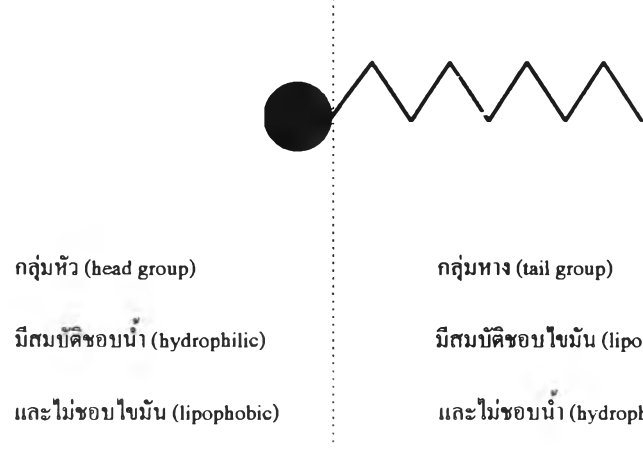
บทที่ 1

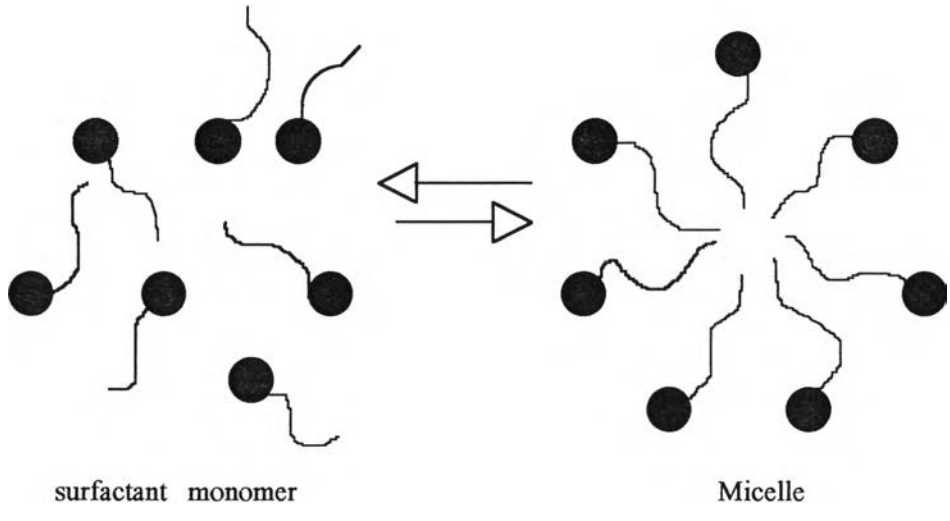
บทนำ

สารลดแรงตึงผิว (surfactant) มาจากภาษาอังกฤษคำว่า SURFace ACTive AgeNT เป็นสารที่มีโครงสร้างของโมเลกุล แบบแอมฟิฟาติก (amphiphatic structure) ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) และ ส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) โดยทั่วไปสารลดแรงตึงผิว สามารถลดแรงตึงผิวระหว่างสองพื้นผิวที่ประจันกันได้ เช่น ลดแรงตึงผิวระหว่างของแข็งกับของเหลว ระหว่างของเหลวกับของเหลว และ ระหว่างของเหลวกับก๊าซ โครงสร้างโดยทั่วไปของสารลดแรงตึงผิว ส่วนหัว (head group) คือ ส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) ไม่ชอบไขมัน เป็นส่วนที่มีขั้ว ส่วนหาง (tail group) คือ ส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ชอบไขมัน เป็นส่วนที่ไม่มีขั้ว ดังรูปที่ 1 เมื่ออยู่ในตัวทำละลาย สารลดแรงตึงผิว จะสะสมอยู่บริเวณผิว (surface) ของตัวทำละลาย และส่งผลให้เกิดการลดค่าแรงตึงผิวของตัวทำละลายนั้น เนื่องมาจาก เมื่อสารลดแรงตึงผิว มีความเข้มข้นสูงในตัวทำละลาย โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิว จะหันเอาส่วนที่ละลายน้ำได้ดี ออกสู่ด้านนอก ส่วนที่ไม่ละลายน้ำ (ไม่ชอบตัวทำละลาย) เข้าหากัน เกิดเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า ไมเซลล์ (micelle) ขึ้น ลักษณะการเกิดไมเซลล์ แสดงดังรูปที่ 2



รูปที่ 1 โครงสร้างโดยทั่วไปของสารลดแรงตึงผิว (Margaritis และคณะ , 1979)

โดยสารละลายไมเซลล์เหล่านี้ จะมีผลลดแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลของตัวทำละลาย (cohesive force) และ/หรือ แรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลของตัวทำละลาย กับสารชนิดอื่น (adhesive force) ทำให้เกิดการลดค่าแรงตึงผิวของสารละลาย เช่น สารอินทรีย์ประเภทไฮโดรโฟบิก เมื่อนำไปละลายในสารละลายไมเซลล์ ความสามารถในการละลาย ของ

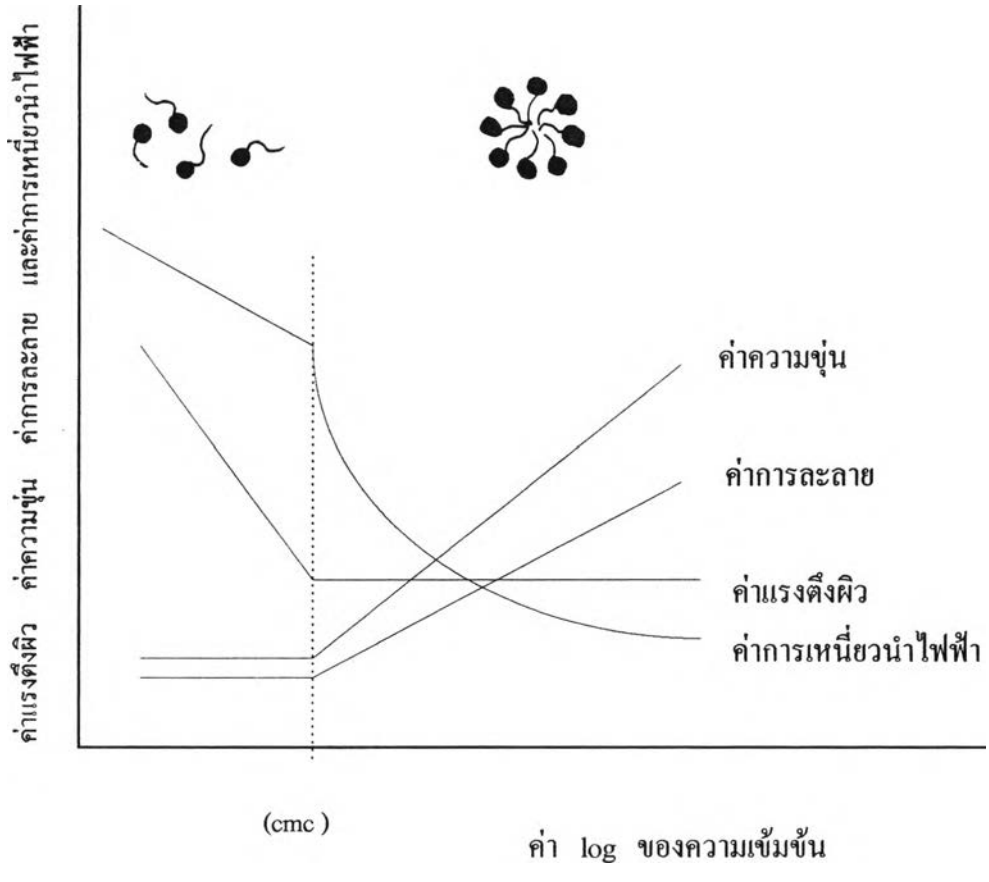


รูปที่ 2 การเกิดไมเซลล์ของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิว (Margaritis และคณะ , 1979)

สารอินทรีย์นั้น จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้เนื่องจากโมเลกุลของสารอินทรีย์ จะกระจัดกระจายเข้าไปอยู่ภายในไมเซลล์ ของสารลดแรงตึงผิว และ ส่วนที่ไม่ชอบน้ำ ของสารลดแรงตึงผิว จะทำหน้าที่เพิ่มการละลาย โดยที่ การละลายจะเพิ่มมากยิ่งขึ้น เมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวมีค่าสูงขึ้น (Margaritis และคณะ , 1979 ; พิมลพรรณ พิทยานุกูล, 2533)

ดังนั้นการเกิดไมเซลล์จึงมีผลต่อค่าแรงตึงผิวของสารละลาย โดยเมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว ในสารละลายเพิ่มขึ้น ค่าแรงตึงผิวของสารละลายจะมีค่าลดลงจนถึงจุดหนึ่ง ที่เรียกว่า Critical micelle concentration (CMC) ซึ่ง ความเข้มข้น ณ จุดนี้เป็นสมบัติเฉพาะของสารลดแรงตึงผิว แต่ละชนิด และ เป็นความเข้มข้นที่ทำให้โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวรวมตัวกัน โดยที่ ค่าแรงตึงผิวของสารละลายจะไม่ลดลงอีก ถึงแม้ว่าความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว ในสารละลาย จะยังคงเพิ่มขึ้นอยู่ เนื่องจาก โมเลกุลของสาร

ลดแรงตึงผิวในสารละลาย จะรวมตัวกันเป็นไมเซลล์ เมื่อวัดค่าความขุ่นของสารละลาย พบว่า ค่าความขุ่นของสารละลาย ยังคงเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของสารลดแรงตึงผิว และค่าการเหนี่ยวนำไฟฟ้าของสารละลายจะลดลง เมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวเพิ่มขึ้น ดังรูปที่ 3 (Davies และ Rideal, 1961)



รูปที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวในสารละลายกับ ค่าแรงตึงผิว ค่าความขุ่น ค่าการละลาย และ ค่าการเหนี่ยวนำไฟฟ้าของ สารละลาย (Davies และ Rideal, 1961)

ในการดำเนินกิจกรรม และ กระบวนการต่างๆ ทั้งในบ้านเรือน และ ในโรงงานอุตสาหกรรม ต้องอาศัยสารลดแรงตึงผิว ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิว ที่ได้จากการสังเคราะห์ มากกว่าสารลดแรงตึงผิวที่ได้จากธรรมชาติ สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ ผลิตได้จากปิโตรเลียม เช่น แอลกอฮอล์ อัลคิลเบนซีน อัลคิลฟีนอล หรือผลิตจากวัตถุดิบธรรมชาติ เช่น ได้จากน้ำมันพืช น้ำมันสัตว์ และ ไขมัน กรดไขมัน แอลกอฮอล์ คาร์โบไฮเดรต เป็นต้น โดยผ่านกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางเคมี ตัวอย่างของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ ที่ดีที่สุด คือ ดีเทอร์เจนท์ (detergent) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการทำความสะอาด สบู่ เป็นดีเทอร์เจนท์ที่มีปรากฏตั้งแต่สมัยโรมัน ในตอนแรก สบู่ ถูกผลิตขึ้นใช้ ภายในครัวเรือน ต่อมาเมื่ออุตสาหกรรมขนสัตว์ได้เจริญเติบโตขึ้น เป็นผลให้มีโรงงานผลิตสบู่ เพื่อเป็นการค้าขึ้นในศตวรรษ ที่ 13 แม้ว่ามูลค่าความต้องการสบู่มีแนวโน้มที่จะเพิ่มมากขึ้น แต่ก็มีการแนะนำ สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ขึ้นในปี ค.ศ. 1940 ซึ่งถือเป็นการเริ่มต้นของวิวัฒนาการของอุตสาหกรรม ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด ที่ใช้ในบ้านเรือน และ โรงงานอุตสาหกรรม ปัจจุบันทั่วโลกได้มีการใช้ ผลิตภัณฑ์ สารลดแรงตึงผิว ประมาณ 1,000,000 ตัน ต่อปี ซึ่งนอกจากจะใช้ใน บ้านเรือน แล้ว ในอุตสาหกรรมใหญ่ๆ ก็มีการใช้สารลดแรงตึงผิว เช่น อุตสาหกรรมการฟอกย้อม อุตสาหกรรมเส้นใย อุตสาหกรรมถลุงแร่ อุตสาหกรรมน้ำมัน อุตสาหกรรมยาฆ่าแมลง อุตสาหกรรมยา และ อุตสาหกรรมพลาสติก เป็นต้น การใช้งานในด้านต่างๆของสารลดแรงตึงผิว ได้แก่ สารทำเปียก (wetting agents) ตัวทำอิมัลสิไฟ (emulsifiers) สารทำให้เกิดฟอง (foam boosters) สารลดฟอง (defoamers) ดีเทอร์เจนท์ (detergents) ตัวทำละลาย (solubilizers) สารขึ้นรูปพลาสติก (plasticizers) เป็นต้น มูลค่าของสารลดแรงตึงผิวในตลาดทั่วโลก มีมูลค่ามากถึง 12.8 พันล้านดอลลาร์ ในปี ค.ศ. 1990 และ คาดว่าความต้องการในการใช้สารลดแรงตึงผิวทั่วโลก จะเพิ่มขึ้น 35 เปอร์เซนต์ เมื่อสิ้นศตวรรษนี้ จึงจัดได้ว่า สารลดแรงตึงผิวมีบทบาทสำคัญยิ่งในทางเศรษฐกิจ สารเหล่านี้ ทั้งหมด ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี โดยใช้ปิโตรเลียม เป็นวัตถุดิบนับเป็นมูลค่า และ ปริมาณมหาศาล เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ ทนต่อการย่อยสลายทางชีวภาพ และปริมาณ ที่มากของสารเหล่านี้ เป็นพิษ ต่อระบบนิเวศน์ ในสิ่งแวดล้อม เมื่อเร็วๆ นี้ จึงได้มีการศึกษานำเอา สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ มาใช้ทดแทนสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ เนื่องจากมีข้อได้เปรียบกว่า เซอแฟกแตนท์ที่ได้จากการสังเคราะห์ขึ้นทางเคมี อยู่หลายประการ เช่น สามารถถูกย่อยสลายทางชีวภาพได้ง่ายกว่า (biodegradable) และเป็นพิษน้อยกว่า (low toxicity) (Clint , 1992 ; Fiechter, 1992 ; Kosaric, 1992)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactant)

