



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

การติดตามการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ
ที่ผลิตโดย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41
ในอาหารที่มีน้ำมันและกรดไขมันเป็นแหล่งคาร์บอน

โดย

จิราภรณ์ ธานีวัน

ณัฐชนันท์ ลิพิพัฒน์ไพบูลย์

นพรัตน์ วานิชสุขสมบัติ

668.1
จ535ก

เมษายน ๒๕๕๗

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

การติดตามการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 ในอาหารที่มีน้ำมันและกรดไขมันเป็นแหล่งคาร์บอน

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐชนันท์ ลิขิตพัฒนไพบุลย์
นางสาวนพรัตน์ วานิชสุขสมบัติ

เดือนเมษายน พ.ศ. 2547

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่อง "การติดตามการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 ในอาหารที่มีน้ำมันและกรดไขมันเป็นแหล่งคาร์บอน" ได้รับทุนวิจัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ปีงบประมาณ 2546 ครั้งที่ 2 เป็นระยะเวลา 1 ปี คณะผู้วิจัยจึงขอกราบ ขอขอบคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้



คณะผู้วิจัย

เมษายน 2547

สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ	II
บทคัดย่อภาษาไทย	III
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	IV
รายการภาพประกอบ	V
รายการตารางประกอบ	VI
รายการสัญลักษณ์	VII
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
บทที่ 3 วิธีการวิจัย	24
บทที่ 4 ผลการวิจัย	34
บทที่ 5 การอภิปรายผล	96
บทที่ 6 ข้อเสนอสรุป	100
บทที่ 7 ข้อเสนอแนะ	103
เอกสารอ้างอิง	104
ภาคผนวก	108



บทคัดย่อภาษาไทย

ชื่อโครงการวิจัย	การติดตามการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย <i>Pseudomonas</i> sp. สายพันธุ์ A41 ในอาหารที่มีน้ำมันและกรดไขมันเป็นแหล่งคาร์บอน
ชื่อผู้วิจัย	ผศ.จิราภรณ์ ธนีย์วัน ผศ.ดร.ณัฐชนันท์ สิริพัฒน์ไพบูลย์
ผู้ช่วยวิจัย	นส.นพรัตน์ วานิชสุขสมบัติ
เดือนและปีที่ทำวิจัยสำเร็จ	เมษายน 2547

บทคัดย่อ

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มี 2% (v/v) ของไขมันหรือกรดไขมันเป็นแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน 9 ชนิด และ NH_4NO_3 0.4% ที่ 30°C เขย่าที่ 200 rpm เป็นเวลา 7 วัน พบว่าเชื้อจะผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีเมื่อเจริญเข้าสู่ระยะพัก (stationary phase) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ สามารถลดค่าแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์จาก 55 – 63.4 mN/m ลงเป็น 27.8 - 30 mN/m ในอาหารเลี้ยงเชื้อทุกแหล่งคาร์บอน ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จะขึ้นกับชนิดของแหล่งคาร์บอน จากผลการทดลองพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันมะกอก น้ำมันปาล์ม และน้ำมันมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอน จะให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 16.9 13.4 และ 6.23 กรัม/ลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าการกระจายตัวของน้ำมันและปริมาณน้ำตาลแรมโนสจะมีค่าสูงในแหล่งอาหารคาร์บอนที่เป็นกรดไขมัน สายโซ่ที่สั้นกว่า ($C_{12} > C_{14} > C_{16}$) และถ้าเป็นกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว พบว่า C18:2 จะให้ค่าการกระจายน้ำมันและปริมาณน้ำตาลแรมโนสสูงกว่ากรดไขมัน C18:1 และกรดไขมันอิ่มตัว C18 ตามลำดับ ส่วนที่เป็นไฮโดรฟิลิกจะถูกนำมาวิเคราะห์หาสารน้ำตาลแรมโนสโดยการใช้ HPLC และ UV-VIS ขณะที่ส่วนที่เป็นไฮโดรโฟบิกถูกนำมาเตรียมเป็นรูปอนุพันธ์ของ Methyl ester แล้ววิเคราะห์ด้วย GC-MS ผลการวิเคราะห์แสดงการเปลี่ยนแปลงของกรดไขมันไปเป็นผลิตภัณฑ์หลัก ในรูป 3-hydroxydecanoic acid (3OH-C10:0)เกือบทั้งหมด เนื่องจากน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาแพง ผู้วิจัยจึงได้สนใจที่จะผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากน้ำมันปาล์มแทน โดยได้ทำการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน แล้วทำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ให้บริสุทธิ์บางส่วนโดย

วิธีการทางเคมี พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้สามารถลดแรงตึงผิวได้ดี มีค่า CMC 50 มก.ต่อลิตร γ CMC เท่ากับ 30 mN/m มีค่าผลผลิต 196 กรัมต่อบาท สารสามารถเกิดอิมัลชันกับ สารละลายอินทรีย์ต่างๆ 8 ชนิด มากกว่า 60% และเมื่อทำการแยกและทำสารให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น ด้วย HPLC แล้ววิเคราะห์สารด้วย LC-MS พบว่า มีองค์ประกอบหลักที่สำคัญคือสารที่มีมวล โมเลกุล 527 ซึ่งมีค่าเท่ากับมวลโมเลกุลของไซเตียมโมโนแรมโนลิปิด



ชื่อโครงการวิจัย	Growth and production of biosurfactant produced from <i>Pseudomonas</i> sp. using oils and fatty acids as carbon sources.
ชื่อผู้วิจัย	Assist. Prof. Jiraporn Thaniyavarn Assist. Prof. Dr. Nulchanun Leepipatpiboon
ผู้ช่วยวิจัย	Miss Nopparat Wanitsuksombut

Biosurfactant production by *Pseudomonas* sp. strain A41 was examined under different carbon sources, in defined medium containing 2% of oil or fatty acid and 0.4% H_4NO_3 pH 7 at 30 °C 200 rpm for 7 days. The yield of biosurfactant steadily increased even after the bacterial cultures reached the stationary phase. Under such condition the surface tension of the medium was lowered from the 55-63.4 mN/m to 27.8-30 mN/m in every carbon sources. Biosurfactant yield was affected by the nature of carbon source of the culture, by which rhamnolipid biosurfactants produced were found to be 16.9, 13.4 and 6.23 g/l in olive oil, palm oil and coconut oil, respectively. Increased biosurfactant activities in terms of oil displacement test and rhamnose were observed in the culture of shorter chain fatty acid than that of long chain ($C_{12} > C_{14} > C_{16}$). Further more we found that unsaturated fatty acid $C_{18:2}$ possessed oil displacement activity and rhamnose content higher than $C_{18:1}$ and C_{18} , respectively. After the hydrophilic moiety was identified as rhamnose by HPLC and its UV-visible spectrum, the hydrophobic part was methylated and characterized by Gas chromatographic procedures. The GC-MS analysis showed that main component of 3-hydroxydecanoyl ester was found in every carbon sources. Since, olive oil is rather expensive, we purpose to use palm oil in place of this for economical reason. Then partially purified biosurfactant was prepared when cultivated in palm oil medium. The biosurfactant was isolated by TLC and silica gel column subsequently to gradient HPLC and mass spectrometry. The biosurfactant showed excellent surface active properties in terms of CMC 50 mg/l, γ CMC 30 mN/m and high productivity cost 196 g/baht. Emulsification activities >60% with 8 types hydrocarbon tested. The main peak of mass spectrometry showed its mass of 527 correspond to sodiummonorhamnolipid.

รายการภาพประกอบ

	หน้า
บทที่ 2 การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะโครงสร้างโดยทั่วไปของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	7
รูปที่ 2.2 แสดงโครงสร้างและการจัดเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	8
รูปที่ 2.3 โครงสร้างของไกลโคลิปิดที่พบได้ทั่วไป	10
รูปที่ 2.4 แสดงโครงสร้างของแรมโนลิปิด ชนิด R1, R2, R3 R4, A และ B จาก <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
รูปที่ 2.5 กระบวนการสังเคราะห์แรมโนลิปิดชนิด R1 และ R2 ซึ่งผลิตจาก <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
รูปที่ 2.6 แสดงกระบวนการสังเคราะห์ β -Hydroxydecanoly- β -Hydroxydecanoly-S-CoA	20
รูปที่ 2.7 แผนภูมิภาพการแสดงวิถีของ fatty acid metabolism ใน จุลินทรีย์	20
บทที่ 3 วิธีการวิจัย	
รูปที่ 3.1 แสดงวิธีวัดการกระจายน้ำ	26
รูปที่ 3.2 วิธีการหาค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ โดยการวัดค่าแรงตึงผิวของส่วนน้ำใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อหลังจากทำการเจือจางแล้ว	28
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
รูปที่ 4.1 แสดงการเจริญ ปริมาณน้ำตาลแรมโนส พื้นที่การกระจายน้ำมัน ค่าแรงตึงผิวของ <i>Pseudomonas sp.</i> สายพันธุ์ A41 เมื่อใช้น้ำมันมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอน	39
รูปที่ 4.2 แสดงการเจริญ ปริมาณน้ำตาลแรมโนส พื้นที่การกระจายน้ำมัน ค่าแรงตึงผิวของ <i>Pseudomonas sp.</i> สายพันธุ์ A41 เมื่อใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน	41

รูปที่ 4.3 แสดงการเจริญ ปริมาณน้ำตาลแรมโนส พื้นที่การกระจายน้ำมัน ค่าแรงดึงผิว ของ <i>Pseudomonas</i> sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อใช้น้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอน	43
รูปที่ 4.4 แสดงการเจริญ ปริมาณน้ำตาลแรมโนส พื้นที่การกระจายน้ำมัน ค่าแรงดึงผิว ของ <i>Pseudomonas</i> sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อใช้กรดลอริกเป็นแหล่งคาร์บอน	45
รูปที่ 4.5 แสดงการเจริญ ปริมาณน้ำตาลแรมโนส พื้นที่การกระจายน้ำมัน ค่าแรงดึงผิว ของ <i>Pseudomonas</i> sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อใช้กรดไมริสติกเป็นแหล่งคาร์บอน	47
รูปที่ 4.6 แสดงการเจริญ ปริมาณน้ำตาลแรมโนส พื้นที่การกระจายน้ำมัน ค่าแรงดึงผิว ของ <i>Pseudomonas</i> sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อใช้กรดปาล์มมิติกเป็นแหล่งคาร์บอน	49
รูปที่ 4.7 แสดงการเจริญ ปริมาณน้ำตาลแรมโนส พื้นที่การกระจายน้ำมัน ค่าแรงดึงผิว ของ <i>Pseudomonas</i> sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อใช้กรดสเตียริกเป็นแหล่งคาร์บอน	51
รูปที่ 4.8 แสดงการเจริญ ปริมาณน้ำตาลแรมโนส พื้นที่การกระจายน้ำมัน ค่าแรงดึงผิว ของ <i>Pseudomonas</i> sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อใช้กรดโอเลอิกเป็นแหล่งคาร์บอน	53
รูปที่ 4.9 แสดงการเจริญ ปริมาณน้ำตาลแรมโนส พื้นที่การกระจายน้ำมัน ค่าแรงดึงผิว ของ <i>Pseudomonas</i> sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อใช้กรดไลโนเลอิกเป็นแหล่งคาร์บอน	55
รูปที่ 4.10 แสดงค่าการกระจายน้ำมันสูงสุดในแต่ละแหล่งคาร์บอน	57
รูปที่ 4.11 แสดงปริมาณน้ำตาลแรมโนสสูงสุดที่ผลิตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่ง คาร์บอนชนิดต่างๆ	58
รูปที่ 4.12 แสดงโครมาโตแกรมของ GC-MS ของน้ำมันมะพร้าว	63
รูปที่ 4.13 แสดงโครมาโตแกรมของ GC-MS ของน้ำมันปาล์ม	64
รูปที่ 4.14 แสดงโครมาโตแกรมของ GC-MS ของน้ำมันมะกอก	65
รูปที่ 4.15 แสดงโครมาโตแกรมของ GC-MS เมื่อใช้น้ำมันมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอน	66
รูปที่ 4.16 แสดงโครมาโตแกรมของ GC-MS เมื่อใช้น้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอน	67
รูปที่ 4.17 แสดงโครมาโตแกรมของ GC-MS เมื่อใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน	68
รูปที่ 4.18 GC Profile ของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในกรดลอริก	69
รูปที่ 4.19 GC Profile ของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในกรดไมริสติก	70
รูปที่ 4.20 GC Profile ของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในกรดปาล์มมิติก	71
รูปที่ 4.21 GC Profile ของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในกรดสเตียริก	72
รูปที่ 4.22 GC Profile ของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในกรดโอเลอิก	73
รูปที่ 4.23 GC Profile ของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในกรดไลโนเลอิก	74

รูปที่ 4.24 แสดง mass spectrum ของ methyl ester 3-hydroxy decanoic acid ที่ได้จากการนำไปเลี้ยงเชื้อที่ RT เท่ากับ 4.9 นาที เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย GC-MS	75
รูปที่ 4.25 แสดงโครมาโตแกรมของ HPLC ของน้ำตาลแรมโนสมมาตรฐานปริมาณ 4.2 มิลลิกรัม	76
รูปที่ 4.26 แสดงโครมาโตแกรมของ HPLC ของน้ำตาลแรมโนสมมาตรฐานปริมาณ 10 มิลลิกรัมเมื่อผ่านการ hydrolysis	76
รูปที่ 4.27 แสดงโครมาโตแกรมของ HPLC ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนปริมาณ 20 มิลลิกรัม เมื่อผ่านการ hydrolysis	76
รูปที่ 4.28 แสดงยูวี-วิสิเบิลสเปกตรัมของน้ำตาลชนิดต่างๆ เมื่อผ่านการวิเคราะห์ตามวิธีของ Dische และ Shettles ในปี 1948	77
รูปที่ 4.29 แสดงยูวี-วิสิเบิลสเปกตรัมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วน เมื่อผ่านการวิเคราะห์ตามวิธีของ Dische และ Shettles ในปี 1948	78
รูปที่ 4.30 แสดงการหาค่า CMC ซึ่งเขียนกราฟระหว่างค่าแรงตึงผิวและ log ของความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วน	79
รูปที่ 4.31 แสดง spot บน TLC เมื่อนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ในน้ำมันปาล์มมาวิเคราะห์และแยกให้บริสุทธิ์โดยวิธี TLC	80
รูปที่ 4.32 โครมาโตแกรม HPLC จากตัวอย่างที่ F1	83
รูปที่ 4.33 โครมาโตแกรม HPLC จากตัวอย่างที่ F2	83
รูปที่ 4.34 โครมาโตแกรม HPLC จากตัวอย่างที่ F3	84
รูปที่ 4.35 โครมาโตแกรม HPLC จากตัวอย่างที่ F4	84
รูปที่ 4.36 โครมาโตแกรม HPLC จากตัวอย่างที่ F5	85
รูปที่ 4.37 โครมาโตแกรม HPLC จากตัวอย่างที่ F6	85
รูปที่ 4.38 แสดงผลโครมาโตแกรมของ LC-MS และ Mass spectrum ของตัวอย่าง A	88
รูปที่ 4.39 แสดงผลโครมาโตแกรมของ LC-MS และ Mass spectrum ของตัวอย่าง B โดยมี peak หลักที่ RT 23.15 นาที มีค่า $[M+H]^+$ เท่ากับ 527.4	89
รูปที่ 4.40 แสดงผลโครมาโตแกรมของ LC-MS และ Mass spectrum ของตัวอย่าง C มี peak ที่ RT 28.36 นาที มีค่า $[M+H]^+$ เท่ากับ 661.6	89
รูปที่ 4.41 แสดงผลโครมาโตแกรมของ LC-MS และ Mass spectrum ของตัวอย่าง C มี peak ที่ RT 28.94 นาที มีค่า $[M+H]^+$ เท่ากับ 661.6	90

รูปที่ 4.42 แสดงผลการวิเคราะห์สารถแรงดึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากแหล่งคาร์บอน
ต่างๆบน TLC

93



รายการตารางประกอบ

	หน้า
บทที่ 2 การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
ตารางที่ 2.1 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ	14
ตารางที่ 2.2 แสดงชนิดและ [M-H] แรมโนลิปิดที่ผลิตโดย <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 57RP ที่เลี้ยงบน แมนิทอล หรือแนฟทารีน 2%	17
ตารางที่ 2.3 เปรียบเทียบแรมโนลิปิดที่ผลิตได้ใน <i>Pseudomonas</i> sp. สายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเลี้ยงในอุณหภูมิระหว่าง 25-40 °C และคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิว	23
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
ตารางที่ 4.1 แสดงค่าของน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลแรมโนส ค่าการกระจายน้ำมัน ค่าแรงตึงผิว ของ <i>Pseudomonas</i> sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อใช้น้ำมันมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอน	38
ตารางที่ 4.2 แสดงค่าของน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลแรมโนส ค่าการกระจายน้ำมัน ค่าแรงตึงผิว ของ <i>Pseudomonas</i> sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน	40
ตารางที่ 4.3 แสดงค่าของน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลแรมโนส ค่าการกระจายน้ำมัน ค่าแรงตึงผิว ของ <i>Pseudomonas</i> sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อใช้น้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอน	42
ตารางที่ 4.4 แสดงค่าของน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลแรมโนส ค่าการกระจายน้ำมัน ค่าแรงตึงผิว ของ <i>Pseudomonas</i> sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อใช้กรดลอริกเป็นแหล่งคาร์บอน	44
ตารางที่ 4.5 แสดงค่าของน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลแรมโนส ค่าการกระจายน้ำมัน ค่าแรงตึงผิว ของ <i>Pseudomonas</i> sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อใช้กรดไมริสติกเป็นแหล่งคาร์บอน	46
ตารางที่ 4.6 แสดงค่าของน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลแรมโนส ค่าการกระจายน้ำมัน ค่าแรงตึงผิว ของ <i>Pseudomonas</i> sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อใช้กรดปาล์มมิติกเป็นแหล่งคาร์บอน	48
ตารางที่ 4.7 แสดงค่าของน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลแรมโนส ค่าการกระจายน้ำมัน ค่าแรงตึงผิว ของ <i>Pseudomonas</i> sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อใช้กรดสเตียริกเป็นแหล่ง	50

คาร์บอน	
ตารางที่ 4.8 แสดงค่าของน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลแรมโนส ค่าการกระจายน้ำมัน ค่าแรงตึงผิว ของ <i>Pseudomonas</i> sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อใช้กรดโอเลอิกเป็นแหล่งคาร์บอน	52
ตารางที่ 4.9 แสดงค่าของน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลแรมโนส ค่าการกระจายน้ำมัน ค่าแรงตึงผิว ของ <i>Pseudomonas</i> sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อใช้กรดไลโนเลอิกเป็นแหล่งคาร์บอน	54
ตารางที่ 4.10 สรุปเปรียบเทียบผลการเจริญและการวิเคราะห์ต่างๆ ในอาหารที่มีคาร์บอนต่างชนิดกัน	56
ตารางที่ 4.11 แสดงองค์ประกอบของกรดไขมันที่มีในน้ำมัน 3 ชนิด	59
ตารางที่ 4.12 แสดงช่วงเวลาการเกิดสาร (3-OH-C10:0) ที่ตรวจวิเคราะห์ได้ ในน้ำเลี้ยงเชื้อ ในอาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ที่มีน้ำมัน 3 ชนิดเป็นแหล่งคาร์บอน	61
ตารางที่ 4.13 แสดงช่วงเวลาการเกิดสาร (3-OH-C10:0) ที่ตรวจวิเคราะห์ได้ ในน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดไขมันชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน	62
ตารางที่ 4.14 แสดงอัตราการเคลื่อนที่ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนบนแผ่น preparative TLC และผลการกระจายน้ำมัน	81
ตารางที่ 4.15 แสดงค่าการกระจายน้ำมันที่ลำดับส่วนต่างๆ เมื่อทำให้บริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ silica gel 60 จากแถบต่างๆ F1 ถึง F6	82
ตารางที่ 4.16 สรุปค่าการกระจายน้ำมันเมื่อผ่านการวิเคราะห์และทำให้บริสุทธิ์ด้วย HPLC	86
ตารางที่ 4.17 แสดงโครงสร้างของตัวอย่าง A,B และ C	91
ตารางที่ 4.18 แสดงค่า R_f ของสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ในน้ำมันปาล์มบนแผ่น TLC	92
ตารางที่ 4.19 แสดงราคาต้นทุนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนเมื่อคิดเปรียบเทียบกับราคาแหล่งคาร์บอนของน้ำมัน 3 ชนิด	94
ตารางที่ 4.20 แสดงค่าอิมัลชัน อินเด็กซ์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบริสุทธิ์บางส่วนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ	95

คำย่อ

$^{\circ}\text{C}$	= องศาเซลเซียส
ชม.	= ชั่วโมง
มม.	= มิลลิเมตร
มล.	= มิลลิลิตร
มก.	= มิลลิกรัม
μm	= ไมโครเมตร
μg	= ไมโครกรัม
%	= เปอร์เซ็นต์
w/v	= น้ำหนักต่อปริมาตร
v/v	= ปริมาตรต่อปริมาตร
cm^2	= ตารางเซนติเมตร
ตร.ซม.	= ตารางเซนติเมตร
mN/m	= มิลลินิวตันต่อเมตร
mM	= มิลลิโมลาร์
min	= นาที
CMC	= ค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์
γCMC	= ค่าแรงตึงผิว ณ จุดของการเกิดไมเซลล์
CMC^{-1}	= ค่าความเข้มข้นสัมพันธ์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ
RT	= Retention time
m/z	= ค่ามวลประจุ



บทที่ 1
บทนำ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) หมายถึง สารชีวโมเลกุลที่มีสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิว (surface-active substance) ซึ่งสร้างโดยสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์ ชนิดต่างๆ เช่น แบคทีเรีย ราและยีสต์บางชนิด (Cooper และ Zajic, 1980) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีโครงสร้างเป็นแอมฟิพาติก (amphipatic structure) ซึ่งประกอบด้วยส่วนที่ชอบไขมัน (lipophilic portion) และส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic portion) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเมื่อละลายอยู่ในตัวทำละลายเช่น น้ำ จะเกิดการรวมตัวกันเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า ไมเซลล์ (micelle) โดยจะหันเอาส่วนที่ชอบน้ำไว้ด้านนอก และส่วนที่ชอบไขมันไว้ด้านใน ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ทำให้สารลดแรงตึงผิวเกิดการรวมตัวเป็นไมเซลล์ เรียกว่า ความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ Critical Micelle Concentration (CMC) ซึ่งจะมีค่าจำเพาะสำหรับสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิด โครงสร้างไมเซลล์ในน้ำจะอยู่ตัวเนื่องจากแรงดึงดูดระหว่างหมู่ไฮโดรคาร์บอนซึ่งอยู่ด้านในของไมเซลล์ แรงนี้เรียกว่าแรงกระทำระหว่างส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interaction) การเกิดโครงสร้างในรูปไมเซลล์ทำให้สารลดแรงตึงผิวละลายน้ำได้ และสามารถลดแรงตึงระหว่างชั้น(phase) ของสารที่มีขั้วแตกต่างกันได้เช่น ระหว่างน้ำมันกับน้ำ อากาศกับน้ำ หรือน้ำกับของแข็ง (Desai และคณะ, 1994) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์สามารถแบ่งได้ตามโครงสร้างทางเคมีเป็น 6 ชนิด ได้แก่ โกลโคลิพิด (glycolipids) ไลโฟเพปไทด์และไลโฟโปรตีน (lipopeptide and lipoproteins) กรดไขมันและไขมัน (fatty acid and neutral lipid) ฟอสโฟลิพิด (phospholipids) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์ (polymeric biosurfactants) และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีลักษณะเป็นอนุภาค(particulate surfactants) (Desai และ Banat, 1997)

ปัจจุบันสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทวีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากขึ้น และมีการนำมาใช้แทนสารลดแรงตึงผิวจากการสังเคราะห์ทางเคมีเนื่องจากถูกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม มีความเป็นพิษต่ำ อีกทั้งสามารถผลิตจากสารตั้งต้นที่มาจากทรัพยากรที่นำกลับมาใช้ใหม่ได้ (Kosaric และคณะ, 1984; Mercade และคณะ, 1993; Babu และคณะ, 1996; PatelและDesai,1997; Daniel และคณะ, 1998) เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีโครงสร้างและสมบัติที่ต่างกันทำให้สามารถนำมาประยุกต์ใช้งานได้อย่างกว้างขวาง เช่น ใช้เป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ สารทำให้เกิดฟอง ตัวทำละลายและสารลดความหนืดเป็นต้น ปัจจุบันได้มีการใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในทางการค้า เช่น Emulsan จาก *Arthobacter* sp. ATCC31012 ในการขจัดคราบน้ำมัน, Sorphorolipid จาก *Torulopsis bombicola* ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เช่น แชมพูและครีมทาผิว นอกจากนี้ยังมีรายงานถึง Trehalose lipid จาก *Rhodococcus erythropolis* DSM 43215, Fructose lipid จาก *Arthobacter*

paraffinicus ATCC 15591, Surfactin จาก *Bacillus subtilis* ATCC 21331 และ Lipopeptide จาก *Methylomonas clasa* ATCC 31226 เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีการผลิตทางการค้า (Kosaric N, 1993) อย่างไรก็ตามสารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังมีต้นทุนการผลิตที่สูง หากสามารถใช้วัตถุดิบในการผลิตที่มีราคาถูกและสามารถหาได้ง่ายในประเทศไทยเช่น น้ำมันปาล์ม ซึ่งปัจจุบันประเทศไทยผลิตน้ำมันปาล์มถึง 1.48 ล้านตันต่อปี เป็นการเพิ่มความคุ้มค่าและการพัฒนาอุตสาหกรรมการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้

ได้มีรายงานว่า *Pseudomonas* sp. สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้หลายชนิด ได้แก่ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดไกลโคลิปิด เช่น แรมโนลิปิด ผลิตโดย *Pseudomonas aeruginosa* (Lang และ Wullbrandt, 1999) แรมโนลิปิดเป็นสารที่พบมากใน *Pseudomonas* spp. โดยแรมโนลิปิดบริสุทธิ์ที่มีความเข้มข้นระหว่าง 10-200 มก.ต่อ ลิตร สามารถลดแรงตึงผิวให้อยู่ระหว่าง 25-30 mN/m โครงสร้างของแรมโนลิปิดนั้นมีด้วยกันหลายแบบ แบ่งเป็น 6 กลุ่มใหญ่ตามรายงานของ Lang และ Wullbrandt (1999) ซึ่ง *Pseudomonas* sp. บางชนิดผลิตแรมโนลิปิดได้หลายชนิดโดยจะแตกต่างกันในส่วนกรดไขมันตามรายงานของ Abalos A. และคณะในปี 2001 แรมโนลิปิดยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์เช่น นำไปกำจัดคราบน้ำมันในทะเล กำจัดสารพิษพวก PAH เป็นอิมัลซิฟายเออร์ในเครื่องสำอางและยา กำจัดศัตรูพืชจำพวกรา และยังสามารถสกัดแรมโนลิปิดไปใช้เป็นสารปรุงแต่งอาหาร นอกจากนี้ยังมีสารลดแรงตึงผิวชนิดอื่นที่ผลิตโดย *Pseudomonas* sp. ได้แก่ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดไลโปเพปไทด์และไลโปโปรตีน เช่น วิสโคซิน ผลิตโดย *Pseudomonas fluorescens* (Desai และ Banat, 1997) และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดพอลิเมอร์ เซอร์แฟกแตนท์ เช่น โปรตีน พีเอ ผลิตโดย *Pseudomonas aeruginosa* (Desai และ Banat, 1997) โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Pseudomonas* sp. มีค่าแรงตึงผิวอยู่ระหว่าง 25-30 มิลลินิวตันต่อเมตร (mN/m) (Desai และ Banat, 1997) จะเห็นได้ว่า *Pseudomonas* sp. ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้หลายชนิด แต่ละชนิดมีสมบัติแตกต่างกันตามโครงสร้าง ดังนั้นจากความสัมพันธ์ของโครงสร้างและสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจึงมีความเป็นไปได้ที่จะสามารถปรับปรุงคุณภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ทั้งจากวิธีการทางเคมีและทางพันธุวิศวกรรม (Morikawa และคณะ, 2000)

การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Pseudomonas* sp. A41 เป็นเพียงการผลิตในระดับห้องปฏิบัติการ หากต้องการนำไปใช้งานในระดับอุตสาหกรรมต้องคำนึงถึงปัจจัยทางเศรษฐกิจ เช่น ราคาวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 ซึ่งแยกได้จากดินบริเวณคอนหอย

หลอด จังหวัดสมุทรปราการโดย อารีย์ กังฉิน ในปี 2542 รายงานว่าสามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ลดแรงตึงผิวได้ 30 มิลลิวัตตันต่อเมตร (mN/m) และมีค่า oil displacement เท่ากับ 132.79 cm² ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทราบสูตรโครงสร้างทางเคมี ที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน แต่เมื่อใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าได้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ลดแรงตึงผิวได้ 29 มิลลิวัตตันต่อเมตร (mN/m) และมีค่า oil displacement เท่ากับ 154 cm² ซึ่งมีแอกติวิตีมากกว่าเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ยังสามารถเกิดอิมัลชันกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้อีกด้วย ดังนั้นจึงน่าจะมีการศึกษาถึงการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อใช้น้ำมันชนิดต่างๆ และกรดไขมันชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อศึกษาถึงโครงสร้างและสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

วัตถุประสงค์

เพื่อติดตามการเจริญ และศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีน้ำมัน และกรดไขมันชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน ตลอดจนวิเคราะห์องค์ประกอบของสารที่ผลิตได้จากแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดด้วยวิธีทางเคมี

ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. การติดตามการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนที่ต่างชนิดกัน
 - 1.1 เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวกำหนดสูตรที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำมันมะพร้าว น้ำมันปาล์ม และน้ำมันมะกอก กรดไขมันอิสระ 6 ชนิด คือ กรดไขมันโอเลอิก(C18:1) กรดไขมันไลโนเลอิก(C18:2) กรดไขมันสเตียริก(C18) กรดปาล์มมิติก(C16) กรดไมริสติก(C14)และกรดไขมันลอริก(C12) ซึ่งประกอบประกอบในน้ำมันปาล์มและน้ำมันมะพร้าว เตรียมหัวเชื้อซึ่งใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวกำหนดสูตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิห้องเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ วันเป็นเวลา 7 วัน
 - 1.2 นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำตะกอนเซลล์ที่ได้มานำหนักแห้งเพื่อติดตามการเจริญ นำน้ำเลี้ยงเชื้อไปปราศจากเซลล์วัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวัดค่าแรงตึงผิว วัดค่าการกระจายน้ำมัน (Morikawa และ Imanaka, 1993) และวิเคราะห์หาแอมโนส (Dische และ Shettles, 1948) และนำเลี้ยงเชื้อส่วนไปปราศจากเซลล์มาลดปริมาตรแล้วนำมาทำ

methyl ester ด้วย 0.5 N NaOH ของสารละลายโซเดียมเมทอกไซด์ (Folch และคณะ, 1957) วิเคราะห์
หากรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของแรมโนลิปิดด้วย GC-MS และพิสูจน์น้ำตาลแรมโนสด้วย HPLC

2. ทำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์ และวิเคราะห์องค์ประกอบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ใน
น้ำมันปาล์ม (จากข้อ 1)

2.1 นำเลี้ยงเชื้อส่วนไฮปราศจากเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน มาตกตะกอน
ด้วย 6 N HCl จนมีค่าความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 2 จึงสกัดด้วยคลอโรฟอร์มและเอทานอล อัตราส่วน
2 ต่อ 1 นำส่วนที่ตัวทำละลายอินทรีย์ไปกำจัดน้ำด้วยโซเดียมซัลเฟต แอนไฮดรัส นำไประเหยแห้งได้สาร
ลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วน

2.2 นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย TLC และ คอลัมโครมาโตกราฟี
โดยใช้ตัวชะเป็นคลอโรฟอร์มและเมทานอล


2.3 นำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย HPLC ซึ่งชะด้วยเกรเดียนท์ของอะซิโตรไนโตรที่และน้ำ

2.4 วิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วย LC-MS

3. นำส่วนน้ำไฮปราศจากเซลล์จากแหล่งอาหารคาร์บอนต่างๆ กันมาทำให้บริสุทธิ์ตามข้อ 1.5 แล้ว
เปรียบเทียบองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนต่างกับสารลดแรงตึงผิว
ชีวภาพที่ผลิตได้ในน้ำมันปาล์มบนแผ่น TLC

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบถึงการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *Pseudomonas* sp. A41
ในอาหารที่มีน้ำมัน และกรดไขมัน C_{12} - C_{18} $C_{18:1}$ และ $C_{18:2}$ เป็นแหล่งคาร์บอน



บทที่ 2
การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ชนิดแรกที่ถูกจัดเป็นอย่างดี ตั้งแต่ปีทศวรรษ 1930 คือสบู่ หลังจากนั้นก็ได้มีการใช้สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์อย่างแพร่หลาย โดยในปี 1984 ทั่วโลกได้มีการใช้สารลดแรงตึงผิวมากถึง 14 ล้านตัน ซึ่งมูลค่าการซื้อขายถึง 100 ล้าน มาร์กเยอรมัน (Falbe, 1987) ในปี 1992 มูลค่าการซื้อขายสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์มีถึง 1.7 พันล้านเหรียญอเมริกา และคาดว่าจะมีอัตราการเพิ่มอีก 3-5 % ต่อปี (Lin, 1996) และจนถึงสิ้นศตวรรษที่ 20 จะมีมูลค่าเพิ่มถึง 35% (Desai และ Banal, 1997) สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์นั้นผลิตจากกระบวนการทางเคมีซึ่งเป็นกระบวนการที่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมและสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ยังเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมเองอีกด้วยซึ่งจะเกิดการย่อยสลายทางธรรมชาติได้ยาก (Fiechter, 1992) ดังนั้นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจึงเป็นที่สนใจศึกษาเพื่อนำมาใช้ทางอุตสาหกรรม

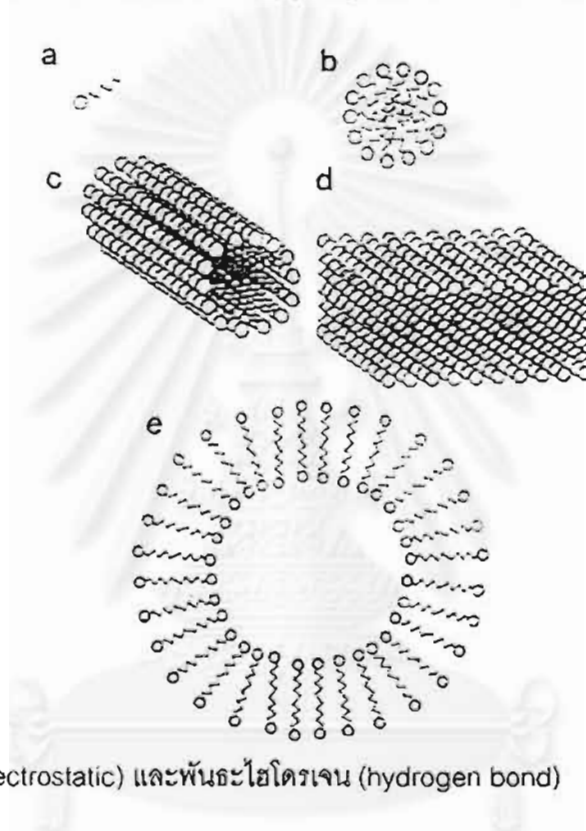
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactant) คือ สารลดแรงตึงผิวที่ได้จากสิ่งมีชีวิต ส่วนใหญ่ได้มาจากจุลินทรีย์ทั้ง แบคทีเรีย รา ยีสต์ มีโครงสร้างเป็นแบบแอมฟิพาติก (amphipatic structure) ซึ่งประกอบด้วยส่วนที่มีขั้ว (ส่วนที่ชอบน้ำ) ส่วนใหญ่ได้แก่ โปรตีน และน้ำตาลซึ่งจะเป็นโมเลกุลที่มีหมู่คาร์บอกซิลิก หมู่ไฮดรอกซิล หมู่อะมิโน หมู่ฟอสเฟต เป็นต้น ส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic portion) หรือ ส่วนที่ชอบไขมัน (lipophilic portion) ซึ่งจะเป็นโมเลกุลพวกไฮโดรคาร์บอน เช่น กรดไขมัน ทั้งชนิดอิ่มตัว (saturated fatty acid) และไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) มีทั้งโมเลกุลใหญ่และโมเลกุลเล็ก ซึ่งจะทำให้ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแตกต่างกันไป ดังรูปที่ 1.2 แสดงโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เป็นแบบแอมฟิพาติก



รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะโครงสร้างโดยทั่วไปของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Fiechter, 1992)

เมื่อสารลดแรงตึงผิวละลายอยู่ในตัวทำละลายไม่ว่าเป็นพวกมีขั้วหรือไม่มีขั้ว จะเกิดโครงสร้างที่เรียกว่าไมเซลล์ (micelle) และสารลดแรงตึงผิวต่างชนิดกันจะให้ค่าของความเข้มข้นที่น้อยที่สุด ซึ่งทำให้เกิดไมเซลล์ โดยเรียกว่า CMC (critical micelle concentration) หรือกล่าวได้ว่า CMC คือ

ประสิทธิภาพของการละลายของสารลดแรงตึงผิวในตัวทำละลาย หรือความเข้มข้นที่น้อยที่สุด ซึ่งทำให้ค่าแรงตึงผิวต่ำที่สุด (Lin, 1996) ค่า CMC ยังสามารถบอกได้ว่าพร้อมที่จะเกิดโครงสร้างทุติยภูมิ เช่น ไมเซลล์ (micelle) โบลีเยอร์ (bilayer) และ เวสสิเคิล (vesicles) ดังรูปที่ 2.2 การรวมตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเกิดจากแรงไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) แวนเดอร์วาลส์ (van der Waal's)



อิเล็กโตรสแตติก (electrostatic) และพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond)

รูปที่ 2.2 แสดงโครงสร้างและการจัดเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Fiechter, 1992)

- โครงสร้างโมโนเมอร์ (monomer) ของแอมฟิพาติกโมเลกุล
- โครงสร้างไมเซลล์แบบกลม
- โครงสร้างไมเซลล์แบบแท่ง
- โครงสร้างไมเซลล์แบบเลเยอร์
- โครงสร้างไมเซลล์แบบเวสสิเคิล

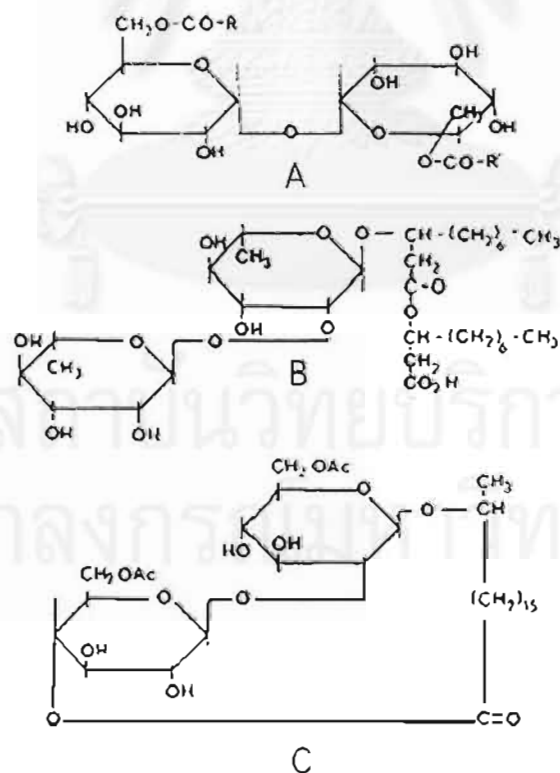
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพส่วนมากจะมีประจุสุทธิเป็นกลางหรือเป็นลบ โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประจุเป็นลบ อาจเนื่องมาจากหมู่คาร์บอกซิลิก หมู่ฟอสเฟต หรือ หมู่ซัลเฟต เป็นต้น ส่วนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประจุบวกนั้น อาจเกิดจากอิทธิพลของหมู่เอมีน แต่ก็พบได้น้อย (Cooper, 1986) ค่าแสดงถึงประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ นอกจากค่า CMC ที่กล่าวข้างต้นแล้วยังมีอีกหลายค่าได้แก่

1. ค่าแรงตึงผิว (surface tension) หมายถึง แรงที่กระทำระหว่างของเหลวและอากาศ มีหน่วยเป็น mN/m หรือ dyne/cm ซึ่งค่าแรงตึงผิวของน้ำบริสุทธิ์เท่ากับ 72 mN/m และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ดีว่ามีประสิทธิภาพดีจะทำให้ค่าแรงตึงผิวลดลงเหลือหรือต่ำกว่า 35 mN/m (Kosaric, 1993)
2. ค่าแรงตึงระหว่างผิวที่ประจุ (interfacial tension) หมายถึง แรงที่กระทำระหว่างของเหลวกับของเหลวที่มีเฟสต่างกัน มีหน่วยเป็น mN/m การวัดแรงตึงระหว่างผิวที่ประจุจะวัดระหว่างน้ำและสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น น้ำมัน เฮกซาเดคเคน (hexadecane) หรือ น้ำมันก๊าด (kerosene) โดยทั่วไปค่าแรงตึงระหว่างผิวที่ประจุของน้ำกับเฮกซาเดคเคนมีค่าเท่ากับ 50 mN/m และค่าแรงตึงระหว่างผิวที่ประจุของน้ำกับน้ำมันก๊าดมีค่าเท่ากับ 30-40 mN/m ซึ่งเมื่อเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถลดแรงตึงผิวที่ประจุลงเหลือ 0.1-1.0 mN/m (Gerson, 1993)
3. การเกิดอิมัลชัน (Emulsification) คือความสามารถในการทำให้น้ำและ สารประกอบ เช่น น้ำมันปิโตรเลียม สารละลายอินทรีย์ และน้ำมันพืชชนิดต่างๆ รวมตัวเป็นเนื้อเดียวกัน ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะทำให้เกิดอิมัลชันระหว่างน้ำกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เป็นผลทำให้น้ำมันมีสภาพเป็นหยดเล็กๆ อยู่ในน้ำ (อิมัลชันชนิด oil in water) เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวระหว่างน้ำและสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Cooper และ Zajic, 1980) การวัดประสิทธิภาพในการเกิดอิมัลชัน อาจทำได้ด้วยการวัดค่าอิมัลชัน อินเด็กซ์ คือการวัดอัตราส่วนระหว่างความสูงของอิมัลชันและ ความสูงของเหลวในหลอดทั้งหมด เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง (Patel และ Desai, 1997) และอาจวัดความเสถียรของอิมัลชันที่เกิดขึ้นโดยวัดค่าอิมัลชัน อินเด็กซ์ในระยะเวลาที่นานออกไป
4. ค่าการกระจายน้ำมัน (Morikawa และคณะ, 1993) เป็นการวัดความสามารถของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการทำให้แผ่นฟิล์มของน้ำมันบนผิวน้ำเป็นวงใส (clear zone) โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส คำนวณหาพื้นที่ตามสูตร Πr^2 มีหน่วยเป็นตารางเซนติเมตร โดยกำหนด 1 ตารางเซนติเมตรของการกระจายตัวของน้ำมันดิบเท่ากับ 1 หน่วย นอกจากการวัดค่าการกระจายตัวของน้ำมันจะใช้วัดส่วนน้ำใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแล้ว ยังเป็นวิธีที่เหมาะสมในการวัดกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิว

ชีวภาพที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธีการนี้จะใช้สารในการวิเคราะห์เพียง 10 ไมโครลิตร จึงเหมาะสมกับสารที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ซึ่งจะได้ปริมาณน้อย

การจำแนกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ สามารถแบ่งออกเป็น 6 กลุ่มตามโครงสร้างทางเคมี (Desai และ Banal, 1997) ได้แก่

1. ไกลโคลิพิด (glycolipid) เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต เช่น กลูโคส แมนโนส กาแล็คโตส กรดกลูคูโรนิก แรมโนส และ กาแล็คโตสซัลเฟต เชื่อมต่อกับไขมัน เช่น aliphatic acid และ hydroxy-aliphatic โดยอาจเชื่อมต่อกับคาร์โบไฮเดรต 1-2 โมเลกุล สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่จัดเป็นไกลโคลิพิดได้แก่ ทรีฮาโลส (trehalose) โซโฟโรลิพิด (sophorolipids) แรมโนลิพิด (rhamnolipid) เตตระอะซิลกลูโคส (tetraacylglucose) ไตรอะซิลกลูโคส (triacylglucose) แมนโนซิลเอริททอล ลิพิด (mannosylerythritol lipid) ซูโครส ลิพิด (sucrose lipid) ฟรุคโทส ลิพิด (fructose lipid) ไดเอซิล อินอสิทอล แมนโนไซด์ (diacyl inositol mannoside) เป็นต้น



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของไกลโคลิปิดที่พบได้ทั่วไป (Rosenberg และ Ron, 1999)

- A. โครงสร้างของทรีฮาโรส (β, β -6,6'-dicarboxylic ester) ตัวอย่าง ทรีฮาโรส คือ trehalose dimycolates ที่ผลิตจาก *Rhodococcus erythropolis* ประกอบด้วยทรีฮาโรส 2 โมเลกุลต่อกับสายโซ่ยาว 2 สาย (β -hydroxy fatty acid) ซึ่งมีจำนวนคาร์บอน 37-41 ที่ตำแหน่ง β โดยหมู่ R และ R' แทน fatty acid
- B. โครงสร้างของแรมโนลิปิดแบบที่ 2 (Lang และ Wullbrandt, 1999) จาก *Pseudomonas aeruginosa* แรมโนลิปิดประกอบด้วย แรมโนส 2 โมเลกุลเชื่อมต่อกับ β -hydroxydecanoic acid 2 โมเลกุล
- C. โครงสร้างของไซโฟโรลิปิด จาก *Torulopsis bombicola* ประกอบด้วย กลูโคส 2 โมเลกุลเชื่อมกันแบบ β -1,2 ต่อกับพวกกรดไขมันโซ่สายยาวของ hydroxy fatty acid (C_{18}) อาจเป็น lactic form

2. ไลโปเพปไทด์ (lipopeptides) และ ไลโปโปรตีน (Lipoprotein) เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มักมีคุณสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะ เช่น เซอร์แฟคติน (surfactin) หรือซับทีไลซิน (subtilysin) พอลิมิกซิน (polymyxins) และไลเคนินซิน (lichenysin) จาก *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymyxa* และ *Bacillus licheniformis* (Rosenberg, 1986) นอกจากนี้ยังพบว่า *Pseudomonas rubescens* (Yamane, 1987) และ *Thiobacillus thiooxidans* (Knoche, 1972) ผลิตออร์นิตินลิปิด (ornithine lipids) *Gluconobacter cerinus* IFO 3267 ผลิตออร์นิตินลิปิด (ornithine lipids) และ ทัวรีนลิปิด (taurine lipids) (Tahara, 1976a) *Agrobacterium tumefaciens* IFO 3058 ผลิตไลซีนลิปิด (lysine lipids) (Tahara, 1976b) เป็นต้น

3. กรดไขมันและไขมัน (Fatty acid and Neutral lipid) โดยสามารถพบได้ในเซลล์จุลินทรีย์ทุกชนิด และมักปล่อยออกนอกเซลล์เช่น กรดคาร์บอกซิลิก แอลกอฮอล์ เอสเทอร์ โมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ และโทกลีเซอไรด์ ตัวอย่างของกรดไขมันและไขมันที่สามารถลดแรงตึงผิวได้แก่ กรดโครีโนมัยคอลลิก (corynomycolic acid) ที่ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร สามารถลดแรงตึงผิวของน้ำลงเหลือ 40 mN/m (ปกติมีแรงตึงผิวเท่ากับ 72 mN/m) ไขมัน (neutral lipid) ที่มีรายงานว่าสามารถลดแรงตึงผิวคือ ไขมันที่ผลิตจาก *Mycobacterium rhodochrous* เมื่อความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตร

สามารถลดแรงตึงผิวของน้ำเหลือ 44 mN/m และยังส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ (Cooper และ Zajic, 1980) รูบิเวทิน อาร์1 (rubiwetlin R1) ซึ่งเป็นลิปิดที่ผลิตจาก *Serratia rubidaea* ATCC 27593 รูบิเวทิน อาร์1 เป็นลิปิดชนิด β -hydroxy fatty acid ที่มีจำนวนคาร์บอน 10 อะตอมเชื่อมต่อกับ β -hydroxy fatty acid ที่มีจำนวนคาร์บอน 12, 14 หรือ 16 อะตอมด้วยพันธะเอสเตอร์ (Matsuyama และคณะ, 1990)

4. ฟอสโฟลิปิด (phospholipids) เป็นองค์ประกอบสำคัญในเซลล์จุลินทรีย์ แต่มีส่วนน้อยที่ปล่อยออกนอกเซลล์ ทำให้วัดค่าแรงตึงผิวได้ยาก โครงสร้างทั่วไปของฟอสโฟลิปิดประกอบด้วย กลีเซอรอลต่อกับกรดไขมัน ตัวอย่างฟอสโฟลิปิดที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ เช่น ฟอสฟาติดีล ไนโนซิทอล (phosphatidylinositol) ฟอสฟาติดีลกลีเซอรอล (phosphatidylglycerol) และกรดฟอสฟาติค (phosphatidic acid) จาก *Thiobacillus thiooxidans* และ *Rhodococcus erythropolis* ที่ผลิตฟอสฟาติลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) นอกจากนี้ยังพบการสร้างฟอสโฟลิปิดใน *Corynebacterium alkanolyticum*, *Candida tropicalis* และ *Micrococcus cerificans* (Cooper และ Zajic, 1980 และ Rosenberg, 1986)

5. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์ (polymeric biosurfactants) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทนี้มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เช่น อิมัลชัน (emulsan) ที่ผลิตได้จาก *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 ที่มีลักษณะเป็นไลโปเฮเทอโรพอลิแซคคาไรด์ (lipoheteropolysaccharide) ที่มีประจุลบ น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 9.9×10^5 ดาลตัน อิมัลชันไม่มีคุณสมบัติลดแรงประจันผิว (interfacial tension) แต่ทำให้เกิดอิมัลชันได้ดี คือใช้เพียง 0.001 – 0.01 % และอิมัลชันที่เกิดขึ้นมีความเสถียร ไบโอดีสเพอร์แซน (biodispersan) ผลิตจาก *Acinetobacter calcoaceticus* A2 มีลักษณะเป็นเฮเทอโรพอลิแซคคาไรด์ (lipoheteropolysaccharide) ที่มีประจุลบ น้ำหนักโมเลกุล 51,400 ดาลตัน ไลโปแซน (liposan) ผลิตจาก *Candida lipolytica* ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต 83% ได้แก่ กลูโคส กาแลคโตส และกรดกาแลคโตยูโรนิก และโปรตีน 17% อะลาซาน (alasan) ผลิตโดย *Acinetobacter radioresistens* KA53 ประกอบด้วยโปรตีน และ ไขมัน มีประจุเป็นลบ น้ำหนักโมเลกุล 900,000 ดาลตัน (Rosenberg, 1986; Desai และ Desai, 1993; Navon-Venezia และคณะ, 1995)

6. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีลักษณะเป็นอนุภาค (particulate biosurfactants) โดยเป็นส่วนหนึ่งของ extracellular membrane vesicles มาฟอร์มเป็น microemulsion ซึ่งมีส่วนช่วยในการนำพวก

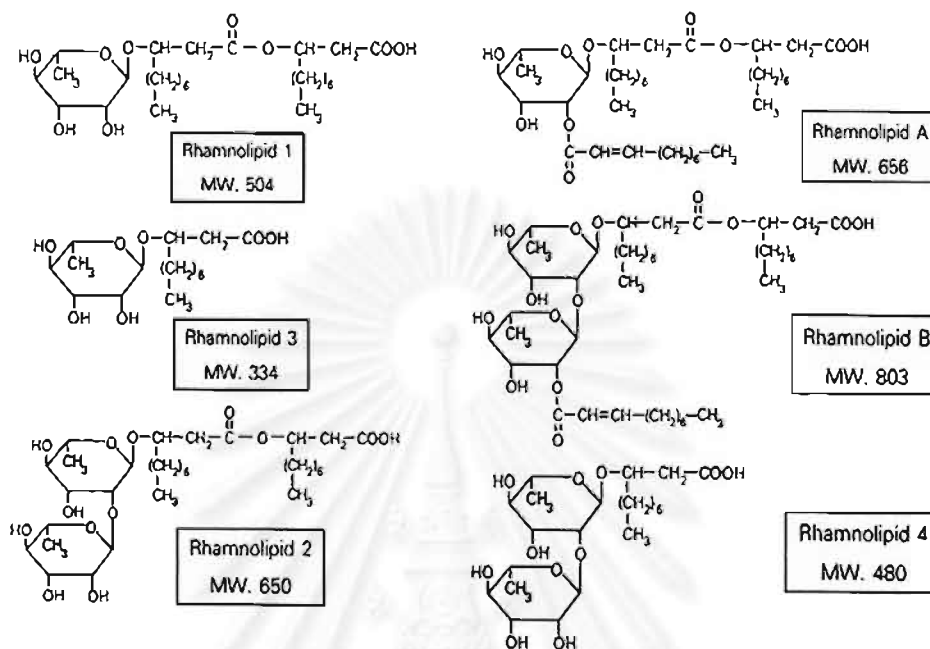
alkane เข้าสู่เซลล์ เช่น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีลักษณะเป็นอนุภาคที่ผลิตโดย *Acinetobacter* sp. H01-N ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 20-50 นาโนเมตร มีความหนาแน่นการลอยตัว (buoyant density) 1.158 g/cm^3 และประกอบด้วยโปรตีน ฟอสโฟลิปิด และไลโปพอลิแซคคาไรด์ membrane vesicle เหมือนกับ outer membrane ของจุลินทรีย์ที่ผลิตขึ้น (Desai และ Banat, 1997)



ตารางที่ 2.1 ตารางลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ (Desai และ Banal, 1997)

ชนิดของสารลดแรงตึงผิว	จุลินทรีย์	Surface tension (mN/m)	CMC (g/l)	Interfacial tension (mN/m)
Glycolipids				
Rhamnolipids	<i>P.aeruginosa</i>	29	0.1-10	0.25
Trehalolipids	<i>Pseudomonas</i> sp.	25-30	4	1
	<i>R.erythropolis</i>	32-36	20	14-17
	<i>N.erythropolis</i>	30	0.3	3.5
Sophorolipids	<i>Mycobacterium</i> sp.	38		1.5
	<i>T.bombicola</i>	33		1.8
	<i>T.apicola</i>	30		0.9
Cellobiolipids	<i>T.petrophilum</i>			
Lipopeptide and lipoprotein	<i>U.zeae,U.maydis</i>			
Peptide-lipid				
Serrawettin	<i>B.licheniformis</i>	27	12-20	0.1-0.3
Viscosin	<i>S.marcescens</i>	28-33		
Surfactin	<i>P.fluorescens</i>	26.5	150	
Subtilisin	<i>B.subtilis</i>	27-32	23-160	1
Gramicidins	<i>B.subtilis</i>			
Polymyxins	<i>B.brevis</i>			
Fatty acids, neutral lipids and phospholipids	<i>B.polymyxa</i>			
Fatty acids				
Neutral lipids	<i>C.lepus</i>	30	150	2
Phospholipids	<i>N.erythropolis</i>	32		3
Polymeric surfactants	<i>T.thiooxidans</i>			
Emulsan	<i>A.calcoaceticus</i>			
Biodispersant	<i>A.calcoaectius</i>			
Mannan lipids protein	<i>C.tropiccalis</i>			
Protein IPA	<i>P.aeruginosa</i>			
Particulate biosurfactants				
Vesicle and fimbriae:	<i>A.calcoaceticus</i>			
Whole cell	Variety of bacteria			

แรมโนลิปิดเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด ไกลโคลิปิด ที่ผลิตได้จาก *Pseudomonas* sp. ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลแรมโนส และ β -hydroxydecanoic acid พบครั้งแรกโดย Bergstrom และคณะในปี 1946 แรมโนลิปิดที่พบผลิตโดย *Pseudomonas pyocyanea* และมีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน อย่างไรก็ตาม Bergstrom และคณะ ยังไม่สามารถหาอัตราส่วนระหว่างน้ำตาลแรมโนส และ β -hydroxydecanoic acid ต่อมาในปี 1949 Jarvis และ Johnson สามารถพิสูจน์ได้ว่ามี β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate ต่อกับน้ำตาลแรมโนส 2 โมเลกุลด้วยพันธะ glycosidic โดยวิเคราะห์แรมโนลิปิดจาก *Pseudomonas aeruginosa* ที่เลี้ยงใน 3% กลีเซอรอลแล้วทำให้บริสุทธิ์ถึงกระนั้นการเชื่อมต่อกันระหว่างน้ำตาลแรมโนสทั้ง 2 โมเลกุลยังไม่กระจ่าง ในปี 1965 Edward และ Hayashi สามารถบอกถึงโครงสร้างของแรมโนลิปิดอย่างละเอียดโดยกล่าวว่า หลังจากเกิด oxidation และ methylation พบ 1,2-linkage คือ rhamnolipid 2 ในรูปที่ 2.4 Hisatsuka และคณะ, 1971 พบว่า rhamnolipid 2 เป็นเพียงชนิดเดียวที่พบในการผลิตโดย *Pseudomonas aeruginosa* S₇B, ที่เลี้ยงใน n-hexadecane และ n-paraffins (C₁₄-C₁₈) (Lang และ Wullbrandt, 1999) พบแรมโนลิปิดชนิดใหม่ คือ L- β -rhamnopyranosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate (rhamnolipid 1 ในรูปที่ 2.4) ที่ผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* KY 4025 ที่เลี้ยงใน 10% n-alkane (Itoh และคณะ, 1971) และในปี 1976 Yamagushi และคณะ พบ rhamnolipid A และ B ซึ่งเกิดจาก acylation ของ β -decanoic acid ตามรูปที่ 2.4 จากรายงานของ Hirayama และ Kato ในปี 1982 พบทั้ง R1 และ R2 ในการเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* 158 ในอาหาร Difco trypticase soya และในปี 1985 Sydaik และคณะ พบว่ามีแรมโนลิปิดที่คล้าย R1 และ R2 แต่มี β -hydroxydecanoyl เพียงหน่วยเดียว (R3 และ R4 ในรูปที่ 2.4i) ที่ผลิตโดย *Pseudomonas* sp. DSM 2874 ในระยะ resting cell ต่อมาพบว่าแรมโนลิปิด มีความยาวของสายโซ่ fatty acid ได้หลากหลายโดยมีจำนวนคาร์บอนอะตอมตั้งแต่ 8-12 จาก *Pseudomonas* sp. (Rendell และคณะ, 1990) และความยาวของโซ่คาร์บอนของสารตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีผลต่อโครงสร้างของแรมโนลิปิด (Lang และ Wullbrandt, 1999) ขณะที่ Deziel และคณะในปี 1999 เลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* 57RP ในอาหารที่มีแมนนิทอลหรือเนฟทารีนเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถพบแรมโนลิปิดที่มีสายโซ่ของ fatty acid ได้หลากหลายตามตารางที่ 2.2



รูปที่ 2.4 แสดงโครงสร้างของแรมโนลิปิด ชนิด R1, R2, R3 R4, A และ B จาก *Pseudomonas aeruginosa* (Lang และ Wullbrandt, 1999)

ตารางที่ 2.2 แสดงชนิดและ [M-H] แรมโนลิปิดที่ผลิตโดย *Pseudomonas aeruginosa* 57RP ที่เลี้ยงบน แมนนิทอล หรือแนฟทารีน 2% (Deziel และคณะ, 1999)

ชนิดแรมโนลิปิด	[M-H]	% สัมพัทธ์ระหว่าง แมนนิทอล และ แนฟทาลีน ที่เหลือ	
		แมนนิทอล	แนฟทาลีน
Rha-C8-C8	447	0.12	-
Rha-Rha-C8-C8	593	0.3	-
Rha-Rha-C8-C10	621	11.30	2.65
Rha-Rha-C10-C8	621	1.84	0.88
Rha-C8-C10	475	2.22	1.20
Rha-C10-C8	475	0.95	0.38
Rha-Rha-C8-C12:1	647	1.53	0.12
Rha-Rha-C12:1-C8	647	0.61	0.74
Rha-Rha-C10-C10	649	56.95	13.11
Rha-C10-C10	503	8.77	2.04
Rha-Rha-C10-C12:1	675	4.52	0.70
Rha-C10-C12:1	529	0.78	-
Rha-C12:1-C10	529	0.78	-
Rha-Rha-C12:1-C10	675	0.09	-
Rha-Rha-C12-C10	677	1.51	-

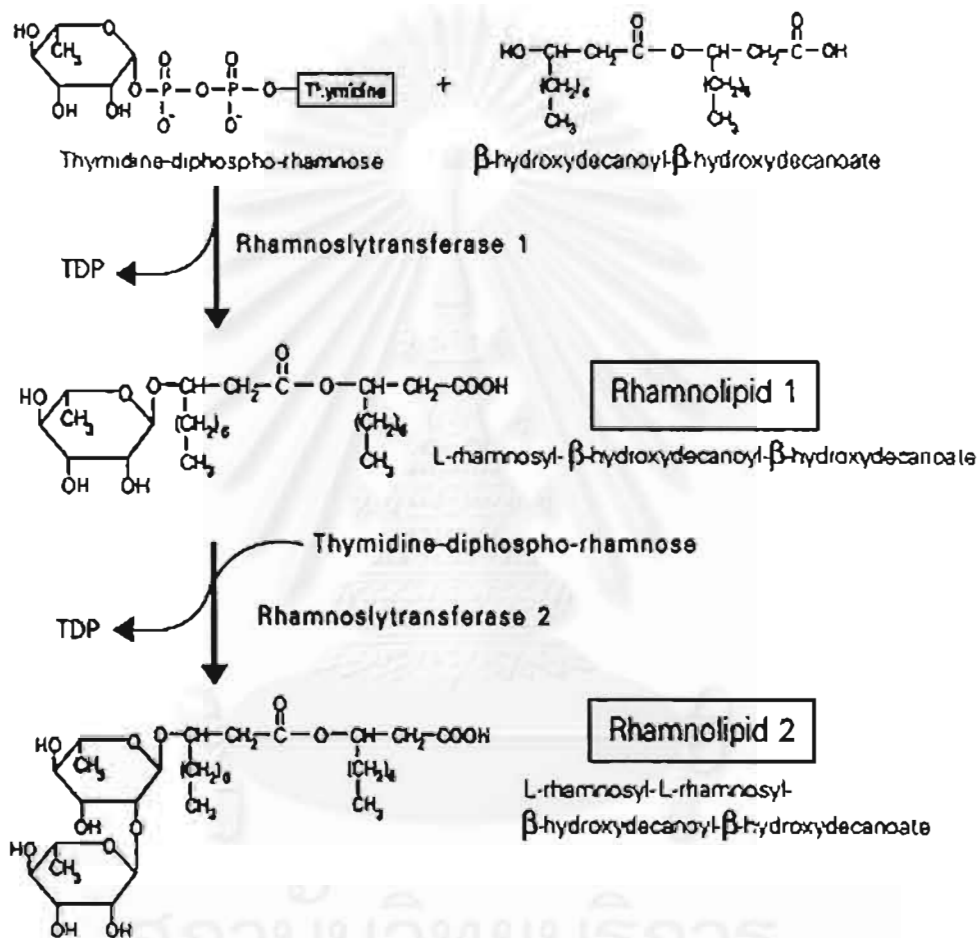
ตารางที่ 2.2(ต่อ) แสดงชนิดและ [M-H] แรมโนลิปิดที่ผลิตโดย *Pseudomonas aeruginosa* 57RP ที่เลี้ยงบน แมนนิทอล หรือแนฟทาซีน 2% (Deziel และคณะ, 1999)

ชนิดแรมโนลิปิด	[M-H]	% สัมพัทธ์ระหว่าง แมนนิทอล และ แนฟทาซีน ที่เหลือ	
		แมนนิทอล	แนฟทาซีน
Rha-Rha-C10-C12	677	4.53	-
Rha-C12-C10	531	0.10	-
Rha-C10-C12	531	0.33	-
Rha-Rha-C12:1-C12	703	0.25	-
Rha-Rha-C10-C14:1	703	0.25	-
Rha-Rha-C12-C12	705	0.10	-
Rha-Rha-C8	451	0.05	3.41
Rha-Rha-C10	479	0.16	52.99
Rha-C8	305	-	1.85
Rha-Rha-C12:1	505	-	0.70
Rha-Rha-C12	507	-	3.33
Rha-C10	333	-	15.49
Rha-C12	361	-	0.41

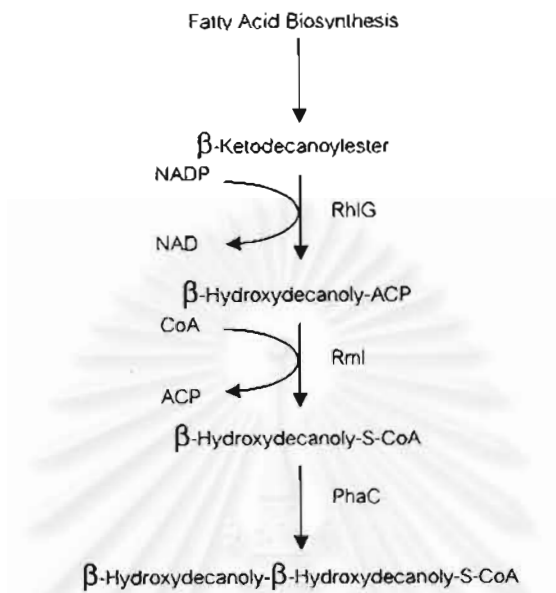
หมายเหตุ CX:Y X หมายถึงจำนวนคาร์บอน Y หมายถึงจำนวนพันธะคู่

การศึกษาการสังเคราะห์แรมโนลิปิดครั้งแรก จากแรมโนลิปิดที่สร้างขึ้นในระยะพักเซลล์ (resting cell) หรือ ระยะ stationary phase โดยแรมโนลิปิดที่ผลิตขึ้นจะปล่อยออกนอกเซลล์ (Hauser และ Karnovsky, 1957;1958) และด้วยการสกัดเอนไซม์ และ ใช้กัมมันตภาพรังสีติดตามสาร precursor ในการสังเคราะห์แรมโนลิปิด ทำให้ Burger และคณะ (1963) สามารถเสนอกระบวนการการสังเคราะห์แรมโนลิปิด ที่ผลิตโดย *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 7700 ตามรูปที่ 2.5 โดยพบว่าปฏิกิริยา glycosyl-transferase สองครั้ง ด้วยเอนไซม์ rhamnosyltransferase 2

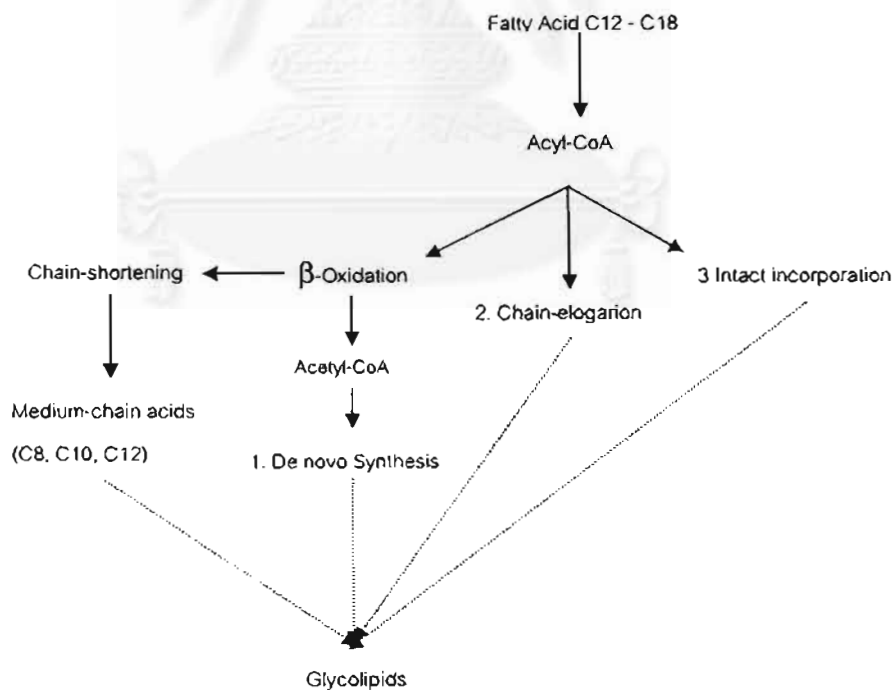
ชนิด ซึ่งพบการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวที่ผนังเซลล์ และ ภายในเซลล์ ในปี 1996 Ochsner และคณะ พบว่าเป็นไปดังที่กล่าวมาแล้วโดยวิจัยใน *Pseudomonas aeruginosa* PG 201



รูปที่ 2.5 กระบวนการสังเคราะห์แรมโนลิปิดชนิด R1 และ R2 ซึ่งผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* (Lang และ Wullbrandt, 1999)



รูปที่ 2.6 แสดงกระบวนการสังเคราะห์ β -Hydroxydecanoyl- β -Hydroxydecanoyl-S-CoA (Maier และ Soberon-Chavez, 2000)



รูปที่ 2.7 แผนภูมิภาพการแสดงวิถีของ fatty acid metabolism ใน จุลินทรีย์ (Kitamoto และคณะ, 1993)

ปฏิกิริยา rhamnosyl-transferase ทั้งสองชั้นตอนถูก catalyze ด้วย เอนไซม์ rhamnosyl-transferase ที่จำเพาะ 2 ชนิด เริ่มจาก deoxy-thymidine-diphospho-L-rhamnose (d-TDP-L-rhamnose) ซึ่งเป็นตัวที่จะให้ rhamnosyl แก่แรมโนลิปิด โดยที่ β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate และ mono หรือ di-rhamnolipid เป็นตัวรับ (Land และ Wullbrandt ,1999) ดังรูปที่ 2.5

เอนไซม์ rhamnosyl-transferase I จะมีสารตั้งต้นที่เป็น β -hydroxy acid เพื่อใช้ในการสังเคราะห์แรมโนลิปิดโดยมีเอนไซม์ RhIG และ NADPH เป็น coenzyme เปลี่ยนกรดไขมันไปเป็น β -hydroxydecanoyl-ACP และ β -hydroxydecanoyl-S-CoA ตามลำดับก่อนที่จะเปลี่ยนไปเป็น β -Hydroxydecanoyl- β -Hydroxydecanoyl-S-CoA ดังรูปที่ 2.6 (Maier และ Soberon-chavez, 2000)

เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีกรดไขมัน (C12 – C18) การเกิดกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของ glycolipids อาจเกิดขึ้นได้หลายวิธีในจุลินทรีย์ เช่น เกิดจากขบวนการ de novo synthesis ที่ผ่าน β -oxidation (Land และ Wullbrandt ,1999) หรือเกิดโดยวิธี chain shortening ของกรดไขมันที่มีสายไฮโดรคาร์บอนที่ยาว แล้วเกิดเป็น medium chain acids (C8, C10, C12) หรือ เกิดโดยวิธี Intact incorporation ของ กรดไขมันโดยตรงกับโมเลกุลของน้ำตาล (Kitamoto และคณะ, 1993) ดังรูปที่ 2.7

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Desai และ Banat, 1997) ได้แก่

1. แหล่งคาร์บอน แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแบ่งออกได้เป็นชนิดที่สามารถละลายน้ำ และ ไม่สามารถละลายน้ำ แหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำที่นิยมใช้ในการผลิตแรมโนลิปิดจาก *Pseudomonas* sp. เช่น กลีเซอรอล กลูโคส แมนนิทอล และ เอทานอล เป็นต้น และตัวอย่างแหล่งคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำ ได้แก่ n-alkane และพวกน้ำมันพืชต่างๆ เช่น น้ำมันมะกอก น้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันถั่วเหลือง และ น้ำมันปาล์ม แม้ว่าความยาวของสายกรดไขมันในสับสเตรทไม่เท่ากัน ก็ไม่มีผลต่อความยาวของสายกรดไขมันในส่วนที่เป็นไขมันในสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ แต่ในบางสายพันธุ์ก็มีรายงานว่าเมื่อแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน จะทำให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีองค์ประกอบที่ต่างกัน
2. แหล่งไนโตรเจน พบว่าการผลิตแรมโนลิปิดจาก *Pseudomonas* sp. จะใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นไนเตรทเนื่องจากจะให้ผลผลิตสูงสุด และการที่จำกัดปริมาณแหล่งไนโตรเจนในการผลิตแรมโนลิปิด เพราะการสังเคราะห์แรมโนลิปิดจะเกิดในระยะ Stationary phase ซึ่งการจำกัดปริมาณแหล่งไนโตรเจนนอกจากจะเป็นการควบคุมไม่มีการผลิตได้มากแล้ว ยังพบว่าสามารถเปลี่ยนองค์ประกอบ

ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยจะมีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมากเมื่อมีอัตราส่วน C/N เท่ากับ 16:1 ถึง 18:1 และพบว่าไม่มีการผลิตเมื่อมีอัตราส่วน C/N ต่ำกว่า 11:1 (Guerra-Santos และคณะ, 1984; 1986) ปริมาณแหล่งไนโตรเจนจะบอกถึง biomass yield ในขณะที่ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ไม่ชอบน้ำจะสัมพันธ์กับปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Hommel และคณะ, 1987)

3. แหล่งเกลือแร่และวิตามิน เกลือแร่และวิตามินเป็นปัจจัยที่จุลินทรีย์ต้องการเพื่อการเจริญจากแหล่งคาร์บอน และ แหล่งไนโตรเจน นอกจากนี้ยังมีผลกระทบหรือยับยั้งการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์และชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เกลือแร่ที่มีความสำคัญต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้แก่ แมงกานีส แมกนีเซียม เหล็ก และ ฟอสฟอรัส (Fiechter, 1992; Kim และคณะ, 1997; Sen, 1997) ในการผลิตแรมโนลิปิดที่ได้จาก *Pseudomonas aeruginosa* DSM 2659 ถ้าควบคุมปริมาณ เหล็ก ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม แคลเซียม โปตัสเซียม และ โซเดียม ให้เหมาะสมจะช่วยเพิ่มปริมาณการผลิตแรมโนลิปิด (Guerra-Santos และคณะ, 1984; 1986)

4. ปัจจัยทางกายภาพ เป็นอีกปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งปัจจัยทางกายภาพที่สำคัญได้แก่ ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง อุณหภูมิ อัตราการกวน และอัตราการให้อากาศ โดยจะส่งผลต่ออัตราการเจริญ และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ในการผลิตแรมโนลิปิดพบว่าถ้าค่าความเป็นกรดเป็นด่างอยู่ระหว่าง 6.0-6.5 จะให้การผลิตสูงสุด แต่ถ้าค่าความเป็นกรดเป็นด่างมากกว่า 7 การผลิตจะลดลงอย่างชัดเจน (Guerra-Santos และคณะ, 1984)

Pseudomonas sp. แต่ละสายพันธุ์สามารถผลิตแรมโนลิปิดได้หลากหลายชนิดที่แตกต่างกัน และสามารถผลิตได้มากกว่า 1 ชนิดจากสายพันธุ์เดียวตามรายงานของ ดังแสดงในตารางที่ 2.3 จะเปรียบเทียบชนิดของสารแรมโนลิปิดที่ผลิตได้ในสายพันธุ์ต่างๆ ของ *Pseudomonas* sp. และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแสดงค่า CMC และ ค่าแรงตึงผิวที่ลดลงทั้ง surface tension และ interfacial tension ของสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิดที่ผลิตได้



ตารางที่ 2.3 เปรียบเทียบแรมโนลิปิดที่ผลิตได้ใน *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเลี้ยงในอุณหภูมิระหว่าง 25-40 °C และคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิว (Lang และ Wullbrandt, 1999)

Strain	Product	Surface tension (mN/m)	Interfacial tension (mN/m)	CMC (mg/l)
<i>P.aeruginosa</i> S,B ₁	R2	40	-	50
<i>P.sp</i> DSM 2874	R1+R2	26	<1 ^a	20
<i>P.sp</i> DSM 2874	R1-R4	28	<1 ^a	20
<i>P.sp</i> DSM 2874	R1	26	4 ₁	20
<i>P.sp</i> DSM 2874	R2	27	<1 ₁	10
<i>P.sp</i> DSM 2874	R3	25	<1 ₁	200
<i>P.sp</i> DSM 2874	R4	30	<1 ₁	200
<i>P.aeruginosa</i> 44T1	R1	25	0.2 ₁	11
<i>P.aeruginosa</i> 44T1	R2	25	1 ₁	11
<i>P.aeruginosa</i> BPO 100	R B Na salt	29	3.5 ^c	260
<i>P.aeruginosa</i> BPO 100	RB-Me	31	0.1 ^c	400

หมายเหตุ a, b และ c หมายถึงสารที่ใช้วัด Interfacial tension ได้แก่ n-C₁₆, kerosene และ n-C₈ ตามลำดับ Me หมายถึง methyl ester โดยข้อมูลจากตารางที่ 2.6 อ้างจากงานวิจัยของ Hisatsuka และคณะ, 1971; Syldak และคณะ, 1985; Parra และคณะ, 1989; Ishigami และคณะ, 1993

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *Pseudomonas aeruginosa* สามารถลดแรงตึงผิวได้ดี ทำให้เกิดอิมัลชันที่เสถียร เป็นสารทำให้เกิดฟอง โดยทั่วไปแล้วจะไม่เป็นพิษ ไม่มีอันตราย และยังย่อยสลายได้ง่ายทางชีวภาพ เนื่องจากมีความหลากหลาย จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำไปสู่การผลิตแบบขยายส่วน มีโดยลักษณะเฉพาะ สามารถผลิตได้จากแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูก จึงเป็นข้อได้เปรียบกว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมี จากการที่แรมโนลิปิดมีคุณสมบัติประโยชน์มากมาย ทำให้เป็นที่ต้องการและมีการเพิ่มปริมาณการผลิตแรมโนลิปิดเพื่อใช้ทางอุตสาหกรรมเป็นจำนวนมาก ตัวอย่างเช่น ในปัจจุบันบริษัท Jeneil Biosurfactant ได้ทำการผลิตสาร แรมโนลิปิด RL ชนิดต่างๆขึ้น มีการประมาณราคาแรมโนลิปิดโดยมีราคา 5-20 เหรียญสหรัฐต่อ 1 กิโลกรัม และมีปริมาณการผลิต 20 - 100 ต่อกิโลกรัม (Lang และ Wullbrandt, 1999) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ก็นับว่ายังแพงกว่าอยู่มาก ตัวอย่างเช่น ethoxylate หรือ alkyl polyglycoside มีราคาประมาณ 1-3 เหรียญสหรัฐต่อ 1 กิโลกรัม ถึงกระนั้นก็ยังมีความพยายามที่จะผลิตแรมโนลิปิดให้ได้มากขึ้น และมีราคาที่ถูกลง โดยการพัฒนาปรับปรุงกระบวนการผลิตและใช้เทคนิคทางวิศวกรรม



บทที่ 3
วิธีการวิจัย

1. การติดตามการเจริญและผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน

1.1 เตรียมหัวเชื้อโดยถ่าย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 บนอาหารแข็งนิวเตรียนท์ในหลอดเลี้ยง บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายลงอาหารเหลวกำหนดสูตรซึ่งประกอบด้วยเกลือแร่และวิตามินบีรวม แหล่งไนโตรเจนในที่นี้ คือแอมโมเนียมไนเตรทปริมาณ 0.14 % (w/v) และมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนปริมาณ 2 % (w/v) ปริมาตร 50 มล. ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. แล้วบ่มบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 + 2 °C) เป็นเวลา 16 ชั่วโมง มีค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ประมาณ 1 และใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิต

1.2 ถ่ายหัวเชื้อ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 จากข้อ 1.1 ปริมาณ 4% (v/v) ลงในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำมันมะพร้าว น้ำมันมะกอก น้ำมันปาล์ม ปริมาณ 2% (v/v) และกรดไขมันอิสระ 6 ชนิด คือ กรดไขมันโอเลอิก (C18:1) กรดไขมันไลโนเลอิก (C18:2) กรดไขมันสเตียริก (C18) กรดปาล์มมิติก (C16) กรดไมริสติก (C14) และกรดไขมันลอริก (C12) ปริมาณ 2% (w/v) บ่มที่อุณหภูมิห้องเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ วันเป็นเวลา 7 วัน

1.3 การวัดค่าแรงตึงผิว (surface tension)

นำส่วนน้ำใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออก โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ 4 °C ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที วัดค่าแรงตึงผิวโดยวิธี Du Nuoy ring method ด้วยเครื่องวัดค่าแรงตึงผิว (Ring tensiometer) และเพื่อเห็นความแตกต่างของค่าแรงตึงผิวชัดเจน จึงนำค่าแรงตึงผิวที่ชั่วโมงที่ 0 มาลบหักกับเวลาต่างๆ ที่ทำการศึกษาเป็น Δ ค่าแรงตึงผิว σ_t

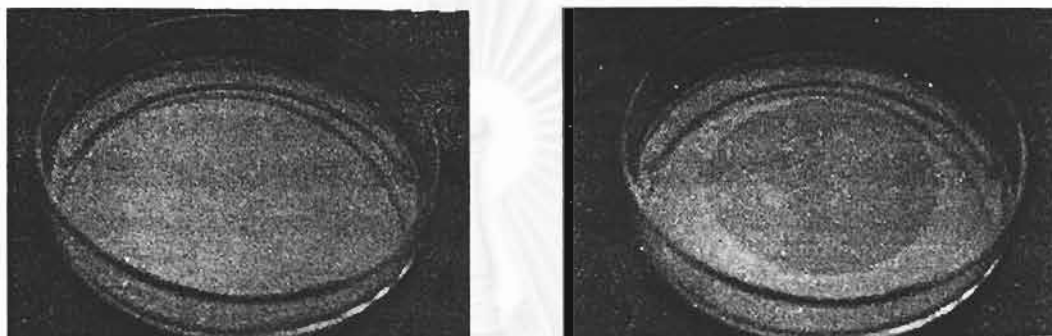
1.4 การวัดการกระจายตัวของน้ำมัน (Oil displacement test) ตามวิธีของ Morikawa และคณะ (1993)

ตวงน้ำ 40 มล. ลงในจานแก้วเส้นผ่านศูนย์กลาง 150 มม. หยดน้ำมันดิบปริมาตร 15 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าของน้ำจะเกิดเป็นแผ่นฟิล์มแผ่ทั่วผิวน้ำ จากนั้นหยดตัวอย่างที่ได้จากการเจือจางด้วยด้วย 50 มิลลิโมลาร์ของทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 8.0

ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นฟิล์มของน้ำมันดิบ สังเกตวงกลมของการกระจายตัวของน้ำมันดิบ
ดังรูปที่

ก. ก่อนการกระจายน้ำมัน

ข. หลังจากหยดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ



รูปที่ 3.1 แสดงวิธีการกระจายน้ำ (Morikawa และคณะ, 1993)

การวัดความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางเพื่อนำไปคำนวณหาพื้นที่ของการกระจายน้ำมันดังนี้

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

r: รัศมีของพื้นที่วงกลมของการกระจายน้ำมัน

หมายเหตุ ตัวอย่างที่ใช้วัดการกระจายตัวของน้ำมันให้มีความเจือจาง (dilution factor) เท่ากัน

เนื่องจากค่าการกระจายตัวของน้ำมันไม่สัมพันธ์กับค่าความเจือจาง

1.5 การวัดการเพิ่มจำนวนของเชื้อ โดยการหาน้ำหนักแห้ง

นำน้ำเลี้ยงเชื้อ 40 มล. มาปั่นแยกเซลล์ออกโดยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที 20 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นแล้วปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง นำเซลล์ที่แยกได้ใส่ถ้วยฟอริยที่ทราบน้ำหนักแห้งแน่นอนไปอบที่ 60 °C 12 ชั่วโมง นำออกมาพักในโถเก็บความชื้นจนเย็นแล้วนำไปชั่งด้วยเครื่องชั่งละเอียดจนได้น้ำหนักคงที่ คำนวณน้ำหนักเซลล์แห้งมีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

1.6 การหาปริมาณน้ำตาลแรมโนสตามวิธีของ Dische และ Shettles (1948)

นำตัวอย่างมาเจือจางในความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 1 มล. ผสมกับกรดซัลฟิวริกที่มีอัตราส่วน 6 ต่อ น้ำกลั่น 1 ส่วนในปริมาตร 4.5 มล. (ก่อนนำมาผสมกันนำทั้งตัวอย่างและกรดซัลฟิวริกมาแช่ในอ่างน้ำแข็ง) เขย่าในเครื่องผสมสารแล้วต้มในน้ำเดือด 10 นาที จากนั้นเติม ซีสเทอีน(3%) ปริมาตร 0.2 มล. บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืนแล้ววัดค่าดูดกลืนแสงที่ 396 นาโนเมตร แล้วลบด้วยค่าดูดกลืนแสงที่ 427 นาโนเมตร แล้วคำนวณหาค่าน้ำตาลแรมโนสเทียบกับกราฟมาตรฐาน

1.7 วิเคราะห์ส่วนไขมันของสารที่ผลิตได้โดยทำ methyl ester ด้วย methanolic HCl ตามวิธีของ Jenkins และคณะ (2001)

นำน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ปริมาณ 1 มิลลิลิตร มาทำให้แห้งด้วยเครื่อง centrivap แล้วจึงเติมด้วย 5% methanolic HCl 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันปิดฝาหลอดให้สนิท แล้วบ่มในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 70 °C นาน 16 ชั่วโมง แช่น้ำเย็นจนเท่ากับอุณหภูมิห้อง แล้วเติม 6% K₂CO₃ เขย่าแล้วเติม เฮกเซน 2 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงดูดชั้นเฮกเซน(ชั้นบน) ไปวิเคราะห์ส่วนไขมันด้วย GC-MS

2. ทำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์ และวิเคราะห์องค์ประกอบสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้ในน้ำมันปาล์ม ตามข้อ 7

2.1 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพตามภาวะที่เหมาะสม

เตรียมหัวเชื้อตามข้อ 1.1 ถ่ายหัวเชื้อที่มีค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 1 ที่ 660 นาโนเมตร 8%(v/v) ลงในอาหารเหลวกำหนดสูตร 10 ลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 + 2 °C) เก็บน้ำเลี้ยงเชื้อทุกๆ 6 ชั่วโมง จนครบ 72 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นแยกเซลล์ที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ได้ส่วนน้ำใสที่ปลอดเซลล์

2.2 ทำให้น้ำใสที่ปลอดเซลล์มาตกตะกอนด้วย 6 N HCl จนมีความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ

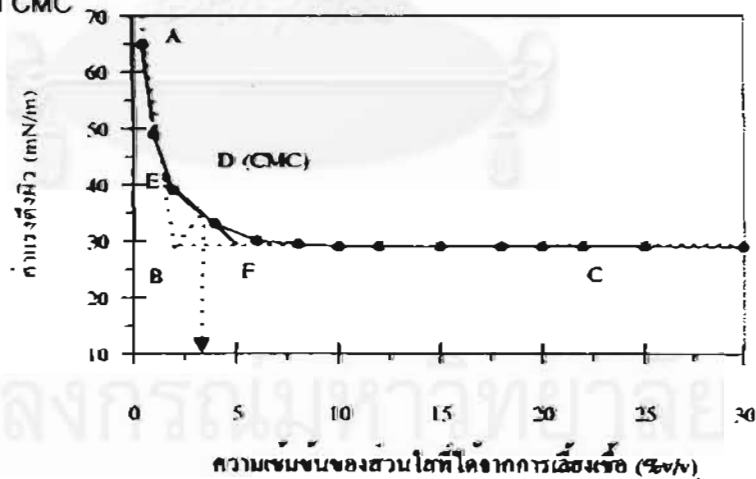
2 ทั้งข้ามคืนที่ 4 °C แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่ 10 °C อัตราเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที จากนั้นนำตะกอนที่ได้ล้างในน้ำกลั่นที่มีความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 2 แล้วปั่นเหวี่ยง

ด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่ 10°C อัตราเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาทีทำซ้ำ 2 ครั้ง (Cooper และคณะ, 1981) แล้วนำตะกอนมาละลายในทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ที่มีความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 8 จนตะกอนละลายหมดพอดี

นำมาสกัดโดยใช้กรวยแยกด้วยคลอโรฟอร์มและเอทานอลด้วยอัตราส่วน 2 ต่อ 1 เขย่าเป็นเวลา 3 นาที ทิ้งไว้ให้แยกชั้นจะเห็นได้ว่าชั้นล่างจะเป็นชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์ไซชั้นล่าง เก็บไว้ สกัดซ้ำ 3 ครั้ง นำตัวทำละลายอินทรีย์ที่สกัดมากำจัดน้ำด้วยโซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำโดยใสโซเดียมซัลเฟตจนกว่าจะเห็นตะกอนสีขาว (น้ำออกจากตัวทำละลายอินทรีย์หมด) กรองแยกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต นำตัวทำละลายอินทรีย์ที่ปราศจากน้ำมาแยกออกด้วยเครื่องอีแวปอเรเตอร์ ควบคุมอุณหภูมิที่ 40°C ได้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วน ซึ่งมีสีน้ำตาลไหม้ เหนียวหนืด

2.3 หาค่า Critical Micelle Concentration (CMC) ตามวิธี Sheppard และ Mulligan (1987)

โดยนำสารลดแรงตึงผิวที่บริสุทธิ์บางส่วนซึ่งผลิตได้ 100 มก. ละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์มีความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 8 แล้วนำมาเจือจางตั้งแต่ 0.00001 – 10 มก.ต่อมล. นำแต่ละความเข้มข้นมาวัดค่าแรงตึงผิวแล้วมาเขียนกราฟระหว่าง \log ของความเข้มข้น และค่าแรงตึงผิวหาจุด CMC



รูปที่ 3.2 วิธีการหาค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ โดยการวัดค่าแรงตึงผิวของส่วนน้ำที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อหลังจากทำการเจือจางแล้ว

การหาค่า CMC ได้จากการคำนวณหาเส้นสัมผัส AB, BC และหาค่าจุดตัด B ด้วยสมการการถดถอยเชิงเส้น (Linear regression) เมื่อกำหนดให้

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

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

เมื่อเกิดจุดตัด B จะได้

$$\begin{aligned} b_1x_1 + a_1 &= b_2x_2 + a_2 && \text{เมื่อ } y_1 = y_2 \\ b_1x_1 - b_2x_2 &= a_2 - a_1 \end{aligned}$$

2.4 การตรวจสอบชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธี analytical TLC

การวิเคราะห์แรมโนลิปิดด้วยสารละลายโมลิส (Arino และคณะ, 1996) โดยนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนมา 40 มก. ละลายในคลอโรฟอร์ม 0.5 มล. Spot ลงบนแผ่น TLC 1 ไมโครลิตรนำไปจุ่มในแท่งที่อิมมัวไปด้วยไอของเฟสเคลื่อนที่ซึ่งประกอบด้วย คลอโรฟอร์ม 65 ส่วน, เมทานอล 25 ส่วน และ น้ำ 4 ส่วน เมื่อเฟสเคลื่อนที่เคลื่อนบนแผ่น TLC จนเกือบสุด(เหลือขอบประมาณ 0.5 มม.) นำออกมาแล้วทิ้งไว้ให้แห้งใน ตู้ความดันด้วยสารละลายโมลิส(ภาคผนวกข)ทิ้งไว้สักพักจะปรากฏจุดสีเขียวถ้าพบแรมโนลิปิด

2.5 การทำบริสุทธิ์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวิธีโครมาโตกราฟี

2.5.1 ทำให้บริสุทธิ์ด้วยแผ่น preparative TLC

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก 2.2 ปริมาณ 25 มก. ละลายในคลอโรฟอร์ม 0.5 มล. นำมา spot เป็นแถบยาบน preparative TLC silica gel 60 จนหมด ทิ้งไว้ให้แห้ง โดยแผ่น TLC มีขนาด 20 x 20 ซม. หนา 2 มม. แล้วนำไปจุ่มในแท่งที่อิมมัวไปด้วยไอของเฟสเคลื่อนที่ซึ่งประกอบด้วย คลอโรฟอร์ม 65 ส่วน, เมทานอล 25 ส่วน และ น้ำ 4 ส่วน เมื่อเฟสเคลื่อนที่เคลื่อนบนแผ่น TLC จนเกือบสุด(เหลือขอบประมาณ 0.5 มม.) นำออกมาแล้วทิ้งไว้ให้แห้งในตู้ความดันจากนั้นนำมาอังกับไอที่อิมมัวของไอโอดีนเป็นเวลา 15 นาที จะเห็นแถบยาสีน้ำตาลเกิดขึ้น(ใช้ดินสอขีดแถบสีน้ำตาลที่เกิดขึ้น)คำนวณค่า R_f โดยวัดระยะทางของแถบที่เกิดสีน้ำตาลแล้วหารด้วยระยะทางที่เฟสเคลื่อนที่เคลื่อนที่บนแผ่น TLC ทิ้งไว้ 1 วันเพื่อให้ไอโอดีนระเหยออกจากแผ่น TLC เพื่อที่จะได้ปริมาณมากพอในการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นต่อไปจึงต้องเตรียมแผ่น TLC ทั้งหมด 5 แผ่น (ปริมาณสาร

ลดแรงดึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนที่ใช้เท่ากับ 125 มก.) ให้หมดแล้วดูดแถบที่ขีดไว้บดให้ละเอียด (เกิดแถบสีน้ำตาลบนแผ่น TLC 6 แถบ) นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์โดย

แถบที่ 1 และ 2 จากด้านล่างนำมาสกัดด้วยคลอโรฟอร์มและเมทานอล ด้วยอัตราส่วน 1 ต่อ 3

แถบที่ 3 นำมาสกัดด้วยคลอโรฟอร์มและเมทานอล อัตราส่วน 1 ต่อ 2

แถบที่ 4 นำมาสกัดด้วยคลอโรฟอร์มและเมทานอล อัตราส่วน 1 ต่อ 1

แถบที่ 5 และ 6 นำมาสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม

ซึ่งการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ดังกล่าวต้องทำซ้ำ 3-4 ครั้งหรือว่าสารลดแรงดึงผิวชีวภาพจะหมด โดยนำมาวัดค่าการกระจายน้ำมันตามข้อ 1.4 นำสารสกัดของแต่ละแถบมาระเหยแห้งด้วยเครื่อง evaporator นำส่วนระเหยแห้งที่ได้ไปชั่งน้ำหนัก

2.5.2 การบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ silica gel 60

นำผง silica gel 60 ประมาณ 60 กรัม มาบรรจุลงคอลัมน์โดยผสมตัวทำละลายอินทรีย์ตาม อัตราส่วนแรกที่จะใช้ชะคอลัมน์ดังนี้

แถบที่ 1, 2 และ 3 ชะด้วยคลอโรฟอร์ม 80 % ในเมทานอลซึ่งผสมด้วย 0.5 % กรดอะซิติก แล้วชะต่อด้วยคลอโรฟอร์ม 60, 40 และ 20 % ตามลำดับ โดยมีปริมาณในแต่ละอัตราส่วนเท่ากับ 200 มล.

แถบที่ 4 ชะด้วยคลอโรฟอร์ม 100 % ในเมทานอลซึ่งผสมด้วย 0.5 % กรดอะซิติก แล้วชะต่อด้วยคลอโรฟอร์ม 80, 60 และ 40 % ตามลำดับ โดยมีปริมาณในแต่ละอัตราส่วนเท่ากับ 200 มล.

แถบที่ 5 ชะด้วยคลอโรฟอร์ม 100 % ในเมทานอลซึ่งผสมด้วย 0.5 % กรดอะซิติก แล้วชะต่อด้วยคลอโรฟอร์ม 90, 80, 60 และ 40 % ตามลำดับ โดยมีปริมาณในแต่ละอัตราส่วนเท่ากับ 200 มล.

แถบที่ 6 ชะด้วยคลอโรฟอร์ม 100 % ในเมทานอลซึ่งผสมด้วย 0.5 % กรดอะซิติก แล้วชะต่อด้วยคลอโรฟอร์ม 90, 80 และ 60 % ตามลำดับ โดยมีปริมาณในแต่ละอัตราส่วนเท่ากับ 200 มล.

