บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

จากปัญหาสิ่งแวดล้อมซึ่งกลายเป็นปัญหาของโลกในปัจจุบัน ได้มีความพยายามทุกวิถีทางที่จะช่วยกันรักษาสิ่งแวดล้อม ซึ่งมีทั้งแนวทางการป้องกันและแก้ไขปัญหา ที่อาจเกิดจากการใช้สารบางอย่างที่จะส่งผลกระทบต่อสภาพแวดล้อม และก่อให้เกิดอันตรายต่อมนุษย์ การเลือกใช้ผลิตภัณฑ์ชีวภาพ (bioproduct) ซึ่งผลิตได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ แทนการเลือกใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี (chemical products) เป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับการช่วยรักษาสิ่งแวดล้อม เนื่องจากผลิตภัณฑ์ทางเคมีมักย่อยสลายได้ยาก จึงตกค้างและเป็นสาเหตุให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ในขณะที่ผลิตภัณฑ์ชีวภาพมีความเป็นพิษต่ำ สามารถย่อยสลายได้ดีในธรรมชาติ มีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) และพอลิเมอร์ชีวภาพ (biopolymer) เป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพที่สนใจในการศึกษาครั้งนี้ เนื่องจากผลิตภัณฑ์ชีวภาพทั้ง 2 ชนิด สามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลากหลายชนิด ทั้งจากแบคทีเรีย ยีสต์ และรา (Lang and Wullbrandt, 1999) เป็นผลิตภัณฑ์ประเภทที่หลั่งออกมานอกเซลล์ ซึ่งง่ายต่อการเก็บเกี่ยว และเป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างหลากหลาย ทำให้มีลักษณะเฉพาะตัว มีคุณสมบัติทางกายภาพ เคมี และชีวภาพที่แตกต่างกัน ด้วยเหตุนี้จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้หลากหลาย เช่น การนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไปใช้ในอุตสาหกรรมการเกษตร ก่อสร้าง อาหารและเบียร์ เครื่องหนัง กระดาษ เครื่องสำอาง ยา และอุตสาหกรรมปิโตรเลียม (Desai and Banat, 1997) สำหรับพอลิเมอร์ชีวภาพนั้นได้มีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยา การเกษตร การทำน้ำประปา การบำบัดน้ำเสีย และอุตสาหกรรมการหมักในขั้นตอนของกระบวนการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ (Kurane *et al*., 1986)

นอกจากนี้การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและพอลิเมอร์ชีวภาพจากจุลินทรีย์นั้น ส่วนใหญ่มักเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (mesophile) แต่สำหรับการศึกษาครั้งนี้จะเลือกใช้จุลินทรีย์ในกลุ่มที่ชอบอุณหภูมิสูง (thermophile) เนื่องจากการใช้จุลินทรีย์ในกลุ่มที่ชอบอุณหภูมิสูงนั้นยังมีรายงานน้อย ทั้งที่ลักษณะเหล่านี้มีความน่าสนใจเพราะเป็นคุณสมบัติเฉพาะตัว (unique properties) ดังนั้นจึงเป็นการพัฒนาการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติเฉพาะตัว

เป็นการเพิ่มศักยภาพในการประยุกต์ใช้กับงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพ (Cameotra and Makkar, 1998)

ตรวจเอกสาร

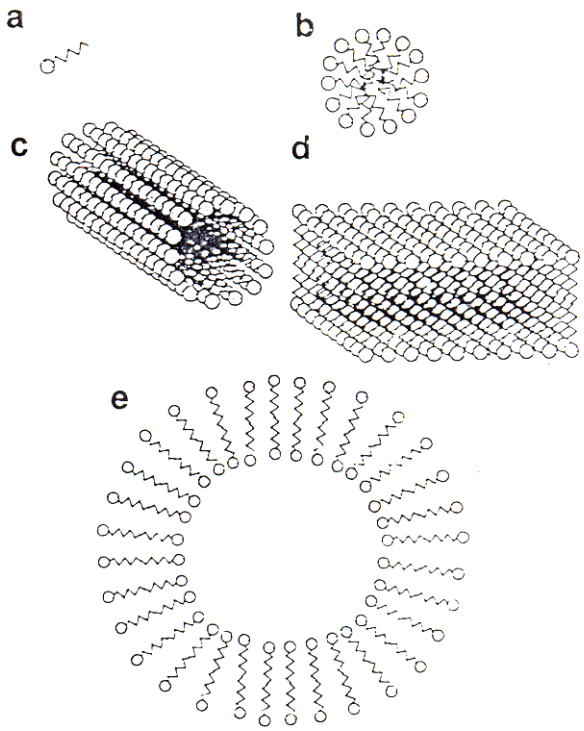
1. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวมีโครงสร้างของโมเลกุลเป็นแบบแอมฟิฟาติก (amphipathic molecules) ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ (hydrophilic and hydrophobic moieties)

1. **ส่วนที่ชอบน้ำหรือส่วนหัว** (head group) อาจจะเป็น carbohydrate, carboxylic acid, phosphate, amino acid, cyclic peptide หรือ alcohol
2. **ส่วนที่ไม่ชอบน้ำหรือส่วนหาง** (tail group) อาจจะเป็น long-chain fatty acid, hydroxy fatty acid หรือ α-alkyl-β-hydroxy fatty acid

เมื่ออยู่ในสารละลาย โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวจะสะสมอยู่บริเวณผิว (surface) ของตัวทำละลาย และเนื่องจากการมีโครงสร้างดังกล่าว จึงทำให้เกิดการลดค่าแรงตึงผิวของตัวทำละลายนั้น ทำให้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนละลายได้ในน้ำ หรือ ส่วนของน้ำละลายในสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ดีในการเป็นสารชำระล้าง (detergent) สารเกิดฟองและการเกิดอิมัลชัน (Desai and Banat, 1997) ค่าแรงตึงผิวมีหน่วยเป็นมิลลินิวตันต่อเมตร (mN/m) หรือไดน์ (Dyne) โดยทั่วไปสารลดแรงตึงผิวสามารถทำหน้าที่ลดแรงตึงผิว ระหว่างสองพื้นที่ผิวที่สัมผัสกันได้ เช่น สารลดแรงตึงผิวระหว่างของแข็งกับของเหลว ระหว่างของเหลวกับของเหลว และระหว่างของเหลวกับก๊าซ ค่าแรงตึงผิวระหว่างพื้นผิวของน้ำกับอากาศ เรียกว่า “surface tension” และค่าแรงตึงผิวระหว่างน้ำกับไฮโดรคาร์บอน เรียกว่า “interfacial tension” (Kim *et al*., 1997)

เมื่อสารลดแรงตึงผิวมีความเข้มข้นในตัวทำละลาย โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวจะหันส่วนที่ไม่ชอบน้ำเข้าหากัน ด้วยแรงจับกันของสารลดแรงตึงผิว (surfactant self-association) เกิดเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า “ไมเซลล์” (micelle) ขึ้น ลักษณะการเกิดไมเซลล์แสดงดังภาพที่ 1 ซึ่งความเข้มข้น ณ จุดที่ทำให้โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวมารวมตัวกันนี้ เป็นคุณสมบัติเฉพาะของสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิด เรียกความเข้มข้น ณ จุดนี้ว่า critical micelle concentration (CMC) การเกิดไมเซลล์จะมีผลต่อค่าแรงตึงผิวของสารละลาย เมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวในสารละลายเพิ่มขึ้น ค่าแรงตึงผิวของสารละลายจะมีค่าลดลงจนถึงจุด CMC คือ ค่าแรงตึงผิวของ



ภาพที่ 1 โครงสร้างต่าง ๆ ของสารลดแรงตึงผิว ซึ่งเป็นโมเลกุลแอมฟิพาติก (a) surfactant monomer มีส่วนหัวเป็นส่วนที่ชอบน้ำและส่วนหางเป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ, (b) circular micelle, (c) rod-shaped micelle, (d) micellar layer และ (e) vesicle representation

Figure 1 Structure of surfactant molecules which are an amphipathic molecule. (a) surfactant monomer, (b) circular micelle, (c) rod-shaped micelle, (d) micellar layer และ (e) vesicle representation

Source : Fiechter (1992)

สารละลายจะไม่ลดลงอีก ถึงแม้จะเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวในสารละลาย (Fiechter, 1992)

2. ประเภทของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

2.1 การจำแนกตามโครงสร้าง แบ่งเป็นกลุ่มหลัก ๆ 4 กลุ่ม คือ

2.1.1 ไกลโคลิปิด (glycolipid)

สารลดแรงตึงผิวที่พบส่วนใหญ่มักเป็นกลุ่มนี้ มีโครงสร้างซึ่งประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต มักเป็นน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เช่น น้ำตาล rhamnose, trehalose, sucose และ glucose เชื่อมต่อกับ long chain aliphatic acids หรือ hydroxyaliphatic acids สารลดแรงตึงผิวกลุ่มไกลโคลิปิด แบ่งเป็นกลุ่มย่อยที่รู้จักกันดี ได้แก่ rhamnolipids, trehalolipids และ sophorolipids เป็นต้น

2.1.1.1 Rhamnolipids

ประกอบด้วยน้ำตาล rhamnose จำนวน 1 หรือ 2 โมเลกุล เชื่อมต่อกับ β-hydroxydodecanoic หรือ β-hydroxydodecenoic acid จำนวน 1 หรือ 2 โมเลกุล โดยพันธะไกลโคซิดิค (ภาพที่ 2A) การผลิตสารลดแรงตึงผิวชนิดนี้มักพบในแบคทีเรียสกุล *Pseudomonas* ปัจจุบันพบว่า rhamnolipids มีโครงสร้างแตกต่างกันถึง 5 รูปแบบ โดยโครงสร้างแรกพบเมื่อปี ค.ศ. 1946 ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Pseudomonas aeruginosa* (Fiechter, 1992; Kosaric, 1996; Deziel *et al*., 2000; Lang, 2002)

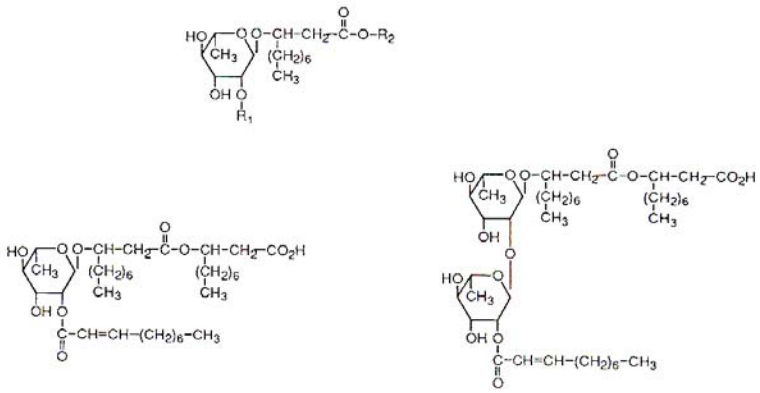
2.1.1.2 Trehalolipids

มักพบในผนังเซลล์โครงสร้างประกอบด้วยน้ำตาล trehalose 2 โมเลกุล เชื่อมต่อกับ mycolic acids ซึ่งประกอบด้วยสายยาวของ α-branched-β-hydroxy fatty acid มักพบในแบคทีเรียกลุ่ม *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Corynebacterium* และผลิตจากเชื้อ *Rhodococcus erythropolis* โดยการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นตรงตำแหน่งคาร์บอน C-6 และ C'-6 ของน้ำตาล trehalose (ภาพที่ 2B) (Kosaric, 1996) trehalolipid ผลิตจากจุลินทรีย์ต่างชนิดจึงมีขนาดและโครงสร้างของ mycolic acids ที่แตกต่างกันทั้งในส่วนของจำนวนอะตอมคาร์บอนและ degree of unsaturation (Rosenberg and Ron, 1997; 1999)

