

การหาภาวะที่เหมาะสมของการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Candida mucifera* NJP25



นางสาวธิดารัตน์ สมเรือง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2559

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

OPTIMIZATION OF BIOSURFACTANT PRODUCTION FROM *Candida mucifera* NJP25

Miss Tidarat Somruang



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

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การหาภาวะที่เหมาะสมของการผลิตสารลดแรงตึงผิว ชีวภาพจาก <i>Candida mucifera</i> NJP25
โดย	นางสาวธิดารัตน์ สมเรือง
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร.จำรูญศรี พุ่มเทียน

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวงนิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชูลี ยมภักดิ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ดร.จำรูญศรี พุ่มเทียน)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป นภาธร)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.สาโรจน์ ศิริคั่นสนียกุล)

ธิดารัตน์ สมเรือง : การหาภาวะที่เหมาะสมของการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Candida mucifera* NJP25 (OPTIMIZATION OF BIOSURFACTANT PRODUCTION FROM *Candida mucifera* NJP25) อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. จิราภรณ์ ธนียวัน, อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ดร.จำริญศรี พุ่มเทียน, 122 หน้า.

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อเพิ่มผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Candida mucifera* NJP25 โดยปรับปรุงสูตรและภาวะการเพาะเลี้ยงสำหรับการผลิตด้วยวิธีการศึกษาที่ละเอียดและพื้นผิวตอบสนอง การศึกษาองค์ประกอบของอาหารและภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประกอบด้วย แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจน ค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิ เมื่อศึกษาที่ละเอียดที่ประกอบด้วยซูโครสความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (มวลต่อปริมาตร) อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจน 20:1 ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า เท่ากับ 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 9 วัน ผลิตสารลดค่าแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงจาก 53.2 เหลือ 35.5 มิลลินิวตันต่อเมตร และกระจายน้ำมันได้ 0.62 ตารางเซนติเมตร และได้สารสกัดหยาบ 0.26 กรัมต่อลิตร ผลการออกแบบการทดลอง Box-Behnken พบว่าอาหารที่เหมาะสมประกอบด้วย ซูโครสความเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์ (มวลต่อปริมาตร) อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจน 15:1 ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6.5 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งให้ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มขึ้นเป็น 0.36 กรัมต่อลิตร จากการศึกษาลักษณะคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่า มีค่าความเข้มข้นวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ เท่ากับ 27.48 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีสมบัติการเป็นสารก่ออิมัลชัน และสารกระจายน้ำมันที่ดีกับน้ำมันพืช สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความเสถียรต่อภาวะต่าง ๆ ได้แก่ ความเข้มข้นเกลือ (1-10 เปอร์เซ็นต์) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (2-10) และอุณหภูมิ (4-100 องศาเซลเซียส) เมื่อเตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยเทคนิค preparative TLC และ HPLC ได้ลำดับส่วนที่ F2-1 และ F2-4 ที่มีค่าการกระจายน้ำมันสูงสุด เมื่อนำไปวิเคราะห์หามวลโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเทคนิค LC-MS พบว่าได้สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 375 474 490 และ 507 ซึ่งเป็นสารที่มีมวลโมเลกุลแตกต่างจากโซโฟโรลิพิดที่ผลิตจากยีสต์ชนิดอื่น

5672249823 : MAJOR MICROBIOLOGY AND MICROBIAL TECHNOLOGY

KEYWORDS: BIOSURFACTANT / ONE FACTOR AT A TIME / RSM / BOX-BEHNKEN DESIGN

TIDARAT SOMRUANG: OPTIMIZATION OF BIOSURFACTANT PRODUCTION FROM *Candida mucifera* NJP25. ADVISOR: ASSOC. PROF. JIRAPORN THANİYAVARN, CO-ADVISOR: JAMROONSRI POOMTIEN, Ph.D., 122 pp.

This study aimed to improve the biosurfactant yield of *Candida mucifera* NJP25 and optimization of the culture medium and culture conditions using one factor at a time (OFAT) and response surface methodology (RSM). The study considered the effects of carbon and nitrogen source, C:N ratio, pH and temperature. When studying one factor at a time that consisted of 4.0% sucrose (w/v), C:N ratio 20:1, pH 6.5 within a shake flask at 200 rpm and incubated at 30°C for 9 days, the surface tension of culture medium was decreased from 53.2 mN/m to 35.5 mN/m and oil displacement in medium 0.62 cm² and the biosurfactant yield of 0.26 g/L. The results from Box-Behnken design showed that the optimized medium containing 7.0% sucrose (w/v), C:N ratio (NaNO₃) 15:1, pH 6.5 at 30°C, could increase the biosurfactant yield to 1.64 g/L. The biosurfactant showed a critical micelle concentration (CMC) value of 27.48 mg/ml at the surface tension of 34.81 mN/m and emulsification activity with vegetable oils. The study of stability test, it remained unchanged properties of the biosurfactant within a wide range of environmental condition such as pH (2-10), NaCl concentration (2-10 %) and temperature (4-100°C). A partially purified biosurfactant fraction with preparation TLC and HPLC displayed both major biosurfactants, F2-1 and F2-4, showed high biosurfactant activity by oil displacement assay and further analyzed via LC-MS. Their molecular mass were 375 474 490 and 506. There were molecular mass different substance from sophorolipid found in other yeasts.

Department: Microbiology Student's Signature

Field of Study: Microbiology and Advisor's Signature

Microbial Technology Co-Advisor's Signature

Academic Year: 2016

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ดร. จำรูญศรี พุ่มเทียน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ซึ่งได้ให้ความรู้ ความเมตตา คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ ในการทำวิจัย ตลอดจนตรวจแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ชุติ ยมภักดี ที่กรุณาได้รับเป็นประธานกรรมการในการสอบ ตลอดจนให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ รวมทั้งช่วยปรับปรุงและแก้ไขเล่มวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา จันทร์ประทีป นภاطر และรองศาสตราจารย์ ดร. สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล ที่กรุณาได้รับเป็นกรรมการในการสอบตลอดจนให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ และช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ Professor Dr. Masaaki Morikawa สำหรับความกรุณาให้คำแนะนำและช่วยเหลือในการวิเคราะห์โครงสร้างสารด้วยเทคนิค MS และ NMR

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาให้ความรู้ ข้อคิดเห็นและคำแนะนำต่าง ๆ แก่ผู้วิจัย

ขอขอบพระคุณ คุณสุนันท์ เจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความกรุณาให้คำแนะนำและช่วยเหลือในการวิเคราะห์สารด้วยเทคนิค HPLC

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ทุกคนนภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเฉพาะอย่างยิ่งห้องปฏิบัติการ 1804/14 ตึกมหาวชิรุณหิศ สำหรับการช่วยเหลือ กำลังใจ และความหวังดีที่ให้เสมอมา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านบัณฑิตวิทยาลัยที่ได้ช่วยอำนวยความสะดวกต่าง ๆ

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา น้องชาย และญาติพี่น้อง ที่ให้การสนับสนุนช่วยเหลือ รวมถึงให้กำลังใจเป็นอย่างดีในทุก ๆ ด้านแก่ผู้วิจัยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษาไปได้ด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญภาพ	ฑ
สารบัญตาราง.....	ด
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและความเป็นมา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
1.3 ขั้นตอนการดำเนินการ.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ปรีทัศน์วรรณกรรม	4
2.1 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	4
2.2 สมบัติสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	6
2.2.1 แรงตึงผิว (surface tension) และ แรงตึงระหว่างผิวที่ประจัน (interfacial tension).....	6
2.2.2 ค่าการกระจายน้ำมัน (oil displacement activity)	6
2.2.3 ค่าความเข้มข้นวิกฤตในการเกิดไมเซลล์ (Critical micelle concentration,CMC)....	7
2.2.4 การก่ออิมัลชัน (Emulsification).....	8
2.2.5 ค่าเฮชแอลบี (hydrophilic-lipophilic balance (HLB))	8
2.3 ข้อดีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	9
2.3.1 มีความเป็นพิษต่ำ	9
2.3.2 ย่อยสลายทางชีวภาพได้.....	9

2.3.3 สามารถก่ออิมัลชันได้ดี.....	9
2.3.4 ทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสม.....	10
2.3.5 มีโครงสร้างหลากหลาย	10
2.4 ประเภทของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	12
2.4.1 ไกลโคลิพิด (Glycolipid)	12
2.4.2 ไลโปเพปไทด์ (lipopeptides) และไลโปโปรตีน (lipoprotein).....	16
2.4.3 กรดไขมันและไขมัน (fatty acid และ neutral lipid)	17
2.4.4 ฟอสโฟลิพิด.....	18
2.4.5 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์ (polymeric biosurfactants)..	19
2.4.6 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดอนุภาค (particulate biosurfactant)	20
2.5 จลนพลศาสตร์การหมักสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Kinetic of fermentative production).....	22
2.5.1 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพควบคู่กับการเจริญของเซลล์ (Growth-associated production).....	22
2.5.2 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในภาวะจำกัดการเจริญ (Production under growth-limiting conditions)	22
2.5.3 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในช่วงระยะพักเซลล์ (Production by resting or immobilized cells	22
2.5.4 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยมีการเติมสารตั้งต้น (Production with precursor supplementation).....	23
2.6 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	23
2.6.1 อิทธิพลขององค์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	24
2.6.2 ปัจจัยทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	27
2.7 ประโยชน์และการประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	28

2.7.1	ด้านสิ่งแวดล้อม.....	28
2.7.2	ด้านอุตสาหกรรมน้ำมัน.....	29
2.7.3	ด้านอุตสาหกรรมอาหาร.....	30
2.7.4	ด้านเครื่องสำอาง.....	30
2.7.5	ด้านการแพทย์.....	31
2.7.6	สารซักล้างเชิงพาณิชย์.....	31
2.8	วิธีการพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology)	32
2.8.1	ขั้นตอนการทำ RSM.....	33
2.8.2	การเลือกแบบจำลอง (model selection) และการวางแผนการทดลอง (experimental design).....	34
2.8.3	การวิเคราะห์การถดถอย (Regression analysis).....	35
2.8.4	แผนการทดลอง Box-Behnken design.....	35
2.8.5	แผนการทดลอง Central Composite Design (CCD).....	37
บทที่ 3	วิธีการทดลอง	41
3.1	อุปกรณ์.....	41
3.2	เคมีภัณฑ์.....	42
3.3	วิธีดำเนินการทดลอง.....	43
3.3.1	การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก <i>Candida mucifera</i> NJP25	43
3.3.2	การศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย วิธี One factor at a time.....	45
3.3.3	การติดตามการเจริญ ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และการผลิตสาร ลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	47
3.3.4	การผลิตและการสกัดแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	47

3.3.5 การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวิธี Response Surface Methodology (RSM)	48
3.3.6 ศึกษาลักษณะสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	50
3.3.7 เตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนและวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	51
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	54
4.1 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวิธี One factor at a time.....	54
4.1.1 ผลของแหล่งคาร์บอน.....	54
4.1.2 ผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน.....	55
4.1.3 ผลของแหล่งไนโตรเจน.....	56
4.1.4 ผลของอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน	57
4.1.5 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่าง.....	58
4.1.6 ผลของอุณหภูมิ	59
4.2 การติดตามการเจริญ ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	60
4.3 การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวิธี Response Surface Methodology (RSM)	62
4.4 ศึกษาลักษณะสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	69
4.4.1 ค่าความเข้มข้นวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ (Critical micelle concentration, CMC)	69
4.4.2 ศึกษาความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Stability of biosurfactant).....	70
4.4.3 การวัดค่าดัชนีการก่ออิมัลชัน (Emulsion Index).....	72
4.5 เตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วน	73

4.5.1 เตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography).....	73
4.5.2 เตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยวิธี Preparative thin layer chromatography (PLC).....	74
4.5.3 การทำให้สารบริสุทธิ์ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครโมโตกราฟี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC).....	75
4.5.4 วิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	77
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	79
รายการอ้างอิง.....	83
ภาคผนวก.....	97
ภาคผนวก ก สูตรอาหารและสารเคมี.....	98
ภาคผนวก ข หลักการการวัดค่าแรงตึงผิวด้วยวิธี Du Nouy Ring.....	101
ภาคผนวก ค ตารางแสดงการวิเคราะห์ผลทางสถิติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	104
ภาคผนวก ง ข้อมูลวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก <i>C. mucifera</i> NJP25.....	118
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	121

สารบัญภาพ

รูปที่ 2.1	แสดงลักษณะโครงสร้างโดยทั่วไปของของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	4
รูปที่ 2.2	โครงสร้างและการจัดเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	5
รูปที่ 2.3	การวัดค่ากระจายน้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก <i>Pseudomonas</i> sp. (EM19).....	7
รูปที่ 2.4	การเกิดโครงสร้างไมเซลล์ในน้ำเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจนถึง CMC	7
รูปที่ 2.5	โครงสร้างของกรดกลูคูโรนิก (glucuronic acids) ที่เน้นไกลโคลิพิดผลิตจาก <i>Pseudomonas. diminuta</i>	12
รูปที่ 2.6	โครงสร้างทางเคมีของโซโฟโรลิพิด.....	13
รูปที่ 2.7	โครงสร้างทางเคมีของโซโฟโรลิพิดที่ผลิตจาก <i>S. bombicola</i> ATCC 22214 เมื่อปลายคาร์บอกซิลิกของกรดไขมันรวมตัวกับหมู่ไฮดรอกซีของน้ำตาลเป็นวงแลคโตน.....	13
รูปที่ 2.8	โครงสร้างทางเคมีของแรมโนลิพิด	14
รูปที่ 2.9	โครงสร้างทางเคมีของทรีฮาโรลิพิด	14
รูปที่ 2.10	โครงสร้างทางเคมีแมนโนซิลอีทรีทอลลิพิด (MEL-A: $R_1 = R_2 = \text{Ac}$; MEL-B: $R_1 = \text{Ac}$, $R_2 = \text{H}$; MEL-C: $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{Ac}$; $n = 6-10$).....	15
รูปที่ 2.11	โครงสร้างทางเคมีของ α -diglucosyl diglyceride.....	16
รูปที่ 2.12	โครงสร้างทางเคมีของเซอร์แฟคซินที่ผลิตจาก <i>B. subtilis</i>	16
รูปที่ 2.13	โครงสร้างทางเคมีของไลโปเปปไทด์ชนิดต่าง ๆ.....	17
รูปที่ 2.14	โครงสร้างทางเคมีของออร์นิตินที่ผลิตจาก <i>Mesorhizobium loti</i>	18
รูปที่ 2.15	โครงสร้างของฟอสฟาติลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) ผลิตจาก <i>Acinetobacter</i> sp. ส่วน R_1 และ R_2 เป็นสายไฮโดรคาร์บอนของกรดไขมัน	19
รูปที่ 2.16	โครงสร้างของอิมัลแซนที่ผลิตจาก <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	20
รูปที่ 2.17	แสดงรูปแบบการเจริญและการผลิตสารของเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ.....	23

รูปที่ 2.18	กลไกการเก็บเกี่ยวน้ำมันโดยใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	30
รูปที่ 2.19	แผนภาพพื้นที่ผิวตอบสนองแบบ 3 มิติ (response surface plot) และ 2 มิติ (contour plot).....	33
รูปที่ 2.20	แสดงระดับของสิ่งทดลอง (design points) สำหรับแผนการทดลอง Box-Behnken design.....	36
รูปที่ 2.21	แสดงระดับของสิ่งทดลอง (design points) สำหรับแผนการทดลอง Central Composite Design (CCD).....	38
รูปที่ 3.1	การวัดค่าการกระจายน้ำมัน.....	45
รูปที่ 4.1	ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก <i>C. mucifera</i> NJP25 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อปรับปรุงสูตร เป็นระยะเวลา 1 3 5 7 และ 9 วัน.....	61
รูปที่ 4.2	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (crude biosurfactant) ที่ผลิตได้จาก <i>C. mucifera</i> NJP25 .	62
รูปที่ 4.3	แผนภาพพื้นผิวพื้นผิวตอบสนองสามมิติ (3D response surface plot) โดยวัดค่าผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยเปรียบเทียบปัจจัย 2 ปัจจัย ก. ซูโครสต่ออัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน ข. ซูโครสต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง ค. ซูโครสต่ออุณหภูมิ ง. อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง จ. อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่ออุณหภูมิ ฉ. ค่าความเป็นกรด-ด่างต่ออุณหภูมิ.....	67
รูปที่ 4.4	ค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก <i>C. mucifera</i> NJP25.....	69
รูปที่ 4.5	การศึกษาความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก <i>C. mucifera</i> NJP25.....	71
รูปที่ 4.6	การก่อกอิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก <i>C. mucifera</i> NJP25 กับน้ำมันชนิดต่าง ๆ ที่ 24 ชั่วโมง (E_{24}).....	72
รูปที่ 4.7	การแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก <i>C. mucifera</i> NJP25 โดยใช้โครมาโตกราฟีชนิดแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography) สามารถแยกได้ 4 ลำดับส่วนได้แก่ F1 F2 F3 และ F4 ตามลำดับ.....	73

รูปที่ 4.8	การแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก <i>C. mucifera</i> NJP25 ด้วย Preparative thin layer chromatography สามารถแยกได้ 4 ลำดับส่วน ได้แก่ F1 F2 F3 และ F4 ตามลำดับ.....	74
รูปที่ 4.9	โครมาโตแกรมของ HPLC จากตัวอย่างลำดับที่ F2 เก็บตัวอย่างพีกที่เวลาต่าง ๆ (Retention time, RT) จำนวน 4 ตัวอย่าง ได้แก่ F 2-1 F 2-2 F 2 -3 และ F 2-4	76
รูปที่ 4.10	สเปกตรัมมวลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก <i>C. mucifera</i> NJP25 ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธีแมสสเปกโตรเมตรี	77
รูปที่ ข.1	แสดงขั้นตอนการวัดค่าแรงตึงผิวด้วยวิธี Du Nouy Ring	101
รูปที่ ข.2	แสดงองค์ประกอบของเครื่องวัดค่าแรงตึงผิวรุ่น K6 บริษัท KRUSS ประเทศเยอรมัน .	102
รูปที่ ง.1	¹ H-NMR สเปกตรัมของ F2-1 ที่ผลิตได้จาก <i>C. mucifera</i> NJP25	118
รูปที่ ง.2	¹ H-NMR สเปกตรัมของ F2-4 ที่ผลิตได้จาก <i>C. mucifera</i> NJP25	118
รูปที่ ง.3	HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence, 2D NMR) NMR แบบ 2 มิติ สเปกตรัมของ F2-1 ที่ผลิตได้จาก <i>C. mucifera</i> NJP25	119
รูปที่ ง.4	HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence, 2D NMR) NMR แบบ 2 มิติ สเปกตรัมของ F2-4 ที่ผลิตได้จาก <i>C. mucifera</i> NJP25	120

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1	ช่วงของ HLB และการนำไปประยุกต์ใช้.....	8
ตารางที่ 2.2	ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่มีสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประยุกต์ใช้ในทางอุตสาหกรรม	11
ตารางที่ 2.3	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ	21
ตารางที่ 2.4	การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของยีสต์โดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ	25
ตารางที่ 2.5	ค่าของ code level ใน Box-Behnken design สำหรับ 3 ปัจจัย	36
ตารางที่ 2.6	ค่าของ code level ใน central composite design (CCD) สำหรับ 3 ปัจจัย...	39
ตารางที่ 2.7	การเลือกการออกแบบการทดลองตามวัตถุประสงค์	40
ตารางที่ 3.1	แผนการทดลองออกแบบโดย Box-Behnken Design สำหรับ 4 ปัจจัย 3 ระดับ.....	48
ตารางที่ 3.2	โปรแกรมของลิเนียร์เกรเดียนท์เท่ากับ 0 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 30 นาที.....	52
ตารางที่ 3.3	โปรแกรมของลิเนียร์เกรเดียนท์.....	53
ตารางที่ 4.1	ผลของแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย <i>C. mucifera</i> NJP25 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน.....	55
ตารางที่ 4.2	ผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญและการผลิตสารลดแรง ตึงผิวชีวภาพโดย <i>C. mucifera</i> NJP25 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็น ระยะเวลา 7 วัน	56
ตารางที่ 4.3	ผลของแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดย <i>C. mucifera</i> NJP25 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็น ระยะเวลา 7 วัน	57
ตารางที่ 4.4	ผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนสำหรับการเจริญและการผลิต สารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย <i>C. mucifera</i> NJP25 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศา เซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน.....	58

ตารางที่ 4.5	ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างสำหรับการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย <i>C. mucifera</i> NJP25 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน	59
ตารางที่ 4.6	ผลของอุณหภูมิสำหรับการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย <i>C. mucifera</i> NJP25 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน	60
ตารางที่ 4.7	แผนการทดลองออกแบบโดย Box-Behnken Design สำหรับ 4 ปัจจัย 3 ระดับ และปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ในแต่ละชุดการทดลอง.....	63
ตารางที่ 4.8	การอธิบายปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและความเหมาะสมของ สมการความสัมพันธ์	66
ตารางที่ 4.9	เปรียบเทียบปัจจัยที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพก่อนและหลังปรับปรุงสูตรจากการใช้โปรแกรมทางสถิติ.....	68
ตารางที่ 4.10	อัตราการเคลื่อนที่ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและค่าการกระจายน้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จากวิธี Preparative thin layer chromatography	75
ตารางที่ 4.11	สรุปค่าการกระจายน้ำมันของตัวอย่างลำดับส่วนที่ F2 ซึ่งผ่านการวิเคราะห์และทำให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่อง HPLC	76
ตารางที่ 4.12	แสดงน้ำหนักโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	78
ตารางที่ ค.1	ผลทางสถิติของน้ำหนักเซลล์แห้งจากแหล่งคาร์บอน.....	104
ตารางที่ ค.2	ผลทางสถิติของค่าการกระจายน้ำมันจากแหล่งคาร์บอน	105
ตารางที่ ค.3	ผลทางสถิติของค่าแรงตึงผิวจากแหล่งคาร์บอน	105
ตารางที่ ค.4	ผลทางสถิติของผลต่างของค่าแรงตึงผิวจากแหล่งคาร์บอน	106
ตารางที่ ค.5	ผลทางสถิติของน้ำหนักเซลล์แห้งจากความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน.....	107
ตารางที่ ค.6	ผลทางสถิติของค่าการกระจายน้ำมันจากความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน.....	107
ตารางที่ ค.7	ผลทางสถิติของค่าแรงตึงผิวจากความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน	108
ตารางที่ ค.8	ผลทางสถิติของผลต่างของค่าแรงตึงผิวจากความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน	109
ตารางที่ ค.9	ผลทางสถิติของน้ำหนักเซลล์แห้งจากแหล่งไนโตรเจน	109

ตารางที่ ค.10	ผลทางสถิติของค่าการกระจายน้ำมันจากแหล่งไนโตรเจน	110
ตารางที่ ค.11	ผลทางสถิติของค่าแรงดึงผิวจากแหล่งไนโตรเจน	111
ตารางที่ ค.12	ผลทางสถิติของผลต่างของค่าแรงดึงผิวจากแหล่งไนโตรเจน	111
ตารางที่ ค.13	ผลทางสถิติของน้ำหนักเซลล์แห้งจากอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน ...	112
ตารางที่ ค.14	ผลทางสถิติของค่าการกระจายน้ำมันจากอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อ ไนโตรเจน	113
ตารางที่ ค.15	ผลทางสถิติของค่าแรงดึงผิวจากอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน	113
ตารางที่ ค.16	ผลทางสถิติของผลต่างของค่าแรงดึงผิวจากอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อ ไนโตรเจน	114
ตารางที่ ค.17	ผลทางสถิติของน้ำหนักเซลล์แห้งจากอุณหภูมิ	115
ตารางที่ ค.18	ผลทางสถิติของค่าการกระจายน้ำมันจากอุณหภูมิ	115
ตารางที่ ค.19	ผลทางสถิติของค่าแรงดึงผิวจากอุณหภูมิ	116
ตารางที่ ค.20	ผลทางสถิติของผลต่างของค่าแรงดึงผิวจากอุณหภูมิ	117

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและความเป็นมา

ในปัจจุบันสารลดแรงตึงผิว (surfactant) มีบทบาทที่สำคัญต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์ จะเห็นได้จากการใช้ผลิตภัณฑ์ผสมสารลดแรงตึงผิวในการทำกิจกรรมต่าง ๆ เริ่มตั้งแต่ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดร่างกายและของใช้ต่าง ๆ ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง รวมไปถึงในผลิตภัณฑ์อาหาร ล้วนแล้วแต่มีสารลดแรงตึงผิวเป็นส่วนประกอบทั้งสิ้น ทำให้สารลดแรงตึงผิวได้รับการสนใจมากขึ้น อย่างไรก็ตาม สารลดแรงตึงผิวที่ใช้ในระดับอุตสาหกรรมส่วนใหญ่เป็นสารที่ถูกสังเคราะห์จากกระบวนการทางเคมี (Singh และคณะ, 2007) ซึ่งเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ย่อยสลายได้ยาก ทำให้เกิดการสะสมในสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ ขั้นตอนการผลิตรวมไปถึงผลิตผลพลอยได้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวนั้น ยังก่อให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย (Banat และคณะ, 2000) ดังนั้น เพื่อลดปัญหาที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและเพื่อเพิ่มความปลอดภัยต่อผู้บริโภค สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการใช้ทดแทนสารลดแรงตึงผิวที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ หมายถึง สารลดแรงตึงผิวที่ผลิตจากสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และรา สามารถแบ่งออกได้เป็นหลายชนิดตามลักษณะโครงสร้างทางเคมี ได้แก่ โกลโคลิพิด ไลโปเปปไทด์ ฟอสโฟลิพิด ไชมัน/กรดไชมัน และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์ เป็นต้น (Cooper และ Zajic, 1980) สารลดแรงตึงผิวส่วนใหญ่เป็นสารประกอบอินทรีย์ ซึ่งประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic group) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic group) โดยทั่วไปสารลดแรงตึงผิวสามารถทำหน้าที่ลดแรงตึงผิวระหว่างสองพื้นผิวที่สัมผัสกันได้ ข้อดีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ มีความหลากหลายในการนำไปใช้ประโยชน์และยังคงมีประสิทธิภาพการทำงานในสภาวะแวดล้อมรุนแรง ได้แก่ อุณหภูมิ พีเอช และความเค็ม (Tabatabaee และคณะ, 2005) แต่การใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังคงมีข้อจำกัดอยู่ในอุตสาหกรรมบางประเภทเท่านั้น เนื่องจากมีต้นทุนการผลิตสูง (Gong และคณะ, 2009) การทำให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้รับความนิยมนำมาใช้กันได้มากขึ้น โดยการใช้แหล่งอาหารที่มีต้นทุนต่ำสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เพื่อเพิ่มผลผลิตและพัฒนากระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Nitschke และคณะ, 2004)

มีงานวิจัยที่ศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยยีสต์สายพันธุ์ต่าง ๆ โดยใช้สารตั้งต้นที่มีความหลากหลาย Cirigliano และ Carman (1984) ได้ศึกษา

ยีสต์ *Candida lipolytica* สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยมีแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน เช่น เฮกซะเดกเคน พาราฟิน น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันมะกอก น้ำมันข้าวโพด และ น้ำมันเมล็ดฝ้าย โดยเฉพาะเฮกซะเดกเคนเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด มีน้ำมันพืชหลายชนิด (ข้าวโพด, ถั่วเหลือง, ดอกทานตะวัน, ดอกคำฝอย) ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Stromerella bombicola* (Cooper และ Paddock, 1984) ในปัจจุบันสารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังไม่สามารถทดแทนสารลดแรงตึงผิวทางเคมีได้ทั้งหมด เนื่องจากมีผลผลิตต่ำและต้นทุนในการผลิตค่อนข้างสูง จึงต้องมีการพัฒนากระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อควบคุมและลดต้นทุนในการผลิต โดยพัฒนาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมต่อการผลิตและการเลือกแหล่งอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราคาถูกถือเป็นปัจจัยหลักที่มีอิทธิพลต่อการลดต้นทุนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นอย่างมาก (Gallert และ Winter, 2002)

แนวทางในการพัฒนากระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เช่น การใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูกเป็นของเสียที่สามารถใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ สารตั้งต้นราคาถูกต่าง ๆ เช่น น้ำมันพืชและของเสียจากน้ำมัน เวียแลคติกและของเสียจากโรงกลั่น สารตั้งต้นจากแป้ง น้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันมะกอก ไขมันสัตว์ ไชสบูและกากน้ำตาล มีศักยภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งกลูโคสได้รับเป็นแหล่งคาร์บอนทางเลือกของนักวิจัยต่างๆ ในบางกรณียีสต์ *Candida bombicola* สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไฮโฟโวลิตีพิดทั้งจากน้ำมันพืชและน้ำตาล (Anandaraj และ Thivakaran, 2010) ดังนั้นในอนาคตจะมีสารลดแรงตึงผิวชีวภาพใหม่ ๆ เกิดขึ้นโดยจะขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่มีราคาถูกนำมาใช้และการเพิ่มประสิทธิภาพในการหาภาวะที่เหมาะสมเพื่อเพาะเลี้ยงให้ได้ผลิตภัณฑ์ปริมาณสูง จุลินทรีย์สามารถใช้สารประกอบอินทรีย์ที่เป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงานสำหรับการเจริญได้อย่างหลากหลายเมื่อแหล่งคาร์บอนเป็นสารที่ไม่ละลายน้ำเช่น ไฮโดรคาร์บอน จุลินทรีย์จะผลิตสารลดแรงตึงผิวออกมานอกเซลล์เพื่อทำให้สารไฮโดรคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำแตกเป็นโมเลกุลเล็ก ๆ เพื่อให้สามารถนำเข้าสู่เซลล์ได้

กระบวนการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของจุลินทรีย์และการผลิตสารผลิตภัณฑ์ โดยการแปรผันชนิดและปริมาณในการใช้แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และปัจจัยทางกายภาพด้าน อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง เป็นสิ่งที่มักดำเนินการในการวางแผนการทดลอง เพื่อให้ได้ภาวะที่เหมาะสมและดีที่สุดในการเจริญของจุลินทรีย์และการผลิตสาร การวางแผนการทดลองแบบ One Factor at a Time เป็นการศึกษาที่ละปัจจัยโดยที่ปัจจัยอื่นกำหนดให้เป็นค่าคงที่ จึงเรียกว่าเป็นการวิเคราะห์แบบ univariate มีข้อดี คือ เป็นวิธีการที่ง่ายและเป็นวิธีเบื้องต้นที่ช่วยในการหาภาวะที่เหมาะสม ข้อเสีย คือ มีจำนวนสิ่งทดลองมาก ใช้เวลาในการวิเคราะห์ และไม่ได้มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย ส่วนวิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology, RSM) เป็นวิธีการทางคณิตศาสตร์และสถิติที่เป็นประโยชน์ในการสร้างแบบจำลองและวิเคราะห์ปัญหา ซึ่ง

แสดงผลตอบสนองต่อผลจากตัวแปรต่าง ๆ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อหาจุดหรือความเหมาะสมต่อผลนั้น (Montgomery, 2008) วิธีพื้นผิวตอบสนอง จึงเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพกับกระบวนการที่มีความซับซ้อน ทำให้ง่ายในการจัดการและการอธิบายผล เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการอื่น (Box และ Behnken, 1960; Gan และ Latiff, 2011) ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพของภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงสุดจากยีสต์ *Candida. mucifera* NJP25 และแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่เหมาะสม เพื่อใช้ในการทำนายโดยใช้เทคนิคพื้นผิวตอบสนอง และศึกษาสมบัติและวิเคราะห์องค์ประกอบเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 ศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพจากสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่คัดเลือกจากวิธี one factor at a time ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิ และแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่เหมาะสม เพื่อใช้ในการทำนายโดยใช้เทคนิคพื้นผิวตอบสนอง

1.2.2 ศึกษาสมบัติและวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

1.3 ขั้นตอนการดำเนินการ

1.3.1 ศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระดับขวดเขย่าจากวิธี one factor at a time ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจน ค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิ

1.3.2 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระดับขวดเขย่าจากเทคนิคพื้นผิวตอบสนอง

1.3.3 ศึกษาลักษณะสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถเพิ่มผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้

1.4.2 ทราบองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากการใช้วิธี one factor at a time เปรียบเทียบกับเทคนิคพื้นผิวตอบสนอง (RSM)

1.4.3 ได้ศึกษาสมบัติของสารและโครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้ต่อไป

บทที่ 2 ปรีทัศน์วรรณกรรม

2.1 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

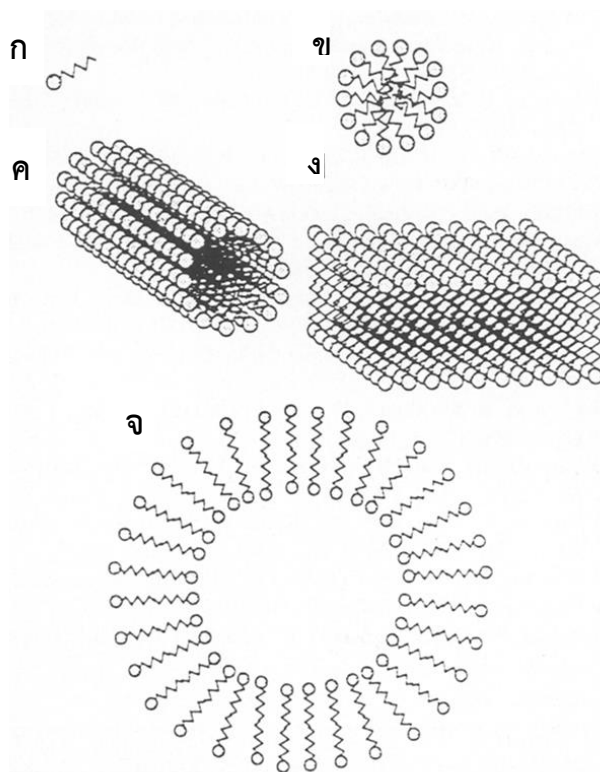
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ คือ สารชีวโมเลกุลที่มีคุณสมบัติในการลดค่าแรงตึงผิว (Surface-active compound) ที่ผลิตจากสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และรา (Cooper และ Zajic, 1980) โดยทั่วไปจะมีโครงสร้างเป็นแบบแอมฟิพาลิก (Amphiphilic molecules) ดังรูปที่ 2.1 ซึ่งประกอบด้วยส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic moiety) ประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิลิก หมู่ไฮดรอกซิล หมู่ฟอสเฟต น้ำตาลหรือกรดอะมิโน และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic moiety) เป็นส่วนของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น กรดไขมันชนิดอิ่มตัวหรือกรดไขมันไม่อิ่มตัว และอาจมีหมู่ไฮดรอกซิลรวมอยู่ด้วย ดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะโครงสร้างโดยทั่วไปของของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Cooper, 1986)

โดยทั่วไปสารลดแรงตึงผิวสามารถทำหน้าที่ลดแรงตึงผิว ระหว่างสองพื้นที่ผิวที่สัมผัสกันได้ เช่น สารลดแรงตึงผิวระหว่างของเหลว ระหว่างของเหลวกับของเหลว และระหว่างของเหลวกับก๊าซ ค่าแรงตึงผิวระหว่างพื้นผิวของน้ำกับอากาศ เรียกว่า “surface tension” และค่าแรงตึงผิวระหว่างน้ำกับไฮโดรคาร์บอน เรียกว่า “interfacial tension” (Kim และคณะ, 1997) เมื่อสารลดแรงตึงผิวมีความเข้มข้นในตัวทำละลาย โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวจะหันส่วนที่ไม่ชอบน้ำเข้าหากัน ด้วยแรงจับกันของสารลดแรงตึงผิว (surfactant self-association) เกิดเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า “ไมเซลล์” (micelle) ขึ้น ลักษณะการเกิดไมเซลล์แสดงดังรูปที่ 2.2 ซึ่งความเข้มข้น ณ จุดที่ทำให้โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวมารวมตัวกันนี้ เป็นคุณสมบัติเฉพาะของสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิด เรียกความเข้มข้น ณ จุดนี้ว่า critical micelle concentration (CMC) การเกิดไมเซลล์จะมีผลต่อค่าแรงตึงผิวของสารละลาย เมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวในสารละลายเพิ่มขึ้น ค่าแรงตึงผิวของ

สารละลายจะมีค่าลดลงจนถึงจุด CMC คือ ค่าแรงตึงผิวของสารละลายจะไม่ลดลงอีก ถึงแม้จะเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวในสารละลาย (Fiechter, 1992)



รูปที่ 2.2 โครงสร้างและการจัดเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Fiechter, 1992)

