

## บทที่ 2

### บททวนวรรณกรรม

#### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

##### 2.1 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิว (surfactants) คือสารที่มีลักษณะเป็น amphiphilic molecules เนื่องจากโมเลกุลของสารจะประกอบด้วย 2 ส่วนที่สำคัญ คือส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic moiety) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic moiety) ซึ่งจะเป็นสารในกลุ่ม hydrocarbon ในขณะที่ส่วนที่ชอบน้ำ อาจจะเป็นได้ทั้งกลุ่มของสารที่ไม่มีขั้ว (non-ionic) หรือมีขั้วบวกหรือลบ (positive or negative charge) หรือมีทั้งสองขั้วปนกัน (amphoteric) ทำให้มีคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิวระหว่างสาร 2 ชนิด ที่ไม่ละลายกันตามธรรมชาติให้สามารถผสมกันได้ เช่น น้ำและน้ำมัน (interface tension) หรือน้ำและอากาศ (surface tension) โดยทำให้เกิด microemulsion ซึ่งเป็นบริเวณที่น้ำสามารถละลายในสาร hydrocarbons และสาร hydrocarbons สามารถละลายในน้ำได้ (Desai, 1997) ดังนั้นทำให้สารลดแรงตึงผิวถูกนำมาใช้เพื่อทำหน้าที่เป็น detergency, emulsifying, forming, solubilizing, wetting และ dispersing agents จากคุณสมบัติที่หลากหลายเหล่านี้ทำให้ surfactants ได้ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ มากมาย เช่น อุตสาหกรรมการผลิตเส้นใยผ้า กระดาษ โพลีเมอร์ พลาสติก เครื่องสำอาง ยา อาหาร และอุตสาหกรรมการผลิตเครื่องจักรกล หรือแม้แต่การนำมาใช้ประกอบประกอบสำคัญในห้วปากกาลูกสูบและกระป๋องกาแפהที่ไม่สามารถทดแทนด้วยสารอื่นได้ อาจกล่าวได้ว่า surfactants เป็นหนึ่งในสารเคมีที่มีการใช้มากที่สุดในชีวิตประจำวันก็ว่าได้ (Kitamoto, 2002)

ในตลาดทั่วโลก สารลดแรงตึงผิวที่มีการซื้อขายต่อปีมูลค่าสูงถึง 9.4 พันล้านดอลลาร์สหรัฐ และมีแนวโน้มความต้องการใช้ยังคงเพิ่มขึ้น 35% จนถึงสิ้นศตวรรษที่ 20 ในตลาดภายในของญี่ปุ่นเองมีการใช้สารดังกล่าวนี้มากกว่า 1 พันล้านตันต่อปี (Kitamoto, 2002) พบว่าเกือบทั้งหมดของสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้ถูกสังเคราะห์ขึ้นโดยใช้สารตั้งต้นจากสารในกลุ่มปิโตรเคมี (chemically derived from petroleum) สารเคมีสังเคราะห์เหล่านี้ย่อยสลายยาก ตกค้างอยู่ในดิน น้ำและสิ่งแวดล้อมเป็นเวลานาน จากกระแสความตื่นตัวในเรื่องสิ่งแวดล้อมของโลก และความนิยมการใช้ผลิตภัณฑ์ที่มาจากธรรมชาติ ทำให้ความสนใจที่จะค้นหาสารลดแรงตึงผิวที่มาจากธรรมชาติกลายเป็นสิ่งที่มีความสำคัญ สารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้จาก พืชหรือสัตว์ เช่น สบู่ lecithin หรือ saponin ยังคงนิยมนำไปใช้ทั้งในบ้านและอุตสาหกรรม และหนึ่งในสารลดแรงตึงผิวที่ได้จากธรรมชาติ ซึ่งกำลังได้รับความสนใจอย่างมากคือสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตมาจากจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย ยีสต์และรา ซึ่งชื่อที่นิยมเรียกกันทั่วไปคือ biosurfactants หรือ microbial surfactants (Lang, 2002)

