

การเสริมการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพใน *Pichia anomala* PY1 โดยการกลายพันธุ์

นางสาวพรทิพย์ ศิริเรืองสกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ENHANCEMENT OF BIOSURFACTANT PRODUCTION IN
Pichia anomala PY1 BY MUTATION

Miss Porntip Siriraungsakul

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

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การเสริมการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพใน *Pichia anomala* PY1 โดยการกลายพันธุ์

โดย

นางสาวพรทิพย์ ศิริเรืองสกุล

สาขาวิชา

จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์จิราภรณ์ ธนียวัน

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์จิราภรณ์ ธนียวัน)

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

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

พรทิพย์ ศิริเรืองสกุล : การเสริมการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพใน *Pichia anomala* PY1 โดยการกลายพันธุ์ . (ENHANCEMENT OF BIOSURFACTANT PRODUCTION IN *Pichia anomala* PY1 BY MUTATION) อ. ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์
หลัก : รศ. จิราภรณ์ ธนียวัน 130 หน้า.

เมื่อทำการกลายพันธุ์ *Pichia anomala* PY1 ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตร่วมกับสาร Ethylmethane sulfonate คัดเลือกได้ยีสต์สายพันธุ์กลาย MUE24 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4 % เป็นแหล่งคาร์บอน โดยให้ค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 17.64 ตารางเซนติเมตร ซึ่งมีค่ามากกว่าประมาณ 3 เท่า เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ PY 1 และค่าแรงตึงผิวต่ำสุดเท่ากับ 35 mN/m ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกัน และเมื่อทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของสายพันธุ์กลาย MUE24 พบว่าสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในอาหารเหลวปรับปรุงสูตรที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.02 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 % สารสกัดยีสต์ 0.65 % NaNO_3 0.11 % น้ำมันถั่วเหลือง 13.34 % และกลูโคส 6.66 % (อัตราส่วน 2:1) ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 โดยมีภาวะการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C ในระดับขวดเขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มีค่าแรงตึงผิวต่ำสุด 37.25 mN/m ค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 53.87 ตารางเซนติเมตร และให้ผลผลิตเท่ากับ 0.50 กรัมต่อลิตร จากการวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากยีสต์สายพันธุ์กลาย MUE 24 ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบ Analytical Thin-Layer Chromatography พบว่ามีส่วนประกอบ 4 ส่วน ที่มีค่าคงที่ของอัตราส่วนการเคลื่อนที่ (R_f) เท่ากับ 0.96, 0.89, 0.84 และ 0.69 (Fa-Fd) ตามลำดับ ซึ่งต่างจากของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 โดย Fb ให้ค่าการกระจายน้ำมันสูงสุด และการศึกษาความสามารถในการก่ออิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้โดยการวัด ค่าความเสถียรในการก่ออิมัลชัน (Emulsification stability) และค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน (Emulsion Index) ต่อน้ำมัน 2 ชนิดได้แก่ น้ำมันคาโนลา และน้ำมันถั่วเหลือง ที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งยีสต์สายพันธุ์กลาย MUE 24 ให้ค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันเท่ากับ 94.14 และ 88.53 เปอร์เซนต์ตามลำดับ

ภาควิชา:.....จุลชีววิทยา..... ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา:.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
ปีการศึกษา.....2553..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

5072375623 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS : BIOSURFACTANT / *Pichia anomala* / MUTATION

PORNTIP SIRIRAUNGSAKUL : ENHANCEMENT OF BIOSURFACTANT

PRODUCTION IN *Pichia anomala* PY1 BY MUTATION. ADVISOR : ASSOC.

PROF. JIRAPORN THANİYAVARN, 130 pp.

Mutation of *Pichia anomala* PY1 was conducted by UV and ethylmethane sulfonate (EMS) mutation. Among the mutants isolated, strain MUE24 gave high biosurfactant activity when cultivated in production medium containing 4% soybean oil as a carbon source. The biosurfactant yielded could lower surface tension down to 35 mN/m and 17.64 cm² in term of oil displacement of which is a 3 folds higher than the parent strain. The biosurfactant production by MUE24 consisted KH₂PO₄ 0.02%, MgSO₄.7H₂O 0.02%, NaNO₃ 0.11%, yeast extract 0.64%, soybean oil 13.34% and glucose 6.66% with initial pH of 4.5 while cultivation condition was incubated at 30°C in shake flask at 200 rpm. After 7 days of cultivation, the biosurfactant showed minimum surface tension of 37.25 mN/m, oil displacement activity of 53.87 cm² with yield of 0.5 g/l, hence MUE24 gave a 10 folds increase in oil displacement activity and 2 folds increase yield as compared to parental strain PY1. Analysis of the biosurfactants produced via analytical TLC showed 4 major peaks with R_f of 0.96, 0.89, 0.84 and 0.69 (Fa-Fd) respectively while peak Fb gave highest oil displacement activity. In addition we also observed that the active band with biosurfactant with oil displacement activity gave different R_f than that of parental strain; *Pichia anomala* PY1. Emulsification stability and emulsifying index of MUE24 strain at 24 hours with canola oil and soy bean oil were 94.14% and 88.53% respectively.

Department : Microbiology Student's Signature _____
 Field of Study : Industrial Microbiology Advisor's Signature _____
 Academic Year : 2010 Co-Advisor's Signature _____

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี ด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของ รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ฐนิยวัน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งได้ให้ความรู้ คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ ในการทำวิจัย ตลอดจนตรวจแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์ ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ฐนิยวัน ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการในการสอบ ตลอดจนให้คำแนะนำต่างๆ

กราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร. สวัสดิ์ ลิ้มทอง และรองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบ ตลอดจนให้คำแนะนำต่างๆ และช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาให้ความรู้ ข้อคิดเห็น และคำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัย

ขอขอบคุณงบประมาณแผ่นดิน ปี 2552 ที่สนับสนุนเงินทุนเพื่อกำทำวิจัยนี้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ที่มีส่วนในการช่วยเหลือ และกำลังใจด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านของบัณฑิตวิทยาลัยที่ได้ช่วยอำนวยความสะดวกต่างๆ

ท้ายที่สุดขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และญาติพี่น้องที่ให้การสนับสนุน และความช่วยเหลือ ตลอดจนให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ฌ
สารบัญรูป	ฎ
บทที่	
1. บทนำ	1
2. ประวัติศัณัรวรรณกรรม.....	5
2.1 ความหมายและความสำคัญของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	7
2.2 การจัดจำแนกชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	11
2.3 จลนศาสตร์การหมักสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	26
2.4 กระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	28
2.5 แหล่งอาหารที่มีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	29
2.6 กระบวนการผลิตไฮโฟโรลิพิด.....	33
2.7 ประโยชน์และการประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	36
2.8 การกลายพันธุ์.....	43
3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง	49
4. ผลการทดลอง.....	64
4.1 การทดสอบความสามารถในการผลิตของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของยีสต์ <i>Pichia anomala</i> PY1.....	64
4.2 การกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต	66
4.3 การทดสอบความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของยีสต์สาย พันธุ์กลาย.....	68
4.4 การกลายพันธุ์ครั้งที่สองด้วยสาร Ethyl methane sulfonate (EMS).....	84

4.5 การเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ <i>Pichia anomala</i> PY1 และสายพันธุ์กลายในอาหารเหลว.....	86
4.6 การศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของสายพันธุ์กลาย MUE24.....	90
4.7 การผลิตและการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	105
4.8 การแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและวิเคราะห์องค์ประกอบของสารโดยวิธีโครมาโตกราฟี.....	105
4.9 การวัดค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน (Emulsion Index) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วน.....	107
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	109
รายการอ้างอิง.....	112
ภาคผนวก.....	122
ภาคผนวก ก.....	123
ภาคผนวก ข.....	126
ภาคผนวก ค.....	127
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	130

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ..... 25
2.2	หน้าที่ต่างๆของสารลดแรงตึงผิวที่ใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์ในอาหารชนิดต่างๆ ตัวอย่าง..... 39
2.3	สิทธิบัตรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตด้วยจุลินทรีย์..... 40
2.4	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากยีสต์ในแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน..... 42
4.1	ความกว้างของบริเวณใส และขนาดโคโลนีของยีสต์ <i>Pichia anomala</i> PY1 เมื่อบ่มบนอาหารแข็ง Yeast Malt Extract ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 3, 5 และ 7 วัน 64
4.2	แสดงค่าน้ำหนักแห้ง ค่าแรงตึงผิว ค่าความเป็นกรดต่าง และค่าการกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเซลล์ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ <i>Pichia anomala</i> PY1 ในอาหารเหลว กำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน มี NaNO ₃ 0.4 % เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน..... 65
4.3	ค่า CFU/ml. ของชุดควบคุม..... 67
4.4	แสดงค่า CFU/ml. ของชุดก่อนการกลายพันธุ์ที่ได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ต..... 67
4.5	การทดสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบนอาหารแข็ง Yeast Malt Extract ของยีสต์ <i>Pichia anomala</i> PY1 และสายพันธุ์กลาย..... 68
4.6	แสดงการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของยีสต์สายพันธุ์กลายเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ PY1 ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีกลูโคส 8% เป็นแหล่งคาร์บอนเป็นเวลา 7 วัน..... 76
4.7	แสดงพื้นที่การกระจายน้ำมัน ค่าแรงตึงผิวในของน้ำเลี้ยงเชื้อ ค่าความเป็นกรดต่างและค่าน้ำหนักแห้ง เมื่อทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ <i>Pichia anomala</i> PY1 และสายพันธุ์กลายในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน..... 79
4.8	แสดงบริเวณใสบนอาหารแข็ง Yeast Malt Extract ของยีสต์ <i>Pichia anomala</i> PY1 และสายพันธุ์กลายในแต่ละรุ่น..... 83
4.9	แสดงค่า CFU/ml. ของชุดควบคุม..... 84
4.10	แสดงค่า CFU/ml. ของยีสต์สายพันธุ์กลาย MU28 ที่ก่อการกลายพันธุ์ด้วยสาร EMS ที่ปริมาณต่างๆ..... 85
4.11	แสดงการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของยีสต์ <i>Pichia anomala</i> PY1 สายพันธุ์กลาย MU28 และ MU28 ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยสาร EMS ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีกลูโคส 8% เป็นแหล่งคาร์บอนเป็นเวลา 7 วัน..... 87

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.12 แสดงการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของยีสต์ <i>Pichia anomala</i> PY1 สายพันธุ์กลาย MU28 และ MU28 ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยสาร EMS ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มี น้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอนเป็นเวลา 7 วัน.....	89
4.13 แสดงค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าแรงตึงผิว ค่าการกระจายน้ำมัน และค่า pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อ จากสายพันธุ์กลาย MUE 24 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ที่ 30°C เป็นเวลา 7 วัน.....	90
4.14 แสดงค่าแรงตึงผิว ค่าการกระจายน้ำมัน และค่า pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย MUE 24 เมื่อแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนน้ำมันถั่วเหลืองร่วมกับน้ำตาลกลูโคส ในอัตราส่วน 1:1 ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	92
4.15 แสดงค่าแรงตึงผิว ค่าการกระจายน้ำมัน และค่า pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย MUE 24 เมื่อแปรผันอัตราส่วนแหล่งคาร์บอนน้ำมันถั่วเหลืองร่วมกับน้ำตาลกลูโคสที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	94
4.16 แสดงค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าแรงตึงผิว ค่าการกระจายน้ำมัน และค่าความเป็นกรดต่าง ของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย MUE 24 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆที่ 30°C เป็นเวลา 7 วัน.....	96
4.17 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าแรงตึงผิว ค่าการกระจายน้ำมัน และค่า pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อ จากสายพันธุ์กลาย MUE 24 เมื่อแปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยง เชื้อที่ใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	98
4.18 แสดงค่าแรงตึงผิว ค่าการกระจายน้ำมัน และค่า pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย MUE 24 เมื่อแปรผันอัตราส่วนแหล่งไนโตรเจน NaNO_3 ร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	99
4.19 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าแรงตึงผิว ค่าการกระจายน้ำมัน และค่า pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อ จากสายพันธุ์กลาย MUE 24 เมื่อแปรผันค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ใช้น้ำมันถั่วเหลืองร่วมกับน้ำตาลกลูโคสในอัตราส่วน 2:1 เป็นแหล่งคาร์บอนที่ 30 องศา เซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	101

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.20 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าแรงตึงผิว ค่าการกระจายน้ำมัน และค่า pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อ จากสายพันธุ์กลาย MUE 24 เมื่อแปรผันอุณหภูมิต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ใช้น้ำมันถั่วเหลืองร่วมกับน้ำตาลกลูโคสในอัตราส่วน 2:1 เป็นแหล่งคาร์บอนที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 7 วัน.....	103
4.21 อัตราการเคลื่อนที่ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากยีสต์ <i>Pichia anomala</i> PY1 และยีสต์สายพันธุ์กลาย MUE 24 ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอนบนแผ่น TLC และค่าการกระจายน้ำมันแต่ละลำดับส่วนที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.....	107
4.22 แสดงค่าการก่ออิมัลชัน (Emulsification activity) และความเสถียรของการก่ออิมัลชัน (Emulsification stability) หรือค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน (Emulsion Index) ที่เวลา 24 ชั่วโมง ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้อ่อน้ำมันคาโนลา และน้ำมันถั่วเหลือง.....	108

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ลักษณะโครงสร้างทั่วไปของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	7
2.2 การเกิดโครงสร้างไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในน้ำเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจนถึงจุด Critical Micelle Concentration (CMC).....	8
2.3 โครงสร้างและการจัดเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	9
2.4 โครงสร้างของแรมโนลิพิด ชนิด R1, R2, R3, R4, A และ B ที่ผลิตโดย <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
2.5 โครงสร้างของ Trehalose dimycolate จาก <i>Rhodococcus erythropolis</i>	12
2.6 โครงสร้างของไซโฟโรลิพิดจาก <i>Torulopsis bombicola</i> แสดงไดเมอริกไซโฟโรสที่เชื่อมต่อกับสายยาวของ hydroxyl fatty acid (C18).....	13
2.7 โครงสร้างของไซโฟโรลิพิดจาก <i>Torulopsis bombicola</i>	13
2.8 โครงสร้างของไซโฟโรลิพิดจาก <i>Candida bombicola</i> ซึ่งแสดงโครงสร้างของ lactic form และ acid form.....	14
2.9 โครงสร้างของ α -diglucosyldiglyceride , R = หมู่อัลคิล.....	14
2.10 โครงสร้างของ Mannosylerythritol lipid (MEL) จาก <i>Pseudozyma (Candida) antarctica</i> T- 34.....	15
2.11 โครงสร้างของ cellobiose lipid จาก <i>Ustilago maydis</i> ATCC 14826.....	16
2.12 โครงสร้างของเซอร์แฟกตินจาก <i>Bacillus subtilis</i>	17
2.13 โครงสร้างของไลโปเพปไทด์ชนิดต่าง ๆ.....	18
2.14 โครงสร้างของ lichenysin A.....	18
2.15 โครงสร้างของ ornithine containing lipid จาก <i>Pseudomonas rubescens</i>	19
2.16 โครงสร้างของ viscosin จาก <i>Pseudomonas fluorescens</i>	19
2.17 โครงสร้างของ cerilipin จาก <i>Gluconobacter cerinus</i>	20
2.18 โครงสร้างของ surface-active lipopeptide ที่ผลิตโดย <i>B. licheniformis</i>	20
2.19 โครงสร้างของฟอสโฟลิพิด.....	22
2.20 โครงสร้างของฟอสฟาติลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) จาก <i>Acinetobacter</i> sp.....	22
2.21 โครงสร้างของอิมัลชันจาก <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	23
2.22 รูปแบบการเจริญของเชื้อแบบต่าง ๆ.....	27

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่	หน้า	
2.23	กระบวนการผลิตสาร Mannosylerythritol lipid (MEL) จาก <i>Candida Antarctica</i> T-34	29
2.24	แสดงกระบวนการผลิตไซโฟโรลิพิดจาก <i>Candida bombicola</i> ATCC 22214.....	35
2.25	แสดงการเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยรังสียูวี.....	45
2.26	โครงสร้างสาร 5-bromouracil และ 2 Aminopurine.....	46
2.27	การกลายพันธุ์โดยใช้สาร 5-bromouracil (5BU)	46
2.28	โครงสร้างทางเคมีของสาร Ethylmethanesulphonate.....	47
2.29	แสดงการเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยสาร EMS.....	48
3.1	แสดงลักษณะการกระจายตัวของน้ำมัน.....	54
4.1	แสดงค่าน้ำหนักแห้ง ค่าความเป็นกรดต่าง พื้นที่การกระจายน้ำมัน และค่าแรงตึงผิวใน ของน้ำเลี้ยงเชื้อ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ <i>Pichia anomala</i> PY1 ในอาหารเหลว กำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน มี NaNO_3 0.4 % เป็นแหล่ง ไนโตรเจน.....	66
4.2	แสดงร้อยละการรอดของ <i>Pichia anomala</i> PY1 ที่ก่อการกลายพันธุ์ด้วยรังสี อัลตราไวโอเล็ต ที่ช่วงเวลาต่างๆ.....	67
4.3	แสดงค่าการกระจายน้ำมันของยีสต์ <i>Pichia anomala</i> PY1 และสายพันธุ์กลายใน อาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน.....	81
4.4	ค่าแรงตึงผิวในแต่ละวันของยีสต์ <i>Pichia anomala</i> PY1 และสายพันธุ์กลายในอาหาร เหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน.....	81
4.5	ค่าความเป็นกรดต่างในแต่ละวันของยีสต์ <i>Pichia anomala</i> PY1 และสายพันธุ์กลายใน อาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน.....	82
4.6	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งในแต่ละวันของยีสต์ <i>Pichia anomala</i> PY1 และสายพันธุ์กลายใน อาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน.....	82
4.7	แสดงร้อยละการรอดของยีสต์สายพันธุ์กลาย MU 28 ที่ก่อการกลายพันธุ์ด้วยสาร EMS ที่ปริมาณต่างๆ.....	85
4.8	แสดงค่าการกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก สายพันธุ์กลาย MUE24 เมื่อใช้แหล่ง คาร์บอนชนิดต่างๆ ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	91

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.9 แสดงค่าแรงดึงผิว ของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก สายพันธุ์กลาย MUE24 เมื่อใช้ แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	91
4.10 แสดงค่าการกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก สายพันธุ์กลาย MUE24 เมื่อใช้น้ำมันถั่วเหลืองแหล่งคาร์บอนที่แปรผันความเข้มข้นต่างๆ ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน...	93
4.11 แสดงค่าแรงดึงผิว ของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก สายพันธุ์กลาย MUE24 เมื่อใช้น้ำมันถั่วเหลืองแหล่งคาร์บอนที่แปรผันความเข้มข้นต่างๆ ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	93
4.12 แสดงการกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก <i>Pichia anomala</i> PY1 ที่ใช้น้ำมันถั่วเหลืองร่วมกับน้ำตาลกลูโคสในอัตราส่วนต่างๆ กันเป็นแหล่งคาร์บอนที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	95
4.13 แสดงค่าแรงดึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก <i>Pichia anomala</i> PY1 ที่ใช้น้ำมันถั่วเหลืองร่วมกับน้ำตาลกลูโคสในอัตราส่วนต่างๆ กันเป็นแหล่งคาร์บอนที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	95
4.14 แสดงค่าการกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก สายพันธุ์กลาย MUE24 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	97
4.15 แสดงค่าแรงดึงผิว ของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก สายพันธุ์กลาย MUE24 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	97
4.16 แสดงค่าการกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก สายพันธุ์กลาย MUE24 เมื่อใช้ NaNO_3 แหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นต่างๆที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	98
4.17 แสดงค่าแรงดึงผิว ของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก สายพันธุ์กลาย MUE24 เมื่อใช้ NaNO_3 แหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นต่างๆที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	98
4.18 แสดงค่าการกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก สายพันธุ์กลาย MUE24 เมื่อแปรผันอัตราส่วนแหล่งไนโตรเจน NaNO_3 ร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	100
4.19 แสดงค่าแรงดึงผิว ของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก สายพันธุ์กลาย MUE24 เมื่อแปรผันอัตราส่วนแหล่งไนโตรเจน NaNO_3 ร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน...	100
4.20 แสดงค่าการกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย MUE24 ทำการแปรผันค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำมัน ถั่วเหลืองร่วมกับน้ำตาลกลูโคสในอัตราส่วน 2:1 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	102

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.21 แสดงค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย MUE24 ทำการแปรผันค่าความเป็นกรดเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำมันถั่วเหลืองร่วมกับน้ำตาลกลูโคสในอัตราส่วน 2:1 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	102
4.22 แสดงค่าการกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย MUE24 ทำการแปรผันอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อปรับปรุงสูตรที่อุณหภูมิ 30 37 และ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน.....	104
4.23 แสดงค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์ กลาย MUE24 ทำการแปรผันอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อปรับปรุงสูตรที่อุณหภูมิ 30 37 และ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน.....	104
4.24 การแยกและวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก <i>Pichia anomala</i> PY1 และสายพันธุ์กลาย MUE24 ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบ analytical Thin-Layer Chromatography.....	106
4.25 แสดงค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน (Emulsion Index) ที่เวลา 24 ชั่วโมง ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ต่อน้ำมันคาโนลา และน้ำมันถั่วเหลือง.....	108

บทที่ 1

บทนำ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) หมายถึง สารชีวโมเลกุลที่มีสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้จากสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะอย่างยิ่งจากจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย รา และยีสต์ (Cooper และ Zajic, 1980) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นแอมฟิพาติก (amphipathic molecules) ที่ประกอบด้วยส่วนที่ไม่มีขั้วหรือส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (apolar หรือ hydrophobic portion) หรือส่วนที่ชอบไขมัน (lipophilic portion) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน หรือกรดไขมัน กับอีกส่วนคือส่วนที่มีขั้วหรือส่วนที่ชอบน้ำ (polar หรือ hydrophilic portion) ซึ่งส่วนใหญ่ได้แก่ โปรตีน และน้ำตาลที่มีหมู่คาร์บอกซิลิก หมู่ไฮดรอกซิล หมู่อะมิโน หมู่ฟอสเฟต เป็นต้น สารละลายของสารลดแรงตึงผิวในน้ำจะรวมตัวเป็นกลุ่ม เรียกว่า ไมเซลล์ (micelle) โดยหันส่วนที่มีขั้วออกด้านนอก และส่วนไม่มีขั้วอยู่ด้านใน และเรียกค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารลดแรงตึงผิวที่ทำให้เกิดโครงสร้างไมเซลล์ว่า Critical micelle concentration (CMC) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถจัดจำแนกตามโครงสร้างทางเคมีได้ 5 กลุ่ม ได้แก่ ไกลโคลิพิด (glycolipid) ไลโปเพปไทด์ และไลโปโปรตีน (lipopeptide and lipoprotein) ฟอสโฟลิพิด และกรดไขมัน (phospholipids and fatty acid) สารลดแรงตึงผิวชนิดพอลิเมอร์ (polymeric surfactants) และสารลดแรงตึงผิวชนิดอนุภาค (particulate surfactants) (Desai และ Banat, 1997) ปัจจุบันสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้รับความสนใจมากขึ้นที่จะนำมาทดแทนสารลดแรงตึงผิวที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี เพราะสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ มีความเป็นพิษต่ำ คงความมีประสิทธิภาพที่ดีได้แม้ในภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น อุณหภูมิสูง ความเป็นกรดเป็นด่างสูง ความเข้มข้นของเกลือสูง อีกทั้งยังสามารถผลิตจากสารตั้งต้นที่มาจากทรัพยากรที่นำกลับมาใช้ใหม่ได้ (Mercade และคณะ, 1993; Plaza และคณะ, 2006) แม้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะมีโครงสร้างที่หลากหลายสามารถนำไปใช้งานได้กว้างขวาง เช่น สารก่ออิมัลชัน สารแยกเฟส สารเปียก สารก่อฟอง สารช่วยเพิ่มการละลาย สารลดการเกิดสนิม สารลดความหนืด เป็นต้น แต่ในตลาดการค้าก็ยังไม่สามารถทดแทนสารลดแรงตึงผิวที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมีได้ทั้งหมด เนื่องจากมีต้นทุนในการผลิตสูง จึงมีผู้สนใจศึกษาเพื่อพัฒนากระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อให้ลดต้นทุนในการผลิต (Kosaric และคณะ, 1984) และการพัฒนาสายพันธุ์ให้ได้สายพันธุ์กลายที่มีการผลิตได้มาก

Kim และคณะ (1997) รายงานว่าการใช้น้ำมันถั่วเหลือง และกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนมีผลต่อการเจริญของ *Torulopsis bombicola* และการผลิตไซโฟโรลิพิด โดยใช้น้ำมันถั่วเหลืองจะถูก

ใช้ในกระบวนการผลิตไซโฟโรลิพิดเท่านั้น ส่วนกลูโคสจะใช้ในการเจริญเติบโตของเซลล์ และพบว่าถ้ามีความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองมากจะมีผลในการยับยั้งการผลิตไซโฟโรลิพิด

Gumienna และคณะ (2005) รายงานว่าการใช้แหล่งคาร์บอนอื่นร่วมกับกลูโคส ยังส่งผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ดังผลการทดลองที่พบว่า *Candida bombicola* สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอาหารที่มีกรดโอเลอิก ร่วมกับกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้มากกว่าในอาหารที่มีเฉพาะกลูโคสถึง 60%

การกลายพันธุ์ (Mutation) สามารถเกิดได้เองทั้งตามธรรมชาติและจากการกระตุ้นด้วยสารเคมี หรือสิ่งเร้าอื่นๆ การกลายพันธุ์อาจทำให้เกิดการพัฒนาที่ดีขึ้นหรือแย่ลงในสิ่งมีชีวิตก็ได้ แต่ในบางครั้งหากเกิดการกลายพันธุ์ในตำแหน่งยีนที่สำคัญต่อการดำรงชีวิตก็อาจทำให้เซลล์ไม่สามารถอยู่รอดได้ การกลายพันธุ์โดยธรรมชาติ มีโอกาส เกิดขึ้นในอัตราที่ต่ำมากคือประมาณ 10^{-6} ต่อยีน 1 ยีน ตัวอย่างของสาเหตุส่วนใหญ่ที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติคือ การเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระ การสะสมของรังสีที่ได้รับในตลอดช่วงอายุ หรือเกิดจากความผิดพลาดในการจำลองตัวเองของสารพันธุกรรมในขณะที่มีการเพิ่มจำนวน เซลล์อย่างรวดเร็ว การกลายพันธุ์สามารถทำได้ 2 วิธีคือ

1. การใช้รังสี เช่น รังสีอัลตราไวโอเล็ต จะทำให้เกิดพันธะจากการเข้าคู่กันของเบส Thymine เป็น Thymine-Thymine dimer จากนั้นจะเกิดการซ่อมแซมตัวเองโดยการตัด Thymine-Thymine dimer ออกแล้วเติมเบสเข้าแทนที่แบบสุ่ม การเติมเบสเข้าแบบสุ่มนี้เองจะทำให้ยีนเกิดการเปลี่ยนแปลงจากการใส่ชนิดเบสที่ผิด

2. การใช้สารเคมี เช่น สารที่เติมหมู่แอลคิล (Alkylating agent) จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงได้ 3 ลักษณะคือ เป็นสารเคมีที่ทำให้มีการเติมหมู่แอลคิลเข้าที่เบส ทำให้สายดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักมากขึ้นหัก และเกิดการขาดหายไปของรหัสพันธุกรรม หรือทำให้เกิดการเข้าคู่ของเบสในแนวข้ามคู่กัน (Cross bridge) ทำให้ไม่สามารถมีการเพิ่มจำนวนสายดีเอ็นเอ หรือเกิดการถอดรหัสเป็นโปรตีนได้ ลักษณะสุดท้ายคือ การทำให้เกิดการเข้าคู่ที่ผิดของเบส หากไม่มีการซ่อมแซมจะทำให้ อ่านกรดอะมิโนผิดชนิดได้ ตัวอย่างของสารเคมีในกลุ่มนี้คือ Ethyl ethanesulfonate, Ethyl methanesulfonate, Methyl methanesulfonate และ Nitrosoguanidine เป็นต้น โดยสารเคมีในกลุ่มนี้เหมาะที่จะใช้ในการกระตุ้นการกลายพันธุ์ที่นิวเคลียสของสิ่งมีชีวิตเนื่องจากจะทำให้เกิดการกลายพันธุ์มากกว่าทำให้เซลล์ตาย

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

แนวทางในการพัฒนากระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพคือ หาวัตถุดิบที่มีราคาถูกราคาถูก หารกระบวนการในการผลิตและการแยกสารที่ผลิตได้ที่ราคาถูกลงและเหมาะสม และการพัฒนาสายพันธุ์ให้ได้สายพันธุ์ที่ผลิตได้มาก หรือการพัฒนาให้เป็นรีคอมบิแนนท์ (Recombinant strain) ในสองหัวข้อแรกนั้นได้มีการศึกษา และใช้กันอย่างกว้างขวางแล้วในระดับอุตสาหกรรม แต่การพัฒนาสายพันธุ์ยังมีเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (Mukherjee และคณะ, 2006) จากเหตุผลดังกล่าว ขันตัน จึงนำมาสู่หัวข้อการวิจัยการพัฒนาสายพันธุ์โดยการการกลายพันธุ์ *Pichia anomala* PY1 เพื่อเพิ่มการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

Pichia anomala PY1 เป็นยีสต์สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่คัดแยกได้จากอาหารหมักพื้นบ้าน (ข้าวหมาก) ที่อำเภอพนัสนิคม จังหวัดชลบุรี (ธนัสถา เชียงอุทัย, 2549) ซึ่งเป็นยีสต์ที่ทนร้อนที่สามารถเจริญ และผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ที่ อุณหภูมิสูงถึง 40 องศาเซลเซียส

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

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ทำการกลายพันธุ์ยีสต์ *Pichia anomala* PY1 เพื่อเพิ่มการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ต หรือร่วมกับสาร Ethylmethanesulfonate รวมทั้งศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากสายพันธุ์กลาย

ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. การกลายพันธุ์จุลินทรีย์โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ต หรือร่วมกับสาร EMS
2. คัดเลือกสายพันธุ์กลายที่สามารถเจริญ และให้ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สูงกว่าสายพันธุ์เดิม และทดสอบความเสถียรของสายพันธุ์กลาย
3. หาภาวะที่เหมาะสมต่างๆในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของสายพันธุ์กลาย
4. ศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ
5. การผลิตและการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ
6. เตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนและวิเคราะห์องค์ประกอบเบื้องต้นโดยวิธีโครมาโตกราฟี

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในภาวะที่เหมาะสมจากเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้มากขึ้นกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม รวมทั้งทราบองค์ประกอบ และสมบัติเบื้องต้นของสารลดแรงตึงดังกล่าว ซึ่งจะเป็นข้อมูลเพื่อใช้พัฒนาในอุตสาหกรรมต่อไป

บทที่ 2

ปริทรรศน์วรรณกรรม

เนื่องจากความต้องการของผู้บริโภคในปัจจุบัน มีความต้องการสารอาหารที่เป็นสารจากธรรมชาติ ซึ่งสารธรรมชาติต่างๆเหล่านี้กำลังทวีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหารมากขึ้นกว่าสารสังเคราะห์ทางเคมี และความสนใจเกี่ยวกับสุขภาพ ราคาต้นทุนก็เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดความต้องการสารที่มาจากธรรมชาติมากขึ้น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นสารชีวโมเลกุลที่สามารถก่ออิมัลชันได้ดี สร้างได้จากแบคทีเรีย รา และยีสต์บางชนิด โดยเข้ามามีส่วนแบ่งในตลาดของสารที่สังเคราะห์ทางเคมี มีโครงสร้างหลากหลาย มีโครงสร้างเป็นแอมฟิพาติก (Amphiphatic structure) ทำให้มีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน และยังคงมีคุณสมบัติที่ดี คงทนได้อยู่ใน pH ช่วงกว้าง อุณหภูมิ และเกลือความเข้มข้นต่างๆ เป็นผลให้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อาหาร ยา เครื่องสำอาง และปิโตรเคมี นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นสารที่ย่อยสลายได้ในธรรมชาติ มีความเป็นพิษต่ำ และสามารถผลิตได้จากวัสดุทางการเกษตรภายในประเทศ จึงมีความเป็นไปได้สูงที่จะนำการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากจุลินทรีย์เพื่อมาใช้ในการพัฒนาระบบการผลิตอาหารเพื่อสุขภาพชนิดใหม่ เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพดี และมีความปลอดภัยสูง

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

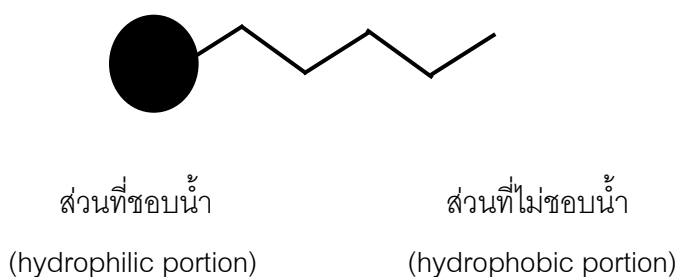
การที่จะให้เกิดอิมัลชันในอาหารนั้นต้องการสารก่ออิมัลชันที่เรียกว่าอิมัลซิไฟเออร์ซึ่งการทำงานนั้นขึ้นกับสมดุลย์ ความชอบน้ำ (hydrophilic)/ ความไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) สารที่สามารถใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์ในอาหารมีหลายชนิด อาทิ เอสเทอร์ของกรดไขมันของกลีเซอรอล เลซิธิน และอนุพันธ์ของเลซิธิน เอสเทอร์ของกรดไขมันของซอร์บิแทน เป็นต้น ปัจจุบันสามารถผลิตสารก่ออิมัลชันได้จากจุลินทรีย์ที่เรียกกันว่า ไบโอบิโอฟอสฟอไรต์ (biosurfactant) หรือสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งการที่จุลินทรีย์ผลิตสารขึ้นเพื่อการสลายและนำสารอาหารเข้าเซลล์นั้นเป็นสิ่งที่

ได้รับความสนใจเป็นพิเศษ เนื่องจากเป็นการผลิตที่ง่าย รวดเร็ว ใช้ต้นทุนต่ำ และไม่ก่อปัญหาทางสิ่งแวดล้อม ตัวอย่างของไบโอเซอร์แฟคแทนท์ที่เป็นที่รู้จักกันได้แก่ ไกลโคลิพิดจาก *Arthrobacter* sp. ไโซไฟโรลิดจาก *Torulopsis bombicola* แรมโนลิดจาก *Pseudomonas* spp. อิมัลชันจาก *Acinetobacter calcoaceticus* และไลโปโปรตีน (เซอร์แฟคติน) โดย *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* เป็นต้น สารเหล่านี้ได้ถูกใช้ทดแทนสารลดแรงตึงผิวชนิดสังเคราะห์ทางเคมีในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ตัวอย่างเช่น การใช้ไกลโคลิพิดไบโอเซอร์แฟคแทนท์ (glycolipid biosurfactant) แทนเอสเทอร์กรดไขมันของโมโน และโอลิโกแซคคาไรด์ เป็นอิมัลซิไฟเออร์ในอาหาร การใช้ไซโฟโรลิดไบโอเซอร์แฟคแทนท์ และอนุพันธ์เอซิลเลท และแอลคอกซิลเลท (acylated and alkoxylated derivatives) ของสารดังกล่าวในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ในทางอุตสาหกรรมอาหารมีการจดสิทธิบัตรการใช้ไซโฟลิดกับแป้งเพื่อสร้างคุณภาพ และยืดอายุการเก็บอาหาร มีสิทธิบัตรการใช้ผนังเซลล์ที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ของยีสต์ (*Saccharomyces uvarum*) เพื่อผลิตมาการ์ริน เป็นต้น