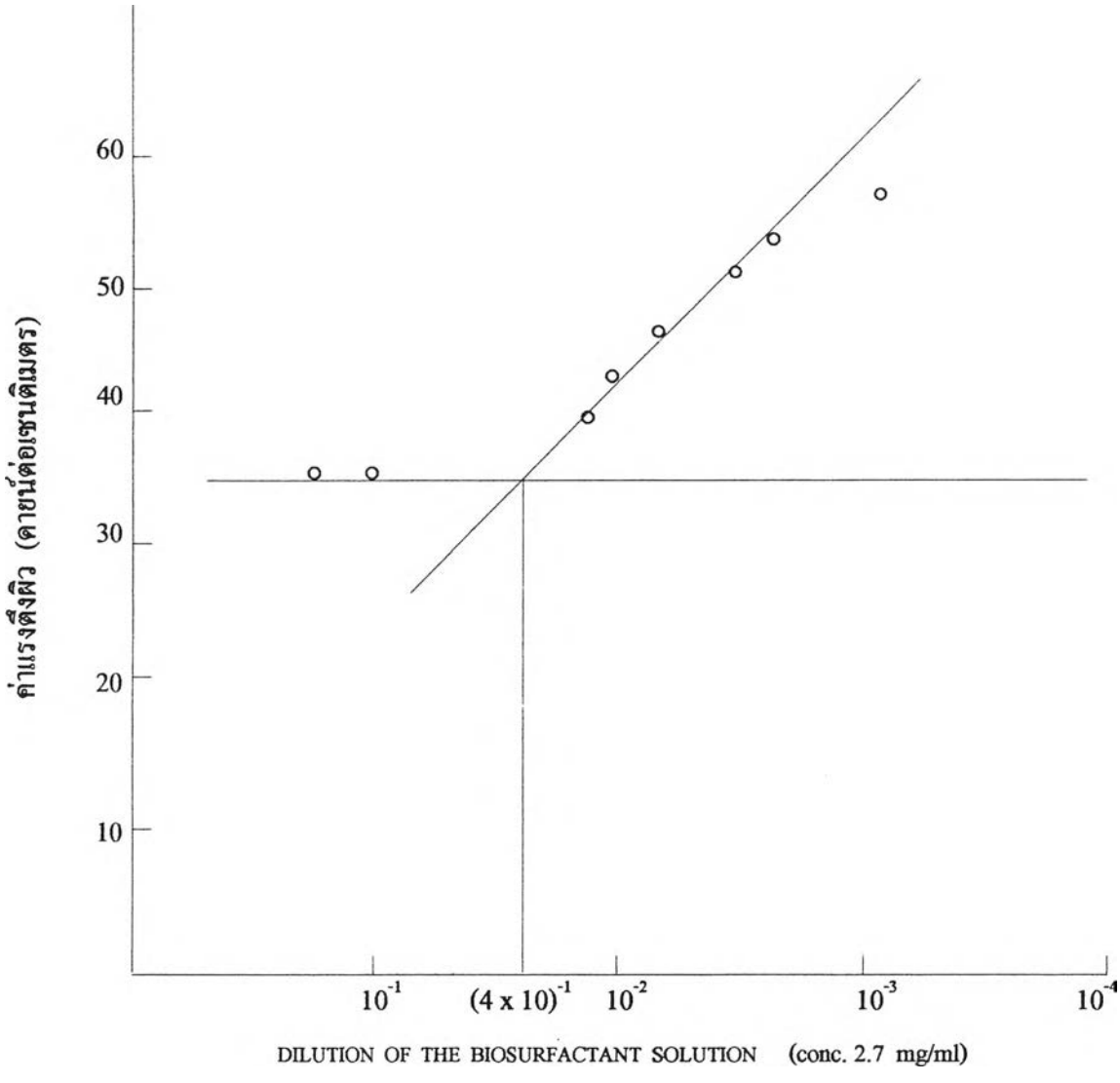
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เป็นสารชีวโมเลกุล ที่มีสมบัติเป็น สารลดแรงตึงผิว (Microbial Surface Active Agents) ซึ่งผลิตโดยจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย รา และ ยีสต์ บางชนิด คุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวเหล่านี้ เป็นผลเนื่องมาจากการรวมกันของส่วนที่ไม่มีขั้ว เช่น สายยาวไฮโดรคาร์บอนของกรดไขมัน กับส่วนที่มีขั้ว เช่น กลุ่มที่ทำหน้าที่เป็น เอสเทอร์ และ แอลกอฮอล์ของไขมัน ฟอสเฟตที่เป็นส่วนประกอบของฟอสโฟลิปิด และ คาร์โบไฮเดรต ที่เป็นส่วนของไกลโคลิปิด คาร์บอกซีเลท ของกรดไขมันหรือกรดอะมิโน (Cooper และคณะ ,1980; Fiechter ,1992) เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ มีสูตรโครงสร้างต่างๆกัน ทำให้ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ มีสมบัติต่างๆกัน สามารถประยุกต์ใช้กับงานได้อย่างกว้างขวาง ปัจจุบันได้มีการใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในทางการค้า เช่น ในปี 1987 ประเทศคูเวต ได้มี การนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ที่ได้จาก จุลินทรีย์ *A. calcoaceticus* (สิทธิบัตรโดย Gutnick และคณะ, 1983) มีชื่อทางการค้าว่า อีมัลแซน (Emulsan) มาใช้ในการกำจัดคราบน้ำมันที่ปนเปื้อนตามชายฝั่งทะเล มหาสมุทร หรือใช้ทำความสะอาดคราบน้ำมัน ในถังเก็บน้ำมัน และท่อส่งน้ำมัน เพื่อลดความหนืดของน้ำมันดิบ จุลินทรีย์จะใช้น้ำมันเป็นแหล่งอาหาร และจะผลิตสารลดแรงตึงผิวเพื่อให้ตัวมันเข้าถึงน้ำมันได้ดีขึ้น จึงทำให้เกิดการย่อยสลายน้ำมันทางชีวภาพ (Rosenberg และคณะ, 1979 ; Banat และคณะ , 1995)

นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ยังมีความปลอดภัยเนื่องจากสามารถเข้ากันได้กับสิ่งมีชีวิต (Biocompatability) และถูกย่อยสลายได้ง่าย (digestibility) ดังนั้นจึงเป็นที่ยอมรับในอุตสาหกรรม อาหาร ยา และเครื่องสำอางค์ สำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมอาหาร มีการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ มาใช้เป็น ตัวทำอีมัลสิไฟ (emulsifier) ในสารปรุงแต่งอาหาร (food additive) ในกระบวนการผลิต สารทำอีมัลชั่นมีบทบาทที่สำคัญในการขึ้นรูป คงรูป เพื่อให้วัตถุดิบมีความเหนียว ข้นขึ้น หรือเพื่อให้เนื้อสัมผัส (texture) กระจายทั่วถึงกันดี ทำให้ไขมันที่แทรกอยู่ในเนื้อเยื่อกระจายออก (broken fat tissue) (Kosaric และ Gray, 1987; Fiechter, 1992) ในทางการเกษตรสามารถใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นตัวเกาะติดโลหะหนักที่ดีในดิน ช่วยทำให้ดินร่วนซุย ส่วนในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์ พบว่า มีการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ Sophorolipid ที่ผลิตได้จาก *Torulopsis bombicola* มาใช้เป็นส่วนประกอบในแชมพู ครีมบำรุงผิวต่างๆ (Inoue และ Ito, 1982)

การหาประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Evaluation of Microbial Surfactants)

วิธีการวัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ที่ผลิตขึ้นจากจุลินทรีย์ ใช้วิธีการวัดค่าแรงตึงผิว (surface tension) ของสาร เพื่อบอกถึงคุณภาพของสารลดแรงตึงผิวที่ถูกผลิตขึ้นเป็นสิ่งสำคัญ ส่วนใหญ่ใช้วิธีวัดจาก ส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้หลังจากผ่านการเลี้ยงเชื้อ โดยค่าแรงตึงผิวของน้ำกลั่นจะเท่ากับ 72 mN/m พบว่า เซลล์เพาะเลี้ยง *Corynebacterium lepus* สามารถลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ จาก 72 mN/m ลงมาต่ำกว่า 30 mN/m ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ Cooper และคณะ (1980) พบว่า *Clostridium pasteurianum* สามารถผลิต neutral lipid ออกมาภายนอกเซล และ สามารถลดแรงตึงผิวของน้ำกลั่นลงมาประมาณ 55 mN/m อย่างไรก็ดีเมื่อมีการผลิต สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ออกมามากเกินพอ จะพบว่า ค่าแรงตึงผิวจะมีค่าคงที่ ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ดังนั้นการเจือจาง ส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ เพื่อเพิ่มค่าแรงตึงผิวขึ้นให้ถึง จุด critical micelle concentration เป็นสิ่งที่จะช่วยในการหาปริมาณของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ นั้นโดยประมาณ (Cooper และคณะ ,1979) เนื่องจากค่า CMC (Critical micelle concentration) คือ ค่าความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่น้อยที่สุดที่สามารถเกิดไมเซลล์ได้ เป็นการวัด ค่าแรงตึงผิวเพื่อบอกถึงประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ หากค่า CMC มีค่าต่ำแสดงว่า ประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวจะดี ค่าแรงตึงผิว และ ค่า CMC ของ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ กับสารลดแรงตึงผิวที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี แสดงดังตารางที่ 1 ตัวอย่าง วิธีการหาค่า CMC แสดงดังรูปที่ 4 ทำโดยการเจือจางส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ ให้มีค่าความเจือจางที่มากที่สุด ที่ทำให้ค่าแรงตึงผิว เริ่มมีค่าเพิ่มสูงขึ้น จากรูปที่ 4 สามารถหาค่า CMC โดยประมาณ มีค่า เท่ากับ 0.067 mg/ml (Babu และคณะ , 1994) ภายหลัง ได้มีการพัฒนาวิธีการ หาปริมาณของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพอีกวิธีหนึ่ง ซึ่งเป็นการหาปริมาณโดยตรงด้วย HPLC (Lin และคณะ , 1993)

วิธีอื่นๆที่ใช้วัดหาค่า surface activity มีหลายวิธี เช่น การวัดค่าแรงตึงผิวระหว่างพื้นผิวของสารที่ประจันกัน (interfacial tension) มีหน่วยเป็น มิลลินิวตันต่อเมตร (mN/m) หรือ ดายน์ต่อเซนติเมตร (dyne/cm) การวัดความเสถียรของอีมัลชั่นระหว่างน้ำและน้ำมัน การเกิดฟอง การวัดความสามารถในการกระจายน้ำมัน (Oil displacement) นอกจากนี้ พบว่า การแตกของโปรโตพลาสต์ และ การยับยั้งการแข็งตัวของเลือด ก็เป็นคุณสมบัติ



รูปที่ 4 Critical Micelle Concentration ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Babu และคณะ , 1994)

หนึ่งของ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Arima และคณะ ,1968 ;Cooper และ Goldenberg ,1987 ; Desai 1987 ; Morikawa และคณะ ,1993)

ส่วนความสามารถในการทำให้น้ำ และน้ำมัน รวมกันเป็นอีมัลชั่นได้นี้ เป็นคุณสมบัติที่สำคัญสำหรับจุลินทรีย์หลายชนิด จุลินทรีย์เหล่านี้ส่วนใหญ่สามารถใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอน เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ทั้งที่มีโครงสร้างเป็นสายตรง มีกิ่งบนโครงสร้าง เป็นไซคลิกอัลเคน (cyclic alkanes) อัลคีน (alkenes) และ อะโรมาติก (aromatics) จุลินทรีย์ที่สามารถใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนในน้ำเป็นแหล่งอาหารได้ จะมีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิว สารลดแรงตึงผิวที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นนี้ จะทำให้เกิดอีมัลชั่นระหว่าง น้ำกับน้ำมัน เป็นผลทำให้ น้ำมันมีสภาพเป็นหยดเล็กๆ ในน้ำ เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวระหว่าง น้ำกับน้ำมัน พื้นที่ผิวเหล่านี้ ช่วยส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ โดยทำให้จุลินทรีย์สัมผัสกับน้ำมันได้มากขึ้น ช่วยกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (Cooper และ Zajic ,1980)

ตารางที่ 1 แสดงค่าแรงตึงผิว และค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกับสารลดแรงตึงผิวที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี (Kosaric, 1993)

Producing organism	Surface Tension (mN/m)	Critical micelle concentration (mg/L)
R. erythropolis	37	15
P. aeruginosa	29	15
T. bombicola	37	82
B. subtilis	27	11 (0.01 mM)
Anionic synthetics		
Detergent alkylate		
Dodecylbenzene	47	590 (1.2 mM)
Sodium lauryl sulfate	37	2023 - 2890
(SLS or SDS)		(7-10 mM)

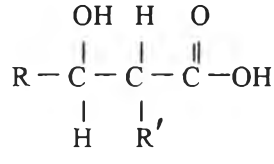
<u>ประเภทของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ</u> (Types of Biosurfactants)

สามารถจัดแบ่งประเภทของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ตามโครงสร้างทางเคมี ออกเป็น 4 กลุ่มใหญ่ ด้วยกันคือ

1. ไกลโคลิปิด (Glycolipids)

สารลดแรงตึงผิวที่มีส่วนประกอบของคาร์โบไฮเดรต ทั้งที่เป็นสายยาว หรือ ไฮดรอกซี ของ กรดอะลิฟาติก (aliphatic acids) แบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด คือ

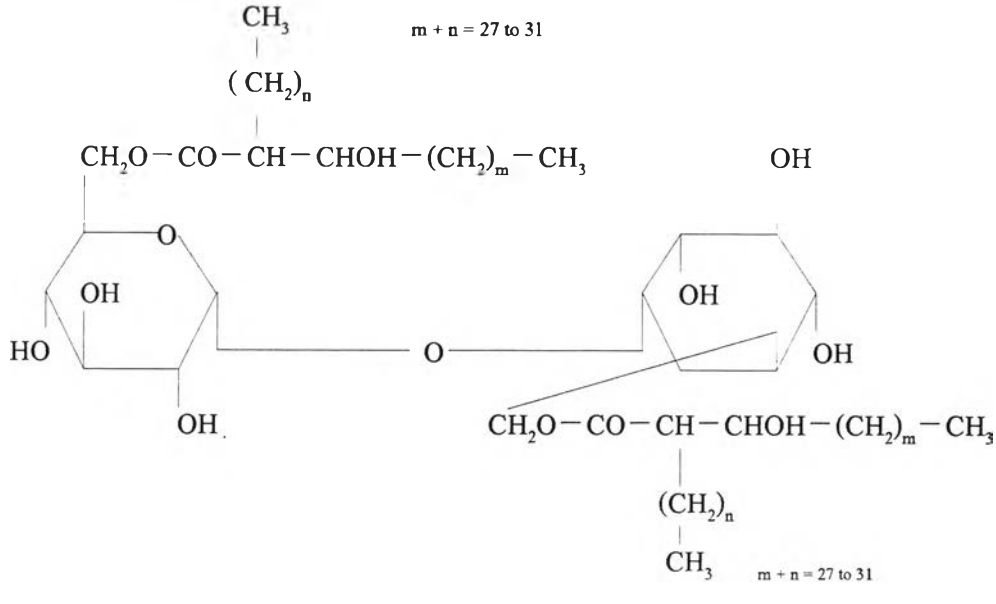
1.1 ทรีฮาโลสลิปิด (Trehalose lipids) ลิปิดเหล่านี้ประกอบด้วยส่วน ของไดแซคคาไรด์ หรือ ฮาโลส มีการเชื่อมต่อด้วยพันธะเอสเทอร์ที่ C-6 และ C-6′ - hydroxyl ของหน่วยย่อยทรีฮาโลส เป็นสายยาวโครงสร้าง α-branched β-hydroxycarboxylic acids หรือที่รู้จักกันดี เรียกว่า mycolic acid ดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 5 โครงสร้างของ mycolic acids : R และ R′ จะถูกแทนที่ด้วยกลุ่ม อัลคิล (Cooper และคณะ, 1979)

พบในกลุ่มจุลินทรีย์ *Mycobacterium, Nocardia, Corynebacterium, Arthrobacter* และ *Brevibacterium* โดยส่วนใหญ่ไกลโคลิปิดชนิดนี้เป็น nonionic trehalose lipids มักพบเชื่อม อยู่กับผนังเซล (cell wall-associated) จำนวนคาร์บอนอะตอมของ mycolic acids อยู่ ระหว่าง 60-90 ตัว, nocardomycolic acids มี จำนวนคาร์บอนอะตอม 40-60 ตัว และ corynomycolic acids มี จำนวนคาร์บอนอะตอม อยู่ระหว่าง 25-40 ตัว (Parkinson, 1985) ตัวอย่างของ corynomycolic acid เช่น trehalose diesters ที่แยกได้จาก *Arthrobacter paraffineus* KY 4303 และ *Rhodococcus erythropolis* DSM 43215 (Suzuki และ คณะ, 1969 ; Rapp และคณะ, 1979)