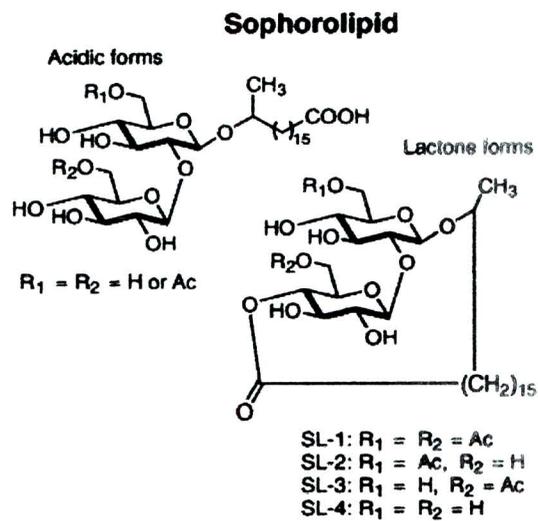
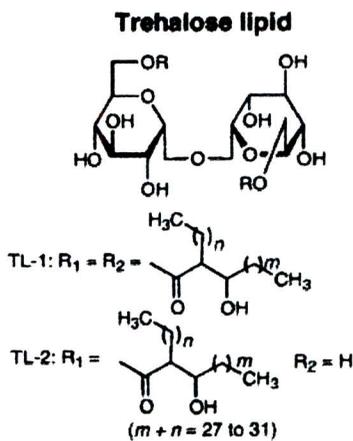
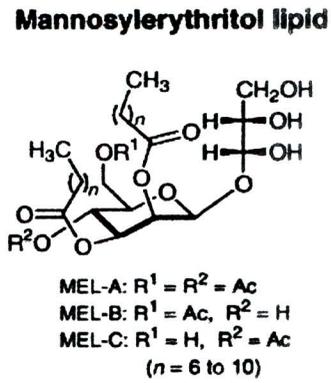
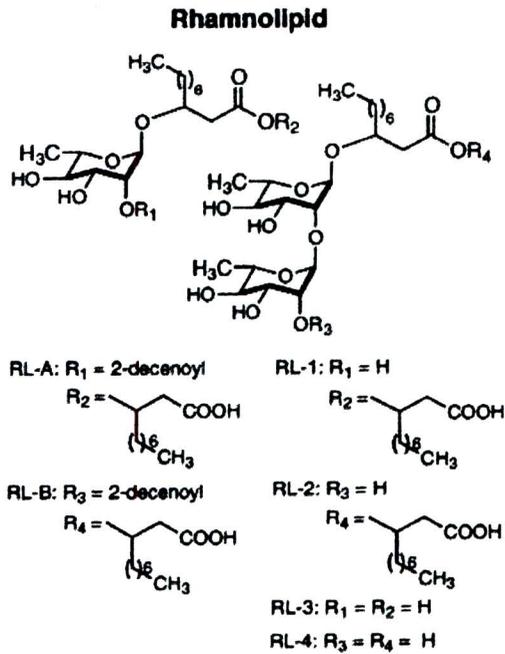
Biosurfactants ถูกค้นพบครั้งแรกในปี 1960 ในงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการหมักสาร hydrocarbon ตั้งแต่ครั้งแรกที่ถูกค้นพบ biosurfactants ก็ได้รับความสนใจในฐานะ alternative surfactants เนื่องจากคุณสมบัติที่สามารถย่อยสลายได้ง่ายและมีความปลอดภัยในการนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์ ในระหว่าง 10 ปี หลังจากการค้นพบ ความสนใจในสารดังกล่าวนี้ก็ยิ่งเพิ่มมากขึ้น จากการค้นพบคุณสมบัติซึ่งเป็นเอกลักษณ์ที่หาไม่ได้ในสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี นั่นคือการทำงานในฐานะสารชีวภาพ (biological activities) เช่นคุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ (anti-bacterial) และการต่อต้านมะเร็ง (anti-tumor) (Lang, 2002) หรือคุณสมบัติอื่นๆ เช่น ให้ความชุ่มชื้น (moisturizer effect) ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สามารถนำมาทำ moisturizer สำหรับผิว หรือ skin softener ในเครื่องสำอาง อีกหนึ่งตัวอย่างคือ mannosylerythritol lipid (MEL) ซึ่งเป็น glycolipid BS ที่มีคุณสมบัติ molecular orientation และสามารถในการสร้างสมดุลระหว่างส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำได้ดีมาก ทำให้สารดังกล่าวนี้ถูกนำมาใช้ในการขนส่งยาและยีนไปสู่อวัยวะเป้าหมายภายในร่างกาย (drug- and gene- delivery system) โดยทำงานร่วมกับ carrier ตัวอื่น เช่น phospholipid และ polymer (Kitamoto, 2002)

