

การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดย *Pseudomonas* sp. A41 ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง



นายณรงค์ ลักษณะนาภิรมย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2543

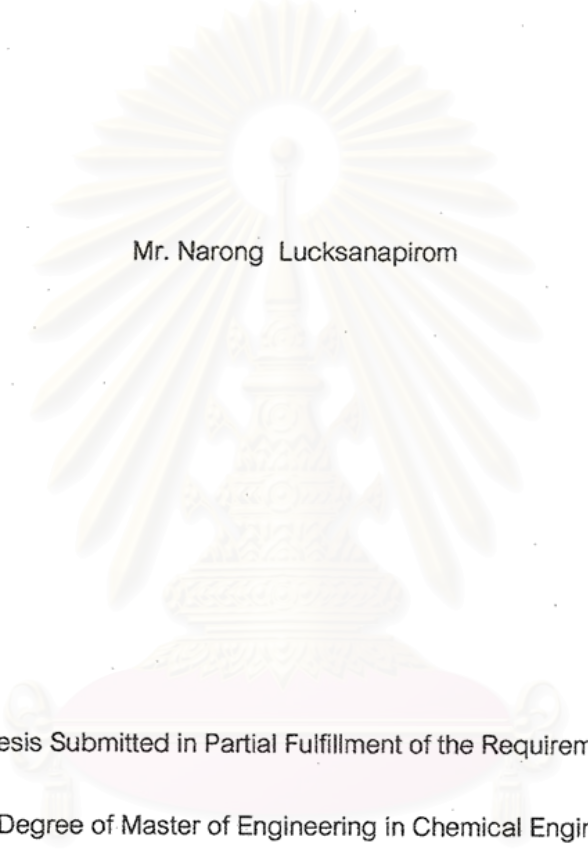
ISBN 974-13-0665-2

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

17 S.R. 2546

๕ 2011๖8๖๗

BIOSURFACTANT PRODUCTION BY *Pseudomonas* sp. A41 IN A BATCH FERMENTER



Mr. Narong Lucksanapirom

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Engineering in Chemical Engineering

Department of Chemical Engineering

Faculty of engineering

Chulalongkorn University

Academic year 2000

ISBN 974-13-0665-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์      การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดย *Pseudomonas* sp.A41  
   ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง  
โดย                              นายณรงค์ ลักษณะภิรมย์  
ภาควิชา                        วิศวกรรมเคมี  
อาจารย์ที่ปรึกษา            ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริรุ่ง ปรีชานนท์  
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม      ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธานีวัน

---

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้  
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ ปัญญาแก้ว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. อรุณี ปานเจริญ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริรุ่ง ปรีชานนท์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธานีวัน)

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

.....กรรมการ  
(อาจารย์ ดร. เหมือนเดือน พิศาลพงศ์)

ณรงค์ ลักษณะนามิรรมย์ : การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดย *Pseudomonas* sp.A41  
ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง(BIOSURFACTANT PRODUCTION BY *Pseudomonas* sp.  
A41 IN BATCH FERMENTER) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ. ดร. สิริรุ่ง ปริษานนท์  
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. ดร. สุเทพ ธนียวัน, 148 หน้า.ISBN 974-13-0665-2

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิว  
โดย *Pseudomonas* sp.A41 ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่องโดยใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งอาหารและ  
พลังงานของจุลินทรีย์ ตัวแปรที่สนใจศึกษาถึงอิทธิพลที่มีต่อกระบวนการเจริญเติบโตและการผลิต  
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพของจุลินทรีย์ ได้แก่ความเป็นกรด-ด่าง ความเร็วรอบในการปั่นกววนของใบ  
กววน และเปอร์เซ็นต์ของน้ำมันปาล์มที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ การทดลองใน  
งานวิจัยนี้จะแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนที่หนึ่ง การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับอัตราการ  
เจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ และอัตราผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะ โดยพบว่าภาวะที่  
เหมาะสมของอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ คือ ความเป็นกรด-ด่าง 6.4 ความเร็วรอบใน  
การปั่นกววน 627 รอบต่อนาที และให้ปริมาณน้ำมันปาล์ม 1.0 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และภาวะที่  
เหมาะสมต่ออัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะ คือที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.5  
ความเร็วรอบในการปั่นกววน 608 รอบต่อนาที และให้ปริมาณน้ำมันปาล์ม 1.5 เปอร์เซ็นต์โดย  
ปริมาตร และขั้นตอนที่สอง คือการทดสอบสมบัติของผลิตภัณฑ์ พบว่าสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้  
มีความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิที่จุดเดือดนาน 70 นาที และสามารถก่ออิมัลชันกับสาร  
ประกอบไฮโดรคาร์บอนหลายชนิด ได้แก่ เฮปแทน ไสโคลเฮกซีน เฮกเซน เคโรซีน และน้ำมัน  
พาราฟิน นอกจากนี้ยังพบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพดังกล่าวมีน้ำตาลแรมโนสเป็นองค์ประกอบ

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา วิศวกรรมเคมี  
สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี  
ปีการศึกษา 2544

ลายมือชื่อผู้ผลิต.....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

MAJOR CHEMICAL ENGINEERING DEPARTMENT

KEY WORD: Biosurfactant / *Pseudomonas* sp. / Palm Oil / Experimental Design

NARONG LUCKSANAPIROM: BIOSURFACTANT PRODUCTION BY

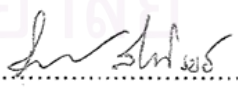
*Pseudomonas* sp.A41 IN A BATCH FERMENTER.

THESIS ADVISOR:SEEROONG PRICHANONT, Ph.D.,

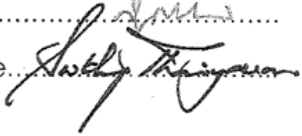
THESIS COADVISOR:SUTHEP THANİYAVARN, Ph.D., 148 pp.,

ISBN 974-13-0665-2

The ultimate aim of this research project was to determine suitable operating parameters for biosurfactant production by *Pseudomonas* sp.A41 using palm oil as a sole carbon and energy source in a batch fermenter. Effects of operating parameters which were pH, turbine speed, and amounts of palm oil on growth and biosurfactant production were thoroughly investigated. The experiments were, therefore, divided into two main parts which were; first, to determine suitable operating parameters. It was discovered that suitable conditions for cell growth were pH of 6.4, turbine speed of 627 rpm, and 1.0 volume percent palm oil, while conditions determined for biosurfactant production were pH of 7.5, turbine speed of 608 rpm, and 1.5 volume percent palm oil. Second, the biosurfactant obtained was further tested for its properties and it was revealed that the surfactant was heat stable at 100 °C for 70 minutes. In addition, it was found to be able to form emulsions with various types of hydrocarbons, namely; heptane, cyclohexene, hexane, kerosene, and paraffin oil. The biosurfactant produced, furthermore, was found to be constituted of rhamnose.

Department.....Chemical engineering..... Student's signature..... 

Field of study... Chemical engineering .... Advisor's signature..... 

Academic year.....2000..... Co-advisor's signature..... 

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลือจากหลายๆท่านผู้วิจัยขอ  
ขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิริรุ่ง ปรีชานนท์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธานีวัน และ  
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธานีวัน ที่ได้ให้คำปรึกษาแนะนำในการพัฒนางานวิจัย ตลอดจน  
ตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.อุรา ปานเจริญ อาจารย์ ดร.เหมือนเดือน พิศาลพงศ์  
และรองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ที่ได้กรุณารับเป็นประธานกรรมการ และกรรมการ  
การสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ในงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย และภาควิชาวิศวกรรมเคมี ที่ได้สนับสนุนให้ทุนอุดหนุน  
การวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ คุณอารีย์ กังฉิน ที่ให้การแนะนำและช่วยเหลือสิ่งต่าง ๆ ซึ่งเป็น  
ประโยชน์ต่องานวิจัยเป็นอย่างมาก

ขอขอบพระคุณ คุณสุนันท์ รังษีกาญจน์ส่อง ที่ได้ให้คำแนะนำช่วยเหลือในด้านการ  
วิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC

ท้ายสุดนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ที่ได้ให้การสนับสนุน  
และคอยให้กำลังใจ ให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาและคำแนะนำต่างๆที่เป็นประโยชน์ จนทำให้  
ผู้วิจัยทำงานชิ้นนี้ได้ลุล่วงไปด้วยดี

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ณ
สารบัญรูป.....	ญ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	3
1.3 ขอบเขตการศึกษา.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
2. ทฤษฎี.....	4
2.1 บทนำ.....	4
2.2 ลักษณะของสารลดแรงตึงผิว.....	4
2.3 การจำแนกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	9
2.4 ลักษณะการเกิดของผลิตภัณฑ์.....	15
2.5 กระบวนการขนย้ายอาหารเข้าเซลล์.....	20
3. ตรวจสอบเอกสาร.....	26
3.1 บทนำ.....	26
3.2 ชนิดของจุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้.....	26
3.3 ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ <i>Pseudomonas</i> .....	29
3.4 การทดสอบสารลดแรงตึงผิวในเชิงคุณภาพและปริมาณ.....	33

## สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
4. อุปกรณ์ เคมี และวิธีดำเนินการทดลอง.....	42
4.1 อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์.....	42
4.2 เชื้อจุลินทรีย์.....	44
4.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	44
4.4 วิธีการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์.....	44
4.5 ขั้นตอนการทดลอง.....	45
4.6 การติดตามการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในถังหมัก แบบไม่ต่อเนื่อง.....	48
4.7 การวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	49
5. ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง.....	52
5.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารลดแรงตึงผิว.....	52
5.2 รูปแบบการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	57
5.3 ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	62
5.4 การหาภาวะที่เหมาะสมของตัวแปรทั้งสาม.....	80
5.5 คุณสมบัติบางประการของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้...	82
5.6 ผลการวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	85
6. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	90
6.1 สรุปผลการทดลอง.....	90
6.2 ข้อเสนอแนะ.....	91
รายการอ้างอิง.....	92
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก.....	101
ภาคผนวก ข.....	103
ภาคผนวก ค.....	118
ภาคผนวก ง.....	122
ภาคผนวก จ.....	125
ภาคผนวก ฉ.....	130
ประวัติผู้แต่ง.....	148



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ.....	27
5.1 ผลของปริมาณสารลดการเกิดฟองต่อค่าแรงตึงผิว และการกระจายตัวของน้ำมัน.....	54
5.2 แสดงองค์ประกอบของน้ำมันปาล์ม.....	59
5.3 แสดงอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ <i>Pseudomonas</i> .....	80
5.4 ค่าตรวจหีนีการเกิดอิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ในสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ.....	83
ข1 แสดงค่าของตัวแปรในแต่ละการทดลองตั้งแต่การทดลองที่ 1 ถึง 17 .....	107
ข2 เปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์และอัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะ ได้จากสมการที่ (ข10) และ (ข11) และผลที่ได้จากการทดลอง.....	112
ข3 การวิเคราะห์ความแตกต่างของสมการ (ข10) โดยใช้ ANOVA.....	113
ข4 การวิเคราะห์ความแตกต่างของสมการ (ข11) โดยใช้ ANOVA.....	115
จ1 ผลการทดสอบค่าแรงตึงผิว การกระจายตัวบนผิวน้ำมันและความเข้มข้นของเซลล์จากการทดลองตัวอย่าง.....	126
ฉ1 การเพาะเลี้ยง <i>Pseudomonas</i> sp.A41 ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง น้ำมันปาล์ม 50 มิลลิลิตร ความเร็วรอบใบกวน 580 รอบต่อนาที ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.0 ในเวลา 30 ชั่วโมง.....	131
ฉ2 การเพาะเลี้ยง <i>Pseudomonas</i> sp.A41 ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง น้ำมันปาล์ม 50 มิลลิลิตร ความเร็วรอบใบกวน 580 รอบต่อนาที ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.0 ในเวลา 30 ชั่วโมง.....	132
ฉ3 การเพาะเลี้ยง <i>Pseudomonas</i> sp.A41 ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง น้ำมันปาล์ม 50 มิลลิลิตร ความเร็วรอบใบกวน 820 รอบต่อนาที ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.0 ในเวลา 30 ชั่วโมง.....	133
ฉ4 การเพาะเลี้ยง <i>Pseudomonas</i> sp.A41 ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง น้ำมันปาล์ม 50 มิลลิลิตร ความเร็วรอบใบกวน 820 รอบต่อนาที ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.0 ในเวลา 30 ชั่วโมง.....	134

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ฉ5 การเพาะเลี้ยง <i>Pseudomonas</i> sp.A41 ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง น้ำมัน ปาล์ม 150 มิลลิลิตร ความเร็วรอบใบกวน 580 รอบต่อนาที ที่ค่าความเป็น กรด-ด่าง 6.0 ในเวลา 30 ชั่วโมง.....	135
ฉ6 การเพาะเลี้ยง <i>Pseudomonas</i> sp.A41 ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง น้ำมัน ปาล์ม 150 มิลลิลิตร ความเร็วรอบใบกวน 580 รอบต่อนาที ที่ค่าความเป็น กรด-ด่าง 8.0 ในเวลา 30 ชั่วโมง.....	136
ฉ7 การเพาะเลี้ยง <i>Pseudomonas</i> sp.A41 ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง น้ำมัน ปาล์ม 150 มิลลิลิตร ความเร็วรอบใบกวน 820 รอบต่อนาที ที่ค่าความเป็น กรด-ด่าง 6.0 ในเวลา 30 ชั่วโมง.....	137
ฉ8 การเพาะเลี้ยง <i>Pseudomonas</i> sp.A41 ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง น้ำมัน ปาล์ม 150 มิลลิลิตร ความเร็วรอบใบกวน 820 รอบต่อนาที ที่ค่าความเป็น กรด-ด่าง 8.0 ในเวลา 30 ชั่วโมง.....	138
ฉ9 การเพาะเลี้ยง <i>Pseudomonas</i> sp.A41 ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง น้ำมัน ปาล์ม 100 มิลลิลิตร ความเร็วรอบใบกวน 700 รอบต่อนาที ที่ค่าความเป็น กรด-ด่าง 5.32 ในเวลา 30 ชั่วโมง.....	139
ฉ10 การเพาะเลี้ยง <i>Pseudomonas</i> sp.A41 ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง น้ำมัน ปาล์ม 100 มิลลิลิตร ความเร็วรอบใบกวน 700 รอบต่อนาที ที่ค่าความเป็น กรด-ด่าง 8.64 ในเวลา 30 ชั่วโมง.....	140
ฉ11 การเพาะเลี้ยง <i>Pseudomonas</i> sp.A41 ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง น้ำมัน ปาล์ม 100 มิลลิลิตร ความเร็วรอบใบกวน 500 รอบต่อนาที ที่ค่าความเป็น กรด-ด่าง 7.0 ในเวลา 30 ชั่วโมง.....	141
ฉ12 การเพาะเลี้ยง <i>Pseudomonas</i> sp.A41 ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง น้ำมัน ปาล์ม 100 มิลลิลิตร ความเร็วรอบใบกวน 900 รอบต่อนาที ที่ค่าความเป็น กรด-ด่าง 7.0 ในเวลา 30 ชั่วโมง.....	142
ฉ13 การเพาะเลี้ยง <i>Pseudomonas</i> sp.A41 ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง น้ำมัน ปาล์ม 16 มิลลิลิตร ความเร็วรอบใบกวน 700 รอบต่อนาที ที่ค่าความเป็น กรด-ด่าง 7.0 ในเวลา 30 ชั่วโมง.....	143

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ฉ14 การเพาะเลี้ยง <i>Pseudomonas</i> sp.A41 ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง น้ำมัน ปาล์ม 184 มิลลิลิตร ความเร็วรอบใบกวน 700 รอบต่อนาที ที่ค่าความเป็น กรด-ด่าง 7.0 ในเวลา 30 ชั่วโมง.....	144
ฉ15 การเพาะเลี้ยง <i>Pseudomonas</i> sp.A41 ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง น้ำมัน ปาล์ม 100 มิลลิลิตร ความเร็วรอบใบกวน 700 รอบต่อนาที ที่ค่าความเป็น กรด-ด่าง 7.0 ในเวลา 30 ชั่วโมง.....	145
ฉ16 การเพาะเลี้ยง <i>Pseudomonas</i> sp.A41 ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง น้ำมัน ปาล์ม 100 มิลลิลิตร ความเร็วรอบใบกวน 700 รอบต่อนาที ที่ค่าความเป็น กรด-ด่าง 7.0 ในเวลา 30 ชั่วโมง.....	146
ฉ17 การเพาะเลี้ยง <i>Pseudomonas</i> sp.A41 ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง น้ำมัน ปาล์ม 100 มิลลิลิตร ความเร็วรอบใบกวน 700 รอบต่อนาที ที่ค่าความเป็น กรด-ด่าง 7.0 ในเวลา 30 ชั่วโมง.....	147

## สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิว.....	5
2.2	การกระจายตัวของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวบนผิวน้ำ.....	5
2.3	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสารลดแรงตึงผิวกับค่าแรงตึงผิวเพื่อแสดงการหาค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์.....	6
2.4	การรวมตัวของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	8
2.5	โครงสร้างของทรีฮาโลสลิปิด.....	10
2.6	โครงสร้างของไซโฟโวลีปิด.....	10
2.7	โครงสร้างของแรมโนลิปิด ทั้ง 4 ชนิด ซึ่งสังเคราะห์โดย <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	11
2.8	โครงสร้างของฟอสโฟลิปิด.....	12
2.9	โครงสร้างของเปปไทด์และกรดอะมิโน ที่ประกอบด้วยไขมัน.....	13
2.10	โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพประเภทโพลีเมอร์ของอีมีลแซน.....	14
2.11	การเกิดของผลิตภัณฑ์ในรูปแบบต่าง ๆ .....	19
2.12	แสดงการขนถ่ายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเข้าสู่เซลล์.....	22
2.13	กลไกการนำสารประกอบอัลเคนผ่านกรดไขมันไปใช้ภายในเซลล์.....	23
2.14	กระบวนการผลิตแรมโนลิปิดของ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	24
2.15	กลไกการสังเคราะห์กรดไขมันจากน้ำตาลกลูโคสภายในเซลล์.....	25
3.1	อิทธิพลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากสูตรอาหารของฟอตเฟต 3 ชนิด โดยการวัดค่าแรงตึงผิวของ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	32
3.2	สเปกตรัมที่ได้หลังจากผ่านเครื่องวิเคราะห์โครงสร้างของกรดไขมันที่ได้จากการสกัดแยกจากน้ำมัน.....	37
3.3	คอลัมน์โครมาโตแกรมของแรมโนลิปิด.....	38
3.4	การแยกของแรมโนลิปิดชนิดต่าง ๆ เมื่อผ่านด้วยไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิกวิด โครมาโตกราฟี.....	39
3.5	แก๊สโครมาโตกราฟีของไตรเมทิลไซริวเอสเทอร์.....	41
4.1	ถังหมักแบบไม่ต่อเนื่องขนาด 10 ลิตร.....	47
5.1	กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเซลล์และการผลิตของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ในรูปของค่าแรงตึงผิว และค่าการกระจายบนผิวน้ำมัน ในเวลา 30 ชั่วโมง.....	61

## สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
5.2	แสดงการรวมตัวของแรมโนลิปิดที่ภาวะความเป็นกรด – ต่างต่าง ๆ .....	64
5.3	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรด-ต่างและความเร็วรอบ ไบกวนต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์.....	70
5.4	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรด-ต่างและความเร็วรอบ ไบกวนต่ออัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะ.....	71
5.5	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรด – ต่างและเปอร์เซ็นต์น้ำมัน ปาล์มต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์.....	74
5.6	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรด – ต่างและเปอร์เซ็นต์น้ำมันปาล์ม ต่ออัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะ.....	75
5.7	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วรอบไบกวนและเปอร์เซ็นต์น้ำมันปาล์ม ต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์.....	78
5.8	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วรอบไบกวนและเปอร์เซ็นต์น้ำมันปาล์ม ต่ออัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะ.....	79
5.9	ความเสถียรของน้ำหมักที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส.....	84
5.10	สารละลายน้ำตาลแรมโนสมมาตรฐาน.....	87
5.11	สารละลายน้ำตาลแรมโนสมมาตรฐาน (ผ่านการต้มในภาวะที่เป็นกรด) .....	87
5.12	สารละลายตัวอย่างที่ทำการสกัดบริสุทธิ์บางส่วน.....	88
5.13	ผสมสารละลายน้ำตาลแรมโนสมมาตรฐานในสารละลายตัวอย่าง 25%.....	88
5.14	ผสมสารละลายน้ำตาลแรมโนสมมาตรฐานในสารละลายตัวอย่าง 50%.....	89
5.15	ผสมสารละลายน้ำตาลแรมโนสมมาตรฐานในสารละลายตัวอย่าง 75%.....	89
ข1	แสดงการออกแบบการทดลอง 17 การทดลองของสามตัวแปร.....	105
ค1	เครื่องวัดแรงตึงผิว.....	121
ง1	การหาค่าความเข้มข้นวิกฤตจากการทดลองชุดที่ 1.....	123
ง2	การหาค่าความเข้มข้นวิกฤตจากการทดลองชุดที่ 2.....	123
ง3	การหาค่าความเข้มข้นวิกฤตจากการทดลองชุดที่ 3.....	124
จ1	ความสัมพันธ์ระหว่าง เวลา และ $\ln(x)$ .....	129
จ2	ความสัมพันธ์ระหว่าง C และ $-\Delta s$ .....	129





สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
๑15 การเจริญเติบโตและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ <i>Pseudomonas</i> sp.A41 ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง.....	145
๑16 การเจริญเติบโตและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ <i>Pseudomonas</i> sp.A41 ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง.....	146
๑17 การเจริญเติบโตและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ <i>Pseudomonas</i> sp.A41 ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง.....	147



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความสำคัญของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิว (surface active agent) เป็นสารเคมีที่มีคุณลักษณะพิเศษเนื่องจากภายในโมเลกุลประกอบด้วยทั้งส่วนที่มีขั้ว (hydrophilic moiety) และส่วนที่ไม่มีขั้ว (hydrophobic moiety) ทำให้สามารถกระจายตัวอยู่ระหว่างสองวัฏภาค (phases) ที่มีคุณสมบัติของความเป็นขั้วที่แตกต่างกัน เช่น ระหว่างวัฏภาคของน้ำและน้ำมัน

สารลดแรงตึงผิวจึงสามารถถูกนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง เช่น ใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์ (emulsifier) ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง, สารทำให้เปียก (wetting agent) ในอุตสาหกรรมยา หรืออุตสาหกรรมสิ่งทอ (textile), สารทำให้เกิดโฟม (foaming agent) ในอุตสาหกรรมสินแร่ (ore floatation), สารช่วยในการทำละลาย และเกิดไมโครอิมัลชัน (solubilizers and microemulsion) ในอุตสาหกรรมทำความสะอาด (toiletries), เป็นสารช่วยลดความหนืด (viscosity reducing agent) ในกระบวนการขนส่งผ่านท่อ (pipeline transportation), สารดีเทอร์เจนต์ (detergents) ที่มีการนำไปใช้งานในครัวเรือนหรือผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร, ดีมัลซิไฟเออร์ (demulsifier) ในงานด้านการบำบัดน้ำเสีย (water treatment), สารที่ทำให้เกิดการกระจายตัว (dispersants) ของน้ำมันและถ่านหิน (coal-oil mixture), และเป็นตัวเพิ่มความหนาแน่นหรือความเข้มข้น (thickening agents) ในอุตสาหกรรมสี (Banat และคณะ, 2000)

สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพเป็นสารลดแรงตึงผิวที่ถูกผลิตขึ้นโดยจุลินทรีย์จากสารตั้งต้นที่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ (renewable resources substrates) และพบว่ามีข้อได้เปรียบเหนือสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมี (chemical surfactants) หลายประการ เช่น เป็นสารที่มีความเป็น

พืชต่ำ จึงเหมาะที่จะนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ยา และเครื่องสำอาง เพราะสามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ (biodegradability) และไม่ก่อมลภาวะ นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตจากสารตั้งต้นต่างชนิดกันยังมีความแตกต่างกันทางโครงสร้างของโมเลกุล ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพมีความหลากหลาย และสามารถถูกนำไปประยุกต์ใช้งานที่แตกต่างกันได้อย่างกว้างขวาง และรูปแบบพิเศษที่แตกต่างไปจากสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมี (Georgiou และคณะ, 1992)

ในทางอุตสาหกรรมมีความต้องการใช้สารลดแรงตึงผิวเพิ่มมากขึ้น ในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา โดยมีความต้องการสารลดแรงตึงผิวเพิ่มขึ้น 300 เปอร์เซ็นต์ในอุตสาหกรรมเคมี (Greek , 1990) โดยทั่วไปประมาณ 54 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้จะถูกนำมาใช้ในครัวเรือน และงานซักรีด มีเพียง 32 เปอร์เซ็นต์ที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรม สารลดแรงตึงผิวส่วนใหญ่เป็นสารที่สังเคราะห์ได้จากปิโตรเลียม (petroleum-derived) ด้วยกระบวนการทางเคมี จากการศึกษาในปัจจุบันได้มีความสนใจในการรักษาภาวะแวดล้อมมากขึ้น กระบวนการพัฒนาสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจึงเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่อย่างไรก็ตามการขยายกำลังการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพถึงขั้นอุตสาหกรรมยังไม่ประสบความสำเร็จมากนัก ทั้งนี้เนื่องจากความสามารถในการแข่งขันเชิงเศรษฐศาสตร์ยังด้อยกว่าผลิตภัณฑ์จากการสังเคราะห์ทางเคมี ดังนั้นการพัฒนากระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพเพื่อพัฒนาไปสู่ระดับอุตสาหกรรมจำเป็นต้องพิจารณาปรับปรุงปัจจัยสำคัญที่เกี่ยวข้องของหลายๆประการได้แก่ การเลือกใช้สารตั้งต้นราคาถูก, การเพิ่มผลผลิต (yield) และอัตราการผลิต, การพัฒนากระบวนการหมัก, การลดค่าใช้จ่ายในการสกัดแยกผลิตภัณฑ์จากน้ำหมัก และการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่เหมาะสม และมีประสิทธิภาพ

## 1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดย *Pseudomonas* sp.A41 ภายในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง (batch reactor)

## 1.3 ขอบเขตการศึกษา

- 1.3.1 หาปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม โดยใช้น้ำมันปาล์ม
- 1.3.2 หาภาวะความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ
- 1.3.3 ศึกษาภาวะการกวนภายในถังหมักที่เหมาะสม
- 1.3.4 ศึกษาชนิดและคุณสมบัติบางประการของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากการเลี้ยง *Pseudomonas* sp.A41

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 14.1 เป็นการเพิ่มคุณค่าของพืชเศรษฐกิจ (น้ำมันปาล์ม) ที่มีราคาต่ำไปเป็นผลผลิต โดยอาศัยจุลินทรีย์ในการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพ (biotransformation) ไปเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีคุณค่าสูงขึ้น
- 14.2 เป็นทางเลือกหนึ่งในการลดปัญหาสิ่งแวดล้อมโดยใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ย่อยสลายได้
- 14.3 เป็นประโยชน์ในการพัฒนาระบบการหมักแบบต่อเนื่องต่อไป

## บทที่ 2

### ทฤษฎี

#### 2.1 บทนำ

รายละเอียดในบทนี้ ประกอบด้วย 5 ส่วน ได้แก่ ส่วนแรกเป็นลักษณะของสารลดแรงตึงผิวอธิบายถึงลักษณะโดยทั่วไปของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวซึ่งภาพรวมไปถึงการรวมตัวของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวในสารละลาย ส่วนที่สองกล่าวถึงชนิดและลักษณะโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวซึ่งภาพแต่ละชนิด ส่วนที่สามเป็นลักษณะการเกิดของผลิตภัณฑ์ในรูปแบบต่าง และส่วนสุดท้ายจะกล่าวถึงกลไกการนำอาหารเข้าไปใช้ภายในเซลล์

#### 2.2 ลักษณะของสารลดแรงตึงผิว

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactant) ผลิตได้โดยจุลินทรีย์บางชนิดในกลุ่มของแบคทีเรีย ยีสต์ หรือ รา สมบัติที่สำคัญของสารลดแรงตึงผิว คือ ช่วยในการลดแรงตึงผิวระหว่างวัฏภาค (phase) สองวัฏภาค โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวจะสะสมตัวอยู่ระหว่างผิวสัมผัสสองวัฏภาค เช่น ผิวสัมผัสระหว่างของเหลวด้วยกัน ผิวสัมผัสระหว่างของเหลวกับแก๊ส หรือผิวสัมผัสระหว่างของแข็งกับของเหลว

โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่มีขั้วสามารถละลายน้ำได้ โดยทั่วไปจะเป็นส่วนหัวของโมเลกุล (hydrophilic head group) อีกส่วนเป็นส่วนที่ไม่มีขั้ว โดยทั่วไปจะเป็นส่วนหางของโมเลกุล (hydrophobic tail) ส่วนหางของโมเลกุลส่วนมากจะเป็นสายยาวหรือสายกิ่งของหมู่แอลคิล (alkyl group) หรือสายยาวของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon chain) แสดงโครงสร้างดังรูปที่ 2.1 จะเห็นว่าโครงสร้างของโมเลกุลประเภทนี้ มีทั้งส่วนที่มีขั้วและไม่มีขั้วในโมเลกุลเดียวกัน จากคุณสมบัตินี้เองทำให้โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิว

สามารถจัดเรียงตัวกันได้ระหว่างภูมิภาคที่มีความเป็นขั้วต่างกัน เช่น การกระจายตัวของ โมเลกุลสารลดแรงตึงผิว ในระหว่างผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับอากาศ โมเลกุลสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะหันส่วนที่มีขั้วหรือมีประจุเข้าหาโมเลกุลของน้ำ ในขณะที่ส่วนที่ไม่มีขั้วจะหันปลายไปทางผิวของอากาศ การกระจายตัวของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอบนผิวของน้ำแสดงดังรูปที่ 2.2



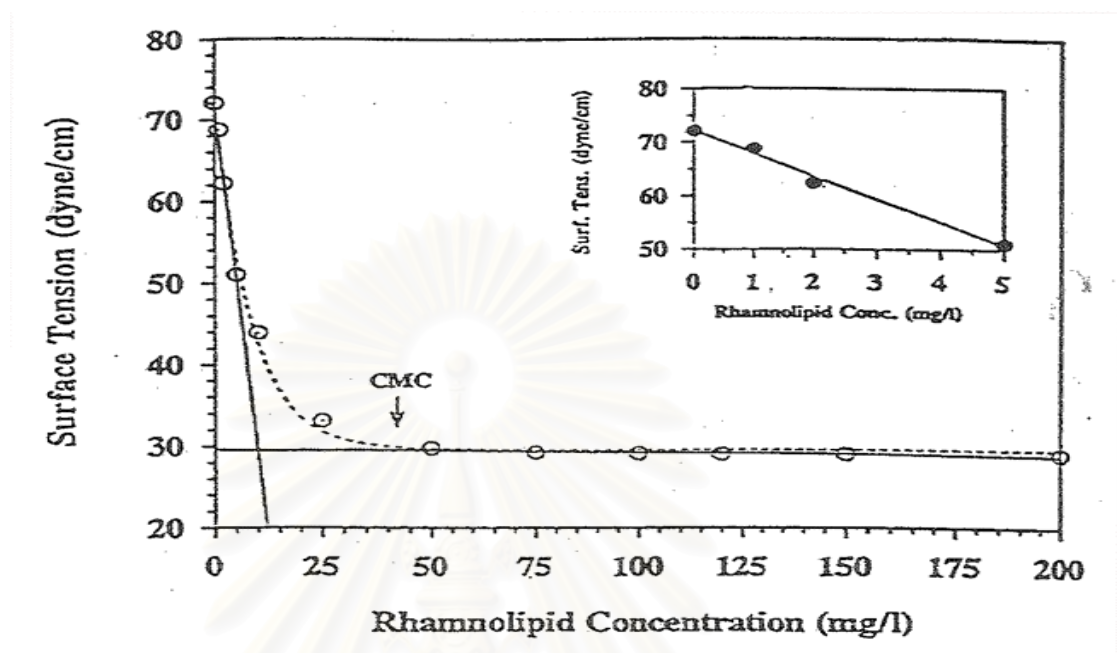
รูปที่ 2.1 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิว

รูปที่ 2.2 การกระจายตัวของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวบนผิวน้ำ

เมื่อมีการเติมสารลดแรงตึงผิวลงในน้ำ สารลดแรงตึงผิวจะมีบทบาทในการลดแรงตึงผิวของน้ำกับอากาศได้โดยดูจากค่าแรงตึงผิวที่ลดลง เมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวเพิ่มขึ้นค่าของแรงตึงผิวจะลดลงเรื่อย ๆ จนถึงระดับหนึ่งและมีค่าคงที่ (รูปที่ 2.3) การลดลงของแรงตึงระหว่างผิวน้ำเกิดเนื่องจากการสะสมตัวของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวที่เพิ่มมากขึ้นที่บริเวณผิวสัมผัสระหว่างภูมิภาค จนในที่สุดบริเวณนี้อิ่มตัวไปด้วยโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวทำให้ถึงแม้จะมีการเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวเข้าไปในระบบมากกว่านี้ก็ยังจะทำให้แรงตึงระหว่างผิวน้ำมีค่าคงที่ที่ค่าหนึ่ง ส่วนโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวส่วนเกินที่ไม่สามารถแทรกตัวที่ผิวสัมผัสระหว่างภูมิภาคได้ก็จะรวมตัวกันเป็นไมเซลล์ ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวที่น้อยที่สุดที่ทำให้เกิดการรวมตัวของไมเซลล์นี้เรียกว่า ความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์ (Critical Micelles Concentration, CMC) ขั้นตอนการหาค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์ทำได้ โดยการเตรียมสารลดแรงตึงผิวที่



ความเข้มข้นต่าง ๆ และทำการวัดค่าแรงตึงผิวที่ลดลง เขียนกราฟความสัมพันธ์จุดเริ่มต้นของการเปลี่ยนแปลงค่าแรงตึงผิวเป็นค่าของความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์ แสดงดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสารลดแรงตึงผิวกับค่าแรงตึงผิวเพื่อแสดงการหาค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์ (Zhang และ Miller, 1992)

การรวมตัวของโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวสามารถทำได้ในหลายลักษณะ ได้แก่ ไมเซลล์ทรงกลม (spherical micelles), ไมเซลล์ทรงกระบอก (cylindrical micelles), ผืนสองชั้นลักษณะแบนราบ (flat bilayers), ผืนสองชั้นแนวโค้ง (flexible bilayers) และไมเซลล์กลับด้าน (inverted micelles) แสดงดังรูป 2.4 นอกจากนี้ยังแสดงปรากฏการณ์เกิดโครงสร้างต่าง ๆ ดังกล่าวซึ่งจะขึ้นอยู่กับโครงสร้างโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิว ตัวอย่างเช่น โมเลกุลสารลดแรงตึงผิวชีวภาพหางเดี่ยว (คือโมเลกุลที่ประกอบไปด้วยสายไฮโดรคาร์บอนสายเดี่ยวที่มาจากกรดไขมัน) โครงสร้างโมเลกุลประเภทนี้มีลักษณะเป็นกรวย โดยส่วนของปากกรวยเป็นส่วนของโมเลกุลที่มีขั้วและส่วนปลายแหลมของกรวยคือส่วนปลายไฮโดรคาร์บอนที่ไม่มีขั้ว โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเหล่านี้ในน้ำจะเรียงตัวเป็นไมเซลล์ สำหรับโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสายคู่ (คือโมเลกุลมี

ส่วนของสายไฮโดรคาร์บอน 2 สายที่มาจากกรดไขมัน) ซึ่งได้แก่ ฟอสโฟลิปิดต่างๆ โมเลกุลของสารเหล่านี้จะสามารถเรียงตัวในสารละลายน้ำเกิดเป็นผนังสองชั้นได้

การเกิดการรวมตัวกันของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวซึ่งภาพเป็นโครงสร้างต่าง ๆ จะขึ้นอยู่กับความสมดุลของส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ของโมเลกุลของสารและแรงดูดหรือแรงผลักของส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำของโมเลกุลด้วย

มิติ (dimension) ของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวซึ่งภาพต่าง ๆ เหล่านี้จะเป็นตัวกำหนดว่าโครงสร้างการรวมตัวกันของโมเลกุลในสารละลายน้ำจะเป็นรูปแบบใด โดยมิติของโมเลกุลจะสามารถอธิบายได้ด้วยค่าที่เรียกว่า พารามิเตอร์ของการรวมตัววิกฤต (critical packing parameter, CPP) ซึ่งค่าของ CPP หาได้จากสูตรต่อไปนี้

$$CPP = \frac{v}{a_0 l_c}$$

เมื่อ  $v$  คือ ปริมาตรของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวซึ่งภาพ (hydrocarbon chain volume)

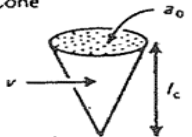


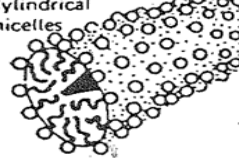

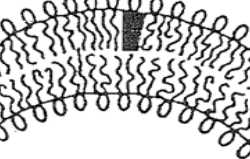



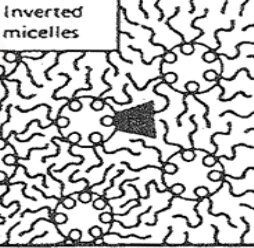
$a_0$  คือ พื้นที่หน้าตัดของส่วนที่มีหัวของโมเลกุล (head group area)

$l_c$  คือ ความยาวของสายไฮโดรคาร์บอนในโมเลกุล (hydrocarbon chain length)

ค่าของ CPP ที่คำนวณได้สามารถนำมาประเมินดังนี้

- ค่า CPP น้อยกว่า 0.33 จะได้ไมเซลล์ทรงกลม
- ค่า CPP อยู่ระหว่าง 0.33 และ 0.5 จะได้ไมเซลล์ทรงกระบอก
- ค่า CPP อยู่ระหว่าง 0.5 และ 1.0 จะได้ไมเซลล์ผนังสองชั้นแนวโค้ง
- ค่า CPP ประมาณ 1.0 จะได้ผนังสองชั้นแนวระนาบ
- ค่า CPP มีค่ามากกว่า 1.0 จะได้ไมเซลล์กลับด้าน

## SURFACTANT AGGREGATION

Lipid	Critical packing parameter $v/a_0l_c$	Critical packing shape	Structures formed
Single-chained lipids (surfactants) with large head-group areas: <i>SDS in low salt</i>	$< 1/3$	Cone 	Spherical micelles 
Single-chained lipids with small head-group areas: <i>SDS and CTAB in high salt nonionic lipids</i>	$1/3-1/2$	Truncated cone 	Cylindrical micelles 
Double-chained lipids with large head-group areas, fluid chains: <i>Phosphatidyl choline (lecithin), phosphatidyl serine, phosphatidyl glycerol, phosphatidyl inositol, phosphatidic acid, sphingomyelin, DGDG*, dihexadecyl phosphate, dialkyl dimethyl ammonium salts</i>	$1/2-1$	Truncated cone 	Flexible bilayers, vesicles 
Double-chained lipids with small head-group areas, anionic lipids in high salt, saturated frozen chains: <i>phosphatidyl ethanolamine, phosphatidyl serine + Ca<sup>2+</sup></i>	$\sim 1$	Cylinder 	Planar bilayers 
Double-chained lipids with small head-group areas, nonionic lipids, poly ( <i>cis</i> ) unsaturated chains, high <i>T</i> : <i>unsat. phosphatidyl ethanolamine, cardiolipin + Ca<sup>2+</sup>, phosphatidic acid + Ca<sup>2+</sup>, cholesterol, MGDG<sup>b</sup></i>	$> 1$	Inverted truncated cone or wedge 	Inverted micelles 

\* DGDG, digalactosyl diglyceride, diglucosyl diglyceride; <sup>b</sup> MGDG, monogalactosyl diglyceride, monoglucosyl diglyceride.

