

การผลิตและลักษณะสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก
Aureobasidium pullulans สายพันธุ์ YTP6-14



นางสาวณัฐวรา อมาตยกุล

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2559

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF BIOSURFACTANT FROM
Aureobasidium pullulans STRAIN YTP6-14

Miss Natwara Amatyakul



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Microbiology and Microbial Technology
Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2016
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตและลักษณะสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จาก <i>Aureobasidium pullulans</i> สายพันธุ์ YTP6-14
โดย	นางสาวณัฐวรา อมาตยกุล
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวงษ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. รุ่งอรุณ วาติลี สิริศรัทธา)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

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

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร. นิรันดร์ รุ่งสว่าง)

ณัฐวรา อมาตยกุล : การผลิตและลักษณะสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Aureobasidium pullulans* สายพันธุ์ YTP6-14 (PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF BIOSURFACTANT FROM *Aureobasidium pullulans* STRAIN YTP6-14) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. จิราภรณ์ ธนียวัน, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ดร. สุเทพ ธนียวัน, 136 หน้า.

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Aureobasidium pullulans* สายพันธุ์ YTP6-14 พบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสร้อยละ 5 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ละลายอยู่ในน้ำหมัก (biosurfactant, BS) และผลิตน้ำมันที่หนักกว่าน้ำ (heavy oil, HO) ปลดปล่อยออกนอกเซลล์ในปริมาณมาก เมื่อวิเคราะห์ BS และ HO ด้วย HPLC โดยนำพีคที่มีประสิทธิภาพการกระจายน้ำมันสูงจากเวลา 11.154 และ 11.161 นาที ตามลำดับ ไปหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี GC/MS พบว่าทั้งคู่มิใช่แอสซอซีแลคโตน (168 ดาลตัน) และจากการหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี MALDI-TOF/MS พบว่า สารสกัดหยาบ HO มีพีค $[M+Na]^+$ ตรงกับ เลียโมซิน เอ1 เลียโมซิน บี1 เลียโมซิน บี2 เลียโมซิน อรา-เอ1 เลียโมซิน อรา-บี1 เอ็กโซฟิลิน เอ1 เอ็กโซฟิลิน เอ1-H₂O เอ็กโซฟิลิน เอ1+4Ac และ เอ็กโซฟิลิน บี2 จากการทำให้เซลล์แตกด้วยอุลตราโซนิคเคเตอร์พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ BS ที่อยู่ภายในเซลล์ถูกปลดปล่อยออกมา และจากการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 เพื่อศึกษาการผลิต BS และ HO พบว่า กลีเซอรอลสามารถผลิต BS ได้สูงสุด คือ 1.81 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 5 และแป้งมันสำปะหลังย่อยสามารถผลิต HO ได้สูงสุดเท่ากับ 7.37 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 โดย BS และ HO ที่ได้จากแป้งมันสำปะหลังย่อยมีค่า CMC เท่ากับ 42.28 และ 13.80 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ทนเกลือได้สูง ทนต่อความเป็นกรดต่าง ทนอุณหภูมิ ทนต่อภาวะภายใต้หม้อนึ่งฆ่าเชื้อได้ และสามารถก่อกอิมัลชันที่มีได้ตักกับน้ำมันมะกอกโดยอิมัลชันมีความคงตัวมากกว่าร้อยละ 90 เมื่อตั้งทิ้งไว้ 60 วัน นอกจากนี้ BS และ HO สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *Streptococcus sobrinus* 6715 ได้สูงสุดร้อยละ 24.73 และ 53.16 ในขณะที่ BS และ HO สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *Streptococcus mutans* ได้ร้อยละ 88.86 และ 91.10 ตามลำดับ BS และ HO จึงเป็นสารประกอบชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูง เหมาะแก่การนำไปประยุกต์ในอุตสาหกรรมต่างๆ

ภาควิชา	จุลชีววิทยา	ลายมือชื่อนิสิต
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก
ปีการศึกษา	2559	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5771982023 : MAJOR MICROBIOLOGY AND MICROBIAL TECHNOLOGY

KEYWORDS: BIOSURFACTANT/MASSOIA LACTONE/LIAMOCIN

NATWARA AMATYAKUL: PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF BIOSURFACTANT FROM *Aureobasidium pullulans* STRAIN YTP6-14. ADVISOR: ASSOC. PROF. JIRAPORN THANİYAVARN, CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. SUTHEP THANİYAVARN, Ph.D., 136 pp.

In the present study, the production of surface active compounds from *Aureobasidium pullulans* strain YTP6-14 was investigated. In the medium containing 5% of glucose, biosurfactant (BS) was released and dissolved in culture broth whereas those in form of heavy oil (HO) were found as droplets. The obtained BS and HO were analyzed by HPLC. The fractions with high activity at retention time of 11.154 and 11.161 minutes were found to processes Massioa lactone (168 Da) as analyzed by GC/MS. Crude HO was also characterized by pseudomolecular $[M+Na]^+$ ions in MALDI-TOF/MS, the spectra of (m/z) were corresponded to Liamocin A1, Liamocin B1, Liamocin B2, Liamocin Ara-A1, Liamocin Ara-B1, Exophilin A1, Exophilin A1-H₂O Exophilin A1 + 4Ac and Exophilin B2. Cells disruption by ultrasonicator revealed the release of BS. As carbon sources for BS and HO production, 5% of glycerol produced the highest BS of 1.81 g/L at day 5 while 5% of cassava flour hydrolysate produced the highest HO of 7.37 g/L at day 7. CMC of BS and HO were 42.28 mg/L and 13.80 mg/L respectively. Both, BS and HO resisted to wide range of NaCl concentrations, pH, temperatures and autoclave condition. Moreover, they displayed good emulsifying activity with olive oil and able to retain these emulsifying form more than 90% when left on for 60 days. In addition, BS and HO inhibited biofilm formation of *Streptococcus sobrinus* 6715 by 24.73% and 53.16% respectively. While the inhibited formations of *Streptococcus mutans* were 88.86% and 91.10% respectively. Based on the above properties, HO and BS from *A. pullulans* strain YTP6-14 are high efficiency bioactive compounds and valuable for industrial applications.

Department: Microbiology Student's Signature

Field of Study: Microbiology and Microbial Advisor's Signature

Technology Co-Advisor's Signature

Academic Year: 2016

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม และศาสตราจารย์ ดร. โมริกาว่า มาซาอากิ มหาวิทยาลัยฮอกไกโด ประเทศญี่ปุ่น ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ ความช่วยเหลือ และข้อคิดต่างๆ ในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. รุ่งอรุณ วาติลี-สิริศรัทธา ที่กรุณารับเป็นประธาน ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา จันทร์ประทีป นภاطر และ ดร. นิรันดร์ รุ่งสว่าง ที่กรุณารับเป็นคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ รวมทั้งให้ คำปรึกษา คำแนะนำ และกำลังใจ ตลอดจนปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่ให้ความรู้ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาอำนวยความสะดวก ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ และเป็นกำลังใจในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการศึกษาในระดับบัณฑิตศึกษาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา เพื่อสนับสนุนทุนการศึกษาในระดับปริญญาโท

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ที่ห้อง 1804/12 และ 1804/14 ทุกคนบนภาควิชาจุลชีววิทยาแห่งนี้ ที่คอยช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ และให้กำลังใจตลอดการทำงานวิจัย

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณครอบครัว คุณพ่อ คุณแม่ ญาติ พี่น้อง ที่สนับสนุนช่วยเหลือในทุกๆด้าน และให้กำลังใจในการทำงานวิจัยตลอดมาจนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและความเป็นมา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
1.3 ขั้นตอนการดำเนินงาน.....	3
บทที่ 2 ปรีทรรศน์วรรณกรรม.....	4
2.1 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	4
2.2 คุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	5
2.3 ประเภทของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	10
2.4 ข้อดีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	20
2.5 ประโยชน์และการประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	22
2.6 สารประกอบชีวภาพที่ผลิตได้จาก <i>A. pullulans</i>	27
2.7 ไบโอฟิล์ม.....	37
บทที่ 3 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย.....	43
3.1 อุปกรณ์.....	43
3.2 เคมีภัณฑ์.....	45
3.3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	46

3.3.1 จุลินทรีย์และการเก็บรักษาจุลินทรีย์.....	46
3.3.2 การผลิตและสกัดแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	47
3.3.3 การศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	48
3.3.4 การศึกษาการปลดปล่อยสารประกอบชีวภาพโดยการทำให้เซลล์แตก.....	50
3.3.5 การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากชิ้นส่วนใส (BS) และน้ำมัน (HO).....	51
3.3.6 การศึกษาลักษณะสมบัติสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากชิ้นส่วนใส (BS) และน้ำมัน (HO).....	52
3.3.7 ศึกษาผลของสารประกอบชีวภาพต่อการสร้างไบโอฟิล์ม.....	53
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	56
4.1 การผลิตและองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากชิ้นส่วนใส (BS) และน้ำมัน (HO) จาก <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ YTP6-14.....	56
4.2 การปลดปล่อยสารประกอบชีวภาพด้วยการทำให้เซลล์แตก	62
4.3 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากชิ้นส่วนใส (BS) และน้ำมัน (HO) ของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ YTP6-14.....	66
4.4 คุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากชิ้นส่วนใส (BS) และน้ำมัน (HO) ที่ผลิตได้จาก แป้งมันสำปะหลังย่อย.....	70
4.5 ผลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากชิ้นส่วนใส (BS) และน้ำมัน (HO) ต่อการสร้างไบโอฟิล์ม	77
บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง	85
รายการอ้างอิง.....	93
ภาคผนวก.....	109
ภาคผนวก ก สูตรอาหารและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	110
ภาคผนวก ข สารเคมี	112

ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐาน	114
ภาคผนวก ง โครมาโทแกรมจากการวิเคราะห์พีค BS-2 และ HO-4 ด้วยวิธี GC/MS.....	116
ภาคผนวก จ โครมาโทแกรมของ BS-4 และ HO-2 จากการวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOFF	121
ภาคผนวก ฉ โครมาโทแกรมของสารสกัดหยาบ HO จากการวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOFF	123
ภาคผนวก ช พื้นที่ใต้กราฟของสารประกอบชีวภาพที่ผลิตจากแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกันจาก HPLC	124
ภาคผนวก ซ ผลของสารประกอบชีวภาพต่อการสร้างไบโอฟิล์ม.....	134
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	136



สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1	ค่าแรงดึงผิวที่ต่ำสุด และค่าแรงดึงผิวประจันระหว่างน้ำและเฮกเซน.....	6
ตารางที่ 2.2	ช่วงค่า HLB ของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพและการนำไปประยุกต์ใช้.....	10
ตารางที่ 2.3	การจัดจำแนกสารลดแรงดึงผิวชีวภาพตามมวลโมเลกุล.....	11
ตารางที่ 2.4	การประยุกต์ใช้สารลดแรงดึงผิวชีวภาพในอุตสาหกรรมต่างๆ.....	23
ตารางที่ 2.5	การประยุกต์ใช้สารประกอบชีวภาพที่ผลิตโดย <i>A. pullulans</i>	30
ตารางที่ 2.6	องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตน้ำมันจาก <i>A. pullulans</i>	33
ตารางที่ 2.7	การประยุกต์ใช้น้ำมันที่ผลิตได้จาก <i>A. pullulans</i>	34
ตารางที่ 2.8	หน้าที่ของพอลิแซ็กคาไรด์ต่อการสร้างไบโอฟิล์ม.....	39
ตารางที่ 2.9	การใช้สารลดแรงดึงผิวชีวภาพเพื่อยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม.....	42
ตารางที่ 4.1	ผลต่างค่าแรงดึงผิวเมื่อเทียบกับน้ำบริสุทธิ์ (Δ ST) และการกระจายน้ำมัน (ODA) ของ BS และ HO	57
ตารางที่ 4.2	ประสิทธิภาพการกระจายน้ำมันของตัวอย่างพีคที่เก็บจาก HPLC.....	59
ตารางที่ 4.3	น้ำหนักโมเลกุลของส่วนประกอบของ BS-4 และ HO-2.....	60
ตารางที่ 4.4	น้ำหนักโมเลกุลของส่วนประกอบของสารสกัดหยาบน้ำมัน (HO)	62
ตารางที่ 4.5	ผลต่างค่าแรงดึงผิวเมื่อเทียบกับน้ำบริสุทธิ์ (Δ ST) และการกระจายน้ำมัน (ODA) ของ IA IIA IB IIB IC และ IIC จากวันที่ 5	64
ตารางที่ 4.6	ปริมาณ BS และ HO ที่ผลิตได้ และน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอน.....	66
ตารางที่ 4.7	ผลต่างค่าแรงดึงผิวเมื่อเทียบกับน้ำบริสุทธิ์ (Δ ST) และการกระจายน้ำมัน (ODA) ของ BS และ HO ของแต่ละแหล่งคาร์บอนที่ใช้.....	69
ตารางที่ 5.1	ค่า CMC ของ BS และ HO เทียบกับสารลดแรงดึงผิวชีวภาพชนิดต่างๆ	89

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2.1 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	5
รูปที่ 2.2 โมเลกุลของน้ำยัดเหนียวกันด้วยพันธะไฮโดรเจน	6
รูปที่ 2.3 พื้นที่วงใสที่เกิดจากการกระจายน้ำมัน	7
รูปที่ 2.4 ความเข้มข้นวิกฤตในการเกิดไมเซลล์	8
รูปที่ 2.5 ชนิดของการรวมกลุ่มของสารลดแรงตึงผิว	8
รูปที่ 2.6 การจัดจำแนกชนิดของไมโครอิมัลชันตามแบบวินเซอร์	9
รูปที่ 2.7 โครงสร้างของแรมโนลิปิด	13
รูปที่ 2.8 โครงสร้างของโซโฟโรลิปิด	13
รูปที่ 2.9 โครงสร้างของทรีฮาโรลิปิด	14
รูปที่ 2.10 โครงสร้างของแมนโนซิลอีรีทริทอล ลิปิด	15
รูปที่ 2.11 โครงสร้างของไลโปเปปไทด์ชนิดต่างๆ	17
รูปที่ 2.12 โครงสร้างของเคิร์สตาคิน	17
รูปที่ 2.13 โครงสร้างของฟอสฟาทีดิวเอทานอลามีน	18
รูปที่ 2.14 โครงสร้างของอิมัลชัน	19
รูปที่ 2.15 วงจรชีวิตของ <i>A. pullulans</i>	28
รูปที่ 2.16 โครงสร้างของ Liamocin และ Exophilin	32
รูปที่ 2.17 โครงสร้างของ Glycerol-Liamocin	35
รูปที่ 2.18 โครงสร้างของ Aureosurfactin และ 3-deoxyaureosurfactin	36
รูปที่ 2.19 โครงสร้างของ Massoia lactone	36
รูปที่ 2.20 ขั้นตอนการเกิดไบโอฟิล์ม	38
รูปที่ 3.1 วิธีการเก็บตัวอย่างเพื่อศึกษาการปลดปล่อยสารประกอบชีวภาพจาก <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ YTP6-14 โดยใช้อุลตราโซนิเคเตอร์	50

รูปที่ 4.1	น้ำมันได้ชั้นเซลล์เมื่อนำน้ำหมักไปปั่นเหวี่ยง	56
รูปที่ 4.2	ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตสารประกอบชีวภาพ (BS และ HO) ของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ YTP6-14 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 9 วัน	57
รูปที่ 4.3	โครมาโทแกรมของ BS จาก HPLC	58
รูปที่ 4.4	โครมาโทแกรมของ HO จาก HPLC	58
รูปที่ 4.5	โครงสร้างของ 3,5-dihydroxydecanoic acid delta lactone (1) และ Massoia lactone (2)	61
รูปที่ 4.6	ปริมาณสารที่ปลดปล่อยก่อนและหลังการแตกเซลล์	63
รูปที่ 4.7	โครมาโทแกรมของ IA IB IIB IC และ IIC จาก HPLC	65
รูปที่ 4.8	ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตสารประกอบชีวภาพของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ YTP6-14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด A ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน	67
รูปที่ 4.9	ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตสารประกอบชีวภาพของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ YTP6-14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด A ที่มีแป้งมันสำปะหลังย่อยเป็นแหล่งคาร์บอน....	67
รูปที่ 4.10	ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตสารประกอบชีวภาพของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ YTP6-14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด A ที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน	68
รูปที่ 4.11	ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตสารประกอบชีวภาพของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ YTP6-14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด A ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน.....	68
รูปที่ 4.12	ค่าความเข้มข้นวิกฤตการเกิดไมเซลล์ (CMC) ของสารประกอบชีวภาพ BS ที่ผลิตได้จาก <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ YTP6-14 เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังย่อยเป็นแหล่งคาร์บอน	70
รูปที่ 4.13	ค่าความเข้มข้นวิกฤตการเกิดไมเซลล์ (CMC) ของสารประกอบชีวภาพ HO ที่ผลิตได้จาก <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ YTP6-14 เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังย่อยเป็นแหล่งคาร์บอน	71
รูปที่ 4.14	ผลของภาวะต่างๆ ต่อค่าแรงตึงผิวของสารประกอบชีวภาพ BS.....	72
รูปที่ 4.15	ผลของภาวะต่างๆ ต่อค่าแรงตึงผิวของสารประกอบชีวภาพ HO.....	73
รูปที่ 4.16	ค่าการก่อก้อนชั้นของ BS และ HO กับน้ำมันชนิดต่างๆ	75
รูปที่ 4.17	ค่าความคงตัวของอิมัลชันของ BS (ก) และ HO (ข) กับน้ำมันชนิดต่างๆ	76
รูปที่ 4.18	ภาวะที่เหมาะสมแก่การสร้างไบโอฟิล์มของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ YTP6-14	77

รูปที่ 4.19 ผลของ BS และ HO ต่อการสร้างไบโอฟิล์มของ *A. pullulans* สายพันธุ์ YTP6-14 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ก) วิธี pre-coating (ข) วิธี co-incubation (ค) วิธี mid post-incubation 79

รูปที่ 4.20 ผลของ BS และ HO ต่อการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. sobrinus* (ก) และ *S. mutans* (ข) ด้วยวิธี pre-coating เป็นเวลา 8 และ 10 ชั่วโมง ตามลำดับ 81

รูปที่ 4.21 ผลของ BS และ HO ต่อการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. sobrinus* (ก) และ *S. mutans* (ข) ด้วยวิธี co-incubation เป็นเวลา 8 และ 10 ชั่วโมง ตามลำดับ 82

รูปที่ 4.22 ผลของ BS และ HO ต่อการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. sobrinus* (ก) และ *S. mutans* (ข) ด้วยวิธี mid post-formation เป็นเวลา 8 และ 10 ชั่วโมง ตามลำดับ 83

รูปที่ 5.1 วิธีการสังเคราะห์กรดไขมันขึ้นมาใหม่ 87



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและความเป็นมา

สารลดแรงตึงผิวมีบทบาทสำคัญในชีวิตประจำวัน เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวใช้เป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์หลายชนิด เช่น ผลิตภัณฑ์อาหาร ผลิตภัณฑ์ส่วนบุคคลที่ใช้ในการดูแลสุขภาพร่างกาย น้ำยาทำความสะอาดพื้นผิว เครื่องสำอาง ยา และรวมทั้งในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมแปรรูปอาหาร อุตสาหกรรมสิ่งทอ อุตสาหกรรมกระดาษ และอุตสาหกรรมปิโตรเลียม (Satpute และคณะ, 2010; Ma และคณะ, 2012) สารลดแรงตึงผิวมีโครงสร้างโมเลกุลเป็นแบบแอมฟิพาติก (Amphipathic) ที่ประกอบด้วยส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ ทำให้สารลดแรงตึงผิวสามารถเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างพื้นผิวของสิ่งที่เป็นของเหลว ของแข็ง และอากาศได้ (Marchant และ Banat, 2012b) สารลดแรงตึงผิวมีคุณสมบัติหลายอย่าง เช่น ลดค่าแรงตึงผิว ก่ออิมัลชัน ทำให้เกิดฟอง และช่วยให้เกิดการดูดซับ โดยขึ้นอยู่กับชนิดของสารลดแรงตึงผิว (Satpute และคณะ, 2010; Marchant และ Banat, 2012b) ด้วยคุณสมบัติเหล่านี้ ทำให้มีความต้องการสารลดแรงตึงผิวเพิ่มขึ้น สารลดแรงตึงผิวเป็นสารเคมีสังเคราะห์ที่ใช้กันทั่ว ๆ ไป มีข้อด้อยที่ไม่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติรวมทั้งอาจเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อมได้ ดังนั้นการนำสารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์จากปฏิกิริยาทางเคมีไปใช้จะต้องคำนึงถึง ชนิด ความเข้มข้นที่ใช้ และผลกระทบที่จะเกิดขึ้น (Van Bogaert และคณะ, 2011) จากปัญหาดังกล่าวข้างต้นจึงมีการวิจัยและพัฒนาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย รา และยีสต์ ที่ให้คุณสมบัติเช่นเดียวกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ แต่มีข้อดี คือ เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม มีความเป็นพิษต่ำ และสามารถสลายได้ตามธรรมชาติ (Shin และคณะ, 2010; Marchant และ Banat, 2012a) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถคงประสิทธิภาพได้ดีแม้อยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรดต่าง และความเข้มข้นไอออน ขึ้นอยู่กับชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Cameotra และ Makkar, 2010; Makkar และคณะ, 2011)

Aureobasidium pullulans (*A. pullulans*) เป็นราคล้ายยีสต์ (yeast-like fungus) มีรูปร่างหลายแบบ และจัดอยู่ในคลาสแอสโคไมซีตส์ที่สามารถสร้างเส้นใยได้ (filamentous ascomycetes) สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ดิน ดอกไม้ป่า พืชกำแพง ผลองุ่น หิน น้ำทะเล และธารน้ำแข็งอาร์กติก (Urzi และคณะ, 1999; Gunde-Cimerman และคณะ, 2000; Zalar และคณะ, 2008; Grube และคณะ, 2011) *A. pullulans* มีความสำคัญในอุตสาหกรรมเนื่องจากสามารถผลิตสารประกอบชีวภาพได้หลากหลายชนิด เช่น เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (Exopolysaccharide) มีชื่อว่า พูลูลูลาน (Pullulan) ถูกนำไปใช้อย่างมากในอุตสาหกรรมอาหาร

นอกจากนี้ *A. pullulans* ยังผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ เช่น เอนไซม์ บีตา-กลูแคน สารฆ่ารา สารต้านแบคทีเรีย น้ำมันและสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Price และคณะ, 2013; Gostin และคณะ, 2014)

Kurosawa และคณะ (1994) รายงานว่า *Aureobasidium* sp. ผลิตน้ำมันที่หนักกว่าน้ำ (heavy oil) ปลดปล่อยออกนอกเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 12 น้ำมันที่ผลิตออกมาเป็นส่วนผสมน้ำตาลอะราบิทอล (Arabitol) หรือน้ำตาลแมนนิทอล (mannitol) ที่ต่อกับเอสเทอร์ของกรดไขมัน กรดไขมันที่พบมี 2 ชนิด คือ 3,5-dihydroxydecanoic acid และ 5-hydroxy-2-decanoic acid จากนั้น Manitchotpisit และคณะ (2011) รายงานว่า *A. pullulans* หลายสายพันธุ์สามารถผลิตน้ำมันและปลดปล่อยออกนอกเซลล์ มีคุณสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิว ต่อมาได้ศึกษาโครงสร้างของน้ำมันที่ผลิตโดย *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 50380 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลซูโครสร้อยละ 5 พบว่ามีองค์ประกอบเป็นเลียมอซิน (Liamocin) สามารถแบ่งได้เป็น 4 แบบ คือ A1 A2 B1 และ B2 มีโครงสร้างเป็นน้ำตาลแมนนิทอลกับเอสเทอร์ของ 3,5-hydroxydecanoic จำนวน 3 ถึง 4 กลุ่ม โดยที่อาจต่อกับหมู่อะเซทิล (acetyl) (Price และคณะ, 2013) จากนั้น Manitchotpisit และคณะ (2014) รายงานว่าเลียมอซินสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งปากมดลูกโดยไม่เป็นพิษกับเซลล์ปกติ Kim และคณะ (2015) พบว่า *A. pullulans* สายพันธุ์ L3-GPY สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอาหารเลี้ยงเชื้อ GPY ที่มีน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 4 มีโครงสร้างเป็นกลีเซอรอล-เลียมอซิน (glycerol-Liamocin) และเมื่อเร็ว ๆ นี้ ได้มีรายงานที่ *A. pullulans* สายพันธุ์ YTP6-14 ผลิตแมสซอย แลคโตน (Massoia lactone) มีประสิทธิภาพในการลดค่าแรงตึงผิวในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสและกลีเซอรอลอย่างละ ร้อยละ 2.5 (สุภารัตน์ ลือพงศ์พัฒนา, 2557) จากรายงานการวิจัยแสดงให้เห็นว่านอกจาก *A. pullulans* ที่ต่างสายพันธุ์กันแล้ว อาหารเลี้ยงเชื้อและแหล่งคาร์บอนที่ใช้อาจมีผลต่อลักษณะของสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้

นอกจากนี้ยังพบว่า *A. pullulans* สามารถสร้างไบโอฟิล์มบนพื้นผิวของวัสดุ เช่น พอลิไวนิลคลอไรด์ (polyvinylchloride) และ พอลิคาร์บอเนต (polycarbonate) ได้ (Webb และคณะ, 2000; Metzger และคณะ, 2006) โดยปัจจัยที่ส่งผลต่อการสร้างไบโอฟิล์ม ได้แก่ ลักษณะของวัสดุ พื้นผิว ชนิดของจุลินทรีย์ และ อาหารที่ใช้ในการทดลอง (Prabhawathi และคณะ, 2014) ลักษณะของวัสดุพื้นผิวที่ไม่ชอบน้ำเป็นปัจจัยหนึ่งที่เป็นอุปสรรคสำคัญในการเกาะติดและสร้างไบโอฟิล์ม การเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ความเข้มข้นต่ำๆ จะช่วยให้จุลินทรีย์สามารถเกาะติดกับพื้นผิวและการสร้างไบโอฟิล์มได้ดีขึ้น ในขณะที่ความเข้มข้นสูงจะรบกวนการสร้างไบโอฟิล์ม (Arutchelvi และคณะ, 2011)

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Aureobasidium pullulans* สายพันธุ์ YTP6-14 ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตและลักษณะสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

1.3 ขั้นตอนการดำเนินงาน

- 1.3.1 ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ
- 1.3.2 ศึกษาองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้
- 1.3.3 ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ
- 1.3.4 ศึกษาผลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อการสร้างไบโอฟิล์ม

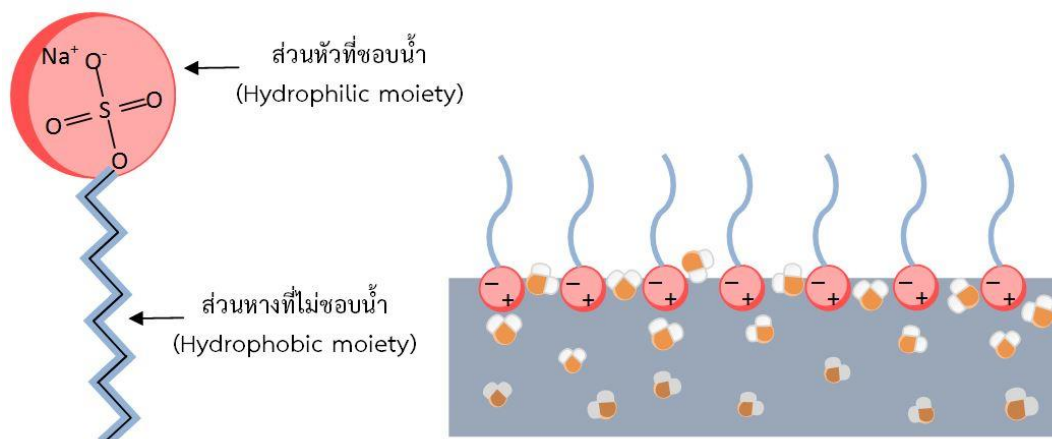


บทที่ 2

ปรีทรรคณ์วรรณกรรม

2.1 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ มีคุณสมบัติในการลดค่าแรงตึงผิว ผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น แบคทีเรีย รา และยีสต์ โดยใช้น้ำตาล น้ำมัน ของเสียเหลือใช้เป็นสารตั้งต้น จุลินทรีย์จะหลั่งสารลดแรงตึงผิวออกมาภายนอกเซลล์ หรือสะสมอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ (Marchant และ Banat, 2012b) ตัวอย่างเช่น *Candida bombicola* สายพันธุ์ ATCC 22214 ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดโซโฟโรลิปิด (Sphorolipid) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยน้ำมันจาก *Cryptococcus curvatus* สายพันธุ์ ATCC 20509 ร่วมกับน้ำมันดอกเรพซีด (Rapeseed oil) (Daniel และคณะ, 1998) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นสารอินทรีย์ที่มีโครงสร้างเป็นแอมฟิฟิลิก (Amphiphilic molecules) ประกอบไปด้วยส่วนหัวที่ชอบน้ำ (hydrophilic moiety) ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) ฟอสเฟต (phosphate) กรดอะมิโน (amino acid) เปปไทด์ (peptide) กรดคาร์บอกซิลิก (carboxylic acid) และแอลกอฮอล์ (alcohol) และส่วนหางที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic moiety) ได้แก่ กรดไขมันอิ่มตัวหรือไม่อิ่มตัว และเอสเทอร์ของกรดไขมัน (Mishra และคณะ, 2009; Makkar และคณะ, 2011; Foley และคณะ, 2012) โครงสร้างดังกล่าวทำให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถละลายได้ทั้งในน้ำและในน้ำมัน มักจะอยู่ในบริเวณรอยต่อระหว่างพื้นผิวโดยหันส่วนที่มีขั้วเข้าสู่โมเลกุลของน้ำและหันส่วนที่ไม่มีขั้วเข้าสู่โมเลกุลของน้ำมันหรืออากาศ ดังรูปที่ 2.1 จึงทำให้ค่าแรงตึงผิวระหว่างวัฏภาคทั้งสองชนิด (surface tension, ST) เช่น ค่าแรงตึงผิวระหว่างโมเลกุลของเหลวและอากาศ และค่าแรงตึงผิวระหว่างวัฏภาคชนิดเดียวกัน เช่น ค่าแรงตึงผิวระหว่างโมเลกุลของเหลวและของเหลว (interfacial tension, IT) มีค่าลดลง (Banat และคณะ, 2010) นอกจากนี้ สารลดแรงตึงผิวยังมีคุณสมบัติอื่นๆ อีก ได้แก่ ความสามารถในการกระจายน้ำมัน ความสามารถในการทำให้พื้นผิวเปียก การก่ออิมัลชัน การเกิดฟอง และช่วยให้เกิดการดูดซับ (Satpute และคณะ, 2010) โดยสามารถพิจารณาคูณสมบัติเหล่านี้ได้จากประจุที่โครงสร้างส่วนหัวและสัดส่วนของ hydrophilic ต่อส่วน hydrophobic เรียกว่า Hydrophilic-Lipophilic Balance (HLB) (Foley และคณะ, 2012)



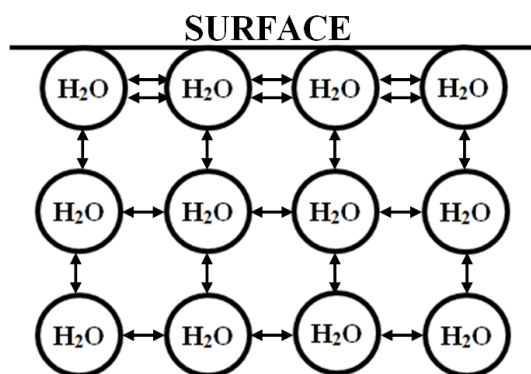
รูปที่ 2.1 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ผลิตภัณฑ์หลายชนิด เช่น ผลิตภัณฑ์อาหาร ผลิตภัณฑ์ส่วนบุคคลที่ใช้ในการดูแลสุขภาพร่างกาย น้ำยาทำความสะอาดพื้นผิว เครื่องสำอาง ยาเวชภัณฑ์ มีสารลดแรงตึงผิวเป็นส่วนประกอบ โรงงานอุตสาหกรรมมีการใช้สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ซึ่งได้จากปฏิกิริยาทางเคมีโดยการรวมส่วนที่ชอบน้ำ เช่น คาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน และ เปปไทด์ เข้ากับส่วนที่ไม่ชอบน้ำ เช่น กรดไขมันอิ่มตัว หรือไม่อิ่มตัว และเอสเทอร์ของกรดไขมัน เพื่อให้เกิดโครงสร้างเป็นแอมพลิฟิกลิกที่สามารถนำไปใช้ได้โดยตรงหรือสามารถนำไปปรับปรุงหมู่ฟังก์ชัน (functional group) เพื่อให้ได้สารลดแรงตึงผิวชนิดใหม่ๆ (Foley และคณะ, 2012) แต่อย่างไรก็ตาม ข้อเสียของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ คือ ไม่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม (Van Bogaert และคณะ, 2011) จึงทำให้มีการวิจัยและพัฒนาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย รา และยีสต์ ที่ให้คุณสมบัติเช่นเดียวกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ แต่มีข้อดี คือ มีความเป็นพิษต่ำกว่า และสามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ (Shin และคณะ, 2010; Marchant และ Banat, 2012a)

2.2 คุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

2.2.1 ลดค่าแรงตึงผิว

แรงตึงผิว คือ คุณสมบัติของของเหลวที่บริเวณพื้นผิวเกิดจากความไม่สมดุลของแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุล เมื่อโมเลกุลบนพื้นผิวไม่ได้ล้อมรอบไปด้วยโมเลกุลชนิดเดียวกันในทุกๆ ด้าน ทำให้มีแรงดึงดูดกับโมเลกุลข้างเคียงมากขึ้น เช่นแรงตึงผิวที่เกิดจากโมเลกุลของน้ำยึดเหนี่ยวกันด้วยพันธะไฮโดรเจน (Reger และคณะ, 2009) ดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 โมเลกุลของน้ำยึดเหนี่ยวกันด้วยพันธะไฮโดรเจน

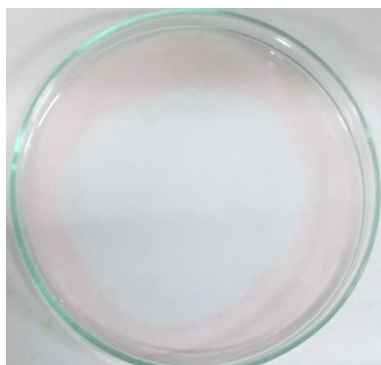
แรงตึงผิวสามารถแบ่งได้ 2 ชนิดคือแรงตึงผิวระหว่างของเหลวและอากาศ (surface tension, ST) และแรงระหว่างผิวประจันของของเหลว 2 ชนิด หรือระหว่างของเหลวและของเหลว (interfacial tension, IT) (Nitschke และ Costa, 2007) ค่าแรงตึงผิวสามารถวัดได้ด้วยวิธีของ Du Nouy โดยใช้เครื่องแทนซิโอมิเตอร์ (tensiometer) และห่วงวงแหวนทองคำขาวอิริเดียม (Latinum Iridium ring) มีหน่วยเป็นมิลลินิวตันต่อเมตร (mN/m) หรือ ดายน์ต่อเซนติเมตร (dyne/cm) (Marchant และ Banat, 2014) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถลดค่าแรงตึงผิวของน้ำบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสจากประมาณ 72.8 mN/m ให้ต่ำลงถึง 27 mN/m ได้โดยประมาณ และลดค่าแรงระหว่างผิวประจันของน้ำและเฮกเซนจาก 40 mN/m ให้ต่ำลงถึง 1 mN/m (Mulligan, 2005; Marchant และคณะ, 2014) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่างชนิดกันจะสามารถลดแรงตึงผิวของน้ำได้ไม่เท่ากัน ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ค่าแรงตึงผิวที่ต่ำสุด และค่าแรงตึงผิวประจันระหว่างน้ำและเฮกเซน

สารลดแรงตึงผิว ชีวภาพ	จุลินทรีย์	ค่าแรงตึงผิวต่ำสุด (mN/m)	ค่าแรงตึงผิว	
			ประจันระหว่าง น้ำและเฮกเซน (mg/l)	อ้างอิง
เซอร์แฟคติน (Surfactin)	<i>Bacillus subtilis</i>	25	<1	(Cooper และคณะ, 1981)
รามโนลิปิด (Rhamnolipid)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26	<1	(Sylatk และคณะ, 1985)
โซโฟโรลิปิด (Sophorolipid)	<i>Candida bombicola</i>	33	5	(Cooper และ Paddock, 1984)

2.2.2 ความสามารถในการกระจายน้ำมัน (oil displacement activity)

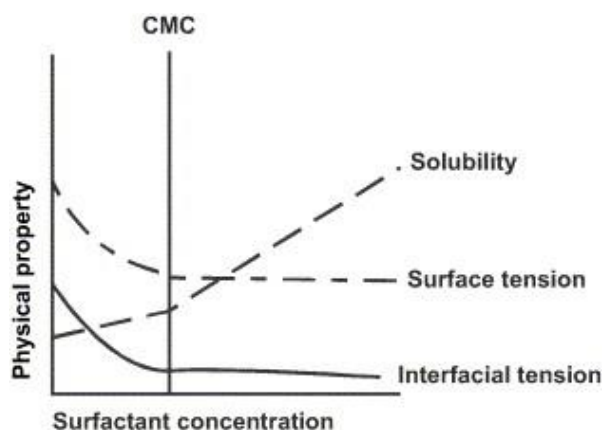
การกระจายน้ำมันเป็นวิธีการวัดประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ง่ายและรวดเร็ว โดยวัดขนาดของพื้นที่วงใสที่เกิดขึ้นบนฟิล์มน้ำมันดิบสังเคราะห์ที่อยู่บนผิวน้ำเมื่อหยดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลงไป ดังรูปที่ 2.3 พื้นที่กระจายน้ำมันสามารถคำนวณได้จากสูตร πr^2 มีหน่วยเป็นตารางเซนติเมตร (Morikawa และคณะ, 2000)



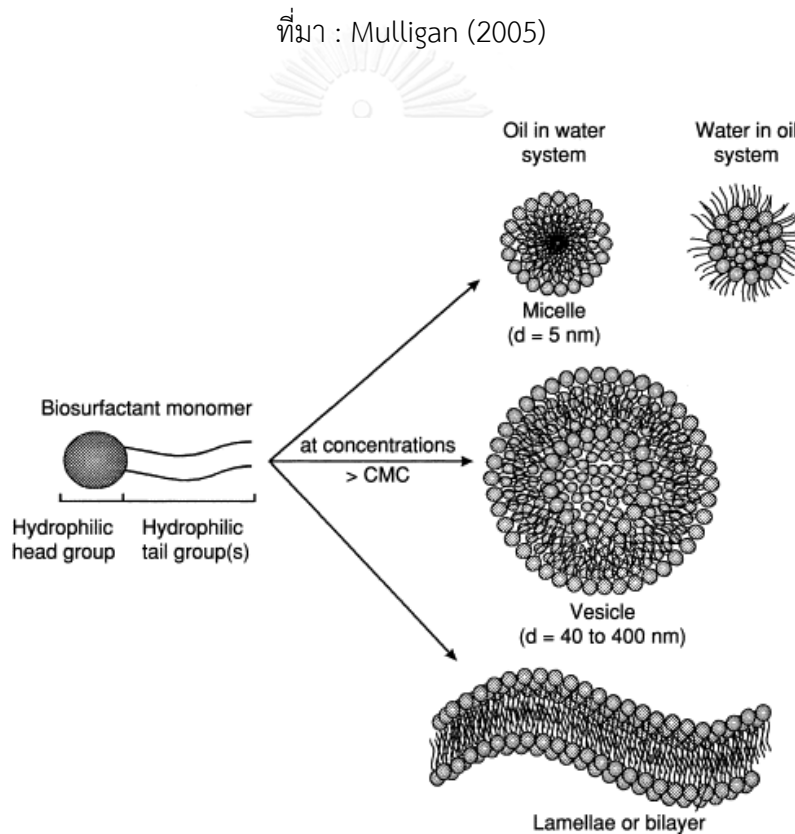
รูปที่ 2.3 พื้นที่วงใสที่เกิดจากการกระจายน้ำมัน

2.2.3 ค่าความเข้มข้นวิกฤตในการเกิดไมเซลล์ (Critical micelle concentration, CMC)

ความสามารถในการลดแรงตึงผิวจะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จนกระทั่งถึงจุด CMC กล่าวคือเมื่อเติมสารลดแรงตึงผิวลงในสารละลาย ค่าแรงตึงผิวของสารละลายจะลดลงเรื่อยๆ จนกระทั่งถึง CMC ค่าแรงตึงผิวจะคงที่ ดังรูปที่ 2.4 และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะเรียงตัวอยู่ในรูปไมเซลล์ (micelle) เวสซิเคิล (vesicle) หรือไบเลเยอร์ต่อกัน (continuous bilayers) และค่าแรงตึงผิวจะคงที่ ดังรูปที่ 2.5 (Maier, 2003; Mulligan, 2005) การจับกันเช่นนี้เกิดจากปฏิกิริยาเคมีอย่างอ่อนระหว่างส่วนหัวที่มีขั้วและส่วนหางที่ไม่มีขั้ว เช่น พันธะไฮโดรโฟบิก (hydrophobic bond) พันธะแวนเดอร์วาลส์ (van der Waals bond) และพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) ที่จุด CMC คุณสมบัติทางกายภาพของสารละลายเปลี่ยนแปลงไป เช่น ค่าการนำไฟฟ้า ความหนืด ความหนาแน่น และความขุ่น เป็นต้น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพแต่ละชนิดจะมีค่า CMC จำเพาะแตกต่างกัน ขึ้นกับโครงสร้าง ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ความเข้มข้นของประจุ และ อุณหภูมิ (Margaritis และคณะ, 1979; Maier, 2003; Raza และคณะ, 2010; Satpute และคณะ, 2010) สารลดแรงตึงผิวที่มีประสิทธิภาพจะมีค่า CMC ต่ำ ซึ่งก็คือใช้ปริมาณสารน้อยในการลดค่าแรงตึงผิว (Seydlová และ Svobodová, 2008)



รูปที่ 2.4 ความเข้มข้นวิกฤตในการเกิดไมเซลล์
ที่มา : Mulligan (2005)



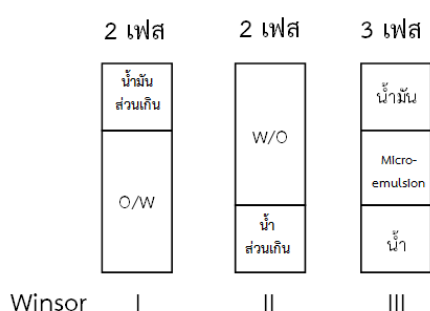
รูปที่ 2.5 ชนิดของการรวมกลุ่มของสารลดแรงตึงผิว
ที่มา : Maier (2003)

2.2.4 การก่ออิมัลชัน (Emulsification)

อิมัลชันเป็นระบบคอลลอยด์ (colloid) ประกอบด้วยของเหลวอย่างน้อยสองชนิดที่ไม่สามารถละลายเข้ากันได้ โดยของเหลวชนิดหนึ่งจะแตกตัวเป็นเม็ดเล็กๆ (droplets) เรียกว่าวัฏภาคภายใน (dispersal phase) กระจายอยู่ในของเหลวอีกชนิดหนึ่งซึ่งเป็นวัฏภาคภายนอก

(continuous phase) เช่น สารประกอบไฮโดรคาร์บอนและน้ำ (Nitschke และ Costa, 2007; Satpute และคณะ, 2010) อิมัลชันแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ อิมัลชันชนิดน้ำ-ใน-น้ำมัน (water-in-oil, W/O) คืออิมัลชันที่มีน้ำเป็นวัฏภาคภายในและน้ำมันเป็นวัฏภาคภายนอก และอิมัลชันชนิดน้ำมัน-ใน-น้ำ (oil-in-water, O/W) คือ อิมัลชันที่มีน้ำมันกระจายเป็นวัฏภาคภายในและน้ำเป็นวัฏภาคภายนอก อิมัลชันเป็นระบบที่มีความเสถียรต่ำ ดังนั้นการเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเข้าไปในระบบจะช่วยลดค่าแรงตึงผิวระหว่างของเหลวทั้งสองชนิดทำให้ระบบอิมัลชันมีความเสถียรมากขึ้นคงอยู่ได้เป็นเดือนหรือเป็นปี (Velikonja และ Kosaric, 1993) โดยส่วนใหญ่แล้วสารลดแรงตึงผิวที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะมีคุณสมบัติเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (emulsifier) ที่ดีกว่าสารลดแรงตึงผิวน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เรียกว่าไบโออิมัลซิไฟเออร์ (bioemulsifiers) จะทำให้ระบบอิมัลชันเสถียรแต่ไม่สามารถลดค่าแรงตึงผิวได้มาก ตัวอย่างเช่น โซโปโรลิปิด ที่ผลิตจากเชื้อ *Torulopsis bombicola* มีประสิทธิภาพในการลดค่าแรงตึงผิวได้ดีแต่มีความสามารถในการก่ออิมัลชันต่ำ ในทางกลับกัน ไลโปซาน (Liposan) มีน้ำหนักโมเลกุลสูงไม่สามารถลดค่าแรงตึงผิวได้แต่ก่ออิมัลชันได้ดีในน้ำมันสำหรับประกอบอาหาร (Cooper และ Paddock, 1984; Cirigliano และ Carman, 1985) นอกจากนี้ยังมีอิมัลชันประเภทไมโครอิมัลชัน (microemulsions) เป็นระบบอุณหพลศาสตร์ (thermodynamics) ที่มีความเสถียรแบ่งเป็น 4 ชนิดตามการจัดจำแนกของวินซอร์ (Winsor) Winsor (1948) ดังรูปที่ 2.6

1. อิมัลชันสองเฟสที่ชั้นล่างเป็นอิมัลชันชนิดน้ำมัน-ใน-น้ำ (oil-in-water, O/W) และชั้นบนเป็นน้ำมันส่วนเกิน
2. อิมัลชันสองเฟสที่ชั้นบนเป็นอิมัลชันชนิดชนิดน้ำ-ใน-น้ำมัน (water-in-oil, W/O) และชั้นบนเป็นน้ำส่วนเกิน
3. อิมัลชันระบบสามเฟสที่ชั้นกลางเป็นไมโครอิมัลชันที่อยู่ในภาวะสมดุล โดยมีชั้นบนเป็นน้ำมันส่วนเกิน และชั้นล่างเป็นน้ำส่วนเกิน
4. อิมัลชันเฟสเดียว คือ น้ำมัน น้ำ และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพผสมเป็นเนื้อเดียวกัน



รูปที่ 2.6 การจัดจำแนกชนิดของไมโครอิมัลชันตามแบบวินซอร์

ที่มา : ดัดแปลงจาก (Chai และคณะ, 2005)

2.2.5 ค่าเอชแอลบี (hydrophilic-lipophilic balance, HLB)

ค่า HLB คือ ค่าที่แสดงสัดส่วนระหว่างส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำในโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ มีค่าระหว่าง 0 ถึง 20 สามารถบอกชนิดของอิมัลชันและการนำไปประยุกต์ใช้ได้ ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ช่วงค่า HLB ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและการนำไปประยุกต์ใช้

ค่า HLB	การนำไปประยุกต์ใช้
3-6	อิมัลซีไฟเออร์ชนิดน้ำ-ใน-น้ำมัน (water-in-oil emulsifier)
7-9	สารทำให้เปียก (wetting agent)
8-18	อิมัลซีไฟเออร์ชนิดน้ำมัน-ใน-น้ำ (oil-in-water emulsifier)
13-15	สารทำความสะอาด (detergent)
15-18	สารละลาย (solubilizer)

2.3 ประเภทของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีโครงสร้างหลากหลาย สามารถจัดจำแนกได้ตามโครงสร้างจุลินทรีย์ผู้ผลิต และขนาดโมเลกุล (Fracchia และคณะ, 2012) เมื่อจัดจำแนกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพตามโมเลกุลจะสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีโมเลกุลต่ำ และกลุ่มที่มีโมเลกุลสูง สารลดแรงตึงผิวชีวภาพโมเลกุลต่ำจะสามารถลดค่าแรงตึงผิวได้ดี ได้แก่ ไกลโคลิปิด (Glycolipid) ลิโปเปปไทด์ (Lipopeptide) กรดไขมัน (fatty acid) และฟอสโฟลิปิด (Phospholipid) ส่วนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโมเลกุลสูงจะมีความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิวต่ำแต่เพิ่มความเสถียรของอิมัลชันได้ดีจึงเรียกว่า ไบโอบีโอมัลซีไฟเออร์ (bioemulsifier) ได้แก่ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดพอลิเมอร์ (polymeric biosurfactant) และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดอนุภาค (particulate biosurfactant) (Gautam และ Tyagi, 2006; Dastgheib และคณะ, 2008; Singh และ Saini, 2014) การจัดจำแนกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพตามโมเลกุลและจุลินทรีย์ผู้ผลิตได้แสดงไว้ ดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 การจัดจำแนกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพตามมวลโมเลกุล

ชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	จุลินทรีย์
มวลโมเลกุลต่ำ	
ไกลโคลิปิด (Glycolipid)	
แรมโนลิปิด (Rhamnolipid)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
โซโฟโรลิปิด (Sphorolipid)	<i>Candida bombicola</i>
ทรีฮาโรลิปิด (Trehalolipid)	<i>Arthrobacter paraffineus</i>
แมนโนซิลอีรีทริทอล ลิปิด (Mannosylerythritol lipid, MELs)	<i>Pseudozyma</i> sp.
ไลโปเปปไทด์ (Lipopeptide)	
เซอร์แฟคติน (Surfactin, อีทูริน (iturin), เฟนโจซิน (fengycin)	<i>Bacillus subtilis</i>
ฟลิปัสตาติน (Phipastatin)	<i>Bacillus cereus</i>
ไลเคโนซิน (Lichenysin)	<i>Bacillus licheniformis</i>
อาร์โทรแฟคติน (Arthrofactin)	<i>Arthrobacter</i> sp.
กรดไขมัน (fatty acid)	
โครีโนมัยโคลิก แอซิด (Corynomycolic acid)	<i>Corynebacterium lepus</i>
ฟอสโฟลิปิด (Phospholipids)	<i>Acinetobacter</i> sp., <i>Thiobacillus thiooxidans</i>
มวลโมเลกุลสูง	
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดพอลิเมอร์	
อีมัลชัน (Emulsan)	<i>Acinetobacter calcoacetius</i>
อลาซาน (Alasan)	<i>Acinetobacter radioresistens</i>
ไลโปซาน (Liposan)	<i>Candida lipolytica</i>
มานานโปรตีน (Mananprotein)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดอนุภาค	
สารลดแรงตึงผิวพาร์ทิคูลेट (Particulate surfactant, PM)	<i>Pseudomonas marginalis</i>
ไบโอเซอร์ พีเอ็ม (Biosur PM)	<i>Pseudomonas maltophila</i>
เวสิเคิล (Vesicles)	<i>Acinetobacter</i> sp.