## 2.2 การจัดจำแนกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

การจัดจำแนกประเภทของสารลดแรงตึงสังเคราะห์ (synthetic surfactant) สามารถจำแนกได้ตามหมู่ที่มีหัวในสูตร โครงสร้างแต่สำหรับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้น สามารถจะใช้เกณฑ์ในการจัดจำแนกองค์ประกอบทางเคมีและชนิดของจุลินทรีย์ที่สร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นๆ ซึ่งโครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประกอบด้วย ส่วนที่ชอบน้ำ ได้แก่ กรดอะมิโนหรือเปปไทด์ที่เป็นประจุลบ หรือประจุบวก น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว โมเลกุลคู่หรือเป็นสาย และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ ได้แก่ สารประกอบของไขมันทั้งไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว ซึ่งทำให้สามารถจัดจำแนกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพออกได้เป็น 5 กลุ่มใหญ่คือ (Desai and Bannat, 1997)

### 2.2.1. ไกลโคไลปิด (glycolipid)

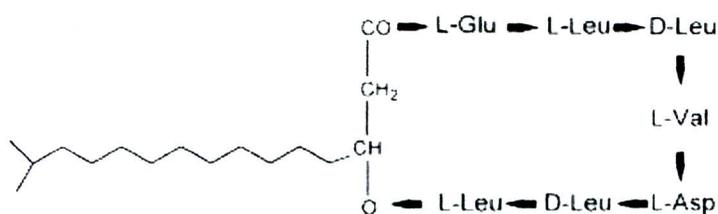
ไกลโคไลปิดเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต เช่น กลูโคส แมนโนส กาแล็คโตส กรดลิวโรนิก แรมโนส และการแล็คโตสซัลเฟต เชื่อมต่อกับไขมัน เช่น aliphatic acid และ hydroxyl-aliphatic acid โดยอาจจะเชื่อมต่อกับคาร์โบไฮเดรต 1-2 โมเลกุล สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่จัดเป็นไกลโคไลปิดคือ ทรีฮาโลส (trehalose) โซโฟโรไลปิด (sophorolipid) แรมโนไลปิด (rhamnolipid) เตตระเอซิลกลูโคส (tetraacylglycerol) ไตรเอซิลกลูโคส (triacylglycerol) แมนโนซิลเอริททอลไลปิด (mannosylerythritol lipid) ซูโครสไลปิด (sucrose lipid) ฟรุคโตสไลปิด (fructose lipid) ไดเอซิล อินอสิทอล แมนโนไซด์ (diacyl inositol mannoside) เป็นต้น



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทไกลโคไลปิด (Kitamoto, *et al.*, 2002)

**2.2.2. ไลโปเปปไทด์และไลโปโปรตีน (Lipopeptide and Lipoprotein)**

ไลโปเปปไทด์และไลโปโปรตีน เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มักมีคุณสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะ ไลโปเปปไทด์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *Bacillus subtilis* เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด เช่น surfactin มีคุณสมบัติเป็นสารต่อต้านแบคทีเรีย Iturin และ fengycin ยังมีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งเชื้อราได้อีกด้วย โครงสร้างของ surfactin แสดงดังภาพ 2) จากการทดลองพบว่า surfactin สามารถลดค่าแรงตึงผิวของน้ำให้เหลือเพียง 27 mN/m (Lang, 2002)



