

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรีย B189

ปริญญานิพนธ์
ของ
วิภาวรรณ เพชลีพะ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
เมษายน 2547
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

๐๖๔.๖
๑๑๖.๖
๗.๖

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรีย B189

บทคัดย่อ
ของ
วิภาวรรณ เพชลีพพะ

๔๕๖.๖
๑๑๖.๖
๗.๖

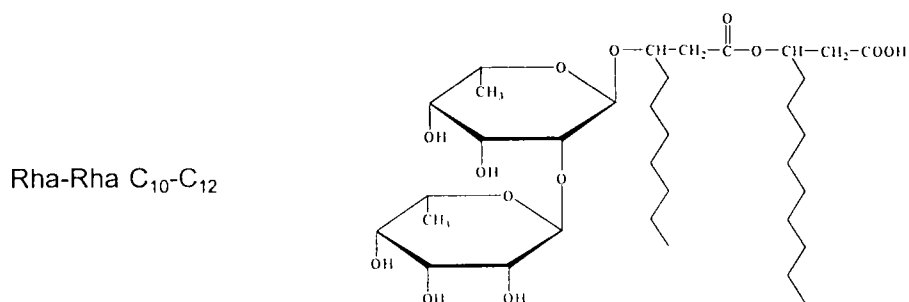
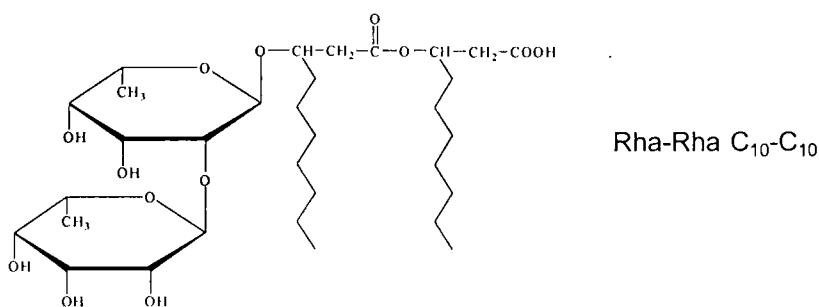
เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
เมษายน 2547

๗.๖.๖

วิภาวรรณ เพชลีพะ. (2547). การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรีย B189. วิทยานิพนธ์ กศ.ม. (เคมี). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: รศ.ดร. ชารัตน์ ศุภศิริ, ผศ.ดร. เบญจมาศ ถนอมทรัพย์

ในการแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรีย B189 ซึ่งคัดแยกได้จากน้ำทิ้งโรงงานผลิตนมในประเทศไทย โดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟีได้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวดีที่สุด 2 ชนิด คือ สารประกอบ A และสารประกอบ B ซึ่งมีความสามารถในการลดแรงตึงผิวได้ดีกว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์มาตรฐาน 2 ชนิด คือ Sodium dodecyl sulfate และ Tween 80 และดีกว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาตรฐาน 2 ชนิด คือ Sophorolipid และ Mannosylerythritol lipid โดยมีค่า Minimum Active Dose (MAD) เท่ากับ 0.2 μg

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 2 ชนิดนี้ โดยวิเคราะห์ด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปี (FAB-MS, GC-MS และ NMR) และเปรียบเทียบข้อมูลจากที่เคยมีรายงานไว้แล้วพบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทั้ง 2 ชนิดเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทแรมโนลิปิดซึ่งมีโครงสร้างคล้ายคลึงกัน คือ L-rhamnopyranosyl-L-rhamnopyranosyl- β -hydroxydecanoate, (Rha-Rha C₁₀-C₁₀) และ L-rhamnopyranosyl-L-rhamnopyranosyl- β -hydroxydecanoate, (Rha-Rha C₁₀-C₁₂)



**STUDY OF THE CHEMICAL CONSTITUENTS OF BIOSURFACTANT PRODUCED BY
BACTERIA B189**

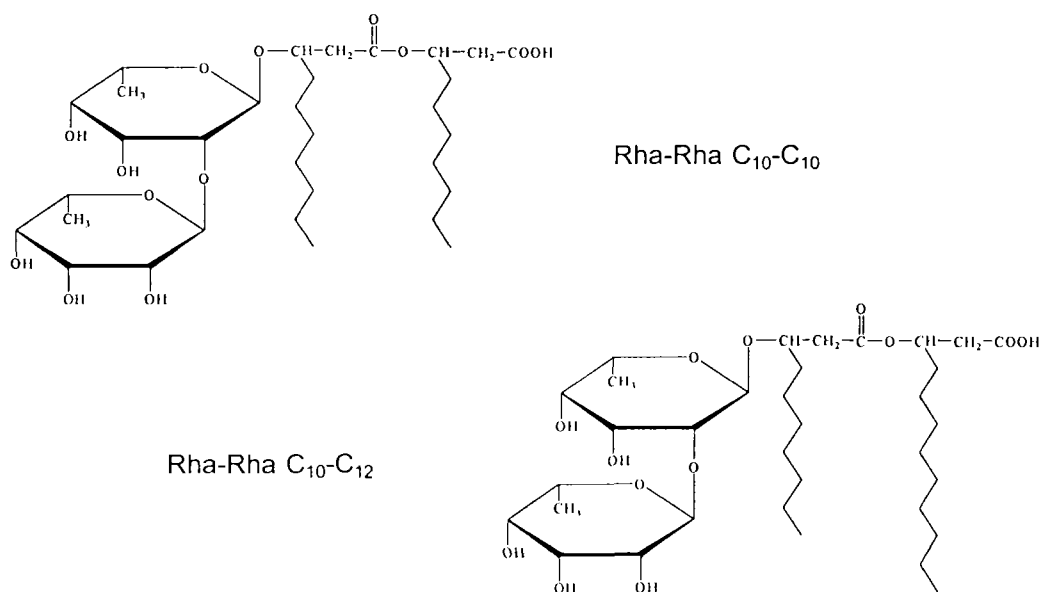
AN ABSTRACT
BY
WIPAWAN PETCHALEELAHA

Presented in partial fulfillment of the requirements for the
Master of Education degree in Chemistry
at Srinakharinwirot University
April 2004

Wipawan Petchaleelaha. (2004). *Study of the chemical constituents of biosurfactant produced by bacteria B189*. Master Thesis, M.Ed. (Chemistry). Bangkok : Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Assoc. Prof. Dr. Thararat Supasiri, Asst. Prof. Dr. Benjamas Thanomsub

A bacteria strain B189 Isolated from wastewater of milk manufacturing industry in Thailand could produce various kinds of biosurfactant. These biosurfactants were purified using column chromatography by surfactant activity-guided purification. Two highest surfactant-activity compounds, compound A and compound B were obtained. Both of them showed minimum active dose (MAD) at 0.2 μg which were less than two commercial chemical surfactant (sodium dodecyl sulfate, tween 80) and two standard biosurfactant (sophorolipid, mannosylerythritol lipid)

The structures of two biosurfactants were characterized using fast atom bombard-mass spectroscopy, gas chromatography-mass spectroscopy and nuclear magnetic resonance spectroscopy and compare with current reports. The results showed that compound A and compound B were rhamnolipids which their structures revealed to be L-rhamnopyranosyl-L-rhamnopyranosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate, (Rha-Rha C₁₀-C₁₀) and L-rhamnopyranosyl-L-rhamnopyranosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydodecanoate, (Rha-Rha C₁₀-C₁₂)



ปริญญานิพนธ์
เรื่อง

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรีย B189

ของ
นางสาววิภาวรรณ เพชลีพะ

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.นภาพรณ์ หะวานนท์)
วันที่ 24 เดือน เมษายน พ.ศ. 2547

คณะกรรมการสอบปริญญานิพนธ์

..... ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธารรัตน์ สุขศิริ)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เบญจมาศ ถนอมทรัพย์)

..... กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประเสริฐ ศรีไพโรจน์)

..... กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุนิตย์ สุขสำราญ)

ประกาศขอบคุณการ

ปริญญานิพนธ์นี้สำเร็จได้ด้วยดีเป็นเพราะผู้วิจัยได้รับความกรุณาอย่างยิ่งจากคณาจารย์หลายท่าน ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ธารรัตน์ ศุภศิริ ประธานกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เบญจมาศ ถนอมทรัพย์ กรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ในทุกขั้นตอนของการวิจัยและการเขียนปริญญานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ประเสริฐ ศรีไพโรจน์ และรองศาสตราจารย์ ดร.สุนิตย์ สุขสำราญที่กรุณาเป็นกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ ตลอดจนให้คำแนะนำต่าง ๆ ที่ทำให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร. Hiroshi Kanzaki และรองศาสตราจารย์ ดร. Teruhiko Nitoda แห่งมหาวิทยาลัยโอคายาม่า ประเทศญี่ปุ่นที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในการบันทึก NMR, MS, GC-MS spectra และตรวจยืนยันการพิสูจน์โครงสร้างสาร รองศาสตราจารย์ ดร.สุนิตย์ สุขสำราญ ในการบันทึก ^1H NMR spectra และคำแนะนำในการอภิปรายโครงสร้างสาร และคณาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้ ความเมตตาแก่ผู้วิจัยในการศึกษาตามหลักสูตรการศึกษามหาบัณฑิตมาตลอด

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์พนารัตน์ อรุณรัตติยากรที่ได้เสียสละเวลาอันมีค่าเพื่อให้คำปรึกษา คำแนะนำ และให้ความช่วยเหลือทั้งกำลังกายและกำลังใจที่ดีเยี่ยมในการจัดทำงานวิจัยนี้ทุกขั้นตอน

ขอขอบพระคุณคุณณอมรัตน์ วัชรชัยพงษ์ แห่งภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ ที่ให้คำปรึกษาแนะนำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย B189 ขอขอบคุณเพื่อน พี่ น้อง นิสิตปริญญาโทที่ให้คำแนะนำปรึกษา ช่วยเหลือด้านการปฏิบัติการแก่ผู้วิจัย รวมทั้งคอยเป็นกำลังใจที่ดีตลอดระยะเวลาที่ศึกษาและทำงานวิจัย ตลอดจนเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาเคมีที่ช่วยอำนวยความสะดวกให้แก่ผู้วิจัยตลอดมา

ท้ายสุดคุณค่าและประโยชน์ใด ๆ อันเกิดจากปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแต่ บิดามารดา ญาติพี่น้อง ครูอาจารย์และผู้มีพระคุณทุกท่าน

วิภาวรรณ เพชลีพะ

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	2
ความสำคัญของการวิจัย.....	2
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	4
การจำแนกประเภทของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	6
วิธีการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	18
การตรวจวัดกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	19
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	21
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	
แบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัย.....	26
อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	26
วิธีดำเนินการวิจัย.....	28
การเลี้ยงแบคทีเรีย B189 เพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	28
การสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเซลล์และน้ำเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย.....	28
การแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและการทำสารให้บริสุทธิ์ขึ้น.....	29
การวัดกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	30
การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	31
4 ผลการวิจัย.....	34
ผลการเลี้ยงแบคทีเรีย B189 เพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	34
ผลการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเซลล์และน้ำเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย.....	35
ผลการแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและการทำสารให้บริสุทธิ์ขึ้น.....	35

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
ผลการวัดกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	51
ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	56
สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	60
บรรณานุกรม.....	76
ภาคผนวก.....	81
อภิธานศัพท์.....	108
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	110

บัญชีตาราง

ตาราง		หน้า
1	สมบัติบางประการของสารลดแรงตึงผิวกลุ่มต่างๆ ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์.....	16
2	ผลการแยกส่วนสกัด methanol ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ชนิดเร็ว.....	37
3	ผลการแยกสารกลุ่ม F14(1) ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (reverse phase).....	40
4	ผลการแยกสารกลุ่ม F14(1).5 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (reverse phase).....	43
5	ผลการแยกสารกลุ่ม F14(2) ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (normal phase).....	46
6	ผลการแยกสารกลุ่ม F14(2).6 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (reverse phase).....	49
7	ผลการวัดค่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิวของสารสกัดชั้น methanol ละลายในตัวทำละลาย ethanol.....	51
8	ผลการวัดค่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิวของสารกลุ่มที่แยกได้จากสารสกัดชั้น methanol ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ชนิดเร็ว ละลายในตัวทำละลาย methanol.....	52
9	ผลการวัดค่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิวของสารกลุ่มที่แยกได้จากสารกลุ่ม F14(1) ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ละลายในตัวทำละลาย methanol.....	53
10	ผลการวัดค่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิวของสารกลุ่มที่แยกได้จากสารกลุ่ม F14(1).5 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ละลายในตัวทำละลาย methanol.....	53
11	ผลการวัดค่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิวของสารกลุ่มที่แยกได้จากสารกลุ่ม F14(2) ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ละลายในตัวทำละลาย methanol.....	54
12	ผลการวัดค่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิวของสารกลุ่มที่แยกได้จากสารกลุ่ม F14(2).6 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ละลายในตัวทำละลาย methanol.....	55
13	ผลการวัดค่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิวของสารประกอบ A, สารประกอบ B เปรียบเทียบกับ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาตรฐานและสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์มาตรฐาน ละลายในตัวทำละลาย methanol.....	56
14	ข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR ของ Rha-Rha $\text{C}_{10}\text{-C}_{10}$ และสารประกอบ A.....	67
15	ข้อมูล ^1H NMR ของ Rha-Rha $\text{C}_{10}\text{-C}_{10}$ และสารประกอบ B.....	73

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 โครงสร้างทั่วไปของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิว.....	4
2 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวเมื่ออยู่ในตัวทำละลาย เช่น น้ำ.....	5
3 โครงสร้างแรมโนลิปิดที่แตกต่างกันทั้ง 4 ชนิดซึ่งสังเคราะห์โดย <i>Pseudomonas</i> Species...	7
4 โครงสร้างแรมโนลิปิด A และ B ซึ่งสังเคราะห์ได้จาก <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
5 โครงสร้างของกรดโคริโนไมโคลิค.....	9
6 โครงสร้างของทรีฮาโลลิปิดที่ได้จากจุลินทรีย์สายพันธุ์ <i>Rhodococcus erythropolis</i>	9
7 โครงสร้างของชอบโฟโรลิปิดที่ผลิตจาก <i>Torulopsis bombicola</i>	10
8 โครงสร้างของชอบโฟโรลิปิดที่ผลิตจาก <i>Torulopsis bombicola</i> ATCC 22214 เมื่อเกิดการรวมตัวเป็นวงแลคโตน.....	10
9 โครงสร้างของเซอร์แฟกตินที่ผลิตจาก <i>Bacillus subtilis</i>	11
10 โครงสร้างออร์โทโรแฟกตินที่ผลิตได้จาก <i>Arthrobacter</i> sp. Strain MIS38.....	12
11 โครงสร้างทั่วไปของฟอสโฟลิปิดที่แยกได้จากจุลินทรีย์.....	13
12 โครงสร้างของ Rubiwettins R1 ที่ผลิตจาก <i>Serratia rubidaea</i> ATCC 27593.....	14
13 โครงสร้างของอิมัลแซน ที่ผลิตจาก <i>Arthrobacter calcoaceticus</i>	15
14 แสดงขั้นตอนการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย B189.....	32
15 แสดงขั้นตอนการแยกและทำสารให้บริสุทธิ์.....	33
16 TLC ของส่วนสกัดชั้น methanol ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในระยะเวลาต่างๆ กันละลายใน methanol ที่ความเข้มข้น 10 mg/mL ในระบบตัวทำละลาย chloroform:methanol:น้ำ (65:15:2) พ่นด้วย <i>p</i> -anisaldehyde reagent.....	34
17 แผนภูมิแสดงผลการแยกสารสกัดชั้น methanol ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบเร็ว.....	36
18 TLC plate ของ F1-F15 ที่แยกได้จากส่วนสกัดชั้น methanol ด้วยโครมาโทกราฟีแบบ คอลัมน์ชนิดเร็วที่ความเข้มข้น 10 mg/mL (spot 1 μ L) ในระบบตัวทำละลายเคลื่อนที่ chloroform:methanol (90:10) พ่นด้วย <i>p</i> -anisaldehyde reagent.....	37
19 แผนภูมิแสดงผลการแยกสารกลุ่ม F14(1) ให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วย ODS C ₁₈ CC.....	39
20 ODS-TLC plate ของ F14(1).1-F14(1).6 ที่แยกได้จากสารกลุ่ม F14(1) ด้วยโครมาโท กราฟีแบบคอลัมน์ที่ความเข้มข้น 10 mg/mL (spot 2 μ L) ในระบบ (reverse phase) ตัวทำละลายเคลื่อนที่ CH ₃ CN:H ₂ O (60:40) พ่นด้วย <i>p</i> -anisaldehyde reagent.....	40
21 แผนภูมิแสดงผลการแยกสารกลุ่ม F14(1).5 ให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วย ODS C ₁₈ CC.....	42

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
22 ODS-TLC plate ของ F14(1).5.1-F14(1).5.7 ที่แยกได้จากสารกลุ่ม F14(1) ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ที่ความเข้มข้น 10 mg/mL (spot 2 μ L) ในระบบ (reverse phase) ตัวทำละลายเคลื่อนที่ $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (60:40) พ่นด้วย <i>p</i> -anisaldehyde reagent.....	43
23 แผนภูมิแสดงผลการแยกสารกลุ่ม F14(2) ให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วย silica gel CC.....	45
24 TLC plate ของ F14(2).1-F14(2).7 ที่แยกได้จากสารสกัดขึ้น methanol ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ที่ความเข้มข้น 10 mg/mL (spot 1 μ L) ในระบบตัวทำละลายเคลื่อนที่ chloroform:methanol (70:30) พ่นด้วย <i>p</i> -anisaldehyde reagent.....	46
25 แผนภูมิแสดงผลการแยกสารกลุ่ม F14(2).6 ให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วย ODS C_{18} CC.....	48
26 ODS-TLC plate ของ F14(2).6.1-F14(2).6.9 ที่แยกได้จากสารกลุ่ม F14(2).6 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ที่ความเข้มข้น 10 mg/mL (spot 2 μ L) ในระบบ (reverse phase) ตัวทำละลายเคลื่อนที่ $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (60:40) พ่นด้วย <i>p</i> -anisaldehyde reagent.....	49
27 ODS-TLC plate ของสารประกอบ A และ B ที่แยกจากคอลัมน์โครมาโทกราฟีในระบบ (reverse phase) ตัวทำละลาย $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (60:40) พ่นด้วย <i>p</i> -anisaldehyde reagent.....	50
28 แสดงการแตกออกของ fragment ion ของสารประกอบ A m/z 651 $[\text{M}+\text{H}]^+$	66
29 แสดงการแตกออกของ fragment ion ของสารประกอบ B m/z 679 $[\text{M}+\text{H}]^+$	72
30 แสดงการเกิด fragment ion ที่ m/z 479 ซึ่งเกิดจากการแตกออกของโมเลกุลกรดไขมัน β -hydroxyundecanoic acid ของสารประกอบ B m/z 677 $[\text{M}-\text{H}]^-$	72
31 ^1H NMR spectrum ของสารประกอบ A (CD_3OD , 600 MHz).....	83
32 ^1H NMR spectrum ของสารประกอบ A (CD_3OD , 600 MHz) ขยาย.....	84
33 ^1H NMR spectrum ของสารประกอบ A (CD_3OD , 600 MHz) ขยาย.....	85
34 ^1H NMR spectrum ของสารประกอบ A (CDCl_3 , 600 MHz).....	86
35 ^{13}C NMR spectrum ของสารประกอบ A (CD_3OD , 150 MHz).....	87
36 Mass spectrum (positive ion mode) ของสารประกอบ A.....	88
37 GC-MS spectrum ของสารมาตรฐานน้ำตาล L-rhamnose.....	89
38 GC-MS spectrum ของสารมาตรฐานน้ำตาล L-rhamnose + L-fucose.....	90

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
39 GC-MS spectrum ส่วนที่เป็นน้ำตาลของสารประกอบ A.....	91
40 GC-MS spectrum ของสารมาตรฐานน้ำตาล L-rhamnose + L-fucose + ส่วนที่เป็น น้ำตาลของสารประกอบ A.....	92
41 GC-MS spectrum ของสารมาตรฐาน 3-hydroxydecanoic acid.....	93
42 GC-MS spectrum ส่วนของกรดไขมันของสารประกอบ A.....	94
43 GC-MS spectrum ของสารมาตรฐาน 3-hydroxydecanoic acid + ส่วนของกรดไขมัน ของสารประกอบ A.....	95
44 ¹ H NMR spectrum ของสารประกอบ B (CD ₃ OD, 600 MHz).....	96
45 ¹ H NMR spectrum ของสารประกอบ B (CD ₃ OD, 600 MHz) ขยาย.....	97
46 ¹ H NMR spectrum ของสารประกอบ B (CD ₃ OD, 600 MHz) ขยาย.....	98
47 ¹³ C NMR spectrum ของสารประกอบ B (CDCl ₃ , 150 MHz).....	99
48 Mass spectrum (positive ion mode) ของสารประกอบ B.....	100
49 Mass spectrum (negative ion mode) ของสารประกอบ B.....	101
50 GC-MS spectrum ส่วนที่เป็นน้ำตาลของสารประกอบ B.....	102
51 GC-MS spectrum ของสารมาตรฐานน้ำตาล L-rhamnose + L-fucose + ส่วนที่เป็น น้ำตาลของสารประกอบ B.....	103
52 GC-MS spectrum ของสารมาตรฐาน 3-hydroxydodecanoic acid methyl ester.....	104
53 GC-MS spectrum ส่วนของกรดไขมันของสารประกอบ B.....	105
54 GC-MS spectrum ของสารมาตรฐาน 3-hydroxydecanoic acid + ส่วนของกรดไขมัน ของสารประกอบ B.....	106
55 GC-MS spectrum ของสารมาตรฐาน 3-hydroxydodecanoic acid methyl ester + ส่วน ของกรดไขมันของสารประกอบ B.....	107

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

สารลดแรงตึงผิว (surfactant) เป็นสารที่มีโครงสร้างของโมเลกุลแบบแอมฟิพาติก (amphiphatic structure) คือ ประกอบด้วย ส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่มีขั้ว และ ส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) ซึ่งเป็นส่วนที่มีขั้ว จึงสามารถกระจายตัวอยู่ระหว่างสอง วัฏภาค (phase) ที่มีสมบัติของความเป็นขั้วที่แตกต่างกัน เช่น น้ำมันกับน้ำ หรือ อากาศกับน้ำ เป็นต้น สมบัตินี้ทำให้สารลดแรงตึงผิวมีความสามารถในการลดแรงตึงผิว (surface tension) ลดแรงตึงผิวระหว่างสอง พื้นผิวที่สัมผัสกัน (interfacial tension) และก่อให้เกิดเป็น ไมโครอิมัลชัน (microemulsion) ได้นอกจากนี้ ยังมีสมบัติอื่น ๆ เช่น เป็นสารซักฟอก (detergents) เป็นสารสร้างอิมัลชัน (emulsifier) เป็นสารก่อให้เกิดฟอง (foaming agent) และสารที่ทำให้เกิดการกระจายตัว (dispersant) เป็นต้น สมบัติเหล่านี้ ทำให้สารลดแรงตึงผิวมีความสำคัญในกระบวนการทางเคมีหลายกระบวนการ (Greek. 1990 : 37-38)

ปี ค.ศ. 1994 ความต้องการใช้สารลดแรงตึงผิวทั่วโลกมีมูลค่าสูงถึง 9.4 พันล้าน ดอลลาร์ (Desai; & Banat. 1997 : 47-64) และคาดว่าจะภายใน 10 ปีนี้ จะมีความต้องการเพิ่มสูงขึ้นอีกประมาณ 35 % (Greek. 1991 : 25-52) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นความต้องการใช้ในครัวเรือน ในลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่ใช้ทำความสะอาด และในโรงงานอุตสาหกรรมที่ต้องอาศัยสารลดแรงตึงผิว เช่น อุตสาหกรรมฟอกย้อม อุตสาหกรรมเส้นใย อุตสาหกรรมการกลึงแร่ อุตสาหกรรมน้ำมัน อุตสาหกรรมยาฆ่าแมลง อุตสาหกรรมยาและอุตสาหกรรมพลาสติก ซึ่งแต่ละชนิดนับได้ว่าเป็นอุตสาหกรรมหลัก ดังนั้น สารลดแรงตึงผิวจึงมีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งในทางเศรษฐกิจ (ธนขวัญ บุษบัน. 2539 อ้างถึง Clint. 1992)

ปัจจุบัน การผลิตสารลดแรงตึงผิวส่วนใหญ่ได้จากการสังเคราะห์จากปิโตรเลียม (petroleum derived) ด้วยกระบวนการทางเคมี แต่เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์นั้นก่อมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมทางชีวภาพและเป็นพิษต่อระบบนิเวศน์ ทำให้สารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้จากสิ่งมีชีวิต หรือที่เรียกว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) ได้รับความสนใจมากขึ้นเรื่อยๆ เนื่องจากด้วยมีข้อได้เปรียบเหนือสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์หลายประการ เช่น ความหลากหลายของชนิดของสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์และสารตั้งต้นที่แตกต่างกัน จึงสามารถเลือกนำไปใช้ให้เหมาะสมกับงานได้ง่าย (Desai; & Banat. 1997 : 47-64) ความหลากหลายของหมู่ฟังก์ชันในโมเลกุลที่ทำหน้าที่เป็นสารลดแรงตึงผิว ทำให้โมเลกุลเหล่านี้สามารถลดแรงตึงผิวและลดแรงตึงผิวระหว่างสองพื้นผิวที่สัมผัสกัน ทั้งในสารละลายที่

มีน้ำเป็นตัวทำละลาย และ สารผสมของไฮโดรคาร์บอน อันเป็นสมบัติสำคัญในกระบวนการเก็บเกี่ยว น้ำมัน (oil recovery) (Shennan; & Levi. 1987 : 163-181) นอกจากนี้ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังมีความเป็นพิษต่ำ สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ (biodegradability) (Zajic; Gignard; & Gerson. 1977 : 1303-1320) ไม่ก่อให้เกิดมลภาวะในสิ่งแวดล้อม (Georgiou; Lin; & Sharma. 1990 : 60-65) จึงทำให้เป็นที่ยอมรับในอุตสาหกรรมอาหาร ยาและเครื่องสำอาง และยังมีความหลากหลายและมีกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวที่มีความเฉพาะเจาะจงและทนต่อภาวะอุณหภูมิสูง ความเป็นกรด-ด่าง และความเค็ม ได้ในช่วงกว้าง (Kretschmer; Bock; & Wagner. 1982 : 864-870)

เนื่องด้วยปัจจุบันมีความตื่นตัวในเรื่องการลดมลภาวะและการรักษาภาวะแวดล้อม ทำให้การพัฒนาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพดำเนินไปอย่างต่อเนื่อง ทั้งในด้านการค้นหาสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในงานต่าง ๆ และการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากธรรมชาติ งานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะทำการศึกษาสมบัติบางประการ และองค์ประกอบทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตนมในประเทศไทย

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อทำการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรีย B189 ที่คัดแยกได้จากน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตนมใน จ. สมุทรปราการ
2. เพื่อแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย B189 ให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น
3. เพื่อศึกษาความสามารถในการเป็นสารลดแรงตึงผิวและวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

ความสำคัญของการวิจัย

1. ทำให้ทราบวิธีการสกัด การแยกและการทำสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้ให้บริสุทธิ์ขึ้น
2. ทำให้ทราบความสามารถในการเป็นสารลดแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย B189
3. ทำให้ทราบองค์ประกอบทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

ขอบเขตของการวิจัย

1. ใช้แบคทีเรีย B 189 ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งได้จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ซึ่งคัดแยกได้จากน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตนมใน จ. สมุทรปราการ

2. การแยกและการทำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ให้บริสุทธิ์ขึ้น จะทำเฉพาะส่วนที่พบความสามารถในการเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ดี โดยใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟี

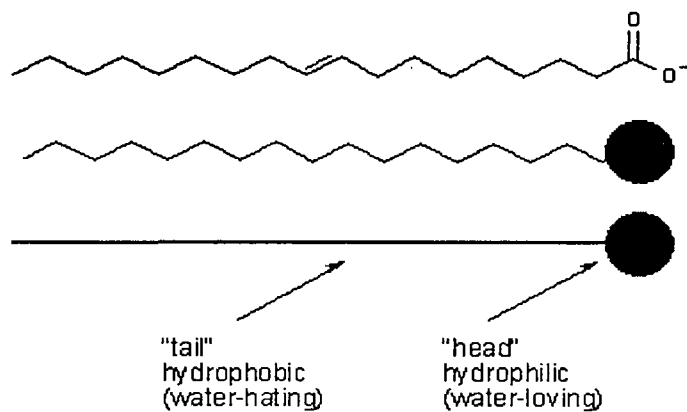
3. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่แยกได้ จะทำโดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโคปี

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เป็นสารชีวโมเลกุลที่ผลิตได้โดยจุลินทรีย์บางชนิดในกลุ่มของแบคทีเรีย ยีสต์และรา สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน จะมีโครงสร้างแตกต่างกัน แต่มีลักษณะของโมเลกุลหลักเหมือนกัน คือ ประกอบด้วย 2 ส่วน ได้แก่ ส่วนที่มีขั้วสามารถละลายน้ำได้ โดยทั่วไปมักเป็นส่วนหัวของโมเลกุล (head group) อันอาจจะเป็นหมู่คาร์บอกซิลิก หมู่ไฮดรอกซิล หมู่เอสเทอร์ หมู่ฟอสเฟต น้ำตาล หรือกรดอะมิโนขึ้นอยู่กับชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ อีกส่วนเป็นส่วนที่ไม่มีขั้ว โดยทั่วไปมักเป็นส่วนหางของโมเลกุล (tail group) ซึ่งส่วนมากจะเป็นสายยาวของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon chain) ที่พบมากที่สุด คือ สารประกอบไฮโดรคาร์บอนของกรดไขมัน แสดงโครงสร้างทั่วไปของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ดังภาพประกอบ 1

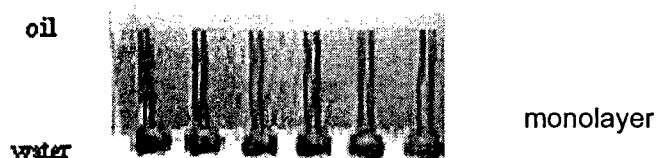


ภาพประกอบ 1 โครงสร้างทั่วไปของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิว

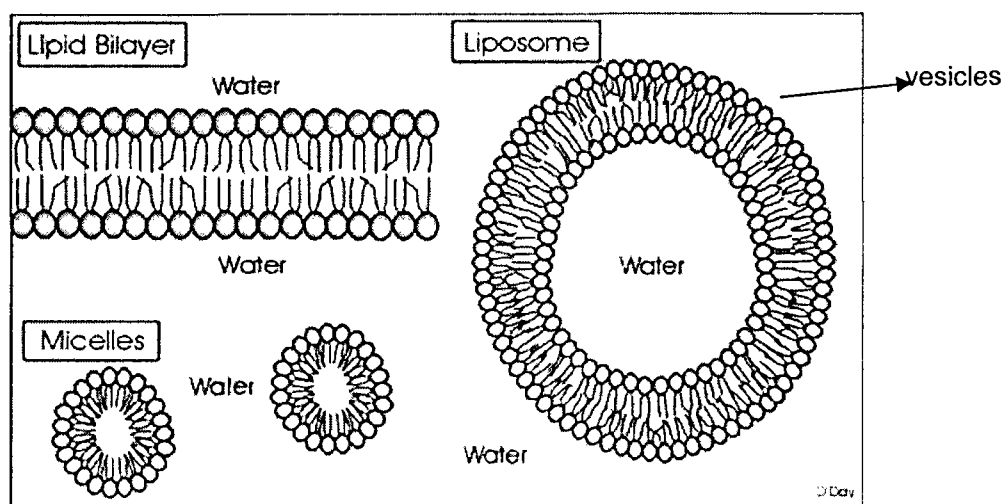
ที่มา : (introsurfactant. 2004 : Online)

สมบัติที่สำคัญของสารลดแรงตึงผิว คือ สามารถลดแรงตึงผิวระหว่างวัฏภาคสอง วัฏภาคที่มีความเป็นขั้วแตกต่างกันได้ โดยโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวเมื่ออยู่ในตัวทำละลาย เช่น น้ำ อาจมีโครงสร้างได้ 3 แบบ แสดงดังภาพประกอบ 2 ดังนี้

1. monolayer ส่วนหัวของโมเลกุลซึ่งมีขั้วจะอยู่ใต้ผิวน้ำ
2. micelles ลักษณะเป็นก้อนกลม อันเกิดจากการหันเอาส่วนชอบน้ำออกสู่ด้านนอกและส่วนไม่ชอบน้ำเข้าหากัน
3. vesicles หรือ bilayer ประกอบด้วยโมเลกุล 2 แถวขนานกันมาเรียงกันจนทำให้ส่วนหางซึ่งเป็นไฮโดรคาร์บอนเข้ามารวมอยู่ด้วยกัน



(a)



(b)

ภาพประกอบ 2 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวเมื่ออยู่ในตัวทำละลาย เช่น น้ำ

ที่มา : (a) (Simscience. 2004 : Online)

(b) (O'Day, D.H.; & Myre, M.A. 2004 : Online)

การจำแนกประเภทของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

การจัดจำแนกประเภทของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ อาจจำแนกตามหมู่ที่มีขั้วในสูตรโครงสร้าง แต่สำหรับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จะจำแนกตามส่วนประกอบทางเคมีและชนิดของจุลินทรีย์ที่สร้างสารลดแรงตึงผิวนั้น ๆ ซึ่งโครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประกอบด้วย ส่วนที่ชอบน้ำ ได้แก่ กรดอะมิโนหรือเพปไทด์ที่เป็นประจุลบ หรือประจุบวก น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว โมเลกุลคู่หรือเป็นสายยาว และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ ได้แก่ สารประกอบของไขมัน ทั้งไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว ซึ่งทำให้สามารถจำแนกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพออกได้เป็น 5 ประเภท คือ (Desai; & Banat. 1997 : 47-64)

1. ไกลโคลิปิด (glycolipids)
2. ลิโปเปปไทด์และลิโปโปรตีน (lipopeptides and lipoproteins)
3. ฟอสโฟลิปิดและกรดไขมัน (phospholipids and fatty acid)
4. สารลดแรงตึงผิวชนิดพอลิเมอร์ (polymeric surfactants)
5. สารลดแรงตึงผิวชนิดอนุภาค (particulate surfactants)

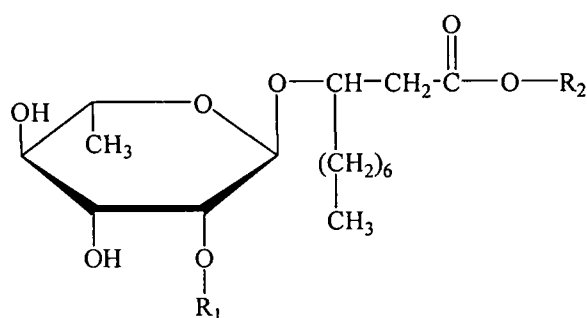
1. ไกลโคลิปิด (Glycolipids)

สารลดแรงตึงผิวชนิดไกลโคลิปิดเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่รู้จักกันมากประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตกับกรดอะลิฟาติก (aliphatic acid) ที่เป็นสายยาว หรือกรดไฮดรอกซีอะลิฟาติก (hydroxy aliphatic acid) ตัวอย่างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มนี้ที่เป็นที่รู้จักกันแพร่หลายคือ แรมโนลิปิด ทรินาโกลิปิด และซอโบไฟโรลิปิด

1.1 แรมโนลิปิด (rhamnolipid) เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ที่โครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยน้ำตาลแรมโนส 1 หรือ 2 โมเลกุลต่ออยู่กับ 1 หรือ 2 โมเลกุลของ β -hydroxydecanoic acid แรมโนลิปิดเป็นไกลโคลิปิดที่มีการศึกษาวิจัยกันมากที่สุด การผลิตไกลโคลิปิดที่มีแรมโนลิปิดเป็นองค์ประกอบถูกรายงานเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1949 โดย Jarvis และ Johnson โดยผลิตได้จากเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* (Desai; & Banat. 1997 : 47-64; อ้างอิงจาก Jarvis; & Johnson. (1949). pp. 4124-4126)

แรมโนลิปิดที่มีรายงานอยู่ในปัจจุบันมีโครงสร้างแตกต่างกันหลายแบบ โดยมีจำนวนน้ำตาลแรมโนสและ β -hydroxydecanoic acid ต่างกัน แรมโนลิปิดชนิดที่ 1 (R1) ประกอบด้วย น้ำตาลแรมโนส 2 หมู่และกรดไขมัน 2 หมู่ มีชื่อเรียกทางเคมีว่า L- α -rhamnopyranosyl- L- α -rhamnopyranosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate (Hisatsuka; et al. 1971 : 686-692) แรมโนลิปิดชนิดที่ 2 (R 2) จะแตกต่างจาก R1 ตรงจำนวนของน้ำตาลแรมโนสซึ่งมีเพียง 1 หมู่ มีชื่อเรียกทางเคมีว่า L- α -rhamnopyranosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate (Lang; & Wagner. 1987 : 21-45; อ้างอิงจาก Itoh; et al. (1971). p. 855) ส่วนแรมโนลิปิดชนิดที่ 3 (R 3) และแรมโนลิปิดชนิดที่ 4 (R 4) จะมีน้ำตาลแรมโนส 2 และ 1 หมู่

ต่อกับกรดไขมัน 1 หมู่ตามลำดับ โครงสร้างของแรมโนลิปิดทั้ง 4 ชนิดแสดงในภาพประกอบ 3 นอกจากนั้นยังมีรายงานการค้นพบแรมโนลิปิดที่มีการเติมหมู่เมทิลเอสเทอร์ (methyl esters) ตรงหมู่ไฮดรอกซีของน้ำตาลแรมโนสอีกสองชนิด คือ แรมโนลิปิด A และแรมโนลิปิด B ที่มีชื่อเรียกทางเคมีว่า L-rhamnopyranosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoic acid methyl ester และ L-rhamnopyranosyl-L-rhamnopyranosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoic acid methyl ester (Lang; & Wagner. 1987 : 21-45; อ้างอิงจาก Hirayama; & Kato. (1982). p. 81) แสดงโครงสร้างดังภาพประกอบ 4

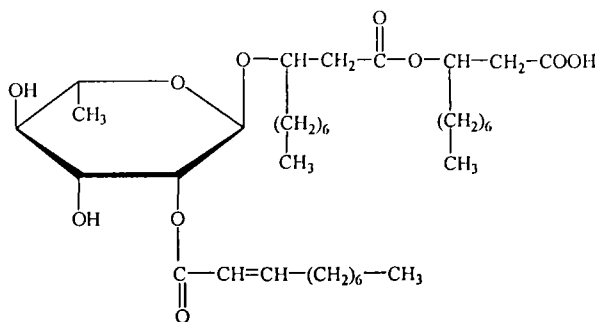


RL 1 : $R_1 = \text{L-}\alpha\text{-rhamnopyranosyl}$	$R_2 = \beta\text{-hydroxydecanoic acid}$
RL 2 : $R_1 = \text{H}$	$R_2 = \beta\text{-hydroxydecanoic acid}$
RL 3 : $R_1 = \text{L-}\alpha\text{-rhamnopyranosyl}$	$R_2 = \text{H}$
RL 4 : $R_1 = \text{H}$	$R_2 = \text{H}$

ภาพประกอบ 3 โครงสร้างแรมโนลิปิดที่แตกต่างกันทั้ง 4 ชนิดซึ่งสังเคราะห์โดย

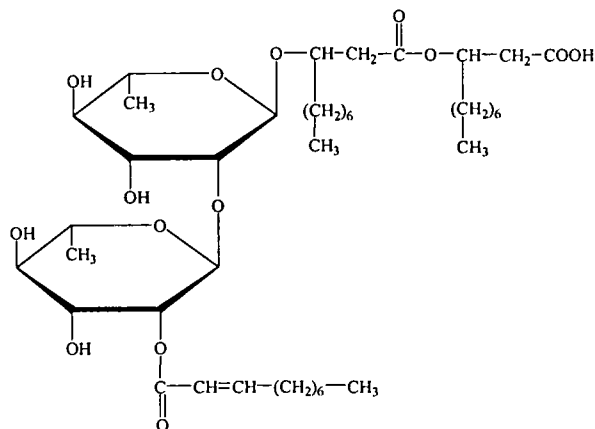
Pseudomonas Species

ที่มา : (Lang; & Wagner. (1987). "Structure and properties of Biosurfactant". p. 26)



