



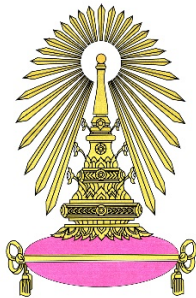
โครงการ การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Meyerozyma guilliermondii*
สายพันธุ์ CCN-6 แบบเซลล์ตรึงโดยใช้น้ำมะพร้าวเป็นแหล่งอาหาร

ชื่อนิสิต นางสาวรวิวิชญ์ ตาคำ รหัสประจำตัวนิสิต 6032346123

ภาควิชา จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Meyerozyma guilliermondii*
สายพันธุ์ CCN-6 แบบเซลล์ตรึงโดยใช้น้ำมะพร้าวเป็นแหล่งอาหาร

ชื่อนิสิต นางสาววิวิษณ์ ตาคำ เลขประจำตัว 6032346123

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ

การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Meyerozyma guilliermondii*

สายพันธุ์ CCN-6 แบบเซลล์ตรึงโดยใช้น้ำมะพร้าวเป็นแหล่งอาหาร

โดย

นางสาวรวีวิชญ์ ตาคำ รหัสนิสิต 6032346123

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2563

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงการฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงการวิทยาศาสตร์



..... หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา

(ศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ)

คณะกรรมการสอบโครงการ



..... อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.เอกวัล ลือพร้อมชัย)



..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันท์ประทีป นภทร)



..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.อรุทัย ภิญญาคง)



..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชิวานันท์ เดชอุปการ ศิริสมบุรณ์)

ชื่อโครงการ	การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก <i>Meyerozyma guilliermondii</i> สายพันธุ์ CCN-6 แบบเซลล์ตรึงโดยใช้น้ำมะพร้าวเป็นแหล่งอาหาร
นิสิตหัวหน้าโครงการ	นางสาวรวีวิชญ์ ตาคำ รหัสนิสิต 6032346123
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ	รองศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2563	

บทคัดย่อ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactants) ที่ผลิตขึ้นจากจุลินทรีย์จัดว่ามีความปลอดภัย ย่อยสลายทางชีวภาพได้ มีความเป็นพิษต่ำ และมีประสิทธิภาพภายใต้พีเอชและอุณหภูมิที่หลากหลาย อย่างไรก็ตามการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังมีข้อจำกัดด้านต้นทุนการผลิตที่สูง งานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์ที่จะนำน้ำมะพร้าวที่เป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมผลิตกะทิมาใช้ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากยีสต์ *Meyerozyma guilliermondii* สายพันธุ์ CCN-6 แบบเซลล์ตรึง ซึ่งทำให้ไม่เสียเวลาในการเตรียมเชื้อ และสามารถเพิ่มผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ โดยในเบื้องต้นงานวิจัยนี้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Bushnell Haas (BH) ที่มีกลูโคสร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่า ระยะเวลา 5 วัน มีความเหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยมีผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงสุดที่ 0.71 กรัมต่อลิตร และการเติมน้ำมันถั่วเหลือง และกลูโคส ทำให้ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มขึ้นเป็น 2.73 กรัมต่อลิตร ต่อมาได้คัดเลือกสูตรอาหารที่มีน้ำมะพร้าวเป็นองค์ประกอบหลัก โดยเปรียบเทียบกับอาหารสูตรต่างๆ คือ น้ำมะพร้าวอย่างเดียว น้ำมะพร้าวที่เติมน้ำมันถั่วเหลืองร้อยละ 2 โดยปริมาตรต่อปริมาตร และน้ำมะพร้าวที่เติมกลีเซอรอลร้อยละ 10 โดยปริมาตรต่อปริมาตร พบว่า ชุดทดลองที่ใช้น้ำมะพร้าวที่เติมน้ำมันถั่วเหลืองมีประสิทธิภาพเหมาะแก่การนำมาผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมากที่สุด โดยผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ 2.03 กรัมต่อลิตร และเมื่อทำการผลิต 2 รอบ มีปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพรวมสูงสุดเป็น 4.35 กรัมต่อลิตร แสดงว่า *M. guilliermondii* สามารถใช้อองค์ประกอบภายในน้ำมะพร้าว และน้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพนี้มีประสิทธิภาพในการกระจายคราบน้ำมันดิบชนิด BKC และ ARL เป็นร้อยละ 72 และร้อยละ 26 ตามลำดับ ในงานวิจัยนี้พบว่าประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *M. guilliermondii* จะน้อยกว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ Triton X-100 ที่ความเข้มข้น 1.5 กรัมต่อลิตร เท่ากัน ดังนั้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิว ควรผสมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดนี้กับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดอื่น นอกจากนี้ควรศึกษาโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เพื่อประโยชน์สำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆต่อไป

Project title Production of biosurfactants by immobilized *Meyerozyma guilliermondii* CCN-6 using coconut water as carbon source

Investigator Miss Ravewish Takham Student ID 6032346123

Project Advisor Assoc. Prof. Ekawan Luepromchai, Ph.D.

Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

Abstract

Biosurfactants produced by microorganisms are biodegradable, low toxicity and effective under a wide range of pH and temperature. However, the production of biosurfactants is limited due to its high cost of production. This research aims to utilize coconut water, a by-product from coconut milk industry for biosurfactant production by the immobilized *Meyerozyma guilliermondii* CCN-6, an ascomycetous yeast. Initially, this research used Bushnell Haas (BH) medium with 10% glucose. The results showed that the biosurfactant production period of 5 days was suitable with the maximum biosurfactant yield at 0.71 g/L. When soybean oil and glucose was added, the biosurfactant yield was increased to 2.73 g/L. To select the production medium containing coconut water as the main component, the study compared different media including coconut water only, coconut water with 2% v/v soybean oil and coconut water with 10% v/v glycerol. The results revealed that coconut water with 2% v/v soybean oil was the most effective for biosurfactant production with 2.03 g/L biosurfactant yield, while the accumulated biosurfactant yield after 2 production cycles was 4.35 g/L. Thus, *M. guilliermondii* used the components in coconut water and soybean oil as carbon source for growth and biosurfactant production. This biosurfactant was effective in dispersing BKC and ARL crude oil at 72% and 26% respectively. In this study, the efficiency of biosurfactant from *M. guilliermondii* was less than Triton X-100, a synthetic surfactant at the same concentrations of 1.5 g/L. To increase its efficiency on reducing surface tension, this biosurfactant should be mixed with other biosurfactants. In addition, the structure of biosurfactants should be studied for further application in various industries.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมสร้างประสบการณ์นี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความกรุณาของอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ รองศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย ที่ถ่ายทอดความรู้ ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย อีกทั้งยังช่วยตรวจทานแก้ไขโครงการฉบับนี้สมบูรณ์มากขึ้น ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณในความกรุณาของอาจารย์เป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำในด้าน ต่าง ๆ รวมถึงการใช้ชีวิตในอนาคต และให้เกียรติเป็นกรรมการในการสอบโครงการฉบับนี้

ขอขอบคุณทุนโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ จากงบประมาณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้อนุเคราะห์เงินทุนสนับสนุนงานวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ และอำนวยความสะดวกต่าง ๆ ตลอดการทำโครงการฉบับนี้

ขอขอบคุณตลาดคลองเตย สำหรับการซื้อขายน้ำมะพร้าวราคาถูก

ขอขอบคุณ นางสาวทิพย์สุดา ทรัพย์สงวน และทุกคนในห้องปฏิบัติการ 1704/14 ที่คอยให้คำปรึกษา คำแนะนำ และการช่วยเหลือต่าง ๆ ระหว่างการทำโครงการฉบับนี้

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ ภาควิชาจุลชีววิทยา รุ่นที่ 44 และพี่น้องชาวจุลชีววิทยาทุกคน ที่คอยช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้ตลอดการดำเนินโครงการนี้

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และสมาชิกในครอบครัวทุกคนรวมถึงสัตว์เลี้ยงที่น่ารัก ที่ให้การสนับสนุน ช่วยเหลือ แก้ปัญหาต่าง ๆ ตลอดจนเป็นกำลังใจสำคัญให้ผู้วิจัยเรื่อยมา

ด้วยความเคารพอย่างสูง
รวีวิษญ์ ตาคำ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูปภาพ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญสมการ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ	11
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	11
บทที่ 2 อุปกรณ์ และเคมีภัณฑ์	12
2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	12
2.2 เคมีภัณฑ์	13
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน	14
3.1 การทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	15
3.1.1 เตรียมความเข้มข้นของหัวเชื้อ <i>M. guilliermondii</i> ที่เหมาะสม	15
3.2 หาสูตรอาหารที่มีน้ำมะพร้าวเป็นองค์ประกอบหลักสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	15
3.2.1 เตรียมน้ำมะพร้าวเพื่อเป็นแหล่งอาหาร	15
3.2.2 เตรียม <i>M. guilliermondii</i> สำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิว	16
3.2.3 การตรึงยีสต์บนวัสดุสังเคราะห์ที่มีรูพรุน	17
3.2.4 การเลือกสูตรอาหารที่มีน้ำมะพร้าวเป็นองค์ประกอบหลักสำหรับผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	18
3.2.5 การผลิตสารลดแรงตึงผิวจากเชื้อ <i>M. guilliermondii</i> โดยใช้เซลล์ตรึงผลิตซ้ำ และแปรผันปริมาณน้ำตาลในอาหาร	18
3.2.6 การแยกสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่เชื้อผลิตได้	18
3.2.7 การสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	19
3.1 ทดสอบคุณสมบัติทั่วไปของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพจาก <i>M. guilliermondii</i>	19
3.3.1 วัดความสามารถในการกระจายน้ำมัน (Oil displacement)	19

บทที่ 4 ผลการทดลอง	20
4.1 การทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	20
4.1.1 เตรียมความเข้มข้นของหัวเชื้อ <i>M. guilliermondii</i> ที่เหมาะสม	20
4.1.2 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดย <i>M. guilliermondii</i>	21
4.1.2.1 ปริมาณเชื้อภายในวัสดุตั้งและน้ำเลี้ยงเชื้อ	21
4.1.2.2 ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	22
4.1.2.2.1 ช่วงเวลาที่เหมาะสมที่สุด	22
4.1.2.2.2 สารอาหารที่เหมาะสมที่สุด	22
4.2 หาสูตรอาหารที่มีน้ำมะพร้าวเป็นองค์ประกอบหลักสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	24
4.2.1 วิเคราะห์องค์ประกอบน้ำมะพร้าว	24
4.2.2 วิเคราะห์ค่าซีไอดีในแต่ละสูตรอาหารที่มีน้ำมะพร้าวเป็นองค์ประกอบ	25
4.2.3 การเลือกสูตรอาหารที่มีน้ำมะพร้าวเป็นองค์ประกอบหลักสำหรับ	25
การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	
4.2.3.1 เปรียบเทียบปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ <i>M. guilliermondii</i>	25
สายพันธุ์ CCN-6 แบบเซลล์ตรึงผลิตได้เมื่อใช้น้ำมะพร้าวเป็นองค์ประกอบหลัก	
4.2.3.2 การผลิตสารลดแรงตึงผิวจากเชื้อ <i>M. guilliermondii</i> โดยใช้เซลล์ตรึงผลิตซ้ำ	26
และแปรผันปริมาณน้ำตาลในอาหาร	
4.3 ทดสอบคุณสมบัติทั่วไปของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพจาก <i>M. guilliermondii</i>	28
4.3.1 วัดความสามารถในการกระจายน้ำมัน (Oil displacement)	28
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	30
รายการอ้างอิง	34
ภาคผนวก	42
ภาคผนวก ก	42
ภาคผนวก ข	43
ภาคผนวก ค	44

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1.1 โครงสร้างตัวอย่างกลุ่มที่สำคัญที่สุดของไกลโคไลปิด	5
รูปที่ 1.2 ตัวอย่างการใช้ประโยชน์จากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มมีน้ำหนักรวมโมเลกุลต่ำ	6
รูปที่ 1.3 <i>M. guilliermondii</i> ผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง	10
รูปที่ 3.1 แผนผังแสดงขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย	14
รูปที่ 3.2 ลักษณะน้ำมะพร้าว และแหล่งที่มาของน้ำมะพร้าว	16
รูปที่ 3.3 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ <i>Meyerozyma guilliermondii</i> สายพันธุ์ CCN-6 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด YM	17
รูปที่ 3.4 วัสดุสังเคราะห์ที่มีรูพรุนสำหรับตรึงเชื้อจุลินทรีย์ Aquaporous gel	17
รูปที่ 4.1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและปริมาณจุลินทรีย์	20
รูปที่ 4.2 ปริมาณเชื้อในระหว่างการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ Bushnell Haas (BH) ที่มีกลูโคสร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร.	21
รูปที่ 4.3 ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม	23
รูปที่ 4.4 เปรียบเทียบผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอาหารแต่ละชนิด เป็นเวลา 5 วัน	26
รูปที่ 4.5 เปรียบเทียบผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการใช้เซลล์ตรึงผลิตซ้ำเป็นเวลารอบละ 5 วัน	27
รูปที่ 4.6 เปรียบเทียบความสามารถในการกระจายน้ำมันในน้ำมันชนิด ARL	29
รูปที่ 4.7 เปรียบเทียบความสามารถในการกระจายน้ำมันในน้ำมันชนิด BKC	29

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1.1 ตัวอย่างแหล่งอาหารราคาถูกที่นำมาใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	2
ตารางที่ 1.2 การใช้น้ำมะพร้าวเป็นสารตั้งต้นเพื่อผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	4
ตารางที่ 1.3 ชนิดของสารลดแรงตึงผิวไกลโคลิปิดที่ผลิตโดยยีสต์	6
ตารางที่ 1.4 ตัวอย่างการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากยีสต์ไปใช้ประโยชน์	8
ตารางที่ 1.5 ตัวอย่างการนำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก <i>M. guilliermondii</i> ไปใช้ประโยชน์	10
ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบภายในน้ำมะพร้าว	24
ตารางที่ 4.2 ค่าซีไอดีของแต่ละสูตรอาหาร	25
ตารางที่ 4.3 ประสิทธิภาพความสามารถในการกระจายน้ำมันของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพจาก <i>M. guilliermondii</i>	28
ตารางที่ 5.1 เปรียบเทียบราคาของอาหารที่มีน้ำมะพร้าวเป็นองค์ประกอบหลักกับชุดควบคุม	31
ตารางที่ ค.1 ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Bushnell Haas(BH) ที่มีกลูโคสร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร.	44
ตารางที่ ค.2 ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเมื่อใช้อาหารที่แตกต่างกัน เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม เป็นเวลา 5 วัน.	45
ตารางที่ ค.3 ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเมื่อใช้อาหารที่มีน้ำมะพร้าวเป็นองค์ประกอบหลัก ที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 5 วัน	45
ตารางที่ ค.4 ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเมื่อใช้เซลล์ตรึงผลิตซ้ำ และแปรผันปริมาณน้ำตาลในอาหาร	46

สารบัญสมการ

หน้า

สมการที่ 3.1 คำนวณเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการกระจายน้ำมัน

