บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) ส่วนใหญ่เป็นสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตจากจุลินทรีย์ เป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างโมเลกุลแบบแอมฟีพาติก(amphipathic) โดยมีขั้วทั้งสองข้างที่ประกอบด้วย ส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) และส่วนที่ชอบน้ำ(hydrophilic) ซึ่งคุณสมบัติของสารเหล่านี้เป็นผลการรวมตัวกันของความมีขั้วและไม่มีขั้วไว้ในโมเลกุลเดียวกัน ความไม่มีขั้วหรือส่วนที่ไม่ละลายน้ำจะเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนทั่วไป เช่น สายโซ่ไฮโดรคาร์บอนของกรดไขมัน ความมีขั้วหรือกลุ่มที่ชอบน้ำ เช่น กลุ่มที่ทำหน้าที่เป็นเอสเทอร์และเอลกอฮอล์ของไขมัน ฟอสเฟสที่เป็นส่วนประกอบของฟอสโฟไลปิดและน้ำตาลของไกลโคลิปิด(Cooper et al., 1980; Desai and Banat, 1997) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นกลุ่มโครงสร้างของ surface active molecules ที่สร้างขึ้นโดยจุลินทรีย์ โดยโมเลกุลเหล่านี้เมื่ออยู่ในสารละลายสามารถลดแรงตึงผิวหน้าและแรงตึงผิวระหว่างผิวหน้าของสารละลายสองชนิด ทำให้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนสามารถละลายได้ในน้ำ หรือส่วนของน้ำสามารถละลายในสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ เมื่อสารลดแรงตึงผิวมีความเข้มข้นสูงในตัวทำละลาย โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวจะหันส่วนที่ไม่ชอบน้ำเข้าหากัน ด้วยแรงจับกันของสารลดแรงตึงผิว (surfactant self-association) เกิดเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า ไมเซลล์ (micelle) ซึ่งความเข้มข้น ณ จุดที่ทำให้โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวมารวมกันนี้ เป็นคุณสมบัติเฉพาะของสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิด เรียกความเข้มข้น ณ จุดนี้ว่า critical micelle concentration (CMC) การเกิดไมเซลล์ส่งผลต่อค่าแรงตึงผิวของสารละลาย เมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวในสารละลายเพิ่มขึ้น ค่าแรงตึงผิวของสารละลายจะมีค่าลดลงจนถึงจุด CMC คือค่าแรงตึงผิวของสารละลายจะไม่ลดลงอีก ถึงแม้จะเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวลงไปในสารละลายก็ตาม (Fiechter, 1992)

ประเภทของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถจัดจำแนกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ จำแนกตามโครงสร้างและน้ำหนักโมเลกุล แต่วิธีการจำแนกที่นิยมใช้ ได้แก่ การจัดจำแนกตามโครงสร้างโมเลกุลทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นกลุ่มหลัก ๆ 4 กลุ่ม ดังนี้ คือ

1. ไกลโคลิปิด (Glycolipids)

เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่พบทั่วไปมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต ส่วนมากเป็นกลุ่มของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เช่น น้ำตาลแรมโนส(rhamnose), เทรฮาโลส (trehalose), ซูโครส (sucrose) และกลูโคส (glucose) ที่เกิดการเชื่อมต่อกันกับกรดอะลิฟาติกสายยาว (long chain aliphatic acids) หรือกรดไฮดรอกซีอะลิฟาติก(hydroxyaliphatic acid) และส่วนประกอบของ monosaccharides, disaccharides, trisaccharides, tetrasaccharides ที่ประกอบด้วย glucose, manose, galactose, glucolonic acid, rhamnose และ galactose sulphate มี fatty acid ที่มีองค์ประกอบอย่างง่ายของ phospholipids ของจุลินทรีย์ชนิดเดียวกัน

2. ลิโปเปปไทล์ (Lipopeptides) และลิโปโปรตีน (lipoproteins)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มนี้เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีไขมันจับอยู่กับสายเปปไทด์มักพบในจุลินทรีย์สกุล *Bacilli* ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชนิดนี้มีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ จัดเป็นพวก cyclic lipopeptides ได้แก่ decapeptide antibiotic (gramicidins) ที่ผลิตโดยเชื้อ *Bacillus brevis*