รูปที่ 2.2: โครงสร้างของเซอแฟกตินที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* (Lang, 2002)

### 2.2.3. ฟอสโฟไลปิดและกรดไขมัน (Phospholipid and fatty acid)

#### 2.2.3.1 ฟอสโฟไลปิด (Phospholipid)

พบได้ในจุลินทรีย์เกือบทุกชนิดเนื่องจากเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเซลล์ แต่มีส่วนน้อยที่ปล่อยออกนอกเซลล์ ทำให้วัดค่าลดแรงตึงผิวได้ยาก โครงสร้างทั่วไปของฟอสโฟไลปิดประกอบด้วย กลีเซอรอลต่อกับกรดไขมัน เช่น ฟอสฟตดิซิลไอโนซิทอล (phosphatidylinositol) ฟอสฟาติลกลีเซอรอล (phosphatidylglycerol) และกรดฟอสฟาติก (phosphatidic acid) ที่ผลิตจากเชื้อ *Thiobacillus thiooxidans* และ *Rhodococcus erythropolis* ที่ผลิตฟอสฟาติลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) นอกจากนี้ยังพบการสร้างฟอสโฟไลปิดใน *Corynebacterium alkanolyticum*, *Candida tropicalis* (Cooper และ Zajic, 1980 )

#### 2.2.3.2 กรดไขมันและไขมันธรรมชาติ (fatty acid and neutral lipid)

สามารถพบได้ในเซลล์ของจุลินทรีย์ทุกชนิดและมักจะปล่อยออกนอกเซลล์ เช่น กรดคาร์บอกซิลิก (carboxylic acid), แอลกอฮอล์ (alcohol), เอสเทอร์ (ester), โมโนกลีเซอไรด์ (monoglyceride), ไดกลีเซอไรด์ (diglyceride), และไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ซึ่งต่างก็มีคุณสมบัติลดแรงตึงผิว เช่น กรดโครีโนไมโคลิก (corynomycolic acid) ที่ผลิตจากเชื้อ *Corynebacterium lepus* (Cooper และ Zajic, 1980 ) ในปี 1990 Matsuyama และคณะได้รายงานถึงเชื้อแบคทีเรีย *Serratia rubidaea* ATCC27593 ที่ผลิตสารรูบิเวทินอาร์1 ซึ่งเป็นไขมันชนิด  $\beta$ -hydroxy fatty acid ที่มีจำนวนคาร์บอน 10 อะตอมเชื่อมต่อกับ hydroxy fatty acid ที่มีจำนวนคาร์บอน 12, 14 หรือ 16 อะตอมด้วยพันธะเอสเทอร์ (Matsuzama, et al., 1990)

### 2.2.4. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์ (polymeric biosurfactants)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทนี้มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เช่น อิมัลชัน (emulsan) ที่ผลิตได้จากเชื้อ *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 ซึ่งมีลักษณะเป็นไลโปโพลิแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) ที่มีประจุลบ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ  $9.9 \times 10^5$  D อิมัลชันไม่มีคุณสมบัติลดแรง interfacial tension แต่ทำให้เกิดอิมัลชันได้ดี คือใช้เพียง 0.001-0.01% และอิมัลชันที่เกิดขึ้นก็มีความเสถียรด้วย ไลโปแซน (liposan) ผลิตจากเชื้อ *Candida lipolytica* ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต 83% ได้แก่กลูโคส กาแลคโตส และกรดกาแลคโดย

โรนิกและโปรตีน 17% อะลาเซน (alasan) ผลิตจากเชื้อ *Acinetobacter radioresistens* KA53 ประกอบด้วยโปรตีนและไขมัน มีประจุลบ น้ำหนัก โมเลกุล  $9 \times 10^5$  D (Desai, 1993; และ Navon-Veezia, *et al.*, 1995)

