การเตรียมอิมัลชันน้ำมันถั่วเหลืองจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pichia anomala* MUE24

นางสาวธัญญรัตน์ เทียนชัยเกิดศิลป์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2559
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PREPARATION OF SOYBEAN OIL EMULSIONS FROM BIOSURFACTANT OF *Pichia anomala* MUE24

Miss Tanyarat Tianchaigerdsilp

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

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเตรียมอิมัลชันน้ำมันถั่วเหลืองจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pichia anomala* MUE24
โดย	นางสาวธัญญรัตน์ เทียนชัยเกิดศิลป์
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โศรดา กนกพานนท์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ชุลี ยมภักดี)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โศรดา กนกพานนท์)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป นภาธร)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล)

ธัญญรัตน์ เทียนชัยเกิดศิลป์ : การเตรียมอิมัลชันน้ำมันถั่วเหลืองจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pichia anomala* MUE24 (PREPARATION OF SOYBEAN OIL EMULSIONS FROM BIOSURFACTANT OF *Pichia anomala* MUE24) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. จิราภรณ์ ธนียวัน, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร.โศรดา กนกพานนท์, 77 หน้า.

การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Pichia anomala* MUE24 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบแบตช์ ด้วยอาหารเหลวปรับปรุงสูตรที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.02% $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% สารสกัดยีสต์ 0.64% $NaNO_3$ 0.11% กลูโคส 6.66% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) และน้ำมันถั่วเหลือง 13.34% (ปริมาตร/ปริมาตร) pH 4.5 ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมอัตราเร็วรอบกวนในถังเป็น 400 รอบต่อนาที และควบคุมอัตราการให้อากาศ 1 vvm เป็นเวลา 120 ชั่วโมง พบว่า ที่เวลา 72 ชั่วโมง เมื่อสกัดแบบพร้อมเซลล์จะได้ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 21.61 กรัมต่อลิตร และสามารถลดค่าแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 41.25 มิลลินิวตันต่อเมตร เป็น 28.75 มิลลินิวตันต่อเมตร เมื่อนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มาวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบ Analytical Thin-Layer Chromatography พบว่า มีส่วนประกอบ 3 ลำดับส่วน มีอัตราการเคลื่อนที่ (R_f) 0.96, 0.91 และ 0.87 (F1A-F3A) ตามลำดับ ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับสารโซโฟโรลิพิดมาตรฐาน และเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบ Preparative Thin-Layer Chromatography พบว่า มีส่วนประกอบ 3 ลำดับส่วน มีอัตราการเคลื่อนที่ (R_f) 0.90, 0.77 และ 0.74 (FI-FIII) ตามลำดับ จากนั้นนำสารจากตำแหน่ง FII ที่มีค่าการกระจายน้ำมันสูงที่สุดไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย HPLC พบว่าสารที่ RT เท่ากับ 26.56 มีค่าการกระจายน้ำมันสูงที่สุด ซึ่งสามารถเทียบเคียงได้กับสารโซโฟโรลิพิดทั้งในรูปแบบแล็กโทน (lactonic form) และรูปแบบแอซิด (acidic form) ค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีค่าเท่ากับ 113 มิลลิกรัมต่อลิตร สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ที่ความเข้มข้น 75, 150 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความเป็นพิษต่ำกว่าสารลดแรงตึงผิวทางเคมีเมื่อทดสอบกับเซลล์ 3T3 mouse fibroblast ด้วยเทคนิค MTT assay และทำการศึกษาเพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการเตรียมอิมัลชันน้ำมันถั่วเหลืองจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้โดยการสร้างแผนภาพวัฏภาคสามองค์ประกอบ พบว่า สามารถเตรียมอิมัลชันในอัตราส่วนของน้ำมันถั่วเหลือง 5%, สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 36%, span80 9% และน้ำ 50% ที่มีขนาดอนุภาค 765 นาโนเมตร ซึ่งมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 เดือน

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

5672234323 : MAJOR MICROBIOLOGY AND MICROBIAL TECHNOLOGY
KEYWORDS: BIOSURFACTANT/SOPHOROLIPID/EMULSION

TANYARAT TIANCHAIGERDSILP: PREPARATION OF SOYBEAN OIL EMULSIONS FROM BIOSURFACTANT OF *Pichia anomala* MUE24. ADVISOR: ASSOC. PROF. JIRAPORN THANIYAVARN, CO-ADVISOR: ASST. PROF. SORADA KANOKPANONT, Ph.D., 77 pp.

The biosurfactant production from *Pichia anomala* MUE24 in a 5-L batch bioreactor was studied in modified medium containing 0.02% of KH_2PO_4, 0.02% of $MgSO_4.7H_2O$, 0.64% of yeast extract, 0.11% of $NaNO_3$, 6.66% of glucose (w/w) and 13.34% of soybean oil (v/v). Cultivation was performed at pH 4.5 30°C with 400 rpm and 1 vvm for 120 h. After 72 h of cultivation, crude biosurfactant was found at 21.61 g/l from whole cell extraction. The biosurfactant was able to reduce surface tension of the medium from 41.25 mN/m to 28.75 mN/m. Analysis of the biosurfactant via analytical thin-layer chromatography showed 3 major bands similar to standard sophorolipid with R_f of 0.96, 0.91 and 0.87 (F1A-F3A), respectively. Furthermore, analysis of the biosurfactant via preparative thin-layer chromatography showed 3 major bands with R_f of 0.90, 0.77 and 0.74 (FI-FIII), respectively. In addition, FII was purified via high performance liquid chromatography (HPLC). The solution of a peak of HPLC analysis at retention time (RT) of 26.56 revealed the highest oil displacement activity. The result showed that the FII biosurfactant corresponded to sophorolipid in lactonic form and acidic form. The critical micelle concentration (CMC) of crude biosurfactant was 113 mg/l. This biosurfactant at concentration 75, 150 and 300 mg/l was less cytotoxicity with 3T3 mouse fibroblast when compared with chemical surfactant using MTT assay. The preparation of soybean oil emulsions from biosurfactant using ternary phase diagram showed that it could form stable emulsion by the ratio 5% of soybean oil, 36% of biosurfactant, 9% of span80 and 50% of water with particle size 765 nm at 4, 25 and 40°C for 2 months.

Department:	Microbiology	Student's Signature .....
Field of Study:	Microbiology and Microbial Technology	Advisor's Signature .....
		Co-Advisor's Signature .....
Academic Year:	2016	

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ รองศาสตราจารย์จิราภรณ์ ธนียวัน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โศรดา กนกพานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ซึ่งได้ให้ทั้งความรู้ ความเมตตา คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ในการทำวิจัยตลอดจนตรวจแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ชุลี ยมภักดี ที่ได้กรุณารับเป็นประธานกรรมการในการสอบ ตลอดจนให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา จันทร์ประทีป นภาธร และรองศาสตราจารย์ ดร. สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล ที่ได้กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบ ตลอดจนให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ รวมทั้งช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำและอำนวยความสะดวกต่างๆแก่ผู้วิจัย รวมถึงอาจารย์ทุกท่านในชีวิตที่ได้อบรมสั่งสอนมาจนสำเร็จการศึกษา

ขอขอบคุณพี่สุนันท์ รังษีกาญจน์ส่อง จากศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความช่วยเหลือในการวิเคราะห์ HPLC

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านของบัณฑิตวิทยาลัยที่ได้ช่วยอำนวยความสะดวกต่างๆ

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ทุกคนในภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเฉพาะอย่างยิ่งห้องปฏิบัติการ 1804/14 สำหรับความช่วยเหลือ กำลังใจและความหวังดีที่มีให้กันเสมอมา

ท้ายที่สุดขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดาและน้องชายที่อยู่เคียงข้าง ให้การสนับสนุนช่วยเหลือและแบ่งเบาความกังวลใจ รวมถึงให้กำลังใจในทุกๆด้านแก่ผู้วิจัยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษาไปได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ฎ

สารบัญภาพ ..... ฐ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ประวัติความเป็นมา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 3

1.3 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย 3

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

บทที่ 2 ปริทัศน์วรรณกรรม 4

2.1 สารลดแรงตึงผิว 4

2.2 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 4

2.3 การวิเคราะห์สมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 10

2.3.1 ค่าแรงตึงผิว 10

2.3.2 ค่าการกระจายตัวของน้ำมัน 11

2.3.3 การเตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วน 12

2.3.4 ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ 13

2.4 การประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอุตสาหกรรมต่างๆ 14

2.5 อิมัลชัน 15

2.5.1 ชนิดของอิมัลชัน 16

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

หน้า

2.5.2 ค่า Hydrophilic Lipophilic Balance (HLB) 18
2.5.3 ส่วนประกอบของอิมัลชัน 18
2.5.4 กลไกการเกิดอิมัลชัน 19
2.6 แผนภาพวัฏภาคสามองค์ประกอบ (ternary phase diagram) 19
บทที่ 3 อุปกรณ์วิธีดำเนินการวิจัย 21
3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง 21
3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง 22
3.3 วิธีดำเนินการทดลอง 23
3.3.1 ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *P. anomala* MUE24 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร 23
3.3.1.1 เตรียมหัวเชื้อ 23
3.3.1.2 ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 23
3.3.2 หาน้ำหนักแห้งของเซลล์ 24
3.3.3 วัดค่าความเป็นกรดด่าง 24
3.3.4 วัดค่าแรงตึงผิว (Surface tension) 24
3.3.5 วัดค่าการกระจายตัวของน้ำมัน (Oil displacement test) 24
3.3.6 สกัดแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้แบบพร้อมเซลล์ 25
3.3.7 เตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย Analytical Thin-Layer Chromatography 25
3.3.8 เตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย Preparative Thin-Layer Chromatography 26
3.3.9 วิเคราะห์สารด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) 26
3.3.10 คำนวณค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์การหมัก 27
3.3.11 หาค่าความเข้มข้นวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ (Critical Micelle Concentration; CMC) 27

หน้า

3.3.12 หาค่า Hydrophilic Lipophilic Balance (HLB) 27
3.3.13 ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ 28
3.3.14 นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ไปใช้ในการเตรียมอิมัลชันน้ำมันถั่วเหลือง 29
3.3.14.1 ทดลองเพื่อวาดแผนภาพวัฏภาค 29
3.3.14.2 วัดขนาดเฉลี่ยและการกระจายตัวของขนาดอนุภาคในอิมัลชัน 31
3.3.14.3 ทดสอบความเสถียรของอิมัลชัน 32
บทที่ 4 ผลการทดลอง 33
4.1 ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *P. anomala* MUE24 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร 33
4.2 สกัดแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้แบบพร้อมเซลล์ 36
4.3 เตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย Analytical Thin-Layer Chromatography 36
4.4 เตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย Preparative Thin-Layer Chromatography 38
4.5 วิเคราะห์สารด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) 39
4.6 คำนวณค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์การหมัก 41
4.7 หาค่าความเข้มข้นวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ (Critical Micelle Concentration; CMC) 42
4.8 หาค่า Hydrophilic Lipophilic Balance (HLB) 44
4.9 ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ 44
4.10 นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ไปใช้ในการเตรียมอิมัลชันน้ำมันถั่วเหลือง 48
4.10.1 ทดลองเพื่อวาดแผนภาพวัฏภาค 48
4.10.2 วัดขนาดเฉลี่ยและการกระจายตัวของอนุภาคในอิมัลชัน 49
4.10.3 ทดสอบความเสถียรของอิมัลชัน 50
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 54
รายการอ้างอิง 58

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หน้า

ภาคผนวก 63
ภาคผนวก ก สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 64
ภาคผนวก ข สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง 66
ภาคผนวก ค หลักการวัดค่าแรงตึงผิวด้วยวิธี Du Nouy Ring 67
ภาคผนวก ง ถังหมักที่ใช้ในการทดลอง 70
ภาคผนวก จ กราฟมาตรฐานที่ใช้คำนวณหาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MTT assay 71
ภาคผนวก ฉ ตารางแสดงลักษณะของผสมที่เกิดขึ้นเพื่อใช้สร้างแผนภาพวัฏภาคสามองค์ประกอบ 72
ภาคผนวก ช กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและค่าการกระจายน้ำมัน 76
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 77

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากแบคทีเรียและรา 10

ตารางที่ 3.1 การคำนวณร้อยละองค์ประกอบของผสมน้ำมันถั่วเหลือง : สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ในอัตราส่วน 1 : 9..... 30

ตารางที่ 3.2 ค่า HLB จากการผสมสารลดแรงตึงผิว span80 และ tween80 ที่อัตราส่วนโดย น้ำหนักต่างๆ..... 31

ตารางที่ 4.1 ผลการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *P. anomala* MUE24 ที่เลี้ยงในถังหมักแบบแบตช์โดยมีอัตราการให้อากาศ 1 vvm อัตราเร็วใบกวน 400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง.....34

ตารางที่ 4.2 อัตราการเคลื่อนที่ (R_f) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ 37

ตารางที่ 4.3 ค่าการกระจายน้ำมันของแต่ละลำดับส่วนที่สกัดพร้อมเซลล์ 38

ตารางที่ 4.4 อัตราการเคลื่อนที่ (R_f) และค่าการกระจายน้ำมันของแต่ละลำดับส่วน..... 39

ตารางที่ 4.5 ค่าการกระจายน้ำมันของตัวอย่างลำดับส่วน FII ที่ผ่านการวิเคราะห์และทำให้ บริสุทธิ์ด้วย HPLC 40

ตารางที่ 4.6 เปรียบเทียบผลการคำนวณค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตสารลด แรงตึงผิวชีวภาพจาก *P. anomala* MUE24 ในถังหมักแบบแบตช์ ที่เวลา 72 และ 120 ชั่วโมง 41

ตารางที่ 4.7 ค่าความเข้มข้นวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *P. anomala* MUE24 43

ตารางที่ 4.8 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์..... 45

ตารางที่ 4.9 ขนาดเฉลี่ยและการกระจายตัวของอนุภาคในอิมัลชันน้ำมันถั่วเหลืองที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส..... 50

ตารางที่ 4.10 ค่าการก่ออิมัลชันและความเสถียรของอิมัลชันน้ำมันถั่วเหลืองที่อุณหภูมิ 4 องศา เซลเซียส 50

ตารางที่ 4.11 ค่าการก่ออิมัลชันและความเสถียรของอิมัลชันน้ำมันถั่วเหลืองที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 51
ตารางที่ 4.12 ค่าการก่ออิมัลชันและความเสถียรของอิมัลชันน้ำมันถั่วเหลืองที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 51

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 2.1 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิว 4

รูปที่ 2.2 การกระจายตัวของสารลดแรงตึงผิวระหว่างผิวสัมผัสของน้ำกับอากาศ 5

รูปที่ 2.3 การเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิวเป็นไมเซลล์ 6

รูปที่ 2.4 โครงสร้างของ mono-rhamnolipid และ di-rhamnolipid 7

รูปที่ 2.5 โครงสร้างของทรีฮาโลลิพิด 7

รูปที่ 2.6 โครงสร้างของโซโฟโรลิพิด 8

รูปที่ 2.7 โครงสร้างของสารในกลุ่ม lipopeptide 9

รูปที่ 2.8 โครงสร้างของ emulsan 9

รูปที่ 2.9 โครงสร้างของ phospholipids 10

รูปที่ 2.10 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ แรงตึงผิวและการเกิดไมเซลล์ 11

รูปที่ 2.11 โครมาโทแกรม HPLC ของโซโฟโรลิพิดบริสุทธิ์บางส่วนผลิตโดย *Torulopsis bombicola* และใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน (29) 13

รูปที่ 2.12 ลักษณะการเกิดอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W) และชนิดน้ำในน้ำมัน (W/O) (34) 17

รูปที่ 2.13 วิธีการบันทึกแผนภาพวัฏภาคสามองค์ประกอบของผสม M ที่ประกอบด้วย A 50% B 30% C 20% 20

รูปที่ 3.1 ลักษณะการกระจายตัวของน้ำมัน 25

รูปที่ 4.1 ผลการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *P. anomala* MUE24 ที่เลี้ยงในถังหมักแบบแบตช์โดยมีอัตราการให้อากาศ 1 vvm อัตราเร็วใบกวน 400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง 35

รูปที่ 4.2 ลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อจากการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในถังหมักแบบแบตช์ที่เวลา 0 และ 72 ชั่วโมง 35

รูปที่ 4.3 ลักษณะของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้แบบพร้อมเซลล์ 36

รูปที่ 4.4 การแยกและวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *P. anomala* MUE24 ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบ Analytical Thin-Layer Chromatography 37

รูปที่ 4.5 การแยกและวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *P. anomala* MUE24 ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบ Preparative Thin-Layer Chromatography..... 39

รูปที่ 4.6 โครมาโทแกรมของตัวอย่างลำดับส่วน FII-1 ถึง FII-6 จาก HPLC..... 40

รูปที่ 4.7 ค่าความเข้มข้นวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *P. anomala* MUE24 จากการเขียนกราฟระหว่างค่า log ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวและค่าแรงตึงผิว..... 43

รูปที่ 4.8 จำนวนและเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีชีวิตหลังจากการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพความเข้มข้น 75, 150, 300 mg/l และสารละลาย Tris-HCl เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบ (อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี Tween80 ความเข้มข้น 300 mg/l) และกลุ่มควบคุมเชิงบวก (อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซิงค์แอซีเทตความเข้มข้น 20 ppm) แถบค่าความคลาดเคลื่อนแสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิต 45

รูปที่ 4.9 รูปร่างของเซลล์ 3T3 mouse fibroblast ที่เปลี่ยนแปลงไป (A) ก่อนทดสอบด้วยการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM และหลังทดสอบ 24ชั่วโมงด้วยการเพาะเลี้ยงใน (B) อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM , อาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพความเข้มข้น (C) 75 mg/l; (D) 150 mg/l; (E) 300 mg/l; (F) สารละลาย Tris-HCl; (G) Tween80 ความเข้มข้น 300 mg/l; (H) ซิงค์แอซีเทตความเข้มข้น 20 ppm เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่มีกำลังขยาย 20x 47

รูปที่ 4.10 แผนภาพวัฏภาคสามองค์ประกอบของระบบที่ประกอบด้วย น้ำ/น้ำมันถั่วเหลือง/สารลดแรงตึงผิวชีวภาพและ span80 เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม 48

รูปที่ 4.11 แผนภาพวัฏภาคสามองค์ประกอบของระบบที่ประกอบด้วย น้ำ/น้ำมันถั่วเหลือง/สารลดแรงตึงผิวชีวภาพและ tween80 เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม 49

รูปที่ 4.12 ความเสถียรของอิมัลชันน้ำมันถั่วเหลืองที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในเวลา 2 เดือน.. 52

รูปที่ 4.13 ลักษณะของอิมัลชันน้ำมันถั่วเหลืองที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 เดือน โดยหลอด A คือ อิมัลชัน HLB 8.3 ที่อัตราส่วนของน้ำมันถั่วเหลือง 5% สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 36% span80 9% น้ำ 50%, หลอด B คือ อิมัลชัน HLB 10.4 ที่อัตราส่วนของน้ำมันถั่วเหลือง 5% สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 36% span80 9% น้ำ 50% และหลอด C คือ ไมโครอิมัลชัน HLB 10.4 ที่อัตราส่วนของน้ำมันถั่วเหลือง 6.7% สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 48% span80 12% น้ำ 33.3%..... 53

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ประวัติความเป็นมา

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ คือ สารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์และรา โครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่มีขั้วและไม่มีขั้ว ทำให้สามารถกระจายตัวอยู่ระหว่าง 2 วัฏภาคที่มีขั้วแตกต่างกันได้ (1) โดยส่วนหัวที่มีขั้วชอบน้ำและส่วนหางที่ไม่มีขั้วชอบไขมัน สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถแบ่งตามลักษณะโครงสร้างทางเคมีได้เป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ ไกลโคลิพิด ไลโพเพปไทด์ ฟอสโฟลิพิด และสารลดแรงตึงผิวชนิดพอลิเมอร์ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่พบส่วนใหญ่เป็นกลุ่มไกลโคลิพิด ได้แก่ โซโฟโรลิพิด ซึ่งสามารถผลิตได้จากยีสต์หลายชนิด ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่ได้รับความสนใจอย่างมากในการศึกษาเพื่อพัฒนากระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพราะมีผนังเซลล์ที่แข็งแรงทนต่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวสูง ๆ ได้ (2) นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากยีสต์ยังมีความสามารถในการก่ออิมัลชันได้ดีร่วมกับน้ำมันหลายชนิด ได้แก่ น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันดีเซล น้ำมันคาโนลา น้ำมันมะพร้าว เป็นต้น

Pichia anomala MUE24 เป็นยีสต์สายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลายพันธุ์ *P. anomala* PY1 ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเอทิล มีเทน ซัลโฟเนต (ethyl methane sulfonate) คัดแยกได้จากอาหารหมักพื้นบ้าน (ข้าวหมาก) ในอำเภอพนัสนิคม จังหวัดชลบุรี (3) สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทโซโฟโรลิพิดที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในอาหารเหลวปรับปรุงสูตรที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.02% $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% สารสกัดยีสต์ 0.64% $NaNO_3$ 0.11% กลูโคส 6.66% (w/w) และน้ำมันถั่วเหลือง 13.34% (v/v) ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในระดับขวดเขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน ได้ผลผลิตเท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตร (4) และได้มีการเพิ่มผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยหมักแบบแบตช์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมอัตราเร็วรอบกวนในถังเป็น 400 รอบต่อนาทีและควบคุมอัตราการให้อากาศ 1 vvm สกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแบบพร้อมเซลล์ให้ผลผลิตสูงสุดเท่ากับ 34.061 กรัมต่อลิตร (5)

ปัจจุบันสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์มากขึ้นเพราะมีความเป็นพิษต่ำ สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ สารตั้งต้นหาได้ง่ายราคาถูกและผลิตจากสารตั้งต้นที่สามารถผลิตขึ้นใหม่ได้ (6) การนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมปิโตรเคมี สิ่งแวดล้อม อุตสาหกรรมอาหาร ได้รับความสนใจมากขึ้นเพราะมีบทบาทที่สำคัญต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์ โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เนื่องจากไม่มีความเป็นพิษต่อผิวหนัง ไม่เกิดการระคายเคือง เป็นสารก่ออิมัลชัน สารก่อฟอง และสารเพิ่มการละลาย นอกจากนี้ สารลดแรงตึงผิวถูกนำมาใช้ในการเตรียมเป็นอิมัลชันมากมายเพื่อประยุกต์ใช้ในทางเภสัชกรรม อิมัลชันเป็นระบบที่ประกอบด้วยของเหลวอย่างน้อย 2 ชนิดซึ่งไม่เข้ากันหรือไม่ละลายในกันและกัน เช่น น้ำและน้ำมัน การจะผสมเข้าเป็นเนื้อเดียวกันต้องใช้ตัวก่ออิมัลชัน (emulsifier) เป็นตัวผสานของเหลวทั้งสองเข้าด้วยกัน อิมัลชันที่เกิดขึ้นถ้ามองด้วยตาเปล่าจะเห็นเป็นเนื้อเดียวกัน แต่ถ้ามองด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นเป็น 2 วัฏภาค คือ หยดเล็ก ๆ ที่เป็นของเหลวชนิดหนึ่ง เรียกว่า วัฏภาคภายในกระจายตัวแทรกอยู่ในของเหลวอีกชนิดหนึ่ง เรียกว่า วัฏภาคภายนอก (7) อิมัลชันมีส่วนประกอบหลักสำคัญ 3 ส่วน คือ วัฏภาคน้ำ วัฏภาคน้ำมัน และตัวก่ออิมัลชัน กลไกการเกิดอิมัลชัน คือ ทำให้ของเหลวที่เป็นวัฏภาคภายในแตกกระจายเป็นหยดเล็ก ๆ และทำให้การกระจายตัวนั้นคงสภาพอยู่ได้ ซึ่งอาศัยตัวก่ออิมัลชันที่มักเป็นสารลดแรงตึงผิว การศึกษาลักษณะการเกิดโครงสร้างต่าง ๆ ของอิมัลชันนิยมแสดงด้วยแผนภาพวัฏภาคสามองค์ประกอบ (ternary Phase Diagram) ซึ่งมีลักษณะเป็นสามเหลี่ยมสองมิติ โดยมุมทั้งสามแสดงแต่ละองค์ประกอบ ได้แก่ น้ำ น้ำมัน และสารลดแรงตึงผิว โดยให้อัตราส่วนของสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมมีค่าคงที่ (8)