แรมโนลิปิด A

แรมโนลิปิด B



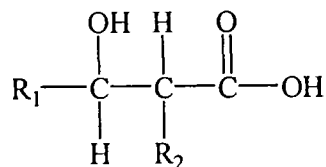
ภาพประกอบ 4 โครงสร้างแรมโนลิปิด A และ B ซึ่งสังเคราะห์ได้จาก *Pseudomonas-aeruginosa*

ที่มา : (Lang; & Wullbrandt. (1999). "Rhamnose lipids-biosynthesis, microbial production and application potential". p. 23)

โดยส่วนใหญ่แรมโนลิปิดที่ผลิตได้จาก *Pseudomonas* spp. จะให้ค่าแรงตึงผิวอยู่ในช่วง 25–30 mN/m และค่าแรงตึงผิวระหว่างพื้นผิวของสารต่อเฮกซะเดเคนเท่ากับ 1 mN/m (Guerra-Santos; Kappeli; & Fiechter 1980 : 301-305)

1.2 ทรีฮาโลลิปิด (trehalolipid) โครงสร้างโมเลกุลโดยทั่วไปของทรีฮาโลลิปิดประกอบด้วย กรดไมโคลิก มีลักษณะเป็นสายยาวของกรดไขมันแบบตัว-ไฮดรอกซี (α -branched- β -hydroxy fatty acid) ที่มีจำนวนอะตอมของคาร์บอนตั้งแต่ 60–90 อะตอม โครงสร้างแสดงดังภาพประกอบ 5 เชื่อมต่อกับน้ำตาลทรีฮาโลส (disaccharide trehalose) ที่ตำแหน่ง C-6 และ C-6'-OH ซึ่งผลิตได้จากจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Mycobacterium*, *Nocardia* หรือ *Corynebacterium* ทรีฮาโลลิปิดที่ผลิตจากสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันจะมีขนาดและโครงสร้างของกรดไมโคลิกแตกต่างกัน โดยจะมีจำนวนอะตอมของคาร์บอนและระดับความไม่อิ่มตัวต่างกัน เช่น ทรีฮาโลลิปิด ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Rhodococcus erythropolis* หรือ *Arthrobacter paraffineus* จะให้ทรีฮาโลสไดเอสเทอร์ซึ่งประกอบด้วย กรดโคโรโนไมโคลิก (corynomycolic acid) ที่มีจำนวนอะตอมคาร์บอนประมาณ 25–40 อะตอมแทน โครงสร้างของทรีฮาโลลิปิดแสดงในภาพประกอบ 6 ค่าแรงตึงผิวและแรงตึงผิว

ระหว่างสารกับเยื่อเซลล์ของทรีฮาโลลิปิดที่ผลิตโดย *Rhodococcus erythropolis* หรือ *Arthrobacter paraffineus* มีค่าอยู่ในช่วง 25 – 40 mN/m และ 1–5 mN/m ตามลำดับ

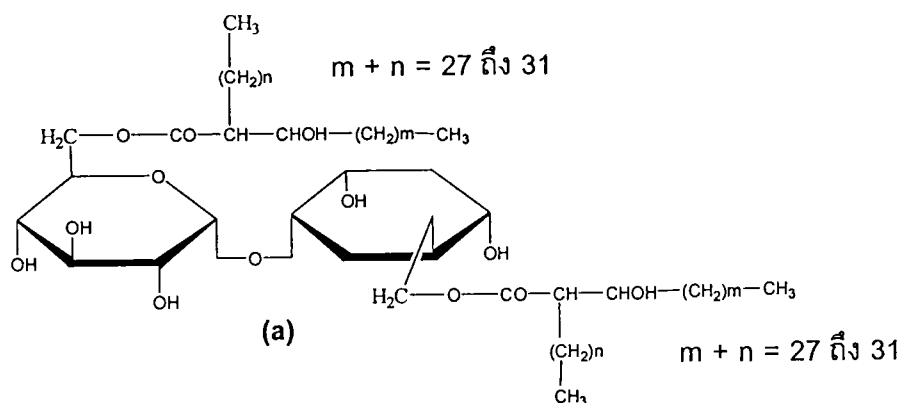


$\text{R}_1, \text{R}_2 =$ หมู่อัลคิลที่จำนวนคาร์บอน
น้อยกว่า 40 อะตอม

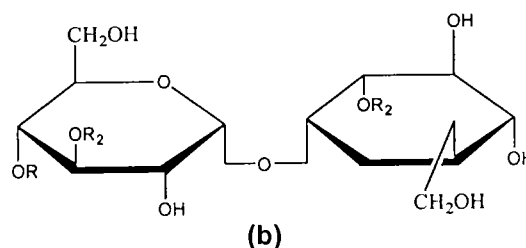
ภาพประกอบ 5 โครงสร้างของกรดโครีโนไมโคลิก

ที่มา : Cooper; & Zajic. (1980). "Surface-Active Compounds from Microorganisms".

p. 232



$\text{R}_1 = \text{OC}(\text{CH}_2)_m\text{CH}_3$ และ
 $\text{OC}(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$
 $m = 6$ (main component)
 $\text{R}_2 = \text{OC}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$
 $n = 8$ (main component)

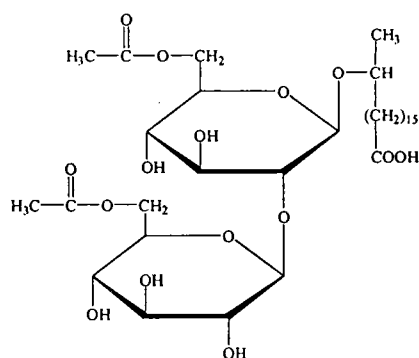


ภาพประกอบ 6 โครงสร้างของทรีฮาโลลิปิดที่ได้จากจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Rhodococcus-erythropolis* (a) Trehalose-6,6'-dicorynomycolate

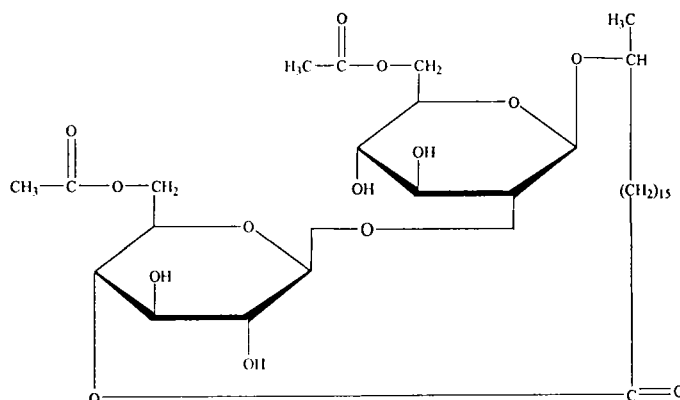
(b) Trehalose-2,3,4,2'-tetraester

ที่มา : (Lang; & Wagner. (1987). "Structure and properties of Biosurfactant". p. 29-31)

1.3 ซอบโฟโรลิปิด (sophorolipid) เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากยีสต์ *Torulopsis* เป็นส่วนใหญ่ เช่น *Torulopsis bombicola*, *Torulopsis petrophilum* และ *Torulopsis apicola* เป็นต้น โครงสร้างของ ซอบโฟโรลิปิดจะคล้ายคลึงกับแรมโนลิปิดที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย โดยประกอบด้วย น้ำตาลซอบโฟโรส (กลูโคส 2 โมเลกุลเชื่อมกันด้วยพันธะเบต้า 1-2) เชื่อมต่อกับ สายยาวของกรดไฮดรอกซีคาร์บอกซิลิก (hydroxy-carboxylic acid) ที่ตำแหน่ง C-6 และ C-6' ด้วย พันธะไกลโคซิดิก แสดงโครงสร้างดังภาพประกอบ 7 ซึ่งส่วนปลายหมู่คาร์บอกซิลิกของกรดไขมัน อาจเกิดรวมกับหมู่ไฮดรอกซีของน้ำตาลเกิดเป็นวงแลคโตน (lactone ring) ภาพประกอบ 8 หรือ หากถูกแยกสลาย (hydrolyzed) ก็จะก่อให้เกิดสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุเป็นลบ (anionic surfactant) (Rosenberg. 1986 : 109-132)



ภาพประกอบ 7 โครงสร้างของซอบโฟโรลิปิดที่ผลิตจาก *Torulopsis bombicola*
ที่มา : Desai; & Banat. (1997). "Microbial Production of Surfactant and Their Commercial Potential". p. 49



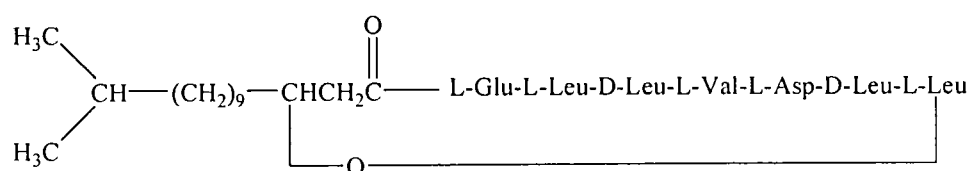
ภาพประกอบ 8 โครงสร้างของซอบโฟโรลิปิดที่ผลิตจาก *Torulopsis bombicola* ATCC 22214
เมื่อเกิดการรวมตัวเป็นวงแลคโตน

ที่มา : Rosenberg. (1986). "Microbial Surfactant". P. 111

2. ลิโปเปปไทด์และลิโปโปรตีน

ลิโปเปปไทด์สามารถแยกได้จากแบคทีเรียและยีสต์เป็นจำนวนมาก ลิโปเปปไทด์หลายชนิดมีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น (antibiotic) จึงถูกนำไปผลิตเป็นยาปฏิชีวนะ เช่น gramicidins หรือ polymyxins ซึ่งเป็นลิโปเปปไทด์ที่ได้จาก *Bacillus brevis* และ *Bacillus polymyxa* (Desai; & Banat. 1997 : 47-64) ตามลำดับ แต่พบว่ามีเป็นจำนวนเล็กน้อยที่มีสมบัติในการเป็นสารลดแรงตึงผิว อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าลิโปเปปไทด์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด ซึ่งรู้จักกันทั่วไปในชื่อ เซอร์แฟกติน (surfactin) (Arima; Kakinuma; & Tamura. 1968 : 488-494) หรือ ซับซิลซิน (Bernheimer; & Avigag. 1970 : 361-369)

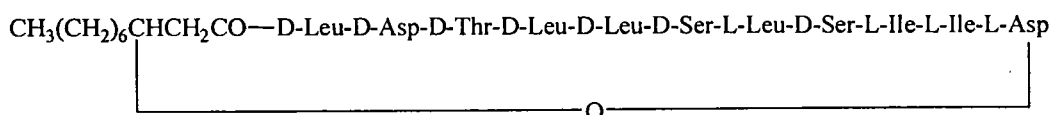
โครงสร้างของเซอร์แฟกตินประกอบด้วยกรดอะมิโน 7 ชนิด ได้แก่ D-glutamic acid, L-leucine, D-leucine, L-valine, L-asparagine, D-leucine, L-leucine เรียงต่อกันด้วยพันธะโคเวเลนต์ โดยปลายข้างหนึ่งต่อกับหมู่คาร์บอกซิล ส่วนปลายอีกข้างหนึ่งต่อกับหมู่ไฮดรอกซิลของกรดไขมัน 3-hydroxy-13-methyl-tetradecanoic acid (Kakinuma; Hori; Isono; et al. 1969 : 971-972); (Kakinuma; Sugino; et al. 1969 : 973-976); (Kakinuma; Hori; Sugino; et al. 1969 : 1523-1524); (Kakinuma; Ouchida; et al. 1969 : 1669-1671) โครงสร้างของเซอร์แฟกตินแสดงดังภาพประกอบ 9 เซอร์แฟกตินเป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีประสิทธิภาพสูงมาก จากการศึกษาพบว่า เซอร์แฟกตินที่มีความเข้มข้นเพียง 0.005 % โดยน้ำหนัก จะสามารถลดค่าแรงตึงผิวของ 0.1 M ของสารละลายบัฟเฟอร์ NaHCO_3 จาก 71.57 dyne/cm ให้เหลือเพียง 27.9 dyne/cm ในขณะที่ Sodium lauryl sulfate ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์สามารถลดแรงตึงผิวของ 0.1 M ของสารละลายบัฟเฟอร์ NaHCO_3 ได้ต่ำสุดเพียง 56.56 dyne/cm นอกจากนั้นเซอร์แฟกตินยังมีสมบัติในการย่อยเม็ดเลือดแดงของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม, ย่อยสลายโพลีพลาสต์ของแบคทีเรียได้ และสามารถยับยั้งการแข็งตัวของเลือด โดยยับยั้งปฏิกิริยาการเปลี่ยนโมโนเมอร์ไปเป็นพอลิเมอร์ (polymerization) ของไฟบริน (Arima; Kakinuma; & tamura. 1968 : 488-494)



ภาพประกอบ 9 โครงสร้างของเซอร์แฟกตินที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis*

ที่มา : Kakinuma; Ouchida; et al. (1969). "Confirmation of the Structure of Surfactin by Mass spectrometry". p. 1670

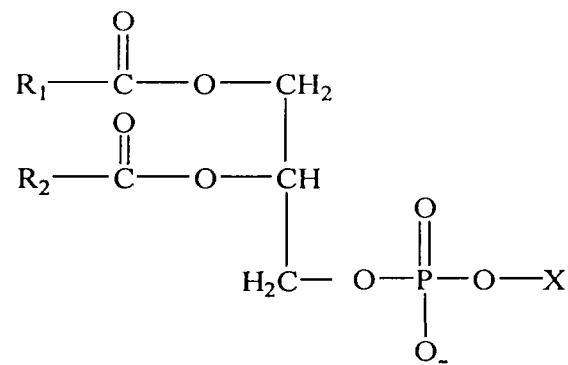
โมริคาวา และคนอื่นๆ (Morikawa; et al. 1993 : 6459-6466) รายงานถึง การค้นพบสารลดแรงตึงผิวชนิดใหม่ประเภท ลิโปเปปไทด์ คือ อาร์โทรแฟกติน (arthrofactin) ซึ่งผลิตได้จากแบคทีเรีย *Arthrobacter* sp. strain MIS38 โดยแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค TLC ตรวจสอบความบริสุทธิ์ โดยใช้ HPLC และวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิคสเปกโทรเมตรี พบว่า มีโครงสร้างเป็น 3-hydroxydecanoyl-D-leucyl-D-asparagyl-D-threonyl-D-leucyl-D-seryl-L-leucyl-D-seryl-L-isoleucyl-L-isoleucyl-L-asparagyl lactone โครงสร้างแสดงดังภาพประกอบ 10 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวดีกว่า เซอร์แฟกติน 5-7 เท่า โดยค่า CMC ของ อาร์โทรแฟกตินและเซอร์แฟกติน มีค่าเท่ากับ 1.0×10^{-5} M และ 7.0×10^{-5} M ตามลำดับ อาร์โทรแฟกตินสามารถลดแรงตึงผิวได้ต่ำสุด 24 mN/m ที่ความเข้มข้น 1.0×10^{-4} M ในขณะที่เซอร์แฟกตินลดแรงตึงผิวได้ต่ำสุด 27 mN/m ที่ความเข้มข้น 5.0×10^{-4} M และพบว่าความสามารถในการกระจายตัวของน้ำมัน (oil displacement assay) มีค่าสูงกว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ เช่น Triton X-100 และ sodium dodecyl sulfate



ภาพประกอบ 10 โครงสร้างอาร์โทรแฟกตินที่ผลิตได้จาก *Arthrobacter* sp. Strain MIS38
ที่มา : Morikawa, M.; et al. (1993). "A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. strain MIS38," pp. 6459-6466

3. ฟอสโฟลิปิดและกรดไขมัน

3.1 ฟอสโฟลิปิด พบได้ในจุลินทรีย์เกือบทุกชนิด เนื่องจากเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเซลล์จุลินทรีย์ แต่มีเป็นจำนวนน้อยที่มีการปลดปล่อยฟอสโฟลิปิดออกนอกเซลล์ หรือ สามารถวัดสมบัติของการเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ โครงสร้างทั่วไปของฟอสโฟลิปิด ประกอบด้วยกลีเซอรอลต่อกับกรดไขมัน 2 หมู่และฟอสเฟต 1 หมู่ด้วยพันธะเอสเทอร์ แสดงดังภาพประกอบ 11



R_1, R_2 = หมู่อัลคิล

เมื่อ X = H (กรดฟอสฟาติติก; phosphatidic acid)
 = CH_2NH_2 (ฟอสฟาติลเอทานอลามีน;
 phosphatidylethanolamine)
 = $\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ (ฟอสฟาติลซีรีน; phosphatidylserine)
 = inositol (ฟอสฟาติลอินโนซิทอล;
 phosphatidylinositol)
 = $\text{CH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OH}$ (ฟอสฟาติลกลีเซอรอล;
 phosphatidylglycerol)
 = $\text{CH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OPO}_3^-$ (ฟอสฟาติลกลีเซอรอลฟอสเฟต;
 phosphatidylglycerolphosphate)

ภาพประกอบ 11 โครงสร้างทั่วไปของฟอสโฟลิปิดที่แยกได้จากจุลินทรีย์

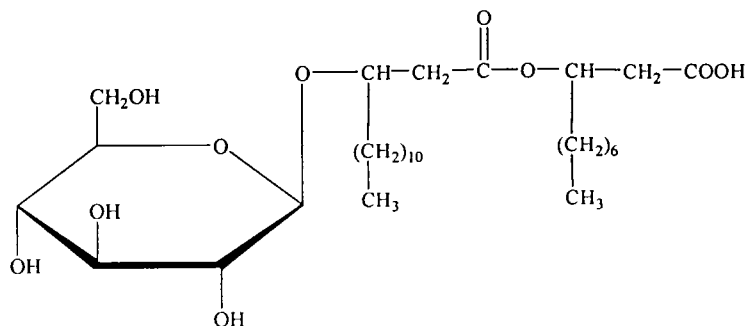
ที่มา : Cooper; & Zajic. (1980). "Surface-Active Compounds from Microorganisms".

p. 242

มีรายงานการแยกฟอสโฟลิปิดหลายชนิดจากอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เป็นจำนวนมาก เช่น ฟอสฟาติลอินโนซิทอล, ฟอสฟาติลกลีเซอรอล, กรดฟอสฟาติก และฟอสฟาติลเอทานอลามีน ซึ่งต่างมีสมบัติเป็นสารเพิ่มสมรรถนะในการซึมผ่าน (wetting agent) ทั้งสิ้น ฟอสฟาติลเอทานอลามีนนับเป็นสารที่มีสมบัติดังกล่าวดีที่สุดที่สุดในจำนวนสารที่ค้นพบ สามารถแยกได้จากส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อ *Thiobacillus thiooxidans* แต่ไม่พบในเซลล์ของจุลินทรีย์ชนิดนี้ (Cooper; & Zajic. 1980 : 229-253)

3.2 กรดไขมันและไขมันธรรมชาติพบได้ในเซลล์จุลินทรีย์ทุกชนิด เมื่อผลิตแล้วมักจะปลดปล่อยออกนอกเซลล์ (extracellularly) ไขมันเหล่านี้ประกอบด้วย กรดคาร์บอกซิลิก (carboxylic acid), แอลกอฮอล์ (alcohol), เอสเทอร์ (ester), โมโนกลีเซอไรด์ (monoglycerides), ไดกลีเซอไรด์ (diglycerides) และไตรกลีเซอไรด์ (triglycerides) ซึ่งต่างมีสมบัติในการลดแรงตึงผิวทั้งสิ้น ตัวอย่างเช่น กรดโครีโนไมโคลิก (corynomycolic acid) ซึ่งผลิตได้จากเชื้อ *Corynebacterium lepus* ที่เลี้ยงบนน้ำมันก๊าด (kerosene) ซึ่งสามารถลดค่าแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อลงเหลือ 30 dyn/cm โดยกรดโครีโนไมโคลิกนี้จะถูกผลิตเป็นจำนวนมากในช่วงแรกของการเจริญของเซลล์ หลังจากนั้นจะลดลงเรื่อยๆ ในช่วงที่เซลล์เจริญเต็มที่แล้ว (stationary growth phase) (Cooper; Zajic; & Gerson. 1979 : 4-10)

มัทซุยาม่า และคนอื่นๆ (Matsuyama; et al. 1990 : 3015-3022) รายงานถึงแบคทีเรีย *Serratia rubidaea* ATCC 27593 ที่เลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 30°C สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชนิดใหม่ 2 ชนิด คือ Rubiwettins RG1 ซึ่งเป็นสารประเภทไกลโคลิปิดและ Rubiwettins R1 ซึ่งเป็นสารประเภทไขมัน จากการศึกษาโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโคปี พบว่า Rubiwettins R1 เป็นสารผสมที่มี 3-(3'-hydroxytetradecanoyloxy) decanoate, 3-(3'-hydroxyhexadecanoyloxy) decanoate เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งโครงสร้างแสดงดังภาพประกอบ 12



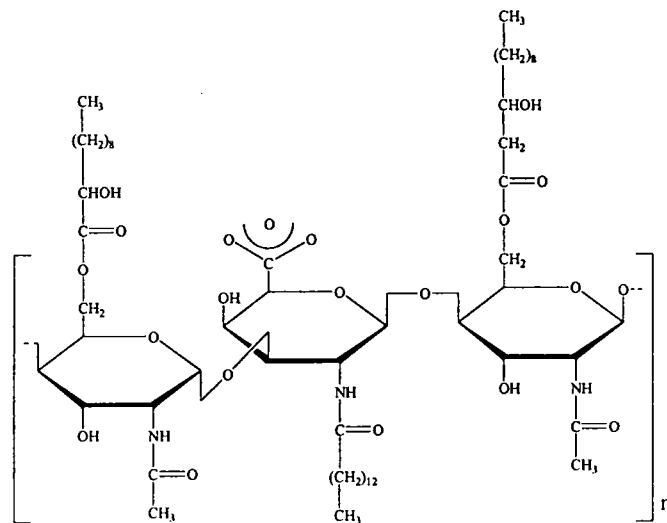
ภาพประกอบ 12 โครงสร้างของ Rubiwettins R1 ที่ผลิตจาก *Serratia rubidaea* ATCC 27593
ที่มา : Matsuyama; et al. (1990). "Surface-Active Novel Glycolipid and Linked 3-hydroxy Fatty acids Produced by *Serratia rubidaea*". p. 3021)

4. สารลดแรงตึงผิวชนิดพอลิเมอร์

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์ที่ถูกนำมาศึกษามากที่สุด ได้แก่ อิมัลแซน (emulsan) ลิโปแซน (liposan) แมนโนโปรตีน (mannoprotein) และสารประกอบเชิงซ้อนของพอลิแซ็กคาไรด์กับโปรตีนชนิดอื่นๆ

โรเซนเบิร์ก และคนอื่นๆ (Rosenberg; et al. 1979 : 402-408) รายงานว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ *Arthrobacter* species RAG-1 ที่เจริญบนอาหารที่มีเฮกซะเดเคน, เอทานอล หรืออะซีเตต สามารถผลิตสารก่ออิมัลชัน (emulsifying agent) มีลักษณะเป็น polyanionic amphipathic heteropolysaccharide bioemulsifier หรือมีชื่อเรียกว่า อิมัลแซน

ซูเกอร์เบิร์ก และคนอื่นๆ (Zukerberg; et al. 1979 : 414-420) พบว่า อิมัลแซนที่ผลิตได้จาก *Arthrobacter* species RAG-1 มีโครงสร้างสายหลักของ heteropolysaccharide ประกอบขึ้นจากหน่วยของไตรกลีเซอไรด์ซ้ำๆ กัน คือ *N*-acetyl-D-galactosamine, *N*-acetylgalactosamine uronic acid, *N*-acetyl amino sugar ที่ยังไม่ทราบชนิด เรียงต่อกัน โดยมีกรดไขมันเชื่อมต่อกับโพลีแซคคาไรด์ด้วยพันธะ *o*-ester มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยประมาณ 9.9×10^5 ดาลตัน โครงสร้างโมเลกุลแสดงดังภาพประกอบ 13



ภาพประกอบ 13 โครงสร้างของอิมัลแซน ที่ผลิตจาก *Arthrobacter calcoaceticus*
ที่มา : Desai; & Banat. (1997). "Microbial production of Surfactants and Their Commercial Potential". p. 51)

อิมัลแซนเป็นสารก่ออิมัลชันระหว่างสารประกอบไฮโดรคาร์บอนกับน้ำที่มีคุณภาพดี โดยใช้เพียง 0.001–0.01 % เท่านั้น และอิมัลชันที่เกิดจะมีความเสถียรมากที่สุด เท่าที่มีการศึกษาในปัจจุบัน โดยอัตราส่วนของน้ำต่อน้ำมันที่ศึกษา มีค่าเท่ากับ 1:4 ซึ่งหากตั้งอิมัลชันที่เกิดขึ้นหลังจากผสมสารแล้วเป็นเวลานาน จะเกิดการแยกชั้นเป็น 2 ชั้น ชั้นบนจะมีลักษณะเป็นครีม

เรียกว่า อิมัลชันโนโซล (emulsanosol) ประกอบด้วยน้ำมัน 70–75% ของปริมาตร (Zosim; Gutnick; & Rosenberg. 1982 : 281-292)

5. สารลดแรงตึงผิวชนิดอนุภาค

สารลดแรงตึงผิวชนิดนี้ พบว่าผลิตได้จากเยื่อหุ้มเซลล์ vesicle ซึ่งสารที่ผลิตได้สามารถก่อให้เกิดไมโครอิมัลชันกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ และเป็นส่วนสำคัญที่ใช้ในการลำเลียงอัลเคนเข้าสู่เซลล์จุลินทรีย์ เช่น vesicle ของ *Acinetobacter* sp. Strain H01-N มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20–50 nm ความหนาแน่น (buoyant density) 1.158 g/cm³ ประกอบด้วย โปรตีน, ฟอสโฟลิปิด และลิพอพอลิแซ็กคาไรด์ (Kappeli; & Finnerty. 1979 : 707-712)

สมบัติบางประการของสารสารลดแรงตึงผิวกลุ่มต่าง ๆ ที่จุลินทรีย์ผลิตได้ แสดงไว้ในตาราง 1

ตาราง 1 สมบัติบางประการของสารลดแรงตึงผิวกลุ่มต่าง ๆ ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์

ชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	ชนิดของจุลินทรีย์	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	ค่า CMC ^a (mg/L)
1. Glycolipids			
Rhamnolipids	<i>P. aeruginosa</i>	29	0.1-10
	<i>Pseudomonas</i> spp.	25-30	
Trehalolipids	<i>R. erythropolis</i>	32-36	4
	<i>N. erythropolis</i>	30	20
	<i>Mycobacterium</i> sp.	38	0.3
Sophorolipids	<i>T. bombicola</i>	33	
	<i>T. apicola</i>	30	
	<i>T. pretrohihum</i>		
Cellobiolipids	<i>U. zeae</i> , <i>U. maydis</i>		

ตาราง 1 (ต่อ)

ชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	ชนิดของจุลินทรีย์	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	ค่า CMC ^a (mg/L)
2. Lipopeptides and lipoproteins			
Peptide lipid	<i>B. licheniformis</i>	27	12-20
Serrawettin	<i>S. marcescens</i>	28-33	
Viscosin	<i>P. fluorescens</i>	26.5	150
Surfactin	<i>B. subtilis</i>	27-32	23-160
Gramicidins	<i>B. brevis</i>		
Polymyxins	<i>B. polymyxa</i>		
3. Fatty acids, neutral lipids, and phospholipids			
Fatty acids	<i>C. lepus</i>	30	150
Neutral lipids	<i>N. erythropolis</i>	32	
Phospholipids	<i>T. thiooxidans</i>		
4. Polymeric surfactants			
Emulsan	<i>A. calcoaceticus</i>		
Biodispersan	<i>A. calcoaceticus</i>		
Mannan-lipid-protein	<i>C. tropicalis</i>		
Liposan	<i>C. lipolytica</i>		
Carbohydrate-protein-lipid	<i>P. fluorescens</i>	27	10
	<i>D. polymorphus</i>		
Protein PA	<i>P. aeruginosa</i>		
5. Particulate biosurfactants			
Vesicles and fimbriae	<i>A. calcoaceticus</i>		
Whole cells	Variety of bacteria		

^a critical micelle concentration = ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ทำให้เกิดไมเซลล์

ที่มา : Desai, J.D.; & Banat, I.M. (1997). "Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* Mar. : 47-64

นอกจากนี้ จุลินทรีย์ที่ต่างชนิดกันยังสามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีสมบัติแตกต่างกัน ซึ่งสามารถจัดจำแนกประเภทตามตระกูลของจุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นๆ

วิธีการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Screening of Potential Biosurfactant-Producing Microorganism) (Desai; & Banat. (1997). : 47-64)

ความก้าวหน้าของการค้นหาจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพถูกพัฒนาไปอย่างรวดเร็ว มีหลายวิธีการที่ถูกนำมาใช้ในการคัดกรองความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สร้างจากเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่

1. การวิเคราะห์รูปร่างที่สมมาตรของหยดน้ำ (axisymmetric drop shape analysis; ADSA) โดยพิจารณาจากรูปร่างของหยดน้ำเป็นตัวบ่งชี้ถึงความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของแบคทีเรีย ในเทคนิคนี้จะหยดน้ำเลี้ยงเชื้อลงบนผิวหน้าของฟลูออโร-เอทิลีน-โพรพิลีน (fluoro-ethylene-propylene) จากนั้นพิจารณาจากขอบของหยดน้ำเลี้ยงเชื้อว่ามีการกระจายตัวหรือไม่ วิธีการนี้ถูกนำไปใช้เพื่อวัดค่าแรงตึงผิว ซึ่งแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้เท่านั้นจึงจะลดค่าแรงตึงผิวได้

2. การวิเคราะห์โดยวินิจัยจากสี (colorimetric estimation) ใช้ในการพิจารณาสารลดแรงตึงผิวชีวภาพพื้นฐาน โดยพิจารณาจากสีของสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุเป็นลบกับอินดิเคเตอร์ที่เป็นประจุบวก

3. การทดสอบการยุบตัวของหยดน้ำ (rapid drop-collapsing test) วิธีการนี้ใช้การหยดส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อลงบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันเคลือบผิวหน้า หากส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีสารลดแรงตึงผิวอยู่จะเกิดการยุบตัว (collapse) ของหยดน้ำเลี้ยงเชื้อนั้น แต่หากไม่มีสารลดแรงตึงผิว ส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อจะยังคงมีรูปร่างเช่นเดิม

4. การใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบเยื่อบาง (direct thin-layer chromatography technique) (Matsuyama; sagawa; & Yano. 1987 : 1186-1188) วิธีนี้เป็นการตรวจสอบลักษณะสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากจุลินทรีย์ โดยใช้แบคทีเรีย *Serratia marcescens* สายพันธุ์ดัดแปลง มาตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น โดยดูจากตำแหน่งของสารบนแผ่น TLC เทียบกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาตรฐาน

5. การวัดค่าดัชนีการก่อเกิดอิมัลชัน (estimation of the emulsification index value) วัดโดยการนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาผสมกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น สารผสมเฮกซะเดเคน-2 -เมทิลแนพทาซีนหรือน้ำมันก๊าด (kerosene) ตั้งทิ้งไว้นาน 24 ชั่วโมงหรือ 1 เดือน จึงวัดความยาวของส่วนที่เป็นอิมัลชันที่มีลักษณะสีขาวเป็นครีม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของความยาวของของเหลวทั้งหมด ถ้าเปอร์เซ็นต์ของอิมัลชันมีค่าสูงและมีความเสถียรอยู่ได้นาน 24 ชั่วโมงและ 1 เดือน แสดง

ว่า สารลดแรงตึงผิวชนิดนั้นเป็นสารก่อเกิดอิมัลชันที่ดี ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการผสมสารประกอบไฮโดรคาร์บอนกับน้ำ หรือสารประกอบที่มีขั้วต่างกันดีเป็นอย่างดี (อารีย์ กังนิน. 2542.)

การตรวจวัดกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (estimation of biosurfactant activity)

กิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถตรวจวัดได้หลายวิธี เช่น การวัดค่าแรงตึงผิว ค่าแรงตึงผิวระหว่างสองพื้นผิวที่สัมผัสกัน ค่าความสามารถในการเป็นสารก่ออิมัลชัน ค่าอัตราส่วนการขบน้ำและค่าการกระจายตัวของน้ำมัน เป็นต้น

1. การวัดค่าแรงตึงผิว (surface tension) และค่าแรงตึงผิวระหว่างสองพื้นผิวที่สัมผัสกัน (interfacial tension)

การวัดค่าแรงตึงผิวเป็นการวัดค่าแรงตึงผิวระหว่างของเหลวกับอากาศ ส่วนใหญ่จะใช้วิธีการวัดจากส่วนไซของน้ำเลี้ยงเชื้อ ส่วนการวัดค่าแรงตึงผิวระหว่างสองพื้นผิวที่สัมผัสกัน เป็นการวัดค่าแรงตึงผิวระหว่างของเหลวกับของเหลว ซึ่งมักจะใช้วัดค่าแรงตึงผิวระหว่างน้ำกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น เฮกซะเดกเคน (hexadecane) หรือน้ำมันก๊าด (kerosene) เป็นต้น ค่าแรงตึงผิวและค่าแรงตึงผิวระหว่างสองพื้นผิวที่สัมผัสกันอาจวัดโดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า Tensiometer ค่าที่วัดได้มีหน่วยเป็น มิลลินิวตันต่อเมตร (mN/m) หรือ ไดน์ต่อเซนติเมตร (dyne/cm)

เมื่อมีการเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลงในน้ำ โมเลกุลสารลดแรงตึงผิวจะเกิดการสะสมตัวอยู่ระหว่างผิวสัมผัสสองวัฏภาค มีผลทำให้ค่าแรงตึงผิวมีค่าลดลง ตัวอย่างเช่น ค่าแรงตึงผิวของน้ำกลั่นมีค่าเท่ากับ 72 mN/m เมื่อเติมสารลดแรงตึงผิวลงไป จะทำให้ค่าแรงตึงผิวของน้ำกลั่นลดลงต่ำกว่า 30 mN/m (Jenny; Käppeli; & Fiechter. 1991 : 5-13); (Lang; & Wullbrandt. 1999 : 22-32) และหากความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวที่เติมลงไปมีค่าเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ จนในที่สุดทำให้บริเวณนี้อิ่มตัวไปด้วยโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวแล้ว ค่าแรงตึงผิวที่ลดลงจะคงที่ที่ระดับวิกฤต ที่แม้จะมีการเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวเข้าไปในระบบมากกว่านี้ก็ยังทำให้ค่าแรงตึงผิวไม่มีการเปลี่ยนแปลง ส่วนโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวส่วนเกินที่ไม่สามารถแทรกตัวที่ผิวสัมผัสระหว่างวัฏภาคได้ จะเกิดเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า ไมเซลล์ (micelle) ความเข้มข้นที่น้อยที่สุด ณ จุดที่ทำให้โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิว มารวมตัวกันเกิดเป็นไมเซลล์นี้ เรียกว่า critical micelle concentration (CMC) ซึ่งเป็นสมบัติเฉพาะตัวของสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิด ค่า CMC เป็นค่าที่บ่งบอกถึงประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้เป็นอย่างดี มีหน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อลิตร (mg/L) โมลาร์ (M) หรือร้อยละโดยปริมาตร(% v/v) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดใดมีค่า CMC ต่ำ หมายความว่า เป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีคุณภาพดีเนื่องจากใช้ในปริมาณเพียงเล็กน้อย แต่สามารถทำให้ค่าแรงตึงผิวของสารละลายมีค่าลดลงได้มาก

2. ค่าความสามารถในการเป็นสารก่ออิมัลชัน คือ ค่าที่บอกถึงความเสถียรของอิมัลชัน ซึ่งอิมัลชันหมายถึงผลิตภัณฑ์รูปแบบหนึ่งที่ประกอบด้วยของเหลวอย่างน้อยสองชนิดซึ่งไม่เข้ากันหรือไม่ละลายในกันและกัน เช่น น้ำและน้ำมัน ถูกนำมาไว้ด้วยกันในลักษณะที่ผสมผสานเข้าเป็น

เนื้อเดียวกันได้โดยอาศัยตัวทำอิมัลชัน (emulsifier) อิมัลชันเมื่อมองด้วยตาเปล่าจะเห็นลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน แต่ถ้าส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นเป็นสองวัฏภาค สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจัดเป็นตัวทำอิมัลชันชนิดหนึ่ง ซึ่งอิมัลชันที่เกิดขึ้นเมื่อเวลาผ่านไปจะเกิดการแยกชั้นขึ้นได้ แต่หากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถทำให้วัฏภาคหนึ่ง (เช่น สารประกอบไฮโดรคาร์บอน) เกิดการกระจายตัวเป็นหยดเล็กๆ อยู่ในอีกวัฏภาค (เช่น น้ำ) ได้มาก อิมัลชันที่เกิดขึ้นก็จะมีเสถียรภาพมากขึ้น การวัดความสามารถของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการก่อเกิดอิมัลชัน ทำได้โดยการเปรียบเทียบความสามารถของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ที่มีสมบัติเป็นตัวทำอิมัลชันที่ดี ในการก่ออิมัลชันระหว่างสารผสมเฮกซะเดเคน-2-เมทิลแนฟทาลีน (hexadecane-2-methylnaphthalene mixture) กับน้ำ (Rosenberg; et al. 1979 : 402-408) หรือ คีโรซีน (kerosene) กับน้ำ (Cooper; & Goldenberg. 1987 : 224-229)

3. ค่าอัตราส่วนการชอบน้ำ (hydrophilic-lipophilic balance, HLB) เป็นค่าที่แสดงถึงความสามารถของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการทำให้อิมัลชันที่เกิดขึ้นอยู่ในรูปไมโครอิมัลชันที่เรียกว่า water-in-oil (W/O microemulsion) หรือ oil-in-water (O/W microemulsion) ในกรณีแรกจะเป็นระบบที่ประกอบด้วยหยดน้ำเล็กๆ (1-10 nm) แขนงลอยอยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์ (กรณีที่มีตัวทำละลายอินทรีย์มากกว่าน้ำ) กรณีหลังจะเป็นระบบที่ประกอบด้วยหยดน้ำมันเล็กๆ แขนงลอยอยู่ในน้ำ (กรณีนี้ น้ำมากกว่าตัวทำละลายอินทรีย์) (ไกรฤกษ์ อบรมสุข. 2542.) โดยกำหนดให้กรดโอเลอิก (oleic acid) มีค่า HLB เท่ากับ 1 และโซเดียมโอเลเอต (sodium oleate) มีค่าเท่ากับ 20 และสารผสมระหว่างสารสองชนิดนี้ในอัตราส่วนต่างๆ กันจะมีค่า HLB อยู่ในช่วงระหว่าง 1-20 หากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพตัวใดมีค่า HLB น้อยกว่า 6 แสดงว่าจะทำให้อิมัลชันที่เกิดขึ้นมีความเสถียรในรูปของ water-in-oil และถ้ามีค่า HLB อยู่ในช่วง 10-18 แสดงว่าอิมัลชันที่เกิดขึ้นอยู่ในรูปของ oil-in-water

4. ค่าการกระจายตัวของน้ำมัน (oil displacement) เป็นการวัดความสามารถของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการทำให้แผ่นฟิล์มของน้ำมันบนผิวน้ำเกิดเป็นวงใส (clear zone) โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของพื้นที่วงใส คำนวณหาพื้นที่ตามสูตร πr^2 มีหน่วยเป็นตารางเซนติเมตร (cm^2) โดยกำหนด 1 ตารางเซนติเมตรของการกระจายตัวของน้ำมันดิบเท่ากับ 1 หน่วย นอกจากการวัดค่าการกระจายตัวของน้ำมันจะใช้วัดส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อแล้ว ยังเป็นวิธีที่เหมาะสมในการวัดกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธีนี้จะใช้สารในการวิเคราะห์เพียง 10 μL จึงเหมาะกับสารที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์เนื่องจากมักจะมีปริมาณน้อย (Morikawa; et al. 1993. : 6459-6466)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โบโด และมิลเลอร์-ไมเออร์ (Bodour; & Miller-Maier. 1998 : 273-280) เสนอวิธีการใหม่ ที่เรียกว่า drop-collapse เพื่อใช้ในการคัดแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิว ซึ่งเป็นวิธีการที่ทำได้ ง่าย มีความเที่ยงตรงสูง และใช้เพียงเครื่องมือพื้นฐานในห้องปฏิบัติการ โดยจะเคลือบน้ำมันบาง ๆ ลงบนฝา polystyrene ของจานหลุม 96 หลุม (96-microwell plate) แล้วหยดสารละลายตัวอย่างลง ไป ทิ้งไว้ 1 นาที วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของสารละลายผ่านกล้องจุลทรรศน์ (stereomicroscope) ที่มี สเกลอยู่ด้วย ผลการทดลองพบว่า ค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิว 2 ชนิด คือ rhamnolipid ซึ่งเป็น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *Pseudomonas aeruginosa* IGB83 กับ sodium dodecyl sulfate ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ ที่ได้จากวิธี drop-collapse และจากเครื่อง Surface Tensiometer Model 21 พบว่าให้ค่าที่เท่ากันทั้ง 2 วิธี คือ rhamnolipid มีค่าเท่ากับ 27 mg/L และ sodium dodecyl sulfate มีค่าเท่ากับ 1845 mg/L