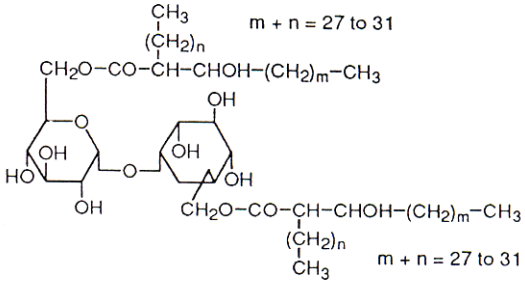
2.1.1.3 Sophorolipids

เป็นที่รู้จักตั้งแต่ปี 1961 มักพบในกลุ่มยีสต์สกุล *Torulopsis* มีโครงสร้างที่เกิดจากการเชื่อมต่อกันโดยพันธะไกลโคซิดิก ระหว่างน้ำตาล sophorose กับ hydroxyl fatty acid residue คือ 17-L-hydroxyoctadecanoic และ 17-L-hydroxy-9-octadecenoic acid และพบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Toruloposis magholiae (bombicola)* ในอาหารที่มีกลูโคส ยีสต์สกัด และ ยูเรีย

(A)



(B)



ภาพที่ 2 โครงสร้างของ rhamnolipids จากเชื้อ *Pseudomonas* sp. (A) และ โครงสร้างของ trehalolipids จากเชื้อ *Rhodococcus erythropolis* (B).

Figure 2 Structure of rhamnolipids produced by *Pseudomonas* sp. (A) and structure of trehalolipids produced by *Rhodococcus erythropolis* (B).

Source : Kosaric (1996)

สามารถผลิต sophorolipids 2 ชนิดโดยมี lactonic และ acidic อยู่ในโครงสร้าง (ภาพที่ 3) (Kosaric, 1996; Lang, 2002)

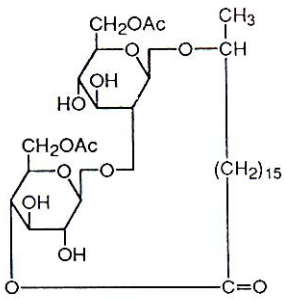
2.1.1.4 Mannosylerythritol lipids

ผลิตจากเชื้อ *Candida* sp. SY16 กลุ่มน้ำตาลที่ประกอบในโครงสร้าง คือ β-D-mannopyranosyl-(1→4)-O-mesoerythritol ส่วนกลุ่มไม่ชอบน้ำ คือ fatty acid และเมื่อวิเคราะห์หาองค์ประกอบด้วยเครื่อง gas chromatography-mass spectroscopy พบว่าประกอบด้วย hexanoic, dodecanoic, tetradecanoic และ tetradecenoic acid สามารถวิเคราะห์หาโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชนิดนี้ด้วยเทคนิค NMR ได้เป็น 6-O-acetyl-2,3-di-O-alkanoyl-β-D-mannopyranosyl-(1→4)-O-meso-erythritol โดยหมู่ acetyl group เชื่อมต่อกับน้ำตาล mannose ตรงตำแน่ง C-6 (Kim *et al*., 1999) (ภาพที่ 3)

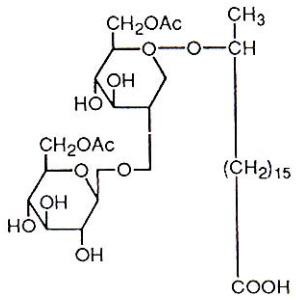
2.1.2 ลิโปเปปไทด์ (Lipopeptide)

จุลินทรีย์ในสกุล *Bacillus* มักผลิตสารลดแรงตึงผิวในกลุ่มลิโปเปปไทด์ โดยมีไขมันจับอยู่กับสายเปปไทด์ ซึ่งสารในกลุ่มนี้นับว่าเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงสุด นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติของการเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ ตัวอย่างของสารกลุ่ม cyclic lipopeptides ในกลุ่มนี้ เช่น decapeptide antibiotics (gramicidins) จากเชื้อ *Bacillus brevis* และ lipopeptide antibiotics (polymyxins) จากเชื้อ *Bacillus polymyxa* และแสดงคุณสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิวได้อีกด้วย นอกจากนี้ยังมีสารลดแรงตึงผิวที่มีกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบ เช่น Ornithine-containing lipid จากเชื้อ *Thiobacillus thiooxidans* และ *P.rubescens* หรือสาร cerilipin ซึ่งมี ornithine และ taurine เป็นองค์ประกอบโดยผลิตจากเชื้อ *Gluconobacter cerinus* IFO 3267 และชนิดที่มีกรดอะมิโน lysine เป็นองค์ประกอบผลิตจากเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* IFO 3058

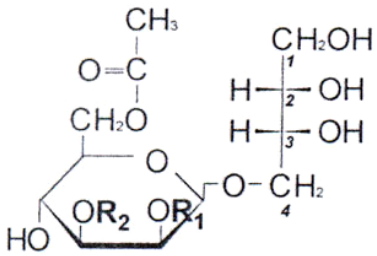
Surfactin, Iturin และ Fengycin ซึ่งจะแตกต่างกันที่โครงสร้างและคุณสมบัติ กล่าวคือ Surfactin มีกรดอะมิโนชนิดแอลฟา 7 โมเลกุล คือ L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-Lleu และ β-hydroxyl fatty acid คาร์บอน 13-15 อะตอม สำหรับ Fengycin มีกรดอะมิโน 10 โมเลกุลต่อกันเป็นวงซึ่งมีคาร์บอน 14-18 อะตอม ขณะที่ Iturin A ประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดเบต้า 7 โมเลกุลต่อกันเป็นวงและมีโมเลกุลของกรดไขมัน 14-17 คาร์บอนอะตอม (ภาพที่ 4) สารในกลุ่ม Iturin A ประกอบด้วย bacillomycin D, bacillomycin F, bacillomycin L และ mycosubtilin ซึ่งสามารถสังเคราะห์ได้โดยเชื้อ *B.subtilis* (Besson *et al*., 1992) ทั้ง Fengycin



(A)



(B)



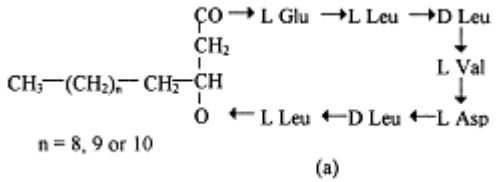
(C)

ภาพที่ 3 โครงสร้างของ sophorolipids ที่มี lactonic (A) และ acidic (B) รวมอยู่ในโครงสร้างจากเชื้อ *Torulopsis magnoliae (bombicola)* และโครงสร้างของ mannosylerythritol lipids จากเชื้อ *Candida* sp. SY16 (C).

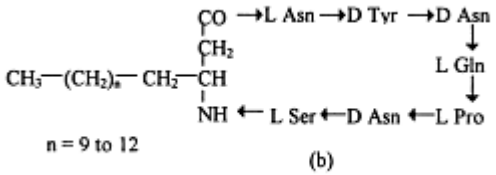
Figure 3 Structure of lactonic (A) and acidic (B) sophorolipids produced by *Torulopsis magnoliae (bombicola)* and structure of mannosylerythritol lipids produced by *Candida* sp. SY16 (C).

Source : Kosaric (1996)

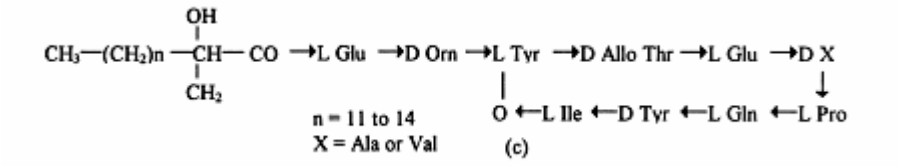
(A)



(B)



(C)



ภาพที่ 4 โครงสร้างของสารกลุ่ม lipopeptide (A) : surfactin, (B) : Iturin และ (C) : Fengycin

Figure 4 Structure of lipopeptide group. (A) : surfactin, (B) : Iturin and (C) : Fengycin

Source : Deleu *et al.*, 1999

และ Iturin A มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านเชื้อรา (antifungal) (Rosenberg and Ron, 1997; 1999; Lang, 2002)

2.1.3 ฟอสโฟลิปิด, กรดไขมัน และนิวทรัลลิปิด (phospholipids, fatty acids and neutral lipids)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด phospholipids เกิดพันธะเอสเทอร์ขึ้นระหว่างหมู่แอลกอฮอล์ของลิปิดและฟอสเฟต (ภาพที่ 5) มีแบคทีเรียและยีสต์หลายชนิดสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด phospholipids เช่น *Aspergillus* spp., *Thiobacillus thiooxidans*, *Arthrobacter* sp. AK-19 และ *P. aeruginosa* โดยมีการสะสมไขมันในโครงสร้างถึง 40-80 เปอร์เซ็นต์ (w/w) เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มี hexadecane และ olive oil วิธีวัดค่ากิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวกลุ่มนี้ คือ การวัดการเปลี่ยนแปลงของ hydrophilic-lipophilic balance (HLB) ซึ่งเป็นวิธีที่สัมพันธ์โดยตรงกับสายยาวของไฮโดรคาร์บอนในโครงสร้าง นอกจากนี้มีสารลดแรงตึงผิวชนิด phosphatidylethanolamine (ภาพที่ 5) ซึ่งผลิตจากเชื้อ *Acinetobacter* sp. HO1-N หรือ *R. erythropolis* (Desai and Banat, 1997)

สำหรับกรดไขมันและนิวทรัลลิปิด เช่น ustilagic acid, corymomycolic acid, lipotheichoic acid และ hydrophobic proterin (Bognolo, 1999)

2.1.4 สารลดแรงตึงผิวชนิดพอลิเมอร์ริก (polymeric surfactant)

เป็นสารที่เกิดขึ้นจากการรวมตัวของหน่วย polysaccharide-protein และหน่วยของกรดไขมันมีลักษณะเป็นพอลิเมอร์ในธรรมชาติ ตัวอย่างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มนี้ คือ emulsan, alasan และ biodispersan เป็นต้น

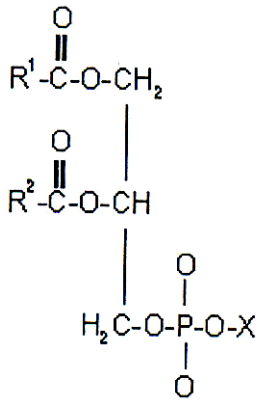
2.2 การจำแนกตามน้ำหนักโมเลกุล แบ่งเป็น 2 กลุ่ม (Rosenberg and Ron, 1997; 1999; Ron and Rosenberg, 2001) คือ