ในปี 2554 จิราพร คำแก้ว (9) ศึกษาความเป็นไปได้ในการนำเอาสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *P. anomala* MUE24 มาใช้ก่ออิมัลชันในสูตรผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่มี mineral oil เป็นส่วนประกอบหลัก พบว่า ก่ออิมัลชันได้ดีจากการใช้ส่วนผสมระหว่างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและ Steareth-21 ที่อัตราส่วน 1.2:1.8 และทดสอบความคงตัวของอิมัลชันที่สภาวะเร่งโดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที พบว่าอิมัลชันยังคงสภาพอยู่ได้ไม่เกิดการแยกชั้นเป็นเวลา 1 เดือน 2 สัปดาห์ที่อุณหภูมิห้อง ในปี 2556 อาทิมา ปุญญวา (10) ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *P. anomala* MUE24 เพื่อใช้ในการก่ออิมัลชันกับน้ำมันชนิดต่างๆ พบว่า ก่ออิมัลชันได้ดีในน้ำมันถั่วเหลืองโดยมีการเติมสารเพิ่มความหนืด HPMC และอิมัลซิไฟเออร์ร่วม span

80 อิมัลชันมีความคงตัวเป็นเวลา 7 วันที่อุณหภูมิห้อง จากงานวิจัยที่กล่าวมานี้ได้มีการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาใช้ในการก่ออิมัลชัน แต่ยังไม่มีการศึกษาถึงโครงสร้างและอัตราส่วนที่เหมาะสมที่จะทำให้เกิดอิมัลชัน การก่ออิมัลชันเกิดจากองค์ประกอบแต่ละชนิดผสมกันในอัตราส่วนที่เหมาะสม ซึ่งการสร้างแผนภาพวัฏภาคสามองค์ประกอบจะช่วยในการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับการเกิดอิมัลชันได้ ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *P. anomala* MUE24 สำหรับเตรียมเป็นอิมัลชันโดยใช้แผนภาพวัฏภาคสามองค์ประกอบเพื่อเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อผลิตอิมัลชันน้ำมันถั่วเหลืองจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *P. anomala* MUE24

1.3 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

1.3.1 ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *P. anomala* MUE24 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

1.3.2 ทดสอบประสิทธิภาพและสกัดแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

1.3.3 ทดสอบสมบัติเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดแยกแล้ว

1.3.4 นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ไปใช้ในการเตรียมอิมัลชันน้ำมันถั่วเหลือง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบอัตราส่วนที่เหมาะสมในการเตรียมอิมัลชันน้ำมันถั่วเหลืองจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

1.4.2 สามารถนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ไปใช้ในการเตรียมอิมัลชันน้ำมันถั่วเหลืองทดแทนการใช้สารลดแรงตึงผิวทางเคมี

1.4.3 สามารถเตรียมอิมัลชันน้ำมันถั่วเหลืองที่มีความคงตัวซึ่งนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางและทางเภสัชกรรมได้

บทที่ 2
ปริทัศน์วรรณกรรม

2.1 สารลดแรงตึงผิว

ในปัจจุบันสารลดแรงตึงผิวมีความสำคัญต่อชีวิตประจำวันของมนุษย์มากขึ้นทั้งใช้ในครัวเรือนและอุตสาหกรรมต่างๆ สารลดแรงตึงผิวมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยส่วนที่ไม่มีขั้วหรือส่วนที่ไม่ชอบน้ำ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนหรือกรดไขมัน และส่วนที่มีขั้วหรือส่วนที่ชอบน้ำ ซึ่งส่วนใหญ่ ได้แก่ โปรตีน, น้ำตาลที่มีหมู่คาร์บอกซิลิก, หมู่ไฮดรอกซิล, หมู่อะมิโนและหมู่ฟอสเฟต การที่สารลดแรงตึงผิวมีโครงสร้างนี้ทำให้มีคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิวและเป็นสารก่ออิมัลชันระหว่างของเหลวที่มีขั้วแตกต่างกัน (6) โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิว ดังแสดงในรูปที่ 2.1

รูปที่ 2.1 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิว (6)

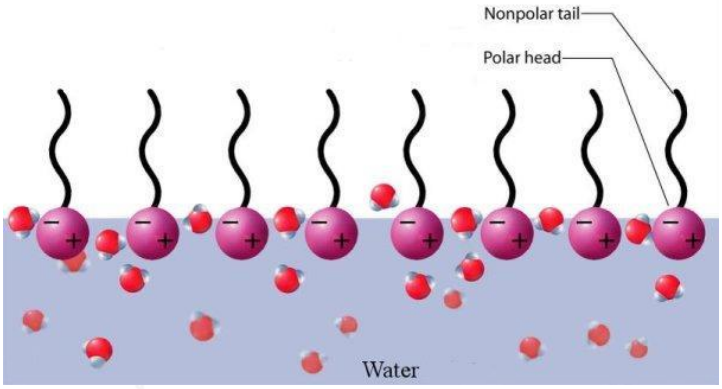
สารลดแรงตึงผิวที่ใช้ในปัจจุบันส่วนใหญ่ได้มาจากวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี ซึ่งสารที่ได้จากกระบวนการทางเคมีนี้มีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมและอาจนำไปสู่ปัญหาด้านนิเวศวิทยา โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารลดแรงตึงผิวประเภทสารชะล้างที่ถูกปล่อยสู่สิ่งแวดล้อม มีความเป็นพิษต่อธรรมชาติและมีการสะสมตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อม ดังนั้นจึงมีความสนใจที่จะนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาใช้มากขึ้น (11) เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีข้อดีหลายประการเมื่อเปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมี ได้แก่ เป็นสารที่สามารถย่อยสลายได้เองตามกระบวนการธรรมชาติ มีความเป็นพิษต่ำ มีประสิทธิภาพการทำงานภายใต้สภาวะอุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่างที่หลากหลาย สามารถผลิตได้จากสารตั้งต้นที่ใช้แล้วไม่หมดไปและมีราคาถูก (12)

2.2 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ คือ สารลดแรงตึงผิวที่ถูกผลิตและหลั่งออกมานอกเซลล์หรือเป็นส่วนหนึ่งของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ยีสต์และรา (13) มีโครงสร้างเป็นแบบแอมฟิฟิลิค

เช่นเดียวกันสารลดแรงตึงผิวชนิดอื่น ประกอบด้วยส่วนหัวที่มีขั้ว มีลักษณะชอบน้ำ และส่วนหางที่ไม่มีขั้ว มีลักษณะชอบไขมัน มีทั้งขนาดและโครงสร้างที่หลากหลายขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ ภาวะในการเลี้ยงและสารตั้งต้นที่ใช้ในการผลิต (14)

จากลักษณะโครงสร้างที่เป็นแอมฟิฟิลิคทำให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีสมบัติที่สำคัญ คือ มีความสามารถในการลดแรงตึงผิวระหว่างสสาร ได้แก่ ลดแรงตึงผิวระหว่างของเหลวด้วยกัน ของเหลวกับของแข็ง หรือ ของเหลวกับแก๊ส (6) โดยโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวไปสะสมระหว่างผิวสัมผัส ตัวอย่างเช่น การกระจายตัวของสารลดแรงตึงผิวระหว่างผิวสัมผัสของน้ำกับอากาศ โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวจะหันส่วนที่มีขั้วเข้าสู่ด้านโมเลกุลของน้ำและหันส่วนที่ไม่มีขั้วออกสู่ด้านอากาศ โดยโมเลกุลจะกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอบนผิวหน้าของน้ำทำให้ลดแรงตึงผิวของน้ำได้ ดังแสดงในรูปที่ 2.2

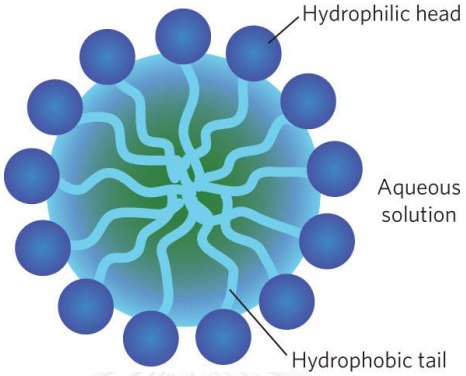


รูปที่ 2.2 การกระจายตัวของสารลดแรงตึงผิวระหว่างผิวสัมผัสของน้ำกับอากาศ (6)

ค่าแรงตึงผิวระหว่างน้ำกับอากาศ เรียก surface tension และค่าแรงตึงผิวระหว่างน้ำกับไฮโดรคาร์บอน เรียกว่า interfacial tension (15)

เมื่อสารลดแรงตึงผิวละลายอยู่ในสารละลาย จะส่งผลให้แรงตึงผิวมีค่าลดลง เช่น น้ำกลั่นมีค่าแรงตึงผิวอยู่ที่ 72 mN/m เมื่อเติมสารลดแรงตึงผิวลงไป ค่าแรงตึงผิวลดลงเหลือ 30 mN/m (16) สารลดแรงตึงผิวนี้มีบทบาทในการลดแรงตึงผิวระหว่างน้ำกับอากาศ โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวเรื่อยๆ จนมีความเข้มข้นสูงขึ้นจนไม่สามารถแทรกตัวระหว่างผิวสัมผัสระหว่างน้ำและ

อากาศได้อีก โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวส่วนเกินจะจัดเรียงตัวเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า ไมเซลล์ (micelle) ดังแสดงในรูปที่ 2.3 การเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิวเป็นไมเซลล์ (16)



รูปที่ 2.3 การเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิวเป็นไมเซลล์ (16)

ซึ่งความเข้มข้น ณ จุดที่ทำให้โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวมารวมกันนี้ เป็นคุณสมบัติเฉพาะของสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิด เรียกความเข้มข้น ณ จุดนี้ว่า ความเข้มข้นวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ (critical micelle concentration, CMC) เมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวในสารละลายเพิ่มขึ้น ค่าแรงตึงผิวของสารละลายจะมีค่าลดลงจนถึงจุด CMC ค่าแรงตึงผิวของสารละลายจะไม่ลดลงอีก ถึงแม้จะเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวในสารละลาย

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ สามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม ตามลักษณะโครงสร้างทางเคมี คือ

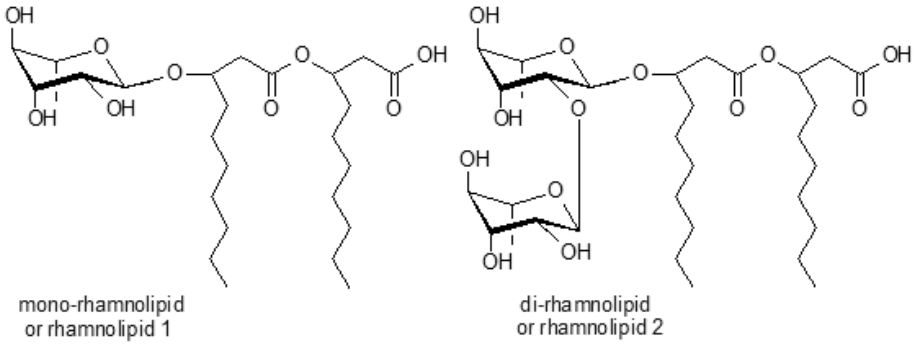
1)ไกลโคลิพิด (glycolipid)

สารลดแรงตึงผิวที่พบส่วนใหญ่มักเป็นกลุ่มนี้ มีโครงสร้างซึ่งประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต มักเป็นน้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น น้ำตาล rhamnose, trehalose, sucrose และ glucose เชื่อมต่อกับ long chain aliphatic acids หรือ hydroxyl aliphatic acids สารลดแรงตึงผิวในกลุ่มไกลโคลิพิดที่รู้จักกันดี ได้แก่ rhamnolipids, trehalolipids และ sophorolipids เป็นต้น

-แรมโนลิพิด (rhamnolipids)

ประกอบด้วยน้ำตาล rhamnose 1 หรือ 2 โมเลกุล เชื่อมต่อกับ β- hydroxydodecanoic จำนวน 1 หรือ 2 โมเลกุล โดยพันธะไกลโคซิดิก (รูปที่ 2.4) การผลิตสารลดแรงตึงผิวชนิดนี้มักพบในแบคทีเรีย *Pseudomonas* spp.

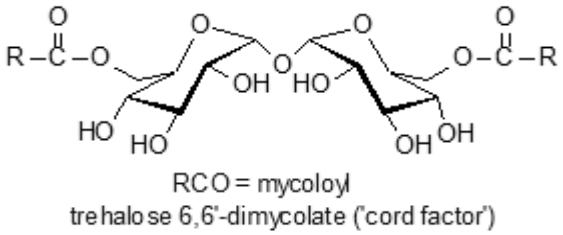
แรมโนลิพิดมีสมบัติในการลดค่าแรงตึงผิวอยู่ที่ 30-32 mN/m มีความสามารถในการก่ออิมัลชันสูงและสามารถดูดซับสารประเภท hydrophobic ได้ดี



รูปที่ 2.4 โครงสร้างของ mono-rhamnolipid และ di-rhamnolipid (17)

-ทรีฮาโลลิพิด (trehalolipids)

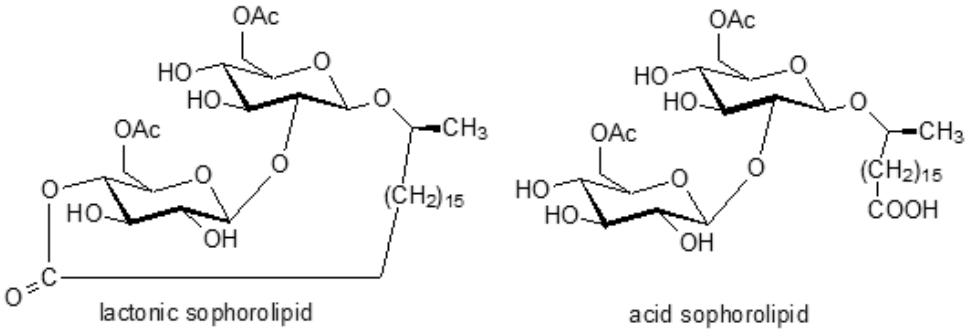
มักพบในผนังเซลล์ โครงสร้างประกอบด้วยน้ำตาล trehalose 2 โมเลกุล เชื่อมต่อกับ mycolic acid ซึ่งประกอบด้วยสายยาวของ α-branched-β-hydroxy fatty acid มักพบในแบคทีเรียกลุ่ม Mycobacterium, Nocardia, Corynebacterium โดยการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นตรงตำแหน่ง C-6 และ C'-6 ของน้ำตาลtrehalose (รูปที่ 2.5) trehalolipid ผลิตจากจุลินทรีย์ต่างชนิดจึงมีขนาดและโครงสร้างของ mycolic acids



รูปที่ 2.5 โครงสร้างของทรีฮาโลลิพิด (18)

-โซโฟโรลิพิด (sophorolipids)

เป็นที่รู้จักตั้งแต่ปี 1967 มักพบในกลุ่มยีสต์สกุล Torulopsis มีโครงสร้างที่เกิดจากการเชื่อมต่อกันโดยพันธะไกลโคซิดิกระหว่างน้ำตาล sophorose กับ hydroxyl fatty acid residue คือ 17-L-hydroxyoctadecanoic และ 17-L-hydroxy-9-octadecenoic acid (รูปที่ 2.6) และพบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Toruloposis magholiae* (*bombicola*) ในอาหารที่มีกลูโคส สารสกัดยีสต์และยูเรียสามารถผลิต sophorolipid ได้ 2 ชนิดโดยมี lactonic และ acidic อยู่ในโครงสร้าง



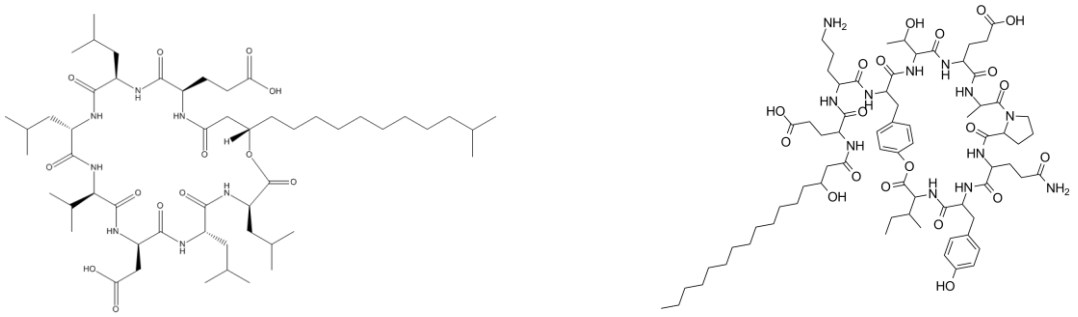
รูปที่ 2.6 โครงสร้างของโซโฟโรลิพิด (19)

2)ไลโพเพพไทด์ (lipopeptide)

จุลินทรีย์ในกลุ่ม Bacillus มักผลิตสารลดแรงตึงผิวในกลุ่มไลโพเพพไทด์ โดยมีไขมันจับอยู่กับสายเปปไทด์ ซึ่งสารในกลุ่มนี้นับว่าเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงสุด นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ ตัวอย่างของสารกลุ่ม cyclic lipopeptide ในกลุ่มนี้เช่น decapeptide antibiotics (gramicidins) จากเชื้อ *Bacillus brevis* และ lipopeptide antibiotics (polymyxins) จากเชื้อ *Bacillus polymyxa* และแสดงคุณสมบัติลดแรงตึงผิวได้อีกด้วย

Surfactin และ Fengycin ซึ่งแตกต่างกันที่โครงสร้างและคุณสมบัติ กล่าวคือ surfactin มีกรดอะมิโนชนิดแอลฟา 7 โมเลกุล คือ L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-Lleu และ β-hydroxyl fatty acid คาร์บอน 13-15 อะตอม สำหรับ Fengycin มีกรดอะมิโน 10 โมเลกุลต่อกันเป็นวง ซึ่งมีคาร์บอน 14-18 อะตอม (รูปที่ 2.7)

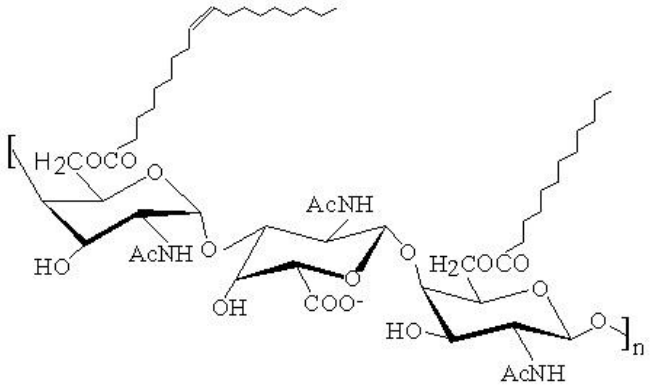
A B



รูปที่ 2.7 โครงสร้างของสารในกลุ่ม lipopeptide
Surfactin (A) และ Fengycin (B) (20)

3)สารลดแรงตึงผิวชนิดพอลิเมอร์ (polymeric surfactant)

สารที่เกิดขึ้นจากการรวมตัวกันของหน่วย polysaccharide-protein และหน่วยของกรดไขมันที่มีลักษณะเป็นพอลิเมอร์ในธรรมชาติ ตัวอย่างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มนี้ คือ emulsan (รูปที่ 2.8)

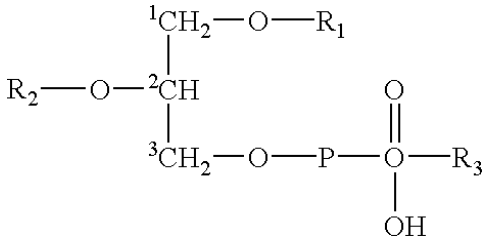


รูปที่ 2.8 โครงสร้างของ emulsan (21)

4)ฟอสโฟลิพิด (phospholipids)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด phospholipids เกิดพันธะเอสเทอร์ขึ้นระหว่างหมู่แอลกอฮอล์ของลิพิดและฟอสเฟต (รูปที่ 2.9) มีแบคทีเรียและยีสต์หลายชนิดสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด phospholipids เช่น *Aspergillus* spp., *Thiobacillus thiooxidans*, *Arthrobacter*

sp. AK-19 และ *P. aeruginosa* โดยมีการสะสมไขมันในโครงสร้าง ถึง 40–80% (w/w) เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มี hexadecane และ olive oil (6)



รูปที่ 2.9 โครงสร้างของ phospholipids (22)

ตารางที่ 2.1 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากแบคทีเรียและรา (23)

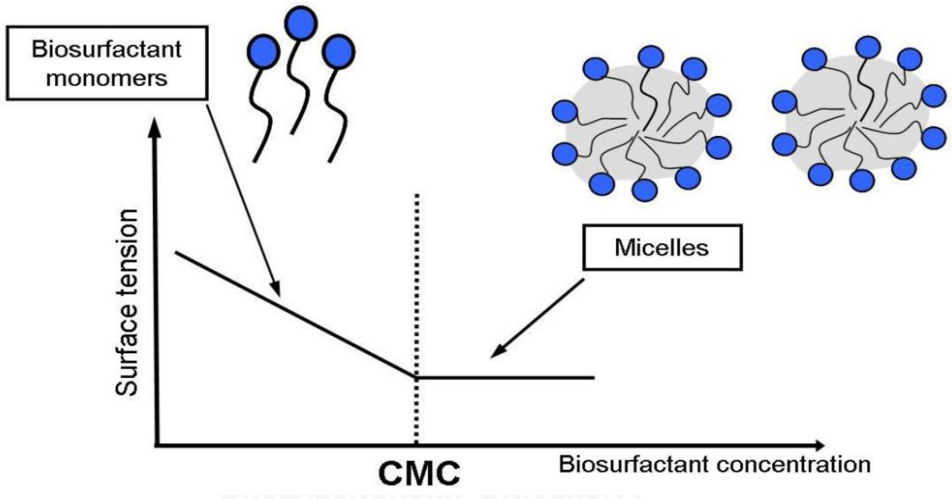
Organisms	Biosurfactants	References
Bacteria		
Serratia marcescens	Serrawettin	Lai *et al.* (2009)
Rhodotorula glutinis, R. graminis	Polyol lipids	Amaral *et al.* (2006)
Rhodococcus erythropolis, Arthrobacter spp., *Nocardia erythropolis, Corynebacterium* spp., *Mycobacterium* spp.	Trehalose lipids	Muthusamy *et al.* (2008)
Pseudomonas spp., *Thiobacillus thiooxidans, Agrobacterium* spp.	Ornithine lipids	Desai and Banat (1997)
Pseudomonas fluorescens, Leuconostoc mesenteriods	Viscosin	Banat *et al.* (2010)
Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas chlororaphis, Serratia rubidea	Rhamnolipids	Jadhav *et al.* (2011)
P. fluorescens, Debaryomyces polmorphus	Carbohydrate-lipid	Nerurkar *et al.* (2009)
P. aeruginosa	Protein PA	Hisatsuka *et al.* (1971)
Lactobacillus fermentum	Diglycosyl diglycerides	Mulligan *et al.* (2001)
Fungi		
Torulopsis bombicola	Sophorose lipid	Kim *e al.* (1997)
Candida bombicola	Sophorolipids	Casas *et al.* (1997)
Candida lipolytica	Protein-lipidpolysaccharide complex	Sarubbo *et al.* (2007)
Candida lipolytica	Protein-lipidcarbohydrate complex	Rufino *et al.* (2007)
Candida ishiwadae	Glycolipid	Thanomsub *et al.* (2004)
Candida batistae	Sophorolipid	Konishi *et al.* (2008)
Aspergillus ustus	Glycolipoprotein	Alejandro *et al.* (2011)
Trichosporon ashii	Sophorolipid	Chandran and Das (2010)

2.3 การวิเคราะห์สมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

2.3.1 ค่าแรงตึงผิว

ค่าแรงตึงผิว หมายถึง แรงที่กระทำระหว่างของเหลวกับอากาศ มีหน่วยเป็น mN/m หรือ dyne/cm โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีโครงสร้างแบบแอมฟิฟิลิค จะสะสมบริเวณผิวหน้าของวัฏภาคที่แตกต่างกัน ทำให้แรงกระทำระหว่างของเหลวกับอากาศลดลง เมื่อความเข้มข้น

ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มขึ้น ค่าแรงตึงผิวจะลดลงเรื่อยๆ โดยทั้งสองค่านี้จะมีความสัมพันธ์กัน จนกระทั่งถึงจุดที่ความเข้มข้นมากพอจนเกิดการรวมตัวเป็นโครงสร้างไมเซลล์ เรียกว่า ความเข้มข้นวิกฤติการเกิดไมเซลล์ (critical micelle concentration, CMC) ที่จุดนี้เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ค่าแรงตึงผิวจะไม่เปลี่ยนแปลง ซึ่งค่า CMC สามารถบ่งบอกถึงประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชนิดนั้นๆได้ ความสามารถในการละลายสารที่ไม่ละลายน้ำจะเริ่มที่ CMC และค่อยๆ เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของไมเซลล์ การวัดค่าแรงตึงผิวทำได้โดยใช้เครื่อง tensiometer ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมอย่างกว้างขวาง เนื่องจากค่อนข้างแม่นยำ ไม่ยุ่งยาก ทำได้สะดวกและรวดเร็วในอุณหภูมิห้อง ค่าแรงตึงผิวของน้ำบริสุทธิ์เท่ากับ 72 mN/m และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ถือว่ามีประสิทธิภาพดีทำให้ค่าแรงตึงผิวลดลงเหลือ 35 mN/m



รูปที่ 2.10 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ แรงตึงผิวและการเกิดไมเซลล์ (24)

2.3.2 ค่าการกระจายตัวของน้ำมัน

เป็นการวัดประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการทำให้แผ่นฟิล์มของน้ำมันสังเคราะห์บนผิวน้ำเกิดเป็นวงใส (clear zone) โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของพื้นที่วงใส แล้วคำนวณหาพื้นที่วงกลมตามสูตร πr^2 มีหน่วยเป็นตารางเซนติเมตร โดยกำหนด 1 ตารางเซนติเมตรของการกระจายตัวของน้ำมันสังเคราะห์เท่ากับ 1 หน่วย วิธีนี้เป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยากและประหยัดค่าใช้จ่ายและยังเป็นวิธีที่เหมาะสมในการวัดกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว เนื่องจากวิธีนี้ใช้สารปริมาณเพียงเล็กน้อยในการวิเคราะห์ คือ 10 ไมโครลิตรเท่านั้น (25)

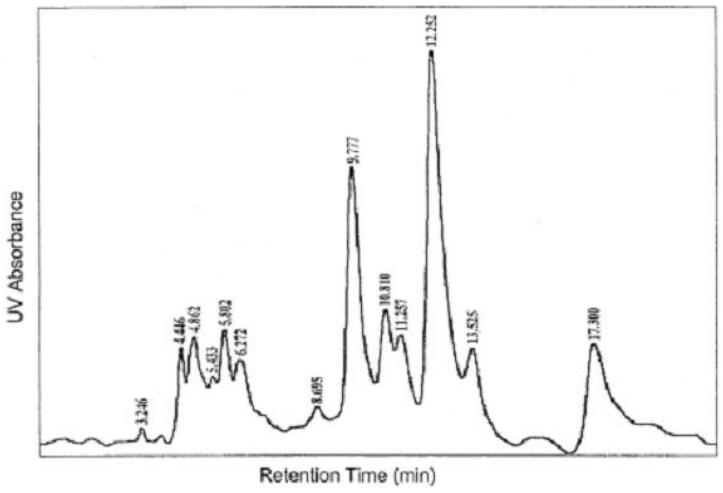
2.3.3 การเตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วน

โครมาโทกราฟี (chromatography) เป็นเทคนิคที่เป็นประโยชน์ในการแยกสาร ตรวจสอบและวิเคราะห์ชนิดของสาร โดยอาศัยหลักการละลายของสารในตัวทำละลายและการถูกดูดซับที่แตกต่างกัน กล่าวคือ สารที่ละลายในตัวทำละลายได้ดีและถูกดูดซับน้อยจะเคลื่อนที่ออกมาก่อน ส่วนสารที่ละลายได้น้อยและถูกดูดซับได้ดีจะเคลื่อนที่ออกมาทีหลัง การแยกของสารนั้นอาศัยความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ระหว่างสารตัวอย่าง วิธีการนี้มีเฟส 2 เฟส คือ เฟสอยู่กับที่ (stationary phase) กับเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) (26)

โครมาโทกราฟีแบบบาง (Thin-Layer Chromatography) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกและการทำบริสุทธิ์สารประกอบอินทรีย์ที่มีขั้วแตกต่างกัน เฟสคงที่ที่นิยมใช้ คือ ซิลิกาเจลเคลือบบนแผ่นแก้ว เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้จะเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) เทคนิคการแยกทำได้โดยจุดสารตัวอย่างลงบนเฟสคงที่ จากนั้นนำไปใส่ในภาชนะที่บรรจุตัวทำละลาย สารจะเคลื่อนที่ผ่านเฟสคงที่ด้วยแรง capillary action อัตราเร็วที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับความสามารถในการกระจายตัวระหว่างเฟสคงที่และเฟสเคลื่อนที่ ซึ่งบนซิลิกาเจลนั้นจะมีหมู่ไฮดรอกซิลทำให้มีความเป็นขั้วสูง ทำให้สารที่มีขั้วจับบนอนุภาคของเจลได้ดีจึงเคลื่อนที่ได้ช้า ในขณะที่สารไม่มีขั้วจะจับได้น้อยจึงเคลื่อนที่ได้เร็ว ข้อดีของโครมาโทกราฟีชนิดนี้ คือ ไม่ยุ่งยาก ต้องการอุปกรณ์น้อย สามารถตรวจแยกสารในปริมาณน้อย ๆ ได้ และสามารถแยกสารออกจากเฟสคงที่โดยสกัดด้วยตัวทำละลาย (27)

ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์สารประกอบที่อยู่ในรูปของเหลว โดยใช้เครื่องสูบแรงดันสูงสูบตัวทำละลายซึ่งทำหน้าที่เป็นเฟสเคลื่อนที่พาสารตัวอย่างที่ถูกฉีดเข้าทางช่องฉีดสารผ่านอนุภาคที่เป็นเฟสคงที่ซึ่งบรรจุอยู่ในคอลัมน์ สารผสมตัวอย่างจะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์และถูกแยกออกมา สารจะถูกแยกออกมาในเวลาที่ต่างกัน โดยสารผสมที่อยู่ในตัวอย่างสามารถแยกออกจากกันได้นั้นขึ้นอยู่กับการดูดซับของสารประกอบนั้นกับเฟสคงที่ สารที่ดูดซับได้ต่ำในเฟสคงที่จะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ได้เร็ว สารนั้นก็จะถูกแยกออกมาก่อน ส่วนสารที่ดูดซับได้ดีในเฟสคงที่จะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ได้ช้าจะถูกแยกออกมาทีหลัง (28) เพื่อผ่านเข้าสู่เครื่องตรวจวัด เช่น UV ELSD ในเวลาที่ต่างกัน สัญญาณที่วัดได้จะอยู่ในรูปสัญญาณไฟฟ้าตามเวลาและปริมาณของสารแต่ละตัวที่ตรวจวัดได้

จากนั้นสัญญาณจะถูกส่งไปยังเครื่องบันทึกสัญญาณเพื่อแสดงผลออกมาเป็นโครมาโทแกรม เทคนิค HPLC แบ่งเป็น 2 แบบตามลักษณะการใช้เฟสเคลื่อนที่คือ การแยกโดยใช้องค์ประกอบของเฟสคงที่แบบเดียวตลอดการแยก (isocratic) และการแยกโดยมีการเปลี่ยนองค์ประกอบของเฟสคงที่ในระหว่างการแยกแบบต่อเนื่องหรือแบบทีละขั้น (gradient elution) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่จะนำมาแยกด้วยวิธีนี้ต้องทำให้มีความบริสุทธิ์เบื้องต้นก่อน ตัวอย่างเช่น โซโฟโรลิพิดที่ได้จากกระบวนการหมัก ก่อนผ่านการแยกด้วย HPLC ได้ผ่านขั้นตอนการแยกบนโครมาโทกราฟีแบบบางมาแล้ว โดยการวิเคราะห์โซโฟโรลิพิดนั้นนิยมใช้คอลัมน์ C-18 เป็นเฟสคงที่และใช้สารละลายแอซีโทไนไตรล์เป็นเฟสเคลื่อนที่ ตรวจวัดด้วยเครื่อง UV detector ที่ 207 นาโนเมตร อัตราการชะเท่ากับ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นโซโฟโรลิพิดที่มีโครงสร้างแบบต่างๆจะแยกออกมาในเวลาที่ต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 2.11



รูปที่ 2.11 โครมาโทแกรม HPLC ของโซโฟโรลิพิดบริสุทธิ์บางส่วนผลิตโดย *Torulopsis bombicola* และใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน (29)

2.3.4 ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

ปัจจุบันสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ถูกนำไปประยุกต์ใช้ในทางเภสัชกรรมและอาหารมากมาย ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับชีวิตของมนุษย์โดยตรง ดังนั้นจึงควรมีการทดสอบความปลอดภัยของสารลดแรงตึงผิวที่นำมาใช้ก่อน ตัวอย่างเช่น ในงานวิจัยของ Cochis และคณะ (30) ได้มีการรายงานถึงความเป็นพิษของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อเซลล์เนื้อเยื่อหนูว่า การใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพช่วย

ลดการเกิดไบโอฟิล์มและเพิ่มอัตราการรอดชีวิตได้ดีกว่าสารลดแรงตึงผิวทางเคมี นอกจากนี้ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Sphingobacterium detergens* ได้ถูกนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อ 2 ชนิดคือ fibroblast และ keratinocyte พบว่า มีความเป็นพิษต่ำกว่า SDS ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวทางเคมี (16)

2.4 การประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอุตสาหกรรมต่างๆ

ปัจจุบันสารลดแรงตึงผิว (surfactant) มีบทบาทที่สำคัญต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์ ซึ่งจะเห็นได้จากการใช้ผลิตภัณฑ์ผสมสารลดแรงตึงผิวในการทำกิจกรรมต่างๆ เริ่มตั้งแต่ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดร่างกายและของใช้ต่างๆ ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง รวมไปถึงในผลิตภัณฑ์อาหารล้วนแล้วแต่มีสารลดแรงตึงผิวเป็นส่วนประกอบทั้งสิ้น ทำให้สารลดแรงตึงผิวได้รับการสนใจมากขึ้น อย่างไรก็ตาม สารลดแรงตึงผิวที่ใช้ในระดับอุตสาหกรรมส่วนใหญ่เป็นสารที่ถูกสังเคราะห์จากกระบวนการทางเคมี (31) ซึ่งเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ย่อยสลายได้ยาก ทำให้เกิดการสะสมในสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ขั้นตอนการผลิตรวมไปถึงผลิตผลพลอยได้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวนั้น ยังก่อให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย (1) ดังนั้น เพื่อลดปัญหาที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและเพื่อเพิ่มความปลอดภัยต่อผู้บริโภค สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการใช้ทดแทนสารลดแรงตึงผิวที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

อุตสาหกรรมปิโตรเคมี

การประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อช่วยการนำน้ำมันที่ตกค้างในสิ่งแวดล้อมออกมาบำบัด (oil recovery) กับการทำความสะอาดถังเก็บน้ำมัน โดยจะไปลดความหนืดของน้ำมันทำให้ง่ายต่อการสกัดและขนย้ายน้ำมันหรือการใช้ในขบวนการขุดเจาะน้ำมัน เช่น ในขบวนการสกัดน้ำมันมีการนำโซโฟโรลิพิดมาเป็นส่วนประกอบช่วยในการกำจัดสารประกอบไฮโดรคาร์บอนออกจากสว่านขุดเจาะน้ำมัน

สิ่งแวดล้อม

สารเคมีที่ตกค้างในสิ่งแวดล้อมส่วนมากมาจากอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น แนปทาลีนจากอุตสาหกรรมปิโตรเลียม อุตสาหกรรมกระดาษ อุตสาหกรรมสิ่งทอ สารคลอโรฟีนอลจากยาฆ่าแมลง

และยาฆ่าวัชพืช เป็นต้น และจากกิจกรรมประจำวันของมนุษย์ ปัญหาสารพิษจากอุตสาหกรรมเหล่านี้ส่งผลกระทบต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม ดังนั้น โรงงานอุตสาหกรรมจึงต้องมีกระบวนการบำบัดก่อนปล่อยสู่แหล่งธรรมชาติด้วยวิธีทางเคมี กายภาพ และชีวภาพ ซึ่งวิธีทางชีวภาพเป็นวิธีทางหนึ่งที่ให้ประโยชน์อย่างมากเพราะไม่ทิ้งสารพิษตกค้างหลังการบำบัดอาจทำได้โดยการเติมสารลดแรงตึงผิวลงไปในธรรมชาติเพื่อให้จุลินทรีย์ท้องถิ่นสามารถย่อยสลายสารปนเปื้อนดังกล่าวหรือเติมจุลินทรีย์ที่มีความสามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวเพื่อใช้ในการย่อยสลายสารปนเปื้อนดังกล่าวลงไปในบริเวณนั้นๆ (32)

อุตสาหกรรมอาหาร

ในอุตสาหกรรมอาหารสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมักใช้เป็นสารที่ทำหน้าที่ในการก่ออิมัลชันซึ่งอิมัลชันมีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดการผสมเข้ากันได้ดีและทำให้เกิดเนื้อสัมผัสที่ดี ด้วยเนื่องจากคุณสมบัติในการก่ออิมัลชันจึงมีรายงานว่ามีการนำโซโฟโรลิพิดมาใช้ในการปรับปรุงคุณภาพของแป้งสาลีและใช้เป็นตัวช่วยในการรักษาสภาพน้ำแข็งที่ใช้แช่เย็นอาหารในการขนส่ง (33) นอกจากนี้ยังมีการนำมาใช้ประยุกต์ในอาหารชนิดต่างๆ มากมาย เช่น สารก่ออิมัลชันในมาร์การีนยับยั้งการเกิดผลึกของไขมัน (fat crystallization) ในขนมพวกลูกอม เป็นต้น

อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพพบได้บ่อยในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางเนื่องจากมีคุณสมบัติที่ดีคือมีความชื้นต่ำและไม่เป็นพิษต่อผิวหนัง ใช้เป็นสารก่ออิมัลชัน สารก่อฟอง และสารเพิ่มการละลาย เช่น โซโรลิพิดที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ต่างๆ หลายชนิด เช่น *Candida bombicola* KSM-36 โดยใช้น้ำมันปาล์มและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน *Candida apicola* ใช้กลูโคสและน้ำมันเมล็ดทานตะวันเป็นแหล่งคาร์บอน เป็นต้น (1)

2.5 อิมัลชัน

อิมัลชัน หมายถึง ผลิตภัณฑ์รูปแบบหนึ่งที่ประกอบด้วยของเหลวอย่างน้อย 2 ชนิด ซึ่งไม่เข้ากันหรือไม่ละลายในกันและกัน เช่น น้ำและน้ำมัน ซึ่งนำมารวมกันในลักษณะที่ผสมผสานเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน โดยใช้ตัวก่ออิมัลชัน (emulsifier) เป็นตัวผสานของเหลวทั้งสองเข้าด้วยกัน อิมัลชันที่เกิดขึ้น

ถ้ามองด้วยตาเปล่าจะเห็นลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน แต่ถ้ามองด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นเป็น 2 วัฏภาค คือ เห็นเป็นหยดเล็กๆของของเหลวชนิดหนึ่ง ที่เรียกว่า วัฏภาคภายใน (internal or dispersed phase) กระจายตัวแทรกอยู่ในของเหลวอีกชนิดหนึ่ง ที่เรียกว่า วัฏภาคภายนอก (external or continous phase) โดยทั่วไปหยดของวัฏภาคภายในอาจมีขนาดแตกต่างกันตั้งแต่ขนาดที่เล็กกว่า 0.05 ไมครอน จนถึง 25 ไมครอน ซึ่งขนาดอนุภาคของวัฏภาคภายในมีผลต่อการกระจายแสงได้ต่างกันจึงทำให้อิมัลชันมีลักษณะภายนอกที่มองเห็นได้แตกต่างกัน ผลิตภัณฑ์อิมัลชันที่พบโดยทั่วไปมักจะมีลักษณะขาวขุ่นคล้ายน้ำนม แต่อิมัลชันอาจมีลักษณะโปร่งแสงก็ได้ (7)

2.5.1 ชนิดของอิมัลชัน

แบ่งตามลักษณะภายนอกที่มองเห็น

มี 2 ชนิด คือ แมคโครอิมัลชัน (macroemulsion) คือ อิมัลชันลักษณะขุ่นขาวที่พบโดยทั่วไป อนุภาคของวัฏภาคภายในของอิมัลชันชนิดนี้ มักจะมีขนาดตั้งแต่ 0.25–10 ไมครอน (โดยทั่วไปจะใหญ่กว่า 1 ไมครอน) จึงทำให้เกิดความแตกต่างในค่าดัชนีการหักเหของแสงของวัฏภาคทั้งสองและเกิดการกระจายแสงทำให้มองดูขุ่นขาว อิมัลชันชนิดนี้อาจแบ่งย่อยได้เป็นอิมัลชันเนื้อหยาบ (coarse emulsion) ซึ่งมีอนุภาคค่อนข้างใหญ่และอิมัลชันเนื้อละเอียด (fine emulsion) ซึ่งมีอนุภาคค่อนข้างเล็กหรือเล็กกว่า 5 ไมครอน แมคโครอิมัลชันเป็นอิมัลชันที่พบมากที่สุด ทั้งในอาหาร ยาและเครื่องสำอาง เช่น ไอศครีม สลัดครีม ครีมรักษาโรคผิวหนัง ครีมกันแดด โลชันทาผิว ชนิดที่สอง คือ ไมโครอิมัลชัน (microemulsion) มีลักษณะโปร่งแสง เนื่องจากอนุภาคของวัฏภาคภายในเล็กมาก ประมาณ 10-75 นาโนเมตร (0.01-0.75 ไมครอน) ซึ่งมีค่าน้อยกว่าหนึ่งในสี่ของความยาวคลื่นแสงที่มองเห็นได้ (visible light) จึงไม่หักเหหรือกระจายแสง แสงจึงสามารถทะลุผ่านได้ ทำให้ดูโปร่งใส หยดของวัฏภาคภายใน มีลักษณะกลม ถูกล้อมรอบด้วยฟิล์มของตัวก่ออิมัลชัน มีทั้งชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W) และน้ำในน้ำมัน (W/O)

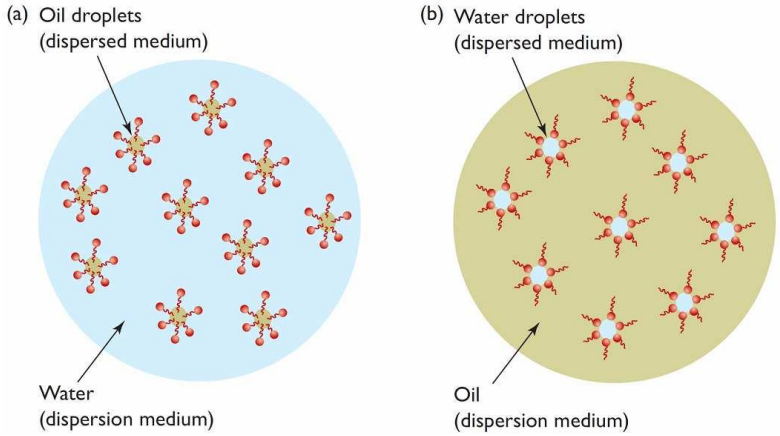
แบ่งตามชนิดของของเหลวที่เป็นวัฏภาคภายในและวัฏภาคภายนอก

สามารถแบ่งได้ 3 ชนิด คือ ชนิดน้ำในน้ำมัน (W/O emulsion) อิมัลชันชนิดนี้มีวัฏภาคภายในเป็นน้ำ วัฏภาคภายนอกเป็นน้ำมัน พบอิมัลชันชนิดนี้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เช่น ครีมล้างหน้า (cleansing cream) ครีมทากลางคืน (night cream) ในผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น เนย มาการีน

เป็นต้น ชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W emulsion) อิมัลชันชนิดนี้กลับกับชนิดแรก คือ มีวัฏภาคภายในเป็นน้ำมัน วัฏภาคภายนอกเป็นน้ำ จึงมีความเหนอะหนะน้อย ทาแล้วกระจายดี ล้างน้ำออกง่าย เป็นที่นิยมมากในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เช่น ครีม โลชันทาผิว (body cream and lotion) และในผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น น้ำนม และน้ำสลัด เป็นต้น และสุดท้ายอิมัลชันเชิงซ้อน (multiple emulsion) เป็นอิมัลชันที่มีวัฏภาคภายในซ้อนกันอยู่ ซึ่งเป็นของเหลวต่างชนิดกัน เช่น W/O/W หรือ O/W/O อิมัลชันเชิงซ้อนเหล่านี้ สามารถกลับกลายเป็นอิมัลชันชนิดธรรมดาได้ เช่น W/O/W ซึ่งมีน้ำเป็นวัฏภาคภายนอก แต่วัฏภาคภายในเป็นน้ำมันจะมีหยดเล็กๆของหยดน้ำซ้อนอยู่อีกที เมื่อกลับกลายเป็นอิมัลชันธรรมดาจะกลายเป็นชนิด O/W พบอิมัลชันชนิดนี้บ้างในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางเช่น cold cream

แบ่งตามความหนืดของอิมัลชัน

ได้เป็น 2 ชนิด คือ โลชัน (lotion) เป็นอิมัลชันที่มีความหนืดต่ำ (เหลว) เพราะมีวัฏภาคภายในปริมาณที่สูง วัฏภาคภายในมักมีไม่เกิน 35% โลชันอาจเป็นทั้งชนิด O/W และ W/O หรือมีชื่อเรียกต่างออกไปว่า น้ำนม (milk or milky lotion) เป็นรูปแบบที่พบมากที่สุดในผลิตภัณฑ์ที่ใช้ทาผิว ครีม (cream) เป็นอิมัลชันที่มีความหนืดสูง (ลักษณะกึ่งแข็ง) เพราะมีส่วนประกอบของสารพวกไขแข็ง (waxes) และไขมัน (fatty acid or fatty alcohol) ซึ่งช่วยเพิ่มความหนืดและเนื้อครีมที่ผสมอยู่กับน้ำมัน (oil) ในวัฏภาคน้ำมัน ครีมมีทั้งชนิด O/W และ W/O ครีมมีความหนืดกว่าโลชัน เพราะมีปริมาณวัฏภาคภายในสูงกว่า คือ ประมาณ 35-75%



รูปที่ 2.12 ลักษณะการเกิดอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W) และชนิดน้ำในน้ำมัน (W/O) (34)

เมื่อส่วนน้ำผสมกับส่วนน้ำมัน ส่วนน้ำหรือน้ำมันจะกระจายให้ อิมัลชันแบบ W/O หรือแบบ O/W ตามลำดับ ขึ้นอยู่กับธรรมชาติของสารก่ออิมัลชันและส่วนประกอบของสารผสม parameter ที่สำคัญอย่างหนึ่งในการกำหนดธรรมชาติของสารก่ออิมัลชัน คือค่า HLB (Hydrophilic Lipophilic Balance)

2.5.2 ค่า Hydrophilic Lipophilic Balance (HLB)

ค่า HLB เป็นดัชนีอย่างหนึ่งในการแสดงอัตราส่วนโดยน้ำหนักของส่วนประกอบโมเลกุลที่กลมกลืนกับน้ำได้ดี (hydrophilic portion) ของสารก่ออิมัลชันชนิดที่ไม่มีประจุ ดังนั้นถ้าสารก่ออิมัลชันมีโครงสร้างโมเลกุลทั้งหมดกลมกลืนกับน้ำก็ควรมีจะมีค่า HLB 100 แต่เพื่อความสะดวกในการบันทึกกำหนดค่า HLB ของสารก่ออิมัลชันจะอยู่ในช่วง 0–20 สารก่ออิมัลชันที่มีค่า HLB ต่ำ (2–8) จะละลายกลมกลืนกับน้ำมันได้ดี ส่วนสารก่ออิมัลชันที่มีค่า HLB สูง (14–18) จะละลายกลมกลืนกับน้ำได้ดี และสารก่ออิมัลชันที่มีค่า HLB อยู่ในช่วง 8–14 จะสามารถก่ออิมัลชันได้ดีกับน้ำมันพืช

