

การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Pichia anomala* PY189 เพื่อเตรียมไมโครแคปซูลบรรจุน้ำมันหอมระเหย
สำหรับใช้ในอาหาร

นางสาวชนาภา เดชวัฒนาโกมล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



BIOSURFACTANT PRODUCTION BY *Pichia anomala* PY189 FOR PREPARING ESSENTIAL OIL
ENCAPSULATED MICROCAPSULE FOR USE IN FOOD

Miss Chanapa Dejjatthanakomol

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

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Pichia anomala* PY189 เพื่อเตรียมไมโครแคปซูลบรรจุน้ำมันหอมระเหย สำหรับใช้ในอาหาร

โดย

นางสาวชนาภา เดชวัฒนาโกมล

สาขาวิชา

จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธานีวัน

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิรวัฒน์ ทัตติยกุล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หรรหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธานีวัน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธานีวัน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิรวัฒน์ ทัตติยกุล)

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

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร. นรินทร์ รุ่งสว่าง)

ชานาภา เดชวัฒนาโกมล : การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Pichia anomala* PY189 เพื่อเตรียมไมโครแคปซูลบรรจุน้ำมันหอมระเหยสำหรับใช้ในอาหาร (BIOSURFACTANT PRODUCTION BY *Pichia anomala* PY189 FOR PREPARING ESSENTIAL OIL ENCAPSULATED MICROCAPSULE FOR USE IN FOOD) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. จิราภรณ์ ธนียวัน อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ.ดร. จิรรัตน์ ทัดติยกุล., 104 หน้า.

Pichia anomala สายพันธุ์ PY189 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในอาหารเหลวปรับปรุงสูตรซึ่งมีแหล่งคาร์บอนคือ น้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) และแหล่งไนโตรเจนคือ โซเดียมไนเตรท 0.4 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มีค่าแรงตึงผิวต่ำสุด 36.5 mN/m ค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 10.17 ตารางเซนติเมตร และให้ผลผลิตเท่ากับ 0.57 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าความเข้มข้นวิกฤตการเกิดไมเซลล์ (CMC) เท่ากับ 204 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าHydrophilic-lipophilic balance (HLB) ในช่วง 10-13 ซึ่งแสดงว่าเป็นสารก่อกอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำได้ดี สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้เมื่อนำมาทดสอบด้วย TLC พบว่ามีส่วนประกอบ 4 ส่วน มีอัตราเร็วการเคลื่อนที่ (R_f) เท่ากับ 0.92, 0.81, 0.76 และ 0.55 (F1-F4) ตามลำดับ โดยสารที่สกัดจากตำแหน่ง F3 ให้ค่าการกระจายน้ำมันสูงสุดและมีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบในโมเลกุล นำสาร F3 ไปทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งด้วย HPLC และวิเคราะห์ต่อกด้วย MALDI-TOF MS พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 522, 548 และ 648 เทียบเคียงได้กับสารไซโฟโรลิพิด์ที่มีโครงสร้างในส่วนของกรดไขมันเป็น C12, C14 และ C16 อยู่ในรูปแบบแลคโตนิก (lactonic form) เมื่อนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ไปใช้เป็นตัวก่อกอิมัลชันของน้ำมันตะไคร้พบว่า อิมัลชันที่มีสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 0.8 และ 1 % มีขนาดอนุภาคเล็กกว่า 10 ไมครอน และทำแห้งแบบพ่นกระจายโดยใช้อัตราส่วนของน้ำมันตะไคร้ต่อมอลโตเดกซ์ตรินเป็น 0.2:1 และ 0.15:1 พบว่าประสิทธิภาพในการทำไมโครแคปซูลเท่ากับ 48.5 และ 51.6%ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ค่า MIC ของน้ำมันตะไคร้และไมโครแคปซูลบรรจุน้ำมันตะไคร้พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli*, *S. aureus* และ *Salmonella* sp. และยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำสลัดได้

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่อ.....
 สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม..ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
 ปีการศึกษา..2553.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5172253823 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS: BIOSURFACTANT / *Pichia anomala* / Lemongrass oil

CHANAPA DEJWATTHANAKOMOL: BIOSURFACTANT PRODUCTION BY *Pichia anomala* PY189 FOR PREPARING ESSENTIAL OIL ENCAPSULATED MICROCAPSULE FOR USE IN FOOD. ADVISOR: ASSOC. PROF. JIRAPORN THANIYAVARN, CO-ADVISOR: ASST.PROF. DR. JIRARAT TATTIYAKUL, Ph.D., 104pp.

In the present study, the production and characterization of biosurfactant from yeast *Pichia anomala* strain PY189 were investigated. The highest efficiency for biosurfactant production was found when the organism was grown in modified medium with soybean oil 4%, as carbon source and NaNO₃ 0.4%, as nitrogen source using optimal condition at 30°C, pH of 5.5 for 7 days. After 7 days of cultivation, *P. anomala* PY189 was able to produce biosurfactant up to 0.57 gL⁻¹. The crude biosurfactant was able to reduce the surface tension of pure water to 36.5 mN/m, oil displacement activity of 10.17 cm² with a critical micelle concentration (CMC) of 204 mg/l, it exhibited HLB value of 10-13. Result from TLC analysis indicated that crude biosurfactant consisted of 4 major bands with R_f values of 0.92, 0.81, 0.76 and 0.55 (F1-F4), respectively. Among these, F3 gave highest oil displacement activity and gave positive test with sugar. Further, F3 was fractionated via HPLC in combination with MALDI-TOF MS, the chemical structure of the most relatively abundant fraction was identified as sophorolipid in nature. This biosurfactant can be used as emulsifier for lemongrass oil. Emulsion containing biosurfactant concentration at 0.8 and 1% was stable and having particle size less than 10µm. Lemongrass oil emulsion was prepared for microencapsulation using spray dry technique. Microencapsulation efficiency was 48.5 and 51.6% at lemongrass oil:maltodextrin ratio 0.2:1 and 0.15:1, respectively. This microcapsule also exhibited microbial inhibition activity against *E.coli*, *S. aureus* and *Salmonella* sp.

Department :Microbiology.....Student's Signature.....

Field of Study :Industrial Microbiology.....Advisor's Signature.....

Academic Year : ..2010.....Co-advisor's Signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธานีวัน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิราวัฒน์ ทัตติยกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ซึ่งได้ให้ความรู้ ความเมตตา คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ในการทำวิจัย ตลอดจนตรวจแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธานีวัน ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการในการสอบ ตลอดจนให้คำแนะนำต่างๆ

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชกร และดร. นิรันดร์ รุ่งสว่างที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบตลอดจนให้คำแนะนำต่างๆ และช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณ คณาจารย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ และอำนวยความสะดวกต่างๆ แก่ผู้วิจัย รวมถึงอาจารย์ทุกท่านที่ผ่านมาในชีวิต ที่ได้อบรมสั่งสอนมาจนสำเร็จการศึกษา

ขอขอบพระคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2553 ภายใต้โครงการวิจัยเรื่อง แผนงานวิจัยนวัตกรรมเพื่อยกระดับคุณภาพและความปลอดภัยทางอาหารสู่โครงสร้างเศรษฐกิจยุคใหม่

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านของบัณฑิตวิทยาลัย ที่ได้ช่วยอำนวยความสะดวกต่างๆ

ขอขอบคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ทุกคนในภาควิชาจุลชีววิทยา โดยเฉพาะอย่างยิ่งห้องปฏิบัติการ 402, 453 และ 462 อ.จำรูญศรี พุ่มเทียน สำหรับประสบการณ์ชีวิตที่ดี การแบ่งปันรอยยิ้ม เสียงหัวเราะ ความช่วยเหลือ กำลังใจ และความหวังดีที่มีให้เสมอมา

ท้ายที่สุดขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และพี่น้องที่อยู่เคียงข้าง ให้การสนับสนุนการช่วยเหลือ และแบ่งเบาความกังวลใจ รวมถึงให้กำลังใจเป็นอย่างดีในทุกๆ ด้านแก่ผู้วิจัยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ท
บทที่	
1. บทนำ.....	1
1.1 ประวัติความเป็นมา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	4
1.3 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย.....	4
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
2. ทัศนวิสัยวรรณกรรม.....	5
2.1 ความหมายและความสำคัญของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	5
2.2 ชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	8
2.3 สมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	18
2.4 กระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	19
2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	22
2.6 การประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	25
2.7 การวิเคราะห์สมบัติสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	32
2.8 การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	34
2.9 น้ำมันตะไคร้.....	38
2.10 เทคโนโลยีการผลิตไมโครแคปซูล.....	39
3. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการทดลอง.....	43
- อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง.....	43
- เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	45
- วิธีดำเนินการทดลอง.....	47

บทที่	หน้า
3.1 การหาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระดับขวดเขย่า.....	47
3.2 การผลิต สกัด และทำให้บริสุทธิ์บางส่วน.....	51
3.3 การศึกษาลักษณะสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	51
3.4 การทำบริสุทธิ์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธีโครมาโทกราฟี.....	53
3.5 การวิเคราะห์โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้.....	55
3.6 การศึกษาความคงตัวของอิมัลชันน้ำมันตะไคร้ในสารละลายมอลโตเดกซ์ตริน.....	56
3.7 การผลิตไมโครแคปซูลของอิมัลชันน้ำมันตะไคร้.....	56
3.8 การศึกษาสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของไมโครแคปซูล.....	57
3.9 ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของไมโครแคปซูล.....	58
3.10 ประเมินฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในน้ำสลัด.....	59
4. ผลการทดลอง.....	60
4.1 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระดับขวดเขย่า.....	60
4.2 การผลิต สกัด และการทำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วน.....	67
4.3 ลักษณะสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้.....	67
4.3.1 ความเข้มข้นวิกฤติของการเกิดไมเซลล์.....	67
4.3.2 ค่า Hydrophilic-lipophilic balance.....	69
4.4 การทำบริสุทธิ์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธีโครมาโทกราฟี.....	72
4.4.1 การทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีทีนเลเยอร์โครมาโทกราฟี.....	72
4.4.2 การทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนลิวิดโครมาโทกราฟี.....	74
4.5 วิเคราะห์องค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วย MALDI-TOF.....	75
4.6 การศึกษาความคงตัวของอิมัลชันน้ำมันตะไคร้ในสารละลายมอลโตเดกซ์ตริน.....	77
4.7 การผลิตไมโครแคปซูลของอิมัลชันน้ำมันตะไคร้.....	79
4.8 การศึกษาสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของไมโครแคปซูล.....	80
4.9 ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของไมโครแคปซูล.....	81
4.10 ประเมินฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในน้ำสลัด.....	82

5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	83
รายการอ้างอิง.....	87
ภาคผนวก.....	97
ภาคผนวก ก สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	98
ภาคผนวก ข สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	100
ภาคผนวก ค เครื่องมือและการวัดค่าแรงดึงผิว.....	101
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	104

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า	
2.1	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ.....	16
2.2	การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทไซโฟโรลิพิดจากยีสต์ในแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ.....	24
2.3	หน้าที่ต่างๆของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์ในอาหารชนิดต่างๆ...	27
2.4	การประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดต่างๆ.....	30
3.1	ความสัมพันธ์ระหว่างค่า HLB กับลักษณะสารละลายของสารลดแรงตึงผิวในน้ำ.....	53
3.2	สภาวะที่ใช้ในการอบแห้งแบบพ่นฝอย.....	57
4.1	ผลการศึกษาการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย <i>P.anomala</i> PY189 ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในขวดเขย่า.....	61
4.2	ผลการศึกษาความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย <i>P.anomala</i> PY189 ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในขวดเขย่า.....	62
4.3	ผลการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย <i>P.anomala</i> PY189 ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในขวดเขย่า.....	64
4.4	ผลการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย <i>P.anomala</i> PY189 ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในขวดเขย่า.....	66
4.5	เปรียบเทียบค่าความเข้มข้นวิกฤติของการเกิดไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก <i>P. anomala</i> PY189 กับสารลดแรงตึงผิวชนิดอื่น.....	70
4.6	ค่าการกระจายน้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จากแผ่น TLC ในแต่ละลำดับส่วน.....	72
4.7	ค่าการกระจายน้ำมันของตัวอย่างตำแหน่ง F3 ที่ผ่านการวิเคราะห์และทำให้บริสุทธิ์ด้วย HPLC.....	75
4.8	ผลการวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้ ด้วยวิธี MALDI-TOF MS.....	77
4.9	ผลการสังเกตความเสถียรของอิมัลชันน้ำมันตะไคร้ เมื่อตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง.....	78
4.10	ขนาดอนุภาคเฉลี่ยโดยปริมาตรของอิมัลชันน้ำมันตะไคร้.....	78
4.11	ขนาดอนุภาคเฉลี่ยโดยพื้นที่ผิวของอิมัลชันน้ำมันตะไคร้.....	78
4.12	แสดงประสิทธิภาพการทำไมโครแคปซูลของไมโครแคปซูลน้ำมันตะไคร้ที่ผลิตได้.....	81
4.13	ค่า MIC ของน้ำมันตะไคร้และไมโครแคปซูลบรรจุน้ำมันตะไคร้	82
4.14	จำนวนจุลินทรีย์ในน้ำสลัดชนิดชั้นจัดที่ไม่เติมและเติมไมโครแคปซูลน้ำมันตะไคร้....	82

สารบัญญภาพ

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิว.....	6
2.2 การกระจายตัวของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิว.....	6
2.3 โครงสร้างไมเซลล์.....	6
2.4 การเกิดโครงสร้างไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในน้ำ.....	7
2.5 โครงสร้างและการจัดเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแบบต่างๆ.....	8
2.6 โครงสร้างของแรมโนลิพิด ชนิด R1, R2, R3, และ R4.....	9
2.7 โครงสร้างของ Trehalose ชนิด mono-dimycolate.....	10
2.8 โครงสร้าง acidic และ lactonic form ของไซโฟโรลิพิด.....	11
2.9 โครงสร้างของเซอร์แฟคติน.....	11
2.10 โครงสร้างของ lichenysin A.....	12
2.11 โครงสร้างของอาร์โทรแฟกติน จาก <i>Pseudomas</i> sp. MIS38.....	12
2.12 โครงสร้างของ phosphatidylethanolamine จาก <i>Acinetobactor</i> sp.	13
2.13 โครงสร้างของอิมัลแซน จาก <i>Acinetobactor calcoaceticus</i>	14
2.14 แสดงกระบวนการผลิตไซโฟโรลิพิดจาก <i>Candida bombicola</i> ATCC 22214.....	21
2.15 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตึงผิว แรงตึงระหว่างผิวที่ประจัน และค่าการละลายกับความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	32
2.16 โคโรมาโทแกรม HPLC ของไซโฟโรลิพิดบริสุทธิ์บางส่วน ที่ผลิตโดย <i>Torulopsis bombicola</i> และใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน.....	35
2.17 แมสสเปกตรัมของไซโฟโรลิพิดเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนต่างๆ.....	37
2.18 แสดงลักษณะของไมโครแคปซูล.....	40
2.19 ขั้นตอนการอบแห้งแบบพ่นกระจาย.....	41
3.1 แสดงลักษณะการกระจายตัวของน้ำมัน.....	50
3.2 วิธีการหาความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ ค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก <i>P. anomala</i> สายพันธุ์ PY189 เมื่อแปรผันชนิดของ	52
4.1 แหล่งคาร์บอนที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในขวดเขย่า.....	61

รูปที่	หน้า	
4.2	การกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก <i>P. anomala</i> สายพันธุ์ PY189 เมื่อแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอน ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในขวดเขย่า.....	62
4.3	ค่าแรงดึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก <i>P. anomala</i> สายพันธุ์ PY189 เมื่อแปรผันความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลือง ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในขวดเขย่า.....	63
4.4	การกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก <i>P. anomala</i> สายพันธุ์ PY189 เมื่อแปรผันความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลือง ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในขวดเขย่า...	63
4.5	ค่าแรงดึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก <i>P. anomala</i> สายพันธุ์ PY189 เมื่อแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจน ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในขวดเขย่า.....	64
4.6	การกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก <i>P. anomala</i> สายพันธุ์ PY189 เมื่อแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจน ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในขวดเขย่า.....	65
4.7	ค่าแรงดึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก <i>P. anomala</i> สายพันธุ์ PY189 เมื่อแปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในขวดเขย่า.....	66
4.8	การกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก <i>P. anomala</i> สายพันธุ์ PY189 เมื่อแปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในขวดเขย่า...	67
4.9	กราฟแสดงค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก <i>P. anomala</i> PY189	68
4.10	ค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก <i>Pichia anomala</i> สายพันธุ์ PY1...	69
4.11	ค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	69
4.12	ค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ ไทรทอนเอกซ์ 100.....	70
4.13	ลักษณะของสารละลายสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบริสุทธิ์บางส่วนที่ผลิตโดย <i>P. anomala</i> PY189 เมื่อละลายในน้ำกรอง และน้ำดื่ม.....	71
4.14	ผลการวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย <i>P. anomala</i> PY189 ด้วยวิธี Thin-layer Chromatography เมื่อตรวจสอบผลด้วยไอโอดีน.....	73
4.15	ผลการวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จากแผ่น TLC ในแต่ละลำดับส่วน เมื่อตรวจสอบผลด้วยมอริช รีเอเจนท์.....	73
4.16	โครมาโทแกรมของตัวอย่างลำดับส่วน F3 จาก HPLC.....	74
4.17	โครมาโทแกรมของ MALDI-TOF MS จากตัวอย่างสาร P2.....	75
4.18	โครงสร้างของโซไฟโรลิพิดที่ประกอบด้วยน้ำตาลโซไฟโรสและกรดไขมันที่มีความยาว ต่างๆ จากการวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF MS.....	76

รูปที่	หน้า
4.19 ผงไมโครแคปซูลบรรจุน้ำมันตะไคร้ที่ได้จากการอบแห้ง.....	79
4.20 ลักษณะพื้นผิวของผงไมโครแคปซูลที่ผลิตได้ภายใต้ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด.....	80
4.21 ภาพตัดขวางของผงไมโครแคปซูลที่ผลิตได้ภายใต้ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด.....	80
4.22 จำนวนจุลินทรีย์ในน้ำสลัดชนิดชั้นจัดที่ (ก)ไม่เติมและ(ข)เติมไมโครแคปซูลน้ำมันตะไคร้.....	82

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

°ซ	=	องศาเซลเซียส
%	=	เปอร์เซ็นต์
rpm	=	รอบต่อนาที
g L ⁻¹	=	กรัมต่อลิตร
:	=	อัตราส่วนต่อ
cm ²	=	ตารางเซนติเมตร
mN/m	=	มิลลินิวตันต่อเมตร

บทที่ 1

บทนำ

ในปัจจุบันสารลดแรงตึงผิวมีบทบาทที่สำคัญอย่างยิ่งในชีวิตประจำวันของมนุษย์ เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวเป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด เช่น ผงซักฟอก สบู่ แชมพู และผลิตภัณฑ์ที่มีฟอง นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวยังถูกนำมาใช้ทางการแพทย์ การผลิตยา และอุตสาหกรรมต่างๆ อย่างไรก็ตามสารลดแรงตึงผิวที่ใช้ในทางการค้าส่วนใหญ่เป็นสารที่สังเคราะห์โดยวิธีทางเคมี ซึ่งก่อให้เกิดผลเสียต่อธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ในหลายๆประเทศที่พัฒนาแล้วมีการรณรงค์ให้ใช้สารชีวภาพแทนการใช้ผลิตภัณฑ์ที่มาจากสารเคมี ทั้งนี้เพื่อลดปัญหามลพิษในด้านต่างๆที่เกิดขึ้น ดังนั้นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการใช้ทดแทนสารลดแรงตึงผิวที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี ทั้งนี้เพราะสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถย่อยสลายได้ง่ายในธรรมชาติ (Mohan และคณะ, 2006) มีความเป็นพิษต่ำ ทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่มีความเป็นกรด - ด่าง และอุณหภูมิสูง ก่ออิมัลชันได้ดี สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Nitschke และ Costa, 2007) มีโครงสร้างที่หลากหลาย ทำให้มีคุณสมบัติใหม่ๆ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactant) เป็นสารชีวโมเลกุลที่มีคุณสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิว (surface active compound) สร้างโดยสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ และรา โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีโครงสร้างเป็นแบบแอมฟิฟิลิก (amphiphilic compound) ซึ่งประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic group) ส่วนใหญ่เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนและกรดไขมัน และส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic group) ซึ่งเป็นได้ทั้งคาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน เปปไทด์ ฟอสเฟต กรดคาร์บอกซิลิก หรือแอลกอฮอล์ เป็นต้น (Pattanathu และคณะ, 2008) สารลดแรงตึงผิวสามารถลดแรงตึงผิวของน้ำเพื่อให้เกิดกระบวนการต่างๆ ง่ายขึ้น เช่น การเกิดฟอง การทำให้เปียก และกระบวนการทำความสะอาด จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้นั้นมีโครงสร้างที่หลากหลายสามารถนำไปใช้งานได้อย่างกว้างขวาง อย่างไรก็ตามในตลาดการค้าก็ยังไม่สามารถทดแทนสารลดแรงตึงผิวที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมีได้ทั้งหมด เนื่องจากมีต้นทุนในการผลิตสูง จึงมีผู้สนใจศึกษาเพื่อพัฒนากระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อลดต้นทุนในการผลิตโดยใช้จุลินทรีย์ และการพัฒนาสายพันธุ์ให้ได้สายพันธุ์กลายที่มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มาก

Pichia anomala PY1 เป็นยีสต์ที่คัดแยกได้จากข้าวหมาก จากอำเภอพนสนิมคม จังหวัดชลบุรี โดย ธนัสถา เชียงอุทัย (2549) ซึ่งเป็นยีสต์ที่ทนร้อนที่สามารถเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 40 องศาเซลเซียส มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีบนอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน และโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน ในปี 2008 Thaniyavarn และคณะ รายงานว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *Pichia anomala* PY1 ที่ใช้น้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถลดแรงตึงผิวได้ดีที่สุด 28-30 มิลลิวัตตันต่อเมตร ค่าการกระจายน้ำมัน 7.07 ตารางเซนติเมตร ค่าความเข้มข้นวิกฤตการเกิดไมเซลล์ (CMC) 180 มิลลิกรัมต่อลิตร และให้ผลผลิต 0.26 กรัมต่อลิตร เป็นสารลดแรงตึงผิวประเภทไกลโคลิพิด และมีมวลโมเลกุลเทียบเคียงกับโซโฟโรลิพิด *Pichia anomala* PY189 เป็นสายพันธุ์ที่ได้จากการกลายพันธุ์ด้วย Ethylmethane sulfonate (EMS) และคัดแยกโดย รัชนา บุญมี (2551) ซึ่งพบว่าสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดี

ในปัจจุบันงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไปใช้มักจะเกี่ยวข้องกับ การบำบัดมลภาวะต่างๆ เช่น การบำบัดพื้นที่ปนเปื้อนน้ำมัน (Mulligan, 2005) อย่างไรก็ตาม สารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังมีคุณสมบัติอีกมากมายที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ เช่น ใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์ (emulsifiers) สารก่อโฟม (foaming) สารทำให้เกิดการละลาย (solubilizers) (Banat และคณะ, 2000) และสารต้านจุลินทรีย์ (Singh และ Cameotra, 2004) นอกจากนี้ความต้องการที่เพิ่มขึ้นของผู้บริโภคในการลดการใช้สารเคมีและหันมาใช้สารที่ได้จากธรรมชาติแทนเพื่อใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารและสารปรุงแต่ง (Shepherd และคณะ, 1995) ทำให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้น บทบาทที่สำคัญของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอุตสาหกรรมอาหาร คือการใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifier) ซึ่งเป็นสารที่ทำให้ น้ำ และน้ำมัน หรือไขมันรวมตัวกันเป็นเนื้อเดียว โดยอาหารที่ต้องใช้อิมัลซิไฟเออร์ ได้แก่ ไอศกรีม มายองเนส น้ำสลัด และมาร์การีน เป็นต้น สารลดแรงตึงผิวจะทำให้เกิดอิมัลชัน (emulsion) ซึ่งเป็นระบบที่มีสองวัฏภาค (phase) คือ น้ำ และ น้ำมัน โดยอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ จะมีลักษณะอนุภาคซึ่งมีการจัดเรียงโมเลกุลของสารก่ออิมัลชันภายในอนุภาคจะเป็นน้ำมัน ส่วนตัวกลางที่ล้อมรอบอยู่จะเป็นน้ำ อิมัลชันชนิดนี้จะใช้สำหรับเพิ่มการละลายของสารที่ละลายน้ำได้น้อย นอกจากนี้ยังช่วยปรับปรุงเนื้อสัมผัสและความเป็นเนื้อเดียวกันของผลิตภัณฑ์อาหารอีกด้วย

ปัญหาการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในอาหารยังคงเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขที่สำคัญ ในปัจจุบันอาหารพร้อมรับประทานที่สามารถนำมาบริโภคได้ทันทีกำลังเป็นที่นิยมอย่างกว้างขวาง ทั้งนี้เพื่อตอบสนองต่อการใช้ชีวิตที่เร่งรีบ น้ำสลัดชนิดข้น จัดเป็นผลิตภัณฑ์พร้อมรับประทานที่ไม่ได้ผ่านขั้นตอนการฆ่าเชื้อ ทั้งนี้เพราะผู้บริโภคมีความต้องการในการบริโภคอาหารที่มีรสชาติ และเนื้อสัมผัสใกล้เคียงกับของสด พร้อมทั้งยังคงคุณค่าของสารอาหารต่างๆ ในการแปรรูปอาหาร

จึงหลีกเลี่ยงการให้ความร้อนสูง เนื่องจากมีผลเสียต่อคุณค่าของสารอาหารและลักษณะเนื้อสัมผัส ดังนั้นการวางจำหน่ายน้ำสลัดชนิดชั้นในสถานที่ที่ไม่ได้มีการปรับอากาศ จุลินทรีย์ทุกชนิดสามารถเจริญเติบโตได้รวมทั้งจุลินทรีย์ก่อโรคส่งผลให้เกิดความเสี่ยงต่อผู้บริโภคเพราะน้ำสลัดมีสารอาหารและความชื้นที่เหมาะสมต่อจุลินทรีย์หลายชนิดรวมถึงยีสต์ รา แลคโตบาซิลลัสและโคลิฟอร์มหลายชนิดสามารถเจริญได้ ดังนั้นต้องมีวิธีอื่นร่วมในการป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียและจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในอาหาร ซึ่งในปัจจุบันกระแสการบริโภคของโลกกำลังเปลี่ยนไปหาผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพและให้ความสำคัญกับสารที่ได้จากธรรมชาติ ดังนั้นการนำสารที่ได้จากธรรมชาติมาประยุกต์ใช้ในการแก้ปัญหาการปนเปื้อนของจุลินทรีย์นั้น น่าจะเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่ดี

น้ำมันหอมระเหย (essential oil) เป็นน้ำมันที่พืชสร้างขึ้น และสามารถสกัดนำมาใช้ได้ มักมีกลิ่นหอม และมีการรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย รวมทั้งฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่มีขอบข่ายการออกฤทธิ์กว้าง (Burt, 2004) จึงมีความเป็นไปได้อย่างยิ่งที่จะนำน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากพืชสมุนไพร เช่น ตะไคร้ มะกรูด โหระพา กะเพรา และข่า ซึ่งเป็นส่วนประกอบของอาหารมาใช้ในการควบคุมการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหาร

เทคโนโลยีการผลิตไมโครแคปซูล เป็นเทคนิคที่ได้รับความสนใจโดยนักเทคโนโลยีทางอาหารนิยมใช้เคลือบหุ้มส่วนผสมของอาหารที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาไว้ภายในแคปซูล หรืออนุภาคขนาดเล็กเพื่อประโยชน์ในการถนอมรักษาและสามารถควบคุมการปลดปล่อยของส่วนผสมนั้นให้ออกมาภายใต้สภาวะที่กำหนดไว้ (Todd, 1970) จากแนวคิดนี้ สามารถนำการผลิตไมโครแคปซูลมาใช้เพื่อความคงตัวของอิมัลชันน้ำมันตะไคร้ด้วยการนำน้ำมันตะไคร้มาผลิตไมโครแคปซูลโดยวิธีการอบแห้งแบบพ่นกระจาย ซึ่งใช้วัสดุเคลือบคือ มอลโตเดกซ์ตริน เนื่องจากราคาถูก มีกลิ่นอ่อน มีความสามารถในการละลายน้ำได้สูง (มากกว่าร้อยละ 75) และมีค่าความหนืดของสารละลายต่ำ (Turchiuli และคณะ, 2004) เทคนิคการอบแห้งแบบพ่นกระจาย (Spray drying) นั้นเป็นวิธีหนึ่งที่ได้รับคามนิยมสูงในการผลิตไมโครแคปซูล โดยเทคนิคนี้เป็นการฉีดพ่นสารในรูปแบบของอิมัลชัน โดยใช้สารลดแรงตึงผิวเป็นตัวก่ออิมัลชัน เช่น Tween 20

ในงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Pichia anomala* PY189 ในระดับขวดเขย่าและปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการผลิต เพื่อนำไปเตรียมไมโครแคปซูลบรรจุอิมัลชันน้ำมันตะไคร้ โดยใช้สารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้เป็นตัวก่ออิมัลชัน พร้อมทั้งวิเคราะห์ประสิทธิภาพของการห่อหุ้มและฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของไมโครแคปซูลที่ผลิตขึ้น

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Pichia anomala* PY189 ในระดับขวดเขย่า และปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการผลิต เพื่อนำไปเตรียมไมโครแคปซูลบรรจุอิมัลชันน้ำมันตะไคร้ โดยใช้สารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้เป็นตัวก่ออิมัลชัน พร้อมวิเคราะห์ประสิทธิภาพของและฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของไมโครแคปซูลที่ผลิตขึ้น

ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. หาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Pichia anomala* PY 189
2. ศึกษาลักษณะและคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้
3. ศึกษาความคงตัวของอิมัลชันน้ำมันตะไคร้ในสารละลายมอลโตเดกซ์ตรินโดยใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้เป็นตัวก่ออิมัลชัน
4. ศึกษาสัดส่วนของน้ำมันตะไคร้ต่อมอลโตเดกซ์ตรินที่มีผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพของไมโครแคปซูลบรรจุอิมัลชันน้ำมันตะไคร้
5. ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของไมโครแคปซูลบรรจุอิมัลชันน้ำมันตะไคร้
6. ประเมินฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของน้ำสลัดที่เติมไมโครแคปซูลบรรจุอิมัลชันน้ำมันตะไคร้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในภาวะที่เหมาะสมจากเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย *Pichia anomala* PY189 และได้ไมโครแคปซูลบรรจุอิมัลชันน้ำมันตะไคร้โดยใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้เป็นสารก่ออิมัลชัน

บทที่ 2

ปริทรรศน์วรรณกรรม

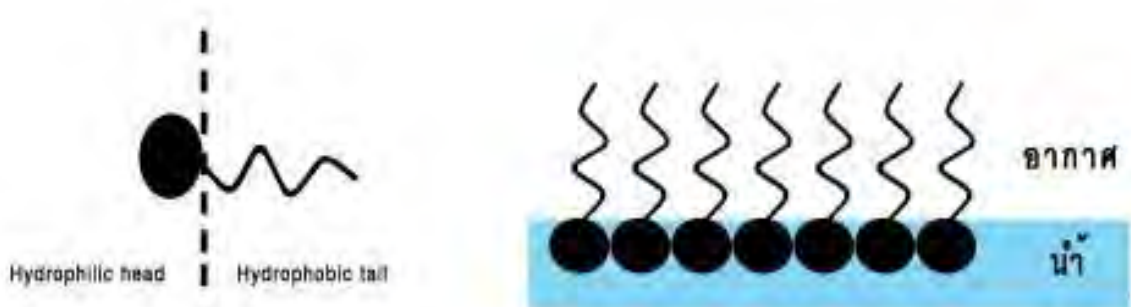
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactant)

ในปัจจุบันผู้บริโภคมีความสนใจเกี่ยวกับสุขภาพ และมีความต้องการสารอาหารที่เป็นสารจากธรรมชาติเพิ่มมากขึ้น สารธรรมชาติต่างๆเหล่านี้จึงทวีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหารมากขึ้นกว่าสารสังเคราะห์ทางเคมี สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นสารชีวโมเลกุลที่สามารถก่ออิมัลชันได้ดี สร้างได้จากแบคทีเรีย รา และยีสต์บางชนิด โครงสร้างหลากหลาย ทำให้มีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน และยังมีคุณสมบัติที่ดี ทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่มีความเป็นกรด - ด่าง และอุณหภูมิสูง เป็นผลให้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้หลายประเภท เช่น อาหาร ยา เครื่องสำอาง และปิโตรเคมี นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นสารที่ย่อยสลายได้ ในธรรมชาติ มีความเป็นพิษต่ำ จึงมีความเป็นไปได้สูงที่จะทำการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากจุลินทรีย์เพื่อมาใช้ในการ พัฒนาระบบการผลิตอาหาร เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพดี และมีความปลอดภัยสูง

2.1 ความหมายและความสำคัญของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ หมายถึง สารชีวโมเลกุลที่มีคุณสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิว (surface active compound) สร้างโดยสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ และรา (Lu และคณะ ,2007) โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีโครงสร้างเป็นแบบแอมฟิฟิลิค (amphiphilic compound) ซึ่งประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic group) ส่วนใหญ่เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนและกรดไขมัน ซึ่งเป็นได้ทั้งกรดไขมันชนิดอิ่มตัว (saturated fatty acid) และไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) และส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic group) ส่วนใหญ่ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน เปปไทด์ ฟอสเฟต กรดคาร์บอกซิลิก หรือ แอลกอฮอล์ เป็นต้น (Pattanathu และคณะ, 2008) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจึงมีทั้งขนาดและโครงสร้างที่หลากหลาย ส่งผลให้มีประสิทธิภาพแตกต่างกันออกไป (Muthusamy และคณะ , 2008) แสดงโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิว ดังรูปที่ 2.1 เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีโครงสร้างที่เป็นแบบแอมฟิฟิลิค ทำให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีสมบัติที่สำคัญ คือ ช่วยลดแรงตึงผิวระหว่างวัฏภาคสองชนิด (Interfacial tension) โดยโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวจะไปสะสมระหว่างผิวสัมผัส ได้แก่ ผิวสัมผัสระหว่างของเหลวด้วยกัน ผิวสัมผัสระหว่างของเหลวกับแก๊ส หรือระหว่างของแข็งกับของเหลว เมื่อสารลดแรงตึงผิวชีวภาพละลายในสารที่มีขั้ว เช่น น้ำ โมเลกุลจะเกิดการรวมตัวเป็นกลุ่ม โดยหันส่วนที่ไม่มีขั้วเข้าหากันด้านใน และหันส่วนที่มีขั้วออกด้านนอกเพื่อ

ยึดกับโมเลกุลของน้ำ เกิดเป็นโครงสร้างไมเซลล์ (micelle) โดยโมเลกุลจะกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอบนผิวหน้าของน้ำทำให้สามารถลดแรงตึงผิวของน้ำได้ดังแสดงในรูป 2.2

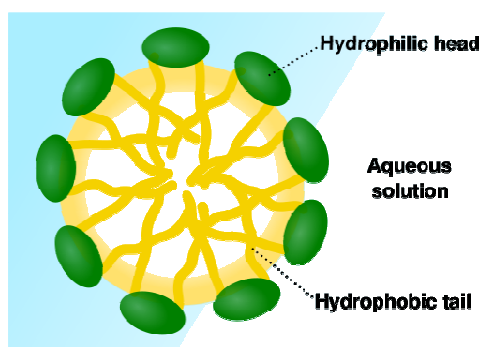


รูปที่ 2.1 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิว

รูปที่ 2.2 การกระจายตัวของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิว

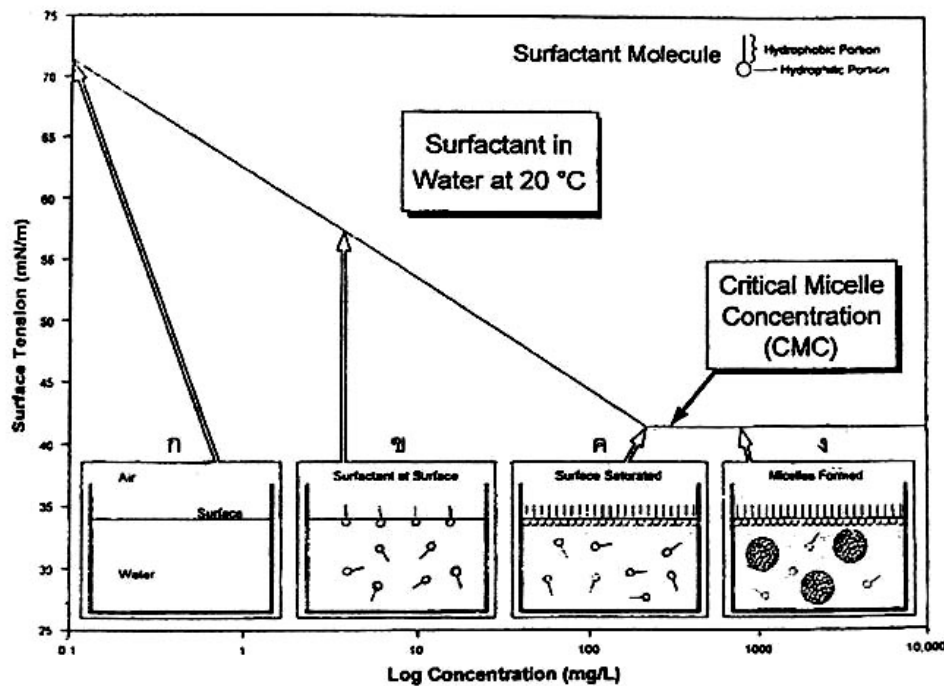
ที่มา: <http://www.gov.mu/portal/sites/ncb/eurd/oil/noscp1/strategy.htm>

เมื่อสารลดแรงตึงผิวละลายอยู่ในสารละลาย ค่าแรงตึงผิวของสารละลายนั้นจะมีค่าลดลง เช่น น้ำกลั่นมีค่าแรงตึงผิว 72 mN/m เมื่อเติมสารลดแรงตึงผิวลงไป ค่าแรงตึงผิวจะลดลงเหลือ 30 mN/m สารลดแรงตึงผิวนี้จะไปมีบทบาทในการลดแรงตึงผิวระหว่างน้ำกับอากาศ โดยเมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ ค่าแรงตึงผิวจะลดลงจนกระทั่งสารลดแรงตึงผิวมีความเข้มข้นสูงจนไม่สามารถแทรกตัวระหว่างผิวสัมผัสของสองวัฏภาคได้อีก โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวส่วนเกินจะจัดเรียงตัวเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า ไมเซลล์ (micelle) ดังรูปที่ 2.3 ซึ่งความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวน้อยที่สุดที่ทำให้เกิดการรวมตัวเป็นโครงสร้างไมเซลล์ เรียกว่า ความเข้มข้นวิกฤตการเกิดไมเซลล์ (critical micelle concentration, CMC) และหากเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวอีก ค่าแรงตึงผิวของสารละลายก็จะไม่มีการเปลี่ยนแปลง ดังแสดงในรูปที่ 2.4 ซึ่งค่า CMC นี้เป็นค่าที่บ่งชี้ถึงความสามารถการละลายของสารลดแรงตึงผิว และยังบอกถึงประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชนิดนั้นๆ ได้ โครงสร้างไมเซลล์ประกอบด้วยโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิว 20-200 โมเลกุล (Desai และ Banat, 1997)



รูปที่ 2.3 โครงสร้างไมเซลล์

ที่มา : http://web.njit.edu/mitra/green_chemistry/

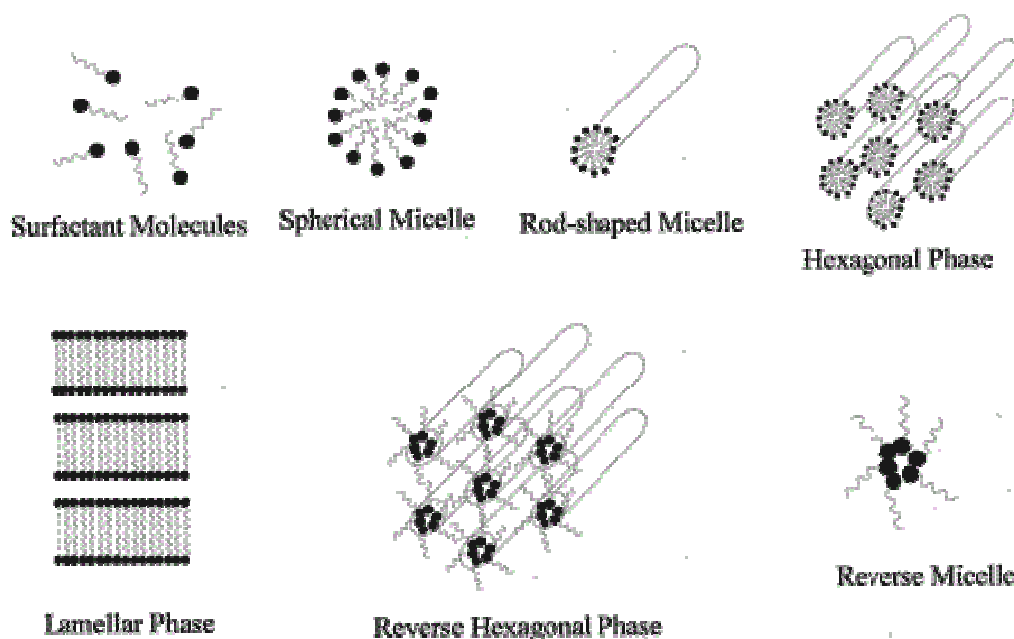


รูปที่ 2.4 การเกิดโครงสร้างไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในน้ำ

ที่มา : <http://www.kruss.de/en/theory/measurements/surface-tension>

(ก) ภาวะที่ไม่มีสารลดแรงตึงผิว (ข) สารลดแรงตึงผิวละลายอยู่ในน้ำโดยหันส่วนที่ไม่ชอบน้ำออกสู่ผิวน้ำ (ค) โมเลกุลสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มมากขึ้นจนเต็มผิวสัมผัสของสองวัฏภาค เริ่มเกิดโครงสร้างไมเซลล์ ความเข้มข้น ณ จุดนี้เรียกว่า CMC และ (ง) เมื่อเกิดเป็นโครงสร้างไมเซลล์ ค่าแรงตึงผิวจะมีค่าคงที่ไม่ลดลงอีกแม้ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะเพิ่มขึ้นก็ตาม (Gillman, 1993)

นอกจากนี้การจัดเรียงตัวของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวสามารถเกิดเป็นไมเซลล์ได้หลายรูปแบบ เช่น ไมเซลล์ทรงกลม ไมเซลล์ทรงกระบอก ไมเซลล์แบบลามลาร์ เป็นต้น (รูป 2.5) ลักษณะการจัดเรียงตัวนั้นจะแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ แรงดูดหรือแรงผลักจากพันธะไฮโดรเจนในโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิว โดยอัตราของการรวมตัวเป็นไมเซลล์จะขึ้นกับค่าความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ และความแรงของประจุ (ionic strength)



รูปที่ 2.5 โครงสร้างและการจัดเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแบบต่างๆ

ที่มา: Lawrence และ Rees (2007)

สารลดแรงตึงผิวสามารถลดแรงตึงผิวของน้ำเพื่อให้เกิดกระบวนการต่างๆ ง่ายขึ้น เช่น การเกิดฟอง การทำให้เปียก และกระบวนการทำความสะอาด งานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้นั้นมีโครงสร้างที่หลากหลายแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ รวมทั้งสภาวะต่างๆที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ ทำให้สามารถนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไปประยุกต์ใช้งานได้อย่างกว้างขวาง

2.2 ชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

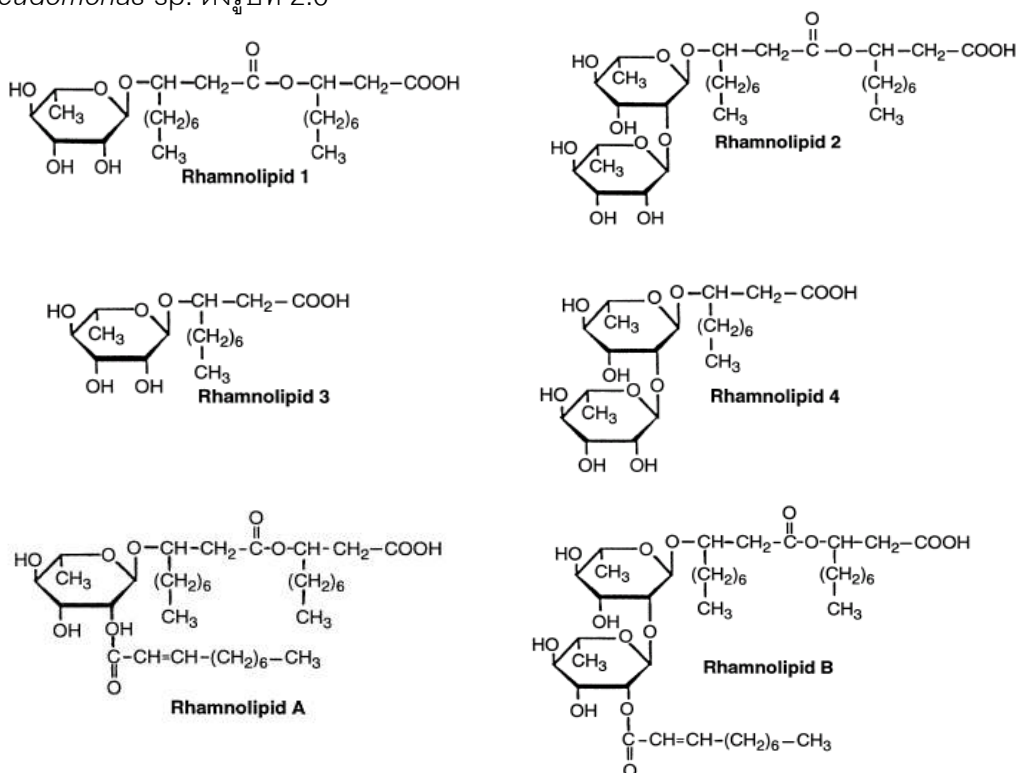
การจำแนกชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ตามโครงสร้างทางเคมี สามารถแบ่งได้ 6 กลุ่ม (Desai และ Banat, 1997) ได้แก่

1. ไกลโคลิพิด (glycolipid)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดไกลโคลิพิด โครงสร้างประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต เช่น กลูโคส แมนโนส แรมโนส เชื่อมต่อกับไขมัน เช่น long-chain aliphatic acids หรือ hydroxyaliphatic acids ด้วยหมู่อีเทอร์ (ether) หรือ เอสเทอร์ (ester) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่จัดเป็นไกลโคลิพิด ได้แก่ แรมโนลิพิด (rhamnolipid) ทรีฮาโลลิพิด (trehalolipid) โซโฟโรลิพิด (sophorolipid) (Karanth และคณะ, 1999)

1.1 แรมโนลิพิด (rhamnolipid)

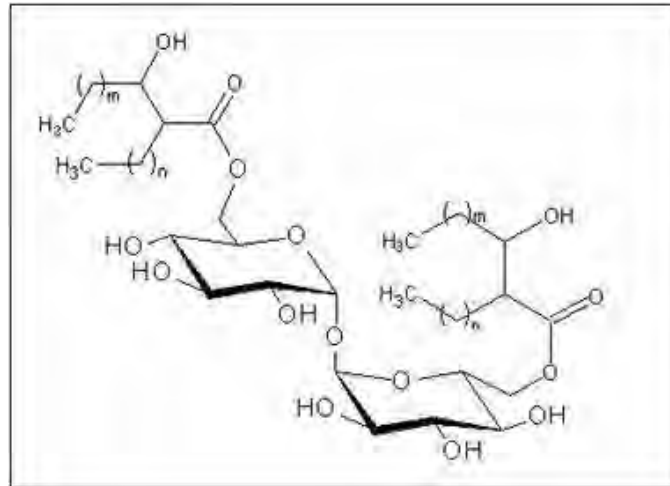
โครงสร้างของแรมโนลิพิดประกอบด้วยน้ำตาลแรมโนส 1 หรือ 2 โมเลกุลเชื่อมต่อกับ β -hydroxydecanoic acid 1 หรือ 2 โมเลกุลด้วยพันธะไกลโคซิดิก แรมโนลิพิดมีสูตรโครงสร้างต่างกัน 6 แบบแตกต่างกันขึ้นอยู่กับจำนวนแรมโนส และส่วนของ β -hydroxydecanoic acid แรมโนลิพิดเป็นไกลโคลิพิดที่มีการศึกษาวิจัยมากที่สุด มักผลิตได้โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ *Pseudomonas* sp. ดังรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 โครงสร้างของแรมโนลิพิด ชนิด R1, R2, R3, R4, A และ B ที่ผลิตโดย *Pseudomonas aeruginosa* (Lang และ Wullbrandt, 1999)

1.2 ทรีฮาโลลิพิด (trehalolipid)

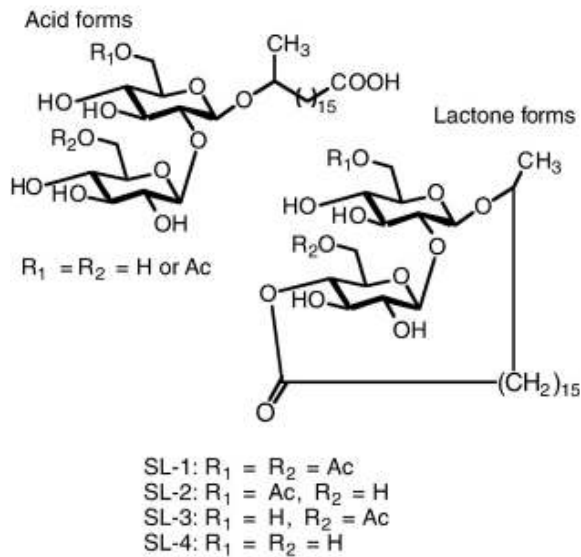
โครงสร้างของทรีฮาโลลิพิดประกอบด้วยน้ำตาลไดแซคคาไรด์ ทรีฮาโลส เชื่อมต่อกับสายยาวของ mycolic acid (α -branched- β -hydroxy fatty acid) ที่ตำแหน่ง C-6 และ C-6' สามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter* และ *Corynebacterium* ซึ่งสารที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ต่างชนิดกันจะมีขนาดและโครงสร้างของ mycolic acid แตกต่างกันไปตามจำนวนอะตอมของคาร์บอนและความไม่อิ่มตัว



รูปที่ 2.7 โครงสร้างของ nonionic trehalose-dicorynomycolates จาก *Rhodococcus erythropolis* DSM 43215 $n + m = 27$ ถึง 30 (Rapp และคณะ, 1979)

1.3 โซโฟโรลิพิด (sophorolipid)

โครงสร้างของโซโฟโรลิพิดประกอบด้วยน้ำตาลโซโฟโรส ซึ่งเป็นไดเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสต่อกันด้วยพันธะ β -1,2 เชื่อมต่อกับสายยาวของ hydroxyl fatty acid ซึ่งส่วนใหญ่เป็นคาร์บอน 16-18 อะตอม ด้วยพันธะปีตา-ไกลโคซิดิก (Asmer และคณะ, 1988) โซโฟโรลิพิดส่วนใหญ่ผลิตได้จากยีสต์ที่ไม่ก่อโรค เช่น *Torulopsis bombicola*, *Centrolene petrophilum*, *Candida apicola*, *C. batistae*, *Rhodotorula bogoriensis* เป็นต้น โครงสร้างของโซโฟโรลิพิดแบ่งได้เป็น 2 ลักษณะ แสดงในรูป 2.8 คือ acidic form มีลักษณะคือปลายสายของ hydroxyl fatty acid เป็นปลายเปิด มีสมบัติในการทำให้เกิดฟองและการละลายดี ส่วน lactonic form ที่ปลายสายของ hydroxyl fatty acid จะเชื่อมเป็นวงกับน้ำตาลโซโฟโรสด้วยพันธะเอสเทอร์ โดยทั่วไปโซโฟโรลิพิดจะมีสมบัติในการลดค่าแรงตึงผิวและแรงตึงระหว่างผิวที่ประจันได้ดี โดยลดค่าแรงตึงผิวของน้ำเป็น 40 mN/m ค่า CMC อยู่ในช่วง 40-100 mg/L มีค่า HLB หลากหลายตามลักษณะโครงสร้าง ทำให้มีการนำไปประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวาง นอกจากนี้ยังมีสมบัติในการก่ออิมัลชัน เป็นสารทำให้เปียก และเป็นสารทำความสะอาดได้ดี (Shete และคณะ, 2006)



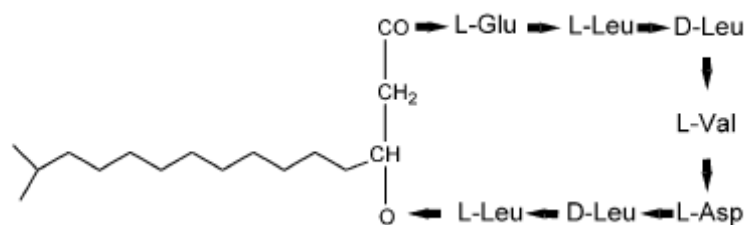
รูปที่ 2.8 โครงสร้าง acidic และ lactonic form ของไซโฟโรลิพิด
 ที่มา: Kitamoto และคณะ, 2009

2. ไลโปเพปไทด์และไลโปโปรตีน (lipopeptide and lipoprotein)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดนี้สามารถผลิตได้จากแบคทีเรียหลายชนิด แต่มีเพียงไม่กี่ชนิดที่ได้มีการศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารลดแรงตึงผิว ซึ่งส่วนมากมีคุณสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะ เช่น กรามิซิดิน (gramicidin) และเซอร์แฟคติน (surfactin) หรือซับทีไลซิน (subtilysin) ซึ่งได้มีการรายงานว่าเป็นไลโปเพปไทด์ที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* และมีคุณสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด มีชื่อเรียกทางเคมีว่า เซอร์แฟคติน (surfactin) หรือ ซับทีไลซิน (subtilysin) (Arima และคณะ, 1968; Bemheimer และ Avigad, 1970)

2.1 เซอร์แฟคติน (surfactin)

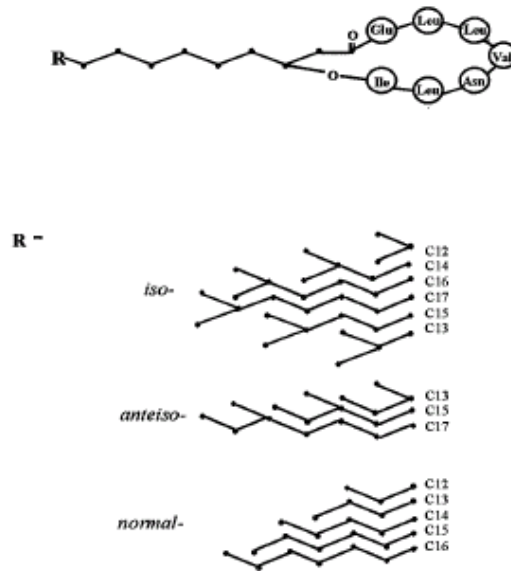
โครงสร้างของเซอร์แฟคตินประกอบด้วย กรดอะมิโน 7 โมเลกุลเชื่อมต่อกับหมู่คาร์บอกซิลหมู่ไฮดรอกซิลของ β -hydroxyl fatty acid เป็นวง ด้วยพันธะโควาเลนต์



รูปที่ 2.9 โครงสร้างของเซอร์แฟคติน ผลิตได้จาก *Bacillus subtilis*
 ที่มา: Lang (2002)

2.2 ไลเคโนซิน เอ (lichenysin A)

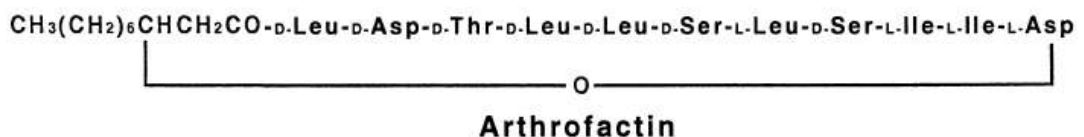
โครงสร้างของไลเคโนซินเอคล้ายกับเซอร์แฟกติน (รูปที่ 2.10) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดนี้มีสมบัติที่ดีแม้อยู่ในสถานะที่ไม่เหมาะสม เช่น สถานะที่มีความเค็ม ความเป็นกรดต่ำ และอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม ผลิตได้จาก *Bacillus licheniformis*



รูปที่ 2.10 โครงสร้างของ lichenysin A
ที่มา: Yakimov และคณะ (1995)

2.3 อาร์โทรแฟกติน (arthrofactin)

โครงสร้างของอาร์โทรแฟกติน (รูปที่ 2.11) ที่ผลิตโดย *Pseudomonas* sp. MIS 38 ประกอบด้วย 3- hydroxydecanosyl-D-leucyl-D-asparagyl-D-threonyl-D-leucyl-D-leucyl-D-seryl-L-leucyl-D-seryl-L-isoleucyl-L-isoleucyl-L-asparagyl lactone ซึ่งมีประสิทธิภาพดีกว่าเซอร์แฟกติน 5-7 เท่า มีค่า CMC 1.0×10^{-5} M สามารถลดแรงตึงผิวได้ดีที่สุด 24mN/m และมีค่าการกระจายตัวของน้ำมันดีกว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมี



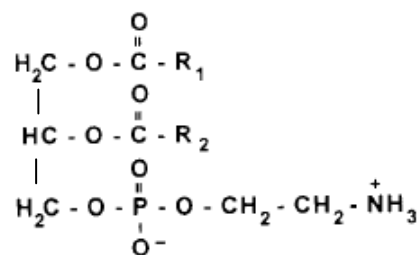
รูปที่ 2.11 โครงสร้างอาร์โทรแฟกติน จาก *Pseudomonas* sp. MIS38
ที่มา: Roongsawang และคณะ (2003)

3. กรดไขมันและไขมัน (fatty acid and neutral lipid)

กรดไขมันและไขมันสามารถผลิตได้ในแบคทีเรียและยีสต์หลายชนิด และหลั่งออกนอกเซลล์เป็นปริมาณมาก เมื่อเจริญในอาหารที่มี n-alkanes ซึ่งกรดไขมันที่ผลิตออกมาจะมีความซับซ้อน คือ มีหมู่ไฮดรอกซิลและสายอัลคิลเป็นส่วนประกอบ เช่น กรดโครีโนมายโคลิก (corynomycolic acid) จาก *Corynebacterium lepus* ที่ความเข้มข้นของสารละลายกรดโครีโนมายโคลิก 0.5 กรัมต่อลิตร สามารถลดค่าแรงตึงผิวเหลือ 40 mN/m และค่าแรงตึงระหว่างผิวที่ประจันต่อเฮกซาเดคเคนได้ 10 mN/m และรูบิเวททิน อาร์ 1 (rubiwettin R1) ที่ผลิตจาก *Serratia rubidaea* ATCC27593 เป็นลิพิดชนิด β -hydroxy fatty acid มีจำนวนคาร์บอน 10 อะตอม เชื่อมต่อกับ β -hydroxy fatty acid ที่มีจำนวนคาร์บอน 12 14 หรือ 16 อะตอมด้วยพันธะเอสเทอร์ (Matsuyama และคณะ, 1990)

4. ฟอสโฟลิพิด (phospholipid)

ฟอสโฟลิพิดเป็นส่วนประกอบหลักของเยื่อหุ้มในจุลินทรีย์ โครงสร้างประกอบด้วยกลีเซอรอลเชื่อมต่อกับกรดไขมัน 2 หมู่ และฟอสเฟต 1 หมู่ ซึ่งแบคทีเรีย และยีสต์ที่ย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ จะสามารถสร้างกรดไขมัน และฟอสโฟลิพิดระหว่างการเจริญในภาวะที่มีอัลเคนเป็นสารตั้งต้น โดยกรดไขมันและฟอสโฟลิพิดเหล่านี้มีสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิว (Cirigliano และ Carman, 1985) โดยฟอสโฟลิพิดที่ผลิตได้จะแตกต่างกันไปขึ้นกับสารตั้งต้นที่ใช้ในการเลี้ยงจุลินทรีย์ ตัวอย่างเช่น *Acinetobacter* sp. สายพันธุ์ H01-N และ *Rhodococcus erythropolis* เมื่อเจริญในอาหารที่มีเฮกซาเดคเคน จะสามารถผลิตฟอสโฟลิพิด ชนิด phosphatidylethanolamine (รูปที่ 2.12) มีสมบัติในการลดแรงตึงระหว่างผิวที่ประจันของน้ำกับเฮกซาเดคเคนได้ต่ำกว่า 1 mN/m และมีค่า CMC 30 mg/L (Kretschner และคณะ, 1982) นอกจากนี้ยังมีจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่สามารถผลิตฟอสโฟลิพิดชนิดต่างๆ ได้ เช่น *Corynebacterium lepus*, *Corynebacterium alkanolyticum*, *Candida tropicalis*, *Micrococcus cerificans* เป็นต้น (Cooper และ Zajic, 1980)



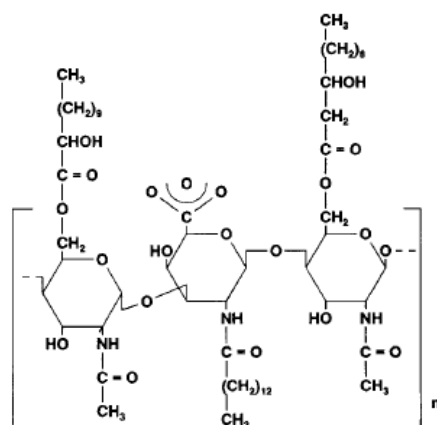
รูปที่ 2.12 โครงสร้างของ phosphatidylethanolamine จาก *Acinetobacter* sp.

R₁ และ R₂ คือสายไฮโดรคาร์บอนของกรดไขมัน ที่มา: Desai และ Banat (1997)

5. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดพอลิเมอร์ (polymeric biosurfactants)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดพอลิเมอร์ที่รู้จักโดยทั่วไปคือ อิมัลชัน (emulsan) ไลโปแซน (liposan) และสารประกอบเชิงซ้อนของพอลิแซคคาไรด์กับโปรตีนชนิดอื่นๆ Rosenberg และคณะ(1999) รายงานว่า *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 ผลิต polyanionic amphipathic heteropolysaccharide bioemulsifier หรือที่เรียกว่า อิมัลชัน สูตรโครงสร้างแสดงในรูปที่ 2.13 โดยมีโครงสร้างสายหลักเป็นเฮเทอโรพอลิแซคคาไรด์ (heteropolysaccharide) ประกอบด้วยไตรแซคคาไรด์ของ N-acetyl-D-galactosamine, N-acetylgalactosamine uronic acid และ unidentified N-acetyl amino sugar เชื่อมต่อกับกรดไขมันด้วยพันธะ O-ester อิมัลชันสามารถก่ออิมัลชันระหว่างสารประกอบไฮโดรคาร์บอนกับน้ำได้ที่ความเข้มข้นเพียง 0.001-0.01 เปอร์เซ็นต์

ส่วนไลโปแซนสามารถผลิตได้จาก *Candida lipolytica* ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต 83 เปอร์เซ็นต์ และโปรตีน 17 เปอร์เซ็นต์ โดยส่วนของคาร์โบไฮเดรตเป็น heteropolysaccharide ที่ประกอบด้วยกลูโคส กาแลคโตส กาแลคโตซามีน และกรดกาแลคทูโรนิก (galacturonic acid)



รูปที่ 2.13 โครงสร้างของอิมัลชัน (emulsan) จาก *Acinebactor calcoaceticus*

ที่มา: Desai และ Banat (1997)

6. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดอนุภาค (particulate biosurfactants)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดอนุภาคเป็นส่วนของ extracellular membrane vesicle ที่สามารถรวมตัวกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเป็น microemulsion ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อจุลินทรีย์ในการนำอัลเคนเข้าสู่เซลล์ ตัวอย่างเช่น *Acinetobacter* sp. สายพันธุ์ HO1-N สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดอนุภาคขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 20-50 เซนติเมตร และมีความหนาแน่นการลอยตัว 1.158 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนี้ประกอบด้วย

โปรตีน ฟอสโฟลิพิด และไลโปพอลิแซคคาไรด์ โดยมี membrane vesicle เหมือนกับ outer membrane ของจุลินทรีย์ที่ผลิตขึ้น (Desai และ Banat, 1997)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยทั่วไปจะมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 500-1500 ดาลตัน จึงทำให้สามารถจำแนกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ตามน้ำหนักโมเลกุลได้เป็น 2 ชนิด คือ (Van Hamme และคณะ, 2006)

1. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (high molecular weight biosurfactant) ได้แก่ โพลีแซคคาไรด์ที่มีโครงสร้างแบบแอมฟิฟิลิก โปรตีน ไลโปโพลีแซคคาไรด์ และไลโปโปรตีน มีชื่อเรียกอีกอย่างว่า ไบโอมัลแซน (bioemulsan) หรือ ไบโอมัลซิไฟเออร์ (bioemulsifier) สารที่อยู่ในกลุ่มนี้มีความสามารถในการเพิ่มความเสถียรของอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ แต่ไม่มีประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิว

2. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (low molecular weight biosurfactant) ได้แก่ โกลโคลิพิด โกลโคเปปไทด์ ซึ่งสารในกลุ่มนี้จะมีประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวและแรงตึงระหว่างผิวที่ประจันได้ดี

ในปัจจุบันหลายประเทศได้มีการรณรงค์ให้ใช้สารที่มาจากธรรมชาติทดแทนการใช้ผลิตภัณฑ์ที่มาจากสารเคมี ทั้งนี้เพื่อลดปัญหามลพิษในด้านต่างๆที่เกิดขึ้น ดังนั้นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการใช้ทดแทนสารลดแรงตึงผิวที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี ทั้งนี้เพราะสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถย่อยสลายได้ง่ายในธรรมชาติ (Mohan และคณะ, ปี 2006) มีความเป็นพิษต่ำ ทนทานต่อสภาวะที่มีความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิสูง ก่ออิมัลชันได้ดี สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Nitschke และ Costa, 2007) มีโครงสร้างที่หลากหลาย ทำให้มีคุณสมบัติใหม่ๆ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท

ตารางที่ 2.1 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ (Desai และ Banat, 1997; Kitamoto และคณะ, 2009)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	จุลินทรีย์	Surface tension (mN/m)	CMC	Interfacial tension (mN/m)
Glycolipid				
Rhamnolipid	<i>P. aeruginosa</i>	29	-	0.25
	<i>Pseudomonas</i> sp.	25-30	0.1-10	1
Trehalolipid	<i>R. erythropolis</i>	32-36	4	14-17
	<i>N. erythropolis</i>	30	20	3.5
	<i>Mycobacterium</i> sp	38	0.3	15
Succinoyl-trehalose lipid	<i>R. erythropolis.</i>			
Sophorolipid	<i>C. bombicola</i>	33	-	1.8
	<i>C. apicola</i>	30	-	0.9
	<i>C. batistae</i>	39.3	138	-
Mannosylerythritol lipid	<i>P. antarctica</i>	28.2	-	2.4
	<i>P. crassa</i>	26.5	-	-
	<i>P. siamensis</i>	30.7	-	-
	<i>P. shanxiensis</i>	-	-	-
	<i>P. hubeiensis</i>	30.7	-	-
Cellobiose lipid	<i>U. cynodontis</i>	-	-	-
	<i>U. maydis</i>	-	-	-
	<i>U. zeac</i>	-	-	-
Lipopeptides and lipoproteins				
Peptide-lipid	<i>B. licheniformis</i>	-	-	-
Serrawettin	<i>S. marcescens</i>	27	12-20	0.1-0.3
Viscosin	<i>P. fluorescens</i>	28-33	-	-
Surfactin	<i>B. subtilis</i>	26.5	150	-
Subtilisin	<i>B. subtilis</i>	27-32	123-160	1

ตารางที่ 2.1 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ (Desai และ Banat, 1997; Kitamoto และคณะ 2009 ,) ต่อ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	จุลินทรีย์	Surface tension (mN/m)	CMC	Interfacial tension (mN/m)
Fatty acid, neutral lipids, and phospholipids				
Fatty acids	<i>C. lepus</i>	30	150	2
Neutral lipids	<i>N. erythropolis</i>	32	-	3
Phospholipids	<i>T. thiooxidans</i>	-	-	-
Corynomycolic acid	<i>C. insidibasseosum</i>	-	-	-
Polymeric surfactants				
Emulsan	<i>A. calcoaceticus</i>	-	-	-
Biodispersan	<i>A. calcoaceticus</i>	-	-	-
Mannan-lipid-protein	<i>C. tropicalis</i>	-	-	-
Liposan	<i>C. lipolytica</i>	-	-	-
Carbohydrate-protein-lipid	<i>P. fluorescens</i>	27	10	-
	<i>D. polymorphis</i>	-	-	-
Alasan	<i>A. radioresistens</i>	-	-	-
Particulate biosurfactants				
Vesicles and fimbriae	<i>A. calcoaceticus</i>	-	-	-
Whole cells	Variety of bacteria	-	-	-

2.3 สมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ในปัจจุบันสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้รับความสนใจในการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ มากขึ้น เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีสมบัติที่ดี เมื่อเปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์จากทางเคมีหลายประการ ดังนี้

1. มีประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวและแรงตึงระหว่างผิวที่ประจันได้ดี

สารลดแรงตึงผิวที่มีประสิทธิภาพดี ต้องมีสมบัติในการลดแรงตึงผิวของน้ำจาก 72 mN/m ให้เหลือ 35 mN/m และลดแรงตึงระหว่างผิวที่ประจันของน้ำกับเฮกซะเดคเคนจาก 40 mN/m ให้เหลือ 1 mN/m (Mulligan, 2005) ตัวอย่างเช่น เซอร์แฟคติน ที่ผลิตโดย *B. subtilis* สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด มีสมบัติในการลดแรงตึงผิวของน้ำเหลือเพียง 25 mN/m และลดแรงตึงระหว่างผิวที่ประจันของน้ำกับเฮกซะเดคเคนได้ ต่ำกว่า 1 mN/m นอกจากนี้ โดยทั่วไปสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมีและยังมีค่า CMC ต่ำ 10-40 เท่า นั่นคือสามารถใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพความเข้มข้นน้อยกว่าในการทำให้ค่าแรงตึงผิวลดลงถึงค่าที่น้อยที่สุด

2. มีโครงสร้างหลากหลาย

โครงสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นจะขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์และสารตั้งต้นที่ใช้ผลิตสารนั้น ๆ ทำให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้นั้นมีโครงสร้างและมีสมบัติแตกต่างกันออกไป จึงสามารถเลือกนำไปใช้ได้เหมาะสมกับอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น สารก่อเกิดอิมัลชัน (emulsification) สารแยกเฟส (phase separation) สารเปียก (wetting agent) สารก่อฟอง (foaming agent) สารช่วยเพิ่มการละลาย (solubilization) สารลดการเกิดสนิม (corrosion-inhibition) และสารลดความหนืด (viscosity-reduction) (Kosaric และคณะ, 1993)

3. มีประสิทธิภาพดีแม้ในอุณหภูมิ ความเป็นกรดต่าง และปริมาณไอออนที่ไม่เหมาะสม

ปัจจัยภายนอกต่างๆ เช่น อุณหภูมิและความเป็นกรดต่าง ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จากการศึกษาของ McInerney และคณะ (1990) พบว่า ไลโคโนซิน ที่ผลิตจาก *B. licheniformis* JF-2 ยังคงมีประสิทธิภาพดี แม้อยู่ในอุณหภูมิสูงเกิน 50 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดต่าง 4.5-9 ปริมาณโซเดียมคลอไรด์และแคลเซียมสูงถึง 50 และ 25 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