ที่มา : (Cirigliano และ Carman, 1985; Mulligan, 2005; Gautam และ Tyagi, 2006; Rahman และ Gakpe, 2008; Fracchia และคณะ, 2012)

2.3.1 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมวลโมเลกุลต่ำ

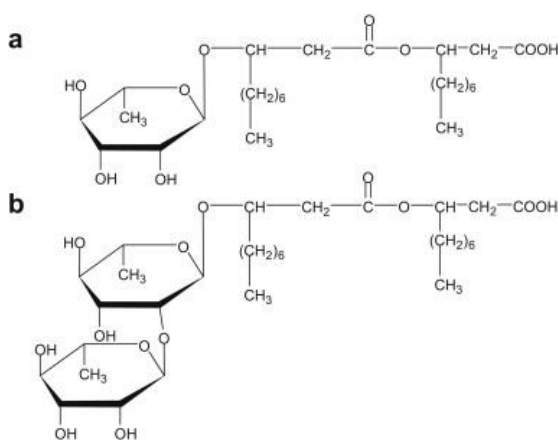
2.3.1.1 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดไกลโคลิปิด (Glycolipid)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพส่วนใหญ่จะเป็นชนิดไกลโคลิปิด มีโครงสร้างเป็นคาร์โบไฮเดรต เช่น กลูโคส (Glucose) แมนโนส (Mannose) กาแลคโตส (Galactose) แรมโนส (Rhamnose) ทรีฮาโรส (Treharose) กรดกลูคูโรนิก (Glucuronic acid) และ กาแลคโตสซัลเฟต (Galactose sulphate) เชื่อมต่อกับกรดไขมันสายยาว หรือ กรดไขมันที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ด้วยพันธะไกลโคซิดิก (Glycosidic bond) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดที่ศึกษามากที่สุดได้แก่ แรมโนลิปิด โซโฟโรลิปิด ทรีฮาโรลิปิด และ แมนโนซิลอีริทริทอล ลิปิด เป็นต้น (Chen และคณะ, 2007; Rahman และ Gakpe, 2008)

แรมโนลิปิด (Rhamnolipid) เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากแบคทีเรียสกุล *Pseudomonas* เช่น *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* และแบคทีเรียในสกุล *Burkholderia* มีโครงสร้างเป็นน้ำตาลแรมโนส จำนวน 1 หรือ 2 โมเลกุล เชื่อมกับกรด β -hydroxydecanoic จำนวน 1 หรือ 2 โมเลกุล (Gautam และ Tyagi, 2006; Fracchia และคณะ, 2012) ดังรูปที่ 2.7 สามารถลดค่าแรงตึงผิวของน้ำบริสุทธิ์จาก 72.8 mN/m ให้ต่ำลงอยู่ในระหว่าง 32 ถึง 30 mN/m มีค่า CMC อยู่ในช่วง 5 ถึง 65 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถก่อกอิมัลชันได้ดี และละลายได้ดีในสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจึงมักถูกนำไปใช้ในทางสิ่งแวดล้อม เช่น การกำจัดสารไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในดิน นอกจากนี้ยังถูกใช้ในทางการแพทย์เพื่อในการต่อต้านการยึดเกาะ (antiadhesive) ด้านแบคทีเรีย (antibacteria) ด้านเชื้อรา (antifungal) และต้านไวรัส (antiviral) (Dyke และคณะ, 1993; Rahman และ Gakpe, 2008; Fracchia และคณะ, 2012)

โซโฟโรลิปิด (Sophorolipid) ผลิตได้จากยีสต์หลายสปีชีส์ เช่น *Candida bombicola*, *Candida lipolytica*, *Rhodotorula bogoriensis*, *Wickerrhaminella domercqiae* และ *Candida batistae* (Van Bogaert และคณะ, 2011) มีโครงสร้างเป็นน้ำตาลโซโฟโรส (Sophorose) หรือ กลูโคส 2 โมเลกุล ที่เชื่อมกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก β -1,2 ต่อกับกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอน 16 ถึง 18 อะตอม โดยแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ อะซิติก (acidic) มีลักษณะเป็นวงเปิดโดยหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl) อยู่อย่างอิสระที่ปลายสายของกรดไขมัน และชนิดแลคโตนิก (lactonic) หมู่คาร์บอกซิลที่ปลายสายของกรดไขมันจะเชื่อมต่อกับน้ำตาลโซโฟโรสทำให้มีลักษณะเป็นวงปิด ดังรูปที่ 2.8 ทำให้มีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน โดยชนิดแลคโตนิกจะมีคุณสมบัติในการลดค่าแรงตึงผิว และต่อต้านจุลชีพได้ดีกว่า ในขณะที่ชนิดอะซิติกจะสามารถละลายน้ำและก่อกอได้ดีกว่า นอกจากนี้การมีหมู่อะเซทิลเพิ่มขึ้นจะทำให้ละลายน้ำได้น้อยลง แต่กระตุ้นการต้านไวรัสและ

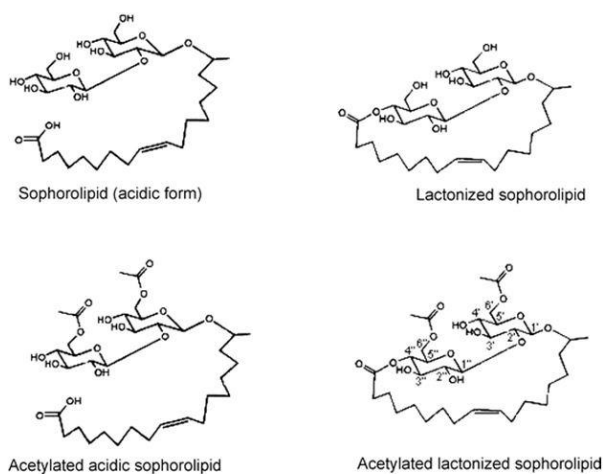
การหลั่งไซโตไคน์ (Cytokine) (Van Bogaert และคณะ, 2007; Van Bogaert และคณะ, 2011) โสโฟโรลิปิดสามารถลดค่าแรงตึงผิวของน้ำบริสุทธิ์จาก 72.8 mN/m ให้ต่ำลงอยู่ในระหว่าง 40 ถึง 30 mN/m มีค่า CMC ประมาณ 11-250 มิลลิกรัมต่อลิตร (Develter และ Laurysen, 2010) สามารถผลิตได้มาก เช่น *Candida bombicola* สายพันธุ์ ATCC 22214 ผลิตได้สูงถึง 422 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำมันจาก *Cryptococcus curvatus* สายพันธุ์ ATCC 20509 ปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร และน้ำมันดอกเรพซีด (rapeseed oil) ปริมาณ 400 กรัมต่อลิตร (Daniel และคณะ, 1998)



รูปที่ 2.7 โครงสร้างของแรมโนลิปิด

a : Monorhamnolipid, b : Dirhamnolipid

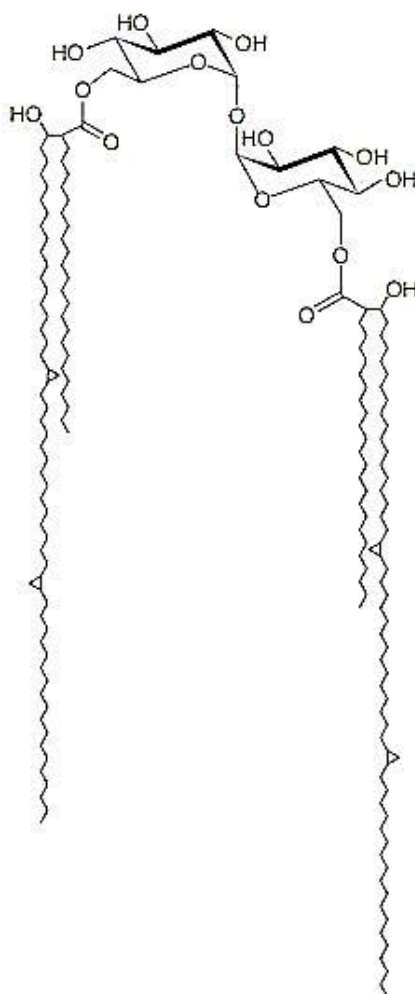
ที่มา : Magalhães และ Nitschke (2013)



รูปที่ 2.8 โครงสร้างของโซโฟโรลิปิด

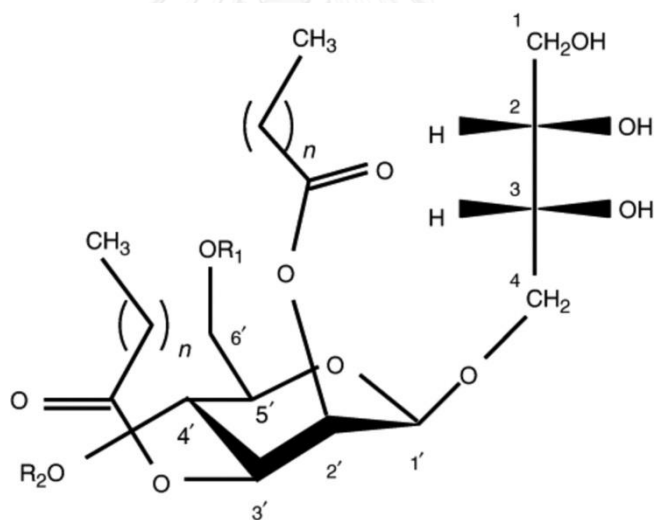
ที่มา : ดัดแปลงจาก Van Bogaert และคณะ (2007)

ทรีฮาโรลิปิด (Trehalolipid) เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น *Mycobacteria*, *Corynebacteria*, *Arthrobacter*, *Nocardia* และ *Gordonia* มีโครงสร้างเป็นน้ำตาลทรีฮาโรส (กลูโคส 2 โมเลกุล เชื่อมกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก α,α -1,1) เชื่อมต่อกับกรดไขมันโคลิค (Mycolic acids) ที่มีลักษณะเป็นกรดไขมันสายยาว (α -branched- β -hydroxy fatty acids) ดังรูปที่ 2.9 อย่างไรก็ตามชนิดของจุลินทรีย์ผู้ผลิตมีผลต่อโครงสร้างส่วนกรดไขมันโคลิค (Mycolic acid) ทำให้มีจำนวนคาร์บอนอะตอมตั้งแต่ 20 ไปจนถึง 90 อะตอม และจำนวนกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่แตกต่างกัน (Desai และ Banat, 1997; Fracchia และคณะ, 2012)



รูปที่ 2.9 โครงสร้างของทรีฮาโรลิปิด
(Trehalose 6,6' - dimycolate, TDM)
ที่มา : Shao (2011)

แมนโนซิลอีรีทริทอล ลิพิด (Mannosylerythritol lipid, MELs) เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีลักษณะเป็นน้ำมันผลิตได้จากยีสต์สกุล *Pseudozyma* sp. และ *Ustilago* sp. มีโครงสร้างเป็นน้ำตาลแมนโนสและน้ำตาลแอลกอฮอล์อีรีทริทอล (4-O- β -D-manopyranosyl-D-erythritol) ต่อกับกรดไขมันที่มีคาร์บอนตั้งแต่ 2 ถึง 18 อะตอม โดยที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 4 และ 6 ของน้ำตาลแมนโนสอาจจะต่อกับหมู่เอเซทิล จำนวนและตำแหน่งที่มีหมู่เอเซทิลส่งผลให้เกิดโครงสร้างที่หลากหลายแบ่งเป็น 4 แบบ คือ MEL-A, MEL-B, MEL-C และ MEL-D ดังรูปที่ 2.10 MEL-A จะมีเอเซทิล 2 หมู่ MEL-B มีเอเซทิล 1 หมู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 4 MEL-C มีเอเซทิล 1 หมู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 6 ส่วน MEL-D ไม่มีหมู่เอเซทิล (Morita และคณะ, 2008; Arutchelvi และ Doble, 2011) การสังเคราะห์แมนโนซิลอีรีทริทอล ลิพิด จะเกิดขึ้นเมื่อยีสต์เจริญอยู่ในเฟสคงที่ (stationary phase) และเก็บสะสมไว้ในเซลล์เพื่อเป็นแหล่งพลังงานเหมือนกับไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerols) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดนี้สามารถลดค่าแรงตึงของน้ำบริสุทธิ์ที่ให้ต่ำกว่า 30 mN/m ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ด้านเซลล์มะเร็ง และด้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Kitamoto และคณะ, 2002; Arutchelvi และ Doble, 2011)



รูปที่ 2.10 โครงสร้างของแมนโนซิลอีรีทริทอล ลิพิด

ที่มา : Arutchelvi และ Doble (2011)

2.3.1.2 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดไลโปเปปไทด์ (Lipopptide)

ไลโปเปปไทด์ส่วนใหญ่ผลิตจากจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Bacillus* แบ่งออกเป็น 4 แฟมิลีส์ (families) คือ เซอร์แฟคติน (Surfactin) อีทูริน (Iturin) เฟนไจซินและฟลิปาสตาติน (Fangycin และ Flipastatin) และ เคิร์สตาคิน (Kurstakins) มีความแตกต่างกันเล็กน้อยที่สายกรดไขมันและกรดอะมิโนในสายเปปไทด์ ดังรูปที่ 2.11 และ 2.12

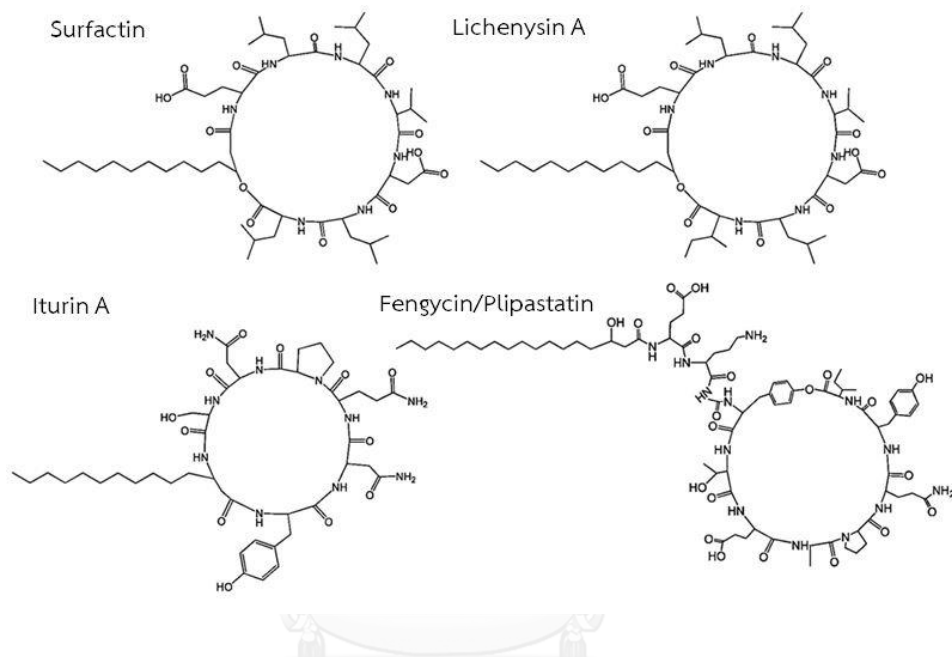
เซอร์แฟคติน (Surfactin) ผลิตได้จาก *Bacillus subtilis* มีโครงสร้างเป็นกรดอะมิโน 7 ตัว เชื่อมกับกรดไขมันเบต้าไฮดรอกซีที่มีคาร์บอนตั้งแต่ 12 ถึง 16 อะตอม มีลักษณะเป็นวงดังรูปที่ 2.11 (Seydlová และ Svobodová, 2008) เซอร์แฟคตินแบ่งได้เป็น 3 แบบ คือ A, B และ C มีความแตกต่างกันที่ชนิดของกรดอะมิโนในตำแหน่งที่เชื่อมเป็นวงกับคาร์บอนตำแหน่งที่ 14 ถึง 15 ของกรดไขมัน โดยแบบ A มีกรดอะมิโนเป็น L-leucine แบบ B มี L-valine และแบบ C มี L-isoleucine ส่วนกรดอะมิโนลำดับอื่นๆ อาจแตกต่างกันขึ้นกับภาวะในการเลี้ยงเชื้อโดยเฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดอะมิโนจำเพาะประกอบอยู่ด้วย (Jacques, 2011) เซอร์แฟคตินสามารถลดค่าแรงตึงของน้ำบริสุทธิ์จาก 72 mN/m เป็น 27 mN/m มีค่า CMC ประมาณ 23 มิลลิกรัมต่อลิตร (Heerklotz และ Seelig, 2001) มีคุณสมบัติในการต้านจุลชีพ ต้านมะเร็ง และยับยั้งการแข็งตัวของเลือด จึงมักถูกนำไปประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ (Arima และคณะ, 1968; Thimon และคณะ, 1992; Kim และคณะ, 2007) อนุพันธ์อื่นๆ ของเซอร์แฟคติน ได้แก่ ไลซีนัยซิน (Lichenysin) และ พูมิลาซิดิน (Pumilacidin) ที่ผลิตได้จาก *Bacillus licheniformis* และ *Bacillus pumilus* ตามลำดับ (Horowitz และคณะ, 1990; Morikawa และคณะ, 1992) ไลซีนัยซินมีโครงสร้างที่คล้ายกันกับเซอร์แฟคตินต่างกันที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่หนึ่ง จึงทำให้มีคุณสมบัติทางเคมีที่คล้ายกัน (McInerney และคณะ, 1990)

อีทูริน (Iturin) ผลิตได้จาก *Bacillus subtilis* ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Delcambe (1950) มีคุณสมบัติในการต้านจุลชีพ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มนี้ประกอบไปด้วยอินทูริน A ถึง E (Iturins A-E) บาซิลโลมัยซิน D, F, L (Bacillomycins D, F, L) และ มัยโคซับทิลิน (Mycosubtilin) อีทูรินมีโครงสร้างเป็นวงเปปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 7 ตัว เชื่อมกับกรดไขมันเบต้าไฮดรอกซีที่มีคาร์บอนตั้งแต่ 14 ถึง 17 อะตอม (Bland, 1996; Jacques, 2011)

เฟนไจซิน (Fengycin) และฟลิปาสตาติน (Phipastatin) ผลิตได้จาก *Bacillus subtilis* และ *Bacillus cereus* ตามลำดับ เฟนไจซินถูกค้นพบครั้งแรกเป็นสารต้านเชื้อราโดยนักวิจัยชาวเยอรมัน (Vanittanakom และคณะ, 1986) ในขณะที่ฟลิปาสตาตินถูกค้นพบครั้งแรกเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ฟอสโฟไลเปส เอ2 (Phospholipase A2) โดยนักวิจัยชาวญี่ปุ่น (Nishifiori และ

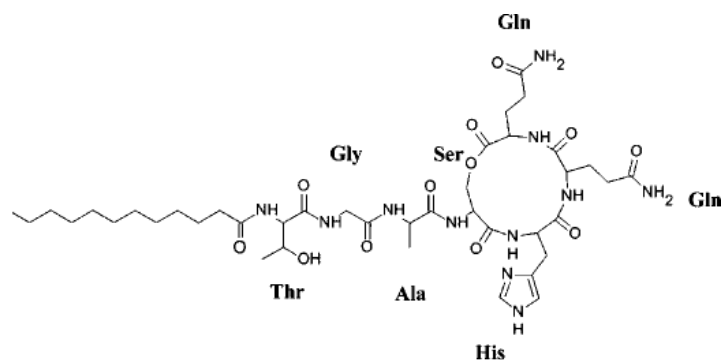
คณะ, 1986) สารทั้งสองมีโครงสร้างแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยและมีคุณสมบัติทางชีวภาพที่คล้ายคลึงกันมาก

เคิร์สตาคิน (Kurstakin) ผลิตได้จาก *Bacillus thuringiensis* ถูกค้นพบโดย Hathout และคณะ (2000) มีคุณสมบัติเป็นสารต้านเชื้อรา *Stachybotrys charatum* มีโครงสร้างดังรูปที่ 2.12



รูปที่ 2.11 โครงสร้างของไลโปเปปไทด์ชนิดต่างๆ

ที่มา : ดัดแปลงจาก Hamley (2015)



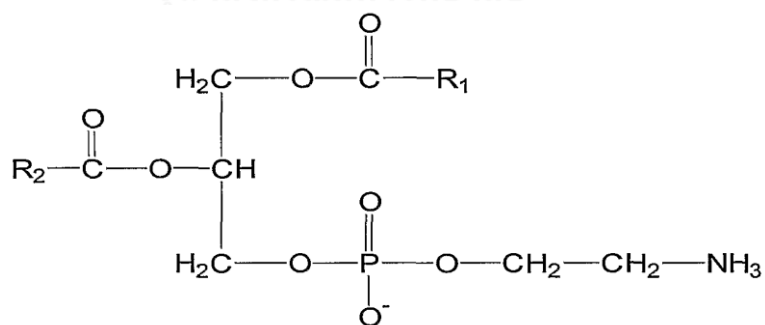
รูปที่ 2.12 โครงสร้างของเคิร์สตาคิน

ที่มา : Béchet และคณะ (2012)

2.3.1.3 กรดไขมัน (Fatty acid) และฟอสโฟลิปิด (Phospholipid)

จุลินทรีย์หลายชนิดทั้ง รา แบคทีเรียและยีสต์ เช่น *Candida lepus*, *Nocardia erythropolis*, *Thiobacillus thiooxidans*, *Acinetobacter* sp., *Micrococcus* sp., *Mycococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Candida* sp., *Penicillium* sp., และ *Aspergillus* sp. สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีโครงสร้างเป็นกรดไขมันและฟอสโฟลิปิดจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอลเคน (Alkane) เป็นองค์ประกอบ โดยค่า HLB ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะแปรผันตรงกับความยาวของสายไฮโดรคาร์บอน (Shekhar และคณะ, 2015) กรดไขมันที่ผลิตขึ้นโดยจุลินทรีย์เหล่านี้มีโครงสร้างซับซ้อน เช่น กรดโครีโนมัยโคลิก (Corynomycolic acid) ที่ประกอบไปด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) และหมู่อัลคิล (alkyl group) (Rahman และ Gakpe, 2008)

การเลี้ยงจุลินทรีย์เหล่านี้ในอาหารที่มีแอลเคนจะทำให้ผลิตฟอสโฟลิปิดได้เพิ่มขึ้นอย่างมาก แต่ *Thiobacillus thiooxidans* สามารถผลิตฟอสโฟลิปิดได้ในปริมาณมากเมื่อมีซัลเฟอร์ (Sulphur) อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Beeba และ Umbreit, 1971) *Acinetobacter* sp. สายพันธุ์ HO1-N ผลิตสารสื่อประสาทฟอสฟาติเตอานอลามีน (Phosphatidylethanolamine) ที่มีโครงสร้างดังรูปที่ 2.13 ไว้ในถุงเวสิเคิล (vesicle) มีความสามารถในการเกิดไมโครอิมัลชัน (micro emulsion) ที่สามารถเห็นด้วยตาเปล่าในแอลเคนและน้ำ (Käppeli และ Finnerty, 1979) ฟอสฟาติเตอานอลามีนที่ผลิตจาก *Rodococcus erythropolis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอลเคนมีคุณสมบัติในการลดค่าแรงตึงผิวประจันระหว่างน้ำและเฮกซะเดคเคน (Hexadecane) ได้ต่ำกว่า 1 mN/m และมีค่า CMC เท่ากับ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร (Kretschmer และคณะ, 1982)



รูปที่ 2.13 โครงสร้างของฟอสฟาติเตอานอลามีน

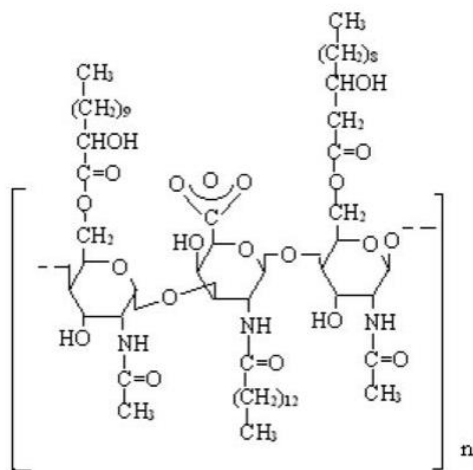
หมู่ R_1 และ R_2 คือ สายของกรดไขมัน

ที่มา : (Sampalis, 2011)

2.3.2 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมวลโมเลกุลสูง

2.3.2.1 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดพอลิเมอร์

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทนี้มีลักษณะเป็นพอลิเมอร์มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ประมาณ 1,000 กิโลดาลตัน ทำให้สามารถก่อกอิมัลชันได้ดี เช่น อิมัลซาน (Emulsan) อลาซาน (Alasan) และ ลิโพซาน (Liposan) เป็นต้น อิมัลซานเป็นเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ประจุลบ มีโครงสร้างหลักเป็นน้ำตาลอะมิโนต่อกัน 3 ตัว คือ D-galactosamine, D-galactosaminouronic acid และ di-deoxy-di-amino hexose ในอัตราส่วน 1:1:1 และมีกรดไขมันที่มีคาร์บอน 10 ถึง 22 อะตอม ต่อกับโครงสร้างหลักนี้ประมาณร้อยละ 5 ถึง 23 โดยน้ำหนักของพอลิเมอร์ ดังรูปที่ 2.14 (Dams-Kozłowska และคณะ, 2008) อิมัลซานมีน้ำหนักโมเลกุล 1,000 กิโลดาลตัน ผลิตได้จากเชื้อ *Acinetobacter calcoaceticus* สายพันธุ์ RAG-1 ATCC 31012 (Rosenberg และ Ron, 1997) ลิโพซานเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวต่างชนิดกัน คือ กลูโคส (Glucose) กาแล็กโตส (Galactose) กาแล็กโตซามีน (Galactosamine) และ กรดกาแล็กโตโรนิก (Galacturonic acid) มาเชื่อมต่อกัน มีคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 83 และโปรตีนร้อยละ 17 ผลิตได้จาก *Candida lipolytica* (Cirigliano และ Carman, 1985)



รูปที่ 2.14 โครงสร้างของอิมัลซาน

ที่มา : (Gautam และ Tyagi, 2006)

2.3.2.2 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดอนุภาค

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดนี้ถูกผลิตและปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ *Acinetobacter* sp. สายพันธุ์ HO1-N ปลดปล่อยเวสสิเคิลที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 20 ถึง 50 นาโนเมตร ภายในประกอบด้วย โปรตีน ฟอสโฟลิปิด และลิโปพอลิแซ็กคาไรด์ สามารถเกิดไมโครอิมัลชันกับสารไฮโดรคาร์บอนได้ และมีบทบาทสำคัญในการนำอัลเคนเข้าสู่เซลล์ (Käppeli และ Finnerty, 1979)

2.4 ข้อดีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพผลิตได้จากแบคทีเรีย รา และยีสต์ โดยสามารถใช้แหล่งอาหารที่มีราคาถูกในการผลิต สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีคุณสมบัติเช่นเดียวกับกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ แต่มีข้อดี คือ เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม มีความเป็นพิษต่ำ และสามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้ อีกทั้งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพส่วนใหญ่ทนภาวะที่ไม่เหมาะสมต่างๆ เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรดต่าง และความเข้มข้นของเกลือได้ดี (Shin และคณะ, 2010; Marchant และ Banat, 2012a)

2.4.1 มีความเป็นพิษต่ำ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความเป็นพิษต่ำหรือไม่เป็นพิษ มีส่วนน้อยที่เป็นพิษแต่ก็ต่ำกว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ จึงทำให้เหมาะสำหรับการนำไปใช้ในด้านเกษตรกรรม เครื่องสำอาง และอาหาร (Nitschke และ Costa, 2007) งานวิจัยโดย Poremba และคณะ (1991a) รายงานว่า แรมโนลิปิดมีค่า LC₅₀ (ค่าความเข้มข้นที่ทำให้ประชากรร้อยละ 50 ของกลุ่มตัวอย่างเสียชีวิต) ต่อ *Photobacterium phosphoreum* สูงกว่าโคริซิท (Corexit) ที่เป็นสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ถึง 10 เท่า ซึ่งแสดงให้เห็นว่า แรมโนลิปิดเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีความเป็นพิษต่ำ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จาก *Pseudomonas aeruginosa* มีความปลอดภัยต่อมนุษย์โดยไม่มีผลต่อเนื้อเยื่อหัวใจ ปอด ตับ และไต (Das และ Mukherjee, 2005) และเมื่อเปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ มาร์ลอน เอ-350 (Marlon A-350) พบว่ามาร์ลอน เอ-350 มีความเป็นพิษสูงกว่าและมีผลต่อการกลายพันธุ์ (Flasz และคณะ, 1998)

2.4.2 สามารถย่อยสลายทางชีวภาพ

นอกจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมแล้วยังสามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้โดยมีรายงานว่าแรมโนลิปิดสามารถย่อยสลายได้ดีโดยแบคทีเรียแอโรบิก (Aerobic bacteria) แบคทีเรียแอนแอโรบิก (Anaerobic bacteria) แบคทีเรียรีดิวซ์ไนเตรท (Nitrate-reducing bacteria) และแบคทีเรียรีดิวซ์ซัลเฟต (Sulphate-reducing bacteria) ส่วนไตรตอน

เอ็กซ์-100 (Triton x-100) ที่เป็นสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์สามารถย่อยสลายได้บางส่วนในภาวะที่มีอากาศ (Aerobic condition) แต่ไม่สามารถย่อยสลายได้ในภาวะอื่นๆ (Mohan และคณะ, 2006)

2.4.3 ทนต่อภาวะที่ไม่เหมาะสม

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพหลายชนิดมีความสามารถทนต่อภาวะที่ไม่เหมาะสมต่างๆ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเนื่องจากจะต้องผ่านกรรมวิธีต่างๆ ที่มีภาวะที่แตกต่างกัน เช่น ความร้อน ความดัน กรดต่าง (pH) และไอออนต่างๆ (Cameotra และ Makkar, 1998; Muthusamy และคณะ, 2008) ไลซีนัยซินเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus licheniformis* สายพันธุ์ JF-2 สามารถทนอุณหภูมิได้ถึง 50 องศาเซลเซียส ทนต่อความเป็นกรดต่างในช่วง 4 ถึง 9 ได้ และทนต่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) และแคลเซียม (Ca^{2+}) ได้ถึง 50 และ 25 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ ไลโปเปปไทด์จาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ LB5a ทนต่อภาวะภายในตู้แช่แข็งที่ 121 องศาเซลเซียส เวลา 20 นาที และเก็บรักษาได้ 6 เดือนที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส ทนต่อความเป็นกรดต่างในช่วง 5 ถึง 11 ได้ และทนต่อโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 20 โดยมวลต่อปริมาตร ได้ (Poremba และคณะ, 1991b; Nitschke และ Pastore, 2006; Muthusamy และคณะ, 2008)

2.4.4 มีโครงสร้างทางเคมีที่หลากหลาย

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีโครงสร้างทางเคมีที่หลากหลายขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์และสารตั้งต้นที่ใช้ในการผลิต (Nitschke และ Pastore, 2006) เช่น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเซอร์เฟคทินที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* มีโครงสร้างเป็นไลโปเปปไทด์ คือ สายเปปไทด์จับกับกรดไขมัน (Kakinuma และคณะ, 1969) ในขณะที่ไซโฟโรลิปิดจาก *Candida bombicola* มีโครงสร้างเป็นไกลโคลิปิดซึ่งประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตเชื่อมต่อกับกรดไขมันสายยาว สารตั้งต้นที่ใช้ในการผลิต เช่น แหล่งคาร์บอนที่เป็นไฮโดรโฟบิกส่งผลต่อกรดไขมันในโครงสร้างของไซโฟโรลิปิด (Van Bogaert และคณะ, 2007) ทำให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้มีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน

2.4.5 แหล่งอาหารที่ใช้ในการผลิตมีราคาถูก

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถผลิตได้จากแหล่งอาหารที่มีราคาถูกเนื่องจากจุลินทรีย์สามารถใช้แหล่งอาหารได้หลากหลาย เช่น พืชที่ให้แป้ง น้ำมันจากพืชและจากสัตว์ที่เหลือใช้จากอุตสาหกรรมต่างๆ วัตถุดิบเหลือใช้ทางการเกษตร ของเสียและผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมน้ำตาล อุตสาหกรรมน้ำมัน เป็นต้น (Singh และ Saini, 2014) น้ำเสียจากโรงงานผลิตแป้งจากมันสำปะหลังเป็นแหล่งอาหารที่นิยมนำมาใช้เนื่องจากประกอบไปด้วยโปรตีน กลูโคส มอลโตส (Maltose) ไนเตรต (Nitrate) ฟอสฟอรัส (Phosphorus) และแร่ธาตุ ถูกนำไปใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เช่น

เซอร์เฟกทินและแรมโนลิปิด (Barros และคณะ, 2008; Costa และคณะ, 2009) โมลาส (Molasses) เป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลจากอ้อยมีน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) ที่ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลซูโครสประมาณร้อยละ 48 ถึง 56 ถูกนำไปใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus subtilis* (Makkar และ Cameotra, 1997) น้ำมันที่เหลือจากการประกอบอาหารก็สามารถนำมาใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ โดย Habu และคณะ (2000) รายงานว่า *Pseudomonas* spp. และ *Bacillus* spp. สามารถใช้น้ำมันมะกอกและน้ำมันทานตะวันที่ผ่านการทอดแล้วมาผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ นอกจากนี้ Shah และคณะ (2007) ได้นำน้ำมันที่เหลือใช้จากร้านอาหารมาผลิตโซโฟโรลิปิดจาก *Candida bombicola*

2.5 ประโยชน์และการประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีประโยชน์และถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมแทนการใช้สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์เนื่องจากมีคุณสมบัติเหมือนกัน เช่น ส่งเสริมการไหล ส่งเสริมการละลาย ช่วยในการกระจายตัวของสาร เป็นสารก่ออิมัลชัน ทำให้เกิดฟอง ทำให้พื้นผิวเปียก และช่วยให้ตกตะกอนเป็นต้น แต่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความเป็นพิษน้อยกว่า ย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ และมีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ยับยั้งการเกาะติดและการสร้างไบโอฟิล์ม ยับยั้งการเจริญของเนื้องอกและเซลล์มะเร็ง ยับยั้งการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน ลดการอักเสบ ด้านอาการแพ้ ส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ และ เป็นพาหะขนส่งยา เป็นต้น (Rahman และ Gakpe, 2008; Gharaei-Fathabad, 2011) จึงมีการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไปประยุกต์ใช้จำนวนมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมน้ำมันทั้งในการผลิตน้ำมันปิโตรเลียม การผสมสูตรน้ำมันตลอดจนการบำบัดทางชีวภาพ เช่น การกำจัดน้ำมันออกจากดิน ทราบและน้ำทะเล นอกจากนี้ยังถูกนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอาง เกษีขกรรม การแพทย์ การเกษตร เหมือนแร่ และผลิตภัณฑ์สำหรับซักล้างทำความสะอาด (Banat และคณะ, 2000) รายละเอียดแสดงคุณสมบัติเด่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและการนำไปประยุกต์ใช้ ดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 การประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอุตสาหกรรมต่างๆ

การประยุกต์ใช้	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	แหล่งอ้างอิง
อุตสาหกรรมน้ำมัน		
เพิ่มการผลิตน้ำมัน (EOR) โดยการลดแรงตึงผิว	Surfactin	Schaller และคณะ (2004)
ประจันระหว่างน้ำมันและน้ำเกิดเป็นอิมัลชันทำให้น้ำมันไหลออกมาจากช่องหิน	Lichenysin	Banat (1993)
	Rhamnolipid	Yakimov และคณะ (1997)
ขนส่งน้ำมันปิโตรเลียมผ่านท่อโดยทำให้เกิดอิมัลชันความหนืดลดลงเหลือ 70 cP ส่งน้ำมันได้ไกล 9.56 กิโลเมตรต่อชั่วโมง	Emulsan	Hayes และคณะ (1990)
ทำความสะอาดถังบรรจุน้ำมัน โดยทำให้เกิดอิมัลชัน	Rhamnolipid	Pesce (2002)
ผสมลงในสูตรน้ำมันปิโตรเลียมเพื่อให้เกิดอิมัลชันระหว่างน้ำและน้ำมันดีเซล	Rhamnolipid	Perfumo และคณะ (2010)
การบำบัดทางชีวภาพ		
กำจัดน้ำมันจากชายหาดที่รั่วไหลจากถังบรรจุน้ำมัน	Rhamnolipid	Harvey และคณะ (1990)
ช่วยให้น้ำมันดีเซลละลายในเฟสของเหลวได้ดีขึ้นเพื่อให้ต่อการย่อยสลาย	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	Ayed และคณะ (2015)
ชะโลหะหนักออกจากดินปนเปื้อน	Glycolipid	Yang และคณะ (2016)
อุตสาหกรรมอาหาร		
ลดความเสื่อมเสียและการปนเปื้อนของจุลินทรีย์	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	Mnif และคณะ (2012)
เพิ่มความคงตัวของมายองเนส	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	Campos และคณะ (2015)
เครื่องสำอาง		
ต้านจุลชีพและเพิ่มความชุ่มชื้นให้แก่ผิวหนัง	Sophorolipid	Cho และคณะ (2008)
สารบำรุงผิวหยาบกร้าน	Mannosylerythritol lipids	Kitagawa และคณะ (2006)
การเกษตร		
ยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคในพืช	Rhamnolipid	Sha และคณะ (2012)

ยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคในพืช เช่น *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., และ *Bipolaris sorokiniana* Surfactin และ Iturin A Velho และคณะ (2011)

การแพทย์

ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *Salmonella enterica* บนพลาสติกพีวีซี และสายท่อปัสสาวะ Surfactin Mireles และคณะ (2001)

กระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งตับในมนุษย์ H7402 Sophorolipid Chen และคณะ (2006)

สังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่มีคุณสมบัติในการต้านแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ และต้านเชื้อ *Candida albican* Rhamnolipid Kumar และคณะ (2010)

2.5.1 การใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอุตสาหกรรมปิโตรเลียม

เนื่องจากโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีทั้งส่วนที่มีขั้วและไม่มีขั้วทำให้ของเหลวผสมระหว่างน้ำมันและน้ำเกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เช่น ค่าแรงตึงผิว ค่าแรงตึงผิว ประจัน ความหนืด ขั้ว และความยืดหยุ่น เป็นต้น อุตสาหกรรมปิโตรเลียมจึงได้นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาช่วยเพิ่มการผลิตน้ำมันปิโตรเลียม (Microbial Enhancing Oil recovery, MEOR) เช่น การใช้จุลินทรีย์ย่อยสลายโมเลกุลน้ำมันให้เล็กลงเพื่อลดความหนืดของน้ำมัน การเติมจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเมือกพอลิแซ็กคาไรด์ และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ หรือการใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพใส่ลงไปโดยตรงเพื่อหล่อลื่นน้ำมันให้ไหลได้ดีขึ้นจะช่วยชะน้ำมันออกจากซอกหินภายในหลุมด้วยการลดค่าแรงตึงผิวประจันระหว่างน้ำมันและน้ำ ทำให้หินและรูพรุนในหินเปียก และทำให้เกิดอิมัลชัน (Khire, 2010) นอกจากนี้ยังใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เช่น อิมัลชัน มาใช้โดยให้เกิดเป็นอิมัลชันในลักษณะน้ำในน้ำมันเพื่อลดความหนืดและเพิ่มอัตราการไหลของน้ำมันปิโตรเลียมผ่านท่อขนส่ง (Perfumo และคณะ, 2010) การทำความสะอาดถังบรรจุน้ำมันโดยบริษัท wldrabel Italia และบริษัท Jeneil Biosurfactant ใช้แรมโนลิปิด น้ำ และสารหล่อลื่น (fluidizing agent) ปล่อยเข้าถึงในลักษณะวนรอบถังจนกระทั่งเกิดเป็นอิมัลชัน เมื่อหยุดระบบหมุนวน อิมัลชันจะแยกส่วนโดยส่วนบนเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ส่วนล่างเป็นน้ำ สารอนินทรีย์ และส่วนที่เป็นทรายจะตกลงสู่ก้นถัง (Pesce, 2002) และการประยุกต์ใช้กับเครื่องยนต์โดยผสมลงในน้ำมันดีเซล เนื่องจากน้ำมันดีเซลอิมัลชันนี้มีข้อดีคือ ปรับปรุงประสิทธิภาพการเผาไหม้ของเครื่องยนต์ ลดการปล่อยสารมลพิษ ลดการเผาไหม้ของเครื่องยนต์ดีเซล เชื้อเพลิงอิมัลชันนี้จะเป็นอิมัลชันแบบน้ำในน้ำมันดีเซลโดยมีสัดส่วนของน้ำอยู่ร้อยละ 10 ถึง 20 โดยปริมาตร ซึ่งจะประกอบไปด้วยสารลดแรงตึงผิวและสารเติมแต่งต่างๆ

เช่น สารชะล้างทำความสะอาด สารหล่อลื่น สารกำจัดโพลีเมอร์ สารเพิ่มประสิทธิภาพการเผาไหม้ สารต้านสนิม และ สารป้องกันการเกิดปฏิกิริยาของโลหะกับน้ำมัน สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะช่วยให้อิมัลชันมีความเสถียรและกระจายโมเลกุลของน้ำให้อยู่ในน้ำมันดีเซล (Perfumo และคณะ, 2010)

2.5.2 การใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการบำบัดทางชีวภาพ

การปนเปื้อนของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน โลหะหนัก และยาฆ่าแมลง ในแหล่งน้ำและดินส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตทั้งคนและสัตว์รวมถึงระบบนิเวศน์และระบบเศรษฐกิจ (Franzetti และคณะ, 2010) เนื่องจากอุตสาหกรรมปิโตรเลียมมีความสำคัญเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานและเป็นวัตถุดิบให้กับอุตสาหกรรมเคมี จึงมีการปนเปื้อนในน้ำและดินอันเนื่องมาจากการรั่วไหลจากแท่นขุดเจาะ ถึงบรรจุน้ำมัน ท่อส่งน้ำมัน (Xia และคณะ, 2014) นอกจากนี้การทำเหมืองแร่ โรงงานอุตสาหกรรม และการฝังกลบของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมยังส่งผลให้บริเวณโดยรอบปนเปื้อนไปด้วยโลหะหนัก โลหะหนักจะอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้ยาวนานกว่าสารประกอบไฮโดรคาร์บอนและยาฆ่าแมลง การละลายของโลหะหนักขึ้นกับค่าความเป็นกรดต่าง ทำให้โลหะหนักบางส่วนถูกนำไปใช้โดยสิ่งมีชีวิต ความเป็นพิษและอันตรายจากโลหะหนักจึงเกิดจากการปนเปื้อนในน้ำดื่ม และการสะสมในห่วงโซ่อาหาร (Hashim และคณะ, 2011; Luna และคณะ, 2016) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพถูกนำไปใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายสารปนเปื้อนจากอุตสาหกรรมปิโตรเลียมโดยใช้กลไก เช่น การก่ออิมัลชัน การลดค่าแรงตึงผิวของสารปนเปื้อนเพื่อให้จุลินทรีย์ย่อยสลายได้ง่ายขึ้น และการเพิ่มค่า hydrophobicity ให้แก่ผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ผู้ย่อยสลายทำให้จุลินทรีย์เข้าถึงสารปนเปื้อนได้ง่ายขึ้น อย่างไรก็ตามการบำบัดทางชีวภาพจะต้องใช้เวลานานขึ้นเมื่อสารปนเปื้อนเกาะติดอยู่ในรูหรือซอกขนาดเล็ก เช่น ซอกดิน ซอกหิน เป็นต้น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะช่วยลดค่าแรงตึงผิวของสารปนเปื้อน ลดค่าแรงตึงผิวประจันระหว่างสารปนเปื้อนและดิน และลดค่าแรงคาปิลลารี (Capillary) ระหว่างน้ำมันและดิน สำหรับการบำบัดโลหะหนักที่ตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อม สารลดแรง-ตึงผิวชีวภาพจะเข้าไปจับกับโลหะหนัก ลดค่าแรงตึงผิวประจันระหว่างโลหะหนักและพื้นผิวทำให้สามารถชะโลหะหนักออกมาได้ (Franzetti และคณะ, 2010; Hashim และคณะ, 2011)

2.5.3 การใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอุตสาหกรรมอาหาร

การใช้สารเติมแต่งในอุตสาหกรรมอาหารมีความสำคัญและจำเป็นในขั้นตอนการผลิต การบรรจุ การเก็บรักษา และการขนส่ง เพื่อปรับปรุงลักษณะทางกายภาพ เคมี ชีวภาพ หรือรสชาติของอาหารให้ดียิ่งขึ้น โดยจะต้องมีความปลอดภัย ไม่เป็นพิษ เพื่อให้สอดคล้องกับความต้องการของผู้บริโภคที่มีค่านิยมลดการบริโภคอาหารที่มีสารสังเคราะห์เป็นองค์ประกอบ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจึงมีบทบาทสำคัญเนื่องจากการมีคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์ เช่น เป็นสารให้ความคงตัว ทำให้ขึ้น และ

ก่ออิมัลชัน เป็นต้น สามารถนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ ได้หลายชนิด เช่น เบเกอรี่ ไอศกรีม โยเกิร์ต น้ำสลัด ซอส และ เนย เป็นต้น นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพบางชนิดยังมีคุณสมบัติต้านจุลชีพและป้องกันการยืดเกาะของจุลินทรีย์ จึงถูกนำไปใช้เพื่อควบคุมการปนเปื้อนของแบคทีเรียในอาหาร ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค และป้องกันการสร้างไบโอฟิล์มหรือเมือกบนผิวหน้าอาหาร ส่งผลให้อาหารมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค ยืดอายุการเก็บรักษาอาหาร และลดการเน่าเสียของอาหาร (Nitschke และ Costa, 2007; Campos และคณะ, 2013)

2.5.4 การใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอุตสาหกรรมความงาม

เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ มีความเป็นพิษต่ำ และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม จึงมีความเหมาะสมต่อการนำมาประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอาง สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในผลิตภัณฑ์เพื่อการทำผิวสะอาดและเครื่องสำอาง ได้แก่ โซโฟโรลิปิด แรมโนลิปิด และ แมนโนซิลอิริธรีออล ลิปิด เป็นต้น ซึ่งมีคุณสมบัติหลากหลาย เช่น ก่ออิมัลชัน ที่ทำให้สิ่งสกปรกเปื่อยก ช่วยในการละลาย การกระจาย และการเกิดฟอง (Lourith และ Kanlayavattanakul, 2009)

2.5.4.1 โซโฟโรลิปิด

โซโฟโรลิปิดมีข้อดีคือปกป้องเส้นผมและเพิ่มความชุ่มชื้นให้กับผิวหนัง โซโฟโรลิปิดถูกผลิตโดยบริษัท Kao Co. Ltd และจำหน่ายทางการค้าในรูปของโลชั่นบำรุงผิวและเครื่องสำอาง ภายใต้ยี่ห้อการค้า Sofina และ Soliance เช่น ลิปสติก ดินสอเขียนขอบปาก ที่ทาตา และแป้งทาหน้า เป็นต้น เนื่องจากมีคุณสมบัติในการต่อต้านอนุมูลอิสระ ช่วยเพิ่มความชุ่มชื้นให้กับผิวหนัง กระตุ้นการทำงานของเซลล์ผิวหนังและการสังเคราะห์คอลลาเจน นอกจากนี้โซโฟโรลิปิดยังมีคุณสมบัติในการต่อต้านจุลชีพจึงถูกนำไปใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เพื่อรักษาสิว ขจัดรังแค และกำจัดกลิ่นกาย (Lourith และ Kanlayavattanakul, 2009)

2.5.4.2 แรมโนลิปิด

แรมโนลิปิดถูกนำไปใช้อย่างกว้างขวางในผลิตภัณฑ์บำรุงผิวลดริ้วรอย เนื่องจากสามารถเข้ากับผิวหนังได้ดีและก่ออาการระคายเคืองผิวได้ต่ำ นอกจากนี้แรมโนลิปิดยังก่ออิมัลชันได้ดี และลดค่าแรงตึงผิวได้สูงจึงถูกนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์ดูแลสุขภาพ เช่น ยาไล่แมลง ยาลดกรด แผ่นแปะสิว ผลิตภัณฑ์ขจัดรังแค น้ำยาล้างคอนแทคเลนส์ (contact lens) สารกำจัดกลิ่น ผลิตภัณฑ์ดูแลเล็บ และยาสีฟัน เป็นต้น (Lourith และ Kanlayavattanakul, 2009)

2.5.4.3 แมนโนซิลอิริธรีออล ลิปิด

แมนโนซิลอิริธรีออล ลิปิด มีคุณสมบัติในการเพิ่มความชุ่มชื้นให้แก่ผิว ปกป้องและซ่อมแซมเส้นผมที่แห้งเสียจากสารเคมี ปกป้องเซลล์ผิวจากสารอนุมูลอิสระ จึงถูกนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์เพื่อการบำรุงผมและบำรุงผิว ลดริ้วรอย เครื่องสำอาง ครีมรองพื้นและแป้งรองพื้นซึ่งจะช่วยให้รองพื้นกันน้ำได้ดีขึ้นและยังคงความชุ่มชื้นให้แก่ผิวหน้า (Morita และคณะ, 2013)

2.5.5 การใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการเกษตร

การเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรเพื่อตอบสนองความต้องการอาหารของประชากรมนุษย์เป็นปัญหาความกังวลระดับโลก การเกษตรแบบยั่งยืนและความมั่นคงทางอาหารจึงเป็นเรื่องสำคัญนำไปสู่การปรับปรุงคุณภาพดินเพื่อเพิ่มผลผลิต การเติมจุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลงในดินจะช่วยบำรุงดิน และเพิ่มปริมาณสารอาหารที่พืชจะนำไปใช้ได้ และยังช่วยในด้านการบำบัดดินที่ปนเปื้อนจากน้ำมันปิโตรเลียม โลหะหนัก และสารเคมีกำจัดศัตรูพืช นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังถูกนำไปประยุกต์ใช้เพื่อควบคุมกำจัดจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในพืช และถูกนำไปใช้ทดแทนสารสังเคราะห์ทางเคมีที่เป็นองค์ประกอบในสารกำจัดศัตรูพืช (Sachdev และ Cameotra, 2013)

2.5.6 การใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในด้านการแพทย์

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพถูกนำไปประยุกต์ใช้ทางการแพทย์อย่างกว้างขวางเนื่องจากการมีคุณสมบัติในการต่อต้านจุลชีพ ทั้งแบคทีเรีย รา และไวรัส อีกทั้งยังสามารถยับยั้งการเกาะติดและการสร้างไบโอฟิล์มบนอุปกรณ์การแพทย์ เช่น สายต่อให้อาหาร หรือสายต่อปัสสาวะ ซึ่งจะทำให้เกิดอันตรายแก่ผู้ป่วย สารลดแรงตึงผิวชีวภาพบางชนิด เช่น เซอร์แฟคทีน แมนโนซิลอิริธรีออล ลิปิด และอีธาโรส ลิปิด ถูกนำมาใช้ ในการยับยั้งการอักเสบ ต่อต้านการเกิดเนื้องอก ยับยั้งการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้ในผู้ป่วยที่เปลี่ยนถ่ายอวัยวะ นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังถูกนำไปประยุกต์เป็นสารที่ช่วยในการส่งผ่านยีน และการนำส่งยา เช่น อนุภาคนาโน (Fracchia และคณะ, 2012)

2.6 สารประกอบชีวภาพที่ผลิตได้จาก *A. pullulans*

2.6.1 *A. pullulans*

A. pullulans เป็นราคล้ายยีสต์ (yeast-like fungus) เดิมจัดจำแนกอยู่ในชั้น Deuteromycetes หรือ Fungi imperfecti ปัจจุบันมีการจัดจำแนกทางอนุกรมวิธานให้อยู่ในไฟลัม Ascomycota ชั้น Deuteromycetes อันดับ Dothideales วงศ์ Aureobasidiaceae สามารถแบ่งออกเป็น 3 varieties ได้แก่ *Aureobasidium pullulans* var. *pullulans*, *A. pullulans* var.