ฮิซัทซูกา และคนอื่นๆ (Hisatsuka; et al. 1971 : 686-692) พบว่าการเลี้ยงแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* S₇B₁ บนเฮกซะเดเคนและพาราฟิน (C₁₄-C₁₈) จะสร้างแรมโนลิปิด 1 และแรมโนลิปิดที่ผลิตได้มีความสามารถในการกระตุ้นการเจริญของ *P. aeruginosa* สายพันธุ์อื่น ๆ ที่เจริญบนเฮกซะเดเคนได้ แต่ไม่สามารถกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ได้ เมื่อ ทดลองวัดค่าแรงตึงผิวของแรมโนลิปิดที่ผลิตได้ ในบัฟเฟอร์ 0.1 M NaHCO₃ พบว่ามีค่าต่ำกว่า 40 dyn/cm ค่า CMC ประมาณ 0.006 % และยังสามารถก่อเกิดอิมัลชันที่เสถียรกับสารพวกอัลเคนได้ มากกว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ 2 ชนิด คือ ทวิน 20 (Tween 20) และ Noigen EA 141

อิทาร์และซุซูกิ (Itoh; & Suzuki. 1972 : 2233-2235) รายงานว่า แรมโนลิปิด 1 หรือแรม โนลิปิด 2 เป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ดัดแปลง *Pseudomonas aeruginosa* PU-1 และ PU-2 ซึ่งเดิมไม่สามารถเจริญในภาวะที่มีพาราฟิน (C₁₂-C₁₄) เป็นแหล่ง คาร์บอนได้ ทำให้ขาดสมบัติในการผลิตแรมโนลิปิด แต่เมื่อเติมแรมโนลิปิด 1 หรือ แรมโนลิปิด 2 ที่ ผลิตได้จากสายพันธุ์อื่น ๆ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะกระตุ้นให้สายพันธุ์ *P. aeruginosa* PU-1 และ PU-2 สามารถเจริญบนพาราฟินได้ นอกจากนั้นการเติมทริฮาไลลิปิดที่แยกได้จาก *Nocardia* หรือ *Corynebacterium* ก็สามารถกระตุ้นการเจริญของสายพันธุ์ *P. aeruginosa* PU-1 และ PU-2 ได้ เช่นกัน แต่น้อยกว่าการเติมแรมโนลิปิด

ค็อก และคนอื่นๆ (Koch; et al. 1991 : 4212-4219) พบว่าสายพันธุ์ดัดแปลง In5-GM ที่ ได้จาก *Pseudomonas aeruginosa* PG201 ซึ่งไม่สามารถเจริญบนเฮกซะเดเคนได้ จะไม่มีการ ผลิตแรมโนลิปิด โดยทดสอบความสามารถในการทำลายเม็ดเลือดแดงและการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* แต่เมื่อ มีการเติม แรมโนลิปิดลงไปแม้เพียงเล็กน้อยจะทำให้ความสามารถในการ เจริญบนเฮกซะเดเคนกลับคืนมา

แวน ดายค์ และคนอื่น ๆ (Van Dyke; et al. 1993 : 1071-1078) ศึกษาโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* UG2 โดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (Gas chromatography-mass spectrometry) และนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโคปี (Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy) พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ เป็น glycolipid คือ rhamnolipid 2 ชนิด ซึ่งมีโครงสร้างเป็น α -L-rhamnopyranosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate และ 2-O- α -L-rhamnopyranosyl- α -L-rhamnopyranosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate และพบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ UG2 ที่บริสุทธิ์ความเข้มข้น 5 g/L สามารถเคลื่อนย้ายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน 6 ชนิด (naphthalene, anthracene, phenanthrene, fluorene, 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl, และ 3,3',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl) ที่ถูกดูดซึมอยู่ในดินทรายกลับคืนมาได้มากกว่าจากดินโคลน และเมื่อเปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ sodium dodecyl sulfate และ Witconol SN70 แล้ว rhamnolipid UG2 จะนำสารประกอบไฮโดรคาร์บอนกลับคืนได้มากกว่า sodium dodecyl sulfate แต่จะน้อยกว่า Witconol SN70 ในกรณีของ phenanthrene, 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl

อาร์โน มาร์ซาลส์ และแวนเดอคาสทีลี (Arino; Marchal; & Vandecasteele. 1996 : 162-168) รายงานว่าแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* GL-1 ซึ่งแยกได้จากดินที่ปนเปื้อนสารประกอบพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (polycyclic aromatic hydrocarbons; PAH) จากโรงงานผลิตน้ำมันเครื่อง สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้เมื่อสกัดส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อด้วย ethyl acetate และละลายสารสกัดที่ผ่านการระเหยตัวทำละลายออกแล้วด้วย methanol นำไปแยกด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟี พบว่าเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภท glycolipid ที่ประกอบด้วย rhamnolipid ชนิดที่ 1, 2, 3 และ 4 โดยพบ rhamnolipid ชนิดที่ 1 เป็นปริมาณมากที่สุด

ดีเซียล และคนอื่น ๆ (Déziel; Lépine; Dennie; et al. 1999 : 244-252) ; ดีเซียล และคนอื่น ๆ (Déziel; Lépine; Milot; et al. 2000 : 145-152) เสนอวิธีการวิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างและปริมาณของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแบบใหม่ โดยใช้ส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อมา วิเคราะห์ด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (Liquid chromatography-mass spectrometry, LC/MS) โดยศึกษาจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ rhamnolipid ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ 57 RP พบว่าวิธีการดังกล่าวให้ผลในการวิเคราะห์เหมือนกับการแยก rhamnolipid ที่ผลิตได้ด้วยเทคนิค TLC และ HPLC แล้วนำสารที่แยกได้ไปวิเคราะห์ด้วยแมสสเปกโตรเมตรี ซึ่งเป็นวิธีการที่นิยมใช้กันแพร่หลาย แต่ข้อดีของเทคนิค LC/MS คือใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยกว่าและมีวิธีการที่ไม่ยุ่งยากเหมือนวิธีการเดิมด้วย

คาคุกาวา และคนอื่น ๆ (Kakugawa; et al. 2002 : 188-191) รายงานการค้นพบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภท glycolipid จากยีสต์ *Kurtzmanomyces* sp. I-11 ที่เลี้ยงในอาหารที่

มีน้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อศึกษาโครงสร้างของ glycolipid โดยวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC, GC และ TLC พบว่าเป็น glycolipid ชนิด mannosylerythritol lipid (MEL) ที่มีโครงสร้างเป็น 6-*O*-acetyl-2,3-di-*O*-alkanoyl- β -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-meso-erythritol ซึ่งยีสต์ *Kurtzmanomyces* sp. I-11 นี้เป็นยีสต์สายพันธุ์ใหม่ที่พบว่าสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด MEL ได้ นอกเหนือจากยีสต์ *Candida* sp., *Schizonella melanogramma* และ *Ustilago maydis* ที่เคยมีรายงานการค้นพบก่อนหน้านี้

ซูซูกิ และคนอื่นๆ (Suzuki; et al. 1969 : 1619-1627) พบว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Arthrobacter paraffineus* KY 4304 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีพาราฟินเป็นแหล่งคาร์บอน จะสามารถผลิตทรีฮาโลลิปิดได้ และทรีฮาโลลิปิดที่ผลิตได้จะก่อให้เกิดอิมัลชันตรงรอยต่อระหว่างส่วนที่เป็นไขมันพาราฟินกับส่วนที่เป็นน้ำเลี้ยง นอกจากนี้ทรีฮาโลลิปิดที่ผลิตได้ยังมีความสามารถในการกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ ที่เลี้ยงบนอาหารที่มีพาราฟินเป็นแหล่งคาร์บอน เช่นกัน

เครทซ์เมอร์ บอค และแวกเนอร์ (Kretschmer; Bock; & wagner. 1982 : 864-870) รายงานว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Rhodococcus erythropolis* DSM 43215 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีอัลเคน (C14-C15 หรือ C13-C18) เป็นแหล่งคาร์บอน หลังจากสกัดด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง dichloromethane – methanol พบว่ามีส่วนที่เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภท ทรีฮาโลลิปิด ซึ่งมีโครงสร้างเป็น α - α -Trehalose-6,6'-dicorynomycolate ซึ่งสามารถลดค่าแรงตึงผิวระหว่างสารกับเฮกซะเดเคนเคนจาก 44 mN/m ให้เหลือเพียง 18 mN/m และยังพบว่า α - α -Trehalose-6,6'-dicorynomycolate ที่ผลิตได้มีความคงทนต่อสภาพความเค็ม และความเป็นกรด-ด่างได้ในช่วงกว้าง

แร็ปป์ และแวกเนอร์ (Cooper; & Zajic. 1980 : 229-253; อ้างอิงจาก Rapp; & Wagner. (1976). p. 133) พบว่าสามารถแยกทรีฮาโลลิปิดที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Nocardia* ที่เจริญบนอัลเคนได้ ซึ่งหากเลี้ยงแบคทีเรียชนิดนี้บนกลีเซอรอลจะผลิตทรีฮาโลลิปิดได้น้อยมาก ทรีฮาโลลิปิดที่ได้นี้ สามารถก่อให้เกิดอิมัลชันระหว่างน้ำกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอน และมีความสามารถในการกระตุ้นการเจริญของ *Nocardia* บนอัลเคนได้เช่นกัน โดยการศึกษาจากการเติมทรีฮาโลลิปิดที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว แม้เพียงเล็กน้อยลงในขวดเขย่าก่อนทำการเลี้ยงเชื้อ จะทำให้น้ำหนักแห้งของเซลล์เพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าทรีฮาโลลิปิดทำให้ปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นนั่นเอง

กอร์ริน และคนอื่นๆ (Cooper; & Zajic. 1980 : 229-253; อ้างอิงจาก Gorin; et al. (1961). p. 846-855) รายงานถึงการแยกขอบฟอสโฟลิปิดจากยีสต์ *Torulopsis magnoliae* ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกับแรมโนลิปิดชนิดที่ 1 (R1) ที่ผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลคู่ (เช่น น้ำตาลขอบฟอส) เชื่อมกับหมู่ไฮดรอกซิลของกรดไฮดรอกซีคาร์บอกซิลิกด้วยพันธะไกลโคซิดิก แต่ต่างจากแรมโนลิปิดชนิดที่ 1 ตรงที่มีหมู่อะซิเตด 1 หรือ 2 หมู่เชื่อมกับน้ำตาลขอบฟอสด้วยพันธะเอซิล (acyl bonds) และหมู่ไฮดรอกซีไม่ได้ต่อยูกับคาร์บอนตำแหน่งเบต้าของกรดไขมันแต่ต่อยูกับคาร์บอนตำแหน่งรองสุดท้ายของสายอัลคิลแทน

คูเปอร์ และแพ็ดดอค (Cooper; & paddock. 1983 : 1426-1429) พบว่ายีสต์สายพันธุ์ *Torulopsis petrophilum* สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดชอบโพโรลิปิดได้ โดยเลี้ยงในอาหารที่มีสารประกอบอัลเคนและน้ำมันพืชเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งชอบโพโรลิปิดที่ผลิตได้มีสมบัติทางเคมีเหมือนกับชอบโพโรลิปิดที่ผลิตได้จาก *Torulopsis bombicola*

โรแซนเบิร์ก (Rosenberg. 1986 : 109-132) ได้กล่าวถึงชอบโพโรลิปิดว่าเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวและแรงตึงผิวระหว่างสองพื้นผิวที่สัมผัสกัน แต่ไม่มีความสามารถในการก่อให้เกิดอิมัลชันได้ โดยพบว่าชอบโพโรลิปิดบริสุทธิ์ที่อยู่ในรูปวงแลคโตนที่มีความเข้มข้น 10 mg/L สามารถลดค่าแรงตึงผิวระหว่างน้ำกับเฮกซะเดคเคนลงจาก 40 mN/m เหลือ 5 mN/m และมีความคงทนต่อสภาพความเป็นกรด-ด่าง ความเค็มและอุณหภูมิได้ในช่วงกว้าง

นิว ฮาร์ทเนอร์ และพอร์ลลา (Neu; Härtner; & Poralla. 1989 : 518-520) ศึกษาโครงสร้างและสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (centrifuge) แยกเซลล์แบคทีเรียออก นำส่วนของเหลวด้านบน (supernatant) มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography; TLC) ใช้สารละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) ในระบบ $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (65:25:4, v/v) เมื่อทดสอบสารที่แยกได้ จะไม่ให้สีกับ ninhydrin reagent แต่ให้สีกับ 4,4'-tetramethyldiamino-diphenylmethane (TDM) นำสารที่ผ่านการแยกด้วยเทคนิค TLC มาตรวจสอบความบริสุทธิ์อีกครั้งด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography : HPLC) และวิเคราะห์หากรดอะมิโน พบว่า ส่วนประกอบของกรดอะมิโนเหมือนกับกรดอะมิโนของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ วิสโคซิน (viscosin) ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย *P. viscosa* ซึ่งเป็นสารจำพวก lipopeptides ที่มีความสามารถในการต่อต้านจุลชีพ น้ำหนักโมเลกุลของสารเมื่อวิเคราะห์ด้วย Fast-atom bombardment mass spectrometry (FAB-MS) มีค่าเท่ากับ 1,126 ดาลตัน ค่าแรงตึงผิวที่วัดด้วย ring-tensiometer และค่า CMC ได้เท่ากับ 26.5 mN/m และ 0.15 mg/mL ตามลำดับ

โจนส์ และสตาร์กี้ (Cooper; & Zajic. 1980 : 229-253; อ้างอิงจาก Jones; & Starkey. (1961). p. 260-261) รายงานถึงจุลินทรีย์ *Thiobacillus thiooxidans* ที่สามารถผลิตสารที่มีสมบัติซึมผ่าน (wet) เข้าสู่แร่ซัลเฟอร์ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ และระหว่างที่จุลินทรีย์เจริญ สารที่ผลิตได้นี้สามารถลดค่าแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อลงได้ จาก 72 dyn/cm เหลือ 49 dyn/cm นอกจากนั้นส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อภายหลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 7 วันก็ยังคงความสามารถในการซึมผ่านเข้าสู่แร่ซัลเฟอร์ได้เช่นเดิม

คูเปอร์ ซาจิค และเจอร์สัน (Cooper; Zajic; & Gerson. 1979 : 4-10) รายงานว่าจุลินทรีย์ *Corynebacterium lepus* จะผลิตสารลดแรงตึงผิวผสมจำพวกไขมัน ได้แก่ ฟอสฟาติดิลกลีเซอรอล, ฟอสฟาติดิลลิโนซิทอล, ฟอสฟาติดิลกลีเซอรอลฟอสเฟต, คาร์ดิโอลิปิน (cardiolipin), ฟอสฟาติดิล

ลินโนซิทอลแมนโนไซด์ (phosphatidylinositol mannoside) และเมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการลดแรงตึงผิว พบว่าทำให้ค่าแรงตึงผิวของน้ำกลั่นลดลงเหลือ 49 dyn/cm

เครทซ์เมอร์ บอค และแวกเนอร์ (Kretschmer; Bock; & wagner. 1982 : 864-870) รายงานถึงการผลิตสารลดแรงตึงผิวหลายประเภทที่ได้จากการเลี้ยงจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Rhodococcus erythropolis* DSM 43215 ในอาหารที่มีอัลเคนเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อแยกฟอสฟาติดิลเอทานอลามีนซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวประเภทฟอสโฟลิปิดออกจากสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปทดสอบความสามารถในการลดแรงตึงผิว พบว่าสามารถลดแรงตึงผิวระหว่างสารกับเฮกซะเดเคนได้ต่ำกว่า 1 mN/m และมีค่า CMC เท่ากับ 30 mg/L

โรเซนเบิร์ก และคนอื่นๆ (Rosenberg; Rubinovitz; Gottlieb; et al. 1988 : 317-322); โรเซนเบิร์ก และคนอื่นๆ (Rosenberg; Rubinovitz; Legmann; et al. 1988 : 323-326) ศึกษาสารลดแรงตึงผิวชนิดพอลิเมอร์ ที่เรียกว่า ไบโอดีสเพอร์แซน (biodispersant) ที่ผลิตได้จาก *Arthrobacter calcoaceticus* A2 พบว่ามีลักษณะเป็น anionic heteropolysaccharide ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 51,400 ดาลตัน ประกอบด้วยน้ำตาลรีดิวซ์ 4 ชนิด คือ กลูโคซามีน (glucosamine) 6-เมทิลลามิโนเฮกโซส (6-methylamino hexaose) กรดกาแลคโตซามีน ยูโรนิก (glucosamine uronic acid) และน้ำตาลอะมิโน (amino sugar) ที่ยังไม่ทราบชนิด

ซีริกิลอันโน และคาร์แมน (Cirigliano; & Carman. 1984 : 323-326) รายงานว่า *Candida lipolytica* ATCC 8662 สามารถผลิตสารก่ออิมัลชันได้ เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีเฮกซะเดเคนเป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลานาน 36 ชั่วโมง แต่จะมีปริมาณสูงสุดเมื่อเวลาผ่านไป 130 ชั่วโมง เรียกสารก่ออิมัลชันนี้ว่า ลิโพแซน ประกอบด้วย โปรตีน 17 % และคาร์โบไฮเดรต 83 % ส่วนของคาร์โบไฮเดรตเป็น heteropolysaccharide ที่เกิดจากน้ำตาล 4 ชนิด คือ กลูโคส (glucose) กาแลคโตส (galactose) กาแลคโตซามีน (galactosamine) และกรดกาแลคตูโรนิก (galacturonic acid) ลิโพแซนเป็นสารก่ออิมัลชันที่มีประสิทธิภาพดีชนิดหนึ่ง โดยอิมัลชันที่เกิดจะมีปริมาณมากที่สุดที่อัตราส่วนอย่างต่ำของเฮกซะเดเคน ต่อ ลิโพแซน เท่ากับ 50:1 คงความเสถียรได้ที่เป็นกรด-ด่าง (pH) อยู่ในช่วง 2-5 อุณหภูมิสูงกว่า 70°C

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

แบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัย

แบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัยคือ แบคทีเรีย B189 ได้จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ซึ่งคัดแยกได้จากน้ำทิ้งของโรงงานผลิตนมใน จ. สมุทรปราการ

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

วัสดุและสารเคมี

1. สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) บริษัท Scharlau F.E.R.O.S.A, Barcelona, Spain
2. น้ำมันถั่วเหลือง (Soybean oil) บริษัท มรกตอินดัสตรีส์ จำกัด ประเทศไทย
3. Acetonitrile (CH_3CN) AR grade บริษัท Merck, Germany
4. Ammonium nitrate (NH_4NO_3) AR grade บริษัท Merck, Germany
5. Chloroform (CHCl_3) commercial grade
6. Ethanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) AR grade บริษัท Merck, Germany
7. Ethyl acetate ($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$) commercial grade
8. Hexane (C_6H_{14}) commercial grade
9. Magnesium sulfate heptahydrate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) AR grade บริษัท Merck, Germany
10. Mannosylerythritol lipid (MEL) สร้างจาก *Kurzmannomyces* sp. ได้รับอนุเคราะห์จาก Dr. Koji Kakugawa Hiroshima Prefectural Food Technology Research Center, Hiroshima Japan
11. Methanol (CH_3OH) commercial grade
12. Methanol (CH_3OH) HPLC grade บริษัท Merck, Germany
13. Mineral oil AR grade บริษัท Fluka
14. *p*-Anisaldehyde AR grade บริษัท Panreac
15. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) AR grade บริษัท Merck, Germany
16. ODS-AQ 120 - S50 lot No. 21041 YMC-GEL[®] (pore size 120 Å particle size 5 µm)
17. ODS-TLC plate (RP-18 F254s No. 1.05560) บริษัท Merck, Germany

18. Silica gel 60 for column chromatography (0.036-0.200 nm) บริษัท Merck, Germany
19. Silica gel 60 GF₂₅₄ aluminium sheet for preparative TLC บริษัท Merck, Germany
20. Sodium dodecyl sulfate (SDS) บริษัท Bio-Rad
21. Sophorolipid (SL) สร้างจาก *Candida bombicola* ได้รับอนุเคราะห์จาก Dr. Koji Kakugawa Hiroshima Prefectural Food Technology Research Center, Hiroshima Japan
19. Tween 80 AR grade บริษัท Fluka

หมายเหตุ ต้องทำการกลั่นตัวทำลายอินทรีย์ (commercial grade) ก่อนนำมาใช้ทุกครั้ง

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. กล้องจุลทรรศน์ Stereomicroscope รุ่น RFB-7 บริษัท Kyowa, Japan
2. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (controlled environment incubator shaker) รุ่น Innova บริษัท New Brunswick
3. เครื่องชั่งทศนิยม 5 ตำแหน่ง รุ่น R 200 D บริษัท Sartorius Research
4. เครื่องปั่นเหวี่ยงภาวะสูญญากาศ (Rotational-vacuum-concentrator) รุ่น RVC 2-18 บริษัท Chaist
5. คอลัมน์แก้วขนาดต่าง ๆ
6. ถังหมัก (Fermenter) ขนาด 5 ลิตร รุ่น Bioflo III บริษัท New Brunswick Scientific, Edison, N.J., U.S.A.
7. ฝา polystyrene ของจานหลุม 96 หลุม (96-microwell plate)
8. Capillary column เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 cm
9. Freeze dryer (FTS system FD-3-55D-MP)
10. Fast Atom Bombard Mass Spectrometer (Joel SX-102A Tokyo Japan)
11. Gas Chromatography Mass Spectrometer (Joel Automass 20 Tokyo Japan)
12. Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (Bruker AVANCE 300 MHz)
13. Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (Varian VXR-500 MHz)
14. Rotary evaporator (Buchi Rotavapor R-114)

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ใช้ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี ได้แก่ การวัดสเปกตรัมนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR) ใช้เครื่องมือและทำการวิเคราะห์ที่มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒและที่มหาวิทยาลัยโอภา

ยาม่า ประเทศญี่ปุ่น, แมสสเปกโตรเมตรี (MS) และแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (GC-MS) ใช้เครื่องมือและทำการวิเคราะห์ที่มหาวิทยาลัยโอคายาม่า ประเทศญี่ปุ่น

วิธีดำเนินการวิจัย ประกอบด้วยขั้นตอนหลัก 5 ขั้นตอน ดังนี้

1. การเลี้ยงแบคทีเรีย B189 เพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ
2. การสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเซลล์และน้ำเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย
3. การแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและการทำสารให้บริสุทธิ์ขึ้น
4. การวัดกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ
5. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

1. การเลี้ยงแบคทีเรีย B189 เพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

1.1 การศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย B189 เพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ทำโดยถ่ายเชื้อแบคทีเรีย B189 จำนวน 1 โคโลนี ใส่ลงในอาหารเหลว oil selective medium (ภาคผนวก) ปริมาตร 5 mL ในหลอดทดลองขนาดใหญ่ บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อที่ได้ปริมาตร 0.5 mL ลงในอาหารเหลว oil selective medium ใหม่ ปริมาตร 50 mL ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วรูปทรงกรวยขนาด 250 mL เลี้ยงเชื้อในภาวะขวดเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 36, 72 และ 168 ชั่วโมง นำไปสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพออกจากเซลล์และน้ำเลี้ยงเซลล์ แล้วนำไปทดสอบค่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิว

1.2 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อใช้ในการศึกษา

ทำโดยถ่ายเชื้อแบคทีเรีย B189 จำนวน 1 โคโลนี ใส่ลงในอาหารเหลว oil selective medium ปริมาตร 50 mL ในขวดแก้วรูปทรงกรวยขนาด 250 mL บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อที่ได้ปริมาตร 30 mL ลงในอาหารเหลว oil selective medium ใหม่ ปริมาตร 3 L ในถังหมักขนาด 5 L บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C กวนด้วยใบพัดในอัตราเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง นำไปสกัดเพื่อแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพออกจากเซลล์และน้ำเลี้ยงเซลล์

2. การสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรียและน้ำเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย

นำเซลล์และน้ำเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย B189 ที่ได้จากข้อ 1.2 มาสกัดแบบแบ่งส่วนการละลาย เพื่อแยกสารลดแรงตึงผิว โดย

2.1 สกัดด้วย ethyl acetate

สกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรียและน้ำเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียด้วย

ethyl acetate ใน อัตราส่วน ethyl acetate:น้ำเลี้ยงเซลล์ เท่ากับ 2:1 เป็นจำนวน 12 ครั้ง โดยใช้ ethyl acetate ครั้งละ 500 mL เป็นเวลานาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้จนเกิดการแยกชั้น แยกเอาส่วน สารละลายชั้นล่าง ซึ่งเป็นชั้นของเบคทีเรียและน้ำเลี้ยงเซลล์เบคทีเรีย ใส่ในบีกเกอร์ เพื่อนำไปสกัด ด้วย ethyl acetate ซ้ำอีกครั้ง รวมส่วนสกัดชั้น ethyl acetate ทั้งหมดเข้าด้วยกัน นำไประเหยตัว ทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำ โดยใช้เครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40°C ได้ส่วนสกัดชั้น ethyl acetate (ภาพประกอบ 14)

2.2 สกัดด้วยสารละลายผสมระหว่าง hexane:methanol

นำส่วนสกัดชั้น ethyl acetate ที่ได้จากข้อ 2.1 มาละลายด้วย methanol ปริมาตร 6 L แล้วนำมาแบ่งส่วนการละลายด้วย hexane 24 ครั้ง ๆ ละ 250 mL โดยใช้ hexane ครั้งละ 500 mL แยกส่วนสารละลายชั้นล่างซึ่งเป็นชั้นของ methanol นำไประเหยตัวทำละลายออก ภายใต้ความดันต่ำ โดยใช้เครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40°C ได้สารสกัดชั้น methanol (ภาพประกอบ 14)

3. การแยกสารลดแรงดึงผิวชีวภาพและการทำสารให้บริสุทธิ์ขึ้น

3.1 การหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม สำหรับการแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (column chromatography)

นำสารตัวอย่างที่ต้องการแยกและทำให้บริสุทธิ์ขึ้น มาตรวจสอบด้วยโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง (TLC) เพื่อหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารต่างๆ ออกจากกัน ตรวจสอบสารที่แยกได้ด้วย *p*-anisaldehyde spray reagent (ภาคผนวก)

3.2 การทำโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ชนิดเร็ว (quick column chromatography)

นำส่วนสกัดชั้น methanol ที่ได้จากข้อ 2.2 มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ชนิดเร็วที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางคอลัมน์เท่ากับ 10 เซนติเมตร ที่บรรจุด้วย silica gel (0.063-0.200 nm) 140 g ซะด้วยตัวทำละลายเคลื่อนที่ที่เหมาะสมตามข้อ 3.1 ปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ในแต่ละระบบเท่ากับ 1,000 mL เก็บสารละลายที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ครั้งละ 100 mL ทำการตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ *p*-anisaldehyde spray reagent พ่นบนแผ่น TLC และนำไปให้ความร้อนที่ 80-100°C นาน 5-10 นาที เพื่อหาตำแหน่งของสารบน TLC ซึ่งจะปรากฏเป็นสีแตกต่างกัน รวมส่วนที่ให้ผล TLC เหมือนกันเข้าด้วยกัน แต่ละกลุ่มที่รวมได้นำไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำด้วยเครื่อง rotary evaporator จากนั้นนำสารแต่ละกลุ่มไปทดสอบค่ากิจกรรมการลดแรงดึงผิว นำส่วนที่มีค่ากิจกรรมการลดแรงดึงผิวสูงสุด มาแยกต่อด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (ภาพประกอบ 15)

3.3 การทำโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

นำสารกลุ่มที่มีค่ากิจกรรมของการลดแรงดึงผิวสูงสุด มาแยกและทำให้บริสุทธิ์

ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้อัตราส่วนสาร:silica gel ประมาณ 1:50 โดยน้ำหนัก ใช้วิธีบรรจุ silica gel แบบเปียก (normal phase column chromatography) และ ODS-AQ 120-S50 แบบแห้ง (reverse phase column chromatography) และชะด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ออกเป็นส่วน ๆ นำแต่ละส่วนไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำด้วยเครื่อง rotary evaporator และ/หรือเครื่อง rotational-vacuum-concentrator ตรวจสอบส่วนที่แยกได้ด้วยเทคนิค TLC และหาตำแหน่งของสารบนแผ่น TLC โดยใช้ *p*-anisaldehyde spray reagent ฟ้นบนแผ่น TLC และนำไปให้ความร้อนที่ 80-100°C นาน 5-10 นาที รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน นำสารแต่ละกลุ่มไปทดสอบค่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิวแล้วนำส่วนที่มีค่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิวสูงสุดมาแยกต่อด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ทำเช่นนี้จนได้สารลดแรงตึงผิวที่บริสุทธิ์ที่ทราบค่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิว (ภาพประกอบ 15)

4. การวัดกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

- 4.1 นำสารตัวอย่างแต่ละส่วนที่ต้องการวัดกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวไปละลายใน methanol หรือ ethanol ให้มีความเข้มข้น 10 mg/mL
- 4.2 ใช้ syringe ดูด mineral oil หยดใส่ฝ้า polystyrene ของจานหลุม 96 หลุม หลุมละ 2 μ L แล้วตั้งทิ้งไว้ 1-2 ชั่วโมง เพื่อให้ oil กระจายเป็นแผ่นฟิล์มบาง
- 4.3 ใช้ syringe ดูดสารละลายตัวอย่างในข้อ 4.1 หยดลงในหลุมที่มี mineral oil ที่เตรียมได้จากข้อ 4.2 หลุมละ 2 μ L (ทำ 3 ซ้ำ) แล้วตั้งทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที (ตัวทำละลายเป็น methanol) หรือ 5 นาที (ตัวทำละลายเป็น ethanol) เพื่อให้ตัวทำละลายระเหยไปหมด
- 4.4 ใช้ syringe ดูดน้ำกลั่นหยดใส่หลุมในข้อ 4.3 หลุมละ 5 μ L แล้วตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที อ่านค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของหยดน้ำที่เกิดขึ้น ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่มีสเกลวัดบันทึกผล หากเกิดการแตกของหยดน้ำ ทำให้ไม่สามารถอ่านค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของหยดน้ำได้จะเรียกว่า drop collapse ทั้งนี้เนื่องมาจากสารตัวอย่างมีกิจกรรมการลดแรงตึงผิวสูง ให้นำสารตัวอย่างที่เตรียมไว้ในข้อ 4.1 มาเจือจางความเข้มข้นลงครึ่งละ 10 เท่า จนกว่าจะสามารถอ่านค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของหยดน้ำได้
- 4.5 นำค่าที่อ่านได้ของทุกหลุมมาหาค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของหยดน้ำเปรียบเทียบกับค่าของ control
- 4.6 สำหรับ control ใช้ตัวทำละลายแทนสารละลายตัวอย่างในข้อ 4.1 และทำการทดลองเช่นเดียวกับ ข้อ 4.2-4.4
- 4.7 เมื่อทำแยกสารจนได้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพบริสุทธิ์แล้ว จะทำการวัดค่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบริสุทธิ์เปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาตรฐานและสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์มาตรฐาน ตามวิธีการข้างต้น

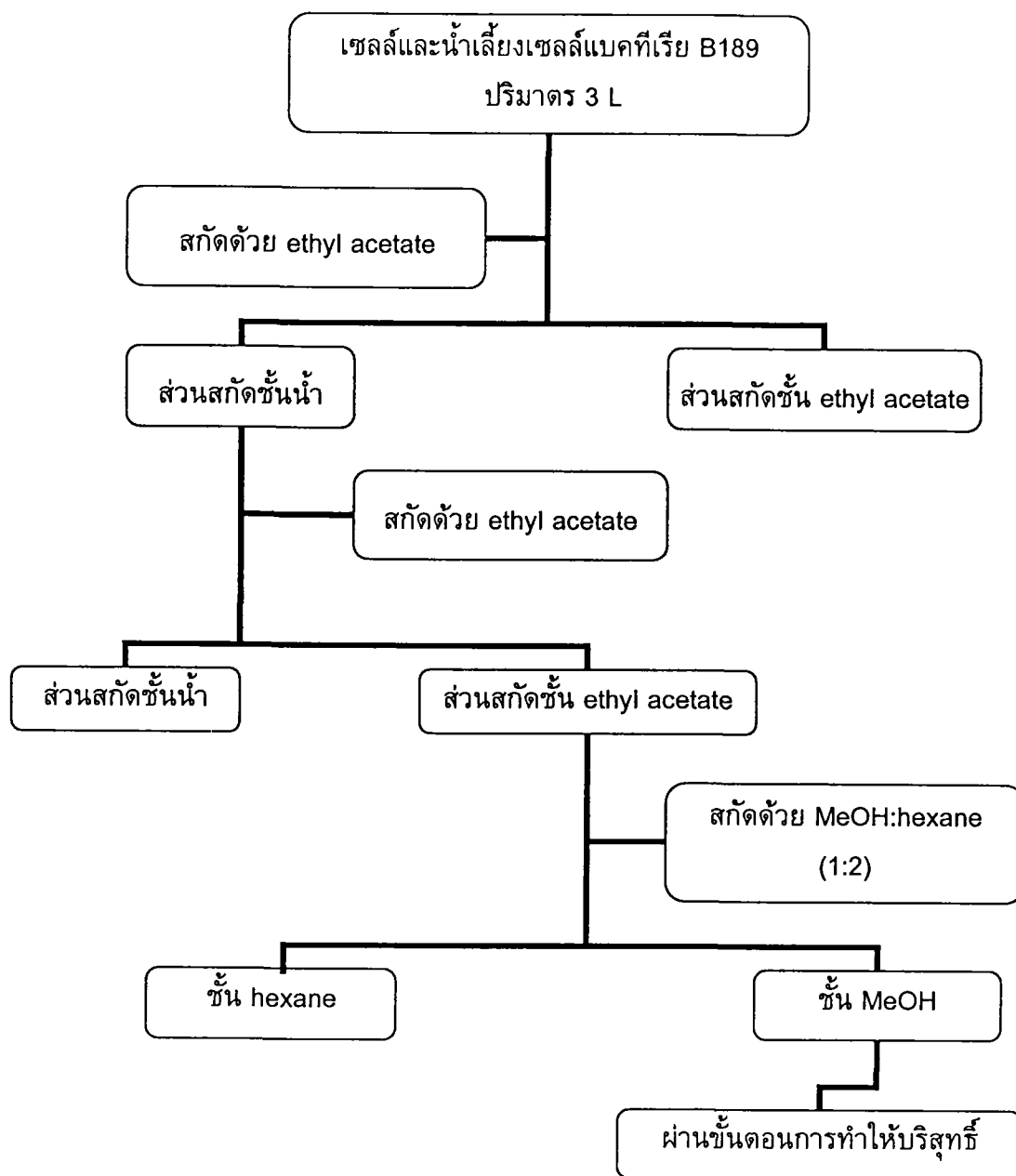
หมายเหตุ หากเส้นผ่านศูนย์กลางของหยดน้ำมีค่ามาก หมายความว่า มีค่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิวสูง

5. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

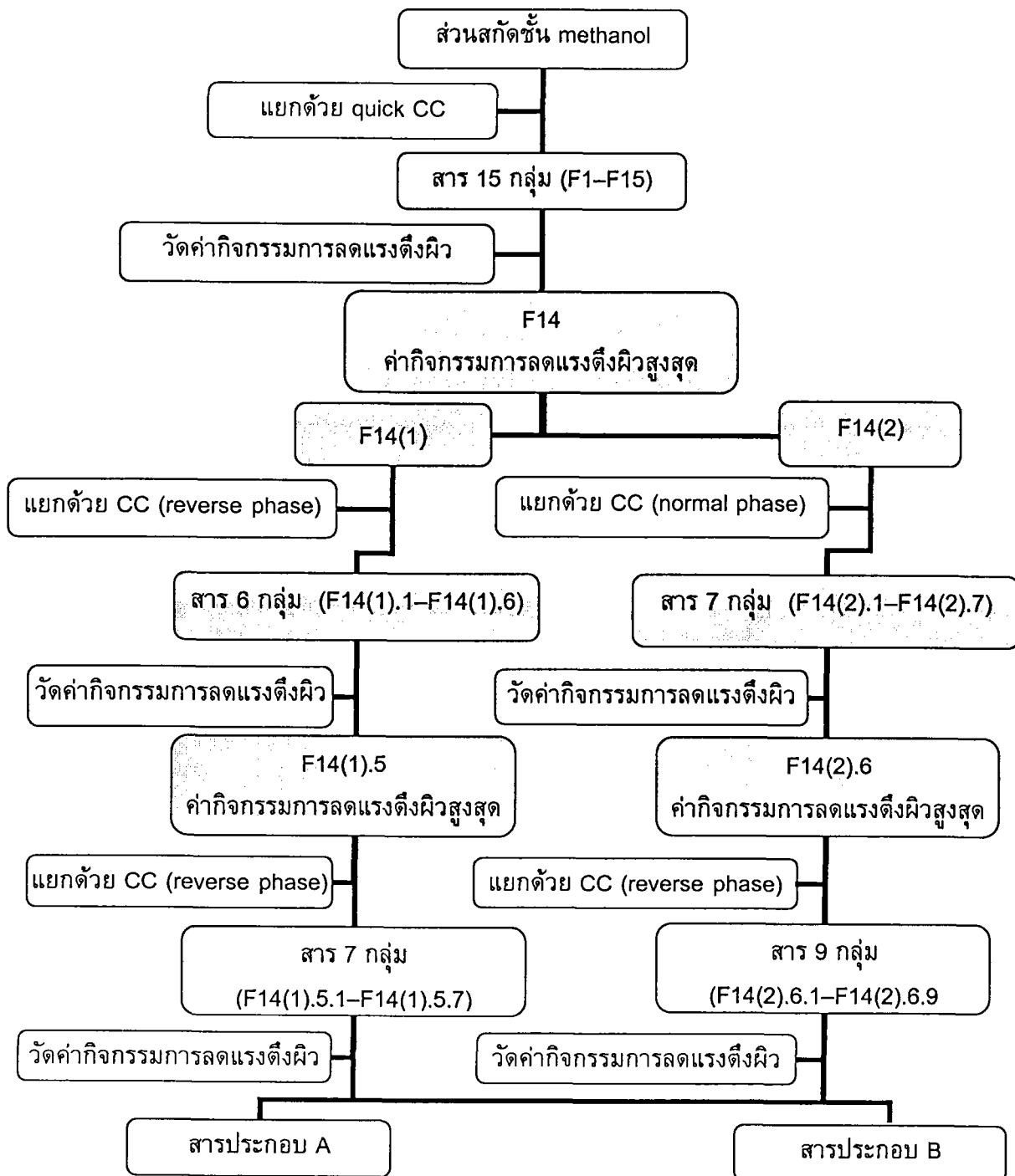
นำสารลดแรงตึงผิวบริสุทธิ์ที่แยกได้มาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ดังนี้

5.1 การวิเคราะห์ด้วยนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR) สำหรับ 300 MHz และ 600 MHz ^1H NMR spectra ใช้ deuteromethanol เป็นตัวทำละลาย สำหรับ 150 MHz ^{13}C NMR spectra ใช้ deuteriochloroform เป็นตัวทำละลาย และรายงานในหน่วย δ ที่ downfield จาก TMS ซึ่งใช้เป็น internal standard (δ 0.00)

5.2 การวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรีใช้คอลัมน์ DB-1 (0.25 mm I.D. x 30 m, 0.25 μm) ใช้ L-rhamnose, L-fucose, 3-hydroxydecanoic acid และ 3-hydroxydodecanoic acid methyl ester เป็นสารมาตรฐาน รายงานผลในหน่วย retention time โดยมี inositol เป็น internal standard