Batrakov และคณะ (1981) อ้างถึงใน Kosaric และ Gray 1987 ได้รายงานถึง *Mycobacterium paraffinicum* พบว่าเชื้อสามารถผลิตทรีฮาโลสลิปิด ได้ 2 ชนิด คือ nonionic 6-o-mycolyl-6′-o-acyl (C_{12}-C_{16})-α, α-D-trehalose และอีกชนิดหนึ่ง คือ anionic 2-o-octanoyl-3,2′-di-o-decanoyl-6-o-succinoyl-α, α- D-trehalose สามารถแทนที่ ทรีฮาโลสที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ในการเจริญของจุลินทรีย์ เป็น ซูโครส, ฟรุกโตส หรือน้ำตาลอื่นๆ เช่น *Arthrobacter, Corynebacterium* และ *Nocardia* เมื่อเลี้ยงให้เจริญบนซูโครส (Suzuki และคณะ, 1974) หรือ ฟรุกโตส (Itoh และ Suzuki, 1974) พบว่าส่วนที่เป็นทรีฮาโลสของทรีฮาโลสลิปิด จะมีการเปลี่ยนแปลงเมื่อใช้ซูโครส เป็นแหล่งอาหาร โดยจะได้ 2 โมเลกุล ของ sucrose glycolipids ที่มี 1 หรือ 2 โมเลกุล corynomycolic และเมื่อใช้ฟรุกโตส เป็นแหล่งอาหารจะได้ fructrose-6-corynomycolate และ fructrose 1,6-dicorynomycolate Syldatk และคณะ (1987) ได้ศึกษาถึงค่าแรงตึงผิวของทรีฮาโลสลิปิด พบว่า ทรีฮาโลสลิปิดที่แยกได้จาก *Rhodococcus erythropolis* สามารถลดค่าแรงตึงผิวได้ถึง 25-30 mN/m ส่วน corynomycolates จาก Arthrobacter spp. สามารถลดแรงตึงผิวได้ 33-40 mN/m สำหรับโครงสร้างของ Trehalose-6, 6′-dicorynomycolate แสดงไว้ในรูปที่ 6 (Rapp และคณะ, 1979)

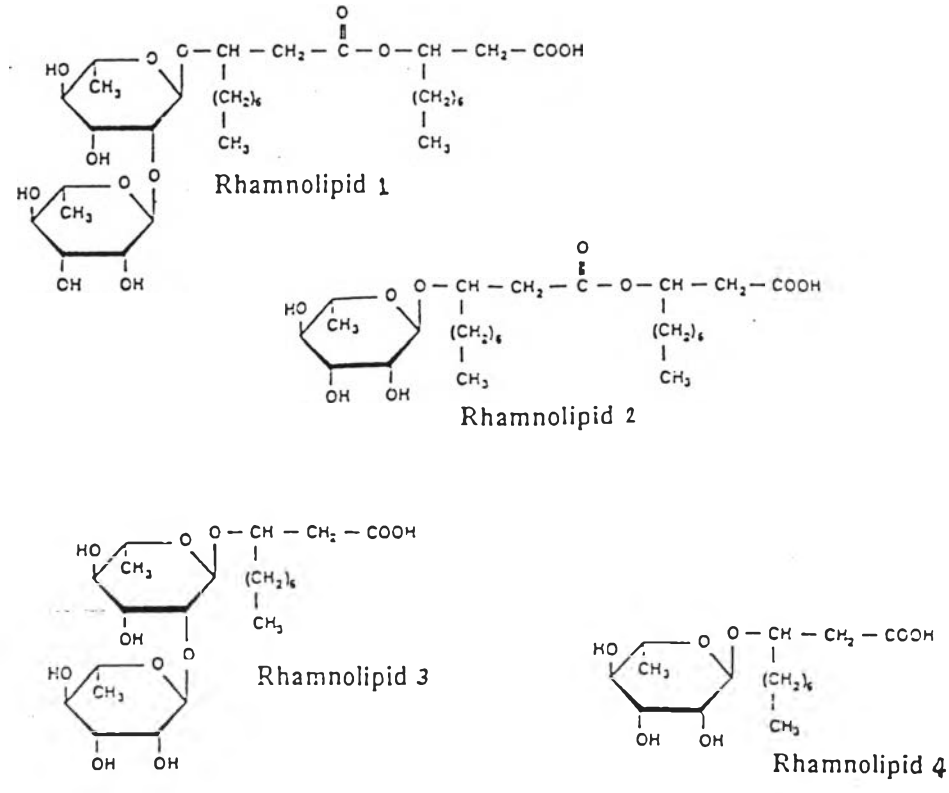


รูปที่ 6 โครงสร้างของ Trehalose − 6, 6′ − dicorynomycolate จาก *Rhodococcus erythopolis*

1. 2 แรมโนลิปิด (Rhamnolipids) เป็นไกลโคลิปิดที่ประกอบด้วย น้ำตาลแรมโนส (rhamnose) 1 หรือ 2 โมเลกุล เชื่อมต่อกับ 1 หรือ 2 โมเลกุล ของ β-hydroxydecanoic acid โดย แรมโนลิปิดตัวแรกที่พบ (rhamnolipid RL 1) มีลักษณะประกอบด้วย rhamnose 2 โมเลกุล และ β-hydroxydecanoic acid 2 โมเลกุล (Edward และ Hayashi, 1965) โครงสร้างดังแสดงไว้ในรูปที่ 7

แรมโนลิปิดต่างจากทรีฮาโลสลิปิด ตรงที่ กรดไขมันไม่ได้เชื่อมต่อกับน้ำตาลด้วยพันธะเอซิล (acyl) ไฮดรอกซิลของกรดตัวที่ 1 จะจับกับคาร์บอกซีของกรดตัวที่ 2 และหมู่ไฮดรอกซิลของกรดตัวที่ 2 จะจับกับหมู่ไฮดรอกซิลของคาร์โบไฮเดรต ด้วยเหตุนี้จึงมีกลุ่ม carboxyl อิสระ ในไกลโคลิปิด Hisatsuka และคณะ (1971) ได้รายงานว่า แรมโนลิปิดมีความสามารถในการกระตุ้นการเจริญโดยจำเพาะกับเชื้อ (species-specific) โดย เมื่อทำการเลี้ยง *P. aeruginosa* บน n-hexadecane แล้วเติม แรมโนลิปิด ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า สามารถกระตุ้น การเจริญของ *P. aeruginosa* แต่ไม่สามารถกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นๆ บน n-hexadecane ได้ ต่อมาเขาได้ทดลองเลี้ยง *P. aeruginosa* S_7B_1 บน n-hexadecane , n-paraffin และ glucose ที่ อุณหภูมิ 30° C เป็นเวลา 6 วัน พบว่า เชื้อสามารถผลิต 2-o- α -L- rhamnopyranosyl- α- L-rhamnopyranosyl-β-hydroxydecanoyl-β - hydroxydecanoate ซึ่งเป็น (rhamnolipid RL 1) ได้เช่นเดียวกัน (Hisatsuka และคณะ , 1972)

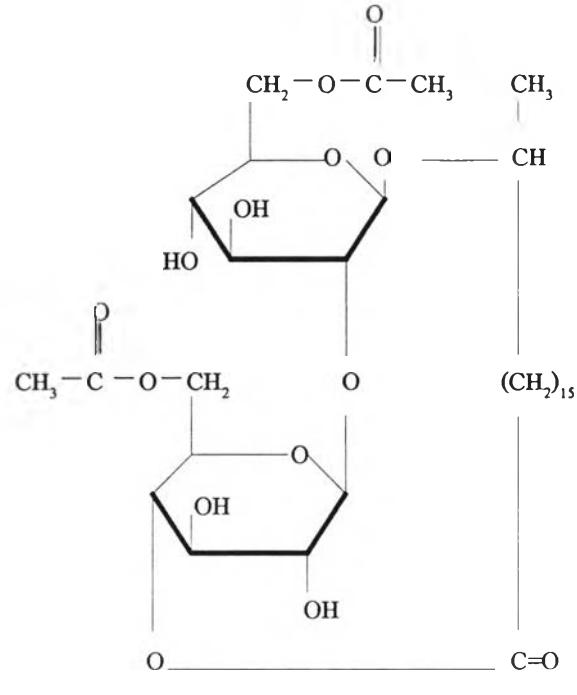
แรมโนลิปิด 2 (rhamnolipid RL 2) แตกต่างจาก RL 1 ตรงที่ มีแรมโนสเพียงหน่วยเดียว โดย แรมโนลิปิด 2 ประกอบด้วย กรดไขมัน 2 ตัว และ น้ำตาลแรมโนส 1 ตัว โครงสร้างของสารประกอบนี้ เป็น L-α- rhamnopyranosyl-β-hydroxydecanoyl-β- hydroxydecanoate ดังแสดงในรูปที่ 7 พบ แรมโนลิปิด 2 จากการเลี้ยง *P. aeruginosa* KY 4025 บน 10 % n-paraffin ที่ อุณหภูมิ 30° C เป็นเวลา 55 ชั่วโมง (Itoh และคณะ, 1971) Itoh และ Suzuki (1972) ได้ทำการแยกสายพันธุ์กลายของ *P. aeruginosa* ที่ไม่สามารถเจริญบนไฮโดรคาร์บอน และไม่สามารถสร้าง แรมโนลิปิดได้ เมื่อเติมแรมโนลิปิด 1 หรือ 2 ที่ แยกได้จากสายพันธุ์อื่น ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า สายพันธุ์กลายนี้ สามารถเจริญได้ดีบนไฮโดรคาร์บอน แสดงให้เห็นว่า แรมโนลิปิด 1 หรือ 2 นี้ มีความจำเป็นสำหรับการเจริญของ *P. aeruginosa* บนไฮโดรคาร์บอน ต่อมา Syldatk และคณะ (1985) สามารถแยกแรมโนลิปิดได้ใหม่ 2 ชนิด คือ rhamnolipid RL 3 และ rhamnolipid RL 4 จากการบ่มเชื้อ *P. aeruginosa* DSM 2874 ในระยะพัก (resting cells) ที่อุณหภูมิ 30° C ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ โครงสร้างดังแสดงไว้ในรูปที่ 7



รูปที่ 7 แสดงโครงสร้างที่แตกต่างกัน 4 แบบ ของแรมโนลิปิดทั้ง 4 ชนิด ซึ่งสังเคราะห์โดย *Pseudomonas aeruginosa* (Fiechter, 1992)

1.3 โซโฟโรลิปิด (Sophorolipids) เป็นไกลโคลิปิดที่คล้ายกับแรมโนลิปิด ผลิตโดยเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มยีสต์ ประกอบด้วย disaccharide sophorose acetylated ที่ 6 และ 6′ เชื่อมด้วยพันธะไกลโคสิดิกกับหมู่ไฮดรอกซิลของกรด hydroxycarboxylic ซึ่งจะแตกต่างจาก แรมโนลิปิด 1 ตรงที่ โซโฟโรลิปิด มีกรดไขมันเพียง 1 ตัว และมี อะซิเตต 1 หรือ 2 กลุ่มติดอยู่กับ sophorose ด้วยพันธะเอซิล นอกจากนี้พบว่ากลุ่มไฮดรอกซิล ไม่ได้อยู่บนตำแหน่ง β-carbon ของกรดไขมัน แต่อยู่บนคาร์บอนตำแหน่งรองสุดท้ายของสายอัลคิล (Gorin และคณะ, 1961) สำหรับโครงสร้างแสดงไว้ดังรูปที่ 8

Tulloch และคณะ (1968) ทำการแยกโซโฟโรลิปิดออกจากเซลในระยะพัก ของ *T. bombicola* ที่เจริญบน alkane พบว่า โซโฟโรลิปิดสามารถลดค่าแรงตึงผิวลงได้ แต่ไม่มีประสิทธิภาพเป็นสารก่ออีมัลชั่น (emulsifying agents) Lactonic sophorose lipid ที่ความเข้มข้น 10 mg/l สามารถลดค่า interfacial tension ระหว่าง n-hexadecane กับ น้ำจาก 40 ลงถึง 5 mN/m ในการผลิต โซโฟโรลิปิด พบว่า การเติม ซับสเตรทตัวที่ 2 จะมีผลกระทบต่อ โครงสร้างและปริมาณของโซโฟโรลิปิด นอกจากนี้สามารถปรับปรุง การผลิตโซโฟโรลิปิดได้โดย การเปลี่ยนสภาวะการเจริญ และสายพันธุ์ ของ Torulopsis ที่ ใช้ในการผลิต (Tulloch และคณะ, 1962 อ้างถึงใน Cooper และ Zajic, 1980)

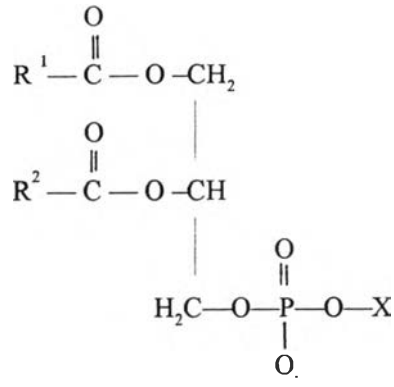


รูปที่ 8 โครงสร้าง Lactone ของ Sophorose lipid จาก *Torulopsis* (Cooper และคณะ, 1979)

2. ฟอสโฟลิปิด และ กรดไขมัน (Phospholipids and Fatty Acids)

แบคทีเรีย และ ยีสต์ ที่สามารถย่อยสลายไฮโดรคาร์บอน สามารถผลิต ฟอสโฟลิปิด และ กรดไขมัน เมื่อเจริญโดยใช้ n-alkane เป็นซับสเตรท โดย ฟอสโฟลิปิด และ กรดไขมัน เหล่านี้มีคุณสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิว โครงสร้างทั่วไปของฟอสโฟลิปิด แสดงไว้ในรูปที่ 9

Cooper และคณะ (1979) สามารถแยกสารลดแรงตึงผิว ผสมประเภทไขมัน จาก *Corynebacterium lepus* สามารถลดค่าแรงตึงผิวของน้ำกลั่นลงได้ 49 mN/m สารผสม นี้ประกอบด้วย ฟอสโฟลิปิดหลายชนิด ได้แก่ ฟอสฟาติดิลกลีเซอรอล (phosphatidylglycerol), ฟอสฟาติดิลอิโนซิทอล (phosphatidylinositol), ฟอสฟาติดิลกลีเซอรอลฟอสเฟต (phosphatidylglycerol phosphate), คาร์ดิโอไลปิน (cardiolipin) และ ฟอสฟาติดิลอิโนซิทอล แมนโนไซด์ (phosphatidylinositol mannoside) Kappeli และ Finnerty (1979) (อ้าง ถึงใน Desai, 1987) ได้รายงานว่า จากการเลี้ยง *Acinetobacter sp.* ให้เจริญบน hexadecane พบว่า เชื้อสามารถปลดปล่อย phospholipid-rich membrane vesicles ลงสู่ อาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งพบลักษณะเช่นเดียวกันนี้ ในรายงานของ Ristau และ ผู้ร่วมงาน ของเขา ในปี (1983) ระหว่างการเจริญของ *R. erythropolis* บน alkanes โดย phosphatidylethanolamine นี้ ให้ค่า interfacial tension เท่ากับ 1 mN/m และมีค่า CMC เท่ากับ 30 mg/l Beeba และ Umbreit (1971) รายงานถึง ฟอสโฟลิปิดที่ผลิต ได้จาก *Thiobacillus thioxidans* พบว่ามีสมบัติสามารถเกาะติด (wetting) แร่ซัลเฟอร์ ซึ่ง มีความจำเป็นสำหรับการเจริญของเชื้อ แต่อย่างไรก็ตามยังไม่เป็นที่กระจ่างว่า ฟอสโฟลิปิด นี้ มาจากเซลล์ หรือ มาจากกระบวนการทำลายของเซลล์ (disruption of cells) ต่อมามี รายงาน พบการผลิต ฟอสโฟลิปิด จากการเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus sp.* บนสารประกอบไฮโดร คาร์บอน (Kosaric , 1993) จุลินทรีย์หลายชนิดที่เลี้ยงให้เจริญบน อัลเคน พบว่า จะ สามารถปลดปล่อยกรดไขมันอิสระออกมานอกเซลล์ (extracellular free fatty acids) ซึ่งมี สมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยส่วนใหญ่เป็นกรดไขมันอิ่มตัวที่มีจำนวนคาร์บอน อะตอม ระหว่าง C_{12}-C_{14} เชื่อมกับ กลุ่มไฮดรอกซิล และ กิ่งอัลคิล เช่นเดียวกับ กรด โคริโนมัยโคลิก (corynomycolic acid) (Macdonald และคณะ, 1981 ; Ristau และ Wagner , 1983)