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

การที่จะเกิดการจัดเรียงตัวของโครงสร้างไมเซลล์เป็นแบบใดนั้นนอกจากแรงกระทำระหว่างโมเลกุลแล้วยังขึ้นกับชนิดของสารลดแรงตึงผิวว่ามีโครงสร้างแบบใด เช่น โมเลกุลมีลักษณะเป็นโซ่สายสั้นและส่วนหัวที่มีขั้วใหญ่จะเกิดการจัดเรียงตัวเป็นแบบไมเซลล์ทรงกลม ถ้าส่วนหัวมีขนาดเล็กก็จะรวมตัวเป็นไมเซลล์แบบทรงกระบอก หรือส่วนไม่ชอบน้ำเป็นสายยาวก็จะรวมตัวเกิดเป็นไบเลเยอร์ เป็นต้น ด้วยสมบัติที่หลากหลายของโครงสร้างไมเซลล์จึงสามารถนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไปประยุกต์ใช้ในงานต่าง ๆ ได้อย่างกว้างขวาง

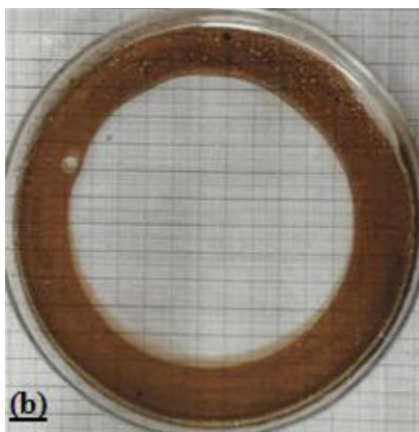
2.2 สมบัติสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

2.2.1 แรงตึงผิว (surface tension) และ แรงตึงระหว่างผิวที่ประจัน (interfacial tension)

แรงตึงผิว คือ แรงที่เกิดขึ้นบริเวณผิวหน้าของของเหลว สามารถแบ่งได้ 2 ชนิด คือ แรงตึงผิวระหว่างของเหลวและอากาศ (surface tension) และแรงระหว่างผิวประจันของของเหลว 2 ชนิด (interfacial tension) สามารถวัดค่าแรงตึงผิวได้จากเครื่องมือ เรียกว่า เทนซิโอมิเตอร์ (tensiometer) มีหน่วยเป็นมิลลินิวตันต่อเมตร (mN/m) หรือ ไดน์ต่อเซนติเมตร (dyne/cm) โดยค่าแรงตึงผิวของน้ำกลั่น เท่ากับ 72 มิลลินิวตันต่อเมตรและสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถลดเหลือต่ำกว่า 30 มิลลินิวตันต่อเมตร และลดค่าแรงระหว่างผิวประจันของน้ำและเฮกซะเดคเคนจาก 40 มิลลินิวตันต่อเมตร เหลือเพียง 1 มิลลินิวตันต่อเมตร (Mulligan, 2005) โดยถ้าจุลินทรีย์สามารถลดค่าแรงตึงผิวได้ต่ำกว่า 40 มิลลินิวตันต่อเมตร แสดงว่าสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ ถ้าต่ำกว่า 35 มิลลินิวตันต่อเมตร แสดงว่ามีประสิทธิภาพดี (Cooper, 1986) เช่น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Cyberlindnera samutprakarnensis* JP52 (Poomtien และคณะ, 2013), *Pseudomonas aeruginosa* F23 (Patil และคณะ, 2014) และ น้ำเลี้ยงเชื้อของ *Candida sphaerica* UCP0995 (Luna และคณะ, 2011) สามารถลดค่าแรงตึงผิวได้เท่ากับ 30.9 31 และ 25.34 มิลลินิวตันต่อเมตร ตามลำดับ ซึ่งนับว่าเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพดี มาก

2.2.2 ค่าการกระจายน้ำมัน (oil displacement activity)

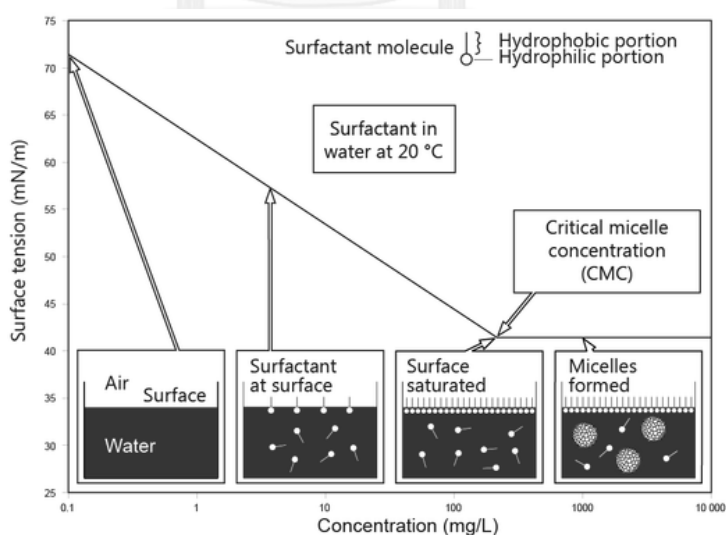
เป็นการกระจายตัวในน้ำมันของสารลดแรงตึงผิว คุณสมบัตินี้ของสารลดแรงตึงผิวในการเปลี่ยนมุมสัมผัสระหว่างน้ำและน้ำมัน เป็นการวัดประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิว สามารถหาได้โดยวัดขนาดของพื้นที่วงใส (clear zone) ที่เกิดแทนที่แผ่นฟิล์มของน้ำมันที่ปกคลุมอยู่บนผิวหน้า น้ำ ดังรูปที่ 2.3 โดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของพื้นที่วงใส คำนวณหาพื้นที่ตามสูตร πr^2 มีหน่วยเป็นตารางเซนติเมตร ซึ่งค่าการกระจายน้ำมันจะแปรผันโดยตรงกับปริมาณความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว (Morikawa และคณะ, 1993) นอกจากการวัดค่าการกระจายน้ำมันจะทำการวัดในส่วนของน้ำใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยากและประหยัดค่าใช้จ่าย และเป็นวิธีที่เหมาะสมในการวัดกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เนื่องจากวิธีนี้ใช้สารปริมาณเพียงเล็กน้อยในการวิเคราะห์ คือ 10 ไมโครลิตรเท่านั้น



รูปที่ 2.3 การวัดค่ากระจายน้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Pseudomonas* sp. (EM19) (Diab, 2015)

2.2.3 ค่าความเข้มข้นวิกฤตในการเกิดไมเซลล์ (Critical micelle concentration, CMC)

ค่าความเข้มข้นวิกฤตในการเกิดไมเซลล์ คือ ค่าความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวที่น้อยที่สุด ที่ทำให้สารลดแรงตึงผิวเกิดการจัดเรียงตัวเป็นรูปร่างไมเซลล์ (micelle) เป็นค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถลดแรงตึงผิวได้ต่ำที่สุดและถ้าเพิ่มความเข้มข้นของสารมากกว่านี้ก็ไม่สามารถลดค่าแรงตึงผิวได้อีก (Cooper และคณะ, 1981) ดังรูปที่ 2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อความเข้มข้นวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ ได้แก่ ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ และ ไอออน (Mulligan และ Gibbs, 2004)



รูปที่ 2.4 การเกิดโครงสร้างไมเซลล์ในน้ำเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจนถึง CMC (Luna และคณะ, 2012)

2.2.4 การก่ออิมัลชัน (Emulsification)

อิมัลชันเป็นระบบคอลลอยด์ (colloid) ประกอบด้วยของเหลวสองชนิดที่ไม่สามารถละลายรวมเป็นเนื้อสารเดียวกันได้ เช่น น้ำและสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Satpute และคณะ, 2010) โดยจะมีของเหลวชนิดหนึ่งจะแตกตัวเป็นหยดเล็ก ๆ และกระจายตัวอยู่ในของเหลวอีกชนิดหนึ่ง อิมัลชันเป็นระบบอุณหพลศาสตร์ (thermodynamic) ที่มีความเสถียรต่ำ ดังนั้นการเติมสารลดแรงตึงผิวลงไปจะช่วยลดแรงตึงผิวระหว่างของเหลวทั้งสองชนิด ทำให้อิมัลชันมีความเสถียรมากขึ้น โดยทั่วไปอิมัลชันแบ่งเป็น 2 ชนิด ได้แก่ อิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ หรือ oil-in-water (O/W) และ อิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน หรือ water-in-oil (W/O) อิมัลชันน้ำมันในน้ำ คือ อิมัลชันที่มีน้ำมันกระจายตัวภายในและภายนอกเป็นน้ำ ส่วนอิมัลชันน้ำในน้ำมัน คือ อิมัลชันที่มีน้ำกระจายภายในและภายนอกเป็นน้ำมัน (Madaan และคณะ, 2014) การวัดประสิทธิภาพในการเกิดอิมัลชันอาจทำได้โดยการวัดค่าดัชนีการก่อเกิดอิมัลชัน (emulsion index) คือ การวัดอัตราส่วนระหว่างความสูงของอิมัลชันและความสูงของของเหลวในหลอดทั้งหมด เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง (Patel และ Desai, 1997) และอาจวัดความเสถียรของอิมัลชันที่เกิดขึ้นโดยวัดค่าดัชนีการก่อเกิดอิมัลชันในระยะเวลานานออกไป

2.2.5 ค่าเฮชแอลบี (hydrophilic-lipophilic balance (HLB))

ค่าเฮชแอลบี คือ ค่าที่แสดงสมบัติชอบน้ำและชอบน้ำมันในโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิว (Griffin, 1955) มีค่าระหว่าง 0-20 ค่าเฮชแอลบีจะบ่งบอกชนิดของอิมัลชันและการนำไปประยุกต์ใช้ได้ โดยถ้าค่าเฮชแอลบีมีค่าน้อยกว่า 6 แสดงว่า สารลดแรงตึงผิวชนิดนั้นจะมีแนวโน้มจะเกิดอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน ถ้าค่าเฮชแอลบีมีค่าระหว่าง 8-18 แสดงว่า สารนั้นมีแนวโน้มจะเกิดอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (Plaza และคณะ, 2014) ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ช่วงของ HLB และการนำไปประยุกต์ใช้ (Tadros, 2009)

ช่วงของ HLB	การนำไปประยุกต์ใช้
0-3	สารลดโฟม (Anti-foaming agent)
4-6	อิมัลซิไฟเออร์ชนิดน้ำในน้ำมัน (Water-in-oil emulsifier)
7-9	สารทำให้เปียก (Wetting agent)
8-18	อิมัลซิไฟเออร์ชนิดน้ำมันในน้ำ (Oil-in-water emulsifier)
13-15	สารทำความสะอาด (Detergent)
15-18	สารละลาย (Solubilizer)

2.3 ข้อดีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์เป็นสารที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างยิ่งในปัจจุบัน เนื่องจากสามารถย่อยสลายได้ เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมและมีความเป็นพิษต่ำ ซึ่งใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ในชีวิตประจำวัน เช่น สารชะล้าง สารทำให้เกิดฟอง สารก่ออิมัลชัน สารช่วยเพิ่มการละลาย เป็นต้น มีการนำผลิตภัณฑ์นั้นไปใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 2.2

2.3.1 มีความเป็นพิษต่ำ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้รับความสนใจมากขึ้น ในการนำมาใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์อาหาร สารชำระต่าง ๆ และเครื่องสำอางและยา (Sobrinho และคณะ, 2013) มักประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ 10-18 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งของเสียจากผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เหล่านี้ มักถูกปล่อยออกสู่ธรรมชาติ ทำให้ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมตามมา นอกจากนี้ยังมีความเป็นพิษต่อทั้งมนุษย์และสัตว์อีกด้วย สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความเป็นพิษต่ำเมื่อเทียบกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์คอร์ซิกเป็นสารลดแรงตึงผิวเคมีที่มีค่า LD50 ของ *Photobacterium phosphoreum* น้อยกว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดแรมโนลิพิด 10 เท่า ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสาร Corexit เป็นสารลดแรงตึงผิวเคมีที่มีความเป็นพิษสูง (Kapadia และ Yagnik, 2013)

2.3.2 ย่อยสลายทางชีวภาพได้

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถย่อยสลายได้ง่ายโดยแบคทีเรียและจุลินทรีย์อื่น ๆ ในน้ำหรือดิน ซึ่งทำให้เหมาะสมใช้งานบำบัดสารมลพิษทางชีวภาพและบำบัดน้ำเสีย (Sobrinho และคณะ, 2013) จากปัญหาสิ่งแวดล้อมที่เพิ่มมากขึ้น ทำให้ผู้บริโภคระหนักถึงผลกระทบที่เกิดจากปัญหาสิ่งแวดล้อมมากขึ้น รวมทั้งกฎหมายที่คุ้มครองเกี่ยวข้องกับปัญหาสิ่งแวดล้อมมีความเข้มงวด ดังนั้นจึงมีการเลือกใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาประยุกต์กับงานทางด้านสิ่งแวดล้อมมากขึ้น เนื่องจากเป็นสารที่ถูกย่อยสลายทางชีวภาพได้ง่าย (Nitschke และ Costa, 2007)

2.3.3 สามารถก่ออิมัลชันได้ดี

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีมวลโมเลกุลสูงจะสามารถก่อหรือสลายอิมัลชันได้ดีกว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีมวลโมเลกุลต่ำ โซโฟโรลิพิดที่ผลิตได้จาก *S. bombicola* สามารถลดค่าแรงตึงผิวและแรงระหว่างผิวประจันได้ดีกว่าเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ (Cooper และ Paddock, 1984) ในขณะที่ไลโปแซนเป็นอิมัลซิไฟเออร์ในน้ำมันที่กินได้ มีความสามารถเคลือบหยดน้ำมันได้ดี ทำให้อาจสามารถนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอางได้ (Nitschke และ Costa, 2007)

2.3.4 ทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสม

ในโรงงานอุตสาหกรรมขั้นตอนกระบวนการผลิตจะต้องผ่านสภาวะต่าง ๆ กัน เช่น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และไอออนต่าง ๆ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพหลายชนิดมีคุณสมบัติที่สามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ได้ จึงเป็นสารที่มีความน่าสนใจในการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม McInerney และคณะ (1990) รายงานว่า ไลเคนนิซินที่ผลิตจาก *Bacillus licheniformis* LF-2 ไม่ส่งผลกระทบต่ออุณหภูมิที่สูงกว่า 50 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วง 4.5-9.0 และ ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์และแคลเซียม 50 และ 25 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

2.3.5 มีโครงสร้างหลากหลาย

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และสารตั้งต้นที่ใช้ในกระบวนการผลิต (Nitschke และ Costa, 2007) ซึ่งทำให้สารแต่ละชนิดมีคุณสมบัติที่จำเพาะจึงสามารถเลือกนำไปประยุกต์ใช้กับงานที่เหมาะสมได้ (Kapadia และ Yagnik, 2013) เช่น การก่ออิมัลชัน การทำให้เปียก การแยกชั้นของวัฏภาค การเกิดฟอง การละลายลดความหนืด เป็นต้น (Bodour และคณะ, 2003)

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่มีสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประยุกต์ใช้ในทางอุตสาหกรรม (Singh และคณะ, 2007)

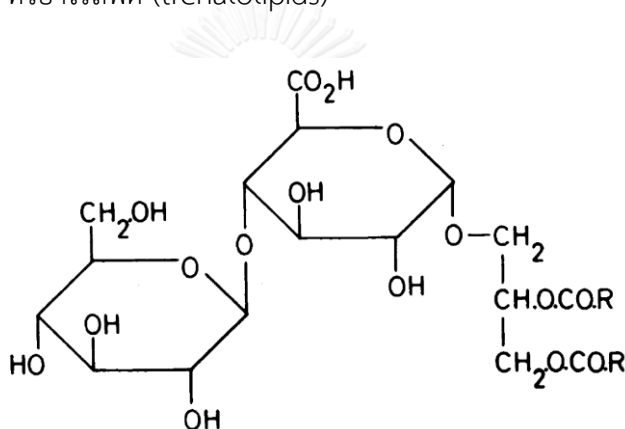
อุตสาหกรรม	การประยุกต์	บทบาทของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ
ปิโตรเลียม	การเก็บเกี่ยวน้ำมันดิบ	วิธีการที่ช่วยในการผลิตน้ำมันขึ้นมาจากหลุมหลังจากที่ได้มีการผลิตตามธรรมชาติแล้ว ช่วยให้ระบายน้ำมันได้ดีขึ้น
	การก่อกิมล์ชัน	ความสามารถในการเข้ากันได้ระหว่างน้ำกับน้ำมัน คุณสมบัตินี้เองทำให้น้ำมันมาใช้ในการทำความสะอาด อุปกรณ์ต่างๆ เช่น ถังเก็บน้ำมัน ท่อส่งน้ำมัน เป็นต้น
สิ่งแวดล้อม	การบำบัดทางชีวภาพ	ช่วยสลายสารไฮโดรคาร์บอนสามารถเข้าถึงมลพิษได้และการบำบัดโลหะและยาฆ่าแมลง
	การฟื้นฟูดิน	ฟื้นฟูดินที่มีการปนเปื้อนด้วยสารอินทรีย์และอนินทรีย์ที่สำคัญ โดยใช้หลักการการชะล้างด้วยสารละลายที่เหมาะสม
อาหาร	การก่อกิมล์ชัน	อิมัลซิไฟเออร์; โดยช่วยป้องกันอิมัลชันไม่ให้แยกเป็นชั้น เพิ่มการละลายในไขมัน ช่วยลดความเหนียวและลดการเกิดฟอง
ชีวภาพ	จุลชีววิทยา	ช่วยในการเคลื่อนที่ของเซลล์ การเข้าสู่อาหาร การเกิดเชื้อก่อโรคในพืชและสัตว์
การเกษตร	การควบคุมศัตรูพืชโดยชีวภาพ	ช่วยในกลไกการควบคุมทางชีวภาพของจุลินทรีย์ เช่น ปรสิต ภาวะหลังสารยับยั้งการเจริญ และเหนี่ยวนำให้เกิดความต้านทานต่อระบบและความรุนแรงของโรค
เครื่องสำอาง	ผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพและความงาม	อิมัลซิไฟเออร์ น้ำยาทำความสะอาด ยารักษาสิว ให้ความชุ่มชื้นในเครื่องสำอางและยาลดกรด

2.4 ประเภทของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

การจัดจำแนกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ สามารถแบ่งได้เป็น 6 กลุ่มตามน้ำหนักโมเลกุล (Molecular mass) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Desai และ Banat, 1997) ได้แก่

2.4.1 ไกลโคลิพิด (Glycolipid)

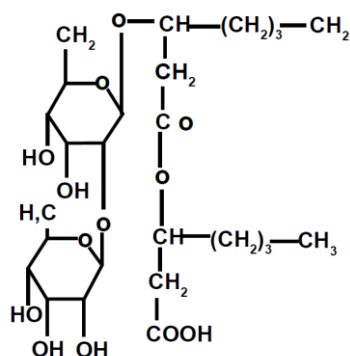
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดไกลโคลิพิดประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตที่เชื่อมต่อกับกรดไขมันสายยาว (long chain fatty acids) หรือ กรดไขมันที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl fatty acids) ด้วยพันธะไกลโคสิดิก (Kaloorazi และ Choobari, 2013) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่จัดเป็นไกลโคลิพิด ได้แก่ กลูคูโรนิก (glucuronic) โซโฟโรลิพิด (sophorolipids) แรมโนลิพิด (rhamnolipids) และ ทรีฮาโรลิพิด (trehalolipids)



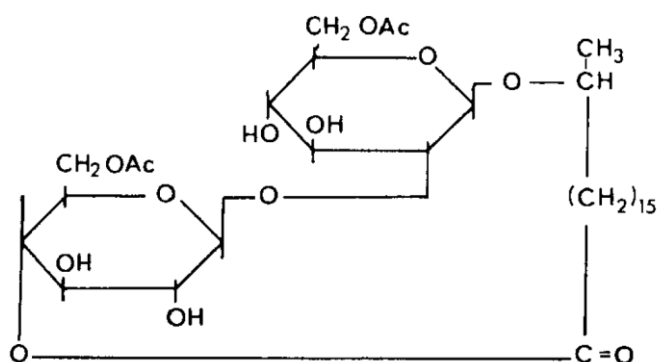
รูปที่ 2.5 โครงสร้างของกรดกลูคูโรนิก (glucuronic acids) ที่เน้นไกลโคลิพิดผลิตจาก *Pseudomonas. diminuta* (Shaw, 1974)

2.4.1.1 โซโฟโรลิพิด (sophorolipids)

โดยส่วนใหญ่สามารถผลิตได้จากยีสต์ เช่น *Torulopsis bombicala*, *T. petrophilium* และ *T. apicola* โครงสร้างโดยประกอบด้วยน้ำตาลโซโฟโรส เชื่อมต่ออยู่กับกรดไฮดรอกซีคาร์บอกซิลิก (hydroxycarboxylic acids) โดยปลายคาร์บอกซิลิกของกรดไขมันอาจเกิดการรวมตัวกับหมู่ไฮดรอกซีของน้ำตาลเกิดเป็นวงแลคโตน (lactone ring) แสดงดังรูปที่ 2.6 เมื่อละลายน้ำแล้วจะแตกตัวและจะมีประจุเป็นลบ (Rosenberg, 1986) โซโฟโรลิพิดเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีคุณสมบัติเข้ากับผิว ให้ความชุ่มชื้นแก่ผิว ยับยั้งแบคทีเรีย และสามารถช่วยลดไขมันส่วนเกินได้ บริษัท Kao Co. Ltd. นำโซโฟโรลิพิดมาใช้เป็นส่วนผสมที่ให้ความชุ่มชื้นในเครื่องสำอาง เช่น ลิปสติก ดินสอเขียนขอบปาก ภายใตยี่ห้อ Sofina และ Soliance (Irfan-Maqsood และ Seddiq-Shams, 2014)



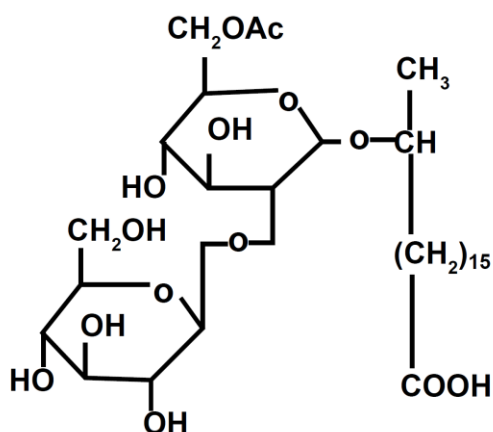
รูปที่ 2.6 โครงสร้างทางเคมีของโซโฟโรลิพิด (Fakruddin, 2012)



รูปที่ 2.7 โครงสร้างทางเคมีของโซโฟโรลิพิดที่ผลิตจาก *S. bombicola* ATCC 22214 เมื่อปลายคาร์บอกซิลิกของกรดไขมันรวมตัวกับหมู่ไฮดรอกซีของน้ำตาลเป็นวงแลคโตน (Rosenberg, 1986)

2.4.1.2 แรมโนลิพิด (rhamnolipids)

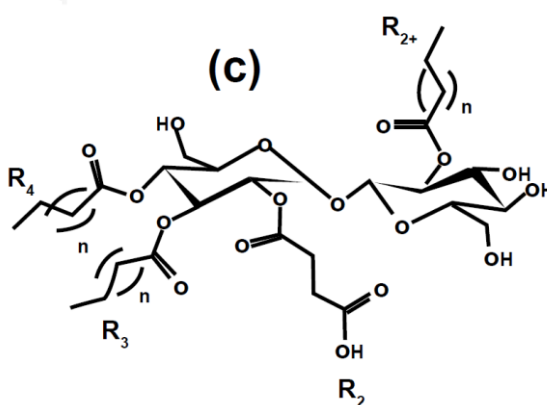
จุลินทรีย์ในสกุล *Pseudomonas* sp. สามารถผลิตแรมโนลิพิดได้หลายชนิด โครงสร้างโดยทั่วไปประกอบด้วยน้ำตาลแรมโนส 1 หรือ 2 โมเลกุล ดังรูปที่ 2.8 ที่เชื่อมต่อกับกรดบิต้าไฮดรอกซีเตคาโนอิก (β -hydroxydecanoic acid) จำนวน 1 หรือ 2 โมเลกุล ด้วยพันธะไกลโคซิดิก ซึ่งแรมโนลิพิดมีสูตรโครงสร้างต่างกัน 6 แบบที่มีจำนวนน้ำตาลแรมโนส และส่วนของ β -hydroxydecanoic acid แตกต่างกันไป แรมโนลิพิดเป็นไกลโคลิพิดที่มีการศึกษาวิจัยมากที่สุด (Kaloorazi และ Choobari, 2013) แรมโนลิพิดมีประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวและละลายได้ดีในสารประกอบไฮโดรคาร์บอน สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในด้านสิ่งแวดล้อม ได้แก่ การบำบัดสารมลพิษทางชีวภาพ (bioremediation) และการย่อยสลายทางชีวภาพ (biodegradation) (Abdel-Mawgoud และคณะ, 2011)



รูปที่ 2.8 โครงสร้างทางเคมีของแรมโนลิพิด (Fakruddin, 2012)

2.4.1.3 ทรีฮาโรลิพิด (trehalolipids)

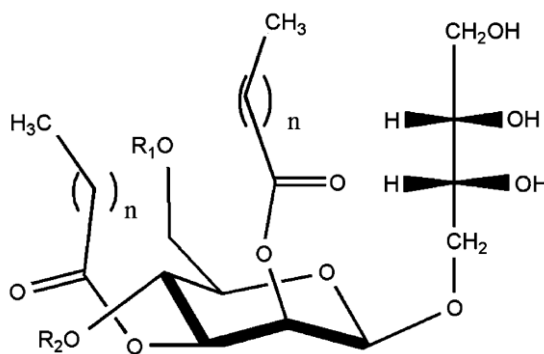
สามารถพบได้ในจุลินทรีย์ที่ผนังเซลล์มีโครงสร้างประกอบด้วยน้ำตาลทรีฮาโรส 2 โมเลกุล เชื่อมต่อกับด้านที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) โดยทั่วไปประกอบด้วยกรดไมโคลิก (mycolic acid) ซึ่งจะมีจำนวนของคาร์บอนอะตอม และจำนวนกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ผลิต ได้แก่ *Corynebacterium* sp., *Mycobacterium* sp. และ *Nocardia* sp. (Burgos-Diaz และคณะ, 2012) จึงทำให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดนี้ มีโครงสร้างหลากหลายรูปแบบ ซึ่ง *Rhodococcus erythropolis* เป็นสายพันธุ์ที่ศึกษาสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดทรีฮาโรลิพิดมากที่สุด (Kaloorazi และ Choobari, 2013)



รูปที่ 2.9 โครงสร้างทางเคมีของทรีฮาโรลิพิด (Fakruddin, 2012)

2.4.1.4 แมนโนซิลอีรีทริทอลลิพิด (mannosylerythritol lipids, MELs)

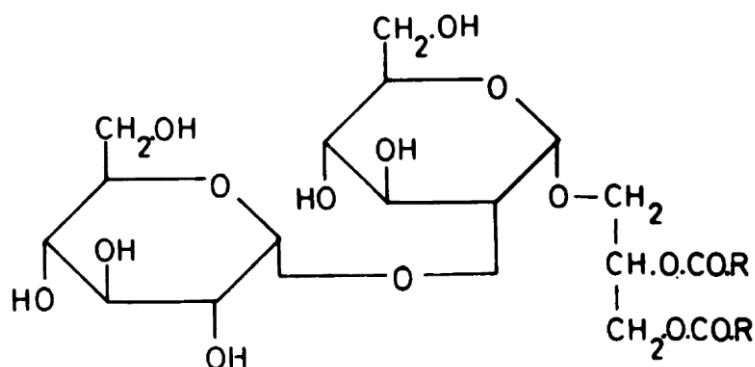
สามารถผลิตได้จากยีสต์ *Candida* sp. เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำมันพืชจะได้ผลผลิตปริมาณมากจำนวน 40 กรัมต่อลิตร (Kitamoto และคณะ, 1992; Kim และคณะ, 1999) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดนี้ ประกอบด้วย 4-O- β -D-mannopyranosylmeso-erythritol เชื่อมต่อกับกรดไขมันชนิดสายสั้น หรือกรดไขมันชนิดสายยาว โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดแมนโนซิลอีรีทริทอลลิพิดมีโครงสร้างที่หลากหลาย (Kitamoto, 2008) ดังรูปที่ 2.10 MEL พบได้ในจุลินทรีย์กลุ่ม *Ustilago* sp. (Haskins และคณะ, 1955) *Pseudozyma* sp. (Kitamoto และคณะ, 1990) และ *Schizonella melanogramma* (shizonellin) (Deml และคณะ, 1980) โดยน้ำเลี้ยงเชื้อสามารถลดแรงตึงผิวได้น้อยกว่า 30 มิลลินิวตันต่อเมตร (Kim และคณะ, 2006) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ได้ เช่น สารต้านมะเร็ง (antitumor) และมีสารต้านจุลินทรีย์แบบที่เรียกว่า แกรมลบและแกรมบวก (Arutchelvi และคณะ, 2008)



รูปที่ 2.10 โครงสร้างทางเคมีแมนโนซิลอีรีทริทอลลิพิด (MEL-A: $R_1 = R_2 = \text{Ac}$; MEL-B: $R_1 = \text{Ac}$, $R_2 = \text{H}$; MEL-C: $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{Ac}$; $n = 6-10$) (Kitamoto, 2008)

2.3.1.5 ไดไกลโคซิล ไดกลีเซอไรด์ (diglycosyl diglycerides)

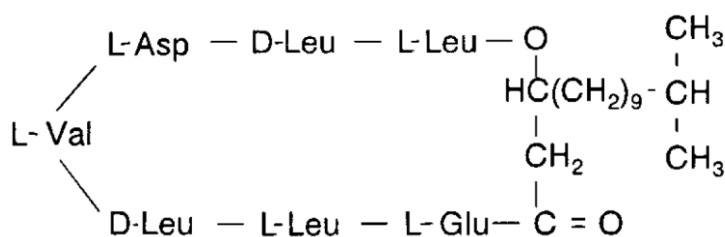
เป็นไกลโคลิพิดชนิดที่พบทั่วไปในแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบบ (Lechevalier, 1977) มีสูตรโครงสร้างประกอบด้วยไดไกลโคซิลกับไดกลีเซอไรด์ที่แตกต่างกัน 5 หมู่ คือ แอลฟา-ไดกลูโคซิลไดกลีเซอไรด์ (α -diglucosyldiglyceride) บีตา-ไดกลูโคซิล- (β -diglucosyl-) ไตแมนโนซิล (dimannosyl-) ไดกาแลคโตซิล- (digalactosyl-) และกาแลคโตซิลกลูโคซิลไดกลีเซอไรด์ (galactosylglucosyldiglycerides) สมบัติของสารไกลโคซิลไดกลีเซอไรด์ยังไม่ค่อยมีรายงานศึกษามากนัก อย่างไรก็ตาม Brundish และคณะ (1967) ได้เสนอว่าสารนี้จัดเป็นสารลดแรงตึงผิว เพราะโมเลกุลของสารมีส่วนที่มีขั้วชอบน้ำ และมีส่วนไม่มีขั้วเป็นหมู่อัลคิล 2 หมู่



รูปที่ 2.11 โครงสร้างทางเคมีของ α -diglycosyl diglyceride (Shaw, 1970)

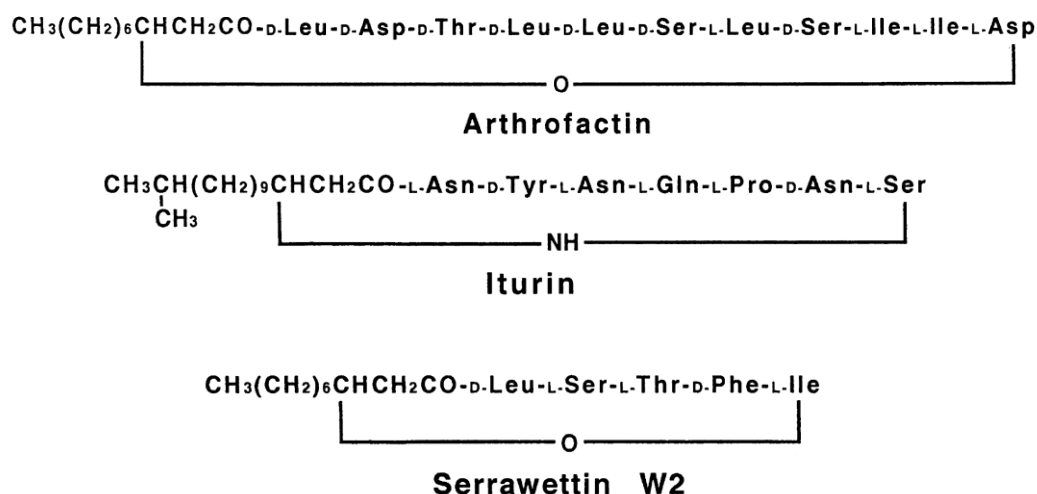
2.4.2 ไลโปเปปไทด์ (lipopeptides) และไลโปโปรตีน (lipoprotein)

เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สามารถผลิตได้จากแบคทีเรียและยีสต์หลายชนิด สามารถยับยั้งจุลินทรีย์อื่นร่วมด้วย ตัวอย่างเช่น เซอร์แฟคติน (surfactin) หรือ ซับทิลิซิน (subtilysin) โพลีมัยซิน (polymyxins) และ ไลเคนิซิน (lichenysin) ที่ผลิตจาก *B. subtilis*, *B. polymyxa* และ *B. licheniformis* ตามลำดับ (Rosenberg, 1986) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าไลโปเปปไทด์ที่ผลิตโดย *B. subtilis* เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด เซอร์แฟคตินประกอบด้วยกรดอะมิโนยาว 7 ตัว เชื่อมต่อกันด้วยพันธะโควาเลนต์ ปลายข้างหนึ่งเชื่อมต่อกับกลุ่มคาร์บอกซิลและปลายอีกข้างหนึ่งต่อกับกลุ่มไฮดรอกซิล ของหมู่ปีตา-ไฮดรอกซีของกรดไขมัน ดังรูปที่ 2.12 มีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งการแข็งตัวของเม็ดเลือด สารยับยั้งจุลินทรีย์และสารต้านมะเร็ง (Gong และ คณะ, 2009)



รูปที่ 2.12 โครงสร้างทางเคมีของเซอร์แฟคตินที่ผลิตจาก *B. subtilis* (Desai และ Banat, 1997)

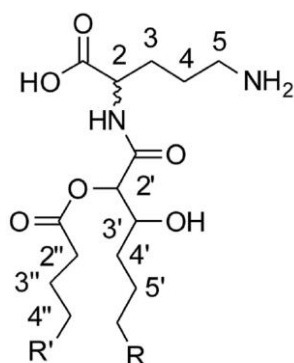
เซอร์แฟคตินเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงที่มีความเข้มข้นเพียง 0.005 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์ สามารถลดแรงตึงผิวของสารละลาย 0.1 M NaCO₃ จาก 71.6 มิลลินิวตันต่อเมตร เป็น 27.9 มิลลินิวตันต่อเมตร (Arima และคณะ, 1968) ไลโปเปปไทด์โครงสร้างประกอบด้วยลิพิดเชื่อมต่อกับสารเพปไทด์ จะมีโครงสร้างของส่วนไขมันมาก โดยเฉพาะโครงสร้างขนาดกลาง



รูปที่ 2.13 โครงสร้างทางเคมีของไลโปเปปไทด์ชนิดต่าง ๆ (Morikawa และคณะ, 1993)

2.4.3 กรดไขมันและไขมัน (fatty acid และ neutral lipid)