จากสถิติการนำเข้าสารลดแรงตึงผิว สารก่ออิมัลชัน และสารอนุพันธ์จากกรมศุลกากรประจำปี 2547 พบว่ามีการนำเข้าเป็นมูลค่ากว่า 105 ล้านบาทต่อปี และมีแนวโน้มสูงขึ้นเพื่อเป็นการทดแทนการนำเข้า อีกทั้งเพื่อเป็นการพึ่งตนเองได้ จึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการค้นคว้า และผลิตสารชีวโมเลกุลที่สามารถลดแรงตึงผิวและก่ออิมัลชันได้ดี เพื่อทดแทนสารดังกล่าวมาใช้ ซึ่งเป็นผลให้ประเทศสามารถผลิตอาหารที่มีมาตรฐานสูงขึ้นสามารถแข่งขันกับสินค้าจากต่างประเทศ และยังเป็นการส่งเสริมการตลาดภายใน และภายนอกประเทศอีกด้วย

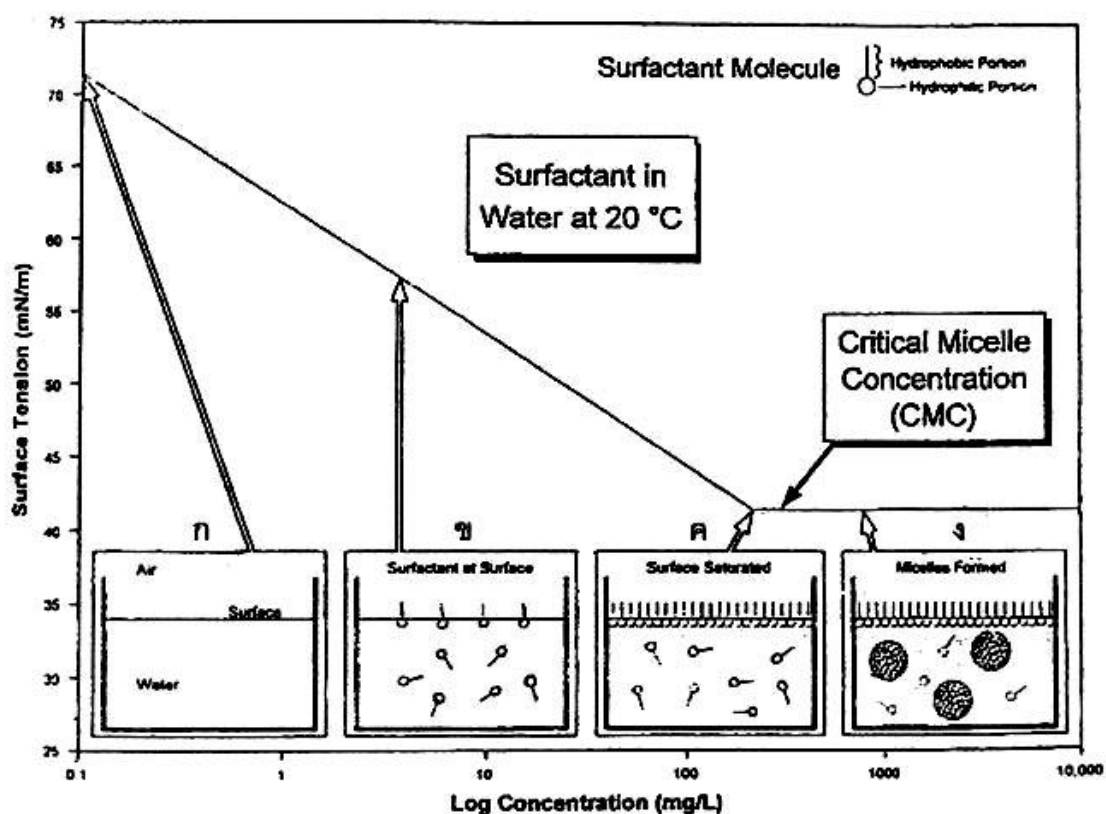
2.1 ความหมายและความสำคัญของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactant) หมายถึง สารชีวโมเลกุลที่มีสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิว (surface-active substance) ซึ่งสร้างจากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เช่น แบคทีเรีย รา และ ยีสต์บางชนิด (Cooper และ Zajic, 1980) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีโครงสร้างแตกต่างกัน แต่มีลักษณะโมเลกุลหลักที่มีโครงสร้างเป็นแอมฟิพาติก ประกอบด้วยส่วนที่มีขั้ว (hydrophilic portion) ได้แก่ โปรตีน และน้ำตาล ซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีหมู่คาร์บอกซิลิก หมู่ไฮดรอกซิล หมู่อะมิโน หมู่ฟอสเฟต เป็นต้น ส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic portion) หรือส่วนที่ชอบไขมัน (lipophilic portion) ซึ่งเป็นโมเลกุลพวกไฮโดรคาร์บอน เช่น กรดไขมันทั้งชนิดอิ่มตัว (saturated fatty acid) และกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) มีทั้งโมเลกุลใหญ่และโมเลกุลเล็ก ซึ่งจะทำให้ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแตกต่างกันไป ดังรูปที่ 2.1 แสดงโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เป็นแบบแอมฟิพาติก



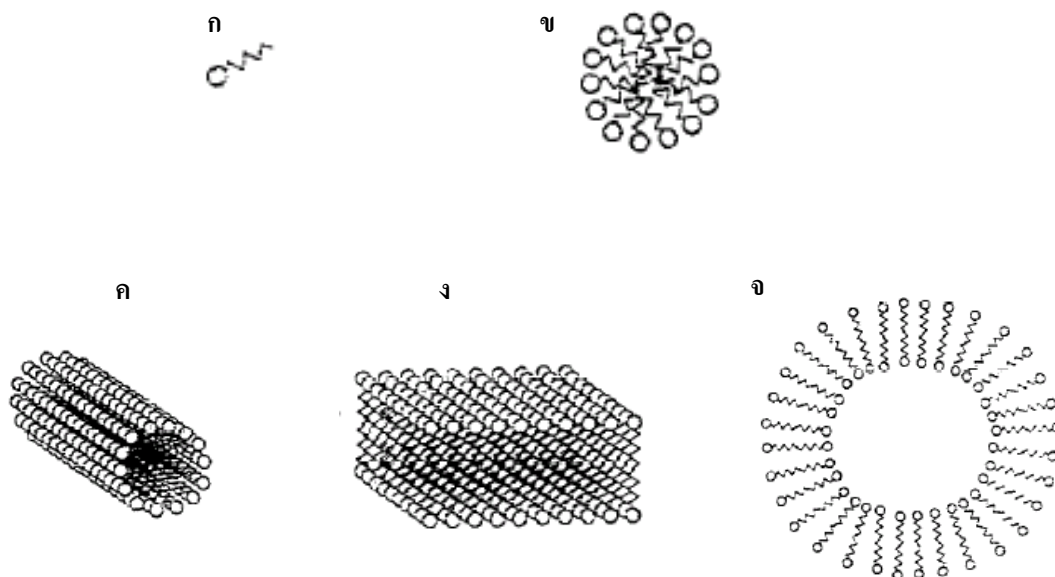
รูปที่ 2.1 ลักษณะโครงสร้างทั่วไปของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Fiechter, 1992)

จากสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีโครงสร้างเป็นแอมฟิพาติก เมื่อสารลดแรงตึงผิวอยู่ในน้ำ ส่วนที่ชอบน้ำจะละลายน้ำได้และส่วนที่ไม่ชอบน้ำจะอยู่บริเวณรอยต่อระหว่างน้ำกับอากาศ การที่สารลดแรงตึงผิวไปอยู่ที่รอยต่อนี้จะทำให้ลดค่าแรงตึงผิวของสารละลายนั้นได้ และโดยส่วนใหญ่แล้ว สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะลดค่าแรงตึงผิวของน้ำจาก 72 mN/m เป็น 30 ± 5 mN/m ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ สารลดแรงตึงผิวสามารถละลายอยู่ในตัวทำละลายทั้งชนิดมีขั้วและไม่มีขั้ว เมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวมากขึ้นก็จะไปลดค่าแรงตึงผิวของสารละลาย จนถึงความเข้มข้นหนึ่งที่ทำให้เกิดโครงสร้างที่เรียกว่าไมเซลล์ (micelle) และค่าแรงตึงผิวของสารละลายนั้นจะคงที่ไม่ลดลงไปอีกแม้จะเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลงไปอีกเท่าใดก็ตามดังแสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 การเกิดโค รงสร้างไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในน้ำเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจนถึงจุด Critical Micelle Concentration (CMC) ก) เป็นภาวะที่ไม่มีสารลดแรงตึงผิว ข) สารลดแรงตึงผิวละลายอยู่ในน้ำโดยหันส่วนที่ไม่ชอบน้ำออกสู่อากาศ 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 ของสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิดจะมีค่าต่างกัน และขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ (Desai และ Banat, 1997) นอกจากนี้ค่า CMC ยังสามารถบอกโครงสร้างทุติยภูมิของสารลดแรงตึงผิวได้ เช่น ไมเซลล์ไบเลเยอร์ (bilayer) และไมเซลล์เวสสิเคิล (vesicles) เป็นต้น ดังแสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 โครงสร้างและการจัดเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Fiechter, 1992)

- ก) โครงสร้างโมโนเมอร์ (monomer) ของแอมฟิพาติกโมเลกุล
- ข) โครงสร้างไมเซลล์แบบกลม
- ค) โครงสร้างไมเซลล์แบบแท่ง
- ง) โครงสร้างไมเซลล์แบบเลเยอร์
- จ) โครงสร้างไมเซลล์แบบเวสิเคิล

การที่จะเกิดการจัดเรียงตัวของโครงสร้างไมเซลล์เป็นแบบใดนั้นนอกจากแรงกระทำระหว่างโมเลกุลแล้วยังขึ้นกับชนิดของสารลดแรงตึงผิวว่ามีโครงสร้างแบบใด เช่น โมเลกุลมีลักษณะเป็นโซ่สายสั้นและส่วนหัวที่มีขั้วใหญ่จะเกิดการจัดเรียงตัวเป็นแบบไมเซลล์ทรงกลม ถ้าส่วนหัวมีขนาดเล็กก็จะรวมตัวเป็นไมเซลล์แบบทรงกระบอก หรือส่วนไม่ชอบน้ำเป็นสายยาวก็จะรวมตัวเกิดเป็นไบเลเยอร์ เป็นต้น ด้วยสมบัติที่หลากหลายของโครงสร้างไมเซลล์จึงสามารถนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไปประยุกต์ใช้ในงานต่างๆ ได้อย่างกว้างขวาง

ค่าที่แสดงถึงประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ นอกจากค่า CMC ที่กล่าวข้างต้นแล้วยังมีอีกหลายค่าได้แก่

1. ค่าแรงตึงผิว (Surface tension)

หมายถึง แรงที่กระทำระหว่างของเหลวและอากาศ ค่าแรงตึงผิวมีหน่วยเป็นมิลลินิวตัน

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

2. ค่าแรงตึงผิวระหว่างผิวที่ประจัน (interfacial tension)

หมายถึง แรงที่กระทำระหว่างของเหลวกับของเหลวที่มีเฟสต่างกัน มีหน่วยเป็น mN/m การวัดแรงตึงผิวระหว่างผิวที่ประจันจะวัดระหว่างน้ำ และสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น น้ำมัน เฮกซาเดคเคน หรือ น้ำมันก๊าด โดยทั่วไปค่าแรงตึงผิวระหว่างผิวที่ประจันของน้ำกับเฮกซาเดคเคน มีค่าเท่ากับ 50 mN/m และค่าแรงตึงผิวระหว่างผิวที่ประจันของน้ำ กับน้ำมันก๊าดมีค่าเท่ากับ 30-40 mN/m ซึ่งเมื่อเติมสารลดแรงตึงผิวซึ่งภาพจะสามารถลดแรงตึงผิวที่ประจันลงเหลือ 0.1-1.0 mN/m (Gerson, 1993)

3. การก่อเกิดอิมัลชัน (Emulsification)

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

4. ค่าการกระจายตัวของน้ำมัน (oil displacement activity)

เป็นการวัดประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวซึ่งภาพในการทำให้แผ่นฟิล์มของน้ำมันบนผิวน้ำเป็นวงใส (clear zone) โดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของพื้นที่วงใส คำนวณหาพื้นที่ตามสูตร πr^2 มีหน่วยเป็นตารางเซนติเมตร โดยกำหนด 1 ตารางเซนติเมตรของการกระจายตัวของน้ำมันดิบ เท่ากับ 1 หน่วย นอกจากการวัดค่าการกระจายตัวของน้ำมันจะทำการวัดในส่วนของน้ำใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยากและประหยัดค่าใช้จ่าย และยังเป็นวิธีที่เหมาะสมในการวัดกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวซึ่งภาพที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว เนื่องจากวิธีนี้ใช้สารปริมาณเล็กน้อยในการวิเคราะห์เพียง 10 ไมโครลิตรเท่านั้น (Morikawa และคณะ, 1993)

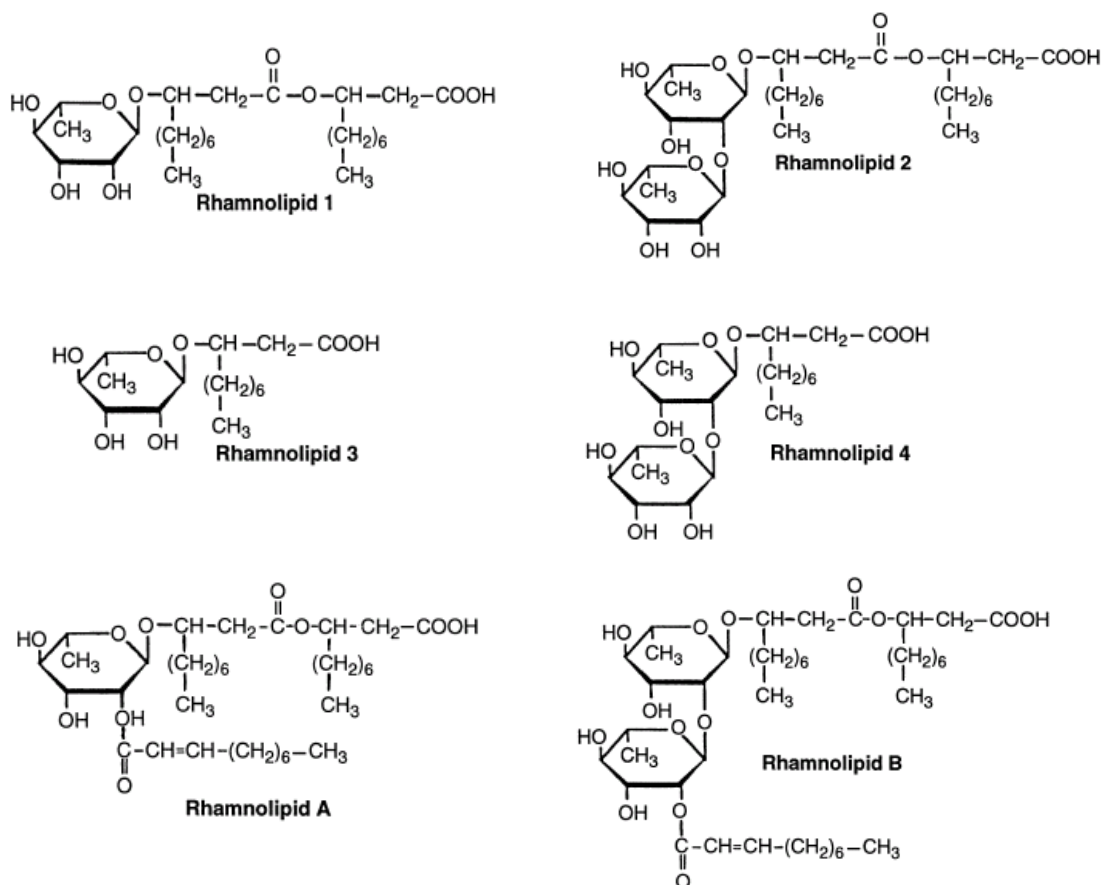
2.2 การจัดจำแนกชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactant Classification)

การจำแนกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ สามารถแบ่งออกเป็น 6 กลุ่มตามโครงสร้างทางเคมี (Desai และ Banat, 1997) ได้แก่

1. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดไกลโคลิพิด

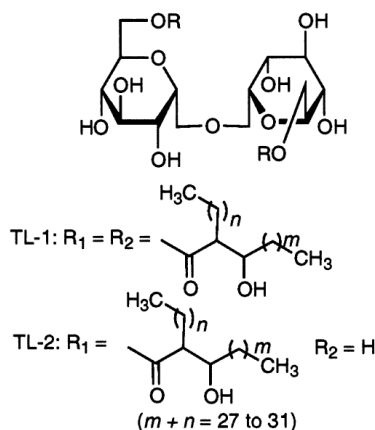
สารลดแรงตึงผิวชนิดไกลโคลิพิดประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต เช่น กลูโคส แมนโนส กาแล็กโตส กรดกลูคูโรนิ ก แรมโนส เชื่อมต่อกับไขมัน เช่น กรดอะลิฟาติกและหมู่ไฮดรอกซี สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่จัดเป็นไกลโคลิพิด ได้แก่ แรมโนลิพิด ทรีฮาโรลิพิด และไซโฟโรลิพิด

1.1 แรมโนลิพิด (rhamnolipid) เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ประกอบด้วยน้ำตาลแรมโนส 1 หรือ 2 โมเลกุลเชื่อมต่อกับ 1 หรือ 2 โมเลกุลของ β -hydroxydecanoic acid ดังในรูปที่ 2.4 ซึ่งแรมโนลิพิดมีสูตรโครงสร้างต่างกัน 6 แบบที่มีจำนวนแรมโนส และส่วนของ β -hydroxydecanoic acid แตกต่างกัน แรมโนลิพิดเป็นไกลโคลิพิดที่มีการศึกษาวิจัยมากที่สุด ซึ่งการผลิตไกลโคลิพิดที่มีแรมโนสเป็นองค์ประกอบโดย *Pseudomonas aeruginosa*



รูปที่ 2.4 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* sp. , *Nocardia* sp. และ *Corynebacterium* sp.

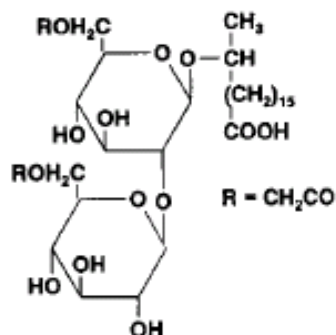


รูปที่ 2.5 โครงสร้างของ Trehalose dimycolate จาก *Rhodococcus erythropolis* (Desai และ Banat, 1997)

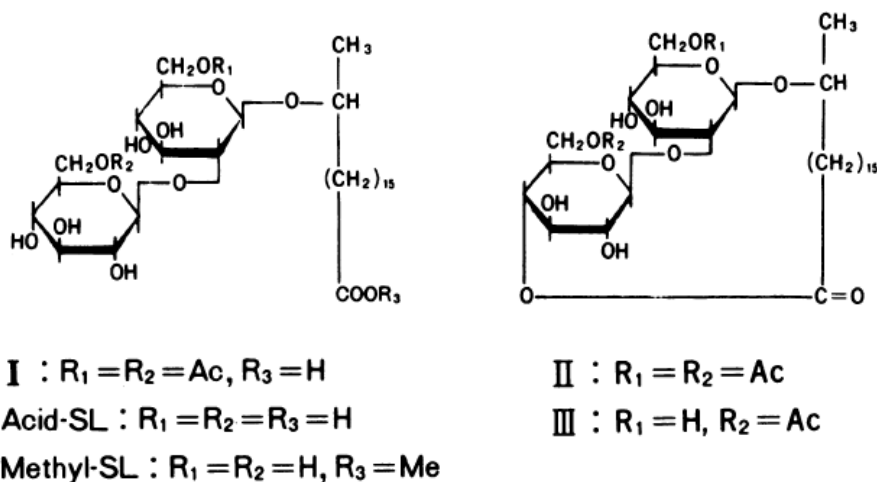
ทรีฮาโรลิพิดที่ผลิตจากสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันจะมีขนาดและโครงสร้างของกรดไมโคลิกต่างกัน ซึ่งต่างกันในจำนวนอะตอมของคาร์บอน และความแรงของประจุของสารทรีฮาโรลิพิดจาก *R. erythropolis* และ *Arthrobacter* sp. ให้ค่าแรงตึงผิวต่ำสุดอยู่ในช่วง 25-40 mN/m และค่าแรงตึงผิวระหว่างสารกับเฮกซะเดเคนอยู่ในช่วง 1-5 mN/m

1.3 โซโฟโรลิพิด (sophorolipids) เป็นไกลโคลิพิดที่คล้ายกับแรมโนลิพิดผลิตโดยจุลินทรีย์พวกยีสต์เป็นส่วนใหญ่ เช่น *Torulopsis bombicala* (Inoue และ Itoh, 1982) *T. petrophilium* (Cooper และ Paddock, 1983) และ *T. apicola* (Tulloch และคณะ, 1967) ประกอบด้วยไดเมอริกโซโฟโรสเชื่อมต่อกับสายยาวของ hydroxy fatty acid ที่ตำแหน่ง C-6 และ C-6' ด้วยพันธะไกลโคซิดิก การผลิตโซโฟโรลิพิดจากยีสต์ข้างต้น สามารถใช้สารตั้งต้นได้หลากหลายชนิด ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต (กลูโคส ฟรุคโตส ซูโครส แลคโตส) น้ำมันจากพืช น้ำมันจากสัตว์ และสารประกอบพวกอัลเคน เป็นต้น (Kitamoto และคณะ, 2002) Cutler และ Light, 1979 รายงานว่า *Candida bogoriensis* ผลิตไกลโคลิพิดที่มีน้ำตาลโซโฟโรสเชื่อมอยู่กับ docosanoic acid diacetate นอกจากนี้ยังมี *T. petrophilium* ที่ผลิตโซโฟโรลิพิดได้โดยใช้สารตั้งต้นที่เป็นสารประกอบพวกอัลเคน และน้ำมันพืช (Cooper และ Paddock, 1983) ทั้ง lactic และ acetic

sophorolipids จะให้ค่าแรงตึงผิวระหว่างสารกับเฮกซาเดเคนจาก 40 mN/m เป็น 5 mN/m และยังคงตัวอยู่ได้เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่างและอุณหภูมิ



รูปที่ 2.6 โครงสร้างของไซโฟโรลิพิดจาก *Torulopsis bombicola* แสดงไดเมอริกไซโฟโรสที่เชื่อมต่อกับสายยาวของ hydroxyl fatty acid (C18) (Desai และ Banat, 1997)

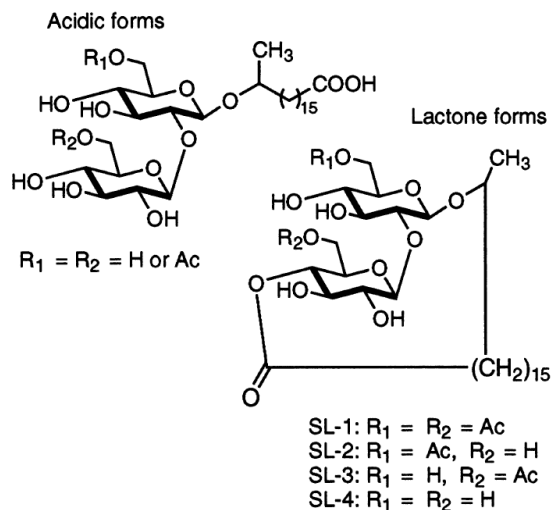


รูปที่ 2.7 โครงสร้างของไซโฟโรลิพิดจาก *Torulopsis bombicola* (Inoue และ Itoh, 1982)

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

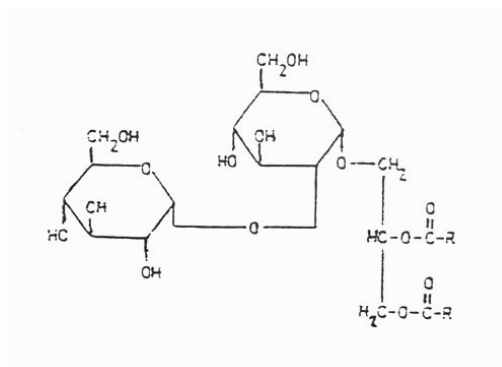
II: 1,4"-lactone of type I

III: 6'-deacetylated derivative of type II



รูปที่ 2.8 โครงสร้างของไซโฟโรลิพิดจาก *Candida bombicola* ซึ่งแสดงโครงสร้างของ lactonic form และ acid form (Kitamoto และคณะ, 2002)

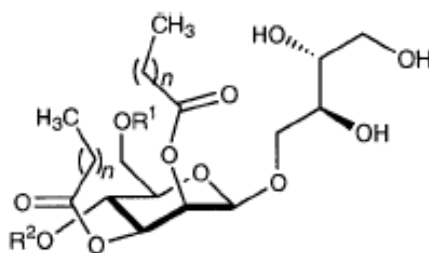
1.4 ไดไกลโคซิลไดกลีเซอไรด์ (diglycosyl diglycerides) เป็นไกลโคลิพิดชนิดที่พบทั่วไปในจุลินทรีย์ มีสูตรโครงสร้างประกอบด้วยไดไกลโคซิลกับไดกลีเซอไรด์ที่แตกต่างกัน 5 หมู่ คือ แอลฟา- ไดกลูโคซิลไดกลีเซอไรด์ (α - diglycosyldiglyceride) บีตา- ไดกลูโคซิล- (β - diglycosyl-) ไดแมนโนซิล (dimannosyl-) ไดกาแลคโตซิล- (digalactosyl-) และกาแลคโตซิลกลูโคซิลไดกลีเซอไรด์ (galactosylglucosyldiglycerides) สมบัติของสารไกลโคซิลไดกลีเซอไรด์ยังไม่ค่อยมีการศึกษามากนัก อย่างไรก็ตาม Brundish และคณะ, 1967 ได้เสนอว่าสารนี้จัดเป็นสารลดแรงตึงผิว เพราะโมเลกุลของสารมีส่วนที่มีขั้วซึ่งชอบน้ำ และมีส่วนไม่มีขั้วเป็นหมู่อัลคิล 2 หมู่นอกจากนี้ Wichken และ Knox ,1970 รายงานว่า สารไกลโคซิลไดกลีเซอไรด์ที่แยกได้จาก *Lactobacillus fermenti* สามารถก่อรูปเป็นไมเซลล์ได้



รูปที่ 2.9 โครงสร้างของ α -diglycosyldiglyceride , R = หมู่อัลคิล (Cooper และ Zajic, 1980)

1.5 สารประกอบพอลิแซคคาไรด์ – ลิพิด (Polysaccharide – lipid complex)

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



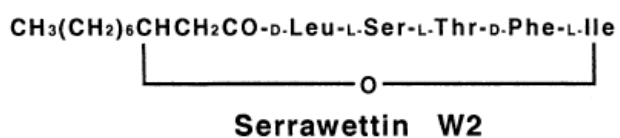
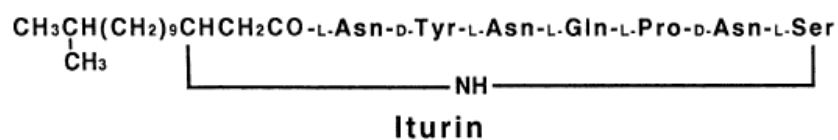
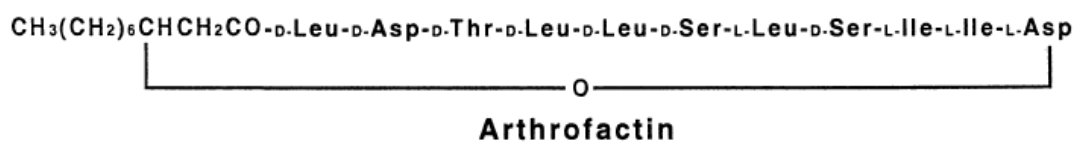
MEL-A: R¹ = R² = Ac
 MEL-B: R¹ = Ac, R² = H
 MEL-C: R¹ = H, R² = Ac
 (n = 6–10)

รูปที่ 2.10 โครงสร้างของ Mannosylerythritol lipid (MEL) จาก *Pseudozyma (Candida) antarctica* T- 34 (Kitamoto และคณะ, 2002)

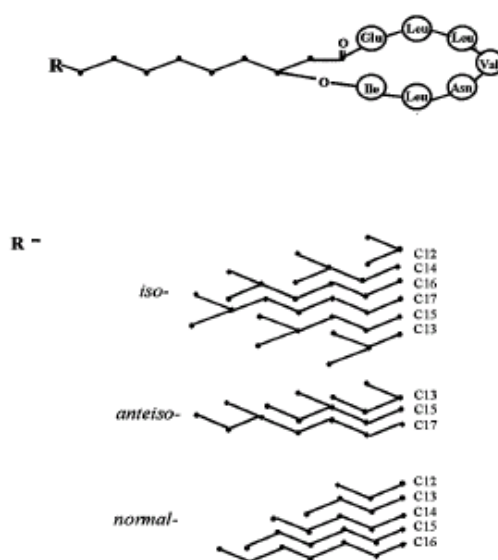
โครงสร้างของเซอร์แฟกตินประกอบด้วยกรดอะมิโนยาว 7 ตัว เชื่อมต่อกันด้วยพันธะโคเวเลนต์ ปลายข้างหนึ่งเชื่อมต่อกับกลุ่มคาร์บอกซิลและปลายอีกข้างหนึ่งต่อกับกลุ่มไฮดรอกซิลของหมู่บีตา-ไฮดรอกซีของกรดไขมัน เซอร์แฟกตินเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงที่มีความเข้มข้นเพียง 0.005 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์ สามารถลดแรงตึงผิวของสารละลาย 0.1M NaCO₃ จาก 71.6 mN/m เป็น 27.9 mN/m นอกจากนี้เซอร์แฟกตินยังมีสมบัติยับยั้งการแข็งตัวของเลือดโดยจะยับยั้งการจับตัวกันของไฟบรินในระบบธรมบิน ทำให้ระยะเวลาที่ใช้ในการจับตัวกันจะนานขึ้น (Arima และคณะ, 1968 อ้างอิงใน Cooper และ Zajic, 1980) และสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงและโปรโตพลาสต์ของแบคทีเรียแตกได้ จากกิจกรรมการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกนี้ทำให้สามารถใช้เป็นวิธีการในการคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตสารเซอร์แฟกตินได้

นอกจากนี้ *B. licheniformis* ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทไลโปเพปไทด์ได้หลายชนิดที่มีความเสถียรต่อ ค่าความเป็นกรดต่าง อุณหภูมิ และความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ได้ดี (McInerney และคณะ, 1990) สารลดแรงตึงผิว BL-86 ที่ผลิตโดย *B. licheniformis* 86 สามารถลดค่าแรงตึงผิวได้ดีที่สุด 27 mN/m และค่าแรงตึงผิวระหว่างสารกับเฮกซะเดคเคน 0.36 mN/m (Horowitz, Gilbert และ Griffin, 1990)

Morikawa และคณะ (1993) ได้รายงานว่ พบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดใหม่คือ อาร์โทรแฟกติน (arthrofactin) ซึ่งผลิตโดย *Arthrobacter* sp. MIS 38 มีโครงสร้างเป็น 3-hydroxydecanosyl-D-leucyl-D-asparagyl-D-threonyl-D-leucyl-D-leucyl-D-seryl-L-leucyl-D-seryl-L-isoleucyl-L-isoleucyl-L-asparagyl lactone สูตรโครงสร้างแสดงในรูปที่ 2.13 ซึ่งมีประสิทธิภาพดีกว่าเซอร์แฟกติน 5 - 7 เท่า มีค่า CMC 1.0×10^{-5} M ขณะที่เซอร์แฟกตินมีค่า CMC 7.0×10^{-5} M ซึ่งสามารถลดแรงตึงผิวได้ดีที่สุด 24 mN/m เมื่อวัดสมบัติการกระจายตัวของน้ำมัน จะให้ค่าที่สูงกว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมี เช่น ไตรทอน เอกซ์ 100 (Triton X-100) และ โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate: SDS) Yakimov และคณะ (1995) ได้แสดงให้เห็นว่า สามารถผลิตไลโปเพปไทด์ชนิดใหม่ได้ คือ lichenysin A ผลิตโดย *B. licheniformis* BAS-50 ซึ่งมีส่วนประกอบของ β - hydroxy fatty acid ที่เป็นสายยาว สามารถลดแรงตึงผิวได้ดีที่สุด 28 mN/m มีค่า CMC 12×10^{-6} M

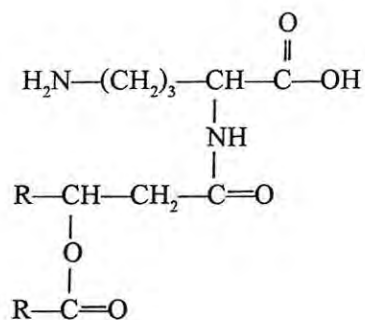


รูปที่ 2.13 โครงสร้างของไลโปเพปไทด์ชนิดต่าง ๆ (Morikawa และคณะ, 1993)



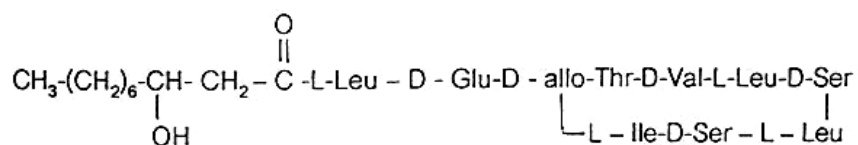
รูปที่ 2.14 โครงสร้างของ lichenysin A (Yakimov และคณะ, 1995)

ตัวอย่างสารลดแรงตึงผิวอื่นในกลุ่มนี้ ได้แก่ ornithine containing lipid ผลิตโดย *Pseudomonas rubescens* สูตรโครงสร้างแสดงในรูปที่ 2.15 วิสโคซิน (viscosin) ผลิตโดย *Pseudomonas fluorescens* สูตรโครงสร้างแสดงในรูปที่ 2.16 (Morikawa และคณะ, 1993) lysin-containing lipid ผลิตโดย *Agrobacterium tumefaciens* และ ornithine – taurine lipid (cerilipin) ผลิตโดย *Gluconobacter cerinus* (Knoche และ Shively, 1972) สูตรโครงสร้างแสดงในรูปที่ 2.17

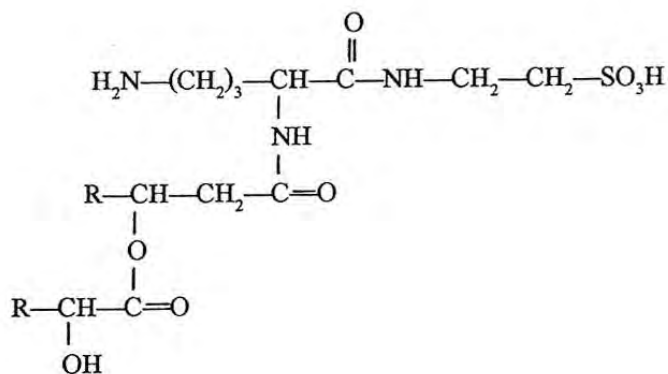


R = หมู่อัลคิล

รูปที่ 2.15 โครงสร้างของ ornithine containing lipid จาก *Pseudomonas rubescens* (Cooper และ Zajic, 1980)



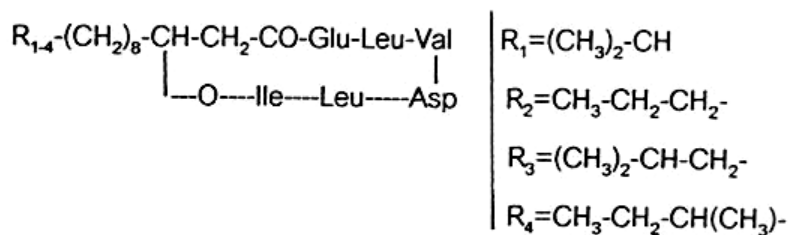
รูปที่ 2.16 โครงสร้างของ viscosin จาก *Pseudomonas fluorescens* (Morikawa และคณะ, 1993)



R = หมู่อัลคิล

รูปที่ 2.17 โครงสร้างของ cerilipin จาก *Gluconobacter cerinus* (Cooper และ Zajic, 1980)

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีโครงสร้างคล้ายกับเซอร์แฟกตินซึ่งผลิตโดย *Bacillus licheniformis* โครงสร้างประกอบด้วย lipophilic fatty acid เชื่อมกันด้วยพันธะแลคโตน (lactone linkage) กับ hydrophilic peptide ที่มีโครงสร้างรูปร่างแหวน (ring structure) ดังแสดงในรูปที่ 2.18