รูปที่ 2.4 การรวมตัวของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวซีวภาพ (Clint, 1992)

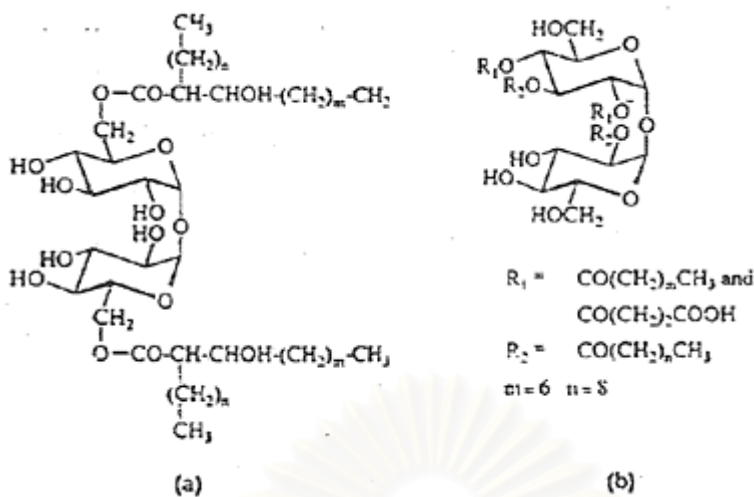
## 2.3 การจำแนกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

การจำแนกประเภทของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ทำโดยอาศัยองค์ประกอบของโครงสร้างภายในที่แตกต่างกัน กล่าวคือ ส่วนของโมเลกุลไม่มีขั้วเป็นสายยาวของกลุ่มไฮโดรคาร์บอน เช่น กรดไขมัน (fatty acid) และองค์ประกอบส่วนของโมเลกุลมีขั้ว เช่น กลุ่มเอสเทอร์ (ester) กลุ่มแอลกอฮอล์ (alcohol group) กลุ่มคาร์บอกซิเลท (carboxylate group) กลุ่มฟอสเฟต (phosphate containing group) กลุ่มคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) ดังนั้นสามารถจำแนกประเภทของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพออกเป็น 5 ประเภท ดังนี้

### 2.3.1 ไกลโคลิปิด (Glycolipid)

เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีส่วนประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตซึ่งเป็นส่วนของโมเลกุลที่มีขั้วที่เชื่อมต่อกับสายโซ่ยาวของกรดอะลิฟาติก (long chain aliphatic acid) หรือกลุ่มไฮดรอกซี อะลิฟาติก แอซิด (hydroxy aliphatic acids) ตัวอย่างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่พบบ่อยในกลุ่มนี้ได้แก่ ทรีฮาโลสลิปิด (trehalose lipid) แรมโนลิปิด (rhamnolipid) และโซโฟโรลิปิด (sophorolipid)

2.3.1.1 ทรีฮาโลสลิปิด มีโครงสร้างหลายรูปแบบแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียที่ผลิต เช่น การเลี้ยง *Mycobacterium*, *Nocardia* และ *Corynebacterium* จะให้กรดไมโคลิค ซึ่งเป็นกรดไขมันบีตา-ไฮดรอกซีสายยาว (long-chain  $\alpha$ -branched  $\beta$ -hydroxy fatty acid) ที่มีไดแซ็กคาไรด์ทรีฮาโลส (disaccharide trehalose) เชื่อมในตำแหน่งที่ C6 และ C6' หรือการเลี้ยง *Rhodococcus* และ *Arthrobacter paraffineus* จะให้ทรีฮาโลสไดเอสเทอร์ (trehalose diester) มีโครงสร้างดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 โครงสร้างของทรีฮาโลสลิปิด (Kosaric, 1993)

a ทรีฮาโลสลิปิด 6,6' ไดโครีโนมายโคเลท

(Trehalose 6,6' dicorynomycolate) (m+n=27-31)

b ทรีฮาโลส เททราเอสเทอร์ (Trehalose tetraester)

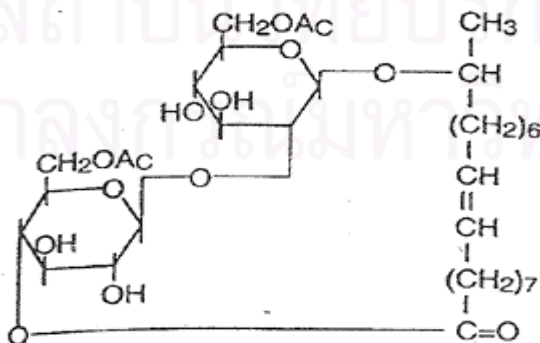
2.3.1.2 โซไฟโรลิปิด ได้จากการเลี้ยงยีสต์สกุล (genus) *Torulopsis* ต่าง ๆ เช่น

*Torulopsis bombicola*, *Torulopsis petrophilum* หรือ *Torulopsis apicola* จะให้ผลิตภัณฑ์เป็น

โซไฟลิปิดออกมาภายนอกเซลล์ มีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 2.6 โครงสร้างที่ประกอบด้วยส่วนของ

ไดเมอร์ิก คาร์โบไฮเดรต โซไฟโรส (dimeric carbohydrate sophorose) เชื่อมต่ออยู่กับสาย

โมเลกุลของกรดไฮดรอกซีคาบอกซิลิก (hydroxy- carboxylic acid)



รูปที่ 2.6 โครงสร้างของโซไฟโรลิปิด (Davila และคณะ, 1992)

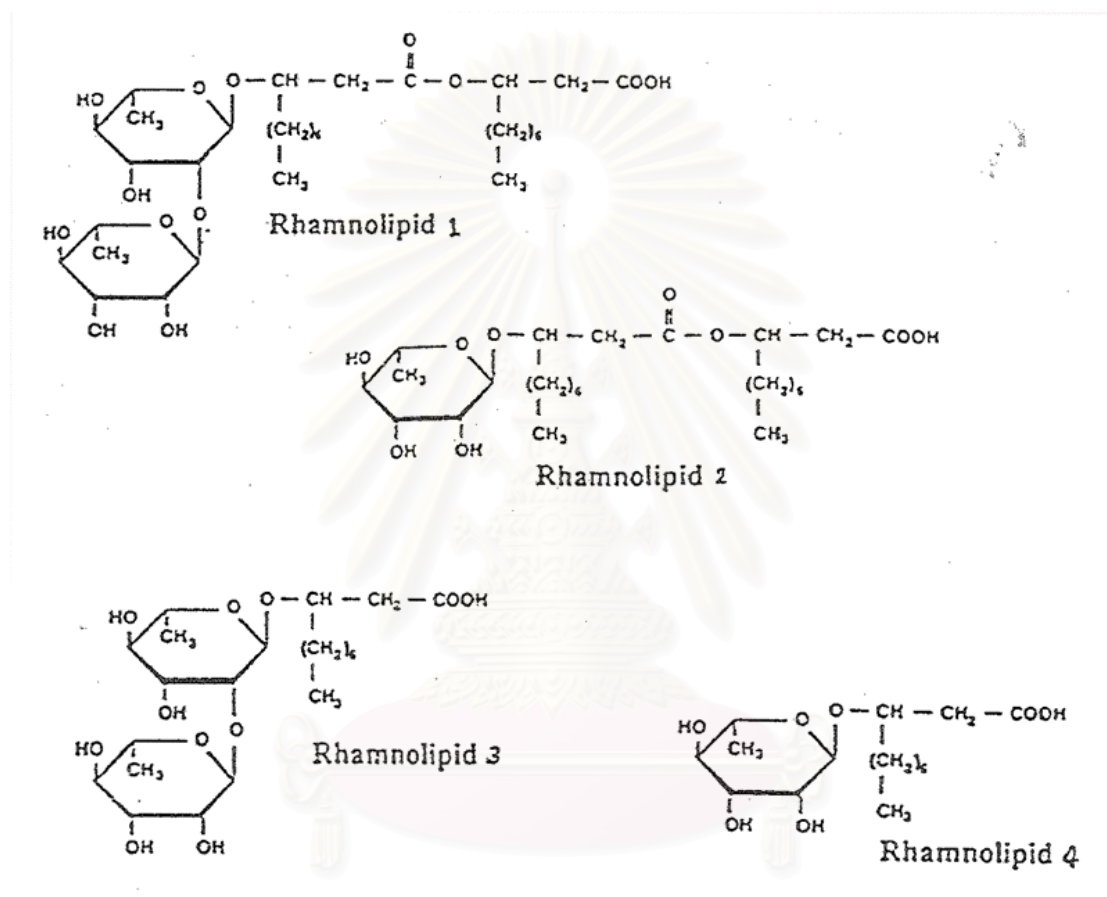


### 2.3.1.3 แรมโนลิปิด สารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มนี้ผลิตได้จากการเลี้ยงแบคทีเรียสกุล

*Pseudomonas* ลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้มีโครงสร้างที่แตกต่างกัน แบ่งออกได้เป็น 4 แบบ

ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลแรมโนส (rhamnose) 1 หรือ 2 โมเลกุล เชื่อมต่อกับ 1 หรือ 2 โมเลกุลของ

ปีตา ไฮดรอกซีซิลเดคะนอิก แอซิด ( $\beta$ -hydroxy decanoic acid)



รูปที่ 2.7 โครงสร้างของแรมโนลิปิด ทั้ง 4 ชนิด ซึ่งสังเคราะห์

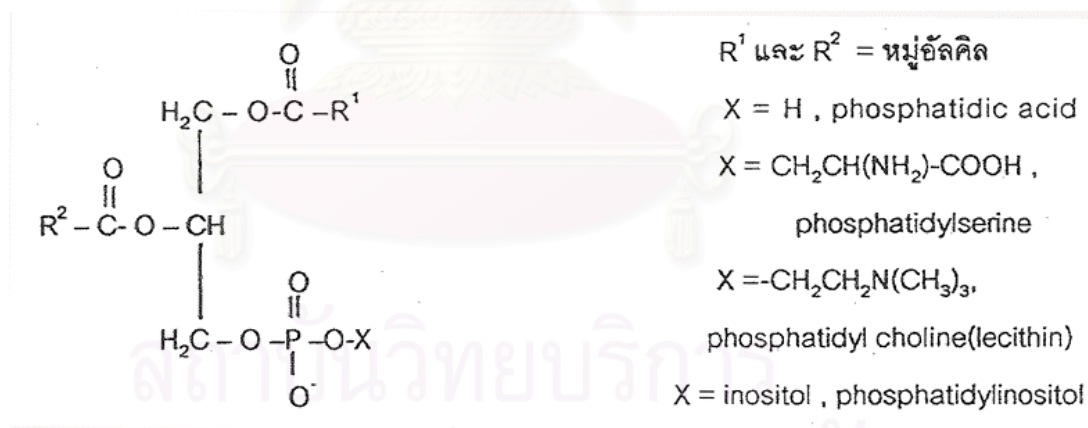
โดย *Pseudomonas aeruginosa* (Fiechter, 1992)



### 2.3.2 ฟอสโฟลิปิดและกรดไขมัน (Phospholipids and Fatty acids)

การเลี้ยงจุลินทรีย์ของ *Candida spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Micrococcus spp.* หรือ *Acinetobacter spp.* บนแหล่งอาหารซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะถูกผลิตและปลดปล่อย ในรูปของฟอสโฟลิปิด หรือกรดไขมัน ออกมาภายนอกเซลล์ ซึ่งโมเลกุลเหล่านี้มีสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ

ฟอสโฟลิปิด ประกอบด้วยกลีเซอรอลที่แทนที่ด้วยกรดไขมันสองตัว ฟอสเฟตและแอลกอฮอล์ โครงสร้างของฟอสโฟลิปิด มีกรดไขมัน 2 ตัวมาเชื่อมโดยพันธะเอสเทอร์ที่หมู่ไฮดรอกซิลของ คาร์บอนอะตอมที่ 1 และ 2 ส่วนคาร์บอนอะตอมที่ 3 มีแอลกอฮอล์ (X-OH) ซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซิลมาเชื่อมโดยพันธะเอสเทอร์กับกรดฟอสฟอริก ให้ได้เป็นฟอสโฟไดเอสเทอร์ ฟอสโฟลิปิดทุกตัวมีหัวที่มีขั้ว (polar head) หนึ่งตัวและที่ไม่มีขั้ว (nonpolar tail) สองหางจึงมีลักษณะแอมฟิพาธิก (amphipathic) (Shaw, 1974)



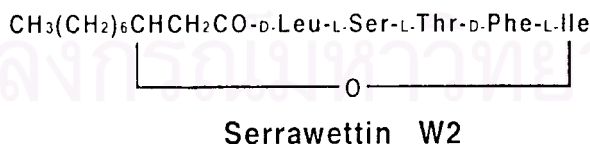
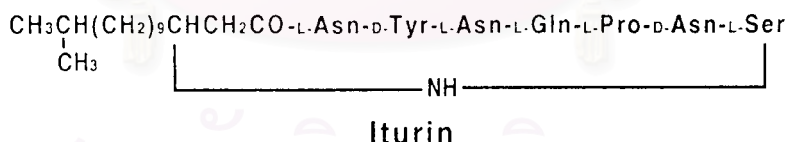
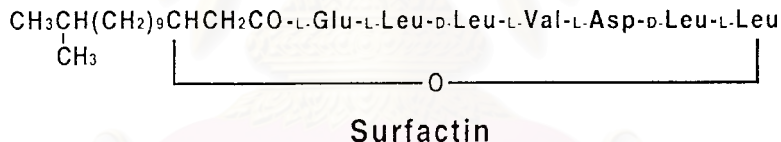
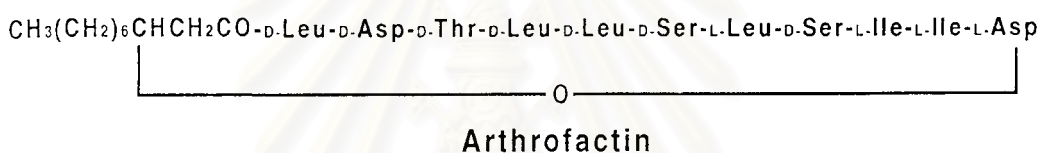
รูปที่ 2.8 โครงสร้างของฟอสโฟลิปิด

### 2.3.3 เปปไทด์และกรดอะมิโนที่ประกอบด้วยไขมัน

(Peptides and Amino acid Containing lipids)

เซอร์แฟกติน (surfactin) หรือซับทีไลซิน (subtilysin) เป็นตัวอย่างของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพของกลุ่มนี้ที่ได้จากการเลี้ยง *Bacillus subtilis* โครงสร้างของเซอร์แฟกติน เป็นกลุ่ม

ของกรดอะมิโนเจ็ดตัวเชื่อมต่อกัน มีปลายข้างหนึ่งเชื่อมต่อกับกลุ่มคาร์บอกซิล และปลายอีกข้างหนึ่งต่อกับกลุ่มไฮดรอกซิลของหมู่ปีตา-ไฮดรอกซีของกรดอะมิโน เซอร์เฟทินเป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีการค้นพบมาเป็นเวลานาน และมีประสิทธิภาพในการนำมาใช้งานสูง สามารถลดค่าแรงตึงผิวของน้ำได้ถึง 27 มิลลินิวตันต่อเมตร (ที่ความเข้มข้น  $5.0 \times 10^{-4}$  โมลต่อลิตร) และให้ค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์ในน้ำที่  $7.0 \times 10^{-5}$  โมลต่อลิตร (Morikawa และคณะ, 1993) นอกจากนี้ยังมีสารลดแรงตึงผิวตัวอื่น ๆ ที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้เช่น อาร์โทรแฟกติน (arthrofactin) ไอตูริน(iturin) และเซอร์ราเวททิน ดับบีว 2 (serrawettin W2) ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังต่อไปนี้

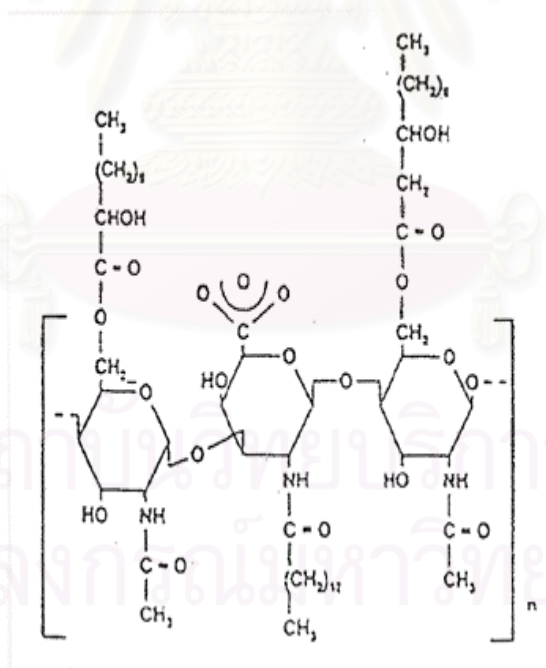


รูปที่ 2.9 โครงสร้างของเปปไทด์และกรดอะมิโน ที่ประกอบด้วยไขมัน (Morikawa และคณะ, 1993)

### 2.3.4 สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพประเภทโพลิเมอร์ (Polymeric Biosurfactant)

สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพในกลุ่มนี้ที่น่าสนใจได้แก่ อิมัลชัน (emulsan) ไลโปแซน (liposan) แมนโนโปรตีน (mannoprotein) และสารประกอบโปรตีนของโพลีแซ็กคาไรด์อื่น ๆ (other polysaccharide-protein complexes)

อิมัลชันมีโครงสร้างสายหลักเป็นเฮเทอโรโพลีแซ็กคาไรด์ (heteropolysaccharide) ซึ่งประกอบขึ้นมาจากไตรแซ็กคาไรด์ (trisaccharide) ของ N-acetyl-D-galactosamine, N-acetylgalactosamine uronic acid และ unidentified N-acetyl amino sugar คุณสมบัติของอิมัลชัน คือ เป็นสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพต่ำในการลดแรงตึงระหว่างผิว (interfacial tension) แต่เป็นสารก่ออิมัลชัน (emulsifying agent) ได้เป็นอย่างดี และเป็นสารก่ออิมัลชันที่มีเสถียรภาพมาก



รูปที่ 2.10 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพประเภทโพลิเมอร์ของอิมัลชัน

(Desai, 1997)

### 2.3.5 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดอนุภาค (Particulate biosurfactant)

ลักษณะของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทนี้จะสะสมตัวอยู่บนผิวของเซลล์แบคทีเรีย มีบทบาทช่วยในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยจะช่วยในการนำอาหารจำพวกไฮโดรคาร์บอนเข้าสู่ภายในเซลล์ องค์ประกอบภายในของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดอนุภาคจะประกอบด้วย โปรตีน ฟอสโฟลิปิด และไลโปพอลิแซ็กคาไรด์

## 2.4 ลักษณะการเกิดของผลิตภัณฑ์(Product Formation)

ลักษณะการเกิดผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์ มีรูปแบบการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นภายในถังหมัก แบ่งออกได้เป็น 4 รูปแบบดังนี้

### 2.4.1 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพควบคู่กับการเจริญของเซลล์

(Growth-Associated Biosurfactant Production )

ลักษณะการเกิดของผลิตภัณฑ์จะเกิดขึ้นพร้อม ๆ กับการเพิ่มขึ้นของการเจริญเติบโตของเซลล์ และอัตราการเกิดของผลิตภัณฑ์ที่มีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของเซลล์จุลินทรีย์ตามสมการ (2.1)

$$r_p = \frac{dc_p}{dt} = q_p c_x \quad (2.1)$$

เมื่อ  $r_p$  อัตราการผลิตของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

$c_p$  ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

$c_x$  ความเข้มข้นของเซลล์จุลินทรีย์

$q_p$  อัตราจำเพาะ ของการเกิดสารลดแรงตึงผิว  
(Specific Rate of Product Formation)

$t$  เวลา

และอัตราการเกิดสารลดแรงตึงผิวจะมีความสัมพันธ์กับอัตราการเกิดของเซลล์ดังนี้

$$\frac{dc_p}{dt} = Y_{p/x} \frac{dc_x}{dt} \quad (2.2)$$

กำหนดให้  $Y_{p/x}$  คือ ผลได้ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากจุลินทรีย์ (Production yield)

อัตราการเจริญของจุลินทรีย์ ในกระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแบบไม่ต่อเนื่อง

โดยพิจารณาในช่วงเอกซ์โพเนนเชียล (Exponential phase) สามารถอธิบายได้ตามสมการ (2.3)

$$\frac{dc_x}{dt} = \mu c_x \quad (2.3)$$

เมื่อ  $\mu$  คือ อัตราการเติบโตจำเพาะ (Specific Growth Rate)

แทน (2.3) ใน (2.2) จะได้สมการดังนี้

$$\frac{dc_p}{dt} = Y_{p/x} \mu c_x \quad (2.4)$$

จากสมการ (2.1) และ (2.4) จะได้อัตราจำเพาะของการเกิดสารลดแรงตึงผิว ในรูปของ อัตราการเติบโตจำเพาะดังนี้

$$q_p = Y_{p/x} \mu \quad (2.5)$$

ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอัตราจำเพาะของการเกิดสารลดแรงตึงผิว จะมีค่าเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นตามอัตราการเติบโตจำเพาะ ซึ่งเป็นลักษณะของการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพควบคู่กับการเจริญของเซลล์ แสดงรูปแบบการเจริญในรูปที่ 2.11a ตัวอย่างการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลักษณะนี้ได้แก่ การผลิตไกลโคโปรตีนโดย *P. fluorescens* 378 (Person Robert และคณะ, 1989)

#### 2.4.2 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในภาวะจำกัดการเจริญ

(Biosurfactant Production by Growing Cell Under Growth-Limiting Condition)

ลักษณะการผลิตของผลิตภัณฑ์จะเกิดขึ้นในภาวะที่จำกัดปริมาณของแหล่งอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญ อาหารที่จำเป็นต่อการเจริญโดยทั่วไปจะเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน

โดยทั่วไปรูปแบบการจำกัดจะจำกัดกับแหล่งไนโตรเจนให้หมดในเวลาที่เหมาะสม และควบคุมให้ภาวะการเลี้ยงจุลินทรีย์ในระบบมีแหล่งคาร์บอนเพียงพอ

การเพิ่มขึ้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะมีความสัมพันธ์ทั้งในช่วงอัตราการเจริญและช่วงที่เซลล์หยุดการเจริญ (ช่วงของการซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอของเซลล์จุลินทรีย์) แสดงสมการดังนี้

$$\begin{aligned}\frac{dc_p}{dt} &= Y_{p/x} \left( \frac{dc_x}{dt} \right) + m_p c_x \\ &= Y_{p/x} \mu c_x + m_p c_x \\ &= \left( Y_{p/x} \mu + m_p \right) c_x\end{aligned}\quad (2.6)$$

เมื่อ  $m_p$  คืออัตราการเกิดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในช่วงการซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอภายในเซลล์

จากสมการ (2.1) และ (2.5) สามารถแสดงค่าอัตราจำเพาะการเกิดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้เป็นสมการ (2.6) ซึ่งจากลักษณะรูปแบบสมการเป็นรูปแบบผสมของการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทั้งในช่วงการเจริญของเซลล์ และช่วงหยุดการเจริญของเซลล์

$$q_p = Y_{p/x} \mu + m_p \quad (2.7)$$

แสดงรูปแบบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในรูปที่ 2.11b ตัวอย่างเช่น การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *P. aeruginosa* เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อจนถึงภาวะที่ปริมาณของไนโตรเจนในอาหารหมดจะมีผลทำให้เซลล์มีอัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงมากขึ้น (Robert และคณะ, 1989) นอกจากนี้จะจำกัดปริมาณของไนโตรเจนแล้วยังมีผู้ศึกษาการจำกัดปริมาณของฟอสเฟต พบว่าที่ปริมาณฟอสเฟตน้อย ๆ จะช่วยกระตุ้นให้ *P. aeruginosa* ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพออกมามากขึ้น (Mulligan และคณะ, 1989)



### 2.4.3 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในช่วงระยะพักของเซลล์

#### (Biosurfactant Production by Resting Cells)

เป็นภาวะการผลิตสารลดแรงตึงผิวโดยใช้เซลล์ที่อยู่ในระยะพักเป็นหัวข้อ โดยที่เชื้อยังสามารถสังเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ หรือกล่าวได้ว่าอัตราการเกิดของผลิตภัณฑ์จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของจุลินทรีย์โดยตรงสามารถเขียนความสัมพันธ์ในสมการ (2.8)

$$\frac{dc_p}{dt} = m_p c_x \quad (2.8)$$

จากสมการ (2.1) และ (2.8) จะได้ว่า

$$q_p = m_p \quad (2.9)$$

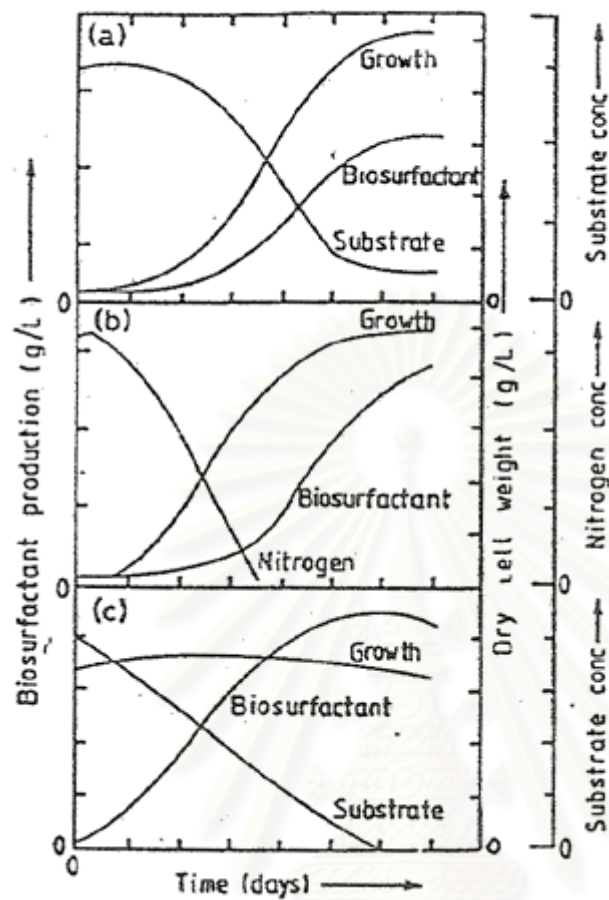
ในกรณีนี้จะเห็นว่าการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเกิดขึ้นโดยไม่มีความสัมพันธ์กับการเติบโตของจุลินทรีย์ แสดงรูปแบบการเจริญในรูปที่ 2.11c ตัวอย่างที่พบ เช่นการผลิตแรมโนลิปิดโดยเชื้อ *P. aeruginosa* CFTR-6 ที่อยู่ในระยะพัก ค่าความเข้มข้นของเซลล์ตลอดระยะเวลาที่ทำการเลี้ยงจะมีค่าคงที่ ขณะที่การผลิตของไกลโคลิปิดจะเพิ่มขึ้นเป็นเส้นตรงด้วยอัตราคงที่ที่ 29.5 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และจะหยุดการผลิตไกลโคลิปิดหลังจากผ่านไปแล้ว 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นของไกลโคลิปิดที่ทำการวัดได้โดยเฉลี่ยมีค่าเป็น 450 มิลลิกรัมต่อลิตร (Ramana K.V. และคณะ, 1989)

### 2.4.4 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยการเติมสารเริ่มต้น

#### (Biosurfactant Production by Microbial Cell and Addition of Precursors)

เป็นกระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิว โดยการเติมสารตั้งต้นลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเพิ่มการผลิตสารลดแรงตึงผิว โดยมีผลทำให้ผลผลิตมีการเปลี่ยนแปลงทั้งปริมาณและคุณภาพ

### Production of Biosurfactants



รูปที่ 2.11 การเกิดของผลิตภัณฑ์ในรูปแบบต่าง ๆ (Kosaric, 1993)

a) การผลิตของผลิตภัณฑ์เกิดควบคู่กับการเจริญ

b) การผลิตสารภายใต้ภาวะที่มีการจำกัดการเจริญ

c) การผลิตของผลิตภัณฑ์โดยใช้เชื้อในระยะพัก

## 2.5 กระบวนการขนย้ายอาหารเข้าเซลล์

ลักษณะการจัดเรียงตัวแบบผนังสองชั้นของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวชีวภาพพบในผนังเซลล์ของสิ่งมีชีวิต การจัดเรียงตัวของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะหันส่วนที่ไม่มีขั้วหรือสายไฮโดรคาร์บอนเข้าหาส่วนที่ไม่มีขั้วเหมือนกันของโมเลกุลของตัวเอง และจะหันเอาส่วนที่มีขั้วไปทางนอกเซลล์ (extra cellular) หรือ ไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ของเซลล์ (แสดงในรูปที่ 2.12)

จากลักษณะโครงสร้างของผนังเซลล์ดังกล่าวและรูปแบบการเกิดเป็นผนังสองชั้นของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ นำมาใช้อธิบายกลไก (mechanism) การนำแหล่งอาหารคาร์บอนไปใช้ในการเจริญของจุลินทรีย์ การรวมตัวระหว่างสารประกอบไฮโดรคาร์บอนและโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวชีวภาพภายในสารละลายและกระบวนการขนถ่าย (transport) ของโมเซลล์ไฮโดรคาร์บอนเข้าสู่เซลล์แสดงดังรูปที่ 2.12

กลไกการขนย้ายของโมเลกุลสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเข้าสู่เซลล์ประกอบด้วย 3 กลไก ซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ดังต่อไปนี้

1. การขนย้ายและการใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ละลายอยู่ในน้ำหมัก
2. การนำสารประกอบไฮโดรคาร์บอนมาใช้โดยการสัมผัสกันโดยตรงระหว่างโมเลกุลของ

สารประกอบไฮโดรคาร์บอนกับเซลล์ ซึ่งขนาดโมเลกุลสารประกอบไฮโดรคาร์บอนมีขนาดใหญ่กว่าขนาดของเซลล์

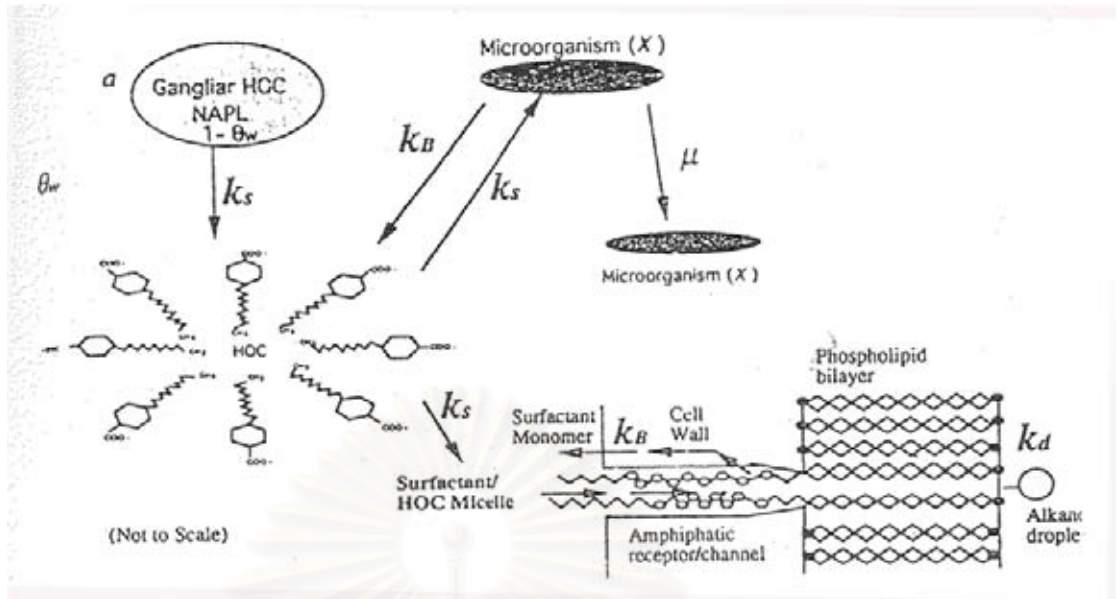
3. การขนย้ายของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในรูปของไมเซลล์

ลักษณะการเป็นโมเลกุลไม่มีขั้วของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนทั่วไปจะไม่สามารถ

อธิบายด้วยกลไกแบบแรก เพราะการละลายของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในน้ำจะมีค่าน้อยจึงมีบทบาทต่อการนำไปใช้ในการเจริญเติบโตน้อย ดังนั้น การนำแหล่งคาร์บอนที่อยู่ในรูปของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนไปใช้ภายในเซลล์สามารถอธิบายด้วยลักษณะกลไกแบบที่สอง และที่สาม

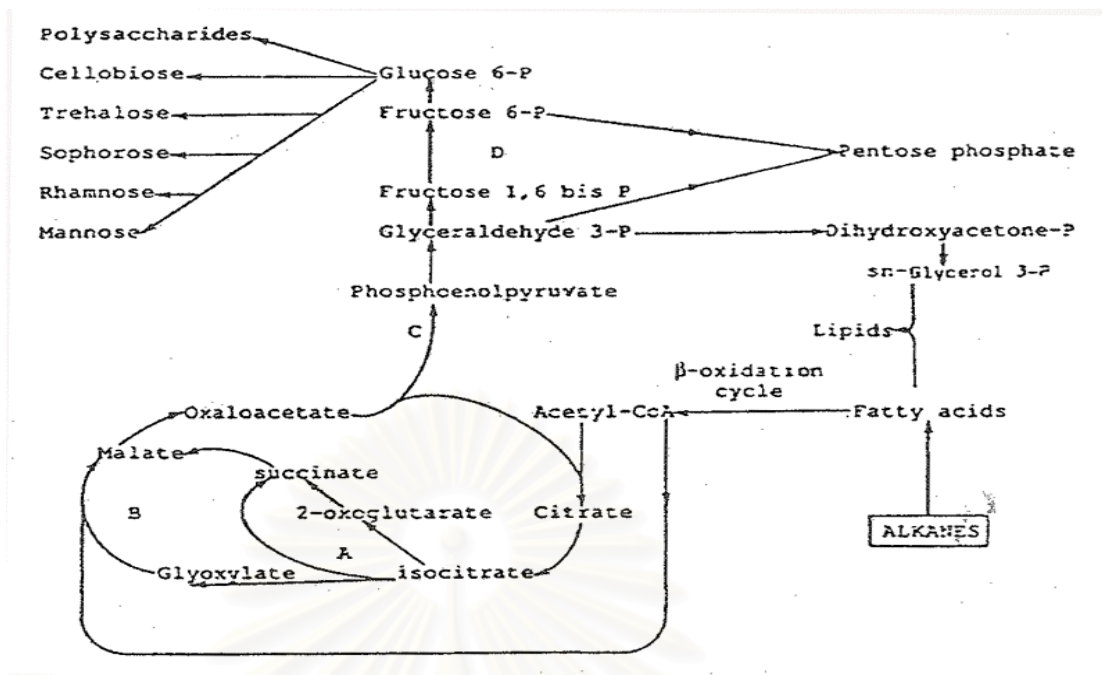
หรือทั้งสองรูปแบบผสมกัน ระบบที่ประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิวเริ่มต้น ที่ได้จากการเติมสารลดแรงตึงผิวเข้าไปในระบบหรือการผลิตขึ้นมาของจุลินทรีย์ มีความสำคัญอย่างมากต่อการละลายและการกระจายตัวของโมเลกุลสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในสารละลาย การอธิบายกลไกการใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนด้วยกลไกแบบที่สอง เป็นลักษณะของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่กระจายตัวเป็นหยดน้ำมัน (droplet) ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าขนาดของจุลินทรีย์ การใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนของจุลินทรีย์เกิดจากการที่จุลินทรีย์เกาะรวมตัวกันล้อมรอบบนหยดของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยตรงอาศัยสารลดแรงตึงผิวช่วยในการยึดเกาะ จึงเกิดการขนย้ายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ตัวแปรหลักของกลไกลักษณะนี้ขึ้นอยู่กับพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างจุลินทรีย์และสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ขณะที่กลไกแบบที่สามจะเป็นลักษณะการกระจายตัวของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนรวมตัวกับโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวในรูปของไมเซลล์ที่สามารถขนย้ายผ่านช่องของผนังเซลล์ได้ ตัวแปรหลักของกลไกแบบที่สามจึงขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของส่วนที่เกิดขึ้นเป็นไมเซลล์ (micellar-phase hydrocarbon concentration) และความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว (Sekcisky และ Shreve , 1999; AL-Tahhan และคณะ, 2000)

การทดลองที่สนับสนุนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีผลต่อการเจริญของเซลล์ โดยทำการเลี้ยงจุลินทรีย์กลายพันธุ์ (mutant) ของ *Pseudomonas aeruginosa* strain PG 201 และ 65E12 บนแหล่งอาหารไฮโดรคาร์บอน (ผลของการทำการกลายพันธุ์ของ *P.aeruginosa* ของ strain ทั้งสองนี้ทำให้ไม่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้) และไม่มีการเติมสารลดแรงตึงผิวเข้าไป มีผลทำให้การเจริญของเซลล์ช้ามาก แต่เมื่อมีการเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลงไปในการเลี้ยงของจุลินทรีย์พบว่าจะสามารถเจริญบนแหล่งอาหารไฮโดรคาร์บอนได้ (Koch และคณะ, 1991)



รูปที่ 2.12 แสดงการขนส่งสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเข้าสู่เซลล์  
(Sekcisky และ Shreve ,1999)

แหล่งอาหารคาร์บอนต่างชนิดกันมีรูปแบบขั้นตอนการนำไปใช้ของจุลินทรีย์แตกต่างกัน กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับจุลินทรีย์ทั่วไป ในงานวิจัยใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งกลไกการขนย้ายนำแหล่งคาร์บอนในลักษณะของน้ำมันเข้าสู่ภายในเซลล์อาศัยรูปแบบกลไกที่สองหรือแบบที่สามที่ได้กล่าวมาแล้ว ขั้นตอนการนำเอาแหล่งคาร์บอนที่อยู่ในรูปของน้ำมันมาใช้ภายในเซลล์แสดงดังรูปที่ 2.13 ลักษณะของกลไกเป็นกระบวนการใช้อาหารประเภทอัลเคนหรือน้ำมันผ่านวัฏจักรเครป (Krebs cycle หรือ Tricarboxylic acid cycle) ให้กลูโคสออกมา ซึ่งกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในการเจริญและให้พลังงาน



รูปที่ 2.13 กลไกการนำสารประกอบอัลเคนผ่านกรดไขมันไปใช้ภายในเซลล์

(Kosaric , 1993)

จากอะซิติล โคเอ (Acetyl CoA) ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันจะผ่านเข้าสู่วัฏจักรเครป ซึ่งจะเกิดการรวมตัวของ อะซิติล โคเอ กับ กรดออกซาโลอะซิติก (oxaloacetic acid) ได้กรดซิตริก (citric acid) เมื่อผ่านหนึ่งรอบของวัฏจักรเครป คาร์บอน 2 อะตอมจะถูกกำจัดไปเป็นแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ได้สารประกอบคาร์บอน 4 อะตอมของกรดออกซาโลอะซิติกที่จะถูกนำกลับไปรวมตัวใหม่กับอะซิติล โคเอ และอะตอมของไฮโดรเจน ซึ่งเมื่อผ่านกระบวนการจะมีการถ่ายทอดอิเล็กตรอนและมีการผลิตพลังงานสะสมในรูปของ ATP ต่อไป

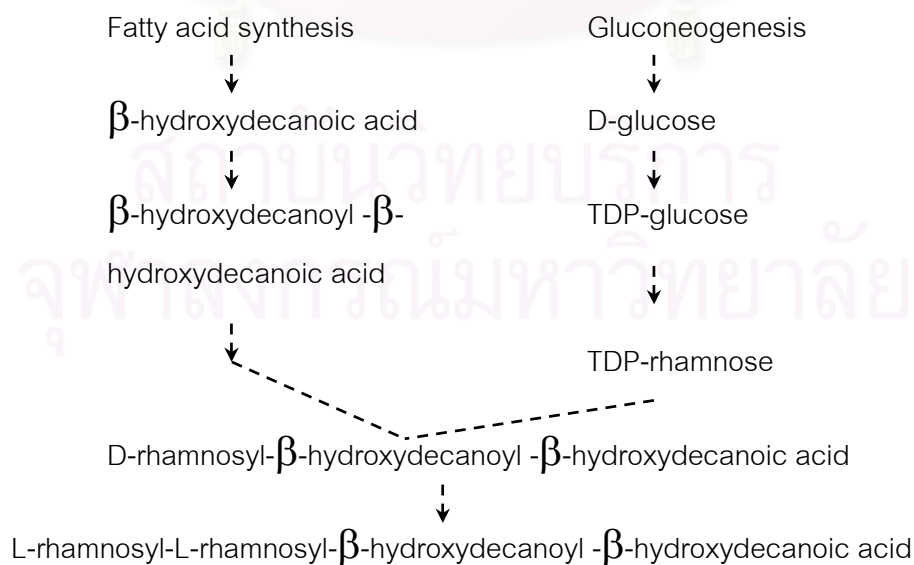
จากลักษณะของแรมโนลิปิดที่ประกอบด้วยส่วนที่มีหัวเป็นส่วนของน้ำตาลแรมโนส และส่วนที่ไม่มีหัวเป็นส่วนของกรดไขมัน (fatty acid) การผลิตแรมโนลิปิดของจุลินทรีย์จึงประกอบด้วยกระบวนการ 2 กระบวนการแสดงดังรูปที่ 2.14 กล่าวคือ

1. กระบวนการสร้างน้ำตาลแรมโนส น้ำตาลแรมโนสมีคาร์บอน 5 อะตอม กระบวนการสร้างภายในเซลล์ยังไม่แน่ชัด แต่น้ำตาลแรมโนสเป็นอนุพันธ์ที่ได้จากน้ำตาลกลูโคส

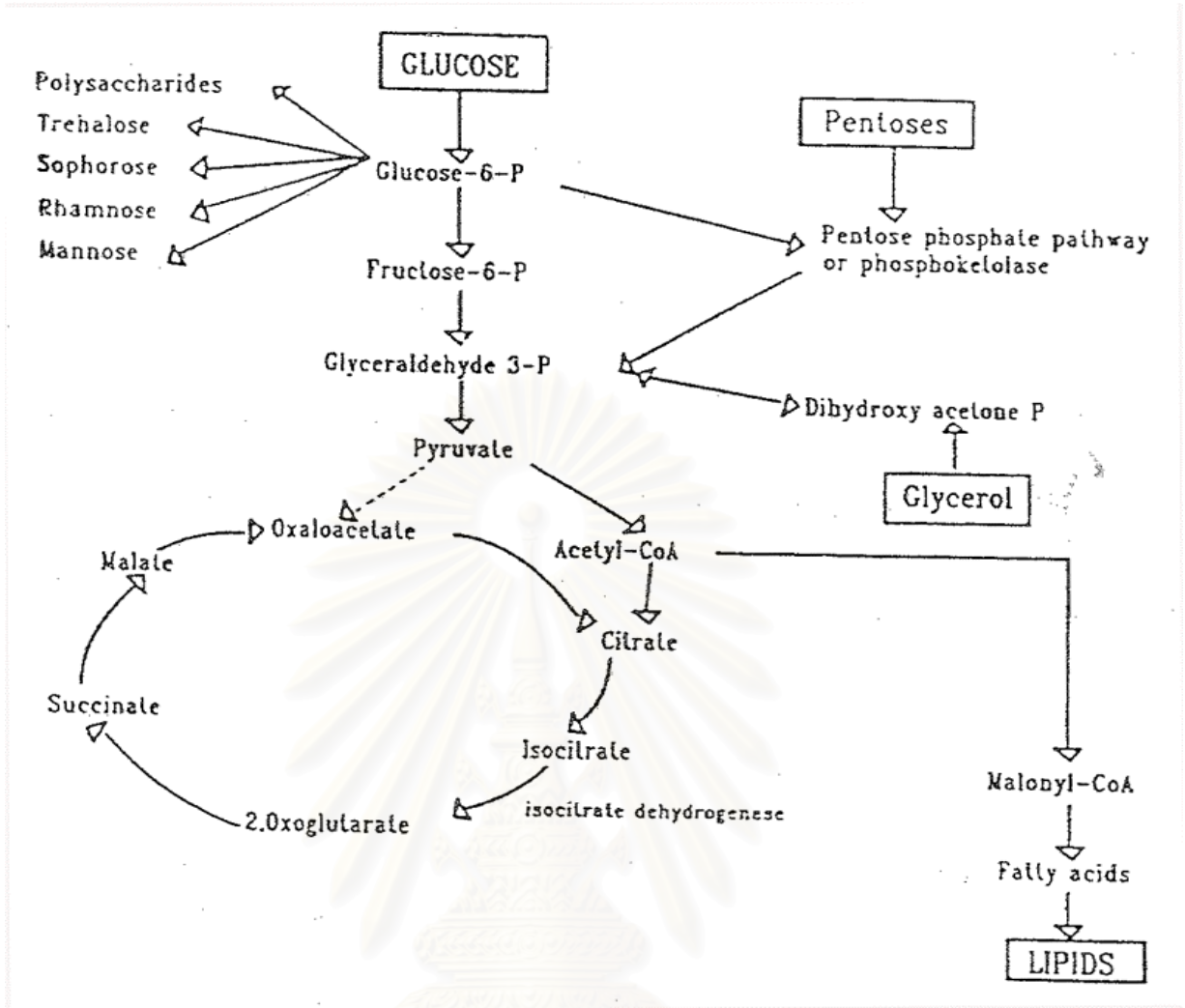


2. กระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน กรดไขมันเป็นชีวโมเลกุลขนาดเล็ก โดยเริ่มต้นการใช้ น้ำตาลกลูโคส แต่ขั้นตอนของการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์จะควบคุมกลไกโดยใช้เอนไซม์รูปแบบการสังเคราะห์กรดไขมัน แสดงดังรูปที่ 2.15 และมีเอนไซม์ควบคุมตลอดกระบวนการ ซึ่งเอนไซม์แต่ละตัวคือ A: phosphofructokinase; B: pyruvate kinase; C: isocitrate dehydrogenase; D: citrate lyase; และ E: pyruvate dehydrogenase.