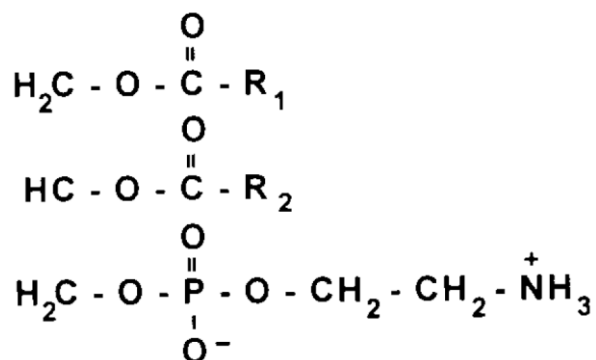
สามารถพบในจุลินทรีย์ได้หลายชนิด และมักปล่อยออกนอกเซลล์ เช่น กรดคาร์บอกซิลิก แอลกอฮอล์ เอสเทอร์ โมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ และไตรกลีเซอไรด์ ดังรูปที่ 2.14 กรดไขมันที่ได้จากอัลเคนได้รับความสนใจมากที่สุดในสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Rosenberg, 1986) Rehm และ Reiff (1981) รายงานว่า กรดไขมันที่ได้มาจากจุลินทรีย์เกิดจากการออกซิเดชันของอัลเคน ตัวอย่างของกรดไขมัน และไขมันที่สามารถลดแรงตึงผิว ได้แก่ กรดโครีโนมัยโคลิก (corynomycolic acid) ที่ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร สามารถลดแรงตึงผิวของน้ำลงเหลือ 40 มิลลินิวตันต่อเมตร ไขมัน (neutral lipid) ที่มีรายงานว่าสามารถลดแรงตึงผิวได้คือ ไขมันที่ผลิตจาก *Mycobacterium rhodochrous* เมื่อความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตร สามารถลดแรงตึงผิวของน้ำเหลือ 44 มิลลินิวตันต่อเมตร และยังส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ Cooper และ Zajic (1980) มีรายงานว่า *Arthrobacter* strain AK-19 (Wayman และคณะ, 1984) และ *P. aeruginosa* 44T1 (Robert และคณะ, 1989) สามารถสะสมไขมันได้ 40-80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเฮกซะเดคเคนและน้ำมันมะกอก (Olive oil) ตามลำดับ



รูปที่ 2.14 โครงสร้างทางเคมีของออร์นิตินที่ผลิตจาก *Mesorhizobium loti* (Diercks และคณะ, 2015)

2.4.4 ฟอสโฟลิพิด

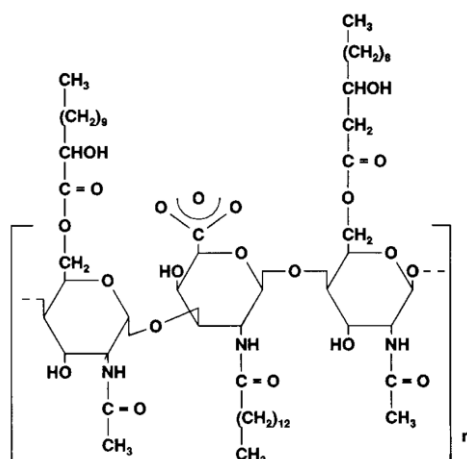
ส่วนใหญ่พบได้ในเยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อจุลินทรีย์เจริญในอาหารที่มีอัลเคนเป็นองค์ประกอบ โครงสร้างโดยทั่วไปของลิพิดประกอบด้วยกลีเซอรอลต่อกับกรดไขมัน 2 หมู่และฟอสเฟต 1 หมู่ด้วยพันธะเอสเทอร์ จุลินทรีย์หลายชนิดที่ผลิตฟอสโฟลิพิดได้ เช่น *Thiobacillus thiooxidans* สามารถลดแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก 72 มิลลิวตันต่อเมตร ลงได้ถึง 49 มิลลิวตันต่อเมตร ตัวอย่างของฟอสโฟลิพิด เช่น ฟอสฟาติดีลลิโนซิลิตอล (phosphatidylinositol) ฟอสฟาติดีลกลีเซอรอล (phosphatidylglycerol) และกรดฟอสฟาติติก (phosphatidic acid) (Käppeli และ Finnerty, 1979) รายงานว่า *Acinetobacter* sp. สายพันธุ์ HO1-N ผลิตฟอสฟาติลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) ดังรูปที่ 2.15 ไว้ในถุงเวซิเคิลจำนวนมาก ได้เมื่อเจริญอยู่ในอาหารที่มีเฮกซาเดเคนเป็นแหล่งพลังงาน (Rosenberg, 1986) *Rhodococcus erythropolis* ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดฟอสฟาติลเอทานอลามีน มีคุณสมบัติในการลดค่าแรงตึงผิวประจันระหว่างน้ำและเฮกซะดีเคนได้น้อยกว่า 1 มิลลิวตันต่อเมตร และมีค่า CMC เท่ากับ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร (Gautam และ Tyagi, 2006)



รูปที่ 2.15 โครงสร้างของฟอสฟาติดีลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) ผลิตจาก *Acinetobacter* sp. ส่วน R₁ และ R₂ เป็นสายไฮโดรคาร์บอนของกรดไขมัน (Desai และ Banat, 1997)

2.4.5 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์ (polymeric biosurfactants)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดพอลิเมอร์มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เช่น อิมัลแซน (emulsan) อะลาแซน (alasan) ไลโปแซน (liposan) แมนโนโปรตีน (mannoprotein) และสารประกอบเชิงซ้อนของพอลิแซคคาไรด์กับโปรตีนชนิดอื่น ๆ (Desai และ Banat, 1997) Rosenberg และคณะ (1979) รายงานว่า *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 ผลิต polyanionic amphipathic heteropolysaccharide bioemulsifier หรือเรียกว่า อิมัลแซน ดังรูปที่ 2.16 เป็นสารที่มีก้ออิมัลชันได้ดี (Zosim และคณะ, 1982) โดยใช้ความเข้มข้นเพียง 0.001-0.01 เปอร์เซ็นต์ ไลโปซานผลิตจากยีสต์ *C. lipolytica* โดยโครงสร้างมีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ 83 เปอร์เซ็นต์ และมีโปรตีน 17 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นสายของเฮเทอโรพอลิแซคคาไรด์ ได้แก่ กลูโคส กาแลกโตส กาแลกโตซามีน และ กรดกาแลคโทโรนิก แมนโนโปรตีนที่ผลิตจาก *Saccharomyces cerevisiae* เป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ (emulsifier) กับน้ำมันหลายชนิด เช่น อัลเคน และใช้เป็นตัวทำละลายได้ดี (Cameron และคณะ, 1988)



รูปที่ 2.16 โครงสร้างของอิมัลชันที่ผลิตจาก *Acinetobacter calcoaceticus* (Desai และ Banat, 1997)

2.4.6 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดอนุภาค (particulate biosurfactant)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดอนุภาคเป็นส่วนหนึ่งของ extracellular membrane vesicle จะสามารถรวมตัวกันเป็นไมโครอิมัลชันกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ มีบทบาทสำคัญในการนำอัลเคนเข้าสู่เซลล์จุลินทรีย์ เวสิเคิลของ *Acinetobacter* sp. HO1-N มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 20-50 นาโนเมตร มีความหนาแน่น 1.158 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ประกอบด้วยโปรตีน ฟอสโฟลิพิด และไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ (Käppeli และ Finnerty, 1979) (Burd และ Ward, 1997) รายงานว่า *P. marginalis* สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชนิดอนุภาคที่มีชื่อว่า PM-factor ไปพร้อมกับการเจริญของเซลล์ สามารถก่อให้เกิดอิมัลชันกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้หลายประเภท

ตารางที่ 2.3 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ (Desai และ Banat, 1997)

ชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	จุลินทรีย์
ไกลโคลิพิด	
Rhamnolipids	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Trehalolipids	<i>Arthrobacter</i> sp. <i>Mycobacterium</i> sp. <i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Nocardia erythropolis</i>
Sophorolipids	<i>Starmerella bombicola</i> <i>C. apicola</i>
Mannosylerythritol lipids	<i>Pseudozyma</i> sp. <i>Ustilago</i> sp.
ไลโปเปปไทด์และไลโปโปรตีน	
Surfactin/iturin/fengycin	<i>B. subtilis</i>
Peptide-lipid	<i>B. licheniformis</i>
Gramicidins	<i>B. brevis</i>
Polymyxins	<i>B. polymyxa</i>
กรดไขมัน ไขมัน และฟอสโฟลิพิด	
Fatty acids	<i>Corynebacterium lepus</i>
Neutral lipids	<i>Nocardia erythropolis</i>
Phospholipids	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Phosphatidylethanolamine	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีโครงสร้างเป็น	
พอลิเมอร์	
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
Mannoprotein	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

2.5 จลนพลศาสตร์การหมักสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ (Kinetic of fermentative production)

ส่วนใหญ่สารลดแรงดึงผิวชีวภาพจะผลิตในขั้นทุติยภูมิ (secondary metabolites) ซึ่งจะปล่อยออกมาในระยะคงที่ (stationary phase) หรือจะผลิตในระยะ log phase (Cameotra และ Makkar, 1998) จลนพลศาสตร์การหมักสารลดแรงดึงผิวชีวภาพมีหลายรูปแบบขึ้นกับแต่ละชนิดของระบบที่ใช้ในการหมัก สรุปได้ 4 รูปแบบ ดังนี้

2.5.1 การผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพควบคู่กับการเจริญของเซลล์ (Growth-associated production)

การผลิตในรูปแบบนี้จะเกิดขึ้นควบคู่กับการเจริญของเซลล์ ดังรูปที่ 2.17 (ก) เช่น การผลิตแรมโนลิพิดจาก *P. aeruginosa* 44T1 (Robert และคณะ, 1989) ไกลโคโปรตีน เอพี 6 (glycoprotein AP-6) จาก *P. fluorescens* 378 (Persson และคณะ, 1988) สารลดแรงดึงผิวจาก *B. cereus* IAF346 และไบโอดีสเพอร์แซนจาก *Bacillus* sp. IAF343 (Cooper และ Goldenberg, 1987) เป็นต้น

2.5.2 การผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพในภาวะจำกัดการเจริญ (Production under growth-limiting conditions)

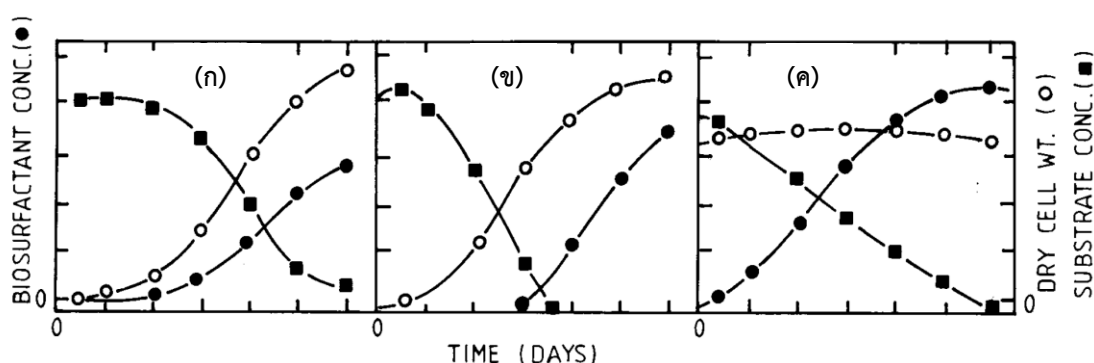
การผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพจะเกิดขึ้นเมื่อทำการจำกัดสารตั้งต้นที่ใช้ในการผลิต ดังรูปที่ 2.17 (ข) เช่น การผลิตแรมโนลิพิดโดย *Pseudomonas* sp. จะเกิดในช่วงภาวะคงที่ (stationary phase) ของการเจริญและมีแหล่งไนโตรเจนจำกัด โดยเมื่อมีการใช้แหล่งไนโตรเจนจนเกือบหมด จุลินทรีย์จะเปลี่ยนไปใช้กลูโคสแทนส่งผลทำให้การผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพเพิ่มขึ้น *Candida tropicalis* lipP-4 จะผลิตสารก่ออิมัลชันได้ดีในภาวะที่มีแหล่งไนโตรเจนจำกัด (Singh และคณะ, 1990)

2.5.3 การผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพในช่วงระยะพักเซลล์ (Production by resting or immobilized cells)

โดยใช้หัวเชื้อที่อยู่ในระยะพัก โดยเซลล์ยังคงสามารถใช้แหล่งคาร์บอนในการผลิตสารได้ ดังรูปที่ 2.17 (ค) เช่นการผลิตโซโฟโรลิพิดจาก *S. bombicola* 11 (Casas และ García-Ochoa, 1999) และ *C. apicola* (Hommel และคณะ, 1994) และการผลิต MEL จาก *C. Antarctica* (Kitamoto และคณะ, 1992) จะผลิตได้ดีที่สุดในระยะพักเซลล์และในภาวะที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีเพียงแหล่งคาร์บอน การผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพในระยะพักเซลล์เป็นสิ่งสำคัญในการลดต้นทุนในการเก็บเกี่ยวผลผลิต เนื่องจากการเจริญและขั้นตอนการผลิตสามารถแยกออกกันได้ (Amaral และคณะ, 2008)

2.5.4 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยมีการเติมสารตั้งต้น (Production with precursor supplementation)

มีรายงานว่าเมื่อมีการเติมสารตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ทำให้คุณภาพและปริมาณของผลผลิตเปลี่ยนแปลงไป เช่น การเติมสารประกอบไปพร้อมกับแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ *T. magnoliae* (Tulloch และคณะ, 1962) *S. bombicola* (Cooper และ Paddock, 1984) และ *T. apicola* IMET 43747 (Stüwer และคณะ, 1987) ส่งผลให้การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มขึ้นประมาณ 120-150 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 2.17 แสดงรูปแบบการเจริญและการผลิตสารของเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ

(Desai และ Banat, 1997)

(ก) การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพควบคู่กับการเจริญของเซลล์ (Growth-associated production)

(ข) การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในภาวะจำกัดการเจริญ (Production under growth-limiting conditions)

(ค) การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในช่วงระยะพักเซลล์ (Production by resting or immobilized cells)

2.6 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพผลิตโดยยีสต์จำนวนมากทั้งภายในเซลล์และนอกเซลล์ ยีสต์สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในสารตั้งต้นที่แตกต่างกัน เช่น คาร์โบไฮเดรต เป็นต้น (Amaral และคณะ, 2008) แต่การนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาประยุกต์ใช้ยังมีข้อจำกัด เนื่องจากต้นทุนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์และได้ผลผลิตต่ำ (Panesar และคณะ, 2011) การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถเกิดขึ้นได้เองหรือจากการ

เลี้ยงเชื้อในสารประกอบที่ไม่มีซั้ว เช่น สารไฮโดรคาร์บอน เป็นต้น ค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ การให้อากาศและอัตราการกวน เมื่อเซลล์เจริญภายใต้สภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น ความเข้มข้นของ ไนโตรเจนต่ำ (Desai และ Banat, 1997) นอกจากนี้แหล่งคาร์บอนยังมีผลต่อสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ไม่ว่าจะเป็นสารที่ปล่อยสู่นอกเซลล์ (extracellular) หรือถูกขังอยู่ในเซลล์ (intracellular) แหล่ง ไนโตรเจน (N-source) และอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N) ก็มีผลต่อการเกิดการผลิ ต์เช่นกัน ดังนั้นประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะดีหรือไม่ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย และ ปัจจัยที่สำคัญคือ สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ใช้ต้องเป็นสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตที่ดีที่สุดที่ภาวะเหมาะสม การ เปลี่ยนแหล่งอาหารจะส่งผลให้โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเปลี่ยน และส่งผลให้สมบัติของ การเป็นสารลดแรงตึงผิวเปลี่ยนไปด้วย ดังนั้นจึงต้องเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับเชื้อแต่ละ ชนิดด้วย

2.6.1 อิทธิพลขององค์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

2.6.1.1 แหล่งคาร์บอน

ในทางด้านคุณภาพและปริมาณของการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะมีผลจากสารตั้ง ต้นที่เป็นแหล่งคาร์บอน (Rahman และ Gakpe, 2008) น้ำมันดีเซล (Diesel) น้ำมันดิบ (crude oil) กลูโคส ซูโครส และ กลิเซอรอล ดังตารางที่ 2.4 ได้รับรายงานว่าเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีในการผลิต สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Desai และ Banat, 1997) โดยแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตสารลดแรง ตึงผิวชีวภาพแบ่งเป็น 3 ประเภท ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต สารประกอบไฮโดรคาร์บอน และน้ำมันพืช มีรายงานว่าพบผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่ำเมื่อใช้กลูโคสหรือน้ำมันพืชจาก *S. bombicola* แต่ จะให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นเป็น 70 กรัมต่อลิตรเมื่อรวมแหล่งคาร์บอนทั้งสองชนิดเข้าด้วยกัน (Cooper และ Paddock, 1984) เพื่อลดต้นทุนในการผลิตจำเป็นต้องใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูก เช่น น้ำทิ้งจาก โรงงานน้ำมันมะกอก แป้งมันสำปะหลัง น้ำมันพืช กากน้ำตาล (molasses) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นของเสีย จากโรงงานอุตสาหกรรม สามารถนำมาผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ (Gautam และ Tyagi, 2006)

ตารางที่ 2.4 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของยีสต์โดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ (Katemai และคณะ, 2010)

Yeast	Carbon source
<i>Candida antarctica</i> T-34	n-Octadecane
<i>Candida antarctica</i> KCTC 7804	Glycerol, oleic acid
<i>Ustilago maydis</i> DSM 4500	Sunflower oil
<i>Starmmerellra bombicola</i> ATCC 22214	Whey, rapeseed oil
<i>Candida apicola</i> IMET 43147	Glucose, sunflower oil
<i>Ustilago maydis</i> ATCC 14826	Coconut oil
<i>Issatchenkia orientalis</i> SR4	Glucose, weathered crude oil, xylene

ในปัจจุบันสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไม่สามารถแข่งขันทางเศรษฐกิจกับสารสังเคราะห์ทางเคมีได้ เนื่องจากต้นทุนในการผลิตสูงซึ่งเป็นผลมาจากการใช้สารตั้งต้นที่มีราคาแพง ค่าใช้จ่ายเหล่านี้อาจลดลงอย่างมากโดยการใช้แหล่งทดแทนสารอาหารที่มีต้นทุนต่ำและผลให้ผลิตสูง (Maneerat, 2005) การนำวัสดุที่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ (renewable resources) มาเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์และผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีบทบาทในการลดต้นทุนในอุตสาหกรรมการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสามารถลดมลพิษในทางทิ้งในหลุมฝังกลบ อุตสาหกรรมอาหารหลายชนิดที่ไขมันและน้ำมัน สร้างของเสียจำนวนมาก ซึ่งเหมาะสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ แต่อย่างไรก็ตามการนำวัสดุดังกล่าวกลับมาใช้ใหม่จำเป็นต้องมีการคัดเลือกวัสดุที่มีสารอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Makkar และ Cameotra, 2002)

กลีเซอรอล (glycerol) เป็นของเสียหรือผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล (biodiesel) และอุตสาหกรรมโอเลโอเคมีอื่น ๆ (oleochemical) (da Silva และคณะ, 2009) และเป็นส่วนประกอบของไขมันที่เป็นธรรมชาติ สามารถทำหน้าที่แทนคาร์โบไฮเดรต เช่น ซูโครส กลูโคส และแป้ง (Bognolo, 1999) ในการผลิตไบโอดีเซลเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วทำให้การสะสมของกลีเซอรอลเพิ่มขึ้นไปด้วย เป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมนี้ ด้วยการผลิตไบโอดีเซล 10 กิโลกรัมจากน้ำมันคาโนลาจะมีกลีเซอรอล 1 กิโลกรัม (Meesters และคณะ, 1996) การสังเคราะห์ไฮโฟโรลิพิตจาก *S. bombicola* ได้ศึกษาในรูปของผลพลอยได้จากการผลิตไบโอดีเซล มีกลีเซอรอล 40 เปอร์เซ็นต์ เฮกซะเดคเคนที่ละลายได้ 34 เปอร์เซ็นต์และน้ำ 26 เปอร์เซ็นต์ จะได้ไฮโฟโรลิพิต 60 กรัมต่อลิตร (Ashby และคณะ, 2005)

กากน้ำตาล (molasses) เป็นผลพลอยได้จากการผลิตน้ำตาลของอ้อยและบีท สารตั้งต้นนี้ประกอบด้วย วัตถุแห้ง 75 เปอร์เซ็นต์ สารอินทรีย์ที่ไม่ใช่น้ำตาล 9-12 เปอร์เซ็นต์ โปรตีน 2.5 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียม 1.5-5.0 เปอร์เซ็นต์ และ แคลเซียม แมกนีเซียมและฟอสฟอรัส 1 เปอร์เซ็นต์ มีลักษณะขุ่น หนืดและสีน้ำตาลเข้ม ปริมาณน้ำตาลสูงประมาณ 48-56 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าเป็นสารตั้งต้นที่ดีในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ต่าง ๆ (Raza และคณะ, 2007) (Patel และ Desai, 1997) รายงานว่า ใช้กากน้ำตาลและ corn steep liquor (CSL) เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ ในการผลิตแรมโนลิพิดจาก *P. aeruginosa* GS3 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงสุดเมื่อใช้ 7 เปอร์เซ็นต์ ของกากน้ำตาลและ 0.5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ของ corn steep liquor

น้ำมันพืชที่ใช้แล้ว (frying oil) เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ น้ำมันพืชประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัวหรือไม่อิ่มตัวที่มีจำนวนของคาร์บอนอะตอม 16-18 (Makkar และคณะ, 2011) เช่น น้ำมันปาล์ม น้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันคาโนลา น้ำมันข้าวโพด น้ำมันดอกคำฝอย และน้ำมันถั่วเหลือง เป็นต้น *P. aeruginosa* ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากข้าวโพดที่ตกค้าง ถั่วเหลืองและน้ำมันคาโนลา (Raza และคณะ, 2006; Raza และคณะ, 2007) น้ำมันคาโนลาที่ตกค้างและโซเดียมไนเตรดเหมาะสมสำหรับให้จุลินทรีย์เจริญและผลิตแรมโนลิพิดได้ถึง 8.50 กรัมต่อลิตร การรวมกันกลูโคสและน้ำมันคาโนลาได้ถูกนำมาใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *C. lipolytica* (Sarubbo และคณะ, 2007)

2.6.1.2 แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนมีความสำคัญในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เนื่องจากมีความจำเป็นสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น โปรตีนและสังเคราะห์เอนไซม์ แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันถูกนำมาใช้ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เช่น ยูเรีย เปปโตน ยีสต์สกัด (yeast extract) แอมโมเนียมซัลเฟต (NH_4SO_4) แอมโมเนียมไนเตรด (NH_4NO_3) โซเดียมไนเตรด (NaNO_3) beef extract และ malt extract (Amaral และคณะ, 2008) ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่นำมาใช้มากในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแต่ความเข้มข้นขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์และอาหารเลี้ยงเชื้อ เกลือแอมโมเนียมและยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Arthrobacter paraffineus* ในขณะที่เลี้ยงในอาหารที่มีไนเตรดทำให้มีสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงสุดโดย *P. aeruginosa* (Adamczak และ Bednarski, 2000)

จุลินทรีย์จะเริ่มมีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เมื่อแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อมีจำกัด หรือจุลินทรีย์เข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) ซึ่งส่งผลทำให้เกิดการยับยั้งกระบวนการเมแทบอลิซึมต่าง ๆ ภายในเซลล์ (Saharan และคณะ, 2011) และทำให้เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องการผลิต

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น (Syladat และคณะ, 1985) แสดงให้เห็นว่าการจำกัดไนโตรเจนทำให้เกิดการผลิตมากเกินไปจนถึงการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิต (Guerra-Santos และคณะ, 1984) มีการผลิตแรมโนลิพิดสูงสุดหลังจากจำกัดไนโตรเจนที่อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจน (C:N) 16:1 ถึง 18:1 และไม่มีการผลิตสารที่ต่ำกว่าอัตราส่วน 11:1

2.6.2 ปัจจัยทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

การศึกษาสภาวะแวดล้อมทางด้านกายภาพมีความสำคัญต่อผลผลิตและลักษณะของสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้ เพื่อให้ได้ปริมาณของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมากขึ้นจำเป็นต้องเพิ่มประสิทธิภาพให้เหมาะสมต่อกระบวนการทางชีวภาพ เนื่องจากปัจจัยทางด้านกายภาพ เช่น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง การให้อากาศและอัตราการกวน (Fakruddin, 2012)

2.6.2.1 ค่าความเป็นกรด-ด่าง

ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *C. Antarctica* ได้ใช้ฟอสเฟตบัพเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างแตกต่างกันตั้งแต่ 4-8 (Kitamoto และคณะ, 2001) Zinjarde และ Pant (2002) รายงานว่า การศึกษาอิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *C. lipolytica* ที่ดีที่สุด เมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.0 ซึ่งเป็นค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำทะเล

2.6.2.2 อุณหภูมิ

มีรายงานว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพส่วนใหญ่จะผลิตได้ดีในช่วงอุณหภูมิเท่ากับ 25-30 องศาเซลเซียส (Saharan และคณะ, 2011) อุณหภูมิมีผลต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เนื่องจากเอนไซม์จะทำงานได้ดีที่สุดในสภาวะที่อุณหภูมิที่เหมาะสม (Auhim และ Mohamed, 2013) Deshpande และ Daniels (1995) ได้สังเกตว่าการเจริญของ *S. bombicola* ถึงจุดสูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ขณะที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่ดีที่สุดในการผลิตโซโฟโรลิพิด

2.6.2.3 การให้อากาศและการกวน

การให้อากาศและอัตราการกวนเป็นปัจจัยสำคัญที่มีอิทธิพลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เนื่องจากมีการถ่ายโอนออกซิเจนจากก๊าซไปยังของเหลวและเชื่อมโยงกับสรีรวิทยาของอิมัลซิไฟเออร์ของจุลินทรีย์ มีข้อเสนอแนะว่าการผลิตอิมัลซิไฟเออร์สามารถเพิ่มการละลายของสารตั้งต้นที่ไม่ละลายน้ำ ดังนั้นส่งเสริมให้อาหารเข้าไปยังจุลินทรีย์ง่ายยิ่งขึ้น (Amaral และคณะ, 2008) *Nocardia erythropolis* และ *Acetobacter calcoaceticus* ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพน้อยลง

เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของแรงเฉือน แต่ในทางกลับกันสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดยยีสต์มักเพิ่มขึ้น เมื่อมีการกวนและให้อากาศ (Desai และ Banat, 1997) Oliveira และคณะ (2009) ได้ศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงความเร็วในการหมุนของอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 50-200 รอบต่อนาที โดย *P. alcaligenes* เพาะเชื้อในน้ำมันปาล์มและพบว่าความเร็วของการหมุนช่วยลดแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเซลล์ได้ถึง 27.6 มิลลินิวตันต่อเมตร

2.6.2.4 ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง

เวลาในการเพาะเลี้ยงมีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพอย่างมาก จุลินทรีย์ที่แตกต่างกันสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงสุดโดย *Aspergillus ustus* MSF3 หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 5 วัน ในขณะที่ *S. bombicola* มีระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 7 8 และ 11 วัน (Casas และ García-Ochoa, 1999; Cavaleiro และ Cooper, 2003; Felse และคณะ, 2007) นอกจากนี้ยังพบว่าการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงสุดโดย *S. bombicola* โดยใช้ไขมันสัตว์หลังจากการเพาะเลี้ยง 68 ชั่วโมง (Deshpande และ Daniels, 1995)

2.7 ประโยชน์และการประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

มีรายงานวิจัยและเผยแพร่เกี่ยวกับการนำสารลดแรงตึงผิวไปประยุกต์ใช้จำนวนมากในทางการค้าและอุตสาหกรรม ในความเป็นจริงสารลดแรงตึงผิวถูกสังเคราะห์ทางเคมี อย่างไรก็ตามมีการให้ความสนใจเป็นอย่างมากเกี่ยวกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเนื่องจากมีคุณสมบัติอยู่ในวงกว้างและมีความสามารถในการสังเคราะห์ที่หลากหลายของจุลินทรีย์ ที่สำคัญที่สุดได้การยอมรับทางด้านสิ่งแวดล้อมเนื่องจากมีความสามารถในการย่อยสลายได้ง่ายและมีความเป็นพิษต่ำกว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ (Desai และ Banat, 1997) นอกจากนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้งานด้านอุตสาหกรรมน้ำมัน อุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอางและเภสัชกรรม (Nitschke และ Costa, 2007) ทั้งนี้ยังมีความสามารถในการต้านจุลชีพจึงนำมาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ได้

2.7.1 ด้านสิ่งแวดล้อม

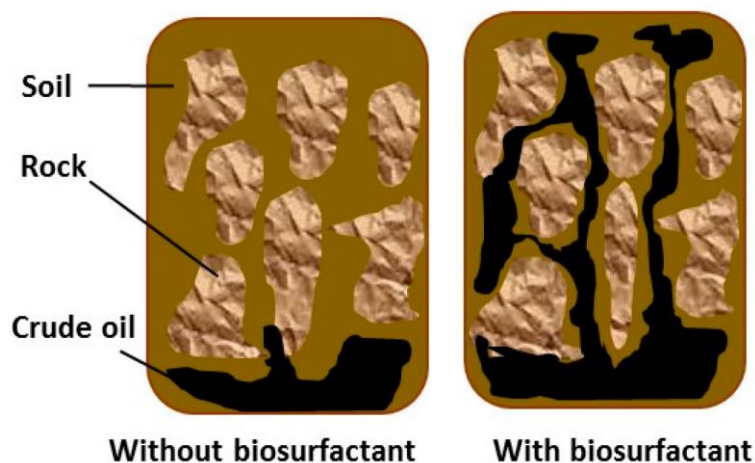
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถนำมาประยุกต์ใช้ทางด้านสิ่งแวดล้อมได้ เช่น การย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอน การบำบัดโลหะหนักและยาฆ่าแมลง วิธีที่เพิ่มความสามารถในการละลายของสารเคมีอันตรายทางชีวภาพ เช่น PAH (Polycyclic aromatic hydrocarbons) ใช้สารลดแรงตึงผิวเป็นตัวเร่งการเคลื่อนที่มีค่าการละลายน้ำที่ต่ำมาก ๆ เป็นการเพิ่มความสามารถในการละลายของสารประกอบอินทรีย์จำพวกไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic Organic Contaminants : HOC) เกิดได้จาก

การเผาไหม้ของสารอินทรีย์ที่อุณหภูมิสูงหรือกระบวนการหลายอย่างที่เกี่ยวกับอุตสาหกรรมเชื้อเพลิงและปิโตรเคมี (Fakruddin, 2012) นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังช่วยดูดซับจุลินทรีย์ที่เกาะอยู่กับอนุภาคของดินในมลพิษ จึงลดระยะทางการแพร่กระจายระหว่างพื้นที่ของการดูดซึมและพื้นที่ของการใช้จากจุลินทรีย์ ในทางการเกษตรสารลดแรงตึงผิวชีวภาพใช้สำหรับพองดินที่หนักให้ความชุ่มชื้นและเพื่อให้เกิดการกระจายตัวของปุ๋ยในดินได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังป้องกันการจับตัวกันเป็นก้อนของปุ๋ยระหว่างการเก็บรักษาและส่งเสริมการแพร่กระจายและการซึมผ่านของสารพิษในสารกำจัดศัตรูพืช (Makkar และ Rockne, 2003)

Mulligan (2005) ศึกษาการบำบัดโลหะหนักด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่า เซอร์เฟกติน แรมโนลิพิด และ โซโฟโรลิพิด มีประสิทธิภาพในการกำจัดทองแดงและสังกะสีออกจากดินตะกอนได้ โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถดูดซึมอยู่บนผิวน้ำดินตะกอนที่ปนเปื้อนโลหะหนักและโครงสร้างไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะเกิดการรวมตัวกันกับโลหะหนัก ซึ่งจะสามารถกำจัดโลหะหนักออกจากดินตะกอนได้

2.7.2 ด้านอุตสาหกรรมน้ำมัน

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพและอิมัลซิไฟเออร์เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดและผลิตภัณฑ์ที่หลากหลายของเทคโนโลยีจุลินทรีย์สามารถนำเสนอในด้านต่าง ๆ เช่น การย่อยสลายของสารไฮโดรคาร์บอนในแหล่งเก็บน้ำมัน เอนไซม์และตัวเร่งปฏิกิริยาสำหรับปิโตรเลียม (Perfumo และคณะ, 2010) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นสารที่มีบทบาทในการช่วยเก็บเกี่ยวน้ำมันดิบ โดยจะช่วยเพิ่มการผลิตน้ำมันดิบผ่านกระบวนการทางจุลชีววิทยา (microbial-enhanced oil recovery, MEOR) โดยใช้กระบวนการเมตาบอลิซึมเพื่อเพิ่มการผลิตของน้ำมันจากแหล่งที่มีการผลิตน้อย จุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จะสามารถลดค่าแรงตึงผิวและความหนืดระหว่างน้ำมันกับหินทำให้น้ำมันดิบในชั้นหินเคลื่อนตัวได้ดีขึ้น (Fakruddin, 2012) มีรายงานว่าจุลินทรีย์บางชนิด เช่น *B. subtilis* *P. aeruginosa* และ *S. bombicola* ใช้ไขมันดิบและไฮโดรคาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอนและสามารถนำมาใช้ทำความสะอาดคราบน้ำมันได้ (Das และ Mukherjee, 2007)



รูปที่ 2.18 กลไกการเก็บเกี่ยวน้ำมันโดยใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Santos และคณะ, 2016)

2.7.3 ด้านอุตสาหกรรมอาหาร

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีแนวโน้มประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้หลายอย่าง เช่น เป็นสารปรุงแต่งอาหาร ในขั้นตอนกระบวนการผลิตของอุตสาหกรรมอาหารไม่เพียงแต่ต้องสนใจถึงด้านความปลอดภัยของผู้บริโภค แต่ยังคงคำนึงถึงลักษณะรูปร่าง รสชาติ และกลิ่นรสที่ปรุงแต่งให้มีความใกล้เคียงกับอาหารที่ปรุงสดใหม่ ดังนั้นจึงต้องมีการเติมสารเติมแต่งอาหาร (food additives) เพื่อรักษาคุณภาพและชะลอความสดใหม่ของอาหาร จากคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifier) สารที่ป้องกันการยึดเกาะของจุลินทรีย์ (antiadhesive) และมีคุณสมบัติในการต้านจุลชีพ (antimicrobial) (Bloomberg, 1991)

นอกจากนี้ยังใช้ควบคุมการรวมตัวของอนุภาคเม็ดไขมัน (fat globules) ความเสถียรของระบบอิมัลชัน ปรับปรุงเนื้อสัมผัสและอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยแป้ง ปรับปรุงคุณสมบัติรีโวลยี (rheological properties) เช่น ความหนืดและเนื้อสัมผัสของโด (Dough) จากแป้งข้าวสาลีและปรับปรุงความชื้นเหนียวและเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ที่มีไขมัน (Muthusamy และคณะ, 2008)

2.7.4 ด้านเครื่องสำอาง

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังมีความน่าสนใจมากในอุตสาหกรรมสุขภาพและเครื่องสำอาง สารประกอบจำนวนมากสำหรับงานประยุกต์ใช้ด้านเครื่องสำอางเตรียมโดยการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ของโม่เลกุลไม่ชอบน้ำจากไลเปสและเซลล์ทั้งหมด (Therisod และ Klibanov, 1986) อุตสาหกรรมเครื่องสำอางต้องการสารลดแรงตึงผิวที่มีอายุการเก็บรักษา 3 ปี ดังนั้นกลุ่มเอซิล (acyl group) ที่อิมตัวเป็นที่ต้องการมากกว่าสารไม่อิมตัว โมโนกลีเซอไรด์ (monoglycerides) เป็นหนึ่งใน

สารลดแรงตึงผิวที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง มีรายงานว่าผลิตจากกลีเซอรอล และไขมันวัว (1.5:2) ที่ให้ผลผลิต 90 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ *P. fluorescens* (Francy และคณะ, 1991)

บริษัท Kao Co. Ltd. นำโซโฟโลลิพิตมาใช้เป็นส่วนผสมที่ให้ความชุ่มชื้นในเครื่องสำอาง เช่น ลิปสติก ดินสอเขียนขอบปาก ภายใต้ยี่ห้อ Sofina และ Soliance (Irfan-Maqsood และ Seddiq-Shams, 2014) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเหล่านี้ถูกใช้เป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ สารทำฟอง สารช่วยในการละลาย สารช่วยเคลือบผิว น้ำยาทำความสะอาด สารต้านจุลชีพ แผ่นสิว ผลิตภัณฑ์อาบน้ำ ผลิตภัณฑ์ป้องกันรังแค และ ลิปสติก (Gharaei-Fathabad, 2011)

2.7.5 ด้านการแพทย์

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพถูกนำมาประยุกต์ใช้ในด้านการรักษาที่แตกต่างกัน เนื่องจากสามารถยับยั้งแบคทีเรีย (antibacterial) รา (antifungal) และไวรัส (antivirus) (Gudiña และคณะ, 2011) โครงสร้างที่หลากหลายของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพช่วยให้สามารถแสดงประโยชน์ได้หลากหลาย โดยโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความเป็นพิษต่อความสามารถในการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์มีผลคล้ายกับสารซักล้าง (Zhao และคณะ, 2010)

