บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 คุณสมบัติของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

จากการวิเคราะห์หาปริมาณกลีเซอรอลซึ่งผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลที่สามารถละลายได้ในเฮกเซนโดยนำ Crude glycerol ปริมาณ 100 กรัมเมื่อน้ำมาสกัดโดยใช้ตัวทำละลายเฮกเซนปริมาตร 50 มิลิลิตรจำนวน 3 ครั้งและทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกโดยใช้การระเหยแบบสุญญากาศที่ความดัน 200 mBar อุณหภูมิ 50 ^{0}C จนน้ำหนักคงที่ (ทำ 3 ซ้ำ) พบว่ามีกลีเซอรอลที่สามารถละลายได้ในเฮกเซนอยู่เฉลี่ยร้อยละ 29.24 (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ปริมาณกลีเซอรอลที่ละลายได้ในเฮกเซนจากผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

ตัวอย่างที่	กลีเซอรอลที่ละลายได้ในเฮกเซน (%)
1	27.8
2	31.4
3	28.5
ค่าเฉลี่ย	29.24

4.2 ผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอลและไนเตรตต่ออัตราการเจริญเติบโตและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยเปรียบเทียบระหว่าง Commercial glycerol และ Crude glycerol

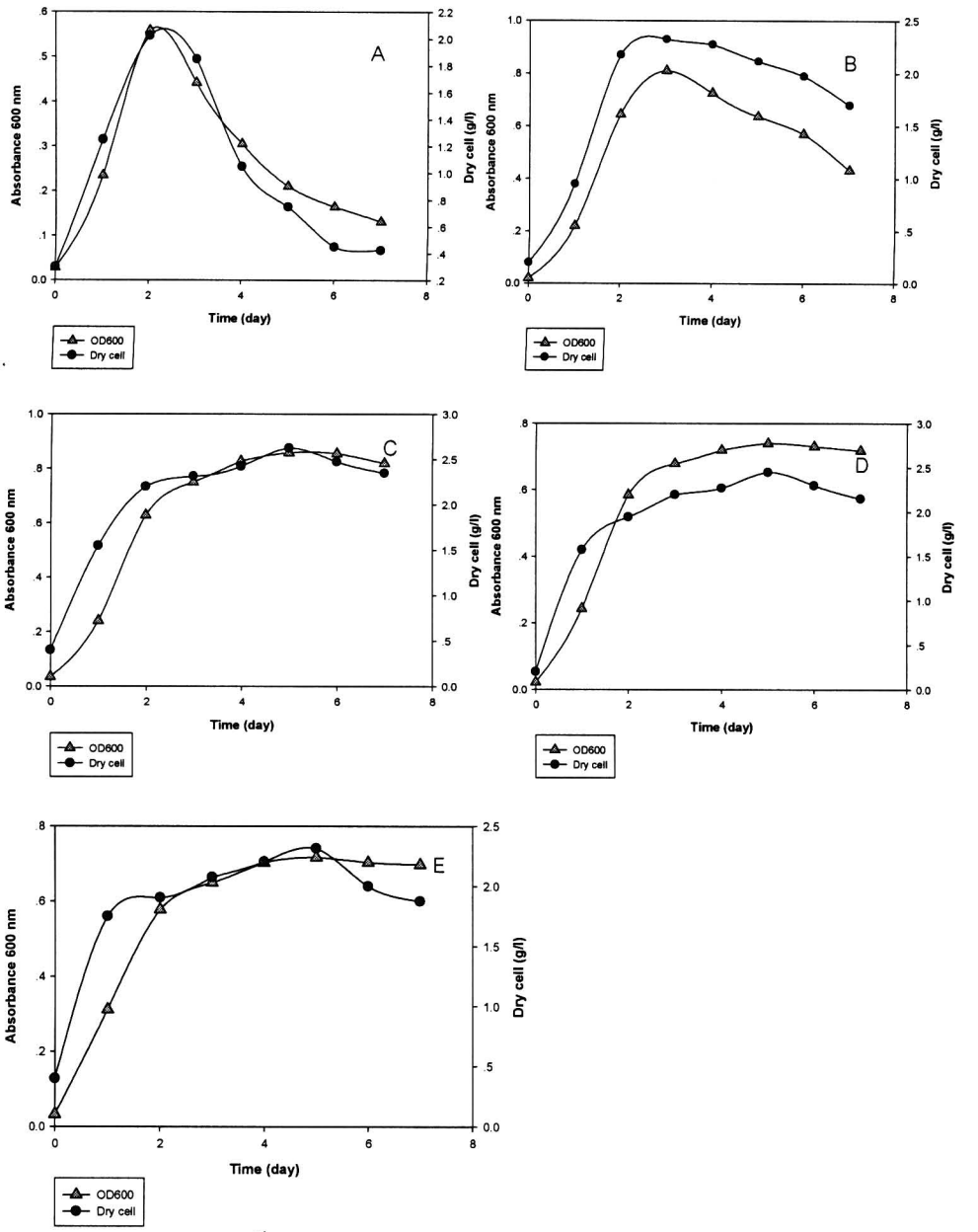
4.2.1 ผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอลต่ออัตราการเจริญเติบโตและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยเปรียบเทียบระหว่าง Commercial glycerol และ Crude

จากการทดลองการศึกษาผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอลต่ออัตราการเจริญเติบโตของ *P.aeruginosa* TISTR 781 โดยใช้ Commercial glycerol เป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลระดับต่างๆ โดยเก็บผลการทดลองเป็นการวัดค่าการดูดกลืนแสงและการเก็บ

เป็นน้ำหนักเซลล์แห้งซึ่งผลที่ได้จากการเก็บทั้งสองแบบเป็นไปในทิศทางเดียวกันดังภาพที่ 4ซึ่งผลที่ได้คือที่ระดับความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นที่เชื้อ *P.aeruginosa* TISTR 781 สามารถเจริญได้ดีที่สุดเมื่อพิจารณาตามค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) คือที่ระดับความเข้นข้นกลีเซอรอลเริ่มต้น 16.90 g/l มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงที่สุด รองลงมาคือความเข้นข้นกลีเซอรอลเริ่มต้น 32.42, 8.25, 26.08, และ 42.45 g/l (ตารางที่ 2) การที่ระดับความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้น 42.45 g/l มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่ต่ำกว่าเข้มข้นของกลีเซอรอลที่ 32.42 g/l อาจเป็นผลมาจากที่ระดับความเข้มข้นของกลีเซอรอลสูงๆ จะทำให้เกิดการยับยั้งเมตาบอลิสมของแบคทีเรียทำให้เชื้อจุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญได้ดีที่สุดแม้ว่าที่ระดับความเข้มข้นของกลีเซอรอลดังกล่าวจะมีความเข้มข้นของอาหารที่เชื้อสามารถนำไปใช้ได้มากกว่าที่ระดับความเข้มข้นที่ 16.90 g/l ก็ตาม ส่วนที่ระดับความเข้มข้นที่ 8.25 g/l แม้ว่าที่ระดับความเข้มข้นที่จะความเข้มข้นของกลีเซอรอลไม่สูงถึงขนาดทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้แต่ที่มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่ำที่สุดเนื่องมาจากที่ระดับความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นที่ 8.25 g/l มีแหล่งอาหารอยู่น้อยจึงทำให้เชื้อไม่สามารถเจิญเติบโตได้อย่างเต็มที่อาหารก็หมดก่อน

ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Crude glycerol เป็นแหล่งคาร์บอนนั้นทำการเก็บผลโดยการ Spread plate เนื่องจากลักษณะของ Crude glycerol ที่นำมาเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะขุ่นมากและเมื่อปั่นเหวี่ยงแล้วจะไม่สามารถแยกส่วนใสออกมาได้เนื่องจากชั้นบนสุดมีสารประกอบจำพวกกรดไขมันอิสระขวางอยู่ดังนั้นจึงทำการเก็บผลโดยการนับจำนวนเซลล์ได้ผลดังนี้ เมื่อพิจารณาค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) ตารางที่ 2ที่ระดับความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นที่เชื้อ *P.aeruginosa* TISTR 781 สามารถเจริญได้ดีและอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงที่สุดคือที่ระดับความเข้นข้นกลีเซอรอลเริ่มต้น 16.96 g/l รองลงมาคือความเข้นข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นที่ 44.78, 9.20, 27.26, และ 35.52g/l แสดงว่าที่ระดับความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดโดยมี Crude glycerol เป็นแหล่งคาร์บอนคือที่ระดับความเข้มข้นกลีเซอรอล 16.96 g/l

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อระหว่างการใช้ Commercial glycerol กับ Crude glycerol โดยพิจารณาตามค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) แล้วพบว่า Commercial glycerol มีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงกว่าค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของ Crude glycerol มากแสดงว่าเชื้อจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตใน Commercial glycerol ได้ดีกว่า Crude glycerol การที่จุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญได้ดีใน Crude glycerol อาจเป็นเพราะใน Crude glycerol มีสารประกอบต่างๆมากมายที่ผสมอยู่ เช่น กรดไขมันอิสระและอื่นๆซึ่งสารบางอย่างอาจมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์



ภาพที่ 4 การเจริญเติบโตของเชื้อ *P.aeruginosa* TISTR 781 โดยมี Commercial glycerol เป็นแหล่งคาร์บอน

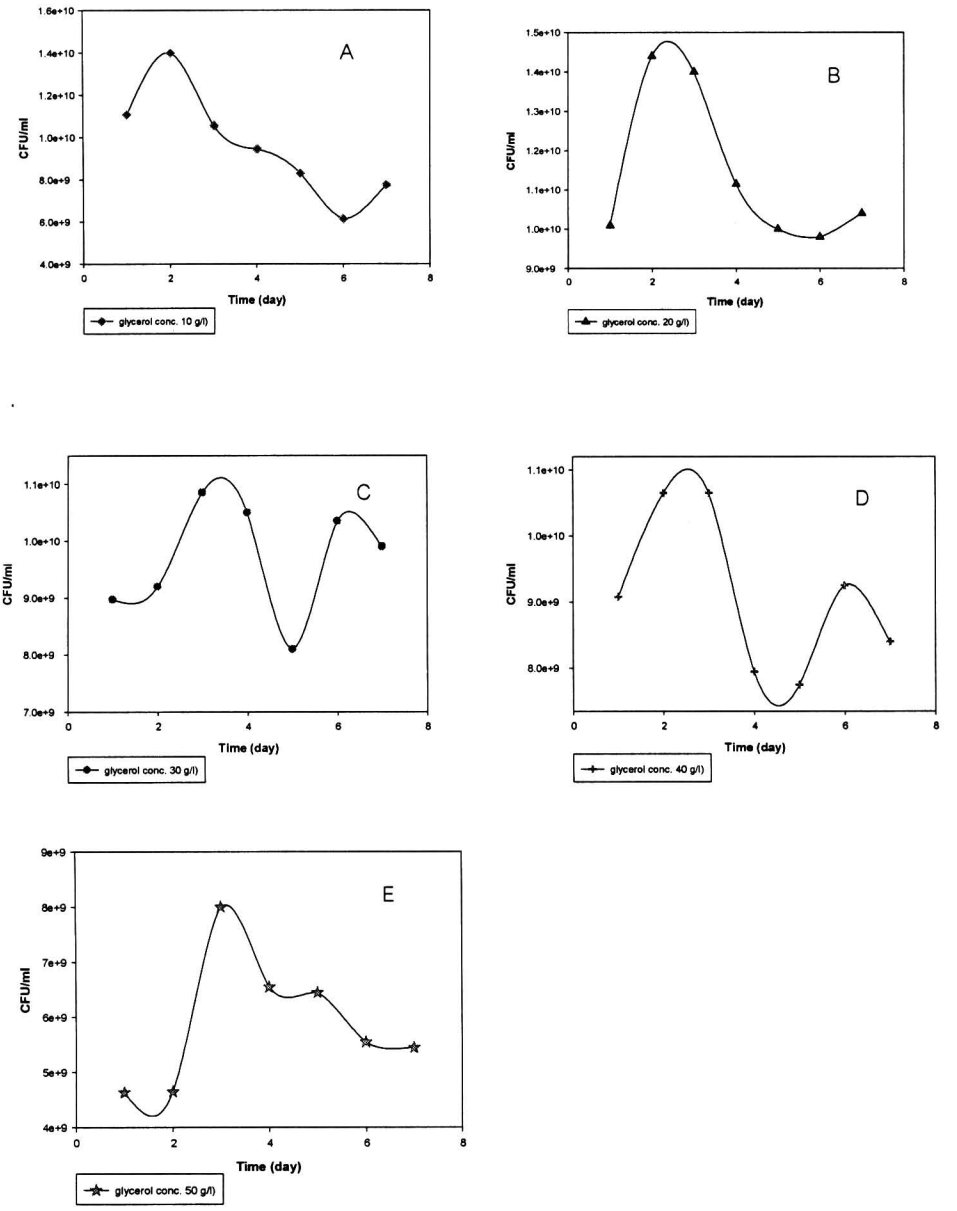
(A) ใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอล 8.25 g/l

