
PY 48	บริเวณใส	1.3	0.77
	ขนาดโคโลนี	0.53	
PY 49	บริเวณใส	1.47	0.9
	ขนาดโคโลนี	0.57	

สายพันธุ์	ความกว้าง (ซม.)		ความต่าง (ซม.)
PY 101	บริเวณใส	1.9	0.5
	ขนาดโคโลนี	1.4	
PY 105	บริเวณใส	2.1	0.3
	ขนาดโคโลนี	1.8	
PY 108	บริเวณใส	1.7	0.2
	ขนาดโคโลนี	1.5	
PY 113	บริเวณใส	2.1	0.5
	ขนาดโคโลนี	1.6	
PY 123	บริเวณใส	1.9	0.5
	ขนาดโคโลนี	1.4	
PY 125	บริเวณใส	2	0.5
	ขนาดโคโลนี	1.5	
PY1 148	บริเวณใส	2	0.5
	ขนาดโคโลนี	1.5	
PY 152	บริเวณใส	2	0.5
	ขนาดโคโลนี	1.5	
PY 154	บริเวณใส	2.1	0.5
	ขนาดโคโลนี	1.6	
PY 165	บริเวณใส	1.9	0.5
	ขนาดโคโลนี	1.4	
PY 170	บริเวณใส	1.7	0.3
	ขนาดโคโลนี	1.4	
PY 171	บริเวณใส	1.9	0.4
	ขนาดโคโลนี	1.5	
PY 173	บริเวณใส	2	0.5
	ขนาดโคโลนี	1.5	

สายพันธุ์	ความกว้าง (ซม.)		ความต่าง (ซม.)
PY 187	บริเวณใส	2.1	0.3
	ขนาดโคโลนี	1.8	
PY 189	บริเวณใส	1.43	0.8
	ขนาดโคโลนี	0.63	
PY 190	บริเวณใส	2	0.6
	ขนาดโคโลนี	1.4	
PY 191	บริเวณใส	2.1	0.4
	ขนาดโคโลนี	1.7	
PY 192	บริเวณใส	1.8	0.4
	ขนาดโคโลนี	1.4	
PY 193	บริเวณใส	2.5	0.6
	ขนาดโคโลนี	1.9	
PY 194	บริเวณใส	1.9	0.7
	ขนาดโคโลนี	1.2	
PY 195	บริเวณใส	1.9	0.5
	ขนาดโคโลนี	1.4	
PY 202	บริเวณใส	1.7	0.2
	ขนาดโคโลนี	1.5	
PY 203	บริเวณใส	1.7	0.8
	ขนาดโคโลนี	0.9	

เมื่อทำการกลายพันธุ์ และได้ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ PY 12 PY 19 PY 37 PY 44 PY 48 PY 49 PY 189 PY 193 PY 194 และPY 203 มาศึกษาต่อ เนื่องจากสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ สามารถวัดความกว้างของบริเวณใสได้มากกว่ายีสต์ *Pichia anomala* PY1 นั่นคือมีค่าความต่างของการวัดความกว้างของบริเวณใสกับบริเวณที่มีเชื้อเจริญมากกว่า 0.54 เซนติเมตร ไปทำการทดลองผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอาหารเหลวกำหนดสูตรต่อไป

7.2 การทดสอบความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของยีสต์สายพันธุ์กลายในอาหารเหลวกำหนดสูตร

นำยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และยีสต์สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน มี $NaNO_3$ 0.4 % เป็นแหล่งไนโตรเจน ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่ 7 วัน วัดการเจริญของเชื้อ โดยการทดสอบหาทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้โดย วัดพื้นที่การกระจายน้ำมัน (Oil displacement test) และการวัดค่าแรงตึงผิว (Surface tension)

ตารางที่ 3.12 แสดงค่า ΔST ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้โดยของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และยีสต์สายพันธุ์กลายในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอนเป็นเวลา 7 วัน

สายพันธุ์	พื้นที่การกระจายน้ำมัน (cm^2)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	ΔST* (mN/m)
PY 1	4.99	38.59	22.91
PY 12	6.47	36.51	24.99
PY 19	4.23	40.11	21.39
PY 37	2.18	46.93	14.57
PY 44	5.31	38.95	22.55
PY 48	7.07	40.18	21.32
PY 49	9.19	40.61	20.89
PY 189	10.07	39.95	21.55
PY 193	3.14	47.89	13.61
PY 194	3.73	43.22	18.28
PY 203	0.79	49.50	12.00

*ΔST คือค่าความแตกต่างของแรงตึงผิวเมื่อเทียบกับวันที่ 0 (61.5 mN/m)

จากการทดสอบวัดค่าแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ของยีสต์ *Pichia anomala* PY1และยีสต์สายพันธุ์กลาย พบว่า ยีสต์สายพันธุ์กลายที่มีพื้นที่การกระจายน้ำมันสูงกว่า PY 1 ได้แก่ PY 12 PY 44 PY 48 PY 49 และ PY 189 และยีสต์สายพันธุ์กลายที่สามารถลดค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยง

เชื้อที่ไม่มีเซลล์ลงได้มากกว่ายีสต์ *Pichia anomala* PY1 คือ PY 12 ในขณะที่ยีสต์สายพันธุ์กลาย PY 44 และ PY 189 ให้ค่าใกล้เคียงกับยีสต์ *Pichia anomala* PY1 ดังแสดงผลการทดลองในตารางที่ 3.12 ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงได้เลือกสายพันธุ์กลาย PY 12 PY 44 และ PY 189 ไปศึกษาต่อไป

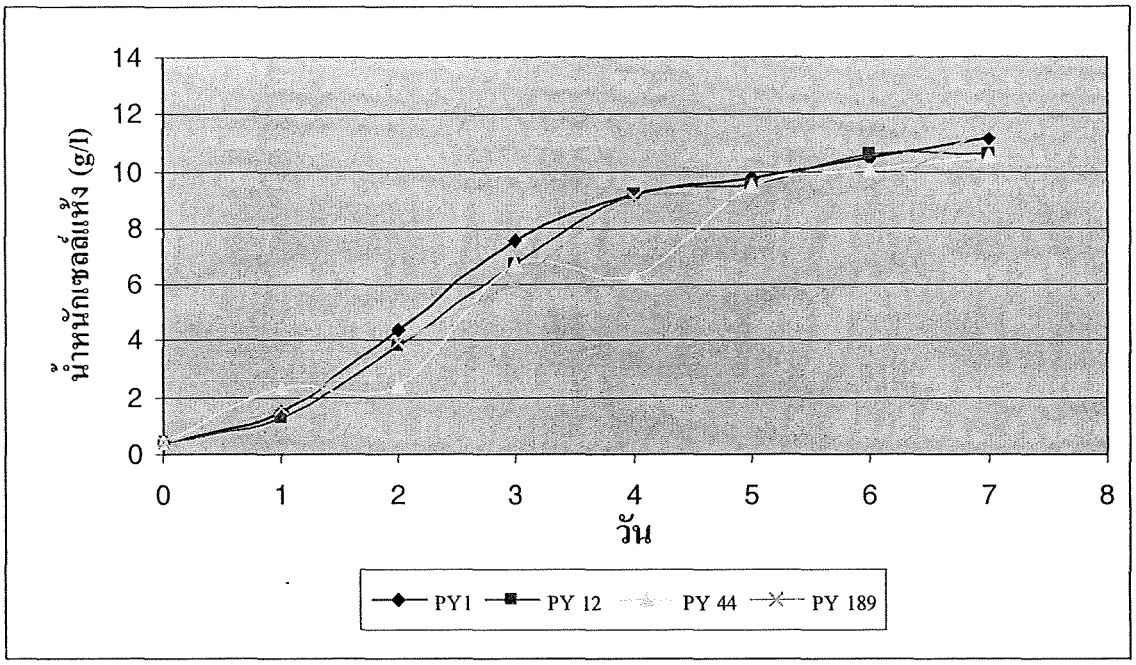
8. การติดตามการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และยีสต์สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้

ทำการคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์กลาย PY 12, PY 44 และPY 189 มาทำการศึกษาต่อโดย มาเลี้ยงในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วทำการบ่มในตู้บ่มเชื้อที่มีการเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน เพื่อติดตามการเจริญ และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในช่วงเวลาต่างๆกัน

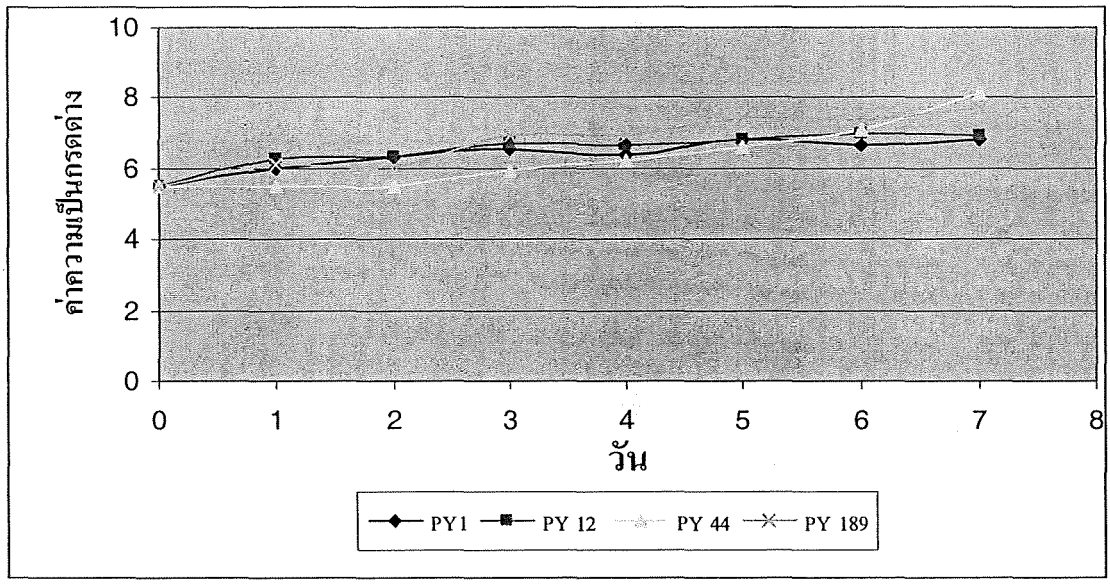
ตารางที่ 3.13 แสดงการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของยีสต์ *Pichia anomala* PY1และยีสต์สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอนเป็นเวลา 1ถึง 7 วัน

สายพันธุ์	วันที่	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l)	pH	พื้นที่การกระจายน้ำมัน (cm^2)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)
PY1	0	0.46	5.50	0.30	62.00
	1	1.47	5.99	0.41	60.48
	2	4.38	6.33	0.69	52.89
	3	7.59	6.54	1.33	50.7
	4	9.18	6.39	1.17	49.94
	5	9.72	6.79	3.94	36.83
	6	10.43	6.63	4.37	37.25
	7	11.16	6.81	5.07	38.1

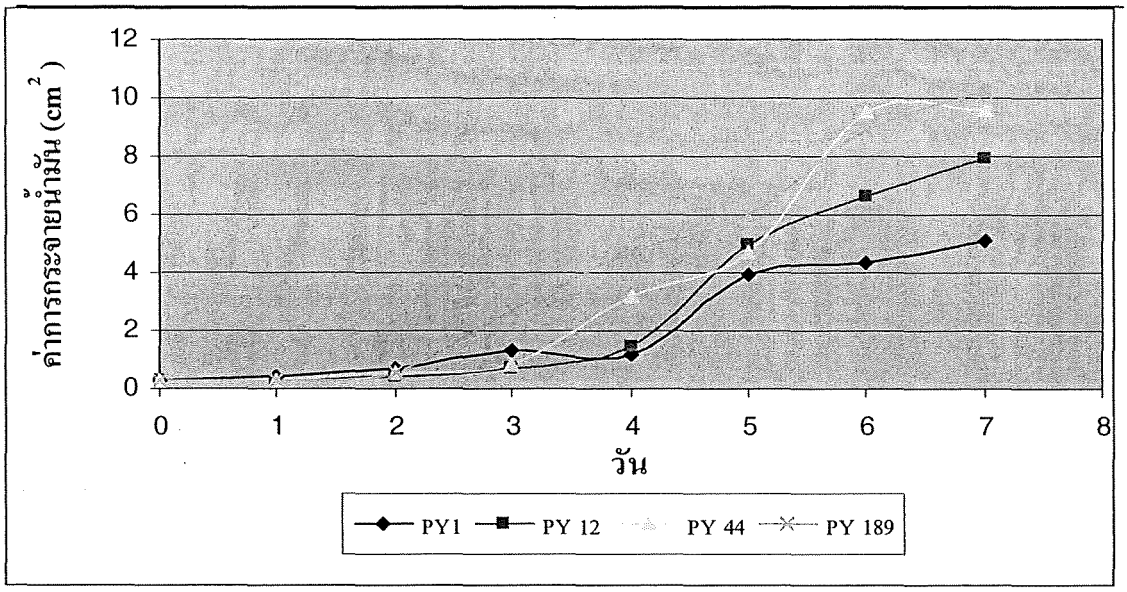
สายพันธุ์	วันที่	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l)	pH	พื้นที่การกระจายน้ำมัน (cm^2)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)
PY 12	0	0.40	5.50	0.30	62.00
	1	1.29	6.29	0.30	57.00
	2	3.85	6.34	0.43	52.00
	3	6.70	6.69	0.66	50.00
	4	9.22	6.67	1.45	48.00
	5	9.55	6.84	4.99	44.00
	6	10.57	6.97	6.61	39.28
	7	10.60	6.93	7.94	36.00
PY 44	0	0.42	5.50	0.25	62.00
	1	2.33	5.51	0.25	60.00
	2	2.39	5.50	0.53	58.30
	3	6.71	5.94	0.85	52.67
	4	6.30	6.22	3.14	46.83
	5	9.48	6.58	4.68	37.72
	6	10.04	7.11	9.51	42.00
	7	10.50	8.14	9.62	40.5
PY 189	0	0.43	5.50	0.30	62.00
	1	1.65	6.08	0.30	59.27
	2	3.93	6.06	0.58	55.33
	3	6.05	6.93	2.72	50.67
	4	9.08	6.90	4.68	49.33
	5	8.93	7.41	5.98	38.83
	6	9.50	7.37	8.87	37.89
	7	11.46	7.67	10.18	36.00