3. กรดไขมัน, ฟอสโฟลิปิดและนิวทรัลลิปิด (Fatty acid, Phospholipids และ Neutral lipids)

แบคทีเรียและยีสต์ที่เจริญได้ในสารประกอบไฮโดรคาร์บอน n-alkanes สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มนี้ได้ (Cirigliano and Carman, 1985) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด phospholipids จะเกิดพันธะเอสเทอร์ขึ้นระหว่างหมู่แอลกอฮอล์ของลิปิดและฟอสเฟต มีแบคทีเรียหลายชนิดสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด phospholipids เช่น *Aspergillus* sp. *Thiobacillus thiooxidans* และ *Arthrobacter* sp. โดยมีการสะสมไขมันในโครงสร้างถึง 40-80 เปอร์เซนต์ (w/w) เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี hexadecane และ olive oil

4. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดโพลิเมอร์ริก (Polymeric surfactants)

สารลดแรงตึงผิวชนิดโพลิเมอร์ริก ส่วนมากเป็นพวก emulsan, liposan, monoprotein และสารประกอบเชิงซ้อนของ polysaccharide protein โดย liposan เป็น extracellular weater-soluble emulsifier ที่ถูกผลิตโดย *Cadida lipolytica* ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต 83 เปอร์เซ็นต์ และโปรตีน 17 เปอร์เซ็นต์ โดยส่วนของคาร์โบไฮเดรตจะเป็น heteropolysaccharide ที่เป็นด้วย glucose, galactosamine และ galacturonic acid (Cirigliano and Carman, 1984)

แรมโนลิปิด (Rhamnolipid)

เป็นสารลดแรงตึงผิวที่อยู่ในกลุ่มของไกลโคลิปิด ประกอบด้วยน้ำตาลแรมโนสจำนวน 1 หรือ 2 โมเลกุล เชื่อมต่อกับ β-hydroxydecanoic acid หรือ β-hydroxydodecenoic จำนวน 1 หรือ 2 โมเลกุล ด้วยพันธะไกลโคซิดิค ดังภาพที่ 1 แรมโนลิปิดเป็นสารลดแรงตึงผิว anion ที่มีค่าพีเอชมากกว่า 4.0 เป็น emulsify ของสารประกอบพวก C_xH_y และเป็นสารที่กระตุ้นการเจริญเติบโตของ *Pseudomonas aeruginosa* มีแรงตึงผิวต่ำเมื่ออยู่ในรูปบริสุทธิ์ โดยสามารถคงตัวต่อสาร n-hexadecane ในน้ำได้ประมาณ 1 มิลลินิวตันต่อเมตร และมี CMC ตั้งแต่ 10 ถึง 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพีเอชและความเข้มข้นของเกลือ(Deziel et al., 2000; Lang, 2002)

ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการเกิดอิมัลชันของแรมโนลิปิด

1. พีเอช องค์ประกอบของ rhamnolipid ประกอบด้วย carboxylic groups ในโครงสร้างทางเคมี พีเอชของแรมโนลิปิดอยู่ในช่วงที่เป็นเบส carboxylic groups (COOH) ของแรมโนลิปิดไม่แตกตัวเป็น carboxilate groups (COO^-) ทำให้ส่วนหัวของแรมโนลิปิดละลายน้ำได้น้อยลง เมื่อพีเอชสูงกว่า 4 ช่วงที่พีเอชเป็นเบสจะเป็นการเพิ่มประจุลบที่ส่วนหัวของแรมโนลิปิด (Pornsunthorntawee et al., 2009) ทำให้ส่วนหัวนี้ละลายน้ำได้ดี