การรวมกันของน้ำตาลแรมโนสและกรดไขมัน อดีนิวคลีโอไทด์(nucleotide) เป็นสารตั้งต้น (precursor) ที่ช่วยในการรวมตัวกันของส่วนประกอบทั้งสอง แต่การรวมตัวด้วยสัดส่วนของจำนวนโมเลกุลในแต่ละด้านไม่สามารถกำหนดได้แน่นอน กระบวนการผลิตโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะขึ้นกับภาวะที่เหมาะสมเพื่อนำมาใช้งาน ดังได้กล่าวมาแล้วว่ากรณีของอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ที่เป็นพวกสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ถ้าจุลินทรีย์ต้องการนำแหล่งอาหารคาร์บอนซึ่งแยกขึ้นจากชั้นของน้ำมัน จะสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อช่วยในการลดแรงตึงผิวระหว่างชั้นของน้ำมันและชั้นน้ำทำให้สามารถรวมตัวมากขึ้น จุลินทรีย์ที่กระจายตัวอยู่ในชั้นน้ำก็มีโอกาสสัมผัสกับชั้นของน้ำมันได้มากขึ้น มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์เป็นไปได้มากขึ้น



รูปที่ 2.14 กระบวนการผลิตแรมโนลิปิดของ *Pseudomonas aeruginosa* (Kosaric , 1993)



รูปที่ 2.15 กลไกการสังเคราะห์กรดไขมันจากน้ำตาลกลูโคสภายในเซลล์  
(Kosaric , 1993)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 3

### ตรวจเอกสาร

#### 3.1 บทนำ

การศึกษากระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่องจะต้องมีการค้นคว้าหาข้อมูลในหลาย ๆ หัวข้อ ซึ่งสามารถแบ่งเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนแรกเป็นการรวบรวมชนิดของจุลินทรีย์และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ ส่วนที่สองกล่าวถึงปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และส่วนสุดท้ายจะเป็นการทดสอบคุณสมบัติและการหาปริมาณของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากกระบวนการผลิต

#### 3.2 ชนิดของจุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้

กระบวนการต่าง ๆ ในอุตสาหกรรมต้องอาศัยสารลดแรงตึงผิว เช่น อุตสาหกรรมฟอกย้อม อุตสาหกรรมน้ำมัน อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมถลุงแร่ อุตสาหกรรมพลาสติก ฯลฯ ซึ่งส่วนมากเป็นชนิดที่ได้จากการสังเคราะห์ สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ผลิตได้จากปิโตรเลียม เช่น แอลกอฮอล์ อัลคิลเบนซีน หรือจากวัตถุดิบธรรมชาติ เช่น จากน้ำมันพืช น้ำมันสัตว์ โดยอาศัยกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางเคมี ตัวอย่างของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ที่ใช้กันมากที่สุด คือ ดีเทอร์เจนท์ (detergent) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการทำความสะอาด ตัวอย่างของดีเทอร์เจนท์ที่พบเห็นมากที่สุด คือ สบู่ ผลิตเพื่อใช้ในครัวเรือน ประโยชน์การนำสารลดแรงตึงผิวมาใช้งาน ได้แก่ ใช้เป็นตัวอิมัลซิไฟเออร์ (emulsifier) สารทำให้เกิดฟอง (foam booster) ตัวทำละลาย (solubilizer) เป็นต้น

ในปัจจุบันนักวิจัยได้หันมาสนใจศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวจากสิ่งมีชีวิตมากขึ้น ซึ่งมีความสำคัญด้านเศรษฐกิจ และมีการใช้แทนสารลดแรงตึงผิวที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมีมาก

ขึ้น เนื่องจากมีข้อดีอยู่หลายประการ คือ สามารถถูกย่อยสลายได้โดยกระบวนการทางชีวภาพ ซึ่งจะเป็นการลดปัญหาสิ่งแวดล้อมได้ ตลอดจนมีความเป็นพิษที่ต่ำกว่าสารลดแรงตึงผิวที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์

การพัฒนาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากการเลี้ยงจุลินทรีย์ ได้มีการศึกษาค้นพบจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ หรือ รา จุลินทรีย์ในแต่ละชนิดจะให้ผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างกัน ตารางที่ 3.1 ได้รวบรวมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

ตารางที่ 3.1 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

Microorganism	Substrate	Biosurfactant	Reference
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> strain RAG-1	crude oil	heteropolysaccharides	Foght et al. (1989)
<i>Bacillus subtilis</i>	glucose	surfactin	Mulligan et al. (1984)
<i>B. subtilis</i> MTCC 1427	hydrocarbon	biosurfactant	Makkar et al. (1998)
<i>B. subtilis</i> ATCC 21332	glucose	surfactin	Davis et al. (1999)
<i>Candida antarctica</i> T-34	glucose	mannosylerythritol lipid	Kitamoto et al. (1992)
<i>Candida apicola</i>	glucose	sophorose lipid	Hemmel et al. (1993)
<i>C. bombicola</i> CBS 6009	glucose	sophorose lipid	Davila et al. (1992)
<i>Cellulomonas cellulans</i>	glycerol	glycolipid	Arino et al. (1998)
<i>Micrococcus</i> sp.	n-alkane and sugars	biosurfactant	Das et al. (1998)

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

Microorganism	Substrate	Biosurfactant	Reference
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain S <sub>7</sub> B <sub>1</sub>	hydrocarbon	rhamnolipid	Hisatsuka et al. (1971)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	n-paraffin	rhamnolipid	Iton et al. (1989)
<i>P. aeruginosa</i> UW-1	corn oil	rhamnolipid	Sim et al. (1997)
<i>P. aeruginosa</i> CFTR-6	glucose	rhamnolipid	Ramana et al. (1989)
<i>P. aeruginosa</i> 44T1	hydrocarbon	rhamnolipid	Robert et al. (1989)
<i>P. aeruginosa</i> DSM2659	glucose	rhamnolipid	Guerra-santos et al. (1984)
<i>P. aeruginosa</i> UG2	glucose	rhamnolipid	Van Dyke et al. (1993)
<i>P. aeruginosa</i> BS22	glucose	rhamnolipid	Sudhakar babu et al. (1996)
<i>P. aeruginosa</i> GS3	molasses	rhamnolipid	Patel et al. (1997)
<i>P. aeruginosa</i> IFO 3924	ethanol	rhamnolipid	Matsufuji et al. (1997)
<i>P. aeruginosa</i> PG201	hexadecane	rhamnolipid	Sekelsky et al. (1998)
<i>P. aeruginosa</i> 47T2 NCIB 40044	frying oils	rhamnolipid	Haba et al. (2000)
<i>Pseudomonas</i> NCIB11264	glucose	exopolysaccharide	Williams et al. (1978)
<i>Rhodococcus erythropolis</i> DSM43215	n-hexadecane	$\alpha,\alpha$ -trehalose- 6,6'- di- corynomycolate	Kretschmer et al. (1982)
<i>Rhodococcus sp.</i> 51T7	hydrocarbon	trehalose	Espuny et al. (1996)

จากตารางที่ 3.1 ได้รวบรวมจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ โดยเฉพาะจุลินทรีย์ชนิด *Pseudomonas* สายพันธุ์ต่าง ๆ จะเห็นว่า *Pseudomonas* สามารถเจริญเติบโตบนแหล่งอาหารได้หลายชนิดทั้งในอาหารที่สามารถละลายได้ในน้ำเช่น น้ำตาลกลูโคส เอทานอล หรือสารอาหารที่ละลายน้ำได้น้อย เช่น พอลิเมอร์ประกอบไฮโดรคาร์บอนต่าง ๆ เหตุผลที่สำคัญคือจุลินทรีย์ประเภทนี้มีความสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพออกมาภายนอกเซลล์ได้ ซึ่งน่าจะมีส่วนช่วยในการลำเลียงอาหารเข้าสู่ภายในเซลล์ นอกจากนี้จะเห็นว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *Pseudomonas aeruginosa* จะเป็นแรมโนลิปิด ดังนั้น จุลินทรีย์ที่จะทำการเลี้ยงในงานวิจัยนี้ ซึ่งเป็น *Pseudomonas* sp.A41 คาดว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้น่าจะมีส่วนประกอบของแรมโนลิปิด

### 3.3 ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pseudomonas*

มีอิทธิพลที่มีผลกระทบต่อกระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pseudomonas* sp. นั้นขึ้นกับปัจจัยหลายประการ เช่น ภาวะของระบบ ชนิดของแหล่งอาหาร เป็นต้น การศึกษาอิทธิพลของปัจจัยต่าง ๆ นั้นมีผู้ศึกษาก่อนหน้านี้หลายด้าน และสามารถจำแนกได้ดังนี้

#### 3.3.1 อิทธิพลจากชนิดของแหล่งอาหาร

จุลินทรีย์ทั่วไปจะใช้สารอาหารเป็นแหล่งพลังงานในการเจริญเติบโต มีเพียงจุลินทรีย์บางชนิดเท่านั้นที่สามารถใช้แสงเป็นแหล่งพลังงานได้ การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่อาศัยสารอาหารนอกจากสารอาหารประเภทคาร์บอนแล้ว จุลินทรีย์ยังต้องการแหล่งอาหารไนโตรเจนซึ่งได้จากแอมโมเนียมไนเตรต หรือกรดอะมิโนเปปไทด์ รวมไปถึงวิตามิน เกลือแร่ต่างๆ ดังนั้นอาหารจึงมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์โดยตรง จำแนกความสำคัญของแหล่งอาหารได้ดังนี้



3.3.1.1 อิทธิพลของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการเจริญและกระบวนการผลิตของผลิตภัณฑ์ จากการศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอน โดยทั่วไปจะเป็นแหล่งคาร์บอนประเภทไฮโดรคาร์บอน เพราะเป็นวัตถุดิบที่สามารถหาได้ง่ายและมีราคาถูกจึงเหมาะที่จะนำมาใช้ให้เป็นประโยชน์สูงสุด พาราฟิน (n-parafin) และกลีเซอรอล (Glycerol) เป็นอาหารที่ถูกนำมาใช้เลี้ยง *P. aeruginosa* I-85 เปรียบเทียบผลการผลิตของปริมาณแรมโนลิปิดที่ได้จากการเลี้ยงด้วยกลูโคส พบว่าปริมาณของแรมโนลิปิดที่ผลิตได้บนอาหารกลูโคสจะมีปริมาณน้อยกว่าการเลี้ยงบนพาราฟิน หรือเลี้ยงด้วยกลีเซอรอลประมาณ 2.4-3.7 เท่า (Itoh และคณะ, 1971) และจากการศึกษาของ Matsufuji และคณะ (1997) การเลี้ยง *P. aeruginosa* IFO 3924 บนแหล่งอาหารชนิดต่างๆ พบว่ากลูโคสให้ปริมาณน้ำหนักเซลล์สูงสุดเป็น 7.1 กรัมต่อลิตร แต่ให้ปริมาณการผลิตแรมโนลิปิดต่ำ ในขณะที่ถ้าเลี้ยงบนเอทานอลจะให้ความเข้มข้นของเซลล์เป็น 0.9 แต่ให้ปริมาณการผลิตแรมโนลิปิด 1 และแรมโนลิปิด 2 สูงมากกว่าเป็น 73 เท่าและ 18 เท่า ตามลำดับ และผลในการเลี้ยง *P. aeruginosa* บนแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ พบว่ามีผลทำให้การเจริญเติบโตและการผลิตของแรมโนลิปิดแตกต่างกันออกไป (Ramana และ Karanth ,1989) เช่น การใช้ฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ปริมาณการผลิตของแรมโนลิปิดน้อยกว่าการเลี้ยง *P. aeruginosa* บนน้ำมันมะกอก โดยสังเกตค่าที่ได้จากการวัดค่าแรงดึงผิวของน้ำมันซึ่งจะได้ค่าต่ำกว่า นอกจากนี้พบว่าชนิดของแหล่งอาหารคาร์บอนที่แตกต่างกันจะให้แรมโนลิปิดชนิดต่าง ๆ กันด้วย เช่น การเลี้ยงบนกลูโคสหรือบนแมนนิทอลจะให้แรมโนลิปิดทั้ง 4 ชนิด ขณะที่ถ้าเลี้ยงบนน้ำมันมะกอกจะให้แรมโนลิปิดเพียงบางชนิดเท่านั้น (Robert และคณะ, 1989)

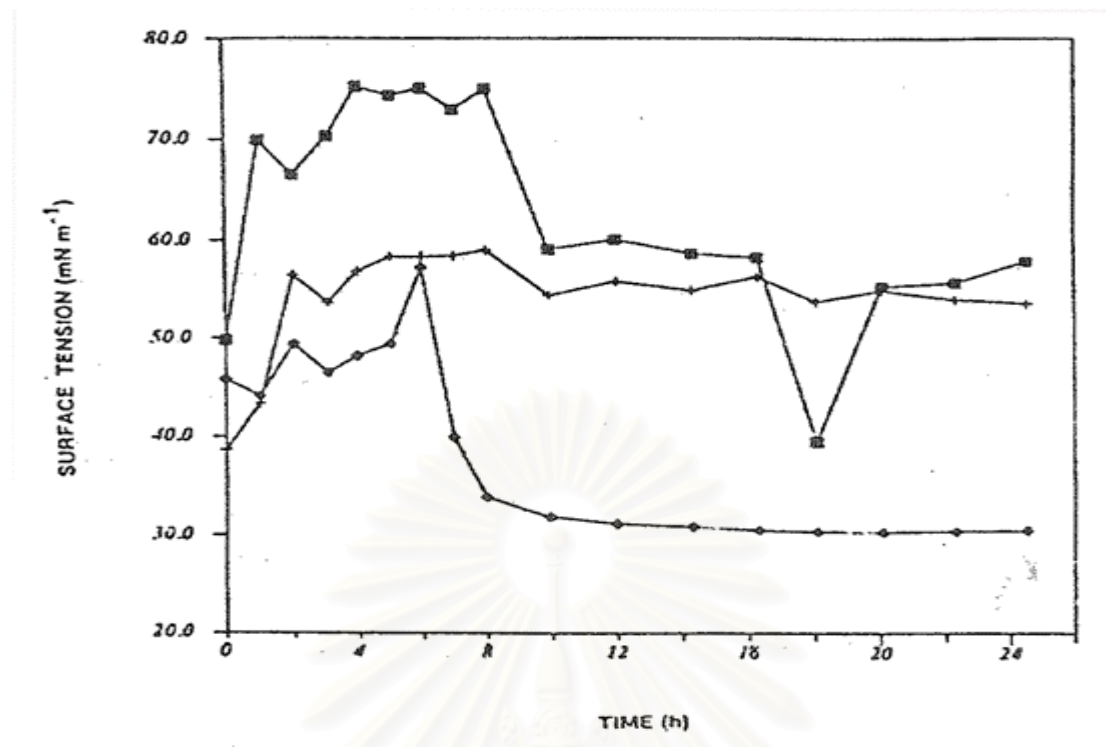
3.3.1.2 อิทธิพลของแหล่งไนโตรเจน แหล่งอาหารไนโตรเจนเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ โดยทั่วไปการเติมแหล่งอาหารไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์จะนิยมใช้สารอนินทรีย์ เช่น โซเดียมไนเตรท หรือ แอมโมเนียมไนเตรท ปริมาณของแหล่ง

ไนโตรเจนที่เติมลงไปจะเติมในปริมาณน้อย เพื่อจำกัดปริมาณของไนโตรเจนให้หมดในช่วงเวลาที่เหมาะสมจะทำให้จุลินทรีย์ผลิตสารผลิตภัณฑ์ออกมาได้ ตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาหาปริมาณของไนโตรเจนที่เหมาะสม โดยเติมปริมาณของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเซลล์แตกต่างกันในช่วง 1 ถึง 6 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้ค่าแรงดึงผิวที่วัดได้จากน้ำหนักแตกต่างกัน ปริมาณของไนโตรเจนที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 2.5 กรัมต่อลิตร หลังจากทำการเลี้ยง *Pseudomonas sp.* JAMM เป็นเวลา 150 ชั่วโมง นำน้ำหนักมาวัดค่าแรงดึงผิวให้ค่าลดลงมากที่สุดจาก 42 มิลลินิวตันต่อเมตร เป็น 30 มิลลินิวตันต่อเมตร (Mercade และคณะ, 1993)

ประเภทของแหล่งไนโตรเจนที่ใช้แตกต่างกันมีผลต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวได้ต่างกัน เช่น การใช้ไซเตียมไนเตรทเป็นแหล่งอาหารไนโตรเจน สำหรับ *P. aeruginosa* CFTR-6 จะให้ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ผลิตออกมาสูงกว่า เมื่อเทียบกับการใช้แอมโมเนียมไนเตรท หรือแอมโมเนียมซัลเฟต (Ramana และ Karanth, 1989)

การศึกษาของ Arino และคณะ(1996) เกี่ยวกับปริมาณและชนิดของแหล่งไนโตรเจนสามชนิด ได้แก่ เป็ปโติน ไซเตียมไนเตรท และแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีผลต่อผลิตภัณฑ์ สรุปได้ว่าชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยง *P. aeruginosa* GL1 คือ ไซเตียมไนเตรทที่ความเข้มข้น 5.0 กรัมต่อลิตร

3.3.1.3 อิทธิพลของฟอสเฟต ฟอสเฟตเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งในกระบวนการเจริญของจุลินทรีย์ และมีผลต่อกระบวนการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ ตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาความสำคัญของฟอสเฟตคือ การศึกษาของ Mulligan (1989) ถึงอิทธิพลของชนิดฟอสเฟต 3 ชนิด ที่มีผลต่อการเจริญและกระบวนการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ แนวโน้มการเจริญแสดงดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 อิทธิพลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากสูตรอาหารของฟอสเฟต 3 ชนิด

โดยการวัดค่าแรงตึงผิวของ *P.aeruginosa* โดยที่ (Mulligan และคณะ, 1989)

( ) : phosphate – buffered Kay's mineral medium (Warren ,19660)

( ) : phosphate – limitedproteose peptone/glucose/ammonium salts medium  
(Cheng , 1970)

( ) : phosphate-sufficient nutrient broth (Difco)

นอกจากนี้ชนิดของแหล่งอาหารของฟอสเฟตซึ่งมีผลต่อความเป็นกรด-ด่างของอาหาร

เลี้ยงเชื้อจะให้ผลการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแตกต่างกัน ตัวอย่างของประเภท

ของฟอสเฟตที่ใช้ คือ โฟแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต

พบว่าการใช้ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็นแหล่งอาหารฟอสเฟต จะให้ปริมาณการผลิต

ของไกลโคลิปิดที่สูงกว่าการใช้โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต สาเหตุมาจากภาวะของความ

เป็นกรด - ด่างของอาหารโดยการเลี้ยงจุลินทรีย์ด้วยโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต จะให้

ภาวะความเป็นกรด - ด่างเป็น 5 ขณะที่ถ้าใช้ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตแล้วจะให้ภาวะ

ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.5 นอกจากนี้ยังพบว่าที่ความเข้มข้นของฟอสเฟตสูงกว่า 40 มิลลิโมลต่อ

ลิตร จะมีผลยับยั้งการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และมีผลทำให้หยุดเจริญเติบโต (Ramana และ Karanth , 1989)

### 3.3.2 อิทธิพลจากภาวะที่ใช้เลี้ยงจุลินทรีย์

3.3.2.1 อิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่าง จุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ มีความสามารถในการเจริญเติบโตในภาวะค่าความเป็นกรด-ด่างได้แตกต่างกัน จากการศึกษากว่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมของการเลี้ยง *P. aeruginosa* DMS 2659 ที่ภาวะค่าความเป็นกรด-ด่างช่วง 5.75-7.5 พบว่าการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วงดังกล่าว มีการเปลี่ยนแปลงค่าความเข้มข้นของเซลล์แตกต่างกันน้อยซึ่งจะอยู่ในช่วง 1.0 - 1.2 กรัมต่อลิตร แต่การผลิตของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้ผลิตภัณฑ์สูงสุดเป็น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.25 (Guerra-Santos และคณะ, 1986)

3.3.2.2 อิทธิพลของอุณหภูมิ การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและกระบวนการผลิตแรมโนลิปิด การศึกษาช่วงอุณหภูมิที่ 26-40 องศาเซลเซียสของ *P. aeruginosa* DMS 2659 พบว่าในช่วงที่ทำการศึกษาให้ค่าความเข้มข้นของเซลล์อยู่ระหว่าง 2.8-3.0 กรัมต่อลิตรในขณะที่อุณหภูมิช่วง 30-32 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณของแรมโนลิปิดสูงสุดเป็น 480 มิลลิกรัมต่อลิตร (Guerra-Santos และคณะ, 1986)

## 3.4 การทดสอบสารลดแรงตึงผิวในเชิงคุณภาพและปริมาณ

การทดสอบสารลดแรงตึงผิวในเชิงคุณภาพและปริมาณโดยอาศัยการทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการทดสอบ และจะไม่ทำปฏิกิริยากับสารเคมีอื่น ๆ ที่ปะปนอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ แบ่งวิธีการทดสอบสารลดแรงตึงผิวในเชิงคุณภาพและปริมาณได้เป็น 2 วิธี คือ การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี และการวิเคราะห์โดยวิธีโครมาโตกราฟี (chromatographic assays)

### 3.4.1 การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของผลิตภัณฑ์

มีรายงานถึงเซอร์แฟกตินที่ได้จาก *Pseudomonas* sp. ว่ามีแรมโนลิปิด (Hisatsuka และคณะ, 1971) โดยโมเลกุลของแรมโนลิปิดประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาลแรมโนสเชื่อมต่อกับโมเลกุลของปีตาไฮดรอกซีวเดคาโนอิกแอซิดรวมกันเป็นโมเลกุลที่มีขั้วและไม่มีขั้วอยู่ด้วยกัน จากลักษณะโครงสร้างดังกล่าวจึงนำมาใช้เป็นสารลดแรงตึงผิวระหว่างวัฏภาค 2 วัฏภาค โดยโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวจะสะสมตัวระหว่างวัฏภาคเกิดเป็นชั้นฟิล์มระหว่างผิวหน้า และจากคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิวจึงนำมาใช้แสดงปริมาณของสารลดแรงตึงผิวโดยทางอ้อม กล่าวคือ ปริมาณของสารลดแรงตึงผิวที่มีปริมาณมากจะสามารถลดแรงตึงผิวได้มาก จากการทดลองของ Deziel และคณะ (1996) พบว่าแรมโนลิปิดสามารถลดแรงตึงผิวของน้ำจาก 72 มิลลินิวตันต่อเมตรเป็น 29 มิลลินิวตันต่อเมตร การศึกษากระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวส่วนใหญ่จะอาศัยการวัดค่าแรงตึงผิวที่ลดลง (Robert และคณะ, 1989 ; Zhang และ Miller, 1992 ; Deziel และคณะ, 1996) เพื่อทำนายการเกิดกระบวนการผลิตของผลิตภัณฑ์

นอกจากนี้การวัดปริมาณของผลิตภัณฑ์อาศัยกระบวนการวิเคราะห์เชิงปริมาณทางเคมี ซึ่งมีวิธีหลายวิธีที่นำมาใช้ทดสอบนั้น การสกัดแยกเอาผลิตภัณฑ์ที่ต้องการออกจากน้ำหมักจะทำให้การตรวจสอบด้วยวิธีการต่าง ๆ มีความถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น เนื่องจากแรมโนลิปิดสามารถละลายในสารละลายของเมทานอล, คลอโรฟอร์ม, เอทิลอะซิเตรท, เอทิลอีเธอร์ หรือไซเดียม ไบคาร์โบเนตได้ดี (Iton และคณะ, 1971) ดังนั้นสารละลายผสมของสารดังกล่าวจึงได้นำมาใช้สกัดแยกแรมโนลิปิดออกจากน้ำหมัก การสกัดแยกด้วยตัวทำละลายทั้ง Iton และคณะ (1971) และ Van Dyke และคณะ (1993) ใช้เอทิลอะซิเตรทเป็นตัวสกัดแยกเอาแรมโนลิปิดออกจากน้ำหมัก ในขณะที่ Zhang และ Miller (1992) ใช้สารละลายที่ผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและเอทานอลเป็น 2:1 ในการสกัดเพื่อทำให้บริสุทธิ์ขึ้นก่อนวิเคราะห์ด้วยกระบวนการทางเคมีดังนี้

3.4.1.1 การทดสอบด้วยวิธีน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) การตรวจสอบน้ำตาลด้วยวิธีนี้ สารออกซิไดซ์ เช่น  $\text{Cu}^{++}$  tartrate (Fehing's solution) หรือ  $\text{Cu}^{++}$  Citrate (Benedicts solution) ในสารละลายที่เป็นต่างจะทำปฏิกิริยากับหมู่  $-\text{OH}$  อิสระของน้ำตาลในตำแหน่งคาร์บอนที่หนึ่ง และได้ตะกอนสีแดงของ cuprous oxide ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ) จากโครงสร้างของน้ำตาลแรมโนส ตำแหน่งของคาร์บอนที่หนึ่งมีหมู่  $-\text{OH}$  อิสระที่สามารถรีดิวซ์เกลือของโลหะได้ วิธีนี้ Hisatsuka และคณะ (1971) ได้นำมาทดสอบหาปริมาณของแรมโนลิปิดจากน้ำตาลแรมโนสที่เกิดจากกระบวนการเลี้ยง *P. aeruginosa* S<sub>7</sub>B<sub>1</sub>

3.4.1.2 การทดสอบโดยอาศัยการเกิดเฟอร์ฟูรอล (furfural) โดยการต้มน้ำตาลกับกรดเข้มข้น จะทำให้น้ำตาลสูญเสียน้ำและเกิดเป็นอนุพันธ์ของเฟอร์ฟูรอล ซึ่งสามารถรวมตัวกับสารประกอบประเภทฟีนอล (phenol) เช่น ออซินอล (orcinol) ให้สารสีน้ำเงินเขียว (Deziel และคณะ, 1996 ; Matsufuji และคณะ, 1997) แอลฟาแนพทอล ( $\alpha$ -naphthol) ให้สารสีม่วงแดง (Robert และคณะ, 1989) แอนโทรน (anthrone) ให้สารสีเขียว (Iton และคณะ, 1971; Zhang และ Miller , 1992) หรือรีซอลซินอล (resorcinol) เป็นต้น ซึ่งความเข้มของสีจะแปรไปตามปริมาณของน้ำตาล

### 3.4.2 การวิเคราะห์โดยวิธีโครมาโตกราฟี

วิธีนี้ช่วยให้การตรวจสอบชนิดและปริมาณของสารประกอบที่มีปริมาณเพียงเล็กน้อยทำได้สะดวกและถูกต้อง โครมาโตกราฟีแบ่งออกได้เป็นหลายประเภท แต่ที่นำมาประยุกต์ใช้ในการสกัดแยกแรมโนลิปิดมีดังต่อไปนี้

3.4.2.1 ทินแลเยอร์โครมาโตกราฟี (Thin Layer Chromatography) ใช้ซิลิกาเจลเตรียมเป็นแผ่นบาง ๆ บนกระดาษและจุดสารที่ต้องการสกัดแยกบนแผ่นซิลิกาเจล โดยใช้ตัวทำ

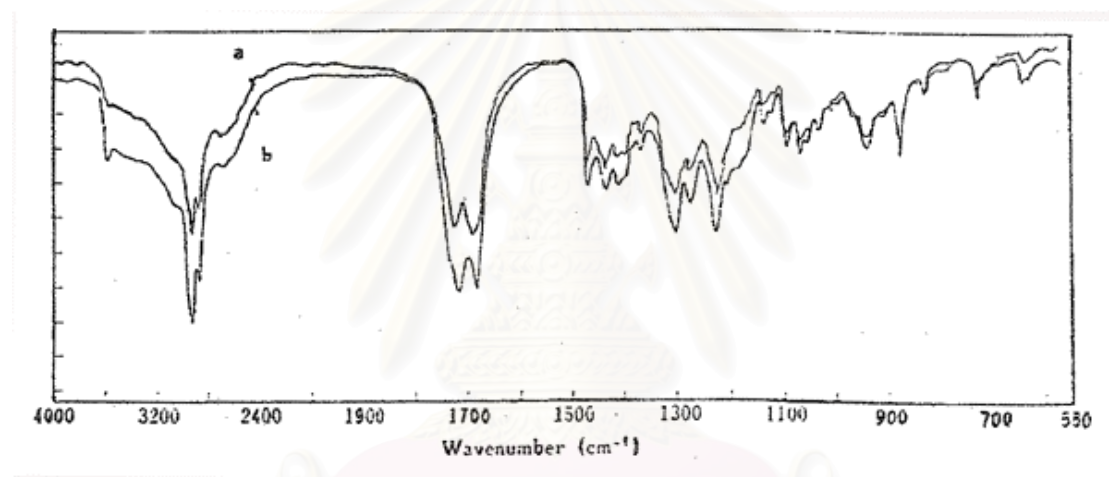


ละลายที่เหมาะสม การศึกษาการแยกแรมโนลิปิดที่ผลิตได้จากกระบวนการเลี้ยง *P. aeruginosa* บนพาราฟินให้ผลิตภัณฑ์ของแรมโนลิปิด 2 ตัว คือ แรมโนลิปิด 1 (R1) และแรมโนลิปิด 2 (R2) การสกัดแยกบนดินแลเยอร์โครมาโตกราฟีเมื่อใช้สารละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็นสารละลายผสมของคลอโรฟอร์ม: เมทานอล: อะซิติกแอซิดเป็น 80:15:5 พบว่าค่ารีทาเดชัน แฟกเตอร์ (Retardation Factor, Rf) ของแรมโนลิปิด 1 และแรมโนลิปิด 2 มีค่าเป็น 0.4 และ 0.8 ตามลำดับ (Iton และคณะ, 1971) และการศึกษาเกี่ยวกับการแยกผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยง *P. aeruginosa* CFTR-6 บนแผ่นซีลิกาเจล ให้ผลค่ารีทาเดชัน แฟกเตอร์ของแรมโนลิปิด 1 และแรมโนลิปิด 2 เช่นเดียวกัน (Ramana และ Karanth, 1989) สำหรับการศึกษาการสกัดแยกของ Van Dyke (1993) ใช้ไอโซโพรพานอล (isopropanol): น้ำ: แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ในอัตราส่วน 80:11:9 ในการชะจะได้ค่ารีทาเดชัน แฟกเตอร์ของแรมโนลิปิด 1 และแรมโนลิปิด 2 คือ 0.4 และ 0.55 ตามลำดับ

การสกัดแยกน้ำมันที่ได้จากการเลี้ยง *P. aeruginosa* GL1 โดยใช้ คลอโรฟอร์ม: เมทานอล: กรดอะซิติก (60:15:2) บนดินแลเยอร์โครมาโตกราฟี สังเกตการแยกด้วยไอเอ็มตัวของ ไอโอดีนหรือใช้สารโมลิช รีเอเจน (Molish reagent) จะได้ค่ารีทาเดชันแฟกเตอร์ของแรมโนลิปิด 1 แรมโนลิปิด 2 แรมโนลิปิด 3 และแรมโนลิปิด 4 เป็น 0.31, 0.72, 0.13 และ 0.40 ตามลำดับ (Arino และคณะ, 1996)

เนื่องจากโมเลกุลของแรมโนลิปิดประกอบด้วยส่วนของน้ำตาลแรมโนสเชื่อมต่อกับไฮดรอกซิลแพตตีแอซิด (hydroxyl fatty acid) การสaponified ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มอล (normal) ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เพื่อแยกส่วนประกอบทั้งสองส่วนออกจากกัน ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายให้มีค่าเป็น 2 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก และแยกส่วนของไฮดรอกซิลแพตตีแอซิดจากสารละลายด้วยเอทิลอะซิเตรทในชั้นน้ำ หลังจาก

ผ่านเอทิลอะซิเตรทจะได้ส่วนของน้ำตาลโมเลกุลเชิงเดี่ยว (monosaccharide) อีสารละลายอยู่ในน้ำ นำมาตรวจสอบด้วยวิธีการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่อไป สารละลายของเอทิลอะซิเตรทนำมาจุดบนแผ่นซิลิกาเจล มีสารละลายที่ใช้เป็นตัวชะประกอบด้วยปิโตรเลียมอีเธอร์: เอทิลอีเธอร์: กรดอะซิติกในอัตราส่วน 70:30:1 หลังจากทดสอบด้วยสารแอนโรน พบว่ามีการแยกออกเป็น 2 ส่วน จากการตรวจสอบด้วยเครื่องสเปกตรัม (IR spectrum) และเปรียบเทียบผลกับกรดไขมันไฮดรอกซิลมาตรฐานได้เส้นกราฟคล้ายกันดังแสดงในรูปที่ 3.2 (Hisatsuka และคณะ, 1971)



รูปที่ 3.2 สเปกตรัมที่ได้หลังจากผ่านเครื่องวิเคราะห์โครงสร้างของกรดไขมันที่ได้จากการสกัดแยกจากน้ำมันัก (Hisatsuka และคณะ, 1971)

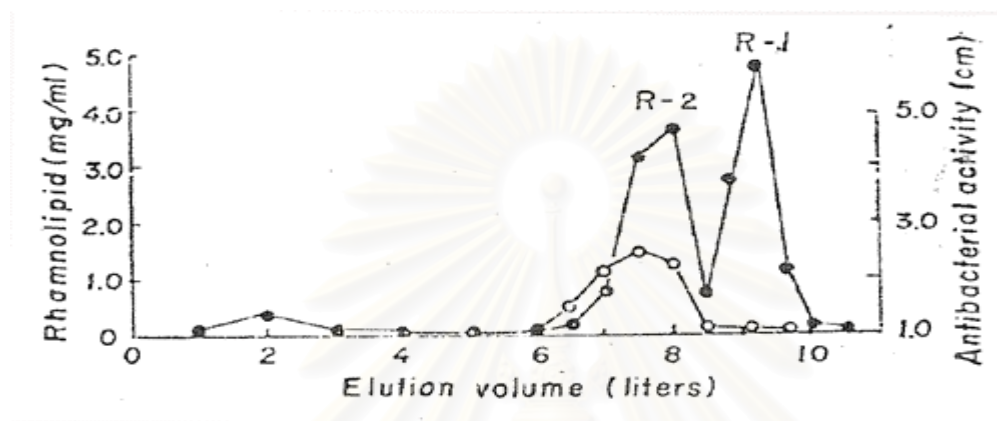
a กรดไขมันจากกระบวนการหมัก

b กรดไขมันจากแรมโนลิปิดมาตรฐาน

#### 3.4.2.2 คอลัมน์โครมาโตกราฟี (Column Chromatography) จะใช้ซิลิกา

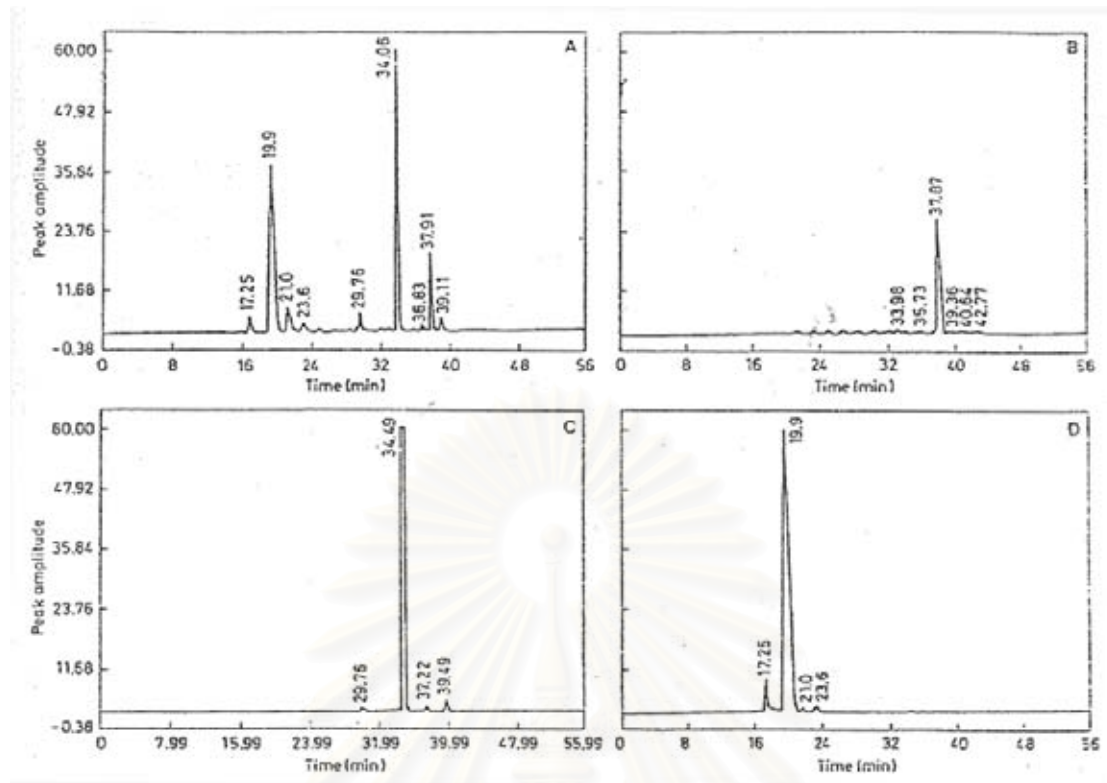
เจลบรรจุในหลอดแก้วหรือท่อแก้ว เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมสารให้บริสุทธิ์ สารต่างชนิดกันจะเคลื่อนบนตัวกลางของซิลิกาเจลด้วยความเร็วแตกต่างกัน ตัวอย่างการแยกของแรมโนลิปิดที่ได้จากกระบวนการหมัก โดยการใช้คอลัมน์กรดซิลิซิค (column of silicic acid) นำมาใช้

แยกแรมโนลิปิด 1 และแรมโนลิปิด 2 ออกจากกัน ตัวชะที่ใช้เป็นสารผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและเมทานอล พบว่าแรมโนลิปิด 2 จะถูกชะแยกออกมาที่สัดส่วนของคลอโรฟอร์มและเมทานอลเป็น 97:3 ส่วนแรมโนลิปิด 1 จะถูกชะตามออกมาที่สัดส่วนของคลอโรฟอร์มและเมทานอลเป็น 93:7 แสดงดังรูปที่ 3.3



รูปที่ 3.3 คอลัมน์ โครมาโตแกรมของแรมโนลิปิด (Iton และคณะ, 1971)

3.4.2.3 ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิกวิด โครมาโตกราฟี (High Performance Liquid Chromatography) เครื่องมือนี้ใช้ในการวิเคราะห์สารประกอบที่อยู่ในรูปของเหลว สารละลายที่เหมาะสมซึ่งใช้เป็นตัวพาสารผลิตภัณฑ์ผ่านของเหลวที่ถูกขับไว้บนผิวคอลัมน์ ภายใต้ภาวะความดันสูงความสามารถในการละลายของสารผลิตภัณฑ์ในสารละลายตัวพาและของเหลวที่ผิวคอลัมน์ต่าง ๆ จะถูกผลักดันให้ออกจากคอลัมน์ในเวลาที่แตกต่างกัน สารที่จะนำมาแยกด้วยไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิกวิด โครมาโตกราฟีจะต้องทำให้มีความบริสุทธิ์ ตัวอย่างของไกลโคลิปิดที่ได้จากกระบวนการหมักก่อนผ่านการแยกด้วยไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิกวิด โครมาโตกราฟีจะต้องผ่านขั้นตอนการแยกบนทินแลเยอร์โครมาโตกราฟีมาแล้ว สารละลายที่นำมาใช้เป็นตัวพาจะใช้สารละลายอะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile) ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ไหลผ่านคอลัมน์ด้วยอัตรา 1 มิลลิลิตรต่อนาทีเป็นเวลา 40 นาที (Arino และคณะ, 1996) เวลาที่แรมโนลิปิดชนิดต่าง ๆ ที่ได้จากการเลี้ยง *P. aeruginosa* GL1 ไหลผ่านออกจากคอลัมน์แสดงดังรูปที่ 3.4

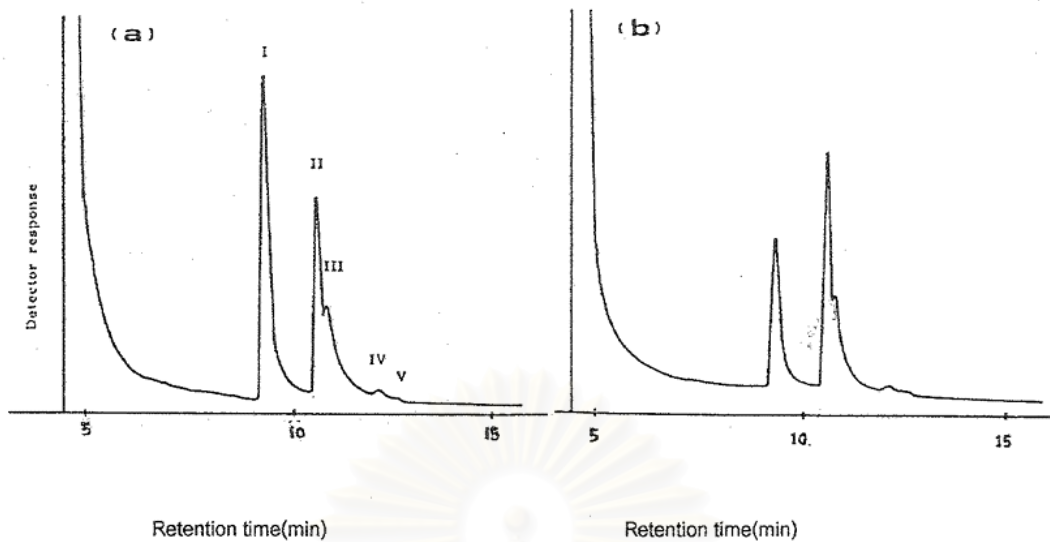


รูปที่ 3.4 การแยกของแรมโนลิปิดชนิดต่าง ๆ เมื่อผ่านด้วย  
ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิกวิด โครมาโตกราฟี โดยอาศัย  
ตัวชะที่มีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น (gradient)  
(Arino และคณะ, 1996)

- a โครมาโตแกรมของสารแรมโนลิปิด
- b โครมาโตแกรมของแรมโนลิปิด 2
- c โครมาโตแกรมของแรมโนลิปิด 1
- d โครมาโตแกรมของแรมโนลิปิด 3

#### 3.4.2.4 แก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography) เครื่องมือนี้ใช้ใ้

การแยกสารประกอบที่ระเหยได้ สารประกอบที่จะนำมาตรวจสอบด้วยแก๊สโครมาโตกราฟีจะต้องไม่มีสารประกอบที่ระเหยไม่ได้ปนอยู่ และเมื่อฉีดสารที่ต้องการตรวจสอบเข้าไปในเครื่องสารนั้นจะถูกความร้อนเปลี่ยนให้เป็นแก๊สและถูกแก๊สเฉื่อยผลักดันไปตามท่อและคอลัมน์ สารประกอบที่ไม่ระเหยเมื่อถูกความร้อน ถ้าสามารถนำมาทำปฏิกิริยาให้เป็นสารประกอบที่ระเหยได้ จะสามารถนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ได้ เช่นการตรวจสอบองค์ประกอบในส่วนที่ไม่มีหัวของแรมโนลิปิด 1 และแรมโนลิปิด 2 แรมโนลิปิดทั้งสองจะประกอบด้วยส่วนของน้ำตาลแรมโนสเชื่อมต่อกับโมเลกุลของกรดไขมันไฮดรอกซี (hydroxy fatty acid) สามารถแยกส่วนประกอบทั้งสองออกจากกันด้วยการไฮโดรไลซ์โดยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2 นอร์มอล ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ในเวลา 2 ชั่วโมง สกัดส่วนของกรดไขมันด้วยโทลูอิน (toluene) กรดไขมันในโทลูอินจะทำให้เป็นสารประกอบของหมู่เอสเทอร์ โดยใช้สารประกอบระหว่างเมธานอลและกรดซัลฟูริก สารที่ได้เป็นไตรเมทิลไซริวเอสเทอร์ (Trimethylsilyl (TMS) ester) และนำไปตรวจสอบด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี แรมโนลิปิดทั้งสองจะให้พีคออกมา 5 พีค (I – V) ที่เวลา 9.2(I), 10.6(II), 10.7(III), 12.1(IV), และ 12.5(V) นาที ตามลำดับแสดงดังรูปที่ 3.5 จากการตรวจสอบด้วยเครื่อง แก๊สโครมาโตกราฟีและแมสสเปกตรัม (Mass Spectra) เปรียบเทียบกับไตรเมทิลไซริวเอสเทอร์ (TMS-derivative) ที่ได้จากเมทิลปีตาไฮดรอกซีวเดคาโนเอทมาตรฐาน พบว่าให้ผลเช่นเดียวกับพีค 1(I) สำหรับพีค 2 ถึง 5 ได้แสดงไว้ในงานวิจัยของ Yamakawa (1964) ซึ่งไม่ได้แสดงผลไว้ในที่นี้



รูปที่ 3.5 แก๊สโครมาโตกราฟของไตรเมทิลไซริวเอสเทอร์ (Hirayama และ Kato ,1982)

a ไตรเมทิลไซริวเอสเทอร์ที่ได้จาก แรมโนลipsoid 2

b ไตรเมทิลไซริวเอสเทอร์ที่ได้จาก แรมโนลipsoid 1

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## บทที่ 4

### อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการทดลอง

#### 4.1 อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

##### 4.1.1 อุปกรณ์

1. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator Shaker) รุ่น G-FS บริษัท Gasells Chaffur Labortechnik, Germany.
2. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น Kubota 5100 บริษัท Kubota Corporation, Japan.
3. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys บริษัท Spectronic Instruments, USA.
4. ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar Flow) รุ่น VS-124 บริษัท ISSCO, USA.
5. หม้อฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น HL24ADY บริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Tokyo, Japan.
6. ถังหมัก (Fermenter) ขนาด 10 ลิตร รุ่น Biostat<sup>®</sup> ED บริษัท B.Braun Biotech Internation, Germany.
7. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น MP220 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland.
8. ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (Hot Air Oven) รุ่น ULM 500 บริษัท Memmert, Germany.
9. เครื่องวัดค่าแรงตึงผิว (Ring Tensiometer) รุ่น K6 บริษัท Kruss, Germany.
10. เครื่องวิเคราะห์สาร HPLC รุ่น LC-3A บริษัท Shimadzu, Japan คอลัมน์ ZORBAX NH<sub>2</sub> 4.6mm\*25cm

11. แผ่นซิลิกาเจล 60 บริษัท E.Merk, Darmstadt, Germany
12. เครื่องระเหยภายใต้ภาวะสุญญากาศของศาลาเซสเซียส(Evaporator, B U CHI Rotavator R—3000, Switzerland)

#### 4.1.2 เคมีภัณฑ์

1. กรดไฮโดรคลอริก 35.4% [HCl] บริษัท BDH Laboratory Supplies, England.<sup>(1)</sup>
  2. คลอโรฟอร์ม [CHCl<sub>3</sub>] บริษัท Merck, Germany.<sup>(1)</sup>
  3. โซเดียมไฮดรอกไซด์ [NaOH] บริษัท Merck, Germany.<sup>(1)</sup>
  4. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต [Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O] บริษัท Carloerba. Italy.<sup>(2)</sup>
  5. แอมโมเนียมไนเตรท [NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>] บริษัท J.T.Baker, U.S.A.<sup>(1)</sup>
  6. เมทานอล [CH<sub>4</sub>O] บริษัท J.T.Baker, U.S.A.<sup>(2)</sup>
  7. เอทานอล 99.5% [C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O] บริษัท Carloerba, Italy.<sup>(2)</sup>
  8. ไอโอดีนชนิดเกล็ด บริษัท Univar, Australia.
  9. ไฮโดรเจนเปอร์ฟอสเฟต 85% [H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>] บริษัท Carloerba. Italy.<sup>(2)</sup>
  10. น้ำมันปาล์ม ของบริษัท มรกตอินดัสตรีส์ จำกัด Thailand.
  11. น้ำมันดิบ (crude oil) จากห้องทดลองของ Prof. Imanaka, U. of Kyoto, Japan.
  12. อาหารแข็ง NA (Nutrient broth) บริษัท Difco laboratories, U.S.A.
  13. ซิลิกาเจล 60 (Silica gel) บริษัท Merck, Germany
  14. โทลูอิน (Toluene) 99.5% บริษัท Merck, Germany
  15. กรดอะซิติก 100% [CH<sub>3</sub>COOH] บริษัท Merck, Germany<sup>(1)</sup>
  16. สารลดการเกิดฟอง (Antiform) บริษัท SIGMA
- (ความบริสุทธิ์ของสารเคมี (1) ระดับ Lab grade และ (2) ระดับ AR grade)

## 4.2 เชื้อจุลินทรีย์

ในการทดลองใช้เชื้อ *Pseudomonas* sp.A41 ได้จากการคัดแยกเชื้อในงานวิจัยของ อารีย์(2542) คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## 4.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

### 4.3.1 อาหารสำหรับเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

ใช้อาหารนิวเทรียนเอการ์แบบแข็งเอียง (nutrient agar slant) แสดงในภาคผนวก ก

### 4.3.2 อาหารเหลวสำหรับเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์

อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ปริมาตร 1 ลิตร แสดงในภาคผนวก ก

### 4.3.3 อาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ใช้สัดส่วนเดียวกับอาหารสำหรับเลี้ยงหัว

เชื้อแต่จะมีการเติมแหล่งอาหารคาร์บอนโดยใช้น้ำมันปาล์มตามความเหมาะสม

## 4.4 วิธีการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารนิวเทรียนเอการ์แบบแข็งเอียง (agar slant) ในหลอดฝาเกลียวขนาด 20 มิลลิลิตร ที่ภาวะเจริญเติบโต เชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกโดยอารีย์ (2542) คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นำมาเชยเชื้อลงบนอาหารนิวเทรียนเอการ์แบบแข็งเอียงในหลอดฝาเกลียวขนาด 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเจริญดีแล้ว เเทน้ำมันพาราฟินที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้ท่วมบนผิวอาหารนิวเทรียนเอการ์แบบแข็งเอียงในตู้ปลอดเชื้อ นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นการทำให้เซลล์อยู่ในสภาพไร้อากาศ เมื่อต้องการนำออกมาใช้จึงนำออกมาถ่ายเชื้อลงในอาหารนิวเทรียนเอการ์แบบแข็ง เพื่อเพิ่มปริมาณและบำรุงเซลล์ให้แข็งแรง ระหว่างการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

ลินทรียด์ด้วยวิธีนี้เชื่อจะไม่มีอาการเจริญเติบโตแบ่งตัว ดังนั้นจึงไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสายพันธุ์อย่าง  
แน่นอน

#### 4.5 ขั้นตอนการทดลอง

##### 4.5.1 การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์ตั้งต้น

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่เลี้ยงบนอาหารนิวเทรียนเอการ์แบบแข็งเอียงในหัวข้อ 4.4 มาเขี่ยลงบน  
อาหารนิวเทรียนเอการ์แบบแข็งเอียงในหลอดฝาเกลียวขนาด 20 มิลลิลิตร จำนวน 1 หลอด นำไป  
บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเชื้อในหลอดดังกล่าวมาเขี่ย  
ลงบนอาหารนิวเทรียนเอการ์แบบแข็งเอียงในหลอดฝาเกลียวขนาด 20 มิลลิลิตร จำนวน 6 หลอด  
อีกรอบหนึ่ง และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเช่นเดียวกัน จากนั้นล้าง  
เซลล์ออกจากอาหารนิวเทรียนเอการ์แบบแข็งเอียงด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ควบคุมความ  
เข้มข้นของสารละลายเซลล์ที่ได้ โดยอาศัยการวัดค่าการดูดกลืน ที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโน  
เมตร ให้อยู่ในช่วง 0.70-0.80 บีบอัดสารละลายเซลล์ 5 มิลลิลิตรที่ได้ ลงในอาหารเลี้ยงหัวเชื้อที่  
ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ด้วยวิธีการ  
ปลอดเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มในเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศา  
เซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง

##### 4.5.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อในถังหมัก

ในการเพาะเลี้ยงเชื้อในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง (ดังรูปที่ 4.1) โดยถ่ายเชื้อตั้งต้น (จากข้อ