2.2.1 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพน้ำหนักโมเลกุลต่ำ

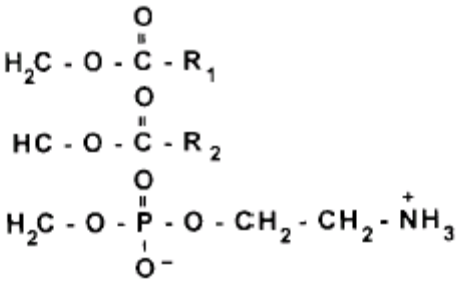
หน้าที่หลักของสารในกลุ่มนี้ คือ การลดแรงตึงผิว (surface tension) และแรงระหว่างผิว (interfacial tension) สารลดแรงตึงผิวที่สำคัญได้แก่ กลุ่มไกลโคลิปิด และลิโปเปปไทด์ เช่น

rhamnolipids เช่น rhamnolipids A และ B จากเชื้อ *P. aeruginosa* BOP 100 มีค่าน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 38 kDa และ 7 kDa ตามลำดับ (Lang and Wullbrandt, 1999) สามารถลดค่า interfacial tension ใน n-hexadecane เหลือ 1 mN/m และค่า surface tension เหลือ 25-30 mN/m นอกจากนี้สามารถอิมัลซิไฟด์สารประกอบ alkane และเจริญเมื่อใช้ hexadecane เป็นแหล่งคาร์บอน

(A)



(B)



ภาพที่ 5 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวในกลุ่มฟอสโฟลิปิด (A) : R^1 และ R^2 เป็นหมู่ alkyl X เป็น hydrogen, ethylamine, inositol, (B) : phosphatidylethanolamine จากเชื้อ *Acinetobacter* sp. HO1-N

Figure 5 Structure of phospholipids (A) : R^1 and R^2 is alkyl, X is hydrogen, ethylamine, inositol, (B) : phosphatidylethanolamine produced by *Acinetobacter* sp. HO1-N

Source : Bognolo (1999); Desai and Banat, 1997

trehalolipids จากเชื้อ *R. erythropolis* และ *Arthrobacter* sp. สามารถลดค่า surface tension และ interfacial tension ของน้ำหมักเหลือ 25-40 mN/m และ 1-5 mN/m ตามลำดับ

sophorolipids สามารถลดค่า surface tension และ interfacial tension แต่ไม่สามารถเป็นสาร emulsifying agents สารลดแรงตึงผิว lactonic และ acidic sophorolipids สามารถลดค่า interfacial tension ระหว่าง n-hexadecane กับน้ำ จาก 40 mN/m เหลือ 5 mN/m และสามารถคงตัวได้เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของระดับพีเอชหรืออุณหภูมิ

สารในกลุ่ม cyclic lipopeptides ที่รู้จักกันดี คือ surfactin มีค่าน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 979-1,091 ดาลตัน สามารถทำลายเม็ดเลือดแดงของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จึงนำไปประยุกต์ใช้ในขั้นตอนการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสาร surfactin ได้ นอกจากนี้สาร surfactain จากเชื้อ *B. subtilis* เป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีประสิทธิภาพสูง โดยสามารถลดแรงตึงผิวจาก 72 mN/m เหลือ 27.9 mN/m เมื่อใช้ความเข้มข้นเพียง 0.005% สำหรับเชื้อ *B. licheniformis* ผลิตสารลดแรงตึงผิวที่ความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ ระดับพีเอช และความเข้มข้นของเกลือ

สารลดแรงตึงผิวชนิด BL-86 จากเชื้อ *B. licheniformis* 86 สามารถลดค่า surface tension ของน้ำลงเหลือ 27 mN/m และลดค่า interfacial tension ระหว่าง n-hexadecane กับน้ำลงเหลือ 0.36 mN/m นอกจากนี้สามารถเป็นตัวทำให้เกิดการกระจายตัวของคอลลอยด์ β-silicon carbide และ aluminium nitride

lichenysin A ผลิตจาก *B. licheniformis* BAS-50 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 7 โมเลกุล ประกอบด้วย glutamic acid, asparagine, valine, leucine และ isoleucine ส่วนกลุ่มลิปิดประกอบด้วย linear และ branched ของ β-hydroxy fatty acids 12-17 อะตอมคาร์บอน มีค่าน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 1,006-1,034 ดาลตัน สาร lichenysin A สามารถลดค่า surface tension ของน้ำลงเหลือ 28 mN/m และให้ค่า CMC เท่ากับ 12 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าสารลดแรงตึงผิวชนิดอื่น ๆ นอกจากนี้มีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์โดยสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลากหลายชนิดแต่ประสิทธิภาพที่ได้ด้อยกว่าสาร surfactin (Yakimov *et al*., 1995)

สำหรับลิโปเปปไทด์นอกจากมีคุณสมบัติของการเป็นสารลดแรงตึงผิวแล้วยังมีคุณสมบัติอื่น ๆ ได้แก่ ยับยั้งการเจริญของเนื้องอก แบคทีเรีย รา ไวรัส และ ไมโครพลาสมา

2.2.2 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพน้ำหนักโมเลกุลสูง

หน้าที่หลักของสารกลุ่มนี้เกี่ยวข้องกับความคงตัวของสารอิมัลชัน ทำให้แบคทีเรียสามารถติดอยู่กับพื้นที่ผิวที่เป็นส่วน hydrophobic ได้ดีขึ้น ซึ่งทำให้สามารถย่อยสลายสารชีวภาพ

ได้ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มนี้เกิดจากการรวมตัวของสารพอลิเมอร์ชีวภาพต่าง ๆ เช่น พอลิแซคคาร์ไรด์ โปรตีน ลิโปโพลิแซคคาร์ไรด์ ลิโปโปรตีน หรือ พอลิแซคคาร์ไรด์-โปรตีน-ลิปิดคอมเพลกซ์ (Ron and Rosenberg, 2001) สาร Bioemulsan สามารถผลิตได้จากแบคทีเรียทั้งแกรมบวก แกรมลบ และยีสต์ โดยโครงสร้างของสาร bioemulsan แตกต่างกันไปตามชนิดของเชื้อที่ผลิต และการนำไปประยุกต์ใช้จึงแตกต่างกันด้วยดังตารางที่ 1 (Rosenberg and Ron, 1997) แบคทีเรียสกุล *Acinetobacter* สามารถผลิตสารในกลุ่ม bioemulsan ได้หลายชนิด เช่น

2.2.2.1 RAG-1 emulsan

เป็นสาร emulsan ที่รู้จักกันดี ผลิตจากเชื้อ *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 โดยมี anionic heteropolysaccharide เป็น backbone ประกอบด้วย *N*-acetyl-D-galactosamine, *N*-acetylgalactosamine uronic acid และ *N*-acetyl amino sugar เชื่อมต่อกับโปรตีน สำหรับส่วนของ fatty acid ซึ่งเป็นส่วนที่แสดงค่ากิจกรรมลดแรงตึงผิว โดยมีปริมาณกรดไขมัน 15 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักแห้ง) โดยส่วนของ fatty acid เชื่อมกับ backbone ของพอลิแซคคาร์ไรด์โดยผ่าน O-ester และ *N*-acyl linkage (ภาพที่ 6) คุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของ RAG-1 emulsan แสดงดังตารางที่ 2

การผลิต RAG-1 emulsan เกิดขึ้นเมื่อเข้าสู่ระยะ stationary phase ให้ผลผลิตสูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี 2% เอทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน สาร emulsan เป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ที่มีประสิทธิภาพมากแม้ว่าจะใช้ที่ความเข้มข้นต่ำ (0.01-0.001%) นั่นคือ มีอัตราส่วนของสาร emulsan ต่อสารไฮโดรคาร์บอนเป็น 1:100 ถึง 1:1000 นอกจากนี้สาร RAG-1 emulsan มีความจำเพาะต่อสับสเตรท โดยสามารถ emulsify สารผสมระหว่าง aliphatic และ aromatic หรือ cyclic alkane hydrocarbon แต่ไม่สามารถ emulsify สารไฮโดรคาร์บอนที่ไม่ได้อยู่ในรูปผสม

จากการทดลองของ Bach และคณะ (2003) ได้แยกองค์ประกอบของ emulsan โดยในส่วนของ apoemulsan คือ ส่วนที่กำจัดโปรตีนออกแล้วนั้นจะไม่พบค่ากิจกรรมอิมัลซิไฟล์ แต่เมื่อเพิ่มปริมาณโปรตีนจะทำให้ค่ากิจกรรมเพิ่มขึ้นถึง 30 เท่า

2.2.2.2 BD4 emulsan

ผลิตจากเชื้อ *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 มี anionic heteropolysaccharide เป็นองค์ประกอบหลัก โดยผลิตอยู่ในรูปแคปซูล สำหรับโปรตีนเซลล์จะขับออกมาละลายอยู่ในส่วนของน้ำหมัก โดยแต่ละส่วนจะไม่มีความสามารถในการอิมัลซิไฟล์ แต่เมื่อมีการผสมกันระหว่างพอลิแซคคาร์ไรด์และโปรตีน จึงแสดงคุณสมบัติเป็นสารอิมัลซิไฟล์เออร์ โดยส่วนของโปรตีนจับกับสารไฮโดรคาร์บอน เมื่อพอลิแซคคาร์ไรด์ละลายจึงทำให้สาร

ตารางที่ 1 การผลิตสาร bioemulsan จากจุลินทรีย์ต่าง ๆ

Table1 Bioemulsans from different microorganisms

Producing strain	Biochemical nature	Activity
A.calcoaceticus RAG-1	Heteropolysaccharide with bound fatty acid	Stabilizes oil-in-water emulsion; lower oil viscosity
A.calcoaceticus BD413	Complex of hydrophilic polysaccharide and proteins	Stabilizes oil-in-water emulsion; reconstitution from constituents
A.calcoaceticus A2	Polysaccharide	Disperses limestone powders
A.calcoaceticus MM5	Polysaccharide-protein	Emulsifies heating oils
A.calcoaceticus KA53	Alanine-containing polysaccharide-protein	Forms oil-in-water emulsions; stable to alkali and 100°C
M.thermoautotrophium	Protein complex	Forms oil-in-water emulsions; effective at high temperatures
B.stearothermophilus	Protein-polysaccharide-lipid	Emulsifies benzene at high temperature
P.tralucida	Acetylated extracellular polysaccharide	Emulsifies insecticides
Sphingomonas paucimobilis	Acetylated heteropolysaccharide	Forms stable emulsions with food oil
P.marginalis ST	Lipopolysaccharide-protein	Suggested use in bioremediation
Klebsiella sp.	Polysaccharide	Emulsion stabilizer and antioxidant
C.utilis	80% polysaccharide	Excellent emulsifier; yeast has food-grade status

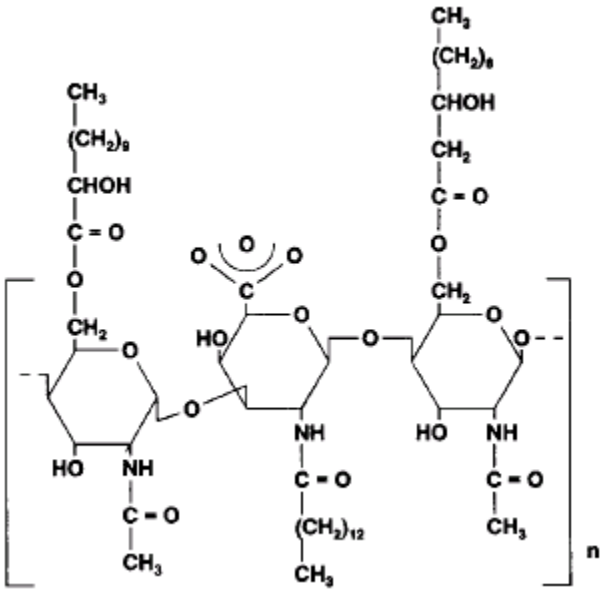
Source : Rosenberg and Ron (1997)

ตารางที่ 2 คุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของสาร RAG-1 emulsan จากเชื้อ *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1.