Gharaei-Fathabad (2011) รายงานว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีบทบาทในการยับยั้งเชื้อก่อโรคทำให้เป็นประโยชน์ในการรักษาโรคต่าง ๆ รวมถึงสามารถใช้เป็นยารักษาโรคและสารปรับภูมิคุ้มกัน ตัวอย่างที่ดีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *B. circulans* จากทะเลมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรค แรมโนลิพิตมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย Abalos และคณะ (2001) รายงานว่า แรมโนลิพิตที่ผลิตได้จาก *P. aeruginosa* AT10 ที่เพาะเลี้ยงในน้ำมันถั่วเหลืองที่ใช้แล้วและสารละลายมีคุณสมบัติต้านจุลินทรีย์

สารเสริมฤทธิ์ของภูมิคุ้มกัน (Immunological adjuvants) แบคทีเรียผลิตไลโปเปปไทด์ เป็นสารประกอบหรือระบบนำส่งที่มีคุณสมบัติในการช่วยเพิ่มการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของแอนติเจน สารเสริมฤทธิ์ที่ดีจะต้องไม่เป็นพิษต่อร่างกาย มีความคงตัว ราคาถูกสามารถนำไปใช้ได้กับวัคซีนหลายชนิด สามารถกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้หลายกลไก เพิ่มการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ดีกว่าการใช้แอนติเจนในวัคซีนเพียงอย่างเดียว และสามารถทำให้ร่างกายมีภูมิคุ้มกันเป็นระยะยาวนานและทำให้ไม่มีความจำเป็นต้องฉีดวัคซีนเข็มกระตุ้นบ่อย ๆ (Bae และคณะ, 2009; Gharaei-Fathabad, 2011)

2.7.6 สารซักล้างเชิงพาณิชย์

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเกือบทั้งหมดเป็นองค์ประกอบสำคัญที่สามารถนำมาใช้ในสารซักล้างเชิงพาณิชย์ได้ในปัจจุบัน ในการสังเคราะห์ทางเคมีมักจะเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตที่มีอยู่ในน้ำ การ

ตระหนักถึงอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมและความเสี่ยงที่เกี่ยวข้องสารลดแรงตึงผิวทางเคมีได้กระตุ้นให้เกิดแนวคิดเพื่อสิ่งแวดล้อม (ecofriendly) โดยที่จะไม่ต้องใช้สารลดแรงตึงผิวทางเคมี (Fakruddin, 2012) Cyclic Lipopeptide (CLP) มีความเสถียรในช่วงความเป็นกรดต่างที่กว้าง (7.0-12.0) และการให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงจะไม่ส่งผลกระทบต่อคุณสมบัติของสาร (Mukherjee, 2007) มีความสามารถในการก่ออิมัลชันที่ดีด้วยน้ำมันพืชและแสดงให้เห็นถึงความเข้ากันได้และความเสถียรของสารซักล้างเชิงพาณิชย์ (Das และ Mukherjee, 2007)

2.8 วิธีการพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology)

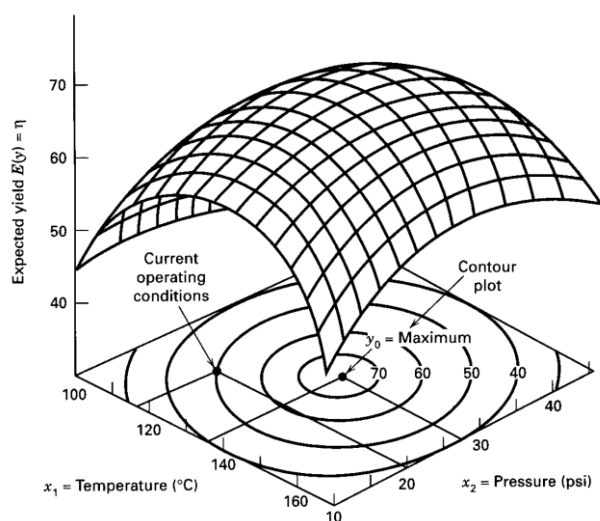
การหาภาวะที่เหมาะสม (optimization) เป็นวิธีการที่ใช้ในการปรับปรุงการทำงานของกระบวนการผลิตเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุด การวิจัยเพื่อหาภาวะที่เหมาะสม (Optimization) สามารถทำได้โดยหาที่ละปัจจัยขณะที่ควบคุมอิทธิพลของปัจจัยอื่นให้คงที่เรียก one factor at a time หรือใช้วิธีทางคณิตศาสตร์สถิตินำปัจจัยมากกว่า 2 ปัจจัยมาหาความสัมพันธ์เรียกว่า multivariable statistics techniques ซึ่งนิยมกันมากขึ้นในปัจจุบัน

ข้อจำกัดของวิธีการ one factor at a time คือ (1) ไม่สามารถหาผลกระทบร่วมระหว่างปัจจัยที่ทำการศึกษาทั้งหมด (2) ไม่สามารถรับรองผลได้ว่าปัจจัยที่ศึกษานั้นให้ค่าตอบสนองที่เหมาะสมที่สุด และ (3) จำนวนการทดลองที่ใช้ศึกษา ถ้าต้องให้ครบทุกปัจจัยอย่างมีความสัมพันธ์กันหรือในทางสถิติเรียก full factorial method จะมีจำนวนการทดลองมาก (Araujo และ Brereton, 1996; Wang และ Wan, 2009)

วิธี Multivariate Statistic Techniques สามารถนำมาใช้หาภาวะที่เหมาะสมโดยจะได้รับความสัมพันธ์ระหว่างทุกปัจจัยจากวิธีพื้นผิวตอบสนองหรือ Response Surface Methodology (RSM) ซึ่งเป็นกระบวนการนำความรู้ทางคณิตศาสตร์ และทางสถิติ เข้ามาใช้ร่วมกับการทดลองจริง เพื่อช่วยในการหาผลตอบสนองที่ดีที่สุด (optimum response) และให้ได้ผลเร็วที่สุดอีกทั้งเป็นการลดจำนวนการทดลองลงได้ ช่วยให้ประหยัดทรัพยากรและเวลาที่ใช้ในการทดลอง แล้วได้ผลคือได้สภาวะที่ใกล้จุดที่สุดได้มากกว่าวิธี one factor at a time ทำโดยการนำสมการพหุนาม (polynomial equation) ฟิต (fitted) เข้ากับผลการทดลอง ซึ่งจะช่วยให้สามารถอธิบายพฤติกรรมของชุดข้อมูลที่ศึกษาได้โดยวิธีทางสถิติ วิธีพื้นผิวตอบสนองหรือ RSM นั้นนำไปใช้ได้ดีเมื่อต้องการศึกษาผลที่ได้จากการทดลอง (response หรือ set of response) ที่ขึ้นกับอิทธิพลของหลายปัจจัยหลายระดับ

การนำวิธีการพื้นผิวตอบสนองหรือ RSM ประกอบด้วยวิธีการออกแบบการทดลอง (experimental design) ความรู้พื้นฐานในการวิเคราะห์สมการถดถอย (regression analysis) และ

ความรู้ในการใช้โปรแกรมที่สร้างแผนภาพคอนทัวร์ (contour plot) การออกแบบการทดลองต้องพิจารณาถึงวิธีการด้วย เช่น หากชุดข้อมูลที่ได้จากการทดลองนั้นแสดงผลเป็นเส้นตรง จะเลือกวิธีการออกแบบที่เป็น 1st order model แต่ถ้าแสดงผลเป็นเส้นโค้ง (curvature) จะใช้วิธีการออกแบบการทดลองที่เป็น 2nd order model เช่น Three-level factorial Design Box-Behnken Design, Central Composite Design และ Doehlert design เป็นต้น (Bezerra และคณะ, 2008; อนุวัตร แจ่มชัด, 2549)



รูปที่ 2.19 แผนภาพพื้นที่ผิวตอบสนองแบบ 3 มิติ (response surface plot) และ 2 มิติ (contour plot) (Montgomery, 2008)

2.8.1 ขั้นตอนการทำ RSM

2.8.1.1 เลือกแผนการทดลองที่เหมาะสมที่สามารถให้ข้อมูลเพียงพอ

โดยเลือกทฤษฎีที่ออกแบบการทดลองที่เหมาะสม แล้วทำการทดลองจริงตามที่โปรแกรมออกแบบ ดังตัวอย่าง เช่น Factorial in CRD or RBD design Fractional factorial in CRD or RBD design Rotatable design Central Composite Design (CCD) Box-Behnken design และ Mixture design

2.8.1.2 จากข้อมูลที่ได้จากผลการทดลองจริงนำมาสร้างสมการถดถอย (regression) ที่ดีที่สุดสามารถใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติได้ เช่น SAS SPSS หรือ MINITAB

2.8.1.3 สร้างแผนภาพคอนทัวร์ (contour plot) จากสมการที่หามาได้ software ที่ใช้ เช่น STATISTICA หรือ MINITAB

2.8.1.4 ตรวจสอบสถานะที่เหมาะสมด้วยการทำการทดลองจริงอีกครั้งตามค่าที่ดีที่สุดจากคอนทัวร์

2.8.1.5 Verification โดยการทำ independent run ภายใต้ขอบเขตของตัวแปรแต่ละตัว

2.8.1.6 ถ้า model ไม่เหมาะสม (invalid) ให้สร้าง model ใหม่ (ทำซ้ำข้อ 2.8.1.2 ถึง 2.8.1.5)

2.8.2 การเลือกแบบจำลอง (model selection) และการวางแผนการทดลอง (experimental design)

การใช้วิธี RSM มีหลายเทคนิคในการสร้างและคัดเลือกแบบจำลอง (model) ที่ดีที่สุดนั้น ขึ้นอยู่กับการวางแผนเริ่มต้น และเมื่อมีแผนการทดลองแล้วจะใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อทดสอบความเหมาะสมของแบบจำลองที่ใช้ อย่างไรก็ตาม บางการทดลองที่ไม่มีการวางแผนล่วงหน้าอาจเลือกใช้เทคนิค (อนุวัตร แจ็งซัด, 2549) ดังนี้

2.8.2.1 เทคนิคการสร้างแบบจำลองแบบสมบูรณ์ (full model technique)

วิธีการนี้จะระบุ แบบจำลองที่ต้องการใช้ เช่น แบบจำลองอันดับหนึ่ง (first order model) หรืออันดับสอง (second order model) แล้วใช้การวิเคราะห์สมการถดถอยเพื่อประมาณค่าสัมประสิทธิ์ของตัวแปรทุกตัว

2.8.2.2 เทคนิคการสร้างแบบจำลองลดรูป (reduced model technique)

วิธีการนี้จะแสดงแบบจำลองแบบลดรูป (reduced model) โดยเลือกเฉพาะตัวแปรที่มีนัยสำคัญในแบบจำลองมาใช้สร้างแผนภาพคอนทัวร์ หรือ surface plot โดยวิเคราะห์สมการถดถอยด้วยเทคนิค ได้แก่ stepwise technique และ all possible regression technique

โดยข้อมูลที่ได้จากการทำ Response Surface Methodology (RSM) เป็นข้อมูลพื้นฐานที่ดีเกี่ยวกับกระบวนการพัฒนาผลิตภัณฑ์ เนื่องจากนำมาใช้ศึกษาผลกระทบและผลตอบสนองที่เปลี่ยนแปลงไปของหลายปัจจัยที่ศึกษา โดยอาศัยแผนการทดลองได้หลายรูปแบบ ขึ้นอยู่กับว่าผู้วิจัยต้องการจำนวนสิ่งทดลองมากน้อยเพียงใดและระดับของการทดลองเป็นเท่าใด ทั้งนี้การคำนวณค่าระดับจริงที่ใช้ในการทดลอง ใช้สมการในการเปลี่ยนรหัส (Neter และคณะ, 1996) คือ

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X_i}$$

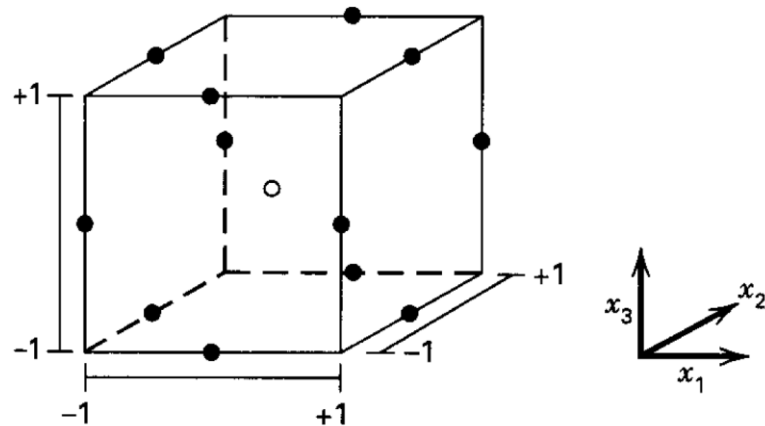
โดย	x_i	คือ	ค่ารหัสของปัจจัยในการทดลอง
	X_i	คือ	ค่าจริงของปัจจัยในการทดลอง
	X_0	คือ	ค่าเฉลี่ยของระดับของปัจจัยในการทดลอง
	ΔX_i	คือ	ค่าช่วงกลางของระดับของปัจจัยในการทดลอง

2.8.3 การวิเคราะห์การถดถอย (Regression analysis)

ในทางปฏิบัติเกี่ยวกับการประยุกต์ใช้เทคนิคพื้นผิวตอบสนองจำเป็นต้องอาศัยสมการสำหรับประมาณค่าตอบสนองที่แท้จริง โดยถ้ากำหนดตัวแปรที่นำมาศึกษาตัวหนึ่งเป็นตัวแปรตาม ส่วนตัวแปรที่เหลือเป็นตัวแปรอิสระ จะใช้หลักการวิเคราะห์การถดถอย เพื่อศึกษาว่าตัวแปรอิสระที่กำหนดมีส่วนในการอธิบายความผันแปรของตัวแปรตามมากน้อยเพียงใด โดยลักษณะความสัมพันธ์จะแทนด้วยสมการถดถอย (regression equation) ซึ่งหาจากวิธีกำลังสองน้อยที่สุด (least square method) สมการถดถอยที่สร้างขึ้นจะเป็นสมการที่เหมาะสมหรือไม่นั้น จะพิจารณาได้จากค่าสถิติ เช่น ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination, R²) และการทดสอบสมมติฐาน เพื่อพิจารณาว่าค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยบางค่าเท่ากับศูนย์หรือไม่ นั่นคือตัวแปรอิสระบางตัวแปรมีส่วนในการอธิบายความผันแปรของตัวแปรตามอย่างไร โดยโปรแกรมที่ใช้ในการวิเคราะห์ เช่น SPSS, SAS และ Microsoft Excel เป็นต้น (Myers และ Montgomery, 2002)

2.8.4 แผนการทดลอง Box-Behnken design

เป็นการออกแบบที่คล้ายกับ CCD แต่ต่างกันที่จุดบนแกนจะอยู่ในระนาบเดียวกับจุดที่เป็น Factorial และทำซ้ำที่จุดกึ่งกลาง แต่ละปัจจัยจะมี 3 ระดับ คือ -1, 0, 1 (Montgomery, 1991) เป็นวิธีที่ใช้ใน RSM เพื่อใช้หาข้อมูลมาใช้ในการประมาณพื้นผิวตอบสนองด้วยแบบจำลองความสัมพันธ์อันดับสอง และเป็นแผนการทดลองที่ใช้กับปัจจัยหรือตัวแปรอิสระ และตัวแปรตอบสนองที่เป็นตัวแปรเชิงปริมาณ ดังแสดงในรูปที่ 2.20 และตารางที่ 2.5



รูปที่ 2.20 แสดงระดับของสิ่งทดลอง (design points) สำหรับแผนการทดลอง Box-Behnken design (Montgomery, 1991)

มีการนำ Box-Behnken design ไปประยุกต์ใช้นั้นจะนำไปใช้กับกระบวนการทางด้านเคมีและฟิสิกส์ แต่ด้านของการวิเคราะห์ทางเคมีนั้น จะนิยมใช้การออกแบบการทดลองแบบ Central Composite Design มากกว่า นอกจากนี้ในทางชีวภาพก็มีการใช้แบบการทดลองทั้ง 2 แบบ ขึ้นอยู่กับจุดประสงค์ของงาน (Wang และ Wan, 2009)

ตารางที่ 2.5 ค่าของ code level ใน Box-Behnken design สำหรับ 3 ปัจจัย (Montgomery, 1991)

Treatments	Variable levels		
	X_1	X_2	X_3
1	-1	-1	0
2	-1	1	0
3	1	-1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	-1	0	1
7	1	0	-1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	-1	1
11	0	1	-1

Treatments	Variable levels		
	X_1	X_2	X_3
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

งานวิจัยที่ผ่านมาในการศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้แผนการทดลอง Box-Behnken design เช่น

Abbasi และคณะ (2013) ศึกษาใช้วิธีพื้นผิวตอบสนอง หรือ RSM เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ ในอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *P.seudomonas aeruginosa* MA01 มีแหล่งคาร์บอน 19 ชนิด และแหล่งไนโตรเจน 11 ชนิด พบว่าน้ำมันถั่วเหลืองและโซเดียม ไนเตรตเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ตามลำดับ

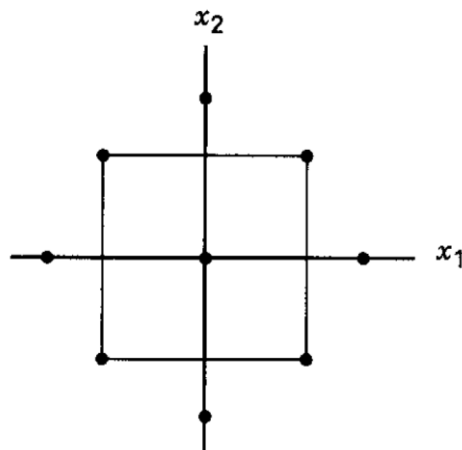
Joshi และคณะ (2007) ใช้แผนการทดลอง Plackett-Burman คัดเลือกปัจจัยที่สำคัญ คือ กรดฟอสฟอริก (H_3PO_4) แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) กรดบอริก (H_3PO_3) และ โซเดียม-EDTA และออกแบบแผนการทดลองด้วย Box-Behnken design เพื่อหาความเข้มข้นของแต่ละปัจจัยที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จาก *Bacillus licheniformis* K51

Parekh และ Pandit (2011) ศึกษาการผลิตโซโฟโรลิพิดโดย *S. bombicola* NRRL Y-17069 ในขนาดฟลาสก์ โดยมีปัจจัยที่ศึกษาได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ความเข้มข้นของยีสต์สกัด ความเข้มข้นของกรดของกรดโอเลอิก ที่มีอิทธิพลต่อการผลิตโซโฟโรลิพิด ด้วยแผนการทดลอง Box-Behnken design พบว่า การผลิตโซโฟโรลิพิดสูงสุดถึง 18.32 กรัมต่อลิตร ความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 3 ความเข้มข้นของยีสต์สกัดและกรดโอเลอิก 5 กรัมต่อลิตรและ 20 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

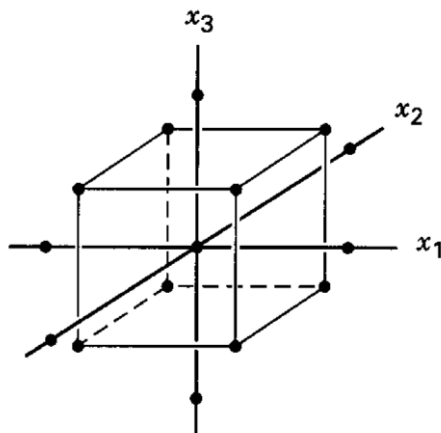
2.8.5 แผนการทดลอง Central Composite Design (CCD)

เป็นแผนการทดลองที่ดัดแปลงมาจากการจัดสิ่งทดลองแบบแฟคทอเรียล ซึ่งเป็นการเพิ่มสิ่งทดลองระหว่างระดับของปัจจัย แต่เป็นการลดสิ่งทดลอง เช่น ถ้าในการทดลองมี 3 ปัจจัย แต่ละปัจจัยมี 5 ระดับ จะจัดสิ่งทดลองแบบ 33 factorial design ได้สิ่งทดลองทั้งหมด 27 สิ่งทดลอง ในขณะที่แผนการทดลอง Central Composite Design (CCD) 3 ปัจจัย จะได้ระดับของสิ่งทดลอง 5 ระดับ และมีสิ่งทดลองทั้งหมด $23 + (2 \times 3 + 1)$ โดยที่เทอม $(2n+1)$ เป็นจุดพิเศษที่เพิ่มขึ้นมา และ

เพิ่มการทดลองที่จุดตรงกลาง 3 ถึง 5 ครั้ง จะได้เท่ากับ 17 ถึง 20 สิ่งทดลอง (ไพโรจน์ วิริยจारी, 2544) ดังแสดงในรูปที่ 2.21 และตารางที่ 2.6



(ก) 2 ปัจจัย



(ข) 3 ปัจจัย

รูปที่ 2.21 แสดงระดับของสิ่งทดลอง (design points) สำหรับแผนการทดลอง Central Composite Design (CCD) (Montgomery, 1991)

ตารางที่ 2.6 ค่าของ code level ใน central composite design (CCD) สำหรับ 3 ปัจจัย

จำนวนการทดลอง	ระดับความสำคัญ		
	X_1	X_2	X_3
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	1
3	-1	1	-1
4	-1	1	1
5	1	-1	-1
6	1	-1	1
7	1	1	-1
8	1	1	1
9	-1.68	0	0
10	1.68	0	0
11	0	-1.68	0
12	0	1.68	0
13	0	0	-1.68
14	0	0	1.68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0

งานวิจัยที่ผ่านมาในการศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยใช้แผนการทดลอง central composite design เช่น

ผลของอุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และความเข้มข้นของน้ำตาล (50 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส + 50 เปอร์เซ็นต์ฟรุกโทส เป็นตัวแปรการเจริญของ *Saccharomyces cerevisiae* และ *S. kudriavzevii* โดยใช้วิธีพื้นผิวตอบสนองด้วยแผนการทดลอง central composite design (Arroyo-Lopez และคณะ, 2009)

Rodrigues และคณะ (2006) ศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยแบคทีเรียโพรไบโอติก *Lactococcus lactis* 53 และ *Streptococcus thermophilus* A ได้ประยุกต์ใช้นำแผนการทดลอง CCD มาใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งให้ผลที่ดี ได้ปริมาณของการผลิตมากขึ้น

ตารางที่ 2.7 การเลือกการออกแบบการทดลองตามวัตถุประสงค์ (Croarkin และคณะ, 2006)

จำนวนปัจจัย	จุดประสงค์		
	เพื่อเปรียบเทียบ	เพื่อคัดเลือก	หาพื้นผิวตอบสนอง
1	1-factor completely randomized design	-	-
2-4	randomized block design	Full หรือ fractional factorial	Central composite หรือ Box-Behnken
มากกว่า 5	randomized block design	fractional factorial หรือ Plackett-Burman	Screen first to reduce number of factor

บทที่ 3 วิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์

- กล้องจุลทรรศน์ชนิดสองตา (Binocular compound microscope) รุ่น BH-2 ของบริษัท Olympus, Japan
- คอลัมน์ C18-AR Cosmosil 5 μm , A° ขนาด 4.6 x 150 มม. ของบริษัท Water, USA
- คอลัมน์ของ HPLC คือ C18 ของ InertSustainSwift ขนาด 3 ไมโครเมตร 1.0 x 100 มิลลิเมตร (GL Science), USA
- เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated incubator shaker) รุ่น Innova™ 4300 ของบริษัท New Brunswick Scientific, USA
- เครื่องชั่งละเอียด รุ่น AG 285 ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland
- เครื่องชั่งหยาบ รุ่น PG 2002-S ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วควบคุมอุณหภูมิ (High speed refrigerated centrifuge) รุ่น Avanti J-301 ของบริษัท Beckman Coulter, USA
- เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries Inc., USA
- เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Centrifuge evaporator) รุ่น R-300 ของบริษัท BUCHI, Switzerland
- เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Rotary vacuum evaporator) รุ่น N-N ของบริษัท Eyela, Japan
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys ของบริษัท Thermo Spectronic, USA
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland
- เครื่องวัดแรงตึงผิว (Ring tensiometer) รุ่น K6 ของบริษัท Kruss, Germany
- เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ (Mass Spectrometer) รุ่น LTQ-Orbitrap XL (ThermoScience), USA
- เครื่อง NMR สเปกโตรมิเตอร์ รุ่น Bruker Avance spectrometer AMX 500 (Bruker), USA
- เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิกวิดโครมาโตกราฟี (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) รุ่น Pro star บริษัท Varian, USA

- ตู้ดูดควัน (Air flow Hood) ของบริษัท Flexlab ตู้นี้มีความดันไอฆ่าเชื้อแบบอัตโนมัติ (Autoclave) รุ่น SS-35 และรุ่น ES-315 ของบริษัท Tomy Seiko, Ltd., Japan, รุ่น MLS 3020 ของบริษัท Sany Co., Ltd., Japan และรุ่น HV-25 ของบริษัท Hirayama, Co., Ltd., Japan
- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow cabinet) รุ่น 25 Manometer ของบริษัท Dwyer Instrument, USA
- ตู้บเพาะเชื้อ (Incubator) รุ่น memmert BE 600 ของบริษัท Jepsen & Jessen, USA
- ไมโครปิเปต (Micropipette) รุ่น P10, P20, P100, P1000 และ P5000 ของบริษัท Gilson, France

3.2 เคมีภัณฑ์

- กระดาษกรองขนาด 47 มม. 0.45 ไมครอน (Cellulose acetate membrane) ของบริษัท Whatman, USA
- กรดไตรฟลูออโรอะซิติก (Trifluoroacetic acid) HPLC grade ของบริษัท E. Merk, Dreamstadt, Germany
- กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (HCl) Merck ของบริษัท E. Merk, Dreamstadt, Germany
- กลีเซอรอล (glycerol) ของบริษัท E. Merk, Dreamstadt, Germany
- กลูโคส (Glucose) ของบริษัท E. Merck, Dramstdt, Germany
- กากน้ำตาล ของบริษัท น้ำตาลมิตรผล จำกัด
- คลอโรฟอร์ม (Chloroform) ของบริษัท BHD-ProLabo, England
- ซูโครส บริษัท วังนาย คอนสตรัคชั่น จำกัด ประเทศไทย
- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Promega, U.S.A.
- โซเดียมไนเตรต (NaNO₃) ของบริษัท E. Merk, Dreamstadt, Germany
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) Merck ของบริษัท E. Merk, Dreamstadt, Germany
- ทริปโตเน (Tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.
- ทริสมาเบส (Trisma base; Tris [hydroxymethyl] aminomethane) (C₄H₁₂NO₃) ของบริษัท Sigma, U.S.A.
- น้ำ HPLC grade ของบริษัท E. Merk Dramstadt, Germany
- น้ำมันปาล์ม บริษัท มรกตอินดัสตรีส์ จำกัด ประเทศไทย
- น้ำมันสังเคราะห์ (Synthetic crude-oil) ของบริษัท Japan Petroleum Institute, Japan

- น้ำมันถั่วเหลือง บริษัทมรกตอินดัสตรีส์ จำกัด ประเทศไทย
- น้ำคาโนล่า (conola) Singapore บริษัท ไช้หมัดาร์บี เอ็ดเป็ง โปรตักส์ ลิมิเต็ด จำกัด
- น้ำมันมะกอก (olive oil) Naturel บริษัท ลำสูง จำกัด ประเทศไทย
- แบคโตเปปโตน (Bactopeptone) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.
- แผ่นโครมาโตรกราฟีทีนเลเยอร์ (Analytical Thin-layer Chromatography) Sillica gel 60 ขนาด 20x20 ซม. หนา 0.2 มิลลิเมตร ของบริษัท E. Merk, DreamstadtGermany
- แผ่นโครมาโตรกราฟีทีนเลเยอร์ (Preparative Thin-layer Chromatography) Sillica gel 60 ขนาด 20x20 ซม. หนา 2 มิลลิเมตร ของบริษัท E. Merk, DreamstadtGermany
- โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท E. Merk, Dreamstadt, Germany
- แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท E. Merk, Dreamstadt, Germany
- สารสกัดจากข้าวมอลต์ (Malt extract) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.
- ยีสต์สกัด (Yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.
- อะซิโตนไนไตรล์ (Acetonitrile) HPLC grade ของบริษัท E. Merk, Dreamstadt, Germany
- เอทานอล (Ethanol) ของบริษัท E. Merk, Dreamstadt, Germany
- เอทิลอะซิเตต ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$) Macron Fine Chemicals ของบริษัท Avantor Performance Materials สหรัฐอเมริกา - แอลฟา-แนฟทอล (naphthol) ของบริษัท Fluka, Switzerland
- แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ของบริษัท E. Merk, Dreamstadt, Germany
- แอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ของบริษัท E. Merk, Dreamstadt, Germany
- แอมโมเนียมไนเตรด (NH_4NO_3) ของบริษัท E. Merk, Dreamstadt, Germany
- ไอโอดีนชนิดเกล็ด ของบริษัท Univar, U.S.A.
- เฮกเซน (Hexane, C_6H_{14}) ของบริษัท Macron, U.S.A.

3.3 วิธีดำเนินการทดลอง

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง *Candida mucifera* NJP25 สายพันธุ์ยีสต์ที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ได้จากงานวิจัยของ Poomtien และคณะ (2013) ซึ่งแยกได้ทะเลยาล์มจากสวนปาล์มอำเภอปากจั่น จังหวัดระนอง

3.3.1 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Candida mucifera* NJP25

3.3.1.1 เตรียม inoculum ของยีสต์ *C. mucifera* NJP25

เพาะยีสต์ *C. mucifera* NJP25 ลงบนอาหารเพาะเชื้อแข็งชนิด Yeast Malt Extract โดยการ streak เพื่อแยกโคโลนีเดี่ยว นำไปบ่มอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นใช้ลูปถ่ายโคโลนีของยีสต์ 1 โคโลนี ลงในอาหารเหลว Yeast Malt Extract ทำการบ่มโดยใช้เครื่องเขย่า (shaker) ณ อุณหภูมิห้อง ที่เขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร อยู่ที่ 1 ± 0.1 ถ่ายหัวเชื้อปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร)

3.3.1.2 ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพระดับขวดเขย่า

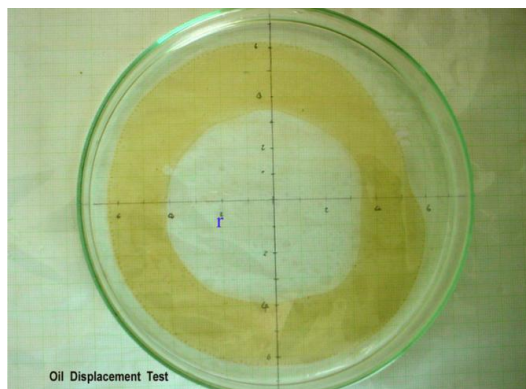
นำหัวเชื้อจากข้อ 3.3.1.1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตรใส่ลงในอาหารเหลวกำหนดสูตรของยีสต์ *C. mucifera* NJP25 ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อที่ปรับปรุงจากสูตรของ Hua และคณะ (2004) ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทำการบ่มโดยใช้เครื่องเขย่าผสมสาร (shaker) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน

3.3.1.3 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (Dry cell weight)

แยกเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที และควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 20 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์ไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงหรือจนกว่าจะแห้ง และชั่งน้ำหนักเซลล์แห้งด้วยเครื่องชั่งละเอียด

3.3.1.4 การวัดค่าการกระจายน้ำมัน (Oil displacement activity)

ทดสอบการกระจายน้ำมันตามวิธีของ (Morikawa และคณะ, 1993) โดยตวงน้ำ 40 มิลลิลิตร ลงในจานแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 150 มิลลิเมตร ที่มีกระดาษกราฟรองอยู่เป็นมาตรฐานวัดความกว้างของบริเวณใส หยดน้ำมันดิบ (crude oil) ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าของน้ำจะเกิดเป็นแผ่นฟิล์มแผ่ทั่วผิวน้ำ จากนั้นนำตัวอย่างที่เป็นส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเซลล์ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นฟิล์มของน้ำมันดิบทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสของการกระจายตัวของน้ำมันที่ได้และคำนวณหาพื้นที่ของการกระจายน้ำมัน



รูปที่ 3.1 การวัดค่าการกระจายน้ำมัน

พื้นที่บริเวณใสของการกระจายน้ำมัน = πr^2

เมื่อ r เท่ากับรัศมีความกว้างของพื้นที่บริเวณใส มีหน่วยเป็นตารางเซนติเมตร (cm²)

โดยกำหนดให้ 1 ตารางเซนติเมตรของการกระจายน้ำมันมีค่าเท่ากับ 1 หน่วย

3.3.1.5 การวัดค่าแรงตึงผิว (Surface tension activity)

นำตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อมาวัดค่าแรงตึงผิวตามวิธี Du Nuoy Ring โดยใช้เครื่องวัดค่าแรงตึงผิว (Ring tensiometer K6, Kruss Germany) ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส และคำนวณเปอร์เซ็นต์ผลต่างแรงตึงผิวตามสูตรดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ผลต่างแรงตึงผิว} = \frac{\text{ค่าแรงตึงผิวเริ่มต้น} - \text{ค่าแรงตึงผิวที่วัดได้}}{\text{ค่าแรงตึงผิวเริ่มต้น}} \times 100$$

3.3.2 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวิธี

One factor at a time

3.3.2.1 หาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยเฉพาะเลี้ยงยีสต์ในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยโซเดียมไนเตรดความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน แมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.02 เปอร์เซ็นต์ และยีสต์สกัดความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 จากนั้นแปรผันแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส กลีเซอรอล ซูโครส น้ำมันปาล์ม น้ำมันเหลือง และกากน้ำตาล โดยใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของแหล่งคาร์บอน เท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์ (มวลต่อปริมาตร) เป็นเวลา 7 วัน (ทำ 3

ซ้ำในทุกชุดการทดลอง) ให้น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาทำการวัดค่าแรงดึงผิว และการกระจายน้ำมัน โดยเปรียบเทียบชนิดของแหล่งคาร์บอน

3.3.2.2 หาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ

เลือกสูตรอาหารที่ดีที่สุด จากข้อ 3.3.2.1 แปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเป็น 2 4 6 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ทำการเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน (ทำ 3 ซ้ำในทุกชุดการทดลอง) โดยนำน้ำเลี้ยงเซลล์มาทำการวัดค่าแรงดึงผิว วัดค่าการกระจายน้ำมัน การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง และประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ โดยวัดค่าแรงดึงผิวและค่าการกระจายน้ำมัน

3.3.2.3 หาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ

ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ โดยเฉพาะเลี้ยงยีสต์ในอาหารเหลว โดยใช้แหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.2.1 และ 3.3.2.2 จากนั้นแปรผันแหล่งไนโตรเจนได้แก่ แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) แอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) และโซเดียมไนเตรต (NaNO_3) โดยใช้ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 0.4 เปอร์เซ็นต์ ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 เป็นเวลา 7 วัน (ทำ 3 ซ้ำในทุกชุดการทดลอง) โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาทำการวัดค่าแรงดึงผิว และ การกระจายน้ำมัน โดยเปรียบเทียบชนิดของแหล่งไนโตรเจน

3.3.2.4 หาอัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ

เลือกสูตรอาหารที่ดีที่สุด จากข้อ 3.3.2.3 แปรผันอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 20 40 60 และ 80 โดยให้แหล่งคาร์บอนความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์คงที่ ทำการเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน (ทำ 3 ซ้ำในทุกชุดการทดลอง) โดยนำน้ำเลี้ยงเซลล์มาทำการวัดค่าแรงดึงผิว วัดค่าการกระจายน้ำมัน การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง และประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ โดยวัดค่าแรงดึงผิวและค่าการกระจายน้ำมัน

3.3.2.5 หาค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ

หาค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์และการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ โดยการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลว (จากข้อ 3.3.2.4) เป็น 4.5 5.5 และ 6.5 และเพาะเลี้ยงในอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน

(ทำ 3 ซ้ำในทุกชุดการทดลอง) โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยวัดค่าแรงตึงผิวและค่าการกระจายน้ำมัน

3.3.2.6 หาอุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

หาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยการเพาะเลี้ยงอาหารเหลว (จากข้อ 3.3.2.5) ปรับอุณหภูมิเพาะเลี้ยงเป็น 25 30 และ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน (ทำ 3 ซ้ำในทุกชุดการทดลอง) โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยวัดค่าแรงตึงผิวและค่าการกระจายน้ำมัน