หน่อได้บลาสโตสปอร์ใหม่ ลักษณะที่ 2 บลาสโตสปอร์สร้างเส้นใยเทียมมีลักษณะเป็นเซลล์ใหม่ที่ต่อจากเซลล์เดิม ลักษณะที่ 3 บลาสโตสปอร์กลายเป็นเซลล์พอง จากนั้นเซลล์พองนี้อาจเกิดการแตกหน่อเป็นบลาสโตสปอร์ใหม่ หรือสร้างท่ออก (germ tube) แล้วกลายเป็นเส้นใย หรือเซลล์พอง อาจจะสร้างผนังกันขึ้นมา เซลล์พองที่มีผนังกันนี้สามารถแตกหน่อเป็นบลาสโตสปอร์ใหม่ได้หรือสร้างท่ออกเพื่อกลายเป็นเส้นใยได้เช่นกัน หรือผนังของเซลล์อาจจะหนาขึ้นกลายเป็นคลาไมโดสปอร์ (Clamydospore) คลาไมโดสปอร์จะสามารถแตกหน่อเป็นบลาสโตสปอร์ใหม่ หรือสร้างท่ออกและเปลี่ยนเป็นเส้นใยได้ ในทางกลับกันเส้นใยจะผลิตเม็ดสีและเปลี่ยนไปเป็นคลาไมโดสปอร์ได้

A. pullulans เป็นราที่สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ในดิน ตะกอนในมหาสมุทร ดินบริเวณปากแม่น้ำ น้ำทะเล ดอกไม้ป่า เนื้อไม้ หินปูน ผลองุ่น ธารน้ำแข็งอาร์กติก ถังน้ำมัน บนพื้นผิวพลาสติก หรือบริเวณที่มีความชื้นสูง เช่น ผนังห้องน้ำ ม่านห้องน้ำ ห้องครัว ขอบหน้าต่าง เป็นต้น (Deshpande และคณะ, 1992; Urzi และคณะ, 1999; Gunde-Cimerman และคณะ, 2000; Zalar และคณะ, 2008; Gostinčar และคณะ, 2014) พบได้ทั้งในหลายเขตอากาศ เช่น ร้อน แห้ง แล้ง อบอุ่น หนาว และขั้วโลก เป็นต้น เช่น Thaniyavarn และคณะ (2013) ได้คัดแยก *A. pullulans* สายพันธุ์ YTP6-14 จากตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณเกาะสีซัง จังหวัดชลบุรี ประเทศไทย ซึ่งเป็นเขตร้อน ส่วน Kim และคณะ (2015) แยก *A. pullulans* สายพันธุ์ L3-GPY จากดอกกลีบลีเลีย เสือ เขตอุลจิน (Ujin) ประเทศเกาหลีใต้

A. pullulans มีความสำคัญในอุตสาหกรรมเนื่องจากสามารถผลิตสารได้หลากหลายชนิด เช่น เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารมีชื่อว่าพูลลูแลน (Pullulan) ซึ่งประกอบด้วยหน่วยของน้ำตาลมอลโตไตรโอส (Maltotriose) ต่อกันเป็นสายยาว นอกจากนี้ยังผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ เช่น บีตา-กลูแคน (β -glucan) สารฆ่ารา สารต้านแบคทีเรีย สารลดแรงตึงผิว ชีวภาพ และเอนไซม์ ต่างๆ เช่น อะไมเลส เซลลูเลส โปรติเอส แพคตินเอส และไลเปส เป็นต้น (Gostin และคณะ, 2014) ดังตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 การประยุกต์ใช้สารประกอบชีวภาพที่ผลิตโดย *A. pullulans*

ผลิตภัณฑ์	การประยุกต์ใช้
พอลิแลน	ฟิล์มที่มีคุณสมบัติในการป้องกันการซึมผ่านของออกซิเจน (oxygen-impermeable film) สารเพิ่มความข้นหนืด สารยึดติดหรือสารหล่อลื่น สารผสมในอาหารที่มีแคลอรีต่ำ สารต้านการจับตัวเป็นก้อนของเลือด ใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับอุตสาหกรรมทางเคมี
อะไมเลส	ใช้ในขั้นตอนการย่อยแป้ง สารลอกแป้งออกในอุตสาหกรรมผ้า เป็นสารเติมในผลิตภัณฑ์ซักล้าง ใช้ในการผลิตเอทานอล ใช้ในการวิเคราะห์ทางการแพทย์และเคมีคลินิก ใช้ในการผลิตน้ำเชื้อที่มีปริมาณมฟรุกโทสสูง และยังใช้ในการผลิตยีสต์ และจุลินทรีย์อื่นๆ
เซลลูเลส	ใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอทั้งการปรับปรุงเส้นใยเซลลูเลสและการฟอกผ้า เป็นสารเติมในผลิตภัณฑ์ซักล้าง ใช้ผลิตโปรตีนเซลล์เดียวและเชื้อเพลิงชีวภาพ และใช้ในการบำบัดของเสีย
ไลเปส	ใช้เป็นสารเร่งปฏิกิริยา เช่น ไฮโดรไลซิส อินเทอร์-เอสเทอร์ริฟิเคชัน แอลกอฮอล์ไลซิส อะดิโกลิซิส เอสเทอร์ริฟิเคชัน และ อะมิโนไลซิส เป็นต้น และใช้ในการผลิตไบโอดีเซล
อัลคาไลน์ ไลเปส	เป็นสารเติมในผลิตภัณฑ์ซักล้าง ใช้ในการแยกโลหะเงิน ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและอาหารสัตว์ อุตสาหกรรมเคมี บำบัดของเสีย และใช้ในการย่อยโปรตีน
ไซแลนเนส	ใช้ในอุตสาหกรรมกระดาษ อุตสาหกรรมอาหาร และใช้ในการบำบัดของเสีย
β -Fructofuranosidase และ Maltosyl Transferase	บรรเทาอาการท้องผูก ปรับปรุงองค์ประกอบของของเหลวในเลือดในผู้ที่มีไขมันในเลือดสูง เพิ่มประสิทธิภาพของการดูดซึมแคลเซียมและแมกนีเซียม ยังยับยั้งการผลิตสารเน่าเสียในลำไส้ และยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จำพวก bifidobacterium
แมนนาเนส	ใช้ฟอกเยื่อกระดาษ ใช้ในการเปลี่ยนของเสียชีวมวลให้กลายเป็นน้ำตาลเพื่อใช้ในการหมัก เพิ่มคุณค่าทางโภชนาการในอาหารสัตว์ ใช้ลดความหนืดของสารสกัดจากกาแฟ และใช้ในการผลิตแมนโน - โอลิโกแซ็กคาไรด์
โปรตีนเซลล์เดียว	ใช้เป็นอาหารสัตว์และอาหารมนุษย์ ใช้เป็นแหล่งโปรตีนสำหรับการผลิตสารเปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive peptide)
การควบคุมทางชีวภาพ	ใช้ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในผลไม้ ธัญพืชและผัก
ไซเตอโรเฟอร์	ใช้ในทางการแพทย์ ใช้ในการแยกโลหะและบำบัดของเสีย

ที่มา : Chi และคณะ (2009)

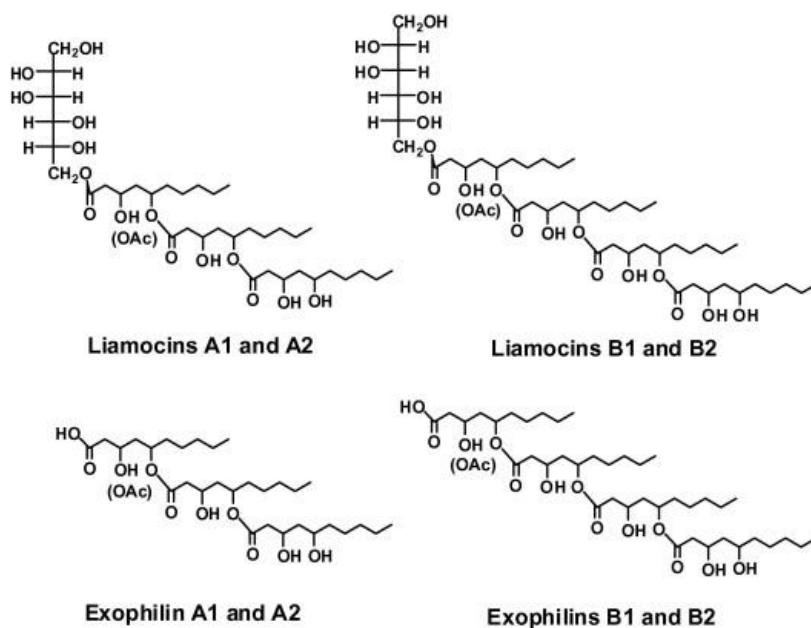
นอกจากนี้ *A. pullulans* ยังสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและน้ำมันที่มีคุณสมบัติในการลดค่าแรงตึงผิวได้หลายชนิด เช่น น้ำมัน Liamocin และ Massoia lactone เป็นต้น

2.6.2 น้ำมันที่หนักกว่าน้ำ (Heavy oil, HO) จาก *A. pullulans*

นักวิจัยหลายกลุ่มได้รายงานว่ *A. pullulans* หลายสายพันธุ์สามารถผลิตน้ำมันที่หนักกว่าน้ำเมื่อเจริญอยู่ในชั้นทุติยภูมิและปลดปล่อยออกนอกเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณไนโตรเจนจำกัดและมีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลหรือน้ำตาลแอลกอฮอล์ มีลักษณะเป็นหยดน้ำมันลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อและเกาะที่ก้นหรือผนังของขวดรูปชมพู่ น้ำมันนี้จะตกลงอยู่ใต้ชั้นเซลล์เมื่อนำน้ำหมักไปปั่นเหวี่ยง น้ำมันที่สกัดได้มีความสามารถในการลดแรงตึงผิวเช่นเดียวกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่อยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อ

Kurosawa และคณะ (1994) พบว่าจุลินทรีย์สกุล *Aureobasidium* sp. ผลิตน้ำมันและปลดปล่อยออกนอกเซลล์เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลซูโครสร้อยละ 12 น้ำมันที่ผลิตออกมานั้นมีองค์ประกอบเป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันที่ต่อกับน้ำตาลอะราบิทอล (Arabitol) หรือน้ำตาลแมนนิทอล (Mannitol) โดยกรดไขมันที่พบมี 2 ชนิด คือ 3,5-dihydroxydecanoic acid และ 5-hydroxy-2-decanoic acid

Manitchotpisit และคณะ (2011) ได้รายงานว่ *A. pullulans* จำนวน 21 สายพันธุ์สามารถผลิตน้ำมันที่หนักกว่าน้ำได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลซูโครสร้อยละ 5 โดยสายพันธุ์ CU 43 ผลิตน้ำมันได้สูงสุด 6 กรัมต่อลิตรในวันที่ 6 จากนั้น Price และคณะ (2013) ได้ศึกษาโครงสร้างน้ำมันที่ผลิตจากสายพันธุ์ NRRL 50380 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลซูโครสร้อยละ 5 และให้ชื่อน้ำมันเลียโมซิน (Liamocin) มีคุณสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ แบ่งได้เป็น 4 แบบ คือ A1, A2, B1 และ B2 มีโครงสร้างเป็นน้ำตาลแมนนิทอลต่อกับเอสเทอร์ของกรด 3,5-hydroxydecanoic จำนวน 3 ถึง 4 กลุ่ม และอาจมีบางส่วนต่อกับหมู่อะเซทิล (acetyl) แบบ A มีเอสเทอร์ของกรด 3,5-hydroxydecanoic จำนวน 3 กลุ่ม ในขณะที่ แบบ B มี 4 กลุ่ม A1 และ B1 ไม่มีหมู่อะเซทิลในโครงสร้าง แต่ A2 และ B2 หมู่อะเซทิลในโครงสร้าง นอกจากนี้ยังพบโครงสร้างที่ไม่มีน้ำตาลแมนนิทอล เรียกว่า เอ็กโซฟิลิน (Exophilin) มีความแตกต่างกันดังรูปที่ 2.16



รูปที่ 2.16 โครงสร้างของ Liamocin และ Exophilin

ที่มา : Price และคณะ (2013)

Leathers และคณะ (2015) ได้ทำการเลี้ยง *A. pullulans* จำนวน 6 สายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิดที่มีองค์ประกอบดังตารางที่ 2.6 โดยอาหารทุกชนิดจำกัดปริมาณไนโตรเจนและมีปริมาณคาร์บอนเกินพอเพื่อให้จุลินทรีย์นำไปใช้ในการผลิตสารทุติยภูมิ เช่น พอลูแลน กรดโพลีแลคติก (Poly β -L-malic acid) และเลียมอซิน พบว่าสายพันธุ์และแหล่งคาร์บอนมีผลต่อการเจริญ การผลิตเลียมอซิน และการสร้างเม็ดสี แต่อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและชนิดของเลียมอซินยังไม่ชัดเจน

Leathers และคณะ (2016) พบว่า *A. pullulans* ผลิตน้ำมันที่หนักกว่าน้ำโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟางข้าวที่ผ่านการย่อยด้วยอัลคาไลน์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (alkaline hydrogen peroxide) ร่วมกับเอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) เบต้า-กลูโคซิเดส (β -glucosidase) และ ไชลานเนส (Xylanase) ทำให้ได้น้ำมันที่ปราศจากสีดำเมลานิน (Melanin)

ต่อมา Price และคณะ (2016) พบว่าแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ (Polyol) เช่น ดี-แมนนิทอล (D-Mannitol) ดี-ซอร์บิทอล (D-Sorbitol) ดี-กาแล็คทิทอล (D-Galactitol) ดี-อราบิทอล (D-Arabitol) แอล-อราบิทอล (L-Arabitol) ดี-ไซลิตอล (D-Xylitol) ดี-ริบิทอล (D-Ribitol) แอล-ธรีอิตอล (L-Threitol) ดี-ธรีอิตอล (D-Threitol) เมโซ-อีริทริทอล (Meso-erythritol) และ ดี-

กลีเซอรอล (D-Glycerol) ส่งผลต่อโครงสร้างส่วนหัวที่ของเลียวโมซินที่ผลิตโดย *A. pullulans* NRRL 50380 ให้เปลี่ยนจากน้ำตาลแมนนิทอลเป็นน้ำตาลอราบิทอล

ตารางที่ 2.6 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตน้ำมันจาก *A. pullulans*

องค์ประกอบ	อาหารชนิด A	อาหารชนิด B	อาหารชนิด C	อาหารชนิด D
Sucrose	5			
Glucose		12	1	8
Peptone	0.06			
Yeast extract	0.04	0.02		0.02
L-Asparagine-H ₂ O			0.05	
NaNO ₃		0.15		
KNO ₃		0.1		
(NH ₄)SO ₄				0.02
Sea salts			4	
NaCl	0.1			
CaCl ₂				0.015
K ₂ HPO ₄	0.5	0.005	0.05	0.7
Na ₂ PO ₄				0.25
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.04	0.02		0.15
FeCl ₃ ·7H ₂ O				0.015
MnSO ₄ ·H ₂ O				0.002
ZnSO ₄ ·7H ₂ O		0.02		0.002
pH	6.5	5.5	7.0	6.0

ที่มา : Leathers และคณะ (2015)

Wang และคณะ (2014) แยกเชื้อ *A. pullulans* var. *melanogenum* สายพันธุ์ P10 จากป่าชายเลน สามารถผลิตน้ำมันได้ร้อยละ 66 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 10 ลิตร ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสร้อยละ 8 เป็นเวลา 5 วัน น้ำมันที่ผลิตได้มีองค์ประกอบเป็นกรดไขมัน C16:0 ร้อยละ 26.7 C16:1 ร้อยละ 1.7 C18:0 ร้อยละ 6.1 C18:1 ร้อยละ 44.5 และ C18:2 ร้อยละ 21.0

Liu และคณะ (2014) แยกเชื้อ *A. pullulans* var.*melanogenum* สายพันธุ์ P5 จากป่าชายเลน สามารถผลิตน้ำมันที่หนักกว่าน้ำได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 12 และสารสกัดจากข้าวโพดร้อยละ 0.1 พบว่าสามารถผลิตน้ำมันได้ 32.5 กรัมต่อลิตร ในถังหมักขนาด 10 ลิตร โดยใช้เวลา 7 วัน น้ำมันที่ได้มีองค์ประกอบเป็นอัลเคนสายยาวร้อยละ 66.15 และกรดไขมันร้อยละ 26.4 ซึ่งเป็น C16:0 ร้อยละ 21.2 C16:1 ร้อยละ 2.8 C18:0 ร้อยละ 2.9 C18:1 ร้อยละ 39.8 และ C18:2 ร้อยละ 33.3

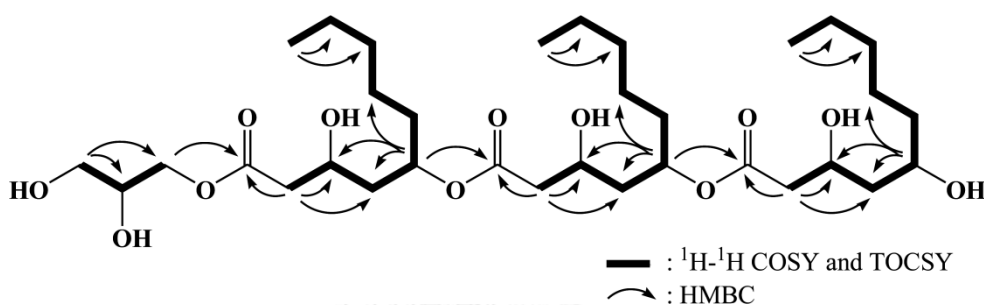
น้ำมันที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* ถูกนำไปประยุกต์ใช้ในการทางการแพทย์เพื่อเป็นสารยับยั้งเซลล์มะเร็งและสารต้านแบคทีเรีย และอุตสาหกรรมน้ำมัน ดังตารางที่ 2.7 โดย Manitchotpisit และคณะ (2014) รายงานว่าน้ำมัน Liamocin จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ RSU สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมได้ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 32.1 ± 1.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และน้ำมัน Liamocin จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ RSU 21 สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูก โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 63.1 ± 2.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร Bischoff และคณะ (2015) พบว่าน้ำมัน Liamocin สามารถต้านแบคทีเรียได้หลายชนิด ได้แก่ *E. faecalis* สายพันธุ์ ATCC 29212, *S. agalactiae* สายพันธุ์ NRRL B-1815, *S. mutans* สายพันธุ์ ATCC 25175, *S. infantarius* สายพันธุ์ NRRL B-41208 และ *S. uberis* นอกจากนี้ Wang และคณะ (2014) พบว่าน้ำมันที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* var.*melanogenum* สายพันธุ์ P10 มีองค์ประกอบเป็นกรดไขมันสามารถนำไปผลิตเป็นน้ำมันดีเซล และน้ำมันดีเซลที่ผลิตได้นี้สามารถจุดติดไฟได้ดี

ตารางที่ 2.7 การประยุกต์ใช้น้ำมันที่ผลิตได้จาก *A. pullulans*

จุลินทรีย์	การนำไปประยุกต์ใช้	แหล่งอ้างอิง
<i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ RSU 9	ยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม	(Manitchotpisit และคณะ, 2014)
<i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ RSU 21	ยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูก	(Manitchotpisit และคณะ, 2014)
<i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 50380	ต้านแบคทีเรีย <i>E. faecalis</i> ATCC 29212, <i>S. agalactiae</i> NRRL B-1815, <i>S. mutans</i> ATCC 25175, <i>S. infantarius</i> NRRL B-41208, <i>S. uberis</i> ,	(Bischoff และคณะ, 2015)
<i>A. pullulans</i> var. <i>melanogenum</i> สายพันธุ์ P10	ผลิตน้ำมันดีเซลจุดติดไฟ	(Wang และคณะ, 2014)

2.6.3 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จากน้ำหมักเลี้ยงเชื้อ *A. pullulans*

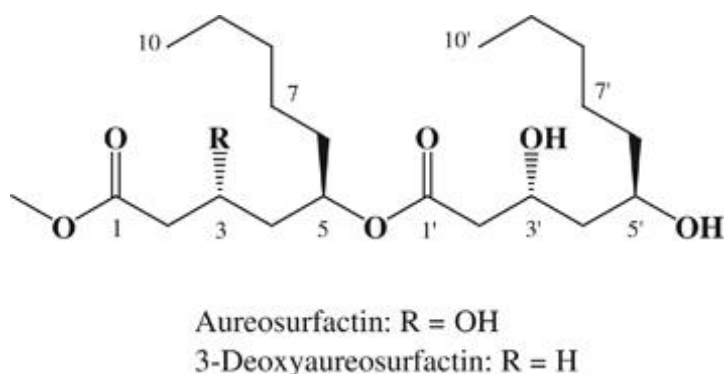
นอกจาก *A. pullulans* จะผลิตน้ำมันและปลดปล่อยออกนอกเซลล์แล้วยังผลิตสารประกอบชีวภาพในน้ำหมักเลี้ยงเชื้อ โดยสารประกอบชีวภาพดังกล่าวนี้มีคุณสมบัติในการลดค่าแรงตึงผิว Kim และคณะ (2015) รายงานว่า *A. pullulans* สายพันธุ์ L3-GPY สามารถผลิตกลีเซอรอล-เลียโมซิน (Glycerol-Liamocin) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GPY ที่มีน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 4 มีโครงสร้างเป็นกลีเซอรอลต่อกับเอสเทอร์ของกรด 3,5-hydroxydecanoic ดังรูปที่ 2.17 มีน้ำหนักโมเลกุล 650 ดาลตันสามารถลดแรงตึงผิวของน้ำจาก 72.8 ลงเหลือ 31.5 มิลลินิวตันต่อเมตร (mN/m) ที่ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร



รูปที่ 2.17 โครงสร้างของ Glycerol-Liamocin

ที่มา : Kim และคณะ (2015)

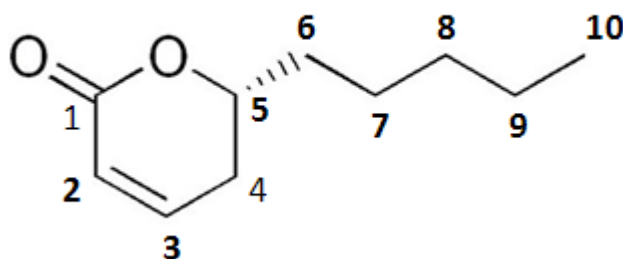
ต่อมา Kim และคณะ (2016) ได้เลี้ยง *A. pullulans* สายพันธุ์ L3-GPY ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยกลีเซอรอลร้อยละ 4 ในถังหมักขนาด 300 ลิตร เป็นเวลา 136 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สามารถสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดใหม่ได้ 2 ชนิด คือ ออริโอเซอร์เฟคติน (Aureosurfactin) และ 3-ดีออกซีออริโอเซอร์เฟคติน (3-deoxyaureosurfactin) มีโครงสร้างดังรูปที่ 2.18 มีลักษณะเป็นน้ำมันไม่มีสี มีน้ำหนักโมเลกุล 404 และ 388 ดาลตัน ตามลำดับ และที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถลดค่าแรงตึงผิวของน้ำลงเหลือเพียง 29.5 และ 36.4 ดายน์ต่อเซนติเมตร (dyne/cm) ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร



รูปที่ 2.18 โครงสร้างของ Aureosurfactin และ 3-deoxyaureosurfactin

ที่มา : Kim และคณะ (2016)

A. pullulans สายพันธุ์ YTP6-14 ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส ร้อยละ 2.5 และกลีเซอรอลร้อยละ 2.5 สารสกัดหยาบมีค่าความเข้มข้นวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ เท่ากับ 39 มิลลิกรัมต่อลิตร และก่ออิมัลชันได้ดีในน้ำมันรำข้าว ทนต่อความเข้มข้นเกลือ ความเป็นกรดต่าง และอุณหภูมิได้ดี และพบว่ามีแมสซอย แลคโตน (Massoia lactone, 5-hydroxy-2-decenoic acid delta lactone) เป็นองค์ประกอบและมีคุณสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ มีมวลโมเลกุล 168 ดาลตัน และมีโครงสร้างดังรูปที่ 2.19 (สุดารัตน์ ลือพงศ์พัฒนา, 2557)



รูปที่ 2.19 โครงสร้างของ Massoia lactone

ที่มา : สุดารัตน์ ลือพงศ์พัฒนา (2557)

2.6.4 การเก็บสะสมสารประกอบชีวภาพไว้ภายในเซลล์

A. pullulans ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และน้ำมัน แล้วหลั่งออกนอกเซลล์ แต่ไม่มีงานวิจัยใดที่รายงานว่ามีการสะสมสารประกอบเหล่านี้ไว้ภายในเซลล์ อย่างไรก็ตามงานวิจัยจำนวนมากพบว่าจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และ ลิปิด แล้วสะสมไว้ภายในเซลล์ เช่น *Lactobacillus pentosus* ผลิตและสะสมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไว้ภายในเซลล์ 4.8 มิลลิกรัมต่อลิตร (Rivera และคณะ, 2007) *Candida antarctica* ผลิตแมนโนซิลอีรีทรีธอล ลิปิด โดยทั้งสะสมและปลดปล่อยออกนอกเซลล์ (Kitamoto และคณะ, 2002)

สารประกอบชีวภาพชนิดอื่นที่ผลิตโดย *A. pullulans* เช่น เอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรส (Fructosyltransferase) เป็นที่ทราบกันดีว่าเมื่อผลิตแล้วจะถูกหลั่งออกนอกเซลล์และสะสมไว้ภายในเซลล์ ดังนั้นในการสกัดเอนไซม์ที่สะสมไว้ภายในจึงทำได้หลากหลายวิธีทั้งการบด และการใช้คลื่นเสียงในการทำให้เซลล์แตก โดยงานวิจัยของ Lateef และคณะ (2007) ได้ใช้คลื่นเสียงกำลัง (acoustic power) 20 วัตต์ เป็นเวลา 9 นาที

2.7 ไบโอฟิล์ม

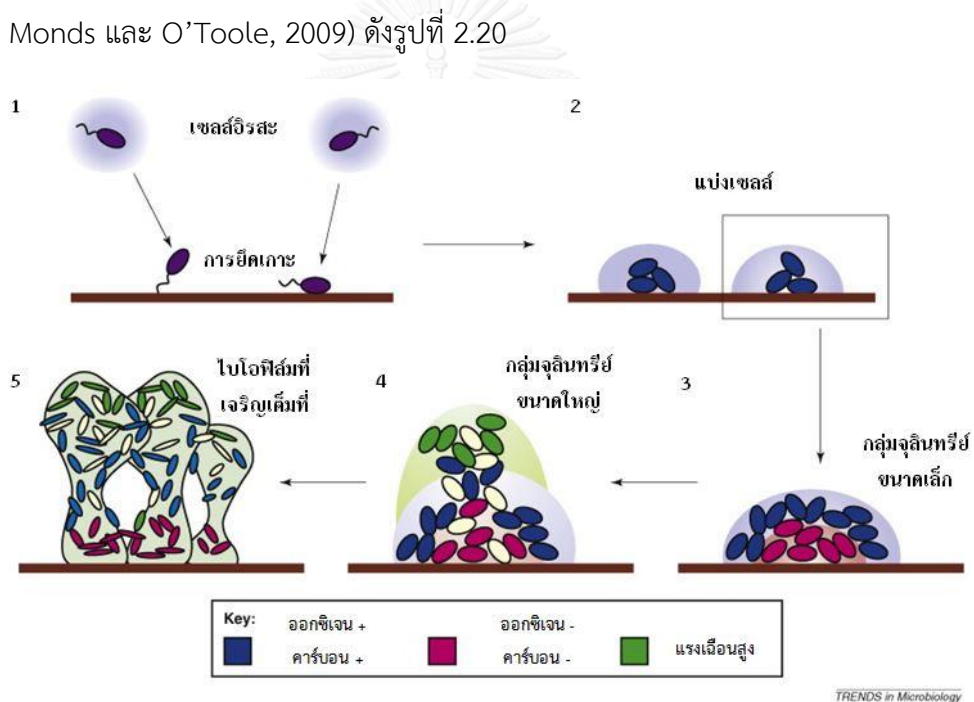
จุลินทรีย์ในธรรมชาติมักจะเกาะติดกับพื้นผิวที่เป็นของแข็งและสร้างแผ่นไบโอฟิล์ม ไบโอฟิล์มมีโครงสร้างเป็นสามมิติประกอบด้วยเซลล์จุลินทรีย์และพอลิเมอร์ที่จุลินทรีย์หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ เช่น คราบสกปรกบนสุขภัณฑ์ในห้องน้ำ ท่อน้ำทิ้ง หรือแม้กระทั่งท่อน้ำประปา สารประกอบชีวภาพหลายชนิดเช่น สารพิษและเอนไซม์จะถูกผลิตอยู่ภายในกลุ่มเซลล์ไบโอฟิล์ม เซลล์ไบโอฟิล์ม (Biofilm cell) มีความแตกต่างจากเซลล์ที่อยู่เป็นอิสระ (Planktonic cell) ในปัจจัยต่างๆ เช่น ปริมาณอาหาร การแลกเปลี่ยนแก๊ส และแรงเฉือนจากการกวน ปัจจัยเหล่านี้ทำให้เชื้อก่อโรคสามารถต้านทานยาปฏิชีวนะได้มากขึ้น มีความรุนแรงมากขึ้นและยากต่อการกำจัดด้วยสารเคมี (Banat และคณะ, 2014)

2.7.1 การเกิดไบโอฟิล์ม

ขั้นตอนการเกิดไบโอฟิล์มเป็นขั้นตอนที่ซับซ้อน ประกอบไปด้วยขั้นตอนหลักๆ 3 ขั้นตอน คือ การยึดเกาะ (Attachment) การเจริญของไบโอฟิล์ม (Maturation) และการหลุด (Detachment) เพื่อกลับไปเป็นเซลล์อิสระ (free living cell)

เซลล์จุลินทรีย์ที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมอย่างอิสระและไม่ยึดเกาะพื้นผิวใดๆ แบคทีเรียอาจจะยึดเกาะกับพื้นผิววัสดุโดยอาศัยโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการยึดเกาะ เช่น Pili และ Fimbria พื้นผิวของวัสดุและสิ่งแวดล้อมจะส่งผลต่อการยึดเกาะเช่นกัน เมื่อเซลล์เกาะกับพื้นผิวแล้วจะสามารถกลับไปเป็นเซลล์อิสระได้อีก หรือแบ่งเซลล์เจริญเติบโตต่อไปบนพื้นผิว ในช่วงแรกเซลล์ที่อยู่ใกล้ๆ กัน จะไม่

ส่งผลกระทบซึ่งกันและกันเนื่องจากมีออกซิเจนและแหล่งคาร์บอนเพียงพอ แต่เมื่อเจริญเติบโตมากขึ้นจนซ้อนทับกันเป็นกลุ่มขนาดเล็ก (microcolony) เซลล์ที่อยู่บริเวณพื้นผิววัสดุจะขาดออกซิเจนและแหล่งคาร์บอนจึงต้องมีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมดังกล่าว ทำให้เกิดความหลากหลายในไบโอฟิล์ม จากนั้นกลุ่มเซลล์จะสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ ออกมาเพื่อยึดกลุ่มจุลินทรีย์เป็นร่างแหทำให้ไบโอฟิล์มเจริญสูงขึ้นในแนวตั้ง (macrocolony) ส่งผลให้ได้รับออกซิเจนและแหล่งคาร์บอนมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามเมื่อไบโอฟิล์มสูงขึ้นก็จะทำให้มีแรงเฉือนเพิ่มขึ้นที่บริเวณส่วนบนของไบโอฟิล์ม กลุ่มเซลล์บริเวณนี้จึงมีการปรับตัวแตกต่างจากเซลล์ที่อยู่ภายในไบโอฟิล์ม จากนั้นกลุ่มจุลินทรีย์ขนาดใหญ่ก็จะเจริญเติบโตต่อไปมีรูปร่างคล้ายเห็ด หรืออาจมีลักษณะเป็นก้อนแบน กลุ่มเซลล์ขนาดใหญ่นี้อาจถูกชะจนแตกออกและปลดปล่อยเซลล์ที่เกาะกลุ่มกันอยู่ภายในออกมา ทำให้เซลล์กลับมาอยู่อย่างอิสระอีกครั้ง (Costerton และคณะ, 1995; Elasri และ Miller, 1999; O'Toole และคณะ, 2000; Monds และ O'Toole, 2009) ดังรูปที่ 2.20



รูปที่ 2.20 ขั้นตอนการเกิดไบโอฟิล์ม

ที่มา : Monds และ O'Toole (2009)

พอลิแซ็กคาไรด์ มีความสำคัญต่อการสร้างไบโอฟิล์มหลายประการ เช่น มีโครงสร้างสามมิติเป็นที่ยึดเกาะของเซลล์ไบโอฟิล์ม เป็นแหล่งอาหารให้กับเซลล์ และปกป้องเซลล์ไบโอฟิล์มจากการขาดน้ำ ยาปฏิชีวนะ รังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV) และความเป็นกรด-ด่าง (pH) เป็นต้น นอกจากนี้พอลิแซ็กคาไรด์ยังมีหน้าที่อีกหลายอย่างดังตารางที่ 2.8

ตารางที่ 2.8 หน้าที่ของพอลิแซ็กคาไรด์ต่อการสร้างไบโอฟิล์ม

หน้าที่	ความสัมพันธ์กับไบโอฟิล์ม	ส่วนประกอบของ EPS ที่เกี่ยวข้อง
การยึดเกาะ	ช่วยในการยึดเกาะกับพื้นผิวของวัสดุหรือผิวของสิ่งมีชีวิตทั้งในขั้นแรก และระยะยาว	พอลิแซ็กคาไรด์ โปรตีน ดีเอ็นเอ และ แอมฟิฟิลิกโมเลกุล
รวมกลุ่มของเซลล์ แบคทีเรีย	เป็นสะพานเชื่อมระหว่างเซลล์ เพิ่มความหนาแน่นของกลุ่มเซลล์ รวมถึงการติดต่อกันระหว่างเซลล์	พอลิแซ็กคาไรด์ โปรตีน และ ดีเอ็นเอ
สร้างโครงไบโอ ฟิล์มไบโอฟิล์ม	สร้างโครงข่ายพอลิเมอร์ช่วยให้ไบโอฟิล์มมีความเสถียรเชิงกล และช่วยในการติดต่อกันระหว่างเซลล์	พอลิแซ็กคาไรด์ ดีเอ็นเอ และ โปรตีน เช่น amyloids และ lectins
เก็บรักษาน้ำ	ทำให้ไบโอฟิล์มทนต่อความแห้งแล้งเมื่อขาดน้ำ	พอลิแซ็กคาไรด์ที่ชอบน้ำและโปรตีน
เกราะป้องกัน	ช่วยให้ทนต่อกลไกการป้องกันตัวของเจ้าบ้านในระหว่างการติดเชื้อ ช่วยให้ทนต่อสารฆ่า ป้องกันอันตรายจากออกซิเจนต่อเอนไซม์ไนโตรจีเนสของไฮยาโนแบคทีเรีย และ ปกป้องจากการถูกกินจากโโบโตซัว	พอลิแซ็กคาไรด์ และ โปรตีน
การดูดซับ สารประกอบอินทรีย์	ช่วยในการเก็บสะสมอาหารจากสิ่งแวดล้อม และดูดซับสารพิษแปลกปลอม	พอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุ พอลิแซ็กคาไรด์ที่ชอบน้ำ และ โปรตีน
การดูดซับ ไอออนอินทรีย์	ช่วยในการการแลกเปลี่ยนไอออน และเก็บสะสมไอออนของโลหะที่เป็นพิษ	พอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุ โปรตีน สารอินทรีย์ เช่น ฟอสเฟต และซัลเฟต
กิจกรรมเอนไซม์	ช่วยในการย่อยสารโมเลกุลใหญ่ภายนอกเพื่อให้ได้สารอาหารที่จำเป็น และย่อยพอลิแซ็กคาไรด์	โปรตีน
แหล่งอาหาร	มีคาร์บอน ไนโตรเจน และฟอสฟอรัสสำหรับเป็นอาหารของกลุ่มเซลล์ในไบโอฟิล์ม	ส่วนประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ทั้งหมด
แลกเปลี่ยนสาร พันธุกรรม	อำนวยความสะดวกในการถ่ายโอน horizontal gene ระหว่างเซลล์ไบโอฟิล์ม	ดีเอ็นเอ
ให้และรับอิเล็กทรอนิกส์	ช่วยให้เกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ในโครงสร้างไบโอฟิล์ม	สารฮิวมิก โปรตีน เช่นโปรตีนที่ใช้ในการสร้าง pili และ สายนาโน
ปลดปล่อย	ปลดปล่อยสารประกอบสู่นอกเซลล์เพื่อหมุนเวียน	ถุงเวสิเคิลบรรจุกรดนิวคลีอิก

สารประกอบสู่นอกเซลล์	การเผาผลาญ	เอนไซม์ ลิโปพอลิแซ็กคาไรด์ และพอสโพลิปิด
แหล่งสะสมพลังงานส่วนเกิน	สะสมคาร์บอนส่วนเกินเมื่ออัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนไม่สมดุล	พอลิแซ็กคาไรด์
ยึดเกาะเอนไซม์	ช่วยเก็บสะสมและรักษาเสถียรภาพของเอนไซม์	พอลิแซ็กคาไรด์ และ เอนไซม์

ที่มา : Flemming และ Wingender (2010)

2.7.2 ผลเสียของไบโอฟิล์ม

ไบโอฟิล์มก่อให้เกิดผลเสียมากมายหลายด้าน เช่น ด้านการแพทย์ ทัศนกรรม และอุตสาหกรรม เนื่องจากจุลินทรีย์ที่ก่อโรค และทนต่อยาปฏิชีวนะ

2.7.2.1 ด้านการแพทย์

เมื่อเชื้อก่อโรคสร้างไบโอฟิล์มจะก่อให้เกิดปัญหามากมายในการรักษาพยาบาล เนื่องจาก Biofilm cells ทนต่อยาปฏิชีวนะได้ดีกว่า Planktonic cells เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้การปลูกถ่ายอวัยวะเทียมล้มเหลว แพทย์จะกำจัดไบโอฟิล์มโดยวิธีเชิงกล หรือไม่เช่นนั้นจะต้องถอดอวัยวะเทียมออก ซึ่งมีค่าใช้จ่ายสูงและสร้างความเจ็บปวดให้กับผู้ป่วย นอกจากนี้ไบโอฟิล์มยังก่อความเสียหายกับอุปกรณ์การแพทย์ทำให้มีอายุการใช้งานสั้นลง (Anderl และคณะ, 2000)

Kojic และ Darouiche (2004) รายงานว่าร้อยละ 10 ของการติดเชื้อจากสายสวนหลอดเลือดดำและวาล์วหัวใจเทียมเกิดจากเกิดจากยีสต์ในกลุ่ม *Candida* ร้อยละ 21 ของการติดเชื้อในท่อปัสสาวะก็เกิดจากยีสต์ในกลุ่ม *Candida* เช่นกัน ซึ่งผู้ที่ติดเชื้อในท่อปัสสาวะกลุ่มนี้จะมีอัตราการเสียชีวิตสูงร้อยละ 20 ถึง 40

2.7.2.2 ด้านทัศนกรรม

Streptococcus mutans และ *Streptococcus sobrinus* เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในช่องปากร่วมกับจุลินทรีย์อื่นๆ มากกว่า 500 ชนิด อย่างสมดุล แบคทีเรียทั้งสองชนิดจะสร้างคราบ (ไบโอฟิล์ม) บนผิวฟันเมื่อภาวะในช่องปากเปลี่ยนแปลงไป เช่นเมื่อรับประทานอาหารที่มีน้ำตาลสูง โครสสูง แบคทีเรียทั้งสองชนิดจะสร้างคราบ (ไบโอฟิล์ม) บนผิวฟันได้ คราบบนผิวฟันจะประกอบไปด้วยจุลินทรีย์เป็นหลัก ร่วมกันกับสารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ มีลักษณะนุ่ม หนืด ยึดติดกับผิวเคลือบฟัน แบคทีเรียจะสร้างเอนไซม์ในกลุ่มกลูโคซิลทรานสเฟอเรส (Glucosyltransferase) หลั่งออกมา นอกเซลล์เพื่อเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสเป็น 2 ชนิด คือ มูแทน (mutan, α -(1,6)-glucan)

ไม่ละลายน้ำ และ เดกซ์แทรน (dextran, glucan α -(1,3)-glucan) ละลายน้ำได้ ความเหนียวหนืดของเดกซ์แทรนจะทำหน้าที่เสมือนกาวยึดเกาะกับผิวเคลือบฟัน และส่งเสริมการยึดเกาะของแบคทีเรียอื่นที่ไม่สามารถสร้างพอลิเมอร์ได้ ทำให้เกิดคราบจุลินทรีย์ที่แข็งแรงและห่อหุ้มแบคทีเรียหลายชนิดไว้ด้วยกัน เมื่อจุลินทรีย์ใช้น้ำตาลจะปลดปล่อยกรดออกมาซึ่งนอกจากจะส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์แล้ว กรดเหล่านี้จะย่อยสลายแร่ธาตุในผิวเคลือบฟัน (demineralization) ทำให้เกิดรูหรือโพรงในชั้นเนื้อฟัน (สิทธิชัย ขุนทองแก้ว, 2552)

2.7.2.3 ด้านอุตสาหกรรม

ไบโอฟาวลิง (Biofouling) หรือกลุ่มไบโอฟิล์มที่เกิดจากการเกาะรวมตัวกันของจุลินทรีย์ สาหร่าย พืช หรือสัตว์ บนพื้นผิวที่เปียก พบได้ตั้งแต่บริเวณลำตัวเรือ และในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น การผลิตน้ำมัน ยานยนต์ เหล็กกล้า กระจก อาหาร เครื่องดื่ม ตลอดจน การกลั่นน้ำทะเล การบำบัดน้ำเพื่อบริโภค การจับเก็บ และการจัดจำหน่าย ไบโอฟาวลิง จึงเป็นปัญหาที่มีค่าใช้จ่ายสูง เนื่องจากไม่มีระบบเตือนล่วงหน้าที่จะช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายในการกำจัด โดยมากจะพบก็ต่อเมื่อเกิดปัญหาในกระบวนการผลิต คุณภาพผลิตภัณฑ์ต่ำลง หรือปริมาณการผลิตลดลง และมีปัจจัยอื่นที่จะก่อปัญหาดังกล่าวได้ อย่างไรก็ตามในทางปฏิบัติถึงแม้จะนำตัวอย่างน้ำมาตรวจสอบได้ แต่ก็ไม่สามารถระบุบริเวณและขอบเขตของไบโอฟาวลิงได้ การใช้สารฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ก็สามารถทำได้เพียงฆ่าเชื้อจุลินทรีย์เท่านั้นแต่ไม่สามารถทำความสะอาดไบโอฟาวลิงออกไปได้ และในบางสถานการณ์สารฆ่าเชื้อจุลินทรีย์อาจไปออกซิไดซ์ให้โมเลกุลแตกตัวเป็นสารอาหารให้จุลินทรีย์นำไปใช้ในการเจริญและสร้างไบโอฟิล์มมากขึ้น วิธีการที่ดีที่สุดจึงเริ่มต้นจากการเลือกวัสดุที่เกาะติดได้ยาก ทำความสะอาดง่าย นอกจากนั้นจะต้องมีระบบการทำความสะอาดที่ดี มีน้ำยาทำความสะอาดที่เหมาะสม มีการควบคุม และกลไกการทำความสะอาด เพื่อให้ไบโอฟิล์มส่งผลกระทบต่อระดับมาตรฐานที่ตั้งไว้ (Flemming, 2011)

Flemming (2011) รายงานว่าปัญหาไบโอฟิล์มทำให้ตัวกรองน้ำทะเลเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมน้ำมันมีอายุการใช้ลดลงจาก 3 ปี เป็น 1 ปี ในอุตสาหกรรมน้ำมันแห่งนี้ใช้งานทั้งหมดประมาณ 700 ตัว ราคาตัวละ 2,500 ปอนด์ ทำให้ค่าใช้จ่ายในการเปลี่ยนตัวกรองเพิ่มขึ้น 1.17 ล้านปอนด์ต่อปีนอกจากนี้ยังต้องจ่ายค่าแรงงานในการเปลี่ยนตัวกรองและเปลี่ยนท่อต่างๆ อีกทั้งประสิทธิภาพของน้ำที่กรองได้ก็ลดลง

Cloete (2003) รายงานว่าไบโอฟิล์มก่อให้เกิดปัญหาในการแลกเปลี่ยนความร้อนในโรงงานไฟฟ้าทั่วโลก โดยโรงงานไฟฟ้าทั่วโลกใช้คลอรีนหลายพันตันในการกำจัดไบโอฟิล์ม ซึ่งมีค่าใช้จ่ายสูงในการทำมาสะอาด และการบำบัดน้ำเสียที่เกิดขึ้น

ในทะเล เมื่อจุลินทรีย์เกาะที่ลำตัวเรือจะสร้างเมือกออกมาและกลายเป็นที่ยึดเกาะของสิ่งมีชีวิตอื่นๆ จึงทำให้เกิดปัญหาคือไปเพิ่มแรงต้านในการเดินเรือ และลดความสามารถในการแลกเปลี่ยนความร้อนบริเวณพื้นผิว นอกจากนี้จะสร้างความเสียหายให้กับลำเรือทั้งภายในและภายนอก มีการคำนวณว่าความหนาของไบโอฟิล์ม 25 ไมโครเมตร จะเพิ่มแรงต้านร้อยละ 8 และถ้าหนา 50 ไมโครเมตร จะเพิ่มแรงต้านถึงร้อยละ 22 (Schultz, 2007; Flemming และคณะ, 2009; Andrewartha และคณะ, 2010)

2.7.3 การกำจัดไบโอฟิล์มโดยใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะช่วยรักษาสุขภาพของไบโอฟิล์มโดยทำให้ไบโอฟิล์มเกาะกันแบบไม่แน่นเกินไป มีช่องว่างเพื่อให้มีอาหารและการแลกเปลี่ยนแก๊ส ปรากฏการณ์นี้อาจทำให้ Biofilm cells บางส่วนหลุดและกลับไปเป็น Free living cell อีกครั้ง อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยจำนวนมากได้รายงานว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความสามารถในการป้องกันการสร้างไบโอฟิล์มดังตารางที่ 2.9

ตารางที่ 2.9 การใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	จุลินทรีย์	การยับยั้งไบโอฟิล์ม
Lipopeptide (Putisolvin I and II)	<i>Pseudomonas putida</i>	ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ <i>Pseudomonas</i> spp.
Lipopeptide	<i>Bacillus subtilis</i>	ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ <i>S. enterica</i> บนสายสวนปัสสาวะ
Lipopeptide	<i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ SW9	ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียหลายชนิด
Lipopeptide	<i>Bacillus tequilensis</i>	ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ <i>E. coli</i> และ <i>Streptococcus mutans</i>
Glycolipids	<i>Brevibacterium casei</i>	ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของกลุ่มแบคทีเรียก่อโรค
ไม่ทราบชนิด	<i>Lactobacillus paracasei</i> สายพันธุ์ A20	ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย ยีสต์ และราหลายชนิด
Rhamnolipid	<i>P. aeruginosa</i>	ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ <i>S. aureus</i> และ <i>Candida tropicalis</i>

ที่มา : Banat และคณะ (2014)

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

1. เครื่องวัดแรงตึงผิว (Ring tensiometer) รุ่น K6 บริษัท Kruss, Germany
2. เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) รุ่น Pro star บริษัท Varian, USA
3. คอลัมน์ C18-AR Cosmosil 5 μm , Ao ขนาด 4.6 x 150 มม. บริษัท Water
4. เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Rotary vacuum evaporator) รุ่น N-N บริษัท Eyela, Japan
5. เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Centrifuge evaporator) รุ่น R-300 บริษัท BUCHI, Switzerland
6. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys บริษัท Spectronic Unicam, USA, รุ่น Gensys 20 บริษัท Thermo Spectronic, USA
7. ตู้เพิ่มความดันไอแบบฆ่าเชื้อแบบอัตโนมัติ (Autoclave) รุ่น SS-35 และรุ่น ES-315 บริษัท Tomy Seiko, Ltd., Japan
8. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated incubator shaker) รุ่น InnovaTM 4300 บริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, N.J., USA และรุ่น Gyromax 707R บริษัท Amerex Instruments, Inc., USA
9. เครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasonicator) บริษัท Sonics and Materials, USA
10. ตู้บเพาะเชื้อ (Incubator) รุ่น Memmert BE 600 บริษัท Memmert, Germany
11. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดทำความเย็น รุ่น 6500 บริษัท Kubota, Japan
12. เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส รุ่น SevenEasy บริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
13. เครื่องชั่งหยاب รุ่น PG 2002-S และรุ่น PG 6002-S บริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
14. เครื่องชั่งละเอียด รุ่น AG 204 และรุ่น AG 285 บริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
15. ไมโครปิเปต รุ่น P20, P100, P200, P1000 และ P5000 บริษัท Gilson, France
16. หลอดทดลอง บริษัท PYREX, USA

17. จานเลี้ยงเชื้อ บริษัท PYREX, USA
18. กระบอกเซนตริฟิวส์ บริษัท NALGENE, USA
20. ขวดฝาเกลียว บริษัท PYREX, USA
21. ขวดวัดปริมาตร บริษัท PYREX, USA
22. ขวดรูปชมพู่ บริษัท PYREX, USA
23. ขวดรูปชมพู่ชนิดมีแขน บริษัท PYREX, USA
24. ขวดก้นกลม บริษัท PYREX, USA
25. ขวดระเหย บริษัท PYREX, USA
26. ขวดลดความดัน บริษัท PYREX, USA
27. กรวยกรอง บริษัท PYREX, USA
28. กรวยแยกสาร บริษัท PYREX, USA
29. หลอดทดลองฝาเกลียว บริษัท PYREX, USA
30. ตู้แช่เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส บริษัท Sanyo, Japan
31. ตู้อบความร้อนแห้ง รุ่น UE 600 บริษัท Memmert, Germany
32. หัวกรองชนิดไนลอน ขนาดความกว้างของรูกรอง 0.2 ไมครอน บริษัท Filtrex, Virginia Beach, USA
33. หัวกรองชนิดไนลอน ขนาดความกว้างของรูกรอง 0.45 ไมครอน บริษัท Filtrex, Virginia Beach, USA
34. กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 1 มิลลิลิตร บริษัท นิโปร (ประเทศไทย) จำกัด
35. คอลัมน์ Sugar SZ5532 บริษัท Shodex, Japan
36. เครื่องผสมสาร (vortex mixer) รุ่น G-560E บริษัท Scientific Industries Inc., USA
37. กระดาษกรอง Whatman บริษัท General Electric (GE), China
38. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก รุ่น Spectrafuge บริษัท National Labnet, Co., Edison, USA
40. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ รุ่น Mikro20 บริษัท Hettich zentrifugen, Germany
41. ตู้แช่เชื้อ ISSCO รุ่น BV-124, บริษัท International Scientific Supply Co., Ltd., Thailand, รุ่น Clear รุ่น V3-4 บริษัท Triwork 2000 Co., Ltd., Thailand และ Bosstech รุ่น HVB 120S บริษัท Boss Scientific Associate L.P., Thailand
42. คิวเวตต์ ของบริษัท PYREX, USA
43. พาราฟิล์ม ของบริษัท American national can, USA

44. ปีเปตทิป ขนาด 1-200 ไมโครลิตร, 1 ml, 5 ml และ 10 ml ของบริษัท Axygen Scientific, USA
45. กระจกดวง ของบริษัท PYREX, USA
46. ปีกเกอร์ ของบริษัท PYREX, USA
47. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ บริษัท Memmert, Germany
48. ปีเปตต์แก้วขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร ของบริษัท HBG, Germany

3.2 เคมีภัณฑ์

1. สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) บริษัท Biospringer, France
2. กลูโคส (Glucose) บริษัท Merck, Germany
3. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium Dihydrogenphosphate, KH_2PO_4) บริษัท Merck, Germany
4. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid, HCl) บริษัท Merck, Germany
5. กรด-3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิก (3,5-Dinitrosalicylic acid, $\text{C}_7\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_7$) บริษัท Merck, Germany
6. กรดอะซิติก (Acetic acid, CH_3COOH) บริษัท Merck, Germany
7. กรดไตรฟลูออโรอะซิติก (Trichloroacetic acid, TCA, $\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$) บริษัท Merck, Germany
8. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH) บริษัท Merck, Germany
9. โซเดียมเพอร์ไอโอดेट (Sodium periodate, NaIO_4) บริษัท Merck, Germany
10. แมกนีเซียมซัลเฟต เฮปตะไฮเดรต (Magnesium sulphate heptahydrate, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) บริษัท Merck, Germany
11. แอมโมเนียมอะซิเตท (Ammonium acetate, $\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$) บริษัท Merck, Germany
12. กลีเซอรอล (Glycerol) บริษัท Merck, Germany
13. เอทานอล (Ethanol, $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$) บริษัท Labscan Asia, Co., Ltd., Thailand
14. ไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ (Isopropyl alcohol, $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$) บริษัท Merck, Germany
15. เมทานอล (Methanol, CH_3OH) บริษัท Merck, Germany
16. อะซีโตน (Acetone, $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$) บริษัท Merck, Germany
17. อะเซทิลอะซีโตน (Acetylacetone, $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$) บริษัท Sigma chemical, USA
18. เอซิลอะซิเตต (Ethyl acetate, $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$) บริษัท Avantor Performance Materials, USA

19. อะซีโตนไนไตรล์ (Acetonitrile, C₂H₃N) บริษัท Merck, Germany
20. โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride, NaCl) บริษัท Merck, Germany
21. โพแทสเซียมคลอไรด์ (Potassium chloride, KCl) บริษัท Merck, Germany
22. ทริปโตเน (Tryptone) บริษัท Difco, USA
23. ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide, DMSO, (CH₃)₂S₂O) บริษัท Fisher scientific, UK
24. บิวทานอน (Butanone, C₄H₈O) บริษัท Merck, Germany
25. สีย้อมคริสตัลไวโอเล็ต บริษัท Sigma-Aldrich, India
26. เกลือ ตราปรุngthิพย์ บริษัท อุตสาหกรรมเกลือบริสุทธิ์ จำกัด ประเทศไทย
27. แป้งมันสำปะหลัง ตราปลาไทย บริษัท อี.ที.ซี. อินเตอร์เนชั่นแนล เทรดิง จำกัด ประเทศไทย
28. ซูโครส (น้ำตาลทรายขาว) บริษัท น้ำตาลมิตรผล ประเทศไทย
39. เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (α -amylase), (Spezyme alpha, 13,775 AAU/g) บริษัท Genencor, Danisco US Inc., USA
30. เอนไซม์กลูโคอะไมเลส (Glucoamylase), (GC 147, 580 TGAU/g) บริษัท Genencor, Danisco US Inc., USA

3.3 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.3.1 จุลินทรีย์และการเก็บรักษาจุลินทรีย์

3.3.1.1 จุลินทรีย์

A. pullulans สายพันธุ์ YTP6-14 คัดแยกจากน้ำทะเลบริเวณเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี ประเทศไทย โดย Thaniyavarn และคณะ (2013)

Streptococcus sobrinus 6715 และ *Streptococcus mutans* ได้รับจาก รศ.ดร. รัชชพิน ศรีสังจะลักษณ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากช่องปาก และมีความสามารถในการผลิตเดกซ์แทรน

3.3.1.2 การเก็บรักษาจุลินทรีย์

เลี้ยง *A. pullulans* สายพันธุ์ YTP6-14 บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งยีสต์ มอลต์ (Yeast Malt, YM) (ยีสต์เอ็กซ์แทรก 3 กรัมต่อลิตร มอลต์เอ็กซ์แทรก 3 กรัมต่อลิตร เปปโทน 5 กรัมต่อลิตร และกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน จากนั้น

ถ่ายเชื้อข้างต้นใส่ในอาหารเหลว YM ที่มีกลีเซอรอลอยู่ร้อยละ 15 และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