(B) ใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอล 16.90 g/l

(C) ใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอล 26.08 g/l

(D) ใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอล 32.42 g/l

(E) ใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอล 42.45 g/l



ภาพที่ 5 การเจริญเติบโตของเชื้อ *P.aeruginosa* TISTR 781 โดยมี Crude glycerol เป็นแหล่งคาร์บอนเวลาที่ทำการเลี้ยงเชื้อ 7 วัน

(A) ใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอล 9.20g/l

(B) ใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอล 16.96 g/l

(C) ใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอล 27.26 g/l

(D) ใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอล 35.52 g/l

(E) ใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอล 44.78 g/l

ตารางที่ 2 ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) ของเชื้อ *P.aeruginosa* TISTR 781 โดยใช้ Commercial Glycerol และ Crude Glycerol เป็นแหล่งคาร์บอน

Commercial glycerol		Crude glycerol	
ความเข้มข้นกลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)	อัตราการเติบโตจำเพาะ (day^{-1})	ความเข้มข้นกลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)	อัตราการเติบโตจำเพาะ (day^{-1})
8.25	0.598	9.20	0.233
16.90	0.898	16.96	0.355
26.08	0.791	27.26	0.165
32.42	0.872	35.52	0.160
42.45	0.765	44.78	0.273

จากการหาผลได้ (Yield) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด Rhamnolipids พบว่าในกรณีที่ใช้ Commercial Glycerol เป็นแหล่งคาร์บอนนั้นระดับความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นที่ 26.08 g/l ให้ Yield สูงที่สุดดังตารางที่ 3 ระดับความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่ให้ Yield ต่ำที่สุดคือที่ 8.25 g/l สาเหตุที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นที่ 26.08 g/l ให้ผลได้สูงที่สุดเป็นเพราะระดับความเข้มข้นของกลีเซอรอลดังกล่าวอยู่ในช่วงที่เหมาะสมซึ่งเชื้อสามารถเจริญได้ดีโดยที่ความเข้มข้นกลีเซอรอลไม่สูงพอที่จะทำให้เกิดการยับยั้งเมตาบอลิซึมของเชื้อแบคทีเรียและไม่มีความเข้มข้นของอาหารต่ำเกินไปที่จะทำให้เชื้อไม่สามารถเจริญเติบโตได้เต็มที่ จากตารางที่ 3 สามารถสังเกตุได้ว่าที่ความเข้มข้นกลีเซอรอลทั้งสามคือ 26.08 , 32.42, และ 16.90 g/l ให้ผลได้ไม่แตกต่างกันมากนัก ที่ความเข้มข้นกลีเซอรอล 8.25 และ 42.45 g/l ได้ผลได้น้อยต่างจากความเข้มข้นอื่นๆ มากอาจเนื่องมาที่ความเข้มข้นกลีเซอรอล 8.25 g/l มีความเข้มข้นของอาหารอยู่น้อยเชื้อจึงไม่สามารถเจริญเติบโตได้อย่างเต็มที่ ส่วนที่เข้มข้นกลีเซอรอล 42.45 g/l นั้นน่าจะเป็นผลจากการที่มีความเข้มข้นของกลีเซอรอลสูงมากเกินควรจึงทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้

กรณีที่ใช้ Crude Glycerol เป็นแหล่งคาร์บอนเนื่องจากไม่สามารถเก็บผลในวันที่ศูนย์ได้ทำให้การรายงานผลจึงอยู่ในรูปแบบของการรายงานผลิตภัณฑ์ที่ได้ในวันสุดท้ายดังนี้ระดับความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นที่มีความเข้มข้นของ Rhamnolipids สูงที่สุดคือที่ความเข้มข้น 9.20 รองลงมาคือที่ความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้น 27.26, 44.78, 16.96, และ 35.52 g/l (ตารางที่ 4)

ดังนั้นการหาความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เหมาะสมในการศึกษาอิทธิพลของไนเตรตต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของเชื้อ *P.aeruginosa* TISTR 781ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Commercail glycerol เป็นแหล่งคาร์บอนจึงเลือกระดับความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นที่ 26.08 g/l เนื่องจากที่ความเข้มข้นดังกล่าวให้ผล Yield ($Y_{P/S}$) สูงที่สุด ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Crude glycerol เป็นแหล่งคาร์บอนจะเลือกระดับความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นที่ 9.20 g/l เนื่องจากให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายสูงที่สุด

ตารางที่ 3 ค่าผลได้ (Yield) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด Rhamnolipids ที่ใช้ Commercial Glycerol เป็นแหล่งคาร์บอน

ความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ ($Y_{P/S}$) (กรัม/กรัม)
8.25	0.019
16.90	0.051
26.08	0.054
32.42	0.053
42.45	0.045

ตารางที่ 4 ค่าความเข้มข้นของ Rhamnolipids ที่วัดได้ในวันสุดท้ายในกรณีที่ใช้ Crude Glycerol เป็นแหล่งคาร์บอน

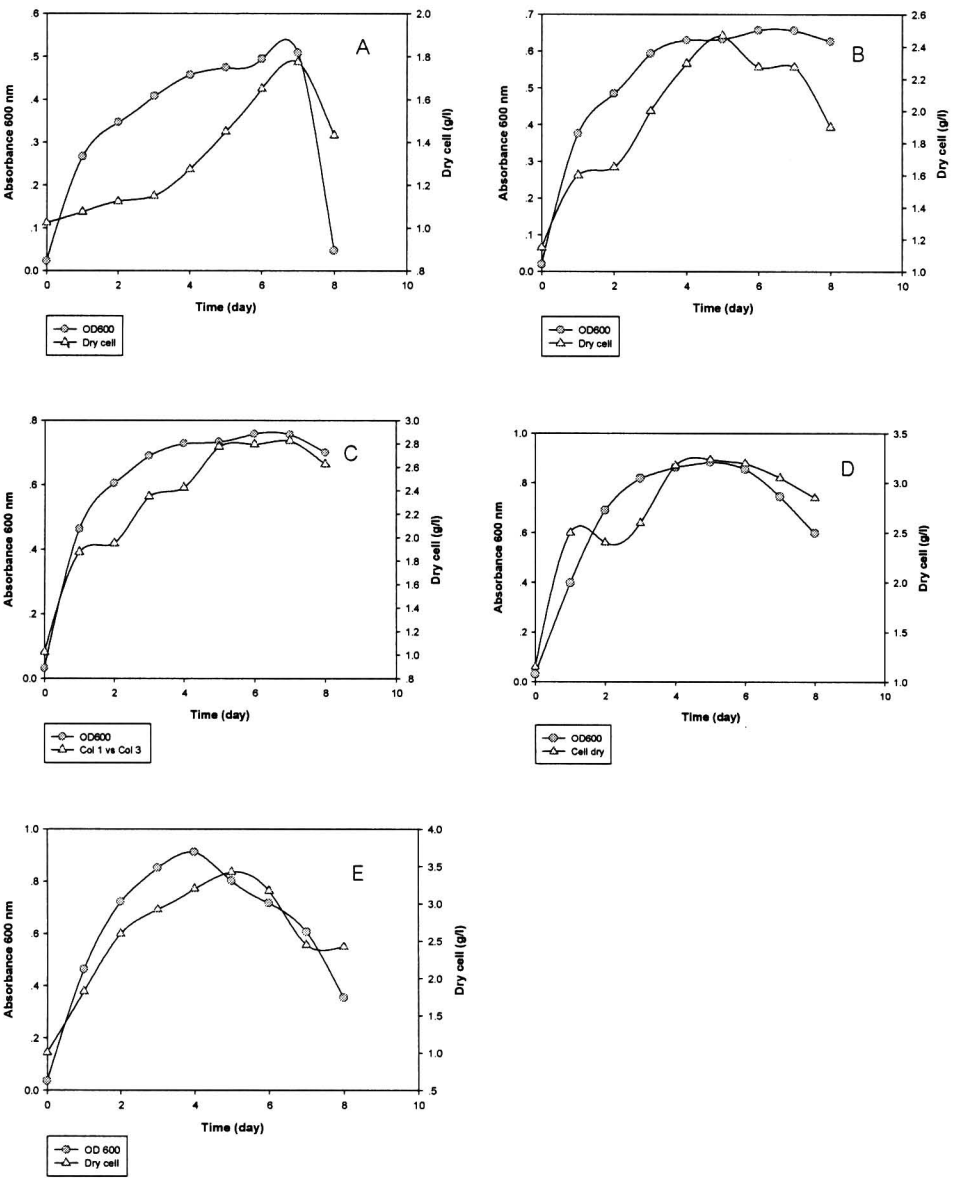
Crude Glycerol Conc. (g/l)	**Rhamnose conc. ในตัวอย่าง สุดท้าย (g/l)**
9.20	0.984
16.96	0.406
27.26	0.517
35.52	0.364
44.78	0.438

4.2.2 ผลของความเข้มข้นของไนเตรตต่ออัตราการเจริญเติบโตและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยเปรียบเทียบระหว่าง Commercial glycerol และ Crude