3.3.3 การติดตามการเจริญ ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการปรับปรุงสูตรจากวิธี one factor at a time (ข้อ 3.3.2) ด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที โดยเก็บตัวอย่างวันที่ 0 1 3 5 7 และ 9 ติดตามการเจริญของยีสต์ ทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อปั่นแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ แยกส่วนเซลล์ไปหาน้ำหนักแห้ง เพื่อติดตามการเจริญของเซลล์ และนำส่วนน้ำใสมาทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยวัดค่าการกระจายน้ำมัน ค่าแรงตึงผิว และติดตามสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากการสกัดสารและคำนวณหาน้ำหนักของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.3.4 การผลิตและการสกัดแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เพาะเลี้ยงยีสต์ *C. mucifera* NJP25 ในอาหารที่มีการปรับปรุงสูตรและภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที นำน้ำเลี้ยงเชื้อมาปั่นแยกเซลล์ออก จากนั้นสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเอทิลอะซิเตทในอัตราส่วน 1:1 จำนวน 3 ครั้ง นำส่วนบนของสารละลายมาระเหยเอทิลอะซิเตท ออกด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Evaporator) จากนั้นทำการระเหยแห้งอีกครั้งด้วยเครื่อง centrifuge evaporator และหาน้ำหนักของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยวัดค่าการกระจายน้ำมันและค่าแรงตึงผิว

3.3.5 การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวิธี Response Surface Methodology (RSM)

3.3.5.1 การออกแบบการทดลอง

นำข้อมูลจากการทดลองทีละหนึ่งปัจจัย (one-factor-at-a-time) ของปัจจัย 4 ชนิด (ซูโครส โซเดียมไนเตรต ค่าความเป็นกรด-ด่าง และ อุณหภูมิ) จากข้อ 3.2.2 ไปใช้สำหรับการกำหนดระดับโค้ด (code level) ทั้ง 4 ปัจจัย สำหรับการออกแบบการทดลองใช้วิธี Box-Behnken Design (Jo และคณะ, 2008; Pan และคณะ, 2008; Teerapatsakul และคณะ, 2008) ใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ คือ STATISTICA 10 (Statsoft, Inc., USA) ชุดการทดลองที่ออกแบบโดย Box-Behnken Design ด้วย 4 ปัจจัย (4 factors) และมีจำนวนระดับ 3 ระดับ (3 levels) ได้ 29 ชุดการทดลอง ดังตารางที่ 3.1 ความเข้มข้นของซูโครส 3 ระดับคือ 1 (-1) 4 (0) และ 7 (+1) อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N) 3 ระดับคือ 15:1 (-1) 20:1 (0) และ 25:1 (+1) ค่าความเป็นกรด-ด่าง 3 ระดับคือ 4 (-1) 6.5 (0) และ 9 (+1) และอุณหภูมิ 3 ระดับคือ 25 (-1) 30 (0) และ 35 (+1)

ตารางที่ 3.1 แผนการทดลองออกแบบโดย Box-Behnken Design สำหรับ 4 ปัจจัย 3 ระดับ

ชุดการทดลอง (experimental no.)	โค้ดระดับของปัจจัย (coded levels)			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
1	0 (4)	+1 (25:1)	0 (6.5)	-1 (25)
2	+1 (7)	+1 (25:1)	0 (6.5)	0 (30)
3	0 (4)	0 (20:1)	0 (6.5)	0 (30)
4	0 (4)	-1 (15:1)	-1 (4)	0 (30)
5	0 (4)	0 (20:1)	-1 (4)	-1 (25)
6	0 (4)	0 (20:1)	0 (6.5)	0 (30)
7	0 (4)	+1 (25:1)	-1 (4)	0 (30)
8	+1 (7)	0 (20:1)	0 (6.5)	+1 (35)
9	0 (4)	0 (20:1)	+1 (9)	+1 (35)
10	0 (4)	+1 (25:1)	0 (6.5)	+1 (35)
11	0 (4)	0 (20:1)	0 (6.5)	0 (30)
12	-1 (1)	-1 (15:1)	0 (6.5)	0 (30)
13	0 (4)	+1 (25:1)	+1 (9)	0 (30)
14	+1 (7)	-1 (15:1)	0 (6.5)	0 (30)

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

ชุดการทดลอง (experimental no.)	โค้ตระดับของปัจจัย			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
15	-1 (1)	+1 (25:1)	0 (6.5)	0 (30)
16	0 (4)	0 (20:1)	0 (6.5)	0 (30)
17	0 (4)	0 (20:1)	0 (6.5)	0 (30)
18	-1 (1)	0 (20:1)	-1 (4)	0 (30)
20	-1 (1)	0 (20:1)	0 (6.5)	-1 (25)
21	0 (4)	0 (20:1)	+1 (9)	-1 (25)
22	+1 (7)	0 (20:1)	+1 (9)	0 (30)
23	0 (4)	-1 (15:1)	+1 (9)	0 (30)
24	+1 (7)	0 (20:1)	0 (6.5)	-1 (25)
25	+1 (7)	0 (20:1)	-1 (4)	0 (30)
26	0 (4)	0 (20:1)	-1 (4)	+1 (35)
27	-1 (1)	0 (20:1)	0 (6.5)	+1 (35)
28	0 (4)	-1 (15:1)	0 (6.5)	+1 (35)
29	-1 (1)	0 (20:1)	+1 (9)	0 (30)

หมายเหตุ: X₁ คือ น้ำตาลซูโครส (เปอร์เซ็นต์, w/v) X₂ คือ อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อนโตรเจน
X₃ คือ ความเป็นกรด-ด่าง X₄ คือ อุณหภูมิ

3.3.5.2 วิเคราะห์ความถดถอยหรือ ค่า regression ของการออกแบบการทดลองด้วย Box-Behnken design และทำนายภาวะที่เหมาะสมที่สุดของปัจจัยทั้ง 4 ด้วยวิธีทางสถิติ

ทำการทดลองจริง ตามจำนวนการทดลองที่โปรแกรม Box Behnken กำหนด 29 ชุดการทดลอง ติดตามการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสะสมสุดท้ายที่ 9 วัน เป็นค่าตอบสนอง (response value) ของทั้ง 29 ชุดการทดลอง และนำผลการทดลองทั้งหมดไปวิเคราะห์ค่ารีเกรสชัน (regression) หรือค่าความถดถอยของการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken design แล้วสร้างสมการคณิตศาสตร์หรือสมการถดถอย (regression model) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทั้ง 4 และค่าตอบสนอง ที่แสดงเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ (กรัมต่อลิตร) และวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance: ANOVA) ในสมการถดถอยและทำนายภาวะที่เหมาะสมที่สุดของปัจจัยทั้ง 4 ด้วยวิธีการ SPSS-Statitica วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ด้วยโปรแกรม

SPSS และสร้างกราฟพื้นผิวสัมผัส response surface plot โดยใช้โปรแกรม Statistica แล้วทำนายสภาวะที่ดีที่สุดของปัจจัยทั้ง 4 ชนิด จากแผนภาพพื้นผิวสัมผัส

3.3.5.3 ทำการทดลองจริง เพื่อยืนยันผลการทำนายจากสถิติ

นำภาวะของปัจจัยทั้ง 4 ชนิดที่เหมาะสมที่สุดที่ได้จากการทำนายด้วยโปรแกรมทางสถิติมาใช้ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เพื่อยืนยันผลที่ได้จากการทำนายด้วยสถิติ ทำการทดลองในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยซูโครส โซเดียมไนเตรต แมกนีเซียมซัลเฟต โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และอีสต์สกัด ค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิ ตามภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทำนายด้วยสถิติเปรียบเทียบกับอาหารเดิม

3.3.6 ศึกษาลักษณะสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.3.6.1 การหาค่าความเข้มข้นวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ (Critical micelle concentration)

เป็นการหาค่าความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่น้อยที่สุดที่ทำให้สารลดแรงตึงผิวเกิดการรวมตัวเป็นไมเซลล์ โดยนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ มาเจือจางให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.01-10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยสารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.0 จากนั้นวัดค่าแรงตึงผิวและเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตึงผิวและค่า log ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เพื่อคำนวณหาจุดวิกฤตในการเกิดไมเซลล์

3.3.6.2 การศึกษาความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Stability of biosurfactant)

การศึกษาความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในสภาวะต่าง ๆ นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาเจือจางด้วยทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทดสอบความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อความเข้มข้นของเกลือเท่ากับ 1-10 เปอร์เซ็นต์ (มวลต่อปริมาตร) ค่าความเป็นกรด-ด่าง 2-10 และอุณหภูมิ 4 30 60 และ 100 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที และนอกจากนี้ยังทดสอบความเสถียรภายใต้สภาวะฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที บ่มในสภาวะดังกล่าว และวัดค่าแรงตึงผิว เพื่อเปรียบเทียบความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.3.6.3 การวัดค่าดัชนีการก่ออิมัลชัน (Emulsion Index)

การวัดค่าดัชนีการก่ออิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพร่วมกับน้ำมันพืชชนิดต่าง ๆ เช่น น้ำมันคาโนลา น้ำมันมะกอก น้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันข้าวโพด น้ำมันรำข้าว และน้ำมันเมล็ดชา นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาเจือจางในทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ให้มีความเข้มข้น

เท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร ผสมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและน้ำมัน ในอัตราส่วน 1:1 โดยเครื่องผสมสาร (vortex) ความเร็วสูงสุด เป็นระยะเวลา 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นวัด ความสูงของอิมัลชันที่เกิดขึ้นหลังจากบ่ม 24 ชั่วโมงและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ค่าดัชนีการก่ออิมัลชัน และวัดค่าความเสถียรในการก่ออิมัลชันจากสูตรดังนี้

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

3.3.7 เตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนและวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมี ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.3.7.1 เตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบ แผ่นบาง (Thin Layer Chromatography)

การเตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยใช้เฟสคงที่เป็นแผ่นซิลิกาเจล 60 ขนาด 20x20 เซนติเมตร หนา 0.2 มิลลิเมตร และเฟสเคลื่อนที่ คือ สารละลายคลอโรฟอร์ม เมทานอล และน้ำ ในอัตราส่วน 65:25:4 นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาเจือจางให้มีความเข้มข้น เท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยเมทานอล จากนั้นจุดบนแผ่นซิลิกาเจลปริมาตร 140 ไมโครลิตร

$$\text{อัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (R}_f\text{)} = \frac{\text{ระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลาย}}$$

และนำไปใส่ในภาชนะปิดที่บรรจุด้วยเฟสเคลื่อนที่ ทิ้งไว้ประมาณ 1-2 ชั่วโมง หรือจนกระทั่ง สารละลายเคลื่อนที่จนเกือบสุดปลายแผ่นซิลิกาเจล (solvent front) จากนั้นนำแผ่นซิลิกาเจลมา ระเหยจนแห้ง และนำไปอบด้วยไอระเหยของไอโอดีนที่อุณหภูมิในภาชนะที่มีฝาปิดสนิท ประมาณ 15-20 นาที ทำเครื่องหมายในตำแหน่งที่เห็นสารในแผ่นซิลิกาเจล และคำนวณหาอัตราส่วนของ ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (Retention factor, R_f)

3.3.7.2 เตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธี Preparative Thin Layer Chromatography

ในการเตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธี PLC ทำตามวิธีในข้อ 3.2.7.1 แต่เปลี่ยนเฟสคงที่เป็นแผ่นซิลิกาเจลที่มีความหนา 2 มิลลิเมตรและจุดบนแผ่นซิลิกาเจล ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร จากนั้นนำสารออกจากแผ่นซิลิกาเจล และสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท ใน อัตราส่วน 1:1 จำนวน 3 ครั้ง ระเหยสารสกัดด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสูญญากาศ นำแต่ละลำดับ

ส่วนที่สกัดได้จากแผ่นซิลิกาเจล มาทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากค่ากระจายน้ำมัน

3.3.7.3 การแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบริสุทธิ์ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครโมโทกราฟี (High Performance Chromatography, HPLC)

นำสารจากข้อ 3.2.7.2 มาละลายในอะซิโตนไตรล 100 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ C18 reverse phase เป็นเฟสคงที่ (stationary phase) และใช้สารชะหรือเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็นสารที่มีการปรับอัตราส่วนตามเวลาที่เปลี่ยนไป (gradient elution) ได้แก่ สารละลาย A (อะซิโตนไตรล 10 เปอร์เซ็นต์ + กรดไตรฟลูออโรอะซิติก 0.1 เปอร์เซ็นต์) และสารละลาย B (อะซิโตนไตรล 100 เปอร์เซ็นต์ + กรดไตรฟลูออโรอะซิติก 0.1 เปอร์เซ็นต์) โดยกำจัดแก๊สออกจากสารละลายก่อนใช้งานทุกครั้งด้วยอ่างอัลตราโซนิก

ตารางที่ 3.2 โปรแกรมของลิเนียร์เกรเดียนท์เท่ากับ 0 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 30 นาที

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

โดยมีอัตราเร็วของการชะสารละลาย เท่ากับ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดสารที่ออกมาจากคอลัมน์ด้วย UV Detector ที่ความยาวคลื่น เท่ากับ 210 นาโนเมตร เก็บตัวอย่างจากฟีกที่ปรากฏบนโครมาโตแกรมในแต่ละช่วงเวลา (Retention time) จากนั้นนำไปประเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Centrifuge evaporator) และนำสารที่แยกได้มาวิเคราะห์ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยเจือจางในสารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วัดค่าการกระจายน้ำมันและคัดเลือกฟีกที่ให้ค่าการกระจายน้ำมันสูงสุดไปทดสอบ เพื่อวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.3.7.4 วิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

วิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธี LC-MS (Liquid Chromatograph-Mass Spectrometer) โดยคอลัมน์ของ HPLC คือ C18 ของ InertSustainSwift

ขนาด 3 ไมโครเมตร 1.0 x 100 มิลลิเมตร (GL Science) ตัวอย่างจะถูกแยกให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ โดยเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ได้แก่ สารละลาย A (น้ำ 98 เปอร์เซ็นต์ + อะซิโตนไตรรล์ 2 เปอร์เซ็นต์ + กรดฟอร์มิก 0.1 เปอร์เซ็นต์) และสารละลาย B (น้ำ 10 เปอร์เซ็นต์ + อะซิโตนไตรรล์ 90 เปอร์เซ็นต์ + กรดฟอร์มิก 0.1 เปอร์เซ็นต์) โดยมีอัตราเร็วของการชะสารละลาย เท่ากับ 40 ไมโครลิตรต่อนาที

ตารางที่ 3.3 โปรแกรมของลิเนียร์เกรเดียนท์

เวลา (นาที)	% ของสารละลาย B
0	20
30	100
40	100
41	20
60	20

จากนั้นสารบริสุทธิ์จะถูกตรวจวิเคราะห์น้ำหนักโมกุลของสารซึ่งวัดด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ (Mass Spectrometer) รุ่น LTQ-Orbitrap XL (ThermoScience) โดยตัวอย่างจะถูกทำให้แตกตัวเป็นไอออนด้วยวิธี Electrospray Ionization (ESI) m/z (มวลต่อประจุ) 300-2000 และวิเคราะห์องค์ประกอบของโครงสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเครื่อง NMR สเปกโตรมิเตอร์ รุ่น Bruker Avance spectrometer AMX 500 (Bruker) MMS-0025 2.5 mm ID (Shigemi) ที่ Instrumental Analysis Division, Global Facility Center, Creative Research Institution มหาวิทยาลัยฮอกไกโด โดย Professor Dr. Masaaki Morikawa

บทที่ 4 ผลการทดลอง

4.1 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวิธี One factor at a time

4.1.1 ผลของแหล่งคาร์บอน

ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *C. mucifera* NJP25 ในงานวิจัยนี้ได้ใช้แหล่งคาร์บอนความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารที่ปรับปรุงสูตรของ Hua และคณะ (2004) ที่มีการแปรผันแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส กลิเซอรอล ซูโครส น้ำมันปาล์ม น้ำมันเหลือใช้ และกากน้ำตาล บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่า ซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น ๆ เมื่อเพาะเลี้ยง *C. mucifera* NJP25 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนจะมีการเจริญสูงสุด มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 3.69 ± 0.21 กรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสและซูโครส ซึ่งวัดค่าแรงตึงผิวได้ต่ำที่สุดเท่ากับ 42.33 ± 0.70 และ 42.49 ± 1.25 มิลลินิวตันต่อเมตร ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ค่าการกระจายน้ำมันของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเท่ากับ 0.54 ± 0.10 ตารางเซนติเมตร ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซูโครสให้ค่าการกระจายน้ำมันสูงสุดเท่ากับ 0.63 ± 0.15 ตารางเซนติเมตร ดังตารางที่ 4.1 และมีค่าผลต่างแรงตึงผิวสูงสุดเท่ากับ 10.51 มิลลินิวตันต่อเมตร

ตารางที่ 4.2 ผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *C. mucifera* NJP25 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน

ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ค่าการกระจายน้ำมัน (ตารางเซนติเมตร)	ค่าแรงตึงผิว (มิลลินิวตันต่อเมตร)	Δ ST (มิลลินิวตันต่อเมตร)	เปอร์เซ็นต์ผลต่างแรงตึงผิว	ค่าความเป็นกรด-ด่าง
2	3.31 ± 0.01^b	0.32 ± 0.12^a	37.63 ± 0.65^a	15.38^b	29.02	3.40 ± 0.09
4	3.63 ± 0.02^a	0.33 ± 0.11^a	36.93 ± 0.43^a	18.07^a	32.85	3.42 ± 0.03
6	3.30 ± 0.10^b	0.31 ± 0.05^a	37.35 ± 0.37^a	14.15^c	27.48	3.18 ± 0.05
8	3.47 ± 0.13^{ab}	0.23 ± 0.03^{ab}	36.59 ± 1.18^a	16.41^b	30.96	3.33 ± 0.09
10	3.55 ± 0.25^{ab}	0.12 ± 0.05^b	37.26 ± 0.25^a	17.74^a	32.25	3.31 ± 0.10

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT (Duncan's Multiple Range Test)

* Δ ST คือ ผลต่างของค่าแรงตึงผิว ณ เวลาเริ่มต้นและเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

4.1.3 ผลของแหล่งไนโตรเจน

ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *C. mucifera* NJP25 ในอาหารเลี้ยงเชื้อปรับปรุงสูตรที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นซูโครส 4 เปอร์เซ็นต์ และแปรผันแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) แอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) และโซเดียมไนเตรต (NaNO_3) ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 0.4 เปอร์เซ็นต์ (มวลต่อปริมาตร) และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน จากการทดลองพบว่า โซเดียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ทำให้ *C. mucifera* NJP25 สามารถเจริญได้ดี โดยมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 3.65 ± 0.23 กรัมต่อลิตร ให้ค่าผลต่างของแรงตึงผิวเท่ากับ 23.42 เปอร์เซ็นต์ และค่าการกระจายน้ำมันสูงสุดเท่ากับ 0.36 ± 0.14 ตารางเซนติเมตร ดังตารางที่ 4.3 จึงเลือกโซเดียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อไป

ตารางที่ 4.3 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *C. mucifera* NJP25 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน

แหล่งไนโตรเจน	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ค่าการกระจายน้ำมัน (ตารางเซนติเมตร)	ค่าแรงตึงผิว (มิลลินิวตันต่อเมตร)	Δ ST (มิลลินิวตันต่อเมตร)	เปอร์เซ็นต์ผลต่างแรงตึงผิว	ค่าความเป็นกรด-ด่าง
NaNO ₃	3.65 ± 0.23 ^a	0.36 ± 0.14 ^a	35.90 ± 1.44 ^b	10.98 ^a	23.42	3.45 ± 0.02
NH ₄ Cl	2.06 ± 0.03 ^d	0.12 ± 0.07 ^b	46.69 ± 3.33 ^b	2.11 ^b	4.32	3.32 ± 0.03
NH ₄ NO ₃	2.70 ± 0.08 ^c	0.18 ± 0.04 ^b	38.39 ± 1.93 ^a	8.61 ^a	18.32	3.26 ± 0.04
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.28 ± 0.20 ^b	0.11 ± 0.03 ^b	47.38 ± 1.14 ^a	1.78 ^b	4.62	3.23 ± 0.03

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT (Duncan's Multiple Range Test)

* Δ ST คือ ผลต่างของค่าแรงตึงผิว ณ เวลาเริ่มต้นและเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

4.1.4 ผลของอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน

ศึกษาอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสม (C:N) สำหรับการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *C. mucifera* NJP25 โดยให้แหล่งคาร์บอนความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์คงที่ และแปรผันปริมาณไนโตรเจนความเข้มข้น 0.442 0.186 0.101 0.059 0.032 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะทำให้มีค่า C:N เท่ากับ 20 40 60 80 และ 100 ตามลำดับ และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่า อัตราส่วน C:N 20 40 60 80 และ 100 มีการเจริญของ *C. mucifera* NJP25 ที่ใกล้เคียงกัน เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของพบว่า อัตราส่วน C:N 20 มีค่าผลต่างของแรงตึงผิวและค่าการกระจายน้ำมันสูงสุดเท่ากับ 28.23 เปอร์เซ็นต์ และ 0.39±0.12 ตารางเซนติเมตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.4 จึงเลือกอัตราส่วน C:N 20 ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ตารางที่ 4.4 ผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *C. mucifera* NJP25 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน

C:N ratio	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ค่าการกระจายน้ำมัน (ตารางเซนติเมตร)	ค่าแรงตึงผิว (มิลลินิวตันต่อเมตร)	Δ ST (มิลลินิวตันต่อเมตร)	เปอร์เซ็นต์ผลต่างแรงตึงผิว	ค่าความเป็นกรด-ด่าง
20	3.41 ± 0.07^a	0.39 ± 0.12^a	34.45 ± 1.62^b	13.55^a	28.23	3.44 ± 0.05
40	3.28 ± 0.12^a	0.28 ± 0.14^{ab}	38.14 ± 0.50^a	4.86^c	11.30	3.45 ± 0.02
60	3.32 ± 0.14^a	0.28 ± 0.13^{ab}	38.28 ± 0.09^a	5.53^c	12.63	3.31 ± 0.14
80	3.40 ± 0.21^a	0.17 ± 0.09^b	36.94 ± 1.47^a	11.36^b	23.52	3.33 ± 0.15
100	3.29 ± 0.05^a	0.12 ± 0.05^b	38.21 ± 0.79^a	13.59^a	26.24	3.36 ± 0.01

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT (Duncan's Multiple Range Test)

* Δ ST คือ ผลต่างของค่าแรงตึงผิว ณ เวลาเริ่มต้นและเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

4.1.5 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่าง

ศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *C. mucifera* NJP25 ในอาหารเลี้ยงเชื้อปรับปรุงสูตรที่เหมาะสมซึ่งมีซูโครสความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนและโซเดียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20 โดยแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่าง ดังนี้ 4.5 5.5 และ 6.5 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.5 เป็นค่าที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของ *C. mucifera* NJP25 มากที่สุด โดยมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 4.75 ± 0.75 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อติดตามประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพพบว่า ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพน้อยกว่าค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.5 ซึ่งมีค่าผลต่างแรงตึงผิวเท่ากับ 33.79 เปอร์เซ็นต์ และค่าการกระจายน้ำมันสูงสุดเท่ากับ 0.36 ± 0.07 ตารางเซนติเมตร ดังตารางที่ 4.5 ดังนั้นจึงเลือกค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อปรับปรุงสูตรที่เหมาะสมเท่ากับ 6.5 ไปทำการทดลองต่อไป

ตารางที่ 4.5 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *C. mucifera* NJP25 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน

ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ค่าการกระจายตัวของน้ำมัน (ตารางเซนติเมตร)	ค่าแรงตึงผิว (มิลลินิวตันต่อเมตร)	Δ ST (มิลลินิวตันต่อเมตร)	เปอร์เซ็นต์ผลต่างแรงตึงผิว	ค่าความเป็นกรด-ด่าง
4.5	4.75 ± 0.75 ^a	0.27 ± 0.02 ^a	37.59 ± 1.30 ^a	18.58 ^a	33.08	3.42 ± 0.26
5.5	3.96 ± 0.01 ^a	0.30 ± 0.08 ^a	38.14 ± 0.31 ^a	16.61 ^a	30.34	3.52 ± 0.01
6.5	3.50 ± 0.48 ^a	0.36 ± 0.07 ^a	37.08 ± 0.90 ^a	18.92 ^a	33.79	3.74 ± 0.01

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT (Duncan's Multiple Range Test)

* Δ ST คือ ผลต่างของค่าแรงตึงผิว ณ เวลาเริ่มต้นและเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

4.1.6 ผลของอุณหภูมิ

ศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *C. mucifera* NJP25 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อปรับปรุงสูตรที่เหมาะสมซึ่งมีซูโครสความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนและโซเดียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 20 ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.5 และแปรผันอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง ดังนี้ อุณหภูมิ 25 30 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน จากการทดลองพบว่า อุณหภูมิ 25 30 และ 37 องศาเซลเซียส มีการเจริญที่ใกล้เคียงกัน ได้แก่ 3.54 3.70 และ 3.17 ตามลำดับ แต่ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีค่าการกระจายน้ำมันสูงสุดเท่ากับ 0.37±0.09 ตารางเซนติเมตร และมีผลต่างแรงตึงผิวเท่ากับ 29.17 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพของ *C. mucifera* NJP25 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน

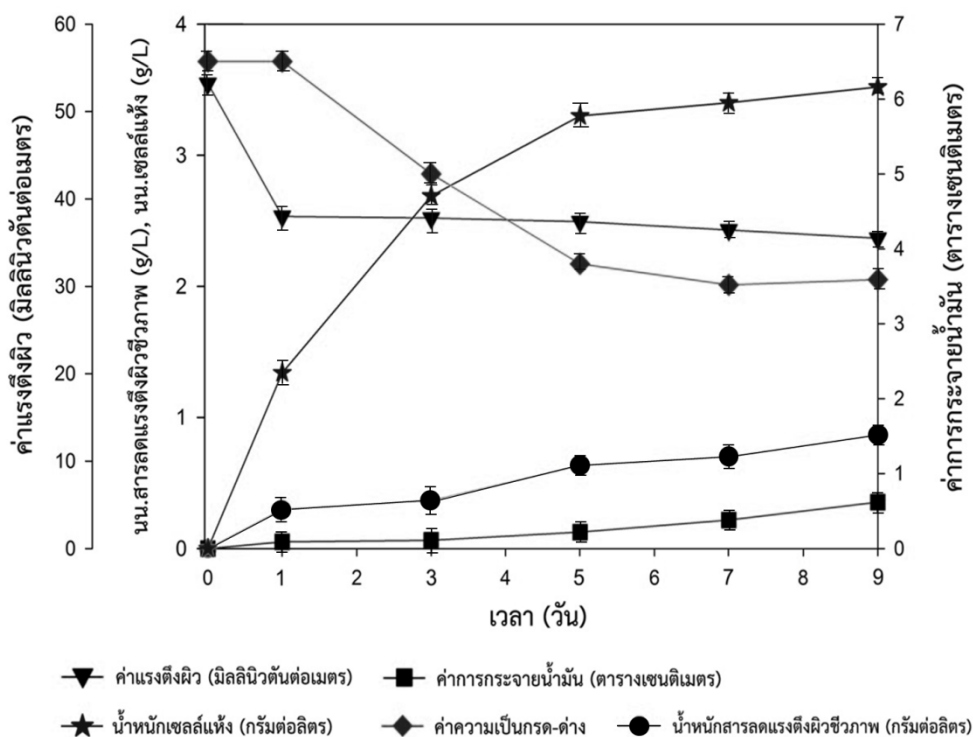
อุณหภูมิ	น้ำหนักเซลล์ แห้ง (กรัมต่อ ลิตร)	ค่าการกระจาย น้ำมัน (ตาราง เซนติเมตร)	ค่าแรงดึงผิว (มิลลินิวตัน ต่อเมตร)	Δ ST (มิลลินิว ตันต่อ เมตร)	เปอร์เซ็นต์ ผลต่าง แรงดึงผิว	ค่าความเป็น กรด-ด่าง
25	3.54 ± 0.12 ^a	0.19 ± 0.03 ^b	39.71 ± 0.62 ^{ab}	12.29 ^b	23.63	3.58 ± 0.01
30	3.70 ± 0.08 ^a	0.37 ± 0.09 ^a	36.83 ± 1.20 ^b	15.17 ^a	29.17	3.53 ± 0.01
37	3.17 ± 0.03 ^b	0.16 ± 0.01 ^b	40.64 ± 2.19 ^a	11.36 ^b	21.85	3.67 ± 0.06

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT (Duncan's Multiple Range Test)

* Δ ST คือ ผลต่างของค่าแรงดึงผิว ณ เวลาเริ่มต้นและเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

4.2 การติดตามการเจริญ ประสิทธิภาพของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ และการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ

เพาะเลี้ยง *C. mucifera* NJP25 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปรับปรุงสูตรที่เหมาะสมซึ่งมีซูโครส ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนและโซเดียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20 ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.5 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราเขย่า 200 รอบต่อนาที ติดตามการเจริญของ *C. mucifera* NJP25 จากน้ำหนักเซลล์แห้งและค่าความเป็นกรด-ด่าง ประสิทธิภาพของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพจากค่าการกระจายน้ำมันและค่าแรงดึงผิว และสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ เป็นระยะเวลา 1 3 5 7 และ 9 วัน พบว่า *C. mucifera* NJP25 เจริญได้ดีที่สุดในวันที่ 9 (3.52 กรัมต่อลิตร) โดยค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงวันที่ 1-5 ของการเจริญ และจะมีค่าคงที่จนถึงวันที่ 9 โดยค่าแรงดึงผิวจะลดลงตั้งแต่วันที่ 1 ของการทดลอง และจะเริ่มค่าคงที่ในวันที่ 3 ถึงวันที่ 5-9 ซึ่งค่าแรงดึงผิวเริ่มต้นที่ 53.2 ลงมาถึง 35.5 มิลลินิวตันต่อเมตร มีผลต่างของค่าแรงดึงผิว เท่ากับ 17.7 มิลลินิวตันต่อเมตร และเปอร์เซ็นต์ผลต่างแรงดึงผิว เท่ากับ 33.27 เปอร์เซ็นต์ ส่วนค่าการกระจายน้ำมันจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นจนกระทั่งสูงสุดถึงวันที่ 9 (0.62 ตารางเซนติเมตร) มีการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพตั้งแต่วินาทีแรกของการเจริญและสามารถผลิตได้ดีที่สุดในวันที่ 9 ของการเจริญ (0.26 กรัมต่อลิตร) ดังรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ของ *C. mucifera* NJP25 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

เมื่อสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้เอทิลแอลกอฮอล์และระเหยเอทิลอะซิเตทออกภายใต้สูญญากาศ มีลักษณะหนืด มีสีน้ำตาลเข้ม ดังรูปที่ 4.3 และวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ (crude biosurfactant) โดยละลายด้วยสารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์ ให้มีความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร และวัดค่าการกระจายน้ำมันและค่าแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *C. mucifera* NJP25 10 ไมโครลิตร หรือ เท่ากับ 0.00002 มิลลิกรัม สามารถกระจายน้ำมันได้เท่ากับ 27.33 ตารางเซนติเมตร และลดค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 34 มิลลินิวตันต่อเมตร



รูปที่ 4.2 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (crude biosurfactant) ที่ผลิตได้จาก *C. mucifera* NJP25

4.3 การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวิธี Response Surface Methodology (RSM)

การทดลองนี้เลือกปัจจัย 4 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นของซูโครส อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน ค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิ มีผลต่อประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิว ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ โดยที่ปริมาณสารลดแรงตึงผิวที่มากขึ้นจะส่งผลให้ประสิทธิภาพในการลดค่าแรงตึงผิวและค่าการกระจายน้ำมันสูงขึ้น และเพื่อทราบปริมาณและภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยทั้ง 4 ปัจจัย ที่ส่งผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จึงได้ออกแบบการทดลองโดยใช้วิธี Box-Behnken เพื่อหาปริมาณและภาวะที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัย ซึ่งได้จำนวนชุดการทดลอง 29 ชุดการทดลอง และผลการผลิตการทดลองในแต่ละชุดการทดลองดังตารางที่ 4.7 เมื่อวิเคราะห์ด้วยหลักสถิติซึ่งได้ตาราง ANOVA

สมการที่ใช้คำนวณหาจำนวนชุดการทดลองทั้งหมด ที่ใช้ Box-Behnken design ออกแบบการทดลองสำหรับ 3 ปัจจัย ซึ่งกำหนดให้จำนวนการทดลองที่ค่ากลาง มีจำนวน 5 ชุด ได้ผลการออกแบบการทดลองทั้งสิ้น 29 ชุดการทดลอง ดังตารางที่ 4.7

$$N = 2k(k-1)C_p$$

N คือ จำนวนการทดลองทั้งหมด (the number of experiments)

k คือ จำนวนปัจจัย (number of factors)

C_p คือ จำนวนการทดลองซ้ำที่ระดับกลาง (the number of central points)

ตารางที่ 4.7 แสดงจำนวนการทดลอง 29 การทดลองที่ออกแบบโดย Box-Behnken เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของ ความเข้มข้นของซูโครส อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อนิโตรเจน ค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิ และแสดงให้เห็นผลการทดลองจริงของการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในปัจจัยต่าง ๆ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ออกวิเคราะห์ค่าถดถอยหรือค่า regression ของการวางแผนการทดลองแล้วสร้างสมการความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทั้ง 4 สร้างเป็นแผนภาพพื้นผิวตอบสนองสามมิติ (3D reponse surface plot) ซึ่งอธิบายภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยทั้ง 4 ได้

ตารางที่ 4.7 แผนการทดลองออกแบบโดย Box-Behnken Design สำหรับ 4 ปัจจัย 3 ระดับ และ ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ในแต่ละชุดการทดลอง

ชุดการทดลอง (experimental no.)	โค้ดระดับของปัจจัย (coded levels)				ผลผลิต (กรัมต่อลิตร)	
	X_1	X_2	X_3	X_4	ค่าจริง (experimental value)	ค่าทำนาย (predicted value)
1	0 (4)	+1 (25:1)	0 (6.5)	-1 (25)	0.093	0.094
2	+1 (7)	+1 (25:1)	0 (6.5)	0 (30)	0.363	0.325
3	0 (4)	0 (20:1)	0 (6.5)	0 (30)	0.267	0.275
4	0 (4)	-1 (15:1)	-1 (4)	0 (30)	0.198	0.175
5	0 (4)	0 (20:1)	-1 (4)	-1 (25)	0.053	0.016
6	0 (4)	0 (20:1)	0 (6.5)	0 (30)	0.249	0.275
7	0 (4)	+1 (25:1)	-1 (4)	0 (30)	0.071	0.074
8	+1 (7)	0 (20:1)	0 (6.5)	+1 (35)	0.350	0.337
9	0 (4)	0 (20:1)	+1 (9)	+1 (35)	0.052	0.086
10	0 (4)	+1 (25:1)	0 (6.5)	+1 (35)	0.098	0.121
11	0 (4)	0 (20:1)	0 (6.5)	0 (30)	0.362	0.275
12	-1 (1)	-1 (15:1)	0 (6.5)	0 (30)	0.137	0.171
13	0 (4)	+1 (25:1)	+1 (9)	0 (30)	0.174	0.172
14	+1 (7)	-1 (15:1)	0 (6.5)	0 (30)	0.354	0.341
15	-1 (1)	+1 (25:1)	0 (6.5)	0 (30)	0.133	0.143
16	0 (4)	0 (20:1)	0 (6.5)	0 (30)	0.284	0.275
17	0 (4)	0 (20:1)	0 (6.5)	0 (30)	0.215	0.275
18	-1 (1)	0 (20:1)	-1 (4)	0 (30)	0.041	0.074

ตารางที่ 4.7 ต่อ

ชุดการทดลอง (experimental no.)	โค้ดระดับของปัจจัย (coded levels)				ผลผลิต (กรัมต่อลิตร)	
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	ค่าจริง (experimental value)	ค่าทำนาย (predicted value)
19	0 (4)	-1 (15:1)	0 (6.5)	-1 (25)	0.090	0.092
20	-1 (1)	0 (20:1)	0 (6.5)	-1 (25)	0.122	0.110
21	0 (4)	0 (20:1)	+1 (9)	-1 (25)	0.049	0.041
22	+1 (7)	0 (20:1)	+1 (9)	0 (30)	0.277	0.269
23	0 (4)	-1 (15:1)	+1 (9)	0 (30)	0.143	0.115
24	+1 (7)	0 (20:1)	0 (6.5)	-1 (25)	0.118	0.170
25	+1 (7)	0 (20:1)	-1 (4)	0 (30)	0.253	0.270
26	0 (4)	0 (20:1)	-1 (4)	+1 (35)	0.070	0.075
27	-1 (1)	0 (20:1)	0 (6.5)	+1 (35)	0.122	0.045
28	0 (4)	-1 (15:1)	0 (6.5)	+1 (35)	0.143	0.167
29	-1 (1)	0 (20:1)	+1 (9)	0 (30)	0.104	0.112

หมายเหตุ: X₁ คือ ซูโครส (เปอร์เซ็นต์, w/v) X₂ คือ อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อนโตรเจน
X₃ คือ ความเป็นกรด-ด่าง X₄ คือ อุณหภูมิ

สมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างซูโครส อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อนโตรเจน ความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิ

$$Y = -4.56414 + 0.087037X_1 + 0.076813X_2 + 0.21471X_3 + 0.27717X_4 + 0.002708X_1X_2 - 0.0013X_1X_3 + 0.003867X_1X_4 + 0.0395X_2X_3 - 0.006X_2X_4 - 0.00029X_3X_4 + 0.000967X_1^2 - 0.24013X_2^2 - 0.016381X_3^2 - 0.00472X_4^2$$

Y คือ สารลดแรงตึงผิวที่ได้จากการทำนาย (กรัมต่อลิตร) (predicted response variable, mL)

X₁ คือ ซูโครส

X₂ คือ อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อนโตรเจน

X₃ คือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง

X₄ คือ อุณหภูมิ

จากการวิเคราะห์ด้วยหลักสถิติซึ่งได้ตาราง ANOVA ตามตารางที่ 4.8 สามารถอธิบายได้ว่าการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นมีปัจจัยที่ส่งผลคือ ซูโครสและอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน จากการอ่านค่า p ของตาราง ANOVA มีค่าน้อยกว่า 0.0001 และ 0.0423 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าน้อยกว่า 0.05 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และปัจจัยร่วมที่ส่งผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่า ปัจจัยร่วมระหว่างซูโครสกับอุณหภูมิ มีค่า p เท่ากับ 0.0258 มีค่าน้อยกว่า 0.05 เป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ในขณะที่เดียวกันเทอมยกกำลังสองทั้ง 4 ปัจจัย พบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่าง² (C^2) และอุณหภูมิ (D^2) มีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และเมื่อพิจารณาค่า F ของ Lack of fit ต่อ Pure Error เท่ากับ 0.61 ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ การที่ Lack of fit ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเป็นสิ่งที่ดี แสดงว่าสมการที่สร้างมีความเหมาะสมและมีความน่าเชื่อถือ ($R^2 = 0.8996$) โดยสมการความสัมพันธ์ที่ได้นั้นสามารถสร้างได้จากข้อมูลตารางที่ 4.8 และใช้อธิบายความสัมพันธ์ดังรูปที่ 4.2

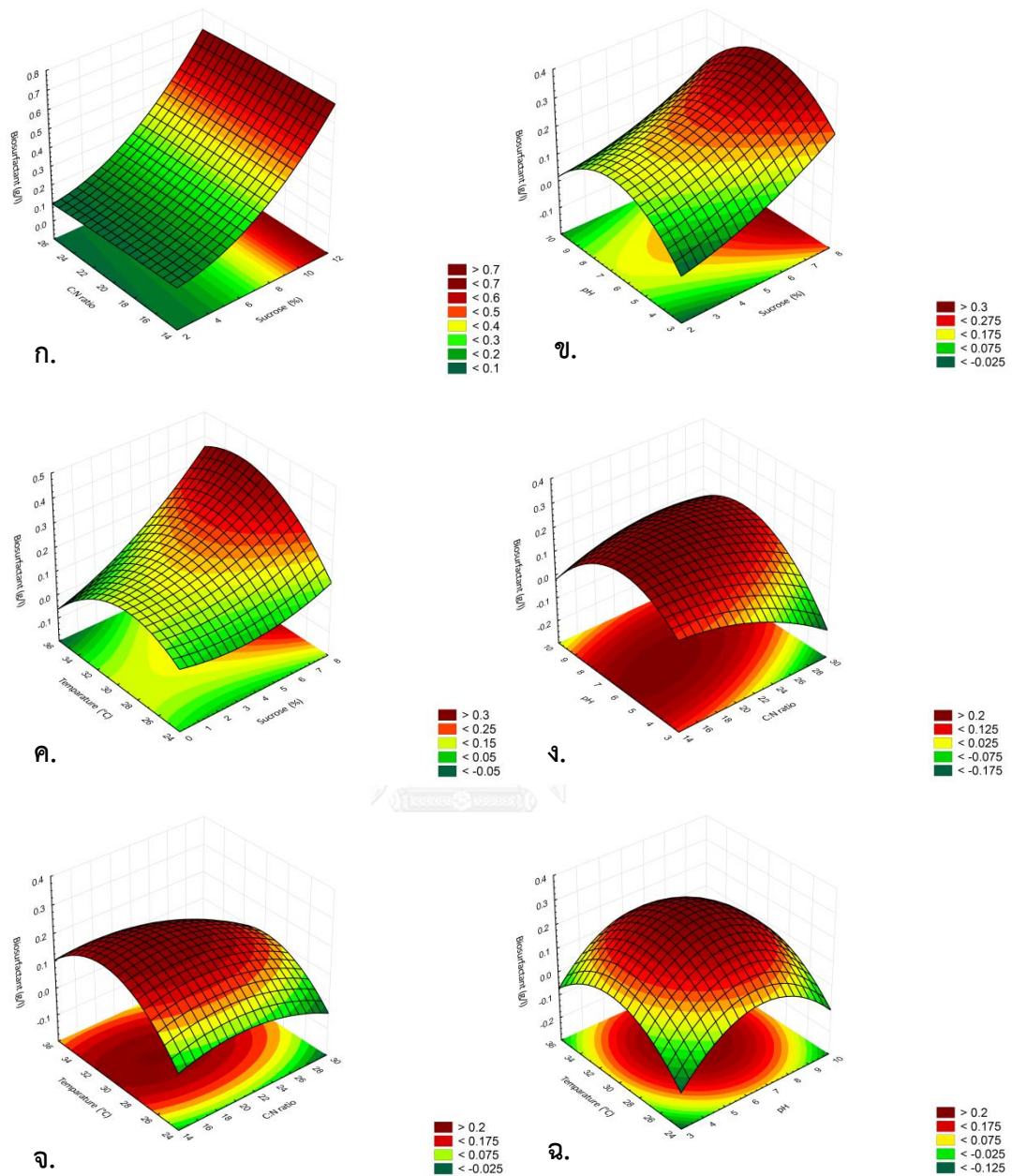


ตารางที่ 4.8 การอธิบายปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและความเหมาะสมของ
สมการความสัมพันธ์

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value	
Model	0.27	14	0.019	8.96	0.0001	significant
A-Sucrose	0.093	1	0.093	42.94	< 0.0001*	
B-C:N	0.001474	1	0.001474	0.68	0.0423*	
C-pH	0.001070	1	0.00107	0.49	0.4935	
D-Temp	0.007993	1	0.007993	3.69	0.0752	
AB	4.220E-05	1	4.22E-05	0.020	0.8909	
AC	0.000380	1	0.00038	0.18	0.6814	
AD	0.013	1	0.013	6.22	0.0258*	
BC	0.006241	1	0.006241	2.88	0.1116	
BD	0.000576	1	0.000576	0.27	0.6140	
CD	0.000051	1	5.11E-05	0.024	0.8800	
A ²	0.000491	1	0.000491	0.23	0.6410	
B ²	0.009575	1	0.009575	4.42	0.0540	
C ²	0.068	1	0.068	31.42	< 0.0001*	
D ²	0.090	1	0.090	41.74	< 0.0001*	
Residual	0.030	14	0.002164			
Lack of Fit	0.018	10	0.001831	0.61	0.7600	not significant
Pure Error	0.012	4	0.002997			
Cor Total	0.30	28				

R-square (R^2) = 0.8996 Adjusted R-square (adj R^2) = 0.803

*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 5% (significant at 5% level)



รูปที่ 4.3 แผนภาพพื้นผิวพหุคูณสามมิติ (3D response surface plot) โดยวัดค่าผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยเปรียบเทียบปัจจัย 2 ปัจจัย ก. ซูโครสต่ออัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน ข. ซูโครสต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง ค. ซูโครสต่ออุณหภูมิ ง. อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง จ. อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่ออุณหภูมิ ฉ. ค่าความเป็นกรด-ด่างต่ออุณหภูมิ

หลังจากนั้นเลือกกำหนดค่าปัจจัยองค์ประกอบทั้ง 4 ปัจจัย สำหรับผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เพื่อเป็นการตรวจสอบความแม่นยำของสมการความสัมพันธ์สำหรับใช้ทำนายปริมาณการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยมีซูโครสความเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 15 (โดยให้แหล่งคาร์บอนความเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์คงที่ และปริมาณโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.124 เปอร์เซ็นต์) ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6.5 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ผลจากการทำนายจะได้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เท่ากับ 0.34 กรัมต่อลิตร และผลจากการทำทดลองจริงได้เท่ากับ 0.36 กรัมต่อลิตรซึ่งใกล้เคียงกับผลจากการทำนายจากสมการแสดงความสัมพันธ์ ทำให้ยืนยันได้ว่าปัจจัยทั้ง 4 ชนิดเหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากกว่าก่อนใช้โปรแกรมทางสถิติถึง 1.38 เท่า ซึ่งปริมาณสารอาหารและปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่ผ่านการปรับปรุงจากการออกแบบการทดลองด้วย Box-Behnken ได้สูตรอาหารที่เปลี่ยนไปตามตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 เปรียบเทียบปัจจัยที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพก่อนและหลังปรับปรุงสูตรจากการใช้โปรแกรมทางสถิติ

ปัจจัยที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	ก่อนปรับปรุงสูตร	หลังปรับปรุงสูตร
ซูโครส	4 %	7 %
อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจน (NaNO ₃)	20:1	15:1
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.02 %	0.02 %
โพแทสเซียมซัลเฟต	0.02 %	0.02 %
ยีสต์สกัด	0.1 %	0.1 %
ค่าความเป็นกรด-ด่าง	6.5	6.5
อุณหภูมิ	30°C	30°C
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (crude biosurfactant)	0.26 g/l	0.36 g/l

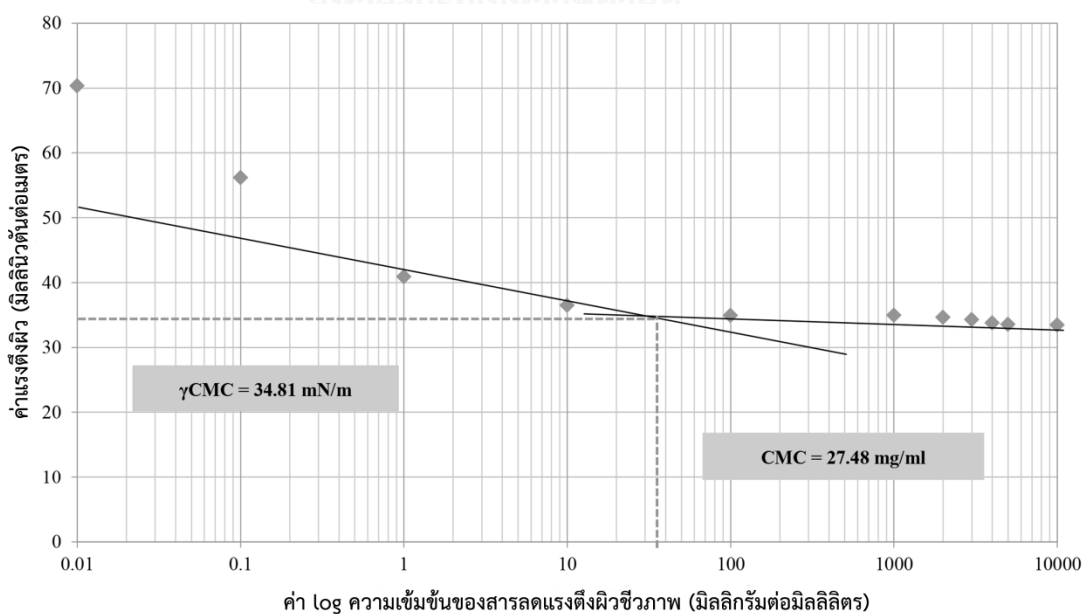
การนำวิธีทางสถิติมาใช้กับงานทดลองกับสิ่งมีชีวิตนั้นให้ผลสำเร็จดี แต่ต้องคำนึงถึงจุดประสงค์ของผู้วิจัย และควรระมัดระวังโดยเฉพาะหากใช้วิธี manual adjust การจะเลือกใช้โปรแกรมใดนั้นขึ้นอยู่กับความสะดวกและความชำนาญของผู้ใช้ เพราะตัวโปรแกรมไม่ได้ทำให้ค่าที่ได้จากการทำนายต่างกัน แต่จะต่างกันเพราะผู้ใช้โปรแกรม ดังนั้นในการจะใช้วิธีทางสถิติกับงานทางที่เกี่ยวกับสิ่งมีชีวิตเพียงต้องมีความรอบคอบ แต่มีนักสถิติทำงานในคอมพิวเตอร์แล้วสรุปเลยต้องมีนัก

ชีววิทยาควบคุมและทำการทดลองจริงเพื่อยืนยันผล เพื่อให้งานเป็นไปตามจุดประสงค์ เพราะบางครั้งในทางสถิติไม่แตกต่างกันโดยเฉพาะในการทดลองระดับห้องปฏิบัติการ แต่เมื่อทำการขยายขนาดเป็น pilot plant อาจจะต่างกันมากอย่างชัดเจน

4.4 ศึกษาลักษณะสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

4.4.1 ค่าความเข้มข้นวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ (Critical micelle concentration, CMC)

ค่าความเข้มข้นวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เป็นค่าความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่น้อยที่สุดที่ทำให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพก่อตัวเป็นไมเซลล์ได้ สามารถหาค่าความเข้มข้นวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ โดยนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้มาเจือจางด้วยทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.01-10,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นวัดค่าแรงตึงผิวด้วยวิธี Du Nuoy Ring และเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตึงผิวและค่า \log ของความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่วัดค่าได้ เพื่อหาความเข้มข้นวิกฤตของการเกิดไมเซลล์จากการทดลองพบว่า เมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงขึ้นค่าแรงตึงผิวจะลดต่ำลงสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารและที่ความเข้มข้นวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *C. mucifera* NJP25 มีค่าเท่ากับ 27.48 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะมีค่าแรงตึงผิว ความเข้มข้นวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ หรือค่า γ_{CMC} เท่ากับ 34.81 มิลลินิวตันต่อเมตร และถ้าความเข้มข้นของสารสูงขึ้นกว่าค่า CMC จะไม่มีผลต่อค่าแรงตึงผิว ดังรูปที่ 4.4



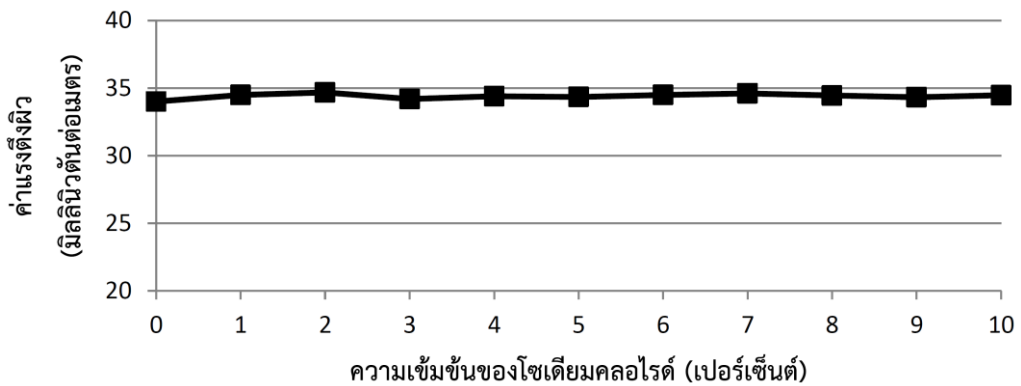
รูปที่ 4.4 ค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *C. mucifera* NJP25

4.4.2 ศึกษาความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Stability of biosurfactant)

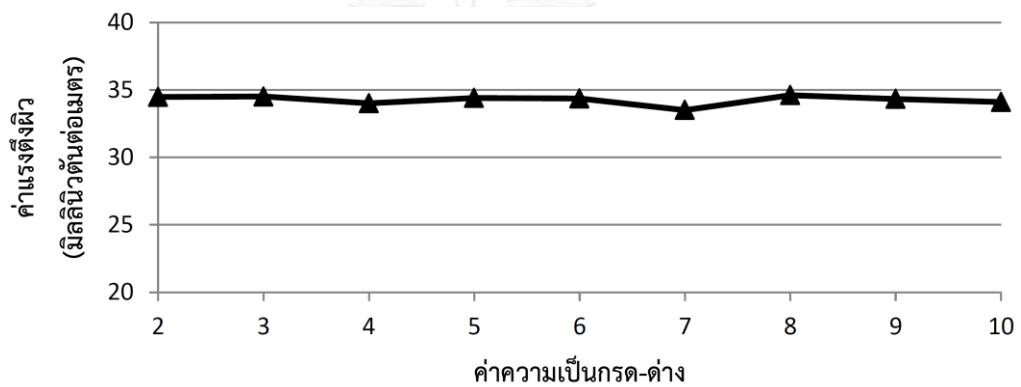
การศึกษาความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *C. mucifera* NJP25 ต่อความเข้มข้นของเกลือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิ เจือจางสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทดสอบความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อความเข้มข้นของเกลือ เท่ากับ 1-10 เปอร์เซ็นต์ (มวลต่อปริมาตร) โดยวัดจากค่าแรงตึงผิว ณ ภาวะต่าง ๆ พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังคงมีประสิทธิภาพได้ดีแม้มีการแปรผันความเข้มข้นของเกลือ ดังรูปที่ 4.5 (ก) การทดสอบความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วง 2-10 พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถทนต่อค่าความเป็นกรด-ด่างได้ โดยมีประสิทธิภาพไม่เปลี่ยนแปลงทั้งในสภาวะที่เป็นกรดและเบส ดังรูปที่ 4.5 (ข) การทดสอบความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่ออุณหภูมิต่าง ๆ ได้แก่ 4 30 60 และ 100 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถทนต่ออุณหภูมิในช่วงกว้างได้ โดยยังคงมีประสิทธิภาพไม่เปลี่ยนแปลงที่อุณหภูมิ ต่าง ๆ ดังรูปที่ 4.5 (ค) นอกจากนี้ยังนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไปทดสอบความเสถียรภายใต้สภาวะฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถทนต่ออุณหภูมิสูง โดยยังคงมีประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไม่เปลี่ยนแปลง



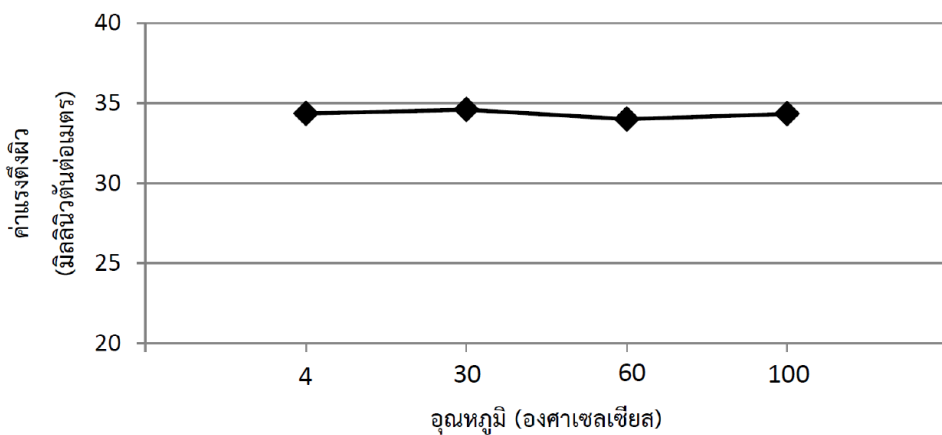
(ก) ความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อความเข้มข้นของเกลือ



(ข) ความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง



(ค) ความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่ออุณหภูมิ

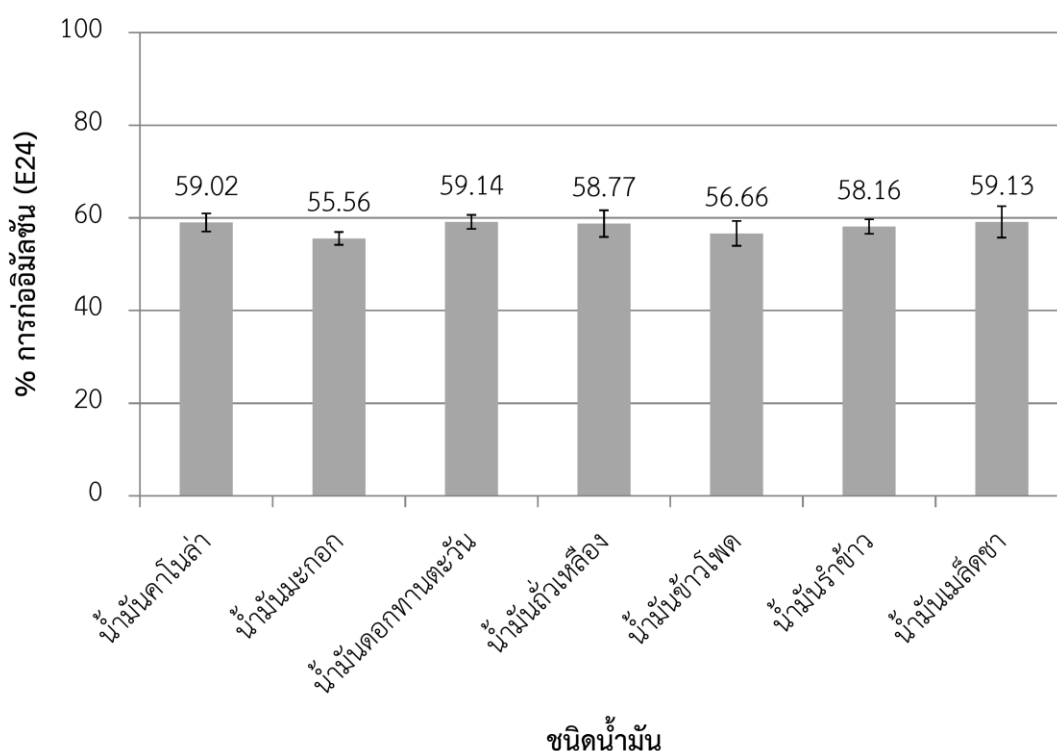


รูปที่ 4.5 การศึกษาความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *C. mucifera* NJP25

(ก) ความเข้มข้นของเกลือ (ข) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (ค) อุณหภูมิ

4.4.3 การวัดค่าดัชนีการก่ออิมัลชัน (Emulsion Index)

การวัดค่าดัชนีการก่ออิมัลชัน (Emulsification Index) และศึกษาความเสถียรในการก่ออิมัลชัน (Emulsification stability) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *C. mucifera* NJP25 ร่วมกับน้ำมันพืชชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ประกอบอาหาร เช่น น้ำมันคาโนล่า น้ำมันมะกอก น้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันข้าวโพด น้ำมันรำข้าว และ น้ำมันเมล็ดชา ที่การก่ออิมัลชันที่ช่วงโมเมนต์ 24 (E₂₄) พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถก่ออิมัลชันร่วมกับน้ำมันได้ทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบ โดยน้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันเมล็ดชา และน้ำมันคาโนล่า มีเปอร์เซ็นต์การก่ออิมัลชันใกล้เคียงกันและสูงสุด คือ 59.14 59.13 และ 59.02 ตามลำดับ ดังรูปที่ 4.6 ดังนั้นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสำหรับใช้เป็นสารก่ออิมัลชันสามารถประยุกต์ได้กับงานที่เกี่ยวข้องกับน้ำมันพืช โดยใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ในรูปสารสกัดหยาบที่ละลายในบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอริก และมีความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มากพอต่อการก่ออิมัลชันที่ดี

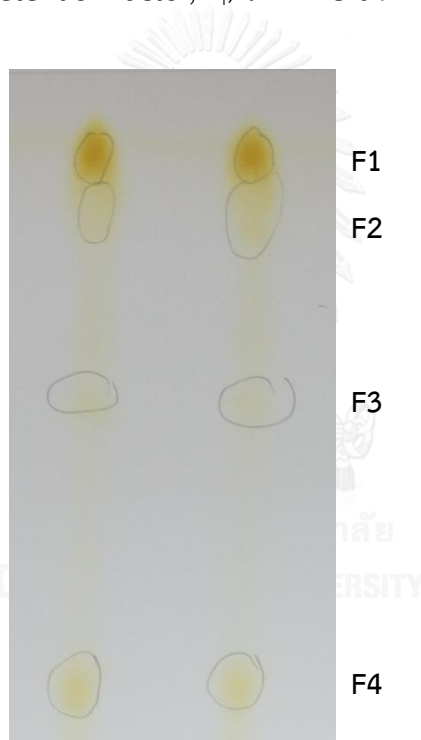


รูปที่ 4.6 การก่ออิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *C. mucifera* NJP25 กับน้ำมันชนิดต่าง ๆ ที่ 24 ชั่วโมง (E₂₄)

4.5 เตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วน

4.5.1 เตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography)

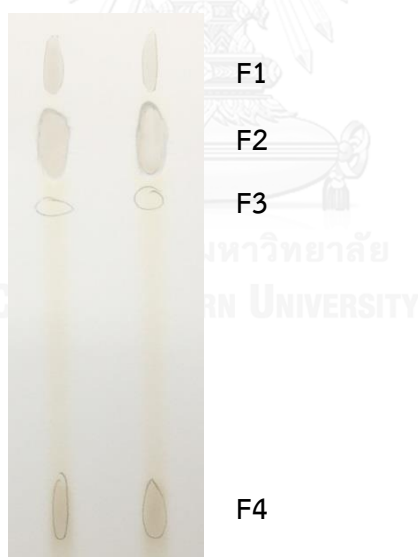
เตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธี Analytical TLC โดยนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 140 ไมโครลิตร มาจุดบนแผ่นซิลิกาเจล 60 ขนาด 20x20 ซม. หนา 0.2 มิลลิเมตร โดยมีคลอโรฟอร์ม เอทานอล และน้ำ (65:25:4) เป็นเฟสเคลื่อนที่ โดยนำแผ่นซิลิกาเจลไปอบด้วยไอระเหยของไอโอดีน พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถแยกได้ 4 ลำดับส่วน ได้แก่ F1 F2 F3 และ F4 ดังรูปที่ 4.7 และหาค่าอัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (Retention factor, R_f) ได้เท่ากับ 0.92 0.87 0.71 และ 0.45



รูปที่ 4.7 การแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *C. mucifera* NJP25 โดยใช้โครมาโตกราฟีชนิดแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography) สามารถแยกได้ 4 ลำดับส่วน ได้แก่ F1 F2 F3 และ F4 ตามลำดับ

4.5.2 เตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยวิธี Preparative thin layer chromatography (PLC)

แยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธีการ Preparative thin layer chromatography ซึ่งเป็นเทคนิคแยกสารที่ต้องการในปริมาณมาก โดยนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร มาจุดบนแผ่นซิลิกาเจล หนา 2 มิลลิเมตร และคลอโรฟอร์ม เอทานอล และน้ำ (65:25:4) เป็นเฟสเคลื่อนที่ จากนั้นวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเบื้องต้น โดยนำแผ่นซิลิกาเจลไปอบด้วยไอระเหยของไอโอดีน พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถแยกได้ 4 ลำดับส่วน ได้แก่ F1 F2 F3 และ F4 ดังรูปที่ 4.8 และมีค่า R_f เท่ากับ 0.92, 0.76 0.68 และ 0.24 ตามลำดับ และนำตัวอย่างแต่ละลำดับส่วนของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้มาทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยใช้แผ่นซิลิกาเจล 16 แผ่น พบว่า F2 มีค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 85.67 ตารางเซนติเมตร ดังตารางที่ 4.10 ดังนั้นจึงทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครโมโตกราฟี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ในการทดลองต่อไป



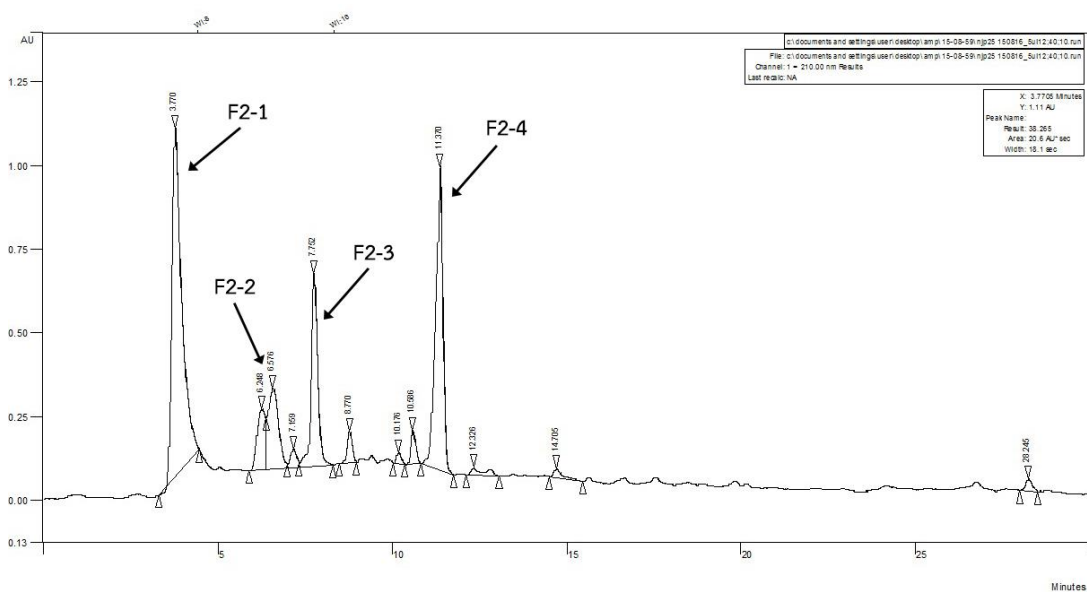
รูปที่ 4.8 การแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *C. mucifera* NJP25 ด้วย Preparative thin layer chromatography สามารถแยกได้ 4 ลำดับส่วน ได้แก่ F1 F2 F3 และ F4 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.10 อัตราการเคลื่อนที่ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและค่าการกระจายน้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จากวิธี Preparative thin layer chromatography

ลำดับส่วน	อัตราการเคลื่อนที่ของสาร (R _f)	ค่าการกระจายน้ำมัน (ตารางเซนติเมตร)	น้ำหนักของ PLC แต่ละลำดับส่วน (กรัม)
F1	0.92	48.56	3.15
F2	0.76	85.67	3.67
F3	0.68	29.35	2.74
F4	0.24	22.34	3.32

4.5.3 การทำให้สารบริสุทธิ์ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิกวิดโครโมโตกราฟี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลำดับส่วนที่ F2 มาสกัดด้วยด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน 1:1 จำนวน 3 ครั้ง แล้วนำมาวิเคราะห์และแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่อง HPLC ปริมาตรที่ฉีด 350 ไมโครลิตร ผลการทดลองพบว่า ลำดับส่วนที่ F2 แสดงบนโครมาโตแกรม ดังรูปที่ 4.9 โดยเก็บตัวอย่างฟีกที่เวลาต่าง ๆ 4 ตัวอย่าง ได้แก่ F2-1 F2-2 F2-3 และ F2-4 โดยแต่ละตัวอย่างออกมาที่เวลา (Retention time, RT) เท่ากับ 3.770 6.576 7.752 และ 11.370 นาที ตามลำดับ โดยน้ำหนักที่ได้แสดงในตารางที่ 4.11 จากนั้นนำไปวิเคราะห์ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยเตรียมความเข้มข้นของสารเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้ววัดค่าการกระจายน้ำมันและชั่งน้ำหนักของสารที่ได้ ดังตารางที่ 4.11 พบว่า ตัวอย่างสารฟีกที่ F2-4 ที่เวลา (RT) เท่ากับ 11.370 นาที ให้ค่าการกระจายน้ำมันสูงสุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 803.84 ตารางมิลลิเมตร และตัวอย่างสารฟีกที่ F2-1 ที่เวลา 3.770 นาที ให้ค่าการกระจายน้ำมันรองลงมา ซึ่งมีค่าเท่ากับ 645.70 ตารางมิลลิเมตร และนำไปทำการวิเคราะห์หาน้ำหนักมวลโมเลกุลด้วยวิธี LCMS และเครื่องโปรตอน-นิวเคลียร์ แมกเนติกเรโซแนนซ์ สเปกโตรสโกปี (¹H-Nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR) ในการทดลองถัดไป



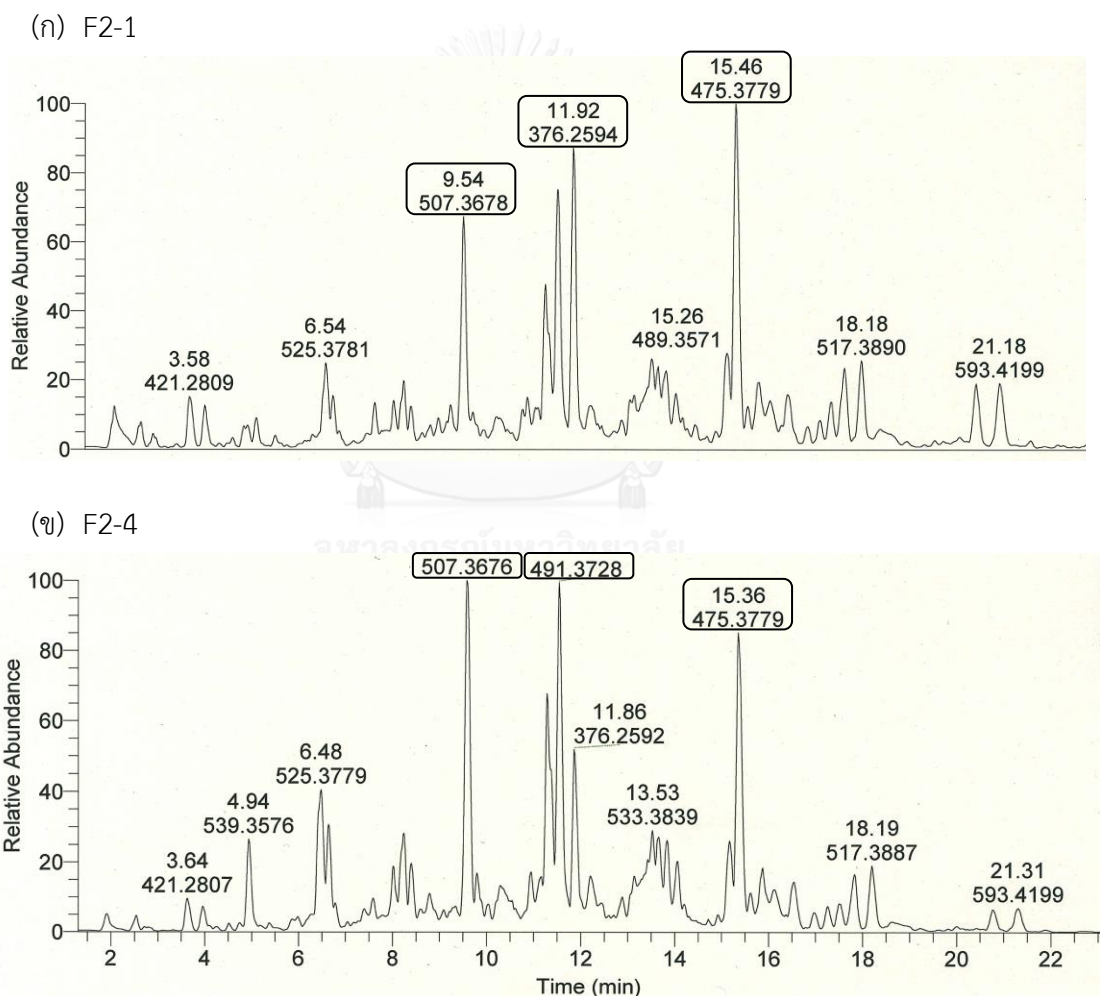
รูปที่ 4.9 โครมาโทแกรมของ HPLC จากตัวอย่างลำดับที่ F2 เก็บตัวอย่างพริกที่เวลาต่าง ๆ (Retention time, RT) จำนวน 4 ตัวอย่าง ได้แก่ F 2-1 F 2-2 F 2-3 และ F 2-4

ตารางที่ 4.11 สรุปค่าการกระจายน้ำมันของตัวอย่างลำดับส่วนที่ F2 ซึ่งผ่านการวิเคราะห์และทำให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่อง HPLC

ตำแหน่งพริกจาก F2	เวลา (นาที)	เส้นผ่าศูนย์กลาง (มิลลิเมตร)	ค่าการกระจายน้ำมัน (ตารางมิลลิเมตร)	น้ำหนักของแต่ละพริก (มิลลิกรัม)
F2-1	3.770	28.67	645.70	1.9
F2-2	6.576	25.33	504.06	1.6
F2-3	7.752	23	415.26	1.4
F2-4	11.370	32	803.84	1.2