4.5.1) ปริมาณ 400 มิลลิลิตร ลงในถังหมักที่มีอาหารเหลว 5,000 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่  
อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เปลี่ยนแปลงปริมาณของน้ำมันปาล์ม ค่าความเป็นกรด – ด่าง และ  
อัตราการกวนต่าง ๆ ตามความเหมาะสม ค่าการละลายของอากาศถูกควบคุมที่ค่า 60 เปอร์เซ็นต์

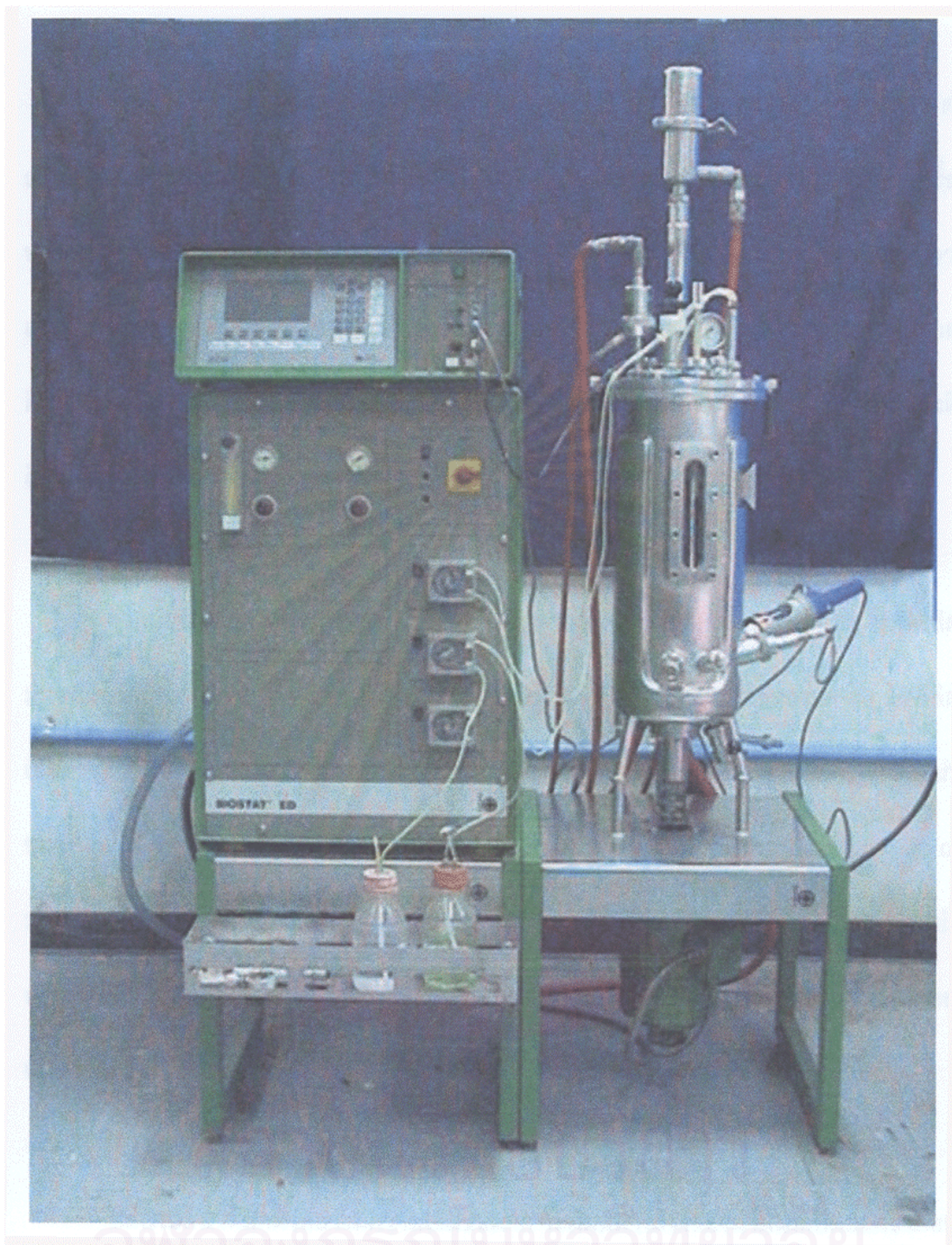
ของอากาศอิมตัว ควบคุมค่าความเป็นกรด – ด่าง ด้วยไฮเดียมไฮดรอกไซด์และกรดไฮโดรคลอริก  
เข้มข้น 1 โมลาร์

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่องเป็นเวลา 30 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่าง  
ทุก ๆ 3 ชั่วโมง เป็นปริมาตร 40 มิลลิลิตร ตัวอย่างน้ำหมักทำการตรวจวัดปริมาณเซลล์ (กรัมต่อ  
ลิตร) ค่าการลดแรงตึงผิว (มิลลินิวตันต่อเมตร) และพื้นที่ผิวการแทนที่ของน้ำมัน (ตาราง  
เซนติเมตร)



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





รูปที่ 4.1 ถังหมักแบบไม่ต่อเนื่องขนาด 10 ลิตร



## 4.6 การติดตามการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง

### 4.6.1 การวัดค่าแรงตึงผิว

เก็บตัวอย่างน้ำหมักจากการเพาะเลี้ยง *Pseudomonas* sp.A41 ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่องทุก ๆ 3 ชั่วโมงเป็นเวลา 30 ชั่วโมง ปริมาตร 40 มิลลิลิตร มาปั่นแยกเซลล์ออกด้วยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นแยกส่วนน้ำใสออกจากเซลล์ นำส่วนน้ำใสไปทำการเจือจางที่อัตราส่วนน้ำหมักต่อน้ำเป็น 1:100 และ 1:200 โดยปริมาตร คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของน้ำหมักในน้ำเป็น 0.99 และ 0.50 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ นำไปวัดค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่องวัดแรงตึงผิว แสดงวิธีการใช้เครื่องวัดค่าแรงตึงผิวในภาคผนวก ค

### 4.6.2 การวัดการกระจายตัวของผิวน้ำมัน (oil displacement test)

จากน้ำหมักตัวอย่างที่แยกเซลล์ออกแล้วที่ได้จากหัวข้อ 4.6.1 แบ่งออกมา 10 ไมโครลิตร มาหยดบนผิวน้ำมันสังเกตค่าการกระจายตัวของผิวน้ำมัน ทำการทดลองโดยตวงน้ำ 40 มิลลิลิตร เทลงในจานแก้วเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 15 เซนติเมตร ซึ่งวางอยู่บนกระดาษกราฟที่ระบุขนาดของ 1 ช่องใหญ่บนกระดาษกราฟจะมีขนาดเท่ากับ 1 เซนติเมตร หยดน้ำมันดิบ (crude oil) ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ลงในน้ำจานแก้ว น้ำมันจะขยายตัวครอบคลุมบนผิวน้ำในจานแก้วอย่างสม่ำเสมอ หยดน้ำหมักตัวอย่างปริมาตร 10 ไมโครลิตร อ่านค่ารัศมีของวงน้ำมันที่ถูกเปิดออก และคำนวณหาพื้นที่โดยอาศัยสมการดังนี้

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

ในกรณีที่น้ำหมักตัวอย่างมีความเข้มข้นมาก จะมีผลทำให้วงของน้ำมันที่เปิดออกขาดออกจากกัน ให้เจือจางน้ำหมักลงจนกระทั่งทำการวัดขนาดของวงน้ำมันที่ถูกเปิดออกได้ แล้วค่อยคูณหาพื้นที่กลับด้วยค่าความเจือจาง (dilution factor)

### 4.6.3 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

จากน้ำหมักตัวอย่างปริมาตร 40 มิลลิลิตรที่ได้จากหัวข้อ 4.6.1 ปั่นแยกเซลล์ออกจาก ส่วนของน้ำหมัก โดยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 10 มิลลิลิตรและปั่นแยกน้ำล้างซ้ำอีกสองครั้ง แล้วนำเซลล์เปียกไปอบที่ 70 ถึง 80 องศา เซลเซียสทิ้งไว้ข้ามคืน นำไปชั่งน้ำหนักแห้งของเซลล์ด้วยเครื่องชั่งละเอียด จนได้น้ำหนักคงที่ คำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ในหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

## 4.7 การวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

### 4.7.1 การสกัดแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

นำน้ำหมักตัวอย่างปริมาตร 4 ลิตร ปั่นแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็ว รอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำน้ำหมักส่วนน้ำใสที่ได้ไปสกัดแยกสารลดแรงตึง ผิวชีวภาพ ด้วยการปรับค่าพีเอชด้วยกรดไฮโดรคลอริก 6.0 โมลาร์ จนมีค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 2.0 โมเลกุลสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะตกตะกอนแยกชั้นออกมา ควรตั้งทิ้งไว้ข้ามคืนที่ 4 องศา เซลเซียส เพื่อให้ตกตะกอนอย่างสมบูรณ์ จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนด้วยเครื่องหมุน เหวี่ยงความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส รวมตะกอนมาละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 2.0 จากนั้นนำสาร มาสกัดด้วยสารละลายคลอโรฟอร์มและเอทานอล อัตราส่วน 2:1 (Sim และคณะ, 1997) โดยใช้ กรวยแยก ทำการสกัดแยก 3 ครั้ง นำส่วนล่างของสารละลายมาระเหยด้วยเครื่องระเหยจนแห้ง ภายใต้ภาวะสุญญากาศ โดยควบคุมอุณหภูมิเครื่องระเหยที่ 40 องศาเซลเซียส ผลิตภัณฑ์ที่ได้ใส่ ขวดฝาเกลียว ชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน

#### 4.7.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

นำสารลดแรงตึงผิวที่ได้จากหัวข้อ 4.7.1 มาทำการวิเคราะห์องค์ประกอบด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง องค์ประกอบที่อยู่ในรูปของกรดไขมันถูกสกัดแยกด้วยโทลูอีนออกไป ส่วนของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพซึ่งละลายอยู่ในน้ำถูกนำมาตรวจสอบเปรียบเทียบกับน้ำตาลแรมโนสมมาตรฐานบนไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิควิด โครมาโตกราฟี

#### 4.7.3 ทดสอบความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

นำส่วนน้ำหมักตัวอย่างที่แยกเซลล์ออกแล้วจากหัวข้อ 4.6.1 ที่เวลา 30 ชั่วโมง ปริมาตร 10 มิลลิลิตรใส่ในหลอดฝาเกลียวขนาด 20 มิลลิลิตร วางไว้ในอ่างน้ำเดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บสารตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ทุก ๆ 10 นาที จนครบ 150 นาที นำมาทดสอบค่าแรงตึงผิว โดยนำมาผสมน้ำกลั่น 9.9 มิลลิลิตร คิดเป็นความเข้มข้นของน้ำหมักในน้ำ 0.99 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร วัดและบันทึกค่าแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเจอจางที่ได้ (Makkar and Cameota, 1998)

#### 4.7.4 ทดสอบการเกิดอิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

นำน้ำหมักตัวอย่างที่ทำการแยกเซลล์ออกแล้วจากหัวข้อ 4.6.1 ที่เวลา 30 ชั่วโมง ปริมาตร 20 มิลลิลิตร มาทดสอบการเกิดเป็นอิมัลชันกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนประเภทต่าง ๆ เลือกลักษณะของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนต่าง ๆ กัน เช่น ไฮโดรคาร์บอนโซ่ตรง หรืออะโรมาติก ไฮโดรคาร์บอน ขั้นตอนการทดลองทำโดยผสมน้ำหมัก 4 มิลลิลิตรกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอน 6 มิลลิลิตรในหลอดฝาเกลียวขนาด 15 มิลลิลิตร นำหลอดผสมดังกล่าวปิดฝาเกลียวเรียบร้อยมาปั่นที่ความเร็วสูง ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง และคำนวณหาค่าดรชนีของอิมัลชัน (Emulsion Index,  $E_{24}$ ) (Makkar and Cameota, 1998)

$$E_{24} = 100 \left( \frac{h_1}{h_2} \right)$$

เมื่อ  $h_1$  = ความสูงของชั้นอิมัลชัน

$h_2$  = ความสูงรวมของสารละลายทั้งหมดในหลอดฝาเกลียว

ตัวอย่างของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่นำมาทดสอบการเกิดอิมัลชัน ได้แก่ เฮปเทน, เฮกเซน, ไซโคลเฮกซีน, น้ำมันก๊าด, และน้ำมันพาราฟิน



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 5

### ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

การศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pseudomonas* sp.A41 ในกระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่องแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรกศึกษาถึงภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยการหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรด-ด่าง ความเร็วรอบไบควอน และค่าเปอร์เซ็นต์ของน้ำมันปาล์ม แสดงผลของความสัมพันธ์ในรูปแบบของอัตราการผลิตของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และอัตราการผลิตความเข้มข้นของเซลล์ โดยอาศัยการออกแบบการทดลอง (Experimental Design) มาช่วยในการวิเคราะห์หาภาวะที่เหมาะสม ส่วนในการทดลองขั้นตอนที่สองเป็นการศึกษาและตรวจสอบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *Pseudomonas* sp.A41

#### 5.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารลดแรงตึงผิว

##### 5.1.1 การวัดค่าแรงตึงผิว และการกระจายตัวบนผิวน้ำมัน

(Surfactension and Oil Displacement Test)

ในงานวิจัยนี้ทำการทดสอบค่าแรงตึงผิวและค่าการกระจายตัวบนผิวน้ำมันเพื่อแสดงแนวโน้มการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pseudomonas* sp. แต่ผลการทดลองในบางชุด พบว่าการทดสอบด้วยวิธีการวัดค่าแรงตึงผิวและค่าการกระจายตัวบนผิวน้ำมัน เพื่อแสดงเวลาที่จุลินทรีย์เริ่มหยุดการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการทดลองเดียวกันใช้เวลาไม่เท่ากัน สาเหตุพบว่าเป็นจากการเติมสารลดการเกิดฟอง (Antifoam) ลงไปในขณะทำการหมัก โดยให้ทำการทดสอบปริมาณของสารลดการเกิดฟองที่มีผลต่อการวิเคราะห์ด้วยวิธีการวัดค่าแรงตึงผิวและค่าการกระจายตัวบนผิวน้ำมัน ดังแสดงในตารางที่ 5.1 โดยในการทดลองแต่ละชุดในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

มีปริมาณฟองเกิดขึ้นไม่เท่ากัน ดังนั้นความจำเป็นในการเติมสารลดการเกิดฟองในแต่ละการทดลองจึงไม่เท่ากันด้วย แต่ปริมาณการเติมสารลดการเกิดฟองในการทดลองทุกชุดพบว่ามีค่าสูงสุดไม่เกิน 8 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และจากการทดสอบเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างที่ปริมาณของสารลดการเกิดฟองที่เพิ่มขึ้นพบว่าการเติมสารลดการเกิดฟองในปริมาณมากจะมีอิทธิพลต่อการตรวจสอบด้วยวิธีการกระจายบนผิวน้ำมันมากกว่าการวัดค่าแรงตึงผิว ดังนั้นการตรวจสอบด้วยวิธีการวัดด้วยการกระจายตัวบนผิวน้ำมันจะมีค่าเคลื่อนได้มากกว่า จึงเลือกวิธีการแสดงปริมาณของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *Pseudomonas* sp.A41 ด้วยการวัดค่าแรงตึงผิวเป็นสำคัญ



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ตารางที่ 5.1 ผลของปริมาณสารลดการเกิดฟองต่อค่าแรงตึงผิว และการกระจายตัวของน้ำมัน

ความเข้มข้นของสารลดการเกิดฟอง (%v/v)	ค่าแรงตึงผิวที่ระดับการเจือจาง 1:100 (มิลลินิวตันต่อเมตร)	ส่วนต่าง <sup>(1)</sup> (เปอร์เซ็นต์)	พื้นที่การกระจายตัวบนผิวน้ำมัน (ตร.ซม.)	ส่วนต่าง <sup>(2)</sup> (เปอร์เซ็นต์)
0	41.8	-	118.89	-
1	41.5	0.72	116.18	-2.28
2	41.8	0.00	124.42	4.65
4	41.4	0.96	124.42	4.76
6	41.0	1.91	135.86	14.27
8	39.2	6.22	160.24	34.78
10	35.8	14.35	179.84	51.27

(1) ส่วนต่าง =  $100 \times \frac{\text{ค่าแรงตึงผิว (ไม่มีสารลดการเกิดฟอง)} - \text{ค่าแรงตึงผิว (ปริมาณสารลดการเกิดฟองต่าง ๆ)}}{\text{ค่าแรงตึงผิว (ไม่มีสารลดการเกิดฟอง)}}$

(2) ส่วนต่าง =  $100 \times \frac{\text{การกระจายตัวบนผิวน้ำมัน (ไม่มีสารลดการเกิดฟอง)} - \text{การกระจายตัวบนผิวน้ำมัน (ปริมาณสารลดการเกิดฟองต่าง ๆ)}}{\text{ค่าการกระจายตัวบนผิวน้ำมัน (ไม่มีสารลดการเกิดฟอง)}}$

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 5.1.2 ความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์

จากนิยามในหัวข้อ 2.2 ความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์ (CMC) คือ ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวที่น้อยที่สุดที่ทำให้เกิดการรวมตัวเป็นไมเซลล์ ซึ่งความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์เป็นคุณสมบัติจำเพาะของสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิด ทำการทดลองหาความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์ในการทดลองตัวอย่างเพื่อแสดงว่าภาวะในการเพาะเลี้ยง *Pseudomonas* sp.A41 ต่างกันจะให้ผลของค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์เป็นอย่างไร โดยทำการทดลองที่ภาวะแตกต่างกัน 3 ชุด การทดลองดังนี้

การทดลองชุดที่ 1 การเพาะเลี้ยง *Pseudomonas* sp.A41 บนอาหารสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์ม 3 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ภาวะความเป็นกรด-ด่างที่ 6.5 และควบคุมความเร็วรอบใบกวนที่ 400 รอบต่อนาทีในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง วิเคราะห์หาความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์ เป็น 10 เปอร์เซ็นต์ (แสดงในภาคผนวกรูปที่ ๑1)

การทดลองชุดที่ 2 การเพาะเลี้ยง *Pseudomonas* sp.A41 บนอาหารสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์ม 2 เปอร์เซ็นต์ในขวดเขย่าที่ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 ชั่วโมง (โดยไม่ได้ควบคุมค่าความเป็นกรด - ด่าง) วิเคราะห์หาความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์เป็น 12 เปอร์เซ็นต์ (แสดงในภาคผนวกรูปที่ ๑2)

การทดลองชุดที่ 3 การเพาะเลี้ยง *Pseudomonas* sp.A41 บนอาหารสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์ม 2.1 เปอร์เซ็นต์ ภาวะความเป็นกรด-ด่างที่ 7.0 และควบคุมความเร็วรอบใบกวนที่ 675 รอบต่อนาทีในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง เป็นเวลา 30 ชั่วโมง วิเคราะห์หาความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์เป็น 6 เปอร์เซ็นต์ (แสดงในภาคผนวกรูปที่ ๑3)

จากการทดลองพบว่าที่ภาวะแตกต่างกันจะให้ค่าความเข้มข้นวิกฤตต่างกัน ทั้งในระบบที่ทำการหมักในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง และระบบของขวดเขย่า หรือกล่าวได้ว่าการเพาะเลี้ยง *Pseudomonas* sp.A41 ในภาวะต่างกัน น่าจะให้ผลิตภัณฑ์ที่ออกมาแตกต่างกัน

เนื่องจากค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์ที่ได้จากการทดลองทั้ง 3 ภาวะให้ค่าแตกต่างกัน คาดว่าการเพาะเลี้ยง *Pseudomonas* sp.A41 น่าจะผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากกว่าหนึ่งชนิด และในงานวิจัยของอารีย์ (2542) ทำการเพาะเลี้ยง *Pseudomonas* sp.A41 เพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่จุลินทรีย์ผลิตได้มาทำบริสุทธิ์บางส่วน และวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC ปรากฏว่าสามารถแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้เป็น 4 ส่วนที่มีค่ารีทาร์เดชัน แฟกชัน (Retardation Fraction) ต่างๆกัน 4 ค่า การคำนวณหาค่าของความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์เฉลี่ยสมมาตรได้จากสมการต่อไปนี้ (Clint, 1992)

$$CMC = x_1 CMC_1 + x_2 CMC_2 + x_3 CMC_3 + x_4 CMC_4$$

เมื่อ  $x_1, x_2, x_3,$  และ  $x_4$  คือ สัดส่วนเชิงโมลของสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้ชนิดที่ 1, 2, 3, และ 4 ตามลำดับ

และ  $CMC_i$  คือค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแต่ละชนิด โดยที่  $i$  แสดงชนิดที่ 1 ถึง 4

จากภาวะที่ใช้เพาะเลี้ยง *Pseudomonas* sp.A41 แตกต่างกันทำให้การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแต่ละชนิดแตกต่างกัน ค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์จึงมีค่าไม่เท่ากัน ในงานวิจัยนี้ ติดตามการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากความสามารถในการลดแรงตึงผิวที่ลดลงของน้ำ ไม่ได้ทำการแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแต่ละชนิดที่เวลาต่าง ๆ มาทำการวิเคราะห์ โดยความสามารถของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแต่ละชนิดสามารถลดแรงตึงผิวของน้ำได้แตกต่างกัน ในที่นี้จะสมมติให้สารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิดที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยง *Pseudomonas* sp.A41 มีความ

สามารถในการลดแรงตึงผิวของน้ำได้เท่ากัน ดังนั้นปริมาณของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ถูกผลิตเพิ่มขึ้น ( $\Delta P$ ) จะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับค่าของแรงตึงผิวที่ลดลง ( $-\Delta s$ ) ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ในภาคผนวก จ

## 5.2 รูปแบบการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

งานวิจัยนี้มุ่งศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวของ *Pseudomonas* sp.A41 จากน้ำมันปาล์มซึ่งเป็นวัตถุดิบที่มีราคาถูกและหาได้ง่าย

จากลักษณะของน้ำมันปาล์ม เมื่อนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารคาร์บอนโดยเติมเข้าไปผสมในแหล่งอาหารกำหนดสูตร (defined medium) (แสดงส่วนประกอบของแหล่งอาหารกำหนดสูตรในภาคผนวก ก) น้ำมันปาล์มจะอยู่แยกชั้นจากชั้นน้ำ จุลินทรีย์ที่จะกระจายตัวอยู่ในชั้นน้ำจะสัมผัสกับน้ำมันปาล์มและนำเอาน้ำมันปาล์มไปใช้ในการเจริญได้น้อย แต่ผลการทดลองของ Robert และคณะ (1989) พบว่าน้ำมันมะกอกให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงสุด ซึ่งอธิบายด้วยกลไกการนำเอาแหล่งอาหารคาร์บอนที่เป็นน้ำมันเข้าสู่เซลล์เนื่องจาก *Pseudomonas* sp. เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวออกมาภายนอกเซลล์ได้ดังได้กล่าวแล้วในหัวข้อ 3.2 ทั้งนี้เนื่องจากลักษณะของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิว ซึ่งประกอบด้วยส่วนที่มีขั้ว และส่วนที่ไม่มีขั้วอยู่ด้วยกัน น้ำมันซึ่งเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ไม่มีขั้ว จึงสามารถกระจายตัวเป็นหยดเล็ก ๆ (ขนาดของแมคโครอิมัลชันประมาณระดับไมโครเมตร) (Binks, 1993) อยู่ในชั้นน้ำ โดยโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวจะรวมตัวกันเป็นไมเซลล์ หันด้านที่ไม่มีขั้วไปทางหยदन้ำมันและด้านที่มีขั้วไปด้านของน้ำ โอกาสของการสัมผัสของหยदन้ำมันกับจุลินทรีย์จะมีมากขึ้น ทำให้จุลินทรีย์นำเอาน้ำมันซึ่งเป็นสารอาหารคาร์บอนไปใช้ในการเจริญมากขึ้น

การเพาะเลี้ยง *Pseudomonas* sp.A41 ในอาหารเหลวกำหนดสูตร (defined medium) ที่มีการเติมน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน ควบคุมภาวะความเป็นกรด-ด่างและความเร็วรอบใบกวนต่าง ๆ กัน ที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 2$  องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างน้ำหมักทุก 3 ชั่วโมงไปปั่นแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แยกส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์หาค่าแรงตึงผิว และค่าการกระจายตัวของน้ำมัน เซลล์ที่แยกน้ำออกแล้วจะนำไปอบแห้ง และคำนวณหาความเข้มข้นของเซลล์

ผลการทดลองตัวอย่างของ *Pseudomonas* sp.A41 ที่มีการเติมน้ำมันปาล์ม 2.3 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ควบคุมภาวะความเป็นกรด-ด่างที่ 7.0 และความเร็วรอบใบกวนเป็น 675 รอบต่อนาที แสดงผลในรูปที่ 5.1

ลักษณะของกราฟรูปที่ 5.1 แสดงถึงความสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นระหว่างการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของเซลล์และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ กล่าวคือเมื่อมีการเพิ่มขึ้นของเซลล์ จะเกิดการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มขึ้นด้วย และที่ความเข้มข้นของเซลล์สูงสุดที่ 2.59 กรัมต่อลิตร ค่าแรงตึงผิวที่ทำการเจือจางน้ำหมักในสัดส่วน 1:100 วัดได้ค่าเฉลี่ยคงที่ได้เป็น 36.7 มิลลินิวตันต่อเมตร โดยค่าแรงตึงผิวที่วัดได้มีค่าลดลงจากเวลาเริ่มต้น 47.3 เปอร์เซ็นต์ จากลักษณะความสัมพันธ์ดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่าเป็นการผลิตสารลดแรงตึงผิวมีลักษณะที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (Growth Associate Product)

ในงานวิจัยนี้ไม่ได้ทำการวัดปริมาณของน้ำมันปาล์มในแต่ละช่วงเวลา สาเหตุมาจากคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Pseudomonas* sp. ซึ่งถูกผลิตออกมาภายนอกเซลล์นั้นสามารถเกิดการรวมตัวกับหยดของน้ำมันในรูปของไมเซลล์ได้ และจากโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะมีกรดไขมันเป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย ดังนั้นการวิเคราะห์หา

ปริมาณของน้ำมันปาล์มเพื่อแสดงปริมาณของน้ำมันที่เหลือในแต่ละช่วงเวลาจึงเป็นไปได้ยากและอาจเกิดความผิดพลาดขึ้นได้มาก

หลังจากการเลี้ยง *Pseudomonas* sp.A41 เป็นเวลา 15 ชั่วโมง สังเกตเห็นความเข้มข้นของเซลล์ที่มีแนวโน้มลดลง สาเหตุสำคัญน่าจะเกิดจากการขาดแคลนสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต แต่สารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญนอกจากแหล่งอาหารคาร์บอนแล้ว แหล่งอาหารไนโตรเจนก็เป็นแหล่งอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เช่นกัน จากงานวิจัยของอารีย์ (2542) ศึกษาปริมาณของแหล่งคาร์บอน (น้ำมันปาล์ม) และแหล่งไนโตรเจน (ไซเดียมไนเตรท) ที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็น 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และ 0.3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักตามลำดับ ในงานวิจัยนี้ใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในการเพาะเลี้ยง *Pseudomonas* sp.A41 ชนิดเดียวกัน และปริมาณของแหล่งไนโตรเจนควบคุมปริมาณเริ่มต้นที่ 0.3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ขององอาจและจินตนา (2537) ซึ่งศึกษาองค์ประกอบของน้ำมันปาล์ม (น้ำมันมรกต) องค์ประกอบของน้ำมันปาล์มแสดงในตารางที่ 5.2

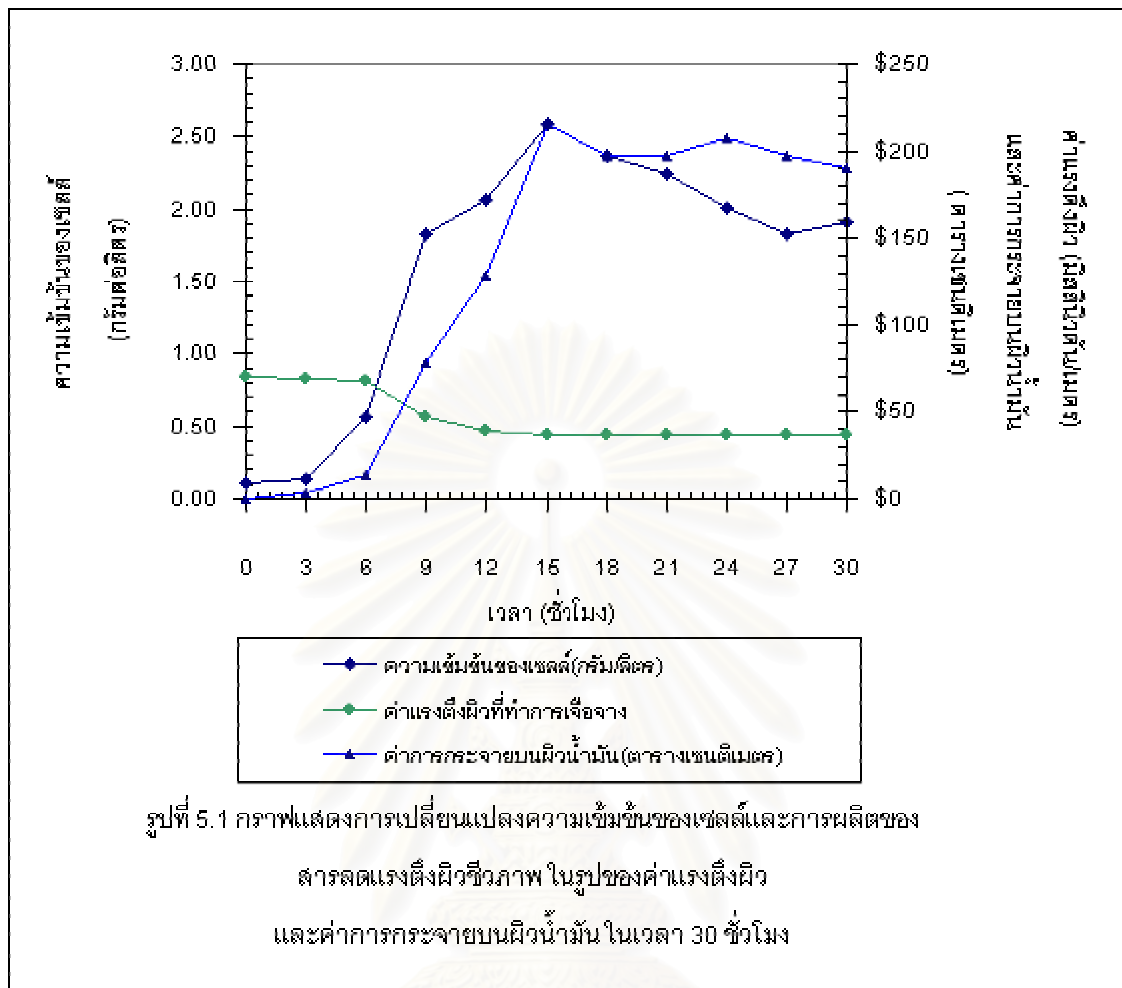
ตารางที่ 5.2 แสดงองค์ประกอบของน้ำมันปาล์ม

ประเภทของกรดไขมัน	ชื่อสามัญ	เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก	น้ำหนักโมเลกุล
- Dodecanoic acid (12:0)	Lauric	1.32	200
- Tetradecanoic acid (14:0)	Myristic	1.61	228
- 14-Methyl-petadecanoic acid (16:0)	Palmitic	38.84	256
- 9,11-Octadecanoic acid (18:2)	Linoleic	10.76	280
- 9-Octadecanoic acid (18:1)	Oleic	4.34	282
- Ocyadecanoic acid (18:0)	Stearic	5.13	284



จากองค์ประกอบของน้ำมันปาล์มดังกล่าวคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ปริมาณของคาร์บอนในน้ำมันปาล์มเป็น 75.6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ดังนั้นจะได้สัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนโดยประมาณเป็น 12:1 (คำนวณจากน้ำมันปาล์มเริ่มต้นเป็น 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรและแอมโมเนียมไนเตรตเริ่มต้น 0.3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์, ความหนาแน่นน้ำมันปาล์ม 0.87 กรัมต่อมิลลิลิตร) แต่สัดส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนของจุลินทรีย์ที่ใช้ในสร้างเซลล์โดยทั่วไปเป็น 5:1 (Bailey และ Ollis, 1986) ในขณะที่ผลิตภัณฑ์ของแรมโนลิปิดจะไม่มียังองค์ประกอบของไนโตรเจน ดังนั้นจะเห็นว่าในกรณีนี้ *Pseudomonas* sp. มีการเจริญเติบโตและมีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพก็อาจจะเกิดภาวะขาดแคลนแหล่งอาหารไนโตรเจนเพราะสัดส่วนของไนโตรเจนมีน้อยกว่าคาร์บอน ดังนั้นปริมาตรของน้ำมันปาล์มเริ่มต้นที่เดิมมากกว่า 2 เปอร์เซ็นต์ในบางชุดของการทดลองอาจมีน้ำมันปาล์มเหลือบางส่วน แต่ไม่สามารถสังเกตเห็นได้เนื่องจากน้ำมันปาล์มสามารถรวมตัวกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นอิมัลชันอยู่ในน้ำหมัก และผลของการหยุดการเจริญเติบโตจะมีสาเหตุมาจากการขาดแหล่งไนโตรเจน

ในหัวข้อต่อไปจะเป็นการศึกษาถึงอิทธิพลของความเป็นกรด-ด่าง, ความเร็วรอบใบกวน, และเปอร์เซ็นต์แหล่งคาร์บอนต่อการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ



### 5.3 ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ในการหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้อาศัยข้อมูลที่ได้จากการคำนวณหาค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ และอัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะมาใช้เป็นตัวแปรตามผลของตัวแปรดำเนินการ (operating parameters) ซึ่งประกอบด้วยภาวะความเป็นกรด-ด่าง ความเร็วรอบใบกวนภายในถังหมัก และเปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรของน้ำมันปาล์มต่างๆกันที่ใช้เป็นแหล่งอาหารคาร์บอน ทำการทดลองโดยนำเอาทฤษฎีการออกแบบการทดลอง (experimental design) มาใช้เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมของตัวแปรทั้งสาม การออกแบบการทดลองประกอบด้วยวิธีการทดลองแบบแฟกเตอร์เรียล การทดลองล้อมรอบจุดกึ่งกลาง และการทดลองซ้ำที่จุดกึ่งกลาง ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ ข1

การวางแผนการออกแบบการทดลองถูกนำมาใช้ในการหาภาวะที่เหมาะสมนั้นในงานวิจัยนี้มีประโยชน์หลายประการดังต่อไปนี้

- สามารถบ่งชี้ความสำคัญและอิทธิพลของตัวแปรดำเนินการที่มีต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์และอัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะ
- ทำให้การรวบรวมข้อมูลทำได้อย่างครอบคลุม
- เป็นการนำวิธีการทางสถิติมาใช้ควบคู่กับการทดลองอย่างถูกต้องตามหลักวิชาการทางสถิติ ทำให้ผลการทดลองที่ได้มีความน่าเชื่อถือ

#### 5.3.1 อิทธิพลของตัวแปรดำเนินการ (Operating Parameters)

ในงานวิจัยนี้สนใจศึกษาถึงอิทธิพลของตัวแปรดำเนินการซึ่งประกอบด้วย ค่าความเป็นกรด-ด่าง ความเร็วรอบใบกวนภายในถังหมัก และเปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรของน้ำมันปาล์ม ที่มีต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ และอัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะของ *Pseudomonas* sp.A41 โดยจะแยกประเด็นตามตัวแปรดำเนินการดังนี้

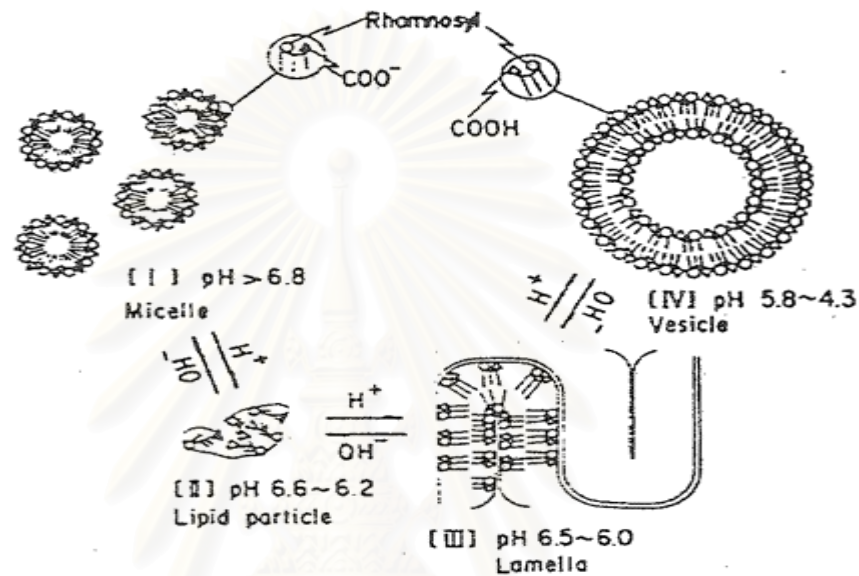
### 5.3.1.1 อิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่าง

ภาวะความเป็นกรด-ด่างของระบบการหมักเป็นตัวแปรหนึ่งที่น่าสนใจที่นำมาศึกษาวิจัยถึงอิทธิพลที่มีต่อการเจริญเติบโตของ *Pseudomonas* sp.A41 โดยควบคุมภาวะค่าความเป็นกรด-ด่างคงที่ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 โมลาร์ หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 โมลาร์ เนื่องจากมีผู้วิจัยพบว่ากระบวนการเจริญเติบโตของ *Pseudomonas* sp. บนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจะมีความเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเติมสารลดแรงตึงผิวลงในน้ำหมัก (Hisatsuka และคณะ, 1971) ดังนั้นสารลดแรงตึงผิวน่าจะมีส่วนช่วยในกระบวนการขนย้ายอาหารเข้าเซลล์ ซึ่งแสดงในหัวข้อ 2.5

ส่วนวิจัยที่เกี่ยวข้องกับอิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่างที่มีต่อสมบัติของสารลดแรงตึงผิว ได้แก่ งานวิจัยของ Zhang และ Miller (1992) ซึ่งพบว่าที่ค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วง 7.0 ถึง 7.5 สารละลายของแรมโนลิปิด (50 มิลลิกรัมต่อลิตร) ให้ผลค่าแรงตึงผิวต่ำสุดที่ 30 ดายน์ต่อเซนติเมตร แต่ให้ค่าแรงตึงผิวเพิ่มสูงขึ้นเป็น 32 ดายน์ต่อเซนติเมตรที่ค่าความเป็นกรด-ด่างมากกว่า 7.5 และเช่นเดียวกันที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่า 7.0 จะทำให้ค่าแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวที่วัดได้มีค่าเพิ่มสูงขึ้นมากกว่า 30 ดายน์ต่อเซนติเมตร เป็น 40.5 ดายน์ต่อเซนติเมตร ดังนั้นจะเห็นว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่แตกต่างกันมีผลต่อความสามารถในการลดแรงตึงผิวของแรมโนลิปิด

นอกจากนี้ในงานวิจัยของ Ishigami และคณะ (1987) ได้แสดงผลของค่าความเป็นกรด-ด่างที่มีผลต่อโครงสร้างและการรวมตัวของแรมโนลิปิด (รูปที่ 5.12) พบว่าที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำ (ช่วง 4.3 - 5.8) แรมโนลิปิดรวมตัวเป็นทรงกลมผนังสองชั้น (vesicle) ขนาด 50 - 100 นาโนเมตร ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าการรวมตัวเป็นไมเซลล์ซึ่งจะเกิดในภาวะที่ค่าความเป็นกรด-ด่างประมาณ 6.8 - 7.0 การที่สารลดแรงตึงผิวสามารถรวมตัวกับแหล่งอาหารคาร์บอนในรูปของไมเซลล์น่าจะมีข้อดีว่าการรวมตัวเป็นแบบผนังสองชั้นของสารลดแรงตึงผิว เนื่องจากขนาดของไม

เซลล์ที่เล็กกว่า (จากการรวมตัวเป็นไมเซลล์ของ AOT ขนาดประมาณ 170 °Å) (Cabral และ Aires-Darros, 1993) น่าจะสามารถทำให้เกิดการขนย้ายอาหารผ่านชั้นผนังเซลล์และเข้าสู่เซลล์ได้สะดวกกว่า และจะให้พื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างไมเซลล์และจุลินทรีย์เพิ่มมากขึ้น ซึ่งน่าจะเป็นผลให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และอัตราผลิตจำเพาะสูงขึ้นตามไปด้วย



รูปที่ 5.2 แสดงการรวมตัวของแรมโนลิปิดที่ภาวะความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ (Ishigami และคณะ, 1987)

จากงานวิจัยของ Guerra-Santos และคณะ (1986) ศึกษาการผลิตแรมโนลิปิด

ของ *Pseudomonas aeruginosa* โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักแบบต่อเนื่อง พบว่าที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพอยู่ในช่วง 6.0 – 6.5

ดังนั้นสามารถกล่าวโดยสรุปได้ว่าค่าความเป็นกรด-ด่างมีอิทธิพลต่อความ

สามารถในการลดแรงตึงผิวและการรวมตัวของสารลดแรงตึงผิว ซึ่งน่าจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์ โดยภาวะค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมน่าจะมีค่าประมาณ 7.0 (พิจารณาจากความสามารถในการลดแรงตึงผิวและการรวมตัวของสารลดแรงตึงผิวเป็นไมเซลล์) และให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยของอารีย์ (2542) ที่พบว่าการเจริญเติบโตและการ

ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pseudomonas* sp.A41 ในขวดรูปชมพู่แบบเขย่า (Erlenmeyer Flask) มีค่าที่เหมาะสมที่สุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.0

### 5.3.1.2 อิทธิพลของความเร็รรอบใบกวน

หน้าที่หลักที่สำคัญของระบบการกวนภายในถังหมักมี 2 ประการ ดังนี้ ประการแรกจะช่วยลดขนาดของฟองอากาศและน้ำมันปาล์มในถังหมักให้มีเล็กกลง ทำให้มีพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างอากาศและน้ำมันกับจุลินทรีย์มากขึ้น และประการที่สองระบบการกวนทำให้ภาวะภายในถังหมักสม่ำเสมอขึ้นโดยตลอด ในงานวิจัยที่ใช้น้ำหมักประกอบด้วยทั้งวัฏภาค (phase) ของน้ำและวัฏภาคของแหล่งอาหารคาร์บอนจากน้ำมันปาล์ม ระบบการกวนภายในถังหมักนอกจากจะช่วยให้การกระจายตัวของน้ำมันมากขึ้นแล้ว ยังช่วยลดขนาดของน้ำมันที่กระจายตัวอยู่ชั้นน้ำ และเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสของหยดน้ำมันกับชั้นน้ำ จากผลงานวิจัยของ Schmid (1998) แสดงให้เห็นว่าความเร็รรอบใบกวนที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของดีแคน (decane) 20 เปอร์เซ็นต์ในน้ำมีค่าลดลง และผิวสัมผัสของดีแคนและน้ำมีค่าเพิ่มขึ้น (ที่ความเร็วของใบกวนในช่วง 1500 ถึง 2500 รอบต่อนาที มีผลทำให้ขนาดของดีแคน มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ระหว่าง 13 ถึง 10 ไมโครเมตร) ซึ่งหยดของน้ำมันปาล์มที่มีขนาดเล็กน่าจะส่งผลให้การขนย้ายน้ำมันปาล์มผ่านผนังเซลล์เข้าสู่เซลล์ได้สะดวกขึ้นและทำให้การเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นด้วย

นอกจากนี้ความเร็รรอบของใบกวนที่สูงเกินไปอาจส่งผลทำลายเซลล์ได้ค่าความเร็รรอบใบกวนสูงสุดที่ควรใช้ในการเลี้ยงจุลินทรีย์ สามารถแสดงได้ในรูปของค่าความเร็วที่ปลายใบพัด (tip speed) ค่าความเร็วที่ปลายใบพัดสำหรับจุลินทรีย์กำหนดไว้โดยทั่วไปไม่เกิน 1500 ฟุตต่อนาที (Charles และ Wilson, 1995) แต่สำหรับค่าความเร็รรอบที่ใช้ในงานวิจัยนี้อยู่ในช่วง 500 ถึง 900 รอบต่อนาที ที่ขนาดของใบพัดที่ใช้มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 นิ้ว สามารถคำนวณหาค่าความเร็วที่ปลายใบพัดสูงสุดไม่เกิน 710 ฟุตต่อนาที ซึ่งมีค่าน้อยกว่าค่าความเร็วที่ปลายใบ



พืดสูงสุดซึ่งกำหนดไว้โดยทั่วไปถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น จึงอาจกล่าวได้ว่าค่าความเร็วรอบใบ กวนที่ใช้ในงานวิจัยนี้น่าที่จะไม่มีผลต่อการทำลายเซลล์ แต่จะมีผลต่อการกระจายตัวของน้ำมัน ปาล์มในชั้นของน้ำ

### 5.3.1.3 เปอร์เซ็นต์น้ำมันปาล์ม

จากลักษณะของน้ำมันปาล์มจะแยกชั้นจากชั้นของน้ำ เซลล์ของจุลินทรีย์ซึ่ง กระจายตัวอยู่ในชั้นของน้ำมีโอกาสสัมผัสและนำเอาแหล่งอาหารคาร์บอนไปใช้ในการเจริญได้ยาก แต่เนื่องจาก *Pseudomonas* sp.A41 เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพออกมา ภายนอกเซลล์ได้ (อารีย์, 2542) และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถรวมตัวกับหยดน้ำมันใน รูปของไมเซลล์ และกระจายตัวอยู่ในชั้นของน้ำได้ ทำให้การสัมผัสระหว่างเซลล์จุลินทรีย์กับน้ำมัน ปาล์มมีมากยิ่งขึ้น ช่วยให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตได้ดี มีผลงานวิจัยของ Hisatsuka และคณะ (1971) สนับสนุนผลของสารลดแรงตึงผิวมีส่วนช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยการ เติมสารลดแรงตึงผิวบางชนิด (Growth stimulant, Noigen EA 141, Tween 20) เปรียบเทียบกับ ภาวะที่ไม่มีการเติมสารลดแรงตึงผิว พบว่าการเติมสารลดแรงตึงผิวจะให้การเจริญเติบโตของจุลินท รีย์เพิ่มขึ้น โดยเปรียบเทียบระหว่างระบบที่ไม่มีการเติมสารลดแรงตึงผิว และระบบที่มีการเติมสาร ลดแรงตึงผิว (เติม Growth stimulant) จะมีผลทำให้ค่าของระยะเวลาที่จุลินทรีย์ใช้ในการปรับตัว (lag phase) และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate) ลดลงจาก 100 ชั่วโมง เป็น 7 ชั่วโมง และ จาก 0.099 ต่อชั่วโมงเป็น 0.462 ต่อชั่วโมงตามลำดับ