2.5.3 ส่วนประกอบของอิมัลชัน

ผลิตภัณฑ์รูปแบบอิมัลชัน มีส่วนประกอบหลักสำคัญ 3 ส่วน คือ วัฏภาคน้ำ (water phase) ได้แก่ น้ำและสารต่างๆ ซึ่งอาจเป็นของแข็งหรือของเหลวที่ละลายได้ในน้ำ อาจเป็นสารเพิ่มความหนืด เช่น acacia, veegum, สารกันเสีย เช่น methylparaben, sodium benzoate สารลดแรงตึงผิว เช่น tween, sodium lauryl เป็นต้น สารต่างๆ เหล่านี้ อาจเติมลงในวัฏภาคน้ำได้ทั้งสิ้นแล้วแต่ส่วนประกอบของสูตรในผลิตภัณฑ์แต่ละประเภท วัฏภาคน้ำมัน (oil phase) ได้แก่ น้ำมันต่างๆ เช่น olive oil, mineral oil, castor oil ไขมัน เช่น stearyl alcohol, stearic acid เป็นต้น สีที่ละลายในน้ำมัน น้ำหอมต่างๆ สารลดแรงตึงผิว เช่น span, emulgin C 1000 เป็นต้น แล้วแต่ส่วนประกอบในสูตรของผลิตภัณฑ์แต่ละประเภทเช่นกัน ตัวทำอิมัลชัน (emulsifier) หมายถึง สารที่เติมลงไปเพื่อทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมหรือประสานของเหลวนั้นตั้งแต่สองชนิดขึ้นไปให้อนุภาคกระจายไปได้ มักเป็นสารที่ลดแรงตึงผิวได้เนื่องจากการละลายเกิดจากความต่างขั้วกันและทำให้วัฏภาคน้ำและน้ำมันเข้าไปเป็นเนื้อเดียวกันได้ ตัวอย่างของการเกิดอิมัลซิไฟเออร์ เช่น สบู่ ผงซักฟอก เป็นอิมัลซิไฟเออร์ระหว่างไขมันกับน้ำ ไข่แดง เป็นอิมัลซิไฟเออร์ในการทำน้ำสลัด น้ำดีเป็นอิมัลซิไฟเออร์ใน

ร่างกาย ช่วยให้ไขมันรวมตัวกับน้ำย่อย ได้แก่ สารลดแรงตึงผิว เช่น tween, span และ sodium lauryl sulfate

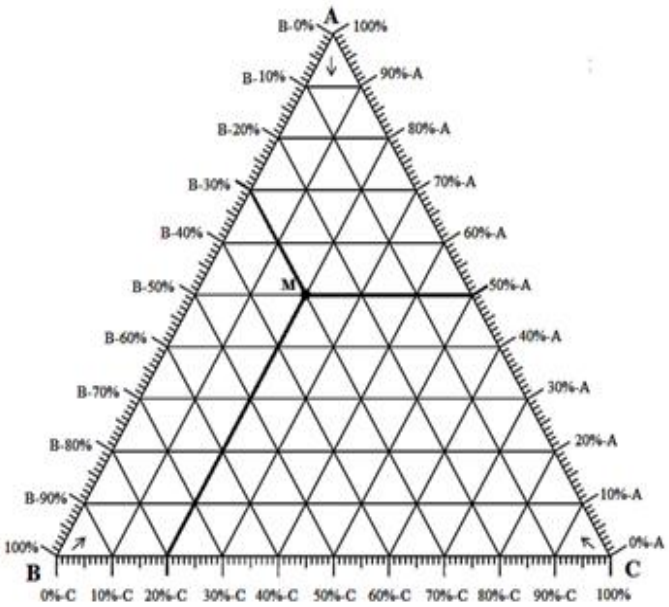
2.5.4 กลไกการเกิดอิมัลชัน

ปกติของเหลวสองชนิดซึ่งไม่เข้ากันเมื่อถูกนำมารวมจะแยกกันอยู่เป็น 2 ชั้น เนื่องจากเกิดแรงตึงระหว่างผิว แต่เมื่อมีการเขย่าซึ่งเป็นการเพิ่มพลังงานและเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างของเหลวทั้งสอง จะทำให้ของเหลวนั้นกระจายตัวเป็นหยดเล็กๆ ในกันและกันได้ และมีลักษณะของอิมัลชันเกิดขึ้น การเกิดอิมัลชันได้ต้องอาศัยกระบวนการ คือ การทำให้ของเหลวที่เป็นวัฏภาคภายในแตกกระจายเป็นหยดเล็กๆและทำให้การกระจายตัวนั้นคงสภาพอยู่ได้ ซึ่งอาศัยตัวก่ออิมัลชันดังกล่าว

การใช้อิมัลซิไฟเออร์ผสมมักทำให้เกิดอิมัลชันที่มีความคงตัวดีกว่าการใช้อิมัลซิไฟเออร์เพียงชนิดเดียวในปริมาณเท่ากันเนื่องจากอิมัลซิฟิเคชันเกิดได้ง่ายขึ้น โดยแรงตึงผิวจะลดลงจากการใช้อิมัลซิไฟเออร์ผสม ในระบบที่มีอิมัลซิไฟเออร์ผสมความแข็งแรงของฟิล์มจะเพิ่มขึ้นเนื่องจากการเกาะตัวของโมเลกุลที่ชั้นจะดีขึ้น, การเกิดเฟสผสมของแข็ง-ของเหลวที่บริเวณผิวของอนุภาคและการเกิดโมเลกุลเชิงซ้อนระหว่างอิมัลซิไฟเออร์ที่บริเวณผิวร่วม (35) กลไกการทำงานของอิมัลซิไฟเออร์ คือ การดูดซับที่ผิวชั้นแรกของโมเลกุลที่บริเวณผิวร่วมระหว่างอนุภาคน้ำมันและน้ำ ส่วนหัวที่มีขั้วของโมเลกุลจะอยู่ในส่วนของน้ำและส่วนหางที่เป็นสายไฮโดรคาร์บอนซึ่งไม่มีขั้วและประกอบด้วยคาร์บอนจะอยู่ในส่วนของน้ำมัน (36)

2.6 แผนภาพวัฏภาคสามองค์ประกอบ (ternary phase diagram)

แผนภาพวัฏภาคสามองค์ประกอบ คือ แผนภาพของระบบที่มีองค์ประกอบ 3 ชนิด ลักษณะของแผนภาพเฟสเป็นรูปสามเหลี่ยมด้านเท่าและมีองค์ประกอบทั้ง 3 ชนิดอยู่ที่มุมของสามเหลี่ยม ปัจจัยที่มีผลต่อเฟสที่เกิดขึ้น คือ ปริมาณขององค์ประกอบทั้ง 3 ชนิด



รูปที่ 2.13 วิธีการบันทึกแผนภาพวัฏภาคสามองค์ประกอบของผสม M ที่ประกอบด้วย A 50% B 30% C 20%

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 3
อุปกรณ์วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

- ถังหมัก (fermenter) ขนาด 5 ลิตร รุ่น WP-Winpact ของบริษัท กิบไทย จำกัด
- เครื่องวัดแรงตึงผิว (ring tensiometer) รุ่น K6 ของบริษัท Kruss, Germany
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วควบคุมอุณหภูมิ (high - performance centrifuge) รุ่น Avanti® J-30I ของบริษัท Beckman Coulter, USA
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge) รุ่น KUBOTA 3700 ของบริษัท Kubota Corporation, Japan
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น KUBOTA 6500 ของบริษัท Kubota Corporation, Japan
- เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (rotary vacuum evaporator) รุ่น N-N ของบริษัท Eyela, Japan
- เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (centrifuge evaporator) รุ่น R-300 ของบริษัท BUCHI, Switzerland
- เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (centrifuge evaporator) รุ่น eppendorf concentrator 5301 ของบริษัท Modotech ,Germany
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys ของบริษัท Thermo Spectronic, USA
- เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น SS-325 และรุ่น ES-315 ของบริษัท Tomy Seiko, Ltd., Japan, รุ่น MLS 3020 ของบริษัท Sanyo Co., Ltd., Japan และรุ่น HV-25 ของบริษัท Hirayama, Co., Ltd., Japan
- เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) รุ่น Innova™ 4300 ของบริษัท New Brunswick Scientific, USA
- ตู้อบ (hot air oven) รุ่น UE 600 ของบริษัท Memmert, Germany
- ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น BE 800 ของบริษัท Memmert, Germany
- เครื่องชั่งหยาบ รุ่น PG 2002-S ของบริษัท Metler Toledo, Switzerland
- เครื่องชั่งละเอียด รุ่น AG 285 ของบริษัท Metler Toledo, Switzerland
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ของบริษัท Metler Toledo, Switzerland

- เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) รุ่น Pro star ของบริษัท Varian, USA
- คอลัมน์ C18-AR Cosmosil 5µm, 120°A ขนาด 4.6x150 มม. ของบริษัท Water
- ตู้ปลอดเชื้อ (larminar flow cabinet) รุ่น 25 Manometer ของบริษัท Dwyer Instrument, USA
- เครื่องผสมสาร (vortex mixer) รุ่น K-550 GE ของบริษัท Scientific Industries, USA
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) M-LAB ของบริษัท เมโทรโลยี เทคนิคคอล, Thailand
- ไมโครปิเปต (micropipette) รุ่น P10, P20, P100, P200, P1000 และ P5000 ของบริษัท Gilson, France
- zetasizer Ver.6.12 Serial Number : MAL1043816 ของบริษัท Malvern Instrument Ltd., UK

3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

- สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
- สารสกัดจากข้าวมอลต์ (malt extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
- แบคโตเปปโตน (bacto peptone) บริษัท Difco Laboratories, USA
- กลูโคส ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- แบคโตอะการ์ (bacto agar) บริษัท Difco Laboratories, USA
- น้ำมันสังเคราะห์ (synthetic oil) ของบริษัท Tokyo kasei, Japan
- น้ำมันถั่วเหลือง บริษัทมรกตอินดัสตรีส์ จำกัด ประเทศไทย
- แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) E.Merck, Darmstadt, Germany
- โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) ของบริษัท Ajax Finechem, Australia
- ทริสเบส (Tris base; Tris[hydroxymethl] aminomethane) ($C_4H_{11}NO_3$) ของบริษัท Fisher Scientific UK, UK
- ทริสไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl) ของบริษัท Sigma, USA
- กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (concentration HCl) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, Germany
- คลอโรฟอร์ม (chloroform) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- เมทานอล (methanol) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- เฮกเซน (hexane) (C_6H_{14}) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany

- เอทิลแอซีเทต (ethyl acetate) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- ไอโอดีนชนิดเกล็ด ของบริษัท Univar, U.S.A
- แอซีโทไนไตรล์ (acetronitrile) HPLC grade ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, Germany
- Span80 ของบริษัท Fluka Biochemika, Germany
- Tween80 ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- กระดาษกรองหมายเลข 2 ขนาด 125 มม. ของบริษัท Whatman, USA
- กระดาษกรองขนาด (cellulose acetate membrane) ขนาด 47 มม. 0.45 ไมครอน ของบริษัท Whatman, U.S.A
- แผ่นซิลิกาเจล 60 ขนาด 20x20 ซม.,หนา 0.2 มม. (TLC silica gel 60, 0.2 mm.) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- แผ่นซิลิกาเจล 60 ขนาด 20x20 ซม., หนา 2 มม. (PLC silica gel 60, 2 mm.) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany

3.3 วิธีดำเนินการทดลอง

3.3.1 ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *P. anomala* MUE24 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

3.3.1.1 เตรียมหัวเชื้อ

นำ *P. anomala* MUE24 ที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด yeast malt extract บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงมา 1 ลูป เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว yeast malt extract ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มเชื้อที่มีการเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

3.3.1.2 ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

นำหัวเชื้อที่เตรียมได้ 10% (v/v) มาเพาะเลี้ยงยีสต์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ด้วยอาหารเหลวปรับปรุงสูตรที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.02% $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% สารสกัดยีสต์ 0.64% $NaNO_3$ 0.11% กลูโคส 6.66% (w/w) และน้ำมันถั่วเหลือง 13.34% (v/v) ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมอัตราเร็วรอบกวนในถังเป็น 400 รอบต่อนาทีและควบคุมอัตราการให้อากาศ 1 vvm เป็นเวลา 120 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ เพื่อติดตามการเจริญโดยหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ วัดค่าความเป็น

กรดด่าง ทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวัดค่าแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อและค่าการกระจายน้ำมัน จากนั้นทำการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ด้วยเอทิลแอซีเทต เพื่อหาน้ำหนักของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.3.2 หาน้ำหนักแห้งของเซลล์

นำตัวอย่างที่เก็บได้มาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที โดยควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนของเหลวที่ได้แยกเก็บไว้ ส่วนเซลล์นำมาล้างด้วยเฮกเซน 2 รอบ และน้ำกลั่น 1 รอบ จากนั้นอบเซลล์ในถ้วยฟอยล์ที่รู้น้ำหนักแน่นอนแล้วที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงหรือจนกว่าน้ำหนักจะคงที่ เมื่อครบเวลานำถ้วยฟอยล์มาใส่ในโถดูดความชื้น ชั่งด้วยเครื่องชั่งละเอียดและคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้งเป็นกรัมต่อลิตร

3.3.3 วัดค่าความเป็นกรดด่าง

นำส่วนของเหลวที่ไม่มีเซลล์มาวัดค่าความเป็นกรดด่างด้วยเครื่อง pH meter ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

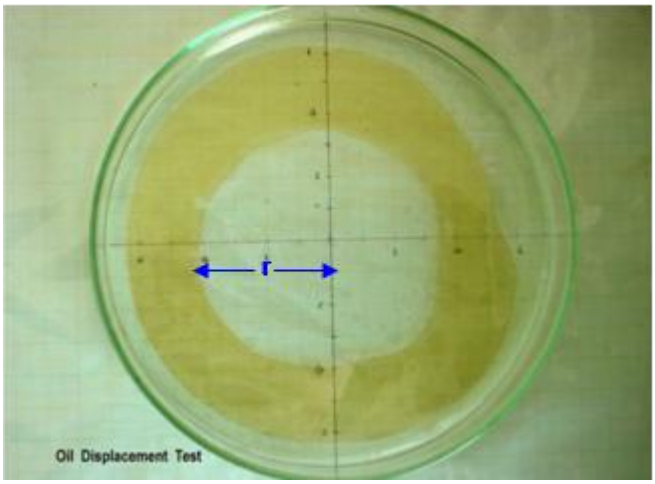
3.3.4 วัดค่าแรงตึงผิว (Surface tension)

นำส่วนของเหลวที่ไม่มีเซลล์มาวัดค่าแรงตึงผิวด้วยวิธี Du Nuoy Ring จากเครื่องวัดค่าแรงตึงผิว (tensiometer) รุ่น K6 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

Chulalongkorn University

3.3.5 วัดค่าการกระจายตัวของน้ำมัน (Oil displacement test)

ทดสอบการกระจายตัวของน้ำมันตามวิธีของ Morikawa และคณะ (25) โดยตวงน้ำปริมาตร 45 มิลลิลิตรลงในจานแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 150 มิลลิเมตรที่มีกระดาษกราฟรองอยู่เป็นมาตรวัดความกว้างของบริเวณใส หยดน้ำมันดิบปริมาตร 15 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าของน้ำจะเกิดเป็นแผ่นฟิล์มแผ่ทั่วผิวน้ำ จากนั้นหยดตัวอย่างที่เป็นส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเซลล์ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นฟิล์มของน้ำมันดิบ วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสของการกระจายตัวของน้ำมันที่ได้และคำนวณหาพื้นที่การกระจายตัวของน้ำมัน (πr^2)



รูปที่ 3.1 ลักษณะการกระจายตัวของน้ำมัน (25)

3.3.6 สกัดแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้แบบพร้อมเซลล์

ทำการสกัดแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพตามวิธีของ Ueda และคณะ (37) โดยการนำตัวอย่างที่เก็บแต่ละตัวอย่างมาต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นนำส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์มาทำการสกัดด้วยเฮกเซน เก็บชั้นของส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์มาสกัดต่อด้วยเอทิลแอซีเทตในอัตราส่วน 1:1 จำนวน 3 รอบ จากนั้นนำไประเหยที่สุญญากาศ ชั่งน้ำหนักสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้เป็นกรัมต่อลิตร

3.3.7 เตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย Analytical Thin-Layer Chromatography

โดยใช้เฟสคงที่เป็นแผ่นซิลิกาเจล ($SiO_2 \cdot XH_2O$) 60 ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, Germany ขนาด 20x20 ซม. หนา 0.2 มม. ส่วนเฟสเคลื่อนที่ใช้สารละลายคลอโรฟอร์ม เมทานอล และน้ำ ในอัตราส่วน 65:25:4 นำสารลดแรงตึงผิวที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.6 มาละลายด้วยเมทานอลให้มีความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาจุดบนแผ่น TLC ปริมาตรจุดละ 20 ไมโครลิตร ให้ห่างจากขอบล่าง ประมาณ 1.5 เซนติเมตร จากนั้นหย่อนแผ่น TLC ลงในแนวดิ่งอย่างช้าๆ ในภาชนะปิดที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่สูงประมาณ 1 เซนติเมตร ทิ้งไว้ประมาณ 1-2 ชั่วโมง จนเฟสเคลื่อนที่ไปเกือบสุดแผ่นหรือเหลือขอบประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร จากนั้นนำแผ่น TLC ออกมาทิ้งไว้จนแห้ง แล้วจึงตรวจหากรดไขมันด้วยการนำไปอบในภาชนะปิดสนิทที่อิ่มตัวไปด้วยไอของ

ไอโอดีน ประมาณ 15 นาที เปิดภาชนะออกแล้วทำเครื่องหมายบริเวณที่เกิดสีน้ำตาลเข้ม และทิ้งไว้ข้ามคืนเพื่อให้ไอโอดีนระเหยจนหมด จากนั้นทำการขูดซิลิกาเจล 60 บริเวณที่ทำเครื่องหมายไว้มาสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเอทิลแอซีเทต 3 ครั้ง และระเหยแห้งภายใต้สุญญากาศ นำส่วนที่สกัดได้มาทดสอบค่าการกระจายน้ำมันโดยเจือจางให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8

3.3.8 เตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย Preparative Thin-Layer Chromatography

โดยทำการทดลองตามวิธีในข้อ 3.3.7 แต่ใช้แผ่นซิลิกาเจล 60 ที่มีความหนา 2 มม. และใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพละลายในเมทานอลให้มีความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรจุดละ 50 ไมโครลิตร

3.3.9 วิเคราะห์สารด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC)

เตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบริสุทธิ์บางส่วนที่สกัดได้จากข้อ 3.3.8 ในสารละลายแอซีโทไนไตรล์ 100% ที่ความเข้มข้น 22.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC รุ่น Pro star ของบริษัท Varian, USA คอลัมน์ C18-AR Cosmosil 5μm, 120°A ขนาด 4.6x150 มม. ของบริษัท Water ลิเนียร์เกรเดียนท์ 0-100% ของตัวทำละลาย B ใน A โดย ตัวพา A คือ 10% แอซีโทไนไตรล์ + 0.1% กรดไตรฟลูออโรแอซีติก (TFA) และตัวพา B คือ 100% แอซีโทไนไตรล์ + 0.1% กรดไตรฟลูออโรแอซีติก (TFA)

โปรแกรมของลิเนียร์เกรเดียนท์ ดังนี้

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

อัตราการชะของตัวพาเท่ากับ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจผลด้วย UV Detector ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร (38)

3.3.10 คำนวณค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์การหมัก

การคำนวณค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์การหมักเพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในถังหมัก ณ เวลาต่างๆ ดังต่อไปนี้

X = น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l) P = น้ำหนักสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ (g/l)

$Y_{P/X}$ = ผลผลิตที่ได้ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (g-P/g-X) Q_P = Productivity (g-P/l/h)

Specific productivity = q_p = (mg-P/g-X/h)

Specific growth rate = $\mu = \frac{\ln(X_2-X_1)}{t_2 - t_1}$, $t_2 > t_1$

3.3.11 หาค่าความเข้มข้นวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ (Critical Micelle Concentration; CMC)

การหาค่าความเข้มข้นวิกฤตของการเกิดไมเซลล์เป็นการวัดค่าความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เพื่อหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ทำให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเกิดการรวมตัวกันเป็นไมเซลล์และสามารถลดค่าแรงตึงผิวได้ต่ำที่สุด (6) โดยการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มาเจือจางให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.01-10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8 แล้วนำสารละลายแต่ละความเข้มข้นมาวัดค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่อง tensiometer จากนั้นเขียนกราฟระหว่างค่าแรงตึงผิวและความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อหาค่าความเข้มข้นวิกฤตของการเกิดไมเซลล์

3.3.12 หาค่า Hydrophilic Lipophilic Balance (HLB)

หาค่า HLB ตามวิธีของ Chun และคณะ (39) โดยทำการละลายสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8 ให้มีความ

เข้มข้นเป็น 10 เท่าของค่า CMC แล้ววัดค่า interfacial tension ระหว่างสารละลายที่เตรียมกับ toluene ด้วยเครื่อง tensiometer จากนั้นคำนวณหาค่า HLB จากสมการที่ 3.1

$$HLB = - (\gamma - 45.7) / 2.36 \quad (3.1)$$

โดย γ คือ ค่า interfacial tension ระหว่างสารละลายกับ toluene

3.3.13 ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

ทดสอบตามมาตรฐาน ISO 10993-5:2009 (Biological Evaluation of Medical Devices Part5: Tests for *in vitro* cytotoxicity) (40) โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ 3T3 mouse fibroblast ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ในจานเพาะเลี้ยง 24 หลุม ให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 2.5×10^4 เซลล์/ตารางเซนติเมตร ที่สภาวะ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เจริญเติบโตและแผ่ตัวเป็นแบบชั้นเดียว จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก เติมสารที่ต้องการทดสอบลงไปในแต่ละหลุม นำไปเพาะเลี้ยงตามสภาวะข้างต้นและทำการประเมินจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ด้วยเทคนิค MTT assay (41) คือ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตจะวัดได้จากระดับความเข้มสีของ formazan ด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร (30) สังเกตรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีชีวิตได้จากสมการที่ 3.2

$$\text{เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีชีวิต} = \frac{\text{จำนวนเซลล์สุดท้าย}}{\text{จำนวนเซลล์เริ่มต้น}} \times 100 \quad (3.2)$$

โดยสารที่ต้องการทดสอบแบ่งเป็น 7 กลุ่ม ดังนี้

<u>กลุ่มที่1</u> กลุ่มควบคุมเชิงลบ (negative control) คือ อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM

<u>กลุ่มที่2</u> สารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์

<u>กลุ่มที่3</u>* สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีความเข้มข้น 75 มิลลิกรัมต่อลิตร

กลุ่มที่4* สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร

กลุ่มที่5* สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร

กลุ่มที่6 กลุ่มควบคุมเชิงลบ (negative control) คือ tween80 ที่มีความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร

กลุ่มที่7 กลุ่มควบคุมเชิงบวก (positive control) คือ ซิงค์แอซีเทตที่มีความเข้มข้น 20 ppm

*สารที่ต้องการทดสอบกลุ่มที่ 3-5 เตรียมได้โดยการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาละลายด้วย 50 มิลลิโมลาร์ของสารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์บัพเฟอร์แล้วทำการเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM จนมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 75, 150, 300 มิลลิกรัมต่อลิตร

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลอง 4 ซ้ำแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน วิเคราะห์ค่าทางสถิติแบบ One-Way ANOVA ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์มินิแทบ (Minitab system for Windows version 14) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) เพื่อศึกษาว่าค่าที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่

3.3.14 นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ไปใช้ในการเตรียมอิมัลชันน้ำมันถั่วเหลือง