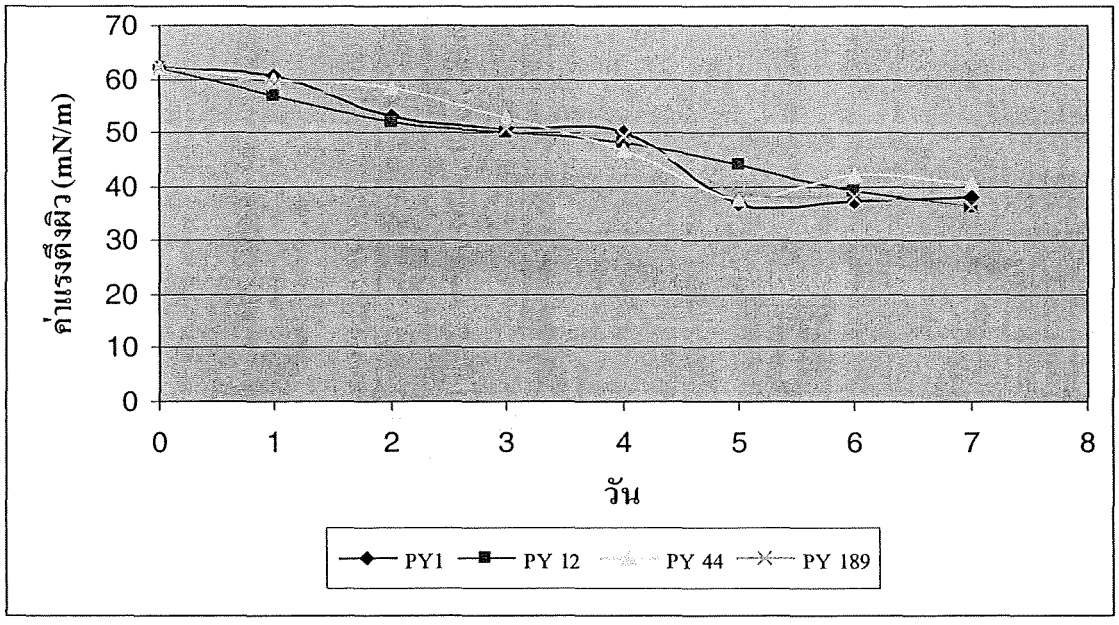
รูปที่ 3.7 กราฟแสดงน้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ *Pichia anomala* PY1และยีสต์สายพันธุ์กลายในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอนเป็นเวลา1- 7 วัน



รูปที่ 3.8 กราฟแสดงค่าความเป็นกรดด่างของยีสต์ *Pichia anomala* PY1และยีสต์สายพันธุ์กลายที่เปลี่ยนแปลงในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอนเป็นเวลา 1-7 วัน



รูปที่ 3.9 กราฟแสดงการกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเซลล์ของยีสต์ *Pichia anomala* PY1และยีสต์สายพันธุ์กลายในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา1-7 วัน



รูปที่ 3.10 กราฟแสดงค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเซลล์ของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และยีสต์สายพันธุ์กลายในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอนเป็น เวลา1-7 วัน

จากการทดลอง ยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และยีสต์สายพันธุ์กลายในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอนเป็นเวลา 1-7 วัน พบว่ายีสต์สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้สามารถเจริญเติบโตสร้างเซลล์ได้ใกล้เคียงกับยีสต์ *Pichia anomala* PY1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเซลล์ของ ยีสต์ *Pichia anomala* PY1 จะมีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.50 - 6.81 ช่วงค่าความเป็นกรดด่างที่เปลี่ยนแปลงเป็นไปเช่นเดียวกันกับยีสต์ *Pichia anomala* PY1 คือยีสต์สายพันธุ์กลาย PY 12 ค่าความเป็นกรดด่างอยู่ในช่วง 5.50-6.97 และช่วงความเป็นกรดด่างที่เปลี่ยนแปลงไปสูงกว่าคือยีสต์สายพันธุ์กลาย PY44 และ PY 189 ค่าความเป็นกรดด่างอยู่ในช่วง 5.5-8.14 และ 5.5-7.67 ตามลำดับ ความสามารถในการกระจายน้ำมันของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 เริ่มสูงขึ้นในวันที่ 4 และให้พื้นที่การกระจายน้ำมันสูงสุดในวันที่ 7 เท่ากับ 5.07 ตารางเซนติเมตร ยีสต์สายพันธุ์กลาย PY 12 เริ่มสูงขึ้นในวันที่ 4 เช่นเดียวกับยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และให้พื้นที่การกระจายน้ำมันสูงสุดในวันที่ 7 เท่ากับ 7.94 ตารางเซนติเมตร ยีสต์สายพันธุ์กลาย PY 44 เริ่มสูงขึ้นในวันที่ 3 และให้พื้นที่การกระจายน้ำมันสูงสุดในวันที่ 7 เท่ากับ 9.62 ตารางเซนติเมตร ยีสต์สายพันธุ์กลาย PY 189 เริ่มสูงขึ้นในวันที่ 2 และให้พื้นที่การกระจายน้ำมันสูงสุดในวันที่ 7 เท่ากับ 10.18 ตารางเซนติเมตร ประมาณ 2 เท่าของสายพันธุ์ดั้งเดิม เมื่อเปรียบเทียบพื้นที่การกระจายน้ำมันของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และยีสต์สายพันธุ์กลายเป็นเวลา 1-7 วัน พบว่ายีสต์สายพันธุ์กลายให้พื้นที่การกระจายน้ำมันดีกว่ายีสต์ *Pichia anomala* PY1 และให้พื้นที่การกระจายน้ำมันดีที่สุดคือยีสต์สายพันธุ์กลาย 189 ให้ค่าแรงตึงผิวต่ำสุดในวันที่ 7 เท่ากับ 36 มิลลินิวตันต่อเมตร

9. **ติดตามความเสถียรของยีสต์สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้**

นำยีสต์สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด Yeast Malt Extract มาขีดเป็นรูปกากบาดบนอาหารแข็ง Yeast Malt Extract ที่มีน้ำมันดิบปริมาตร 20 ไมโครลิตรกระจายตัวอยู่ทั่ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้ววัดค่าบริเวณใสนอกสุดและขนาดของโคโลนี (มีหน่วยเป็นเซนติเมตร) ความสามารถในการกระจายน้ำมันบนอาหารแข็งในรุ่นที่ 10 ดังแสดงในตารางที่ 3.14

ตารางที่ 3.14 แสดงบริเวณใสบนอาหารแข็ง Yeast Malt Extract ของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้ในรุ่นที่ 1-5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชม.

สายพันธุ์	ความกว้าง (ซม.)	รุ่น									
		1	ความต่าง (ซม.)	2	ความต่าง (ซม.)	3	ความต่าง (ซม.)	4	ความต่าง (ซม.)	5	ความต่าง (ซม.)
PY1	บริเวณใส	1.7		1.7		1.7		1.7		1.7	
	ขนาดโคโลนี	1.5	0.2	1.5	0.1	1.4	0.3	1.4	0.3	1.4	0.3
PY 189	บริเวณใส	1.6		1.7		1.9		1.7		1.7	
	ขนาดโคโลนี	1.2	0.4	1.5	0.2	1.4	0.5	1.5	0.2	1.5	0.2

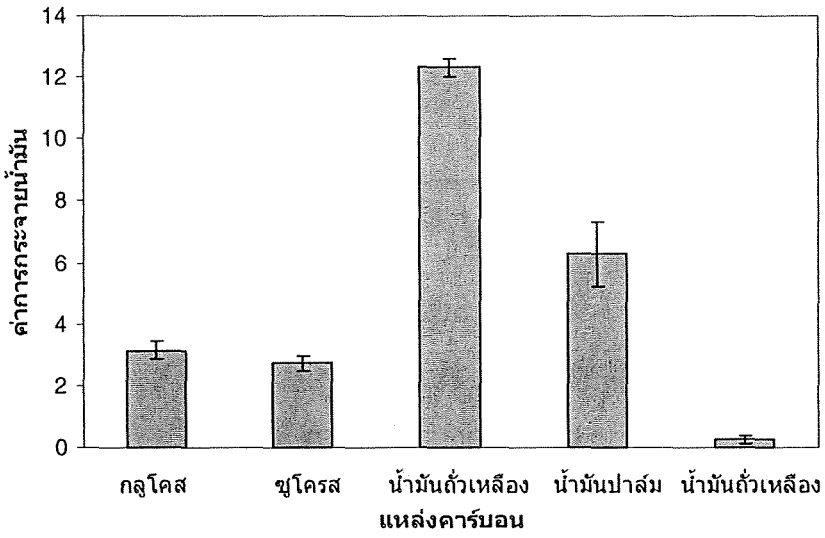
จากการทดลองพบว่ายีสต์สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้จากการกลายพันธุ์ด้วยสาร EMS ยังคงมีความเสถียรจนถึงรุ่นที่ 5 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบนอาหารแข็ง Yeast Malt Extract โดยมีค่าเท่ากับ 0.2 ถึง 0.5 เซนติเมตร และมีค่าความต่างเฉลี่ยเท่ากับ 0.3 เซนติเมตร

10. การศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pichia anomala* PY 189

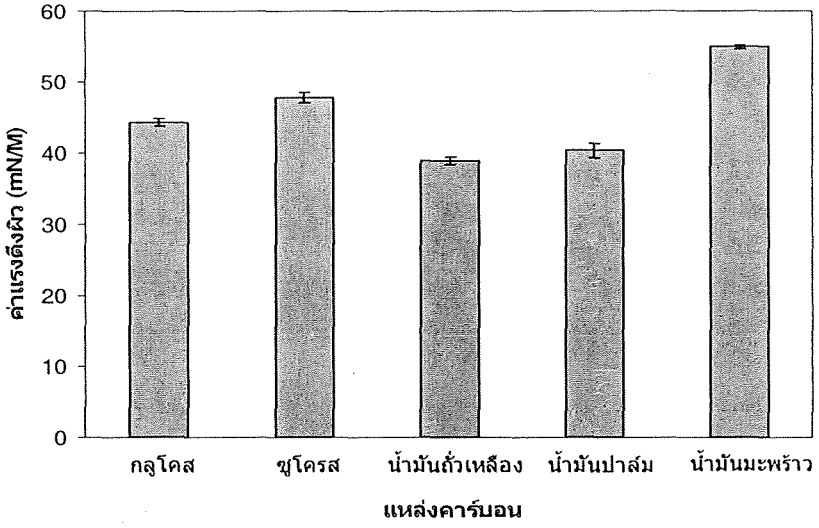
การแปรผันแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ผลการทดลองพบว่า น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากมีค่าการกระจายตัวของน้ำมันสูงสุด 12.33 cm^2 และค่าแรงตึงผิวต่ำสุด เท่ากับ 38.94 mN/m ดังแสดงในตารางที่ 3.15 ส่วนการแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน พบว่าที่ความเข้มข้น 4% ของน้ำมันถั่วเหลือง เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งจะให้ค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 12.56 cm^2 และค่าแรงตึงผิว 37.57 mN/m แสดงผลในตารางที่ 3.16

ตารางที่ 3.15 แสดงค่าแรงตึงผิว ค่าการกระจายน้ำมัน และค่า pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย PY 189 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ที่ 30°C เป็นเวลา 7 วัน

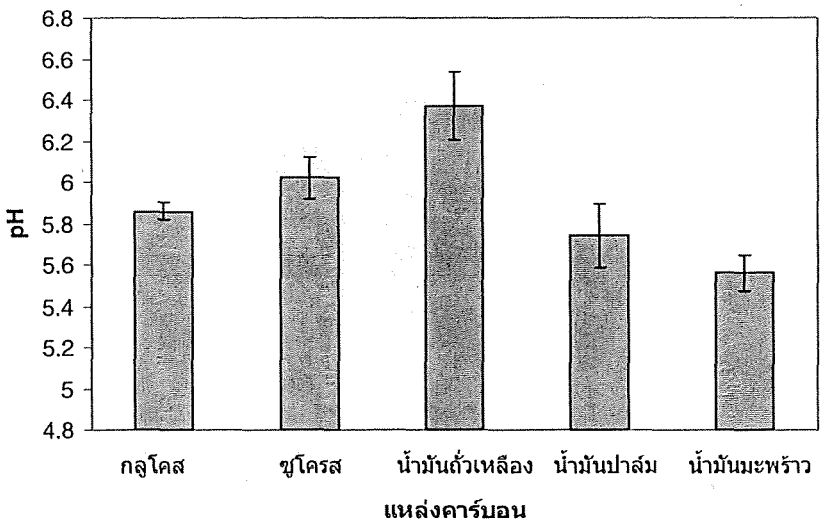
แหล่งคาร์บอน (4% w/v)	น้ำหนักเซลล์แห้ง(g/l)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	ΔST_{b-t} (mN/m)	ค่าการกระจายตัวของน้ำมัน (cm^2)	ค่า pH
กลูโคส	14.87±0.67	44.27±0.5	15.23	3.14±0.29	5.86±0.04
ซูโครส	10.36±0.77	47.83±0.76	13.67	2.72±0.26	6.02±0.10
น้ำมันถั่วเหลือง	15.21±0.27	38.94±0.57	16.56	12.33±0.29	6.37±0.16
น้ำมันปาล์ม	14.82±0.27	40.33±1.04	10.33	6.28±1.04	5.74±0.15
น้ำมันมะพร้าว	6.75±0.71	54.94±0.28	9.14	0.25±0.14	5.56±0.08



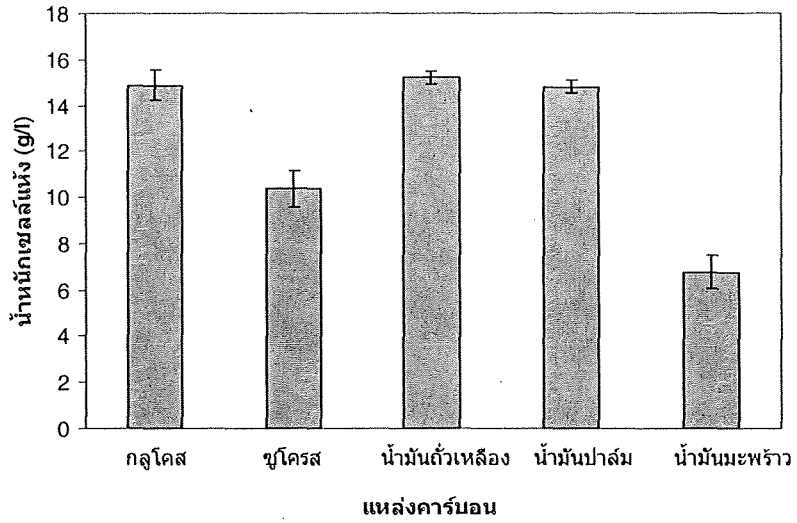
รูปที่ 3.11 ค่าการกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย PY 189 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ



รูปที่ 3.12 แสดงค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย PY 189 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ



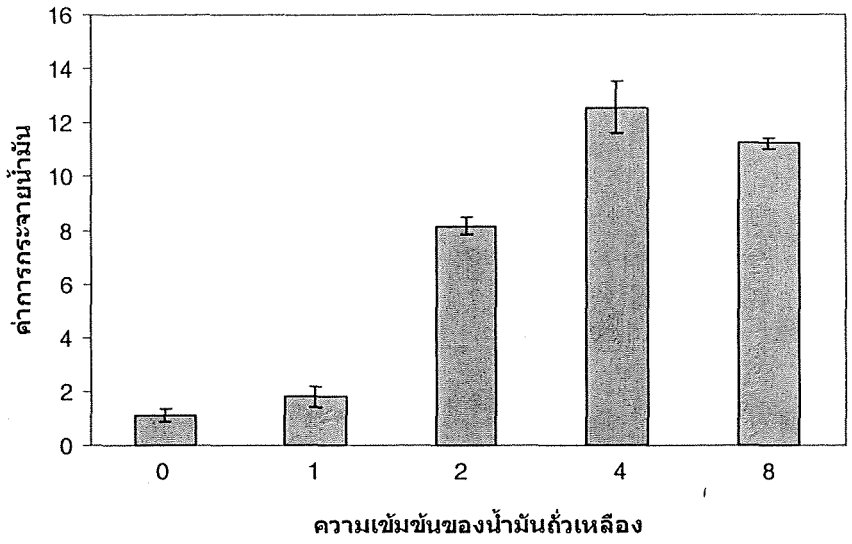
รูปที่ 3.13 แสดงค่า pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย PY 189 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ



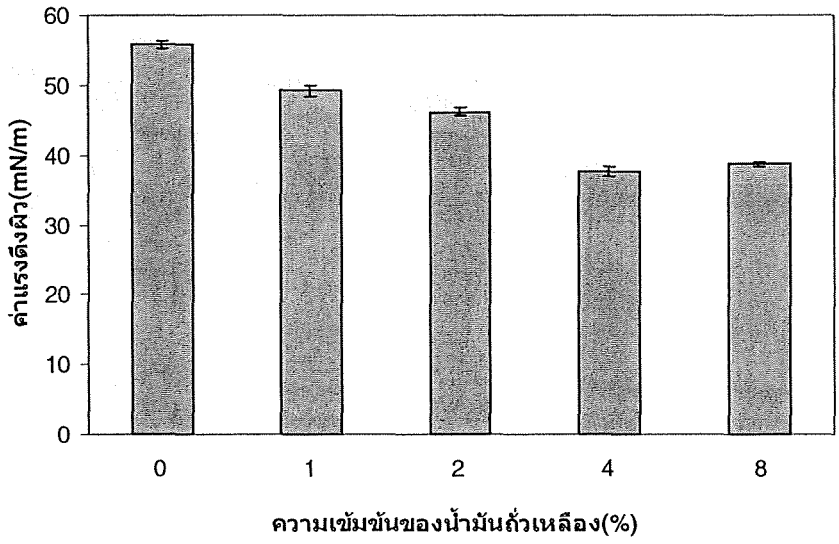
รูปที่ 3.14 แสดงค่าน้ำหนักเซลล์ของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย PY 189 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

ตารางที่ 3.16 น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าแรงตึงผิว ค่าการกระจายน้ำมัน และค่า pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย PY 189 เมื่อแปรผันความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลือง

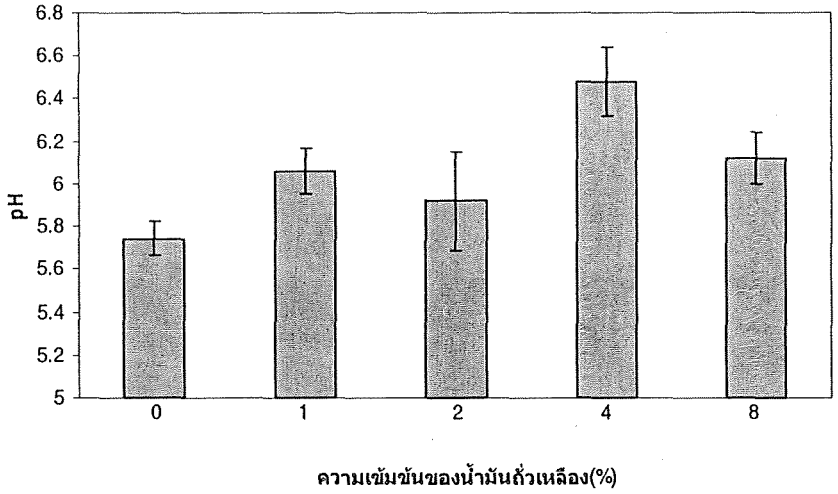
ความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลือง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	ΔST_{b-t} (mN/m)	ค่าการกระจายตัวของน้ำมัน (cm^2)	ค่า pH
0 %	2.17±0.56	55.83±0.59	1.25	1.13±0.24	5.74±0.08
1 %	6.45±0.67	49.17±0.78	1.70	1.79±0.36	6.06±0.11
2 %	10.77±0.56	46.17±0.5	4.76	8.17±0.32	5.92±0.23
4 %	13.96±0.41	37.57±0.72	18.50	12.56±0.98	6.48±0.16
8 %	10.53±0.73	38.77±0.33	16.12	11.23±0.22	6.12±0.12



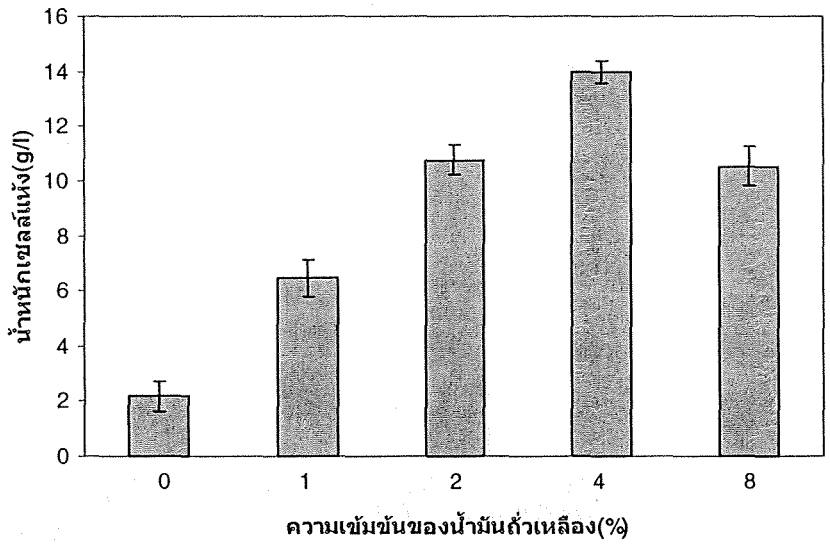
รูปที่ 3.15 แสดงค่าการกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย PY 189 เมื่อใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนที่แปรผันความเข้มข้นต่างๆ



รูปที่ 3.16 แสดงค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย PY 189 เมื่อใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนที่แปรผันความเข้มข้นต่างๆ



รูปที่ 3.17 แสดงค่า pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย PY 189 เมื่อใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนที่แปรผันความเข้มข้นต่างๆ

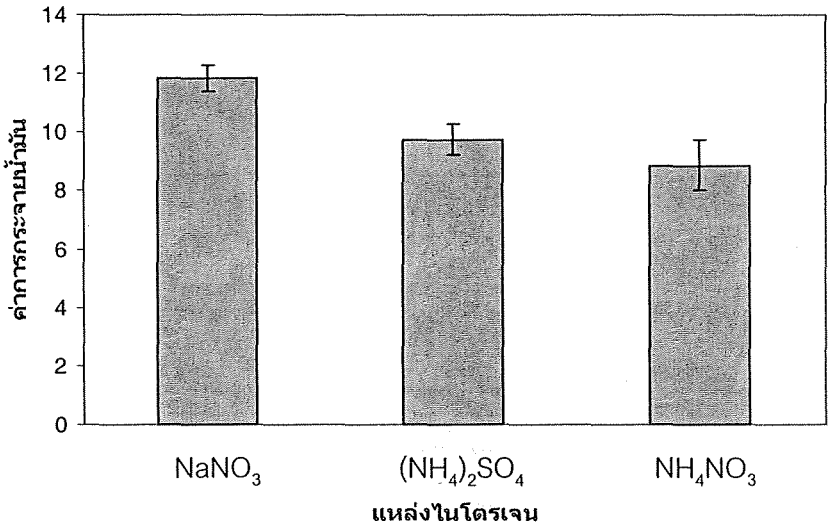


รูปที่ 3.18 แสดงค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย PY 189 เมื่อใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนที่แปรผันความเข้มข้นต่างๆ

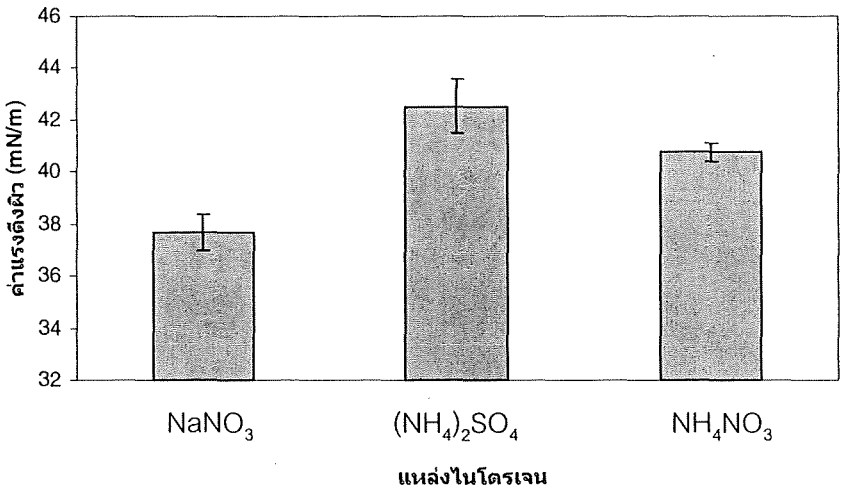
เมื่อทำการแปรผันแหล่งไนโตรเจน พบว่า $NaNo_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Pichia anomala* PY 189 ให้ผลค่าการกระจายตัวของน้ำมันสูงสุดเท่ากับ 11.82 cm^2 และค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 37.68 mN/m ดังแสดงในตารางที่ 3.17 พบว่าที่ความเข้มข้น 0.4% ของ $NaNo_3$ เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งจะให้ค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 10.17 cm^2 และค่าแรงตึงผิว 36.5 mN/m แสดงผลในตารางที่ 3.18

ตารางที่ 3.17 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าแรงตึงผิว ค่าการกระจายน้ำมัน และค่า pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย PY 189 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ที่ 30°C เป็นเวลา 7 วัน

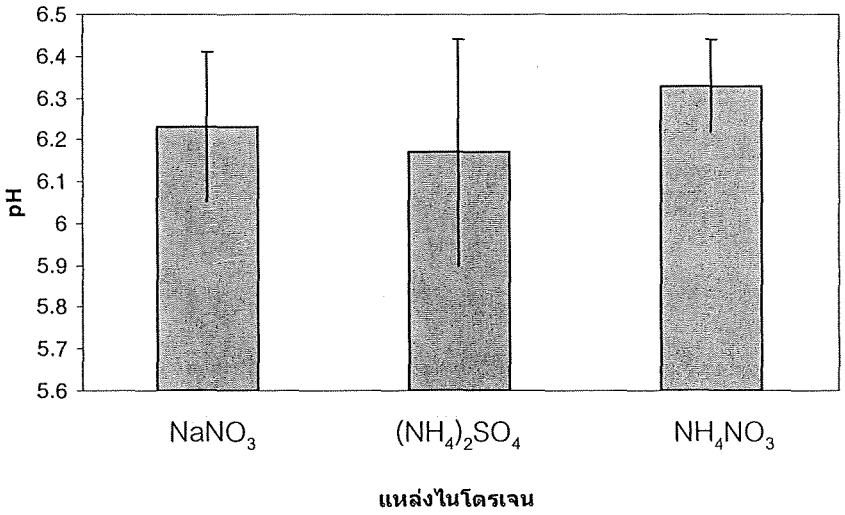
แหล่งไนโตรเจน (0.2% w/v)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	ΔST_{b-t} (mN/m)	ค่าการกระจายตัวของน้ำมัน	ค่า pH
$NaNO_3$	12.78±0.29	37.68±0.69	16.73	11.82±0.44	6.23±0.18
NH_4NO_3	10.65±0.27	42.52±1.03	12.48	9.76±0.52	6.17±0.27
$(NH_4)_2SO_4$	11.76±0.68	40.76±0.36	11.57	8.87±0.85	6.33±0.11



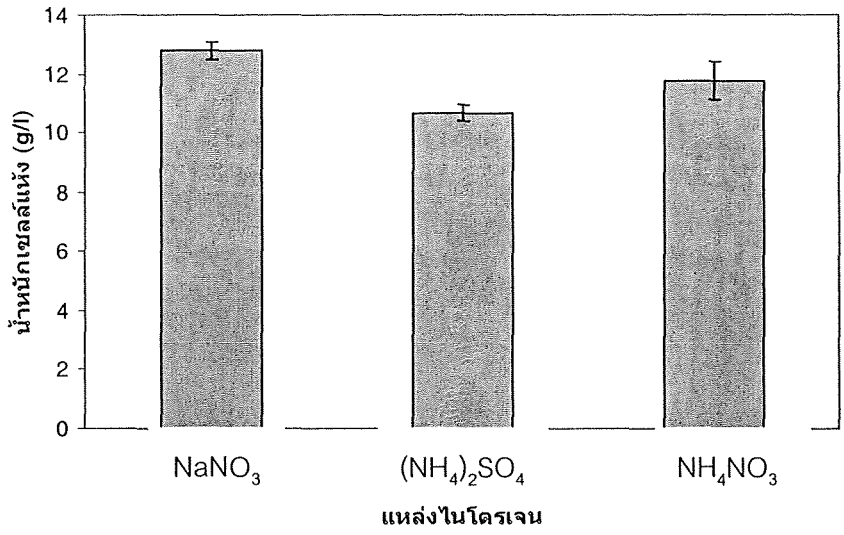
รูปที่ 3.19 แสดงค่าการกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย PY 189 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนต่างๆ



รูปที่ 3.20 แสดงค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย PY 189 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนต่างๆ



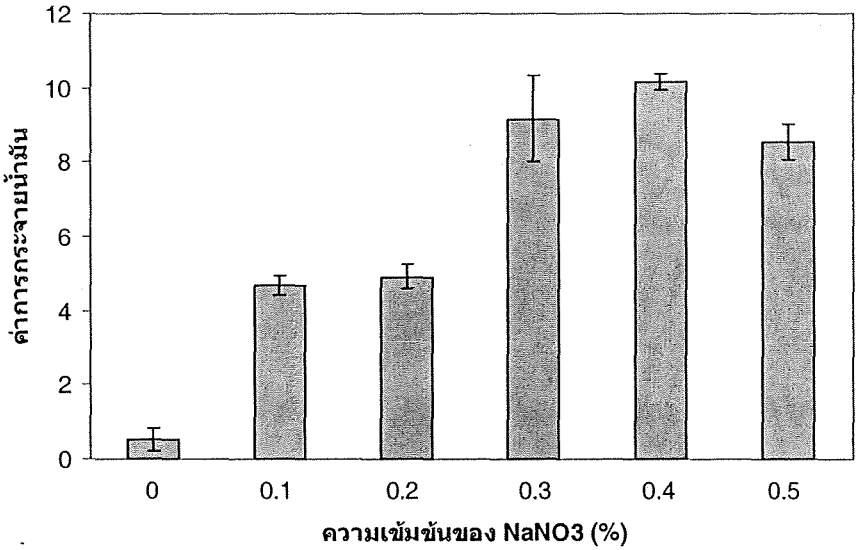
รูปที่ 3.21 แสดงค่า pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย PY 189 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนต่างๆ