นอกจากนี้ความเหมาะสมของปริมาณแหล่งอาหารคาร์บอนน่าจะมีผลต่อการ เจริญเติบโตของจุลินทรีย์เช่นกัน กล่าวคือ ปริมาณของแหล่งอาหารที่น้อยเกินไปส่งผลให้จุลินทรีย์ เจริญเติบโตได้ไม่เต็มที่ และปริมาณอาหารที่มากเกินไปจนอาจส่งผลกระทบต่ออัตราการลดลง ของการเจริญเติบโตหรือการผลิตของผลิตภัณฑ์ได้ตัวอย่างการศึกษาของ Ramana และ Karanth

(1989) การเพาะเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6 บนแหล่งอาหารคาร์บอนโดยใช้  
กลูโคสปริมาณต่าง ๆ ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมเป็น 20 กรัมต่อลิตร แต่ถ้าใช้  
ความเข้มข้นที่มากหรือน้อยกว่านี้จะส่งผลการการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลดลงอย่างมาก  
และจากการศึกษาในงานวิจัยของอารีย์ ศึกษาผลของน้ำมันปาล์มที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลด  
แรงตึงผิวชีวภาพของ *Pseudomonas* sp.A41 มีค่าเป็น 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 5.3.2 อิทธิพลร่วมจากค่าความเป็นกรด-ด่างและความเร็วรอบใบกวน

#### 5.3.2.1 อิทธิพลที่มีต่อผลอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์

รูปที่ 5.3 แสดงถึงอิทธิพลร่วมของค่าความเป็นกรด-ด่างและความเร็วรอบใบกวนต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ จะสังเกตได้ว่าตัวแปรดำเนินการคู่นี้ไม่ได้แสดงอิทธิพลร่วมกันต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะอย่างชัดเจนนัก เนื่องจากพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่ให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดอยู่ในช่วง 6.5-7.0 ตลอดในทุกความเร็วรอบใบกวน (500-900 รอบต่อนาที) และความเร็วรอบใบกวนที่ให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดมีค่าประมาณ 700 รอบต่อนาทีในทุกค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH 5.3-8.7) ดังนั้นอิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่าง และความเร็วรอบใบกวนต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสามารถอธิบายได้ในทำนองเดียวกับหัวข้อ

#### 5.3.1.1 และ 5.3.1.2 ซึ่งกล่าวถึงผลของตัวแปรดำเนินการนี้ในลักษณะของอิทธิพลเดี่ยว

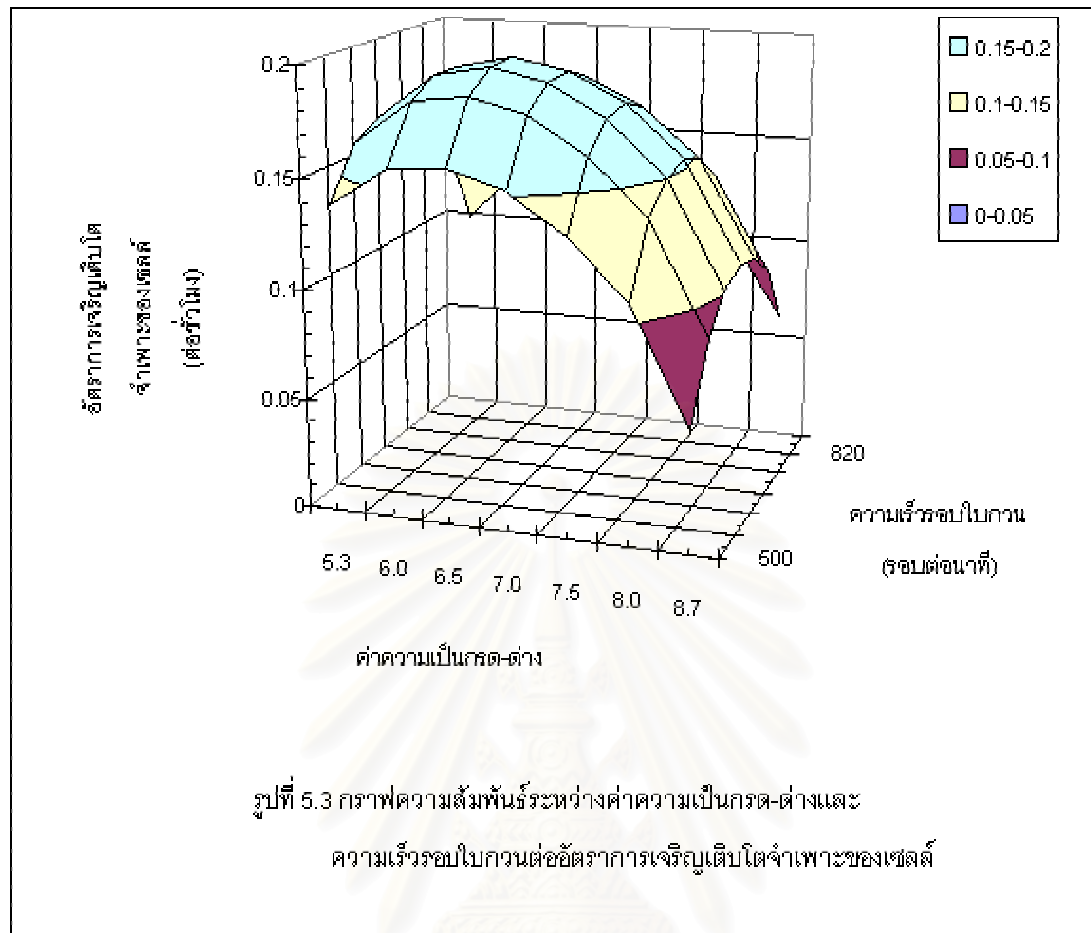
#### 5.3.2.2 อิทธิพลที่มีผลต่ออัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะ

อิทธิพลร่วมของค่าความเป็นกรด-ด่างและความเร็วรอบใบกวนต่ออัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนในรูปที่ 5.4 โดยพบว่าที่ 500 รอบต่อนาที ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ให้อัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะสูงสุดอยู่ที่ 8.0 ในขณะที่ความเร็วรอบ 900 รอบต่อนาที ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมอยู่ที่ 6.0 หรือกล่าวได้ว่าที่ความเร็วรอบใบกวนสูงขึ้นค่าความเป็นกรด-ด่างที่ให้อัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะสูงสุดจะมีค่าลดลง

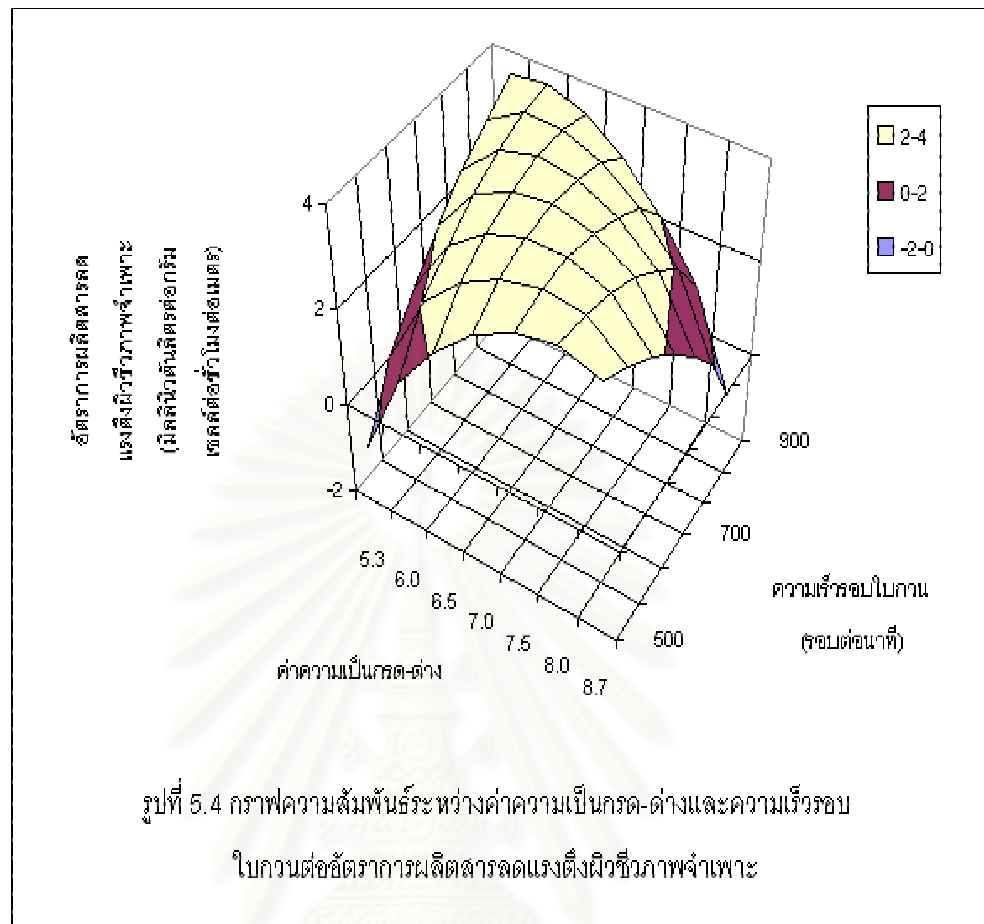
ดังที่ได้กล่าวแล้วในหัวข้อ 5.3.1.1 อ้างถึงผลงานวิจัยของ Ishigami และคณะ (1987) ซึ่งพบว่าในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างมากกว่า 6.8 แรมนิโลปิดจะรวมตัวกันเป็นไมเซลล์ แต่เมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างมีค่าต่ำลงลักษณะการรวมตัวของแรมนิโลปิดจะเปลี่ยนแปลงไป โดยจะมีลักษณะเป็นอนุภาคไขมัน (lipid particle) ชั้นฟิล์มสองชั้น (lamella) และทรงกลมผนังสองชั้น

(vesicle) ที่ช่วงค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.2-6.6 6.0-6.5 และ 4.8-5.3 ตามลำดับ ในขณะที่เดียวกัน Sekcisky และ Shreve (1999) ได้เสนอกลไกการขนถ่ายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเข้าสู่เซลล์ว่า ในกระบวนการนี้ต้องอาศัยสารลดแรงตึงผิวรวมตัวกันล้อมรอบหยดเล็ก ๆ ของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon droplet) ในลักษณะที่เป็นไมเซลล์ เซลล์จึงจะสามารถขนถ่ายสารประกอบชนิดนี้ผ่านผนังเซลล์และเข้าสู่เซลล์ได้ ดังนั้นจะเห็นว่าหากค่าความเป็นกรด-ด่างมีค่าลดลงจากค่าประมาณ 6.8 น่าจะเป็นไปได้ที่ *Pseudomonas* sp.A41 จะขนถ่ายน้ำมันปาล์มเข้าไปใช้งานได้ในอัตราที่น้อยลงเนื่องจากอนุภาคไขมัน ชั้นฟิล์มสองชั้น และทรงกลมผนังสองชั้นมีลักษณะไม่เหมาะสมสำหรับการเคลื่อนย้ายผ่านผนังเซลล์โดยมีลักษณะมิติ (characteristic dimension) ที่ใหญ่กว่าไมเซลล์ การปั่นกวนน้ำหมักด้วยอัตราใบกวนที่สูงขึ้นเป็นการช่วยลดขนาดหรือลักษณะมิติของกลุ่มของสารลดแรงตึงผิวให้เล็กลง ซึ่งน่าจะมีผลให้อัตราการขนถ่ายน้ำมันปาล์มเข้าสู่เซลล์สูงขึ้น และทำให้อัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวจำเพาะสูงขึ้นตามไปด้วย ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่พบว่าที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.3 อัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะจะมีค่าแปรผันตามความเร็วรอบในการกวน

ในขณะที่ภาวะความเป็นกรด-ด่างที่ 8.5 ให้อัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะแปรผกผันกับความเร็วรอบในการกวน โดยมีอัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะเป็น 3.86 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อกรัมเซลล์ต่อชั่วโมงต่อเมตรที่ความเร็วรอบ 500 รอบต่อนาที และมีค่าลดลงเมื่อเพิ่มความเร็วรอบใบกวนจนถึง 900 รอบต่อนาที ซึ่งที่ความเป็นกรด-ด่างดังกล่าว การรวมตัวของสารลดแรงตึงผิวน่าจะอยู่ในรูปของไมเซลล์ที่สะดวกต่อการขนถ่ายน้ำมันปาล์มเข้าสู่เซลล์ ดังนั้นอัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะที่ต่ำลงน่าจะเป็นผลมาจากปัจจัยอื่นที่ไม่เกี่ยวข้องกับการขนถ่ายน้ำมันปาล์มเข้าสู่เซลล์ โดยในที่นี้ยังไม่สามารถสรุปได้ ต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



### 5.3.3 อิทธิพลร่วมจากค่าความเป็นกรด-ด่างและเปอร์เซ็นต์น้ำมันปาล์ม

#### 5.3.3.1 อิทธิพลที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์

รูปที่ 5.5 แสดงถึงอิทธิพลร่วมของค่าความเป็นกรด-ด่างและเปอร์เซ็นต์น้ำมันปาล์มที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ จะสังเกตได้ว่าตัวแปรดำเนินการคู่นี้ไม่ได้แสดงอิทธิพลร่วมกันต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะอย่างชัดเจนนัก เนื่องจากพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่ให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดอยู่ในช่วง 6.5-7.0 ตลอดในทุกค่าของเปอร์เซ็นต์น้ำมันปาล์ม (0.3-3.7 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) และค่าเปอร์เซ็นต์น้ำมันปาล์มที่ให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดมีค่าประมาณในช่วง 1.5-2.0 เปอร์เซ็นต์ในทุกค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH 5.3-8.7) ดังนั้นอิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่าง และความเร็วรอบใบกวนต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสามารถอธิบายได้ในทำนองเดียวกับหัวข้อ 5.3.1.1 และ 5.3.1.3 ซึ่งกล่าวถึงผลของตัวแปรดำเนินการนี้ในลักษณะของอิทธิพลเดี่ยว

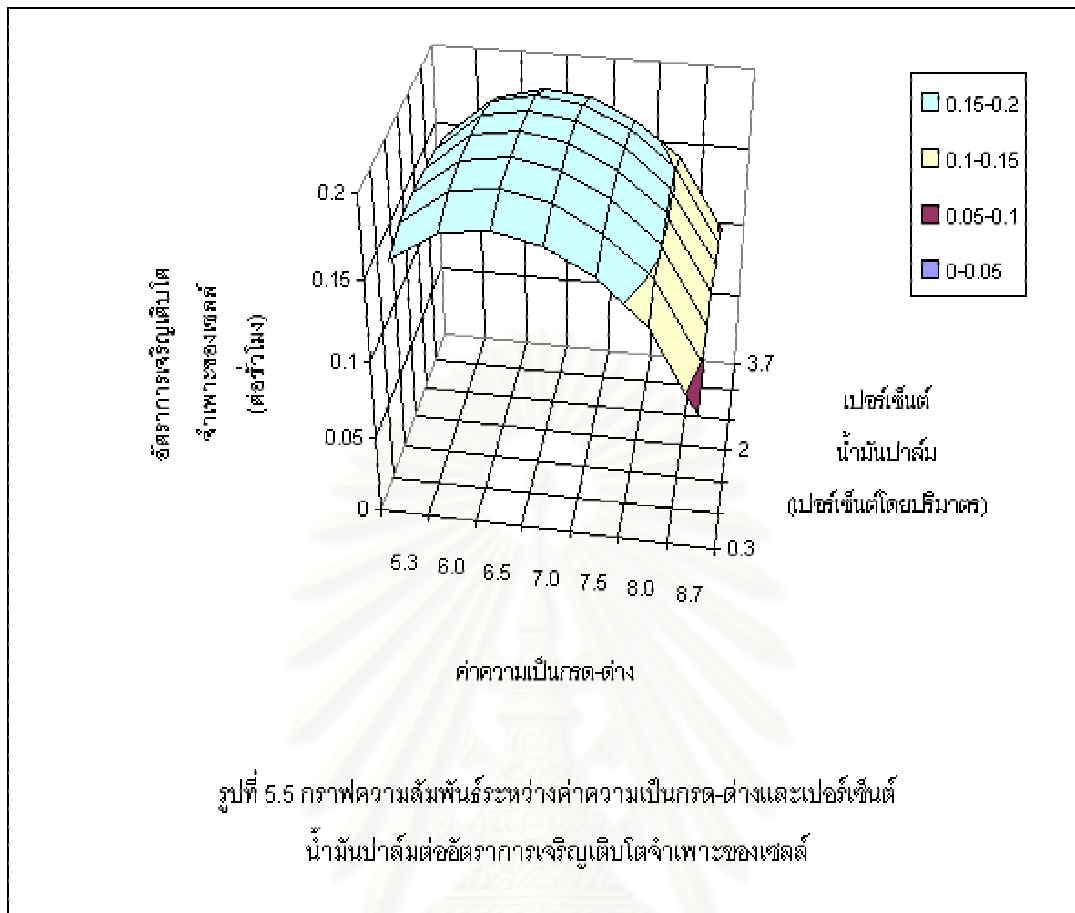
ในหัวข้อ 5.3.1.1 ในการศึกษาภาวะความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการรวมตัวเป็นไมเซลล์จะมีค่ามากกว่า 6.8 และเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างมีค่าต่ำลงลักษณะการรวมตัวจะเปลี่ยนแปลงไป และจากผลงานวิจัยของ Zhang และ Miller (1992) ซึ่งพบว่าการกระจายตัวของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Octadecane) (0.78 กรัมต่อลิตร) ในสารละลายแรมโนลิปิด (เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร) จะขึ้นอยู่กับภาวะความเป็นกรด-ด่าง โดยที่ความเป็นกรด-ด่างมีค่าเป็น 5.5 การกระจายตัวของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจะมีค่าสูงกว่าที่ภาวะความเป็นกรด - ด่าง 8.5 ประมาณ 42 เปอร์เซ็นต์ (การกระจายตัวของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนสูงสุดและต่ำสุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.0 และ 6.0 ตามลำดับ) การเพิ่มการกระจายตัวของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในน้ำหมักจะช่วยให้จุลินทรีย์มีโอกาสสัมผัสแหล่งอาหารได้มากขึ้นน่าจะมีผลให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์สูงขึ้นตามไปด้วย ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่พบว่า

บริเวณของค่าความเป็นกรด-ด่างที่มีค่าต่ำ (pH 5.3) จะให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์สูงกว่าบริเวณที่ควบคุมด้วยภาวะค่าความเป็นกรด-ด่างที่มีค่ามาก (pH 8.7)

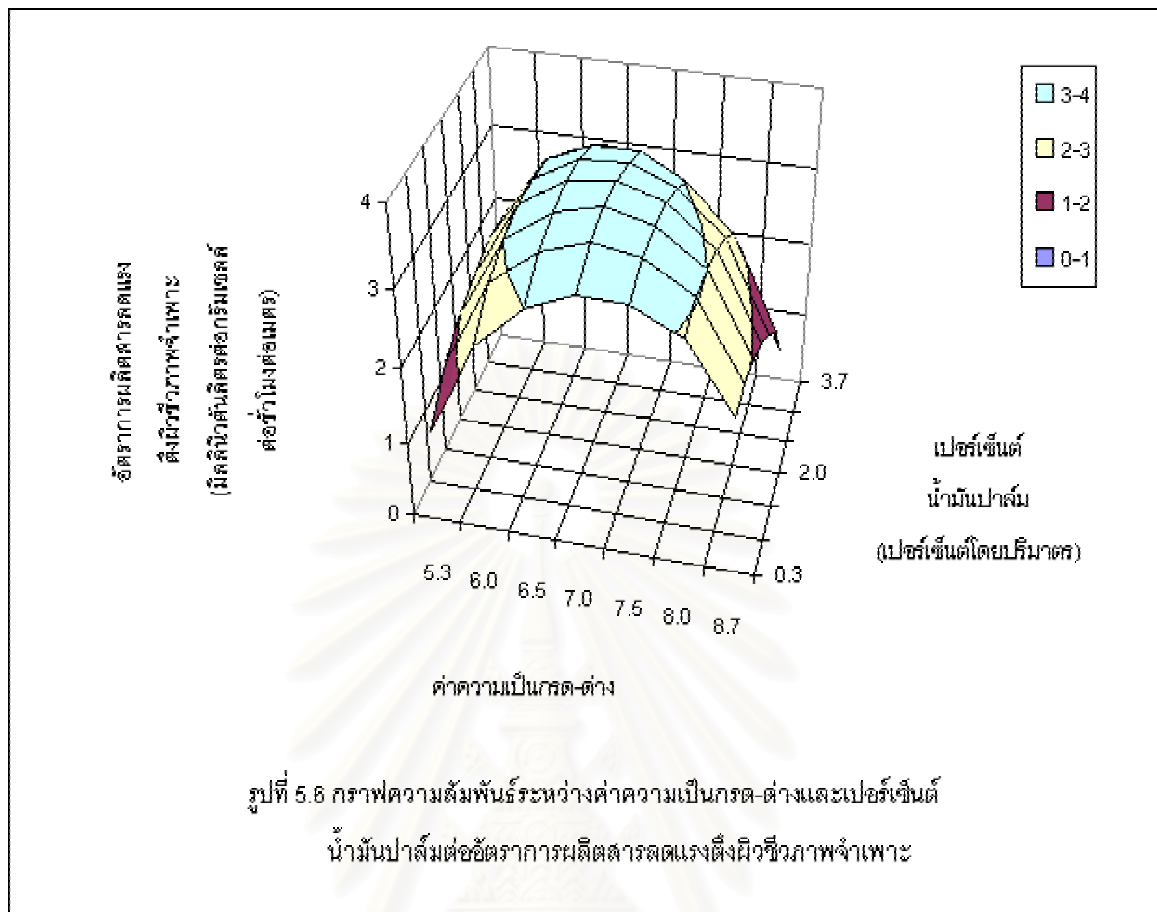
#### 5.3.3.2 อิทธิพลที่มีผลต่ออัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะ

จากรูปที่ 5.6 แสดงอิทธิพลร่วมของค่าความเป็นกรด-ด่าง และเปอร์เซ็นต์น้ำมันปาล์มต่ออัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะ จะสังเกตได้ว่าตัวแปรดำเนินการของค่าความเป็นกรด-ด่างจะแสดงอิทธิพลต่ออัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะอย่างชัดเจน เนื่องจากพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่ให้อัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะสูงสุดในช่วง 6.5 - 7.5 ตลอดในทุกค่าเปอร์เซ็นต์ของน้ำมันปาล์ม (0.3-3.7 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) อิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่างที่มีต่ออัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะสามารถอธิบายได้ในทำนองเดียวกับหัวข้อ 5.3.1.1

แต่อย่างไรก็ตามรูปที่ 5.6 แสดงอิทธิพลร่วมของค่าความเป็นกรด-ด่างและเปอร์เซ็นต์น้ำมันปาล์มต่ออัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะด้วย โดยพบว่าที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 5.3 ให้อัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะสูงสุดที่เปอร์เซ็นต์น้ำมันปาล์มเป็น 2.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ในขณะที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 8.7 ค่าเปอร์เซ็นต์น้ำมันปาล์มที่เหมาะสมอยู่ที่ 0.3 เปอร์เซ็นต์ หรือกล่าวได้ว่าที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเพิ่มสูงขึ้นเปอร์เซ็นต์น้ำมันปาล์มที่ให้อัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะสูงสุดจะมีค่าลดลง



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



### 5.3.4 อิทธิพลร่วมจากค่าความเร็วรอบไบกวนและเปอร์เซ็นต์น้ำมันปาล์ม

#### 5.3.4.1 อิทธิพลที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์

อิทธิพลร่วมของความเร็วรอบไบกวนและเปอร์เซ็นต์น้ำมันปาล์มต่ออัตราการ

เจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนในรูปที่ 5.7 โดยพบว่าที่เปอร์เซ็นต์น้ำมัน เป็น 0.3 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ความเร็วรอบไบกวนที่ให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ สูงสุดที่ 500 รอบต่อนาที ในขณะที่เปอร์เซ็นต์น้ำมันปาล์ม 3.7 เปอร์เซ็นต์ค่าความเร็วรอบไบกวนที่ เหมาะสมอยู่ที่ 900 รอบต่อนาที หรือกล่าวได้ว่าที่เปอร์เซ็นต์น้ำมันปาล์มเพิ่มสูงขึ้นค่าความเร็ว รอบไบกวนที่ให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์สูงสุดมีค่าเพิ่มขึ้น

ดังที่ได้กล่าวแล้วในหัวข้อ 5.3.1.2 อ้างถึงงานวิจัยของ Schmid (1998) ซึ่งแสดง ให้เห็นว่าความเร็วรอบไบกวนที่เพิ่มขึ้นจะมีผลทำให้หยดของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (decane) มีขนาดเล็กลง ซึ่งน่าจะเกิดในลักษณะเดียวกันกับขนาดของน้ำมันปาล์มในน้ำมันหมัก กล่าวคือ ความเร็วรอบไบกวนที่เพิ่มขึ้นจะทำให้ขนาดของหยदन้ำมันปาล์มเล็กลง ซึ่งขนาดของ หยदन้ำมันที่มีขนาดเล็กน่าจะส่งผลให้การขนย้ายน้ำมันปาล์มผ่านผนังเซลล์เข้าสู่เซลล์ได้สะดวก ขึ้นและน่าจะทำให้การเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่พบว่าที่เปอร์เซ็นต์ น้ำมันปาล์ม 3.7 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์จะมีค่าแปรผัน ตามความเร็วรอบไบกวน โดยมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่ 0.10 ต่อชั่วโมงที่ความเร็วรอบ 500 รอบต่อนาที และเพิ่มขึ้นเป็น 0.15 ต่อชั่วโมงที่ 900 รอบต่อนาที ซึ่งการเพิ่มขึ้นของอัตราการ เจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์มีค่าประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์

แต่อย่างไรก็ตามที่เปอร์เซ็นต์น้ำมันปาล์ม 0.3 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร อัตราการ เจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์น่าจะมีการแปรผันตามความเร็วรอบไบกวนเช่นกัน แต่จากผลการ ทดลองพบว่ามีค่าของอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเป็น 0.17 ต่อชั่วโมงที่ความเร็วรอบ 500 รอบ

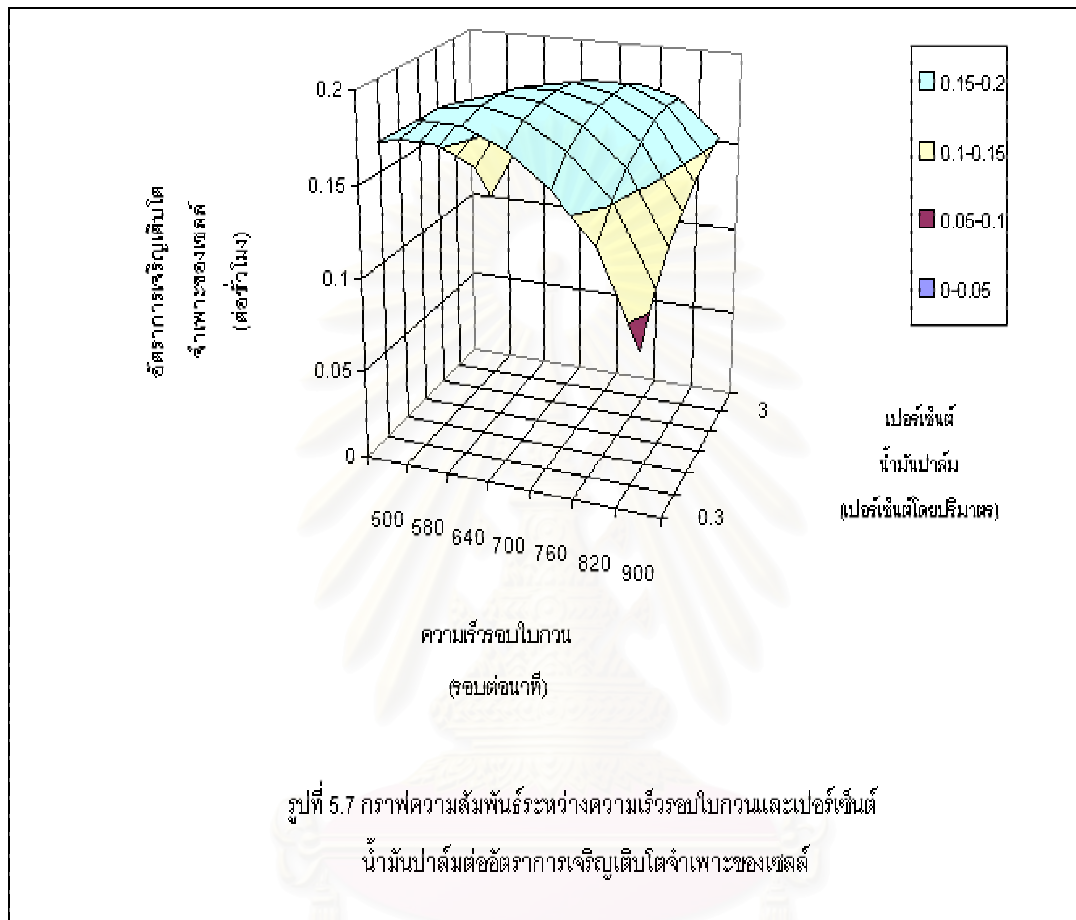
ต่อหน้าที่ และลดลงเป็น 0.09 ต่อชั่วโมงที่ 900 รอบต่อหน้าที่ ดังนั้นอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ที่ต่ำลงน่าจะเป็นผลมาจากปัจจัยอื่นที่ไม่เกี่ยวข้องกับขนาดของหยดน้ำมันที่มีขนาดเล็ก และน่าจะส่งผลต่อการขนย้ายน้ำมันปาล์มผ่านผนังเซลล์เข้าสู่เซลล์ ซึ่งในตอนนี้ยังไม่สามารถสรุปได้แน่นอนซึ่งต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

#### 5.3.4.2 อิทธิพลที่มีผลต่ออัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะ

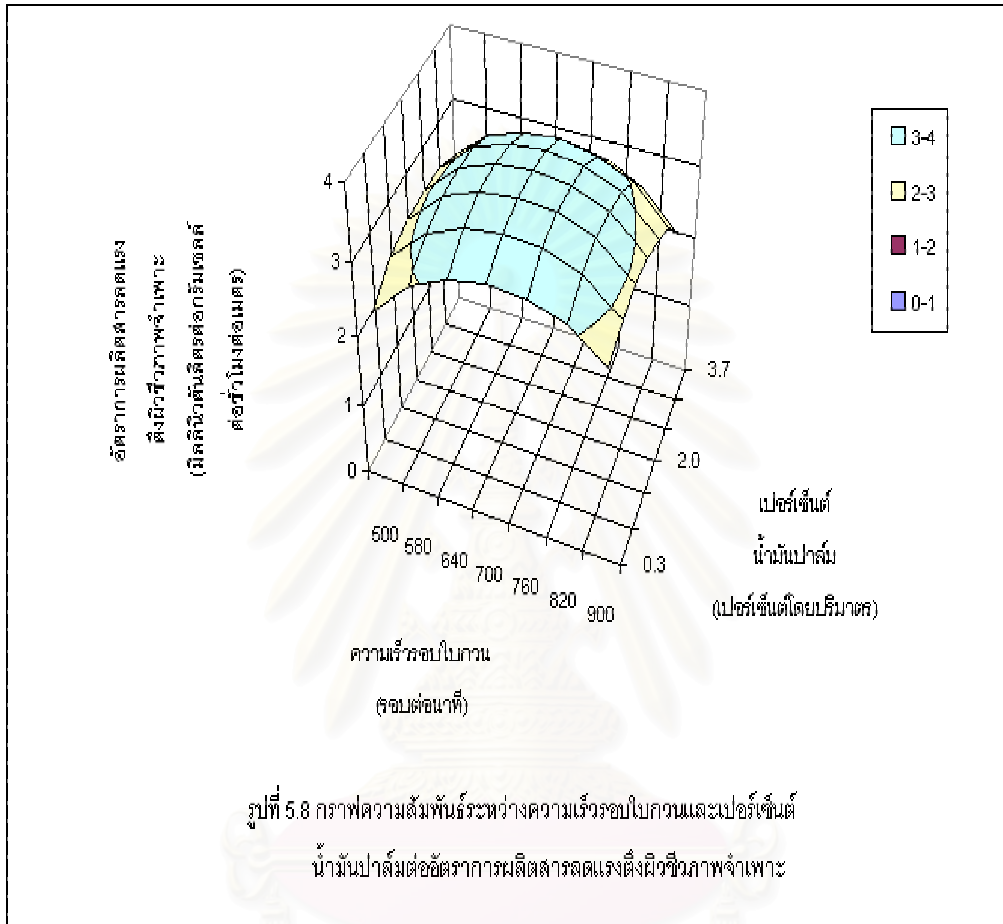
รูปที่ 5.8 แสดงถึงอิทธิพลร่วมของค่าความเป็นกรด-ด่างและเปอร์เซ็นต์น้ำมันปาล์มที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ จะสังเกตได้ว่าตัวแปรดำเนินการคู่นี้ไม่ได้แสดงอิทธิพลร่วมกันต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะอย่างชัดเจนนัก เนื่องจากพบว่าค่าความเร็วรอบใบกวนที่ให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดอยู่ในช่วง 700 - 750 รอบต่อนาที ตลอดในทุกค่าของเปอร์เซ็นต์น้ำมันปาล์ม (0.3 - 3.7 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) และค่าเปอร์เซ็นต์น้ำมันปาล์มที่ให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดมีค่าประมาณในช่วง 1.5 - 2.0 เปอร์เซ็นต์ในทุกค่าความเป็นกรด-ด่าง (ความเร็วรอบใบกวน 500 - 900 รอบต่อนาที) ดังนั้นอิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่างและความเร็วรอบใบกวนต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสามารถอธิบายได้ในทำนองเดียวกับหัวข้อ 5.3.1.2 และ 5.3.1.3 ซึ่งกล่าวถึงผลของตัวแปรดำเนินการนี้ในลักษณะของอิทธิพลเดี่ยว

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## 5.4 การหาภาวะเหมาะสมของตัวแปรทั้งสาม

### 5.4.1 ภาวะที่เหมาะสมต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์

พิจารณาจากกราฟที่ 5.3, 5.5 และ 5.7 แสดงถึงความสัมพันธ์ของค่าความเป็นกรด-ด่าง, ความเร็วรอบไบกวน และเปอร์เซ็นต์น้ำมันปาล์ม ที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ *Pseudomonas* sp.A41 การหาภาวะที่เหมาะสมของตัวแปรทั้งสาม แสดงในภาคผนวก ข2.1 ซึ่งแสดงค่าของตัวแปรที่ทำให้ได้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดดังนี้

ค่าความเป็นกรด-ด่าง = 6.4

ความเร็วรอบไบกวน = 627 รอบต่อนาที

เปอร์เซ็นต์น้ำมันปาล์ม = 1.0 เปอร์เซ็นต์

ภาวะเหมาะสมที่ได้ถูกนำมาแทนในสมการที่ ข10 เพื่อคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ได้ 0.2 ต่อชั่วโมง

ตารางที่ 5.3 แสดงอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ *Pseudomonas*

ชนิดของจุลินทรีย์	แหล่งอาหารคาร์บอน	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์(ต่อชั่วโมง)	อ้างอิง
<i>P. aeruginosa</i> CFTR-6	กลูโคส	0.60	Ramana และคณะ (1991)
<i>P. aeruginosa</i> BS2	อาหารสังเคราะห์	0.36	Babu และคณะ (1996)
	น้ำเสียจากโรงต้มกลั่น	0.34	
	น้ำเสียจากห่านม	0.41	

จากผลการทดลองค่าของอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Pseudomonas* sp.A41 มีค่าเป็น 0.20 ต่อชั่วโมง และเมื่อเปรียบเทียบกับผลของอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ของ *Pseudomonas* สายพันธุ์อื่นๆ (ในตารางที่ 5.3) พบว่า *Pseudomonas* sp.A41 จะให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์น้อยกว่าประมาณ 2 – 3 เท่า

เนื่องจากระบบที่เพาะเลี้ยง *Pseudomonas* sp.A41 ในงานวิจัยนี้แหล่งอาหารคาร์บอนเป็นน้ำมันปาล์มซึ่งอยู่แยกชั้นจากชั้นน้ำ ดังนั้นการนำเอาแหล่งอาหารคาร์บอนไปใช้ในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์น่าจะสะดวกน้อยกว่าระบบที่แหล่งอาหารคาร์บอนสามารถละลายในน้ำได้ ส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์มีค่าน้อยด้วยเช่นกัน

#### 5.4.2 ภาวะที่เหมาะสมต่ออัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะ

พิจารณาจากกราฟที่ 5.4, 5.6 และ 5.8 แสดงถึงความสัมพันธ์ของค่าความเป็นกรด-ด่าง, ความเร็วรอบใบกวน และเปอร์เซ็นต์น้ำมันปาล์ม ที่มีผลต่ออัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะของ *Pseudomonas* sp.A41 การหาภาวะที่เหมาะสมของตัวแปรทั้งสาม แสดงในภาคผนวก ข2.2 ซึ่งแสดงค่าของตัวแปรที่ทำให้ได้อัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงสุดดังนี้

$$\text{ค่าความเป็นกรด-ด่าง} = 7.5$$

$$\text{ความเร็วรอบใบกวน} = 608 \text{ รอบต่อนาที}$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์น้ำมันปาล์ม} = 1.5 \text{ เปอร์เซ็นต์}$$

ภาวะเหมาะสมที่ได้ถูกนำมาแทนในสมการที่ ข11 เพื่อคำนวณหาอัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะได้ 2.95 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อกรัมเซลล์ต่อชั่วโมงต่อเมตร

## 5.5 คุณสมบัติบางประการของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

### 5.5.1 ความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

นำเอาน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Pseudomonas* sp.A41 มาตรวจสอบความเสถียรที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส โดยทำดัมน้ำหมักมาดัมที่น้ำเดือดอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ในเวลา 150 นาที และเก็บตัวอย่างน้ำหมักทุก ๆ 10 นาที ติดตามผลโดยนำน้ำหมักตัวอย่างเจือจางที่ 1 ต่อ 100 ด้วยการวัดค่าแรงตึงผิว ผลของค่าแรงตึงผิวแสดงรูปที่ 5.9 พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีการเปลี่ยนแปลงค่าแรงตึงผิวลดลง 5.8 เฮอร์เซ็นต์ โดยเริ่มเปลี่ยนแปลงภายหลังจากทำการดัมในน้ำเดือด 70 นาที และเริ่มคงที่ที่เวลา 110 นาที แสดงว่ามีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จากการทดสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Pseudomonas* sp.A41 ด้วยการวัดค่าความเข้มข้นวิกฤตของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยเลี้ยงในภาวะต่างๆ คาดว่าที่ภาวะการเพาะเลี้ยง *Pseudomonas* sp.A41 แตกต่างกัน สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากกว่าหนึ่งชนิดแสดงในหัวข้อ 5.1.2 และเมื่อนำน้ำหมักที่ได้มาดัมในระยะเวลาหนึ่ง ทำให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพบางส่วนเสียสภาพไปทำให้ค่าแรงตึงผิวที่วัดได้ไม่คงที่

### 5.5.2 การวัดค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน (Emulsion Index)

นำน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว มาทดสอบดัชนีการเกิดอิมัลชัน กับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง และวัดส่วนที่เกิดเป็นอิมัลชัน พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *Pseudomonas* sp.A41 สามารถก่อเกิดอิมัลชันกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ได้ ลักษณะของอิมัลชันมีลักษณะสีขาวขุ่น แสดงค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันในตารางที่ 5.4

ตารางที่ 5.4 ค่าตรวจการเกิดอิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในสารประกอบไฮโดรคาร์บอน

ชนิดต่าง ๆ

ชนิดของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน	ตรวจการเกิดอิมัลชัน( $E_{24}$ ) (เปอร์เซ็นต์)	ตรวจการเกิดอิมัลชัน( $E_t$ ) (เปอร์เซ็นต์)	เปอร์เซ็นต์ลดลง
เฮปเทน	71.8	67.4	6.1
เฮกเซน	70.8	67.4	4.8
ไซโคลเฮกซีน	74.8	69.7	6.8
น้ำมันก๊าด	72.6	64.8	10.7
น้ำมันพาราฟิน	73.6	71.4	3.0

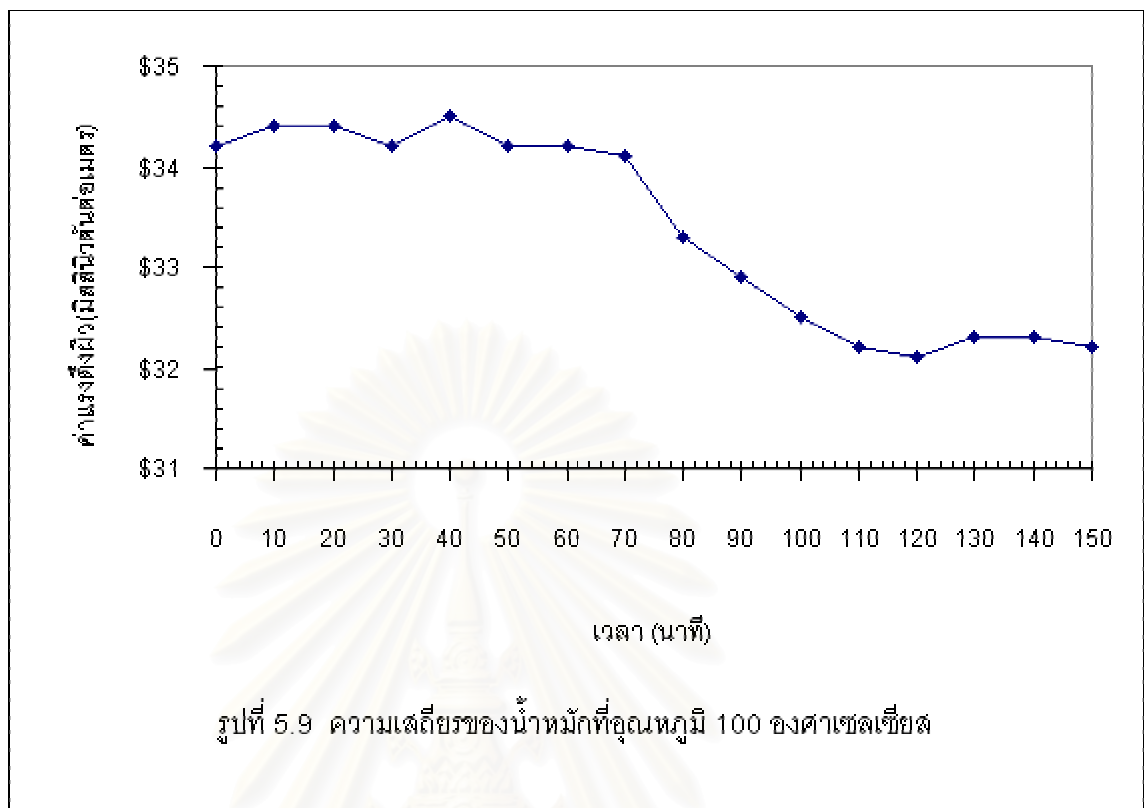
$E_t$  ค่าที่วัดการเกิดอิมัลชันกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนหลังจากตั้งทิ้งไว้ 1 เดือน

$E_{24}$  ค่าที่วัดการเกิดอิมัลชันกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนหลังจากตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง

ตรวจการเกิดอิมัลชันแสดงความสามารถในการรวมตัวกันระหว่างสารลดแรงตึงผิวและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนก่อนเกิดเป็นอิมัลชัน ดังนั้นจึงสามารถนำมาใช้เป็นวิธีหนึ่งในการติดตามการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของจุลินทรีย์ (Banat, 1993)

จากตารางที่ 5.4 พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Pseudomonas* sp.A41 สามารถรวมตัวกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนประเภทต่าง ๆ ได้ซึ่งมีค่าความแตกต่างของตรวจการเกิดอิมัลชันไม่เกิน 5.6 เปอร์เซ็นต์ จากสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เลือกมาจะเห็นว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถรวมตัวเกิดเป็นอิมัลชันกับไซโคลเฮกซีนได้ดีที่สุด และสามารถเกิดเป็นอิมัลชันกับน้ำมันพาราฟินได้เสถียรมากที่สุด โดยมีค่าตรวจการเกิดอิมัลชันลดลง 3.0 เปอร์เซ็นต์ภายในเวลา 1 เดือน





สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## 5.6 ผลการวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เมื่อนำส่วนน้ำใสที่ปั่นแยกเอาส่วนของเซลล์ออกไปจากการเลี้ยง *Pseudomonas* sp.A41 ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการสกัดโดยวิธีในหัวข้อ 4.7.1 จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะคล้ายกับน้ำมันมีสีน้ำตาลเข้ม จากกระบวนการสกัดแยกจากน้ำหมักปริมาตร 1 ลิตร สามารถสกัดแยกผลิตภัณฑ์ด้วยคลอโรฟอรัลล์ และทำการระเหยคลอโรฟอรัลล์ออกจะได้ผลิตภัณฑ์ 7.76 กรัม จากข้อมูลของ Jeneil Biosurfactant Company แสดงผลิตภัณฑ์ของแรมโนลิปิดมีสีน้ำตาลเข้ม ดังนั้น จึงทำการตรวจสอบองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้โดยการนำผลิตภัณฑ์ที่คาดว่าจะเป็นแรมโนลิปิดซึ่งมีโครงสร้างของโมเลกุลของน้ำตาลแรมโนสเชื่อมต่อกับส่วนของกรดไขมัน แยกองค์ประกอบทั้งสองออกจากกันด้วยการเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2 โมลาร์และต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง แสดงวิธีการในหัวข้อ 4.7.1