จากการทดลองการศึกษาผลของความเข้มข้นของไนเตรตต่ออัตราการเจริญเติบโตของ *P.aeruginosa* TISTR 781โดยใช้ Commercial glycerol ที่ความเข้มข้น 26.08 g/l เป็นแหล่งคาร์บอนและใช้ระดับความเข้มข้นของไนเตรตที่แตกต่างกันในการเลี้ยงเชื้อโดยเก็บผลการทดลองเป็นการวัดค่าการดูดกลืนแสงและการวัดน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งผลที่ได้จากการวัดทั้งสองแบบเป็นไปในทิศทางเดียวกัน (ภาพ 6) นั้นคือเมื่อเชื้อมีการเจริญเติบโตมากขึ้นค่าการดูดกลืนแสงมากขึ้นซึ่งน้ำหนักเซลล์ก็จะเพิ่มมากขึ้นด้วยในขณะที่เมื่อสารอาหารเริ่มหมดเชื้อจะมีการเจริญเติบโตได้น้อยดังค่าการดูดกลืนแสงจะลดลงและน้ำหนักเซลล์ก็จะลดลงด้วยเช่นกัน การพิจารณาที่ระดับความเข้มข้นของไนเตรตต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของ *P.aeruginosa* TISTR 781ซึ่งสามารถทำการพิจารณาโดยใช้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) พบว่าที่ความเข้มข้นของไนเตรต 2 g/l มีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงที่สุด (ตารางที่ 5) รองลงมาคือ ที่ความเข้มข้นของไนเตรต 4, 5, 3 g/l และที่ระดับความเข้มข้นของไนเตรตที่มีการเจริญเติบโตจำเพาะสูงต่ำที่สุดคือที่ความเข้มข้นไนเตรต 1 g/l แสดงว่าที่ระดับความเข้มข้นของไนเตรต 2 g/l เป็นระดับความเข้มข้นไนเตรตที่เชื้อสามารถใช้ในการเจริญได้ดีที่สุดโดยมีCommercial glycerol ที่ความเข้มข้น 26.08 g/l เป็นแหล่งคาร์บอน

ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Crude glycerol 9.20 g/l เป็นแหล่งคาร์บอนนั้นทำการเก็บผลโดยการ Spread plate นับจำนวนเซลล์และวัดน้ำหนักเซลล์แห้งซึ่งผลที่ได้จากการวัดทั้งสองแบบเป็นไปในทิศทางเดียวกัน (รูปที่ 4) โดยที่ระดับความเข้มข้นไนเตรตที่มีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงที่สุดคือที่ความเข้มข้นไนเตรตเริ่มต้น 2 g/l รองลงมาคือ ที่ความเข้มข้นของไนเตรต 5, 1, 3 g/l และที่ระดับความเข้มข้นของไนเตรตที่มีการเจริญเติบโตจำเพาะสูงต่ำที่สุดคือที่ความเข้มข้นไนเตรต 4 g/l แสดงว่าที่ระดับความเข้มข้นของไนเตรตเริ่มต้น 2 g/l เป็นระดับความเข้มข้นของไนเตรตที่เชื้อสามารถใช้ในการเจริญได้ดีที่สุดโดยมีCrude glycerol ความเข้มข้น 9.20 g/l เป็นแหล่งคาร์บอน

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อระหว่างการใช้ Commercial glycerol 26.08 g/l กับ Crude glycerol 9.20 g/l ที่ระดับความเข้มข้นของไนเตรตต่างๆโดยพิจารณาตามค่าค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) แล้วพบว่า Commercial glycerol ที่ระดับความเข้มข้นไนเตรต 2 g/l มีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงที่สุด ส่วน Crude glycerol 9.20 g/l ที่ระดับความเข้มข้นไนเตรต 2 g/l มีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสูงที่สุดเช่นกัน แสดงว่าระดับความเข้มข้นของไนเตรตที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *P.aeruginosa* TISTR 781 ทั้งใน Commercial glycerol 26.08 g/l และ Crude glycerol 9.20 g/l คือที่ความเข้มข้นของไนเตรตเริ่มต้น 2 g/l

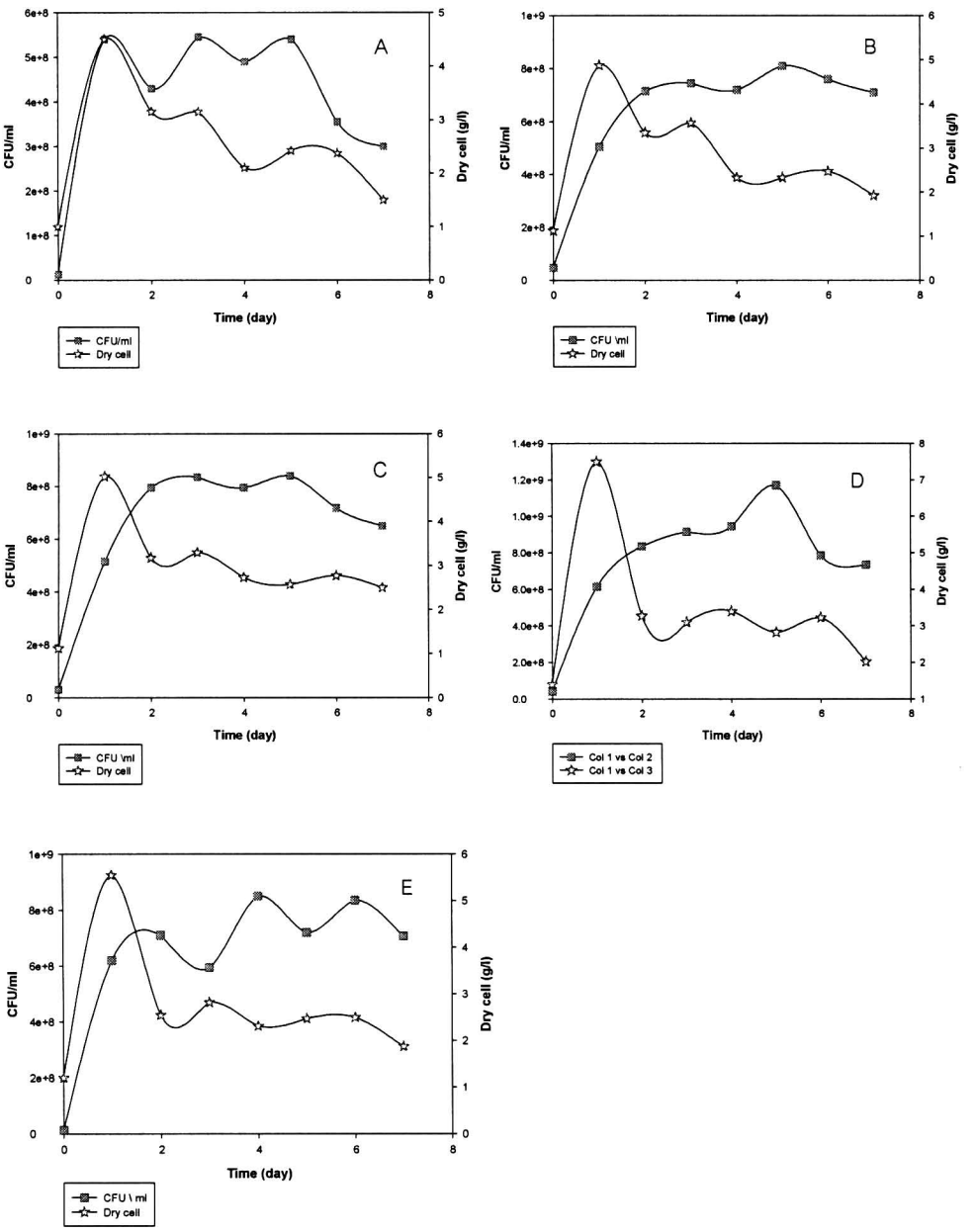


ภาพที่ 6 การเจริญเติบโตของเชื้อ *P.aeruginosa* TISTR 781 โดยมี Commercial glycerol เป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นไนเตรตแตกต่างกัน

(A) ใช้ความเข้มข้นของไนเตรต 1 g/l (B) ใช้ความเข้มข้นของไนเตรต 2 g/l

(C) ใช้ความเข้มข้นของไนเตรต 3 g/l (D) ใช้ความเข้มข้นของไนเตรต 4 g/l

(E) ใช้ความเข้มข้นของไนเตรต 5 g/l



ภาพที่ 7 การเจริญเติบโตของเชื้อ *P.aeruginosa* TISTR 781 โดยมี Crude glycerol เป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นไนเตรตแตกต่างกัน

(A) ใช้ความเข้มข้นของไนเตรต 1 g/l (B) ใช้ความเข้มข้นของไนเตรต 2 g/l

(C) ใช้ความเข้มข้นของไนเตรต 3 g/l (D) ใช้ความเข้มข้นของไนเตรต 4 g/l

(E) ใช้ความเข้มข้นของไนเตรต 5 g/l

ตารางที่ 5 ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) ของเชื้อ *P.aeruginosa* TISTR 781 โดยใช้ Commercial Glycerol และ Crude Glycerol เป็นแหล่งคาร์บอน

Nitrate Conc. (g/l)	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) day^{-1}	
	Commercial Glycerol 26.08 g/l	Crude Glycerol 9.20 g/l
1	0.748	1.261
2	0.863	1.639
3	0.781	1.109
4	0.824	1.027
5	0.815	1.262

จากการทดลองการศึกษาผลของความเข้มข้นของไนเตรตต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *P.aeruginosa* TISTR 781โดยใช้ Commercial glycerol ที่ความเข้มข้น 26.08 g/l และ Crude glycerol 9.20 g/l เป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งใช้ระดับความเข้มข้นของไนเตรตที่แตกต่างกันห้าระดับคือที่ความเข้มข้นของไนเตรตเริ่มต้น 1, 2, 3, 4, และ 5 g/l พบว่าในทั้งกรณีของ Commercial glycerol และ Crude glycerol นั้นมีระดับความเข้มข้นของไนเตรตที่ให้ผลิตภัณฑ์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงที่สุดที่ระดับเดียวกันคือที่ความเข้มข้นของไนเตรต 4 g/l (ตารางที่ 6)

จากตารางที่ 6 แสดงให้เห็นว่าปริมาณผลิตภัณฑ์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นเพิ่มขึ้นตามปริมาณไนเตรตและที่ความเข้มข้นไนเตรต 4 g/l เป็นระดับความเข้มข้นที่มีความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์สูงที่สุดและลดลงเมื่อปริมาณความเข้มข้นของไนเตรตเพิ่มมากขึ้นทั้งที่มี Commercial glycerol และ Crude glycerol เป็นแหล่งคาร์บอน แสดงว่าที่ระดับความเข้มข้นของไนเตรตที่ 4 g/l เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการผลิตาสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *P.aeruginosa* TISTR 781 ที่เลี้ยงใน Commercial glycerol และ Crude glycerol เป็นแหล่งคาร์บอนและมี $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจน

ตารางที่ 6 แสดงค่าความเข้มข้นของ Rhamnolipids ที่วัดได้ในวันสุดท้ายใน Commercial glycerol และ Crude Glycerol เป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นของไนเตรตแตกต่างกัน

Nitrate conc. (g/l)	**Rhamnose conc. ในตัวอย่างวันสุดท้าย(g/l)**	
	Commercial glycerol	**Crude glycerol**
1	0.733	0.917
2	0.883	1.067
3	1.192	1.100
4	1.983	1.192
5	1.458	0.817

4.2.3 การทดสอบค่า Emulsification activity (E_{24}) โดยเปรียบเทียบระหว่าง Commercial glycerol และ Crude glycerol