Table 2 Chemical and physical properties of RAG-1 emulsan produced by *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1.

Measurement	Result
Chemical composition (%)	D-galactosamine, 25%
	L-galactosaminuronic acid, 25%
	Dideoxy-diaminohexose, 25%
	3-hydroxydodecanoic acid, 10%
	2-hydroxydodecanoic acid, 10%
	Water and ash, 10%
Intrinsic viscosity (cm^3/g)	550
Diffusion constant (cm^3/g)	5.3×10^{-8}
Partial molar volume (cm^3/g)	0.71
Molecular mass (kDa)	980
Dimensions (nm)	3 x 200

Source : Rosenberg and Ron, 1999



ภาพที่ 6 โครงสร้างสาร RGA-1 emulsan ผลิตจากเชื้อ *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1.

Figure 6 Structure of RGA-1 emulsan produced by *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1.

Source : Desai and Banat, 1997

ไฮโดรคาร์บอนสามารถละลายน้ำได้ด้วยจึงเกิดสภาพเป็นอิมัลชั่น เมื่อสาร BD4 emulsan ผ่านขั้นตอนการกำจัดโปรตีนออก

2.2.2.3 Alasan

ผลิตจากเชื้อ *Acinetobacter radioresistens* KA53 ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของพอลิเมอร์แซคคาร์ไรด์ประจุลบและโปรตีน มีค่าน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1 ล้านดาลตัน โดยองค์ประกอบส่วนพอลิแซคคาร์ไรด์เกิดการจับกันของโมเลกุล alanine ด้วยพันธะโควาเลนซ์ สาร alasan สามารถลดค่า interfacial tension จาก 69 mN/m เหลือ 41 mN/m และให้ค่า CMC เท่ากับ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้พบว่าในส่วนของโปรตีนภายใน alasan มีบทบาทสำคัญทั้งในเรื่องของโครงสร้างและกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิว เมื่อกำจัดโปรตีนของ alasan ด้วยการต้มกับฟีนอลและย่อยด้วยเอนไซม์ protenase เรียกผลิตภัณฑ์ส่วนนี้ว่า apo-alasan พบว่าสูญเสียความสามารถในการอิมัลซิไฟล์ แต่เมื่อให้ความร้อนสำหรับสารละลาย alasan พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงค่ากิจกรรมและความหนืด โดยเมื่อให้อุณหภูมิระหว่าง 30-50 องศาเซลเซียส ทำให้ความหนืดเพิ่มขึ้น 2.6 เท่าและไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของค่ากิจกรรม แต่เมื่อให้อุณหภูมิสูงขึ้นระหว่าง 50-90 องศาเซลเซียส พบว่าความหนืดลดลง 4.8 เท่าแต่ค่ากิจกรรมเพิ่มขึ้น 5 เท่า ทั้งนี้เนื่องจากสาร alasan มีคุณสมบัติคงทนต่อความร้อนและสภาวะที่เป็นด่าง

จากรายงานการทดลองของ Toren และคณะ (2001) พบว่าโปรตีนภายในโมเลกุล alasan ซึ่งมีค่าน้ำหนักโมเลกุล 16, 31 และ 45 กิโลดาลตัน โดยโปรตีนกลุ่ม 45 กิโลดาลตันประกอบด้วยลำดับของกรดอะมิโนเรียกว่า OmpA-link protein ซึ่งมีความจำเพาะมากกว่าสารประกอบ มีปริมาณ 11 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนัก) และเป็นกลุ่มที่ให้ค่ากิจกรรมอิมัลซิไฟล์มากที่สุด

2.2.2.4 Biodispersan

ผลิตจาก *Acinetobacter calcoaceticus* A2 ประกอบด้วยพอลิแซคคาร์ไรด์ประจุลบเพียงอย่างเดียว มีน้ำตาล glucosamine, 6-methylaminohexose, galactosamine uronic และ aminoi sugar เป็นองค์ประกอบสาร biodispersan มีคุณสมบัติในการกระจายหรือสลายหินปูน ($CaCO_3$) และ titanium dioxide (TiO_2) โดยสาร biodispersan ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพสามารถจับกับ $CaCO_3$ และเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติบนผิวของโมเลกุล เพื่อให้มีการกระจายในน้ำได้ดีขึ้น จึงเหมาะสำหรับอุตสาหกรรมกระดาษ, เซรามิกส์ และอุตสาหกรรมสิ่งทอ

ดังนั้นการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนหรือสารประกอบ xenobiotic แม้กระทั่งสารประกอบโลหะต่าง ๆ นิยมใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมากกว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์

เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความจำเพาะมากกว่า ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม สามารถย่อยสลายได้ และมีความเสถียรมากกว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์

3. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากจุลินทรีย์ (Biosurfactant)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพส่วนใหญ่เป็นสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ต่าง ๆ เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อรา ซึ่งคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวเหล่านี้ เป็นผลมาจากการรวมตัวกันของความมีขั้วและไม่มีขั้วไว้ในโมเลกุลเดียวกัน ความไม่มีขั้วหรือส่วนที่ไม่ชอบน้ำจะเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนทั่วไป เช่น สายโซ่ไฮโดรคาร์บอนของกรดไขมัน สำหรับความมีขั้วหรือกลุ่มที่ชอบน้ำ เช่น กลุ่มที่ทำหน้าที่เอสเทอร์และแอลกอฮอล์ของไขมัน ฟอสเฟตที่เป็นส่วนประกอบของฟอสโฟลิปิดและน้ำตาลของไกลโคลิปิด (Desai and Banat, 1997) สารลดแรงตึงผิวที่ดีควรให้ค่า CMC ต่ำ แต่ให้ค่าลดแรงตึงผิวที่สูง (Lin *et al*., 1998)

ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวจากจุลินทรีย์ วิธีการวัดค่า surface activity ซึ่งเป็นค่าที่ใช้บอกคุณภาพของสารลดแรงตึงผิวนั้นเป็นสิ่งสำคัญ ส่วนใหญ่ใช้วิธีการวัดจากส่วนใสของน้ำหมักหลังจากผ่านการเลี้ยงเชื้อ โดยค่าแรงตึงผิวของน้ำกลั่นเท่ากับ 72 mN/m พบว่าในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส สามารถลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 68 dynes/cm ลงมาต่ำเท่ากับ 28 และ 43 dynes/cm เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (Makkar and Cameotra, 1998)

วิธีอื่น ๆ ที่ใช้ในการวัดหาค่า surface activity มีหลายวิธี ซึ่งแต่ละวิธีนั้นก็มีข้อดี-ข้อเสียความเหมาะสมที่แตกต่างกัน เช่น การวัดความเสถียรของอิมัลชันระหว่างน้ำและน้ำมัน (emulsification) มีข้อเสียที่การจับตัวของโมเลกุลในอิมัลชันไม่คงที่ จึงเหมาะสำหรับการใช้ในขั้นตอนการคัดเลือก (screening method) มากกว่า หรือวิธี colorimetric assay (Lin *et al*., 1998, Tuleva *et al*., 2002) ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายโดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของอาหาร ซึ่งจะกลายเป็นสีน้ำเงินเข้มรอบ ๆ โคโลนีของเชื้อเมื่อเลี้ยงบนอาหาร Blue agar โดยอาศัยหลักการทำปฏิกิริยาของอิออนจากสารลดแรงตึงผิวกับอิออนบวกของ cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) และการเปลี่ยนสีของ methylene blue แต่วิธีนี้จะใช้ได้เฉพาะสารลดแรงตึงผิวกลุ่ม anionic เท่านั้น จึงไม่สามารถนำมาใช้สำหรับขั้นตอนการคัดเลือก (screening method) นอกจากนี้ยังมีวิธีที่ใช้วัด surface activity ได้โดยตรง เช่น surface และ/หรือ interfacial tension (Makkar and Cameotra *et al*., 1998; Kim *et al*., 1999) axisymmetric drop shape analysis profile (ADSA-P), glass-slide test, drop collapse method (Youssef *et al*., 2004) และการวัดความสามารถใน

การกระจายน้ำมัน (oil displacement) (Morikawa *et al*., 2000) โดยวิธีหาค่า surface tension เป็นวิธีดั้งเดิมที่ได้รับความนิยมมากที่สุด แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้ไม่ค่อยจะสะดวกนักสำหรับการคัดเลือกตัวอย่างที่มีจำนวนมาก สำหรับวิธี oil displacement area (ODA) เป็นอีกวิธีที่ง่ายเหมาะสำหรับการคัดเลือกตัวอย่างที่มีจำนวนมาก แต่ค่าแรงตึงผิวที่ลดลงยังไม่มีความต่อเนื่องหรือความน่าเชื่อถือมากนัก วิธีที่เหมาะสมสำหรับใช้คัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในขั้นต้น คือ hemolytic activity จากรายงานของ Carrillo และคณะ (1996 อ้างโดย Youssef *et al*., 2004) พบว่า blood agar lysis เหมาะที่จะเป็นวิธีคัดเลือกเชื้อในเบื้องต้น (primary method) โดยจุลินทรีย์ที่ให้ผล positive คิดเป็นร้อยละ 13.5 ของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และเมื่อทดสอบค่าแรงตึงผิวพบว่าสามารถลดแรงตึงผิวได้ลงมาต่ำกว่า 40 mN/m และจากการทดลองของ Tuleva *et al*., 2002 พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด rhamnolipid ซึ่งผลิตจากเชื้อ *Pseudomonas putida* 21BN สามารถทำลายเม็ดเลือดแดง (5 % sheep blood) เมื่อเจือจางความเข้มข้นของส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ 100 เท่า โดยวงใสมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 11 มิลลิเมตร

4. ประเภทของพอลิเมอร์ชีวภาพ

พอลิเมอร์ชีวภาพ คือ พอลิเมอร์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย, แอคติโนมัยซีส และ รา ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม มีลักษณะที่ข้นหนืดและมีน้ำหนักโมเลกุลสูง (Margaritis and Pace, 1985) โดยพอลิเมอร์เหล่านี้มีคุณสมบัติทางกายภาพ ทางเคมี และทางชีวภาพรวมถึงองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน โดยใช้ปฏิกิริยาพอลิเมอร์แบบควบแน่น (condensation) ซึ่งในการเกิดปฏิกิริยาจะทำให้โมเลกุลเล็กๆ ที่มีอยู่ในโครงสร้างของโมโนเมอร์ เช่น H_2O, HCL และ CH_3OH ขาดหายไป เมื่อเปรียบเทียบหน่วยที่ซ้ำ ๆ กันในโครงสร้างของพอลิเมอร์กับโมโนเมอร์ที่ใช้สังเคราะห์พอลิเมอร์ชนิดนั้น ในการเชื่อมต่อหน่วยย่อยหรือโมโนเมอร์เข้าด้วยกัน (ชัยวัฒน์ เจนวานิชย์, 2527)

4.1 พอลิเมอร์ชนิดโปรตีน(Protein polymer)