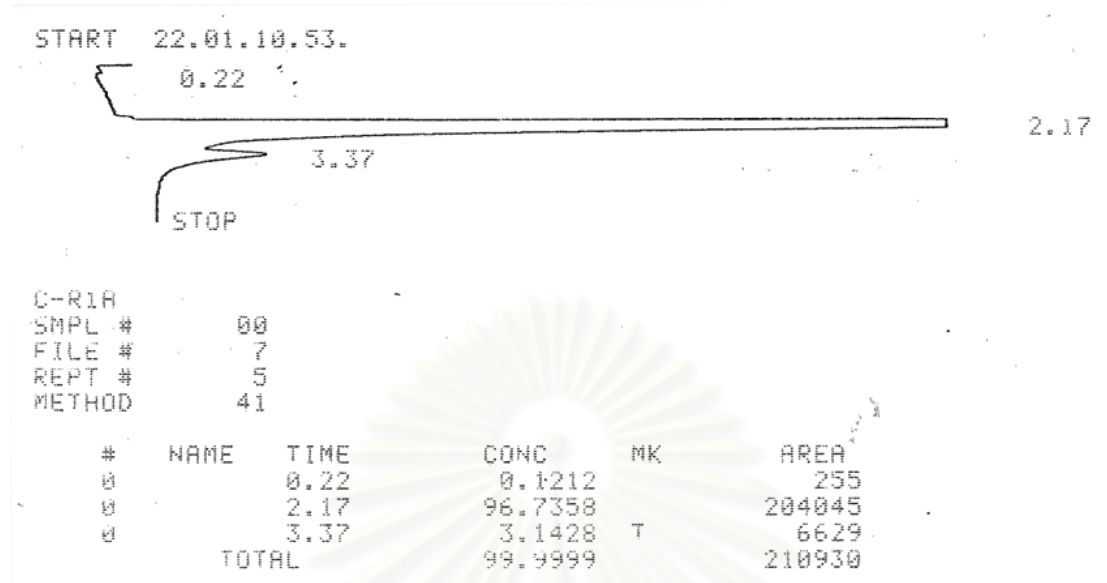
ผลจากการวิเคราะห์ส่วนประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยกระบวนการแยกโดยไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิกวิด โครมาโตกราฟี (High Performance Liquid Chromatography) และตรวจสอบด้วยการหักเหของแสง (Refractive Index) ได้ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 5.10 ถึง 5.15

การตรวจสอบโดยการเปรียบเทียบกับสารละลายน้ำตาลแรมโนสมาตรฐานแสดงในรูปที่ 5.10 และ 5.11 ในรูปที่ 5.10 แสดงพีค (peak) สารละลายแรมโนสที่ได้จากการนำเอาน้ำตาลแรมโนสมาตรฐานละลายในน้ำกลั่น ขณะที่รูปที่ 5.11 แสดงพีคของสารละลายแรมโนสมาตรฐานที่ผ่านภาวะการต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสในสภาพที่เป็นกรด (เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2 โมลาร์) สารละลายน้ำตาลแรมโนสมาตรฐาน (รูปที่ 5.10 และ 5.11) จะถูกชะออกมาที่เวลา 3.37 นาที ทดลองฉีดสารละลายตัวอย่างพบว่าให้พีคเกิดขึ้นที่เวลา 3.11 นาที และ 3.33 นาที (รูปที่ 5.12) คาดว่าที่เวลา 3.33 นาทีเป็นสารละลายน้ำตาลแรมโนส ดังนั้นทดสอบผสมสารละลายน้ำตาลแรมโนส

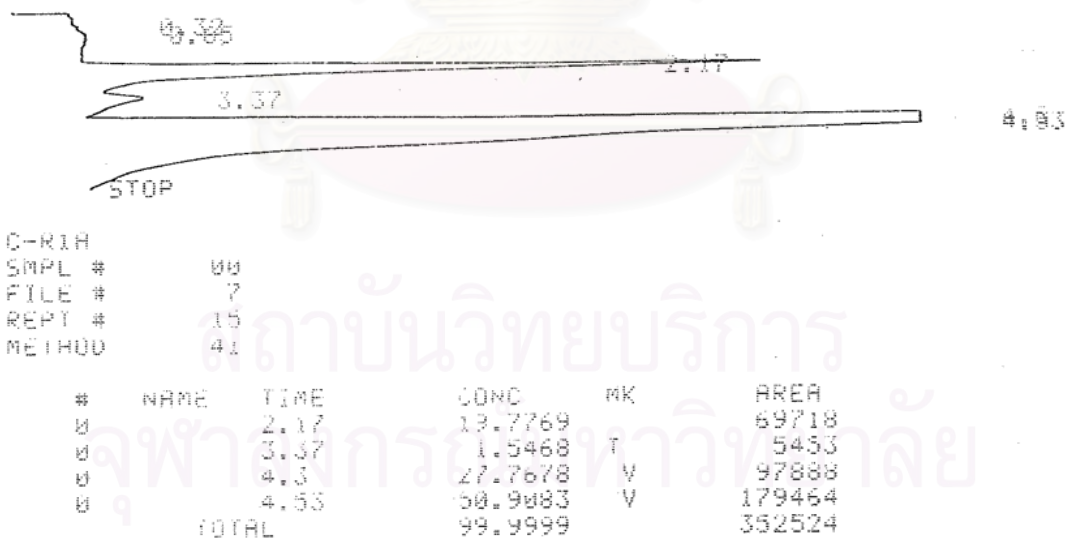
มาตรฐาน และสารละลายตัวอย่าง ในสัดส่วนของสารละลายตัวอย่าง 25 เปอร์เซ็นต์, 50 เปอร์เซ็นต์ และ 75 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ตามลำดับ เพื่อทดสอบการรวมตัวของสารละลายน้ำตาลแรมโนสมมาตรฐานกับสารละลายตัวอย่าง และการแสดงผลของพีคหลังทำการผสม แสดงในรูปที่ 5.13, 5.14 และ 5.15 ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่าพีคขึ้นในเวลาใกล้เคียงกันคือที่ 3.34 นาที และลักษณะของพีค เมื่อปริมาณของสารละลายน้ำตาลแรมโนสเพิ่มสูงขึ้นจะให้พีคของสารละลายน้ำตาลแรมโนสที่สูงเพิ่มขึ้นตามลำดับเมื่อเทียบกับพีคข้างเคียง สรุปได้ว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *Pseudomonas* sp.A41 จะมีส่วนประกอบของน้ำตาลแรมโนสรวมอยู่ด้วย



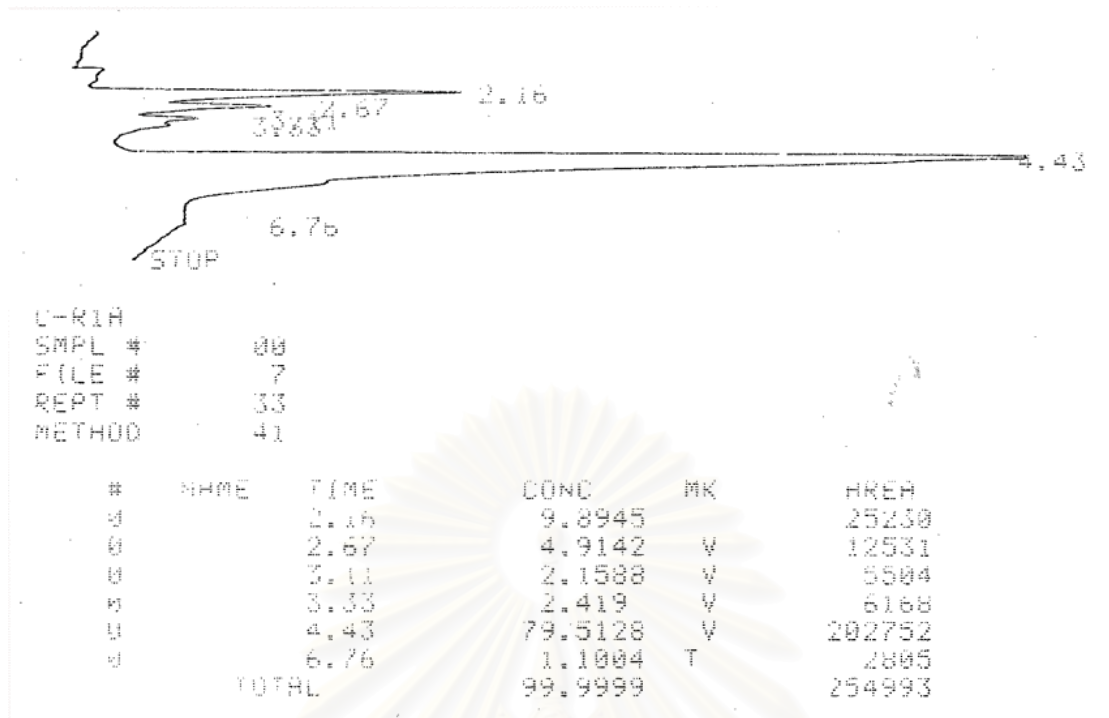
สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



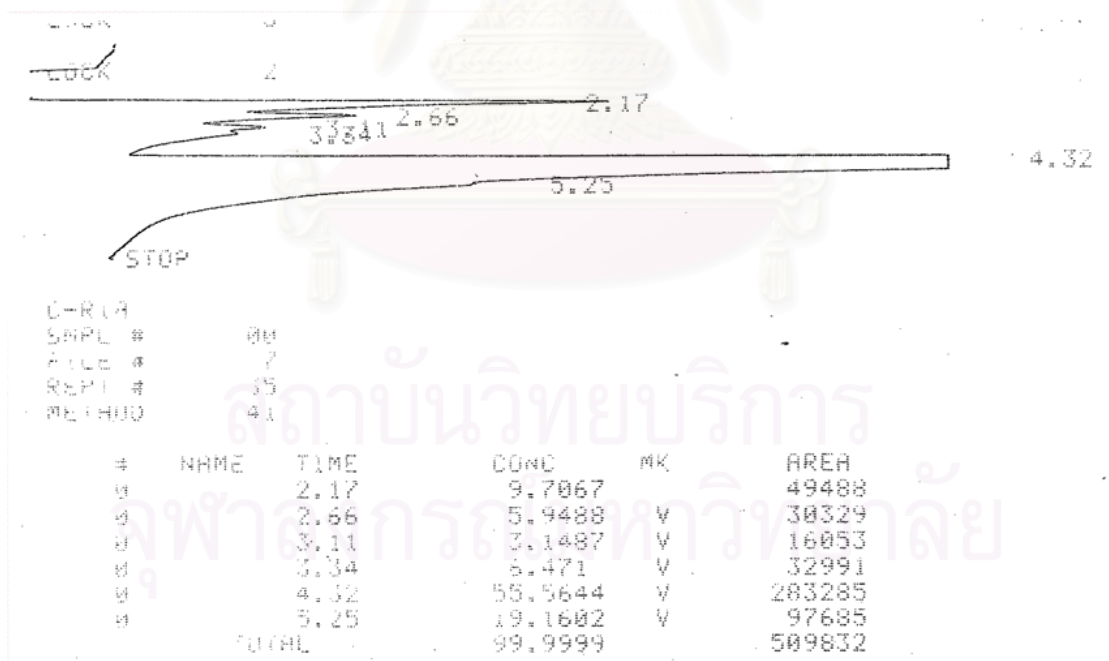
รูปที่ 5.10 สารละลายน้ำตาลแรมในสมมาตรฐาน



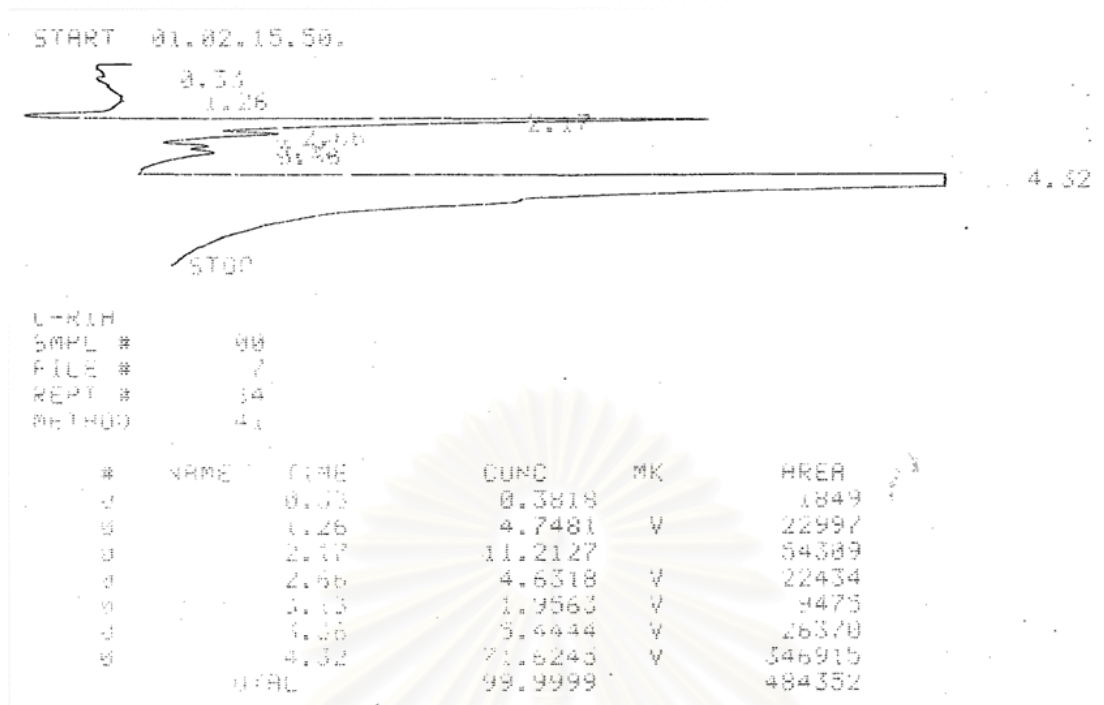
รูปที่ 5.11 สารละลายน้ำตาลแรมในสมมาตรฐาน (ผ่านการต้มในภาวะที่เป็นกรด)



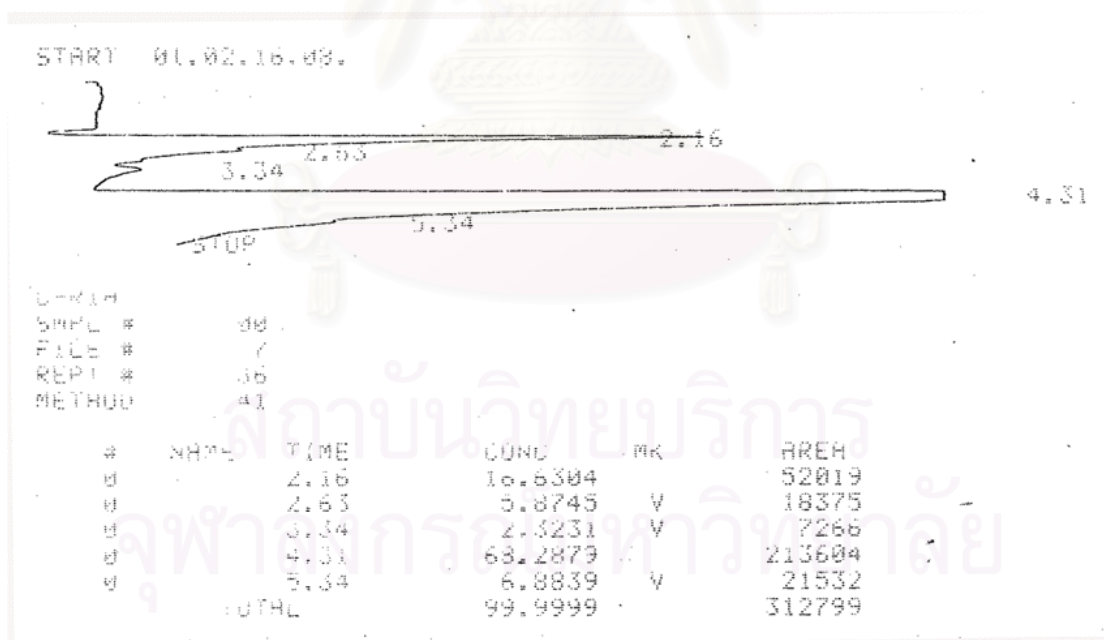
รูปที่ 5.12 สารละลายตัวอย่างที่ทำการสกัดบริสุทธิ์บางส่วน



รูปที่ 5.13 ผสมสารละลายน้ำตาลแรมในสมมาตรฐานในสารละลายตัวอย่าง 25 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 5.14 ผสมสารละลายน้ำตาลแรมในสมมาตรฐานในสารละลายตัวอย่าง 50 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 5.15 ผสมสารละลายน้ำตาลแรมในสมมาตรฐานในสารละลายตัวอย่าง 75 เปอร์เซ็นต์



## บทที่ 6

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

#### 6.1 สรุปผลการทดลอง

1. จากการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง *Pseudomonas* sp.A41 ภายในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่องสามารถสรุปได้ดังนี้

1.1 รูปแบบการเจริญเติบโตของ *Pseudomonas* sp.A41 มีลักษณะเกี่ยวเนื่องกับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

1.2 ภาวะที่เหมาะสมต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ คือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง = 6.4, ความเร็วรอบใบกวน = 627 รอบต่อนาที และเปอร์เซ็นต์น้ำมันปาล์ม = 1.0 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ให้ค่าของอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ที่เหมาะสม 0.2 ต่อชั่วโมง

1.3 ภาวะที่เหมาะสมต่ออัตราผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะ คือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง = 7.5, ความเร็วรอบใบกวน = 608 รอบต่อนาที และเปอร์เซ็นต์น้ำมันปาล์ม = 1.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ให้ค่าของอัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะที่เหมาะสม 2.95 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อกรัมเซลล์ต่อเมตรต่อชั่วโมง

2. สมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ทำบริสุทธิ์บางส่วนมีความเสถียรต่ออุณหภูมิที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 70 นาที หลังจากนั้นค่าแรงตึงผิวลดลง จนกระทั่งเวลาที่ใช้ในการต้มเป็น 110 นาที ค่าแรงตึงผิวมีแนวโน้มคงที่ที่ 32.3 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อเมตร และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังสามารถก่อเกิดอิมัลชันกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนหลายชนิด ได้แก่ เฮปแทน ไโซโคเฮกซีน เฮกเซน น้ำมันก๊าด และน้ำมันพาราฟิน

3. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยง *Pseudomonas* sp.A41 จะมีองค์ประกอบของน้ำตาลแรมโนสรวมอยู่ด้วย

## 6.2 ข้อเสนอแนะ

1. กระบวนการเพาะเลี้ยง *Pseudomonas* sp.A41 พบว่ามีฟองเกิดขึ้นระหว่างทำการทดลอง แก้ไขโดยอาศัยการเติมสารลดการเกิดฟอง ซึ่งการเติมสารลดการเกิดฟองมากขึ้นจะเป็นเพิ่มความผิดพลาดให้กับวิธีการวัดปริมาณของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากการวัดค่าตึงผิว และการกระจายตัวของน้ำมันเพิ่มขึ้น ดังนั้นเพื่อลดปัญหาการเกิดฟองดังกล่าวเราสามารถใช้อุปกรณ์ทางกลช่วยในการตัดฟอง หรือหาวิธีการวิเคราะห์ที่ไม่มีผลกระทบจากปริมาณของสารลดการเกิดฟอง

2. การออกแบบการทดลองที่ถูกนำมาใช้ในการพิจารณาหาภาวะที่เหมาะสมต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ และอัตราผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะในงานวิจัยนี้จะช่วยให้ประหยัดเวลาและทรัพยากรในการทำงาน อีกทั้งยังทำให้การรวบรวมข้อมูลทำได้อย่างครอบคลุมยิ่งขึ้น แต่จะเห็นว่าวิธีการออกแบบและการตรวจสอบความถูกต้องอาจมีความยุ่งยากอยู่บ้าง แต่ในปัจจุบันมีโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่สามารถกำหนดจุดของผลที่ได้จากการทดลองเพียงไม่กี่ชุดก็สามารถนำมาสร้างความสัมพันธ์ของสมการได้ซึ่งทำให้รวดเร็วมากยิ่งขึ้น

3. ในขั้นตอนพิสูจน์สารผลิตภัณฑ์ เพื่อวิเคราะห์ประเภทของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้นั้น ควรทำการบริสุทธิ์ก่อนที่จะนำไปตรวจสอบกับสารละลายมาตรฐาน เพื่อความถูกต้องในการวิเคราะห์ข้อมูลต่อไป

4. การวิเคราะห์หาชนิดของผลิตภัณฑ์ ในงานวิจัยนี้ได้ทำการตรวจสอบชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่คาดว่าน่าจะเป็นแรมโนลิปิดเท่านั้น โดยการตรวจสอบส่วนที่คาดว่าจะเป็นแรมโนลิปิดกับน้ำตาลแรมโนสมาตรฐานให้ผลการพบน้ำตาลแรมโนส ซึ่งยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัดว่าเป็นแรมโนลิปิด จำเป็นต้องมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมต่อไป

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

อารีย์ กังฉิน . 2542 . การแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและการผลิตสารลดแรง

ตึงผิวชีวภาพ. วิทยานิพนธ์ ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

องอาจ ธเนศนิตย์ และ จิตนภา มาดี. 2537. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันปาล์ม.

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### ภาษาอังกฤษ

Arino, S., Marchal, R., and Vandecasteele, J. – P. 1996. Identification and production of a rhamnolipidic biosurfactant by a *Pseudomonas* species. Appl. Microbiol. Biotechnol. **45**: 162 – 168.

Arino, S., Marchal, R., and Vandecasteele, J. – P. 1998. Production of new extracellular glycolipids by a strain of *Cellulomonas cellulans* (*Oerskovia xanthineolytica*) and their structural characterization. Can. J. Microbiol. **44**: 238 – 243.

AL – Tahhan, R.A., Sandrin, T.R., Bodour, A.A., and Maier, R.M. 2000. Rhamnolipid – induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: Effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. Appl. Environ. Microbiol. **66**: 3262 – 3268.

- Babu, P.S., Vaidya, A.N., Bal, A.S., Kapur, R., Juwarkar, A., and Khanna, P. 1996. Kinetics of biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* strain BS2 from industrial wastes. Biotech. Lett. **18**: 263 – 268.
- Bai, G., Brusseau, M.L., and Miller, R.M. 1997. Influence of a rhamnolipid biosurfactant on the transport of bacteria through a sandy soil. Appl. Environ. Microbiol. **63**: 1866 – 1873.
- Bailey, J.E., and Ollis, D.F. 1986. In 'Biochemical Engineering Fundamentals'. McGraw-Hill. Inc. Singapore.
- Banat, I.M. 1995. Biosurfactants production and possible use in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. Biores. Technol. **51**: 1 – 12.
- Banat, I.M. 1993. The isolation of a thermophilic biosurfactant producing *Bacillus* sp. Biotechnol. Lett. **15**(6): 591 – 594.
- Bink, B. 1993. In 'Chemistry and Industry'. July(14): 537 – 541.
- Box, G.E.P., Hunter, W.G., Hunter, J.S. 1985. In 'Statistics for Experimenters'. 143 – 291 . John Wiley & Sons. New York.
- Das, M., Das, S.K., and Mukherjee, R.K. 1998. Surface active properties of the culture filtrates of a *Micrococcus* species grown on *n*-alkanes and sugars. Biores. Technol. **63**: 231 – 235.
- Davila, A-M., Marchal, R., and Vendecasteele, J. – P. 1992. Kinetics and balance of fermentation free from product inhibition: sophorose lipid production by *Candida bombicola*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **38**: 6 – 11.

- Davis, D.A., Lynch, H.C., and Varley, J. 1999. The production of surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. Enz. Micro. Technol. **25**: 322 – 329.
- Deziel, E., Paquette, G., Villemur, R., Lepine, F., and Bisailon, J. – G. 1996. Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. Appl. Environ. Microbiol. **62**: 1908 – 1912.
- Espuny, M.J., Egido, S., Rodon, I., Manresa, A., and Mercade, M.E. 1996. Nutritional requirements of a biosurfactant producing strain *Rhodococcus* sp. 51T7. Biotech. Letters. **18**: 521 – 526.
- Fiechter, A. 1992. Biosurfactants: moving towards industrial application. Tibtech. **10**: 208 – 217.
- Foght, J.M., Gutnick, D.L., and Westlake, D.W.S. 1989. Effect of emulsan on biodegradation of crude oil by pure and mixed bacterial cultures. Appl. Environ. Microbiol. **55**: 36 – 42.
- Gacula, M.C., and Singh J. 1984. In 'Statistical Methods in Food and Consumer Research' 214 – 273. John Wiley & Sons. New York.
- Goswami, P., and Singh, H.D. 1991. Different modes of hydrocarbon uptake by two *Pseudomonas* species. Biotechnol. Bioeng. **37**: 1 – 11.
- Guerra-Santos, L., Kappeli, O. and Fiechter, A. 1984. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. Appl. Environ. Microbiol. **48**: 301 – 305.

- Guerra-Santos, L.H., Kappeli, O. and Fiechter, A. 1986. Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. Appl. Microbiol. Biotechnol. **24**: 443 – 448.
- Haba, E., Espuny, M.J., Busquets, M., and Manresa, A. 2000. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. J. Appl. Microbiol. **88**: 379 – 387.
- Hirayama, T., and Kato, I., 1982. Novel methyl rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa*. FEBS Lett. **139**: 81 – 85.
- Hisatsuka, K., Nakahara, T., Sano, N., and Yamada, K. 1971. Formation of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* and its function in hydrocarbon fermentation. Agric. Biol. Chem. **35**: 686 – 692.
- Hommel, R.K., and Huse, K. 1993. Regulation of sophorose lipid production by *Candida (torulopsis) apicola*. Biotech. Lett. **15**: 853 – 858.
- Ishigami, Y., Gama, Y., Nagahora, H., Yamaguchi, M., Nakahara, H., and Kamata, T. 1987. The pH – Sensitive conversion of molecular aggregates of rhamnolipid biosurfactant. Chem. Lett. 763 – 766.
- Itoh, S., Honda, H., Tomita, F., and Suzuki, T. 1971. Rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on n-paraffin (Mixture of C<sub>12</sub>, C<sub>13</sub> and C<sub>14</sub> fractions). J. Antibiot. **24**: 855 – 859.



Kitamoto, D., Fuzishiro, T., Yanagishita, H., Nakane, T., and Nakahara, T. 1992.

Production of mannosylerythritol lipids as biosurfactants by resting cells of *Candida antarctica*. Biotech. Lett. **14**: 305 – 310.

Kretschmer, A., Bock, H., and Wagner, F. 1982. Chemical and physical characterization of interfacial – active lipids from *Rhodococcus erythropolis* grown on *n*-alkanes.

Appl. Environ. Microbiol. **44**: 864 – 870.

Lang, S. and Wullbrandt, D. 1999. Rhamnolipids – biosynthesis microbial production and application potential. Mini-Review Appl. Microbiol. Biotechnol. **51**: 22 – 32.

Lydersen, B.K., D'elia N.A., and Nelson, K.L. In 'Bioprocess Engineering Systems Equipment and Facilities'. 1994. John Wiley & Sons. Inc. New York.

Makkar, RS., and Cameotra, SS. 1998. Production of biosurfactant at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. **20**: 48 – 52.

Matsufuji, M., Nakata, K., and Yoshimoto, A. 1997. High production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* growing on ethanol. Biotech. Lett. **9**: 1213 – 1215.

Mercade, M.E., Manresa, M.A., Robert, M., Espuny, M.J., Andres, C., and Guinea, J. 1993. Olive oil mill effluent (OOME). New substrate for biosurfactant production. Biores. Technol. **43**: 1 – 6.

Morikawa, M., Daido, H., Takao, T., Murata, S., Shimonishi, Y., and Imanaka, T. 1993. A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. strain MIS38. J. Bacteriol. **175**: 6459 – 6466.

- Mulligan, C.N., Cooper, D.G., and Neufeld, R.J. 1984. Selection of microbes producing biosurfactants in media without hydrocarbons. J. Ferment. Technol. **62**: 311 – 314.
- Mulligan, C.N., Mahmoudides, G., and Gibbs, B.F. 1989. The influence of phosphate metabolism on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Biotechnol. **12**: 199 – 210.
- Myers, R.H. In 'Resonse Surface Methodology'. Eds:Allyn and Bacon. 1971. 27 – 175. Inc. Boston.
- Patel, R.M. and Desai, A.J. 1997. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. Lett. Appl. Microbiol. **25**: 91 – 94.
- Ramana, K.V., Charyulu, N.C.L.N., and Karanth, N.G.1991. A mathematical model for the production of biosurfactants by *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6: Production of Biomass. J. Chem. Tech. Biotechnol. **51**: 525 – 538.
- Ramana, K.V., and Karanth, N.G. 1989. Factors affecting biosurfactant production using *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6 under submerged conditions. J. Chem. Tech. Biotechnol. **45**: 249 – 257.
- Ramana, K.V., and Karanth, N.G. 1989. Production of biosurfactants by the resting cells of *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6. Biotech. Lett. **11**: 437 – 442.
- Rendell, N.B., Taylor, G.W., Somerville, M., Todd, H., Wilson, R., and Cole, P.J. 1990. Characterisation of *Pseudomonas rhamnolipids*. Biochem. Biophys. Acta. **1045**: 189 – 193.

- Robert, M., Mercade, M.E., Bosch, M.P., Parra, J.L., Espuny, M.J., Manresa, M.A., and Guinea, J. 1989. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. Biotech. Lett. **11**: 871 – 874.
- Scheibenbogen, K., Zytner, R.G., Lee, H., and Trevors, J.T. 1994. Enhanced removal of selected hydrocarbons from soil by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 biosurfactants and some chemical surfactants. J. chem. Tech. Biotechnol. **59**: 53 – 59.
- Schmid, A., Kollmer, A., and Witholt B. 1998. Effects of biosurfactant and emulsification on two – phase *Pseudomonas oleovorans* cultures and cell – free emulsions containing n-decane. Enzyme Microb. Technol. **22**: 487 – 493.
- Sekelsky, A.M., and Shreve, G.S. 1998. Kinetic model of biosurfactant – enhanced hexadecane biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa*. Biotechnol. Bioeng. **63**: 401 – 409.
- Sim, L., Ward, O.P., and Li, Z-Y. 1997. Production and characterisation of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. **19**: 232 – 238.
- Van Dyke, M.I. ,Couture, P., Brauer, M., Lee, H. and Trevors, J.T. 1993. *Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactant: structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil . Can. J. Microbiol. **39**: 1071 – 1078.

Williams, A.G., and Wimpenny, J.W.T. 1978. Exopolysaccharide production by

*Pseudomonas* NCIB11264. J. Gen. Microbiol. **104**: 47 – 57.

Zhang, Y. and Miller, R.M. 1992. Enhanced octadecane dispersion and biodegradation

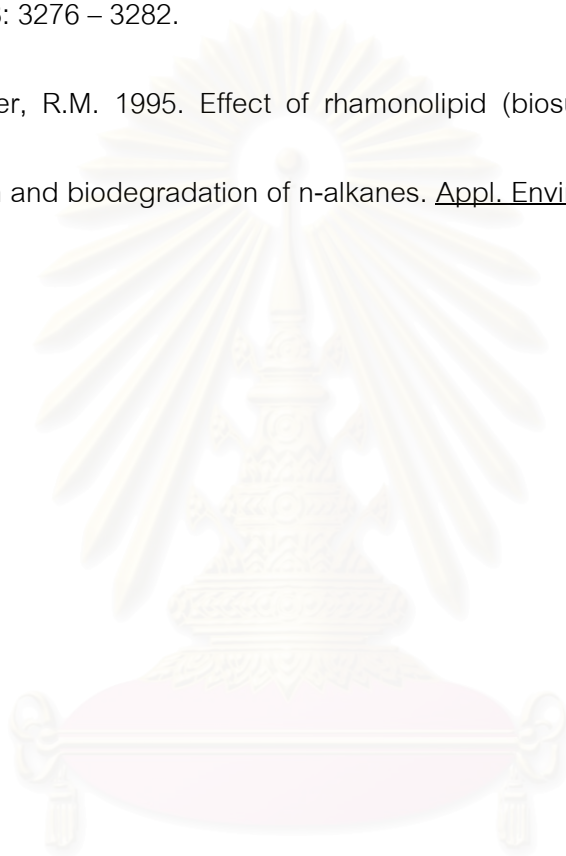
by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). Appl. Environ.

Microbiol. **58**: 3276 – 3282.

Zhang, Y. and Miller, R.M. 1995. Effect of rhamnolipid (biosurfactant) structure on

solubilization and biodegradation of n-alkanes. Appl. Environ. Microbiol. **61**: 2247

– 2251.



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก ก

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

### 1. อาหารวุ้นนิวเตรียนท์ ( Nutrient agar )

สารสกัดจากเนื้อ ( beef extract )	3.0	กรัม
แบคโตเปปโติน ( bacto peptone )	5.0	กรัม
วุ้นผง ( agar )	15.0	กรัม
น้ำกลั่น ( distilled water )	1	ลิตร

### 2. อาหารกำหนดสูตร (defined medium)

แอมโมเนียมไนเตรท ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )	3.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.4	กรัม
โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.2	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0.1	กรัม
กรดฟอสเฟอริก ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ )	0.5	มิลลิลิตร
กรดบอริก ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )	1.53	มิลลิกรัม
คอปเปอร์ซัลเฟต ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	0.284	มิลลิกรัม
แมงกานีสซัลเฟต ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	1.71	มิลลิกรัม
โซเดียมโมลิบเดต ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0.7	มิลลิกรัม
ซิงค์ซัลเฟต ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	2.9	มิลลิกรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	4.3	มิลลิกรัม
โคบอลตคลอไรด์ ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	0.1	มิลลิกรัม
อีดีทีเอ (EDTA)	200.0	มิลลิกรัม
แคลเซียม-แพนโททีเนต (Calcium-Pantothenate)	1.176	ไมโครกรัม
ไบโอติน (Biotin)	5.88	ไมโครกรัม
กรดพาราอะมิโนเบนโซอิก (P-Aminobenzoic acid)	0.588	มิลลิกรัม
ไพริดอกซีน-ไฮโดรคลอไรด์ (Pyridoxine-HCl)	1.176	มิลลิกรัม
ไรโบฟลาวิน (Riboflavin)	0.588	มิลลิกรัม
ไทอามีนไฮโดรคลอไรด์ (Thiamine-HCl)	1.176	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น (distilled water)	1	ลิตร



ภาคผนวก ข

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### ข1 กระบวนการวางแผนและออกแบบการทดลอง( experimental design)

การวางแผนและการออกแบบการทดลองมีประโยชน์ในการช่วยลดจำนวนการทดลอง อีกทั้งยังทำให้การรวบรวมข้อมูลทำได้อย่างครอบคลุมยิ่งขึ้น วิธีการทางสถิติที่นำมาใช้ในการออกแบบและวิเคราะห์ผลการทดลองเป็นวิธีที่เรียกว่าเรสพอนส์เซอร์เฟซ(response surface) โดยข้อมูลจะอยู่ในรูปของสมการความสัมพันธ์ของตัวแปรอิสระที่สนใจ ซึ่งในโครงงานวิจัยนี้ตัวแปรอิสระที่สนใจประกอบด้วย ค่าความเป็นกรด-ด่าง( $x_1$ ) ความเร็วรอบใบกวน( $x_2$ ) และเปอร์เซ็นต์น้ำมันปาล์มที่นำมาใช้ ( $x_3$ ) ผลของข้อมูลที่ได้จะแสดงในรูปอัตราการผลิตไขมันดีต่อไขมันเลวของเซลล์( $Y_1$ ) และอัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะ( $Y_2$ ) จากการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธีของเรสพอนส์เซอร์เฟซ จะสามารถสรุปผลของข้อมูล ซึ่งอาจได้ผลของข้อมูลเป็นข้อมูลสูงสุด(maximum response) ข้อมูลต่ำสุด(minimum response) หรือเป็นจุดเปลี่ยนแปลงของข้อมูล(saddle point)

กำหนดช่วงค่าตัวแปรอิสระของค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 6.0 ถึง 8.0 ความเร็วรอบใบกวนเป็น 580 ถึง 820 รอบต่อนาที และเปอร์เซ็นต์น้ำมันปาล์ม 1.0 เปอร์เซ็นต์ถึง 3.0 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร เพื่อสะดวกต่อการคำนวณ กำหนดค่าตัวแปรอิสระในช่วงของ -1 ถึง 1 โดยอาศัยสมการที่ (ข1)

$$x_n = \frac{\xi_n - a}{b} \quad (ข1)$$

- เมื่อ  $x_n$  เป็นโคัดของตัวแปรอิสระแต่ละตัว  
 $\xi_n$  เป็นค่าจริงของตัวแปรอิสระ  
 $a$  เป็นจุดกึ่งกลางของช่วงตัวแปรอิสระที่เลือกในแต่ละตัวแปร  
 $b$  เป็นช่วงกว้างที่ทำการทดสอบในแต่ละตัวแปร

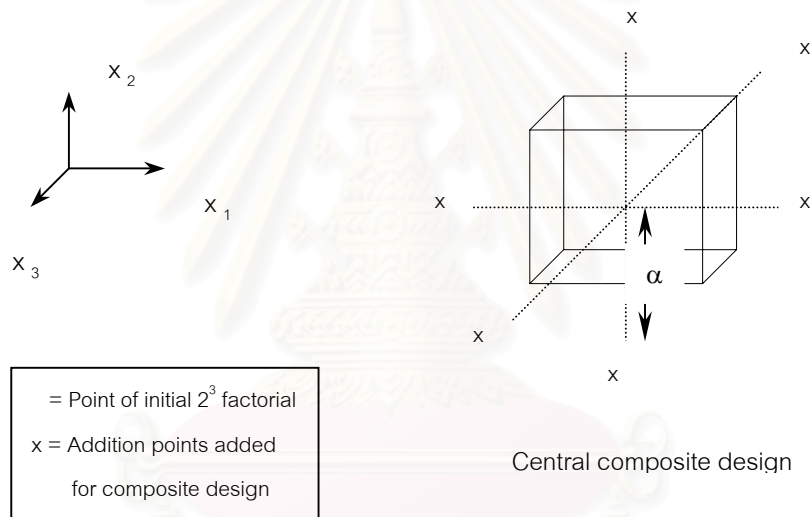
ดังนั้น สามารถแสดงโคัดค่าของตัวแปรอิสระของความเป็นกรด-ด่าง ค่าของตัวแปรอิสระ ความเร็วรอบ และตัวแปรอิสระเปอร์เซ็นต์น้ำมันปาล์มได้ตามลำดับ ดังนี้

$$x_1 = \frac{\xi_1 - 7.0}{1.0} \quad (ข2)$$

$$x_2 = \frac{\xi_2 - 700}{120} \tag{ข3}$$

$$x_3 = \frac{\xi_3 - 2.0}{1.0} \tag{ข4}$$

ทำการออกแบบการทดลองแสดงในตารางที่ ข1 เป็นการทดลองแบบแฟกเตอร์เรียลมีจำนวนการทดลอง  $2^3$  ครั้ง ( $2^3$  factorial) การทดลองกระจาย 6 ครั้ง (star) และการทดลองที่ศูนย์กลาง (center) จำนวนสามถึงห้าการทดลอง ในการทดลองชุดนี้ทำการทดลองที่ศูนย์กลางสามการทดลองเพื่อหาค่าความผิดพลาดที่เกิดขึ้นจากการทดลอง แสดงดังรูปที่ ข1



รูปที่ ข1 แสดงการออกแบบการทดลอง 17 การทดลองของสามตัวแปร

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การคำนวณค่าของการทดลองกระจายรอบจุดศูนย์กลาง(star) กำหนดให้มีค่าเท่ากับ  $\alpha$  โดยค่าของ  $\alpha$  ในแต่ละชุดการทดลองที่มีจำนวนตัวแปรอิสระไม่เท่ากันจะแตกต่างกันออกไป สำหรับชุดการทดลองที่มีตัวแปรอิสระเป็นสาม อาศัยสมการที่ (ข5) ในการหาค่าของ  $\alpha$  จะได้ค่า เป็น 1.682

$$\alpha = 2^{n/4} \quad (\text{ข5})$$

เมื่อ  $n$  คือจำนวนตัวแปรอิสระ

ตัวอย่างการแสดงผลการหาสมการแสดงความสัมพันธ์ของตัวแปรอิสระทั้งสามตัวที่มีผลต่อ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ จากจำนวนการทดลองรวมทั้งหมดเป็น 17 การทดลอง นำ มาคำนวณหาสมการอันดับสอง และทำนายผลการทดลองที่จุดที่เหมาะสมด้วยสมการดังนี้

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \varepsilon \quad (\text{ข6})$$

โดยที่  $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_3, \dots$  และ  $\varepsilon$  คือค่าสัมประสิทธิ์ของสมการอันดับสองและ

ค่าความผิดพลาดจากการทดลอง(experimental error) ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ข1 แสดงค่าของตัวแปรในแต่ละการทดลองตั้งแต่การทดลองที่ 1 ถึง 17

ชุดการทดลอง	ค่าของตัวแปร			โค้ดของตัวแปร			อัตราการเจริญเติบโต จำเพาะของเซลล์ (ต่อชั่วโมง)	อัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จำเพาะ (มิลลิกรัมลิตรต่อกรัม เซลล์ต่อชั่วโมงต่อเมตร)
	กรด-ด่าง (pH)	ความเร็วรอบ (rpm)	เปอร์เซ็นต์น้ำมัน (%v/v)	X1	X2	X3		
1	6.0	580	1	-1	-1	-1	0.232	2.238
2	8.0	580	1	1	-1	-1	0.138	3.409
3	6.0	820	1	-1	1	-1	0.148	3.244
4	8.0	820	1	1	1	-1	0.120	2.207
5	6.0	580	3	-1	-1	1	0.193	2.006
6	8.0	580	3	1	-1	1	0.157	3.194
7	6.0	820	3	-1	1	1	0.208	3.682
8	8.0	820	3	1	1	1	0.139	0.934
9	5.3	700	2	-1.68	0	0	0.120	1.853
10	8.7	700	2	1.68	0	0	0.105	1.848
11	7.0	498	2	0	-1.68	0	0.110	2.540
12	7.0	902	2	0	1.68	0	0.126	3.003
13	7.0	700	0.32	0	0	-1.68	0.175	3.101
14	7.0	700	3.68	0	0	1.68	0.130	2.830
15	7.0	700	2	0	0	0	0.246	2.589
16	7.0	700	2	0	0	0	0.144	5.001
17	7.0	700	2	0	0	0	0.189	3.091



การประมาณค่า  $\beta_0', \beta_1, \beta_2, \dots$  โดยใช้วิธีกำลังสองน้อยที่สุด (least squares method)

นั่นคือหาค่าของ  $\beta_0', \beta_1, \beta_2, \dots$  ที่ทำให้  $L = \sum_{i=1}^n \varepsilon_i^2 = \varepsilon' \varepsilon$  มีค่าน้อยที่สุด (Myers, 1971)

$$\text{นั่นคือ } L = (Y - X \hat{\beta}) (Y - X \hat{\beta}) \tag{๗7}$$

$$\text{และ } \frac{\partial L}{\partial \hat{\beta}} = -2X'Y + 2(X'X) \hat{\beta} = 0 \tag{๗8}$$

$$\text{ดังนั้น } (X'X) \hat{\beta} = X'Y \quad \text{หรือ} \quad \hat{\beta} = (X'X)^{-1} X'Y \tag{๗9}$$

แสดงค่าของสมการรวมในรูปของเมตริก เพื่อสะดวกในการคำนวณ

$$Y = \begin{bmatrix} y_1 \\ y_2 \\ y_3 \\ y_4 \\ \vdots \\ \vdots \\ \vdots \\ y_{17} \end{bmatrix}, \quad \hat{\beta} = \begin{bmatrix} \beta_0' \\ \beta_1 \\ \beta_2 \\ \beta_3 \\ \beta_{11} \\ \beta_{22} \\ \beta_{33} \\ \beta_{12} \\ \beta_{13} \\ \beta_{23} \end{bmatrix}$$
  

$$X = \begin{pmatrix} 1 & x_{1,1} & x_{2,1} & x_{3,1} & x_{1,1}^2 & x_{2,1}^2 & x_{3,1}^2 & x_{1,1}x_{2,1} & x_{1,1}x_{3,1} & x_{2,1}x_{3,1} \\ 1 & x_{1,2} & x_{2,2} & x_{3,1} & x_{1,2}^2 & x_{2,2}^2 & x_{3,2}^2 & x_{1,2}x_{2,2} & x_{1,2}x_{3,2} & x_{2,2}x_{3,2} \\ 1 & x_{1,3} & x_{2,3} & x_{3,1} & x_{1,3}^2 & x_{2,3}^2 & x_{3,3}^2 & x_{1,3}x_{2,3} & x_{1,3}x_{3,3} & x_{2,3}x_{3,3} \\ 1 & x_{1,4} & x_{2,4} & x_{3,1} & x_{1,4}^2 & x_{2,4}^2 & x_{3,4}^2 & x_{1,4}x_{2,4} & x_{1,4}x_{3,4} & x_{2,4}x_{3,4} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & x_{1,17} & x_{2,17} & x_{3,17} & x_{1,17}^2 & x_{2,17}^2 & x_{3,17}^2 & x_{1,17}x_{2,17} & x_{1,17}x_{3,17} & x_{2,17}x_{3,17} \end{pmatrix}$$