### 2.2.5. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดอนุภาค (particulated biosurfactant)

สารลดแรงตึงผิวประเภทนี้สามารถผลิตได้จากเชื้อหุ้มเซลล์ vesicle ซึ่งสารที่สร้างขึ้นส่วนใหญ่ก่อให้เกิดไมโครอิมัลชัน (microemulsion) กับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ และเป็นส่วนสำคัญในการลำเลียงอัลเคน (alkane) เข้าสู่เซลล์จุลินทรีย์ ตัวอย่างเช่น vesicle ของ *Acinetobacter* sp. HO1-N มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20-50 นาโนเมตร ความหนาแน่น  $1.158 \text{ g/cm}^3$  ซึ่งประกอบด้วยโปรตีน ฟอสโฟไลปิด และไลโปโพลิแซคคาไรด์ (Kappeli and Finnetry, 1979)

## 2.3 การตรวจวัดคุณสมบัติพื้นฐานของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถตรวจวัดได้หลายวิธี เช่น การวัดค่าแรงตึงผิว (surface tension), ค่าแรงตึงผิวระหว่างสองพื้นผิวที่สัมผัสกัน (interfacial tension), ค่าความสามารถในการเกิดอิมัลชัน (emulsification), ค่าอัตราส่วนการชอบน้ำและค่าการกระจายตัวของน้ำมัน เป็นต้น

### 2.3.1 ค่าแรงตึงผิว (surface tension)

แรงตึงผิวเป็นแรงที่กระทำระหว่างของเหลวและอากาศ มักจะใช้วัดค่าแรงตึงผิวระหว่างน้ำกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ค่าแรงตึงผิวอาจวัดโดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า tensiometer ค่าที่วัดมีหน่วยเป็น mN/m หรือ dyne/cm เมื่อมีการเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลงในน้ำ โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวจะเกิดการสะสมตัวอยู่ระหว่างผิวสัมผัสสองเฟส มีผลทำให้ค่าแรงตึงผิวมีค่าลดลง โดยปกติค่าแรงตึงผิวของน้ำกลั่นมีค่าเท่ากับ 72 mN/m และหากความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวที่เติมลงไปมีค่าเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ จนในที่สุดทำให้บริเวณนี้อิ่มตัวไปด้วยโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวแล้ว ค่าแรงตึงผิวที่ลดลงจะคงที่ที่ระดับวิกฤต ที่แม้จะมีการเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวเข้าไปในระบบมากกว่านี้ ก็ยังทำให้ค่าแรงตึงผิวไม่มีการเปลี่ยนแปลง ส่วนโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวส่วนเกินที่ไม่สามารถแทรกตัวที่ผิวสัมผัสระหว่างเฟสทั้งสองได้ จะเกิดเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า ไมเซลล์ (micelle) ความเข้มข้นที่น้อยที่สุด ณ จุดที่ทำให้โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวมารวมตัวกันเกิดเป็นไมเซลล์นี้ เรียกว่า critical micelle concentration (CMC) ซึ่งเป็นสมบัติเฉพาะตัวของสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิด ค่า CMC เป็นค่าที่บ่งบอกถึงประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวได้เป็นอย่างดี มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อลิตร (mg/l) โมลาร์ (M) หรือร้อยละโดยปริมาตร (%v/v) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดใดมีค่า CMC ต่ำ หมายความว่า เป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีคุณภาพดีเนื่องจากใช้ในปริมาณเพียงเล็กน้อย แต่สามารถทำให้ค่าแรงตึงผิวของสารละลายมีค่าต่ำลงได้มาก (เบญจมาศและคณะ, 2545)

