



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

โครงข่ายเซลล์เบคทีเรียและพอลิเมอร์ในการประดิษฐ์อีมีลชัน
ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมชนิดใหม่

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิรารัตน์ วงศ์คงคาเทพ และคณะ

กรกฎาคม 2558

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

โครงข่ายเซลล์เบคทีเรียและพอลิเมอร์ในการประดิษฐ์อิมัลชันที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมชนิดใหม่

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิรรัตน์ วงศ์คงคาเทพ

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและมหาวิทยาลัยมหิดล

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. และ มหาวิทยาลัยมหิดล ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยโครงการ โครงข่ายเซลล์แบคทีเรียและพอลิเมอร์ในการประดิษฐ์อิมัลชันที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมชนิดใหม่ นี้สำเร็จลงด้วยดีจากความร่วมมือของรองศาสตราจารย์ ดร. มานพ สุพรรณธริกา ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่เอื้อเฟื้อ hydrocolloids ที่ใช้ในการเพิ่มความเสถียรของ Bacteria interface emulsion รวมทั้งความรู้และประสบการณ์ต่างๆที่แบ่งปันให้กันในการทำงานวิจัยเกี่ยวกับอิมัลชัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธัญญารัตน์ พงศ์ทรงกูร ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดลที่เอื้อเฟื้อเชื้อแบคทีเรีย และความรู้ทั้งหลายทั้งปวงเกี่ยวกับการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและการนำไปใช้ประโยชน์ โครงการขอขอบพระคุณท่านทั้งสองไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณนักศึกษาทั้งหมดที่ช่วยกันคิด ช่วยกันทำ ช่วยกันลอง จนงานวิจัยชิ้นนี้เป็นรูปเป็นร่างขึ้นมาได้ เรียงลำดับจากนักศึกษาปัจจุบัน ไปจนถึงนักศึกษากลุ่มแรกที่ทดลองระบบอิมัลชันนี้สำเร็จแม้จะด้วยความบังเอิญ ก็เป็นความบังเอิญที่ยิ่งใหญ่ค่ะ น.ส. พิชชาภา รัตนบุรี, Miss Dorkjand Gunchinbat, น.ส. อรกานต์ หาญพานิช, น.ส. นฤมล เลี่ยมนาค, น.ส. เจนจิรา สันทาลุนย์, น.ส. อัญชดา ลาตนาเลา, น.ส. ขนิษฐ์ จรัสวิมลใส, น.ส. ชมภิศา คุณจักร, น.ส. จรรยา เล่ห์อ้อม, น.ส. ดวงหทัย แก้วอุไร, น.ส. ณัฐภัทร์ เจริญรัตน์, นายจรรพพงศ์ มานพวิเศษเจริญ, น.ส. นริศรา อารังพาณิชย์, น.ส. อรพินธ์ ถาวรศิลป์สุรกุล

ขอขอบพระคุณภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดลเป็นอย่างมากที่เอื้อเฟื้อสถานที่ทำงานวิจัย และเครื่องมือวิจัยต่างๆ ขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือกลาง และศูนย์สังเคราะห์ภาพนาโน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เป็นอย่างมากสำหรับความอนุเคราะห์ด้านเครื่องมือวิทยาศาสตร์ต่างๆ

ขอขอบพระคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและมหาวิทยาลัยมหิดลเป็นอย่างมากสำหรับการสนับสนุนทางด้านงบประมาณในการทำวิจัย

ท้ายที่สุดคงต้องขอบคุณ คุณสามี และคุณลูกสาวทั้งสาม แม้ว่าจะทำให้แมื่อย่งเหียงสุดๆ เวลาหนูๆป่วยไข้ แต่หนูทั้งสามก็ทำให้แม่มั่มมีความสุขทุกครั้งที่ได้วิ่งเล่น กระโดดโลดเต้น หรืออ่านนิทานให้หนูๆฟัง

