ตารางที่ 3.1 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ณรงค์ (2543)

ชนิดของจุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	อ้างอิง
Acinetobacter calcoaceticus RAG-1	Crude oil	Heteropolysaccharide	Foght el al.(1989)
Bacillus subtilis	Glucose	Surfactin	Mulligan et al.(1984)
B.subtilis MTCC1427	Hydrocarbon	Biosurfactant	Makkar et al.(1998)
B.subtilis ATCC21332	Glucose	Surfactin	Davis et al.(1999)
Candida Antarctica T-34	Glucose	Mannosylerythritol	Kitamoto et al.(1992)
Candida apicola	Glucose	lipids	Hemmel et al.(1993)
C.bombicola CBS6009	Glucose	Sophorose lipid	Davila et al.(1992)
Cellulomonas cellulans	Glycerol	Sophorose lipid	Arino et al.(1998)
Micrococcus sp.	n-alkane and sugar	Glycolipid	Das et al.(1998)
Pseudomonas areuginosa S_7B_1	Hydrocarbon	Biosurfactant	Hisatsuka et al.(1978)
Pseudomonas areuginosa	n-parafin	Rhamnolipids	Iton et al.(1989)
P.areuginosa UW-1	Corn oil	Rhamnolipids	Sim et al.(1997)
P.areuginosa CFTR-6	Glucose	Rhamnolipids	Romana et al.(1989)
P.areuginosa 44T1	Hydrocarbon	Rhamnolipids	Robert et al.(1989)
P.areuginosa DSM2659	Glucose	Rhamnolipids	Guerra-santos et al.(1984)
P.areuginosa UG2	Glucose	Rhamnolipids	Van Dyke et al.(1993)
P.areuginosa BS22	Glucose	Rhamnolipids	Sudhakar babu et al.(1996)
P.areuginosa GS3	Molasses	Rhamnolipids	Patel et al.(1997)
P.areuginosa IFO3924	Ethanol	Rhamnolipids	Matsufuji et al.(1997)
P.areuginosa PG201	Hexadecane	Rhamnolipids	Sekelsky et al.(1998)
P.areuginosa 47T2 NCIB 40044	Frying oil	Rhamnolipids	Haba et al.(2000)
Pseudomonas NCIB11264	Glucose	Exopolysaccharide	Williams et al.(1978)
Rhodoccocus erythropolis DSM43215	n-hexadecane	α-α-trehalose-6,6'- di-corynomycolate	Kretschmer et al.(1982)
Rhodococcus sp. 51T7	Hydrocarbon	Trehalose	Espuny et al.(1996)

จากตารางที่ 3.1 ซึ่งรวบรวมจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้โดยเฉพาะ *Pseudomonas* สายพันธุ์ต่างๆ ซึ่งสามารถเจริญเติบโตได้บนแหล่งคาร์บอนหลายๆชนิดทั้งในอาหารที่สามารถละลายน้ำได้ เช่น กลูโคส เอทานอล หรือสารที่ละลายน้ำได้น้อย เช่น สารประกอบไฮโดรคาร์บอนต่างๆ ซึ่งเป็นเหตุผลที่สำคัญที่ทำให้จุลินทรีย์ชนิดนี้มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพออกมาภายนอกเซลล์ได้ ซึ่งสารลดแรงตึงผิว

ชีวภาพน่าจะมีส่วนช่วยในการลำเลียงอาหารเข้าสู่เซลล์ นอกจากนี้จะพบว่าสารลดแรงตึงผิวที่ *Pseudomonas* ผลิตได้เป็น แรมโนลิปิด และเนื่องจากจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสำหรับงานวิจัยนี้เป็น *Pseudomonas* sp.A41 จึงคาดว่าสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้น่าจะมีส่วนประกอบของ แรมโนลิปิด ซึ่งจากการวิจัยของ ณรงค์ (2543) ซึ่งศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดย *Pseudomonas* sp.A41 ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง ได้มีการวิเคราะห์ส่วนประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ด้วยกระบวนการแยกโดย ไฮเปอร์ฟอร์มานซ์ ลิควิด โครมาโตกราฟฟี (High Performance Liquid Chromatogrophy) และตรวจสอบด้วยการหักเหของแสง (Reflective Index) ซึ่งเปรียบเทียบกับสารละลายแรมโนสมาตรฐาน พบว่าสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้ จะมีองค์ประกอบของน้ำตาลแรมโนสรวมอยู่ด้วย

3.2 การทดสอบสารลดแรงตึงผิวในเชิงคุณภาพและปริมาณ

สารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้จาก *Pseudomonas sp.* จะมีแรมโนลิปิดเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย (Hisatsuka และคณะ ,1971) โดยโมเลกุลของ แรมโนลิปิด จะประกอบไปด้วยโมเลกุลของน้ำตาลแรมโนส เชื่อมต่อกับโมเลกุลของบีต้าไฮดรอกซิลเดคาโนอิกแอซิด รวมกันเป็นโมเลกุลที่มีขั้วและไม่มีขั้วอยู่ด้วยกัน ซึ่งลักษณะเช่นนี้ทำให้โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวสะสมตัวอยู่ระหว่าง 2 วัฏภาค และจากคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิวนี้จึงนำมาใช้แสดงปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ทางอ้อม กล่าวคือ ถ้ามีปริมาณของสารลดแรงตึงผิวมากค่าแรงตึงผิวที่ได้ก็จะน้อยลง เช่น จากการทดลองของ Deziel และคณะ (1996) ได้ทำการทดลองผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Pseudomonas sp.* พบว่าแรมโนลิปิดที่ผลิตได้สามารถลดแรงตึงผิวของน้ำจาก 72 มิลลินิวตันต่อเมตร เป็น 29 มิลลินิวตันต่อเมตร

การทดสอบสารลดแรงตึงผิวในเชิงคุณภาพและปริมาณโดยอาศัยการทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการทดสอบ และจะไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่นๆที่ปะปนอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ แบ่งวิธีการทดสอบสารลดแรงตึงผิวในเชิงคุณภาพและปริมาณได้เป็น 2 วิธีคือ การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี และการวิเคราะห์โดยวิธีโครมาโตกราฟฟี