พอลิเมอร์ชีวภาพชนิดโปรตีน ผลิตจากกลุ่มแอคติโนมัยซีส *Rhodococcus erythropolis* S-1 ซึ่งแยกได้จากดิน (Kurane *et al*., 1994a) มีชื่อเรียกว่า NOC-1 มีโครงสร้างที่เรียกว่า ไมเซลล์ (micelles) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.22-5 ไมโครเมตร เมื่อวิเคราะห์หาปริมาณแร่ธาตุพบว่ามีไนโตรเจนประมาณร้อยละ 11 (โดยน้ำหนัก) และมีการดูดกลืนรังสีอินฟาเรด โดยสเปกตรัมที่ได้ปรากฏเป็นแถบดูดกลืนในช่วงถี่ 1500-1550 และ 1650-1700 cm^{-1} ซึ่งเป็น IR สเปกตรัมของเอไมด์ นอกจากนี้ยังปรากฏแถบโปรตีนจำนวน 1 แถบ บน filter paper electrophoresis และ

ปรากฏแถบจำนวนมากบน sodiumdodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Takeda *et al*.,1991) จากรายงานของ Kurane และคณะ (1994b) พบว่าแถบต่าง ๆ ที่ปรากฏบน SDS-PAGE สามารถแบ่งน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเปปไทด์ได้เป็น 2 กลุ่มมีค่าระหว่าง 10-100 กิโลดาลตัน นอกจากนี้พอลิเมอร์ NOC-1 แสดงคุณสมบัติเป็นสารตกตะกอนชีวภาพ เมื่อศึกษาถึงกลไกการตกตะกอน พบว่าการตกตะกอนเกิดจากสายเปปไทด์ หลาย ๆ สายมารวมกันจับตัวกันเป็นไมเซลล์ พอลิเมอร์เปปไทด์เหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการตกตะกอนของพอลิเมอร์โดยกิจกรรมการตกตะกอนจะไม่เกิดขึ้น ถ้าหากว่ามีการบ่มพอลิเมอร์ด้วยเอนไซม์ Pronase E (Takeda *et al*., 1991) หรือได้รับความร้อนสูง (Kurane *et al*., 1986) ก่อนนำมาใช้

การผลิตพอลิเมอร์โดย *Rhodococcus erythropolis* S-1 ซึ่งแสดงคุณสมบัติเป็นสารตกตะกอนโดยสามารถตกตะกอนได้ทั้งสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ที่แขวนลอยอยู่ในน้ำ สำหรับการผลิตพอลิเมอร์พบว่าเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนที่ต่างกันจะผลิตพอลิเมอร์ในรูปแบบที่ต่างกันด้วย เมื่อเชื้อเติบโตโดยใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลชนิดต่าง ๆ พอลิเมอร์ที่เชื้อผลิตได้จะหลั่งออกสู่สิ่งแวดล้อม แต่เมื่อเชื้อเติบโตโดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นไฮโดรคาร์บอน เช่น n-pentadecane พอลิเมอร์ที่เชื้อผลิตได้จะติดอยู่กับตัวเซลล์ ซึ่งยากต่อการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ จากปัญหาเรื่องต้นทุนในการผลิตจึงมีแนวโน้มในการนำวัสดุเหลือใช้จากอุตสาหกรรมมาเป็นแหล่งคาร์บอนใหม่สำหรับการผลิตพอลิเมอร์ต่อไปในอนาคต โดยพบว่า *R. erythropolis* S-1 สามารถใช้แอลกอฮอล์ 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอนได้ และให้ค่ากิจกรรมการตกตะกอนของพอลิเมอร์ไม่แตกต่างกับการใช้กลูโคสและฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกัน ดังนั้นเอทานอลจึงเป็นแหล่งคาร์บอนใหม่ที่น่าสนใจในกลุ่มของสารอินทรีย์ประเภทแอลกอฮอล์ (Kurane *et al*., 1994a)

พอลิเมอร์โปรตีนอีกกลุ่มคือ ไกลโคโปรตีน มีน้ำตาลและโปรตีนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญ เช่น พอลิเมอร์ที่ผลิตโดยเชื้อ *Arcuadendron* sp. TS-49 เมื่อศึกษาถึงองค์ประกอบของพอลิเมอร์พบว่าประกอบด้วย เฮกโซซามีน กรดยูโรนิก น้ำตาลที่เป็นกลาง และโปรตีนในสัดส่วนที่ค่อนข้างสูงโดย พอลิเมอร์ที่ผลิตได้สามารถแสดงคุณสมบัติเป็นสารตกตะกอนชีวภาพ ซึ่งสามารถตกตะกอนได้ทั้งสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ นอกจากนี้มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูง แต่ไม่สามารถแสดงค่ากิจกรรมการตกตะกอนเมื่อบ่มพอลิเมอร์ด้วยเอนไซม์โปรตีเอส (Lee *et al*., 1995) *Bacillus* sp. As-101 แยกได้จาก activated sludge มีองค์ประกอบที่สำคัญ คือ คาร์โบไฮเดรตและโปรตีนปริมาณ 83 และ 17 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (Salehizadeh *et al*., 2000)

จากคุณสมบัติของพอลิเมอร์ในกลุ่มนี้ ที่แสดงความสามารถในการตกตะกอนสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ได้ จึงมีแนวโน้มที่จะนำพอลิเมอร์ไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมน้ำดื่ม การบำบัด

น้ำเสีย อุตสาหกรรมอาหารหมัก หรืออุตสาหกรรมอาหาร โดยประยุกต์ใช้ในขั้นตอนของกระบวนการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ (Kurane *et al*., 1986)

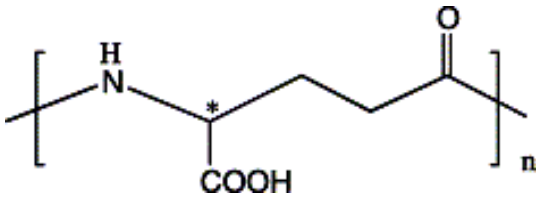
4.2 พอลิเมอร์ชนิดลิปิด (Lipid polymer)

Rhodococcus erythropolis S-1 สามารถผลิตพอลิเมอร์ชนิดโปรตีน มีชื่อเรียกว่า NOC-1 (Takeda *et al*., 1991) นอกจากนี้ยังสามารถผลิตพอลิเมอร์ชนิดลิปิดได้อีกด้วย (Kurane *et al*., 1994b) โดยแสดงคุณสมบัติเป็นสารตกตะกอนชีวภาพได้เช่นเดียวกัน พอลิเมอร์ที่ผลิตได้มีมวลโมเลกุลมากกว่า 1 ล้านดาลตัน ประกอบด้วยส่วนของพอลิเปปไทด์ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 10-100 กิโลดาลตัน และส่วนของลิปิดเป็นจำนวนมาก พบว่าลิปิดที่สกัดได้เป็นจำพวกไกลโคลิปิด ภายในโมเลกุลประกอบด้วยสายยาวของ methylene และน้ำตาลกลูโคส จึงทำให้พอลิเมอร์ชนิดลิปิดสามารถละลายได้ทั้งในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว เช่น คลอโรฟอร์ม และในตัวทำละลายที่มีขั้ว เช่น น้ำ

4.3 พอลิเมอร์ชนิดพอลิอะมิโนแอซิด (Poly (amino acid) polymer)

4.3.1 พอลิกลูตามิกแอซิด (poly-glutamic acid)

Polyglutamic acid : PGA เป็นพอลิเมอร์ชนิดโฮโมพอลิเมอร์ เกิดจากหน่วยย่อยของกรดกลูตามิกชนิด D และ L เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอไมด์ ระหว่างแอลฟาอะมิโน (α-amino) และแกมมาคาร์บอกซิลิก (γ-carboxylic acid) (ภาพที่ 7) จัดเป็นเปปไทด์โมเลกุลใหญ่ที่สามารถละลายน้ำได้ ภายในโมเลกุลประกอบด้วย D และ L-glutamic acid ในสัดส่วนที่แตกต่างกัน (Ito *et al*., 1996) มีค่าน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 100,000-8,000,000 ดาลตัน และค่าการแจกแจงน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วงระหว่าง 2-5 (Shih and Van, 2001)



ภาพที่ 7 โครงสร้างของพอลิกลูตามิกแอซิด (polyglutamic acid)

Figure 7 Structure of polygutamic acid (PGA)

Source : Shih and Van (2001)

PGA ค้นพบครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ.1973 โดยคณะของ Ivanovics จากเชื้อ *Bacillus anthracis* ซึ่งผลิต PGA ในรูปแคปซูลและหลั่งออกสู่สิ่งแวดล้อมเมื่อเซลล์แตก นอกจากนี้ PGA สามารถแยกหรือสกัดได้จากสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น แบคทีเรีย ไซยาโน-แบคทีเรีย เมล็ดพืช (Kubota *et al*., 1993) และกลุ่มนีมาโทด (ไฮดรา) โดยเชื่อมจับกับกรดโฟริคหรือโปรตีนทูโบลิน (Shih and Van, 2001) PGA เป็นองค์ประกอบหนึ่งที่สำคัญ ซึ่งทำให้เกิดความเหนียวหนืดในถั่วเน่า (natto) ซึ่งเป็นอาหารพื้นเมืองของชาวญี่ปุ่นที่ได้จากการหมักถั่วเหลืองกับเชื้อ *B. subtilis (natto)* สารที่ทำให้เกิดความเหนียวและหนืดนั้นประกอบด้วยฟรุคแทนในรูปลีแวน (levan-form fructan) และพอลิกลูตามิกแอซิดเป็นองค์ประกอบหลัก (Kunioka, 1997)

แบคทีเรียหลายสายพันธุ์ในสกุล *Bacillus* สามารถผลิต PGA ได้ในรูปของแคปซูล หรือสารข้นหนืดปลดปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อม เช่น *B. anthracis* และ *B. mesentericus* ผลิตในรูปแคปซูล ในขณะที่ *B. subtilis* และ *B. licheniformis* ผลิตในรูป extracellular (Ogawa *et al*., 1997) จากความต้องการกรดกลูตามิกสำหรับใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน เพื่อการเจริญและการผลิต PGA ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มของแบคทีเรียที่ผลิต PGA ได้เป็น 2 กลุ่มดังนี้

ก. แบคทีเรียที่ผลิต PGA เมื่อมีการเติมกรดกลูตามิกลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น *B. licheniformis* ATCC9945, *B. subtilis* IFO3335, *B. subtilis* F-2-01 และ *B. anthracis*

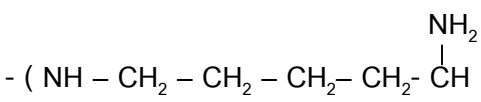
ข. แบคทีเรียที่สามารถผลิต PGA ได้โดยไม่จำเป็นต้องมีกรดกลูตามิกในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น *B. licheniformis* A35, *B. subtilis* TAM-4 และ *B. subtilis* 5E (Ito *et al*., 1996)

PGA สามารถย่อยสลายได้โดยวิธีทางชีวภาพ (biodegradable) กินได้ (eatable) ละลายน้ำได้ ไม่เป็นพิษต่อมนุษย์ และสิ่งแวดล้อม จึงมีแนวโน้มที่จะนำไปประยุกต์ใช้ทางด้านการบำบัดน้ำเสีย การผลิตน้ำดื่ม กระบวนการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ทางด้านอุตสาหกรรมอาหาร และอุตสาหกรรมการหมัก (Yokoi *et al*., 1996) นอกจากนี้ยังสามารถประยุกต์ใช้เป็นสารเพิ่มความเหนียว (thickener) สารรักษาความชื้น (humectant) วัสดุควบคุมการปลดปล่อย (sustained release meterials) หรือ สารตัวนำพายา (drug carrier) ซึ่งนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอางค์และทางการแพทย์ (Yoon *et al*., 2000) นอกจากนี้ยังมีการใช้ปฏิกิริยาทางเคมีเพื่อดัดแปลงโครงสร้างของ PGA ทำให้ PGA มีคุณสมบัติพิเศษ เช่น การใช้ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่น (esterification) ตรงบริเวณหมู่คาร์บอกซิล (carboxy group) ของ PGA ทำให้ esterified ของ