จิรารัตน์ วงศ์คงคาเทพ

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ RSA5580001

ชื่อโครงการ โครงการขยายเซลล์แบคทีเรียและพอลิเมอร์ในการประดิษฐ์อิมัลชันที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม
ชนิดใหม่

ชื่อนักวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิรารัตน์ วงศ์คงคาเทพ

สถาบัน ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail jirarut.chu@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ 3 ปี

อิมัลชันหรือการที่หยดนํ้ามันสามารถกระจายตัวอยู่ในน้ำได้มีประโยชน์มากมายในเชิงอุตสาหกรรม ไม่ว่าจะเป็นอุตสาหกรรมอาหาร การเกษตร เคมีหรือยา เป็นต้น แต่ emulsifier หรือ stabilizer ที่ใช้มักจะมีมาจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี ซึ่งวัตถุดิบคือแหล่งนํ้ามันต่างๆก็เหลือน้อยลงทุกที ทั้งยังส่งผลกระทบต่อสภาพแวดล้อม ทำให้มีความจำเป็นที่จะต้องหาวัสดุประเภทใหม่ที่มาจากรธรรมชาติและย่อยสลายได้มาใช้แทน chemical-based emulsifier/stabilizer

งานวิจัยนี้ได้นำพอลิเมอร์ประเภทที่มาจากธรรมชาติ มาปรับปรุงสภาพประจุของเชื้อแบคทีเรียให้มีสภาพเป็นกลาง และมีความไม่ชอบนํ้ามากขึ้น จนสามารถนำไปใช้ในการทำอิมัลชันได้เป็นผลสำเร็จ พอลิเมอร์ธรรมชาติประเภทที่สามารถจับกับเชื้อจุลินทรีย์และเกิดอิมัลชันได้ดีที่สุดคือไคโตซาน โดยปริมาณอิมัลชันที่ได้ขึ้นกับความเข้มข้นของไคโตซานที่นำมาใช้ และขนาดของเชื้อแบคทีเรีย พบว่า *Pseudomonas putida* F1 มีค่า cell viability สูงที่สุด และยังแสดง metabolism activity สูงที่สุดอีกด้วย เหมาะกับการนำไปใช้ในการทำ bioremediation ของนํ้ามันและตัวทำละลายต่างๆ อิมัลชันที่มีแบคทีเรียและพอลิเมอร์เป็นองค์ประกอบนี้มีความอ่อนไหวต่อแรงกระทำทางกายภาพเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งภายใน 24 ชั่วโมงแรกของการเกิดอิมัลชัน แต่เมื่อตั้งทิ้งไว้นาน 30 วัน การลดลงของชั้นอิมัลชันเมื่อให้แรงภายนอกมีสัดส่วนน้อยลงมากกว่า 50% แต่ในการนำไปใช้ประโยชน์จริง หากต้องการ activity ของเชื้อแบคทีเรีย จำเป็นต้องปรับให้อิมัลชันมี kinetic ที่เร็วขึ้นด้วยการเติม Hydroxylpropyl methyl cellulose ซึ่งสามารถเพิ่มความคงตัวของอิมัลชันได้ดีกว่า hydrocolloids อื่นๆ เช่น xanthan gum

คำหลัก : แบคทีเรีย อิมัลชัน ไคโตซาน

Abstract

Project Code : RSA5580001

Project Title : Novel environmental-friendly emulsion stabilized by bacterial cells and polymer network

Investigator : Assistant Professor Dr. Jirarut Wongkongkatep

Department of biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University

E-mail : jirarut.chu@mahidol.ac.th

Project Period : 3 Years

Emulsion, or the phenomenon that oil droplets disperse in an aqueous media, are of great practical interest because their application is almost every chemical industry, such as in detergent, dyestuffs, paints, paper coatings, inks, fibers and plastics, personal care and cosmetics, agrochemicals, pharmaceuticals and food industry. A conventional emulsifier or stabilizer, however, is a product from petrochemical industry, which has a limited resource and always shows some toxicity to our environment. Therefore, there is an urgent need to search for a natural-origin and renewable bio-based interface material.