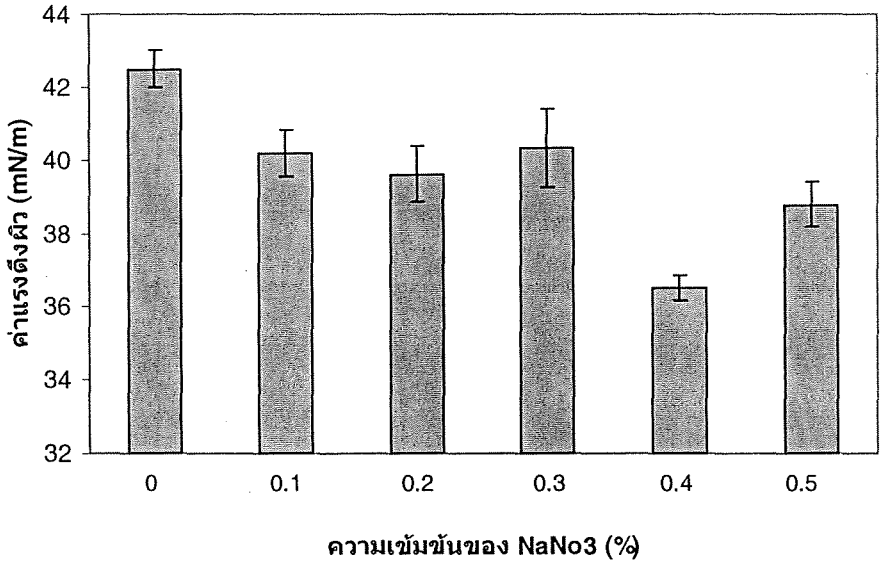
รูปที่ 3.22 แสดงค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย PY 189 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนต่างๆ

ตารางที่ 3.18 ผลการแปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

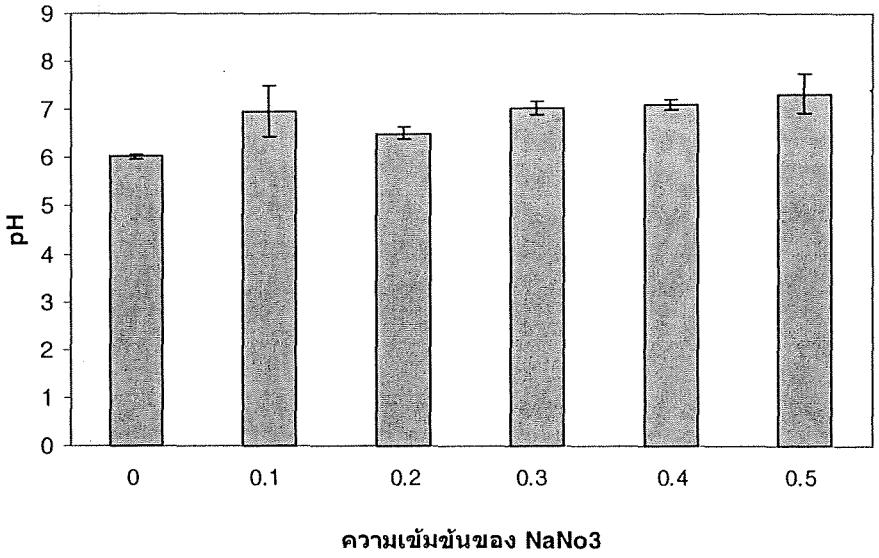
ความเข้มข้นของ $NaNO_3$ (%)	น้ำหนักเซลล์แห้ง(g/l)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	ΔST (mN/m)	ค่าการกระจายน้ำมัน(cm^2)	pH
0	2.26±0.41	42.50±0.5	10.57	0.53±0.29	6.04±0.05
0.1	4.19±0.54	40.19±0.63	10.95	4.68±0.25	6.96±0.53
0.2	9.66±0.33	39.61±0.77	14.80	4.92±0.32	6.52±0.13
0.3	10.75±0.39	40.32±1.06	13.06	9.16±1.16	7.04±0.15
0.4	14.54±0.61	36.50±0.34	18.45	10.17±0.23	7.11±0.11
0.5	10.20±0.13	38.77±0.61	16.24	8.53±0.48	7.34±0.41



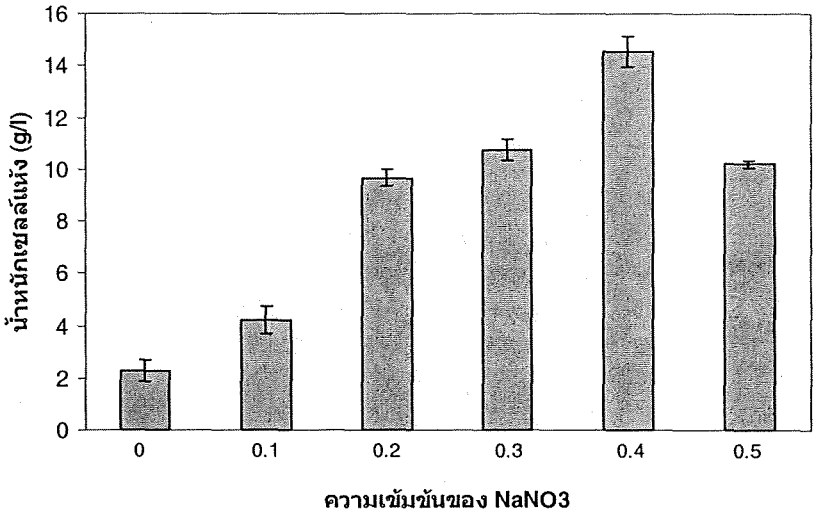
รูปที่ 3.23 ค่าการกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย PY 189 เมื่อใช้ $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่แปรผันความเข้มข้นต่างๆ



รูปที่ 3.24 แสดงค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย PY 189 เมื่อใช้ $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่แปรผันความเข้มข้นต่างๆ



รูปที่ 3.25 แสดงค่า pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย PY 189 เมื่อใช้ $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่แปรผันความเข้มข้นต่างๆ



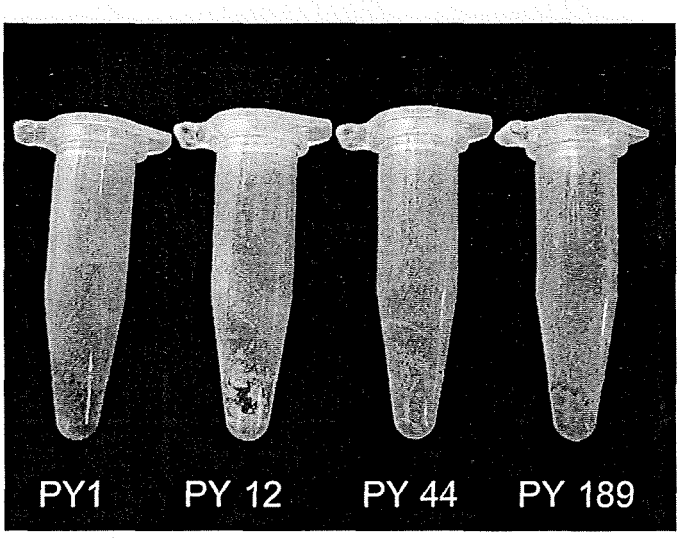
รูปที่ 3.26 แสดงค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย PY 189 เมื่อใช้ $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่แปรผันความเข้มข้นต่างๆ

11. การผลิตและสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และยีสต์สายพันธุ์กลาย PY 12 PY 44 และ PY 189 ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน หลังจากการสกัดด้วยสารละลายอินทรีย์จะให้ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเท่ากับ 0.45 0.41 0.37 และ 0.53 กรัมต่อลิตรตามลำดับ

ตารางที่ 3.19 แสดงค่าน้ำหนักแห้ง พื้นที่การกระจายน้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดด้วยสารละลายอินทรีย์แล้วของ *Pichia anomala* PY1 ยีสต์สายพันธุ์กลาย PY 12, PY 44 และ PY 189

สายพันธุ์	PY 1	PY 12	PY 44	PY 189
น้ำหนักแห้ง (g/l)	0.45	0.41	0.37	0.53
พื้นที่การกระจายน้ำมัน (cm^2)	7.07	8.04	11.95	15.21

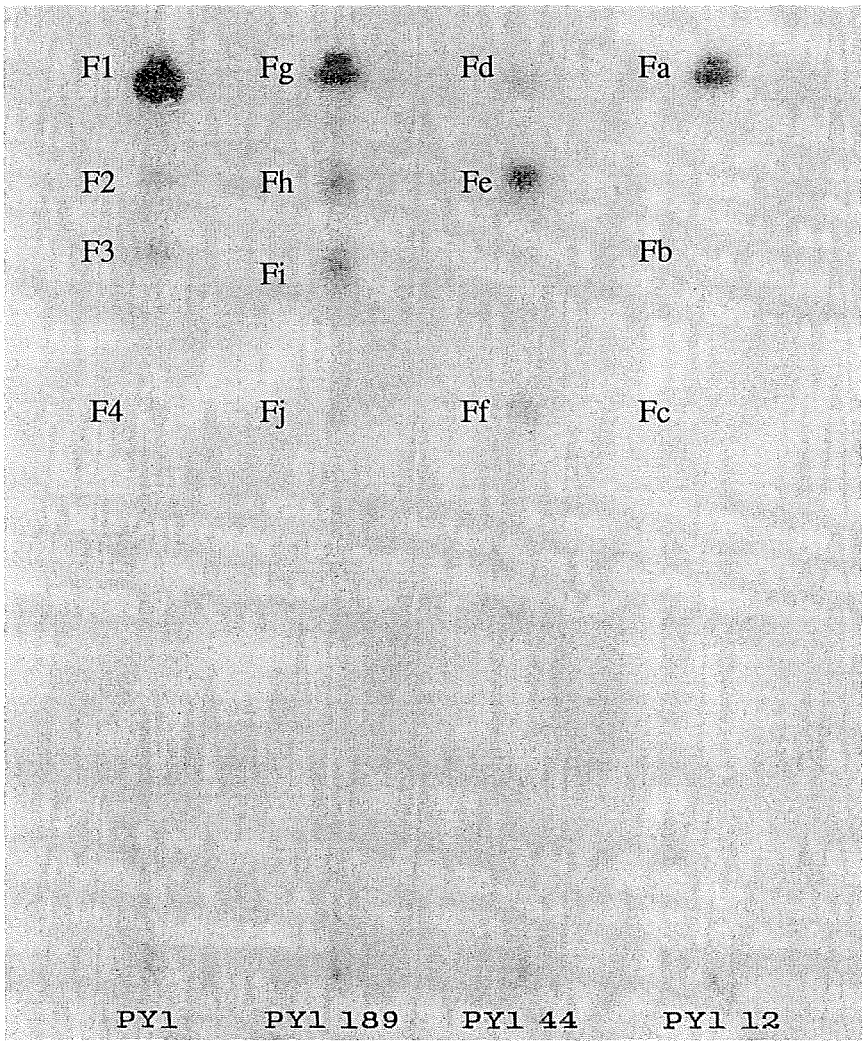


รูปที่ 3.27 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากยีสต์ *Pichia anomala* PY1และยีสต์สายพันธุ์กลาย PY12 PY 44 และ PY 189 ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน

จากการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้นำมาทดสอบพื้นที่การกระจายน้ำมันพบว่ายีสต์ *Pichia anomala* PY1 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ให้พื้นที่การกระจายน้ำมันได้เท่ากับ 7.07 ตารางเซนติเมตร และยีสต์ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ให้พื้นที่การกระจายน้ำมันที่มากกว่ายีสต์ *Pichia anomala* PY1 คือยีสต์สายพันธุ์กลาย PY 12 PY 44 และ PY 189 ให้ค่า

เท่ากับ 8.04 11.95 และ 15.21 ตารางเซนติเมตร ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ *Pichia anomala* PY1 พบว่ายีสต์สายพันธุ์สามารถให้พื้นที่กระจายน้ำมันได้ดีกว่าประมาณ 1.14 1.69 และ 2.15 เท่า ตามลำดับ

จากนั้นทำบริสุทธิ์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้ด้วยวิธีโครมาโตกราฟี(Ito และ Inoue, 1982) โดยการเตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย analytical Thin-Layer Chromatography นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จากข้อ 7.2 มาแยกและทดสอบบนแผ่น TLC silica gel 60 มีเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยคลอโรฟอร์มต่อเมทานอลต่อน้ำเท่ากับ 65: 25: 4 แล้วทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารด้วยไอระเหยของไอโอดีน



รูปที่ 3.28 การวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และยีสต์สายพันธุ์กลาย PY 12, PY 44 และ PY 189 ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบ analytical Thin-Layer Chromatography

พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากยีสต์ *Pichia anomala* PY1 สามารถแยกสารออกได้เป็น 4 ลำดับส่วน เรียกว่า F1 ถึง F4 โดยมีค่าคงที่ของอัตราส่วนการเคลื่อนที่ (R_f) เป็น 0.94 0.83 0.75 และ 0.58 ตามลำดับ ยีสต์สายพันธุ์กลาย PY 12 สามารถแยกสารออกได้เป็น 3 ลำดับส่วน เรียกว่า Fa ถึง Fc โดยมีค่าคงที่ของอัตราส่วนการเคลื่อนที่ (R_f) เป็น 0.96 0.78 และ 0.61 ตามลำดับ ยีสต์สายพันธุ์กลาย PY 44 สามารถแยกสารออกได้เป็น 3 ลำดับส่วน เรียกว่า Fd ถึง Ff โดยมีค่าคงที่ของอัตราส่วนการเคลื่อนที่ (R_f) เป็น 0.95 0.84 และ 0.60 ตามลำดับ และยีสต์สายพันธุ์กลาย PY 189 สามารถแยกสารออกได้เป็น 4 ลำดับส่วน เรียกว่า Fg ถึง Fj โดยมีค่าคงที่ของอัตราส่วนการเคลื่อนที่ (R_f) เป็น 0.95 0.83 0.74 และ 0.59 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 3.28 เมื่อนำแต่ละลำดับส่วนมาตรวจสอบประสิทธิภาพด้วยการวัดค่าการกระจายน้ำมัน พบว่า F1 ของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 ผลิตได้มีค่าการกระจายน้ำมันสูงที่สุดที่ 2.84 ตารางเซนติเมตร ยีสต์สายพันธุ์กลาย PY 12 ลำดับส่วน Fa มีค่าการกระจายน้ำมันสูงที่สุดที่ 1.33 ตางรางเซนติเมตร ยีสต์สายพันธุ์กลาย PY 44 ลำดับส่วน Fe มีค่าการกระจายน้ำมันสูงที่สุดที่ 3.14 ตารางเซนติเมตร และยีสต์สายพันธุ์กลาย PY 189 ลำดับส่วน Fj มีค่าการกระจายน้ำมันสูงที่สุดที่ 3.14 ตารางเซนติเมตร ดังแสดงในตารางที่ 3.16

ตารางที่ 3.20 อัตราการเคลื่อนที่ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และยีสต์สายพันธุ์กลาย ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน บนแผ่น TLC และค่าการกระจายน้ำมันแต่ละลำดับส่วน

สายพันธุ์	**ลำดับส่วนที่**	**อัตราการเคลื่อนที่ (R_f)**	**ค่าการกระจายน้ำมัน (cm^2)**
PY1	F1	0.94	2.84
	F2	0.83	0.79
	F3	0.75	0.50
	F4	0.58	0.64
PY 12	Fa	0.96	1.33
	Fb	0.78	0.50
	Fc	0.61	0.50
PY 44	Fd	0.95	0.38
	Fe	0.84	3.14
	F f	0.60	0.38

สายพันธุ์	ลำดับส่วนที่	อัตราการเคลื่อนที่ (R_f)	ค่าการกระจายน้ำมัน (cm^2)
PY 189	Fg	0.95	2.01
	Fh	0.83	1.33
	F i	0.74	0.50
	F j	0.59	3.14

จากการวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และยีสต์สายพันธุ์กลาย PY 12, PY 44 และ PY 189 ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบ analytical Thin-Layer Chromatography พบว่า ลำดับส่วนของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากยีสต์สายพันธุ์กลายแต่ละสายพันธุ์ที่มีค่าคงที่ของอัตราส่วนการเคลื่อนที่ (R_f) ที่ต่างจากของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และที่ Fe และ Fj มีการกระจายน้ำมันสูงสุด อาจเพราะสารที่ผลิตได้จากยีสต์สายพันธุ์กลายมีโครงสร้างและองค์ประกอบของสารที่มีลักษณะแตกต่างจากโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะนำสารที่ผลิตได้จากสายพันธุ์กลายไปศึกษาหาโครงสร้างหรือคุณสมบัติอื่นๆต่อไป

12. **การกลายพันธุ์ครั้งที่สองด้วยสาร** Ethyl methane sulfonate (EMS)

เมื่อทำการเจือจางเชื้อทั้งชุดควบคุมและชุดที่ก่อการกลายพันธุ์ที่เหมาะสมแล้วนำไปเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบเชื้อเจริญในชุดควบคุมและชุดที่ก่อการกลายพันธุ์ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3.21 และ 3.22

ตารางที่ 3.21 แสดงค่า CFU/ml. ของชุดควบคุม

ชุดควบคุม	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	เฉลี่ย
จำนวนโคโลนีต่อเพลท	100	87	93.5

ตารางที่ 3.22 แสดงค่า CFU/ml. ของชุดที่ก่อการกลายพันธุ์

ชุดก่อการกลายพันธุ์ที่ความเข้มข้น EMS (ไมโครลิตร)	จำนวนโคโลนีต่อเพลท	ร้อยละการอยู่รอด
0	93.5	100
20	88	94.11
25	80	85.56
30	34	36.36
35	2	2.14
40	1	1.07
45	0	0

13. การเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pichia anomala* PY1 และสายพันธุ์กลายในอาหารเหลว

13.1 อาหารเหลวที่มีกลูโคส 8% เป็นแหล่งคาร์บอน

เมื่อได้ทำการเลี้ยงเชื้อยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และสายพันธุ์กลาย ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีกลูโคส 8% เป็นแหล่งคาร์บอน แล้วทำการบ่มในตู้บ่มเชื้อที่มีการเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่ 3, 5 และ7 วัน เพื่อติดตามการการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยการวัดพื้นที่การกระจายน้ำมัน และค่าแรงตึงผิว ดังแสดงในตารางที่ 3.23

ตารางที่ 3.23 แสดงการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของยีสต์สายพันธุ์กลายเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ PY1 ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีกลูโคส 8% เป็นแหล่งคาร์บอนเป็นเวลา 7 วัน

สายพันธุ์	วันที่	พื้นที่การกระจายน้ำมัน (cm^2)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	ΔST (mN/m)	pH
PY1	3	0.25	47.5	21.5	4.31
	5	0.27	46.5	22.5	4.24
	7	0.3	47.5	21.5	4.36

สายพันธุ์	วันที่	พื้นที่การกระจายน้ำมัน (cm^2)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	ΔST (mN/m)	pH
MU28	3	0.45	46	23	4.41
	5	0.27	48.5	20.5	4.21
	7	0.4	50	19	4.74
MUE1	3	0.25	55.5	13.5	4.23
	5	0.3	59	10	4.5
	7	0.42	55	14	6.32
MUE4	3	0.3	58	11	4.16
	5	0.4	59	10	4.45
	7	0.4	52	17	7.31
MUE5	3	0.25	57	12	4.14
	5	0.32	58	11	4.52
	7	0.35	54	15	7.1
MUE6	3	0.2	57	12	4.18
	5	0.35	59	10	4.55
	7	0.35	56	13	7.36
MUE7	3	0.35	54	15	4.23
	5	0.32	52.5	16.5	4.25
	7	0.37	53	16	4.44
MUE8	3	0.37	55	14	4.23
	5	0.35	53	16	4.27
	7	0.37	53	16	4.64
MUE11	3	0.32	54.5	14.5	4.23
	5	0.37	55	14	4.21
	7	0.4	56.5	12.5	4.64
MUE14	3	0.27	54	15	4.39
	5	0.27	55	14	4.3
	7	0.3	54	15	4.49

สายพันธุ์	วันที่	พื้นที่การกระจายน้ำมัน (cm^2)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	ΔST (mN/m)	pH
MUE15	3	0.37	55	14	4.49
	5	0.3	55.5	13.5	4.12
	7	0.32	58.5	10.5	4.17
MUE18	3	0.4	54	15	4.95
	5	0.3	54.5	14.5	4.23
	7	0.35	56.5	12.5	4.39
MUE19	3	0.4	54	15	4.76
	5	0.3	57	12	4.17
	7	0.3	59.5	9.5	4.26
MUE20	3	0.47	57	12	4.88
	5	0.37	57	12	4.17
	7	0.3	58	11	4.16
MUE21	3	0.45	54.5	14.5	4.88
	5	0.35	57	12	4.18
	7	0.4	58	11	4.14
MUE23	3	0.2	53	16	4.29
	5	0.7	52	17	4.12
	7	0.5	56	13	4.16
MUE24	3	0.25	52.5	16.5	4.3
	5	1.7	48	21	4.04
	7	0.4	55	14	4.03
MUE26	3	0.2	53	16	4.24
	5	0.75	53	16	4.14
	7	0.6	56.5	12.5	4.23

* ΔST คือค่าความแตกต่างของแรงตึงผิวเมื่อเทียบกับวันที่ 0 (69 mN/m)

เมื่อทำการก่อการกลายพันธุ์ *Pichia anomala* PY1 ที่มีความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นประมาณ 1.0 x 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตรด้วยสาร Ethyl methane sulfonate ที่ความเข้มข้น 0, 20, 25, 30, 35, และ 40 ไมโครลิตร พบว่าจะได้สายพันธุ์กลายที่มีค่าการอยู่รอดอยู่ในช่วงที่เหมาะสมที่เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสาร Ethyl methane sulphonate คือ 36.36 % (ตารางที่ 3.22)

จากนั้นทำการสุ่มสายพันธุ์กลายจำนวน 16 สายพันธุ์จาก 36 สายพันธุ์มาทดลองเลี้ยงในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีกลูโคส 8% เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มในตู้บ่มเชื้อที่มีการเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3, 5 และ 7 วัน พบว่ามีสายพันธุ์กลาย 1 สายพันธุ์คือ MUE24 ให้พื้นที่การกระจายน้ำมันสูงกว่าสายพันธุ์ PY1 อีก 4 สายพันธุ์ คือ MU20, MU22, MU26 และ MU41 ที่ให้พื้นที่การกระจายน้ำมันใกล้เคียงกับสายพันธุ์ PY1 สายพันธุ์กลาย MUE24 ให้ ΔST ของน้ำเลี้ยงเชื้อใกล้เคียงกับสายพันธุ์ PY1

ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ MUE24 มาศึกษาต่อไป เนื่องจากสายพันธุ์ให้พื้นที่การกระจายน้ำมันสูงกว่าสายพันธุ์ PY1 ประมาณ 5.67 เท่า และสามารถลดค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อได้เป็น 48 มิลลินิวตันต่อเมตร ให้ค่า ΔST เท่ากับ 21 ไปทำการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Pichia anomala* สายพันธุ์กลาย (MUE24)

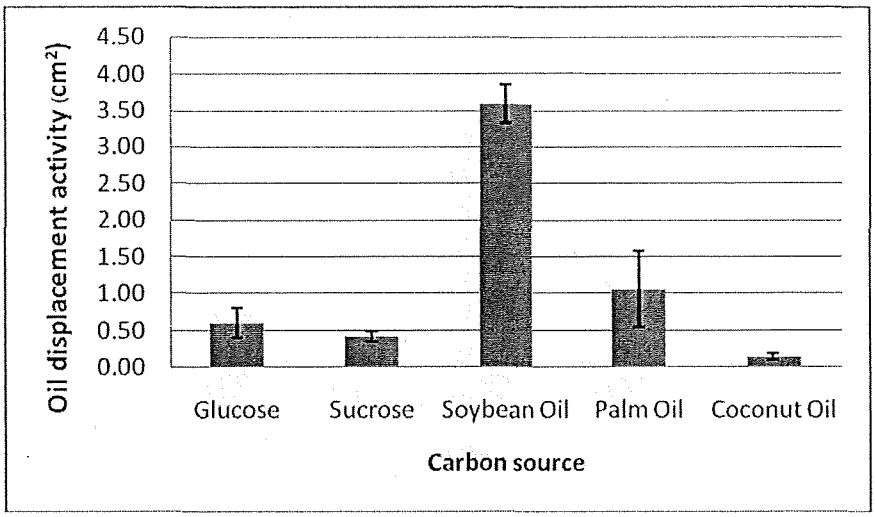
14. การศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pichia anomala* MUE24

การแปรผันแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จากการทดลองเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 5 วัน พบว่าน้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากมีค่าการกระจายตัวของน้ำมันสูงสุด 4.91 cm^2 และค่าแรงตึงผิวต่ำสุด เท่ากับ 39 mN/m ดังแสดงในตารางที่ 3.24 ส่วนการแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน พบว่าที่ความเข้มข้น 4% ของน้ำมันถั่วเหลือง เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งจะให้ค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 17.64 cm^2 และค่าแรงตึงผิว 35 mN/m แสดงผลในตารางที่ 3.25

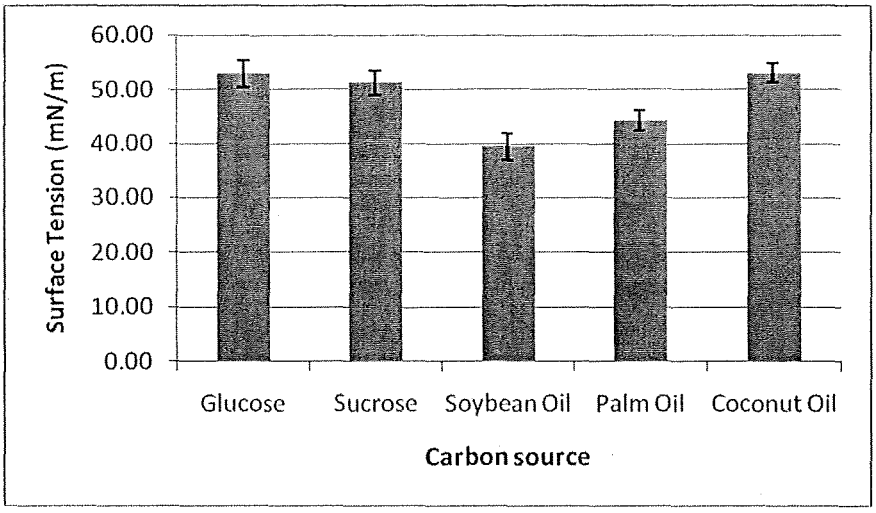
ตารางที่ 3.24 ค่าแรงตึงผิว ค่าการกระจายน้ำมัน และค่า pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย MUE 24 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ที่ 30°C เป็นเวลา 5 วัน

แหล่งคาร์บอน (8% w/v)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	ΔST_{b-t} (mN/m)	ค่าการกระจายตัวของน้ำมัน (cm^2)	ค่า pH
กลูโคส	54±2.47	8.5	0.58±0.20	4.61±0.13
ซูโครส	53.5±2.25	14	0.43±0.07	4.38±0.07
น้ำมันถั่วเหลือง	39±2.52	13.5	4.91±0.27	7.79±0.10
น้ำมันปาล์ม	43±1.89	7	0.79±0.52	7.2±0.06
น้ำมันมะพร้าว	53.5±1.73	10	0.20±0.04	4.48±0.02

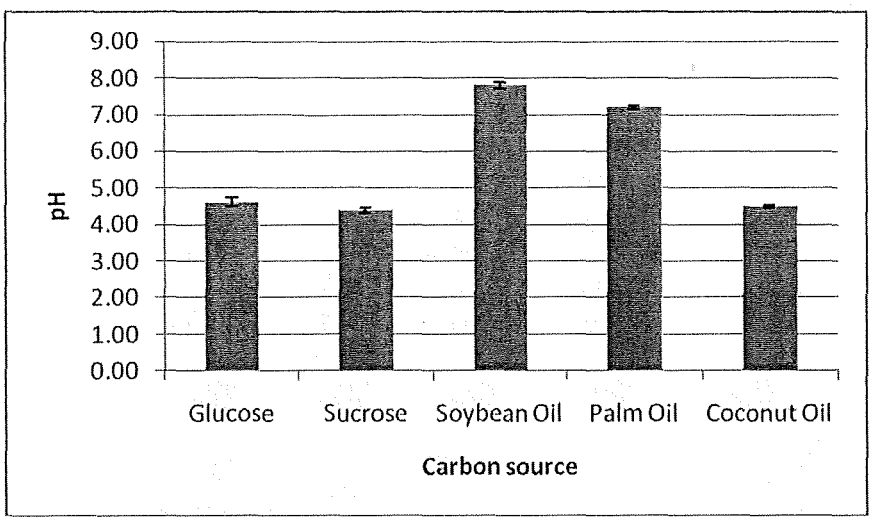
* ΔST คือค่าความแตกต่างของแรงตึงผิวเมื่อเทียบกับวันที่ 0 (กลูโคส 62.5 mN/m, ซูโครส 67.5 mN/m, น้ำมันถั่วเหลือง 52.5 mN/m, น้ำมันปาล์ม 50.0 mN/m และน้ำมันมะพร้าว 63.5 mN/m)



รูปที่ 3.29 ค่าการกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย MUE24 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ



รูปที่ 3.30 แสดงค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย MUE24 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

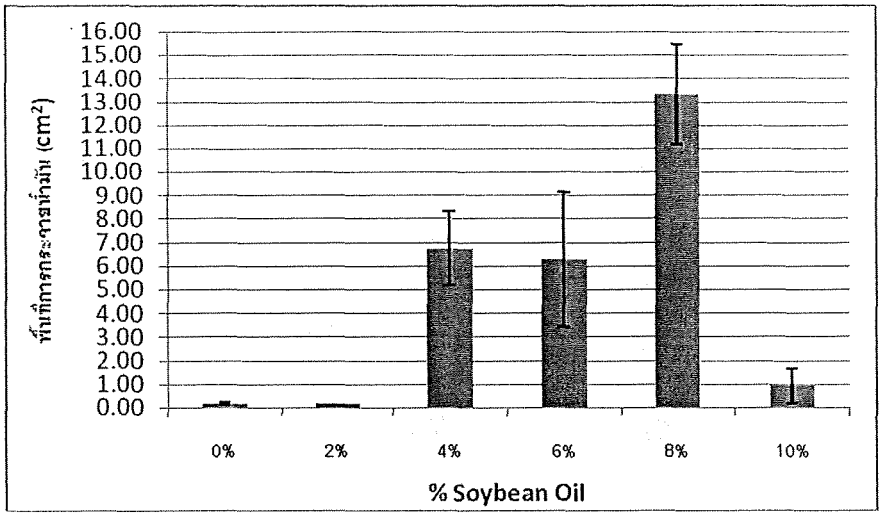


รูปที่ 3.31 แสดงค่า pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย MUE24 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