ค่าของ  $x_{i,j}$  แสดงค่าของตัวแปรที่  $i$  และ  $j$  ต่างๆกัน

โดยที่  $i$  คือแสดงชนิดของตัวแปรประกอบด้วยค่าความเป็นกรด-ด่าง ความเร็ว

รอบใบกวน และเปอร์เซ็นต์น้ำมันปาล์ม เป็นตัวเลข 1, 2 และ 3 ตามลำดับ

และ  $j$  แสดงชุดการทดลองตั้งแต่ 1 ถึง 17 การทดลอง

การคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ของสมการอันดับสองอาศัยการแก้สมการที่แสดงไว้สมการ

ที่(ข8) ต้องหาอินเวอร์สของเมตริก( $X'X$ ) คูณกับค่าเมตริก( $X'Y$ ) แสดงขั้นตอนการคำนวณดังนี้

$$X'X = \begin{bmatrix} N & \sum x_1 & \sum x_2 & \sum x_3 & \sum x_1^2 & \sum x_2^2 & \sum x_3^2 & \sum x_1x_2 & \sum x_1x_3 & \sum x_2x_3 \\ \sum x_1^2 & \sum x_1x_2 & \sum x_1x_3 & \sum x_1^3 & \sum x_1x_2^2 & \sum x_1x_3^2 & \sum x_1^2x_2 & \sum x_1^2x_3 & \sum x_1x_2x_3 & \sum x_1^2x_3 \\ \sum x_2^2 & \sum x_2x_3 & \sum x_1^2x_2 & \sum x_2^3 & \sum x_2x_3^2 & \sum x_1x_2^2 & \sum x_1x_2x_3 & \sum x_1x_3^2 & \sum x_2x_3^2 \\ \sum x_3^2 & \sum x_1^2x_3 & \sum x_2^2x_3 & \sum x_3^3 & \sum x_1x_2x_3 & \sum x_1x_3^2 & \sum x_2x_3^2 \\ \sum x_1^4 & \sum x_1^2x_2^2 & \sum x_1^2x_3^2 & \sum x_1^3x_2 & \sum x_1^3x_3 & \sum x_1^2x_2x_3 \\ \sum x_2^4 & \sum x_2^2x_3^2 & \sum x_1x_2^3 & \sum x_1x_2^2x_3 & \sum x_2^2x_3^2 \\ \sum x_3^4 & \sum x_1x_2x_3^2 & \sum x_1x_3^3 & \sum x_2x_3^3 \\ \sum x_1^2x_2^2 & \sum x_1^2x_2x_3 & \sum x_1x_2^2x_3 \\ \text{Sym .} & \sum x_1^2x_3^2 & \sum x_1x_2x_3^2 \\ & \sum x_2^2x_3^2 \end{bmatrix}$$

หรือมีค่าเป็น

$$X'X = \begin{bmatrix} 17 & 0 & 0 & 0 & 13.6582 & 13.6582 & 13.6582 & 0 & 0 & 0 \\ 13.6582 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ & 13.582 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ & & 13.582 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ & & & 24.0079 & 8 & 8 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ & & & & 24.0079 & 8 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ & & & & & 24.0079 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ & & & & & & 8 & 0 & 0 & 0 \\ \text{Sym .} & & & & & & & 8 & 0 & 0 \\ & & & & & & & & 8 & 0 \end{bmatrix}$$

เมตริกอินเวอร์สของ  $(X'X)$  คือ

$$(X'X)^{-1} = \begin{bmatrix} 0.3320 & 0 & 0 & 0 & -0.1133 & -0.1133 & -0.1133 & 0 & 0 & 0 \\ & 0.0732 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ & & 0.0732 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ & & & 0.0732 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ & & & & 0.0886 & 0.0262 & 0.0262 & 0 & 0 & 0 \\ & & & & & 0.0886 & 0.0262 & 0 & 0 & 0 \\ & & & & & & 0.0886 & 0 & 0 & 0 \\ & & & & & & & 0.1250 & 0 & 0 \\ & & & & & & & & 0.1250 & 0 \\ & & & & & & & & & 0.1250 \end{bmatrix}$$

Sym.

$$X'Y = \begin{bmatrix} \sum Y \\ \sum x_1Y \\ \sum x_2Y \\ \sum x_3Y \\ \sum x_1^2Y \\ \sum x_2^2Y \\ \sum x_3^2Y \\ \sum x_1x_2Y \\ \sum x_1x_3Y \\ \sum x_2x_3Y \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 2.6790 \\ -0.2529 \\ -0.0766 \\ -0.0179 \\ 1.9699 \\ 2.0010 \\ 2.1965 \\ 0.0319 \\ 0.0169 \\ 0.0987 \end{bmatrix} \quad \text{ดังนั้นค่าของ } \beta = (X'X)^{-1} X'Y = \begin{bmatrix} 0.1905 \\ -0.0185 \\ -0.0056 \\ -0.0013 \\ -0.0190 \\ -0.0171 \\ -0.0049 \\ 0.0040 \\ 0.0021 \\ 0.0123 \end{bmatrix}$$

จากสมการข้างต้นสามารถเขียนเป็นเมตริก แล้วทำการแก้สมการของเมตริกจะทำให้ได้  
 เวกเตอร์ของของ  $\hat{\beta}$  ดังนั้นสมการแสดงผลอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ โดยมีตัวแปร  
 อีสาระของค่าความเป็นกรด-ด่าง ความเร็วรอบไบกวนและเปอร์เซ็นต์น้ำมันที่มีอิทธิพลต่อกระบวนการหมัก ได้ความสัมพันธ์ดังต่อไปนี้

$$y_1 = 0.1905 - 0.0185x_1 - 0.0056x_2 - 0.0013x_3 - 0.0190x_1^2 - 0.0171x_2^2 - 0.0049x_3^2 + 0.0040x_1x_2 + 0.0021x_1x_3 + 0.0123x_2x_3 \quad (ข10)$$

และในทำนองเดียวกัน การคำนวณผลของค่าความเป็นกรด-ด่าง ความเร็วรอบและ  
 ปริมาณของน้ำมันที่นำมาใช้ในกระบวนการหมัก ที่มีผลต่ออัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ  
 จำเพาะ แสดงความสัมพันธ์ดังต่อไปนี้

$$y_2 = 3.5521 - 0.1050x_1 - 0.0001x_2 - 0.1272x_3 - 0.5719x_1^2 - 0.2467x_2^2 - 0.1781x_3^2 - 0.7681x_1x_2 - 0.2118x_1x_3 - 0.0485x_2x_3 \quad (ข11)$$

แทนค่าตัวแปรของ  $x_1$ ,  $x_2$  และ  $x_3$  ตามรหัสโค้ดของตัวแปรในชุดการทดลองที่ 1 ถึง 17 ที่  
 แสดงไว้ในตารางที่ ข1 จะได้ผลในตารางที่ ข2

สถาบันวิทยบริการ  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ข2 เปรียบเทียบค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ และอัตราการผลิตสารลดแรง

ดึงผิวชีวภาพจำเพาะที่ได้จากสมการที่ (ข10) และ (ข11) ตามลำดับ กับผลที่ได้จากการทดลอง

การทดลองที่	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์		ผลต่าง	อัตราการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพจำเพาะ		ผลต่าง
	ทดลอง	คำนวณ		ทดลอง	คำนวณ	
1	0.2319	0.1928	0.0391	2.2378	1.7593	0.4785
2	0.1383	0.1446	-0.0063	3.4091	3.5091	-0.1000
3	0.1484	0.1490	-0.0006	3.2439	3.3923	-0.1484
4	0.1202	0.1168	0.0034	2.2071	2.0697	0.1374
5	0.1925	0.1614	0.0311	2.0059	2.0255	-0.0196
6	0.1568	0.1216	0.0352	3.1943	2.9281	0.2662
7	0.2078	0.1668	0.0410	3.6823	3.4645	0.2178
8	0.1386	0.1430	-0.0044	0.9339	1.2947	-0.3608
9	0.1201	0.1671	-0.0470	1.8533	2.1144	-0.2611
10	0.1045	0.1066	-0.0021	1.8481	1.7616	0.0865
11	0.1095	0.1516	-0.0421	2.5401	2.8560	-0.3159
12	0.1261	0.1328	-0.0067	3.0026	2.8556	0.1470
13	0.1746	0.1789	-0.0043	3.1010	3.2631	-0.1621
14	0.1301	0.1745	-0.0444	2.8301	2.8357	-0.0056
15	0.2464	0.1905	0.0559	2.5888	3.5521	-0.9633
16	0.1439	0.1905	-0.0466	5.0009	3.5521	1.4488
17	0.1893	0.1905	-0.0012	3.0910	3.5521	-0.4611

หมายเหตุ

# หน่วยของอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ (ต่อชั่วโมง)

# หน่วยของอัตราการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพจำเพาะ (มิลลิกรัมต่อลิตรต่อกรัม

เซลล์ต่อเมตรต่อชั่วโมง)

ใช้ ANOVA ในการวิเคราะห์สมการ (ข10) และ (ข11) โดยอาศัยโปรแกรม STATGRAPHICS เวอร์ชัน 6.1 ทำนายหาค่าอัตราการผลิตดิบต่อจำเพาะของเซลล์และอัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวซึ่งภาพจำเพาะ แสดงถึงความแม่นยำในตารางที่ ข3 และ ข4 ตามลำดับ

ตารางที่ ข3 การวิเคราะห์ความแตกต่างของสมการ (ข10) โดยใช้ ANOVA ตรวจสอบ

Source of variance	Sum Square	Degree of Freedom	Mean Square	F Ratio
Total	0.0290	16		
Model	0.0138	9		
Linear	0.0050	3		
$\beta_1$	0.0046	1		
$\beta_2$	0.0004	1		
$\beta_3$	0.0000	1		
Quadratic and interaction	0.0088	6		
$\beta_{11}$	0.0040	1		
$\beta_{22}$	0.0032	1		
$\beta_{33}$	0.0003	1		
$\beta_{12}$	0.0001	1		
$\beta_{13}$	0.0000	1		
$\beta_{23}$	0.0012	1		
Error	0.0167	7		
Lack of fit	0.0115	5	0.0023	0.88
Experimental Error	0.0052	2	0.0026	



$$\text{Sum of Square experiment} = 0.246^2 + 0.144^2 + 0.189^2 - (0.579^2/3) = 0.0052$$

$$\text{Sum of Square lack of fit} = 0.0167 - 0.0052 = 0.0115$$

พิจารณาค่า F วิกฤตที่ระดับความเชื่อมั่น 90 เปอร์เซนต์ จะได้ค่าของ F วิกฤต ณ จุด

$F_{0.90, 5, 2}$  ประมาณ 9.29 ซึ่งค่าของ F ที่คำนวณนั้นเท่ากับ 0.88 ซึ่งมีค่าน้อยกว่า F วิกฤตที่ระดับความเชื่อมั่น 90 เปอร์เซนต์ แสดงว่าสมการอัตราการผลิตเตบโตจำเพาะของเซลล์ที่ได้มีความเชื่อถือได้ที่ระดับความเชื่อมั่น 90 เปอร์เซนต์



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ๗4 การวิเคราะห์ความแตกต่างของสมการ (๗13) โดยใช้ ANOVA ตรวจสอบ

Source of variance	Sum Square	Degree of Freedom	Mean Square	F Ratio
Total	13.2176	16		
Model	10.1913	9		
Linear	0.3718	3		
$\beta_1$	0.1506	1		
$\beta_2$	0.0000	1		
$\beta_3$	0.2212	1		
Quadratic and interaction	9.8195	6		
$\beta_{11}$	3.6852	1		
$\beta_{22}$	0.6829	1		
$\beta_{33}$	0.3553	1		
$\beta_{12}$	4.7186	1		
$\beta_{13}$	0.3587	1		
$\beta_{23}$	0.0188	1		
Error	3.9898	7		
Lack of fit	0.7498	5	0.1387	0.09
Experimental Error	3.24	2	1.62	

$$\text{Sum of Square experiment} = 2.589^2 + 5.001^2 + 3.091^2 - (10.681^2/3) = 3.24$$

$$\text{Sum of Square lack of fit} = 3.9931 - 3.2400 = 0.7498$$

พิจารณาค่า F วิกฤตที่ระดับความเชื่อมั่น 90 เปอร์เซนต์ จะได้ค่าของ F วิกฤต ณ จุด

$F_{0.90, 5, 2}$  ประมาณ 9.29 ซึ่งค่าของ F ที่คำนวณนั้นเท่ากับ 0.09 ซึ่งมีค่าน้อยกว่า F วิกฤตที่ระดับ

ความเชื่อมั่น 90 เปอร์เซนต์ แสดงว่าสมการการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะมีความเชื่อ

ถือได้ที่ระดับความเชื่อมั่น 90 เปอร์เซนต์

## ข2 การหาภาวะที่เหมาะสมของตัวแปรทั้งสาม

จากความสัมพันธ์ของค่าความเป็นกรด-ด่าง ความเร็วรอบไบกวน และเปอร์เซ็นต์ของน้ำมันปาล์มที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ และอัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะ เราจำเป็นต้องหาภาวะที่เหมาะสมของตัวแปรทั้งสาม จากสมการที่ (ข6) ทำการดิฟเฟอเรนเชียล (Differential) เทียบกับตัวแปรอิสระแต่ละตัวดังนี้

$$\frac{\partial y}{\partial x_1} = \beta_1 + 2\beta_{11}x_1 + \beta_{12}x_2 + \beta_{13}x_3 = 0 \quad (\text{ข12})$$

$$\frac{\partial y}{\partial x_2} = \beta_2 + \beta_{12}x_1 + 2\beta_{22}x_2 + \beta_{23}x_3 = 0 \quad (\text{ข13})$$

$$\frac{\partial y}{\partial x_3} = \beta_3 + \beta_{13}x_1 + \beta_{23}x_2 + 2\beta_{33}x_3 = 0 \quad (\text{ข14})$$

### ข2.1 ภาวะที่เหมาะสมต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์

จากสมการที่ (ข10) เมื่อดิฟเฟอเรนเชียลเทียบกับตัวแปรแล้วจะได้สมการดังนี้ คือ

$$-0.0185 - 0.3803x_1 + 0.0040x_2 + 0.0021x_3 = 0 \quad (\text{ข15})$$

$$-0.0056 + 0.0040x_1 - 0.0341x_2 + 0.0123x_3 = 0 \quad (\text{ข16})$$

$$-0.0013 + 0.0021x_1 + 0.0123x_2 - 0.0097x_3 = 0 \quad (\text{ข17})$$

จากสมการ (ข15) ถึง (ข17) แก้สมการหาค่าของตัวแปรอิสระ

$$x_1 = -0.61, \quad x_2 = -0.61, \quad x_3 = -1.04$$

เปลี่ยนค่าของระดับในแต่ละตัวแปรให้เป็นค่าจริงของตัวแปรจะได้ภาวะที่เหมาะสมต่อ

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ ในกระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง คือ

$$\text{ค่าความเป็นกรด-ด่าง} = 6.4$$

$$\text{ความเร็วรอบไบกวน} = 627 \quad \text{รอบต่อนาที}$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์น้ำมันปาล์ม} = 1.0 \quad \text{เปอร์เซ็นต์}$$

ข2.2 ภาวะที่เหมาะสมต่ออัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะ

จากสมการที่ (ข11) เมื่อดิฟเฟอเรนเชียลเทียบกับตัวแปรแล้วจะได้สมการดังนี้ คือ

$$-0.1050 - 1.1438x_1 - 0.7681x_2 - 0.2118x_3 = 0 \quad (\text{ข18})$$

$$-0.0001 - 0.7681x_1 - 0.4934x_2 - 0.0485x_3 = 0 \quad (\text{ข19})$$

$$-0.1272 - 0.2118x_1 - 0.0485x_2 - 0.3563x_3 = 0 \quad (\text{ข20})$$

จากสมการ (ข18) ถึง (ข20) แก้สมการหาค่าของตัวแปรอิสระ

$$x_1 = 0.53, \quad x_2 = -0.77, \quad x_3 = -0.57$$

เปลี่ยนค่าของระดับในแต่ละตัวแปรให้เป็นค่าจริงของตัวแปรจะได้ภาวะที่เหมาะสมต่อ

อัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะ ในกระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง คือ

$$\text{ค่าความเป็นกรด-ด่าง} = 7.5$$

$$\text{ความเร็วรอบใบกวน} = 608 \quad \text{รอบต่อนาที}$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์น้ำมันปาล์ม} = 1.5 \quad \text{เปอร์เซ็นต์}$$

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก ค

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## การใช้เครื่อง Kruss Tensiometer K6

- 1 ปรับ handwheel with pointer [2] ให้สเกลมีค่าเป็นศูนย์
- 2 ปรับ zero adjustment [8] โดยหมุนทวนเข็มนาฬิกา (ไม่เกินรอบ) ให้ balance beam [9] อยู่ในตำแหน่งสมดุล กึ่งกลางของ mark [7]
- 3 ปรับระดับที่วางตัวอย่างโดยหมุน [10] แล้วยกขึ้นให้อยู่ในระดับที่ต้องการ (สูงพอควร)
- 4 แขนง ring ลงใน balance beam [9] ปรับให้อยู่ในตำแหน่งสมดุล โดยหมุน zero adjustment [8] หมุนตามเข็มนาฬิกา (ไม่เกินรอบ)
- 5 ใส่ตัวอย่างลงใน vessel (10 - 50 ml) แล้ววางลงบน sample table [6] แล้วหมุน micrometer screw [5] ตามเข็มนาฬิกา เพื่อยก vessel ขึ้นให้สัมผัสกับ ring โดยให้ ring จมอยู่ในตัวอย่างไม่น้อยกว่า 5 mm.
- 6 เมื่อ ring สัมผัสกับตัวอย่างแล้วอาจต้องปรับ balance beam [9] ให้อยู่ในตำแหน่งสมดุลอีกครั้ง โดยหมุน zero adjustment [8]
- 7 เมื่ออยู่ในตำแหน่งสมดุลแล้ว ก็เริ่มวัดค่าได้โดยการหมุน micrometer screw [5] ลงอย่างช้า ๆ ทวนเข็มนาฬิกาเพื่อดีดตัวอย่างลง ในขณะที่เดียวกันก็หมุน pointer [2] ตามเข็มนาฬิกาอย่างช้า ๆ โดยรักษาสภาพของ balance beam [9] ให้อยู่ในตำแหน่งสมดุล
- 8 เมื่อ ring หลุดออกจากสารตัวอย่างอ่านค่าแรงตึงผิวตามสเกล [1]
- 9 เมื่อเสร็จการทดลองล้าง ring ด้วยน้ำกลั่น สะบัดให้แห้ง (หรือผ่านเปลวไฟ) เก็บเข้ากล่องไม้ ส่วน vessel ล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น (หรือ acetone) ซับให้แห้ง (หรือผ่านเปลวไฟ)
- 10 การเก็บเครื่องจะต้องปรับ zero adjustment [8] ให้ balance beam [9] ยกขึ้น เพื่อป้องกันการแกว่งของ balance beam ปรับที่วางสารตัวอย่างให้อยู่ในระดับเดิม แล้วหมุนเข้าหาตัวเครื่อง [13]



### ข้อควรระวัง

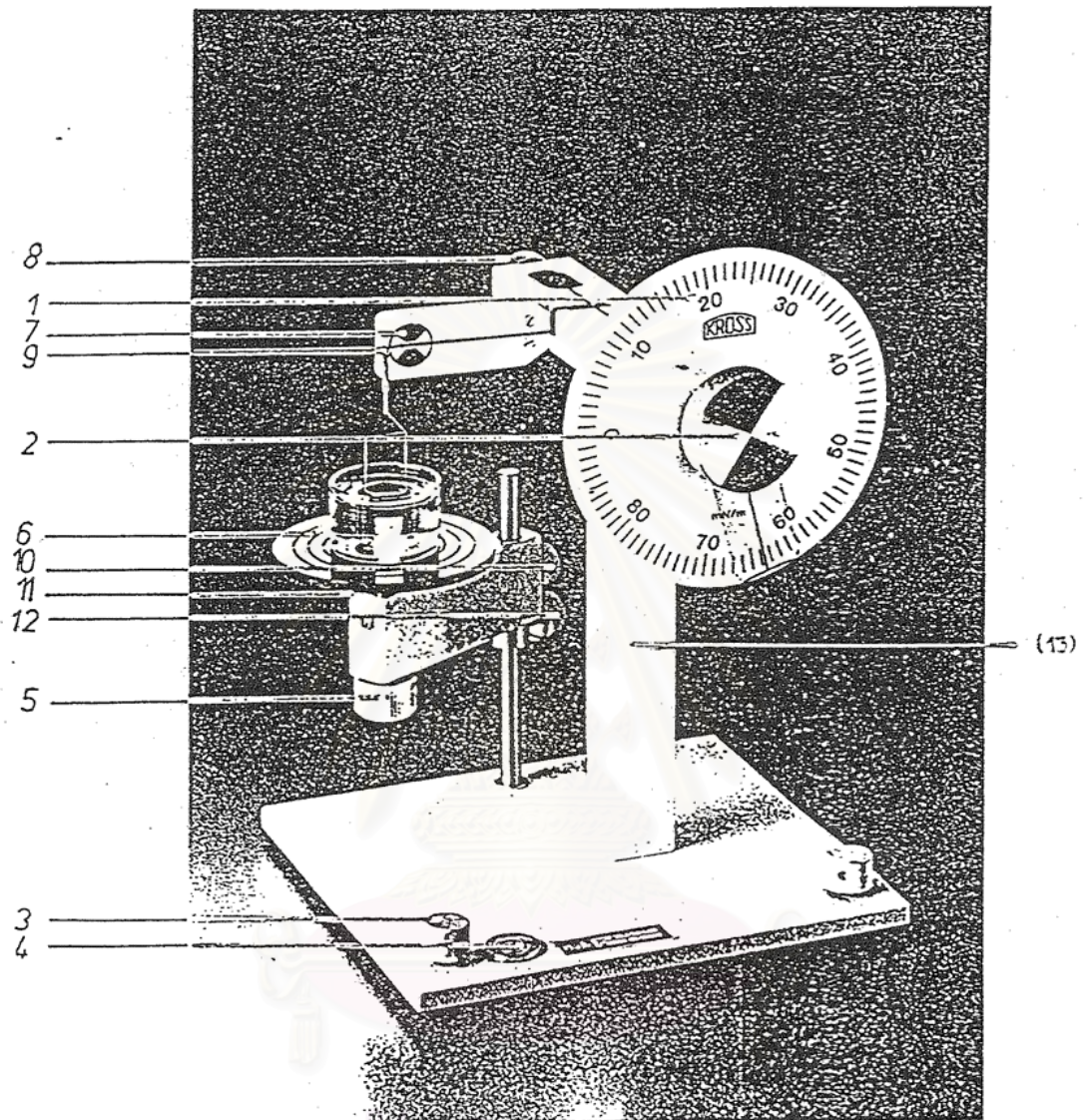
- 1 ห้ามกดปุ่มที่อยู่ด้านหลังของ zero adjustment [8] เด็ดขาด เพราะจะทำให้ wire หลุดได้
- 2 ห้ามหมุน zero adjustment [8] เกิน 1 รอบเด็ดขาด
- 3 การใช้ ring ต้องใช้ด้วยความระมัดระวังอย่าให้บิดเบี้ยว เพราะถ้า ring เสียรูปจะทำให้การวัดค่าผิดไปได้
- 4 การใช้ vessel ต้องใช้ด้วยความระมัดระวังเช่นกัน

### ข้อแนะนำ

- 1 ขณะวัดค่าแรงตึงผิวตามข้อ 7 ถ้าทำการหมุน micrometer screw[5] และ pointer[2] อย่างช้า ๆ จะทำให้เกิดความผิดพลาดน้อย
2. ring, vessel มีคุณสมบัติทนไฟ สามารถผ่านเปลวไฟได้ ในกรณีที่จำเป็น
- 3.ขณะแขวน ring ลงบน balance beam [9] อาจต้องใช้มือช่วยเล็กน้อย

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวัดค่าแรงดึงผิว

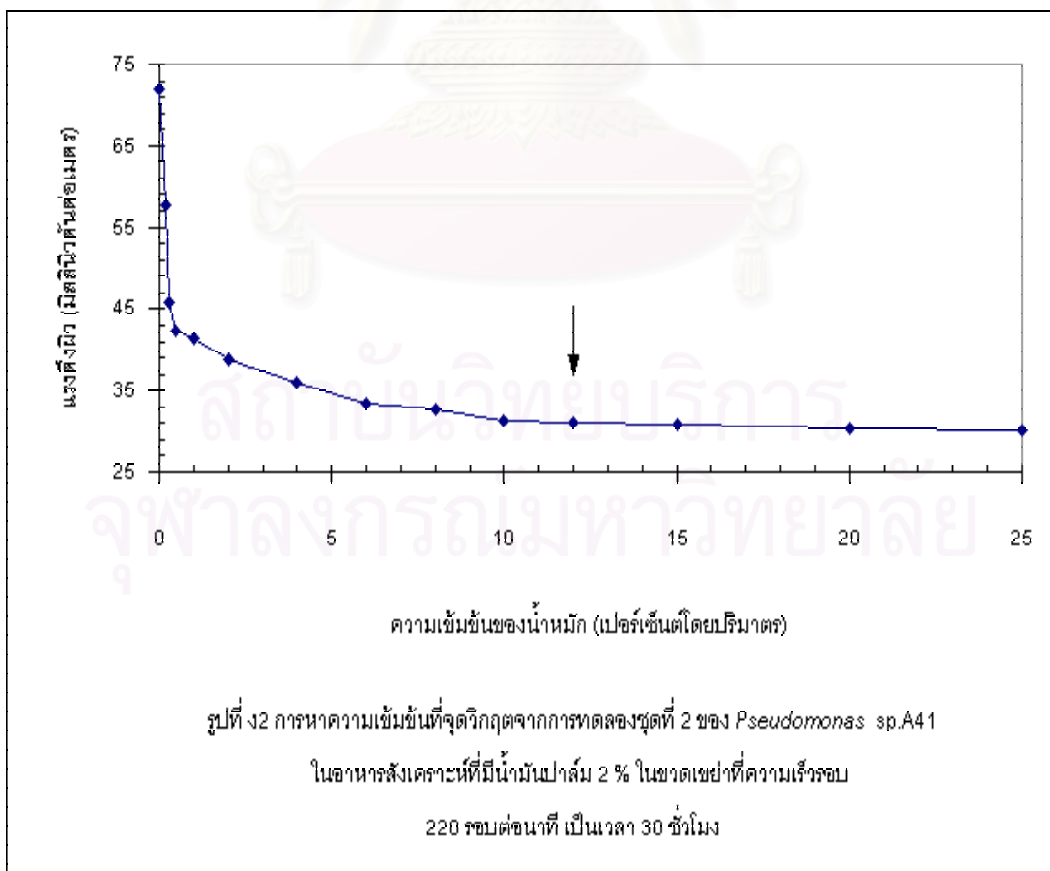
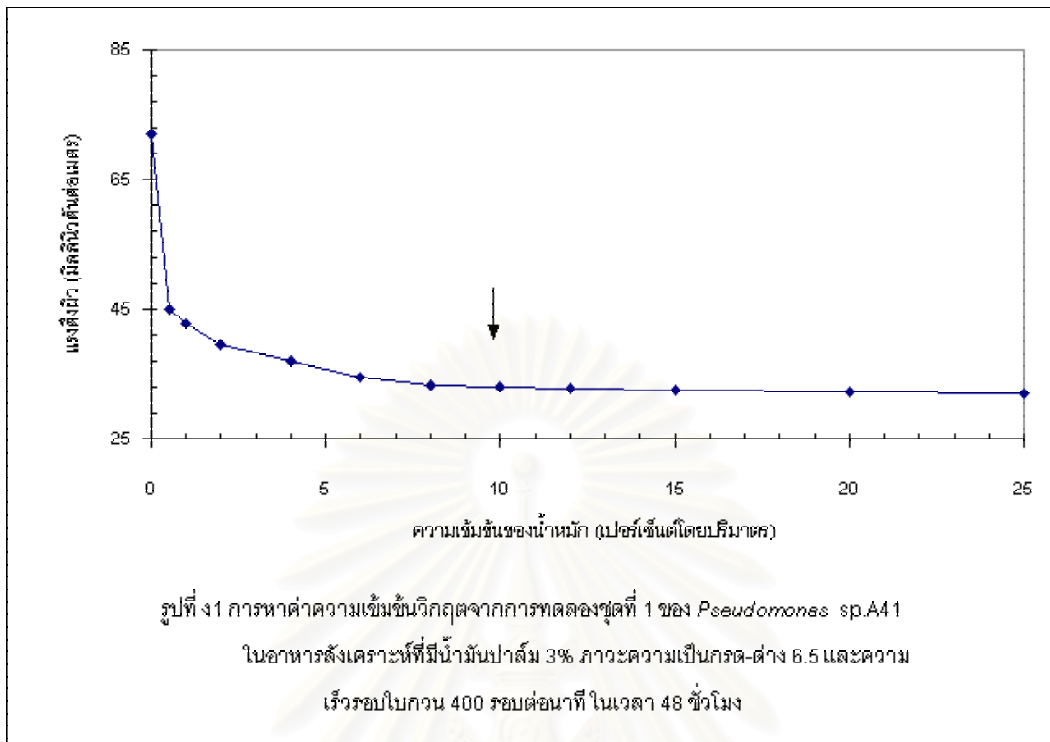


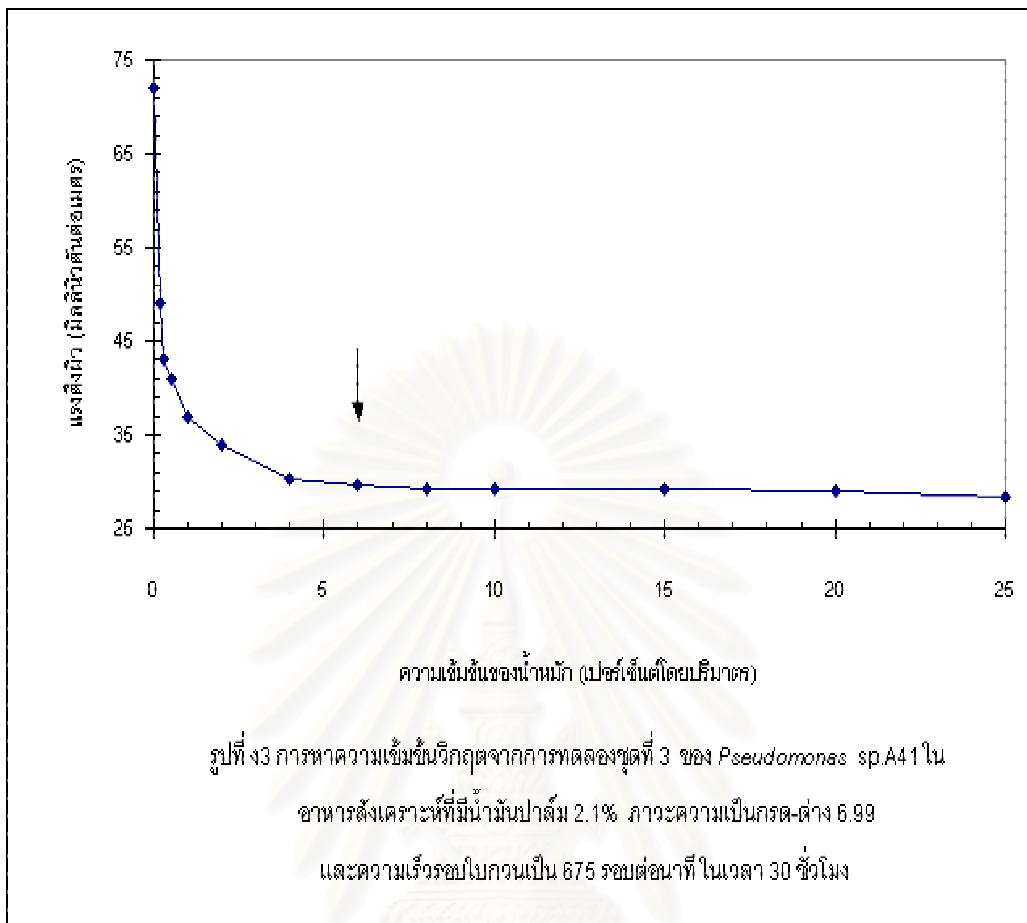
สถานวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก ง

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก จ

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### จ ตัวอย่างการคำนวณผลการทดลอง

แสดงตัวอย่างการคำนวณหาค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ และอัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะ จากการเพาะเลี้ยง *Pseudomonas* sp.A41 บนอาหารสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์ม 2.1 เปอร์เซ็นต์ ภาวะความเป็นกรด-ด่างที่ 7.0 และควบคุมความเร็วรอบใบกวนเป็น 675 รอบต่อนาทีในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง เป็นเวลา 30 ชั่วโมง แยกส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์หาค่าแรงตึงผิว และค่าการกระจายตัวของน้ำมัน เซลล์ที่แยกน้ำออกแล้วนำไปอบแห้ง และคำนวณหาความเข้มข้นของเซลล์ แสดงในตารางที่ ๑1

ตารางที่ ๑1 ผลการทดสอบค่าแรงตึงผิว การกระจายตัวของน้ำมัน และความเข้มข้นของเซลล์จากการทดลองตัวอย่าง

เวลา(นาท)	ความเข้มข้นของเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าแรงตึงผิวที่เจือจาง1:100 (มิลลินิวตันต่อเมตร)	การแทนที่บนผิวน้ำมัน (ตารางเซนติเมตร)
0	0.11	69.6	0.03
3	0.13	68.6	3.14
6	0.56	68.0	13.85
9	1.83	46.9	78.54
12	2.06	39.0	128.00
15	2.59	36.6	215.03
18	2.37	37.0	197.04
21	2.24	36.4	197.04
24	2.01	36.7	207.74
27	1.83	36.9	197.04
30	1.91	36.9	190.07



๑1 การคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์

(Specific Cell Productivity,  $\mu$ )

จากการทำสมดุลมวลของเซลล์ (cell mass balance) ในกระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad (๑1)$$

เมื่อ  $x$  = ความเข้มข้นของเซลล์ (กรัมต่อลิตร)

$t$  = เวลา (ชั่วโมง)

$\mu$  = อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ (ต่อชั่วโมง)

จัดรูปสมการที่ (๑1) และทำการอินทิเกรต

$$\int_{x_0}^x \frac{dx}{x} = \int_{t_0}^t \mu dt$$

$$\ln(x) = \mu t - \ln(x_0) \quad (๑2)$$

จากสมการที่ (๑2) เขียนกราฟความสัมพันธ์  $t$  กับ  $\ln(x)$  จะมีแนวโน้มเป็นเส้นตรง

แสดงดังรูปที่ ๑1 ความชันที่ได้เป็น 0.242 (ต่อชั่วโมง)

๑2 การคำนวณอัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะ

(Specific Product Productivity)

จากการทำสมดุลความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (production balance) ในกระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง

$$\frac{dP}{dt} = q_p x \quad (๑3)$$

เมื่อ  $P$  = ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)

$q_p$  = อัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะ

(กรัมผลิตภัณฑ์ต่อกรัมเซลล์ต่อชั่วโมง)

จัดรูปสมการที่ (๑3) และทำการอินทิเกรต

$$\int_{P_0}^P dp = q_p \int_0^t x dt$$

$$\Delta P = P - P_0 = q_p \int_0^t x dt \quad (๑4)$$

กำหนดให้การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ( $\Delta P$ ) เพิ่มขึ้นจะเกิดในทิศทางตรงกันข้ามกับการเปลี่ยนแปลงค่าแรงตึง ( $\Delta S$ ) ให้ค่าลดลง ดังนั้น

$$\Delta P = -a \Delta S \quad (๑5)$$

และจากกฎทราพีซอยดอล (Trapezoidal Rule)

$$\int_0^t x dt = h \left[ \left( \frac{x_0 + x_t}{2} \right) + \sum_1^{n-1} x_i \right] = C \quad (๑6)$$

- เมื่อ  $x_0$  = ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)  
 $x_t$  = ความเข้มข้นของเซลล์ที่เวลาใด ๆ (กรัมต่อลิตร)  
 $x_i$  = ความเข้มข้นของเซลล์ในช่วงเริ่มต้นและเวลาใด ๆ (กรัมต่อลิตร)  
 $h$  = ระยะเวลาการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นเซลล์แต่ละครั้ง (ชั่วโมง)

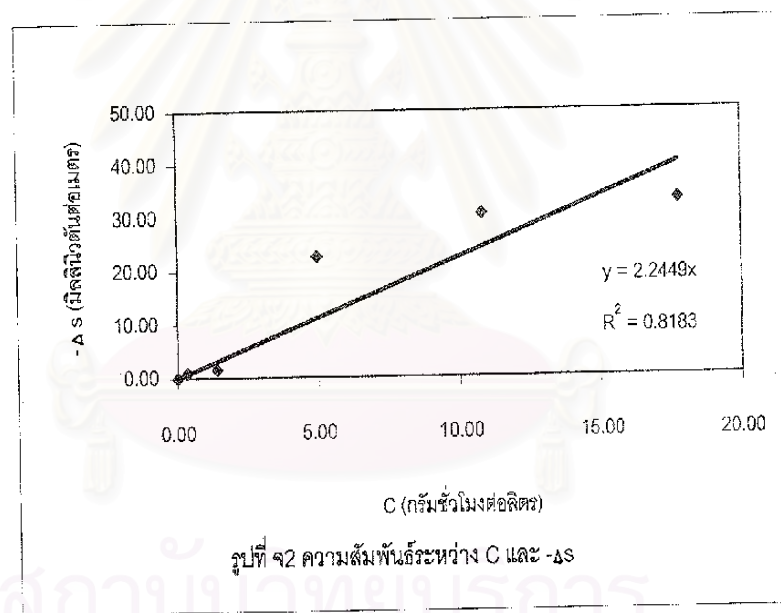
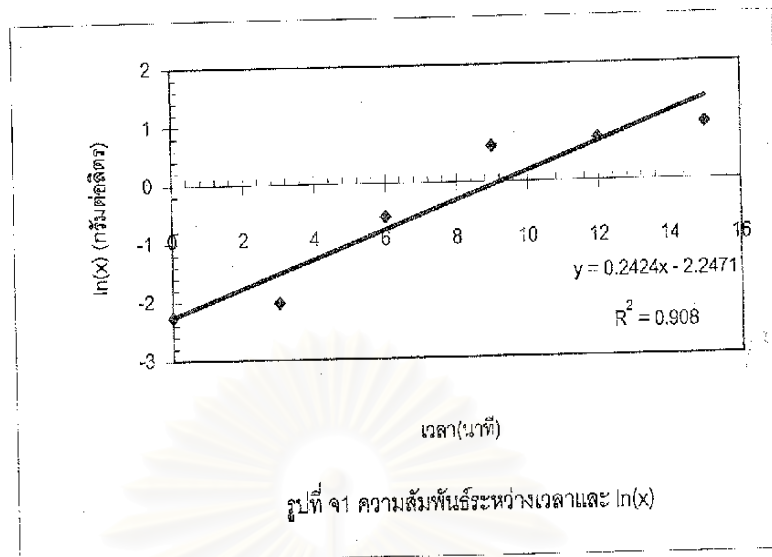
จากสมการที่ (๑5) และ (๑6) แทนใน (๑4)

$$-\Delta S = Q_p C \quad (๑7)$$

$Q_p$  = อัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะรวม  
 (มิลลิวตัน ลิตรต่อกรัมเซลล์ต่อชั่วโมงต่อเมตร)

จากสมการที่ (๑7) เขียนกราฟความสัมพันธ์ C กับ  $-\Delta S$  จะมีแนวโน้มเป็นเส้นตรงแสดงในรูปที่ ๑2 ความชันที่ได้เป็น 2.245 (มิลลิวตัน ลิตรต่อกรัมเซลล์ต่อชั่วโมงต่อเมตร)

สำหรับผลการคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ และอัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ในการทดลองทั้งหมดแสดงในภาพผนวก ข ตารางที่ ข2



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

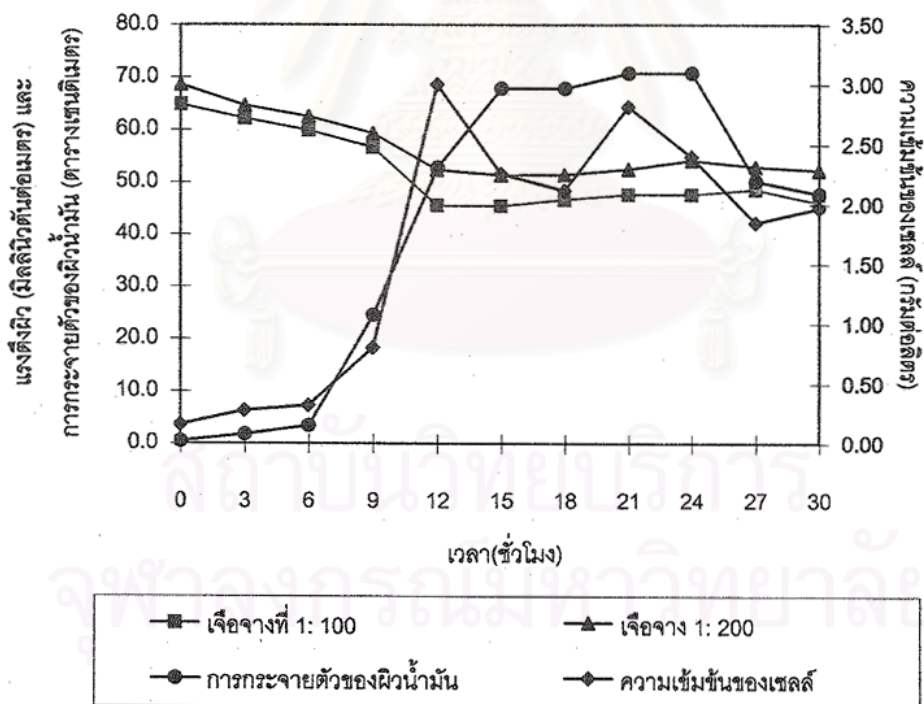


ภาคผนวก ฉ

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ๑1 การเพาะเลี้ยง *Pseudomonas* sp.A41 ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง น้ำมันปาล์ม 50 มิลลิลิตร  
ความเร็วรอบใบกวน 580 รอบต่อนาที ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.0 ในเวลา 30 ชั่วโมง

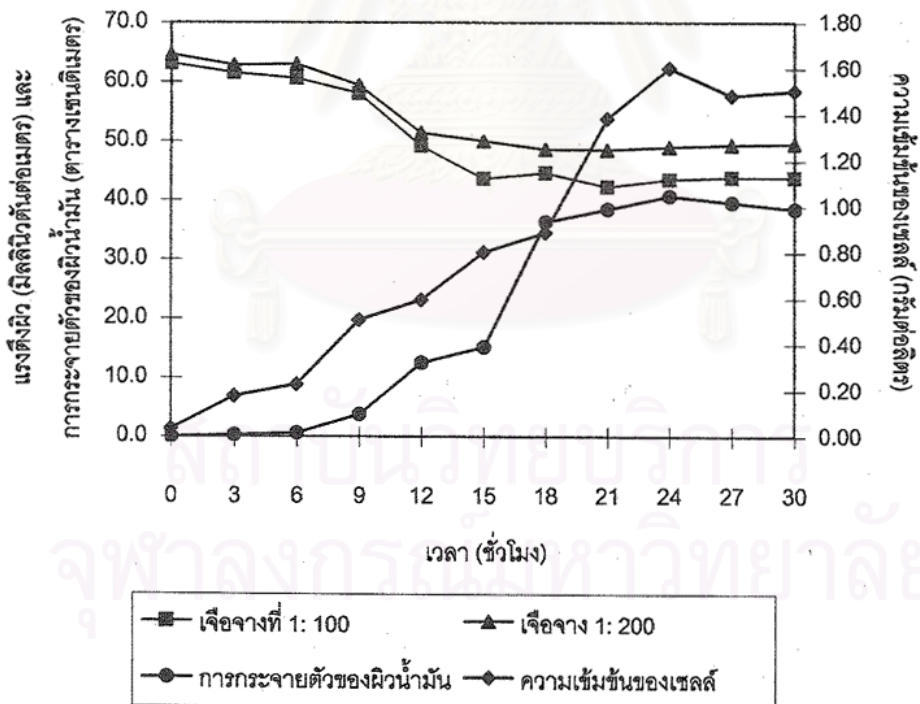
เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	เชื้อจางที่ 1: 100 (มิลลินิวตันต่อเมตร)	เชื้อจาง 1: 200 (มิลลินิวตันต่อเมตร)	การกระจายตัวของผิวน้ำมัน (ตารางเซนติเมตร)
0	0.16	64.8	68.6	0.50
3	0.28	62.1	64.6	1.77
6	0.32	59.8	62.5	3.46
9	0.80	56.6	59.3	24.63
12	3.00	45.5	52.3	52.81
15	2.26	45.4	51.3	67.93
18	2.12	46.6	51.4	67.93
21	2.82	47.6	52.4	70.88
24	2.40	47.6	54.1	70.88
27	1.85	48.6	52.9	50.27
30	1.97	46.0	52.2	47.78



รูปที่ ๑1 การเจริญเติบโตและการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพของ *Pseudomonas* sp.A41  
ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง

ตารางที่ ๑2 การเพาะเลี้ยง *Pseudomonas* sp.A41 ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง น้ำมันปาล์ม 50 มิลลิลิตร  
ความเร็วรอบใบกวน 580 รอบต่อนาที และความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ในเวลา 30 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	เชื้อจางที่ 1: 100 (มิลลินิวตันต่อเมตร)	เชื้อจาง 1: 200 (มิลลินิวตันต่อเมตร)	การกระจายตัวของผิวน้ำมัน (ตารางเซนติเมตร)
0	0.03	63.1	64.6	0.01
3	0.18	61.5	62.8	0.28
6	0.23	60.6	63.0	0.64
9	0.51	58.0	59.4	3.80
12	0.60	49.2	51.4	12.57
15	0.80	43.6	50.0	15.21
18	0.89	44.6	48.6	36.32
21	1.38	42.2	48.5	38.48
24	1.60	43.5	49.0	40.72
27	1.48	43.8	49.3	39.59
30	1.50	43.8	49.5	38.49