เลี้ยง *S. sobrinus* 6715 บนอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป Brain Heart Infusion (BHI) ชนิดแข็ง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว BHI ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 บ่มแบบไม่เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตกตะกอนเซลล์แล้วละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว BHI ที่มีความเข้มข้นซูโครสร้อยละ 2 ที่มีกลีเซอรอลอยู่ร้อยละ 15 และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับการเก็บรักษาเชื้อ *S. mutans* ทำเช่นเดียวกันกับ *S. sobrinus* 6715 ดังกล่าวข้างต้น

3.3.2 การผลิตและสกัดแยกสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ

3.3.2.1 เตรียมหัวเชื้อสำหรับการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ

นำจุลินทรีย์ จากข้อ 3.3.1.2 ขีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง YM บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นใช้ลูปเขี่ยเชื้อข้างต้นใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ ชนิดเหลวชนิดเดียวกันซึ่งมีค่าความเป็นกรดต่าง เท่ากับ 4.5 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร แล้วปรับให้อยู่ระหว่าง 0.8 ถึง 1.0 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ

3.3.2.2 ผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ

ถ่ายหัวเชื้อจากข้อ 3.3.2.1 ปริมาตรร้อยละ 10 โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด A ที่ปรับสูตรจาก Manitchotpsit และคณะ (2011) (กลูโคส 50 กรัมต่อลิตร ยีสต์เอ็กซ์แทร็กต์ 0.4 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.4 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 5 กรัมต่อลิตร โซเดียมคลอไรด์ 1 กรัมต่อลิตร และเปปโทน 0.3 กรัมต่อลิตร) ค่าความเป็นกรดต่าง เท่ากับ 6.5 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที

3.3.2.3 การสกัดสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ

นำอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ 3.3.2.2 มาสกัดแยกสารลดแรงดึงผิวชีวภาพและน้ำมัน โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 9,800xg เป็นเวลา 40 นาที จะทำให้อาหาร

เลี้ยงเชื้อแยกเป็น 3 ชั้น คือ ชั้นส่วนใส ชั้นเซลล์ และชั้นน้ำมันซึ่งอยู่ใต้ชั้นเซลล์ นำส่วนใสและน้ำมันที่ได้ไปสกัดสารลดแรงตึงผิวด้วยสารละลายเอธิลอะซีเตท ดังนี้

3.3.2.3.1 การสกัดสารลดแรงตึงผิวจากชั้นส่วนใส (BS)

เติมสารละลายเอธิลอะซีเตทและส่วนใสปริมาณเท่ากันใสในกรวยแยกแล้วเขย่าเป็นเวลา 3 นาที ตั้งทิ้งไว้จนสารละลายแยกออกเป็น 2 ชั้น คือ ชั้นเอธิลอะซีเตท และชั้นส่วนใส จากนั้นเปิดกรวยแยกเพื่อนำชั้นส่วนใสออกแล้วเก็บชั้นเอธิลอะซีเตทใสในภาชนะใหม่ ทำการสกัดเช่นนี้ 3 รอบ จากนั้นเอธิลอะซีเตทที่เก็บไว้ไประเหยภายใต้เครื่องระเหยสุญญากาศ เปิดสารที่เหลือในพลาสติกกันกลมใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไประเหยให้แห้งอีกครั้ง แล้วชั่งน้ำหนัก

3.3.2.3.2 การสกัดน้ำมัน (HO)

หลังจากแยกชั้นเซลล์ออก ละลายน้ำมันที่ติดอยู่กับภาชนะด้วยสารละลายเอธิลอะซีเตท นำไประเหยภายใต้เครื่องระเหยสุญญากาศ เปิดสารที่เหลือในพลาสติกกันกลมใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไประเหยให้แห้งอีกครั้ง แล้วชั่งน้ำหนัก

3.3.3 การศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.3.3.1 ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงชีวภาพเป็นระยะเวลา 9 วัน

เลี้ยง *A. pullulans* สายพันธุ์ YTP6-14 โดยถ่ายหัวเชื้อจากข้อ 3.3.2.1 ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวชนิด A (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ที่บรรจุในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 9 วัน จากนั้นนำน้ำหมักที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 9,800xg เป็นเวลา 40 นาที นำส่วนใสที่ได้มาวัดค่าความเป็นกรดต่าง วัดปริมาณกลูโคสที่เหลือ แยกเซลล์ออกไปหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากชั้นส่วนใส (BS) และน้ำมัน (HO)

3.3.3.2 วัดประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากชั้นส่วนใส (BS) และน้ำมัน (HO)

การวัดประสิทธิภาพของ BS และ HO สามารถวัดได้จากจากความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิวของน้ำและความสามารถในการกระจายน้ำมัน

3.3.3.2.1 การวัดค่าแรงตึงผิวเมื่อเทียบกับน้ำบริสุทธิ์

ละลาย BS หรือ HO ด้วยน้ำกลั่น ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปวัดค่าแรงตึงผิวโดยใช้เทนซิโอมิเตอร์ (tensiometer) แล้วคำนวณผลต่างค่าแรงตึงผิวเมื่อเทียบกับน้ำบริสุทธิ์ (ΔST)

3.3.3.2.2 การวัดค่าการกระจายน้ำมัน

ละลาย BS หรือ HO ด้วยน้ำกลั่น ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเทน้ำกลั่นปริมาตร 40 มิลลิลิตร ลงในเพลทแก้วที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 150 มิลลิเมตร หยดน้ำมันดิบสังเคราะห์ปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงบนผิวหน้าของน้ำ แล้วหยดสารประกอบชีวภาพที่เตรียมไว้ข้างต้นปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงไปบนผิวหน้าน้ำมัน วัดพื้นที่การกระจายน้ำมัน (ODA) โดยใช้เครื่องมือวัดเวอเนียร์ แล้วคำนวณค่าการกระจายน้ำมัน ดังสมการ

$$\text{พื้นที่การกระจายน้ำมัน (ตารางเซนติเมตร)} = \pi r^2 (\text{ตารางเซนติเมตร})$$

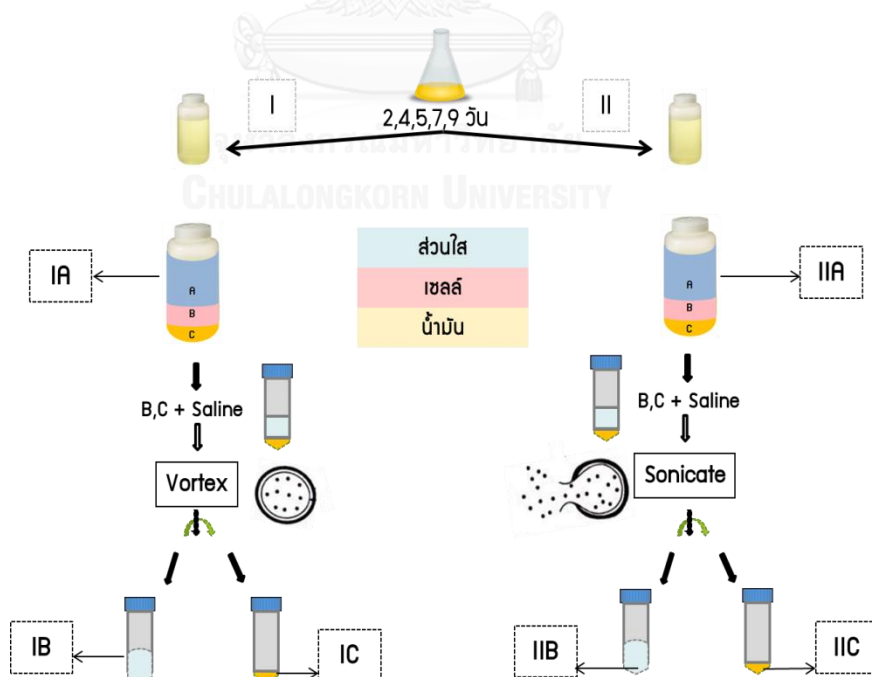
$$r = \text{รัศมีการกระจายน้ำมัน}$$

3.3.3.3 การศึกษาองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากชิ้นส่วนไส้ (BS) และน้ำมัน (HO)

ละลาย BS หรือ HO ในสารละลายอะซิโตนไตรลแล้วกรองผ่านตัวกรองชนิดไนลอนที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 0.2 ไมโครเมตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ C18-AR Cosmosil reverse phase สารละลายตัวพา (mobile phase) มี 2 ชนิด คือ ชนิด A และ B และปรับอัตราส่วนตามเวลาที่เปลี่ยนไป (gradient elution) สารละลายตัวพาชนิด A ประกอบด้วย อะซิโตนไทรลร้อยละ 10 โดยปริมาตร และกรดไตรฟลูออโรอะซิติกร้อยละ 0.1 โดยปริมาตร สารละลายตัวพาชนิด B ประกอบด้วยอะซิโตนไทรลร้อยละ 99.9 โดยปริมาตร และกรดไตรฟลูออโรอะซิติก ร้อยละ 0.1 โดยปริมาตร เป็นเวลาทั้งสิ้น 30 นาที ด้วยอัตราการไหลของเหลว 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้ UV detector ที่ความยาวคลื่น 200 นาโนเมตร จากนั้นเก็บสารตัวอย่างที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ตามเวลา ระยะเวลาสารละลายตัวพาออก แล้วนำสารตัวอย่างที่ได้มาวัดค่าการกระจายน้ำมัน จากนั้นนำสารตัวอย่างที่มีความสามารถในการกระจายน้ำมันสูงส่งไปวิเคราะห์ต่อด้วยเครื่องแมสสเปกโตรเมทรี (GC/MS) และเครื่องมัลติทอพแมสสเปกโตรเมทรี (MALDI-TOF/MS) และนำสารสกัดหยาบ HO ไปวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF/MS ที่ศูนย์บริการวิเคราะห์ด้านเครื่องมือ มหาวิทยาลัยฮอกไกโด (Hokkaido University)

3.3.4 การศึกษาการปลดปล่อยสารประกอบชีวภาพโดยการทำให้เซลล์แตก

เลี้ยง *A. pullulans* สายพันธุ์ YTP6-14 โดยถ่ายหัวเชื้อจากข้อ 3.3.2.1 ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด A (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2, 4, 5, 7 และ 9 วัน นำตัวอย่างน้ำหมักที่เก็บได้มาวิเคราะห์ดังรูปที่ 3.1 โดยแบ่งน้ำหมัก ออกเป็น 2 ขวดเท่าๆกัน (I, II) แล้วนำทั้งสองส่วนไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 9,800xg เป็นเวลา 40 นาที อาหารเลี้ยงเชื้อจะแยกเป็น 3 ชั้น คือ ชั้นส่วนใส (A) ชั้นเซลล์ (B) และชั้นน้ำมัน (C) นำส่วนใสของทั้ง 2 ส่วน (IA, IIA) ไปสกัดแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพตามข้อ 3.3.2.3.1 จากนั้นละลายส่วนที่เหลือ (B, C) ของทั้ง 2 ขวดด้วยสารละลายน้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 0.85 แล้วถ่ายใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 มิลลิลิตร จากนั้นนำหลอดที่ 1 ไปปั่นด้วยเครื่องผสมสาร และนำหลอดที่ 2 ไปทำให้เซลล์แตกโดยใช้อัลตราโซนิเคเตอร์ที่แอมพลิจูด 40% เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 3 รอบจากวิธีการข้างต้นจะทำให้ ขวดที่ 1 ต่างจากขวดที่ 2 ตรงที่ ขวดที่ 1 จะมีสารประกอบชีวภาพที่ติดอยู่ที่ผิวเซลล์หลุดออกมาเมื่อปั่นด้วยเครื่องผสมสาร ส่วนขวดที่ 2 จะมีสารประกอบชีวภาพที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากการแตกเซลล์ จากนั้นนำทั้ง 2 ขวดไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 9,800xg เป็นเวลา 10 นาที นำชั้นส่วนใสและน้ำมันไปสกัดแยกจะได้ IB, IC, IIB และ IIC แล้วชั่งน้ำหนักแห้งของสารประกอบชีวภาพทุกส่วนที่สกัดได้ จากนั้นนำสารไปวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC ตามวิธีในข้อ 3.3.3.3



รูปที่ 3.1 วิธีการเก็บตัวอย่างเพื่อศึกษาการปลดปล่อยสารประกอบชีวภาพจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ YTP6-14 โดยใช้อัลตราโซนิเคเตอร์

3.3.5 การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากชิ้นส่วนไส้ (BS) และน้ำมัน (HO)

3.3.5.1 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

ถ่ายหัวเชื้อ ปริมาณร้อยละ 10 โดยปริมาตร ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด A (ภาคผนวก ก) โดยแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนปริมาณร้อยละ 5 จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ กลูโคส ซูโครส กลีเซอรอล และแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 9,800xg เป็นเวลา 40 นาที นำส่วนใสที่ได้มาวัดค่าความเป็นกรดต่าง วัดปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหลือ แยกเซลล์ออกไปหาน้ำหนักเซลล์แห้ง สกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (BS) และสกัดน้ำมัน (HO) เปรียบเทียบค่าต่างๆ ระหว่างชนิดคาร์บอน จากนั้นนำ BS และ HO จากแต่ละแหล่งคาร์บอนไปวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยใช้คอลัมน์ C18-AR Cosmosil reverse phase ตามข้อ 3.3.3.3 โดยใช้ความเข้มข้น 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วนำโครมาโทแกรมที่ได้มาเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตจากแหล่งคาร์บอนที่ต่างชนิดกัน

3.3.5.2 ย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ ตามวิธีของ ธนาพร พลศักดิ์ (2557)

นำแป้งมันสำปะหลังปริมาณ 15 กรัม มาละลายด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร แล้วปรับค่าความเป็นกรดต่างให้เท่ากับ 5.8 จากนั้นเติมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 60 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นรอให้เย็นแล้วปรับค่าความเป็นกรด-ต่างให้เท่ากับ 4.5 เติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ปริมาตร 400 ไมโครลิตร นำไปบ่มในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 60 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำสารละลายน้ำตาลที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 9,800xg เป็นเวลา 20 นาที แล้วเก็บส่วนใสมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

3.3.5.3 วิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยกรด 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิก (DNSA reagent)

เติมสารละลายกรด 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิก ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต้มในอ่างน้ำเดือด 5 นาที แล้วนำมาแช่ในอ่างน้ำเย็น จากนั้นเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลาย กลูโคสเข้มข้น 0 ถึง 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.3.5.4 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครส

ตกตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ ด้วยอะซิโตนไทรล์ แล้วนำส่วนใสไปกรองผ่านตัวกรองชนิดไนลอนที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 0.2 ไมโครเมตร นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Sugar Sz5532 สารละลายตัวพา (mobile phase) ที่ใช้คืออะซิโตนไทรล์ร้อยละ 85 โดยปริมาตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลายซูโครสเข้มข้น 0 ถึง 50 กรัมต่อลิตร

3.3.5.5 วิเคราะห์ปริมาณกลีเซอรอลด้วยปฏิกิริยา Malaprade และ Hantzsch ตามวิธีของ Kuhn และคณะ (2015)

เติมสารละลายเพอร์ไอโอดีต (โซเดียมเพอร์ไอโอดีต 18 กรัมต่อลิตร อะซิโตนไทรล์ 100 มิลลิลิตรต่อลิตร แอมโมเนียมอะซิเตต 77 กรัมต่อลิตร) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในตัวอย่าง ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายอะเซทิลอะซิโตน (อะเซทิลอะซิโตน 10 มิลลิลิตรต่อลิตร ไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ 990 มิลลิลิตรต่อลิตร) ปริมาตร 625 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลา 15 และ 25 นาทีนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกลีเซอรอลความเข้มข้น 0 ถึง 200 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วคำนวณปริมาณกลีเซอรอลดังสมการ

$$\text{ปริมาณกลีเซอรอล} \left(\frac{\text{มิลลิกรัม}}{\text{ลิตร}} \right) = \frac{\Delta A_{\text{ตัวอย่าง}} (25 \text{ นาที} - 15 \text{ นาที}) - \Delta A_{\text{แบล็ค}} (25 \text{ นาที} - 15 \text{ นาที})}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} \left(\frac{\text{ลิตร}}{\text{มิลลิกรัม}} \right)}$$

3.3.6 การศึกษาลักษณะสมบัติสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากชิ้นส่วนไส้ (BS) และน้ำมัน (HO)

3.3.6.1 การหาค่าวิกฤตในการเกิดไมเซลล์ (CMC)

ละลาย BS หรือ HO ด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 0.01 - 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร วัดค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่องเทนซิโอมิเตอร์ และเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตึงผิวและค่า log ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เพื่อคำนวณหาค่าจุดวิกฤตในการเกิดไมเซลล์

3.3.6.2 การศึกษาผลของความเข้มข้นเกลือ ความเป็นกรดต่าง และอุณหภูมิต่อ BS และ HO

ละลาย BS หรือ HO ด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นเท่ากับค่า CMC แล้วทดสอบความเสถียรต่อความเข้มข้นเกลือร้อยละ 1 ถึง 12 โดยมวลต่อปริมาตร ค่าความเป็นกรดต่าง 2 ถึง 12 ปรับโดยใช้กรดอะซิติกเข้มข้น 6 โมลาร์ และโซเดียมไฮดรอกไซด์เม็ด อุณหภูมิ 4, 30, 60, 100 องศา

เซลเซียส 15 นาที่ และความเสถียรภายใต้หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที่ แล้ววัดค่าแรงตึงผิว

3.3.6.3 การศึกษาการเกิดอิมัลชัน (Emulsification index, E24)

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและน้ำมันมาละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปผสมกับน้ำมันพืชชนิดต่างๆ ในอัตราส่วน 1:1 ดังนี้ น้ำมันมะกอก น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันมะพร้าว น้ำมันรำข้าว น้ำมันข้าวโพด น้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน และน้ำมันงา ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารเป็นเวลา 2 นาที่ แล้ววัดค่าอิมัลชันหลังจาก 24 ชั่วโมง แสดงเป็นร้อยละของระดับความสูงอิมัลชันต่อระดับความสูงทั้งหมด (Emulsion index, E24) แล้วติดตามเสถียรภาพของอิมัลชันเป็นเวลา 60 วัน

3.3.7 ศึกษาผลของสารประกอบชีวภาพต่อการสร้างไบโอฟิล์ม

3.3.7.1 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างไบโอฟิล์มของ *A. pullulans* สายพันธุ์ YTP6-14

สร้างไบโอฟิล์ม โดยถ่ายหัวเชื้อจากข้อ 3.3.2.1 ปริมาณร้อยละ 10 โดยปริมาตร ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด A และอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวยีสต์ ไนโตรเจน เบส (Yeast Nitrogen Base, YNB) แล้วนำมาเติมลงในไมโครเวลเพลทขนาด 96 หลุม ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในภาวะนิ่งและภาวะเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที่ เป็นเวลา 1 และ 7 วัน ถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อออก แล้ววัดปริมาณไบโอฟิล์มตามวิธีของ Stepanović และคณะ (2000) โดยยัดไบโอฟิล์มด้วยเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 99 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 15 นาที่ แล้วถ่ายเมทานอลออก รอนจนไบโอฟิล์มแห้งสนิท แล้วย้อมด้วยคริสตัลไวโอเล็ตความเข้มข้นร้อยละ 0.02 ปริมาตร 120 ไมโครลิตร เป็นเวลา 15 นาที่ ถ่ายสีย้อมออกแล้วล้างสีย้อมส่วนเกินด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 150 ไมโครลิตร ละลายสีที่เหลือด้วยกรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 33 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ชุดควบคุม คือ อาหารเหลวปราศจากเชื้อ แล้วเลือกภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างไบโอฟิล์มเพื่อใช้ในการศึกษาผลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อการสร้างไบโอฟิล์มของ *A. pullulans* สายพันธุ์ YTP6-14

3.3.7.2 เตรียมสารทำละลาย

ผสมไตรเมทิลซิลฟอกไซด์ และบิวทานอน อย่างละ 1.25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วยตัวกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร

3.3.7.3 เตรียมสารประกอบชีวภาพ

ละลายสารประกอบชีวภาพ BS หรือ HO ด้วยสารทำละลายข้อ 3.3.7.2 ให้ได้ความเข้มข้น 2500 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร แล้วกรองด้วยตัวกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร

3.3.7.4 ศึกษาผลของสารประกอบชีวภาพ (BS และ HO) ต่อการสร้างไบโอฟิล์มของ *A. pullulans* สายพันธุ์ YTP6-14

การศึกษาผลของสารประกอบชีวภาพ (BS หรือ HO) ต่อการสร้างไบโอฟิล์มของ *A. pullulans* สายพันธุ์ YTP6-14 แบ่งการทดลองออกเป็น 3 แบบ คือ บ่มสารประกอบชีวภาพก่อนการสร้างไบโอฟิล์ม (pre-coating) บ่มสารประกอบชีวภาพพร้อมกับการสร้างไบโอฟิล์ม (co-incubation) และบ่มสารประกอบชีวภาพหลังการสร้างไบโอฟิล์มได้ครึ่งทาง (mid post-formation) โดยทำการทดลองดังนี้

3.3.7.4.1 บ่มสารประกอบชีวภาพก่อนการสร้างไบโอฟิล์ม (pre-coating)

ใส่สารทำละลายจากข้อ 3.3.7.2 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในไมโครเวลเพลทขนาด 96 หลุม จากนั้นเติมสารประกอบชีวภาพ (BS หรือ HO) ความเข้มข้น 2,500 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่ 1 และหลุมที่ 2 เริ่มทำเจือจางที่ละ 2 เท่า จากหลุมที่ 2 จนถึงหลุมที่ 7 จะได้ความเข้มข้น 39 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ตูดสารละลายปริมาตร 50 ไมโครลิตร ออกจากหลุมที่ 7 แล้วเติมสารทำละลายตามข้อ 3.3.7.2 ลงไปทุกหลุมๆละ 50 ไมโครลิตร จะทำให้ได้สารประกอบชีวภาพที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1,250 625 312 156 78 39 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ชุดควบคุมบวก (ที่ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร) ให้เติมตัวทำละลายปริมาตร 100 ไมโครลิตร ชุดควบคุมลบให้เติมตัวทำละลายปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตูดสารประกอบชีวภาพออกแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 1 รอบ เติมอาหารเลี้ยงเชื้อความเข้มข้นเข้มข้น 4 เท่า ปริมาตร 25 ไมโครลิตร สารแขวนลอยเชื้อที่มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.4 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตร และสารละลายน้ำเกลือ 50 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ววัดไบโอฟิล์มตามวิธีในข้อ 3.3.7.1 ชุดควบคุมลบ ไม่ต้องเติมเชื้อ ให้เติมสารละลายน้ำเกลือ

3.3.7.4.2 บ่มสารประกอบชีวภาพพร้อมกับการสร้างไบโอฟิล์ม (co-incubation)

ใส่สารทำละลายจากข้อ 3.3.7.2 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในไมโครเวลเพลทขนาด 96 หลุม จากนั้นเติมสารประกอบชีวภาพ (BS หรือ HO) ความเข้มข้น 2,500 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่ 1 และหลุมที่ 2 เริ่มทำเจือจางที่ละ 2 เท่าจากหลุมที่

2 จนถึงหลุมที่ 7 จะได้ความเข้มข้น 39 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ดูดสารละลายปริมาตร 50 ไมโครลิตร ออกจากหลุมที่ 7 จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเข้มข้น 4 เท่า ปริมาตร 25 ไมโครลิตร และสารแขวนลอยเชื้อที่มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.4 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตร จะได้สารประกอบชีวภาพที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1,250 625 312 156 78 39 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ชุดควบคุมบวก (ที่ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร) ให้เติมสารทำละลายแทนสารประกอบชีวภาพ ชุดควบคุมลบให้เติมสารทำละลายแทนสารประกอบชีวภาพและเติมสารละลายน้ำเกลือร้อยละ 0.85 แทนสารแขวนลอยเชื้อ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ววัดไปโอฟิล์มตามวิธีในข้อ 3.3.7.1

3.3.7.4.3 บ่มสารประกอบชีวภาพหลังการสร้างไปโอฟิล์มได้ครึ่งทาง (mid post-formation)

เติมอาหารเลี้ยงเชื้อเข้มข้น 4 เท่า ปริมาตร 25 ไมโครลิตร และสารแขวนลอยเชื้อที่มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.4 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลายน้ำเกลือ 50 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารประกอบชีวภาพ (BS หรือ HO) ที่ความเข้มข้น 2,500 1,250 625 312 156 78 39 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ลงไปในหลุมที่ 1 ถึงหลุมที่ 7 ตามลำดับ จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1,250 625 312 156 78 39 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ตามลำดับ แล้วบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนครบ 24 ชั่วโมง แล้ววัดไปโอฟิล์มตามวิธีในข้อ 3.3.7.1 ชุดควบคุมบวกจะเติมสารละลายน้ำเกลือปราศจากเชื้อแทนสารประกอบชีวภาพ ชุดควบคุมลบ ไม่เติมเชื้อและสารประกอบชีวภาพ

3.3.7.5 ศึกษาผลของสารประกอบชีวภาพ (BS และ HO) ต่อการสร้างไปโอฟิล์มของ *S. sobrinus* 6715 และ *S. mutans*

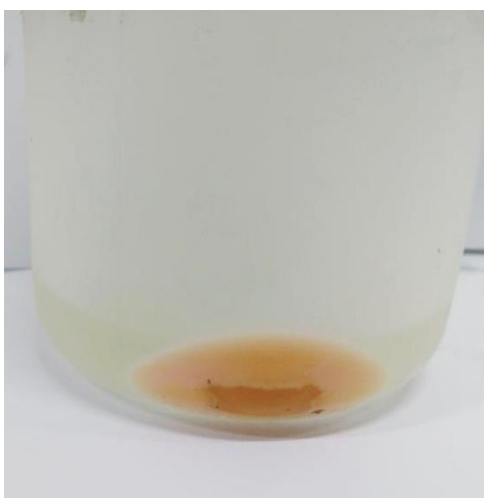
การศึกษามผลของสารประกอบชีวภาพ (BS หรือ HO) ต่อการสร้างไปโอฟิล์มของ *S. sobrinus* และ *S. mutans* แบ่งการทดลองออกเป็น 3 แบบ คือ บ่มสารประกอบชีวภาพก่อนการสร้างไปโอฟิล์ม (pre-coating) บ่มสารประกอบชีวภาพพร้อมกับการสร้างไปโอฟิล์ม (co-incubation) และบ่มสารประกอบชีวภาพหลังการสร้างไปโอฟิล์ม (mid post-formation) ตามวิธีการข้อ 3.3.7.4 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion (BHI) ที่เติมซูโครสร้อยละ 2 โดยมวลต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภาวะไร้อากาศเป็นเวลา 8 ชั่วโมง สำหรับ *S. sobrinus* และ 10 ชั่วโมง สำหรับ *S. mutans* วัดไปโอฟิล์มตามข้อ 3.3.7.1

บทที่ 4

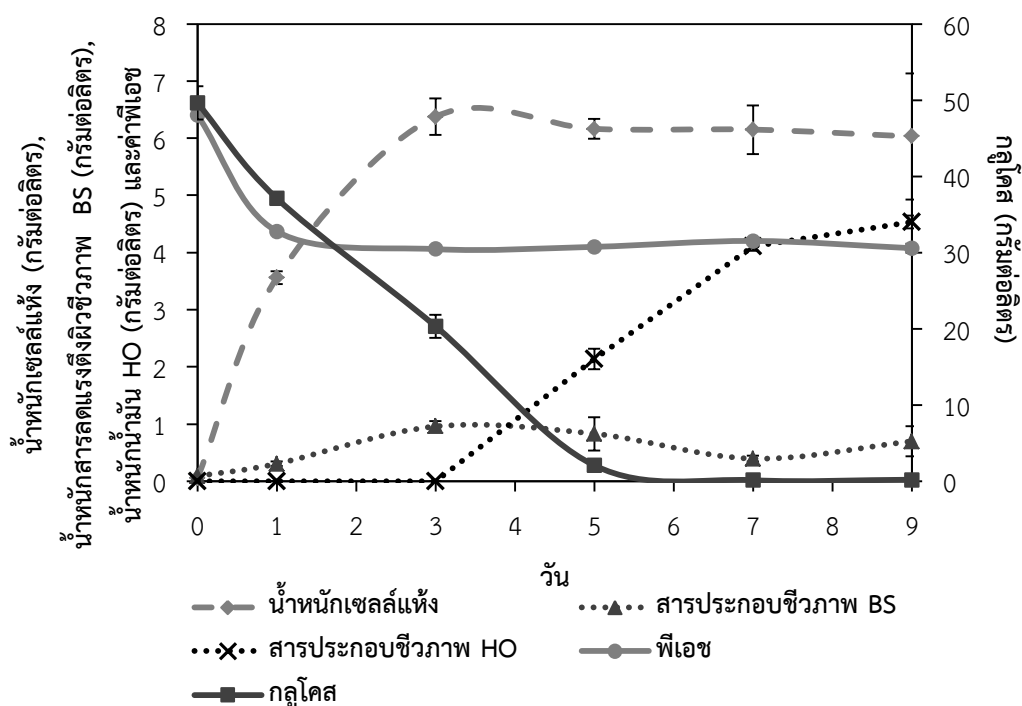
ผลการทดลอง

4.1 การผลิตและองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากชั้นส่วนใส (BS) และน้ำมัน (HO) จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ YTP6-14

เมื่อเลี้ยง *A. pullulans* สายพันธุ์ YTP6-14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด A ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 9 วัน พบว่าค่าความเป็นกรดต่างลดลงจาก 6.40 ± 0.02 เป็น 4.37 ± 0.01 ในวันที่ 1 และคงที่ไปตลอดจนวันที่ 9 น้ำตาลกลูโคสลดลงเหลือ 2.08 ± 0.625 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 5 และหมดลงหลังจากนั้น น้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุดในวันที่ 3 เท่ากับ 6.38 ± 0.31 กรัมต่อลิตร สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากชั้นส่วนใส (BS) ถูกผลิตและปลดปล่อยออกมาในน้ำหมักเลี้ยงเชื้อ ตั้งแต่วันที่ 1 และสูงสุดในวันที่ 3 เท่ากับ 0.96 ± 0.09 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงไปจนถึงวันที่ 5 จะสามารถเห็นหยดน้ำมันขนาดเล็กลอยอยู่ในน้ำหมักและเมื่อนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9800xg น้ำมันจะตกอยู่ใต้ชั้นเซลล์มีลักษณะดังรูปที่ 4.1 เมื่อแยกเซลล์ออกและสกัดน้ำมันด้วยเอธิลอะซีเตท พบว่าเชื้อสามารถผลิตน้ำมันที่หนักกว่าน้ำ (HO) ได้สูงสุดในวันที่ 9 เท่ากับ 4.54 ± 0.11 จากความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตสารประกอบชีวภาพ (BS และ HO) ในรูปที่ 4.2 แสดงให้เห็นว่า HO ถูกผลิตในวันที่ 5 ซึ่งอยู่ในระยะ stationary phase เป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ในขณะที่การผลิต BS นั้นสัมพันธ์กับการเจริญ (growth associated production)



รูปที่ 4.1 น้ำมันใต้ชั้นเซลล์เมื่อนำน้ำหมักไปปั่นเหวี่ยง



รูปที่ 4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตสารประกอบชีวภาพ (BS และ HO) ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ YTP6-14 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 9 วัน

จากนั้นเตรียมสารประกอบชีวภาพ BS หรือ HO ความเข้มข้น 0.01 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบประสิทธิภาพ พบว่า BS มีค่าผลต่างแรงตึงผิวต่ำกว่า HO แต่มีค่าการกระจายน้ำมันสูงกว่า HO โดย BS และ HO มีประสิทธิภาพในการลดค่าแรงตึงผิวใกล้เคียงกันเท่ากับ 26.13 ± 0.58 และ 28.80 ± 0.00 มิลลินิวตันต่อตารางเมตร มีค่าการกระจายน้ำมันต่างกันเท่ากับ 30.37 ± 1.09 และ 23.19 ± 0.86 ตารางเซนติเมตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.1 แต่อย่างไรก็ตามปริมาณ HO ที่สกัดได้สูงกว่า คือ 4.54 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.1 ผลต่างค่าแรงตึงผิวเมื่อเทียบกับน้ำบริสุทธิ์ (Δ ST) และการกระจายน้ำมัน (ODA) ของ BS และ HO

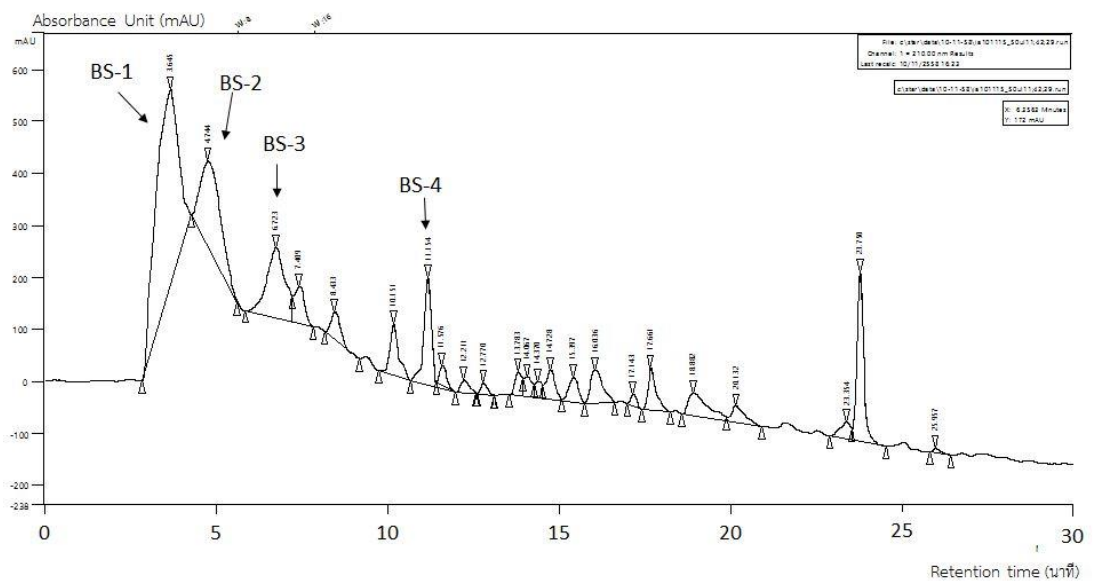
สารประกอบชีวภาพ	ปริมาณที่สกัดได้ (กรัม/ลิตร)	ค่าผลต่างแรงตึงผิว ¹ (mN/m)	ค่าการกระจายน้ำมัน ² (ชม. ²)
BS	0.96	26.13 ± 0.58	30.37 ± 1.09
HO	4.54	28.80 ± 0.00	23.19 ± 0.86

¹ ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

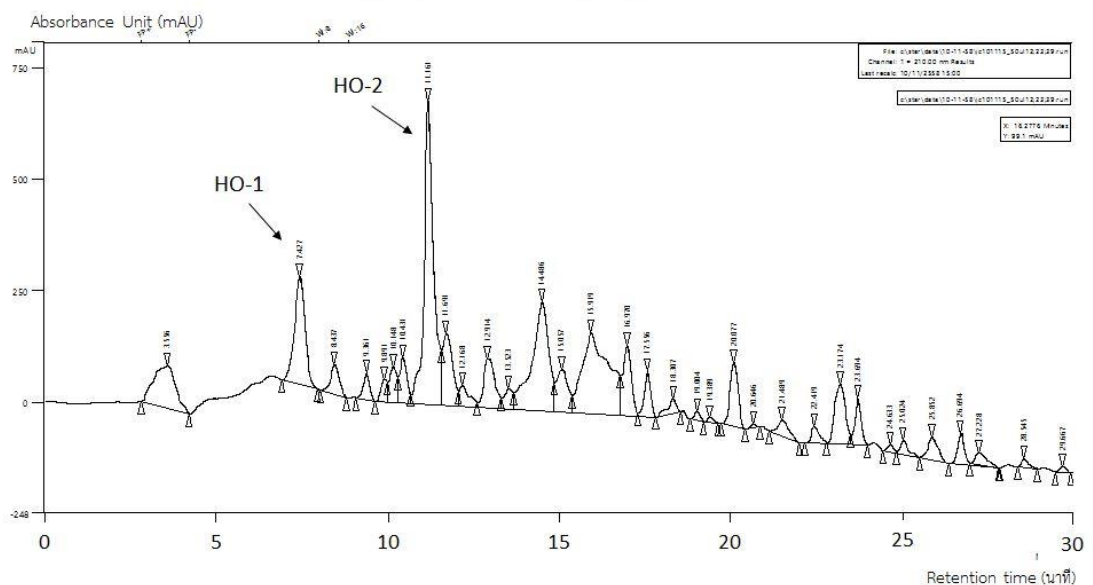
² ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร

หมายเหตุ : ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

และเมื่อนำสารประกอบชีวภาพ BS และ HO ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยเก็บพีคที่เวลาต่างๆ จำนวน 6 พีค เป็นพีคจาก BS จำนวน 4 พีค คือ BS-1, BS-2, BS-3 และ BS-4 ที่เวลา 3.645, 4.744, 6.732 และ 11.154 นาที ตามลำดับ และ พีคจาก HO จำนวน 2 พีค คือ HO-1 และ HO-2 ที่เวลา 7.427 และ 11.161 นาที ตามลำดับ ดังรูปที่ 4.3 และ 4.4 แล้วนำตัวอย่างพีคดังกล่าว ที่ความเข้มข้น 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไปวัดการกระจายน้ำมัน แสดงผลในตารางที่ 4.2



รูปที่ 4.3 โครมาโทแกรมของ BS จาก HPLC



รูปที่ 4.4 โครมาโทแกรมของ HO จาก HPLC

ตารางที่ 4.2 ประสิทธิภาพการกระจายน้ำมันของตัวอย่างพืชที่เก็บจาก HPLC

พืช	RT (นาที)	ค่าการกระจายน้ำมัน ¹ (ชม. ²)
BS-1	3.645	0 ± 0.00
BS-2	4.744	0.13 ± 0.00
BS-3	6.732	0.13 ± 0.04
BS-4	11.154	10.07 ± 0.05
HO-1	7.427	1.87 ± 0.01
HO-2	11.161	35.98 ± 0.20

¹ ตัวอย่างมีความเข้มข้น 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร

หมายเหตุ : ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากตารางที่ 4.2 พบว่าพืช HO-2 มีค่าการกระจายน้ำมันสูงสุด 35.98 ± 0.20 ตารางเซนติเมตร รองลงมาคือ BS-4 มีค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 10.07 ± 0.05 ตารางเซนติเมตร ทั้งสองตัวอย่างถูกเก็บมาที่เวลาใกล้เคียงกันที่เวลา 11.154 และ 11.161 นาที ตามลำดับ จึงถูกนำไปวิเคราะห์หาหน้าหนักมวลโมเลกุลด้วยวิธีแมสสเปกโตรเมตรี โดยเทคนิคที่ทำให้เกิดไอออนไนเซชัน 2 วิธีคือ GC/MS และ MALDI-TOF พบว่า BS-4 และ HO-2 มีองค์ประกอบดังตารางที่ 4.3 นอกจากนี้ได้นำสารสกัดหยาบ HO ส่งไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF มีองค์ประกอบดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.3 น้ำหนักโมเลกุลของส่วนประกอบของ BS-4 และ HO-2

สารประกอบ ชีวภาพ	HPLC (เวลา)	วิธีการวิเคราะห์ น้ำหนักโมเลกุล	น้ำหนัก มวลโมเลกุล	ส่วนประกอบ
BS-4	11.154	GC/MS	43.06	-
			68.04	-
			73.08	-
			97.04	วงแหวน Lactone ของ Massoia lactone
			108.11	-
			115.06	วงแหวน Lactone ของ 3,5-dihydroxydecanoic acid delta lactone
			168.14	Massoia lactone
			187.16	3,5-dihydroxydecanoic acid delta lactone
			203.16	-
			HO-2	11.161
763.9	Liamocin A1 [M+Na] ⁺			
806.0	Liamocin A2 [M+Na] ⁺			
GC/MS	97.04	วงแหวน Lactone ของ Massoia lactone		
	108.11	-		
	115.06	วงแหวน Lactone ของ 3,5-dihydroxydecanoic acid delta lactone		
	168.15	Massoia lactone		
	187.16	3,5-dihydroxydecanoic acid delta lactone		
	203.16	-		
	MALDI-TOF	437.6		
639.1		-		
641.1		Exophilin A2 [M+Na] ⁺		
667.1		-		

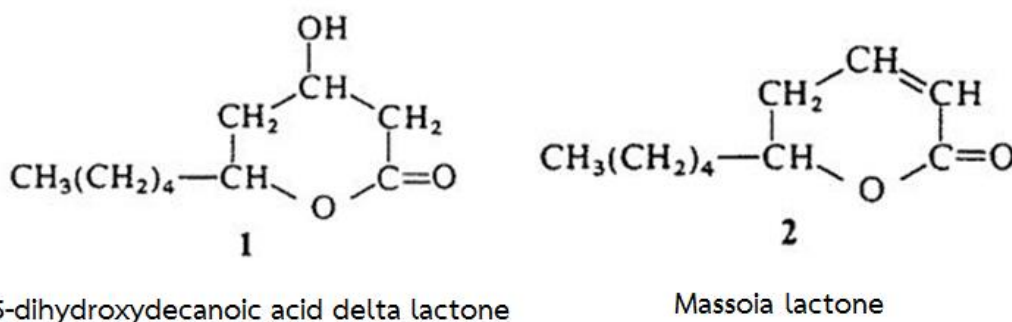
หมายเหตุ : โครมาโทแกรมของพีค BS-2 และ HO-4 จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี GC/MS และวิธี MALDI-TOF/MS แสดงดังภาคผนวก ง และ จ

จากตารางที่ 4.3 และผลการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี GC/MS ที่แสดงในภาคผนวก ง เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ สุदारัตน์ ลือพงศ์พัฒนา (2557) ทำให้ทราบว่าพิก BS-4 และ HO-2 ประกอบไปด้วย

1. 3,5-dihydroxydecanoic acid delta lactone หรือ Massoia lactone + H₂O (187.16)
2. Massoia lactone (168.14)
3. วงแหวน Lactone ของ 3,5-dihydroxydecanoic acid delta lactone (115.06)
4. วงแหวน Lactone ของ Massoia lactone (97.04)

อย่างไรก็ตามเมื่อนำผลจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี MALDI-TOF แสดงในภาคผนวก จ มาเปรียบเทียบกับ m/z กับงานวิจัยของ Price และคณะ (2013) และ Price และคณะ (2016) พบว่า BS-4 มีพิก [M+Na]⁺ ที่ m/z เท่ากับ 733.9, 763.9 และ 806.0 ตรงกับ Liamocin Ara-A1, Liamocin A1 และ Liamocin A2 ตามลำดับ ส่วน HO-2 พิก [M+Na]⁺ ที่ m/z เท่ากับ 641.1 ตรงกับ Exophilin A2

Liamocin มีโครงสร้างเป็นน้ำตาลแมนนิทอลต่อกับ 3,5-dihydroxydecanoic ester จำนวน 3 (A) ถึง 4 (B) กลุ่ม โดยบางส่วนอาจไม่ต่อ (1) หรือต่อ (2) กับหมู่อะซีติล ในขณะที่ Liamocin Ara-A1 คือ Liamocin ที่โครงสร้างส่วนหัวเปลี่ยนเป็นน้ำตาลอะราบิทอล ส่วน Exophilin จะมีโครงสร้างเป็น Liamocin ที่ไม่มีน้ำตาล



รูปที่ 4.5 โครงสร้างของ 3,5-dihydroxydecanoic acid delta lactone (1)

และ Massoia lactone (2)

ที่มา : Vesonder และคณะ (1972)

ตารางที่ 4.4 น้ำหนักโมเลกุลของส่วนประกอบของสารสกัดหยาบน้ำมัน (HO)

สารประกอบชีวภาพ	วิธีการวิเคราะห์ น้ำหนักโมเลกุล	น้ำหนัก มวลโมเลกุล	ส่วนประกอบ
สารสกัดหยาบ น้ำมัน (HO)	MALDI-TOF/MS	581.6	Exophilin A1 [M+Na-H ₂ O] ⁺
		599.6	Exophilin A1 [M+Na] ⁺
		733.6	Liamocin Ara-A1 [M+Na] ⁺
		763.6	Liamocin A1 [M+Na] ⁺
		767.7	Exophilin A1 + [M+Na+4Ac] ⁺
		827.7	Exophilin B2 [M+Na] ⁺
		919.7	Liamocin Ara-B1 [M+Na] ⁺
		949.8	Liamocin B1 [M+Na] ⁺
		991.8	Liamocin B2 [M+Na] ⁺

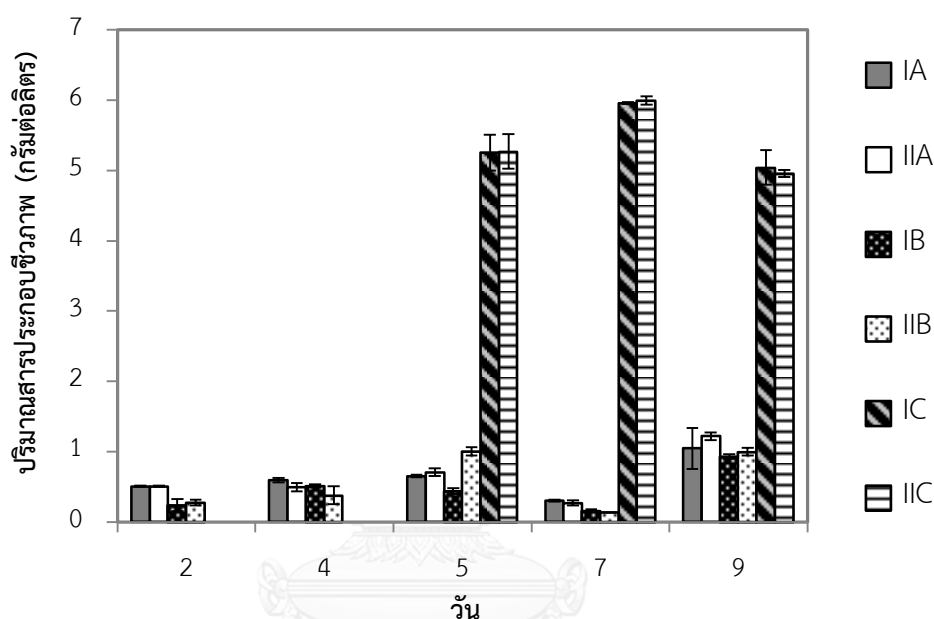
หมายเหตุ : โครมาโทแกรมของสารสกัดหยาบ HO จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี MALDI-TOF/MS แสดงดังภาคผนวก ฉ

จากตารางที่ 4.4 เมื่อนำผลการวิเคราะห์สารสกัดหยาบ HO ด้วยวิธี MALDI-TOF ดังภาคผนวก ฉ มาเปรียบเทียบกับ m/z กับงานวิจัยของ Price และคณะ (2013) และ Price และคณะ (2016) พบว่ามีพีค [M+Na]⁺ ที่ m/z เท่ากับ 581.6, 599.6, 733.43, 763.45, 767.49, 827.51, 919.56, 949.57 และ 991.58 ตรงกับ Exophilin A1 - H₂O, Exophilin A1, Liamocin Ara-A1, Liamocin A1, Exophilin A1 + 4Ac, Exophilin B2, Liamocin Ara-B1, Liamocin B1 และ Liamocin B2

4.2 การปลดปล่อยสารประกอบชีวภาพด้วยการทำให้เซลล์แตก

เมื่อเพาะเลี้ยง *A. pullulans* สายพันธุ์ YTP6-14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด A เป็นเวลา 2, 4, 5, 7 และ 9 วัน และเก็บตัวอย่างดังรูปที่ 3.1 โดยแบ่งน้ำหมักออกเป็น 2 ขวดเท่าๆกัน (I, II) แล้วนำทั้งสองส่วนไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 9,800xg เป็นเวลา 40 นาที น้ำหมักจะแยกเป็น 3 ชั้น คือ ชั้นส่วนใส (A) ชั้นเซลล์ (B) และชั้นน้ำมัน (C) นำส่วนใสของทั้ง 2 ขวด (IA, IIA) ไปสกัดแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จากนั้นละลายส่วนที่เหลือ (B, C) ของทั้ง 2 ขวดด้วยสารละลายน้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 0.85 แล้วถ่ายใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 มิลลิลิตร จากนั้นนำหลอดที่ 1 ไปปั่นด้วยเครื่องผสมสาร และนำหลอดที่ 2 ไปทำให้เซลล์แตกโดยใช้อัลตราโซนิเคเตอร์ที่แอมพลิจูด 40% เป็นเวลา 5

นาที่ จำนวน 3 รอบจากวิธีการข้างต้นจะทำให้ ขวดที่ 1 ต่างจากขวดที่ 2 ตรงที่ ขวดที่ 1 จะมี สารประกอบชีวภาพที่ติดอยู่ที่ผิวเซลล์หลุดออกมาเมื่อปั่นด้วยเครื่องผสมสาร ส่วนขวดที่ 2 จะมี สารประกอบชีวภาพที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากการแตกเซลล์ จากนั้นนำทั้ง 2 ขวดไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 9,800xg เป็นเวลา 10 นาที นำชั้นส่วนใสและน้ำมันไปสกัดแยกจะได้ IB, IC, IIB และ IIC แล้วชั่งน้ำหนักแห้งของสารประกอบชีวภาพทุกส่วนที่สกัดได้ แล้วนำมาทำกราฟความสัมพันธ์ของ ปริมาณสารประกอบชีวภาพที่สกัดได้กับเวลา ดังรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 ปริมาณสารที่ปลดปล่อยก่อนและหลังการแตกเซลล์

* IA และ IIA: สารลดแรงตึงผิวที่สกัดได้จากน้ำหมัก

IB: สารที่ติดอยู่กับผิวเซลล์

IIB: สารที่ปลดปล่อยออกมาหลังจากการแตกเซลล์

IC: น้ำมันที่จุลินทรีย์หลั่งออกมานอกเซลล์

IIC: มีน้ำมันที่ปลดปล่อยออกมาหลังจากการแตกเซลล์

จากรูปที่ 4.6 พบว่าปริมาณสารประกอบชีวภาพที่ได้ก่อนและหลังจากการแตกเซลล์มีความใกล้เคียงกัน ส่วน IIC (Sonicate) และ IC (Vortex) มีปริมาณใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่าเซลล์ไม่ได้เก็บสะสมน้ำมันไว้ในเซลล์ ส่วนในวันที่ 5 พบว่าปริมาณสารประกอบชีวภาพส่วน IIB (Sonicate) มากกว่า IB (Vortex) โดย IIB เท่ากับ 1.00 ± 0.06 กรัมต่อลิตร ส่วน IB เท่ากับ 0.44 ± 0.04 กรัมต่อลิตร แสดงว่าการแตกเซลล์ช่วยปลดปล่อยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพออกมา จึงนำสารประกอบ

ชีวภาพในวันที่ 5 มาวัดประสิทธิภาพในการลดค่าแรงตึงผิว และความสามารถในการกระจายน้ำมันดัง ตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ผลต่างค่าแรงตึงผิวเมื่อเทียบกับน้ำบริสุทธิ์ (Δ ST) และการกระจายน้ำมัน (ODA) ของ IA IIA IB IIB IC และ IIC จากวันที่ 5

สารประกอบชีวภาพ	ปริมาณที่สกัดได้ (กรัม/ลิตร)	ค่าผลต่างแรงตึงผิว ¹ (mN/m)	ค่าการกระจายน้ำมัน ² (ซม. ²)
IA	0.6520 ± 0.02	27.80 ± 0.00	31.18 ± 0.99
IIA	0.7053 ± 0.06	27.80 ± 0.00	31.18 ± 0.99
IB	0.4373 ± 0.04	18.80 ± 0.00	15.44 ± 0.40
IIB	1.0040 ± 0.06	23.80 ± 1.00	16.88 ± 1.50
IC	5.2567 ± 0.25	29.80 ± 0.00	19.14 ± 1.60
IIC	5.2727 ± 0.25	30.47 ± 0.58	20.43 ± 0.80