โดยเก็บ fraction ละ ประมาณ 50 มล. ทั้งไว้ 2-3 วันในตู้เย็น ปริมาณจะลดลง 2 ใน 3 แล้ว นำแต่ละ fraction ที่ได้มา spot ลง analytic TLC spot ละประมาณ 2-3 ไมโครลิตร โดยทำตามข้อ 2.5.1 ซึ่งจะเห็นได้ว่าในแต่ละ fraction น่าจะเป็นสารชนิดเดียวกันหรือไม่ด้วยหลักการที่ว่าสารชนิดเดียวกันเคลื่อนที่บนเฟสคงที่และเฟสเคลื่อนที่เดียวกันต้องมีค่า R_f และนำแต่ละ fraction มาวัดค่าการกระจายน้ำมันตามข้อ 1.4 นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟระหว่าง จำนวน fraction และ พื้นที่ของการ

กระจายน้ำมัน จากผลบน analytic TLC และ กราฟระหว่างค่าการกระจายน้ำมันและจำนวน fraction จะช่วยในการตัดสินใจว่าจะนำ fraction ไตรวมกันได้ เมื่อเทรวมกันแล้วนำไประเหยแห้งในเครื่อง evaporator นำส่วนระเหยแห้งไปวิเคราะห์ด้วย HPLC ต่อไป

2.5.3 การตรวจวิเคราะห์น้ำตาลแรมโนสด้วยวิธีสแกนยูวี-วิสิเบิลสเปกตรัม

เตรียมน้ำตาลที่ผลิตใน *Pseudomonas* sp. ได้แก่ กลูโคส กาแลคโตส แมนโนส และแรมโนส (Williams และ Wimpenny, 1978) ให้มีความเข้มข้น 5 $\mu\text{g/ml}$ และนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนจากข้อ 2.2 ความเข้มข้น 5 มก. ต่อ มล. และ ตัวอย่างจากแถบที่ 5 ที่ได้จาก silica gel column (F5) จากข้อ 2.5.5 ความเข้มข้น 5 มก. ต่อ มล. มาวิเคราะห์ปริมาณแรมโนสตามวิธีของ Dische และ Shettles ในปี 1948 จากนั้นสแกนหาค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นตั้งแต่ 200 – 700 nm แล้วนำสเปกตรัมที่ได้มาเปรียบเทียบระหว่างน้ำตาลชนิดต่างๆที่ *Pseudomonas* sp. ผลิตได้

2.5.4 การทำบริสุทธิ์โดยวิธี HPLC

นำส่วนที่ทำให้บริสุทธิ์จากคอลัมน์ silica gel แถบที่ 1 ละลายด้วย 10% อะซิโตไนโตรที่ 3 มล. แถบที่ 2 และ 3 ละลายใน 80% อะซิโตไนโตรที่ 3 มล. ส่วนแถบที่ 4, 5 และ 6 ละลายใน 100% อะซิโตไนโตรที่ 3 มล. นำตัวอย่างที่ได้วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC มีคอลัมน์เป็น Lichrocart C_{18} endcapped (reverse phase) ขนาด 250 x 4 มม. ะด้วยลิเนียร์เกรเดียนท์ มีสารละลาย A (10% อะซิโตไนโตรที่ และ 0.1% กรดไตรฟลูออโรอะซิติก) และ สารละลาย B (100% อะซิโตรไนโตรที่ และ 0.1% กรดไตรฟลูออโรอะซิติก) ด้วยอัตราการไหล 0.6 มล.ต่อนาที

ตัวอย่างจากแถบที่ 1 มีโปรแกรมของลิเนียร์เกรเดียนท์ชะด้วยสารละลาย A เป็น 5 นาที เพิ่ม %สารละลาย B เป็น 50% ในเวลา 10 นาที(5%B/min) เพิ่มเป็น 100% สารละลาย B ในเวลา 7 นาที(8%B/min)

ตัวอย่างจากแถบที่ 2 เริ่มต้นด้วยชะ 30%ของสารละลาย B เป็นเวลา 5 นาที เพิ่ม % สารละลาย Bเป็น 60% ในเวลา 15 นาที(2%B/min) เพิ่มเป็น 100% สารละลาย B ในเวลา 4 นาที(10%B/min)

ตัวอย่างจากแถบที่ 3 เริ่มต้นด้วยชะ 60%ของสารละลาย B เป็นเวลา 5 นาที เพิ่ม % สารละลาย Bเป็น 70% ในเวลา 10 นาที(0.5%B/min) เพิ่มเป็น 100% สารละลาย B ในเวลา 5 นาที(6%B/min)

ตัวอย่างจากแถบที่ 4 เริ่มต้นด้วยชะ 50%ของสารละลาย A เป็นเวลา 5 นาที เพิ่ม % สารละลาย Bเป็น 65% ในเวลา 15 นาที(1%B/min) เพิ่มเป็น 100% สารละลาย B ในเวลา 3.5 นาที(10%B/min)

ตัวอย่างจากแถบที่ 5 และ6 เริ่มต้นด้วยชะ 60%ของสารละลาย A เป็นเวลา 5 นาที เพิ่ม % สารละลาย Bเป็น 75% ในเวลา 20 นาที(1%B/min) เพิ่มเป็น 100% สารละลาย B ในเวลา 7 นาที(2%B/min)

ตรวจผลด้วย UV detector ที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร เก็บแต่ peak ละไประเหยแห้งด้วยเครื่อง centrifuge evaporator เต็ม 1 โมล ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 8 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เขย่าด้วยเครื่องผสมสารนาน 5 นาทีแล้วนำไปวัดค่าการกระจายน้ำมันตามข้อ 1.4 นำตัวอย่างที่สกัดได้จากคอลัมน์ silica gel ไปฉีด HPLC อีกครั้งเพื่อเก็บ peak ที่มีค่าการกระจายน้ำมันมากไปวิเคราะห์ต่อไป

2.5.5 การวิเคราะห์โครงสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวิธี LC-MS

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี HPLC โดยเลือกตัวอย่าง ณ RT ที่มีค่าการกระจายน้ำมันมาก (ประมาณ 121 ตร.ซม.) และมีปริมาณมากพอโดยเทียบจากขนาดและความสูงHPLC พิก จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี HPLC จนมีปริมาณมากพอที่จะวิเคราะห์ด้วย LC-MS

2.5.6 การวิเคราะห์องค์ประกอบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ กับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ในน้ำมันปาล์มด้วย TLC

นำน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ตามข้อ 1.2 มา 10 มิลลิลิตรไประเหยแห้งจนเหลือ 1 มิลลิลิตร แล้วสกัดด้วยคลอโรฟอร์มและเอทานอลด้วยอัตราส่วน 2:1 แล้วนำส่วนของตัวทำละลายไประเหยแห้ง ละลายในคลอโรฟอร์ม 100 ไมโครลิตร Spot ลงบนแผ่น TLC 5 และ 10 ไมโครลิตรนำไป

จุ่มในแท่งที่อิมมัลชันด้วยไอของเฟสเคลื่อนที่ซึ่งประกอบด้วย คลอโรฟอร์ม 65 ส่วน, เมทานอล 25 ส่วน และ น้ำ 4 ส่วน เมื่อเฟสเคลื่อนที่เคลื่อนบนแผ่น TCL จนเกือบสุด(เหลือขอบประมาณ 0.5 มม.) นำออกมาแล้วทิ้งไว้ให้แห้งในตู้ควั่น แล้วอังกกับไอไอโอดีนประมาณ 15 - 20 นาที จนเกิดจุดสีน้ำตาล ทำเครื่องหมาย วัดค่า R_f และทิ้งไว้ในตู้ควั่นจนไอโอดีนระเหยไปหมด แล้วจึงพ่นด้วยสารละลายโมลิสทิ้งไว้สักพักจะปรากฏจุดสีเขียวถ้าพบแรมโนลิปิด

2.6 การหาค่าอิมัลชัน อินเด็กซ์

นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์จากข้อ 3.6.1 และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วน จาก 3.6.2 ปริมาณ 10 มก.ต่อมล.ใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์มีความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 8 ปริมาตร 4 มล.ใส่หลอดฝาเกลียวขนาด 15 มล.แล้วผสมกับสารละลายอินทรีย์ได้แก่ ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซีเตต ไซโคลเฮกเซน เฮกเซน โทลูอิน ไซซีน เอทิลเมทิลคีโตน คลอโรฟอร์ม และเบนซิน และน้ำมันได้แก่ น้ำมันมะกอก, ฟาราฟิน ออย, น้ำมันก๊าด, น้ำมันปาล์ม และ น้ำมันถั่วเหลือง ปริมาตร 6 มล. ผสมด้วยเครื่องผสมสารนาน 5 นาที วัดอิมัลชัน อินเด็กซ์ที่เวลา 1, 7, 30 และ 90 วัน การวัดอิมัลชัน อินเด็กซ์ตามวิธีของ Patel และDesai,1993 ทำได้โดยหาอัตราส่วนระหว่างอิมัลชันซึ่งจะมีลักษณะเป็นครีมขาวและความสูงของของเหลวทั้งหมด จากการคำนวณดังนี้

$$\text{emulsion index} = \frac{h_e}{h_s} \times 100$$

h_e = ความสูงของอิมัลชัน

h_s = ความสูงของของเหลวทั้งหมด



1. การติดตามการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41.

Pseudomonas sp. สายพันธุ์ A41. ซึ่งแยกได้จากดินในบริเวณคอนหอยหลอด จังหวัดสมุทรสงคราม โดย อารีย์ กังจีน ปี 2542 เมื่อทดลองเลี้ยงในอาหารเหลวกำหนดสูตร ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำมันมะพร้าว น้ำมันปาล์ม น้ำมันมะกอก และกรดไขมันอีก 6 ชนิด เพื่อศึกษาเปรียบเทียบผลของการเจริญ วิเคราะห์ค่าแรงตึงผิว การกระจายน้ำมัน และปริมาณน้ำตาลแรมโนสในทุกๆ 12 ชั่วโมง จนถึง 168 ชั่วโมง ผลดังแสดงตารางที่ 4.1-4.9 และรูปที่ 4.1-4.9 ตามลำดับ และสรุปเปรียบเทียบผลการทดลองในตารางที่ 4.10

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas* sp. A41 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อจะมีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด 10.43 กรัม/ลิตร มี lag phase ที่สั้น log phase จะอยู่ในช่วง 12 – 48 ชั่วโมงและ ชั่วโมงที่ 48 เป็นต้นไปจะเข้าสู่ช่วง stationary phase ค่าแรงตึงผิวจะต่ำสุดที่ 72 ชั่วโมง(29.9 mN/m) ขณะเดียวกันที่ความสามารถในการกระจายน้ำมันเริ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงชั่วโมงที่ 108-144(50.24 cm²) ขณะที่น้ำตาลแรมโนสสามารถตรวจพบและสูงสุดที่ 108 ชั่วโมง (2.93 กรัม/ลิตร) แสดงผลการทดลองในตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.1

เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดี (7.66 กรัม/ลิตร) มี lag phase ที่สั้น log phase อยู่ในช่วง 12 –48 ชั่วโมง และชั่วโมงที่ 48 เป็นต้นไปจะเข้าสู่ stationary phase ค่าแรงตึงผิวจะต่ำสุดที่ 48 – 84 ชั่วโมง(30 mN/m) ส่วนค่าการกระจายน้ำมันจะสูงสุดที่ 168 ชั่วโมง(66.85 cm²) ขณะที่สามารถตรวจพบน้ำตาลแรมโนสสูงสุดที่ 84 – 168 ชั่วโมง(2.97 กรัม/ลิตร) ดังแสดงผลการทดลองในตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.2

เมื่อเลี้ยงเชื้อในน้ำมันมะกอก พบว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดี(6.10 กรัม/ลิตร)มีช่วง log phase ตั้งแต่ 12 –72 ชั่วโมง หลังจาก 72 ชั่วโมงเชื้อจะเริ่มเข้าสู่ stationary phase ขณะที่ค่าแรงตึงผิวลดลงต่ำสุดที่ 72 ชั่วโมง(30 mN/m) ค่าการกระจายน้ำมันที่ 68 ชั่วโมง(70.63 cm²) ส่วนน้ำตาลแรมโนสจะมีค่าสูงสุดที่ 108 ชั่วโมง(6.58 กรัม/ลิตร) ดังแสดงผลในตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.3

ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดลอริกเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อจะมี lag phase ยาวตั้งแต่ 0 – 48 ชั่วโมง เชื้อจะเริ่มเจริญเข้าสู่ stationary phase เมื่อ 72 ชั่วโมง(8.42 กรัม/ลิตร) ค่าแรงตึงผิวก็ลดลงต่ำสุดที่ 72 ชั่วโมง(29.5 mN/m) (เมื่อพิจารณาจาก Δ ค่าแรงตึงผิว σ_{t-1}) การเจริญของเชื้อไม่ดี ส่งผลต่อค่าการกระจายน้ำมัน พบว่าจะมีค่าต่ำกว่าในน้ำมันปาล์ม และน้ำมันมะกอกคือมีค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 60.79 cm² ขณะที่น้ำตาลแรมโนสที่ 108 ชั่วโมง(3.39 กรัม/ลิตร) ดังแสดงในตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.4

เมื่อเลี้ยงเชื้อด้วยกรดไมริสติกเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่า เชื้อเจริญได้ไม่ดีเท่าในกรดลอลิก(3.46 กรัม/ลิตร) มี lag phase ที่ยาวอยู่ในช่วง 0 – 48 ชั่วโมง และเข้าสู่ stationary phase ที่ 60 ชั่วโมง ค่าแรงตึงผิวลดต่ำสุดที่ 84 ชั่วโมง(27.8 mN/m Δ ค่าแรงตึงผิว σ_1 เท่ากับ 34.4) ค่าการกระจายน้ำมัน เริ่มสูงขึ้นตั้งแต่ 48 ชั่วโมงจนสูงสุดที่ 108 ชั่วโมงซึ่งจะมีค่าน้อยกว่าอาหารคาร์บอนชนิดอื่นๆ (41.30 cm²) และจากการตรวจวิเคราะห์น้ำตาลแรมโนสสูงสุด 84 ชั่วโมง(1.89 กรัม/ลิตร) ดังแสดงผลในตารางที่ 4.5 และรูปที่ 4.5

เมื่อเลี้ยงเชื้อในกรดปาล์มิติกพบว่าเชื้อมีการเจริญได้ดี(4.16 กรัม/ลิตร) มี log phase ยาวอยู่ในช่วง 0 – 48 ชั่วโมง แล้วเข้าสู่ stationary phase ที่ 72 ชั่วโมง ค่าแรงตึงผิวลดต่ำที่สุดที่ 84 ชั่วโมง(29.7 mN/m) การเจริญของเชื้อไม่ดีส่งผลให้ค่าการกระจายน้ำมันมีค่าน้อยตลอดการทดลอง(0.05 cm²) ขณะที่น้ำตาลแรมโนสมีค่าสูงขึ้นเล็กน้อย ดังแสดงในตารางที่ 4.6 และรูปที่ 4.6

เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีกรดสเตียริกเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ดีแต่ช้า(6.01 กรัม/ลิตร) มี lag phase ยาว 0 – 48 ชั่วโมง log phase ตั้งแต่ 48 – 120 ชั่วโมง และสู่ stationary phase ที่ 120 ชั่วโมงเป็นต้นไป Δ ค่าแรงตึงผิว σ_1 มีค่าค่อนข้างน้อย ค่าแรงตึงผิวจะลดต่ำสุดที่ 168 ชั่วโมง ขณะที่ค่าการกระจายน้ำมันและน้ำตาลแรมโนสมีค่าสูงสุดที่ 168 ชั่วโมง 56.72 cm² และ 2.26 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.7 และรูปที่ 4.7

เมื่อเลี้ยงเชื้อในกรดโอเลอิก พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ดี(6.44 กรัม/ลิตร) มี lag phase และสั้นมาก log phase จะอยู่ในช่วง 12 – 36 ชั่วโมง ขณะที่ค่าแรงตึงผิวสุดที่ 96 ชั่วโมง(29.9 mN/m) ส่วนค่าการกระจายน้ำมันที่ 168 ชั่วโมง(53.78 cm²) ขณะที่สามารถตรวจพบน้ำตาลแรมโนสมีค่าสูงสุดเพียง 1.58 กรัม/ลิตร ดังแสดงผลในตารางที่ 4.8 และรูปที่ 4.8

เมื่อเลี้ยงเชื้อในกรดไลโนเลอิก จะพบว่าเชื้อจะสามารถเจริญได้ดีและรวดเร็ว(6.89 กรัม/ลิตร) มี lag phase ที่สั้นมาก มีช่วง log phase ในช่วง 12 – 48 ชั่วโมง ค่าแรงตึงผิวลดต่ำสุดที่ 72 ชั่วโมง (29.8 mN/m) ค่าการกระจายน้ำมันมีค่าสูงสุดที่ 84 ชั่วโมง การเจริญของเชื้อดีส่งผลให้มีค่าการกระจายน้ำมันสูงถึง 71.25 cm² ขณะที่น้ำตาลแรมโนสสามารถตรวจพบได้เป็นปริมาณสูงสุดที่ 84 ชั่วโมง(5.09 กรัม/ลิตร) ดังผลในตารางที่ 4.9 และรูปที่ 4.9

จากการสรุปผลการทดลองในตารางที่ 4.10 จะเห็นได้ว่าในน้ำมันปาล์ม จะเป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้ค่า Δ ค่าแรงตึงผิว σ_1 สูงสุดคือ 41 นอกจากนี้จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าทุกแหล่งคาร์บอนจะให้ค่า Δ ค่าแรงตึงผิว σ_1 สูงสุดตั้งแต่ 31 – 41 ในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ถ้าเป็นแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำมันเช่นน้ำมันมะพร้าว น้ำมันปาล์ม และน้ำมันมะกอก จะให้ค่า Δ ค่าแรงตึงผิว σ_1 สูงสุดในเวลา

120 108 และ 108 ชั่วโมงตามลำดับ ถ้าเป็นแหล่งคาร์บอนที่เป็นกรดไขมันจะให้ค่า Δ ค่าแรงดึงผิว σ_s อยู่ในช่วง 34 – 38 โดยใช้เวลาน้อยกว่าคือ 72 -84 ชั่วโมง โดยกรดไขมันที่มีสายโซ่คาร์บอนยาวจะใช้เวลามากขึ้น แต่ในขณะที่กรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวเช่น C18:2 จะใช้เวลาน้อยกว่าคือ 48 ชั่วโมง

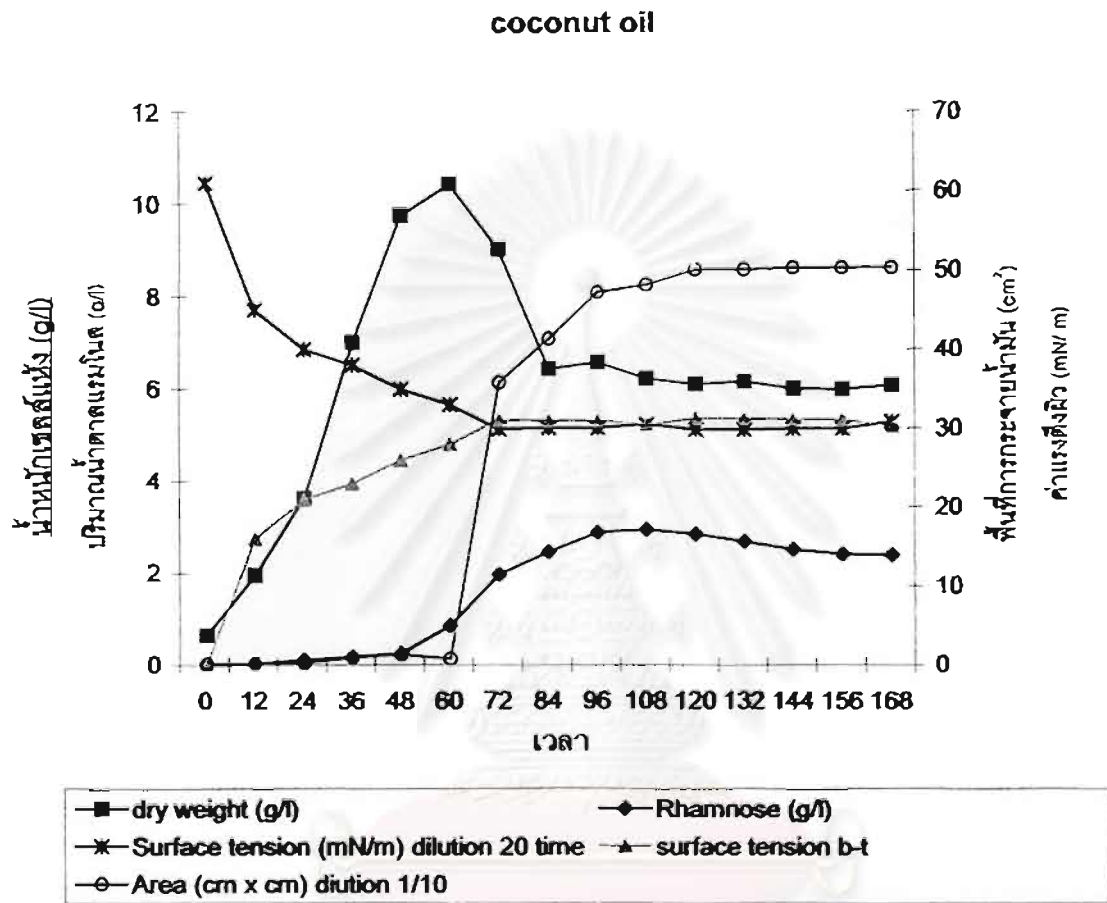
จากรูปที่ 4.10 และ 4.11 แสดงให้เห็นผลการวิเคราะห์ค่าการกระจายน้ำมัน และปริมาณน้ำตาลแรมโนสในแต่ละชนิดของแหล่งคาร์บอน จะเห็นได้ว่ามีความสัมพันธ์ไปในทางเดียวกันในทุกชนิดของแหล่งคาร์บอน ในขณะที่แหล่งคาร์บอน C18:2 และน้ำมันมะกอกจะให้ค่าการกระจายน้ำมัน และปริมาณน้ำตาลแรมโนสสูงกว่าแหล่งคาร์บอนสูงกว่าแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ คือมีค่าเท่ากับ $71.25 \text{ cm}^2/4.99 \text{ กรัม/ลิตร}$ และ $70.63 \text{ cm}^2/6.58 \text{ กรัม/ลิตร}$ ตามลำดับ



ตารางที่ 4.1 แสดงค่าของน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลแรมโนส ค่าการกระจายน้ำมัน ค่าแรงตึงผิว ของ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อใช้น้ำมันมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอน

เวลา	น้ำหนักเซลล์ แห้ง (g/l)	ปริมาณ น้ำตาลแรม โนส (g/l)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m) dilution 20 time	Δ ค่าแรงตึงผิว _{๒๕} (mN/m)	พื้นที่การกระจายน้ำมัน (cm ²) diution 10 ⁻¹
0	0.65	0.00695	61.00	0	0.13
12	1.95	0.01092	45.00	16.00	0.13
24	3.63	0.10907	40.00	21.00	0.20
36	7.01	0.1737	38.00	23.00	0.95
48	9.76	0.25571	35.00	26.00	1.33
60	10.43	0.86	33.00	28.00	0.79
72	9.01	1.97	29.90	31.10	35.77
84	6.42	2.45	30.00	31.00	41.26
96	6.56	2.87	30.00	31.00	47.15
108	6.21	2.93475	30.50	30.50	48.10
120	6.09	2.83	29.80	31.20	50.00
132	6.14	2.67	29.80	31.20	50.00
144	5.99	2.50	29.90	31.10	50.24
156	5.98	2.40	29.90	31.10	50.24
168	6.07	2.381	30.80	30.20	50.24

หมายเหตุ : Δ ค่าแรงตึงผิว_{๒๕} คือค่าแรงตึงผิวที่เวลาที่ 0 ลบด้วยค่าแรงตึงผิว ณ เวลาใดๆ

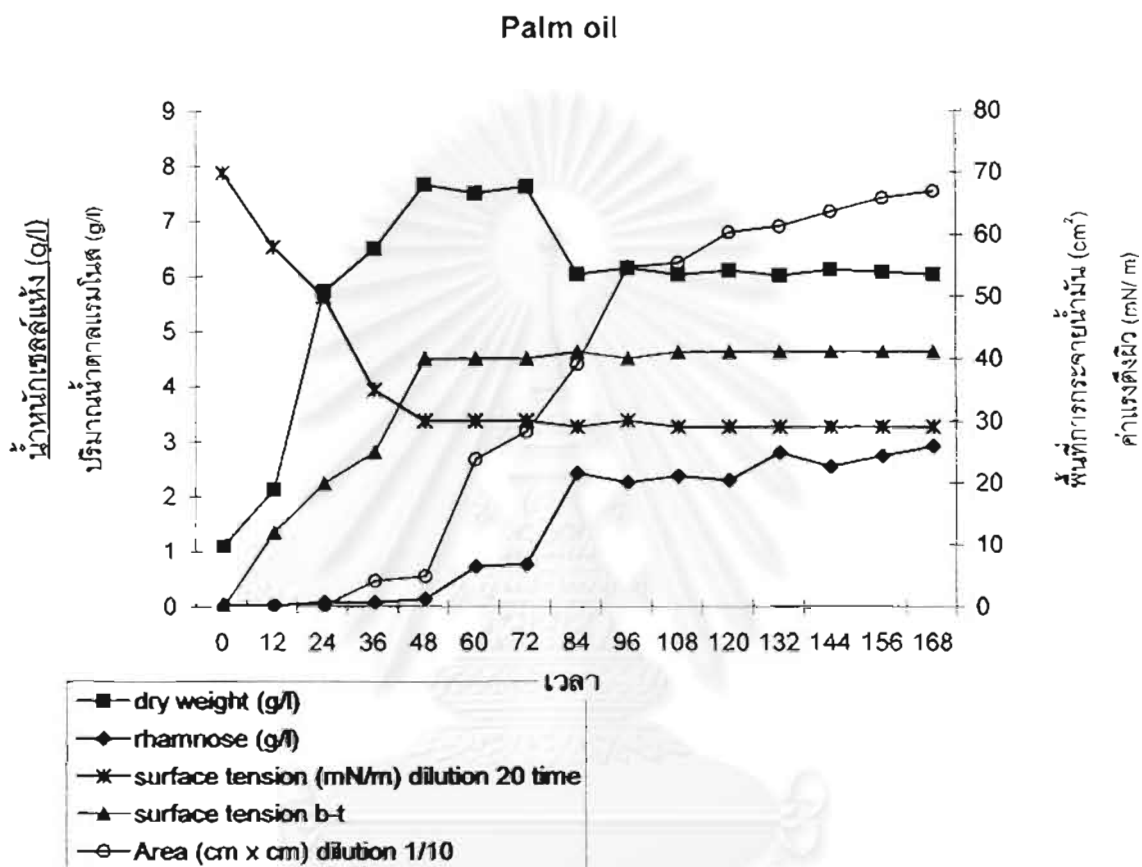


รูปที่ 4.1 แสดงการเจริญ ปริมาณน้ำตาลแรมโนส พื้นที่การกระจายน้ำมัน ค่าแรงตึงผิว ของ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อใช้น้ำมันมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ 4.2 แสดงค่าของน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาล แรมโนส ค่าการกระจายน้ำมัน ค่าแรงตึงผิว ของ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน

เวลา	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l)	ปริมาณน้ำตาล แรมโนส (g/l)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m) dilution 20 time	Δ ค่าแรงตึงผิว _{t-t₀} (mN/m)	พื้นที่การกระจายน้ำมัน (cm ²) diution 10 ⁻¹
0	1.09	0.0282	70	0	0
12	2.13	0.017	58	12	0.13
24	5.72	0.077	50	20	0.20
36	6.50	0.07836	35	25	4.15
48	7.66	0.141	30	40	4.91
60	7.50	0.72	30	40	23.75
72	7.62	0.76	30	40	28.26
84	6.03	2.42	29	41	39.02
96	6.13	2.25	30	40	54.69
108	6.01	2.37	29	41	55.34
120	6.08	2.29	29	41	60.25
132	5.99	2.79	29	41	61.23
144	6.10	2.54	29	41	63.59
156	6.06	2.73	29	41	65.78
168	6.01	2.91	29	41	66.85

หมายเหตุ : Δ ค่าแรงตึงผิว_{t-t₀} คือค่าแรงตึงผิวที่เวลาที่ t ลบด้วยค่าแรงตึงผิว ณ เวลาใดๆ



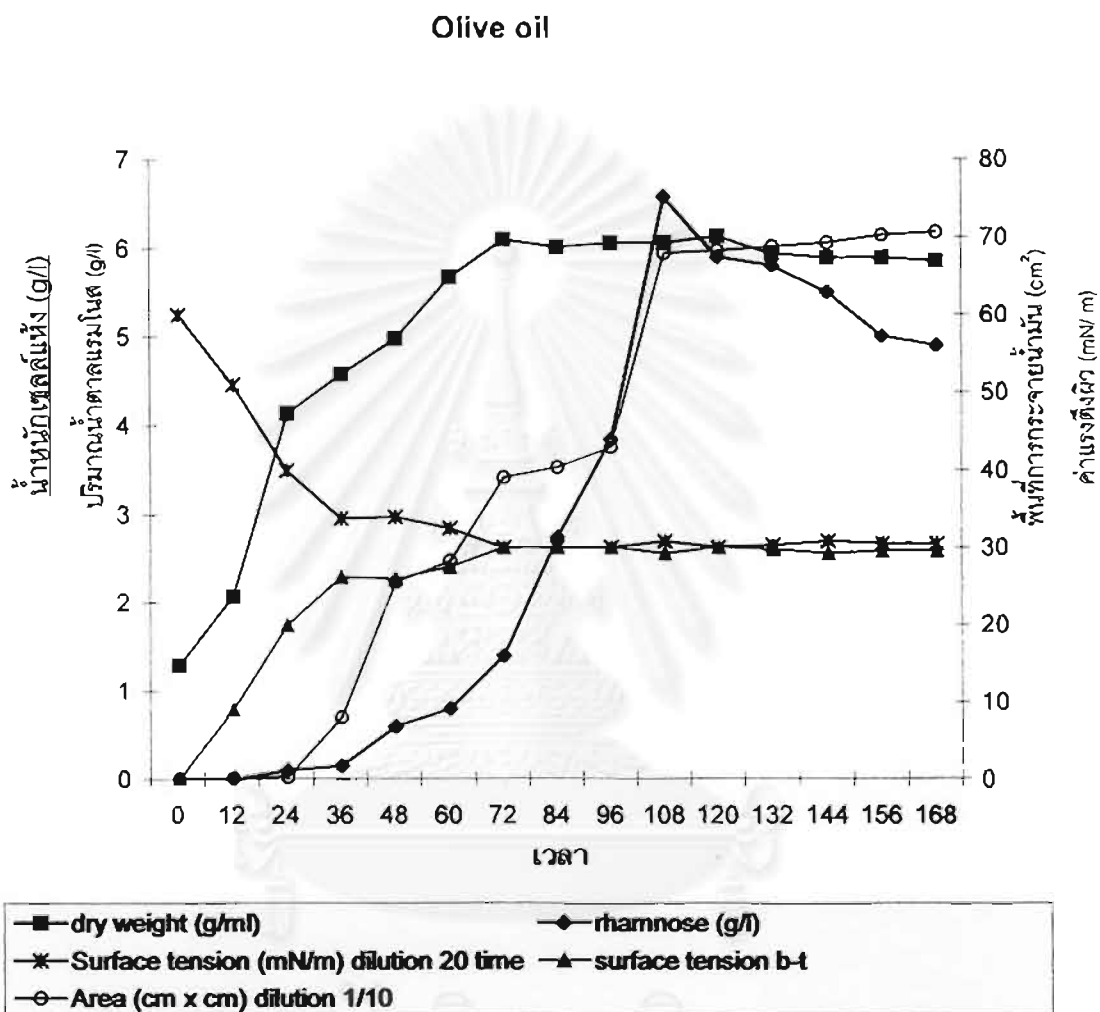
รูปที่ 4.2 แสดงการเจริญ ปริมาณน้ำตาลแรมโนส พื้นที่การกระจายน้ำมัน ค่าแรงตึงผิว ของ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.3 แสดงค่าของน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลแรมโนส ค่าการกระจายน้ำมัน ค่าแรงตึงผิว ของ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อใช้น้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอน

เวลา	น้ำหนักเซลล์ แห้ง (g/l)	ปริมาณน้ำตาล แรมโนส (g/l)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m) dilution 20 time	Δ ค่าแรงตึงผิว _{t-t₀} (mN/m)	พื้นที่การกระจายน้ำมัน (cm ²) dilution 10 ⁻¹
0	1.29	0.0091	60	0	0
12	2.08	0.0046	51	9	0.2
24	4.14	0.099	40	20	0.33
36	4.58	0.1538	33.8	26.2	8.04
48	4.98	0.6	34	26	25.51
60	5.67	0.8	32.5	27.5	28.26
72	6.10	1.4	30	30	39.02
84	6.015	2.74	30	30	40.35
96	6.06	3.84	30	30	42.89
108	6.06	6.58	30.8	29.2	67.90
120	6.14	5.9	30	30	68.23
132	5.94	5.8	30.3	29.7	68.78
144	5.89	5.5	30.8	29.2	69.26
156	5.89	5	30.5	29.5	70.25
168	5.85	4.9	30.5	29.5	70.63

หมายเหตุ : Δ ค่าแรงตึงผิว_{t-t₀} คือค่าแรงตึงผิวที่เวลาที่ t ลบด้วยค่าแรงตึงผิว ณ เวลา t₀

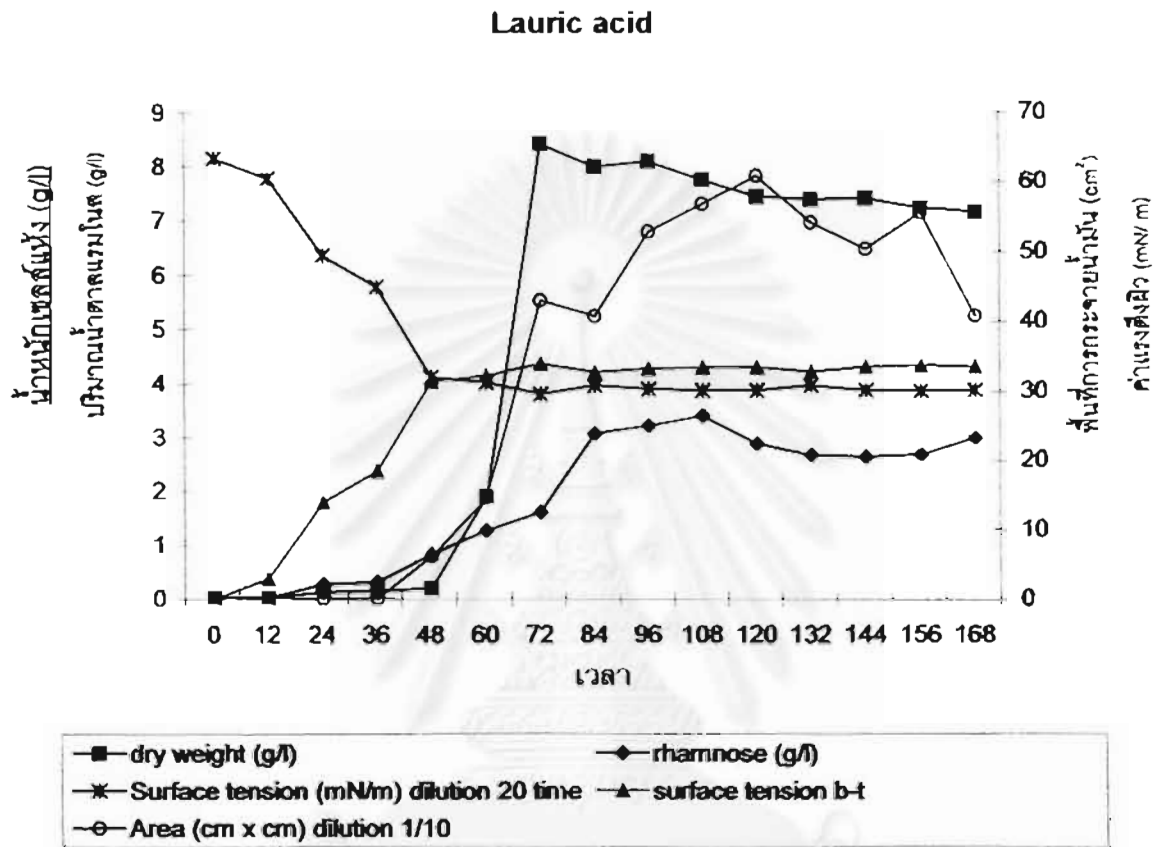


รูปที่ 4.3 แสดงการเจริญ ปริมาณน้ำตาลแรมโนส พื้นที่การกระจายน้ำมัน ค่าแรงตึงผิว ของ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อใช้น้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ 4.4 แสดงค่าของน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลแรมโนส ค่าการกระจายน้ำมัน ค่าแรงตึงผิว ของ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อใช้กรดลิกนินเป็นแหล่งคาร์บอน

เวลา	น้ำหนักเซลล์ แห้ง (g/l)	ปริมาณน้ำตาล แรมโนส (g/l)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m) dilution 20 time	Δ ค่าแรงตึงผิว _{๒๑} (mN/m)	พื้นที่การกระจายน้ำมัน (cm ²) dilution 10 ⁻¹
0	0.01	0.016	63.4	0	0
12	0.02	0.015	60.5	2.9	0
24	0.13	0.27	49.5	13.9	0
36	0.15	0.312	45	18.4	0.01
48	0.19	0.83	32	31.4	6.15
60	1.89	1.26	31.2	32.2	14.52
72	8.42	1.6	29.5	33.9	42.99
84	7.99	3.06	30.7	32.7	40.69
96	8.08	3.21	30.2	33.2	52.78
108	7.75	3.39	30	33.4	56.72
120	7.42	2.87	30	33.4	60.79
132	7.38	2.65	30.7	32.7	54.08
144	7.39	2.62	30	33.4	50.24
156	7.22	2.66	29.9	33.5	55.39
168	7.14	2.97	30	33.4	40.69

หมายเหตุ : Δ ค่าแรงตึงผิว_{๒๑} คือค่าแรงตึงผิวที่เวลาที่ 0 ลบด้วยค่าแรงตึงผิว ณ เวลาใดๆ

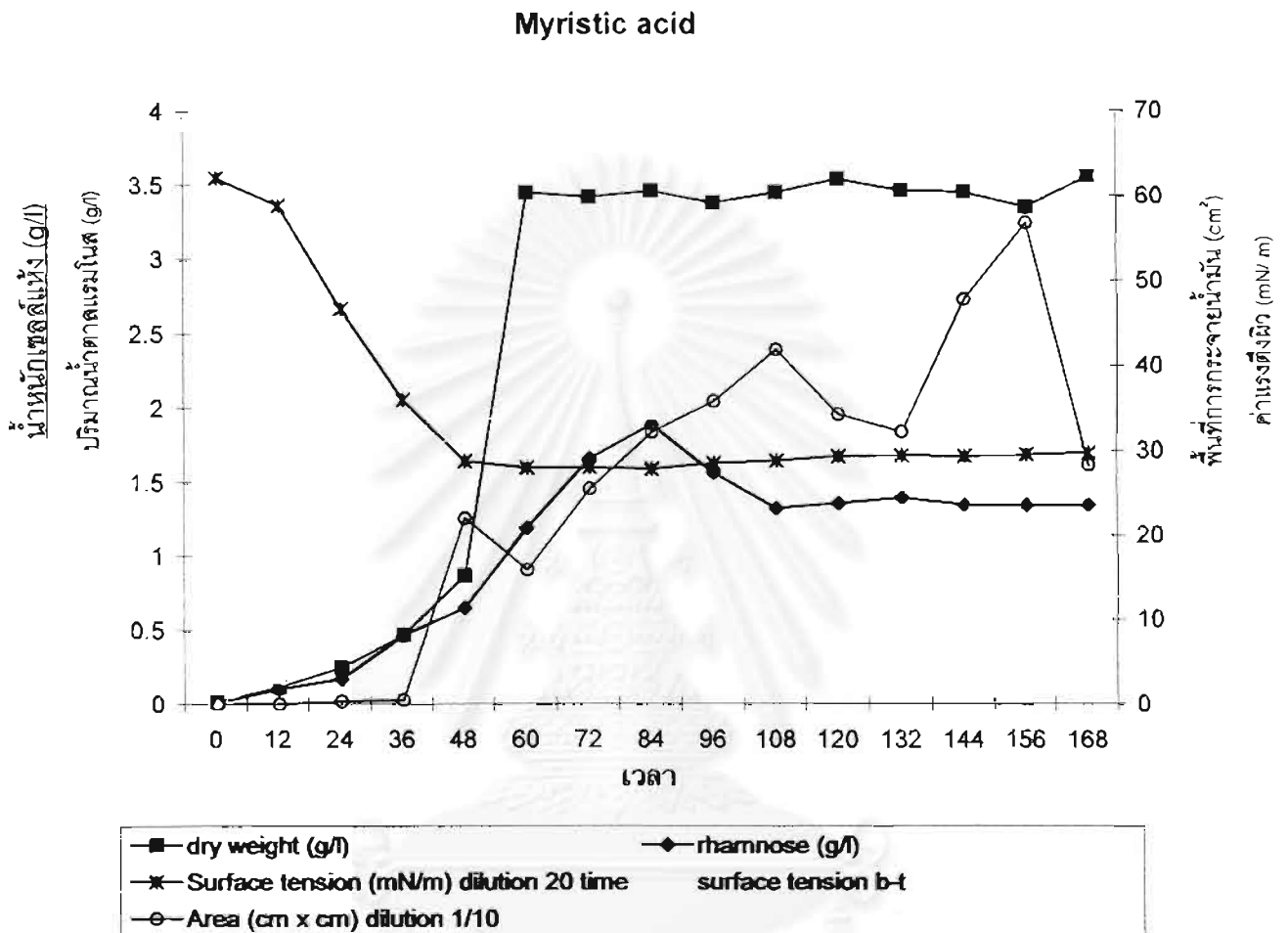


รูปที่ 4.4 แสดงการเจริญ ปริมาณน้ำตาลแรมโนส พื้นที่การกระจายน้ำมัน ค่าแรงตึงผิว ของ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อใช้กรดลอริกเป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ 4.5 แสดงค่าของน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลแรมโนส ค่าการกระจายน้ำมัน ค่าแรงตึงผิว ของ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อใช้กรดไมริสติกเป็นแหล่งคาร์บอน

เวลา	น้ำหนักเซลล์ แห้ง (g/l)	ปริมาณน้ำตาล แรมโนส (g/l)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m) dilution 20 time	Δ ค่าแรงตึงผิว _{b1}	พื้นที่การกระจายน้ำมัน (cm ²) dilution 10 ⁻¹
0	0.02	0.0139	62.2	0	0
12	0.12	0.104	58.9	3.3	0
24	0.25	0.1713	46.7	15.5	0.31
36	0.47	0.4675	36	26.2	0.50
48	0.87	0.65	28.8	33.4	22.05
60	3.45	1.1904	28	34.2	15.90
72	3.42	1.6603	28	34.2	25.51
84	3.46	1.89056	27.8	34.4	32.15
96	3.38	1.5647	28.5	33.7	35.77
108	3.45	1.323	28.8	33.4	41.83
120	3.54	1.356	29.3	32.9	34.20
132	3.46	1.394	29.4	32.8	32.15
144	3.45	1.347	29.3	32.9	31.52
156	3.35	1.345	29.5	32.7	33.85
168	3.56	1.347	29.7	32.5	28.26

หมายเหตุ : Δ ค่าแรงตึงผิว_{b1} คือค่าแรงตึงผิวที่เวลาที่ 0 ลบด้วยค่าแรงตึงผิว ณ เวลาใดๆ



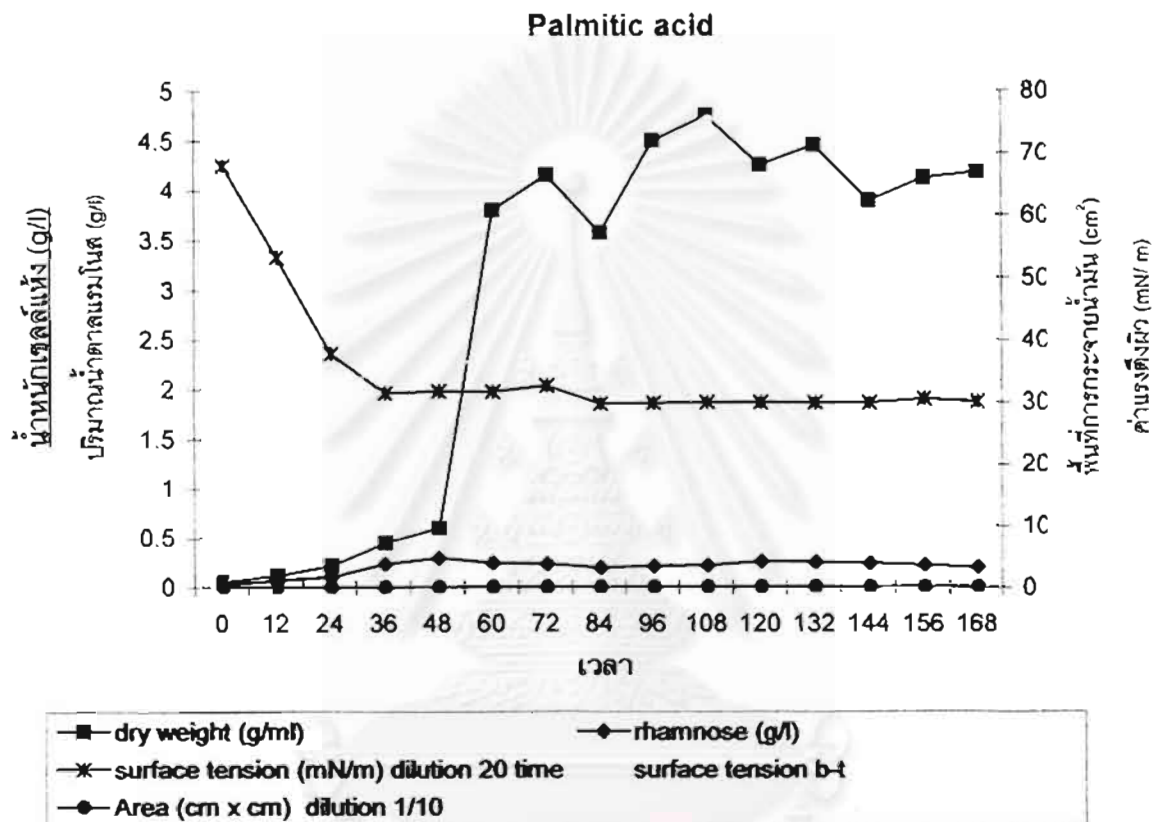
รูปที่ 4.5 แสดงการเจริญ ปริมาณน้ำตาลแรมโนส พื้นที่การกระจายน้ำมัน ค่าแรงตึงผิว ของ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อใช้กรดไมริสติกเป็นแหล่งคาร์บอน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.6 แสดงค่าของน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลแรมโนส ค่าการกระจายน้ำมัน ค่าแรงตึงผิว ของ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อใช้กรดปาล์มมิติกเป็นแหล่งคาร์บอน

เวลา	น้ำหนักเซลล์ แห้ง (g/l)	ปริมาณน้ำตาล แรมโนส (g/l)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m) dilution 20 time	Δ ค่าแรงตึงผิว _{๒-๑} (mN/m)	พื้นที่การกระจายน้ำมัน (cm ²) dilution 10 ⁻¹
0	0.06	0.028	68	0	0
12	0.12	0.072	53.3	14.7	0.01
24	0.22	0.106	37.8	30.2	0.03
36	0.45	0.234	31.4	36.6	0.04
48	0.60	0.295	31.7	36.3	0.05
60	3.80	0.246	31.6	36.4	0.05
72	4.155	0.2359	32.6	35.4	0.05
84	3.57	0.198	29.7	38.3	0.05
96	4.50	0.213	29.8	38.2	0.05
108	4.75	0.22	29.9	38.1	0.05
120	4.25	0.26	29.9	38.1	0.05
132	4.45	0.25	29.8	38.2	0.05
144	3.89	0.24	29.8	38.2	0.05
156	4.12	0.22	30.4	37.6	0.05
168	4.18	0.2	30	38	0.05