19

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ

1.1.1 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้แหล่งอาหารราคาถูกลง

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์ มีโครงสร้างของโมเลกุลเป็นแบบแอมฟิพาติก (amphipathic molecules) ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่ชอบน้ำ และไม่ชอบน้ำ (hydrophilic and hydrophobic moieties) เมื่ออยู่ในสารละลาย โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวจะสะสมอยู่บริเวณผิว (surface) ของตัวทำละลาย และเกิดการลดค่าแรงตึงผิวของตัวทำละลายนั้น ทำให้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนละลายได้ในน้ำ หรือ ส่วนของน้ำละลายในสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ดีในการเป็นสารชำระล้าง (detergent) สารเกิดฟอง และการเกิดอิมัลชัน (Desai and Banat, 1997) จุลินทรีย์ต่างชนิดกันจะสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ต่างชนิดกัน ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยเช่น สภาพแวดล้อม และแหล่งอาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโต เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความเป็นพิษต่ำ ความบริสุทธิ์สูง เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม มีประสิทธิภาพที่อุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-ด่างที่หลากหลาย และสามารถย่อยสลายได้ดีในธรรมชาติ (Antoniou et al., 2015; Fodelianakis et al., 2015) โดยสารลดแรงตึงผิวของจุลินทรีย์เป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่สามารถปล่อยออกนอกเซลล์ (Extracellular biosurfactant) และติดอยู่ที่ผิวเซลล์ (Cell-bound biosurfactant) ซึ่งในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมา สารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้รับความสนใจอย่างมากในอุตสาหกรรม (Karlapudi et al., 2018; Kumar et al., 2018) แต่เนื่องจากต้องใช้ต้นทุนในการผลิตสูง เมื่อเทียบกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ จึงมีการใช้สารตั้งต้นที่มีราคาถูกลงมาปรับใช้ในการผลิตเพื่อลดต้นทุนในการผลิต (Jimoh and Lin, 2019) โดยการใช้ น้ำเสีย หรือของเสียจากอุตสาหกรรมอาหาร และการเกษตร แสดงดังตารางที่ 1.1 โดยการเลือกสารตั้งต้นที่มีราคาถูกลงมาปรับใช้ต้องเหมาะสม และมีสารอาหารที่สมดุลซึ่งจะช่วยให้เซลล์เติบโตและสะสมผลิตภัณฑ์ได้ (Makkar et al. 2011) ซึ่งชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุในสารตั้งต้นมีความสำคัญทั้งในการทดลองระดับขวดปริมาตรและถังหมักขนาดใหญ่ และจากรายงานวิจัยของ Sivapathasekaran และ Sen et al., 2017 รายงานว่า น้ำมันพืชจัดเป็นสารตั้งต้นที่ประหยัด และให้ผลกำไรสูงสุดสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวขนาดใหญ่ โดยเฉพาะสำหรับ *Pseudomonas*, *Bacillus* และ *Candida* sp. อย่างไรก็ตามไม่ได้มีเพียงแค่ต้นทุนของวัตถุดิบเท่านั้นที่ใช้สำหรับพิจารณาเลือกใช้สารตั้งต้นที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ แต่รูปแบบสารตั้งต้นที่จะใช้ (ของแข็งหรือของเหลว) ขนาดและพื้นผิวสารตั้งต้น การขนส่ง วิธีการเก็บรักษา ความพร้อมใช้งาน

ความเสถียร และความบริสุทธิ์ของแต่ละองค์ประกอบก็เป็นปัจจัยสำคัญที่ต้องพิจารณาในการเลือกใช้สารตั้งต้นที่เหมาะสมเช่นเดียวกัน

ตารางที่ 1.1 ตัวอย่างแหล่งอาหารราคาถูกที่นำมาใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

แหล่งอาหาร ราคาถูก	วิธีการใช้สารตั้งต้น และความเข้มข้น(ร้อยละ โดยน้ำหนักต่อ ปริมาตร)	จุลินทรีย์	ชนิดของ สารลดแรงตึง ผิวชีวภาพ	อ้างอิง
ของเสียน้ำมันทำอาหาร	5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DG30	แรมโนลิพิด	Zheng et al., 2011
ของเสียจากเบเกอรี่	2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain PG1	แรมโนลิพิด	Patowary et al., 2019
เปลือกแครอท	ต้มเป็นเวลา 30 นาที	<i>Bacillus subtilis</i>	อิทูริน	Paraszkiewicz. et al., 2018
ของเสียน้ำมันคาโนลา	ร้อยละ 1 และ 3 โดย ปริมาตรต่อปริมาตร	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	แรมโนลิพิด	Perez-Armendariz et al., 2019
ของเสียน้ำมันถั่วเหลือง	20 กรัมต่อลิตร	<i>Bacillus pseudomycoides</i> BS6	ไลโปเปปไทด์	Li et al., 2016
น้ำเสียแป้งมันสำปะหลัง	6	<i>Serratia marcescens</i> UCP 1549	สารลดแรงตึงผิว	Araujo et al., 2019
กลีเซอรอล	5	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	เซอแฟคติน	Cruz et al., 2018
น้ำมะพร้าว	น้ำมะพร้าวบริสุทธิ์ที่ ผ่านการกรองเส้นใย	<i>Pseudozyma antarctica</i> JCM10317	แมนโน ซิลอิทริทอล ลิพิด	Madihalli et al., 2019
ของเสียจากผลิตภัณฑ์นม	28 มิลลิตรต่อลิตร	<i>Starmerella bombicola</i> MTCC 1910	โซโฟโรลิพิด	Vidhya et al., 2015
ไขมันและของเสียจากสัตว์	100 กรัมต่อลิตร	<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214	โซโฟโรลิพิด	Minucelli et al., 2017

1.1.2 การใช้ น้ำมะพร้าวเป็นแหล่งอาหารราคาของจุลินทรีย์

ปัจจุบันความต้องการมะพร้าวทางอุตสาหกรรมมี แนวโน้มเพิ่มขึ้น เนื่องจากมีการขยายตัวด้าน อุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์มะพร้าว เช่น การผลิตกะทิเข้มข้น จากรายงานการ ประชุมสัมมนาอุตสาหกรรม มะพร้าวนานาชาติที่มาเลเซีย เมื่อปี พ.ศ. 2530 รายงานว่า กลุ่มประเทศสมาชิกขมรมมะพร้าวแห่งเอเชีย และแปซิฟิกเป็นกลุ่มประเทศที่ผลิตมะพร้าวมากที่สุดในโลก คือ ประมาณร้อยละ 85 ของผลผลิตทั่วโลก สำหรับปริมาณการผลิตมะพร้าวผลในประเทศไทยเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณการผลิตมะพร้าวผลใน ตลาดโลก พบว่า อยู่ในอันดับที่ 6 มีผลผลิตมะพร้าว 1.3 ล้านตัน คิดเป็นสัดส่วนร้อยละ 2.08 ของผลผลิต มะพร้าวทั่วโลก (FAO, 2012) อีกทั้งสถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร และคณะ, 2563 ได้รายงาน สถานการณ์การผลิตมะพร้าวในไทย ปี 2562 ไว้ว่า มีการส่งออกผลิตภัณฑ์กะทิสำเร็จรูปถึง 263,121 ตัน เป็นมูลค่าการส่งออก 12,766 ล้านบาทต่อปี ดังนั้น ในปัจจุบันหลังจากกระบวนการผลิตน้ำกะทิโดยการ คั้นเนื่องจากผลผลิตมะพร้าวจำนวนมาก ส่งผลให้น้ำมะพร้าวที่เหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตกะทิประมาณ 200,000 ตันต่อปี (Unagul et al., 2007) จึงจำเป็นต้องมีการจัดการหรือลดปริมาณน้ำมะพร้าวลง ดังนั้น จึงมีการใช้น้ำมะพร้าวเพื่อเป็นสารตั้งต้นราคาถูกเพื่อผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ แสดงดังตารางที่ 1.2 จากงานวิจัย Kantachote et al. (2017) ได้นำน้ำมะพร้าวที่ถูกทิ้งจากอุตสาหกรรมมาใช้ในกระบวนการ หมัก โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus plantarum* DW12 เพื่อเพิ่มสารอาหารและประโยชน์ต่อสุขภาพของ เครื่องดื่ม และงานวิจัย Law et al., 2011 รายงานว่า ในน้ำมะพร้าวมีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่อุดม สมบูรณ์ เหมาะกับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิต metabolite ที่หลากหลาย โดยทั้ง 2 งานวิจัยที่กล่าว มาใช้น้ำมะพร้าวสำหรับอุตสาหกรรมเครื่องดื่ม แต่ยังไม่งานวิจัยที่รายงานการใช้น้ำมะพร้าวสำหรับการ ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ดังนั้น งานวิจัยของ Madihalli et al., 2019 จึงเป็นงานวิจัยแรกที่ใช้น้ำ มะพร้าวผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ Mannosylerythritol lipids ชนิด A (MEL-A) และเมื่อเปรียบเทียบ ผลผลิตและประสิทธิภาพของ MEL-A ที่ผลิตจากน้ำมะพร้าว กับที่ผลิตจากอาหารที่ใช้ กลีเซอรอลร้อยละ 10 โดยปริมาตรต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีเกลือ และสารสกัดยีสต์เป็นสารอาหารเสริม พบว่า ปริมาณผลผลิต MEL-A จากน้ำมะพร้าวมีค่าสูงกว่าผลผลิต MEL-A จากกลีเซอรอล เนื่องจากองค์ประกอบ ของน้ำมะพร้าวมีสารอาหารที่ใช้สำหรับการเจริญครบถ้วน และมีอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนและแหล่ง ไนโตรเจนที่เหมาะสม (Madihalli et al., 2019) ด้วยเหตุนี้จึงคาดว่าจุลินทรีย์จะสามารถนำน้ำมะพร้าว ไปใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับการเจริญเติบโตเพื่อสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้

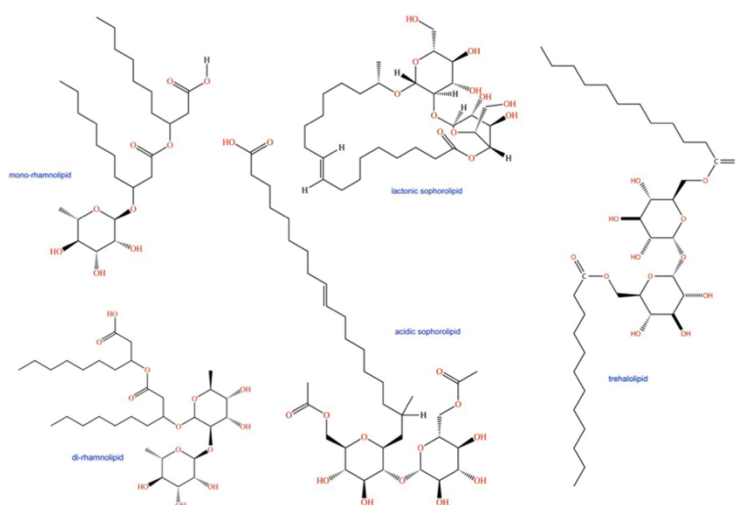
ตารางที่ 1.2 การใช้ nấmะพร้าวเป็นสารตั้งต้นเพื่อผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ชนิดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	จุลินทรีย์	การนำไปใช้ประโยชน์	อ้างอิง
Delta endotoxin	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> (VCRC B-17)	ใช้เป็น biocide เพื่อควบคุมยุงพาหะ	Prabakaran et al., 2008
γ -aminobutyric acid (GABA)	<i>Pediococcus pentosaceus</i> HN8	ใช้แทน monosodium glutamate ในผงปรุงรส	Ratanaburee et al., 2013
Astaxanthin	<i>Phaffia rhodozyma</i> TISTR 5730	สามารถใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และสารเสริมสุขภาพในมนุษย์	Sujarit C. et al., 2010
Mannosylerythritol lipids ชนิด A (MEL-A)	<i>Pseudozyma antarctica</i> JCM10317	Drug encapsulation	Madihalli et al., 2019

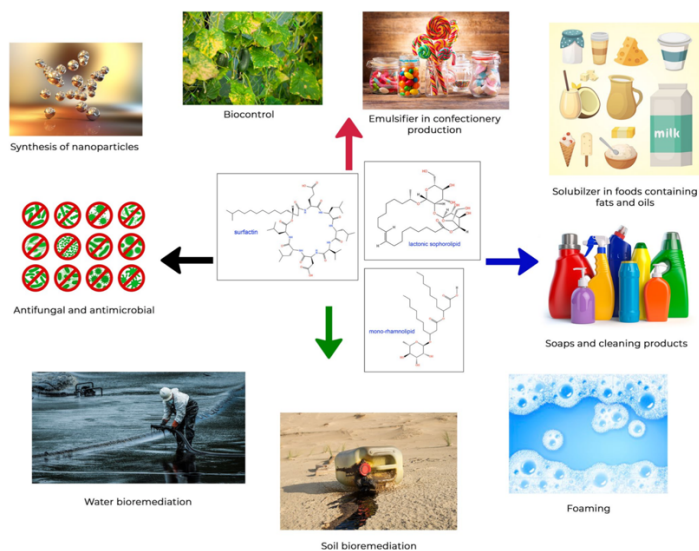
1.1.3 ชนิดและสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยยีสต์ชนิดต่าง ๆ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ได้แก่ ไกลโคลิปิดและไลโปเปปไทด์ และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ได้แก่ โพลีแซคคาไรด์และไลโปโปรตีน (Paulino et al., 2016; Santos et al., 2016; Vijayakumar และ Saravanan, 2015) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำถูกนำไปใช้ประโยชน์สูงกว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงเนื่องจากมีประสิทธิภาพภาพในการลดแรงตึงผิวสูง กลุ่มที่สำคัญที่สุดของไลโปเปปไทด์ ได้แก่ surfactins, fengycins และ iturins และกลุ่มไกลโคลิปิดที่สำคัญที่สุด ได้แก่ rhamnolipids, sophorolipids, trehalolipids และ mannosylerythritol lipids ซึ่งสารลดแรงตึงผิวส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มนี้ โดยมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต น้ำตาล เช่น rhamnose, trehalose, sucrose และ glucose เชื่อมต่อกับ long chain aliphatic acids หรือ hydroxyaliphatic acids แสดงดังรูปที่ 1.1 (ปวีณา และ อทิพันธ์, 2557) อีกทั้งไกลโคลิปิดเป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีความสำคัญที่สุดในด้านการศึกษาวิจัยและเชิงพาณิชย์ แสดงดังรูปที่ 1.2 (Bogaert et al., 2007)

ยีสต์สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้หลากหลายชนิด แสดงดังตารางที่ 1.3 อีกทั้งยังจัดเป็นจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัย (Generally Recognized as Safe, GRAS) (Fontes et al., 2008)



รูปที่ 1.1 โครงสร้างตัวอย่างกลุ่มที่สำคัญที่สุดของไกลโคไลปิด ก) โมโน แรมโนลิพิด ข) แลคโทนิค โซโฟโลลิพิด ค) ไดแรมโนลิพิด ง) แอซิดิก โซโฟโลลิพิด จ) ทรีฮาโลลิพิด (Rivera et al., 2019)



รูปที่ 1.2 ตัวอย่างการใช้ประโยชน์จากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มมีน้ำหนักรวมโมเลกุลต่ำ

(Rivera et al., 2019)

ตารางที่ 1.3 ชนิดของสารลดแรงตึงผิวไกลโคลิปิดที่ผลิตโดยยีสต์

ชนิดของสารลดแรงตึงผิวไกลโคลิปิด	สารตั้งต้น	จุลินทรีย์	Yield (กรัมต่อลิตร)	อ้างอิง
Sophorolipids	- แหล่งคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำ : น้ำหมักข้าวโพดร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก	<i>Starmerella bombicola</i> ATCC 22214	342.00	Liu et al., 2019
	- แหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำ : น้ำมันคาโนลาร้อยละ 2.7 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก			