รูปที่ 9 โครงสร้างโดยทั่วไปของฟอสโฟลิปิดที่แยกได้จากจุลินทรีย์ R^1 และ R^2 ถูกแทนที่ด้วยกลุ่มอัลคิล X = H เมื่อเป็น phosphatidic acid ; $X = CH_2NH_2$ เมื่อเป็นฟอสฟาติดิลเอทธาโนเอมีน

$X = CH_2CH(NH_2)COOH$ เมื่อเป็น ฟอสฟาติดิลเซอรีน ; X = อิโนซิทอล เมื่อเป็นฟอสฟาติดิลอิโนซิทอล

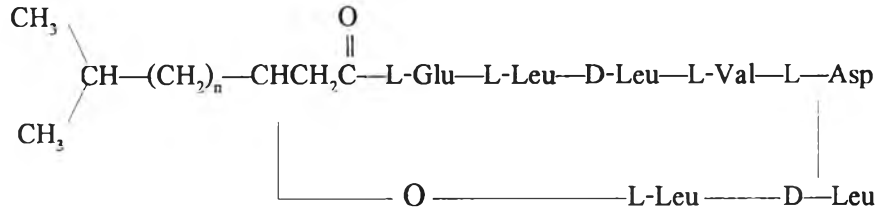
X = อิโนซิทอล ที่แทนที่ด้วยแมนโนสหนึ่งตัว หรือมากกว่า เมื่อเป็น ฟอสฟาติดิลอิโนซิทอลแมนโนไซด์

$X = CH_2CHOHCH_2OH$ เมื่อเป็น ฟอสฟาติดิลกลีเซอรอล ; $X= CH_2CHOHCH_2OPO_3^-$ เมื่อเป็น ฟอสฟาติดิลกลีเซอรอล ฟอสเฟต คาร์ดิโอไลปิน ประกอบด้วย phosphatidic acid 2 หน่วย เชื่อมต่อด้วยพันธะเอสเทอร์กับ กลีเซอรอล ตำแหน่งที่ 1 และ 3 (Cooper และคณะ, 1979)

3. ไลโปเปปไทด์ และ ไลโปโปรตีน (Lipopeptides and Lipoproteins)

Arima และคณะ (1968) ได้รายงานครั้งแรกถึง สารประกอบเซอร์แฟกติน (surfactin) หรือ ซับทิลิซิน (subtilisin) ที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ตัวหนึ่งที่มีประสิทธิภาพดีเยี่ยมในการลดแรงตึงผิว โดยปริมาณเพียงเล็กน้อยเพียง 0.005 % โดยน้ำหนัก ก็สามารถลดแรงตึงผิวของ 0.1M $NaHCO_3$ จาก 71.6 mN/m ลงเหลือ 27.9 mN/m โครงสร้างของเซอร์แฟกติน ประกอบด้วย กรดอะมิโนยาว 7 ตัว เชื่อมต่อกันด้วยพันธะโควาเลนท์ ปลายข้างหนึ่งเชื่อมต่อกลุ่มคาร์บอกซิล และ ปลายอีกข้างหนึ่งต่อกับ กลุ่มไฮดรอกซิลของ β-hydroxy fatty acid ดังแสดงไว้ในรูปที่ 10

เซอร์แฟกติน เป็นสารประเภทกรด (acidic substance) ละลายได้ในน้ำด่าง (alkaline water) และในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เมทานอล (methanol), เอทานอล (ethanol), อะซีโตน (acetone), คลอโรฟอร์ม (chloroform) และ เฮกเซน (hexane) เป็นต้น นอกเหนือ



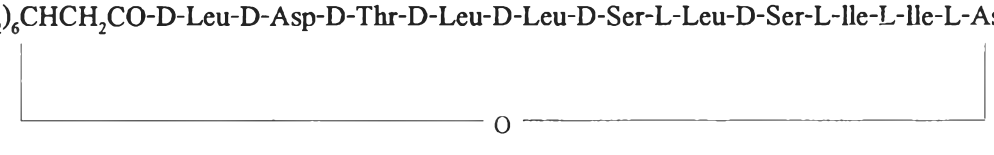
รูปที่ 10 โครงสร้างของเซอร์แฟกติน ซึ่งเป็นไลโปเปปไทด์ แยกได้จาก *Bacillus subtilis* (Cooper และคณะ, 1979)

จากความสามารถในการลดแรงตึงผิว เซอร์แฟกติน ยังสามารถทำให้เกิดอีมัลชั่น (Cooper และ Goldenberg, 1987) มีสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะ (Kluge และคณะ, 1988) นอกจากนี้เซอร์แฟกติน ยังมีสมบัติยับยั้งการแข็งตัวของเลือด โดยจะยับยั้งการจับตัวกันของไฟบริน (fibrin clot) ในระบบธรอมบินไฟบริโนเจน ทำให้ระยะเวลาที่ใช้ในการจับตัวกันจะนานมากขึ้น (Arima และคณะ, 1968) และ พบว่าสามารถทำให้ เม็ดเลือดแดง สเฟียโรพลาสต์ (spheroplast) และ โปรโตพลาสต์ของแบคทีเรีย แตกได้ (Bernheimer และ Avigad, 1970)

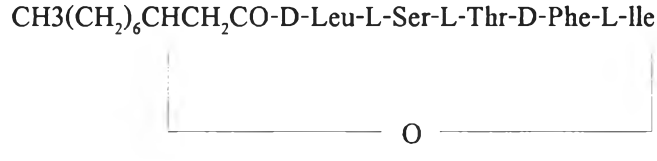
Roubin และคณะ (1989) ได้ศึกษาถึงกิจกรรมของเอนไซม์ isocitrate dehydrogenase (ICD) ในระหว่างการผลิตเซอร์แฟกติน พบว่า ถ้าระดับของ ICD ลดลง จุลินทรีย์จะสามารถผลิตเซอร์แฟกติน ได้มากขึ้น *Bacillus sp.* นอกจากจะผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ประเภท ไลโปเปปไทด์ ได้แล้ว ยังพบว่าสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ประเภทอื่นได้อีกด้วย เช่น *Bacillus cereus* IAF 346 สามารถผลิต monoglyceride ซึ่งเป็น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สามารถลดแรงตึงผิวของน้ำ ลงได้ถึง 28 mN/m (Cooper และ Goldenberg, 1987)

Morikawa และคณะ (1993) ได้รายงานถึงการพบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดใหม่ คือ arthrofactin จัดอยู่ในกลุ่มไลโปเปปไทด์ ผลิตโดย *Arthrobacter sp.* MIS 38 มีโครงสร้างเป็น 3-hydroxydecanoyl-D-leucyl-D-asparagyl-D-threonyl-D-leucyl-D-leucyl -D-

seryl-L-leucyl-D-sreyl-L-isoleucyl-L-isoleucyl-L-asparagyl lactone ดังแสดงในรูปที่ 11 arthrofactin มีประสิทธิภาพดีกว่า surfactin 5-7 เท่า ค่า CMC ของ arthrofactin และ surfactin มีค่าประมาณ 1.0×10^{-5} M และ 7.0×10^{-5} M ที่ 25 °C ตามลำดับ arthrofactin สามารถลดแรงตึงผิวลงได้ถึง 24 mN/m นอกจากนี้ตัวอย่างของสารลดแรงตึงผิวอื่นๆ ในกลุ่มนี้ ได้แก่ orthinine containing lipid โครงสร้างประกอบด้วย กรด β-hydroxycarboxylic และ กรด carboxylic ต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์ ที่ตำแหน่ง ไฮดรอกซิล (hydroxyl) ของกรดตัวที่ 1 ดังรูปที่ 12 viscosin ผลิตโดย *Pseudomonas fluorescens* (Morikawa และคณะ, 1993) serrawettin W2 ซึ่งผลิตจาก *Serratia marcescens* โครงสร้างแสดงดังรูปที่ 11 ลิปิดที่มีส่วนประกอบไลซีน จาก *Agrobacterium tumefaciens* IFO 3058 Tahara และคณะ (1976) (อ้างถึงใน Cooper และคณะ, 1979) ได้ทำการแยกสารประกอบเซอร์ลิไลปิน (cerilipin) จาก *Gluconobacter cerinus* IFO 3267 โครงสร้างแสดงดังรูปที่ 13 (Cooper และคณะ, 1979)

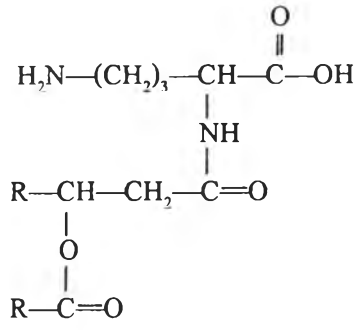


Arthrofactin

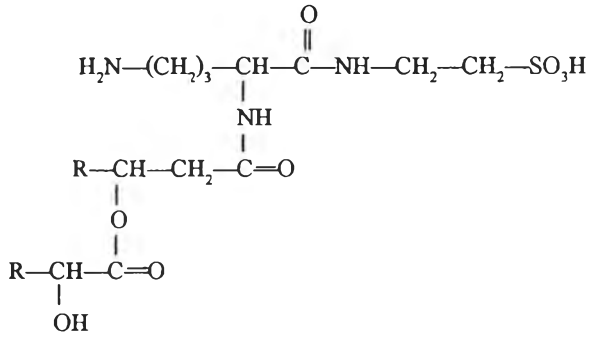


Serrawettin W2

รูปที่ 11 แสดงโครงสร้างของ arthrofactin ที่ผลิตโดย *Arthrobacter sp.* MIS 38 และ โครงสร้างของ serrawettin W2 จาก *Serratia marcescens*



รูปที่ 12 โครงสร้างของ ornithine ประกอบด้วยไขมันที่แยกจาก *Pseudomonas rubescens* ; R- แทนกลุ่มอัลคิล (alkyl) (Cooper และคณะ, 1979)

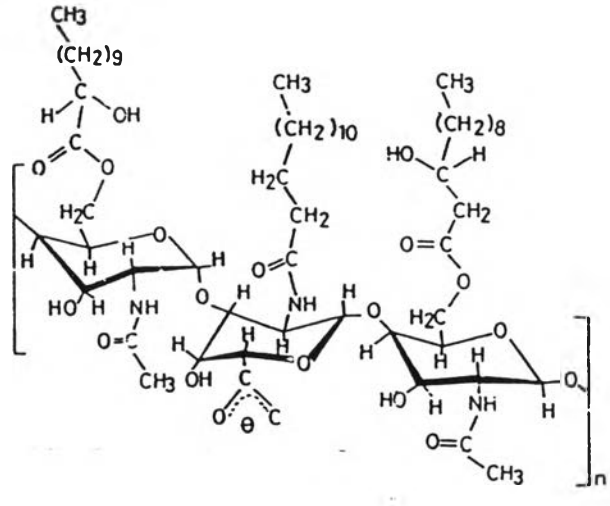


รูปที่ 13 โครงสร้างของ cerilipin แยกจาก *Gluconobacter cerinus* ; R- ถูกแทนที่อัลคิล (alkyl) (Cooper และคณะ, 1979)

4. Polymeric Biosurfactants

อีมัลแซน (Emulsan) เป็น polymeric bioemulsifier มีสมบัติเป็นสารก่ออีมัลชั่น (emulsifying agent) ผลิตโดย *Arthrobacter* RAG-1 ต่อมาได้จำแนกใหม่เป็น *Acinetobacter calcoaceticus* สารก่ออีมัลชั่น ชนิดนี้มีโครงสร้างเป็น polyanionic amphiphatic heteropolysaccharide Rosenberg และคณะ (1979) ได้ทำการแยก อีมัลแซน ออกจาก *A. calcoaceticus* พบว่า 15 % เป็นโปรตีน เมื่อเอาโปรตีนออกจาก อีมัลแซน ได้เป็น อะโพอีมัลแซน (deprotienized emulsan) มีลักษณะเป็นพอลิแซคคาไรด์ประจุลบ ที่มีความหนืด 700 cm^3/g และ มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 980,000

มีแกนกลางของเฮทเทอโรพอลิแซคคาไรด์ ที่ประกอบด้วย ไตรแซคคาไรด์ ซ้ำ ๆ กัน ของ N-acetyl -D-galactosamine , N-acetylgalactosamine uronic acid และ unidentified N-acetyl amino sugar สายยาวของ เอสเทอร์ของกรดไขมัน และ ไฮดรอกซิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน ซึ่งมีสมบัติเป็น ไฮโดรโฟบิก พบว่ามีอยู่ประมาณ 10-15 % ของน้ำหนักแห้งของโพลิเมอร์ โครงสร้างโดยทั่วไปของ อีมัลแซน แสดงไว้ดังรูปที่ 14



รูปที่ 14 โครงสร้างโดยทั่วไปของ emulsan biopolymer ซึ่งสังเคราะห์ได้จาก *A. calcoaceticus* (Rosenberg และคณะ, 1979)

Polysaccharide-protein complex

เฮทเทอโรพอลิแซคคาไรด์ ที่ผลิตโดย *A. calcolaceticus* BD 4 ที่เลี้ยงบน ไฮโดรคาร์บอน หน่วยย่อยของ เฮปตะแซคคาไรด์ จะถูกปล่อยลงสู่อาหารเลี้ยงเชื้อในระหว่างการเจริญ แต่ถ้าเลี้ยงบน กลูโคส พบว่าสารประกอบนี้จะเกาะติดแน่นอยู่กับเซล ถ้ามีเฉพาะพอลิแซคคาไรด์ จะไม่สามารถก่อให้เกิดอีมัลชั่น แต่เมื่อมีการปล่อย พอลิแซคคาไรด์ ออกมากับ โปรตีน ในระหว่างการเจริญ ของเชื้อสายพันธุ์ปกติ หรือ สายพันธุ์กลาย BD 413 พบว่าจะสามารถก่อให้เกิดอีมัลชั่นได้

สารประกอบเชิงซ้อนโปรตีน-พอลิแซคคาไรด์ นี้มีความต้องการ Mg^{2+} และสารผสมของ ไฮโดรคาร์บอนชนิดอะลิฟาติก และไฮโดรคาร์บอนชนิดอะโรมาติก (Sar และ Rosenberg, 1983 อ้างถึงใน Desai, 1987)

Polysaccharide-lipid complexes

จากการทดลองแยก สารประกอบเชิงซ้อนพอลิแซคคาไรด์-ลิปิด ออกจาก *Candida tropicalis* ที่เจริญบนอัลเคน พบว่าสารประกอบเชิงซ้อนนี้สามารถทำให้เกิดอีมัลชั่นที่เสถียร ระหว่าง เฮกซะเดคเคน กับน้ำได้ (Fiechter และคณะ, 1976 อ้างถึงใน Desai, 1987)