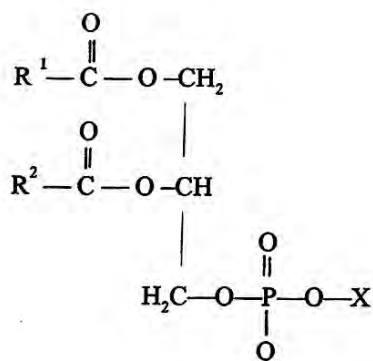
รูปที่ 2.18 โครงสร้างของ surface-active lipopeptide ที่ผลิตโดย *B. licheniformis* (Jenny, Deltrieu และ Kappeli, 1993 อ้างอิงใน Kosaric และคณะ, 1993)

3. กรดไขมันและไขมัน (fatty acid and neutral lipid)

กรดไขมันและไขมันสามารถพบได้ในเซลล์จุลินทรีย์ทุกชนิด และมักปล่อยออกนอกเซลล์ เช่น กรดคาร์บอกซิลิก แอลกอฮอล์ เอสเทอร์ โมโนกลี เซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ และไตรกลีเซอไรด์ ตัวอย่างของกรดไขมัน และไขมันที่สามารถลดแรงตึงผิว ได้แก่ กรดโครีโนมายโคลิก (corynomycolic acid) ที่ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร สามารถลดแรงตึงผิวของน้ำเกลือ 40 mN/m ไขมัน (neutral lipid) ที่มีรายงานว่าสามารถลดแรงตึงผิว คือ ไขมันที่ผลิตจาก *Mycobacterium rhodochrous* เมื่อความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตร สามารถลดแรงตึงผิวของน้ำเกลือ 44 mN/m และยังสามารถเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ (Cooper และ Zajic, 1980) รูปเวททิน อาร์ 1 (rubiwettin R1) ซึ่งเป็นไขมันที่ผลิตจาก *Serratia rubidaea* ATCC 27593 รูปเวททิน อาร์ 1 เป็นไขมันชนิด β -hydroxy fatty acid ที่มีจำนวนคาร์บอน 10 อะตอมเชื่อมต่อกับ β -hydroxy fatty acid ที่มีจำนวนคาร์บอน 12, 14 หรือ 16 อะตอมด้วยพันธะเอสเทอร์ (Matsuyama และคณะ, 1990)

4. ฟอสโฟลิพิด (phospholipids)

ฟอสโฟลิพิดพบในจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ โดยทั่วไปมีสูตรโครงสร้างซึ่งประกอบด้วย กลีเซอรอลเชื่อมต่อกับกรดไขมัน 2 หมู่ และฟอสเฟต 1 หมู่ แบคทีเรีย และยีสต์ที่ย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ สามารถสร้างกรดไขมัน และฟอสโฟลิพิดระหว่างการเจริญในภาวะที่มีอัลเคนเป็นสารตั้งต้นโดยกรดไขมันและฟอสโฟลิพิดเหล่านี้มีสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิว (Cirigliano และ Carman, 1985; Robert และคณะ, 1989) Kappeli และ Finnerty (1979) รายงานว่า *Acinetobacter* sp. สายพันธุ์ HO1-N ผลิตฟอสฟาทีดิลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) ได้เมื่อเจริญอยู่ในอาหารที่มีเฮกซาเดคเคนเป็นแหล่งพลังงาน



R^1 และ R^2 = หมู่อัลคิล

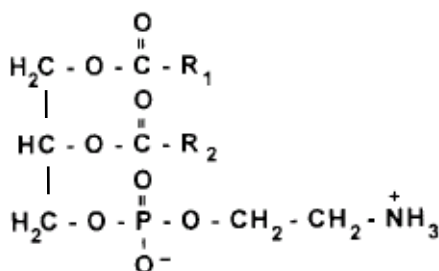
$\text{X} = \text{H}$, phosphatidic acid

$\text{X} = \text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{-COOH}$,
phosphatidylserine

$\text{X} = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3$,
phosphatidyl choline (lecithin)

$\text{X} = \text{inositol}$, phosphatidylinositol

รูปที่ 2.19 โครงสร้างของฟอสโฟลิพิด (Shaw, 1974 อ้างอิงใน Cooper และ Zajic, 1980)



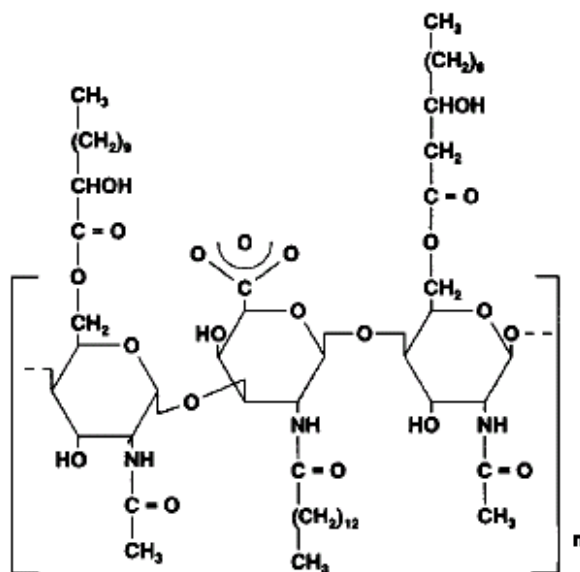
R_1 , R_2 = สายไฮโดรคาร์บอนของกรดไขมัน

รูปที่ 2.20 โครงสร้างของฟอสฟาติลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) จาก *Acinetobacter* sp. (Kappeli และ Finnerty, 1979)

นอกจากนี้ยังพบว่ามีจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ผลิตฟอสโฟลิพิดได้ เช่น *Aspergillus* sp. (Kappeli และ Finnerty, 1979) เมื่อเลี้ยงเชื้อในเฮกซาเดเคนและน้ำมันมะกอก (olive oil) นอกจากนี้พบว่า *R. erythropolis* ผลิตฟอสฟาติลเอทานอลามีนได้ เมื่อเลี้ยงเชื้อในอัลเคน ซึ่งสามารถลดแรงตึงผิวระหว่างสารกับเฮกซาเดเคนได้ดีที่สุด 1 mN/m และมีค่า CMC 30 mg/l (Kretschmer, Bock และ Wagner, 1982)

5. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์ (polymeric biosurfactants)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดพอลิเมอร์ที่รู้จักโดยทั่วไปคือ อิมัลชัน (emulsan) ไลโฟแซน (liposan) แมนโนโปรตีน (mannoprotein) และสารประกอบเชิงซ้อนของพอลิแซคคาไรด์กับโปรตีนชนิดอื่นๆ (Desai และ Banat, 1997) Rosenberg และคณะ รายงานว่า *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 ผลิต polyanionic amphipathic heteropolysaccharide bioemulsifier หรือที่เรียกว่า อิมัลชัน สูตรโครงสร้างแสดงในรูปที่ 2.21 สาย heteropolysaccharide ที่เป็นสายหลักประกอบด้วยหน่วยของกลีเซอไรด์ซ้ำ ๆ กัน 3 ชนิด คือ N-acetyl-D-galactosamine, N-acetylgalactosamine uronic acid และ unidentified N-acetyl amino sugar (Zuckerberg และคณะ, 1979) โดยมีกรดไขมันเชื่อมต่อกับพอลิแซคคาไรด์ด้วยพันธะ o-ester อิมัลชันเป็นสารที่ก่อเกิดอิมัลชัน (emulsifying agent) ได้เป็นอย่างดี สำหรับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนกับน้ำโดยใช้เพียง 0.001 – 0.01 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะให้อิมัลชันที่คงตัวมากที่สุด



รูปที่ 2.21 โครงสร้างของอิมัลชัน จาก *Acinetobacter calcoaceticus* (Rosenberg และคณะ, 1979)

ไบโอดีสเพอร์แซน (biodispersan) เป็นสารที่ *A. calcoaceticus* A2 สร้างขึ้นเป็น anionic heteropolysaccharide ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 51,000 ดาลตัน ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลรีดิวิธ 4 ชนิด ได้แก่ กลูโคซามีน (glucosamine) 6- เมทิลลามีโนเฮกโซส (6-methylaminohexose) กรดกาแลคโตซีโนยูโรนิก (galactosine uronic acid) และ unidentified amino sugar Novonvenezia และคณะ (1995) รายงานว่าทำการแยก อะลาแซน (alasan ; anionic alanine- containing heteropolysaccharide - protein) ได้จาก *A. radioresistens* KA-53 ซึ่งพบว่าทำงานได้ดีขึ้น 2.5-3 เท่า เมื่อให้ความร้อน 100 องศาเซลเซียส ในภาวะที่เป็นก ลางหรือต่าง ส่วนไลโปแซน (liposan) เป็นสารก่อเกิดอิมัลชันที่สังเคราะห์โดย *Candida lipolytica* (Kappeli และ Fiechter, 1977) ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต 83 เปอร์เซ็นต์ และโปรตีน 17 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรตเป็นสายของ heteropolysaccharide ที่ประกอบด้วย กลูโคส กาแลคโตส กาแลคโตซามีน และกรดกาแลคโทโรนิก Cameron และคณะ (1988) รายงานว่า *Saccharomyces cerevisiae* สามารถผลิตแมนโนโปรตีนได้ ซึ่งเป็นโปรตีนที่ก่อเกิดอิมัลชันได้ดีกับน้ำมัน อัลเคน และตัวทำละลายสารอินทรีย์ เมื่อทำให้บริสุทธิ์พบว่าประกอบด้วย แมนโนส 44 เปอร์เซ็นต์ และโปรตีน 17 เปอร์เซ็นต์ Hisatsuka และคณะ (1972) ได้ทำงานวิจัยแยก protein - like activator จาก *P. aeruginosa* S7B1 ได้และนำมาปรับปรุงใช้เป็นสารก่อเกิดอิมัลชันกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอน มีน้ำหนักโมเลกุล 14,300 ดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 147 ตัว เป็นเซอรีน (serine) และทรีโอนีน (threonine) 51 ตัว

6. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดอนุภาค (particulate biosurfactants)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดอนุภาคเป็นส่วนของ extracellular membrane vesicles ที่มารวมตัวเป็น microemulsion กับสารประกอบไฮโดรคาร์บอน นได้ ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการนำอัลเคนเข้าสู่เซลล์ของจุลินทรีย์ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดอนุภาคที่ผลิตโดย *Acinetobacter* sp. HO1-N ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 20 – 50 นาโนเมตร ประกอบด้วยโปรตีน ฟอสโฟลิพิด และไลโปพอลิแซกคาไรด์ ซึ่งมี membrane vesicle เหมือนกับ outer membrane ของจุลินทรีย์ที่ผลิตขึ้น Burd และ Ward (1997) รายงานว่า *Pseudomonas marginalis* สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชนิดอนุภาคที่มีชื่อว่า PM-factor ไปพร้อมกับการเจริญของเซลล์ (Desai และ Banat, 1997)

ตารางที่ 2.1 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ (Desai และ Banat, 1997)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	จุลินทรีย์	Surface tension (mN/m)	CMC	Interfacial tension (mN/m)
Glycolipid				
Rhamnolipid	<i>P. aeruginosa</i>	29		0.25
	<i>Pseudomonas sp.</i>	25-30	0.1-10	1
Trehalolipids	<i>R. erythropolis</i>	32-36	4	14-17
	<i>N. erythropolis</i>	30	20	3.5
	<i>Mycobacterium sp.</i>	38	0.3	15
Sophorolipid	<i>T. bombicola</i>	33		1.8
	<i>T. apicola</i>	30		0.9
	<i>T. petrophilum</i>			
Cellobiolipids	<i>U. zeac, U. maydis</i>			
Lipopeptides and lipoproteins				
Peptide-lipid	<i>B. licheniformis</i>	27	12-20	0.1-0.3
Serrawettin	<i>S. marcescens</i>	28-33		
Viscosin	<i>P. fluorescens</i>	26.5	150	
Surfactin	<i>B. subtilis</i>	27-32	23-160	1
Subtilisin	<i>B. subtilis</i>			
Gramicidins	<i>B. brevis</i>			
Polymyxins	<i>B. polymyxa</i>			
Fatty acid, neutral lipids, and phospholipids				
Fatty acids	<i>C. lepus</i>	30	150	2
Neutral lipids	<i>N. erythropolis</i>	32		3
Phospholipids	<i>T. thiooxidans</i>			
Polymeric surfactants				
Emulsan	<i>A. calcoaceticus</i>			
Biodispersan	<i>A. calcoaceticus</i>			
Mannan-lipid-protein	<i>C. tropicalis</i>			
Liposan	<i>C. lipolytica</i>			

ตารางที่ 2.1 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ (Desai และ Banat, 1997)
(ต่อ)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	จุลินทรีย์	Surface tension (mN/m)	CMC	Interfacial tension (mN/m)
Carbohydrate-protein-lipid	<i>P. fluorescens</i>	27	10	
Protein PA	<i>D. polymorphis</i>			
Perticulate biosurfactants	<i>P. aeruginosa</i>			
Vesicles and fimbriae	<i>A. calcoaceticus</i>			
Whole cells	Variety of bacteria			

2.3 จลนศาสตร์การหมักสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Kinetics of fermentative production)

จลนศาสตร์การหมักสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นมีหลายรูปแบบตามการแปรผันของระบบที่ใช้ในการหมัก ซึ่งสรุปได้ 4 รูปแบบ ดังนี้

1. การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพควบคู่กับการเจริญของเซลล์

(Growth - associated production)

โดยการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นจะควบคู่ไปกับการเจริญของจุลินทรีย์ ดังรูปที่ 2.22 ก ตัวอย่างการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแบบนี้ได้แก่ การผลิตไกลโคลิพิดจาก *Torulopsis bombicola* พบว่าจะเกิดขึ้นในช่วง exponential phase ของการเจริญ โดยมีกลูโคสและน้ำมันจากพืชเป็นแหล่งคาร์บอน (Cooper และ Paddock, 1984)

2. การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในภาวะจำกัดการเจริญ

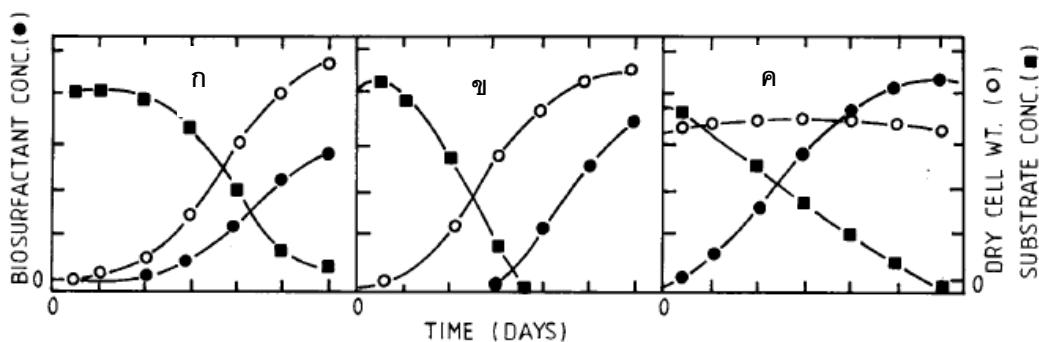
(Growth - limited condition)

การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพภายใต้ภาวะเลี้ยงเชื้อที่มีการจำกัดสารตั้งต้น เช่น แหล่งไนโตรเจน โดยเมื่อสารตั้งต้นเหล่านั้นถูกใช้โดยจุลินทรีย์หมดลงการผลิตสารลดแรงตึงผิวก็เพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว ดังแสดงในรูปที่ 2.22 ข ตัวอย่างเช่น การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Torulopsis apicola* การผลิตไกลโคลิพิดจาก *Norcadia* sp. SFC-D และการผลิตสารที่มีสมบัติเป็นอิมัลซิไฟเออร์จาก *Candida tropicalis* IIP-4 เมื่อเลี้ยงเชื้อเจริญมาถึงระยะหนึ่งจนการเจริญคงที่ ปริมาณของไนโตรเจนและแร่เหล็กลดลง จนเกือบหมด แล้วจึงมีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Desai และ Banat, 1997)

3. การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในช่วงระยะพักของเซลล์

(Resting cells or immobilized cells)

เป็นภาวะการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้เชื้อที่อยู่ในระยะพักเป็นหัวเชื้อ ในขณะที่เชื้อยังสามารถใช้แหล่งคาร์บอนและสังเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ โดยการเจริญของเชื้อจะคงที่และรักษาระดับอยู่ตลอดเวลาในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ รูปแบบการเจริญแสดงในรูปที่ 2.22 ค ตัวอย่างการผลิตเช่น การผลิตแรมโนลิพิดโดย *Pseudomonas* spp. และ *P.aeruginosa* CFTR-6 (Ramana และ Karanth, 1989) การผลิตไซโทโรลิพิดโดย *Torulopsis bombicola* (Inoue และ Itoh, 1982) และ *Candida apicola* (Hommel และ Huse, 1993) และการผลิต mannosylerythritol lipid โดย *Candida antarctica* strain T-34 (Kitamoto และคณะ, 1992) เป็นต้น



รูปที่ 2.22 รูปแบบการเจริญของเชื้อแบบต่าง ๆ

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

4. การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยมีการเติมสารตั้งต้น

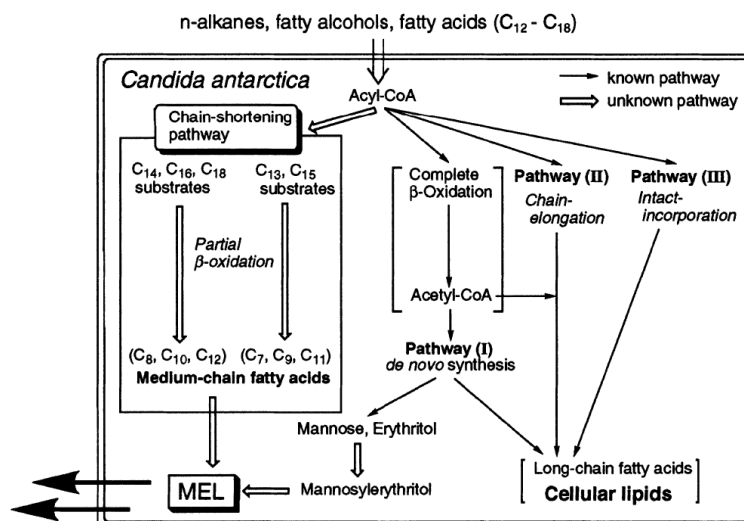
(Precursor supplementation)

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

2.4 กระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นกระบวนการที่ค่อนข้างยาก ปัจจัยการผลิตที่มีผลต่อชนิดและปริมาณของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ได้แก่ แหล่งคาร์บอน ซึ่งถ้าเป็นกลูโคสจะสามารถนำไปใช้ได้ง่ายโดยผ่านกระบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis) แต่ถ้าเป็นไขมันจะต้องถูกย่อยด้วยเอนไซม์ไลเปส แล้วเข้าสู่กระบวนการบีตา-ออกซิเดชัน (β -oxidation) จากนั้นจึงเข้าสู่วัฏจักรเครบส์ต่อไป แหล่งไนโตรเจน แร่ธาตุบางชนิด และปริมาณอาหารที่เหมาะสม นอกจากนี้ยังมีปัจจัยทางกายภาพและทางเคมี เช่น อัตราการให้อากาศ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดต่าง และปัจจัยที่สำคัญคือ สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ใช้ต้องเป็นสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตดีที่สุดที่ภาวะเหมาะสม การเปลี่ยนแปลงอาหารจะส่งผลให้โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเปลี่ยน และส่งผลให้สมบัติของการเป็นสารลดแรงตึงผิวเปลี่ยนไปด้วย ดังนั้นจึงต้องเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับเชื้อแต่ละชนิดด้วย นอกจากนี้แหล่งคาร์บอนยังมีผลต่อสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยว่าจะเป็นการปล่อยสู่นอกเซลล์ (extracellular) หรือถูกขังอยู่ในเซลล์ (intracellular) แหล่งไนโตรเจน (N- source) และอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N) ก็มีผลต่อการเกิดการผลิติดังนั้นประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะดีหรือไม่ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย

กระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของจุลินทรีย์โดยทั่วไป เริ่มต้นจากการนำสารตั้งต้น (สารประกอบไฮโดรคาร์บอนต่างๆ) เข้าสู่เซลล์โดยผ่านผนังเซลล์ ผนังเมมเบรน และเข้าสู่ไซโทพลาสซึม สารตั้งต้นที่ผ่านเข้าสู่เซลล์แล้วจะผ่านกระบวนการบีตา-ออกซิเดชัน แล้วให้สารตั้งต้นตัวใหม่คือ Acetyl CoA ซึ่งเป็นสารตั้งต้นหลักในกระบวนการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ กระบวนการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพภายในเซลล์จุลินทรีย์มี 3 pathway ได้แก่ 1) de novo synthesis 2) chain elongation (การนำ Acetyl CoA มาต่อที่ละโมเลกุลจนได้กรดไขมันสายยาว) 3) intact incorporation (การนำ Acetyl CoA 2 โมเลกุลมาต่อกัน) นอกจากกระบวนการที่กล่าวมาแล้วยังมีกระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่น่าสนใจอีกคือ กระบวนการ chain shortening โดยจะใช้ Acetyl CoA เป็นสารตั้งต้นซึ่งจะจับกับกรดไขมันสายสั้น แล้วผ่านกระบวนการบีตา-ออกซิเดชัน ที่ไม่สมบูรณ์จะได้กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จากนั้นอาจเกิดการรวมตัวของกรดไขมันกับสารชนิดอื่น หรืออาจเกิดการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของกรดไขมัน เพื่อให้ได้สารที่สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ซึ่งสารนี้อาจอยู่ภายในเซลล์หรือหลั่งออกมา นอกเซลล์ขึ้นอยู่กับชนิดของสารและจุลินทรีย์ชนิดนั้น ดังแสดงตัวอย่างกระบวนการผลิตสาร Mannosylerythritol lipid (MEL) จากยีสต์ *Candida antarctica* T-34 ในรูปที่ 2.23



รูปที่ 2.23 กระบวนการผลิตสาร Mannosylethritol lipid (MEL) จาก *Candida antarctica* T-34 (Kitamoto และคณะ, 2002)

2.5 แหล่งอาหารที่มีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

1. แหล่งคาร์บอน

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

การผลิตไซโฟโรลิพิดจาก *Candida bombicola* ATCC22214 พบว่าส่วนของ hydroxyl-fatty acid จะแตกต่างกันไปตามสารตั้งต้น เช่น เมื่อใช้สารตั้งต้นเป็นโดดีเคน (dodecane) จะให้ไซโฟโรลิพิดที่ประกอบด้วย hydroxydodecanoic fatty acid ซึ่งไม่พบในไซโฟโรลิพิดที่ผลิตได้จากสารตั้งต้นชนิดอื่น เช่นเดียวกับเมื่อใช้อัลเคนเป็นสารตั้งต้นที่มีจำนวนคาร์บอนแตกต่างกันตั้งแต่ 12 ถึง 17 จะพบว่า hydroxyl acid จะมีความยาวเพิ่มขึ้นตามความยาวของสายคาร์บอนของสารตั้งต้น (Cavalero และ Cooper, 2003)

2. แหล่งไนโตรเจน

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

ผลกระทบของแหล่งไนโตรเจน 2 ชนิด คือ โซเดียมไนเตรทและแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการผลิต trehalose 2,3,4,2' tetraester โดย *Rhodococcus* sp. 51T7 พบว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนจะทำให้ค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงเป็นผลทำให้ไปยับยั้งการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และเมื่อใช้โซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 2.5 กรัมต่อลิตร จะเป็นภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิต ตสาร (Espuny และคณะ, 1996) ไลเคนไนซินเอจาก *B. licheniformis* BAS50 จะให้ผลผลิต 2 และ 5 เท่าเมื่อเติม L-glutamic acid และ L-asparagine เป็นแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ (Yakimov และคณะ, 1996)

การจำกัดอาหารในภาวะการเจริญก็เป็นปัจจัยที่สำคัญในการผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) (David และคณะ, 1999) เช่น *Pseudomonas aeruginosa* จะถูกกระตุ้นให้ผลิตแรมโนลิพิดได้ดีในภาวะที่มีการจำกัดปริมาณไนโตรเจน (Hudak และ Cassidy, 2004; Arino และคณะ, 1996; Wu และ Ju, 1998) นอกจากนี้อัตราส่วนระหว่างไนโตรเจนและคาร์บอนต้องเหมาะสมด้วย เช่น *P. aeruginosa* จะผลิตแรมโนลิพิดได้ดีที่สุดในภาวะจำกัดปริมาณไนโตรเจนและมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 16:1 และ 18:1 แต่จะให้ผลผลิตน้อยเมื่ออัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่ำกว่า 11:1 (Guerra-Santos และคณะ, 1984)

3. แหล่งเกลือแร่และวิตามิน

เกลือแร่และวิตามิน เป็นปัจจัยหนึ่งที่จุลินทรีย์ต้องการใช้เพื่อการเจริญเติบโต นอกเหนือ

จากแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน นอกจากนี้ยังมีผลในการส่งเสริมหรือยับยั้งการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ Guerra- Santos และคณะ (1986) แสดงให้เห็นว่าการเติมแมกนีเซียม แคลเซียม โพแทสเซียม โซเดียม และแร่ธาตุเสริมในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีผลกระตุ้นการผลิตแรมโนลิพิดได้เพิ่มมากขึ้นโดย *Pseudomonas* sp. ในทางตรงข้ามการผลิตเซอร์แฟกตินโดย *B. subtilis* พบว่าสามารถถูกกระตุ้นได้โดยการเติมเหล็กและเกลือแมงกานีสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Cooper และคณะ, 1981) นอกจากนี้ปริมาณเกลือแร่และวิตามินต้องมีอัตราส่วนต่อคาร์บอนที่เหมาะสมด้วย เช่น *Candida ingens* จะผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีเมื่อเติมโพแทสเซียมและธาตุเหล็กในอาหารเลี้ยงเชื้อในอัตราส่วนคาร์บอนต่อแร่ธาตุที่สูง (Amezcu-Vega และคณะ, 2007) แตกต่างจากการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *P. fluorescens* จะถูกกระตุ้นเมื่อจำกัดปริมาณธาตุเหล็ก (Persson และคณะ, 1990)

ปัจจัยทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

1. ความเป็นกรด-ด่าง

การเจริญของจุลินทรีย์หรือสิ่งมีชีวิตต่างๆ ถูกควบคุมโดยกระบวนการเมตาบอลิซึมมี เอนไซม์เป็นตัว วสำคัญ และการทำงานของเอนไซม์จะได้รับผลกระทบจากความเป็นกรด-ด่าง องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยสำคัญอันหนึ่งที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากจุลินทรีย์จะมีการย่อยสลายสารอาหารเพื่อเป็นแหล่งพลังงาน ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีองค์ประกอบที่เป็นโปรตีน และไนโตรเจน เมื่อถูกย่อยสลายจะปลดปล่อยสารที่เป็นแอมโมเนีย หรือ อีคคาไลนอื่นๆ ออกมา แต่ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมี องค์ประกอบที่เป็นคาร์โบไฮเดรต เมื่อถูกย่อยสลายจะขับสารที่เป็นกรดอินทรีย์ออกมา ซึ่งสิ่งที่ขับออกมานี้ จะทำให้ ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเปลี่ยนแปลงไป จนอยู่ในสภาพที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ และมีความสำคัญในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของจุลินทรีย์ จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะเจริญได้ดีที่ความเป็นกรด-ด่างแตกต่างกัน เช่น *Rhodococcus* sp. เจริญเติบโตได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5 ถึง 6.8 แต่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ในช่วงความเป็นกรด-ด่างกว้างกว่าคือ 6.5 ถึง 7.2 (Abu-Ruwaida และคณะ, 1991) เช่นเดียวกับที่ Cooper และ Goldenberge (1987) เคยรายงานว่า เมื่อเพิ่มค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 6.5 เป็น 7.0 จะส่งเสริมทั้งการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus* sp. และถ้าค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่า 5.5 จะยับยั้งทั้งการเจริญและการผลิตสารเช่นกัน แต่การเจริญของ *P. aeruginosa* ได้รับผลกระทบจากค่าความเป็นกรด-ด่างเพียงเล็กน้อย ขณะที่การผลิต

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จะลดลงเมื่อค่าความเป็นกรดต่างเปลี่ยนไปจาก 6.2 ถึง 6.4 (Guerra-Santos และคณะ, 1986) เป็นต้น

2. อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นอีกสาเหตุที่ทำให้องค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเปลี่ยนแปลง และยังส่งผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น *Candida bombicola* ATCC22214 เจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่ 28.8 องศาเซลเซียส (Inge และคณะ, 2007) แต่ Gobbert และคณะ (1984) รายงานว่าสามารถผลิตโซโรลิพิด์ได้ดีที่สุดที่ 21 องศาเซลเซียส เป็นต้น ขบวนการหมักส่วนใหญ่ทำที่ 25 หรือ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งทั้งสองอุณหภูมินี้สามารถใช้ผลิตโซโรลิพิด์ได้ แต่ที่ 25 องศาเซลเซียสพบว่าการเจริญของจุลินทรีย์ต่ำกว่าแต่อัตราการย่อยสลายกลูโคสสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับที่ 30 องศาเซลเซียส นอกจากนี้อุณหภูมียังมีผลกระทบต่อกระบวนการสร้างไขมัน นอกเหนือจากระดับของความไม่อิ่มตัว ตัวอย่างเช่น มีผลเปลี่ยนแปลงความยาวของสารกรดไขมัน มีผลต่อระดับของกิ่งของกรดไขมัน (fatty acid branching) และ cyclization มีผลต่อการกระจายตัวและความแตกต่างของสัดส่วนระหว่างไกลโคลิพิด์ และฟอสโฟลิพิด์ที่เกิดเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิโดยอุณหภูมียังมีผลต่อปริมาณของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *A.paraineus* ATCC 19558, *Rhodococcus erythropolis* และ *Pseudomonas* sp. DSM-2874 (Guerra-Santos และคณะ 1986 ; Kosaric และคณะ, 1984)

3. การให้อากาศ

การให้อากาศ การกวน เป็นการเพิ่มปริมาณออกซิเจนให้กับจุลินทรีย์เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมทางหนึ่ง นอกจากนี้ยังเป็นการช่วยให้จุลินทรีย์อยู่ในสภาพแขวนลอยสามารถดูดซึมปริมาณออกซิเจนเพื่อนำไปใช้ได้มากขึ้น ออกซิเจนที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้นั้นต้องอยู่ในรูปของโมเลกุลออกซิเจนที่ละลายหรืออยู่ในรูปของเหลว การละลายของออกซิเจนในน้ำมีปริมาณจำกัด ออกซิเจนสามารถละลายในสื่อกลางที่เป็นน้ำได้เพียงไม่กี่มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยอากาศที่ความดัน 1 บรรยากาศ นับว่าน้อยมากเมื่อเทียบกับปริมาณออกซิเจนที่จุลินทรีย์ต้องการ ดังนั้นจำเป็นต้องทำให้มีออกซิเจนละลายเข้าไปในอาหารเหลวอยู่ตลอดเวลาโดยการถ่ายเทจากอากาศ ซึ่งช่วยให้จุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศเจริญได้ด้วย ความหนาแน่นสูงภายใต้ภาวะที่เป็นอันหนึ่งอันเดียวกัน ดังนั้นจะเห็นว่าในขั้นตอนของกระบวนการหมักจึงต้องมีการให้อากาศตลอดเวลา Papanikolaou และคณะ (2002) พบว่าอัตราการถ่ายเทอากาศเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญสำหรับการผลิต Single cell oil ของยีสต์ *Y. lipolytica* พบว่าที่ความอิ่มตัวของออกซิเจน 5-15% จะให้ผลผลิตของไขมันเท่ากับ 3 g/l ในขณะที่ความอิ่มตัวของออกซิเจนสูงถึง 60-70% จะไม่

สามารถผลิตไขมันได้ และการผลิตเซอร์แฟคตินจาก *Bacillus subtilis* ATCC21332 พบว่าที่อัตรา การให้อากาศ 1.5 vvm และความเร็วในการเขย่าที่ 300 รอบต่อนาที จะให้ผลผลิตสูงสุด (Yeh และ คณะ, 2006) แต่การผลิตเซอร์แฟคตินจาก *B.licheniformis* JF-2 ได้ดีที่สุดในภาวะการจำกัด ปริมาณออกซิเจน (Lin และคณะ, 1994)

2.6 กระบวนการผลิตไซโฟโรลิพิด

ไกลโคลิพิดเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตต่อกับไขมัน เป็นชนิด ไม่มีประจุ ซึ่งเข้ามามีบทบาทในตลาดของการผลิตสารลดแรงตึงผิวมากขึ้นในช่วง 10 ปีมานี้ เพราะเป็นสารที่มีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม มีโครงสร้างที่หลากหลาย ซึ่งส่วนใหญ่ได้มาจาก กระบวนการหมัก โดยเฉพาะอย่างยิ่งแรมโนลิพิดและไซโฟโรลิพิด (Van Bogaert และคณะ, 2007)

ไซโฟโรลิพิดเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ประกอบด้วยน้ำตาลไซโฟโรสต่อกับ hydroxyl fatty acid มีทั้ง acidic form และ lactonic form เป็นสารที่มีคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิวได้ดี ไม่ เป็นพิษต่อผิวหนัง จึงมีความสำคัญในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์บำรุงผิว นอกจากนี้ ยังมีการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ เนื่องจากคุณสมบัติในการก่ออิมัลชัน และความสามารถ ในการต่อต้านจุลินทรีย์ เป็นต้น ไซโฟโรลิพิดสามารถผลิตได้จากยีสต์ไม่กี่สปีชีส์โดยครั้ง แรกที่มีการค้นพบว่ายีสต์สามารถผลิตไซโฟโรลิพิดได้ คือ Gorin และคณะ (1961) พบว่า *Torulopsis (Candida) apicola* สามารถผลิตไซโฟโรลิพิดที่มีองค์ประกอบเป็น acetylate 2-O- β -D-glucopyranosyl-D-glucopyranose ต่อกับ 17-L-hydroxyoctadecanoic หรือ 17-L-hydroxyl- Δ 9-octadecanoic acid ด้วยพันธะ β -glycoside (Tulloch และคณะ, 1962; Tulloch และ Spencer, 1968)