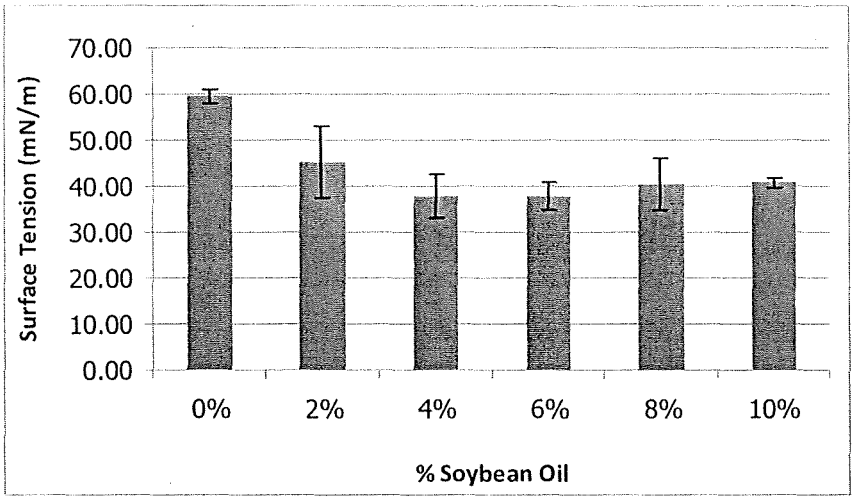
ตารางที่ 3.25 น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าแรงตึงผิว ค่าการกระจายน้ำมัน และค่า pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย MUE 24 เมื่อแปรผันความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลือง

ความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลือง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	ΔST_{b-t} (mN/m)	ค่าการกระจายตัวของน้ำมัน (cm^2)	ค่า pH
0 %	0.6889±0.02	59±1.50	-6.5	0.20±0.04	7.36±0.11
2 %	4.0378±1.04	50±7.97	2.5	0.20±0.0	6.4±0.07
4 %	9.0411±1.13	35±4.93	17.5	17.64±1.55	7.13±0.49
6 %	8.9033±0.14	39±3.25	13.5	6.15±2.84	7.39±0.25
8 %	9.1578±0.54	39±5.77	13.5	13.20±2.14	7.1±0.04
10 %	11.1767±0.27	41±1.26	11.5	0.28±0.73	6.92±0.11

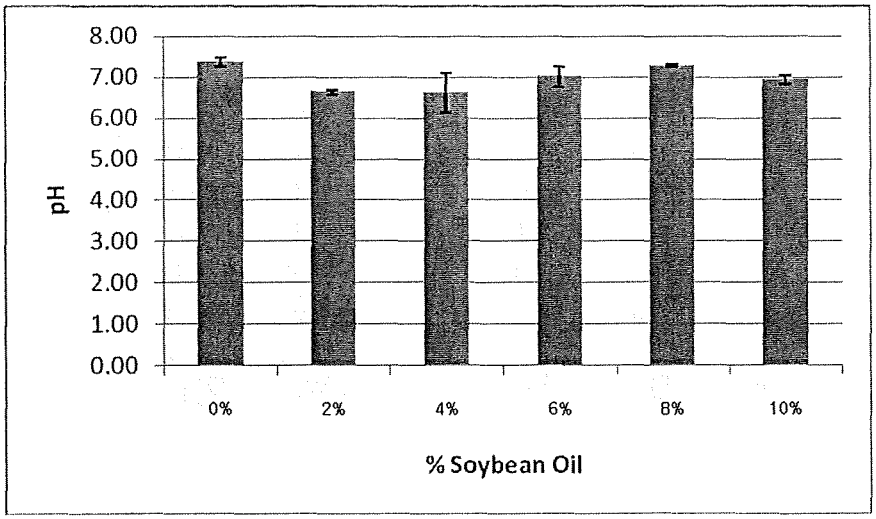
* ΔST คือค่าความแตกต่างของแรงตึงผิวเมื่อเทียบกับวันที่ 0 (52.5 mN/m)



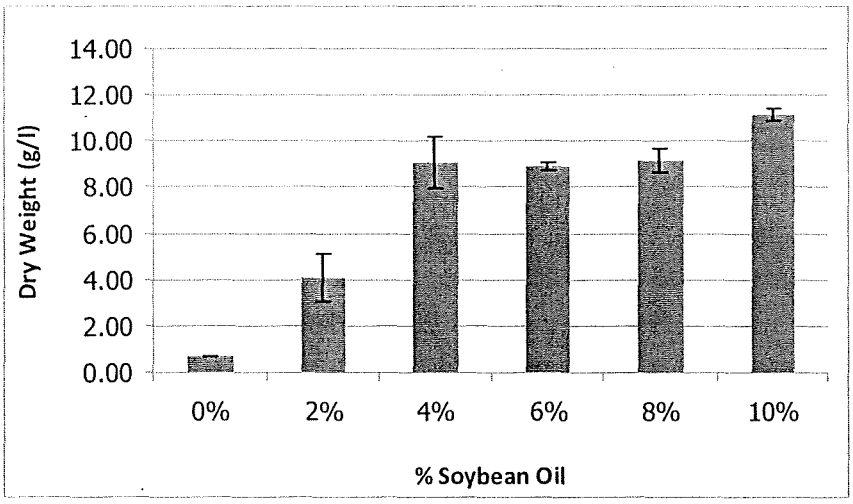
รูปที่ 3.32 แสดงค่าการกระจายน้ำมัน ของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย MUE24 เมื่อใช้น้ำมันถั่วเหลืองแหล่งคาร์บอนที่แปรผันความเข้มข้นต่างๆ



รูปที่ 3.33 แสดงค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย MUE24 เมื่อใช้น้ำมันถั่วเหลืองแหล่งคาร์บอนที่แปรผันความเข้มข้นต่างๆ



รูปที่ 3.34 แสดงค่า pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย MUE24 เมื่อใช้น้ำมันถั่วเหลืองแหล่งคาร์บอนที่แปรผันความเข้มข้นต่างๆ

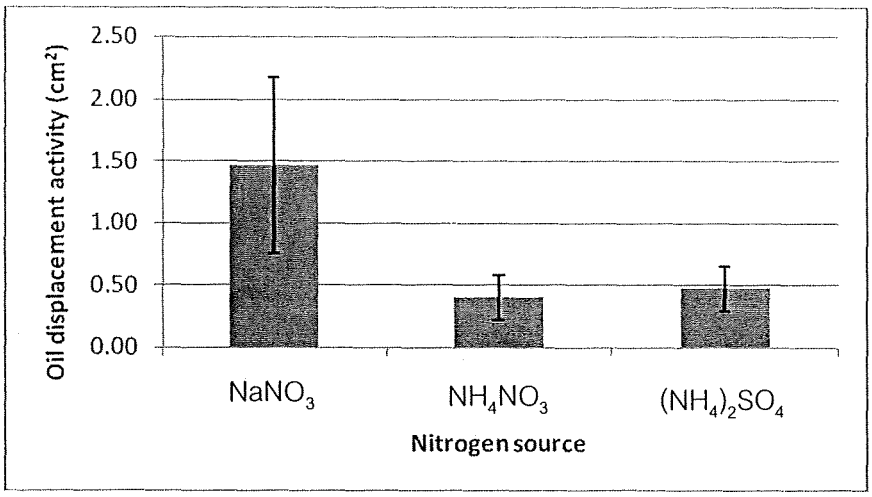


รูปที่ 3.35 แสดงค่า น้ำหนักเซลล์แห้งของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย MUE24 เมื่อใช้น้ำมันถั่วเหลืองแหล่งคาร์บอนที่แปรผันความเข้มข้นต่างๆ

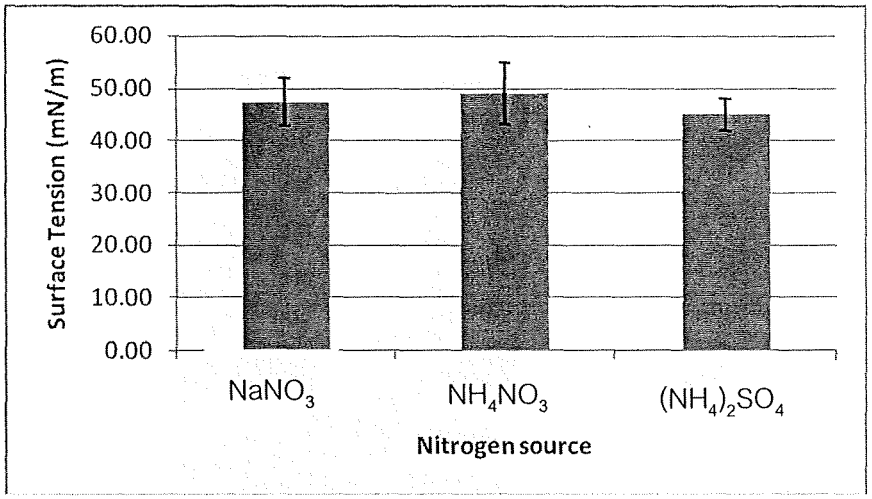
เมื่อทำการแปรผันแหล่งไนโตรเจน พบว่า 0.4% $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Pichia anomala* MUE24 ให้ผลค่าการกระจายตัวของน้ำมันสูงสุดเท่ากับ 6.15 cm^2 และค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 41.5 mN/m ดังแสดงในตารางที่ 3.22

ตารางที่ 3.26 น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าแรงตึงผิว ค่าการกระจายน้ำมัน และค่า pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย MUE 24 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ที่ 30°C เป็นเวลา 5 วัน

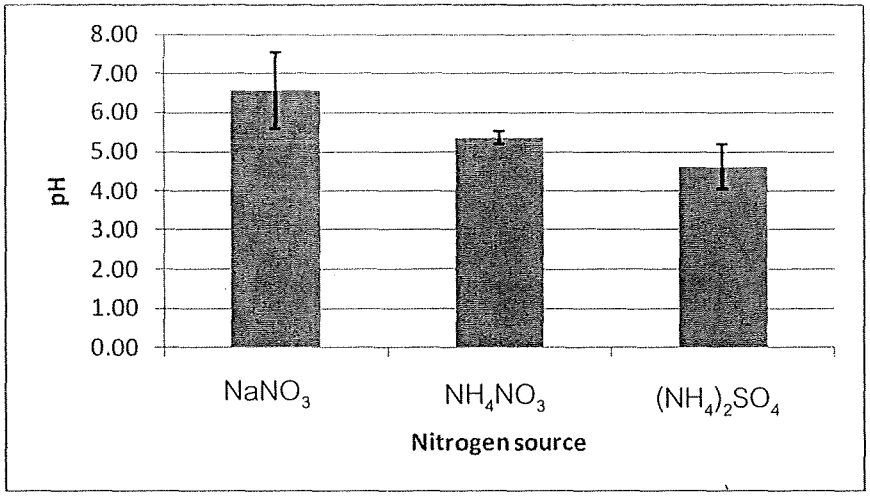
แหล่งไนโตรเจน (0.2% w/v)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	ΔST_{b-t} (mN/m)	ค่าการกระจายตัวของน้ำมัน (cm^2)	ค่า pH
$NaNO_3$	9.95±1.24	41.5±4.51	16	6.15±0.71	7.19±0.97
NH_4NO_3	2.4489±0.09	43±6.00	10	3.14±0.18	3.84±0.16
$(NH_4)_2SO_4$	1.9433±0.22	50±3.00	2	0.28±0.18	3.44±0.56



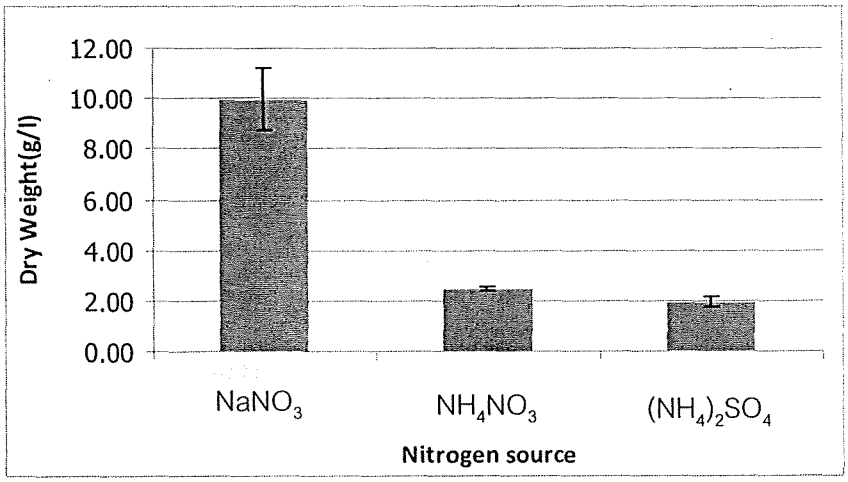
รูปที่ 3.36 แสดง ค่าการกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย MUE24 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนต่างๆ



รูปที่ 3.37 แสดงค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย MUE24 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนต่างๆ



รูปที่ 3.38 แสดงค่า pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย MUE24 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนต่างๆ



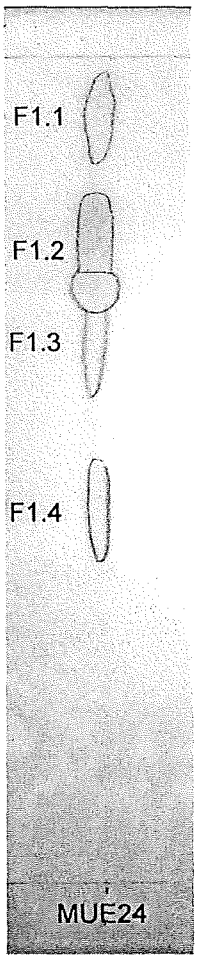
รูปที่ 3.39 แสดงค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย MUE24 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนต่างๆ

15. การผลิตและการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ทำการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากยีสต์ *Pichia anomala* สายพันธุ์ MUE24 ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่ประกอบด้วย 0.02% KH_2PO_4, 0.02% $MgSO_4.7H_2O$, 0.1% สารสกัดยีสต์ 0.4% $NaNO_3$ และ 4% น้ำมันถั่วเหลือง ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในระดับขวดเขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน

16. การเตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนและวิเคราะห์องค์ประกอบของสารโดยวิธีโครมาโตกราฟี

การเตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธี analytical TLC โดยนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนมาตรวจสอบบนแผ่น TLC silica gel 60 เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยคลอโรฟอร์ม ต่อ เมทานอล ต่อ น้ำ (65: 25: 4) แล้วทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารด้วยไอระเหยของไอโอดีน (Passeri และคณะ, 1992) พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จากสายพันธุ์กลาย MUE24 สามารถแยกสารออกได้เป็น 4 ลำดับส่วน เรียกว่า F1.1 ถึง F1.4 โดยมีค่าคงที่ของอัตราส่วนการเคลื่อนที่ (R_f) เป็น 0.92, 0.75, 0.64 และ 0.43 ตามลำดับ เมื่อนำแต่ละลำดับส่วนมาตรวจสอบประสิทธิภาพด้วยการวัดค่าการกระจายน้ำมัน พบว่ายีสต์สายพันธุ์กลาย MUE24 ที่ลำดับส่วน F1.3 และ F1.4 มีค่าการกระจายน้ำมันสูงที่สุดที่ 18.09 ตางรางเซนติเมตร ดังแสดงในตารางที่ 3.23