In this research, a natural-origin positively-charged polymer was used to neutralize the negatively-charged bacterial cells and increase their surface hydrophobicity, resulting in a newly-developed bacteria interface emulsion. Chitosan demonstrated the best performance in charge neutralization, hydrophobicity enhancement as well as emulsion stabilization. Chitosan concentration and size of the bacteria affected the emulsification index significantly. *Pseudomonas putida* F1 showed the highest cell viability and activity when exposed to emulsion system which is promising in the application to bioremediation of oil and organic solvents. This bacteria interface emulsion, nevertheless, is sensitive to agitation and physical forces especially within 24 hours after emulsification. Static storage of the emulsion at room temperature more than 30 days can reduce this sensitivity up to 50%. When considered about its practical use in bioconversion and bioremediation which require the live cells or the activity of the bacteria, the kinetic of the emulsion has been accelerated by adding hydroxypropyl methyl cellulose as a secondary stabilizer.

Keywords : bacteria, emulsion, chitosan

เนื้อหาทางวิจัย

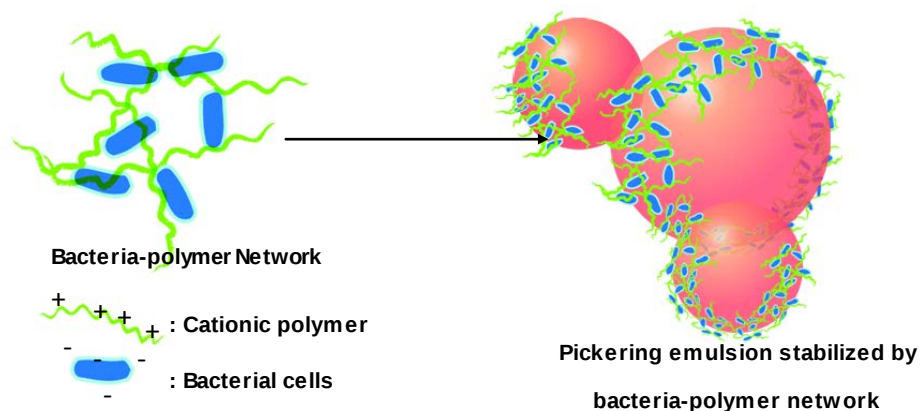
บทนำ (Introduction)

Emulsions are of great practical interest because their application is almost every chemical industry, such as in detergent, dyestuffs, paints, paper coatings, inks, fibers and plastics, personal care and cosmetics, agrochemicals, pharmaceuticals and food industry.

An emulsion is a system consisted of dispersed emulsions of one immiscible liquid in another stabilized by surfactants or emulsifiers. Surfactants are involved in almost every industrial product or process. As a result, they enter the environment in effluents from industrial and household wastes. Contamination of phosphate-type surfactant to the environment has caused “Algae Boom” in the reservoir and depleted the dissolved oxygen during nighttime which will result in the serious effect to all life species in the water system. Due to the adverse effect of surfactants to the environment, it has been required to find an alternative to a conventional surfactant in order to reduce its environmental impact. Since the original work of Ramsden (1903) and Pickering (1907), solid colloidal particles have been proved to adsorb at the interfaces to form “Pickering emulsions”. Interest in Pickering emulsions has increased over the past 10 years, especially for health and cosmetics applications where the use of surfactants can cause an adverse effect to the environment. Indeed, Pickering emulsions not only present good mechanical properties, but also produce good stability, thereby leading to a reduction in the use of non-environmental friendly surfactants (Rosen et al., 1999).