PGAs สามารถแสดงคุณสมบัติเป็นพลาสติกทนร้อน (thermoplastics) หรือ poly(γ-glutamic acid α-benzyl ester) แสดงคุณสมบัติเป็นเส้นใยและแผ่นฟิล์ม (Choi and Kunioka, 1995)

4.3.2 **พอลิไลซีน** (ε-polylysine)

ε-polylysine : PL เป็นพอลิเมอร์ในกลุ่มพอลิอะมิโนแอซิดอีกชนิดหนึ่ง พบในจุลินทรีย์กลุ่มแอคติโนมัยซีส *Streptomyces albulus* ซึ่งแยกได้จากดินในประเทศญี่ปุ่นโดยวิธี alkaloid screening พอลิเมอร์ PL เป็นโฮโมพอลิเมอร์ที่เกิดจากการเชื่อมต่อกันระหว่างหน่วยย่อยของ L-lysine ประมาณ 25-30 โมเลกุล โดยเชื่อมต่อกันระหว่าง α-carboxyl group กับ ε-amino group (ภาพที่ 8) มีค่าน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 4000 ดาลตัน สามารถละลายได้ในน้ำ และย่อยสลายได้โดยกระบวนการทางชีวภาพ (Kunioka, 1997) และแสดงคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ (antimicrobial) โดยยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ (Shima *et al*., 1984) และสามารถยับยั้งฟาจ (antiphage) ได้ด้วย (Shima *et al*., 1982) นอกจากนี้สามารถจับกับสารสีประเภทสารอินทรีย์และโลหะหนัก เช่น คอปเปอร์ (Choi *et al*., 1995) และมีคุณสมบัติเป็นสารไฮโดรเจล ซึ่ง PL gel สามารถย่อยสลายได้โดยกระบวนการทางชีวภาพ เช่น จากการทำงานของเอนไซม์ Protease A ผลิตจากเชื้อรา *Aspergillus oryzae* พบว่าสามารถย่อยสลาย PL gel ได้ภายในเวลา 2 วัน ภายใต้สภาวะระดับพีเอชเท่ากับ 7.0 และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อัตราการย่อยสลาย PL gel โดยเอนไซม์ขึ้นอยู่กับปริมาณ PL ที่ใช้ในการเตรียมเจลและปริมาณรังสีแกมมาที่ฉายเพื่อให้เกิดการ cross-link (Kunioka and Choi, 1995, Choi *et al*., 1995; Kunioka,1997) จากคุณสมบัติย่อยสลายได้โดยกระบวนการทางชีวภาพ จึงมีแนวโน้มที่จะนำ PL hydrogel มาใช้ประโยชน์ทางด้านสิ่งแวดล้อมหรือนำมาใช้กับมนุษย์



ภาพที่ 8 โครงสร้างของ ε- polylysine (PL)

Figure 8 Structure of ε- polylysine (PL)

Source : Kunioka (1997)

4.4 พอลิเมอร์ชนิดพอลิแซคคาร์ไรด์ (Polysaccharride polymer)

Expolysaccharide : EPS เป็นพอลิเมอร์ที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบหลัก และอาจจะมีสารอินทรีย์หรือสารอนินทรีย์รวมอยู่ในโครงสร้างของพอลิแซคคาร์ไรด์ (Morin, 1998) EPS สามารถแยกหรือสกัดได้จากสิ่งมีชีวิตหลายชีวิต เช่น แบคทีเรีย, ยีสต์, เชื้อราและพืช (Shu and Lung, 2003; Morin, 1998) พบว่าจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ผลิต EPS ในรูปของแคปซูล หรือสารข้นหนืดปลดปล่อยออกนอกเซลล์ EPS ที่จุลินทรีย์ผลิตสามารถแบ่งออกได้ 2 กลุ่มตามองค์ประกอบภายในโมเลกุล คือ

4.4.1 โฮโมพอลิแซคคาร์ไรด์

ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเพียงชนิดเดียวในโครงสร้าง ส่วนใหญ่มักเป็นน้ำตาลกลูโคสหรือฟรุคโตส เช่น กลูแคน เกิดจากน้ำตาลกลูโคส ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักเชื่อมต่อกันด้วยพันธะที่ต่างกันจึงทำให้สามารถแบ่งกลูแคนได้หลายชนิด ได้แก่ bacterial cellulose (β-D-glucan), pullulan (α-D-Glucan), curdlan (1,3-β-D-glucan) และ scleroglucan (1,3-β-D-glucan) (Sutherland,1998)

4.4.2 เฮทเทอโรพอลิแซคคาร์ไรด์

พอลิแซคคาร์ไรด์โดยมากที่พบจัดอยู่ในกลุ่มนี้ ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไปและองค์ประกอบอื่น ๆ เช่น sn-glycerol-3-phosphate, *N*-acetyl-aminosugar, phosphate หรือ acetyl group รวมอยู่ด้วยในโครงสร้าง

จากแหล่งที่มาของจุลินทรีย์, องค์ประกอบของ EPS, น้ำหนักโมเลกุล และโครงสร้าง ซึ่งสิ่งเหล่านี้มีอิทธิพลต่อคุณสมบัติของ EPS ที่แสดงออกมา (Tallon *et al*., 2003) การนำ EPS ไปใช้ประโยชน์ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของ EPS เป็นสำคัญ มีการนำ EPS ไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยา เช่น สารเพิ่มความเหนียว (thickener), stabilizing, emulsifiying, texturizing และ gelling agent (Nampoothiri *et al*., 2003) สารยับยั้งมะเร็ง (anti-tumor), สารยับยั้งไวรัส (Shu and Lung, 2004) แสดงดังตารางที่ 3

5. คุณสมบัติของพอลิเมอร์ชีวภาพ

5.1 สารตกตะกอนชีวภาพ (Bioflocculant)

สารตกตะกอนที่ใช้กันอยู่โดยทั่วไปแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ

ก. กลุ่มสารอนินทรีย์ เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต พอลิอะลูมิเนียมคลอไรด์ (PAC)

ข. กลุ่มสารอินทรีย์ เช่น อนุพันธ์พอลิอะคริลาไมด์ (PAA), พอลิอะคริลิกแอซิด และพอลิเอทิลีนเอไมด์4

ตารางที่ 3 การประยุกต์ใช้พอลิเมอร์ชนิดพอลิแซคคาร์ไรด์

Table 3 Established applications of microbial exopolysaccharides

	Use	Polymer
Biological properties :	Antitumour agents	β-D-Glucans
	Eye and joint surgery	Hyaluronic acid
	Heparin analogues	*Escherichia coli* K5 EPS
	Wound dressings	Bacterial cellulose
Chemical properties :	Enzyme substrates	*Escherichia coli* K4 and K5 EPS
	Oligosaccharide preparation	Curdlan, pullulan, scleroglucan
Physical properties :		
Emulsion stabilization	Foods, thixotropic paints	Xanthan
Fiber strength	Acoustic membranes	Bacterial cellulose
Film formation	Food coatings	Pullulan
Flocculant	Water clarification, ore extraction	Various
Foam stabilization	Beer, fire-fighting fluids	Xanthan
Gelling agents	Cell and enzyme technology	Gellan
	Foods	Curdlan, gellan
	Oil recovery	Curdlan, xanthan
Hydrating agent	Cosmetics, pharmaceuticals	Hyaluronic acid
Inhibitor of crystal formation	Frozen foods, pastilles and sugar syrups	Xanthan
Shear thinning and viscosity	Oil-drilling “muds”	Xanthan
Suspending agent	Food	Xanthan
	Paper coatings	Various
	Agrochemical pesticides and sprays	Xanthan
Viscosity control	Jet printing	Xanthan

Abbreviation : EPS,exopolysaccharides

Source : Sutherland (1998)

ค. สารตกตะกอนชีวภาพ เช่น ไคโตแซน โซเดียมอัลจิเนต เจลาติน และสารตกตะกอนจากจุลินทรีย์

สารตกตะกอนใช้กันอย่างแพร่หลายในการบำบัดน้ำเสีย อุตสาหกรรมน้ำดื่ม ประปา กระบวนการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ของอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมการหมัก ในบรรดาสารตกตะกอนทั้ง 3 กลุ่ม พบว่าสารตกตะกอนกลุ่มสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ได้รับความสนใจมากกว่าสารตกตะกอนชีวภาพ เนื่องจากเหตุผลทางด้านราคาและให้ประสิทธิภาพในการตกตะกอนได้สูงกว่า แต่สารตกตะกอนทั้ง 2 กลุ่มนั้น มีข้อเสียตรงที่ตกค้างในสิ่งแวดล้อมและเป็นอันตรายต่อสุขภาพมนุษย์ เช่น อนุพันธ์พอลิอะคริลาไมด์ (PAA) ซึ่งนิยมใช้กันมาก แต่โมโนเมอร์ของพอลิอะคริลาไมด์จะทำลายระบบประสาทและเป็นสารก่อมะเร็ง หรือสารอะลูมิเนียมซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของพอลิอะลูมิเนียมคลอไรด์ก่อให้เกิดโรค Alzheimer's disease (Fujita *et al*., 2000) ทั้งยังไม่สามารถย่อยสลายได้ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ ดังนั้นจากปัญหาดังกล่าวได้มีความพยายามที่จะป้องกันและแก้ไข ทางเลือกหนึ่ง คือ การใช้สารที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและสุขภาพของมนุษย์ให้น้อยที่สุด เช่น การใช้สารพอลิเมอร์ชีวภาพแทนการใช้สารพอลิเมอร์สังเคราะห์ ถึงแม้ว่าประสิทธิภาพในการตกตะกอนจะด้อยกว่า แต่มีข้อดีที่สามารถย่อยสลายได้เองด้วยกระบวนการทางชีวภาพ จึงมีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม (Kurane and Matsuyama, 1994; Nam *et al*., 1996; Yokoi *et al*., 1997; Fujita *et al*., 2000; Salehizadeh *et al*., 2000)

สารตกตะกอนชีวภาพสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลากหลายชนิด เช่น แบคทีเรีย รา ยีสต์ แอคติโนมัยซีส และสาหร่าย ซึ่งสามารถแยกได้จากดินและแหล่งบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง (activated sludge) แสดงดังตารางที่ 4 (Salehizadeh and Shojaosadati, 2001) และเมื่อเร็ว ๆ นี้ได้มีการค้นพบจุลินทรีย์ที่ผลิตสารตกตะกอนต่าง ๆ ที่ให้ประสิทธิภาพการตกตะกอนมากขึ้น (Fujita *et al*., 2000; Salehizadeh and Shojaosadati, 2001; Shih *et al*., 2001; He *et al*., 2002) จุลินทรีย์จะเริ่มผลิตสารตกตะกอนได้ตั้งแต่กลางระยะ exponential phase จนถึงระยะสุดท้ายของการเลี้ยงตามแต่ชนิดของจุลินทรีย์โดยขับออกมานอกเซลล์ เช่น *R. erythropolis* (Kurane *et al*., 1991), *Alcaligenes latus* (Kurane and Nohata, 1991), *Klebsiella* sp. S11 (Dermlim *et al*., 1999), *Citrobacter* sp. TKF04 (Fujita *et al*., 2000) โดยผลิตสารตกตะกอนพร้อมกับการเจริญของเชื้อ ในขณะที่การผลิตของเชื้อ *S. griseus* จะไม่สัมพันธ์กับการเจริญโดยสามารถผลิตสารตกตะกอนชีวภาพในระยะ death phase (Shimofuruya *et al*., 1996) เช่นเดียวกันกับเชื้อ *Bacillus* sp. As-101 (Salehizadeh *et al*., 2000)