หมายเหตุ : Δ ค่าแรงตึงผิว_{๒-๑} คือค่าแรงตึงผิวที่เวลาที่ 0 ลบด้วยค่าแรงตึงผิว ณ เวลาใดๆ



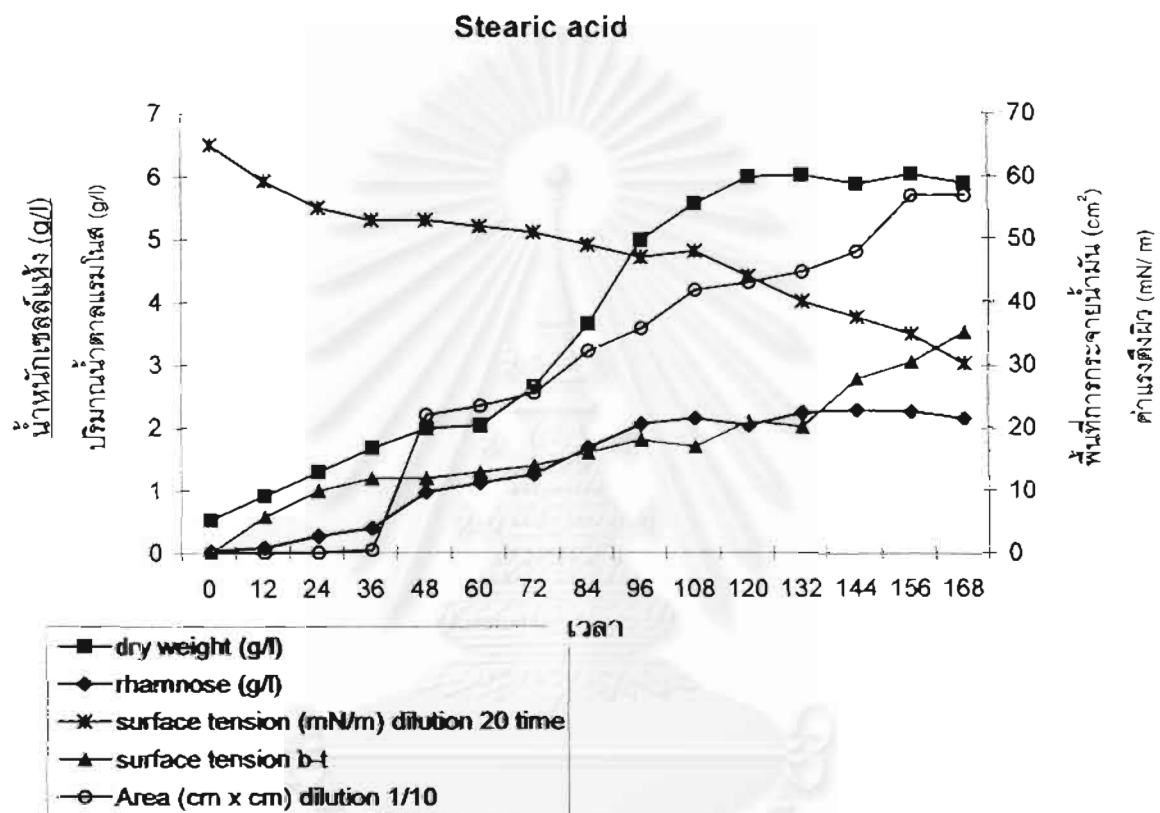
รูปที่ 4.6 แสดงการเจริญ ปริมาณน้ำตาลรวมในส พื้นที่การกระจายน้ำมัน ค่าแรงตึงผิว ของ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อใช้กรดปาล์มมิติกเป็นแหล่งคาร์บอน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.7 แสดงค่าของน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลแรมโนส ค่าการกระจายน้ำมัน ค่าแรงตึงผิว ของ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อใช้กรดสเตรียริกเป็นแหล่งคาร์บอน

เวลา	น้ำหนักเซลล์ แห้ง (g/l)	ปริมาณน้ำตาล แรมโนส (g/l)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m) dilution 20 time	Δ ค่าแรงตึงผิว _{๐-๓} (mN/m)	พื้นที่การกระจายน้ำมัน (cm ²) diution 10 ⁻¹
0	0.53	0.024	65	0	0
12	0.92	0.0824	59.2	5.8	0
24	1.30	0.2752	55	10	0.03
36	1.68	0.401	53	12	0.50
48	1.99	0.972	53	12	22.05
60	2.03	1.12	52	13	23.46
72	2.65	1.2489	51	14	25.51
84	3.65	1.6844	49	16	32.15
96	4.98	2.06	47	18	35.77
108	5.56	2.15	48	17	41.83
120	5.98	2.03	44	21	42.99
132	6.01	2.23	40	20	44.63
144	5.86	2.26	37.4	27.6	47.76
156	6.012	2.24	34.7	30.3	56.72
168	5.87	2.13	30	35	56.72

หมายเหตุ : Δ ค่าแรงตึงผิว_{๐-๓} คือค่าแรงตึงผิวที่เวลาที่ 0 ลบด้วยค่าแรงตึงผิว ณ เวลาใดๆ



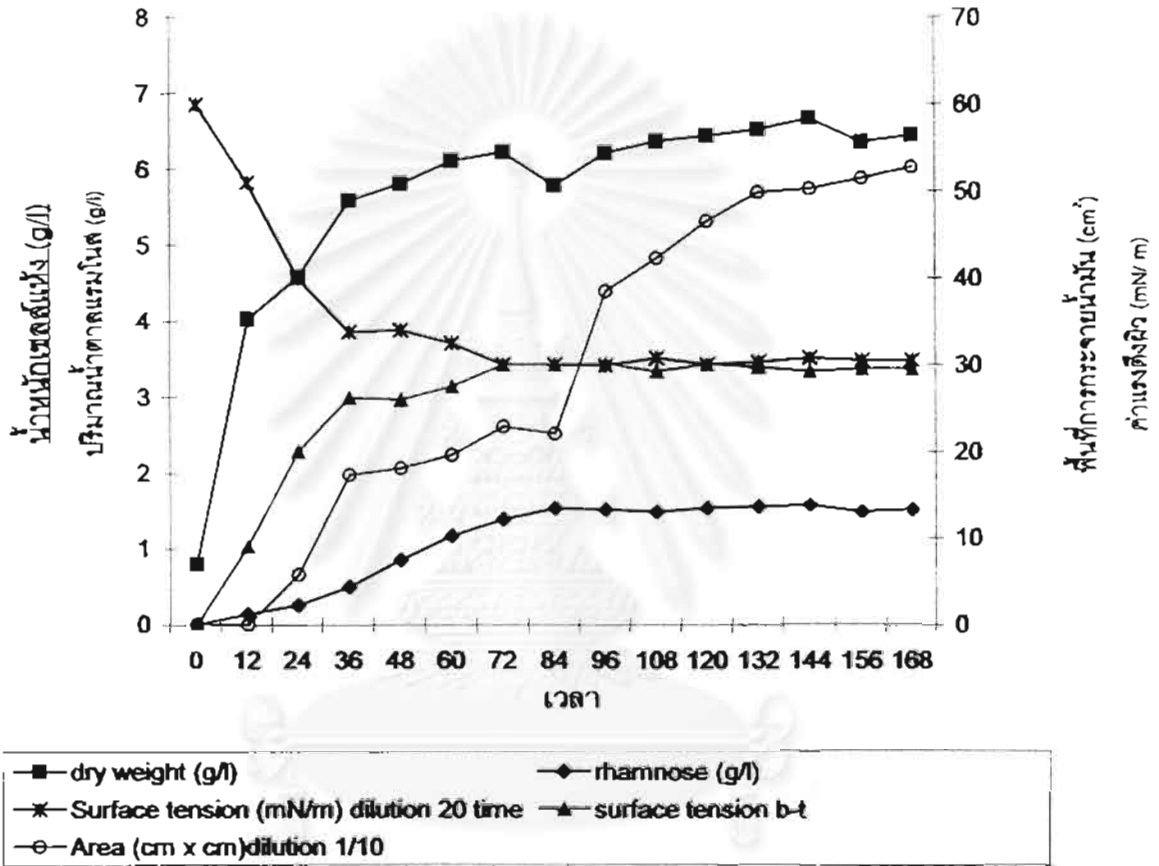
รูปที่ 4.7 แสดงการเจริญ ปริมาณน้ำตาลแรมโนส พื้นที่การกระจายน้ำมัน ค่าแรงตึงผิว ของ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อใช้กรดสเตียริกเป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ 4.8 แสดงค่าของน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลแรมโนส ค่าการกระจายน้ำมัน ค่าแรงตึงผิว ของ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อใช้กรดโอเลอิกเป็นแหล่งคาร์บอน

เวลา	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l)	ปริมาณน้ำตาล แรมโนส (g/l)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m) dilution 20 time	Δ ค่าแรงตึงผิว _{๒๕} (mN/m)	พื้นที่การกระจายน้ำมัน (cm ²) diution 10 ⁻¹
0	0.8	0.0029	60	0	0
12	4.036	0.1425	51	9	0
24	4.584	0.256	40	20	5.72
36	5.592	0.4988	33.8	26.2	17.34
48	5.816	0.8529	34	26	18.09
60	6.119	1.172	32.5	27.5	19.63
72	6.23	1.3918	30	30	22.89
84	5.79	1.536	30	30	22.05
96	6.219	1.52	29.9	30.1	38.47
108	6.37	1.49	30.8	29.2	42.26
120	6.439	1.54	30	30	46.54
132	6.526	1.56	30.3	29.7	49.86
144	6.67	1.58	30.8	29.2	50.26
156	6.365	1.49	30.5	29.5	51.50
168	6.45	1.52	30.5	29.5	52.78

หมายเหตุ : Δ ค่าแรงตึงผิว_{๒๕} คือค่าแรงตึงผิวที่เวลาที่ 0 ลบด้วยค่าแรงตึงผิว ณ เวลาใดๆ

Oleic acid



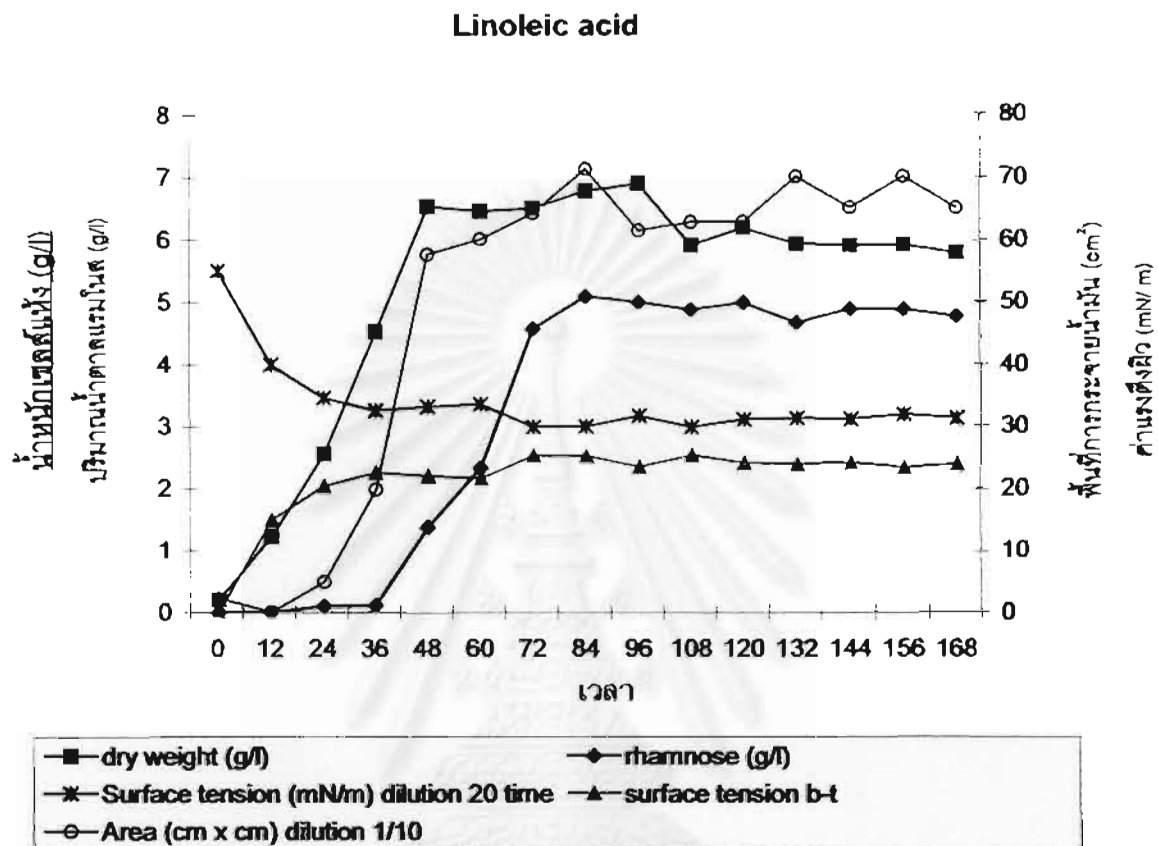
รูปที่ 4.8 แสดงการเจริญ ปริมาณน้ำตาลแรมโนส พื้นที่การกระจายน้ำมัน ค่าแรงตึงผิว ของ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อใช้กรอโอเลอิกเป็นแหล่งคาร์บอน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.9 แสดงค่าของน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลแรมโนส ค่าการกระจายน้ำมัน ค่าแรงตึงผิว ของ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อใช้กรดไลโนเลอิกเป็นแหล่งคาร์บอน

เวลา	น้ำหนักเซลล์ แห้ง (g/l)	ปริมาณน้ำตาล แรมโนส (g/l)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m) dilution 20 time	Δ ค่าแรงตึงผิว _{0-t} (mN/m)	พื้นที่การกระจายน้ำมัน (cm ²) dilution 10 ⁻¹
0	0.2	0	55	0	2.29
12	1.23	0	40	15	0.07
24	2.56	0.099	34.6	20.4	4.95
36	4.522	0.1136	32.5	22.5	19.81
48	6.528	1.37	33.1	21.9	57.53
60	6.453	2.32	33.5	21.5	60.02
72	6.502	4.56	29.8	25.2	64.19
84	6.771	5.085	29.9	25.1	71.25
96	6.894	4.9875	31.6	23.4	61.37
108	5.902	4.87	29.8	25.2	62.77
120	6.184	4.98	31	24	62.77
132	5.92	4.658	31.2	23.8	70.00
144	5.898	4.875	31	24	65.00
156	5.902	4.87	31.8	23.2	70.00
168	5.777	4.76	31.2	23.8	65.01

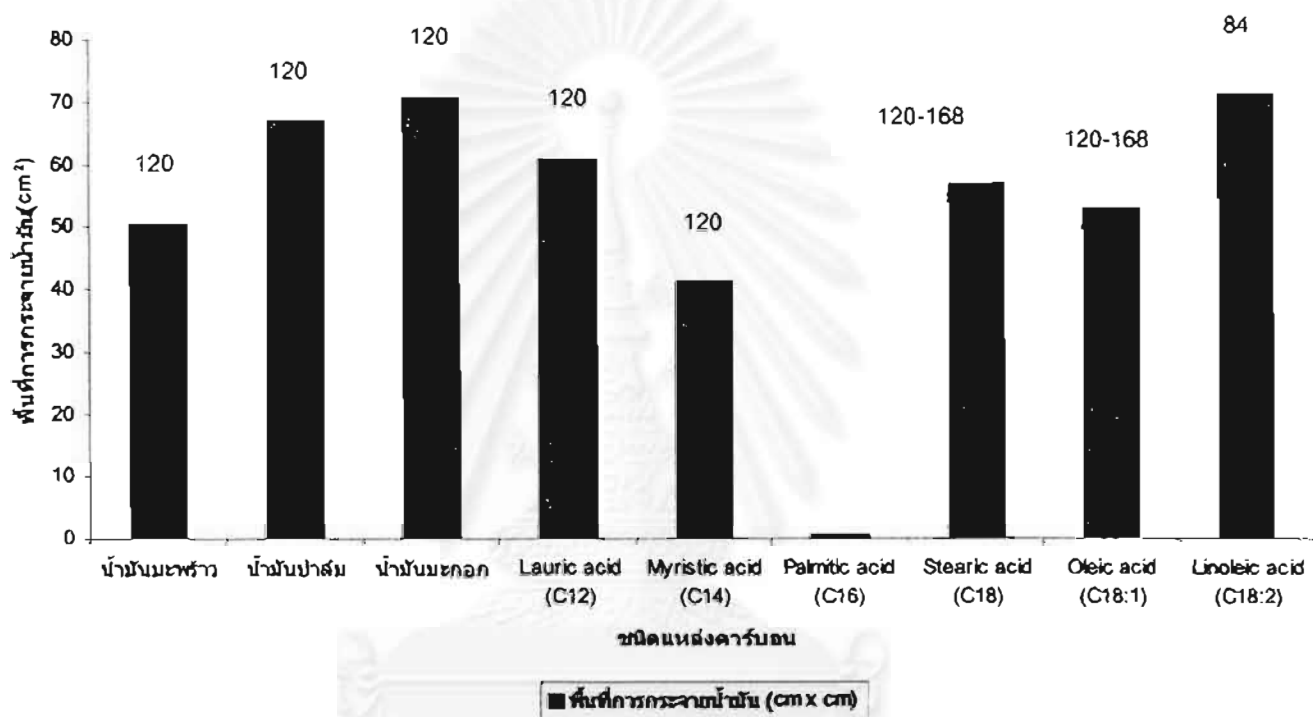
หมายเหตุ : Δ ค่าแรงตึงผิว_{0-t} คือค่าแรงตึงผิวที่เวลาที่ 0 ลบด้วยค่าแรงตึงผิว ณ เวลาใดๆ



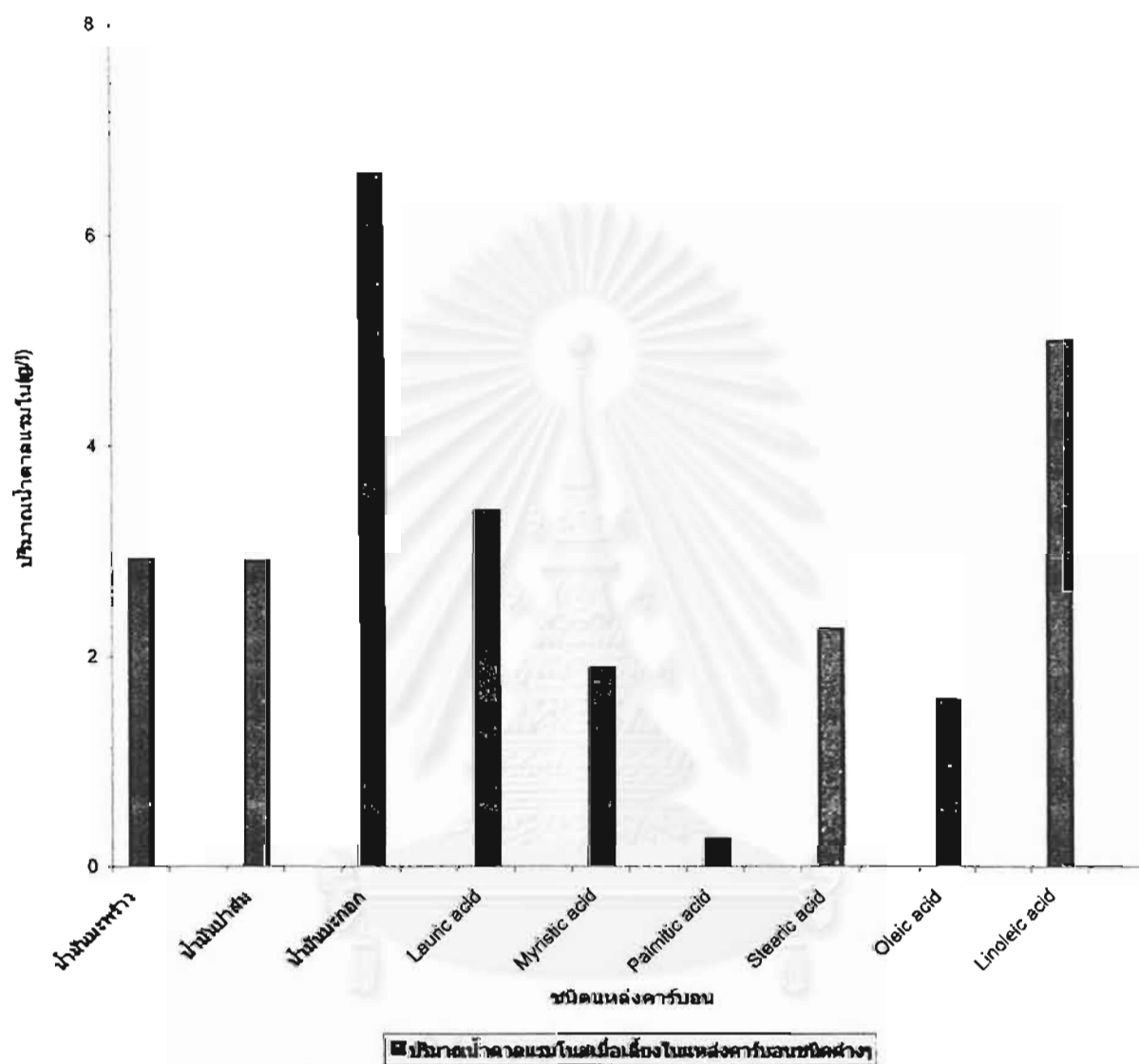
รูปที่ 4.9 แสดงการเจริญ ปริมาณน้ำตาลแรมโนส พื้นที่การกระจายน้ำมัน ค่าแรงตึงผิว ของ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อใช้กรดไลโนเลอิกเป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ 4.10 สรุปเปรียบเทียบผลการเจริญและการวิเคราะห์ต่างๆ ในอาหารที่มีคาร์บอนต่างชนิดกัน

ชนิดของ แหล่งคาร์บอน	น้ำหนัก เซลล์แห้ง (g/l)	ปริมาณ น้ำตาลแรมโนส (g/l)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	Δ ค่าแรงตึงผิว _{๖๔} (mN/m)	พื้นที่การกระจายน้ำมัน (cm ²) dilution 10 ⁻¹
น้ำมันมะพร้าว	10.43 (60 hr)	2.93 (108 hr)	29.9 (72 hr)	31 (120 hr)	50.24 (120-144 hr)
น้ำมันปาล์ม	7.66 (48 hr)	2.91 (108-168 hr)	30 (48 hr)	41 (108 hr)	66.85 (120-168 hr)
น้ำมันมะกอก	6.10 (72 hr)	6.58 (108 hr)	30 (72 hr)	30.8 (108 hr)	70.63 (120-168 hr)
Lauric acid (C12)	8.42 (72 hr)	3.39 (108 hr)	29.5 (72 hr)	33.9 (72 hr)	60.79 (120 hr)
Myristic acid (C14)	3.46 (60-84 hr)	1.89 (84 hr)	27.8 (84 hr)	34.4 (84 hr)	41.30 (96-108 hr)
Palmitic acid (C16)	4.16 (72 hr)	0.26 (120 hr)	29.7 (84 hr)	38 (84 hr)	0.05
Stearic acid (C18)	6.01 (120-132 hr)	2.26 (132-144 hr)	30 (168 hr)	35 (168 hr)	56.72 (156-168 hr)
Oleic acid (C18:1)	6.44 (120 hr)	1.58 (144 hr)	29.9 (96 hr)	34 (84 hr)	52.78 (144-168 hr)
Linoleic acid (C18:2)	6.89 (72-96 hr)	4.99 (72-96 hr)	29.9 (72 hr)	33.5 (48 hr)	71.25 (84 hr)



รูปที่ 4.10 แสดงค่าการกระจายน้ำมันสูงสุดในแต่ละแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 4.11 แสดงปริมาณน้ำตาลแรมโนในสูงสุดที่ผลิตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

2. การวิเคราะห์ส่วนผสมไขมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

จากคุณสมบัติของไกลโคลิปิดซึ่งประกอบด้วยส่วนที่ละลายน้ำได้ดีในน้ำ จะเป็นโมเลกุลของคาร์โบไฮเดรตและโมเลกุลไฮดรอกซิลสายยาวที่มีหมู่ฟังก์ชันอัลเป็นกรดหรือที่เรียกว่า hydroxyl-aliphatic acids ซึ่งจุลินทรีย์สามารถผลิตสารประเภทนี้ขึ้นได้ และกลุ่มของสารประเภทนี้ที่สำคัญคือแรมโนลิปิด ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *Pseudomonas aeruginosa* จะสร้างโมเลกุลแรมโนลิปิด ซึ่งมีองค์ประกอบของน้ำตาลแรมโนส และหนึ่งหรือสองโมเลกุลของ β -hydroxydecanoate

จากผลการทดลองของ Gas Chromatography-Mass Spectrometry แสดงเพื่อป้องกันการเกิด glycolipid โดยจุลินทรีย์ให้เห็นชัดเจนยิ่งขึ้น คือเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนต่างๆ กันเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ในระยะเวลาที่ต่างกัน และนำน้ำเลี้ยงเชื่อนั้นมาสกัดแยกโดยทำปฏิกิริยา hydrolysis แยกส่วนที่ละลายได้ดีในน้ำ และส่วนที่ละลายได้ดีในไขมันแยกออกจากกัน ส่วนที่ละลายได้ดีในไขมันนำมาเตรียมให้เป็นอนุพันธ์ในรูป methyl ester และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS ซึ่งแสดงจากภาพโครมาโตแกรม เริ่มจากโครมาโตแกรมของแหล่งคาร์บอนต่างๆ ได้แก่ น้ำมันมะพร้าว น้ำมันปาล์ม และน้ำมันมะกอก ซึ่งมีชนิดของกรดไขมันที่แตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 แสดงองค์ประกอบของกรดไขมันที่มีในน้ำมัน 3 ชนิด

ชนิดของกรดไขมัน	แสดงค่าร้อยละ		
	น้ำมันมะพร้าว	น้ำมันปาล์ม	น้ำมันมะกอก
C-10	6.99	-	-
C-12	38.60	-	-
C-14	19.20	1.19	-
C-16	13.93	36.47	15.26
C-18:2	2.61	11.97	-
C-18:1	11.13	41.59	75.88
C-18:0	4.71	5.70	5.52

การวิเคราะห์ส่วนไขมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน โดยการวิเคราะห์ด้วย GC-MS ได้ผลการทดลองดังนี้คือ ในอาหารน้ำมันมะพร้าว ซึ่งมีส่วนผลสมของกรดไขมัน C12(38.6%), C14(19.2%),C10(6.99%), C16(13.93%) และ C18(4.71%) ในอาหารน้ำมันมะกอกซึ่งมีส่วนผลสมของกรดไขมัน C18:1(75.88%) C16(15.26%) และC18(5.5.2%) และในอาหารน้ำมันปาล์ม ซึ่งมีส่วนผลสมของกรดไขมัน C18:1(41.59%), C16(36.47%), C18:2(11.97%), C18(5.70%) และC14(1.19%) ตามลำดับ เมื่อเริ่มต้นการทดลองจาก 0 ชั่วโมง กรดไขมันต่างๆ เหล่านี้จะค่อยๆ ลดปริมาณลงเมื่อเลี้ยงเชื้อผ่านไป และจะพบสาร 3-hydroxy C10 methyl ester ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นที่ 36 ชั่วโมงและจะเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ จนถึงสิ้นสุดการทดลองดังแสดงตารางที่ 4.12(ภาพแสดง mass spectrum ของสาร 3-hydroxy C10 methyl ester ในรูปที่ 4.24)

และเมื่อทดลองเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีกรดไขมันชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนพบว่า เมื่อใช้กรดลอริก(C12) และกรดไมริสติก(C14)เป็นแหล่งคาร์บอนที่เวลา 24 ชั่วโมง จะเริ่มปรากฏสาร 3-hydroxy C10 methyl ester และที่ 36 ชั่วโมง จะปรากฏอย่างชัดเจน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดปาล์มิติก (C16) พบสาร 3-hydroxy C10 methyl ester ในชั่วโมงที่ 48-60 แล้วลดลงอย่างชัดเจนในชั่วโมงที่ 120 ดังแสดงตารางที่ 4.13

เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีกรดไขมันอิ่มตัวเช่น สเตริริก (C18) จะพบ 3-hydroxy C10 methyl ester ในชั่วโมงที่ 24 ปริมาณเพียงเล็กน้อยเมื่อเริ่มต้น และชัดเจนมากขึ้นที่ 36 ชั่วโมง แต่ในขณะที่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดไขมันพันธะคู่ (C18:1,C18:2) จะพบสาร 3-hydroxy C10 methyl ester ภายใน 24 -36 ชั่วโมงอย่างชัดเจน ดังแสดงตารางที่ 4.13

ส่วนปริมาณของสาร 3-hydroxy C10 methyl ester ที่วิเคราะห์ได้ พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีกรดไขมันชนิด C12 และ C14 จะให้ผลดีกว่า C16 และ C18 ขณะที่กรดไขมันไม่อิ่มตัวเช่น C18:1 และ C18:2 จะให้ปริมาณสาร 3-hydroxy C10 methyl ester ได้เร็วกว่าและสูงกว่า C18 ดังนั้น จะเห็นได้ว่า ในอาหารที่มีน้ำมันชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนผลผลิตของ 3-hydroxy C10 จะสามารถตรวจพบภายใน 36 ชั่วโมง เนื่องจากประกอบด้วยองค์ประกอบด้วยกรดไขมันชนิดต่างๆ ที่มีความสำคัญในการที่เชื้อจะนำไปใช้ในการผลิตสาร นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าผลจากการตรวจวิเคราะห์แสดงการเปลี่ยนแปลงจากกรดไขมันไปเป็นผลิตภัณฑ์ในรูป 3-hydroxydecanoic acid (3OH-C10:0) เกือบทั้งหมด และมีการตรวจพบสาร 3-hydroxyoctanoic acid (3OH-C8:0),3-hydroxydodecanoic acid (3OH-C12:1) และ 3-hydroxydodecanoic acid (3OH-C12:0) ร่วมด้วย เป็นการยืนยันการเกิดสาร glycolipid ได้อย่างชัดเจน

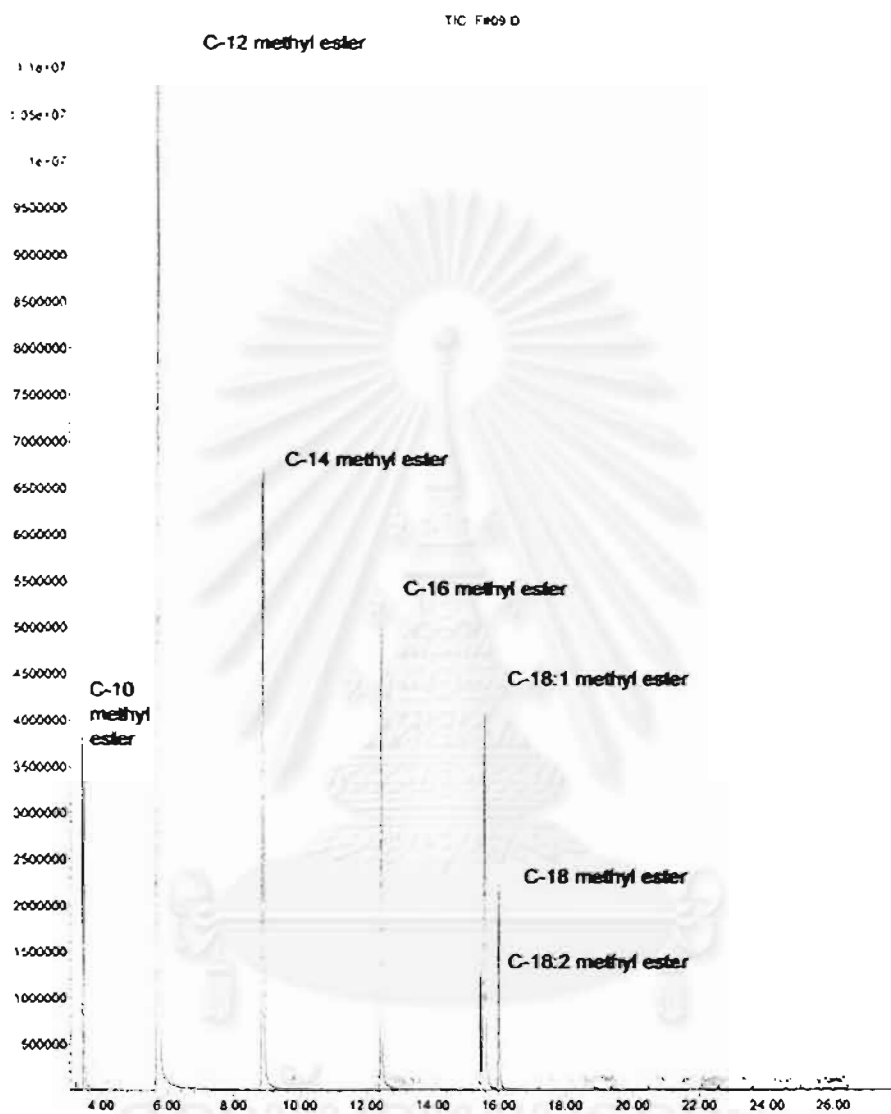
ตารางที่ 4.12 แสดงช่วงเวลาการ เปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของสาร (3-OH-C10:0) ที่ตรวจวิเคราะห์
 ในน้ำเลี้ยงเชื้อ ในอาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ที่มีน้ำมัน 3 ชนิดเป็นแหล่งคาร์บอน

เวลาในการทดลอง (ชั่วโมง)	แหล่งคาร์บอน		
	น้ำมันมะพร้าว	น้ำมันปาล์ม	น้ำมันมะกอก
0	-	-	-
12	-	-	-
24	-	-	-
36	trace	trace	trace
48	trace	trace	trace
60	trace	+	+
72	+	++	++
84	++	+++	+++
96	+++	+++	+++
108	+++	+++	+++
120	+++	+++	+++
132	+++	+++	+++
144	+++	+++	+++
156	+++	+++	+++
168	+++	+++	+++

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

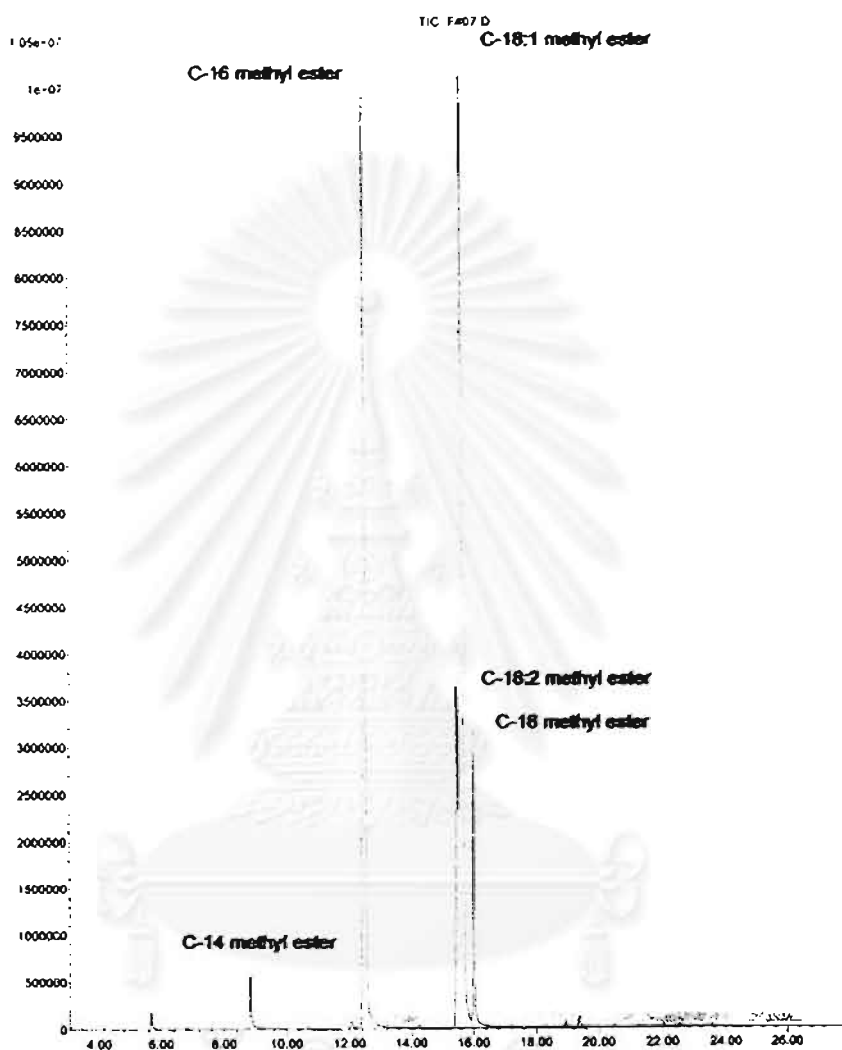
ตารางที่ 4.13 แสดงช่วงเวลาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของสาร (3-OH-C10:0) ที่ตรวจวิเคราะห์
 ในน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดไขมันชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน

เวลาในการทดลอง (ชั่วโมง)	แหล่งคาร์บอน					
	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
0	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-
24	trace	trace	-	trace	+	+
36	+	+	-	+	++	++
48	++	++	trace	++	+++	+++
60	++	++	+	++	+++	+++
72	+++	+++	++	+++	+++	+++
84	+++	+++	+++	+++	+++	+++
96	+++	+++	+++	+++	+++	+++
108	+++	+++	++	+++	+++	+++
120	+++	+++	+	+++	+++	+++
132	+++	+++	+ -	+++	+++	+++
144	+++	+++	+ - -	+++	+++	+++
156	+++	+++	-	+++	+++	+++
168	+++	+++	-	+++	+++	+++



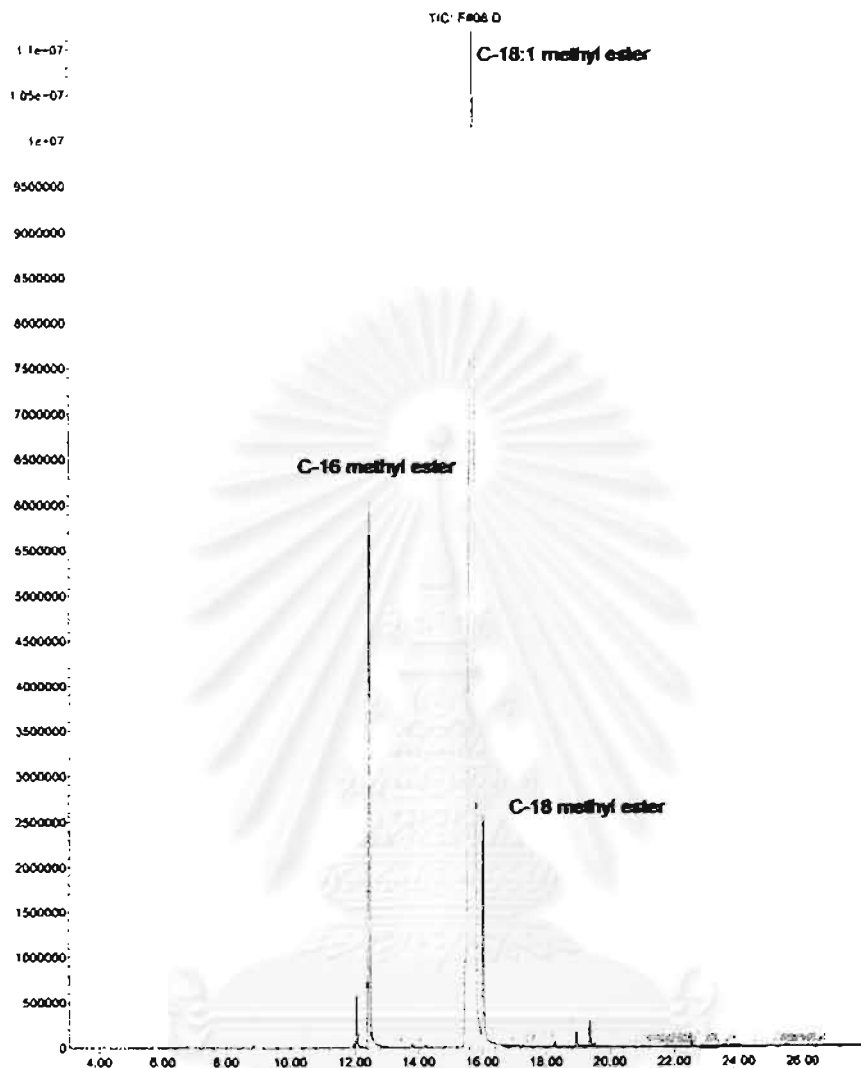
รูปที่ 4.12 แสดงโครมาโตแกรมของ GC-MS ของน้ำมันมะพร้าว

ชนิดของกรดไขมัน	% พื้นที่พีค	ชนิดของกรดไขมัน	% พื้นที่พีค
C12	38.60	C18	4.71
C14	19.20	C10	6.99
C16	13.93	C18:2	2.61
C18:1	11.13		



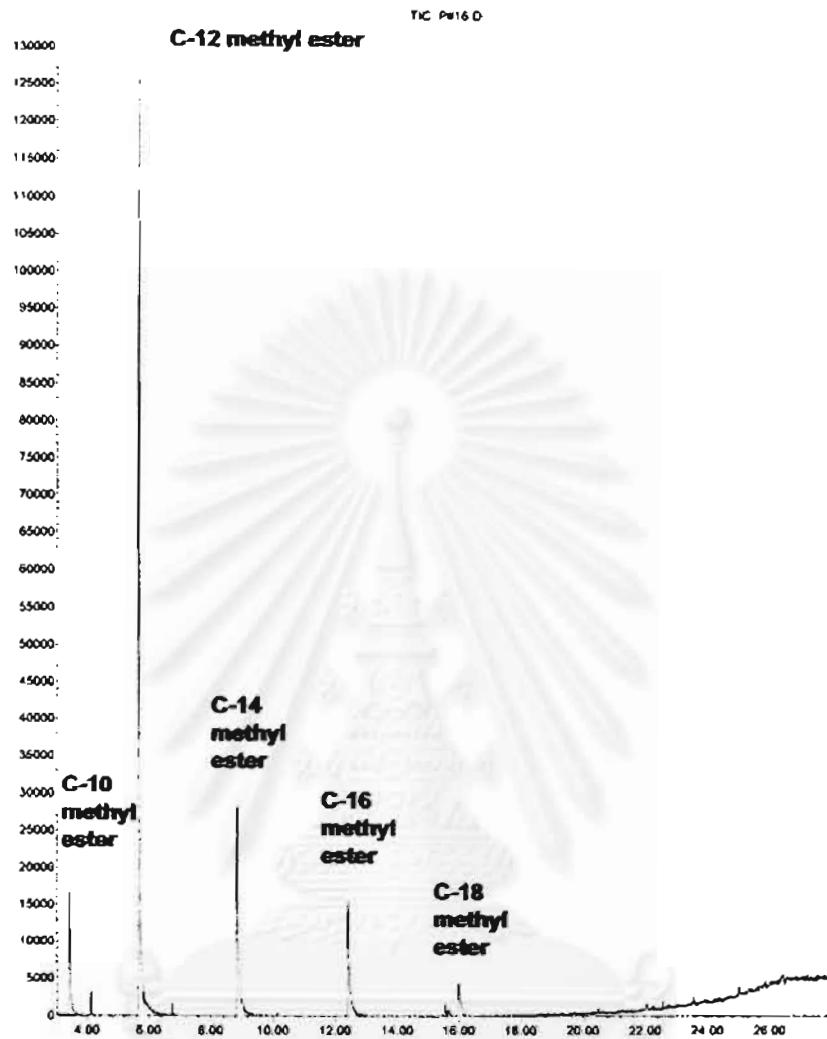
รูปที่ 4.13 แสดงโครมาโตแกรมของ GC-MS ของน้ำมันปาล์ม

ชนิดของกรดไขมัน	% พื้นที่พีค	ชนิดของกรดไขมัน	% พื้นที่พีค
C18:1	41.59	C18	5.70
C16	36.47	C14	1.19
C18:2	11.97		

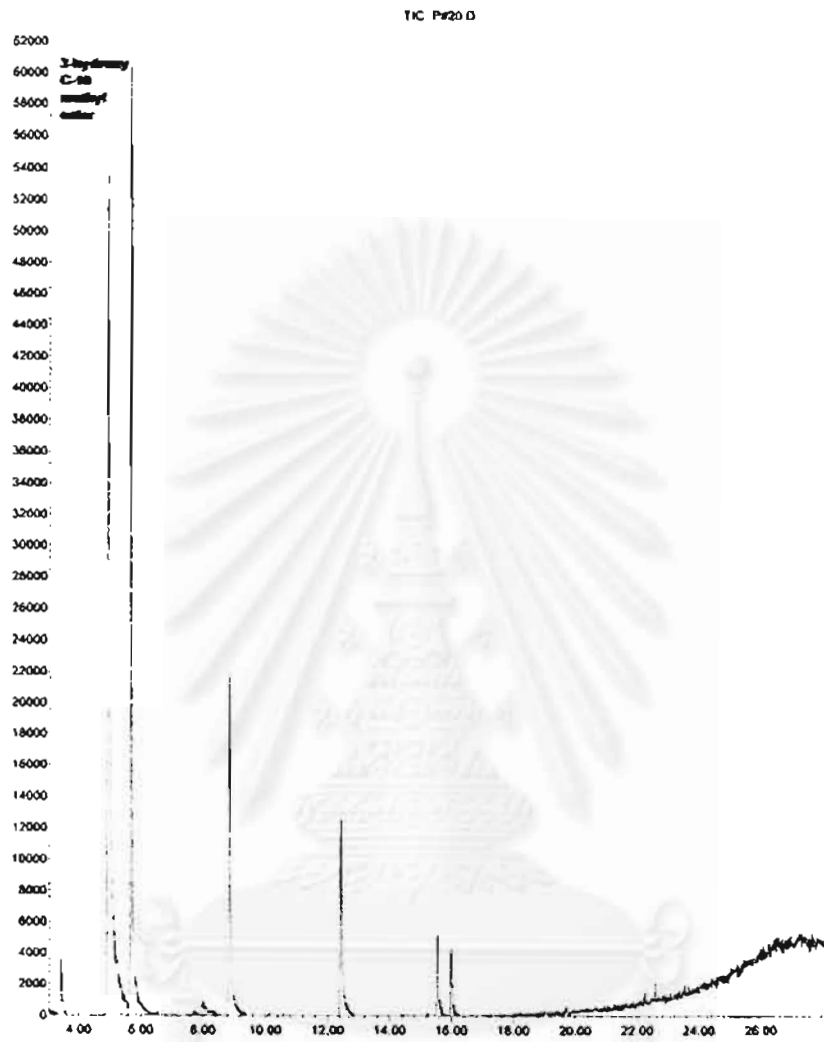


รูปที่ 4.14 แสดงโครมาโตแกรมของ GC-MS ของน้ำมันมะกอก

ชนิดของกรดไขมัน	% พื้นที่พีค	ชนิดของกรดไขมัน	% พื้นที่พีค
C18:1	75.88	C18	5.52
C16	15.26		



รูปที่ 4.15 แสดงโครมาโตแกรมของ GC-MS เมื่อใช้น้ำมันมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอน ที่เวลา 0 ชั่วโมง