ชนิดของสารลดแรงตึงผิวไกลโคลิปิด	สารตั้งต้น	จุลินทรีย์	Yield (กรัมต่อลิตร)	อ้างอิง
	- แหล่งคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำ : กากน้ำตาล 50 กรัมต่อลิตร	<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214	38.76	Daverey et al., 2011
	- แหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำ : น้ำเสียจากโรงงานนมและผลิตภัณฑ์นม และน้ำมันถั่วเหลือง	<i>Wickerhamiella domercqiae</i> CGMCC 1576	53.70	Liu et al., 2017
	- แหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำ : ฟางข้าวที่ผ่านกระบวนการย่อยที่มีกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร	<i>Pseudozyma antarctica</i> JCM 10317	16.30	Morita et al., 2007
Mannosylerythritol lipids	- แหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำ : กลีเซอรอลร้อยละ 10 โดยปริมาตรต่อปริมาตร			

1.1.4 การใช้ประโยชน์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากยีสต์

ปัจจุบันผู้คนตระหนักถึงผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมมากขึ้นทำให้ความต้องการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไปใช้ในผลิตภัณฑ์ใหม่เพิ่มมากขึ้น เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจัดเป็นสารที่มีประสิทธิภาพที่อ่อนนุ่มและค่าความเป็นกรด-ด่างที่หลากหลาย เหมาะแก่การนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ (Souza et al., 2017) และจากการคาดการณ์ คาดว่าภายในปี 2020 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะสามารถสร้างมูลค่าได้มากกว่า 2 พันล้านเหรียญสหรัฐ ในการฟื้นฟูน้ำมันด้วยจุลินทรีย์, การกำจัดคาร์บอนเปื้อนของโลหะหนัก, การบำบัดทางชีวภาพ, อุตสาหกรรมอาหาร, อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง, อุตสาหกรรมยา และนาโนเทคโนโลยี (Sarubbo et al., 2016) ดังนั้นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจึงมีบทบาทหลากหลายในอุตสาหกรรม ยกตัวอย่างดังตารางที่ 1.4

ตารางที่ 1.4 ตัวอย่างการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากยีสต์ไปใช้ประโยชน์

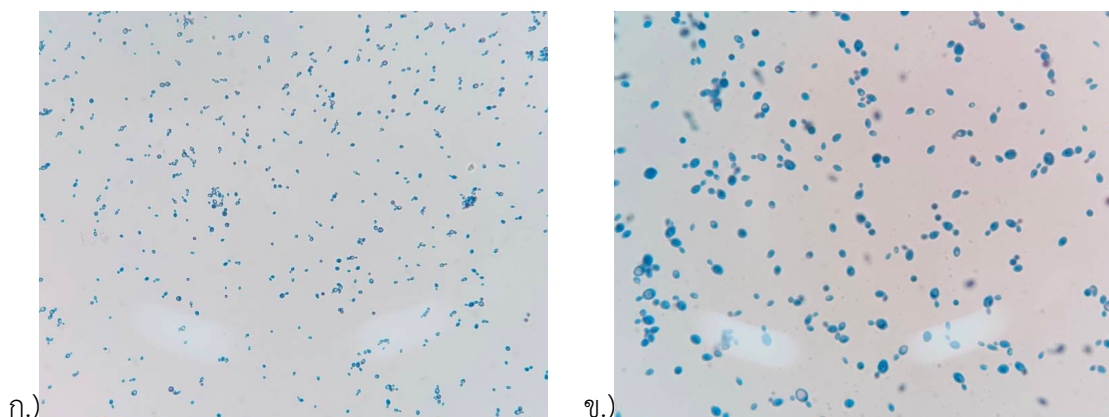
อุตสาหกรรม	ชนิดของยีสต์	ชนิดสารลดแรงตึงผิว	การประยุกต์ใช้	อ้างอิง
การบำบัดทางชีวภาพ	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> Stain YBR	ไกลโคไลโพโปรตีน	ส่งเสริมการบำบัดน้ำมันที่ปนเปื้อนในทราย	Derguine-Mecheri et al., 2021
การแพทย์	<i>Pseudozyma antarctica</i> JCM10317	แมนโนซิลอิทริทอลลิพิด	ส่งเสริมการบรรจุยาในกระบวนการขนส่งยา	Madihalli et al., 2019
การเกษตร	<i>Wickerhamomyces anomalus</i> CCMA 0358	ไกลโคไลพิด	ยับยั้งการเจริญของตัวอ่อนแมลงและรา	Andrade Teixeira Fernandes et al., 2019
อาหาร	<i>Candida utilis</i> UFPEDA1009	ไกลโคไลพิด	ใช้เป็นส่วนประกอบในสูตรคุกกี้เพื่อปรับปรุงเนื้อสัมผัส ปริมาตร และความคงตัวหลังการอบ	Ribeiro et al., 2020

1.1.5 บทบาทของ *Meyerozyma guilliermondii* ในอุตสาหกรรม

Meyerozyma guilliermondii (แสดงดังรูปที่ 5.1) เป็นยีสต์ที่อยู่ในกลุ่ม ascomycetous yeast ซึ่งมีคุณสมบัติทางเคมี และกายภาพที่เด่นหลายหลากประการ โดย *M. guilliermondii* กระจายอยู่ทั่วไปในธรรมชาติ ส่วนใหญ่จะสามารถแยกได้จากดิน พืช น้ำ และอากาศ (Sibirny, 1996; Zharova et al., 1980; Zharova et al., 1977) เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญในภาวะที่มีออกซิเจนทั่วไป ซึ่งไม่สามารถเจริญได้ในภาวะไร้ออกซิเจน อุณหภูมิการเจริญเติบโตที่เหมาะสมของยีสต์ชนิดนี้คือ 30 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุดที่สามารถทนได้คือ 42 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับยีสต์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมชนิดอื่น ๆ และสามารถเพาะเลี้ยงได้ได้ในอาหารสำหรับเลี้ยงยีสต์มาตรฐาน (Sibirny, 1996) ถึงแม้ว่า *M. guilliermondii* ได้ถูกจัดว่าเป็นสิ่งมีชีวิตที่ปลอดภัย และมีความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ 1 แต่ก็สามารถเกิดโอกาสเป็นเชื้อโรคที่ฉวยโอกาสในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องได้ (Pfaller et al. 2006) นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้ *M. guilliermondii* ในอุตสาหกรรมเป็นวงกว้าง แสดงดังตารางที่ 1.5 เนื่องจาก *M. guilliermondii* เป็นจุลินทรีย์ต้นแบบสำหรับการผลิตไรโบฟลาวินที่มากเกินไป (riboflavin overproduction) (Abbas and Sibirny, 2011; Sibirny et al., 1977) และยังเป็นหนึ่งในยีสต์ที่เหมาะสมสำหรับการเปลี่ยนรูปของไซลิทอลซึ่งเป็นสารให้ความหวานจากธรรมชาติที่ดีต่อสุขภาพ (Canettieri et al., 2001; Carvalho et al., 2002) นอกจากนี้ *M. guilliermondii* ยังมีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์อุตสาหกรรมบางชนิด (Gong et al., 2007; Cai et al., 2018; Wah et al., 2013) สายพันธุ์ *M. guilliermondii* บางสายพันธุ์ยังมีการควบคุมทางชีวภาพของเชื้อราหลังการเก็บเกี่ยวในระหว่างการรักษาเก็บผักและผลไม้ที่มีประสิทธิภาพ อีกทั้งการควบคุมทางชีวภาพของยีสต์นี้ได้กลายเป็นทางเลือกที่มีแนวโน้มในการป้องกันและลดการสูญเสียการเน่าของผลิตภัณฑ์ที่เก็บเกี่ยวมากกว่าการใช้ยาฆ่าเชื้อรา (Zhang et al., 2011) และในอนาคต *M. guilliermondii* จะสามารถประยุกต์ใช้ในเทคโนโลยีชีวภาพใหม่ๆ ได้มากมาย

อย่างไรก็ตามยังไม่มีงานวิจัยที่ใช้ *M. guilliermondii* ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้สารตั้งต้นราคาถูก ดังนั้น โครงการวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อหาอาหารที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และลดต้นทุนของการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยเปรียบเทียบระหว่างน้ำมะพร้าว น้ำมะพร้าวที่เติมน้ำมันพืช และน้ำมะพร้าวที่เติมกลีเซอรอล โดยใช้ *M. guilliermondii* สายพันธุ์ CCN-6 ที่คัดแยกได้จากกากปืบมะพร้าว โดยนางสาวนัชพร สุริยะ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย การผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพจะเริ่มจากการนำยีสต์นี้มาตรึงบนวัสดุสังเคราะห์ที่มีรูพรุน (cubic sponges) จากงานวิจัยก่อนหน้า Subsanguan et al., 2020 ที่มีการใช้วัสดุสังเคราะห์ที่มีรูพรุนมาใช้ร่วมกับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ รายงานว่า สามารถนำวัสดุสังเคราะห์ที่มีรูพรุนมาใช้ซ้ำได้สูงสุดถึง 9 รอบ โดยเตรียมหัวเชื้อสำหรับผลิตเพียงรอบเดียว และสามารถผลิตสารลดแรง

ตั้งผิวชีวภาพได้สูงสุดถึง 3.45 กรัมต่อลิตรเมื่อทราบอาหารที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ แล้ว นำมาทดสอบคุณสมบัติทั่วไปของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ คือ ค่าแรงตึงผิว, ค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์, ความสามารถในการกระจายน้ำมัน และค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน



รูปที่ 1.3 *M. guilliermondii* ผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light Microscope)

โดย ก.) กำลังขยาย 400 เท่า ข.) กำลังขยาย 1000 เท่า (รวิวิชญ์ ตาคำ., 2564)

ตารางที่ 1.5 ตัวอย่างการนำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *M. guilliermondii* ไปใช้ประโยชน์

ชนิดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	แหล่งคาร์บอน	การประยุกต์ใช้	Yield (กรัมต่อลิตร)	อ้างอิง
Organic acid	น้ำตาล กลูโคส	ผลิต Indole-3-acetic acid (IAA) เป็นฮอร์โมนพืชในกลุ่มออกซิน (Auxins) เพื่อใช้ในการส่งเสริมการเจริญของพืช	0.041	Ling et al., 2019
	กลีเซอรอล	ผลิต citric acid (CA)	10.4	West et al., 2013
Polyalcohols	น้ำตาล กลูโคส และ ไซโลส	ผลิตไซลิทอล โดยใช้กลูโคส และไซโลสเป็นสารตั้งต้น เพื่อใช้เป็นสารให้ความหวานจากธรรมชาติที่ดีต่อสุขภาพ	7	Clara Vida et al., 2019
Biocontrol	-	ยับยั้ง <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ที่ก่อให้เกิดโรค Anthracnose ในมะม่วง	-	Chen et al., 2016
	-	ยับยั้ง <i>Penicillium expansum</i> ที่ก่อให้เกิดโรค Blue mold ในเลมอน	-	Bilal and Huseyin et al., 2019

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 1.2.1 เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดย *M. guilliermondii*
- 1.2.2 เพื่อหาสูตรอาหารที่มีน้ำมะพร้าวเป็นองค์ประกอบหลักสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดย *M. guilliermondii*
- 1.2.3 เพื่อทดสอบคุณสมบัติทั่วไปของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพจาก *M. guilliermondii*

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.3.1 สามารถนำน้ำมะพร้าวมาเป็นแหล่งอาหารสำหรับผลิตสารลดแรงตึงผิวได้อย่างมีประสิทธิภาพ

บทที่ 2

อุปกรณ์ และเคมีภัณฑ์

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. วัสดุสังเคราะห์ที่มีรูพรุน (Aquaporous gel, Cubic sponges) ของบริษัท GSI Creos, Thailand
2. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ของบริษัท PYREX, USA
3. กระบอกเซนติฟิวจ์ (Centrifuge ware) ของบริษัท Nalgene, USA
4. ขวดแก้วฝาเกลียว (Vial) ของบริษัท Lab System, Thailand
5. ไมโครปิเปต (Micropipette) ของบริษัท Eppendorf, Thailand
6. เครื่องชั่งหยาบ (Laboratory balance) รุ่น PG 2002-S และรุ่น PG 6002-S ของบริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
7. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (Analytical balance) และรุ่น AG 285 ของบริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
8. เครื่องคนแม่เหล็ก หรือเครื่องระเหยสาร (Magnetic Stirrer) รุ่น HS10-2 ของบริษัท Torrey pines Scientific, USA
9. เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น Innova 2100 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co., Edison, N.J., USA
10. เครื่องล้างทำความสะอาดด้วยคลื่นอัลตราโซนิก (Elmasonic E Ultrasonic Cleaning รุ่น E30H), Germany
11. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated micro-centrifuge) รุ่น 6500 ของบริษัท Kubota, Japan
12. เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific industries, USA
13. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง รุ่น MP125 ของบริษัท Mettler Toledo Co.,Ltd., Switzerland
14. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Genesys 20 ของบริษัท Thermo Scientific, USA
15. เตาย่อยสาร (COD reactor) ของบริษัท HACH, USA
16. เครื่องวัดค่าซีโอดี ของบริษัท Hanna instruments, Italy
17. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) ของบริษัท PYREX, USA
18. ตู้ดูดควัน (Fumehood) รุ่น Airone 12009s ของบริษัท Safelab systems, England
19. ตู้ปลอดเชื้อแบบ laminar flow ISSCO รุ่น BV-124 ของบริษัท International Scientific Supply Co., Ltd., Thailand

20. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น BE 800 ของบริษัท Memmert, Germany
21. ตู้อบแห้ง (Hot air oven) รุ่น Series 5 ของบริษัท Contherm Scientific Ltd., New Zealand
22. หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น ES-315 ของบริษัท Tomy Kogyo Co.,Ltd., Japan และรุ่น HV- ของบริษัท HIRAYAMA, Japan
23. ตู้แช่เย็น (Refrigerated showcase) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส รุ่น SPE-0753D11A ของบริษัท Sanden Intercool, Thailand
24. เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Rotary vacuum evaporator) รุ่น R-300 ของบริษัท BUCHI, Switzerland

