



โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การประยุกต์ใช้น้ำเสียจากโรงงานแปรรูปผลไม้เพื่อเพิ่มผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ
ที่ผลิตจากเชื้อ *Weissella cibaria* สายพันธุ์ PN3 แบบเซลล์ตรึง

ชื่อนิสิต นางสาวบุญยานุช สุภัทรกุล **เลขประจำตัว** 5832330523

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2561

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the senior project authors' files submitted through the faculty.

หัวข้อโครงการ

การประยุกต์ใช้น้ำเสียจากโรงงานแปรรูปผลไม้เพื่อเพิ่มผลผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *Weissella cibaria* สายพันธุ์ PN3 แบบเซลล์ตรึง

โดย

นางสาวบุญยานุช สุภัทรกุล รหัสนิสิต 5832330523

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. เอกวิทย์ ลือพร้อมชัย

ปีการศึกษา

2561

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงการฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงการวิทยาศาสตร์



หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิช)

คณะกรรมการสอบโครงการ



..... อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. เอกวิทย์ ลือพร้อมชัย)



..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. อรทัย ภิญญาคง)



..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร. ชมพูนิกข์ กาญจนพังคะ)

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ

การประยุกต์ใช้น้ำเสียจากโรงงานแปรรูปผลไม้เพื่อเพิ่มผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ

Weissella cibaria สายพันธุ์ PN3 แบบเซลล์ตรึง

นิสิตในโครงการ

นางสาวบุญยานุช สุภัทรกุล

รหัสนิสิต 5832330523

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ปีการศึกษา 25561

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ การประยุกต์ใช้น้ำเสียจากโรงงานแปรรูปผลไม้เพื่อเพิ่มผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ
ที่ผลิตจากเชื้อ *Weissella cibaria* สายพันธุ์ PN3 แบบเซลล์ตรึง

นิสิตหัวหน้าโครงการ นางสาวบุญยานุช สุภัทรกุล รหัสนิสิต 5832330523

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ รองศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2558

บทคัดย่อ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactant) ถูกผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิดรวมถึงกลุ่มแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก ซึ่งเป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปว่ามีความปลอดภัยในการใช้งาน (Generally recognized as safe, GRAS) แต่การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในปริมาณมากต้องใช้ต้นทุนการผลิตที่สูง งานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์ที่จะนำน้ำเสียจากโรงงานแปรรูปผลไม้ที่มีค่าซีโอดีสูงมาผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกชนิด *Weissella cibaria* สายพันธุ์ PN3 แบบเซลล์ตรึง เพื่อลดต้นทุนการผลิต จากการหาปริมาณของน้ำเสียที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่าน้ำเสียที่มีค่าซีโอดีเจือจางเป็น 1 เท่าของอาหารเลี้ยงเชื้อเบซัลสูตรปกติและมีการเติมน้ำมันถั่วเหลือง 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อปริมาตร ให้ผลผลิตมากที่สุดในรอบการผลิตที่ 1 และมีแนวโน้มที่จะใช้เซลล์ตรึงซ้ำได้ในรอบที่ 2 และ 3 โดยปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพรวมจากการผลิตทั้ง 3 รอบ มีปริมาณ 4.26 กรัมต่อลิตร และเมื่อนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากการใช้น้ำเสียมาเป็นแหล่งคาร์บอนมาทดสอบคุณสมบัติต่างๆ พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดปล่อยออกมาออกเซลล์ ชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์จากเซลล์อิสระ และชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์จากเซลล์ในวัสดุตรึงมีค่า CMC อยู่ที่ 1.76 กรัมต่อลิตร 3.98 กรัมต่อลิตร และ 3.91 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพพบว่าชนิดปล่อยออกมาออกเซลล์ ชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์จากเซลล์อิสระ มีสัดส่วน คาร์โบไฮเดรต: โปรตีน: ไขมัน เท่ากับ 69: 0: 39 และ 14: 25: 61 ตามลำดับ จากนั้นเมื่อนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มาทดสอบการก่ออิมัลชันกับน้ำมันชนิดต่างๆ พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์จากเซลล์อิสระมีประสิทธิภาพในการก่ออิมัลชันกับน้ำมันพืชที่นำมาทดสอบได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ จากงานวิจัยนี้จึงสรุปได้ว่าการใช้น้ำเสียจากโรงงานแปรรูปผลไม้มาเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับการตรึงเซลล์อาจเป็นหนึ่งทางเลือกในการช่วยลดต้นทุนการผลิต และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้อาจนำไปใช้ประโยชน์เป็นตัวก่ออิมัลชันในอาหาร และเครื่องสำอาง เป็นต้น

Project title Utilization of wastewater from fruit processing industry for biosurfactant production by immobilized *Weissella cibaria* PN3

Investigator Miss Boonyanuch Supataragul Student ID 5832330523

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

Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

Abstract

Biosurfactant is produced by many microorganisms, including lactic acid bacteria, which are generally regarded as safe (GRAS). However, the scale-up biosurfactant production has high production cost. This research aimed to utilize wastewater from fruit processing industry, which has high COD for producing biosurfactant by immobilized *Weissella cibaria* PN3 to reduce the cost of production. From the optimization of wastewater volume, the results showed that the medium containing wastewater at COD equal to the normal basal medium (1x COD) and 2% (v/v) soybean oil produced the highest biosurfactant yield in the first production cycle. The immobilized cells could be reused in the second and third production cycles. The total amount of biosurfactant after three production cycles was 4.26 g/L. The produced biosurfactants were later characterized. Extracellular biosurfactant, cell-bound biosurfactant from suspended cells and cell-bound biosurfactant from immobilized cells had CMC values of 1.76 g/L, 3.98 g/L and 3.91 g/L respectively. After analyzing chemical composition, the ratios of sugar: protein: lipid were 69: 0: 31 in extracellular biosurfactant, 14: 25: 61 in cell-bound biosurfactant (suspended cells). The emulsification index of biosurfactants with difference oil were tested. The cell-bound biosurfactant from suspended cells created emulsion with vegetable oils at >50%. From this research, we can conclude that the utilization of wastewater from fruit processing industry as carbon source together with immobilized cells could reduce production cost and the produced biosurfactant has potential to act as emulsifier in food and cosmetics.

กิตติกรรมประกาศ

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

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำในด้านต่าง ๆ รวมถึงการใช้ชีวิตในอนาคต และให้เกียรติเป็นกรรมการในการสอบโครงการฉบับนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ และอำนวยความสะดวกต่าง ๆ ตลอดการทาโครงการฉบับนี้

ขอขอบพระคุณบริษัทมาร์เก็ตเทเวีย จำกัด ที่กรุณามอบน้ำเสียจากโรงงานมาให้ดำเนินงานวิจัย

ขอขอบคุณ นางสาวทิพย์สุดา ทรัพย์สงวน นางสาวนันท์ธร เภาราช นางสาวปรีสรินทร์ นววิมาน นายณัฐวุฒิ ขุนอาวุธ นางสาวรัตติยา ผดุงผล ที่คอยให้คำปรึกษา คำแนะนำ และการช่วยเหลือต่างๆ รวมถึงกำลังใจที่มีให้เสมอมา

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนในภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่คอยช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้ตลอดการดำเนินโครงการนี้

ขอขอบคุณ นางสาววันทีนิ เบญจมงคลสกุล ที่คอยช่วยเหลือ รับฟังปัญหาต่างๆ รวมถึงกำลังใจที่คอยมีให้ตลอดมา

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณพระคุณพระคุณบิดา มารดา และสมาชิกในครอบครัวทุกคน ที่ให้การสนับสนุนช่วยเหลือ แก้ปัญหาต่างๆ ตลอดจนเป็นกำลังใจสำคัญให้ผู้วิจัยเรื่อยมา

ด้วยความเคารพอย่างสูง

บุญยานุช สุภัทรกุล

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูปภาพ	ช
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญสมการ	ฅ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ	8
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	8
บทที่ 2 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และชุดทดสอบ	9
2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	9
2.2 เคมีภัณฑ์	10
บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง	12
3.1 การหาความเข้มข้นของน้ำเสียจากโรงงานแปรรูปผลไม้ที่เหมาะสมสำหรับผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ..	12
3.1.1 การเตรียมน้ำเสียจากโรงงานแปรรูปผลไม้	12
3.1.2 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก	13
3.1.3 การตรึงเชื้อจุลินทรีย์บนวัสดุสังเคราะห์ที่มีรูพรุน	14
3.1.4 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ <i>Weissella cibaria</i> สายพันธุ์ PN3 โดยใช้เซลล์ตรึงผลิตซ้ำ	14

3.1.5 ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในแต่ละชั้นการผลิต	15
3.1.6 การแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เชื่อผลิตได้	15
3.1.7 การสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	15
3.2 การทดสอบคุณสมบัติของของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	16
3.2.1 การวัดค่าแรงตึงผิว (Surface tension)	16
3.2.2 การหาค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์ (Critical micelle concentration, CMC)	16
3.2.3 การวัดค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน (Emulsification index, E24)	18
3.3 การทดสอบหองค์ประกอบทางชีวเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	19
3.3.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบของไขมันในสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้โดยวิธี Sulfo-Phospho- Vanillin	19
3.3.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนในสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้โดยวิธี Bradford	19
3.3.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตในสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้โดยวิธี phenol- sulfuric acid	19
บทที่ 4 ผลการทดลอง	20
4.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	20
4.2 การเลือกสภาวะการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เหมาะสม	20
4.2.1 เปรียบเทียบปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ <i>W. cibaria</i> PN3 แบบเซลล์ตรึงผลิตได้ในชุดการ ทดลองที่ใช้น้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอน	20
4.2.2 จำนวนจุลินทรีย์ในแต่ละชั้นการทดลอง	22
4.3 การทดสอบคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	23
4.3.1 การวัดค่าแรงตึงผิวและการหาค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	24
4.3.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	26
4.3.3 การหาค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน (E24)	27
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	30

เอกสารอ้างอิง	34
ภาคผนวก	37
ภาคผนวก ก.....	38
ภาคผนวก ข.....	41
ภาคผนวก ค.....	43
ภาคผนวก ง	50

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1.1 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	1
รูปที่ 3.1 น้ำเสียจากโรงงานแปรรูปผลไม้ของบริษัทมาร์เก็ตเททเวย์ จำกัด	12
รูปที่ 3.2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ <i>Weissella cibaria</i> สายพันธุ์ PN3 รหัส MSCU 0840 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด MRS.....	13
รูปที่ 3.3 Aquaporousgel ที่ใช้เป็นวัสดุสำหรับตรึงเซลล์ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	14
รูปที่ 3.4 เครื่อง Tensiometer (Kruss, K100)	16
รูปที่ 3.5 วิธีการหาค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์	17
รูปที่ 4.1 ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในชุดการทดลองต่างๆและแต่ละรอบการผลิตที่ผลิตโดยเชื้อ <i>W. cibaria</i> PN3 แบบเซลล์ตรึง.....	21
รูปที่ 4.2 จำนวนจุลินทรีย์ในแต่ละขั้นการทดลองของชุดควบคุม ชุดที่ใช้น้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอน 1 เท่า และ 5 เท่า.....	22
รูปที่ 4.3 ลักษณะสารสกัดหยาบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพละลายใน PBS ที่ผลิตจากเชื้อ <i>W. cibaria</i> PN3 แบบเซลล์ตรึงเมื่อนำน้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอน.....	24
รูปที่ 4.4 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดหยาบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ <i>W. cibaria</i> PN3 แบบเซลล์ตรึงกับค่าแรงตึงผิว เมื่อนำน้ำเสียจากโรงงานแปรรูปผลไม้เป็นแหล่งคาร์บอนในปริมาณ 1 เท่าของอาหารเลี้ยงเชื้อเบซัล และเติม 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อปริมาตร ของน้ำมันถั่วเหลือง	25
รูปที่ 4.5 ผลการก่ออิมัลชันระหว่างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์จากเซลล์อิสระ เมื่อนำน้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอนกับชนิดต่างๆ.....	28

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1.1 ตัวอย่างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ.....	2
ตารางที่ 1.2 ตัวอย่างการนำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกไปใช้ประโยชน์.....	4
ตารางที่ 1.3 ตัวอย่างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก.....	6
ตารางที่ 4.1 เปรียบเทียบค่า CMC และค่าแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากสภาวะที่ใช้ น้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอน กับสภาวะที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน.....	26
ตารางที่ 4.2 ผลการวิเคราะห์สัดส่วนองค์ประกอบทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพใช้อาหารเบสัลที่ใช้ น้ำเสียมีค่าซีไอดีเป็น 1 เท่า.....	26
ตารางที่ 4.3 ค่าความเสถียรในการก่อกิมล์ชั้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากชุดการทดลองที่ใช้ น้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 2 CMC เทียบกับน้ำมันชนิดต่างๆ.....	27
ตารางที่ 4.4 ค่าความเสถียรในการก่อกิมล์ชั้นของสารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ทางเคมีที่ความเข้มข้น 1 CMC เทียบกับน้ำมันชนิดต่างๆ.....	29
ตารางที่ 5.1 เปรียบเทียบค่าแรงตึงผิวของน้ำที่ลดลงจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์ของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ.....	32

สารบัญสมการ

หน้า

สมการที่ 3.1 การคำนวณค่า E24.....	18
-----------------------------------	----

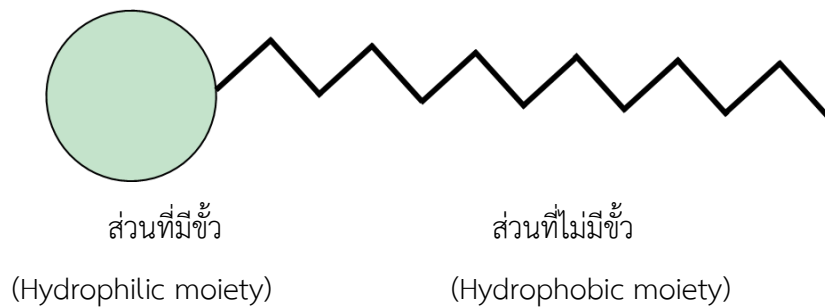
บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactant) คือ สารประกอบที่ทำให้แรงตึงผิวของของเหลวลดลงซึ่งถูกผลิตจากจุลินทรีย์ โดยโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีโครงสร้างเป็นแบบแอมฟิฟิลิก (Amphiphilic) คือ เป็นส่วนที่มีขั้ว (Hydrophilic moiety) และส่วนที่ไม่มีขั้ว (Hydrophobic moiety) อยู่ในโมเลกุลเดียวกัน แสดงดังรูปที่ 1.1 จากคุณสมบัติดังกล่าวทำให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความสามารถในการลดความตึงเครียดบริเวณผิวน้ำระหว่างของเหลวที่มีขั้วต่างกัน (Mouafo และคณะ, 2018) นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมต่ำ สามารถย่อยสลายได้ และมีประสิทธิภาพในการทำงานที่อุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-เบสที่หลากหลายจึงถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมยา เป็นต้น (Sharma และคณะ, 2014)



รูปที่ 1.1 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากจุลินทรีย์มีทั้งชนิดที่จุลินทรีย์ปล่อยออกมานอกเซลล์ (Extracellular) และชนิดที่ติดอยู่ที่ผิวเซลล์ (Cell-bound) ขึ้นกับแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งบางสายพันธุ์ผลิตเพียงชนิดใดชนิดหนึ่งแต่บางสายพันธุ์ผลิตทั้งสองชนิด เช่น *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* A20 ผลิตทั้งชนิดที่ปล่อยออกมานอกเซลล์และชนิดที่ติดอยู่ที่ผิวเซลล์ (Vecino และคณะ, 2017) *Lactobacillus pentosus* CECT-4023T ผลิตชนิดที่ติดอยู่ที่ผิวเซลล์เพียงชนิดเดียว (Vecino และคณะ, 2018) เป็นต้น

ประเภทของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

องค์ประกอบทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความสำคัญเนื่องจากใช้ทำนายความเป็นไปได้ในการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ โดยแต่ละสายพันธุ์จะผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีองค์ประกอบทางชีวเคมีที่แตกต่างกัน หรือสายพันธุ์เดียวกันแต่เมื่อให้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันส่งผลให้ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพคนละชนิดกัน แสดงดังตารางที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 ตัวอย่างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ

สายพันธุ์ของจุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน	ชนิดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	อ้างอิง
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI	ของเสียจากการผลิต น้ำมันดอกทานตะวัน	แรมโนลิปิด	Benincasa และ คณะ, 2008
<i>Bacillus subtilis</i> C19	ซูโครส	ลิโปเปปไทด์	Yuliani และคณะ, 2018
<i>Lactobacillus agilis</i> CCUG31450	เวย์โปรตีน	ไกลโคโปรตีน	Gudiña และคณะ, 2015
<i>Lactobacillus helveticus</i> MRTL 91	เวย์โปรตีน	ไซโคลลิปิด	Sharma และคณะ, 2014
<i>Lactobacillus paracasei</i> <i>ssp. paracasei</i> A20	กลูโคสจากกิ่งไม้ในไร่่อ่งุ่น	ไกลโคลิโปเพพไทด์	Vecino และคณะ, 2017
	แลคโตส	ไกลโคโปรตีน	
<i>Enterococcus faecium</i> MRTL9	แลคโตส	ไกลโคลิปิด	Sharma และคณะ, 2015
<i>Lactococcus lactis</i> ID1.5	กลูโคส	ลิโปเปปไทด์	Saraiva และคณะ, 2017

จุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

จุลินทรีย์ที่ศึกษากันอย่างแพร่หลายในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ให้ผลผลิตปริมาณมาก ได้แก่ *Pseudomonas* sp. และ *Bacillus* sp. เช่น *Pseudomonas aeruginosa* LBI และ *Bacillus subtilis* C19 ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ 7.3 กรัมต่อลิตร และ 2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Benincasa และคณะ, 2008; Yuliani และคณะ, 2018) แม้ว่าจุลินทรีย์ดังกล่าวจะให้ผลผลิตในปริมาณมากแต่บางสายพันธุ์ยังมีข้อจำกัดทางด้านความปลอดภัย ดังนั้นแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกจึงเป็นแบคทีเรียที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างปลอดภัย

แบคทีเรียผลิตกรดแลคติก (Lactic acid bacteria)

แบคทีเรียผลิตกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีรูปร่างเป็นแบบกลม (Coccus) หรือแบบแท่ง (Rod) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ได้รับการยอมรับโดย FDA (US Food and Drug Administration) ว่าเป็นแบคทีเรียที่มีความปลอดภัย (Generally Recognized as Safe, GRAS) แบคทีเรียผลิตกรดแลคติกบางชนิดสามารถผลิตกรดแลคติกเพียงอย่างเดียว แต่บางชนิดสามารถผลิตสารชนิดอื่นออกมาด้วย (Souza และคณะ, 2017) นอกจากนี้แบคทีเรียผลิตกรดแลคติกยังมีความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดต่างๆ เช่น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactant) และ แบคเทอริโอซิน (Bacteriocin) (Saraiva และคณะ, 2017) โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แบคทีเรียผลิตกรดแลคติกผลิตได้มีงานวิจัยที่รายงานถึงความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้ในหลายด้าน เช่น ทางด้านอาหาร และด้านสิ่งแวดล้อม เป็นต้น แสดงดังตารางที่ 1.2

ตารางที่ 1.2 ตัวอย่างการนำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกไปใช้ประโยชน์

จุลินทรีย์	ชนิดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	การประยุกต์ใช้	อ้างอิง
<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> A20	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	- ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ - ต้านการยึดเกาะของจุลินทรีย์	Gudička และคณะ, 2010
- <i>Pediococcus acidilactici</i> - <i>Lactobacillus plantarum</i>	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	ยับยั้งการเจริญ, ต้านการยึดเกาะ และลดการเกิดไบโอฟิล์มของ <i>Staphylococcus aureus</i>	Yan และคณะ, 2019
<i>Lactococcus lactis</i> N5764	แบคทีเรียโอสซินชนิดไนซิน (Nisin)	ผสมกับสารประกอบฟีนอลิก เพื่อยับยั้งการเจริญของ <i>S. aureus</i> และ <i>L. monocytogenes</i> ในนมวัว	Alves และคณะ, 2016
<i>Lactobacillus reuteri</i> INIA P572	แบคทีเรียโอสซิน	ยับยั้งการเจริญของ <i>Clostridium tyrobutyricum</i> ในชีส	Gómez-Torres และคณะ, 2014

แบคทีเรียผลิตกรดแลคติกสายพันธุ์ *W. cibaria*

เพ็ญญา บุญจริง (2015) ได้คัดแยกแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกสายพันธุ์ *Weissella cibaria* PN3 จากไส้กรอกอีสานในประเทศไทยซึ่งถูกจัดอยู่ในชั้น Bacilli, อันดับ Lactobacillales, วงศ์ Leuconostocaceae, สกุล *Weissella* โดยเป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างแบบแท่งหรือแบบกลม ให้ผลการทดสอบแคตาเลสเป็นลบ ไม่สร้างสปอร์ภายในเซลล์ สามารถเจริญได้ในแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ เช่น อะราบิโนส เซลโลไบโอส ฟรุคโตส มอลโตส ซูโครส และไซโลส และเป็นแบคทีเรียที่หมักน้ำตาลในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัดเป็นแบบเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (obligately heterofermentative) โดยผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ร่วมกับกรดแลคติกและกรดอะซีติก (Fusco และคณะ, 2015) นอกจากนี้จุลินทรีย์สายพันธุ์ *W. cibaria* ยังมีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้

ปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกมีปัจจัยหลักที่มาเกี่ยวข้องคือ แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน โดยสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตจะต้องมีปริมาณของแหล่งคาร์บอนสูงและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนจำกัด (Vera และคณะ, 2018) เนื่องจากหากมีไนโตรเจนปริมาณมากจะนำไปใช้ในการเจริญเติบโตมากกว่าการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ นอกจากนี้มีงานวิจัยที่ใช้เชื้อ *Lactobacillus agilis* CCUG31450 ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นชีสเวย์ (cheese whey medium) และบ่มบนเครื่องเขย่า 100 รอบต่อนาทีที่ 37 องศาเซลเซียส พบว่าให้ผลผลิต 960 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเป็น MRS medium ให้ผลผลิตเพียง 84 มิลลิกรัมต่อลิตร (Gudina และคณะ, 2015) แสดงดังตารางที่ 1.2 เนื่องจากในชีสเวย์มีองค์ประกอบของน้ำตาลแลคโตสซึ่งจะไปกระตุ้นการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดที่เกาะอยู่ที่ผิวเซลล์ดังนั้นผลผลิตรวมจึงเพิ่มมากขึ้น (Vera และคณะ, 2018) การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนอกจากปริมาณที่ผลิตได้แล้วต้องคำนึงถึงความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิวและค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์ (CMC) เพื่อให้ทราบถึงคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่จุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ผลิตได้ แสดงดังตารางที่ 1.3

ตารางที่ 1.3 ตัวอย่างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก

สายพันธุ์ของจุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน	ชนิดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแบ่งตามการผลิต	ชนิดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแบ่งตามองค์ประกอบ	Surface tension (mN/m)	CMC	อ้างอิง
<i>Lactobacillus agilis</i> <i>CCUG31450</i>	MRS medium	ชนิดที่ติดอยู่ที่ผิวเซลล์	ไกลโคโปรตีน	42.5	7.5 mg/mL	Gudiřna และคณะ, 2015
<i>Lactobacillus helveticus</i> MRTL 91	เวย์โปรตีน	ชนิดที่ติดอยู่ที่ผิวเซลล์	ไซโลลิปิด	39.5	2.5 mg/mL	Sharma และคณะ, 2014
<i>Lactobacillus casei</i> MRTL3	MRS broth	ชนิดที่ติดอยู่ที่ผิวเซลล์	ไกลโคลิปิด	40.8	ND	Sharma และคณะ, 2014
		ชนิดที่ปล่อยออกมานอกเซลล์		46.8		
<i>Enterococcus faecium</i> MRTL9	MRS-Lac	ชนิดที่ติดอยู่ที่ผิวเซลล์	ไกลโคลิปิด	40.2	2.25 mg/mL	Sharma และคณะ, 2015
<i>Lactobacillus paracasei</i>	กลูโคส	ชนิดที่ติดอยู่ที่ผิวเซลล์	ไกลโคลิโปเปปไทด์	25	1.35 g/L	Ferreira และคณะ, 2017
<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> A20	กลูโคสจากกิ่งไม้ในไร่่อ่งุ่น	ชนิดที่ติดอยู่ที่ผิวเซลล์	ไกลโคลิโปเปปไทด์	25.1	1.35 mg/mL	Vecino และคณะ, 2017
	แลคโตส		ไกลโคโปรตีน	27.3	1.52 mg/mL	

หมายเหตุ ND หมายถึง Not Determine

น้ำเสียจากโรงงานแปรรูปผลไม้สู่ทางเลือกในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ผลไม้บดแห้งถือเป็นการแปรรูปผลไม้的一种方式ซึ่งช่วยเพิ่มมูลค่าและยืดอายุในการเก็บรักษาให้แก่ผลไม้ชนิดนั้นๆ ซึ่งประกอบกับประเทศไทยที่มีการเพาะปลูกผลไม้ตามแต่ละท้องถิ่นจำนวนมาก ทำให้มีการส่งออกสู่ต่างประเทศจึงนำไปสู่การเติบโตที่มากขึ้นของอุตสาหกรรมแปรรูปผลไม้ ผลกระทบที่ตามมาคือจะต้องมีการจัดการน้ำเสียจากกระบวนการผลิตอย่างเหมาะสมเพื่อให้ไม่ส่งผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม โดยมีข้อกำหนดมาตรฐานควบคุมการระบายทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมจะต้องไม่เกิน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร (ประกาศกระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, 2549) น้ำเสียจากโรงงานแปรรูปผลไม้แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ น้ำเสียที่มาจากการแช่ผลไม้ในสารละลายซัลเฟอร์ไดออกไซด์เพื่อกำจัดจุลินทรีย์ชนิดต่างๆที่ปนเปื้อนและอาจส่งผลให้ผลไม้เน่าเสีย โดยน้ำเสียส่วนนี้จะมีค่าความเป็นกรดสูง น้ำเสียส่วนที่สอง คือ น้ำเสียที่ได้จากการผลิตโดยจะเป็นพวกน้ำตาล น้ำเชื่อมจึงทำให้มีค่าซีโอดีที่สูง (Chemical oxygen demand) ดังนั้นจะต้องมีการจัดการที่ถูกต้องก่อนปล่อยลงสู่แม่น้ำ (พีรตนย์ เอื้อนศิริกุล, 2017)

โครงการวิจัยนี้สนใจที่จะหาปริมาณน้ำเสียที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Weissella cibaria* PN3 รหัส MSCU 0840 จากคลังจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (MSCU Microbial Culture Collection) โดยเลือกใช้ใช้น้ำเสียจากโรงงานแปรรูปผลไม้เนื่องจากมีน้ำตาลซูโครสเป็นองค์ประกอบหลักและมีค่าซีโอดีสูง (พีรตนย์ เอื้อนศิริกุล, 2017) มาเป็นแหล่งคาร์บอนให้เชื้อใช้ในการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ นอกจากนี้ผู้วิจัยเลือกใช้การตรึงเซลล์บนวัสดุสังเคราะห์ที่มีรูพรุน (cubic sponges) ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เพื่อให้ง่ายต่อการผลิตซ้ำและลดต้นทุนการผลิต โดยสาเหตุที่เลือกใช้วัสดุสังเคราะห์ที่มีรูพรุนนี้ เนื่องจากมีรูพรุนมากจึงเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างเซลล์กับอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้เซลล์ได้รับอาหารอย่างทั่วถึง และวัสดุนี้มีราคาต่อหน่วยที่ถูกจึงเป็นการลดต้นทุนในการผลิตลง เมื่อทราบปริมาณน้ำเสียที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแล้ว จะนำมาทดสอบหาองค์ประกอบทางเคมี และทดสอบประสิทธิภาพโดยการวัดค่าแรงตึงผิว (surface tension) และหาค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์ (Critical micelle concentration, CMC) เพื่อหาความเข้มข้นที่ต่ำสุดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สามารถทำให้เกิดการก่อไมเซลล์

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 2.1 หาความเข้มข้นของน้ำเสียจากโรงงานแปรรูปผลไม้ที่เหมาะสมสำหรับผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ
- 2.2 เพื่อเพิ่มการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้เซลล์ตรึงซ้ำ
- 2.3 ทดสอบคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และวิเคราะห์องค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 3.1 สามารถนำน้ำเสียจากโรงงานแปรรูปผลไม้มาใช้เป็นแหล่งอาหารในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของเชื้อแบคทีเรียเพื่อลดต้นทุนในการผลิต
- 3.2 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพมากพอสำหรับการใช้งานจริง

บทที่ 2

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และชุดทดสอบ

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. วัสดุสังเคราะห์ที่มีรูพรุน (Aquaporousgel, Cubic sponges) ของบริษัท GSI Creos, Thailand
2. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ของบริษัท PYREX, USA
3. หลอดเอเพนดอร์ฟ (Eppendorf tube) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรของบริษัท AXYGEN, INC., USA
4. ไมโครปิเปต (Micropipette)
5. เครื่องชั่งหยาบ (Laboratory balance) รุ่น PG 2002-S และรุ่น PG 6002-S ของบริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
6. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (Analytical balance) และรุ่น AG 285 ของบริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
7. เครื่องคนแม่เหล็ก หรือเครื่องระเหยสาร (Magnetic Stirrer) รุ่น HS10-2 ของบริษัท Torrey pines Scientific, USA
8. เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น Innova 2100 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co., Edison, N.J., USA
9. เครื่องล้างทำความสะอาดด้วยคลื่นอัลตราโซนิก (Elmasonic E Ultrasonic Cleaning รุ่น E30H), Germany
10. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated micro-centrifuge) รุ่น 6500 ของบริษัท Kubota, Japan
11. เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific industries, USA
12. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง รุ่น MP125 ของบริษัท Mettler Toledo Co.,Ltd., Switzerland
13. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Genesys 20 ของบริษัท Thermo Scientific, USA
14. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 2 Genesys ของบริษัท Thermo Spectronic, USA
15. เตาย่อยสาร (COD reactor) ของบริษัท HACH, USA
16. เครื่องวัดค่าซีโอดี ของบริษัท Hanna instruments, Italy

17. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) ของบริษัท PYREX, USA
18. ตู้ดูดควัน (Fumehood) รุ่น Airone 12009s ของบริษัท Safelab systems, England
19. ตู้ปลอดเชื้อแบบ laminar flow ISSCO รุ่น BV-124 ของบริษัท International Scientific Supply Co., Ltd., Thailand
20. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น BE 800 ของบริษัท Memmert, Germany
21. ตู้อบแห้ง (Hot air oven) รุ่น Series 5 ของบริษัท Contherm Scientific Ltd., New Zealand
22. หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น ES-315 ของบริษัท Tomy Kogyo Co.,Ltd., Japan และรุ่น HV- ของบริษัท HIRAYAMA, Japan
23. ตู้แช่เย็น (Refrigerated showcase) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส รุ่น SPE-0753D11A ของบริษัท Sanden Intercool, Thailand
24. เครื่องวัดแรงตึงผิว (tensiometer) รุ่น K100 บริษัท Kruss, Germany
25. เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Rotary vacuum evaporator) รุ่น R-300 ของบริษัท BUCHI, Switzerland

2.2 เคมีภัณฑ์

1. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany
2. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB (Luria-Bertani) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
3. น้ำมันถั่วเหลือง ตรารองุ่น ประเทศไทย
4. คลอโรฟอร์ม (Chloroform) ของบริษัท RCI Labscan, Thailand
5. เมทานอล (Methanol) ของบริษัท E. Merk, Dramstadt, Germany
6. โซเดียมไนเตรท (Sodium nitrate) ของบริษัท VWR chemicals, Belgium
7. โพแทสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท VWR chemicals, Belgium
8. ไดโพแทสเซียม ไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ของบริษัท Merck, Germany
9. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ของบริษัท E. Merk, Dramstadt, Germany
10. แมกนีเซียมซัลเฟต เฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Merck, Germany
11. แคลเซียมคลอไรด์ ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Merck, Germany
12. สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract Powder) ของบริษัท HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India
13. เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) จากบริษัท Ajax Finechem Pty Ltd., New Zealand

14. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (35% w/w) ของบริษัท E. Merk, Dramstadt, Germany
15. กรดฟอสฟอริก ของบริษัท E. Merk, Dramstadt, Germany
16. วานิลลิน (Vanillin) ของบริษัท E. Merk, Dramstadt, Germany
17. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท E. Merk, Dramstadt, Germany
18. Brilliant Blue G ของบริษัท Sigma Chemical Co., USA
19. ชุดทดสอบค่าซีโอดี จากบริษัท Hanna instruments, Italy
20. น้ำเสีย จากบริษัท Market Gateway Co. Ltd., Thailand
21. น้ำมันปาล์ม ตราโอสิน ประเทศไทย

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงาน

3.1 การหาความเข้มข้นของน้ำเสียจากโรงงานแปรรูปผลไม้ที่เหมาะสมสำหรับผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.1.1 การเตรียมน้ำเสียจากโรงงานแปรรูปผลไม้

น้ำเสียจากโรงงานแปรรูปผลไม้ของบริษัทมาร์เก็ตเกตเวย์ จำกัด ที่มีคุณสมบัติคือ มีน้ำตาลซูโครสเป็นองค์ประกอบหลัก เมื่อทดสอบค่าซีโอดีหรือค่าของปริมาณออกซิเจนทั้งหมดที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอินทรีย์ภายในน้ำสูง (พีรตนย์ เอื่อนศิริกุล, 2017) นำน้ำเสียมาเจือจาง 100 เท่า เพื่อนำไปวัดค่าซีโอดี จากนั้นนำมาเจือจางให้มีค่าซีโอดีเป็น 1 และ 5 เท่าของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเบซัลปกติ (มีกลูโคสเป็นองค์ประกอบ) (ภาคผนวก ก) เพื่อใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเบซัล สำหรับผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ



รูปที่ 3.1 น้ำเสียจากโรงงานแปรรูปผลไม้ของบริษัทมาร์เก็ตเกตเวย์ จำกัด

3.1.2 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก

นำเชื้อแบคทีเรีย *Weissella cibaria* สายพันธุ์ PN3 รหัส MSCU 0840 จากคลังจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (MSCU Microbial Culture Collection) มาซัดบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด MRS บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนีของเชื้อ *W. cibaria* สายพันธุ์ PN3 ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่เตรียมใน Erlenmeyer flasks ขนาด 250 มิลลิลิตร เพื่อเตรียมเป็นหัวเชื้อ นำไปบ่มแบบเขย่าบนเครื่องเขย่าสารที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1



รูปที่ 3.2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Weissella cibaria* สายพันธุ์ PN3 รหัส MSCU 0840 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด MRS

3.1.3 การตรึงเชื้อจุลินทรีย์บนวัสดุสังเคราะห์ที่มีรูพรุน

วัสดุสังเคราะห์ที่มีรูพรุนสำหรับตรึงเชื้อจุลินทรีย์ เป็นวัสดุที่จำหน่ายทางการค้าในชื่อ Aquaporousgel จากบริษัท Nisshinbo ขั้นตอนการตรึงเริ่มจากถ่ายหัวเชื้อจุลินทรีย์จากข้อ 3.1.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีวัสดุสังเคราะห์ที่มีรูพรุนอยู่ 1.8 กรัม ที่เตรียมใน Erlenmeyer flasks ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นแบบเขย่าบนเครื่องเขย่าสารที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



รูปที่ 3.3 Aquaporousgel ที่ใช้เป็นวัสดุสำหรับตรึงเซลล์ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.1.4 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Weissella cibaria* สายพันธุ์ PN3 โดยใช้เซลล์ตรึงผลิตซ้ำ

จากข้อ 3.1.3 เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB โดยแทนที่ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเบซัล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (Laorrattanasak และคณะ, 2016) แบ่งออกเป็น 3 สภาวะคือ อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเบซัล ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (เป็นชุดควบคุม) อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเบซัล ที่ใช้น้ำเสียจากโรงงานแปรรูปผลไม้แทนกลูโคสที่มีค่าซีไอดี เป็น 1 และ 5 เท่าของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเบซัลปกติ จากนั้นเติมน้ำมันถั่วเหลืองที่ผ่านการทำให้ปลอดเชื้อ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในทั้ง 3 สภาวะ และนำไปปั่นแบบเขย่าบนเครื่องเขย่าสารที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อเพื่อเตรียมไปสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และนำส่วนวัสดุสังเคราะห์ที่มีรูพรุนเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเบซัล 100 มิลลิลิตร และเติมน้ำมันถั่วเหลือง 2 มิลลิลิตร

เพื่อทำการผลิตซ้ำ โดยนำไปปั่นบนเครื่องเขย่าสารที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเก็บส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ เพื่อเตรียมไปสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ทำซ้ำแบบเดิมอีก 1 รอบ และเก็บส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อและวัสดุสังเคราะห์ที่มีรูพรุนมาสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.1.5 ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในแต่ละขั้นการผลิต

เก็บเชื้อจุลินทรีย์จากขั้นการตรึงเชื้อจุลินทรีย์ในข้อ 3.1.3 และเชื้อจุลินทรีย์ในแต่ละรอบการผลิตในข้อ 3.1.4 นำมาหาปริมาณเชื้อโดยการทำให้ MPN บนเพลท 96 หลุม (96 well plate) เริ่มจากหยดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ลงในแต่ละหลุมปริมาตร 180 ไมโครลิตรจากนั้นหยดเชื้อจุลินทรีย์ 20 ไมโครลิตรลงในแถวแรก จากนั้นเจือจาง 10 เท่าจนถึงระดับการเจือจางที่ 10^{-10} นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน

นำส่วนวัสดุสังเคราะห์ที่มีรูพรุนในขั้นการตรึงเชื้อจุลินทรีย์ในข้อ 3.1.3 และในแต่ละรอบการผลิตในข้อ 3.1.4 มาตัดเป็น 4 ส่วนลงในขวดไวแอล (Vial) จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% ปริมาตร 5 มิลลิตร ลงในขวด นำไปใส่เครื่องโซนิเคเตอร์ (Sonicator) เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้เซลล์บางส่วนออกมาจากวัสดุสังเคราะห์ที่มีรูพรุน เมื่อครบกำหนดดูดส่วนน้ำไปทำ MPN บนเพลท 96 หลุมตามวิธีที่กล่าวไปข้างต้น

3.1.6 การแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เชื้อผลิตได้

นำส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ในแต่ละรอบการผลิตมาปั่นเหวี่ยง 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนน้ำใสเพื่อเตรียมในขั้นสกัดและนำไปวัดค่าแรงตึงผิวที่เชื้อผลิตออกมานอกเซลล์ นำส่วนตะกอนเซลล์และส่วนวัสดุสังเคราะห์ที่มีรูพรุนมาเติมสารละลายเมทานอล 30 มิลลิตร จากนั้นนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าสารที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำส่วนเมทานอลมาปั่นเหวี่ยง 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนน้ำใสเพื่อเตรียมในขั้นสกัด

3.1.7 การสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

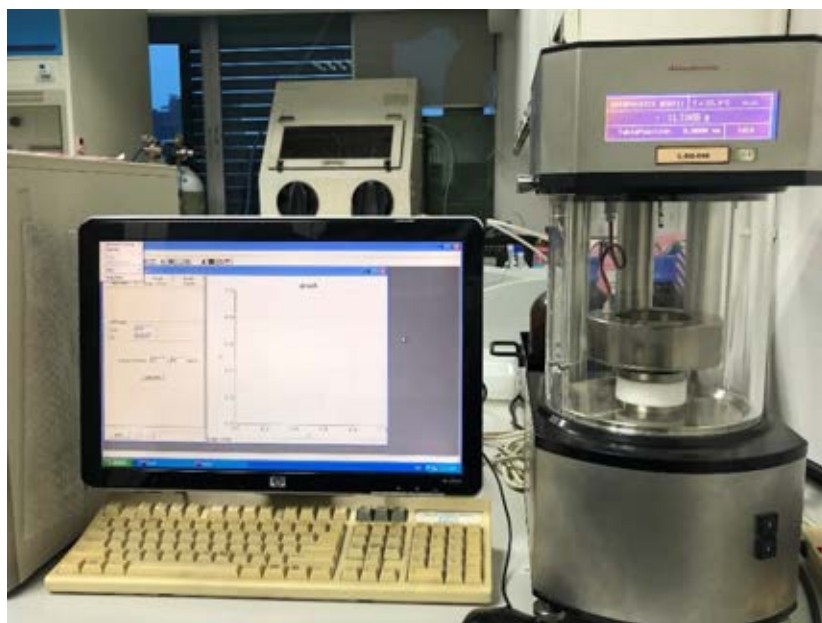
นำส่วนน้ำใสที่ได้จากข้อ 3.1.6 มาเติมสารละลายคลอโรฟอร์มและเมทานอล อัตราส่วน 2:1 ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าสารที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำส่วนน้ำทั้งหมดไปแยกในกรวยแยกสาร (Separatory funnel) ไซส์กลางเพื่อเก็บชั้นคลอโรฟอร์มและ

เมทานอลใส่ใน Erlenmeyer flasks ขนาด 150 มิลลิลิตร นำไปประเหยจนแห้งและชะสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเมทานอล จากนั้นคัดเฉพาะส่วนเมทานอลใส่กระทงฟอยล์ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน นำไปอบข้ามคืนที่ 50 องศาเซลเซียส และนำมาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งละเอียดเพื่อเปรียบเทียบปริมาณปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในแต่ละสถานะ โดยเลือกสถานะที่ให้ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมากที่สุดไปทำการทดลองต่อไป

3.2 การทดสอบคุณสมบัติของของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากข้อ 3.1.7

3.2.1 การวัดค่าแรงตึงผิว (Surface tension)

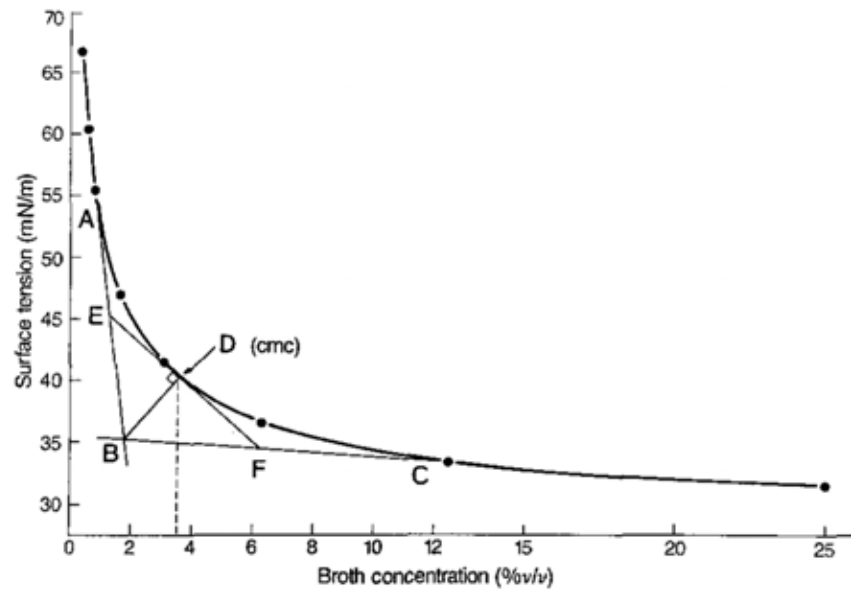
นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ทั้งชนิดที่เชื่อมผลิตออกมานอกเซลล์และชนิดที่ติดอยู่ที่ผิวเซลล์มาวัดค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่อง Tensiometer (Kruss, K100) ที่อุณหภูมิต้อง โดยเปรียบเทียบกับน้ำ DI (Deionized water) (เพ็ญนภา บุญจรัส, 2015)



รูปที่ 3.4 เครื่อง Tensiometer (Kruss, K100)

3.2.2 การหาค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์ (Critical micelle concentration, CMC)

ค่า CMC เป็นค่าที่บอกถึงความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ต่ำสุดในการเกิดเป็นไมเซลล์ซึ่งสามารถลดแรงตึงผิวได้มีประสิทธิภาพสูงสุดซึ่งหาได้จากการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตึงผิวกับค่าความเข้มข้นต่างๆของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแสดงดังรูปที่ 3.5



รูปที่ 3.5 วิธีการหาค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์

ค่า CMC คำนวณโดยหาเส้นสัมผัส AB และ BC ด้วยสมการถดถอยเชิงเส้นเพื่อหาจุดตัด B เมื่อกำหนดให้

$$\text{เส้นสัมผัส AB : } y_1 = b_1x_1 + a_1$$

$$\text{เส้นสัมผัส BC : } y_2 = b_2x_2 + a_2$$

เมื่อเกิดจุดตัด B จะได้

$$b_1x_1 + a_1 = b_2x_2 + a_2 \quad \text{เมื่อ } y_1 = y_2$$

$$b_1x_1 - b_2x_2 = a_2 - a_1$$

$$x(b_1 - b_2) = a_2 - a_1 \quad \text{เมื่อ } x_1 = x_2$$

$$x = (a_2 - a_1) / (b_1 - b_2)$$

จุดตัด B จึงเท่ากับ $(a_2 - a_1) / (b_1 - b_2)$

เมื่อลากเส้นตรง BD ผ่านจุด B ให้ตั้งฉากกับเส้นสัมผัส EF ที่จุด D แล้วลากมาตัดแกน X ค่าที่ได้คือค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ และเมื่อลากมาตัดแกน Y ค่าที่ได้คือค่าแรงตึงผิว ณ จุดของการเกิดไมเซลล์ (Sheppard และ Mulligan, 1987)

ทดสอบโดยนำตัวอย่างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่อยู่ในรูปสารสกัดหยาบในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ซาไลนให้มีความเข้มข้นในช่วง 0.01 ถึง 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าแรงตึงผิวและสร้างกราฟ ความสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตึงผิวกับค่าลอการิทึมความเข้มข้นต่างๆ ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Gudiña และ คณะ, 2010)

3.2.3 การวัดค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน (Emulsification index, E24)

การวัดความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพต่อการเกิดอิมัลชันโดยเปรียบเทียบกับน้ำมันพืช และ น้ำมันหอมระเหยชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำมันปาล์ม น้ำมันมะพร้าว น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันมะกอก น้ำมันหอมระเหย กลิ่นลาเวนเดอร์ และน้ำมันหอมระเหยกลิ่นโรสแมรี่ นำน้ำมันชนิดต่างๆ 300 ไมโครลิตร ใส่ลงในขวดแก้วปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารสกัดหยาบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการใช้เครื่อง ผสมสารละลาย (Vortex Mixer) เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวิเคราะห์ ความขุ่นของอิมัลชันโดยคำนวณจากสมการที่ 3.1 (เพ็ญนภา บุญจริง, 2015)

$$E_{24} = \frac{H_{emulsion}}{H_{total}} \times 100$$

สมการที่ 3.1 การคำนวณค่า E24

โดย E24 คือ ความเสถียรของอิมัลชัน

$H_{emulsion}$ คือ ความสูงของชั้นอิมัลชัน

H_{total} คือ ความสูงของของเหลวทั้งหมด

3.3 การทดสอบหาองค์ประกอบทางชีวเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากข้อ 3.1.7

3.3.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบของไขมันในสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้โดยวิธี Sulfo-Phospho-Vanillin

นำตัวอย่างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่อยู่ในรูปสารสกัดหยาบในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ที่ปรับค่าความเป็นกรดเบสที่ 8 ให้มีความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองโดยทำคู่กับน้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร (เป็นหลอดอ้างอิง) แล้วนำทั้ง 2 หลอด มาเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปต้มในอ่างน้ำร้อน 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบกำหนดวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติมกรดฟอสฟอริก-วานิลลิน (Phosphoric acid- vanillin reagent) 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มในน้ำอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ที่จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตร แล้วคำนวณจากกราฟมาตรฐานสำหรับวัดปริมาณไขมัน (Izard และคณะ, 2003)

3.3.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนในสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้โดยวิธี Bradford

นำตัวอย่างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่อยู่ในรูปสารสกัดหยาบในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ที่ปรับค่าความเป็นกรดเบสที่ 8 ให้มีความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองแล้วเติมสารละลาย Coomassie Brilliant Blue ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร แล้วคำนวณจากกราฟมาตรฐานสำหรับวัดปริมาณโปรตีน (He, 2011)

3.3.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตในสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้โดยวิธี phenol-sulfuric acid