3.2.1 การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของผลิตภัณฑ์

การที่จะสามารถวัดปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่ได้นั้นจำเป็นต้องมีการสกัดแยกผลิตภัณฑ์ที่เราต้องการออกจากน้ำหมักเพื่อให้การวิเคราะห์มีความถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น เนื่องจากแรมโนลิปิดสามารถละลายได้ในตัวทำละลายหลายๆชนิด เช่น สารละลายเมทานอล คลอโรฟอร์ม เอทธิลอะซิเตท เอทธิลอีเทอร์ (Iton และคณะ, 1971) การใช้ตัวทำละลายในการสกัดแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้น Patal และคณะ (1997) ใช้สารละลายผสมระหว่าง คลอโรฟอร์ม และ เอทานอล ในอัตราส่วน 2:1 โดยปริมาตร Wilson และคณะ (1996) สกัดแยกโดยใช้สารละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์ม และ เอทานอล ในอัตราส่วน 2:1 ก่อนนำผลไปวิเคราะห์ทางเคมีดังต่อไปนี้

3.2.1.1 การทดสอบด้วยการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) การตรวจสอบน้ำตาลด้วยวิธีนี้ อาศัยหลักการที่สารออกซิไดซ์ เช่น Cu^{2+} tatrate (Fehing's solution) หรือ Cu^{2+} citrate (Bnedicts solution) ที่อยู่ในสารละลายที่เป็นด่างจะทำปฏิกิริยากับหมู่ –OH อิสระของน้ำตาล ที่ตำแหน่งคาร์บอนที่หนึ่ง ซึ่งจะให้ตะกอนสีแดงของคิวปรัสออกไซด์ (Cu_2O) ซึ่ง Hisatsuka และคณะ (1971) ได้นำวิธีนี้มาใช้ทดสอบหาปริมาณแรมโนลิปิด จากปริมาณน้ำตาลแรมโนสที่ผลิตได้จาก *P.areuginosa* S_7B_1

3.2.1.2 การทดสอบโดยอาศัยการเกิดเฟอร์ฟูราล (furfural) โดยการต้มน้ำตาลกับกรดเข้มข้น จะทำให้น้ำตาลสูญเสียน้ำและเกิดเป็นอนุพันธ์ของเฟอร์ฟูราล ซึ่งสามารถรวมตัวกับสารประกอบประเภทฟีนอล(phenol) เช่น ออซินอล (orinol) ให้สารสีน้ำเงินเขียว แอลฟาแนปทอล (α-naphthol) ให้สารสีม่วงแดง แอนโทรน (anthrone) ให้สารสีเขียว หรือ รีซอลซีนอล (resorcinol) เป็นต้น ซึ่งสีที่เกิดขึ้นต่างๆเหล่านี้ ความเข้มของสีจะแปรไปตามปริมาณปริมาณของน้ำตาล

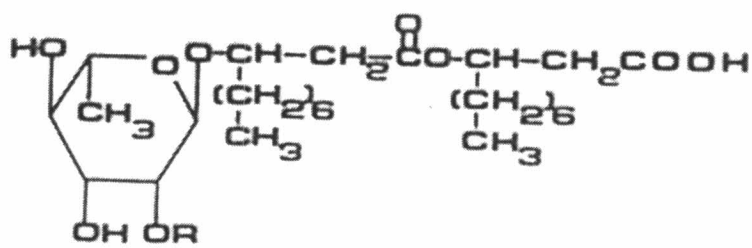
3.2.2 การวิเคราะห์โดยวิธีโครมาโตกราฟฟี

โครมาโตกราฟีเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถตรวจสอบชนิดและปริมาณของสารประกอบที่มีปริมาณน้อยๆ ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกและถูกต้อง โดยวิธีโครมาโตกราฟฟีที่นำมาประยุกต์ใช้ในการสกัดแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ มีดังต่อไปนี้

3.2.2.1 ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี (Thin layer Chromatography) ทำโดยการเตรียมซิลิกาเจลเป็นแผ่นบางๆ บนกระจก แล้วจุดสารที่ต้องการสกัดแยกบนแผ่นซิลิกาเจล โดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม การศึกษาการแยกแรมโนลิปิดที่ผลิตได้จากการเลี้ยง *P.aeruginosa*

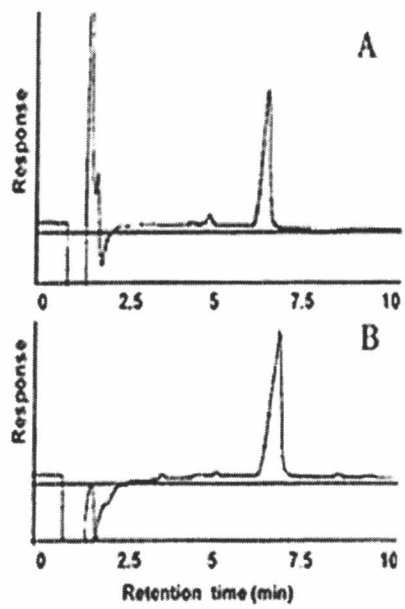
ATCC10145 โดยใช้สารละลายผสมของคลอโรฟอร์ม เมทานอล และกรดอะซิติก ที่อัตราส่วน 65:15:2 กำหนดให้เป็นชุด A และสารละลายผสมของ 2-โพรพานอล แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์และน้ำ ในอัตราส่วน 6:2:1 กำหนดให้เป็นชุด B โดยพบว่าเมื่อใช้ชุด A จะให้จุด 2 จุดซึ่งเป็นไกลโคลิปิด 2 ชนิด ทราบได้โดยเทียบค่ารีทาเดชั่นเฟคเตอร์ (Retardation factor,Rf) ที่ได้กับค่ามาตรฐาน ส่วนกรณีใช้สารละลายชุด B ให้จุดเพียงจุดเดียวเท่านั้น และค่ารีทาเดชั่นเฟคเตอร์ ที่ได้เมื่อเทียบกับมาตรฐานแล้ว พบว่าเป็นน้ำตาลแรมโนส (Wu และ Ju,1998) งานวิจัยของ Mercade และคณะ (1992) ได้ใช้สารละลายผสมระหว่าง คลอโรฟอร์ม เมทานอล และน้ำ ในอัตราส่วน 65:25:4 เป็นตัวสกัดแยก เมื่อนำมาแยกด้วยทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี พบว่าเป็นแรมโนลิปิด การสกัดแยกสารลดแรงตึงผิวที่ได้จากการเลี้ยง *P.aeruginosa* GL1 โดยใช้คลอโรฟอร์ม เมทานอล และกรด อะซิติกในอัตราส่วน 60:15:2 บนทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี สังเกตการแยกด้วยไออิ่มตัวของไอโอดีน หรือใช้สารโมริชรีเอเจน (Molish reagent) จะได้ค่ารีทาเดชั่นแฟคเตอร์ของแรมโนลิปิด 1 2 3 และ 4 เป็น 0.31,0.72,0.13 และ 0.40 ตามลำดับ โดยงานวิจัยนี้เป็นของ Arino และคณะ (1996)