4. มีความสามารถในการก่ออิมัลชันได้ดี

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดที่มีมวลโมเลกุลสูงสามารถก่อหรือสลายอิมัลชันได้ดี ตัวอย่างเช่น ไลโฟแซน เป็นตัวอิมัลซิไฟเออร์ในน้ำมันที่รับประทานได้ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดโพลีเมอร์ สามารถเคลือบบหยดน้ำมันได้ ทำให้อิมัลชันมีความเสถียร จากสมบัติข้อนี้จึงเหมาะในการนำไปประยุกต์ใช้ในการเกิดอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ สำหรับอุตสาหกรรมเครื่องสำอางและอาหาร (Nitschke และ Costa, 2007)

5. สามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้และมีความเป็นพิษต่ำ

สารลดแรงตึงผิวที่ผลิตจากจุลินทรีย์นั้น สามารถย่อยสลายได้ง่ายทางชีวภาพ (biodegradability) จึงเหมาะสมสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ในสิ่งแวดล้อม ซึ่งต่างจากสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมีที่ย่อยสลายยาก ทำให้เกิดการตกค้างในสิ่งแวดล้อม สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความเป็นพิษต่ำ เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีค่า LC50 สูงกว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ถึงสิบเท่า และเมื่อเปรียบเทียบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *P. aeruginosa* กับ Marlon A-350 ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ที่ใช้ทั่วไปในโรงงาน พบว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์นอกจากจะมีความเป็นพิษสูงกว่า แล้วยังเป็นสารก่อการกลายพันธุ์อีกด้วย (Muthusamy และคณะ, 2008) ดังนั้น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจึงเหมาะสำหรับการนำไปใช้ทางด้านอาหาร ยา และเครื่องสำอาง

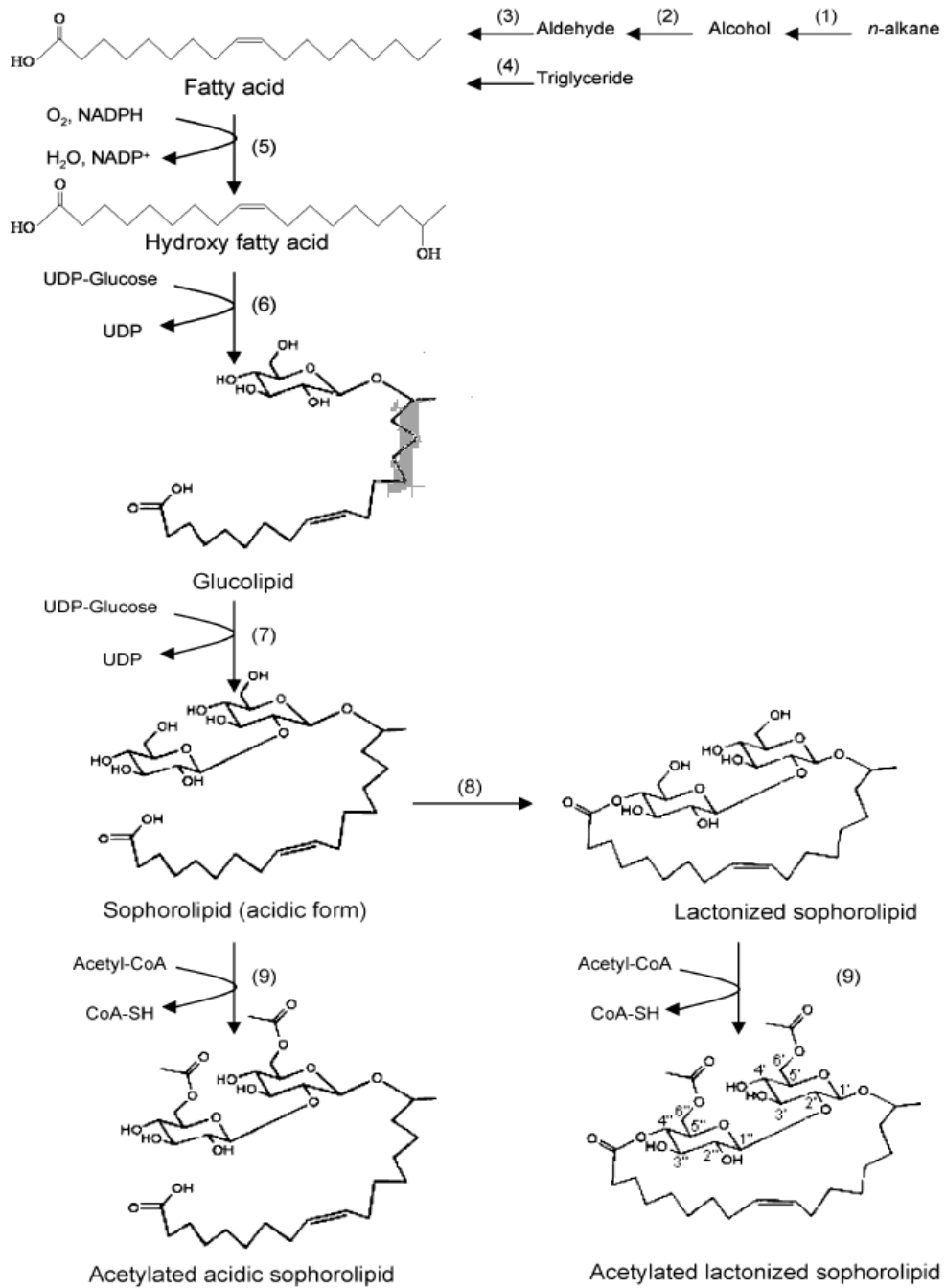
2.4 กระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

การจัดเรียงตัวของผนังเซลล์สิ่งมีชีวิต มีลักษณะเป็นลิพิดไบเลเยอร์ เกิดจากโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเรียงตัวเป็นผนังสองชั้น โดยหันส่วนที่ไม่มีขั้วหรือสายไฮโดรคาร์บอนเข้าหาส่วนที่ไม่มีขั้วเช่นเดียวกัน และหันส่วนที่มีขั้วออกนอกเซลล์ (extracellular) และไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ในเซลล์ จากลักษณะดังกล่าวทำให้การนำแหล่งอาหารคาร์บอนและกระบวนการขนย้าย (transport) ไฮโดรคาร์บอนเข้าสู่เซลล์ทำได้ง่ายขึ้น จากการรวมตัวระหว่างสารประกอบไฮโดรคาร์บอนกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ในการเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารลดแรงตึงผิว หรือจุลินทรีย์ผลิตขึ้นมาเอง ส่งผลให้การละลายและการกระจายตัวของโมเลกุลสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในสารละลายดีขึ้น กรณีที่สารประกอบไฮโดรคาร์บอนมีขนาดใหญ่กว่าขนาดของจุลินทรีย์ จุลินทรีย์จะเกาะล้อมรอบหยดสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยตรงและอาศัยสารลดแรงตึงผิวช่วยในการยึดเกาะ จากนั้นจึงเกิดการขนย้ายสารเข้าไปในเซลล์ โดยอาศัยการกระจายตัวของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนรวมตัวกับโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวในรูปของไมเซลล์ ทำให้

สามารถขนย้ายผ่านผนังเซลล์ได้ (Sekelsky และ Shreve, 1999 และ Al-Tahhan และคณะ, 2000)

แหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน ย่อมมีลักษณะการนำไปใช้ของจุลินทรีย์แตกต่างกัน สำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นนิยมใช้ทั้งแหล่งคาร์บอนชนิดที่ละลายน้ำ และไม่ละลายน้ำ เป็นสารตั้งต้น หากเติมเฉพาะแหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำในการเลี้ยงจุลินทรีย์ กรดไขมันจะถูกสร้างจาก *de novo* โดยไพรุเวทที่ได้จากปฏิกิริยาไกลโคไลซิส ถูกเปลี่ยนเป็นอะซิติก โคเอ จากนั้นจึงถูกนำไปใช้ผ่านทางกระบวนการ บีตา ออกซิเดชัน เพื่อใช้สำหรับ cell maintenance ทำให้ขาดสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดไขมัน การแก้ไขปัญหานี้ทำได้โดยการเติมแหล่งคาร์บอนชนิดไม่ละลายน้ำ เพื่อเป็นสารตั้งต้นสำหรับส่วนของกรดไขมันในการสร้างโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ตัวอย่างการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ชนิดแมนโนซิลอิทธิฤทธิ์ทอลลิพิด และไซโฟโรลิพิด เป็นสารลดแรงตึงผิวที่ยีสต์สามารถผลิตได้เป็นปริมาณมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งไซโฟโรลิพิดนั้นผลิตจากยีสต์ที่ไม่ก่อโรค จึงได้รับความสนใจเป็นอย่างยิ่ง โครงสร้างหลักของไซโฟโรลิพิดประกอบด้วยกลูโคสและกรดไขมัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงควรมีแหล่งคาร์บอนทั้งสองชนิดนี้ ในขั้นตอนการผลิตหากใช้อัลเคนเป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อเอนไซม์ cytochrome P450 monooxygenase จะทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ปลายสายอัลเคน ได้เป็นแอลกอฮอล์ จากนั้นเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase) และเอนไซม์อัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (aldehyde dehydrogenase) จะเข้าทำปฏิกิริยาต่อ เกิดเป็นอัลดีไฮด์ (aldehyde) และกรดไขมันตามลำดับ ถ้าหากใช้สารตั้งต้นเป็นไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) เอนไซม์ไลเปส (lipase) จะเข้ามาทำปฏิกิริยาได้เป็นกรดไขมัน และกรดไขมันที่ได้จะเข้าสู่กระบวนการบีตาออกซิเดชันต่อไป

โดยกระบวนการผลิตไซโฟโรลิพิดจะประกอบด้วย ขั้นแรก กรดไขมันจะถูกเติมหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งปลายสาย(ω) หรือ ตำแหน่งก่อนปลายสาย ($\omega-1$) ได้เป็น hydroxyl fatty acid จากการทำงานของ membrane bound NADP monooxygenase หรือเอนไซม์ cytochrome P450 monooxygenase จากนั้นเอนไซม์ glycosyltransferase I จะเติมกลูโคสจาก nucleotide-activate glucose [uridine diphosphate (UDP)-glucose) เข้าที่หมู่ไฮดรอกซิลของกรดไขมันที่ตำแหน่ง C1' ด้วยพันธะไกลโคซิดิก ได้เป็น กลูโคลิพิด (glucolipid) ต่อจากนั้นเอนไซม์ glycosyltransferase II จะทำการเติมกลูโคสตัวที่สองที่ตำแหน่ง C2' ของกลูโคสตัวแรก เกิดเป็นไซโฟโรลิพิดในรูปของ acidic form และไซโฟโรลิพิดเหล่านี้มักจะถูกเปลี่ยนแปลงต่อด้วยการทำปฏิกิริยา esterification ภายในเซลล์ ส่งผลให้หมู่คาร์บอกซิลที่ปลายกรดไขมันเชื่อมต่อกับหมู่ไฮดรอกซิลของน้ำตาลไซโฟโรส ที่ตำแหน่ง 4" หรือบางครั้งอาจเกิดที่ตำแหน่ง 6' หรือ 6" เกิดเป็นวงเรียกว่า lactonic form และอาจเกิดปฏิกิริยาการเติมหมู่อะซิติกที่ส่วนหัวที่เป็นคาร์โบไฮเดรตที่ตำแหน่ง 6' และ/หรือ 6" โดยเอนไซม์ acetyl transferase แสดงในรูปที่ 2.14



รูปที่ 2.14 แสดงกระบวนการผลิตไซโฟโรลิพิดจาก *Candida bombicola* ATCC 22214

- (1) cytochrome P450 monooxygenase (2) alcohol-dehydrogenase
 (3) aldehyde-dehydrogenase (4) lipase (5) cytochrome P450 monooxygenase
 (6) glycosyltransferase I (7) glycosyltransferase II (8) lactonesterase (9) acetyl transferase

ที่มา: Van Bogaert และคณะ (2007)

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

1. แหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ แบ่งเป็น 2 กลุ่มหลักๆ คือ แหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำ (glycidic) ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต จำพวกกลูโคส ซูโครส กลีเซอรอล และ แหล่งคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำ (lipidic) เช่น ไฮโดรคาร์บอน น้ำมันพืชชนิดต่างๆ ซึ่งสมบัติของแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิด จะมีผลต่อ ชนิด คุณภาพ และปริมาณของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ (Raza และคณะ, 2007) นอกจากนี้ในปัจจุบันยังมีการศึกษาการใช้แหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูก สามารถผลิตทดแทนใหม่ได้ และเหลือทิ้งจากทางเกษตร มาใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เพื่อลดต้นทุนการผลิตเช่นกัน ตัวอย่างเช่น ไขมันสัตว์ โมลาส แลคติกเวีย เป็นต้น

2. แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนมีความจำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ โดยมีความสำคัญต่อกระบวนการสร้างโปรตีนและเอนไซม์ ซึ่งแหล่งไนโตรเจนที่ถูกใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยยีสต์มีหลายชนิด เช่น ยูเรีย แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรท โซเดียมไนเตรท เพปโตน สารสกัดมอลต์ สารสกัดเนื้อ และสารสกัดยีสต์ โดยเฉพาะสารสกัดยีสต์ได้ถูกนำมาใช้มากที่สุด ส่วนความเข้มข้นที่ใช้จะแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และอาหารเลี้ยงเชื้อ จากงานวิจัยของ Casas และ Garcia-Ochoa (1999) พบว่า การผลิตไกลโคลิพิดโดยยีสต์ *C. bombicola* เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารสกัดยีสต์ที่สูง จะส่งผลให้ปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้น แต่การผลิตไกลโคลิพิดลดลง เนื่องจากแหล่งคาร์บอนได้ถูกใช้หมดไปสำหรับการเจริญของยีสต์ นอกจากนี้อีกหนึ่งปัจจัยที่สำคัญ คือ อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) เช่น *Pseudomonas fluorescens* สามารถผลิตแรมโนลิพิดได้ดีที่สุด เมื่อมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10 แต่จะให้ผลผลิตน้อยลงเมื่อมีอัตราส่วนเพิ่มขึ้นเป็น 30 และ 50 (Abouseoud และคณะ, 2008) แรมโนลิพิดสามารถผลิตได้ดีที่สุด เมื่อจำกัดปริมาณไนโตรเจนที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 16:1 และ 18:1 (Guerra-Santos และคณะ, 1984)

3. ความเป็นกรดต่างและอุณหภูมิ

จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีที่ความเป็นกรดต่างแตกต่างกัน เช่น ความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างยิ่งต่อการผลิตไซโฟโรลิพิด Bernardski และคณะ (2004) ได้ศึกษาปัจจัยของความเป็นกรดต่างต่อการผลิตไกลโคลิพิดโดย *C. antarctica* และ *C. apicola* พบว่า เมื่อควบคุมค่าความเป็นกรดต่างที่ 5.5 สามารถผลิตไกลโคลิพิดได้ปริมาณมาก ขณะที่เมื่อไม่มีการควบคุมความเป็นกรดต่างการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะลดลง เช่นเดียวกับ *Candida bombicola* ATCC 22214 สามารถผลิตสาร

ลดแรงดึงผิวชีวภาพได้ดีเมื่อมีความเป็นกรดต่างเริ่มต้นเท่ากับ 3.5 และควบคุมอุณหภูมิระหว่างการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งค่าความเป็นกรดต่างที่ต่ำนี้สามารถป้องกันการปนเปื้อนของน้ำเลี้ยงเชื้อ (Davila และคณะ, 1997) กระบวนการหมักของ *C. bombicola* ATCC 22214 ส่วนมากเลี้ยงที่ 25 หรือ 30 องศาเซลเซียส โดยไซโฟโรลิพิดที่ผลิตได้มีปริมาณใกล้เคียงกัน แต่ที่ 25 องศาเซลเซียส การเจริญของจุลินทรีย์ต่ำกว่าแต่มีอัตราการใช้กลูโคสสูงกว่าเมื่อเทียบกับ 30 องศาเซลเซียส (Casas และ Garcia-Ochoa, 1999) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าอุณหภูมิส่งผลเพียงเล็กน้อยต่อสมบัติของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ เช่น ค่าแรงดึงผิว ค่าแรงดึงระหว่างผิวที่ประจัน และประสิทธิภาพการก่ออิมัลชัน เป็นต้น (Desai และ Banat, 1997)

4. แหล่งแร่ธาตุและวิตามิน

แร่ธาตุและวิตามินเป็นปัจจัยสำคัญในการส่งเสริมหรือยับยั้งการเจริญและการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ เช่น การเติมเหล็ก ฟอสเฟต และแมงกานีสในอาหารเลี้ยงเชื้อ ช่วยเพิ่มปริมาณการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *B. subtilis* (Wei, 2003) ความเข้มข้นของเกลือที่สูงเกินกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ส่งผลต่อการทำงานของเซลล์และการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ และมีผลต่อค่า CMC เล็กน้อย (Abu-Ruwaida และคณะ, 1991)

ตารางที่ 2.2 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทไฮโฟโพลิพิดจากยีสต์ในแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

จุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน	ระดับการผลิต	ผลผลิต (กรัมต่อลิตร)	อ้างอิง
<i>Torulopsis apicola</i> IMET 43747	- กลูโคส และน้ำมันพืช	- ชาวเดเย่า	5-90	Stüwer และคณะ, 1987
<i>Candida bombicola</i> CBS 6009	- กลูโคส และ Rapeseed ester	- ถึงหมัก	320	Davila และคณะ, 1992
<i>Torulopsis bombicola</i> ATCC 22214	- กลูโคส และน้ำมันถั่วเหลือง	- ถึงหมัก	40-80	Kim และคณะ, 1997
<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214	- Rapeseed oil และ whey	- ถึงหมัก	280	Daniel และคณะ, 1998
<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214	- น้ำมันเหลือทิ้งจากร้านอาหาร - กรดโอเลอิก	- ชาวเดเย่า - ถึงหมัก แบบแบดซ์ - ชาวเดเย่า - ถึงหมัก แบบแบดซ์	30 34 38 42	Shah และคณะ, 2007
<i>Candida lipolytica</i> UCP 0988	- กลูโคส และน้ำมันคาโนลา	- ชาวเดเย่า	8	Sarubbo และคณะ, 2007
<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214	- กรดโอเลอิก และ Soy molasses - กลูโคส และ Beef tallow	- ถึงหมัก - ถึงหมัก	53-75 32	Solaiman และคณะ, 2007
<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214	- กลูโคส และ Tallow fatty acid - กลูโคส และ Coconut fatty acid	- ชาวเดเย่า - ชาวเดเย่า	120 40	Felse และคณะ, 2007
<i>Starmerella bombicola</i> NRRL Y-17069	- น้ำมันถั่วเหลือง และ Sugarcane molasses	- ถึงหมัก	63.7	Deverey และ Pakshirajan, 2009

2.6 การประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวส่วนใหญ่สังเคราะห์ได้จากสารเคมี จนกระทั่งในช่วงหลายปีที่ผ่านมาสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้เข้ามามีบทบาทในอุตสาหกรรมหลายภาคส่วนเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากมีสมบัติและโครงสร้างที่หลากหลาย ทำให้เลือกนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้อย่างเหมาะสมในอุตสาหกรรมด้านต่างๆ ดังนี้

1. อุตสาหกรรมอาหาร

ในปัจจุบันได้มีการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อควบคุมการรวมตัวของหยดไขมันในอาหาร ส่งเสริมให้คุณภาพของแป้งสาลี มีผิวสัมผัสดีขึ้น ช่วยยืดอายุการเก็บผลิตภัณฑ์ที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบ ป้องกันการกระเด็นของน้ำมันระหว่างทอด นอกจากนี้ยังเพิ่มความเข้ากันเป็นเนื้อเดียวในผลิตภัณฑ์ที่มีไขมัน เช่น เบเกอรี่และไอศกรีม จะมีการใส่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อเพิ่มความเนียน เพิ่มการละลายของไขมัน และยังช่วยรักษาความเสถียรของไขมัน (Nitschke และ Costa, 2007) แรโนลิพิดยังสามารถช่วยเพิ่มคุณภาพของครีมเนย ครัวซองต์ และผลิตภัณฑ์แช่แข็ง รวมถึงใช้เป็นสารต้านการยัดเกาะของจุลินทรีย์ในบริเวณพื้นผิวที่ต้องสัมผัสกับอาหาร เพื่อป้องกันการเน่าเสียและการแพร่กระจายของเชื้อโรคในโรงงานอาหาร (Gautam และ Tyagi, 2006) โดยจากการศึกษาของ Meylheuc และคณะ (2006) พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดไม่มีประจุที่ผลิตโดย *Pseudomonas fluorescens* สามารถลดจำนวนของ *Listeria monocytogenes* LO28 บนพื้นผิวของสเตนเลส สตีล และ polytetrafluoroethylene ได้

อาหารบางชนิดที่เกิดจากการผสมของเฟสที่เป็นน้ำ (aqueous) และส่วนที่มีลักษณะไขมัน เช่น ครีม น้ำสลัด มายองเนส ผลิตภัณฑ์จากนม เนย ชนมหวาน และเบเกอรี่ต่างๆ โดยผลิตภัณฑ์นั้นต้องอยู่ในรูปของอิมัลชัน อีกทั้งเมื่อเกิดแล้วลักษณะดังกล่าวต้องมีความเสถียรจึงจะอยู่ในรูปลักษณะและลักษณะเมื่อรับประทานที่เป็นที่ยอมรับโดยผู้บริโภค ลักษณะอิมัลชันดังกล่าวเกิดจากการลดความตึงระหว่างผิวประจัน (intersurface tension) ระหว่างทั้งสองเฟสจนได้เป็นอิมัลชันขึ้น โดยกระบวนการทำให้เกิดอิมัลชันนั้นมีบทบาททำให้อาหารเหนียวข้นและดูมีเนื้อมากขึ้น การที่จะให้เกิดอิมัลชันในอาหารนั้นต้องการสารก่ออิมัลชันที่เรียกว่าอิมัลซิไฟเออร์ซึ่งการทำงานนั้นขึ้นกับสมดุลย์ ความชอบน้ำ (hydrophilic)/ ความไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) สารที่สามารถใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์ในอาหารมีหลายชนิด อาทิ เอสเทอร์ของกรดไขมันของกลีเซอรอล เลซิธิน และอนุพันธ์ของเลซิธิน เอสเทอร์ของกรดไขมันของซอร์บิแทน เป็นต้น ปัจจุบันสามารถผลิตสารก่ออิมัลชันได้จากจุลินทรีย์ที่เรียกกันว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) หรือ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งการที่จุลินทรีย์ผลิตสารขึ้นเพื่อการสลายและนำสารอาหารเข้าเซลล์

นั้นเป็นสิ่งที่ได้รับความสนใจเป็นพิเศษ เนื่องจากเป็นการผลิตที่ง่าย รวดเร็ว ใช้ต้นทุนต่ำ และไม่ก่อปัญหาทางสิ่งแวดล้อม ตัวอย่างของไบโอเซอร์แฟคแตนท์ที่เป็นที่รู้จักกัน ได้แก่ ไกลโคลิพิดจาก *Arthrobacter* sp. โซไฟโรลิพิดจาก *Torulopsis bombicola* แรมโนลิพิดจาก *Pseudomonas* spp. อิมัลแซน จาก *Acinetobacter calcoaceticus* และไลโปเพพไทด์ (เซอร์แฟคติน) โดย *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* เป็นต้น สารเหล่านี้ได้ถูกใช้ทดแทนสารลดแรงตึงผิวชนิดสังเคราะห์ทางเคมีในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ตัวอย่างเช่น การใช้ไกลโคลิพิด แทนเอสเทอร์กรดไขมันของโมโน และโอลิโกแซคคาไรด์ เป็นอิมัลซิไฟเออร์ในอาหาร (Makkar และ Cameotra, 2002) การใช้โซไฟโรลิพิด และอนุพันธ์เอซิลเลท และแอลคอกซิลเลท (acylated and alkoxylated derivatives) ของสารดังกล่าวในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง (Brown, 2007) ในทางอุตสาหกรรมอาหารได้มีการใช้โซไฟลิพิดกับแป้งเพื่อสร้างคุณภาพ และยืดอายุการเก็บอาหาร (Nitschke และ Costa, 2007) มีสิทธิบัตรการใช้ผนังเซลล์ที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ของยีสต์ *Saccharomyces uvarum* เพื่อผลิตมาการ์ริน (Tuynenburg, 1975) เป็นต้น

อย่างไรก็ตามยังเป็นที่ถกเถียงกันว่า จะสามารถใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากจุลินทรีย์จะใช้กับอาหารได้หรือไม่ ดังนั้นองค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา จึงทดสอบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในด้านคุณค่าทางอาหาร คุณสมบัติต่างๆ ด้านการปรับรส ด้านชีวภาพ และด้านพิษวิทยา สุดท้าย ยังห้ามใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากจุลินทรีย์กับอาหาร แต่อนุญาตให้ใช้ในยา และเครื่องสำอางได้ ในขณะที่ในประเทศญี่ปุ่น อนุญาตให้ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากจุลินทรีย์กับอาหารได้ เช่น โซไฟโรลิพิดโดยใช้เป็น additive ในแป้งเพื่อเพิ่มอายุของการวางขาย (shelf life) ของขนมอบ (Fiechter, 1992 และ Kosaric, 1993) และ mannosylerythrytol lipids จาก *Candida antarctica* ที่ผลิตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันถั่วเหลือง (Kitamoto, 1990) นอกจากนี้ยังมีสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เป็นพอลิเมอร์ เช่น emulsan ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 200 กิโลดาลตัน ซึ่ง emulsan และ apoemulsan ที่ผลิตจาก *Acinetobacter calcoaceticus* (Shepherd, 1995)

ตารางที่ 2.3 หน้าที่ต่างๆ ของสารลดแรงตึงผิวที่ใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์ในอาหารชนิดต่างๆ
(Kosaric, 1993)

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

2. ด้านเครื่องสำอาง

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดไกลโคลิพิด ได้รับความนิยมในการนำมาใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางในปริมาณมาก เนื่องจากสามารถเข้ากับผิวหนังได้ดี ไม่เกิดการระคายเคือง หรือเป็นอันตรายต่อผิวหนังมนุษย์ (Pomsunthorntaweew และคณะ, 2009a) เช่น โซไฟโรลิพิดที่ผลิตโดย *Candida bombicola* มีสมบัติในการให้ความชุ่มชื้น ช่วยต่อต้านแบคทีเรีย เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และยังเชื่อว่ามีสมบัติในการกระตุ้นการสังเคราะห์เลปตินผ่านเซลล์ adipocytes ซึ่งจะช่วยลดไขมันส่วนเกินในผิวหนังชั้น subcutaneous ได้ (Pelleciar และ André, 2004) รวมไปถึงการนำโซไฟโรลิพิดไปใช้เป็นส่วนผสมสำคัญในเชิงพาณิชย์ ได้แก่ ผลิตภัณฑ์รักษาสิว แชมพูป้องกันรังแค ผลิตภัณฑ์ระงับกลิ่นกาย ในชื่อยี่ห้อ Sopholiance โดยบริษัท Groupe soliance ประเทศฝรั่งเศส แผ่นมาร์คหน้า สบู่ล้างหน้า สบู่เหลว ในชื่อยี่ห้อ Sopholine ประเทศเกาหลี และเป็นสารให้ความชุ่มชื้นใน ลิปสติก อายแชโดว์ แป้งอัดแข็ง ในชื่อยี่ห้อ Sofina โดยบริษัท Kao ประเทศญี่ปุ่น (Kawano และคณะ, 1981) เป็นต้น รวมถึงแมนโนซิลอิทธิฤทธิ์อลิพิด ก็มีการนำมาใช้เป็นตัวอิมัลซิไฟเออร์ในเครื่องสำอาง ซึ่งมีสมบัติในการต่อต้านริ้วรอย ช่วยให้ผิวเนียนเรียบ นอกจากนี้แรมโนลิพิดที่ผลิตโดย *Pseudomonas* sp. ยังมีสมบัติในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่งจำเป็นสำหรับเครื่องสำอางในการช่วยป้องกันการปนเปื้อนจากการสัมผัสเป็นประจำจากผู้ใช้ และมีสมบัติเป็นอิมัลซิไฟเออร์ที่ดี ช่วยเรื่องการเข้ากันและเนื้อสัมผัสที่ดีในเครื่องสำอางอีกด้วย (Lourith และ Kanlayavattanakul, 2009)

3. ด้านสิ่งแวดล้อม

การปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม เกิดจากโรงงานอุตสาหกรรมและสารพิษจากการเกษตร ปล่อยสารประกอบอินทรีย์ และอนินทรีย์ลงในสิ่งแวดล้อมทั้งทางตรงและทางอ้อม สารประกอบเหล่านี้ก่อให้เกิดปัญหาการตกค้างในสิ่งแวดล้อม ยากแก่การกำจัดทำลาย เนื่องจากสารเหล่านี้จับกับอนุภาคของดินได้ง่าย จึงมีการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการบำบัดสารพิษ การประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการกำจัดสารประกอบอินทรีย์ พวกไฮโดรคาร์บอนนั้น สารลดแรงตึงผิวสามารถช่วยรักษาความเสถียรระหว่างน้ำมันกับน้ำ ช่วยกำจัดสารปนเปื้อนด้วยวิธีการละลายแบบเทียม (pseudosolubilization) ช่วยในการเกิดอิมัลชันซึ่งจะช่วยเพิ่มค่าการละลายของไฮโดรคาร์บอนภายในไมเซลล์ ทำให้ผิวสัมผัสระหว่างน้ำมันกับน้ำเพิ่มขึ้น (Volkering และคณะ, 1998) ซึ่งจะเป็นการเพิ่มความสามารถในการเจริญของจุลินทรีย์บนไฮโดรคาร์บอน (bioavailability) เป็นการช่วยกำจัดไฮโดรคาร์บอนออกจากดินให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น (Banat และคณะ, 2010) ตัวอย่างเช่น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *R. erythropolis* 3C-9 ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัด n-hexadecane โดย *Alcanivorax dieselolei* และ *Psychrobacter celer* ได้อย่างมีนัยสำคัญ (Noordman และ Janssen, 2002; Peng และคณะ,

2007) ส่วนการกำจัดสารประกอบอินทรีย์ เช่น โลหะหนัก สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะช่วยให้เกิดการรวมไอออน และกำจัดไอออนได้ง่ายขึ้น และจากการรายงานของ Wang และ Mulligan (2009) พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด bioemulsifier ที่ผลิตโดย *Gordonia* sp. BS29 มีประสิทธิภาพในการกำจัดสารหนูในกากแร่หรือในดินที่ปนเปื้อน ภายใต้สภาวะที่มีความเค็ม นอกจากนี้แรมโนลิพิด ยังมีความสามารถในการกำจัดแคดเมียม ตะกั่ว และสังกะสีออกจากดิน โดยการรวมตัวของโลหะหนักกับแรมโนลิพิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ผิวของเซลล์ จากนั้นเซลล์จะนำโลหะหนักเข้าไปในเซลล์จึงลดความเป็นพิษลงได้ และอิมัลชันที่ผลิตโดย *Alcanivorax calcoaceticus* สามารถจับกับยูเรเนียมได้ (Ron และ Rosenberg, 2001)

4. อุตสาหกรรมน้ำมัน

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในกระบวนการนำน้ำมันขึ้นมาใช้ การทำความสะอาดถังเก็บน้ำมัน และกระบวนการขนส่งน้ำมันผ่านท่อ โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายของสารประกอบต่างๆ ในปิโตรเลียมกับน้ำ ช่วยลดความหนืดของน้ำมัน ช่วยกำจัดน้ำออกจากน้ำมันก่อนเข้าสู่กระบวนการถัดไป นอกจากนี้ยังช่วยในการเกิดอิมัลชันของน้ำมัน รวมถึงลดการเกิดฟิล์มของน้ำมันกับชั้นหิน จากการศึกษานี้ของ Makkar และ Cameotra (1998) พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *Bacillus licheniformis* JF-2 และ *B. subtilis* ซึ่งทนร้อนและทนเค็ม สามารถดึงน้ำมันขึ้นมาใช้ได้มากขึ้น 9.3-62 เปอร์เซ็นต์

5. ด้านการแพทย์

ปัจจุบันจุลินทรีย์ดื้อต่อยาปฏิชีวนะมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้การรักษาเป็นไปได้ยาก ดังนั้น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพซึ่งมีสมบัติในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบและรา อีกทั้งยังมีประสิทธิภาพและมีความปลอดภัย จึงเป็นอีกทางเลือกที่น่าสนใจอย่างยิ่งในวงการแพทย์ ตัวอย่างเช่น เซอร์แฟคติน สามารถต้านการอักเสบ ต้านไวรัส ชักนำไปให้เกิด apoptosis ในเซลล์ Human breast cancer MCF-7 ได้ (Cao, 2010) รวมถึงยับยั้งการเกิดไฟบรินคลอท ยับยั้ง cyclic adenosine monophosphate (cAMP) ไคโคไนซิน, อีทูริน เอ, แดปโตมายซิน, พูมิลาซิดิน, และวิสโคซิทินาไมด์ มีสมบัติในการต้านไวรัสและราได้ (Baltz และคณะ, 2005) โซไฟโรลิพิด สามารถต้านเชื้อไวรัส HIV (Banat และคณะ, 2010) และยับยั้งการหลั่ง cytokine ได้ (Shah และคณะ, 2005) นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้ไลโปโซมและอนุพันธ์ของโคเลสเตอรอลที่ผลิตโดยแมนโนซิลอิทธิพลลิดสำหรับการขนถ่ายยีน ซึ่งมีประสิทธิภาพและปลอดภัยกว่าการใช้ไวรัสเป็นเวกเตอร์ (Singh และ Cameotra, 2004)

ตารางที่ 2.4 การประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดต่างๆ (Kosaric, 2001)

Use	Effect of surfactant
Metals Concentration of ores Cutting and forming	Wetting and foaming, collectors and frothers Wetting, emulsification, lubrication and corrosion inhibition in rolling oils, cutting oils
Casting Rust and scale removal Plating	In pickling and electrolytic cleaning Wetting and foaming in electrolytic plating
Paper Pulp treatment Paper machine Calender	Deresinification, washing Defoaming, color leveling and dispersing Wetting and leveling, coating and coloring
Paint and protective coating Pigment preparation Latex paints	Dispersing and wetting of pigment during grinding Emulsification, dispersion of pigment, stabilize latex, retard sedimentation and pigment separation, rheology
Waxes and polishes	Emulsify waxes, stabilize emulsions, antistat
Petroleum production/product Drilling fluids	Emulsify oil, disperse solids, modify rheological properties of drilling fluids for oil and gas wells
Textiles Preparation of fibers Dyeing and printing	Detergent and emulsifier in raw wool scoring; dispersant in viscose rayon spinbath; lubricant and antistat in spinning of hydrophobic filaments Wetting, penetration, solubilization, emulsification, dye leveling, detergency and dispersion
Agricultural Phosphate fertilizers Spray application	Prevent caking during storage Wetting, dispersing, suspending of powdered pesticides and emulsification of pesticide solutions

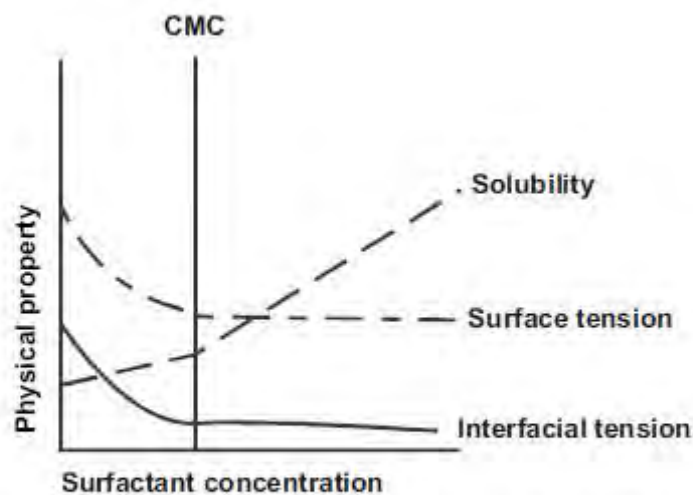
ตารางที่ 2.4 การประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดต่างๆ (Kosaric, 2001) (ต่อ)