3.3.14.1 ทดลองเพื่อวาดแผนภาพวัฏภาค

ทำการทดลองเพื่อหาอัตราส่วนของสารในระบบ ได้แก่ น้ำ น้ำมัน และสารลดแรงตึงผิวที่สามารถเกิดเป็นอิมัลชันได้ โดยในการทดลองนี้จะใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นเฟสน้ำมัน แปรผันปริมาณสารลดแรงตึงผิว : น้ำมันถั่วเหลืองในระบบเป็น 9:1, 7:3, 5:5, 3:7, 1:9 จากนั้นไตเตรตน้ำลงในของผสม (ตัวอย่างอัตราส่วนแสดงดังตารางที่ 3.1) ให้ความร้อนของผสมที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ผสมสารให้เข้ากันด้วย vortex mixer จนของผสมเย็นตัวลงแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดสมดุลวัฏภาค สังเกตลักษณะของผสมที่เกิดขึ้นด้วยตาหากของผสมที่ได้มีลักษณะโปร่งแสงและเหลว จัดเป็นไมโครอิมัลชัน ของผสมที่ได้มีลักษณะทึบแสงจัดเป็นอิมัลชัน และของผสมที่ได้มีลักษณะโปร่งแสงแต่ไหลไม่ได้จัดเป็นครีมหรือเจล (42) บันทึกผล

การสังเกตลงในแผนภาพวัฏภาคสามองค์ประกอบ ทำการทดลองซ้ำโดยเปลี่ยนอัตราส่วนของสารทั้ง 3 วัฏภาค เพื่อให้เห็นขอบเขตของอัตราส่วนที่จะทำให้เกิดไมโครอิมัลชัน อิมัลชัน และครีม

ตารางที่ 3.1 การคำนวณร้อยละองค์ประกอบของผสมน้ำมันถั่วเหลือง : สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ในอัตราส่วน 1 : 9 เมื่อไตเตรตน้ำที่ปริมาณต่างๆ (ใช้วิธีเดียวกันกับของผสมอัตราส่วนน้ำมันถั่วเหลือง : สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ตั้งแต่ 2 : 8 จนถึง 9 : 1)

น้ำมันถั่วเหลือง (g)	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (g)	น้ำ (g)	ปริมาตรรวมทั้งหมด (g)	น้ำมันถั่วเหลือง (%)	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (%)	น้ำ (%)
0.1	0.9	0.1	1.1	9.1	81.8	9.1
0.1	0.9	0.5	1.5	6.7	60.0	33.3
0.1	0.9	1.0	2.0	5.0	45.0	50.0
0.1	0.9	2.0	3.0	3.3	30.0	66.7
0.1	0.9	10.0	11.0	0.9	8.2	90.9

เนื่องจากการใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพียงชนิดเดียวเกิดอิมัลชันที่แยกเฟสซึ่งไม่มีความเสถียร จึงทำการทดลองโดยเตรียมอิมัลชันจากการผสมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ โดยในการทดลองเลือกใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ 2 ชนิด คือ span80 และ tween80 ที่มีค่า HLB 4.3 และ 15 ตามลำดับ ผสมสารลดแรงตึงผิว 2 ชนิดตามอัตราส่วนร้อยละโดยน้ำหนัก ซึ่งแสดงดังตารางที่ 3.2 คำนวณค่า HLB ใหม่จากการผสม (43) โดยให้ค่า HLB ของการผสมมีค่าใกล้เคียงกับค่า HLB require ของน้ำมันถั่วเหลือง คือ 7 และคำนวณหาค่า HLB ของการผสมจากสมการที่ 3.3

$$X_A H_A + X_B H_B = H_{blend} \qquad (3.3)$$

เมื่อ X_A คือ ร้อยละโดยมวลของสารลดแรงตึงผิว A

H_A คือ ค่า HLB ของสารลดแรงตึงผิว A

X_B คือ ร้อยละโดยมวลของสารลดแรงตึงผิว B

H_B คือ ค่า HLB ของสารลดแรงตึงผิว B

H_{blend} คือ ค่า HLB ของสารลดแรงตึงผิว A และ B ผสมกัน

ตารางที่ 3.2 ค่า HLB จากการผสมสารลดแรงตึงผิว span80 และ tween80 ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนักต่างๆ

wt% of surfactant			HLB of surfactant blend
Span80 HLB = 4.3	Biosurfactant HLB = 9.3	Tween80 HLB = 15	
0	100	-	9.3
20	80	-	8.3
40	60	-	7.3
-	60	40	11.6
-	80	20	10.4
-	100	0	9.3

นำสารลดแรงตึงผิวที่มีค่า HLB ต่างๆกันที่ได้จากการเตรียมไปหาอัตราส่วนที่เหมาะสมจากแผนภาพวัฏภาคสามองค์ประกอบของน้ำมันถั่วเหลือง สารลดแรงตึงผิวและน้ำ จากนั้นบันทึกช่วงของการเกิดอิมัลชันลงในแผนภาพวัฏภาคสามองค์ประกอบ คัดเลือกอิมัลชันที่ไม่เกิดการแยกชั้นไปทำการทดลองต่อไป

Chulalongkorn University

3.3.14.2 วัดขนาดเฉลี่ยและการกระจายตัวของขนาดอนุภาคในอิมัลชัน

นำอิมัลชันที่คัดเลือกได้มาวัดขนาดของอนุภาคด้วยเครื่อง zetasizer nano zs โดยบันทึกขนาดเฉลี่ยและการกระจายตัวของขนาดอนุภาค ทำการทดสอบที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ดูดตัวอย่างอิมัลชันใส่ลงในเซลล์เก็บตัวอย่าง จากนั้นบรรจุลงในช่องสำหรับวิเคราะห์ ใช้ค่าดัชนีหักเหแสงของน้ำมันถั่วเหลืองเท่ากับ 1.47 และค่าดัชนีหักเหแสงของน้ำเท่ากับ 1.33

3.3.14.3 ทดสอบความเสถียรของอิมัลชัน

นำอิมัลชันที่คัดเลือกได้ไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 40 องศาเซลเซียส วัดความสูงของชั้นอิมัลชันที่เกิดขึ้นเพื่อหาค่า emulsion index (E_{24}) และ % ความเสถียรของอิมัลชันที่เวลาต่างๆ โดยค่า emulsion index (E_{24}) คำนวณได้จากสมการที่ 3.4

$$E_{24} = \frac{\text{ความสูงของชั้นอิมัลชัน}}{\text{ความสูงของสารละลายทั้งหมด}} \times 100 \qquad (3.4)$$

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *P. anomala* MUE24 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

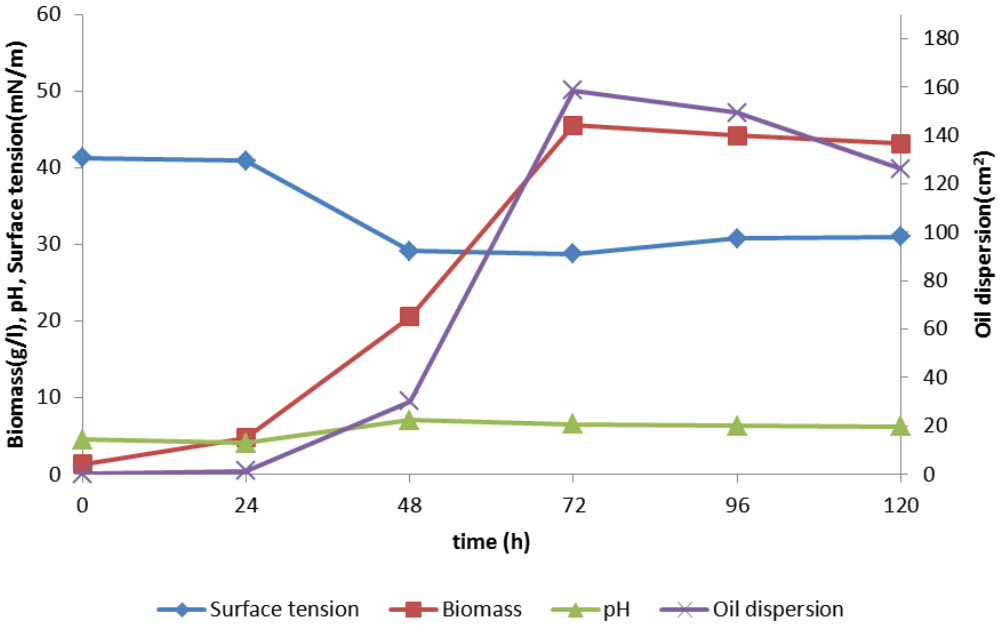
ทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ *P. anomala* MUE24 ในถังหมักขนาด 5 ลิตรแบบแบตช์ด้วยอาหารเหลวปรับปรุงสูตรที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.02% $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% สารสกัดยีสต์ 0.64% $NaNO_3$ 0.11% กลูโคส 6.66% (w/w) และน้ำมันถั่วเหลือง 13.34% (v/v) ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมอัตราเร็วรอบกวนในถังเป็น 400 รอบต่อนาที และควบคุมอัตราการให้อากาศ 1 vvm เป็นเวลา 120 ชั่วโมง วิเคราะห์หาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง วัดค่าความเป็นกรดด่างและทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ โดยวัดพื้นที่การกระจายน้ำมัน (oil displacement test) และการวัดค่าแรงตึงผิว (surface tension) ของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเซลล์ พบว่า ประสิทธิภาพของการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพดีที่สุดในชั่วโมงที่ 72 คือ มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุดคือ 45.54 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมักเท่ากับ 6.74 ให้ค่าการกระจายน้ำมันสูงที่สุดคือ 158.48 ตารางเซนติเมตร และสามารถลดค่าแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 41.25 มิลลินิวตันต่อเมตร เป็น 28.75 มิลลินิวตันต่อเมตร ดังผลที่ได้แสดงในตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.1 โดยการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นแบบ growth associated คือมีความสัมพันธ์กับการเจริญของเชื้อและสอดคล้องกับประสิทธิภาพในการลดค่าแรงตึงผิวและเพิ่มค่าการกระจายตัวของน้ำมัน เซลล์มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 72 และให้ค่าการกระจายน้ำมันสูงสุด อาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะเป็นครีมน้ำนมสีขาวและเกิดฟองจำนวนมาก ซึ่งต่างจากเริ่มต้นที่มีลักษณะสีเหลืองใส ดังแสดงในรูปที่ 4.2

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

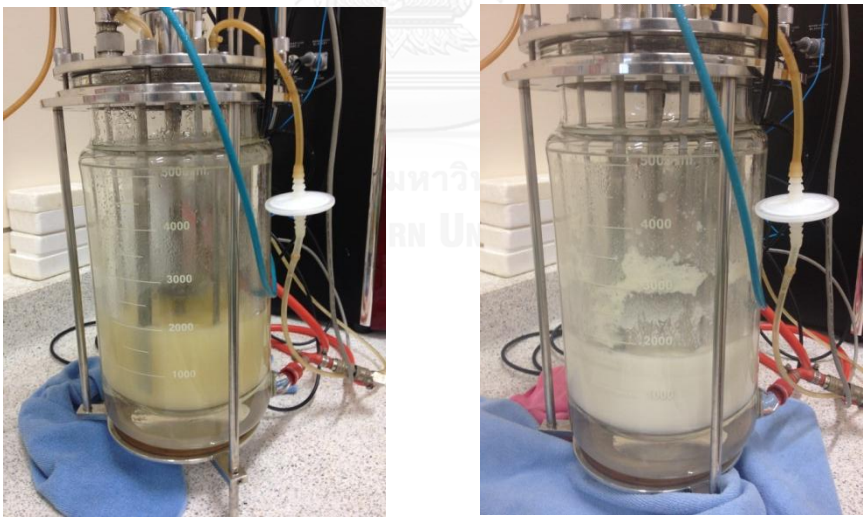
ตารางที่ 4.1 ผลการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *P. anomala* MUE24 ที่เลี้ยงในถังหมักแบบแบตช์โดยมีอัตราการให้อากาศ 1 vvm อัตราเร็วใบกวน 400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l)	ค่าการกระจายตัวของน้ำมัน (cm^2)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	Δค่าแรงตึงผิว* (mN/m)	pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อ	pH ในถัง	ปริมาณออกซิเจนที่ละลาย (%)
0	1.32±0.08	0.27±0.09	41.25±0.35	0.00	4.52	4.46	100.0
24	4.78±0.00	1.29±1.02	40.88±0.18	0.37	4.09	3.97	51.1
48	20.57±1.06	30.21±0.64	29.13±0.18	12.12	7.09	7.16	12.9
72	45.54±0.21	158.48±0.52	28.75±1.06	12.50	6.53	6.74	70.8
96	44.17±0.06	149.40±1.46	30.75±0.00	10.50	6.30	6.50	52.4
120	43.12±0.09	126.12±0.69	31.00±0.35	10.25	6.27	6.30	40.6

*Δค่าแรงตึงผิว คือ ผลต่างของค่าแรงตึงผิว ณ เวลาเริ่มต้นและเมื่อสิ้นสุดการทดลอง



รูปที่ 4.1 ผลการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *P. anomala* MUE24 ที่เลี้ยงในถังหมักแบบแบตช์ โดยมีอัตราการให้อากาศ 1 vvm อัตราเร็วใบกวน 400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง



รูปที่ 4.2 ลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อจากการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในถังหมักแบบแบตช์ที่เวลา 0 และ 72 ชั่วโมง

4.2 สกัดแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้แบบพร้อมเซลล์

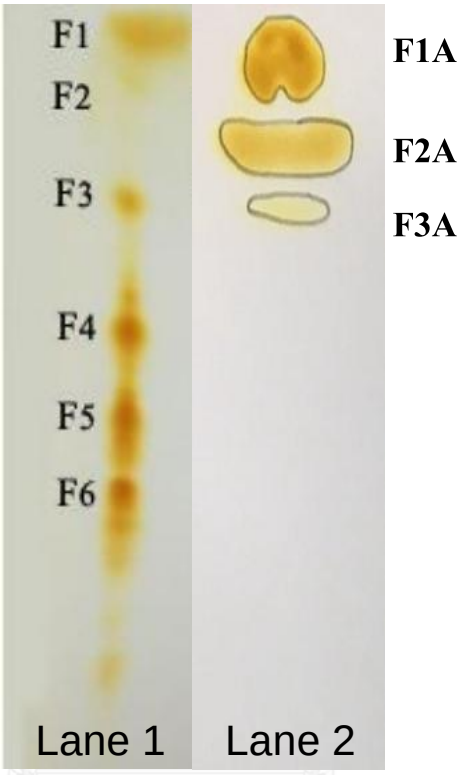
การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากยีสต์ *P. anomala* MUE24 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบแบตช์ด้วยอาหารเหลวปรับปรุงสูตรที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.02% $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% สารสกัดยีสต์ 0.64% $NaNO_3$ 0.11% กลูโคส 6.66% (w/w) และน้ำมันถั่วเหลือง 13.34% (v/v) ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมอัตราเร็วรอบกวนในถังเป็น 400 รอบต่อนาที และควบคุมอัตราการให้อากาศ 1 vvm เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ทำการสกัดด้วยเอทิลแอซีเทตจำนวน 3 รอบโดยใช้วิธีสกัดแบบพร้อมเซลล์ จะได้ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยน้ำหนักแห้งเท่ากับ 21.61 กรัมต่อลิตร ลักษณะสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ดังแสดงในรูปที่ 4.3

รูปที่ 4.3 ลักษณะของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้แบบพร้อมเซลล์

4.3 เตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย Analytical Thin-Layer Chromatography

ทดสอบและแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จาก *P. anomala* MUE24 โดยใช้แผ่น TLC silica gel 60 ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรจุดละ 20 ไมโครลิตร เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยคลอโรฟอร์ม เมทานอล และน้ำ ในอัตราส่วน 65:25:4 ตามลำดับ แล้วจึงนำไปอังด้วยไอระเหยของไอโอดีน ผลการทดลองเทียบกับสารโซโฟโรลิพิดมาตรฐานที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แยกได้เป็น 6 ลำดับส่วน มีอัตราการเคลื่อนที่ (R_f)

0.95, 0.90, 0.86, 0.81, 0.75 และ 0.70 ตามลำดับ ส่วนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ แยกได้เป็น 3 ลำดับส่วน มีอัตราการเคลื่อนที่ (R_f) 0.96, 0.91 และ 0.87 ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับลำดับส่วนที่ 1-3 ของสารโซโฟโรลิพิดมาตรฐาน ดังผลที่ได้แสดงในรูปที่ 4.4 และตารางที่ 4.2



รูปที่ 4.4 การแยกและวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *P. anomala* MUE24 ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบ Analytical Thin-Layer Chromatography

Lane 1 คือ โซโฟโรลิพิดมาตรฐาน

Lane 2 คือ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดพร้อมเซลล์

ตารางที่ 4.2 อัตราการเคลื่อนที่ (R_f) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

Lane	R_f ของแต่ละลำดับส่วน					
1.โซโฟโรลิพิดมาตรฐาน	(F_1) 0.95	(F_2) 0.90	(F_3) 0.86	(F_4) 0.81	(F_5) 0.75	(F_6) 0.70
2.สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดพร้อมเซลล์	(F_1A) 0.96	(F_2A) 0.91	(F_3A) 0.87	-	-	-

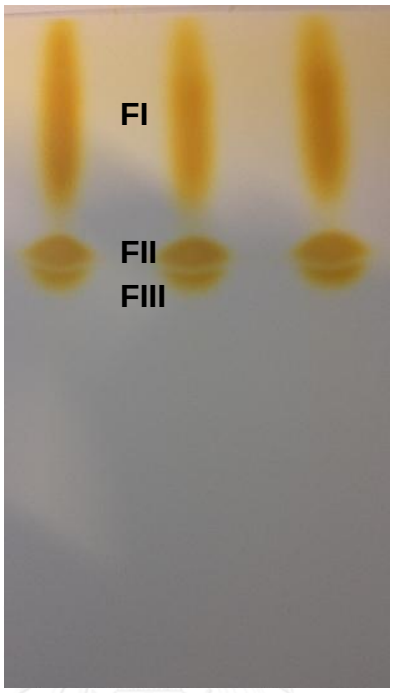
จากผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.3 พบว่า ในแต่ละลำดับส่วนของการสกัดพร้อมเซลล์ให้ค่าการกระจายน้ำมันสูงที่สุดในลำดับส่วน F_2A เท่ากับ 158.48 ตารางเซนติเมตร

ตารางที่ 4.3 ค่าการกระจายน้ำมันของแต่ละลำดับส่วนที่สกัดพร้อมเซลล์

ลำดับส่วน	ค่าการกระจายน้ำมัน (cm^2)
F_1A	130.18
F_2A	158.48
F_3A	112.53

4.4 เตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย Preparative Thin-Layer Chromatography

ทดสอบและแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ แต่ใช้แผ่น PLC silica gel 60 ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรจุดละ 50 ไมโครลิตร เมื่อนำสารที่สกัดได้มาทดสอบสามารถแยกสารออกได้เป็น 3 ลำดับส่วน คือ FI, FII และ FIII ตามลำดับ ดังรูปที่ 4.5 โดยมีอัตราการเคลื่อนที่ (R_f) 0.90, 0.77 และ 0.74 ตามลำดับ เมื่อสกัดแต่ละลำดับส่วนด้วยเอทิลแอซีเทตและเจือจางด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8 ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเพื่อทดสอบค่าการกระจายน้ำมัน พบว่า FII มีค่าการกระจายน้ำมันสูงที่สุด คือ 5.31 ตารางเซนติเมตร ดังแสดงในตารางที่ 4.4 ซึ่งค่าการกระจายน้ำมันมีค่าน้อยกว่าเมื่อวิเคราะห์ด้วย TLC เนื่องจากปริมาณสารที่ใช้มากขึ้นอาจเกิดการผสมกันระหว่าง FII และ FIII ขณะที่ทำการเก็บสารแผ่น silica gel 60



รูปที่ 4.5 การแยกและวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *P. anomala* MUE24 ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบ Preparative Thin-Layer Chromatography

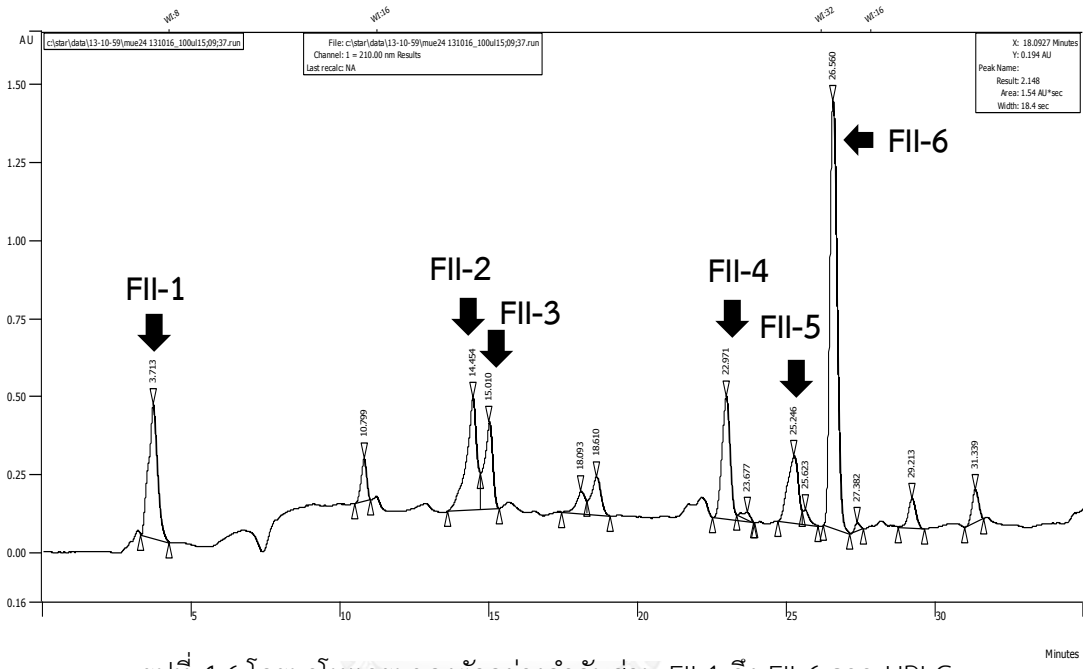
ตารางที่ 4.4 อัตราการเคลื่อนที่ (R_f) และค่าการกระจายน้ำมันของแต่ละลำดับส่วน

ลำดับส่วน	R_f ของแต่ละลำดับส่วน	ค่าการกระจายน้ำมัน (cm^2)
FI	0.90	0.64
FII	0.77	5.31
FIII	0.74	1.33

4.5 วิเคราะห์สารด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC)

นำลำดับส่วน FII ที่สกัดได้จาก Preparative Thin-Layer Chromatography ซึ่งสามารถกระจายน้ำมันได้ดีที่สุดมาวิเคราะห์และทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) โดยละลายสารตัวอย่างด้วย 100% แอซีโทไนไตรล์ ให้มีความเข้มข้น 22.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้ภาวะดังข้อ 3.3.9 ทำการเก็บพีกในแต่ละ retention time ของตัวอย่างตำแหน่ง FII

ที่ปรากฏจำนวน 6 พีก คือ FII-1 ถึง FII-6 ดังแสดงในรูปที่ 4.6 จากนั้นนำสารในแต่ละพีกมาทำให้แห้งในสภาวะสุญญากาศแล้ววัดค่าการกระจายน้ำมันที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยละลายด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัพเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8 พบว่า หลังจากผ่าน HPLC พีกที่ FII-6 ที่ RT 26.56 นาที มีค่าการกระจายน้ำมันสูงที่สุดเท่ากับ 4.53 ตารางเซนติเมตร ดังแสดงในตารางที่ 4.5



รูปที่ 4.6 โครมาโทแกรมของตัวอย่างลำดับส่วน FII-1 ถึง FII-6 จาก HPLC

ตารางที่ 4.5 ค่าการกระจายน้ำมันของตัวอย่างลำดับส่วน FII ที่ผ่านการวิเคราะห์และทำให้บริสุทธิ์ด้วย HPLC

ตำแหน่งพีกจากลำดับส่วน FII	Retention time (นาที)	ค่าการกระจายน้ำมัน (cm^2)
FII-1	3.71	0.07
FII-2	14.45	0.13
FII-3	15.01	0.20
FII-4	22.97	0.28
FII-5	25.25	0.79
FII-6	26.56	4.53

จากผลการวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ พบว่า ให้ผลเช่นเดียวกับรายงานของทิวาพร ปั้นรัตน์ (5) ซึ่งมีการศึกษาโดย MALDI-TOF MS แล้วว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีโครงสร้าง

เทียบเคียงได้กับสารโซโฟโรลิพิดทั้งในรูปแบบแล็กโทน (lactonic form) และรูปแบบแอซิด (acidic form)

4.6 คำนวณค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์การหมัก

การคำนวณค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์การหมักเพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในถังหมักที่เวลา 72 และ 120 ชั่วโมง ดังต่อไปนี้

X = น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l) P = น้ำหนักสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ (g/l)

$Y_{P/X}$ = ผลผลิตที่ได้ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (g-P/g-X) Q_P = Productivity (g-P/l/h)

Specific productivity = q_p = (mg-P/g-X/h)

Specific growth rate = $\mu = \frac{\ln(X_2-X_1)}{t_2 - t_1}$, $t_2 > t_1$

ตารางที่ 4.6 เปรียบเทียบผลการคำนวณค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *P. anomala* MUE24 ในถังหมักแบบแบตช์ ที่เวลา 72 และ 120 ชั่วโมง

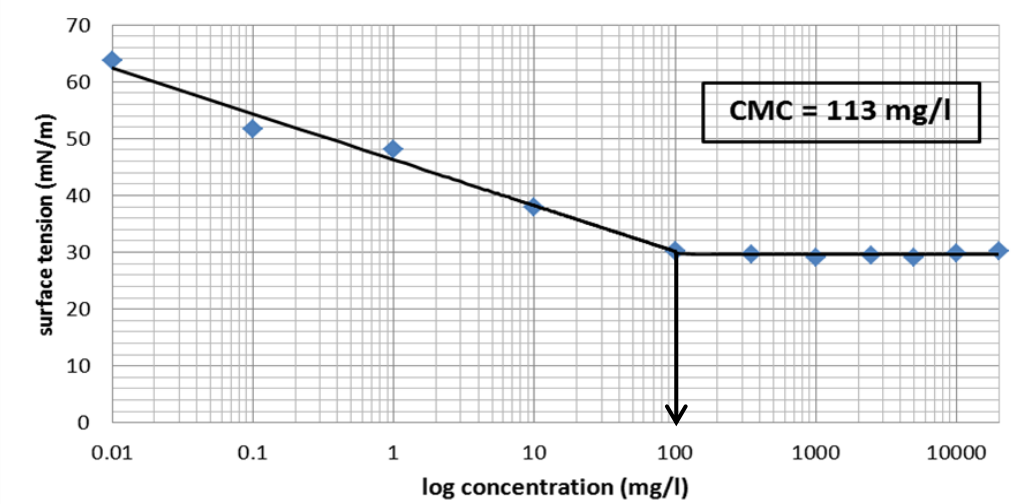
Parameters	Fermentor 72h	Fermentor 120h
X (g/l)	45.54	43.12
P (g/l)	21.608	15.697
$Y_{P/X}$ (g-P/g-X)	0.4745	0.3640
Q_P(g-P/l/h)	0.3001	0.1308
μ	0.6142	0.3483
Specific productivity (q_p) (mg-P/g-X/h)	6.5901	3.0336

จากตารางที่ 4.6 เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในถังหมักแบบแบตช์ที่เวลา 72 และ 120 ชั่วโมง ด้วยการคำนวณค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ พบว่า ที่เวลา 72 ชั่วโมง ให้ค่า P (ผลิตภัณฑ์), ค่า μ (specific growth rate) และค่า specific productivity สูงกว่าที่เวลา 120 ชั่วโมง เนื่องจากการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความสัมพันธ์กับ

การเจริญ เมื่อยีสต์มีการเจริญสูงที่สุดที่เวลา 72 ชั่วโมง ส่งผลให้มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงที่สุดด้วย และเมื่อเวลาผ่านไปถึง 120 ชั่วโมง จะเห็นได้ว่าค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ลดลง แสดงถึงความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ลดลง ดังนั้น จึงเลือกทำการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยสกัดแบบพร้อมเซลล์ที่เวลา 72 ชั่วโมง เพื่อให้ได้ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงที่สุดและมีประสิทธิภาพมากที่สุดไปใช้ในการเตรียมอิมัลชันน้ำมันถั่วเหลืองต่อไป

4.7 หาค่าความเข้มข้นวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ (Critical Micelle Concentration; CMC)

การหาค่าความเข้มข้นวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ทำได้โดยการเจือจางสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.01-10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8 แล้วนำสารละลายแต่ละความเข้มข้นมาวัดค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่อง tensiometer เพื่อหาค่า CMC จากกราฟจะเห็นว่าในช่วงแรกค่าแรงตึงผิวจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มขึ้น ช่วงที่สองค่าแรงตึงผิวค่อนข้างคงที่แม้ว่าจะเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จากผลการทดลองในรูปที่ 4.7 พบว่า ค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *P. anomala* MUE24 มีค่าเท่ากับ 113 มิลลิกรัมต่อลิตร และจากผลการทดลองในตารางที่ 4.7 เมื่อเปรียบเทียบค่า CMC และค่าแรงตึงผิว ณ การเกิดไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพซึ่งมีค่าเท่ากับ 29.72 mN/m พบว่ามีค่าต่ำกว่าโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตและไทรทอนเอกซ์ 100 ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวทางเคมี แสดงถึงประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สูงกว่าสารลดแรงตึงผิวทางเคมี



รูปที่ 4.7 ค่าความเข้มข้นวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *P. anomala* MUE24 จากการเขียนกราฟระหว่างค่า log ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวและค่าแรงตึงผิว

ตารางที่ 4.7 ค่าความเข้มข้นวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *P. anomala* MUE24

สารลดแรงตึงผิว	ค่า CMC (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่า γ_{CMC} (แรงตึงผิว ณ การเกิดไมเซลล์) (mN/m)
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *P. anomala* MUE24	113	29.72
โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต*	1,004	38
ไทรทอนเอกซ์ 100*	537	36

*ที่มา Das และคณะ (44)

4.8 หาค่า Hydrophilic Lipophilic Balance (HLB)

จากการวัดค่า interfacial tension ระหว่างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของค่า CMC (113.06 mg/L) กับ toluene ได้ค่าเท่ากับ 23.67 mN/m เมื่อนำมาคำนวณหาค่า HLB จากสมการที่ 3.1

$$HLB = -(\gamma - 45.7)/2.36$$

$$= -(23.67-45.7)/2.36$$

$$= 9.3$$

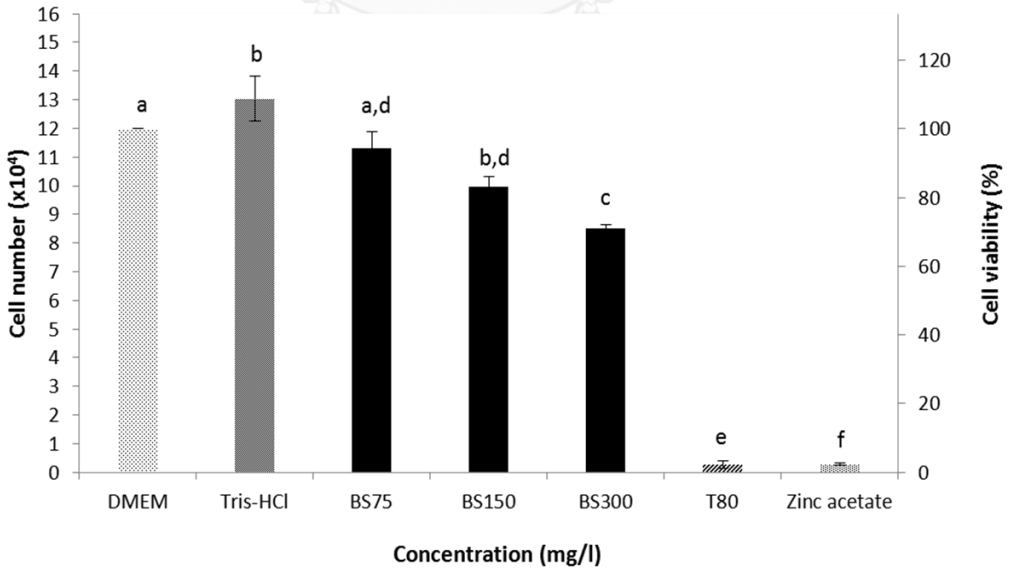
ดังนั้น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *P. anomala* MUE24 จึงจัดเป็นอิมัลซิไฟเออร์ชนิดน้ำมันในน้ำ (oil-in-water emulsifier)

4.9 ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ 3T3 mouse fibroblast ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีความเข้มข้น 75, 150 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยเทคนิค MTT assay คือ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตจะวัดได้จากระดับความเข้มสีของ formazan ที่เกิดขึ้น โดยในการทดสอบนี้จะมี tween80 ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวทางเคมีที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุมลบ เพื่อเปรียบเทียบระดับความเป็นพิษกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่นำมาทดสอบ จากผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.8 และรูปที่ 4.8 พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีความเข้มข้น 75 และ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ 12.80×10^4 และ 12.00×10^4 เซลล์ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ 93.15% และ 87.20% ตามลำดับ โดยทั้งจำนวนเซลล์และเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีชีวิตของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีความเข้มข้น 75 และ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าสูงกว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงเหลือ 7.75×10^4 เซลล์ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ 56.19% อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ tween80 ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ 5.14×10^4 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ 37.39% พบว่า ทั้งจำนวนเซลล์และเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีชีวิตของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีความเข้มข้น 75, 150 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางที่ 4.8 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

สารทดสอบ	ความเข้มข้น (mg/l)	จำนวนเซลล์ ($x10^4$)	เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีชีวิต
กลุ่มควบคุมลบ (DMEM)	-	13.77±1.03	100.00±0.00
สารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์	-	15.66±0.33	114.03±6.54
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	75	12.80±0.59	93.15±4.90
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	150	12.00±0.70	87.20±2.88
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	300	7.75±0.73	56.19±1.16
Tween80	300	5.14±0.27	37.39±1.05
กลุ่มควบคุมบวก (ซิงค์แอซีเทต)	-	0.53±0.06	3.85±0.29

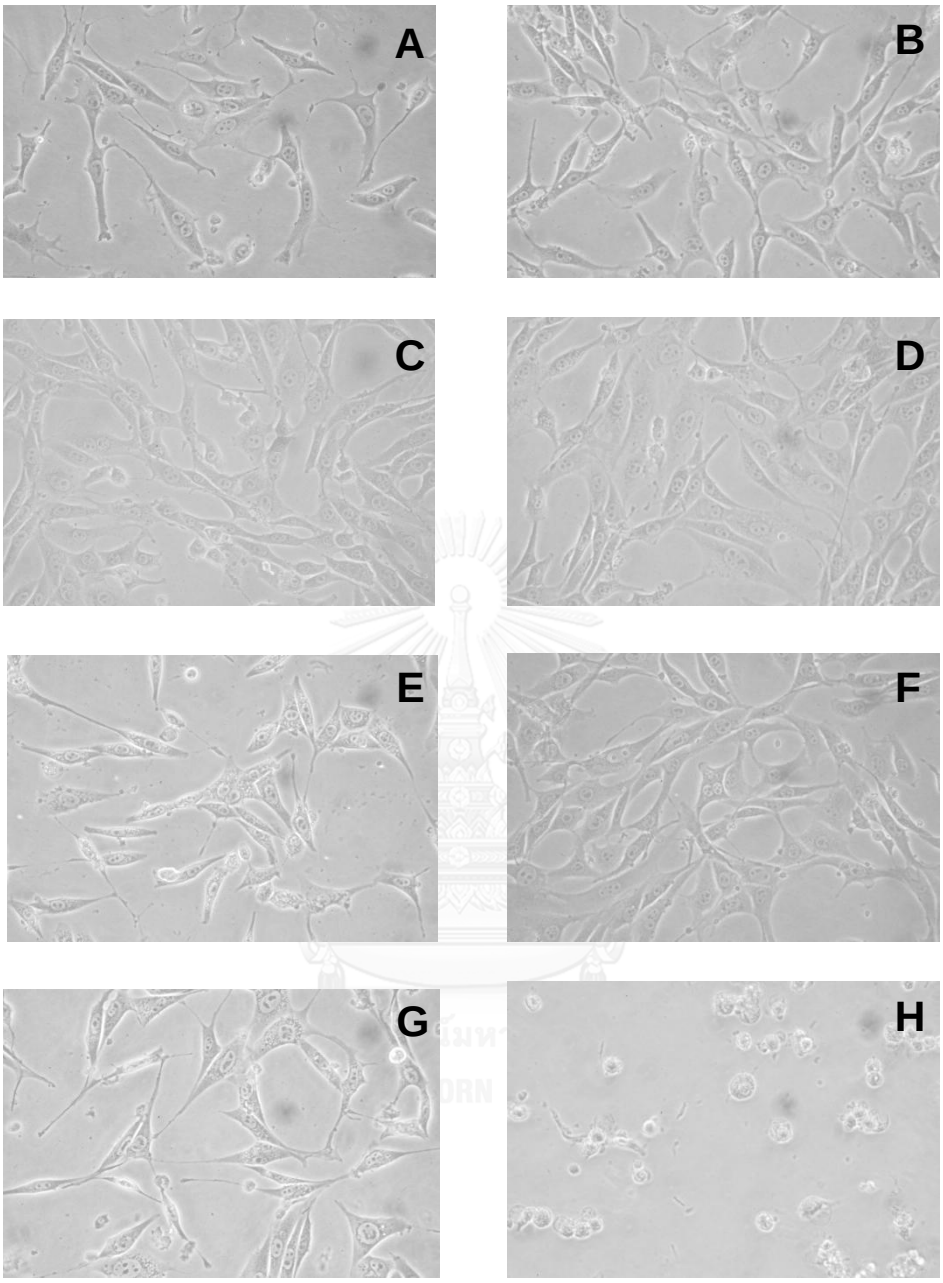


รูปที่ 4.8 จำนวนและเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีชีวิตหลังจากการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพความเข้มข้น 75, 150, 300 mg/l และสารละลาย Tris-HCl เปรียบเทียบกับ

กลุ่มควบคุมเชิงลบ (อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี Tween80 ความเข้มข้น 300 mg/l) และกลุ่มควบคุมเชิงบวก (อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซิงค์แอซีเทตความเข้มข้น 20 ppm) แถบค่าความคลาดเคลื่อนแสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิต
(a-e แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p<0.05$)

ในการวัดระดับความเป็นพิษจากเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีชีวิตพบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีความเข้มข้นสูงสุดคือ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีชีวิตสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ tween80 ที่มีความเข้มข้นเท่ากันซึ่งแสดงว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความเป็นพิษต่ำกว่าสารลดแรงตึงผิวทางเคมี นอกจากนี้สารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ที่ใช้เป็นตัวทำละลายจัดเป็นสารที่ไม่มีความเป็นพิษเช่นกันโดยมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงที่สุดเท่ากับ 15.66×10^4 เซลล์ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ 114.03%

จากการเปรียบเทียบรูปร่างของเซลล์ 3T3 mouse fibroblast ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติมสารทดสอบ ดังแสดงในรูปที่ 4.9A-H พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีความเข้มข้น 75 และ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.9C และ 4.9D) รวมทั้งสารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (รูปที่ 4.9F) มีรูปร่างของเซลล์คล้ายกับในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่ไม่ได้เติมสารทดสอบ (รูปที่ 4.9B) คือ เซลล์จะมีลักษณะเป็นแท่งยาวที่เชื่อมต่อกัน เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเท่ากับ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.9E) ทำให้จำนวนเซลล์ลดลงและเซลล์บางส่วนมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นลักษณะกลม โดยการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์เกิดจากความเป็นพิษของสารทดสอบที่มากขึ้นซึ่งพบเซลล์ที่มีรูปร่างกลมจำนวนมากเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซิงค์แอซีเทต (รูปที่ 4.9H)

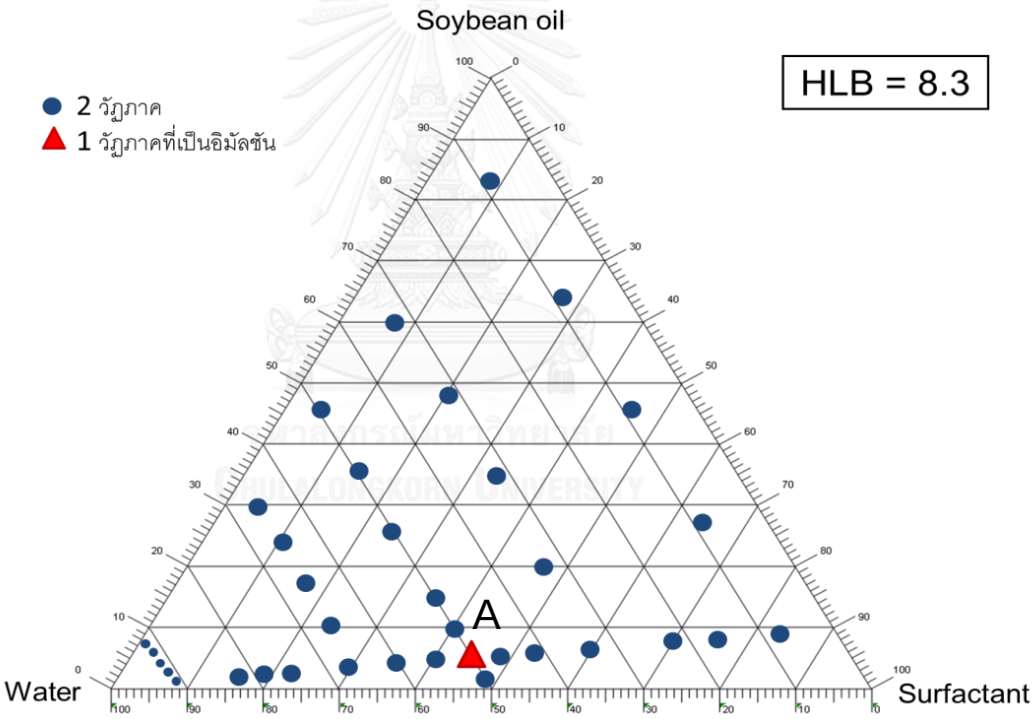


รูปที่ 4.9 รูปร่างของเซลล์ 3T3 mouse fibroblast ที่เปลี่ยนแปลงไป (A) ก่อนทดสอบด้วยการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM และหลังทดสอบ 24ชั่วโมงด้วยการเพาะเลี้ยงใน (B) อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM , อาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพความเข้มข้น (C) 75 mg/l; (D) 150 mg/l; (E) 300 mg/l; (F) สารละลาย Tris-HCl; (G) Tween80 ความเข้มข้น 300 mg/l; (H) ซิงค์แอซีเทตความเข้มข้น 20 ppm เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่มีกำลังขยาย 20x

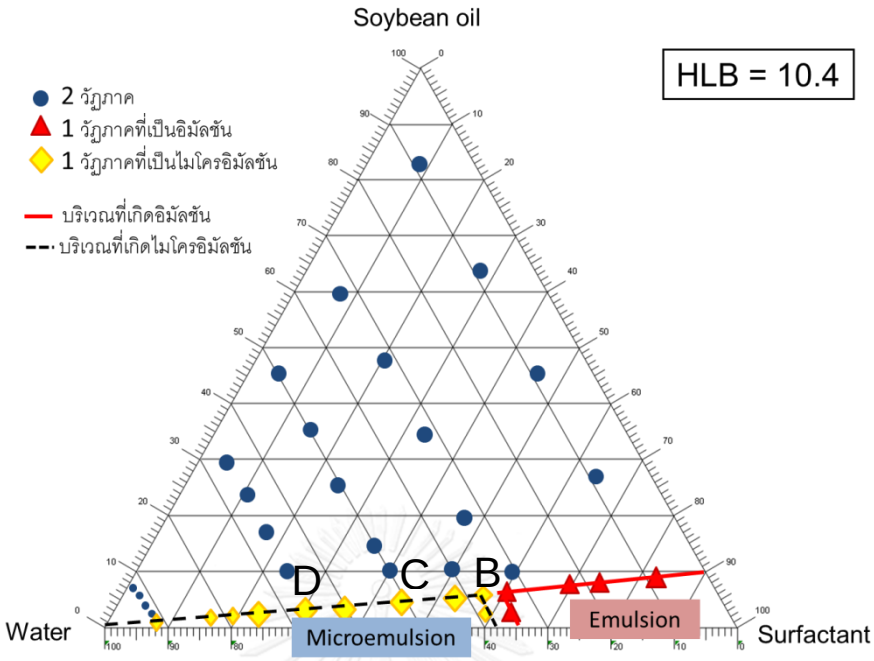
4.10 นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ไปใช้ในการเตรียมอิมัลชันน้ำมันถั่วเหลือง

4.10.1 ทดลองเพื่อวาดแผนภาพวัฏภาค

จากการทดลองเพื่อวาดแผนภาพวัฏภาคโดยเตรียมอิมัลชันในอัตราส่วนต่างๆ สังเกตและบันทึกลักษณะของผสมที่เกิดขึ้นลงในแผนภาพวัฏภาคสามองค์ประกอบ พบว่า ของผสมที่มีค่า HLB 8.3 เกิดเป็นอิมัลชันเพียง 1 ตัวอย่าง ที่อัตราส่วนของน้ำมันถั่วเหลือง 5% สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 36% span80 9% น้ำ 50% ดังแสดงในรูปที่ 4.10 และของผสมที่มีค่า HLB 10.4 เกิดบริเวณที่เป็นอิมัลชันและไมโครอิมัลชัน ที่อัตราส่วนของน้ำมันถั่วเหลือง:สารลดแรงตึงผิว น้อยกว่าหรือเท่ากับ 1:9 ดังแสดงในรูปที่ 4.11 คัดเลือกอิมัลชันและไมโครอิมัลชันที่ไม่เกิดการแยกชั้นไปทำการทดลองต่อไป



รูปที่ 4.10 แผนภาพวัฏภาคสามองค์ประกอบของระบบที่ประกอบด้วย น้ำ/น้ำมันถั่วเหลือง/สารลดแรงตึงผิวชีวภาพและ span80 เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม



รูปที่ 4.11 แผนภาพวัฏภาคสามองค์ประกอบของระบบที่ประกอบด้วย น้ำ/น้ำมันถั่วเหลือง/สารลดแรงตึงผิวชีวภาพและ tween80 เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม

4.10.2 วัดขนาดเฉลี่ยและการกระจายตัวของอนุภาคในอิมัลชัน

จากการทดลองวัดขนาดเฉลี่ยและการกระจายตัวของอนุภาคในอิมัลชันน้ำมันถั่วเหลือง พบว่า ที่อัตราส่วนของน้ำมันถั่วเหลือง:สารลดแรงตึงผิว เท่ากับ 1:9 อิมัลชันที่มีค่า HLB 8.3 มีขนาดอนุภาค 765.0±0.3 นาโนเมตร ซึ่งใกล้เคียงกับอิมัลชันที่มีค่า HLB 10.4 ที่มีขนาดอนุภาคเท่ากับ 758.3±0.2 นาโนเมตร เมื่อเพิ่มปริมาตรน้ำได้ไมโครอิมัลชันที่มีขนาดอนุภาคเล็กลงเท่ากับ 397.8±0.5 และ 160.5±0.5 นาโนเมตร ตามลำดับ อิมัลชันที่มีค่า HLB 8.3 มีค่าการกระจายตัวของอนุภาคดีที่สุดเท่ากับ 0.052±0.048 เนื่องจากค่าการกระจายตัวที่น้อยแสดงว่าอนุภาคในอิมัลชันมีการกระจายตัวที่ดีกว่า (45) นอกจากนี้ pH ของอิมัลชันยังอยู่ในช่วง 4-7 ซึ่งเป็นช่วง pH ที่เหมาะกับสภาพผิวทั่วไปอีกด้วย ดังแสดงผลในตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 ขนาดเฉลี่ยและการกระจายตัวของอนุภาคในอิมัลชันน้ำมันถั่วเหลืองที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

น้ำมันถั่วเหลือง (g)	สารลดแรงตึงผิว (g)	น้ำ (g)	pH	HLB	ขนาดอนุภาค (Z-Average; nm)	ค่าการกระจายตัวของอนุภาค (PdI)
0.1	0.9	1	4.5	8.3	765.0±0.3	0.052±0.048
0.1	0.9	0.5	6.0	10.4	758.3±0.2	0.194±0.089
0.1	0.9	1	6.0	10.4	397.8±0.5	0.246±0.035
0.1	0.9	5	6.0	10.4	160.5±0.5	0.541±0.052