3.2.2.2 <u>คอลัมน์โครมาโตกราฟฟี</u> (Column Chromatography) ลักษณะเป็นซิลิกา เจลบรรจุอยู่ในหลอดแก้วหรือท่อแก้ว วิธีนี้เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมสารให้บริสุทธิ์ โดยอาศัยหลักการที่ว่าสารต่างชนิดกันจะเคลื่อนที่บนตัวกลางของซิลิการเจลได้ต่างกัน ซึ่งตัวอย่างของการแยกแรมโนลิปิดโดยมีสารละลายผสมของ เมทิลคลอไรด์ และเมทานอล เป็นสารละลายสำหรับชะคอลัมน์ (Robert และคณะ,1988) แล้วนำมาวิเคราะห์โครงสร้างด้วยนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปคโทรสโคปี (Neclear Magnetic Resonance Spectroscopy) ซึ่งได้ลักษณะโครงสร้างของน้ำตาลแรมโนสดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 โครงสร้างของแรมโนลิปิด ที่ได้จากการเลี้ยง *Paeruginosa* (Linhardt และคณะ,1989)

3.2.2.3 ไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ ลิควิด โครมาโตกราฟี (Heigh Performance Liquid Chromatography) ใช้วิเคราะห์สารประกอบที่อยู่ในรูปของเหลว สารละลายที่เหมาะสมซึ่งใช้เป็นตัวพาสารผลิตภัณฑ์ผ่านของเหลวที่ถูกฉาบไว้บนผิวคอลัมน์ ภายใต้ความดันสูงความสามารถในการละลายของสารผลิตภัณฑ์ในสารละลายที่เป็นตัวพาและของเหลวที่ผิวคอลัมน์ต่างๆ จะถูกผลักดันให้ออกจากคอลัมน์ในเวลาต่างๆกัน สารที่จะนำมาแยกด้วยไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ ลิควิด โครมาโตกราฟฟี จะต้องทำให้มีความบริสุทธิ์ ดังเช่นงานวิจัยของ Kim และคณะ (2000) ได้มีการนำตัวอย่างน้ำหมักมาทำการสกัดแยกด้วยวิธี ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟีก่อน โดยเลือกใช้สารละลายที่จะนำมาเป็นตัวพา 2 ระบบ 2 ชุดด้วยกัน คือ ชุด A ประกอบด้วยระบบของ คลอโรฟอร์ม เมทานอล และกรดอะซิติก(85:15:2) และ คลอโรฟอร์มและเมทานอล(80:20) เพื่อแยกแรมโนลิปิดชนิดที่1 และชุด B ประกอบไปด้วยระบบของคลอโรฟอร์มและเมทานอล (5:1)และ คลอโรฟอร์มเมทานอล (2:1) เพื่อแยกแรมโนลิปิดชนิดที่ 2 ซึ่งเมื่อนำมาแยกด้วย ไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ ลิควิด โครมาโตกราฟี จะได้ลักษณะกราฟดังรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 การแยกของแรมโนลิปิดชนิดต่างๆเมื่อทำการแยกด้วยไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ ลิควิด โครมาโตกราฟี โดยอาศัยตัวพาแตกต่างกัน โดยใช้คอลัมน์ Nova-pak C_{18} อัตราการป้อน 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้คือสารละลายของอะซิโตไนไตร และน้ำ (60:40) (Kim และคณะ,2000)

A โครมาโตแกรมของแรมโนลิปิดชนิดที่ 1

B โครมาโตแกรมของแรมโนลิปิดชนิดที่ 2

3.2.2.4 แก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography) ใช้สำหรับแยกสารประกอบที่ระเหยได้ สารที่นำมาใช้ตรวจสอบด้วยแก๊สโครมาโตกราฟีจะต้องเป็นสารที่ระเหยได้ทั้งหมด และเมื่อฉีดสารที่ต้องการทดสอบเข้าไปในเครื่อง สารนั้นจะถูกความร้อนเปลี่ยนให้เป็นแก๊ส และจะถูกแก๊สเฉื่อยผลักดันให้เข้าไปในท่อ และคอลัมน์ ถ้าสามารถนำสารที่ไม่ระเหยมาทำปฏิกิริยาให้เป็นสารที่ละลายได้ ซึ่งจะสามารถนำมาวิเคราะห์ได้ด้วยวิธีนี้

3.3 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อกระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pseudomonas sp.*

ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อกระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ *Pseudomonas sp.* มีหลายประการเช่น ภาวะของระบบ ชนิดของแหล่งอาหาร เป็นต้น การศึกษาอิทธิพลของปัจจัยต่างๆนั้นมีผู้ศึกษามาก่อนหน้านี้หลายด้าน และสามารถจำแนกได้ดังนี้