รูปที่ 3.40 การวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากสายพันธุ์กลาย MUE24 ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบ analytical Thin-Layer Chromatography

ตารางที่ 3.27 อัตราการเคลื่อนที่ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และยีสต์สายพันธุ์กลาย ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอนบนแผ่น TLC และค่าการกระจายน้ำมันแต่ละลำดับส่วน

สายพันธุ์	ลำดับส่วนที่	อัตราการเคลื่อนที่ (R_f)	ค่าการกระจายน้ำมัน (cm^2)
MUE24	F1.1	0.92	0.95
	F1.2	0.75	3.46
	F1.3	0.64	18.09
	F1.4	0.43	18.09

17. การวัดค่าดรรชนีการเกิดอิมัลชัน (Emulsion Index) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วน

วัดค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน (Emulsion Index) เมื่อทดสอบกับน้ำมันชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำมันคาโนลา และน้ำมันถั่วเหลือง ตามวิธีของ Shepherd และคณะ (1995) พบว่าความสามารถในการก่ออิมัลชัน (Emulsification activity) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ต่อน้ำมันชนิดต่างๆ มีค่าใกล้เคียงกันคือ มีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร ประมาณ 0.237-0.572 และค่าความเสถียรในการก่ออิมัลชัน (Emulsification stability) หรือค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน(Emulsion Index) ต่อน้ำมันชนิดได้แก่ น้ำมันคาโนลา และน้ำมันถั่วเหลืองที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งให้ค่ามากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำมันคาโนลา คือ ยีสต์สายพันธุ์กลาย PY 12, PY 44, PY 189 และ MUE24และให้ค่ามากกว่า 80-90 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำมันถั่วเหลือง คือยีสต์สายพันธุ์กลาย PY 44 และ MUE 24 ดังแสดงในตารางที่ 3.28

ตารางที่ 3.28 แสดงค่าการก่ออิมัลชัน (Emulsification activity) และความเสถียรของการก่ออิมัลชัน (Emulsification stability) หรือค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน (Emulsion Index) ที่เวลา 24 ชั่วโมง ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ต่อน้ำมันคาโนลา และน้ำมันถั่วเหลือง

สายพันธุ์	ค่าการก่ออิมัลชัน(OD units)		ค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน E_{24}	
	น้ำมันคาโนลา	น้ำมันถั่วเหลือง	น้ำมันคาโนลา	น้ำมันถั่วเหลือง
PY1	0.508	0.545	70.67	73.76
PY 12	0.237	0.572	91.56	61.54
PY 44	0.493	0.345	91.89	91.01
PY 189	0.309	0.473	97.73	77.59
MUE 24	0.257	0.301	94.14	88.53

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ยีสต์ *Pichia anomala* PY1 ที่ใช้ในการทดลองนี้ถูกแยกมาจากข้าวหมากที่อำเภอพนัสนิคม จังหวัด ชลบุรี โดยนางสาวธนัสถา เชียงอุทัย เมื่อปี พ.ศ. 2549 จากการศึกษาการเจริญ และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน มี $NaNO_3$ 0.4 % เป็นแหล่งไนโตรเจน ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน โดยส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเซลล์ มีค่าการกระจายน้ำมันสูงสุด 5.07 ตารางเซนติเมตร มีค่าแรงตึงผิวต่ำสุดในวันที่ 7 เท่ากับ 38 มิลลินิวตันต่อเมตร และเมื่อทำการก่อการกลายพันธุ์เพื่อเพิ่มการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยสาร Ethylmethane sulfonate โดยนางสาวศิตา วีรกุล พ.ศ.2550 และ การก่อการกลายพันธุ์โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสาร Ethylmethane sulfonate โดยนางสาวพรทิพย์ ศิริเรืองสกุล พ.ศ.2551 จึงได้คัดเลือกยีสต์สายพันธุ์กลาย PY 12, PY 44, PY 189 และ MUE24 มาทำการศึกษาต่อ ในการศึกษาการเจริญ และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน มี $NaNO_3$ 0.4 % เป็นแหล่งไนโตรเจน ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน พบว่ายีสต์สายพันธุ์กลาย PY 12 ให้ค่าการกระจายน้ำมันสูงสุดในวันที่ 7 เท่ากับ 7.94 ตารางเซนติเมตร มีค่าแรงตึงผิวต่ำสุดในวันที่ 7 ΔST เท่ากับ 26 มิลลินิวตันต่อเมตร ยีสต์สายพันธุ์กลาย PY 44 ให้ค่าการกระจายน้ำมันสูงสุดในวันที่ 7 เท่ากับ 9.62 ตารางเซนติเมตร มีค่าแรงตึงผิวต่ำสุดในวันที่ 5 ΔST เท่ากับ 24 มิลลินิวตันต่อเมตร ยีสต์สายพันธุ์กลาย PY 189 ให้ค่าการกระจายน้ำมันสูงสุดในวันที่ 7 เท่ากับ 10.18 ตารางเซนติเมตร มีค่าแรงตึงผิวต่ำสุดในวันที่ 7 ΔST เท่ากับ 26 มิลลินิวตันต่อเมตรและเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ *Pichia anomala* PY1 พบว่ายีสต์สายพันธุ์กลายสามารถให้พื้นที่กระจายน้ำมันได้ดีกว่าประมาณ 1.14 1.69 และ 2.15 เท่า ตามลำดับ และมี ΔST อยู่ในช่วง 24-26 มิลลินิวตันต่อเมตร

เมื่อทำการศึกษาการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีกลูโคส 8% เป็นแหล่งคาร์บอน ยีสต์สายพันธุ์กลาย MUE 24 ให้ค่าการกระจายน้ำมันสูงสุดในวันที่ 5 เท่ากับ 1.7 ตารางเซนติเมตร มีค่าแรงตึงผิวต่ำสุดในวันที่ 5 ΔST เท่ากับ 21 มิลลินิวตันต่อเมตร ซึ่งในขณะที่ PY1 ให้พื้นที่การกระจายน้ำมัน 0.3 ตารางเซนติเมตร ในวันที่ 7 ในอาหารชนิดเดียวกัน ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ PY1 ประมาณ 5.67

เท่า และยังให้ผลเร็วกว่า คือในวันที่ 5 ขณะที่ ΔST ให้ค่าใกล้เคียงกับสายพันธุ์ PY1 และเมื่อเลี้ยงสายพันธุ์กลาย MUE 24 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 4% น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน จะให้ค่าการกระจายน้ำมันสูงสุดเท่ากับ 17.64 ตารางเซนติเมตรในวันที่ 5 เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ PY 1 ซึ่งให้ค่าการกระจายน้ำมันสูงสุดเท่ากับ 5.07 ตารางเซนติเมตรในวันที่ 7 จะมีค่ามากกว่าประมาณ 3 เท่า และให้ผลเร็วกว่าสายพันธุ์เดิม

การเตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย analytical Thin-Layer Chromatography แล้วทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารด้วยไอระเหยไอโอดีน พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากยีสต์ *Pichia anomala* PY1 สามารถแยกสารออกได้เป็น 4 ลำดับส่วน เรียกว่า F1 ถึง F4 โดยมีค่าคงที่ของอัตราส่วนการเคลื่อนที่ (R_f) เป็น 0.94, 0.83, 0.75 และ 0.58 ตามลำดับ ยีสต์สายพันธุ์กลาย PY 12 สามารถแยกสารออกได้เป็น 3 ลำดับส่วน เรียกว่า Fa ถึง Fc โดยมีค่าคงที่ของอัตราส่วนการเคลื่อนที่ (R_f) เป็น 0.96, 0.78 และ 0.61 ตามลำดับ ยีสต์สายพันธุ์กลาย PY 44 สามารถแยกสารออกได้เป็น 3 ลำดับส่วน เรียกว่า Fd ถึง Ff โดยมีค่าคงที่ของอัตราส่วนการเคลื่อนที่ (R_f) เป็น 0.95, 0.84 และ 0.60 ตามลำดับ ยีสต์สายพันธุ์กลาย PY 189 สามารถแยกสารออกได้เป็น 4 ลำดับส่วน เรียกว่า Fg ถึง Fj โดยมีค่าคงที่ของอัตราส่วนการเคลื่อนที่ (R_f) เป็น 0.95, 0.83, 0.74 และ 0.59 ตามลำดับ และยีสต์สายพันธุ์กลาย MUE24 สามารถแยกสารออกได้เป็น 4 ลำดับส่วน เรียกว่า F1.1 ถึง F1.4 โดยมีค่าคงที่ของอัตราส่วนการเคลื่อนที่ (R_f) เป็น 0.92, 0.75, 0.64 และ 0.43 ตามลำดับ เมื่อนำแต่ละลำดับส่วนมาตรวจ สอบประสิทธิภาพด้วยการวัดค่าการกระจายน้ำมัน พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก ยีสต์ *Pichia anomala* PY1 ที่ลำดับส่วน F1 มีค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 2.84 ตารางเซนติเมตร สารลดแรงตึงผิวชีวภาพของยีสต์สายพันธุ์กลาย PY 44 ที่ลำดับส่วน Fe ยีสต์สายพันธุ์กลาย PY 189 ที่ลำดับส่วน Fj มีค่าการกระจายน้ำมันสูงที่สุดและสูงกว่าคือเท่ากับ 3.14 ตารางเซนติเมตร และ MUE24 ที่ลำดับส่วน F1.3 และ F1.4 มีค่าการกระจายน้ำมันสูงที่สุดและสูงกว่าคือเท่ากับ 18.09 ตารางเซนติเมตร

จากการวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และยีสต์สายพันธุ์กลายทั้ง 4 สายพันธุ์ ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบ analytical Thin-Layer Chromatography พบว่า ลำดับส่วน ที่มีการกระจายน้ำมันสูงสุดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากยีสต์สายพันธุ์กลายแต่ละสายพันธุ์ที่มีค่าคงที่ของอัตราส่วนการเคลื่อนที่ (R_f) ที่ต่างจากของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 อาจเพราะสารที่ผลิตจากยีสต์สายพันธุ์กลายมีโครงสร้างและองค์ประกอบของสารที่มีลักษณะแตกต่างจากโครงสร้างของสาร

ลดแรงตึงผิวชีวภาพของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะนำสารที่ผลิตได้จากสายพันธุ์กลายต่างไปศึกษาหาโครงสร้างสารหรือคุณสมบัติอื่นๆต่อไป

เมื่อทำการศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pichia anomala* PY189 และ *Pichia anomala* MUE24 โดยทำการแปรผันแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ผลการทดลองพบว่าน้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุด ส่วนการแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน พบว่าที่ความเข้มข้น 4% ของน้ำมันถั่วเหลือง เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

การศึกษาความสามารถในการก่ออิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้โดยการวัดค่าความเสถียรในการก่ออิมัลชัน (Emulsification stability) และค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน (Emulsion Index) ต่อน้ำมัน 2 ชนิดได้แก่ น้ำมันคาโนลา และน้ำมันถั่วเหลืองที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งให้ค่าค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำมันคาโนลา คือ ยีสต์สายพันธุ์กลาย PY 12, PY 44, PY 189 และ MUE 24 และให้ค่าค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันมากกว่า 80-90 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำมันถั่วเหลือง คือยีสต์สายพันธุ์กลาย PY 44 และ MUE 24

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ธนัสถา เชียงอุทัย. 2549. การผลิตและลักษณะสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากยีสต์ที่คัดเลือกได้ วิทยานิพนธ์ ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาษาอังกฤษ

Babu, P. S., Vaidya, A. N., Bal, A. S., Kapur, R., Juwarkar, A., and Khanna, P. 1996. Kenetic of biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* strain BS2 from industrial waste. Biotechnol. Lett. 18: 263– 268.

Cameotra, S. S. and Makkar, R. S. 1998. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. Appl. Miocrobiol. Biotechnol. 50: 520- 529.

Casas, J.A., S. Garcia de Lara, and F. Garcia-Ochoa. 1997. Optimization of a synthetic medium for *Candida bombicola* growth using factorial design of experiments. Enz. Microb. Technol. 21: 221-229.

Cavalero D. A., Cooper D. G., 2003. The effect of medium composition on the structure and physical state of sophorolipids produced by *Candida biombicola* ATCC 22214. J. Biotechnol. 103, 31-41.

Cirigliano, M. C. and Carman, G. M. 1985. Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. Appl. Environ. Microbiol. 50: 846- 850.

Cook, A. H. 1958. The Chemistry and Biology of Yeasts. New York. 63: 251.

Cooper, D. G., and Paddock, D. A. 1983. *Torulopsis petrophilum* and surface activity. Appl. Environ. Microbiol. 46: 1426- 1429.

Cooper, D. G., and Paddock, D. A. 1984. Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. Appl. Environ.Microbiol. Jan. 173-176.

Cooper, D. G., and Zajic, J. E. 1980. Surface active compounds from microorganism. Adv. Appl. Microbiol. 16: 229-256.

Culter, A. J. and Light, R. J. 1979. Regulatio of hydroxydocosanoic and sophoroside production in *Candida bogoriensis* by the level of glucose and yeast extract in the growth medium. J. Biol. Chem. 254: 1944- 1950. In Desai, J. D., and Banet, I. M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbio. Mol. Bio. Rev. 61: 47-64.

Daniel, H. J. , Otto, R. T., Binder, M., and Syldatk, C. 1998. Sophorolipid production with high yields on whey concentrated and rape seed oil without consumption of lactose. Biotechnol. Lett. 20: 805–807.

Desai, J. D., and Banet, I. M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbio. Mol. Bio. Rev. 61: 47-64.

Deshande M., Daniels L. 1995. Evaluation of sophorolipid biosurfactant production by. *Candida bombicola* using animal fat. Biores. Technol. 54, 143-150.

Fiechter, A. 1992. Biosurfactants: moving towards industrial application. Trends. Biotechnol. 10: 208 –217.

Frautz, B., Lang, S., and Wagner, F. 1986. Formation of cellobiose lipids by growing and resting cells of *Ustilago maydis*. Biotechnol. Lett. 8: 757- 762.

Gerson, D.F. 1993. The biophysics of microbial surfactants: Growth on concentration, but also on surface property of cells and insoluble substrates. p. 257–268. *In* Kosaric, N. Biosurfactants:. Production, properties, application. Marcel Dekker, New York.

Gillman, L. B. 1993. A review of instruments for static and dynamic surface and interfacial tension measurement. Present at the seminar by Kruss Gmbtt and Scientific promotion Co., Ltd., at Indra Regent Hotel, BK. Thailand, October 30, 1997.

Guerra- Santos, L., Kappeli, O., and Fiechter, A. 1986. Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. Appl. Environ. Microbiol. 24: 443- 448.

Hommel, R. K. and Huse, K. 1993. Regulation of sophorose lipid production by *Candida (Torulopsis) apicol*a. Biotechnol. Lett. 15: 853- 858.

Hommel, R. K., Weber, L., Weiss, A., Himmelreich, U., Rilke, O., and Kleber, H. P. 1994. Production of sophorose lipid by *Candida* (*Torulopsis*) *apicola* grown on glucose. J. Biotechnol. 33: 147- 155.

Inoue, S. and Itoh, S. 1982. Sophorolipids from *Torulopsis bombicola* as microbial surfactants in alkane fermentation. Biotechnol. Lett. 4: 3- 8.