Use	Effect of surfactant
Building and construction	
Paving	Improve bond of asphalt to gravel and sand
Concrete	Promote air entertainment
Elastomers and plastics	
Emulsion polymerization	Solubilization, emulsification of monomers
Foamed polymers	Introduction of air, control of cell size
Latex adhesive	Promote wetting, improve bond strength
Plastic articles	Antistatic agents
Plastic coating and laminating	Wetting agent
Food and beverages	
Food processing plants	For cleaning sanitizing
Fruit and vegetables	Improve removal of pesticides, and in wax coating
Bekery and icecream	Solubilize flevor oils, control consistency, retard staling
Crystallization of sugar	Improve washing, reduce processing time
Cooking fat and oils	Prevent spattering due to super heat and water
Industrial cleaning	
Janitorial supplies	Detergent and sanitizing
Descaling	Wetting agents and corrosion inhibitors in acid cleaning of boiler tubes and heat exchangers
Soft goods	Detergents for laundry and dry cleaning
Leather	
Skins	Detergent and emulsifier in decreasing
Tanning	Promote weting and penetration
Hides	Emulsifiers in fat liquoring
Dyeing	Promote wetting and penetration

2.7 การวิเคราะห์สมบัติสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

1. ค่าแรงตึงผิว (surface tension)

หมายถึง แรงที่กระทำระหว่างของเหลวกับอากาศ มีหน่วยเป็น mN/m หรือ dyne/cm โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีโครงสร้างแบบแอมฟิฟิลิก จะสะสมบริเวณผิวน้ำของวัฏภาคที่แตกต่างกัน ทำให้แรงกระทำระหว่างของเหลวกับอากาศลดลง เมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มขึ้น ค่าแรงตึงผิวจะลดลงเรื่อยๆ โดยทั้งสองค่านี้จะมีความสัมพันธ์กันจนกระทั่งถึงจุดที่ความเข้มข้นมากพอจนเกิดการรวมตัวเป็นโครงสร้างไมเซลล์ เรียกว่า ความเข้มข้นวิกฤติการเกิดไมเซลล์ (critical micelle concentration, CMC) ที่จุดนี้เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ค่าแรงตึงผิวจะไม่เปลี่ยนแปลง ซึ่งค่า CMC สามารถบ่งบอกถึงประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชนิดนั้นๆ ได้ ดังแสดงในรูป 2.15 ความสามารถในการละลายสารที่ไม่ละลายน้ำจะเริ่มที่ CMC และค่อยๆ เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของไมเซลล์ การวัดค่าแรงตึงผิวทำได้โดยใช้เครื่อง tensiometer ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมอย่างกว้างขวาง เนื่องจากค่อนข้างแม่นยำ ไม่ยุ่งยาก ทำได้สะดวกและรวดเร็วที่อุณหภูมิห้อง ค่าแรงตึงผิวของน้ำบริสุทธิ์เท่ากับ 72 mN/m และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ถือว่ามีประสิทธิภาพดีจะทำให้ค่าแรงตึงผิวลดลงเหลือ 35 mN/m (Kosaric, 1993)



รูปที่ 2.15 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตึงผิว แรงตึงระหว่างผิวที่ประจัน และค่าการละลายกับ

ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ที่มา: Mulligan (2005)

2. ค่าแรงตึงระหว่างผิวที่ประจัน (interfacial tension)

หมายถึง แรงที่กระทำระหว่างของเหลวกับของเหลวที่มีวัฏภาคต่างกัน มีหน่วยเป็น mN/m การวัดค่าแรงตึงระหว่างผิวที่ประจันจะวัดระหว่างน้ำและสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น น้ำมัน เฮกซาเดเคน หรือน้ำมันก๊าด โดยทั่วไปค่าแรงตึงระหว่างผิวที่ประจันของน้ำกับเฮกซาเดเคนมีค่าเท่ากับ 50 mN/m และค่าแรงตึงระหว่างผิวที่ประจันของน้ำกับน้ำมันก๊าดมีค่าเท่ากับ 30-40 mN/m ซึ่งเมื่อเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะสามารถลดแรงตึงระหว่างผิวที่ประจันลงเหลือ 0.1-1.0 mN/m (Gerson, 1993)

3. การก่ออิมัลชัน (emulsification)

อิมัลชันเป็นระบบที่ประกอบด้วยของเหลว 2 ชนิดที่เข้ากันไม่ได้ หรือไม่ละลายในกันและกัน โดยมีของเหลวชนิดหนึ่งกระจายตัวเป็นหยดเล็กๆอยู่ในของเหลวอีก เป็นระบบที่มีความคงตัวทางเทอร์โมไดนามิกส์ต่ำ จึงต้องมีการเติมสารลดแรงตึงผิวลงไปเพื่อลดแรงตึงระหว่างผิวของของเหลวทั้งสอง และลดพลังงานอิสระที่พื้นที่ผิว เป็นการช่วยเพิ่มความคงตัวของอิมัลชัน โดยสามารถแบ่งตามชนิดของของเหลวที่เป็นวัฏภาคภายใน และวัฏภาคภายนอกได้เป็น 3 ชนิด คือ ชนิดน้ำในน้ำมัน (W/O emulsion) ชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W emulsion) และอิมัลชันเชิงซ้อน (multiple emulsion) โดยเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคมีขนาดระหว่าง 0.5-100 ไมโครเมตร การวัดประสิทธิภาพในการเกิดอิมัลชันอาจทำได้ด้วยการวัดค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน คือ การวัดอัตราส่วนระหว่างความสูงของอิมัลชันและความสูงของของเหลวในหลอดทั้งหมดเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง (Patel และ Desai, 1997) หรือค่าการดูดกลืนแสง (Shepherd และคณะ, 1995) และอาจวัดความเสถียรของอิมัลชันที่เกิดขึ้นโดยวัดค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันในระยะเวลานานออกไป

4. ค่าการกระจายตัวของน้ำมัน (oil displacement activity)

เป็นการวัดประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการทำให้แผ่นฟิล์มของน้ำมันสังเคราะห์บนผิวน้ำเกิดเป็นวงใส (clear zone) โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของพื้นที่วงใส แล้วคำนวณหาพื้นที่วงกลมตามสูตร πr^2 มีหน่วยเป็นตารางเซนติเมตร โดยกำหนด 1 ตารางเซนติเมตรของการกระจายตัวของน้ำมันสังเคราะห์เท่ากับ 1 หน่วย วิธีนี้เป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยากและประหยัดค่าใช้จ่าย และยังเป็นวิธีที่เหมาะสมในการวัดกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว เนื่องจากวิธีนี้ใช้สารปริมาณเพียงเล็กน้อยในการวิเคราะห์ คือ 10 ไมโครลิตรเท่านั้น (Morikawa และคณะ, 1993)

5. ค่า Hydrophilic-Lipophilic balance (HLB)

คือสมบัติที่ชอบน้ำและชอบน้ำมันในโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิว ตามทฤษฎีสารลดแรงตึงผิวที่มีค่า HLB สูงระหว่าง 8-18 จะให้อิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ และที่มีค่า HLB ต่ำระหว่าง 3-6 จะให้อิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน ค่า HLB นี้เป็นค่าเฉพาะตัว ซึ่งจะต่างกันออกไปตามโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชนิดนั้นๆ เช่น สารลดแรงตึงผิวชนิดโซโฟโรลิพิด มีค่า HLB เท่ากับ 10-13 (Van Bogaert และคณะ, 2007) ชนิดแมนโนซิลอิทธิทธิทอล ลิพิด ที่ผลิตโดย *Candida* sp. SY16 มีค่า HLB เท่ากับ 8.8 (Kim และคณะ, 2002) เป็นต้น

2.8 การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

1. โครมาโทกราฟี (Chromatography)

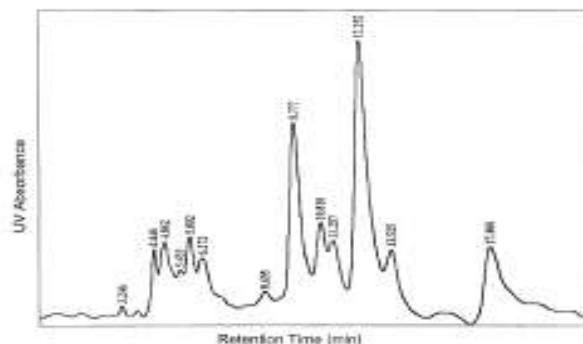
เป็นเทคนิคที่เป็นประโยชน์ในการแยกสาร ตรวจสอบ และวิเคราะห์ชนิดของสาร โดยอาศัยหลักการการละลายของสารในตัวทำละลายและการถูกดูดซับที่แตกต่างกัน กล่าวคือ สารที่ละลายในตัวทำละลายได้ดีและถูกดูดซับน้อยจะเคลื่อนที่ออกมาก่อน ส่วนสารที่ละลายได้น้อยและถูกดูดซับได้ดีจะเคลื่อนที่ออกมาทีหลัง การแยกของสารนั้นอาศัยความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ระหว่างสารตัวอย่าง วิธีการนี้มีเฟส 2 เฟส คือ เฟสอยู่กับที่ (stationary phase) กับเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) (Skoog, 1988)

2. โครมาโทกราฟีแบบบาง (Thin-Layer Chromatography)

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยก การทำบริสุทธิ์สารประกอบอินทรีย์ที่มีขั้วแตกต่างกัน เฟสคงที่ที่นิยมใช้ คือ ซิลิกาเจลเคลือบบนแผ่นแก้ว เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้จะเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) เทคนิคการแยกทำได้โดยจุดสารตัวอย่างลงบนเฟสคงที่ จากนั้นนำไปใส่ในภาชนะที่บรรจุตัวทำละลาย สารจะเคลื่อนที่ผ่านเฟสคงที่ด้วยแรง capillary action อัตราเร็วที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับความสามารถในการกระจายตัวระหว่างเฟสคงที่และเฟสเคลื่อนที่ ซึ่งบนซิลิกาเจลนั้นจะมีหมู่ไฮดรอกซิลทำให้มีความเป็นขั้วสูง ทำให้สารที่มีขั้วจับบนอนุภาคของเจลได้ดีจึงเคลื่อนที่ได้ช้า ในขณะที่สารไม่มีขั้วจะจับได้น้อยจึงเคลื่อนที่ได้เร็ว ข้อดีของโครมาโทกราฟีชนิดนี้คือ ไม่ยุ่งยาก ต้องการอุปกรณ์น้อย สามารถตรวจแยกสารในปริมาณน้อย ๆ ได้ และสามารถแยกสารออกจากเฟสคงที่โดยสกัดด้วยตัวทำละลาย (Heyd และคณะ, 2008)

3. ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid chromatography)

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์สารประกอบที่อยู่ในรูปของเหลว โดยใช้เครื่องสูบลแรงดันสูง (high pressure pump) สูบตัวทำละลายซึ่งทำหน้าที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) พาสารตัวอย่างที่ถูกฉีดเข้าทางช่องฉีดสาร (injector) ผ่านอนุภาคที่เป็นเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) ซึ่งบรรจุอยู่ในคอลัมน์ (column) สารผสมตัวอย่างจะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์และถูกแยกออกมา สารจะถูกแยกออกมาในเวลาที่แตกต่างกัน โดยสารผสมที่อยู่ในตัวอย่างสามารถถูกแยกออกจากกันได้นั้น จะขึ้นอยู่กับค่าการดูดซับของสารประกอบนั้นกับเฟสคงที่ สารที่ดูดซับได้ดีในเฟสคงที่จะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ได้เร็ว สารนั้นก็就会被แยกออกมาก่อน ส่วนสารที่ดูดซับได้ดีในเฟสคงที่จะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ได้ช้าจะถูกแยกออกมาทีหลัง (Lindsay,1991) เพื่อผ่านเข้าสู่เครื่องตรวจวัด (detector) เช่น UV ELSD ในเวลาที่ต่างกัน สัญญาณที่วัดได้จะอยู่ในรูปสัญญาณไฟฟ้าตามเวลาและปริมาณของสารแต่ละตัวที่ตรวจวัดได้ จากนั้นสัญญาณจะถูกส่งไปยังเครื่องบันทึกสัญญาณเพื่อแสดงผลออกมาเป็นโครมาโทแกรม เทคนิค HPLC แบ่งเป็น 2 แบบตามลักษณะการใช้เฟสเคลื่อนที่คือ การแยกโดยใช้องค์ประกอบของเฟสคงที่แบบเดียวตลอดการแยก (Isocratic) และการแยกโดยมีการเปลี่ยนองค์ประกอบของเฟสคงที่ในระหว่างการแยกแบบต่อเนื่องหรือแบบทีละขั้น (Gradient elution) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่จะนำมาแยกด้วยวิธีนี้ ต้องทำให้มีความบริสุทธิ์เบื้องต้นก่อน ตัวอย่างเช่น โซไฟโรลิพิดที่ได้จากกระบวนการหมัก ก่อนผ่านการแยกด้วย HPLC ได้ผ่านขั้นตอนการแยกบนโครมาโทกราฟีแบบบางมาแล้ว โดยการวิเคราะห์โซไฟลิพิดนั้นนิยมใช้คอลัมน์ C-18 เป็นเฟสคงที่ และใช้สารละลายอะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile) เป็นเฟสเคลื่อนที่ ตรวจวัดด้วยเครื่อง UV detector ที่ 207 นาโนเมตร อัตราการชะเท่ากับ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นโซไฟโรลิพิดที่มีโครงสร้างแบบต่างๆ จะแยกออกที่เวลาแตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 2.16 (Hu และ Ju, 2001)



รูปที่ 2.16 โครมาโทแกรม HPLC ของโซไฟโรลิพิดบริสุทธิ์บางส่วนผลิตโดย

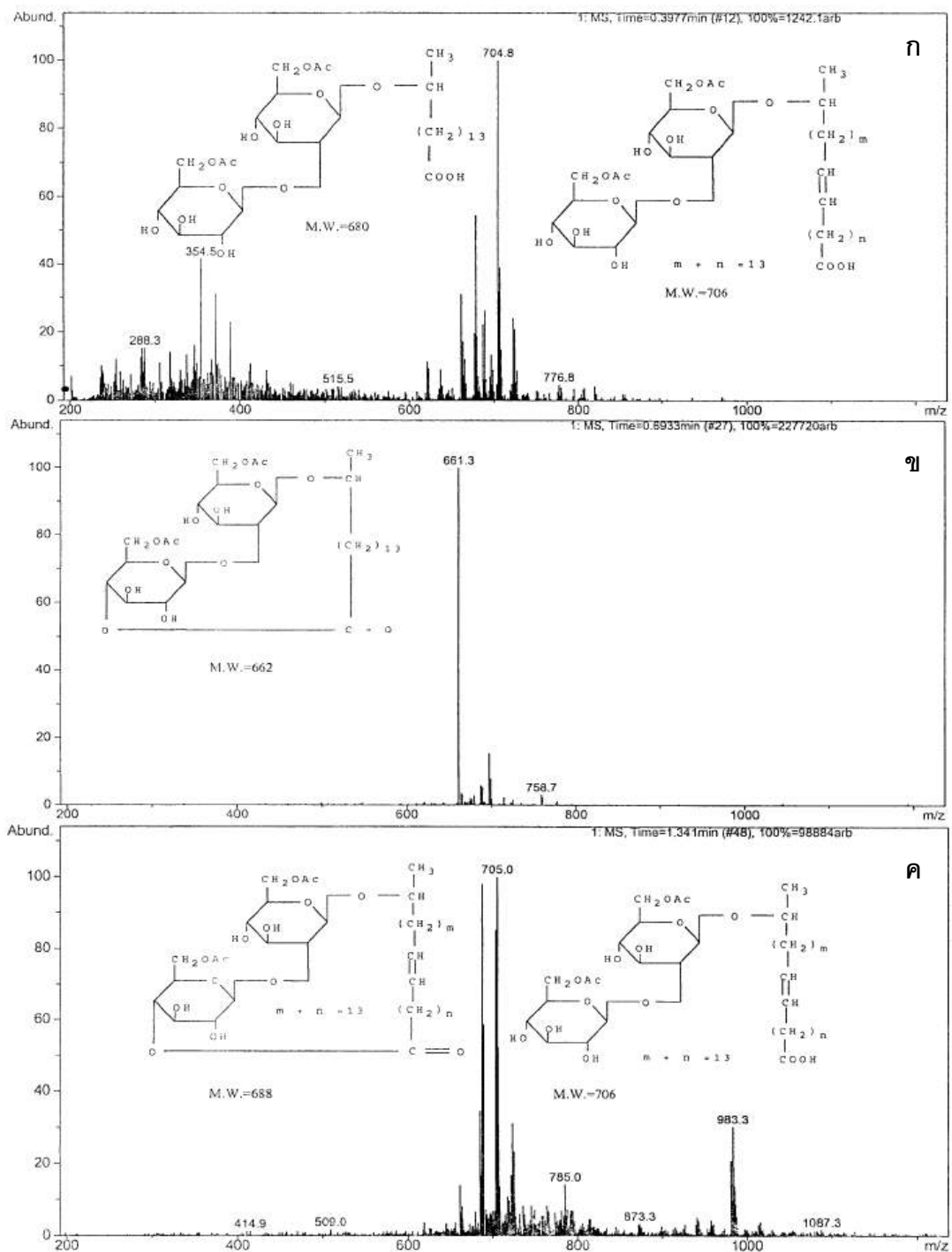
Torulopsis bombicola และใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน

ที่มา: Hu และ Ju (2001)

4.แมสสเปกโทรเมตรี (Mass spectrometry)

เป็นเทคนิคทางเคมีวิเคราะห์ที่ใช้วิเคราะห์สารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ เพื่อตรวจสอบมวลโมเลกุลของสาร ทำนายถึงปริมาณและองค์ประกอบในสารนั้นๆ โดยอ่านจากค่าสเปกตรัม วิธีนี้จัดเป็นเทคนิคขั้นสูงมีค่าความไว (sensitivity) ในการวิเคราะห์สูง สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งแบบเจาะจงและแบบทั่วไป ทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณ ด้วยการทำให้โมเลกุลแตกตัวเป็นไอออนด้วยวิธีต่างๆ เช่น electrosprey ionization (ESI) และ atmospheric pressure chemical ionization (APCI) ในระยะหลังได้พัฒนาการทำให้เกิดไอออนโดยใช้พลังงานต่ำ (soft ionization) เช่น matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) จะใช้ UV lasers เช่น ไนโตรเจนเลเซอร์ ที่ความยาวคลื่น 337 นาโนเมตร ซึ่งสามารถทำให้เกิดไอออนได้โดยสารไม่สลายตัว จึงเหมาะสำหรับการวิเคราะห์สารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ระเหยได้ยาก จำพวกสารชีวโมเลกุล เช่น โปรตีน เพปไทด์ และน้ำตาล ส่วนมวลของไอออนที่เกิดขึ้นสามารถวิเคราะห์ด้วยวิธีต่างๆ ดังนี้ time of flight (TOF), magnetic section ion trap ซึ่งจะทำให้เกิดสเปกตรัมของไอออนได้อย่างสมบูรณ์ การวิเคราะห์มวลด้วย TOF มีข้อดีที่แตกต่างจากวิธีอื่น คือสามารถบันทึกค่ามวลของไอออนได้ทั้งหมดในเวลาอันรวดเร็ว จึงช่วยลดระยะเวลาในการวิเคราะห์ และยังให้ผลการวิเคราะห์ที่เชื่อถือได้ แมสสเปกโทรเมตรีจะตรวจวัดไอออนที่เกิดขึ้นและปรากฏเป็นพีก (peak) บนสเปกตรัมตามขนาดมวลต่อประจุของไอออน (m/z)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่จะนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี MS นี้ ต้องผ่านการทำให้มีความบริสุทธิ์เบื้องต้นก่อน ตัวอย่างเช่น โซโฟโรลิพิดต้องผ่านการแยกด้วย TLC และ HPLC มาก่อน จึงนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ต่อไป จากการศึกษาของ Hu และ Ju (2001) พบว่า โซโฟโรลิพิดที่ผลิตโดยใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน จะมีโครงสร้างทั้งรูปแบบแลคโตน ชนิด C18:0 C18:1 C18:2 และ C16:0 มีค่ามวลโมเลกุล (m/z) เท่ากับ 688.9 686.9 684.9 และ 661.2 ตามลำดับ และรูปแบบอะซิติก ชนิด C18:0 C18:1 C18:2 และ C16:0 มีค่ามวลโมเลกุล (m/z) เท่ากับ 707.0 705.0 703.0 และ 679.3 ตามลำดับ รวมถึงอาจเกิดการเติมหมู่อะซิติก 1-2 หมู่ และมีการขาดหายของกลูโคสในน้ำตาลโซโฟโรสได้เช่นกัน ดังแสดงในรูป 2.17



รูปที่ 2.17 แมสสเปกตรัมของไซไฟโรลิพิดเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนต่างๆ

ก) กลูโคสเพียงชนิดเดียว ข) กลูโคสร่วมกับเฮกซะเดเคน ค) กลูโคสร่วมกับน้ำมันถั่วเหลือง

ที่มา: Hu และ Ju (2001)

2.9 น้ำมันตะไคร้ (Lemongrass oil)

น้ำมันตะไคร้เป็นน้ำมันหอมระเหย ซึ่งสกัดได้จากต้นตะไคร้ ชื่อวิทยาศาสตร์ *Cymbopogon citratus* (De ex Nees) Stapf. ซึ่งจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าน้ำมันตะไคร้มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ดังนี้

1. ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย Hammer และคณะ (1999) รายงานว่า น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ เมื่อนำมาทดสอบด้วยวิธี agar dilution method พบว่า น้ำมันตะไคร้ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิด เช่น *E. coli*, *S. typhimurium* และ *S. aureus* ซึ่งค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (MIC) ดังแสดงในตาราง 2.5 โดยสารเคมีสำคัญที่ออกฤทธิ์ในน้ำมันหอมระเหย คือ citral , citronellol, geraneol และ cineole มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้แก่เชื้อ *E. coli* นอกจากนี้สาร citral ที่เป็นส่วนประกอบหลักของน้ำมันตะไคร้ เมื่อนำมาทดสอบกับแบคทีเรีย *Shigella flexneri* และ *Samonella typhi* para-A พบว่าสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวได้เมื่อใช้ในขนาดต่ำ

ตารางที่ 2.5 ค่า MIC (% โดยปริมาตร) ของน้ำมันตะไคร้ที่มีผลต่อเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ (Hammer และคณะ, 2001)

Table 1 Minimum inhibitory concentrations (MICs) of selected essential oils (% v/v) against 10 different micro-organisms

Details of plant oils and extracts		Test organism											
Plant species	Common name	Extract type*	Source†	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Aeromonas sobria</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Cymbopogon citratus</i>	Lemongrass	EO	L	0-03	0-12	0-06	0-12	0-06	0-25	1-0	0-25	0-25	0-06

(Hammer, et al 2001)

* EO, essential oil; L, leaf;

2. ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ เมื่อนำมาทดสอบด้วยวิธี agar dilution พบว่าน้ำมันตะไคร้ที่ความเข้มข้น 60 ไมโครกรัม /มิลลิลิตร สามารถต้านเชื้อรา *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*, *Epidermophyton floccosum* และ *Microsporium gypseum* ได้ ซึ่งน้ำมันตะไคร้มีสาร citral และ myrcene เป็นส่วนประกอบหลัก มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราดังกล่าวโดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้ง (MIC) เท่ากับ 122.5, 135,

115, 235 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันตะไคร้ที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อราดังกล่าว (MLC) มีค่าเท่ากับ 135, 147.5, 125, 310 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (Wannissorn และคณะ, 1996)

3. ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของยีสต์ สารสกัดตะไคร้ด้วยเอทานอล และน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ความเข้มข้น 40 และ 60 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าสามารถต้านยีสต์ *Candida albicans* ได้ (Wannissorn และคณะ, 1996)

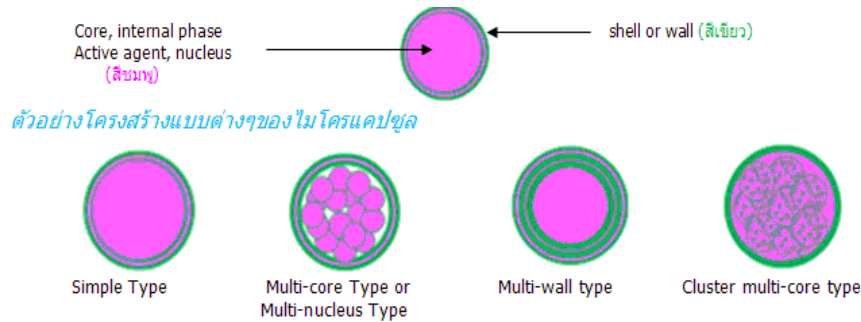
4. หลักฐานความเป็นพิษและการทดสอบความเป็นพิษของน้ำมันตะไคร้
เมื่อให้น้ำมันตะไคร้เข้าทางกระเพาะอาหารกระต่าย พบว่ามีค่า LD₅₀ มากกว่า 5 กรัม/กิโลกรัม ส่วนพิษในหนูขาวไม่ชัดเจน และเมื่อป้อนสารสกัดใบด้วยอัลกอฮอล์และน้ำ (1:1) ขนาด 460 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เข้ากระเพาะอาหารหนูถีบจักร พบว่ามีพิษ แต่สารสกัดใบด้วยน้ำขนาด 20-40 ซีซี/กิโลกรัม เมื่อให้ทางปากไม่พบพิษ และไม่เป็นพิษต่อตัวอ่อน และไม่มีผลต่อน้ำหนักตัวของหนูขาว มีผู้ศึกษาพิษของน้ำมันหอมระเหย พบว่าอัตราส่วน LD₅₀/TD เท่ากับ 6.9 การป้อนยาขงตะไคร้ให้หนูขาวในขนาด 20 เท่าของขนาดที่ใช้ในคนเป็นเวลา 2 เดือน ไม่พบความเป็นพิษ การศึกษาพิษเฉียบพลันของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ขนาด 1,500 ppm เป็นเวลา 60 วัน พบว่าหนูขาวกลุ่มที่ได้ตะไคร้ โตเร็วกว่ากลุ่มควบคุม แต่ค่าเคมีเลือดไม่เปลี่ยนแปลง (Mishra และคณะ, 1992) นอกจากนี้มีผู้ทดสอบพิษของชาที่เตรียมจากตะไคร้พบว่า เมื่อให้อาสาสมัครสุขภาพดีรับประทานชาตะไคร้ 1 ครั้ง หรือรับประทานวันละครั้ง เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางเคมี เลือด และปัสสาวะ มีบางรายเท่านั้นที่ปริมาณบิลิรูบิน และ Amylase สูงขึ้น จึงนับว่าปลอดภัย (Leite และคณะ, 1986)

2.10 เทคนิคการผลิตไมโครแคปซูล

ในปัจจุบันนี้ นักเทคโนโลยีทางอาหารได้หันมาสนใจการผลิตไมโครแคปซูลเพิ่มมากขึ้น โดยใช้ห่อหุ้มองค์ประกอบของอาหาร ไม่ให้เกิดปฏิกิริยากับสิ่งแวดล้อมภายนอกและสามารถเก็บรักษาได้ง่ายและนานขึ้น

ไมโครเอนแคปซูลเลชัน (Microencapsulation) คือ เทคโนโลยีที่อนุภาคของแข็งหรือของเหลวที่เรียกว่า แกน (Core) ถูกห่อหุ้มด้วยสารประเภทพอลิเมอร์เป็นชั้นบางๆ เกิดเป็นแคปซูล (capsule) ที่มีขนาดอยู่ในช่วง 1 ไมครอนถึง 1,000 ไมครอน (1-1,000 μm) หรือ ในขณะที่แคปซูลที่มีขนาดเล็กกว่า 1 μm จะเรียกว่า นาโนแคปซูล ซึ่งขนาดของไมโครแคปซูลที่เหมาะสมและนิยมใช้ที่สุดอยู่ระหว่าง 5-20 ไมครอน และความหนาของผนังมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 0.1-30 ไมครอน และเรียกผนังที่ห่อหุ้มนี้ว่า wall หรือ shell ไมโครแคปซูลส่วนใหญ่ที่นำมาใช้กันผนังจะมี

ลักษณะเป็นเมทริกซ์ และภายในของไมโครแคปซูลจะบรรจุสารสำคัญต่างๆที่เป็นของเหลวทั้งที่เป็น Hydrophobic และ hydrophilic โดยปกติของเหลวที่บรรจุจะมีปริมาณอยู่ที่ 55-95 % ของน้ำหนักไมโคร-แคปซูล



รูปที่ 2.18 แสดงลักษณะของไมโครแคปซูลประกอบด้วยส่วนสำคัญ 2 ส่วนหลักๆ คือ สารสำคัญหรือสารกระตุ้นที่บรรจุในแคปซูล (Core) และ เปลือกหรือผนังที่ห่อหุ้มอยู่รอบนอก (wall)

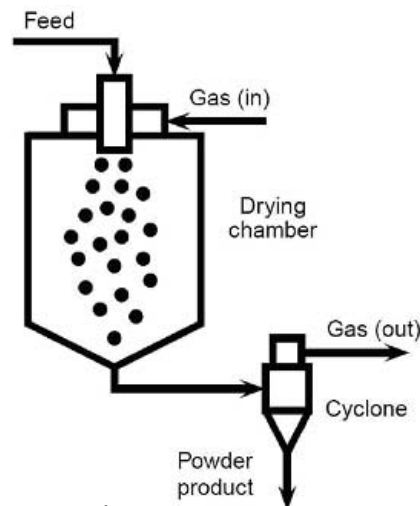
ที่มา : <http://www.thaitextile.org/tdc/>

ในปัจจุบันมีการพัฒนาใช้เทคโนโลยีไมโครแคปซูลเหล่านี้มาใช้งานมากมาย เนื่องจากข้อดีของเทคโนโลยีนี้ได้แก่

- ป้องกันการเกิดปฏิกิริยากับสภาวะภายนอก เช่น ปฏิกิริยาออกซิเดชัน เนื่องจากสารบางตัวมีความไวต่อความร้อน แสง อากาศ น้ำ ออกซิเจน ฯ ซึ่งจะช่วยป้องกันไม่ให้คุณสมบัติของสารเปลี่ยนไป
- ช่วยควบคุมการทำงานของสารแกน ให้มีการปลดปล่อยสารแกนในปริมาณที่เหมาะสม และสามารถควบคุมการปลดปล่อยสารแกนให้ได้ตรงตามวัตถุประสงค์
- ช่วยทำให้ง่ายต่อการนำสารแกนไปใช้ เช่น ช่วยทำของเหลวอยู่ในรูปของแข็ง ง่ายต่อการนำไปผสมกับส่วนผสมอื่น โดยไม่เกิดการทำปฏิกิริยาต่อกัน
- ช่วยลดอัตราการระเหยของสารหอม เนื่องจากสารบางชนิดมีอัตราการระเหยที่รวดเร็ว เช่น น้ำมันหอมระเหย เมื่อนำมาทำไมโครแคปซูลจะช่วยลดการระเหยของสารหอม ซึ่งถ้าไม่มีกลไกไปกระตุ้นให้ผนังของไมโครแคปซูลแตก สารหอมภายในก็จะไม่สามารถระเหยออกมาได้ และจะสามารถเก็บรักษากลิ่นได้เป็นเวลานาน

ในการเตรียมหรือผลิตไมโครแคปซูลนั้นสามารถแบ่งออกได้เป็น กระบวนการทางเคมีและกระบวนการทางกายภาพ ซึ่งมีหลากหลายวิธี ต้องเลือกให้เหมาะกับสาร core และ shell ที่จะนำมาทำไมโครแคปซูล ซึ่งวิธีการที่นิยมใช้อย่างหนึ่ง คือ เทคนิคการอบแห้งแบบพ่นกระจาย

(Spray dry) กระบวนการของ Spray dry เริ่มจากอากาศจะถูกดูดผ่าน filter และผ่านตัวให้ความร้อน จากนั้นจึงเข้าสู่ห้องอบแห้ง (drying chamber) ส่วนวัตถุดิบที่ใช้ spray (feed) ควรจะมีลักษณะเหลว จากนั้นสารละลายของเหลวจะถูกดูดโดยปั๊มผ่านอุปกรณ์ที่ทำให้เกิดละอองฝอยภายในห้องอบแห้งและจุดสัมผัสกับอากาศร้อนทำให้เกิดการระเหยของน้ำอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิสูง จะได้ผงผลิตภัณฑ์ที่ตกลงสู่ด้านล่างของ drying chamber และผงบางส่วนที่หลุดมากับอากาศจะถูกแยกโดยใช้ cyclone จนได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายในกระบวนการอบด้วย spray dryer



รูปที่ 2.19 ขั้นตอนการอบแห้งแบบพ่นกระจาย

ที่มา : <http://www.chec.kt.dtu.dk/Research/Chemical>

เทคนิคการอบแห้งแบบพ่นกระจาย ประกอบด้วย 4 กระบวนการ คือ

1. การทำให้สารที่ป้อนเข้าไป (feed) กระจายตัวเป็นละออง (Atomization of feed) กระบวนการนี้ทำให้ feed เป็นละอองโดยใช้ atomizer ซึ่งถือว่าเป็นส่วนประกอบที่สำคัญที่สุดของ spray dryer โดยลักษณะของ atomizer มี 3 ชนิด คือ

1.1 Rotary Atomizer atomizer ชนิดนี้ feed จะไหลลงบนจานหมุน ซึ่งใกล้กับจุดศูนย์กลางโดยจานหมุนจะมีความเร็วรอบสูงประมาณ 5,000-10,000 รอบต่อนาที และ feed จะถูกเหวี่ยงออกด้านข้างกระจายเป็นละอองโดยขนาดเฉลี่ย 30-120 mm ซึ่งขนาดเฉลี่ยนี้จะแปรผันโดยตรงกับอัตราการไหลของ feed ความหนืดและแปรผกผันกับอัตราการหมุนและเส้นผ่านศูนย์กลางของจานหมุน

1.2 Pressure Nozzles

วิธีนี้ feed จะไหลผ่าน orifice ภายใต้อัตราความดันสูง ทำให้ของเหลวที่ออกมาจากหัวฉีดเป็นฝอยโดยไม่ใช้อากาศ อนุภาคที่ได้จะมีขนาดเฉลี่ย 120-250 mm โดยขนาดอนุภาคจะแปรผันโดยตรงกับอัตราการไหลของ feed ความหนืด และแปรผกผันกับความดัน

1.3 Two-fluid Nozzle (Pneumatic Nozzle)

อุปกรณ์ชนิดนี้ feed และอากาศจะไหลผ่านหัวของ nozzle ซึ่งจะทำให้ feed แยกเป็นละอองฝอยเนื่องจากการไหลผ่านของอากาศด้วยความเร็วสูงภายใน nozzle การปรับอัตราการไหลของอากาศ จะช่วยในการกระจายเป็นละอองของ feed วิธีนี้นิยมใช้กับ feed ที่มีความหนืดสูง อย่างไรก็ตามวิธีนี้ มีค่าดำเนินการที่สูงและให้ผลผลิตที่ต่ำ

2. การสัมผัสของละอองฝอยกับอากาศ โดยพิจารณาจากตำแหน่งของ atomizer กับอากาศแห้งๆเข้าโดยจะแบ่งเป็น

- การไหลผ่านทางเดียวกัน (co-current flow)
- การไหลผ่านสวนทางกัน (counter-current flow)
- การไหลผ่านแบบผสม (mixed flow)

3. การระเหยของละอองฝอย

เมื่อละอองสัมผัสกับอากาศแห้งร้อน จะเกิดการระเหยชั้นไออิมิตัวบริเวณผิวของละอองอย่างรวดเร็ว โดยจะมีอุณหภูมิที่ผิวละอองที่อุณหภูมิกระเปาะเปียกของอุณหภูมิอากาศแห้งจะแพร่สู่ผิวหนึ่งซึ่งอยู่ในสภาวะอิมิตัว ช่วงนี้จึงเป็นช่วงที่อัตราการระเหยคงที่ จนกระทั่งความชื้นต่ำไม่มีการแพร่สู่ผิวหน้า ทำให้เกิดชั้นแห้งหนาขึ้นตามเวลา ช่วงนี้อัตราการระเหยจะลดลง