3.3.1 อิทธิพลจากชนิดของแหล่งอาหาร

จุลินทรีย์ทั่วไปจะใช้อาหารเป็นแหล่งพลังงานในการเจริญเติบโต ซึ่งนอกจากแหล่งคาร์บอนแล้ว จุลินทรีย์ยังต้องการแหล่งไนโตรเจน ในการเจริญเติบโต ซึ่งได้จาก แอมโมเนียม ซัลเฟต หรือกรดอะมิโนเปปไทด์ รวมไปถึงวิตามินและเกลือแร่ต่างๆ ดังนั้นอาหารจึงมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์โดยตรง จำแนกความสำคัญของแหล่งอาหารได้นี้

3.3.1.1 อิทธิพลของแหล่งคาร์บอน ต่อการเจริญเติบโตและการผลิตผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์ จากการศึกษาพบว่าโดยทั่วไปแหล่งคาร์บอนที่ใช้จะเป็นไฮโดรคาร์บอน เพราะเป็นวัตถุดิบที่หาได้ง่ายและมีราคาถูก จึงเหมาะที่จะนำมาใช้ประโยชน์ ซึ่ง Rahaman และคณะ (2002) ได้อาศัยหลักเศรษฐศาสตร์ในการคัดเลือกแหล่งคาร์บอนที่ให้ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวสูงที่สุด โดยการใช้สารที่มีราคาถูกในท้องตลาด ได้แก่ น้ำมันที่สกัดจากดอกทานตะวัน (safflower oil) น้ำมันถั่วเหลือง (soybean oil) และกลีเซอรอล (glycerol) ซึ่งน้ำมันถั่วเหลืองจะให้ปริมาณเซลล์สูงสุด และให้ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงที่สุด คือ 4.31 กรัมต่อลิตร ซึ่งวัดโดยอาศัยค่าการดูดกลืนแสงที่ 400 และ 430 นาโนเมตร หลังจากทำปฏิกิริยากับกรดซัลฟูริก (sulfuric acid) นำไปต้มที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็น หลังจากนั้นเติมกรดไตรไกลโคลิก (triglycolic acid) บ่มไว้ในที่มืด 3 ชั่วโมง Linhardt และคณะ,1989 เลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa 44T1* โดยใช้ อัลเคนโซ่ตรง ร่วมกับไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่นเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งพบว่า การเลี้ยงจุลินทรีย์โดยใช้ อัลเคนโซ่ตรง ร่วมกับ น้ำมันมะกอก (olive oil) เป็นแหล่งคาร์บอนจะ

ให้ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงที่สุด คือ 7.65 กรัมแรมโนลิปิด ต่อลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ต่างกันจะให้แรมโนลิปิดชนิดต่างๆกันอีกด้วย เช่น การเลี้ยงบน กลูโคสจะให้แรมโนลิปิดทั้ง 4 ชนิดขณะที่ถ้าเลี้ยงบนน้ำมันมะกอกจะให้แรมโนลิปิดเพียงบางชนิดเท่านั้น และจากการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยการเลี้ยงจุลินทรีย์ *P.aeruginosa* บนแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ของ Ramana และ Karanth (1989) พบว่าแหล่งคาร์บอนต่างๆมีผลทำให้การเจริญเติบโตและการผลิตแรมโนลิปิดแตกต่างกันออกไป เช่น การใช้ฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ปริมาณแรมโนลิปิดน้อยกว่า การเลี้ยงบนน้ำมันมะกอก โดยสังเกตจากค่าแรงตึงผิวที่ต่ำกว่านั่นคือ 37 มิลลินิตันต่อเมตร ส่วนน้ำมันมะกอกจะอยู่ที่ 33 มิลลินิวตันต่อเมตร นอกจากนี้ Chayabutra และคณะ (2000) ได้ทดลองเลี้ยง *P.aeruginosa* ATCC10145 บนแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ พบว่า การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยใช้ กรดปาล์มมิติก (plamitic acid) ร่วมกับกรดสเตียริก (steric acid) เป็นไปอย่างช้าๆ แต่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้สูงที่สุดคือ 0.9 กรัมแรมโนสต่อลิตร Lang และ Wullbrandt (1999) ได้ทำการรวบรวมผลการทดลองที่ศึกษาการผลิต Rhamnose lipid จาก *Pseudomonas sp.* โดยใช้แหล่งของคาร์บอนที่แตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 แสดงการผลิต Rhamnose lipids (RL) จาก *Pseudomonas* sp. ในสภาวะปกติ : **ขวดเขย่ารูปชมพู่** (shake flasks) **หรือ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ** (bioreactor); 28-37 °C; pH 6-7.5. ND คือไม่ได้พิจารณา (not determined)

Strain	C source (g/l)	RL ($g\ l^{-1}$)	$Y_{P/S}$ ($g\ g^{-1}$)	X ($g\ l^{-1}$)	$Y_{P/X}$ ($g\ g^{-1}$)	t (h)	P_v ($g\ l^{-1}\ h^{-1}$)	Reference
P. aeruginosa	Glycerol (30)	2.5	0.083	ND	ND	96	0.026	Jarvis and Johnson 1949
P. aeruginosa	Glycerol (30)	2.0	0.067	ND	ND	120	0.016	Hauser and Karnovsky 1954
P. aeruginosa KY 4025	*n*-Paraffin (90)	8.5	0.094	ND	ND	144	0.059	Itoh et al. 1971; Suzuki and Itoh 1972
P. sp.	*n*-Paraffin (50)	14.0	0.280	ND	ND	120	0.117	Yamaguchi et al. 1976
P. sp. MUB	*n*-C14/15 (20)	2.9	0.145	3.4	0.85	48	0.060	Wagner et al. 1983
P. sp. DSM 2874	*n*-C14/15 (80)	12.8	0.160	21.0	0.61	180	0.071	Wagner et al. 1984; Syldatk et al. 1985a
P. aeruginosa UI 29791	Corn oil (75)	46.0	0.613	12.0	3.83	192	0.240	Linhardt et al. 1989; Daniels et al. 1988
P. aeruginosa 44T1	Olive oil (20)	7.65	0.382	6.0	1.28	72	0.106	Robert et al. 1989
P. aeruginosa 44T1	Olive oil (20)	9.0	0.450	ND	ND	120	0.075	Parra et al. 1990
P. aeruginosa 44T1	Olive oil (20)	10.0	0.500	4.2	2.38	110	0.091	Manresa et al. 1991
P. sp. JAMM	Olive oil (24)[a]	1.40	0.058	ND	ND	150	0.009	Mercade and Manresa 1994
P. aeruginosa DSM 7108	Soybean oil (125)	78.0	0.624	ND	ND	167	0.467	Wullbrandt et al. 1994,
DSM 7107	Soybean oil (163)	112.0	0.687	ND	ND	264	0.424	1995; Wullbrandt 1998; Giani et al. 1997
P. aeruginosa BS2	Whey (20)	1.78	0.089	1.6	1.11	44	0.040	Babu et al. 1996
P. aeruginosa BS2	Sucrose (20)[b]	1.85	0.093	1.5	1.23	44	0.042	Babu et al. 1996
P. aeruginosa GL1	Glycerol (30)	5.8	0.193	2.8	2.07	150	0.038	Arino et al. 1996
P. sp. BOP100	Ethanol (30)	3.0	0.100	1.0	3.00	120	0.025	Osman et al. 1996
P. aeruginosa IFO 3924	Ethanol (55)	32.0	0.582	3.4	9.41	168	0.190	Matsufuji et al. 1997
P. aeruginosa UW-1	Canola oil (60)	24.3	0.405	ND	ND	216	0.113	Sim et al. 1997