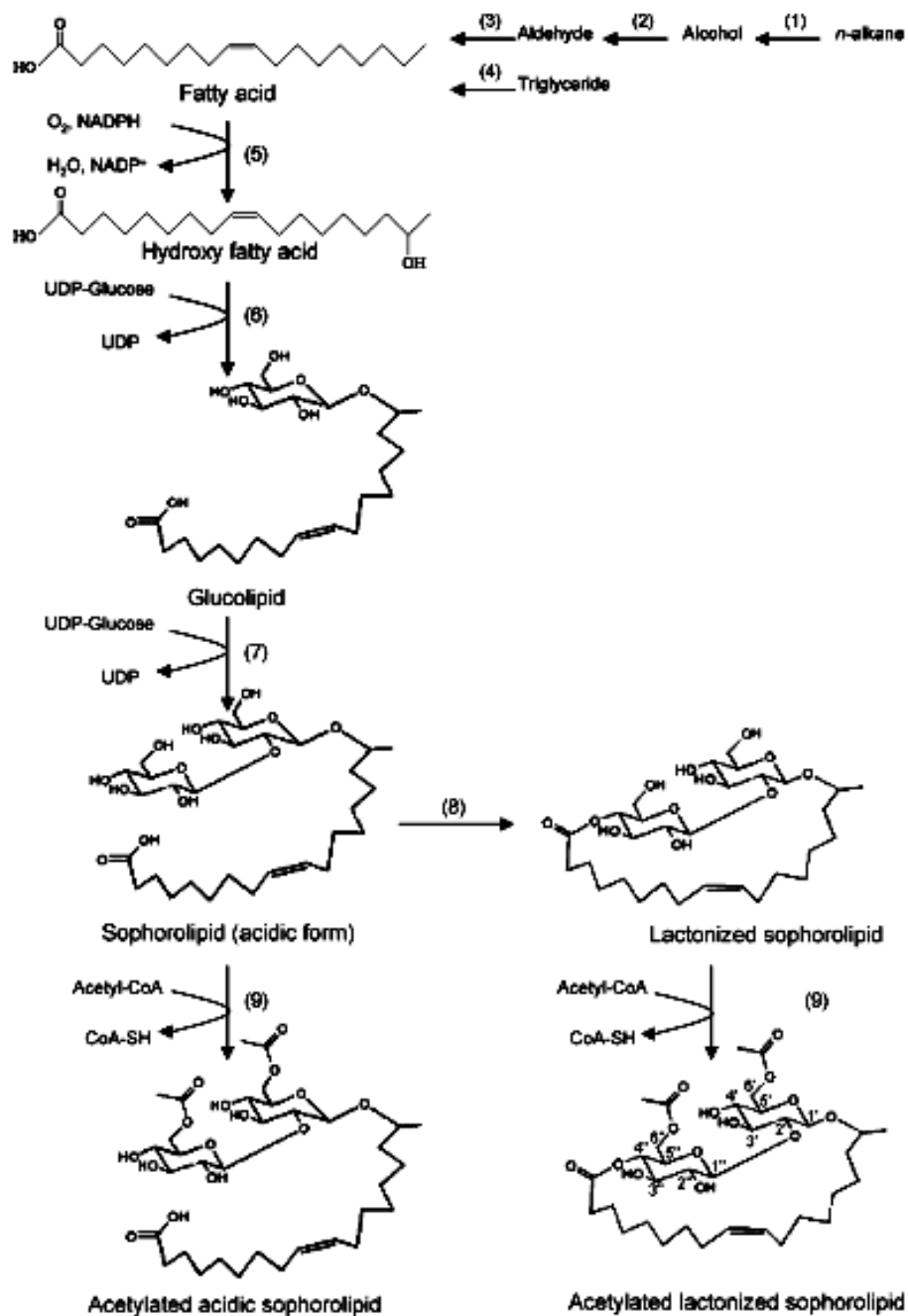
ในปีเดียวกัน Tulloch และคณะ (1968) ได้ค้นพบยีสต์สายพันธุ์ใหม่ที่สามารถผลิตไซโฟโร ลิพิดได้เช่นกัน คือ *Candida bogoriensis* ซึ่งไซโฟโรลิพิดที่ผลิตได้มีโครงสร้างใกล้เคียงกับที่ผลิต ได้โดย *C. apicola* แตกต่างเพียงส่วนที่เป็น hydroxyl fatty acid ซึ่งเป็น 13-hydroxydocosanoic acid ส่วนยีสต์สายพันธุ์ที่สามที่ค้นพบคือ *Candida bombicola* ซึ่งไซโฟโรลิพิดที่ผลิตได้ก็มี โครงสร้างใกล้เคียงกับที่ผลิตได้โดย *C. apicola* มากเช่นกัน (Spencer และคณะ, 1970)

ปัจจุบันได้มีการค้นพบยีสต์สายพันธุ์ใหม่ที่สามารถผลิตไซโฟโรลิพิดได้อีกคือ *Wickerhamiella domercqiae* ที่มีโครงสร้างหลักเป็น 17-L(-oxy)-octadecenoic acid 1,4' - lactone 6',6' - diacetate ซึ่งพบได้ในโครงสร้างของไซโฟโรลิพิดที่ผลิตได้จาก *C. apicola* และ *C. bombicola* เช่นกัน (Jing และคณะ, 2006) นอกจากนี้ Konishi และคณะ (2008) ยังพบยีสต์

สายพันธุ์ล่าสุดที่สามารถผลิตไซโฟโรลิพิดได้อีก คือ *Candida batistae* โดยสารที่ผลิตได้มีโครงสร้างที่ใกล้เคียงกับสารที่ได้จาก *C.bombicola* ซึ่งประกอบด้วย 18 - L - ([2'- O - β - D - glucopyranosyl - β - D - glucopyranosyl]) - (oxy) - octadecenoic acid, 6',6'' - diacetate

โดยโครงสร้างหลักของไซโฟโรลิพิดคือ ไซโฟโรส และกรดไขมัน สารประกอบทั้งสองชนิดนี้จึงสามารถเตรียมเป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อได้เพื่อเป็นสารตั้งต้นในการผลิต โดยเอนไซม์ เอสเทอเรส (esterase) จะค่อยๆ ย่อยสลายและปล่อยกรดไขมันออกมา เช่น เมื่อยีสต์เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอลเคนเป็นแหล่งคาร์บอน จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ที่ปลายสายของแอลเคนจากการทำงานของเอนไซม์ cytochrome P450 monooxygenase ได้เป็นแอลกอฮอล์ จากนั้นเอนไซม์แอลกอฮอล์ ดีไฮโดรจีเนส (alcohol-dehydrogenase) และแอลดีไฮด์ ดีไฮโดรจีเนส (aldehyde-dehydrogenase) จะทำงานต่อและได้แอลดีไฮด์ (aldehyde) และกรดไขมันตามลำดับ จากนั้นกรดไขมันก็จะเข้าสู่ขบวนการบีต้าออกซิเดชัน (β -oxidation) แต่ถ้าสารตั้งต้นเป็นไตรกลีเซอไรด์จะถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลเปส (lipase) ได้กรดไขมันเพื่อเข้าสู่ขบวนการบีต้าออกซิเดชันเช่นกัน

จากนั้นกรดไขมันจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ NADPH ที่ตำแหน่งปลายสาย (ω) หรือตำแหน่งก่อนปลายสาย ($\omega-1$) ด้วยเอนไซม์ cytochrome P450 monooxygenase ได้ hydroxyl fatty acid และเอนไซม์ glycosyltransferase I จะเติมกลูโคสจาก nucleotide-activate glucose [uridine diphosphate (UDP) - glucose] เข้าไปสร้างพันธะไกลโคไซด์ (glycoside) กับหมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่ง C_1' ของกรดไขมันได้กลูโคลิพิด (glucolipid) จากนั้นจะมีการเติมกลูโคสตัวที่สองที่ตำแหน่ง C_2' ของกลูโคสตัวแรก ด้วยการทำงานของเอนไซม์ glycosyltransferase II ได้ไซโฟโรลิพิดซึ่งอยู่ในรูป acidic form ไม่มีหมู่อะซิทิล จะเกิดการเปลี่ยนรูปไปเป็น lactonic form เมื่อเกิดปฏิกิริยา esterification ของหมู่คาร์บอกซิลของ hydroxyl fatty acid กับหมู่ไฮดรอกซีของน้ำตาลไซโฟโรสที่ตำแหน่ง 4'' หรือบางครั้งอาจเกิดที่ตำแหน่ง 6' หรือ 6'' จากการดำเนินงานของเอนไซม์ lactonesterase นอกจากนี้ยังสามารถเกิดการเติมหมู่อะซิทิลที่ตำแหน่ง 6' และ/หรือ 6'' ได้ด้วยเอนไซม์ acetyl transferase ดังแสดงในรูปที่ 2.24



รูปที่ 2.24 แสดงกระบวนการผลิตไซโฟโรลิพิดจาก *Candida bombicola* ATCC 22214 (1) เอนไซม์ cytochrome P450 monooxygenase (2) เอนไซม์แอลกอฮอล์ ดีไฮโดรจีเนส (alcohol-dehydrogenase) (3) เอนไซม์แอลดีไฮด์ ดีไฮโดรจีเนส (aldehyde-dehydrogenase) (4) เอนไซม์ไลเปส (lipase) (5) เอนไซม์ cytochrome P450 monooxygenase (6) เอนไซม์ glycosyltransferase I (7) เอนไซม์ glycosyltransferase II (8) เอนไซม์ lactonesterase (9) เอนไซม์ acetyl transferase (Van Bogaert แลคณะ, 2007)

2.7 ประโยชน์และการประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ปัจจุบันมีผู้สนใจนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไปใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทำหน้าที่ได้หลายประการ ได้แก่

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

สารลดแรงตึงผิวถูกใช้อย่างแพร่หลายทั้งในอุตสาหกรรมปิโตรเลียม สิ่งทอ เครื่องจักร กระจก พอลิเมอร์ พลาสติก ยา เครื่องสำอาง และอาหาร เป็นต้น สารลดแรงตึงผิวที่ใช้ในอุตสาหกรรมดังกล่าว วมีอยู่มากมายหลายชนิด แต่ก็ยังคงมีการพัฒนาเพื่อให้ได้สารใหม่ที่มีประสิทธิภาพมากกว่าเดิม (Cameotra และ Makkar, 1998) ในปีค.ศ. 1997 อุตสาหกรรมการผลิตสารลดแรงตึงผิวมีมูลค่ามากกว่า 9 พันล้านเหรียญอเมริกาต่อปี (Desai และ Banat, 1997) สารลดแรงตึงผิวเหล่านี้ส่วนใหญ่แล้วสังเคราะห์ขึ้นโดยผ่านกระบวนการทางเคมีโดยใช้ปิโตรเลียมเป็นสารตั้งต้น มีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ย่อยสลายทางธรรมชาติได้ยาก และกระบวนการในการผลิตยังเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย ทำให้มีการออกกฎหมายให้ใช้สารลดแรงตึงผิวที่เข้ากันได้และไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม (Maier และ Soberon-Chavez, 2000) ต่อมาสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจึงเป็นที่สนใจมากขึ้น เนื่องจากมันสามารถย่อยสลายเองได้ในธรรมชาติ มีความเป็นพิษต่ำ สามารถเข้ากันได้กับสิ่งแวดล้อม อีกทั้งสามารถผลิตจากสารตั้งต้นที่มีราคาถูกและมาจากทรัพยากรที่นำกลับมาใช้ใหม่ได้ (Mercade และคณะ, 1993; Babu และคณะ, 1996; Ishigami, 1997; Daniel และคณะ, 1998)

ในอุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งนิยมใช้สารลดแรงตึงผิวในอาหารต่างๆ เช่น จ้าพวกเครื่องดื่ม ใช้เป็นสารช่วยในการละลาย ช่วยทำให้อาหารน่ารับประทานด้วยการทำให้แวววาว อาหารพวกของอบโดยช่วยให้เป็นเนื้อเดียวกันจากคุณสมบัติเป็นอิมัลซิไฟเออร์ อาหารพวกที่มีนม ไข่ และไขมัน

เป็นองค์ประกอบ จะช่วยทำให้เกิดเจลาติน ทำให้เกิดการรวมตัวกัน ช่วยทำให้เกิดโฟม หรือเป็น fat stabilizer อาหารพวกซूपและน้ำเกรวี่ จะช่วยเพิ่มความหนืด เป็นอิมัลซิไฟเออร์ดูดซับน้ำ รวมทั้งพวกที่ใช้ตกแต่งอาหารเช่น ทอปปิ้งต่างๆ จากคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวข้างต้น ทำให้สารลดแรงตึงผิวเป็นที่แพร่หลาย ตารางที่ 2.2 จะแสดงตัวอย่างของคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวที่ใช้ในอาหารชนิดต่างๆ และต่อไปนี้เป็นตัวอย่างที่ใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์ในอาหาร เช่น lecithin และ lecithin derivative, glycerol fatty acid ester, hydroxylic acid และ fatty acid ester, lactylate fatty acid ester, polyglycerol fatty acid ester, ethylene หรือ propylene glycol fatty acid ester, ethoxylated derivative of monoglycerides, sorbitan fatty acid ester และ miscellaneous derivative ในประเทศญี่ปุ่นอนุญาตให้ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากจุลินทรีย์กับอาหารได้ เช่น โซโฟโรลิพิดโดยใช้เป็น additive ในแบ่งเพื่อเพิ่มอายุของการวางขาย (shelf life) ของขนมอบ (Fiechter, 1992 และ Kosaric, 1993)

อย่างไรก็ตามยังเป็นที่ถกเถียงกันว่า จะสามารถใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากจุลินทรีย์จะใช้กับอาหารได้หรือไม่ ดังนั้นองค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา จึงทดสอบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในด้านคุณค่าทางอาหาร คุณสมบัติต่างๆ ด้านการปรับรส ด้านชีวภาพ และด้านพิษวิทยา สุดท้ายยังห้ามใช้ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากจุลินทรีย์กับอาหาร แต่อนุญาตให้ใช้ในยา และเครื่องสำอางได้ ในขณะที่ในประเทศญี่ปุ่น อนุญาตให้ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากจุลินทรีย์กับอาหารได้ เช่น โซโฟโรลิพิดโดยใช้เป็น additive ในแบ่งเพื่อเพิ่มอายุของการวางขาย (shelf life) ของขนมอบ และ mannosylerythrytol lipids จาก *Candida antarctica* ที่ผลิตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันถั่วเหลือง นอกจากนั้นยังมีสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เป็นพอลิเมอร์ เช่น emulsan ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 200 กิโลดาลตัน ซึ่ง emulsan และ apoemulsan ที่ผลิตจาก *Acinetobacter calcoacetius* ส่วนในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง โซโฟโรลิพิดที่ผลิตได้จาก *Torulopsis bombicala* ถูกนำไปใช้ในแชมพูและครีมทาผิว (Fiechter, 1992) ตัวอย่างเครื่องสำอางที่ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เช่น สบู่ ครีมอาบน้ำ แผ่นป้องกันผิว ผลิตภัณฑ์ป้องกันรังแค น้ำยาล้างคอนแทคเลนส์ ผลิตภัณฑ์ดับกลิ่น ลิปสติก ยาสีฟัน มาสคาร่า อายแชโดว์ สารให้ความชุ่มชื้น ผลิตภัณฑ์แต่งผม เป็นต้น ในสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางคือ แรมโนลิพิด โดยแรมโนลิพิด จะฟอร์มตัวเป็น liposome (Ishigami และคณะ, 1987) โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในวงการอุตสาหกรรมส่วนมากได้จดสิทธิบัตรแล้ว ตามตัวอย่างใน ตารางที่ 2.3 (Kosaric, 1993) นอกจากนั้นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบางชนิดยังเป็นสารปฏิชีวนะ เช่น เซอร์แฟกติน พอลิไมซิน และ แรมโนลิพิด เป็นต้น

ในทางเกษตรกรรมมักใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็น antiphytopathogen กับพวกเชื้อราตัวอย่าง เช่น แรมโนลิพิดมีผลกับจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในพืช เช่น *Pythium aphanidermatum*

(Stangghellini และคณะ, 1996) อีกทั้งใช้เป็น wetting agent คือเป็นสารที่จะทำให้ใบพืชเปียก โดยอาศัยส่วนที่ไม่ชอบน้ำเกาะกับส่วนที่เป็นแวกซ์ของใบไม้ (Bunster และคณะ, 1989) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพบางชนิดช่วยทำให้ดินที่แห้งมาก ๆ กลับมีความชุ่มชื้นสามารถปลูกพืชต่างๆ ได้ เจริญงอกงามดี

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีประโยชน์หลายด้าน จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องหาวิธีในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้เป็นสินค้าที่มีขายในท้องตลาดได้ในราคาที่ไม่สูงเกินไปนัก ทั้งนี้ถ้ามีการใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพแทนสารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ทางเคมีมากขึ้นเท่าใด ก็จะเป็นการรักษาสภาพแวดล้อมของโลกเราให้ดีขึ้นด้วย

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพส่วนใหญ่ที่นำมาใช้อย่างแพร่หลายทั้ง ในอุตสาหกรรมและบ้านเรือนเป็นสารประเภทไกลโคลิพิด เช่น โซโฟโรลิพิด มีสมบัติเป็นอิมัลซิไฟเออร์ ใช้เป็นส่วนประกอบในเครื่องอุปโภคและบริโภค ซึ่งถือว่ามีความสำคัญต่อมนุษย์มากที่สุด ไกลโคลิพิดเป็นสารธรรมชาติที่มักพบได้ในผนังเซลล์ของจุลินทรีย์จำพวกยีสต์ ดังนั้นการนำ จุลินทรีย์เหล่านี้มาผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระดับอุตสาหกรรมจึงเป็นที่สนใจมากขึ้น เนื่องจากความหลากหลายของสายพันธุ์ สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้โดยใช้แหล่งอาหารได้หลากหลาย รวมถึงแหล่งอาหารที่จากวัสดุเหลือใช้จากเกษตรกรรม เช่นคาร์โบไฮเดรต กรดไขมัน และ น้ำมันจากพืชผัก ดังแสดงในตารางที่ 2.4

ด้วยเหตุผลหลายประการที่กล่าวมาข้างต้นเกี่ยวกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ดังนั้นในปัจจุบันจึงได้มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จากยีสต์กันมากขึ้น และได้เล็งเห็นความสำคัญที่ว่ายีสต์นั้นสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ในปริมาณสูง และใช้แหล่งอาหารได้หลากหลาย หาได้ง่าย ราคาถูก รวมถึงแหล่งอาหารที่จากวัสดุเหลือใช้จากเกษตรกรรม ซึ่งเป็นผลดีและเป็นทางเลือกหนึ่งในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้ได้คุณภาพในราคาต้นทุนการผลิตต่ำ รวมทั้งจะต้องพัฒนาคุณภาพให้ดีขึ้นเรื่อยๆ โดยการหาแหล่งอาหารภาวะการเลี้ยงเชื้อ และปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้เหมาะสม เพื่อให้ได้ผลผลิตสูงสุดเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่อไป

ตารางที่ 2.2 หน้าที่ต่างๆของสารลดแรงตึงผิวที่ใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์ในอาหารชนิดต่างๆ
(Kosaric, 1993)

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

ตารางที่ 2.3 ตัวอย่างสิทธิบัตรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตด้วยจุลินทรีย์ (Kosaric, 1993)

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

ตารางที่ 2.3 ตัวอย่างสิทธิบัตรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตด้วยจุลินทรีย์ (Kosaric, 1993)

(ต่อ)

Product	Microorganism	Patent
Emulsan	<i>Arthrobacter</i> sp. ATCC 31012	Biotechnol. ktienges., US 4,276,094 (1981)
Biosurfactant	<i>Corynebacterium hydroblastus</i> NRLL-B_5631	CPDL, US 3,997,398 (1976)
Biosurfactant	<i>Arthrobacter</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Pseudomonas</i>	CPD, CA 1,114,759 (1981)
Biosurfactant	<i>Arthrobacter</i> RAG1	Gutnick, D., Rosenberg, E.
Lipopeptide	<i>Methylomonas clara</i> ATCC 31226	DE 2,415,897 (1987) Hoescht AG,
Biosurfactant	<i>Penicillium spiculisporum</i>	DE 3,312,166 (1984) Inoue-Japax Research Inc.,
Sophorose lipids	<i>Torulopsis bombicola</i>	Jpn Kokai 7,837,189 (1987) Kao Soap Ltd., DE 2,834,118 (1979)
Glycolipids (trehalose lipids)	<i>Arthrobacter paraffineus</i> ATCC 15591 <i>Corynebacterium hydroblastus</i> ATCC 15592	DE 2,938,383 (1980) Kyowa Hakko Kogyo Co.Ltd. DE 1,905,472 (1970) US 3,637,461 (1972)

ตารางที่ 2.4 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากยีสต์ในแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน

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

แนวทางในการพัฒนากระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพคือ หาวัตถุดิบที่มีราคาถูก หากกระบวนการในการผลิตและการแยกสารที่ผลิตได้ที่ราคาถูกและเหมาะสม และการพัฒนาสายพันธุ์ให้ได้สายพันธุ์กลายที่มีการผลิตได้มาก หรือการพัฒนาให้เป็นรีคอมบิแนนท์ (Recombinant strain) ในสองหัวข้อแรกนั้นได้มีการศึกษา และใช้กันอย่างกว้างขวางแล้วในระดับอุตสาหกรรม แต่การพัฒนาสายพันธุ์ยังมีเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (Mukherjee และคณะ, 2006) จากเหตุผลดังกล่าว ขันต้น จึงนำมาสู่หัวข้อการวิจัยการพัฒนาสายพันธุ์โดยการการกลายพันธุ์ *Pichia anomala* PY1 เพื่อเพิ่มการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

2.8 การกลายพันธุ์ (Mutation)

การกลายพันธุ์สามารถเกิดได้เองทั้งตามธรรมชาติและจากการกระตุ้นด้วยสารเคมี หรือสิ่งเร้าอื่นๆ การกลายพันธุ์อาจทำให้เกิดการพัฒนาที่ดีขึ้นหรือแย่ลงในสิ่งมีชีวิตก็ได้ แต่ในบางครั้งหากเกิดการกลายพันธุ์ในตำแหน่งยีนที่สำคัญต่อการดำรงชีวิตก็อาจจะทำให้เซลล์ไม่สามารถอยู่รอดได้ การเปลี่ยนแปลงในระดับยีนนี้ เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของเบส (A, T, C, G) หรือการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งของลำดับการเรียงตัวของเบสในโมเลกุลของ DNA ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อตำแหน่งการเรียงตัวของกรดอะมิโน ในสายพอลิเปปไทด์ในโมเลกุลของโปรตีนที่อยู่ภายใต้การควบคุมของยีนนั้นด้วย การเปลี่ยนแปลงของเบสในโมเลกุล DNA ดังกล่าวอาจทำให้ไม่มีการสร้างโปรตีน หรือโปรตีนที่สร้างขึ้นมานั้นเปลี่ยนสมบัติทางเคมีไปจากเดิม หรือหมดสภาพการทำงานไป

ชนิดของการเกิดการกลายพันธุ์

1. Point mutation

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

เดิม	<u>C</u> TC AGC	เป็น	Leucine Serine
เกิดการกลายพันธุ์	<u>G</u> TC 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 <u>G</u> TC AGC	เป็น	Leucine Phenylalanine Serine
เกิดการกลายพันธุ์	CTC <u>I</u> AG CAG C	เป็น	Leucine หยุด

3. Deletion mutation

เกิดจากการที่เบสในสายดีเอ็นเอถูกกำจัดออกไป ทำให้การอ่านลำดับเบสเปลี่ยนไปหรือหายไป (Frame shift)

เดิม	CTC <u>G</u> TC AGC	เป็น	Leucine Phenylalanine Serine
เกิดการกลายพันธุ์	CTC AGC	เป็น	Leucine Serine

4. Silent mutation

เกิดจากการที่เบสในสายดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไป 1 ตำแหน่ง แต่ไม่ทำให้การอ่านลำดับเบสผิดไป เนื่องจากเบสหนึ่งตัวมักจะมีลำดับเบสได้หลากหลาย จึงยังคงสามารถอ่านได้ เป็นกรดอะมิโนตัวเดิม

เดิม	CTC <u>A</u> GC	เป็น	Leucine Serine
เกิดการกลายพันธุ์	CTA <u>A</u> GC	เป็น	Leucine Serine

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

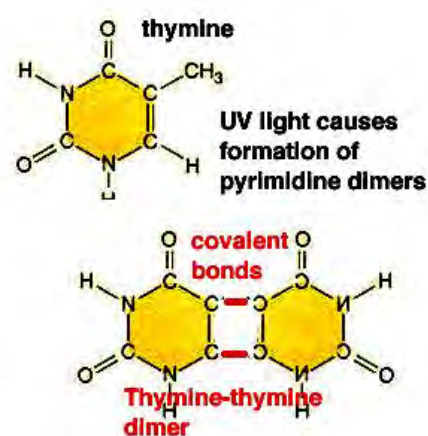
ส่วนการกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์นั้น เบสทุกตัวทั้ง Adenine, Thymine, Cytosine และ Guanine จะสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ แต่จะมีเพียงบางตำแหน่งเท่านั้นที่จะเป็นบริเวณที่มักจะเกิดการกลายพันธุ์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสารกระตุ้นที่ใช้และเบสบริเวณข้างเคียง การกระตุ้นให้ยีนเกิดการเปลี่ยนแปลง สามารถทำได้ 2 วิธีคือ

1. การใช้รังสี

รังสีที่กระตุ้นให้เกิดมิวเทชันมี 2 ชนิดคือ Non-Ionizing Radiation เช่น รังสีอุลตราไวโอเลต และ Ionizing Radiation เช่น รังสีบีต้า, รังสีแกมมา, รังสีเอกซ์

1.1 รังสียูวี

รังสียูวีมักจะทำให้เกิดพันธะจากการเข้าคู่กันของเบส Thymine เป็น Thymine-Thymine dimer จากนั้นจะเกิดการซ่อมแซมตัวเองโดยการตัด Thymine-Thymine dimer ออกแล้วเติมเบสเข้าแทนที่แบบซ่อม การเติมเบสเข้าแบบซ่อมนี้เองจะทำให้ยีนเกิดการเปลี่ยนแปลงจากการใส่ชนิดเบสที่ผิด ทั้งนี้การก่อการกลายพันธุ์ด้วยรังสียูวีมักจะทำให้เกิดการตายของเซลล์มากกว่าการมีพันธุกรรมที่เปลี่ยนไป และยังสามารถเกิดการซ่อมแซมลำดับเบสที่ใส่ผิดไปได้ด้วย



รูปที่ 2.25 แสดงการเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยรังสียูวี

1.2 รังสีเอกซ์และแกมมา

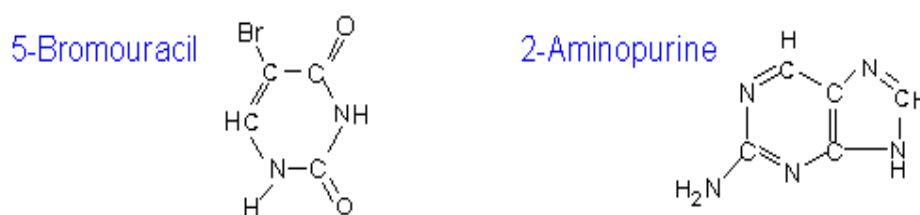
รังสีเอกซ์และแกมมาจะทำให้พันธะฟอสโฟไดเอสเตอในสายดีเอ็นเอหัก ทำให้เกิดการขาดหายไปของรหัสพันธุกรรม และอาจจะทำให้เกิดการตัดหมู่อะมิโนหรือหมู่ไฮดรอกซิลของดีเอ็นเอทิ้ง

2. การใช้สารเคมี

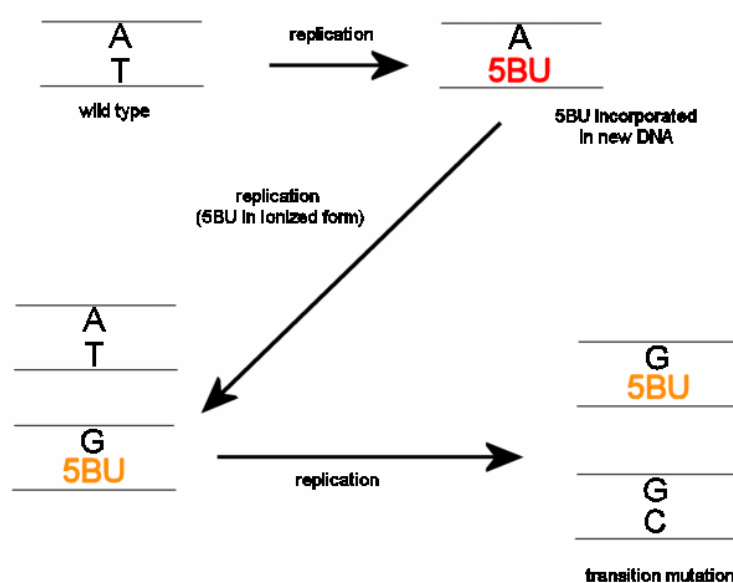
2.1 Base analogues

เป็นสารเคมีที่มีโครงสร้างคล้ายเบสในสายดีเอ็นเอ ซึ่งสามารถเข้าแทนที่เบสเหล่านั้นได้ระหว่างที่เกิดการจำลองโมเลกุลของดีเอ็นเอ ทำให้เกิดการแทนที่คู่เบสและรหัสพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไป ตัวอย่างของสารเคมีในกลุ่มนี้คือ 5-deoxyuridine 2-

aminopurine 5-bromouracil มีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงกับไทมีน เมื่อเกิดการจำลองโมเลกุลของดีเอ็นเอจะสามารถเข้าไปแทนที่ไทมีนได้ และสามารถเกิด tautomeric หรือ ionization ได้ซึ่งเมื่อเกิดแล้วแทนที่จะจับคู่ กับอะดีนีน จะไปจับคู่กับกวanine เมื่อมีการจำลองโมเลกุลต่อไปอีกจะทำให้เกิดการแทนที่คู่เบสขึ้นได้



รูปที่ 2.26 โครงสร้างสาร 5-bromouracil และ 2 Aminopurine

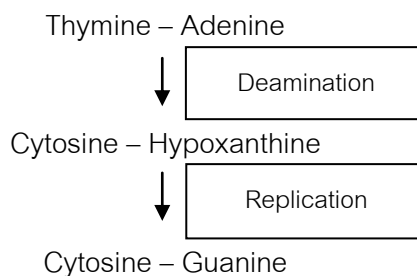


รูปที่ 2.27 การกลายพันธุ์โดยใช้สาร 5-bromouracil (5BU) (Griffiths และคณะ 2005)

2.2 Deaminating agents

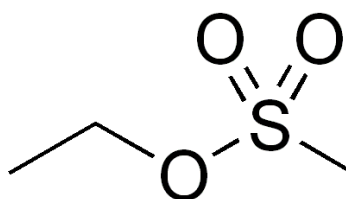
เป็นสารเคมีที่ทำให้เบส Adenine เปลี่ยนแปลงเป็นสารใหม่ชื่อ Hypoxanthine เบสที่เปลี่ยนไปนั้นจะเข้าคู่กับ Cytosine แทน Thymine ตัวอย่างของสารเคมีคือ Nitrous acid จะทำหน้าที่ดึงหมู่อะมิโนออกจากโมเลกุลของเบสอะดีนีน ไซโทซีน และกวanine ทำให้

เบสอะดีนีนเปลี่ยนเป็นไฮโปแซนทีน ซึ่งสามารถจับคู่กับเบสไซโทซีนได้ เบสไซโทซีนเปลี่ยนเป็นยูราซิลซึ่งสามารถจับคู่กับเบสอะดีนีนได้และเบสกวานีน เปลี่ยนเป็นแซนทีน ซึ่งสามารถจับคู่กับเบสไซโทซีนได้ดังนั้นเมื่อเกิดการจำลองโมเลกุล ของดีเอ็นเอจะทำให้เกิดการแทนที่คู่เบสแบบเทรนซิชัน

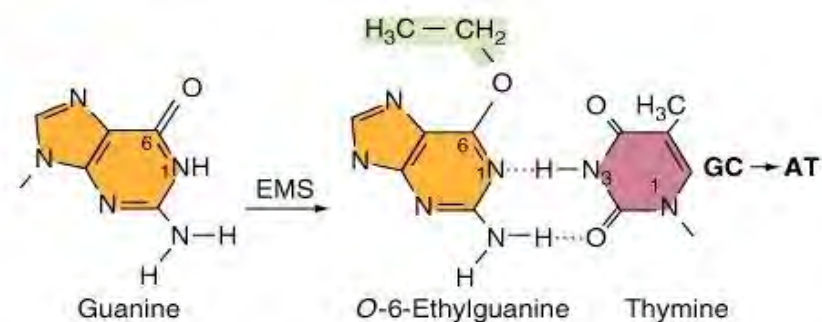


2.3 Alkylating agent

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



รูปที่ 2.28 โครงสร้างทางเคมีของสาร Ethylmethanesulphonate ([Merck Index](#), 11th Edition, 3782.)