นอกจากนี้ยังมี Liposan ซึ่งผลิตโดย *Candida lipolytica* โครงสร้างของ liposan ประกอบด้วย 83 % คาร์โบไฮเดรต และ 17 % โปรตีน ในส่วนของคาร์โบไฮเดรต ประกอบด้วย กลูโคส กาแลคโตส กาแลคโตซามีน และกรด galacturonic (Kappeli และ Fiechter, 1977)

<u>สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *Bacillus licheniformis*</u>

Bacillus licheniformis เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดี ทั้งในภาวะที่มีอากาศ (aerobic) และ ภาวะไร้อากาศ (anaerobic) เจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวได้ในช่วงอุณหภูมิจาก 35° C ถึง 45° C และที่ความเข้มข้นเกลือสูง (10 % NaCl) โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จาก *Bacillus licheniformis* มีลักษณะคล้ายกับเซอร์แฟกตินที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* มีความแตกต่างจากเซอร์แฟกติน ตรงตำแหน่งของกรดอะมิโน คือ มี isoleucine แทน leucine ที่ปลายด้านกรดอะมิโน (Yakimov และคณะ, 1995) โครงสร้างแสดงดังรูปที่ 15

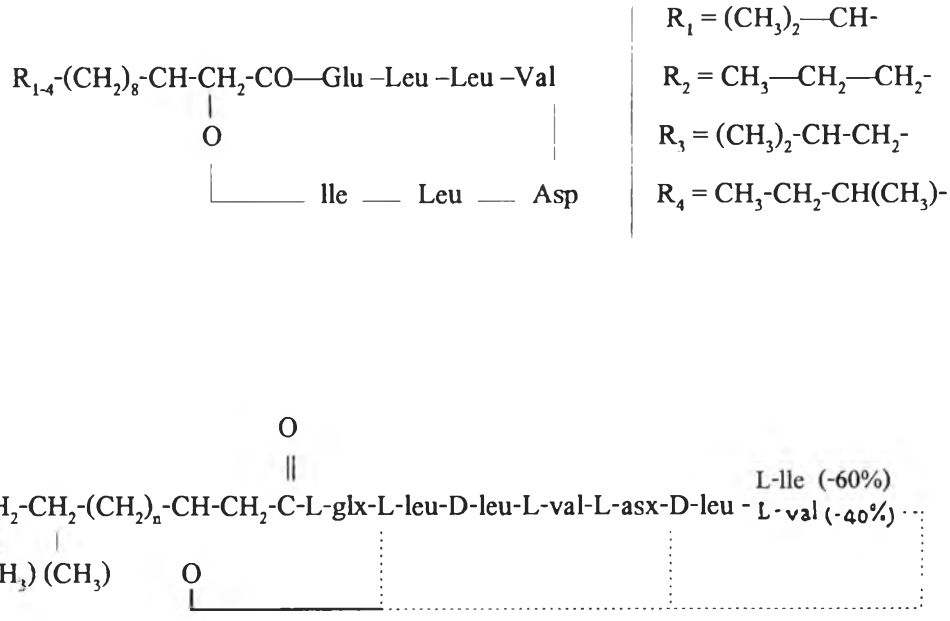
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *Bacillus licheniformis* BAS 50 (lichenysin A) มีประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวได้ดีกว่า เซอร์แฟกติน ประมาณ 2 เท่า โดยค่า CMC ของ lichenysin A 12 mg/l ในขณะที่ค่า CMC ของ surfactin 25 mg/l นอกเหนือจากความสามารถในการลดแรงตึงผิว สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *Bacillus licheniformis* ยังมีสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะ ทำให้เกิดอีมัลชั่น (Lin และคณะ, 1994) และสามารถกระจายตัวได้ในน้ำมัน (oil displacement) (Morikawa และคณะ, 1993) ตัวอย่างโครงสร้างของ lipopeptide ที่ผลิตโดย *Bacillus licheniformis* ได้แสดงไว้ในรูปที่ 15 และ 16

เมื่อเลี้ยง *Bacillus licheniformis* ในอาหารกำหนดสูตร (defined medium) พบว่าเชื้อสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ได้ทั้งในสภาพที่มีอากาศ, ภาวะการจำกัดปริมาณออกซิเจน และภาวะที่ไม่มีอากาศ ซึ่งกลไกการควบคุมการสังเคราะห์ยังไม่เป็นที่กระจ่าง โดยที่ภาวะการจำกัดปริมาณออกซิเจน (oxygen limitation) จะให้ผลที่ดีกว่าโดยสามารถลดค่าแรงตึงผิวลงได้ต่ำกว่า 30 mN/m ในขณะที่ในสภาพที่มีอากาศ และ ภาวะที่ไม่มีอากาศ ค่าแรงตึงผิวจะมีค่าประมาณ 40 mN/m หรือสูงกว่านี้ (Jenny และคณะ, 1993)

Javaheri และคณะ (1985) ได้ทำการทดลองผลิต สารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Bacillus licheniformis* เมื่อมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้ภาวะที่ไม่มีอากาศ พบว่า สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) และโซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) มีความจำเป็นสำหรับการเจริญของเชื้อ

C_{12}—C_{17}--β--hydroxy acid—Glu—Leu—Leu—Val—Asn—Leu—Ile

รูปที่ 15 แสดงโครงสร้างของ lichenysin A ผลิตโดย *Bacillus licheniformis* BAS 50 (Yakimov และคณะ, 1996)



รูปที่ 16 แสดงโครงสร้างของ lipopeptide ชนิดต่าง ๆ ที่ผลิตโดย *Bacillus licheniformis* (บน) : lichenysin C ผลิตโดย *Bacillus licheniformis* (Jenny และคณะ, 1993) (ล่าง) : BL 86 surfactant ผลิตโดย *Bacillus licheniformis* 86 (Horowitz และ Griffin,1991)

<u>การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ</u>

ได้มีการศึกษารูปแบบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยนักวิทยาศาสตร์ เช่น Syldatk และ Wagner, 1987 ; Desai และคณะ , 1994 ทำให้สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 แบบ ด้วยกันคือ

1. การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ควบคู่กับการเจริญของเซล เช่น เมื่อเลี้ยง *Corynebacter sp.* ในอาหารที่มีไนเตรท เป็นแหล่งไนโตรเจน ทำให้เชื้อมีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ระหว่าง midexponential phase ของการเจริญ (Gerson และ Zajic, 1978) Gutnick และคณะ (1980) ได้รายงานถึงการผลิต อีมัลแชน พบว่าจะ

เกิดขึ้นในช่วง exponential phase ของการเจริญ และจะถูกปลดปล่อยลงสู่อาหารเลี้ยงเชื้อเมื่ออัตราการสังเคราะห์โปรตีนลดลง ส่วน *Arthrobacter paraffineus* ATCC 19558 ที่เจริญบนกลูโคส สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ เมื่อมีการเติม hexadecane ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในช่วง stationary phase ของการเจริญ และการผลิตจะเพิ่มมากขึ้น ถ้ามีการเติม aspartic acid, asparagine, glycine หรือ glutamic acid ลงใน mineral salt medium (Duvnjak และคณะ, 1982)

2. การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ในภาวะจำกัดการเจริญ (growth-limiting conditions) ส่วนใหญ่ทำโดยการจำกัดปริมาณไนโตรเจน และมัลติวาเลนท์แคทไอออน (multivalent cations) ตัวอย่างเช่น เมื่อเลี้ยง *Pseudomonas sp.* DSM 2874 ให้เจริญบน n- alkane และจำกัดปริมาณของ NH^{4+} หรือ NO^{3-} พบว่าสามารถชักนำให้มีการผลิตแรมโนลิปิดมากกว่าปกติ (Syldatk และ Wagner, 1987) หรือพบว่ามีการผลิต ไกลโคลิปิดเกิดขึ้น โดย *T. apicola* หลังจากไนโตรเจนเริ่มหมด ในช่วง stationary phase ของการเจริญ (Hommel และคณะ, 1987) การจำกัดปริมาณของแร่ธาตุ (multivalent cations) เช่น Fe^{2+}, Mg^{2+} หรือ Ca^{2+} ก็มีผลช่วยเพิ่มการผลิต rhamnolipid โดย *Pseudomonas sp.* มากขึ้น (Santos และคณะ, 1984)

3. การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในช่วงระยะพักของเซล (Resting Cells) เช่น ในช่วงระยะพักของเซล *Pseudomonas sp.* DSM 2874 ซึ่งเจริญบน n-alkanes ที่ความเป็นกรด-ด่าง 6.6 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่ามีการผลิตแรมโนลิปิดได้สูงสุด (Syldatk และคณะ, 1985) พบการสังเคราะห์ แรมโนลิปิดชนิดใหม่ R3 และ R4 โดยเซลล์ในระยะพัก ซึ่งการผลิตขึ้นอยู่กับ แหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ และอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม (Syldatk และ Wagner, 1987)

4. การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยจุลินทรีย์เมื่อมีการเติมสารตั้งต้น (Precursors) เช่น ในการผลิต sophorolipids โดย *Torulopsis magnoliae* หรือ glycolipid โดย *Torulopsis bombicola* เมื่อเติมสารประกอบ lipophilic ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะสามารถเพิ่มผลผลิตของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้มากขึ้น (Tulloch และคณะ, 1962 ; Cooper และ Paddock, 1984)

ตารางที่ 2 ชนิดต่าง ๆ ของสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ (Desai และ Desai, 1994)

ชนิดของสารลดแรงตึงผิว	ชนิดของจุลินทรีย์ที่ผลิต	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)
(A) Glycolipids		
Trehalose lipids	*R. erythropolis*	32-36
	N. erythropolis	30
	Mycobacterium sp.	38
Rhamnolipids	*P. aeruginosa*	29
	Pseudomonas sps.	25-30
Sophorolipids	*T. bombicola*	33
	T. apicola	30
(B) Fatty Acids/Neutrals Lipids		
Fatty acids (FA)	*C. lepus*	30
FA+Neutral lipids	*N. erythropolis*	32
© Lipopeptides / Lipoprotein		
Arthrofactin	*Arthrobacter sp.* MIS 38	24
Peptide-lipid	*B. licheniformis*	27
Serrawettin	*S. marcescens*	28-33
Viscosin	*P. fluorescens*	26.5
Surfactin	*B. subtilis*	27-32

ชนิดของสารลดแรงตึงผิว	ชนิดของจุลินทรีย์ที่ผลิต	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)
(D) Polymeric surfactants		
Lipopolysaccharide (Emulsan)	*A. calcoaceticus*	-
Protein-carbohydrate	*C. petrophilum*	-
Mannan-lipid	*C. tropicalis*	-
Carbohydrate-	*P. fluorescens*	27
prot.- lipids	*P. fluorescens*	-
	D. polymorphis	-
(E) Particulate Biosurfactants		
Vesicles	*Acinetobacter sps.*	-
Fimbrea	*A. calcoaceticus*	-
Whole cells	Variety of bacteria	-

ตารางที่ 3 ตัวอย่างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้รับการจดสิทธิบัตรแล้ว (Kosaric, 1993)

ผลิตภัณฑ์	จุลินทรีย์	สิทธิบัตร
Emulsan	*Arthobacter sp.* ATCC 31012	Biotechnol. Aktienges.,US 4,276,094 (1981)
Sophorose lipid	*Torulopsis bombicola*	Kao Soap Ltd., DE 2,938,383 (1980), DE 2,834,118 (1979), Jpn. Kokai Tokkyo Koho EP 005004 (1983), 8192,786 (1981)
Fructose lipid	*Arthobacter paraffineus* ATCC 15591	Kyowa Hakko Kogya Co. Ltd. DE 2,440,942 (1975)
Surfactin	*Bacillus subtilis* ATTC 21331	Takeda Chemical Ind. Ltd, US 3,687,926 (1972)
Trehalose lipid	*Arthobacter paraffineus* ATCC 15591	Kyowa Hakko Kogya Co. Ltd. US 3,637,461 (1972) , DE 1,905,475 (1970)
	Corynebacterium hydroblastus ATCC 15592	
Biosurfactant	*Arthobacter* RAG 1	Gutnick, D., Rosenberg, E. DE 2,415,897 (1987)
	Arthobacter, Bacillus, Corynebacterium, Nocardia, Pseudomonas	CPDL, CA 1,114,759 (1981)
	Thiobacillus, Bacillus, Nocardia, Pseudomonas	Phillips Petroleum Co. US 3,185216 (1965) US 2,907,389 (1959)
Arthrofactin	*Arthobacter sp.* MIS 38	US 5,344,913 (1994)

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวโดยจุลินทรีย์นั้น มีรายงานถึงสารต่าง ๆที่มีผลต่อการผลิตดังนี้

1. การเติมสารชักนำการผลิต ตัวอย่างเช่น Tulloch และคณะ (1962) ได้ทำการทดลองผลิต sophorolipids จาก *T. magnoliae* พบว่าสามารถเพิ่มผลผลิตของ sophorolipids ได้หลายเท่า เมื่อเติมกรดไขมันสายยาว, ไฮโดรคาร์บอน หรือ กลีเซอไรด์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Rapp และคณะ (1979) ได้รายงานว่า สามารถชักนำให้ *R. erythropolis* สังเคราะห์ ทรีฮาโลสลิปิด ได้ด้วยการเลี้ยงเชื้อในแหล่งคาร์บอน ที่เป็นสารประกอบประเภทไฮโดรคาร์บอน

2. กลูโคส หรือ เมตาบอไลท์ปฐมภูมิ (primary metabolite) มีผลยับยั้งการสร้าง (catabolite repression) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ หากเลี้ยง *Acinetobacter calcoaceticus* ด้วยกรดอินทรีย์ และ *A. paraffineus* ด้วยกลูโคส เชื้อทั้งสองจะไม่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ นอกจากนี้ *P. aeruginosa* เมื่อเลี้ยงโดยใช้ไฮโดรคาร์บอน เป็นแหล่งคาร์บอน จะสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ แต่จะไม่สร้าง เมื่อใช้กลูโคส กลีเซอรอล หรือ กรดปาลม์มิติก เป็นแหล่งคาร์บอน (Zajic และคณะ, 1977 ; Duvnjak และคณะ , 1982 ; Hisatsuka และคณะ, 1979 อ้างถึงใน Kosaric , 1993) ในทางตรงข้าม เซอแฟกตินซึ่งผลิตโดย *B. subtilis* ตรวจพบเมื่อเซลล์ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและจะถูกยับยั้งเมื่อเติมสาร ไฮโดรคาร์บอนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Cooper และคณะ, 1981)

3. การจำกัดปริมาณแหล่งไนโตรเจนและแร่ธาตุ เช่น การผลิต อีมัลแซนโดย *A. calcoaceticus* RAG-1 จะเพิ่มมากขึ้น ถ้าเชื้ออยู่ในภาวะขาดแคลนกรดอะมิโน (amino acid starvation) การจำกัดปริมาณของแร่เหล็ก จะมีผลกระตุ้นการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ของ *P. fluorescens* (Rosenberg และคณะ, 1982 ; Santos และคณะ, 1984)

อาหารเลี้ยงเชื้อกับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

1. องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยพื้นฐานที่สำคัญในการเจริญของจุลินทรีย์ เช่นเดียวกับสิ่งมีชีวิตทั่ว ๆ ไป คือเป็นแหล่งให้พลังงานสำหรับกิจกรรมต่าง ๆ ของเซลล์ เช่น การหายใจ การเคลื่อนไหว การทำงานของเอนไซม์ ตลอดจนการสังเคราะห์สารเมตาบอไลท์ ซึ่งองค์ประกอบที่สำคัญของอาหารเลี้ยงเชื้อได้แก่