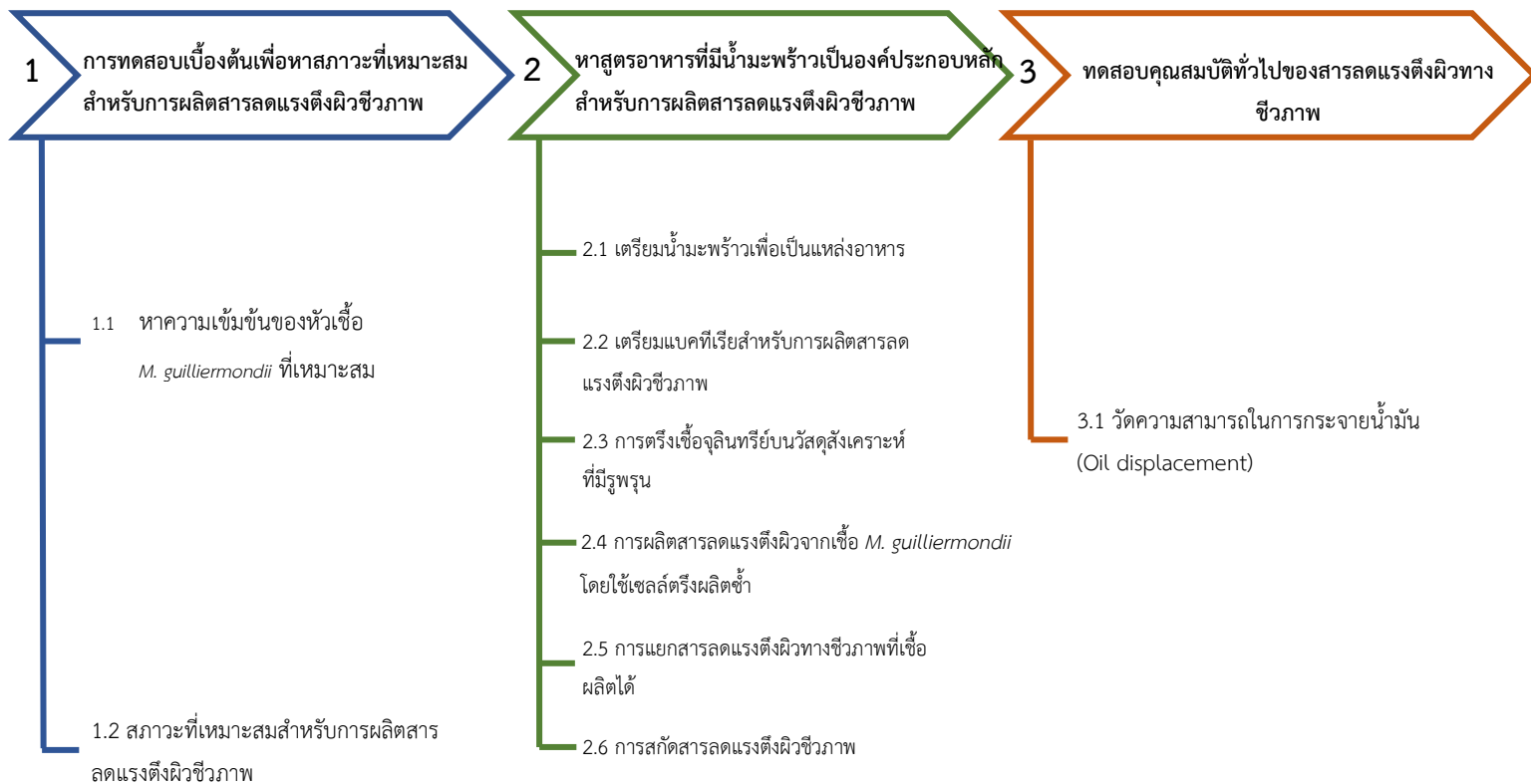
2.2 เคมีภัณฑ์

1. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany
2. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB (Luria-Bertani) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
3. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yeast malt extract ของบริษัท HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India
4. แบคโตอะการ์ (Bacto agar) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
5. น้ำมันถั่วเหลือง ตรารุ่ง, Thailand
6. คลอโรฟอร์ม (Chloroform) ของบริษัท RCI Labscan, Thailand
7. เมทานอล (Methanol) ของบริษัท E. Merk, Dramstadt, Germany
8. โซเดียมไนเตรท (Sodium nitrate) ของบริษัท VWR chemicals, Belgium
9. โพแทสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท VWR chemicals, Belgium
10. ไดโพแทสเซียม ไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ของบริษัท Merck, Germany
11. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ของบริษัท E. Merk, Dramstadt, Germany
12. แมกนีเซียมซัลเฟต เฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Merck, Germany
13. แคลเซียมคลอไรด์ ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Merck, Germany
14. เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Ajax Finechem Pty Ltd., New Zealand
15. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (35% w/w) ของบริษัท E. Merk, Dramstadt, Germany
16. กรดฟอสฟอริก ของบริษัท E. Merk, Dramstadt, Germany
17. วานิลลิน (Vanillin) ของบริษัท E. Merk, Dramstadt, Germany
18. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท E. Merk, Dramstadt, Germany
19. Coomassie Brilliant Blue G ของบริษัท Sigma Chemical Co., USA
20. ชุดทดสอบค่าซีโอดี ของบริษัท Hanna instruments, Italy
21. น้ำมะพร้าว จากตลาดคลองเตย กรุงเทพมหานคร, Thailand

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงาน

งานวิจัยนี้มีแผนผังแสดงขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย ดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แผนผังแสดงขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.1 การทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดย

M. guilliermondii

3.1.1 เตรียมความเข้มข้นของหัวเชื้อ *M. guilliermondii* ที่เหมาะสม

นำเชื้อ *M. guilliermondii* ที่คัดแยกได้จากกากบีบมะพร้าว โดยนางสาววันนัชพร สุริยะ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเก็บรักษาเชื้อในกลีเซอรอล ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ต่อมาลงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (Yeast malt broth (กรัมต่อลิตร) ; เปปโตน 5.0 สารสกัดจากยีสต์ 3.0 สารสกัดจากมอลต์ 3.0 และเดกซ์โตรส 10.0) ที่เตรียมใน Erlenmeyer flasks ขนาด 250 มิลลิลิตร เพื่อเตรียมเป็นหัวเชื้อ นำไปบ่มแบบเขย่าบนเครื่องเขย่าสาร ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 16 ชั่วโมง (บุญยานุช สุภัทรกุล, 2018) เจือจางหัวเชื้อให้มีค่าการดูดกลืนแสงเป็น 2.0, 1.8, 1.6, 1.4, 1.2, 1.0, 0.8, 0.6, 0.4 และ 0.2 วัดด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และวัดปริมาณจุลินทรีย์แต่ละค่าการดูดกลืนแสงโดยวิธี drop plate จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและปริมาณจุลินทรีย์ เพื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นของหัวเชื้อ *M. guilliermondii* ที่เหมาะสม

3.1.2 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดย *M. guilliermondii*

ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จากข้อ 3.2.2 – 3.2.4 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Bushnell Haas (BH) ที่มี กลูโคส ร้อยละ 10 (Bushnell Haas medium (กรัมต่อลิตร) ; $MgSO_4$ 0.2 $CaCl_2$ 0.02 KH_2PO_4 1.0 K_2HPO_4 1.0 NH_4NO_3 1.0 และ $FeCl_3$ 0.05)(Sen et al., 2017) บ่มบนเครื่องเขย่าสารที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง โดยเก็บตัวอย่างวัสดุตั้งและน้ำเลี้ยงเชื้อ และผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในแต่ละวันจนครบ 5 วัน จากนั้นสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อภายในวัสดุตั้งและน้ำเลี้ยงเชื้อ ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกับจำนวนวันที่ใช้สำหรับผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เพื่อวิเคราะห์สภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ ความเข้มข้นหัวเชื้อเริ่มต้น สารอาหาร และช่วงเวลาสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.2 หาสูตรอาหารที่มีน้ำมะพร้าวเป็นองค์ประกอบหลักสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดย

Meyerozyma guilliermondii

3.2.1 เตรียมน้ำมะพร้าวเพื่อเป็นแหล่งอาหาร

นำน้ำมะพร้าวจากจากร้านผลิตกะทิคั้นสด แสดงดังรูปที่ 3.2 มากรองผ่านผ้าฝ้ายมัดลินเพื่อกำจัดกากใยและสิ่งรบกวนออก จากนั้นทำให้ปลอดเชื้อ โดยใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 ปอนด์ เป็นเวลา 20 นาที และแบ่งส่วนหนึ่งเพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมะพร้าว ได้แก่ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด,

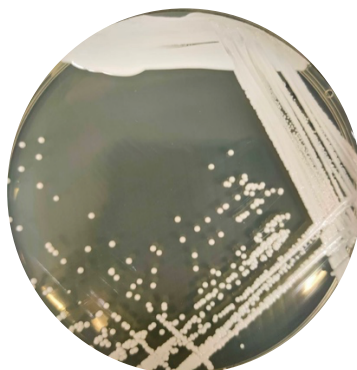
แหล่งไนโตรเจนและโปรตีน, ใ้ของแข็ง และแร่ธาตุในน้ำมะพร้าว (Madihalli *et al.*, 2019) ณ ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.2 ลักษณะน้ำมะพร้าว และแหล่งที่มาของน้ำมะพร้าว

3.2.2 เตรียม *M. guilliermondii* สำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิว

ใช้เชื้อ *M. guilliermondii* มาซิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด YM (Yeast malt agar (กรัมต่อลิตร) ; เปปโตน 5.0 สารสกัดจากยีสต์ 3.0 สารสกัดจากมอลต์ 3.0 เดกซ์โตรส 10.0 และ agar ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน (Boelter *et al.*, 2018) จากนั้นนำไปถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่เตรียมใน Erlenmeyer flasks ขนาด 250 มิลลิลิตร เพื่อเตรียมเป็นหัวเชื้อ นำไปบ่มแบบเขย่าบนเครื่องเขย่าสารที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (บุญยานุช สุภัทรกุล, 2018) เท่ากับ 2 จากการวิเคราะห์ในข้อ 3.1.1



รูปที่ 3.3 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Meyerozyma guilliermondii* สายพันธุ์ CCN-6
ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด YM

3.2.3 การตรึงยีสต์บนวัสดุสังเคราะห์ที่มีรูพรุน

นำวัสดุสังเคราะห์ที่มีรูพรุนสำหรับตรึงเชื้อจุลินทรีย์จากบริษัท Nisshinbo ที่มีชื่อทางการค้า คือ Aquaporous gel ที่มีรูพรุน และความคงตัวสูง มาใช้โดยนำวัสดุสังเคราะห์ที่มีรูพรุน 1.8 กรัม ใส่ลงใน Erlenmeyer flasks ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และถ่ายหัวเชื้อยีสต์จากข้อ 3.2.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงไป จากนั้นนำไปบ่มแบบเขย่าบนเครื่องเขย่าสารที่ ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (Subsangan et al., 2020)



รูปที่ 3.4 วัสดุสังเคราะห์ที่มีรูพรุนสำหรับตรึงเชื้อจุลินทรีย์ Aquaporous gel

3.2.4 การเลือกสูตรอาหารที่มีน้ำมะพร้าวเป็นองค์ประกอบหลักสำหรับผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยเปลี่ยนจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM จากข้อ 3.2.3 เป็นอาหารใหม่ 3 สภาวะ คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ Bushnell Haas (BH) ที่มีกลูโคสร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ชุดควบคุม) (Sen et al., 2017) น้ำมะพร้าว น้ำมะพร้าวที่เติมน้ำมันถั่วเหลืองร้อยละ 2 โดยปริมาตรต่อปริมาตร (Laorrattanasak et al., 2016) และน้ำมะพร้าวที่เติมกลีเซอรอลร้อยละ 10 โดยปริมาตรต่อปริมาตร (Morita et al., 2007) เพื่อเปรียบเทียบการใช้แหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพระหว่าง น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble carbon source) และกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำ (soluble carbon source) จากนั้นนำไปบ่มแบบเขย่าบนเครื่องเขย่าสารที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง เก็บส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อเพื่อเตรียมไปสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.2.5 การผลิตสารลดแรงตึงผิวจากเชื้อ *M. guilliermondii* โดยใช้เซลล์ตรึงผลิตซ้ำ และแปรผันปริมาณน้ำตาลในอาหาร

ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยเปลี่ยนจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM จากข้อ 3.2.3 เป็นอาหารใหม่ 3 สภาวะ คือ น้ำมะพร้าวไม่เติมน้ำตาลกลูโคส และน้ำมะพร้าวที่เติมน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 0.5 และ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ เพื่อปริมาณน้ำตาลในน้ำมะพร้าวที่เติมน้ำมันถั่วเหลืองควบคู่กับการผลิตสารลดแรงตึงผิว จากนั้นนำไปบ่มแบบเขย่าบนเครื่องเขย่าสารที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง เก็บส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อเพื่อเตรียมไปสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

หลังจากนั้นทำการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพซ้ำโดยเติมอาหารสภาวะเดิม 100 มิลลิลิตร ใส่ในขวดเดิมที่มีส่วนวัสดุสังเคราะห์ที่มีรูพรุน นำไปบ่มบนเครื่องเขย่า ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเก็บส่วนน้ำเลี้ยงมาสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (บุญยานุช สุภัทรกุล, 2018)

3.2.6 การแยกสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่เชื้อผลิตได้

นำส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ในแต่ละรอบการผลิตมาปั่นเหวี่ยง 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนน้ำใสที่มีสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดปล่อยออกนอกเซลล์เพื่อเตรียมในขั้นสกัด (บุญยานุช สุภัทรกุล, 2018)

3.2.7 การสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ในส่วนของมะพร้าวที่เติมน้ำมันถั่วเหลืองต้องนำส่วนน้ำใสจากข้อ 3.2.5 ที่มีสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดปล่อยออกนอกเซลล์มาสกัดน้ำมัน โดยนำมาใส่ในกรวยแยกแล้วเติมเฮกเซน (Hexane) ร้อยละ 5 โดยปริมาตรต่อปริมาตร จากนั้นเก็บส่วนชั้นน้ำด้านล่างเพื่อเตรียมสกัดสารลดแรงตึงผิว

ในขั้นตอนการสกัดเริ่มจาก นำส่วนน้ำใสที่มีสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดปล่อยออกนอกเซลล์ที่ผ่านการสกัดน้ำมันมาปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้มีค่าเท่ากับ 2 จากนั้นเติมสารละลายคลอโรฟอร์มและเมทานอล อัตราส่วน 2:1 ในอัตราส่วน 1:1 และนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าสารที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปแยกในกรวยแยกสาร (Separatory funnel) ไซส์ส่วนล่างเก็บใน Erlenmeyer flasks ขนาด 150 มิลลิลิตร นำไประเหยจนแห้งและชะสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพด้วยเมทานอล ลงในกระตังยงฟอยล์ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน นำไปอบข้ามคืนที่ 50 องศาเซลเซียส (บุญยานุช สุภัทรกุล, 2018) แล้วนำมาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งละเอียดเพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในแต่ละสภาวะ โดยการเลือกชนิดอาหารที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้มีประสิทธิภาพที่สุด จะพิจารณาจาก ปริมาณ biosurfactant yield ต่อปริมาณซัพสเตรทที่ใช้ (กรัมต่อกรัม) จากการวัดค่าซีไอดีหรือค่าของปริมาณออกซิเจนทั้งหมดที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอินทรีย์ , ความสะดวกในขั้นตอนการเตรียมอาหาร, การนำซัพสเตรทที่ใช้แล้วไปใช้ประโยชน์, สัดส่วนของเงินทุนกับผลผลิตที่ได้ และองค์ประกอบในแต่ละซัพสเตรท

3.3 ทดสอบคุณสมบัติทั่วไปของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพจาก *M. guilliermondii*

3.3.1 วัดความสามารถในการกระจายน้ำมัน (Oil displacement)

หยดน้ำมันดิบปริมาตร 20 ไมโครลิตร ตรงกลางจานเพาะเชื้อที่มีน้ำกลั่นอยู่ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นหยดสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพสกัดหยาบความเข้มข้น 1.5 กรัมต่อลิตร 20 ไมโครลิตร ลงตรงกลางจานเพาะเชื้อแล้ววัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดขึ้น (เพ็ญญา บุญจริง, 2015) โดยเปรียบเทียบกับ Triton X-100 ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ โดยคำนวณจาก

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความสามารถในการกระจายน้ำมัน} = \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของการกระจายของสารลดแรงตึงผิว}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของการกระจายตัวของน้ำมัน}} \times 100$$