รูปที่ 2.29 แสดงการเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยสาร EMS (Griffiths และคณะ 1999)

Mulligan และคณะ (1989) รายงานว่า เมื่อทำการกลายพันธุ์ *Bacillus subtilis* ATCC 21332 ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต พบว่าสายพันธุ์กลายที่ได้นั้นสามารถผลิตเซอร์เฟกตินได้มากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมประมาณ 3 เท่า

Iqbal และคณะ (1995) รายงานว่า เมื่อทำการกลายพันธุ์ *Pseudomonas aeruginosa* EBN-8 ด้วยรังสีแกมมา พบว่าสายพันธุ์กลายสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ 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 แล้วพบว่าสายพันธุ์กลายสามารถผลิตแรมโนลิพิตได้ 12.5 g L^{-1} ซึ่งมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมประมาณ 10 เท่า รวมถึงให้ค่าการกระจาย และ ลดค่าแรงตึงผิวได้ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ดั้งเดิม

บทที่ 3

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 ๓๓ (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
- ตู้เพิ่มความดันไอน้ำแบบอัตโนมัติ (Autoclave) รุ่น SS-325 ของบริษัท Tomy,Japan
- เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) รุ่น Innova™ 4300 ของบริษัท New Brunswick Scientific, U.S.A
- ตู้อบ (Hot air oven) รุ่น UE 600 ของบริษัท Memmert, Germany
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น BE 800 ของบริษัท Memmert, Germany
- เครื่องชั่งหยาบ รุ่น PG 2002-S ของบริษัท Metler Toledo, Switzerland
- เครื่องชั่งละเอียด รุ่น AG 285 ของบริษัท Metler Toledo, Switzerland

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

2. เคมีภัณฑ์

- สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A
- สารสกัดจากข้าวมอลต์ (Malt extract) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A
- แบคโตเปปโตเน (Bactopeptone) บริษัท Difco Laboratories, U.S.A
- กลูโคส ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- น้ำตาลทราย (ซูโครส) ของบริษัทน้ำตาลทรายมิตรผล จำกัด
- มอลโทสของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A
- แมนนิทอล E.Merck, Darmstadt, Germany
- กาแลกโตสของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A
- น้ำมันดิบเมอร์บานชนิดเบา (Murban light crude-oil) จากบริษัทไทยออยส์จำกัด ประเทศไทย
- น้ำมันสังเคราะห์ (synthetic oil) ของบริษัท Japan Petroleum Institute, Japan
- น้ำมันถั่วเหลือง บริษัทมรกตอินดัสตรีส์ จำกัด ประเทศไทย
- น้ำมันปาล์ม บริษัทมรกตอินดัสตรีส์ จำกัด ประเทศไทย
- น้ำมันมะพร้าว ห้างหุ้นส่วนจำกัดมงคลน้ำมันพืช ประเทศไทย
- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท BDH Laboratory Supplies, Englang
- แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- โบแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) E.Merck, Darmstadt, Germany
- โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) ของบริษัท Ajax Finechem, Australia
- ทริสมาเบส (Trisma base; Tris[hydroxymethyl] aminomethane)($C_4H_{11}NO_3$) ของบริษัท Sigma, U.S.A
- ทริสไฮโดรคลอไรด์ (Tris HCl) ของบริษัท Sigma, U.S.A
- คลอโรฟอร์ม (Chloroform) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- เมทานอล (Methanol) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- เอทานอล (Ethanol) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- เฮกเซน (Hexane) (C_6H_{14}) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (Concentration HCl) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- เอทิล อะซิเตต (Ethyl acetate) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- ไฮโดรเจนซัลไฟด์ 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.) ของ บริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- แผ่นซิลิกาเจล 60 ขนาด 20x20 ซม., หนา 2 มม. (PLC silica gel 60, 2mm.) ของ บริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany

3. วิธีดำเนินการทดลอง

Pichia anomala สายพันธุ์ PY1 คัดแยกได้จากจากอาหารพื้นบ้าน (ข้าวหมาก) ที่อำเภอพนัสนิคม จังหวัดชลบุรี มีลักษณะโคโลนีกลม ขอบเรียบ สีขาวครีม ผิวด้าน กลางโคโลนีมีผิวขุ่นเล็กน้อย การย้อมสีติดแกรมบวก รูปร่างเชื้อยีสต์เป็นทรงกลมรี ขนาดกว้าง 2.0 - 4.8 ไมครอน ยาว 2.6 - 5.2 ไมครอน มีการสร้างสปอร์ที่มีรูปทรงคล้ายหมวก (hat shaped) และมีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดี บนอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน

1. การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 ในอาหารเหลวกำหนดสูตร

1.1 การเตรียมหัวเชื้อ

นำยีสต์ *Pichia anomala* PY1 ที่เพาะเลี้ยงไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด Yeast Malt Extract บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงมา 1 ลูก เพาะลงในอาหารเหลว Yeast Malt Extract ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทำการบ่มในตู้บ่มเชื้อที่มีการเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

1.2 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอาหารเหลวกำหนดสูตร

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

1.3 การหาน้ำหนักแห้งของเซลล์

นำตัวอย่างที่เก็บได้มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที และควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนของเหลวที่ได้ แยกเก็บไว้ ส่วนเซลล์แยกมาอบในถ้วยฟอรัยที่รู้น้ำหนักแน่นอนแล้วที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24

ชั่วโมงหรือจนกว่าน้ำหนักจะคงที่ เมื่อครบเวลานำถ้วยฟอร์มาไลนในโถดูด ความชื้น แล้วชั่งด้วยเครื่องชั่งละเอียด และคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้งเป็นกรัมต่อลิตร

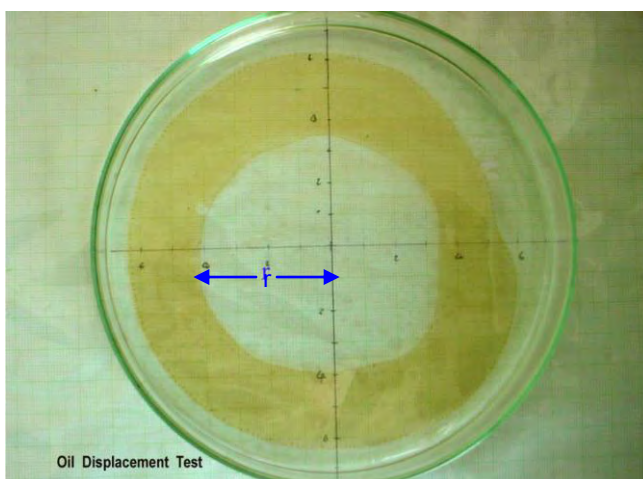
1.4 การวัดค่าความเป็นกรดต่าง

นำส่วนของเหลวที่ได้มาวัดค่าความเป็นกรดต่างด้วยเครื่อง (pH meter) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

1.5 การทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

1.5.1 การวัดค่าการกระจายน้ำมัน (Oil displacement test)

ทดสอบการกระจายน้ำมันตามวิธีของ Morikawa และคณะ (1993) โดยตวงน้ำ 40 มิลลิลิตร ลงในจานแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 150 มิลลิเมตร ที่มีกระดาษกราฟรองอยู่ เป็นมาตรวัดความกว้างของบริเวณใส (โดย 1 ช่องใหญ่ของกราฟมีค่าเท่ากับ 1 เซนติเมตร) หยดน้ำมันดิบ (crude oil) ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าของน้ำจะเกิดเป็นแผ่นฟิล์มแผ่ทั่วผิวน้ำ จากนั้นหยดตัวอย่างที่เป็นส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเซลล์ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นฟิล์มของน้ำมันดิบทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสของการกระจายตัวของน้ำมันที่ได้และคำนวณหาพื้นที่ของการกระจายน้ำมัน (πr^2) (Morikawa และคณะ, 1993)



รูปที่ 3.1 แสดงลักษณะการกระจายตัวของน้ำมัน (Morikawa และคณะ, 1993)

1.5.2 การวัดค่าแรงตึงผิว (Surface tension)

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

2. การกลายพันธุ์จุลินทรีย์

2.1 การกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต

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

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

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

2.1.4 กระจายเซลล์แขวนลอย 0.1 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตบนอาหารแข็ง จากสารสกัดยีสต์ และมอลต์ ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งโคโลนีที่ได้ควรอยู่ในช่วง 100-300 โคโลนี

2.1.5 นับจำนวนโคโลนีที่เจริญ และคำนวณร้อยละการรอดชีวิต

2.1.6 นำโคโลนีที่เจริญไปทำการคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ตามวิธีในข้อ 3

2.2 การกลายพันธุ์ ด้วยสาร Ethyl methanesulfonate (EMS)

- 2.2.1 นำยีสต์สายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 2.1 ที่เพาะเลี้ยงไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด Yeast Malt Extract บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงมา 1 ลูกบอลลอยในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทำการบ่มในตู้บ่มเชื้อที่มีการเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง
- 2.2.2 นำหัวเชื้อที่อายุครบ 18 ชั่วโมงปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในหลอด eppendroff 2 หลอด บั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนน้ำใสแล้วละลายเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อล้างเซลล์ให้อาหารที่คงเหลือหมด บั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทำการล้างเซลล์อีกครั้งหนึ่ง
- 2.2.3 นำเซลล์ที่ได้ละลายด้วยฟอสเฟสบัฟเฟอร์ pH 7.0 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรแล้วนำไปนับด้วย Hemacytometer จากนั้นเจือจางให้ได้ความเข้มข้นเซลล์ประมาณ 1.0×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร
- 2.2.4 เซลล์ประมาณ 1.0×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หลอดหนึ่งใช้เป็นชุดควบคุม ส่วนอีกหลอดหนึ่งเติมสาร Ethylmethane sulfonate ปริมาตร 20-40 ไมโครลิตร นำทั้งสองหลอดใส่เครื่องเขย่าหลอด eppendroff (Thermomixer) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงบั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนน้ำใสลงใน 0.5% โซเดียมไทโอซัลเฟต เพื่อหยุดปฏิกิริยาของสาร Ethylmethane sulfonate ละลายเซลล์ด้วย 5.0% โซเดียมไทโอซัลเฟต ปราศจากเชื้อปริมาตร 200 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาของสาร Ethylmethane sulfonate แล้วย้ายสารละลายเซลล์ไปยังหลอด eppendroff ใหม่ บั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนน้ำใสลงใน 0.5% โซเดียมไทโอซัลเฟต เพื่อหยุดปฏิกิริยาของสาร Ethylmethane sulfonate หยุดปฏิกิริยาของสาร Ethylmethane sulfonate ในเซลล์อีก 2 ครั้ง ละลายเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร
- 2.2.5 ทำการเจือจางเชื้อทั้งชุดควบคุมและชุดที่ก่อการกลายพันธุ์ให้ได้โคโลนีประมาณ 30 – 300 โคโลนีต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ หยดสารละลายเซลล์ 100 ไมโครลิตร แล้วเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48

ชั่วโมงแล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดและนำไปคัดเลือกหาสายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีขึ้นตามวิธีในข้อ 3

3. การทดสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของสายพันธุ์กลาย

3.1 การทดสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของสายพันธุ์กลายบนอาหารแข็ง

โดยนำสายพันธุ์กลายจากงานเพาะเลี้ยงเชื้อในข้อ 2 (ที่มีค่าร้อยละการรอดในช่วง 0.1 -1% สำหรับกากกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต และ 35% สำหรับการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี) ที่ต้องการทดสอบมาซัดเป็นรูปกากบาทบนอาหารแข็ง Yeast Malt Extract ที่มีน้ำมันสังเคราะห์ปริมาณ 20 ไมโครลิตร กระจายตัวอยู่ทั่ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วทำการวัดความกว้างบริเวณใสกับบริเวณที่มีเชื้อเจริญ คัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้ความกว้างของบริเวณใสมากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น จากนั้นนำมาคัดเลือกในข้อ 3.2

3.2 การทดสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของสายพันธุ์กลายในอาหารเหลว

การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของยีสต์สายพันธุ์กลายในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีกลูโคส 8% เป็นแหล่งคาร์บอน และ น้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน

นำยีสต์สายพันธุ์กลายที่เจริญบนอาหารแข็ง Yeast Malt Extract อายุ 24 ชั่วโมง มา 1 ลูกบาศก์ในอาหารเหลว Yeast Malt Extract ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทำการบ่มในตู้บ่มเชื้อที่มีการเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำหัวเชื้อที่อายุ 18 ชั่วโมง 5 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลวกำหนดสูตรปริมาณ 50 มิลลิลิตร ทำการบ่มในตู้บ่มเชื้อที่มีการเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่าง ที่ 7 วันแล้วนำตัวอย่างที่เก็บได้มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

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

3.3 ติดตามความเสถียรของยีสต์สายพันธุ์กลาย

นำยีสต์สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกจากข้อ 3.2 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Yeast Malt Extract มาซิดเป็นรูปกากบาทบนอาหารแข็ง Yeast Malt Extract ที่มีน้ำมันสังเคราะห์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร กระจายตัวอยู่ทั่ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วทำการวัดความแตกต่างระหว่างบริเวณใสกับบริเวณที่มีเชื้อเจริญ ทำเช่นนี้ไปหลายรุ่น (5 รุ่น) เพื่อดูความเสถียรในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

4. การติดตามการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของยีสต์สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้

4.1 การเตรียมหัวเชื้อและการผลิต

นำยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และยีสต์สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้ ที่ครบอายุ 18 ชั่วโมง 5 มิลลิตรลงในอาหารเหลวกำหนดสูตร ที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 ปริมาตร 50 มิลลิตร แล้วทำการบ่มในตู้บ่มเชื้อที่มีการเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน

4.2 การติดตามการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และยีสต์สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้

นำตัวอย่างที่เก็บได้มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที และควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาทีนำส่วนของเซลล์ที่ได้แยกเก็บไว้เพื่อนำมาหาค่าน้ำหนักแห้ง ส่วนของเหลวมาทดสอบการวัดค่าความเป็นกรดต่าง การวัดค่าการกระจายน้ำมัน (Oil displacement test) และการวัดค่าแรงตึงผิว (Surface tension) ทำการทดลองทำนองเดียวกับวิธีในข้อที่ 1.3-1.5

5. หากภาวะที่เหมาะสมต่าง ๆ ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของสายพันธุ์กลาย

5.1 การหาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยเฉพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารกำหนดสูตรที่แปรผันแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส ซูโครส กาแลคโทส มอลโทส และ แมนนิทอล โดยใช้ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเท่ากับ 8% เพาะเลี้ยงเชื้อตามวิธีการในข้อ 3.2 ติดตามการเจริญของจุลินทรีย์ โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดต่าง และนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาทำการวัดค่าแรงตึงผิว และการกระจายน้ำมัน โดยเปรียบเทียบชนิดของแหล่งคาร์บอน

5.2 การหาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้ในอาหารกำหนดสูตร โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม จากข้อ 5.1 แปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเป็น 0, 1, 2, 4, 8, 10 และ 12 % ติดตามการเจริญของจุลินทรีย์โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น และประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยวัดค่าแรงตึงผิวและค่าการกระจายน้ำมัน

5.3 การหาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำ ร่วมกับน้ำมันถั่วเหลืองในอัตราส่วน 1:1 ที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพระดับขวดเขย่า

โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวกำหนดสูตร (ปรับ pH 5.5) (ธัญญา เชียงอุทัย, 2549) ที่ได้ที่แปรผันแหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำ ที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.2 โดยใช้ความเข้มข้น 2 4 6 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ร่วมกับน้ำมันถั่วเหลือง 2 4 6 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในสัดส่วนความเข้มข้นทั้งน้ำตาลและน้ำมันถั่วเหลืองที่เท่ากันหรือในอัตราส่วน 1:1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน และติดตาม การเจริญของจุลินทรีย์โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น และประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยวัดค่าแรงตึงผิวและค่าการกระจายน้ำมัน

5.4 การหาอัตราส่วนของน้ำมันถั่วเหลืองต่อแหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำในระดับขวดเขย่า
แปรผันปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสมที่สุดจากข้อ 5.3 ในอัตราส่วนปริมาณน้ำมันถั่ว
เหลืองต่อน้ำตาลเป็น 1:2 1:3 1:6 1:9 2:1 3:1 6:1 และ 9:1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน และติดตามการเจริญของยีสต์โดยการ
หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดต่าง และประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ
ด้วยการวัดค่าแรงตึงผิวและค่าการกระจายน้ำมัน

5.5 การหาชนิดแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ
ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยเลี้ยง
จุลินทรีย์ในอาหารกำหนดสูตร โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อ 5.4 แปรผันแหล่ง
ไนโตรเจนได้แก่ แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) แอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)
แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) และโซเดียมไนเตรท (NaNO_3) โดยใช้ความเข้มข้นของ
แหล่งไนโตรเจน เท่ากับ 0.4% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เพาะเลี้ยง เชื้อตามวิธีในข้อ 3.2
ติดตามการเจริญของจุลินทรีย์ โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่า ความเป็นกรดต่าง และนำ
น้ำเลี้ยง เชื้อมาทำการวัดค่าแรงตึงผิว และการกระจาย น้ำมันโดยเปรียบเทียบชนิดของ
แหล่งไนโตรเจน

5.6 การหาปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ
เลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้ใน อาหารกำหนดสูตร โดยใช้แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม
จากข้อ 5.5 แปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน เป็น 0, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 และ 2.0
% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เพาะเลี้ยง เชื้อตามวิธีในข้อ 3.2 ติดตามการเจริญของจุลินทรีย์
โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่า ความเป็นกรดต่าง และประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรง
ตึงผิวชีวภาพ โดยวัดค่าแรงตึงผิว และค่าการกระจายน้ำมัน

5.7 การหาอัตราส่วนของไนโตรเจนต่อสารสกัดยีสต์ที่เหมาะสมในระดับขวดเขย่า
แปรผันปริมาณ ไนโตรเจน ที่เหมาะสมที่สุดจากข้อ 5.6 ในอัตราส่วน ปริมาณ
ไนโตรเจนที่เหมาะสม ต่อสารสกัดยีสต์เป็น 1:1 1:2 1:3 1:6 1:9 3:1 6:1 และ 9:1 ที่
อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน และติดตาม
การเจริญของยีสต์โดยการหาน้ำหนัก เซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดต่าง และประสิทธิภาพ
ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยการวัดค่าแรงตึงผิวและค่าการกระจายน้ำมัน

5.8 ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

หาค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยการปรับค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของ อาหารเหลวกำหนดสูตร (จากข้อ 5.7) เป็น 4.0 4.5 5.0 5.5 6.0 และ 6.5 และเพาะเลี้ยงใน อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน ติดตามการเจริญของจุลินทรีย์โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่า ความเป็นกรดต่าง และประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยวัดค่าแรงตึงผิวและค่าการกระจายน้ำมัน

5.9 การหาอุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

หาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยการเพาะเลี้ยงอาหารเหลวกำหนดสูตร (จากข้อ 5.8) ปรับอุณหภูมิเพาะเลี้ยงเป็น 30 37 และ 40 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน ติดตามประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยน้ำเลี้ยงเชื่อม ทำการวัดค่าแรงตึงผิวและค่าการกระจายน้ำมัน พร้อมทั้ง ติดตามการเจริญของจุลินทรีย์โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดต่าง และประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยวัดค่าแรงตึงผิวและค่าการกระจายน้ำมัน

6. การผลิตและสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

6.1 การเตรียมหัวเชื้อและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

นำยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และยีสต์สายพันธุ์กลาย ที่เพาะเลี้ยงไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด Yeast Malt Extract บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง 5 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลวกำหนดสูตร (จากข้อ 5.8) ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วทำการบ่มในตู้บ่มเชื้อที่มีการเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน

6.2 การสกัดแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อจากข้อ 6.1 มาปั่นแยกเซลล์ออก ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้น

นำน้ำส่วนใสมาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตปริมาตร 1 เท่า นำส่วนล่างมาแยกสกัด 3 ครั้ง แล้วนำส่วนบนมาระเหยเอทิลอะซิเตต ออกด้วยเครื่อง evaporator ภายใต้สภาวะสุญญากาศ จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาละลายด้วยเมทานอล และล้างด้วยเฮกเซน 2 รอบ เพื่อกำจัดน้ำมันส่วนเกินออกไป (Kitamoto และคณะ, 1990) ระเหยเฮกเซนออกด้วยเครื่อง evaporator แล้วนำสารที่ได้มาหาน้ำหนักของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และนำสารที่ได้มาทดสอบการกระจายน้ำมัน จากนั้นตรวจสอบชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้เบื้องต้นด้วยวิธีโครมาโตกราฟี (Ito และ Inoue, 1982)

7. การแยกและวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธีโครมาโตกราฟี

7.1 การแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วย Analytical Thin-Layer Chromatography

โดยใช้เฟสคงที่เป็นแผ่นซิลิกาเจล 60 ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, ประเทศเยอรมันขนาด 20x20 ซม. หนา 0.2 มม. และมีสารละลายคลอโรฟอร์มต่อเมทานอลต่อน้ำในอัตราส่วน 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 ออกมาทิ้งไว้จนแห้งนำมาตรวจผล หากลดไขมันด้วยการไปอบด้วยไอของไอโอดีนในภาชนะปิดสนิททิ้งไว้ประมาณ 15-20 นาที เปิดภาชนะทำเครื่องหมายบริเวณที่เกิดสีน้ำตาลเข้ม และทิ้งข้ามคืนให้ไอโอดีนระเหยจนหมด

จากนั้นจุดซิลิกาเจล 60 บริเวณที่ทำเครื่องหมายไว้มาสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเอทิลอะซิเตต 3 ครั้ง และวัดค่าการกระจายน้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบริสุทธิ์บางส่วนที่สกัดได้

8. การวัดค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน (Emulsion Index) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จากสายพันธุ์กล้วย

การวัดค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน (Emulsion Index) โดยทดสอบกับน้ำมันชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำมันคาโนลา และน้ำมันถั่วเหลือง นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เตรียมได้จากข้อ 6.2 มาละลายด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8 ที่มีความเข้มข้นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับน้ำมันแต่ละชนิด ในอัตราส่วนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อน้ำมัน เท่ากับ 60:40 (โดยน้ำหนัก) นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเจือจาง 2 เท่าด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8 นำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตรทันที เพื่อหาค่าการก่ออิมัลชัน และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายส่วนล่างมาเจือจาง 2 เท่าด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8 แล้ววัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร เพื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์ความเสถียรในการก่ออิมัลชัน (Emulsification stability) หรือค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน (Emulsion Index) (Shepherd และคณะ, 1995)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การทดสอบความสามารถในการผลิตของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของยีสต์ *Pichia anomala* PY1

4.1.1 การทดสอบความสามารถในการผลิตของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 บนอาหารแข็ง Yeast Malt Extract

นำยีสต์ *Pichia anomala* PY1 เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Yeast Malt Extract ที่มีน้ำมันดิบปริมาตร 20 ไมโครลิตร กระจายตัวอยู่ที่วุ้นบนผิวหน้าอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 3 5 และ 7 วัน แล้วทำการวัดความกว้างบริเวณใสกับบริเวณที่มีเชื้อเจริญ เพื่อดูความสามารถในการผลิตของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ดังตารางที่ 4.1 แสดงบริเวณใสบนอาหารแข็ง Yeast Malt Extract ของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 3, 5 และ 7 วัน

ตารางที่ 4.1 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

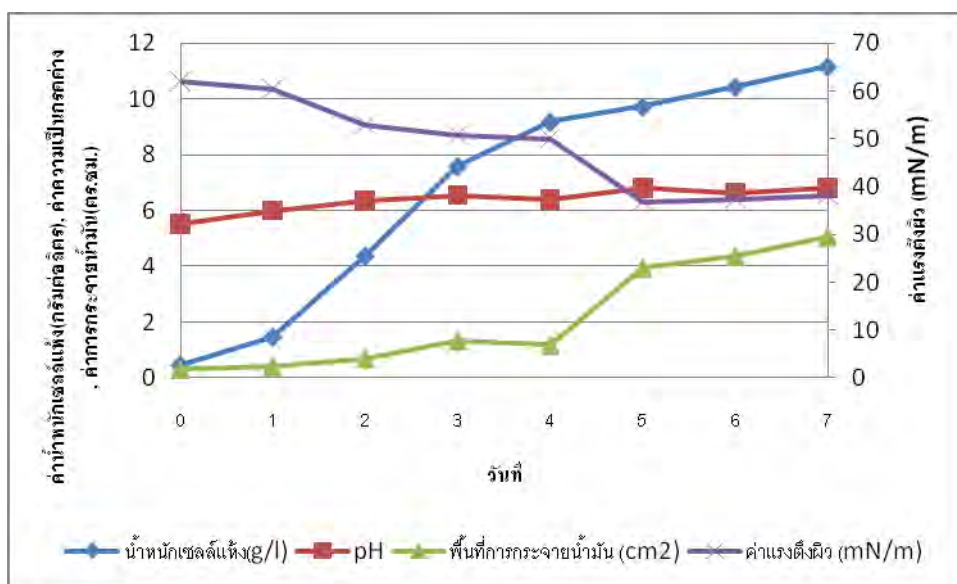
เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ *Pichia anomala* PY1 บนอาหารแข็ง Yeast Malt Extract สังเกตเห็นบริเวณใสได้ภายในเวลา 3 วัน และเมื่อบ่มเป็นเวลา 5-7 วัน บริเวณใสจะมีความกว้างมากขึ้นและคงที่ ในขณะที่ขนาดความกว้างของเชื้อที่เจริญบนอาหารจะเพิ่มขึ้นตั้งแต่ 1-3 วัน สูงสุดในวันที่ 5 และคงที่ไปจนถึงวันที่ 7

4.1.2 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 ในอาหารเหลวกำหนดสูตร

นำยีสต์ *Pichia anomala* PY1 ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน มี NaNO_3 0.4 % เป็นแหล่งไนโตรเจน ควบคุมค่าความเป็นกรดต่าง เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน วัดการเจริญของเชื้อโดยการทดสอบหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ วัดค่าความเป็นกรดต่าง และทดสอบ ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้โดย วัดพื้นที่การกระจายน้ำมัน (Oil displacement test) และการวัดค่าแรงตึงผิว (Surface tension)

ตารางที่ 4.2 แสดงค่าน้ำหนักแห้ง ค่าแรงตึงผิว ค่าความเป็นกรดต่าง และค่าการกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเซลล์ 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

วันที่	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l)	pH	ค่าการกระจายน้ำมัน (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	50.70
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	38.10



รูปที่ 4.1 แสดงค่าน้ำหนักแห้ง ค่าความเป็นกรดต่าง พื้นที่การกระจายน้ำมัน และค่าแรงตึงผิวในของน้ำเลี้ยงเชื้อ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ *Pichia anomala* PY1 ในอาหารเหลว กำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน มี NaNO_3 0.4 % เป็นแหล่งไนโตรเจน

จากการทดลองพบว่าเซลล์จะเพิ่มจำนวนตั้งแต่วันที่ 0 จนถึงวันที่ 4 แล้วจะเริ่มคงที่ ตั้งแต่วันที่ 3 ถึง วันที่ 7 เซลล์สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดี โดยความสามารถในการกระจายน้ำมันของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 เริ่มสูงขึ้นในวันที่ 3-4 และให้พื้นที่การกระจายน้ำมันสูงสุดในวันที่ 7 เท่ากับ 5.07 ตารางเซนติเมตรและมีค่าแรงตึงผิวต่ำสุดในวันที่ 5-7 เท่ากับ 36.83-38.1 มิลลินิวตันต่อเมตร

4.2 การกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต

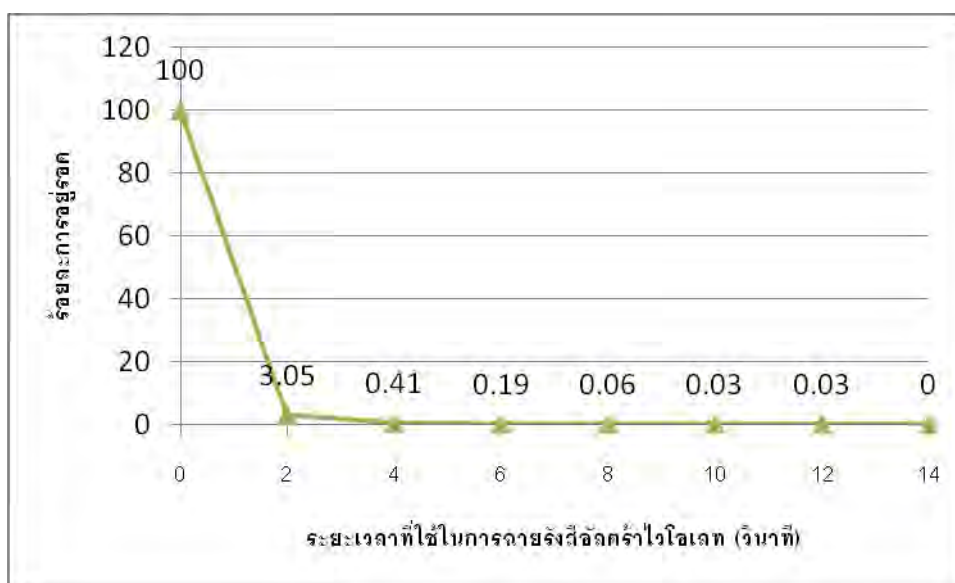
เมื่อทำการเจือจางเชื้อทั้งชุดควบคุมและชุดที่ได้รับรังสี อัลตราไวโอเล็ต ก่อนการกลายพันธุ์ที่เหมาะสมแล้วนำไปเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบเชื้อเจริญในชุดควบคุมและชุดที่ก่อนการกลายพันธุ์ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.3 และ 4.4 จากนั้นทำการคัดเลือกเชื้อที่อัตราการรอด 0.1-1% มาใช้ในการคัดเลือกบนอาหารแข็ง

ตารางที่ 4.3 แสดงค่า CFU/ml. ของชุดควบคุม

ชุดควบคุม	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	เฉลี่ย
จำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตร	311	450	380

ตารางที่ 4.4 แสดงค่า CFU/ml. ของชุดก่อนการกลายพันธุ์ที่ได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ต

ชุดที่ได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ต ที่ระยะเวลาที่ให้รังสี อัลตราไวโอเล็ต (วินาที)	จำนวนโคโลนีต่อ มิลลิลิตร	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 4.2 แสดงร้อยละการรอดของ *Pichia anomala* PY1 ที่ก่อนการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต ที่ช่วงเวลาต่างๆ

4.3 การทดสอบความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของยีสต์สายพันธุ์ กลาย

4.3.1 การเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pichia anomala* PY1 และสายพันธุ์กลายบนอาหารแข็ง Yeast Malt Extract

นำสายพันธุ์กลาย MU จำนวน 104 สายพันธุ์ที่ได้จากการมาทำการการคัดเลือกเชื้อที่
อัตราการรอด 0.1-1% มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Yeast Malt Extract ที่มีน้ำมันดิบปริมาตร
20 ไมโครลิตร แล้ววัด ความกว้างบริเวณใส และขนาดของโคโลนี เมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30
องศาเซลเซียส บนอาหารแข็งเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ดังแสดงผลการทดลองในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 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	
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	

สายพันธุ์	ความกว้าง (ซม.)		ความต่าง (ซม.)
	บริเวณใต้		
MU8	บริเวณใต้	1.65	0.15
	ขนาดโคโลนี	1.5	
MU9	บริเวณใต้	1.7	0.25
	ขนาดโคโลนี	1.45	
MU10	บริเวณใต้	1.4	0.1
	ขนาดโคโลนี	1.3	
MU11	บริเวณใต้	1.8	0.3
	ขนาดโคโลนี	1.5	
MU12	บริเวณใต้	1.7	0.3
	ขนาดโคโลนี	1.4	
MU13	บริเวณใต้	1.4	0.2
	ขนาดโคโลนี	1.2	
MU14	บริเวณใต้	1.7	0.3
	ขนาดโคโลนี	1.4	
MU15	บริเวณใต้	1.6	0
	ขนาดโคโลนี	1.6	
MU16	บริเวณใต้	1.4	0
	ขนาดโคโลนี	1.4	
MU17	บริเวณใต้	1.5	0
	ขนาดโคโลนี	1.5	
MU18	บริเวณใต้	1.5	0
	ขนาดโคโลนี	1.5	
MU19	บริเวณใต้	1.5	0
	ขนาดโคโลนี	1.5	

สายพันธุ์	ความกว้าง (ซม.)		ความต่าง (ซม.)
	บริเวณใต้	ขนาดโคลน	
MU20	บริเวณใต้	1.35	0
	ขนาดโคลน	1.35	
MU21	บริเวณใต้	1.55	0.15
	ขนาดโคลน	1.4	
MU22	บริเวณใต้	1.6	0.2
	ขนาดโคลน	1.4	
MU23	บริเวณใต้	1.55	0.2
	ขนาดโคลน	1.35	
MU24	บริเวณใต้	1.55	0.15
	ขนาดโคลน	1.4	
MU25	บริเวณใต้	1.75	0.3
	ขนาดโคลน	1.45	
MU26	บริเวณใต้	1.45	0.15
	ขนาดโคลน	1.3	
MU27	บริเวณใต้	1.7	0.25
	ขนาดโคลน	1.45	
MU28	บริเวณใต้	1.85	0.25
	ขนาดโคลน	1.6	
MU29	บริเวณใต้	1.45	0.25
	ขนาดโคลน	1.2	
MU30	บริเวณใต้	1.5	0.15
	ขนาดโคลน	1.35	
MU31	บริเวณใต้	1.6	0.2
	ขนาดโคลน	1.4	

สายพันธุ์	ความกว้าง (ซม.)		ความต่าง (ซม.)
	บริเวณใต้	ขนาดโคนี่	
MU32	บริเวณใต้	1.5	0.2
	ขนาดโคนี่	1.3	
MU33	บริเวณใต้	1.6	0.2
	ขนาดโคนี่	1.4	
MU34	บริเวณใต้	1.5	0.05
	ขนาดโคนี่	1.45	
MU35	บริเวณใต้	1.7	0.2
	ขนาดโคนี่	1.5	
MU36	บริเวณใต้	1.55	0.1
	ขนาดโคนี่	1.45	
MU37	บริเวณใต้	1.7	0.1
	ขนาดโคนี่	1.6	
MU38	บริเวณใต้	1.55	0.15
	ขนาดโคนี่	1.4	
MU39	บริเวณใต้	1.4	0.1
	ขนาดโคนี่	1.3	
MU40	บริเวณใต้	1.3	0
	ขนาดโคนี่	1.3	
MU41	บริเวณใต้	1.6	0.15
	ขนาดโคนี่	1.45	
MU42	บริเวณใต้	1.6	0.15
	ขนาดโคนี่	1.45	
MU43	บริเวณใต้	1.7	0.25
	ขนาดโคนี่	1.45	

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

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

สายพันธุ์	ความกว้าง (ซม.)		ความต่าง (ซม.)
	บริเวณไส้	ขนาดโคโลนี	
MU73	บริเวณไส้	2.0	0.4
	ขนาดโคโลนี	1.6	
MU74	บริเวณไส้	1.8	0.2
	ขนาดโคโลนี	1.6	
MU75	บริเวณไส้	2.4	0.75
	ขนาดโคโลนี	1.65	
MU76	บริเวณไส้	1.75	0.25
	ขนาดโคโลนี	1.5	
MU77	บริเวณไส้	2.1	0.4
	ขนาดโคโลนี	1.7	
MU78	บริเวณไส้	1.8	0.2
	ขนาดโคโลนี	1.6	
MU79	บริเวณไส้	1.8	0.3
	ขนาดโคโลนี	1.5	
MU80	บริเวณไส้	2.0	0.3
	ขนาดโคโลนี	1.7	
MU81	บริเวณไส้	2.0	0.2
	ขนาดโคโลนี	1.8	
MU82	บริเวณไส้	1.7	0.3
	ขนาดโคโลนี	1.4	
MU83	บริเวณไส้	1.8	0.3
	ขนาดโคโลนี	1.5	
MU84	บริเวณไส้	1.8	0.3
	ขนาดโคโลนี	1.5	

สายพันธุ์	ความกว้าง (ซม.)		ความต่าง (ซม.)
	บริเวณใต้		
MU85	บริเวณใต้	1.6	0.2
	ขนาดโคนี่	1.4	
MU86	บริเวณใต้	1.9	0.4
	ขนาดโคนี่	1.5	
MU87	บริเวณใต้	1.9	0.35
	ขนาดโคนี่	1.55	
MU88	บริเวณใต้	1.7	0.1
	ขนาดโคนี่	1.6	
MU89	บริเวณใต้	1.8	0.2
	ขนาดโคนี่	1.6	
MU90	บริเวณใต้	1.8	0.2
	ขนาดโคนี่	1.6	
MU91	บริเวณใต้	1.8	0.1
	ขนาดโคนี่	1.7	
MU92	บริเวณใต้	2.0	0.2
	ขนาดโคนี่	1.8	
MU93	บริเวณใต้	1.8	0.3
	ขนาดโคนี่	1.5	
MU94	บริเวณใต้	1.9	0.5
	ขนาดโคนี่	1.4	
MU95	บริเวณใต้	1.7	0
	ขนาดโคนี่	1.7	
MU96	บริเวณใต้	1.65	0.2
	ขนาดโคนี่	1.45	

สายพันธุ์	ความกว้าง (ซม.)		ความต่าง (ซม.)
	บริเวณใส		
MU97	บริเวณใส	1.9	0.1
	ขนาดโคโลนี	1.8	
MU98	บริเวณใส	1.9	0.2
	ขนาดโคโลนี	1.7	
MU99	บริเวณใส	1.8	0.1
	ขนาดโคโลนี	1.7	
MU100	บริเวณใส	2.0	0.3
	ขนาดโคโลนี	1.7	
MU101	บริเวณใส	1.7	0.2
	ขนาดโคโลนี	1.5	
MU102	บริเวณใส	1.8	0.3
	ขนาดโคโลนี	1.5	
MU103	บริเวณใส	1.65	0.05
	ขนาดโคโลนี	1.6	
MU104	บริเวณใส	1.65	0.15
	ขนาดโคโลนี	1.5	

4.3.2 การเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pichia anomala* PY1 และสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้จากการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตในอาหารเหลว

4.3.2.1 อาหารเหลวที่มีกลูโคส 8% เป็นแหล่งคาร์บอน

เมื่อทำการก่อการกลายพันธุ์ *Pichia anomala* PY1 ที่มีความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นประมาณ 1.0×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตรด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต ที่ช่วงเวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 14 วินาที พบว่าจะได้สายพันธุ์กลายที่มีค่าการขยู่รอดอยู่ในช่วงที่เหมาะสมที่เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสี อัลตราไวโอเล็ต คือ 0.1-1 % (ตารางที่ 4.4)

โดยทำการคัดเลือกสายพันธุ์กลายเบื้องต้น 104 สายพันธุ์จากบนอาหารแข็ง Yeast Malt Extract ที่มีน้ำมันดิบปริมาตร 20 ไมโครลิตรกระจายตัวอยู่ทั่ว

จากนั้นทำการคัดเลือกสายพันธุ์กลายจำนวน 44 สายพันธุ์มาทดลองเลี้ยงในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีกลูโคส 8% เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มในตู้บ่มเชื้อที่มีการเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน พบว่ามีสายพันธุ์กลาย 7 สายพันธุ์คือ MU10, MU14, MU19, MU21, MU23, MU24 และ MU28 ให้พื้นที่การกระจายน้ำมัน สูงกว่าสายพันธุ์ PY1 ดังแสดงในตารางที่ 4.6 ในจำนวนนี้พบว่ามี 26 สายพันธุ์ที่ให้ Δ ST ของน้ำเลี้ยงเชื้อสูงกว่าสายพันธุ์ PY1 ดังแสดงในตารางที่ 4.6 จึงทำการคัดเลือกมา 6 สายพันธุ์คือ MU14, MU19, MU21, MU23, MU24 และ MU28 ไว้ศึกษาในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ 4.6 แสดงการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของยีสต์สายพันธุ์กลายเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ PY1 ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีกลูโคส 8% เป็นแหล่งคาร์บอนเป็นเวลา 7 วัน

สายพันธุ์	ค่าการกระจายน้ำมัน (ตร.ซม.)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	Δ ST
PY1	1.13	52.50	5.00
MU 1	0.79	53.00	4.50
MU 2	0.38	54.00	3.50
MU 3	0.95	51.00	6.50
MU 5	0.38	53.75	3.75
MU 6	0.95	55.15	2.35
MU 7	0.07	51.50	6.00
MU 8	0.07	52.50	5.00
MU 9	0.50	51.85	5.65
MU 10	1.77	49.50	8.00
MU 11	0.28	52.05	5.45
MU 12	0.64	45.00	12.50