4.5.4 วิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *C. mucifera* NJP25 ด้วยวิธีแมสสเปกโตรเมตรี โดยเทคนิคการเกิด ion source คือ ESI จากการวิเคราะห์สเปกตรัมมวลของตัวอย่าง F2-1 และ F2-4 มีสารประกอบที่คล้ายกันประมาณ 3 หรือมากกว่านั้น ปรากฏบนโครมาโตแกรม ดังรูปที่ 4.10 (ก) และรูปที่ 4.10 (ข) ตามลำดับ ซึ่งแสดงค่ามวลต่อประจุ (m/z) ในรูป ($M+H^+$) เท่ากับ 507.367 491.372 475.377 และ 376.259 จากงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่าค่ามวลต่อประจุของ F2-1 และ F2-4 มีค่ามวลต่อประจุน้อยกว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดโซโฟโรลิพิดที่ผลิตด้วยยีสต์สายพันธุ์อื่นที่ผ่านมา ดังตารางที่ 4.12



รูปที่ 4.10 สเปกตรัมมวลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *C. mucifera* NJP25 ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธีแมสสเปกโตรเมตรี

ตารางที่ 4.12 แสดงน้ำหนักโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

จุลินทรีย์	มวลโมเลกุล (m/z)	อ้างอิง
Sophorolipid		
<i>Trichosporon asahii</i> .	662	Chandran และ Das (2010)
<i>Candida rugosa</i>	668	Chandran และ Das (2012)
<i>Rhodotorula muciliginosa</i>	728	Chandran และ Das (2012)
<i>Candida samutprakarnensis</i> JP52	662	Poomtien และคณะ (2013)
<i>Starmerella bombicola</i> ATCC-22214	623	Morya และคณะ (2013)
Mannosylerythritol		
<i>Candida antarctica</i>	657	Kim และคณะ (2002)
<i>Ustilago scitaminea</i> NBRC 32730	657	Morita และคณะ (2011)
<i>Ustilago maydis</i>	699	Hewald และคณะ (2006)
<i>Pseudozyma aphidis</i> ZJUDM34	737	Fan และคณะ (2014)
<i>Candida mucifera</i> NJP25	506	งานวิจัยนี้
	490	
	474	
	375	

และเมื่อทำการวิเคราะห์โครงสร้างโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของตัวอย่าง F2-1 และ F2-4 $^1\text{H-NMR}$ ที่ 500 mHz (ภาคผนวก ง) สามารถระบุตำแหน่งของสัญญาณหลักของโปรตอนได้คือ ค่าเคมีคอลชิฟท์ที่ 3-4 ppm เป็นฟีกโปรตอนของหมู่เมทิลีน ($-\text{CH}_2$) จากเทคนิค HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) NMR แบบ 2 มิติ (ภาคผนวก ง) พบว่า ไม่มีสัญญาณของหมู่อัลคิล (alkyl group) ที่ชัดเจนและไม่มีสัญญาณของกลุ่มไกลโคซิล สัญญาณสีแดงในรูป คือ มีหมู่เมทิลีน ($-\text{CH}_2$) และ สัญญาณสีดำ คือ เมทิล หรือ หมู่เมทิล ($-\text{CH}$) ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าสารประกอบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *C. mucifera* NJP25 ไม่ใช่กลุ่มของไกลโคลิพิดที่พบในงานวิจัยอื่น

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นกลุ่มผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่น่าสนใจสำหรับการประยุกต์ใช้ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพและอุตสาหกรรม (Desai และ Banat, 1997) การศึกษาหาค่าประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะในการเพาะเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *C. mucifera* NJP25 พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงปรับปรุงสูตร Hua และคณะ (2004) โดยศึกษาทีละปัจจัย (one factor at a time) พบว่าที่ประกอบด้วยซูโครสความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยอื่นที่จะใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน (Makkar และ Cameotra, 1997) ผลจากการใช้แหล่งคาร์บอนทั้ง 2 ชนิดมาผสมกัน พบว่า การเจริญของ *C. mucifera* NJP25 จากการใช้ซูโครสร่วมกับกลีเซอรอล น้ำมันปาล์มและน้ำมันเหลืองให้ผลที่ใกล้เคียงกัน แต่ต่ำกว่ากลูโคสและซูโครสชนิดเดียว และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของแหล่งคาร์บอน 2 ชนิด ต่ำกว่าการใช้กลูโคส กลีเซอรอล และซูโครสชนิดเดียว แต่มีรายงานวิจัยการใช้แหล่งคาร์บอน 2 ชนิด ซึ่งสามารถเพิ่มการเจริญและประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ สำหรับแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ คือ โซเดียมไนเตรต ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Dastgheib และคณะ (2008) รายงานว่า โซเดียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ในกระบวนการทางชีวภาพนี้ อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) เป็นปัจจัยสำคัญในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (da Silva และคณะ, 2009) โดยอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุด คือ อัตราส่วน C:N เท่ากับ 20 ทำให้มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มขึ้น มีค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 0.39 ตารางเซนติเมตร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยอื่นที่พบว่า อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ต่ำจะมีประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นการเพาะเลี้ยงในภาวะที่มีการจำกัดปริมาณของไนโตรเจน (Santa Anna และคณะ, 2002; Rashedi และคณะ, 2005) ในขณะที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนอื่น ๆ ให้ผลต่อการเจริญที่ไม่แตกต่างกัน แต่มีต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ผลการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.5 เป็นค่าที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เช่นเดียวกับ Abu-Ruwaida และคณะ (1991) พบว่า การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Rhodococcus* อยู่ในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.5-7.2 ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *C. mucifera* NJP25 คือ 30 องศาเซลเซียส ซึ่ง Joice และ Parthasarathi (2014) รายงานว่าในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Pseudomonas aeruginosa* PBSC1 อุณหภูมิเป็นหนึ่งในปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึง

ผิวชีวภาพของจุลินทรีย์ เมื่ออุณหภูมิสูงถึง 40 องศาเซลเซียส จะยับยั้งการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ วิธีการออกแบบการทดลองแบบ One factor at a time แม้จะไม่สามารถอธิบายความสัมพันธ์ของปัจจัยแต่ละปัจจัยได้ แต่เป็นการออกแบบการทดลองที่เข้าใจได้ง่ายและไม่ซับซ้อน

การติดตามความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยเฉพาะเลี้ยง *C. mucifera* NJP25 ในอาหารเลี้ยงเชื้อปรับปรุงสูตรที่เหมาะสม ซึ่งมีซูโครสความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนและโซเดียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20 ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.5 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราเขย่า 200 รอบต่อนาที พบว่า ปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้นมีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมากขึ้นในช่วง 24 ชั่วโมงแรกที่สามารถเห็นได้จากกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ลดค่าแรงตึงผิวได้มาก และค่าแรงตึงผิวที่ลดลงถึงจุดต่ำสุด ตั้งแต่ 3 - 9 วัน แสดงให้เห็นว่ายีสต์นี้มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพดี ลดแรงตึงผิวได้รวดเร็ว การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มมากขึ้นตามอายุการเจริญ สามารถกระจายน้ำมันได้ 0.62 ตารางเซนติเมตรและลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ต่ำสุดเท่ากับ 35.50 มิลลินิวตันต่อเมตร ได้สารสกัดหยาบมีน้ำหนักเท่ากับ 0.26 กรัมต่อลิตร และสารสกัดหยาบ 0.00002 มิลลิกรัม สามารถกระจายน้ำมันได้เท่ากับ 27.33 ตารางเซนติเมตร ซึ่งการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีรูปแบบความสัมพันธ์กับการเจริญของเชื้อ (growth associated production)

สำหรับการหาภาวะที่เหมาะสมที่เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงสุด โดยออกแบบการทดลองด้วย Box-Behnken พบว่า ซูโครส 7 เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจน เท่ากับ 15:1 ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6.5 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ได้สารสกัดหยาบเท่ากับ 0.36 กรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้เพิ่มขึ้น 38.46 เปอร์เซ็นต์จากสูตรอาหารเดิม

ลักษณะคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพขึ้นอยู่กับความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิว ซึ่งขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มขึ้นทำให้ค่าแรงตึงผิวต่ำลง สามารถหาค่าความเข้มข้นวิกฤตในการเกิดไมเซลล์ (CMC) ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวที่ต่ำที่สุดที่ทำให้สารลดแรงตึงผิวก่อตัวเป็นรูปแบบไมเซลล์ และยังเป็นค่าที่แสดงถึงความสามารถในการลดแรงตึงผิวได้ต่ำที่สุดของสาร พบว่า มีค่า CMC เท่ากับ 27.48 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัม และค่าแรงตึงผิว ณ การเกิดไมเซลล์ (γ CMC) 34.81 มิลลินิวตันต่อเมตร ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากงานวิจัยอื่น ๆ พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *C. mucifera* NJP25 มีค่า CMC ต่ำกว่า เช่น สารสกัดหยาบของ *S. bombicola* (39 มิลลินิวตันต่อเมตร) (Pekin และ Vardar-Sukan, 2006) *C. antarctica* (35 มิลลินิวตันต่อ

เมตร) (Adamczak และ Bednarski, 2000) *C. lipolytica* (50 มิลลิกรัมต่อเมตร) (Amaral และคณะ, 2006) โดยสารลดแรงตึงผิวที่มีประสิทธิภาพดีจะมีค่า CMC ต่ำ เนื่องจากใช้ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวน้อยในการลดค่าแรงตึงผิว มีงานวิจัยที่ผลิตโซโฟโวลิตจาก *C. lipolytica* UCP0988 มีค่า CMC (critical micelle concentration) และค่าแรงตึงผิว เท่ากับ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และลดค่าแรงตึงผิวจาก 70 ถึง 25 มิลลิกรัมต่อเมตร ตามลำดับ (Rufino และคณะ, 2014) ซึ่งให้ผลของค่า CMC ที่ใกล้เคียงกันกับงานวิจัยนี้ จากการศึกษาความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *C. mucifera* NJP25 ในสภาวะต่าง ๆ พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถทนต่อความเข้มข้นของเกลือ (1-10 เปอร์เซ็นต์) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (2-10) และอุณหภูมิ (4 30 60 100 องศาเซลเซียส) ได้นาน 15 นาที นอกจากนี้ ยังนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไปทดสอบความเสถียรภายใต้สภาวะฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถทนต่ออุณหภูมิสูง โดยยังคงมีประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวไม่เปลี่ยนแปลง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Luna และคณะ (2016) ทดสอบความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *S. bombicola* สามารถทนต่อความเข้มข้นเกลือ (2-12 เปอร์เซ็นต์) อุณหภูมิ (5-120 องศาเซลเซียส) และค่าความเป็นกรด-ด่าง (2-12) การวัดค่าดัชนีการก่ออิมัลชัน (Emulsification Index) สามารถก่ออิมัลชันได้ดีในน้ำมันพืชทุกชนิดที่นำมาทดสอบ สอดคล้องกับผลการทดลองของ Katemai และคณะ (2010) รายงานว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Issatchenkia orientalis* PO1.2 สามารถก่ออิมัลชันร่วมกับน้ำมันรำข้าวได้ดีและพบว่าน้ำมันพืชเกือบทุกชนิดมีความเสถียรของอิมัลชันมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ จากงานวิจัยของ สุดารัตน์ ลือพงศ์พัฒนา (2557) ได้ศึกษาการก่ออิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด *Massoia lactone* จาก *Aureobasidium pullulans* YTP6-14 ในน้ำมันพบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถก่ออิมัลชันร่วมกับน้ำมันได้ทุกชนิดและน้ำมันรำข้าวมีเปอร์เซ็นต์การก่ออิมัลชันได้สูงสุด ในปัจจุบันสารที่สามารถก่ออิมัลชันนิยมมาทำเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูง เช่น ผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ อาหารเสริม และเครื่องสำอาง (Patel และ Naik, 2004)

การเตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธี TLC พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถแยกเป็น 4 ลำดับส่วน ได้แก่ F1 F2 F3 และ F4 มีค่า R_f เท่ากับ 0.92 0.87 0.71 และ 0.45 ตามลำดับ จากนั้นเตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนให้ได้ปริมาณมากขึ้นด้วยวิธี preparative TLC พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถแยกเป็น 4 ลำดับส่วน ได้แก่ F1 F2 F3 และ F4 และมีค่า R_f เท่ากับ 0.92, 0.76 0.68 และ 0.24 ตามลำดับ โดย F2 มีค่าการกระจายน้ำมันสูงสุด จึงเลือกมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี HPLC และพบว่า ตัวอย่างพิกที่ F2-1 และ F2-4 เป็นตำแหน่งที่ให้ค่าการกระจายน้ำมันสูงสุดตามลำดับ และนำมาวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารลด

แรงดึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *C. mucifera* NJP25 ด้วยวิธี LC-MS และ $^1\text{H-NMR}$ และ 2D-NMR พบว่า ในพีค F2-1 และ F2-4 มีมวลต่อประจุ (m/z) ในรูป ($M+H^+$) เท่ากับ 375 474 490 และ 507 และจากการทำเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ และ 2D-NMR/HSQC ไม่พบสัญญาณของหมู่ไกลโคซิลแต่พบสัญญาณของเมทิล จึงอาจสรุปได้ว่าไม่พบสารประเภท sophorolipid ที่ผลิตได้โดยยีสต์อื่น

ข้อเสนอแนะ

1. ควรเพิ่มผลผลิตของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพให้มีปริมาณที่สูงขึ้น เช่น นำภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากโปรแกรมทางสถิติมาเพาะเลี้ยงเชื้อในระดับถังหมักและพัฒนาสายพันธุ์ *C. mucifera* NJP25 ให้เป็นสายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพการผลิตเพิ่มขึ้น
2. สารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *C. mucifera* NJP25 มีค่าความเข้มข้นวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ของเท่ากับ 27.48 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และทนต่อภาวะที่รุนแรงได้และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้
3. สารลดแรงดึงผิวชีวภาพจาก *C. mucifera* NJP25 มีสมบัติการเป็นสารก่ออิมัลชันและสารกระจายน้ำมันที่ดีกับน้ำมันพืช อาจนำไปประยุกต์ใช้ในงานด้านสิ่งแวดล้อม เช่น ผสมเป็นสารซักล้าง สามารถขจัดคราบไขมันตามครัวเรือนได้
4. ควรมีการนำตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นและน้ำตาลที่เหลือเพื่อศึกษาการใช้สารตั้งต้นในการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ
5. ควรศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์เพิ่มเติม เพื่อดูหมู่ฟังก์ชันอื่น เช่น $-\text{NH}_2$ group โดยวิธี FTIR

รายการอ้างอิง

- ไพโรจน์ วิริยจารี (2544) การออกแบบพื้นที่การตอบสนอง. ภาควิชาเทคโนโลยีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.
- สุดาร์ตน์ ลือพงศ์พัฒนา (2557) การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยยีสต์และราคล้ายยีสต์ที่แยกได้จากบริเวณชายฝั่งเกาะสีชัง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อนุวัตร แจ่มชัด (2549) สถิติสำหรับการพัฒนาผลิตภัณฑ์และการประยุกต์. ภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Abalos A, Pinazo A, Infante M, Casals M, Garcia F & Manresa A (2001) Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. *Langmuir* **17**: 1367-1371.
- Abbasi H, Sharafi H, Alidost L, Bodagh A, Zahiri HS & Noghabi KA (2013) Response surface optimization of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* MA01 isolated from spoiled apples. *Prep Biochem Biotechnol* **43**: 398-414.
- Abdel-Mawgoud AM, Hausmann R, Lépine F, Müller MM & Déziel E (2011) Rhamnolipids: detection, analysis, biosynthesis, genetic regulation, and bioengineering of production. *Microbiol Monogr* **20**: 13-55.
- Abu-Ruwaida A, Banat I, Haditirto S & Khamis A (1991) Nutritional requirements and growth characteristics of a biosurfactant-producing *Rhodococcus* bacterium. *World J Microbiol Biotechnol* **7**: 53-60.
- Adamczak M & Bednarski Wo (2000) Influence of medium composition and aeration on the synthesis of biosurfactants produced by *Candida antarctica*. *Biotechnol Lett* **22**: 313-316.
- Amaral PF, Coelho MAZ, Marrucho IM & Coutinho JA (2008) Biosurfactants from yeasts: characteristics, production and application. *Landes Biosci* 236-247.

- Amaral PFF, da Silva JM, Lehocky M, Barros-Timmons AMV, Coelho MAZ, Marrucho IM & Coutinho JAP (2006) Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochemistry* **41**: 1894-1898.
- Anandaraj B & Thivakaran P (2010) Isolation and production of biosurfactant producing organism from oil spilled soil. *J Biosci Tech* **1**: 120-126.
- Araujo PW & Brereton RG (1996) Experimental design II. Optimization. *TrAC, Trends Anal Chem* **15**: 63-70.
- Arima K, Kakinuma A & Tamura G (1968) Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochem Biophys Res Commun* **31**: 488-494.
- Arroyo-Lopez FN, Orlic S, Querol A & Barrio E (2009) Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and their interspecific hybrid. *Int J Food Microbiol* **131**: 120-127.
- Arutchelvi JI, Bhaduri S, Uppara PV & Doble M (2008) Mannosylerythritol lipids: a review. *J Ind Microbiol Biotechnol* **35**: 1559-1570.
- Ashby RD, Nuñez A, Solaiman DK & Foglia TA (2005) Sophorolipid biosynthesis from a biodiesel co-product stream. *J Am Oil Chem Soc* **82**: 625-630.
- Auhim HS & Mohamed AI (2013) Effect of different environmental and nutritional factors on biosurfactant production from *Azotobacter chroococcum*. *Int J Adv Pharm Biol Chem* **2**: 477-481.
- Bae K, Choi J, Jang Y, Ahn S & Hur B (2009) Innovative vaccine production technologies: the evolution and value of vaccine production technologies. *Arch Pharm Res* **32**: 465-480.
- Banat IM, Makkar RS & Cameotra SS (2000) Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol* **53**: 495-508.
- Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS & Escaleira LA (2008) Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* **76**: 965-977.
- Bloomberg G (1991) Designing proteins as emulsifiers. *Lebensmitteltechnologie* **24**: 130-131.

- Bodour AA, Drees KP & Maier RM (2003) Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid Southwestern soils. *Appl Environ Microbiol* **69**: 3280-3287.
- Bognolo G (1999) Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* **152**: 41-52.
- Box GE & Behnken DW (1960) Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics* **2**: 455-475.
- Brundish DE, Shaw N & Baddiley J (1967) The structure and possible function of the glycolipid from *Staphylococcus lactis*. *Biochem Biophys Acta* **120**: 148-155.
- Burd G & Ward OP (1997) Energy-dependent accumulation of particulate biosurfactant by *Pseudomonas marginalis*. *Can J Microbiol* **43**: 391-394.
- Burgos-Díaz C, Piqué N, Manresa Á & Marqués AM (2012) Advances in the research of new biosurfactants and their potential use in the biomedical and pharmaceutical industry. *Recent Adv Pharm Sci II* **37**: 151-167.
- Cameotra SS & Makkar RS (1998) Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* **50**: 520-529.
- Cameron DR, Cooper DG & Neufeld RJ (1988) The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. *Appl Environ Microbiol* **54**: 1420-1425.
- Casas J & García-Ochoa F (1999) Sophorolipid production by *Candida bombicola*: Medium composition and culture methods. *J Biosci Bioeng* **88**: 488-494.
- Cavalero DA & Cooper DG (2003) The effect of medium composition on the structure and physical state of sophorolipids produced by *Candida bombicola* ATCC 22214. *J Biotechnol* **103**: 31-41.
- Chandran P & Das N (2010) Biosurfactant production and diesel oil degradation by yeast species *Trichosporon asahii* isolated from petroleum hydrocarbon contaminated soil. *Int J Eng Sci Technol* **2**: 6942-6953.
- Chandran P & Das N (2012) Role of plasmid in diesel oil degradation by yeast species isolated from petroleum hydrocarbon-contaminated soil. *Environ Technol* **33**: 645-652.

- Cirigliano MC & Carman GM (1984) Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl Environ Microbiol* **48**: 747-750.
- Cooper DG (1986) Biosurfactants. *Microbiol Sci* **3**: 145-149.
- Cooper DG & Zajic JE (1980) Surface compounds from microorganisms. *Adv Appl Microbiol* **26**: 495-503.
- Cooper DG & Paddock DA (1984) Production of a Biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. *Appl Environ Microb* **47**: 173-176.
- Cooper DG & Goldenberg BG (1987) Surface-Active Agents from Two *Bacillus* Species. *Appl Environ Microb* **53**: 224-229.
- Cooper DG, Macdonald CR, Duff SJ & Kosaric N (1981) Enhanced Production of Surfactin from *Bacillus subtilis* by Continuous Product Removal and Metal Cation Additions. *Appl Environ Microbiol* **42**: 408-412.
- Croarkin C, Tobias P & Filliben J (2006) NIST/SEMATECH e-handbook of statistical methods. *NIST/SEMATECH, July Available online:*
<http://www.itl.nist.gov/div898/handbook>.
- da Silva GP, Mack M & Contiero J (2009) Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnol Adv* **27**: 30-39.
- Das K & Mukherjee AK (2007) Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresour Technol* **98**: 1339-1345.
- Dastgheib SM, Amoozegar MA, Elahi E, Asad S & Banat IM (2008) Bioemulsifier production by a halothermophilic *Bacillus* strain with potential applications in microbially enhanced oil recovery. *Biotechnol Lett* **30**: 263-270.
- Deml G, Anke T, Oberwinkler F, Max Giannetti B & Steglich W (1980) Schizonellin A and B, new glycolipids from *Schizonella melanogramma*. *Phytochemistry* **19**: 83-87.
- Desai JD & Banat IM (1997) Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 47-64.

- Deshpande M & Daniels L (1995) Evaluation of sophorolipid biosurfactant production by *Candida bombicola* using animal fat. *Bioresour Technol* **54**: 143-150.
- Diab EA (2015) Screening bacterial strains isolated from used motor oil-polluted desert soil for the production of biosurfactants and the possibility of applying the produced biosurfactants for washing and bioremediation of the polluted soil. *IJSR* **4**: 887-895.
- Diercks H, Semeniuk A, Gisch N, Moll H, Duda KA & Holz G (2015) Accumulation of novel glycolipids and ornithine lipids in *Mesorhizobium loti* under phosphate deprivation. *J Bacteriol* **197**: 497-509.
- Fakruddin Md (2012) Biosurfactant: production and application. *J Pet Environ Biotechnol* **3**: 2.
- Fan LL, Dong YC, Fan YF, Zhang J & Chen QH (2014) Production and identification of mannosylerythritol lipid-A homologs from the ustilaginomycetous yeast *Pseudozyma aphidis* ZJUDM34. *Carbohydr Res* **392**: 1-6.
- Felse PA, Shah V, Chan J, Rao KJ & Gross RA (2007) Sophorolipid biosynthesis by *Candida bombicola* from industrial fatty acid residues. *Enzyme Microb Technol* **40**: 316-323.
- Fiechter A (1992) Biosurfactants: moving towards industrial application. *Trends Biotechnol* **10**: 208-217.
- Francy DS, Thomas JM, Raymond RL & Ward CH (1991) Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria. *J Ind Microbiol Biotechnol* **8**: 237-246.
- Gallert C & Winter J (2002) Solid and liquid residues as raw materials for biotechnology. *Naturwissenschaften* **89**: 483-496.
- Gan CY & Latiff AA (2011) Optimisation of the solvent extraction of bioactive compounds from *Parkia speciosa* pod using response surface methodology. *Food Chem* **124**: 1277-1283.
- Gautam K & Tyagi V (2006) Microbial surfactants: a review. *J Oleo Sci* **55**: 155-166.
- Gharaei-Fathabad E (2011) Biosurfactants in pharmaceutical industry: a mini-review. *Ame J Drug Dis Dev* **1**: 58-69.

- Gong G, Zheng Z, Chen H, Yuan C, Wang P, Yao L & Yu Z (2009) Enhanced production of surfactin by *Bacillus subtilis* E8 mutant obtained by ion beam implantation. *Food Technol Biotech* **47**: 27.
- Griffin WC (1955) Calculation of HLB values of non-ionic surfactants. *Am Perfumer Essent Oil Rev* **65**: 26-29.
- Gudiña EJ, Teixeira JA & Rodrigues LR (2011) Biosurfactant-producing lactobacilli: screening, production profiles, and effect of medium composition. *Appl Environ Soil Sci* **2011**.
- Guerra-Santos L, Käppeli O & Fiechter A (1984) *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. *Appl Environ Microb* **48**: 301-305.
- Haskins R, Thorn J & Boothroyd B (1955) Biochemistry of the Ustilaginales: XI. Metabolic products of *Ustilago zaeae* in submerged culture. *Can J Microbiol* **1**: 749-756.
- Hewald S, Linne U, Scherer M, Marahiel MA, Kamper J & Bolker M (2006) Identification of a gene cluster for biosynthesis of mannosylerythritol lipids in the basidiomycetous fungus *Ustilago maydis*. *Appl Environ Microbiol* **72**: 5469-5477.
- Hommel RK, Weber L, Weiss A, Himmelreich U, Rilke O & Kleber HP (1994) Production of sophorose lipid by *Candida (Torulopsis) apicola* grown on glucose. *J Biotechnol* **33**: 147-155.
- Hua Z, Chen Y, Du G & Chen J (2004) Effects of biosurfactants produced by *Candida antarctica* on the biodegradation of petroleum compounds. *World J Microbiol Biotechnol* **20**: 25-29.
- Irfan-Maqsood M & Seddiq-Shams M (2014) Rhamnolipids: well-characterized glycolipids with potential broad applicability as biosurfactants. *Ind Biotechnol* **10**: 285-291.
- Jo JH, Lee DS, Park D, Choe W-S & Park JM (2008) Optimization of key process variables for enhanced hydrogen production by *Enterobacter aerogenes* using statistical methods. *Bioresour Technol* **99**: 2061-2066.

- Joice PA & Parthasarathi R (2014) Optimization of biosurfactant production from *Pseudomonas aeruginosa* PBSC1. *Int J Curr Microbiol App Sci* **3**: 140-151.
- Joshi S, Yadav S, Nerurkar A & Desai AJ (2007) Statistical optimization of medium components for the production of biosurfactant by *Bacillus licheniformis* K51. *J Microbiol Biotechnol* **17**: 313-319.
- Kaloorazi NA & Choobari FS (2013) Biosurfactant: Properties and Application. *J Biol Today's World* **2**: 235-241.
- Kapadia S & Yagnik B (2013) Current trend and potential for microbial biosurfactants. *Asian J Exp Biol Sci* **4**: 1-8.
- Käppeli O & Finnerty WR (1979) Partition of alkane by an extracellular vesicle derived from hexadecane-grown *Acinetobacter*. *J Bacteriol* **140**: 707-712.
- Katamai W, Kaewsuksai S & Yaen L (2010) Isolation of Waste Lubricating Oil-degrading Microorganisms. *J Thaksin* **12**: 202-213.
- Kim H-S, Jeon J-W, Kim S-B, Oh H-M, Kwon T-J & Yoon B-D (2002) Surface and physico-chemical properties of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, from *Candida antarctica*. *Biotechnol Lett* **24**: 1637-1641.
- Kim HS, Yoon BD, Choung DH, Oh HM, Katsuragi T & Tani Y (1999) Characterization of a biosurfactant, mannosylerythritol lipid produced from *Candida* sp. SY16. *Appl Microbiol Biotechnol* **52**: 713-721.
- Kim HS, Jeon JW, Kim BH, Ahn CY, Oh HM & Yoon BD (2006) Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, by *Candida* sp. SY16 using fed-batch fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* **70**: 391-396.
- Kim SY, Oh DK, Lee KH & Kim JH (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 (2008) Naturally engineered glycolipid biosurfactants leading to distinctive self-assembling properties. *Yakugaku Zasshi* **128**: 695-706.

- Kitamoto D, Akiba S, Hioki C & 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, Nakane T & Nakahara T (1992) Production of mannosylerythritol lipids as biosurfactants by resting cells of *Candida antarctica*. *Biotechnol Lett* **14**: 305-310.
- Kitamoto D, Ikegami T, Suzuki GT, Sasaki A, Takeyama Y-i, Idemoto Y, Koura N & Yanagishita H (2001) Microbial conversion of n-alkanes into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma (Candida antarctica)*. *Biotechnol Lett* **23**: 1709-1714.
- Lechevalier MP (1977) Lipids in bacterial taxonomy - a taxonomist's view. *CRC Crit Rev Microbiol* **5**: 109-210.
- Luna J, Rufino R, Campos G & Sarubbo L (2012) Properties of the biosurfactant produced by *Candida sphaerica* cultivated in low-cost substrates. *Chem Eng Transact* **27**.
- Luna JM, Santos Filho AS, Rufino RD & Sarubbo LA (2016) Production of biosurfactant from *Starmerella bombicola* URM 3718 for environmental applications. *Chem Eng* **49**: 583-588.
- Luna JM, Rufino RD, Albuquerque CD, Sarubbo LA & Campos-Takaki GM (2011) Economic optimized medium for tensio-active agent production by *Candida sphaerica* UCP0995 and application in the removal of hydrophobic contaminant from sand. *Int J Mol Sci* **12**: 2463-2476.
- Madaan V, Chanana K, Kataria M & Bilandi A (2014) Emulsion technology and recent trends in emulsion applications. *Int Res J Pharm* **5**: 533-542.
- Makkar RS & Cameotra SS (1997) Biosurfactant production by a thermophilic *Bacillus subtilis* strain. *J Ind Microbiol Biotechnol* **18**: 37-42.
- Makkar RS & Cameotra SS (2002) An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **58**: 428-434.

- Makkar RS & Rockne KJ (2003) Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ Toxicol Chem* **22**: 2280-2292.
- Makkar RS, Cameotra SS & Banat IM (2011) Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB Express* **1**: 5-5.
- Maneerat S (2005) Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources. *Songklanakarin J Sci Technol* **27**: 675-683.
- McInerney MJ, Javaheri M & Nagle DP, Jr. (1990) Properties of the biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* strain JF-2. *J Ind Microbiol* **5**: 95-101.
- Meesters PAEP, Huijberts GNM & Eggink G (1996) High-cell-density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. *Appl Microbiol Biotechnol* **45**: 575-579.
- Montgomery DC (1991) Design and analysis of experiments. John Wiley and Sons., New York.
- Montgomery DC (2008) Design and analysis of experiments. John Wiley and Sons., New York.
- Morikawa M, Daido H, Takao T, Murata S, Shimonishi Y & Imanaka T (1993) A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. strain MIS38. *J Bacteriol* **175**: 6459-6466.
- Morita T, Ishibashi Y, Hirose N, Wada K, Takahashi M, Fukuoka T, Imura T, Sakai H, Abe M & Kitamoto D (2011) Production and characterization of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid B, from sugarcane juice by *Ustilago scitaminea* NBRC 32730. *Biosci Biotechnol Biochem* **75**: 1371-1376.
- Morya VK, Ahn C, Jeon S & Kim EK (2013) Medicinal and cosmetic potentials of sophorolipids. *Mini Rev Med Chem* **13**: 1761-1768.
- Mukherjee AK (2007) Potential application of cyclic lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* strains in laundry detergent formulations. *Lett Appl Microbiol* **45**: 330-335.
- Mulligan CN (2005) Environmental applications for biosurfactants. *Environ Pollut* **133**: 183-198.

- Mulligan CN & Gibbs BF (2004) Types, production and applications of biosurfactants. *Proc Indian Natn Sci Acad* **70**: 31-55.
- Muthusamy K, Gopalakrishnan S, Ravi TK & Sivachidambaram P (2008) Biosurfactants: properties, commercial production and application. *Current Science* **94**.
- Myers RH & Montgomery DC (2002) Response Surface Methodology: Process and Product in Optimization Using Designed Experiments. John Wiley and Sons., New York.
- Neter J, Kutner MH, Nachtsheim CJ & Wasserman W (1996) Applied linear statistical models. Irwin Chicago.
- Nitschke M & Costa SGVAO (2007) Biosurfactants in food industry. *Trends Food Sci & Tech* **18**: 252-259.
- Nitschke M, Ferraz C & Pastore GM (2004) Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. *Braz J Microbiol* **35**: 81-85.
- Oliveira FJS, Vazquez L, de Campos NP & de França FP (2009) Production of rhamnolipids by a *Pseudomonas alcaligenes* strain. *Process Biochem* **44**: 383-389.
- Pan CM, Fan YT, Xing Y, Hou HW & Zhang ML (2008) Statistical optimization of process parameters on biohydrogen production from glucose by *Clostridium* sp. Fanp2. *Bioresour Technol* **99**: 3146-3154.
- Panesar R, Panesar P & Bera M (2011) Development of low cost medium for the production of biosurfactants. *Asian J Microbiol Biotechnol* **3**: 388-396.
- Parekh VJ & Pandit AB (2011) Optimization of fermentative production of sophorolipid biosurfactant by *Starmerella bombicola* NRRL Y-17069 using response surface methodology. *Int J Pharm Biol Sci* **1**: 103-116.
- Patel M & Naik S (2004) Gamma-oryzanol from rice bran oil—A review. *J Sci Ind Res* **63**: 569-578.
- Patel R & Desai A (1997) Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. *Lett Appl Microbiol* **25**: 91-94.

- Patil S, Pendse A & Aruna K (2014) Studies on optimization of biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* F23 isolated from oil contaminated soil sample. *Int J Curr Biotechnol* **2**: 20-30.
- Pekin G & Vardar-Sukan F (2006) Production of sophorolipids using the yeast *Candida bombicola* ATTC 22214 for the applications in the food industry. *J Eng Nat Sci* **2**: 109-116.
- Perfumo A, Rancich I & Banat IM (2010) Possibilities and challenges for biosurfactants use in petroleum industry. *Adv Exp Med Biol* **672**: 135-145.
- Persson A, Österberg E & Dostalek M (1988) Biosurfactant production by *Pseudomonas fluorescens* 378: growth and product characteristics. *Appl Microbiol Biotechnol* **29**: 1-4.
- Plaza GA, Chojniak J & Banat IM (2014) Biosurfactant mediated biosynthesis of selected metallic nanoparticles. *Int J Mol Sci* **15**: 13720-13737.
- Poomtien J, Thaniyavarn J, Pinphanichakarn P, Jindamorakot S & Morikawa M (2013) Production and characterization of a Biosurfactant from *Cyberlindnera samutprakarnensis* JP52T. *Biosci, Biotechnol, Biochem* **77**: 2362-2370.
- Rahman PKSM & Gakpe E (2008) Production, characterization and application of Biosurfactants-Review. *Biotechnol* **7**: 360-370.
- Rashedi H, Assadi MM, Bonakdarpour B & Jamshidi E (2005) Environmental importance of rhamnolipid production from molasses as a carbon source. *Int J Environ Sci Technol* **2**: 59-62.
- Raza ZA, Khan MS & Khalid ZM (2007) Physicochemical and surface-active properties of biosurfactant produced using molasses by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* **42**: 73-80.
- Raza ZA, Khan MS, Khalid ZM & Rehman A (2006) Production kinetics and tensioactive characteristics of biosurfactant from a *Pseudomonas aeruginosa* mutant grown on waste frying oils. *Biotechnol Lett* **28**: 1623-1631.
- Raza ZA, Rehman A, Khan MS & Khalid ZM (2007) Improved production of biosurfactant by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant using vegetable oil refinery wastes. *Biodegradation* **18**: 115-121.

- Rehm HJ & Reiff I (1981) Mechanisms and occurrence of microbial oxidation of long-chain alkanes. *Adv Biochem Eng* **19**: 175-215.
- Robert M, Mercadé ME, Bosch MP, Parra JL, Espuny MJ, Manresa MA & Guinea J (1989) Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. *Biotechnol Lett* **11**: 871-874.
- Rodrigues L, Teixeira J, Oliveira R & van der Mei HC (2006) Response surface optimization of the medium components for the production of biosurfactants by probiotic bacteria. *Process Biochem* **41**: 1-10.
- Rosenberg E (1986) Microbial surfactant. *Crit Rev Biotechnol* **3**: 109-132.
- Rosenberg E, Zuckerberg A, Rubinovitz C & Gutnick DL (1979) Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: isolation and emulsifying properties. *Appl Environ Microbiol* **37**: 402-408.
- Rufino RD, de Luna JM, de Campos Takaki GM & Sarubbo LA (2014) Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. *Electron J Biotechnol* **17**: 34-38.
- Saharan B, Sahu R & Sharma D (2011) A review on biosurfactants: fermentation, current developments and perspectives. *Gen Eng and Biotechnol J* **2011**: 1-14.
- Santa Anna L, Sebastian G, Menezes E, Alves T, Santos A, Pereira Jr N & Freire D (2002) Production of biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* PA 1 isolated in oil environments. *Braz J Chem Eng* **19**: 159-166.
- Santos DKF, Rufino RD, Luna JM, Santos VA & Sarubbo LA (2016) Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. *Int J Mol Sci* **17**: 401.
- Sarubbo LA, Farias CB & Campos-Takaki GM (2007) Co-utilization of canola oil and glucose on the production of a surfactant by *Candida lipolytica*. *Curr Microbiol* **54**: 68-73.
- Satpute SK, Banpurkar AG, Dhakephalkar PK, Banat IM & Chopade BA (2010) Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Crit Rev Biotechnol* **30**: 127-144.
- Shaw N (1970) Bacterial glycolipids. *Bacteriol Rev* **34**: 365-377.