ภาพประกอบ 14 แสดงขั้นตอนการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย B189



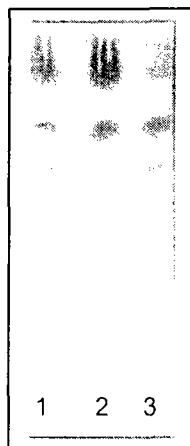
ภาพประกอบ 15 แสดงขั้นตอนการแยกและทำสารให้บริสุทธิ์

บทที่ 4

ผลการวิจัย

ผลการเลี้ยงแบคทีเรีย B189 เพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

การศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย B189 เพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย B189 ในอาหารเหลว oil selective medium ในภาวะขวดเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 36, 72 และ 168 ชั่วโมง หลังจากสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพออกจากเซลล์และน้ำเลี้ยงเซลล์ ได้ส่วนสกัดชั้น methanol เป็นของเหลวสีน้ำตาลแดง ปริมาณ 0.71 g, 0.84 g, และ 0.76 g ตามลำดับ จากการตรวจสอบด้วย TLC พบว่าส่วนสกัดชั้น methanol ของแบคทีเรีย B189 ที่เลี้ยงเป็นเวลา 36, 72 และ 168 ชั่วโมง ละลาย methanol ที่ความเข้มข้น 10 mg/mL ให้ผล TLC คล้ายคลึงกัน ดังแสดงในภาพประกอบ 16 จึงนำไปวัดค่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิว พบว่า ส่วนสกัดชั้น methanol ที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรีย เป็นเวลานาน 36 ชั่วโมง ให้ค่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิวสูงที่สุด ดังแสดงในตาราง 7 จึงเลือกเวลา 36 ชั่วโมง เป็นเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรีย B189 เพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่จะนำไปศึกษาองค์ประกอบทางเคมีต่อไป



ภาพประกอบ 16 TLC ของส่วนสกัดชั้น methanol ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในระยะเวลาต่าง ๆ กัน ละลายใน methanol ที่ความเข้มข้น 10 mg/mL ในระบบตัวทำละลาย chloroform:methanol:น้ำ (65:15:2) ฟันด้วย *p*-anisaldehyde reagent

- (1) เลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง
- (2) เลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง
- (3) เลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง

ผลการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรียและน้ำเลี้ยงเซลล์

แบคทีเรีย

1 สกัดด้วย ethyl acetate

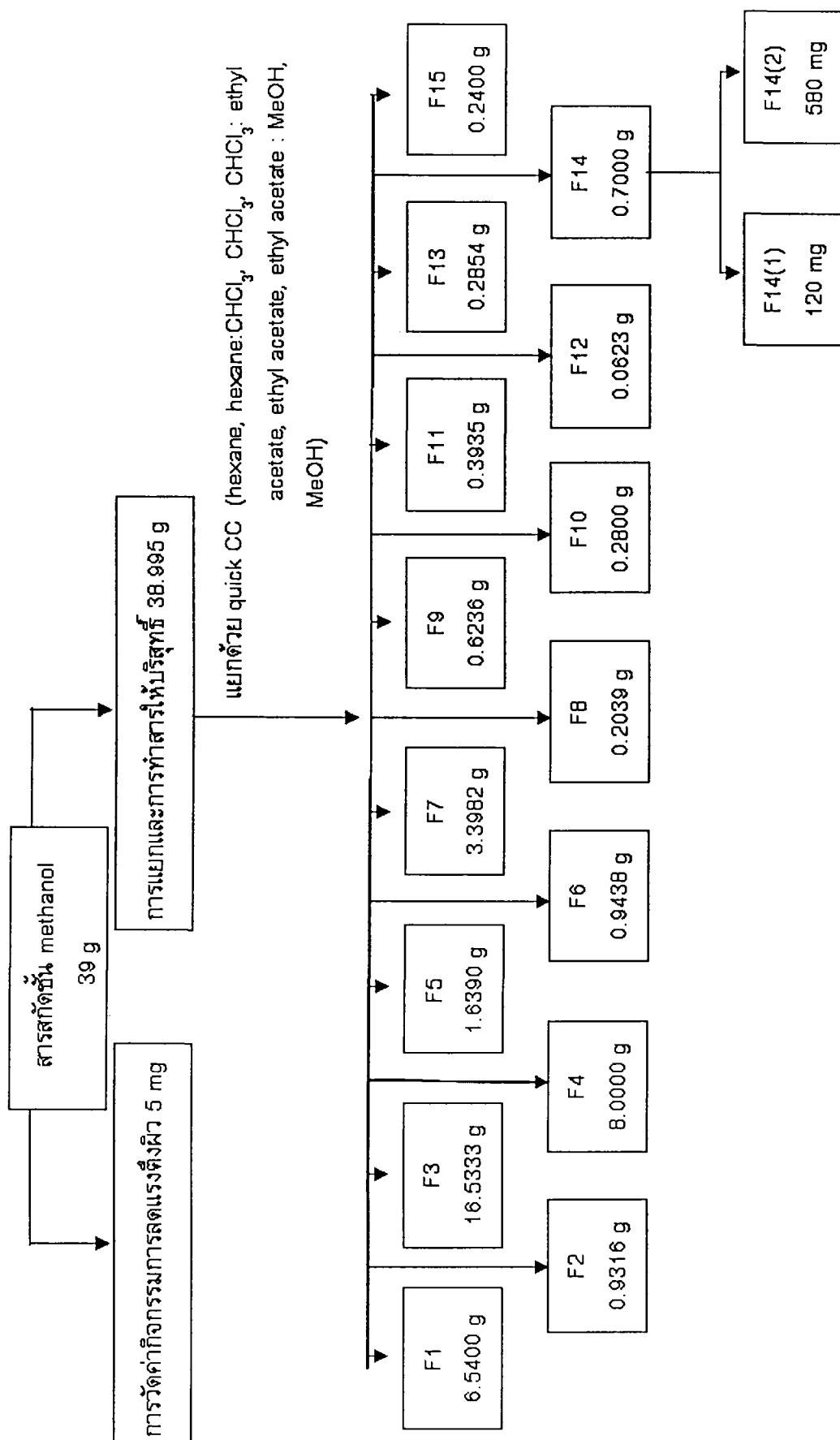
เซลล์และน้ำเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย B189 ที่ได้จากข้อ 1 เมื่อนำไปสกัดด้วย ethyl acetate 2 รอบ ได้ส่วนสกัดชั้น ethyl acetate เป็นของเหลวลักษณะคล้ายน้ำมันสีน้ำตาลแดง ปริมาณ 115 g

2 สกัดด้วยสารละลายผสมระหว่าง hexane:methanol

สารสกัดชั้น ethyl acetate เมื่อละลายด้วย methanol และนำมาแบ่งส่วนการละลายด้วย hexane นำส่วนสกัดชั้น methanol มาระเหยแห้งจนได้เป็นของเหลวลักษณะคล้ายน้ำมันสีน้ำตาลแดงเข้ม ปริมาณ 39 g

ผลการแยกสารสกัดชั้น methanol และการทำสารให้บริสุทธิ์ขึ้น

1. ผลการนำส่วนสกัดชั้น methanol ปริมาณ 38.995 g ไปแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ชนิดเร็ว เก็บเป็นส่วนๆ ได้ทั้งสิ้น 200 ส่วน เมื่อนำแต่ละส่วนที่เก็บได้ไปตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC พบว่า มีรูปแบบการเคลื่อนที่และลักษณะของสารที่แตกต่างกัน 15 รูปแบบ จึงรวมส่วนที่มีรูปแบบเดียวกันเป็นกลุ่มๆ ได้สาร 15 กลุ่ม (F1-F15) หลังจากนั้นนำแต่ละส่วนไประเหยแห้งได้สารมีลักษณะและปริมาณแตกต่างกัน ได้แก่ สารที่มีลักษณะเป็นน้ำมัน, สารคล้ายขี้ผึ้ง และสารมีลักษณะเหนียวหนืด ผลการตรวจสอบสารที่แยกจากส่วนสกัด methanol ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ชนิดเร็วแสดงในภาพประกอบ 17, ภาพประกอบ 18 และตาราง 2



ภาพประกอบ 17 แผนภูมิแสดงผลการแยกสารสกัดขึ้น methanol ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบเร็ว



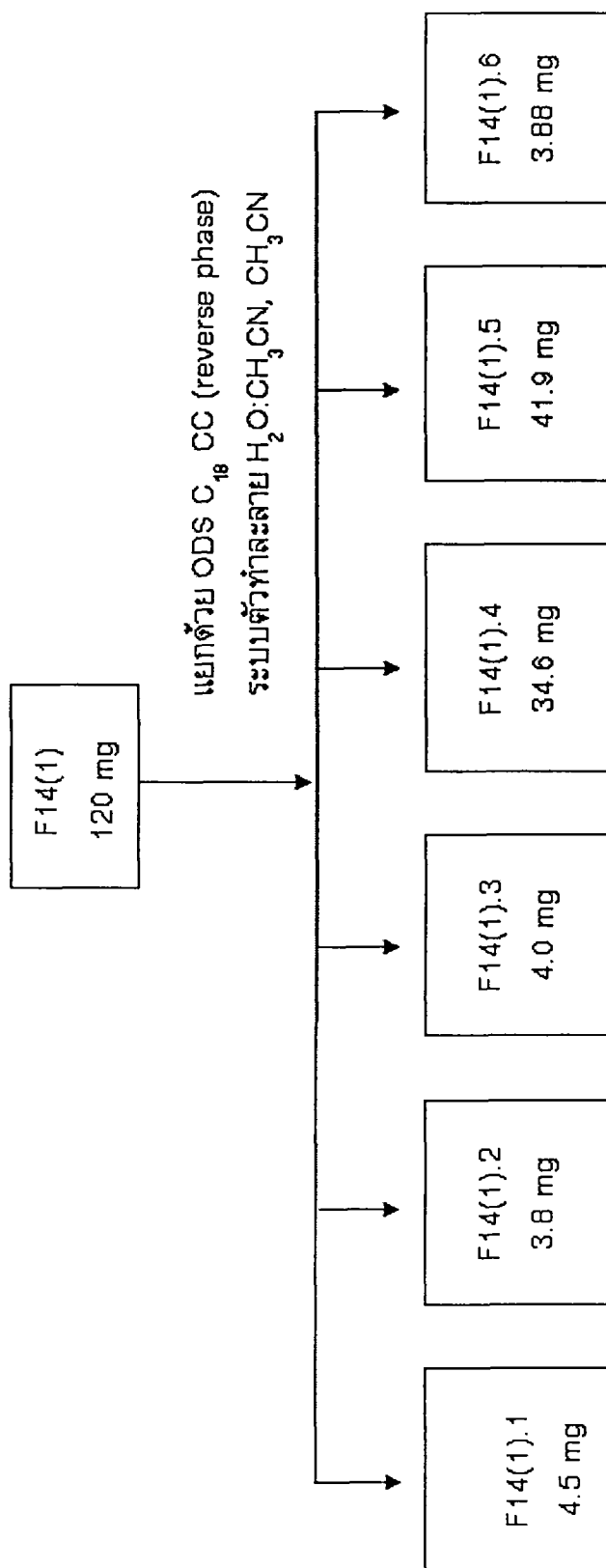
ภาพประกอบ 18 TLC plate ของ F1-F15 ที่แยกได้จากส่วนสกัดชั้น methanol ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ชนิดเร็วที่ความเข้มข้น 10 mg/mL (spot 1 μ L) ในระบบตัวทำละลายเคลื่อนที่ chloroform:methanol (90:10) พ่นด้วย *p*-anisaldehyde reagent

ตาราง 2 ผลการแยกส่วนสกัด methanol ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ชนิดเร็ว

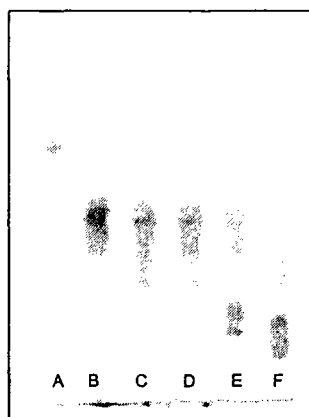
ตัวทำละลาย	สารกลุ่ม	ปริมาณ	ลักษณะสาร
hexane:CHCl ₃	(100:0)	F1	น้ำมันสีเหลือง
	(80:20)	F2	สารคล้ายขี้ผึ้งสีขาวขุ่น
	(80:20) - (70:30)	F3	น้ำมันสีน้ำตาลเข้ม
	(70:30) - (50:50)	F4	น้ำมันสีเหลือง
	(40:60)	F5	น้ำมันสีน้ำตาลเข้ม
	(20:80) - (0:100)	F6	สารเหนียวสีน้ำตาลเข้ม
CHCl ₃ :ethyl acetate	(95:5)	F7	สารคล้ายขี้ผึ้งสีน้ำตาลทอง
	(90:10)	F8	สารคล้ายขี้ผึ้งสีเหลือง
	(80:20)	F9	สารคล้ายขี้ผึ้งสีน้ำตาล
	(60:40) - (10:90)	F10	เหลือง
ethyl acetate:MeOH	(100:0) - (90:10)	F11	สารคล้ายขี้ผึ้งสีน้ำตาลเข้ม
	(90:10)	F12	น้ำมันสีน้ำตาลดำ
	(90:10) - (80:20)	F13	น้ำมันสีน้ำตาลดำ
	(80:20) - (50:50)	F14	สารเหนียวสีน้ำตาลเข้ม
	(50:50) - (0:100)	F15	สารเหนียวสีน้ำตาลเข้ม สารเหนียวสีน้ำตาลดำ

จากการนำแต่ละกลุ่มสาร (F1–F15) ไปวัดค่ากิจกรรมการลดแรงดึงผิว พบว่าสารกลุ่ม F14 ซึ่งแยกได้จากระบบตัวทำละลาย ethyl acetate:MeOH (80:20) ถึง (50:50) มีค่ากิจกรรมการลดแรงดึงผิวสูงที่สุด (ตาราง 8) จึงนำสารกลุ่ม F14 มาแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ F14(1) 120 mg และ F14(2) 580 mg แล้วนำมาแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

2. ผลการนำสารกลุ่ม F14(1) ปริมาณ 120 mg ไปแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ เก็บส่วนที่ชะได้ครั้งละ 5–20 mL เมื่อนำแต่ละส่วนที่เก็บได้ไปตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC ด้วย ODS-TLC plate พบว่า มีรูปแบบการเคลื่อนที่และลักษณะของสารที่แตกต่างกัน 6 รูปแบบ จึงรวมส่วนที่มีรูปแบบเดียวกันให้เป็นกลุ่มๆ ได้สาร 6 กลุ่ม (F14(1).1–F14(1).6) ซึ่งมีลักษณะเป็นน้ำมันสีเหลืองจนถึงน้ำตาล และสารเหนียวสีน้ำตาล มีปริมาณแตกต่างกัน ผลการตรวจสอบสารกลุ่ม F14(1) ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์แสดงในภาพประกอบ 19, ภาพประกอบ 20 และตาราง 3



ภาพประกอบ 19 แผนภูมิแสดงผลการแยกสารกลุ่ม F14(1) ให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วย ODS C₁₈ CC



A = F14(1).1

B = F14(1).2

C = F14(1).3

D = F14(1).4

E = F14(1).5

F = F14(1).6

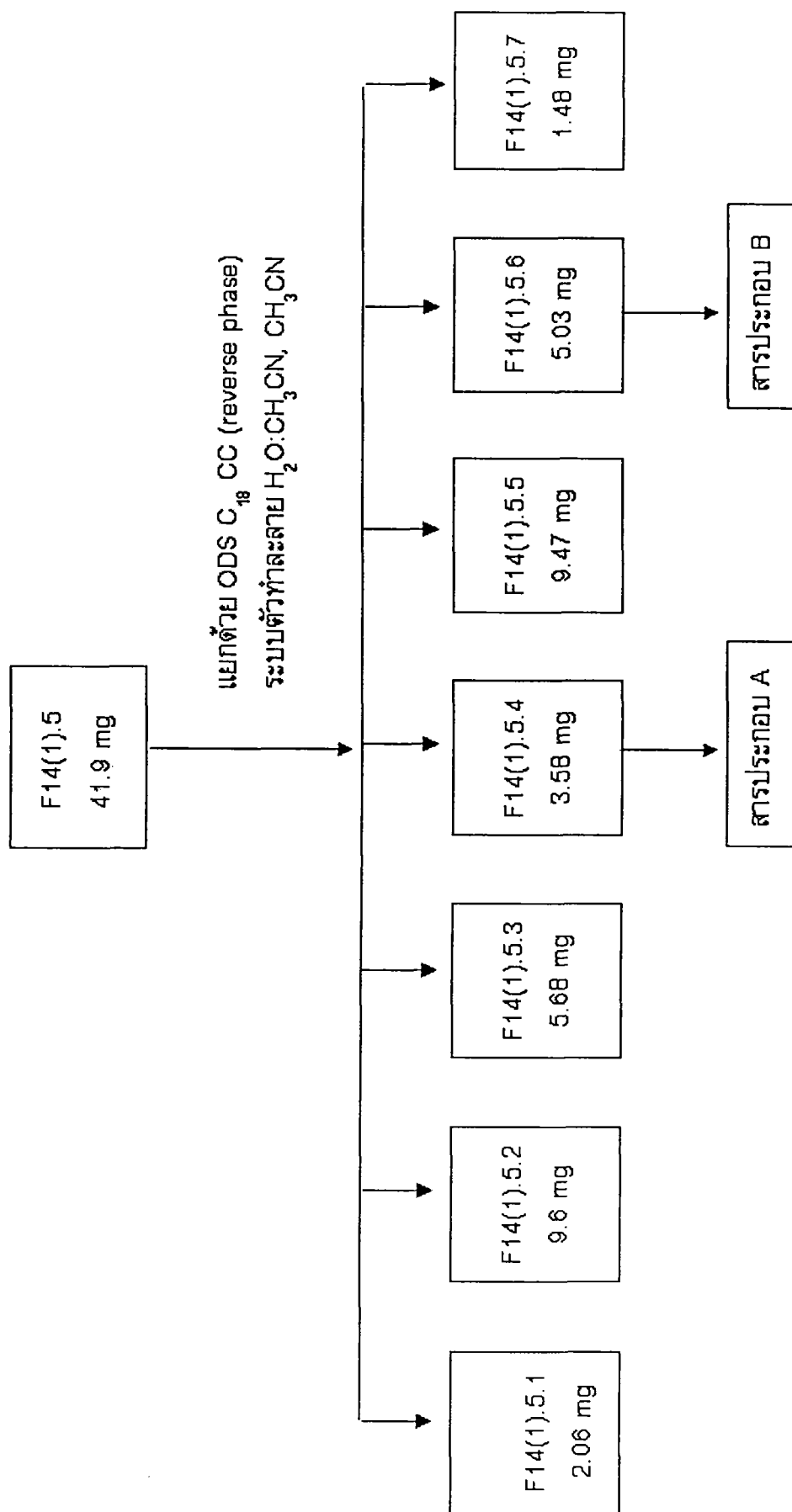
ภาพประกอบ 20 ODS-TLC plate ของ F14(1).1-F14(1).6 ที่แยกได้จากสารกลุ่ม F14(1) ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ที่ความเข้มข้น 10 mg/mL (spot 2 μ L) ในระบบ (reverse phase) ตัวทำละลายเคลื่อนที่ $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (60:40) พ่นด้วย *p*-anisaldehyde reagent

ตาราง 3 ผลการแยกสารกลุ่ม F14(1) ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (reverse phase)

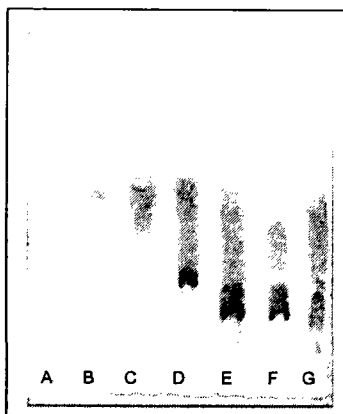
ตัวทำละลาย	สารกลุ่ม	ปริมาณ	ลักษณะสาร
$\text{H}_2\text{O} : \text{CH}_3\text{CN}$ (10:90) - (80:20)	F14(1).1	4.5 mg	น้ำมันสีน้ำตาลอ่อน
(65:35)	F14(1).2	3.8 mg	น้ำมันสีขาวเหลือง
(60:40)	F14(1).3	4.0 mg	น้ำมันสีเหลือง
(42:58) - (50:50)	F14(1).4	34.6 mg	น้ำมันสีเหลือง
(40:60) - (30:70)	F14(1).5	41.9 mg	สารเหนียวสีน้ำตาล
(20:80) - (0:100)	F14(1).6	3.88 mg	สารเหนียวสีน้ำตาล

จากการนำแต่ละกลุ่มสาร (F14(1).1–F14(1).6) ไปวัดค่ากิจกรรมการลดแรงดึงผิว พบว่าสารกลุ่ม 14(1).5 ซึ่งแยกได้จากระบบตัวทำละลาย $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$ (40:60) ถึง (30:70) มีค่ากิจกรรมการลดแรงดึงผิวสูงที่สุด (ตาราง 9) จึงนำสารกลุ่ม F14(1).5 ไปแยกต่อ

3. ผลการนำสารกลุ่ม F14(1).5 ปริมาณ 41.9 mg ไปแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบ คอลัมน์ เก็บส่วนที่ชะได้ครั้งละ 5–20 mL เมื่อนำแต่ละส่วนที่เก็บได้ไปตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC ด้วย ODS-TLC plate พบว่า มีรูปแบบการเคลื่อนที่และลักษณะของสารที่แตกต่างกัน 7 รูปแบบ จึงรวมส่วนที่มีรูปแบบเดียวกันเป็นกลุ่มๆ ได้สาร 7 กลุ่ม (F14(1).5.1–F14(1).5.7) ซึ่งมีลักษณะเป็น น้ำมันสีเหลืองจนถึงน้ำตาล และของแข็งสีขาว มีปริมาณแตกต่างกัน ผลการตรวจสอบสารกลุ่ม F14(1).5 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์แสดงในภาพประกอบ 21, ภาพประกอบ 22 และตาราง 4



ภาพประกอบ 21 แผนภูมิแสดงผลการแยกสารกลุ่ม F14(1).5 ให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วย ODS C₁₈ CC



A = F14(1).5.1 B = F14(1).5.2
 C = F14(1).5.3 D = F14(1).5.4
 E = F14(1).5.5 E = F14(1).5.6
 G = F14(1).5.7

ภาพประกอบ 22 ODS-TLC plate ของ F14(1).5.1-F14(1).5.7 ที่แยกได้จากสารกลุ่ม F14(1) ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ที่ความเข้มข้น 10 mg/mL (spot 2 μ L) ในระบบ (reverse phase) ตัวทำละลายเคลื่อนที่ $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (60:40) พ่นด้วย *p*-anisaldehyde reagent

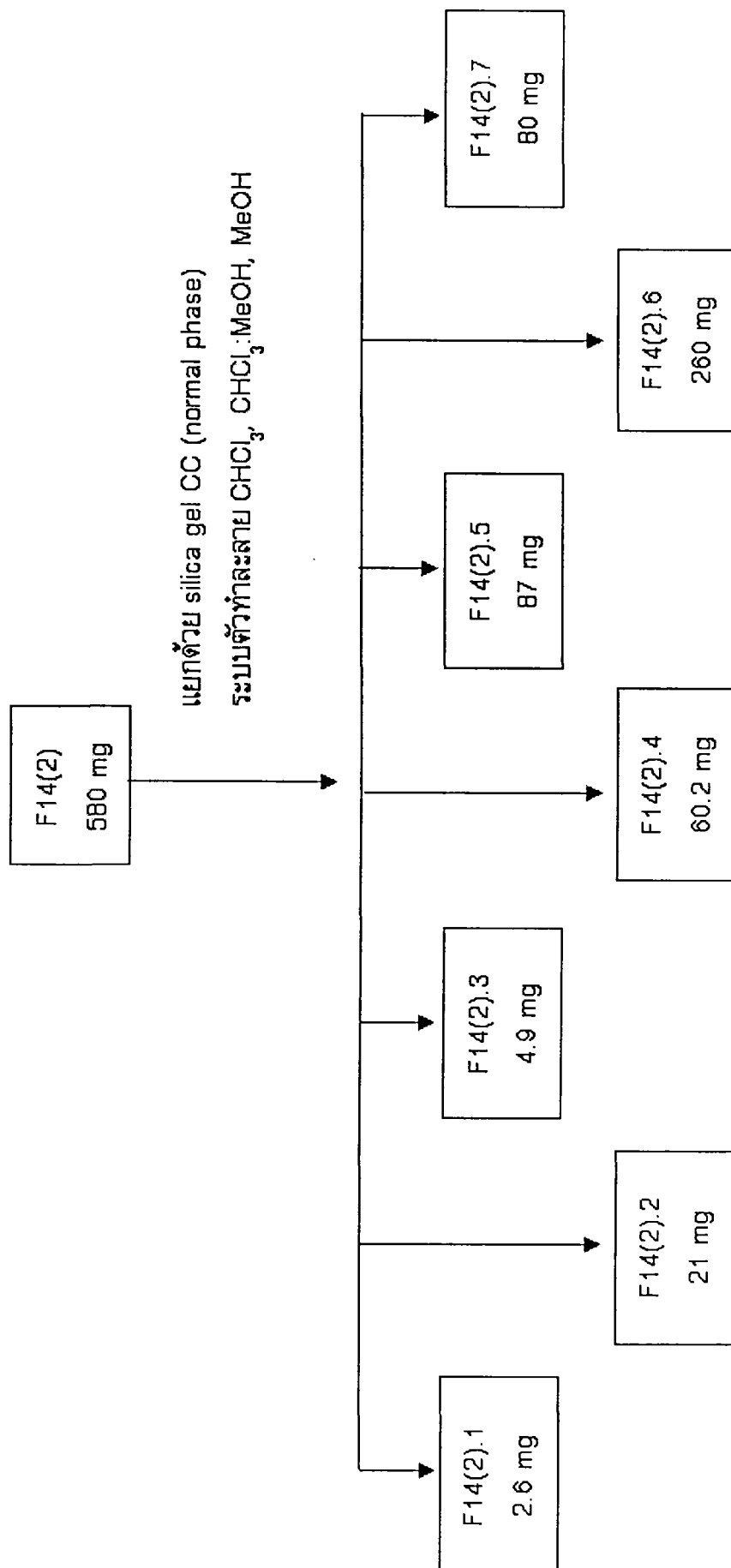
ตาราง 4 ผลการแยกสารกลุ่ม F14(1).5 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (reverse phase)

ตัวทำละลาย	สารกลุ่ม	ปริมาณ	ลักษณะสาร
$\text{H}_2\text{O} : \text{CH}_3\text{CN}$ (80:20) - (70:30)	F14(1).5.1	2.06 mg	น้ำมันสีน้ำตาลอ่อน
(70:30) - (61:39)	F14(1).5.2	9.60 mg	น้ำมันสีเหลืองอ่อน
(61:39) - (50:50)	F14(1).5.3	5.68 mg	น้ำมันสีเหลืองอ่อน
(48:52)	F14(1).5.4	3.58 mg	ของแข็งสีขาว
(48:52) - (44:56)	F14(1).5.5	9.47 mg	น้ำมันสีเหลืองอ่อน
(42:58)	F14(1).5.6	5.03 mg	ของแข็งสีขาว
(40:60) - (0:100)	F14(1).5.7	1.48 mg	น้ำมันสีเหลืองอ่อน

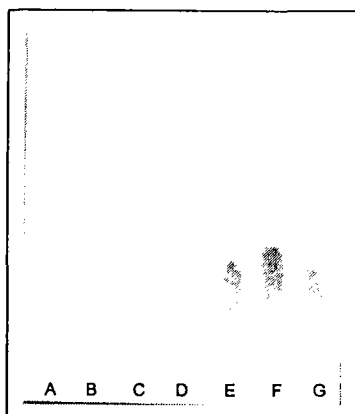
จากการนำแต่ละกลุ่มสาร (F14(1).5.1–F14(1).5.7) ไปวัดค่ากิจกรรมการลดแรงดึงผิวพบว่า สารกลุ่ม 14(1).5.4 และ F14(1).5.6 ซึ่งแยกได้จากระบบตัวทำละลาย $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$ (48:52) และ (42:58) ตามลำดับ มีค่ากิจกรรมการลดแรงดึงผิวสูงที่สุด (ตาราง 10)

สารกลุ่ม F14(1).5.4 และ F14(1).5.6 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคทาง TLC ด้วย ODS-TLC plate พบว่า เป็นสารบริสุทธิ์มีค่า $R_f = 0.2$ และ 0.125 ระบบตัวทำละลาย $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (60:40) ให้ชื่อว่า สารประกอบ A มีปริมาณ 3.58 mg และสารประกอบ B มีปริมาณ 5.03 mg ตามลำดับ (ภาพประกอบ 21, ภาพประกอบ 22) นำสารประกอบ A และสารประกอบ B ไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีต่อไป

4. ผลการนำสารกลุ่ม F14(2) ปริมาณ 580 mg ไปแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ เก็บส่วนที่ชะได้ครั้งละ 100–600 mL เมื่อนำแต่ละส่วนที่เก็บได้ไปตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC พบว่า มีรูปแบบการเคลื่อนที่และลักษณะของสารที่แตกต่างกัน 7 รูปแบบ จึงรวมส่วนที่มีรูปแบบเดียวกันเป็นกลุ่มๆ ได้สาร 7 กลุ่ม (F14(2).1–F14(2).7) ซึ่งมีลักษณะเป็นน้ำมันสีเหลืองอ่อนจนถึงน้ำตาลเข้ม, สารเหนียวสีน้ำตาล และสารลักษณะกึ่งของแข็งสีน้ำตาล มีปริมาณแตกต่างกัน ผลการตรวจสอบสารกลุ่ม F14(2) ด้วยโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์แสดงในภาพประกอบ 23, ภาพประกอบ 24 และตาราง 5



ภาพประกอบ 23 แผนภูมิแสดงผลการแยกสารกลุ่ม F14(2) ให้บริสุทธิ์ด้วย silica gel CC



A = F14(2).1 B = F14(2).2
 C = F14(2).3 D = F14(2).4
 E = F14(2).5 E = F14(2).6
 G = F14(2).7

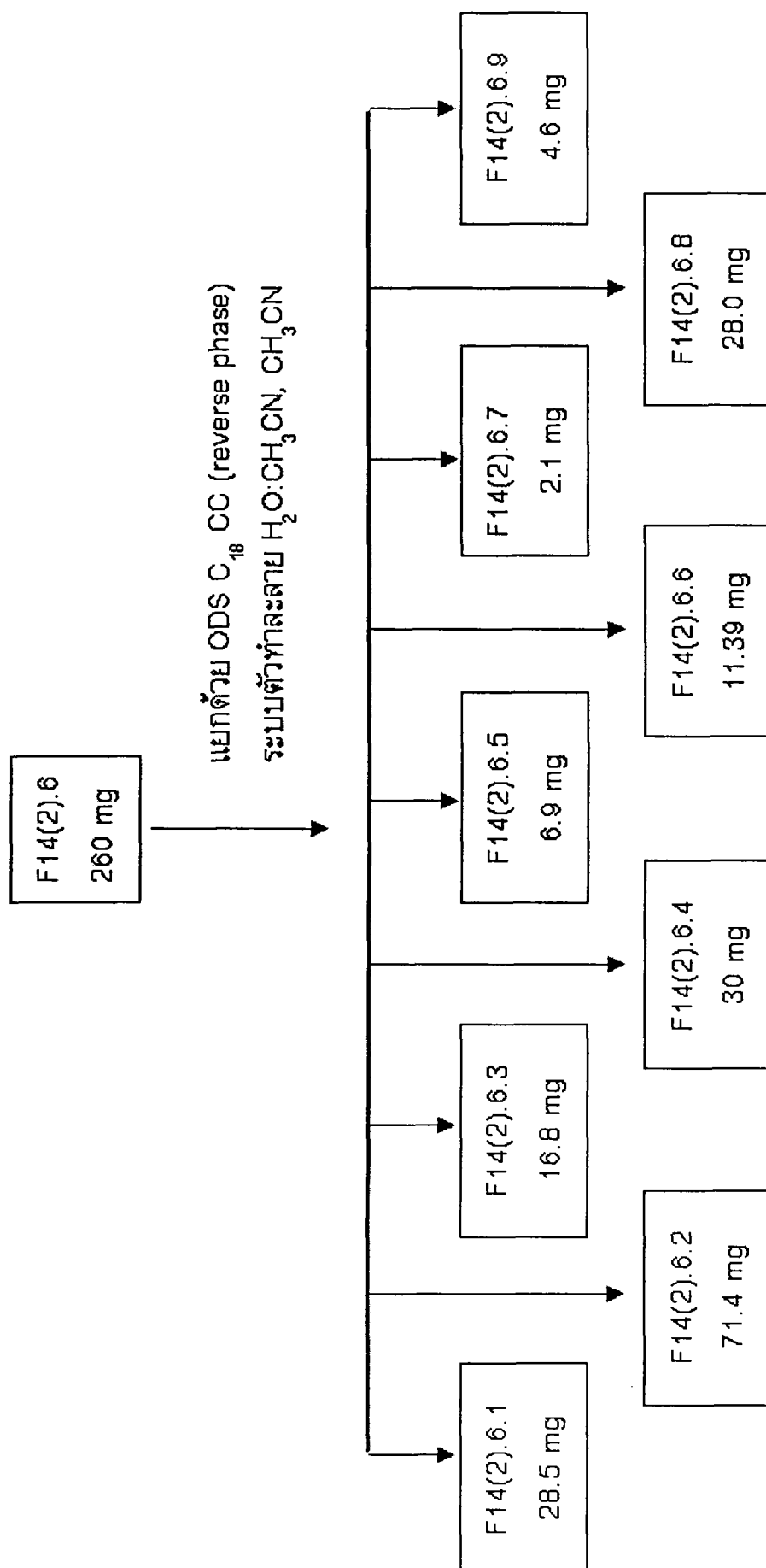
ภาพประกอบ 24 TLC plate ของ F14(2).1-F14(2).7 ที่แยกได้จากสารสกัดชั้น methanol
 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ที่ความเข้มข้น 10 mg/mL (spot 1 μ L) ในระบบตัวทำละลาย
 เคลื่อนที่ chloroform:methanol (70:30) ฟันด้วย *p*-anisaldehyde reagent

ตาราง 5 ผลการแยกสารกลุ่ม F14(2) ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (normal phase)

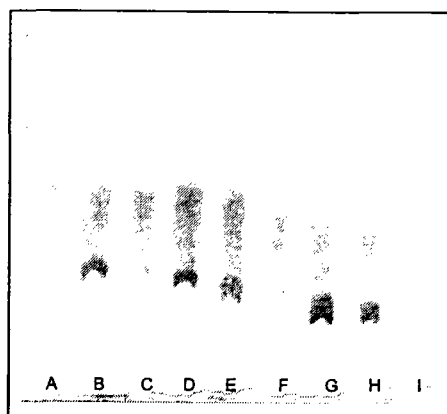
ตัวทำละลาย	สารกลุ่ม	ปริมาณ	ลักษณะสาร
CHCl ₃ : MeOH (100:0) - (95:5)	F14(2).1	2.60 mg	น้ำมันสีเหลืองอ่อน
(95:5)	F14(2).2	21.00 mg	น้ำมันสีน้ำตาล
(93:7)	F14(2).3	4.90 mg	กิ่งของแข็งสีน้ำตาล
(90:10) - (85:15)	F14(2).4	60.20 mg	น้ำมันสีน้ำตาล
(85:15)	F14(2).5	87.00 mg	น้ำมันสีเหลืองเข้ม
(80:20) - (70:30)	F14(2).6	260.00 mg	สารเหนียวสีน้ำตาลเข้ม
(70:30) - (0:100)	F14(2).7	80.00 mg	น้ำมันสีน้ำตาลอ่อน

นำกลุ่มสารที่แยกได้ (F14(2).1-F14(2).7) ไปตรวจสอบด้วยเทคนิคทาง TLC ด้วย ODS-TLC plate และเปรียบเทียบค่า R_f กับสารประกอบ A และสารประกอบ B พบว่าสารกลุ่ม F14(2).6 มีค่า R_f ตรงกับสารประกอบ A และสารประกอบ B และจากการวัดค่ากิจกรรมการลดแรงดึงผิวของกลุ่มสารที่แยกได้ พบว่า สารกลุ่ม 14(2).6 ซึ่งแยกได้จากระบบตัวทำละลาย $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (80:20) ถึง (70:30) มีค่ากิจกรรมการลดแรงดึงผิวสูงที่สุด (ตาราง 11) จึงนำสารกลุ่ม F14(2).6 มาแยกต่อ

5. ผลการนำสารกลุ่ม F14(2).6 ปริมาณ 260 mg ไปแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ เก็บส่วนที่ชะได้ครั้งละ 30–60 mL เมื่อนำแต่ละส่วนที่เก็บได้ไปตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC ด้วย ODS-TLC plate พบว่า มีรูปแบบการเคลื่อนที่และลักษณะของสารที่แตกต่างกัน 9 รูปแบบ จึงรวมส่วนที่มีรูปแบบเดียวกันเป็นกลุ่มๆ ได้สาร 9 กลุ่ม (F14(2).6.1–F14(2).6.9) ซึ่งมีลักษณะเป็นน้ำมันสีเหลืองอ่อนจนถึงน้ำตาล และของแข็งสีขาว มีปริมาณแตกต่างกัน ผลการตรวจสอบสารกลุ่ม F14(2).6 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์แสดงในภาพประกอบ 25, ภาพประกอบ 26 และตาราง 6



ภาพประกอบ 25 แผนภูมิแสดงผลการแยกสารกลุ่ม F14(2).6 ให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วย ODS C₁₈ CC



A = F14(2).6.1 B = F14(2).6.2
 C = F14(2).6.3 D = F14(2).6.4
 E = F14(2).6.5 E = F14(2).6.6
 G = F14(2).6.7 H = F14(2).6.8
 I = F14(2).6.9

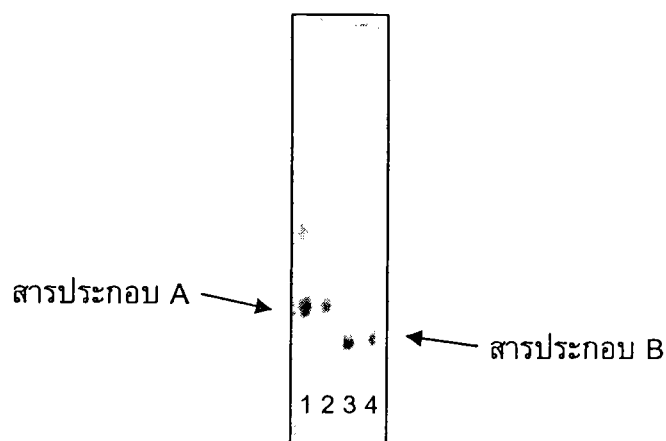
ภาพประกอบ 26 ODS-TLC plate ของ F14(2).6.1-F14(2).6.9 ที่แยกได้จากสารกลุ่ม F14(2).6 ด้วยโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ที่มีความเข้มข้น 10 mg/mL (spot 2 μ L) ในระบบ (reverse phase) ตัวทำละลายเคลื่อนที่ $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (60:40) ฟันด้วย *p*-anisaldehyde reagent

ตาราง 6 ผลการแยกสารกลุ่ม F14(2).6 ด้วยโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ (reverse phase)

ตัวทำละลาย		สารกลุ่ม	น้ำหนัก	ลักษณะสาร
$\text{H}_2\text{O} : \text{CH}_3\text{CN}$	(90:10) - (60:40)	F14(2).6.1	28.50 mg	น้ำมันสีน้ำตาลอ่อน
	(55:45) - (52:48)	F14(2).6.2	71.40 mg	น้ำมันสีเหลืองอ่อน
	(50:50)	F14(2).6.3	16.80 mg	น้ำมันสีเหลืองอ่อน
	(48:52)	F14(2).6.4	30.00 mg	ของแข็งสีขาว
	(48:52)	F14(2).6.5	6.90 mg	น้ำมันสีเหลืองอ่อน
	(46:54)	F14(2).6.6	11.39 mg	ของแข็งสีขาว
	(44:56)	F14(2).6.7	2.10 mg	น้ำมันสีเหลืองอ่อน
	(42:58)	F14(2).6.8	28.00 mg	ของแข็งสีขาว
	(40:60) - (0:100)	F14(2).6.9	4.60 mg	น้ำมันสีเหลืองอ่อน