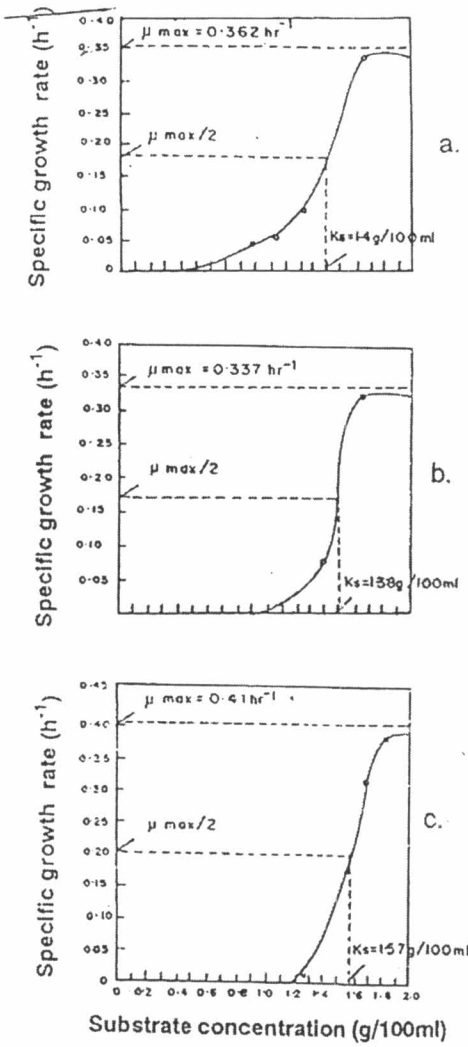
[a] Oil mill waste; [b] distillery waste

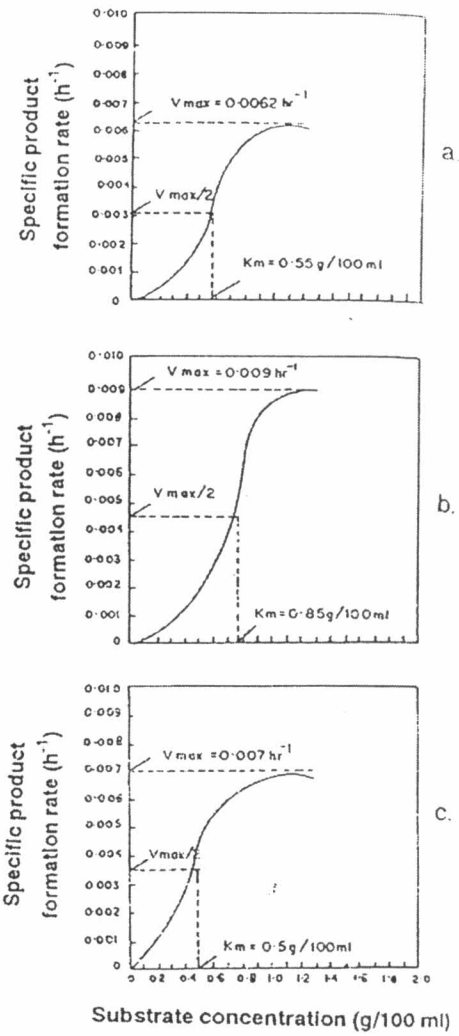
จากตารางจะเห็นได้ว่าการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะแตกต่างกันเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน นอกจากนี้งานวิจัยของอารีย์ 2542 ได้ทดลองเลี้ยง *Pseudomonas sp.* A41ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ โดยใช้แหล่งคาร์บอนต่างๆกัน คือ กลูโคส ซูโครส และน้ำมันปาล์ม พบว่า เมื่อทำการเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมงน้ำมันปาล์มจะให้ปริมาณจุลินทรีย์สูงที่สุด วัดจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ได้ 5.8 และให้ค่าการกระจายตัวของน้ำมันสูงที่สุด 86.2 ตารางเซนติเมตร และพบว่าปริมาณน้ำมันปาล์ม 2 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักจะให้ค่าการกระจายน้ำมันสูงที่สุด 113.1 ตารางเซนติเมตร