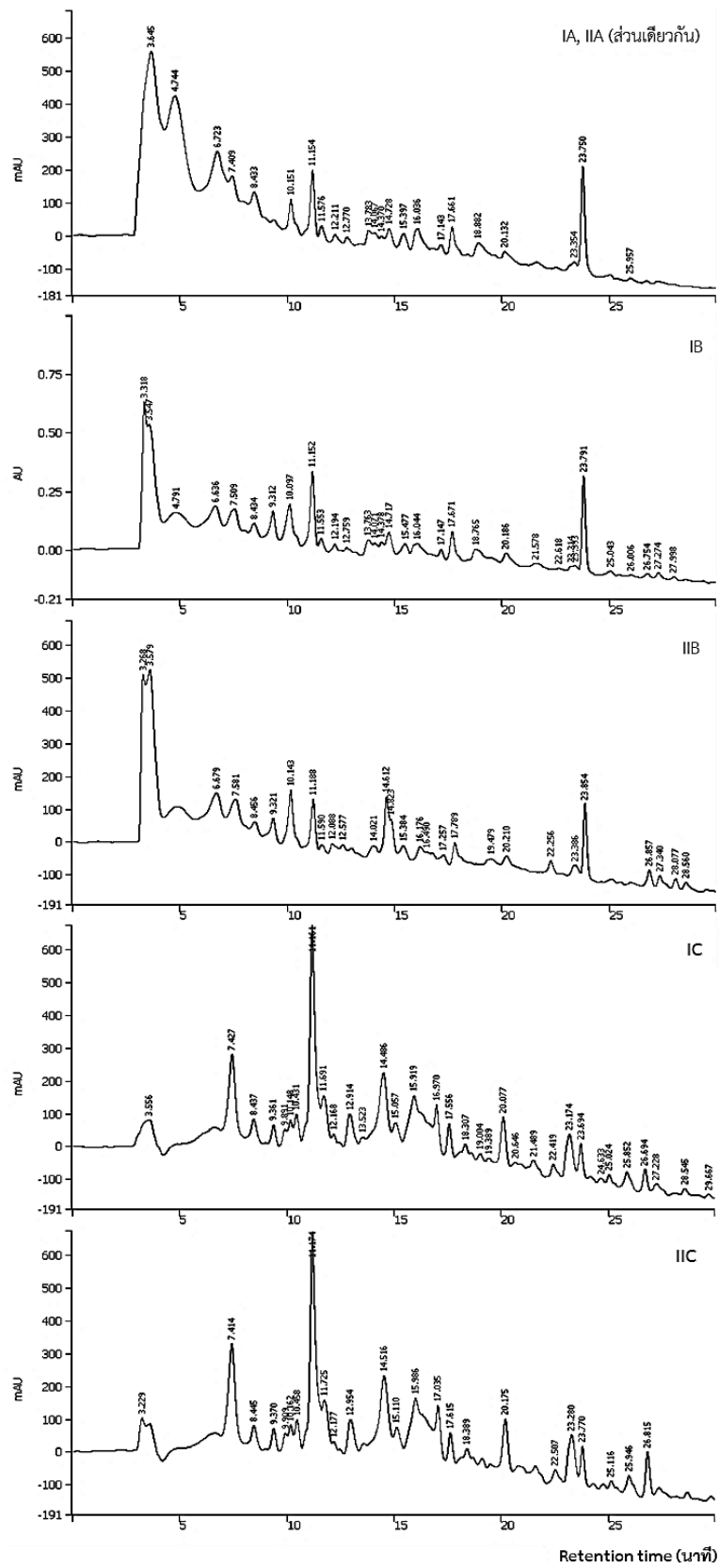
¹ ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

² ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร

หมายเหตุ : ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากตารางที่ 4.5 ส่วน IC และ IIC มีประสิทธิภาพในการลดค่าแรงตึงผิวใกล้เคียงกัน และใกล้เคียงกับส่วน A แต่แตกต่างจากส่วน B และส่วน IIB มีประสิทธิภาพในการลดค่าแรงตึงผิวสูงกว่า IB ทำให้ทราบว่าสารประกอบชีวภาพที่ติดอยู่ที่ผิวเซลล์ และที่อยู่ภายในเซลล์ แตกต่างจากสารประกอบชีวภาพที่อยู่ในน้ำหมัก

เมื่อนำทุกส่วนมาเปรียบเทียบโดยใช้เครื่อง HPLC พบว่าส่วน A, B และ C มีความแตกต่างกันในช่วง 5 นาทีแรก โดย IB และ IIB มีความแตกต่างกันเล็กน้อย และ IC เหมือนกันกับ IIC แสดงในรูปที่ 4.7



รูปที่ 4.7 โครมาโทแกรมของ IA IB IIB IC และ IIC จาก HPLC

4.3 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากชิ้นส่วนใส (BS) และน้ำมัน (HO) ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ YTP6-14

จากการเลี้ยง *A. pullulans* YTP6-14 โดยใช้หัวเชื้อปริมาณร้อยละ 10 โดยปริมาตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด A โดยแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนปริมาณร้อยละ 5 จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ กลูโคส แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ ซูโครส และ กลีเซอรอล ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิตสารประกอบชีวภาพ BS ได้สูงสุด คือ 1.81 ± 0.27 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 5 อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลังย่อยสามารถผลิตสารประกอบชีวภาพ HO ได้สูงสุด คือ 7.37 ± 0.16 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ซูโครสทำให้เชื้อเจริญและมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด คือ 9.59 ± 0.43 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ปริมาณ BS และ HO ที่ผลิตได้ และน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอน

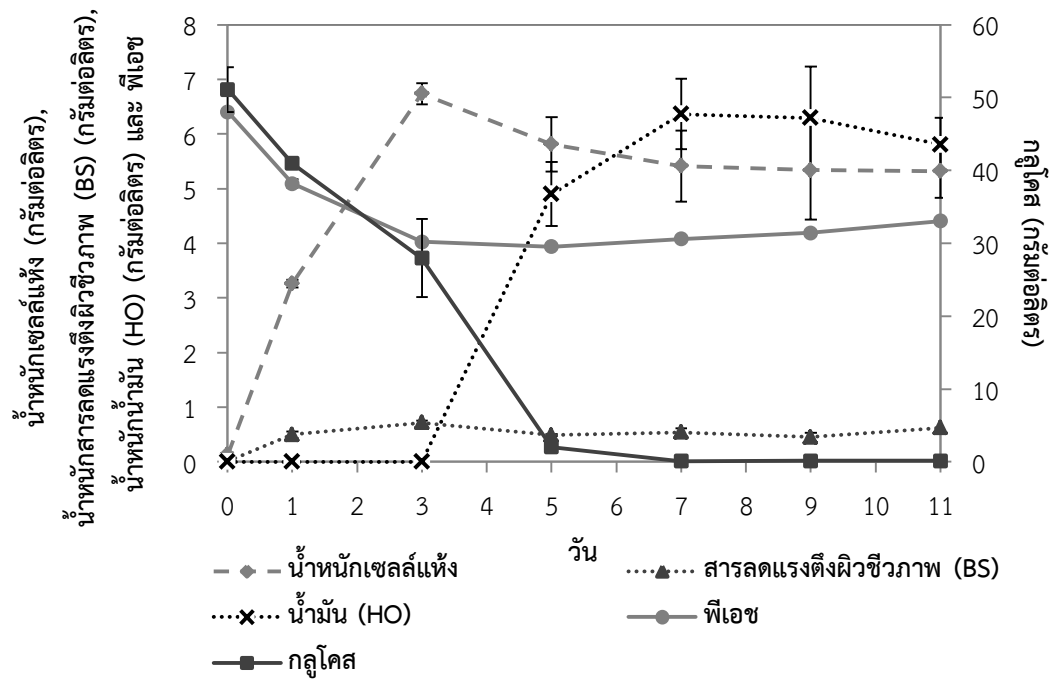
แหล่งคาร์บอน	BS (กรัมต่อลิตร)	HO (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
กลูโคส	0.72 ± 0.03 (d3)	6.37 ± 0.64 (d7)	6.88 ± 0.31 (d7)
แป้งมันสำปะหลังย่อย	0.89 ± 0.27 (d9)	7.37 ± 0.16 (d7)*	8.10 ± 0.35 (d11)
ซูโครส	0.59 ± 0.22 (d3)	4.36 ± 0.37 (d11)	9.59 ± 0.43 (d7)*
กลีเซอรอล	1.81 ± 0.27 (d5)*	1.60 ± 0.04 (d11)	8.47 ± 0.16 (d11)

d คือ วันที่ผลิตได้สูงสุด

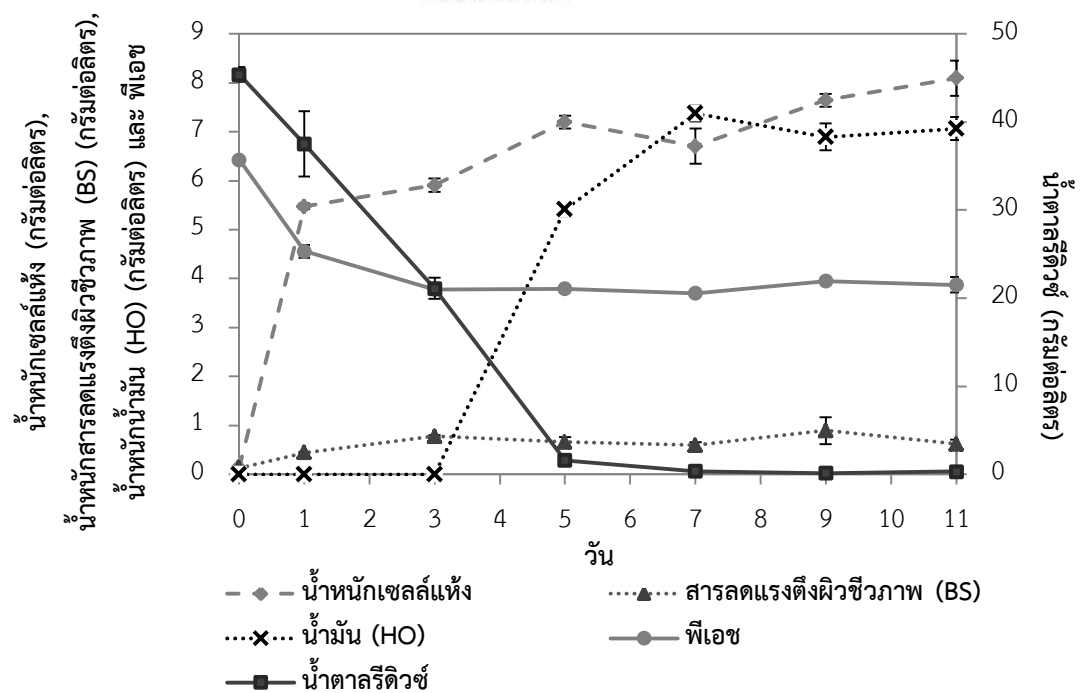
* คือ ปริมาณ BS, HO และน้ำหนักเซลล์แห้งที่สูงที่สุดเมื่อเทียบแต่ละแหล่งคาร์บอน

หมายเหตุ : ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

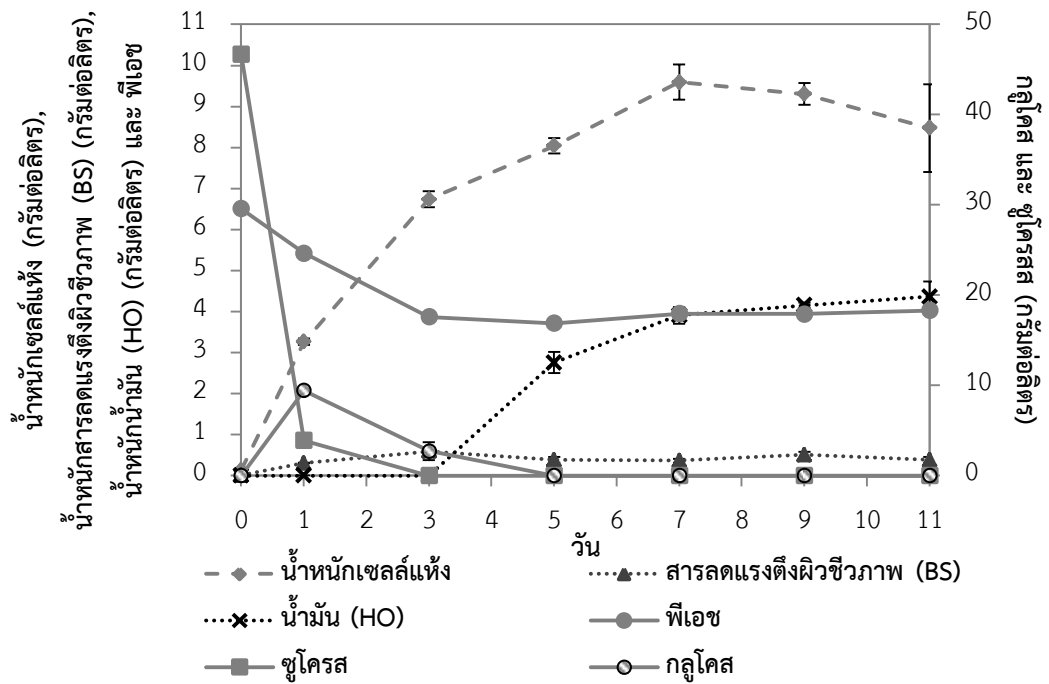
A. pullulans สายพันธุ์ YTP6-14 จะผลิตสารประกอบ BS ตั้งแต่วันที่ 1 และผลิต HO ตั้งแต่วันที่ 5 ยกเว้นเมื่อใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนจะเริ่มผลิต HO ในวันที่ 7 ปริมาณกลูโคสและแป้งมันสำปะหลังย่อยหมดลงในวันที่ 5 ซูโครสหมดในวันที่ 3 ในขณะที่กลีเซอรอลยังคงเหลือถึง 30 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 11 สอดคล้องกับค่าความเป็นกรดต่างที่ลดเพียงเล็กน้อย แสดงในกราฟความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตสารประกอบชีวภาพของ *A. pullulans* สายพันธุ์ YTP6-14 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ดังรูปที่ 4.8 4.9 4.10 และ 4.11



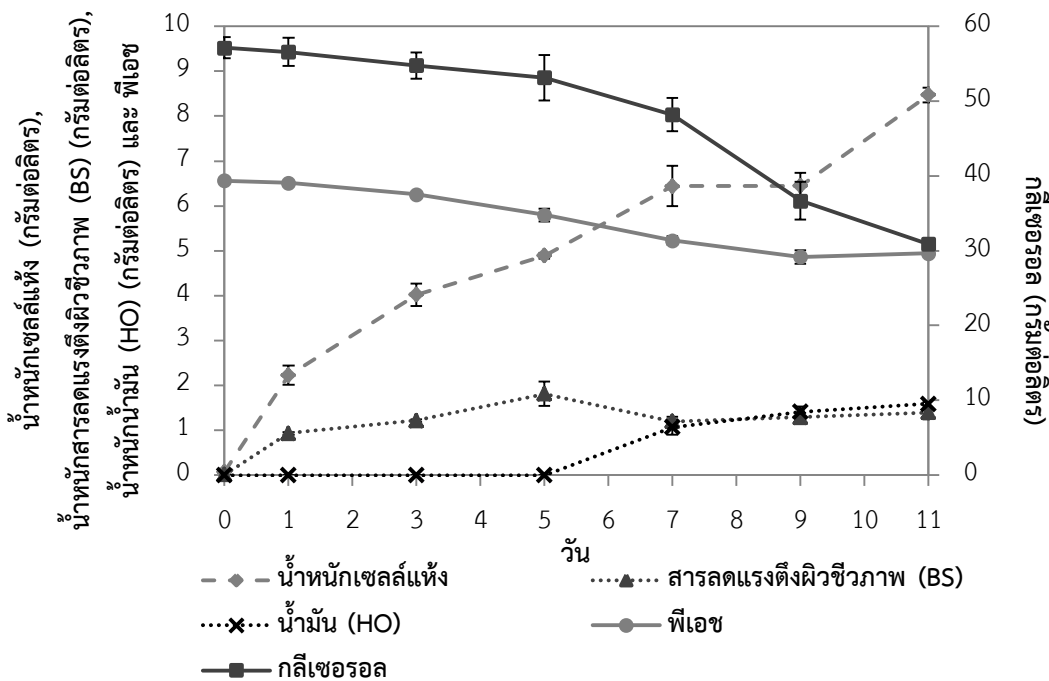
รูปที่ 4.8 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตสารประกอบชีวภาพของ *A. pullulans* สายพันธุ์ YTP6-14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด A ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 4.9 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตสารประกอบชีวภาพของ *A. pullulans* สายพันธุ์ YTP6-14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด A ที่มีแป้งมันสำปะหลังย่อยเป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 4.10 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตสารประกอบชีวภาพของ *A. pullulans* สายพันธุ์ YTP6-14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด A ที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 4.11 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตสารประกอบชีวภาพของ *A. pullulans* สายพันธุ์ YTP6-14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด A ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน

เมื่อนำสารประกอบชีวภาพ BS และ HO ที่ผลิตจากแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดมาเปรียบเทียบประสิทธิภาพ พบว่า BS และ HO มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน ยกเว้น BS ที่ได้จากกลีเซอรอล ดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 ผลต่างค่าแรงตึงผิวเมื่อเทียบกับน้ำบริสุทธิ์ ($\Delta\sigma$) และการกระจายน้ำมัน (ODA) ของ BS และ HO ของแต่ละแหล่งคาร์บอนที่ใช้

สารประกอบชีวภาพ	แหล่งคาร์บอน	ปริมาณที่สกัดได้ (กรัม/ลิตร)	ค่าผลต่างแรงตึงผิว ^{1,2} (mN/m)	ค่าการกระจายน้ำมัน ³ (ชม. ²)
BS	กลูโคส	0.72	24.80 ± 0.00	32.90 ± 1.06
	แป้งมันสำปะหลังย่อย	0.89	26.47 ± 0.58	33.53 ± 0.40
	ซูโครส	0.59	23.46 ± 0.58	32.64 ± 0.65
	กลีเซอรอล	1.81	17.47 ± 0.58	10.93 ± 0.41
HO	กลูโคส	6.38	27.80 ± 0.00	28.35 ± 0.89
	แป้งมันสำปะหลังย่อย	7.37	25.14 ± 0.58	26.53 ± 0.70
	ซูโครส	4.36	26.80 ± 0.00	26.82 ± 1.02
	กลีเซอรอล	1.60	24.80 ± 0.00	25.11 ± 0.48

¹ ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

² ค่าแรงตึงผิวของน้ำบริสุทธิ์ เท่ากับ 66.8 mN/m ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

³ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร

หมายเหตุ : ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

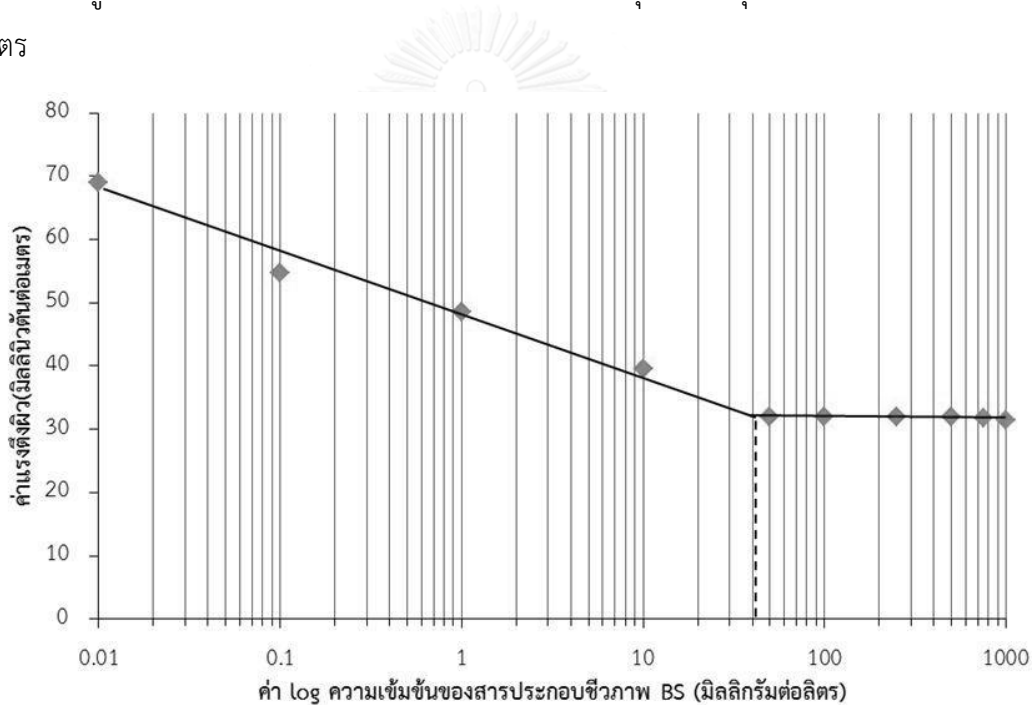
จากตารางที่ 4.7 เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ BS และ HO ระหว่างแต่ละแหล่งคาร์บอนที่ใช้ พบว่า BS และ HO มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน ยกเว้น BS ที่ได้จากกลีเซอรอลจะให้ค่าผลต่างแรงตึงผิวและค่าการกระจายน้ำมันต่ำกว่า BS ที่ได้จากแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น โดย BS จากแป้งมันสำปะหลังย่อยมีประสิทธิภาพสูงสุดคือ ให้ค่าผลต่างแรงตึงผิว 26.47 ± 0.58 มิลลินิวตันต่อเมตร และมีค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 33.53 ± 0.40 ตารางเซนติเมตร รองลงมาคือ กลูโคส ซูโครส และกลีเซอรอล ตามลำดับ สำหรับ HO พบว่า HO ที่ได้จากกลูโคสมีประสิทธิภาพสูงสุดคือ ให้ค่าผลต่างแรงตึงผิว 27.80 ± 0.00 มิลลินิวตันต่อเมตร และมีค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 28.35 ± 0.89 ตารางเซนติเมตร รองลงมาคือ ซูโครส แป้งมันสำปะหลังย่อย และกลีเซอรอล ตามลำดับ

และเมื่อนำ BS และ HO จากแต่ละแหล่งคาร์บอนไปเปรียบเทียบกับ HPLC พบว่าโครมาโทแกรมและพื้นที่ใต้กราฟของ BS จากทุกแหล่งคาร์บอนคล้ายคลึงกัน ยกเว้นกลีเซอรอล และพบว่าเป็นเช่นเดียวกันกับ HO ดังภาคผนวก ข

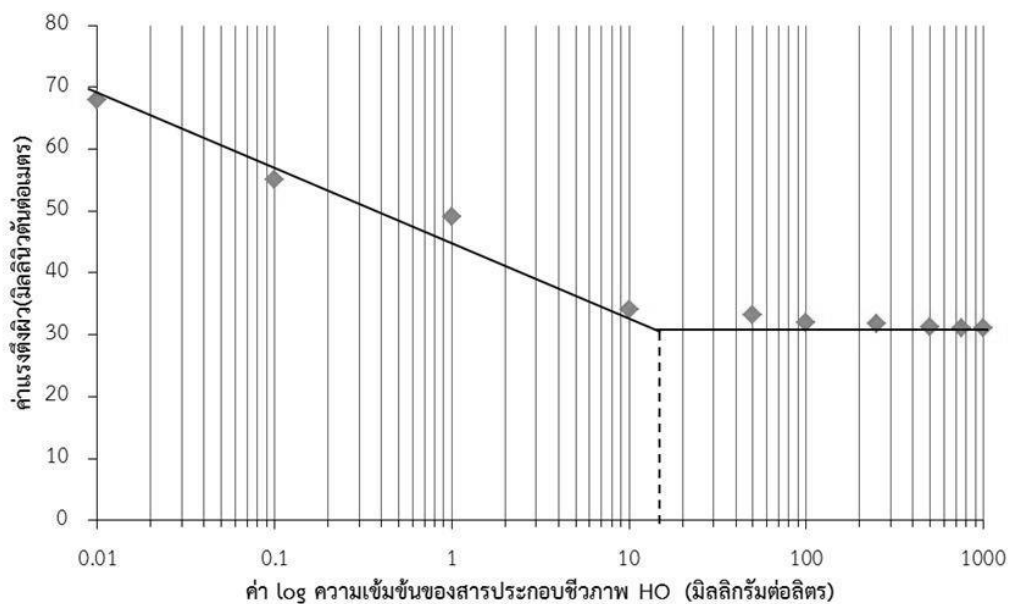
4.4 คุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากชิ้นส่วนไส้ (BS) และน้ำมัน (HO) ที่ผลิตได้จากแป้งมันสำปะหลังย่อย

4.4.1 ค่าความเข้มข้นวิกฤตการเกิดไมเซลล์ (CMC)

เมื่อละลาย BS และ HO ด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 0.01 ถึง 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนำไปวัดค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่องเทนซิโอมิเตอร์ และเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตึงผิวและค่า log ความเข้มข้นของสารประกอบชีวภาพ เพื่อคำนวณหาค่าจุดวิกฤตในการเกิดไมเซลล์ พบว่า BS มีค่า CMC เท่ากับ 42.28 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังรูปที่ 4.12 โดย BS สามารถลดค่าแรงตึงผิวของน้ำบริสุทธิ์ได้ต่ำสุดเท่ากับ 32.79 มิลลินิวตันต่อเมตร ในขณะที่ HO มีค่า CMC เท่ากับ 13.80 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังรูปที่ 4.13 และสามารถลดค่าแรงตึงผิวของน้ำบริสุทธิ์ได้ต่ำสุดเท่ากับ 31.27 มิลลินิวตันต่อเมตร



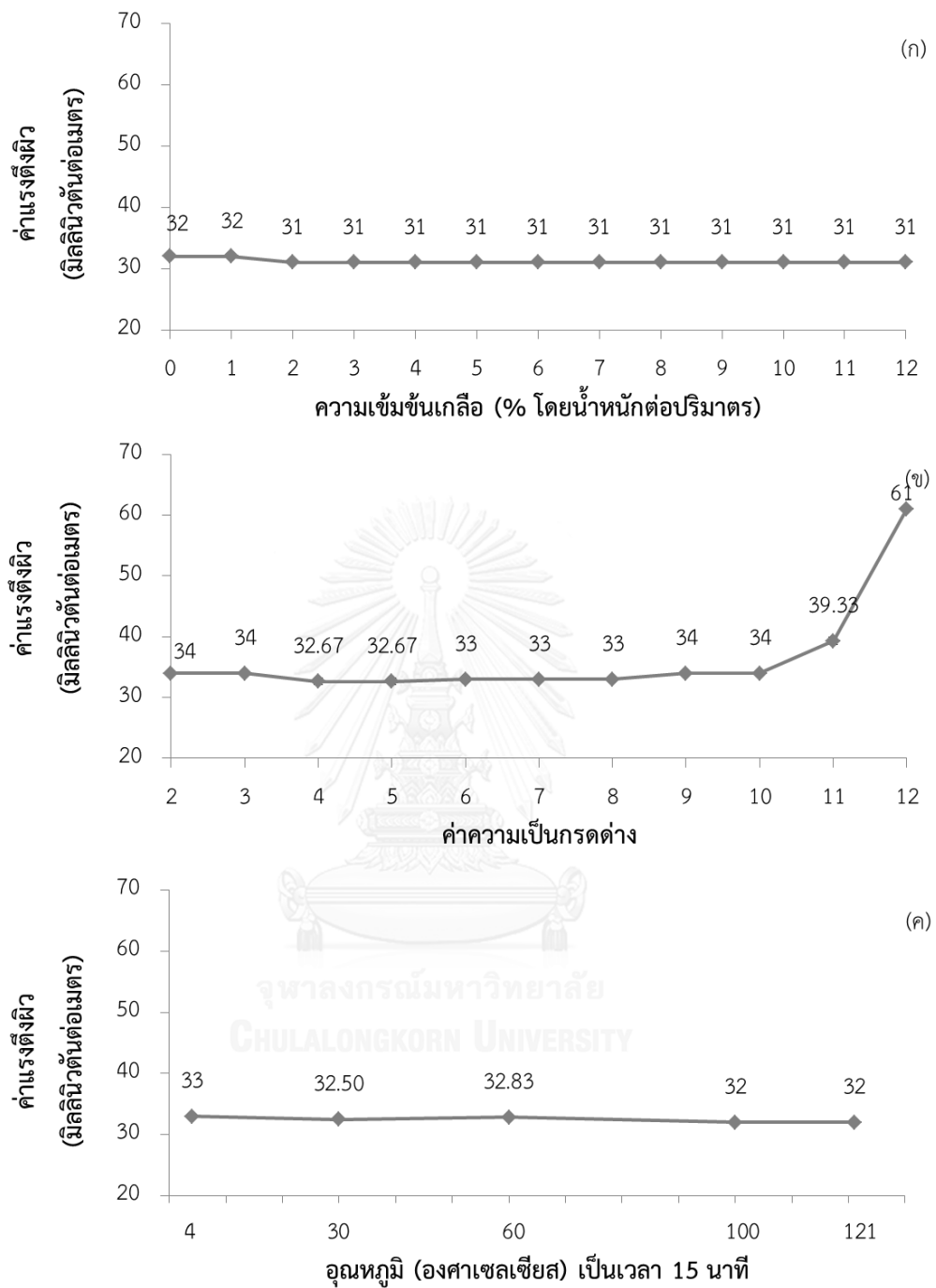
รูปที่ 4.12 ค่าความเข้มข้นวิกฤตการเกิดไมเซลล์ (CMC) ของสารประกอบชีวภาพ BS ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ YTP6-14 เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังย่อยเป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 4.13 ค่าความเข้มข้นวิกฤตการเกิดไมเซลล์ (CMC) ของสารประกอบชีวภาพ HO ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ YTP6-14 เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังย่อยเป็นแหล่งคาร์บอน

4.4.2 ผลของภาวะต่างๆ ต่อค่าแรงดึงผิวของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพจากชิ้นส่วนไส้ (BS) และน้ำมัน (HO)

เมื่อละลาย BS และ HO ด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นเท่ากับค่า CMC แล้วนำไปทดสอบที่ภาวะความเข้มข้นเกลือร้อยละ 1 ถึง 12 โดยมวลต่อปริมาตร ความเป็นกรดต่าง 2 ถึง 12 อุณหภูมิ 4, 30, 60, 100 องศาเซลเซียส 15 นาที และภายใต้หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที วัดค่าแรงดึงผิว ได้ผลดังรูปที่ 4.14 และ 4.15



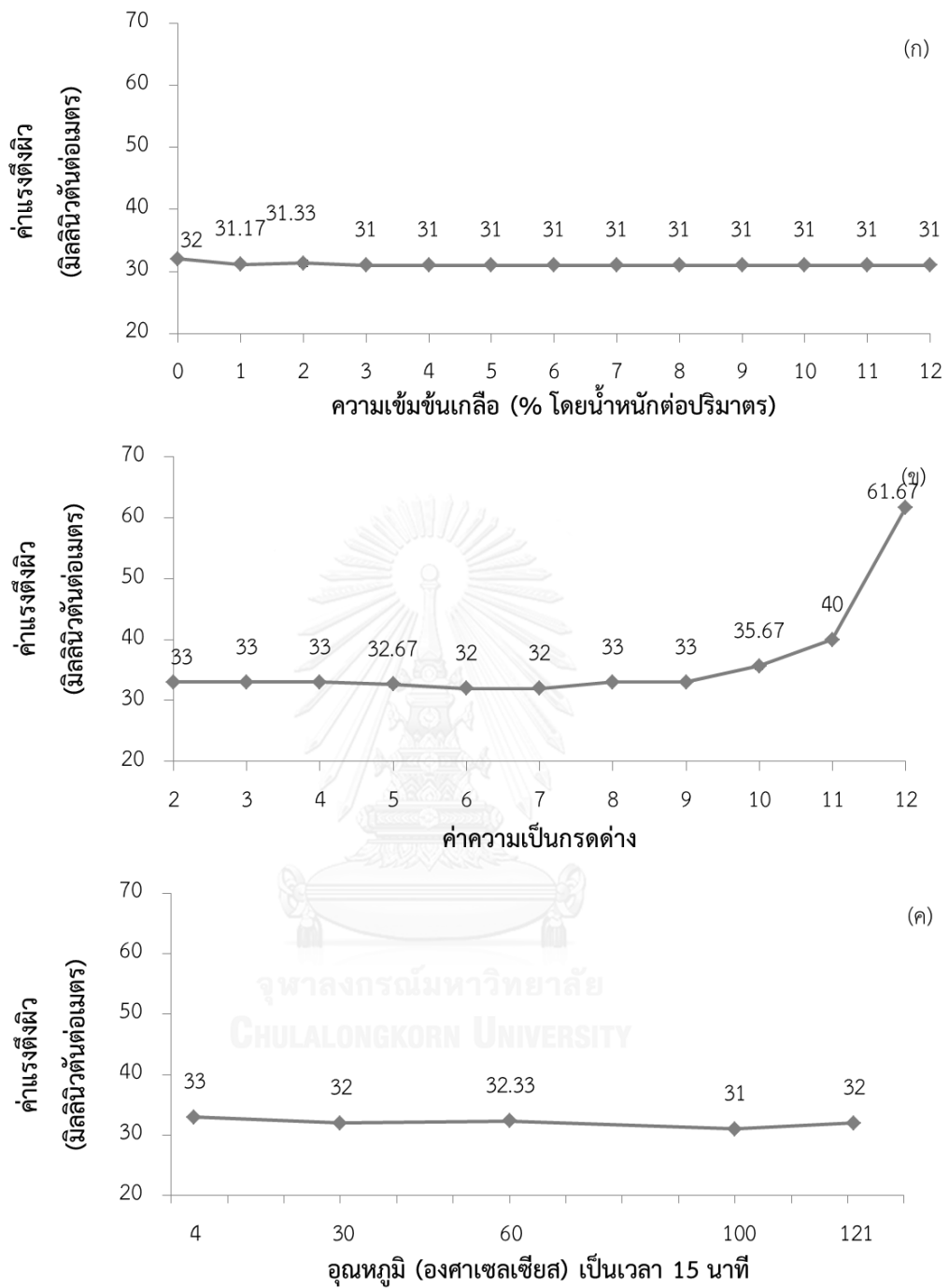
รูปที่ 4.14 ผลของภาวะต่างๆ ต่อค่าแรงดึงผิวของสารประกอบชีวภาพ BS

(ก) ผลของความเข้มข้นเกลือร้อยละ 1 ถึง 12

(ข) ผลของความแตกต่าง 2 ถึง 12

(ค) ผลของอุณหภูมิ 4, 30, 60 องศาเซลเซียส และภาวะภายใต้หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ

หมายเหตุ : ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ



รูปที่ 4.15 ผลของภาวะต่างๆ ต่อค่าแรงดึงผิวของสารประกอบชีวภาพ HO

(ก) ผลของความเข้มข้นเกลือร้อยละ 1 ถึง 12

(ข) ผลของความแตกต่าง 2 ถึง 12

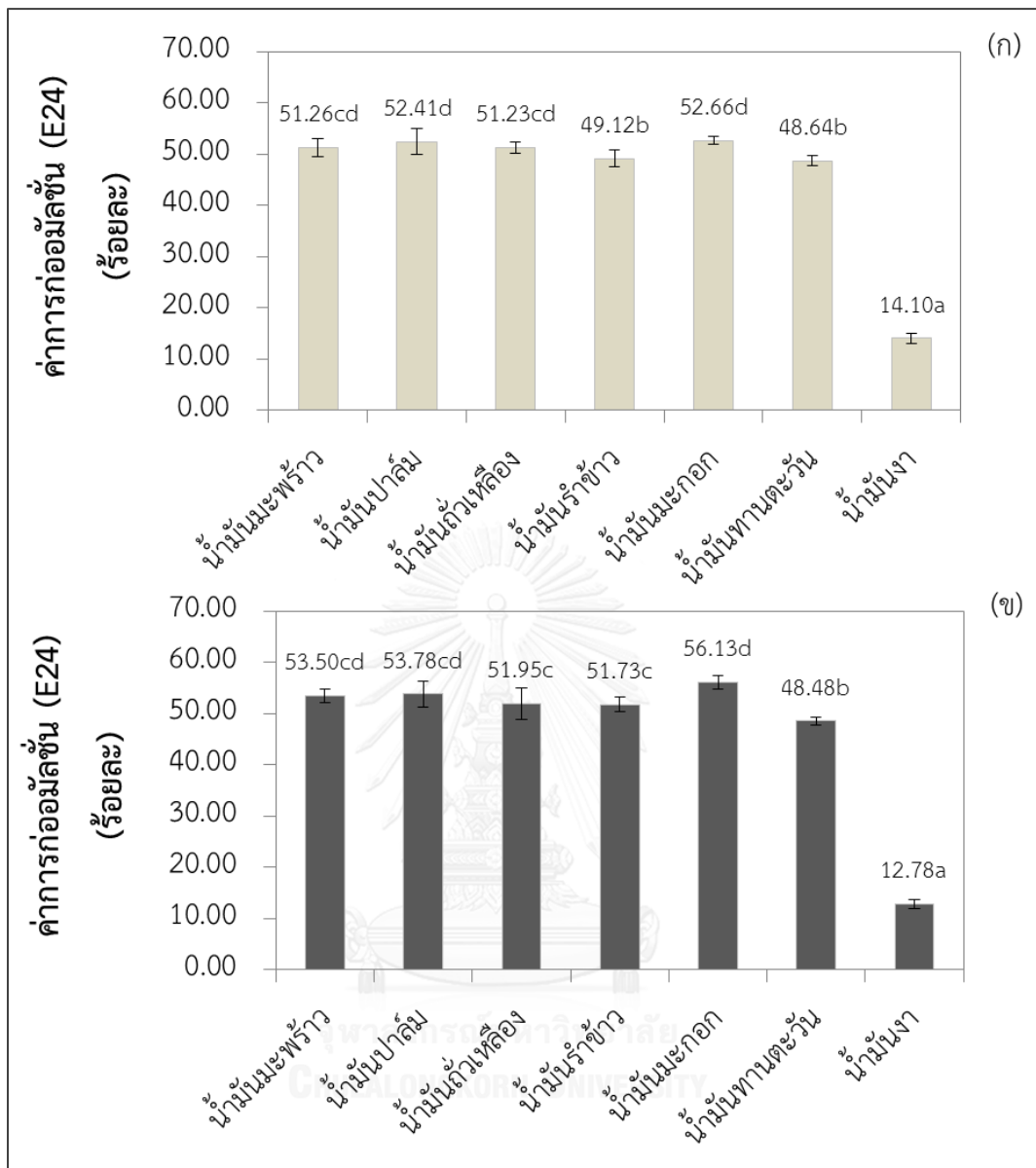
(ค) ผลของอุณหภูมิ 4, 30, 60 องศาเซลเซียส และภาวะภายใต้หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ

หมายเหตุ : ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

จากรูปที่ 4.14 และ 4.15 พบว่า BS และ HO มีผลการทดลองที่คล้ายคลึงกัน โดยความเข้มข้นเกลือมีผลต่อค่าแรงดึงผิวของ BS และ HO เล็กน้อย เมื่อความเข้มข้นเกลือสูงขึ้นจะทำให้ค่าแรงดึงผิวลดลงจาก 32.00 ± 0.00 เป็น 31.00 ± 0.00 มิลลินิวตันต่อเมตร ส่วนอุณหภูมิที่ 4, 30, 60, 100 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที และภาวะภายใต้หม้อน้ำเชื่อม อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ส่งผลต่อค่าแรงดึงผิวของ BS และ HO เล็กน้อยเช่นกัน โดยค่าแรงดึงผิวจะอยู่ในช่วง 31.00 ± 0.00 ถึง 33.00 ± 0.00 มิลลินิวตันต่อเมตร สำหรับค่าความเป็นกรดต่าง 2 ถึง 10 จะมีผลต่อค่าแรงดึงผิวของ BS และ HO เล็กน้อย โดยค่าแรงดึงผิวจะอยู่ในช่วง 32.00 ± 0.00 ถึง 35.67 ± 0.58 มิลลินิวตันต่อเมตร แต่เมื่อค่าความเป็นกรดต่างเพิ่มเป็น 11 จะส่งผลต่อค่าแรงดึงผิวของ BS และ HO ให้เพิ่มขึ้นเป็น 39.33 ± 0.58 และ 40 ± 0.00 ตามลำดับ และเมื่อค่าความเป็นกรดต่างเพิ่มเป็น 12 ค่าแรงดึงผิวของ BS และ HO จะเพิ่มขึ้นถึง 61.00 ± 0.00 และ 61.67 ± 0.58 ตามลำดับ

4.4.3 ความสามารถในการเป็นสารก่ออิมัลชันของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพจากชิ้นส่วนไส้ (BS) และน้ำมัน (HO)

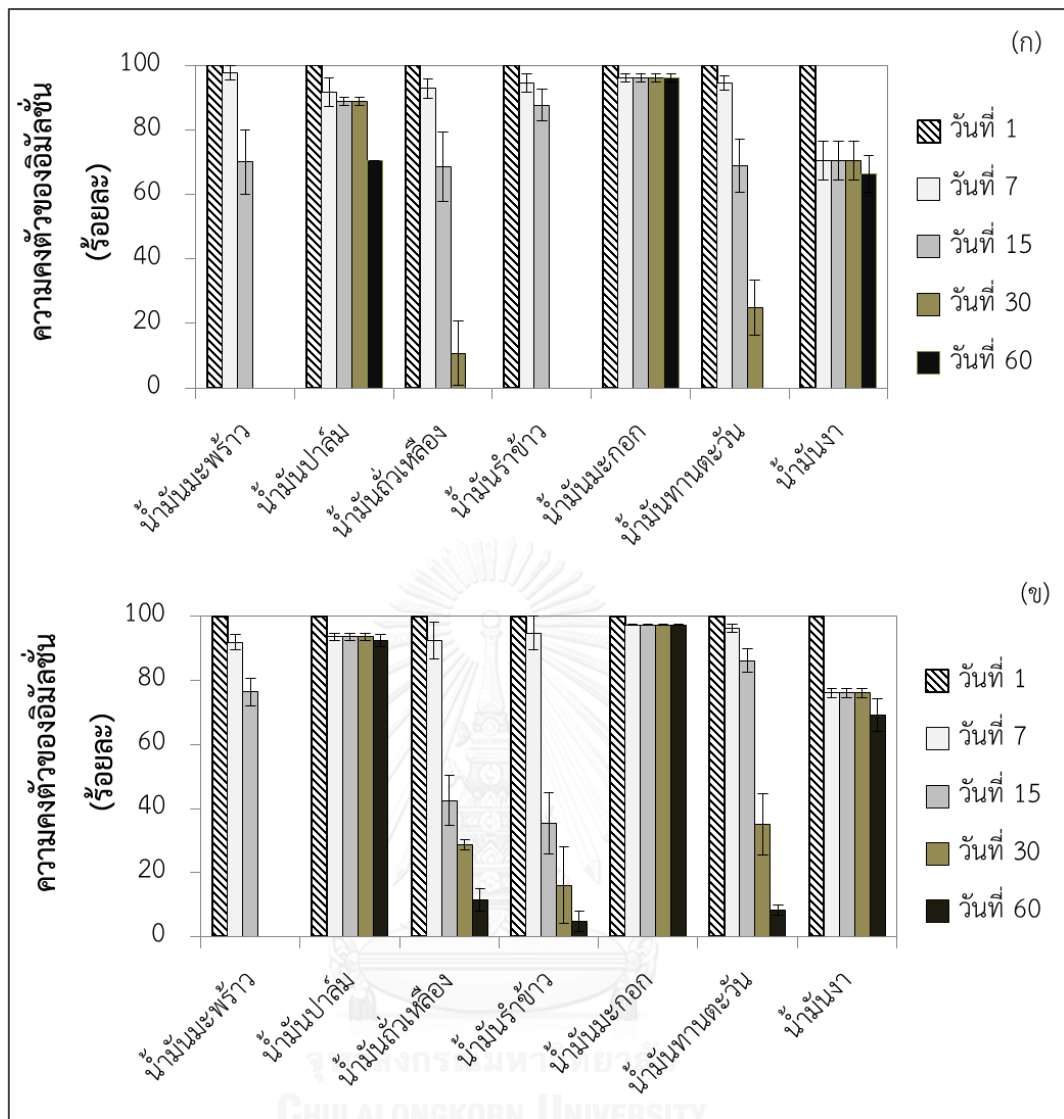
เมื่อนำ BS และ HO มาละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากันกับน้ำมันพืชชนิดต่างๆ ในอัตราส่วน 1:1 ดังนี้ น้ำมันมะพร้าว น้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันรำข้าว น้ำมันมะกอก น้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน และน้ำมันงา ตามลำดับ แล้ววัดค่าอิมัลชันหลังจาก 24 ชั่วโมง แสดงเป็นร้อยละของระดับความสูงอิมัลชันต่อระดับความสูงทั้งหมด (Emulsion index, E24) ดังรูปที่ 4.16 แล้วติดตามความคงตัวของอิมัลชันเป็นเวลา 60 วัน โดยแสดงเป็นร้อยละของอิมัลชันในวันต่างๆ ต่ออิมัลชันวันที่ 1 ดังรูปที่ 4.17



รูปที่ 4.16 ค่าการก่อกอิมัลชันของ BS และ HO กับน้ำมันชนิดต่างๆ

หมายเหตุ : ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 5 ซ้ำ และตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน แสดงค่าความแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยวิธี one-way ANOVA

จากรูปที่ 4.16 พบว่า BS และ HO ก่ออิมัลชันกับน้ำมันมะกอกได้สูงสุดเท่ากับร้อยละ 52.66 และ 56.13 ตามลำดับ รองลงมาคือ น้ำมันปาล์ม น้ำมันมะพร้าว น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันรำข้าว น้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับน้ำมันงา ($P \leq 0.05$) ที่ก่อกอิมัลชันได้ต่ำเพียงร้อยละ 14.10 และ 12.78 ตามลำดับ



รูปที่ 4.17 ค่าความคงตัวของอิมัลชันของ BS (ก) และ HO (ข) กับน้ำมันชนิดต่างๆ

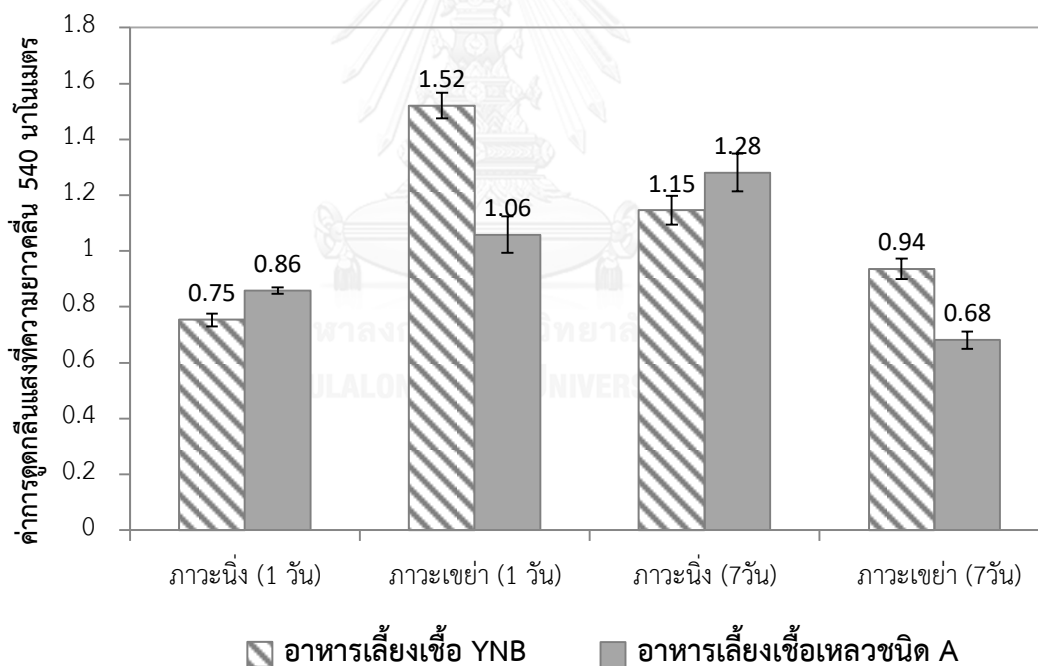
หมายเหตุ : ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 5 ซ้ำ

จากรูปที่ 4.17 เมื่อตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 60 วัน อิมัลชันของน้ำมันมะกอกมีความคงตัวสูงสุดเท่ากับร้อยละ 96.08 และ 97.39 ตามลำดับ รองลงมาคือน้ำมันปาล์มเท่ากับร้อยละ 70.44 และ 92.50 แสดงว่า สารประกอบชีวภาพ BS และ HO ที่ผลิตได้จากเชื้อนี้มีสามารถในการเป็นสารก่ออิมัลชันได้ดีกับน้ำมันมะกอกและน้ำมันปาล์ม

4.5 ผลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากชั้นส่วนใส (BS) และน้ำมัน (HO) ต่อการสร้างไบโอฟิล์ม

4.5.1 ภาวะที่เหมาะสมแก่การสร้างไบโอฟิล์มของ *A. pullulans* สายพันธุ์ YTP6-14

เมื่อสร้างไบโอฟิล์ม โดยถ่ายหัวเชื้อจากข้อ 3.3.2.1 ปริมาตรร้อยละ 10 โดยปริมาตร ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด A ที่มีน้ำตาลกลูโคส และอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Yeast Nitrogen Base แล้วเติมสารแขวนลอยเซลล์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในไมโครเวลเพลทขนาด 96 หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในภาวะนิ่งและภาวะเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 และ 7 วัน ถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อออก แล้ววัดปริมาณไบโอฟิล์มโดยย้อมด้วยคริสตัลไวโอเล็ตแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เปรียบเทียบดังรูปที่ 4.18 พบว่า *A. pullulans* สายพันธุ์ YTP6-14 สร้างไบโอฟิล์มได้สูงที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ YNB เมื่อบ่มในภาวะเขย่าเป็นเวลา 1 วัน รองลงมาคืออาหารสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เมื่อบ่มในภาวะนิ่งเป็นเวลา 7 วัน ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อ YNB ภาวะเขย่าเป็นเวลา 1 วัน จึงถูกเลือกไปใช้ในการศึกษาผลของ BS และ HO ต่อการสร้างไบโอฟิล์มของ *A. pullulans* สายพันธุ์ YTP6-14



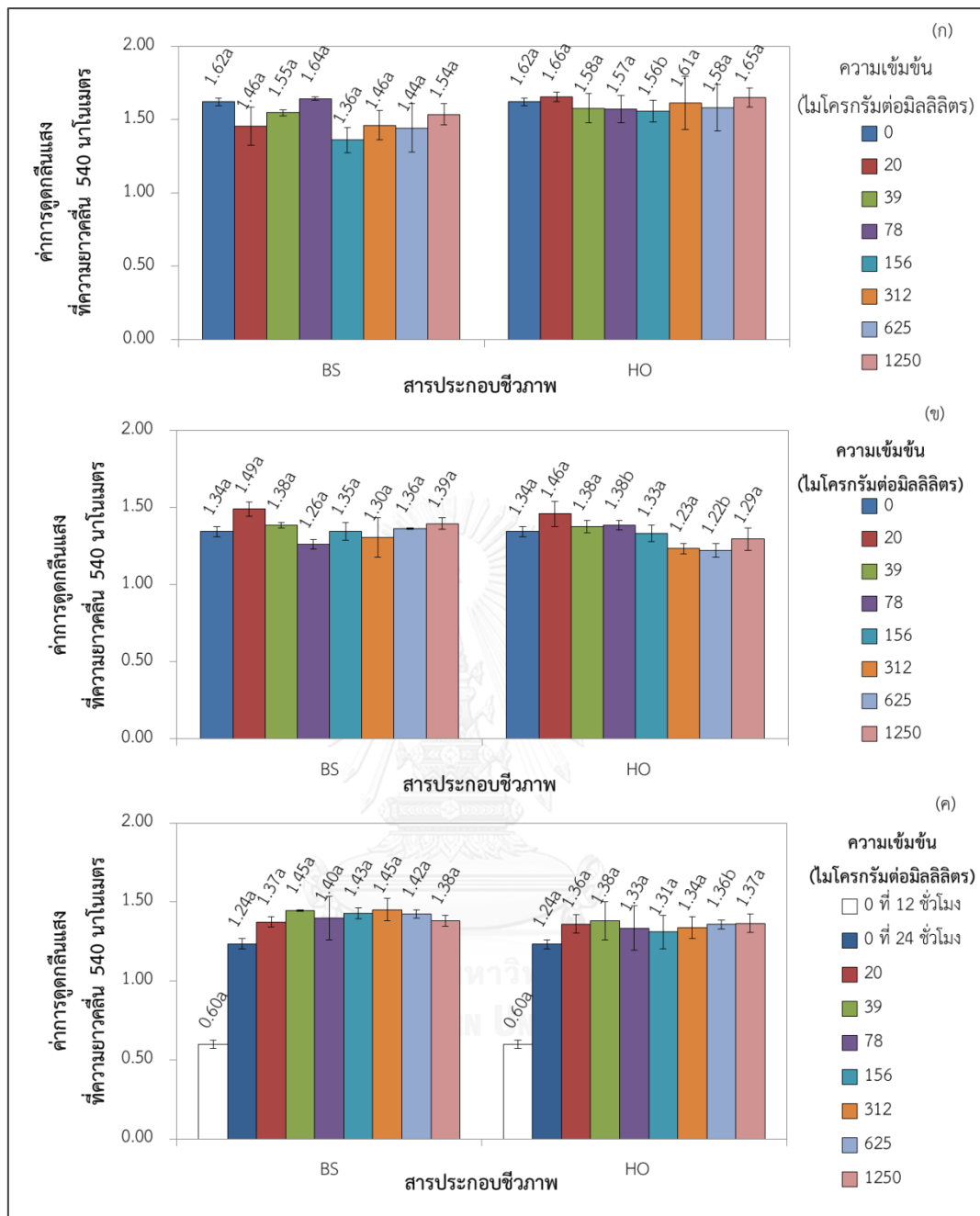
รูปที่ 4.18 ภาวะที่เหมาะสมแก่การสร้างไบโอฟิล์มของ *A. pullulans* สายพันธุ์ YTP6-14