สมการที่ 3.1 คำนวณเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการกระจายน้ำมัน

บทที่ 4

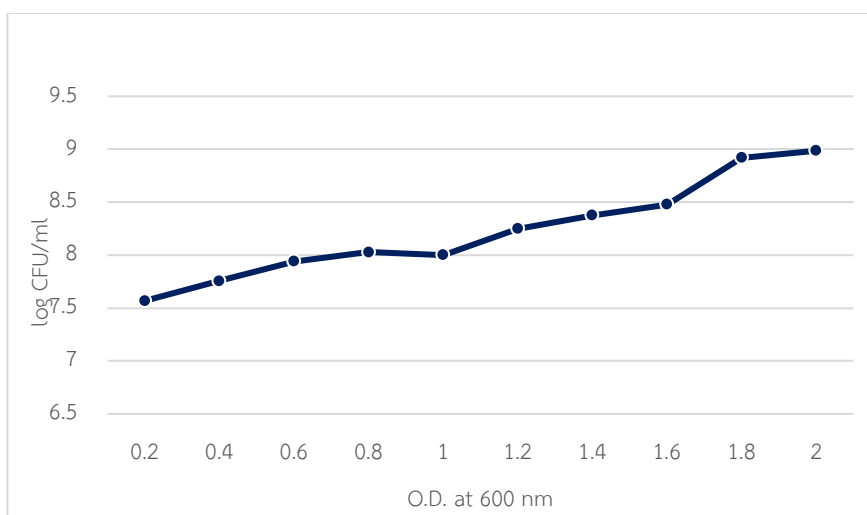
ผลการทดลอง

4.1 การทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดย

M. guilliermondii

4.1.1 เตรียมความเข้มข้นของหัวเชื้อ *M. guilliermondii* ที่เหมาะสม

จากกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและปริมาณจุลินทรีย์ แสดงดังรูปที่ 4.1 พบว่า เชื้อมีแนวโน้มการเจริญเพิ่มขึ้น เมื่อค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น โดยมีปริมาณจุลินทรีย์ต่ำสุด CFU log 7.56 ต่อมิลลิลิตร ที่ค่าการดูดกลืนแสงเป็น 0.2 และสูงสุดที่ CFU log 8.98 ต่อ มิลลิลิตร ที่ค่าการดูดกลืนแสงเป็น 2 โดยใช้ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ดังนั้น ความเข้มข้นของหัวเชื้อ *M. guilliermondii* ที่มีค่าการดูดกลืนแสงเป็น 2 จึงเหมาะสมในการใช้เป็นความเข้มข้นตั้งต้นสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เนื่องจากมีปริมาณเชื้อจำนวนมาก ซึ่งจะส่งผลการต่อการผลิตที่มีประสิทธิภาพด้วยเช่นกัน



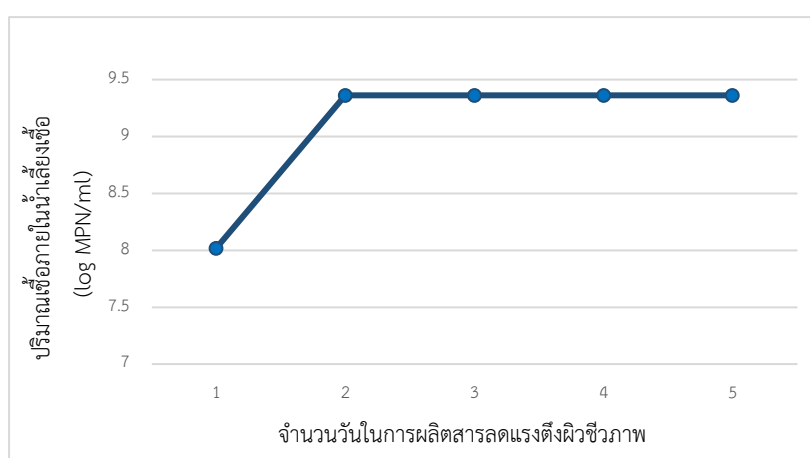
รูปที่ 4.1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและปริมาณจุลินทรีย์

4.1.2 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดย *M. guilliermondii*

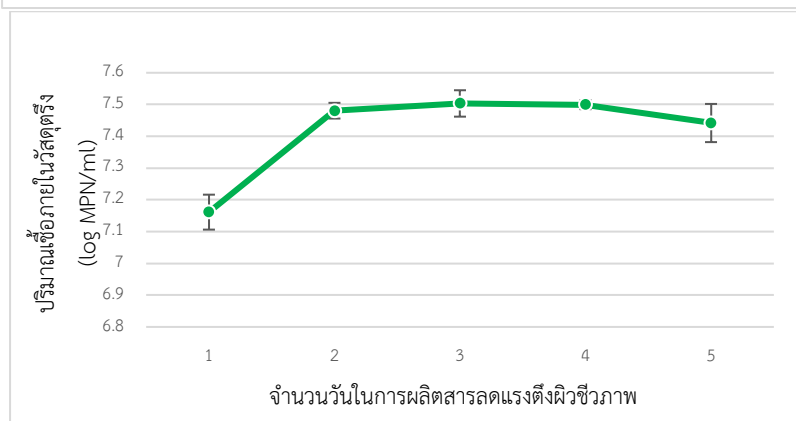
4.1.2.1 ปริมาณเชื้อภายในวัสดุตั้งและน้ำเลี้ยงเชื้อ

จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อภายในวัสดุตั้งและน้ำเลี้ยงเชื้อ กับเวลาในการผลิต (รูปที่ 4.2) มีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นที่ใกล้เคียงกันเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น โดยปริมาณเชื้อภายในน้ำเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นจาก log 8.02 MPN ต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 1 เป็น log 9.36 MPN ต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 2 และคงที่จนถึงวันที่ 5 ของการผลิต (รูปที่ 4.2 ก) เช่นเดียวกันปริมาณเชื้อภายในวัสดุตั้งที่เพิ่มขึ้นจาก log 7.16 MPN ต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 1 เป็น log 7.48 MPN ต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 2 และคงที่ในปริมาณที่ใกล้เคียงกันเฉลี่ยประมาณ log 7.48 MPN ต่อมิลลิลิตร จนถึงวันที่ 5 ของการผลิต (รูปที่ 4.2 ข)

ก.)



ข.)



รูปที่ 4.2 ปริมาณเชื้อในระหว่างการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Bushnell Haas (BH) ที่มีกลูโคสร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

ก.) ปริมาณเชื้อภายในวัสดุตั้ง

ข.) ปริมาณเชื้อภายในน้ำเลี้ยงเชื้อ

4.1.2.2 ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

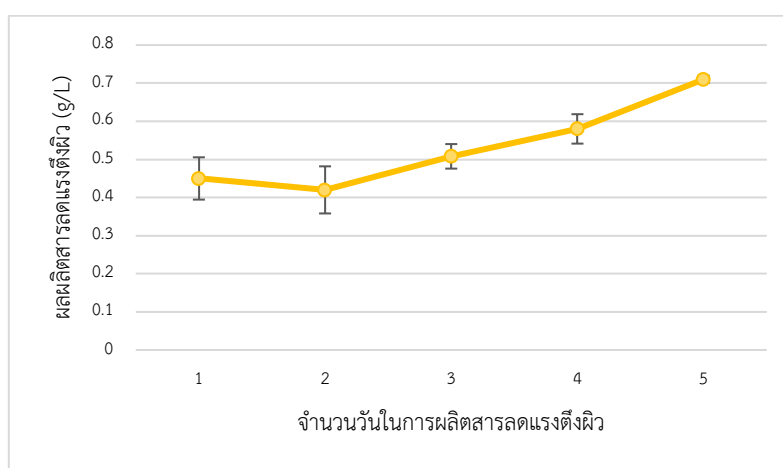
4.1.2.2.1 ช่วงเวลาที่เหมาะสม

ในส่วนของผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Bushnell Haas (BH) ที่มีกลูโคสร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นเวลา 5 วัน จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกับจำนวนวันที่ใช้สำหรับผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (รูปที่ 4.3 ก) พบว่า ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มขึ้น โดยอยู่ในช่วงตั้งแต่ 0.45-0.71 กรัมต่อลิตร และมีค่าสูงสุด ณ วันที่ 5 เป็น 0.71 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นค่าที่ค่อนข้างต่ำในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

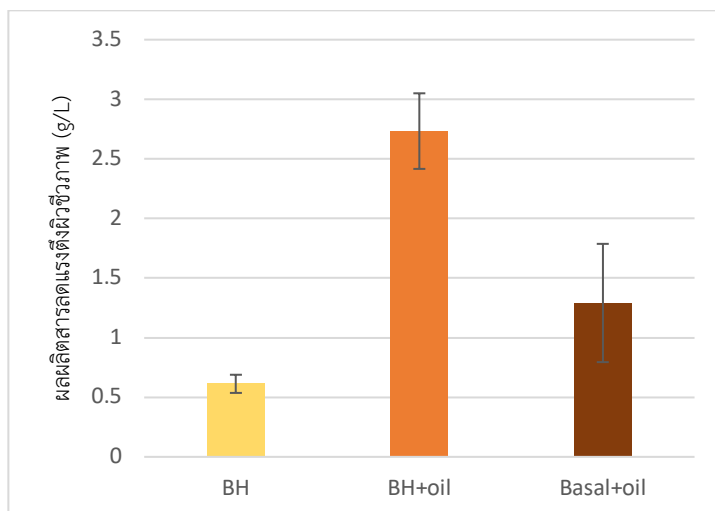
4.1.2.2.2 สารอาหารที่เหมาะสม

เมื่อเติมน้ำมันถั่วเหลืองที่เป็นแหล่งคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำร้อยละ 2 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Bushnell Haas (BH) ที่มีที่มีกลูโคสร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่า ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงสุดที่ 2.73 กรัมต่อลิตร ซึ่งเพิ่มขึ้นถึง 4.46 เท่าเมื่อเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ Bushnell Haas (BH) ที่มีที่มีกลูโคสร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมน้ำมันถั่วเหลือง Bushnell Haas (BH) ที่มีที่มีกลูโคสร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรกับอาหารเลี้ยงเชื้อเบซัลซึ่งเป็นอาหารที่ไม่มืองค์ประกอบของน้ำตาลกลูโคส พบว่า ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากอาหารเลี้ยงเชื้อ Bushnell Haas (BH) ที่มีที่มีกลูโคสร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีค่ามากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อเบซัล แสดงให้เห็นถึงว่าการเพิ่มน้ำตาลกลูโคสส่งผลให้ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.3 ข)

ก.)



ข.)



รูปที่ 4.3 ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม

ก.) ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพใน อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM เป็นเวลา 5 วัน

ข.) ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เมื่อใช้อาหารที่แตกต่างกัน

4.2 หาสูตรอาหารที่มีน้ำมะพร้าวเป็นองค์ประกอบหลักสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดย *M. guilliermondii*

4.2.1 วิเคราะห์องค์ประกอบน้ำมะพร้าว

น้ำมะพร้าวถูกใช้เป็นองค์ประกอบหลักสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จากการวิเคราะห์ทางเคมีของน้ำมะพร้าว พบว่า มีน้ำตาล โปรตีน แล่งไนโตรเจน และองค์ประกอบอนินทรีย์ที่มีความเข้มข้นต่างกัน (ตารางที่ 4.1) พบว่า โดยใน 1 ลิตรของน้ำมะพร้าว มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 28.12 กรัม ซึ่งเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ 18.32 กรัม นอกจากนี้แหล่งคาร์บอนแล้วจุลินทรีย์ยังต้องการแล่งไนโตรเจนซึ่งได้รับจากโปรตีน กรดอะมิโนและเกลืออนินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำมะพร้าว โดยปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดประมาณ 0.056 กรัม อีกทั้งแร่ธาตุหลักและแร่ธาตุเสริมที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ยังพบอยู่ในน้ำมะพร้าวอีกด้วย (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบภายในน้ำมะพร้าว

ชนิดขององค์ประกอบ	ปริมาณในน้ำมะพร้าว (กรัมต่อลิตร)
น้ำตาลทั้งหมด	28.12
น้ำตาลรีดิวซ์	18.32
แล่งไนโตรเจน	0.056
โปรตีน	0.37
โพแทสเซียม	1.78
แคลเซียม	0.16
โซเดียม	0.15
แมกนีเซียม	0.086
เหล็ก	0.001

4.2.2 วิเคราะห์ค่าซีไอดีในแต่ละสูตรอาหารที่มีน้ำมันพร้าวเป็นองค์ประกอบ

จากการวิเคราะห์ค่าซีไอดีของชุดควบคุมที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ Bushnell Haas (BH) ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ชุดควบคุมที่ไม่เติมน้ำมันถั่วเหลืองและเติมน้ำมันถั่วเหลือง มีค่าซีไอดีเป็น 91,140 และ 97,080 ตามลำดับ ในส่วนของอาหารที่มีน้ำมันพร้าวเป็นองค์ประกอบ พบว่า ในน้ำมันพร้าวปกติ และน้ำมันพร้าวเติมน้ำมันถั่วเหลืองมีเท่ากับ 40,340 และ 44,470 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน ในขณะที่น้ำมันพร้าวที่เติมกลีเซอรอลมีค่าซีไอดีถึง 60,570 แสดงว่ามีปริมาณสารอินทรีย์ในอาหารมากกว่าในน้ำมันพร้าวปกติ และน้ำมันพร้าวเติมน้ำมันถั่วเหลือง เมื่อเปรียบเทียบชุดควบคุมกับสูตรอาหารที่มีน้ำมันพร้าวเป็นองค์ประกอบ พบว่า ในชุดควบคุมมีค่าซีไอดีมากกว่าสูตรอาหารที่มีน้ำมันพร้าวเป็นองค์ประกอบสูงสุดถึง 2.4 เท่า แสดงดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ค่าซีไอดีของแต่ละสูตรอาหาร

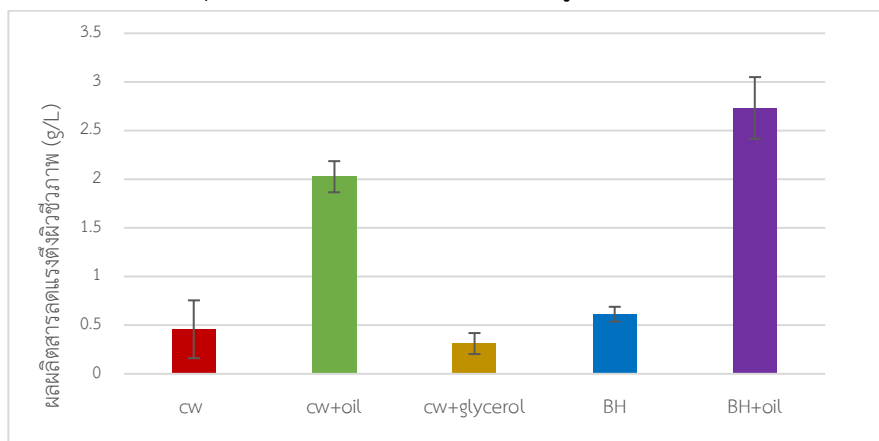
ค่าซีไอดีของแต่ละสูตรอาหาร (มิลลิกรัมต่อลิตร)				
ชุดควบคุม : อาหารเลี้ยงเชื้อ Bushnell Haas (BH) ที่มีที่มีกลูโคสร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร			น้ำมันพร้าว	
ไม่เติมน้ำมันถั่วเหลือง	เติมน้ำมันถั่วเหลือง	ไม่เติมน้ำมันถั่วเหลือง	เติมน้ำมันถั่วเหลือง	เติมกลีเซอรอล
91,140	97,080	40,340	44,470	60,570