จากการนำแต่ละกลุ่มสาร (F14(2).6.1–F14(2).6.9) ไปวัดค่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิว พบว่าสารกลุ่ม 14(2).6.4 และ F14(2).6.8 ซึ่งแยกได้จากระบบตัวทำละลาย $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$ (48:52) และ (42:58) ตามลำดับ มีค่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิวสูงที่สุด (ตาราง 12)

สารกลุ่ม F14(2).6.4 และ F14(2).6.8 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว ปริมาณ 30.00 mg และ 28.00 mg เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคทาง TLC ด้วย ODS-TLC plate พบว่า เป็นสารบริสุทธิ์ที่มีค่า $R_f = 0.2$ และ 0.125 ระบบตัวทำละลาย $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (60:40) เท่ากับสารประกอบ A และ สารประกอบ B จึงนำสารกลุ่ม F14(2).6.4 รวมเข้ากับสารประกอบ A และสารกลุ่ม F14(2).6.8 รวมเข้ากับสารประกอบ B ตามลำดับ ภาพประกอบ 27 แสดงการเคลื่อนที่ของสารประกอบ A และ สารประกอบ B เปรียบเทียบกับสารกลุ่ม F14(2).6.4 และ F14(2).6.8 บนตัวดูดซับ ODS-TLC plate ในระบบ reverse phase



ภาพประกอบ 27 ODS-TLC plate ของสารประกอบ A และ B ที่แยกจากคอลัมน์โครมาโทกราฟีในระบบ (reverse phase) ตัวทำละลาย $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (60:40) พ่นด้วย *p*-anisaldehyde reagent

- (1) สารประกอบ A ที่แยกได้จาก F14(1).5
- (2) สารกลุ่ม F14(2).6.4 ที่แยกได้จาก F14(2).6
- (3) สารประกอบ B ที่แยกได้จาก F14(1).5
- (4) สารกลุ่ม F14(2).6.8 ที่แยกได้จาก F14(2).6

ผลการวัดกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

1. ผลการวัดกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของสารสกัด methanol ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย B189 ในอาหารเหลว oil selective medium ในภาวะขวดเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 36, 72 และ 168 ชั่วโมง พบว่า ส่วนสกัด methanol ที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรีย เป็นเวลานาน 36 ชั่วโมง ให้ค่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิวสูงที่สุด ดังแสดงในตาราง 7

ตาราง 7 ผลการวัดค่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิวของสารสกัด methanol ละลายในตัวทำละลาย ethanol

สารที่ใช้ทดสอบ	MAD ^a	เส้นผ่านศูนย์กลางของหยดน้ำ (mm) $\pm$ S.D.
B 189 เลี้ยง 36 ชั่วโมง	0.2 μg	3.13 $\pm$ 0.07
B 189 เลี้ยง 72 ชั่วโมง	0.2 μg	2.78 $\pm$ 0.08
B 189 เลี้ยง 168 ชั่วโมง	20 μg	3.64 $\pm$ 0.27
Control		2.71 $\pm$ 0.04

^aMAD = minimum active dose (ปริมาณสารน้อยที่สุดที่ยังคงมีความสามารถในการลดแรงตึงผิว)

2. ผลการวัดกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของสารกลุ่มที่แยกได้จากสารสกัด methanol ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ชนิดเร็ว พบว่า สารในกลุ่ม F14 มีค่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิวสูงที่สุด ดังแสดงในตาราง 8

ตาราง 8 ผลการวัดค่ากิจกรรมการลดแรงดึงผิวของสารกลุ่มที่แยกได้จากสารสกัด methanol ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ชนิดเร็ว ละลายในตัวทำละลาย methanol

สารที่ใช้ทดสอบ	MAD	เส้นผ่านศูนย์กลางของหยดน้ำ (mm) $\pm$ S.D.
F1	20 μ g	2.78 $\pm$ 0.04
F2	20 μ g	3.11 $\pm$ 0.04
F3	20 μ g	2.89 $\pm$ 0.04
F4	20 μ g	3.20 $\pm$ 0.00
F5	20 μ g	3.13 $\pm$ 0.12
F6	20 μ g	3.33 $\pm$ 0.00
F7	2 μ g	4.29 $\pm$ 0.08
F8	0.2 μ g	2.64 $\pm$ 0.08
F9	0.2 μ g	2.73 $\pm$ 0.12
F10	20 μ g	3.53 $\pm$ 0.07
F11	20 μ g	3.38 $\pm$ 0.10
F12	20 μ g	4.24 $\pm$ 0.10
F13	0.2 μ g	2.82 $\pm$ 0.10
F14	0.2 μ g	2.93 $\pm$ 0.07
F15	0.2 μ g	2.71 $\pm$ 0.04
Control		2.58 $\pm$ 0.04

3. ผลการวัดกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของสารที่แยกได้จากสารกลุ่ม F14(1) ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ พบว่า สารในกลุ่ม F14(1).5 มีค่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิวสูงที่สุด ดังแสดงในตาราง 9

ตาราง 9 ผลการวัดค่ากิจกรรมการลดแรงดึงผิวของสารกลุ่มที่แยกได้จากสารกลุ่ม F14 (1)
ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ละลายในตัวทำละลาย methanol

สารที่ใช้ทดสอบ	MAD	เส้นผ่านศูนย์กลางของหยดน้ำ (mm) $\pm$ S.D.
F14(1).1	0.2 μ g	2.60 $\pm$ 0.07
F14(1).2	0.2 μ g	2.67 $\pm$ 0.13
F14(1).3	0.2 μ g	2.73 $\pm$ 0.07
F14(1).4	0.2 μ g	2.89 $\pm$ 0.04
F14(1).5	0.2 μ g	3.07 $\pm$ 0.00
F14(1).6	0.2 μ g	2.80 $\pm$ 0.00
Control		2.49 $\pm$ 0.04

4. ผลการวัดกิจกรรมของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพของสารที่แยกได้จากสารกลุ่ม F14(1).5 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ พบว่า สารในกลุ่ม F14(1).5.4 และ F14(1).5.6 มีค่ากิจกรรมการลดแรงดึงผิวสูงที่สุด ดังแสดงในตาราง 10

ตาราง 10 ผลการวัดค่ากิจกรรมการลดแรงดึงผิวของสารกลุ่มที่แยกได้จากสารกลุ่ม F14(1).5
ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ละลายในตัวทำละลาย methanol

สารที่ใช้ทดสอบ	MAD	เส้นผ่านศูนย์กลางของหยดน้ำ(mm) $\pm$ S.D.
F14(1).5.1	0.2 μ g	2.76 $\pm$ 0.04
F14(1).5.2	0.2 μ g	2.73 $\pm$ 0.00
F14(1).5.3	0.2 μ g	2.82 $\pm$ 0.04
F14(1).5.4	0.2 μ g	3.44 $\pm$ 0.08
F14(1).5.5	0.2 μ g	2.87 $\pm$ 0.13
F14(1).5.6	0.2 μ g	3.51 $\pm$ 0.08
F14(1).5.7	0.2 μ g	2.80 $\pm$ 0.07
Control		2.67 $\pm$ 0.07

5. ผลการวัดกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของสารที่แยกได้จากสารกลุ่ม F14 (2) ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ พบว่า สารในกลุ่ม F14(1).6 มีค่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิวสูงที่สุด ดังแสดงในตาราง 11

ตาราง 11 ผลการวัดค่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิวของสารกลุ่มที่แยกได้จากสารกลุ่ม F14(2) ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ละลายในตัวทำละลาย methanol

สารที่ใช้ทดสอบ	MAD	เส้นผ่านศูนย์กลางของหยดน้ำ(mm) $\pm$ S.D.
F14(2).1	20 μ g	3.11 $\pm$ 0.10
F14(2).2	20 μ g	3.69 $\pm$ 0.04
F14(2).3	20 μ g	4.18 $\pm$ 0.04
F14(2).4	0.2 μ g	2.76 $\pm$ 0.15
F14(2).5	0.2 μ g	2.80 $\pm$ 0.07
F14(2).6	0.2 μ g	2.98 $\pm$ 0.04
F14(2).7	2 μ g	3.64 $\pm$ 0.04
Control		2.47 $\pm$ 0.00

6. ผลการวัดกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของสารที่แยกได้จากสารกลุ่ม F14(2).6 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ พบว่า สารในกลุ่ม F14(2).6.4 และ F14(2).6.8 มีค่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิวสูงที่สุด ดังแสดงในตาราง 12

ตาราง 12 ผลการวัดค่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิวของสารกลุ่มที่แยกได้จากสารกลุ่ม F14(2).6 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ละลายในตัวทำละลาย methanol

สารที่ใช้ทดสอบ	MAD	เส้นผ่านศูนย์กลางของหยดน้ำ(mm) $\pm$ S.D.
F14(2).6.1	0.2 μ g	2.71 $\pm$ 0.14
F14(2).6.2	0.2 μ g	2.67 $\pm$ 0.00
F14(2).6.3	0.2 μ g	2.89 $\pm$ 0.04
F14(2).6.4	0.2 μ g	3.24 $\pm$ 0.08
F14(2).6.5	0.2 μ g	3.04 $\pm$ 0.15
F14(2).6.6	0.2 μ g	3.07 $\pm$ 0.07
F14(2).6.7	0.2 μ g	2.98 $\pm$ 0.14
F14(2).6.8	0.2 μ g	3.31 $\pm$ 0.08
F14(2).6.9	0.2 μ g	2.69 $\pm$ 0.04
Control		2.47 $\pm$ 0.00

7. ผลการวัดกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของสารประกอบ A, สารประกอบ B เปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาตรฐาน 2 ชนิด (Sophorolipid, Mannosylerythritol lipid) และสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์มาตรฐาน 2 ชนิด (Sodium dodecyl sulfate, Tween 80) พบว่า สารประกอบ B มีค่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิวสูงที่สุด ดังแสดงในตาราง 13

ตาราง 13 ผลการวัดค่ากิจกรรมการลดแรงดึงผิวของสารประกอบ A, สารประกอบ B
เปรียบเทียบกับสารลดแรงดึงผิวชีวภาพมาตรฐาน และสารลดแรงดึงผิวสังเคราะห์มาตรฐาน
ละลายในตัวทำละลาย methanol

สารที่ใช้ทดสอบ	MAD	เส้นผ่านศูนย์กลางของหยดน้ำ (mm) $\pm$ S.D.
SL ^a	2 μ g	3.04 $\pm$ 0.08
MEL ^b	0.2 μ g	2.60 $\pm$ 0.00
SDS ^c	20 μ g	3.47 $\pm$ 0.00
Tween 80	2 μ g	3.42 $\pm$ 0.10
สารประกอบ A	0.2 μ g	3.24 $\pm$ 0.08
สารประกอบ B	0.2 μ g	3.31 $\pm$ 0.08
Control		2.51 $\pm$ 0.04

^aSL = Sophorolipid

^bMEL = Mannosylerythritol lipid

^cSDS = Sodium dodecyl sulfate

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงดึงผิวชีวภาพกึ่งบริสุทธิ์ที่แยกได้นำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี โดยใช้ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี

สารประกอบ A

สารประกอบ A เป็นของแข็งสีขาว น้ำหนัก 33.58 mg ค่า $R_f = 0.2$ ใช้ ODS-TLC plate ระบบตัวทำละลาย ($\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ 60:40)

¹H NMR (CD_3OD , 600 MHz) δ (ppm) :

0.94	6H (dd, $J = 7.1, 6.6$ Hz)	H-10, H-20
1.28	1H (d, $J = 6.1$ Hz)	H-6'
1.29	1H (d, $J = 6.1$ Hz)	H-6''
1.32-1.42	20H (m)	H-5 ถึง H-9, H-15 ถึง H-19
1.60	2H (dd, $J = 13.7, 6.6$ Hz)	H-4
1.67	2H (dd, $J = 13.3, 5.9$ Hz)	H-14

2.51	1H (d, $J = 5.8$ Hz)	H-12
2.54	1H (d, $J = 5.62$ Hz)	H-12
2.56-2.64	2H (m)	H-2
3.43	1H (t, $J = 9.4$ Hz)	H4"
3.69	1H (dd, $J = 3.4, 1.5$ Hz)	H2'
3.71	1H (d, $J = 3.4$ Hz)	H3'
3.74	1H (dq, $J = 9.4, 6.1$ Hz)	H5'
3.77-3.80	2H (m)	H3", H5"
4.01	1H (dd, $J = 3.4, 1.5$ Hz)	H-2"
4.10	1H (p, $J = 12.1, 6.6$ Hz)	H-3
4.94	1H (d, $J = 1.5$ Hz)	H-1"
4.98	1H (br s)	H-1'
5.29	1H (p, $J = 12.7, 5.8$ Hz)	H-13

^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ (ppm) :

14.01	C-10	14.1	C-20
17.5	C-6', C-6"	22.6	C-9, C-19
24.7	C-5	25.1	C-15
29.1	C-17	29.2	C-7
29.4	C-16	29.7	C-6
31.7	C-8	31.8	C-18
31.8	C-4	34.5	C-14
39.4	C-2	39.6	C-12
67.9	C-5'	68.9	C-5"
70.6	C-3'	70.7	C-2"
70.7	C-3"	71.3	C-13
73.5	C-3	79.9	C-2'
95.5	C-1'	102.5	C-1"
171.4	C-1	173.9	C-11

FAB-MS

(positive ion mode) m/z (% relative intensity) : 651 ($[M+H]^+$, 33), 505 (10), 359 (100), 293 (50), 171 (62)

(negative ion mode) m/z (% relative intensity) : 649 ($[M-H]^-$, 100), 479 (36)

GC-MS

- ส่วนของน้ำตาล มีค่า retention time เท่ากับ 13.26
- ส่วนของไขมัน มีค่า retention time เท่ากับ 8.19

สารประกอบ B

สารประกอบ B เป็นของแข็งสีขาว น้ำหนัก 33.03 mg ค่า $R_f = 0.125$ ใช้ ODS-TLC plate ระบบตัวทำละลาย (CH₃CN:H₂O 60:40)

¹H NMR (CD₃OD, 600 MHz) δ (ppm) :

0.88–0.91	6H (m)	H-10, H-22
1.23	3H (d, $J = 6.1$ Hz)	H-6'
1.25	3H (d, $J = 6.4$ Hz)	H-6''
1.27–1.37	24H (m)	H-5 ถึง H-9, H-15 ถึง H-21
1.56	2H (dd, $J = 13.80, 6.6$ Hz)	H-4
1.63	2H (dd, $J = 13.4, 6.4$ Hz)	H-14
2.49	1H (d, $J = 5.9$ Hz)	H-12
2.52–2.60	2H (m)	H-2
3.38	1H (t, $J = 9.5$ Hz)	H-4''
3.61	1H (dd, 3.4, 1.5 Hz)	H-2'
3.66	1H (d, 3.4 Hz)	H-3''
3.68	1H (dq, 9.5, 6.4 Hz)	H-5''
3.72–3.75	2H (m)	H-3', H-5'
3.96	1H (dd, $J = 3.4, 1.5$ Hz)	H-2''
4.04	1H (p, $J = 12.1, 6.6$ Hz)	H-3
4.89	1H (d, $J = 1.47$ Hz)	H-1''
4.93	1H (br s)	H-1'
5.24	1H (p, $J = 12.8, 6.4$ Hz)	H-13

¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ (ppm) :

14.0	C-10	14.1	C-22
17.5	C-6', C-6''	22.6	C-9

22.6	C-22	24.7	C-5
25.1	C-15	29.1	C-19
29.2	C-7	29.5	C-17
29.5	C-16	29.5	C-18
29.6	C-6	29.7	C-8
29.8	C-2	31.9	C-4
34.6	C-14	39.4	C-2
39.6	C-12	67.9	C-5'
68.4	C-5"	70.6	C-3'
70.7	C-3"	70.8	C-2"
71.2	C-13	71.2	C-4"
72.5	C-4'	73.5	C-3
79.9	C-2'	94.4	C-1'
102.5	C-1"	171.5	C-1
173.9	C-11		

FAB-MS

(positive ion mode) m/z (% relative intensity) : 679 ($[M+H]^+$, 32), 533 (10), 387 (100), 293 (57)

(negative ion mode) m/z (% relative intensity) : 677 ($[M-H]^-$, 100), 479 (36)

GC-MS

- ส่วนของน้ำตาล มีค่า retention time เท่ากับ 13.25
- ส่วนของไขมัน มีค่า retention time เท่ากับ 8.15 และ 11.16

บทที่ 5

สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรีย B189 ที่คัดแยกได้จากน้ำทิ้งของโรงงานผลิตนมในประเทศไทยนั้น ในขั้นตอนแรกเป็นการศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย เพื่อให้ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงสุด พบว่า การเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง แล้วนำไปสกัดด้วยตัวทำละลายตามขั้นตอนจะให้สารสกัดชั้น methanol ที่เมื่อนำไปวัดค่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิวแล้วมีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของหยดน้ำสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับ การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเป็นระยะเวลา 72 และ 168 ชั่วโมง (ตาราง 7) แต่การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในช่วงระยะเวลา 36 ชั่วโมงกับ 72 ชั่วโมงนั้นเมื่อเปรียบเทียบค่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิวแล้วจะเห็นว่า เส้นผ่านศูนย์กลางของหยดน้ำในการวัดค่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิวมีค่าค่อนข้างใกล้เคียงกัน (ตาราง 7) ในขณะที่การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเป็นระยะเวลา 168 ชั่วโมงจะให้ค่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิวของสารสกัดจากเซลล์และน้ำเลี้ยงเซลล์ต่ำกว่าค่อนข้างมาก อาจจะเนื่องมาจากการเจริญของเซลล์ดำเนินมาถึงระยะที่มีการตายของเซลล์มากกว่าการเจริญเติบโต (dead phase) ซึ่งในรายงานต่างๆ เกี่ยวกับการเลี้ยงแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้นั้น มักพบว่าการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของเซลล์จะดำเนินควบคู่ไปกับการเจริญเติบโตของเซลล์ (exponential phase) แต่ปริมาณการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะสูงสุดในช่วงการเจริญของเซลล์คงที่ (stationary phase) (Haba; et al. 2003 : 316-322); (Sim; Ward; & Li 1997 : 232-238) และจากรายงานของอารีย์ กังฉิน (2542) ที่ศึกษาการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากเซลล์จะให้ค่าแรงตึงผิวต่ำสุด เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเป็นระยะเวลา 30 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์มีการเจริญเติบโตแบบคงที่ นั้นหมายถึงเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพควบคู่ไปกับการเจริญของเซลล์ และมีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงสุดในช่วงการเจริญเติบโตแบบคงที่ด้วย

จากการวิเคราะห์พันธุกรรมโดยศึกษาลำดับเบส จาก 16s rRNA ของแบคทีเรีย B189 โดยสถาบัน National Collections of Industrial and Marine Bacteria Ltd. ประเทศญี่ปุ่น พบว่า ลำดับเบสมีความเหมือน 100% กับแบคทีเรียสายพันธุ์ *Pseudomonas aeruginosa* และในการศึกษาครั้งนี้ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากเซลล์แบคทีเรีย B189 ที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมงมีประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวสูงสุด จึงอาจจะเป็นไปได้ว่าแบคทีเรีย B189 มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพควบคู่ไปกับระยะที่มีการเจริญของเซลล์และมีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงสุดในช่วงการเจริญเติบโตแบบคงที่เช่นเดียวกับแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 จึงน่าสนใจที่จะศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะการเจริญเติบโต (growth curve) ของแบคทีเรีย B189 กับการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อยืนยันอีกครั้ง

ในการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเซลล์และน้ำเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียที่มีรายงานการสกัดโดยใช้วิธีและตัวทำละลายแตกต่างกันเป็นจำนวนมาก ขึ้นกับชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพหรือวัตถุดิบที่นำมาใช้ในการสกัด (เซลล์ หรือ ส่วนในไซของน้ำเลี้ยงเซลล์) ซึ่งในกรณีนี้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็น glycolipids มีรายงานวิธีการสกัดแบบแบ่งส่วนการละลายโดยใช้ chloroform, chloroform:methanol, หรือ diethyl ether (Rendell; et al. 1990 : 189-193); (Mata-Sandoval; Karns; & Torrents. 1999 : 211-220); (Ramana; & Karanth. 1989 : 249-257) เป็นตัวทำละลายในการสกัด นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้ ethyl acetate ในการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภท glycolipids จากยีสต์ (Ito; Kinta; & Inoue. 1980 : 2221-2223); (Asmer; et al. 1988 : 1460-1466) ซึ่งจากการทดสอบการสกัดในช่วงแรกด้วยเทคนิค TLC และตรวจสอบโดยใช้ *p*-anisaldehyde spray reagent พบว่าสารสกัดชั้น methanol ที่ได้น่าจะเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภท glycolipids ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงใช้ตัวทำละลาย ethyl acetate ในการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ทั้งนี้เนื่องจาก chloroform มีความเป็นพิษค่อนข้างสูงและราคาสูงกว่า ethyl acetate ในขณะที่ chloroform และ ethyl acetate มีความเป็นขี้ไคลเดียวกัน

ในการทำสารให้บริสุทธิ์ ในขั้นตอนแรกของการแยกสารสกัดชั้น methanol เลือกใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ชนิดเร็วเนื่องจากมีข้อดีหลายประการ เช่น สามารถแยกสารที่มีปริมาณมากๆ ได้ในระยะเวลาสั้น และตัวทำละลายเคลื่อนที่ที่ใช้ในการแยกสารจะใช้ปริมาณน้อยกว่าเมื่อใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบธรรมดา

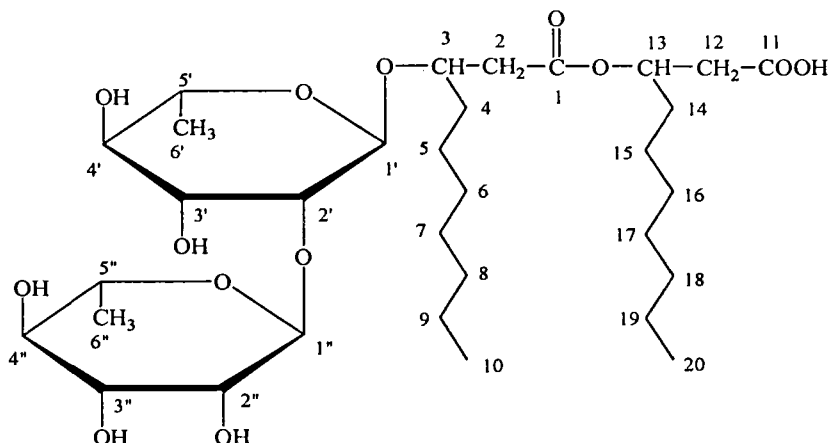
จากการทดสอบการแยกของสารกลุ่มที่มีค่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิวสูงสุด (F14) ที่แยกได้จากสารสกัดชั้น methanol ด้วยเทคนิค TLC ก่อนการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี พบว่าในระบบ reverse phase การแยกของสารจะแยกได้ดีกว่าในระบบของ normal phase เนื่องจากสามารถพบการแยกของแถบสารได้ 2 แถบในระบบ reverse phase แต่ในระบบของ normal phase จะไม่พบการแยกของแถบสาร ในการแยกสารกลุ่ม F14 จึงได้แบ่งสารกลุ่ม F14 ส่วนหนึ่ง (F14(1)) มาทำการแยกในระบบ reverse phase แต่พบว่าสารที่ได้ยังไม่บริสุทธิ์ต้องทำการแยกซ้ำในระบบ reverse phase อีกครั้ง ดังนั้นในการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีเพื่อแยกสารกลุ่ม F14 ที่เหลือ (F14(2)) จึงทำการแยกในระบบ normal phase ก่อนแล้วจึงทำการแยกซ้ำในระบบ reverse phase อีกครั้ง ทั้งนี้เพราะการแยกในระบบ normal phase สามารถระเหยตัวทำละลายได้ง่ายและใช้เวลาน้อยกว่าการแยกในระบบ reverse phase

ทั้งนี้ผลที่ได้จากการแยกสารกลุ่ม F14(1) โดยการทำการคอลัมน์โครมาโตกราฟีในระบบ reverse phase และแยกซ้ำอีกครั้งในระบบ reverse phase กับสารกลุ่ม F14(2) โดยการทำการคอลัมน์โครมาโตกราฟีในระบบ normal phase และแยกซ้ำอีกครั้งในระบบ reverse phase ไม่มีความแตกต่างกัน โดยสามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ 2 ชนิด คือ สารประกอบ A แยกได้ในระบบตัวทำละลาย $H_2O:CH_3CN$ (48:52) ได้ร้อยละของผลผลิตเท่ากับ 0.086 และสารประกอบ B แยกได้ในระบบตัวทำละลาย $H_2O:CH_3CN$ (42:58) ได้ร้อยละของผลผลิตเท่ากับ 0.085

จากการเปรียบเทียบค่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิวของสารประกอบ A และสารประกอบ B กับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาตรฐาน 2 ชนิด (sophorolipid และ mannosylerythritol lipid) และสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์มาตรฐาน 2 ชนิด (sodium dodecyl sulfate และ tween 80) พบว่า ทั้งสารประกอบ A และสารประกอบ B มีค่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิวสูงกว่าทั้งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาตรฐานและสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์มาตรฐาน โดย sodium dodecyl sulfate มีค่า MAD 20 μg sophorolipid และ tween 80 มีค่า MAD เท่ากับ 2 μg สารประกอบ A, สารประกอบ B และ mannosylerythritol lipid มีค่า MAD เท่ากับ 0.2 μg แสดงว่าเมื่อใช้ปริมาณน้อยที่สุดที่ 0.2 μg สารประกอบ A , สารประกอบ B และ mannosylerythritol lipid ยังคงมีความสามารถในการลดแรงตึงผิว แต่ sodium dodecyl sulfate ต้องใช้สารปริมาณเท่ากับ 20 μg , sophorolipid และ tween 80 ต้องใช้สารปริมาณเท่ากับ 2 μg ตามลำดับ ที่ยังคงมีความสามารถในการลดแรงตึงผิว เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการลดแรงตึงผิวระหว่าง สารประกอบ A , สารประกอบ B และ mannosylerythritol lipid แม้จะมีค่า MAD เท่ากัน แต่เส้นผ่านศูนย์กลางของหยดน้ำในการวัดค่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิวของสารประกอบ A และสารประกอบ B มีค่าสูงกว่า mannosylerythritol lipid ที่มีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของหยดน้ำใกล้เคียงกับ Control (ตารางที่ 13) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า สารประกอบ A และสารประกอบ B ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย B189 มีประสิทธิภาพดีสามารถนำไปประยุกต์ใช้ให้เป็นประโยชน์ทดแทนสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ได้

ในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ที่ผลิตจากแบคทีเรีย B189 จากการสกัดเซลล์และน้ำเลี้ยงเซลล์โดยวิธีการสกัดแบบแบ่งส่วนการละลายด้วย ethyl acetate นำสารสกัดชั้น ethyl acetate มาละลายด้วย methanol แล้วนำมาแบ่งส่วนการละลายด้วย hexane จากนั้นนำสารสกัดชั้น methanol มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ silica gel และ/หรือ ODS-AQ 120-S50 เป็นตัวดูดซับ และชะด้วยตัวทำละลายเคลื่อนที่ที่เหมาะสม ได้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีความสามารถในการลดแรงตึงผิวที่ดีที่สุด คือ สารประกอบ A และสารประกอบ B เมื่อศึกษาจาก ^1H NMR, ^{13}C NMR, FAB-MS และ GC-MS แล้วพบว่ามีโครงสร้างคล้ายกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เคยมีผู้รายงานไว้แล้ว จึงพิสูจน์โครงสร้างโดยใช้วิธีเปรียบเทียบข้อมูลจาก ^1H NMR, ^{13}C NMR, FAB-MS และ GC-MS กับที่รายงานไว้ ดังนี้

สารประกอบ A



สารประกอบ A เป็นของแข็งสีขาว มีค่า $R_f = 0.2$ เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC โดยใช้ ODS-TLC plate ระบบตัวทำละลายเคลื่อนที่ $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (60:40) ให้สีเขียวกับ anisaldehyde spray reagent ข้อมูลจาก FAB-MS (positive ion mode) แสดง m/z 651 $[\text{M}+\text{H}]^+$ และ FAB-MS (negative ion mode) แสดง m/z 649 $[\text{M}-\text{H}]^-$ ดังนั้นสารประกอบ A จึงมีมวลโมเลกุล 650 ดาลตัน ตรงกับสูตรโมเลกุล $\text{C}_{32}\text{H}_{58}\text{O}_{13}$

ข้อมูล ^1H NMR (ภาพประกอบ 31, 32, 33) และ ^{13}C NMR (ภาพประกอบ 35) แสดงให้เห็นว่า สารประกอบ A เป็นสารประเภท glycolipid ดังนี้

^{13}C NMR spectrum (CDCl_3 , 150 MHz) แสดง 32 สัญญาณเรโซแนนซ์เป็นของ 32 คาร์บอนในโมเลกุล ซึ่งในจำนวนสัญญาณเรโซแนนซ์ของคาร์บอนทั้งหมด มีอยู่ 8 สัญญาณที่มีค่าอยู่ในช่วง δ 67 ถึง 80 ppm และพบสัญญาณของ methyl carbon 2 หมู่ที่ δ 17.5 ข้อมูลดังกล่าวแสดงถึงการมีน้ำตาลดีออกซี 2 หมู่ ที่มี anomeric carbon ที่ δ 95.5 และ δ 102.5 ppm และพบสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 171.4 และ 173.9 ซึ่งเป็นคาร์บอนของหมู่คาร์บอนิลของเอสเทอร์และกรดคาร์บอกซิลิก, สัญญาณที่ δ 14.0 และ 14.1 เป็นของหมู่ methyl carbon 2 หมู่ พบสัญญาณของอีก 14 คาร์บอน ที่ช่วง δ 22.6 – 39.6 เป็นของหมู่ methylene carbon และสัญญาณเรโซแนนซ์ ที่ δ 71.3 และที่ δ 73.5 เป็นของ methine carbon ตามลำดับ ซึ่งเป็นของส่วนกรดไขมัน

^1H NMR spectrum (CD_3OD , 600 MHz) แสดงให้เห็นว่าโมเลกุลของสารประกอบ A ประกอบด้วยน้ำตาลดีออกซี 2 หมู่ โดยน้ำตาลดีออกซีหมู่แรกแสดง ^1H NMR ดังนี้ H-6' แสดงสัญญาณที่ δ 1.28 ppm (3H, d, $J = 6.1$ Hz) ซึ่งเป็น proton ของหมู่ methyl, สัญญาณที่ช่วง δ 3.76-3.80 (2H, m) เป็นของ H-3' และ H-5', สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 3.69 ppm (1H, dd, $J = 3.4, 1.5$ Hz) เป็นของ H-2' และ H-1' แสดงสัญญาณที่ δ 4.98 ppm (1H, br s) ซึ่งเป็น anomeric

proton ส่วนสัญญาณของ H-4' อยู่ภายใต้สัญญาณของตัวทำละลาย CD₃OD ดังนั้นเพื่อยืนยันการมีตำแหน่งสัญญาณของ H-4' จึงได้เปลี่ยนการบันทึกใน CDCl₃ ด้วย และได้ผลว่า พบสัญญาณของ H-4' ที่ δ 3.34 ppm (1H, t, J = 8.4 Hz) (ภาพประกอบ 34) น้ำตาลดีออกซีหมู่ที่ 2 แสดง ¹H NMR ดังนี้ H-6" แสดงสัญญาณที่ δ 1.29 ppm (3H, d, J = 6.1 Hz) ซึ่งเป็น proton ของหมู่ methyl, H-5" แสดงสัญญาณที่ δ 3.74 (1H, dq, J = 9.4, 6.1 Hz), H-4" แสดงสัญญาณที่ δ 3.43 (1H, t, J = 9.4 Hz), สัญญาณที่ δ 3.71 (1H, d, J = 3.4 Hz) เป็นของ H-3", สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 4.01 ppm (1H, dd, J = 3.4, 1.5 Hz) เป็นของ H-2" และ H-1" แสดงสัญญาณที่ δ 4.94 ppm (1H, d, J = 1.5 Hz) ซึ่งเป็น anomeric proton

ในส่วนกรดไขมันของสารประกอบ A ¹H NMR spectrum แสดงให้เห็นว่าเป็นกรดไขมันที่มีสายคาร์บอนยาว 10 คาร์บอน 2 หมู่ โดยกรดไขมันหมู่แรกพบสัญญาณเรโซแนนซ์ของ H-2 ซึ่งเป็นตำแหน่ง α ของหมู่คาร์บอนิลที่ช่วง δ 2.56-2.64 ppm (2H, m), H-3 แสดงสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 4.10 (1H, p, J = 12.1, 6.6 Hz), H-4 แสดงสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 1.6 (2H, dd, J = 13.7, 6.6 Hz) เป็นของหมู่ methylene, H-10 แสดงสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 0.94 ppm (3H, dd, J = 7.1, 6.6 Hz) กรดไขมันหมู่ที่ 2 พบสัญญาณของ H-12 ซึ่งเป็นตำแหน่งของ α -protons ของหมู่คาร์บอนิลที่ δ 2.51 ppm (1H, d, J = 5.8 Hz) และที่ δ 2.54 ppm (1H, d, J = 5.8 Hz), สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 5.29 (1H, p, J = 12.7, 5.8 Hz) เป็นของหมู่ methine ของ H-13, H-14 แสดงสัญญาณที่ δ 1.67 ppm (2H, dd, J = 13.3, 5.8 Hz) นอกจากนั้นยังปรากฏสัญญาณในช่วง δ 1.32-1.42 ppm ซึ่งเป็นของหมู่ methylene ของกรดไขมันทั้ง 2 หมู่ที่ตำแหน่ง H-5 ถึง H-9 และ H-15 ถึง H-19 ส่วน H-20 แสดงสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 0.94 ppm (3H, dd, J = 7.1, 6.6 Hz)

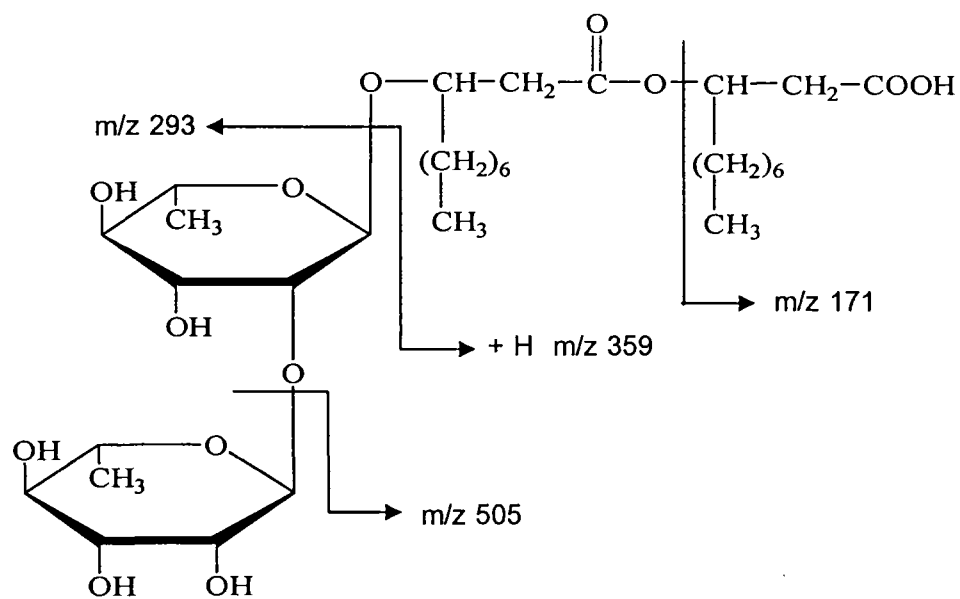
จากข้อมูล NMR ข้างต้นของสารประกอบ A แสดงว่าสารประกอบ A เป็น glycolipid ที่มีน้ำตาลดีออกซีชนิด rhamnose 2 หน่วยและมี 2 หน่วยของ 3-hydroxydecanoic acid เป็นองค์ประกอบ จากการสืบค้นข้อมูลพบว่า มูน และคนอื่นๆ (Moon; & et al. 1996 : 291-293), ซิมวอร์ดและลิ (Sim; Ward; & Li 1997 : 232-238) สามารถแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ rhamnolipid ที่ประกอบด้วย rhamnose 2 หน่วยและ β -hydroxydecanoic acid 2 หน่วย ซึ่งมีมวลโมเลกุล 650 จึงได้ทำการเปรียบเทียบข้อมูล ¹H NMR และ ¹³C NMR ของ rhamnolipid กับสารประกอบ A ดังแสดงในตารางที่ 14 ซึ่งจากการเปรียบเทียบข้อมูล ¹H NMR และ ¹³C NMR ดังกล่าวพบว่ามีใกล้เคียงกันมากจึงมีความเป็นไปได้ว่าสารประกอบ A คือ L-rhamnopyranosyl-L-rhamnopyranosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate หรือ Rha-Rha C₁₀-C₁₀

ข้อมูลจาก mass spectrum โดยใช้เทคนิค fast atom bombard mass spectrometry พบ m/z 651 ([M+H]⁺, 33), 505 (10), 359 (100), 293 (50), 171 (62) (ภาพประกอบ 36) ซึ่งเป็นการแตกออกของ fragment ion ดังแสดงในภาพประกอบ 28 จากการพบ fragment ion ที่ m/z 359 และ 293 ซึ่งเป็น fragment ion ของน้ำตาลกับกรดไขมัน ทำให้ทราบมวลโมเลกุลของน้ำตาลที่อาจเป็นไปได้ นั่นคือ 293 ประกอบกับ NMR spectrum ที่พบว่าโมเลกุลน้ำตาลในสารประกอบ A เป็น

น้ำตาลดีออกซี จึงทำการพิสูจน์ชนิดของน้ำตาลและกรดไขมันด้วย GC-MS โดยใช้ L-rhamnose และ L-fucose เป็นสารมาตรฐานสำหรับเปรียบเทียบน้ำตาล และ 3-hydroxydecanoic acid เป็นสารมาตรฐานสำหรับเปรียบเทียบกรดไขมัน

จากผลการวิเคราะห์ด้วย GC-MS พบว่า ส่วนที่เป็นน้ำตาลของสารประกอบ A มีค่า retention time เท่ากับ 13.26 ซึ่งเท่ากับค่า retention time ของสารมาตรฐาน L-rhamnose (ภาพประกอบ 37, 38, 39) เมื่อทำ coinjection ของสารประกอบ A กับ L-rhamnose และ L-fucose ทำให้พื้นที่ได้กราฟของ L-rhamnose เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า (ภาพประกอบ 40) เป็นการยืนยันว่าสารประกอบ A มีน้ำตาลแรมโนสเป็นองค์ประกอบ และส่วนที่เป็นกรดไขมันของสารประกอบ A มีค่า retention time เท่ากับ 8.19 ซึ่งเท่ากับค่า retention time ของ 3-hydroxydecanoic acid (ภาพประกอบ 41, 42) เมื่อทำ coinjection ของสารประกอบ A กับ 3-hydroxydecanoic acid ทำให้พื้นที่ได้กราฟของ 3-hydroxydecanoic acid เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า (ภาพประกอบ 43) เป็นการยืนยันว่าสารประกอบ A มี 3-hydroxydecanoic acid เป็นองค์ประกอบเช่นกัน

จากข้อมูลข้างต้นประกอบกับการที่ไม่เคยมีผู้รายงานการพบ D-rhamnose เป็นองค์ประกอบใน glycolipid จึงสรุปได้ว่าสารประกอบ A คือ L-rhamnopyranosyl-L-rhamnopyranosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate หรือ Rha-Rha C₁₀-C₁₀



ภาพประกอบ 28 แสดงการแตกออกของ fragment ion ของสารประกอบ A m/z 651 $[M+H]^+$

ตาราง 14 ข้อมูล ^1H NMR และ ^{13}C NMR ของ Rha-Rha $\text{C}_{10}\text{-C}_{10}$ และสารประกอบ A