1.1 แหล่งคาร์บอน

ความยาวของสายไฮโดรคาร์บอนที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ตัวอย่างเช่น *Corynebacterium hydrocarboclastus* และ *R. erythropolis* สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดี เมื่อเจริญบนไฮโดรคาร์บอนสายตรง (n-alkanes) ที่มีจำนวนคาร์บอนอะตอม C_{12} ถึง C_{14} และ C_{12} ถึง C_{18} ตามลำดับ ในขณะที่ *Acinetobacter sp.* ต้องการ แหล่งคาร์บอนที่เป็นไซคลิก (cyclic) และอะลิฟาติก (aliphatic) เพื่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และหากความยาวของ n-alkanes เพิ่มขึ้นจาก C_{10} ถึง C_{17} ความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะลดลง (Ristau และ Wagner , 1983 ; Zajic และ Gerson, 1978 ; Rosenberg และคณะ, 1979) แหล่งคาร์บอนบางชนิด สามารถชักนำให้จุลินทรีย์ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ เช่น Perra และคณะ (1989) ได้ทำการแยก *P. aeruginosa* 44T 1 พบว่าเป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิตแรมโนลิปิดได้ หากเลี้ยงบนกลูโคส แต่จะสูญเสียความสามารถดังกล่าวหากเลี้ยงด้วย n-alkanes มีรายงาน พบว่าสายพันธุ์กลายพันธุ์ของ *B. subtilis* (Suf-1) สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากขึ้นถึง 3 เท่า เมื่อให้เชื้อเจริญบนกลูโคส (Mulligan และคณะ, 1989) *Arthrobacter paraffenium* ATCC 19558 เมื่อเจริญบนกลูโคส แล้วเติม เฮกซะเดคเคน ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อใน ช่วงสเตชั่นนารีของการเจริญ (stationary growth phase) พบว่ามีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Duvnjak และคณะ, 1982) *Corynebacterium lepus* เมื่อเจริญบน เฮกซะเดคเคน พบว่าสามารถลดแรงตึงผิวได้ต่ำถึง

30 mN/m ในขณะที่ถ้าเลี้ยงบนกลูโคส จะลดค่าแรงตึงผิวได้เพียง 55 mN/m ต่อมาพบว่า *Corynebacterium lepus* สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้จำนวนมาก เมื่อเจริญอยู่บนกลูโคส แต่จะคงติดอยู่กับเซลล์ (cell bound) จะสามารถปลดปล่อยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพออกจากเซลล์ได้เมื่อทำการเติม เฮกซะเดคเคน หรือ เตตระเดคเคน ลงไปซึ่งพบผลเช่นเดียวกันนี้ใน *Acinetobacter sp.* เมื่อเจริญบนกลูโคส สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะคงอยู่ติดกับเซลล์ (cell bound) และจะปล่อยออกมาได้เมื่อมีไฮโดรคาร์บอน นอกจากนี้ยังมีรายงานพบ *Arthrobacter sp.* เมื่อเจริญบน อะซีเตท หรือ เอทานอล 75 % ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ จะยังคงอยู่ที่เซลล์ (cell bound) แต่หากเลี้ยงโดยใช้ไฮโดรคาร์บอนเป็นสับสเตรท สารลดแรงตึงผิว ชีวภาพที่ได้จะอยู่ในรูปของ ปลดปล่อยออกนอกเซลล์ (extracellular) นอกจากนี้การเติม สารลดแรงตึงผิวชีวภาพลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ยังสามารถช่วยเพิ่มอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ *Corynebacterium lepus* *Pseudomonas asphaltenius* *Candida lipolytica* และ *Acinetobacter sp.* เมื่อเจริญบนไฮโดรคาร์บอน (Desai, 1987)

1. 2 แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสำคัญมากต่อเมตาบอลิสมของเซลล์รวมทั้งการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วย แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและชนิดของจุลินทรีย์ ตัวอย่างเช่น Robert และคณะ (1989) ได้ทดลองศึกษาผลิต แรมโนลิปิด โดย *Pseudomonas* 44 T1 พบว่า โซเดียมไนเตรท และ น้ำมันมะกอก เป็น แหล่งไนโตรเจน และแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับการผลิตตามลำดับ จะเริ่มมีการผลิต แรมโนลิปิด หลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 30 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงที่ไนโตรเจนถูกใช้หมดแล้ว การผลิตจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึงชั่วโมงที่ 58 ของการเลี้ยง Mulligan และ Gibbs (1989) ได้แสดงให้เห็นถึงการแปรผันตรงระหว่างการสังเคราะห์ glutamine synthetase กับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ที่ผลิตโดย *P. aeruginosa* RC II แต่พบว่า แอมโมเนีย และกลูตามีน ที่ความเข้มข้นสูงจะยับยั้ง (repressed) การสร้างเอนไซม์และ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

นอกจากนี้ปริมาณของ ไนโตรเจนที่ใช้ในการผลิต สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ต้องได้สัดส่วนกับคาร์บอน คือต้องศึกษาหาค่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจน (C/N ratio) ให้เหมาะสม พบว่า ถ้าค่าอัตราส่วนนี้สูงขึ้น การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จะ

เพิ่มมากขึ้น (Ristau และ Wagner , 1983) Santos และคณะ (1984) ทำการทดลองพบแรมโนลิปิดในน้ำหมักของ *P. aeruginosa* เมื่อแหล่งไนโตรเจนถูกใช้หมดแล้ว และเชื้อเริ่มเข้าสู่ ระยะสเตชั่นนารีของการเจริญ (stationary growth phase) หากเติมแหล่งไนโตรเจนลงไปอีกจะมีผลยับยั้งการสังเคราะห์ แรมโนลิปิดในระยะพัก (resting cells) นอกจากนี้พบว่าการผลิตจะสูงขึ้นถึง 10 เท่า เมื่อค่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจน (C/N ratio) เท่ากับ 18

การจำกัดปริมาณไนโตรเจนไม่เพียงแต่จะเป็นสาเหตุให้มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพออกมาได้มากกว่าปกติเท่านั้น แต่ยังสามารถเปลี่ยนองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตขึ้นอีกด้วย เช่น ในการเจริญของ *R. erythropolis* ในภาวะปกติเชื้อมีการผลิต ทรีฮาโลส โคริโนมัยโคเลท ที่ไร้ประจุ ในขณะที่ในภาวะที่จำกัดปริมาณไนโตรเจน เชื้อจะมีการผลิต ทรีฮาโลส เตตระเอสเทอร์ ประจุลบ ขึ้นแทน (Ristau และ Wagner , 1983 ; Kosaric, 1993)

1. 3 แหล่งเกลือแร่ และวิตามิน

เกลือแร่ และวิตามิน เป็นปัจจัยหนึ่งที่จุลินทรีย์ต้องการใช้เพื่อการเจริญเติบโตนอกเหนือจากแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจน นอกจากนี้ยังมีผลในการกระตุ้น หรือกดการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ Santos และคณะ (1986) แสดงให้เห็นว่าการจำกัดปริมาณของ Fe^{2+} Mg^{2+} หรือ Ca^{2+} จะมีผลกระตุ้นการผลิตแรมโนลิปิดได้เพิ่มมากขึ้นโดย *Pseudomonas sp.* ในทางตรงข้าม การผลิตเซอร์แฟกตินโดย *B. subtilis* พบว่าสามารถถูกกระตุ้นได้โดย การเติมเหล็กและเกลือแมงกานีสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Cooper และคณะ, 1981) นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่า การเติม EDTA ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อของ *Rhodococcus erythropolis* จะช่วยเพิ่มการผลิตทรีฮาโลสลิปิด ในขณะที่การเติมอีแธมบิทอล ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อของ *Mycobacterium smegmatis* และ *Rhodococcus erythropolis* จะช่วยในการปลดปล่อย ทรีฮาโลส มัยโคเลท ลงสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ (Kosaric และคณะ, 1987)

2. ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

2.1 ความเป็นกรด-ด่าง

การเจริญของจุลินทรีย์หรือสิ่งมีชีวิตต่างๆ ถูกควบคุมโดยกระบวนการเมตาโบลิซึม ซึ่งมีเอนไซม์เป็นตัวสำคัญ และการทำงานของเอนไซม์จะได้รับผลกระทบจากความเป็นกรด-ด่าง องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นปัจจัยสำคัญอันหนึ่ง ที่ทำให้เกิดเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากจุลินทรีย์จะมีการย่อยสลายสารอาหารเพื่อเป็นแหล่งพลังงาน ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีองค์ประกอบที่เป็นโปรตีน และไนโตรเจน เมื่อถูกย่อยสลายจะปลดปล่อยสารที่เป็นแอมโมเนีย หรือ อัลคาไลน์อื่นๆออกมา แต่ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีองค์ประกอบที่เป็นคาร์โบไฮเดรต เมื่อถูกย่อยสลายจะขับสารที่เป็นกรดอินทรีย์ออกมา ซึ่งสิ่งที่ขับออกมานี้ จะทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเปลี่ยนแปลงไป จนอยู่ในสภาพที่ไม่เหมาะสมต่อ การเจริญของจุลินทรีย์ (วิบูลย์ลักษณ์, 2536) นอกจากนี้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ยังมีความสำคัญในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของจุลินทรีย์ เช่น มีผลต่อการผลิตแรมโนลิปิด จาก *Pseudomonas sp.* และการผลิต sophorolipid จาก *T. bombicola* ส่วนการผลิตแรมโนลิปิด จาก *Pseudomonas aeruginosa* DSM 2659 พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการผลิตอยู่ในช่วง 6.2-6.4 หากค่าความเป็นกรด-ด่างในการผลิตสูงหรือต่ำกว่านี้ จะมีผลทำให้เชื้อหยุดการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Santos และคณะ, 1986)

2.2 อุณหภูมิ

พบว่าอุณหภูมิสามารถเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบ ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ที่ผลิตขึ้นได้คล้ายกับแหล่งคาร์บอน อุณหภูมิมีผลกระทบต่อกระบวนการสร้างไขมันนอกเหนือจากระดับ (degree) ของความไม่อิ่มตัว ตัวอย่างเช่น มีผลเปลี่ยนแปลงความยาวของสายกรดไขมัน มีผลต่อระดับ (levels) ของกิ่งของกรดไขมัน (fatty acid branching) และ cyclization มีผลต่อการกระจายตัว และ ความแตกต่างของสัดส่วนระหว่างไกลโคลิปิด และ

ฟอสโฟลิปิด ที่เกิดเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ โดย อุณหภูมิมีผลต่อปริมาณของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ที่ผลิตได้จาก *A. paraffineus* ATCC 19558, *Rhodococcus erythropolis* และ *Pseudomonas sp.* DSM-2874 นอกจากนั้นยังมีผลต่อส่วนประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ที่ผลิตจาก *Pseudomonas sp.* DSM-2874 (Santos และคณะ 1986 ; Kosaric และคณะ, 1987)

2. 3 การให้อากาศ

การให้อากาศ, การกวน เป็นการเพิ่มปริมาณออกซิเจนให้กับจุลินทรีย์ เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมทางหนึ่ง นอกจากนี้ยังเป็นการช่วยให้จุลินทรีย์อยู่ในสภาพสารแขวนลอย สามารถดูดซึมปริมาณออกซิเจนเพื่อนำไปใช้ได้มากขึ้น ออกซิเจนที่จุลินทรีย์ สามารถนำไปใช้ได้นั้นต้องอยู่ในรูปของโมเลกุลออกซิเจน ที่ละลายหรืออยู่ในรูปของเหลว การละลายของออกซิเจนในน้ำมีปริมาณจำกัด ออกซิเจนสามารถละลายในสื่อกลางที่เป็นน้ำได้เพียงไม่กี่มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยอากาศที่ความดัน 1 บรรยากาศ นับว่าน้อยมากเมื่อเทียบกับปริมาณ ออกซิเจนที่จุลินทรีย์ต้องการ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำให้มีออกซิเจนละลายเข้าไปในอาหารเหลวอยู่ตลอดเวลาโดยการถ่ายเทจากอากาศ ซึ่งวิธีการที่ง่ายที่สุดในการเพิ่มปริมาณออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ การเขย่าหรือการกวน วิธีการนี้จะช่วยให้จุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศเจริญได้ด้วยความหนาแน่นสูง ภายใต้ภาวะที่เป็นอันหนึ่งอันเดียวกัน ดังนั้นจะเห็นว่าในขั้นตอนของกระบวนการหมัก จึงต้องมีการให้อากาศตลอดเวลา (วิบูลย์ลักษณ์, 2536) Sheppard และ Cooper (1990) พบว่าการถ่ายเทออกซิเจน เป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญเป็นกุญแจสำหรับการหาภาวะที่เหมาะสม และการขยายกำลังผลิตเซอร์แฟกติน ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดย *B. licheniformis* พบว่าในภาวะที่มีอากาศน้อย (semiaerobic) จะให้ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ สูงกว่าในภาวะที่มีอากาศ (aerobic) และ ภาวะไม่มีอากาศ (anaerobic) (Jenny และคณะ, 1993)

สำหรับการศึกษาในประเทศไทย จากข้อมูลงานวิจัยเบื้องต้นโดย ธนขวัญ (2539) ทำการเลี้ยง *Bacillus subtilis* 3/38 ในอาหารกำหนดสูตร พบว่า จุลินทรีย์ สามารถลดแรงตึงผิวของส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อตลอดจนก่ออิมัลชั่นได้ดี ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับปรุงจากสูตรของ Jenny และคณะ (1993) ซึ่งประกอบด้วย 2% กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน 0.2 %

เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีแมงกานีสซัลเฟต 3.42 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ค่างเบื้องต้น 8.5 ด้วย 75 มิลลิโมลาร์ ทริส ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ และบ่มที่อุณหภูมิห้อง ($30+2^{0}C$) อัตราการเขย่า 200 รอบ/นาที โดยหลังการเลี้ยง 24 ชั่วโมง จะลดแรงตึงผิวของส่วนเลี้ยงเชื้อจาก 72 มิลลินิวตันต่อเมตร ลงเหลือ 27 มิลลินิวตันต่อเมตร และ 33 มิลลินิวตันต่อเมตร เมื่อทำการเจือจาง 20 เท่า ให้ค่าอิมัลชั่นอินเด็กซ์ (E_{24}) เท่ากับ 74 ค่าการกระจายน้ำมัน (oil displacement) เท่ากับ 38 หน่วย

ปัจจุบันสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ทวีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากขึ้น และเริ่มเข้ามามีส่วนแบ่งในตลาดของ สารลดแรงตึงผิวที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี เนื่องจากมีข้อดีหลายประการดังได้กล่าวแล้ว อาทิ เช่น สามารถถูกย่อยสลายได้โดยกระบวนการทางชีวภาพ (biodegradable) ซึ่งจะเป็นการลดปัญหาสิ่งแวดล้อมได้ ตลอดจนมีความเป็นพิษที่ต่ำกว่าด้วย แต่อย่างไรก็ตาม การนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ มาใช้ ทดแทนสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ในทางอุตสาหกรรมนั้นยังมีข้อจำกัด เนื่องจากต้นทุนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ยังคงมีราคาสูงกว่าเมื่อเทียบกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ ดังนั้นวิธีหนึ่งที่จะช่วยลดต้นทุนการผลิต และทำให้ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เข้ามามีส่วนแบ่งในตลาดได้มากขึ้น จะต้องมีการปรับปรุงความสามารถ ในการสร้างผลผลิตของจุลินทรีย์ เช่น ทำการคัดเลือกหาจุลชีพที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้สูง ควบคุมกระบวนการสังเคราะห์ การเติมสารที่เป็นตัวชักนำให้จุลินทรีย์มี การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากขึ้น การหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต พัฒนากระบวนการผลิตให้มีกรรมวิธี หรือ เทคโนโลยีที่ทันสมัย พัฒนาระบบเก็บเกี่ยว (product-recovery) ให้ง่ายขึ้น ตลอดจนการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจากแหล่งธรรมชาติที่มีราคาถูก (Kosaric, 1993) ได้มีผู้ทดลองหาแหล่งวัตถุดิบราคาถูกมาทดแทน เช่น มีการใช้ Peat pressate เป็นวัตถุดิบในการผลิตเซอแฟกติน โดย *B. subtilis* , ใช้ urban waste ในการผลิตโซโฟโรลิปิด, มีการนำ lactic whey และ soapstock oil มาใช้เป็นสับสเตรทในการผลิต แรมโนลิปิด โดย *P. aeruginosa* D10 (Mulligan และ Cooper, 1985 ; Sheppard และ Mulligan, 1987 ; Mercade และ Manresa, 1994)

Mercade และคณะ (1993) ได้ทดลองศึกษาการใช้ส่วนน้ำทิ้งจากการหีบน้ำมันมะกอก (Olive oil mill effluent, OOME) เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตแรมโนลิปิด

พบว่าสามารถผลิตแรมโนลิปิดได้ 0.058 กรัมของแรมโนลิปิด ต่อกรัมของซับสเตรท (OOME) และยังสามารถลดค่า COD ลงได้ 50 % ภายใน 72 ชั่วโมง

เซลลูโลสเป็นโพลีแซคคาไรด์ ที่พบมากในธรรมชาติ และมีการศึกษาเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารเคมีต่าง ๆ เช่น กรดอินทรีย์ ตลอดจนการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (Mes-Hartree และคณะ, 1983 ; Paturua, 1989)

<u>องค์ประกอบของเซลล์พืช</u>

ในเซลล์พืชประกอบด้วย

1. เซลลูโลส เป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดโพลีแซคคาไรด์ ที่ประกอบด้วย ดี-กลูโคส ในรูปเบต้า-ดี-กลูโคไพราโนส (β-D-glucopyranose) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 ไกลโคสิดิก ที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 1 กับ คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 4 ในโมเลกุลถัดไป ต่อเป็นสายตรง ไม่มีแขนงย่อย (unbranched polymer) มีสูตรทั่วไป คือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ เป็นองค์ประกอบซึ่งให้ความแข็งแรงในพืช โดยธรรมชาติของเซลล์พืชจะไม่พบเซลลูโลสอยู่ในรูปอิสระ แต่มักพบอยู่ร่วมกับ ลิกนิน เฮมิเซลลูโลส แพนโตแซน กัม (gum) แทนนิน (tannins) ไขมัน และ สารเกิดสี (colouring matter) เป็นต้น (Greulch, 1973) ดังแสดงในรูปที่ 17

การจัดเรียงตัวของหน่วย ดี-กลูโคส แต่ละโมเลกุลในสายเซลลูโลส จะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจน (Intra molecule H-bond) ระหว่างหมู่ไฮดรอกซิล ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 กับออกซิเจนที่อยู่ในวงแหวน (ring) ของโมเลกุลถัดไป และเชื่อมต่อระหว่างสายเซลลูโลสที่ขนานกันด้วยพันธะไฮโดรเจน (Inter molecule H-bond) ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 กับออกซิเจนที่เชื่อมระหว่างโมเลกุล ดี-กลูโคส ในอีกสายหนึ่ง ดังแสดงในรูปที่ 18 (Nisizawa, 1973)

จำนวนหน่วยย่อยของ ดี-กลูโคส ในสายของเซลลูโลสไม่สามารถทราบจำนวนที่แท้จริงได้ แต่ประมาณได้ว่าจะต้องมีจำนวนมากตั้งแต่ 1,000 ถึง 10,000 หน่วยกลูโคส (Tsao และ Ching, 1983) แตกต่างกันไปตามชนิดของพืช โมเลกุลของเซลลูโลสจะเรียงกันอยู่เป็นมัด ๆ เรียกว่า ไฟบริล (fibril) เมื่อนำแต่ละไฟบริล มาขยายพบว่า จะประกอบด้วยส่วนที่เป็นผลึก (crystalline) ซึ่งสายเซลลูโลสมีการเรียงตัวขนานกัน

อย่างมีระเบียบทำหน้าที่ เป็นแกนของไฟเบอร์ (fiber axis) และส่วนที่สายของเซลลูโลสมีการเรียงตัวอย่างไม่เป็นระเบียบ เรียกว่า เซลลูโลสอสันฐาน (amorphous cellulose) ดังแสดงในรูปที่ 19

เซลลูโลสมีโครงสร้างที่ซับซ้อน และไม่ละลายในน้ำ ตัวทำละลายอินทรีย์หรือสารละลายด่างอ่อน แต่สามารถละลายได้ดีในกรด หรือ ด่าง แก่ ดังนั้นจึงสามารถแบ่งชนิดของเซลลูโลสตามการละลายในด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ ได้เป็น 3 ชนิด (Paturua, 1989) คือ

1.1 แอลฟา-เซลลูโลส (α -cellulose) เป็นเซลลูโลสที่ไม่ละลายใน 17.5 % ของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่อุณหภูมิห้อง

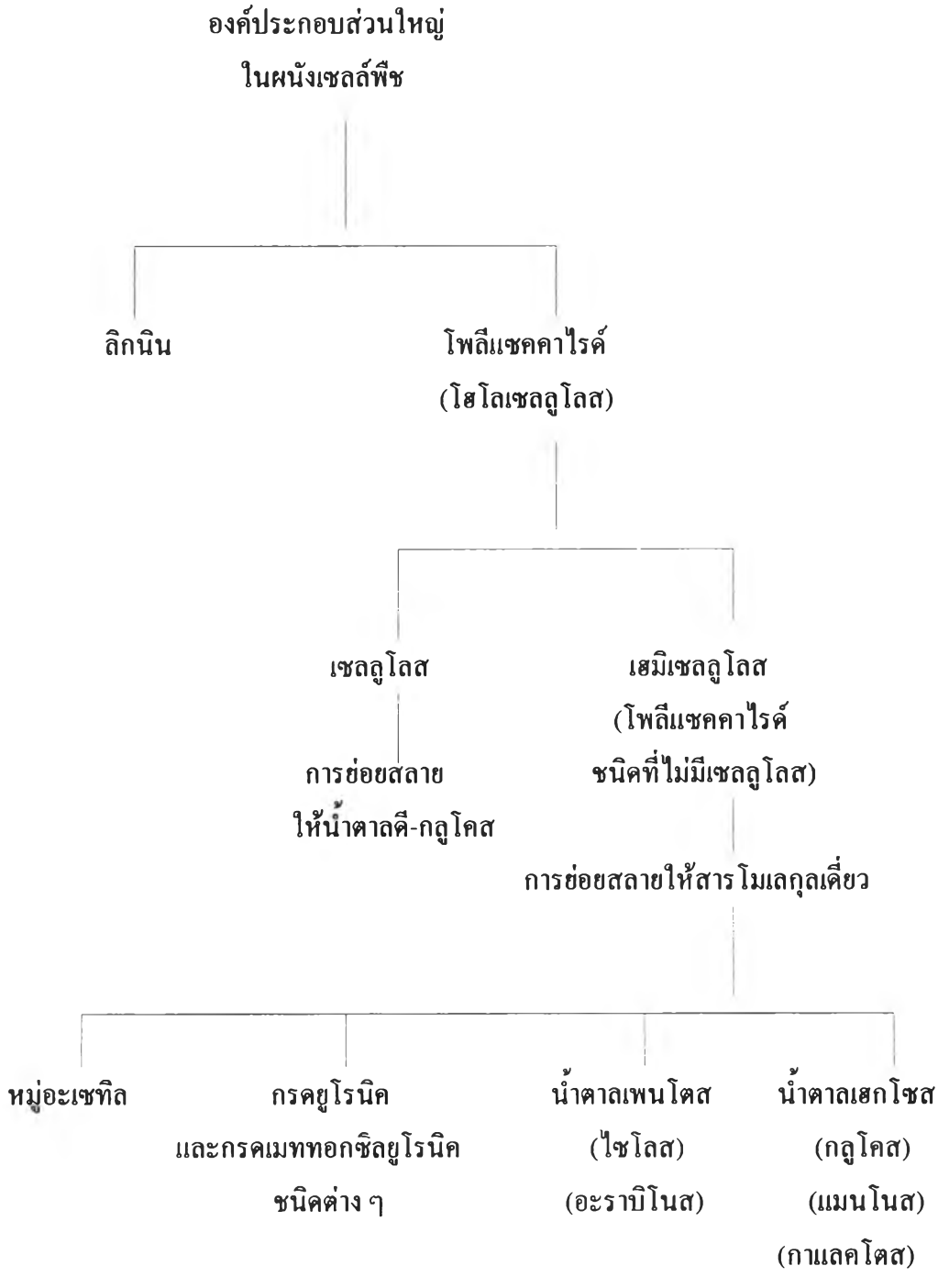
1.2 เบตา-เซลลูโลส (β-cellulose) เป็นเซลลูโลสที่ละลายใน 17.5 % ของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ แต่ตกตะกอนได้ง่าย เมื่อสารละลายมีสภาพเป็นกรด

1.3 แกมมา-เซลลูโลส (γ-cellulose) เป็นเซลลูโลสที่ละลายใน 17.5 % ของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และกรด แต่สามารถตกตะกอนได้โดยแอลกอฮอล์

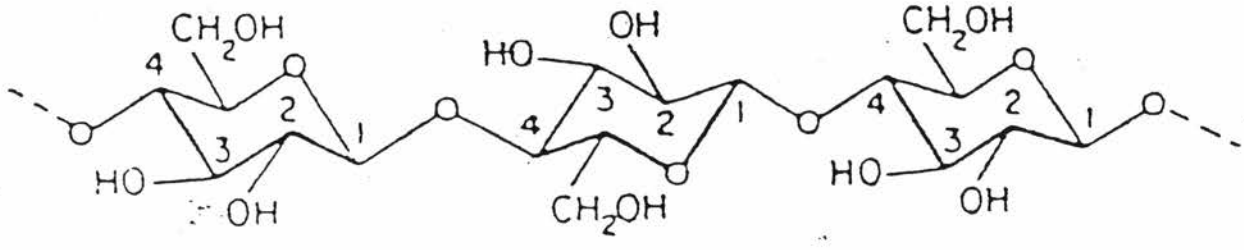
2. เฮมิเซลลูโลส เป็นโพลีเมอร์ของน้ำตาลเพนโตส (pentose) และ/หรือน้ำตาลเฮกโซส เช่น โพลีเมอร์ ของดี-ไซโลสในรูปไซแลน , อะราบิโนสในรูปแอล-อะราบิแนน, กาแลคโตสในรูปของ ดี-กาแลคแตน และ แมนโนส ในรูปของ ดี-แมนแนน ที่มีลักษณะเป็น heterogenous โดยประกอบด้วยโพลีแซคคาไรด์หลายชนิดมารวมกัน ลักษณะโครงสร้างเป็นกิ่งก้านสาขาแตกต่างจากเซลลูโลสที่มีโครงสร้างเป็นเส้นตรง (Paturua, 1989 ; Kirk , 1983) น้ำหนักโมเลกุลของเฮมิเซลลูโลสจะต่ำกว่าเซลลูโลส ขนาดของโมเลกุลมีความยาว 30-50 หน่วย และมีองค์ประกอบหลักคือ ไซแลน ซึ่งเป็นโพลีเมอร์ของน้ำตาลไซโลสที่เชื่อมกันด้วยพันธะ β -1,4- xylosidic สามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มด้วยกัน โดยอาศัยสมบัติการละลายคือ

ก. ไซแลนที่ละลายในสารละลายด่าง ซึ่งเป็นไซแลนที่พบมากในเฮมิเซลลูโลสของพืชทั่วไป

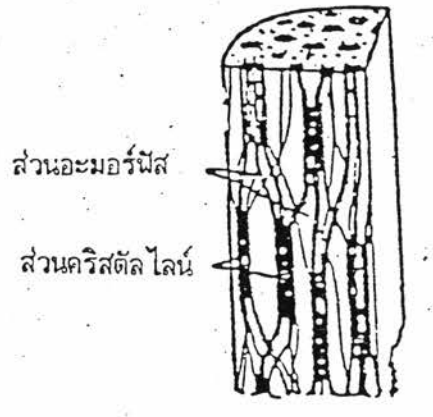
ข. ไซแลนที่สามารถละลายน้ำได้ หรือ เรียกว่า " อะราบิโนไซแลน " ที่พบมากในธัญญพืช โดยเป็นโพลีเมอร์ของไซโลสที่มีกิ่งก้านสาขา เป็นโพลีแซคคาไรด์ชนิดอื่น ๆ ปนอยู่ เช่น (เมธิล)-กรดกลูคูโรนิก ใน อะราบิโน-เมธิล-กลูคูโรโนไซแลนในหญ้า และเมธิล-กลูคูโรโนไซแลนในพืชพวกไม้เนื้อแข็ง (Biely, 1985)



รูปที่ 17 แสดงการแยกองค์ประกอบในเซลล์พืช (Greulch, 1973)



รูปที่ 18 แสดงลักษณะการจัดเรียงตัวของหน่วยกลูโคสในเซลลูโลส (Nisizawa,1973)



รูปที่ 19 แสดงส่วนของเซลลูโลสที่เป็นผลึกและเซลลูโลสอสัณฐาน

เฮมิเซลลูโลส มักถูกพบอยู่ร่วมกับ เซลลูโลส และลิกนิน เฮมิเซลลูโลสที่พบในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ส่วนใหญ่จะเป็นพวก เฮทเทอโร-1,4-เบต้า-ดี- ไซแลน (อะราบิโน-4-o-เมธิล-กลูคูโรโนไซแลน และ 4-o-เมธิล-กลูคูโรโนไซแลน และ เฮทเทอโร-1,4-เบต้า-ดี-แมนแนน (กาแลคโตกลูโคแมนแนน และ กลูโคแมนแนน) (Dekker และ Wallis, 1983)

เฮมิเซลลูโลสเมื่อถูกย่อยสลายจะได้น้ำตาลที่เป็น เพนโตส และ เฮกโซส ได้แก่ ไซโลส, แมนโนส, กาแลคโตส, อะราบิโนส

3. ลิกนิน เป็นสารประกอบอะโรมาติก ที่ประกอบด้วยหมู่เมททอกซิล (methoxyl group $-OCH_3$), หมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) และส่วนที่เป็นฟีโนลิค (phenolic) หรือเรียกว่า " Methylated phenolic compound " โครงสร้างของลิกนิน ไม่สามารถกำหนดแน่นอนได้ เพราะไม่สามารถแยกให้บริสุทธิ์ เนื่องจากลิกนินพันเกาะอยู่ติดกับเซลลูโลส

ลิกนิน เป็นสารประกอบที่ไม่สามารถละลายในน้ำ และสารอินทรีย์ชนิดใด ลิกนินจะอยู่ภายในโครงสร้างของเซลล์พืชโดยอยู่รอบ ๆ เซลลูโลส และป้องกันเซลลูโลสจากการย่อยสลาย, เสริมสร้างให้ไม้แข็งแรง ทนต่อแรงกระแทก ไม่แตกเปราะง่าย