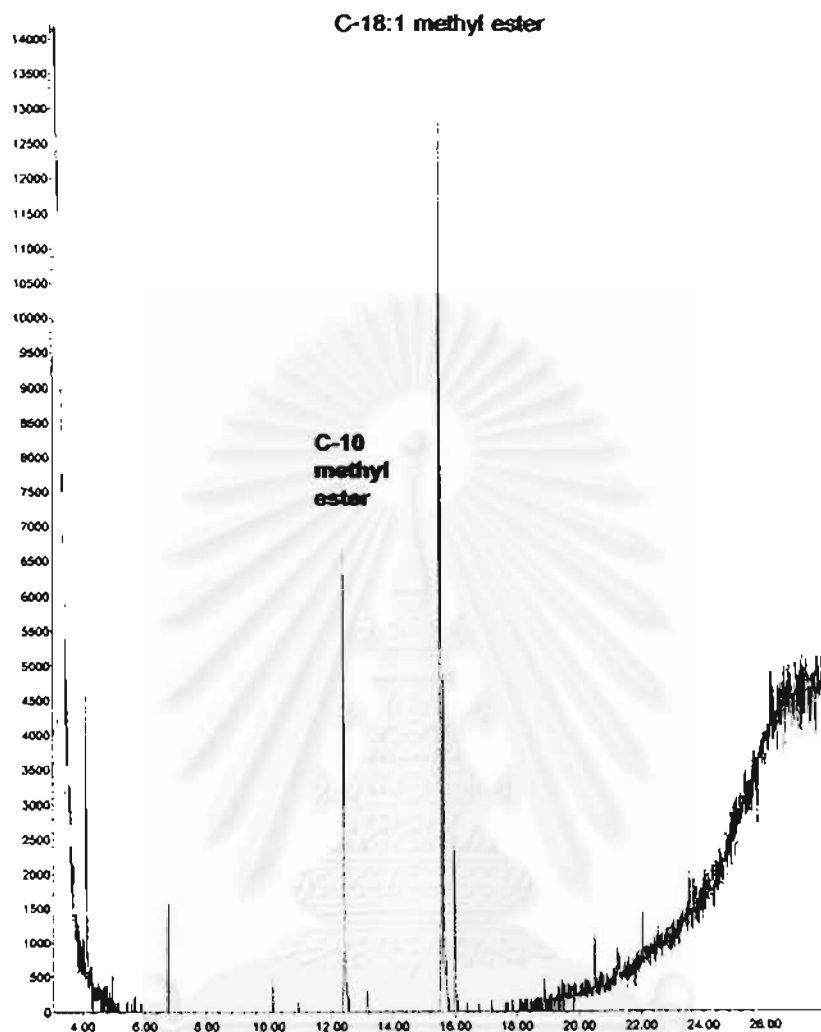
แสดงโครมาโตแกรมของ GC-MS เมื่อใช้น้ำมันมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอน ที่เวลา 60 ชั่วโมง



แสดงโครมาโตแกรมของ GC-MS เมื่อใช้น้ำมันมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอน ที่เวลา 72 ชั่วโมง

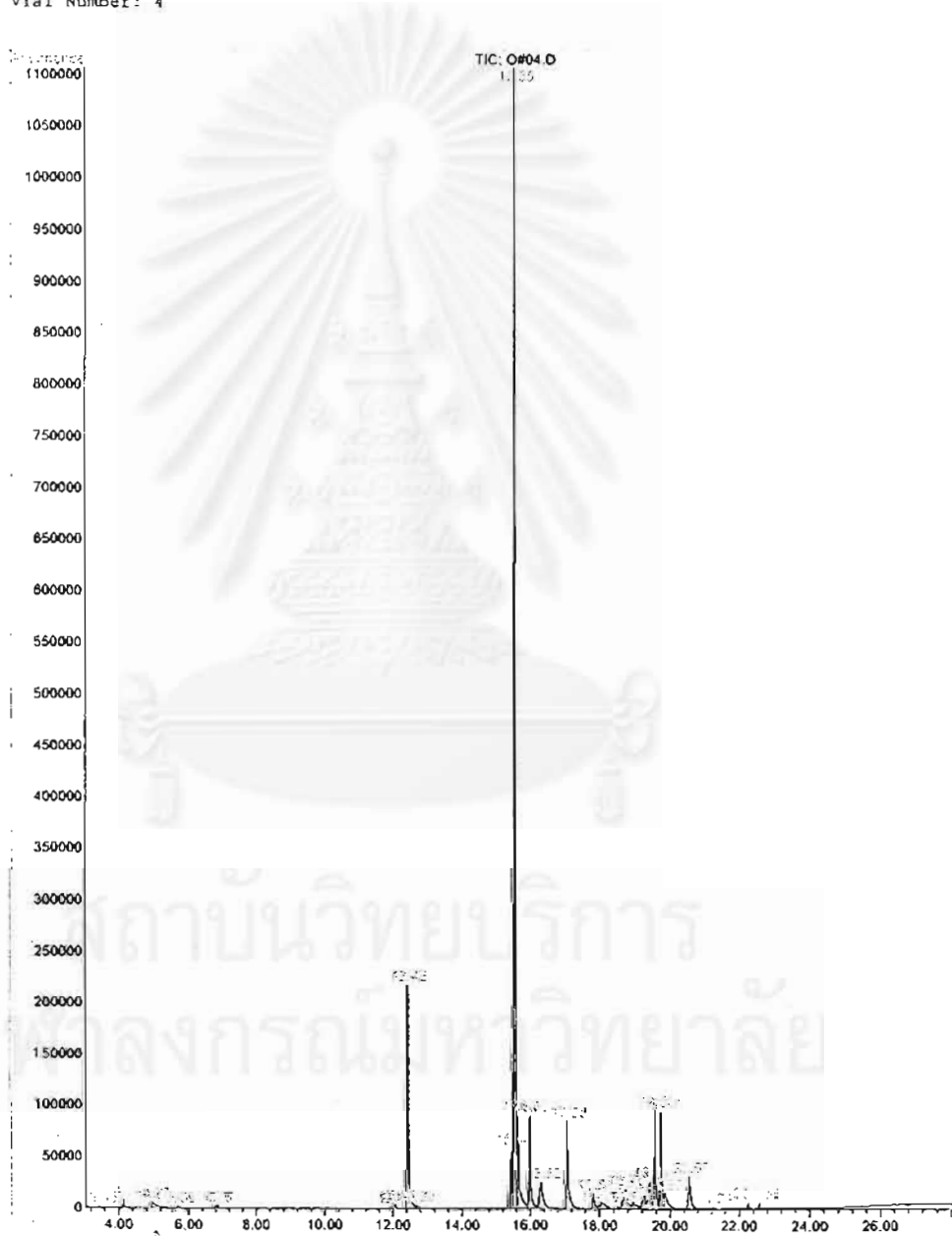


แสดงโครมาโตแกรมของ GC-MS เมื่อนำน้ำมันมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอน ที่เวลา 8.4 ชั่วโมง

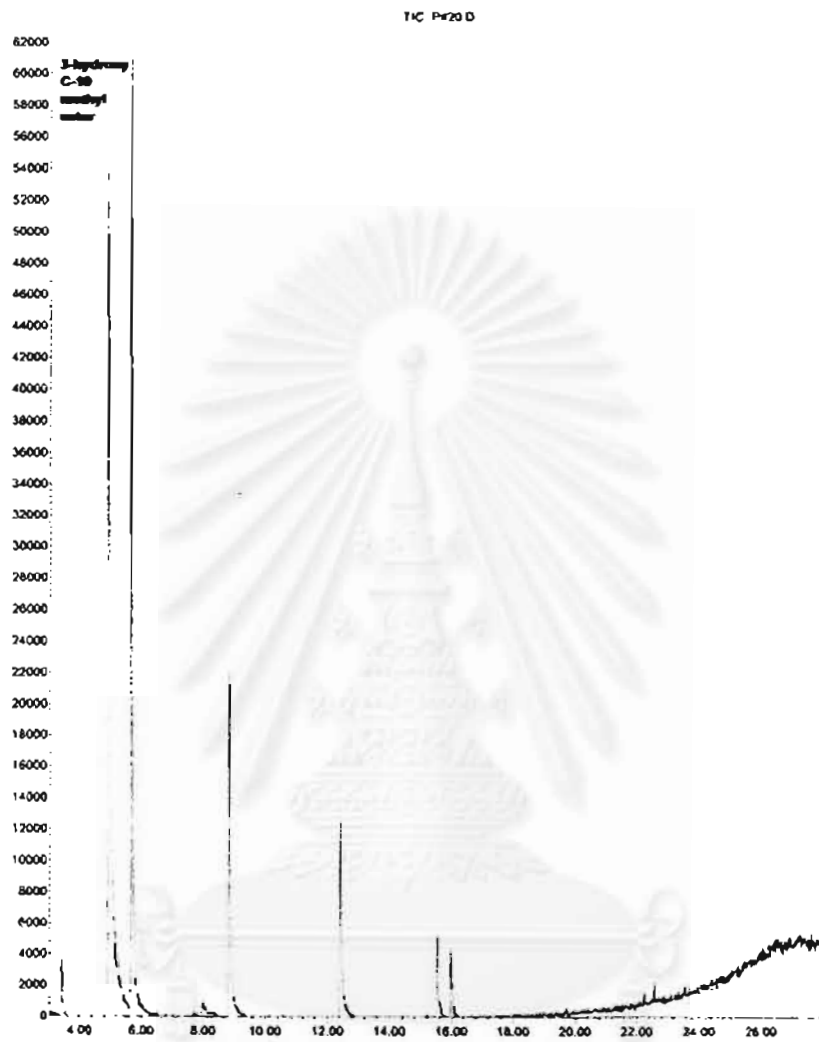


รูปที่ 4.16 แสดงโครมาโตแกรมของ GC-MS เมื่อนำน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอน ที่เวลา 0 ชั่วโมง

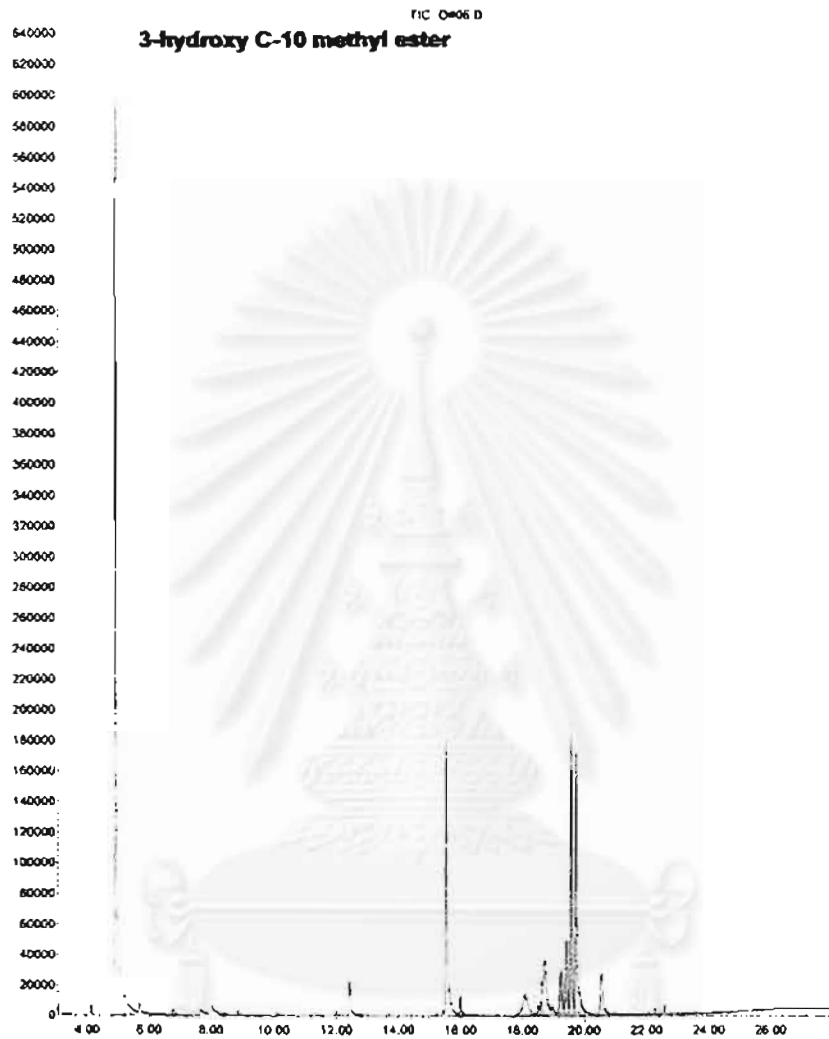
File : C:\HPCHEM\1\DATA\040103\0#04.D
Operator :
Acquired : 3 Apr 2003 14:03 using AcqMethod FAME
Instrument : GC/MS Ins
Sample Name: Olive oil 36 hrs
Misc Info :
Vial Number: 4



แสดงโครมาโตแกรมของ GC-MS เมื่อนำน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอน ที่เวลา 36 ชั่วโมง

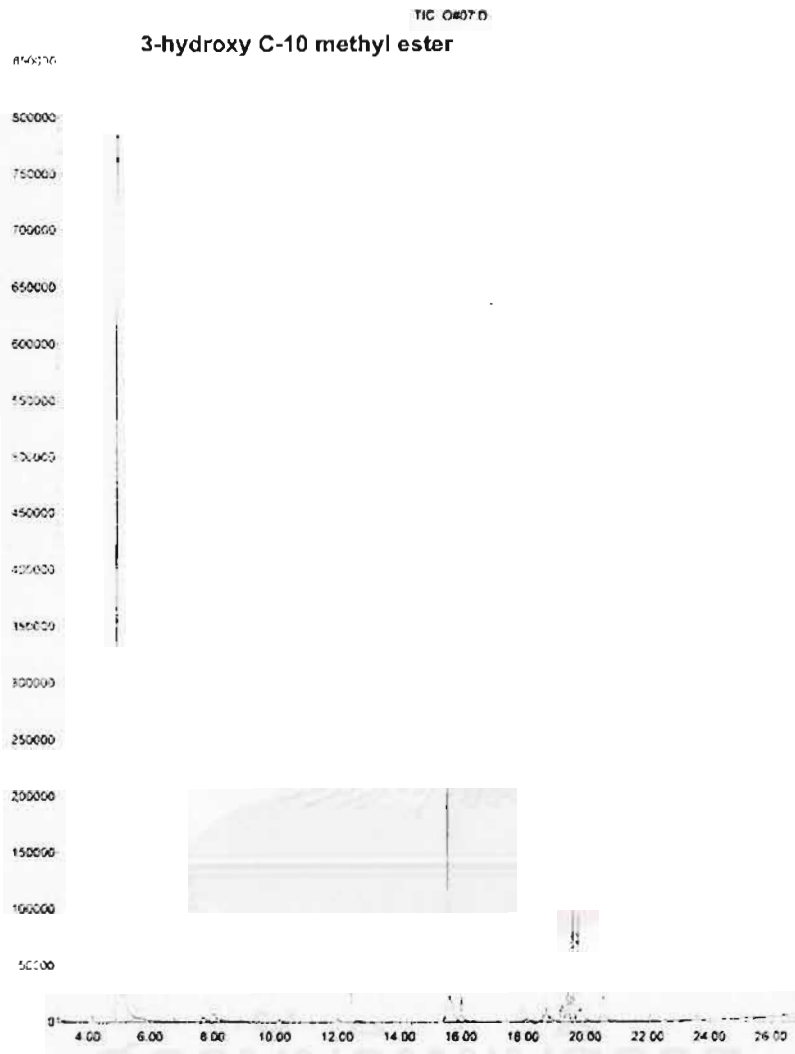


แสดงโครมาโตแกรมของ GC-MS เมื่อนำน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอน ที่เวลา 60 ชั่วโมง



แสดงโครมาโตแกรมของ GC-MS เมื่อนำน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอน ที่เวลา 72 ชั่วโมง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

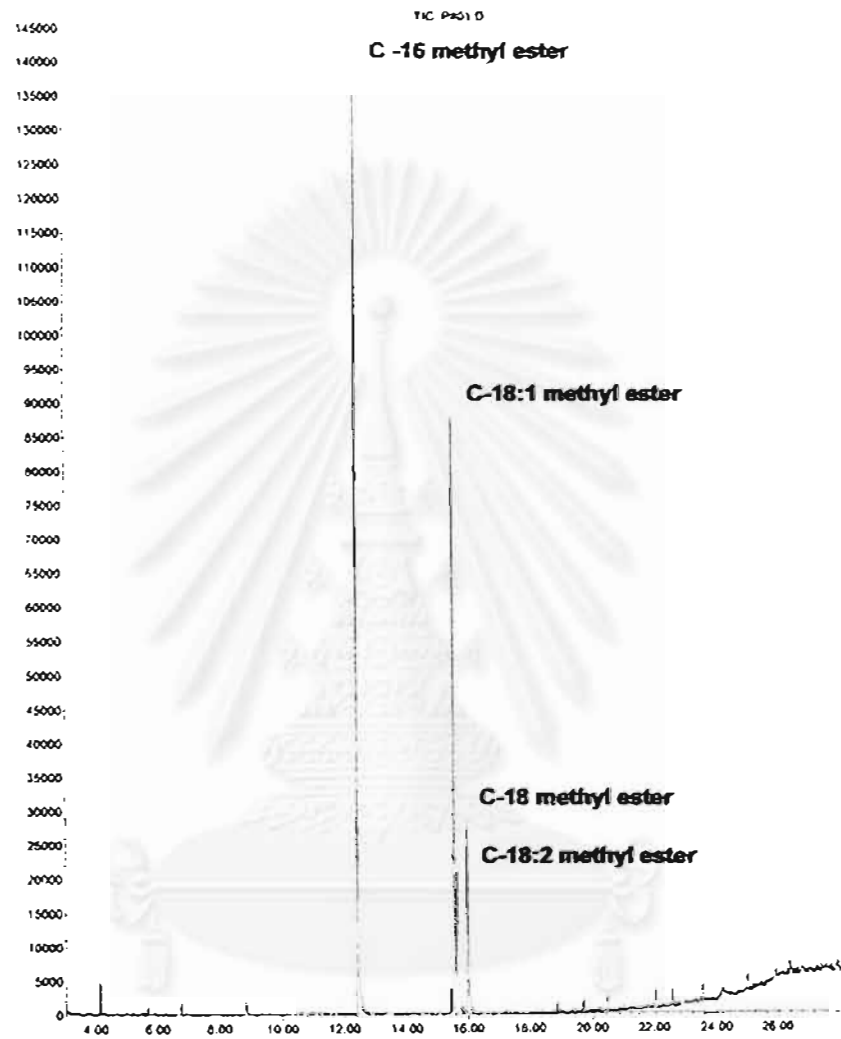


แสดงโครมาโตแกรมของ GC-MS เมื่อนำน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอน ที่เวลา 84 ชั่วโมง

File : C:\HPCHEM\1\DATA\040103\0810.D
Operator :
Acquired : 3 Apr 2003 17:20 using AcqMethod FAME
Instrument : GC/MS Ins
Sample Name: Olive oil 120 hrs
Misc Info :
Vial Number: 10



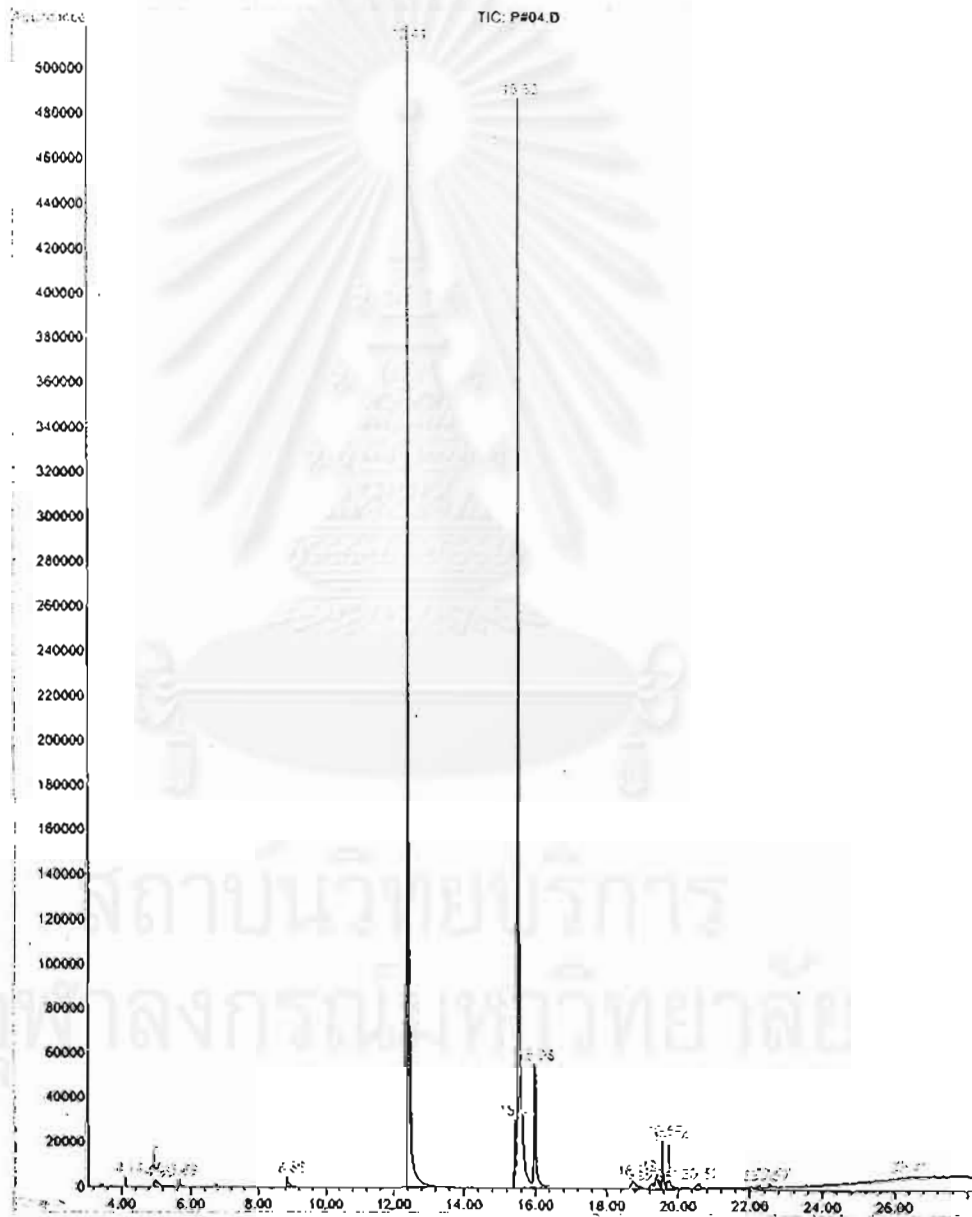
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
แสดงโครมาโตแกรมของ GC-MS เมื่อนำน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอน ที่เวลา 120 ชั่วโมง



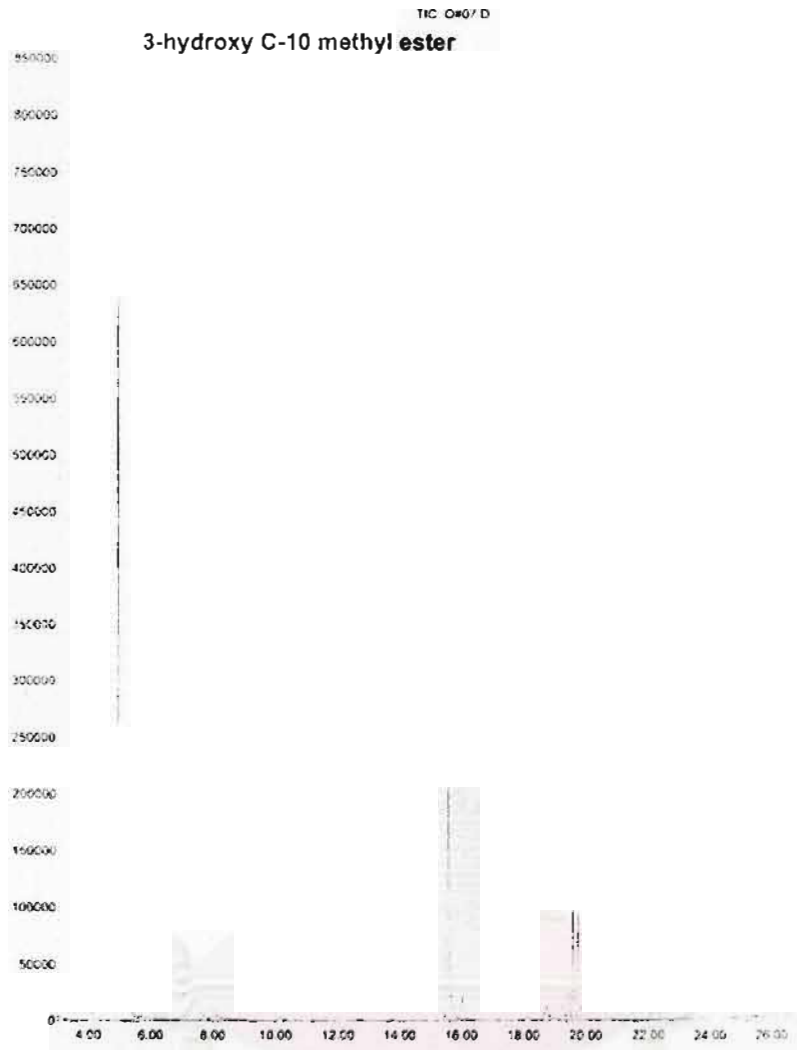
รูปที่ 4.17 แสดงโครมาโตแกรมของ GC-MS เมื่อใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน ที่เวลา 0 ชั่วโมง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

File : C:\HPCHEM\1\DATA\032903\PE04.D
Operator :
Acquired : 29 Mar 2003 10:48 using AcqMethod FAME
Instrument : GC/MS Ins
Sample Name: Palm oil 36 hr
Misc Info :
Vial Number: 4

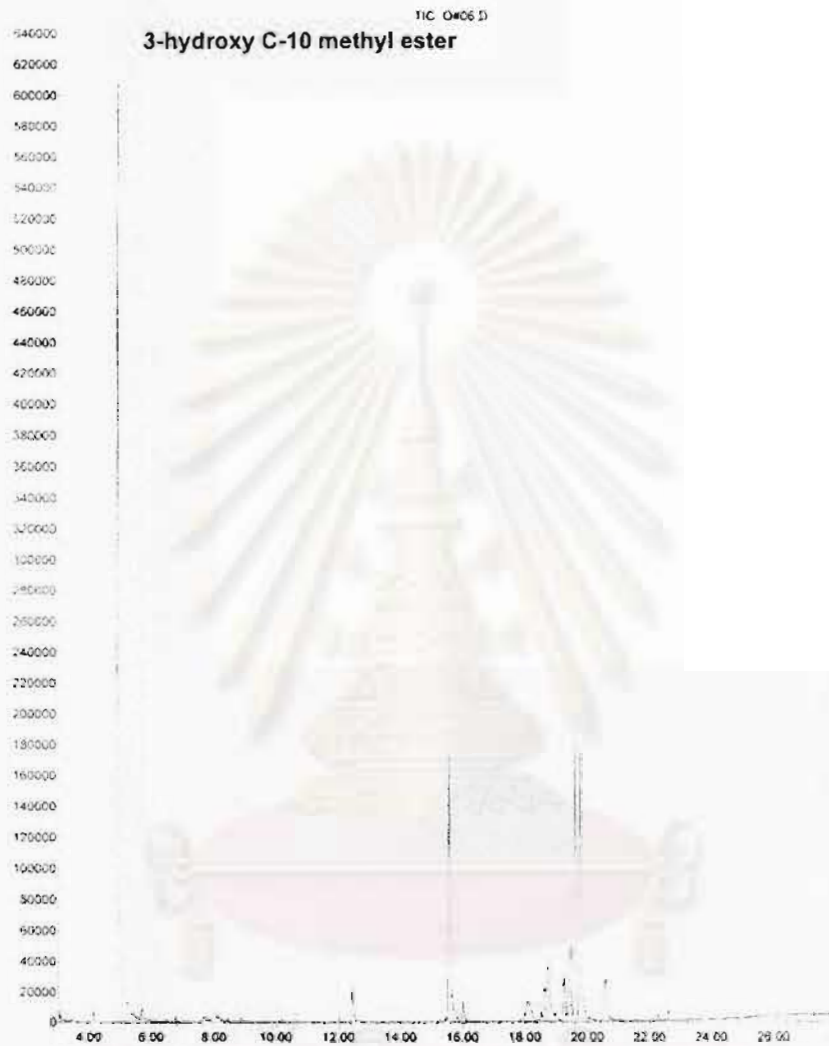


แสดงโครมาโตแกรมของ GC-MS เมื่อใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน ที่เวลา 36 ชั่วโมง



แสดงโครมาโตแกรมของ GC-MS เมื่อใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน ที่เวลา 60 ชั่วโมง

M

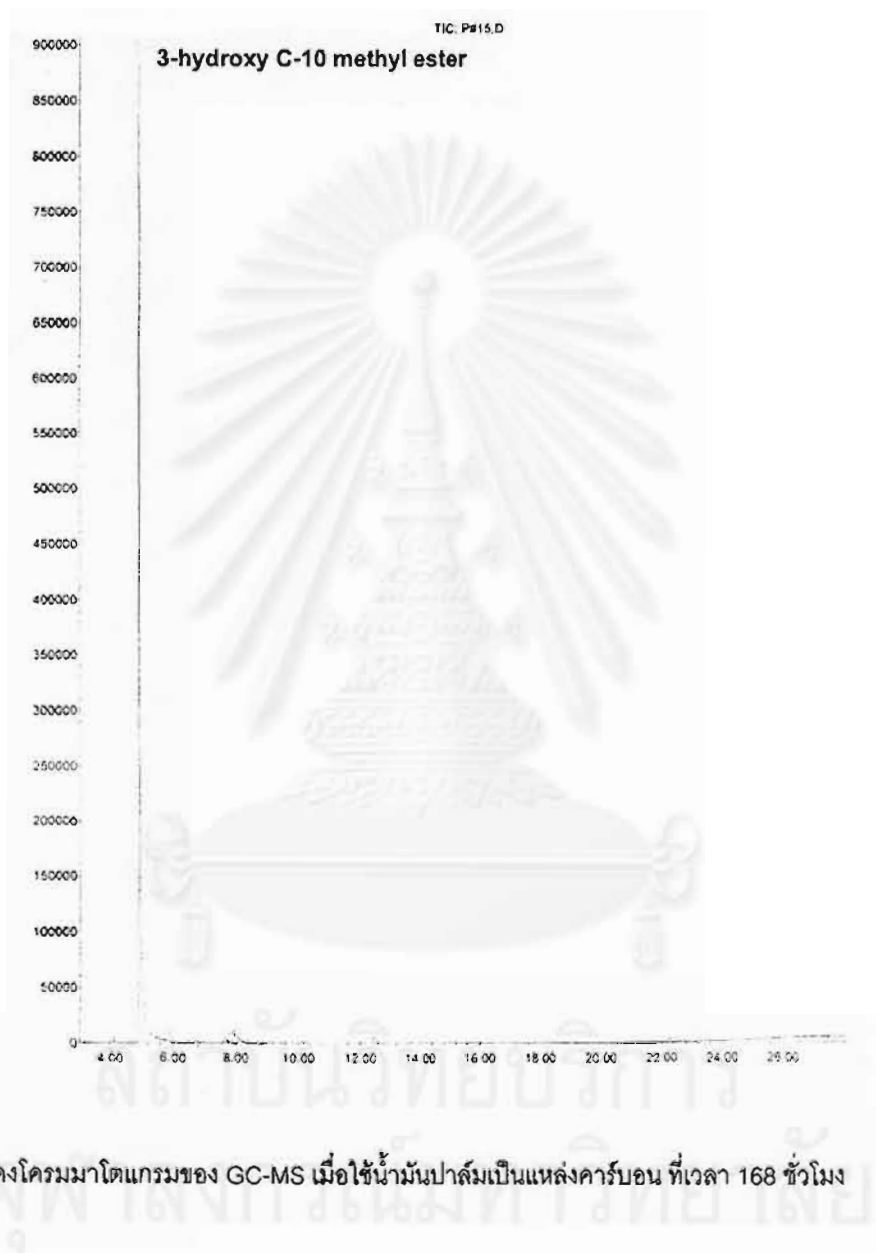


แสดงโครมาโตแกรมของ GC-MS เมื่อใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน ที่เวลา 72 ชั่วโมง

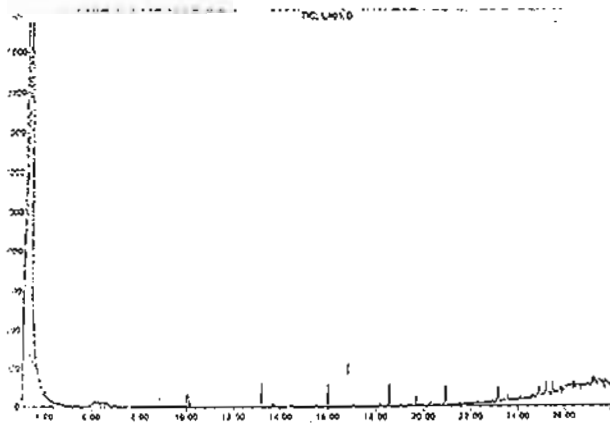
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



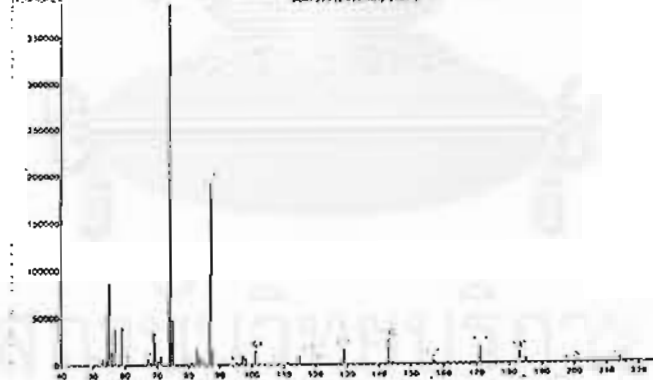
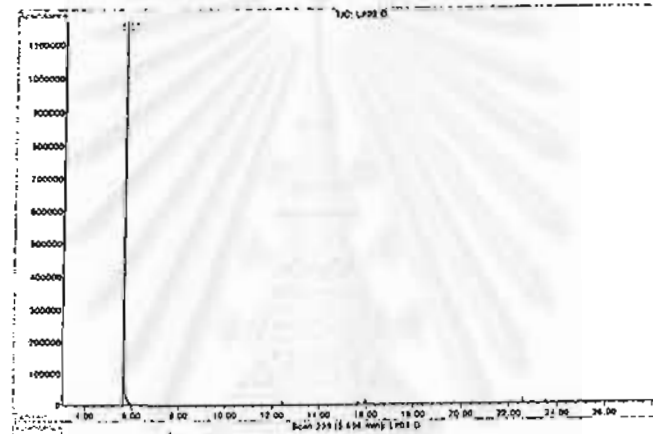
แสดงโครมาโตแกรมของ GC-MS เมื่อนำน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน ที่เวลา 84 ชั่วโมง



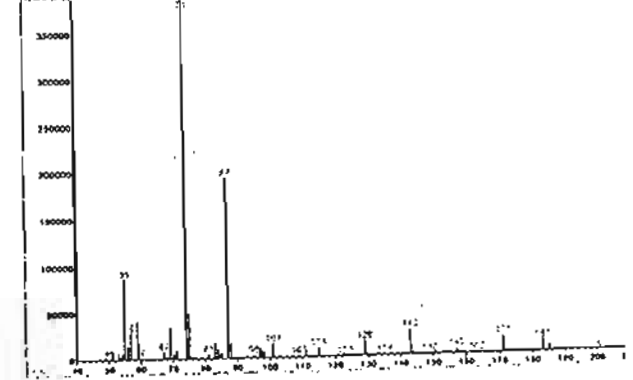
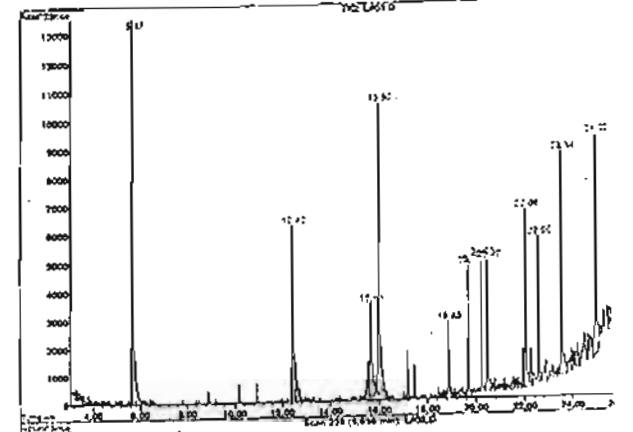
C:\NPKCHEM\1\DATA\101603\1103.D
 15 Oct 2003 11:03 using AcqMethod FAME
 GC/MS Ins
 Sample Name: LAURIC ACID
 Misc Info: 22 HOUR
 Vial Number: 1



File : C:\NPKCHEM\1\DATA\101603\1103.D
 Operator :
 Acquired : 15 Oct 2003 12:35 using AcqMethod FAME
 Instrument : GC/MS Ins
 Sample Name: LAURIC ACID
 Misc Info : 22 HOUR
 Vial Number: 2



File : C:\NPKCHEM\1\DATA\101603\1103.D
 Operator :
 Acquired : 15 Oct 2003 13:03 using AcqMethod FAME
 Instrument : GC/MS Ins
 Sample Name: LAURIC ACID
 Misc Info : 21 HOUR
 Vial Number: 3



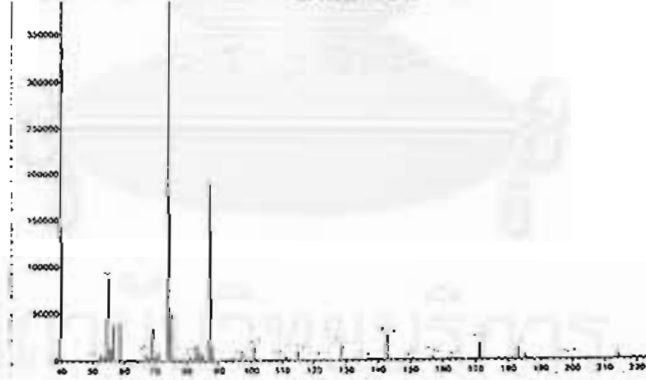
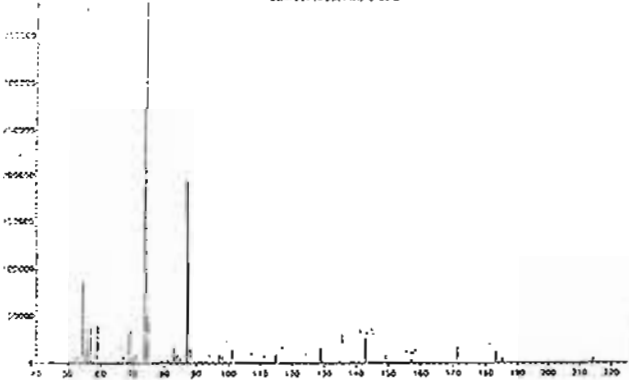
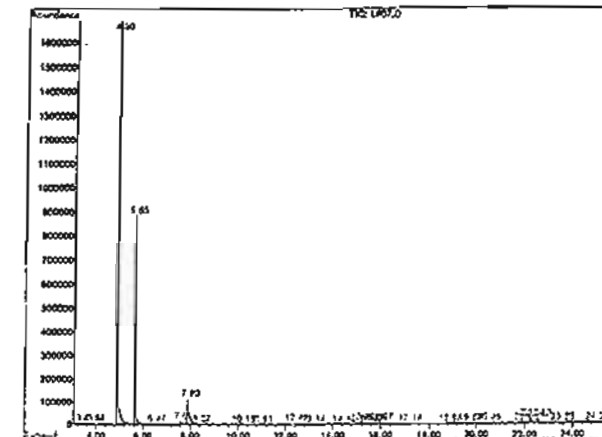
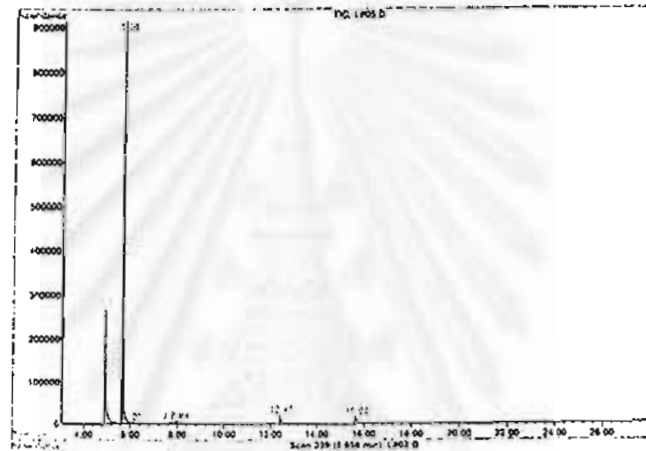
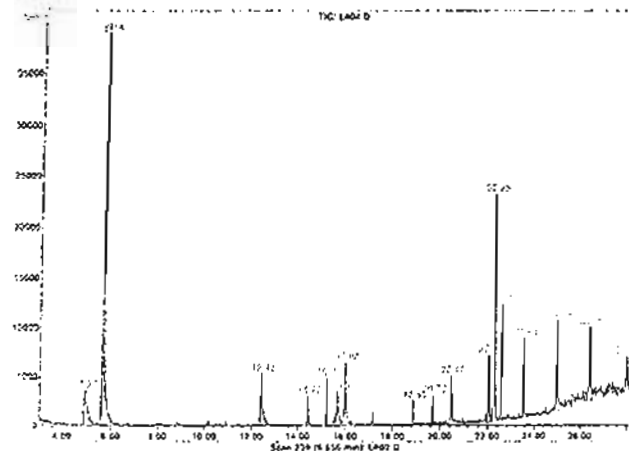
รูปที่ 4.18 GC Profile ของน้ำเค็มเชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในกรดลอร์ริก



File : C:\PROGDATA\101403\1107.D
 Operator :
 Acquired : 15 Oct 2003 13:41 using AcqMethod FAME
 Instrument : GC/MS Ins
 Sample Name: LAURIC ACID
 Misc Info : 16 HOUR
 Vial Number: 4

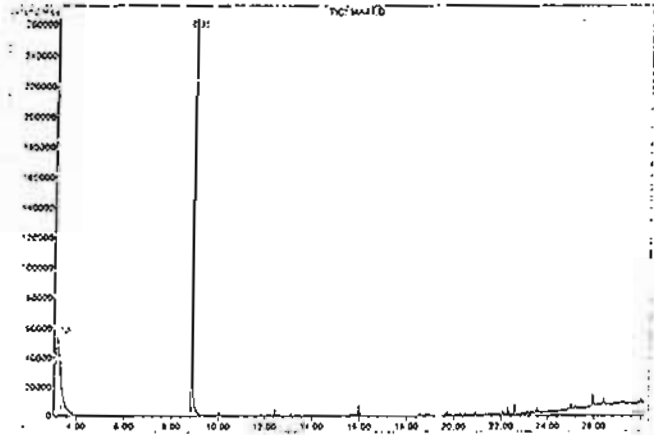
File : C:\PROGDATA\101403\1105.D
 Operator :
 Acquired : 15 Oct 2003 14:14 using AcqMethod FAME
 Instrument : GC/MS Ins
 Sample Name: LAURIC ACID
 Misc Info : 18 HOUR
 Vial Number: 5

File : C:\PROGDATA\101403\1107.D
 Operator :
 Acquired : 16 Oct 2003 11:20 using AcqMethod FAME
 Instrument : GC/MS Ins
 Sample Name: LAURIC ACID
 Misc Info : 12 HOUR
 Vial Number: 7

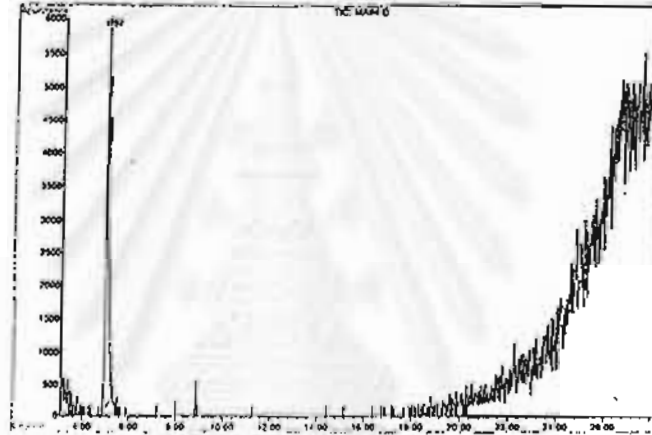


จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

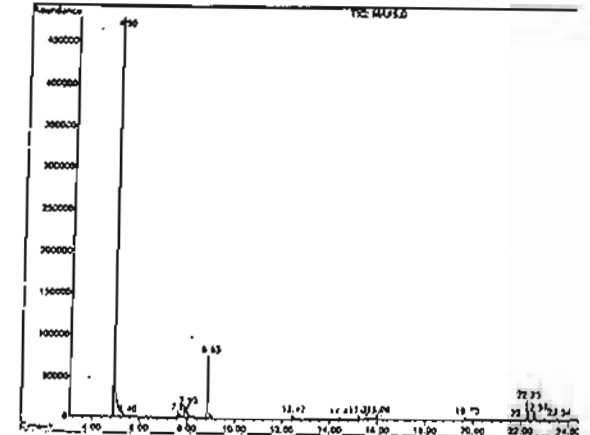
File: C:\MSDCHEM\1\DATA\100403\0011.D
 Date: 4 Oct 2003 8:07 using AcqMethod FAME
 Instrument: GC/MS Inz
 Sample Name: MYRISTIC ACID
 Misc Info: 0 HOUR
 Vial Number: 1



File: C:\MSDCHEM\1\DATA\100403\0011.D
 Operator: [blank]
 Acquired: 4 Oct 2003 10:33 using AcqMethod FAME
 Instrument: GC/MS Inz
 Sample Name: MYRISTIC ACID
 Misc Info: 0 HOUR
 Vial Number: 4

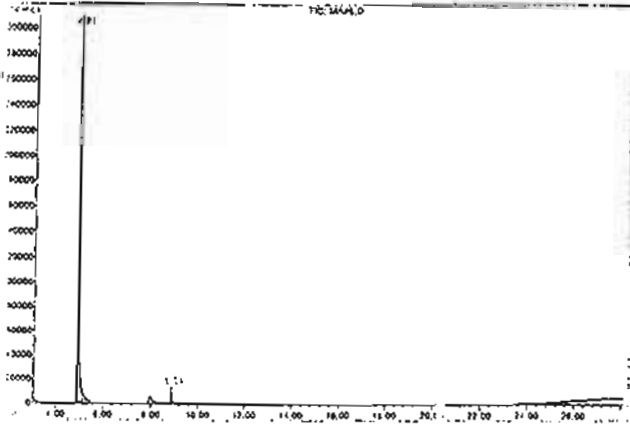


File: C:\MSDCHEM\1\DATA\100403\0011.D
 Operator: [blank]
 Acquired: 4 Oct 2003 11:06 using AcqMethod FAME
 Instrument: GC/MS Inz
 Sample Name: MYRISTIC ACID
 Misc Info: 0 HOUR
 Vial Number: 5

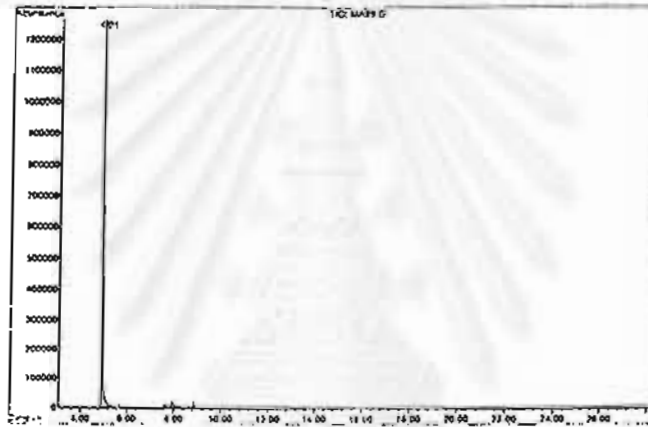


รูปที่ 4.19 GC Profile ของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในกรดไมริสติก

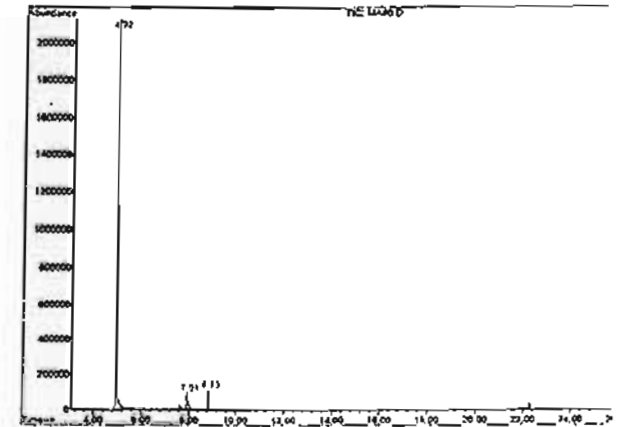
File : C:\NPKCH\1\DATA\100403\0416.D
 Operator :
 Acquired : 4 Oct 2003 13:29 using AcqMethod: FAME
 Instrument : GC/MS Inp
 Sample Name: MYRISTIC ACID
 Misc Info : 96 HOUR
 Vial Number: 6