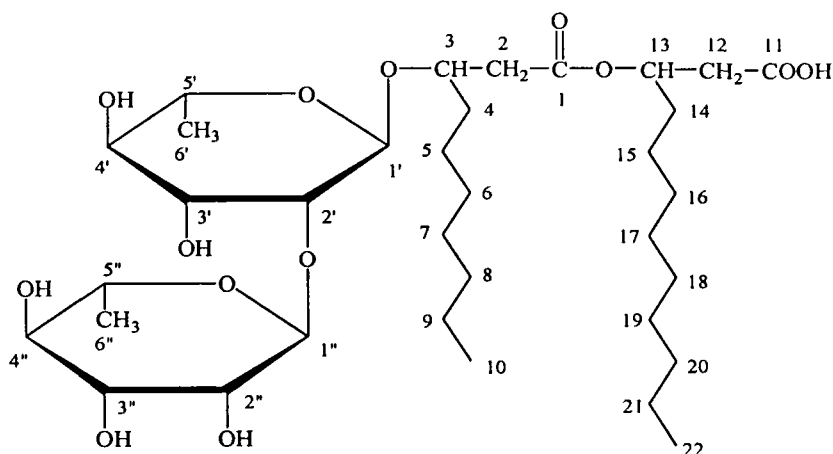
ตำแหน่ง	Rha-Rha $\text{C}_{10}\text{-C}_{10}$ ^a		สารประกอบ A	
	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b}}$, (m, J in Hz) ^d	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{c}}$, (m, J in Hz) ^d
1	172.9		171.4	
2	41.3	2.53 (dd, 15.1, 7.8) 2.46 (dd, 15.1, 5.0)	39.4	2.56–2.64 (m)
3	74.8	4.06–4.11 (m)	73.5	4.10 (p, 12.1, 6.6)
4	33.9	1.53–1.56 (m)	31.8	1.6 (dd, 13.7, 6.6)
5	25.7	1.25–1.35 (m)	24.7	1.32–1.42 (m)
6	30.8	1.25–1.35 (m)	29.7	1.32–1.42 (m)
7	30.3	1.25–1.35 (m)	29.2	1.32–1.42 (m)
8	32.94	1.25–1.35 (m)	31.7	1.32–1.42 (m)
9	23.7	1.25–1.35 (m)	22.6	1.32–1.42 (m)
10	14.4	0.89 (t, 7.1)	14.0	0.94 (dd, 7.1, 6.6)
11	178.2		173.9	
12	42.5	2.49 (dd, 15.1, 7.7) 2.44 (dd, 15.1, 4.9)	39.6	2.51 (d, 5.8) 2.54 (d, 5.8)
13	73.7	5.27–5.33 (m)	71.3	5.29 (p, 5.8)
14	35.4	1.57–1.63 (m)	34.5	1.67 (dd, 13.3, 5.8)
15	26.3	1.25–1.35 (m)	25.1	1.32–1.42 (m)
16	30.5	1.25–1.35 (m)	29.4	1.32–1.42 (m)
17	30.3	1.25–1.35 (m)	29.1	1.32–1.42 (m)
18	32.97	1.25–1.35 (m)	31.8	1.32–1.42 (m)
19	23.7	1.25–1.35 (m)	22.6	1.32–1.42 (m)
20	14.4	0.89 (t, 7.3)	14.1	0.94 (dd, 7.1, 6.6)

ตาราง 14 (ต่อ)

ตำแหน่ง	Rha-Rha C ₁₀ -C ₁₀ ^a		สารประกอบ A	
	δ_C^b	$\delta_H^b, (m, J \text{ in Hz})^d$	δ_C^b	$\delta_H^c, (m, J \text{ in Hz})^d$
1'	98.4	4.92 (d, 1.5)	95.5	4.98 (br s)
2'	80.5	3.74 (dd, 3.2, 1.5)	79.9	3.69 (dd, 3.4, 1.5)
3'	71.9	3.79 (dd, 9.6, 3.2)	70.7	3.77–3.80 (m)
4'	74.4	3.30 (t, 9.6)	72.6	
5'	70.1	3.65 (dq, 9.6, 6.2)	67.9	3.77–3.80 (m)
6'	18.04	1.23 (d, 6.2)	17.5	1.28 (d, 6.1)
1"	104.2	4.88 (d, 1.6)	102.5	4.94 (d, 1.5)
2"	72	3.96 (dd, 3.4, 1.6)	70.7	4.01 (dd, 3.4, 1.5)
3"	72.3	3.65 (dd, 9.5, 3.4)	70.7	3.71 (d, 3.4)
4"	73.9	3.38 (t, 9.5)	71.3	3.43 (t, 9.4)
5"	70.3	3.68 (dq, 9.5, 6.2)	68.9	3.74 (dq, 9.4, 6.1)
6"	18.07	1.24 (d, 6.2)	17.5	1.29 (d, 6.1)

^a จาก Moon; & et al. 1996 : 291-293^b บันทึกใน CD₃OD^c บันทึกใน CDCl₃^d m = multiplicity, J = coupling constant

สารประกอบ B



สารประกอบ B เป็นของแข็งสีขาว ค่า $R_f = 0.125$ เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC โดยใช้ ODS-TLC plate ระบบตัวทำละลายเคลื่อนที่ $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (60:40) ให้สีเดียวกับ anisaldehyde spray reagent ข้อมูลจาก FAB-MS (positive ion mode) แสดง m/z 679 $[\text{M}+\text{H}]^+$ และ FAB-MS (negative ion mode) แสดง m/z 677 $[\text{M}-\text{H}]^-$ ดังนั้นสารประกอบ B จึงมีมวลโมเลกุล 678 ดาลตัน ตรงกับสูตรโมเลกุล $\text{C}_{34}\text{H}_{62}\text{O}_{13}$

ข้อมูล ^1H NMR (ภาพประกอบ 44, 45, 46) และ ^{13}C NMR (ภาพประกอบ 47) แสดงให้เห็นว่า สารประกอบ B เป็นสารประเภท glycolipid ดังนี้

^{13}C NMR spectrum (CDCl_3 , 150 MHz) แสดง 34 สัญญาณเรโซแนนซ์เป็นของ 34 คาร์บอนในโมเลกุล ซึ่งในจำนวนสัญญาณเรโซแนนซ์ของคาร์บอนทั้งหมด มีอยู่ 8 สัญญาณที่มีค่าอยู่ในช่วง δ ที่ 67 ถึง 80 ppm และพบสัญญาณของ methyl carbon 2 หมู่ที่ δ 17.5 ข้อมูลดังกล่าวแสดงถึงการมีน้ำตาลดีออกซี 2 หมู่ ที่มี anomeric carbon ที่ δ 94.4 และ δ 102.5 ppm และพบสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 171.4 และ 173.9 ซึ่งเป็นคาร์บอนของหมู่คาร์บอนิลของเอสเทอร์และกรดคาร์บอกซิลิก, สัญญาณที่ δ 14.0 และ 14.1 เป็นของหมู่ methyl carbon 2 หมู่, พบสัญญาณของอีก 16 คาร์บอน ที่ช่วง δ 22.6-39.6 เป็นของหมู่ methylene carbon และสัญญาณเรโซแนนซ์ ที่ δ 71.2 และที่ δ 73.5 เป็นของ methine carbon ตามลำดับ ซึ่งเป็นของส่วนกรดไขมัน

^1H NMR spectrum (CD_3OD , 600 MHz) ของสารประกอบ B มีความคล้ายคลึงกับ ^1H NMR spectrum ของสารประกอบ A มาก ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโมเลกุลของสารประกอบ B ประกอบด้วยน้ำตาลดีออกซี 2 หมู่เช่นกัน โดยน้ำตาลดีออกซีหมู่แรกแสดง ^1H NMR ดังนี้ H-6' แสดงสัญญาณที่ δ 1.23 ppm (3H, d, $J = 6.1$ Hz) ซึ่งเป็น proton ของหมู่ methyl, H-5' แสดง

สัญญาณที่ช่วง δ 3.72-3.75 (1H, m) พบสัญญาณของ H-4' ที่ช่วง δ 3.30-3.35 ppm (1H, m) สัญญาณที่ช่วง δ 3.72-3.75 (1H, m) เป็นของ H-3', สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 3.61 ppm (1H, dd, $J = 3.4, 1.5$ Hz) เป็นของ H-2' และ H-1' แสดงสัญญาณที่ δ 4.93 ppm (1H, br.s.) ซึ่งเป็น anomeric proton น้ำตาลคือออกซีหมู่ที่ 2 แสดง ^1H NMR ดังนี้ H-6" แสดงสัญญาณที่ δ 1.25 ppm (3H, d, $J = 6.4$ Hz) ซึ่งเป็น proton ของหมู่ methyl, H-5" แสดงสัญญาณที่ δ 3.68 (1H, dq, $J = 9.5, 6.4$ Hz), H-4" แสดงสัญญาณที่ δ 3.38 (1H, t, $J = 9.5$ Hz), สัญญาณที่ δ 3.66 (1H, d, $J = 3.4$ Hz) เป็นของ H-3", สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 3.96 ppm (1H, dd, $J = 3.4, 1.5$ Hz) เป็นของ H-2" และ H-1" แสดงสัญญาณที่ δ 4.89 ppm (1H, d, $J = 1.5$ Hz) ซึ่งเป็น anomeric proton

ในส่วนกรดไขมันของสารประกอบ B ^1H NMR spectrum แสดงให้เห็นว่าเป็นกรดไขมันที่มีสายคาร์บอนยาว 10 คาร์บอน 1 หมู่และกรดไขมันที่มีสายคาร์บอนยาว 12 คาร์บอนอีก 1 หมู่ โดยกรดไขมันหมู่แรกพบสัญญาณเรโซแนนซ์ของ H-2 ซึ่งเป็นตำแหน่ง α ของหมู่คาร์บอนิลที่ช่วง δ 2.52-2.60 ppm (2H, m), H-3 แสดงสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 4.04 (1H, p, $J = 12.1, 6.6$ Hz), H-4 แสดงสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 1.56 (2H, dd, $J = 13.8, 6.6$ Hz) เป็นของหมู่ methylene, H-10 แสดงสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ช่วง δ 0.88-0.91 ppm (3H, m), กรดไขมันหมู่ที่ 2 พบสัญญาณของ H-12 ซึ่งเป็นตำแหน่งของ α -protons ของหมู่คาร์บอนิลที่ δ 2.49 ppm (1H, d, $J = 5.9$ Hz) และที่ δ 2.44 ppm (1H, d, $J = 5.9$ Hz), สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 5.24 (1H, p, $J = 12.8, 6.4$ Hz) เป็นของหมู่ methine ของ H-13, H-14 แสดงสัญญาณที่ δ 1.63 ppm (2H, dd, $J = 13.4, 6.4$ Hz), H-22 แสดงสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ช่วง δ 0.88-0.91 ppm (3H, m) และพบว่าสัญญาณเรโซแนนซ์ของสารประกอบ B ในช่วง δ 1.27-1.37 ppm (22H, m) ที่เป็นของหมู่ methylene มีจำนวน protons มากกว่าสารประกอบ A อยู่ประมาณ 4 protons ซึ่งเมื่อประกอบกับผลจาก FAB-MS ที่พบว่าสารประกอบ B มีมวลโมเลกุลมากกว่าสารประกอบ A อยู่ 28 จึงคาดว่าสารประกอบ B มีหมู่ methylene มากกว่าสารประกอบ A อยู่ 2 หมู่ ซึ่งน่าจะเป็นหมู่ methylene ที่ตำแหน่ง H-5 ถึง H-9 และ H-15 ถึง H-21 ของกรดไขมัน

จากข้อมูล NMR ข้างต้นของสารประกอบ B แสดงว่าสารประกอบ B เป็น glycolipid ที่มีน้ำตาลคือออกซีชนิด rhamnose 2 หน่วย, 1 หน่วยของ 3-hydroxydecanoic acid และ 1 หน่วยของ 3-hydroxydodecanoic acid เป็นองค์ประกอบ จากการสืบค้นข้อมูลพบว่าฮาบา และคนอื่นๆ (Haba; et al. 2003 : 316-322) ได้ทำการแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแรมโนลิปิดผสมที่มีลักษณะเป็น homologs กัน 11 ชนิด (Rha-Rha-C₈-C₁₀; Rha-C₁₀-C₈/Rha-C₈-C₁₀; Rha-Rha-C₈-C_{12:1}; Rha-Rha-C₁₀-C₁₀; Rha-Rha-C₁₀-C_{12:1}; Rha-C₁₀-C₁₀; Rha-Rha-C₁₀-C₁₂/Rha-Rha-C₁₂-C₁₀; Rha-C₁₀-C_{12:1}/Rha-C_{12:1}-C₁₀; Rha-Rha-C_{12:1}-C₁₂; Rha-Rha-C₁₀-C_{14:1}; Rha-C₁₀-C₁₂/Rha-C₁₂-C₁₀) ซึ่งรายงานการพบ pseudomolecular ion $[\text{M-H}]^-$ ของ Rha-Rha-C₁₀-C₁₂ และ Rha-Rha-C₁₂-C₁₀ ที่ m/z 677 ซึ่งมีค่าเท่ากับ FAB-MS (negative ion mode) ของสารประกอบ B (m/z 677 $[\text{M-H}]^-$) ประกอบกับการเปรียบเทียบข้อมูล ^1H NMR ของ rhamnolipid (Moon; &

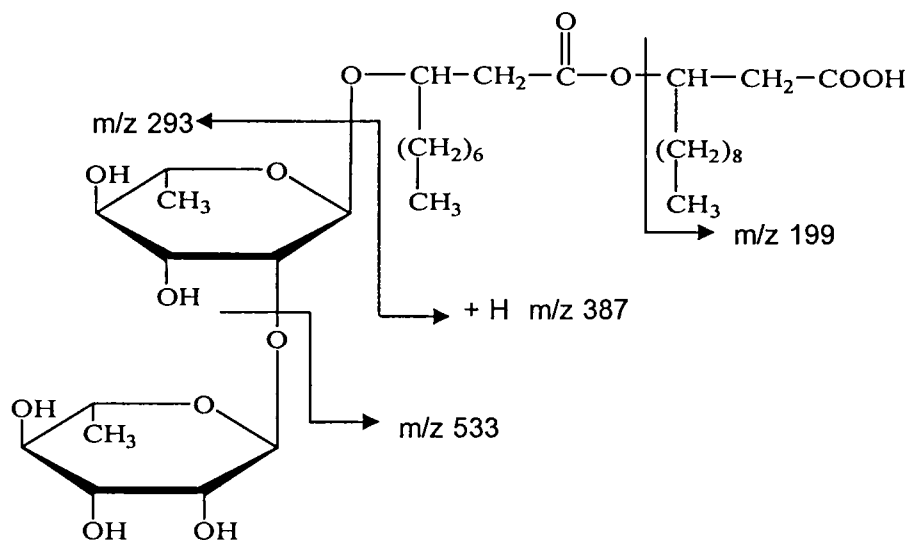
et al. 1996 : 291-293); (Sim; Ward; & Li 1997 : 232-238) กับสารประกอบ B ดังแสดงในตารางที่ 15 พบว่ามีความใกล้เคียงกันมากจึงมีความเป็นไปได้ว่าสารประกอบ B คือ L-rhamnopyranosyl-L-rhamnopyranosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydodecanoate (Rha-Rha C₁₀-C₁₂) หรือ L-rhamnopyranosyl-L-rhamnopyranosyl- β -hydroxydodecanoyl- β -hydroxydecanoate (Rha-Rha C₁₂-C₁₀)

ข้อมูลจาก mass spectroscopy โดยใช้เทคนิค fast atom bombard mass spectrum พบ m/z 679 ($[M+H]^+$, 33), 533 (10), 387 (100), 293 (57), 199 (32) (ภาพประกอบ 48) ซึ่งเป็นการแตกออกของ fragment ion ดังแสดงในภาพประกอบ 29 จากการพบ fragment ion ที่ m/z 387 และ 293 ซึ่งเป็น fragment ion ของน้ำตาลกับกรดไขมันทำให้ทราบมวลโมเลกุลของน้ำตาลที่อาจเป็นไปได้ นั่นคือ 293 ประกอบกับ 1H NMR spectrum ที่พบว่าโมเลกุลน้ำตาลในสารประกอบ B เป็นน้ำตาลดีออกซี จึงทำการพิสูจน์ชนิดของน้ำตาลด้วย GC-MS โดยใช้ L-rhamnose และ L-fucose เป็นสารมาตรฐานสำหรับเปรียบเทียบน้ำตาล ในส่วนของกรดไขมัน จาก 1H NMR spectrum ที่พบว่าสารประกอบ B มีหมู่ methylene มากกว่าสารประกอบ A อยู่ 2 หมู่ ซึ่งน่าจะเป็นหมู่ methylene ของกรดไขมันทั้ง 2 หมู่จึงทำการพิสูจน์ชนิดของกรดไขมันด้วย GC-MS โดยใช้ 3-hydroxydecanoic acid และ 3-hydroxydodecanoic acid methyl ester เป็นสารมาตรฐานสำหรับเปรียบเทียบกรดไขมัน

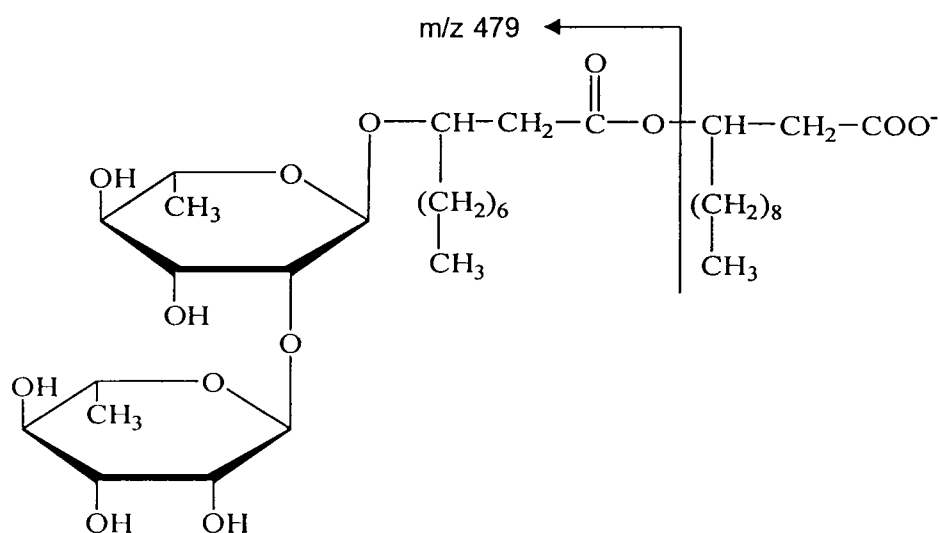
จากผลการวิเคราะห์ด้วย GC-MS พบว่า ส่วนที่เป็นน้ำตาลของสารประกอบ B มีค่า retention time เท่ากับ 13.25 ซึ่งเท่ากับค่า retention time ของสารมาตรฐาน L-rhamnose (ภาพประกอบ 36, 37, 50) เมื่อทำ coinjection ของสารประกอบ B กับ L-rhamnose และ L-fucose จะทำให้พื้นที่ใต้กราฟของ L-rhamnose เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า (ภาพประกอบ 51) เป็นการยืนยันว่าสารประกอบ B มีน้ำตาลแรมโนสเป็นองค์ประกอบ และส่วนที่เป็นกรดไขมันของสารประกอบ B มีค่า retention time เท่ากับ 8.15 และ 11.16 ซึ่งเท่ากับค่า retention time ของ 3-hydroxydecanoic acid และ 3-hydroxydodecanoic acid methyl ester ตามลำดับ (ภาพประกอบ 40, 52, 53) เมื่อทำ coinjection ของสารประกอบ B กับ 3-hydroxydecanoic acid จะทำให้พื้นที่ใต้กราฟของ 3-hydroxydecanoic acid เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า (ภาพประกอบ 54) และเมื่อทำ coinjection ของสารประกอบ B กับ 3-hydroxydodecanoic acid methyl ester จะทำให้พื้นที่ใต้กราฟของ 3-hydroxydodecanoic acid methyl ester เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าเช่นกัน (ภาพประกอบ 55) เป็นการยืนยันว่าสารประกอบ B มี 3-hydroxydecanoic acid และ 3-hydroxydodecanoic acid methyl ester เป็นองค์ประกอบ

นอกจากนั้นการพบ fragment ion ที่ m/z 479 ซึ่งเกิดจากการแตกออกของโมเลกุลกรดไขมัน- β -hydroxydodecanoic acid ดังแสดงในภาพประกอบ 30 โดยใช้เทคนิค FAB-MS (negative ion mode) (ภาพประกอบ 49) เป็นการยืนยันว่าสารประกอบ B คือ Rha-Rha C₁₀-C₁₂ สอดคล้องกับรายงานของฮาบา และคนอื่นๆ (Haba; et al. 2003 : 316-322)

จากข้อมูลข้างต้นประกอบกับการที่ไม่เคยมีผู้รายงานการพบ D-rhamnose เป็นองค์ประกอบใน glycolipid จึงสรุปได้ว่าสารประกอบ B คือ L-rhamnopyranosyl-L-rhamnopyranosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydodecanoate หรือ Rha-Rha C₁₀-C₁₂



ภาพประกอบ 29 แสดงการแตกออกของ fragment ion ของสารประกอบ B m/z 679 $[M+H]^+$



ภาพประกอบ 30 แสดงการเกิด fragment ion ที่ m/z 479 ซึ่งเกิดจากการแตกออกของโมเลกุลกรดไขมัน β -hydroxydodecanoic acid ของสารประกอบ B m/z 677 $[M-H]^-$

ตาราง 15 ข้อมูล ^1H NMR ของ Rha-Rha $\text{C}_{10}\text{-C}_{10}$ และสารประกอบ B

ตำแหน่ง	Rha-Rha $\text{C}_{10}\text{-C}_{10}$ ^a	สารประกอบ B
	$\delta_{\text{H}}^{\text{b}}$, (m, J in Hz) ^c	$\delta_{\text{H}}^{\text{b}}$, (m, J in Hz) ^c
1	-	-
2	2.53 (dd, 15.1, 7.8) 2.46 (dd, 15.1, 5.0)	2.52–2.60 (m)
3	4.06–4.11 (m)	4.04 (p, 12.1, 6.6)
4	1.53–1.56 (m)	1.56 (dd, 13.8, 6.6)
5	1.25–1.35 (m)	1.26–1.37 (m)
6	1.25–1.35 (m)	1.26–1.37 (m)
7	1.25–1.35 (m)	1.26–1.37 (m)
8	1.25–1.35 (m)	1.26–1.37 (m)
9	1.25–1.35 (m)	1.26–1.37 (m)
10	0.89 (t, 7.1)	0.88–0.91 (m)
11		
12	2.49 (dd, 15.1, 7.7) 2.44 (dd, 15.1, 4.9)	2.49 (d, 5.9) 2.47 (d, 5.9)
13	5.27–5.33 (m)	5.24 (p, 12.8, 6.4)
14	1.57–1.63 (m)	1.63 (dd, 13.4, 6.4)
15	1.25–1.35 (m)	1.26–1.37 (m)
16	1.25–1.35 (m)	1.26–1.37 (m)
17	1.25–1.35 (m)	1.26–1.37 (m)
18	1.25–1.35 (m)	1.26–1.37 (m)
19	1.25–1.35 (m)	1.26–1.37 (m)
20	0.89 (t, 7.3)	1.26–1.37 (m)
21		1.26–1.37 (m)
22		0.88–0.91 (m)

ตาราง 15 (ต่อ)

ตำแหน่ง	Rha-Rha C ₁₀ -C ₁₀ ^a	สารประกอบ B
	δ_H^b , (m, J in Hz) ^c	δ_H^b , (m, J in Hz) ^c
1'	4.92 (d, 1.5)	4.93 (br s)
2'	3.74 (dd, 3.2, 1.5)	3.61 (dd, 3.4, 1.5)
3'	3.79 (dd, 9.6, 3.2)	3.72–3.75 (m)
4'	3.30 (t, 9.6)	3.30–3.35 (m)
5'	3.65 (dq, 9.6, 6.2)	3.72–3.75 (m)
6'	1.23 (d, 6.2)	1.23 (d, 6.11)
1"	4.88 (d, 1.6)	4.89 (d, 1.47)
2"	3.96 (dd, 3.4, 1.6)	3.96 (dd, 3.4, 1.5)
3"	3.65 (dd, 9.5, 3.4)	3.66 (d, 3.4)
4"	3.38 (t, 9.5)	3.38 (t, 9.5)
5"	3.68 (dq, 9.5, 6.2)	3.68 (dq, 9.5, 6.4)
6"	1.24 (d, 6.2)	1.25 (d, 6.4)

^a จาก Moon; & et al. 1996 : 291-293^b บันทึกใน CD₃OD^c m = multiplicity, J = coupling constant

ข้อเสนอแนะ

1. สารบริสุทธิ์ที่แยกได้ ควรนำไปศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดต่าง ๆ เช่น การต้านจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่าง ๆ การต้านมะเร็ง เป็นต้น
2. ควรศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย B189 กับการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งอาจทำให้ได้ระยะเวลาที่เหมาะสมการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพและปริมาณสูงขึ้นเพียงพอแก่การนำไปผลิตเพื่อใช้ประโยชน์ทดแทนสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ได้
3. ควรทำการแยกและศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารกลุ่มต่างๆ ที่ยังไม่บริสุทธิ์ต่อ ซึ่งอาจได้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีองค์ประกอบทางเคมีแตกต่างออกไปอีก

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- ไกรฤกษ์ อบรมสุข. (2542). การใช้เอนไซม์ในตัวกลางอินทรีย์ที่มีสารลดแรงตึงผิวเป็นองค์ประกอบ. ใน เอกสารการประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่องเอนไซม์เทคโนโลยี. หน้า 100-110. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยรามคำแหง
- ธนขวัญ บุษบัน. (2539). การลดแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อ *Bacillus Subtilis* 3/38 ที่เลี้ยงในภาวะต่าง ๆ. ปรินญาพนธ์ วท.ม. (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย). กรุงเทพฯ : ภัณฑิลาวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.
- อารีย์ กังฉิน. (2542). การแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ. ปรินญาพนธ์ วท.ม. (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย). กรุงเทพฯ : ภัณฑิลาวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.
- Arima, K.; Kakinuma, A.; & Tamura, G. (1968). Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis* : isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochemical and biophysical research communications*. 31 : 488-494
- Arino, S.; Marchal, R.; & Vandecasteele, J-P. (1996). Identification and production of a rhamnolipidic biosurfactant by a *Pseudomonas* species. *Applied microbiology and biotechnology*. 45 : 162-168
- Asmer, H.-J.; et al. (1988). Microbial production, structure elucidation and bioconversion of sophorose lipids. *Journal of the American oil chemists'society*. 65(9) : 1460-1466
- Bernheimer, A.W.; & Avigad, L.S. (1970). Nature and properties of a cytolytic agent produced by *Bacillus subtilis*. *The journal of general microbiology*. 61 : 361-369
- Bodour, A.A.; & Miller-Maier, R.M. (1998). Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms, *Journal of microbiological methods*. 32 : 273-280
- Cirigliano, M.C.; & Carman, G.M. (1984). Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Applied and environmental microbiology*. 48 : 747-750
- Cirigliano, M.C.; & Carman, G.M. (1985). Purification and characterization of liposan , a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Applied and environmental microbiology*. 50 : 846-850

- Cooper, D.G.; & Goldenberg, B.G. (1987). Surface active agents from two *Bacillus* species. *Applied and environmental microbiology*. 53 : 224-229
- Cooper, D.G.; & paddock, D.A.; (1983). *Torulopsis petrophilum* and surface activity. *Applied and environmental microbiology*. 46 : 1426-1429
- Cooper, D.G.; & Zajic, J.E. (1980). Surface – active compounds from microorganisms. *Advances in applied microbiology*. 26 : 229-253
- Cooper, D.G.; Zajic, J.E.; & Gerson, D.F. (1979). Production of surface-active lipids by *Corynebacterium lepus*. *Applied and environmental microbiology*. 37 : 4-10
- Desai, J.D.; & Banat, I.M. (1997). Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. *Microbiology and molecular biology reviews*. Mar. : 47-64
- Déziel; Lépine; Dennie; et al. (1999). Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. *Biochimica et biophysica acta*. 1440 : 244-252
- Déziel; Lépine; Milot; et al. (2000). Mass spectrometry monitoring of rhamnolipids from a growing culture of *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP. *Biochimica et biophysica acta*. 1485 : 145-152
- Georgiou, G.; Lin, S.C.; & Sharma, M.M. (1990). Surface active compounds from Microorganisms. *Bio/Technology*. 10 : 60-65
- Greek, B.F. (1990). Detergent industry ponders products for new decade. *Chemical & Engineering news*. 68 : 37-38
- Greek, B.F. (1991). Sale of detergents growing despite recession. *Chemical & Engineering news*. 69 : 25-52
- Hisatsuka, K.; et al. (1971). Formation of Rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* and its function in hydrocarbon fermentation. *Agricultural and biological chemistry*. 35 : 686-692
- Haba, E.; et al. (2003). Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044. *Biotechnology and bioengineering*. 81(3) : 316-322
- Ito, S.; Kinta, M.; & Inoue, S. (1980). Growth of yeasts on *n*-alkanes: inhibition by a lactonic sophorolipid produced by *Torulopsis bombicola*. *Agricultural and biological chemistry*. 44(9) : 2221-2223

- Itoh, S.; & Suzuki, T. (1972). Effect of rhamnolipids on growth of *Pseudomonas aeruginosa* mutant deficient in n-paraffin-utilizing ability. *Agricultural and biological chemistry*. 36 : 2233-2235
- Jenny, K.; Käppeli, O.; & Fiechter, A. (1991). Biosurfactants from *Bacillus licheniformis*: structural analysis and characterization. *Applied microbiology and biotechnology*. 36 : 5-13
- Kakugawa, K.; et al. (2002). Isolation of yeast *Kurtzmanomyces* sp. I-11, novel producer of mannosylerythritol lipid. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 66(1) : 188-191
- Kakinuma, A.; Hori, M.; Isono, M.; et al. (1969). Determination of amino acid sequence in surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*. *Agricultural and biological chemistry*. 33 : 971-972
- Kakinuma, A.; Hori, M.; Sugino, H.; et al. (1969). Determination of the location of lactone ring in surfactin. *Agricultural and biological chemistry*. 33 : 1523-1524
- Kakinuma, A.; Ouchida, A.; et al. (1969). Confirmation of the structure of surfactin by mass spectrometry. *Agricultural and biological chemistry*. 33 : 1669-1671
- Kakinuma, A.; Sugino, H.; et al. (1969). Determination of fatty acid in surfactin and elucidation of the total structure of surfactin. *Agricultural and biological chemistry*. 33 : 973-976
- Käppeli, O.; & Finnerty, W.R. (1979). Partition of alkane by an extracellular vesicle derived from hexadecane – grown *Acinetobacter*. *Journal of bacteriology*. 140 : 707-712
- Koch, A.K.; et al. (1991). Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutant. *Journal of bacteriology*. 173 : 4212-4219
- Kretschmer, A.; Bock, H.; & Wagner, F. (1982). Chemical and physical characterization of interfacial-active lipids from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkane. *Applied and environmental microbiology*. 44 : 864-870
- Lang, S.; & Wagner, F. (1987). Structure and properties of biosurfactants. p. 21-45 In: Kosaric, N.; Cairns, W.L.; Gray, N.C.C.; editors. *Biosurfactants and biotechnology*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Lang, S.; & Wulbrandt, D.; (1999). Rhamnolipids – biosynthesis, microbial production and application potential. *Applied microbiology and biotechnology*. 51 : 22-32

- Mata-Sandoval, J.C.; Karns, J.; Torrents, A. (1999). High-performance liquid chromatography method for the characterization of rhamnolipid mixtures produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on corn oil. *Journal of chromatography A* 864 : 211-220
- Matsuyama, T.; et al. (1990). Surface-active novel glycolipid and linked 3 – hydroxyl fatty acids produced by *Serratia rubidaea*. *Journal of bacteriology*. 172 : 3015-3022
- Moon, S.-S.; & et al. (1996). Spectral evidence of 1,2-linkage in antifungal rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Bulletin of the Korean Chemical Society*. 17(3) : 291-293
- Morikawa, M.; et al. (1993). A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. Strain MIS38. *Journal of bacteriology*. Oct. : 6459-6466
- Neu, T.R.; Härtner, T.; & Poralla, K. (1990). Surface active properties of viscosin : a peptidolipid antibiotic. *Applied microbiology biotechnology*. 32 : 518-520
- O'Day, D.H.; & Myre, M.A. (2004). The cell membrane (Online). Available : <http://www.erin.utoronto.ca/~w3bio315/cell%20membrane.htm> Retrieved February 6 2004.
- Ramana, K.V.; & Karanth, N.G. (1989). Factors affecting biosurfactant production using *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6 under submerged conditions. *Journal of chemical technology and biotechnology*. 45 : 249-257
- Rendell, N.B.; et al. (1990). Characterisation of *Pseudomonas* rhamnolipids. *Biochimica et biophysica acta*. 1045 : 189-193
- Rosenberg, E. (1986). Microbiol surfactants. *Critical reviews in biotechnology*. 3 : 109-132
- Rosenberg, E.; et al. (1979). Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1 : isolation and emulsifying properties. *Applied and environmental microbiology*. 37 : 402-408
- Rosenberg, E.; Rubinovitz, C.; Gottlieb, A.; et al. (1988). Production of biodispersan by *Acinetobacter Calcoaceticus* A2. *Applied and environmental microbiology*. 54 : 317-322
- Rosenberg, E.; Rubinovitz, C.; Legmann, R.; et al. (1988). Purification and chemical properties of *Acinetobacter Calcoaceticus* A2 biodispersan. *Applied and environmental microbiology*. 54 : 323-326

- Shennan, J.L.; & Levi, J.D. (1987). *In situ* microbial enhanced oil recovery. p. 163-181 In: Kosaric N.; Cairns, W.L.; Gray, N.C.C.; editors. *Biosurfactants and biotechnology*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Sim, L.; Ward, O.P.; & Li, Z.-Y. (1997). Production and characterisation of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. 19 : 232-238
- Simscience. (2004). Monolayer (Online). Available : <http://www.google.com ; simscience.org/membranes/intermediate/page 4.htm> Retrieved February 6 2004.
- The key centre for polymer colloids. (2004). Micelles (Online). Available : http://www.google.com ; www.kcpc.usyd.edu.au/discovery/9.5.5 short/ 9.5.5_introsurfactant.htm. Retrieved February 6 2004.
- Van Dyke, M.I.; et al. (1993). *Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactants: structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil. *The Canadian journal of microbiology*. 39 : 1071-1078
- Zajic, J.E.; Gignard, H.; & Gerson, D.F. (1977). Properties and biodegradation of a bioemulsifier from *Corynebacterium hydrocarboclastus*. *Biotechnology and bioengineering*. 19 : 1303-1320
- Zosim, Z.; Gutnick, D.L.; Rosenberg, E. (1982). Properties of hydrocarbon-in-water emulsions stabilized by *Acinetobacter* RAG-1 emulsion. *Biotechnology and bioengineering*. 24 : 281-292
- Zuckerberg, A.; et al. (1979). Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1 : chemical and physical properties. *Applied and environmental microbiology*. 37 : 414-420

ภาคผนวก

ภาคผนวก

1. การเตรียม selective medium ประกอบด้วย

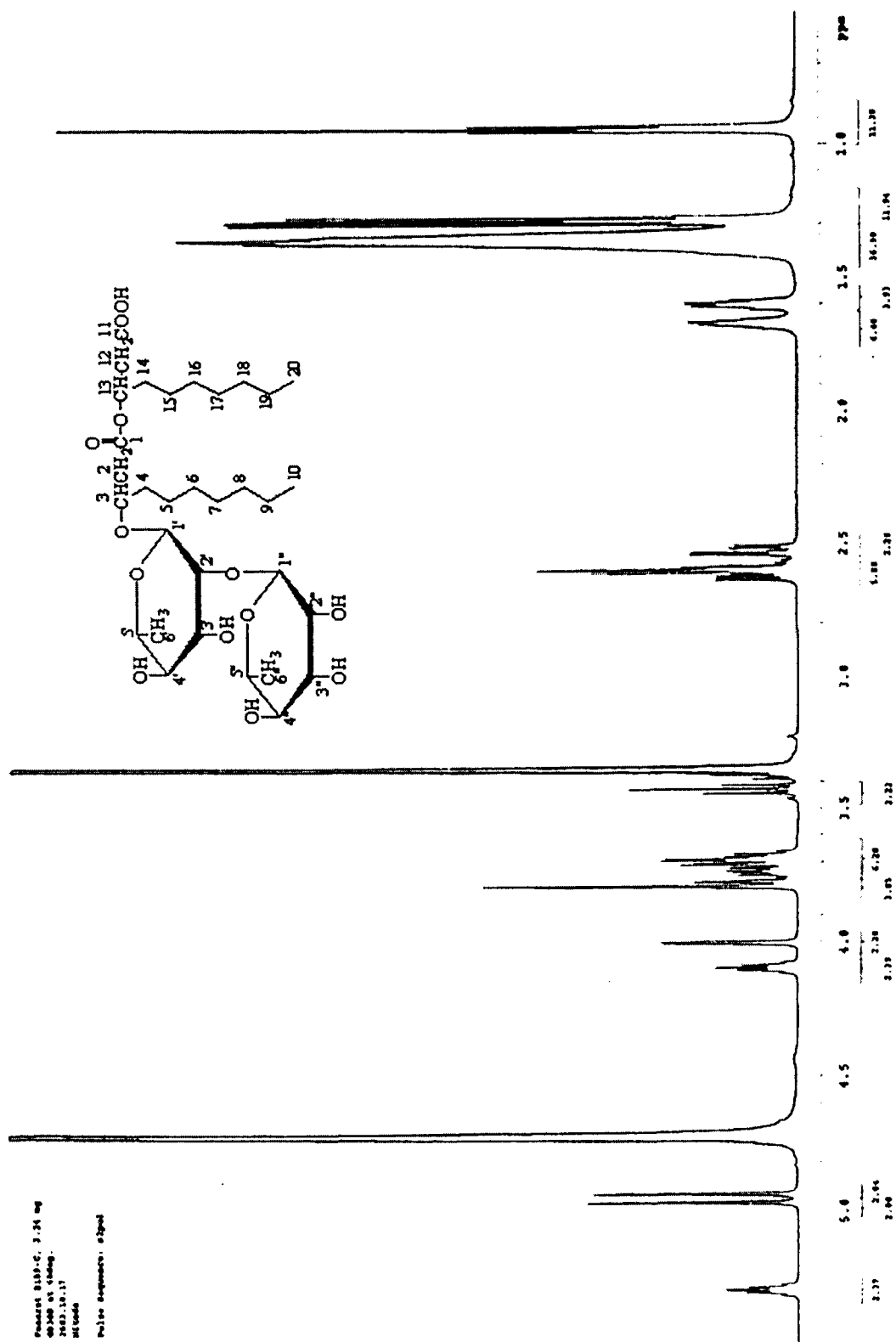
- | | |
|--|-----------|
| 1. น้ำมันถั่วเหลือง | 4 % (v/v) |
| 2. สารสกัดยีสต์ | 0.05 % |
| 3. NH_4NO_3 | 0.3 % |
| 4. KH_2PO_4 | 0.02 % |
| 5. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.02 % |