หมายเหตุ : ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

4.5.2 ผลของ BS และ HO ต่อการสร้างไบโอฟิล์มของ *A. pullulans* สายพันธุ์ YTP6-14

จากการเปรียบเทียบผลของ BS และ HO ที่ความเข้มข้น 1,250 625 312 156 78 39 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ต่อการสร้างไบโอฟิล์มของ *A. pullulans* สายพันธุ์ YTP6-14 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 แบบ คือ บ่มสารประกอบชีวภาพก่อนการสร้างไบโอฟิล์ม (pre-coating) บ่มสารประกอบชีวภาพพร้อมกับการสร้างไบโอฟิล์ม (co-incubation) และบ่มสารประกอบชีวภาพหลังการสร้างไบโอฟิล์มได้ครึ่งทาง (mid post-formation) พบว่า BS และ HO ไม่ส่งผลต่อการสร้างไบโอฟิล์มของ *A. pullulans* สายพันธุ์ YTP6-14 ดังรูปที่ 4.19 โดยเมื่อเปรียบเทียบผลของ BS และ HO ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *A. pullulans* สายพันธุ์ YTP6-14 พบว่า BS และ HO ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) ยกเว้นในวิธี pre-coating ที่ความเข้มข้น 156 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร วิธี co-incubation ที่ความเข้มข้น 78 และ 312 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และวิธี mid post-formation ที่ความเข้มข้น 62 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร พบว่า BS และ HO มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P\leq 0.05$)





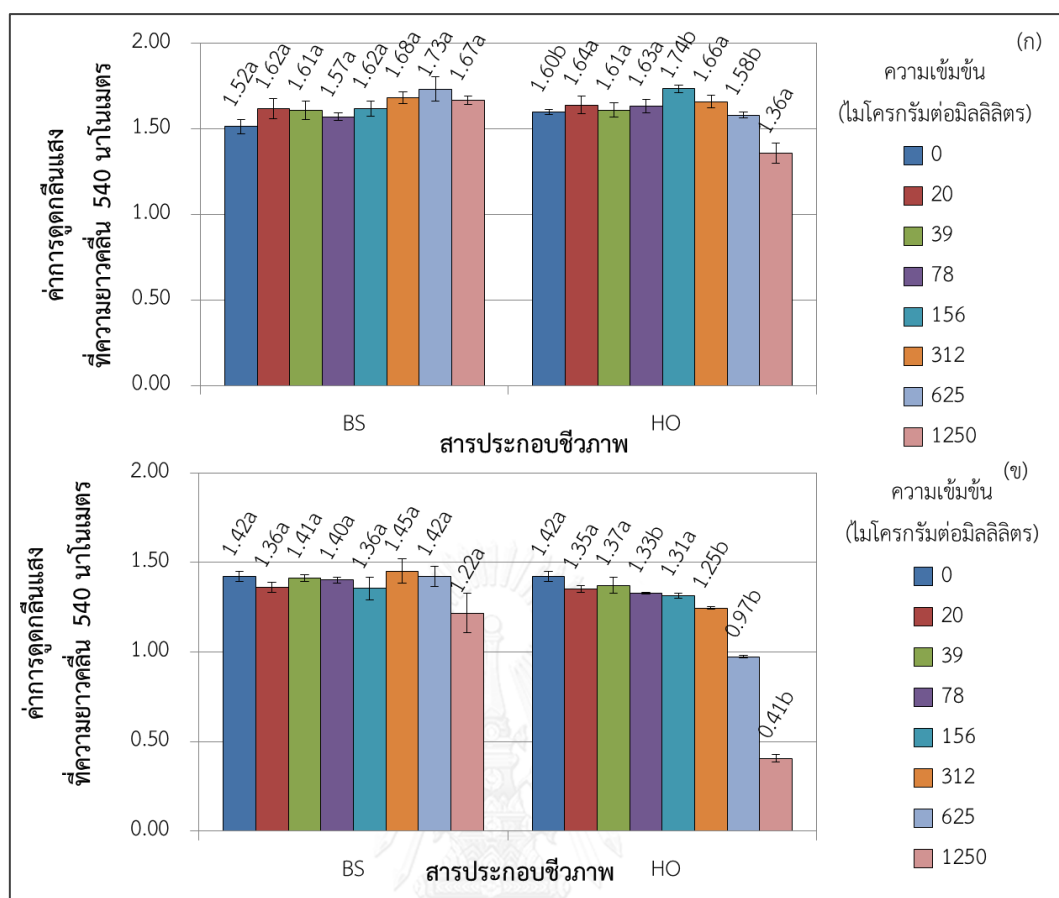
รูปที่ 4.19 ผลของ BS และ HO ต่อการสร้างไบโอฟิล์มของ *A. pullulans* สายพันธุ์ YTP6-14 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ก) วิธี pre-coating (ข) วิธี co-incubation (ค) วิธี mid post-incubation

หมายเหตุ : ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 5 ซ้ำ และตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน แสดงค่าความแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยวิธี one-way ANOVA

4.5.3 ผลของ BS และ HO ต่อการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. sobrinus* และ *S. mutans*

จากศึกษาผลของ BS และ HO ที่ความเข้มข้น 1,250 625 312 156 78 39 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ต่อการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. sobrinus* และ *S. mutans* เป็นเวลา 8 และ 10 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 แบบ คือ บ่มสารประกอบชีวภาพก่อนการสร้างไบโอฟิล์ม (pre-coating) บ่มสารประกอบชีวภาพพร้อมกับการสร้างไบโอฟิล์ม (co-incubation) และ บ่มสารประกอบชีวภาพหลังการสร้างไบโอฟิล์มได้ครึ่งทาง (mid post-formation) ซึ่งเป็นเวลา 4 ชั่วโมง สำหรับ *S. sobrinus* และ 5 ชั่วโมง สำหรับ *S. mutans* พบว่าสารประกอบชีวภาพทั้งสองสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. sobrinus* และ *S. mutans* ได้ ดังรูปที่ 4.20 4.21 และ 4.22

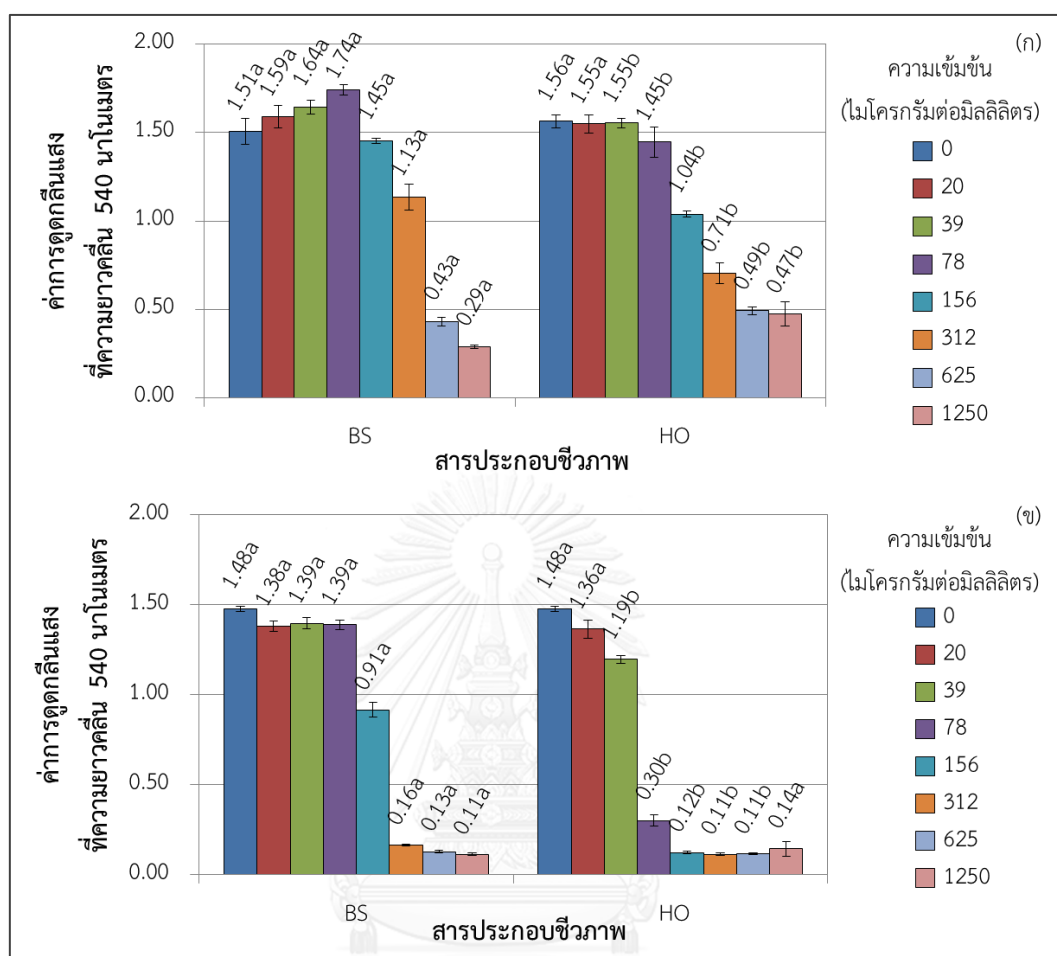




รูปที่ 4.20 ผลของ BS และ HO ต่อการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. sobrinus* (ก) และ *S. mutans* (ข) ด้วยวิธี pre-coating เป็นเวลา 8 และ 10 ชั่วโมง ตามลำดับ

หมายเหตุ : ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 5 ซ้ำ และตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน แสดงค่าความแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยวิธี one-way ANOVA

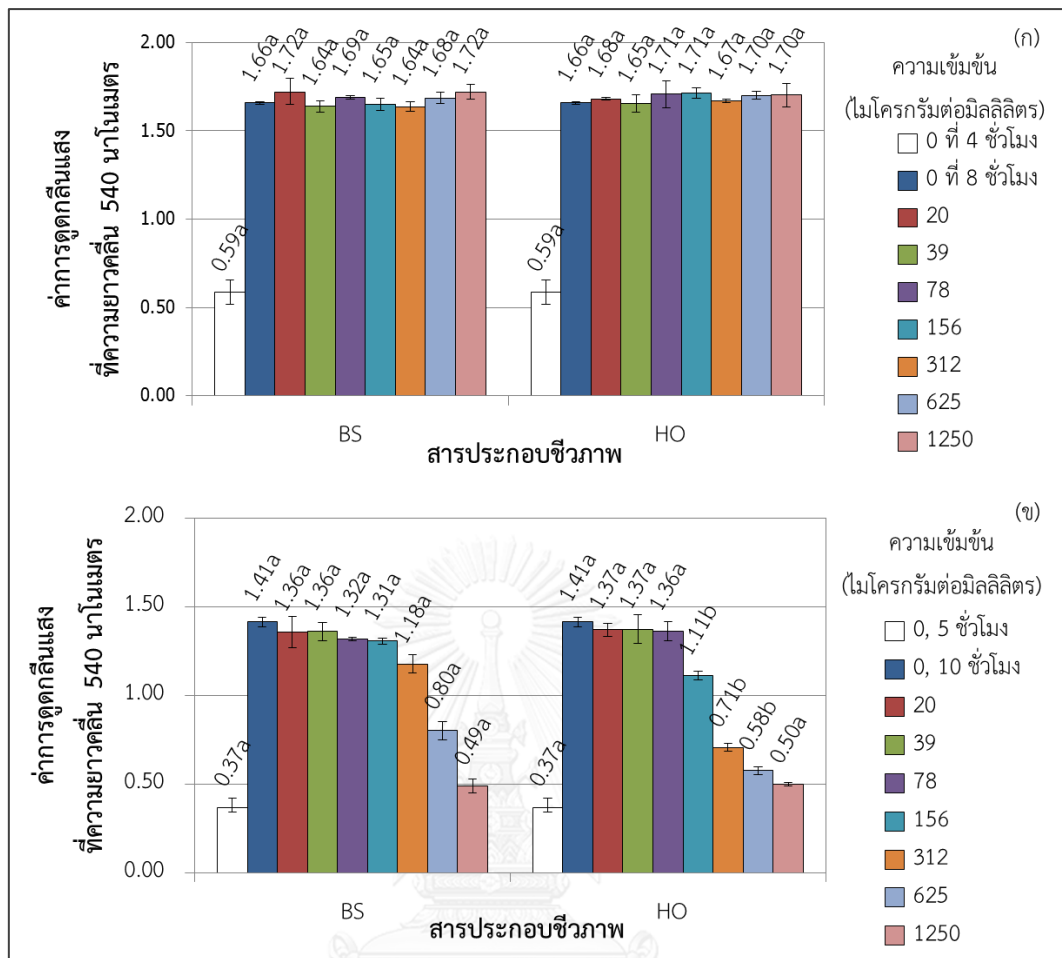
จากรูปที่ 4.20 เมื่อใช้วิธี pre-coating พบว่า BS และ HO ไม่สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. sobrinus* ได้ แต่ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. mutans* ได้บ้าง และเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งไบโอฟิล์มของ BS และ HO พบว่า ที่ความเข้มข้น 625 และ 1,250 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร HO สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. mutans* ได้ดีกว่าและมีความแตกต่างกับ BS อย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) โดยในวิธีนี้ HO สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. mutans* ได้สูงสุดร้อยละ 71.63



รูปที่ 4.21 ผลของ BS และ HO ต่อการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. sobrinus* (ก) และ *S. mutans* (ข) ด้วยวิธี co-incubation เป็นเวลา 8 และ 10 ชั่วโมง ตามลำดับ

หมายเหตุ : ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 5 ซ้ำ และตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน แสดงค่าความแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยวิธี one-way ANOVA

จากรูปที่ 4.21 เมื่อใช้วิธี co-incubation พบว่า BS และ HO สามารถยับยั้งไบโอฟิล์มของ *S. mutans* ได้ดีกว่า *S. sobrinus* และเมื่อเปรียบเทียบความสามารถของ BS และ HO ในการยับยั้งไบโอฟิล์มของ *S. mutans* พบว่า HO ที่ความเข้มข้น 78 ถึง 625 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. mutans* ได้ดีกว่าและมีความแตกต่างกับ BS อย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) โดยในวิธีนี้ BS และ HO สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. mutans* ได้สูงสุดร้อยละ 88.86 และ 91.10 ตามลำดับ



รูปที่ 4.22 ผลของ BS และ HO ต่อการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. sobrinus* (ก) และ *S. mutans* (ข) ด้วยวิธี mid post-formation เป็นเวลา 8 และ 10 ชั่วโมง ตามลำดับ

หมายเหตุ : ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงค่าความแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี one-way ANOVA

จากรูปที่ 4.22 เมื่อใช้วิธี mid post-formation พบว่า BS และ HO ไม่สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. sobrinus* ได้ แต่สามารถยับยั้งการสร้างยับยั้งไบโอฟิล์มของ *S. mutans* ได้ เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งไบโอฟิล์มของ *S. mutans* ระหว่าง BS และ HO พบว่า HO ที่ความเข้มข้น 156 ถึง 625 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. mutans* ได้ดีกว่าและมีความแตกต่างกับ BS อย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) โดยในวิธีนี้ BS และ HO สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. mutans* ได้สูงสุดร้อยละ 62.19 และ 62.46 ตามลำดับ

จากผลการทดลองการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. mutans* 3 วิธี พบว่า ทุกวิธีสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. mutans* ได้ โดยวิธี co-incubation ดีที่สุด รองลงมา คือวิธี

pre-coating และ mid post-formation ตามลำดับ แต่มีเพียงแค่วิธีเดียวที่สามารถยับยั้งไบโอฟิล์มของ *S. sobrinus* ได้คือวิธี co-incubation



บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

Aureobasidium pullulans สายพันธุ์ YTP6-14 เป็นราคล้ายยีสต์ ที่แยกได้น้ำทะเล บริเวณหาดถ้ำพัง เกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี ประเทศไทย โดย Thaniyavarn และคณะ (2013) ต่อมา งานวิจัยของ สุดารัตน์ ลือพงศ์พัฒนนะ (2557) พบว่าสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้สูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยกลูโคสและกลีเซอรอลอย่างละร้อยละ 2.5 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสกัดหยาบมีค่า CMC เท่ากับ 39 มิลลิกรัมต่อลิตร ทนต่อการเปลี่ยนแปลงในช่วงอุณหภูมิ ทนความเป็นกรดต่าง และทนเกลือได้ดี มี Massoia Lactone หรือ 5-hydroxy-2-decenoic acid delta lactone มวลโมเลกุลเท่ากับ 168 กิโลดาลตัน เป็นองค์ประกอบที่มีคุณสมบัติในการลดค่าแรงตึงผิว

ในงานวิจัยนี้ได้นำ *A. pullulans* สายพันธุ์ YTP6-14 มาศึกษาต่อด้านการเจริญ การผลิต สารประกอบชีวภาพ องค์ประกอบ การเพิ่มผลผลิต คุณสมบัติของสารประกอบชีวภาพ และการนำไป ประยุกต์ใช้เบื้องต้น จากการศึกษาการเจริญและการผลิตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 5 เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *A. pullulans* สายพันธุ์ YTP6-14 เป็นจุลินทรีย์ที่น่าสนใจเพราะว่า นอกจากจะสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพละลายอยู่ในน้ำหมัก (biosurfactant, BS) แล้วยังสามารถผลิตน้ำมันที่หนักกว่าน้ำ (heavy oil, HO) แล้วปลดปล่อยออกนอกเซลล์ได้ปริมาณมาก จาก การศึกษาพบว่าน้ำมันถูกผลิตตั้งแต่วันที่ 5 และสูงสุดในวันที่ 9 เท่ากับ 4.54 ± 0.11 กรัมต่อลิตร โดย สามารถสังเกตเห็นหยดน้ำมันขนาดเล็กลอยในน้ำหมัก และเมื่อนำไปปั่นเหวี่ยงน้ำมันจะตกอยู่ได้ชั้น เซลล์ ส่วน BS ที่สกัดได้จากน้ำหมักสูงสุดในวันที่ 3 เท่ากับ 0.96 ± 0.09 กรัมต่อลิตร จาก ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตสารประกอบชีวภาพ (BS และ HO) แสดงให้เห็นว่า HO ถูกผลิตในวันที่ 5 ซึ่งอยู่ในระยะ stationary phase เป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ในขณะที่การผลิต BS นั้นสัมพันธ์กับการเจริญ (growth associated) จากนั้นจึงได้นำตัวอย่าง สารประกอบชีวภาพ BS และ HO ที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยใช้คอลัมน์ C18 reverse phase จากนั้นได้เก็บพิกัดตัวอย่าง BS-4 และ HO-2 ที่เวลา Retention time 11.154 และ 11.161 นาที ไปวัดประสิทธิภาพในการกระจายน้ำมัน แล้ววิเคราะห์หามวลโมเลกุลโดยวิธี GC/MS และ MALDI-TOF พบว่าจากการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี GC/MS แล้วเปรียบเทียบกับงานวิจัย ของ สุดารัตน์ ลือพงศ์พัฒนนะ (2557) และ Vesonder และคณะ (1972) ทำให้ทราบว่าพิกัด BS-4 และ HO-2 มีองค์ประกอบหลักดังนี้

1. 3,5-dihydroxydecanoic acid delta lactone หรือ Massoia lactone + H₂O (187.16)
2. Massoia lactone (168.14)
3. วงแหวน Lactone ของ 3,5-dihydroxydecanoic acid delta lactone (115.06)
4. วงแหวน Lactone ของ Massoia lactone (97.04)

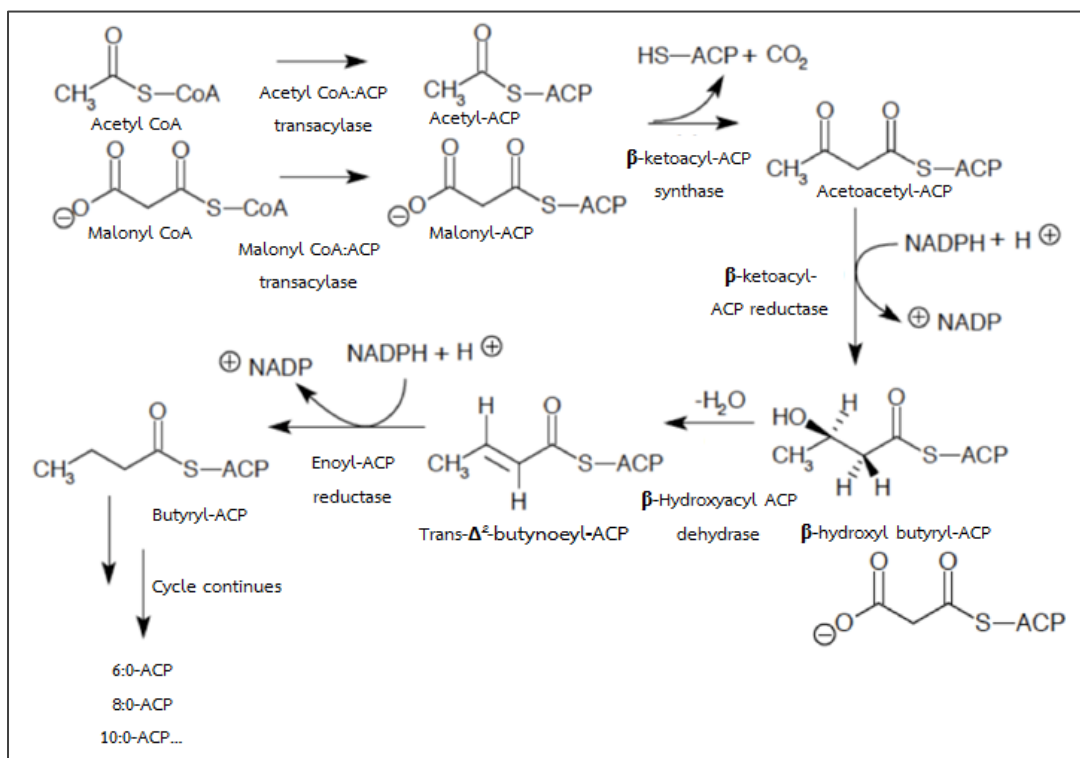
นอกจากนี้ยังมีพีคของ m/z ที่ 43.06, 68.04, 73.08 และ 108.11 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Vesonder และคณะ (1972) ที่นำ 3,5-dihydroxydecanoic acid delta lactone ไปทำปฏิกิริยา dehydration ด้วยกรด p-toluene sulfonic ในสารละลายเบนซีนต้มเดือด แล้ววิเคราะห์ด้วย CG/MS พบว่ามีพีคของ m/z ที่ 168, 115, 97, 73 และ 43 ในทางเดียวกัน Price และคณะ (2013) ได้รายงานไว้ว่าเมื่อนำสารละลายเมทานอลที่ได้จากกระบวนการ methanolysis ของน้ำมัน Liamocin มาวิเคราะห์ด้วย CG/MS พบว่ามีพีคของ m/z ที่ 108, 97, 68 และ 55

แต่เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี MALDI-TOF แล้วเปรียบเทียบกับ m/z กับงานวิจัยของ Price และคณะ (2013) พบว่า BS-4 มีพีค [M+Na]⁺ ที่ m/z เท่ากับ 733.9, 763.9 และ 806.0 ตรงกับ Liamocin Ara-A1, Liamocin A1 และ Liamocin A2 ตามลำดับ ส่วน HO-2 พีค [M+Na]⁺ ที่ m/z เท่ากับ 641.1 ตรงกับ Exophilin A2

เมื่อนำสารสกัดหยาบ HO มาหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี MALDI-TOF แล้วเปรียบเทียบกับ m/z กับงานวิจัยของ Price และคณะ (2013) และ Price และคณะ (2016) พบว่ามีพีค [M+Na]⁺ ที่ m/z เท่ากับ 581.6, 599.6, 733.43, 763.45, 767.49, 827.51, 919.56, 949.57 และ 991.58 ตรงกับ Exophilin A1-H₂O, Exophilin A1, Liamocin Ara-A1, Liamocin A1, Exophilin A1+4Ac, Exophilin B2, Liamocin Ara-B1, Liamocin B1 และ Liamocin B2 ตามลำดับ จากผลการทดลองทำให้ทราบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสร้อยละ 5 สามารถผลิต HO ที่ Liamocin มีส่วนหัวเป็นทั้งน้ำตาลแมนนิทอลและอะราบิทอล ต่างจากรายงานของ Price และคณะ (2016) ที่ว่าแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลจะไม่ส่งผลคือจะโครงสร้างส่วนหัวของเลียมอซินที่เป็นน้ำตาลแมนนิทอล แต่แหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์จะส่งผล อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและชนิดของเลียมอซินยังไม่ชัดเจน

จากโครงสร้างของ Exophilin ที่เป็นกรดไขมันแสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์สังเคราะห์กรดไขมันจากน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้ acetyl CoA ที่ได้จากการย่อยสลายน้ำตาลในวิถี glycolysis มาเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดไขมันขึ้นใหม่ (Van Bogaert และคณะ, 2011) โดยวิธีการสังเคราะห์กรดไขมันแสดงดังรูปที่ 5.1 Exophilin มีโครงสร้างเป็น 3,5-dihydroxydecanoic acid

จำนวน 3-4 กลุ่ม ต่อกันด้วยปฏิกิริยา esterification จากนั้นจะเกิดโครงสร้างที่เรียกว่า Liamocin เมื่อเกิดปฏิกิริยา esterification ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลของ Exophilin และหมู่ไฮดรอกซิลของ น้ำตาลแอลกอฮอล์



รูปที่ 5.1 วิธีการสังเคราะห์กรดไขมันขึ้นมาใหม่

ที่มา : ดัดแปลงจาก Bochyboch (2017) และ Rismani-Yazdi และคณะ (2011)

Massoia lactone ถูกค้นพบและรายงานเป็นครั้งแรกโดย Abe (1937) มีโครงสร้างเป็นวงแหวนเลคโทนที่ไม่อิ่มตัวให้มีกลิ่นหอมคล้ายมะพร้าว ครีม และเนย จึงถูกนำมาใช้เป็นสารเติมแต่งในอุตสาหกรรมอาหาร (Mineeva, 2012) ด้วยเหตุนี้จึงมีงานวิจัยมากมายได้รายงานวิธีการสกัด Massoia lactone จากธรรมชาติโดยสกัดจากเปลือกไม้ *Cryptocarya massoia* ประเทศปาปัวนิวกินี และอินโดนีเซีย (Rali และคณะ, 2007; Rolli และคณะ, 2016) และการสังเคราะห์ด้วยปฏิกิริยาเคมี (Vesonder และคณะ, 1972) แต่หลายวิธีไม่สามารถนำมาใช้ได้เนื่องจากมีข้อจำกัด

ส่วนน้ำมัน Liamocin ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* ถูกนำไปประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์เพื่อเป็นสารยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมและมะเร็งปากมดลูก และเป็นสารต้านแบคทีเรียได้หลายชนิด ได้แก่ *E. faecalis* ATCC 29212, *S. agalactiae* NRRL B-1815, *S. mutans* ATCC 25175, *S. infantarius* NRRL B-41208 และ *S. uberis* (Manitchotpit และคณะ, 2014; Bischoff และ

คณะ, 2015) นอกจากนี้ Wang และคณะ (2014) ยังนำน้ำมัน (triacylglycerols) ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* var. *melanogenum* สายพันธุ์ P10 ไปผลิตเป็นน้ำมันดีเซลที่สามารถจุดติดไฟได้ดี

จากแอกติวิตี้ของ BS และ HO ที่ปลดปล่อยออกนอกเซลล์ซึ่งมาจากการสังเคราะห์ภายในเซลล์ จึงเกิดคำถามว่าทั้ง BS และ HO ที่สังเคราะห์ในเซลล์มีความเหมือนหรือแตกต่างจากที่ปลดปล่อยออกนอกเซลล์หรือไม่ จึงได้ทำการศึกษา BS และ HO เทียบกับรูปที่อยู่ภายในเซลล์โดยการทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงอัลตราโซนิค พบว่าสารประกอบชีวภาพที่ได้ก่อนและหลังจากการแตกเซลล์มีปริมาณใกล้เคียงกัน แต่ในวันที่ 5 ปริมาณสารประกอบชีวภาพส่วน IIB (Sonicate) เท่ากับ 1.00 ± 0.06 กรัมต่อลิตร ส่วน IB (Vortex) เท่ากับ 0.44 ± 0.04 กรัมต่อลิตร แสดงว่าการแตกเซลล์ช่วยปลดปล่อยสารประกอบชีวภาพออกมา ส่วน IIC (Sonicate) และ IC (Vortex) มีปริมาณใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่าเซลล์ไม่ได้เก็บสะสมน้ำมันไว้ในเซลล์ และเมื่อเปรียบเทียบโดยใช้เครื่อง HPLC ทำให้ทราบว่าสารประกอบชีวภาพที่ติดอยู่ที่ผิวเซลล์ (IB) นั้นมีความเหมือนกันกับที่อยู่ภายในเซลล์ (IIB) แต่แตกต่างจากสารประกอบชีวภาพที่อยู่ในน้ำหมัก (A) เล็กน้อย ส่วนน้ำมันที่จุลินทรีย์หลั่งออกมาในน้ำหมัก (IC) มีโครมาโทแกรมเหมือนกับส่วนน้ำมันที่ผ่านการแตกเซลล์ (IIC) อย่างไรก็ตามไม่มีงานวิจัยใดที่รายงานว่า *A. pullulans* สะสมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไว้ในเซลล์ แต่มีรายงานว่า *A. pullulans* สามารถหลั่งเอนไซม์ฟรุคโตซิลทรานสเฟอเรส (Fructosyltransferase) ออกมาในน้ำหมักและสามารถสะสมไว้ในเซลล์ได้ (Lateef และคณะ, 2007) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่รายงานว่าจุลินทรีย์สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและลิปิดสะสมไว้ในเซลล์ พบว่ายีสต์ *Candida antarctica* ทั้งปลดปล่อยแมนโนซิลอีทรีธรีอล ลิปิด (MEL) ออกนอกเซลล์และสะสมไว้ในเซลล์ โดยการสะสม MEL มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นและลดลงตามปริมาณของไตรเอซิลกลีเซอรอล (Triacylglycerols) Kitamoto และคณะ (2002) จึงสันนิษฐานว่าเชื้ออาจเก็บ MEL ไว้เป็นแหล่งพลังงาน

จากการศึกษาการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากชิ้นส่วนใส (BS) และน้ำมัน (HO) ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ YTP6-14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด A โดยแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนปริมาณร้อยละ 5 จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ กลูโคส แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ ซูโครส และ กลีเซอรอล เป็นเวลา 11 วัน พบว่ากลีเซอรอลสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากชิ้นส่วนใสได้สูงสุด คือ 1.81 ± 0.27 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 5 แป้งมันสำปะหลังย่อยสามารถผลิตน้ำมันได้สูงสุดเท่ากับ 7.37 ± 0.16 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากปริมาณน้ำตาลในแป้งมันสำปะหลังย่อยอาจมีน้ำตาลชนิดอื่นที่ไม่ใช่น้ำตาลรีดิคัลปอนอยู่จึงทำให้มีปริมาณตั้งต้นสูงกว่าแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น ซูโครสทำให้ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด คือ 9.59 ± 0.43 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Leathers และคณะ (2015) ที่พบว่า *A. pullulans*

สายพันธุ์ NRRL 50384 เจริญได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดียวกัน โดยสายพันธุ์ของ *A. pullulans* และแหล่งคาร์บอนมีผลต่อการเจริญและการผลิตเลิยโมซิน นอกจากนี้งานวิจัยอื่นอีกมากมายรายงานว่าสายพันธุ์จุลินทรีย์และแหล่งคาร์บอนเป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Gautam และ Tyagi, 2006; Rahman และ Gakpe, 2008)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ดีจะต้องสามารถลดค่าแรงตึงผิวของน้ำบริสุทธิ์จาก 72 เป็น 35 มิลลินิวตันต่อเมตร ได้ (Mulligan, 2005) BS และ HO มีค่า CMC เท่ากับ 42.28 และ 13.80 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และสามารถลดค่าแรงตึงผิวของน้ำบริสุทธิ์ได้ต่ำสุดเท่ากับ 32.79 และ 31.27 มิลลินิวตันต่อเมตร ตามลำดับ และจะเห็นได้ว่าทั้ง BS และ HO มีค่า CMC ต่ำ โดยต่ำกว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแรมโนลิปิดที่ผลิตได้จาก *P. aeruginosa* สายพันธุ์ LBI ต่ำกว่าเซอร์แฟคตินที่ผลิตได้จาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ ATCC 21332 และต่ำกว่าโซโฟโรลิปิดสกัดหยาบที่ได้จาก *Wickerhamiella domercqiae* var. *sophorolipid* สายพันธุ์ CGMCC 1576 ดังตารางที่ 5.1

ตารางที่ 5.1 ค่า CMC ของ BS และ HO เทียบกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดต่างๆ

จุลินทรีย์	สารประกอบชีวภาพ	ค่า CMC (mg/L)	แหล่งอ้างอิง
<i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ YTP6-14	BS	42.28	งานวิจัยนี้
<i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ YTP6-14	HO	13.80	งานวิจัยนี้
<i>P. aeruginosa</i> สายพันธุ์ LBI	สารสกัดหยาบ Rhamnolipid	51.5	Nitschke และคณะ (2010)
<i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ ATCC 21332	สารสกัดหยาบ Surfactin	50	Whang และคณะ (2008)
<i>W. domercqiae</i> var. <i>sophorolipid</i> สายพันธุ์ CGMCC 1576	สารสกัดหยาบ Sophorolipid	20-130	Ma และคณะ (2012)

ค่าความเป็นกรดต่าง อุณหภูมิ ความดัน และ ความเข้มข้นของไอออน เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่า CMC เพื่อการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมจึงต้องการสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ทนต่อภาวะเหล่านี้ได้ (Mulligan, 2005; Nitschke และ Costa, 2007) BS และ HO สามารถทนเกลือได้ถึงร้อยละ 12 ทนต่อความเป็นกรดต่างในช่วง 2 ถึง 10 ทนต่ออุณหภูมิ 4, 30, 60, 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และทนต่อภาวะภายใต้หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที BS และ HO จึงเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพที่จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้ ตัวอย่างเช่น สารลดแรงตึงผิว

ชีวภาพที่ทนเกลือได้จะมีประโยชน์ต่อการนำไปใช้ในการขุดเจาะน้ำมันเพราะมักจะเป็นภาวะที่มีความเข้มข้นเกลือสูง (Shavandi และคณะ, 2011)

ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์เป็นอีกสมบัติหนึ่งที่ถูกนำไปใช้อย่างมากในอุตสาหกรรม สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงถูกนำไปใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์ในอุตสาหกรรมได้แก่ อิมัลชัน โลโซซาน และอลาซาน (Nitschke และ Costa, 2007; Dams-Kozłowska และคณะ, 2008) ถึงแม้ว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะไม่สามารถก่ออิมัลชันได้ดีนัก แต่จากการทดสอบพบว่าทั้ง BS และ HO มีความสามารถในการก่ออิมัลชันได้ดี สอดคล้องกับรายงานของ Nitschke และ Pastore (2006) ที่ว่า *B. subtilis* ผลิตไลโปเปปไทด์ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำแต่สามารถก่ออิมัลชันที่มีความเสถียรได้ในน้ำมันถั่วเหลือง และ น้ำมันมะพร้าว สำหรับ BS และ HO สามารถก่ออิมัลชันกับน้ำชนิดต่างๆ ได้ดี โดยก่ออิมัลชันกับมันมะกอกได้สูงสุดมีค่า E24 เท่ากับร้อยละ 52.66 และ 56.13 ตามลำดับ รองลงมาคือน้ำมันปาล์ม น้ำมันมะพร้าว น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันรำข้าว น้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน และเมื่อตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 60 วัน อิมัลชันของน้ำมันมะกอกมีความคงตัวสูงสุดเท่ากับร้อยละ 96.08 และ 97.39 ตามลำดับ รองลงมาคือน้ำมันปาล์มเท่ากับร้อยละ 70.44 และ 92.50 แสดงว่าสารประกอบชีวภาพ BS และ HO ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ YTP6-14 นี้มีความสามารถการเป็นสารก่ออิมัลชันได้ดีน้ำมันมะกอกและน้ำมันปาล์ม

จากรายงานของ Kuiper และคณะ (2004) ว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด Putisolvins ของ *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ PCL1445 สามารถยับยั้งการก่อไบโอฟิล์มของตัวมันเองได้ จึงนำ BS และ HO ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ YTP6-14 มาทำการทดลองการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มกับตัวมันเอง และกับ *Streptococcus mutans* และ *Streptococcus sobrinus* ที่เป็นที่ยอมรับว่าการสร้างไบโอฟิล์มของมันจัดเป็น virulent factor ในการก่ออาการฟันผุ จึงได้ศึกษาผลของสารประกอบชีวภาพต่อการสร้างไบโอฟิล์มของ *A. pullulans* สายพันธุ์ YTP6-14 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และผลต่อการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. sobrinus* และ *S. mutans* เป็นเวลา 8 และ 10 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 แบบ คือ pre-coating, co-incubation และ mid post-formation พบว่า สารประกอบชีวภาพ BS และ HO ที่ความเข้มข้น 0 ถึง 1,250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่ส่งผลต่อการสร้างไบโอฟิล์มของ *A. pullulans* สายพันธุ์ YTP6-14 แต่สามารถยับยั้งไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย *S. mutans* และ *S. sobrinus* ได้

จากการทดสอบการยับยั้งไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย *S. mutans* และ *S. sobrinus* ด้วยทั้ง 3 วิธี พบว่าทุกวิธีสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. mutans* ได้ แต่มีเพียงแค่วิธีเดียวที่สามารถยับยั้งไบโอฟิล์มของ *S. sobrinus* ได้คือวิธี co-incubation แต่ประสิทธิภาพในการยับยั้งไบโอฟิล์ม

น้อยกว่า *S. mutans* โดยพบว่า BS และ HO สามารถยับยั้ง *S. sobrinus* ได้เพียงร้อยละ 24.73 และ 53.16 ตามลำดับ แต่สามารถยับยั้ง *S. mutans* ได้ร้อยละ 88.86 และ 91.10 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าจำเป็นต้องใช้ความเข้มข้นสารมากขึ้นเพื่อยับยั้งไบโอฟิล์มของ *S. sobrinus* และถึงแม้ว่าแบคทีเรียทั้งสองจะถูกจัดจำแนกอยู่ใน Streptococci กลุ่ม Mutans เช่นเดียวกัน แต่มีความแตกต่างกัน คือ *S. mutans* มีน้ำตาลแรมโนสและกลูโคสในโครงสร้างของผนังเซลล์ และมีสายกรดอะมิโน Lys-Alanine₂₋₃ ใน peptidoglycan แต่ *S. sobrinus* มีน้ำตาลแรมโนส กลูโคส และกาแลกโตส ส่วนสายกรดอะมิโนใน peptidoglycan เป็น Lys-Thr-Ala (Whiley และ Beighton, 1998)

เมื่อใช้วิธี pre-coating พบว่า HO ที่ความเข้มข้น 1,250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งไบโอฟิล์มของ *S. mutans* ได้ร้อยละ 71.63 เมื่อเทียบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จาก *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* A20 ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวิธีเดียวกันสามารถยับยั้งไบโอฟิล์มของ *S. mutans* HG 985 และ *S. mutans* NS ได้ร้อยละ 31.4 และ 38.6 ตามลำดับ (Gudiña และคณะ, 2010) HO จึงเป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งไบโอฟิล์มของ *S. mutans* และจากวิธี mid post-formation พบว่าสารไม่ได้ไปทำลายไบโอฟิล์มที่สร้างอยู่ก่อนแล้ว แต่เข้าไปยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม งานวิจัยจำนวนมากกล่าวว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าแรงตึงผิวและประจุของผนังเซลล์ส่งผลต่อการไปยับยั้งการเกาะติดกันของเซลล์ (cell-to-cell) หรือไปยับยั้งการเกาะติดกับพื้นผิว (cell-to-surface) หรือสารลดแรงตึงผิวชีวภาพอาจทำให้ความเป็น hydrophilic หรือ hydrophobic ของพื้นผิวของวัสดุเปลี่ยนแปลงไป หรืออาจไปมีผลต่อการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ (Fracchia และคณะ, 2010; Monteiro และคณะ, 2011)

BS และ HO ไม่สามารถยับยั้งการก่อไบโอฟิล์มของ *A. pullulans* สายพันธุ์ YTP6-14 ได้ แต่ให้ผลยับยั้งการก่อไบโอฟิล์มของแบคทีเรียชนิดอื่นบางชนิดได้ เช่น *S. mutans* และ *S. sobrinus* ที่จับเกาะและก่อโรคฟันผุ อย่างไรก็ตาม BS และ HO ยับยั้งไบโอฟิล์มได้ดีเฉพาะกับ *S. mutans* ส่วนกลไกจะเป็นอย่างไรนั้นจะต้องศึกษาต่อไป โดย BS และ HO อาจจะไป dis-process ของการสร้างไบโอฟิล์ม ซึ่งก็จะขึ้นกับจุลินทรีย์ที่ทดสอบ

ในงานวิจัยนี้ *A. pullulans* สายพันธุ์ YTP6-14 ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพละลายอยู่ในน้ำหมัก (biosurfactant, BS) และผลิตน้ำมันที่หนักกว่าน้ำ (heavy oil, HO) แล้วปลดปล่อยออกมาภายนอกในรูปของหยดน้ำมัน จากการวิเคราะห์พบว่าสารประกอบชีวภาพทั้งสองมีลักษณะสมบัติที่แตกต่างกัน สารประกอบชีวภาพ HO มีองค์ประกอบหลักเป็น Massoia lactone, Liamocin และ Exophilin ส่วนสารประกอบชีวภาพ BS ที่อยู่ในเซลล์และที่ปลดปล่อยออกมาจากเซลล์นั้นไม่ต่างกัน โดยดูได้จากผลการวิเคราะห์ IB และ IIB ที่ไม่พบความแตกต่าง และเมื่อเลี้ยง *A. pullulans* สายพันธุ์

YTP6-14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด A ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ปริมาณร้อยละ 5 พบว่า กลีเซอรอลสามารถผลิต BS ได้สูงสุด คือ 1.81 ± 0.27 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 5 แป้งมันสำปะหลังย่อยสามารถผลิต HO ได้สูงสุดเท่ากับ 7.37 ± 0.16 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ซูโครสทำให้ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด คือ 9.59 ± 0.43 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 โดย BS และ HO ที่ได้จากแป้งมันสำปะหลังย่อยมีค่า CMC ต่ำ ทนต่อภาวะต่างๆ เช่น ความเข้มข้นเกลือ ความเป็นกรดต่าง และอุณหภูมิต่างๆ ได้ดี รวมทั้งสามารถก่ออิมัลชันที่มีความเสถียรได้ในน้ำมันมะกอกและน้ำมันปาล์ม สำหรับการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มนั้น BS และ HO สามารถยับยั้งการก่อไบโอฟิล์มของ *S. mutans* ได้ดี แต่กลไกในการยับยั้งยังคงต้องศึกษาต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. ศึกษาการเพิ่มปริมาณการผลิตในถังหมัก
2. ควรศึกษาคุณสมบัติอื่นๆ เพิ่มเติม เช่น ความสามารถในการเกิดฟอง ความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระ ความเป็นพิษต่อเซลล์
3. นำคุณสมบัติอื่น เช่น ความเสถียรในอิมัลชันน้ำมันมะกอกไปประยุกต์ใช้ในอาหาร เช่น น้ำสลัด
4. ควรติดตามปริมาณ Planktonic cells และ Biofilm cells หลังจากการทดลองการยับยั้งไบโอฟิล์ม
5. ควรศึกษาการนำ HO ไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดช่องปากและฟัน หรือประยุกต์ใช้ในหมากฝรั่ง เพื่อยับยั้งไบโอฟิล์มของ *S. sobrinus* และ *S. mutans*

รายการอ้างอิง

- Abe, S. Massoy oil. Journal of the Chemical Society of Japan 58 (1937): 246-251.
- Anderl, J.N., Franklin, M.J., and Stewart, P.S. Role of Antibiotic Penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. Antimicrobial agents and chemotherapy 44 (2000): 1818-1824.
- Andrewartha, J. et al. Drag force and surface roughness measurements on freshwater biofouled surfaces. Biofouling 26 (2010): 487-496.
- Arima, K., Kakinuma, A., and Tamura, G. Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. Biochemical and Biophysical Research Communications 31 (1968): 488-494.
- Arutchevi, J., and Doble, M. Mannosylerythritol lipids: microbial production and their applications. in Soberón-Chávez, G. (ed.), Biosurfactants, 145-177. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2011.
- Arutchevi, J., Joseph, C., and Doble, M. Process optimization for the production of rhamnolipid and formation of biofilm by *Pseudomonas aeruginosa* CPCL on polypropylene. Biochemical Engineering Journal 56 (2011): 37-45.
- Ayed, H.B. et al. Enhancement of solubilization and biodegradation of diesel oil by biosurfactant from *Bacillus amyloliquefaciens* An6. International Biodeterioration and Biodegradation 99 (2015): 8-14.
- Banat, I.M., De Rienzo, M.A.D., and Quinn, G.A. Microbial biofilms: biosurfactants as antibiofilm agents. Applied Microbiology and Biotechnology 98 (2014): 9915-9929.
- Banat, I.M. The isolation of a thermophilic biosurfactant producing *Bacillus* sp. Biotechnology Letters 15 (1993): 591-594.
- Banat, I.M., Makkar, R.S., and Cameotra, S.S. Potential commercial applications of microbial surfactants. Applied Microbiology and Biotechnology 53 (2000): 495-508.

- Banat, I.M. et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. Applied Microbiology and Biotechnology 87 (2010): 427-444.
- Barros, F.F.C., Ponezi, A.N., and Pastore, G.M. Production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* LB5a on a pilot scale using cassava wastewater as substrate. Journal of industrial microbiology & biotechnology 35 (2008): 1071-1078.
- Béchet, M. et al. Structure, biosynthesis, and properties of kurstakins, nonribosomal lipopeptides from *Bacillus* spp. Applied microbiology and biotechnology 95 (2012): 593-600.
- Beeba, J., and Umbreit, W. Microbial production of bio surfactants and their importance. Journal of Bacteriology 108 (1971): 612.
- Bischoff, K.M., Leathers, T.D., Price, N.P., and Manitchotpsit, P. Liamocin oil from *Aureobasidium pullulans* has antibacterial activity with specificity for species of *Streptococcus*. Journal of Antibiotics 68 (2015): 642.
- Bland, J.M. The first synthesis of a member of the iturin family, the antifungal cyclic lipopeptide, iturin-A2. The Journal of Organic Chemistry 61 (1996): 5663-5664.
- Bochyboch. Fatty acid synthesis. [online]. 2017. Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Fatty_acid_synthesis. [2017, June 26]
- Cameotra, S.S., and Makkar, R.S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. Applied Microbiology and Biotechnology 50 (1998): 520-529.
- Cameotra, S.S., and Makkar, R.S. Biosurfactant-enhanced bioremediation of hydrophobic pollutants. Pure and Applied Chemistry 82 (2010): 97-116.
- Campos, J.M. et al. Microbial biosurfactants as additives for food industries. Biotechnology Progress 29 (2013): 1097-1108.
- Campos, J.M. et al. Formulation of mayonnaise with the addition of a bioemulsifier isolated from *Candida utilis*. Toxicology Reports 2 (2015): 1164-1170.
- Chai, J.L., Gao, Y.H., Zhao, K.S., Li, G.Z., and Zhang, G.Y. Studies on the phase properties of Winsor HIII type microemulsions with dielectric relaxation spectroscopy. Chinese Chemical Letters 16 (2005): 1263.
- Chen, J., Song, X., Zhang, H., Qu, Y.B., and Miao, J.Y. Sophorolipid produced from the new yeast strain *Wickerhamiella domercqiae* induces apoptosis in H7402

- human liver cancer cells. Applied Microbiology and Biotechnology 72 (2006): 52-59.
- Chen, S.Y., Wei, Y.H., and Chang, J.S. Repeated pH-stat fed-batch fermentation for rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* S2. Applied microbiology and biotechnology 76 (2007): 67-74.
- Chi, Z.M. et al. Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. Applied Microbiology and Biotechnology 82 (2009): 793-804.
- Cho, W.G., Park, H.S., and Ahn, B.J. Antimicrobial Activities of Sophorolipids and Its Application for Cosmetics. Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea 34 (2008): 317-323.
- Cirigliano, M.C., and Carman, G.M. Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. Applied and Environmental Microbiology 50 (1985): 846-850.
- Cloete, T. Biofouling control in industrial water systems: What we know and what we need to know. Materials and Corrosion 54 (2003): 520-526.
- Cooper, D., Macdonald, C., Duff, S., and Kosaric, N. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. Applied and Environmental Microbiology 42 (1981): 408-412.
- Cooper, D.G., and Paddock, D. Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. Applied and Environmental Microbiology 47 (1984): 173-176.
- Costa, S.G. et al. Cassava wastewater as a substrate for the simultaneous production of rhamnolipids and polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 36 (2009): 1063-1072.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., and Lappin-Scott, H.M. Microbial biofilms. Annual Reviews in Microbiology 49 (1995): 711-745.
- Dams-Kozłowska, H., Mercaldi, M.P., Panilaitis, B.J., and Kaplan, D.L. Modifications and applications of the *Acinetobacter venetianus* RAG-1 exopolysaccharide, the emulsan complex and its components. Applied Microbiology and Biotechnology 81 (2008): 201-210.

- Daniel, H.J., Otto, R.T., Reuss, M., and Sylđatk, C. Sophorolipid production with high yields on whey concentrate and rapeseed oil without consumption of lactose. Biotechnology Letters 20 (1998): 805-807.
- Das, K., and Mukherjee, A.K. Characterization of biochemical properties and biological activities of biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* mucoid and non-mucoid strains isolated from hydrocarbon-contaminated soil samples. Applied Microbiology and Biotechnology 69 (2005): 192-199.
- Dastgheib, S., Amoozegar, M., Elahi, E., Asad, S., and Banat, I. Bioemulsifier production by a halothermophilic *Bacillus* strain with potential applications in microbially enhanced oil recovery. Biotechnology Letters 30 (2008): 263-270.
- De Hoog, G. et al. Relationships of dothideaceous black yeasts and meristematic fungi based on 5.8 S and ITS2 rDNA sequence comparison. Studies in Mycology (1999): 31-37.
- Delcambe, L. Iturine, new antibiotic produced by *Bacillus subtilis*. Comptes rendus des seances de la Societe de biologie et de ses filiales 144 (1950): 1431-1434.
- Desai, J.D., and Banat, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiology and Molecular Biology Reviews 61 (1997): 47-64.
- Deshpande, M.S., Rale, V.B., and Lynch, J.M. *Aureobasidium pullulans* in applied microbiology: a status report. Enzyme and Microbial Technology 14 (1992): 514-527.
- Develter, D.W., and Laurysen, L.M. Properties and industrial applications of sophorolipids. European Journal of Lipid Science and Technology 112 (2010): 628-638.
- Dyke, M.V., Couture, P., Brauer, M., Lee, H., and Trevors, J. *Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactants: structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil. Canadian Journal of Microbiology 39 (1993): 1071-1078.
- Elasri, M.O., and Miller, R.V. Study of the response of a biofilm bacterial community to UV radiation. Applied and Environmental Microbiology 65 (1999): 2025-2031.

- Flasz, A., Rocha, C., Mosquera, B., and Sajo, C. A comparative study of the toxicity of a synthetic surfactant and one produced by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 55925. Medical Science Research 26 (1998): 181-185.
- Flemming, H.C., Murthy, P.S., Venkatesan, R., and Cooksey, K. Marine and industrial biofouling. Springer Series on Biofilm. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2009.
- Flemming, H.C., and Wingender, J. The biofilm matrix. Nature Reviews Microbiology 8 (2010): 623-633.
- Flemming, H.C. Microbial biofouling: unsolved problems, insufficient approaches, and possible solutions. in Flemming, H.-C. et al. (eds.), Biofilm highlights, 81-109. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2011.
- Foley, P., Beach, E.S., and Zimmerman, J.B. Derivation and synthesis of renewable surfactants. Chemical Society Reviews 41 (2012): 1499-1518.
- Fracchia, L., Cavallo, M., Allegrone, G., and Martinotti, M. A *Lactobacillus*-derived biosurfactant inhibits biofilm formation of human pathogenic *Candida albicans* biofilm producers. Appl Microbiol Biotechnol 2 (2010): 827-837.
- Fracchia, L., Banat, I.M., Martinotti, M.G., and Cavallo, M. Biosurfactants and bioemulsifiers biomedical and related applications-present status and future potentials. in Ghista, D.N. (ed.), Biomedical science, engineering and technology. InTech, 2012.
- Franzetti, A., Tamburini, E., and Banat, I.M. Applications of biological surface active compounds in remediation technologies. in Sen, R. (ed.), Biosurfactants, 121-134. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2010.
- Gadd, G. Melanin production and differentiation in batch cultures of the polymorphic fungus *Aureobasidium pullulans*. FEMS Microbiology Letters 9 (1980): 237-240.
- Gautam, K., and Tyagi, V. Microbial surfactants: a review. Journal of Oleo Science 55 (2006): 155-166.
- Gharaei-Fathabad, E. Biosurfactants in pharmaceutical industry: a mini-review. American Journal of Drug Discovery and Development 1 (2011): 58-69.
- Gostin, C. et al. Genome sequencing of four *Aureobasidium pullulans* varieties: biotechnological potential, stress tolerance, and description of new species. BMC Genomics 15 (2014): 549.