ตารางที่ 4 จุลินทรีย์ที่ผลิตสารตกตะกอนชีวภาพ

Table 4 Some of the bioflocculant-producting microorganisms

Microorganism	References
Klebsiella sp.	Dermlim *et al*., 1999
Arcuadendron sp.	Lee *et al*., 1995
Pestalotiopsis sp.	Kwon *et al*., 1996
Oscillatoria sp.	Bender *et al*., 1994
N.amarae	Takeda *et al*., 1992
Nocardia restrica	Tong *et al*., 1999
Nocardia calcarea	Tong *et al*., 1999
Nocardia rhodni	Tong *et al*., 1999
Streptomyces griseus	Shimofuruya *et al*., 1996
R. erythropolis	Kurane *et al*., 1986, 1991, 1994
Acinetobacter sp.	Kurane and Matsuyama, 1994
Alc. Latus	Kurane and Nohata, 1991, 1994
Dematinum sp.	Tong *et al*., 1999
Mycobacterium phlei	Misra, 1993
Bacillus sp.	Kim, 1993; Suh *et a*l., 1997; Seo, 1993; Salehizadeh *et al*., 2000; Yokoi *et al*., 1995, 1996
Kluyveromyces marxianus	Sousa *et al*., 1992
Aspergillus sp.	Nam *et al*., 1996
Hansenula anomala	Nam *et al*., 1996

Source : Salehizadeh and Shojaosadati (2001)

สารตกตะกอนชีวภาพจากจุลินทรีย์สามารถแบ่งชนิดตามองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ สารตกตะกอนชนิดพอลิแซคคาร์ไรด์, โปรตีน, ลิปิด, พอลิกลูตามิกแอซิด, พอลิกาแลคตูรอนิคแอซิด, ไกลโคลิปิด และไกลโคโปรตีน (Kurane and Matsuyama, 1994; He *et al*., 2004) สารตกตะกอนชีวภาพส่วนใหญ่แสดงค่า IR spectum ของหมู่คาร์บอกซิล, ไฮดรอกซิล, อะมิโน และหมู่ฟอสเฟต (Salehizadeh and Shojaosadati, 2001) ซึ่งหมู่ฟังก์ชันเหล่านี้มีบทบาทต่อกลไกการตกตะกอนโดยเฉพาะหมู่คาร์บอกซิล (Sousa *et al*., 1992)

5.1.1 กลไกการตกตะกอน

การตกตะกอนในระบบสิ่งมีชีวิต (Biological system) ยังไม่สามารถอธิบายถึงกลไกที่เกิดขึ้นได้ แต่สำหรับการตกตะกอนในระบบคอลลอยด์ (Colloidal system) สามารถอธิบายถึงกลไกการตกตะกอนได้โดยอาศัยกลไกทั้ง 4 วิธี คือ การลดความหนาของชั้นกระจาย (Diffuse layer), การดูดติดและการทำลายประจุไฟฟ้าของอนุภาคคอลลอยด์ (Adsorption/Charge neutralization), การใช้ผลึกสารอินทรีย์เพิ่มน้ำหนักและขนาดของอนุภาคคอยลอยด์ และการใช้สารพอลิเมอร์เป็นสะพานเชื่อม (Polymer bridging) ซึ่งทั้ง 4 วิธีมีหลักการเดียวกัน คือ ทำลายเสถียรภาพของอนุภาคคอลลอยด์ สำหรับการใช้สารตกตะกอนชีวภาพมีกลไกการตกตะกอน 2 วิธี คือ กลไกการทำให้เกิดสภาพเป็นกลาง (Charge neutralization) และการสร้างสะพานเชื่อม (Bridging) สำหรับวิธีแรกนั้นสารตกตะกอนชีวภาพซึ่งมีประจุไฟฟ้าตรงข้ามกับอนุภาคคอลลอยด์ ทำให้สามารถดูดติด (adsorbed) บนผิวของอนุภาค และเกิดการเปลี่ยนประจุของอนุภาคคอลลอยด์ให้เป็นตรงกันข้ามกับของเดิม (Charge Reversal) จึงมักใช้พอลิเมอร์ที่มีประจุบวกเพื่อทำลายประจุลบของอนุภาคคอลลอยด์ โดยพอลิเมอร์ที่ใช้สามารถเลือกใช้พอลิเมอร์ที่มีค่าน้ำหนักโมเลกุลต่ำได้ เนื่องจากน้ำหนักโมเลกุลไม่ได้เป็นปัจจัยที่สำคัญในการสร้างฟล้อค (Floc) แต่สำหรับวิธีการสร้างสะพานเชื่อม โมเลกุลของสารพอลิเมอร์สามารถเกาะติดบนอนุภาคคอลลอยด์ได้หลายตำแหน่ง โดยการเกาะติดอาจเป็นผลเนื่องมาจากประจุที่ต่างกัน หรือเหมือนกันของสายพอลิเมอร์กับอนุภาคคอลลอยด์ อนุภาคที่มีพอลิเมอร์เกาะติดอยู่โดยมีปลายอิสระไว้สำหรับเกาะบนอนุภาคอื่น ถือว่าเป็นอนุภาคที่สูญเสียเสถียรภาพแล้ว (Destabilized Particle) อนุภาคดังกล่าวสามารถจับตัวกับอนุภาคอื่น ๆ โดยมีพอลิเมอร์เป็นสะพานเชื่อม ซึ่งการเชื่อมต่อด้วยพอลิเมอร์จะเกิดขึ้น ตราบเท่าที่มีพอลิเมอร์และตำแหน่งว่างบนผิวอนุภาค ดังนั้นพอลิเมอร์จึงต้องมีขนาดใหญ่เพื่อให้สามารถใช้เป็นสะพานเชื่อมต่อระหว่างอนุภาคต่าง ๆ ได้ และสะพานดังกล่าวต้องแข็งแรงสามารถต้านทานแรงผลักระหว่างอนุภาค ด้วยเหตุนี้การสร้างฟล้อคด้วยวิธีการสร้าง

สะพานเชื่อมจึงต้องการพอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ๆ เป็นชนิดประจุลบหรือชนิดไม่มีประจุ (มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์, 2542; Salehizadeh and Shojaosadati, 2001; Shih *et al*., 2001)

5.1.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการตกตะกอนโดยพอลิเมอร์ชีวภาพ

จากรายงานการทดลองที่ผ่านมา พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของสารตกตะกอนชีวภาพเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการตกตะกอน มีการศึกษาโดยใช้พอลิเมอร์ชนิดต่าง ๆ ซึ่งมีค่าน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน สำหรับตกตะกอนสาร Kaolin ที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร โดยใช้สารละลายพอลิเมอร์ที่ความเข้มข้นเท่ากัน พบว่าพอลิเมอร์ชนิดพอลิกลูตามิกแอซิดที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. PY-90 มีค่าน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 2×10^6 ดาลตัน ให้ค่ากิจกรรมการตกตะกอนเท่ากับ 15 (Yokoi *et al*., 1995) และพอลิเมอร์ชนิดพอลิแซคคาร์ไรด์ซึ่งมีค่าน้ำหนักโมเลกุล 2.5×10^6 ให้ค่ากิจกรรมการตกตะกอนเท่ากับ 125 (Yokoi *et al*., 1997) เป็นเพราะว่าพอลิเมอร์ที่มีขนาดใหญ่ย่อมมีพื้นที่สัมผัสกับอนุภาคคอลลอยด์ได้มากกว่า จึงทำให้ค่ากิจกรรมการตกตะกอนที่ได้มากกว่าพอลิเมอร์ที่มีขนาดเล็ก นอกจากนี้พอลิเมอร์แต่ละชนิดซึ่งมีองค์ประกอบและโครงสร้างที่แตกต่างกัน จึงมีผลทำให้ประจุรวมของโมเลกุลและหมู่ฟังก์ชันในโมเลกุลแตกต่างกันด้วย โดยปัจจัยเหล่านี้มีผลต่อค่ากิจกรรมการตกตะกอน เช่น พอลิเมอร์โปรตีน NOC-1, พอลิเมอร์ชนิดกลูตามิกแอซิดและพอลิเมอร์ชนิดพอลิแซคคาร์ไรด์ให้ค่ากิจกรรมการตกตะกอนเท่ากับ 33, 15 และ 125 ตามลำดับ (เมื่อความเข้มข้นของสารพอลิเมอร์เท่ากัน) (Salehizadeh *et al*., 2000)

สภาวะที่ใช้ในการตกตะกอนก็มีผลต่อค่ากิจกรรมได้เช่นเดียวกัน เนื่องจากสภาวะต่าง ๆ มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของประจุไฟฟ้า หรือความเสถียรภาพ เช่น อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาในการตกตะกอน โดยสารตกตะกอนที่มีโปรตีนหรือเปปไทด์รวมอยู่ในโครงสร้าง จะไม่สามารถทนต่ออุณหภูมิสูง ๆ ได้ เช่น สารตกตะกอนชีวภาพจากเชื้อ *R. erythropolis* (Kurane *et al*., 1986) และสารตกตะกอนชีวภาพ As-101 ผลิตจากเชื้อ *Bacillus* (Salehizadeh *et al*., 2000) ไม่ทนต่ออุณหภูมิสูง โดยให้ค่ากิจกรรมการตกตะกอนลดลงเหลือ 50 เปอร์เซ็นต์เมื่อสารละลายพอลิเมอร์ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที เช่นเดียวกับพอลิอะมิโนแอซิดกลุ่ม PGA จากเชื้อ *Bacillus* sp. PY-90 ซึ่งไม่เหลือค่ากิจกรรมการตกตะกอนหลังจากได้รับความร้อนเป็นเวลา 40 นาที (Yokoi *et al*., 1995) ในขณะที่พอลิเมอร์ประเภทที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลัก มีคุณสมบัติสามารถทนต่ออุณหภูมิสูง ๆ ได้ เช่น พอลิเมอร์ที่ผลิตโดยเชื้อ *Citrobacter* sp. TKF04 (Fujita *et al*., 2000), *Arcuadendron* sp. TS-49 และ *Paecilomyces* sp. (Lee *et al*., 1995), *Aspergillus* sp. JS-42 (Nam *et al*., 1996) และ

Corynebacterium glutamicum (He *et al*., 2004) พบว่าสามารถตกตะกอนสารแขวนลอย Kaolin ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กันในช่วงตั้งแต่ 0-100 องศาเซลเซียสได้ โดยที่อุณหภูมิไม่มีผลกระทบต่อค่ากิจกรรมการตกตะกอนของพอลิเมอร์ในกลุ่มนี้