2. การเตรียม *p* – anisaldehyde spray reagent

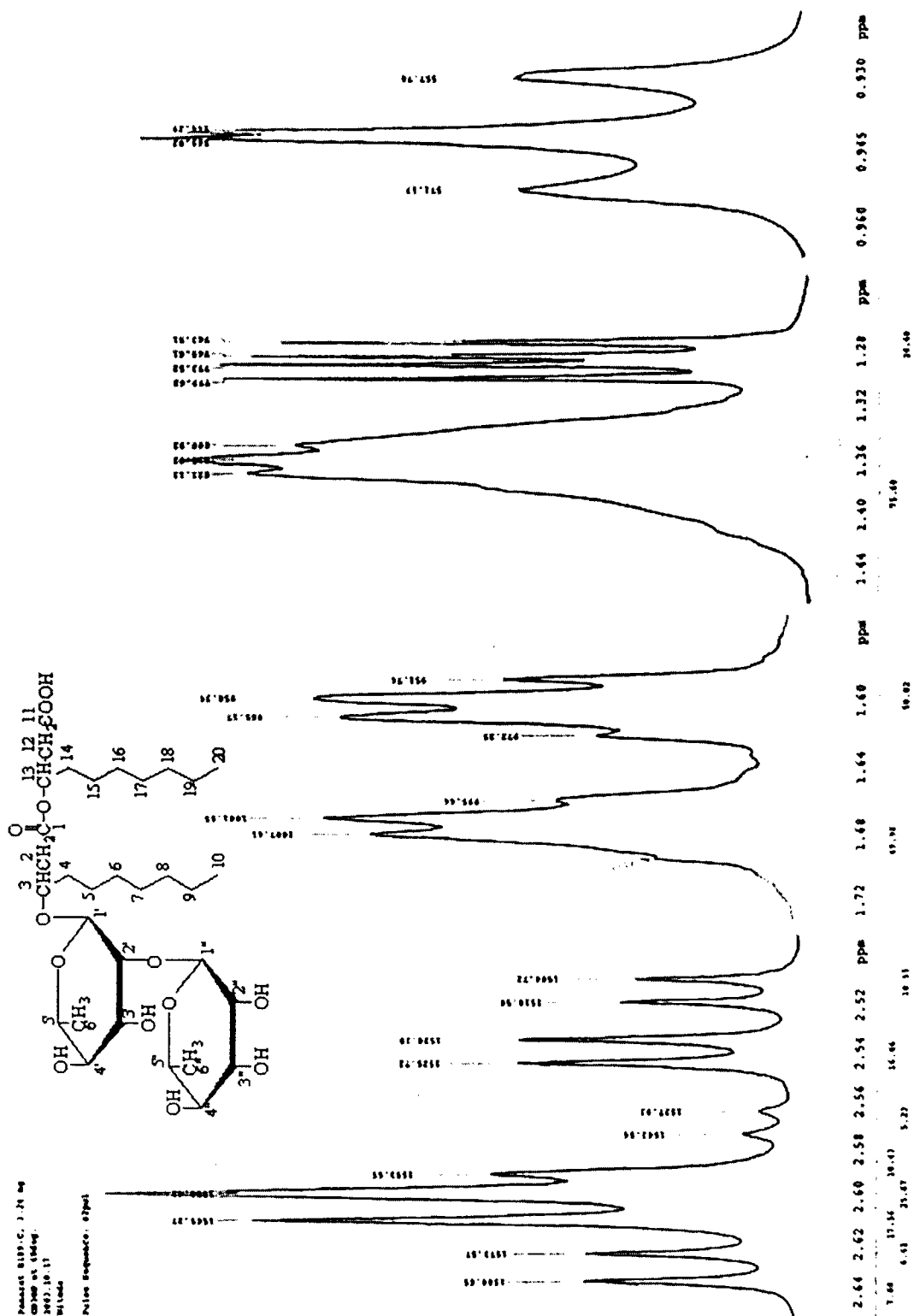
- | | |
|----------------------------|--------|
| 1. <i>p</i> -anisaldehyde | 0.5 mL |
| 2. H_2SO_4 | 0.5 mL |
| 3. ethanol | 9 mL |

การสังเกตผล ฟัน *p*-anisaldehyde spray reagent บน TLC plate ที่ผ่านการชะด้วยตัวทำละลาย และนำ TLC plate วางบน hot place ที่อุณหภูมิประมาณ 100 °C จนเห็นสี

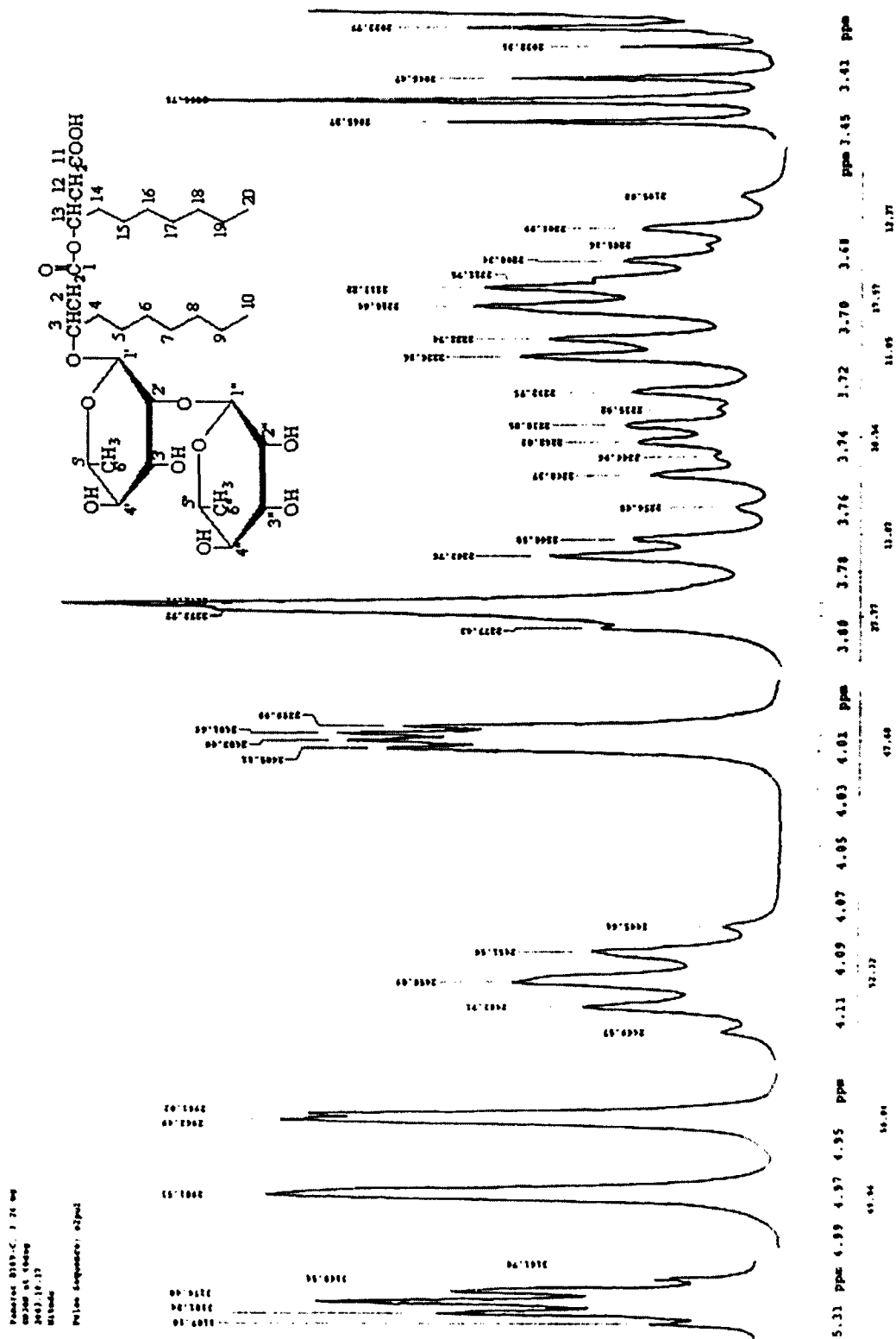
Product 8137-C, 3.54 mg
 4000 at 400g.
 2403.16.17
 11.000
 Pulse sequence: zgpg30



עמדת 31 ¹H NMR spectrum במוחלתרנגולת A (CD₃OD, 500 MHz)



ภาพประกอบ 32 ¹H NMR spectrum ของสารประกอบ A (CD₃OD, 500 MHz) ขยาย



ภาพประกอบ 33 ^1H NMR spectrum ของสารประกอบ A (CD_3OD , 500 MHz) ที่ 25°C

Product 9339-C, 33.79 mg

CHCl₃ at 100°C.

2017.10.12 17

MS data

Polysaccharide (2017)

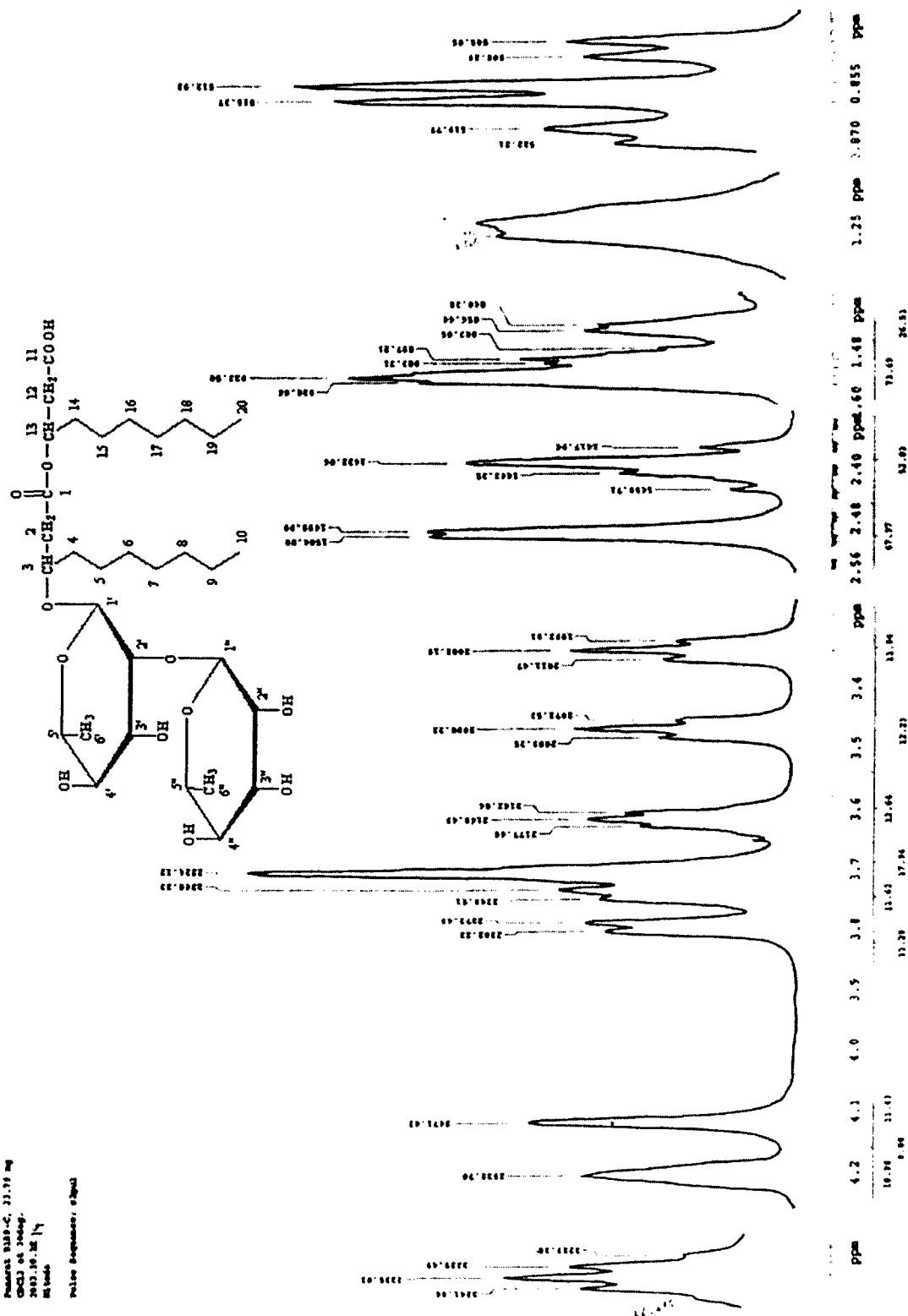
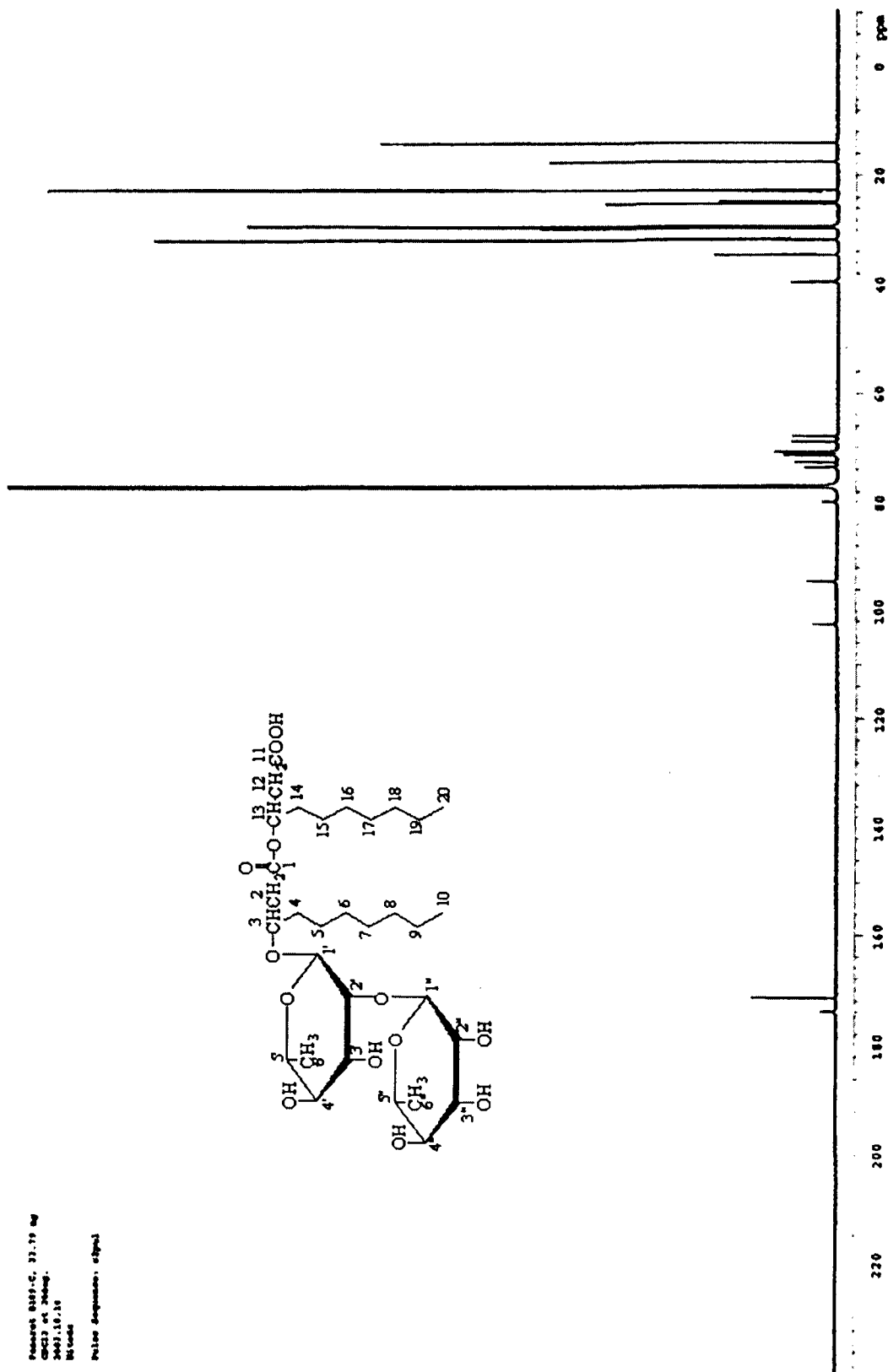
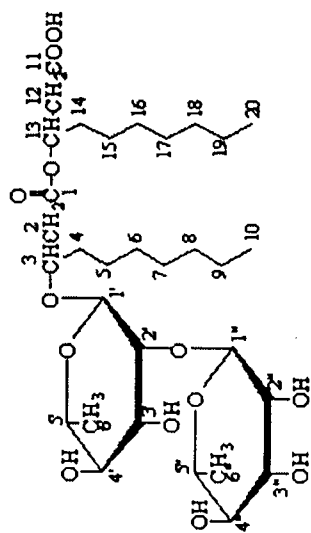
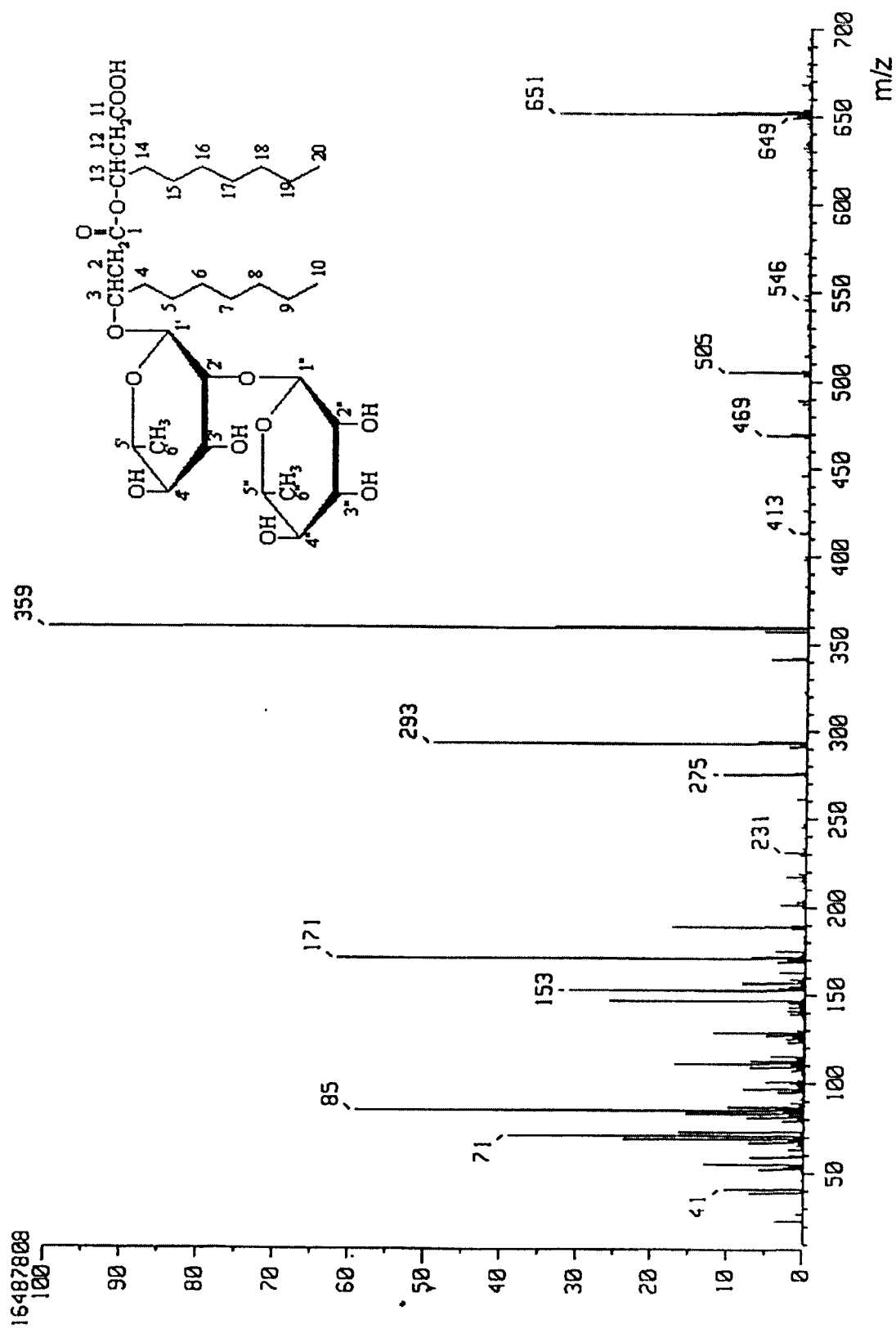


Figure S14. ¹H NMR spectrum of compound 34 (CDCl₃, 500 MHz).

P000001 0109-C, 23.79 ug
 CDCl₃ at 240mg.
 2403.16.10
 1H NMR
 Pulse Sequence: zgpg30



ภาพประกอบ 35 ¹³C NMR spectrum ของสารประกอบ A (CDCl₃, 150 MHz)



รูปที่ 36 มวลสเปกตรัม (โหมดไอออนบวก) ของสารประกอบ A

100 %

TIC=2783372

13:25

L-rhamnose
Area 4.56x10³

50 %

24:08

myo-inositol
Area 3.01x10³

4:51:15

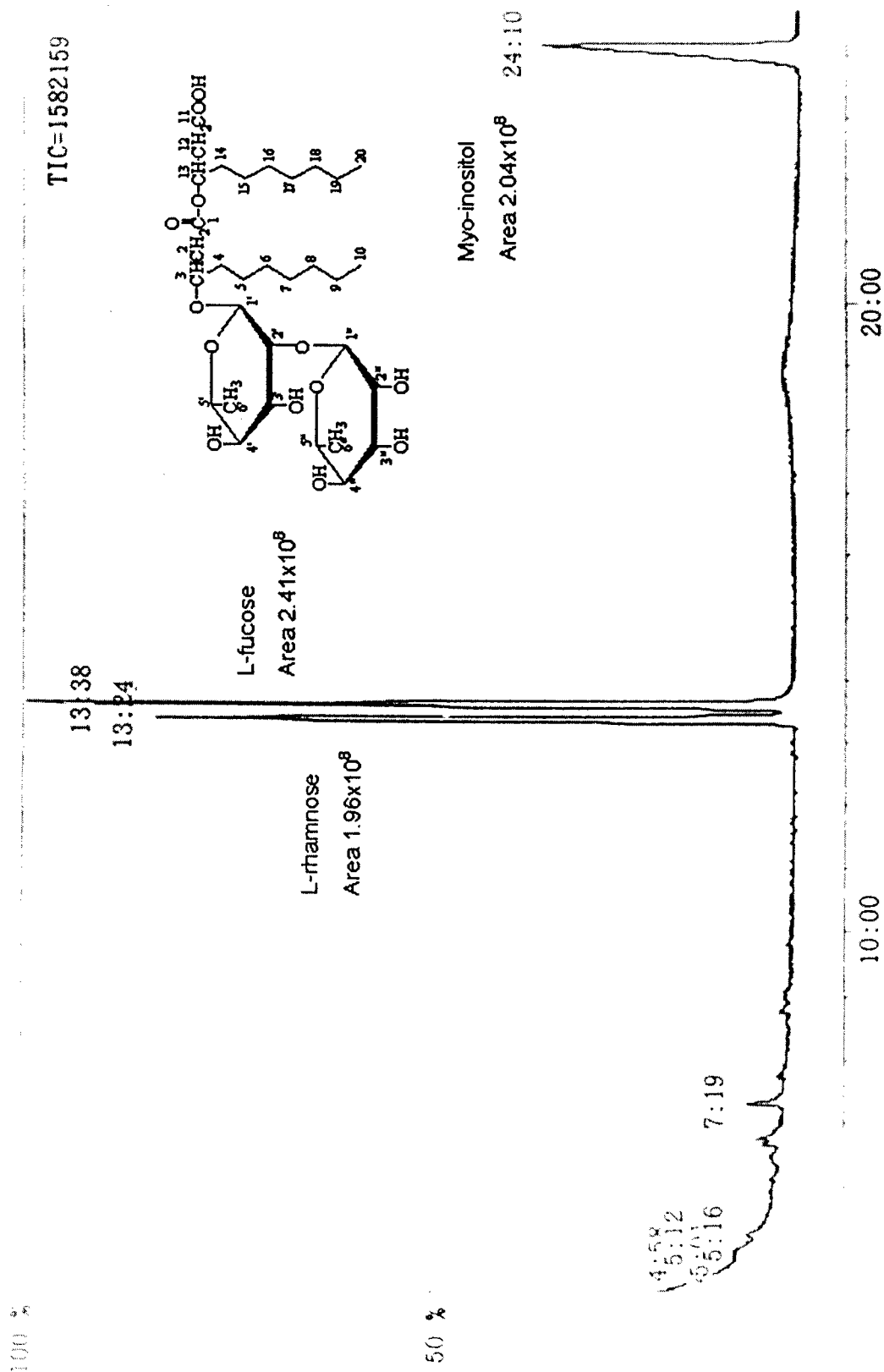
4:51:00

7:18

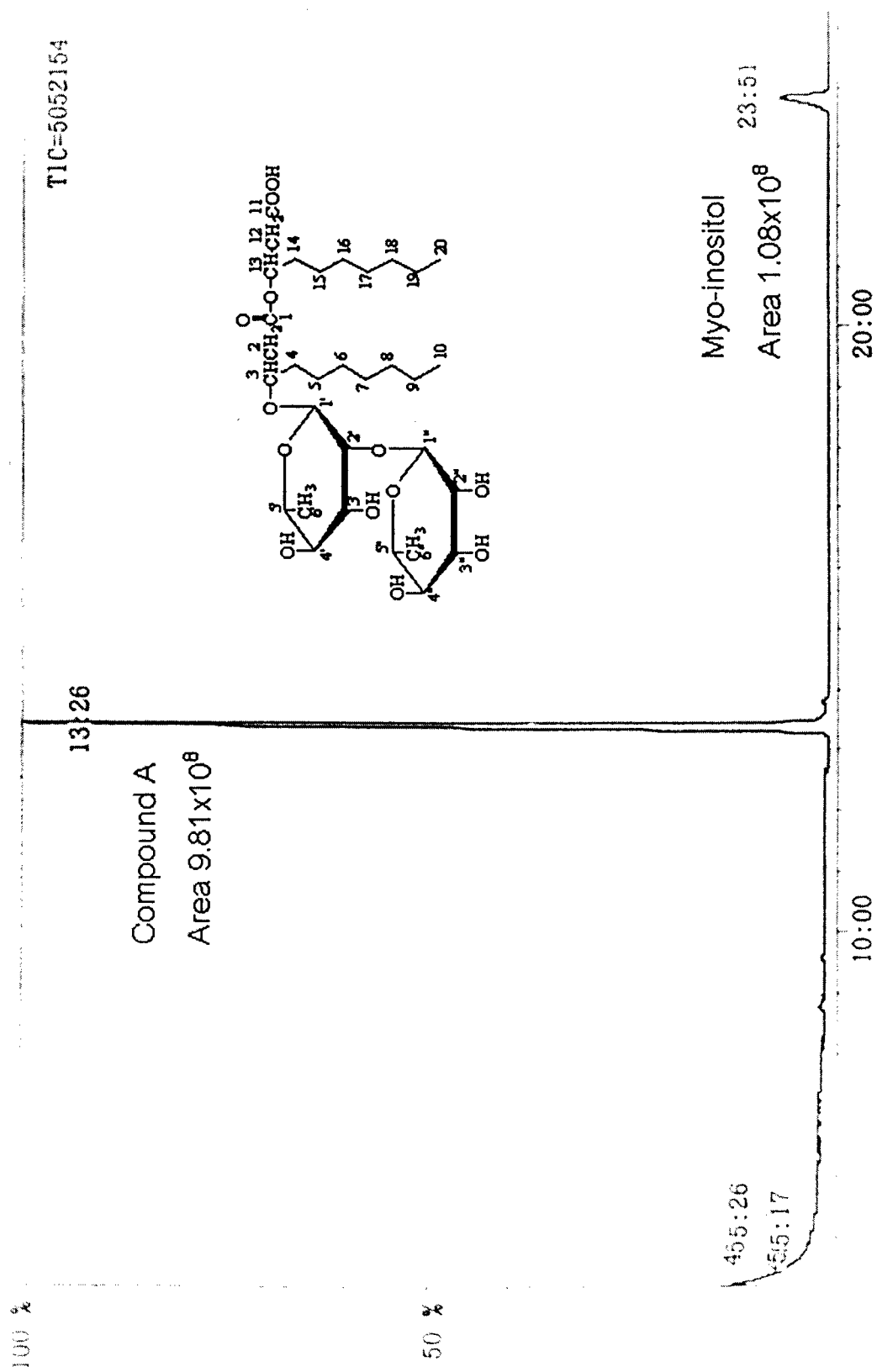
10:00

20:00

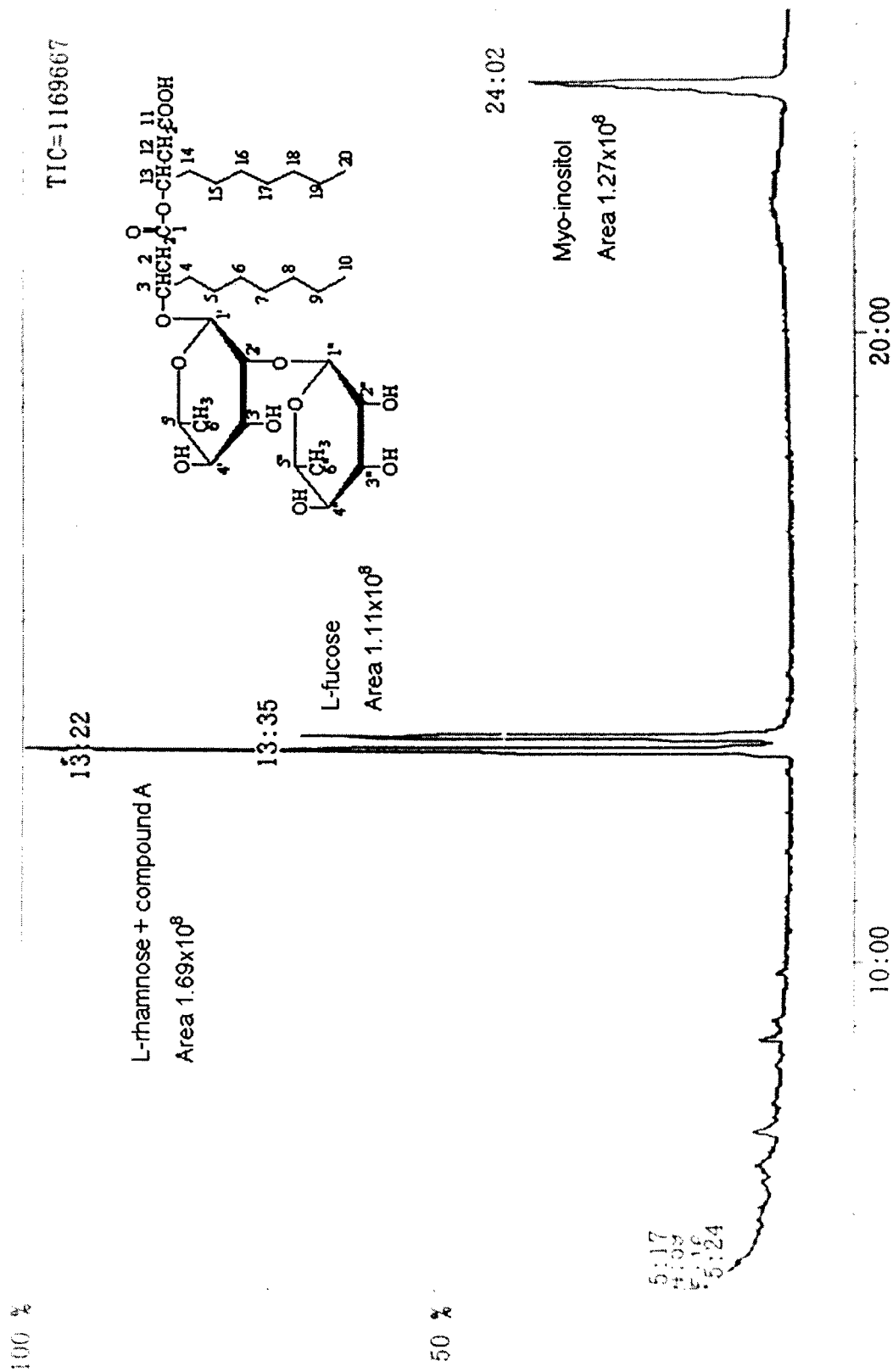
ภาพประกอบ 37 GC-MS spectrum ของสารมาตรฐานน้ำตาล L-rhamnose



ภาพประกอบ 38 GC-MS spectrum ของสารมาตรฐานน้ำตาล L-rhamnose + L-fucose

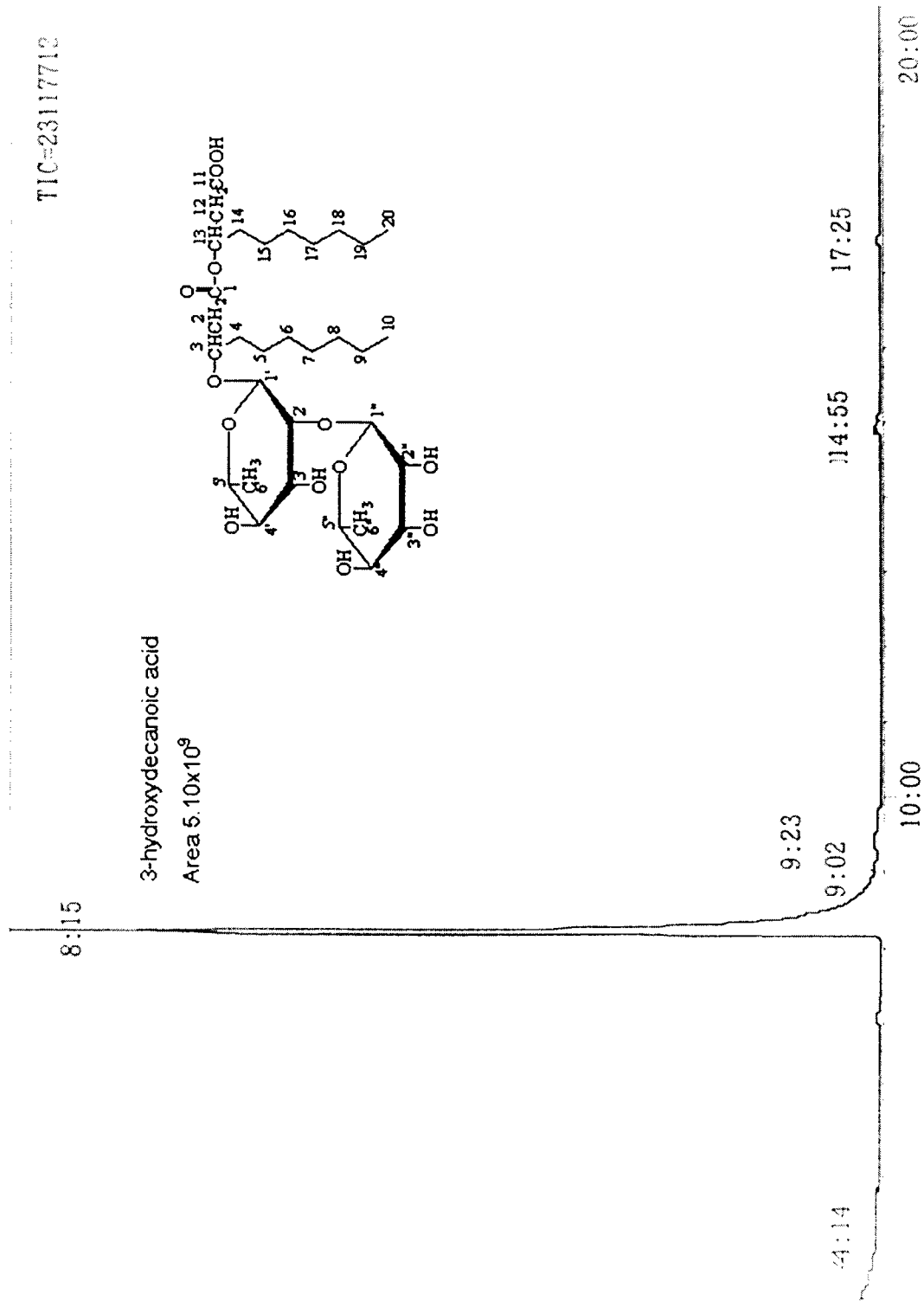


ภาพประกอบ 39 GC-MS spectrum ส่วนที่เป็นน้ำตาลของสารประกอบ A

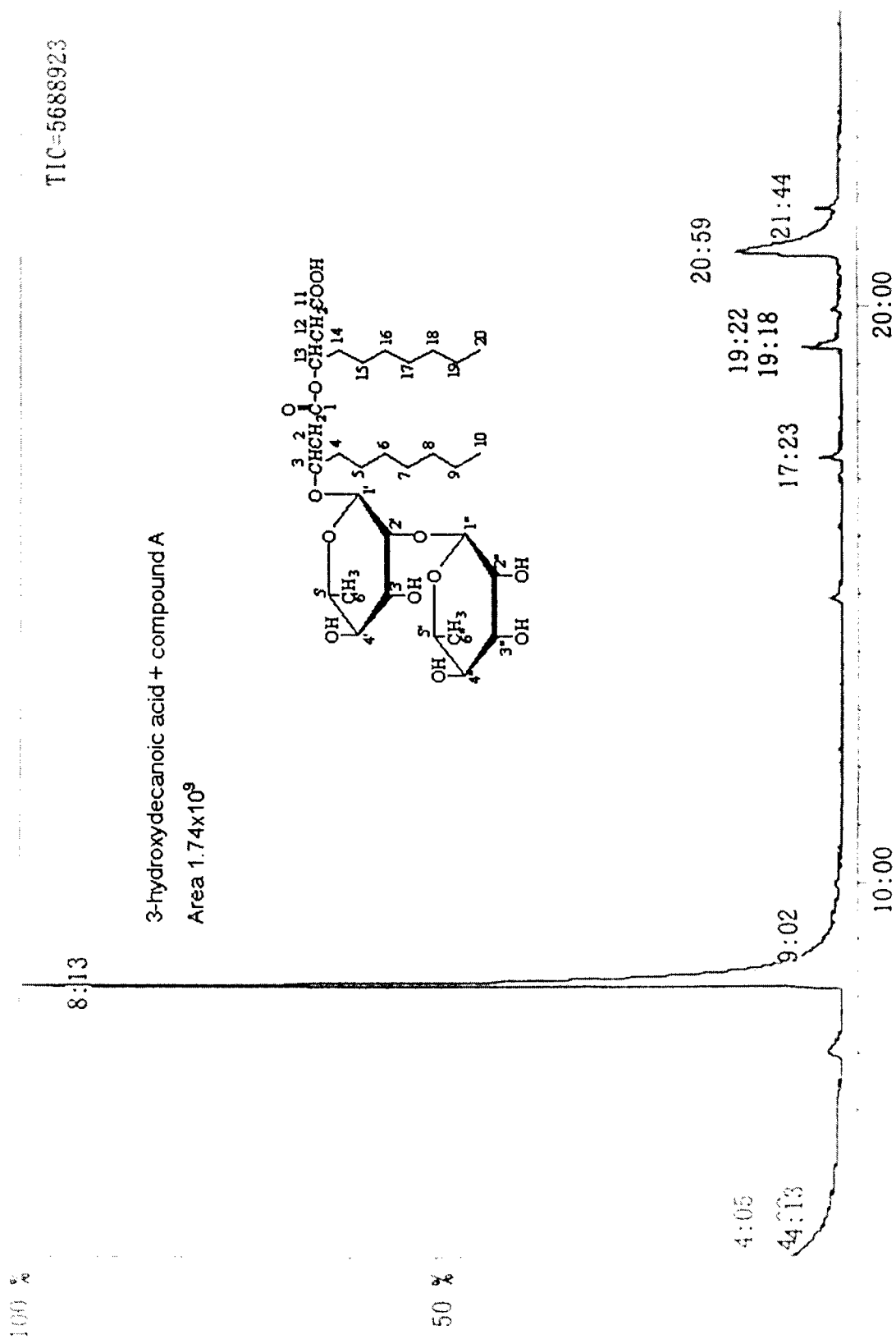


ภาพประกอบ 40 GC-MS spectrum ของสารมาตรฐานน้ำตาล L-rhamnose + L-fucose + ส่วนของน้ำตาลของสารประกอบ A