However, the raw, non-hydrophobically-modified materials are usually not surface active due to their lack of hydrophilicity/hydrophobicity, or great tendency to aggregate. Methods involving hydrophobic modifications or the addition of cosurfacing compounds are required to produce particles/material suitable for Pickering stabilization (Binks, 2002). Such methods increase the use of hazardous chemicals and make the process complicated and not suitable for large-scale production. Research efforts are being focused on the development of an environmental friendly, bio-based Pickering emulsion with simple preparation. Few studies have described stabilization by particles derived from renewable resources (Kalashnikova, 2011) whereas no reports concerned with bio-based Pickering stabilization.

Bacteria are prokaryote microorganisms, typically a few micro-meters in length, ubiquitous in every habitat on earth. The bacterial cell is surrounded by negatively charge lipid membrane which encloses the contents of the cell and acts as a barrier to hold nutrients, protein, enzyme and other essential components of the cytoplasm within the cell (Madigan et al., 2003). An electrostatic interaction between the negatively charged bacterial cell surface and polycationic polymer has been well studied (Li et al., 2010). We utilize our expertise in creating a novel functional gold nanoparticle by coating a polymer which is well summarized and reported (Wongkongkatep et al., 2010). In this project, we aimed to create a novel function of bacterial cell by coating with a specific polymer. Our unique strategy is that the strong binding affinity of polycationic polymer toward the negatively charged cell surface would neutralized the surface charge of the bacterial cells, resulting in a self-assemble bacteria-polymer network which could provide in a single step and able to stabilize the novel type of bio-based Pickering emulsion useful for industrial application (Scheme 1).



Scheme 1. Bio-based Pickering emulsion prepared from bacterial cells and polymer network

วิธีการทดลอง (Methodology)

Preparation of polymer modified bacterial cell

Polymer-coated Bacteria was prepared by combining an appropriate amount of polymer dissolved in aqueous solution (0.3 mL) with the bacteria cell suspension (OD = 2 in 0.1 M sodium phosphate buffer pH 6.8, 0.9 mL) then vigorously mixing for 2 min. The obtained polymer-coated Bacteria was imaged under epifluorescence microscope (Olympus BX 51, Japan), confocal laser scanning microscope (CLSM, Olympus FV-1000, Japan) and scanning electron microscope (SEM, S-2500, Hitachi, Japan). Zeta potential (Nano Zetasizer ZS, Malvern Instrument, USA) and CAM (KRUSS G-10, Germany) measurement will indicate the successful coating of polymer to bacteria.

Fluorescence microscopy

Fluorescent imaging was carried out using an epifluorescence microscope (Olympus BX 51, Japan) which is equipped with a UHS103OL mercury lamp and DAPI (U-MWU2, 330-385 nm excitation and > 420 nm emission), FITC (U-MWB2, 460-490 nm excitation and > 520 nm emission) and Nile red (U-MWG2, 510-550 nm excitation and > 590 nm emission) filter sets. A 1.5 million pixel single CCD camera (DP71) will be used to capture digital images. Confocal laser scanning microscope (CLSM, Olympus FV-1000, Japan) equipped with Ar and He laser was used to identify the position of polymer-coated bacteria in the emulsion system. FV10-ASW 1.7 image analysis software supplied with the microscope was used for projection images and 3D images reconstruction.

Scanning electron microscopy

An observation was recorded using scanning electron microscope (SEM, S-2500, Hitachi, Japan). A suspension of Bacteria at appropriate growth was harvested, washed twice and then centrifuged at 12,000 rpm for 5 min. The pellet was firstly fixed with 2.5% (w/w) glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2) at 4°C for 2 hours, washed three times, and secondly fixed with 1% Osmium tetroxide in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2) at 4°C for 1 hour. The samples were dehydrated in a graded ethanol series and then coated with platinum/palladium alloy. The polymer-modified Bacteria cells were prepared and imaged using the above-described procedure.