3.3.1.2 <u>อิทธิพลของแหล่งไนโตรเจน</u> แหล่งไนโตรเจนเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยทั่วไปการเติมแหล่งไนโตรเจนลงในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์จะนิยมใช้สารอนินทรีย์ เช่น โซเดียมไนเตรท หรือ แอมโมเนียมไนเตรท ซึ่งปริมาณของเหล่งไนโตรเจนที่เติมลงไปจะเติมในปริมาณน้อย เพื่อจำกัดปริมาณไนโตรเจน ให้หมดในช่วงเวลาที่เหมาะสม จะทำให้จุลินทรีย์ผลิตผลิตภัณฑ์ออกมาได้มากขึ้น เนื่องจากในสภาวะที่ไนโตรเจนมีจำกัด จุลินทรีย์จะไม่สามารถสร้างเซลล์เพิ่มขึ้นได้ ดังนั้นกลไกการสร้างเซลล์จึงเปลี่ยนมาเป็นการผลิตผลิตภัณฑ์มากขึ้นแทน การเลี้ยงจุลินทรีย์ *Pseudomonas aeruginosa* 44T โดยใช้น้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอน (Robert และคณะ,1989) พบว่าปริมาณแรมโนลิปิดที่ผลิตได้จะเริ่มสูงขึ้นหลังจากทำการเลี้ยงไป 14 ชั่วโมง และเมื่อปริมาณไนโตรเจนหมดลง ในชั่วโมงที่ 25 ปริมาณแรมโนลิปิดที่ผลิตได้ก็จะสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว และให้ปริมาณสูงที่สุดที่ 7.65 กรัมแรมโนลิปิดต่อลิตร งานวิจัยของ Chayabutra และคณะ (2000) ศึกษาผลของสภาวะที่มีการจำกัด ไนโตรเจน แมกนีเซียม และเหล็ก โดยเติมแอมโมเนียมคลอไรด์ 1 กรัมต่อลิตร ไอออนคลอไรด์ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 8 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ภาวะที่มีการจำกัดปริมาณไนโตรเจนจะให้ผลผลิตแรมโนลิปิดสูงที่สุดคือ 0.14 กรัมแรมโนสต่อลิตร

ประเภทของแหล่งไนโตรเจนที่ใช้แตกต่างกันมีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวได้แตกต่างกัน เช่น การใช้โซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน สำหรับการเลี้ยง *P.aeruginosa* CFTR6 จะให้ปริมาณผลผลิตสูงกว่า เมื่อเทียบกับการใช้แอมโมเนียมไนเตรท หรือแอมโมเนียมซัลเฟต (Ramana และ Karanth,1989) นอกจากนี้ Benincasa และคณะ (2002) ได้ทำการเลี้ยง *P.aeruginosa* LBI โดยใช้ soapstock เป็นแหล่งคาร์บอน และโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า การผลิตแรมโนลิปิดจะเพิ่มขึ้นหลังจากที่แหล่งไนโตรเจนลดลงในชั่วโมงที่ 26 ซึ่งปริมาณ เซลล์ที่ผลิตได้อยู่ที่ 1.75 กรัมต่อลิตร ขณะที่แรมโนลิปิดที่ผลิตได้เพิ่มขึ้นจาก 1.5 กรัมต่อลิตร ไปเป็น 3 กรัมต่อลิตร ในช่วงที่จุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่อัตราการเจริญเติบโตเท่ากับอัตราการตาย การทดลองของอารีย์ (2542) ที่ทำการเลี้ยง *Pseudomonas sp.* A41 โดย ใช้ชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่างๆกันพบว่า เมื่อใช้แอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ค่าการกระจาย

ตัวของน้ำมันสูงที่สุดที่ 132.8 ตารางเซนติเมตร และเมื่อนำมาเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรทระหว่าง 0.1 ถึง 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของแอมโมเนียมไนเตรทก็พบว่าที่ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก จะให้ค่าการกระจายตัวของน้ำมัน สูงที่สุดคือ 134.5 ตารางเซนติเมตร Sudhakar และคณะ (1996) ได้ศึกษาเปรียบเทียบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จากจุลินทรีย์ *Pseudomonas aeruginosa* BS2 โดยใช้ของเสียจากอุตสาหกรรมเป็นสารอาหาร ในการเลี้ยงเปรียบเทียบกับสารอาหารสังเคราะห์ โดยศึกษาของเสียจากอุตสาหกรรม 2 ชนิด คือ Whey waste และ Distillery waste จากการศึกษาพบว่า การเลี้ยงโดยใช้อาหารสังเคราะห์, Distillery waste และ Whey waste เป็นสารอาหาร จะทำให้เซลล์มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด เท่ากับ 0.362,0.337 และ 0.41 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะมากที่สุดเมื่อใช้ Whey waste และน้อยที่สุดเมื่อใช้ Distillery waste ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณไนโตรเจนของ Whey waste มีมากกว่าเมื่อเทียบกับ Distillery waste ดังแสดงในรูปที่ 3.3 อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์จำเพาะจาก อาหารสังเคราะห์, Distillery waste และ Whey waste เท่ากับ 0.0062,0.009 และ 0.007 ต่อชั่วโมงตามลำดับ ซึ่ง อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์จำเพาะของ Disstillery waste จะมากกว่าของ Whey waste ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากปริมาณไนโตรเจนที่มีมากเกินไป (excessive nitrogen) ใน Whey waste จะสนับสนุนการเจริญเติบโตของเซลล์แต่อาจทำให้การผลิตผลิตภัณฑ์ลดน้อยลงดังแสดงในรูปที่ 3.4





รูปที่ 3.3 แสดงอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์

a. ใช้อาหารสังเคราะห์

b. ใช้ Distillery waste

c. ใช้ Whey waste

รูปที่ 3.4 แสดงอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์จำเพาะ

a. ใช้อาหารสังเคราะห์

b. ใช้ Distillery waste

c. ใช้ Whey waste

3.3.1.3 อิทธิพลของอัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอนและไนโตรเจน ซึ่ง Mercade และคณะ (1993) ได้หาปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยง *Pseudomonas sp*, JAMM โดยแหล่งคาร์บอนที่ใช้คือน้ำมันมะกอก 2.5 กรัมต่อลิตร และให้แหล่งไนโตรเจน ซึ่งเป็น โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) ให้แตกต่างกันในช่วง 1 ถึง 6 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้ค่าแรงตึงผิวที่ได้จากการวัดน้ำหมักมีค่าแตกต่างกัน ที่ปริมาณของโซเดียมไนเตรทที่เติมลงไปเป็น 2.5 กรัมต่อลิตร พบว่าหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 150 ชั่วโมง นำน้ำหมักมาวัดค่าแรงตึงผิวจะให้ค่าลดลงมากที่สุดจาก 42 มิลลินิวตันต่อเมตร เป็น 30 มิลลินิวตันต่อเมตรงานวิจัยของ Linhardt และคณะ (1989) พบว่าอาหารที่ใช้เลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบน้อยๆ คือ 1.5 ถึง 2 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร จะให้ผลผลิตแรมโนลิปิดสูงกว่าอาหารที่มีไนโตรเจนปริมาณมาก คือ 2.5 ถึง 3 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร โดยใช้แหล่งคาร์บอนคือน้ำมันมะกอกที่ 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร นอกจากนี้ การเลี้ยง *Pseudomonas sp.*โดยใช้ชนิดของแหล่งไนโตรเจน และปริมาณต่างกัน (Arino และคณะ,1996) พบว่าเมื่อใช้โซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณไกลโคไซด์สูงที่สุด คือ 3.5 กรัมต่อลิตร ส่วนที่ความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท 6 กรัมต่อลิตรจะให้ปริมาณไกลโคไซด์เพียง 1.6 กรัมต่อลิตร