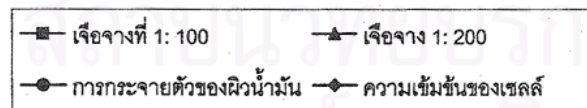
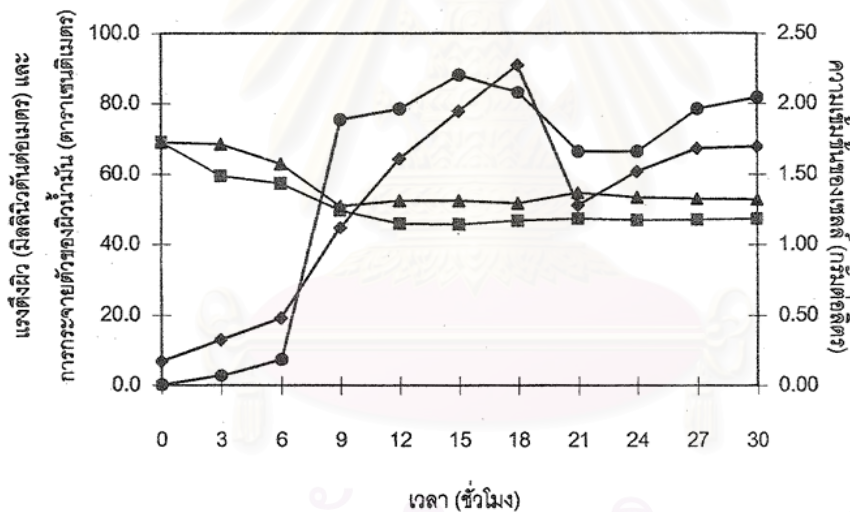


รูปที่ ๑2 การเจริญเติบโตและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pseudomonas* sp.A41  
ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง



ตารางที่ ๑3 การเพาะเลี้ยง *Pseudomonas* sp.A41 ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง น้ำมันปาล์ม 50 มิลลิลิตร  
ความเร็วรอบใบกวน 820 รอบต่อนาที และความเป็นกรด-ด่าง 6.0 ในเวลา 30 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	เชื้อจางที่ 1: 100 (มิลลิวตันต่อเมตร)	เชื้อจาง 1: 200 (มิลลิวตันต่อเมตร)	การกระจายตัวของผิวน้ำมัน (ตารางเซนติเมตร)
0	0.18	69.0	69.0	0.13
3	0.33	59.5	68.5	2.84
6	0.48	57.4	62.9	7.55
9	1.12	49.8	51.0	75.46
12	1.61	46.0	52.5	78.57
15	1.95	45.8	52.5	88.28
18	2.28	46.9	51.8	83.35
21	1.28	47.5	54.8	66.50
24	1.52	47.0	53.5	66.50
27	1.68	47.2	53.1	78.57
30	1.70	47.5	52.9	81.75

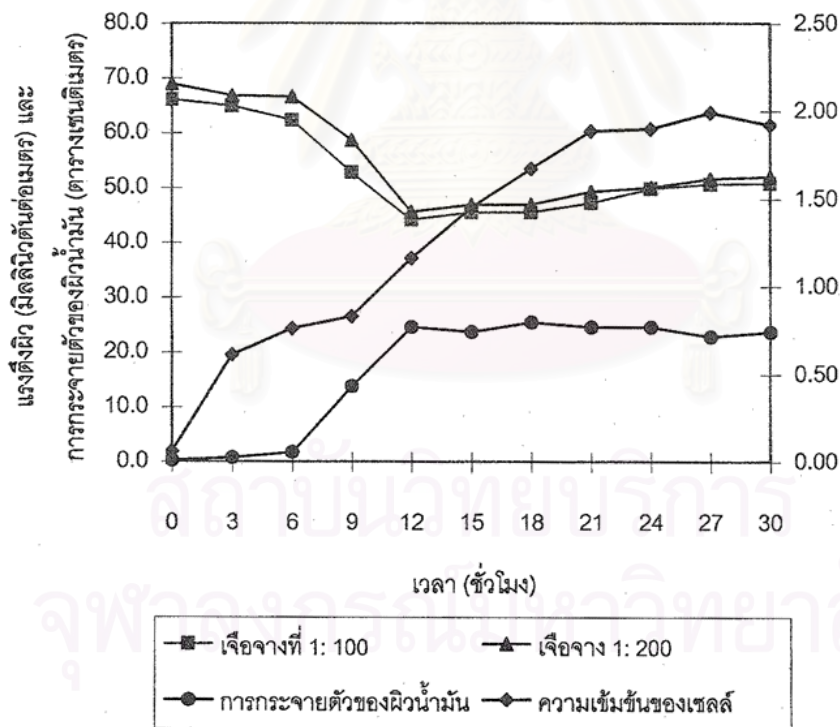


รูปที่ ๑3 การเจริญเติบโตและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pseudomonas* sp.A41  
ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง



ตารางที่ ๑4 การเพาะเลี้ยง *Pseudomonas* sp.A41 ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง น้ำมันปาล์ม 50 มิลลิลิตร  
ความเร็วรอบใบกวน 820 รอบต่อนาที และความเป็นกรด-ด่าง 8.0 ในเวลา 30 ชั่วโมง

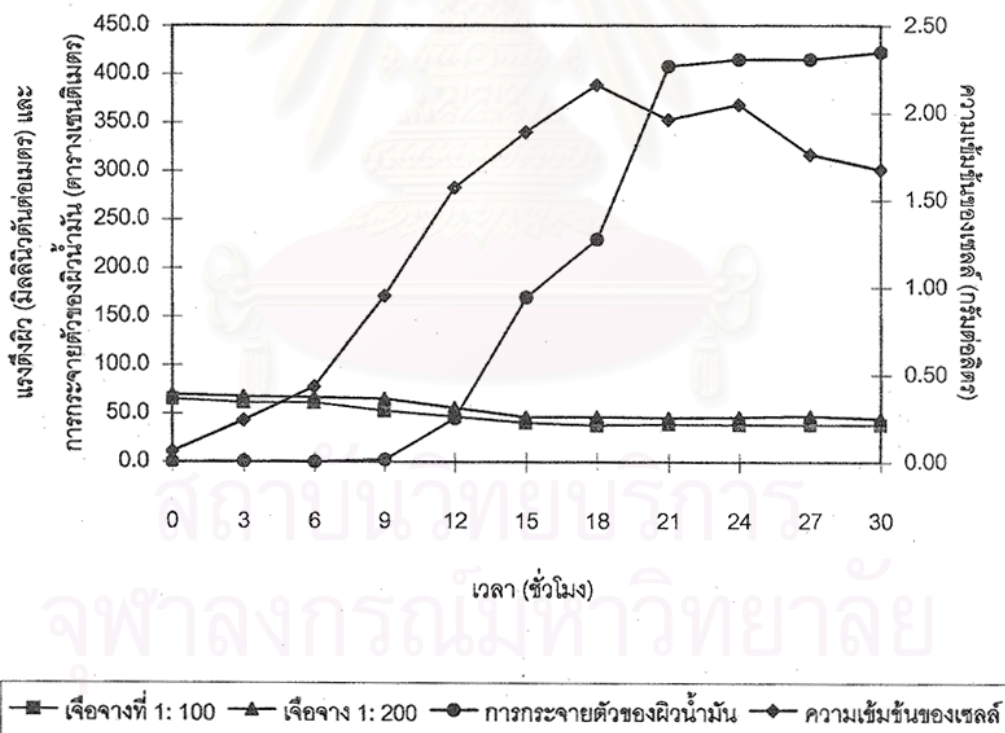
เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	เชื้อจางที่ 1: 100 (มิลลิวตันต่อเมตร)	เชื้อจาง 1: 200 (มิลลิวตันต่อเมตร)	การกระจายตัวของไขมัน (ตารางเซนติเมตร)
0	0.06	66.1	68.9	0.28
3	0.61	64.9	66.8	0.79
6	0.76	62.3	66.6	1.77
9	0.83	52.8	58.7	13.86
12	1.16	44.2	45.6	24.64
15	1.45	45.5	46.9	23.77
18	1.67	45.5	46.9	25.53
21	1.89	47.2	49.3	24.64
24	1.90	49.8	50.0	24.64
27	1.99	50.6	51.6	22.91
30	1.92	50.8	52.0	23.77



รูปที่ ๑4 การเจริญเติบโตและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pseudomonas* sp.A41  
ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง

ตารางที่ ๑5 การเพาะเลี้ยง *Pseudomonas* sp.A41 ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง น้ำมันปาล์ม 150 มิลลิลิตร  
ความเร็วรอบใบกวน 580 รอบต่อนาที และความเป็นกรด-ด่าง 6.0 ในเวลา 30 ชั่วโมง

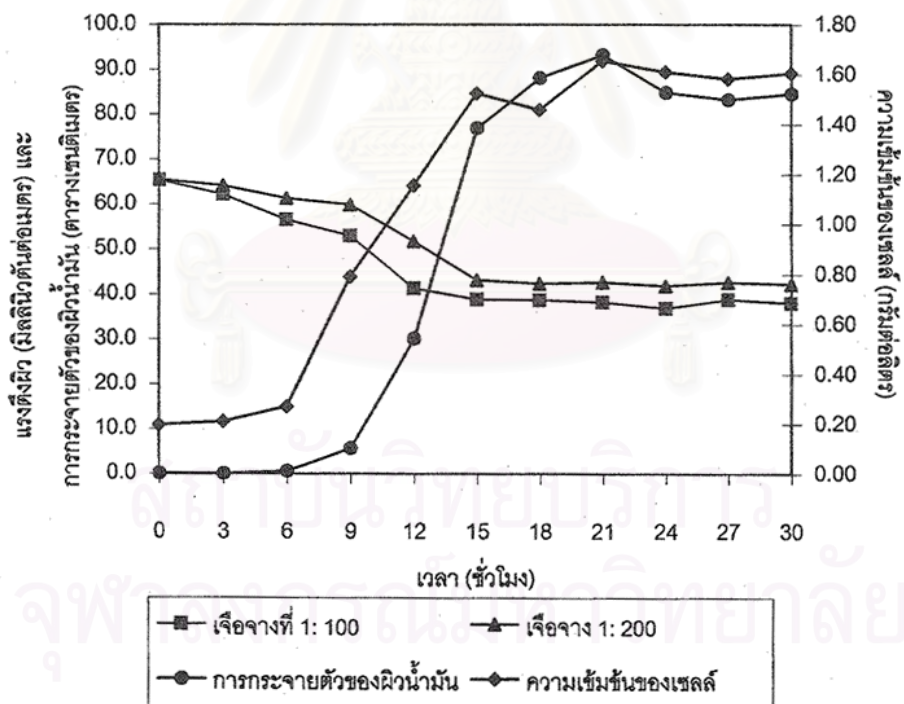
เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	เชื้อจางที่ 1: 100 (มิลลิวินาทีต่อเมตร)	เชื้อจาง 1: 200 (มิลลิวินาทีต่อเมตร)	การกระจายตัวของไขมัน (ตารางเซนติเมตร)
0	0.06	64.7	69.7	0.07
3	0.24	61.4	67.7	0.95
6	0.43	61.1	66.4	0.28
9	0.95	52.6	64.9	2.54
12	1.57	46.7	55.7	45.36
15	1.89	40.3	46.3	169.90
18	2.16	37.7	46.5	229.98
21	1.96	38.8	45.4	408.28
24	2.05	38.2	46.2	415.48
27	1.76	38.3	47.3	415.48
30	1.68	38.2	44.9	422.73



รูปที่ ๑5 การเจริญเติบโตและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pseudomonas* sp.A41  
ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง

ตารางที่ ๑6 การเพาะเลี้ยง *Pseudomonas* sp.A41 ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง น้ำมันปาล์ม 150 มิลลิลิตร  
ความเร็วรอบใบกวน 580 รอบต่อนาที และความเป็นกรด-ด่าง 8.0 ในเวลา 30 ชั่วโมง

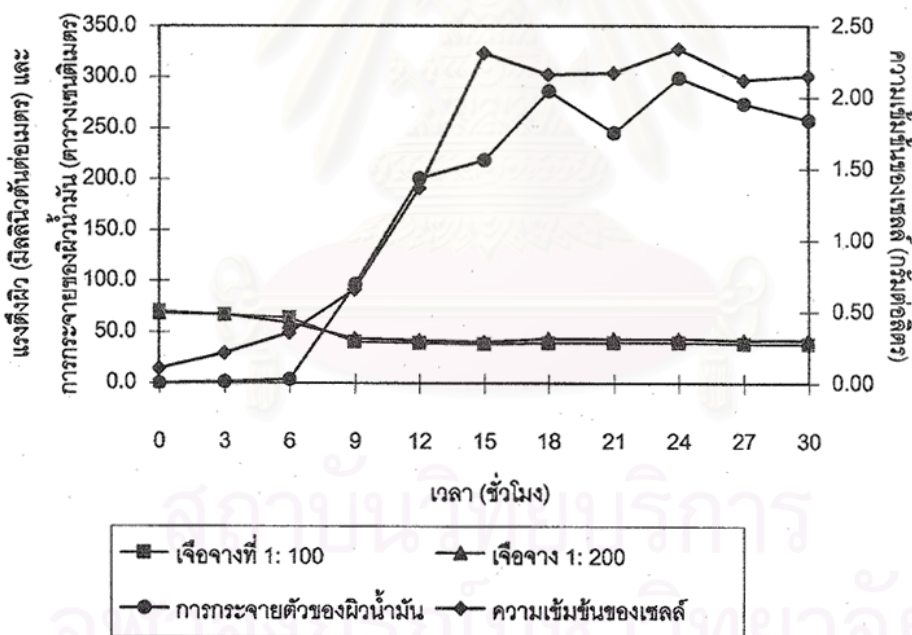
เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	เจือจางที่ 1: 100 (มิลลิวตันต่อเมตร)	เจือจาง 1: 200 (มิลลิวตันต่อเมตร)	การกระจายตัวของผิวน้ำมัน (ตารางเซนติเมตร)
0	0.20	65.4	65.5	0.03
3	0.21	62.2	64.2	0.07
6	0.27	56.5	61.3	0.64
9	0.79	52.9	59.9	5.73
12	1.16	41.3	51.7	30.19
15	1.53	38.8	43.1	76.98
18	1.46	38.7	42.3	88.25
21	1.66	38.2	42.7	93.31
24	1.61	36.8	41.8	84.95
27	1.58	38.8	42.6	83.32
30	1.61	38.0	42.2	84.65



รูปที่ ๑6 การเจริญเติบโตและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pseudomonas* sp.A41  
ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง

ตารางที่ ๑7 การเพาะเลี้ยง *Pseudomonas* sp.A41 ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง น้ำมันปาล์ม 150 มิลลิลิตร  
ความเร็วรอบใบกวน 820 รอบต่อนาที และความเป็นกรด-ด่าง 6.0 ในเวลา 30 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	เชื้อจางที่ 1: 100 (มิลลิวินตันต่อเมตร)	เชื้อจาง 1: 200 (มิลลิวินตันต่อเมตร)	การกระจายตัวของไขมัน (ตารางเซนติเมตร)
0	0.10	70.2	68.3	0.13
3	0.21	66.6	67.1	1.33
6	0.35	64.0	58.9	3.80
9	0.66	40.4	43.7	96.81
12	1.37	39.2	41.9	200.66
15	2.31	38.2	40.3	218.81
18	2.16	39.1	43.4	286.40
21	2.17	39.6	43.0	245.54
24	2.34	39.5	43.3	299.26
27	2.12	38.3	41.6	273.81
30	2.15	38.2	42.2	257.76

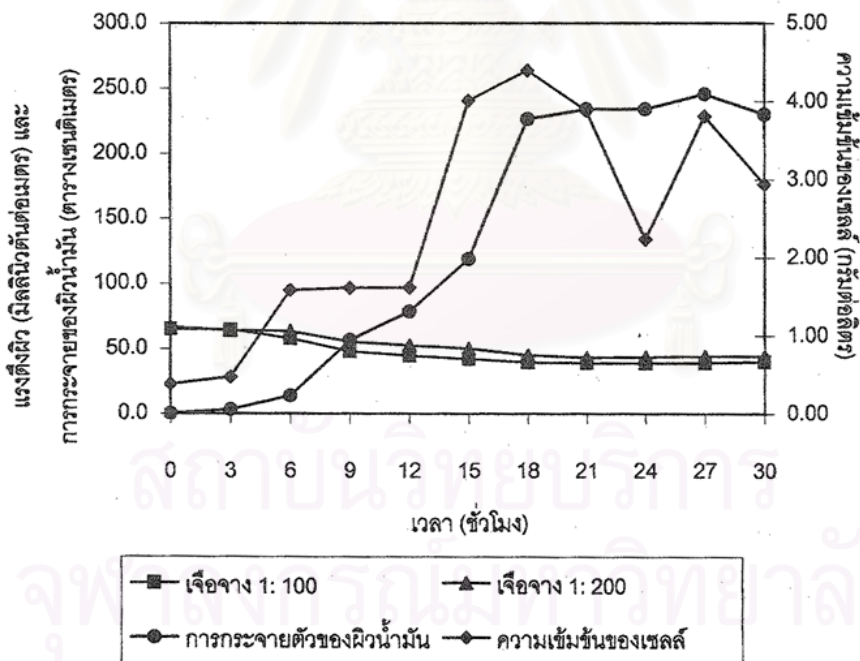


รูปที่ ๑7 การเจริญเติบโตและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pseudomonas* sp.A41  
ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง



ตารางที่ ๑8 การเพาะเลี้ยง *Pseudomonas* sp.A41 ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง น้ำมันปาล์ม 150 มิลลิลิตร  
ความเร็วรอบใบกวน 820 รอบต่อนาที และความเป็นกรด-ด่าง 8.0 ในเวลา 30 ชั่วโมง

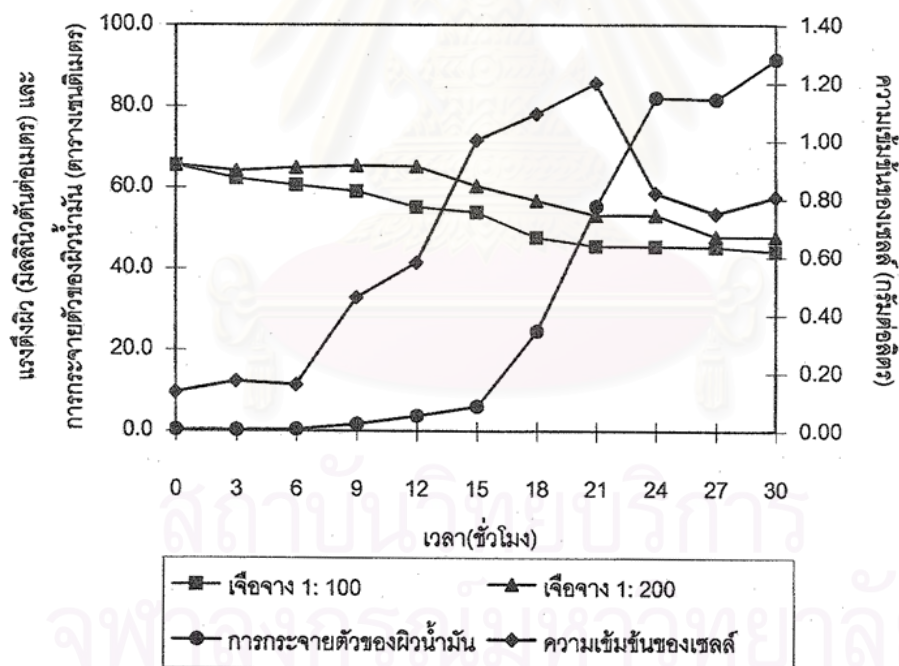
เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	เชื้อจาง 1: 100 (มิลลิวินาทีต่อเมตร)	เชื้อจาง 1: 200 (มิลลิวินาทีต่อเมตร)	การกระจายตัวของผิวน้ำมัน (ตารางเซนติเมตร)
0	0.38	65.2	66.6	0.13
3	0.47	64.7	64.2	3.14
6	1.58	57.9	63.4	13.86
9	1.61	48.1	55.5	56.77
12	1.62	44.7	52.5	78.57
15	4.01	42.0	50.1	118.87
18	4.40	39.5	45.0	226.29
21	3.88	39.2	43.1	233.89
24	2.23	39.0	43.6	233.89
27	3.81	39.2	44.3	245.54
30	2.94	40.0	44.2	230.07



รูปที่ ๑8 การเจริญเติบโตและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pseudomonas* sp.A41  
ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง

ตารางที่ ๑9 การเพาะเลี้ยง *Pseudomonas* sp.A41 ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง น้ำมันปาล์ม 100 มิลลิลิตร  
ความเร็วรอบใบกวน 700 รอบต่อนาที และความเป็นกรด-ด่าง 5.32 ในเวลา 30 ชั่วโมง

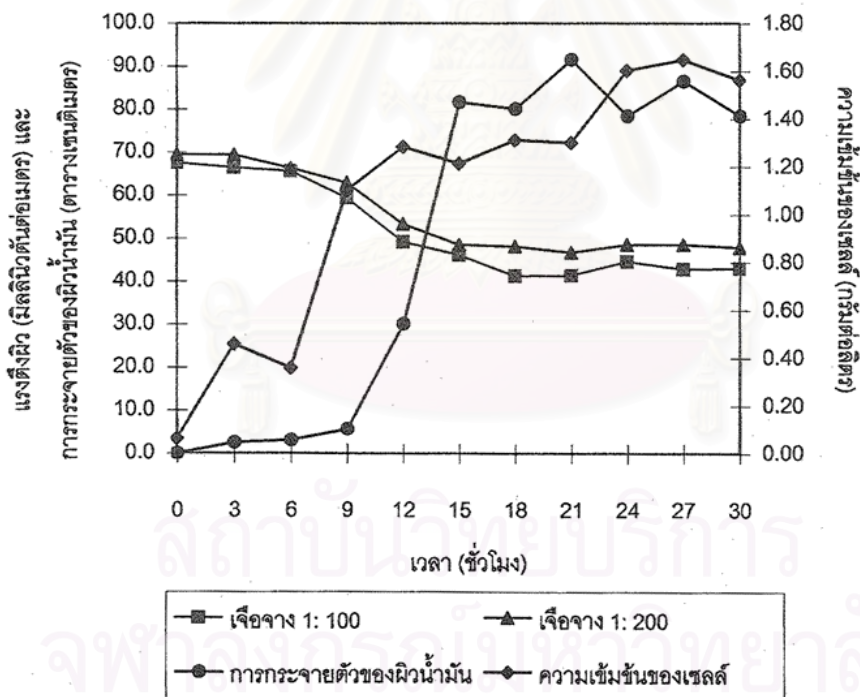
เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	เจือจาง 1: 100 (มิลลิวตันต่อเมตร)	เจือจาง 1: 200 (มิลลิวตันต่อเมตร)	การกระจายตัวของผิวน้ำมัน (ตารางเซนติเมตร)
0	0.14	65.4	65.5	0.38
3	0.17	62.2	64.1	0.28
6	0.16	60.5	64.8	0.50
9	0.46	59.0	65.3	1.77
12	0.58	55.1	65.1	3.80
15	1.00	53.8	60.3	6.16
18	1.09	47.6	56.7	24.63
21	1.20	45.5	53.1	55.42
24	0.82	45.4	53.2	82.13
27	0.75	45.2	47.9	81.71
30	0.81	44.2	47.8	91.61



รูปที่ ๑9 การเจริญเติบโตและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pseudomonas* sp.A41  
ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง

ตารางที่ ๑๐ การเพาะเลี้ยง *Pseudomonas* sp.A41 ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง น้ำมันปาล์ม 100 มิลลิลิตร  
ความเร็วรอบใบกวน 700 รอบต่อนาที และความเป็นกรด-ด่าง 8.64 ในเวลา 30 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	เชื้อจาง 1: 100 (มิลลิวินาทีต่อเมตร)	เชื้อจาง 1: 200 (มิลลิวินาทีต่อเมตร)	การกระจายตัวของไขมัน (ตารางเซนติเมตร)
0	0.06	67.5	69.4	0.03
3	0.46	66.4	69.4	2.54
6	0.36	65.6	66.3	3.14
9	1.10	59.4	62.9	5.73
12	1.28	49.2	53.3	30.19
15	1.21	46.1	48.5	81.71
18	1.31	41.2	48.1	80.12
21	1.30	41.3	46.7	91.61
24	1.60	44.6	48.5	78.54
27	1.65	42.8	48.5	86.59
30	1.56	43.0	47.9	78.54

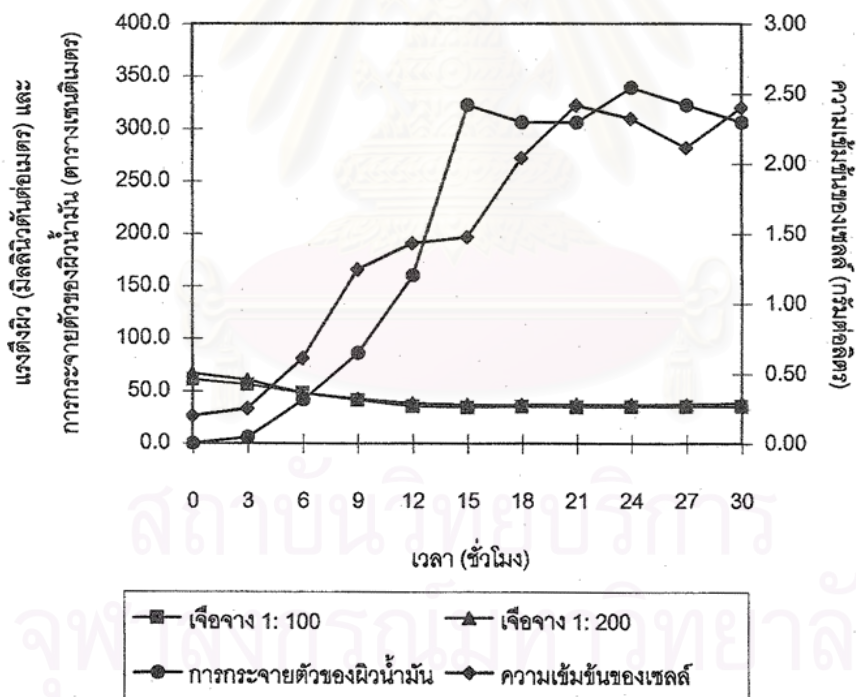


รูปที่ ๑๐ การเจริญเติบโตและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pseudomonas* sp.A41  
ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง



ตารางที่ ๑11 การเพาะเลี้ยง *Pseudomonas* sp.A41 ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง น้ำมันปาล์ม 100 มิลลิลิตร  
ความเร็วรอบใบกวน 500 รอบต่อนาที และความเป็นกรด-ด่าง 7.0 ในเวลา 30 ชั่วโมง

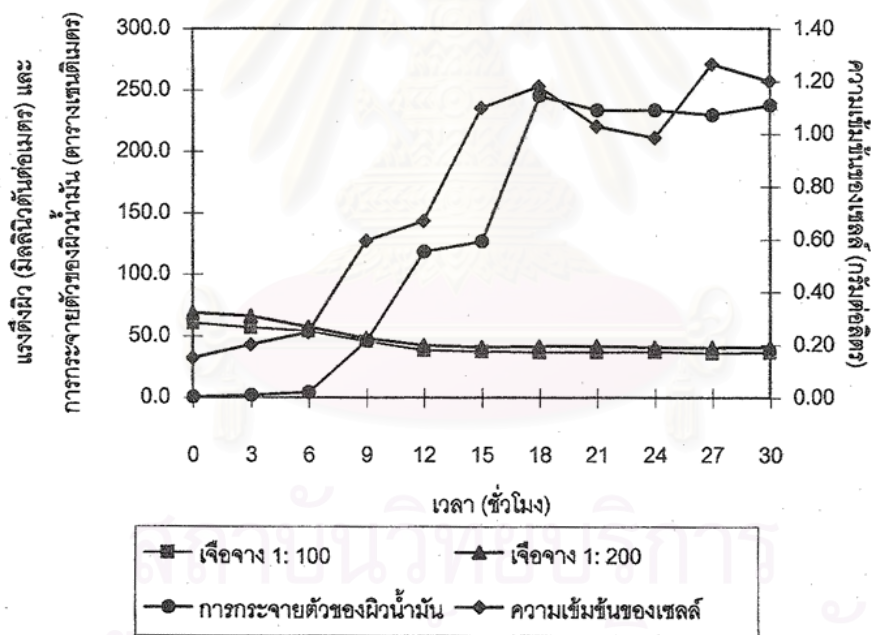
เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	เชื้อจาง 1: 100 (มิลลิวินาทีต่อเมตร)	เชื้อจาง 1: 200 (มิลลิวินาทีต่อเมตร)	การกระจายตัวของไขมัน (ตารางเซนติเมตร)
0	0.20	61.1	66.8	0.28
3	0.25	56.0	60.4	6.16
6	0.61	48.0	47.8	41.83
9	1.24	41.2	42.3	86.26
12	1.43	35.4	38.3	160.24
15	1.47	34.4	36.7	322.54
18	2.04	35.1	37.0	306.21
21	2.42	34.5	36.9	306.21
24	2.32	34.8	36.9	339.29
27	2.11	35.2	37.2	322.54
30	2.40	35.4	38.3	306.21



รูปที่ ๑11 การเจริญเติบโตและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pseudomonas* sp.A41  
ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง

ตารางที่ ๑๒ การเพาะเลี้ยง *Pseudomonas* sp.A41 ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง น้ำมันปาล์ม 100 มิลลิลิตร  
ความเร็วรอบใบกวน 900 รอบต่อนาที และความเป็นกรด-ด่าง 7.0 ในเวลา 30 ชั่วโมง

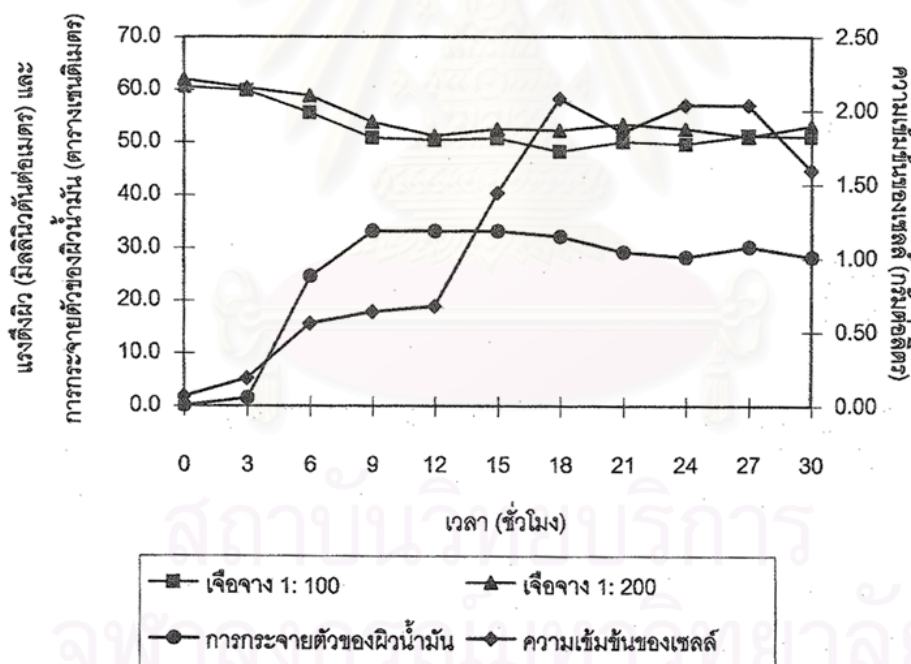
เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	เชื้อจาง 1: 100 (มิลลิวินาทีต่อเมตร)	เชื้อจาง 1: 200 (มิลลิวินาทีต่อเมตร)	การกระจายตัวของผิวน้ำมัน (ตารางเซนติเมตร)
0	0.15	60.5	68.8	0.64
3	0.20	56.7	66.1	2.01
6	0.25	53.9	57.3	4.52
9	0.60	45.6	48.0	46.57
12	0.67	38.5	42.4	118.82
15	1.10	37.2	41.0	127.23
18	1.18	36.7	41.6	245.43
21	1.03	36.6	41.9	233.80
24	0.99	37.0	40.7	233.80
27	1.27	36.0	40.7	229.98
30	1.20	36.6	41.1	237.65



รูปที่ ๑๒ การเจริญเติบโตและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pseudomonas* sp.A41  
ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง

ตารางที่ ๑๓ การเพาะเลี้ยง *Pseudomonas* sp.A41 ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง น้ำมันปาล์ม 16 มิลลิลิตร  
ความเร็วรอบใบกวน 700 รอบต่อนาที และความเป็นกรด-ด่าง 7.0 ในเวลา 30 ชั่วโมง

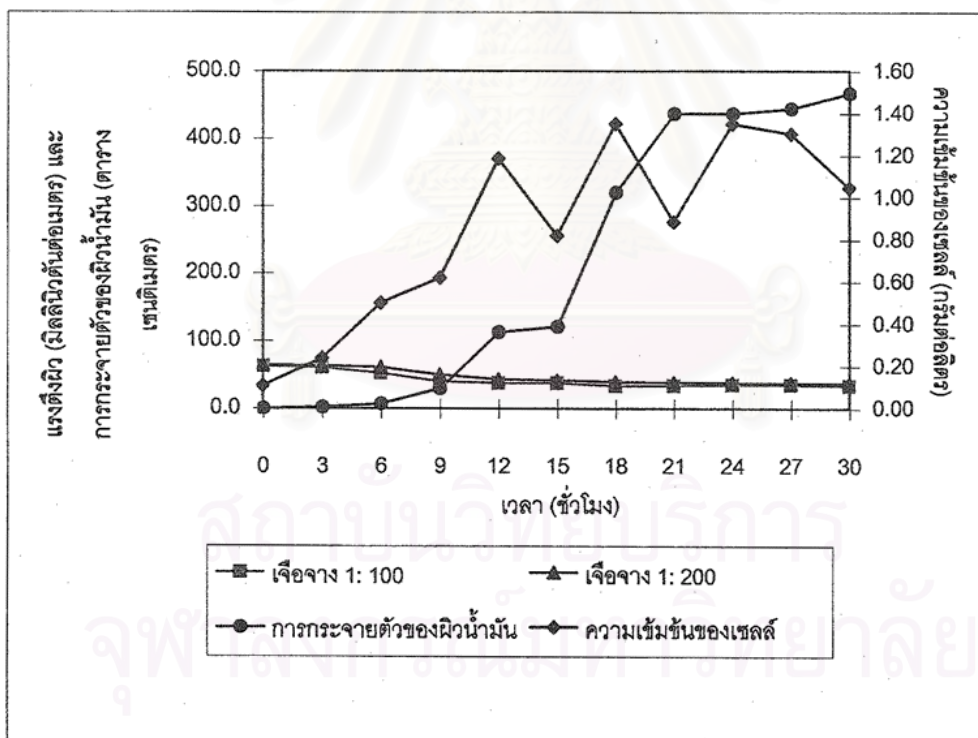
เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	เชื้อจาง 1: 100 (มิลลิวินาทีต่อเมตร)	เชื้อจาง 1: 200 (มิลลิวินาทีต่อเมตร)	การกระจายตัวของไขมัน (ตารางเซนติเมตร)
0	0.07	60.5	61.9	0.13
3	0.19	59.8	60.3	1.54
6	0.56	55.6	58.8	24.63
9	0.64	50.8	53.8	33.18
12	0.67	50.4	51.2	33.18
15	1.44	50.7	52.5	33.18
18	2.08	48.2	52.2	32.17
21	1.85	50.0	53.4	29.22
24	2.04	49.6	52.5	28.27
27	2.04	51.2	51.0	30.19
30	1.60	51.0	53.1	28.27



รูปที่ ๑๓ การเจริญเติบโตและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pseudomonas* sp.A41  
ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง

ตารางที่ ๑14 การเพาะเลี้ยง *Pseudomonas* sp.A41 ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง น้ำมันปาล์ม 184 มิลลิลิตร  
ความเร็วรอบใบกวน 700 รอบต่อนาที และความเป็นกรด-ด่าง 7.0 ในเวลา 30 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	เจือจาง 1: 100 (มิลลิวินาทีต่อเมตร)	เจือจาง 1: 200 (มิลลิวินาทีต่อเมตร)	การกระจายตัวของผิวน้ำมัน (ตารางเซนติเมตร)
0	0.11	62.0	64.3	0.13
3	0.24	60.1	63.1	2.01
6	0.50	52.2	61.0	7.55
9	0.62	39.9	49.9	30.19
12	1.19	38.0	43.4	113.10
15	0.82	37.5	41.7	121.64
18	1.35	33.5	39.5	320.47
21	0.89	33.6	38.1	437.44
24	1.35	34.9	38.1	437.44
27	1.30	35.1	38.0	444.88
30	1.05	33.9	37.6	467.59

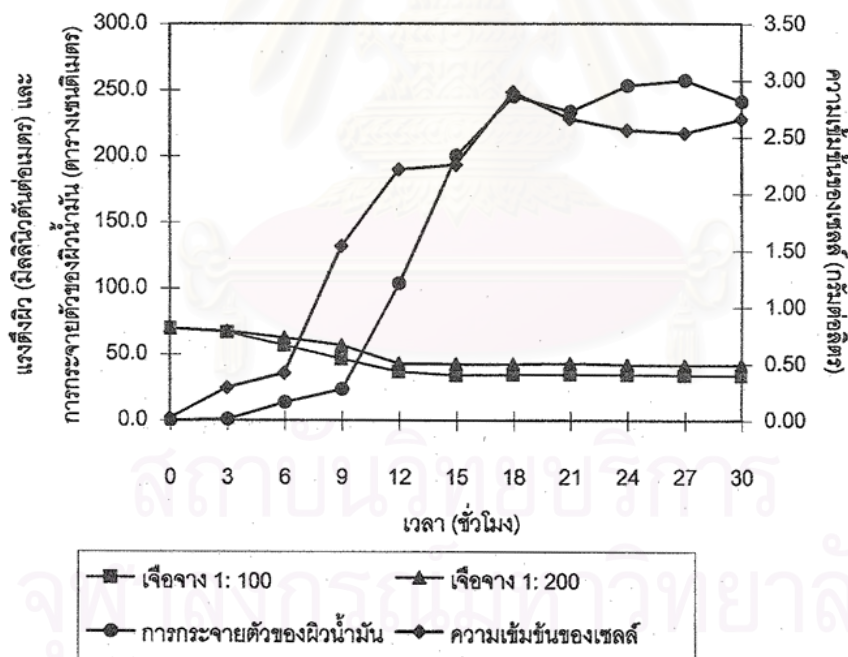


รูปที่ ๑14 การเจริญเติบโตและการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพของ *Pseudomonas* sp.A41  
ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง



ตารางที่ ๑15 การเพาะเลี้ยง *Pseudomonas* sp.A41 ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง น้ำมันปาล์ม 100 มิลลิลิตร  
ความเร็วรอบใบกวน 700 รอบต่อนาที และความเป็นกรด-ด่าง 7.0 ในเวลา 30 ชั่วโมง

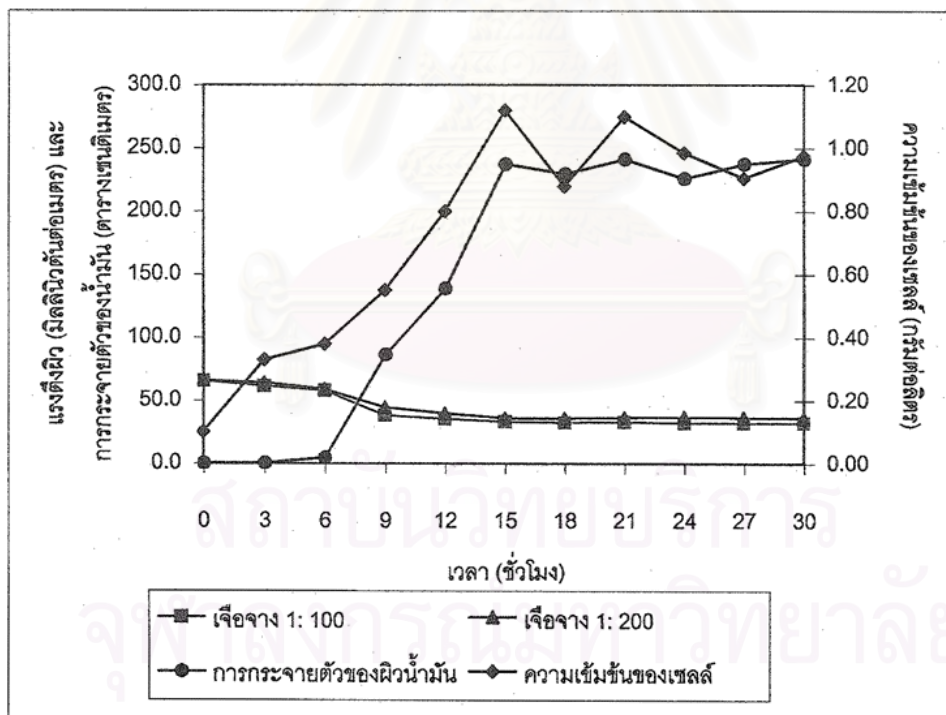
เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	เชื้อจาง 1: 100 (มิลลิวินตันต่อเมตร)	เชื้อจาง 1: 200 (มิลลิวินตันต่อเมตร)	การกระจายตัวของผิวน้ำมัน (ตารางเซนติเมตร)
0	0.02	69.7	69.7	0.03
3	0.29	66.8	67.6	1.13
6	0.42	57.0	62.6	13.85
9	1.54	46.5	57.0	23.76
12	2.22	36.8	43.1	103.87
15	2.26	34.2	42.7	200.57
18	2.90	34.5	42.4	245.44
21	2.66	34.8	43.1	233.80
24	2.56	34.6	42.0	253.35
27	2.54	34.2	41.8	257.36
30	2.66	34.0	42.0	241.53



รูปที่ ๑15 การเจริญเติบโตและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pseudomonas* sp.A41  
ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง

ตารางที่ ข16 การเพาะเลี้ยง *Pseudomonas* sp.A41 ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง น้ำมันปาล์ม 100 มิลลิลิตร  
ความเร็วรอบใบกวน 700 รอบต่อนาที และความเป็นกรด-ด่าง 7.0 ในเวลา 30 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	เชื้อจาง 1: 100 (มิลลิวินาทีต่อเมตร)	เชื้อจาง 1: 200 (มิลลิวินาทีต่อเมตร)	การกระจายตัวของผิวน้ำมัน (ตารางเซนติเมตร)
0	0.10	65.5	65.8	0.13
3	0.33	61.5	64.2	0.50
6	0.38	57.9	58.9	4.91
9	0.55	38.2	44.5	86.59
12	0.80	35.4	39.7	138.93
15	1.12	33.1	36.0	237.65
18	0.88	32.5	35.7	229.98
21	1.10	32.9	36.5	241.52
24	0.99	32.0	36.8	226.19
27	0.91	32.1	36.4	237.65
30	0.98	32.4	35.9	241.52

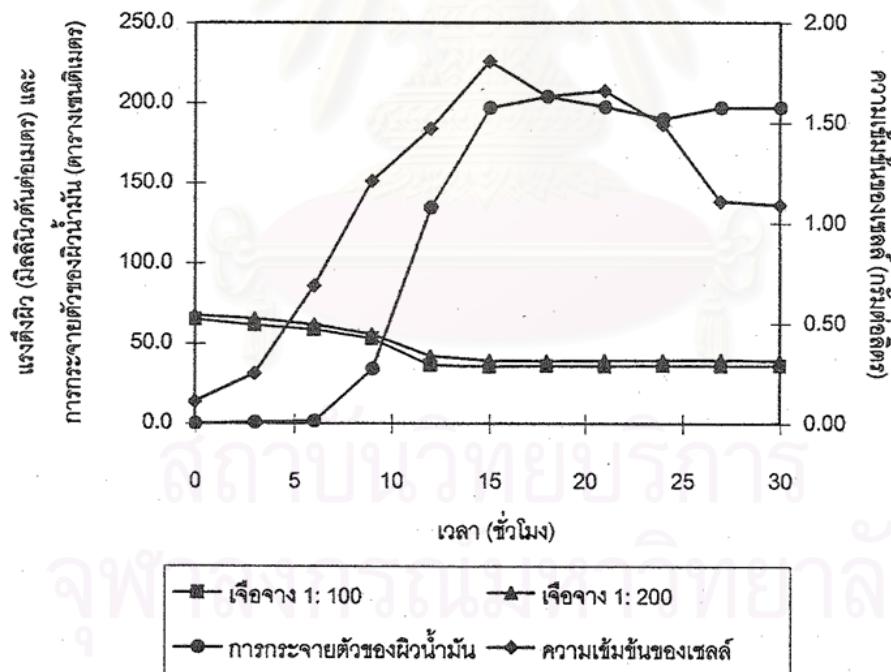


รูปที่ ข16 การเจริญเติบโตและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pseudomonas* sp.A41  
ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง



ตารางที่ ๑17 การเพาะเลี้ยง *Pseudomonas* sp.A41 ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง น้ำมันปาล์ม 100 มิลลิลิตร  
ความเร็วรอบใบกวน 700 รอบต่อนาที และความเป็นกรด-ด่าง 7.0 ในเวลา 30 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	เจือจาง 1: 100 (มิลลิวินาทีต่อเมตร)	เจือจาง 1: 200 (มิลลิวินาทีต่อเมตร)	การกระจายตัวของผิวน้ำมัน (ตารางเซนติเมตร)
0	0.11	65.0	67.4	0.03
3	0.25	61.4	65.6	0.79
6	0.69	58.7	61.7	1.77
9	1.21	53.0	55.5	34.21
12	1.47	36.4	42.0	134.78
15	1.81	35.4	39.3	197.04
18	1.63	35.9	38.9	204.14
21	1.66	35.6	39.2	197.64
24	1.49	36.2	39.3	190.07
27	1.11	36.0	39.8	197.04
30	1.09	35.9	39.1	197.04



รูปที่ ๑17 การเจริญเติบโตและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pseudomonas* sp.A41  
ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง

## ประวัติผู้แต่ง

นายณรงค์ ลักษณะกรมย์ เกิดวันที่ 16 เมษายน พ.ศ. 2515 ที่อำเภอเมือง จังหวัดสุโขทัย สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาเคมีอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในปีการศึกษา 2537 หลังจากนั้นได้เข้าศึกษาในหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2540



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