4.2.3 การเลือกสูตรอาหารที่มีน้ำมันพร้าวเป็นองค์ประกอบหลักสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

4.2.3.1 เปรียบเทียบปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ *M. guilliermondii* สายพันธุ์ CCN-6 แบบเซลล์ตรึงผลิตได้เมื่อใช้น้ำมันพร้าวเป็นองค์ประกอบหลัก

เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากข้อที่ 4.2.2 ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *M. guilliermondii* สายพันธุ์ CCN-6 แบบเซลล์ตรึงบน aquaporous gel พบว่า ในสูตรอาหารที่มีน้ำมันพร้าวเป็นองค์ประกอบที่เติมน้ำมันถั่วเหลืองผลิตลดแรงตึงผิวชีวภาพได้สูงที่สุดที่ 2.026 กรัมต่อลิตร และเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เติมน้ำมันถั่วเหลืองที่ได้ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็น 2.733 กรัมต่อลิตร พบว่า มีผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ใกล้เคียงกัน โดยผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากน้ำมันพร้าวที่เติมน้ำมันถั่วเหลืองคิดเป็นร้อยละ 74 ของ

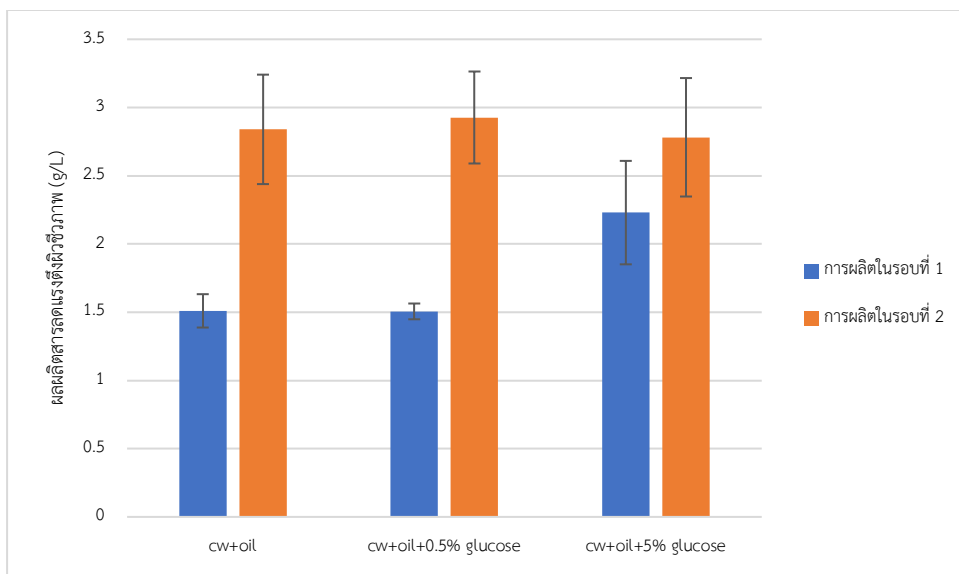
ชุดควบคุมที่เติมน้ำมันถั่วเหลือง อีกทั้งชุดควบคุมที่ไม่เติมน้ำมันถั่วเหลืองที่ได้ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวเป็น 0.71 กรัมต่อลิตร ซึ่งแสดงให้เห็นถึงแนวโน้มว่า การเติมน้ำมันถั่วเหลืองซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำส่งผลให้ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จาก *M. guilliermondii* สายพันธุ์ CCN-6 เพิ่มขึ้น ในขณะที่เดียวกันน้ำมันพรวัวที่เติมกลีเซอรอลสามารถผลิตลดแรงตึงผิวชีวภาพได้น้อยที่สุดที่ 0.311 กรัมต่อลิตร แสดงดังรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 เปรียบเทียบผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอาหารแต่ละชนิด เป็นเวลา 5 วัน

4.2.3.2 การผลิตสารลดแรงตึงผิวจากเชื้อ *M. guilliermondii* โดยใช้เซลล์ตรึงผลิตซ้ำ และ แปรผันปริมาณน้ำตาลในอาหาร

จากข้อที่ 4.1.2.2 พบว่า การเพิ่มน้ำตาลกลูโคสส่งผลให้ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มขึ้น ดังนั้น จึงมีการแปรผันปริมาณน้ำตาลในน้ำมะพร้าวที่เติมน้ำมันถั่วเหลืองควบคู่กับการผลิตสารลดแรงตึงผิวจากเชื้อ *M. guilliermondii* โดยใช้เซลล์ตรึงผลิตซ้ำ พบว่า ในการผลิตรอบที่ 1 น้ำมะพร้าวไม่เติมน้ำตาลกลูโคส และน้ำมะพร้าวที่เติมน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 0.5 โดยปริมาตรต่อปริมาตร มีผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพใกล้เคียงกัน โดยมีค่าเป็น 1.51 และ 1.50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่มะพร้าวที่เติมน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 5 โดยปริมาตรต่อปริมาตร มีผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงถึง 2.23 กรัมต่อลิตร ในการผลิตรอบที่ 2 เห็นได้ชัดว่า อาหารทั้ง 3 ชนิดมีผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงขึ้นจากการผลิตในรอบที่ 1 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นเมื่อผลิตในรอบที่ 2 และแสดงถึงประสิทธิภาพของการใช้เซลล์ตรึงซ้ำ โดยน้ำมะพร้าวไม่เติมน้ำตาลกลูโคส และน้ำมะพร้าวที่เติมน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 0.5 โดยปริมาตรต่อปริมาตร มีผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพใกล้เคียงกัน เป็น 2.84 และ 2.93 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 2 อาหารมีผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มขึ้นจากการผลิตในรอบที่ 1 ร้อยละ 49 แต่ในมะพร้าวที่เติมน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 5 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้น้อยที่สุดเป็น 2.78 กรัมต่อลิตร แสดงดังรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 เปรียบเทียบผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการใช้เซลล์ตรึงผลิตซ้ำเป็นเวลารอบละ 5 วัน

4.3 ทดสอบคุณสมบัติทั่วไปของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพจาก *M. guilliermondii*

4.3.1 วัดความสามารถในการกระจายน้ำมัน (Oil displacement)

จากการทดสอบความสามารถในการกระจายน้ำมัน โดยใช้ความเข้มข้นของ Triton X-100 และ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *M. guilliermondii* เป็น 1.5 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่คาดว่าจะเกินค่า critical micelle concentration (CMC) ของสารลดแรงตึงผิวทั้ง 2 ชนิด พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *M. guilliermondii* มีประสิทธิภาพการเกิดเคลียร์โซนในน้ำมันชนิด BKC และ ARL เป็น 72% และ 26% (รูปที่ 4.7ข,4.6ข)ตามลำดับ เมื่อเทียบกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ Triton X-100 ที่มีประสิทธิภาพการเกิดเคลียร์โซนในน้ำมันชนิด BKC และ ARL เป็น 92% และ 50% ตามลำดับ แสดงดังตาราง 4.3 แสดงว่า สารลดแรงตึงผิวทั้ง 2 ชนิด สามารถลดแรงตึงผิวของน้ำมันชนิด BKC ได้ดีกว่า ARL แม้ว่าประสิทธิภาพการเกิดเคลียร์โซนของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *M. guilliermondii* จะน้อยกว่า สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ Triton X-100 แต่ก็แสดงให้เห็นว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *M. guilliermondii* ก็มีประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวได้เทียบเคียงกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์

ตารางที่ 4.3 ประสิทธิภาพความสามารถในการกระจายน้ำมันของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพจาก *M. guilliermondii*

ชนิดของสารลดแรงตึงผิว	ประสิทธิภาพการเกิดเคลียร์โซน	
	BKC	ARL
Triton X-100	92%	50%
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก <i>M. guilliermondii</i>	71%	26%



รูปที่ 4.6 เปรียบเทียบความสามารถในการกระจายน้ำมันในน้ำมันชนิด ARL

ก.) Triton X-100

ข.) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *M. guilliermondii*



รูปที่ 4.7 เปรียบเทียบความสามารถในการกระจายน้ำมันในน้ำมันชนิด BKC

ค.) Triton X-100

ง.) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *M. guilliermondii*

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในปัจจุบันหลังจากกระบวนการผลิตน้ำกะทิโดยการคั้นเนื้อจากผลผลิตมะพร้าวจำนวนมาก ส่งผลให้น้ำมะพร้าวที่เหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตกะทิประมาณ 200,000 ตันต่อปี (Unagul *et al.*, 2007) จึงจำเป็นต้องมีการจัดการหรือลดปริมาณน้ำมะพร้าวลง งานวิจัยนี้จึงเลือกนำน้ำมะพร้าวจากอุตสาหกรรมอาหารมาใช้ประโยชน์ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งการนำน้ำมะพร้าวมาใช้นี้จัดว่าเป็นการลดต้นทุนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยนำน้ำมะพร้าวมาใช้ทดแทนกลูโคส หรือแหล่งอาหารสังเคราะห์ที่มีราคาสูง จากการนำน้ำมะพร้าวมาผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเชื้อ *M. guilliermondii* สายพันธุ์ CCN-6 แบบเซลล์ตรึง พบว่า เชื้อ *M. guilliermondii* สายพันธุ์ CCN-6 สามารถเจริญโดยใช้น้ำมะพร้าวเป็นองค์ประกอบหลักที่เติมน้ำมันถั่วเหลืองและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งไม่แตกต่างจากเมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Bushnell Haas (BH) ที่มีกลูโคสร้อยละ 10 ที่เติมน้ำมันถั่วเหลือง

ในเบื้องต้นงานวิจัยนี้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Bushnell Haas (BH) ที่มีกลูโคสร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรสำหรับเป็นชุดควบคุม ที่มีราคา 177.84 บาทต่อลิตร ซึ่งเป็นราคาที่ค่อนข้างสูงสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *M. guilliermondii* สายพันธุ์ CCN-6 พบว่า การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยผลิตเป็นเวลา 5 วัน เป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เนื่องจากมีปริมาณเชื้อภายในวัสดุตรึงและน้ำเลี้ยงเชื้อสูงสุดที่ log 7.48 และ log 9.36 MPN ต่อกรัม อีกทั้งยังมีผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงสุดที่ 0.71 กรัมต่อลิตร และเมื่อเติมแหล่งคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำ และน้ำตาลกลูโคส ยังส่งผลให้แนวโน้มของการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มขึ้นอีกด้วย

เมื่อทราบสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแล้ว จึงเริ่มการทดลองผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยอาหารที่มีน้ำมะพร้าวเป็นองค์ประกอบหลัก เพื่อคัดเลือกสูตรอาหารที่มีน้ำมะพร้าวเป็นองค์ประกอบหลักที่เหมาะสมที่สุดไปใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยจากการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมะพร้าว พบว่า น้ำมะพร้าวที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีองค์ประกอบของน้ำตาลที่จำเป็นสำหรับการเจริญและการผลิตสารเมตาบอไลต์ เช่น กลูโคส ฟรักโทส และซูโครส อีกทั้งยังมีแหล่งไนโตรเจน โปรตีน และธาตุอาหารเสริม เช่น โพแทสเซียม แคลเซียม โซเดียม แมกนีเซียม และเหล็กอีกด้วย และจากผลการทดลองพบว่าปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ มีค่าเป็น 0.46 กรัมต่อลิตร 2.03 กรัมต่อลิตร 0.31 กรัมต่อลิตร ในน้ำมะพร้าว น้ำมะพร้าวที่เติม น้ำมันถั่วเหลืองร้อยละ 2 โดยปริมาตรต่อปริมาตร และน้ำมะพร้าวที่เติมกลีเซอรอลร้อยละ 10 โดยปริมาตรต่อปริมาตร โดยน้ำมะพร้าวที่เติมน้ำมันถั่วเหลืองสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้มากที่สุด และใกล้เคียงกับอาหารเลี้ยงเชื้อ Bushnell Haas (BH) ที่มีที่มีกลูโคสร้อยละ 10 และ น้ำมันถั่วเหลืองร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และปริมาตรต่อปริมาตร ตามลำดับ (ชุดควบคุม) ที่ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวได้ 2.733 กรัมต่อลิตร รวมถึงในน้ำมะพร้าวที่เติมน้ำมันถั่วเหลืองมีค่าซีไอดีเป็น 44,470 มิลลิลิตรต่อกรัม ซึ่งมีค่ามากกว่า 40,340 มิลลิลิตรต่อกรัมของน้ำมะพร้าว

จึงมีผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมากกว่าตามไปด้วย แต่ในมะพร้าวที่เติมกลีเซอรอลร้อยละ 10 โดยปริมาตรต่อปริมาตร มีค่าซีไอดีมากถึง 60,570 มิลลิลิตรต่อกรัม แต่กลับผลผลิตสารลดแรงตึงผิวได้น้อยที่สุด คาดว่าเชื้อ *M. guilliermondii* อาจใช้กลีเซอรอลไปใช้สำหรับผลิตสารเมตาบอไลต์อื่น จากรายงานวิจัยของ West et al., 2013 รายงานว่า *M. guilliermondii* ที่ใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถผลิตกรดซิตริกได้ 10.4 กรัมต่อลิตร

จากการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับสารลดแรงตึงผิว พบว่า การเพิ่มน้ำตาลกลูโคสส่งผลให้ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มขึ้น ดังนั้น จึงมีการแปรผันปริมาณน้ำตาลในน้ำมะพร้าวที่เติมน้ำมันถั่วเหลืองควบคู่กับการผลิตสารลดแรงตึงผิวจากเชื้อ *M. guilliermondii* โดยใช้เซลล์ตรึงผลิตซ้ำ พบว่า ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพรวมมีค่าเป็น 4.35 กรัมต่อลิตร 4.43 กรัมต่อลิตร และ 5.01 กรัมต่อลิตร ในน้ำมะพร้าวไม่เติมน้ำตาลกลูโคส และน้ำมะพร้าวที่เติมน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 0.5 และ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ โดยถ้าวิเคราะห์จากปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพรวม น้ำมะพร้าวที่เติมน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรสามารถผลิตได้สูงสุด แต่หากวิเคราะห์จากสัดส่วนผลผลิตต่อราคาต้นทุนนั้น พบว่า น้ำมะพร้าวไม่เติมน้ำตาลกลูโคสมีส่วนผลผลิตต่อราคาต้นทุนสูงสุดถึง 0.99 กรัมต่อบาทต่อลิตร และน้ำมะพร้าวที่เติมน้ำตาลกลูโคส 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีสัดส่วนผลผลิตต่อราคาต้นทุนน้อยสุดอยู่ที่ 0.06 กรัมต่อบาทต่อลิตร ดังนั้น อาหารที่มีน้ำมะพร้าวเป็นองค์ประกอบหลักที่เติมน้ำมันถั่วเหลือง และไม่เติมกลูโคส จึงมีประสิทธิภาพและคุ้มต้นทุนมากที่สุด โดยมีปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพรวมเป็น 4.35 กรัมต่อลิตร อีกทั้งเมื่อเปรียบเทียบราคาต้นทุนของงานวิจัยนี้กับชุดควบคุม พบว่า งานวิจัยสามารถลดต้นทุนการผลิตได้ถึง 97.539% แสดงดังตารางที่ 5.1