4. ขั้นตอนการแยกผลิตภัณฑ์แห้งจากอากาศ

การแยกผลิตภัณฑ์ที่ได้จากอากาศนั้น โดยทั่วไปนิยมใช้ cyclone เป็นตัวเก็บผลผลิตผลิตภัณฑ์ที่ตกลงสู่ด้านล่างของ cyclone ส่วนลมที่ออกจากด้านบนของ cyclone จะผ่านไปยังตัวเก็บขั้นสุดท้ายทั้งนี้อาจเป็น wet scrubber หรือ bag filter หรือ electrostatic precipitator ซึ่งขึ้นอยู่กับปริมาณผง ที่มีและประสิทธิภาพการนำกลับมา

จากงานวิจัยที่ผ่านมา Leimann และคณะ (2008) ได้ศึกษาการทำไมโครแคปซูลของน้ำมันตะไคร้ด้วยเทคนิค Simple coacervation และใช้ PVA และ glutaraldehyde เป็นสารเคลือบ และติดตามผลของการทำไมโครแคปซูล พบว่า ประสิทธิภาพของน้ำมันตะไคร้ในการยับยั้งเชื้อนั้นไม่เปลี่ยนแปลงหลังจากการทำไมโครแคปซูล นอกจากนี้ ธิดาและคณะ (2009) ได้ศึกษาการทำไมโครแคปซูลของน้ำมันแมคาเดเมียด้วยเทคนิคอบแห้งแบบพ่นกระจาย โดยใช้ โซเดียมคาซิเนท และ มอลโตเดกซ์ตริน เป็นสารเคลือบพบว่า ไมโครแคปซูลที่ผลิตได้มีขนาดอนุภาคเฉลี่ย 8.13 ไมครอน และสามารถนำไมโครแคปซูลที่ผลิตได้นี้ไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอางได้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

1. อุปกรณ์

- เครื่องวัดแรงตึงผิว (Ring Tensiometer) รุ่น K6 ของบริษัท Kruss, Germany
- เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิกวิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) รุ่น Pro star ของบริษัท Varian, USA
- คอลัมน์ C18- AR Cosmosil 5 μ m, 120 $^{\circ}$ A ขนาด 4.6 x 150 มม. ของบริษัท Water
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) M-LAB ของบริษัท เมโทรโลยี เทคโนโลยีคคอด, Thailand
- กล้องจุลทรรศน์ชนิด 2 ตา (Biocular compound microscope) รุ่น BH-2 ของบริษัท Olympus, Japan
- เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น SS-325 และรุ่น ES-315 ของบริษัท Tomy Seiko, Ltd., Japan, รุ่น MLS 3020 ของบริษัท Sanyo Co., Ltd., Japan และรุ่น HV-25 ของบริษัท Hirayama, Co., Ltd., Japan
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วควบคุมอุณหภูมิ (High - performance centrifuge) รุ่น Avanti[®] J-30I ของบริษัท Beckman Coulter, U.S.A
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge) รุ่น KUBOTA 3700 ของบริษัท Kubota Corporation, Japan
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge) รุ่น KUBOTA 6500 ของบริษัท Kubota Corporation, Japan
- เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Rotary vacuum evaporator) รุ่น N-N ของบริษัท Eyela, Japan
- เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Centrifuge evaporator) รุ่น R-300 ของบริษัท BUCHI, Switzerland
- เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Centrifuge evaporator) รุ่น eppendorf concentrator 5301 ของบริษัท Modotech ,Germany

- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys ของบริษัท Thermo Spectronic, U.S.A
- เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) รุ่น Innova™ 4300 ของบริษัท New Brunswick Scientific, U.S.A
- ตู้อบความร้อน (Hot air oven) รุ่น UE 600 ของบริษัท Memmert, Germany
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น BE 800 ของบริษัท Memmert, Germany
- เครื่องชั่งหยاب รุ่น PG 2002-S ของบริษัท Metler Toledo, Switzerland
- เครื่องชั่งละเอียด รุ่น AG 285 ของบริษัท Metler Toledo, Switzerland
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น Cyberscan 1000 ของบริษัท Eutech Cybernatics, Singapore
- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow cabinet) รุ่น 25 Manometer ของบริษัท Dwyer Instrument, U.S.A
- เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) รุ่น K-550 GE ของบริษัท Scientific Industries, U.S.A
- เครื่องอุ่นสารละลาย (Dry-block heater) รุ่น TDB-120 ของบริษัท Biosan, Korea
- ไมโครปิเปต (Micropipette) รุ่น P10, P20, P100, P200, P1000 และ P5000 ของบริษัท Gilson, France

2. เคมีภัณฑ์

- สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A
- สารสกัดจากข้าวมอลต์ (Malt extract) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A
- แบทโตเปปโตเน (Bactopeptone) บริษัท Difco Laboratories, U.S.A
- กลูโคส ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- น้ำตาลทราย (ซูโครส) ของบริษัทน้ำตาลทรายมิตรผล จำกัด
- น้ำมันสังเคราะห์ (synthetic oil) ของบริษัท Japan Petroleum Institute, Japan
- น้ำมันถั่วเหลือง บริษัทมรกตอินดัสตรีส์ จำกัด ประเทศไทย
- น้ำมันปาล์ม บริษัทมรกตอินดัสตรีส์ จำกัด ประเทศไทย
- น้ำมันมะพร้าว ห้างหุ้นส่วนจำกัดมงคลน้ำมันพืช ประเทศไทย
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, Germany
- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท BDH Laboratory Supplies, England
- แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) E.Merck, Darmstadt, Germany
- โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) ของบริษัท Ajax Finechem, Australia
- ทริสไฮโดรคลอไรด์ (Tris HCl) ของบริษัท Sigma, U.S.A
- คลอโรฟอร์ม (Chloroform) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- เมทานอล (Methanol) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- เอทานอล (Ethanol) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- เฮกเซน (Hexane) (C_6H_{14}) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- แอลฟา-แนฟทอล (α -naphthol) ($C_{10}H_7OH$) ของบริษัท Fluka, Switzerland
- กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (Concentration HCl) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- อะซิโตรไนไตรท์ (Acetronitrile) HPLC grade ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, Germany
- น้ำ HPLC grade ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, Germany
- เอทิล อะซิเตต (Ethyl acetate) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- ไฮโดรเจนซัลไฟด์ ของบริษัท Univar, U.S.A
- กระดาษกรองขนาด (Cellulose acetate membrane) ขนาด 47 มม. 0.45 ไมครอน ของบริษัท Whatman, U.S.A

- แผ่นซิลิกาเจล 60 ขนาด 20x20 ซม.,หนา 0.2 มม. (TLC silica gel 60, 0.2mm.) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- แผ่นซิลิกาเจล 60 ขนาด 20x20 ซม., หนา 2 มม. (PLC silica gel 60, 2mm.) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany

3. วิธีดำเนินการทดลอง

Pichia anomala สายพันธุ์ PY189 เป็นสายพันธุ์ที่ได้จากการนำ *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 ซึ่งคัดแยกได้จากอาหารหมักดองพื้นบ้าน (ข้าวหมาก) อำเภอพนสนิมคม จังหวัดชลบุรี มากลายพันธุ์ด้วย Ethylmethane sulfonate (EMS) และคัดแยกโดย รัจนา บุญมี (2551)

3.1 การหาค่าประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดย *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY189 ระดับขวดเขย่า

3.1.1 การเตรียมหัวเชื้อ

นำยีสต์ *Pichia anomala* PY189 ที่เพาะเลี้ยงไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด Yeast Malt extract บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงมา 1 ลูก เพาะลงในอาหารเหลว Yeast Malt Extract (YM) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทำการบ่มในตู้บ่มเชื้อที่มีการเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

3.1.2 การหาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพระดับขวดเขย่า

นำหัวเชื้อที่อยู่ในอาหารเหลว YM อายุ 18 ชั่วโมง มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร 0.9 – 1 ถ่ายหัวเชื้อปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเหลวกำหนดสูตร ที่ประกอบด้วย โซเดียมไนเตรท (NaNO_3) 0.4% โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 0.02% แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.02% สารสกัดยีสต์ (Yeast extract) 0.1 % และน้ำมันถั่วเหลือง 4 % (w/v) (ปรับ pH 5.5) โดยแปรผันแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส ซูโครส น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม และน้ำมันมะพร้าว โดยใช้ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเท่ากับ 4% บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน และติดตามการเจริญของยีสต์โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง นำส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ มาวัดค่าความเป็นกรดต่าง ค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่องวัดค่าแรงตึงผิว (Ring tensiometer K6, Kruss, Germany) และค่าการกระจายน้ำมันตามวิธีของ Morikawa และคณะ (1993)

3.1.3 การหาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพระดับขวดเขย่า

นำหัวเชื้อที่อยู่ในอาหารเหลว YM อายุ 18 ชั่วโมง มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร 0.9 – 1 ถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเหลวกำหนดสูตร (ปรับ pH 5.5) เพาะเลี้ยงในอาหารกำหนดสูตรโดยใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อ 3.1.2 แปรผันความเข้มข้นแหล่งคาร์บอนเป็น 0, 1, 2, 4, 8, 10 และ 12 % บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน และติดตามการเจริญของยีสต์โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง นำส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ มาวัดค่าความเป็นกรดต่าง ค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่องวัดค่าแรงตึงผิว (Ring tensiometer K6, Kruss, Germany) และค่าการกระจายน้ำมันตามวิธีของ Morikawa และคณะ (1993)

3.1.4 การหาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพระดับขวดเขย่า

นำหัวเชื้อที่อยู่ในอาหารเหลว YM อายุ 18 ชั่วโมง มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร 0.9 – 1 ถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเหลวกำหนดสูตร (ปรับ pH 5.5) เพาะเลี้ยงในอาหารกำหนดสูตรโดยใช้ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อ 3.1.3 และแปรผันแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) แอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) และโซเดียมไนเตรท (NaNO_3) โดยใช้ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 0.4% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน และติดตามการเจริญของยีสต์โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง นำส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ มาวัดค่าความเป็นกรดต่าง ค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่องวัดค่าแรงตึงผิว (Ring tensiometer K6, Kruss, Germany) และค่าการกระจายน้ำมันตามวิธีของ Morikawa และคณะ (1993)

3.1.5 การหาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพระดับขวดเขย่า

นำหัวเชื้อที่อยู่ในอาหารเหลว YM อายุ 18 ชั่วโมง มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร 0.9 – 1 ถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเหลวกำหนดสูตร (ปรับ pH 5.5) เพาะเลี้ยงในอาหารกำหนดสูตรโดยใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 3.1.4

และแปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน เป็น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน และติดตามการเจริญของยีสต์โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง นำส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ มาวัดค่าความเป็นกรดต่าง ค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่องวัดค่าแรงตึงผิว (Ring tensiometer K6, Kruss, Germany) และค่าการกระจายน้ำมันตามวิธีของ Morikawa และคณะ (1993)

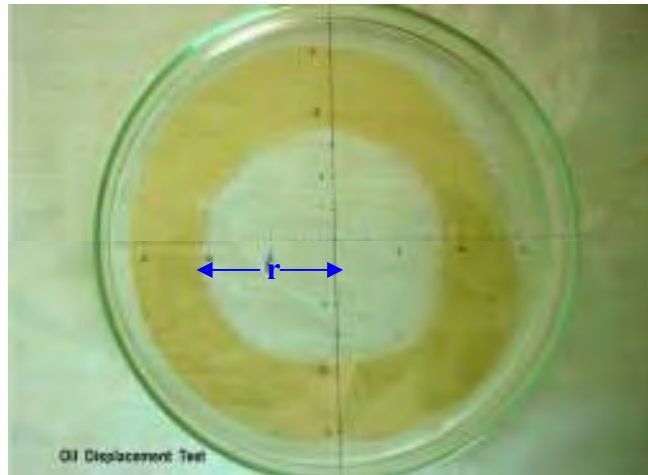
การติดตามประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

1) การวัดค่าแรงตึงผิว

ปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อ โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ถ่ายส่วนน้ำใสที่อาจมีน้ำมันเหลืออยู่ลงในกรวยที่มีกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 เพื่อกรองน้ำมันออก นำส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อใสมาวัดค่าแรงตึงผิวโดยวิธี Du Noüy ring method ด้วยเครื่องวัดค่าแรงตึงผิว (Ring tensiometer K6, Kruss, Germany)

2) การวัดค่าการกระจายตัวของน้ำมัน (Oil displacement test)

ทดสอบการกระจายน้ำมันตามวิธีของ Morikawa และคณะ (1993) โดยตวงน้ำ 40 มิลลิลิตร ลงในจานแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 150 มิลลิเมตร ที่มีกระดาษกราฟรองอยู่เป็นมาตรวัดความกว้างของบริเวณใส (โดย 1 ช่องใหญ่ของกราฟมีค่าเท่ากับ 1 เซนติเมตร) หยดน้ำมันสังเคราะห์ (Synthetic oil) ปริมาตร 15 ไมโครลิตร น้ำมันที่หยดลงไปนั้นจะกระจายตัวบนผิวน้ำของน้ำทำให้เกิดเป็นแผ่นฟิล์มแผ่นทั่วผิวน้ำ จากนั้นหยดตัวอย่างที่เป็นส่วนน้ำใส หรือสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบริสุทธิ์บางส่วนที่ได้จากการสกัด (crude extract) ที่เจือจางด้วย 50 มิลลิโมลาร์ของทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 8 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นฟิล์มของน้ำมันในแนวตั้งฉาก สังเกตและวัดบริเวณใสของการกระจายตัวของน้ำมันดังรูปที่ 3.1 และคำนวณหาพื้นที่ของการกระจายน้ำมัน



รูปที่ 3.1 แสดงลักษณะการกระจายตัวของน้ำมัน (Morikawa และคณะ, 1993)

พื้นที่ของการกระจายน้ำมันสามารถคำนวณได้จาก

$$\text{พื้นที่บริเวณใสของการกระจายน้ำมัน} = \pi r^2$$

เมื่อ r เท่ากับรัศมีความกว้างของบริเวณใส (เซนติเมตร)

กำหนด 1 ตารางเซนติเมตรของการกระจายตัวของน้ำมันมีค่าเท่ากับ 1 หน่วย

วิธีการวัดค่าการกระจายตัวของน้ำมันนี้จะใช้ได้กับสารที่มีความเข้มข้นอย่างน้อย $10 \mu\text{g}$ หรือ 10 nmol ขึ้นไป

3) การวัดการเจริญของเชื้อโดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

ปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อ โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนของเหลวที่ได้แยกเก็บไว้ และนำส่วนเซลล์แยกมาอบในถ้วยฟอริยที่รู้น้ำหนักแน่นอนแล้วที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงหรือจนกว่าน้ำหนักจะคงที่เมื่อชั่งด้วยเครื่องชั่งละเอียด และคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้งเป็นกรัมต่อลิตร

4) การวัดค่าความเป็นกรดต่าง

นำส่วนของเหลวที่ได้มาวัดค่าความเป็นกรดต่างด้วยเครื่อง (pH meter) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

3.2 การผลิตและสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.2.1 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระดับขวดเขย่า

เตรียมหัวเชื้อในอาหารเหลว YM เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ถ่ายหัวเชื้อ 20 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลวปรับปรุงสูตรที่เหมาะสมจากข้อ 3.1.5 ปริมาตร 200 ลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที ค่าความเป็นกรดต่าง 5.5 เป็นเวลา 7 วัน

3.2.2 การสกัดแยกและตรวจสอบชนิดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

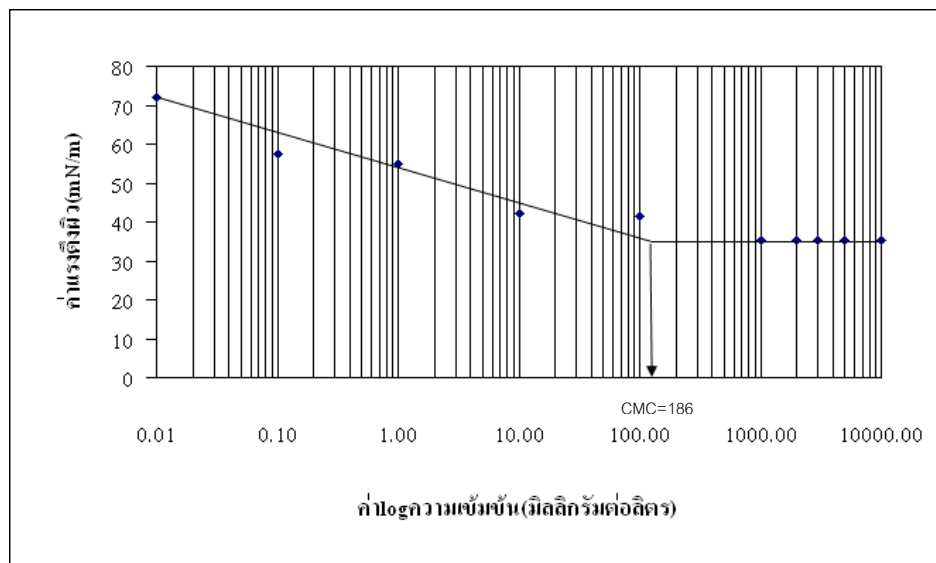
นำน้ำเลี้ยงเชื้อจากข้อ 3.2.1 มาปั่นแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อใส่ในกรวยแยก เติมหีสแกนปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้ไขมันและน้ำเลี้ยงเชื้อใสแยกชั้น จากนั้นใช้เอาเฉพาะส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อด้านล่างมาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตปริมาตร 1 เท่า เก็บส่วนน้ำใสชั้นบนซึ่งเป็นชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์ไว้ นำส่วนล่างมาแยกสกัดซ้ำ 2 ครั้ง ครั้งละ 4 นาที จากนั้นนำส่วนน้ำใสชั้นบนในการสกัดแต่ละครั้ง มาระเหยเอทิลอะซิเตตออกด้วยเครื่องระเหย (Evaporator) ภายใต้สภาวะสุญญากาศ จากนั้นนำสารที่สกัดได้มาละลายด้วยเมทานอล และระเหยแห้งอีกครั้ง จะได้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วน ซึ่งมีสีน้ำตาลไหม้ เหนียวหนืด นำสารนี้มาทดสอบการกระจายน้ำมัน ซึ่งน้ำหนักของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และตรวจสอบชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้เบื้องต้นด้วยวิธีโครมาโทกราฟี (Ito และ Inoue, 1982)

3.3 ลักษณะสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

3.3.1 เปรียบเทียบค่าความเข้มข้นวิกฤติของการเกิดไมเซลล์ (Critical micelle concentration; CMC)

เปรียบเทียบค่าความเข้มข้นวิกฤติของการเกิดไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้กับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ เช่น โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate; SDS) ไทรทอน เอกซ์ 100 (TritonX-100) เป็นต้น โดยนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

หรือสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ มาทำการเจือจางด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8 ที่ความเข้มข้น 0.01-20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร นำแต่ละความเข้มข้นมาวัดค่าแรงตึงผิว เพื่อหาค่าความเข้มข้นวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ โดยเขียนกราฟระหว่างค่าแรงตึงผิวและความเข้มข้น ดังแสดงในรูปที่ 3.2 ตามวิธีของ Sheppard และ Mulligan (1987) และเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้กับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ เช่น โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate; SDS) และไทรอนเอกซ์100(TritonX-100) เป็นต้น



รูปที่ 3.2 วิธีการหาค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ โดยการวัดค่าแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

3.3.2 วัดค่า Hydrophilic-Lipophilic Balance (HLB)

วัดค่า Hydrophilic-Lipophilic Balance (HLB) เบื้องต้น ด้วยการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.2 มาละลายในน้ำกรองและน้ำดื่ม ซึ่งมีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.5 และ 7 ตามลำดับ ให้มีความเข้มข้นเป็น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex mixer) เป็นเวลา 2 นาที ตั้งทิ้งไว้สักครู่จึงสังเกตลักษณะของสารละลายที่ได้เทียบกับตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า HLB กับลักษณะสารละลายของสารลดแรงตึงผิวในน้ำ

ลักษณะสารละลายของสารลดแรงตึงผิวในน้ำ	ค่า HLB
ไม่ละลาย	1-4
ละลายได้น้อย	3-6
กระจายตัวได้เล็กน้อยสีขาวขุ่น ไม่เสถียร	6-8
กระจายตัวสีขาวขุ่น เสถียร	8-10
กระจายตัวได้ดี สารละลายโปร่งแสง	10-13
กระจายตัวได้ดี สารละลายโปร่งใส	13+

ที่มา : <http://www.shell.com/chemicals>

3.4 การทำบริสุทธิ์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธีโครมาโทกราฟี

3.4.1 การเตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย Analytical Thin-Layer Chromatography

โดยใช้เฟสคงที่เป็นแผ่นซิลิกาเจล ($\text{SiO}_2 \cdot \text{XH}_2\text{O}$) 60 ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, Germany ขนาด 20 x 20 ซม. หนา 0.2 มม. ส่วนเฟสเคลื่อนที่ใช้สารละลายคลอโรฟอร์ม เมทานอล และน้ำ ในอัตราส่วน 65:25:4 นำสารลดแรงตึงผิวที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.2 มาละลายด้วยเอทิลอะซิเตตที่ความเข้มข้น 10-20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาจุดบนแผ่น TLC ปริมาตรจุดละ 20 ไมโครลิตร ให้ห่างจากขอบล่าง ประมาณ 1.5 เซนติเมตร จากนั้นหย่อนแผ่น TLC ลงในแนวตั้งอย่างช้าๆ ในภาชนะปิดที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่สูงประมาณ 1 เซนติเมตร ทิ้งไว้ประมาณ 1-2 ชั่วโมง จนเฟสเคลื่อนที่ไปเกือบสุดแผ่นหรือเหลือขอบประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร จากนั้นนำแผ่น TLC ออกมาทิ้งไว้จนแห้ง แล้วจึงตรวจหากรดไขมันด้วยการนำไปอบในภาชนะปิดสนิทที่อุณหภูมิของไอโอดีน ประมาณ 30 นาที เปิดภาชนะออกแล้วทำเครื่องหมายบริเวณที่เกิดสีน้ำตาลเข้ม และทิ้งไว้ข้ามคืนเพื่อให้ไอโอดีนระเหยจนหมด จึงทำการชุบซิลิกาเจล 60 บริเวณที่ทำเครื่องหมายไว้มาสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเอทิลอะซิเตต 3 ครั้ง และระเหยแห้งภายใต้ภาวะสูญญากาศ นำส่วนที่สกัดได้มาตรวจหาคาร์โบไฮเดรตด้วยวิธีมอร์ซ รีเอเจนท์ โดยเจือจางสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยน้ำกลั่นที่ความเข้มข้นประมาณ 1-2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมมอร์ซ รีเอเจนท์ (แอลฟา-แนฟทอล 0.5 กรัม ละลายใน 95% เมทานอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร) จำนวน 2 หยด ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเอียงหลอด แล้วค่อยๆ เติมกรดซัลฟู

ริกเข้มข้นปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงไป โดยห้ามเขย่า ตั้งทิ้งไว้สังเกตสีที่เกิดขึ้น ซึ่งถ้าผลเป็นบวกจะเกิดสีม่วงหรือสีน้ำตาลแดงตรงกลางระหว่างชั้นของสารละลายและชั้นของกรด (Koch และ Hanke, 1953) และนำไปทดสอบค่าการกระจายน้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบริสุทธิ์บางส่วนที่สกัดได้จากซิลิกาเจล โดยเตรียมให้มีความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางด้วย 50 ไมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8

3.4.2 การเตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย Preparative Thin-Layer Chromatography

โดยทำการทดลองตามวิธีในข้อ 3.4.1 แต่ใช้แผ่นซิลิกาเจล 60 ที่มีความหนา 2 มม. และใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพละลายในเอทิลอะซิเตตที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรรวม 1 มิลลิลิตร จุดเป็นเส้นตรงบนแผ่น TLC โดยสูงจากขอบแผ่นซิลิกาเจล 60 ประมาณ 1.5 เซนติเมตร ทำการสกัดแยกสารลดแรงตึงผิวออกจากซิลิกาเจล 60 ด้วยเอทิลอะซิเตต 3 รอบ แล้วนำไประเหยแห้งโดยเครื่อง evaporator ระเหยแห้งภายใต้ภาวะสุญญากาศ และนำไปทดสอบค่าการกระจายน้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบริสุทธิ์บางส่วนที่สกัดได้

3.4.3 การวิเคราะห์สารด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

เตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบริสุทธิ์บางส่วนที่สกัดได้จากข้อ 3.4.2 ในสารละลายอะซิโตนไตรท์ 100% ที่ความเข้มข้น 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC รุ่น Pro star ของบริษัท Varian, USA คอลัมน์ C18-AR Cosmosil 5 μm , 120 $^{\circ}\text{A}$ ขนาด 4.6 \times 150 มิลลิเมตร ของบริษัท Water ลิเนียร์เกรเดียนท์ 0-100% ของตัวทำละลาย B ใน A โดย

ตัวพา A คือ 10% อะซิโตนไตรท์ + 0.1% กรดไตรฟลูออโรอะซิติก (TFA)

ตัวพา B คือ 100% อะซิโตนไตรท์ + 0.1% กรดไตรฟลูออโรอะซิติก (TFA)

โปรแกรมของลิเนียร์เกรเดียนท์ เป็นดังนี้

เวลา (นาที)	% ของตัวพา A	% ของตัวพา B
0	70	30
5	30	70
15	20	80
20	10	90
35	0	100

อัตราการชะของตัวพาเท่ากับ 0.5 มิลลิเมตรต่อนาที ตรวจผลด้วย UV Detector ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร

3.4.4 เก็บตัวอย่างแต่ละพีคที่ปรากฏในแต่ละ Retention time (RT) โดยเก็บหลังจากที่พีคเกิดขึ้นในกราฟเป็นเวลา 55 วินาที นำสารที่เก็บได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่อง Centrifuge evaporator เมื่อแห้งแล้วจึงละลายสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8 ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อวัดค่าการกระจายน้ำมัน จากนั้นเลือกลำดับส่วนที่มีค่าการกระจายน้ำมันมากไปทดสอบต่อด้วยวิธีแมสสเปกโทรเมทรี (Mass Spectrometry, MS) เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุล

3.5 วิเคราะห์องค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธีแมสสเปกโทรเมทรี (Matrix-assisted laser desorption/ionization-Time of flight mass spectrometry; MALDI-TOF)

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี TLC และ HPLC ซึ่งให้ค่าการกระจายน้ำมันมาก มาวิเคราะห์ด้วยเครื่องแมสสเปกโทรเมทรี โดยใช้เทคนิค MALDI-TOF ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.6 ศึกษาความคงตัวของอิมัลชันน้ำมันตะไคร้ในสารละลายมอลโตเดกซ์ตรินโดยใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้เป็นตัวก่ออิมัลชัน

3.6.1 ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อความคงตัวของอิมัลชันน้ำมันตะไคร้

นำสารละลายสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากข้อ 3.2.2 ละลายในสารละลายมอลโตเดกซ์ตรินที่มีความเข้มข้น 20 30 และ 40 กรัมต่อเดซิลิตร ให้ได้ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเท่ากับ 0.6 % 0.8 % และ 1% โดยน้ำหนัก ใส่ลงในแก้วพลาสติกให้ได้น้ำหนักรวม 60 กรัม จากนั้นคนสารละลายให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง

3.6.2 ศึกษาผลของสัดส่วนน้ำมันตะไคร้ต่อความคงตัวของอิมัลชัน

เตรียมสารละลายอิมัลชันของน้ำมันตะไคร้ โดยเติมน้ำมันตะไคร้ลงในสารละลายจากข้อ 4.1 ให้ได้สัดส่วนน้ำมันต่อมอลโตเดกซ์ตรินเป็น 0.2:1 0.15:1 และ 0.1:1 เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเปิดลงในหลอดทดลองปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำ 3 ซ้ำเพื่อหาค่าเฉลี่ย ตั้งทิ้งไว้ 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง สังเกตลักษณะการแยกชั้นที่เกิดขึ้น และนำอิมัลชันที่เตรียมได้ไปวัดขนาดของอนุภาคด้วยเครื่อง Particle size analyzer เลือกอิมัลชันที่มีความคงตัว ไม่เกิดการแยกชั้น และมีอนุภาคขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอน เพื่อใช้ในการเตรียมอิมัลชันสำหรับการอบแห้งแบบพ่นกระจาย

3.7 การผลิตไมโครแคปซูลของอิมัลชันน้ำมันตะไคร้ด้วยการอบแห้งแบบพ่นกระจาย

นำอิมัลชันที่เตรียมได้และมีความเสถียรจากข้อ 4.2 มาใช้ในการทดลอง โดยเตรียมอิมัลชันให้มีปริมาตร 1 ลิตร ต่อการอบแห้งแบบพ่นกระจาย 1 ครั้ง นำอิมัลชันที่เตรียมไว้มาทำแห้งแบบพ่นกระจายโดยปรับอุณหภูมิลมร้อนขาเข้าเป็น 180 ± 5 องศาเซลเซียส และปรับอุณหภูมิลมร้อนขาออกเป็น 110 ± 5 องศาเซลเซียส ดัดแปลงตามวิธีของ Beristain และคณะ (2001) บรรจุไมโครแคปซูลที่ได้ในถุง laminated aluminium foil ที่ปิดผนึกแบบสุญญากาศ

ตารางที่ 3.2 สภาวะที่ใช้ในการทำแห้งแบบพ่นกระจาย

ปัจจัย	ค่า
อุณหภูมิลมร้อนเข้า	180±5 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิลมร้อนออก	110±5 องศาเซลเซียส
อัตราการนำสารเข้า	25±5 มิลลิลิตรต่อวินาที
ความดันอากาศ	3 บาร์

3.8 ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของไมโครแคปซูลบรรจุอิมัลชันน้ำมันตะไคร้ ศึกษาสมบัติทางกายภาพ

3.8.1 วิเคราะห์ลักษณะพื้นผิวของไมโครแคปซูลหลังจากการทำแห้งแบบพ่นกระจายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

จากวิธีของ Rosenberg และคณะ (1995) นำไมโครแคปซูลที่ผลิตได้มาวางบนกระดาษขาวสองหน้าซึ่งอีกด้านหนึ่งยึดติดอยู่กับแท่นวางตัวอย่าง นำแท่นวางที่มีไมโครแคปซูลติดอยู่ไปเคลือบด้วยทองคำภายใต้สภาวะสุญญากาศ จากนั้นนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ที่กำลังขยาย 1000x, 1500x และ 3500x เพื่อศึกษาขนาดและรูปร่างของไมโครแคปซูลที่ผลิตได้ จากนั้นหาขนาดของอนุภาคอย่างน้อย 50 อนุภาคเพื่อหาขนาดเฉลี่ยโดยโปรแกรม SemAfore (Version 4.01 demo, JEOL, Finland)

3.8.2 วิเคราะห์หาปริมาณน้ำมันทั้งหมด (Total oil)

ดัดแปลงจากวิธีของ Hogan และคณะ (2001) นำไมโครแคปซูลที่ผลิตได้ 2 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เติมปิโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether) 250 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปกรองด้วยกระดาษ Whatman เบอร์ 41 จากนั้นนำส่วนน้ำใสมาระเหยอปิโตรเลียมอีเทอร์ออกด้วยเครื่องระเหย (Evaporator) ภายใต้สภาวะสุญญากาศ และนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้นและนำไปชั่งน้ำหนัก โดยปริมาณน้ำมันทั้งหมดสามารถคำนวณได้จากสมการดังนี้

$$\text{ปริมาณน้ำมันทั้งหมด (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{น้ำหนักของน้ำมัน (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)}}$$

3.8.3 วิเคราะห์หาปริมาณน้ำมันที่ผิวหน้า (Surface oil)

ดัดแปลงจากวิธีของ Hogan และคณะ (2001) นำไมโครแคปซูลที่ผลิตได้ 2 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เติมปิโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether) 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำตัวอย่างไปกรองด้วยกระดาษ Whatman เบอร์ 41 จากนั้นนำส่วนน้ำใสมาระเหยปิโตรเลียมอีเทอร์ ออกด้วยเครื่องระเหย (Evaporator) ภายใต้สภาวะสุญญากาศ และนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้นและนำไปชั่งน้ำหนัก โดยปริมาณน้ำมันทั้งหมดสามารถคำนวณได้จากสมการดังนี้

$$\text{ปริมาณน้ำมันทั้งหมด (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{น้ำหนักของน้ำมัน (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)}}$$

3.9 ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของไมโครแคปซูลบรรจุอิมัลชันน้ำมันตะไคร้ที่ผลิตได้

ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของไมโครแคปซูลโดยดูผลการยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus*, *E. coli* และ *Salmonella* sp. ดัดแปลงจากวิธี Agar dilution method ของ Hammer และคณะ (1999)

เพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการทดสอบ ซึ่งได้แก่ แบคทีเรีย *S. aureus*, *E. coli* และ *Salmonella* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อทดสอบแต่ละชนิดมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Mueller-Hinton broth เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมงนำมาปรับความขุ่นของเชื้อให้ได้ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.4 ± 0.01 (10^7 - 10^8 CFU) นำน้ำมันตะไคร้และไมโครแคปซูลที่ผลิตได้ มาเจือจางลง 2 เท่า (2-fold dilution) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ที่มี 0.5% Tween 20 แล้วเทลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อรอกจนอาหารแข็ง จากนั้นหยดเชื้อทดสอบปริมาตร 1-2 ไมโครลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ที่เทไว้

นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ค่าความเข้มข้นของสารที่น้อยที่สุดที่เชื้อไม่สามารถเจริญเติบโตได้คือค่า MIC

3.10 ประเมินฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในน้ำสลัดที่เติมไมโครแคปซูลบรรจุอิมัลชันน้ำมันตะไคร้

นำไมโครแคปซูลที่ผลิตได้ ใส่ลงในน้ำสลัดชนิดชั้น จากนั้นทำการตรวจหาปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ (Total plate count) ทำการเจือจางน้ำสลัดที่ความเข้มข้นต่างๆ (serial dilution) ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างแต่ละความเข้มข้น 0.1 มิลลิลิตร spread ลงบน plate count agar บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ทำการนับเชื้อโดยจะนับเฉพาะจานอาหารที่มีจำนวนเซลล์ระหว่าง 25-250 เซลล์ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย ค่าที่ได้มีหน่วยเป็น colony forming unit (CFU)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การหาค่าองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดย *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY189 ระดับขวดเขย่า

Pichia anomala PY1 เป็นยีสต์ที่คัดแยกได้จากข้าวหมาก จากอำเภอพนัสนิคม จังหวัดชลบุรี โดย ธนัสถา เชียงอุทัย (2549) ซึ่งเป็นยีสต์ที่ร้อนที่สามารถเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 40 องศาเซลเซียส มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีบนอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน และโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน

ในปี 2008 Thaniyavarn และคณะ รายงานว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *Pichia anomala* PY1 ที่ใช้น้ำมันถั่วเหลือง 4% เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถลดแรงตึงผิวได้ต่ำสุด 28-30 มิลลินิวตันต่อเมตร ค่าการกระจายน้ำมัน 7.07 ตารางเซนติเมตร ค่าความเข้มข้นวิกฤตการเกิดไมเซลล์ (CMC) 180 มิลลิกรัมต่อลิตร และให้ผลผลิต 0.26 กรัมต่อลิตร เป็นสารลดแรงตึงผิวประเภทไกลโคลิพิด และมีมวลโมเลกุลเทียบเคียงกับไซโฟโรลิพิด