3.3.1.4 อิทธิพลของฟอสเฟต ฟอสเฟตเป็นแหล่งอาหารอีกชนิดหนึ่งที่สำคัญในกระบวนการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และมีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งงานวิจัยของ Chayabutra และคณะ (2000) ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของสารอาหารต่างๆต่อการเจริญเติบโตของ *P.aeruginosa* ATCC10145 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ทำปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชั่น ภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนพบว่า การเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มี ฟอสเฟต จะให้ ปริมาณแรมโนลิปิดสูงกว่าการเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีไนโตรเจน ประมาณ 4 ถึง 5 เท่า นอกจากนี้ ชนิดของแหล่งฟอสเฟตซึ่งมีผลต่อความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อจะให้ผลการเจริญเติบโต และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่างกัน ดังการทดลองของ Ramana และ Karanth(1989) ซึ่งใช้โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต เป็นแหล่งฟอสเฟต พบว่า การใช้ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต จะให้ปริมาณการผลิตของสารลดแรงตึงผิวสูงกว่าการใช้โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต สาเหตุมาจากภาวะของความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารโดยการเลี้ยงจุลินทรีย์ด้วยโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต จะให้ความเป็นกรด ด่างเป็น 5 ขณะที่ถ้าใช้ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตจะให้ภาวะความเป็นกรด ด่าง ที่ 8 นอกจากนี้ยังพบว่าที่ความเข้มข้นของฟอสเฟตสูงกว่า 40 มิลลิโมลต่อลิตรจะมีผลยับยั้งการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และหยุดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

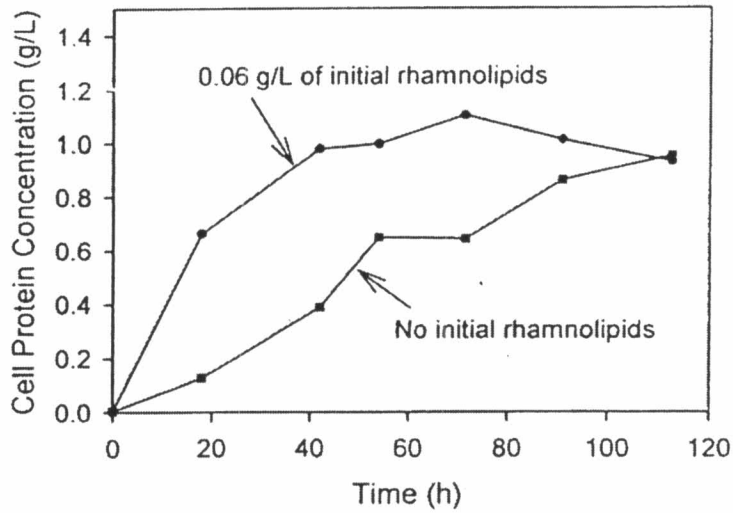
3.3.2 อิทธิพลจากภาวะที่ใช้เลี้ยงจุลินทรีย์

3.3.2.1 อิทธิพลของค่าความเป็นกรด ด่าง ซึ่งจุลินทรีย์ชนิดต่างๆมีความสามารถในการเจริญเติบโตในสภาวะความเป็นกรด ด่าง ได้แตกต่างกัน จากการศึกษาภาวะความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมของการเลี้ยง *P,aeruginosa* DMS2659 ที่ช่วงภาวะความเป็นกรด ด่าง 5.75 ถึง 7.5 พบว่าที่ค่าความเป็นกรดด่าง 6.25 จะให้การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงที่สุดเป็น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยที่การเลี้ยงที่ภาวะความเป็นกรดเป็นด่างดังกล่าวจะให้ความแตกต่างของเซลล์น้อย ซึ่งจะอยู่ในช่วง 1.0 ถึง 1.2 กรัมต่อลิตร (Guerra และคณะ,1986)

3.3.2.2 อิทธิพลของอุณหภูมิ การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดย Guerra และคณะ (1986) ได้ทำการเลี้ยง *P,aeruginosa* DMS2659 ที่ช่วงอุณหภูมิ 26 ถึง 40 องศาเซลเซียส พบว่า ให้ปริมาณเซลล์อยู่ที่ 2.8 ถึง 3.0 กรัมต่อลิตร ขณะที่อุณหภูมิช่วง 30 ถึง 32 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณแรมโนลิปิดสูงที่สุดคือ 480 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.3.3 การเติมสารลดแรงตึงผิวเริ่มต้น

การย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์ ซึ่งถูกจำกัดด้วยความสามารถในการในการละลายน้ำของสารอินทรีย์นั้น ซึ่งสารอินทรีย์ที่มีความสามารถในการละลายต่ำจะแพร่เข้าสู่เซลล์ได้ช้าและมีอัตราการย่อยสลายต่ำ ดังนั้นการเติมสารลดแรงตึงผิวเริ่มต้นจะช่วยทำให้สารอินทรีย์สามารถแพร่เข้าสู่เซลล์ได้รวดเร็วขึ้น ซึ่ง Chayabutra และคณะ (2000) ได้ทดลองเลี้ยงจุลินทรีย์ *P.aeruginosa* ATCC10145 โดยเปรียบเทียบระหว่างเติมและไม่เติมแรมโนลิปิดเริ่มต้น ดังรูปที่ 2.20 พบว่าเมื่อเติมแรมโนลิปิดเริ่มต้นทำให้เซลล์เจริญเติบโตได้ดีกว่า ไม่เติมแรมโนลิปิดเริ่มต้น