4.10.3 ทดสอบความเสถียรของอิมัลชัน

ตารางที่ 4.10 ค่าการก่ออิมัลชันและความเสถียรของอิมัลชันน้ำมันถั่วเหลืองที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

วันที่	อิมัลชัน HLB 8.3 (A)		อิมัลชัน HLB 10.4 (B)		ไมโครอิมัลชัน HLB 10.4 (C)	
	E24	%ความเสถียร	E24	%ความเสถียร	E24	%ความเสถียร
1	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
3	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
5	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
7	100.00	100.00	83.33	83.33	90.91	90.91
14	100.00	100.00	83.33	83.33	90.91	90.91
21	100.00	100.00	83.33	83.33	90.91	90.91
30	100.00	100.00	83.33	83.33	90.91	90.91
45	100.00	100.00	83.33	83.33	90.91	90.91
60	100.00	100.00	83.33	83.33	90.91	90.91

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

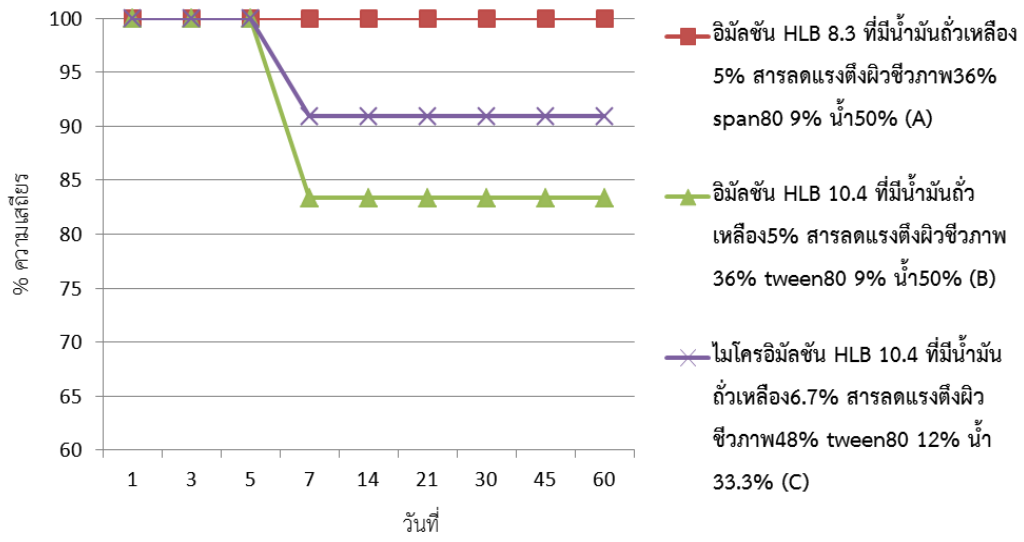
ตารางที่ 4.11 ค่าการก่ออิมัลชันและความเสถียรของอิมัลชันน้ำมันถั่วเหลืองที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

วันที่	อิมัลชัน HLB 8.3 (A)		อิมัลชัน HLB 10.4 (B)		ไมโครอิมัลชัน HLB 10.4 (C)	
	E24	%ความเสถียร	E24	%ความเสถียร	E24	%ความเสถียร
1	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
3	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
5	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
7	100.00	100.00	83.33	83.33	90.91	90.91
14	100.00	100.00	83.33	83.33	90.91	90.91
21	100.00	100.00	83.33	83.33	90.91	90.91
30	100.00	100.00	83.33	83.33	90.91	90.91
45	100.00	100.00	83.33	83.33	90.91	90.91
60	100.00	100.00	83.33	83.33	90.91	90.91

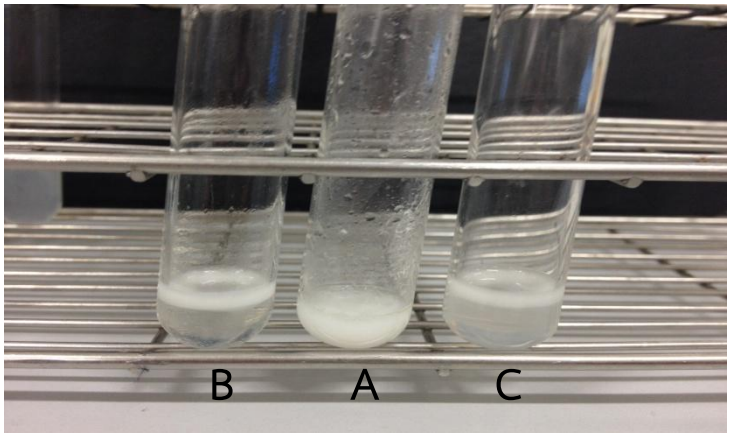
ตารางที่ 4.12 ค่าการก่ออิมัลชันและความเสถียรของอิมัลชันน้ำมันถั่วเหลืองที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

วันที่	อิมัลชัน HLB 8.3 (A)		อิมัลชัน HLB 10.4 (B)		ไมโครอิมัลชัน HLB 10.4 (C)	
	E24	%ความเสถียร	E24	%ความเสถียร	E24	%ความเสถียร
1	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
3	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
5	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
7	100.00	100.00	83.33	83.33	90.91	90.91
14	100.00	100.00	83.33	83.33	90.91	90.91
21	100.00	100.00	83.33	83.33	90.91	90.91
30	100.00	100.00	83.33	83.33	90.91	90.91
45	100.00	100.00	83.33	83.33	90.91	90.91
60	100.00	100.00	83.33	83.33	90.91	90.91

จากผลการทดสอบความเสถียรของอิมัลชันดังแสดงในตารางที่ 4.10-4.12 พบว่า ที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 40 องศาเซลเซียส ได้ผลเช่นเดียวกันคือ อิมัลชันที่มีค่า HLB 8.3 มีความเสถียร 100% เป็นเวลา 60 วัน อิมัลชันที่มีค่า HLB 10.4 มีความเสถียร 100% เป็นเวลา 5 วันและเกิดการแยกชั้นในวันที่ 7 ส่งผลให้ความเสถียรมีค่าลดลงเป็น 83.33% และไมโครอิมัลชันที่มีค่า HLB 10.4 มีความเสถียร 100% เป็นเวลา 5 วันและเกิดการแยกชั้นในวันที่ 7 ส่งผลให้ความเสถียรมีค่าลดลงเป็น 90.91% ดังแสดงผลสรุปความเสถียรของอิมัลชันน้ำมันถั่วเหลืองในรูปที่ 4.12 อิมัลชันที่เตรียมได้มีลักษณะสีขาวทึบแสงและไม่แยกชั้น ดังแสดงในรูปที่ 4.13 (หลอดที่ 2) อิมัลชันที่มีค่า HLB 8.3 มีความเสถียรมากกว่าอิมัลชันที่มีค่า HLB 10.4 เนื่องมาจากอิมัลชันมีค่า HLB ใกล้เคียงกับค่า HLB ของน้ำมันถั่วเหลือง (HLB=7) ทำให้น้ำกระจายในน้ำมันและน้ำมันกระจายในน้ำได้ดีขึ้นจึงไม่เกิดการแยกชั้นของอิมัลชัน (46)



รูปที่ 4.12 ความเสถียรของอิมัลชันน้ำมันถั่วเหลืองที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในเวลา 2 เดือน



รูปที่ 4.13 ลักษณะของอิมัลชันน้ำมันถั่วเหลืองที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 เดือน โดย หลอด A คือ อิมัลชัน HLB 8.3 ที่อัตราส่วนของน้ำมันถั่วเหลือง 5% สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 36% span80 9% น้ำ 50%, หลอด B คือ อิมัลชัน HLB 10.4 ที่อัตราส่วนของน้ำมันถั่วเหลือง 5% สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 36% span80 9% น้ำ 50% และหลอด C คือ ไมโครอิมัลชัน HLB 10.4 ที่อัตราส่วนของน้ำมันถั่วเหลือง 6.7% สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 48% span80 12% น้ำ 33.3%

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากยีสต์ *P. anomala* MUE24 ในถังหมักขนาด 5 ลิตรแบบแบตช์ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการเตรียมอิมัลชันน้ำมันถั่วเหลือง

P. anomala MUE24 เป็นยีสต์สายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลายพันธุ์ *P. anomala* PY1 ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเอทิล มีเทน ซัลโฟเนต (ethyl methane sulfonate) (4) คัดแยกได้จากอาหารหมักพื้นบ้าน (ข้าวหมาก) ในอำเภอพนัสนิคม จังหวัดชลบุรี (3) ในการศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยยีสต์ *P. anomala* MUE24 นี้ ได้ศึกษาการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปรับปรุงสูตรที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.02% $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% สารสกัดยีสต์ 0.64% $NaNO_3$ 0.11% กลูโคส 6.66% (w/w) และน้ำมันถั่วเหลือง 13.34% (v/v) ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมอัตราเร็วรอบกวนในถังเป็น 400 รอบต่อนาที และควบคุมอัตราการให้อากาศ 1 vvm เป็นเวลา 120 ชั่วโมง จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเซลล์มาทดสอบประสิทธิภาพด้วยการวัดค่าแรงตึงผิว ทดสอบการกระจายน้ำมัน วัดค่าความเป็นกรดด่าง และหาน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่า ประสิทธิภาพของการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพดีที่สุดในชั่วโมงที่ 72 คือ มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุดคือ 45.54 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมักเท่ากับ 6.74 ให้ค่าการกระจายน้ำมันสูงที่สุดคือ 158.48 ตารางเซนติเมตร และสามารถลดค่าแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ต่ำที่สุดคือ 28.75 มิลลินิวตันต่อเมตร ดังนั้น จึงทำการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในชั่วโมงที่ 72 พบว่า สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้เท่ากับ 21.61 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีลักษณะเป็นของเหลวสีเหลืองใสคล้ายน้ำมัน

เมื่อนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มาวิเคราะห์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบ Analytical Thin-Layer Chromatography แยกได้เป็น 3 ลำดับส่วน มีอัตราการเคลื่อนที่ (R_f) 0.96, 0.91 และ 0.87 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับอัตราการเคลื่อนที่ (R_f) ของสารโซโฟโรลิพิดมาตรฐานที่แยกได้เป็น 6 ลำดับส่วน มีอัตราการเคลื่อนที่ (R_f) 0.95, 0.90, 0.86, 0.81, 0.75, และ 0.70 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มีโครงสร้างและองค์ประกอบใกล้เคียงกับสารประเภทโซโฟโรลิพิด

เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบ Preparative Thin-Layer Chromatography สามารถแยกสารออกได้เป็น 3 ลำดับส่วน คือ FI, FII และ FIII ตามลำดับ มีอัตราการเคลื่อนที่ (R_f) 0.90, 0.77 และ 0.74 ตามลำดับ เมื่อทดสอบค่าการกระจายน้ำมันพบว่า FII มีค่าการกระจายน้ำมันสูงที่สุด จึงนำลำดับส่วน FII ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย HPLC

จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC สามารถเก็บตัวอย่างจากพีกที่ปรากฏในลำดับส่วน FII ได้ 6 พีก จากนั้นนำสารที่เก็บได้ทั้งหมดมาทดสอบค่าการกระจายน้ำมัน พบว่า สารที่เก็บจากพีกที่ 6 RT ที่ 26.56 เรียกว่า FII-6 ของลำดับส่วน FII ให้ค่าการกระจายน้ำมันสูงที่สุด ซึ่งจากผลการวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ด้วย TLC และ HPLC ให้ผลเช่นเดียวกับรายงานของทิวาพร ปั้นรัตน์ (5) ซึ่งได้ศึกษาโครงสร้างของสารโดยการวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF MS ว่าเป็นสารที่มีโครงสร้างเทียบเคียงได้กับสารโซโฟโรลิพิดทั้งในรูปแบบแล็กโทนและรูปแบบแอซิด ซึ่ง *P. anomala* MUE24 เป็นยีสต์สายพันธุ์กลายของ *P. anomala* PY1 (wild type) ซึ่งสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้มีการพิสูจน์โครงสร้างแล้วว่าเป็นสารประเภทโซโฟโรลิพิด (47)

เมื่อพิจารณาค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในถังหมัก พบว่า ที่เวลา 72 ชั่วโมง ให้ค่า P (ผลิตภัณฑ์) สูงที่สุดเท่ากับ 21.608 กรัมต่อลิตร, ค่า μ (specific growth rate) สูงที่สุดเท่ากับ 0.6142 ต่อชั่วโมง และค่า specific productivity สูงที่สุดเท่ากับ 6.5901 มิลลิกรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง ดังนั้น เพื่อให้ได้ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงที่สุดจึงเลือกทำการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในถังหมักแบบแบตช์ และทำการสกัดแบบพร้อมเซลล์ที่เวลา 72 ชั่วโมง สำหรับใช้เตรียมอิมัลชันน้ำมันถั่วเหลืองในการทดลองต่อไป

ค่าความเข้มข้นวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ (CMC) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีค่าเท่ากับ 113 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจากค่า CMC นี้แสดงถึงประสิทธิภาพที่สูงกว่าสารลดแรงตึงผิวทางเคมี และจากการหาค่า HLB ด้วยวิธีวัดค่า interfacial tension พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีค่า HLB อยู่ในช่วง 8-13 ซึ่งสารที่มีค่า HLB ในช่วงนี้จัดเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ที่ใช้ในการก่ออิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W emulsion) (43)

จากผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *P. anomala* MUE24 พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ความเข้มข้น 75, 150 และ 300 มิลลิกรัมต่อ

ลิตร มีความเป็นพิษต่ำกว่าสารลดแรงตึงผิวทางเคมี โดยเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีชีวิตมีค่าอยู่ในช่วง 56-93% ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sharma และคณะ (48) ที่ทดสอบความเป็นพิษของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Enterococcus faecium* MRTL9 เทียบกับสารลดแรงตึงผิวทางเคมีคือ SDS ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ใช้ทดสอบคือ 0.0625, 0.125 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีชีวิตมีค่าอยู่ในช่วง 44-92%

เมื่อนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ไปประยุกต์ใช้ในการเตรียมอิมัลชันน้ำมันถั่วเหลือง พบว่า จากการสร้างแผนภาพวัฏภาคสามองค์ประกอบ ของผสมที่มีค่า HLB 8.3 คือ ใช้ span80 เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม จัดเป็นอิมัลชัน 1 ตัวอย่าง ที่อัตราส่วนของน้ำมันถั่วเหลือง 5% สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 36% span80 9% น้ำ 50% และของผสมที่มีค่า HLB 10.4 คือ ใช้ tween80 เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม เกิดบริเวณที่เป็นอิมัลชันและไมโครอิมัลชัน ที่อัตราส่วนของน้ำมันถั่วเหลือง:สารลดแรงตึงผิว น้อยกว่าหรือเท่ากับ 1:9 เมื่อวัดขนาดอนุภาคของอิมัลชันที่อัตราส่วนของน้ำมันถั่วเหลือง:สารลดแรงตึงผิว เท่ากับ 1:9 พบว่า อิมัลชันที่มีค่า HLB 8.3 มีขนาดอนุภาค 765 นาโนเมตร ซึ่งมีความเสถียร 100% ที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วัน นอกจากนี้ pH ของอิมัลชันยังอยู่ในช่วง 4-7 ซึ่งเหมาะกับสภาพผิวทั่วไปจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำอิมัลชันที่เตรียมได้ไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ดังนั้น จึงสรุปได้ว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *P. anomala* MUE24 มีคุณสมบัติเหมาะที่จะใช้เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วมในระบบ มีความเป็นพิษต่ำ และใช้เตรียมอิมัลชันที่มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวสีขาวทึบแสงเหมาะสำหรับนำไปประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอางได้ต่อไป

<u>ข้อเสนอแนะ</u>

1) อิมัลชันที่เตรียมได้ในงานวิจัยนี้ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 36% ซึ่งมีค่ามากกว่า 300 มิลลิกรัมต่อลิตร แสดงถึงความเป็นพิษของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ใช้ ดังนั้น ควรทดสอบความเป็นพิษของอิมัลชันที่เตรียมได้ก่อนนำไปใช้จริง

2) ทดสอบประสิทธิภาพของอิมัลชันที่เตรียมได้ในการกักเก็บสารสำคัญ เช่น เคอร์คูมิน เนื่องจากเป็นสารที่มีคุณสมบัติต้านไวรัสและแบคทีเรีย หรือใช้ในระบบนำส่งยาเพื่อเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ต่อไป

3) ทดสอบคุณสมบัติในการต้านต่อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆของอิมัลชันที่เตรียมได้เพื่อประยุกต์ใช้เป็นผลิตภัณฑ์ต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รายการอ้างอิง

1. Banat IM, Makkar, R.S. and Cameotra, S.S. (2000) Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology* 53(5):495-508.
2. Kim YB, Yun, H.S. and Kim, E.K. (2009) Enhanced sophorolipid production by feeding-rate-controlled fed-batch culture. *Bioresource Technology* 100(23):6028-6032.
3. ธนัสถา เชียงอุทัย (2549) การผลิตและลักษณะสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากยีสต์ที่คัดเลือกได้. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
4. พรทิพย์ ศิริเรืองสกุล (2553) การเสริมการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพใน *Pichia anomala* PY1 โดยการกลายพันธุ์. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
5. ทิวาพร ปั้นรัตน์ (2556) การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Pichia anomala* MUE24 ในถังหมักและการใช้เพื่อดัดแปลงสมบัติของแป้งข้าว. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
6. Desai JD and Banat, I.M. (1997) Microbial production of surfactant and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61(1):47-64.
7. มัณฑนา ภานุมาภรณ์ (2552) อิมัลชันและยาเหน็บ. กลุ่มวิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ.
8. Swarbrick J and Boylan, J.C. (1988) *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* 9:375-413.
9. จิราพร คำแก้ว (2554) การประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอิมัลชันทางเครื่องสำอาง วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาธุรกิจเทคโนโลยีและการจัดการนวัตกรรม(สหสาขาวิชา) บัณฑิตวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
10. อาทิมา ปุญญวา (2556) การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Pichia anomala* MUE24 เพื่อเตรียมเป็นสารก่ออิมัลชัน. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

CHULALONGKORN UNIVERSITY

11. Mann RM and Bidwell, J.R. (2001) The acute toxicity of agricultural surfactants to the tadpoles of four Australian and two exotic frogs. *Environmental pollution* 114:195-205.
12. Nitschke M and Pastore, G.M. (2006) Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtillis* grow on cassava wastewater. *Bioresource Technology* 97:336-341.
13. Mulligan CN (2005) Environmental applications for biosurfactants. *Environment pollution* 133:183-198.
14. Guerra-Santos L, Kapelli, O. and Fiechter, A. (1984) *Applied and Environmental Microbiology* 48:301.
15. Kim et al. (1997) Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. *Fermentation Engineering* 84:41-46.
16. Kumar AS, Mody, K. and Jha, B. (2007) Evaluation of biosurfactant/bioemulsifier production by a marine bacterium. *Bull Environmental Contamination and Toxicology* 79:617-621.
17. lipidlibrary.aocs.org/Lipids/rhamno/Figure04.png
18. lipidlibrary.aocs.org/Lipids/rhamno/Figure07.png
19. lipidlibrary.aocs.org/Lipids/rhamno/Figure05.png
20. www.nature.com/nchembio/journal/v5/n12/images/nchembio.252-comp2c.gif&npdomainseeker.sdsc.edu//structures/fengycin.png
21. homepages.rpi.edu/~grossr/img/img_research043.jpg
22. patentimages.storage.googleapis.com/US20030099694A1/US20030099694A1-20030529-C00001.png
23. Vijayakumar S and Saravanan, V. (2015) Biosurfactants-Types, Sources and Applications. *Research Journal of Microbiology* 10:181-192.
24. Whang LM, Liu, P.W.G., Ma, C.C. and Cheng, S.S. (2008) Application of biosurfactant, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. *Journal of Hazardous Materials* 151:155-163.

25. Morikawa M, Daido, H., Takao, T., Murata, S., Shimonishi, Y. and Imanaka, T. (1993) A new lipopeptide biosurfactant produce by *Arthrobacter* sp. Strain MIS38. *Journal of Bacteriology* 175(20):6459-6466.

26. Skoog DA, West, D.M. and Holler F.J. (1988) *Analytical Chemistry. 5th ed. New York, USA.*

27. Heyd M, Kohnert, A., Tan, T.H., Nusser, M., Kirschnöfer, F., Brenner-Weiss, G, Franzreb, M. and Barensmeier, S. (2008) Development and trends of biosurfactant analysis and purification using rhamnolipids as an example. *Analytical Bioanalytical Chemistry* 391:1579-1590.

28. Lindsay S (1991) *High Performance Liquid Chromatography:Analytical chemistry by open learning. 2nd ed. New York.*

29. Hu Y and Ju, L.K. (2001) Sophorolipid production from different lipid precursors observed with LC-MS. *Enzyme and Microbial Technology* 29:531-601.

30. Cochis A, Fracchia, L., Martinotti, M.G. and Rimondini, L. (2012) Biosurfactants prevent *in vitro Candida albicans* biofilm formation on resins and silicon materials for prosthetic devices. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology* 113(6):755-761.

31. Singh P and Cameotra, S.S. (2004) Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends Biotechnology* 22(3):142-146.

32. Kosaric N (2001) Biosurfactants and their application for soil bioremediation. *Food Technology Biotechnology* 39(4):295-304.

33. Van Bogaert INA, Saerens, K., Muynck, C.D., Develter, D., Soetacrt, W. and Vandamme, E.J. (2007) Microbial production and application of Sophorolipids. *Applied Microbiology and Biotechnology* 76:23-34.

34. nsb.wikidot.com

35. Dickinson E and Stainsby, G. (1982) Colloids in Foods. *Appllied Science Publishers. London.*

36. Pomeranz Y (1991) Functional Properties of Food Components. *2nd ed. Academic Press, Inc. San Diego.*

37. Ueda A, Igarashi, K. and Hirata, Y. (2009) Production of sophorolipid by *Pichia anomala* PY1 in Sakaguchi flask culture, Saraya Co., LTD.

38. มาติกา อ้นแก้ว (2553) การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Pichia anomala* PY1 ในถังหมักแบบแบตช์. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

39. Alexander HE, Chun, H.C. and Martin, A.N. (1960) Measurement of hydrophile-lipophile balance of surface-active agents. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 50(9):732-736.

40. International Organization for Standardization (2009) ISO 10993-5:2009 Biological evaluation of medical devices part5: Tests for *in vitro* cytotoxicity.

41. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65:55-63.

42. Mahdi et al. (2011) Effect of surfactant and surfactant blends on pseudoternary phase diagram behavior of newly synthesized palm kernel oil esters. *Drug Design, Development and Therapy* 5:311-323.

43. Estrin et al. (1976) The HLB system a time-saving guide to emulsifier selection, ICI Americas Inc.

44. Das K and Mukherjee, A.K. (2007) Comparison of lipopeptide biosurfactants production by *Bacillus subtilis* strains in submerged and soild state fermentation systems using a cheap carbon source:Some industrial applications of biosurfactants. *Process Biochemistry* 42(8):1191-1199.

45. Deepak Thassu, Gerald J. Chader (2013) Ocular Drug Delivery Systems: Barriers and Application of Nanoparticulate Systems. *CRC Press; 1st ed:*426.