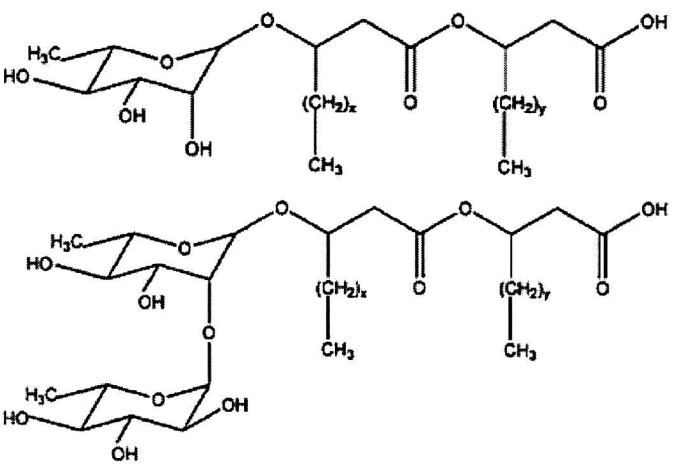
2. ความเข้มข้นของเกลือ เมื่อพีเอชสูงกว่า 4 หมู่ carboxylic groups (COOH) ของแรมโนลิปิดส่วนใหญ่จะแตกตัวเป็น carboxylate groups (COO^-) และแรมโนลิปิดจะเริ่มมีการแสดงคุณสมบัติเป็น anions หรือเบสอ่อน (Nitschke et al., 2005) ถ้าในสารละลายมีโซเดียมคลอไรด์อยู่จะเกิดการแตกตัวเป็นโซเดียมไอออน (Na^+) ซึ่งง่ายต่อการเข้าจับกับ carboxilate groups (COO^-) ของแรมโนลิปิด (Pornsunthorntawee et al., 2009) ทำให้ส่วนหัวของแรมโนลิปิดละลายน้ำได้ไม่ดี

3. แอลกอฮอล์ สารละลายแรมโนลิปิดที่มีแอลกอฮอล์ เช่น เอทานอล (C_2H_5O)ทำให้แอลกอฮอล์ กลายเป็นองค์ประกอบของส่วน hydrophilic และ hydrophobic ในโครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิว โดยที่เอทานอลนี้จะกลายเป็น co-surfactant และเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลของแรมโนลิปิด โดยการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่าง hydroxyl group ของ C_2H_5OH ทำให้ส่วนหัวของแรมโนลิปิดเกิดการโครงสร้างเป็น rhamnolipid- C_2H_5OH mixed

จุลลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิต rhamnolipids

แบคทีเรียที่มีศักยภาพมากที่สุดในการผลิต rhamnolipids คือ *Pseudomonas spp.* โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *P. aeruginosa* สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มีสัดส่วนของ rhamnolipids แต่

ละชนิดแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ แหล่งอาหารคาร์บอน สารอาหารและสภาวะของการเพาะเลี้ยง (Benincasa et al., 2004; Nitschke et al., 2005) ส่งผลให้คุณสมบัติต่างๆ เช่น surface tension, emulsification index, critical micelle concentration ของสารลดแรงตึงผิวที่ได้มีความแตกต่างกันด้วย แหล่งอาหารคาร์บอนที่สามารถใช้เป็นสับสเทรตในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ในกลุ่มไกลโคลปิดได้นั้น เช่น กลูโคส กลีเซอรอล กรดไขมัน น้ำมันพืชต่างๆ และสารประกอบพวกอัลเคน (Chayabutra et al., 2001; Rahman et al., 2002; Nitschke et al., 2005)



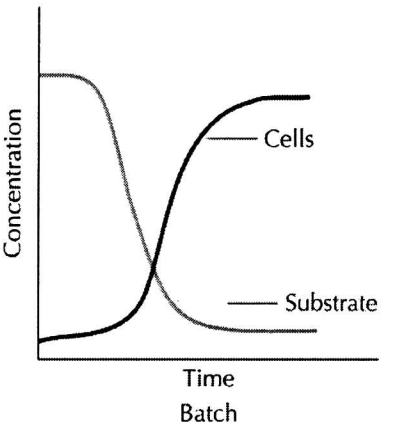
ภาพที่ 1. โครงสร้างทางเคมีของ rhamnolipid biosurfactants

คุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิว rhamnolipid เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่น่าสนใจที่สุด (Cameotra et al , 2004) Rhamnolipid สามารถลดแรงตึงผิวของน้ำบริสุทธิ์จาก 72 mN/m ให้มีค่าต่ำกว่า 30 mN/m ด้วย critical micelle concentration (CMC) ในช่วง 5-200 mg/l ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของ rhamnolipid ใน excreted biosurfactant (Finnerty, 1994) ซึ่ง rhamnolipid สามารถรักษา surface activities ให้คงที่ในสภาวะที่รุนแรงของอุณหภูมิและ pH (Pornsunthorntawee et al, 2008)

แหล่งคาร์บอนที่สามารถใช้เป็นสับเทรตในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่ม glycolipid ได้นั้น เช่น กลูโคส กลีเซอรอล กรดไขมัน น้ำมันพืชต่างๆ และสารประกอบพวกอัลเคน (Chayabutra et al. 2001; Rahman et al. 2002; Nitschke et al. 2005; Santa Anna et al. 2002) ปัจจัยในการเลือกสับสเทรตมาใช้ นอกจากนี้ต้องคำนึงถึงผลได้ (yield) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแล้ว ยังต้องพิจารณาถึงราคาของวัตถุดิบที่นำมาใช้ด้วยดังนั้นจึงได้มีการหาวัตถุดิบราคาถูกมาใช้ในการผลิต ซึ่งพบว่าวัตถุดิบราคาถูกที่เป็นผลพลอยได้จากกระบวนการทำน้ำมันให้บริสุทธิ์ (oil refinery process) คือ soapstock ซึ่งประกอบด้วยกรดไขมันชนิดต่างๆ มีศักยภาพสูงในการผลิดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ Rhamnolipids (Benincasa et al. 2004; Nitschke et al. 2005) และผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลที่เป็นกลีเซอรอลดิบ (crude glycerol) ก็เป็นแหล่งอาหารที่ดีสำหรับการผลิต sophorolipids ซึ่งก็ให้ผลได้ที่สูงมากเมื่อเทียบกับการใช้กลีเซอรอลเป็นสับสเทรตเพียงชนิดเดียว (Ashby et al. 2005) เนื่องจากมีทั้งกลีเซอรอลและกรดไขมันอยู่ในปริมาณสูง ทำให้มีแหล่งคาร์บอนอย่างเพียงพอสำหรับทั้งการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์ sophorolipids นอกจากแหล่งคาร์บอนแล้ว สารอาหารตัวอื่นก็มีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแหล่งไนโตรเจน ซึ่งพบว่าโซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$) เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด (Santan Anna et al. 2002) และการจำกัดปริมาณไนโตรเจนช่วยให้มีการผลิตสารลดแรงตึงผิว Rhamnolipids ได้มากขึ้น (Hudak and Cassidy, 2004)

การเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch culture)

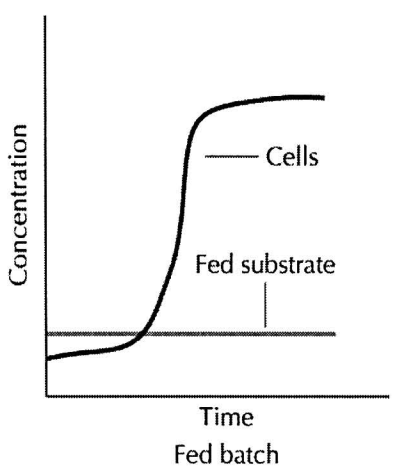
การเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch culture) เป็นการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ถือเป็นระบบปิด คือมีการกำหนดปริมาตรเริ่มต้นของอาหารเพาะเชื้อเอาไว้ โดยที่อัตราเติบโตจะลดลงเรื่อยๆ และแนวโน้มเป็นศูนย์เนื่องจากภาวะการขาดแคลนอาหารและจุลินทรีย์อยู่ในสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม ซึ่งเกิดจากการสะสมของของเสียและผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น จึงถือว่าการเพาะเลี้ยงแบบนี้ระบบจะมีลักษณะไม่คงที่ มีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา (transient states) และโดยทั่วไปสามารถแบ่งช่วง ระยะแรกเป็นระยะที่จุลทรีย์กำลังปรับตัว เซลล์จะยังไม่เพิ่มจำนวน เรียกระยะนี้ว่า lag phase ต่อมาเป็นระยะเวลาในช่วงการเติบโตแบบเอกซ์โพเนนเชียล (log phase) ช่วงการเติบโตคงที่ (stationary phase) และช่วงที่เชื้อมีการเติบโตลดลง (dead phase) ในขณะที่เชื้อมีการเติบโตสารอาหารก็จะค่อยๆ ลดลงดังที่แสดงภาพ 2