### 2.3.2 ค่าแรงตึงผิวระหว่างสองพื้นผิวที่สัมผัสกัน (interfacial tension)

แรงตึงผิวชนิดนี้เป็นแรงที่กระทำระหว่างของเหลวกับของเหลวที่มีเฟสต่างกัน มีหน่วยเป็น mN/m การวัดแรงตึงผิวระหว่างสองพื้นผิวที่สัมผัสกันระหว่างน้ำและสารประกอบ ไฮโดรคาร์บอน เช่น น้ำกับน้ำมัน เฮกซาเดเคน (hexadecane) หรือน้ำมันก๊าด (kerosene) โดยทั่วไปค่าแรงตึงผิวน้ำกับเฮกซาเดเคน มีค่าเท่ากับ 50 mN/m และค่าแรงตึงผิวของน้ำกับ น้ำมันก๊าดมีค่าเท่ากับ 30-40 mN/m ซึ่งเมื่อเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถลดแรงตึงผิวระหว่างสองพื้นผิวที่สัมผัสกันลงเหลือ 0.1-1.0 mN/m (Gerson, 1993)

### 2.3.3 ค่าความสามารถในการเกิดอิมัลชัน (emulsification)

ค่าความสามารถในการเกิดอิมัลชัน หมายถึง ค่าที่บอกระดับความเสถียรของอิมัลชันซึ่งอิมัลชันหมายถึงผลิตภัณฑ์รูปแบบหนึ่งที่ประกอบด้วยของเหลวอย่างน้อยสองชนิดซึ่งไม่เข้ากันหรือไม่ละลายในกันและกัน เช่น น้ำกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เมื่อผสมกันจะรวมตัวกัน เป็น เนื้อเดียวกันโดยอาศัยตัวทำอิมัลชัน (emulsifier) การวัดความสามารถของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการเกิดอิมัลชันทำได้โดยการเปรียบเทียบความสามารถของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ที่มีสมบัติเป็นตัวทำอิมัลชันที่ดี (เบญจมาศและคณะ, 2545)

### 2.3.4 ค่าอัตราส่วนชอบน้ำ (hydrophilic balance, HLB)

เป็นค่าที่แสดงถึงความสามารถของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการทำให้อิมัลชันที่เกิดขึ้นอยู่ในรูปไมโครอิมัลชันที่เรียกว่า water in oil (W/O microemulsion) หรือ oil in water (O/W microemulsion) ในกรณีแรกจะเป็นระบบที่ประกอบด้วยหยดน้ำเล็กๆ (1-10 nm) แขนงลอยอยู่ตัวทำละลายอินทรีย์ (กรณีตัวทำละลายอินทรีย์มากกว่าน้ำ) กรณีหลังจะเป็นระบบที่ประกอบด้วยหยดน้ำมันเล็กๆ แขนงลอยอยู่ในน้ำ (กรณีที่มีน้ำมากกว่าตัวทำละลายอินทรีย์) โดยกำหนดให้กรดโอเลอิก (oleic acid) มีค่า HLB เท่ากับ 1 และ โซเดียมโอเลเอต (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 (เบญจมาศและคณะ, 2545)

### 2.3.5 ค่าการกระจายตัวในน้ำมัน (oil displacement)

เป็นค่าที่วัดความสามารถของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ในการทำให้แผ่นฟิล์มของน้ำมันบนผิวน้ำเกิดเป็นวงใส (clear zone) วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของพื้นที่วงใส คำนวณค่าพื้นที่ตามสูตร  $\pi r^2$  มีหน่วยเป็นตารางเซนติเมตร ( $\text{cm}^2$ ) โดยกำหนด 1 ตารางเซนติเมตร ของการกระจายน้ำมัน เท่ากับ 1 หน่วย นอกจากนี้จะใช้วัดส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อแล้ว ยังเป็นวิธีที่เหมาะสมในการวัดกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิว

ชีวภาพ ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธีนี้จะใช้สารในการวิเคราะห์เพียง 10 ไมโครลิตร จึงเหมาะสมกับสาร  
ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์เนื่องจากมักจะมีปริมาณน้อย (Morikawa, *et al.*, 1993)