สายพันธุ์	ค่าการกระจายน้ำมัน (ตร.ซม.)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	Δ ST
MU 13	0.79	48.90	8.60
MU 14	1.33	48.65	8.85
MU 15	0.50	44.40	13.10
MU 16	0.95	45.40	12.10
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	50.30	7.20
MU 21	4.52	52.35	5.15
MU 22	1.13	54.50	3.00
MU 23	2.83	50.55	6.95
MU 24	2.54	49.50	8.00
MU 25	0.95	47.65	9.85
MU 26	1.13	53.25	4.25
MU 27	0.64	50.00	7.50
MU 28	2.01	44.00	13.5
MU 29	0.5	49.15	8.35
MU 30	0.79	44.75	12.75
MU 31	0.50	53.20	4.30
MU 32	0.64	49.75	7.75
MU 33	0.38	51.35	6.15
MU 34	0.79	51.10	6.40
MU 35	0.64	49.35	8.15
MU 36	0.38	52.25	5.25
MU 37	0.79	47.00	10.50

สายพันธุ์	ค่าการกระจายน้ำมัน (ตร.ซม.)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	Δ ST
MU 38	0.5	46.00	11.50
MU 39	0.79	56.25	1.25
MU 40	1.13	55.00	2.50
MU 41	0.95	49.00	8.50
MU 42	0.64	52.40	5.10
MU 43	0.79	49.50	8.00
MU 44	0.79	49.50	8.00

Δ ST คือค่าความแตกต่างของแรงตึงผิวเมื่อเทียบกับวันที่ 0 (57.5mN/m)

4.3.3.2 อาหารเหลวที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน

เมื่อทำการทดลองเลี้ยงสายพันธุ์ PY1 และสายพันธุ์กลาย MU14, MU19, MU21, MU23, MU24 และ MU28 ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอนแล้วทำการบ่มในตู้บ่มเชื้อที่มีการเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่ 1, 3, 5 และ 7 วัน เพื่อติดตามการเจริญโดยการหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดต่าง และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยการวัดพื้นที่การกระจายน้ำมัน และค่าแรงตึงผิว พบว่ายีสต์สายพันธุ์ PY1 และสายพันธุ์กลายสามารถให้พื้นที่การกระจายน้ำมันได้ดีมากกว่าการใช้อาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีกลูโคส 8% เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งผลการทดลองพบว่าสายพันธุ์กลาย MU21 สามารถให้พื้นที่กระจายน้ำมันได้ดีที่สุดในวันที่ 5 เป็น 15.26 ตารางเซนติเมตร 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 มิลลินิวตันต่อเมตรเป็น 39 มิลลินิวตันต่อเมตร ขณะที่ให้พื้นที่กระจายน้ำมันสูงสุดเท่ากับ 17.56 ตารางเซนติเมตรในวันที่ 3 ในอาหารเหลวกำหนด

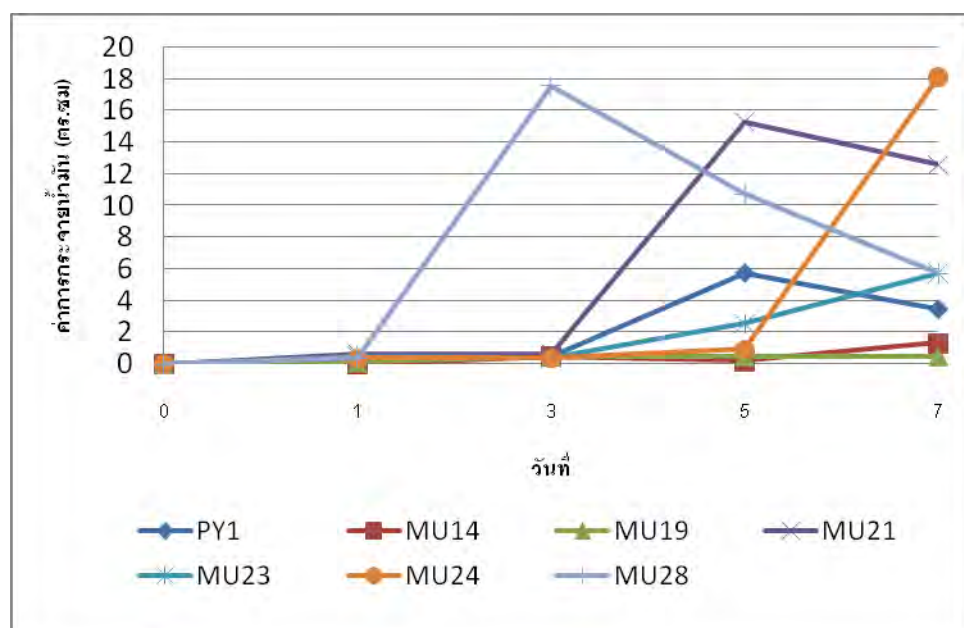
สูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน และเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ PY1 แล้วสามารถให้พื้นที่กระจายน้ำมันได้ดีกว่า PY1 ประมาณ 3.1 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 แสดงพื้นที่การกระจายน้ำมัน ค่าแรงตึงผิวในของน้ำเลี้ยงเชื้อ ค่าความเป็นกรดต่างและค่าน้ำหนักแห้ง เมื่อทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และสายพันธุ์กลายในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน

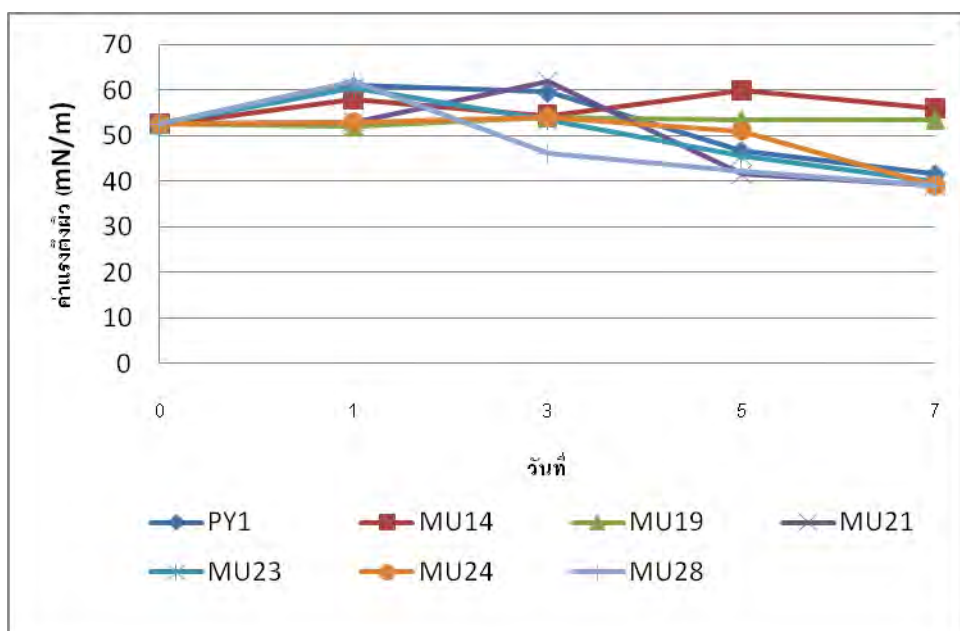
สายพันธุ์	วันที่	ค่าการกระจายน้ำมัน (ตร.ซม)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	Δ ST (mN/m)	ค่า pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
PY1	1	0.23	61.00	8.5	5.9	2.51
	3	0.50	59.50	7.0	6.04	6.60
	5	5.72	46.80	5.7	6.76	10.18
	7	3.46	41.70	10.8	7.20	11.41
MU14	1	0	58.00	5.5	5.84	1.92
	3	0.50	54.50	2.0	6.01	6.66
	5	0.20	60.00	7.5	6.26	10.07
	7	1.33	56.00	3.5	6.82	10.41
MU19	1	0.13	52.00	0.5	6.21	2.43
	3	0.50	54.00	1.5	6.01	7.26
	5	0.50	53.50	1.0	6.20	10.84
	7	0.50	53.50	1.0	6.75	8.46
MU21	1	0.64	53.0	0.50	6.00	2.81
	3	0.64	62.0	9.50	6.10	8.45
	5	15.26	41.5	11.00	7.19	9.13
	7	12.56	39.0	13.50	7.72	15.59

สายพันธุ์	วันที่	ค่าการกระจายน้ำมัน (ตร.ซม)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	Δ ST (mN/m)	ค่า pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
MU23	1	0.50	60.5	8.00	5.91	2.45
	3	0.38	53.5	1.00	6.25	6.49
	5	2.54	45.5	7.00	7.02	12.23
	7	5.72	40.0	12.50	7.21	14.35
MU24	1	0.38	53.0	0.50	5.98	3.15
	3	0.38	54.0	1.50	6.10	9.43
	5	0.95	51.0	1.50	7.16	10.10
	7	18.09	39.0	13.50	7.39	11.97
MU28	1	0.38	62.0	9.50	5.91	2.75
	3	17.56	46.0	6.50	6.53	7.74
	5	10.75	42.0	10.50	7.22	10.50
	7	5.72	39.0	13.50	7.62	13.08

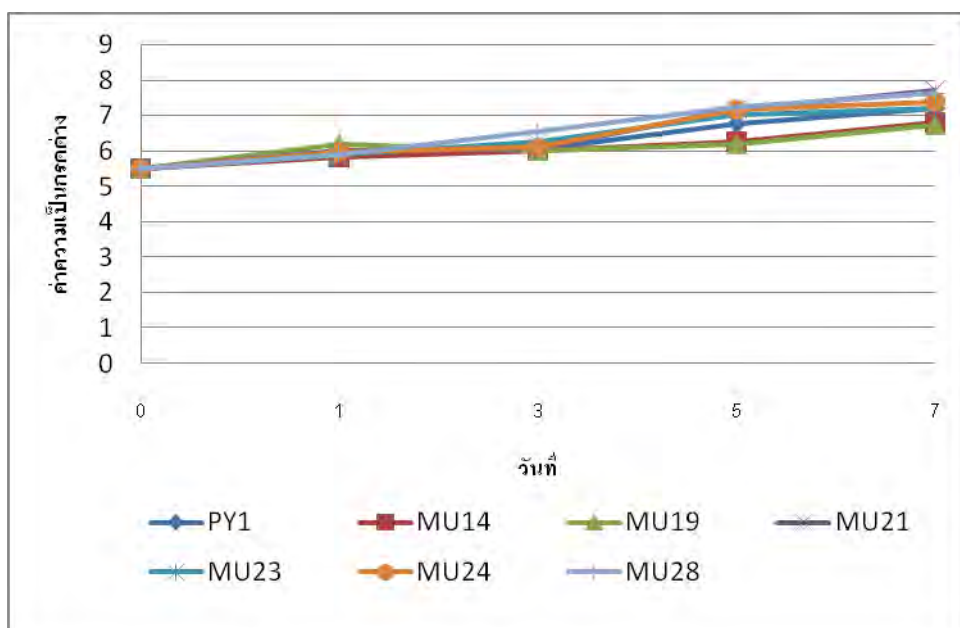
* Δ ST คือค่าความแตกต่างของแรงตึงผิวเมื่อเทียบกับวันที่ 0 (52.5mN/m)



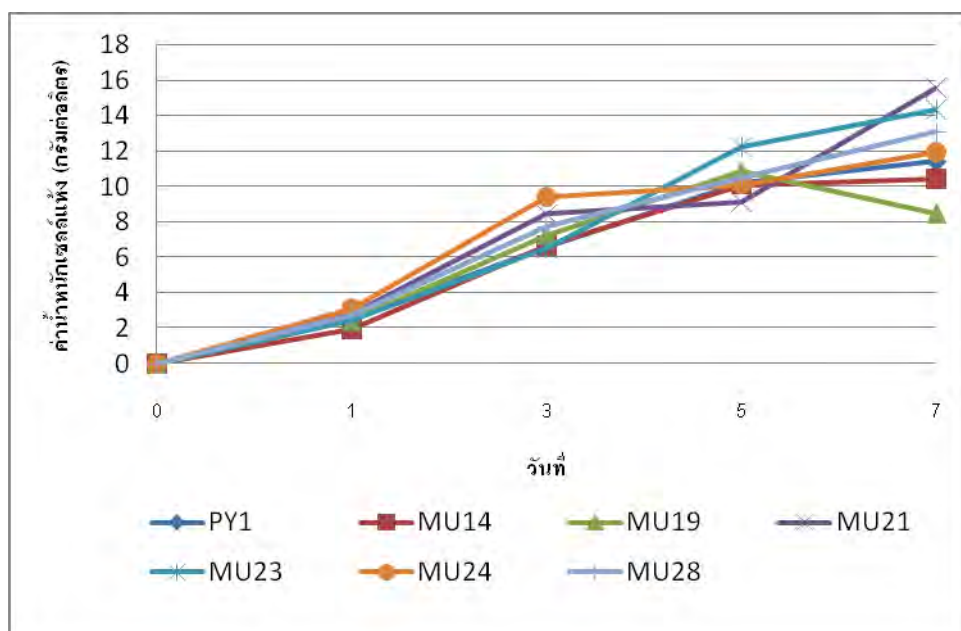
รูปที่ 4.3 แสดงค่าการกระจายน้ำมันของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และสายพันธุ์กลายในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 4.4 แสดงค่าแรงดึงผิวในแต่ละวันของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และสายพันธุ์ กลายในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 4.5 แสดงค่าความเบี่ยงกรดต่างในแต่ละวันของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และสาย พันธุ์กลายในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 4.6 แสดงค่าความหนาแน่นเซลล์แห้งในแต่ละวันของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และสายพันธุ์กลายในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน

4.3.3 ความเสถียรของยีสต์สายพันธุ์กลาย

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 4.8

ตารางที่ 4.8 แสดงบริเวณใสบนอาหารแข็ง Yeast Malt Extract ของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และสายพันธุ์ที่กลายในแต่ละรุ่น

สายพันธุ์	ความกว้าง (ซม.)	รุ่น									
		1	ความต่าง (ซม.)	2	ความต่าง (ซม.)	3	ความต่าง (ซม.)	4	ความต่าง (ซม.)	5	ความต่าง (ซม.)
PY1	บริเวณใส	1.60		1.60		1.55		1.90		1.65	
	ขนาดโคโลนี	1.40	0.20	1.40	0.20	1.30	0.25	1.40	0.50	1.40	0.25
MU14	บริเวณใส	1.50		1.55		1.60		1.70		1.70	
	ขนาดโคโลนี	1.20	0.30	1.30	0.20	1.45	0.15	1.45	0.25	1.40	0.30
MU19	บริเวณใส	1.85		1.50		1.60		1.70		1.50	
	ขนาดโคโลนี	1.60	0.25	1.40	0.1	1.45	0.15	1.45	0.25	1.50	0
MU21	บริเวณใส	1.70		1.40		1.40		1.80		1.55	
	ขนาดโคโลนี	1.50	0.2	1.30	0.1	1.25	0.15	1.60	0.2	1.40	0.15
MU23	บริเวณใส	1.5		1.65		1.6		1.8		1.55	
	ขนาดโคโลนี	1.30	0.2	1.45	0.2	1.40	0.2	1.40	0.4	1.35	0.20
MU24	บริเวณใส	1.80		1.65		1.50		1.60		1.55	
	ขนาดโคโลนี	1.45	0.35	1.4	0.25	1.3	0.2	1.45	0.15	1.40	0.15
MU28	บริเวณใส	1.75		1.50		1.60		1.70		1.85	
	ขนาดโคโลนี	1.50	0.25	1.40	0.10	1.50	0.1	1.60	0.10	1.60	0.25

จากการทดลองพบว่าทั้งยีสต์สายพันธุ์กลายทั้ง 6 สายพันธุ์สามารถให้บริเวณใบบนอาหารแข็ง Yeast Malt Extract ที่มีน้ำมันดิบกระจายอยู่ทั่วทั้ง 5 รุ่นมีค่า 1.3 ถึง 1.8 เซนติเมตร และมีค่าความต่างเฉลี่ยเท่ากับ 0.25 เซนติเมตร

4.4 การกลายพันธุ์ครั้งที่สองด้วยสาร Ethyl methane sulfonate (EMS)

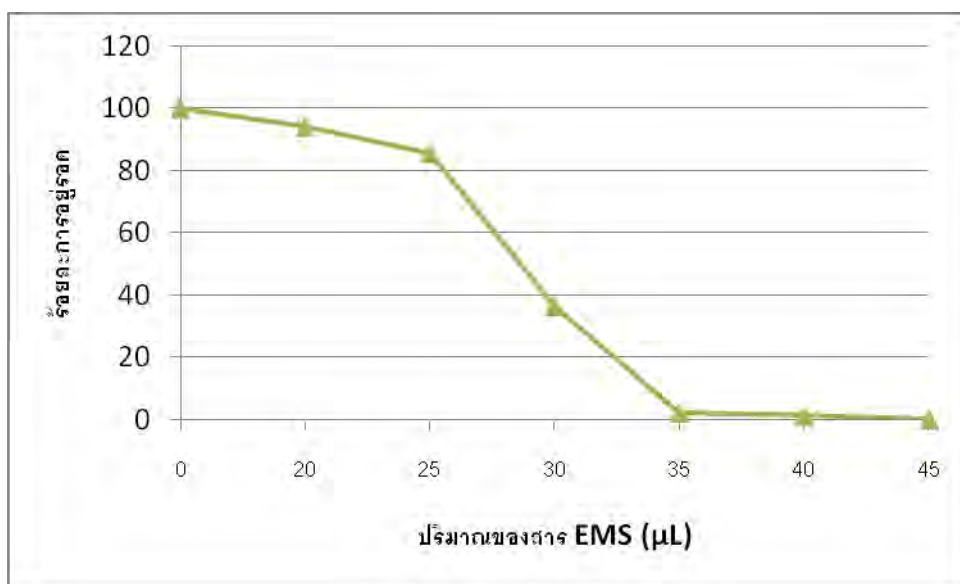
เมื่อทำการเจือจางเชื้อสายพันธุ์กลาย MU 28 ที่ได้จากการคัดเลือกในข้อ 4.3.3.2 ทั้งชุดควบคุมและชุดที่ก่อการกลายพันธุ์ของเชื้อที่เหมาะสม แล้วนำไปเกลี่ยให้ทั่วผิวน้ำอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบเชื้อเจริญในชุดควบคุมและชุดที่ก่อการกลายพันธุ์ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.9 และ 4.10

ตารางที่ 4.9 แสดงค่า CFU/ml. ของชุดควบคุม

ชุดควบคุม	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	เฉลี่ย
จำนวนโคโลนีต่อมิลลิเมตร	100	87	93.5

ตารางที่ 4.10 แสดงค่า CFU/ml. ของยีสต์สายพันธุ์กลาย MU28 ที่ก่อการกลายพันธุ์ด้วยสาร EMS ที่ปริมาณต่างๆ

ชุดก่อการกลายพันธุ์ที่ความเข้มข้น EMS (ไมโครลิตร)	จำนวนโคโลนีต่อมิลลิเมตร	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



รูปที่ 4.7 แสดงร้อยละการรอดของยีสต์สายพันธุ์กลาย MU 28 ที่ก่อการกลายพันธุ์ด้วยสาร EMS ที่ปริมาณต่างๆ

4.5 การเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pichia anomala* PY1 สายพันธุ์กลาย MU28 และ MU28 ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยสาร EMS ในอาหารเหลว

4.5.1 การเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pichia anomala* PY1 สายพันธุ์กลาย MU28 และสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้จากการกลายพันธุ์ MU28 ด้วยสาร EMS ในอาหารเหลว

4.5.1.1 อาหารเหลวที่มีกลูโคส 8% เป็นแหล่งคาร์บอน

เมื่อทำการก่อการกลายพันธุ์ สายพันธุ์กลาย MU28 ที่มีความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นประมาณ 1.0×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตรด้วยสาร Ethyl methane sulfonate ที่ความเข้มข้น 0, 20, 25, 30, 35, และ 40 ไมโครลิตร พบว่าจะได้สายพันธุ์กลายที่มีค่าการอยู่รอดอยู่ในช่วงที่เหมาะสมที่เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสาร Ethylmethane sulphonate คือ 36.36 % (ตารางที่ 4.10)

จากนั้นทำการสุ่มสายพันธุ์กลายจำนวน 16 สายพันธุ์จาก 36 สายพันธุ์มาทดลองเลี้ยงในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีกลูโคส 8% เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มในตู้บ่มเชื้อที่มีการเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3, 5 และ 7 วัน เก็บตัวอย่างที่ 3, 5 และ 7 วัน เพื่อติดตามการการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยการวัด

พื้นที่การกระจายน้ำมัน และค่าแรงตึงผิว ดังแสดงในตารางที่ 4.11 พบว่ามีสายพันธุ์กลาย 1 สายพันธุ์คือ MUE24 ให้พื้นที่การกระจายน้ำมันสูงกว่าสายพันธุ์ PY1 อีก 4 สายพันธุ์ คือ MUE20, MUE22, MUE26 และ MUE41 ที่ให้พื้นที่การกระจายน้ำมันใกล้เคียงกับสายพันธุ์ PY1 สายพันธุ์กลาย MUE24 ให้ ΔST ของน้ำเลี้ยงเชื้อใกล้เคียงกับสายพันธุ์ PY1

ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ MUE24 มาศึกษาต่อไป เนื่องจากสายพันธุ์ให้พื้นที่การกระจายน้ำมันสูงกว่าสายพันธุ์ PY1 ประมาณ 5.67 เท่า และสามารถลดค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อได้เป็น 48 มิลลินิวตันต่อเมตร ให้ค่า ΔST เท่ากับ 21 ในวันที่ 5 วัศึกษาในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4 % เป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ 4.11 แสดงการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 สายพันธุ์กลาย MU28 และ MU28 ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยสาร EMS ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีกลูโคส 8% เป็นแหล่งคาร์บอนเป็นเวลา 7 วัน

สายพันธุ์	วันที่	ค่าการกระจายน้ำมัน (ตร.ซม.)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	ΔST (mN/m)	ค่า 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
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	4.50
	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

สายพันธุ์	วันที่	ค่าการกระจายน้ำมัน (ตร.ซม.)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	Δ ST (mN/m)	ค่า pH
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	55.0	14.0	4.21
	7	0.40	56.5	12.5	4.64
MUE14	3	0.27	54.0	15.0	4.39
	5	0.27	55.0	14.0	4.3
	7	0.3	54.0	15.0	4.49
MUE15	3	0.37	55.0	14.0	4.49
	5	0.30	55.5	13.5	4.12
	7	0.32	58.5	10.5	4.17
MUE18	3	0.40	54.0	15.0	4.95
	5	0.30	54.5	14.5	4.23
	7	0.35	56.5	12.5	4.39
MUE19	3	0.40	54.0	15.0	4.76
	5	0.30	57.0	12.0	4.17
	7	0.30	59.5	9.5	4.26
MUE20	3	0.47	57.0	12.0	4.88
	5	0.37	57.0	12.0	4.17
	7	0.30	58.0	11.0	4.16

สายพันธุ์	วันที่	ค่าการกระจายน้ำมัน (ตร.ซม.)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	Δ ST (mN/m)	ค่า pH
MUE21	3	0.45	54.5	14.5	4.88
	5	0.35	57.0	12.0	4.18
	7	0.40	58.0	11.0	4.14
MUE23	3	0.20	53.0	16.0	4.29
	5	0.70	52.0	17.0	4.12
	7	0.50	56.0	13.0	4.16
MUE24	3	0.25	52.5	16.5	4.3
	5	1.70	48.0	21.0	4.04
	7	0.40	55.0	14.0	4.03
MUE26	3	0.20	53.0	16.0	4.24
	5	0.75	53.0	16.0	4.14
	7	0.60	56.5	12.5	4.23

* Δ ST คือค่าความแตกต่างของแรงตึงผิวเมื่อเทียบกับวันที่ 0 (69 mN/m)

4.5.1.2 อาหารเหลวที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน

เมื่อนำสายพันธุ์กลาย MUE24 มาทดลองเลี้ยงในอาหารเหลวที่กำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มในตู้บ่มเชื้อที่มีการเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน เพื่อติดตามการการผลิิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยการวัดพื้นที่การกระจายน้ำมัน และค่าแรงตึงผิว ดังแสดงในตารางที่ 4.12 พบว่ามีสายพันธุ์กลาย MUE24 สามารถลดค่าแรงตึงผิวได้เหลือ 35 มิลลินิวตันต่อเมตร ขณะที่ให้พื้นที่กระจายน้ำมันสูงสุดเท่ากับ 17.64 ตารางเซนติเมตรซึ่งค่าการกระจายน้ำมันและค่า Δ ST สูงกว่าสายพันธุ์ PY1 และสายพันธุ์กลาย MU28 ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกสายพันธุ์กลาย MUE24 ไปทำการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 4.12 แสดงการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 สายพันธุ์กลาย MU28 และ MU28 ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยสาร EMS ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอนเป็นเวลา 7 วัน

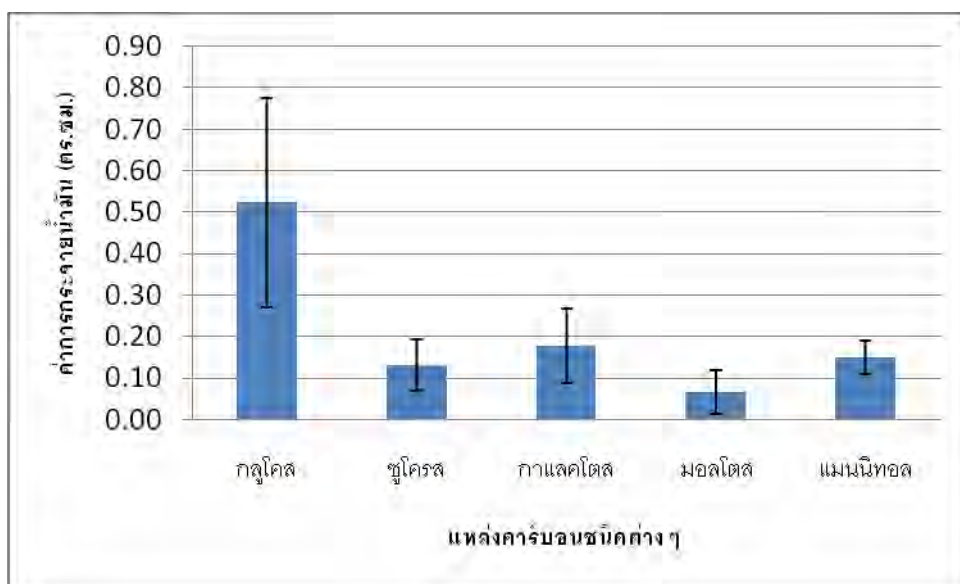
สายพันธุ์	ค่าการกระจายน้ำมัน (ตร.ซม.)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	Δ ST
PY1	3.46	41.7	10.8
MU28	17.56	39.0	13.5
MUE24	17.64	35.0	17.5

4.6 การศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของสายพันธุ์กลาย MUE24

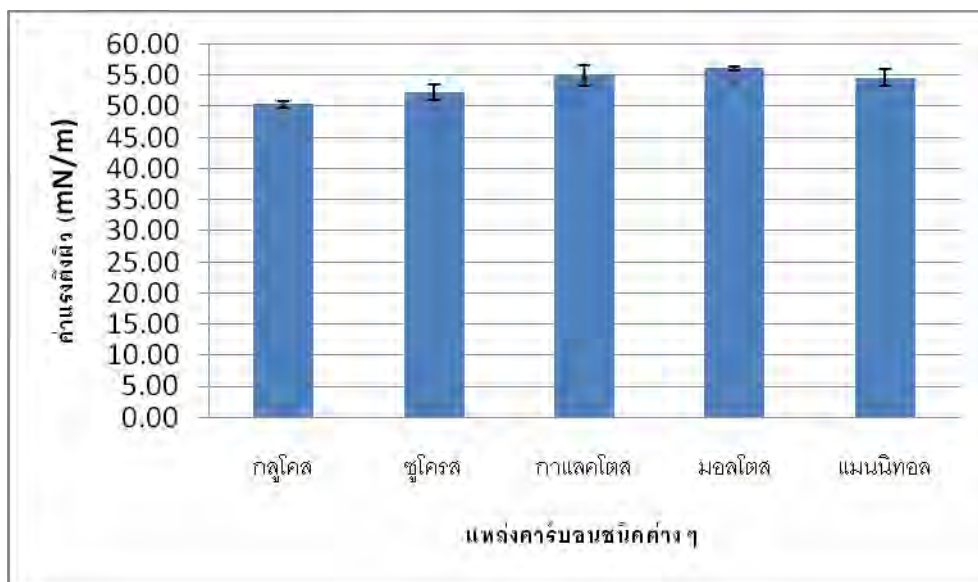
การแปรผันแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จากการทดลอง เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่ากลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากมีค่าการกระจายตัวของน้ำมันสูงสุด 0.52 cm^2 และค่าแรงตึงผิวต่ำสุด เท่ากับ 50.33 mN/m ดังแสดงในตารางที่ 4.13 (ภาพที่ 4.8 และ 4.9)

ตารางที่ 4.13 แสดงค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าแรงตึงผิว ค่าการกระจายน้ำมัน และค่า pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย MUE 24 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ที่ 30°C เป็นเวลา 7 วัน

แหล่งคาร์บอน (8% w/v)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	Δ ST _{b-t}	ค่าการกระจายน้ำมัน (ตร.ซม.)	ค่า pH
กลูโคส	10.5±0.41	50.33±0.58	10.7	0.52±0.25	4.45±0.05
ซูโครส	9.43±0.32	52.33±1.26	1.67	0.13±0.06	4.29±0.03
กาแลคโตส	6.53±0.10	55.00±1.73	10.0	0.18±0.09	7.06±0.05
มอลโตส	5.93±0.25	56.17±0.29	2.17	0.06±0.05	3.94±0.11
แมนนิทอล	15.0±0.81	54.67±1.26	5.33	0.15±0.04	7.56±0.05



รูปที่ 4.8 แสดง ค่าการกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก สายพันธุ์กล้วย MUE24 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

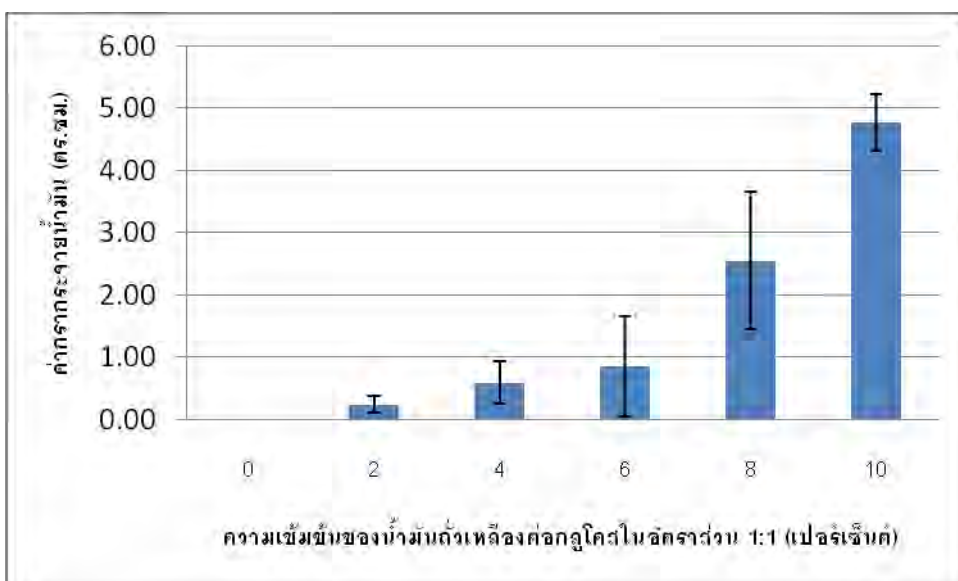


รูปที่ 4.9 แสดงค่าแรงดึงผิว ของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก สายพันธุ์กล้วย MUE24 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

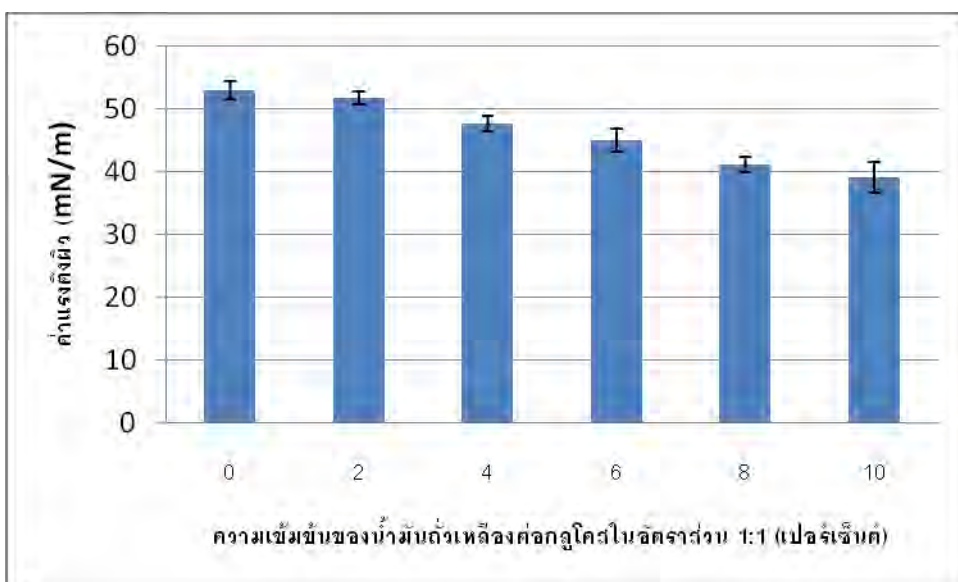
เมื่อทำการแปรผันความเข้มข้นของกลูโคสในอัตราส่วน 1:1 กับน้ำมันถั่วเหลือง พบว่าที่ความเข้มข้นกลูโคส 10 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับน้ำมันถั่วเหลือง 10 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสมที่สุดในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยจะ ให้ค่าแรงตึงผิว 39.17 mN/m และมีค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 4.18 ตารางเซนติเมตร ดังแสดงผลในตารางที่ 4.14 ซึ่งมากกว่าการใช้เพียงกลูโคสชนิดเดียวเป็นแหล่งคาร์บอน (ตารางที่ 4.13)

ตารางที่ 4.14 แสดงค่าแรงตึงผิว ค่าการกระจายน้ำมัน และค่า pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก สายพันธุ์กลาย MUE 24 เมื่อแปรผัน ความเข้มข้นของ แหล่งคาร์บอนน้ำมันถั่วเหลือง ร่วมกับน้ำตาลกลูโคสในอัตราส่วน 1:1 ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

ความเข้มข้นของ น้ำมันถั่วเหลืองต่อ กลูโคสที่อัตราส่วน 1:1	น้ำหนักเซลล์ แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	ΔST_{b-t}	ค่าการกระจาย น้ำมัน (ตร.ซม.)	ค่า pH
0 %	0.91±0.01	53.00±1.41	0	0.00±0	7.45±0.04
2 %	10.88±0.39	51.83±1.04	2.17	0.24±0.13	8.82±0.16
4 %	14.90±2.35	47.67±1.15	7.83	0.59±0.34	8.36±0.19
6 %	14.97±1.02	45.00±1.80	13.50	0.85±0.88	8.12±0.08
8 %	15.55±1.16	41.17±1.26	18.83	2.55±1.11	6.25±0.86
10 %	12.74±0.85	39.17±2.47	19.83	4.78±0.45	5.33±0.20



รูปที่ 4.10 แสดงค่าการกระจายน้ำมัน ของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย MUE24 เมื่อใช้น้ำมันดำเหลืองแหล่งคาร์บอนที่แปรผันความเข้มข้นต่างๆ ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