นอกจากนี้ชนิดและปริมาณของไอออนก็มีผลต่อค่ากิจกรรมเช่นเดียวกัน โดยจะไปเพิ่มค่ากิจกรรมการตกตะกอน การทำงานของประจุชนิด +2 และ +3 จะช่วยลดปริมาณประจุลบของทั้งพอลิเมอร์และอนุภาคคอลลอยด์ ทำให้พอลิเมอร์สามารถจับกับอนุภาคคอลลอยด์ได้มากยิ่งขึ้น อย่าง เช่น เชื้อ *Enterobacter* sp. BY-29 ให้ค่ากิจกรรมเพิ่มขึ้นเมื่อเติม Al^{+3} Fe^{+3} Fe^{+2} และ Ca^{+2} (Yokoi *et al*., 1996)

5.2 การเกิดเจล

เจลจัดเป็นวัฏภาคที่มีลักษณะก่ำกึ่งระหว่างของแข็งและของเหลว โครงสร้างของเจลเกิดจากโมเลกุลของสายโซ่พอลิเมอร์จับกันด้วยพันธะชนิดต่าง ๆ เป็นโครงร่างตาข่าย 3 มิติ ที่สามารถจับกับน้ำหรือสารอื่นที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำไว้ภายในได้ (Damodaran, 1996) เจลเป็นผลมาจากกระบวนการที่ประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญ 2 ขั้นตอน เริ่มแรกจะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง จากการทำปฏิกิริยาระหว่างพอลิเมอร์กับน้ำ ความหนืดของระบบจะเพิ่มขึ้น ขนาดของพอลิเมอร์จะใหญ่ขึ้นเป็นผลมาจากการคลายตัว จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอนที่ 2 พอลิเมอร์ที่คลายตัวหรือโมเลกุลที่คลายตัวอย่างสมบูรณ์แล้ว จะมารวมตัวกันหรือจับกันอย่างช้า ๆ เพื่อเกิดเป็นโครงร่างตาข่าย ความหนืดของระบบจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เมื่อพิจารณาการเกิดพันธะระหว่างโมเลกุล จำนวนพันธะที่เกิดขึ้นต้องไม่น้อยกว่า 3 พันธะ โดยอันตกิริยาภายใน (interactions) ระหว่างโมเลกุล ได้แก่ แรงวันเดอร์วาล พันธะไฮโดรเจน แรงขั้วไฟฟ้า และอันตกิริยาระหว่างหมู่ไม่ชอบน้ำ (Vashuk *et al*., 2001)

พอลิเมอร์ชีวภาพหลายชนิดมีคุณสมบัติการเกิดเจล เนื่องจากพอลิเมอร์ชีวภาพเหล่านี้มีขนาดโมเลกุลที่ใหญ่และสามารถละลายน้ำได้ เช่น พอลิเมอร์กลุ่มพอลิแซคคาร์ไรด์ alginate จากเชื้อ *Pseudomonas*, dextran จากเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides*, xanthan จากเชื้อ *Xanthamonas compestris*, cellulose จากเชื้อ *Acetobacter xylinium*, hyaluronic acid จากเชื้อ *Strptococcus equii*, pullulan จากเชื้อ *Aureobasidium pullulans* (Sutherland, 1998) และ gellan จากเชื้อ *Sphingomonas paucimobilis* (Nampoothiri *et al*., 2003) หรือพอลิเมอร์กลุ่มโปรตีนเป็นที่รู้จักกันดี คือ gelatin และ casein นอกจากนี้ยังพบว่า PGA และ PL สามารถเกิดเป็นไฮโดรเจลได้ด้วย โดยการใช้วิธีต่าง ๆ เช่น chemical cross-linking, repetitive freezing และการฉายรังสีแกมมาซึ่งเป็นวิธีที่นิยมกันมาก เนื่องจากสะดวกไม่จำเป็นต้องใช้สารเคมีตั้งต้น

หรือสภาวะที่ปลอดเชื้อ สารไฮโดรเจลที่ใช้กันอยู่มักเป็นสารสังเคราะห์ เช่น พอลิไวนิลเมธิล เอสเทอร์ พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ และพอลิไอโซพอลิอะคริลาไมด์ ซึ่งมีผลตกค้างในสิ่งแวดล้อม ปัจจุบันไฮโดรเจลที่เตรียมจากพอลิเมอร์ชีวภาพได้รับความสนใจมากขึ้น (Choi and Kunioka, 1995) เพราะสามารถย่อยสลายได้เองในธรรมชาติ และกลับเข้าสู่วัฏจักรคาร์บอนในธรรมชาติได้ จึงไม่ทำให้เกิดการตกค้างในสิ่งแวดล้อม (Kunioka, 1997) จากความสามารถดูดซับน้ำได้สูงถึง 20-3,500 เท่าของน้ำหนักตัวจึงนำไปประยุกต์เป็นวัสดุชีวภาพ (biomaterials) ที่ควบคุมการปลดปล่อยสารต่าง ๆ และสารดูดซับ (superabsorbent materials) (Choi *et al*., 1995) หรือเป็นสารสำหรับ immobilize เอนไซม์ (Choi and Kunioka, 1995)

นอกจากนี้มีการศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดเจลของพอลิเมอร์ชีวภาพ เป็นที่ทราบกันดีว่าการเกิดเจลที่มีความยืดหยุ่นนั้นจำเป็นต้องทำให้สายโซ่ของพอลิเมอร์เกิดอันตกิริยาต่อกันมากที่สุด ปกติภายในสายโซ่พอลิเมอร์จะมีประจุที่แตกต่างกัน จึงทำให้เกิดแรงดูดและผลักกัน ดังนั้นการเติมสารที่ช่วยเสริมการเกิดอันตกิริยาระหว่างสายโซ่พอลิเมอร์ จึงมีส่วนทำให้การเกิดเจลของพอลิเมอร์ดีขึ้น เช่น ผลของการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์จะทำให้อิออนของโซเดียม (Na^{+}) และคลอไรด์ (Cl^{-}) จับกับตำแหน่งบนผิวหน้าโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่มีประจุตรงข้าม จึงมีผลให้พันธะระหว่างขั้วไฟฟ้าระหว่างโมเลกุลถูกทำลาย ดังนั้นพอลิเมอร์จึงถูกแยกออกและกระจายตัวอยู่ในน้ำ นอกจากนี้เกลือยังมีผลต่อความแข็งแรงของเจลได้อีกด้วย จากการทดลองนำพอลิเมอร์ชนิดพอลิแซคคาร์ไรด์ คือ alginate ซึ่งมีความไวจำเพาะเจาะจงสูง (high affinity) ต่อสารที่มีประจุ +2 โดยสารละลายอัลจิเนตมีความหนืดจนสามารถฟอร์มตัวเป็นเจลได้เมื่อมีการเติมสารประจุ +2หรือมากกว่า แต่จะไม่เกิดเจลเมื่อเติมสารประจุ +1 และ Mn^{2+} ในขณะที่ Ba^{2+} และ Sr^{2+}จะช่วยเพิ่มความแข็งแรงของเจลได้ดีกว่าการเติมเกลือ Ca^{2+} (www.genialab.de/inventory/alginate.htm) นอกจากนี้การพองตัว (swelling) ของเจลสามารถเพิ่มได้จากการเปลี่ยนแปลงระดับพีเอช ระดับความเข้มข้นของเกลือ (Ostroha *et al*., 2004) และจากรายงานของ Dermlim, 1999 พบว่าพอลิเมอร์ชนิดพอลิแซคคาร์ไรด์ผลิตจากเชื้อ *Enterobacter cloacae* WD 7 สามารถฟอร์มตัวเป็นเจลในสภาวะที่เป็นด่าง โดยเจลจะมีความแข็งแรงมากที่สุดเมื่อมีการเติม $CuSO_4.5H_2O$ จากความสามารถในการเกิดเจลของพอลิเมอร์ชีวภาพในสภาวะที่มีการเติมเกลือ จึงมีแนวโน้มที่จะประยุกต์ใช้เป็นสารดูดซับโลหะหนัก (biosorption) (Shimada *et al*., 1997; Gutnick and Bach, 2000)

5.3 สารยับยั้งจุลินทรีย์ (antimicrobial agent)

สารปฏิชีวนะ (antibiotic) ที่แยกได้จากจุลินทรีย์โดยทั่วไปจะประกอบไปด้วยกรดอะมิโนตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป หรืออาจจะประกอบด้วยกรดอะมิโนเพียงชนิดเดียว (Shima *et al.,* 1984) โดยอยู่ในรูปของโมโนเมอร์หรือพอลิเมอร์ (Shima *et al.,* 1982) จุลินทรีย์ *Streptomyces albulus* ผลิตพอลิเมอร์ชนิดพอลิไลซีน (ε-PL, n = 25 - 30) แสดงคุณสมบัติเป็นสารต้านจุลินทรีย์ต่อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบเมื่อใช้ที่ระดับความเข้มข้น 1-8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีประสิทธิภาพการต้านจุลินทรีย์ได้ดีกว่า PL ที่ได้จากการสังเคราะห์โดยกระบวนการทางเคมี (α-PL, n = 50) นอกจากนี้ยังพบว่าความยาวของสายพอลิเมอร์มีผลต่อค่ากิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์โดยความยาวที่เหมาะสม คือ มีจำนวนของโมโนเมอร์มาต่อกันน้อยกว่า 10 โมโนเมอร์ สำหรับกลไกการทำงานของ PL ต่อการยับยั้งจุลินทรีย์เกิดจาก PL ถูกดูดซับเข้าไปในชั้น outer membrane ของแบคทีเรียแล้วจึงเข้าสู่ไซโตพลาสซึม และทำให้เกิดความเสียหายต่อลักษณะทางกายภาพของเซลล์แบคทีเรีย (Shima *et al.,* 1984) นอกจากนี้ ε-PL ยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคเทอริโอฟาจ (bacteriophage) โดยพบว่าคุณสมบัติการเป็น antiphage ของ ε-PL ขึ้นอยู่กับโครงสร้างของฟาจมากกว่าชนิดของกรดนิวคลีอิก ค่ากิจกรรมการยับยั้งฟาจของ ε-PL จะมีผลต่อฟาจชนิดที่มีโครงสร้าง long tail และ non-contractic มากกว่าฟาจรูปร่างอื่น ๆ สำหรับค่าความเข้มข้นของ ε-PL ที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญของฟาจทั้ง 2 ชนิด คือ T_4 และ T_5 ซึ่งมีลักษณะโครงสร้างแบบ contractile tail, long – tail และ non – contractile ตามลำดับนั้น พบว่าฟาจชนิด T_5 มีความไวต่อความเข้มข้นของ ε-PL ที่ระดับต่ำ ๆ ได้ดีกว่า T_4 และค่าอัตราการรอดชีวิตของฟาจทั้ง 2 ชนิดที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากับ 20 และ 50 % ตามลำดับ โดยฟาจชนิด T_5 จะหยุดการเจริญเมื่อใช้ความเข้มข้นประมาณ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ T_4 ต้องใช้ความเข้มข้นมากกว่า 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจึงหยุดการเจริญ และฟาจ T_5 มีอัตราการรอดชีวิตที่ไม่เปลี่ยนแปลงตลอดช่วงระยะเวลาการทดลอง ดังนั้นแสดงว่า ε-PL มีผลต่อ T_5มากกว่า (Shima *et al.,* 1982)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เทียบเคียงชนิดของแบคทีเรียทนร้อน 2 สายพันธุ์
2. ศึกษาองค์ประกอบและคุณสมบัติบางประการของสารชีวภาพที่ผลิตได้