นำตัวอย่างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่อยู่ในรูปสารสกัดหยาบในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ที่ปรับค่าความเป็นกรดเบสที่ 8 ให้มีความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองแล้วเติมสารละลายฟีนอล 25 ไมโครลิตร และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 485 นาโนเมตร แล้วคำนวณจากกราฟมาตรฐานสำหรับวัดปริมาณน้ำตาล (ณัฐวิภา ชุนอาวุธ, 2016)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

จากการวิเคราะห์น้ำเสียจากโรงงานแปรรูปผลไม้ บริษัท มาร์เก็ตเกตเวย์ จำกัด พบว่า มีค่าซีโอดีเท่ากับ 638,200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และอาหารเลี้ยงเชื้อเบซัลที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนมีค่าเท่ากับ 3,310 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นจึงนำค่ามาจำนวนเป็นสูตรอาหารที่ใช้้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยอาหารเลี้ยงเชื้อเบซัลที่ใช้้ำเสียเป็น 1 เท่า และ 5 เท่าของอาหารเลี้ยงเชื้อเบซัลที่มีกลูโคส พบว่ามีค่าซีโอดีเริ่มต้นเท่ากับ $5,440 \pm 84.9$ และ $15,750 \pm 70.7$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

4.2 การเลือกสภาวะการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เหมาะสม

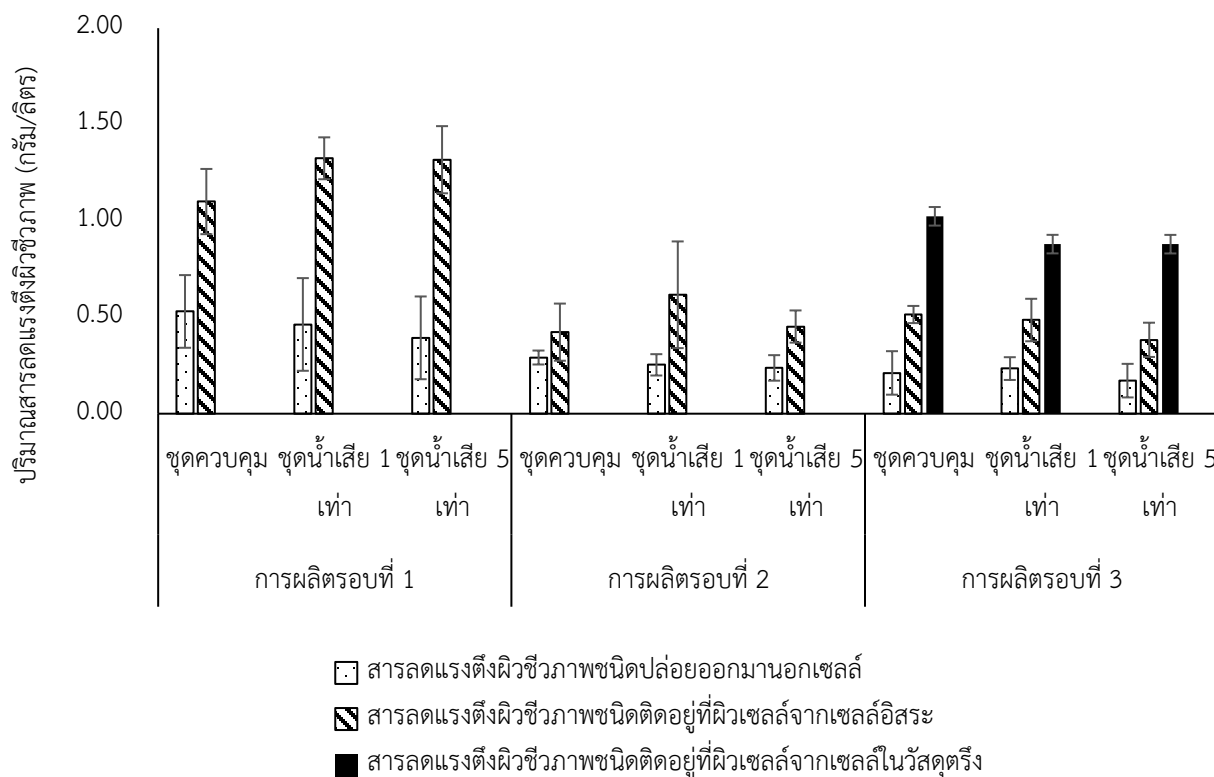
การหาปริมาณน้ำเสียที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยพิจารณาจากปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มากที่สุดเมื่อเทียบกับชุดควบคุม และผลความสามารถในการใช้เซลล์ตรึงซ้ำในการผลิตรอบถัดไป

4.2.1 เปรียบเทียบปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ *W. cibaria* PN3 แบบเซลล์ตรึงผลิตได้ในชุดการทดลองที่ใช้้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอน

เมื่อนำแบคทีเรียสายพันธุ์ *W. cibaria* PN3 มาผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแบบเซลล์ตรึงบน Aquaporousgel โดยใช้้ำเสียจากโรงงานแปรรูปผลไม้มาเป็นแหล่งคาร์บอนตามสูตรอาหารในข้อ 4.1 เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อเบซัลที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งใช้เป็นชุดควบคุม และทั้งสามชุดการทดลองมีการเติมน้ำมันถั่วเหลือง 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อปริมาตร เพื่อใช้เป็นโครงสร้างของหลักในโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จากนั้นบ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ผลิตซ้ำอีก 2 รอบ พบว่าชุดการทดลองที่ใช้้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคสทั้งสองชุดการทดลอง สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ทั้ง 2 ชนิด คือ ชนิดที่ปล่อยออกมานอกเซลล์และชนิดที่ติดอยู่ที่ผิวเซลล์ โดยมีปริมาณผลผลิตใกล้เคียงกับชุดควบคุม โดยชุดการทดลองที่ใช้้ำเสีย 1 เท่าและ 5 เท่า มีปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์อยู่ที่ 1.33 กรัมต่อลิตร และ 1.32 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.1) และปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดปล่อยออกมานอกเซลล์ที่เชื้อ *W. cibaria* PN3 ผลิตในชุดการทดลองที่ใช้้ำเสีย 1 เท่าและ 5 เท่า คือ 0.46 กรัมต่อลิตร และ 0.39 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งแม้ว่าเมื่อใช้้ำเสียที่มีค่าซีโอดีสูงแต่ผลผลิตที่ได้

กลับไม่สูงขึ้นตามไปด้วย อาจเป็นผลมาจากในน้ำเสียมีสารอินทรีย์ปนเปื้อน ทำให้เมื่อมีปริมาณสารปนเปื้อนมากเกินไปอาจส่งผลต่อจุลินทรีย์หรือการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

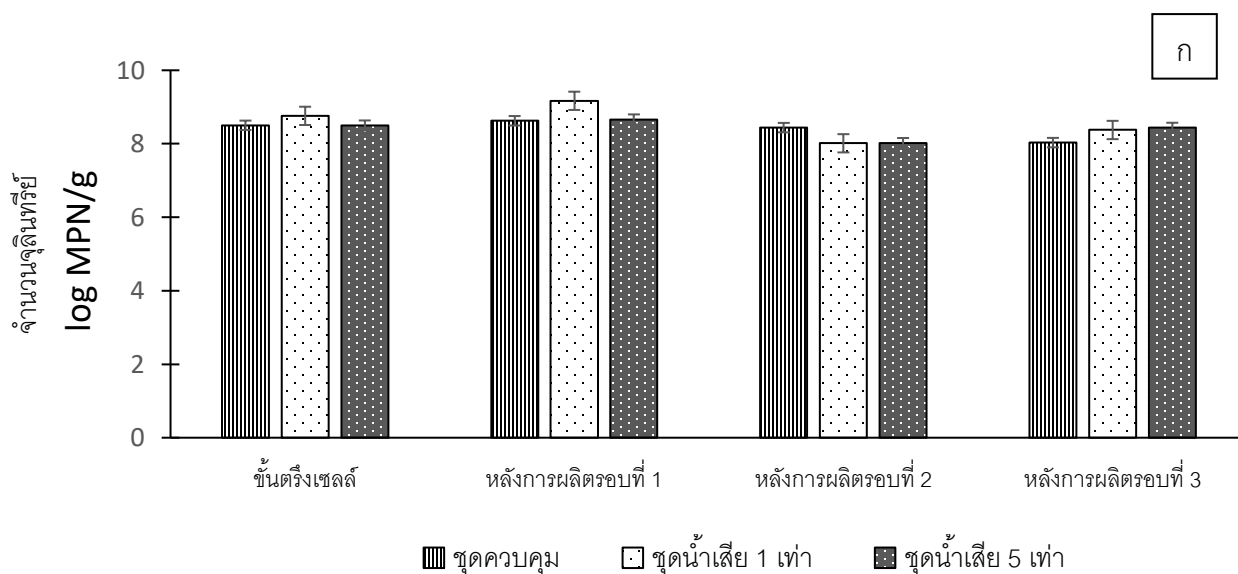
เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพซ้ำๆ โดยการใส่เซลล์ตรึงซ้ำและเปลี่ยนอาหารเพื่อผลิตในรอบที่ 2 และ 3 พบว่า ในรอบที่ 2 และ 3 เชื้อ *W. cibaria* PN3 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ทั้ง 2 ชนิด แต่มีปริมาณลดลงจากรอบที่ 1 ประมาณครึ่งหนึ่ง โดยชุดน้ำเสีย 1 เท่าและ 5 เท่าผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์ได้เท่ากับ 0.62 กรัมต่อลิตร และ 0.45 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดปล่อยออกมานอกเซลล์มีปริมาณ 0.25 กรัมต่อลิตร และ 0.24 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ในรอบที่ 3 มีการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเซลล์ที่เกาะอยู่บนวัสดุตรึงเพิ่ม จึงมีปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มมากขึ้น

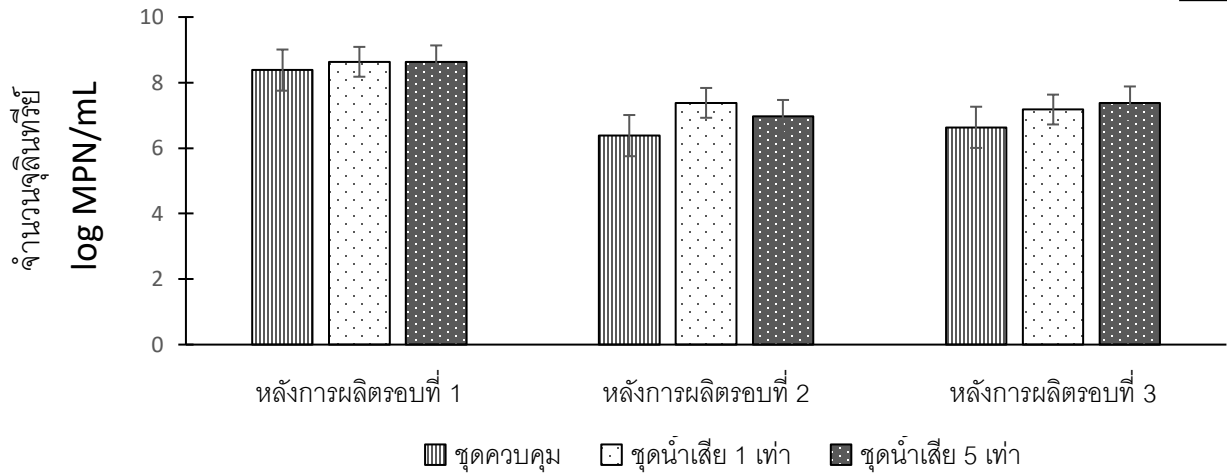


รูปที่ 4.1 ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในชุดการทดลองต่างๆและแต่ละรอบการผลิตที่ผลิตโดยเชื้อ *W. cibaria* PN3 แบบเซลล์ตรึง

4.2.2 จำนวนจุลินทรีย์ในแต่ละขั้นการทดลอง

จากการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์โดยวิธี MPN ในแต่ละขั้นการทดลอง ได้แก่ ขั้นการตรึงเซลล์ และขั้นการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยวิเคราะห์ทั้งจำนวนจุลินทรีย์ที่ถูกตรึงอยู่ในวัสดุตรึงและจำนวนจุลินทรีย์ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่ถูกตรึงอยู่ในวัสดุตรึงของชุดที่ใช้น้ำเสีย 1 เท่าและ 5 เท่ามีปริมาณใกล้เคียงกับชุดควบคุมอยู่ที่ประมาณ $\log 8$ MPN ต่อกรัมของวัสดุตรึง ทั้งในขั้นการตรึงเซลล์และในขั้นการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (รูปที่ 4.2 ก) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้น้ำเสียที่มีค่าซีโอดีที่สูงกว่าไม่ได้ส่งผลให้จำนวนจุลินทรีย์ในวัสดุตรึงเพิ่มมากขึ้นอาจเป็นผลมาจาก สารบางอย่างที่อยู่ในน้ำเสียเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อใช้น้ำเสียที่มีความเข้มข้นที่มีมากเกินไป หรือขีดจำกัดของวัสดุตรึงในการตรึงเซลล์ เมื่อพิจารณาจำนวนจุลินทรีย์ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าจำนวนจุลินทรีย์หลังการผลิตรอบที่ 1 ทั้งชุดการทดลองที่ใช้น้ำเสียและชุดควบคุมมีจำนวนใกล้เคียงกันอยู่ที่ $\log 8$ MPN ต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อผลิตซ้ำในรอบที่ 2 และ 3 จำนวนจุลินทรีย์ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีจำนวนลดลงประมาณ 1-2 log cycle (รูปที่ 4.2 ข) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในรอบที่ 2 และ 3 ที่ลดลงเมื่อเทียบกับรอบที่ 1 (รูปที่ 4.1)



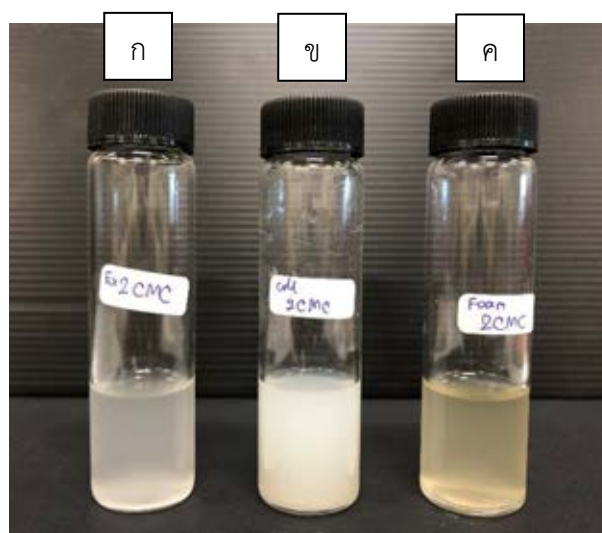


รูปที่ 4.2 จำนวนจุลินทรีย์ในแต่ละขั้นการทดลองของชุดควบคุม ชุดที่ใช้ น้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอน 1 เท่า และ 5 เท่า ก. จำนวนจุลินทรีย์ที่อยู่บนวัสดุจริง ข. จำนวนจุลินทรีย์ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากข้อมูลปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในแต่ละรอบการผลิตแสดงให้เห็นว่าชุดการทดลองที่ใช้ น้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอน 1 เท่า มีปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพรวมมากที่สุด จึงเลือกสภาวะนี้ไปผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพปริมาณมากแล้วนำไปทดสอบคุณสมบัติต่อไป

4.3 การทดสอบคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ลักษณะภายนอกของสารสกัดหยาบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *W. cibaria* PN3 แบบเซลล์ตรงเมื่อใช้น้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทั้ง 3 ชนิด มีลักษณะที่แตกต่างกัน โดยสารสกัดหยาบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดที่ปล่อยออกมานอกเซลล์มีสีเหลืองขุ่น และหนืด ส่วนสารสกัดหยาบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดที่ติดอยู่ที่ผิวเซลล์จากเซลล์อิสระและเซลล์ที่อยู่ในวัสดุจริง มีสีเหลืองอมส้ม มีความใสมากกว่าและหนืดน้อยกว่าโดยสารสกัดหยาบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดที่ปล่อยออกมานอกเซลล์ (รูปที่ 4.3 ก)