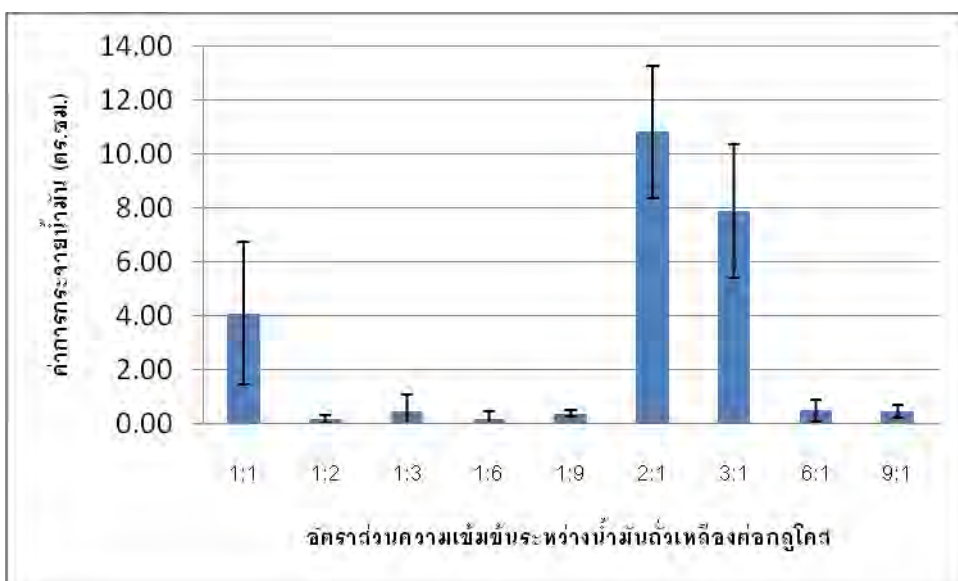


รูปที่ 4.11 แสดงค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย MUE24 เมื่อใช้น้ำมันดำเหลืองแหล่งคาร์บอนที่แปรผันความเข้มข้นต่างๆ ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

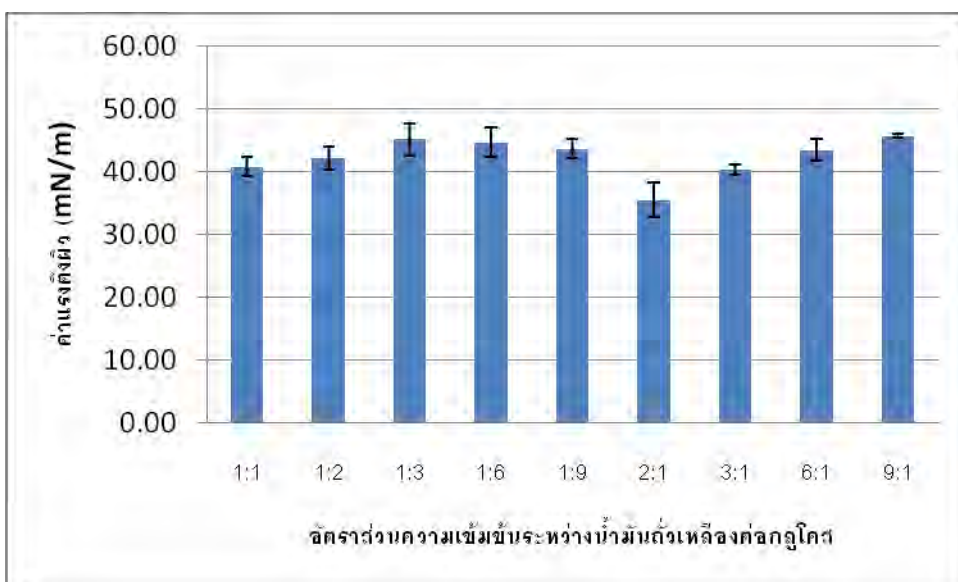
จากนั้นก็ทำการทดลองหาอัตราส่วนน้ำมันถั่วเหลืองต่อกลูโคสภายในปริมาณ แหล่งคาร์บอนทั้งสองชนิดรวมกันเป็น 20 เปอร์เซ็นต์พบว่าที่อัตราส่วนน้ำมันถั่วเหลืองต่อ กลูโคส 2:1 เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดย ให้ ค่าแรงตึงผิว 35.5 mN/m และค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 10.82 ตารางเซนติเมตร ดัง แสดงผลในตารางที่ 4.15 ซึ่งมีค่าแรงตึงผิวต่ำที่สุด และมี ค่าการกระจายน้ำมัน มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับที่อัตราส่วนน้ำมันถั่วเหลืองต่อกลูโคสอื่นๆ ดังแสดงในรูปที่ 4.12 และ 4.13

ตารางที่ 4.15 แสดงค่าแรงตึงผิว ค่าการกระจายน้ำมัน และค่า pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก สายพันธุ์กลาย MUE 24 เมื่อแปรผันอัตราส่วนแหล่งคาร์บอนน้ำมันถั่วเหลืองร่วมกับ น้ำตาลกลูโคสที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

อัตราส่วนน้ำมัน ถั่วเหลืองต่อ กลูโคส	น้ำหนักเซลล์ แห้ง (g/l)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	Δ ค่าแรง ตึงผิว _{b-t}	ค่าการกระจาย ตัวของน้ำมัน (ตร.ซม.)	ค่า pH
1:1	13.08±0.91	40.83±1.44	14.67	4.07±2.65	4.57±0.06
1:2	14.44±0.11	42.17±1.89	11.83	0.16±0.14	4.67±0.03
1:3	13.24±1.63	45.17±2.57	10.33	0.44±0.60	4.59±0.04
1:6	13.63±2.46	44.67±2.36	9.33	0.18±0.28	4.86±0.12
1:9	10.32±3.73	43.67±1.53	13.83	0.36±0.13	4.53±0.31
2:1	16.14±2.22	35.50±2.78	17.00	10.82±2.46	7.70±0.32
3:1	17.16±1.92	40.33±0.76	11.17	7.88±2.46	8.24±0.02
6:1	14.23±2.03	43.50±1.80	8.00	0.48±0.41	8.18±0.17
9:1	19.54±0.51	45.67±0.29	10.33	0.44±0.23	8.26±0.01



รูปที่ 4.12 แสดงการกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก *Pichia anomala* PY1 ที่ใช้น้ำมันถั่วเหลืองร่วมกับน้ำตาลกลูโคสในอัตราส่วนต่างๆ กันเป็นแหล่งคาร์บอนที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

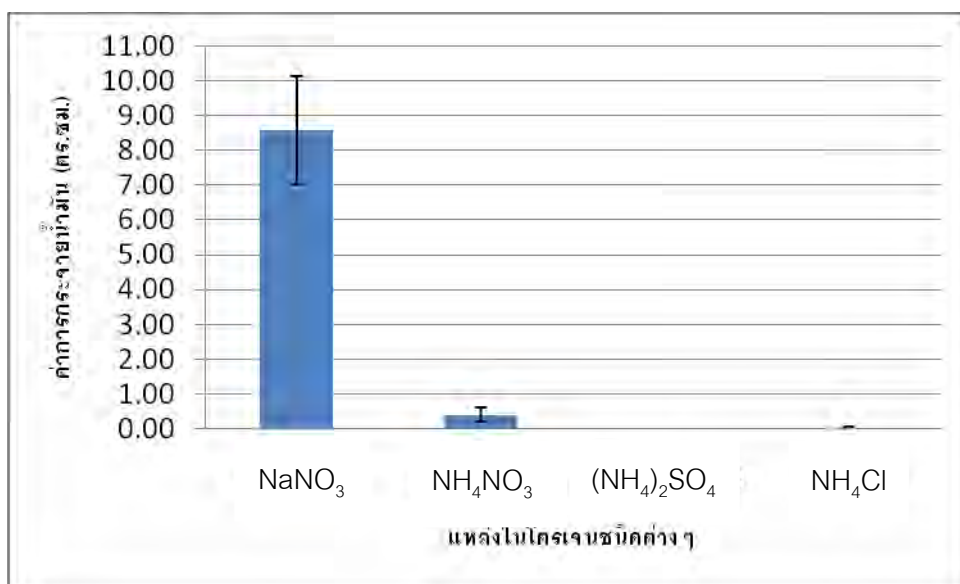


รูปที่ 4.13 แสดงค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก *Pichia anomala* PY1 ที่ใช้น้ำมันถั่วเหลืองร่วมกับน้ำตาลกลูโคสในอัตราส่วนต่างๆ กันเป็นแหล่งคาร์บอนที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

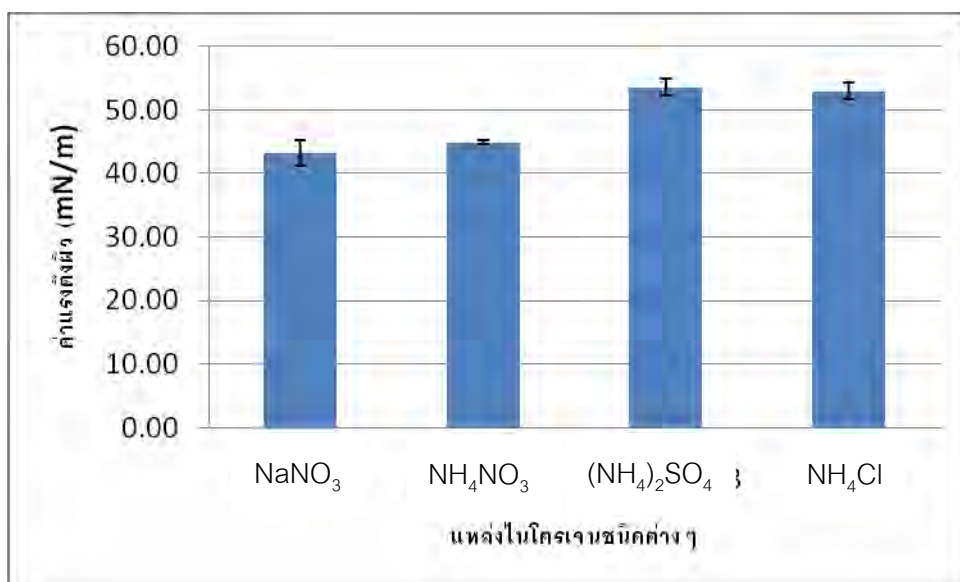
เมื่อได้แหล่งคาร์บอนทั้งชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมแล้ว นำมาหาแหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตสารลดแรงตึงผิว ชีวภาพ พบว่า NaNO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยให้ผลค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 43.17 mN/m และค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 8.6 ตารางเซนติเมตร ดังแสดงในตารางที่ 4.16 ซึ่งมีค่าแรงตึงผิวต่ำที่สุด และมีค่าการกระจายน้ำมันมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ ดังแสดงในรูปที่ 4.14 และ 4.15 และพบว่าความเข้มข้นและอัตราส่วนระหว่าง NaNO_3 : สารสกัดจากยีสต์ที่เหมาะสม คือที่ความเข้มข้น 0.75% โดยให้ผลค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 36.5 mN/m และค่าการกระจายน้ำมันสูงสุดเท่ากับ 23.94 ตารางเซนติเมตร ดังแสดงในตารางที่ 4.17 ซึ่งมีค่าแรงตึงผิวต่ำที่สุด และมีค่าการกระจายน้ำมัน มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับที่อัตราส่วนน้ำมันถั่วเหลืองต่อกลูโคสอื่นๆ ดังแสดงในรูปที่ 4.16 และ 4.17 และที่ อัตราส่วน 1:6 ระหว่าง NaNO_3 ต่อสารสกัดจากยีสต์ ให้ผลค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 39.8 mN/m และค่าการกระจายน้ำมันสูงสุดเท่ากับ 19.6 ตารางเซนติเมตร ดังแสดงในตารางที่ 4.18

ตารางที่ 4.16 แสดงค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าแรงตึงผิว ค่าการกระจายน้ำมัน และค่าความเป็นกรดต่าง ของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก สายพันธุ์กลาย MUE 24 เมื่อใช้แหล่ง ไนโตรเจน ชนิดต่างๆที่ 30°C เป็นเวลา 7 วัน

แหล่งไนโตรเจน (0.4% w/v)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	ΔST_{b-t}	ค่าการกระจายน้ำมัน (ตร.ซม.)	ค่า pH
NaNO_3	14.46±2.8	43.17±2.02	15.33	8.60±1.55	8.34±0.22
NH_4NO_3	12.90±2.48	44.83±0.29	13.17	0.40±0.20	7.64±0.03
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4.07±1.01	53.50±1.32	2.00	0.03±0.00	2.40±0.01
NH_4Cl	2.56±0.13	53.00±1.32	1.00	0.03±0.02	2.19±0.02



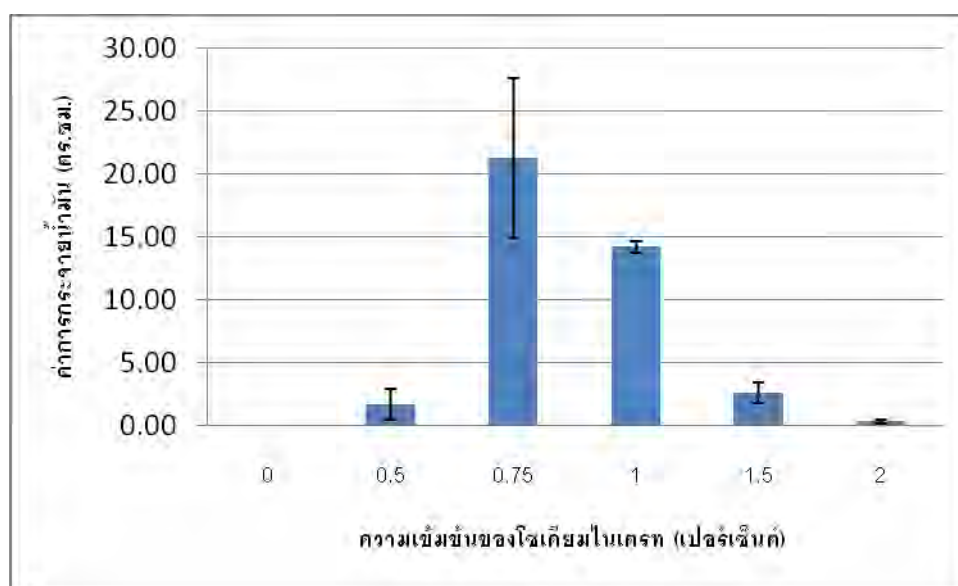
รูปที่ 4.14 แสดงค่าการกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กัลลาย MUE24 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



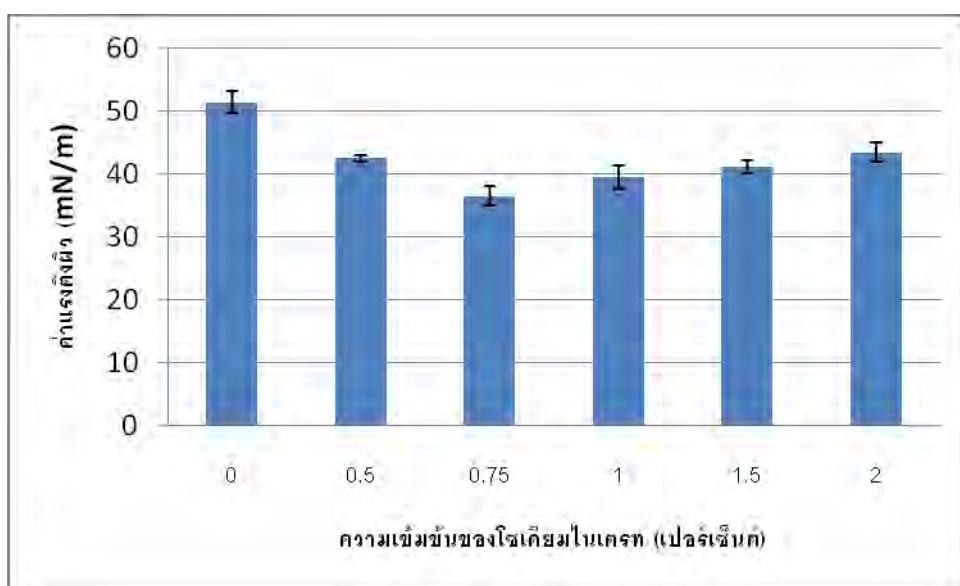
รูปที่ 4.15 แสดงค่าแรงดึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กัลลาย MUE24 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

ตารางที่ 4.17 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าแรงตึงผิว ค่าการกระจายน้ำมัน และค่า pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย MUE 24 เมื่อแปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

ความเข้มข้นของ NaNO_3 (%)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	ΔST_{b-t}	ค่าการกระจายน้ำมัน (ตร.ซม.)	ค่า pH
0	4.27±0.10	51.5±1.73	5.00	0.02±0.04	2.75±0.02
0.5	22.22±1.74	42.5±0.50	11.50	1.66±1.24	7.17±1.18
0.75	26.85±0.55	36.5±1.50	17.50	23.94±6.34	8.45±0.11
1.0	24.51±1.81	39.5±1.80	10.00	14.18±0.47	7.17±1.29
1.5	27.77±1.07	41.17±1.04	10.83	2.57±0.80	6.96±0.51
2.0	23.42±1.53	43.5±1.50	8.50	0.29±0.13	5.93±0.84



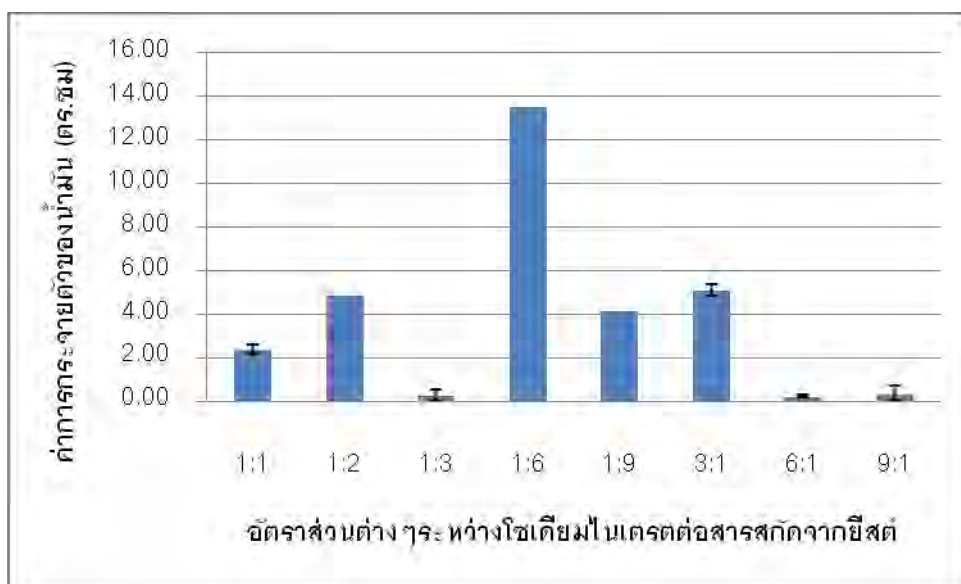
รูปที่ 4.16 แสดงค่าการกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย MUE24 เมื่อใช้ NaNO_3 แหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นต่างๆที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



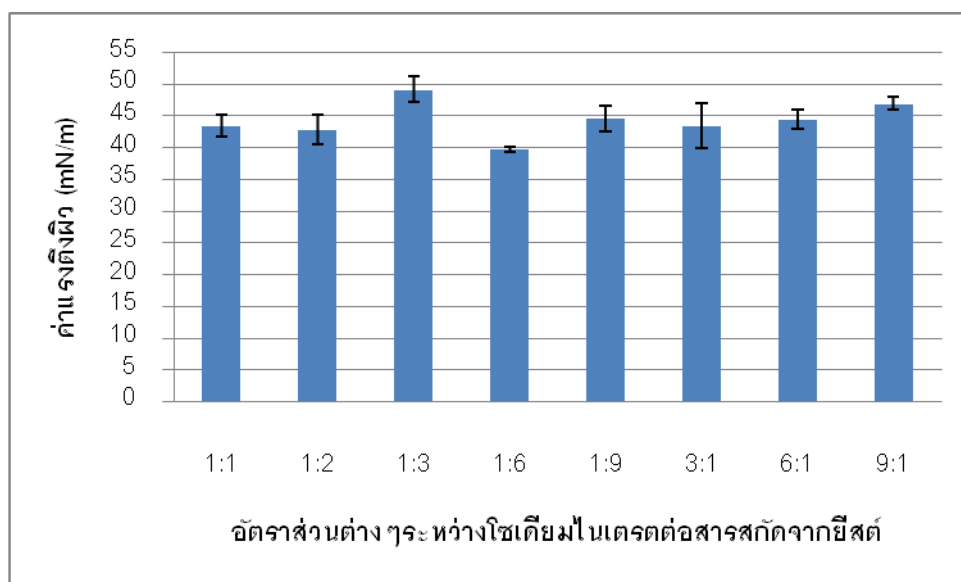
รูปที่ 4.17 แสดงค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย MUE24 เมื่อใช้ NaNO_3 แหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นต่างๆที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

ตารางที่ 4.18 แสดงค่าแรงตึงผิว ค่าการกระจายน้ำมัน และค่า pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย MUE 24 เมื่อแปรผันอัตราส่วนแหล่งไนโตรเจน NaNO_3 ร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

อัตราส่วนแหล่งไนโตรเจน NaNO_3 ร่วมกับสารสกัดจากยีสต์	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	ΔST_{b-t}	ค่าการกระจายตัวของน้ำมัน (ตร.ซม.)	ค่า pH
1:1	19.93±0.88	43.5±1.73	11.50	2.41±0.19	6.9±1.19
1:2	22.76±3.18	42.8±2.31	12.70	4.91±0.00	6.82±1.42
1:3	18.45±3.82	49.2±2.02	5.83	0.31±0.27	5.48±0.57
1:6	22.73±2.64	39.8±0.35	12.80	19.6±0.00	7.20±0.86
1:9	20.54±3.49	44.7±2.02	9.33	4.15±0.00	6.30±1.47
3:1	12.61±3.85	43.5±3.50	13.00	5.11±0.28	6.95±0.77
6:1	13.03±1.87	44.5±1.50	9.05	0.24±0.06	5.29±0.69
9:1	12.34±2.72	47.0±1.00	7.00	0.37±0.36	4.92±0.38



รูปที่ 4.18 แสดงค่าการกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย MUE24 เมื่อแปรผันอัตราส่วนแหล่งไนโตรเจน NaNO_3 ร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

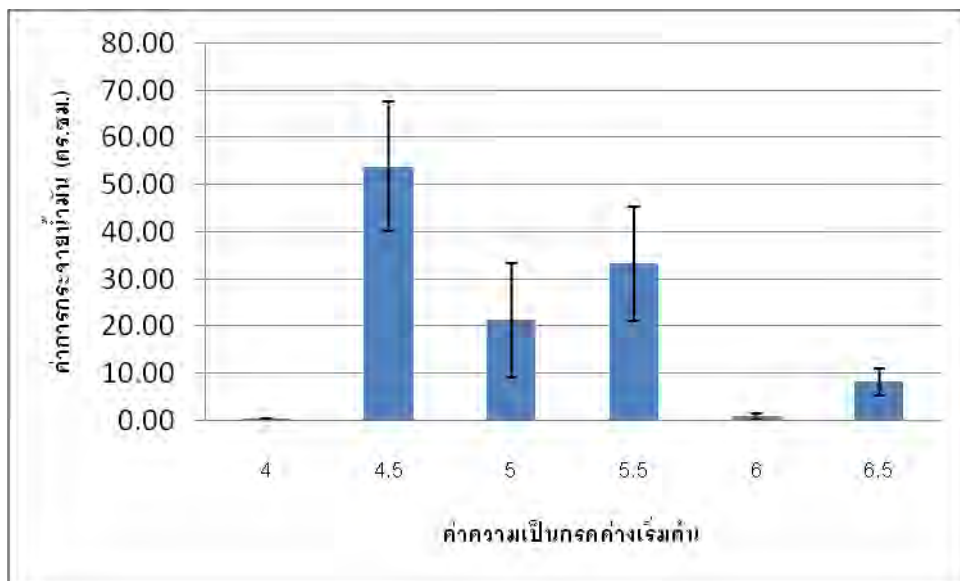


รูปที่ 4.19 แสดงค่าแรงดึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย MUE24 เมื่อแปรผันอัตราส่วนแหล่งไนโตรเจน NaNO_3 ร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

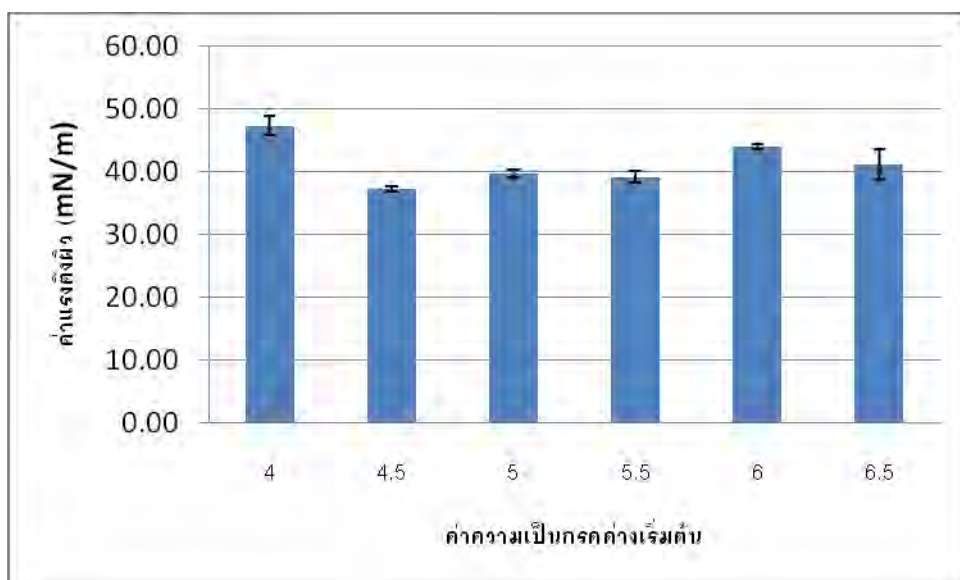
จากนั้นได้ทำการศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยน้ำมันถั่วเหลืองร่วมกับน้ำตาลกลูโคสในอัตราส่วน 2:1 เป็นแหล่งคาร์บอน โดยทำการแปรผันค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าที่ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยให้ผลค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 41.5 mN/m และค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 12.56 ตารางเซนติเมตร ดังแสดงในตารางที่ 4.19 ซึ่งมีค่าแรงตึงผิวต่ำที่สุด และมีค่าการกระจายน้ำมันมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองที่ ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นอื่นๆ ดังแสดงในรูปที่ 4.20 และ 4.21

ตารางที่ 4.19 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าแรงตึงผิว ค่าการกระจายน้ำมัน และค่า pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย MUE 24 เมื่อแปรผันค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ใช้น้ำมันถั่วเหลืองร่วมกับน้ำตาลกลูโคสในอัตราส่วน 2:1 เป็นแหล่งคาร์บอนที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

ค่า pH เริ่มต้น	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	ΔST_{b-t}	ค่าการกระจายน้ำมัน(ตร.ซม.)	ค่า pH
4.0	17.69±1.77	47.33±1.53	8.67	0.29±0.09	6.37±0.57
4.5	25.33±5.23	37.25±0.35	16.75	53.87±13.74	8.24±0.03
5.0	24.35±2.01	39.67±0.58	14.33	21.20±12.24	8.26±0.04
5.5	22.05±1.31	39.17±1.04	15.83	33.24±12.06	8.12±0.34
6.0	20.38±2.11	44.00±0.50	11.50	0.77±0.67	6.92±0.23
6.5	23.08±0.78	41.17±2.47	13.33	8.16±2.84	7.31±0.67



รูปที่ 4.20 แสดงค่าการกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย MUE24 ทำการแปรผันค่าความเป็นกรดค่าเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ไขมันถั่วเหลืองร่วมกับน้ำตาลกลูโคสในอัตราส่วน 2:1 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

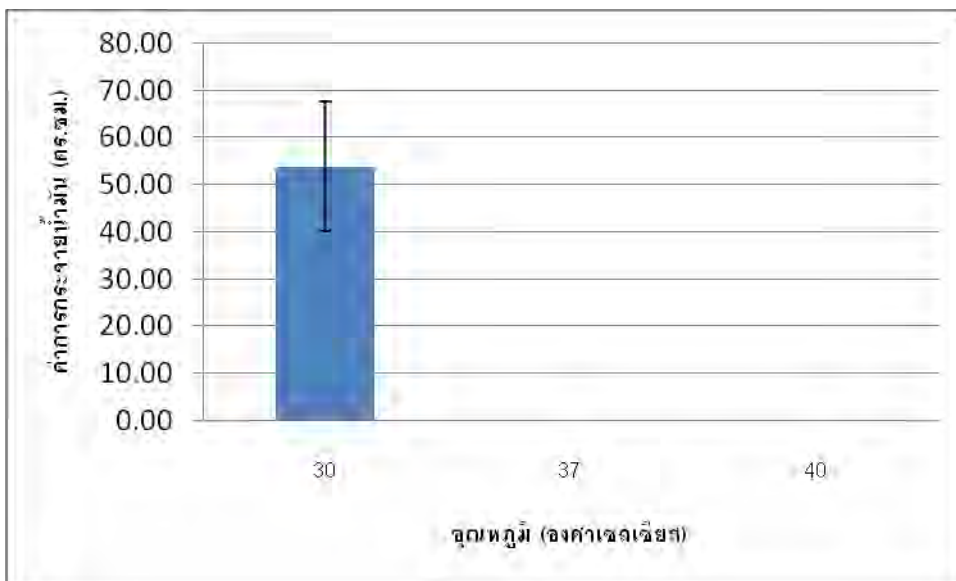


รูปที่ 4.21 แสดงค่าแรงดึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย MUE24 ทำการแปรผันค่าความเป็นกรดค่าเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ไขมันถั่วเหลืองร่วมกับน้ำตาลกลูโคสในอัตราส่วน 2:1 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

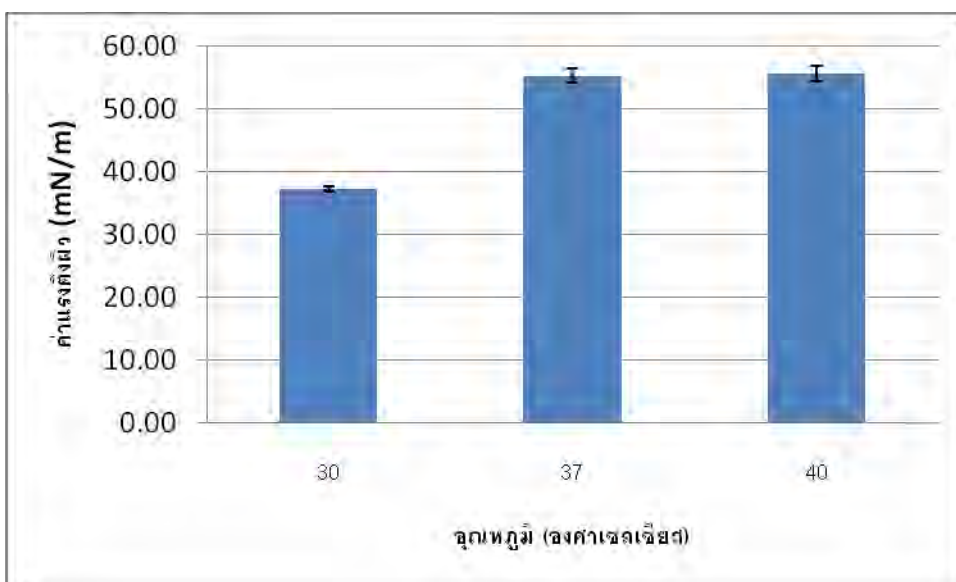
เมื่อทำการทดลองเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวปรับปรุงสูตรในภาวะที่เหมาะสมโดยทำการแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิต่าง จากผลการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเนื่องจากมีค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 37.25 mN/m เมื่อพิจารณาค่าการกระจายตัวของน้ำมัน พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีค่าการกระจายตัวของน้ำมันสูงสุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 53.87 ตร.ซม. เป็นอุณหภูมิที่เชื้อเจริญได้ดีที่สุด รวมทั้งสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 4.20 รูปที่ 4.22 และ 4.23

ตารางที่ 4.20 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าแรงตึงผิว ค่าการกระจายน้ำมัน และค่า pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย MUE 24 เมื่อแปรผันอุณหภูมิต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำมันถั่วเหลืองร่วมกับน้ำตาลกลูโคสในอัตราส่วน 2:1 เป็นแหล่งคาร์บอนที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 7 วัน

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	น้ำหนักเซลล์ แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	ΔST_{b-t}	ค่าการกระจาย น้ำมัน (ตร.ซม.)	ค่า pH
30	25.3±5.23	37.25±0.35	18.8	53.9±13.7	8.24±0.03
37	5.72±1.44	55.33±1.04	0.67	0.15±0.04	3.95±0.04
40	1.25±0.37	55.67±1.15	0.33	0.13±0.00	3.4±0.02



รูปที่ 4.22 แสดงค่าการกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย MUE24 ทำการแปรผันอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อปรับปรุงสูตรที่อุณหภูมิ 30 37 และ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน



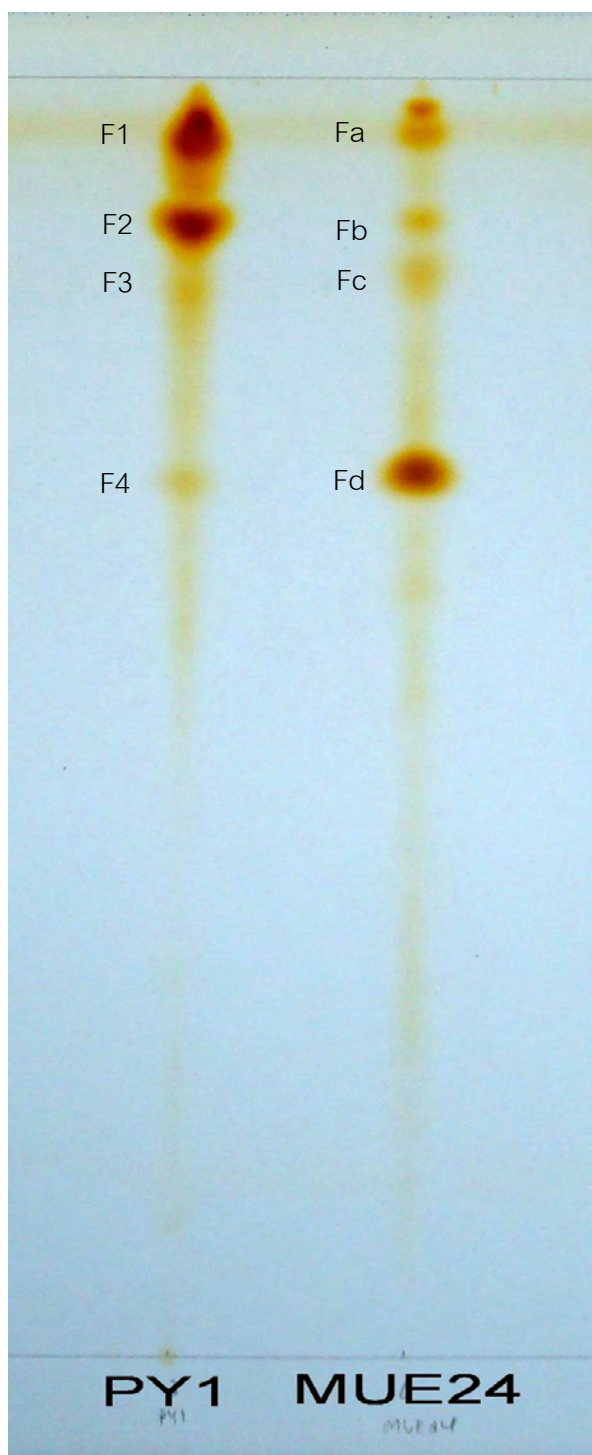
รูปที่ 4.23 แสดงค่าแรงดึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์กลาย MUE24 ทำการแปรผันอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อปรับปรุงสูตรที่อุณหภูมิ 30 37 และ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน

4.7 การผลิตและการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ทำการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากยีสต์ *Pichia anomala* สายพันธุ์ MUE24 ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่ประกอบด้วย 0.02% KH_2PO_4 , 0.02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.64% สารสกัดยีสต์ 0.11% NaNO_3 กลูโคส 6.66% และ 13.34% น้ำมันถั่วเหลือง ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในระดับขวดเขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน

4.8 การแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและวิเคราะห์องค์ประกอบของสารโดยวิธีโครมาโตกราฟี

การเตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธี analytical TLC โดยนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในเอทิลอะซิเตต ปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาตรวจสอบบนแผ่น TLC silica gel 60 เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยคลอโรฟอร์ม ต่อ เมทานอล ต่อ น้ำ (65: 25: 4) แล้วทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารด้วยไอระเหยของไอโอดีน (Passeri และคณะ, 1992) พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จากสายพันธุ์ PY1 สามารถแยกออกมาได้ 4 ลำดับส่วนเรียกว่า F1-F4 โดยมีค่าคงที่ของอัตราส่วนการเคลื่อนที่ (R_f) เป็น 0.94, 0.87, 0.85 และ 0.69 ตามลำดับ ส่วนยีสต์สายพันธุ์กลาย MUE24 สามารถแยกสารออกได้เป็น 4 ลำดับส่วนเรียกว่า Fa ถึง Fd โดย (R_f) เป็น 0.96, 0.89, 0.84 และ 0.69 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.24 เมื่อนำแต่ละลำดับส่วนมาตรวจสอบประสิทธิภาพด้วยการวัดค่าการกระจายน้ำมัน ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ายีสต์สายพันธุ์กลาย MUE24 ที่ลำดับส่วน Fb มีค่าการกระจายน้ำมันสูงที่สุดที่ 7.54 ตารางเซนติเมตร ซึ่งมากกว่าสายพันธุ์ PY1 ที่ลำดับส่วน F1 ที่มีค่าการกระจายน้ำมันสูงที่สุดประมาณ 2.65 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 4.21



รูปที่ 4.24 การแยกและวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *Pichia anomala* PY1 และสายพันธุ์กลาย MUE24 ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบ analytical Thin-Layer Chromatography

ตารางที่ 4.21 อัตราการเคลื่อนที่ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และยีสต์สายพันธุ์กลาย MUE 24 ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอนบนแผ่น TLC และค่าการกระจายน้ำมันแต่ละลำดับส่วน ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

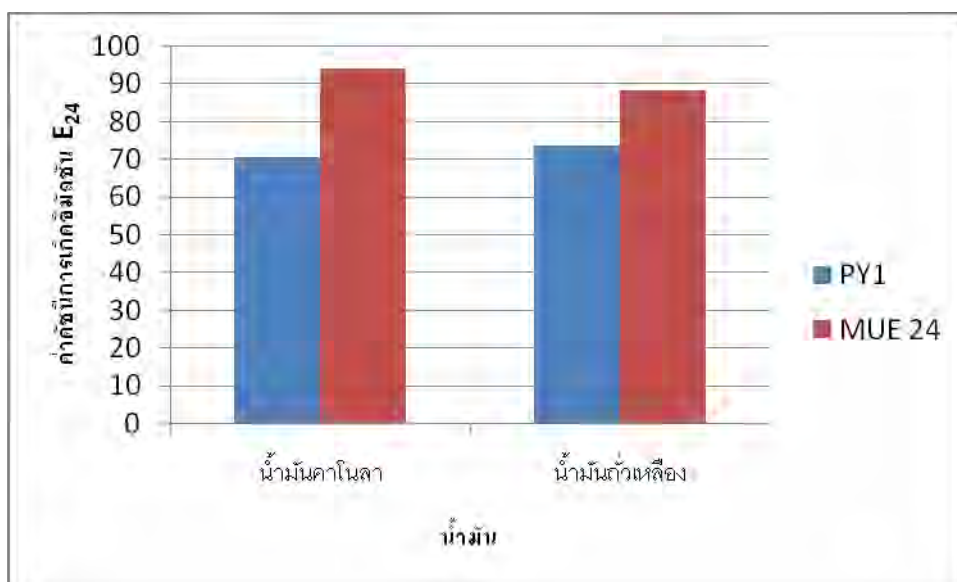
สายพันธุ์	ลำดับส่วนที่	อัตราการเคลื่อนที่ (R_f)	ค่าการกระจายน้ำมัน (ตร.ซม.)
PY1	F1	0.94	2.84
	F2	0.87	0.79
	F3	0.85	0.50
	F4	0.69	0.64
MUE24	Fa	0.96	0.64
	Fb	0.89	7.54
	Fc	0.84	1.77
	Fd	0.69	1.13

4.9. การวัดค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน (Emulsion Index) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วน

วัดค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน (Emulsion Index) เมื่อทดสอบกับน้ำมัน 2 ชนิด 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 ซึ่ง สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก ยีสต์สายพันธุ์กลาย MUE24 ให้ค่า 94.14 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำมันคาโนลา และให้ค่า 88.53 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำมันถั่วเหลือง เมื่อเปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากสายพันธุ์ PY1 ให้ค่า E_{24} เท่ากับ 70.67 และ 73.76 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.22

ตารางที่ 4.22 แสดงค่าการก่ออิมัลชัน (Emulsification activity) และความเสถียรของการก่ออิมัลชัน (Emulsification stability) หรือค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน (Emulsion Index) ที่เวลา 24 ชั่วโมง ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากน้ำมันคาโนลา และน้ำมันถั่วเหลือง

สายพันธุ์	ค่าการก่ออิมัลชัน(OD units)		ค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน E ₂₄	
	น้ำมันคาโนลา	น้ำมันถั่วเหลือง	น้ำมันคาโนลา	น้ำมันถั่วเหลือง
PY1	0.508	0.545	70.67	73.76
MUE 24	0.257	0.301	94.14	88.53



รูปที่ 4.25 แสดงค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน (Emulsion Index) ที่เวลา 24 ชั่วโมง ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากน้ำมันคาโนลา และน้ำมันถั่วเหลือง

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้รายงานการศึกษาผลของการกลายพันธุ์ยีสต์ *Pichia anomala* PY1 เพื่อเพิ่มการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ต ร่วมกับสาร Ethyl methane sulfonate รวมทั้งศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากสายพันธุ์กลาย

ยีสต์ *Pichia anomala* PY1 ที่ใช้ในการทดลองนี้ แยกมาจากข้าวหมากที่อำเภอพนัสนิคม จังหวัด ชลบุรี โดยนางสาวธันัสสา เขียงอุทัย เมื่อปี พ.ศ. 2549 จากการศึกษาการเจริญ และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน มี NaNO_3 0.4 % เป็นแหล่งไนโตรเจน ควบคุมค่าความเป็นกรดต่าง เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน โดยส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเซลล์ มีค่าการกระจายน้ำมันสูงสุด 5.07 ตารางเซนติเมตร มีค่าแรงตึงผิวต่ำสุดในวันที่ 7 เท่ากับ 38 มิลลินิวตันต่อเมตร และเมื่อทำการกลายพันธุ์เพื่อเพิ่มการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย การก่อการกลายพันธุ์โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ต จากนั้นทำการคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ได้โดยคัดเลือกการทดสอบ ค่าการกระจายน้ำมัน และค่าแรงตึงผิว ซึ่งให้ผลดีกว่าสายพันธุ์ PY1 มาทำการกลายพันธุ์อีกครั้ง ด้วยสาร Ethylmethanesulfonate จากนั้นทำการคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ได้ จึงได้ยีสต์สายพันธุ์กลาย MUE24 มาทำการศึกษาต่อ ในการศึกษาการเจริญ และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน มี NaNO_3 0.4 % เป็นแหล่งไนโตรเจน ควบคุมค่าความเป็นกรดต่าง เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน จะให้ค่าการกระจายน้ำมันสูงสุดเท่ากับ 17.64 ตารางเซนติเมตร เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ PY 1 ซึ่งให้ค่าการกระจายน้ำมันสูงสุดเท่ากับ 5.07 ตารางเซนติเมตรในวันที่ 7 จะมีค่ามากกว่าประมาณ 3 เท่า

เมื่อทำการศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pichia anomala* MUE24 พบว่ายีสต์สายพันธุ์กลาย MUE 24 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในอาหารเหลวปรับปรุงสูตรที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.02 เปอร์เซ็นต์ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดยีสต์ 0.64 เปอร์เซ็นต์ NaNO_3 0.11 เปอร์เซ็นต์ น้ำมันถั่วเหลือง 13.34 เปอร์เซ็นต์ และกลูโคส 6.66

เปอร์เซ็นต์ ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 โดยมีภาวะการเลี้ยงเชื้อที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในระดับขวดเขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มีค่าแรงตึงผิวต่ำสุด 37.25 mN/m ค่าการกระจาย น้ำมันเท่ากับ 53.87 ตารางเซนติเมตร และให้ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเท่ากับ 0.50 กรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 ที่ใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว คือให้ ผลผลิต 0.26 กรัมต่อลิตร (ธนัสดา เขียงอุทัย, 2549) สอดคล้องกับการทดลองก่อนหน้านี้ที่ รายงานว่า เมื่อทำการเปรียบเทียบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้สารตั้งต้นเป็น คาร์โบไฮเดรตร่วมกับสารที่ไม่ชอบน้ำหรือสารที่ชอบไขมันจะให้ผลผลิตมากกว่าการใช้แหล่ง คาร์บอนเพียงชนิดเดียว (Linton, 1991; Hommel และคณะ, 1994) โดยยีสต์จะใช้น้ำตาล ในกระบวนการเมตาบอลิซึมขั้นแรกของเซลล์ และสังเคราะห์ส่วนของ hydroxyl fatty acid ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากสารตั้งต้นที่เป็นสารที่ไม่ชอบน้ำหรือสารที่ชอบไขมัน และ เชื่อมต่อโดยตรงกับส่วนที่เป็นน้ำตาลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทไกลโคลิพิด (Webber และคณะ, 1992) ผลผลิตที่ได้ก็จะมีลักษณะคล้ายน้ำมัน เพราะสารลดแรงตึงผิว ชีวภาพที่ผลิตได้จากสารตั้งต้นที่เป็นน้ำมันพืชส่วนมากจะเป็น lactonic form ที่ไม่บริสุทธิ์ (Hu และ Ju, 2001a)

การ แยกและวิเคราะห์ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วย analytical Thin-Layer Chromatography แล้วทำการวิเคราะห์หองค์ประกอบของสารด้วยไอระเหยไอโอดีน พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และสายพันธุ์กลาย MUE24 สามารถแยกสารออกได้เป็น 4 ลำดับส่วน โดยลำดับส่วนของ *Pichia anomala* PY1 เรียกว่า F1 ถึง F4 โดยมีค่าคงที่ของอัตราส่วนการเคลื่อนที่ (R_f) เป็น 0.94, 0.87, 0.85 และ 0.69 ตามลำดับ และยีสต์สายพันธุ์กลาย MUE24 เรียกว่า Fa ถึง Fd โดยมีค่าคงที่ของ อัตราส่วนการเคลื่อนที่ (R_f) เป็น 0.96, 0.89, 0.84 และ 0.69 ตามลำดับ ซึ่งค่าคงที่ของ อัตราส่วนการเคลื่อนที่ ของทั้งสองสายพันธุ์นั้นมีค่าใกล้เคียงกัน แต่มีปริมาณของแต่ละ ลำดับส่วนแตกต่างกัน และเมื่อนำแต่ละลำดับส่วนมาตรวจ สอบประสิทธิภาพด้วยการวัดค่า การกระจายน้ำมัน พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก ยีสต์ *Pichia anomala* PY1 ที่ ลำดับส่วน F1 มีค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 2.84 ตารางเซนติเมตร สารลดแรงตึงผิว ชีวภาพของยีสต์สายพันธุ์กลาย MUE24 ที่ลำดับส่วน Fb มีค่าการกระจายน้ำมันสูงที่สุดและ สูงกว่าคือเท่ากับ 7.54 ตารางเซนติเมตร จากการศึกษาวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ จาก ยีสต์สายพันธุ์กลาย MUE 24 สายพันธุ์ ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบ analytical Thin-

Layer Chromatography พบว่า ลำดับส่วน ที่มีการกระจายน้ำมันสูงสุดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ จากยีสต์สายพันธุ์กลายแต่ละสายพันธุ์ที่มีค่าคงที่ของอัตราส่วนการเคลื่อนที่ (R_f) ที่ต่างจากของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 อาจเพราะสารที่ผลิตจากยีสต์สายพันธุ์กลายมีโครงสร้างและองค์ประกอบของสารที่มีลักษณะแตกต่างจากโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ ยีสต์ *Pichia anomala* PY1 จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะนำสารที่ผลิตได้จากสายพันธุ์กลายต่างไปศึกษาหาโครงสร้างสารหรือคุณสมบัติอื่นๆต่อไป

การศึกษาความสามารถในการก่ออิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ จากยีสต์สายพันธุ์กลาย MUE 24 โดยการวัด ค่าความเสถียรในการก่ออิมัลชัน (Emulsification stability) และค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน (Emulsion Index) ต่อน้ำมัน 2 ชนิดได้แก่ น้ำมันคาโนลา และน้ำมันถั่วเหลืองที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งให้ค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน เท่ากับ 94.14 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำมันคาโนลา และให้ค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันเท่ากับ 88.53 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำมันถั่วเหลือง ซึ่งให้ค่าที่ดีกว่าสายพันธุ์ PY1 ซึ่งให้ค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน เท่ากับ 70.67 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำมันคาโนลา และให้ค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน เท่ากับ 73.76 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำมันถั่วเหลือง

ข้อเสนอแนะ

จากการวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ จากยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และยีสต์สายพันธุ์กลาย MUE 24 ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบ analytical Thin-Layer Chromatography พบว่า ลำดับส่วน ที่มีการกระจายน้ำมันสูงสุดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากยีสต์ สายพันธุ์กลาย ที่มีค่าคงที่ของอัตราส่วนการเคลื่อนที่ (R_f) ที่ต่างจากของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 อาจเพราะสารที่ผลิตจากยีสต์สายพันธุ์กลายมีโครงสร้างและองค์ประกอบของสารที่มีลักษณะแตกต่างจากโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะนำสารที่ผลิตได้จากสายพันธุ์กลายต่างไปศึกษา หาโครงสร้างสารหรือคุณสมบัติอื่นๆต่อไป เนื่องจากสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้ผลิตสารลดแรงตึงผิวที่มีค่าดัชนีการก่ออิมัลชันมากกว่า 80-90 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันคาโนลา จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำสารที่ผลิตได้ไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น ใช้เป็นอิมัลซิฟายเออร์ (emulsifiers) โดยอาหารที่ต้องใช้อิมัลซิฟายเออร์ ได้แก่ ไอศกรีม มายองเนส น้ำสลัด และมาร์การีน และ เพื่อนำไปเตรียมเป็นไมโครแคปซูลบรรจุอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยบางชนิด เพื่อใช้ในอาหารพร้อมรับประทานที่สามารถนำมาบริโภคได้ทันที

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ธนัสถา เชียงอุทัย . 2549. การผลิตและลักษณะสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากยีสต์ที่คัดเลือกได้ วิทยานิพนธ์ ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาษาอังกฤษ

Abu-Runaida, A.S., I.M. Banat, S. Haditirto, and A. Khamis. 1991. Nutritional requirements and growth characteristics of a biosurfactant-producing *Rhodococcus* bacterium. World J. Microbiol. Biotechnol. 7: 53-61.

Amezcu-Vega, C., H.M. Poggi-Varaldo, F. Esparza-Garcia, E. Rios-Leal, and R. Rodriguez-Vazquez. 2007. Effect of culture conditions on fatty acids composition of a biosurfactant produced by *Candida ingens* and change of surface tension of culture media. Biores. Technol. 98: 237-240.

Arima, K., Kakinuma, A., and Tamura, G. 1968. Surfactin, AcrySTALLINE peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. Biochem. Biophys. Res. Comm. 31: 488- 494.

Arino, S., Marchal, R., and Vandecasteele, J. P. 1996. Identification and production of a rhamnolipidic biosurfactant by a *Pseudomonas* species. Appl. Microbiol. Biotechnol. 45: 162-168.

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

Belsky, I., Gutnick, D. L., and Rosenberg, E. 1979. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG- 1: Determination of emulsifier bound fatty acids. FEBS Lett. 101: 175- 178.

Bemheimer, A. W. and Avigad, L. S. 1970. J. Gen. Microbiol. 61: 361- 369. In Cooper, D. G. and Zajic, J. E. 1980. Surface active compounds from microorganisms. Adv. Appl. Microbiol. 26: 229- 256.

- Bunster, L., Fokkema, N. J., and Schippers, B. 1989. Effect of surface- active *Pseudomonas* spp. on leaf wetability. Appl. Environ. Microbiol. 55: 1340- 1345.
- Burd, G. and Ward, O. P. 1997. Energy- dependent accumulation of particulate biosurfactant by *Pseudomonas marginalis*. Can. J. Microbiol. 43: 391- 394.
- Brundish, D.E., Shaw, N., and Baddiley, J. 1967. Biochem. Biophysic. Acta. 120: 148- 155. In Cooper, D. G. and Zajic, J. E. 1980. Surface active compounds from microorganisms. Adv. Appl. Microbiol. 26: 229-256.
- Cameotra, S. S. and Makkar, R. S. 1998. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. Appl. Microbiol. Biotechnol. 50: 520- 529.
- Cameron, D. R., Cooper, D. G., and Neufeld, R. J. 1988. The monoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. Appl. Environ. Microbiol. 54: 1420- 1425.
- Casas, J.A., S. Garcia de Lara, and F. Garcia-Ochoa. 1997. Optimization of a synthetic medium for *Candida bombicola* growth using factorial design of experiments. Enz. Microb. Technol. 21: 221-229.
- 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 Goldenberge, B.G. 1987. Surface active agents from two *Bacillus* species. Adv. Appl. Environ. Microbiol. 53: 224-229.
- 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.

- Cooper, D. G., Macdonald, R., Duff, S. J. B., and Kosaric, N. 1981. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation addition. Appl. Microbiol. 26: 229- 256.
- Culter, A. J. and Light, R. J. 1979. Regulation 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 Banat, 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 Syltatk, 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 Banat, I. M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbio. Mol. Bio. Rev. 61: 47-64.
- Desai, A. J., Patel, K. M., and Desai, J. D. 1988. Emulsifier production by *Pseudomonas fluorescens* during the growth on hydrocarbon. Curr. Sci. 57: 500- 501.
- Deshande M., Daniels L. 1995. Evaluation of sophorolipid biosurfactant production by *Candida bombicola* using animal fat. Biores. Technol. 54, 143-150.
- Espuny, M. J., Egado, S., Manresa, I. R. A., and Mercade, M. E. 1996. Nutritional requirements of a biosurfactant producing strain *Rhodococcus* sp. 51T7. Biotechnol. Lett. 18: 521-526.
- 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.
- Gobbert, U., S. Lang, and F. Wagner. 1984. Sophorose lipid formation by resting cells of *Torulopsis bombicola*. Biotechnol. Lett. 6: 225-230.
- Griffiths, A. J.; Gelbart, W. M., Miller, J. H., and Lewontin, R. C. Modern Genetic Analysis New York: W. H. Freeman and Co. 1999
- Griffiths, A. J., Wessler, S. R., Lewontin, R. C., Gelbart, W. M., Suzuki, D. T., Miller, J. H. Introduction to Genetic Analysis, 8th ed. New York:W.H.Freeman and Co, 2005.
- Guerra-Santos, L. H., Kappeli, O., and Fiechter, A. 1984. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. Appl. Microbiol. Biotechnol. 48: 301-305.
- 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.
- Gumienna, M., M. Czamecka, and Z. Czarnecki. 2005. Effect of selected lipid substrates on the process of biosynthesis of surface-active compounds by the *Candida bombicola* yeasts. [Online]. <http://www.ejpau.media.pl/volume8/issue2/art-12.html>.
- Hisatsuka, K., Nakahara, T., and Yamada, K. 1972. Formation of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* S7B1. Agric. Biol. Chem. 36.: 1361- 1369.
- Hommel, R. K. and Huse, K. 1993. Regulation of sophorose lipid production by *Candida (Torulopsis) apicola*. 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.
- Horowitz, S., Gilbert, J. N., and Griffin, W. M. 1990. Isolation and characterization of surfactant produced by *Bacillus licheniformis* 86. J. Ind. Microbiol. 6: 243- 248.

- Hudak, A. J. and Cassidy, D. P. 2004. Stimulating in-soil rhamnolipid production in a bioslurry reactor by limiting nitrogen. Biotechnol. Bioeng. **30**: 361-368.
- Inge, N.A., Bogaert, V., Saerens, K., Muynck, C.D., Develter, D., Soetaert, W., and E.J. Vandamme. 2007. Microbial production and application of sophorolipids. Appl. Microbiol. Biotechnol. **76**: 23-34.
- Inoue, S. and Itoh, S. 1982. Sophorolipids from *Torulopsis bombicola* as microbial surfactants in alkane fermentation. Biotechnol. Lett. **4**: 3- 8.
- Ishigami, Y., Gama, Y., Nagahora, H., Yamaguchi, M., Nakahara, H., and Kamata, T. 1987. The pH- sensitive conversion of molecular aggregates of rhamnolipid biosurfactant. Chem. Lett. 763- 766.
- Ishigami, Y. and S. Suzuki. 1997. Development of biochemical- functionalization of biosurfactants and natural 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
- Jenny, K., Deltrieu, V. and Kappeli, O. 1993. Lipopeptide production by *Bacillus licheniformis*. In N. Kosaric (ed.), Biosurfactants: production, properties, applications. pp. 135- 156. New York: Marcel Dekker.
- Jing, C., Xin, S., Hui, Z., and Yinbo, Q. 2006. Production, structure elucidation and anticancer properties of sophorolipid from *Wickerhamiella domercqiae*. Enzyme Microbial Technol. **39**: 501-506.
- 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.
- Kappeli, O. and Finnerty, W. R. 1979. Partition of alkane by an extracellular vesicle derived from hexadecane- grown *Acinetobacter*. J. Bacteriol. **140**: 707- 712.
- Kim, H. S., Yoon, B. D., Choung, D. H., Oh, H. M., Katsuragi, T., and Tani, Y. 1999. Characterization of a biosurfactant, mannosylerythritol lipid produced from *Candida* sp. SY 16. Appl. Microbiol. Biotechnol. **52**: 713-721.

- Kim, S. Y., Oh, D. K., Lee, K. H., and Kim J. H. 1997. Effect of soybean oil and glucose on sophorose lipid fermentation by *Torulopsis bombicola* in continuous culture. Appl Microbiol Biotechnol. 48: 23±26
- Kitamoto, D., Akiba, S., Hioki, C., and Tabuchi, T. 1990. Extracellular accumulation of mannosylerythritol lipids by a strain of *Candida antarctica*. Agric. Biol. Chem. 54: 31–36.
- 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 *Candida antarctica*. 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.
- Knoche, H. W. and Shively, J. M. 1972. The structure of an ornithine containing lipid from *Thiobacillus thiooxidans*. J. Biol. Chem. 247: 170- 178.
- Konishi, M., Fukuoka, T., Morita, T., Imura, T., and Kitamoto, D. 2008. Production of new types of sophorolipids by *Candida batistae*. J. Oleo Sci. 57: 359-369.
- Koronelli, T. V., Komarova, T. I., and Denisov, Y. V. 1983. Chemical composition and role of peptidoglycolipid of *Pseudomonas aeruginosa*. Mikrobiologiya. 52: 767- 770.
- In Desai, J. D. and Banat, I. M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61: 47- 64.

- 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.
- Kretschmer, A., Bock, H., and Wagner, F. 1982. Chemical and physical characterization of interfacial- active lipids from *Rhodococcus erythropolis* grown on n- alkane. Appl. Environ. Microbiol. 44: 864- 870.
- Lang, S. 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*. Biotechnol. 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.
- Matsuyama, T., Kaneda, K. , Ishizuma, I., Toida, T., and Yano, I. 1990. Surface- active novel glycolipid and linked 3- hydroxyl fatty acids produced by *Serratia rubidaed*. J. Bacteriol. 172: 3015- 3022.
- 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 MIS38. 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
- Novonvenezia, S., Zosim, Z, Gottlieb, A., Legmann, R., Carmeli, S., Ron, E. Z., and Rosenberg, E. 1995. Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. Appl. Environ. Microbiol. 61: 3240- 3244.
- 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.
- Passoth V., Fredlund, E., Druvefors U. A., and Schnürer J. 2006 Biotechnology, physiology and genetics of the yeast *Pichia anomala*. FEMS Yeast Research 6 (1):3 – 13.
- Patel, R. M. and Desai, A. J. 1997. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. Letter in Appl. Microbiol. 25: 91- 94.
- Persson, A., G. Molin, and C. Weibull. 1990. physiological and morphological changes induced by nutrient limitation of *Pseudomonas fluorescens*. Appl. Environ. Microbiol. 56: 686-692.
- 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.
- 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.
- Ristau, E. and Wagner, F. 1983. Formation of novel anionic trehalosetetraesters from *Rhodococcus erythropolis* under growth limiting conditions. Biotechnol. Lett. 5: 95- 100.
- Robert C. J. and David L B. Mutation. In: Donald L R., Thomas B., Barbara J.M., and James R. .P., editors. C. elegans II. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1997.
- 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.

- Shaw, N. 1974. Adv. Appl. Microbiol. 17: 63- 108. In Cooper, D. G. and Zajic, J. E. 1980. Surface active compounds from microorganisms. Adv. Appl. Microbiol. 26: 229-256.
- Spencer, J.F.T., Gorin, P. A. J., and Tulloch, A. P. 1970. *Torulopsis bombicola* sp. *Antonie Van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol.* 36: 129-133.
- Shepherd, R., Rockey, J., Sutherland, I. W., and Roller, S. 1995. Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods. J. Biotechnol. 40: 207-217.
- Stanghellini, M. E., Rasmussen, S. L., Kim, D. H., and Rorabaugh, P. A. 1996. Efficacy of nonionic surfactants in the control of zoospore spread of *Pythium aphanidermatum* in a recirculating hydroponic system. Plant. Dis. 80: 422- 428.
- 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., Chainguthai, T., Sangvanich, P., Roongsawang, N., Washio, K., Morokawa, M., 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.
- Tulloch, A.P. and Spencer, J. F. T. 1968. Fermentation of long-chain compounds by *Torulopsis apicola*. IV. Products from esters and hydrocarbons with 14 and 15 carbon atoms and from methyl palmitoleate. Can. J. Chem. 46: 1523-1528.
- Tulloch, A. P., Spencer J. F. T., and Deinema, M.H. 1968. A new hydroxyl fatty acid sophoroside from *Candida bogoriensis*. Can. J. Chem. 46: 345-348.

- 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.
- Wu, J. and Ju, L. K. 1998. Extracellular particles of polymeric material formed in n-hexadecane fermentation by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Biotechnol. 59: 193-202.
- Van Bogaert, I. N. T., Saerens, K., Muynck, C. De, D. Develter, Soetaert, W., and Vandamme, E.J. 2007. Microbial production and application of sophorolipids. Appl. Microbiol. Biotechnol. 76: 23-34.
- Yakimov, M. M., Timmis, K. N., Wray, V., and Fredrickson, H. L. 1995. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. Appl Environ Microbiol. 61(5): 1706–1713.
- Yeh, M.S., Y.H. Wei, and J.S. Chang. 2006. Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*. Process Biochem. 41: 1779-1805.
- Zhou, Q. H., and Kosaric, N. 1995. Utilization of canola oil and lactose to produce biosurfactant with *Candida bombicola*. J. Am. Oil Chem. Soc. 72(1): 67-71.
- Zukerberg, A., Diver, A., Peeri, Z., Gutnick, D. L., and Rosenberg, E. 1979. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG- 1: chemical and physical properties. Appl. Environ. Microbiol. 37: 414- 420.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารแข็งจากสารสกัดยีสต์และมอลต์ (YM agar)

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

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

2. อาหารเหลวจากสารสกัดยีสต์และมอลต์ (YM broth)

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

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

3. อาหารเหลวกำหนดสูตรที่มี 8% กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

โซเดียมไนเตรท (NaNO_3)	0.4	กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.02	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.02	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	0.1	กรัม
กลูโคส (Glucose)	8.0	กรัม
น้ำกลั่น (Deionized water)	100.0	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรดต่างให้ได้ 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 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.02	กรัม
สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)	0.10	กรัม
น้ำมันถั่วเหลือง	4.00	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ผสมสารให้เข้ากัน ปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.5 นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. อาหารเหลวปรับปรุงสูตร

โซเดียมไนเตรท (NaNO_3)	0.11	%
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.02	%
แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.02	%
สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)	0.64	%
น้ำมันถั่วเหลือง	13.34	%(v/v)
กลูโคส	6.66	%
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

นี้จัดทำขึ้นด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

วิธีเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. ฟอสเฟสบัฟเฟอร์ pH 7.0

โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4) 1.50 g. ละลายในน้ำกลั่น 100 ml.

ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) 3.58 g. ละลายในน้ำกลั่น 100 ml.

ผสมทั้งสองส่วนเข้าด้วยกันแล้วปรับค่าความเป็นกรดต่างให้ได้ 7.0 จึงนำไปนิ่งมาเชื้อที่ 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. สารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8 (50 mM Tris-HCl buffer pH 8)

ทริส เบส (Tris base) 0.61 กรัม

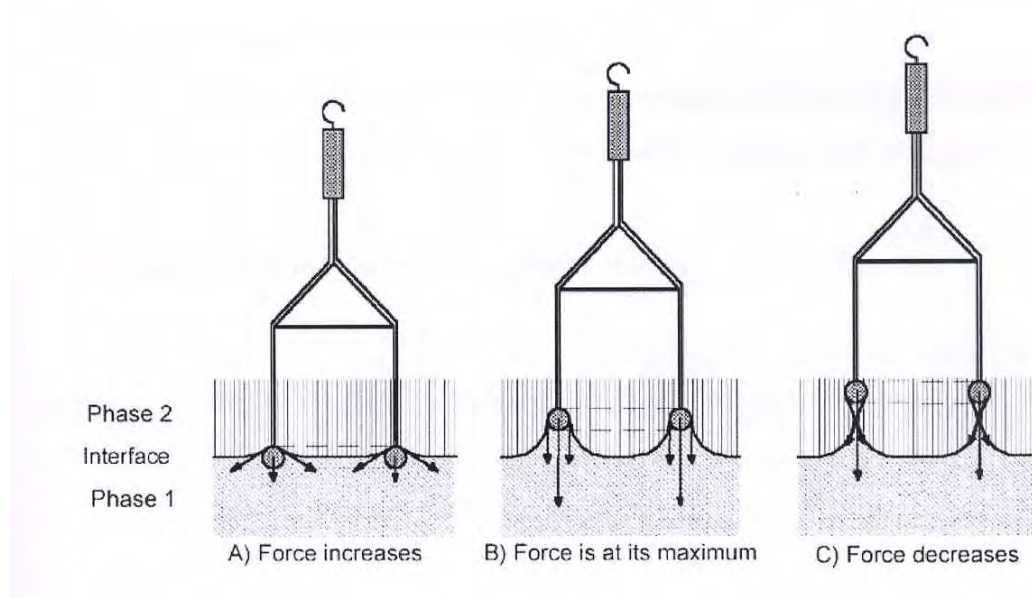
น้ำกลั่น 80 มล.

ปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น ถ้าหาต้องการทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรดต่างอื่นๆ ก็ใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นปรับให้มีค่าความเป็นกรดต่างนั้นๆ

ภาคผนวก ค

หลักการการวัดค่าแรงตึงผิวด้วยวิธี Du Nouy Ring

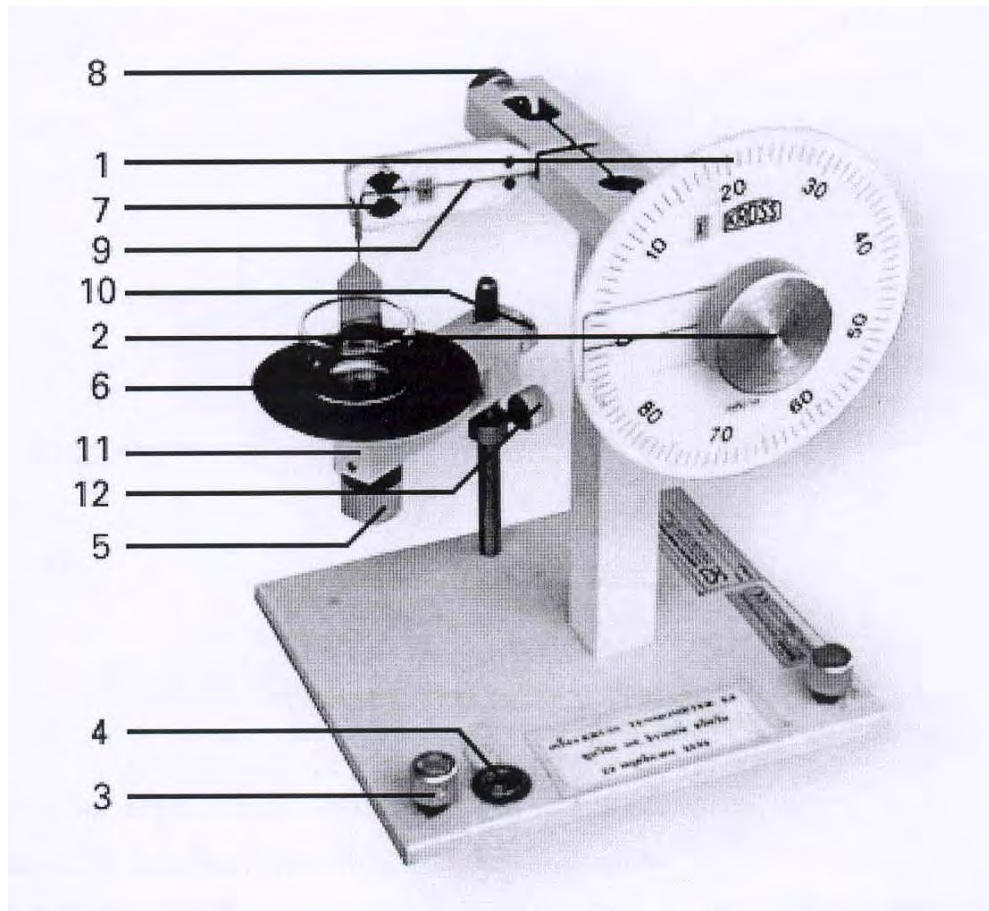
การวัดค่าแรงตึงผิวด้วยวิธี ring method หรือ Du Nouy Ring method ค้นคิดโดย Lecomte Du Nouy ในปี 1919 ซึ่งวิธีนี้จะพิจารณาวงแหวนทองคำขาว (platinum ring) ในแนวระนาบโดยวงแหวนทองคำขาวจะจมในของเหลว และถูกยกขึ้น แรงสูงสุดที่ใช้ในการดึงวงแหวนทองคำขาวของเหลว คือ ค่าแรงตึงผิว (surface tension)



ภาพแสดงขั้นตอนการวัดค่าแรงตึงผิวด้วยวิธี Du Nouy Ring

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวัดค่าแรงตึงผิว

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



แสดงองค์ประกอบของเครื่องวัดค่าแรงตึงผิวรุ่น K6 บริษัท KRUSS ประเทศเยอรมัน

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

ขั้นตอนการวัดค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่องวัดค่าแรงตึงผิว มีดังนี้

1. ปรับ handwheel with point (2) ให้สเกลมีค่าศูนย์
2. ปรับ zero adjustment (8) โดยหมุนทวนเข็มนาฬิกาให้ balance beam (9) อยู่ในตำแหน่งสมดุลกึ่งกลางของ mask (7)
3. ปรับระดับที่วางสารตัวอย่างโดยหมุน (10) แล้วยกขึ้นให้อยู่ในระดับที่ต้องการ
4. แขนวน ring ลงใน balance beam(9) ปรับให้อยู่ในตำแหน่งสมดุลโดยหมุน zero adjustment (8) ตามเข็มนาฬิกา
5. ใส่สารตัวอย่างในที่ใส่สารตัวอย่างประมาณ 10-15 มล. วางลงบน sample table (6) แล้วหมุน micrometer screw (5) ตามเข็มนาฬิกาเพื่อยกที่ใส่สารตัวอย่างขึ้นให้สัมผัสกับ ring โดยให้ ring จมอยู่ในตัวอย่างไม่น้อยกว่า 5 มม.
6. เมื่อ ring สัมผัสกับตัวอย่างแล้วอาจต้องปรับ balance (9) 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 ปรับที่วางสารตัวอย่างให้อยู่ในระดับเดิม แล้วหมุนเข้าหาตัวเครื่อง

ข้อควรระวัง

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

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวพรทิพย์ ศิริเรืองสกุล เกิดเมื่อวันที่ 30 มีนาคม พ.ศ. 2528 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ในปีการศึกษา 2549 และเข้ารับการศึกษาคือในระดับปริญญาโท สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2550 และได้ไปเผยแพร่ผลงานวิจัยในระดับนานาชาติแบบโปสเตอร์ที่การประชุม Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON 2010) จังหวัดอุบลราชธานี