รูปที่ 3.5 การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ *P.aeruginosa* ATCC10145 (Chayabutra และคณะ 2000)

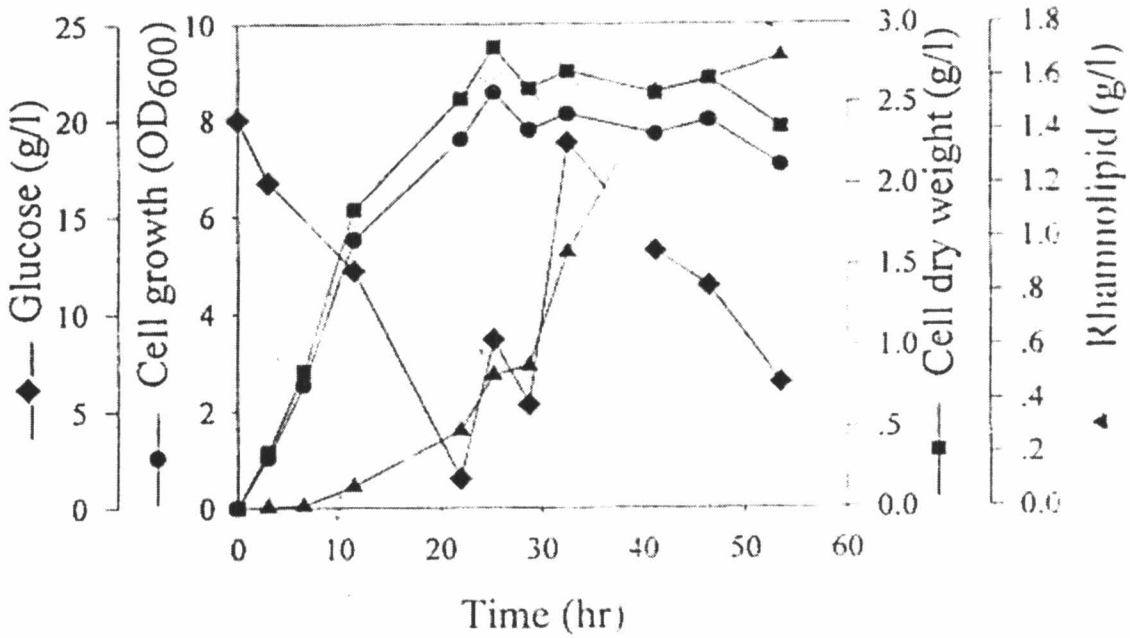
นอกจากนี้ จงระวี (2544) ได้ทำการทดลองเติมสารลดแรงตึงผิวเริ่มต้นต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยเปรียบเทียบสารลดแรงตึงผิวที่ใช้เติมหลายๆชนิดพบว่ากรณีเติมแรมโนลิปิดเริ่มต้นทำให้มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงที่สุด และเมื่อเติม สแปน 80 จะให้อัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะสูงที่สุด ดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 ความสามารถในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเมื่อเติมสารลดแรงตึงผิวเริ่มต้นต่างกัน (จงระวี,2544)

สารลดแรงตึงผิวที่ใช้	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ(ต่อชั่วโมง)	อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์จำเพาะ	$Y_{x/s}$
ไม่เติม	0.0506	0.1092	0.4634
แรมโนลิปิด	0.1973	0.1234	1.5989
สแปน 80	0.1672	0.1331	1.2562
เอโอที	0.1395	0.1269	1.0993

3.3.4 การใช้กระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง

การเพาะเลี้ยง *P.aeruginasa* A41 โดยวิธีการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องนี้ยังไม่มีทำการวิจัยมากนักแต่ก็มีงานวิจัยของ Lee และคณะ (1998) ได้ทำการเลี้ยง *P.aeruginosa* YPJ-80 โดยการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องใช้ กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ใช้ระบบควบคุมการป้อนสารอาหารเป็นแบบ pH-stat พบว่า ที่เวลา 25 ชั่วโมง จะให้ปริมาณเซลล์ 2.5 กรัมเซลล์ ต่อลิตร โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และปริมาณแรมโนลิปิด 1.7 กรัมต่อลิตร โดยวัดความเข้มข้นของน้ำตาลแรมโนส ซึ่งปริมาณแรมโนลิปิดที่ได้นี้มีค่าสูงกว่าการเพาะเลี้ยงโดยวิธีแบบไม่ต่อเนื่องมาก



รูปที่ 3.6 แสดงการเจริญเติบโตของเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณแรมโนลิปิดที่ผลิตได้ ความเข้มข้นของกลูโคส โดยวิธีการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องของ*Pseudomonas* YPJ-80 (Lee และคณะ (1998)

นอกจากนี้การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยจุลินทรีย์ยังมีการศึกษาในระบบการหมักแบบอื่นๆดังตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 กระบวนการหมักแบบต่างๆที่ใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ชนิดของจุลินทรีย์	ระบบการหมัก	แหล่งคาร์บอน	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	อ้างอิง
P.fluorescescens	การตรึงเซลล์	น้ำมันปิโตรเลียม	แรมโนลิปิด	Willson ,1996
B.subtilis FE-2	แพคคอลัมน์	ข้าวสาลี	-	Veenanadig,2000
P.aeruginasa DSM2659	ถังหมักแบบต่อเนื่อง	กลูโคส	แรมโนโลปิด	Guerra-Santos,1986

ซึ่งจากการค้นคว้าจากวารสารงานวิจัยต่างๆ ยังไม่พบว่ามีการรายงานถึงการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยอาศัยกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องอีกเลยดังนั้นงานวิจัยนี้จึงจัดได้ว่าเป็นงานวิจัยที่น่าสนใจและน่าจะเป็นประโยชน์สำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อไปในอนาคต