ตารางที่ 5.1 เปรียบเทียบราคาของอาหารที่มีน้ำมะพร้าวเป็นองค์ประกอบหลัก

ชนิดอาหาร	ราคา (บาทต่อลิตร)	ปริมาณสารลดแรงตึงผิว ชีวภาพรวม (กรัมต่อลิตร)	สัดส่วนผลผลิตต่อ ราคาใน 1 ลิตร (กรัม ต่อบาท)	
น้ำมะพร้าวเต็ม	ไม่เติมน้ำตาลกลูโคส	4.39	4.35	0.99
น้ำมันถั่วเหลือง ร้อยละ 2	เติมน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร	12.89	4.43	0.34
โดยปริมาตรต่อ ปริมาตร	เติมน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร	89.39	5.01	0.06
Bushnell Haas (BH) ที่มีกลูโคสร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร		177.84	0.71(1รอบ)	0.0040
Bushnell Haas (BH) ที่มีกลูโคสร้อยละ 10 และน้ำมันถั่วเหลืองร้อยละ 2		178.90	2.73(1รอบ)	0.015

หมายเหตุ : อาหารเลี้ยงเชื้อ Bushnell Haas (BH) ราคา 2.4 บาทต่อกรัม อ้างอิงจากบริษัท Sisco Research Laboratories ประเทศอินเดีย กลูโคส (D-(+) Glucose) มีราคาขายอยู่ที่ 1.7 บาทต่อกรัม อ้างอิงจากบริษัท Sigma-aldrich ประเทศสิงคโปร์ น้ำมะพร้าว จากตลาดคลองเตย ลิตรละ 3.33 บาท และน้ำมันถั่วเหลือง ลิตรละ 53 บาท

อีกทั้งจากผลการทดลอง พบว่า อาหารทั้ง 3 ชนิดมีผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการผลิตรอบที่ 2 มากกว่ารอบที่ 1 ซึ่งเป็นผลดีสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิว เนื่องจากการใช้เซลล์ตรึงซ้ำทำให้การผลิตมีความรวดเร็วขึ้นไม่เสียเวลาในการเตรียมเชื้อบ่อย ๆ รวมถึงการแบ่งการผลิตเป็นรอบ ๆ แทนการผลิตรอบเดียวที่ใส่สารอาหารที่ความเข้มข้นสูงเพื่อให้เพียงพอต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ แทนที่จุลินทรีย์จะนำสารอาหารไปใช้ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพอาจเกิดการกดแคแทบอลไลต์ (catabolite repression) หรือ การยับยั้งจากสารตั้งต้น (substrate inhibition) ซึ่งเป็นการที่เชื้อนำไปสารอาหารไปใช้ในการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนมากกว่าการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ดังนั้นการผลิตเป็นรอบ ๆ โดยใส่สารอาหารที่ละน้อยจึงมีส่วนช่วยในการป้องกันการเกิดปัญหาเหล่านี้ (Bustos และคณะ, 2018)

จากการทดสอบความสามารถในการกระจายน้ำมันของสารลดแรงตึงผิว เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *M. guilliermondii* โดยใช้ความเข้มข้นของ Triton X-100 และ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *M. guilliermondii* เป็น 1.5 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่คาดว่าจะเกินค่า critical micelle concentration (CMC) ของสารลดแรงตึงผิวทั้ง 2 ชนิด พบว่า สารลดแรงตึงผิวทั้ง 2 ชนิด สามารถลดแรงตึงผิวของน้ำมันชนิด BKC ได้ดีกว่า ARL แม้ว่าประสิทธิภาพการเกิดเคลียร์โชนของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *M.*

guilliermondii จะน้อยกว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ Triton X-100 แต่ก็แสดงให้เห็นว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *M. guilliermondii* ก็มีประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวได้จริง

จากสถานการณ์การระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (COVID-19) ที่ระบาดไปทั่วโลกรวมถึงประเทศไทย จึงทำให้มีประกาศสถานการณ์ฉุกเฉินในทุกเขตท้องที่ทั่วราชอาณาจักรให้มีการควบคุมและป้องกันการระบาดเพื่อให้ประชาชนมีความปลอดภัย (ประกาศสถานการณ์ฉุกเฉิน, 2564) รวมถึงประกาศจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยให้จัดการเรียนการสอนทุกรายวิชาในรูปแบบออนไลน์ (ประกาศจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2564) ทำให้นักวิจัยนี้ไม่สามารถทำการทดลองได้ครบตามที่วางแผนไว้ ซึ่งแผนการทดลองถัดไป คือ การวัดค่าแรงตึงผิวและ critical micelle concentration (CMC) โดยใช้เครื่อง tensiometer ส่วนการทดสอบการก่อกอิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกับน้ำมันพืชและน้ำมันหอมระเหยชนิดต่าง ๆ คาดว่าจะให้ผลที่แตกต่างกันโดยอาจก่อกอิมัลชันได้กับน้ำมันบางชนิด ซึ่งผลการก่อกอิมัลชันและความเสถียรต่อน้ำมันแต่ละชนิดอาจมีความแตกต่างกันเนื่องจากความหนืดของน้ำมัน ความยาวของสายโซ่ไฮโดรคาร์บอน และความเค็ม เป็นต้น และการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพคาดว่าจะเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทไกลโคลิพิด และคาดว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทไกลโคลิพิดที่ผลิตได้นั้นอาจเป็นชนิดโซโฟโรลิพิด และแมนโนซิลอิทธิรทอล ลิพิด โดยหากต้องการผลที่แม่นยำยิ่งขึ้นอาจตรวจวัดเพิ่มเติมด้วยวิธี Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) (Patowary และคณะ, 2019)

จากงานวิจัยนี้จึงสรุปได้ว่าน้ำมะพร้าวที่เติมน้ำมันถั่วเหลืองมีความเป็นไปได้ในการนำไปใช้ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแทนกลูโคส และแหล่งอาหารสังเคราะห์ซึ่งมีราคาสูงเพื่อลดต้นทุนการผลิต และหากต้องการเพิ่มผลผลิตให้มากขึ้นอาจทดลองโดยการปรับลดสารอาหารต่าง ๆ ในสูตรอาหารเพิ่มเติม เช่น จาก Huang et al., 2015 รายงานว่า การเติมธาตุแมงกานีสในอาหารส่งผลให้ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มขึ้นถึง 6.2 เท่าจากอาหารที่ไม่เติมธาตุแมงกานีส และในงานวิจัยของ Ma et al., 2016 รายงานว่า การเติมน้ำมันปาล์ม และโซเดียมไนเตรท 5 กรัมต่อลิตร ที่สัดส่วนแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนเป็น 20 ทำให้ได้ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงสุดเป็น 25.9 กรัมต่อลิตร แสดงให้เห็นว่า การปรับสัดส่วนแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนก็มีส่วนสำคัญสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเช่นเดียวกัน อีกทั้งงานวิจัยนี้ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับน้ำมะพร้าวและเป็นการนำน้ำมะพร้าวมาใช้ประโยชน์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เอกสารอ้างอิง

- บุญยานุช สุภัทรกุล. (2018). การประยุกต์ใช้น้ำเสียจากโรงงานแปรรูปผลไม้เพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *Weissella cibaria* สายพันธุ์ PN3 แบบเซลล์ตรึง. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- ประกาศสถานการณ์ฉุกเฉิน ในทุกเขตท้องที่ทั่วราชอาณาจักร (2564, 30 มีนาคม). ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 138 ตอนพิเศษ 73 ง. หน้า 1.
- ประกาศจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเรื่อง ขยายเวลาการปิดที่ทำการเป็นการชั่วคราวเนื่องจากการแพร่ระบาดของเชื้อโรค COVID-19 (2564, 18 เมษายน).
- เพ็ญญา บุญจริง. (2015). การคัดแยกแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากอาการหมักดองพื้นบ้านเพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- รวิวิชญ์ ตาคำ. (2021). การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Meyerozyma guilliermondii* สายพันธุ์ CCN-6 แบบเซลล์ตรึงโดยใช้น้ำมะพร้าวเป็นแหล่งอาหาร. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- Abbas, C. A., & Sibirny, A. A. (2011). Genetic control of biosynthesis and transport of riboflavin and flavin nucleotides and construction of robust biotechnological producers. *Microbiol Mol Biol Rev*, 75(2), 321-360. doi:10.1128/MMBR.00030-10
- Antoniou, E., Fodelianakis, S., Korkakaki, E., & Kalogerakis, N. (2015). Biosurfactant production from marine hydrocarbon-degrading consortia and pure bacterial strains using crude oil as carbon source. *Frontiers in Microbiology*, 6. doi:ARTN 27410.3389/fmicb.2015.00274
- Araujo, H. W. C., Andrade, R. F. S., Montero-Rodriguez, D., Rubio-Ribeaux, D., da Silva, C. A. A., & Campos-Takaki, G. M. (2019). Sustainable biosurfactant produced by *Serratia marcescens* UCP 1549 and its suitability for agricultural and marine bioremediation applications. *Microbial Cell Factories*, 18. doi:ARTN 210.1186/s12934-018-1046-0
- Boelter, G., Cazarolli, J. C., Beker, S. A., de Quadros, P. D., Correa, C., Ferrao, M. F., . . . Bento, F. M. (2018). *Pseudallescheria boydii* and *Meyerozyma guilliermondii*: behavior of deteriorogenic fungi during simulated storage of diesel, biodiesel, and B10 blend in Brazil. *Environ Sci Pollut Res Int*, 25(30), 30410-30424. doi:10.1007/s11356-018-3015-x
- Bustos, G., Arcos, U., Vecino, X., Cruz, J. M., & Moldes, A. B. (2018). Recycled *Lactobacillus pentosus* biomass can regenerate biosurfactants after various fermentative and extractive cycles. *Biochemical Engineering Journal*, 132, 191-195. doi:10.1016/j.bej.2018.01.021

- Cai, H.Y., Zhang, T., & Feng, F.Q. (2018). High-efficient expression and properties characterization of *Thermomyces lanuginosus* lipase in *Pichia pastoris*. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 18(6), 262–271.
- Canettieri, E.V. (2001). Application of factorial design to the study of xylitol production from eucalyptus hemicellulosic hydrolysate. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 94(2), 159–168.
- Carneiro, C. V. G. C., Silva, F. C. D. E., & Almeida, J. R. M. (2019). Xylitol Production: Identification and Comparison of New Producing Yeasts. *Microorganisms*, 7(11). doi:ARTN 48410.3390/microorganisms7110484
- Carvalho, W., Silva, S. S., Converti, A., & Vitolo, M. (2002). Metabolic Behavior of immobilized *Candida guilliermondii* cells during batch xylitol production from sugarcane bagasse acid hydrolyzate. *Biotechnology and Bioengineering*, 79(2), 165-169. doi:10.1002/bit.10319
- Chen, M., Gao, Y.K., & Song, H.C. (2016). Control of postharvest anthracnose of mango fruit by combining yeast *Meyerozyma guilliermondii* with calcium chloride. *Food Science*, 37(2), 204–209.
- Bilal, A., & Huseyin, E., (2019). Biocontrol ability and action mechanisms of *Aureobasidium pullulans* GE17 and *Meyerozyma guilliermondii* KL3 against *Penicillium digitatum* DSM2750 and *Penicillium expansum* DSM62841 causing post-harvest diseases. *Yeast*. doi:10.1002/yea.3501.
- Cruz, J. M., Hughes, C., Quilty, B., Montagnolli, R. N., & Bidoia, E. D. (2018). Agricultural Feedstock Supplemented with Manganese for Biosurfactant Production by *Bacillus subtilis*. *Waste and Biomass Valorization*, 9(4), 613-618. doi:10.1007/s12649-017-0019-6
- Daverey, A., & Pakshirajan, K. (2011). Pretreatment of Synthetic Dairy Wastewater Using the Sphorolipid-Producing Yeast *Candida bombicola*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 163(6), 720-728. doi:10.1007/s12010-010-9077-y
- de Andrade Teixeira Fernandes, N., de Souza, A. C., Simões, L. A., Ferreira Dos Reis, G. M., Souza, K. T., Schwan, R. F., & Dias, D. R. (2020). Eco-friendly biosurfactant from *Wickerhamomyces anomalus* CCMA 0358 as larvicidal and antimicrobial. *Microbiological research*, 241, 126571. doi:10.1016/j.micres.2020.126571

- Derguine-Mecheri, L., Kebbouche-Gana, S., & Djenane, D. (2021). Biosurfactant production from newly isolated *Rhodotorula* sp.YBR and its great potential in enhanced removal of hydrocarbons from contaminated soils. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, *37*(1). doi:ARTN 1810.1007/s11274-020-02983-3
- Desai, J. D., & Banat, I. M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, *61*(1), 47–64.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS Rome, 2012
- Giaouris, E., Heir, E., Desvaux, M., Hebraud, M., Moretro, T., Langsrud, S., . . . Simoes, M. (2015). Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. *Front Microbiol*, *6*, 841. doi:10.3389/fmicb.2015.00841
- Gong, F., Sheng, J., Chi, Z. M., & Li, J. (2007). Inulinase production by a marine yeast *Pichia guilliermondii* and inulin hydrolysis by the crude inulinase. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, *34*(3), 179-185. doi:10.1007/s10295-006-0184-2
- Huang, X. F., Liu, J. N., Wang, Y. H., Liu, J., & Lu, L. J. (2015). The positive effects of Mn²⁺ on nitrogen use and surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, *29*(2), 381-389. doi:10.1080/13102818.2015.1006905
- Jimoh, A.A., & Lin, J. (2020). Biotechnological Applications of *Paenibacillus* sp. D9 Lipopeptide Biosurfactant Produced in Low-cost Substrates. *Appl Biochem Biotechnol* 191. 921–941
doi : [10.1007/s12010-020-03246-](https://doi.org/10.1007/s12010-020-03246-).
- Kantachote, D., Ratanaburee, A., Hayisama-ae, W., Sukhoom, A., & Nunkaew, T. (2017). The use of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* DW12 for producing a novel functional beverage from mature coconut water. *Journal of Functional Foods*, *32*, 401-408.
doi:10.1016/j.jff.2017.03.018
- Karlapudi, A.P., Venkateswarulu, T.C., Tammineedi, J., Kanumuri, L., Ravuru, B.K., Dirisala, V.R., & Kodali, V.P. (2018). Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution-a review. *Petroleum* 4, 241–249.. doi:10.1016/j.petlm.2018.03.007
- Kumar, Ra., & Das, A.J., (2018). Rhamnolipid Biosurfactant. doi: 10.1007/978-981-13-1289-2