จากการศึกษาความสามารถในการทำให้เกิดอิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P.areuginosa* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอน 2 ชนิดคือ Commercial glycerol และ Crude glycerol พบว่าในกรณีของการใช้ Commercial glycerol ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 26.08 g/l มีค่า Emulsification activity 57 % (ตารางที่ 7) และการใช้ Crude glycerol ที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้น 9.20 g/l มีค่า Emulsification activity 60 % (ตารางที่ 6) แสดงว่า Commercial glycerol ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 26.08 g/l และ Crude glycerol ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 9.20 g/l มีความสามารถในการทำให้เกิดอิมัลชันในน้ำมันพืชได้เท่ากับ 57% และ 60 % ตามลำดับ

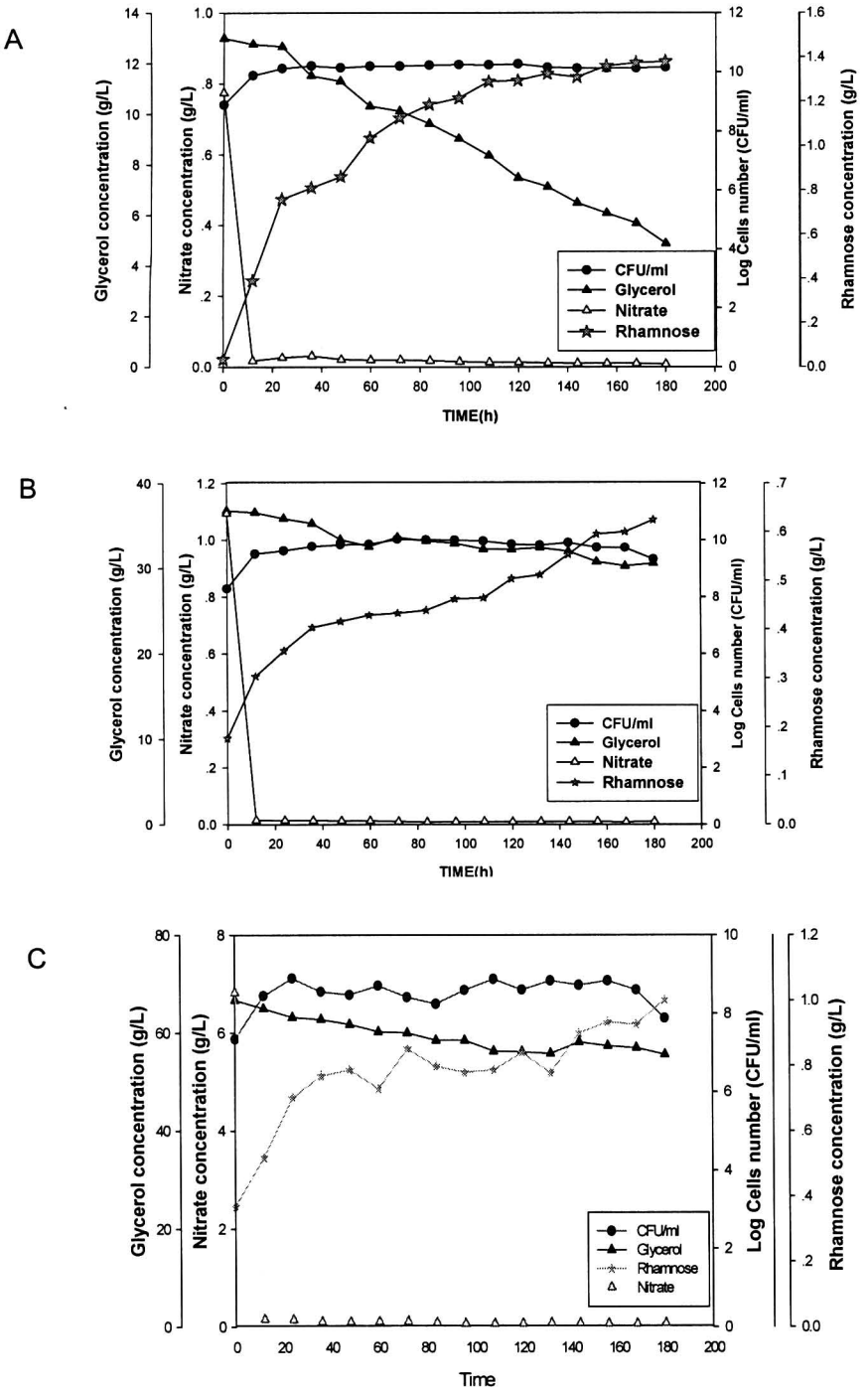
ตารางที่ 7 ค่า Emulsification activity (E_{24}) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอน 2 ชนิดคือ Commercial glycerol และ Crude glycerol

หลอดทดลอง	**Commercial glycerol 26.08 (g/l)**	**Crude Glycerol 9.20 (g/l)**
ความสูงของอิมัลชัน(mm)	25	26
ความสูงของเหลวทั้งหมด(mm)	44	43
ค่า E_{24}(%)	57	60

4.3 การผลิต rhamnolipid โดยการเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch culture) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร

4.3.1 ผลการศึกษาระดับความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยการเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch culture)

จากการทดลองการศึกษาผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอลต่ออัตราการเจริญเติบโตของ *P. aeruginosa* TISTR 781 โดยใช้กลีเซอรอลดิบ (crude glycerol) เป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลระดับต่างๆ กัน การเพาะเลี้ยงแบบกะในอาหาร mineral salt medium เป็นเวลา 180 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวัดการเติบโตและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เมื่อพิจารณาค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) พบว่าที่ระดับความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นที่เชื้อ *P. aeruginosa* TISTR 781 สามารถเจริญได้ดีและอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงที่สุดคือที่ระดับความเข้นข้นกลีเซอรอลเริ่มต้น 36.78 g/l (ตารางที่ 7) รองลงมาคือความเข้นข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นที่ 12.99 และ 66.70 g/l ตามลำดับ การที่ระดับความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นที่ 12.99 และ 66.70 g/l มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่ต่ำกว่าเข้มข้นของกลีเซอรอลที่ 36.78 g/l อาจเป็นผลมาจากการที่การเพาะเลี้ยงแบบกะ (batch culture) ซึ่งมีการเติมอาหารลงไปครั้งเดียวตอนเริ่มต้น ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ไม่อาจสามารถใช้อาหารที่มีความเข้มข้นสูงๆได้ เนื่องจากปริมาณความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่สูงจะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ได้ แม้ว่าที่ระดับความเข้มข้นของกลีเซอรอล ที่ระดับความเข้มข้นที่ 66.70 g/l จะมีความเข้มข้นของอาหารที่เชื้อสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตมากกว่าที่ระดับความเข้มข้นที่ 36.78 g/l ก็ตาม ส่วนที่ระดับความเข้มข้นที่ 12.99 g/l ถึงแม้จะมีความเข้มข้นที่ไม่สูงเกินที่จะทำให้เกิดการยับยั้งของการเจริญเติบโตของเชื้อก็ตาม แต่อาจเกิดจากการที่มีระดับความเข้มข้นที่น้อยเกินไป ซึ่งทำให้มีแหล่งอาหารที่มีความเข้มข้นของอาหารอยู่ไม่เพียงพอต่อความต้องการของการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์จึงทำให้ไม่สามารถเจริญเติบโตได้อย่างเต็มที่ก่อนที่อาหารจะหมด



ภาพที่ 8 จลนพลศาสตร์การเติบโตของเชื้อเชื้อ *P. aeruginosa* TISTR 781โดยการเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch culture) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร (A) ที่ความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นที่ 10 g/l; (B) ที่ความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นที่ 30 g/l; (C) ที่ความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นที่ 50 g/l

ตารางที่ 8 ผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอลต่ออัตราการเติบโตและผลได้ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยการเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch culture)

ความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	อัตราการเติบโตจำเพาะ (h^{-1})	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (g/l)
12.99	0.083	1.38
36.78	0.102	0.63
66.70	0.065	1.00

ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่ได้เมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงในวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงให้ผลที่ได้ ดังนี้ ที่ระดับความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นที่มีความเข้มข้นของ Rhamnolipids สูงที่สุดคือที่ความเข้มข้น 12.99 g/l รองลงมาคือที่ความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้น 66.70 และ 36.78 g/l (ตารางที่ 8) จะเห็นได้ว่าแม้ที่ระดับความเข้นข้นกลีเซอรอลเริ่มต้น 36.78 g/l เชื้อจุลินทรีย์สามารถเจริญได้ดีและมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงที่สุดแต่มีความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ Rhamnolipids ต่ำกว่าที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอล 12.99 g/l นั้นเป็นเพราะสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นผลิตภัณฑ์ secondary metabolism ซึ่งการผลิตผลิตภัณฑ์ไม่สัมพันธ์กับอัตราการเจริญเติบโต โดยการผลิตผลิตภัณฑ์ดังกล่าวจะเกิดขึ้นในช่วง stationary phase

ดังนั้นการหาความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เหมาะสมในการศึกษาอิทธิพลของไนเตรตต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของเชื้อ *P. aeruginosa* TISTR 781 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอนจะเลือกระดับความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นที่ 12.99 g/l เนื่องจากให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายสูงที่สุด

4.3.2 ผลการศึกษาระดับความเข้มข้นของไนเตรตที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยการเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch culture)

จากการทดลองการศึกษาผลของความเข้มข้นของไนเตรตต่ออัตราการเจริญเติบโตของ *P. aeruginosa* TISTR 781 โดยทำการเลือกระดับกลีเซอรอลดิบที่ระดับความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้น 12.99 g/l เป็นแหล่งคาร์บอน ทำการวัดการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรย์และผลิตภัณฑ์ที่ได้ โดยพบว่าที่ระดับความเข้มข้นไนเตรตที่มีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงที่สุดคือ

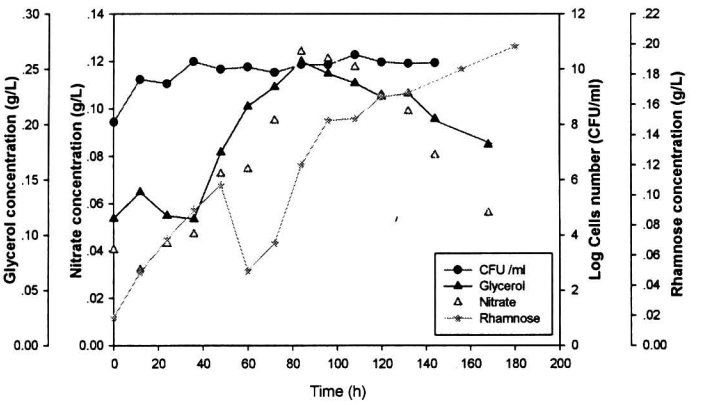
ที่ความเข้มข้นไนเตรตเริ่มต้น 9.48 g/l รองลงมาคือ ที่ความเข้มข้นของไนเตรต 4.69 และ 20.20 g/l และที่ระดับความเข้มข้นของไนเตรตที่มีการเจริญเติบโตจำเพาะต่ำที่สุดคือที่ความเข้มข้นไนเตรต 20.20 g/l (ตารางที่ 9) แสดงว่าที่ระดับความเข้มข้นของไนเตรตเริ่มต้น 9.48 g/l เป็นระดับความเข้มข้นของไนเตรตที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุดโดยมีกลีเซอรอลความเข้มข้น 12.99 g/l เป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ 9 ผลของความเข้มข้นของไนเตรตต่ออัตราการเติบโตและผลได้ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยการเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch culture)