<u>การย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร</u>

เนื่องจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร (agricultural wastes) เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย ซังข้าวโพด เป็นต้น มีเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบอยู่มาก ดังแสดงในตารางที่ 4

ดังนั้นเมื่อนำมาทำการย่อยสลายจะได้น้ำตาลออกมา โดยถ้าทำการย่อยสลายเซลลูโลสอย่างสมบูรณ์จะได้ผลิตภัณฑ์ชนิดเดียว คือ กลูโคส แต่ถ้าการย่อยสลายเกิดไม่สมบูรณ์จะได้ทั้งกลูโคส เซลโลไบโอส (cellobiose) และพวกโอลิโกแซคคาไรด์ (Oligosaccharide) ปนกัน ส่วนเฮมิเซลลูโลส เมื่อย่อยสลายจะได้น้ำตาลหลายชนิดปนกันขึ้นกับโครงสร้างของน้ำตาลในเฮมิเซลลูโลส

การย่อยวัสดุทางการเกษตรสามารถทำได้ 2 วิธี คือ

1. การย่อยด้วยสารเคมี (Chemical Hydrolysis)
2. การย่อยด้วยเอนไซม์ (Enzymatic Hydrolysis)

ตารางที่ 4 แสดงปริมาณเซลลูโลส, เฮมิเซลลูโลส, และลิกนินในวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

ชนิดของพืช	เซลลูโลส (%)	เฮมิเซลลูโลส (%)	ลิกนิน (%)	เอกสารอ้างอิง
ฟางข้าวไรย์	35.1	21.7	5.9	Han และคณะ (1974)
ฟางข้าวเจ้า	40.8	25.9	17.9	Taniguchi และคณะ (1982)
ฟางข้าวสาลี	40.8	26.4	22.9	Behrame และคณะ (1992)
ชานอ้อย	45.0	10.0	22.0	Oi และคณะ (1980)
เปลือกมันสำปะหลัง	20.74	ND	55.69	Chosdu และคณะ (1993)
Peanut husk	48.81	ND	40.84	Chosdu และคณะ (1993)
ก้านข้าวโพด (stalk)	75.29	ND	15.64	Chosdu และคณะ (1993)

หมายเหตุ ND หมายถึง ไม่มีรายงานของข้อมูลนั้น

1. การย่อยด้วยสารเคมี (Chemical Hydrolysis)

เป็นการย่อยโดยการใช้กรดหรือด่าง สำหรับการใช้กรด สารมารถแบ่งออกได้เป็น 2 กระบวนการ คือ กระบวนการที่ใช้กรดแก่ เช่น กรดไฮโดรคลอริก หรือกรดซัลฟูริกเข้มข้น ผลิตภัณฑ์ที่ได้ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลกลูโคส แต่วิธีการนี้ต้องมีการแยกกรดออกจากน้ำตาลก่อนนำไปใช้ และจะมีปัญหาด้านการผุกร่อนของเครื่องมือ อีกกระบวนการหนึ่งคือ การใช้กรดอ่อนกว่า วิธีการนี้ไม่สามารถนำกรดกลับมาใช้ใหม่ การย่อยด้วยกรดจะทำให้เพนโตแซนในเฮมิเซลลูโลสเปลี่ยนเป็นเฟอฟูรัล ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ได้ (Paturua,1989) ดังสมการที่ 1

$$\underset{\text{เพนโตแซน}}{C_5H_8O} \longrightarrow \underset{\text{เพนโตส}}{C_5H_{10}O_5} \longrightarrow \underset{\text{เฟอฟูรัล}}{C_5H_4O_2}$$

ส่วนการย่อยด้วยด่าง สารละลายด่างที่นิยมใช้ เช่น สารละลายเจือจางของโซเดียมไฮดรอกไซด์, แอมโมเนีย และ เอธิลลีนไดอะมีน เป็นต้น จะมีผลทำให้สายของโพลีแซคคาไรด์สั้นลง ปฏิกิริยานี้เกิดในสภาพอุณหภูมิสูงประมาณ 160 ถึง 180 องศาเซลเซียส และต้องการออกซิเจนในปริมาณเล็กน้อยเพื่อใช้ในการย่อยเฮมิเซลลูโลส

2. การย่อยด้วยเอนไซม์ (Enzymatic Hydrolysis)

เป็นการย่อยวัสดุทางการเกษตรด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Parisi, 1989; Woodward, 1987) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบได้ในจุลินทรีย์หลายชนิด โดยมากเป็น ราและแบคทีเรีย ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นที่สภาวะไม่รุนแรง ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่ได้จึงไม่ถูกย่อยสลายต่อไป นอกจากนี้เอนไซม์มีความจำเพาะ (specificity) ต่อวัตถุดิบที่จะย่อยสลาย ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ค่อนข้างบริสุทธิ์ และยังไม่ทำให้เกิดปัญหาการผุกร่อนของเครื่องมืออีกด้วย

<u>การปรับสภาพวัสดุทางการเกษตร</u>

วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย และซังข้าวโพด ฯลฯ จะอยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อน (complex) ระหว่างลิกนิน เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส ลักษณะโครงสร้างของเซลลูโลส ได้แก่ ดีกรีของผลึก (degree of crystallinity) จำนวน

หน่วยกลูโคส (degree of polymerization) การอมน้ำ (degree of water swelling) พื้นที่ผิวสัมผัส (specific surface area) ปริมาณลิกนินในวัสดุทางการเกษตร จะทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสไม่ได้ผลดีเท่าที่ควร ดังนั้น จึงต้องทำการปรับสภาพ (pretreat) วัสดุเหล่านี้ก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ เพื่อให้ได้น้ำตาลใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อ เพื่อการผลิตไบโอเซอแฟกแตนท์ต่อไป

การปรับสภาพวัสดุทางการเกษตร เป็นการเตรียมวัตถุดิบให้เหมาะสมต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ ด้วยการทำลายโครงสร้างผลึกในเซลลูโลส และสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างลิกนินและคาร์โบไฮเดรต, กำจัดลิกนิน, เพิ่มพื้นที่ผิวเพื่อให้เอนไซม์เข้าย่อยได้ง่ายขึ้น และเพิ่มจำนวนพันธะไกลโคสิดิก เพื่อให้จับกับเอนไซม์ได้ง่าย (Dekker และ Wallis, 1983 ; Woodward, 1987)

<u>วิธีการปรับสภาพ</u> สามารถแบ่งได้เป็น 2 วิธีการใหญ่ ๆ คือ

1. <u>วิธีทางกายภาพ</u> (Physical Pretreatment)

1.1 การลดขนาดของสารโดยวิธีบด หรือ โม่บด เป็นการบดผลึกของเส้นใยเซลลูโลสให้แตกออก เพื่อให้เอนไซม์ย่อยสลายได้ง่ายขึ้น รวมทั้งเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวของวัตถุดิบ ทำให้เอนไซม์สามารถเข้าทำการย่อยได้ดีขึ้น จากการศึกษาของ Gharpuray และคณะ (1983) ทดลองใช้การบดด้วยลูกบอล (Ball-milling) บดฟางข้าวสาลี พบว่า จะช่วยให้พื้นที่ผิวเพิ่มมากขึ้น และลดความเป็นผลึกลง

1.2 การใช้ความร้อน และความดัน เป็นการทำให้เซลลูโลสในวัตถุดิบอิ่มตัวด้วยไอน้ำ ภายใต้ความดันและอุณหภูมิสูง แล้วลดความดันทันทีทำให้น้ำระเหยอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะทำให้เส้นใยแยกออกจากกัน เป็นการเพิ่มขนาดเพื่อให้เอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยา ซึ่งเรียกว่า "กระบวนการ Steam Explosion Process"

Mes-Hartree และคณะ (1983) ใช้วิธี Steam Explosion ในการปรับสภาพเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร พวกฟางข้าวบาร์เล่ย์ ฟางข้าวสาลี ต้นข้าวโพด และต้น alfalfa ก่อนจะนำไปย่อยสลายด้วยเอนไซม์จากเชื้อ *Trichoderma horizoo* E58 พบว่าจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายได้ดี

Dekker และ Wallis (1983) พบว่า การปรับสภาพชานอ้อยด้วยการทำ Autohydrolysis- steam Explosion ที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส เป็นเวลาเพียง 4 นาที จากนั้นย่อยด้วยเซลลูเลส จะมีเปอร์เซนต์การเปลี่ยนวัตถุดิบเป็นน้ำตาลถึง 50 % ในสภาวะความเป็นกรด-ด่าง 5.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ในเวลา 24 ชั่วโมง และสูงถึง 80 % ถ้าเพิ่มการย่อยด้วยเอนไซม์ เบตา-กลูโคสิเดส

2. วิธีทางเคมี (Chemical Pretreatment)

การใช้สารเคมีจะทำให้ปริมาณลิกนินและผลึก (crystalline) ลดลง และทำให้เซลลูโลสมีการละลายหรืออมน้ำ (swell) มากขึ้น

Gould (1984) ได้ทำการปรับคุณภาพวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ฟางข้าวสาลี ด้วย H_2O_2 ก่อนจะนำไปเป็นวัตถุดิบในการผลิตแอลกฮอล์ เนื่องจาก H_2O_2 จะทำปฏิกิริยากับลิกนินที่อยู่ในพืชทำให้เกิดปฏิกิริยา Delignification ขึ้น ทำให้สารอินทรีย์อื่น ๆ ถูกย่อยสลายได้ง่ายขึ้น

Meenoti และคณะ (1992) พบว่า การปรับสภาพฟางข้าวด้วย 1.5 % (w/v) NaOH และ H_2O_2 เข้มข้น 1% (v/v) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ในเวลา 5 ชั่วโมง จะทำให้ปริมาณลิกนินลดลงอย่างมากถึง 62 %

<u>สมบัติของเอนไซม์เซลลูเลส</u>

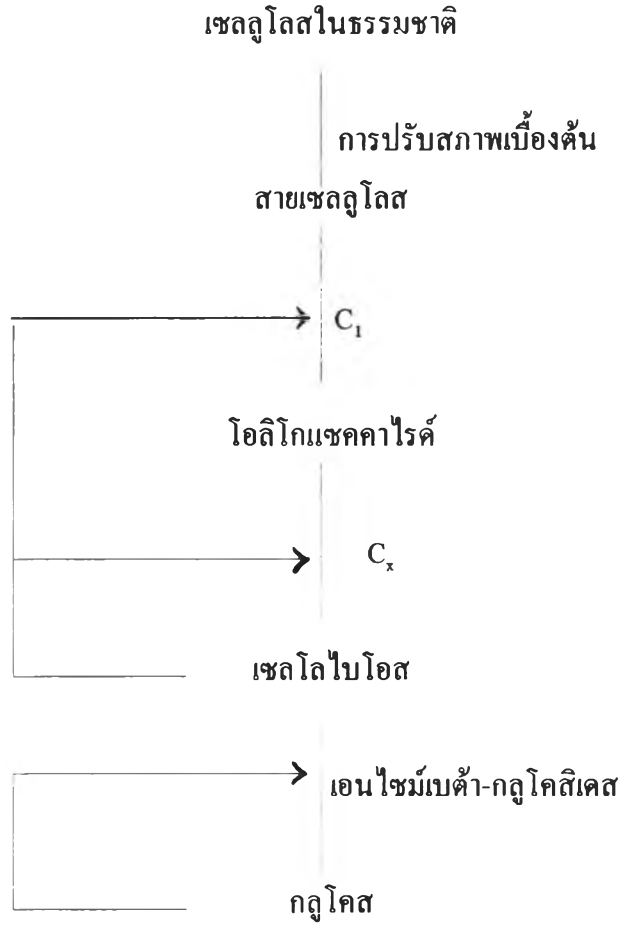
เอนไซม์เซลลูเลสมีสมบัติเป็น multicomponent enzyme โดยมีองค์ประกอบของ เอนไซม์อย่างน้อย 3 ชนิด ทำงานร่วมกันดังนี้ (Ryu และ Mandels, 1980)

1. Endo-β-1,4-glucan glucanohydrolase (E.C. 3.2.1.4) หรือ Endoglucanase หรือ C_x ทำหน้าที่ตัดพันธะ 1,4 กลูโคสิดิก ภายในสายเซลลูโลสในบริเวณที่เป็นอะมอร์ฟัส หรืออนุพันธ์ของเซลลูโลส ซึ่งเป็นการตัดแบบสุ่ม (random) ได้ ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็น เซลโลไบโอส และมีกลูโคสบ้างเล็กน้อย

2. Exo-β-1,4-glucan cellobiohydrolase (E.C. 3.2.1.91) หรือ Exoglucanase หรือ C_1 เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ตัดพันธะ 1,4 กลูโคสิดิก จากปลายทางด้าน non-reducing ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคส และเซลโลไบโอส

3. β-glucosidase หรือ cellobiase (E.C. 3.2.1.21) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลโลไบโอสให้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคส

ขั้นตอนการย่อยสลายเซลลูโลสและการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ แสดงไว้ในรูปที่ 20 การทำงานของเอนไซม์เหล่านี้ จะถูกยับยั้งโดยผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น โดยเอนไซม์เบต้า-กลูโคสิเดส จะถูกยับยั้งโดยกลูโคส ส่วน C_1 และ C_x จะถูกยับยั้งโดยเซลโลไบโอส



รูปที่ 20 การย่อยสลายและการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (Siu และ Reese , 1953)

สืบเนื่องจากทางด้านเกษตรกรรม หลังฤดูการเก็บเกี่ยวแต่ละปี จะมีวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น ซังข้าวโพด แกลบ ฟางข้าว รำข้าว ชานอ้อย เหลือเป็นจำนวนมาก และจากการวัสดุทางการเกษตรเหล่านี้มี เซลลูโลส เป็นองค์ประกอบ เป็นส่วนใหญ่ เช่น ฟางข้าวมีเซลลูโลส เป็นองค์ประกอบมาก 32.1-36 % (Grethlein, 1984 ; Kirk, 1983) , ชานอ้อย มี 33-41 % (Dekker และ Wallis, 1983) เป็นต้น และยังเป็นทรัพยากรหมุนเวียน (renewable resource) จึงมีการศึกษาเพื่อนำเซลลูโลสจากวัสดุทางการเกษตร เหล่านี้มาใช้เป็นซับสเตรท หรือ แหล่งคาร์บอนในการผลิตสารเคมีต่าง ๆ เช่น แอลกอฮอล์ กรดอะซิติก และ กรดอินทรีย์อื่น ๆ (Mes-Hartree และคณะ, 1983 ; Paturua, 1989)

ปราณี (2532) ใช้น้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายผักตบชวาด้วยเอนไซม์ เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตอาซีโตน-บิวทานอล โดยใช้เชื้อ *Cl. butylicum* NRRL B592

สุภาพร (2536) ศึกษาการผลิตเดรกซ์แทรนเนส โดย *Penicillium sp.* สายพันธุ์ 61 ใช้น้ำตาลจากการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น ชานอ้อย ด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต ผลผลิตเดรกซ์แทรนเนสที่ได้อยู่ในระหว่าง 35-42 หน่วยต่อมล.อาหารเลี้ยงเชื้อ

ในลักษณะเดียวกันงานวิจัยนี้ จึงมุ่งศึกษา การนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร มาใช้เป็นแหล่ง คาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus licheniformis* สายพันธุ์ F2. 2 เพื่อลดต้นทุนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยเริ่มทำการปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ไฮโดรไลเสทที่ได้เพื่อทดแทนแหล่งคาร์บอนในสูตร รวมทั้งหาชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน แล้วจึงทำการหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ตลอดจนศึกษาสมบัติเบื้องต้นบางประการของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ที่ผลิตได้