- Gostinčar, C. et al. Genome sequencing of four *Aureobasidium pullulans* varieties: biotechnological potential, stress tolerance, and description of new species. BMC Genomics 15 (2014): 1.
- Grube, M., Schmid, F., and Berg, G. Black fungi and associated bacterial communities in the phyllosphere of grapevine. Fungal Biology 115 (2011): 978-986.
- Gudiña, E.J., Rocha, V., Teixeira, J., and Rodrigues, L. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* A20. Letters in Applied Microbiology 50 (2010): 419-424.
- Gunde-Cimerman, N., Zalar, P., de Hoog, S., and Plemenitaš, A. Hypersaline waters in salterns—natural ecological niches for halophilic black yeasts. FEMS Microbiology Ecology 32 (2000): 235-240.
- Haba, E., Espuny, M., Busquets, M., and Manresa, A. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. Journal of Applied Microbiology 88 (2000): 379-387.
- Hamley, I.W. Lipopeptides: from self-assembly to bioactivity. Chemical Communications 51 (2015): 8574-8583.
- Harvey, S., Elashvili, I., Valdes, J.J., Kamely, D., and Chakrabarty, A. Enhanced removal of Exxon Valdez spilled oil from Alaskan gravel by a microbial surfactant. Nature Biotechnology 8 (1990): 228-230.
- Hashim, M., Mukhopadhyay, S., Sahu, J.N., and Sengupta, B. Remediation technologies for heavy metal contaminated groundwater. Journal of Environmental Management 92 (2011): 2355-2388.
- Hathout, Y., Ho, Y.P., Ryzhov, V., Demirev, P., and Fenselau, C. Kurstakins: A New Class of Lipopeptides Isolated from *Bacillus thuringiensis*. Journal of natural products 63 (2000): 1492-1496.
- Hayes, M.E. et al. Bioemulsifier-stabilized hydrocarbosols. U.S. Patent No. 4,943,390 (1990).
- Heerklotz, H., and Seelig, J. Detergent-like action of the antibiotic peptide surfactin on lipid membranes. Biophysical Journal 81 (2001): 1547-1554.

- Horowitz, S., Gilbert, J., and Griffin, W.M. Isolation and characterization of a surfactant produced by *Bacillus licheniformis* 86. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 6 (1990): 243-248.
- Jacques, P. Surfactin and other lipopeptides from *Bacillus* spp. in Soberón-Chávez, G. (ed.), Biosurfactants, 57-91. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2011.
- Kakinuma, A. et al. Confirmation of the structure of surfactin by mass spectrometry. Agricultural and Biological Chemistry 33 (1969): 1669-1671.
- Käppeli, O., and Finnerty, W. Partition of alkane by an extracellular vesicle derived from hexadecane-grown *Acinetobacter*. Journal of Bacteriology 140 (1979): 707-712.
- Khire, J. Bacterial biosurfactants, and their role in microbial enhanced oil recovery (MEOR). in Sen, R. (ed.), Biosurfactants, 146-157. New York: Springer New York, 2010.
- Kim, J.-S., Lee, I.K., Kim, D.W., and Yun, B.S. Aureosurfactin and 3-deoxyaureosurfactin, novel biosurfactants produced by *Aureobasidium pullulans* L3-GPY. The Journal of Antibiotics 69 (2016): 759–761.
- Kim, J.S., Lee, I.K., and Yun, B.S. A Novel Biosurfactant Produced by *Aureobasidium pullulans* L3-GPY from a Tiger Lily Wild Flower, *Lilium lancifolium* Thunb. PLoS One 10 (2015): e0122917.
- Kim, S.y. et al. Surfactin from *Bacillus subtilis* displays anti-proliferative effect via apoptosis induction, cell cycle arrest and survival signaling suppression. FEBS Letters 581 (2007): 865-871.
- Kitagawa, M. et al. Biosurfactant-containing skin care cosmetic and skin roughness-improving agent. U.S. Patent No. 20100004472 (2006).
- Kitamoto, D., Isoda, H., and Nakahara, T. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants—from energy-saving materials to gene delivery carriers—. Journal of Bioscience and Bioengineering 94 (2002): 187-201.
- Kojic, E.M., and Darouiche, R.O. Candida infections of medical devices. Clinical Microbiology Reviews 17 (2004): 255-267.

- Kretschmer, A., Bock, H., and Wagner, F. Chemical and physical characterization of interfacial-active lipids from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes. Applied and Environmental Microbiology 44 (1982): 864-870.
- Kuhn, J., Müller, H., Salzig, D., and Czermak, P. A rapid method for an offline glycerol determination during microbial fermentation. Electronic Journal of Biotechnology 18 (2015): 252-255.
- Kuiper, I. et al. Characterization of two *Pseudomonas putida* lipopeptide biosurfactants, putisolvin I and II, which inhibit biofilm formation and break down existing biofilms. Molecular Microbiology 51 (2004): 97-113.
- Kumar, C.G. et al. Synthesis of biosurfactant-based silver nanoparticles with purified rhamnolipids isolated from *Pseudomonas aeruginosa* BS-161R. Journal of Microbiology and Biotechnology 20 (2010): 1061-1068.
- Kurosawa, T., Sakai, K., Nakahara, T., Oshima, Y., and Tabuch, T. Extracellular Accumulation of the Polyol Lipids, 3, 5-Dihydroxydecanoyl and 5-Hydroxy-2-decenoyl Esters of Arabitol and Mannitol, by *Aureobasidium* sp. Bioscience, Biotechnology, and Bbiochemistry 58 (1994): 2057-2060.
- Lateef, A., Oloke, J., and Prapulla, S. The effect of ultrasonication on the release of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans* CFR 77. Enzyme and Microbial Technology 40 (2007): 1067-1070.
- Leathers, T.D., Price, N.P., Manitchotpsit, P., and Bischoff, K.M. Production of anti-streptococcal liamocins from agricultural biomass by *Aureobasidium pullulans*. World J Microb Biot 32 (2016): 199.
- Leathers, T.D., Price, N.P., Bischoff, K.M., Manitchotpsit, P., and Skory, C.D. Production of novel types of antibacterial liamocins by diverse strains of *Aureobasidium pullulans* grown on different culture media. Biotechnology Letters 37 (2015): 2075-2081.
- Liu, Y.Y., Chi, Z., Wang, Z.P., Liu, G.L., and Chi, Z.M. Heavy oils, principally long-chain n-alkanes secreted by *Aureobasidium pullulans* var. melanogenum strain P5 isolated from mangrove system. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 41 (2014): 1329-1337.

- Lourith, N., and Kanlayavattanakul, M. Natural surfactants used in cosmetics: glycolipids. International Journal of Cosmetic Science 31 (2009): 255-261.
- Luna, J.M., Rufino, R.D., and Sarubbo, L.A. Biosurfactant from *Candida sphaerica* UCP0995 exhibiting heavy metal remediation properties. Process Safety and Environmental Protection 102 (2016): 558-566.
- Ma, X., Li, H., and Song, X. Surface and biological activity of sophorolipid molecules produced by *Wickerhamiella domercqiae* var. *sophorolipid* CGMCC 1576. Journal of Colloid and Interface Science 376 (2012): 165-172.
- Magalhães, L., and Nitschke, M. Antimicrobial activity of rhamnolipids against *Listeria monocytogenes* and their synergistic interaction with nisin. Food Control 29 (2013): 138-142.
- Maier, R.M. Biosurfactants: evolution and diversity in bacteria. Advances in Applied Microbiology 52 (2003): 101-121.
- Makkar, R.S., and Cameotra, S.S. Utilization of molasses for biosurfactant production by two *Bacillus* strains at thermophilic conditions. Journal of the American Oil Chemists' Society 74 (1997): 887-889.
- Makkar, R.S., Cameotra, S.S., and Banat, I.M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. AMB Express 1 (2011): 1-19.
- Manitchotpisit, P. et al. *Aureobasidium pullulans* as a source of liamocins (heavy oils) with anticancer activity World J Microb Biot 30 (2014): 3013-3013.
- Manitchotpisit, P., Price, N.P., Leathers, T.D., and Punnapayak, H. Heavy oils produced by *Aureobasidium pullulans*. Biotechnology Letters 33 (2011): 1151-1157.
- Marchant, R., and Banat, I.M. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. Trends in Biotechnology 30 (2012b): 558-565.
- Marchant, R., Banat, I.M., and Srividhya, D. Protocols for measuring biosurfactant production in microbial cultures. in Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols, 1-10. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2014.
- Marchant, R., and Banat, I.M. Protocols for measuring biosurfactant production in microbial cultures. in McGenity, T.J. et al. (eds.), Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols, 1-10. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2014.

- Marchant, R., and Banat, I.M. Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants? Biotechnology Letters 34 (2012a): 1597-1605.
- Margaritis, A., Zajic, J., and Gerson, D. Production and surface-active properties of microbial surfactants. Biotechnology and Bioengineering 21 (1979): 1151-1162.
- McInerney, M.J., Javaheri, M., and Nagle, D.P. Properties of the biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* strain JF-2. Journal of Industrial Microbiology 5 (1990): 95-101.
- Metzger, U., Lankes, U., Hardy, E.H., Gordalla, B.C., and Frimmel, F.H. Monitoring the formation of an *Aureobasidium pullulans* biofilm in a bead-packed reactor via flow-weighted magnetic resonance imaging. Biotechnology Letters 28 (2006): 1305-1311.
- Mineeva, I. Asymmetric synthesis of (-)-(R)-massoia lactone, (R)- δ -decalactone, and (+)-(3R, 5R)-3-hydroxydecano-5-lactone. Formal synthesis of verbalactone. Russian Journal of Organic Chemistry 48 (2012): 977-981.
- Mireles, J.R., Toguchi, A., and Harshey, R.M. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. Journal of Bacteriology 183 (2001): 5848-5854.
- Mishra, M. et al. Basics and potential applications of surfactants-a review. International Journal of PharmTech Research 1 (2009): 1354-1365.
- Mnif, I., Besbes, S., Ellouze, R., Ellouze-Chaabouni, S., and Ghribi, D. Improvement of bread quality and bread shelf-life by *Bacillus subtilis* biosurfactant addition. Food Science and Biotechnology 21 (2012): 1105-1112.
- Mohan, P.K., Nakhla, G., and Yanful, E.K. Biokinetics of biodegradation of surfactants under aerobic, anoxic and anaerobic conditions. Water Research 40 (2006): 533-540.
- Monds, R.D., and O'Toole, G.A. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. Trends in Microbiology 17 (2009): 73-87.
- Monteiro, A.S. et al. Inhibition of *Candida albicans* CC biofilms formation in polystyrene plate surfaces by biosurfactant produced by *Trichosporon montevidense* CLOA72. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 84 (2011): 467-476.

- Morikawa, M., Hirata, Y., and Imanaka, T. A study on the structure–function relationship of lipopeptide biosurfactants. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids 1488 (2000): 211-218.
- Morikawa, M., Ito, M., and Imanaka, T. Isolation of a new surfactin producer *Bacillus pumilus* A-1, and cloning and nucleotide sequence of the regulator gene, *psf-1*. Journal of Fermentation and Bioengineering 74 (1992): 255-261.
- Morita, T., Fukuoka, T., Imura, T., and Kitamoto, D. Production of mannosylerythritol lipids and their application in cosmetics. Applied Microbiology and Biotechnology 97 (2013): 4691-4700.
- Morita, T., Konishi, M., Fukuoka, T., Imura, T., and Kitamoto, D. Production of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma siamensis* CBS 9960 and their interfacial properties. Journal of Bioscience and Bioengineering 105 (2008): 493-502.
- Mulligan, C.N. Environmental applications for biosurfactants. Environmental Pollution 133 (2005): 183-198.
- Muthusamy, K., Gopalakrishnan, S., Ravi, T.K., and Sivachidambaram, P. Biosurfactants: Properties, commercial production and application. Current Science 94 (2008):
- Nishifiori, T., Naganawa, H., Muraoka, Y., Aoyagi, T., and Umezawa, H. Plipastatins: new inhibitors of phospholipase A2, produced by *Bacillus cereus* BMG302-ff67. III. Structural elucidation of plipastatins. The Journal of Antibiotics 39 (1986): 755-761.
- Nitschke, M., and Pastore, G.M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. Bioresource Technology 97 (2006): 336-341.
- Nitschke, M., and Costa, S. Biosurfactants in food industry. Trends in Food Science and Technology 18 (2007): 252-259.
- Nitschke, M., Costa, S.G., and Contiero, J. Structure and applications of a rhamnolipid surfactant produced in soybean oil waste. Applied Biochemistry and Biotechnology 160 (2010): 2066-2074.
- O'Toole, G., Kaplan, H.B., and Kolter, R. Biofilm formation as microbial development. Annual Reviews in Microbiology 54 (2000): 49-79.

- Perfumo, A., Rancich, I., and Banat, I.M. Possibilities and challenges for biosurfactants use in petroleum industry. in Sen, R. (ed.), Biosurfactants, 135-145. New York: Springer New York, 2010.
- Pesce, L. A biotechnological method for the regeneration of hydrocarbons from dregs and muds, on the base of biosurfactants. World Patent No. 2002062495 (2002).
- Poremba, K., Gunkel, W., Lang, S., and Wagner, F. Marine biosurfactants, III. Toxicity testing with marine microorganisms and comparison with synthetic surfactants. Zeitschrift für Naturforschung C 46 (1991a): 210-216.
- Poremba, K., Gunkel, W., Lang, S., and Wagner, F. Toxicity testing of synthetic and biogenic surfactants on marine microorganisms. Environmental Toxicology and Water Quality 6 (1991b): 157-163.
- Prabhawathi, V., Thirunavukarasu, K., and Doble, M. A study on the long term effect of biofilm produced by biosurfactant producing microbe on medical implant. Materials Science and Engineering: C 40 (2014): 212-218.
- Price, N.P., Bischoff, K.M., Leathers, T.D., Cossé, A.A., and Manitchotpsit, P. Polyols, not sugars, determine the structural diversity of anti-streptococcal liamocins produced by *Aureobasidium pullulans* strain NRRL 50380. The Journal of Antibiotics 70 (2016): 136–141.
- Price, N.P.J., Manitchotpsit, P., Vermillion, K.E., Bowman, M.J., and Leathers, T.D. Structural characterization of novel extracellular liamocins (mannitol oils) produced by *Aureobasidium pullulans* strain NRRL 50380. Carbohydr Res 370 (2013): 24-32.
- Rahman, P.K., and Gakpe, E. Production, characterisation and applications of biosurfactants-Review. Biotechnology 7 (2008): 360-370.
- Rali, T., Wossa, S.W., and Leach, D.N. Comparative chemical analysis of the essential oil constituents in the bark, heartwood and fruits of *Cryptocarya massoy* (Oken) Kosterm.(Lauraceae) from Papua New Guinea. Molecules 12 (2007): 149-154.
- Ramos, S., and Acha, I.G. A vegetative cycle of *Pullularia pullulans*. Transactions of the British Mycological Society 64 (1975): 129-135.

- Raza, Z.A. et al. Surface properties and sub-surface aggregate assimilation of rhamnolipid surfactants in different aqueous systems. Biotechnology Letters 32 (2010): 811-816.
- Reger, D.L., Goode, S.R., and Ball, D.W. Chemistry: principles and practice. Canada: Cengage Learning, 2009.
- Rismani-Yazdi, H., Haznedaroglu, B.Z., Bibby, K., and Peccia, J. Transcriptome sequencing and annotation of the microalgae *Dunaliella tertiolecta*: pathway description and gene discovery for production of next-generation biofuels. BMC genomics 12 (2011): 148.
- Rivera, O.M.P., Moldes, A.B., Torrado, A.M., and Domínguez, J.M. Lactic acid and biosurfactants production from hydrolyzed distilled grape marc. Process Biochemistry 42 (2007): 1010-1020.
- Rolli, E. et al. Phytotoxic effects and phytochemical fingerprinting of hydrodistilled oil, enriched fractions, and isolated compounds obtained from *Cryptocarya massoy* (OKEN) KOSTERM. Bark. Chemistry and Biodiversity 13 (2016): 66-76.
- Rosenberg, E., and Ron, E.Z. Bioemulsans: microbial polymeric emulsifiers. Current Opinion in Biotechnology 8 (1997): 313-316.
- Sachdev, D.P., and Cameotra, S.S. Biosurfactants in agriculture. Applied Microbiology and Biotechnology 97 (2013): 1005-1016.
- Sampalis, F. Natural marine source phospholipids comprising polyunsaturated fatty acids and their applications. U.S. Patent No. 8,030,348 (2011).
- Satpute, S.K., Banpurkar, A.G., Dhakephalkar, P.K., Banat, I.M., and Chopade, B.A. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. Critical reviews in biotechnology 30 (2010): 127-144.
- Schaller, K.D., Fox, S.L., Bruhn, D.F., Noah, K.S., and Bala, G.A. Characterization of surfactin from *Bacillus subtilis* for application as an agent for enhanced oil recovery. in Proceedings of the Twenty-Fifth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals pp.827-836: Springer, 2004.
- Schultz, M.P. Effects of coating roughness and biofouling on ship resistance and powering. Biofouling 23 (2007): 331-341.

- Seydlová, G., and Svobodová, J. Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical applications. Open Medicine 3 (2008): 123-133.
- Sha, R., Jiang, L., Meng, Q., Zhang, G., and Song, Z. Producing cell-free culture broth of rhamnolipids as a cost-effective fungicide against plant pathogens. Journal of Basic Microbiology 52 (2012): 458-466.
- Shah, V., Jurjevic, M., and Badia, D. Utilization of restaurant waste oil as a precursor for sophorolipid production. Biotechnology Progress 23 (2007): 512-515.
- Shao, Z. Trehalolipids. in Soberón-Chávez, G. (ed.), Biosurfactants, 121-143. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2011.
- Shavandi, M., Mohebal, G., Haddadi, A., Shakarami, H., and Nuhi, A. Emulsification potential of a newly isolated biosurfactant-producing bacterium, *Rhodococcus* sp. strain TA6. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 82 (2011): 477-482.
- Shekhar, S., Sundaramanickam, A., and Balasubramanian, T. Biosurfactant producing microbes and their potential applications: A review. Critical Reviews in Environmental Science and Technology 45 (2015): 1522-1554.
- Shin, J.D., Lee, J., Kim, Y.B., Han, I.-s., and Kim, E.-K. Production and characterization of methyl ester sophorolipids with 22-carbon-fatty acids. Bioresource Technology 101 (2010): 3170-3174.
- Singh, P.B., and Saini, H.S. Exploitation of Agro-Industrial Wastes to Produce Low-Cost Microbial Surfactants. in Brar, S.K. et al. (eds.), Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals, 445-471. New York: Springer New York, 2014.
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., and Švabić-Vlahović, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. Journal of Microbiological Methods 40 (2000): 175-179.
- Syldatk, C., Lang, S., Wagner, F., Wray, V., and Witte, L. Chemical and physical characterization of four interfacial-active rhamnolipids from *Pseudomonas* spec. DSM 2874 grown on n-alkanes. Zeitschrift für Naturforschung C 40 (1985): 51-60.

- Thambugala, K.M. et al. Dothideales. Fungal Diversity 68 (2014): 105-158.
- Thaniyavarn, J. et al. Yeast biodiversity in the coastal area of Koh Si Chang and their potential as biosurfactant producers. in The 25th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference. Bangkok: 2013.
- Thimon, L., Peypoux, F., Dana Maget, R., Roux, B., and Michel, G. Interactions of bioactive lipopeptides, iturin A and surfactin from *Bacillus subtilis*. Biotechnology and Applied Biochemistry 16 (1992): 144-151.
- Urzi, C., De Leo, F., Passo, C.L., and Criseo, G. Intra-specific diversity of *Aureobasidium pullulans* strains isolated from rocks and other habitats assessed by physiological methods and by random amplified polymorphic DNA (RAPD). Journal of microbiological methods 36 (1999): 95-105.
- Van Bogaert, I.N., Zhang, J., and Soetaert, W. Microbial synthesis of sophorolipids. Process Biochemistry 46 (2011): 821-833.
- Van Bogaert, I.N. et al. Microbial production and application of sophorolipids. Applied Microbiology and Biotechnology 76 (2007): 23-34.
- Vanittanakom, N., Loeffler, W., Koch, u., and Jung, G. Fengycin-a novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. The Journal of Antibiotics 39 (1986): 888-901.
- Velho, R., Medina, L., Segalin, J., and Brandelli, A. Production of lipopeptides among *Bacillus* strains showing growth inhibition of phytopathogenic fungi. Folia Microbiologica 56 (2011): 297-303.
- Velikonja, J., and Kosaric, N. Biosurfactants in food applications. Surfactant Science Series (1993): 419-419.
- Vesonder, R., Stodola, F., and Rohwedder, W. Formation of the δ -Lactone of 3, 5-Dihydroxydecanoic Acid by the Fungus *Cephalosporium recifei*. Canadian Journal of Biochemistry 50 (1972): 363-365.
- Wang, C.L., Li, Y., Xin, F.H., Liu, Y.Y., and Chi, Z.M. Evaluation of single cell oil from *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* P10 isolated from mangrove ecosystems for biodiesel production. Process Biochemistry 49 (2014): 725-731.
- Webb, J.S. et al. Fungal colonization and biodeterioration of plasticized polyvinyl chloride. Applied and Environmental Microbiology 66 (2000): 3194-3200.

- Whang, L.M., Liu, P.W.G., Ma, C.C., and Cheng, S.S. Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. Journal of Hazardous Materials 151 (2008): 155-163.
- Whiley, R., and Beighton, D. Current classification of the oral streptococci. Molecular Oral Microbiology 13 (1998): 195-216.
- Winsor, P. Hydrotropy, solubilisation and related emulsification processes. Transactions of the Faraday Society 44 (1948): 376-398.
- Xia, W. et al. Biosurfactant produced by novel *Pseudomonas* sp. WJ6 with biodegradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons. Journal of Hazardous Materials 276 (2014): 489-498.
- Yakimov, M.M. et al. The potential of *Bacillus licheniformis* strains for in situ enhanced oil recovery. Journal of Petroleum Science and Engineering 18 (1997): 147-160.
- Yang, Z. et al. Bioleaching remediation of heavy metal-contaminated soils using *Burkholderia* sp. Z-90. Journal of Hazardous Materials 301 (2016): 145-152.
- Zalar, P. et al. Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. Studies in Mycology 61 (2008): 21-38.
- ธนาพร พลศักดิ์. การหาค่าเหมาะที่สุดของแหล่งไนโตรเจนสำหรับการหมักเอทานอลแบบวีเอชจีจากแป้งมันสำปะหลัง วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2557.
- สิทธิชัย ขุนทองแก้ว. วิทยากรโรคพืช. กรุงเทพมหานคร: โอกรูป เพรส, 2552.
- สุदारัตน์ ลือพงศ์พัฒนะ. การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยยีสต์และราคล้ายยีสต์ที่แยกได้จากบริเวณชายฝั่งเกาะสีชัง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2557.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวยีสต์มอลต์ (Yeast Malt, YM)

สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	3.00	กรัม
สารสกัดจากมอลต์ (Malt extract)	3.00	กรัม
เปปโตเน (Peptone)	5.00	กรัม
กลูโคส (Glucose)	10.00	กรัม

เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 1000 มิลลิลิตร

ปรับระดับความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.5

ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ ถ้าเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ใส่ผงวุ้น 20.00 กรัมต่อลิตร

2. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด A ปรับสูตรจาก Manitchotpisit และคณะ (2011)

กลูโคส (Glucose)	50.00	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	0.40	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.40	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	5.00	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	1.00	กรัม
เปปโตเน (Peptone)	0.30	กรัม

เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 1000 มิลลิลิตร

ปรับระดับความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.5 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ชนิดแข็ง

ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

หมายเหตุ เปลี่ยนชนิดน้ำตาลสำหรับการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตสารประกอบชีวภาพ

3. อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวยีสต์ไนโตรเจนเบส (Yeast Nitrogen Base, YNB)

ผงอาหารยีสต์ไนโตรเจนเบส	6.7	กรัม
กลูโคส (Glucose)	5	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

จะได้อาหารเลี้ยงเชื้อเข้มข้น 10 เท่า นำอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ไปกรองด้วยตัวกรองปราศจากเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส เมื่อนำมาใช้ให้เจือจางอาหารเลี้ยงเชื้อเข้มข้นนี้ 10 เท่า ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ



ภาคผนวก ข

สารเคมี

1. สารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก

กรด 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิก	1	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 2 โมลาร์	20	มิลลิลิตร
โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต (Potassium Sodium Tartrate)	30	กรัม

ละลายกรด 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิก 1 กรัม ในโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส แล้วเติม โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต 30 กรัม แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายจนได้ 100 มิลลิลิตร

2. สารละลายสำหรับวิเคราะห์กลีเซอรอลด้วยปฏิกิริยา Malaprade และ Hantzsch ตามวิธีของ Kuhn และคณะ (2015)

1.1 รีเอเจนท์ 1

โซเดียมเพอริโอเดต (Sodium periodate)	18	กรัม
อะซีโตไนไตรล์ (Acetonitrile)	100	มิลลิลิตร
แอมโมเนียมอะซีเตต (Ammonium acetate)	77	กรัม

ละลายโซเดียมเพอริโอเดตในน้ำกลั่น แล้วเติมอะซีโตไนไตรล์ จากนั้นเติมแอมโมเนียมอะซีเตต สุดท้ายเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 1000 มิลลิลิตร

1.2 รีเอเจนท์ 2

อะเซทิลอะซีโตน (Acetylacetone)	10	มิลลิลิตร
ไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ (Isopropyl alcohol)	990	มิลลิลิตร

3. การย้อมใบโอฟิล์ม

2.1 สารละลายคริสตัลไวโอเล็ต (Crystal violet) ร้อยละ 0.02 โดยน้ำหนัก

ละลายคริสตัลไวโอเล็ต 0.02 กรัม ในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 มิลลิลิตร แล้วในขวดสีชา

2.2 กรดอะซิติก (Acetic acid) เข้มข้นร้อยละ 33 โดยปริมาตร

เติมกรดอะซิติก 33 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น 67 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา

2.3 สารละลายเมทานอล (Methanol) ร้อยละ 99 โดยปริมาตร

เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ลงในเมทานอล 99 มิลลิลิตร เก็บใส่ขวดสีชา

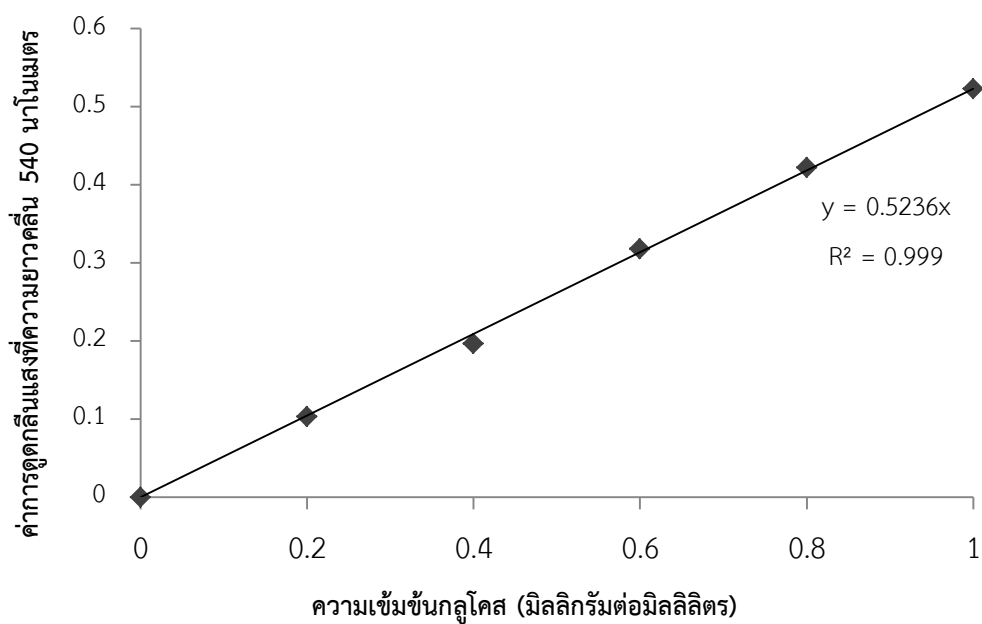
4. ตัวทำละลายสารประกอบชีวภาพ BS และ HO

ผสมไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide, DMSO) และบิวทาโนน (Butanone) อย่างละ 1.25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ 100 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วยตัวกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร

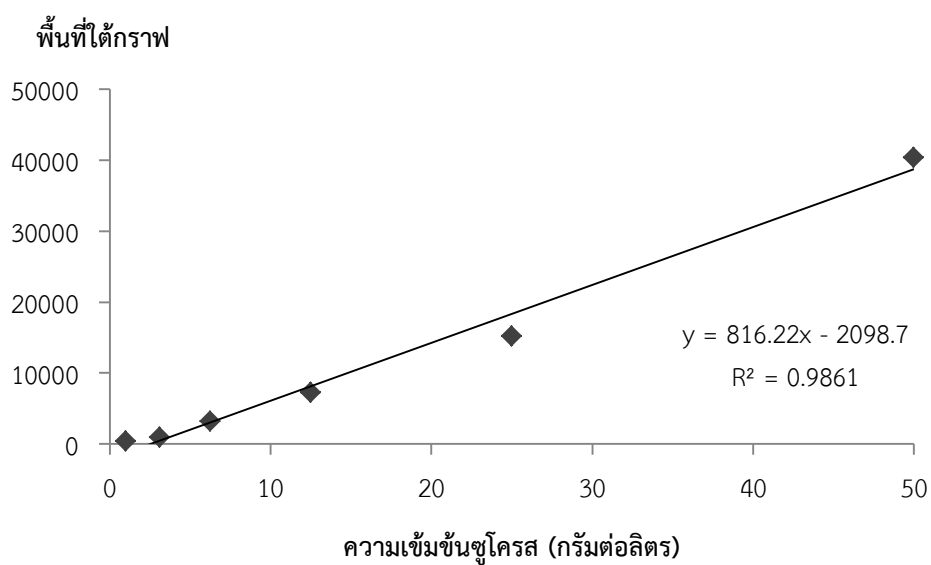


ภาคผนวก ค
กราฟมาตรฐาน

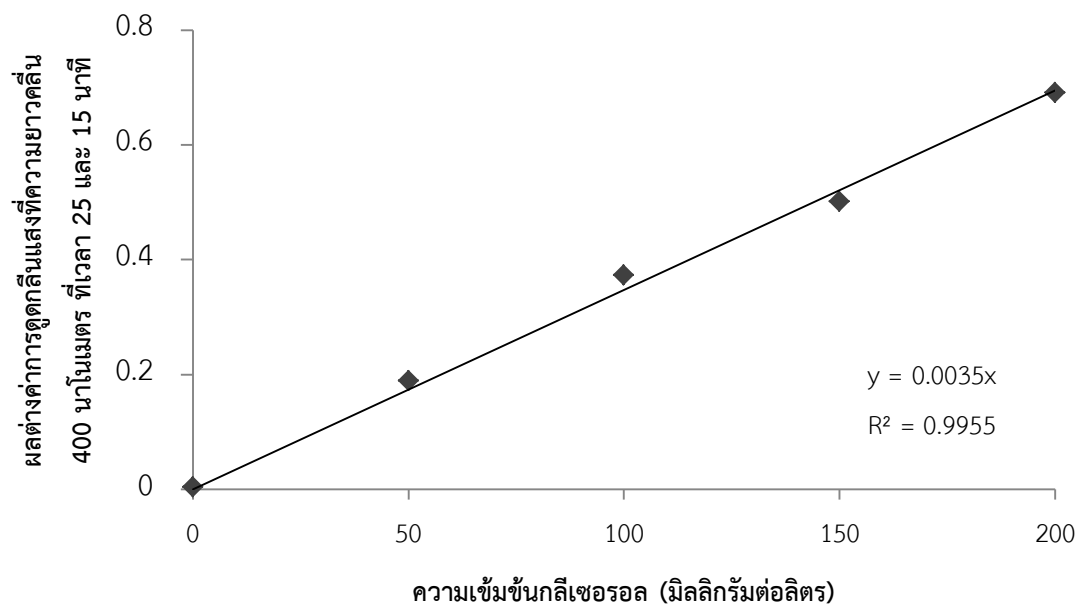
1. กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNSA reagent)



2. กราฟมาตรฐานน้ำตาลซูโครสวิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC



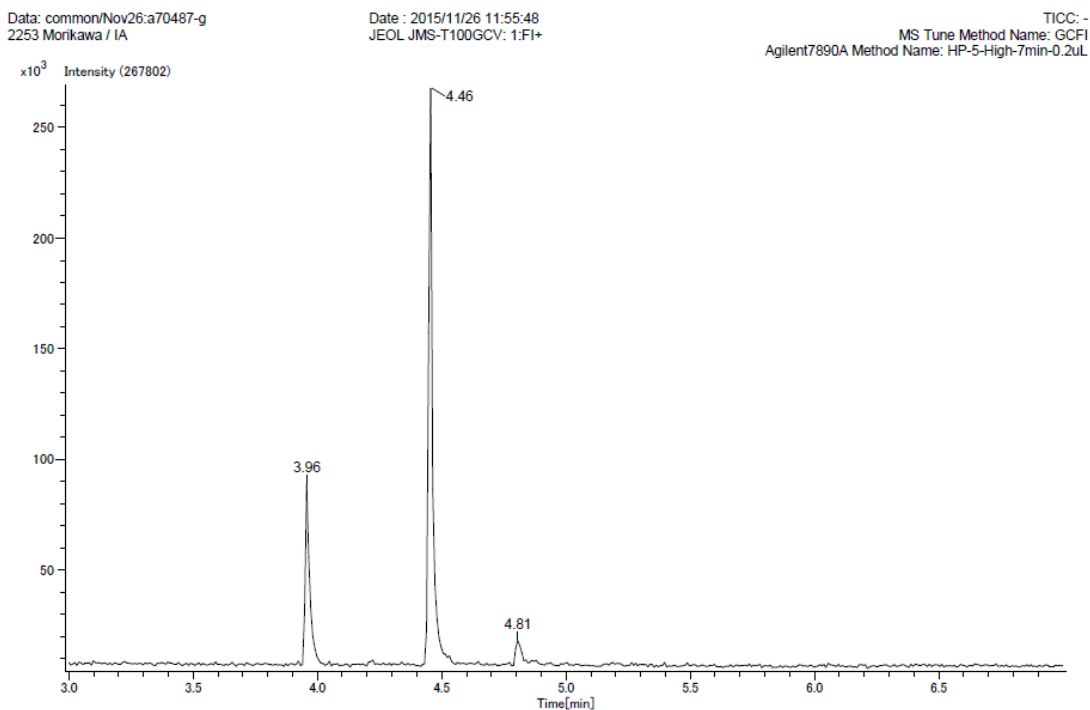
3. กราฟมาตรฐานกลีเซอรอลวิเคราะห์ด้วยปฏิกิริยา Malaprade และ Hantzsch ตามวิธีของ Kuhn และคณะ (2015)



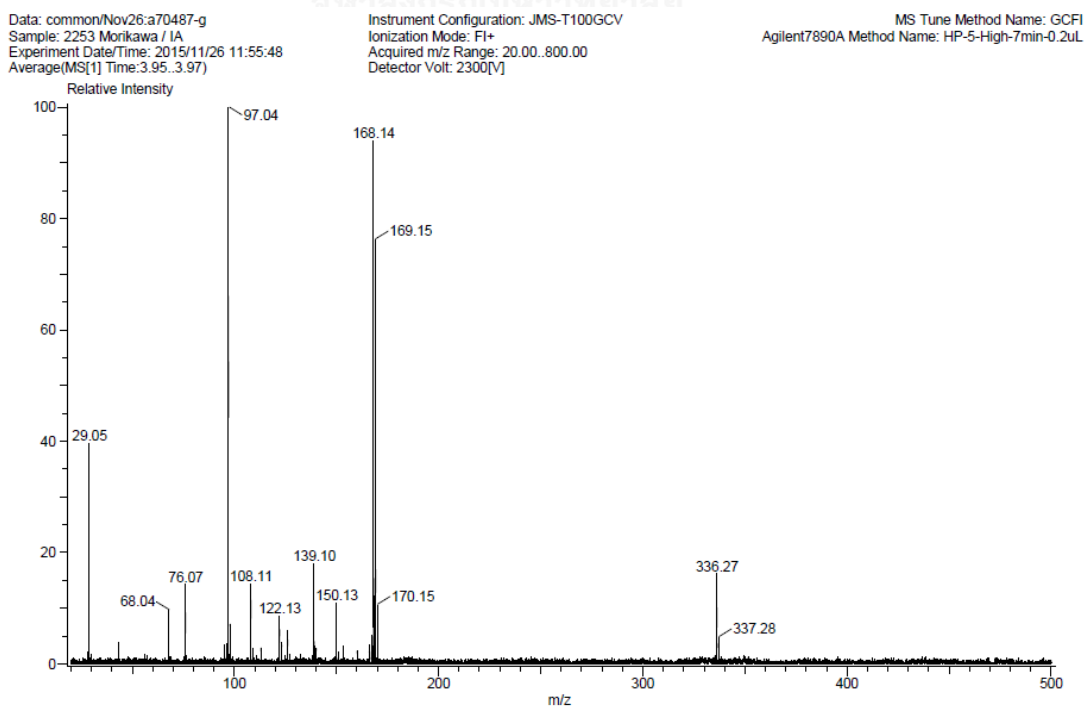
ภาคผนวก ง

โครมาโทแกรมจากการวิเคราะห์พีค BS-2 และ HO-4 ด้วยวิธี GC/MS

1. โครมาโทแกรมของ BS-4 จากการวิเคราะห์ด้วย GC



2. m/z ของพีคที่เวลา 3.96 นาที

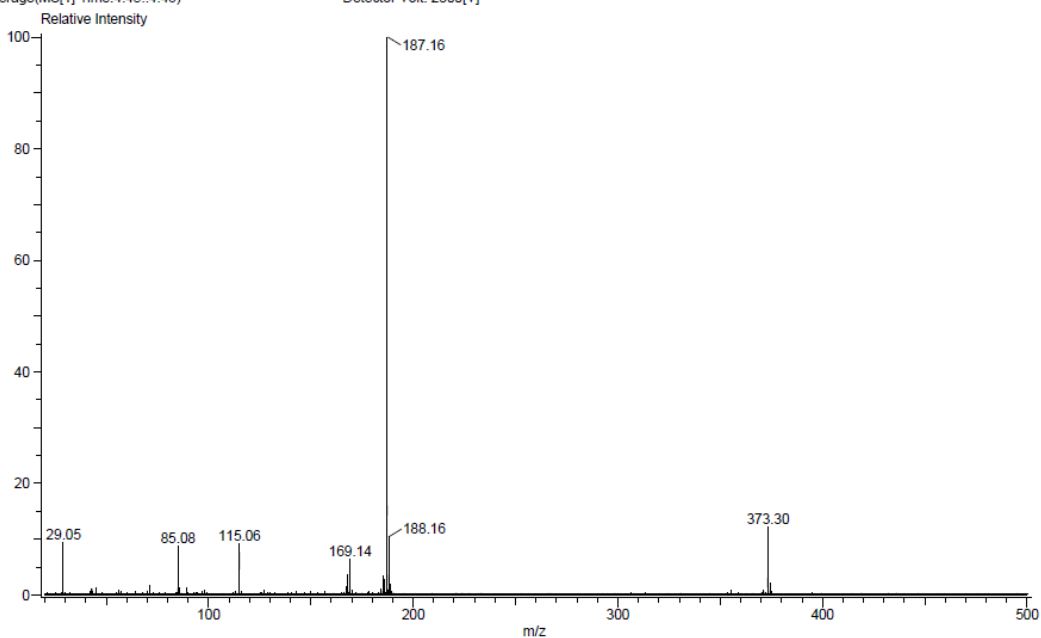


3. m/z ของพีคที่เวลา 4.46 นาที

Data: common/Nov26:a70487-g
Sample: 2253 Morikawa / IA
Experiment Date/Time: 2015/11/26 11:55:48
Average(MS[1] Time:4.45..4.46)

Instrument Configuration: JMS-T100GCV
Ionization Mode: FI+
Acquired m/z Range: 20.00..800.00
Detector Volt: 2300[V]

MS Tune Method Name: GCFI
Agilent7890A Method Name: HP-5-High-7min-0.2uL

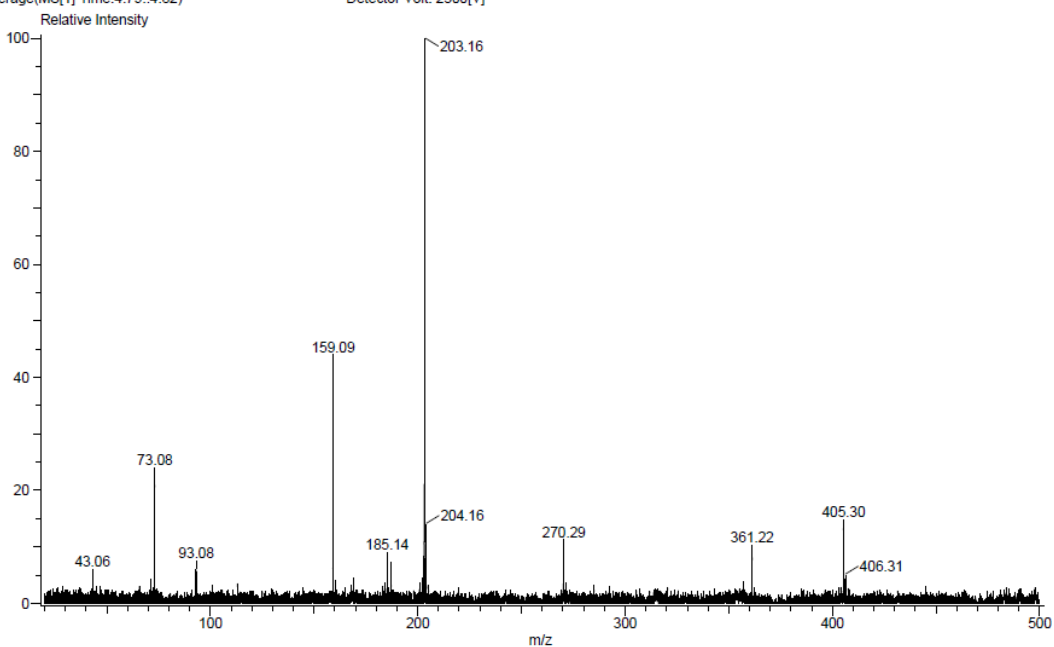


4. m/z ของพีคที่เวลา 4.81 นาที

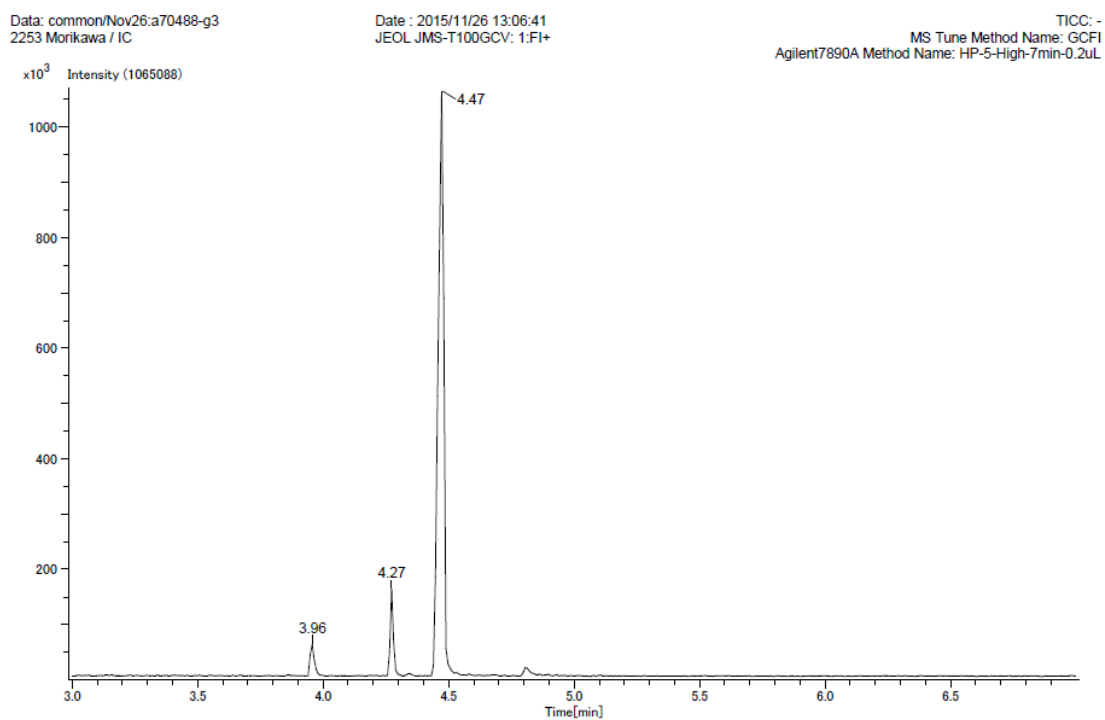
Data: common/Nov26:a70487-g
Sample: 2253 Morikawa / IA
Experiment Date/Time: 2015/11/26 11:55:48
Average(MS[1] Time:4.79..4.82)

Instrument Configuration: JMS-T100GCV
Ionization Mode: FI+
Acquired m/z Range: 20.00..800.00
Detector Volt: 2300[V]

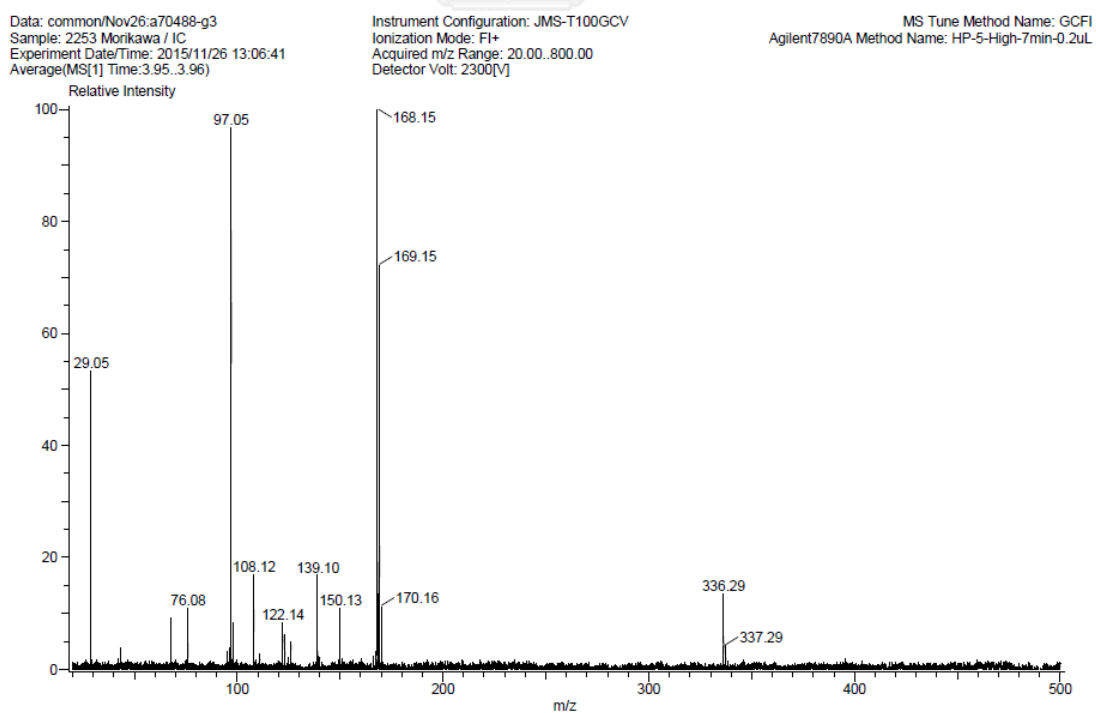
MS Tune Method Name: GCFI
Agilent7890A Method Name: HP-5-High-7min-0.2uL



5. โครมาโทแกรมของ HO-2 จากการวิเคราะห์ด้วย GC



6. m/z ของพีคที่เวลา 3.96 นาที

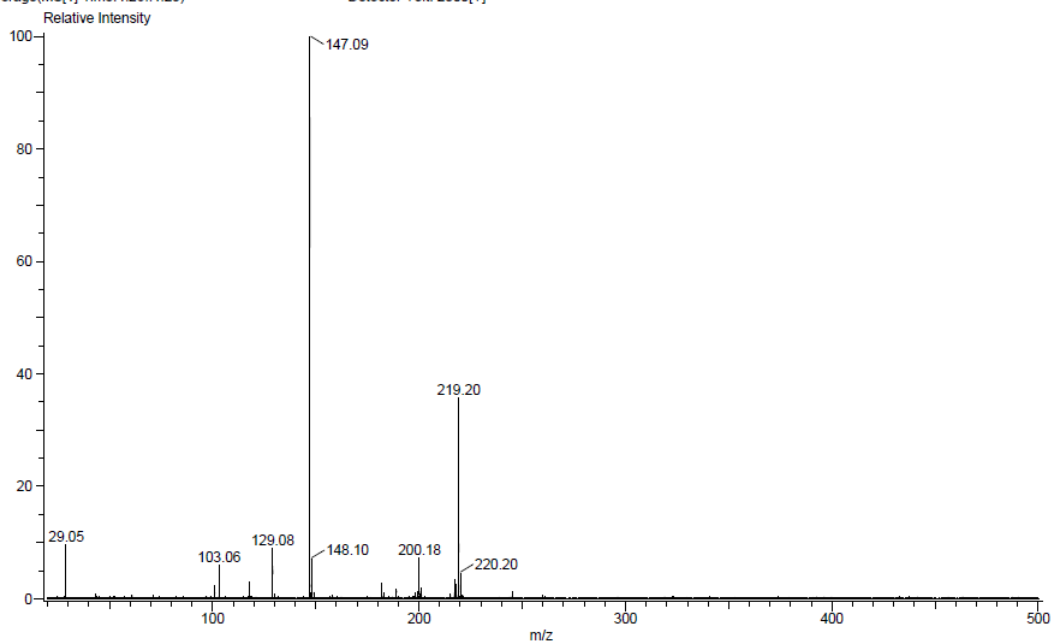


7. m/z ของพีคที่เวลา 4.27 นาที

Data: common/Nov26:a70488-g3
Sample: 2253 Morikawa / IC
Experiment Date/Time: 2015/11/26 13:06:41
Average(MS[1] Time:4.26..4.28)

Instrument Configuration: JMS-T100GCV
Ionization Mode: FI+
Acquired m/z Range: 20.00..800.00
Detector Volt: 2300[V]

MS Tune Method Name: GCFI
Agilent7890A Method Name: HP-5-High-7min-0.2uL

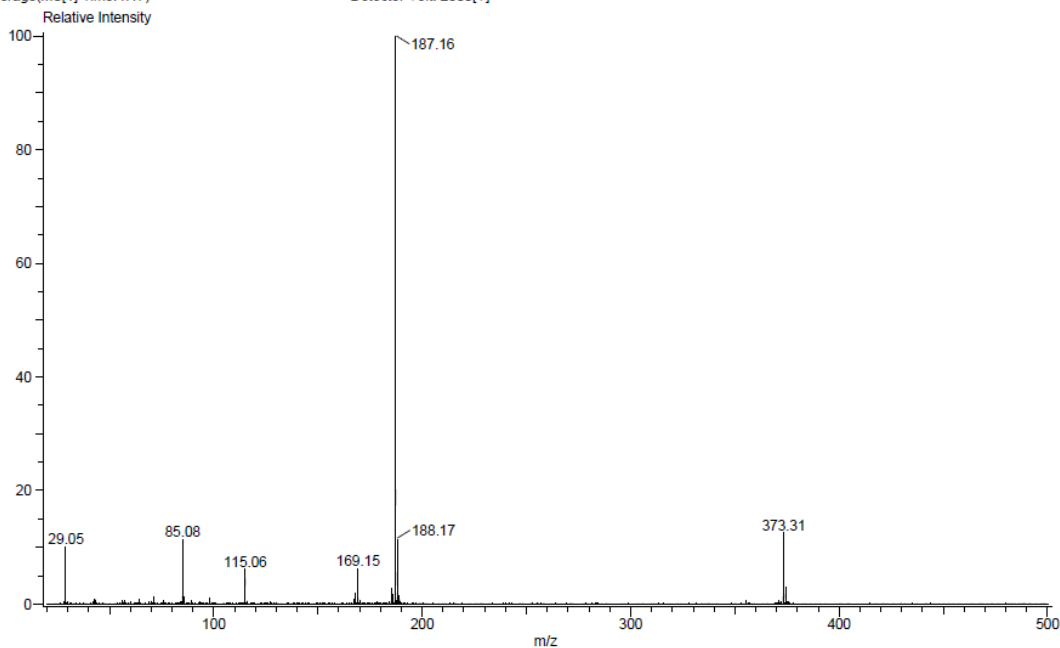


8. m/z ของพีคที่เวลา 4.47 นาที

Data: common/Nov26:a70488-g3
Sample: 2253 Morikawa / IC
Experiment Date/Time: 2015/11/26 13:06:41
Average(MS[1] Time:4.47)