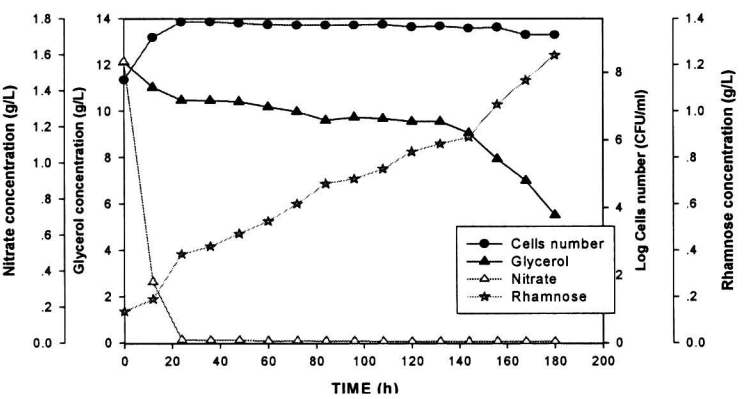
ความเข้มข้นของไนเตรตเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	อัตราการเติบโตจำเพาะ (day^{-1})	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (g/l)
4.69	0.083	1.38
9.48	0.105	1.24
20.20	0.061	0.43

จากการทดลองการศึกษาผลของความเข้มข้นของไนเตรตต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *P. aeruginosa* TISTR 781โดยใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่ระดับความเข้มข้นที่ 12.99 g/l เป็นแหล่งคาร์บอนเริ่มต้น ซึ่งการใช้ระดับความเข้มข้นที่ต่างกัน 3 ระดับคือ ที่ระดับความเข้มข้นของไนเตรทเริ่มต้นที่ 4.69 , 9.48 และ 20.20 g/l พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของไนเตรทเริ่มต้นที่ให้ผลิตภัณฑ์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีความเข้มข้นสูงสุดคือ ที่ความเข้มข้นของไนเตรท 4.69 g/l (ตารางที่ 8) ซึ่งเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน พบว่า ปริมานของวันสุดท้ายที่ได้มีค่าเท่ากับ 1.38 g/l ซึ่งเมื่อทำการเปรียบเทียบจะแสดงให้เห็นว่าปริมาณผลิตภัณฑ์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นเพิ่มขึ้นตามปริมาณความเข้มข้นของไนเตรทเริ่มต้นและที่ความเข้มข้นไนเตรท 4.69 g/l เป็นระดับความเข้มข้นที่มีความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์สูงที่สุดและพบว่าความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ลดลงเมื่อปริมาณความเข้มข้นของไนเตรทเริ่มต้นเพิ่มมากขึ้นแสดงว่าที่ระดับความเข้มข้นของไนเตรท 4.69 g/l เป็นระดับความเข้มข้นเริ่มต้นที่มีความเหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *P. aeriginosa* TISTR 781 ที่เลี้ยงในกลีเซรอลดิบที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นเป็นแหล่งคาร์บอนที่ 12.99 g/l และมีโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นที่เหมาะสมที่ 4 .69 g/l ในการให้ปริมาณความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์สารลดแรงตึงผิวดีที่สุด

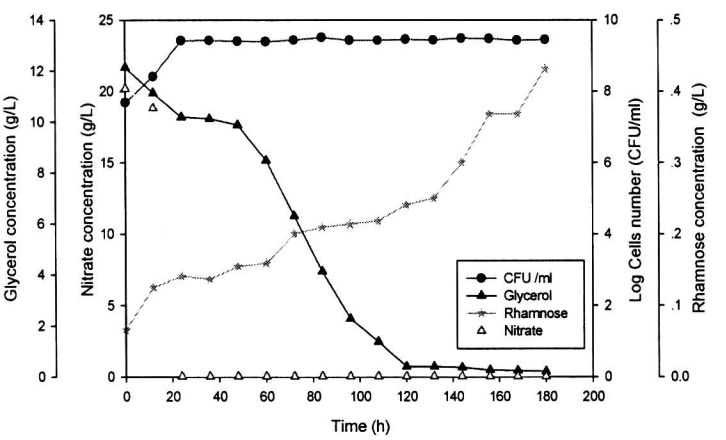
A



B



C



ภาพที่ 9 จลนพลศาสตร์การเติบโตของเชื้อ *P. aeruginosa* TISTR 781โดยการเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch culture) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ที่ความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นที่ 12.99 g/L และความเข้มข้นของไนเตรทระดับต่างๆ (A) ความเข้มข้นของไนเตรท 4.69 g/l; (B) ความเข้มข้นของไนเตรท 9.48 g/l; (C) ความเข้มข้นของไนเตรท 20.20 g/l

4.4 การผลิต rhamnolipid โดยการเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราว (fed-batch culture) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร

4.4.1 ผลของอัตราการไหลของอาหารต่ออัตราการเจริญเติบโตและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

จากการทดลองการศึกษาผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบและไนเตรตต่ออัตราการเจริญเติบโตของ *P. aeruginosa* TISTR 781 โดยทำการเลือกระดับกลีเซอรอลดิบที่ระดับความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้น 12.99 g/l เป็นแหล่งคาร์บอน และระดับความเข้มข้นของไนเตรท 4.69 g/L โดยมีการให้อัตราการไหลของอาหารที่ต่างๆ คือ ระดับอัตรการไหลของอาหารที่ 0.015 , 0.032 และ 0.045 L/h เมื่อทำการวัดการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์ที่ได้ พบว่าที่อัตราการไหลของอาหารที่มีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงที่สุดคือ ที่อัตราการไหลของอาหารที่ 0.045 L/h แสดงว่าอัตราการไหลของอาหารที่ 0.045 L/h เป็นอัตราการไหลของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

ตารางที่ 10 ผลของอัตราการไหลของอาหารต่ออัตราการเติบโตและปริมาณของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

อัตราการไหลของอาหาร (L/h)	อัตราการเติบโตจำเพาะ (day^{-1})	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (g/l)
0.015	0.082	0.79
0.032	0.128	1.09
0.045	0.102	1.80

จากการทดลองการศึกษาผลของอัตราการไหลของอาหารต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *P. aeruginosa* TISTR 781 โดยใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่ระดับความเข้มข้นที่ 12.99 g/l เป็นแหล่งคาร์บอนเริ่มต้นและระดับความเข้มข้นของไนเตรท 4.69 g/L ซึ่งเมื่อทำการเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 84 ชั่วโมง พบว่า ที่อัตราการไหลของอาหารที่ 0.0150 L/h ให้ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์สารลดแรงตึงชีวภาพเท่ากับ 0.79 g/L และที่อัตราการไหลของอาหารที่ 0.032 L/h ให้ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเท่ากับ 1.09 g/L และที่อัตราการไหลของอาหารที่ 0.045 L/h ให้ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีค่าเท่ากับ 1.80 g/L (ตารางที่

ซึ่งเมื่อนำมาเปรียบเทียบกันแล้วจะพบว่าที่อัตราการไหลของอาหารที่ 0.045 L/h ให้ผลิตภัณฑ์สารลดแรงตึงผิวได้มากที่สุด การที่พบว่าความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์นั้นมากอาจเนื่องมากจาก ความเหมาะสมของอัตราการไหลของอาหารที่ทำให้อาหารเพียงพอต่อการใช้ในกระบวนการผลิต คือ การเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch ซึ่งค่อยๆเติมสับเทรตลงไปในระหว่างการเพาะเลี้ยงเป็นระยะๆ ในอัตราการให้อาหารที่คงที่ จะช่วยลดภาวการณ์ยับยั้งจากสับเทรตความเข้มข้นสูงได้ ทำให้อาหารที่เติมลงไปมีความเข้มข้นของสับเทรทที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ และส่งผลให้สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ในปริมาณมากขึ้น

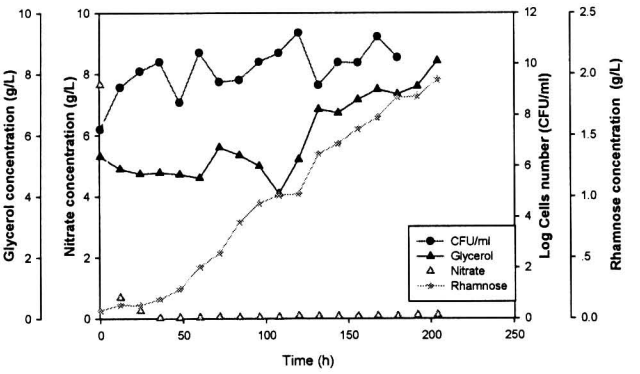
4.4.2 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกระเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch culture) และแบบครั้งคราว (Fed-batch culture)

จากการศึกษาพบว่าการเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราวให้ผลิตภัณฑ์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบกะ เนื่องจากการเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราวเป็นการเติมอาหารแบบต่อเนื่องในอัตราที่คงที่ทำให้อาหารที่เติมลงไปมีปริมาณความเข้มข้นของอาหารที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ทำให้มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและการผลิตผลิตภัณฑ์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบกะ (ตารางที่ 11) ในขณะที่การหมักแบบกะให้ผลของอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและการผลิตผลิตภัณฑ์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่น้อยกว่าแบบครั้งคราว อาจเป็นผลมาจากการที่การเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch culture) มีการเติมอาหารในครั้งเดียวตอนเริ่มต้นการเพาะเลี้ยง ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ไม่อาจสามารถใช้อาหารที่มีความเข้มข้นสูงๆได้ เนื่องจากปริมาณความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่สูงจะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

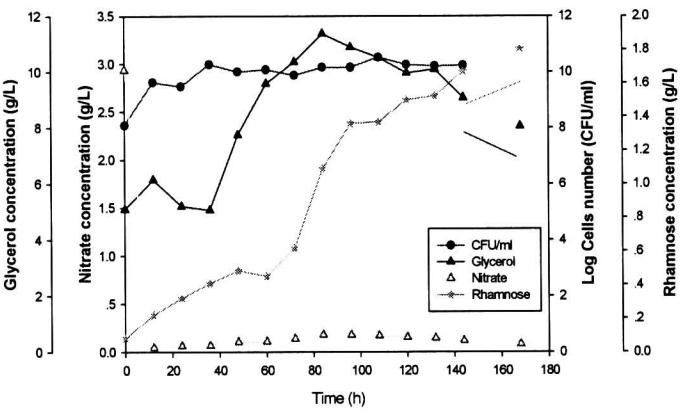
ตารางที่ 11 การเปรียบการเพาะเลี้ยงแบบ Batch และ แบบ Fed-batch ต่ออัตราการเติบโตและปริมาณของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

กระบวนการหมัก	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (h^{-1})	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (g/L)
Batch	0.082	1.38
Fed -Batch	0.128	1.80

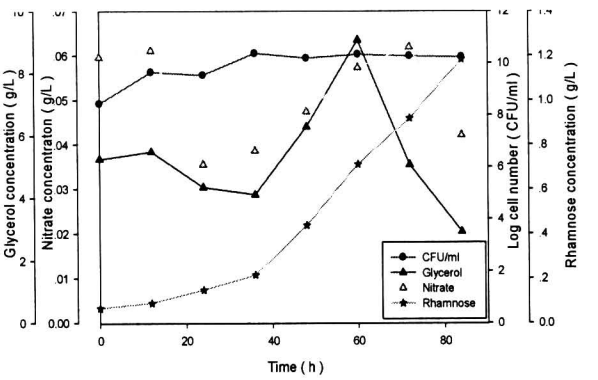
A



B



C

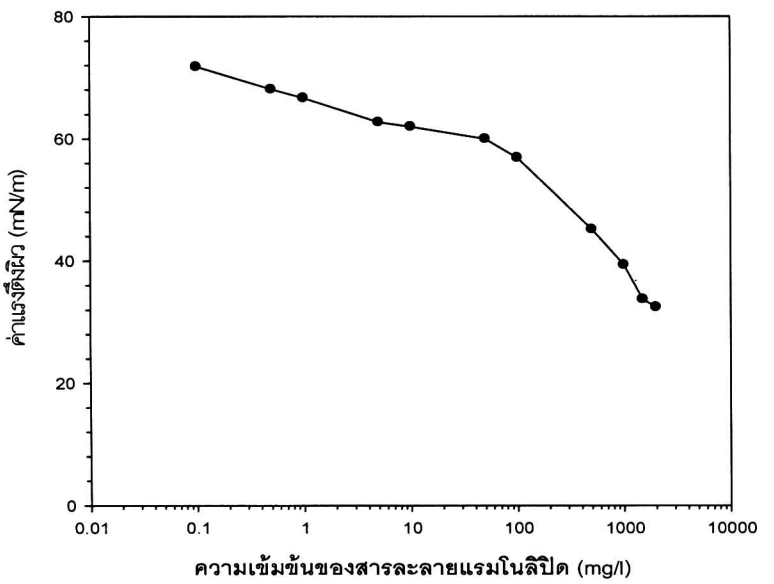


ภาพที่ 10 จลนพลศาสตร์การเติบโตของเชื้อ ที่ความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นที่ 12.99 g/L และความเข้มข้นของไนเตรท 4.69 g/L ในการเพาะเลี้ยงแบบ Fed-batch ด้วยอัตราการเติมอาหาร; (A) 0.015 l/h; (B) 0.0312 l/h; (C) 0.045 l/h;

4.5 ผลการทดสอบคุณสมบัติของ rhamnolipid

4.5.1 การวัดค่าแรงตึงผิว

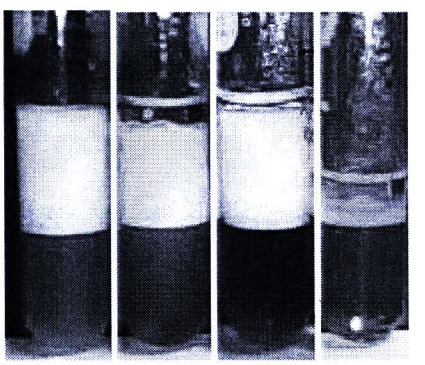
จากการศึกษาคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิวของแรมโนลิปิดในสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) มีแรงตึงผิว 72.03 mN/m พบว่าที่ความเข้มข้นของแรมโนลิปิดในช่วงความเข้มข้น 0.1- 10 mg/l มีค่าแรงตึงผิว 61- 71 mN/m ซึ่งจะเห็นได้ว่าลดลงจากเดิมเล็กน้อย เนื่องจากโมเลกุลของแรมโนลิปิดที่ไม่ละลายน้ำมีปริมาณน้อย เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแรมโนลิปิดมากขึ้นถึง 500 mg/l มีผลทำให้ค่าแรงตึงผิวของสารละลาย PBS ลดลงอย่างรวดเร็วเหลือเพียง 45.16 mN/m ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากส่วนโมเลกุลของแรมโนลิปิดที่ไม่ละลายน้ำมีปริมาณมาก ซึ่งโมเลกุลส่วนที่ไม่ละลายน้ำจะถูกผลักออกไปทำให้โมเลกุลของแรมโนลิปิดไปเรียงตัวกันอยู่ที่ผิวของน้ำ จะเรียงตั้งตรงโดยหันส่วนหัวเข้าหาน้ำและส่วนหางเข้าหาอากาศ ทำให้เปลี่ยนจากระหว่างพื้นผิวน้ำ-อากาศ เป็นระหว่างพื้นผิวไฮโดรคาร์บอน-อากาศ ทำให้แรงตึงผิวของสารละลาย PBS ลดลง เนื่องจากแรงตึงผิวไฮโดรคาร์บอนจะเบากว่าแรงตึงผิวของน้ำ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแรมโนลิปิดมากขึ้น จนค่าแรงตึงผิวไม่เปลี่ยน ความเข้มข้น ณ จุดนั้นจะเรียกว่า CMC แต่จากการทดลองยังไม่ปรากฏหรือสามารถหา CMC ได้ แต่อย่างไรก็ตามค่า CMC ของสารละลายแรมโนลิปิดน่าจะสูงกว่า 1000 mg/l



ภาพที่ 11 ค่าแรงตึงผิวกับความเข้มข้นของแรมโนลิปิด ในสารละลาย Phosphate buffer saline

4.5.2 ประสิทธิภาพการเกิดอิมัลชัน

จากการทดสอบความสามารถในการเกิดอิมัลชัน ในน้ำมันและไฮโดรคาร์บอนแต่ละชนิดพบว่าน้ำมันปาล์มมีค่า Emulsification index (E_{24}) มากที่สุด 55.06% รองลงมาคือน้ำมันก๊าด 48.25% น้ำมันดีเซล 43.81% และเฮกเซน 10% แสดงว่าแรมโนลิปิดที่ผลิตจาก *P.aeruginosa* TISTR781 มีความสามารถในการเกิดอิมัลชันกับน้ำมันปาล์มซึ่งเป็นน้ำมันในกลุ่มน้ำมันพืชได้ดีที่สุด เพราะน้ำมันพืชจะมีองค์ประกอบที่มีไฮโดรคาร์บอนสายโซ่ยาว น้ำมันก๊าดและน้ำมันดีเซลซึ่งเป็นน้ำมันที่เป็นผลิตภัณฑ์จากน้ำมันดิบจะเกิดอิมัลชันได้ใกล้เคียงกัน เพียงแต่อิมัลชันของน้ำมันก๊าดจะมีสีขาวส่วนของน้ำมันดีเซลจะมีสีเหลืองขุ่นเนื่องจากน้ำมันดีเซลมีสีเหลือง เฮกเซนซึ่งเป็นพวกไฮโดรคาร์บอนสายโซ่สั้นเกิดอิมัลชันได้น้อยมาก เพราะแรมโนลิปิดไม่มีประสิทธิภาพในการทำอิมัลชันของพวกไฮโดรคาร์บอนสายโซ่สั้น (Desai, 1997; Costa et al., 2006)



(ก) (ข) (ค) (ง)

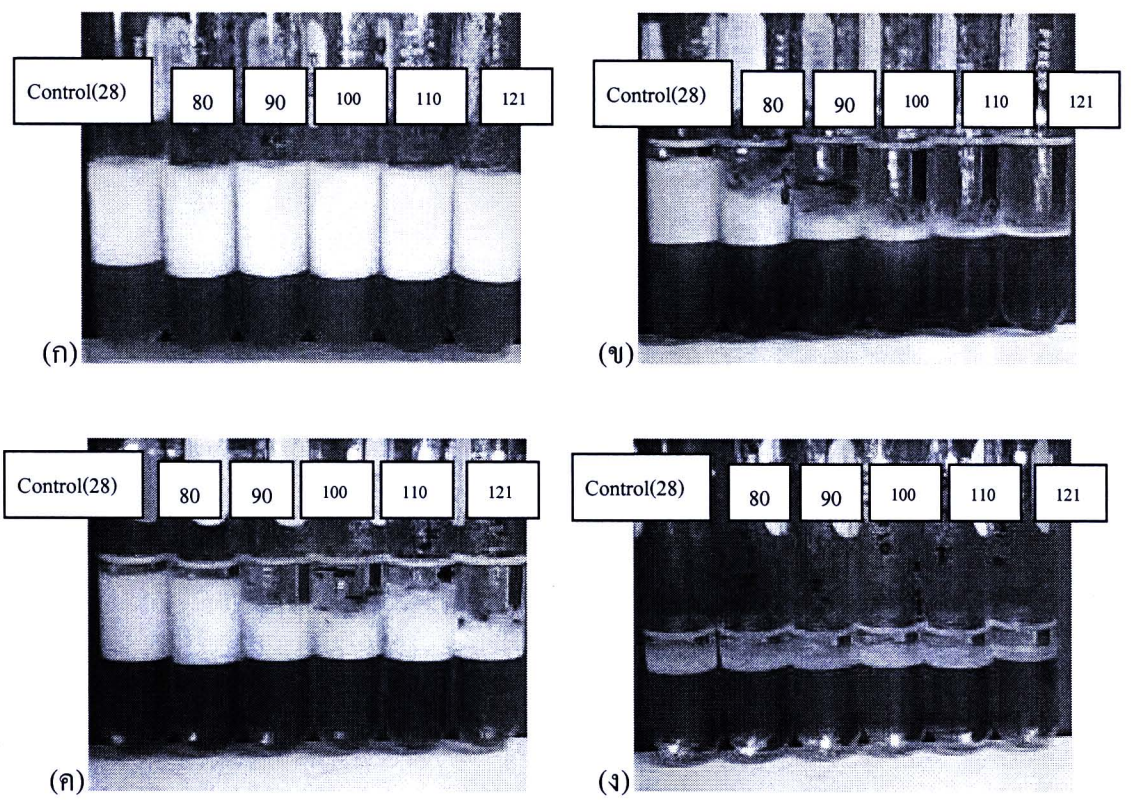
ภาพที่ 12 ความสามารถการเกิดอิมัลชันของแรมโนลิปิดใน (ก) น้ำมันปาล์ม (ข) น้ำมันดีเซล (ค) น้ำมันก๊าด และ (ง) เฮกเซน

4.6 ผลการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวของ rhamnolipid

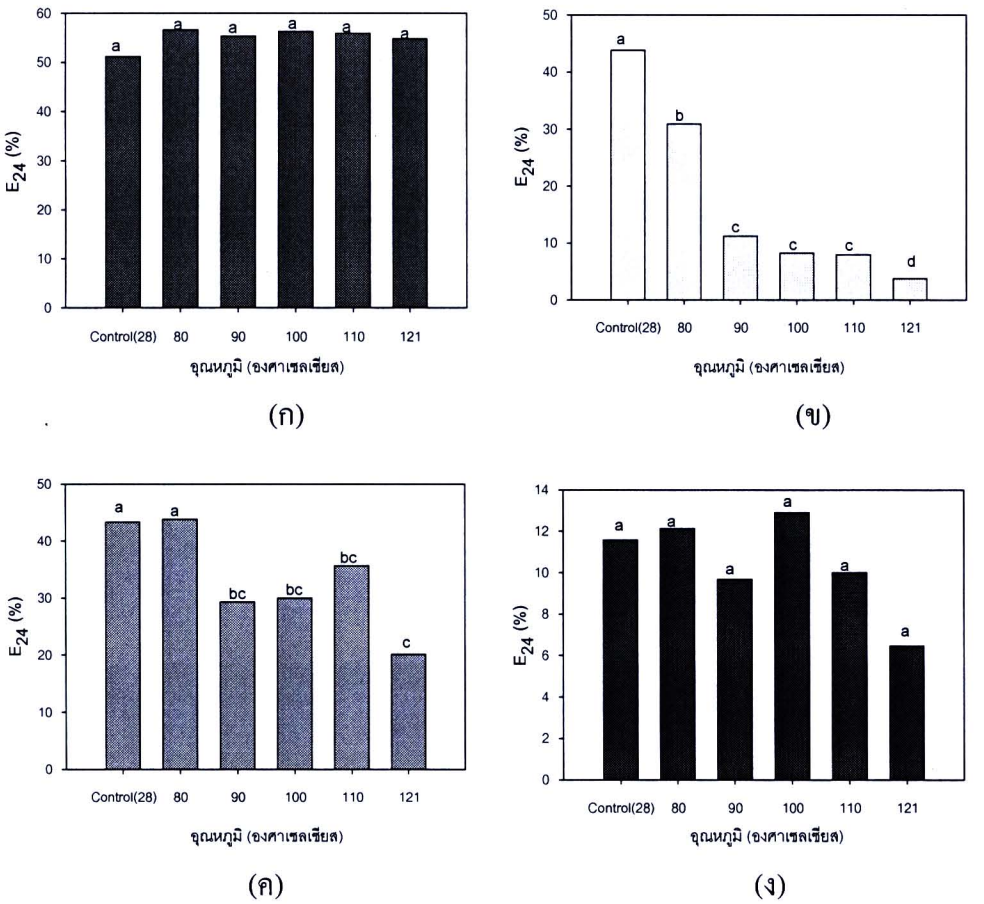
4.6.1 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของแรมโนลิปิด

ภาพที่ 13 และ 14 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อแรมโนลิปิดที่ผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* TISTR781 ในน้ำมันปาล์ม น้ำมันดีเซล น้ำมันก๊าด และเฮกเซน ผลการทดสอบพบว่าความร้อนที่อุณหภูมิ 80-121 ^{o}C ค่า emulsification index (E_{24}) ของแรมโนลิปิดในน้ำมันปาล์มไม่แตกต่างกันทางสถิติ(DUNCAN; α = 0.05) แสดงว่าแรมโนลิปิดสามารถทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิสูงเพราะว่าแรมโนลิปิดไม่เกิดการเสียสภาพของ proteinaceous compounds

(Sarubbo et al., 2006) ส่วน E_{24} ของแรมโนลิปิดในน้ำมันดีเซลและน้ำมันก๊าด เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ความสามารถในการเกิดอิมัลชันลดลง เนื่องจากการเกิดอิมัลชันของแรมโนลิปิดกับน้ำมันดีเซลและน้ำมันก๊าดที่มีจำนวนคาร์บอน 10-19 อะตอม จะไม่มีความไม่เสถียรจึงทำให้เกิดอิมัลชันที่ไม่คงตัว สำหรับการเกิดอิมัลชันของแรมโนลิปิดในเฮกเซนมีความสามารถในการเกิดอิมัลชันได้น้อย เมื่อวัด E_{24} จึงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เนื่องจากเฮกเซนเป็นพวกไฮโดรคาร์บอนสายโซ่สั้นที่มีคาร์บอนเพียง 6 อะตอม (Admin, 2553)



ภาพที่ 13 การเกิดอิมัลชันของแรมโนลิปิดที่อุณหภูมิแตกต่างกัน (80-121 °C) ใน (ก) น้ำมันปาล์ม (ข) น้ำมันดีเซล (ค) น้ำมันก๊าด และ (ง) เฮกเซน

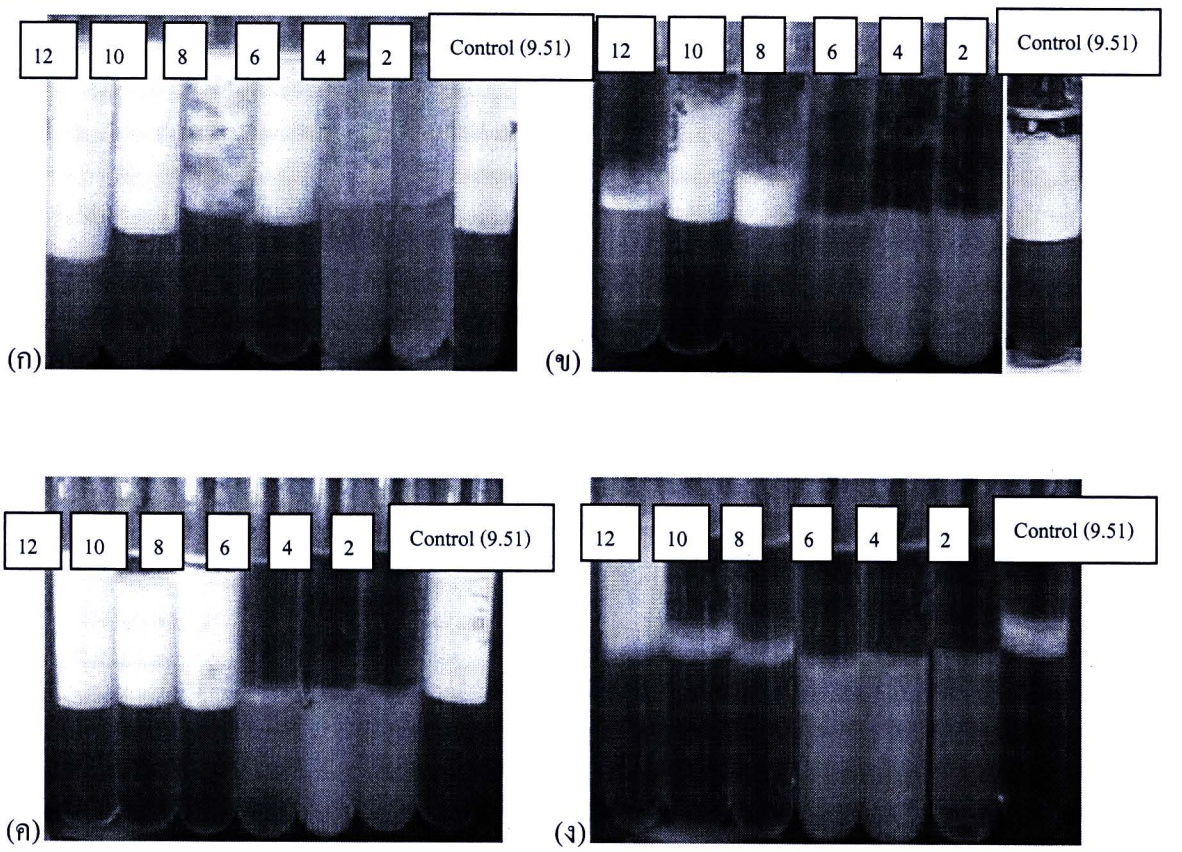


ภาพที่ 14 ผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อความคงตัวของแรมโนลิปิด (ก) น้ำมันปาล์ม (ข) น้ำมันดีเซล (ค) น้ำมันก๊าด และ (ง) เฮกเซน

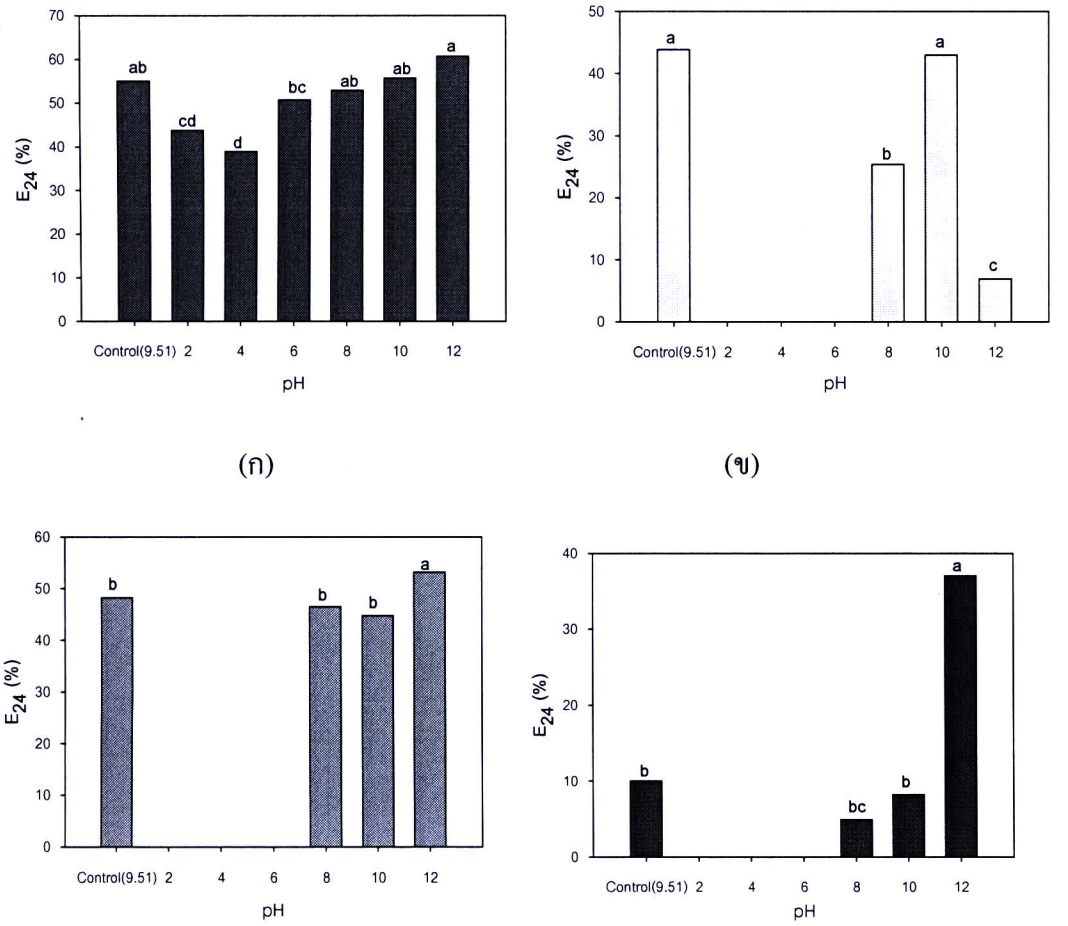
4.6.2 ผลของพีเอชต่อประสิทธิภาพของแรมโนลิปิด

ภาพ 15 การศึกษาผลของพีเอชต่อการเกิดอิมัลชันของแรมโนลิปิดในน้ำมันปาล์ม น้ำมันพืช น้ำมันก๊าดและเฮกเซน แสดงให้เห็นว่าเมื่อพีเอชของแรมโนลิปิดลดลง ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของแรมโนลิปิดกับน้ำมันปาล์มลดลงมี E_{24} อยู่ในช่วง 38-40% ในน้ำมันดีเซล น้ำมันกก๊าดและเฮกเซนเกิดอิมัลชันได้น้อยมากไม่สามารถวัด E_{24} ได้ ที่สภาวะเป็นกรดเกิดอิมัลชันได้น้อยเนื่องจากทางส่วนหัว carboxylic groups (COOH) ของแรมโนลิปิดไม่แตกตัวเป็น carboxilate groups (COO^-) ทำให้ส่วนหัวของแรมโนลิปิดละลายน้ำได้น้อยลง การรวมตัวกันระหว่างน้ำกับน้ำมันจึงเกิดได้ไม่ดี ทำให้การเกิดอิมัลชันที่ไม่ดี แต่เมื่อเพิ่มพีเอชของแรมโนลิปิด จะมีสภาวะเป็นเบสการเกิดอิมัลชันของแรมโนลิปิดกับน้ำมันปาล์มเพิ่มขึ้นมี E_{24} อยู่ในช่วง 52-60% เช่นเดียวกับน้ำมันดีเซล น้ำมันก๊าด เฮกเซนจะเกิดอิมัลชันดีขึ้น เนื่องจากสภาวะที่เป็นเบสของแรม

โนลิปิดจะเป็นการเพิ่มประจุลบที่ส่วนหัวของแรมโนลิปิด (Pornsunthorntawee et al., 2009) ทำให้ส่วนหัวนี้ละลายน้ำได้ดี เฟสสองเฟสรวมตัวกันได้ดี คือส่วนที่เป็นน้ำกับน้ำมันจะรวมตัวเป็นเนื้อเดียวกัน การเกิดอิมัลชันของแรมโนลิปิดในสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่สภาวะเป็นเบสจะเกิดได้ดีกว่า



ภาพที่ 15 การเกิดอิมัลชันของแรมโนลิปิดที่พีเอชแตกต่างกัน (pH 2-12) ใน (ก) น้ำมันปาล์ม (ข) น้ำมันดีเซล (ค) น้ำมันก๊าด และ (ง) เฮกเซน

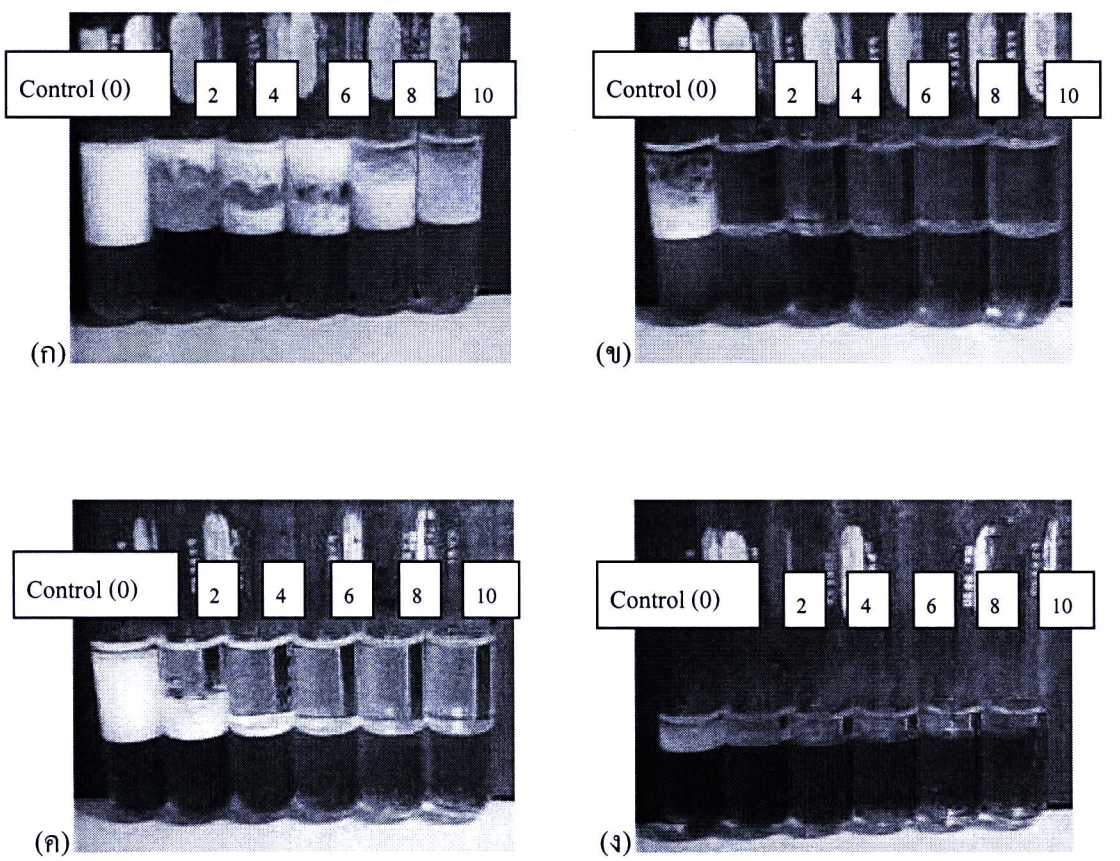


ภาพที่ 16 ผลของพีเอชต่อประสิทธิภาพของแรมโนลิปิด (ก) น้ำมันปาล์ม (ข) มันดีเซล (ค) น้ำมันก๊าด และ(ง) เฮกเซน

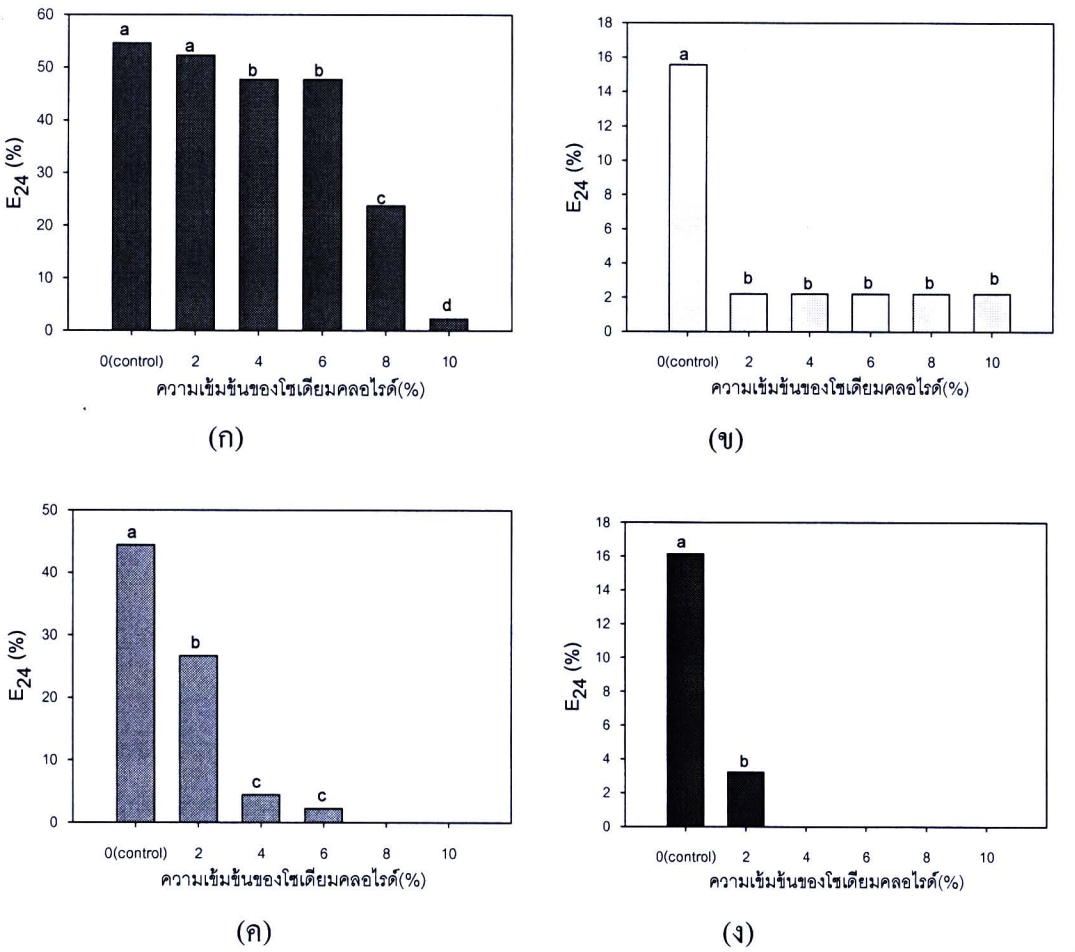
4.6.3 ผลของความเข้มข้นของเกลือต่อประสิทธิภาพของแรมโนลิปิด

จากการผลของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ต่อประสิทธิภาพของแรมโนลิปิด ดังภาพ 17 แสดงให้เห็นว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในแรมโนลิปิดเพิ่มขึ้น มีผลทำให้ค่า E_{24} ลดลง โดยในน้ำมันดีเซลความสามารถในการเกิดอิมัลชันของแรมโนลิปิดจะลดลงอย่างรวดเร็ว จะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 2% มีผลทำให้เกิดอิมัลชันได้น้อยมากมี E_{24} 2.22% ในส่วนของน้ำมันปาล์ม น้ำมันก๊าดและเฮกเซนเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เพิ่มมากขึ้น ความสามารถในการเกิดอิมัลชันลดลงโดยแปรผกผันตามความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ทั้งนี้เนื่องจากแรมโนลิปิดมีคุณสมบัติเป็น anions การเกิดอิมัลชันเป็นแบบน้ำในน้ำมัน

(Pornsunthorntawee et al., 2008) และที่สภาวะปกติมีค่าพีเอช มีสภาวะเป็นเบส ซึ่งแรมโนลิปิดที่สภาวะเป็นเบส หมู่ carboxilic groups (COOH) ของแรมโนลิปิดแตกตัวเป็น carboxilate groups(COO^-) ได้ดี ทำให้ส่วนหัวของแรมโนลิปิดละลายน้ำได้ดี แต่เมื่อมีการเติมโซเดียมคลอไรด์ลงไป โซเดียมคลอไรด์จะแตกตัวเป็นโซเดียมไอออน (Na^+) ทำให้แรมโนลิปิดเป็นกรดอ่อน ซึ่งทำให้โซเดียมไอออนง่ายต่อการเข้าจับกับ carboxilate groups (COO^-) ของแรมโนลิปิด (Pornsunthorntawee et al., 2009) ทำให้ส่วนหัวของแรมโนลิปิดละลายน้ำได้ไม่ดี ทำให้เฟสสองเฟสคือส่วนน้ำกับน้ำมันรวมตัวกันได้ไม่ดี การเกิดอิมัลชันจึงลดลง



ภาพที่ 17 การเกิดอิมัลชันของแรมโนลิปิดที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์แตกต่างกัน(0-10%) ใน (ก) น้ำมันปาล์ม (ข) มันดีเซล (ค) น้ำมันก๊าด และ (ง) เฮกเซน



ภาพที่ 18 ผลของความเข้มข้นของเกลือต่อประสิทธิภาพของแรมโนลิปิด (ก) น้ำมันปาล์ม (ข) มันดีเซล (ค) น้ำมันก๊าด และ(ง) เฮกเซน