ภาพที่ 2 การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในสภาพการเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch culture)

การเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราว (Fed-batch culture)

การเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราว (Fed-batch culture) เป็นการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบกะ (batch culture) ที่มีการเติมอาหารเข้าไปอย่างต่อเนื่อง หรือเติมเป็นระยะๆ โดยไม่มีการถ่ายอาหารที่เพาะเชื้อออกเลย เพราะฉะนั้นปริมาตรของสารอาหารจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูง การเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราวนิยมใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว (single cell protein) และเมตาบอไลต์ทุติภูมิ เพราะสามารถให้อัตราผลผลิต (productivity) เซลล์และผลิตภัณฑ์ได้สูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบกะ โดยควบคุมอัตราการเติบสับสเทรตที่ทำให้การเพาะเลี้ยงอยู่ในภาวะที่เหมาะสมต่อการเติบโตหรือการเกิดผลิตภัณฑ์ตลอดเวลา



ภาพที่ 3 การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในสภาพการเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราว (Fed-batch culture)

แรมโนลิปิดเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ไม่ก่อให้เกิดการตกค้างของสารเคมีในสิ่งแวดล้อม เป็นคุณสมบัติที่ดีในการชำระล้าง(detergent) สารเกิดฟองและการเกิดอิมัลชัน (Desai and Banat, 1997) ซึ่งแรมโนลิปิดเป็นผลผลิตมาจากเชื้อจุลินทรีย์ ในปัจจุบันมีการนำแรมโนลิปิดมาใช้ประโยชน์กันอย่างกว้างขวาง เช่นอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมปิโตรเลียม การเกษตรและสิ่งแวดล้อม การประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ เนื่องจากแรมโนลิปิดมีข้อได้เปรียบในเรื่องของความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพโดยไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม และสามารถทำงานภายใต้สภาวะที่วิกฤติ (extreme condition) ได้ มีคุณสมบัติเป็นได้ทั้ง emulsification/de-emulsification ซึ่งคุณสมบัติ emulsification สามารถนำมาใช้ในการทำความสะอาดอุปกรณ์ต่างๆ เช่น แท็งก์เก็บน้ำมัน ท่อส่งน้ำมัน และเป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด หรือการนำมาช่วยในการบำบัดสภาพแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอน โดยแรมโนลิปิดจะช่วยให้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนลดการถูกดูดซับและถูกปลดปล่อยออกมาอยู่ในรูปที่ถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมได้ง่ายขึ้น (bioavailable form) (Banat, 1995) ส่วนคุณสมบัติ de-emulsification ได้ถูกนำมาใช้ในการลดสภาพของอิมัลชันที่เกิดขึ้นในอุตสาหกรรมปิโตรเลียม โดยอาศัยคุณสมบัติการเป็น hydrophobic/hydrophilic ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเข้าไปแทนที่ในโครงสร้างโมเลกุลหรือเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของ emulsifier ของสารลดแรงตึงผิวหรือใช้คุณสมบัติการเป็น hydrophobic ของผิวเซลล์จุลินทรีย์ (cell surface) ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ จากคุณสมบัติของแรมโนลิปิดที่กล่าวข้างต้นจะเห็นได้ว่าในปัจจุบันถ้ามีการพัฒนากันอย่างจริงจังซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากในอนาคต ซึ่งจะช่วยรักษาสภาพแวดล้อมของโลกเราไปได้อีกนาน