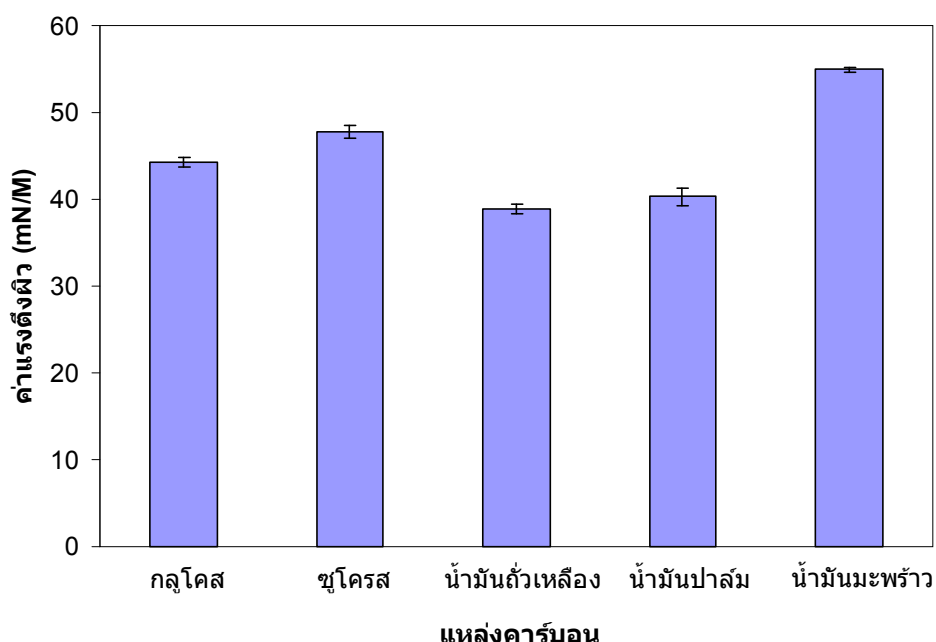
Pichia anomala PY189 เป็นสายพันธุ์ที่ได้จากการกลายพันธุ์ *P. anomala* PY1 ด้วย Ethylmethane sulfonate (EMS) และคัดแยกโดย รัชญา บุญมี (2551) ซึ่งพบว่าสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดี ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้นำแหล่งคาร์บอน คือ กลูโคส ซูโครส น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม น้ำมันมะพร้าว และแหล่งไนโตรเจน คือ โซเดียมไนเตรท แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมฟอสเฟต มาเป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมีวัตถุประสงค์ในการหาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่สุดในระดับขวดเขย่า เพื่อหาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม สำหรับใช้เป็นข้อมูลที่จะนำไปสู่การปรับปรุงประสิทธิภาพและปริมาณการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *P. anomala* สายพันธุ์ PY189 เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

จากการทดลองเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่ได้ทำการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนต่างๆ พบว่าน้ำมันถั่วเหลือง ที่ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น 5.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน เหมาะสมที่สุดในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยให้ค่าแรงตึงผิวต่ำสุดที่ 38.94 mN/m Δ ค่าแรงตึงผิว Δ (ผลต่างของค่าแรงตึงผิว ณ เวลาเริ่มต้นและเมื่อสิ้นสุดการทดลอง) เท่ากับ 16.56 mN/m และมีค่าการกระจายน้ำมันมากที่สุดเท่ากับ

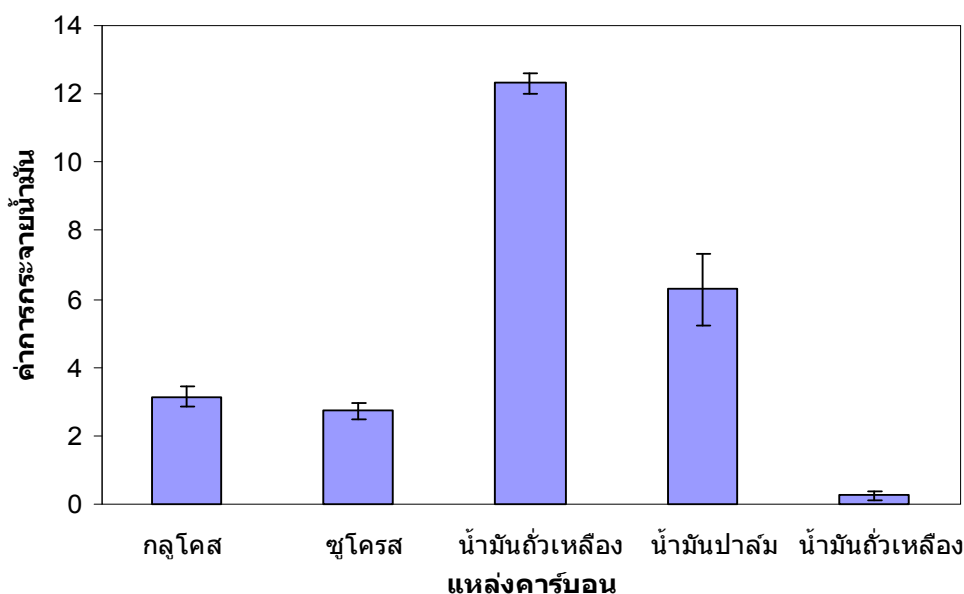
12.33 ตารางเซนติเมตร แสดงผลในตารางที่ 4.1 โดยน้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้ค่าแรงตึงผิวต่ำที่สุด และมีค่าการกระจายน้ำมันมากที่สุดเมื่อเทียบกับแหล่งคาร์บอนอื่นๆที่แสดงในรูปที่ 4.1 และ 4.2 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.1 ผลการศึกษาการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *P.anomala* PY189 ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในขวดเขย่า

แหล่งคาร์บอน (4%)	น้ำหนัก เซลล์แห้ง(g/l)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	Δ ST (mN/m)	ค่าการกระจาย น้ำมัน (cm ²)	pH
กลูโคส	14.87±0.67	44.27±0.5	15.23	3.14±0.29	5.86±0.04
ซูโครส	10.36±0.77	47.83±0.76	13.67	2.72±0.26	6.02±0.10
น้ำมัน ถั่วเหลือง	15.21±0.27	38.94±0.57	16.56	12.33±0.29	6.37±0.16
น้ำมันปาล์ม	14.82±0.27	40.33±1.04	10.33	6.28±1.04	5.74±0.15
น้ำมันมะพร้าว	6.75±0.71	54.94±0.28	9.14	0.25±0.14	5.56±0.08



รูปที่ 4.1 ค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก *P. anomala* สายพันธุ์ PY189 เมื่อแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในขวดเขย่า

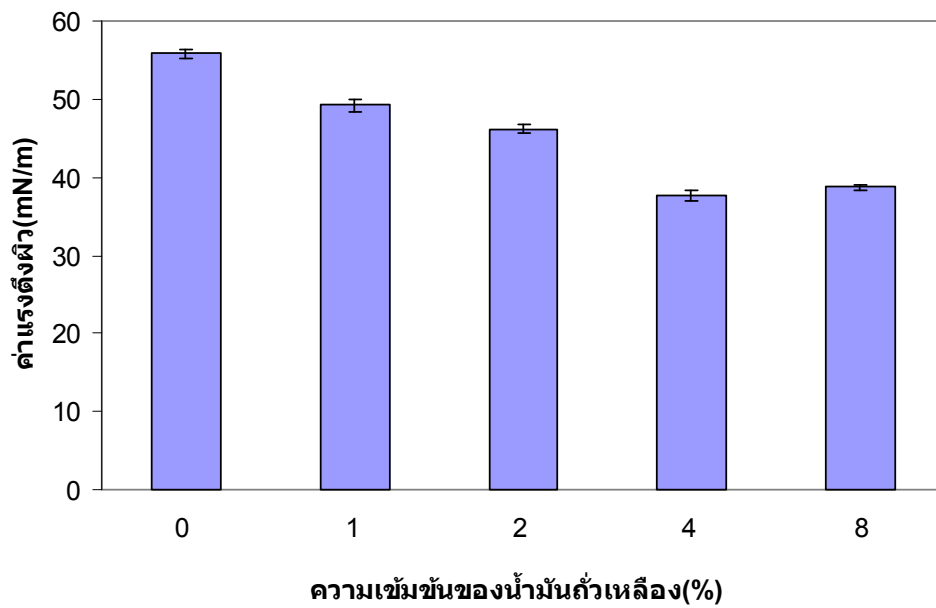


รูปที่ 4.2 การกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก *P. anomala* สายพันธุ์ PY189 เมื่อแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอน ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในขวดเขย่า

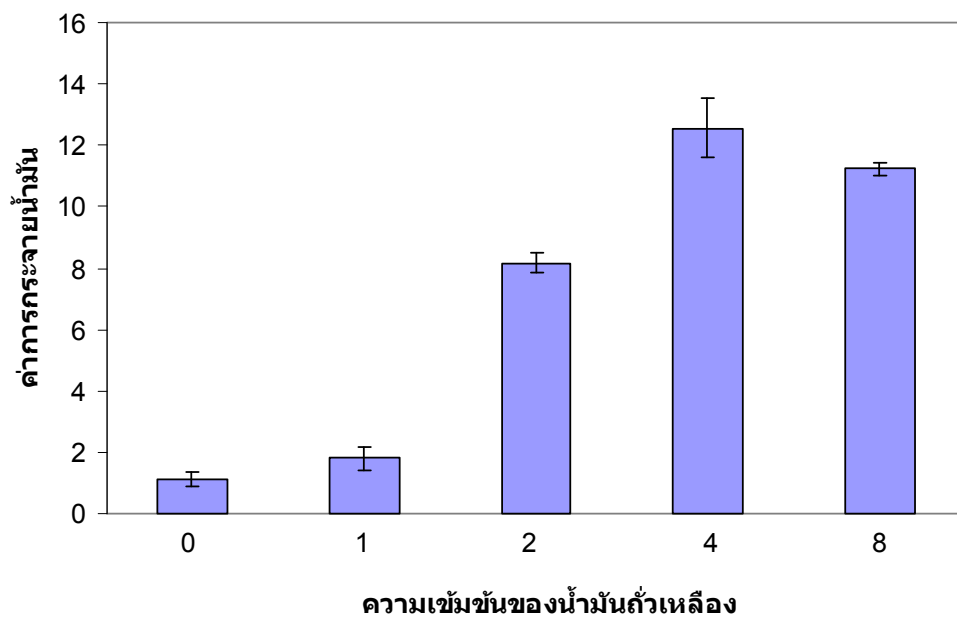
เมื่อได้ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมแล้วคือน้ำมันถั่วเหลือง จากนั้นจึงนำมาแปรผันความเข้มข้นเป็น 0, 1, 2, 4 และ 8 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตร เพื่อหาความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองที่เหมาะสม พบว่าน้ำมันถั่วเหลืองที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น 5.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยให้ค่าแรงตึงผิว 37.57 mN/m และค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 12.56 ตารางเซนติเมตร แสดงผลในตารางที่ 4.2 ซึ่งความเข้มข้นนี้ได้ให้ค่าแรงตึงผิวต่ำที่สุด และมีค่าการกระจายน้ำมันมากที่สุด เมื่อเทียบกับความเข้มข้นอื่นๆ แสดงในรูปที่ 4.3 และ 4.4 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *P. anomala* PY189 ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในขวดเขย่า

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



รูปที่ 4.3 ค่าแรงดึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก *P. anomala* สายพันธุ์ PY189 เมื่อแปรผันความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลือง ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในขวดเขย่า

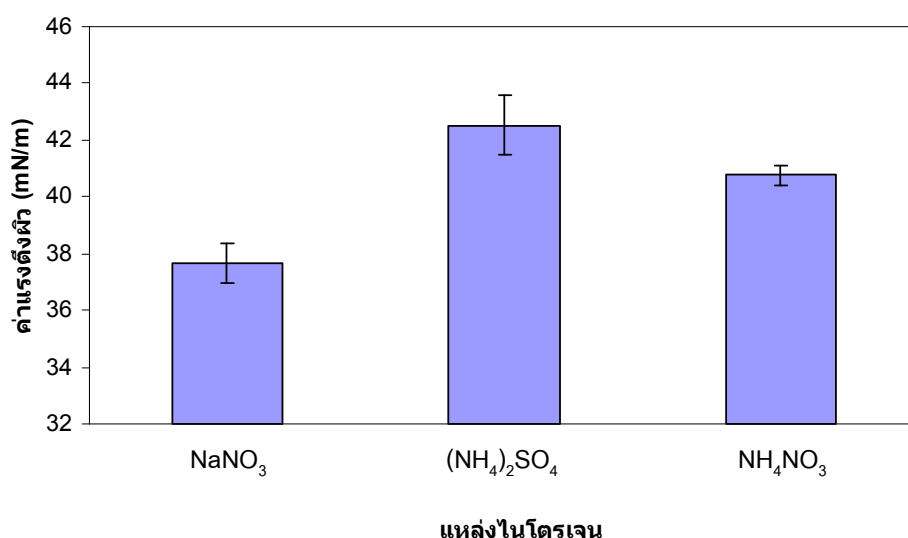


รูปที่ 4.4 การกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก *P. anomala* สายพันธุ์ PY189 เมื่อแปรผันความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลือง ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในขวดเขย่า

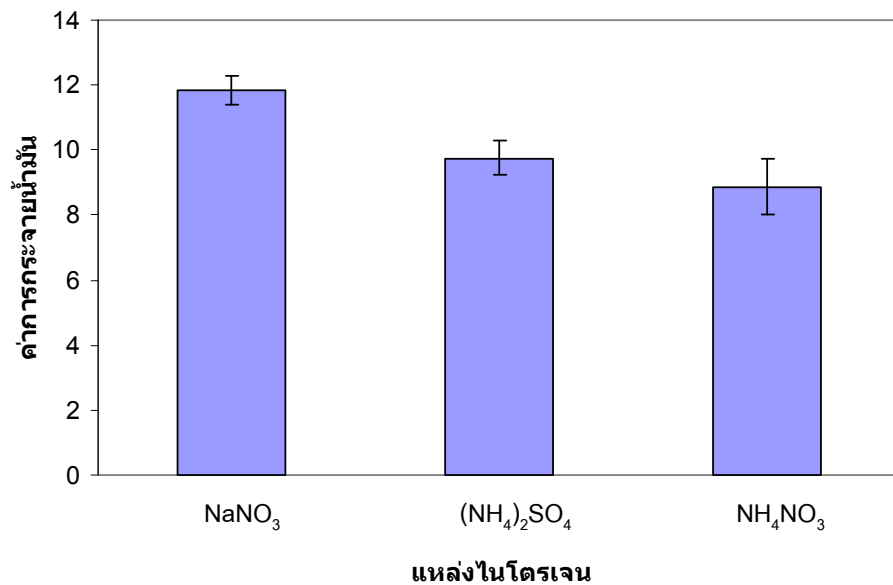
เมื่อได้ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมแล้ว จากนั้นจึงแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม พบว่าไซโตียมไนเตรท ที่ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น 5.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยให้ค่าแรงตึงผิว 37.68 mN/m และค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 11.82 ตารางเซนติเมตร แสดงผลในตารางที่ 4.3 ซึ่งไซโตียมไนเตรทให้ค่าแรงตึงผิวต่ำที่สุด และมีค่าการกระจายน้ำมันมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ ดังแสดงในรูป 4.5 และ 4.6 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.3 ผลการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดย *P. anomala* PY189 ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในขวดเขย่า

แหล่งไนโตรเจน (0.04%)	น้ำหนักเซลล์แห้ง(g/l)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	Δ ST (mN/m)	ค่าการกระจายน้ำมัน (cm ²)	pH
NaNO ₃	12.78±0.29	37.68±0.69	16.73	11.82±0.44	6.23±0.18
(NH ₄) ₂ SO ₄	10.65±0.27	42.52±1.03	12.48	9.76±0.52	6.17±0.27
NH ₄ NO ₃	11.76±0.68	40.76±0.36	11.57	8.87±0.85	6.33±0.11



รูปที่ 4.5 ค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก *P. anomala* สายพันธุ์ PY189 เมื่อแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจน ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในขวดเขย่า

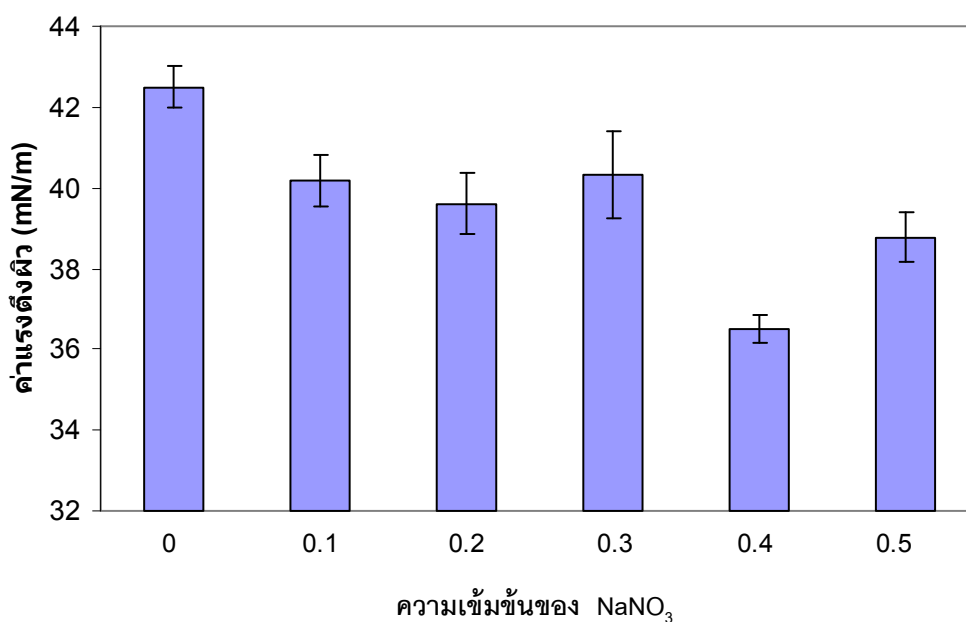


รูปที่ 4.6 การกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก *P. anomala* สายพันธุ์ PY189 เมื่อแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในขวดเขย่า

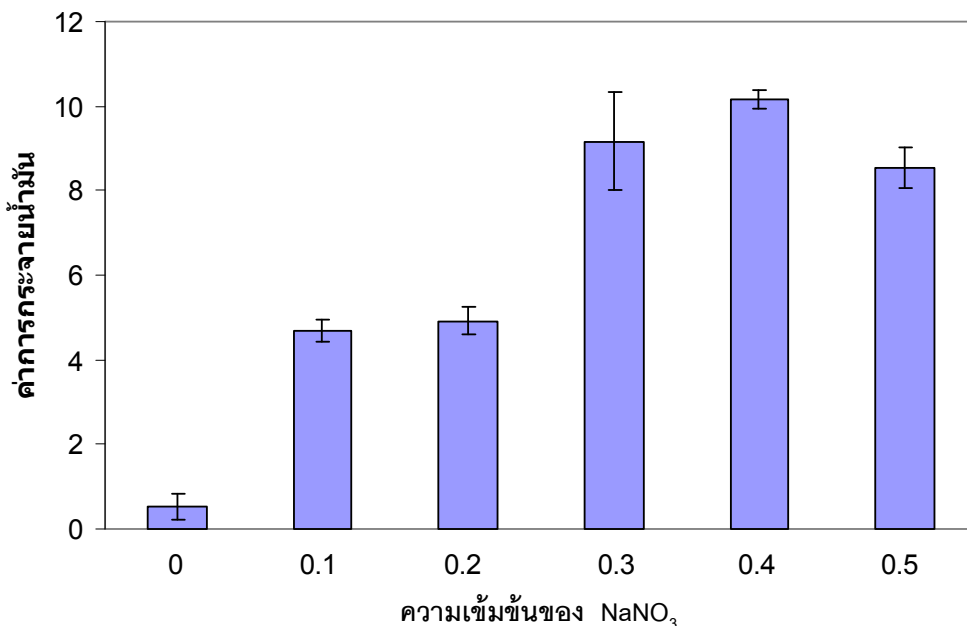
เมื่อได้แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมแล้ว คือ โซเดียมไนเตรท จากนั้นจึงแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทเป็น 0 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ มวลต่อปริมาตร เพื่อหาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม พบว่าโซเดียมไนเตรท ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น 5.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยให้ค่าแรงตึงผิว 36.50 mN/m และค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 10.17 ตารางเซนติเมตร แสดงผลในตารางที่ 4.4 ซึ่งโซเดียมไนเตรทให้ค่าแรงตึงผิวต่ำที่สุด และมีค่าการกระจายน้ำมันมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ ดังแสดงในรูป 4.7 และ 4.8 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.4 ผลการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *P.anomala* PY189 ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในขวดเขย่า

ความเข้มข้นของ NaNO ₃ (%)	น้ำหนักเซลล์แห้ง(g/l)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	Δ ST (mN/m)	ค่าการกระจายน้ำมัน (cm ²)	pH
0	2.26±0.41	42.50±0.5	10.57	0.53±0.29	6.04±0.05
0.1	4.19±0.54	40.19±0.63	10.95	4.68±0.25	6.96±0.53
0.2	9.66±0.33	39.61±0.77	14.80	4.92±0.32	6.52±0.13
0.3	10.75±0.39	40.32±1.06	13.06	9.16±1.16	7.04±0.15
0.4	14.54±0.61	36.50±0.34	18.45	10.17±0.23	7.11±0.11
0.5	10.20±0.13	38.77±0.61	16.24	8.53±0.48	7.34±0.41



รูปที่ 4.7 ค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก *P. anomala* สายพันธุ์ PY189 เมื่อแปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในขวดเขย่า



รูปที่ 4.8 การกระจายน้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก *P. anomala* สายพันธุ์ PY189 เมื่อแปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในขวดเขย่า

4.2 การผลิต สกัด และการทำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วน

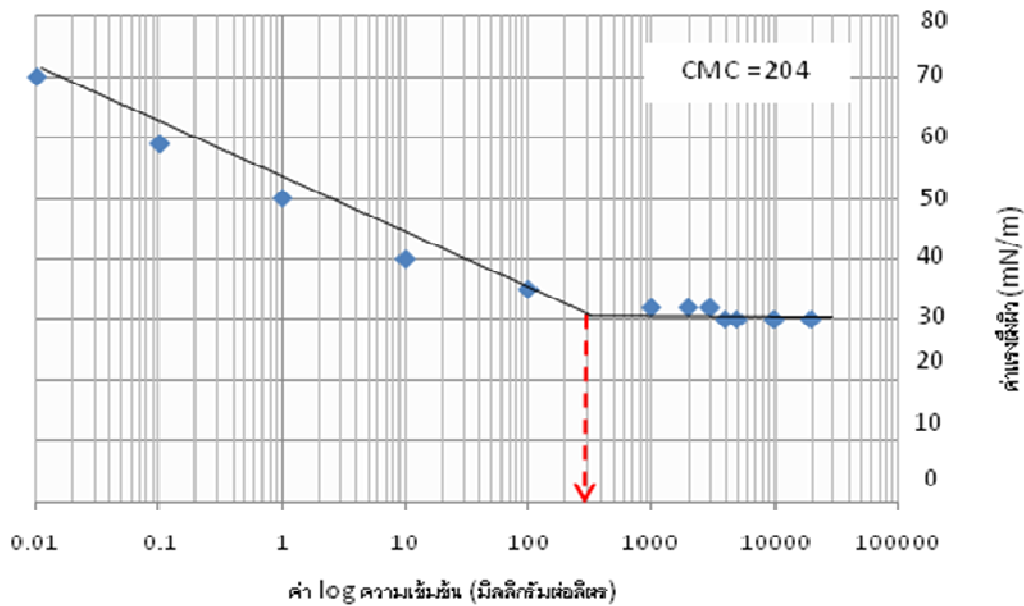
Pichia anomala สายพันธุ์ PY 189 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในอาหารเหลวปรับปรุงสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน และโซเดียมไนเตรท 0.4 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยนำสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมนี้ มาทำการทดลองภายในขวดเขย่าขนาด 500 มิลลิลิตร โดยมีอาหารเลี้ยงเชื้อ 200 มิลลิลิตร ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.5 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน และทำการสกัดด้วยสารละลายอินทรีย์เพื่อหาปริมาณของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า *P. anomala* PY189 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ในปริมาณสูงที่สุดที่ 0.57 กรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่า *P. anomala* PY1 ที่ผลิตได้ 0.45 กรัมต่อลิตร ในระดับขวดเขย่า

4.3 ลักษณะสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

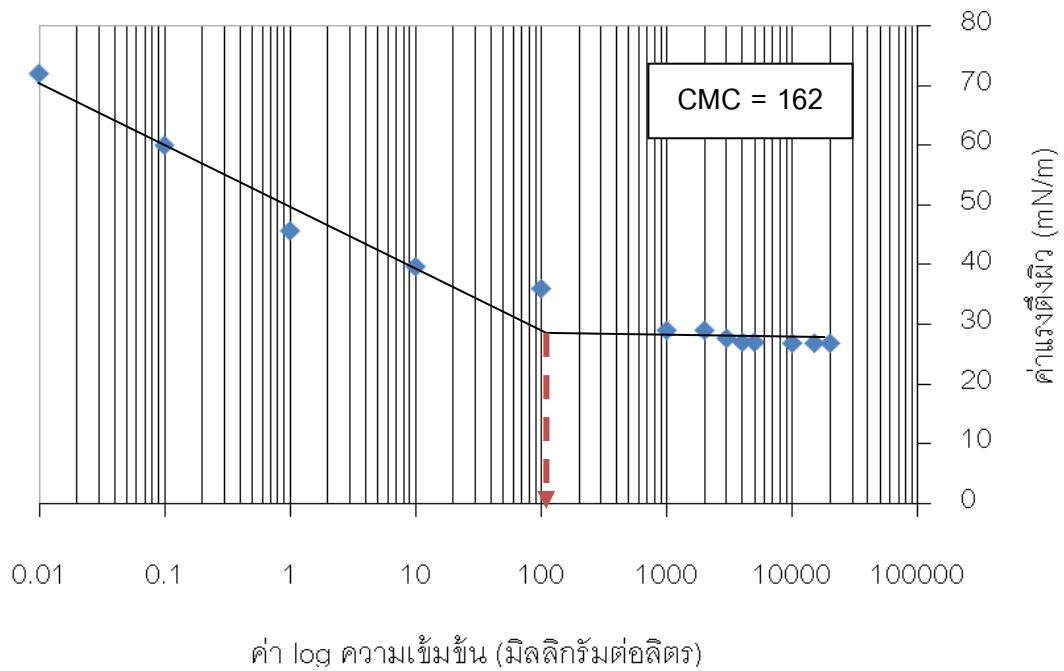
4.3.1 ค่าความเข้มข้นวิกฤติของการเกิดไมเซลล์ (Critical micelle concentration; CMC)

ค่าความเข้มข้นวิกฤติของการเกิดไมเซลล์หรือค่าจุดวิกฤติการเกิดไมเซลล์ สามารถวิเคราะห์ได้โดยเจือจางสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8 เตรียมให้มีความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0.01-20,000

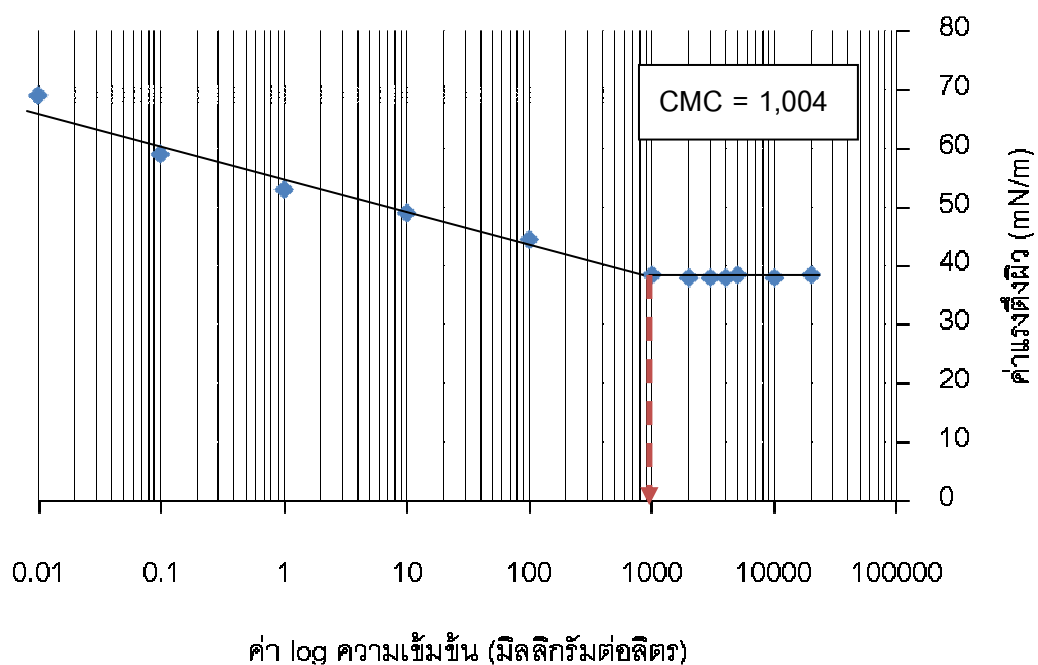
มิลลิกรัมต่อลิตร นำสารละลายแต่ละความเข้มข้นไปวัดค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่อง Tensiometer และนำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟเพื่อหาค่า CMC พบว่า ค่าแรงตึงผิวที่วัดได้สามารถแบ่งออกได้เป็นสองช่วง โดยในช่วงแรกค่าแรงตึงผิวจะมีค่าลดลงเรื่อยๆ ตามความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้น หลังจากนั้น ค่าแรงตึงผิวจะมีค่าค่อนข้างคงที่ ไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของสาร ซึ่งความเข้มข้นวิกฤติของการเกิดไมเซลล์นี้เป็นค่าที่มีความจำเพาะในสารแต่ละชนิด และยังแสดงถึงประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชนิดนั้นๆ ด้วย ซึ่งค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *P. anomala* PY189 มีค่า CMC เท่ากับ 204 มิลลิกรัมต่อมิลลิเมตร และมีค่าแรงตึงผิว ณ การเกิดไมเซลล์ (γ_{CMC}) เท่ากับ 30 mN/m แสดงผลในรูปที่ 4.9 ซึ่งค่า CMC และ γ_{CMC} ที่ได้มีค่าสูงกว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *P. anomala* PY1 (รูปที่ 4.10) แต่มีค่าต่ำกว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์สองชนิดคือโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต(รูปที่ 4.11)และไทรทอนเอกซ์100 (รูปที่ 4.12) โดยเปรียบเทียบค่า CMC และ γ_{CMC} ดังแสดงในตารางที่ 4.5



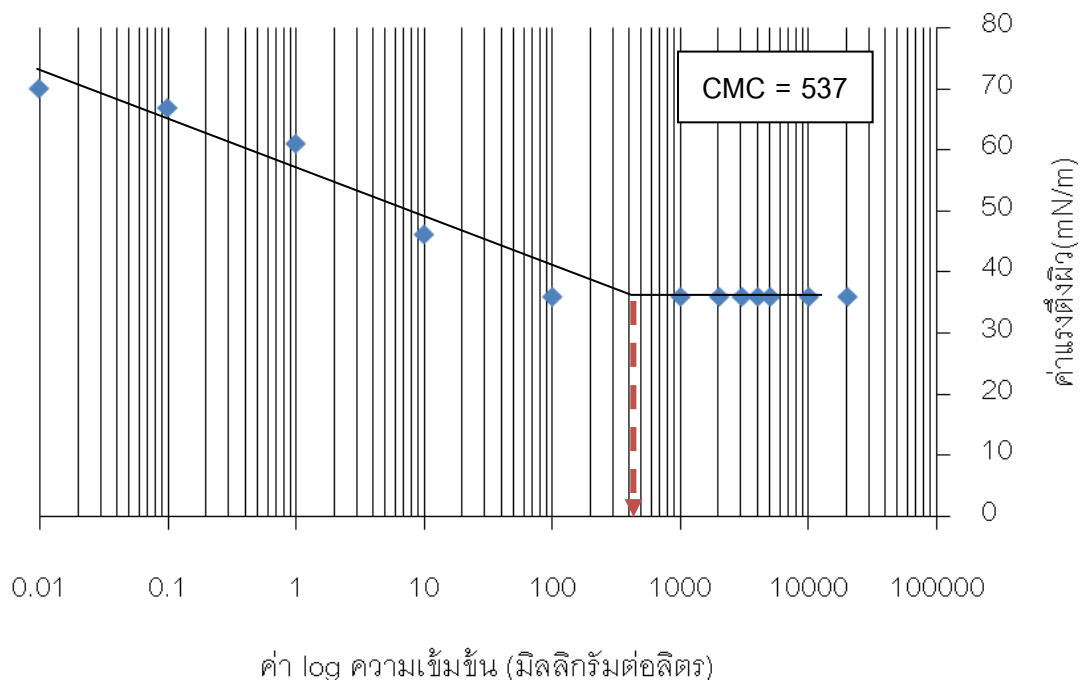
รูปที่ 4.9 กราฟแสดงค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *P. anomala* PY189



รูปที่ 4.10 ค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1 จากการเขียนกราฟระหว่างค่า log ความเข้มข้นของสารและค่าแรงตึงผิว



รูปที่ 4.11 ค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ โยเดียมโดเดซิลซัลเฟต จากการเขียนกราฟระหว่างค่า log ความเข้มข้นของสารและค่าแรงตึงผิว



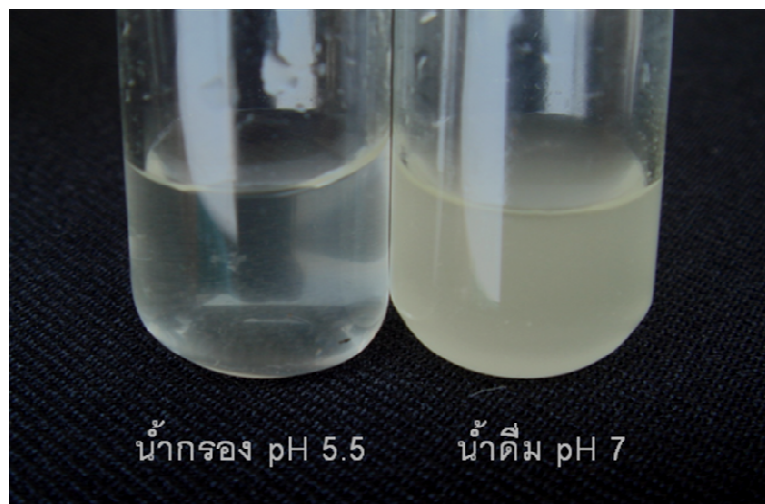
รูปที่ 4.12 ค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ ไทรทอนเอกซ์ 100 จากการเขียนกราฟระหว่างค่า log ความเข้มข้นของสารและค่าแรงตึงผิว

ตารางที่ 4.5 เปรียบเทียบค่าความเข้มข้นวิกฤติของการเกิดไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *P. anomala* PY189 กับสารลดแรงตึงผิวชนิดอื่น

สารลดแรงตึงผิว	ค่า CMC (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่า γ_{CMC} (mN/m)
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จาก <i>P. anomala</i> PY189	204	30
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จาก <i>P. anomala</i> PY1	162	30
ไทรทอน เอกซ์ 100	537	36
โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	1,004	38

4.3.2 ค่า Hydrophilic-Lipophilic Balance (HLB)

ค่า Hydrophilic-Lipophilic Balance คือ ค่าที่บอกลักษณะสมบัติที่ชอบน้ำและชอบน้ำมันของสารลดแรงตึงผิว ค่า HLB มีค่าตั้งแต่ 0-20 หากถ้ามีค่าเป็น 0 จะเป็นสารลดแรงตึงผิวที่ชอบน้ำมันทั้งหมด ในทางตรงข้ามหากมีค่าเป็น 20 จะชอบน้ำทั้งหมด โดยค่า HLB นี้ยังสามารถบอกลักษณะหรือประโยชน์ของสารลดแรงตึงผิวชนิดนั้นๆได้ จากการทดลองเมื่อนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบริสุทธิ์บางส่วนที่สกัดได้มาละลายในน้ำกรองและน้ำดื่มเพื่อสังเกตความสามารถในการละลายของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่า สารละลายที่ได้มีลักษณะโปร่งแสง และกระจายตัวได้ดีในน้ำ ดังรูปที่ 4.13 โดยลักษณะดังกล่าวสามารถบ่งชี้ถึงค่า HLB ได้ในช่วง 10-13 ที่บอกได้ว่าเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีสมบัติในการก่ออิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำได้ดี (ดังตารางที่ 3.1)



รูปที่ 4.13 ลักษณะของสารละลายสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบริสุทธิ์บางส่วนที่ผลิตโดย *P. anomala* PY189 เมื่อละลายในน้ำกรอง และน้ำดื่ม