Ishigami, Y. and S. Suzuki. 1997. Development of biochemicals- funtionalization of biosurfactants and nutural dyes. *Prog. Org. Coat.* 31: 51- 61.

Iqbal, S., Khalid, Z. M. and Malik K. A. 1995. Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactants by a gamma ray induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. Lett. Appl. Microbiol. 21, 176–179

Kappeli, O. and Fiechter, A. 1977. Component from the cell surface of the hydrocarbon-utilizing yeast *Candida tropicalis* with possible relation to hydrocarbon transport. J. Bacteriol. 133: 952- 958.

Kim, H. S., Yoon, B. D., Choung, D. H., Oh, H. M., Katsuragi, T., and Tani, Y. 1999. Characterization of a biosurfactant, monosylerythritol lipid produced from *Candida* sp. SY 16. Appl.Microbial Biotechnol. 52: 713-721.

Kitamoto, D., Akiba, S., Hioki, C., and Tabuchi, T. 1990. Production of mannosylerythritol lipids by *Candida antarctica* from vegetable oils. Agric. Biol. Chem. 54(1): 37-40.

Kitamoto, D., Fuzishiro, T., Yanagishita, H., and Nakahara, T. 1992. Production of mannosylerythritol lipids as biosurfactants by resting cells of *Candida antarctica*. Biotechnol. Lett. 14:305- 310.

Kitamoto, D., Haneishi, K., Nakahara, T., and Tabuchi, T. 1990. Production of mannosylerythritol lipids by *Candida antarctica* from vegetable oils. Agric. Biol. Chem. 54: 37–40.

Kitamoto , D., Hiroshi Yanagishita, Toshio, S., Takashi, N., Chiyoshi, K., and Tadaatsu, N. 1993. Surface active properties and antimicrobial activities of mannosylerythritol lipid as biosurfactants produced by *Canndida antractica*. J. Biotech. 29: 91-96.

Kitamoto , D., Ikegami, T., Suzuki, T., Sasaki, A., Takeyama, Y., Idemoto, Y., Koura, N., and Yanagishita, H. 2001. Microbial conversion of n- alkanes into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma* (*Candida antractica*). Biotechnol. Lett. 23: 1709- 1714.

Kitamoto, D., Isoda, H., and Nakahara, T. 2002. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants from energy-saving materials to gene delivery carriers. J. Biosci Bioeng. 94:187–201.

Kosaric, N., Cairns, W. L., Gray, N. C. C., Stechey, D., and Wood, J. 1984. The role of nitrogen in multiorganism strategies for biosurfactant production. J. Am Oil Chem. Soc. 61: 1735–1743.

Kosaric, N. 1993. Biosurfactants Production Applications. Surfactnt Science Series: vol 48. Mercel Dekker, Inc. New York.

Lang, S. and Wullbrandt, D. 1999. Rhamnose lipids biosynthesis microbial production and application potential. Appl. Microbiol. Biotechnol. 51: 22- 32.

Lee, K. H. and Kim, J. H. 1993. Distribution of substrates carbon in sophorose lipid production by *Torulopsis bombicola*. Biotecnol. Lett. 15(3): 263- 266.

Lin, S. C., Lin K. G., Lo C. C., and Lin Y. M. 1998. Enhanced biosurfactant production by a *Bacillus licheniformis* mutant. Enzyme Microb. Technol. 23, 267–273

Mahmoud, Y.A. 1999. Effect of ethyl methane sulphonate on biomass and protein production by *Candida tropicalis*. Cytobios ;99(391):123-8.

Maier, M. and Soberon-Chavez, R. & G. 2000. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 54: 625-633.

McCaffrey W. C., Cooper D. G., 1995. Sophorolipids production by *Candida bombicola* using self - cycling fermentation. J. Ferment. Bioeng. 79 (2), 146-151.

Mercade, M. E., Manresa, A., Robert, M., Espuny, M. J., de Andres, C., and Guinea, J. 1993. Olive oil mill effluent (OOME). New substrate for biosurfactant production. Bioresource Technol. 43: 1–6.

Morikawa, M., Daido, H., Takao, T., Murata, S., Shimonishi, Y., and Imanaka, T. 1993. A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. Strain MIS 38. J. Bacteriol. 175: 6459–6466.

Mulligan, C.N., Chow, T. Y. K. and Gibbs, B. F. 1989. Enhanced biosurfactant production by a mutant *Bacillus subtilis* strain. Appl. Microbiol. Biotechnol. 31, 486–489

Papanikolaou, S., Chevalot, I., Komaitis, M., and Marc, I. 2002. Single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing on an industrial derivative of animal fat in batch cultures. Appl. Microbiol. Biotechnol. 58: 308- 312.

Patel, R. M. and Desai, A. J. 1997. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. Letter in Appl. Microbial. 25: 91- 94.

Ramana, K. V. and Karanth, N. G. 1989. Production of biosurfactants by the resting cells of *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6. Biotechnol. Lett. 11:(6): 437- 442.

Ristau, E. and Wagner, F. 1983. Formation of novel anionic trehalosetetraesters from *Rhodococcus erythropolis* under growth limiting conditions. Biotechnol. Lett. 5: 95- 100.

Rosenberg, E., Zuckerberg, A., Rubinovitz, C., and GUTNICK, D. L. 1979. Emulsifier *Arthrobacter* RAG- 1: isolation and emulsifying properties. Appl. Environ. Microbiol. 37: 402- 408.

Rau, U., Hammen, S., Heckmann, R. Wray, V., and Lang, S. 2001. Sophorolipids: a source for novel compounds. Industrial Crops and Products. 13: 85-92.

Tahzibi, A. Kamal, F. and Assadi, M. M. 2004. Improved production of rhamnolipids by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant. J. Iran. Biomed. 8, 25–31

Thaniyavarn, J., T. Chainguthai, P. Sangvanich, N. Roongsawang, K. Washio, M. Morokawa, and S. Thaniyavarn. 2008. Production of sophololipid biosurfactant by *Pichia anomala*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 72 (8): 2061–2068.

Thanomsub, B., Watcharachaipong, T., Chotelersak, K., Arunrattiyakorn, P., Nitoda, T., and Kanzaki, H. 2004. Monoacylglycerols: glycolipid biosurfactants produced by a thermotolerant yeast, *Candida ishiwadae*. J Appl. Microbiol. 96: 588-592.

Tulloch, A. P., Spencer, J. F. T., and Gorin, P. A. J. 1962. The fermentation of long-chain compounds by *Torulopsis magnoliae*. Structures of the hydroxyl fatty acids obtained by fermentation of fatty acids and hydrocarbons. Can. J. Chem. 40:1326–1338.

Wichken, A. J. and Knox, K. W. 1970. J. Gen. Microbiol. 60: 293- 301. In Cooper, D. G. and Zajic, J. E. 1980. Surface active compounds from microorganisms. Adv. Appl. Microbiol. 26: 229- 256.

Winston, F. 2008. EMS and UV mutagenesis in yeast. In: Curr. Protoc. Mol. Biol.: John Wiley and Sons. Inc., Massachusetts, p. 13.13B.1-13.13B.5.

Zhou, Q. H., and Kosaric, N. 1995. Utilization of canola oil and lactose to produce biosurfactant with *Candida bombicola*. Journal of American Oil Chemists Society. 72(1): 67-71.

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. **อาหารแข็งจากสารสกัดยีสต์และมอลต์** (YM agar)

สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)	0.3	กรัม
สารสกัดมอลต์ (Malt extract)	0.3	กรัม
แบคโตเปปโตน (Bacto peptone)	0.5	กรัม
กลูโคส	1.0	กรัม
วุ้นผง (Agar)	2.3	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ผสมสารให้เข้ากัน ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.5 นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. **อาหารเหลวจากสารสกัดยีสต์และมอลต์** (YM broth)

สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)	0.3	กรัม
สารสกัดมอลต์ (Malt extract)	0.3	กรัม
แบคโตเพปโตน (Bacto peptone)	0.5	กรัม
กลูโคส	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ผสมสารให้เข้ากัน ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.5 นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. **อาหารเหลวกำหนดสูตรที่มี 8% กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน**

โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$)	0.4	กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟส (KH_2PO_4)	0.02	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 7H_2O$)	0.02	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	0.1	กรัม
กลูโคส (Glucose)	8.0	กรัม
น้ำกลั่น (Deionized water)	100.0	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ 5.5 แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. **อาหารเหลวกำหนดสูตรที่มี 4% น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน**

โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$)	2.42	กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.02	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.02	กรัม
สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)	0.10	กรัม
น้ำมันถั่วเหลือง	4.00	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ผสมสารให้เข้ากัน ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.5 นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

วิธีเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. **ฟอสเฟสบัฟเฟอร์** pH 7.0

   โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟส (NaH_2PO_4) 1.50 g. ละลายในน้ำกลั่น 100 ml.

   ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟส(Na_2HPO_4) 3.58 g. ละลายในน้ำกลั่น 100 ml.

   ผสมทั้งสองส่วนเข้าด้วยกันแล้วปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ 7.0 จึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

2. 0.5% **โซเดียมไทโอซัลเฟต**

   ละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต 0.5 กรัมในน้ำกลั่น 100 ml.

3. 5.0% **โซเดียมไทโอซัลเฟต**

   ละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต 5.0 กรัมในน้ำกลั่น 100 ml.

4. **สารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์บัพเฟอร์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ** 8 (50 mM Tris-HCl buffer pH 8)

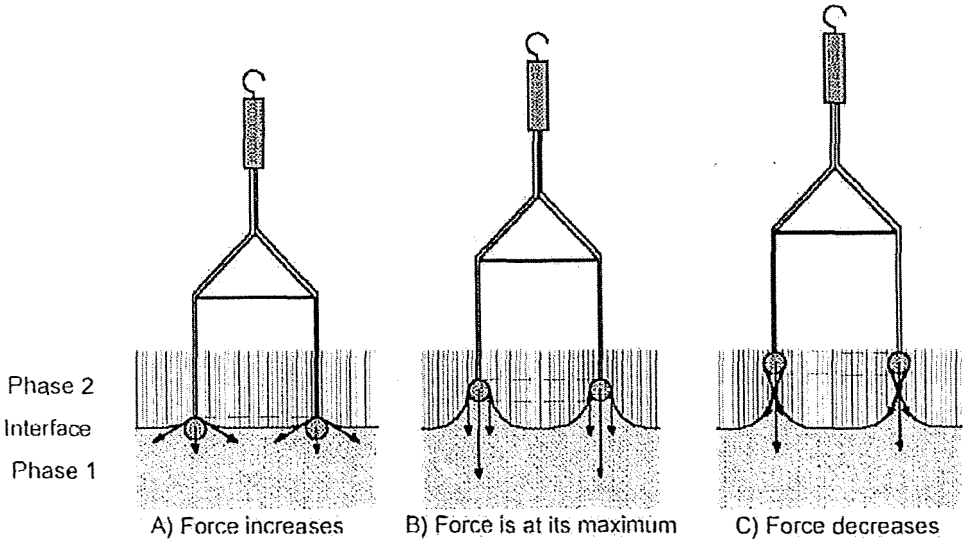
ทริส เบส (Tris base)	0.61	กรัม
น้ำกลั่น	80	มล.

ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น ถ้าหาต้องการทริสไฮโดรคลอไรด์บัพเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรดด่างอื่นๆ ก็ใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นปรับให้มีค่าความเป็นกรดด่างนั้นๆ

ภาคผนวก ค

หลักการการวัดค่าแรงตึงผิวด้วยวิธี Du Nouy Ring

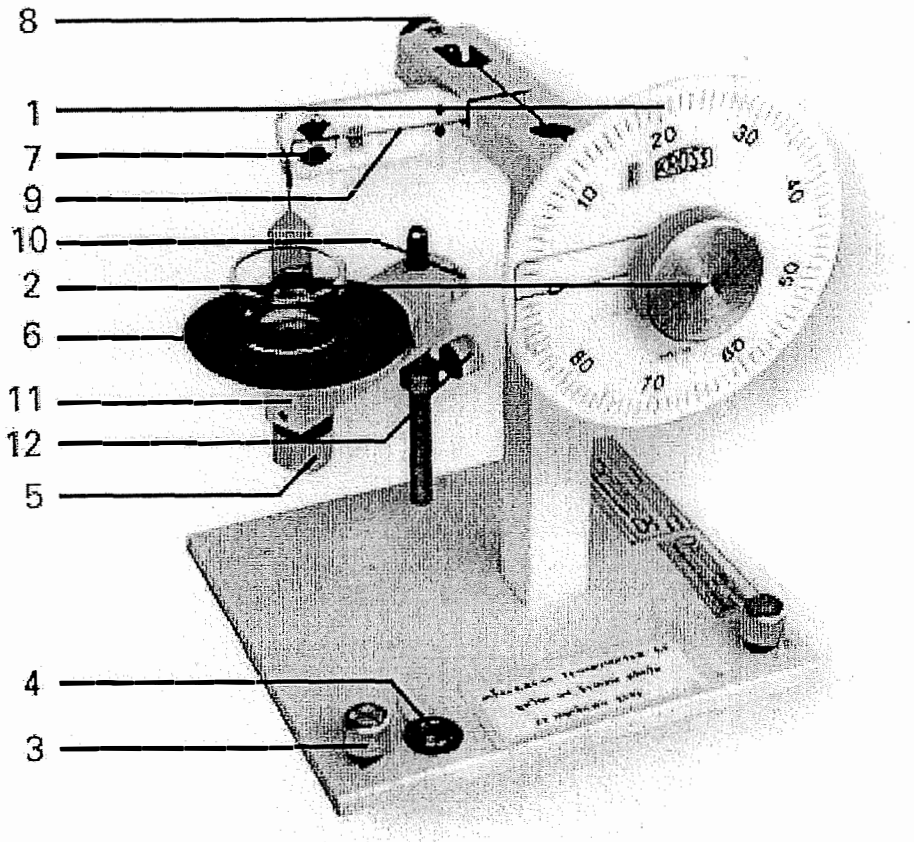
การวัดค่าแรงตึงผิวด้วยวิธี ring method หรือ Du Nouy Ring method ค้นคิดโดย Lecomte Du Nouy ในปี 1919 ซึ่งวิธีนี้จะพิจารณาวงแหวนทองคำขาว (platinum ring) ในแนวระนาบโดยวงแหวนทองคำขาวจะจมในของเหลว และถูกยกขึ้น แรงสูงสุดที่ใช้ในการดึงวงแหวนทองคำพ้นของเหลว คือ ค่าแรงตึงผิว (surface tension)



ภาพแสดงขั้นตอนการวัดค่าแรงตึงผิวด้วยวิธี Du Nouy Ring

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวัดค่าแรงตึงผิว

ลักษณะและองค์ประกอบของเครื่องวัดค่าแรงตึงผิว (Tensiometer) รุ่น K6 ของบริษัท KRUSS ประเทศเยอรมัน เครื่องวัดค่าแรงตึงผิวนี้ทำการวัดที่อุณหภูมิ 25±2 ^{o}ซ ตลอดทำการทดลอง



แสดงองค์ประกอบของเครื่องวัดค่าแรงตึงผิวรุ่น K6 บริษัท KRUSS ประเทศเยอรมัน

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

ขั้นตอนการวัดค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่องวัดค่าแรงตึงผิว มีดังนี้

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

<u>ข้อควรระวัง</u>

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