46. Yaghmur et al. (1999) Argan Oil-In-Water Emulsions: Preparation and Stabilization. *JAOCS* 76(1):15-18.

47. Thaniyavarn et al. (2008) Production of sophorolipid biosurfactant by *Pichia anomala*. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 72(8):2061-2068.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

48. Sharma et al. (2015) Isolation and functional characterization of novel biosurfactant produced by *Enterococcus faecium*. *SpringerPlus* 4(1):1-14.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารแข็งจากสารสกัดยีสต์และมอลต์ (YM agar)

สารสกัดยีสต์ (yeast extract)	0.3	กรัม
สารสกัดมอลต์ (malt extract)	0.3	กรัม
แบคโตเปปโตน (bacto peptone)	0.5	กรัม
กลูโคส	1.0	กรัม
วุ้นผง (agar)	2.3	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ผสมสารให้เข้ากัน ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.5 นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเหลวจากสารสกัดยีสต์และมอลต์ (YM broth)

สารสกัดยีสต์ (yeast extract)	0.3	กรัม
สารสกัดมอลต์ (malt extract)	0.3	กรัม
แบคโตเปปโตน (bacto peptone)	0.5	กรัม
กลูโคส	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ผสมสารให้เข้ากัน ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.5 นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3. อาหารเหลวปรับปรุงสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลืองและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$)	0.11 %	
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.02 %	
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.02 %	
สารสกัดยีสต์ (yeast extract)	0.64 %	
น้ำมันถั่วเหลือง	13.34 % (v/v)	
กลูโคส	6.66 %	
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที โดยแยกนึ่งฆ่าเชื้อกลูโคสที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ข
สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8 (50 mM Tris-HCl buffer pH 8)

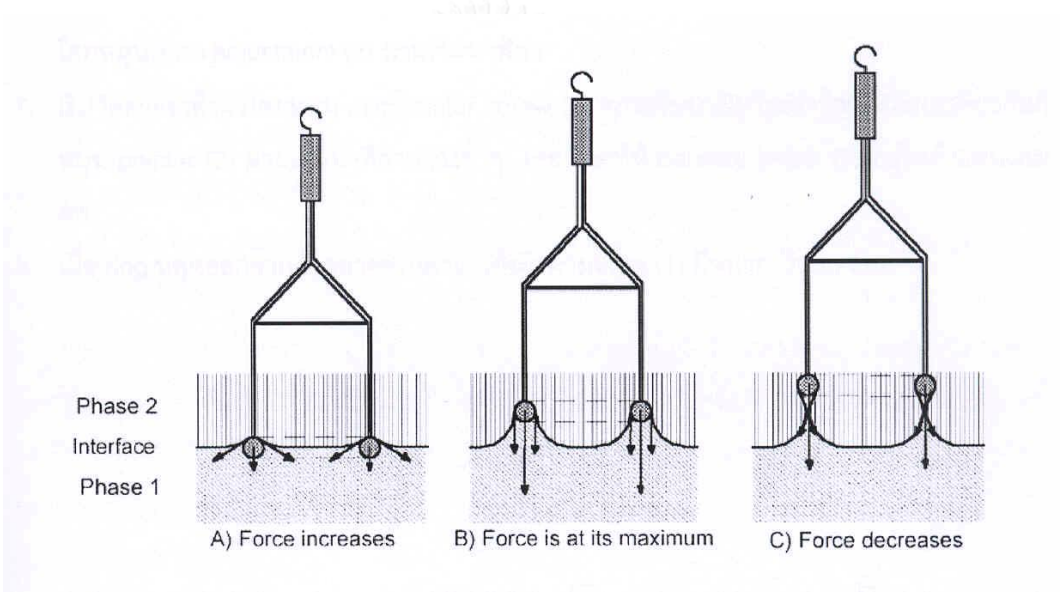
ทริสเบส (Tris base)	0.61	กรัม
น้ำกลั่น	80	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ถ้าหากต้องการทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ที่ pH อื่นก็ใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นปรับให้มี pH นั้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ค
หลักการวัดค่าแรงตึงผิวด้วยวิธี Du Nouy Ring

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



ภาพแสดงขั้นตอนการวัดค่าแรงตึงผิวด้วยวิธี Du Nouy Ring

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวัดค่าแรงตึงผิว

ลักษณะและองค์ประกอบของเครื่องวัดค่าแรงตึงผิว (tensiometer) รุ่น K6 ของบริษัท KRUSS ประเทศเยอรมัน เครื่องวัดค่าแรงตึงผิวนี้ทำการวัดที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ตลอดทำการทดลอง

ขั้นตอนการวัดค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่องวัดค่าแรงตึงผิว มีดังนี้

1. ปรับ handwheel with point (2) ให้สเกลมีค่าศูนย์
2. ปรับ zero adjustment (8) โดยหมุนทวนเข็มนาฬิกาให้ balance beam (9) อยู่ในตำแหน่งสมดุลกึ่งกลางของ mask (7)
3. ปรับระดับที่วางสารตัวอย่างโดยหมุน (10) แล้วยกขึ้นให้อยู่ในระดับที่ต้องการ
4. แขวน ring ลงใน balance beam(9) ปรับให้อยู่ในตำแหน่งสมดุลโดยหมุน zero adjustment (8) ตามเข็มนาฬิกา
5. ใส่สารตัวอย่างในที่ใส่สารตัวอย่างประมาณ 10-15 มล. วางลงบน sample table (6) แล้วหมุน micrometer screw (5) ตามเข็มนาฬิกาเพื่อยกที่ใส่สารตัวอย่างขึ้นให้สัมผัสกับ ring โดยให้ ring จมอยู่ในตัวอย่างไม่น้อยกว่า 5 มม.
6. เมื่อ ring สัมผัสกับตัวอย่างแล้วอาจต้องปรับ balance (9) อยู่ในตำแหน่งสมดุลอีกครั้ง โดยหมุน zero adjustment (8) ทวนเข็มนาฬิกา
7. เริ่มวัดค่าแรงตึงผิวโดยหมุน micrometer screw (5) ทวนเข็มนาฬิกาอย่างช้าๆ ในขณะเดียวกันก็หมุน pointer (2) ตามเข็มนาฬิกาอย่างช้าๆ โดยรักษาให้ balance beam (9) อยู่ในตำแหน่งสมดุล
8. เมื่อ ring หลุดออกจากตัวอย่างอ่านค่าแรงตึงผิวตามสเกล (1) มีหน่วยเป็น mN/m
9. เมื่อเสร็จการทดลองล้าง ring ด้วยน้ำกลั่น สะบัดให้แห้ง (หรือผ่านเปลวไฟ) เก็บเข้ากล่องไม้ ส่วน vessel ล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น(หรือ acetone) ซับให้แห้งหรือผ่านเปลวไฟ
10. การเก็บเครื่องจะต้องปรับ zero adjustment (8) ให้ balance beam (9) ยกขึ้น เพื่อป้องกันการแกว่งของ balance beam ปรับที่ว่างสารตัวอย่างให้อยู่ในระดับเดิม แล้วหมุนเข้าหาตัวเครื่อง

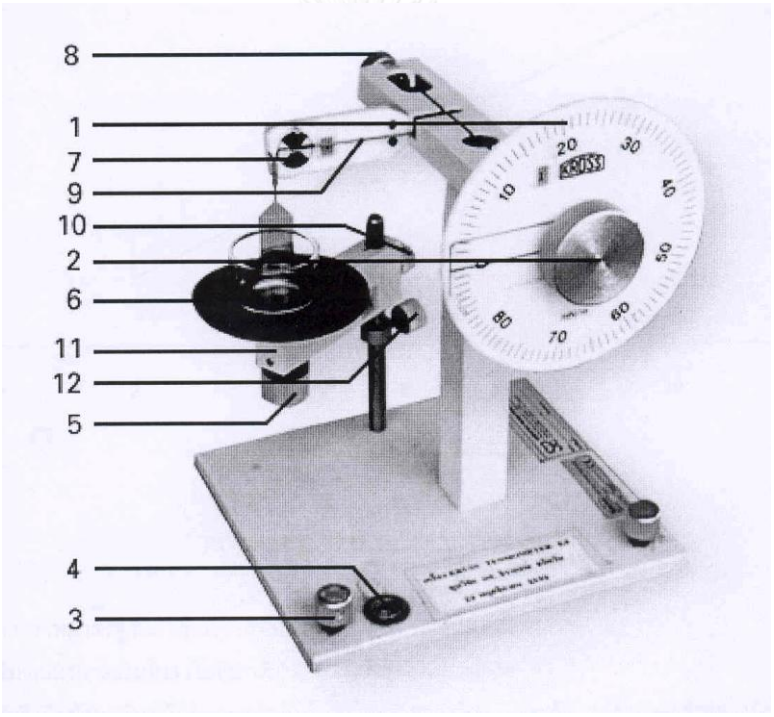
<u>ข้อควรระวัง</u>

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

<u>ข้อแนะนำ</u>

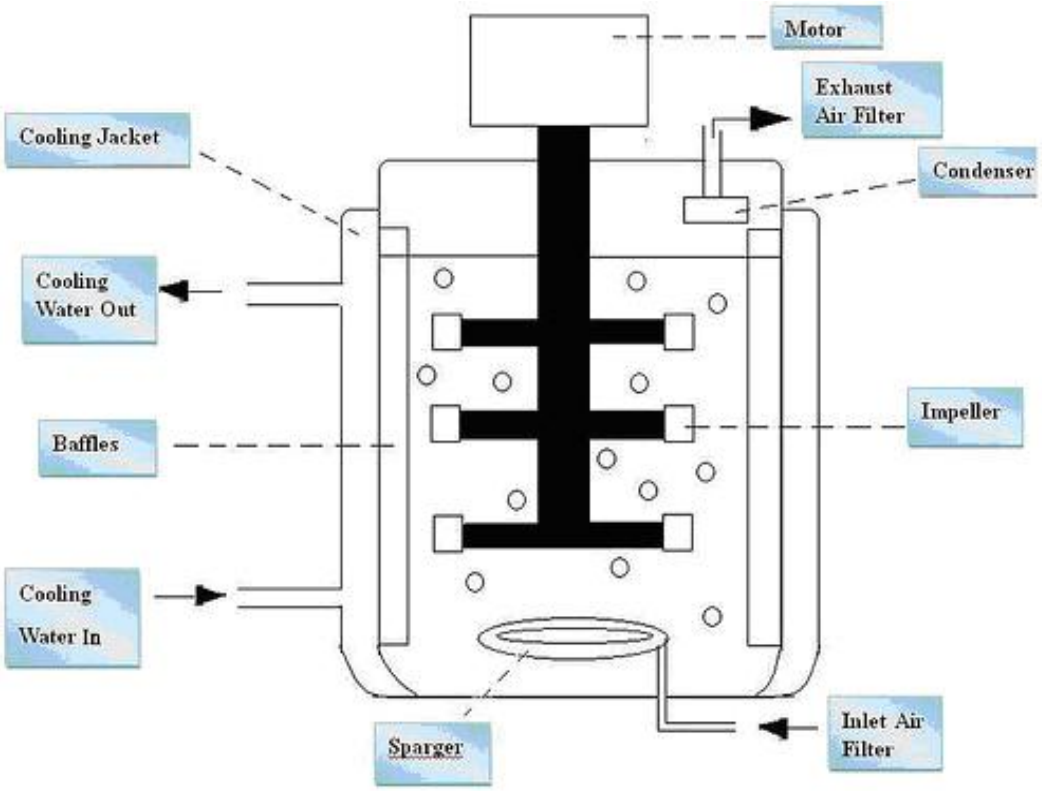
1. ขณะวัดค่าแรงตึงผิวตามข้อ 7 ถ้าทำการหมุน micrometer screw (5) และ pointer (2) อย่างช้าๆ จะทำให้เกิดความผิดพลาดน้อย
2. ring, vessel มีคุณสมบัติทนไฟ สามารถผ่านเปลวไฟได้ ในกรณีที่จำเป็น
3. ขณะแขวน ring ลงบน balance beam (9) อาจต้องใช้มือช่วยเล็กน้อย



แสดงองค์ประกอบของเครื่องวัดค่าแรงตึงผิวรุ่น K6 บริษัท KRUSS ประเทศเยอรมัน

1. Scale in mN/m
2. Handwheel with pointer
3. Screws for regulation of the level
4. Box level
5. Micrometer screw
6. Sample table
7. Mark
8. Handwheel for zero-adjustment
9. Balance-beam
10. Handwheel for fixing the crossbar
11. Carrier of sample-table
12. Handwheel for fixing the

ภาคผนวก ง
ถังหมักที่ใช้ในการทดลอง

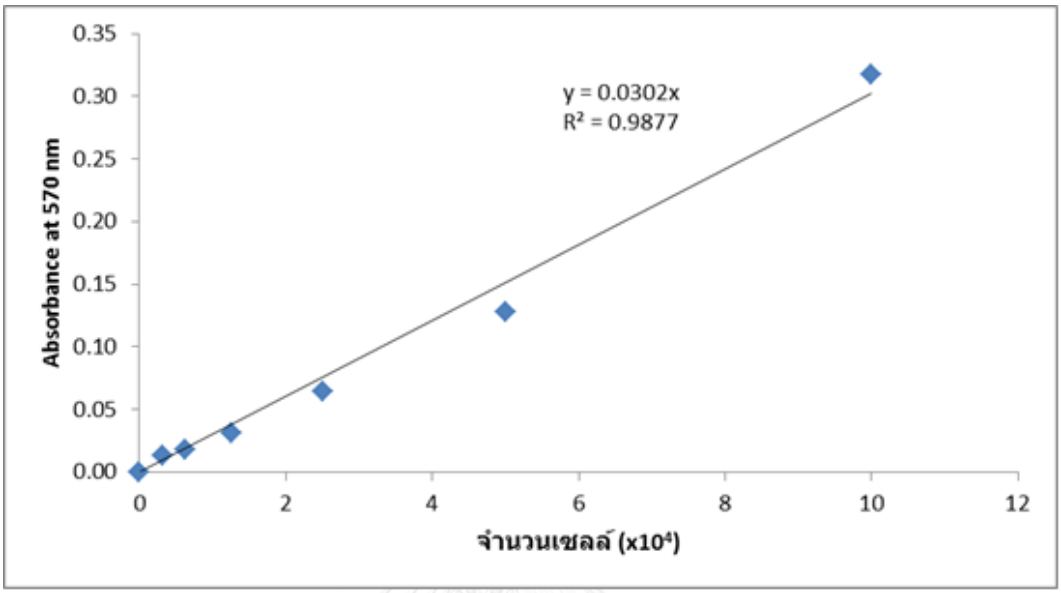


ถังหมักระดับห้องปฏิบัติการขนาด 5 ลิตร รุ่น WP-Winpact บริษัท กิบไทย จำกัด, ประเทศไทย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก จ

กราฟมาตรฐานที่ใช้คำนวณหาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MTT assay



กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตรกับจำนวนเซลล์ 3T3 mouse fibroblast

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ฉ

ตารางแสดงลักษณะของผสมที่เกิดขึ้นเพื่อใช้สร้างแผนภาพวัฏภาคสามองค์ประกอบ

<u>ระบบที่1</u> : HLB = 8.3 (S:O หมายถึง อัตราส่วนของสารลดแรงตึงผิวต่อน้ำมันถั่วเหลือง)

S:O	ปริมาตรน้ำ (ml)	จำนวนชั้นของผสม	ลักษณะของผสม
9:1	0.1	2	ชั้นบนสีเหลือง ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านไม่ได้ ไหลได้
	0.2	2	ชั้นบนสีเหลือง ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านไม่ได้ ไหลได้
	0.3	2	ชั้นบนสีเหลือง ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านไม่ได้ ไหลได้
	0.5	2	ชั้นบนสีเหลือง ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านไม่ได้ ไหลได้
	0.7	2	ชั้นบนสีเหลือง ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านไม่ได้ ไหลได้
	1	1	สีขาวขุ่น แสงผ่านไม่ได้ ไหลได้
	1.5	2	ชั้นบนสีเหลือง ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านไม่ได้ ไหลได้
	2	2	ชั้นบนสีเหลือง ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านไม่ได้ ไหลไม่ได้
	3	2	ชั้นบนสีเหลือง ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านไม่ได้ ไหลไม่ได้
	4	2	ชั้นบนสีเหลือง ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านไม่ได้ ไหลไม่ได้
	5	2	ชั้นบนสีเหลือง ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านไม่ได้ ไหลไม่ได้
	10	2	ชั้นบนสีเหลือง ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านไม่ได้ ไหลไม่ได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

S:O	ปริมาตรน้ำ (ml)	จำนวนชั้นของผสม	ลักษณะของผสม
7:3	0.1	2	ชั้นบนสีเหลือง ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านไม่ได้ ไหลได้
	0.5	2	ชั้นบนสีเหลือง ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านไม่ได้ ไหลได้
	1	2	ชั้นบนสีเหลือง ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านไม่ได้ ไหลได้
	2	2	ชั้นบนสีเหลือง ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านไม่ได้ ไหลได้
	10	2	ชั้นบนสีเหลือง ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านไม่ได้ ไหลได้

S:O	ปริมาตรน้ำ (ml)	จำนวนชั้นของผสม	ลักษณะของผสม
5:5	0.1	2	ชั้นบนสีเหลืองอ่อน ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านไม่ได้ ไหลได้
	0.5	2	ชั้นบนสีเหลืองอ่อน ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านไม่ได้ ไหลได้
	1	2	ชั้นบนสีเหลืองอ่อน ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านไม่ได้ ไหลไม่ได้
	2	2	ชั้นบนสีเหลืองอ่อน ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านไม่ได้ ไหลได้
	10	2	ชั้นบนสีเหลืองอ่อน ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านไม่ได้ ไหลได้

S:O	ปริมาตรน้ำ (ml)	จำนวนชั้นของผสม	ลักษณะของผสม
3:7	0.1	2	ชั้นบนสีเหลืองอ่อน ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านไม่ได้ ไหลได้
	0.5	2	ชั้นบนสีเหลืองอ่อน ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านไม่ได้ ไหลได้
	1	2	ชั้นบนสีเหลืองอ่อน ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านไม่ได้ ไหลไม่ได้
	2	2	ชั้นบนสีเหลืองอ่อน ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านไม่ได้ ไหลได้
	10	2	ชั้นบนสีเหลืองอ่อน ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านไม่ได้ ไหลได้

S:O	ปริมาตรน้ำ (ml)	จำนวนชั้นของผสม	ลักษณะของผสม
1:9	0.1	2	ชั้นบนสีเหลืองอ่อน ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านไม่ได้ ไหลได้
	0.5	2	ชั้นบนสีเหลืองอ่อน ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านไม่ได้ ไหลได้
	1	2	ชั้นบนสีเหลืองอ่อน ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านไม่ได้ ไหลไม่ได้
	2	2	ชั้นบนสีเหลืองอ่อน ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านไม่ได้ ไหลได้
	10	2	ชั้นบนสีเหลืองอ่อน ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านไม่ได้ ไหลได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

<u>ระบบที่2</u> : HLB = 10.4 (S:O หมายถึง อัตราส่วนของสารลดแรงตึงผิวต่อน้ำมันถั่วเหลือง)

S:O	ปริมาตรน้ำ (ml)	จำนวนชั้นของผสม	ลักษณะของผสม
9:1	0.1	1	สีขาวขุ่น แสงผ่านได้ ไหลได้
	0.2	1	สีขาวขุ่น แสงผ่านได้ ไหลได้
	0.3	1	สีขาวขุ่น แสงผ่านได้ ไหลได้
	0.5	1	สีขาวขุ่น แสงผ่านได้ ไหลได้
	0.7	1	สีขาวขุ่น แสงผ่านได้ ไหลได้
	1	1	สีขาวขุ่น แสงผ่านได้ ไหลได้
	1.5	1	สีขาวขุ่น แสงผ่านได้ ไหลได้
	2	1	สีขาวขุ่น แสงผ่านได้ ไหลได้
	3	1	สีขาวขุ่น แสงผ่านได้ ไหลได้
	4	1	สีขาวขุ่น แสงผ่านได้ ไหลได้
	5	1	สีขาวขุ่น แสงผ่านได้ ไหลได้
	10	1	สีขาวขุ่น แสงผ่านได้ ไหลได้

S:O	ปริมาตรน้ำ (ml)	จำนวนชั้นของผสม	ลักษณะของผสม
7:3	0.1	2	ชั้นบนสีเหลือง ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านได้ ไหลได้
	0.5	2	ชั้นบนสีเหลือง ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านได้ ไหลได้
	1	2	ชั้นบนสีเหลือง ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านได้ ไหลได้
	2	2	ชั้นบนสีเหลือง ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านได้ ไหลได้
	10	2	ชั้นบนสีเหลือง ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านได้ ไหลได้

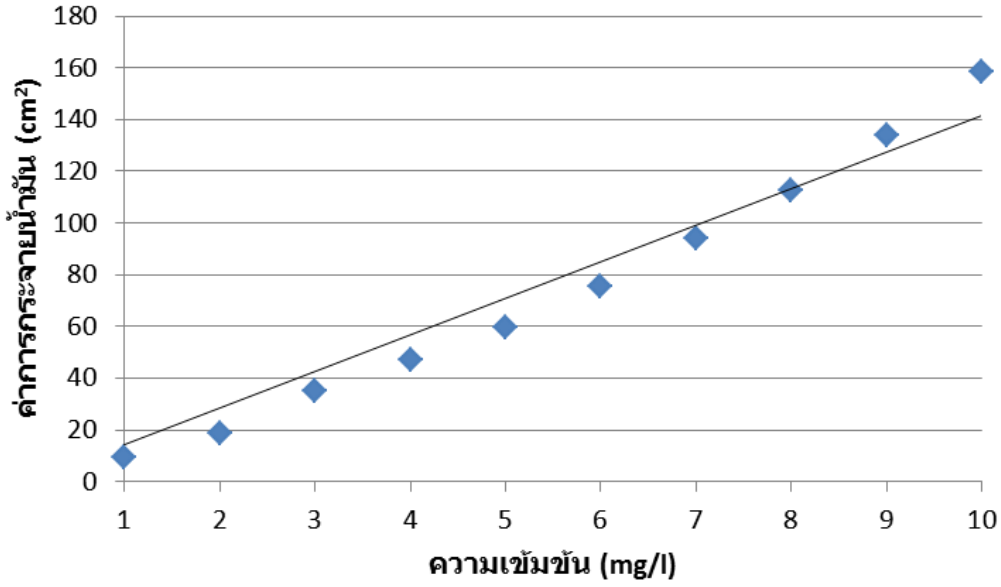
S:O	ปริมาตรน้ำ (ml)	จำนวนชั้นของผสม	ลักษณะของผสม
5:5	0.1	2	ชั้นบนสีเหลืองอ่อน ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านได้ ไหลได้
	0.5	2	ชั้นบนสีเหลืองอ่อน ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านได้ ไหลได้
	1	2	ชั้นบนสีเหลืองอ่อน ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านได้ ไหลไม่ได้
	2	2	ชั้นบนสีเหลืองอ่อน ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านได้ ไหลได้
	10	2	ชั้นบนสีเหลืองอ่อน ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านได้ ไหลได้

S:O	ปริมาตรน้ำ (ml)	จำนวนชั้นของผสม	ลักษณะของผสม
3:7	0.1	2	ชั้นบนสีเหลืองอ่อน ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านได้ ไหลได้
	0.5	2	ชั้นบนสีเหลืองอ่อน ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านได้ ไหลได้
	1	2	ชั้นบนสีเหลืองอ่อน ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านได้ ไหลไม่ได้
	2	2	ชั้นบนสีเหลืองอ่อน ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านได้ ไหลได้
	10	2	ชั้นบนสีเหลืองอ่อน ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านได้ ไหลได้

S:O	ปริมาตรน้ำ (ml)	จำนวนชั้นของผสม	ลักษณะของผสม
1:9	0.1	2	ชั้นบนสีเหลืองอ่อน ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านได้ ไหลได้
	0.5	2	ชั้นบนสีเหลืองอ่อน ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านได้ ไหลได้
	1	2	ชั้นบนสีเหลืองอ่อน ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านได้ ไหลไม่ได้
	2	2	ชั้นบนสีเหลืองอ่อน ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านได้ ไหลได้
	10	2	ชั้นบนสีเหลืองอ่อน ชั้นล่างสีขาว แสงผ่านได้ ไหลได้

ภาคผนวก ช

กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและค่าการกระจายน้ำมัน



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวธัญญรัตน์ เทียนชัยเกิดศิลป์ เกิดเมื่อวันที่ 21 ธันวาคม พ.ศ.2531 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2554 และเข้ารับการศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต ในสาขาวิชาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2556 ที่อยู่ปัจจุบัน 60/4 หมู่บ้านวรารมย์69 ถนนเลียบคลองภาษีเจริญฝั่งใต้ หนองแขม จังหวัดกรุงเทพมหานคร 10160

ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ได้เข้าร่วมเสนอผลงานการประชุมทางวิชาการระดับนานาชาติ The 28th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference (TSB) 2016 ระหว่างวันที่ 28-30 พฤศจิกายน 2559 ณ โรงแรม The Empress จังหวัดเชียงใหม่ ในหัวข้อเรื่อง Production and properties of biosurfactant produced by Pichia anomala MUE24

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University