Instrument Configuration: JMS-T100GCV
Ionization Mode: FI+
Acquired m/z Range: 20.00..800.00
Detector Volt: 2300[V]

MS Tune Method Name: GCFI
Agilent7890A Method Name: HP-5-High-7min-0.2uL

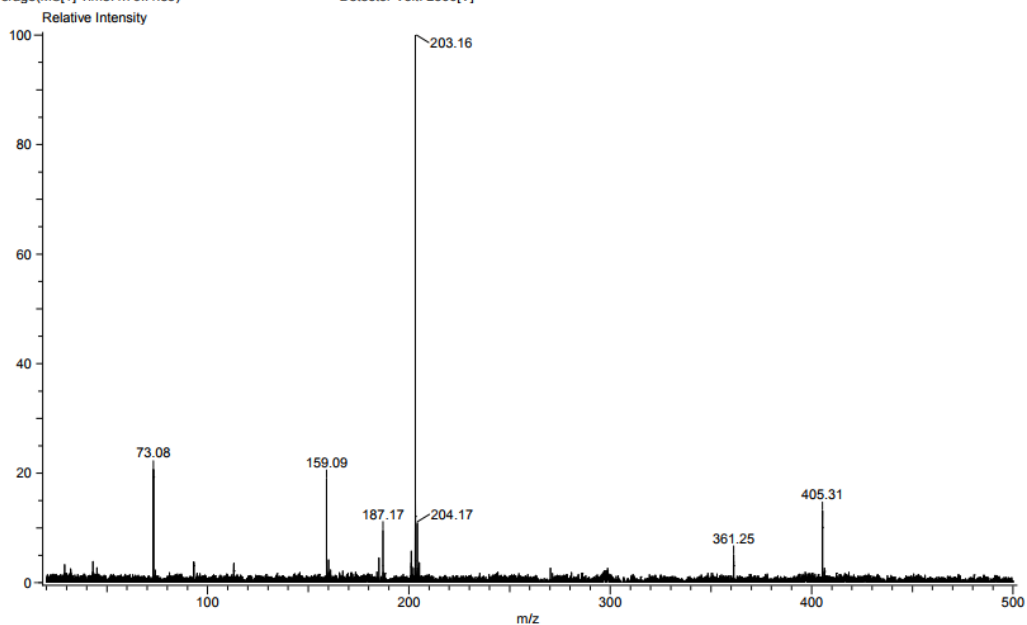


9. m/z ของพีคที่เวลา 4.81 นาที

Data: common/Nov26.a70488-g3
Sample: 2253 Morikawa / IC
Experiment Date/Time: 2015/11/26 13:06:41
Average(MS[1] Time:4.79..4.83)

Instrument Configuration: JMS-T100GCV
Ionization Mode: FI+
Acquired m/z Range: 20.00..800.00
Detector Volt: 2300[V]

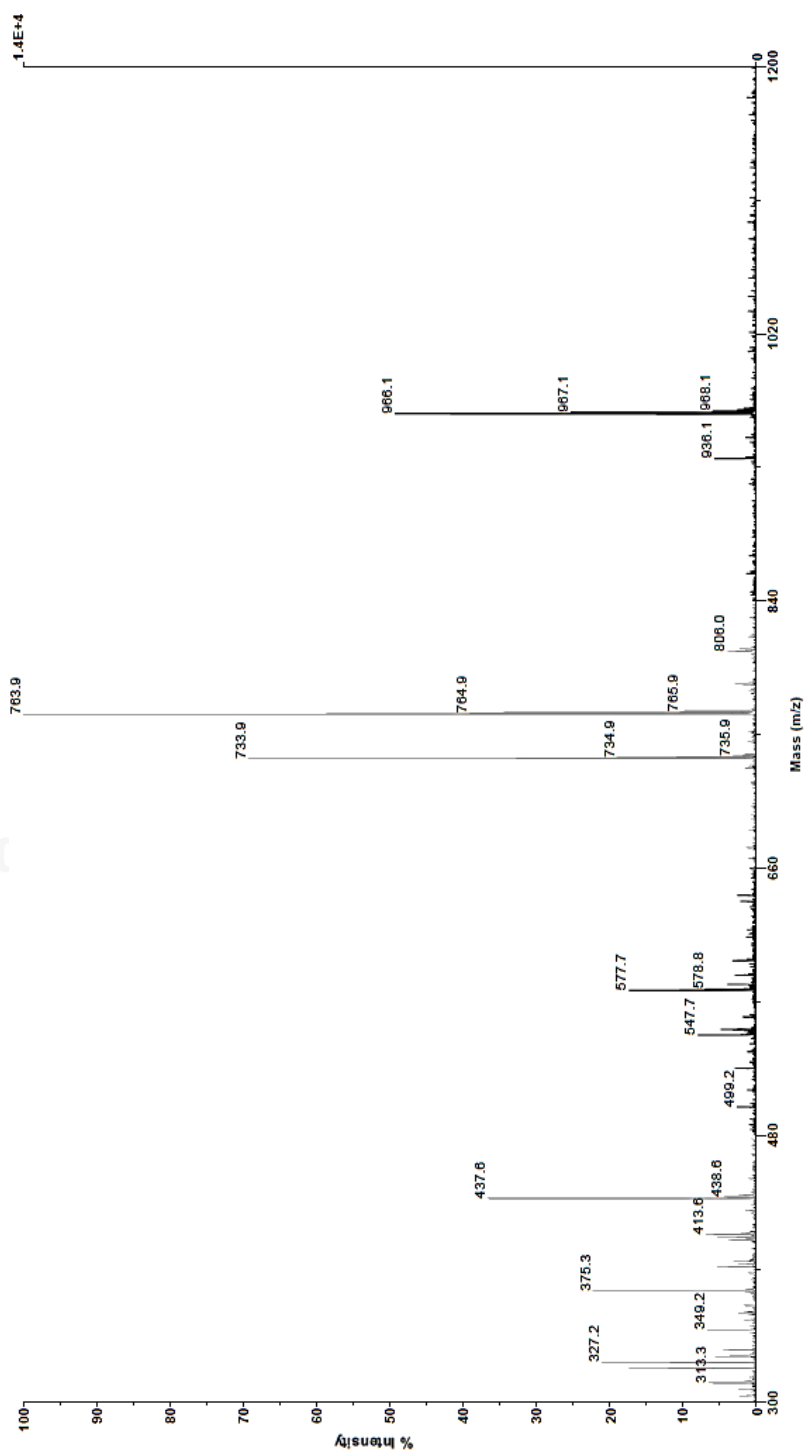
MS Tune Method Name: GCFI
Agilent7890A Method Name: HP-5-High-7min-0.2uL



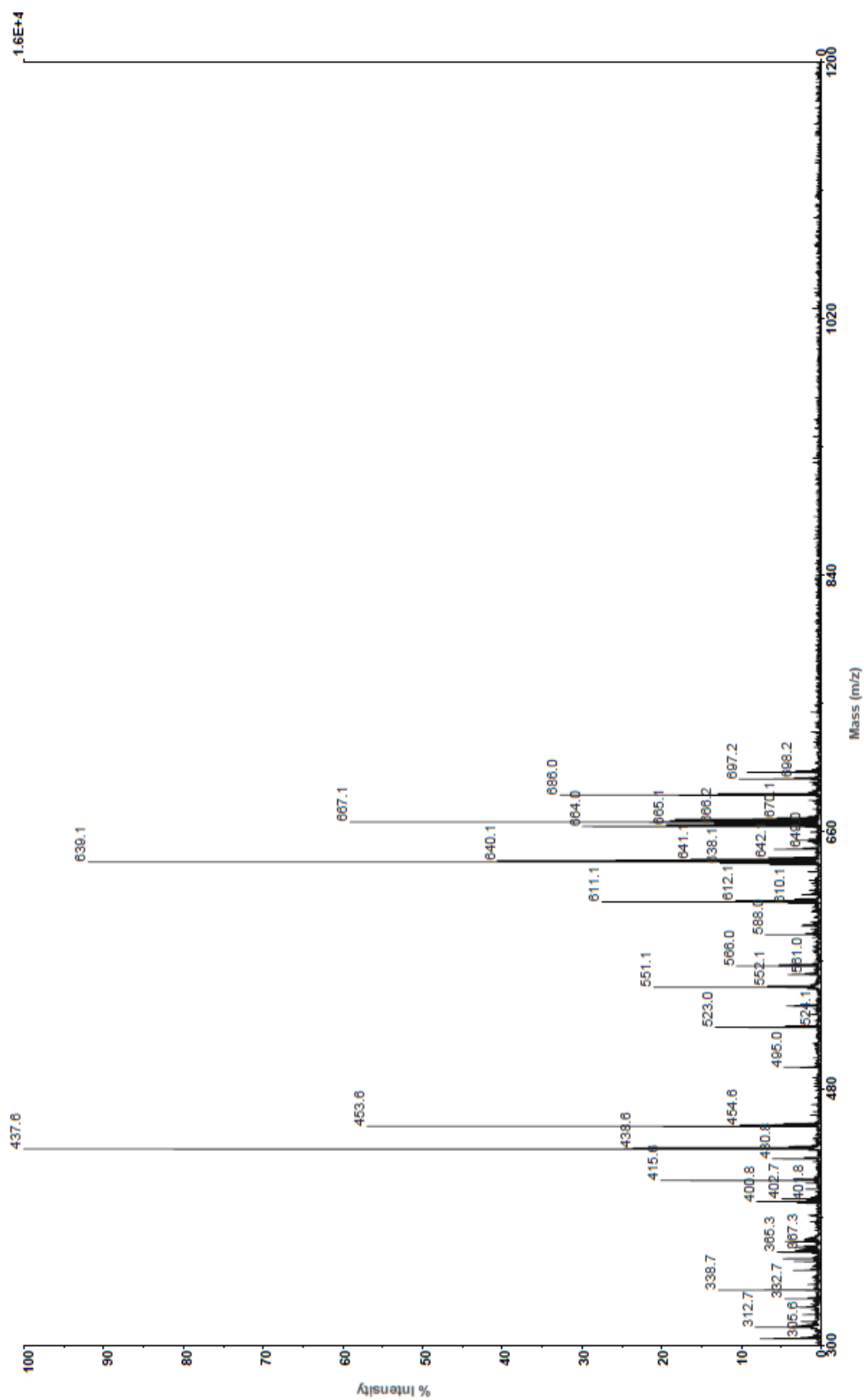
ภาคผนวก จ

โครมาโทแกรมของ BS-4 และ HO-2 จากการวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOFF

1. m/z ที่ $[M+Na]^+$ ของ BS-4



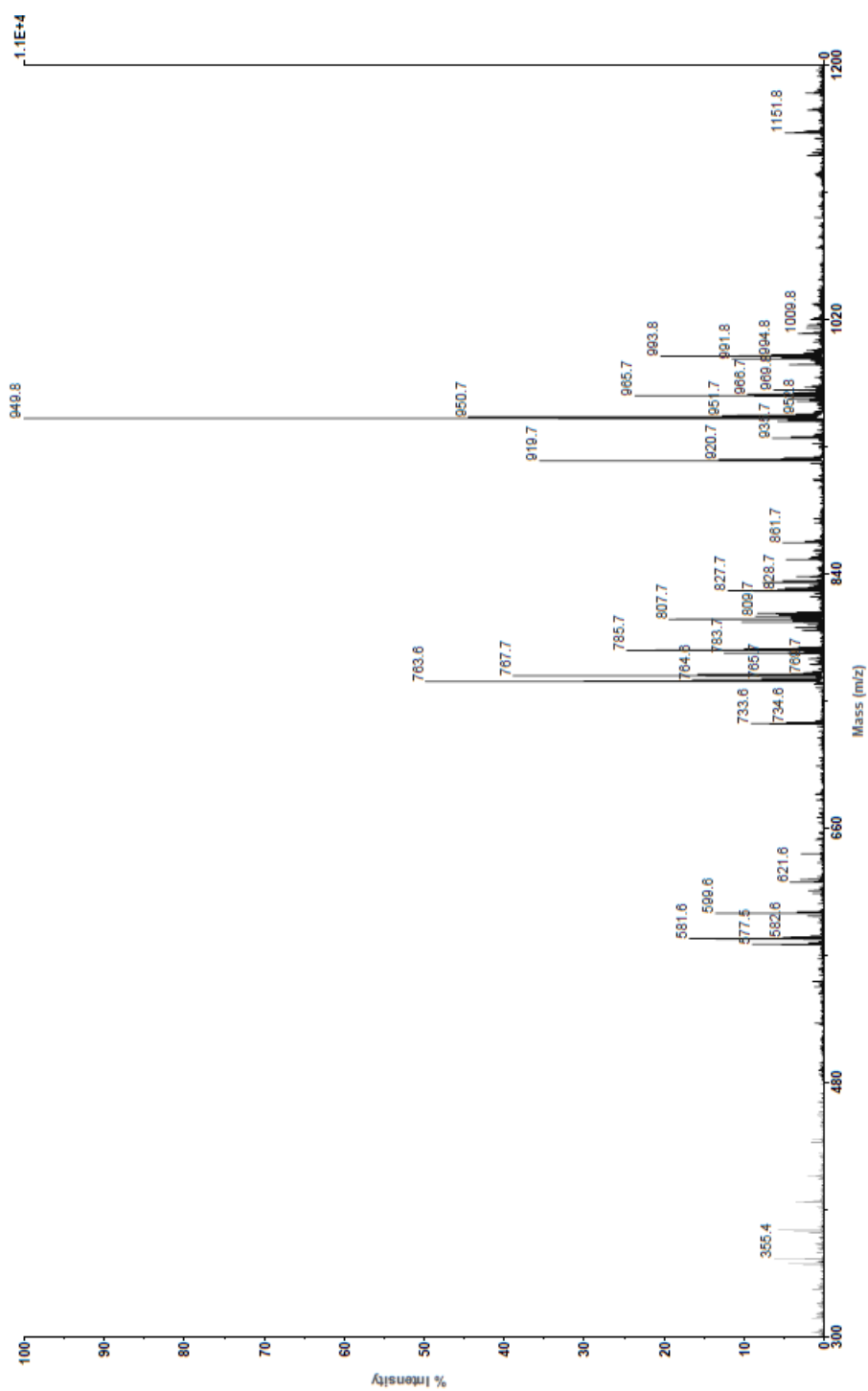
2. m/z ที่ $[M+Na]^+$ ของ HO-2



ภาคผนวก ฉ

โครมาโทแกรมของสารสกัดหยาบ HO จากการวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOFF

1. m/z ที่ $[M+Na]^+$ ของสารสกัดหยาบ HO



ภาคผนวก ข

พื้นที่ใต้กราฟของสารประกอบชีวภาพที่ผลิตจากแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกันจาก HPLC

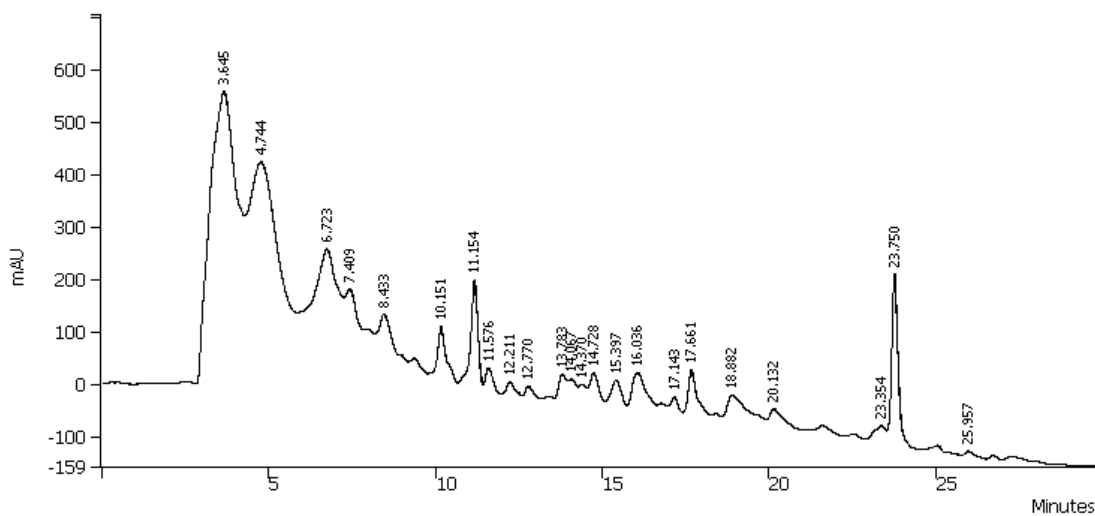
1. ร้อยละพื้นที่ใต้กราฟ HPLC ที่เวลา (Retention time, RT) ต่างๆ ของสารประกอบ BS ที่ได้จากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

กลูโคส		แป้งมันสำปะหลังย่อย		ซูโครส		กลีเซอรอล	
เวลา RT (นาที)	พื้นที่ใต้กราฟ (ร้อยละ)	เวลา RT (นาที)	พื้นที่ใต้กราฟ (ร้อยละ)	เวลา RT (นาที)	พื้นที่ใต้กราฟ (ร้อยละ)	เวลา RT (นาที)	พื้นที่ใต้กราฟ (ร้อยละ)
3.645	33.3890	3.759	39.8925	3.736	23.4841	3.757	35.1248
4.744	12.8217	4.865	16.1823	4.846	9.4699	4.901	3.0059
6.723	9.7592	6.701	6.4765	6.714	8.8552	6.721	3.9337
7.409	2.7375	7.458	8.3873	7.584	20.1021	7.495	13.6582
8.433	1.8334	8.495	1.6541	8.722	3.5554	8.546	1.9204
						9.664	2.9688
10.151	3.2139	10.165	4.9525	10.115	5.8399	10.212	5.4911
11.154	6.0684	11.210	3.9372	11.130	3.9128	11.282	4.1854
						13.068	2.9774
16.036	2.9528	15.687	3.0123				
17.661	2.0685	17.623	2.0030	17.612	1.0437	17.652	1.9140
18.882	3.2618					18.377	2.8717
20.132	1.5801	20.118	1.3433	23.770	23.770	20.144	1.9704
23.750	8.2263	23.721	9.4953			23.737	8.5583
				26.804	1.4619		
รวม	87.9126		97.3363		90.5686		88.5801

2. ร้อยละพื้นที่ใต้กราฟ HPLC ที่เวลา (Retention time, RT) ต่างๆ ของสารประกอบ HO ที่ได้จากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

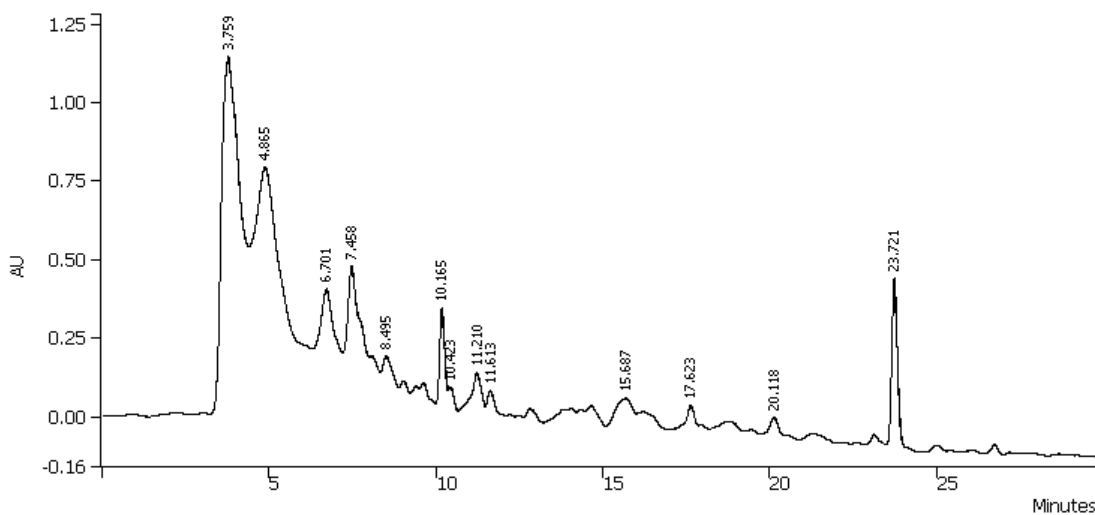
กลูโคส		แป้งมันสำปะหลังย่อย		ซูโครส		กลีเซอรอล	
เวลา RT (นาที)	พื้นที่ใต้กราฟ (ร้อยละ)	เวลา RT (นาที)	พื้นที่ใต้กราฟ (ร้อยละ)	เวลา RT (นาที)	พื้นที่ใต้กราฟ (ร้อยละ)	เวลา RT (นาที)	พื้นที่ใต้กราฟ (ร้อยละ)
3.556	5.7228	3.545	9.2365	3.552	8.6422	3.550	25.3955
7.427	7.1541	7.428	4.0533	7.441	7.5039	7.510	5.2127
8.437	1.1696					8.856	3.1618
9.361	1.1269	9.335	1.2298	9.349	4.8384		
9.891	0.8621	9.820	0.6970	9.840	3.0670		
10.148	1.6279	10.080	0.8683	10.093	2.5392	10.202	2.4430
10.431	2.1430	10.411	2.1596	10.425	1.8299	10.454	1.7556
11.161	17.9583	11.146	3.7237				
		11.292	4.7213	11.281	6.6854	11.217	22.4923
11.691	4.5563	11.727	6.7926	11.684	7.5267		
12.914	3.4929	12.957	5.3004	13.012	3.8419	13.079	4.1018
		13.467	1.6592	13.267	3.1824		
14.486	11.6436	14.350	9.9548	14.388	7.1425	14.763	5.6892
15.057	3.0144	14.978	2.9816	15.040	2.2789	15.464	6.0877
15.919	13.3638	16.084	11.3636	16.161	12.8852		
16.970	3.5604	16.805	11.0513	16.820	5.2155	17.174	2.7725
18.307	0.7582	18.257	2.2100	18.322	2.6704	18.420	4.4012
20.077	3.1733	20.029	5.0916	20.031	3.4717	20.220	2.6754
23.174	4.0511	22.965	4.0007	22.955	3.5160		
23.694	1.8521	23.631	0.6759	23.634	0.6470	23.417	4.9123
						23.869	2.2833
26.694	1.5884	26.694	3.4356	26.660	2.4769	26.833	6.0263
รวม	88.8192		91.2068		89.9611		99.4106

3. โครมาโทแกรมและพื้นที่ใต้กราฟของ BS จากกลูโคส



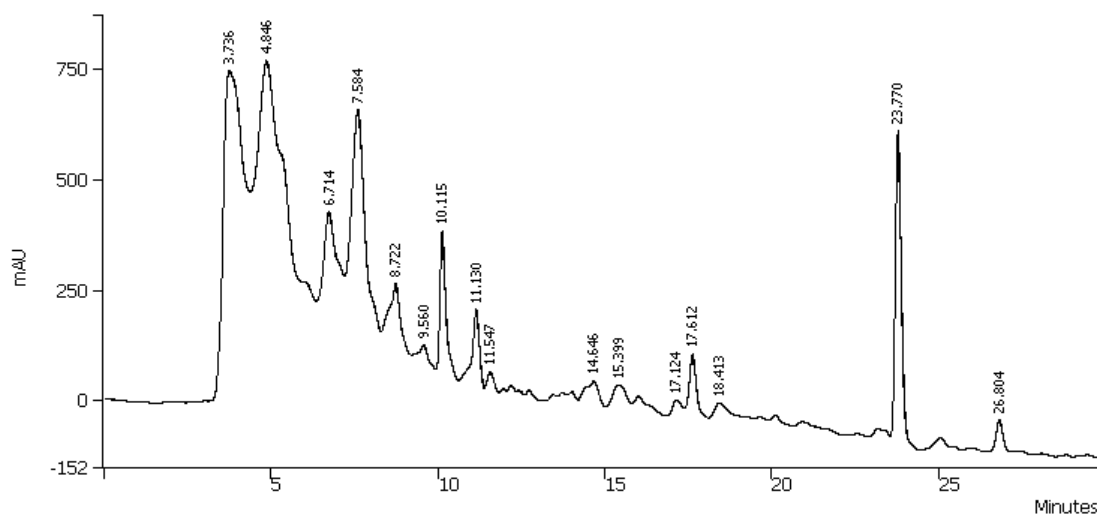
Peak No	Peak Name	Result (%area)	Ret. Time (min)	Area (counts)	Sep. Code
1		33.3890	3.645	176570592	BB
2		12.8217	4.744	67804792	BB
3		9.7592	6.723	51609320	BV
4		2.7375	7.409	14476885	VB
5		1.8334	8.433	9695616	BB
6		3.2129	10.151	16990994	BP
7		6.0684	11.154	32091642	PP
8		0.9975	11.576	5274860	TS
9		0.8084	12.211	4274957	PV
10		0.6235	12.770	3297229	VB
11		1.3762	13.783	7277536	BV
12		1.2226	14.067	6465318	VV
13		0.8268	14.370	4372437	VV
14		1.9816	14.728	10479040	VV
15		1.7158	15.397	9073675	VP
16		2.9528	16.036	15615270	PB
17		0.4714	17.143	2492889	BP
18		2.6085	17.661	13794708	PB
19		3.2618	18.882	17249212	BV
20		1.5801	20.132	8356066	VB
21		1.2441	23.354	6579305	BV
22		8.2263	23.750	43503112	VB
23		0.2805	25.957	1483567	BB
Totals		100.0000		528828992	

4. โครมาโทแกรมและพื้นที่ใต้กราฟของ BS จากแป้งมันสำปะหลังย่อย



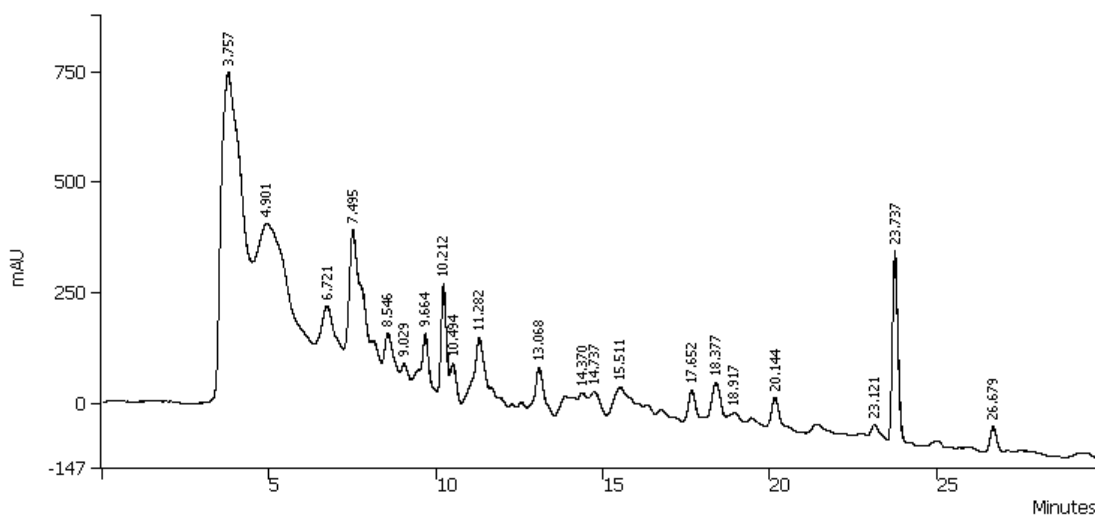
Peak No	Peak Name	Result (%area)	Ret. Time (min)	Area (counts)	Sep. Code
1		39.8925	3.759	264522192	BB
2		16.1823	4.865	107303176	BB
3		6.4765	6.701	42944868	BV
4		8.3873	7.458	55615388	VB
5		1.6541	8.495	10968379	BB
6		4.9525	10.165	32839420	BV
7		1.0487	10.423	6953622	VB
8		3.9372	11.210	26107398	BV
9		1.6142	11.613	10703635	VB
10		3.0129	15.687	19978376	BB
11		2.0030	17.623	13281646	BB
12		1.3433	20.118	8907499	BB
13		9.4953	23.721	62962428	BB
Totals		99.9998		663088064	

5. โครมาโทแกรมและพื้นที่ใต้กราฟของ BS จากซูโครส



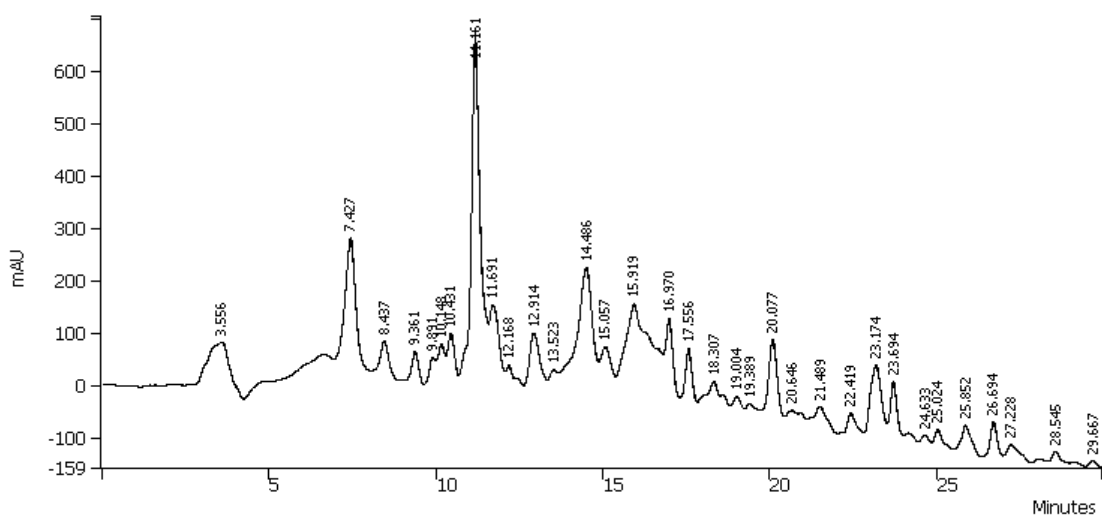
Peak No	Peak Name	Result (%area)	Ret. Time (min)	Area (counts)	Sep. Code
1		23.4841	3.736	158496784	BB
2		9.4699	4.846	63913460	BB
3		8.8552	6.714	59764532	BV
4		20.1021	7.584	135671408	VB
5		3.5554	8.722	23995666	TS
6		0.3094	9.560	2088282	BP
7		5.8399	10.115	39413860	PB
8		3.9128	11.130	26407798	BV
9		0.7681	11.547	5183724	VB
10		1.9423	14.646	13108731	BP
11		1.6413	15.399	11077552	PB
12		1.0437	17.124	7044135	BV
13		3.2117	17.612	21676348	VP
14		1.5586	18.413	10519204	PB
15		12.8436	23.770	86682888	BB
16		1.4619	26.804	9866519	BB
Totals		100.0000		674910976	

6. โครมาโทแกรมและพื้นที่ใต้กราฟของ BS จากกลีเซอรอล



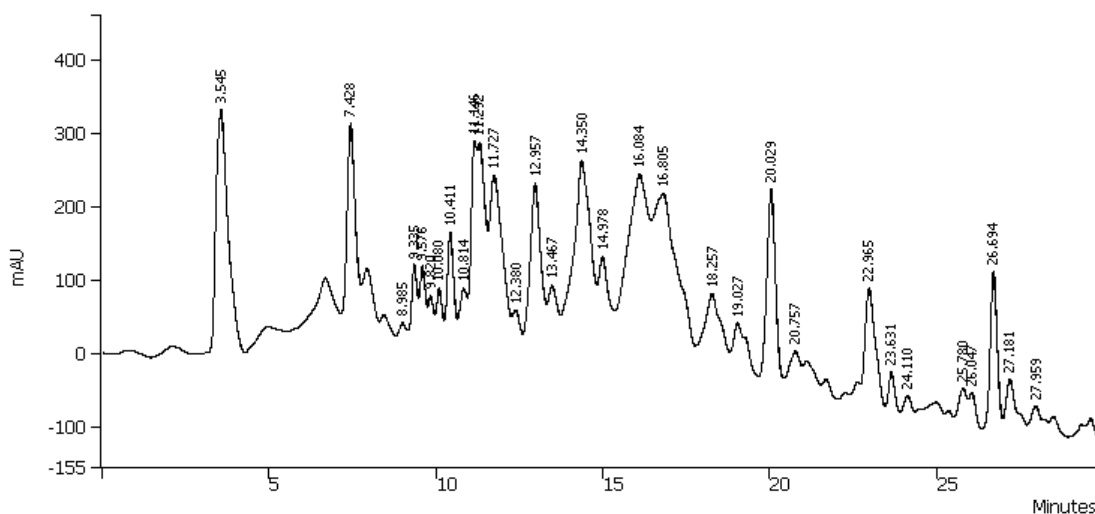
Peak No	Peak Name	Result (%area)	Ret. Time (min)	Area (counts)	Sep. Code
1		35.1248	3.757	204521824	BB
2		3.0059	4.901	17502610	BB
3		3.9337	6.721	22904814	BV
4		13.6582	7.495	79528088	VB
5		1.9204	8.546	11181997	TS
6		0.2303	9.029	1341082	BP
7		2.9688	9.664	17286626	PP
8		5.4911	10.212	31972898	PP
9		0.7399	10.494	4307957	TS
10		4.1854	11.282	24370262	PB
11		2.9774	13.068	17336350	BB
12		3.4728	14.370	20221096	BV
13		1.8581	14.737	10819392	VP
14		2.3510	15.511	13689400	PB
15		1.9140	17.652	11144523	BV
16		2.8717	18.377	16721145	VV
17		0.7188	18.917	4185550	VB
18		1.9704	20.144	11473121	BB
19		0.8069	23.121	4698171	BV
20		8.5583	23.737	49832644	VB
21		1.2421	26.679	7232593	BB
Totals		100.0000		582272128	

7. โครมาโทแกรมและพื้นที่ใต้กราฟของ HO จากกลูโคส



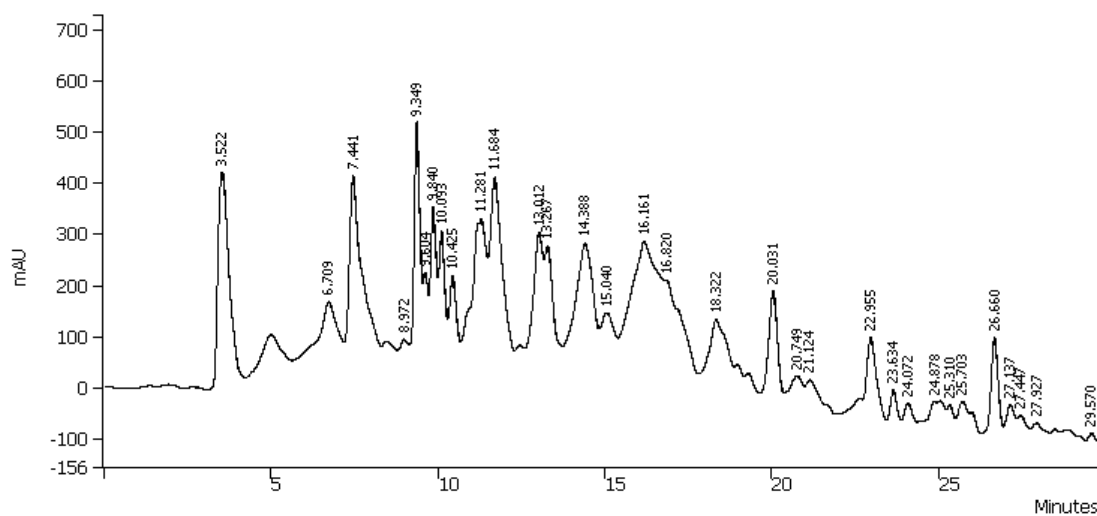
Peak No	Peak Name	Result (%area)	Ret. Time (min)	Area (counts)	Sep. Code
1		5.7228	3.556	41467400	BB
2		7.1541	7.427	51838548	BB
3		1.6196	8.437	11735748	BB
4		1.1269	9.361	8165247	BP
5		0.8621	9.891	6246468	PV
6		1.6279	10.148	11795450	VV
7		2.1430	10.431	15528466	VV
8		17.9583	11.161	130125864	VV
9		4.5563	11.691	33014846	VV
10		1.3051	12.168	9456866	VV
11		3.4929	12.914	25309268	VV
12		1.0817	13.523	7837768	VV
13		11.6436	14.486	84369864	VV
14		3.0144	15.057	21842558	VV
15		13.3638	15.919	96834096	VV
16		3.5604	16.970	25798738	VV
17		1.8325	17.556	13278302	VP
18		0.7582	18.307	5493638	PB
19		0.3528	19.004	2556390	BP
20		0.1702	19.389	1233494	PB
21		3.1733	20.077	22993694	BP
22		0.1551	20.646	1124150	PB
23		1.0993	21.489	7965415	BB
24		0.8702	22.419	6305363	BV
25		4.0511	23.174	29354492	VV
26		1.8521	23.694	13420296	VB
27		0.2958	24.633	2143175	BV
28		0.7147	25.024	5178397	VV
29		1.4558	25.852	10548934	VP
30		1.5884	26.694	11509260	PB
31		0.8141	27.228	5898618	TS
32		0.3696	28.545	2678118	BB
33		0.2142	29.667	1552283	BB
Totals		100.0003		724601088	

8. โครมาโทแกรมและพื้นที่ใต้กราฟของ HO จากแป้งมันสำปะหลังย่อย



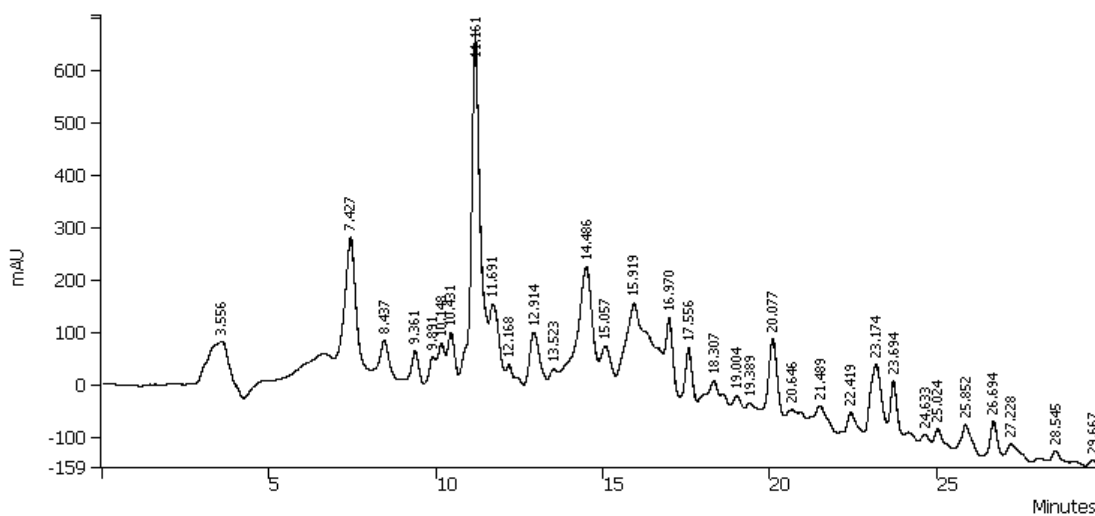
Peak No	Peak Name	Result (%area)	Ret. Time (min)	Area (counts)	Sep. Code
1		9.2365	3.545	81631432	BB
2		4.0533	7.428	35822960	BB
3		0.2636	8.985	2329574	BV
4		1.2298	9.335	10868511	VV
5		1.2997	9.576	11486749	VV
6		0.6970	9.820	6160083	VV
7		0.8683	10.080	7674231	VV
8		2.1596	10.411	19086082	VV
9		1.0684	10.814	9442157	VV
10		3.7237	11.146	32909584	VV
11		4.7213	11.292	41725952	VV
12		6.7926	11.727	60032660	VV
13		0.6698	12.380	5919450	VV
14		5.3004	12.957	46844760	VV
15		1.6592	13.467	14664163	VV
16		9.9548	14.350	87979488	VV
17		2.9816	14.978	26351264	VV
18		11.3636	16.084	100430120	VV
19		11.0513	16.805	97669848	VB
20		2.2100	18.257	19531652	BV
21		1.6043	19.027	14178824	VP
22		5.0196	20.029	44362940	PP
23		0.4679	20.757	4135676	PB
24		4.0007	22.965	35357884	BV
25		0.6759	23.631	5973158	VP
26		0.3299	24.110	2915565	PB
27		0.7984	25.780	7055874	BV
28		0.6582	26.047	5816972	VP
29		3.4356	26.694	30363804	PV
30		1.3821	27.181	12214842	VP
31		0.3227	27.959	2852383	PB
Totals		99.9998		883788608	

9. โครมาโทแกรมและพื้นที่ใต้กราฟของ HO จากซูโครส



Peak No	Peak Name	Result (%area)	Ret. Time (min)	Area (counts)	Sep. Code
1		8.6422	3.522	94001392	BB
2		2.2122	6.709	24061694	BV
3		7.5039	7.441	81619768	VB
4		0.2430	8.972	2642631	BV
5		4.8384	9.349	52627348	VV
6		1.2483	9.604	13578091	VV
7		3.0670	9.840	33359850	VV
8		2.5392	10.093	27618300	VV
9		1.8499	10.425	20121140	VV
10		6.6854	11.281	72716792	VV
11		7.5267	11.684	81867384	VB
12		3.8419	13.012	41788012	BV
13		3.1824	13.267	34614388	VV
14		7.1425	14.388	77688504	VV
15		2.2789	15.040	24787098	VV
16		12.8852	16.161	140151584	VV
17		5.2155	16.820	56728824	VP
18		2.6704	18.322	29046202	PB
19		3.4717	20.031	37761892	BV
20		1.2627	20.749	13734440	VV
21		1.3426	21.124	14603246	VB
22		3.5160	22.955	38243884	BP
23		0.6470	23.634	7037450	PV
24		0.4429	24.072	4817474	VP
25		0.8750	24.878	9517853	PV
26		0.2556	25.310	2779880	VP
27		0.3117	25.703	3390275	PB
28		2.4769	26.660	26941514	BV
29		0.8448	27.137	9189229	VV
30		0.5221	27.447	5679344	VV
31		0.3177	27.927	3455849	VB
32		0.1404	29.570	1526610	BB
Totals		100.0001		087698176	

10. โครมาโทแกรมและพื้นที่ใต้กราฟของ HO จากกลีเซอรอล

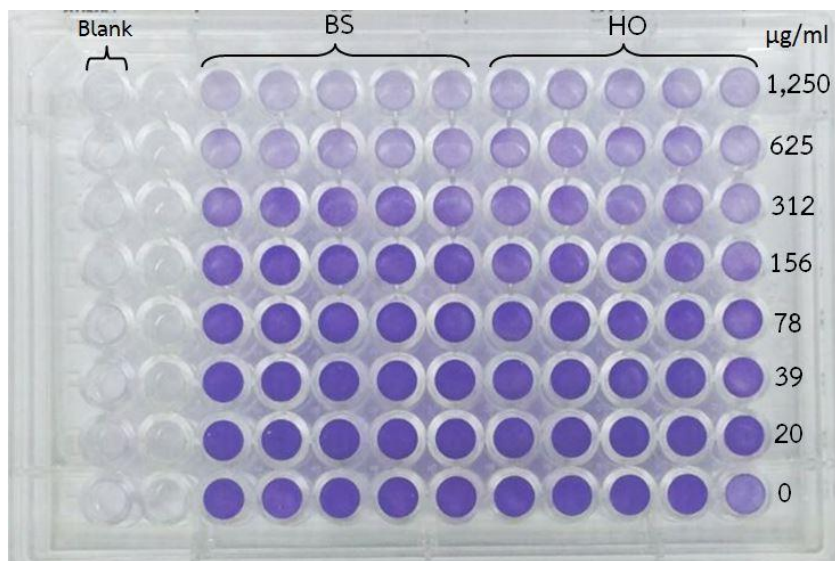


Peak No	Peak Name	Result (%area)	Ret. Time (min)	Area (counts)	Sep. Code
1		5.7228	3.556	41467400	BB
2		7.1541	7.427	51838548	BB
3		1.6196	8.437	11735748	BB
4		1.1269	9.361	8165247	BP
5		0.8621	9.891	6246468	PV
6		1.6279	10.148	11795450	VV
7		2.1430	10.431	15528466	VV
8		17.9583	11.161	130125864	VV
9		4.5563	11.691	33014846	VV
10		1.3051	12.168	9456866	VV
11		3.4929	12.914	25309268	VV
12		1.0817	13.523	7837768	VV
13		11.6436	14.486	84369864	VV
14		3.0144	15.057	21842558	VV
15		13.3638	15.919	96834096	VV
16		3.5604	16.970	25798738	VV
17		1.8325	17.556	13278302	VP
18		0.7582	18.307	5493638	PB
19		0.3528	19.004	2556390	BP
20		0.1702	19.389	1233494	PB
21		3.1733	20.077	22993694	BP
22		0.1551	20.646	1124150	PB
23		1.0993	21.489	7965415	BB
24		0.8702	22.419	6305363	BV
25		4.0511	23.174	29354492	VV
26		1.8521	23.694	13420296	VB
27		0.2958	24.633	2143175	BV
28		0.7147	25.024	5178397	VV
29		1.4558	25.852	10548934	VP
30		1.5884	26.694	11509260	PB
31		0.8141	27.228	5898618	TS
32		0.3696	28.545	2678118	BB
33		0.2142	29.667	1552283	BB
Totals		100.0003		724601088	

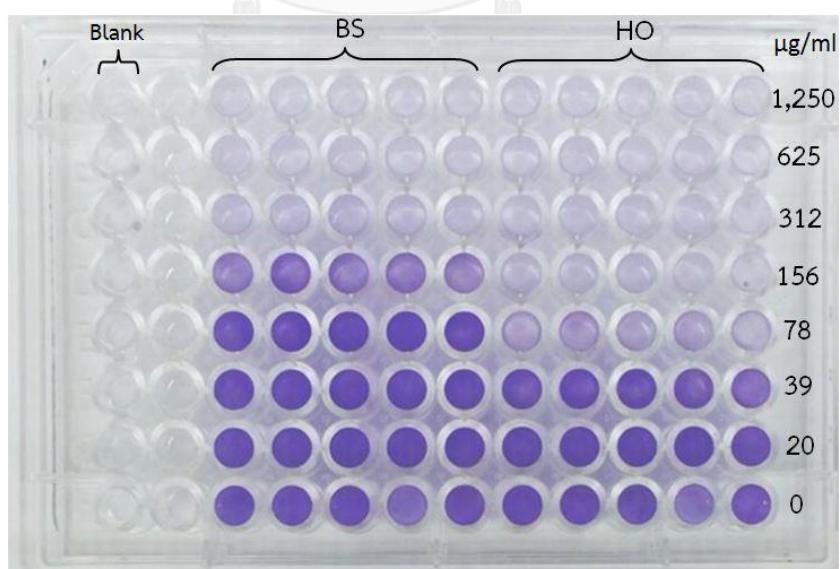
ภาคผนวก ข

ผลของสารประกอบชีวภาพต่อการสร้างไบโอฟิล์ม

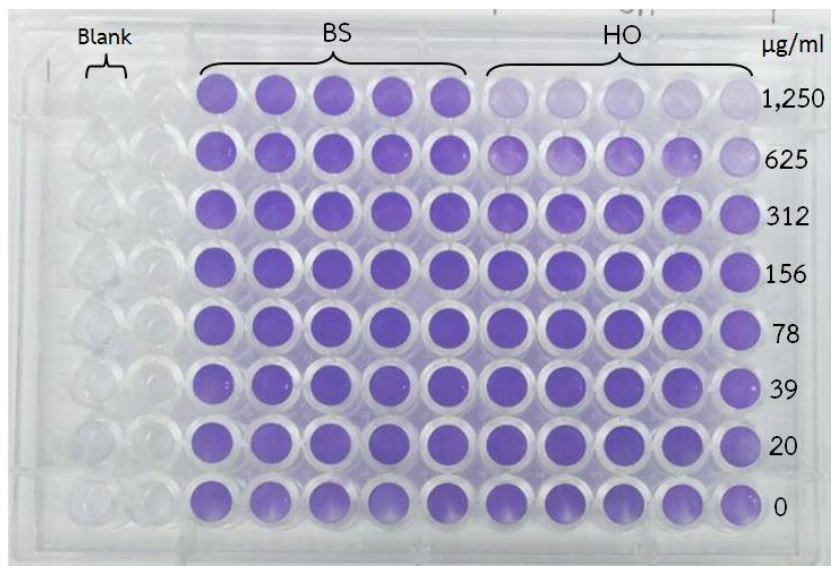
1. ผลของสารประกอบชีวภาพ BS และ HO ต่อการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. sobrinus* เมื่อบ่มสารประกอบชีวภาพพร้อมกับการสร้างไบโอฟิล์ม (Co-incubation)



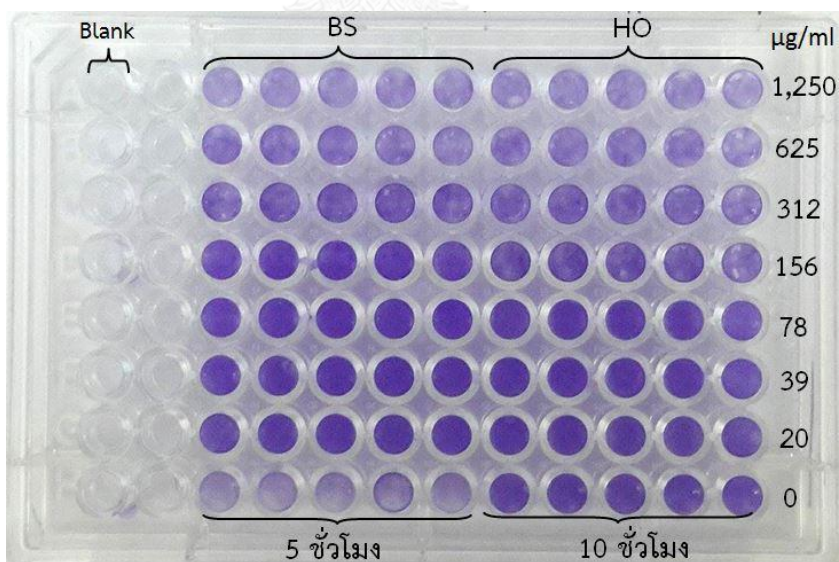
2. ผลของสารประกอบชีวภาพ BS และ HO ต่อการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. mutans* เมื่อบ่มสารประกอบชีวภาพพร้อมกับการสร้างไบโอฟิล์ม (Co-incubation)



3. ผลของสารประกอบชีวภาพ BS และ HO ต่อการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. mutans* เมื่อบ่มสารประกอบชีวภาพในภาชนะก่อนการสร้างไบโอฟิล์ม (Pre-coating)



4. ผลของสารประกอบชีวภาพ BS และ HO ต่อการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. mutans* เมื่อบ่มสารประกอบชีวภาพหลังการสร้างไบโอฟิล์มเป็นเวลา 5 ชั่วโมง (Mid post-formation)



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว ณัฐวรา อมาตยกุล เกิดวันที่ 15 กรกฎาคม 2535 ที่จังหวัดกรุงเทพฯ จบ การศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง (เหรียญทอง) ภาควิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง ปีการศึกษา 2556 และเข้ารับการศึกษต่อในระดับปริญญาโทที่ภาควิชาจุลชีววิทยา สาขาวิชาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2557

รางวัลและทุนการศึกษาที่ได้รับ

- ได้รับประกาศนียบัตร และเข็มรางวัล การศึกษายอดเยี่ยมขั้นวิทยาศาสตร์ บัณฑิต จากมูลนิธิศาสตราจารย์ ดร.แถบ นีละนิธิ ครั้งที่ 46 ประจำปี 2556
- ได้รับทุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา ประจำปีการศึกษา 2557

ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่

ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ได้เข้าร่วมเสนอผลงานในการประชุมทางวิชาการระดับนานาชาติ ในงาน The 28th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference (TSB 2016): ระหว่างวันที่ 28 -30 มกราคม 2559 ณ โรงแรม The Empress Hotel จังหวัดเชียงใหม่ ในหัวข้อเรื่อง “Production and Characterization of Biosurfactant from Aureobasidium pullulans strain YTP6-14”

เข้าร่วมเสนอผลงานในการประชุมทางวิชาการระดับนานาชาติ ในงาน The 2nd Joint Seminar of Core to Core Program A. Advanced Research Networks: ระหว่างวันที่ 14 -15 พฤศจิกายน 2559 ณ โรงแรม ณ โรงแรม Bangsaen Heritage Hotel จังหวัดชลบุรี ในหัวข้อเรื่อง “Development of Beneficial Biofilms and Biosurfactants from Aureobasidium pullulans YTP6-14”