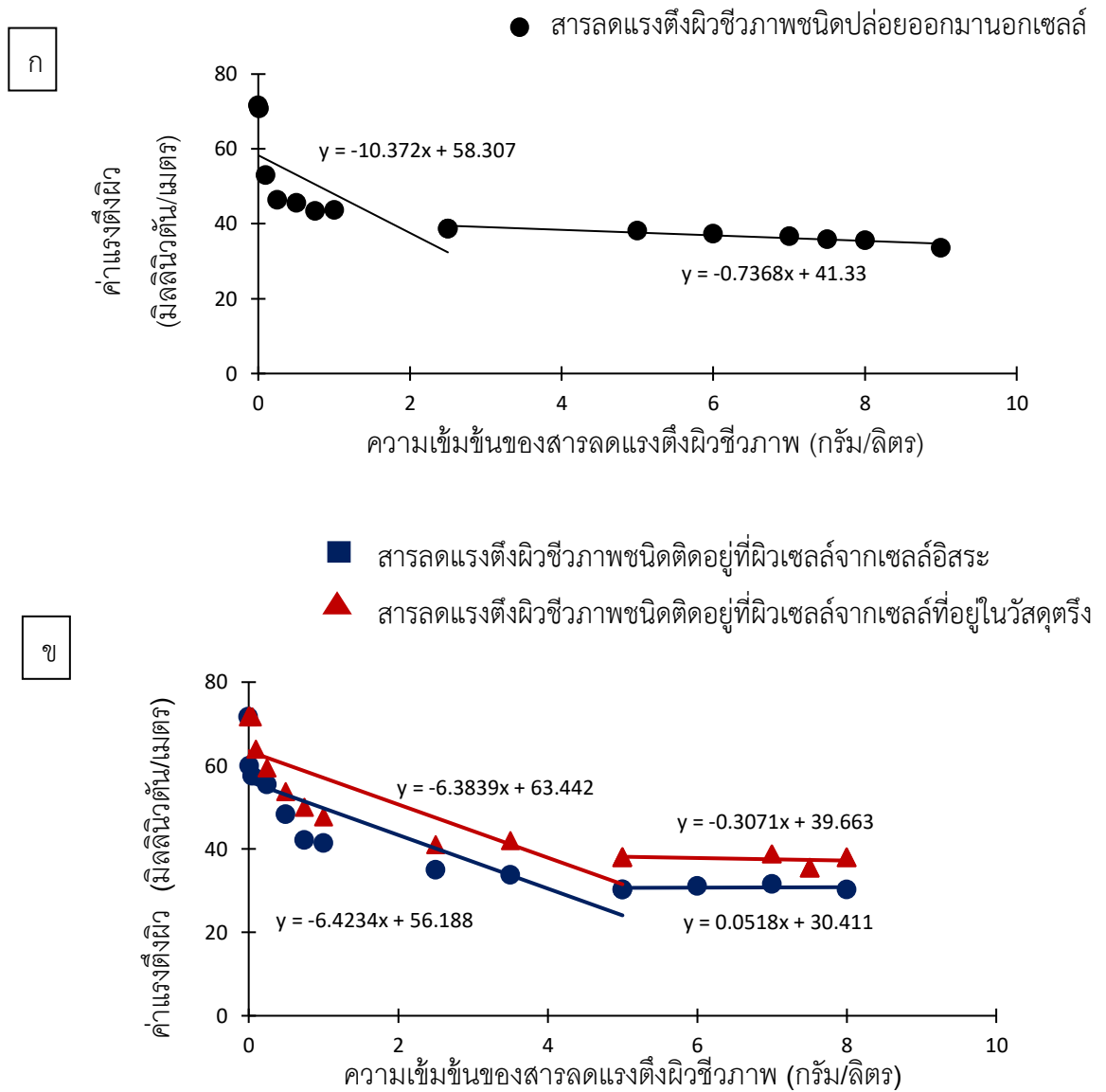


รูปที่ 4.3 ลักษณะสารสกัดหยาบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพละลายใน PBS ที่ผลิตจากเชื้อ *W. cibaria* PN3 แบบเซลล์ตรึงเมื่อใช้น้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอน ก. สารสกัดหยาบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดปล่อยออกมาจากเซลล์ ข. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์จากเซลล์อิสระ ค. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์จากเซลล์ที่อยู่ในวัสดูดซับ

4.3.1 การวัดค่าแรงตึงผิวและการหาค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

การหาค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทำได้โดยการเจือจางสารสกัดหยาบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ให้มีความเข้มข้น 0 ถึง 9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำแต่ละค่าการเจือจางไปวัดค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่อง Tensiometer และนำไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกับค่าแรงตึงผิวเพื่อหาจุดค่าแรงตึงผิวที่เริ่มคงที่ จากการทดลองวัดค่าแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดที่ปล่อยออกมาจากเซลล์พบว่ามีประสิทธิภาพในการลดค่าแรงตึงผิวของน้ำจาก 71.6 มิลลินิวตันต่อเมตร เหลือ 33.57 มิลลินิวตันต่อเมตร โดยมีค่า CMC เท่ากับ 1.76 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.4 ก) ส่วนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์แบ่งการวิเคราะห์ค่าออกเป็น 2 ส่วน คือ เซลล์อิสระในอาหารเลี้ยงเชื้อและเซลล์ที่ติดอยู่บนวัสดูดซับ โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดจากเซลล์อิสระในอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถลดค่าแรงตึงผิวของน้ำได้มากกว่าเซลล์ที่ติดอยู่บนวัสดูดซับ ซึ่งลดค่าแรงตึงผิวของน้ำได้เหลือ 30.21 มิลลินิวตันต่อเมตร และ 38.02 มิลลินิวตันต่อเมตร ตามลำดับ แต่ทั้ง 2 ส่วนมีค่า CMC ที่ใกล้เคียงกัน คือ 3.98 กรัมต่อลิตร และ 3.91 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.4 ข) นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากสภาวะที่ใช้น้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอน กับสภาวะที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า เมื่อใช้น้ำเสียเป็นแหล่ง

คาร์บอน ค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดปล่อยออกมานอกเซลล์มีค่าใกล้เคียงกับเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ส่วนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์มีค่าแตกต่างกันซึ่งอาจเป็นผลมาจากมีสารอื่นในน้ำเสียมาเจือปนส่งผลให้ค่า CMC ของชุดที่ใช้น้ำเสียมีค่าสูงกว่า (ตารางที่ 4.1)



รูปที่ 4.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดหยาบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *W. cibaria* PN3 แบบเซลล์ตรึงกับค่าแรงตึงผิว เมื่อใช้น้ำเสียจากโรงงานแปรรูปผลไม้เป็นแหล่งคาร์บอนที่มีค่าซีโอดีเป็น 1 เท่าของอาหารเลี้ยงเชื้อเบซัล และเติม 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อปริมาตร ของน้ำมันถั่วเหลือง

ก. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดปล่อยออกมานอกเซลล์ ข.สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์

ตารางที่ 4.1 เปรียบเทียบค่า CMC และค่าแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากสภาวะที่ใช้น้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอน กับสภาวะที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

ชนิดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	ค่า CMC (กรัมต่อลิตร)		ค่าแรงตึงผิว (มิลลินิวตันต่อเมตร)	
	แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเสีย	แหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส	แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเสีย	แหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส
ปล่อยออกมานอกเซลล์	1.76	1.6	33.57	30.84
ติดอยู่ที่ผิวเซลล์อิสระ	3.98	3.2	30.21	32.97
ติดอยู่ที่ผิวเซลล์ผิวเซลล์ตรึง	3.91	3.3	38.02	36.78

4.3.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

การวิเคราะห์สัดส่วนต่างๆในโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแต่ละชนิดที่เชื้อ *W. cibaria* PN3 ผลิตได้เมื่อใช้น้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคส มีสัดส่วนองค์ประกอบที่แตกต่างกัน คือ ชนิดที่ปล่อยออกนอกเซลล์ มีอัตราส่วนของคาร์โบไฮเดรต: โปรตีน: ไขมัน เป็น 69: 0: 31 ชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์จากเซลล์อิสระ เป็น 14: 25: 61 แสดงดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ผลการวิเคราะห์สัดส่วนองค์ประกอบทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพใช้อาหารเบซัลที่ใช้น้ำเสียมีค่าซีไอดีเป็น 1 เท่า

ชนิดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	สัดส่วนองค์ประกอบทางเคมี (%w/w)		
	คาร์โบไฮเดรต	โปรตีน	ไขมัน
ชนิดที่ปล่อยออกนอกเซลล์	69	0	31
ชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์จากเซลล์อิสระ	14	25	61
ชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์จากเซลล์ที่อยู่ในวัสดุตรึง	100	N/A	N/A

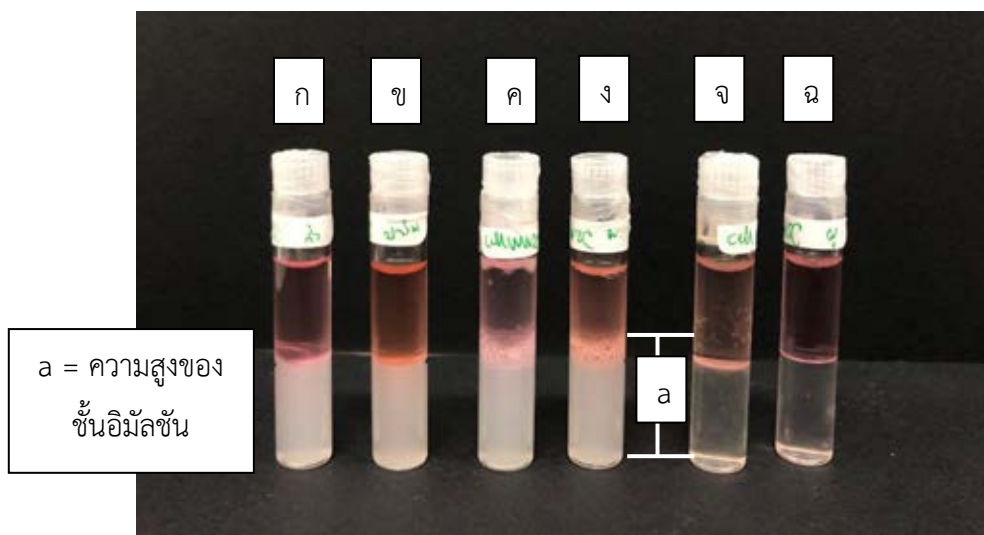
หมายเหตุ N/A หมายถึงไม่สามารถวัดค่าได้

4.3.3 การหาค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน (E24)

จากการทดสอบการก่ออิมัลชันของสารสกัดหยาบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *W. cibaria* PN3 แบบเซลล์ตรึงเมื่อใช้น้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอน มีความเข้มข้นอยู่ที่ 1 CMC และ 2 CMC เปรียบเทียบกับชุดที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยทดสอบประสิทธิภาพการก่ออิมัลชันกับน้ำมันพืชและน้ำมันหอมระเหย ได้แก่ น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม น้ำมันมะพร้าว น้ำมันมะกอก น้ำมันหอมระเหยกลิ่นส้ม และน้ำมันหอมระเหยกลิ่นยูคาลิปตัส พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเท่ากับ 1 CMC ทั้งชุดการทดลองที่ใช้น้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอนและชุดที่ใช้กลูโคส พบว่ามีค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันน้อยและเกิดกับน้ำมันบางชนิดเท่านั้น นอกจากนี้ชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังส่งผลต่อการก่ออิมัลชัน เช่น น้ำมันมะพร้าวสามารถเกิดอิมัลชันกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์จากเซลล์อิสระ แต่ไม่เกิดกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดปล่อยออกมานอกเซลล์ จากการทดสอบการก่ออิมัลชันของสารสกัดหยาบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ความเข้มข้น 1 CMC มีประสิทธิภาพต่ำ (ตารางที่ 4.3) จึงทดสอบที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็น 2 CMC พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดที่ติดอยู่ที่ผิวเซลล์จากเซลล์อิสระในชุดการทดลองที่ใช้น้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอนมีประสิทธิภาพในการก่ออิมัลชันดีที่สุดในน้ำมันพืช แต่ชุดที่ใช้กลูโคสสามารถก่ออิมัลชันได้ดีกับพืชและน้ำมันหอมระเหยกลิ่นยูคาลิปตัส แสดงดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากชุดการทดลองที่ใช้น้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 2 CMC เทียบกับน้ำมันชนิดต่างๆ

ชนิดของน้ำมัน	ค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน (%)		
	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดปล่อยออกมานอกเซลล์	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์จากเซลล์อิสระ	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์จากเซลล์ที่อยู่ในวัสดุตรึง
น้ำมันถั่วเหลือง	0	54.72±5.19	0
น้ำมันปาล์ม	0	53.95±1.06	0
น้ำมันมะพร้าว	3.45±0.00	76.67±17.32	48.28±0.00
น้ำมันมะกอก	0	64.37±1.99	49.43±1.00
น้ำมันหอมระเหยกลิ่นส้ม	3.45±0.00	0	3.33±0.00
น้ำมันหอมระเหยกลิ่นยูคาลิปตัส	0	0	0



รูปที่ 4.5 ผลการก่ออิมัลชันระหว่างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์จากเซลล์อิสระ เมื่อใช้น้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอนกับน้ำมันชนิดต่างๆ ก. น้ำมันถั่วเหลือง ข. น้ำมันปาล์ม ค. น้ำมันมะพร้าว ง. น้ำมันมะกอก จ. น้ำมันหอมระเหยกลีนิสึม ฉ. น้ำมันหอมระเหยกลีนิยูคาลิปตัส

เมื่อเปรียบเทียบค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันระหว่างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *W. cibaria* PN3 เมื่อใช้น้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเท่ากับ 2 CMC กับสารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ขึ้นทางเคมี ได้แก่ TritonX-100 กับ SDS ที่ความเข้มข้น 1 CMC และ 10 CMC พบว่า ที่ความเข้มข้น 1 CMC ของ TritonX-100 มีประสิทธิภาพในการก่ออิมัลชันได้เกือบทุกน้ำมัน แต่ SDS ที่ความเข้มข้น 1 CMC และ 10 CMC มีประสิทธิภาพในการก่ออิมัลชันกับน้ำมันทุกชนิดที่ทดสอบต่ำ เมื่อเปรียบเทียบค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันระหว่างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *W. cibaria* PN3 เมื่อใช้น้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเท่ากับ 2 CMC จึงบอกได้ว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มีประสิทธิภาพดีกว่า SDS เนื่องจากใช้ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในปริมาณที่ต่ำกว่า SDS แต่มีค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันสูงกว่า แต่เมื่อเทียบกับ TritonX-100 ให้ผลตรงกันข้ามคือ TritonX-100 มีประสิทธิภาพสูงกว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *W. cibaria* PN3 เมื่อใช้น้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ 4.4 ค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ทางเคมีที่ความเข้มข้น 1 CMC เทียบกับน้ำมันชนิดต่างๆ

ชนิดของน้ำมัน	ค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน (%)			
	TritonX-100	SDHS	TritonX-100	SDHS
	ความเข้มข้น	ความเข้มข้น	ความเข้มข้น	ความเข้มข้น
	1 CMC	1 CMC	10 CMC	10 CMC
น้ำมันถั่วเหลือง	50±0.00	0	58.89±1.92	0
น้ำมันปาล์ม	92.77±3.57	8.13±1.92	56.17±0.86	0
น้ำมันมะพร้าว	4.81±2.25	0	30.54±20.50	0
น้ำมันมะกอก	67.83±6.34	0	45.56±27.95	0
น้ำมันหอมระเหย กลิ่นส้ม	3.41±0.07	5.79±3.95	3.33±0.00	47.78±1.92
น้ำมันหอมระเหย กลิ่นยูคาลิปตัส	0	37.93±0.00	6.78±0.16	0