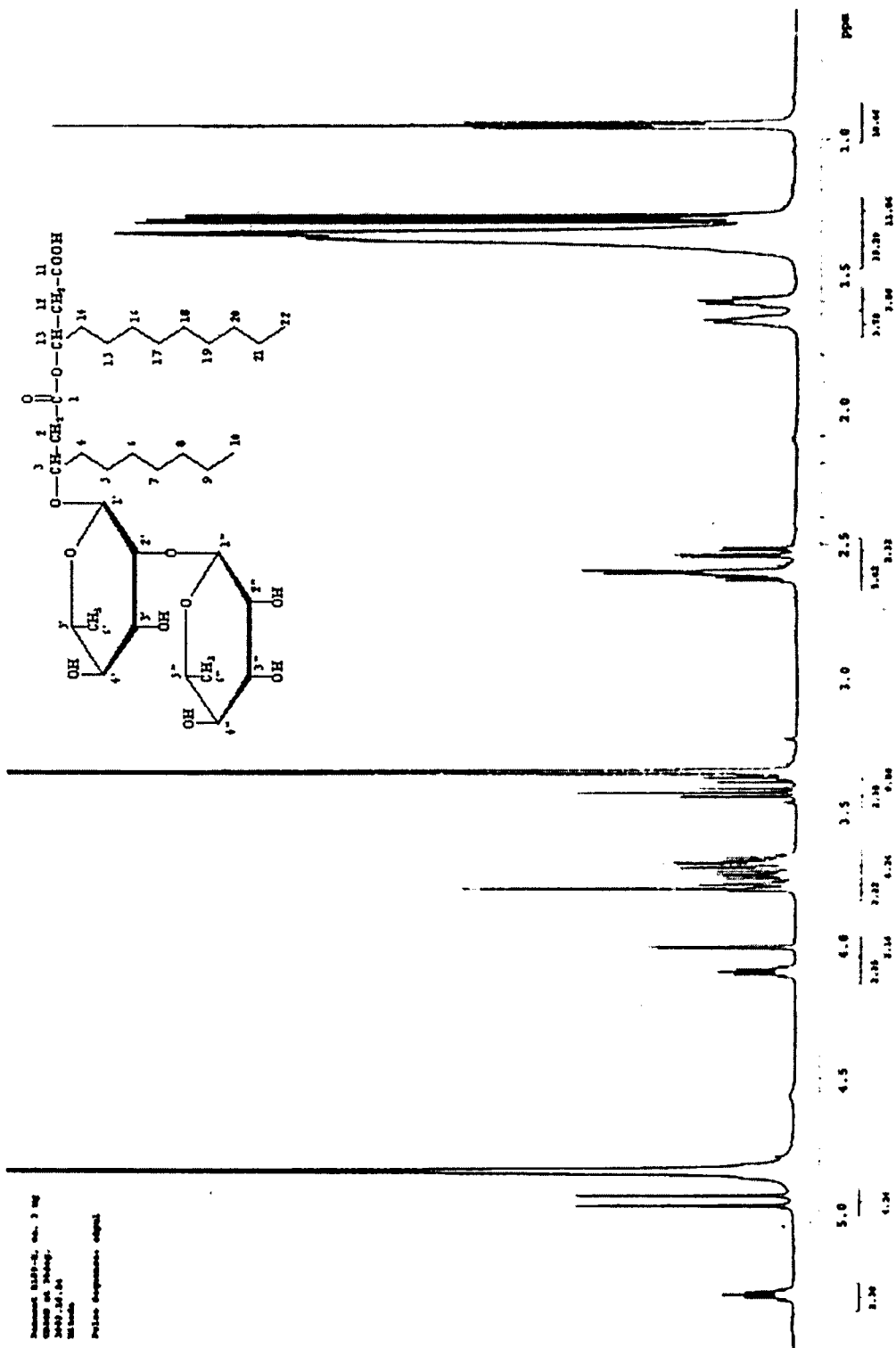
1.1.8



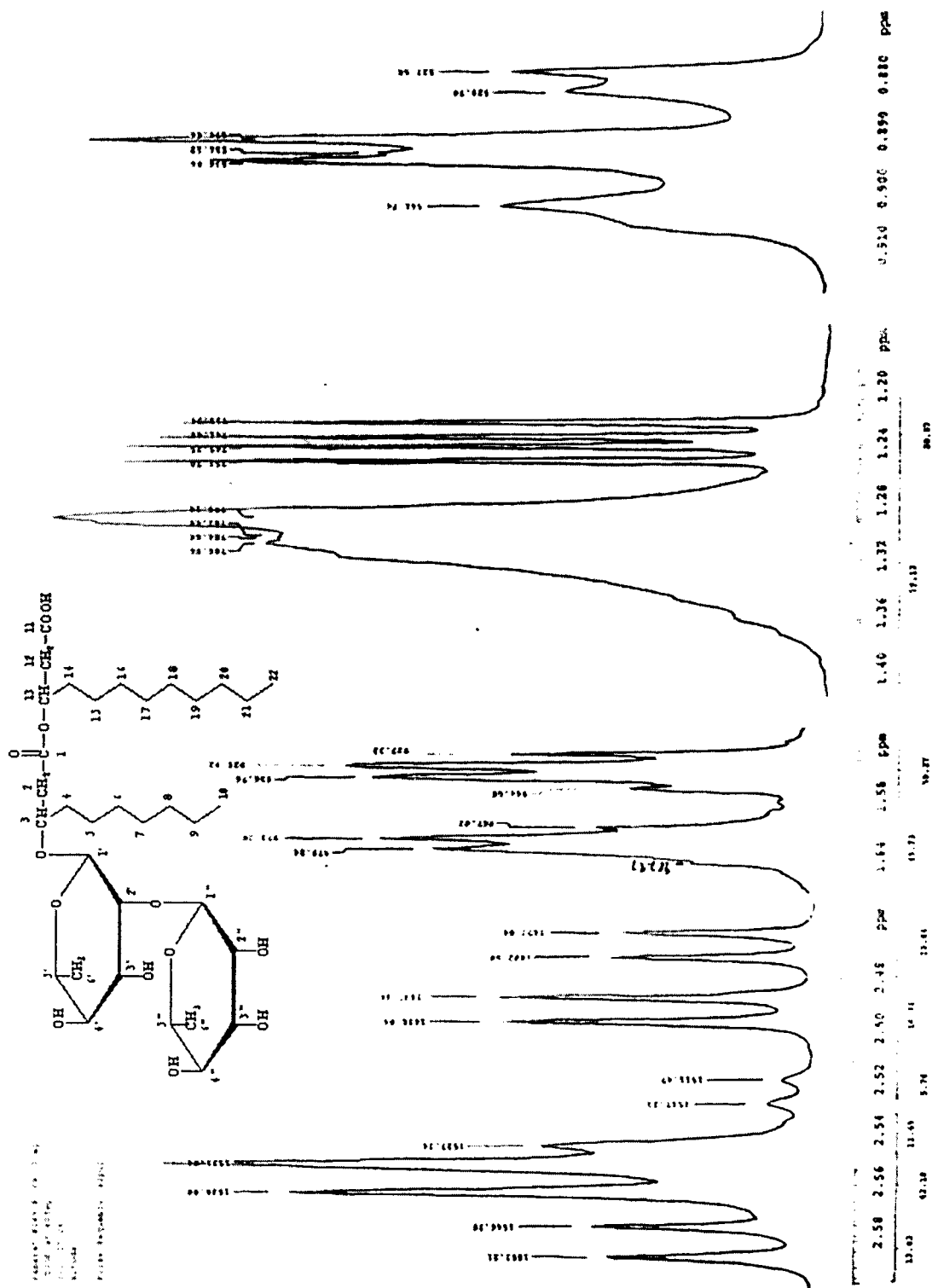
ภาพประกอบ 41 GC-MS spectrum ของสารมาตรฐาน 3-hydroxydecanoic acid



ภาพประกอบ 43 GC-MS spectrum ของสารมาตรฐาน 3-hydroxydecanoic acid + ส่วนที่ได้ไขมันของสารประกอบ A

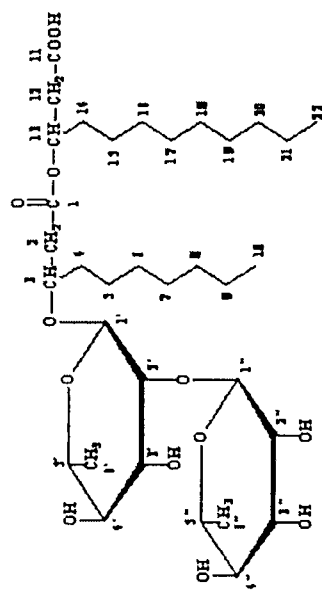


44 ^1H NMR spectrum of compound B (CD_3OD , 500 MHz)

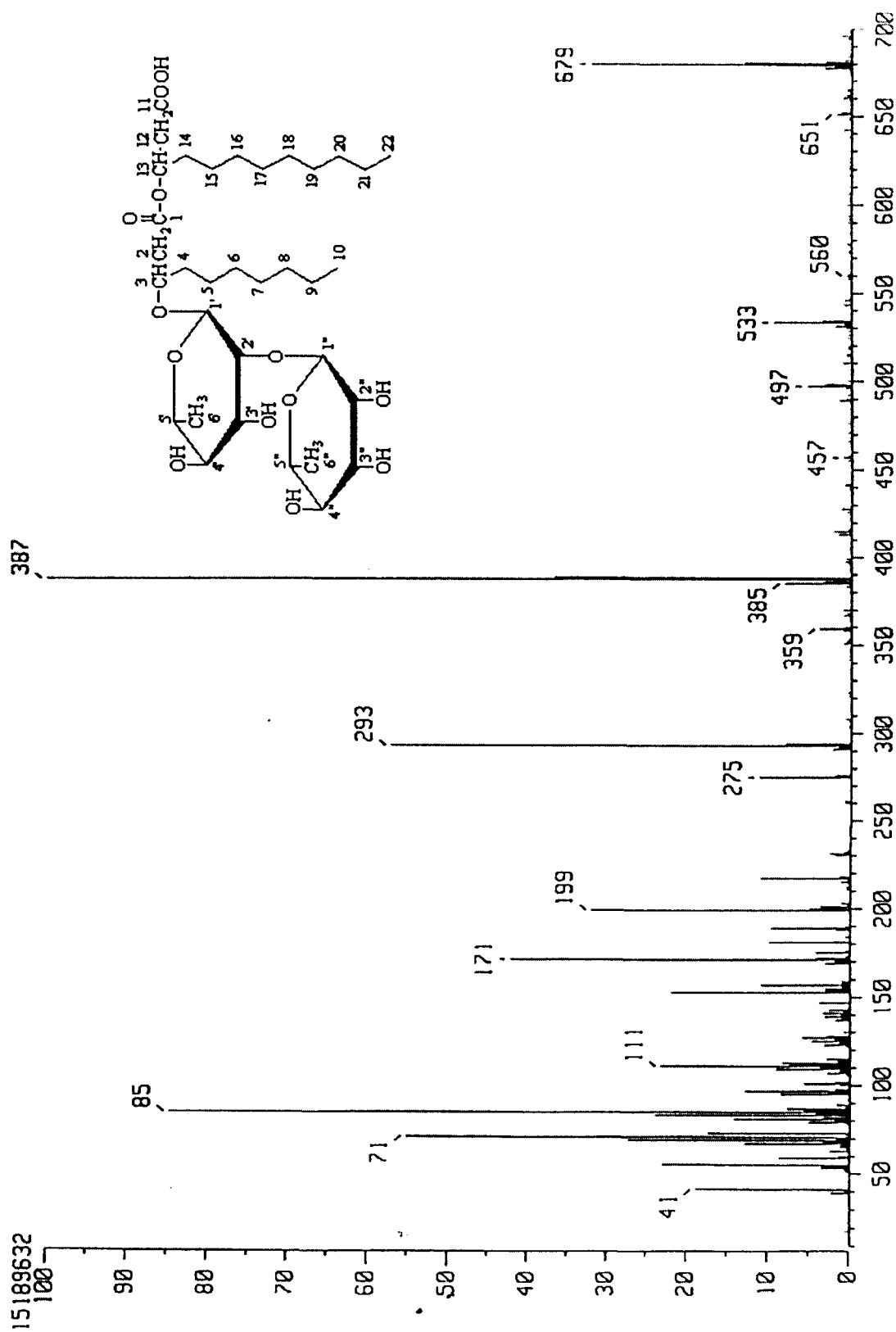


45 ¹H NMR spectrum of compound 45 in CD₃OD (500 MHz)

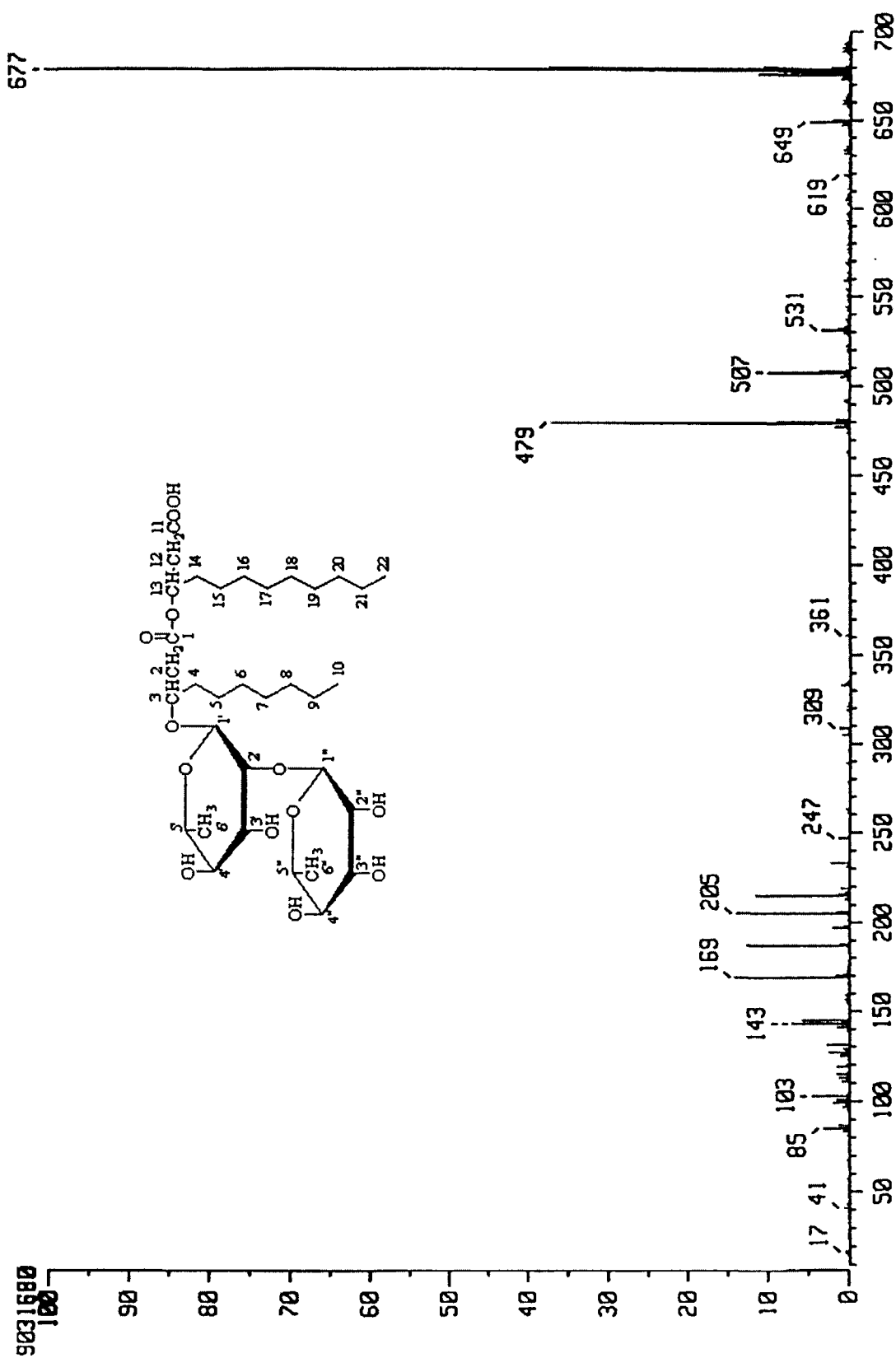
Experiment 47
 13C NMR (150 MHz, CDCl3)
 200, 180, 160, 140, 120, 100, 80, 60, 40, 20, 0 ppm



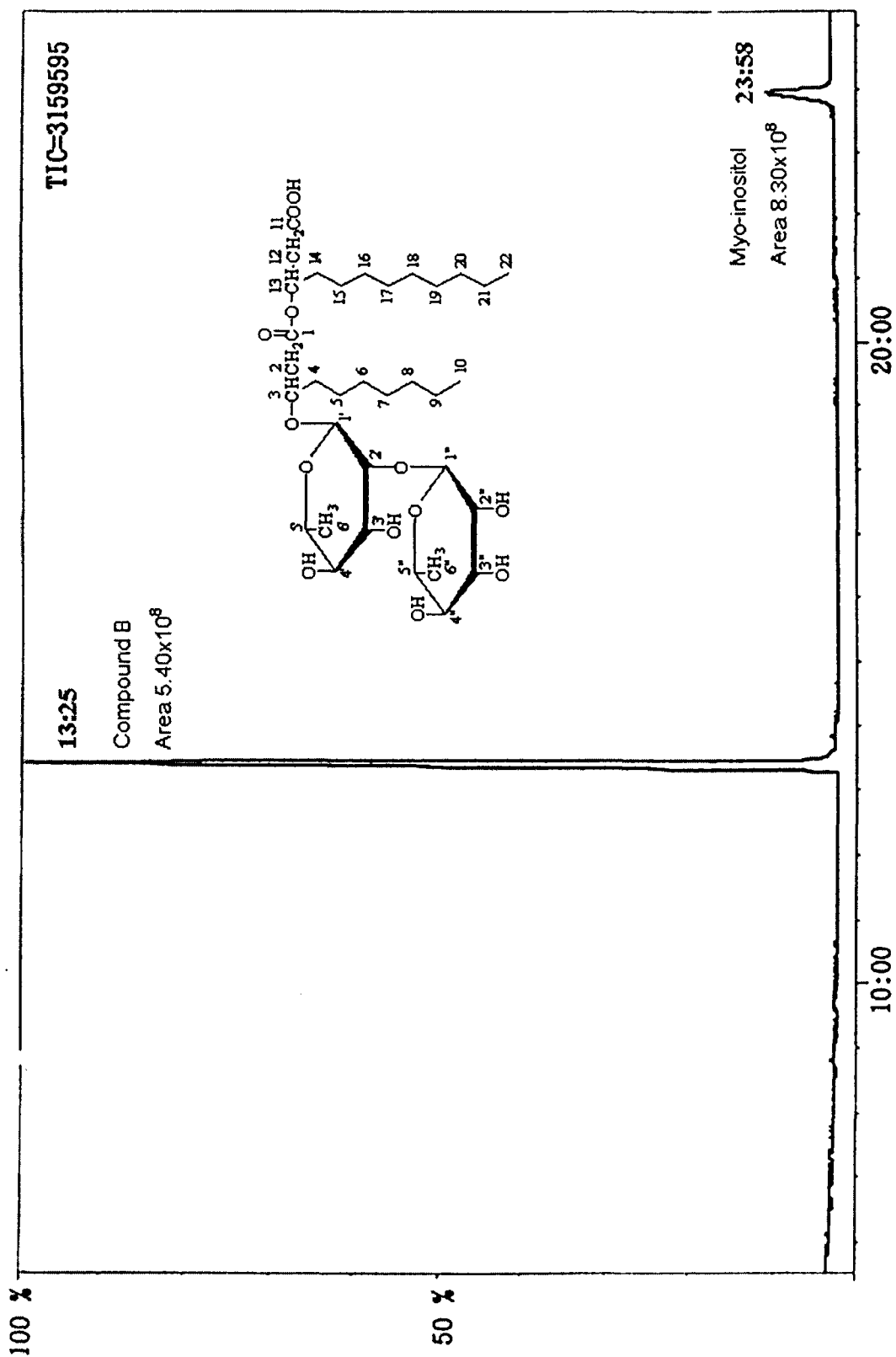
47 13C NMR spectrum of compound 47 (CDCl3, 150 MHz)



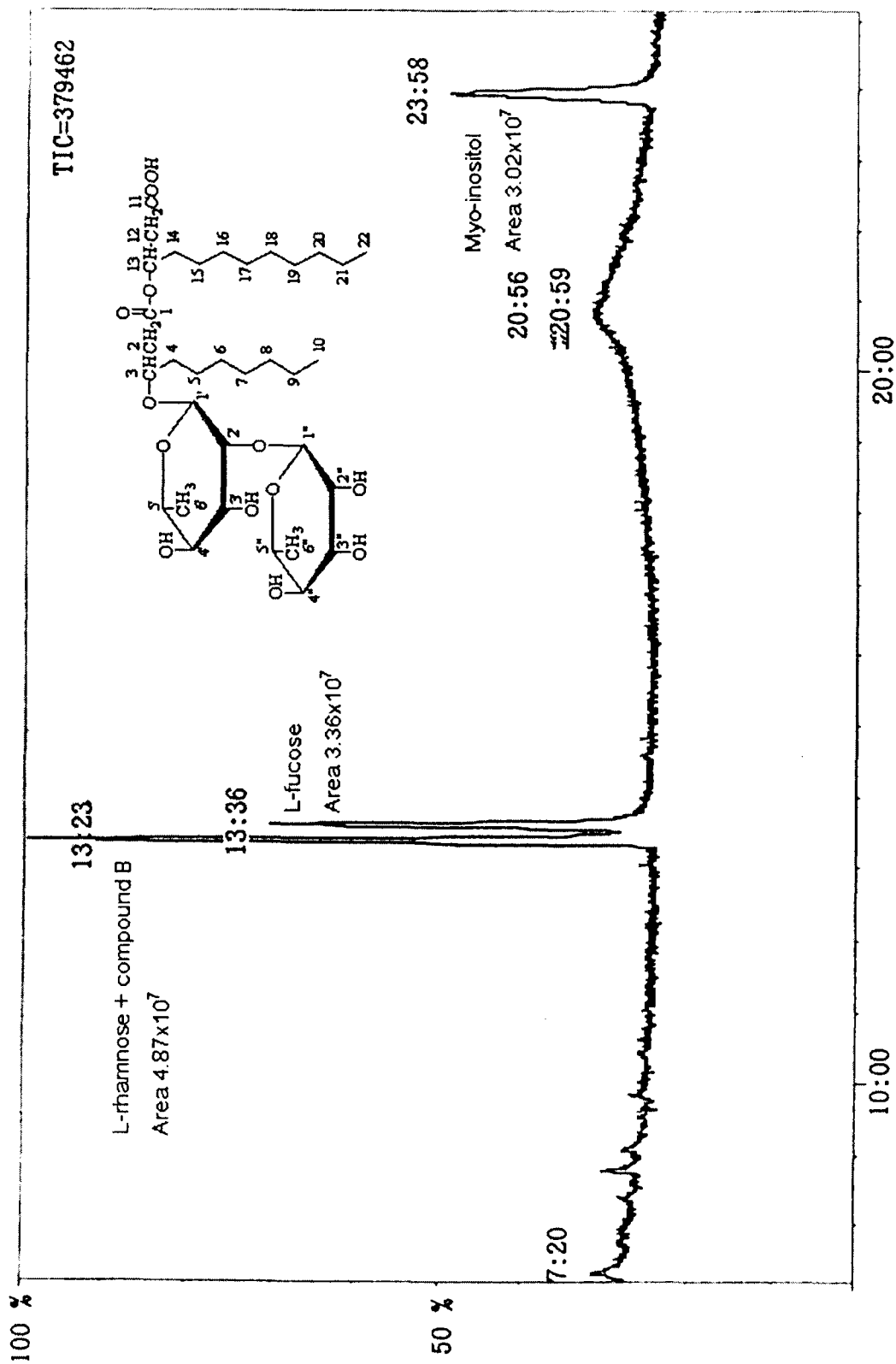
ภาพสเปกตรัมของสารประกอบ B



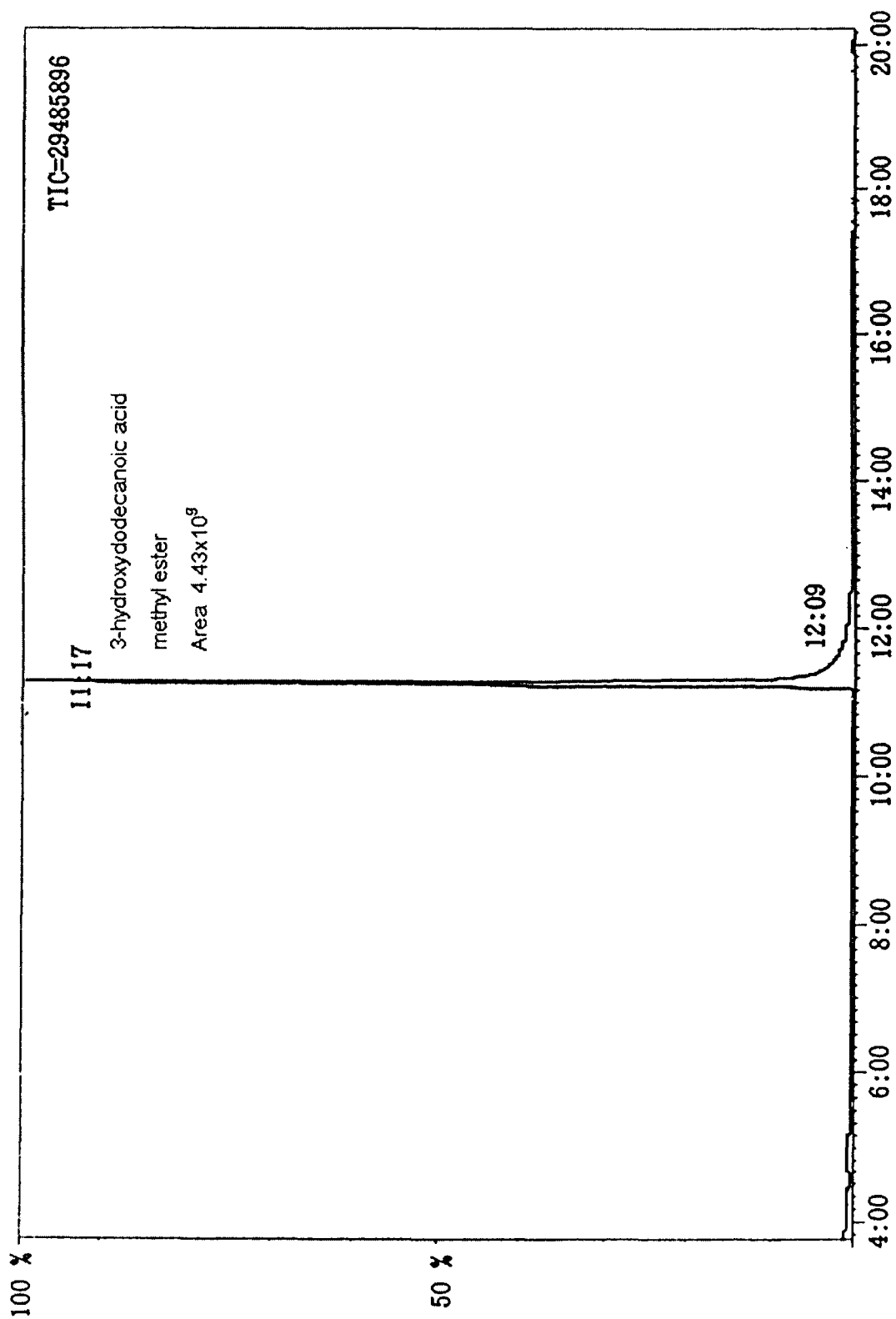
ภาพมวลสารประกอบ 49 mass spectrum (negative ion mode) ของสารประกอบ B



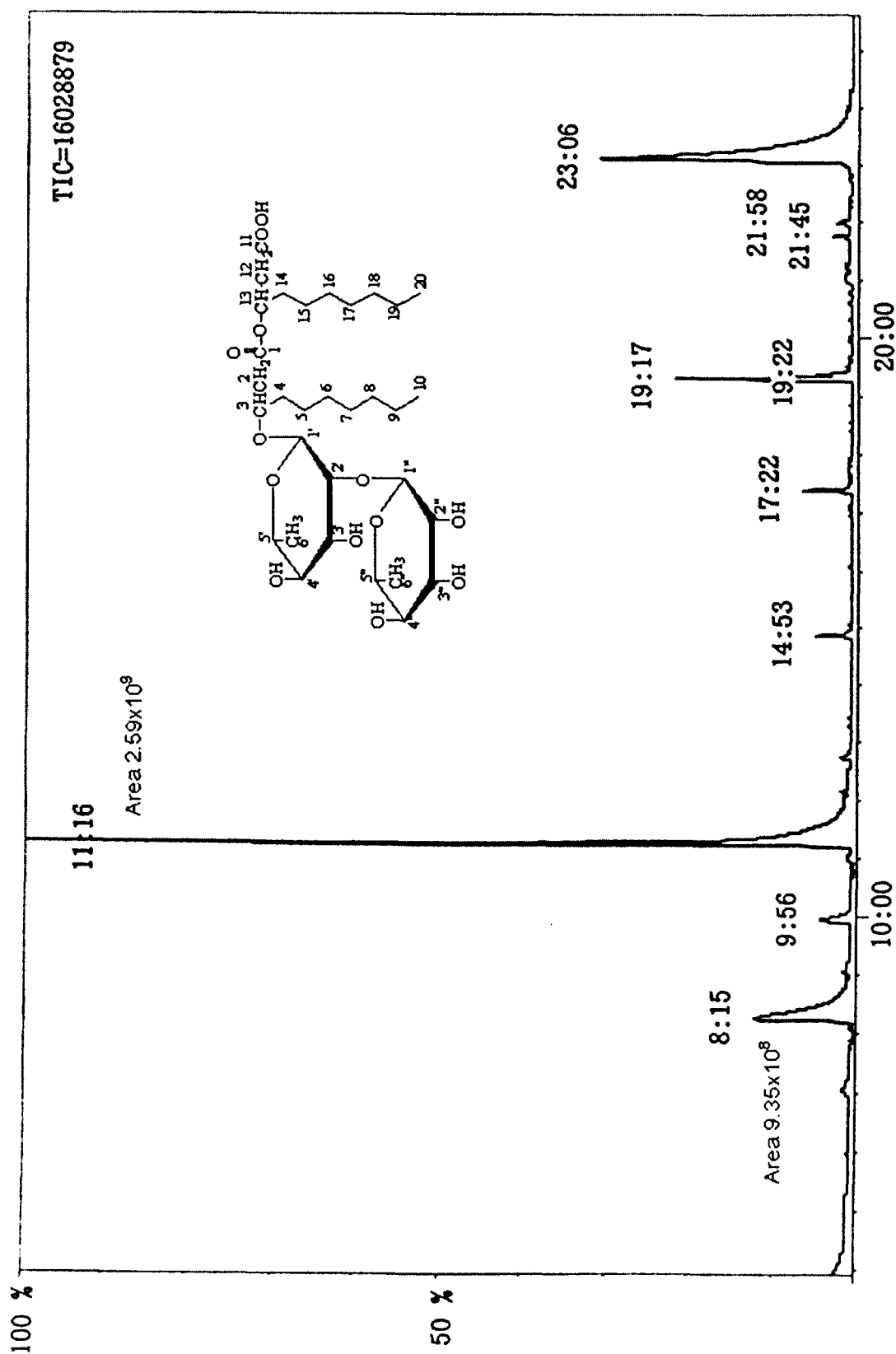
ภาพประกอบ 50 GC-MS spectrum ส่วนของน้ำคาสงสารประกอบ B



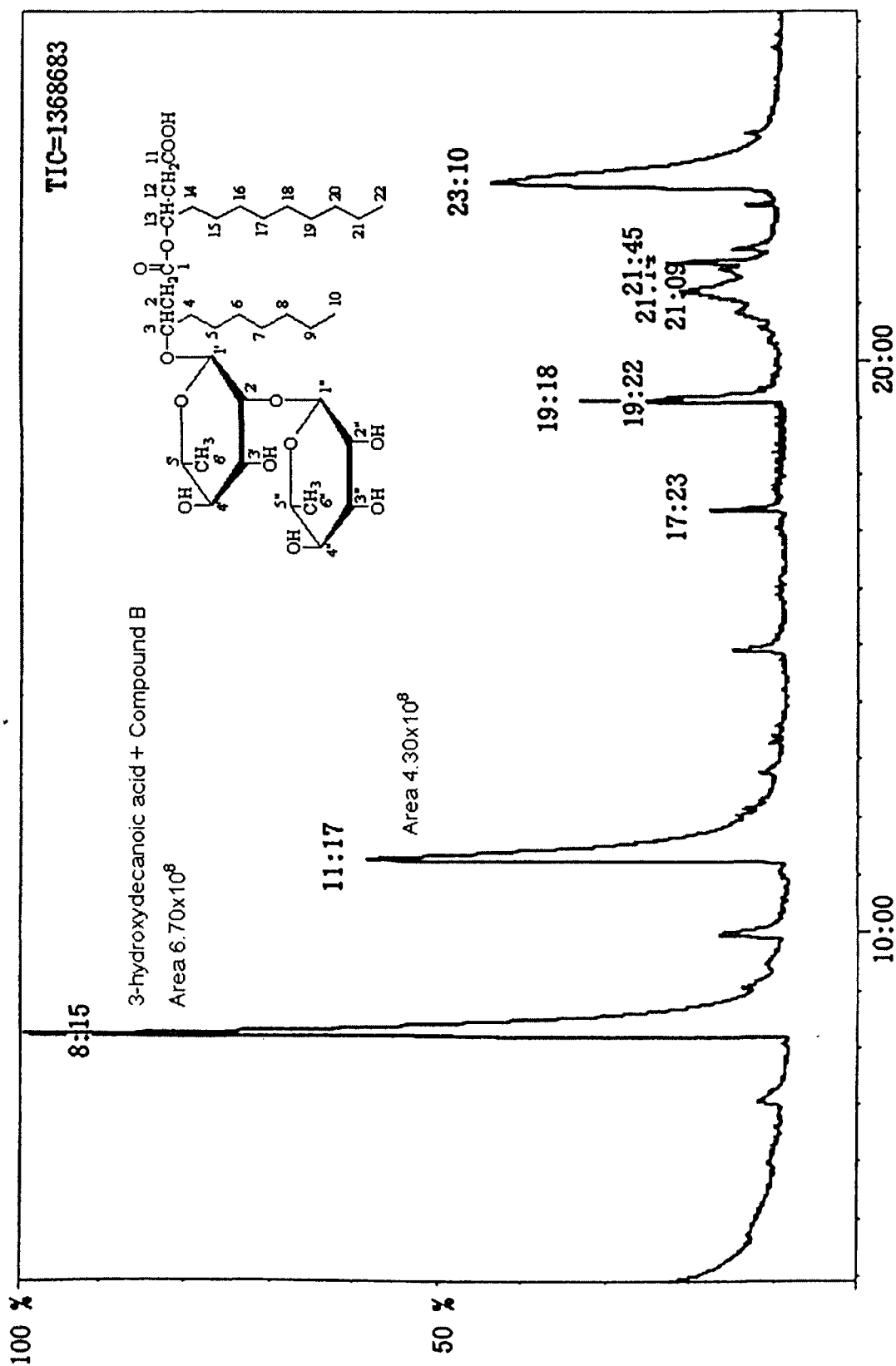
ภาพประกอบ 51 GC-MS spectrum ของสารมาตรฐานน้ำตาล L-thamnose + L-fucose + ส่วนของน้ำตาลของสารประกอบ B



תוצרת 52 GC-MS spectrum של תרכובת 3-הידרוקסידודקאנואית מתילית

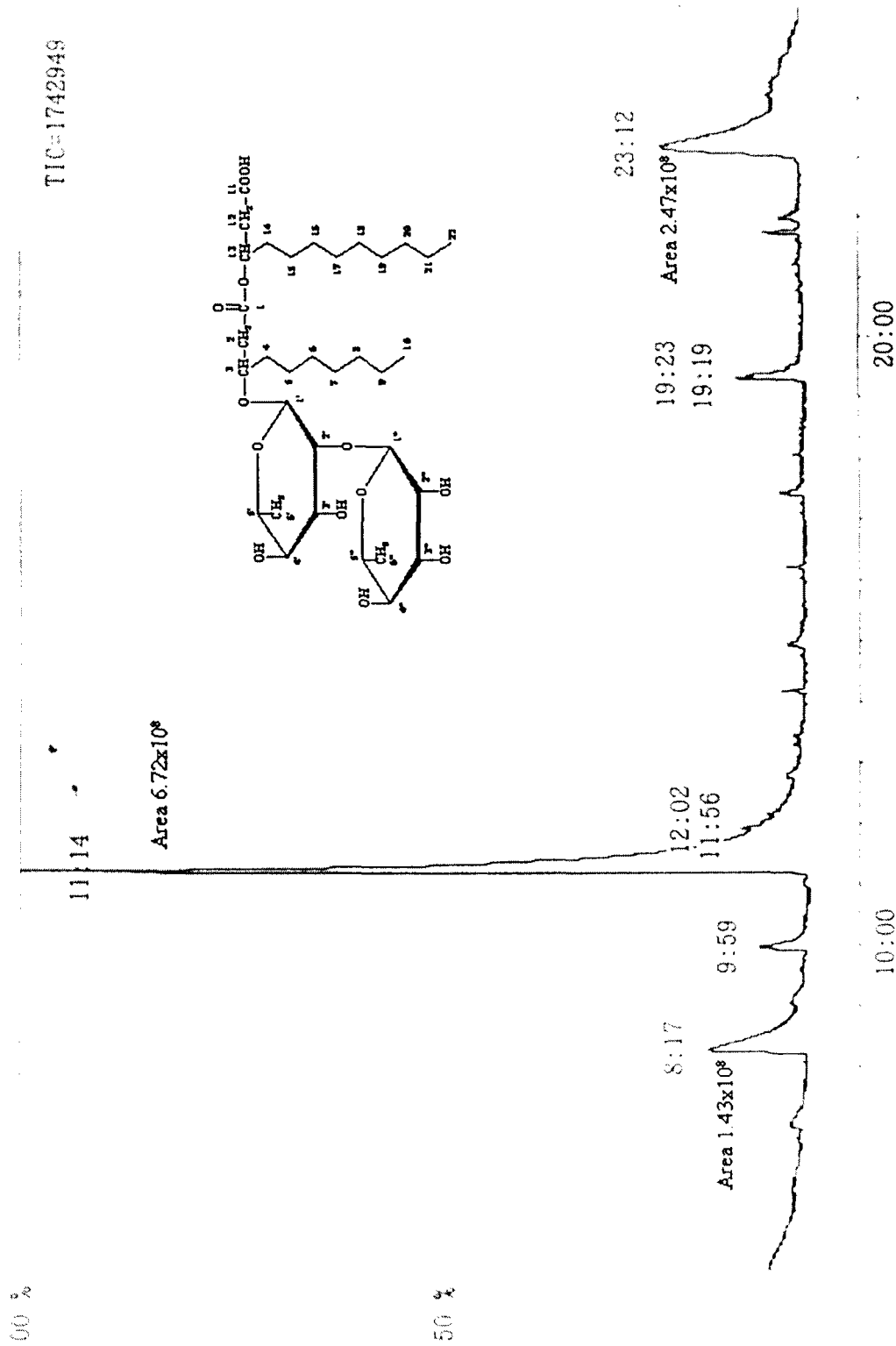


ภาพประกอบ 53 GC-MS spectrum ส่วนของกรดไขมันของสารประกอบ B



ภาพประกอบ 54 GC-MS spectrum ของสารมาตรฐาน 3-hydroxydecanoic acid + ส่วนของการได้ไขมันของสารประกอบ B

100 %



ภาพประกอบ 55 GC-MS spectrum ของสารมาตรฐาน 3-hydroxydodecanoic acid methyl ester + ส่วนกรดไขมันของสารประกอบ B

อภิธานศัพท์

อภิธานศัพท์

<i>br</i>	=	broad
<i>d</i>	=	doublet
<i>dd</i>	=	doublet of doublet
<i>dq</i>	=	doublet of quartet
<i>t</i>	=	triplet
<i>m</i>	=	multiplet
<i>p</i>	=	para
<i>q</i>	=	quartet
<i>s</i>	=	singlet
<i>J</i>	=	coupling constant
μg	=	microgram
δ	=	chemical shift
CDCl_3	=	deuteriochloroform
CD_3OD	=	deuterated methanol
CH_3CN	=	acetonitrile
FAB-MS	=	fast atom bombard mass spectroscopy
GC-MS	=	gas chromatography mass spectroscopy
MAD	=	minimum active dose
MeOH	=	methanol
MHz	=	Mega Hertz
$[\text{M}+\text{H}]^+$	=	molecular ion (positive ion mode)
$[\text{M}-\text{H}]^-$	=	molecular ion (negative ion mode)
m/z	=	mass to charge ratio
TMS	=	tetramethylsilane
^1H NMR	=	Proton Nuclear Magnetic Resonance
^{13}C NMR	=	Carbon Nuclear Magnetic Resonance
TLC	=	thin layer chromatography

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นางสาววิภาวรรณ เพชลีหะ
วันเดือนปีเกิด	31 ตุลาคม 2517
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดจันทบุรี
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	305/14-15 ซ.ท่าแฉลบ 5 ถ.ท่าแฉลบ ต.ตลาด อ.เมือง จ.จันทบุรี 22000 โทรศัพท์ (039) 311224
ตำแหน่งหน้าที่การงานในปัจจุบัน	อาจารย์ 1 ระดับ 4
สถานที่ทำงานในปัจจุบัน	โรงเรียนท่าใหม่ "พูลสวัสดิ์ราษฎร์นุกูล" อ.ท่าใหม่ จ.จันทบุรี 22120 โทรศัพท์ (039) 431341
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2535	มัธยมศึกษาตอนปลาย (แผนกวิทยาศาสตร์) โรงเรียนเบญจมราชูทิศ จ.จันทบุรี
พ.ศ. 2538	ครุศาสตร์บัณฑิต (เคมี) สถาบันราชภัฏนครสวรรค์
พ.ศ. 2546	การศึกษามหาบัณฑิต (เคมี) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพฯ