

## เนื้อหางานวิจัย

### 1. การคัดเลือกหาจุลชีพที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพได้และการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ

#### 1.1 การจัดเตรียมตัวอย่างซึ่งนำมาจากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทยและการคัดแยกจุลชีพออกจากตัวอย่าง

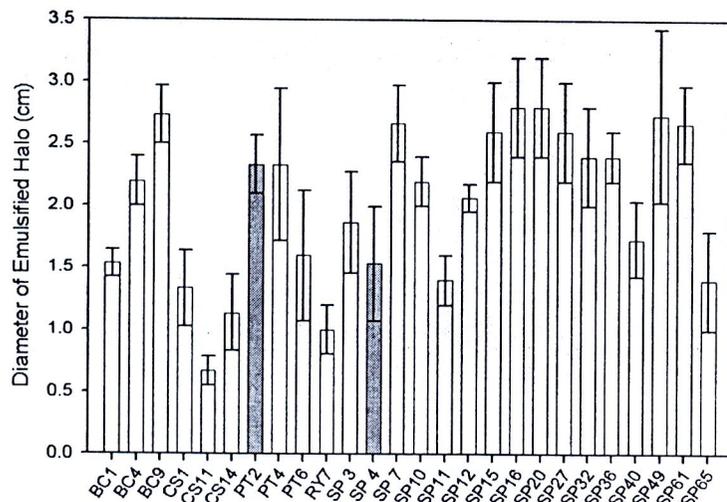
ตัวอย่างที่นำไปใช้ในการคัดแยกจุลชีพ ได้แก่ กากน้ำมัน (oil sludge) จากโรงกลั่นน้ำมันบางจาก จำนวน 2 ตัวอย่าง ดินที่ปนเปื้อนน้ำมันบริเวณอู่ซ่อมรถภายในกรุงเทพมหานครจำนวน 4 ตัวอย่าง น้ำเสียจากโรงอาหารภายในจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยจำนวน 5 ตัวอย่าง น้ำทะเลในเขตจังหวัดชลบุรีจำนวน 4 ตัวอย่าง น้ำทะเลในเขตจังหวัดระยองจำนวน 1 ตัวอย่าง และน้ำทะเลในเขตจังหวัดภูเก็ตจำนวน 1 ตัวอย่าง รวมเป็นจำนวนตัวอย่างทั้งสิ้น 17 ตัวอย่าง

#### ตารางที่ 1.1 ตัวอย่างซึ่งนำมาจากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทยและการคัดแยกจุลชีพออกจากตัวอย่าง

แหล่งที่มาของตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนจุลชีพที่คัดแยก ออกจากตัวอย่าง	จำนวนจุลชีพที่ผลิต สารลดแรงตึงผิว
กากน้ำมัน	2	20	6
ดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน	4	60	16
น้ำเสียจากโรงอาหาร	5	2	0
น้ำทะเลในเขตจังหวัดชลบุรี	4	13	1
น้ำทะเลในเขตจังหวัดระยอง	1	11	1
น้ำทะเลในเขตจังหวัดภูเก็ต	1	14	2
<b>รวม</b>	<b>17</b>	<b>120</b>	<b>26</b>

การคัดแยกจุลชีพออกจากตัวอย่างสามารถทำได้โดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า “serial dilution” จากนั้นจึงทำการเพาะเลี้ยงจุลชีพที่คัดแยกได้ในอาหารเพาะเชื้อที่มีน้ำมันเป็นฟิล์มปกคลุมบริเวณผิวหน้า ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จุลชีพที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพได้จะมีบริเวณที่เรียกว่า “emulsified halo” ปรากฏอยู่รอบๆ โคลินี (colonies) ของจุลชีพนั้น ซึ่งผลที่ได้ พบว่า จากจุลชีพจำนวน 120 สายพันธุ์ ที่คัดแยกออกจากตัวอย่างซึ่งนำมาจากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย มีจุลชีพ

จำนวน 26 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพได้ ดังแสดงในตารางที่ 1.1 โดยแบ่งเป็นจุลชีพที่คัดแยกออกจากตัวอย่างกากน้ำมันจำนวน 6 สายพันธุ์ (BC1, BC4, BC9, PT2, PT4, และ PT6) จุลชีพที่คัดแยกออกจากตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนน้ำมันจำนวน 16 สายพันธุ์ (CS1, CS11, CS14, SP3, SP4, SP7, SP10, SP11, SP12, SP15, SP16, SP20, SP27, SP32, SP36, และ SP40) จุลชีพที่คัดแยกออกจากตัวอย่างน้ำทะเลในเขตจังหวัดชลบุรีจำนวน 1 สายพันธุ์ (SP49) จุลชีพที่คัดแยกออกจากตัวอย่างน้ำทะเลในเขตจังหวัดระยองจำนวน 1 สายพันธุ์ (RY7) และจุลชีพที่คัดแยกออกจากตัวอย่างน้ำทะเลในเขตจังหวัดภูเก็ตจำนวน 2 สายพันธุ์ (SP61 และ SP65) ภาพที่ 1.1 แสดงถึงเส้นผ่านศูนย์กลางของ “emulsified halo” ที่ปรากฏอยู่รอบโคโลนีของจุลชีพที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพได้ทั้ง 26 สายพันธุ์

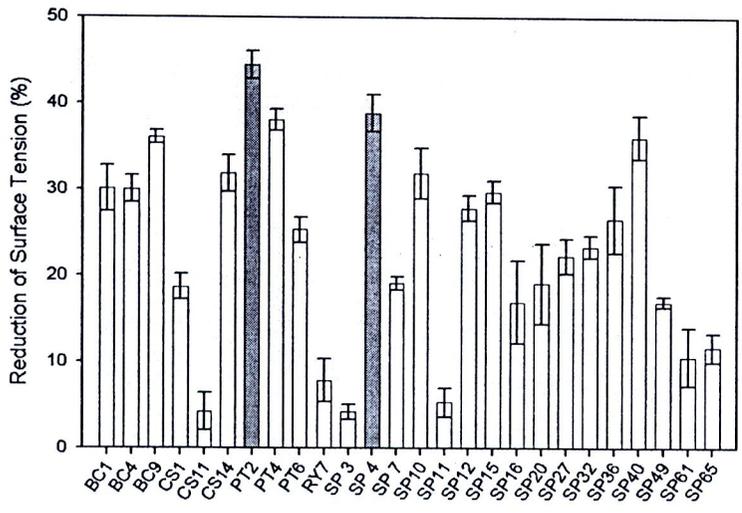


ภาพที่ 1.1 เส้นผ่านศูนย์กลางของ “emulsified halo” ที่ปรากฏอยู่รอบโคโลนีของจุลชีพที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพได้ทั้ง 26 สายพันธุ์

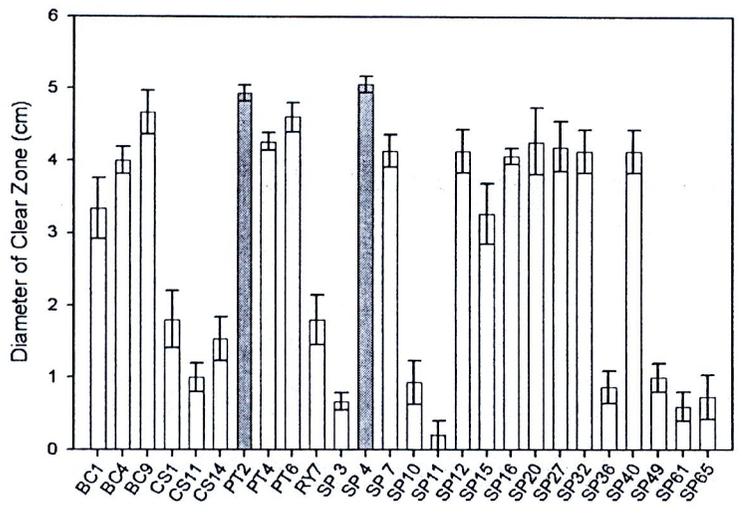
## 1.2 การคัดเลือกหาจุลชีพที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพได้

หลังจากที่ทำการคัดแยกจุลชีพออกจากตัวอย่างที่นำมาแล้ว จึงทำการเพาะเลี้ยงจุลชีพที่คัดแยกได้ใน nutrient broth ที่มีน้ำมันปาล์มผสมอยู่ในปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ในเครื่อง shaking incubator ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้จุลชีพที่คัดแยกได้ผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ จากนั้น จึงทำการวัดความสามารถในการลดแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตได้ และทำการทดสอบที่เรียกว่า “oil displacement test” เพื่อทดสอบความสามารถในการเกิด “clear zone” ซึ่งทำได้โดยการหยดอาหารเลี้ยงเชื้อ (nutrient broth ที่มีน้ำมันปาล์มผสมอยู่) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจุลชีพลงในจานเพาะเชื้อ (Petri dish) ที่มีน้ำซึ่งมีน้ำมันเป็นฟิล์มปกคลุมบริเวณผิวหน้าอยู่ หาก

สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตได้มีประสิทธิภาพสูงก็จะให้บริเวณของ “clear zone” ที่กว้างขึ้นตามไปด้วย ภาพที่ 1.2 และ 1.3 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อและเส้นผ่านศูนย์กลางของ “clear zone” ระหว่างจุลชีพแต่ละสายพันธุ์ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพได้



ภาพที่ 1.2 เปอร์เซ็นต์การลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตจากจุลชีพที่คัดแยกได้ทั้ง 26 สายพันธุ์



ภาพที่ 1.3 เส้นผ่านศูนย์กลางของ “clear zone” ที่เกิดจากสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตจากจุลชีพที่คัดแยกได้ทั้ง 26 สายพันธุ์

ผลจากการทดลองที่ได้ พบว่า มีจุลชีพสายพันธุ์ PT2 ที่คัดแยกออกจากตัวอย่างกากน้ำมันและจุลชีพสายพันธุ์ SP4 ที่คัดแยกออกจากตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนน้ำมันที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่มีคุณสมบัติเชื่อมโยงได้ โดยสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตได้จากทั้งสองสายพันธุ์สามารถลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 47 มิลลินิวตันต่อเมตร จนมีค่าต่ำกว่า 30 มิลลินิวตันต่อเมตร หรือคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การลดแรงตึงผิวประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตได้ยังทำให้เกิดบริเวณของ “clear zone” ได้กว้างที่สุดอีกด้วย ดังจะเห็นได้จากการมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ “clear zone” ที่มากที่สุด

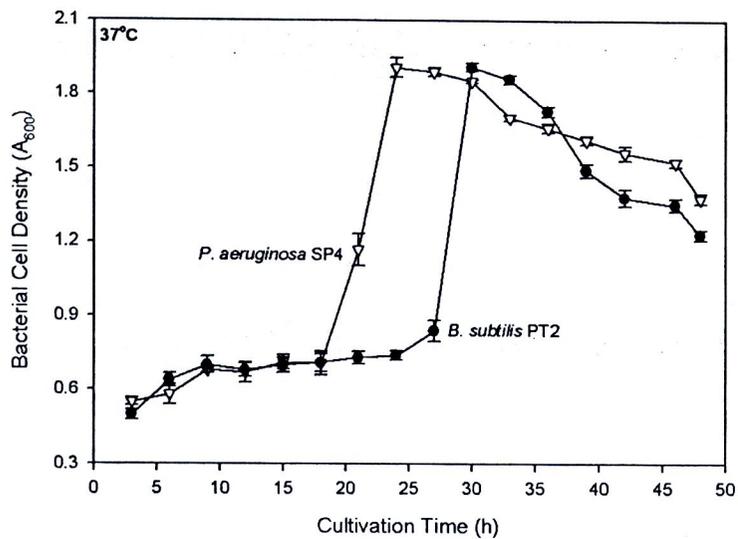
### 1.3 การระบุชนิดของจุลชีพสายพันธุ์ PT2 และสายพันธุ์ SP4 ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพได้

ผลการระบุชนิดของจุลชีพสายพันธุ์ PT2 โดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย พบว่า สายพันธุ์ PT2 ที่คัดแยกได้เป็นแบคทีเรียประเภทแกรมบวก (Gram-positive bacteria) ในตระกูล *Bacillus subtilis* ดังนั้น จุลชีพสายพันธุ์ PT2 จึงมีชื่อว่า “*Bacillus subtilis* PT2” ในขณะที่ ผลการระบุชนิดของจุลชีพสายพันธุ์ SP4 พบว่า สายพันธุ์ SP4 ที่คัดแยกได้เป็นแบคทีเรียประเภทแกรมลบ (Gram-negative bacteria) ในตระกูล *Pseudomonas aeruginosa* ดังนั้น จุลชีพสายพันธุ์ SP4 จึงมีชื่อว่า “*Pseudomonas aeruginosa* SP4”

### 1.4 การทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพจากแบคทีเรียสายพันธุ์ PT2 และ SP4 ในงานวิจัยครั้งนี้ คือ nutrient broth ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนเสริม โดยทำการเพาะเลี้ยงจุลชีพในเครื่อง shaking incubator ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สำหรับตัวแปรที่ศึกษา ได้แก่ เวลาที่ใช้ในการเตรียมหัวเชื้อ ปริมาณน้ำมันปาล์มที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเสริม ปริมาณของหัวเชื้อที่ใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ และเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลชีพเพื่อให้ผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ

จากผลการทดลองที่ได้ พบว่า เวลาที่เหมาะสมต่อการเตรียมหัวเชื้อของแบคทีเรียสายพันธุ์ PT2 คือ 30 ชั่วโมง ในขณะที่ เวลาที่เหมาะสมต่อการเตรียมหัวเชื้อของแบคทีเรียสายพันธุ์ SP4 คือ 22 ชั่วโมง ดังจะเห็นได้จากการที่มีความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียใน nutrient broth ที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในขั้นตอนของการเตรียมหัวเชื้อที่สูงที่สุดในช่วงเวลาดังกล่าว ดังแสดงในภาพที่ 1.4 โดยการวัดความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรีนั้นสามารถทำได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (A600) ด้วยเครื่องยูวีสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV spectrophotometer) ที่ช่วงเวลากการเพาะเลี้ยงจุลชีพต่างๆ กัน



ภาพที่ 1.4 ความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* PT2 และ *Pseudomonas aeruginosa* SP4 ใน nutrient broth ที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 1.2 ผลการทดลองหาปริมาณน้ำมันปาล์มที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเสริมในอาหารเลี้ยงเชื้อของ *Bacillus subtilis* PT2 และ *Pseudomonas aeruginosa* SP4

ปริมาณน้ำมันปาล์ม (เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร)	น้ำหนักแห้งของเซลล์ แบคทีเรีย (กรัมต่อลิตร)	เปอร์เซ็นต์ การลดแรงตึงผิว	เส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone (เซนติเมตร)
<i>Bacillus subtilis</i> PT2:			
2	5.33±0.01	43.62±0.21	9.80±0.01
4	5.33±0.01	43.62±0.43	9.80±0.01
6	5.23±0.01	43.62±0.43	9.80±0.01
8	5.34±0.01	43.62±0.21	9.80±0.01
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SP4:			
2	12.47±0.18	39.22±0.03	12.80±0.28
4	20.96±0.05	37.34±0.01	11.25±0.35
6	14.85±0.21	38.16±0.05	10.40±0.85
8	18.75±0.06	39.04±0.05	10.50±0.70

\* ค่าที่แสดง คือ ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการทดลองอย่างน้อยสามครั้ง



ตารางที่ 1.3 ผลการทดลองหาปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพจาก *Bacillus subtilis* PT2 และ *Pseudomonas aeruginosa* SP4

ปริมาณหัวเชื้อ (เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร)	น้ำหนักแห้งของเซลล์ แบคทีเรีย (กรัมต่อลิตร)	เปอร์เซ็นต์ การลดแรงตึงผิว	เส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone (เซนติเมตร)
<i>Bacillus subtilis</i> PT2:			
2	5.33±0.12	43.62±0.21	9.80±0.01
4	5.34±0.01	43.62± 0.21	9.80±0.01
6	5.25±0.01	43.48±0.12	9.80±0.01
8	5.42±0.08	43.19±0.37	9.80±0.01
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SP4:			
2	5.77±0.04	42.42±0.06	12.36±0.06
4	2.00±0.01	42.39±0.10	11.45±0.07
6	7.68±0.02	40.23±0.24	10.50±0.14
8	12.73±0.10	40.67±0.18	12.15±0.21

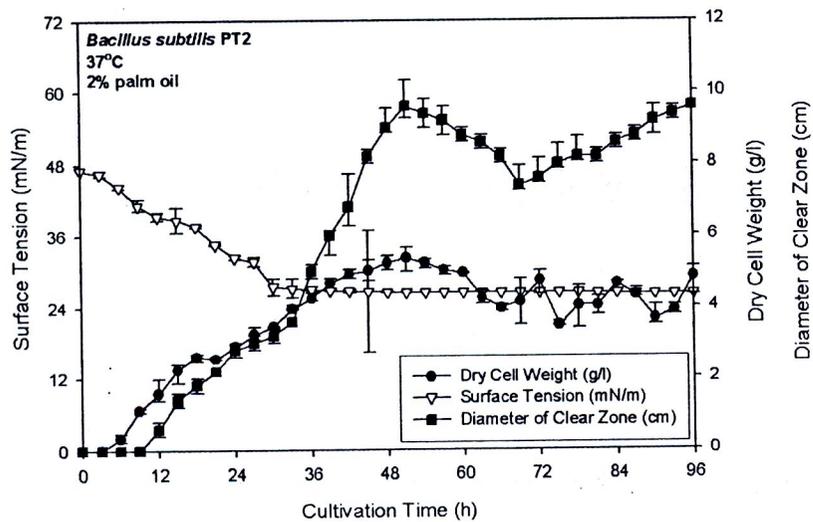
\* ค่าที่แสดง คือ ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการทดลองอย่างน้อยสามครั้ง

เมื่อพบเวลาที่เหมาะสมต่อการเตรียมหัวเชื้อของแบคทีเรียสายพันธุ์ PT2 และ SP4 แล้ว จึงทำการศึกษาหาปริมาณน้ำมันปาล์มที่เหมาะสมต่อการนำมาผสมกับ nutrient broth เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเสริมในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยผลการทดลองที่ได้ พบว่า ปริมาณน้ำมันปาล์มที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพจากจุลชีพสายพันธุ์ PT2 และ SP4 คือ 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ดังแสดงในตารางที่ 1.2 เมื่อได้เวลาที่เหมาะสมต่อการเตรียมหัวเชื้อและปริมาณน้ำมันปาล์มที่เหมาะสมต่อการใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเสริมแล้ว จึงทำการหาปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพดังแสดงในตารางที่ 1.3 ซึ่งผลจากการทดลองที่ได้ พบว่า ปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพของทั้งสองสายพันธุ์ คือ 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ดังนั้น จึงนำหัวเชื้อที่เตรียมได้ในปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ไปใช้ในขั้นตอนการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพจากทั้งสองสายพันธุ์ต่อไป

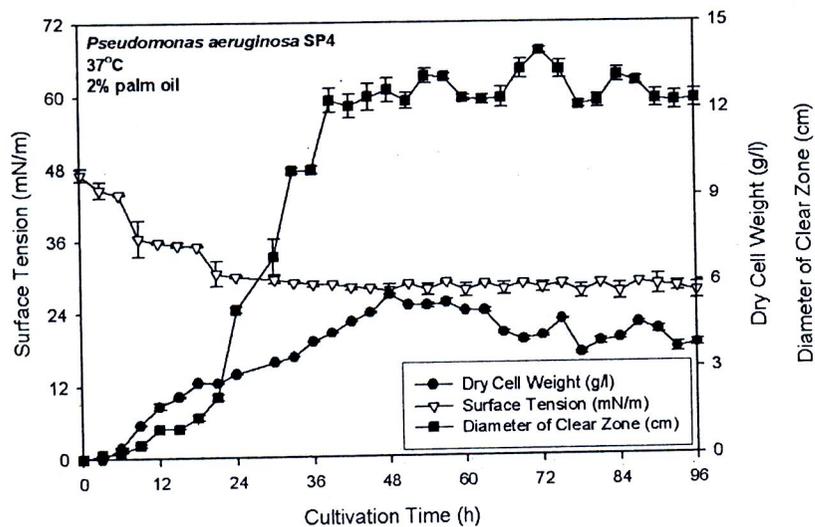
ปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งในขั้นตอนการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพจากทั้งสองสายพันธุ์ PT2 และสายพันธุ์ SP4 คือ เวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลชีพ ดังนั้น ในขั้นตอนนี้ จึงเป็นการหาเวลาที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงจุลชีพเพื่อให้ผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพได้ดีที่สุด โดยทำการเตรียมหัวเชื้อในเวลาที่เหมาะสม



ก่อนที่จะทำการเพาะเลี้ยงจุลชีพด้วยปริมาณหัวเชื้อที่เตรียมได้ในปริมาณที่เหมาะสมใน nutrient broth ที่มีน้ำมันปาล์มผสมอยู่ในปริมาณที่เหมาะสมเป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยจะมีการชั่งน้ำหนักแห้งของเซลล์แบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ การวัดความสามารถในการลดแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้ และการทดสอบ “oil displacement test” ทุกๆ 3 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 1.5 และ 1.6 ซึ่งผลที่ได้ พบว่า เวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงจุลชีพสายพันธุ์ PT2 เพื่อให้ผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ คือ 51 ชั่วโมง ในขณะที่เวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงจุลชีพสายพันธุ์ SP4 เพื่อให้ผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ คือ 48 ชั่วโมง



ภาพที่ 1.5 การผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพโดย *Bacillus subtilis* PT2



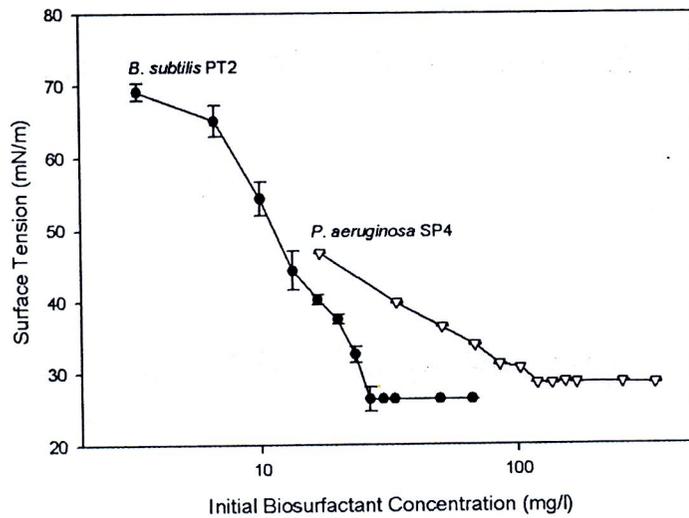
ภาพที่ 1.6 การผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพโดย *Pseudomonas aeruginosa* SP4

### 1.5 การทดสอบความสามารถในการดึงน้ำมันออกจากแหล่งขุดเจาะของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ

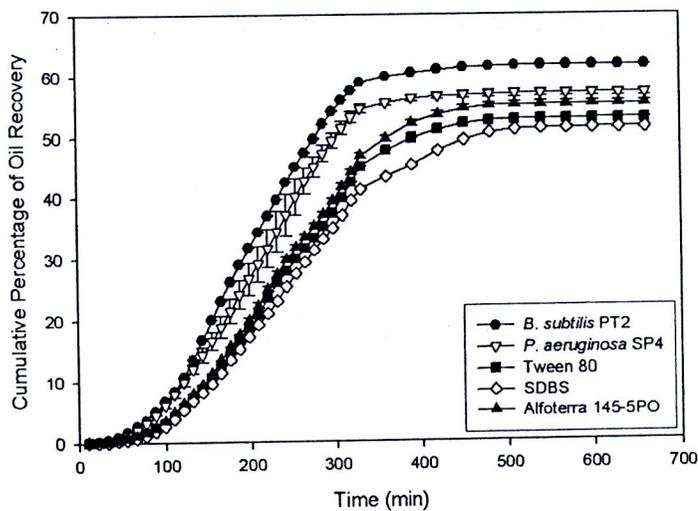
นอกจากการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพจากจุลชีพทั้ง 2 สายพันธุ์แล้ว ยังได้มีการทำการทดลองในเบื้องต้นเกี่ยวกับความสามารถในการดึงน้ำมัน (oil recovery) ของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพเพื่อศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการนำสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตได้ไปใช้งานจริงในอุตสาหกรรมปิโตรเลียมอีกด้วย โดยสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่นำไปใช้ในการทดลองครั้งนี้อยู่ในรูปของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของจุลชีพ (free-cell culture broth) สำหรับการแยกจุลชีพออกจากอาหารเลี้ยงเชื่อนั้นสามารถทำได้โดยการปั่นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้หลังจากการเพาะเลี้ยงจุลชีพภายใต้สภาวะที่เหมาะสมแล้วด้วยความเร็ว 8500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในขณะที่การทดสอบความสามารถในการดึงน้ำมันออกจากแหล่งขุดเจาะของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพสามารถทำได้โดยใช้แบบจำลองที่สร้างขึ้นจากการบรรจุคอลัมน์แก้วด้วยทรายที่เรียกว่า "Ottawa sand" จากนั้น จึงทำให้น้ำมันไหลผ่านคอลัมน์ และหลังจากที่น้ำมันแทรกตัวเข้าไปอยู่ในรูพรุนของทรายแล้ว จึงทำให้สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพไหลผ่านคอลัมน์ด้วยอัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที โดยมีการเก็บตัวอย่างของเหลวที่ไหลผ่านออกจากคอลัมน์ทุก 11 นาทีเป็นเวลา 11 ชั่วโมง เพื่อหาปริมาณน้ำมันที่เกิดจากการดึงกลับของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ โดยความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ใช้ในการทดสอบความสามารถในการดึงน้ำมันมีค่าเป็น 3 เท่าของความเข้มข้นที่ทำให้เกิดไมเซลล์ (critical micelle concentration, CMC) ภาพที่ 1.7 แสดงค่าแรงตึงผิวของน้ำที่ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพต่างๆ กัน ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตจากจุลชีพสายพันธุ์ PT2 มีค่าประมาณ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร เท่านั้น ในขณะที่ค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตจากจุลชีพสายพันธุ์ SP4 มีค่าประมาณ 120 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งนี้ ผลที่ได้ยังชี้ให้เห็นอีกว่า สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตจากจุลชีพสายพันธุ์ PT2 มีความว่องไวมากกว่าสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตจากจุลชีพสายพันธุ์ SP4 อีกด้วย เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวที่มีความว่องไวสูงมีค่า CMC ต่ำนั่นเอง

ผลจากการทดสอบความสามารถในการดึงน้ำมันที่ได้ พบว่า สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตจากจุลชีพสายพันธุ์ PT2 ให้เปอร์เซ็นต์การดึงน้ำมัน (oil recovery percentage) มากกว่าสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตจากจุลชีพสายพันธุ์ SP4 นอกจากนี้ เมื่อทำการทดลองเปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์อีก 3 ชนิด อันได้แก่ โซเดียมโดเดซิลเบนซีนซัลโฟเนต (sodium dodecyl benzene sulfonate, SDBS) พอลิออกซิเอทิลีนซอร์บิแทนมอนออลิเอต (polyoxyethylene sorbitan monooleate, Tween 80) และ โซเดียมอัลคิลพอลิพรอพิลีนออกไซด์ซัลเฟต (sodium alkyl polypropylene oxide sulfate, Alforterra 145-5PO) ที่มีค่า CMC เป็น 16 มิลลิกรัมต่อลิตร 453 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 7 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ พบว่า สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตได้จากจุลชีพทั้ง 2 ชนิดสามารถดึงน้ำมันได้มากกว่าสารลดแรงตึงผิว

สังเคราะห์ทั้ง 3 ชนิด ดังแสดงในภาพที่ 1.8 ทั้งนี้ ผลที่ได้จากการทดสอบการดึงน้ำมันด้วยการใช้น้ำกลั่นและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้ผ่านการเพาะเลี้ยงจุลชีพมาก่อนเป็นการทดลองควบคุม พบว่า น้ำกลั่นสามารถดึงน้ำมันได้เพียง  $3.71 \pm 1.74$  เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ อาหารเลี้ยงเชื้อสามารถดึงน้ำมันได้  $12.25 \pm 0.13$  เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น จึงมีความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมปิโตรเลียมต่อไป



ภาพที่ 1.7 ค่าแรงตึงผิวของน้ำที่ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพต่างๆ กัน



ภาพที่ 1.8 เปอร์เซ็นต์การดึงน้ำมันของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตจากจุลชีพทั้งสายพันธุ์ PT2 และสายพันธุ์ SP4 เปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ 3 ชนิด

## 2. การแยกองค์ประกอบ การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีขององค์ประกอบ และการวิเคราะห์สมบัติของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตจากจุลินทรีย์ *Pseudomonas aeruginosa* SP4

### 2.1 การผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

การผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ SP4 สามารถทำได้โดยทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในเครื่อง shaking incubator ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้ nutrient broth เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อและใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนเสริม ซึ่งเวลาที่เหมาะสมต่อการเตรียมหัวเชื้อ (inoculum) ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SP4 คือ 22 ชั่วโมง และสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพของแบคทีเรียสายพันธุ์ SP4 คือ ที่ปริมาณหัวเชื้อ 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ปริมาณน้ำมันปาล์มใน nutrient broth 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ 48 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์จนครบกำหนดเวลาแล้วจึงทำการปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเร็ว 8500 รอบต่อนาที ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และทำการตกตะกอนสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยการปรับค่าความเป็นกรดค่า (pH) ให้มีค่า 2.0 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 6.0 โมล/ลิตร จากนั้นจึงทำการเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้รับการปรับค่าความเป็นกรดค่าแล้ว ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน หลังจากทีสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพตกตะกอนอย่างสมบูรณ์แล้ว จึงทำการปั่นแยกตะกอนของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเร็ว 8500 รอบต่อนาที ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงละลายตะกอนของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ได้ด้วยสารละลายโซเดียมโบคาร์บอเนตที่มีความเข้มข้น 0.1 โมล/ลิตร จากนั้นจึงทำการสกัดสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ละลายอยู่ในสารละลายโซเดียมโบคาร์บอเนตด้วยตัวทำละลายที่ได้จากการผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและเอทานอลด้วยอัตราส่วน 2:1 ณ อุณหภูมิห้อง และเมื่อทำการระเหยตัวทำละลายผสมภายใต้ภาวะสุญญากาศ ณ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสแล้ว จึงได้สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ SP4 ประมาณ 5.20 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร

### 2.2 การแยกองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

การแยกองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์สายพันธุ์ SP4 ในเบื้องต้นสามารถทำได้โดยใช้เทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (thin layer chromatography, TLC) โดยเมื่อทำการจุดตัวอย่างสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่สกัดได้ลงบนแผ่น TLC แล้ว จึงนำแผ่น TLC ไปใส่ไว้ในภาชนะแก้ว (TLC tank) ที่บรรจุตัวทำละลายที่เหมาะสมอยู่ด้านล่างของภาชนะ ซึ่งตัวทำละลายที่ใช้ในการแยกองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ SP4 ก็คือ ตัวทำละลายผสม

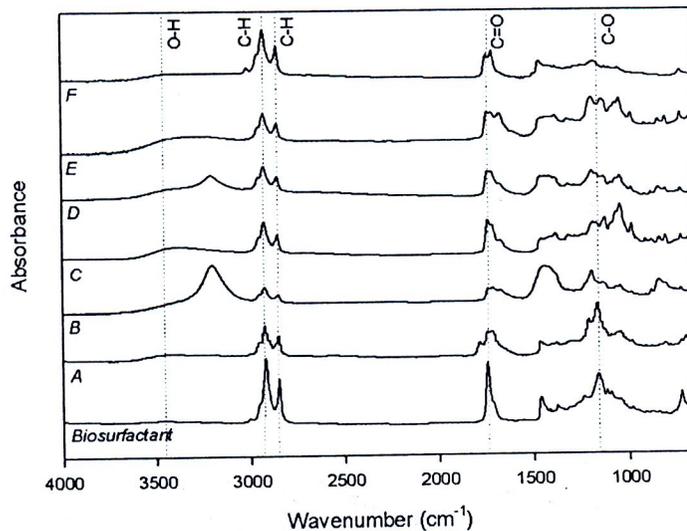
ระหว่างคลอโรฟอร์ม เมทานอล และน้ำในอัตราส่วน 65:25:4 เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนผ่านแผ่น TLC จนครบระยะทางที่กำหนดไว้ จึงนำแผ่น TLC ออกจากภาชนะแก้ว เพื่อให้ตัวทำละลายที่ใช้ระเหยออกจากแผ่น TLC และเมื่อแผ่น TLC แห้งดีแล้ว จึงทำการพ่นสารรีเอเจนต์ (reagent) ลงบนแผ่น TLC จากนั้นจึงเก็บแผ่น TLC ที่ทำการพ่นสารรีเอเจนต์เรียบร้อยแล้ว ณ อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้องค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่แยกได้เกิดปฏิกิริยากับสารรีเอเจนต์และก่อให้เกิดการติดสีขึ้นในที่สุด โดยองค์ประกอบในสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตจากจุลชีพสายพันธุ์ SP4 จะติดสีเมื่อทำการพ่นด้วยสารแอนโทรน (anthrone) หรืออาจทำการเก็บแผ่น TLC ในกล่องที่บรรจุกลีซีโอดีอินเพื่อให้เกิดการติดสีก็ได้ จากนั้นจึงทำการคำนวณอัตราการเคลื่อนที่ (rate of flow, Rf) ของแต่ละองค์ประกอบที่แยกได้จากอัตราส่วนระหว่างระยะทางที่องค์ประกอบเคลื่อนที่ได้กับระยะทางทั้งหมดที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ ซึ่งผลที่ได้ พบว่า สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตจากจุลชีพสายพันธุ์ SP4 ประกอบไปด้วยองค์ประกอบที่สำคัญอย่างน้อย 2 องค์ประกอบ โดยองค์ประกอบดังกล่าวมีค่า Rf ประมาณ 0.70 และ 0.94 ตามลำดับ

โดยทั่วไป แบคทีเรียในตระกูล *Pseudomonas aeruginosa* นั้นมักผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพประเภทไกลโคลิพิด (glycolipid) ที่เรียกว่า “แรมโนลิพิด” (rhamnolipid) ดังนั้น ส่วนประกอบหลักของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตจากจุลชีพสายพันธุ์ SP4 ซึ่งเป็นจุลชีพในตระกูลดังกล่าว จึงน่าจะเป็นสารแรมโนลิพิดเช่นกัน ซึ่งผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC สามารถยืนยันในเบื้องต้นได้ว่า องค์ประกอบทั้งสองของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่แยกได้เป็นสารประเภทแรมโนลิพิด เนื่องจากองค์ประกอบทั้งสองดังกล่าวสามารถทำปฏิกิริยากับสารแอนโทรนที่เป็นสารรีเอเจนต์สำหรับการตรวจวัดสารในกลุ่มไกลโคลิพิด และก่อให้เกิดการติดสีขึ้นได้ แต่อย่างไรก็ตาม เทคนิค LTC ไม่สามารถแยกสารองค์ประกอบที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกันออกจากกันได้ ดังนั้น จุดขององค์ประกอบที่ติดสีอยู่บนแผ่น TLC จึงอาจจะยังคงเป็นของผสมระหว่างสารที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกันได้ ดังนั้น จึงได้มีการใช้เทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (high performance liquid chromatography) ร่วมกับการตรวจวัดการกระเจิงของแสง (light scattering detector) ซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถแยกสารผสมได้อย่างมีประสิทธิภาพในการแยกองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่สกัดได้อีกวิธีการหนึ่ง โดยเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่ใช้ ได้แก่ สารละลายอะซิโตน ไตรล (10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) (เฟส A) และอะซิโตน ไตรลบริสุทธิ์ (100 เปอร์เซ็นต์) (เฟส B) ซึ่งเฟสเคลื่อนที่ทั้งสองนี้มีไทรฟลูออโรอะซิติกเอซิดผสมอยู่ด้วยในปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร สำหรับระบบที่ใช้ในการแยกองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตจากจุลชีพสายพันธุ์ SP4 นั้นเริ่มจากการเพิ่มอัตราส่วนของเฟส B จาก 30 เปอร์เซ็นต์ ไปเป็น 70 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 5 นาทีแรก จากนั้นจึงทำการเพิ่มอัตราส่วนของเฟส B จาก 70 เปอร์เซ็นต์ ไปเป็น 90 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 15 นาที แล้วจึงเพิ่มอัตราส่วนของเฟส B ไปถึง 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสิ้นสุดกระบวนการวิเคราะห์ อัตราการ

เคลื่อนที่ของเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ คือ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที และปริมาตรที่ใช้ในการฉีดสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพตัวอย่าง คือ 50 ไมโครลิตร อุณหภูมิที่ใช้ในอุปกรณ์การตรวจวัด คือ 100 องศาเซลเซียส ซึ่งมีอัตราการไหลของละอองของเหลว (nebulizer) เป็น 1.5 ลิตรต่อนาที โดยผลการวิเคราะห์ที่ได้ พบว่า สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตจากจุลชีพสายพันธุ์ SP4 นั้นประกอบไปด้วยองค์ประกอบต่างๆ อย่างน้อยไม่ต่ำกว่า 6 ชนิดด้วยกัน เนื่องจากมีพีคปรากฏอยู่ในโครมาแกรม (chromatogram) ที่ได้ในช่วงระยะเวลาต่างๆ กันถึง 6 พีค โดยเรียกองค์ประกอบทั้ง 6 ชนิดที่สามารถแยกได้นี้ว่า A, B, C, D, E และ F ซึ่งมีพื้นที่ใต้พีค (peak area) คิดเป็น 0.68, 1.54, 73.48, 9.55, 13.35 และ 1.39 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากนั้น จึงทำการเก็บสารที่ชะออกจากคอลัมน์ในช่วงเวลาที่พีคปรากฏเพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์โครงสร้างขององค์ประกอบที่แยกได้ในลำดับต่อไป

### 2.3 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีขององค์ประกอบที่แยกได้จากสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ

เทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีขององค์ประกอบที่แยกได้จากสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตจากจุลชีพสายพันธุ์ SP4 ได้แก่ ฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR) นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ ( $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance,  $^1\text{H}$  NMR) และแมสสเปกโทรเมตรี (mass spectrometry, MS)



ภาพที่ 2.1 ฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกตรัมของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตจากจุลชีพ SP4 และองค์ประกอบที่แยกได้ทั้ง 6 ชนิด



สเปกตรัมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FT-IR พบว่า สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตจากจุลชีพสายพันธุ์ SP4 และองค์ประกอบที่แยกได้ทั้ง 6 ชนิดมีโครงสร้างสอดคล้องกับสารประเภทแรมโนลิพิดซึ่งประกอบไปด้วยโมเลกุลของแรมโนสเชื่อมต่อกับสายโซ่ไฮโดรคาร์บอน โดยมีพิกที่สำคัญปรากฏที่ 3468, 2922, 2853, 1743, และ 1300-1100 เซนติเมตร<sup>-1</sup> ดังแสดงในภาพที่ 2.1 พิกที่ปรากฏที่เลขคลื่น (wave number) 3468 เซนติเมตร<sup>-1</sup> เป็นการสั่นสะเทือนของพันธะ O-H ในหมู่ไฮดรอกซิลของแรมโนส ในขณะที่พิกที่ปรากฏที่เลขคลื่น 2922 และ 2853 เซนติเมตร<sup>-1</sup> เป็นการสั่นสะเทือนของพันธะ C-H ในสายโซ่ไฮโดรคาร์บอน ส่วนพิกที่ปรากฏที่เลขคลื่น 1743 และ 1300-1100 เซนติเมตร<sup>-1</sup> นั้นเป็นการสั่นสะเทือนของพันธะ C=O ในหมู่คาร์บอนิล และการสั่นสะเทือนของพันธะ C-O ตามลำดับ นอกจากนี้ สเปกตรัมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค <sup>1</sup>H NMR ยังยืนยันถึงโครงสร้างดังกล่าวอีกด้วยโดยพิกที่ปรากฏในบริเวณ 0.8-1.4 ppm สอดคล้องกับสายโซ่ไฮโดรคาร์บอนในโมเลกุลของแรมโนลิพิด ในขณะที่พิกที่ปรากฏในบริเวณ 3.3-5.5 ppm สอดคล้องกับโครงสร้างของแรมโนส สำหรับผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MS พบว่า น้ำหนักโมเลกุลขององค์ประกอบ A, B, C, D, E และ F คือ 622, 476, 504, 530, 532 และ 704 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2.1

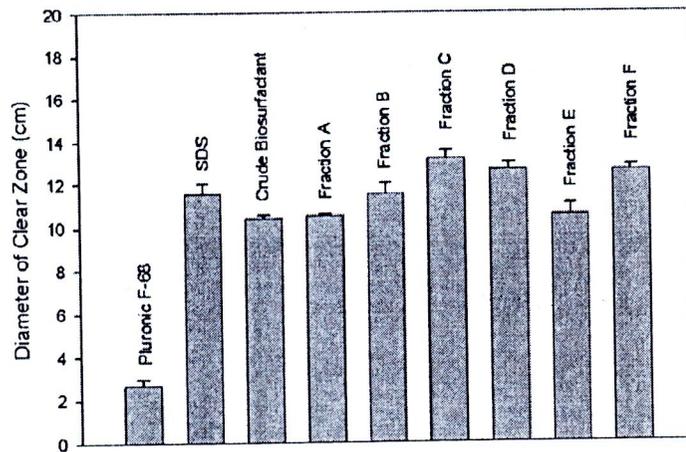
ตารางที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีขององค์ประกอบในสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตจากจุลชีพสายพันธุ์ SP4

องค์ประกอบ	เวลา (นาที)	พื้นที่ใต้พิก (เปอร์เซ็นต์)	โครงสร้างทางเคมี	น้ำหนักโมเลกุล
A	4.68	0.68	Rha-Rha-C <sub>8</sub> -C <sub>10</sub> Rha-Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>8</sub>	622
B	14.58	1.54	Rha-C <sub>8</sub> -C <sub>10</sub> Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>8</sub>	476
C	19.38	73.48	Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	504
D	22.25	9.55	Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>12:1</sub> Rha-C <sub>12:1</sub> -C <sub>10</sub>	530
E	25.12	13.35	Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>12</sub> Rha-C <sub>12</sub> -C <sub>10</sub>	532
F	29.62	1.39	Rha-Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>14:1</sub> Rha-Rha-C <sub>12:1</sub> -C <sub>12</sub>	704

## 2.4 การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพของสารลดแรงตึงผิวทางกายภาพ

ในงานวิจัยครั้งนี้ ได้ทำการทดสอบสมบัติทางกายภาพของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตจากจุลชีพ SP4 เปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ 2 ชนิด คือ Pluronic F-68 ซึ่งเป็นไตรบล็อคโคพอลิเมอร์ระหว่างเอทิลีนออกไซด์ (PEO) และ โพรพิลีนออกไซด์ (PPO) ในรูปของ PEO-PPO-PEO และ โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate, SDS) เพื่อพิจารณาถึงความเป็นไปได้ในการนำสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่สกัดได้ไปใช้ทดแทนสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์

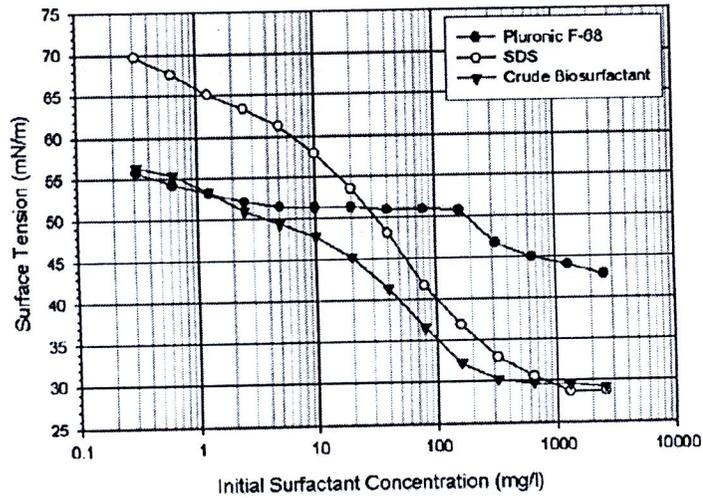
ภาพที่ 2.2 แสดงเส้นผ่านศูนย์กลางของ “clear zone” ที่เกิดจากสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตจากจุลชีพ SP4 และองค์ประกอบที่แยกได้ทั้ง 6 ชนิดเปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ ผลที่ได้พบว่า สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่สกัดได้และองค์ประกอบทั้ง 6 ชนิดมีคุณสมบัติเทียบเท่ากับ SDS ซึ่งดีกว่าคุณสมบัติของ Pluronic F-68 อยู่มาก โดยองค์ประกอบ C มีคุณสมบัติที่ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวทั้งหมดที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์



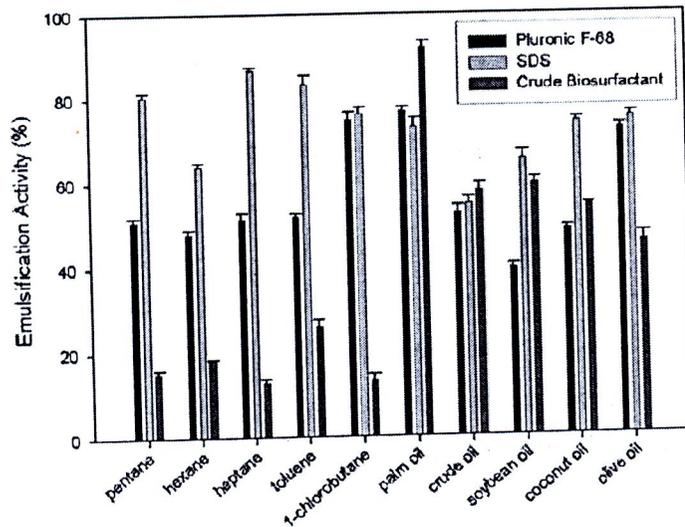
ภาพที่ 2.2 เส้นผ่านศูนย์กลางของ “clear zone” ที่เกิดจากสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตจากจุลชีพ SP4 และองค์ประกอบที่แยกได้ทั้ง 6 ชนิดเปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ (Pluronic F-68 และ SDS)

ภาพที่ 2.3 แสดงถึงแรงตึงผิวของน้ำ ณ ความเข้มข้นต่างๆ กันของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตจากจุลชีพ SP4 Pluronic F-68 และ SDS จากกราฟที่ได้ พบว่า สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพสามารถลดแรงตึงผิวของน้ำจาก 72.0 มิลลินิวตันต่อเมตรเป็น 29.0 มิลลินิวตันต่อเมตร เมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพมีค่ามากกว่า 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้น ความเข้มข้นที่ทำให้เกิดไมเซลล์ (critical micelle concentration, CMC) ของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพจึงมีค่าเป็น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่ Pluronic F-68 และ SDS ลดแรงตึงผิวของน้ำเป็น 42.8 และ 28.6 มิลลินิวตันต่อเมตร โดยมีค่า CMC เป็น 350 และ 1280

มีลิกซ์ที่ต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อพิจารณาจากความสามารถในการลดแรงตึงผิวของน้ำและค่า CMC แล้ว สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตจากจุลชีพ SP4 จึงมีความว่องไวที่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับ Pluronic F-68 และ SDS



ภาพที่ 2.3 แรงตึงผิว ณ ความเข้มข้นต่างๆ กันของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตจากจุลชีพ SP4 Pluronic F-68 และ SDS

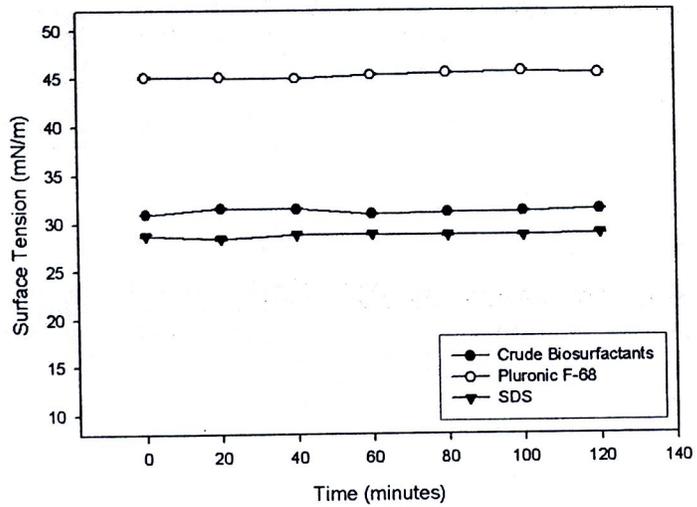


ภาพที่ 2.4 อิมัลซิฟิเคชันแอกทิวิตีของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตจากจุลชีพ SP4 Pluronic F-68 และ SDS

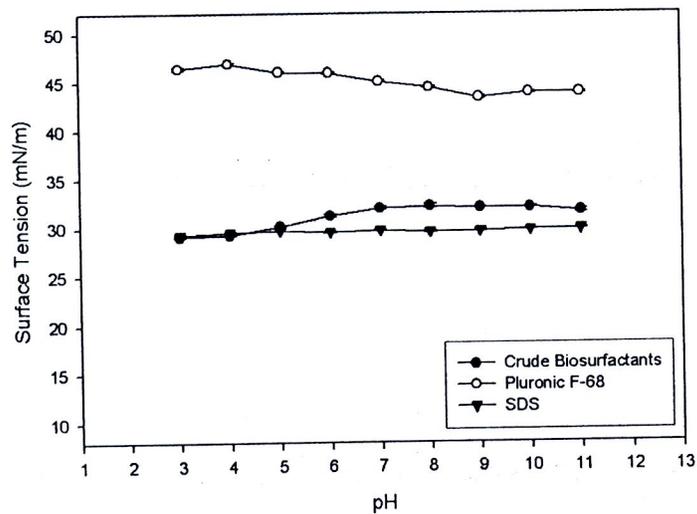
นอกจากคุณสมบัติดังกล่าวแล้ว สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตจากจุลชีพ SP4 ยังสามารถทำให้เกิดอิมัลชัน (emulsion) ของสารประเภทไฮโดรคาร์บอนและน้ำมัน ได้อีกด้วย ภาพที่ 2.4 แสดงอิมัลซิฟิเคชันแอกทิวิตี (emulsification activity) ของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตจากจุลชีพ SP4 เปรียบเทียบกับ Pluronic F-68 และ SDS โดยอิมัลซิฟิเคชันแอกทิวิตีสามารถคำนวณได้จากเปอร์เซ็นต์ความสูงของส่วนที่เป็นอิมัลชันต่อความสูงของสารผสมระหว่างสารละลายของสารลดแรงตึงผิวและไฮโดรคาร์บอนหรือน้ำมันที่ใช้ เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ความสามารถในการทำให้เกิดอิมัลชันของน้ำมันพืช เช่น น้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันมะกอก เป็นต้น บ่งชี้ถึงศักยภาพของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่สามารถนำไปใช้งานได้ในอุตสาหกรรมอาหาร

ภาพที่ 2.5 แสดงถึงเสถียรภาพทางความร้อนของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตจากจุลชีพ SP4 เมื่อเปรียบเทียบกับ Pluronic F-68 และ SDS ที่ความเข้มข้นเท่ากับ CMC ณ อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาต่างๆ กัน จากผลที่ได้ พบว่า สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ Pluronic F-68 และ SDS ยังคงความสามารถในการลดแรงตึงผิวได้เป็นอย่างดี เมื่อเวลาผ่านไปถึง 2 ชั่วโมง ดังนั้น จึงได้ทำการทดสอบ ณ อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที โดยใช้หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ซึ่งผลที่ได้ พบว่า สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพและ Pluronic F-68 ยังมีเสถียรภาพที่ดี เนื่องจากแรงตึงผิวของสารละลายมีค่าเปลี่ยนแปลงไม่มากนัก ในขณะที่ แรงตึงผิวของสารละลาย SDS มีค่าเพิ่มขึ้นจาก 28.7 เป็น 34.9 มิลลินิวตันต่อเมตร ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นถึงการสูญเสียสภาพความเป็นสารลดแรงตึงผิว ดังนั้น สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพจึงมีเสถียรภาพทางความร้อนที่เทียบเท่า Pluronic F-68 ซึ่งดีกว่า SDS มาก ภาพที่ 2.6 แสดงถึงผลของค่าความเป็นกรดต่างที่มีต่อเสถียรภาพของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตจากจุลชีพ SP4 Pluronic F-68 และ SDS สารลดแรงตึงผิวทั้ง 3 ชนิดสามารถคงความสามารถในการลดแรงตึงผิวได้เป็นอย่างดีในช่วงความเป็นกรดต่างตั้งแต่ 3 ถึง 11

จากผลการทดลองที่ได้ พบว่า สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตจากจุลชีพ SP4 มีคุณสมบัติที่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ที่นำมาใช้ทดลอง ดังนั้น สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่สกัดได้ จึงน่าจะสามารถนำไปใช้ทดแทนสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ได้ นอกจากนี้ เสถียรภาพที่ดีของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตจากจุลชีพ SP4 ยังชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการนำไปใช้งานภายใต้สภาวะที่มีความรุนแรงทางด้านสิ่งแวดล้อม เช่น ในอุตสาหกรรมปิโตรเลียมและปิโตรเคมี เป็นต้น และเนื่องจากสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตจากจุลชีพ SP4 ยังคงความสามารถในการลดแรงตึงผิวได้แม้ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ดังนั้น จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำไปใช้ทางด้านการแพทย์ได้อีกด้วย



ภาพที่ 2.5 เสดียรภาพทางความร้อนของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตจากจุลชีพ SP4 Pluronic F-68 และ SDS ณ อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส



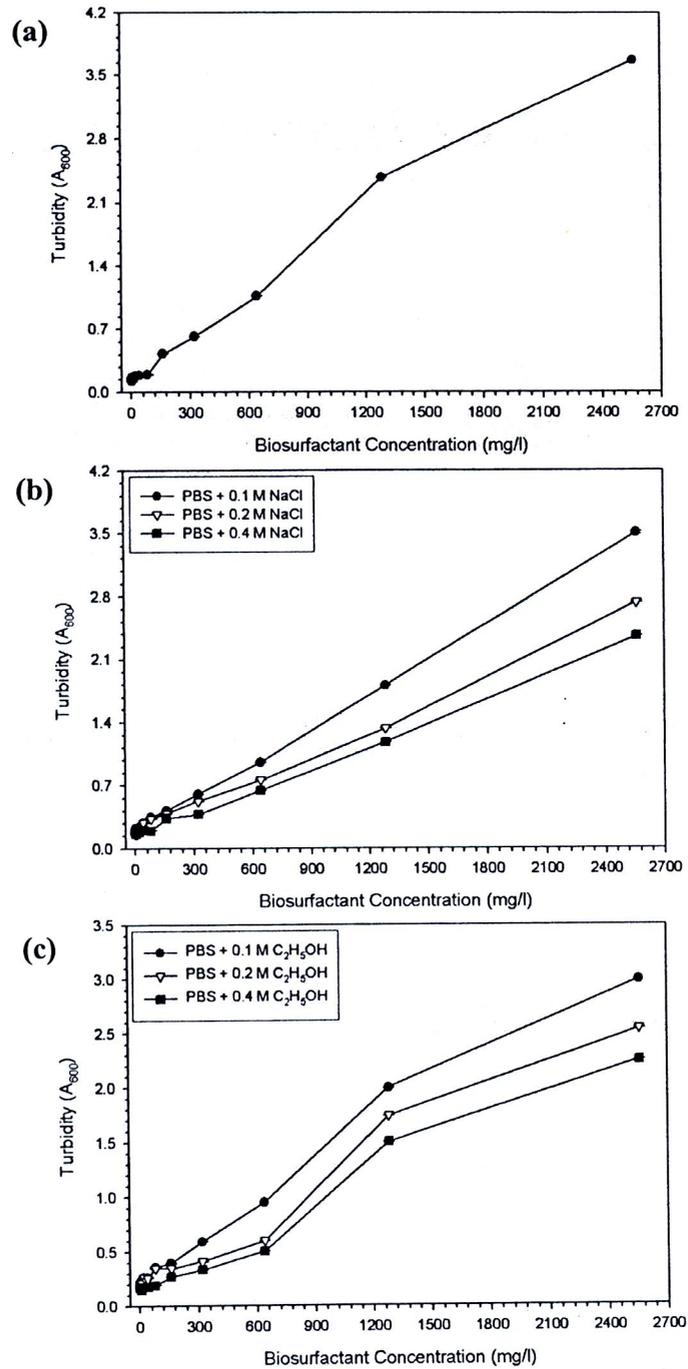
ภาพที่ 2.6 ผลของค่าความเป็นกรดต่างที่มีต่อเสถียรภาพของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตจากจุลชีพ SP4 Pluronic F-68 และ SDS

โดยทั่วไป โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวทั้งสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์และสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพนั้นสามารถเกิดการรวมตัวกันเมื่ออยู่ในตัวกลาง (media) ต่างๆ เช่น น้ำหรือสารละลายบัฟเฟอร์ เป็นต้น ก่อให้เกิดเป็นโครงสร้างหลากหลายประเภท อันได้แก่ ไมเซลล์ (micelle) เวสิเคิล (vesicle) ไบเลเยอร์

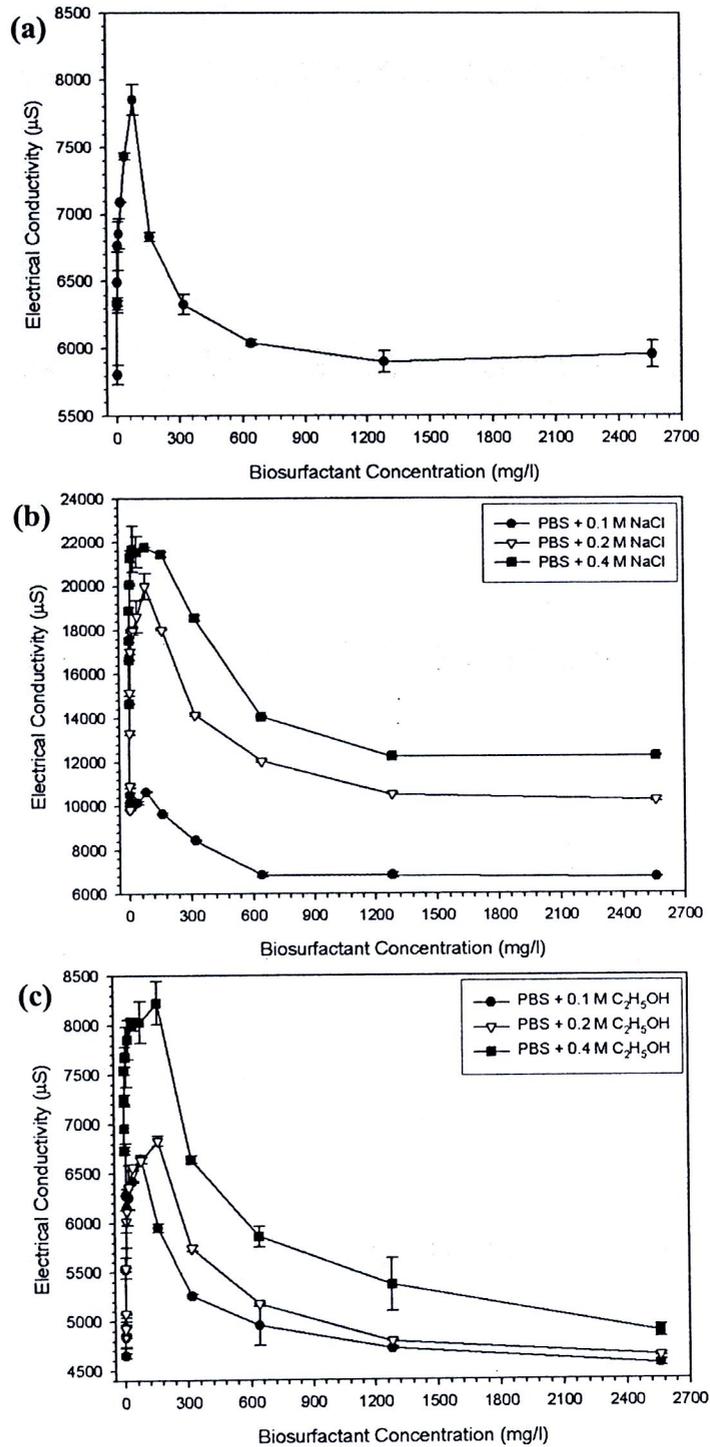
(bilayer) แผ่น (sheet) และผลึกเหลว (liquid crystalline) โดยโครงสร้างที่เกิดจากการรวมตัวกันดังกล่าวสามารถบ่งชี้ให้เห็นถึงศักยภาพในการนำสารลดแรงตึงผิวไปใช้งานในด้านต่างๆ ได้ อาทิเช่น การส่งผ่านยาเข้าสู่ร่างกาย (drug delivery) การใช้งานเป็นสารซักฟอก (detergency) เป็นต้น ดังนั้น ในงานวิจัยนี้ จึงได้ทำการวิเคราะห์เพื่อศึกษาถึงโครงสร้างที่เกิดจากการรวมตัวกันของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตจากจุลชีพ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ SP4 ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน (phosphate buffer saline, PBS) ที่มีค่าความเป็นกรดค่า (pH) เท่ากับ 7.4 ซึ่งเป็นสารละลายที่นิยมใช้ในการทดลองเพื่อการใช้งานทางด้านทางการแพทย์

ผลจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคยูวีสเปกโทรสโกปี (UV spectroscopy) ในเบื้องต้น พบว่า ความขุ่น (turbidity) ของสารละลายสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ SP4 นั้นมีค่าเพิ่มมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพเพิ่มขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 2.6 อันเป็นการชี้ให้เห็นว่า โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพนั้นสามารถเกิดการรวมตัวกันเป็น โครงสร้างขนาดใหญ่ในสารละลาย PBS ได้ ส่งผลทำให้การดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet, UV) ของสารละลายเปลี่ยนแปลงไปตามความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ

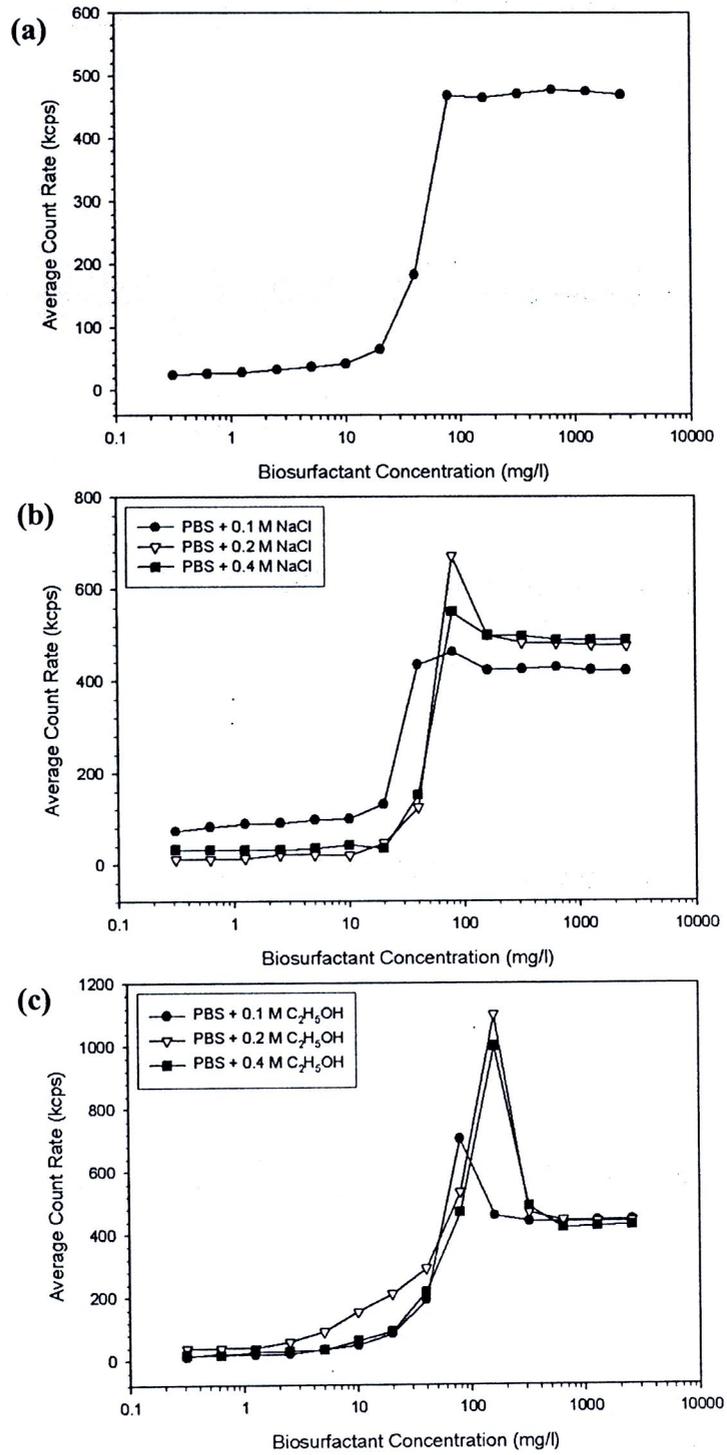
การนำไฟฟ้า (electrical conductivity) ของสารละลายสารลดแรงตึงผิวสามารถเชื่อมโยงเข้ากับโครงสร้างที่เกิดจากการรวมตัวกันของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวได้ ดังนั้น จึงได้ทำการตรวจวัดการนำไฟฟ้าของสารละลายสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพในลำดับต่อไป ภาพที่ 2.7 แสดงถึงการนำไฟฟ้าของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ ณ ความเข้มข้นต่างๆ กัน ผลการทดลองที่ได้ พบว่า ในตอนต้น การนำไฟฟ้าของสารละลายเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพเพิ่มขึ้น จนกระทั่งความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพมีค่ามากกว่า 80 มิลลิกรัมต่อลิตร การนำไฟฟ้าของสารละลายกลับลดลงจนมีค่าคงที่ ณ ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพประมาณ 600 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยทั่วไป การลดลงของการนำไฟฟ้าของสารละลายสารลดแรงตึงผิวเป็นผลมาจากการเกิดโครงสร้างเวจิคิลขึ้น ซึ่งผลที่ได้จากการทดลองด้วยการวัดการกระเจิงของแสง (light scattering) ก็สอดคล้องกับผลที่ได้จากการตรวจวัดการนำไฟฟ้า ดังแสดงในภาพที่ 2.8 นอกจากนี้ ผลที่ได้จากการคำนวณจากผลการตรวจวัดการกระเจิงของแสงยังพบอีกด้วยว่า โครงสร้างเวจิคิลของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพมีขนาดกระจายออกเป็น 2 ช่วงกว้างๆ ด้วยกัน อันได้แก่ขนาดตั้งแต่ 50-250 นาโนเมตร ซึ่งจัดเป็นเวจิคิลขนาดกลาง และขนาดมากกว่า 250 นาโนเมตร ซึ่งจัดเป็นเวจิคิลขนาดใหญ่ โดยเวจิคิลขนาดกลางกลายเป็นเวจิคิลขนาดใหญ่เมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพมีค่ามากกว่า 1200 มิลลิกรัมต่อลิตรขึ้นไป ดังแสดงในภาพที่ 2.9 ภาพที่ 2.10 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ของโครงสร้างเวจิคิลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทรานสมิชัน อิเล็กตรอน ไมโครสโกปี (transmission electron microscopy, TEM)



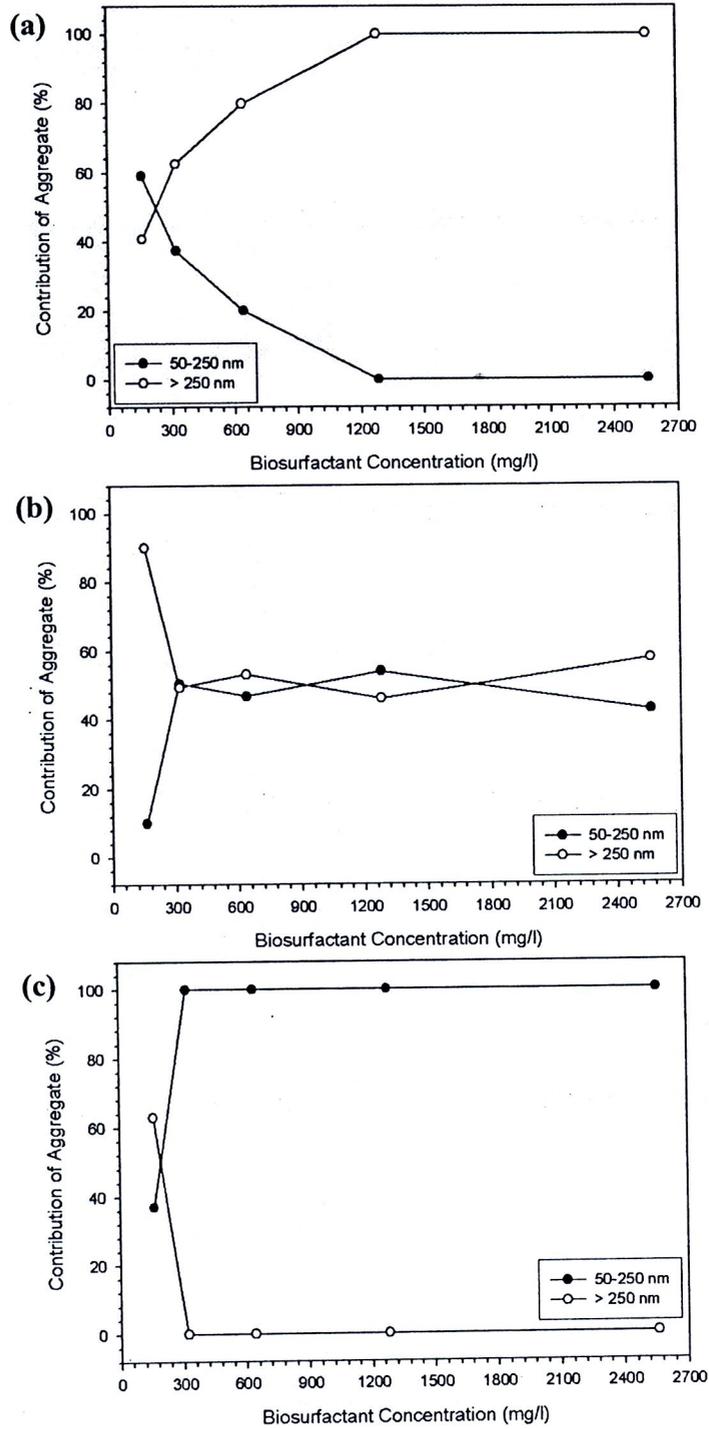
ภาพที่ 2.6 ความขุ่นของสารละลายสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ SP4 ณ ความเข้มข้นต่างๆ กันใน (a) สารละลาย PBS, (b) สารละลาย PBS ที่เติม NaCl, และ (c) สารละลาย PBS ที่เติม  $C_2H_5OH$



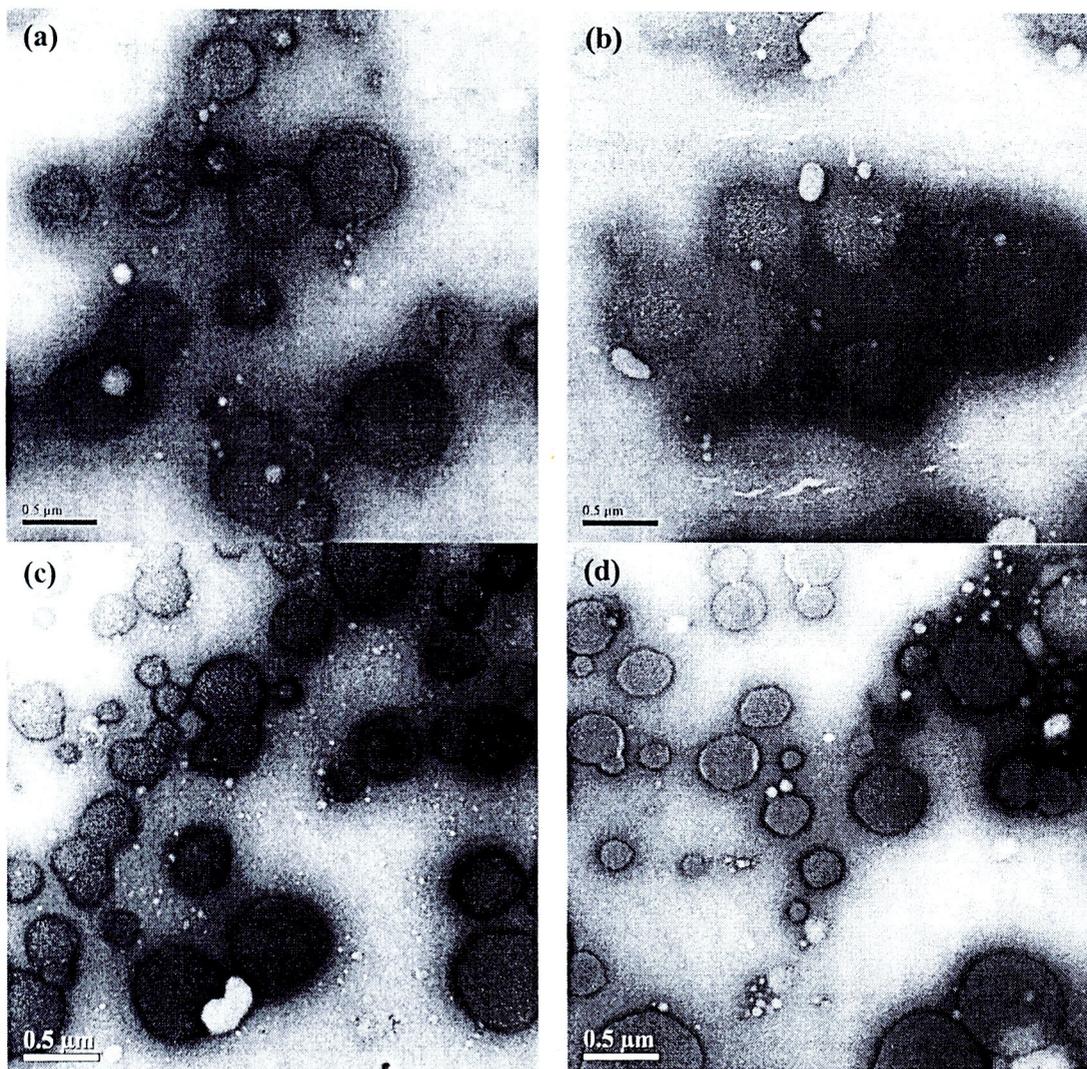
ภาพที่ 2.7 การนำไฟฟ้าของสารละลายสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ ณ ความเข้มข้นต่างๆ กันใน (a) สารละลาย PBS, (b) สารละลาย PBS ที่เติม NaCl, และ (c) สารละลาย PBS ที่เติม  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$



ภาพที่ 2.8 การกระเจิงของแสงจากสารละลายสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ ณ ความเข้มข้นต่างๆ กันใน (a) สารละลาย PBS, (b) สารละลาย PBS ที่เติม NaCl, และ (c) สารละลาย PBS ที่เติม C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH



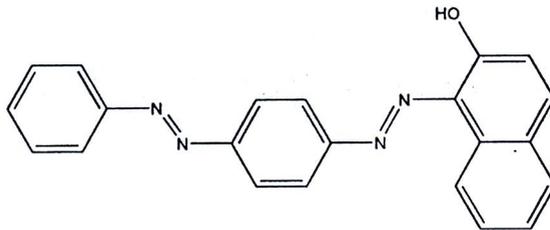
ภาพที่ 2.9 สัดส่วนของเวซิกิลขนาดต่างๆ ของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ ณ ความเข้มข้นต่างๆ กันใน (a) สารละลาย PBS, (b) สารละลาย PBS ที่เติม NaCl, และ (c) สารละลาย PBS ที่เติม C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH



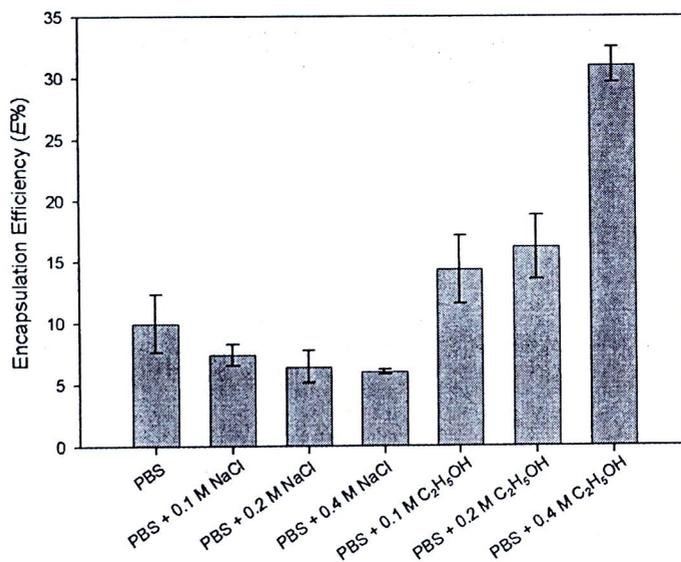
ภาพที่ 2.10 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโครงสร้างเวซิกเคิลที่เกิดจากการรวมตัวกันของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ ณ ความเข้มข้น (a) 320 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสารละลาย PBS และ 2560 มิลลิกรัมต่อลิตร (b) ในสารละลาย PBS, (c) ในสารละลาย PBS ที่เติม 0.4 M NaCl, และ (d) สารละลาย PBS ที่เติม 0.4 M  $C_2H_5OH$

ในปัจจุบัน มีการนำเวซิกเคิลที่เกิดจากการรวมตัวกันของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวมาใช้งานในด้านการส่งผ่านยาเป็นจำนวนมาก ดังนั้น จึงได้มีการทดลองเพื่อหาความสามารถของโครงสร้างเวซิกเคิลของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ SP4 ในการห่อหุ้ม (encapsulation) ยาหรือสารอื่นๆ ตามที่ต้องการ โดยใช้ซูดาน III (Sudan III) ซึ่งเป็นสีที่ไม่ละลายน้ำ (hydrophobic dye) เป็นต้นแบบ (model)

ของสารที่ต้องการห่อหุ้ม ภาพที่ 2.11 แสดงถึงโครงสร้างทางเคมีของ Sudan III ผลการทดลองที่ได้ พบว่า เวชียเคมีของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพสามารถห่อหุ้มอนุภาค III ได้ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของความเข้มข้นเริ่มต้น (initial concentration) หรือคิดเป็นประมาณ 0.96 มิลลิกรัมของอนุภาค III ต่อ 1 กรัมของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ (mg/g) ซึ่งความสามารถในการห่อหุ้มสารต้นแบบนี้ชี้ให้เห็นถึงศักยภาพในการนำไปใช้งาน ในด้านการส่งผ่านยาเข้าสู่ร่างกายของ โครงสร้างเวชียเคมีของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพได้เป็นอย่างดี



ภาพที่ 2.11 โครงสร้างทางเคมีของ Sudan III



ภาพที่ 2.12 ความสามารถในการห่อหุ้มอนุภาค III ของเวชียเคมีของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่เตรียม ณ ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 1280 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นเริ่มต้นของอนุภาค III 35 ไมโครโมลต่อลิตร

นอกจากนี้ ยังได้ทำการศึกษาผลของสารเติมแต่ง (additives) อันได้แก่ เกลือโซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride, NaCl) และเอทานอล (ethanol, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) ที่มีต่อพฤติกรรมการรวมตัวกันและสมบัติของสารละลายของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพอีกด้วย ผลที่ได้ชี้ให้เห็นว่า NaCl ไม่ได้ส่งผลต่อการรวมตัวกัน

ของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพมากนัก ในขณะที่  $C_2H_5OH$  มีผลยับยั้งการรวมตัวกันของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ แต่อย่างไรก็ตาม ทั้ง  $NaCl$  และ  $C_2H_5OH$  มีผลในการลดขนาดของเวสิเคิลลง อันเป็นผลมาจากการที่สารเติมแต่งทั้งสองชนิดสามารถช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพได้ การเติม  $NaCl$  ลงในสารละลายสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพนั้นยังลดความสามารถในการห่อหุ้มซูดาน III ของเวสิเคิล โดยเวสิเคิลของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพสามารถห่อหุ้มซูดาน III ได้เพียง 6 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น หรือคิดเป็นประมาณ 0.58 mg/g ณ ความเข้มข้นของ  $NaCl$  0.4 โมลต่อลิตรอันเป็นผลมาจากการที่เวสิเคิลมีขนาดลดลงนั่นเอง สำหรับ  $C_2H_5OH$  นั้น พบว่า เวสิเคิลของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพสามารถห่อหุ้มซูดาน III ได้เพิ่มขึ้นถึงเกือบ 30 เปอร์เซ็นต์ หรือคิดเป็นประมาณ 3.26 mg/g ณ ความเข้มข้นของ  $C_2H_5OH$  0.4 โมลต่อลิตร ทั้งนี้ เป็นผลเนื่องมาจากการที่โมเลกุลของ  $C_2H_5OH$  สามารถทำอันตรกิริยา (interaction) กับโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพในโครงสร้างเวสิเคิล ดังนั้น ผนังเวสิเคิลจึงประกอบไปด้วยโมเลกุลของทั้ง  $C_2H_5OH$  และสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ โดยโมเลกุลของ  $C_2H_5OH$  ที่อยู่ในผนังเวสิเคิลดังกล่าวสามารถเพิ่มปริมาณของซูดาน III ที่ได้รับการห่อหุ้มได้

## 2.5 การวิเคราะห์สมบัติทางชีวภาพของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ

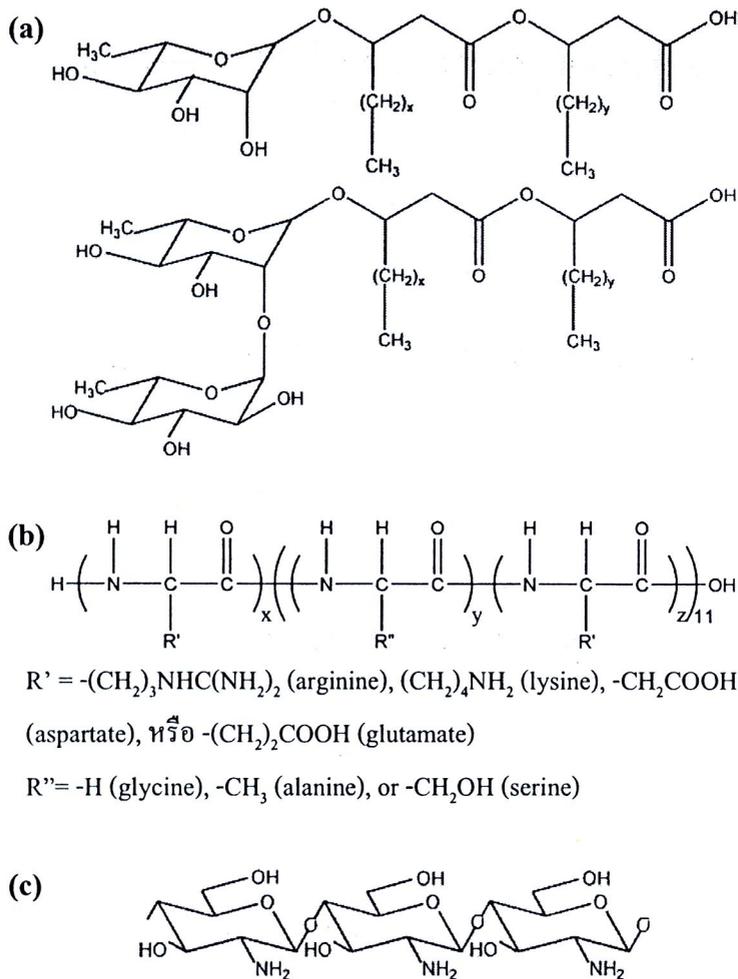
ในการวิเคราะห์สมบัติทางชีวภาพของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ SP4 นั้นสามารถทำได้โดยพิจารณาจากความเข้มข้นที่มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ที่นำมาทดสอบลงครั้งหนึ่ง (inhibitory concentration,  $IC_{50}$ ) ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 กุทธิ์ทางชีวภาพของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* SP4

กุทธิ์ทางชีวภาพ	$IC_{50}$ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
กุทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง (Anti-cancer):	
- เซลล์มะเร็งช่องปาก (KB-Oral cavity cancer)	3.31
- เซลล์มะเร็งทรวงอก (MCF7-Breast cancer)	1.39
- เซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187-Small cell lung cancer)	0.19
กุทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค (Anti-TB)	1.66
ความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Human fibroblast)	0.10
ความเป็นพิษต่อเวโรเซลล์ (Vero cell)	3.17

3. การดัดแปรคุณลักษณะทางพื้นผิวของพอลิเมอร์ด้วยการดูดซับสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ

ในงานวิจัยนี้ ได้ทำการศึกษาพฤติกรรมการดูดซับของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพลงบนพื้นผิวของไหมไฟโบรอิน (silk fibroin) และไคโตซาน (chitosan) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพ (biopolymer) โดยพอลิเมอร์ทั้งสองชนิดนี้มีศักยภาพในการนำมาใช้งานเป็นเวชภัณฑ์บำบัดแผลเป็นอย่างดี ดังนั้น การดัดแปรคุณลักษณะทางพื้นผิวของวัสดุพอลิเมอร์จึงอาจสามารถเพิ่มประสิทธิภาพต่อการสมานแผลให้มากยิ่งขึ้นได้ ภาพที่ 3.1 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตจากจุลชีพ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ SP4 ไหมไฟโบรอิน และไคโตซาน



ภาพที่ 3.1 โครงสร้างทางเคมีของ (a) สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ SP4 (b) ไหมไฟโบรอิน และ (c) ไคโตซาน

### 3.1 การเตรียมไหมไฟโบรอินและโคโตซาน

สารละลายไหมไฟโบรอินสามารถเตรียมได้โดยนำเส้นใยไหมจากไหมสายพันธุ์ *Bombyx mori* มาต้มในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตที่ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นระยะเวลา 15 นาที เพื่อกำจัดกาวไหมที่เรียกว่า “เซรีซิน (sericin)” จากนั้น จึงนำเส้นใยไหมขึ้นมาล้างด้วยน้ำร้อน ก่อนที่จะนำลงไปต้มในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตอีกครั้ง เมื่อทำการกำจัดกาวไหมออกเรียบร้อยแล้ว จึงนำเส้นใยไหมไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำเส้นใยไหมไปละลายในตัวทำละลายผสมระหว่าง แคลเซียมคลอไรด์ เอทานอล และน้ำ ที่สัดส่วนโมล 1:2:8 ณ อุณหภูมิ 78 องศาเซลเซียส เมื่อเส้นใยไหมละลายดีแล้วจึงทำการ dialysis ในน้ำกลั่นเป็นระยะเวลา 4 วัน โดยเปลี่ยนน้ำกลั่นที่ใช้ทุกวัน จากนั้น จึงทำการปั่นสารละลายที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ก่อนที่จะทำการเก็บสารละลายที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสก่อนนำไปใช้งาน โดยความเข้มข้นของสารละลายไหมไฟโบรอินที่เตรียมได้ คือ 4.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เมื่อนำสารละลายไหมไฟโบรอินไปใช้งานจึงทำการเจือจางจนได้ความเข้มข้นของสารละลายไหมไฟโบรอินตามที่ต้องการ

สำหรับโคโตซานที่ใช้ในงานวิจัยในครั้งนี้สามารถเตรียมได้จากเปลือกกุ้ง (*Penaeus merguensis*) โดยนำเปลือกกุ้งมาล้างทำความสะอาดและนำไปตากให้แห้งภายใต้แสงอาทิตย์ จากนั้น จึงบดเปลือกกุ้งให้ละเอียด ก่อนที่จะนำเปลือกกุ้งที่บดละเอียดแล้ว ไปแช่ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 1 โมลต่อลิตร เป็นระยะเวลา 2 วัน พร้อมทั้งทำการคนสารละลายเป็นระยะๆ เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนด จึงล้างเปลือกกุ้งด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่งเป็นกลาง แล้วจึงนำเปลือกกุ้งไปแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 4% เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ณ อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน แล้วจึงนำมาล้างด้วยน้ำกลั่น โดยสารที่ได้ในขั้นตอนนี้ เรียกว่า “โคติน” เมื่อนำโคตินไปแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ณ อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงได้โคโตซาน จากนั้น จึงนำโคโตซานไปล้างด้วยน้ำจนเป็นกลาง ก่อนที่จะนำไปอบจนแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยโคโตซานที่เตรียมได้มีน้ำหนักโมเลกุลโดยเฉลี่ย  $1.1 \times 10^6$  และมีค่า “degree of deacetylation” 85 เปอร์เซ็นต์ การเตรียมสารละลายของโคโตซานสามารถทำได้โดยละลายโคโตซานในสารละลายกรดอะซิติก (acetic acid) ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร จนได้ความเข้มข้นของสารละลายโคโตซานตามที่ต้องการ

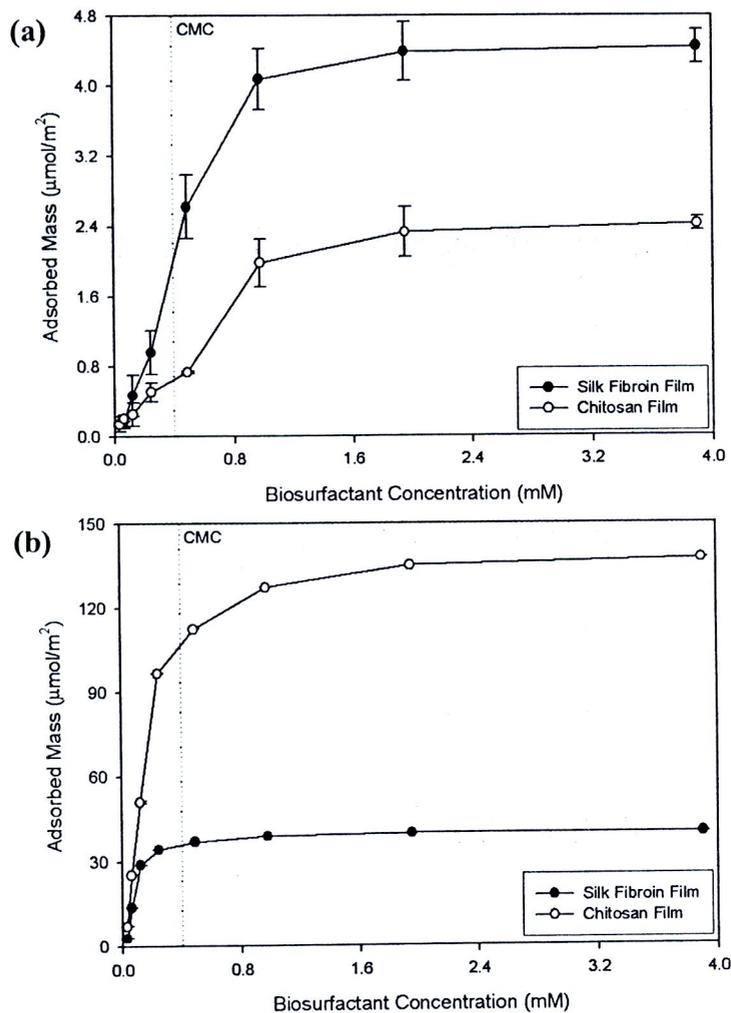
### 3.2 การศึกษาพฤติกรรมการดูดซับของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพลงบนพื้นผิวของพอลิเมอร์

เทคนิคสำคัญที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ดูดซับลงบนพื้นผิวของพอลิเมอร์ชีวภาพ ได้แก่ เทคนิค “surface plasmon resonance (SPR)” และเทคนิค “quartz crystal

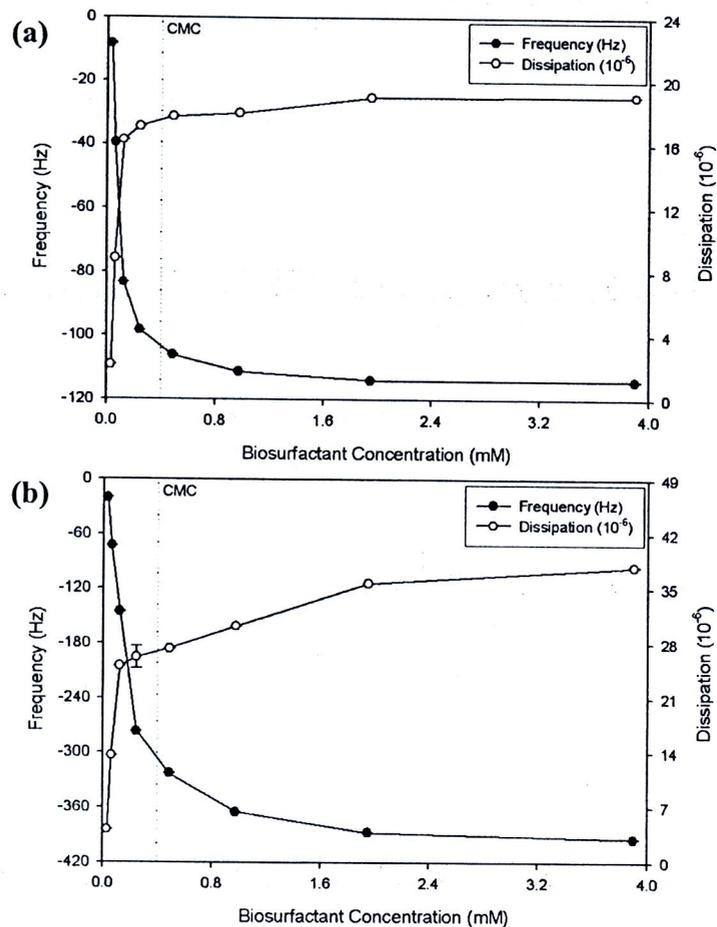
microbalance with dissipation monitoring (QCM-D)” โดยปริมาณที่วัดได้จากเทคนิค SPR นั้น เป็นน้ำหนักแห้ง ในขณะที่ปริมาณที่วัดได้จากเทคนิค QCM-D นั้น เป็นน้ำหนักเปียก เมื่อนำค่าที่วัดได้จากทั้งสองเทคนิค มาคำนวณตามสมการที่แสดง จะสามารถหาปริมาณของน้ำที่อยู่ในชั้นพื้นผิวที่ดูดซับลงบนพอลิเมอร์ได้

$$\text{ปริมาณของน้ำ (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{(\Gamma_{QCM-D} - \Gamma_{SPR})}{\Gamma_{QCM-D}} \times 100$$

เมื่อ  $\Gamma_{QCM-D}$  และ  $\Gamma_{SPR}$  คือ ปริมาณของสารที่ดูดซับลงบนพื้นผิวที่วัดได้จากเทคนิค QCM-D และเทคนิค SPR ตามลำดับ



ภาพที่ 3.2 ปริมาณของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ดูดซับลงบนพื้นผิวของพอลิเมอร์ที่ตรวจวัดได้จาก (a) เทคนิค SPR และ (b) เทคนิค QCM-D



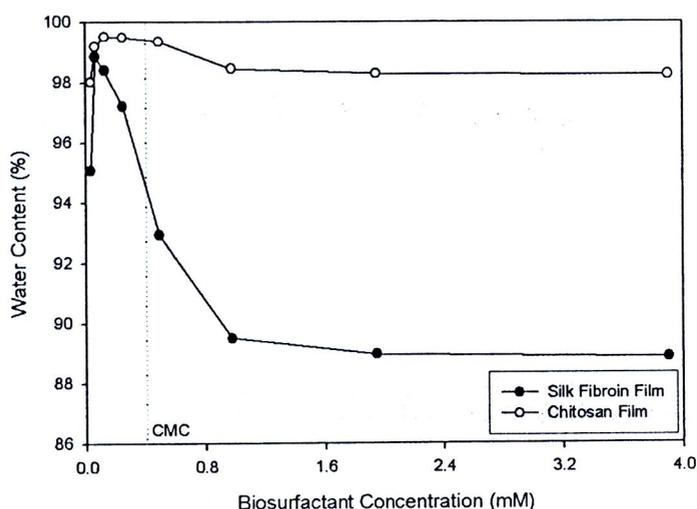
ภาพที่ 3.3 ค่า frequency และ dissipation จากการศึกษากิจกรรมการดูดซับของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลงบนพื้นผิวของ (a) ไหมไฟโบรอิน และ (b) ไคโตซาน

ภาพที่ 3.2 แสดงให้เห็นถึงการดูดซับของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพบนพื้นผิวของไหมไฟโบรอินและไคโตซานที่ได้จากเทคนิค SPR และ QCM-D ผลการทดลองที่ได้ พบว่า ปริมาณของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ดูดซับลงบนพื้นผิวของพอลิเมอร์ชีวภาพมีค่าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารละลายสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ ก่อนมีค่าที่เมื่อความเข้มข้นของสารละลายสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพมีค่ามากกว่าความเข้มข้นที่ทำให้เกิดไมเซลล์ (critical micelle concentration, CMC) ซึ่งมีค่าประมาณ 0.4 มิลลิโมลต่อลิตร ผลที่ได้จากเทคนิค SPR แสดงให้เห็นว่า ปริมาณของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ดูดซับลงบนพื้นผิวของไหมไฟโบรอินมีค่าประมาณ 4.4 ไมโครโมลต่อตารางเมตร เมื่อคำนวณค่าที่ได้ดังกล่าวบนสมมติฐานที่ว่า สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ดูดซับลงบนพื้นผิวของไหมไฟโบรอินนั้น มีการจัดเรียงตัวแบบมอนอเลเยอร์



(monolayer) ทำให้ได้ค่าพื้นที่ผิวต่อโมเลกุล (surface area per molecule) เป็น 74.1 อดังตรอม สำหรับไคโตซานนั้น มีปริมาณของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ดูดซับลงบนพื้นผิวของไคโตซานประมาณ 2.4 ไมโครโมลต่อตารางเมตร เมื่อคำนวณค่าที่ได้นี้ บนสมมติฐานที่ว่า สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ดูดซับลงบนพื้นผิวของไคโตซาน มีการจัดเรียงตัวแบบไบเลเยอร์ (bilayer) ทำให้ได้ค่าพื้นที่ผิวต่อโมเลกุลเป็น 71.0 อดังตรอม พื้นที่ผิวต่อโมเลกุลที่คำนวณได้ยังมีค่าสอดคล้องกับค่าพื้นที่ผิวต่อโมเลกุลที่คำนวณจากกราฟแรงตึงผิวซึ่งคิดเป็น 77.1 อดังตรอม อีกด้วย

สำหรับปริมาณของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ดูดซับลงบนพื้นผิวของพอลิเมอร์ที่วิเคราะห์ได้จากเทคนิค QCM-D นั้น มีค่ามากกว่าค่าที่ได้จากเทคนิค SPR มาก เนื่องจากค่าที่วิเคราะห์ได้จากเทคนิค QCM-D นั้นเป็นน้ำหนักเปียก ดังแสดงในภาพที่ 3.2b ผลที่ได้จากเทคนิค SPR ชี้ให้เห็นว่า สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพสามารถดูดซับลงบนพื้นผิวของไหมไฟโบรอินได้มากกว่าบนพื้นผิวของไคโตซาน ในขณะที่ผลที่ได้จากเทคนิค QCM-D กลับชี้ไปในทางตรงกันข้าม ดังนั้น ปริมาณของสารที่ดูดซับลงบนผิวของไคโตซานที่มากกว่าปริมาณของสารที่ดูดซับลงบนผิวของไหมไฟโบรอินจึงมีความเป็นไปได้มากที่เป็นผลมาจากปริมาณของน้ำที่พอลิเมอร์ทั้งสองชนิดสามารถดูดซับได้แตกต่างกัน ภาพที่ 3.3 แสดงถึงค่า frequency และ dissipation ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค QCM-D โดยค่า frequency มีความเชื่อมโยงกับปริมาณของสารที่ดูดซับลงบนพื้นผิวที่ศึกษา ในขณะที่ค่า dissipation มีค่าสอดคล้องกับความหนาหรือความยืดหยุ่นของชั้นที่ดูดซับอยู่บนพื้นผิว ภาพที่ 3.3 ชี้ให้เห็นว่าค่า dissipation ของพื้นผิวไคโตซานมีค่ามากกว่าพื้นผิวของไหมไฟโบรอินมาก ดังนั้น ผลที่ได้จึงแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการดูดซับน้ำของไคโตซานที่มากกว่าไหมไฟโบรอิน และทำให้เกิดการบวมน้ำ (swelling) ขึ้น



ภาพที่ 3.4 ปริมาณของน้ำในชั้นของสารที่ดูดซับลงบนไหมไฟโบรอินและไคโตซาน

ภาพที่ 3.4 แสดงให้เห็นถึงปริมาณของน้ำที่อยู่ในพื้นผิวของไหมไฟโบรอินและไคโตซาน ณ ความเข้มข้นของสารละลายสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่แตกต่างกัน ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า ปริมาณน้ำในพื้นที่ผิวของไคโตซานมีค่ามากกว่าปริมาณน้ำในพื้นที่ผิวของไหมไฟโบรอินมาก เมื่อความเข้มข้นของสารละลายสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพมีค่าต่ำ ปริมาณของสารที่ดูดซับลงบนพื้นผิวของพอลิเมอร์ที่วิเคราะห์ได้จากเทคนิค QCM-D นั้น โดยส่วนใหญ่เป็นน้ำทั้งสิ้น แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อความเข้มข้นของสารละลายสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพมีค่าเพิ่มมากขึ้น ปริมาณของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ดูดซับลงบนพื้นผิวของพอลิเมอร์จึงมีค่ามากขึ้น ส่งผลทำให้ปริมาณของน้ำนั้นมีค่าลดลงตามลำดับ จนกระทั่งมีค่าคงที่เมื่อการดูดซับเข้าสู่บริเวณที่เกิดการอิมมัวชัน

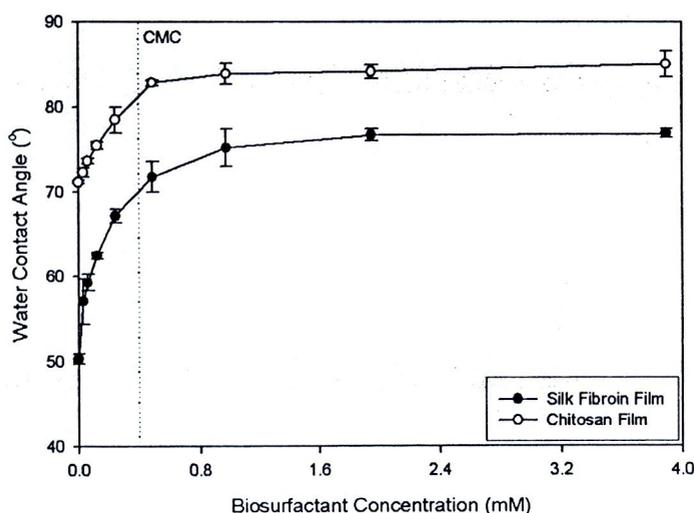
ในงานวิจัยครั้งนี้ ไหมไฟโบรอินได้รับการเปลี่ยนให้อยู่ในรูปที่ไม่สามารถละลายน้ำได้ด้วยการใช้สารละลายเมทานอล โดยไหมไฟโบรอินจะเปลี่ยน โครงสร้างจาก “random coil” กลายเป็น “ $\beta$ -sheet” ทำให้โครงสร้างของไหมไฟโบรอินมีความหนาแน่นมากขึ้น อันเป็นผลมาจากการหดตัวของไหมไฟโบรอิน ดังนั้น น้ำจึงดูดซับเข้าสู่โครงสร้างของไหมไฟโบรอินได้ยาก ปริมาณของน้ำที่ดูดซับอยู่ในชั้นของไหมไฟโบรอินจึงมีค่าต่ำ ในขณะที่โครงสร้างของไคโตซานนั้นสามารถเกิดอันตรกิริยากับน้ำได้ง่ายกว่ามาก เนื่องจากโครงสร้างของไคโตซานไม่ได้เกิดการเชื่อมขวาง (crosslinking) ทำให้ปริมาณของน้ำที่ดูดซับอยู่ในชั้นของไคโตซานมีค่าสูง โดยทั่วไปไหมไฟโบรอินมี “degree of swelling” ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ในขณะที่ไคโตซานนั้นมีค่าสูงมากกว่า 100 เปอร์เซ็นต์

### 3.3 การวิเคราะห์คุณลักษณะทางพื้นผิวของพอลิเมอร์ชีวภาพ

การดัดแปรคุณลักษณะทางพื้นผิวของพอลิเมอร์ทางชีวภาพสามารถทำได้โดยการแช่ฟิล์มของไหมไฟโบรอินหรือไคโตซานในสารละลายสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนดแล้ว จึงนำฟิล์มของพอลิเมอร์ขึ้นมาล้างและทำให้แห้งภายใต้ก๊าซไนโตรเจน ก่อนนำไปวิเคราะห์คุณลักษณะทางพื้นผิวต่อไป

เนื่องจากค่ามุมสัมผัสของน้ำ (water contact angle) มีความไวต่อโครงสร้างและคุณลักษณะทางเคมีของพื้นผิวที่เปลี่ยนแปลงไป ดังนั้นการวัดมุมสัมผัสของน้ำจึงสามารถให้ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการจัดเรียงตัวของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวที่ดูดซับอยู่บนพื้นผิวที่ทำการศึกษาได้ ภาพที่ 3.5 แสดงค่ามุมสัมผัสของน้ำบนพื้นผิวของไหมไฟโบรอินและไคโตซาน ณ ความเข้มข้นของสารละลายสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่แตกต่างกัน ผลที่ได้ พบว่า มุมสัมผัสของน้ำมีค่าเพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นของสารละลายสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่เพิ่มขึ้น ก่อนที่จะมีค่าคงที่เมื่อความเข้มข้นของสารละลายสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพมีค่ามากกว่า CMC ค่ามุมสัมผัสของน้ำที่เพิ่มขึ้นชี้ให้เห็นถึงการเพิ่มขึ้นของปริมาณของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ

ชีวภาพที่ดูดซับอยู่บนพื้นผิวของพอลิเมอร์ ในขณะที่ค่ามุมสัมผัสของน้ำที่คงที่แสดงให้เห็นถึงบริเวณที่เกิดการอิมมัตวของการดูดซับสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพบนพื้นผิวของพอลิเมอร์ แม้ว่าค่ามุมสัมผัสของน้ำที่ذبงบอกถึงความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) ที่เพิ่มขึ้นของพื้นผิวพอลิเมอร์หลังจากกระบวนการดูดซับสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ แต่ค่ามุมสัมผัสของน้ำก็ไม่เกิน 90 องศา นั้นหมายความว่า โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพหันส่วนที่ชอบน้ำออกจากพื้นผิวของพอลิเมอร์

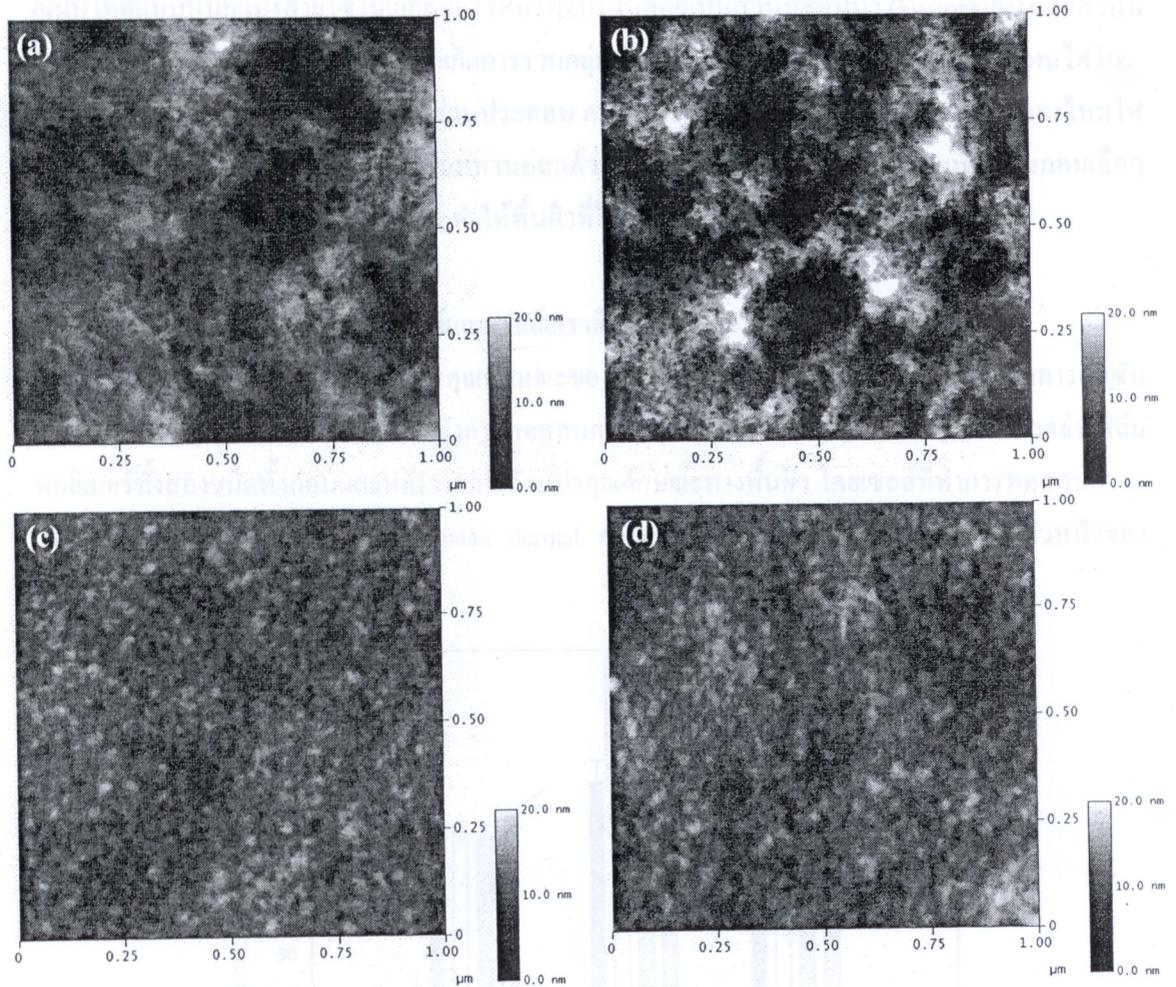


ภาพที่ 3.5 ค่ามุมสัมผัสของน้ำบนพื้นผิวของไหมไฟโบรอินและไคโตซาน ณ ความเข้มข้นของสารละลายสารลดแรงตึงผิวที่แตกต่างกัน

เนื่องจากการดูดซับสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพลงบนพื้นผิวของไหมไฟโบรอินและไคโตซานถึงจุดอิมมัตวที่ความเข้มข้นของสารละลายสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพมีค่ามากกว่า CMC ดังนั้น การทดลองในลำดับต่อไปจึงได้ทำการดูดซับสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลต่อลิตร หรือคิดเป็น 5 เท่าของค่า CMC

ภาพที่ 3.6 แสดงถึงลักษณะทางพื้นผิวของฟิล์มไหมไฟโบรอินและไคโตซานที่วิเคราะห์ได้จากเทคนิค “surface probe microscopy (SPM)” ภายหลังจากที่ทำการดัดแปรคุณลักษณะด้วยกระบวนการดูดซับที่ความเข้มข้นของสารละลายสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ 2 มิลลิโมลต่อลิตร โดยความขรุขระโดยเฉลี่ย (average surface roughness, Ra) ของพื้นผิวฟิล์มของไหมไฟโบรอินและไคโตซานที่วิเคราะห์ได้จากเทคนิค SPM มีค่าเป็น  $2.0 \pm 1.0$  นาโนเมตร และ  $1.4 \pm 0.2$  นาโนเมตร ตามลำดับ ภายหลังจากกระบวนการดูดซับ พบว่าฟิล์มของไหมไฟโบรอินและไคโตซานมีค่า Ra เป็น  $2.7 \pm 1.5$  นาโนเมตร และ  $1.6 \pm 0.3$  นาโนเมตร ตามลำดับ

ดังนั้น จึงเห็นได้ว่า ความขรุขระของพื้นผิวฟิล์มของพอลิเมอร์นั้น ไม่มีความแตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบระหว่างก่อนและหลังจากกระบวนการดูดซับ



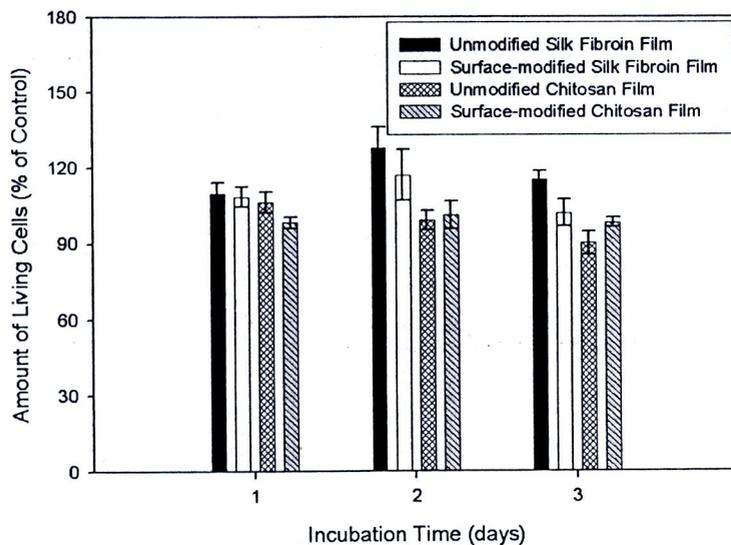
ภาพที่ 3.6 ลักษณะทางพื้นผิวของ (a) โหมดไฟโบรอินก่อนกระบวนการดูดซับสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ (b) โหมดไฟโบรอินหลังกระบวนการดูดซับสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ (c) ไคโตซานก่อนกระบวนการดูดซับสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ และ (d) ไคโตซานหลังกระบวนการดูดซับสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างพื้นผิวของโหมดไฟโบรอินและพื้นผิวของไคโตซาน พบว่า พื้นผิวของโหมดไฟโบรอินมีความขรุขระมากกว่าพื้นผิวของไคโตซาน ทั้งนี้ อาจมีสาเหตุมาจากพฤติกรรมการรวมตัว (self-assembly) ของโหมดไฟโบรอิน ภาพที่ 3.1b แสดงให้เห็นถึงโครงสร้างทางเคมีของโหมดไฟโบรอิน โดยทั่วไปโครงสร้างทางเคมีของโหมดไฟโบรอินประกอบไปด้วยสายโซ่พอลิเปปไทด์ (polypeptides) แบบหนักและ

สายโซ่พอลิเปปไทด์แบบเบามีมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ  $3.5 \times 10^5$  และ  $2.5 \times 10^4$  ตามลำดับ ซึ่งสายโซ่พอลิเปปไทด์ทั้งสองชนิดนี้เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide) ลำดับของกรดอะมิโนภายในสายโซ่พอลิเปปไทด์แบบหนักแบ่งสายโซ่โมเลกุลของไหมไฟโบรอินออกเป็นส่วนของที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ทำให้สามารถเกิดการรวมกลุ่มเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า “ไมเซลล์” เมื่อไหมไฟโบรอินละลายอยู่ในตัวทำละลายที่มีน้ำเป็นส่วนประกอบ ภายหลังจากกระบวนการทำให้โครงสร้างของไหมไฟโบรอินเกิดความเสถียรด้วยสารละลายเมทานอลแล้ว โครงสร้างไมเซลล์จึงมีลักษณะเป็นก้อนกลมเล็กๆ กระจายอยู่บนพื้นผิวของไหมไฟโบรอิน ทำให้พื้นผิวที่ได้มีความขรุขระนั่นเอง

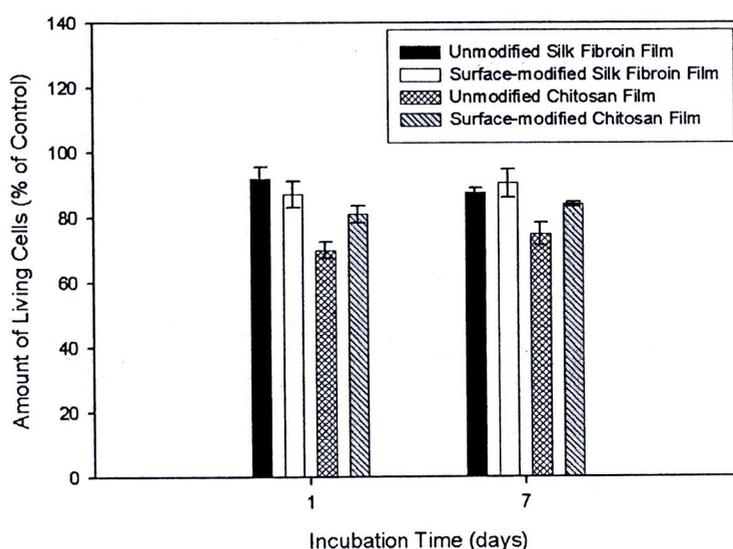
### 3.4 ความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์และเซลล์เคราติโนไซต์จากมนุษย์

ภายหลังจากที่ทำการตัดแปรคุณลักษณะของฟิล์มพอลิเมอร์ทั้งสองชนิดด้วยกระบวนการดูดซับสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพแล้ว จึงได้ทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ของตัวอย่างฟิล์มพอลิเมอร์ทั้งสองชนิดทั้งก่อนและหลังจากการตัดแปรคุณลักษณะทางพื้นผิว โดยเซลล์ที่ทำการทดสอบความเป็นพิษ ได้แก่ เซลล์ไฟโบรบลาสต์ (human dermal fibroblasts) และเซลล์เคราติโนไซต์จากผิวหนังของมนุษย์ (human dermal keratinocytes)



ภาพที่ 3.7 เปรอ์เซ็นต์ของจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่มีชีวิตอยู่ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงบนตัวอย่างฟิล์มพอลิเมอร์เป็นระยะเวลาต่างๆ กัน

ภาพที่ 3.7 แสดงให้เห็นถึงจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่มีชีวิตอยู่ ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงบนตัวอย่างฟิล์มพอลิเมอร์ เมื่อเปรียบเทียบกับ การเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยปราศจากตัวอย่างฟิล์มพอลิเมอร์ ผลการทดลองที่ได้ พบว่า ฟิล์มพอลิเมอร์ทุกชนิดมีความเข้ากันได้กับเซลล์ไฟโบรบลาสต์เป็นอย่างดี ดังจะเห็นได้จากจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่มีชีวิตอยู่ที่มีค่ามากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ แต่อย่างไรก็ตาม ในกรณีของไหมไฟโบรอิน กระบวนการดูดซับสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ลดต่ำลง ในทางตรงกันข้าม กระบวนการดูดซับสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพทำให้การเจริญเติบโตบนฟิล์มไคโตซานดีขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ



ภาพที่ 3.8 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนเซลล์เคราตินโนไซต์ที่มีชีวิตอยู่ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงบนตัวอย่างฟิล์มพอลิเมอร์เป็นระยะเวลาต่างๆ กัน

ภาพที่ 3.8 แสดงให้เห็นถึงจำนวนของเซลล์เคราตินโนไซต์ที่มีชีวิตอยู่ ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงบนตัวอย่างฟิล์มพอลิเมอร์ เมื่อเปรียบเทียบกับ การเพาะเลี้ยงเซลล์เคราตินโนไซต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยปราศจากตัวอย่างฟิล์มพอลิเมอร์ ผลการทดลองที่ได้ พบว่า ฟิล์มพอลิเมอร์ทุกชนิดมีความเข้ากันได้กับเซลล์เคราตินโนไซต์เป็นอย่างดีเช่นกัน แต่อย่างไรก็ตาม กระบวนการดูดซับสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพไม่ได้ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์เคราตินโนไซต์บนฟิล์มพอลิเมอร์ทั้งสองชนิดอย่างมีนัยสำคัญแต่อย่างใด ดังนั้น ผลการทดลองที่ได้จึงชี้ให้เห็นว่า การเจริญเติบโตของเซลล์นอกจากจะขึ้นอยู่กับชั้นของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ถูกดูดซับอยู่บนพื้นผิวของฟิล์มพอลิเมอร์แล้ว ยังขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์และชนิดของพอลิเมอร์ที่นำมาทดสอบอีกด้วย