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

น้ำเสียจากโรงงานแปรรูปผลไม้ที่มีปริมาณน้ำตาลค่อนข้างสูง ทำให้พบว่ามีค่าซีโอตีในน้ำเสียสูงตามไปด้วย จึงเกิดแนวคิดที่จะนำน้ำเสียจากโรงงานแปรรูปผลไม้มาประยุกต์ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนทางเลือกในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ รวมถึงสามารถช่วยลดต้นทุนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพอีกด้วย งานวิจัยนี้ทำการศึกษาโดยการนำน้ำเสียมาเจือจางให้มีค่าซีโอตีเป็น 1 และ 5 เท่าของอาหารเลี้ยงเชื้อเบซัลที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส และวัดปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เชื้อ *Weissella cibaria* PN3 แบบเซลล์ตรึงผลิตได้พบว่าเชื้อ *W. cibaria* PN3 สามารถเจริญโดยใช้น้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอน และผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ 2 ชนิด คือ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดปล่อยออกมานอกเซลล์และชนิดที่ติดอยู่ที่ผิวเซลล์ จากผลการทดลองพบว่าชุดการทดลองที่ใช้ น้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอนและอาหารเลี้ยงเชื้อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน โดยปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพรวมระหว่างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดปล่อยออกมานอกเซลล์และติดอยู่ที่ผิวเซลล์จากการผลิตทั้ง 3 รอบ ในชุดการทดลองที่ใช้ น้ำเสีย 1 เท่า 5 เท่า และชุดควบคุม มีค่าอยู่ที่ 4.26 กรัมต่อลิตร 3.84 กรัมต่อลิตร และ 4.10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยให้ผลผลิตสูงกว่างานวิจัยของ Das และ Kumar (2018) ที่นำกากมันฝรั่งและขานอ้อยมาเป็นแหล่งคาร์บอนให้เชื้อ *Pseudomonas azotoformans* AJ15 ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งผลิตได้ 1.0 กรัมต่อลิตร และงานวิจัยของ Vera และคณะ (2018) ได้นำเวย์จากโรงงานอุตสาหกรรมมาเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยใช้เชื้อ *Lactococcus lactis* CECT-4434 พบว่าให้ผลผลิตเพียง 8.9 มิลลิกรัมต่อลิตร จากข้อมูลข้างต้นจึงสรุปได้ว่าน้ำเสียจากโรงงานแปรรูปผลไม้ที่มีองค์ประกอบของน้ำตาลสูง สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนทางเลือกสำหรับผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ โดยปริมาณน้ำเสียที่เหมาะสมคือ น้ำเสียที่มีค่าซีโอตีเป็น 1 เท่าของอาหารเลี้ยงเชื้อเบซัลปกติ

นอกจากนี้การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแบบเซลล์ตรึงมีแนวโน้มที่สามารถนำเอาวัสดุตรึงที่มีเชื้อบรรจุอยู่กลับมาใช้ซ้ำเพื่อช่วยลดต้นทุนในกระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จากการศึกษาพบว่าเซลล์ตรึงสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ถึง 3 รอบ โดยในรอบที่ 1 เซลล์ตรึงสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวในปริมาณที่มากที่สุด แต่อย่างไรก็ตามการผลิตรอบที่ 2 และ 3 กลับพบว่ามีปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลดลง ซึ่งเมื่อวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ในวัสดุตรึงหลังการผลิต พบว่าปริมาณจุลินทรีย์ใกล้เคียงกับในขั้นตอนการตรึงเซลล์ แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ยังคงมีชีวิตอยู่แต่ไม่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากอาจมีสารบางอย่างปกคลุมอยู่ด้านนอกของวัสดุตรึงจึงทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถผลิตสาร

ลดแรงดึงผิวชีวภาพออกมาได้เช่นเดิม ซึ่งสารที่ปกคลุมบริเวณผิวของวัสดุจริงอาจเป็นน้ำมันถั่วเหลืองที่ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อกระตุ้นให้เกิดการสร้างสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ โดยน้ำมันถั่วเหลืองจะเคลือบอยู่บริเวณด้านนอกของวัสดุจริง ทำให้จุลินทรีย์ที่อยู่ภายในรูของวัสดุจริงสัมผัสกับอาหารได้น้อยลง รวมถึงข้อจำกัดในเรื่องการส่งผ่านของออกซิเจนในระบบ ซึ่งปัจจัยข้างต้นน่าจะเป็นสาเหตุหนึ่งส่งผลให้เซลล์จริงสามารถผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพได้ในปริมาณที่น้อยลง อีกทั้งอาจเกิดจากสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่จุลินทรีย์ผลิตและถูกดูดซับที่วัสดุจริง ทำให้มีผลยังยั้งการผลิตในรอบถัดไป (Bustos และคณะ, 2018) นอกจากนี้มีงานวิจัยของ Ye และคณะ (2018) พบว่าเชื้อ *Weissella cibaria* YB-1 ที่แยกได้จากผักกาดทองของจีน ผลิตเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ (Exopolysaccharides, EPS) ได้ ซึ่ง EPS นี้ อาจจะเคลือบผิวของวัสดุจริงระหว่างการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพก็เป็นได้

หลังจากทราบสถานะของน้ำเสียที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพแล้วจึงนำสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากการใช้น้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอนมาทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ผลการทดลองการหาค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์ พบว่าสารลดแรงดึงผิวชีวภาพชนิดที่ปล่อยออกมานอกเซลล์ มีค่า CMC อยู่ที่ 1.76 กรัมต่อลิตร ส่วนสารลดแรงดึงผิวชีวภาพชนิดที่ติดอยู่ที่ผิวเซลล์ของเซลล์อิสระและเซลล์ที่อยู่ในวัสดุจริงมีค่าอยู่ที่ 3.98 กรัมต่อลิตร และ 3.91 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน จากผลการศึกษา CMC สามารถกล่าวได้ว่า เซลล์จริงสามารถผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพได้ 2 ชนิด คือ สารลดแรงดึงผิวชีวภาพชนิดปล่อยออกมานอกเซลล์และชนิดที่ติดอยู่ที่ผิวเซลล์ นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Gudina และคณะ (2015) ที่นำเชื้อ *Lactobacillus agilis* CCUG31450 มาผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS พบว่าผลิตสารลดแรงดึงผิวชนิดที่ติดอยู่ที่ผิวเซลล์โดยมีค่า CMC อยู่ที่ 7.5 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่า CMC สูงกว่าที่ได้จากงานวิจัยนี้ อีกทั้งสารลดแรงดึงผิวชีวภาพชนิดที่ติดอยู่ที่ผิวเซลล์มีความสามารถในการลดแรงดึงผิวของน้ำมากที่สุดเมื่อเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้าดังตารางที่ 5.1 แสดงให้เห็นว่า เชื้อ *W. cibaria* PN3 ที่ใช้น้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพแบบเซลล์จริง มีประสิทธิภาพเพียงพอและมีความเป็นไปได้ที่จะนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

ตารางที่ 5.1 เปรียบเทียบค่าแรงดึงผิวของน้ำที่ลดลงจากสารลดแรงดึงผิวชีวภาพชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์ของ จุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

สายพันธุ์ของจุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน	ค่าแรงดึงผิวของน้ำ (มิลลินิวตัน/เมตร)	อ้างอิง
<i>Weissella cibaria</i> PN3	น้ำเสียจากโรงงานแปรรูป ผลไม้	30.21	งานวิจัยนี้
<i>Lactobacillus agilis</i> <i>CCUG31450</i>	MRS medium	42.5	Gudiřna และคณะ, 2015
<i>Lactobacillus</i> <i>helveticus</i> MRTL 91	เวย์โปรตีน	39.5	Sharma และคณะ, 2014
<i>Enterococcus</i> <i>faecium</i> MRTL9	MRS-Lac	40.2	Sharma และคณะ, 2015

หมายเหตุ โดยทั่วไปค่าแรงดึงผิวของน้ำมีค่าอยู่ที่ 72 มิลลินิวตันต่อเมตร

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *W. cibaria* PN3 พบว่าเมื่อใช้น้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคส มีสัดส่วนองค์ประกอบที่แตกต่างกัน คือ ชนิดที่ปล่อยออกนอกเซลล์มีอัตราส่วนของคาร์โบไฮเดรต: โปรตีน: ไขมัน เป็น 69: 0: 31 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารลดแรงดึงผิวชีวภาพทั้งชนิดที่ปล่อยออกมานอกเซลล์อาจเป็นสารลดแรงดึงผิวชีวภาพชนิด ไกลโคลิปิด เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Sharma และคณะ (2014) ที่พบว่า *Lactobacillus casei* MRTL3 ผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพชนิดปล่อยออกมานอกเซลล์ชนิดไกลโคลิปิด ส่วนสารลดแรงดึงผิวชีวภาพชนิดที่ติดอยู่ที่ผิวเซลล์อิสระมีอัตราส่วนของคาร์โบไฮเดรต: โปรตีน: ไขมัน เป็น 14: 25: 61 จึงอาจเป็นสารลดแรงดึงผิวชีวภาพชนิด ไกลโคลิโปเปปไทด์ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ferreira และคณะ (2017) พบว่า *Lactobacillus paracasei* ผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพชนิด ไกลโคลิโปเปปไทด์ เช่นเดียวกัน ดังนั้นจากข้อมูลที่กล่าวมาจึงอาจบอกได้ว่าเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกสามารถผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่มีองค์ประกอบหลากหลาย ทั้งปัจจัยด้านแหล่งอาหาร ชนิดของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ และชนิดของจุลินทรีย์ ส่งผลให้องค์ประกอบของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้แตกต่างกันออกไป และจากผลสัดส่วนองค์ประกอบของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์จากเซลล์ที่อยู่ในวัสดุจริง พบว่า มีอัตราส่วนของคาร์โบไฮเดรตเพียงอย่างเดียว ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการเจือปนของสาร EPS ที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้น จึงส่งให้การวิเคราะห์ผิดพลาดได้ ดังนั้นควรเพิ่มขั้นตอนการทำสารลดแรงดึงผิวชีวภาพบริสุทธิ์ก่อนนำไปวิเคราะห์

ผลต่างๆ หรือเพิ่มขึ้นตอนการล้างวัสดุจริงเพื่อให้ EPS หลุดออกไปก่อน นอกจากนี้ควรวិเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีเพิ่มเติมเพื่อให้ได้ผลที่แม่นยำยิ่งขึ้น เช่น วิธี Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)

เมื่อศึกษาความเสถียรในการก่อกอิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *W. cibaria* PN3 แบบเซลล์ตรึง พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทั้ง 3 แบบที่ทดสอบ คือ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดปล่อยออกมาจากเซลล์ ชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์จากเซลล์อิสระ และชนิดที่ติดอยู่ที่ผิวเซลล์จากเซลล์ในวัสดุตรึง ที่ความเข้มข้น 1 CMC ไม่สามารถก่อกอิมัลชันได้กับทุกชนิดของน้ำมันที่ทดสอบ อาจเกิดจากความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไม่เพียงพอในการก่อกอิมัลชันที่เสถียร ดังนั้นจึงเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็น 2 CMC พบว่าเกิดการก่อกอิมัลชันได้ดีกับน้ำมันชนิดต่างๆ โดยเฉพาะสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์จากเซลล์อิสระ ก่อกอิมัลชันกับน้ำมันพืชที่นำมาทดสอบได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.3 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการก่อกอิมัลชันกับน้ำมันสารโซ่ยาว แต่ไม่ก่อกอิมัลชันกับสารในกลุ่มเทอร์พีนที่เป็นองค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหย (Bozkurt และคณะ, 2017) โดยผลการทดลองได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Vecino และคณะ (2015) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากแบคทีเรียในสายพันธุ์ *Lactobacillus pentosus* มีความเสถียรในการก่อกอิมัลชันกับน้ำมันหอมระเหยที่มีองค์ประกอบในกลุ่มเทอร์พีน จึงอาจนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้ไปใช้ประโยชน์ทางด้านอาหารที่มีน้ำมันพืชเป็นองค์ประกอบเพื่อ คงเนื้อสัมผัสและการละลายของกลิ่นอาหารได้ (Sharma และคณะ, 2016)

จากการวิจัยนี้ถือว่ามีความเป็นไปได้ที่จะนำน้ำเสียจากโรงงานแปรรูปผลไม้มาใช้ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแทนกลูโคสเพื่อลดต้นทุนการผลิต โดยปัจจุบันกลูโคส (D-(+) Glucose) มีราคาขายอยู่ที่ 1.7 บาทต่อกรัม อ้างอิงจากบริษัท Sigma-aldrich ประเทศสิงคโปร์ และหากต้องการเพิ่มผลผลิตให้มากขึ้นอาจทดลองโดยการเติมแลคโตสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อกระตุ้นการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์ (Vera และคณะ, 2018) นอกจากนี้การผลิตโดยใช้เซลล์ตรึงซึ่งยังคงมีความเป็นไปได้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในรอบต่อๆ ไป แต่อาจต้องปรับปรุงและหาวิธีการเพิ่มผลผลิตให้เท่ากับการผลิตรอบที่ 1 เช่น การเติมน้ำมันถั่วเหลืองในปริมาณที่น้อยลงเพื่อลดปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ในวัสดุตรึง หรือ ใช้สารละลายอื่นนอกจาก 0.85 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ในการล้างวัสดุตรึงก่อนการผลิตรอบถัดไป นอกจากนี้ อาจทำการกระตุ้นเซลล์ (reactivate) โดยการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุดมสมบูรณ์ระหว่างการผลิต เพื่อให้เซลล์มีประสิทธิภาพในการผลิตสูงขึ้น

รายการอ้างอิง

- ประกาศกระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม เรื่อง กำหนดมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม นิคมอุตสาหกรรม และเขตประกอบการอุตสาหกรรม พ.ศ. 2549 (2549, 6 มิถุนายน). ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 133 ตอนพิเศษที่ 129 ง. หน้า 17-21.
- ณัฐวุฒิ ขุนอาวุธ (2016) การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยแบคทีเรียตรึงบนโคโคโตซานในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบด. สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- พีรตนัย เอื้อนศิริกุล (2017) การบำบัดน้ำเสียจากอุตสาหกรรมแปรรูปผลไม้ด้วยตะกอนแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วง ชนิดไม่สะสมกัมมะถันแบบเม็ด. สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- เพ็ญญา บุญจริง (2015) การคัดแยกแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากอาหารหมักดองพื้นบ้านเพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- Alves, F.C.B., Barbosa, L.N., Andrade, B.F.M.T., Albano, M., Furtado, F.B., Pereira, A.F.M., Rall, V.L.M., & Júnior, A.F. (2016) Inhibitory activities of the lantibiotic nisin combined with phenolic compounds against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in cow milk. *Journal of Dairy Science*, 99, 1831-1836
- Benincasa, M., & Accorsini, F.R. (2008) *Pseudomonas aeruginosa* LBI production as an integrated process using the wastes from sunflower-oil refining as a substrate. *Bioresource Technology*, 99, 3843-3849.
- Bustos, G., Arcos, U., Vecino, X., Cruz, J.M., & Moldes, A.B. (2018) Recycled *Lactobacillus pentosus* biomass can regenerate biosurfactants after various fermentative and extractive cycles. *Biochemical Engineering Journal*, 132, 191-195.
- Ferreira, A., Vecino, X., Ferreira, D., Cruz, J.M., Moldes, A.B., & Rodrigues, L.R. (2017) Novel cosmetic formulations containing a biosurfactant from *Lactobacillus paracasei*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 155, 522-529.
- Fusco, V., Quero, G.M., Cho, G.S., Kabisch, J., Meske, D., Neve, H., Bockelmann, W., & Franz, C.M.A.P. (2015) The genus *Weissella*: taxonomy, ecology and biotechnological potential. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1-22.
- Gómez-Torres, N., Ávila, M., Gaya, P., & Garde, S. (2014) Prevention of late blowing defect by reuterin produced in cheese by a *Lactobacillus reuteri* adjunct. *Food Microbiology*, 42, 82-88.

- Gudiña, E.J., Rocha, V., Teixeira, J.A., & Rodrigues, L.R. (2010). Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* A20. *Letters in Applied Microbiology*, 50, 419-424.
- Gudiña, E. J., Fernandes, E.C., Teixeira, J.A. & Rodrigues, L.R. (2015) Antimicrobial and anti-adhesive activities of cell-bound biosurfactant from *Lactobacillus agilis* CCUG31450. *Royal Society of Chemistry*, 5, 90960-90968.
- He, F. (2011) Bradford Protein Assay. *Bio-101*: e45.
- Izard, J., & Limberger, R.J. (2003) Rapid screening method for quantitation of bacterial cell lipids from whole cells. *Journal of Microbiological Methods*, 55, 411-418.
- Das, A.J., & Kumar, R. (2018) Utilization of agro-industrial waste for biosurfactant production under submerged fermentation and its application in oil recovery from sand matrix. *Bioresource Technology*, 260, 233-240.
- Laorrattanasak, S., Rongsayamanont, W., Khondee, N., Paorach, N., Soonglerdsongpha, S., Pinyakong, O., & Luepromchai, L. (2016). Production and Application of *Gordonia westfalica* GY40 Biosurfactant for Remediation of Fuel Oil Spill. *Water Air and Soil Pollution*, 227:325, 13 pages.
- Mouafo, T.H., Mbawala, A., & Ndjouenkeu, R. (2018). Effect of Different Carbon Sources on Biosurfactants' Production by Three Strains of *Lactobacillus* spp. *Biomed Research International*, 15 pages.
- Saraiva, M.A.F., Brede, D.A., Nes, I.F., Pereira, M.C.B., Queiroz, M.V., & Moraes, C.A. (2017). Purification and characterization of two new cell-bound bioactive compounds produced by wild *Lactococcus lactis* strain. *FEMS Microbiology Letters*, 364, 1-8.
- Sharma, D., Saharan, B.S., Chauhan, N., Bansal, A., & Procha, S. (2014) Production and Structural Characterization of *Lactobacillus helveticus* Derived Biosurfactant. *The Scientific World Journal*, 9 pages.
- Sharma, D., Saharan, B.S., Chauhan, N., Procha, S., & Lal, S. (2015) Isolation and functional characterization of novel biosurfactant produced by *Enterococcus faecium*. *SpringerPlus*, 4, 1-14.
- Sharma, D., Saharan, B.S., & Kapil, S. (2016) Biosurfactants of Lactic Acid Bacteria. *Springer Briefs in Microbiology*, 86 pages.

- Sheppard, J.D., & Mulligan, C.N. (1987) The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 27, 110-116.
- Souza, E.C., Azevedo, P.O.D., Dominguez, J. M., Converti, A., & Oliveira, R.P.S. (2017). Influence of temperature and pH on the production of biosurfactant, bacteriocin and lactic acid by *Lactococcus lactis* CECT-4434. *CyTA-Journal of Food*, 15, 525-530.
- Vecino, X., Barbosa-Pereira, L., Devesa-Rey, R. et al. (2015) Optimization of extraction conditions and fatty acid characterization of *Lactobacillus pentosus* cell-bound biosurfactant/bioemulsifier. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 95, 313-320.
- Vecino, X., Rodríguez-López, L., Gudiña, E.J., Cruz, J.M., Moldes, A.B., & Rodrigues, L.R. (2017) Vineyard pruning waste as an alternative carbon source to produce novel biosurfactants by *Lactobacillus paracasei*. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 55, 40-49.
- Vecino, X., Rodríguez-López, L., Ferreira, D., Cruz, J.M., Moldes, A.B., & Rodrigues, L.R. (2018) Bioactivity of glycolipopeptide cell-bound biosurfactants against skinpathogens. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 971-979.
- Vera, E.C.S., Azevedo, P.O.S., Domínguez, J.M., & Oliveira, R.P.S. (2018) Optimization of biosurfactant and bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) production by *Lactococcus lactis* CECT-4434 from agroindustrial waste. *Biochemical Engineering Journal*, 133, 168-178.
- Yan, X., Gu, S., Cui, X., Shi, Y., Wen, S., Chen, H., & Ge, J. (2019) Antimicrobial, anti-adhesive and anti-biofilm potential of biosurfactants isolated from *Pediococcus acidilactici* and *Lactobacillus plantarum* against *Staphylococcus aureus* CMCC26003. *Microbial Pathogenesis*, 127, 12-20.
- Ye, G., Chen, Y., Wang, C., Yang, R., & Bin, X. (2018) Purification and characterization of exopolysaccharide produced by *Weissella cibaria* YB-1 from pickle Chinese cabbage. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120, 1315-1321.
- Yuliani, H., Perdani, M.S., Savitri, I., Manurung, M., Sahlan, M., Wijanarko, A., & Hermansyah, H. (2018) Antimicrobial activity of biosurfactant derived from *Bacillus subtilis* C19. *Energy Procedia*, 153, 274-278.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีคำนวณปริมาณน้ำเสียที่ใช้

อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS

อาหารสำเร็จรูป MRS 55.00 กรัม

ละลายอาหารสำเร็จรูป 55.00 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้มีค่าเป็น 7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อเบซัล

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

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

อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB)

ทริปโตน (Tryptone)	10	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่าง จนมีค่าเท่ากับ 7.0 และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง เตรียมโดยละลายผงวุ้น 18 กรัม ในอาหารเหลว 1,000 มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (PBS)

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8.00	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.20	กรัม
ไดโซเดียมฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	1.44	กรัม
โมโนโพแทสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.24	กรัม

ละลายส่วนประกอบข้างต้นในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่าง จนมีค่าเท่ากับ 8.0 และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

คำนวณปริมาณน้ำเสีย

- น้ำเสียจากโรงงานแปรรูปผลไม้มีค่าซีโอดีเริ่มต้นเท่ากับ 638,200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
- อาหารเลี้ยงเชื้อเบซัลสูตรปกติที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนมีค่าซีโอดีเท่ากับ 3,310 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

- ใช้สูตรคำนวณความเข้มข้น $C_1V_1=C_2V_2$

เมื่อ C_1 แทน ค่าซีโอดีของน้ำเสียเริ่มต้น

C_2 แทน ค่าซีโอดีของน้ำเสียสุดท้าย

V_1 แทน ปริมาตรของน้ำเสียเริ่มต้น

V_2 แทน ปริมาตรของน้ำเสียสุดท้าย

เมื่อต้องการเจือจางให้ได้ค่าซีโอดีเป็น 1 เท่าและ 5 เท่า ของอาหารเลี้ยงเชื้อเบซัลสูตรปกติ

ค่าซีโอดี 1 เท่า เท่ากับ 3,310 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

$$\begin{aligned} \text{จาก} \quad C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (638,200) * V_1 &= (3,310) *(1,000) \\ V_1 &= 5.19 \text{ มิลลิลิตร} \end{aligned}$$

ดังนั้น นำน้ำเสียจากโรงงานแปรรูปผลไม้มา 5.19 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำน้ำเสียที่เจือจางแล้วไปละลายสารตามสูตรอาหารเบซัลแต่ไม่เติมกลูโคส ปรับความเป็นกรด-ด่าง จนมีค่าเท่ากับ 7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ค่าซีโอดี 5 เท่า เท่ากับ 16,550 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

$$\begin{aligned} \text{จาก} \quad C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (638,200) * V_1 &= (16,550) *(1,000) \\ V_1 &= 25.93 \text{ มิลลิลิตร} \end{aligned}$$

ดังนั้น นำน้ำเสียจากโรงงานแปรรูปผลไม้มา 25.93 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำน้ำเสียที่เจือจางแล้วไปละลายสารตามสูตรอาหารเบซัลแต่ไม่เติมกลูโคส ปรับความเป็นกรด-ด่าง จนมีค่าเท่ากับ 7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมี

สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม : เมทานอล (2:1) โดยปริมาตรต่อปริมาตร

คลอโรฟอร์ม	100	มิลลิลิตร
เมทานอล	50	มิลลิลิตร

สารทดสอบ Phospho-vanilline

สารละลาย vanilline

Vanilline	0.6	กรัม
-----------	-----	------

ละลายสารในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

สารละลาย vanilline	35	มิลลิลิตร
กรดฟอสฟอริก 85 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร	60	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	5	มิลลิลิตร

ผสมสารให้เข้ากัน เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องในขวดสีชา

สารละลาย Coomassie Brilliant Blue

Coomassie Brilliant Blue G	5	มิลลิกรัม
เมทานอล	5	มิลลิลิตร
กรดฟอสฟอริก 85 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร	10	มิลลิลิตร

ผสมสารให้เข้ากัน จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตรให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
เก็บรักษาในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ค

ข้อมูลดิบต่างๆ สำหรับการเปรียบเทียบสภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ผลิตสารลดแรงตึงผิว
ชีวภาพแบบเซลล์ตรึง

ตารางที่ ค.1 ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดปล่อยออกมาจากเซลล์ในสภาวะต่างๆ และแต่ละรอบการผลิต

รอบการผลิต	สภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อ	ชุดการทดลอง	น้ำหนักฟรอยก่อน (กรัม)	น้ำหนักฟรอยหลัง (กรัม)	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)	ค่าเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)
1	กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน	1	0.3477	0.3857	0.76	0.5305±0.1885
		2	0.3398	0.3565	0.334	
		3	0.3447	0.3747	0.6	
		4	0.3439	0.3653	0.428	
	น้ำเสียที่มีค่าซีโอดี 1 เท่า	1	0.3427	0.3574	0.294	0.4630±0.2404
		2	0.3442	0.3699	0.514	
		3	0.3451	0.3582	0.262	
		4	0.3432	0.3823	0.782	
	น้ำเสียที่มีค่าซีโอดี 5 เท่า	1	0.3412	0.3765	0.706	0.3935±0.2146
		2	0.3447	0.3566	0.238	
		3	0.3412	0.3592	0.36	
		4	0.3434	0.3569	0.27	
2	กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน	1	0.3417	0.3559	0.284	0.2915±0.0362
		2	0.3432	0.3588	0.312	
		3	0.3429	0.3592	0.326	
		4	0.3445	0.3567	0.244	
	น้ำเสียที่มีค่าซีโอดี 1 เท่า	1	0.3435	0.3554	0.238	0.2535±0.0553
		2	0.3432	0.3533	0.202	
		3	0.3397	0.3563	0.332	
		4	0.3408	0.3529	0.242	
		1	0.3462	0.3587	0.25	0.2375±0.0662

3	น้ำเสียที่มีค่า ซีโอดี 5 เท่า	2	0.3409	0.35	0.182	0.2115±0.1128
		3	0.3405	0.3501	0.192	
		4	0.3433	0.3596	0.326	
	กลูโคสเป็น แหล่งคาร์บอน	1	0.3377	0.3565	0.376	
		2	0.3434	0.3525	0.182	
		3	0.3372	0.3456	0.168	
		4	0.3406	0.3466	0.12	
	น้ำเสียที่มีค่า ซีโอดี 1 เท่า	1	0.3381	0.347	0.178	
		2	0.3437	0.3553	0.232	
		3	0.3391	0.3496	0.21	
		4	0.3423	0.3581	0.316	
	น้ำเสียที่มีค่า ซีโอดี 5 เท่า	1	0.3423	0.3538	0.23	
		2	0.3403	0.3454	0.102	
		3	0.3415	0.3546	0.262	
		4	0.3404	0.345	0.092	

ตารางที่ ค.2 ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์จากเซลล์อิสระในสภาวะต่างๆ และแต่ละรอบการผลิต

รอบการผลิต	สภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อ	ชุดการทดลอง	น้ำหนักพรอยก่อน (กรัม)	น้ำหนักพรอยหลัง (กรัม)	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)	ค่าเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)
1	กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน	1	0.513	0.6296	1.166	1.1005 ±0.1692
		2	0.5159	0.6247	1.088	
		3	0.52	0.6074	0.874	
		4	0.5247	0.6521	1.274	
	น้ำเสียที่มีค่าซีโอดี 1 เท่า	1	0.5192	0.6529	1.337	1.3250±0.1087
		2	0.5153	0.6337	1.184	
		3	0.5147	0.6596	1.449	
		4	0.5151	0.6481	1.33	

	น้ำเสียที่มีค่าซี โอดี 5 เท่า	1	0.5043	0.6126	1.083	1.3175±0.1742
		2	0.516	0.6559	1.399	
		3	0.5131	0.6619	1.488	
		4	0.5148	0.6448	1.3	
	กลูโคสเป็น แหล่งคาร์บอน	1	0.5138	0.5562	0.424	0.4230±0.1483
		2	0.5072	0.537	0.298	
		3	0.5219	0.5558	0.339	
		4	0.5131	0.5762	0.631	
2	น้ำเสียที่มีค่าซี โอดี 1 เท่า	1	0.5038	0.5513	0.475	0.6170±0.2768
		2	0.5145	0.5634	0.489	
		3	0.5167	0.6199	1.032	
		4	0.5134	0.5606	0.472	
	น้ำเสียที่มีค่าซี โอดี 5 เท่า	1	0.5162	0.5604	0.442	0.4523±0.0835
		2	0.5133	0.5515	0.382	
		3	0.4913	0.5326	0.413	
		4	0.4998	0.557	0.572	
	กลูโคสเป็น แหล่งคาร์บอน	1	0.5206	0.5769	0.563	0.5145±0.0446
		2	0.5084	0.5551	0.467	
		3	0.5153	0.5693	0.54	
		4	0.5134	0.5622	0.488	
3	น้ำเสียที่มีค่าซี โอดี 1 เท่า	1	0.5046	0.5684	0.638	0.4860±0.1102
		2	0.5233	0.5654	0.421	
		3	0.507	0.5461	0.391	
		4	0.5286	0.578	0.494	
	น้ำเสียที่มีค่าซี โอดี 5 เท่า	1	0.5125	0.5587	0.462	0.3833±0.0888
		2	0.5141	0.5599	0.458	
		3	0.5118	0.5418	0.3	
		4	0.5295	0.5608	0.313	

ตารางที่ ค.3 ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์จากเซลล์ที่อยู่ในวัสดุตั้งในสภาวะต่างๆของการผลิตรอบที่ 3

สภาวะอาหาร เลี้ยงเชื้อ	ชุดการ ทดลอง	น้ำหนักฟรอย ก่อน (กรัม)	น้ำหนักฟรอยหลัง (กรัม)	สารลดแรงตึงผิว ชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)	ค่าเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)
กลูโคสเป็นแหล่ง คาร์บอน	1	0.5226	0.6349	1.123	1.0240±0.0858
	2	0.5151	0.6131	0.98	
	3	0.5317	0.638	1.063	
	4	0.5197	0.6127	0.93	
น้ำเสียที่มีค่าซีโอ ดี 1 เท่า	1	0.5132	0.5838	0.706	0.8798±0.1213
	2	0.5326	0.629	0.964	
	3	0.5255	0.6142	0.887	
	4	0.5262	0.6224	0.962	
น้ำเสียที่มีค่าซีโอ ดี 5 เท่า	1	0.519	0.594	0.75	0.8795±0.1362
	2	0.5248	0.6032	0.784	
	3	0.5211	0.625	1.039	
	4	0.514	0.6085	0.945	

ตารางที่ ค.4 จำนวนจุลินทรีย์ที่อยู่ในวัสดุตั้งในแต่ละชั้นการทดลอง

ชั้นการทดลอง	สภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อ	ค่า MPN	Dilution factor	น้ำหนักวัสดุตั้ง (กรัม)			น้ำหนักวัสดุตั้งเฉลี่ย (กรัม)	จำนวนจุลินทรีย์ (MPN/กรัม)
				1	2	3		
ตริงเซลล์	กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน	2.4	10^6	0.0352	0.0361	0.0420	0.0378 ± 0.0037	$3.18E+08$
	น้ำเสียที่มีค่าซีโอดี 1 เท่า	0.43	10^7	0.0354	0.0392	0.0375	0.0374 ± 0.0019	$5.75E+08$
	น้ำเสียที่มีค่าซีโอดี 5 เท่า	2.4	10^6	0.0351	0.0425	0.0367	0.0381 ± 0.0039	$3.15E+08$
ผลิตรอบที่ 1	กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน	0.43	10^7	0.0495	0.0432	0.0599	0.0509 ± 0.0084	$4.23E+08$
	น้ำเสียที่มีค่าซีโอดี 1 เท่า	0.15	10^8	0.0360	0.0698	0.0465	0.0508 ± 0.0173	$1.48E+09$
	น้ำเสียที่มีค่าซีโอดี 5 เท่า	0.43	10^7	0.0466	0.0443	0.0492	0.0467 ± 0.0025	$4.6E+08$

	กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน	2.4	10^6	0.0452	0.0426	0.0430	0.0436 ± 0.0014	$2.75E+08$
ผลิตรอบที่ 2	น้ำเสียที่มีค่าซีโอดี 1 เท่า	0.93	10^6	0.0440	0.0458	0.0455	0.0451 ± 0.0010	$1.03E+08$
	น้ำเสียที่มีค่าซีโอดี 5 เท่า	0.93	10^6	0.0421	0.0432	0.0478	0.0444 ± 0.0030	$1.05E+08$
	กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน	0.93	10^6	0.0497	0.0329	0.0471	0.0432 ± 0.0090	$1.08E+08$
ผลิตรอบที่ 3	น้ำเสียที่มีค่าซีโอดี 1 เท่า	2.4	10^6	0.0676	0.0453	0.0389	0.0506 ± 0.0151	$2.37E+08$
	น้ำเสียที่มีค่าซีโอดี 5 เท่า	0.29	10^7	0.0473	0.0469	0.0653	0.0532 ± 0.0105	$2.73E+08$