- Law, S.V., Abu Bakar F., Mat Hashim D., & Abdul Hamid A. (2011). Popular fermented foods and beverages in Southeast Asia. *Int Food Res J* 18(2). 475–484.
- Li, J., Deng, M. C., Wang, Y., & Chen, W. X. (2016). Production and characteristics of biosurfactant produced by *Bacillus pseudomycooides* BS6 utilizing soybean oil waste. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 112, 72-79. doi:10.1016/j.ibiod.2016.05.002
- Ling, L. J., Li, Z. B., Jiao, Z. L., Zhang, X., Ma, W. X., Feng, J. J., . . . Lu, L. (2019). Identification of Novel Endophytic Yeast Strains from Tangerine Peel. *Current Microbiology*, 76(9), 1066-1072. doi:10.1007/s00284-019-01721-9
- Liu, X. G., Ma, X. J., Yao, R. S., Pan, C. Y., & He, H. B. (2016). Sophorolipids production from rice straw via SO₃ micro-thermal explosion by *Wickerhamiella domercqiae* var. sophorolipid CGMCC 1576. *Amb Express*, 6. doi:ARTN 6010.1186/s13568-016-0227-7
- Liu, Z., Tian, X., Chen, Y., Lin, Y., Mohsin, A., & Chu, Ju. (2018). Efficient sophorolipids production via a novel in situ separation technology by *Starmerella bombicola*. *Process Biochemistry*, 81. doi:10.1016/j.procbio.2018.12.005
- Madihalli, C., Sudhakar, H., & Doble, M. (2020). Production and investigation of the physico-chemical properties of MEL-A from glycerol and coconut water. *World J Microbiol Biotechnol*, 36(6), 88. doi:10.1007/s11274-020-02857-8
- Minucelli, T., Renato, R.V., Borsato, D., Andrade, G., Torres Cely, M.V., Oliveira, M., Baldo, C., Celligoi, M.A., 2017. Sophorolipids Production by *Candida bombicola* ATCC 22214 and Its Potential Application in Soil Bioremediation. *Waste and Biomass Valorization*, 8 doi : 10.1007/s12649-016-9592-3.
- Morita, T., Konishi, M., Fukuoka, T., Imura, T., & Kitamoto, D. (2007). Microbial conversion of glycerol into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by a basidiomycete yeast, *Pseudozyma antarctica* JCM 10317(T). *J Biosci Bioeng*, 104(1), 78-81. doi:10.1263/jbb.104.78
- Morita, T., Konishi, M., Fukuoka, T., Imura, T., & Kitamoto, D. (2007). Microbial conversion of glycerol into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by a basidiomycete yeast, *Pseudozyma antarctica* JCM 10317(T). *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104(1), 78-81. doi:10.1263/jbb.104.78

- Paraszkiwicz, K., Bernat, P., Kusmierska, A., Chojniak, J., & Plaza, G. (2018). Structural identification of lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* strains grown on the media obtained from renewable natural resources. *Journal of Environmental Management*, 209, 65-70. doi:10.1016/j.jenvman.2017.12.033
- Patowary, K., Das, M., Patowary, R., Kalita, M. C., & Deka, S. (2019). Recycling of Bakery Waste as an Alternative Carbon Source for Rhamnolipid Biosurfactant Production. *Journal of Surfactants and Detergents*, 22(2), 373-384. doi:10.1002/jsde.12242
- Perez-Armendariz, B., Cal-y-Mayor-Luna, C., El-Kassis, E. G., & Ortega-Martinez, L. D. (2019). Use of waste canola oil as a low-cost substrate for rhamnolipid production using *Pseudomonas aeruginosa*. *Amb Express*, 9. doi:ARTN 6110.1186/s13568-019-0784-7
- Pfaller, M. A., Boyken, L., Hollis, R. J., Messer, S. A., Tendolkar, S., & Diekema, D. J. (2006). In vitro susceptibilities of *Candida* spp. to caspofungin: four years of global surveillance. *J Clin Microbiol*, 44(3), 760-763. doi:10.1128/JCM.44.3.760-763.2006
- Prabakaran, G., Hoti, S. L., Manonmani, A. M., & Balaraman, K. (2008). Coconut water as a cheap source for the production of δ endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis, a mosquito control agent. *Acta Tropica*, 105(1), 35–38. <https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2007.09.002>
- Ratanaburee A, Kantachote D, Charernjiratrakul W, Sukhoom A. Enhancement of gamma-aminobutyric acid (GABA) in Nham (Thai fermented pork sausage) using starter cultures of *Lactobacillus namu- rensis* NH2 and *Pediococcus pentosaceus* HN8. *Int J Food Microbiol*. 2013;167:170–6.
- Ribeiro, B. G., de Veras, B. O., Aguiar, J. D., Guerra, J. M. C., & Sarubbo, L. A. (2020). Biosurfactant produced by *Candida utilis* UFPEDA1009 with potential application in cookie formulation. *Electronic Journal of Biotechnology*, 46, 14-21. doi:10.1016/j.ejbt.2020.05.001
- Rivera, A. D., Urbina, M. A. M., & Lopez, V. E. L. Y. (2019). Advances on research in the use of agro-industrial waste in biosurfactant production. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 35(10). doi:ARTN 15510.1007/s11274-019-2729-3
- Santos, D. K., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A., & Sarubbo, L. A. (2016). Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *International journal of molecular sciences*, 17(3), 401. <https://doi.org/10.3390/ijms17030401>

- Sibirny A.A. (1996) *Pichia guilliermondii*. In: Nonconventional Yeasts in Biotechnology. Springer, Berlin, Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-79856-6_7
- Singh, P., Patil, Y., & Rale, V. (2019). Biosurfactant production: emerging trends and promising strategies. *Journal of Applied Microbiology*, 126(1), 2-13. doi:10.1111/jam.14057
- Sivapathasekaran, C., & Sen, R. (2017). Origin, properties, production and purification of microbial surfactants as molecules with immense commercial potential. 54, 92-104. doi:10.3139/113.110482.
- Souza, E. C., de Azevedo, P. O. D., Dominguez, J. M., Converti, A., & Oliveira, R. P. D. (2017). Influence of temperature and pH on the production of biosurfactant, bacteriocin and lactic acid by *Lactococcus lactis* CECT-4434. *Cyta-Journal of Food*, 15(4), 525-530. doi:10.1080/19476337.2017.1306806
- Subsanguan, T., Khondee, N., Nawavimarn, P., Rongsayamanont, W., Chen, C. Y., & Luepromchai, E. (2020). Reuse of Immobilized *Weissella cibaria* PN3 for Long-Term Production of Both Extracellular and Cell-Bound Glycolipid Biosurfactants. *Front Bioeng Biotechnol*, 8, 751. doi:10.3389/fbioe.2020.00751
- Sujarit, C., Yongesmith, B., H-kittikun, A., & Siripatana, C. (2010). Citric acid regulates astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* TISTR 5730 in Thai coconut water. *International Food Research Journal*, 17, 947-960.
- Unagal, P., Assantachai, C., Phadungruengluij, S., Suphantharika, M., Tanticharoen, M., & Verduyn, C. (2007). Coconut water as a medium additive for the production of docosahexaenoic acid (C22 : 6 n3) by *Schizochytrium mangrovei* Sk-02. *Bioresource Technology*, 98(2), 281-287. doi:10.1016/j.biortech.2006.01.013
- Vidhya V., Vidhya A., Gowri B. V., & Arunadevi S. (2015). Utilization of Synthetic Dairy Waste Water and Waste Oil for the Production of Sophorolipid from *Starmerella bombicola* MTCC 1910 and Testing its Antimicrobial Activity. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 12(4), 555-565.

- Wah, T. T., Walaisri, S., Assavanig, A., Niamsiri, N., & Lertsiri, S. (2013). Co-culturing of *Pichia guilliermondii* enhanced volatile flavor compound formation by *Zygosaccharomyces rouxii* in the model system of Thai soy sauce fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 160(3), 282-289. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.10.022
- West, T. P. (2013). CITRIC ACID PRODUCTION BY *Candida* SPECIES GROWN ON A SOY-BASED CRUDE GLYCEROL. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 43(6), 601-611. doi:10.1080/10826068.2012.762929
- Yan, X., Gu, S., Cui, X., Shi, Y., Wen, S., Chen, H., & Ge, J. (2019). Antimicrobial, anti-adhesive and anti-biofilm potential of biosurfactants isolated from *Pediococcus acidilactici* and *Lactobacillus plantarum* against *Staphylococcus aureus* CMCC26003. *Microb Pathog*, 127, 12-20. doi:10.1016/j.micpath.2018.11.039
- Zhang, D. P., Spadaro, D., Garibaldi, A., & Gullino, M. L. (2011). Potential biocontrol activity of a strain of *Pichia guilliermondii* against grey mold of apples and its possible modes of action. *Biological Control*, 57(3), 193-201. doi:10.1016/j.biocontrol.2011.02.011
- Zhang, Y. G., Jia, D., Sun, W. Q., Yang, X., Zhang, C. B., Zhao, F. L., & Lu, W. Y. (2018). Semicontinuous sophorolipid fermentation using a novel bioreactor with dual ventilation pipes and dual sieve-plates coupled with a novel separation system. *Microbial Biotechnology*, 11(3), 455-464. doi:10.1111/1751-7915.13028
- Zharova, V.P., Kvasnikov, E.I., & Naumov, G.I. (1980). Production and genetic analysis of *Pichia guilliermondii* Wicherham mutants that do not assimilate hexadecane. *Mikrobiologichnyi Zhurnal*, 42 (2), 167–171.
- Zharova, V.P., Shchelokova, I.F., & Kvasnikov, E.I., (1977). Genetic study of alkane utilization in yeast *Pichia guilliermondii* Wickerham. i. Identification and haploid cultures by mating type and obtaining hybrids. *Genetika*, 13, 309–311.
- Zheng, C., Luo, Z., Yu, L., Huang, L., & Bai, X. (2011). The Utilization of Lipid Waste for Biosurfactant Production and Its Application in Enhancing Oil Recovery. *Petroleum Science and Technology*, 29(3), 282-289. doi:Pii 93111362110.1080/10916460903117586

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีคำนวณปริมาณน้ำเสียที่ใช้

อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด YM

อาหารสำเร็จรูป YM 21.43 กรัม

ละลายอาหารสำเร็จรูป 21.43 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้มีค่าเป็น 6.2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที สำหรับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งให้ละลายผงวุ้น 20 กรัม ในอาหารเหลว 1,000 มิลลิลิตรรวมด้วยก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อเบซัล

โซเดียมไนเตรต (NaNO_3)	10.17	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	1.00	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.50	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.10	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	5.00	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2)	0.01	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.06	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	0.10	กรัม
แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	0.326	กรัม
กลูโคส	5.00	กรัม
สารอาหารอื่นๆ	0.05	มิลลิลิตร

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่าง จนมีค่าเท่ากับ 7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ Bushnell Haas (BH) ที่มีกลูโคส ร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO_4)	0.2	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ CaCl_2	0.02	กรัม
โมโนโพแทสเซียมฟอสเฟต KH_2PO_4	1.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต K_2HPO_4	1.0	กรัม
แอมโมเนียมไนเตรต NH_4NO_3	1.0	กรัม
ไอรอน(III) คลอไรด์ FeCl_3	0.05	กรัม
กลูโคส	100	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่าง จนมีค่าเท่ากับ 7.0 นำไป
นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมี

สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม : เมทานอล (2:1) โดยปริมาตรต่อปริมาตร

คลอโรฟอร์ม	100	มิลลิลิตร
เมทานอล	50	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

ข้อมูลดิบต่าง ๆ สำหรับการเปรียบเทียบสภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้

ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแบบเซลล์ตรึง

ตารางที่ ค.1 ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Bushnell Haas (BH) ที่มีกลูโคส ร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในแต่ละวัน เป็นเวลา 5 วัน

จำนวน วัน	ชุดการ ทดลอง	น้ำหนักฟ ร่อยก่อน (กรัม)	น้ำหนักฟ ร่อยหลัง (กรัม)	สารลดแรงตึง ผิวชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)	ค่าเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)
1	1	0.3679	0.3913	0.390	0.454 ±0.0554
	2	0.3672	0.3968	0.493	
	3	0.3684	0.397	0.477	
2	1	0.3579	0.3587	0.492	0.420±0.0617
	2	0.3593	0.3785	0.384	
	3	0.3587	0.378	0.386	
3	1	0.3624	0.3891	0.534	0.508±0.321
	2	0.3624	0.3844	0.518	
	3	0.362	0.3856	0.472	
4	1	0.3615	0.3911	0.592	0.580±0.0385
	2	0.3619	0.3887	0.536	
	3	0.3592	0.3897	0.610	
5	1	0.3582	0.394	0.716	0.713±0.0094
	2	0.3604	0.3964	0.720	
	3	0.3605	0.7020	0.702	

ตารางที่ ค.2 ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเมื่อใช้อาหารที่แตกต่างกัน เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม เป็นเวลา 5 วัน

ชนิดอาหาร	ชุดการทดลอง	น้ำหนักพรอยก่อน (กรัม)	น้ำหนักพรอยหลัง (กรัม)	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	
				(กรัมต่อลิตร)	ค่าเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)
Basal medium ที่มี 2% v/v น้ำมันถั่วเหลือง	1	0.3686	0.4254	1.136	1.290 ±0.4964
	2	0.3792	0.4237	0.89	
	3	0.3766	0.4689	1.846	
BH medium ที่มี 10% w/v กลูโคส และ 2% v/v น้ำมันถั่วเหลือง	1	0.3717	0.4948	2.462	2.733±0.317
	2	0.3749	0.5077	2.656	
	3	0.3769	0.5310	3.082	
BH medium ที่มี 10% w/v กลูโคส	1	0.3582	0.3940	0.716	0.713±0.0094
	2	0.3604	0.3964	0.72	
	3	0.3605	0.7020	0.702	

ตารางที่ ค.3 ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเมื่อใช้อาหารที่มีน้ำมะพร้าวเป็นองค์ประกอบหลักที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 5 วัน

ชนิดอาหาร	ชุดการทดลอง	น้ำหนักพรอยก่อน (กรัม)	น้ำหนักพรอยหลัง (กรัม)	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	
				(กรัมต่อลิตร)	ค่าเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)
น้ำมะพร้าว	1	0.3761	0.387	0.218	0.458 ±0.2968
	2	0.3695	0.3878	0.366	
	3	0.3702	0.4097	0.79	
	1	0.371	0.4632	1.844	2.033±0.1931

น้ำมะพร้าว ที่มี2%	2	0.3696	0.4811	2.23	
v/v น้ำมันถั่วเหลือง	3	0.3696	0.4722	2.026	
น้ำมะพร้าว ที่มี10%	1	0.3722	0.3934	0.424	
v/v กลีเซอรอล	2	0.3744	0.3893	0.298	0.311±0.1075
	3	0.3744	0.3825	0.21	

ตารางที่ ค.4 ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเมื่อใช้เซลล์ตรึงผลิตซ้ำ และแปรผันปริมาณน้ำตาลในอาหาร

รอบ การ ผลิต	น้ำมะพร้าว ที่มี 2% v/v น้ำมันถั่ว เหลือง	ชุดการ ทดลอง	น้ำหนักพรอย ก่อน (กรัม)	น้ำหนักพรอย หลัง (กรัม)	สารลดแรงตึง ผิวชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)	ค่าเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)	
1	ไม่เติมกลูโคส	1	0.2117	0.2106	1.670	1.510±0.1222	
		2	0.2106	0.2631	1.750		
		3	0.2106	0.2567	1.510		
	0.5% w/v กลูโคส	1	0.2106	0.2539	1.443	1.506±0.0578	
		2	0.2081	0.2539	1.557		
		3	0.2081	0.252	1.520		
	5% w/v กลูโคส	1	0.2069	0.2619	1.833	2.238±0.3797	
		2	0.2093	0.2619	2.293		
		3	0.2073	0.2849	2.586		
	2	ไม่เติมกลูโคส	1	0.2083	0.3075	3.306	2.843±0.4013
			2	0.2088	0.2869	2.603	
			3	0.2070	0.2856	2.620	
0.5% w/v กลูโคส		1	0.2071	0.3066	3.316	2.927±0.3370	
		2	0.2090	0.2914	2.746		
		3	0.2084	0.2900	2.720		
5% w/v กลูโคส		1	0.2092	0.2831	2.463	2.782±0.4341	
		2	0.2092	0.2831	3.276		
		3	0.2092	0.2869	2.606		