File : C:\NPKCH\1\DATA\100403\0419.D
 Operator :
 Acquired : 4 Oct 2003 13:18 using AcqMethod: FAME
 Instrument : GC/MS Inp
 Sample Name: MYRISTIC ACID
 Misc Info : 96 HOUR
 Vial Number: 9

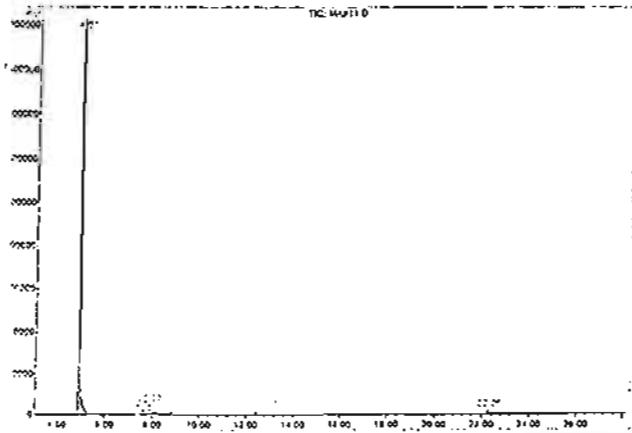


File : C:\NPKCH\1\DATA\100403\0410.D
 Operator :
 Acquired : 4 Oct 2003 13:51 using AcqMethod: FAME
 Instrument : GC/MS Inp
 Sample Name: MYRISTIC ACID
 Misc Info : 104 HOUR
 Vial Number: 10

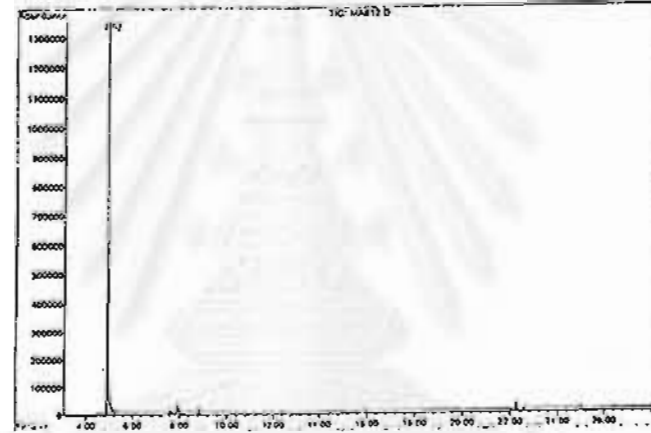


สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

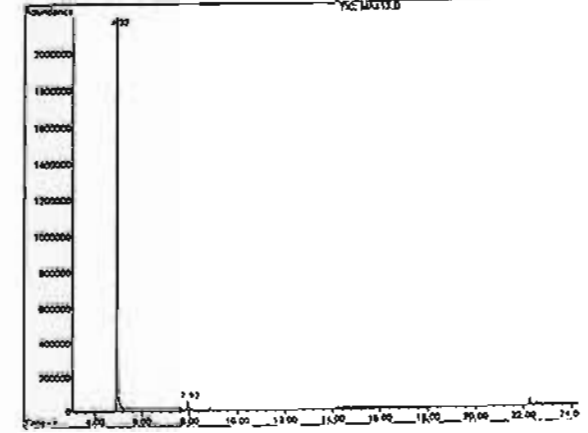
File : C:\NCPORDM\DATA\100403\UN111.D
 Operator :
 Acquired : 4 Oct 2003 14:24 using AcqMethod FAME
 Instrument : GC/MS Ins
 Sample Name: MYRISTIC ACID
 Hlad Info : 120 HOUR
 Vial Number: 13



File : C:\NCPORDM\DATA\100403\UN112.D
 Operator :
 Acquired : 4 Oct 2003 14:57 using AcqMethod FAME
 Instrument : GC/MS Ins
 Sample Name: MYRISTIC ACID
 Hlad Info : 122 HOUR
 Vial Number: 12

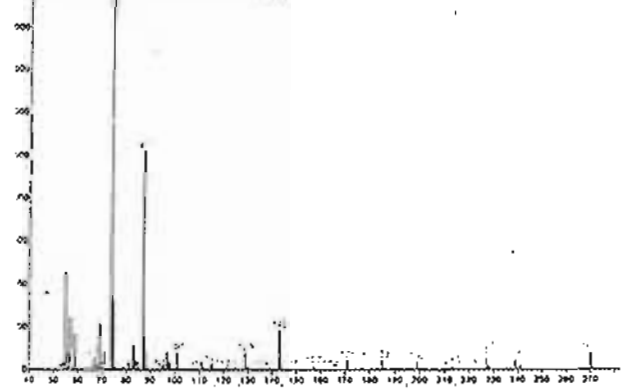
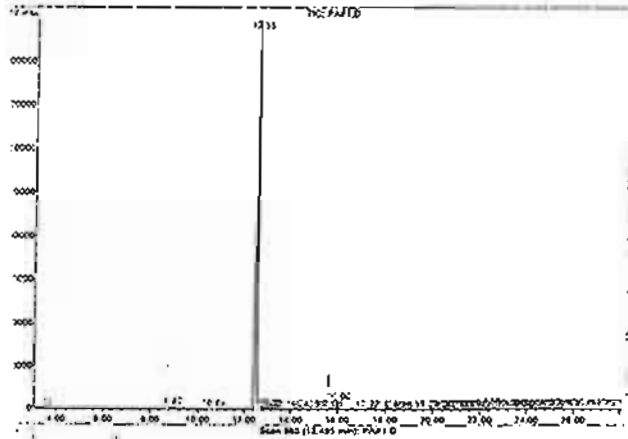


File : C:\NCPORDM\DATA\100403\UN113.D
 Operator :
 Acquired : 4 Oct 2003 15:30 using AcqMethod FAME
 Instrument : GC/MS Ins
 Sample Name: MYRISTIC ACID
 Hlad Info : 141 HOUR
 Vial Number: 13

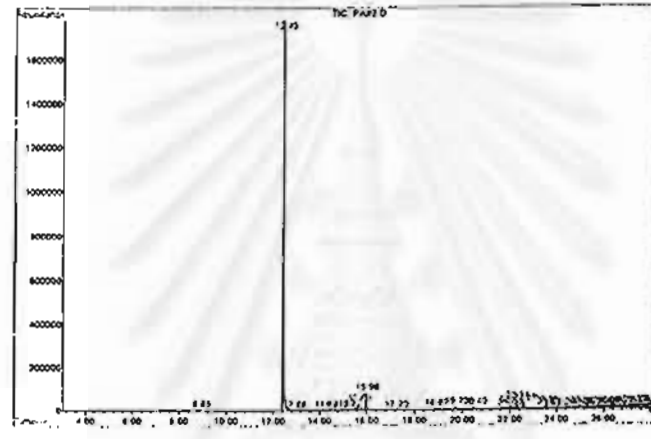


สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

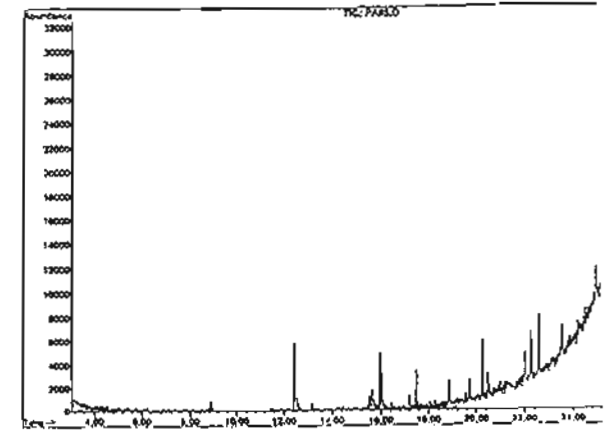
File : C:\RPNCH\1\DATA\100103\FA15.D
 Date : 1 Oct 2003 15:31 using AcqMethod FAME
 Instrument : GC/MS Ina
 Sample Name: PLANTIC ACID
 Misc Info : 12 HOUR
 Vial Number: 1



File : C:\RPNCH\1\DATA\100103\FA17.D
 Operator :
 Acquired : 1 Oct 2003 16:05 using AcqMethod FAME
 Instrument : GC/MS Ina
 Sample Name: PLANTIC ACID
 Misc Info : 12 HOUR
 Vial Number: 2

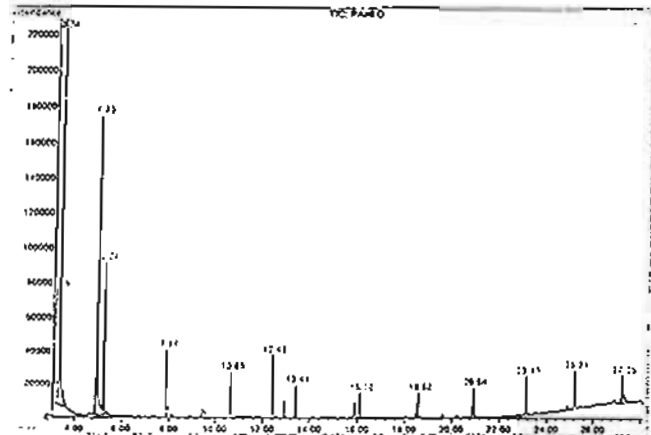


File : C:\RPNCH\1\DATA\100103\FA15.D
 Operator :
 Acquired : 1 Oct 2003 17:41 using AcqMethod FAME
 Instrument : GC/MS Ina
 Sample Name: PLANTIC ACID
 Misc Info : 12 HOUR
 Vial Number: 3

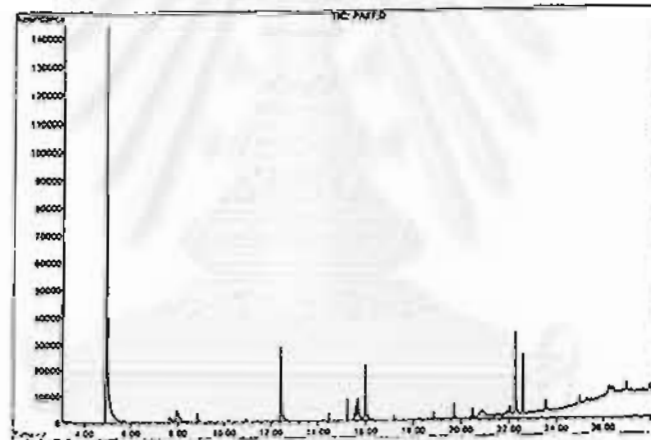


รูปที่ 4.20 GC Profile ของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในกรดพลาสมิดิก

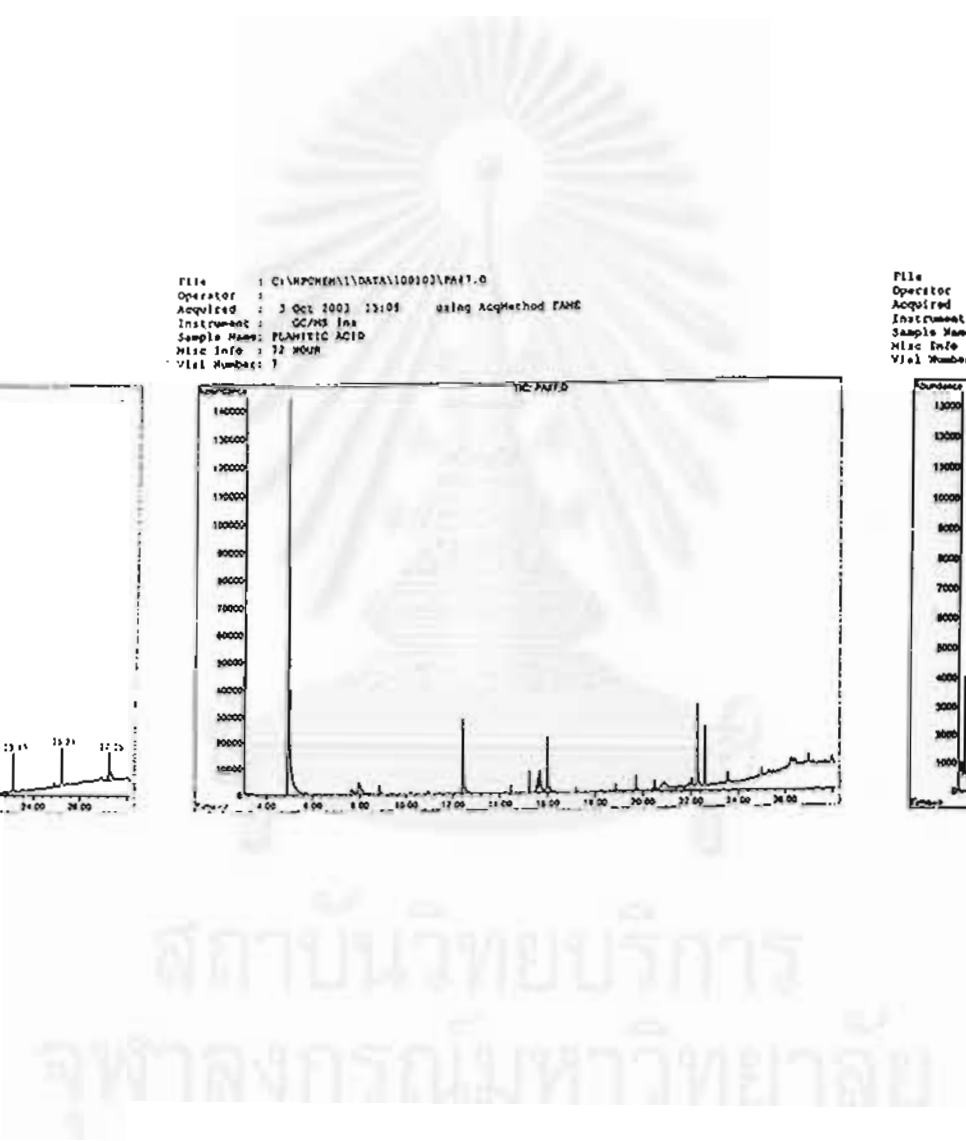
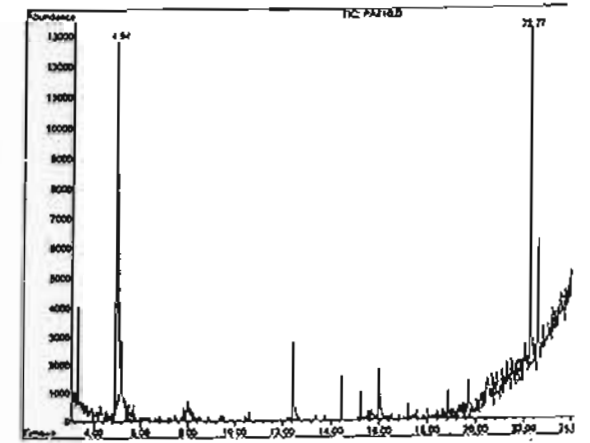
File : C:\PCKEM\DATA\100103\PA16.D
 Operator :
 Acquired : 3 Oct 2003 14:34 using AcqMethod FAMS
 Instrument : GC/MS InJ
 Sample Name: PLAMITIC ACID
 Misc Info : 10 HOUR
 Vial Number: 6



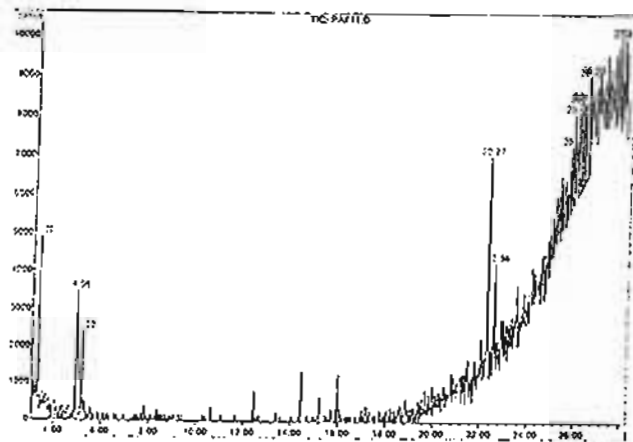
File : C:\PCKEM\DATA\100103\PA17.D
 Operator :
 Acquired : 3 Oct 2003 13:08 using AcqMethod FAMS
 Instrument : GC/MS InJ
 Sample Name: PLAMITIC ACID
 Misc Info : 12 HOUR
 Vial Number: 7



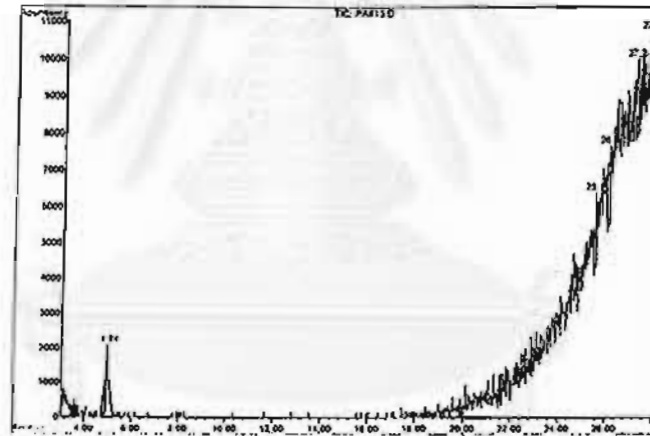
File : C:\PCKEM\DATA\100103\PA110.D
 Operator :
 Acquired : 3 Oct 2003 16:11 using AcqMethod FAMS
 Instrument : GC/MS InJ
 Sample Name: PLAMITIC ACID
 Misc Info : 104 HOUR
 Vial Number: 10



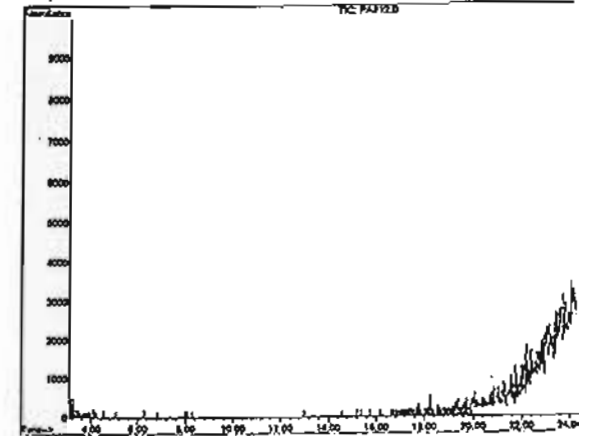
File : C:\MPCHEM\1\DATA\100103\PA111.D
 Date : 3 Oct 2003 17:21 using AcqMethod FAME
 Instrument : GC/MS Inv
 Sample Name : PLAMITIC ACID
 Misc Info : 120 HOUR
 Vial Number: 11



File : C:\MPCHEM\1\DATA\100103\PA113.D
 Operator :
 Acquired : 3 Oct 2003 18:27 using AcqMethod FAME
 Instrument : GC/MS Inv
 Sample Name : PLAMITIC ACID
 Misc Info : 144 HOUR
 Vial Number: 13

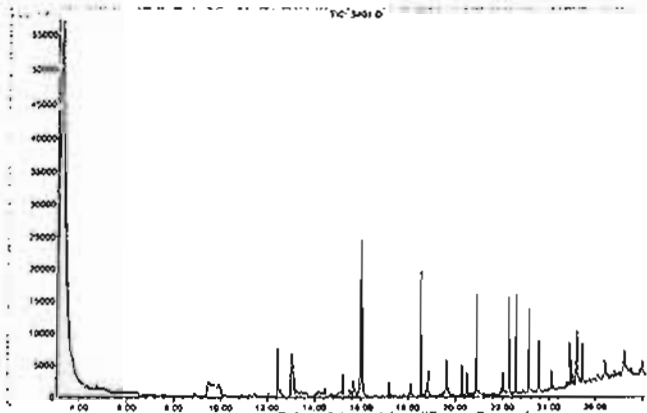


File : C:\MPCHEM\1\DATA\100103\PA112.D
 Operator :
 Acquired : 3 Oct 2003 17:54 using AcqMethod FAME
 Instrument : GC/MS Inv
 Sample Name : PLAMITIC ACID
 Misc Info : 116 HOUR
 Vial Number: 12

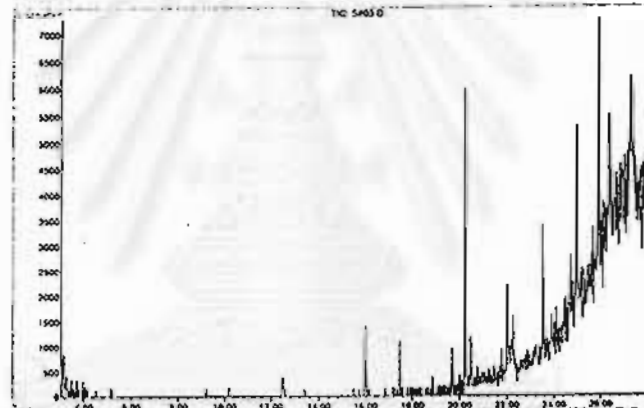


สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

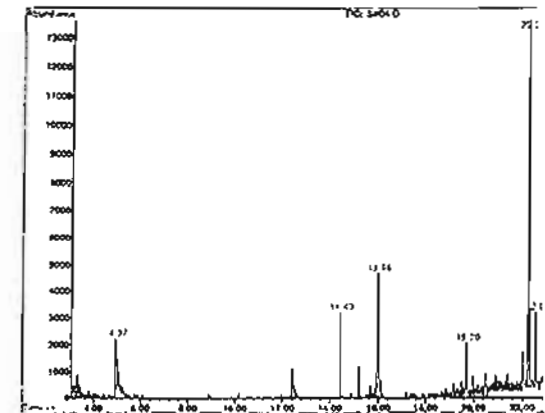
File : C:\PCHEN\1\DATA\101103\101.D
 Operator :
 Acquired : 11 Oct 2003 9:02 using AcqMethod FAMS
 Instrument : GC/MS Ins
 Sample Name: STEARIC ACID
 Misc Info : 0 HOUR
 Vial Number: 1



File : C:\PCHEN\1\DATA\101103\103.D
 Operator :
 Acquired : 11 Oct 2003 10:08 using AcqMethod FAMS
 Instrument : GC/MS Ins
 Sample Name: STEARIC ACID
 Misc Info : 24 HOUR
 Vial Number: 3

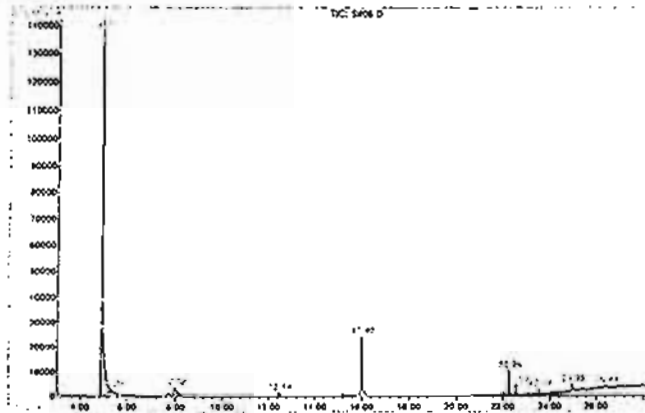


File : C:\PCHEN\1\DATA\101103\104.D
 Operator :
 Acquired : 11 Oct 2003 10:41 using AcqMethod FAMS
 Instrument : GC/MS Ins
 Sample Name: STEARIC ACID
 Misc Info : 36 HOUR
 Vial Number: 4

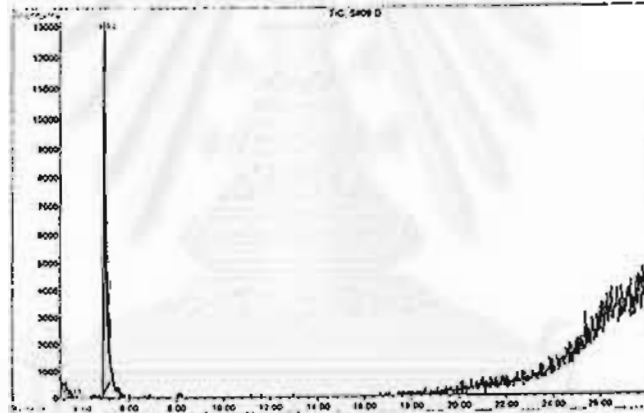


รูปที่ 4.21 GC Profile ของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในกรดตเตวียริก

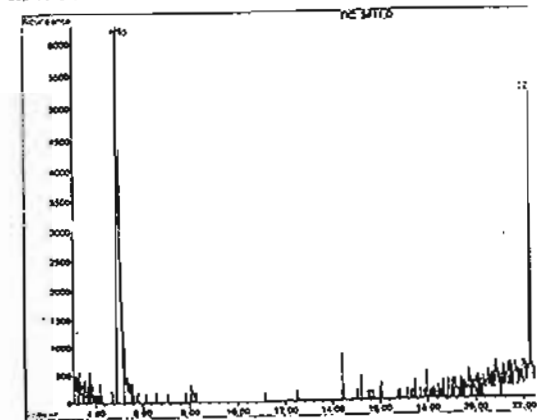
File : C:\NPKOR\1\DATA\101103\5106.D
 Operator :
 Acquired : 11 Oct 2003 11:17 using Acquisition FAME
 Instrument : GC/MS Ina
 Sample Name: STEARIC ACID
 Misc Info : 60 HOUR
 Vial Number: 6



File : C:\NPKOR\1\DATA\101103\5109.D
 Operator :
 Acquired : 11 Oct 2003 13:25 using Acquisition FAME
 Instrument : GC/MS Ina
 Sample Name: STEARIC ACID
 Misc Info : 96 HOUR
 Vial Number: 9

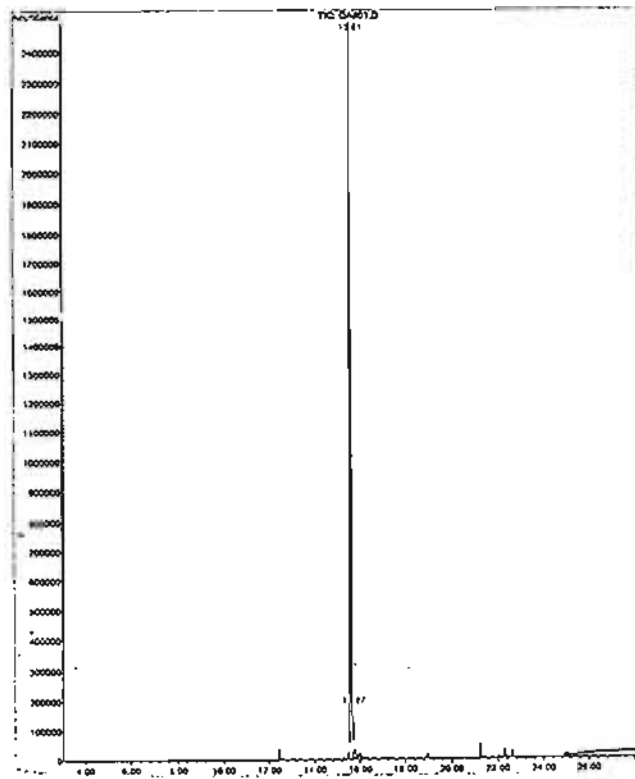


File : C:\NPKOR\1\DATA\101103\5411.D
 Operator :
 Acquired : 11 Oct 2003 14:31 using Acquisition FAME
 Instrument : GC/MS Ina
 Sample Name: STEARIC ACID
 Misc Info : 120 HOUR
 Vial Number: 11

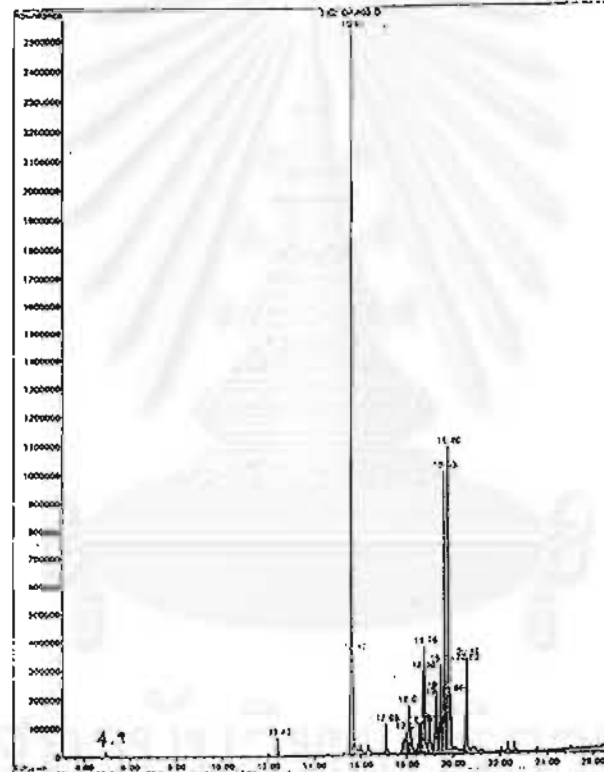


สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

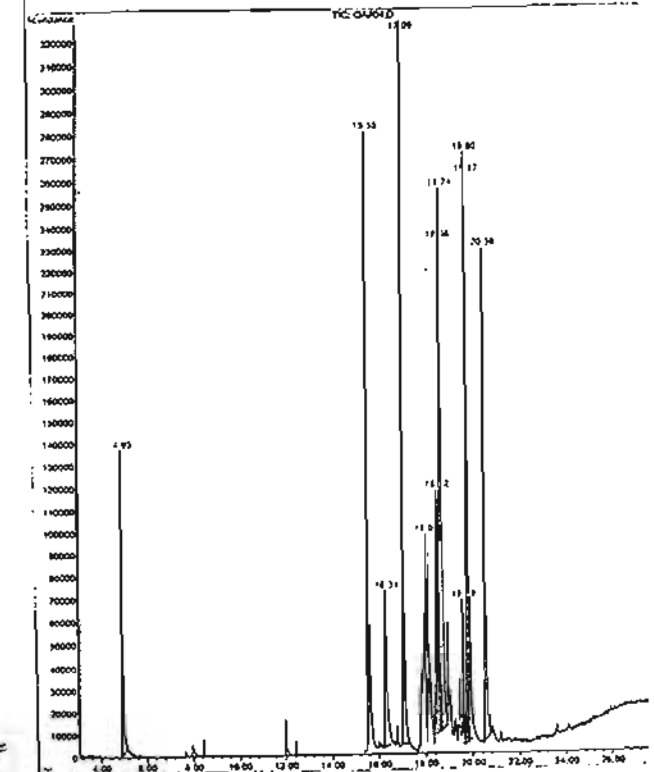
```
File       : C:\NCPCHD\1\DATA\091303\0A101.D
Operator   :
Acquired   : 17 Sep 2003 14:07   using AcqMethod FAME
Instrument : GC/MS Ins
Sample Name: OLEIC ACID
Misc Info  : 0 HOUR
Vial Number: 1
```



```
File       : C:\NCPCHD\1\DATA\091303\0A103.D
Operator   :
Acquired   : 17 Sep 2003 15:13   using AcqMethod FAME
Instrument : GC/MS Ins
Sample Name: OLEIC ACID
Misc Info  : 24 HOUR
Vial Number: 3
```

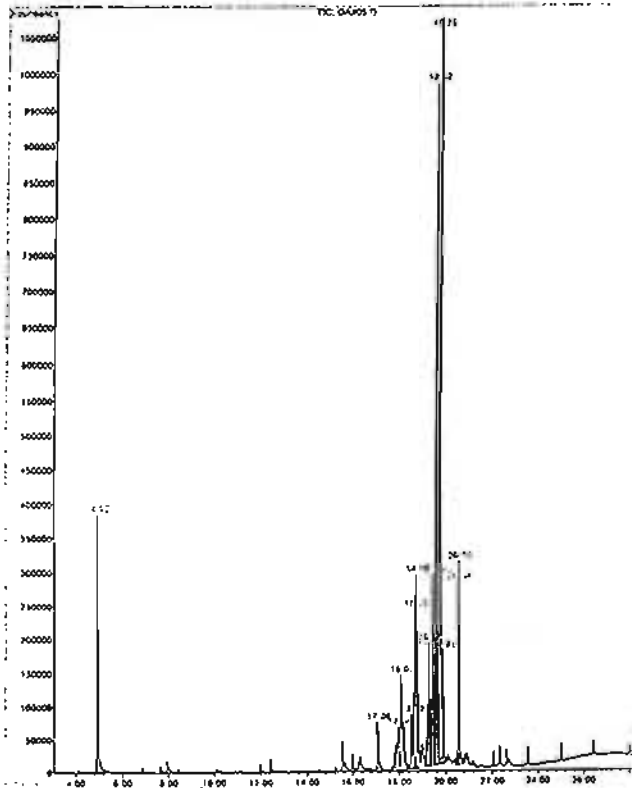


```
File       : C:\NCPCHD\1\DATA\091303\0A101.D
Operator   :
Acquired   : 17 Sep 2003 15:45   using AcqMethod FAME
Instrument : GC/MS Ins
Sample Name: OLEIC ACID
Misc Info  : 36 HOUR
Vial Number: 5
```

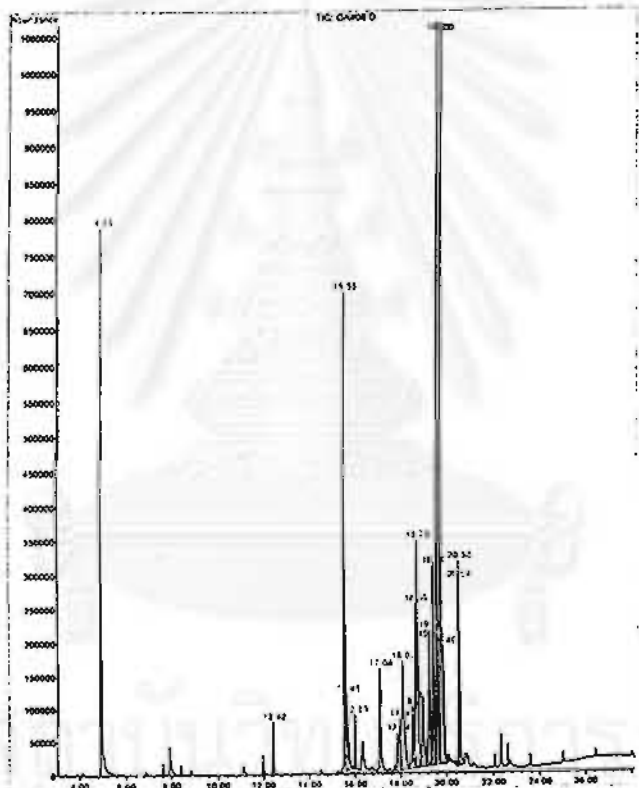


รูปที่ 4.22 GC Profile ของน้ำเลี้ยงแท้ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในกรดโอเลิก

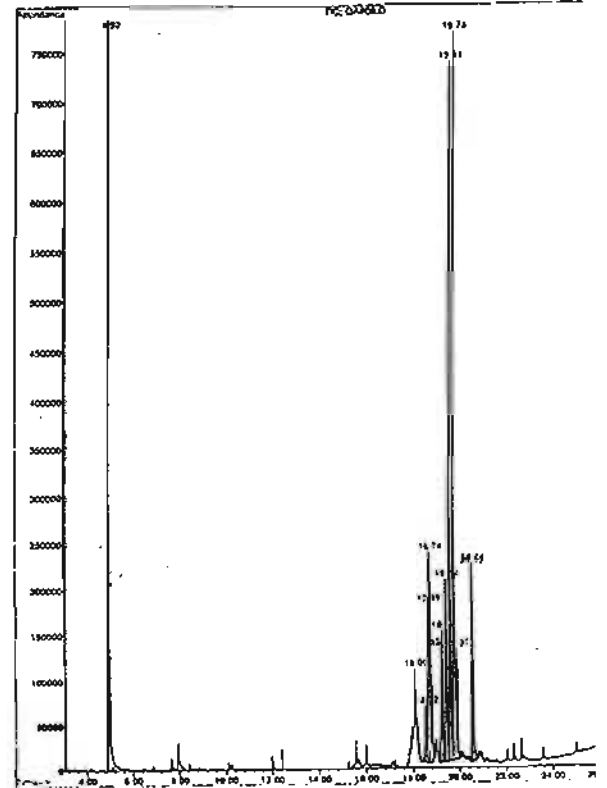
File : C:\NPKCHEM\DATA\091303\GA105.D
 Operator :
 Acquired : 17 Sep 2003 16:18 using AcqMethod FAME
 Instrument : GC/MS Ins
 Sample Name : OLEIC ACID
 Misc Info : 60 HOUR
 Vial Number: 5



File : C:\NPKCHEM\DATA\091303\GA106.D
 Operator :
 Acquired : 17 Sep 2003 16:31 using AcqMethod FAME
 Instrument : GC/MS Ins
 Sample Name : OLEIC ACID
 Misc Info : 60 HOUR
 Vial Number: 6

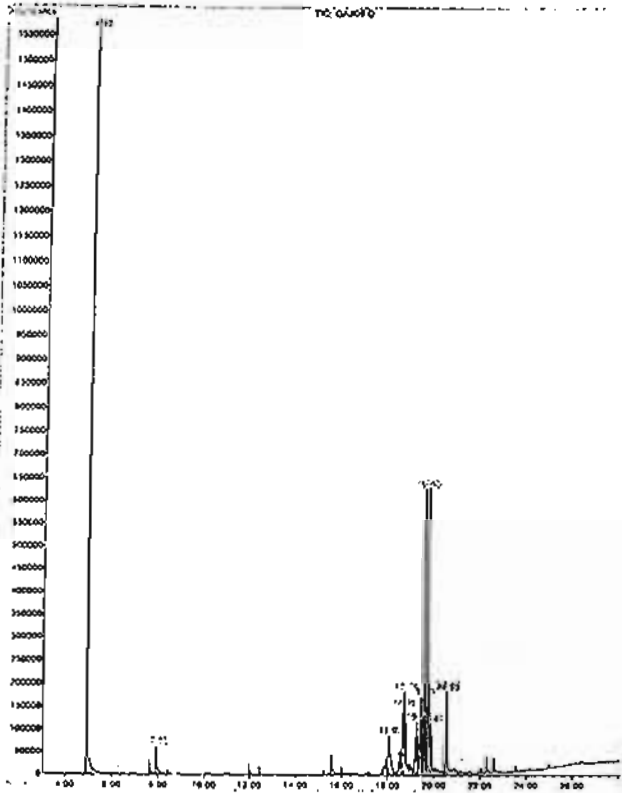


File : C:\NPKCHEM\DATA\091303\GA108.D
 Operator :
 Acquired : 17 Sep 2003 17:57 using AcqMethod FAME
 Instrument : GC/MS Ins
 Sample Name : OLEIC ACID
 Misc Info : 60 HOUR
 Vial Number: 8



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

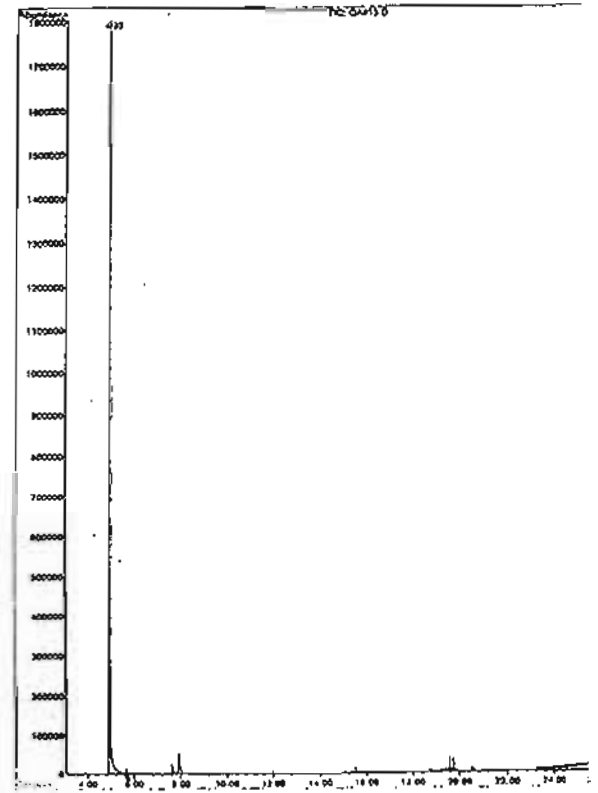
File : C:\NCPDR\1\DATA\091302\0A109.D
 Detector :
 Acquired : 17 Sep 2003 18:33 using AcqMethod FAME
 Instrument : GC/MS Ins
 Sample Name: OLEIC ACID
 Misc Info : 36 HOUR
 Vial Number: 9



File : C:\NCPDR\1\DATA\091302\0A111.D
 Operator :
 Acquired : 18 Sep 2003 15:26 using AcqMethod FAME
 Instrument : GC/MS Ins
 Sample Name: OLEIC ACID
 Misc Info : 120 HOUR
 Vial Number: 11

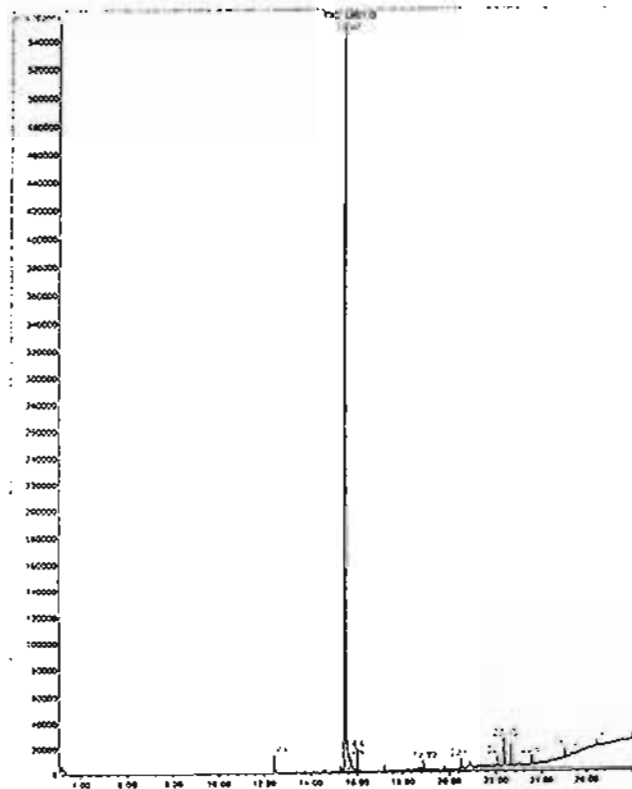


File : C:\NCPDR\1\DATA\091302\0A115.D
 Operator :
 Acquired : 20 Sep 2003 8:17 using AcqMethod FAME
 Instrument : GC/MS Ins
 Sample Name: OLEIC ACID
 Misc Info : 144 HOUR
 Vial Number: 15

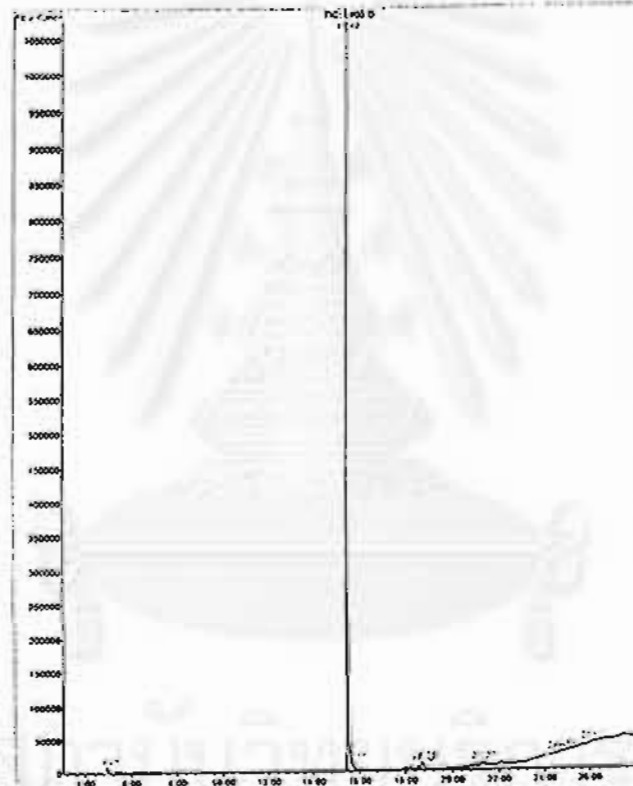


จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

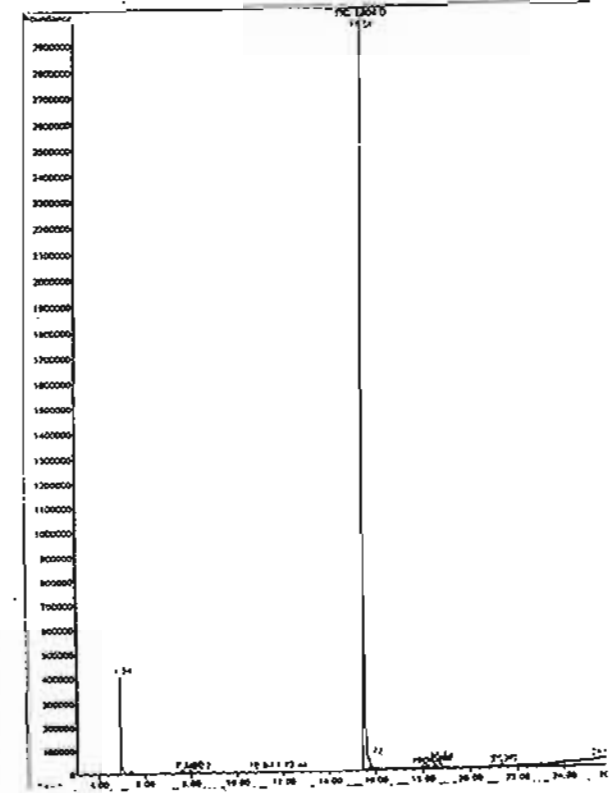
File : C:\MPCHEM\1\DATA\091203\1101.D
 Operator :
 Acquired : 13 Sep 2003 11:19 using AcqMethod FAME
 Instrument : GC/MS Ins
 Sample Name : LIMOLEIC
 Misc Info : 0 HOUR
 Vial Number: 21



File : C:\MPCHEM\1\DATA\091203\1103.D
 Operator :
 Acquired : 13 Sep 2003 12:55 using AcqMethod FAME
 Instrument : GC/MS Ins
 Sample Name : LIMOLEIC
 Misc Info : 24 HOUR
 Vial Number: 23

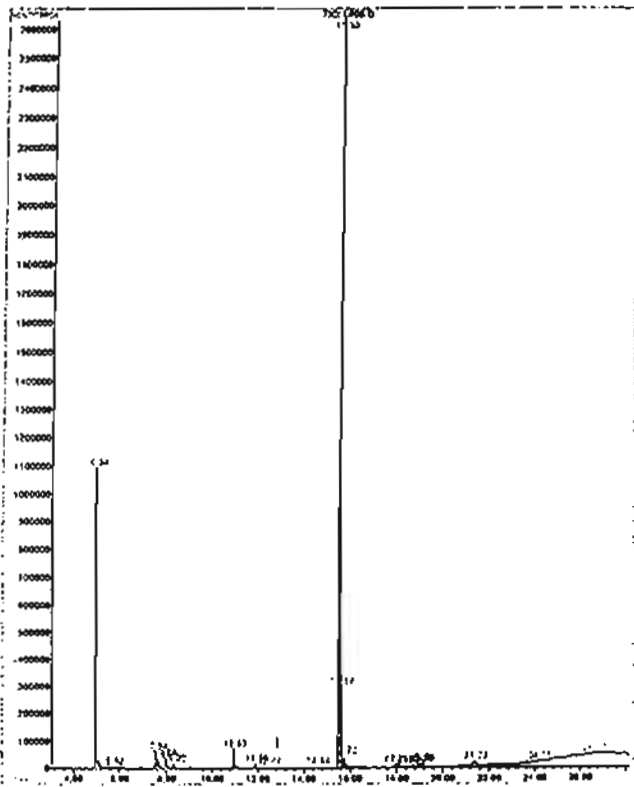


File : C:\MPCHEM\1\DATA\091203\1104.D
 Operator :
 Acquired : 13 Sep 2003 11:28 using AcqMethod FAME
 Instrument : GC/MS Ins
 Sample Name : LIMOLEIC
 Misc Info : 24 HOUR
 Vial Number: 24