ตารางที่ ค.5 จำนวนจุลินทรีย์ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อในแต่ละชั้นการทดลอง

ชั้นการทดลอง	สภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อ	ค่า MPN	Dilution factor	จำนวนจุลินทรีย์ (MPN/มิลลิลิตร)
ตริงเซลล์	กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน	0.43	10^8	4.3E+07
	น้ำเสียที่มีค่าซีโอดี 1 เท่า	0.43	10^8	4.3E+07
	น้ำเสียที่มีค่าซีโอดี 5 เท่า	0.93	10^8	9.3E+07
ผลิตรอบที่ 1	กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน	2.4	10^8	2.4E+08
	น้ำเสียที่มีค่าซีโอดี 1 เท่า	0.43	10^9	4.3 E+08
	น้ำเสียที่มีค่าซีโอดี 5 เท่า	0.43	10^9	4.3E+08
ผลิตรอบที่ 2	กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน	2.4	10^6	2.4E+06
	น้ำเสียที่มีค่าซีโอดี 1 เท่า	2.4	10^7	2.4E+07
	น้ำเสียที่มีค่าซีโอดี 5 เท่า	0.93	10^7	9.3E+06
ผลิตรอบที่ 3	กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน	0.43	10^7	4.3E+06
	น้ำเสียที่มีค่าซีโอดี 1 เท่า	0.15	10^8	1.5E+07
	น้ำเสียที่มีค่าซีโอดี 5 เท่า	2.4	10^7	2.4E+07

ภาคผนวก ง

ข้อมูลดิบต่างๆ สำหรับการศึกษาลักษณะสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Weissella cibaria* PN3

ตารางที่ ง.1 ค่าแรงตึงผิวที่ความเข้มข้นต่างๆเพื่อหาค่า CMC

ความเข้มข้นของสารสกัด หยาบสารลดแรงตึงผิว ชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)	ค่าแรงตึงผิว (มิลลินิวตันต่อเมตร)		
	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ชนิดปล่อยออกมานอก เซลล์	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์จาก เซลล์อิสระ	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์จาก เซลล์ที่อยู่ในวัสดุตั้ง
0	71.6	71.6	71.6
0.01	70.873	59.815	71.84
0.05	57.462	57.462	71.6
0.1	53.053	N/A	63.904
0.25	46.351	55.403	59.417
0.5	45.64	48.304	53.755
0.75	43.447	42.088	49.939
1	43.772	41.337	47.655
2.5	38.717	34.898	41.02
3.5	N/A	33.688	41.887
5	38.153	30.179	38.035
6	37.395	31.089	N/A
7	36.731	31.511	38.793
7.5	35.914	N/A	35.354
8	35.673	30.211	38.024
9	33.568	N/A	N/A

หมายเหตุ N/A หมายถึงไม่ได้ทำการวัดค่า ณ ความเข้มข้นนั้นๆ

ตารางที่ ง.2 น้ำหนักสารลดแรงตึงผิวเริ่มต้นสำหรับการวิเคราะห์หึ่งค์ประกอบทางเคมี

ชุดการทดลอง	ตัวอย่างสารลดแรงตึงผิว ชีวภาพ	น้ำหนักสารลดแรงตึงผิว ชีวภาพ (กรัม)	ความเข้มข้นสารลดแรง ตึงผิวชีวภาพ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
อาหารเลี้ยงเชื้อเบซัลที่ ใช้น้ำเสียมีค่าซีโอดีเป็น 1 เท่า	ชนิดปล่อยออกมานอก เซลล์	0.0942	0.021
	ชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์จาก เซลล์อิสระ	0.1323	0.033
	ชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์จาก เซลล์ที่อยู่ในวัสดุตั้ง	0.1424	0.020
อาหารเลี้ยงเชื้อเบซัลที่ มีกลูโคส	ชนิดปล่อยออกมานอก เซลล์	0.1853	0.021
	ชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์จาก เซลล์อิสระ	0.0927	0.020
	ชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์จาก เซลล์ที่อยู่ในวัสดุตั้ง	0.1026	0.021

ตารางที่ ง.3 ปริมาณองค์ประกอบไขมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ *W. cibaria* PN3

ชุดการทดลอง	ตัวอย่างสารลดแรงตึงผิว ชีวภาพ	OD530	Dilution factor	ความเข้มข้นของไขมัน (ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร)
อาหารเลี้ยงเชื้อเบซัล ที่ใช้น้ำเสีย มีค่าซีโอดีเป็น 1 เท่า	ชนิดปล่อยออกมานอก เซลล์	0.0270	1	14.21
	ชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์จาก เซลล์อิสระ	0.0967	2	101.75
	ชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์จาก เซลล์ที่อยู่ในวัสดุตั้ง	N/A	-	-
อาหารเลี้ยงเชื้อ เบซัลที่มีกลูโคส	ชนิดปล่อยออกมานอก เซลล์	0.0947	3	149.47

ชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์จาก เซลล์อิสระ	0.0977	2	102.81
ชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์จาก เซลล์ที่อยู่ในวัสดุตั้ง	0.0220	1	11.58

หมายเหตุ N/A หมายถึงไม่สามารถวัดค่าได้

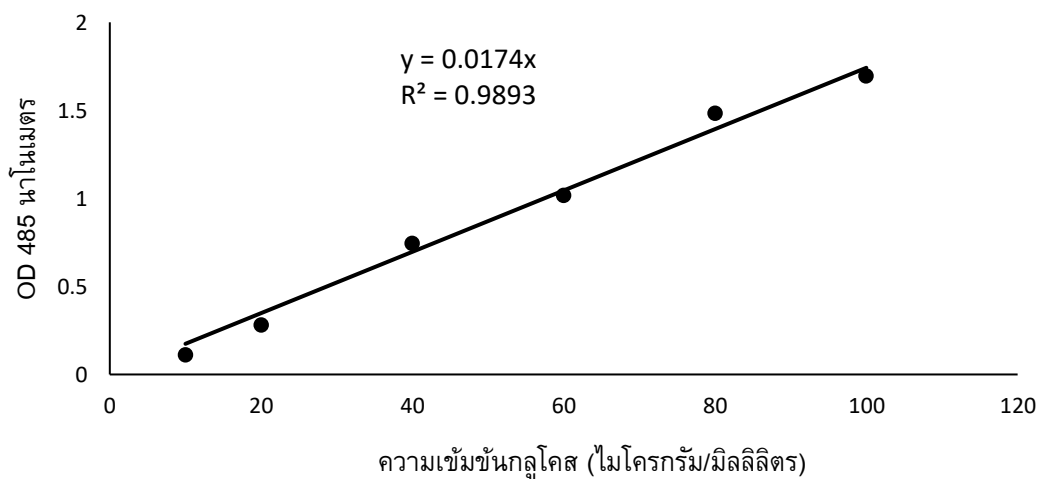
ตารางที่ ง.4 ปริมาณองค์ประกอบน้ำตาลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ *W. cibaria* PN3

ชุดการทดลอง	ตัวอย่างสารลดแรงตึงผิว ชีวภาพ	OD485	Dilution factor	ความเข้มข้นของน้ำตาล (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
อาหารเลี้ยงเชื้อเบซัล ที่ใช้น้ำเสียมี ค่าซีไอดีเป็น 1 เท่า	ชนิดปล่อยออกมาจาก เซลล์	0.538	1	30.92
	ชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์จาก เซลล์อิสระ	0.416	1	23.93
	ชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์จาก เซลล์ที่อยู่ในวัสดุตั้ง	0.152	5	43.77
อาหารเลี้ยงเชื้อ เบซัลที่มีกลูโคส	ชนิดปล่อยออกมาจาก เซลล์	0.463	1	26.63
	ชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์จาก เซลล์อิสระ	0.397	1	22.82
	ชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์จาก เซลล์ที่อยู่ในวัสดุตั้ง	0.536	1	30.80

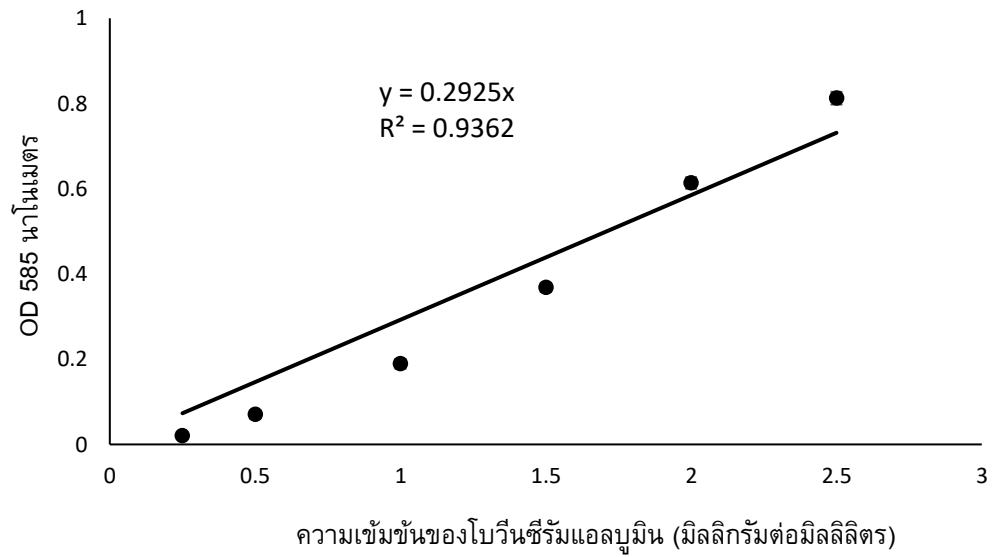
ตารางที่ ง.5 ปริมาณองค์ประกอบโปรตีนของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ *W. cibaria* PN3

ชุดการทดลอง	ตัวอย่างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	OD585	ความเข้มข้นของโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
อาหารเลี้ยงเชื้อเบซัลที่ ใช้น้ำเสียมี ค่าซีไอดีเป็น 1 เท่า	ชนิดปล่อยออกมานอกเซลล์	N/A	-
	ชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์จากเซลล์อิสระ	0.0120	0.04
	ชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์จากเซลล์ที่อยู่ใน วัสดุตั้ง	N/A	-
อาหารเลี้ยงเชื้อ เบซัลที่มีกลูโคส	ชนิดปล่อยออกมานอกเซลล์	0.003	1.58
	ชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์จากเซลล์อิสระ	0.0685	36.05
	ชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์จากเซลล์ที่อยู่ใน วัสดุตั้ง	0.027	14.21

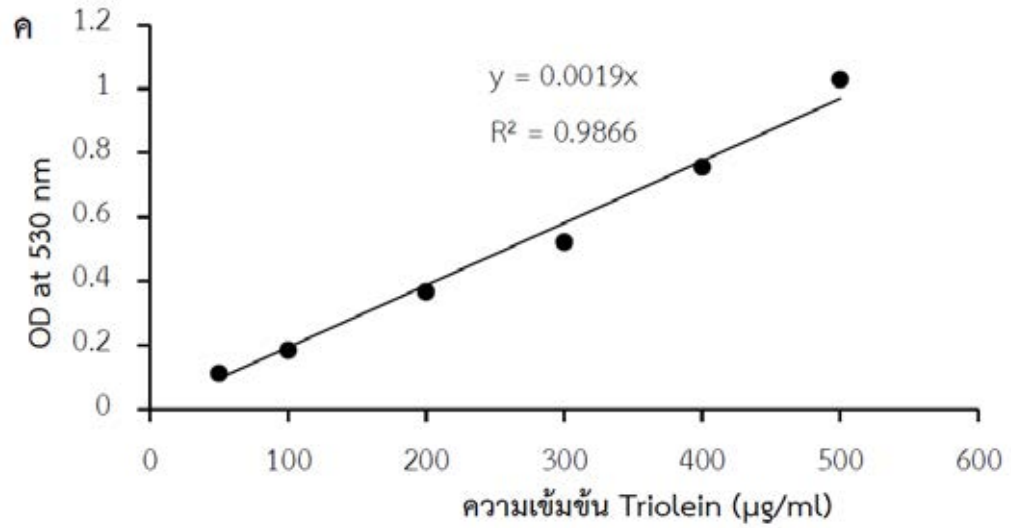
หมายเหตุ N/A หมายถึงไม่สามารถวัดค่าได้



รูปที่ ง.1 กราฟมาตรฐานคาร์โบไฮเดรตจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 485 นาโนเมตร



รูปที่ ง.2 กราฟมาตรฐานโปรตีนจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 585 นาโนเมตร



รูปที่ ง.3 กราฟมาตรฐานไขมันจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร (ณัฐวุฒิ ชุนอาวุธ, 2016)

ตารางที่ ง.6 เปอร์เซ็นต์การก่ออิมัลชันระหว่างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ความเข้มข้น 1 CMC และน้ำมันชนิดต่างๆ

ชุดการทดลอง	ตัวอย่างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	น้ำมันถั่วเหลือง	น้ำมันปาล์ม	น้ำมันมะพร้าว	น้ำมันมะกอก	น้ำมันหอมระเหยกลิ่นส้ม	น้ำมันหอมระเหยกลิ่นยูคาลิปตัส
อาหารเลี้ยงเชื้อเบซัลที่ใช้น้ำเสียมีค่าซีโอดีเป็น 1 เท่า	ชนิดปล่อยออกมา นอกเซลล์	0	0	0	0	3.41	0
	ชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์ จากเซลล์อิสระ	0	0	7.89	14.75	3.44	0
	ชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์ จากเซลล์ที่อยู่ใน วัสดุตรึง	0	0	0	0	3.45	0
อาหารเลี้ยงเชื้อเบซัลที่มีกลูโคส	ชนิดปล่อยออกมา นอกเซลล์	0	0	0	3.39	4.60	24.14
	ชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์ จากเซลล์อิสระ	0	0	10.71	0	37.93	51.72
	ชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์ จากเซลล์ที่อยู่ใน วัสดุตรึง	0	0	0	0	45.98	41.38

ตารางที่ ง.7 เปรอ์เซ็นต์การก่ออิมัลชันระหว่างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ความเข้มข้น 2 CMC และน้ำมันชนิดต่างๆ

ชุดการทดลอง	ตัวอย่างสารลดแรง ตึงผิวชีวภาพ	น้ำมันถั่วเหลือง	น้ำมันปาล์ม	น้ำมันมะพร้าว	น้ำมันมะกอก	น้ำมันหอม ระเหยกลิ่นส้ม	น้ำมันหอมระเหย กลิ่นยูคาลิปตัส
อาหารเลี้ยงเชื้อเบซัล ที่ใช้น้ำเสียมีค่าซีโอดี เป็น 1 เท่า	ชนิดปล่อยออกมา นอกเซลล์	0	0	3.45	0	3.45	0
	ชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์ จากเซลล์อิสระ	54.72	53.95	76.67	64.37	0	0
	ชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์ จากเซลล์ที่อยู่ใน วัสดุตรึง	0	0	48.28	49.43	3.33	0
	ชนิดปล่อยออกมา นอกเซลล์	0	0	0	49.38	0	39.08
อาหารเลี้ยงเชื้อเบซัล ที่มีกลูโคส	ชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์ จากเซลล์อิสระ	53.49	57.97	88.38	56.33	0	55.17
	ชนิดติดอยู่ที่ผิวเซลล์ จากเซลล์ที่อยู่ใน วัสดุตรึง	0	47.04	0	50	51.15	49.43

ตารางที่ ๖.8 เปอร์เซนต์การก่ออิมัลชันระหว่างสารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ทางเคมีและน้ำมันชนิดต่างๆ

ตัวอย่างสารลดแรงตึงผิว	ความเข้มข้น	น้ำมันถั่วเหลือง	น้ำมันปาล์ม	น้ำมันมะพร้าว	น้ำมันมะกอก	น้ำมันหอมระเหยกลิ่นส้ม	น้ำมันหอมระเหยกลิ่นยูคาลิปตัส
TritonX-100	1 CMC	50	92.77	4.81	67.83	3.41	0
	10 CMC	58.89	56.17	30.54	45.56	3.33	6.78
SDHS	1 CMC	0	8.13	0	0	5.79	37.93
	10 CMC	0	0	0	0	47.78	0