- Shaw N (1974) Lipid composition as a guide to the classification of bacteria. *Adv Appl Microbiol* **17**: 63-108.
- Singh A, Van Hamme JD & Ward OP (2007) Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnol Adv* **25**: 99-121.
- Singh M, Saini V, Adhikari D, Desai J & Sista V (1990) Production of bioemulsifier by a SCP-producing strain of *Candida tropicalis* during hydrocarbon fermentation. *Biotechnol Lett* **12**: 743-746.
- Sobrinho H, Luna JM, Rufino RD, Porto A & Sarubbo LA (2013) Biosurfactants: Classification, properties and environmental applications. *Biotechnol Adv* **11**: 1-29.
- Stüwer O, Hommel R, Haferburg D & Kleber HP (1987) Production of crystalline surface-active glycolipids by a strain of *Torulopsis apicola*. *J Biotechnol* **6**: 259-269.
- Syldatk C, Lang S, Wagner F, Wray V & Witte L (1985) Chemical and physical characterization of four interfacial-active rhamnolipids from *Pseudomonas spec.* DSM 2874 grown on n-alkanes. *Z Naturforsch C* **40**: 51-60.
- Tabatabaee A, Assadi MM, Noohi A & Sajadian V (2005) Isolation of biosurfactant producing bacteria from oil reservoirs. *Iranian J Env Health Sci Eng* **2**: 6-12.
- Tadros TF (2009) Emulsion science and technology: a general introduction. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim.
- Teerapatsakul C, Bucke C, Parra R, Keshavarz T & Chitradon L (2008) Dye decolorisation by laccase entrapped in copper alginate. *World J Microbiol Biotechnol* **24**: 1367-1374.
- Therisod M & Klibanov AM (1986) Facile enzymatic preparation of monoacylated sugars in pyridine. *J Am Chem Soc* **108**: 5638-5640.
- Tulloch AP, Spencer JFT & Gorin PAJ (1962) The fermentation of long-chain compounds by *Torulopsis magnoliae*. Structures of the hydroxy fatty acids obtained by fermentation of fatty acids and hydrocarbons. *Can J Chem* **40**: 1326-1338.

- Wang J & Wan W (2009) Experimental design methods for fermentative hydrogen production: A review. *Int J Hydrogen Energy* **34**: 235-244.
- Wayman M, Jenkins A & Kormady A (1984) Biotechnology for oil and fat industry. *J Am Oil Chem Soc* **61**: 129-131.
- Zhao Z, Wang Q, Wang K, Brian K, Liu C & Gu Y (2010) Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 in vitro and identification of its antifungal components. *Bioresour Technol* **101**: 292-297.
- Zinjarde SS & Pant A (2002) Emulsifier from a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. *J Basic Microbiol* **42**: 67-73.
- Zosim Z, Gutnick D & Rosenberg E (1982) Properties of hydrocarbon-in-water emulsions stabilized by *Acinetobacter* RAG-1 emulsan. *Biotechnol Bioeng* **24**: 281-292.





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารและสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM (broth)

ยีสต์สกัด	3	กรัม
สารสกัดมอลต์	3	กรัม
เปปโตน	5	กรัม
กลูโคส	10	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ผสมสารให้เข้ากัน ทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวแข็ง YM (agar)

ยีสต์สกัด	3	กรัม
สารสกัดมอลต์	3	กรัม
เปปโตน	5	กรัม
กลูโคส	10	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ผสมสารให้เข้ากัน ทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อปรับปรุงสูตร (Hua และคณะ, 2004)

โซเดียมไนเตรต	0.40	กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.02	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.02	กรัม
สารสกัดยีสต์	0.10	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ผสมสารให้เข้ากัน ทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. สารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8

ทริส (เบส)	0.61	กรัม
น้ำกลั่น	80	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

5. เตรียมเฟสเคลื่อนที่ในการทำให้สารบริสุทธิ์บางส่วนโดยวิธี โครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography)

สารละลายคลอโรฟอร์ม เมทานอล และน้ำ ในอัตราส่วน (65:25:4)

คลอโรฟอร์ม	65	มิลลิลิตร
เมทานอล	25	มิลลิลิตร
น้ำ	4	มิลลิลิตร

คำนวณปริมาณไนโตรเจน

ในอาหารมีส่วนประกอบของไนโตรเจน 2 ส่วนคือ โซเดียมไนเตรต และสารสกัดจากยีสต์ (คางที่)

ปริมาณไนโตรเจนจากสารสกัดยีสต์

สารสกัดยีสต์ มีส่วนประกอบไนโตรเจนประมาณ 11.4 % หากใช้ปริมาณ 0.1 กรัม มีปริมาณไนโตรเจน เท่ากับ 0.01 กรัม

ปริมาณไนโตรเจนจากโซเดียมไนเตรต

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

ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในอาหาร

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

สัดส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน

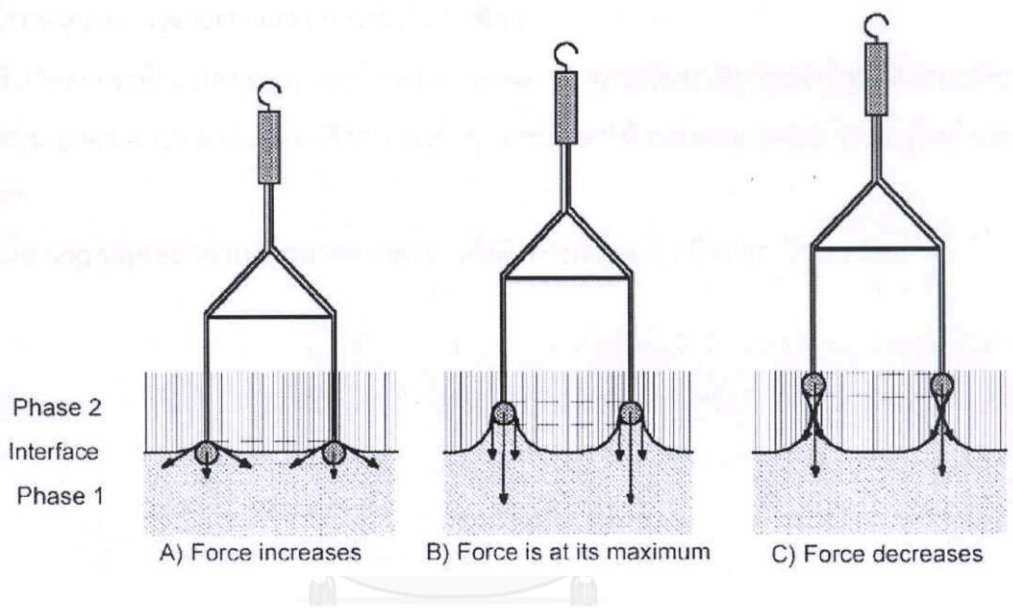
สัดส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ ปริมาณคาร์บอนทั้งหมด (กรัมคาร์บอน) / ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (กรัมไนโตรเจน)



ภาคผนวก ข

หลักการการวัดค่าแรงตึงผิวด้วยวิธี Du Nouy Ring

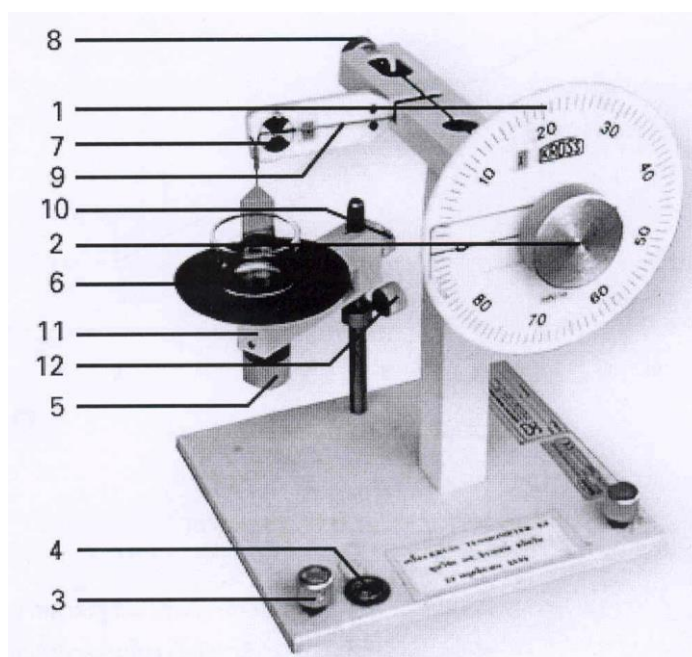
การวัดค่าแรงตึงผิวด้วยวิธี ring method หรือ Du Nouy Ring method ค้นคิดโดย Lecomte Du Nouy ในปี 1919 ซึ่งวิธีนี้จะพิจารณาวงแหวนทองคำขาว (platinum ring) ในแนวระนาบโดยวงแหวนทองคำขาวจะจมในของเหลว และถูกยกขึ้น แรงสูงสุดที่ใช้ในการดึงวงแหวนทองคำขาวพ้นของเหลว คือ ค่าแรงตึงผิว (surface tension)



รูปที่ ข.1 แสดงขั้นตอนการวัดค่าแรงตึงผิวด้วยวิธี Du Nouy Ring

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวัดค่าแรงตึงผิว

ลักษณะและองค์ประกอบของเครื่องวัดค่าแรงตึงผิว (Tensiometer) รุ่น K6 ของบริษัท KRUSS ประเทศเยอรมัน เครื่องวัดค่าแรงตึงผิวนี้ทำการวัดที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ตลอดการทดลอง



รูปที่ ข.2 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) อยู่ในตำแหน่งสมดุลอีกครั้ง โดยหมุน zero adjustment (8) ทวนเข็มนาฬิกา
7. เริ่มวัดค่าแรงตึงผิวโดยหมุน micrometer screw (5) ทวนเข็มนาฬิกาอย่างช้าๆ ในขณะที่เดียวกันก็หมุน pointer (2) ตามเข็มนาฬิกาอย่างช้าๆ โดยรักษาให้ balance beam (9) อยู่ในตำแหน่งสมดุล
8. เมื่อ ring หลุดออกจากตัวอย่างอ่านค่าแรงตึงผิวตามสเกล (1) มีหน่วยเป็น mN/m
9. เมื่อเสร็จการทดลองล้าง ring ด้วยน้ำกลั่น สะบัดให้แห้ง (หรือผ่านเปลวไฟ) เก็บเข้ากล่องไม้ ส่วน vessel ล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น(หรือ acetone) ซับให้แห้งหรือผ่านเปลวไฟ
10. การเก็บเครื่องจะต้องปรับ zero adjustment (8) ให้ balance beam (9) ยกขึ้น เพื่อป้องกันการแกว่งของ balance beam ปรับที่วางสารตัวอย่างให้อยู่ในระดับเดิม แล้วหมุนเข้าหาตัวเครื่อง

ข้อควรระวัง

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

ภาคผนวก ค

ตารางแสดงการวิเคราะห์ผลทางสถิติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป IBM SPSS Statistics Version 22.0 ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Anova : Analysis of Variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าการกระจายน้ำมัน ค่าแรงตึงผิว และ ผลต่างของค่าแรงตึงผิว ในแต่ละการทดลองของการหาภาวะที่เหมาะสมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวิธี (Duncan's Multiple Range Test)

ตารางที่ ค.1 ผลทางสถิติของน้ำหนักเซลล์แห้งจากแหล่งคาร์บอน

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: biomass

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	6.960 ^a	5	1.392	103.619	.000
Intercept	120.178	1	120.178	8946.237	.000
carbon	6.960	5	1.392	103.619	.000
Error	.121	9	.013		
Total	138.682	15			
Corrected Total	7.081	14			

a. R Squared = .983 (Adjusted R Squared = .973)

biomass						
Duncan ^{a,b,c}						
carbon	N	Subset				
		e	d	c	b	a
Waste	2	1.7800				
Gly	2		2.1050			
Mol	3			2.9033		
Palm	3				3.1967	
Glu	3					3.6633
Suc	2					3.6850
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	.842

ตารางที่ ค.2 ผลทางสถิติของค่าการกระจายน้ำมันจากแหล่งคาร์บอน

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: ODA

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.396 ^a	5	.079	13.222	.000
Intercept	1.987	1	1.987	331.756	.000
carbon	.396	5	.079	13.222	.000
Error	.060	10	.006		
Total	2.423	16			
Corrected Total	.456	15			

a. R Squared = .869 (Adjusted R Squared = .803)

Oil displacement activity

Duncan^{a,b,c}

carbon	N	Subset	
		b	a
Mol	3	.1933	
Waste	2	.2250	
Palm	3	.2433	
Gly	3	.3300	
Glu	3		.5367
Suc	2		.6250
Sig.		.091	.225

ตารางที่ ค.3 ผลทางสถิติของค่าแรงดึงผิวจากแหล่งคาร์บอน

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Surface

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	381.913 ^a	5	76.383	30.289	.000
Intercept	38950.687	1	38950.687	15445.524	.000
carbon	381.913	5	76.383	30.289	.000
Error	27.740	11	2.522		
Total	40165.441	17			
Corrected Total	409.653	16			

a. R Squared = .932 (Adjusted R Squared = .902)

ตารางที่ ค.3 ต่อ

Surface tension				
Duncan ^{a,b,c}				
carbon	N	Subset		
		c	b	a
Glu	3	42.3267		
Suc	3	42.4933		
Mol	3		49.0500	
Waste	2		49.4150	
Palm	3			53.3433
Gly	3			53.8767
Sig.		.904	.792	.700

ตารางที่ ค.4 ผลทางสถิติของผลต่างของค่าแรงตึงผิวจากแหล่งคาร์บอน

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: ST

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	242.792 ^a	5	48.558	22.664	.000
Intercept	457.847	1	457.847	213.696	.000
carbon	242.792	5	48.558	22.664	.000
Error	21.425	10	2.143		
Total	740.329	16			
Corrected Total	264.217	15			

a. R Squared = .919 (Adjusted R Squared = .878)

△ST				
Duncan ^{a,b,c}				
carbon	N	Subset		
		b	a	
Gly	3	.9233		
Mol	3	1.7000		
Palm	2	2.6900		
Waste	2		8.0850	
Glu	3		8.7767	
Suc	3		10.5100	
Sig.		.221	.103	

ตารางที่ ค.5 ผลทางสถิติของน้ำหนักเซลล์แห้งจากความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: biomass

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.253 ^a	4	.063	3.406	.053
Intercept	178.745	1	178.745	9627.176	.000
carboncon	.253	4	.063	3.406	.053
Error	.186	10	.019		
Total	179.183	15			
Corrected Total	.439	14			

a. R Squared = .577 (Adjusted R Squared = .407)

biomass			
Duncan ^{a,b}			
[Carbon]	N	Subset	
		b	a
S6.0	3	3.3033	
S2.0	3	3.3100	
S8.0	3	3.4667	3.4667
S10.0	3	3.5467	3.5467
S4.0	3		3.6333
Sig.		.069	.183

ตารางที่ ค.6 ผลทางสถิติของค่าการกระจายน้ำมันจากความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: ODA

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.091 ^a	4	.023	3.554	.047
Intercept	1.019	1	1.019	159.750	.000
carboncon	.091	4	.023	3.554	.047
Error	.064	10	.006		
Total	1.174	15			
Corrected Total	.154	14			

a. R Squared = .587 (Adjusted R Squared = .422)

ตารางที่ ค.6 ต่อ

Oil displacement activity			
Duncan ^{a,b}			
[Carbon]	N	Subset	
		b	a
S10.0	3	.1200	
S8.0	3	.2333	.2333
S6.0	3		.3067
S2.0	3		.3133
S4.0	3		.3300
Sig.		.113	.197

ตารางที่ ค.7 ผลทางสถิติของค่าแรงดึงผิวจากความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Surface

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1.928 ^a	4	.482	1.096	.410
Intercept	20704.810	1	20704.810	47059.238	.000
carboncon	1.928	4	.482	1.096	.410
Error	4.400	10	.440		
Total	20711.138	15			
Corrected Total	6.328	14			

a. R Squared = .305 (Adjusted R Squared = .027)

Surface tension

Duncan^{a,b}

[Carbon]	N	Subset
		a
S8.0	3	36.5900
S4.0	3	36.9300
S10.0	3	37.2667
S6.0	3	37.3500
S2.0	3	37.6267
Sig.		.109

ตารางที่ ค.8 ผลทางสถิติของผลต่างของค่าแรงดึงผิวจากความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: ST

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	31.989 ^a	4	7.997	18.115	.000
Intercept	4008.857	1	4008.857	9080.631	.000
carbon	31.989	4	7.997	18.115	.000
Error	4.415	10	.441		
Total	4045.260	15			
Corrected Total	36.404	14			

a. R Squared = .879 (Adjusted R Squared = .830)

		Δ ST		
Duncan ^{a,b}				
[Carbon]	N	Subset		
		c	b	a
S6.0	3	14.1500		
S2.0	3		15.3767	
S8.0	3		16.4100	
S10.0	3			17.7333
S4.0	3			18.0700
Sig.		1.000	.086	.549

ตารางที่ ค.9 ผลทางสถิติของน้ำหนักเซลล์แห้งจากแหล่งไนโตรเจน

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: biomass

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	4.324 ^a	3	1.441	57.198	.000
Intercept	102.434	1	102.434	4064.827	.000
nitrogen	4.324	3	1.441	57.198	.000
Error	.202	8	.025		
Total	106.959	12			
Corrected Total	4.526	11			

a. R Squared = .955 (Adjusted R Squared = .939)

ตารางที่ ค.9 ต่อ

biomass					
Duncan ^{a,b}					
Nitrogen	N	Subset			
		d	c	b	a
NH ₄ Cl	3	2.0633			
NH ₄ NO ₃	3		2.6967		
(NH ₄) ₂ SO ₄	3			3.2800	
NaNO ₃	3				3.6467
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

ตารางที่ ค.10 ผลทางสถิติของค่าการกระจายน้ำมันจากแหล่งไนโตรเจน

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: ODA

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.121 ^a	3	.040	6.513	.015
Intercept	.429	1	.429	69.446	.000
nitrogen	.121	3	.040	6.513	.015
Error	.049	8	.006		
Total	.600	12			
Corrected Total	.170	11			

a. R Squared = .710 (Adjusted R Squared = .601)

Oil displacement activity			
Duncan ^{a,b}			
Nitrogen	N	Subset	
		b	a
(NH ₄) ₂ SO ₄	3	.1067	
NH ₄ Cl	3	.1167	
NH ₄ NO ₃	3	.1767	
NaNO ₃	3		.3567
Sig.		.326	1.000

ตารางที่ ค.11 ผลทางสถิติของค่าแรงดึงผิวจากแหล่งไนโตรเจน

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: surface

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	241.175 ^a	3	80.392	17.675	.001
Intercept	20509.601	1	20509.601	4509.364	.000
nitrogen	241.175	3	80.392	17.675	.001
Error	36.386	8	4.548		
Total	20787.161	12			
Corrected Total	277.560	11			

a. R Squared = .869 (Adjusted R Squared = .820)

Surface tension			
Duncan ^{a,b}			
Nitrogen	N	Subset	
		b	a
NaNO ₃	3	35.9000	
NH ₄ NO ₃	3	38.3867	
NH ₄ Cl	3		43.6967
(NH ₄) ₂ SO ₄	3		47.3833
Sig.		.191	.067

ตารางที่ ค.12 ผลทางสถิติของผลต่างของค่าแรงดึงผิวจากแหล่งไนโตรเจน

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: ST

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	158.500 ^a	3	52.833	14.870	.002
Intercept	412.345	1	412.345	116.057	.000
nitrogen	158.500	3	52.833	14.870	.002
Error	24.871	7	3.553		
Total	643.194	11			
Corrected Total	183.371	10			

a. R Squared = .864 (Adjusted R Squared = .806)

ตารางที่ ค.12 ต่อ

Δ ST		
Duncan ^{a,b,c}		
Nitrogen	N	Subset
		a
(NH ₄) ₂ SO ₄	3	1.7833
NH ₄ Cl	2	3.4900
NH ₄ NO ₃	3	8.6167
NaNO ₃	3	10.9800
Sig.		.331 .191

ตารางที่ ค.13 ผลทางสถิติของน้ำหนักเซลล์แห้งจากอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: biomass

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.044 ^a	4	.011	.640	.646
Intercept	167.267	1	167.267	9713.543	.000
CNratio	.044	4	.011	.640	.646
Error	.172	10	.017		
Total	167.484	15			
Corrected Total	.216	14			

a. R Squared = .204 (Adjusted R Squared = -.115)

biomass

Duncan ^{a,b}		
C:N ratio	N	Subset
		a
40	3	3.2767
100	3	3.2933
60	3	3.3200
80	3	3.3967
20	3	3.4100
Sig.		.278

ตารางที่ ค.14 ผลทางสถิติของค่าการกระจายน้ำมันจากอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: ODA

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.138 ^a	4	.034	3.196	.062
Intercept	.908	1	.908	84.362	.000
CNratio	.138	4	.034	3.196	.062
Error	.108	10	.011		
Total	1.153	15			
Corrected Total	.245	14			

a. R Squared = .561 (Adjusted R Squared = .386)

Oil displacement activity

Duncan^{a,b}

C:N ratio	N	Subset	
		b	a
100	3	.1167	
80	3	.1667	
40	3	.2767	.2767
60	3	.2800	.2800
20	3		.3900
Sig.		.102	.230

ตารางที่ ค.15 ผลทางสถิติของค่าแรงดึงผิวจากอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: surface

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	32.029 ^a	4	8.007	7.037	.006
Intercept	20761.320	1	20761.320	18245.294	.000
CNratio	32.029	4	8.007	7.037	.006
Error	11.379	10	1.138		
Total	20804.728	15			
Corrected Total	43.408	14			

a. R Squared = .738 (Adjusted R Squared = .633)

ตารางที่ ค.15 ต่อ

Surface tension				
Duncan ^{a,b}				
C:N ratio	N	Subset		
		b	a	
20	3	34.4533		
80	3		36.9367	
40	3		38.1400	
100	3		38.2100	
60	3		38.2767	
Sig.		1.000		.182

ตารางที่ ค.16 ผลทางสถิติของผลต่างของค่าแรงดึงผิวจากอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: ST

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	220.600 ^a	4	55.150	48.532	.000
Intercept	1434.139	1	1434.139	1262.039	.000
nitrogen	220.600	4	55.150	48.532	.000
Error	11.364	10	1.136		
Total	1666.103	15			
Corrected Total	231.964	14			

a. R Squared = .951 (Adjusted R Squared = .931)

△ST

Duncan ^{a,b}				
C:N ratio	N	Subset		
		c	b	a
40	3	4.8600		
60	3	5.5267		
80	3		11.3633	
20	3			13.5467
100	3			13.5933
Sig.		.461	1.000	.958

ตารางที่ ค.17 ผลทางสถิติของน้ำหนักเซลล์แห้งจากอุณหภูมิต่างกัน

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Biomass

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.446 ^a	2	.223	33.305	.001
Intercept	108.299	1	108.299	16163.987	.000
Temp	.446	2	.223	33.305	.001
Error	.040	6	.007		
Total	108.785	9			
Corrected Total	.486	8			

a. R Squared = .917 (Adjusted R Squared = .890)

Biomass			
Duncan ^{a,b}			
Temp	N	Subset	
		b	a
37	3	3.1667	
25	3		3.5433
30	3		3.6967
Sig.		1.000	.062

ตารางที่ ค.18 ผลทางสถิติของค่าการกระจายน้ำมันจากอุณหภูมิต่างกัน

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: ODA

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.073 ^a	2	.037	11.488	.009
Intercept	.504	1	.504	158.080	.000
Temp	.073	2	.037	11.488	.009
Error	.019	6	.003		
Total	.597	9			
Corrected Total	.092	8			

a. R Squared = .793 (Adjusted R Squared = .724)

ตารางที่ ค.18 ต่อ

Oil displacement activity				
Duncan ^{a,b}				
Temp	N	Subset		
		b	a	
37	3	.1600		
25	3	.1867		
30	3		.3633	
Sig.		.584	1.000	

ตารางที่ ค.19 ผลทางสถิติของค่าแรงตึงผิวจากอุณหภูมิ

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Surface

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	23.675 ^a	2	11.838	5.371	.046
Intercept	13733.496	1	13733.496	6231.734	.000
Temp	23.675	2	11.838	5.371	.046
Error	13.223	6	2.204		
Total	13770.394	9			
Corrected Total	36.898	8			

a. R Squared = .642 (Adjusted R Squared = .522)

Surface tension				
Duncan ^{a,b}				
Temp	N	Subset		
		b	a	
30	3	36.8333		
25	3	39.7133	39.7133	
37	3		40.6433	
Sig.		.055	.472	

ตารางที่ ค.20 ผลทางสถิติของผลต่างของค่าแรงดึงผิวจากอุณหภูมิ

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: ST

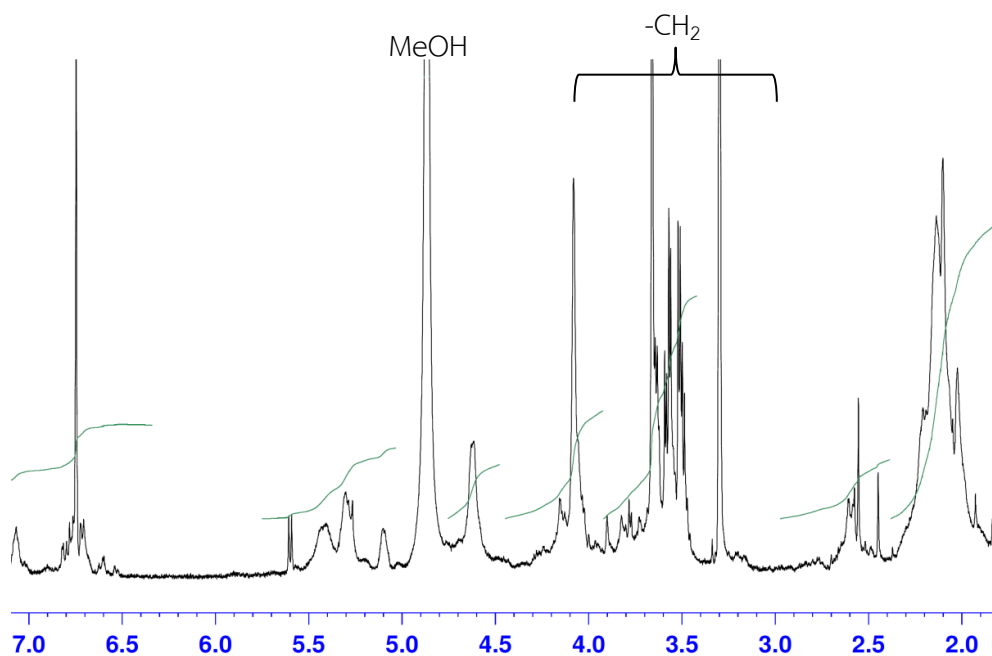
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	23.644 ^a	2	11.822	5.380	.046
Intercept	1506.475	1	1506.475	685.637	.000
Temp	23.644	2	11.822	5.380	.046
Error	13.183	6	2.197		
Total	1543.302	9			
Corrected Total	36.827	8			

a. R Squared = .642 (Adjusted R Squared = .523)

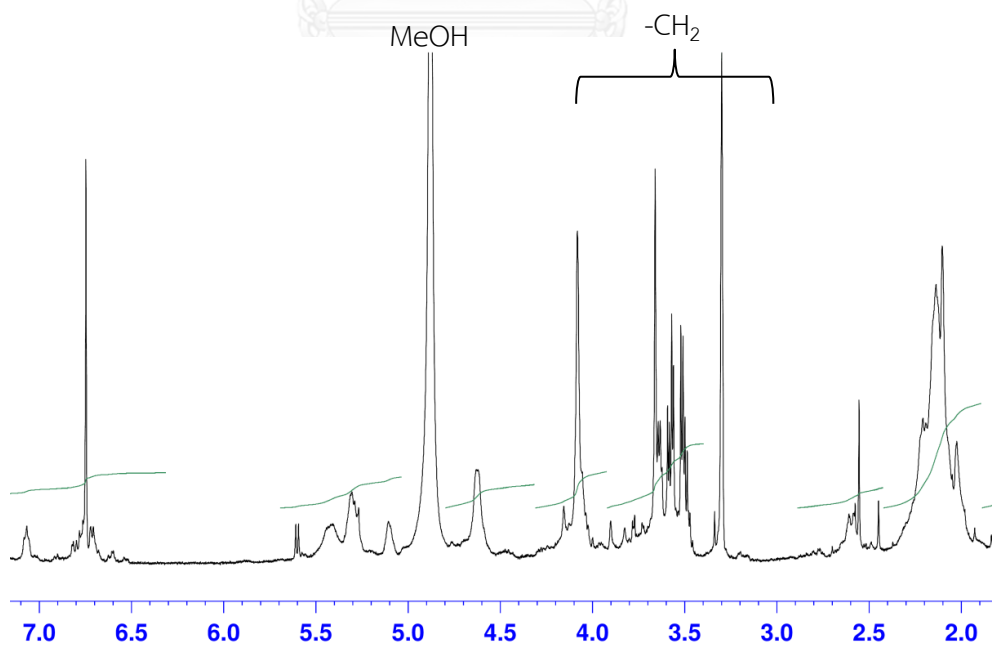
Δ ST			
Duncan ^{a,b}			
Temp	N	Subset	
		b	a
37	3	11.3600	
25	3	12.2867	12.2867
30	3		15.1667
Sig.		.473	.055

ภาคผนวก ง

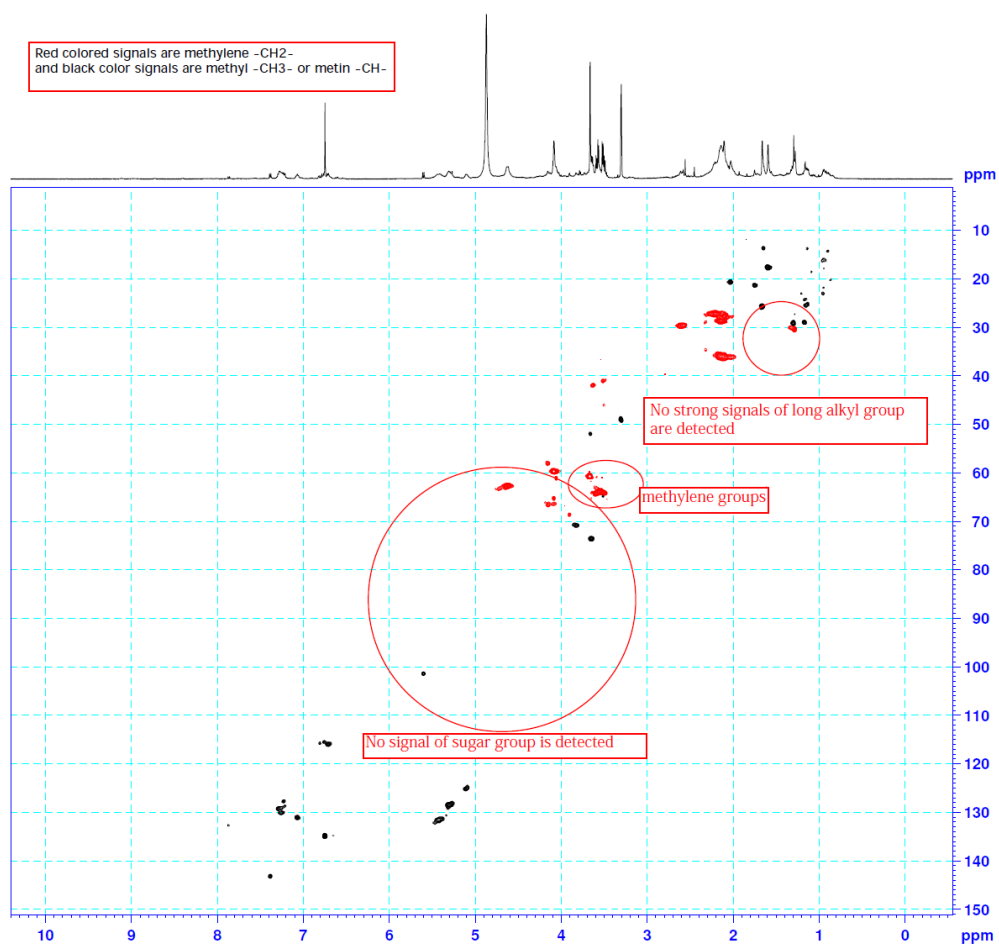
ข้อมูลวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *C. mucifera* NJP25



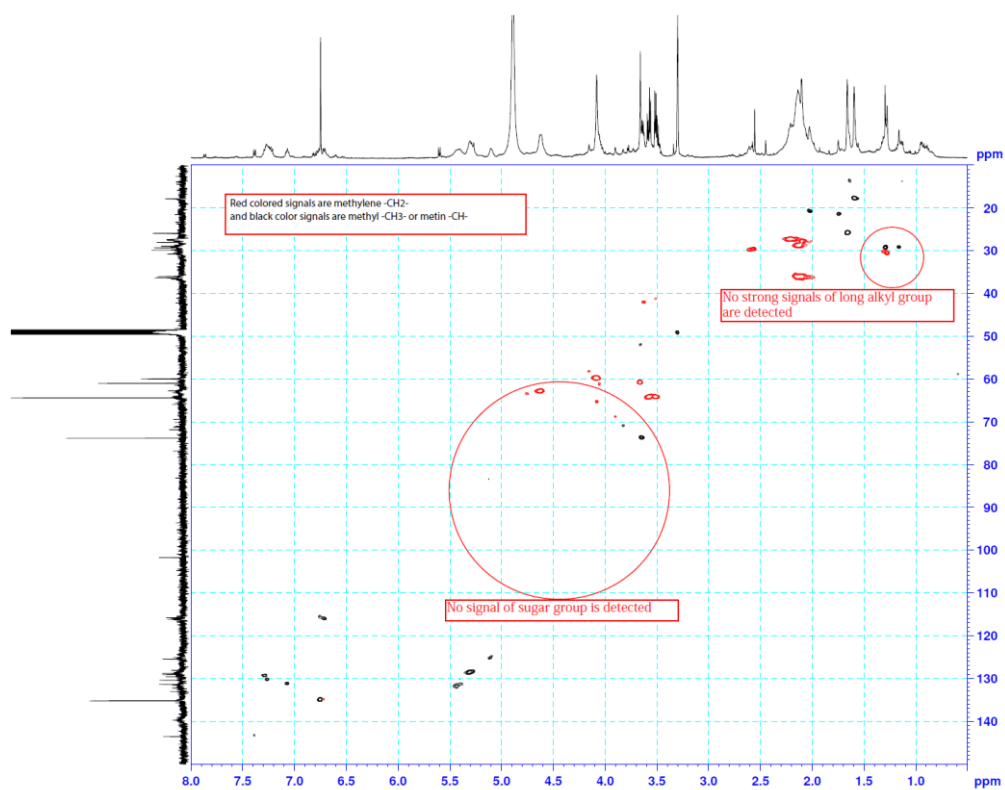
รูปที่ ง.1 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของ F2-1 ที่ผลิตได้จาก *C. mucifera* NJP25



รูปที่ ง.2 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของ F2-4 ที่ผลิตได้จาก *C. mucifera* NJP25



รูปที่ ง.3 HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence, 2D NMR) NMR แบบ 2 มิติ สเปกตรัมของ F2-1 ที่ผลิตได้จาก *C. mucifera* NJP25



รูปที่ ง.4 HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence, 2D NMR) NMR แบบ 2 มิติ สเปกตรัมของ F2-4 ที่ผลิตได้จาก *C. mucifera* NJP25

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวธิดารัตน์ สมเรือง เกิดวันที่ 15 พฤษภาคม พ.ศ. 2534 ที่จังหวัดชุมพร สำเร็จ การศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต หลักสูตรจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ในปีการศึกษา 2555 และเข้ารับการศึกษาคือ ในระดับปริญญาโทบริหารบัณฑิต ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา สาขาวิชาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2556

ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่

ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ได้เข้าร่วมเสนอผลงานในการประชุมทางวิชาการระดับนานาชาติในงาน The 28th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference. "Natural Resources & Bio-based Innovative Products" ระหว่างวันที่ 28-30 พฤศจิกายน พ.ศ. 2559 ณ โรงแรมดิเอ็มเพรส จังหวัดเชียงใหม่ ในหัวข้อ เรื่อง Optimization of biosurfactant production from *Candida mucifera* NJP25