รูปที่ 4.23 GC Profile ของน้ำเต็งเชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในกรดไลโนเลอิก

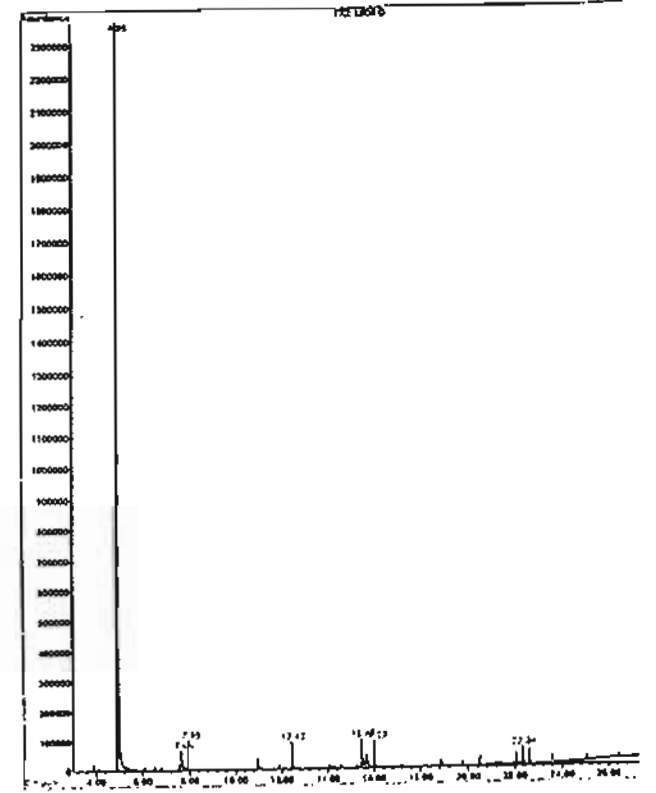
File : C:\XPCHEN\1\DATA\091203\1105.D
 Operator :
 Acquired : 13 Sep 2003 11:01 using AcqMethod FAME
 Instrument : GC/MS Ion
 Sample Name: LIPOLEIC
 Hsic Info : 18 HOUR
 Vial Number: 25



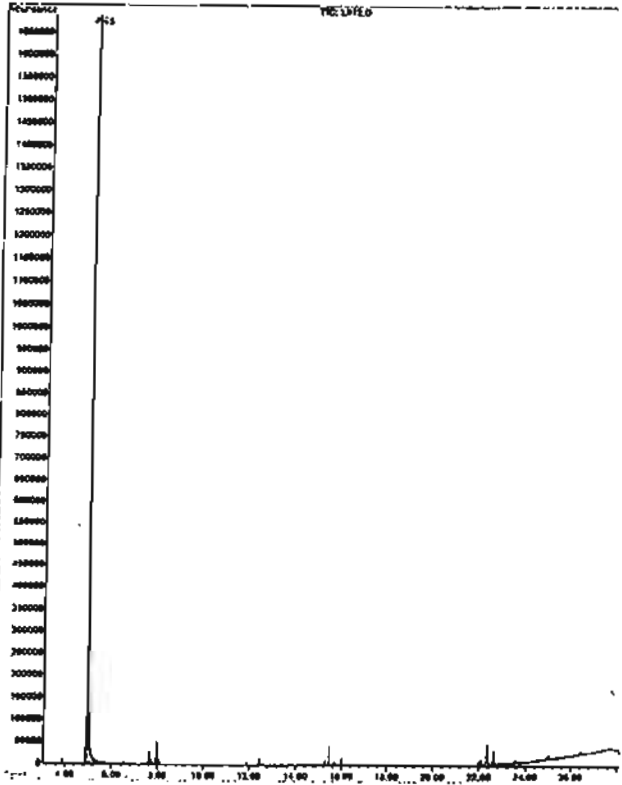
File : C:\XPCHEN\1\DATA\091203\1107.D
 Operator :
 Acquired : 15 Sep 2003 13:04 using AcqMethod FAME
 Instrument : GC/MS Ion
 Sample Name: LIPOLEIC
 Hsic Info : 72 HOUR
 Vial Number: 27



File : C:\XPCHEN\1\DATA\091203\1108.D
 Operator :
 Acquired : 15 Sep 2003 13:37 using AcqMethod FAME
 Instrument : GC/MS Ion
 Sample Name: LIPOLEIC
 Hsic Info : 16 HOUR
 Vial Number: 28



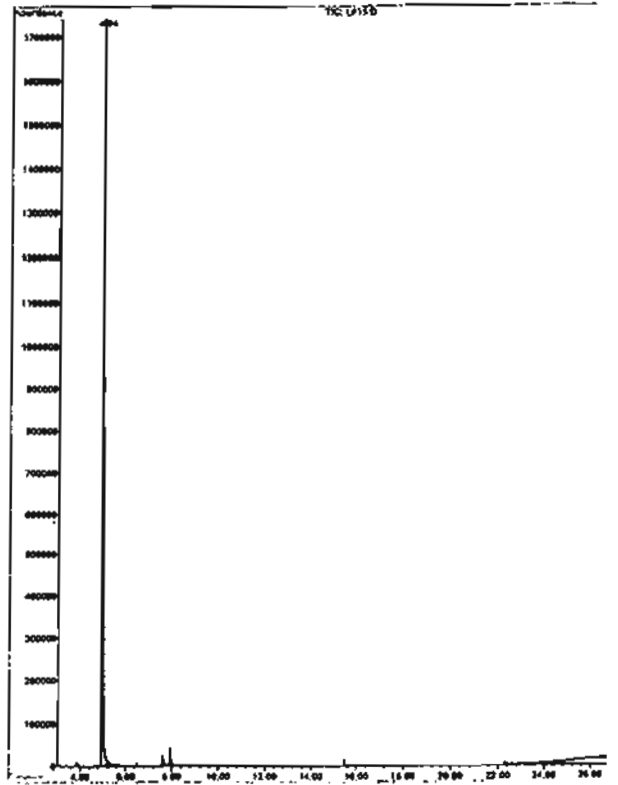
File : C:\XPCKEN\1\DATA\091203\112.D
 Operator :
 Acquired : 15 Sep 2003 15:48 using AcqMethod FAMS
 Instrument : GC/MS Ins
 Sample Name: L1M0LE1C
 Misc Info : 132 HOUR
 Vial Number: 32

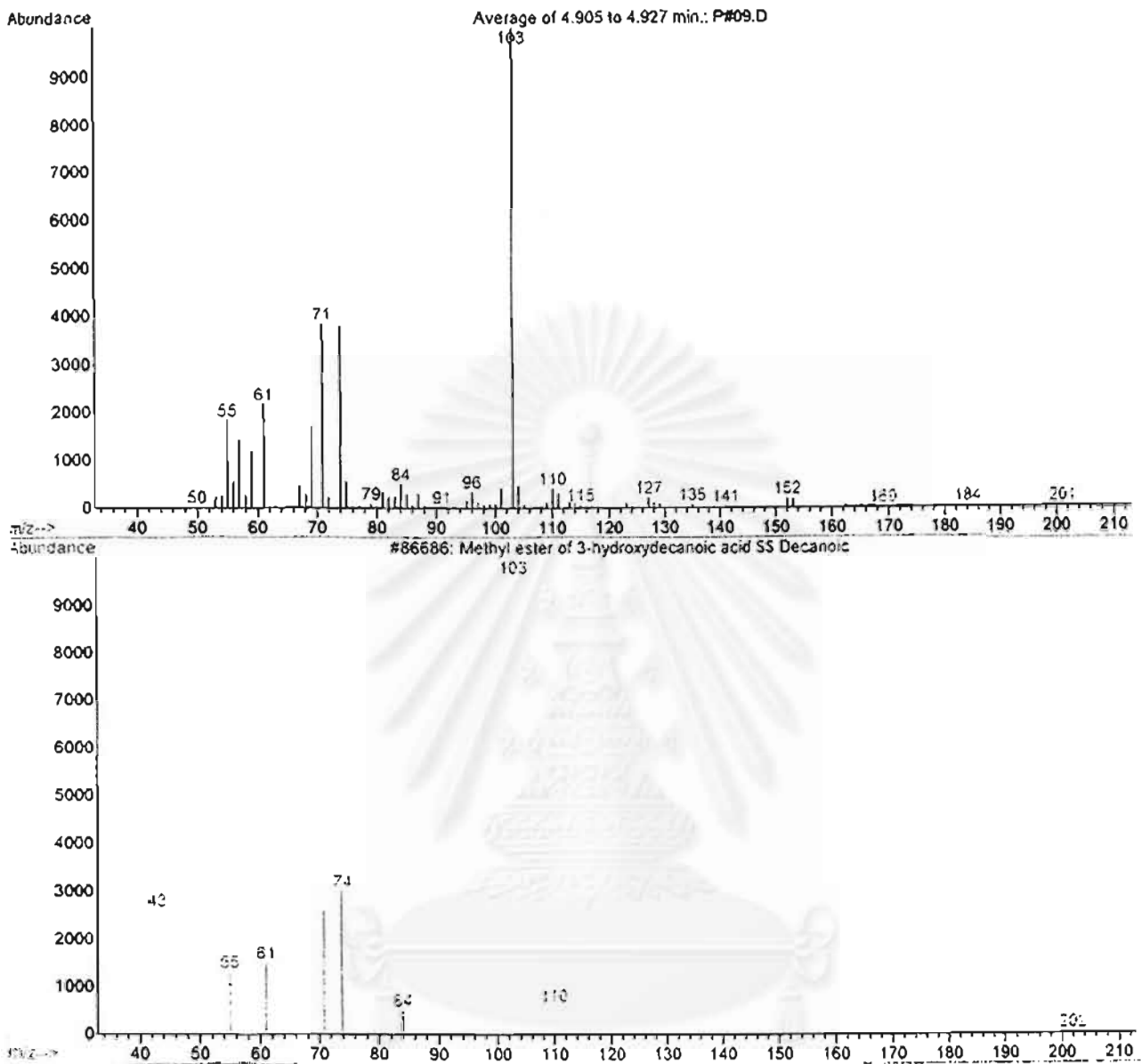


File : C:\XPCKEN\1\DATA\091203\113.D
 Operator :
 Acquired : 15 Sep 2003 18:21 using AcqMethod FAMS
 Instrument : GC/MS Ins
 Sample Name: L1M0LE1C
 Misc Info : 144 HOUR
 Vial Number: 33



File : C:\XPCKEN\1\DATA\091203\115.D
 Operator :
 Acquired : 17 Sep 2003 13:14 using AcqMethod FAMS
 Instrument : GC/MS Ins
 Sample Name: L1M0LE1C
 Misc Info : 168 HOUR
 Vial Number: 35

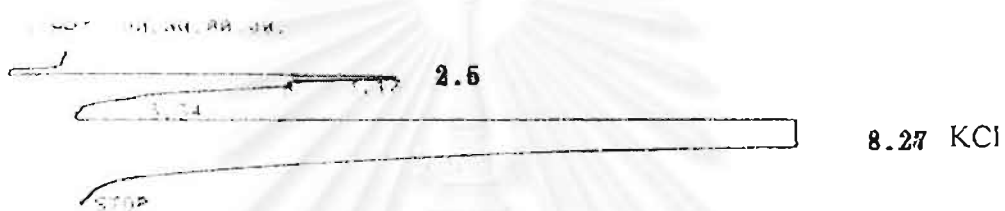




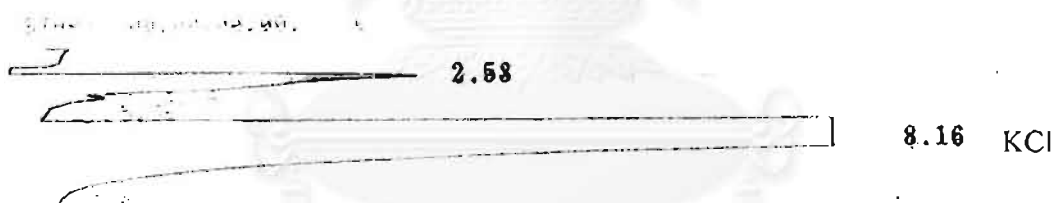
รูปที่ 4.24 แสดง mass spectrum ของ methyl ester 3-hydroxy decanoic acid ที่ได้จากการนำน้ำเลี้ยงเชื้อ
ที่ RT เท่ากับ 4.9 นาที ไปวิเคราะห์ด้วย GC-MS



รูปที่ 4.25 แสดงโครมาโตแกรมของ HPLC ของน้ำตาลแรมโนสมাত্রฐานปริมาณ 4.2 มิลลิกรัม



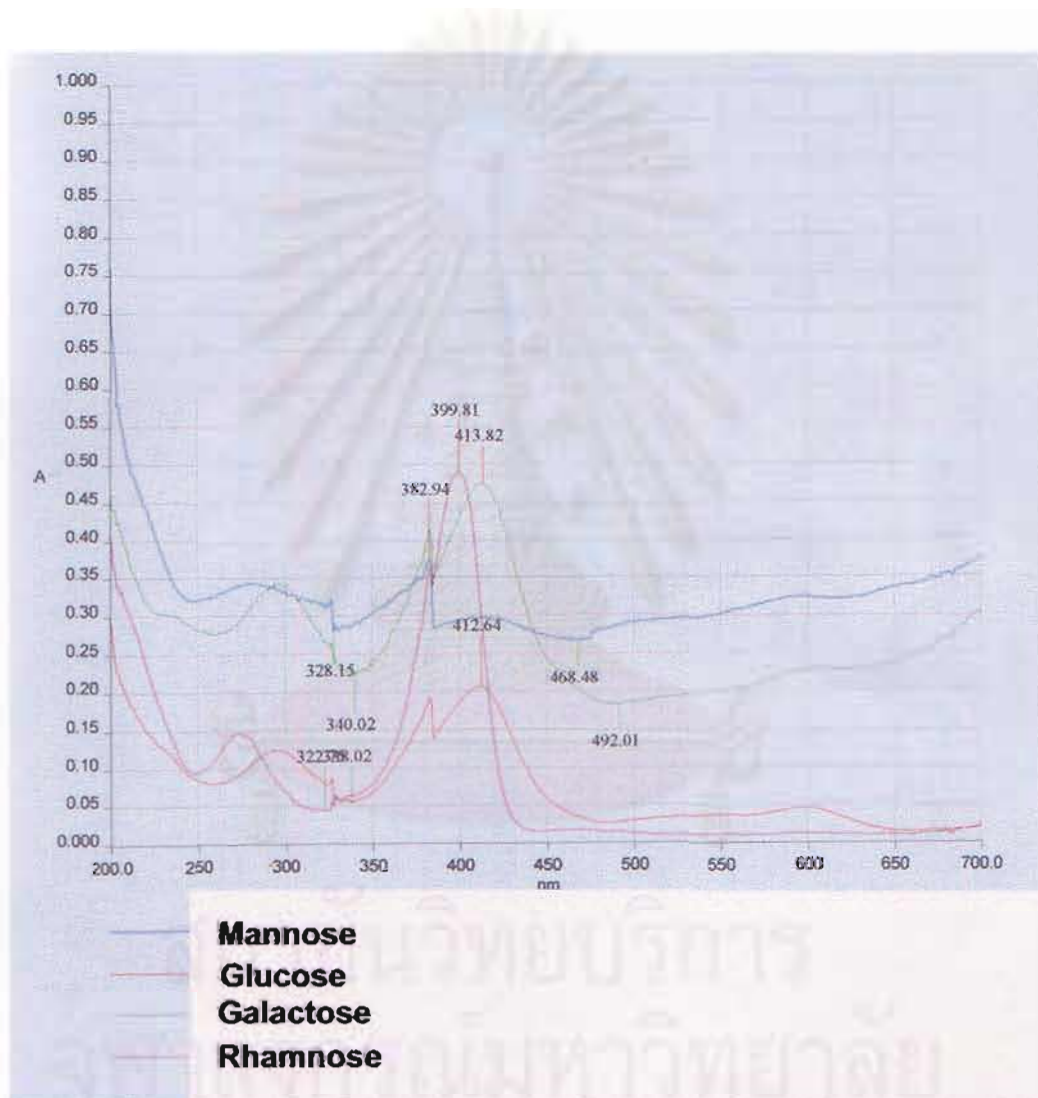
รูปที่ 4.26 แสดงโครมาโตแกรมของ HPLC ของน้ำตาลแรมโนสมাত্রฐานปริมาณ 10 มิลลิกรัมเมื่อผ่านการ hydrolysis



รูปที่ 4.27 แสดงโครมาโตแกรมของ HPLC ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนปริมาณ 20 มิลลิกรัม เมื่อผ่านการ hydrolysis

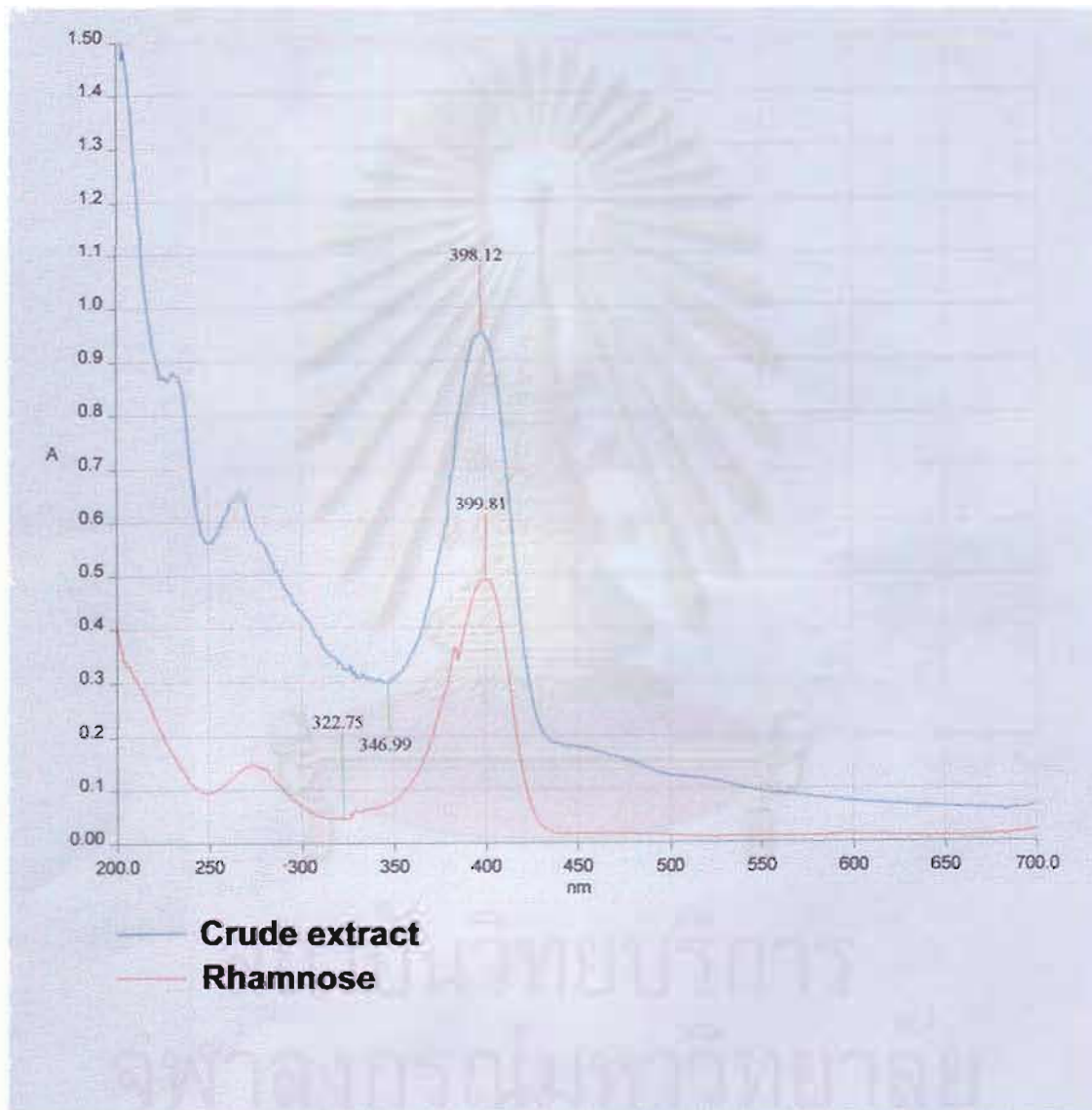
3. การตรวจวิเคราะห์น้ำตาลแรมโนสด้วยวิธี HPLC เมื่อนำเอาสารลดแรงตึงผิวที่บริสุทธิ์บางส่วนที่เตรียมได้จากอาหารที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน มาวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่าไม่สามารถตรวจพบพีกของน้ำตาลแรมโนสได้อย่างชัดเจน เห็นเป็นเพียง shoulder ในโครมาโตแกรมตามรูปที่ 4.25 /4.27 ทั้งนี้อาจเป็นเนื่องมาจากการทำ hydrolysis สารด้วยกรดทำให้น้ำตาลบางส่วนเปลี่ยนโครงสร้างไป ทำให้ไม่สามารถตรวจพบพีกของน้ำตาลแรมโนสซึ่งเกิดในทำนองเดียวกันในโครมาโตแกรมของน้ำตาลแรมโนสมাত্রฐานที่ผ่านการ hydrolysis แล้วดังรูปที่ 4.26

เนื่องจากไม่สามารถบ่งได้อย่างแน่ชัดว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 เป็นแรมโนลิปิด จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC จึงได้ทำการวิเคราะห์หาน้ำตาลแรมโนส ซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งของแรมโนลิปิด โดยทำการเปรียบเทียบสแกนหาวิถี-วิถีเบิลสเปกตรัมของน้ำตาลที่ผลิตใน *Pseudomonas* sp. ซึ่งได้แก่น้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส แมนโนส และแรมโนส (Williams และ Wimpenny, 1978) โดยมีความเข้มข้นเท่ากับ 5 $\mu\text{l/ml}$



รูปที่ 4.28 แสดงวิถี-วิถีเบิลสเปกตรัมของน้ำตาลชนิดต่างๆ เมื่อผ่านการวิเคราะห์ตามวิธีของ Dische และ Shettles ในปี 1948

จากรูปที่ 4.28 จะเห็นว่าหลังจากทำการทดลองหาน้ำตาลแรมโนสตามข้อ 1.6 น้ำตาลกลูโคสดูดกลืนแสงที่มากที่สุดที่ 412.64 nm น้ำตาลกาแลคโตสดูดกลืนแสงมากที่สุดที่ 413.82 nm และน้ำตาลแรมโนสดูดกลืนแสงมากที่สุดที่ 399.81 nm

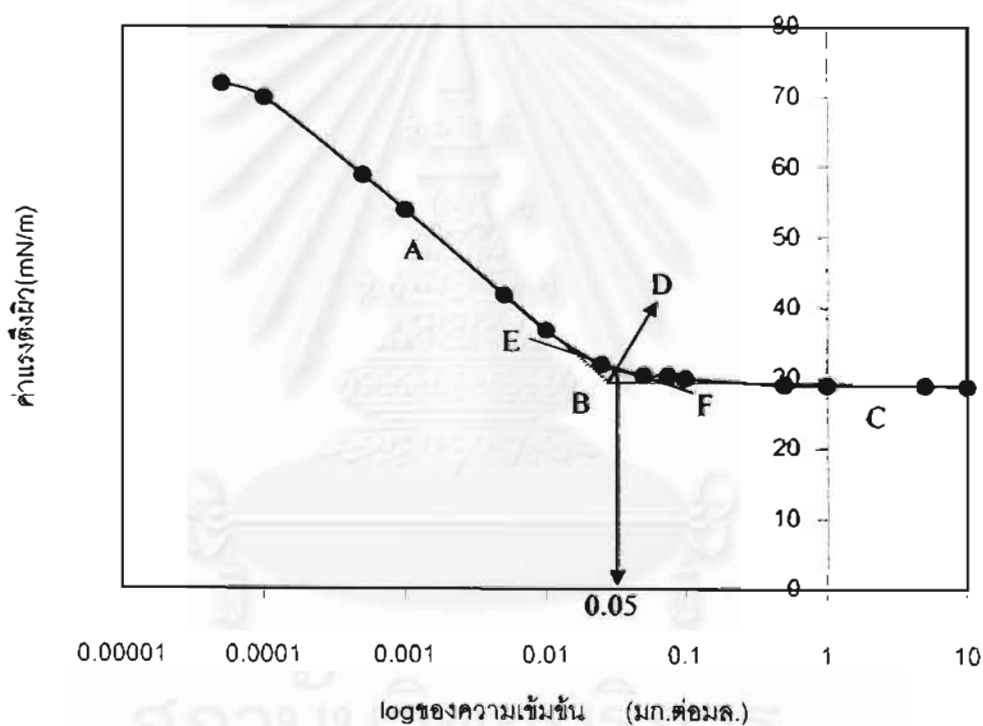


รูปที่ 4.29 แสดงยูวี-วิสิเบิลสเปกตรัมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วน เมื่อผ่านการวิเคราะห์ตามวิธีของ Dische และ Shettles ในปี 1948

จากรูปที่ 4.28-4.29 จะเห็นว่าวิธีวิเคราะห์น้ำตาลแรมโนสของ Dische และ Shettles มีความจำเพาะต่อน้ำตาลแรมโนส จากผลการทดลองพบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนดูดกลืนแสงมากที่สุดที่ 398.12 nm แสดงว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้น้ำตาลแรมโนสเป็นองค์ประกอบ

4. การทำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์ และวิเคราะห์คุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ในน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน

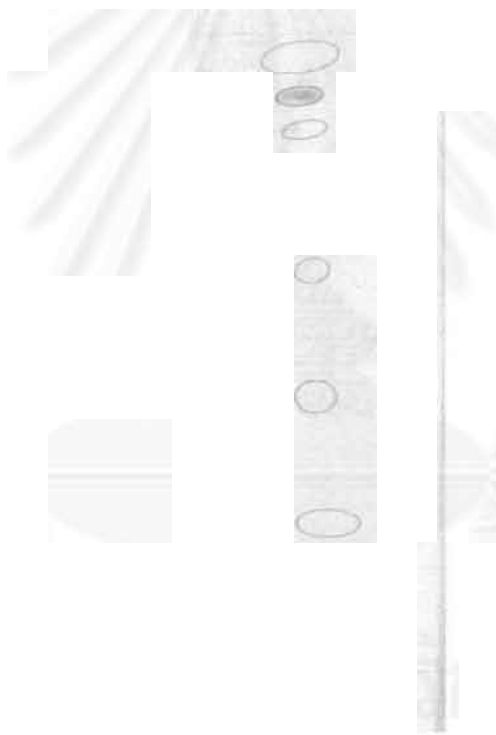
4.1 ทดสอบหา Critical Micelle Concentration (CMC) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วน เมื่อใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 4.30 แสดงการหาค่า CMC ซึ่งเขียนกราฟระหว่างค่าแรงตึงผิวและ log ของความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วน

จุดตัด B ได้จากเส้นสัมผัส AB และ BC แล้วลากจากจุด B ตั้งฉากกับเส้น EF สุดท้ายได้จุด D เมื่อลากเส้นตรงจากจุด D ตั้งฉากกับแกน x ก็จะได้ค่า CMC เท่ากับ 50 มก.ต่อลิตร และค่าแรงตึงผิว ณ การเกิดไมเซลล์เท่ากับ 30 mN/m

4.2 ตรวจจอบชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธี analytical TLC แล้วทำการวิเคราะห์ แรมโนลิปิดด้วยสารละลายโมลิส (Passeri และคณะ, 1992) โดยนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน ซึ่งผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์จากข้อ 2.2 มาตรวจจอบบน TLC เพื่อหาสารแรมโนลิปิดด้วยมอริส รีเอเจนต์ ซึ่งมี silica gel 60 เป็นเฟสคงที่ และมีเฟสเคลื่อนที่เป็น คลอโรฟอร์ม ต่อ เมทานอล ต่อ น้ำ (65: 25: 4) พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน เมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นใน TLC จะประกอบด้วยสารไฮโดรคาร์บอนอยู่ 6 ประเภท โดยมี อัตราส่วนการเคลื่อนที่ (Rf) เป็น 0.33, 0.61, 0.68, 0.75, 0.83 และ 0.95 ตามลำดับ เมื่อทดสอบด้วย มอริส รีเอเจนต์ จะเกิดจุดสีเขียวที่มีอัตราการเคลื่อนที่ (Rf) 0.83 จึงอาจกล่าวได้ว่าพบสารไกลโคลิปิด



รูปที่ 4.31 แสดง spot บน TLC เมื่อนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ในน้ำมันปาล์มมาวิเคราะห์ และแยกให้บริสุทธิ์โดยวิธี TLC

4.3 การทำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์ด้วยแผ่น preparative TLC

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย preparative TLC โดยใช้สารปริมาณ 25 มก. ต่อแผ่น เมื่อทำตามวิธีการทดลองข้อ 2.5.1 แล้วเมื่อนำไปอังด้วยไอของไอโอดีนที่อิมิตัวพบว่าเกิดแถบสีน้ำตาลบนแผ่น TLC 6 แถบ และมีการเคลื่อนที่ดังแสดงในตารางที่ 14 ค่าการกระจายน้ำมันและอัตราการเคลื่อนที่เป็นค่าเฉลี่ยจากการทำแผ่น TLC 5 แผ่น พบว่าแถบที่มีการเคลื่อนที่ไกลที่สุดจะให้ค่าการกระจายน้ำมันมาก แถบที่มีการกระจายน้ำมันมากที่สุดได้แก่ แถบที่ 5, 6 และ 3 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.14 แสดงอัตราการเคลื่อนที่ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนบนแผ่น preparative TLC และผลการกระจายน้ำมัน

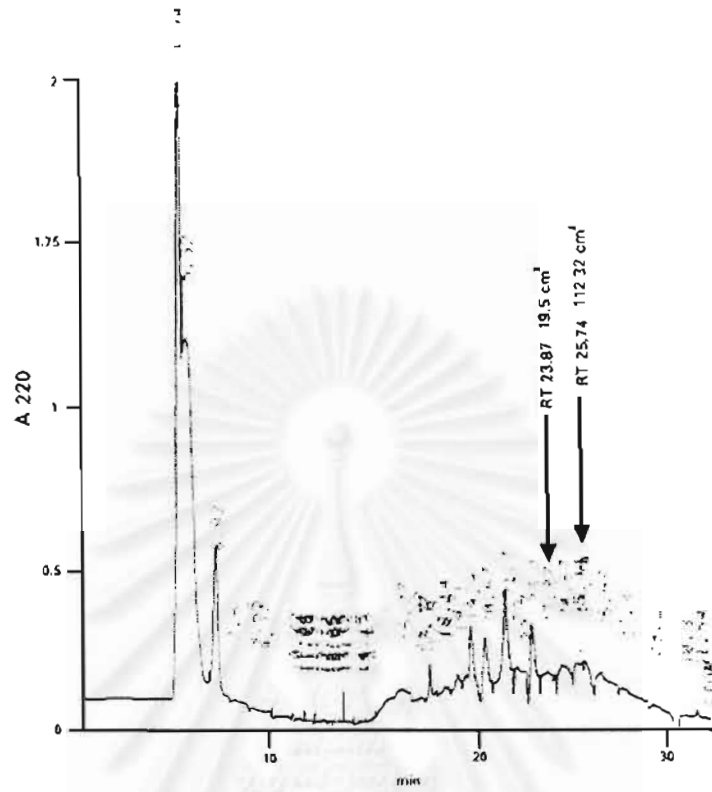
แถบที่	อัตราการเคลื่อนที่ R _f	ค่าการกระจายน้ำมัน (cm ³)
1	0.33	38.48
2	0.61	56.7
3	0.68	102.0
4	0.75	93.7
5	0.83	128.0
6	0.95	121.0

4.4 การทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ silica gel 60

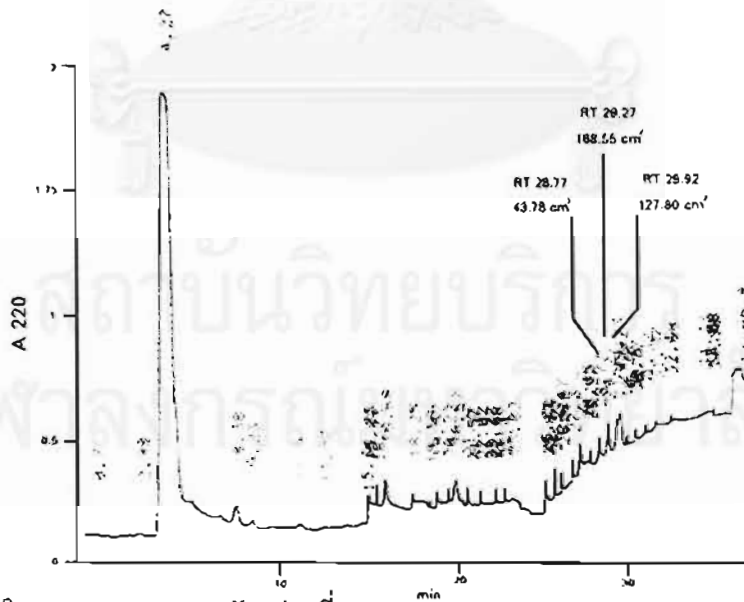
เมื่อสกัดแต่ละแถบด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมตามข้อ 2.5.1 แล้วนำมาระเหยแห้ง และละลายกลับคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 1 มล. โดยแต่ละแถบนำมาชะด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมตามข้อ 2.5.2 โดยเก็บ fraction ละ 16 มล. ทิ้งไว้ให้ปริมาตรลดลงเหลือประมาณ 5 มล. แล้วจึงวัดค่าการกระจายน้ำมัน เมื่อนำค่าการกระจายน้ำมันของลำดับส่วนต่างๆมาเปรียบเทียบดัง แสดงผลในตารางที่ 15

ตารางที่ 4.15 แสดงค่าการกระจายน้ำมันที่ลำดับส่วนต่างๆ เมื่อทำให้บริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ silica gel 60 จากแถบต่างๆ F1 ถึง F6

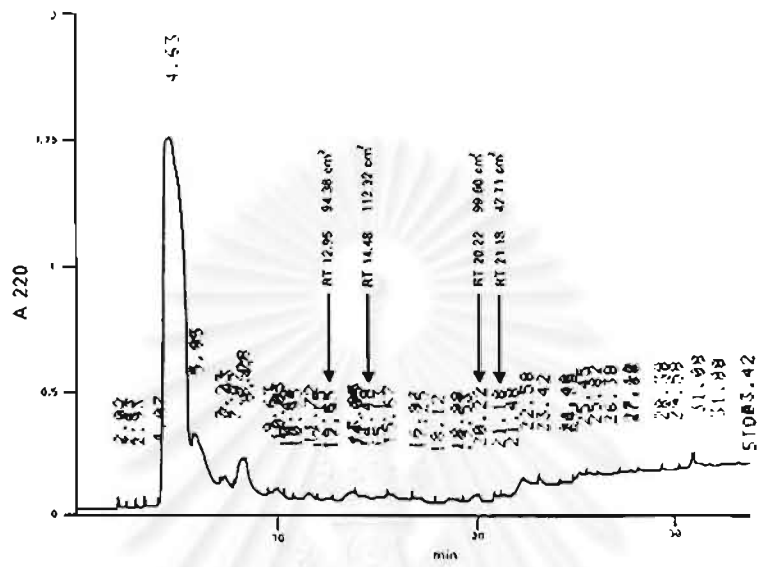
ลำดับส่วน	แถบที่ 1 (F1) จาก TLC	แถบที่ 2 (F2) จาก TLC	แถบที่ 3 (F3) จาก TLC	แถบที่ 4 (F4) จาก TLC	แถบที่ 5 (F5) จาก TLC	แถบที่ 6 (F6) จาก TLC
1	12.5	38.48	19.6	0	113	60.8
2	38.5	56.75	176.7	0	113	56.7
3	28.2	7	15.9	0	15.9	9.62
4	7	0.19	7	0	19.6	0.78
5	0.19	0	0	38.5	4.9	0.78
6	0	0	0	0	0.03	0.78
7	0	0	0	0	0.03	0.19
8	0	0	0	0	0.03	0.07
9	0	0	0	0	0	0.07
10	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0

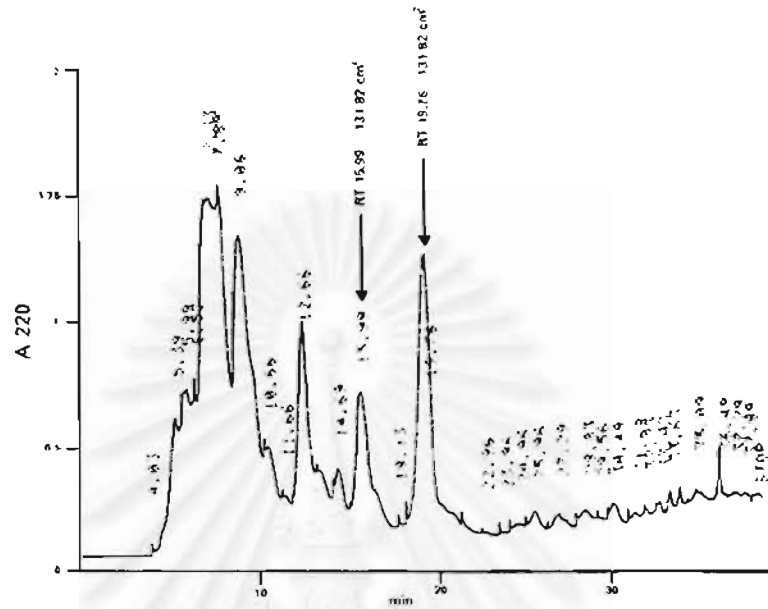


รูปที่ 4.32 โครมาโตแกรม HPLC จากตัวอย่างที่ F1

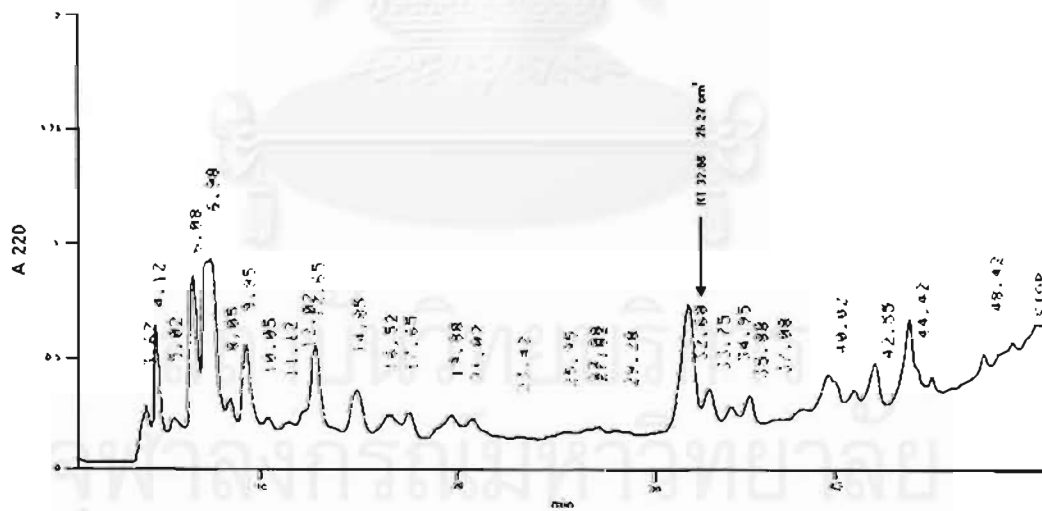


รูปที่ 4.33 โครมาโตแกรม HPLC จากตัวอย่างที่ F2





รูปที่ 4.36 โครมาโตแกรม HPLC จากตัวอย่างที่ F5



รูปที่ 4.37 โครมาโตแกรม HPLC จากตัวอย่างที่ F6

4.5 การวิเคราะห์สารและทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี HPLC

นำตัวอย่าง F1 (ลำดับส่วนที่ 1-4), F2 (ลำดับส่วนที่ 1-3), F3 (ลำดับส่วนที่ 1-3), F4 (ลำดับส่วนที่ 4-6), F5 (ลำดับส่วนที่ 1-3), และ F6 (ลำดับส่วนที่ 1-3) จากตัวอย่างที่ผ่านจาก silica gel 60 column มาวิเคราะห์สารและทำให้บริสุทธิ์ด้วย HPLC ด้วยภาวะตามข้อ 2.5.4 เก็บทุก peak ที่ปรากฏ มาทำให้แห้งแล้วเติม 1 โมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์มีค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 8 ปริมาณ 10 ไมโครลิตร นำตัวอย่างที่ได้ไปวัดค่าการกระจายน้ำมัน ดังแสดงผลค่าการกระจายน้ำมันดังในตารางที่ 16 และรูปโครมาโตแกรมของ HPLC ในรูปที่ 44-49

ตารางที่ 4.16 สรุปค่าการกระจายน้ำมันเมื่อผ่านการวิเคราะห์และทำให้บริสุทธิ์ด้วย HPLC

สารลดแรงตึงผิวที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก silica gel column	ค่าการกระจายน้ำมัน (cm ²)	Retention time (RT) (min)
ลำดับส่วนจากแถบที่ F1	19.5 , 112.32	23.87, 25.74
ลำดับส่วนจากแถบที่ F2	43.78, 168.55, 127.80	28.77, 29.27, 29.92
ลำดับส่วนจากแถบที่ F3	94.83, 112.32, 99.60, 42.71	12.95, 14.48, 20.22, 21.18
ลำดับส่วนจากแถบที่ F4	9.55, 34.85, 67.78	8.36, 9.63, 13.66
ลำดับส่วนจากแถบที่ F5	131.82, 131.82	15.99, 19.76
ลำดับส่วนจากแถบที่ F6	25.22	32.68

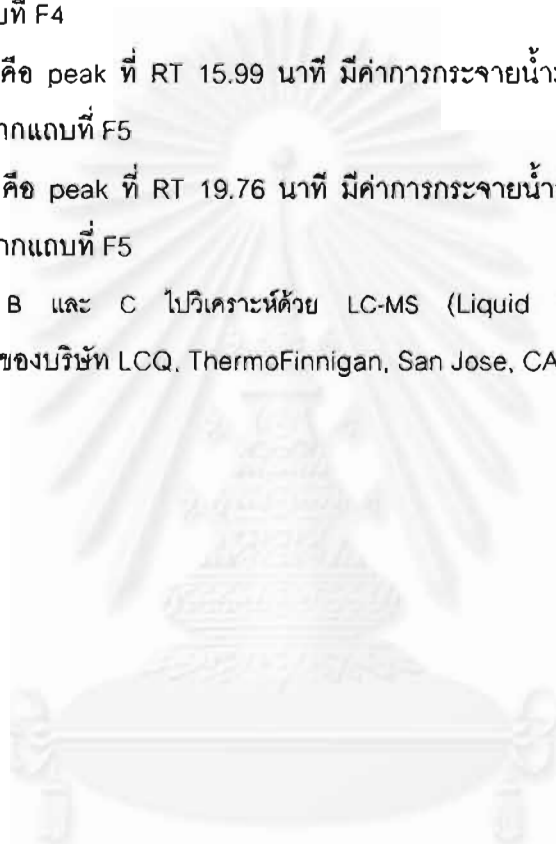
จากตารางที่ 16 พบว่า RT ที่ 29.27 ในลำดับส่วนจากแถบที่ F2 ให้ค่าการกระจายน้ำมันสูงที่สุดคือ 168.55 ตร.ซม. รองมาคือ RT ที่ 15.99 และ 19.76 ในลำดับส่วนที่ F5 มีค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 131.82 ตร.ซม. แต่ RT ที่ 29.27 ในลำดับส่วนจากแถบที่ F2 ไม่สามารถเก็บไปวิเคราะห์ต่อไปได้เนื่องจากมีปริมาณสารอยู่น้อยมาก จึงเลือก peak ที่สามารถเก็บ และมีค่าการกระจายน้ำมันสูงไปวิเคราะห์ต่อไป คือตัวอย่างในแถบที่ F5 และ ตัวอย่างในแถบที่ F4

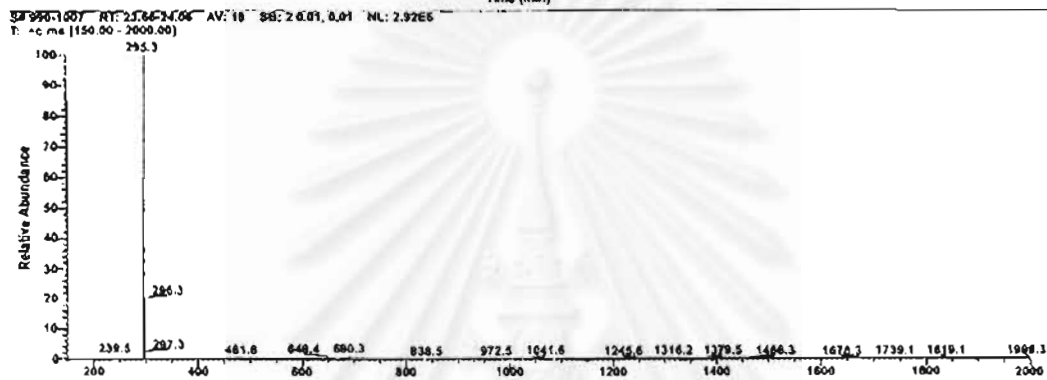
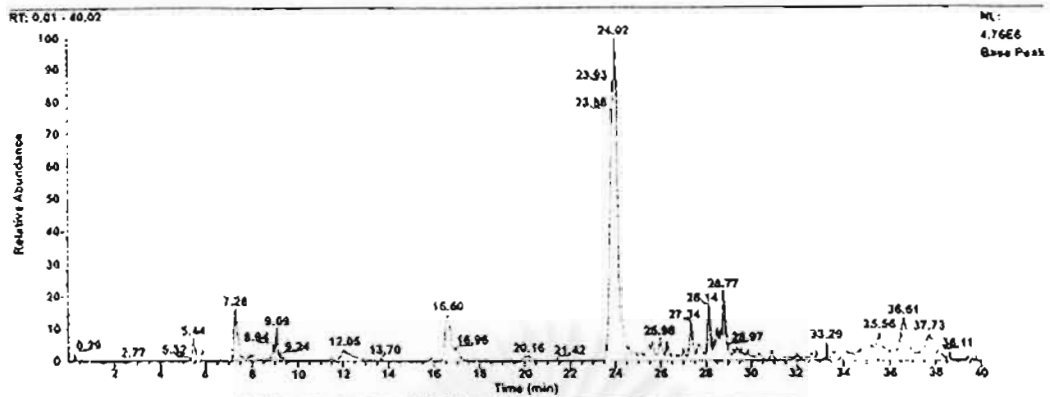
4.6 การวิเคราะห์โครงสร้างการลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วย LC-MS

จากข้อ 4.5 ได้เลือก peak ที่มีค่าการกระจายน้ำมัน และค่าการดูดกลืนแสงสูง จากโครมาโตแกรมของ HPLC ข้างต้นได้ 3 ตัวอย่างดังนี้

- ตัวอย่าง A คือ peak ที่ RT 13.66 นาที มีค่าการกระจายน้ำมัน 67.78 ตร.ซม. จาก ลำดับ ส่วนจากแถบที่ F4
- ตัวอย่าง B คือ peak ที่ RT 15.99 นาที มีค่าการกระจายน้ำมัน 131.82 ตร.ซม. จาก ลำดับส่วนจากแถบที่ F5
- ตัวอย่าง C คือ peak ที่ RT 19.76 นาที มีค่าการกระจายน้ำมัน 131.82 ตร.ซม. จาก ลำดับส่วนจากแถบที่ F5

นำตัวอย่าง A, B และ C ไปวิเคราะห์ด้วย LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) ของบริษัท LCQ, ThermoFinnigan, San Jose, CA.



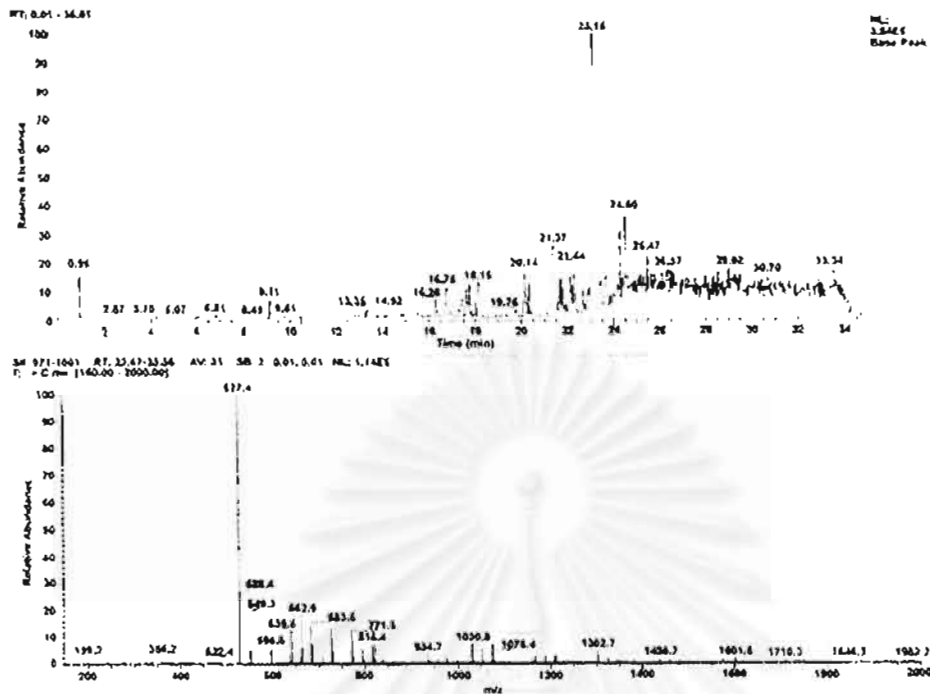


ก. peak ที่ RT 24.02 นาที มีค่า $[M+H]^+$ เท่ากับ 295.3

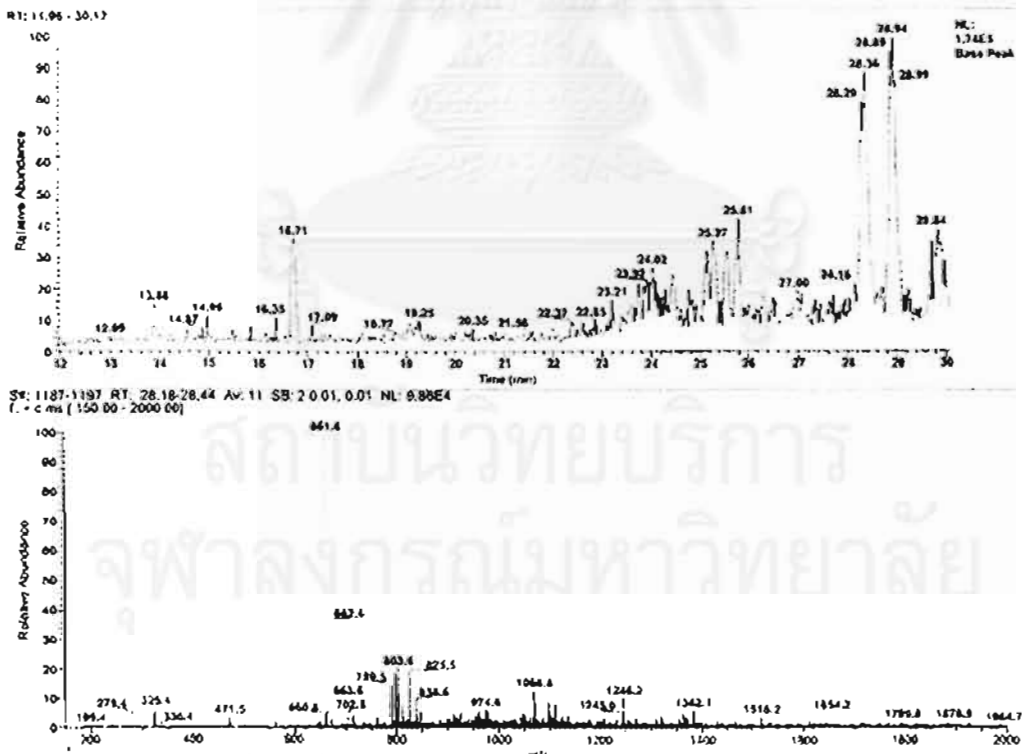


ข. peak ที่ RT 7.28 นาที มีค่า $[M+H]^+$ เท่ากับ 272.3

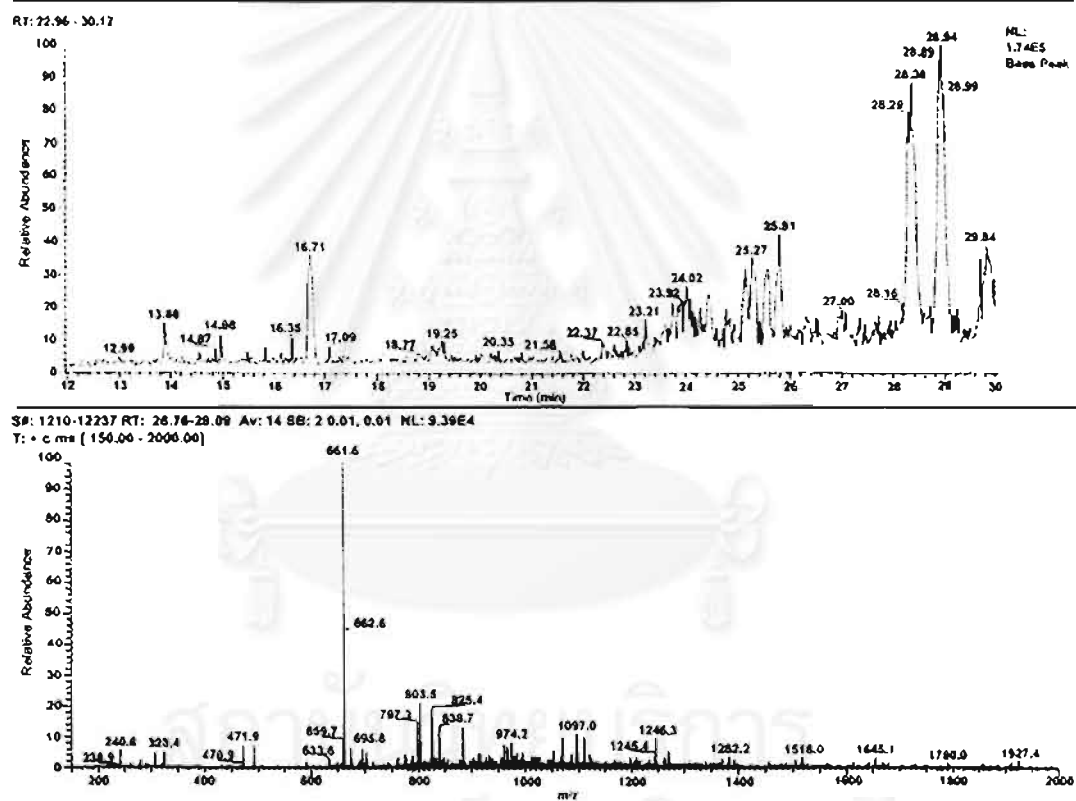
รูปที่ 4.38 แสดงผลโครมาโตแกรมของ LC-MS และ Mass spectrum ของตัวอย่าง A



รูปที่ 4.39 แสดงผลโครมาโตแกรมของ LC-MS และ Mass spectrum ของตัวอย่าง B โดยมี peak หลักที่ RT 23.15 นาที มีค่า $[M+H]^+$ เท่ากับ 527.4



รูปที่ 4.40 แสดงผลโครมาโตแกรมของ LC-MS และ Mass spectrum ของตัวอย่าง C มี peak ที่ RT 28.36 นาที มีค่า $[M+H]^+$ เท่ากับ 661.6



รูปที่ 4.41 แสดงผลโครมาโตแกรมของ LC-MS และ Mass spectrum ของตัวอย่าง C มี peak ที่ RT 28.94 นาที มีค่า $[M+H]^+$ เท่ากับ 661.6

จากผลการวิเคราะห์สารด้วย LC-MS พบว่าตัวอย่าง A จะมีค่า $[M+H]^+$ เท่ากับ 272.3 และ 295.3, ตัวอย่าง B จะมีค่า $[M+H]^+$ เท่ากับ 527.4, และ ตัวอย่าง C จะมีค่า $[M+H]^+$ เท่ากับ 661.6 ตามลำดับ และจะสามารถวิเคราะห์โครงสร้างสารได้โดยเปรียบเทียบมวลโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *Pseudomonas aeruginosa* จากที่เคยมีรายงานโดย Edwards และ Hayashi, 1965; Hisatsuka และคณะ 1971; Rendell และคณะ 1990; Deziel และคณะ 1999; 2000; Mata-Sandoval และคณะ 1999 ได้ว่ามวลโมเลกุลที่เท่ากับ 527 จะตรงกับแรมโนลิปิดชนิด R1 คือ Rhamnopyranosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate มวลโมเลกุลที่เท่ากับ 272 และ 295 จะตรงกับ Hydroxyhexadecanoic acid และ Sodiumhydroxyhexadecanoic acid ตามลำดับ ส่วนมวลโมเลกุลที่เท่ากับ 661 เป็นสารที่ยังไม่เคยมีรายงานว่า เป็นสารชนิดใดมาก่อน ดังแสดงผลการวิเคราะห์โครงสร้างของสารในตารางที่ 17

ตารางที่ 4.17 แสดงโครงสร้างของตัวอย่าง A,B และ C

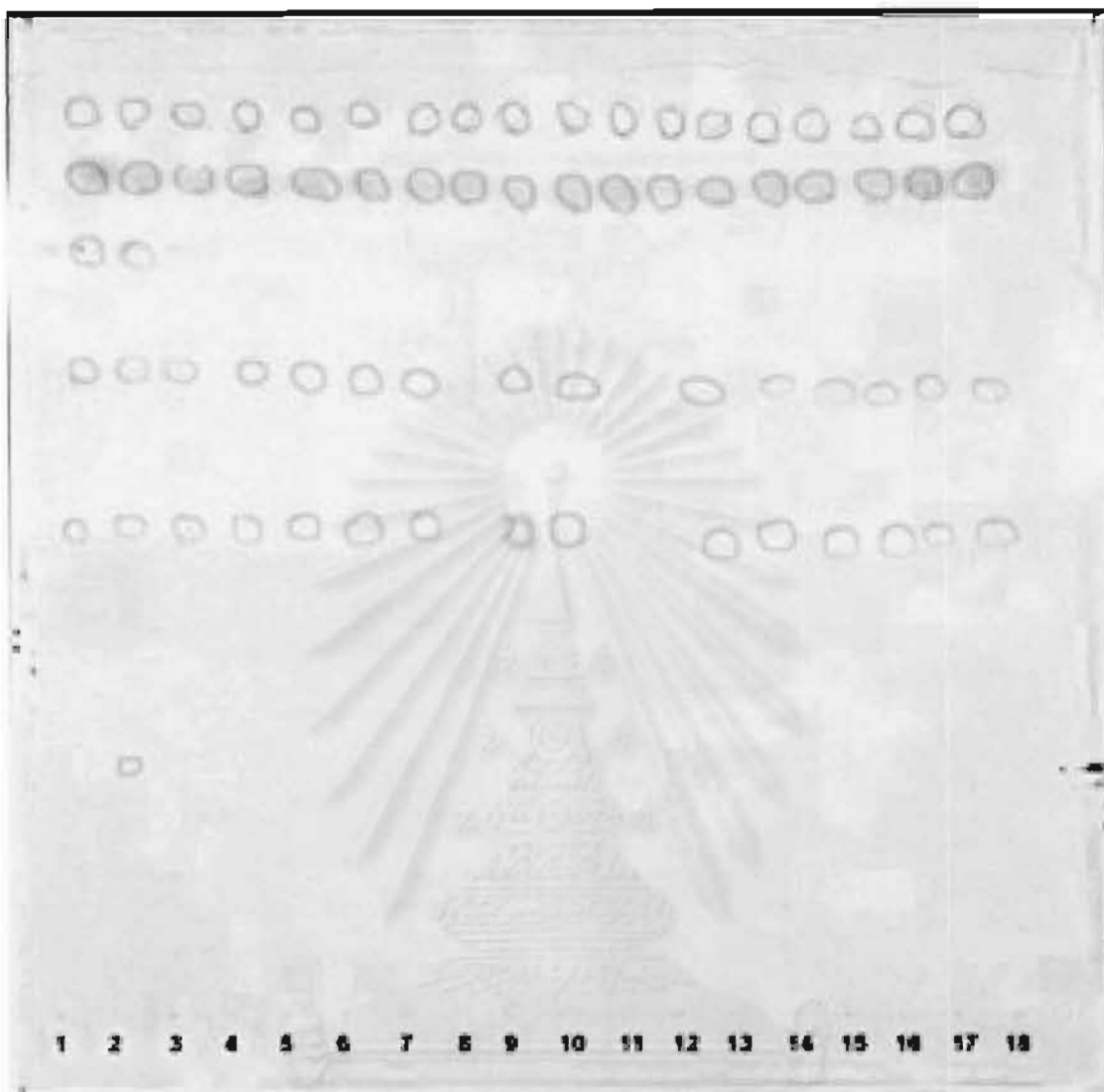
ตัวอย่าง	RT จาก HPLC (min)	ค่าการกระจายน้ำมัน (cm ²)	$[M+H]^+$	โครงสร้าง
A	13.66	67.78	272.3	Hydroxyhexadecanoic acid
			295.3	Sodiumhydroxyhexadecanoic acid
B	15.99	131.82	527.4	RhaC ₁₀ C ₁₀ Na ⁺
C	19.76	131.82	661.6	Unidentified



4.7 เปรียบเทียบองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนต่างๆ กับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ในน้ำมันปาล์มบนแผ่น TLC

ตารางที่ 4.18 แสดงค่า R_f ของสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ กับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ในน้ำมันปาล์มบนแผ่น TLC

ชนิดของแหล่งคาร์บอน	ชั่วโมงที่เก็บ (hr)	ค่า R_f					
		F1	F2	F3	F4	F5	F6
น้ำมันมะพร้าว	168	-	0.62	0.69	-	0.84+M	0.95
	72	-	0.62	0.69	-	0.83+M	0.96
น้ำมันปาล์ม	168	-	0.61	0.69	0.77	0.83+M	0.95
	72	0.33	0.61	0.68	0.75	0.83+M	0.95
น้ำมันมะกอก	168	-	0.61	0.68	-	0.83+M	0.94
	72	-	0.61	0.69	-	0.84+M	0.95
Lauric acid (C12)	168	-	0.62	0.69	-	0.83+M	0.95
	72	-	0.62	0.69	-	0.82+M	0.96
Myristic acid (C14)	168	-	0.61	0.69	-	0.83+M	0.95
	72	-	0.61	0.69	-	0.83+M	0.95
Palmitic acid (C16)	168	-	-	-	-	0.83+M	0.95
	72	-	-	-	-	0.83+M	0.95
Stearic acid (C18)	168	-	0.61	0.69	-	0.83+M	0.96
	72	-	-	-	-	0.83+M	0.95
Oleic acid (C18:1)	168	-	0.61	0.69	-	0.83+M	0.95
	72	-	0.61	0.69	-	0.83+M	0.95
Linoleic acid (C18:2)	168	-	0.61	0.69	-	0.83+M	0.96
	72	-	0.61	0.69	-	0.83+M	0.96



รูปที่ 4.42 แสดงผลการวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากแหล่งคาร์บอนต่างๆบน TLC

lane 1 ; palm oil 168 hr	พบ 5 จุด	lane 10 ; myristic acid 72hr	พบ 4 จุด
lane 2 ; palm oil 72 hr	พบ 6 จุด	lane 11 ; palmitic acid 168 hr	พบ 2 จุด
lane 3 ; olive oil 168 hr	พบ 4 จุด	lane 12 ; palmitic acid 72 hr	พบ 2 จุด
lane 4 ; olive oil 72 hr	พบ 4 จุด	lane 13 ; oleic acid 168 hr	พบ 4 จุด
lane 5 ; coconut oil 168 hr	พบ 4 จุด	lane 14 ; oleic acid 72 hr	พบ 4 จุด
lane 6 ; coconut oil 72 hr	พบ 4 จุด	lane 15 ; linoleic acid 168 hr	พบ 4 จุด
lane 7 ; stearic acid 168 hr	พบ 4 จุด	lane 16 ; linoleic acid 72 hr	พบ 4 จุด
lane 8 ; stearic acid 72 hr	พบ 2 จุด	lane 17 ; lauric acid 168 hr	พบ 4 จุด
lane 9 ; myristic acid 168 hr	พบ 4 จุด	lane 18 ; lauric acid 72 hr	พบ 4 จุด

**จุดที่ positive กับ molish reagent คือ จุดที่ 5 (F5) RF ประมาณ 0.8-0.83

จากการวิเคราะห์สารบริสุทธิ์บางส่วนที่ผลิตได้ในแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ด้วยวิธี TLC จะพบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากน้ำมันปาล์มจะมีองค์ประกอบทั้งหมด 6 ชนิดตั้งแต่ F1-F6 ส่วน แหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ จะมีองค์ประกอบเพียง 4 ชนิดคือ F2, F3, F5 และ F6 ยกเว้นกรดปาล์มิกิก จะพบเพียง 2 ชนิดคือ F5 และ F6 โดยทุกแหล่งคาร์บอน F5 จะเป็นชนิดที่ให้ผลบวกกับสารโมลิส ดังแสดงในตารางที่ 4.18

4.8 ปริมาณสารและราคาต้นทุนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วน

จากการคำนวณหาราคาต้นทุนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วน โดย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำมันทั้ง 3 ชนิด พบว่าผลผลิต กรัมต่อบาท (Productivity Cost) ของน้ำมันมะกอกต่ำที่สุด แสดงว่าจะต้องลงทุนสูงเพื่อให้ได้สารผลิตภัณฑ์ที่เป็น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วน (crude extract) ในปริมาณที่เท่ากับสารที่ผลิตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันปาล์มและน้ำมันมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอนตามลำดับ ถึงแม้ว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอนจะมีค่าผลผลิต กรัมต่อบาท Productivity Cost สูง แต่มีปริมาณ crude extract ต่ำ (6.23 g/l) ในการผลิตสารบริสุทธิ์บางส่วนจำเป็นต้องใช้สารเคมีในปริมาณมากในการสกัด และทำให้บริสุทธิ์ จึงไม่คุ้มกับการลงทุน น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้ค่าผลผลิต กรัมต่อบาท Productivity Cost สูงเช่นเดียวกันและยังให้สารที่มีคุณสมบัติในการกระจายน้ำมันที่ดีและสามารถเพิ่มขึ้นได้โดยการทำให้สารบริสุทธิ์บางส่วน มีค่า CMC ที่ต่ำ นอกจากนี้ น้ำมันปาล์มยังหาได้ง่าย มีราคาถูก และผลิตได้เป็นจำนวนมากในประเทศ จากข้อมูลดังกล่าวผู้วิจัยจึงเลือกและสนับสนุนที่จะใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41

ตารางที่ 4.19 แสดงปริมาณสารราคาต้นทุนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วน ที่ผลิตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนของน้ำมัน 3 ชนิด

แหล่งคาร์บอน	ราคาน้ำมัน (บาท/ลิตร)	ปริมาณน้ำตาล แรมโนส (กรัม/ลิตร)	Crude Extract (กรัม/ลิตร)	การกระจาย น้ำมัน (ตร.ซม.)	Productivity Cost* (กรัม/บาท)
น้ำมันปาล์ม	34	2.81	13.35	66.85	196.32
น้ำมันมะกอก	378	5.73	16.91	70.63	22.36
น้ำมันมะพร้าว	12	2.87	6.23	50.24	259.58

* ยังไม่ได้คิดค่าสารเคมีที่ใช้ในการสกัดและทำสารให้บริสุทธิ์

4.9 ค่า อิมัลชัน อินเด็กซ์

การหาค่าอิมัลชัน อินเด็กซ์นั้นจะวิเคราะห์กับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทั้งในรูปแบบน้ำเลี้ยงปราศจากเซลล์ และในรูปสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วน ที่ความเข้มข้น 10 มก.ต่อมล. โดยวัดค่าอิมัลชัน อินเด็กซ์ตามข้อ พบว่าค่าอิมัลชัน อินเด็กซ์ มากกว่า 60 % ภายใน 7 วัน กับสารไฮโดรคาร์บอน 8 ชนิดดังแสดงในตาราง 4.20

ตารางที่ 4.20 แสดงค่าอิมัลชัน อินเด็กซ์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบริสุทธิ์บางส่วนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ

ประเภทของตัว ทำละลาย	ค่าความ เป็นขี้	ค่าอิมัลชัน อินเด็กซ์ (%)					
		24 ชั่วโมง		7 วัน		30 วัน	
		น้ำเลี้ยงเชื้อ	สารบริสุทธิ์ บางส่วน	น้ำเลี้ยงเชื้อ	สารบริสุทธิ์ บางส่วน	น้ำเลี้ยงเชื้อ	สารบริสุทธิ์ บางส่วน
ไซโคลเฮกเซน	0.0	75.56	67.12	70.00	61.52	0.00	36.59
เฮกเซน	0.0	61.64	63.89	60.05	63.21	0.00	61.11
โทลูอิน	0.4	44.76	70.83	40.00	68.85	0.00	60.38
ไซลีน	2.3	45.21	71.13	41.25	70.00	0.00	68.57
เบนซีน	2.4	44.37	70.13	0.00	69.82	0.00	55.74
ไดคลอโร มีเทน	3.0	62.50	67.13	62.00	67.03	62.00	65.67
คลอโรฟอร์ม	3.4	79.73	68.49	75.58	68.0	0.00	62.50
เอทิลอะซิเตด	4.3	84.62	65.15	80.00	60.87	2.89	0.00
เอทิลเมทิลดี โตน	4.5	55.24	0.00	52.00	0.00	0.00	0.00



บทที่ 5
การอภิปรายผล

5. การอภิปรายผล

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวกำหนดสูตรที่มี 2% (v/v) ของแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน 9 ชนิด ที่ 30°C เขย่าที่ 200 rpm เป็นเวลา 7 วัน พบว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดีในน้ำมันมะพร้าว น้ำมันปาล์ม และน้ำมันมะกอกตามลำดับ ขณะที่เมื่อเลี้ยงเชื้อในกรดไขมันชนิดต่างๆ พบว่าเชื้อมีการเจริญเติบโตได้ดีเช่นเดียวกัน ยกเว้นในกรดไมริสติกและกรดปาล์มิติก เชื้อ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 จะผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเมื่อเจริญเข้าสู่ระยะพัก (stationary phase) ในอาหารเลี้ยงเชื้อทุกแหล่งคาร์บอน สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จะสามารถลดค่าแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ลงเป็น 27.8 - 30 mN/m ในอาหารเลี้ยงเชื้อทุกแหล่งคาร์บอน ซึ่งถือว่าเป็นค่าแรงตึงผิวที่ลดลงต่ำเมื่อเทียบกับ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์อื่นๆที่มีรายงานมา เช่น *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้สามารถลดแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์เป็น 34 - 36 mN/m เมื่อใช้น้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอน (Haba และคณะ, 2000) *Pseudomonas aeruginosa* UW-1 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้สามารถลดแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์เป็น 27.7 - 30.4 mN/m เมื่อใช้ Canola Oil (Sim และคณะ, 1997) *Pseudomonas aeruginosa* S7B1 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้สามารถลดแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์เป็น 40 mN/m (Hisatsuka และคณะ, 1971)

เมื่อทดสอบการกระจายน้ำมันของสารพบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ในอาหารที่มีน้ำมันมะพร้าว น้ำมันมะกอก และน้ำมันปาล์ม เป็นแหล่งคาร์บอน จะให้ผลดีกว่าเมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดไขมันบางชนิดเป็นแหล่งคาร์บอน น้ำมันมะกอกจะให้ผลดีที่สุดมีค่าเท่ากับ 70.63 cm² ในน้ำมันปาล์ม 66.85 cm² และในน้ำมันมะพร้าว 50.25 cm² ตามลำดับ และเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีกรดไขมันอิ่มตัวที่เป็นสายของคาร์บอนยาวขึ้น C12 C14 และ C16 ค่าการกระจายน้ำมันของสารที่ผลิตได้จะมีค่าลดลงตามลำดับดังนี้ 60.79 cm² 41.30 cm² และ 0.05 cm² เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีกรดไขมันอิ่มตัว C18 เปรียบเทียบกับอาหารที่มีกรดไขมันพันธะเดี่ยวและคู่ พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นพันธะคู่ C18:2 สารที่ผลิตได้จะสามารถกระจายน้ำมันได้สูงสุดคือ 71.25 cm² ภายในเวลา 84 ชั่วโมง ในขณะที่ C18 และ C18:1 จะพบว่าการกระจายน้ำมันที่มีค่าต่ำกว่าและช้ากว่า (ในเวลา 120-168 ชั่วโมง)

ปริมาณน้ำตาลแรมโนสที่วิเคราะห์ได้ในแต่ละแหล่งคาร์บอนจะมีความสอดคล้องกับความสามารถในการกระจายน้ำมันของสารที่ผลิตได้ พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีน้ำมันมะกอกและกรดไลโนเลอิกเป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาณน้ำตาลแรมโนสที่วิเคราะห์ได้ และค่าการกระจายน้ำมันจะมีค่าสูงกว่าแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ *Pseudomonas* sp. A41 ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มี

องค์ประกอบของน้ำตาลแรมโนสเท่ากับ 2.81 กรัมต่อลิตร ซึ่งเท่ากับ *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 ที่สามารถผลิตน้ำตาลแรมโนสได้เป็น 2.7 กรัมต่อลิตร (Haba และคณะ, 2000) ค่าของน้ำตาลแรมโนสที่วิเคราะห์ได้มักจะสอดคล้องกับปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งเคยมีรายงานไว้ว่า น้ำหนักของน้ำตาลแรมโนสที่วิเคราะห์ได้จะประมาณเป็น 1 ใน 3 ของน้ำหนักแรมโนลิปิด (Abalos และคณะ, 2001)

จากผลการทดลองของ Gas Chromatography-Mass Spectrometry แสดงเพื่อบ่งชี้การเกิด glycolipid โดยจุลินทรีย์ให้เห็นชัดเจนยิ่งขึ้น คือเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนต่างๆ กันเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ในระยะเวลาที่ต่างกัน และนำน้ำเลี้ยงเชื่อนั้นมาสกัดแยกโดยทำปฏิกิริยา hydrolysis แยกส่วนที่ละลายได้ดีในน้ำ และส่วนที่ละลายได้ดีในไขมันแยกออกจากกัน ส่วนที่ละลายได้ดีในไขมันนำมาเตรียมให้เป็นอนุพันธ์ในรูป methyl ester และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS ผลจากการตรวจวิเคราะห์แสดงการเปลี่ยนแปลงจากกรดไขมันไปเป็นผลิตภัณฑ์ในรูป 3-hydroxydecanoic acid (3OH-C10:0) เกือบทั้งหมด และมีการตรวจพบสาร 3-hydroxyoctanoic acid (3OH-C8:0), 3-hydroxydodecanoic acid (3OH-C12:1) และ 3-hydroxydodecanoic acid (3OH-C12:0) ร่วมด้วย เป็นการยืนยันการเกิดสาร glycolipid ได้อย่างชัดเจน และพบว่าที่ 36 ชั่วโมงเป็นเวลาเริ่มสร้างสาร 3-hydroxy C10 acid ยกเว้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกรดโอเลอิก และกรดไลโนเลอิกจะสร้างสาร 3-hydroxy C10 acid ได้เร็วกว่าเมื่อ 24 ชั่วโมง และเมื่อเลี้ยงเชื้อได้เป็นเวลา 168 ชั่วโมง สาร 3-hydroxy C10 acid จะมีปริมาณสูงสุดในทุกชนิดของแหล่งอาหารเลี้ยงเชื้อ ยกเว้นในกรดปาล์มิติก

จากการคำนวณราคาต้นทุน และค่าผลผลิตของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ ในแหล่งอาหารน้ำมัน 3 ชนิด พบว่าน้ำมันมะกอกจะมีราคาต้นทุนสูงสุด และค่าผลผลิตกรัมต่อบาทต่ำสุด ขณะที่น้ำมันปาล์มจะมีราคาต้นทุนไม่สูงมากนัก แต่ให้ค่าผลผลิตกรัมต่อบาทสูงและให้ปริมาณสารสูงเช่นกัน คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ไขมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน แล้วทำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยวิธีการทางเคมี เพื่อนำไปทดสอบหาคุณสมบัติบางประการเช่น ค่า CMC ค่าลดแรงตึงผิว ความสามารถในการกระจายน้ำมัน และวิเคราะห์โครงสร้างของสารที่บริสุทธิ์บางส่วนที่ผลิตได้โดยวิธี LC-MS

สมบัติของสารลดแรงตึงผิวที่บริสุทธิ์บางส่วนผลิตได้จาก *Pseudomonas* sp. A41 เมื่อใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีค่า CMC เท่ากับ 50 mg/l หรือค่า CMC⁻¹ เท่ากับ 2 mg/l จากรายงานของ Mata-Sandoval และคณะในปี 1999 พบว่ามีค่า CMC ของ RhaC₁₀ หรือ RhaRhaC₁₀ เท่ากับ 200 mg/l แต่ถ้ามี RhaC₁₀C₁₀ มีค่า CMC อยู่ระหว่าง 40-60 mg/l และยังพบว่า RhaRhaC₁₀C₁₀C_{10:1} (Rhamnolipid B) Na Salt มีค่า CMC อยู่ระหว่าง 260 mg/l และ

RhaRhaC₁₀C₁₀C_{10:1} (Rhamnolipid B) methyl ester มีค่า CMC เท่ากับ 400 mg/l (Lang และ Wulbrandt, 1999) หรืออาจกล่าวได้ว่าถ้ามีปริมาณ Rhamnose สูง จะมีเป็นผลทำให้ค่า CMC สูงกว่าในขณะที่มีปริมาณ hydrocarbon chain ที่ยาวขึ้น จะส่งผลให้ค่า CMC ต่ำลง

จากการวิเคราะห์สารด้วย TLC พบว่าผลผลิตที่ได้จะมีองค์ประกอบทั้งหมด 6 ชนิด โดยมี 1 ชนิดที่ให้ผลบวกกับสารละลายโมลิส เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างของสารด้วยวิธี LC-MS จะพบว่ามีสารที่เป็นองค์ประกอบหลักที่มีมวลโมเลกุล 527 และ 272 ซึ่งเท่ากับมวลโมเลกุลของ Sodium monorhamnolipid (RhaC₁₀C₁₀Na') และ Hydroxydecanoic acids และสารที่มีมวลโมเลกุล 661 ซึ่งเป็นสารที่ยังไม่มีรายงานมาก่อน





บทที่ 6
สรุป

6. สรุป

เนื่องจากการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังเป็นการลงทุนที่สูงสำหรับการนำไปบำบัดสิ่งแวดล้อม และการนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาถึงแนวทางในการเพิ่มผลผลิต การเพิ่มผลผลิตของสารจะถูกควบคุมโดยสารพันธุกรรมของจุลินทรีย์ อิทธิพลของสิ่งแวดล้อม และชนิดของ สารตั้งต้นที่ใช้ในการผลิต ล้วนแต่เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการผลิตสาร การปรับภาวะให้เหมาะสมนำไปสู่ ผลผลิตที่สูงขึ้น

การศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Pseudomonas aeruginosa* ส่วนใหญ่จะใช้ สารประกอบไฮโดรคาร์บอนเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ จะมีบ้างที่รายงานการผลิตสารจากคาร์โบไฮเดรต รายงานที่ เกี่ยวกับการผลิตสารจากแหล่งที่มีคุณสมบัติเป็น ไฮโดรโฟบิก เช่น กลีเซอรอล น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันมะกอก น้ำมันมะพร้าว น้ำมันcanola เฮกเซน และแอลกอฮอล์ หรือจากแหล่งอื่นๆ เช่น หางนม โมลาส และแหล่งน้ำ เสียที่มีน้ำมันปนเปื้อนอยู่ (Lang และ Wullbrandt, 1999 ; Rahman และคณะ, 2002 ; Patel และคณะ, 1997 ; Sim และคณะ, 1997) แต่ยังไม่เคยมีรายงานการใช้ free fatty acid C12 – C18 การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จึงมุ่ง ที่จะศึกษาถึงการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยใช้สารตั้งต้นที่แตกต่างจากที่เคยรายงานเช่นในน้ำมัน ปาล์ม และกรดไขมัน C12 – C18 และกรดไขมันไม่อิ่มตัว (C18:1 และ C18:2)

คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* A41 ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่เติม 2%(v/v)คาร์บอนจากแหล่งต่างๆ เช่น น้ำมันมะพร้าว น้ำมันปาล์ม น้ำมันมะกอก และกรดไขมัน C12, C14, C16, C18 C18:1 และ C18:2 จากการ ทดลองพบว่า *Pseudomonas aeruginosa* A41 สามารถเจริญได้ดีทุกแหล่งคาร์บอนยกเว้นในอาหารเลี้ยง เชื้อที่มีกรดไขมัน C14 และ C16 และสามารถลดค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ได้เป็น 27.8 - 30 mN/m

เมื่อเปรียบเทียบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำมัน 3 ชนิด พบว่าน้ำมันมะกอกจะเป็นแหล่งคาร์บอนที่สามารถให้ผลการกระจายน้ำมันสูงสุด 70.63 cm² น้ำตาล แรมโนส 5.73 กรัมต่อลิตร และสารบริสุทธิ์บางส่วน 16.91 กรัมต่อลิตร น้ำมันปาล์มจะให้ผลผลิตที่รองลงมา คือให้ค่าการกระจายน้ำมันเท่ากับ 66.85 cm² น้ำตาลแรมโนส 2.81 กรัมต่อลิตร สารบริสุทธิ์บางส่วน 13.35 กรัมต่อลิตร ส่วนในน้ำมันมะพร้าวจะให้ค่าการกระจายน้ำมันต่ำสุดเท่ากับ 50.24 cm² แต่เมื่อเปรียบเทียบค่า Δ ค่าแรงตึงผิว₀ (ค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ตั้งต้น-ค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจาก เซลล์เมื่อสิ้นสุดการหมัก) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ในน้ำมันปาล์มจะให้ค่าสูงสุดคือ 41 mN/m

เมื่อเลี้ยงเชื้อในกรดไขมันชนิดต่างๆ พบว่ากรดไขมันที่มีพันธะเดี่ยวและพันธะคู่ (C18:1, C18:2) จะเป็นผลดีต่อการผลิต โดยเฉพาะกรดไขมัน C18:2 จะให้การกระจายน้ำมันสูงสุดเท่ากับ 71.25 cm^3 น้ำตาลแรมโนส 4.99 กรัมต่อลิตรในระยะเวลาที่รวดเร็วกว่าแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ และสามารถตรวจพบสาร 3-hydroxy C10 acid ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ตั้งแต่วันที่ 24 ชั่วโมงซึ่งเร็วกว่า แหล่งอาหารคาร์บอนชนิดอื่น

ผลจากการตรวจวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธี GC-MS แสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงจากกรดไขมันไปเป็นผลิตภัณฑ์ในรูป 3-hydroxydecanoic acid (3OH-C10:0) เกือบทั้งหมด และมีการตรวจพบสาร 3-hydroxyoctanoic acid (3OH-C8:0), 3-hydroxydodecanoic acid (3OH-C12:1) และ 3-hydroxydodecanoic acid (3OH-C12:0) ร่วมด้วย เป็นการยืนยันการเกิดสาร glycolipid ได้อย่างชัดเจน

เนื่องจากน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาแพง ผู้วิจัยจึงได้สนใจที่จะผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากน้ำมันปาล์มแทน เพราะเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกและหาได้ง่ายในประเทศ เมื่อนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนมาทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยวิธีการทางเคมี แล้วนำไปทดสอบหาคุณสมบัติบางประการ พบว่าสารมีคุณสมบัติที่ดีโดยมีค่า CMC 50 มก. ต่อลิตร $\gamma_{\text{CMC}} 30 \text{ mN/m}$ ค่าอิมัลชันอินเด็กซ์ มากกว่า 60% ภายใน 7 วัน กับสารไฮโดรคาร์บอน 8 ชนิด สารบริสุทธิ์บางส่วนที่ผลิตได้จะมีปริมาณ 13.4 กรัมต่อลิตร ซึ่งให้ค่าผลผลิตสูงถึง 196.32 กรัมต่อบาท นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์สารที่ผลิตได้โดยวิธี TLC พบว่ามีองค์ประกอบทั้งหมด 6 ชนิด ที่ให้ผลบวกกับไอของไอโอดีน และมี 1 ชนิดที่ให้ผลบวกกับสารละลาย โมลิส และเมื่อวิเคราะห์โครงสร้างของสารด้วยวิธี LC-MS จะพบว่า มีสารที่เป็นองค์ประกอบหลักที่มีมวลโมเลกุล 527 และ 272 ซึ่งเท่ากับมวลโมเลกุลของ Sodium monorhamnolipid ($\text{RhaC}_{10}\text{C}_{10}\text{Na}^+$) และ Hydroxydecanoic acids และสารที่มีมวลโมเลกุล 661 ซึ่งเป็นสารที่ยังไม่มีรายงานมาก่อน

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาด้านพันธุศาสตร์ของ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 อาจนำไปใช้เพิ่มผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้โดยทำการพัฒนาทางพันธุวิศวกรรม หรือวิธีอื่นที่เหมาะสม
2. *Pseudomonas* sp. A41 สร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีส่วนประกอบของสารต่างๆอยู่หลายชนิด ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงคุณสมบัติและประสิทธิภาพของสารแต่ละชนิดต่อไป เพื่อประยุกต์ใช้ในอนาคตต่อไป



เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

1. อารีย์ ก่งฉิ่น. 2542. การแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาษาอังกฤษ

1. Abalos, A., Pinazo, A., Infante, M.R., Casals, M., Garcia, F. and Manresa, A. 2001. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. Langmuir, 17: 1367-1371
2. Arino, A., Marchal, R., Vandecasteele, J.-P. 1996. Identification and production of a rhamnolipidic biosurfactant by a *Pseudomonas* species. Appl Microbiol Biotechnol 45 : 162-168
3. Babu, P.S., Vaidya, A.N., Bal, A.S., Kapur, R., Juwarkar, A. and Khanna, P. 1996. Kinetics of biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* strain BS2 from industrial waste. Biotechnol Lett, 18: 263 – 268
4. Bergstrom, S., Theorell, H. and Davide, H. 1946. On a metabolic product of *Ps. Pyocyanea*, rhamnolipic acid, active against *Myobact. tuberculosis*. Ark Kem Mineral Geol 23A: 1-12
5. Burger, M.M., Glaser, L. and Burton, R.M. 1963. The enzymatic synthesis of a rhamnose-containing glycolipid by extracts of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Biol. Chem. 238: 2595 – 2601
6. Cooper, D.G. and Zajic, J.E. 1980. Surface-active compounds from microorganism. Adv. Appl. Microbiol. 26: 229-256
7. Cooper, D.G. 1986. Biosurfactants. Microbiol. Sci. 3: 145-1459
8. Daniel, H.J., Otto, R.T., Binder, M. and Sydatk, C. 1998. Sophorolipid production with high yields on whey concentrated and rape seed oil without consumption of lactose. Biotechnol Lett, 20: 805 – 807
9. Desai, J.D., Desai, A.J. and Patel, M.R. 1994. Advances in the production of biosurfactants and their commercial applications. J.SCI.IND.RES. 53: 619 -- 629
10. Desai, J.D. and Banat, I.M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61: 47-64
11. Dische, Z. and Shettles, L.B. 1948. A specific color reaction of methylpentoses and a spectrophotometric micromethod for their determination. J. Biol. Chem. 595-603
12. Edwards, J.R. and Hayashi, J.A. 1965. Structure of a rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa*. Arch. Biochem. Biophys. 111: 415-421
13. Falbe, J. 1987. Biosurfactant. Surfactant in Consumer Products. pp. 118 – 117 Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.

14. Fiechter, A. 1992. Biosurfactants: moving towards industrial application. Trends. Biotechnol. 10: 208-217
15. Folch, J., Lee, M. and Sloane Stanley, G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. J. Biol. Chem. 226: 497-509
16. Haba, E., Espuny, M.J., Busquets, M. and Manresa, A. 2000. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. J. Appl. Microbiol. 88: 379-387
17. Hauser, G. and Karnovsky, M.L. 1957. Rhamnose and rhamnolipide biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Biol. Chem. 224: 91-105
18. Hauser, G. and Karnovsky, M.L. 1958. Studies on biosynthesis of L-rhamnose. J. Biol. Chem. 233: 287 – 291
19. Hirayama, T. and Kato, I. 1982. Novel methyl rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa*. FEBS Lett. 139: 81-85
20. Hisatuska, K., Nakahara, T., Sano, N. and Yamada, K. 1971. Formation of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* and function in hydrocarbon fermentation. Agr. Biol. Chem. 35: 686-692
21. Itoh, S., Honda, H., Tomita, F. and Suzuki, T. 1971. Rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on n-paraffin. (mixture of C₁₂, C₁₃ and C₁₄ fractions) J. Antibio. 24: 855-859
22. Ishigami, Y., Gama, Y., Nakahara, H., Yamaguchi, M., Nakahara, H. and Kamata, T. 1987. The pH-sensitive conversion of molecular Aggregates of rhamnolipid biosurfactant. Chem. Lett. 763-766
23. Javis, F.G. and Johnson, M.J. 1949. A glyco-lipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Am. Chem. Soc. 71 : 4124 – 4126
24. Kosaric, N., Cairns, W.L., Gray, N.C.C., Stechey, D. and Wood, J. 1984. The role of nitrogen in multiorganism strategies for biosurfactant production. JAOCS, 61: 1735 – 1743
25. Knoche, H.W. and Shiveley, J.M. 1972. The structure of an ornithine-containing lipids from *Thiobacillus thiooxidans*. J. Biol. Chem. 247: 170-178
26. Kosaric, N. 1993. Biosurfactant *Production *Property *Application. Surfactant Science Series; vol 48 Marcel Dekker, Inc. New York.
27. Kim, H.S., Yoon, B.D., Lee, C.H., Suh, H.H., Oh, H.M., Katsuragi, T. and Taki, Y. 1997a. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. J. Ferment. Bioproc. 84: 41 – 46
28. Kitamoto, D.; Nemoto, T.; Yanagishita, H.; Nakane, T.; Kitamoto, H. and Nakahara, T. 1993. Fatty acid metabolism of mannosyl erythritol lipids as biosurfactants produced by *Candida Antarctica*:

Incorporation of medium-chain fatty acids as β -oxidation intermediates into glycolipid. J.Jpn.Oil.Chem.Soc. 42: 346-358

29. Lang, S. and Wullbrandt, D. 1999. Rhamnose lipid-biosynthesis, microbial production and application potential. Appl. Microbiol. Biotechnol. 51: 22-32.
30. Lin, S.C. Biosurfactants: recent advances. 1996. J. Chem. Tech. Biotechnol. 66: 109-120
31. Maier, R.M. and Soberon-Chavez, G. 2000. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 54: 625-633
32. Manresa, M.A., Bastida, J., Mercade, M.E., Robert, M., Andres J. de., Espuny, M.J. and Guinea, J. 1991. Kinetic studies on surfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. J. Ind. Microbiol. 8: 133 – 136
33. Mata-Sandoval, J.C., Karns, J. and Torrents, A. 1999. High-performance liquid chromatography method for the characterization of rhamnolipid mixtures produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on corn oil. J. Chromato. A. 864: 211-220
34. Matsuyama, T., Kaneda, K., Ishizuka, I., Toida, T. and Yano, I. 1990. Surface-active novel extracellular cyclic lipopeptide which promotes flagellum-dependent and independent spreading growth of *Serratia marcescens*. J. Bacteriol. 174 : 1769 – 1776
35. Medina, G., Juarez, K. and Sober-Chavez, G. 2003. The *Pseudomonas aeruginosa* rhlAB operon is not expressed during the logarithmic phase of growth even in the presence of its activator RhIR and the autoinducer N-butyryl-homoserine lactone. J. Bact. 185: 377-380
36. Mercade, M.E., Manresa, A., Robert, M., Espuny, M.J., de Andres, C. and Guinea, J. 1993. Olive oil mill effluent (OOME). New substrate for biosurfactant production. Bioresource Technol. 43: 1 – 6
37. Morikawa, M. and Imanaka, T. 1993. Isolation of new mixotrophic bacterium which can fix CO₂ and assimilation aliphatic and aromatic hydrocarbons anaerobically. J. Ferment. Bioeng. 76: 280 – 283
38. Morikawa, M. Hirata, Y. and Imanaka, T. 2000. A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. Biochica et Biophysica Acta 1488: 211-218
39. Novon-Venezia, S., Zosim, Z., Gottlieb, A., Legmann, R., Carmell, S., Ron, E.Z. and Rosenberg, E. 1995. Alasan, a new bioemulsification from *Acinetobacter radioresistens*. Appl. Environ. Biotechnol. 32 : 518 – 520
40. Ochser, U.A., Hembach, T. and Fiechter, A. 1996. Production of rhamnolipid biosurfactant. In Fiechter A. (ed) Advances in biochemical engineering biotechnology. vol 53. Springer, Berlin Heidelberg. New York. pp. 89 – 118

41. Patel, R.M. and Desai, A.J. 1997. Surface-active properties of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* GS3. J. Basic Microbiol. 37: 281-286
42. Parra, J.L., Pastor, J., Comelles, F., Manresa, M.A. and Bosch, M.P. 1990. Studies of biosurfactants obtained from olive oil. Tenside, Surf. Det. 27: 302 - 306
43. Persson, A. Oslerberg, E. and Dostalek, M. 1988. Biosurfactant production by *Pseudomonas fluorescens* 378: growth and product characteristics. Appl. Microbiol. Biotechnol. 29: 1-4
45. Rahman, K.S., Rahman, T.J., McClean, S., Marchant, R., Banat, IM. 2002. Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. Biotechnol Prog. 18(6) : 1277-1281.
44. Rendell, N.B., Taylor, G.W., Somerville, M., Todd, H., Wilson, R. and Cole, P.J. 1999. Characterisation of *Pseudomonas* rhamnolipids. Biochimica et Biophysica Acta. 1045: 189-193
45. Robert, M., Mercade, M.E., Bosch, M.P., Parra, J.L., Espuny, M.J, Manresa, M.A. and Guinea, J. 1989. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. Biotech. Lett. 11: 871-874
46. Rosenberg, E. 1986. Microbial surfactants. CRC Crit Rev. Biotechnol. 3: 109-132
47. Sim, L., Ward, O.P. and Li, Z.Y. 1997. Production and characterization of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. J. Indus. Microbiol. Biotechnol. 19: 232-238
48. Sen, R. 1997. Response surface optimization of the critical media components for the production of surfactant. J. Chem. Tech. Biotechnol. 68: 263 – 270
49. Sylđatk, C., Lang, S., Wagner, F., Wray, V. and Witte, L. 1984. Chemical and physical Characterization of four interfacial-active rhamnolipids from *Pseudomonas* spec. DSM 2874 grown on n-alkane. Z Naturforsch. 40 : 51 – 60
50. Tahara, Y., Yamada, Y., and Kondo, K. 1976a. A new lipids; the ornithine and taurine-containing 'cerilipin'. Agric. Biol. Chem. 40: 243-244
51. Tahara, Y., Yamada, Y., and Kondo, K. 1976b. A new lysin containing lipids isolated from *Agrobacterium tumefaciens*. Agric. Biol. Chem. 40: 1440-1450
52. Yamane, T. 1987. Enzyme technology for the lipid industry: an engineering overview. J. Am. Oil. Chem Soc. 64: 1657-1662
53. Yamaguchi, M. Sato, A. and Yukuyama, A. 1976. Microbial production of sugar-lipids. Chem. Ind. 4 : 741 – 742



ภาคผนวก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเหลวกำหนดสูตร (Define medium)

น้ำมันปาล์ม	20.0	มล.
แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3)	4.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.4	กรัม
โปตัสเซียมซัลเฟต (KCl)	0.2	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.1	กรัม
กรดฟอสเฟอริก (H_3PO_4)	0.5	มล.
กรดบอริก (H_3BO_3)	1.53	มิลลิกรัม
คอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.284	มิลลิกรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	1.71	มิลลิกรัม
โซเดียมโมลิบเดต ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.7	มิลลิกรัม
ซิงค์ซัลเฟต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	2.9	มิลลิกรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	4.3	มิลลิกรัม
โคบอลคลอไรด์ ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.1	มิลลิกรัม
อีดีทีเอ (EDTA)	200.0	มิลลิกรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	14.0	กรัม
เกลือแร่และวิตามิน	4.8	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มล.