4.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธีโครมาโทกราฟี

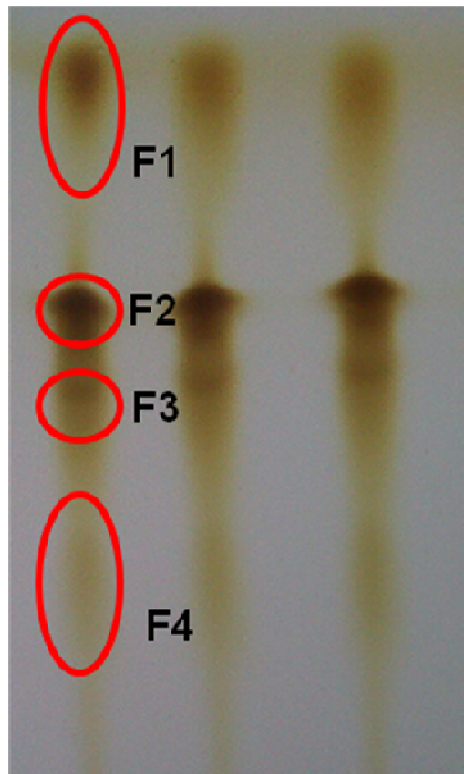
4.4.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (TLC)

ทดสอบและแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ โดยใช้แผ่น TLC silica gel 60 เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยคลอโรฟอร์ม เมทานอล และน้ำ ในอัตราส่วน 65: 25: 4 ตามลำดับ แล้วจึงนำไปอบด้วยไอระเหยของไอโอดีนเพื่อวิเคราะห์หาส่วนที่มีพันธะคู่เป็นองค์ประกอบ พบว่า เมื่อนำสารที่สกัดได้มาทดสอบ สามารถแยกสารออกได้เป็น 4 ลำดับส่วน เรียกว่า F1, F2, F3 และ F4 ตามลำดับ ในรูปที่ 4.14 และค่าคงที่ของอัตราส่วนการเคลื่อนที่ (R_f) มีค่าใกล้เคียงกันดังแสดงในตารางที่ 4.6

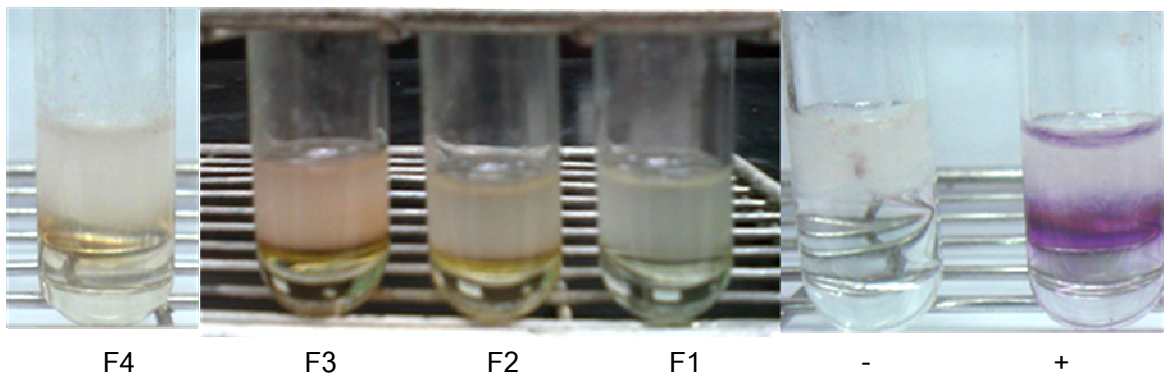
เมื่อสกัดแต่ละลำดับส่วนและนำมาเจือจางด้วย 50 มิลลิโมลาร์ทริสไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ความเป็นกรดต่าง 8 ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อนำมาตรวจสอบประสิทธิภาพด้วยการวัดค่าการกระจายน้ำมัน พบว่า F3 มีค่าการกระจายน้ำมันสูงสุด คือ 13.84 ตารางเซนติเมตร ดังแสดงในตารางที่ 4.6 และเมื่อตรวจสอบแต่ละลำดับส่วนด้วยการเจือจางในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้นประมาณ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อหาส่วนที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบด้วยมอร์ริซ รีเอเจนท์ พบว่าลำดับส่วน F2 และ F3 ให้ผลบวก โดยเกิดเป็นสีน้ำตาลเข้มระหว่างชั้นของสารละลายกับชั้นของกรด ดังแสดงในรูปที่ 4.15 จึงสันนิษฐานได้ว่า *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY189 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหรือเป็นสารประเภทไกลโคลิพิด

ตารางที่ 4.6 ค่าการกระจายน้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จากแผ่น TLC ในแต่ละลำดับส่วน

แถบที่	R_f	ค่าการกระจายน้ำมัน (cm^2)
F1	0.92	2.43
F2	0.81	11.33
F3	0.76	13.84
F4	0.55	3.14



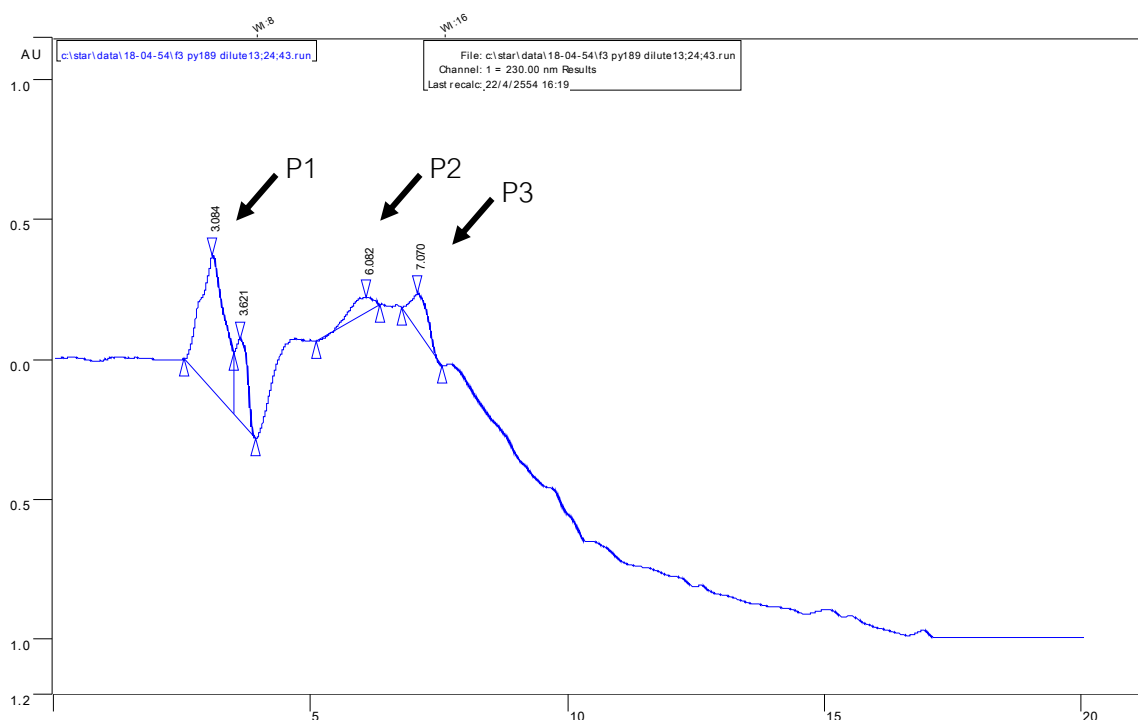
รูปที่ 4.14 ผลการวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *P. anomala* PY189 ด้วยวิธี Thin-layer Chromatography เมื่อตรวจสอบผลด้วยไอโอดีน



รูปที่ 4.15 ผลการวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จากแผ่น TLC ในแต่ละลำดับส่วน เมื่อตรวจสอบผลด้วย มอริช รีเอเจนท์

4.4.2 การทำบริสุทธิ์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC)

ทำการสกัดตัวอย่างสารจากตำแหน่ง F3 ที่เตรียมได้จาก preparative TLC ซึ่งให้ผลบวกในการทดสอบด้วยมอริช รีเอเจนท์ และสามารถกระจายน้ำมันได้ดี มาวิเคราะห์และทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) โดยละลายสารตัวอย่างด้วย 100 % อะซิโตรไนโตรลีนีให้มีความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้ภาวะดังข้อ 3.4.3 และทำการเก็บลำดับส่วนของตัวอย่างตำแหน่ง F3 ที่ปรากฏจำนวน 3 ลำดับส่วน และกำหนดให้เรียกชื่อสารที่เก็บได้หลังจากผ่าน HPLC ของตำแหน่ง F3 ทั้ง 3 ลำดับส่วนนี้ว่า P1 ถึง P3 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.16 ต่อจากนั้นจึงนำมาทำให้แห้งในภาวะสุญญากาศ แล้วเติม 50 มิลลิโมลาร์ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรดต่าง เท่ากับ 8 เจือจางให้มีความเข้มข้นเป็น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารที่เตรียมได้ไปวัดค่าการกระจายน้ำมัน ดังแสดงในตารางที่ 4.7 พบว่า หลังจากผ่าน HPLC ลำดับส่วนที่ 2 ที่ RT 6.08 นาที มีประสิทธิภาพในการกระจายน้ำมันได้ดีที่สุด คือ 12.16 ตารางเซนติเมตร



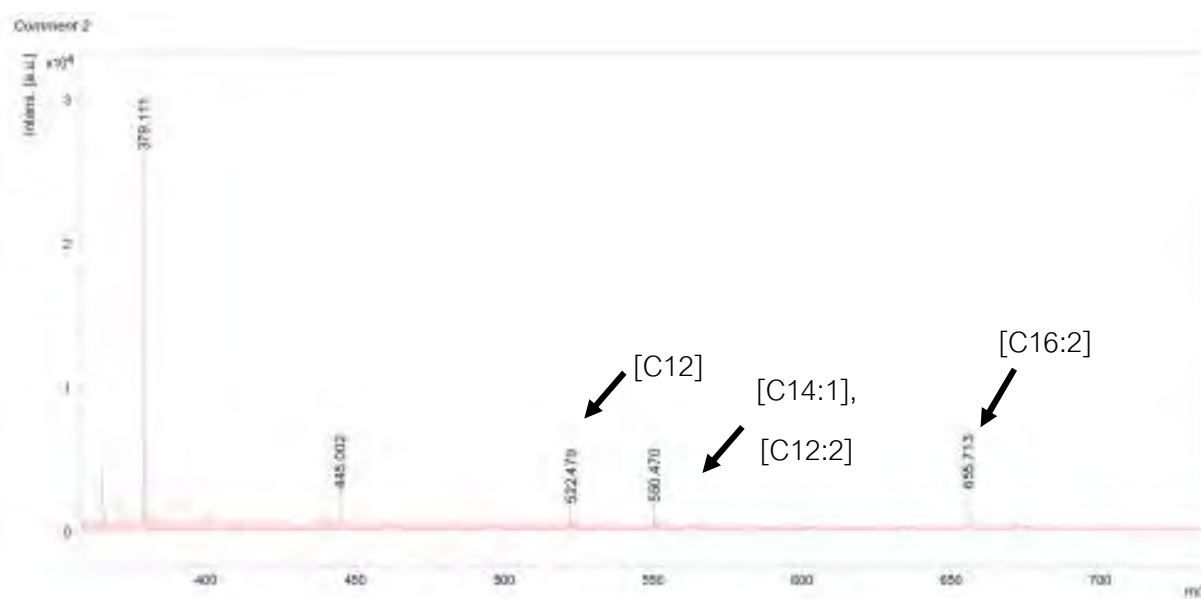
รูปที่ 4.16 โครมาโทแกรมของตัวอย่างลำดับส่วน F3 จาก HPLC โดยตำแหน่งที่เก็บตัวอย่างได้แก่ RT ที่ 3.08, 6.08 และ 7.07 นาที ตามลำดับ

ตารางที่ 4.7 ค่าการกระจายน้ำมันของตัวอย่างตำแหน่ง F3 ที่ผ่านการวิเคราะห์และทำให้บริสุทธิ์ด้วย HPLC

ตำแหน่งพีกจากลำดับส่วน F3	Retention time (RT) (นาที)	ค่าการกระจายน้ำมัน (cm ²)
1 (P1)	3.08	4.01
2 (P2)	6.08	12.16
3 (P3)	7.07	8.79

4.5 วิเคราะห์องค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้

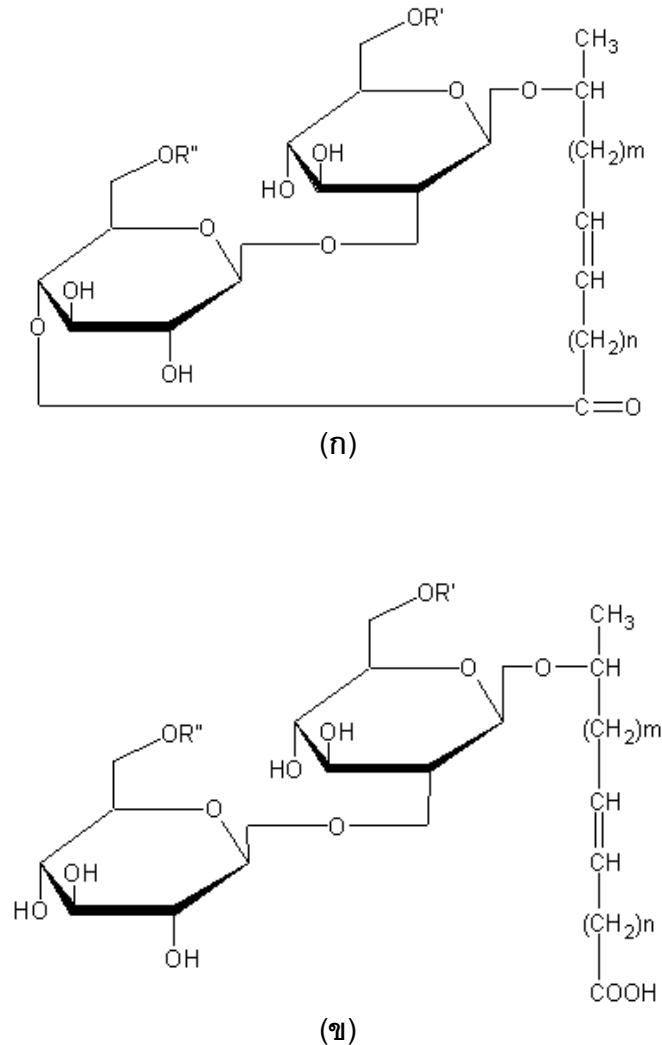
นำตัวอย่างสาร P2 จากตำแหน่ง F3 ซึ่งผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย HPLC มาวิเคราะห์หาน้ำหนักมวลโมเลกุลด้วยวิธีแมสสเปกโทเมตรี โดยใช้เทคนิค MALDI-TOF ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.17 โครมาโทแกรมของ MALDI-TOF MS จากตัวอย่างสาร P2

ผลการวิเคราะห์แต่ละลำดับส่วนด้วยวิธี MALDI-TOF (รูปที่ 4.17) แสดงถึงค่ามวลต่อประจุของไอออน (m/z) ที่บ่งบอกถึงน้ำหนักมวลโมเลกุลของสารจึงช่วยให้สามารถวิเคราะห์โครงสร้างของสารที่ผลิตได้ โดยการคำนวณจากสูตรโครงสร้าง ดังแสดงผลการวิเคราะห์ในตารางที่

4.8 พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากยีสต์ *Pichia anomala* PY189 มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 522, 548 และ 648 เทียบเคียงได้กับสารไซโฟลิพิดที่มีโครงสร้างในส่วนของกรดไขมันเป็น C12, C14 และ C16 ทั้งชนิดอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว อยู่ในรูปแบบแลคโตน (lactonic form) และอาจมีการเติมหมู่อะซิติล 1 หรือ 2 ตำแหน่ง



รูปที่ 4.18 โครงสร้างของไซโฟลิพิดที่ประกอบด้วยน้ำตาลไซโฟโรสและกรดไขมันที่มีความยาวต่างๆ จากการวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF MS (ก) รูปแบบแลคโตน (ข) รูปแบบแอซิด
ที่มา : Konishi และคณะ (2008)

ตารางที่ 4.8 ผลการวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้ ด้วยวิธี MALDI-TOF MS

ตัวอย่างสาร	ค่า RT (นาที) จาก HPLC	ค่า $[M+H]^+$ (m/z)	รูปแบบ	R'/R''	สูตรโครงสร้างของส่วนกรดไขมัน	มวลโมเลกุลจากการคำนวณ
P2	6.08	522.579	Lactone	OH/OH	[C12]	522
		550.470	Lactone	OH/OH	[C14:1]	548
			Lactone	OH/acetate	[C12:2]	
		655.713	Lactone	acetate acetate	[C16:2]	654

4.6 ศึกษาความคงตัวของอิมัลชันน้ำมันตะไคร้ในสารละลายมอลโตเดกซ์ตรินโดยใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

นำสารละลายสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ ละลายในสารละลายมอลโตเดกซ์ตรินที่มีความเข้มข้น 20 กรัมต่อเดซิลิตร และแปรผันความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเท่ากับ 0.6 0.8 และ 1 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก เตรียมสารละลายอิมัลชันของน้ำมันตะไคร้ โดยเติมน้ำมันตะไคร้ลงในสารละลายที่เตรียมไว้ โดยแปรผันสัดส่วนน้ำมันต่อมอลโตเดกซ์ตรินเป็น 0.2:1 0.15:1 และ 0.1:1 เมื่อวิเคราะห์ผลด้วยการสังเกตการแยกชั้นของอิมัลชัน หลังจากตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงพบว่า อิมัลชันที่มีสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 0.6 เปอร์เซ็นต์ อิมัลชันจะมีความเสถียรต่ำ โดยจะแยกชั้นหลังจากทำการ Homogenize เพียง 1-2 ชั่วโมง ส่วนอิมัลชันที่มีสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 0.8 และ 1 เปอร์เซ็นต์ อิมัลชันจะมีความเสถียรมากกว่า แสดงผลในตาราง 4.9

ตารางที่ 4.9 ผลการสังเกตความเสถียรของอิมัลชันน้ำมันตะไคร้ เมื่อตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (%)	อัตราส่วนของน้ำมันตะไคร้ต่อมอลโตเดกซ์ตริน		
	0.1:1	0.15:1	0.2:1
0.6	-	-	-
0.8	+	+	+
1.0	+	+	+

+ อิมัลชันมีความเสถียรหลังจาก 24 ชั่วโมง - อิมัลชันแยกชั้นหลังจาก 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.10 ขนาดอนุภาคเฉลี่ยโดยปริมาตร (volume weighted average diameter หรือค่า $D[4,3]$) (ไมครอน) ของอิมัลชันน้ำมันตะไคร้ที่ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นตัวก่ออิมัลชัน

ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (%)	ขนาดอนุภาคเฉลี่ยโดยปริมาตร(ไมครอน)		
	อัตราส่วนของน้ำมันตะไคร้ต่อมอลโตเดกซ์ตริน		
	0.1:1	0.15:1	0.2:1
0.8	10.17	11.53	13.73
1.0	4.13	5.97	7.96

ตารางที่ 4.11 ขนาดอนุภาคเฉลี่ยโดยพื้นที่ผิว (surface weighted average diameter หรือค่า $D[3,2]$) (ไมครอน) ของอิมัลชันน้ำมันตะไคร้ที่ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นตัวก่ออิมัลชัน

ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (%)	ขนาดอนุภาคเฉลี่ยโดยพื้นที่ผิว(ไมครอน)		
	อัตราส่วนของน้ำมันตะไคร้ต่อมอลโตเดกซ์ตริน		
	0.1:1	0.15:1	0.2:1
0.8	2.77±0.06	2.57±0.01	2.46±0.01
1	2.68±0.03	2.41±0.07	2.16±0.06

และเมื่อนำอิมัลชันที่มีความเสถียรไปวัดขนาดของอนุภาคพบว่า อิมัลชันที่เตรียมได้มีขนาดอนุภาคเฉลี่ยโดยพื้นที่ผิวใกล้เคียงกันคือ ประมาณ 2 ไมครอน แสดงผลในตาราง 4.11 ในขณะที่อิมัลชันที่มีความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมากกว่าจะมีขนาดอนุภาคเฉลี่ยโดยปริมาตรเล็กกว่าอิมัลชันที่มีความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่ำกว่า (ตารางที่ 4.10) และ

อิมัลชันที่มีอัตราส่วนของน้ำมันตะไคร้ต่อมอลโตเดกซ์ตรินต่ำกว่าจะมีขนาดอนุภาคเล็กกว่า
อิมัลชันที่มีอัตราส่วนของน้ำมันตะไคร้ต่อมอลโตเดกซ์ตรินสูงกว่า

4.7 การผลิตไมโครแคปซูลของอิมัลชันน้ำมันตะไคร้ด้วยการอบแห้งแบบพ่นกระจาย

เตรียมอิมัลชันน้ำมันตะไคร้โดยใช้สารลดแรงตึงผิวซีวภาพ 1% อัตราส่วนของน้ำมันตะไคร้ต่อมอลโตเดกซ์ตรินเป็น 0.2:1 และ 0.15:1 โดยเตรียมให้มีปริมาตร 1 ลิตร ต่อการอบแห้งแบบพ่นกระจาย 1 ครั้ง นำอิมัลชันที่เตรียมไว้มาทำแห้งแบบพ่นกระจายโดยปรับอุณหภูมิลมร้อนขาเข้าเป็น 180 ± 5 องศาเซลเซียส และปรับอุณหภูมิลมร้อนขาออกเป็น 110 ± 5 องศาเซลเซียส ดัดแปลงตามวิธีของ Beristain และคณะ (2001) บรรจุไมโครแคปซูลที่ได้ในถุง laminated aluminium foil ที่ปิดผนึกแบบสุญญากาศ พบว่าไมโครแคปซูลที่ผลิตได้มีลักษณะเป็นผงสีขาว และมีกลิ่นของน้ำมันตะไคร้ ดังแสดงในรูป 4.19

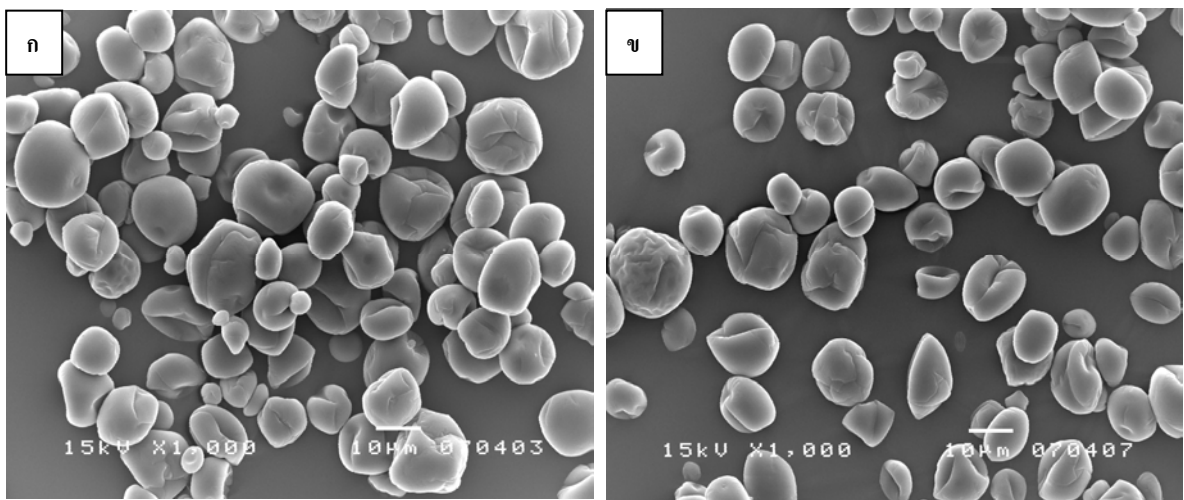


รูปที่ 4.19 ผงไมโครแคปซูลบรรจุน้ำมันตะไคร้ที่ได้จากการอบแห้ง

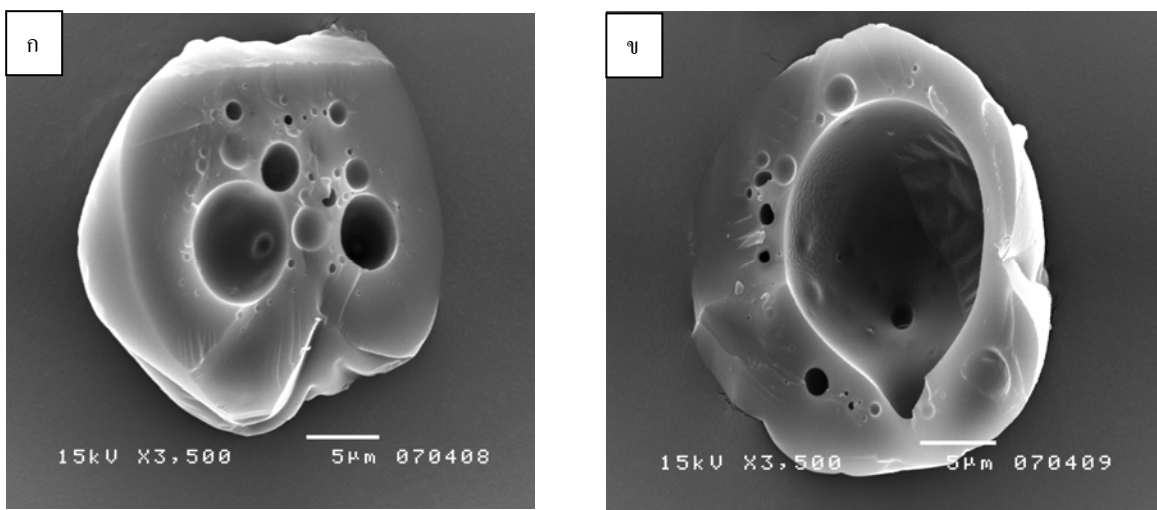
4.8 คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของไมโครแคปซูลบรรจุอิมัลชันน้ำมันตะไคร้

4.8.1 วิเคราะห์ลักษณะพื้นผิวของไมโครแคปซูล

นำผงไมโครแคปซูลที่ผลิตได้มาวิเคราะห์ลักษณะพื้นผิวด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ดัดแปลงตามวิธีของ Rosenberg และคณะ (1995) เพื่อดูลักษณะพื้นผิวและการกระจายของอนุภาคไมโครแคปซูล แสดงในรูป 4.20 โดยพบว่าพื้นผิวของไมโครแคปซูลที่ผลิตได้มีลักษณะแตกต่างกันออกไป และรูปร่างค่อนข้างกลม หรือ รี เมื่อนำไปวัดขนาดอนุภาคพบว่า ไมโครแคปซูลที่ผลิตได้จากอิมัลชันที่มีอัตราส่วนของน้ำมันตะไคร้ต่อมอลโตเดกซ์ตรินเป็น 0.2:1 และ 0.15:1 มีขนาดอนุภาคเฉลี่ย 9.2 ± 0.78 และ 10.84 ± 0.91 ไมครอน ตามลำดับ



รูปที่ 4.20 ลักษณะพื้นผิวของผงไมโครแคปซูลที่ผลิตได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด โดยมีอัตราส่วนน้ำมันตะไคร้ต่อมอลโตเดกซ์ตริน (ก) 0.2:1 และ (ข) 0.15:1



รูปที่ 4.21 ภาพตัดขวางของผงไมโครแคปซูลที่ผลิตได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด โดยมีอัตราส่วนน้ำมันตะไคร้ต่อมอลโตเดกซ์ตริน (ก) 0.2:1 และ (ข) 0.15:1

4.8.2 วิเคราะห์ประสิทธิภาพของการทำไมโครแคปซูล

จากการดัดแปลงจากวิธีของ Hogan และคณะ (2001) เมื่อนำไมโครแคปซูลที่ผลิตได้ 2 กรัม มาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำมันทั้งหมด และปริมาณน้ำมันที่ผิวหน้า แสดงผลในตารางที่ 4.12 จากนั้นหาประสิทธิภาพการทำไมโครแคปซูล (ME%) จากสมการต่อไปนี้

$$\text{ประสิทธิภาพการทำไมโครแคปซูล} = \frac{[(\text{ปริมาณน้ำมันทั้งหมด} - \text{ปริมาณน้ำมันที่ผิวหน้า})] \times 100}{\text{ปริมาณน้ำมันทั้งหมด}}$$

ตารางที่ 4.12 แสดงประสิทธิภาพการทำไมโครแคปซูลของไมโครแคปซูลน้ำมันตะไคร้ที่ผลิตได้

อัตราส่วนสาร แกน:วัสดุเคลือบ	ปริมาณน้ำมัน ทั้งหมด(มก.)	ปริมาณน้ำมันที่ ผิวหน้า(มก.)	ประสิทธิภาพการทำไม โครแคปซูล(%)	ขนาดของไมโครแคปซูล (ไมครอน)
0.2:1	115.06	59.25	48.5 (%)	9.2±0.78
0.15:1	120.31	58.13	51.6 (%)	10.84±0.91

จากการคำนวณพบว่า การทำแห้งแบบพ่นกระจายอิมัลชันน้ำมันตะไคร้โดยใช้อัตราส่วนของน้ำมันตะไคร้ต่อมอลโตเดกซ์ตรินเป็น 0.2:1 และ 0.1 : 1 พบว่า ประสิทธิภาพในการทำไมโครแคปซูลเท่ากับ ร้อยละ 48.5 และ 51.6 ตามลำดับ ซึ่งประสิทธิภาพการทำไมโครแคปซูลจะขึ้นอยู่กับขนาดของไมโครแคปซูล โดยไมโครแคปซูลที่มีขนาดเล็กจะมีประสิทธิภาพต่ำกว่า เนื่องจากมีพื้นที่ผิวที่มากกว่า ทำให้มีประสิทธิภาพในการทำไมโครแคปซูลลดลง (Hogan คณะ, 2001)

4.9 ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของไมโครแคปซูล

ศึกษาผลการยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli*, *S. aureus* และ *Salmonella sp.* ด้วยวิธีการ Agar dilution method พบว่าน้ำมันตะไคร้และไมโครแคปซูลที่บรรจุน้ำมันตะไคร้สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli*, *S. aureus* และ *Salmonella sp.* ได้ โดยมีค่า MIC แสดงในตาราง 4.13 โดยจะสามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และ *S. aureus* ได้ดีกว่าการยับยั้ง *Salmonella sp.* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hammer และคณะ (1999) ที่พบว่า *E. coli* และ *S. aureus* จะมีความไวต่อน้ำมันตะไคร้มากกว่า *Salmonella sp.*

ตาราง 4.13 ค่า MIC ของน้ำมันตะไคร้และไมโครแคปซูลบรรจุน้ำมันตะไคร้

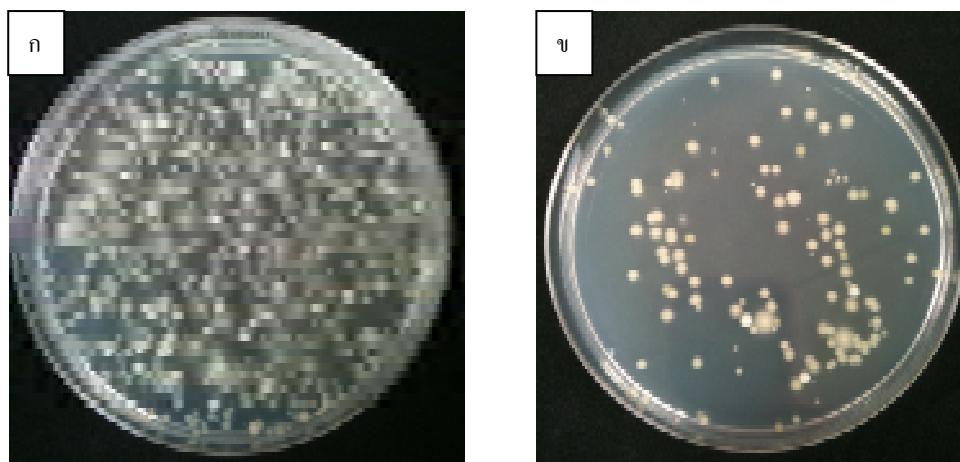
สารที่ทดสอบ	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella sp.</i>
น้ำมันตะไคร้ (% โดยปริมาตร)	0.0625	0.0625	0.125
ไมโครแคปซูล (% โดยมวลต่อปริมาตร)	5	5	5

4.10 ประเมินฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในน้ำสลัดที่เติมไมโครแคปซูลที่ผลิตได้

จากการทำ Total plate count ของน้ำสลัดชนิดชั้นจัดที่ไม่เติมและเติมไมโครแคปซูล น้ำมันตะไคร้ พบว่า สามารถนับจำนวนจุลินทรีย์ได้ดังตาราง โดยน้ำสลัดที่ทำขึ้นเองนั้นมีปริมาณ จุลินทรีย์ 1.31×10^5 CFU/gm ซึ่งเกินปริมาณที่ มอก. ได้กำหนดไว้ว่า จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด จะต้องไม่เกิน 1×10^4 CFU/gm ในขณะที่น้ำสลัดที่มีการเติมไมโครแคปซูลพบว่ามีปริมาณของ จุลินทรีย์ลดลงเหลือ 6.6×10^3 CFU/gm (รูปที่ 4.22)

ตารางที่ 4.14 จำนวนจุลินทรีย์ในน้ำสลัดชนิดชั้นจัดที่ไม่เติมและเติมไมโครแคปซูล น้ำมัน ตะไคร้

ตัวอย่าง	10-fold serial dilutions				การวิเคราะห์ผล
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	
น้ำสลัด	>250	131	23	10	1.31×10^5 CFU/gm
น้ำสลัดเติมไมโครแคปซูล	66	21	3	3	6.6×10^3 CFU/gm



รูปที่ 4.22 จำนวนจุลินทรีย์ในน้ำสลัดชนิดชั้นจัดที่ (ก)ไม่เติมและ(ข)เติมไมโครแคปซูลน้ำมันตะไคร้

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในปัจจุบันผู้บริโภคมีความสนใจเกี่ยวกับสุขภาพ และมีความต้องการสารอาหารที่เป็นสารจากธรรมชาติเพิ่มมากขึ้น สารธรรมชาติต่างๆเหล่านี้จึงทวีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหารมากขึ้นเพื่อทดแทนสารสังเคราะห์ทางเคมี สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นสารชีวโมเลกุลที่สามารถก่อกอิมัลชันได้ดี งานวิจัยนี้จึงศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ตลอดจนศึกษาลักษณะสมบัติบางประการของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY189 เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้

Pichia anomala PY189 เป็นสายพันธุ์ที่ได้จากการกลายพันธุ์ด้วย Ethylmethane sulfonate (EMS) และคัดแยกโดย รัจนา บุญมี (2551) จากการทดลองเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่ได้ทำการแปรผันชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันถั่วเหลือง 4% และ โซเดียมไนเตรท 0.4% เป็นองค์ประกอบ ที่ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น 5.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน เหมาะสมที่สุดในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยให้ค่าแรงตึงผิวดำสุดที่ 36.50 mN/m และมีค่าการกระจายน้ำมันมากที่สุดเท่ากับ 10.17 ตารางเซนติเมตร

การวิเคราะห์ลักษณะสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ จากการทดลองพบว่า ค่าความเข้มข้นวิกฤติการเกิดไมเซลล์ (CMC) เท่ากับ 204 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าแรงตึงผิว ณ การเกิดไมเซลล์ (γ_{CMC}) เท่ากับ 30 mN/m ซึ่งมีค่าต่ำกว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ที่นำมาเปรียบเทียบ คือ โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต และไทรทอน เอกซ์ 100 โดยจากการศึกษาของผกา มาศ ราชมนตรี (2551) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *P. anomala* PY1 พบว่า มีค่า CMC เท่ากับ 162 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งต่ำกว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ในการทดลองนี้ โดย Ashby และคณะ (2008) ได้รายงานค่า CMC จะแตกต่างกันออกไปตามโครงสร้างของไฮโฟโรลิติด และยังเป็นค่าเฉพาะตัวที่แสดงถึงประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวนั้นๆ ได้อีกด้วย

ค่า Hydrophilic-lipophilic balance (HLB) เป็นค่าที่แสดงถึงสมบัติความชอบน้ำ หรือไม่ชอบน้ำสารลดแรงตึงผิว ซึ่งแตกต่างกันออกไปตามโครงสร้างของโมเลกุล โดยเป็นสมบัติเฉพาะของสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิดในการละลายน้ำ จากการทดลองพบว่าค่า HLB ของสารที่ผลิตได้มีค่าอยู่ในช่วง 10-13 ซึ่งสอดคล้องกับ Van Bogaert และคณะ (2007) ที่รายงานค่า HLB ของ

ไซโฟโรลิพิดอยู่ในช่วง 10-13 มีประโยชน์สำหรับใช้เป็นสารช่วยคงความเสถียรของอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ นอกจากนี้ ค่า HLB ยังสามารถหาได้จากการคำนวณตามสูตรโครงสร้างของน้ำหนักรวมของโมเลกุลส่วนที่ชอบน้ำเทียบกับน้ำหนักรวมของโมเลกุลทั้งหมด ซึ่งพบว่าค่า HLB ของไซโฟโรลิพิดจะมีค่าเท่ากับ 11-14 ซึ่งใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการทดลองนี้

เมื่อวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธีทีนเลเยอร์โครมาโทกราฟี (TLC) ด้วยไอระเหยของไอโอดีน พบว่าสามารถแยกสารออกได้เป็น 4 ลำดับส่วน คือ F1 ถึง F4 โดยมีค่า R_f เท่ากับ 0.92, 0.81, 0.76 และ 0.55 ตามลำดับ ซึ่งค่าการกระจายน้ำมันตามลำดับดังนี้ $F3 > F2 > F4 > F1$ เมื่อตรวจสอบด้วยมอริช รีเอเจนท์เพื่อตรวจสอบสารที่มีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบ พบว่า F2 และ F3 ให้ผลบวก จึงสันนิษฐานได้ว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY189 ผลิตได้มีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบหรือเป็นสารประเภทไกลโคลิพิด จากนั้นจึงทำบริสุทธิ์ F3 ด้วยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) แล้วเก็บตัวอย่างจากลำดับส่วนที่ปรากฏจาก F3 จำนวน 3 ลำดับส่วน P1-P3 ตามลำดับ เพื่อนำมาหาค่าการกระจายน้ำมัน ซึ่ง ลำดับส่วน P2 ให้ค่าการกระจายน้ำมันได้ดีที่สุด จึงนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี MALDI-TOF MS ต่อไป จากผลการวิเคราะห์ห้บอกได้ถึงน้ำหนักรวมของโมเลกุล โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY189 มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 522, 548 และ 648 เทียบเคียงได้กับสารไซโฟโรลิพิดที่มีโครงสร้างในส่วนของกรดไขมันเป็น C12, C14 และ C16 ทั้งชนิดอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว อยู่ในรูปแบบแลคโตน (lactonic form) และอาจมีการเติมหมู่อะซิติก 1 หรือ 2 ตำแหน่ง ซึ่งไซโฟโรลิพิดรูปแบบแลคโตนนี้จะมีประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวได้ดี (Van Bogeart และคณะ, 2007) แต่อย่างไรก็ตาม การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการทดลองนี้ เป็นแค่เพียงการวิเคราะห์องค์ประกอบเบื้องต้น เนื่องจากสารที่ใช้ในการทำ HPLC มีปริมาณต่ำ ทำให้สารไม่สามารถแยกสารออกมาได้ชัดเจน

เมื่อนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไปใช้เป็นตัวก่ออิมัลชันของน้ำมันตะไคร้ หลังจากตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง พบว่า อิมัลชันที่มีสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 0.6 เปอร์เซ็นต์ อิมัลชันจะมีความเสถียรต่ำ โดยจะแยกชั้นหลังจากทำการ Homogenize เพียง 1-2 ชั่วโมง ส่วนอิมัลชันที่มีสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 0.8 และ 1 เปอร์เซ็นต์ อิมัลชันจะมีความเสถียรมากกว่า ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Velikov และคณะ (2001) ที่รายงานว่า เมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวสูงขึ้น ความเสถียรของอิมัลชันจะมากขึ้น เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวที่เพิ่มขึ้นจะลดแรงตึงผิวได้ดี จากนั้นเมื่อวัดขนาดอนุภาคพบว่า อิมัลชันที่มีความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 1% เป็นตัวก่ออิมัลชัน จะมีขนาดอนุภาคเล็กกว่า 10 ไมครอน และเมื่อนำอิมัลชันที่มีความเสถียรไปวัดขนาดของอนุภาคพบว่า อิมัลชันที่มีอัตราส่วนของน้ำมันตะไคร้ต่อมอลโตเดกซ์ทรินเป็น 0.2:1 และ 0.15:1 ขนาดอนุภาคเฉลี่ยโดยปริมาตรมีค่าเท่ากับ 7.96 และ 5.97 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอิมัลชันที่มี

อัตราส่วนของน้ำมันตะไคร้ต่อมอลโตเดกซ์ทรินสูงกว่าจะมีขนาดอนุภาคเฉลี่ยโดยปริมาตรใหญ่กว่าอิมัลชันที่มีอัตราส่วนของน้ำมันตะไคร้ต่อมอลโตเดกซ์ทรินต่ำกว่า จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าเมื่อทำอิมัลชันของน้ำมันแมคคาเดเมีย การเพิ่มอัตราส่วนระหว่างสารเคลือบ: วัสดุแกน จะมีผลทำให้หยดน้ำมันมีขนาดอนุภาคเล็กลง (ธิดาและคณะ, 2009) นอกจากนี้ McNaee (1998) ยังได้รายงานว่ ขนาดอนุภาคของอนุภาคเฉลี่ยหรือค่า $D[4.3]$ จะขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของสารแกนต่อสารเคลือบ โดยเมื่ออัตราส่วนเพิ่มขึ้น ขนาดอนุภาคจะมีขนาดใหญ่ขึ้น

จากนั้นเมื่อผลิตไมโครแคปซูลด้วยการอบแห้งแบบพ่นกระจาย พบว่า การทำแห้งแบบพ่นกระจายอิมัลชันน้ำมันตะไคร้โดยใช้อัตราส่วนของน้ำมันตะไคร้ต่อมอลโตเดกซ์ทรินเป็น 0.2:1 และ 0.15 : 1 พบว่า ประสิทธิภาพในการทำไมโครแคปซูลเท่ากับ ร้อยละ 48.5 และ 51.6 ตามลำดับ ซึ่งประสิทธิภาพการทำไมโครแคปซูลจะขึ้นอยู่กับขนาดของไมโครแคปซูล โดยไมโครแคปซูลที่มีขนาดเล็กจะมีประสิทธิภาพต่ำกว่า เนื่องจากมีพื้นที่ผิวที่เพิ่มขึ้น ปริมาณน้ำมันที่ผิวหน้าจึงมากกว่า ทำให้มีประสิทธิภาพในการทำไมโครแคปซูลลดลง (Hogan คณะ, 2001) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Young และคณะ (1996) ซึ่งรายงานว่ เมื่อขนาดของอนุภาคลดลง อนุภาคจะมีการปลดปล่อยน้ำมันที่ผิวหน้าเพิ่มมากขึ้น ทำให้ประสิทธิภาพในการห่อหุ้มสารแกนลดลง และเมื่อนำไมโครแคปซูลที่ผลิตได้มาศึกษาผลการยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli*, *S. aureus* และ *Salmonella sp.* ด้วยวิธีการ Agar dilution method พบว่าน้ำมันตะไคร้และไมโครแคปซูลที่บรรจุน้ำมันตะไคร้สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli*, *S. aureus* และ *Salmonella sp.* ได้ โดยจะสามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และ *S. aureus* ได้ดีกว่าการยับยั้ง *Salmonella sp.* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hammer และคณะ (1999) ที่พบว่า *E. coli* และ *S. aureus* จะมีความไวต่อน้ำมันตะไคร้ และไมโครแคปซูลที่ผลิตได้ยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอยู่ จากงานวิจัยของ Leimann และคณะ (2008) ที่ทำการสกัดน้ำมันตะไคร้หลังการทำไมโครแคปซูล พบว่าค่า MIC ที่ได้ไม่เปลี่ยนแปลงจากน้ำมันตะไคร้ก่อนการทำไมโครแคปซูล แสดงว่าการทำไมโครแคปซูลนั้นไม่ทำให้สมบัติของน้ำมันตะไคร้เปลี่ยนแปลงไป

เมื่อการประเมินฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในน้ำสลัดที่เติมไมโครแคปซูลที่ผลิตได้ พบว่า ไมโครแคปซูลยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์อยู่ โดยสามารถลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดเหลือ 6.6×10^3 CFU ต่อกรัม ซึ่งการทดลองในครั้งนี้เป็นการประเมินผลเบื้องต้นถึงความเป็นไปได้ในการจะนำไมโครแคปซูลบรรจุน้ำมันตะไคร้ไปประยุกต์ใช้ในอาหาร ซึ่งหากจะมีการจะนำไปใช้จริงในอาหารควรที่จะมีการทดสอบทางพิษวิทยาของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ รวมถึงติดตามประสิทธิภาพ ความคงตัว และความเสถียรของไมโครแคปซูลในการใช้น้ำสลัดด้วย

โดยสรุปจากงานวิจัยนี้ พบว่ายีสต์ *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY189 เมื่อเลี้ยงเชื้อใน ภาวะที่เหมาะสม โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อปรับปรุงสูตรที่มีควบคุมความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.5 และ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในระดับขวดเขย่านั้น สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิว ชีวภาพที่มีประสิทธิภาพดี ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการก่อกิมล์ชันน้ำมันตะไคร้ เพื่อใช้ในการผลิตไมโครแคปซูลบรรจุน้ำมันตะไคร้เพื่อประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้

ข้อเสนอแนะ

- งานวิจัยนี้เป็นประโยชน์ในการนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยควรพัฒนาให้มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY189 ในระดับขยายส่วน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและผลผลิตให้ได้ในปริมาณสูงขึ้น และสามารถผลิตได้ในเชิงพาณิชย์และเพียงพอกับความต้องการของตลาด

- ในการนำไปใช้ในอาหาร ควรมีการทดสอบทางพิษวิทยาของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ว่า มีอันตรายต่อผู้บริโภคหรือไม่ รวมถึงติดตามประสิทธิภาพ และอายุการใช้งานของไมโครแคปซูลที่ผลิตได้ ก่อนนำไปใช้จริง

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- ธนัสถา เชียงอุทัย. 2549. การผลิตและลักษณะสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากยีสต์ที่คัดเลือกได้ วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- ธิดา มหาเมฆทัศน์ย์. 2552. การทำไมโครแคปซูลของน้ำมันแมคาเดเมียโดยการทำให้แห้งแบบพ่น วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- ผกามาศ ราชมন্ত্রী. 2551. ผลของการเสริมน้ำตาลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Pichia anomala* PY1 และลักษณะของสารที่ได้ วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- รัชนี นุญมี. 2551. การผลิตและลักษณะสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของยีสต์ *Pichia anomala* PY1 และยีสต์สายพันธุ์กลาย โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาษาอังกฤษ

- Abouseoud, M., Machi, R., Amrane, A., Boudergua, S. and Nabi, A. 2008. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. Desalination. 223: 143-151.
- Abu-Ruwaida, A. S., Banat, I. M., Haditirto, S., Salem, S. and Kadri, M. 1991. Isolation of biosurfactant producing bacteria-product characterization and evaluation. Acta Biotech-nol. 11: 315-324.
- Al-Tahhan, R. A., Sandrin, T. R., Bodor, A. A. and Maier, R. M. 2000. Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: Effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. Appl. Environ. Microbiol. 66: 3262-3268.
- Arima, K., Kakinuma, A. and Tamura G. 1968. Surfactin, a crystalline peptidolipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. Biochem Biophys Res Commun. 31(3): 488-94.

- Ashby, R. D., Solaiman, D. K. Y. and Foglia, T. A. 2008. Property control of sophorolipids: Influence of fatty acid substrate and blending. Biotechnol. Lett. 30: 1093-1100.
- Asmer, H. J., Siegmund, L., Fritz, W. and Wrey, V. 1988. Microbial production, Structure elucidation and bioconversion of sophorose lipid. J. Am. Oil Chem. Soc. 65: 1460-1466.
- Baltz, R. H., Miao, V. and Wrigley S. K. 2005. Natural products to drugs: Daptomycin and related lipopeptide antibiotics. Nat. Prod. Rep. 22: 717-741.
- Banat, I. M., Makkar R. S. and Cameotra, S. S. 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. Appl. Microbiol. Biotechnol. 53: 495-508.
- Banat, I. M. et al. 2010. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. Appl. Microbiol. Biotechnol. 87: 427-444.
- Beristain, C. I., Garcíab H. S. and Vernon-Carterc, E. J. 2001. Spray-dried Encapsulation of Cardamom (*Elettaria cardamomum*) Essential Oil with Mesquite (*Prosopis juliflora*) Gum. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie. 34(6): 398-401.
- Bergeimer, A. W. and Avigad, L. S. 1970. Nature and properties of a cytolytic agent produced by *Bacillus subtilis*. J. Gen. Microbiol. 61: 361-369.
- Bernardski, W., Adamczak, M. and Tomazik, J. 2004. Application of oil refinery waste in the biosynthesis of glycolipids by yeast. Bioresour. Technol. 95: 15-18.
- Brown, M.J. 2007. Biosurfactants for cosmetic applications. Int. J. Cosmetic. Sci. 13(2): 61-64.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. Int. J. Food. Microbiol. 94(3): 223-253.
- Cao, X. H. et al. 2010. Surfactin induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through a ROS/JNK-mediated mitochondrial/caspase pathway. Chem. Biol. Interact. 183(3): 357-362.
- Casas, J. A. and Garcia-Ochoa, F. 1999. Sophorolipid production by *Candida bombicola*: Medium composition and culture methods. J. Biosci. Bioeng. 88: 488-494.

- Cavalero, D. A. and Cooper D. G. 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.
- Cirigliano, M. C. and Carman, G. M. 1985. Purification and Characterization of Liposan, a Bioemulsifier from *Candida lipolytica*. Appl. Environ. Microbiol. 50(4): 846-850.
- Cooper, D. G. and Zajic, J. E. 1980. Surface-active compounds from microorganism. Adv. Appl. Microbiol. 26: 229-253.
- Daniel, H. J., Reuss, M. and Styldatk, C. 1998. Production of sophorolipids in high concentration from deproteinized whey and rapeseed oil in a two stage fed batch process using *Candida bombicola* ATCC 22214 and *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509. Biotechnol. Lett. 20(12): 1553-1556.
- Daverey, A. and Pakshirajan, K. 2009. Production, characterization, and properties of sophorolipids from the yeast *Candida bombicola* using a low-cost fermentative medium. Appl. Biochem. Biotechnol. 158: 663-674.
- Davila, A. M., Marchal, R. and Vandecasteele, J. P. 1992. Kinetics and balance of a fermentation free from product inhibition-sophorose lipid production by *Candida bombicola*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 38: 6-11.
- Davila, A. M., Marchal, R. and Vandecasteele, J. P. 1997. Sophorose lipid fermentation with differentiated substrate supply for grown and production rate. Appl Microbiol. Biotechnol. 47: 496-501.
- Desai, J. D. and Banat, I. M. 1997. Microbial production of surfactant and their commercial potential. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61: 47-64.
- Felse, P. A., Shah, V., Chan, J., Rao, K. J. and Gross, R .A. 2007. Sophorolipid biosynthesis by *Candida bombicola* from industrial fatty acid residues. Environ. Microb. Technol. 40: 316-323.
- Fiechter, A. 1992. Biosurfactants: moving towards industrial application. Trends. Biotechnol. 10: 208-217.
- Gautam, K. K. and Tyagi, V. K. 2006. Microbial surfactants: A review. J. Oleo sci. 55(4): 155-166.

- Gerson, D. F. 1993. The biophysics of microbial surfactants: Growth on concentration, but also on surface property of cells and insoluble substrates. P.257-268. In Kosaric, N., Biosurfactants: Production, properties, application. Marcel Dekker, New York.
- Gillman, L. B. 1993. A review of instruments for static and dynamic surface and interfacial tension measurement. Present at the seminar by Kruss Gmtt and scientefic promotion Co., Ltd., at Indra Regent Hotel, BKK. Thailand, October 30, 1997.
- Guerra-Santos, L. H., Kappeli, O. and Fiecher, A. 1984. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. Appl. Microbiol. Biotechnol. 48: 301-305.
- Hammer K. A., Carson C. F. and Riley T.V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. J. Appl. Microbiol. 86: 985–990.
- Heyd, M. et al. 2008. Development and trends of biosurfactant analysis and purification using rhamnolipids as an example. Anal. Bioanal. Chem. 391: 1579-1590.
- Hogan, S. A., McNameeb, B. F., O’Riordana, E. D. and O’Sullivana, M. 2001. Emulsification and microencapsulation properties of sodium caseinate/carbohydrate blends. Int. J. Dairy. Technol. 11(3): 137-144.
- Hu, Y. and Ju, L. K. 2001. Sophorolipid production from different lipid precursors observed with LC-MS. Enz. Microb. Technol. 29: 531-601.
- Ishigami Y, Gama Y, Nagahora H, Yamaguchi M, Nakahara H, Kamata T (1987) The pH-sensitive conversion of molecular aggregates of rhamnolipid biosurfactant. Chem Lett. 763-766
- Ito, S. and Inoue, S. 1982. Sophorolipids from *Torulopsis bombicola*: possible relation to alkane uptake. Appl. Environ. Microbiol. 43: 1278-1283.
- Kachholz, T. and Schlingmann, M. 1987. Possible food and agricultural application of microbial surfactants. Biosurfactants and Biotechnology, Marcel Dekker, New York: 183–210.
- Karant, N. G. K., Deo, P. G. and Veenenedig, N. K. 1999. Microbial production of biosurfactants and their importance. Curr. Sci. 77(1): 116-126.

- Kawano, J., Suzuki, T., Inoue, S. And Hayashi, S. 1981. Powered compressed cosmetic material. US Patent 4 305 931. Kao Soap Co., Ltd., Tokyo,
- Kim, S. Y., Oh, D. K., Lee, K. H. and Kim, J. H. 1997. Effect of soybean oil and glucose on sophorose lipid fermentation by *Torulopsis bombicola* in continuous culture. Appl. Microbiol. Biotechnol. 48: 23-26.
- Kim, H. S., Jeon, J. W., Kim, S. B., Oh, H. M. Kwon, T. J. and Yoon, B., D. 2002. Surface and physico-chemical properties of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, from *Candida antarctica*. Biotechnol. Lett. 24: 1637-1641.
- Kitamoto, D., Yanagishitaa, H., Shinboa, T., Nakanea, T., Kamisawaa, C. and Nakaharab, T. 1990. Surface active properties and antimicrobial activities of mannosylerythritol lipids as biosurfactants produced by *Candida antarctica*. J. Biotechnol. 29(1-2): 91-96.
- Kitamoto, D., Morita, T., Fukuoka, T. Konishi, M. and Imura, T. 2009. Self-assembling properties of glycolipid biosurfactants and their potential applications. Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 14: 315-328.
- Koch, F. C. and Hanke, M. E. 1953. Practical methods in biochemistry 6th Ed, p.537. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, Md.
- Konishi, M., Fukuoka, T., Morita, T., Imura, T. and Kitamoto, D. 2008. Production of New Types of Sophorolipids by *Candida batistae*. J. Oleo Sci. 57(6): 359-369.
- Kosaric, N. 1993. Biosurfactants Production Applications. Surfactant Science Series: vol 48. Mercel Dekker, Inc. New York.
- Kosaric, N. 2001. Biosurfactants and their application for soil bioremediation. Food Technol. Biotechnol. 39(4): 295-304.
- Kretschner, A., Block, H. and Wagner, F. 1982. Chemical and physical characterization of interfacial-active lipids from *Rhodococcus erythropolis* grown on *n*-alkane. Appl. Environ. Microbiol. 44: 864-870.
- Lang, S. and Wullbrandt, D. 1999. Rhamnose lipids – biosynthesis, microbial production and application potential. Appl. Microbiol. Biotechnol. 51: 22-32.
- Lang, S. 2002. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 7: 12-20.

- Lawrence, M. J. and Rees, G. D. 2007. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. Adv. Drug. Deliv. Rev. 45(1): 89-121.
- Leimann, F. V., Gonçalves, O. H., Machado, R. A. F. and Bolzan, A. 2008. Antimicrobial activity of microencapsulated lemongrass essential oil and the effect of experimental parameters on microcapsules size and morphology. Mater. Sci. Eng. 29: 430–436.
- Leite, J. R., Seabra, M. D. and Maluf E. 1986. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). III. Assessment of eventual toxic, hypnotic and anxiolytic effects on humans. J. Ethnopharmacol. 17(1):75-83.
- Lindsay, S. 1991. High Performance Liquid Chromatography : Analytical chemistry by open learning. Singapore : John Wiley and Sons.
- Lourith, N. and Kanlayavattanakul, M. 2009. Natural surfactants used in cosmetics: glycolipids. Int. J. Cosmet. Sci. 31: 225-261.
- Lu, J. R., Zhao, X. B. and Yaseen, M. 2007. Biomimetic amphiphiles: biosurfactants. Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 12(2): 60-67.
- Makkar, R. S. and Cameotra, S. S. 1998. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. App. Microbiol. Biotechnol. 50(5): 520-529.
- Makkar, R. S. and Cameotra, S. S. 1999. Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources. J. Surfactants Detergents. 2(2): 237-241.
- Makkar, R. S. and Cameotra, S. S. 2002. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. App. Microbiol. Biotechnol. 58(4): 428-434.
- Matsuyama, T., Kaneda, K., Ishizuma, I., Toida, T. and Yano I. 1990. Surface-active novel glycolipid and linked 3-hydroxy fatty acids produced by *Serratia rubidaea*. J. Bacteriol. 172: 3015-3022.
- McInerney, M. J., Javaheri, M. and Nagle, D. P. 1990. Properties of the biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* strain JF-2. J. Ind. Microbiol. 5: 95-102.
- McNamee, B. F., O'Riordan, E. D. and O'Sullivan, M. 1998. Emulsification and Microencapsulation Properties of Gum Arabic. J. Agric. Food Chem. 46(11): 4551–4555.

- Meylheuc, T., Renault, M. and Bellon-Fontaine, M. N. 2006. Adsorption of a biosurfactant on surfaces to enhance the disinfection of surfaces contaminated with *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food microbial. 109: 71-78.
- Mishra, A. K., Kishore, N., Dubey, N. K. and Chansouria, J. P. N. 1992. An evaluation of the toxicity of the oils of *Cymbopogon citratus* and *Citrus medica* in rats. Phytother Res. 6:279-281.
- Mohan P. K., Nakhla G. and Yanful E. K. 2006. Biokinetics of biodegradation of surfactants under aerobic, anoxic and anaerobic conditions. Water Res. 40(3): 533-540.
- Morikawa, M., Daido, H., Takao, T., Murata, S., Shimonishi, Y. and Imanaka, T. 1993. A new lipopeptide biosurfactant produce by *Arthrobacter* sp. Strain MIS 38. J. Bacteriol. 175: 6459-6466.
- Mulligan, C. N. 2005. Environmental applications for biosurfactants. Environ. Pollut. 133: 183-198.
- Muthusamy, K., Gopalakrishnan, S., Ravi, T. K. and Sivachidambaram, P. 2008. Biosurfactants: Properties, commercial production and application. Curr. Sci. 94(6): 736-747.
- Nitschke, M. and Costa, S. G. V. A. O. 2007. Biosurfactants in food industry. Trends food Sci. Technol. 18: 252-259.
- Noordman, W. H. and Janssen, B. B. 2002. Rhamnolipid stimulates uptake of hydrophobic compounds by *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Environ. Microbiol. 68: 4502-4508.
- Nunez, A., Ashby, R., Foglia, T. A., and Solaiman, D. K. Y. 2004. LC/MS analysis and lipase modification of the sophorolipids produced by *Rhodotorula bogoriensis*. Biotechnol. Lett. 26: 1087-1093.
- Otto, R. T., Daniel, H. J. Pekin, G., Muller-Decker, K. Furstenberge, G., Reuss, M. and Syldatk, C. 1999. Production of sophorolipids from whey. Appl. Microbiol. Biotechnol. 52: 495-501.

- Patel, R. M. and Desai, A. J. 1997. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. Lett. Appl. Microbiol. 25:91-94.
- Pattanathu, K. S., Rahman, M. and Gakpe, E. 2008. Production characterization and applications of biosurfactants-Review. Biotechnol. 7(2): 360-370.
- Pellecier, F. and André, P. 2004. Cosmetic use of sophorolipids as subcutaneous adipose cushion regulation agents and slimming application. World patent 2004/108063.
- Peng, F., Liu, Z., Wang, L. and Shao, Z. 2007. An oil-degrading bacterium: *Rhodococcus erythropolis* strain BC-9 and its biosurfactants. J. Appl. Microbiol. 102: 1603-1611..
- Pornsunthorntawee, O., Chavadej, S. and Rujiravanit, R. 2009. Solution properties and vesicle formation of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4. Colloids Surf. B: Biointerfaces. 72(1): 6-15.
- Rapp, P., Bock, H., Wray, V. and Wagner, F. 1979. Formation, Isolation and Characterization of Trehalose Dimycolates from *Rhodococcus erythropolis* Grown on n-Alkanes. J. Gen. Microbiol. 115: 491-503.
- Raza, Z. A., Rehman, A., Khan, M. S. and Khalid, Z. M. 2007. Improved production of biosurfactant by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant using vegetable oil refinery wastes. Biodegradation. 18(1): 115-121.
- Roongsawang, N., Haruki, M., Morikawa, M., Hase, K., Imanaka, T. and Kanaya, S. 2003. Cloning and Characterization of the Gene Cluster Encoding Arthrofactin Synthetase from *Pseudomonas* sp. MIS38. Chem. Biol.10: 869-880.
- Ron, E. Z. and Rosenberg, E. 2001. Natural Role of biosurfactants. Environ. Microbiol. 3: 299-236.
- Rosenberg, M. and Sheu, T. 1995. Microencapsulation by Spray Drying Ethyl Caprylate in Whey Protein and Carbohydrate Wall Systems. J. Food. Sci. 60(1): 98-103.
- Rosenberg, E. and Ron, E. Z. 1999. High and Low molecular-mass microbial surfactants. Appl. Microbiol. Biotechnol. 52(2): 154-162.
- Salihu, A., Abdulkadir, I. and Almustapha, M. N. 2009. An Investigation for potential development on biosurfactants. Biotechnol. Mol. Biol. Rev. 3(5): 111-117.

- Sarubbo, L. A., Farias, C. B. B. and Takaki, G. M. 2007. Co-utilization of canola oil and glucose on the production of a surfactant by *Candida lipolytica*. Curr. Microbiol. 54: 68-73.
- Sekelsky, A. M. and Shreve, G. S. 1999. Kinetic model of biosurfactant-enhanced hexadecane biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa*. Biotechnol. Bioeng. 63: 401-409.
- Shah, V. et al. 2005. Sophorolipids, microbial glycolipid with anti-human immunodeficiency virus and sperm immobilizing activities. Antimicrob. Agents Chemother. 49: 4083-4100.
- Shah, V., Jurjevic, M. and Badia, D. 2007. Utilization of restaurant Waste oil as a precursor for sophorolipid production. Biotechnol. Prog. 23: 512-515.
- Sheppard, J. D. and Mulligan, C. N. 1987. The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. App. Microbiol. Biotechnol. 27(2): 110-116.
- Shepherd, R., Rockey, J., Sutherland, I. W. and Roller, S., 1995. Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods. J. Biotechnol. 40: 207-217.
- Shete, A. M., Wadhawa, G., Banat, I. M. and Chopade, B. A. 2006. Mapping of patents on bioemulsifier and biosurfactant: a review. J. Sci. Ind. Res. 65: 91-115.
- Singh, P. and Cameotra S. S. 2004. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. Trends Biotechnol. 22(3): 142-146.
- Skoog, D. A., West, D. M. and Holler F. J. 1988. Anal. Chem., 5th ed. The United States of America : Saunders College.
- Solaiman, D. K. Y., Ashby, R. D., Zerkowski, J. A. and Foglia, T. A. 2007. Simplified soy molasses-based medium for reduced-cost production of sophorolipids by *Candida bombicola*. Biotechnol. Lett. 29: 1341-1347.
- Stüwer, O., Hommel, R., Haferbug, D. and Kleber, H. P. 1987. Production of crystalline surface-active glycolipids by a strain of *Torulopsis apicola*. J. Biotechnol. 27: 259-269.
- Thaniyavarn, J. et al. 2008. Production of sophorolipid biosurfactant by *Pichia anomala*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 72(8): 2061-2068.

- Todd, R. D. 1970. Microencapsulation in the flavor industry. Flavour Ind. 1: 768-771.
- Turchiuli, C. et al. 2004. Oil encapsulation by spray drying and fluidised bed agglomeration. Innov. Food. Sci. Emerg. Technol. 6(1): 29-35.
- Tuynenburg, G. 1975. Yeast Containing Food Emulsion. United States Patent.
- Van Bogaert, I. N. A., Saerens, K., Muynck, C. D., Develter, D., Soetact, W. and Vandamme, E. J. 2007. Microbial production and application of Sophorolipids. Appl. Microbiol. Biotechnol. 76: 23-34.
- Van Hamme, J. D., Singh, A. and Ward, O. P. 2006. Physiological aspects: Part1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. Biotechnol. Adv. 24: 604-620.
- Velikov, K. P., Velez, O. D., Marinova K. G. and Constantinides, G. N. 1997. Effect of the surfactant concentration on the kinetic stability of thin foam and emulsion films. J. Chem. Soc. 93: 2069-2075.
- Volkering, F., Breure, A. M. and Rulkens, W. H. 1998. Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. Biodegradation. 8: 401-417.
- Wang, S. L. and Mulligan, C. N. 2009. Arsenic mobilization from mono tailings in the presence of a biosurfactant. Appl. Geochem. 24: 928-935.
- Wannissorn B, Jarikasem, S and Soontornanasart, T. 1996. Antifungal activity of lemon grass oil and lemon grass oil cream. Phytother. Res. 10: 551-4.
- Wei, Y. H., 2003. Identification of induced acidification in iron enriched cultures of *Bacillus subtilis* during biosurfactant fermentation. J. Biosci. Bioeng. 96: 174-178.
- Yakimov, M.N., Timmis, K.N., Wray, V. and Fredrickson, H. L. 1995. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. Appl. Environ. Microbiol. 61(5): 1706-1713
- Young, D. K. and Charles, V. M. 1996. Microencapsulation Properties of Gum Arabic and Several Food Proteins: Spray-Dried Orange Oil Emulsion Particles. J. Agric. Food Chem. 44(5): 1314–1320.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเหลวจากสารสกัดยีสต์และมอลต์ (YM broth)

สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)	3.0	กรัม
สารสกัดมอลต์ (Malt extract)	3.0	กรัม
เพปโตน (Peptone)	5.0	กรัม
กลูโคส	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

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

2. อาหารแข็งจากสารสกัดยีสต์และมอลต์ (YM agar)

สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)	3.0	กรัม
สารสกัดมอลต์ (Malt extract)	3.0	กรัม
เพปโตน (Peptone)	5.0	กรัม
กลูโคส	10.0	กรัม
วุ้นผง (Agar)	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

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

3. อาหารเหลวกำหนดสูตร (ผกามาศ ราชมন্ত্রী, 2551)

โซเดียมไนเตรท (NaNO_3)	0.4	%
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.02	%
แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.02	%
สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)	0.1	%
น้ำมันถั่วเหลือง	4	% (w/v)
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.5 หนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว
อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. มอริช รีเอเจนท์ (Molisch's reagent)

แอลฟา-แนฟทอล (α -naphthol)	0.5	กรัม
เอทานอล (Ethanol)	10.0	มล.

ละลายแอลฟา-แนฟทอลในเอทานอลแล้วเติมในตัวอย่างที่จะทำการทดสอบปริมาตร 0.2 มล. จากนั้นเติมกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) 0.5 มล. ตั้งทิ้งไว้โดยห้ามเขย่า

2. สารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8 (50 mM Tris-HCl buffer pH 8)

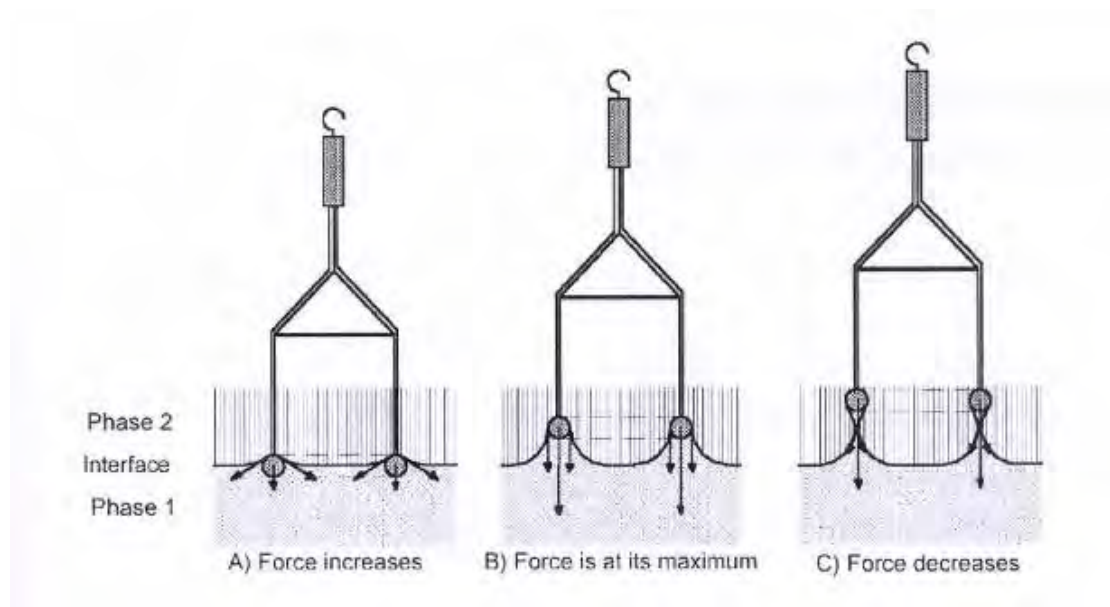
ทริส เบส (Tris base)	0.61	กรัม
น้ำกลั่น	80	มล.

ปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น ถ้าหาต้องการทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรดต่างอื่นๆ ก็ใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นปรับให้มีค่าความเป็นกรดต่างนั้นๆ

ภาคผนวก ค

หลักการการวัดค่าแรงตึงผิวด้วยวิธี Du Nouy Ring

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



ภาพแสดงขั้นตอนการวัดค่าแรงตึงผิวด้วยวิธี Du Nouy Ring

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวัดค่าแรงตึงผิว

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

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 เสียรูปจะทำให้การวัดค่าผิดไปได้
4. การใช้ vessel ต้องใช้ด้วยความระมัดระวังเช่นกัน

ข้อแนะนำ

1. ขณะวัดค่าแรงตึงผิวตามข้อ 7 ถ้าทำการหมุน micrometer screw(5) และ pointer (2) อย่างช้าๆ จะทำให้เกิดความผิดพลาดน้อย
2. ring, vessel มีคุณสมบัติทนไฟ สามารถผ่านเปลวไฟได้ ในกรณีที่จำเป็น
3. ขณะแขวน ring ลงบน balance beam (9) อาจต้องใช้มือช่วยเล็กน้อย



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 |

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวชานาภา เดชวัฒนาโกมลเกิดเมื่อวันที่ 21 พฤศจิกายน พ.ศ. 2529 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ในปีการศึกษา 2550 และเข้ารับการศึกษาคือในระดับปริญญา มหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2551 ที่อยู่ปัจจุบัน 54 ซอย เทอดไท6 ถนน เทอดไท แขวงบางยี่เรือ เขตธนบุรี กรุงเทพฯ 10600

ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่

ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ได้เข้าร่วมเสนอผลงานการประชุมทางวิชาการระดับนานาชาติดังนี้

- งาน The 22nd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology “TSB2010: Biotechnology for Healthy Living” ระหว่างวันที่ 20-22 ตุลาคม 2553 ในหัวข้อเรื่อง “BIOSURFACTANT PRODUCTION BY *Pichia anomala* PY189 FOR PREPARING ESSENTIAL OIL ENCAPSULATED MICROCAPSULE “ ที่มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จ.ตรัง ประเทศไทย

- งาน Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON) 2011 ระหว่างวันที่ 8-10 มกราคม 2554 ในหัวข้อเรื่อง “BIOSURFACTANT PRODUCTION BY *Pichia anomala* PY189 FOR PREPARING LEMONGRASS OIL ENCAPSULATED MICROCAPSULE “ ที่โรงแรมมิราเคิลแกรนด์ จ.กรุงเทพฯ ประเทศไทย