Zeta potential measurement

Zeta potential was recorded on Nano Zetasizer ZS, Malvern Instrument at 25 °C. The bacterial cell suspension was prepared in 0.1 M sodium phosphate buffer solution pH 6.8 with optical density (OD) = 2. Coating of polymer was performed by mixing 3 mL of bacterial cell suspension with 1 mL of polymer solution. In the control experiment, 3 mL of bacterial cell suspension was analyzed for its zeta potential.

Contact Angle Measurement (CAM)

Washed Bacteria cells was suspended in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8) at a concentration of $OD_{660} = 2$. A mixture of 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8) containing Bacteria at the equivalent cell density was prepared for the polymer-coated Bacteria. A 50 mL of suspension of Bacteria cells with or without coating was filtered on a nylon membrane with mean pore size of 0.45 μm , 47 mm in diameter (Millipore, USA). The lawns was kept on a 1% agar plate at room temperature to prevent drying. The lawn was immersed in organic solvent bath, and a 2- μL droplet of distilled water was placed softly on the cell lawn. Then the three-phase contact angle between the water drop, bacterial lawn, and organic solvent was measured using a contact angle meter (KRUSS G-10, Germany).

Formation of polymer-coated Bacteria emulsion

Polymer-coated Bacteria emulsion system was prepared by combining an appropriate amount of polymer dissolved in aqueous solution (0.3 mL) with the bacteria cell suspension ($OD_{660} = 2$ in 0.1 M sodium phosphate buffer pH 6.8, 0.9 mL) prior to a vigorously mixing with an equal volume of organic solvent (1.2 mL). The bacterial emulsion was kept at room temperature and then observed under fluorescent light microscope (Olympus BX 51, Japan) or measure Emulsification index (EI) at time interval.

Emulsification index (EI)

Emulsion of coated Bacteria was prepared as described previously. EI was evaluated by measuring the total volume of the mixture (Ht) and that of an emulsion layer (He) after allow to stand for time interval. The value of EI (%) indicating the ability to stabilize the emulsion by the coated cells, was calculated as $He \times 100 / Ht$.

Cell viability in 3D scaffold of emulsion

Every sample was introduced under sterile conditions in 7 mL disposable cylindrical polyethylene containers containing 1 mL of culture medium. This polyethylene container was inserted into a cylindrical polystyrene container that has four stainless steel electrodes. The outer container was filled with 2 mL of 36 mM (2 g/L) potassium hydroxide aqueous solution. The outer container was hermetically closed by a stopper that causes the aseptically opening of the inner one. Containers tempering to 37°C promotes bacteria growth and hence carbon dioxide release ($C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O$). The carbon dioxide flows from the inner container to the outer one, where it is adsorbed by the KOH solution ($CO_2 + 2OH^- \rightarrow CO_3^{2-} + H_2O$) and causes the change of the conductivity of the KOH solution. Data will be acquired every 10 min.

Addition of secondary stabilizer

Emulsions were prepared by mixing chitosan with hydroxypropyl methyl cellulose or xanthane gum solutions at appropriate concentration (4.8 mL) and *E. coli* DH5α cell suspension ($OD_{660} = 2$, 14.4 mL) as an aqueous phase. The mixtures were then homogenized with soybean oil (6 mL) at 11,200 rpm, 30 sec and rest 2 min for 4 cycles to perform emulsion stabilized by chitosan and hydroxypropyl methyl cellulose or xanthane gum.

ผลการทดลองและบทวิจารณ์ (Results and Discussion)

จะแยกตามวัตถุประสงค์ของโครงการซึ่งประกอบด้วย 4 หัวข้อดังต่อไปนี้

1. ศึกษาผลกระทบของพอลิเมอร์ประจุบวกและการเกิดอิมัลชัน
2. ศึกษาความมีชีวิตของเชื้อแบคทีเรียในโครงสร้างอิมัลชัน 3 มิติ
3. เพื่อดูผลกระทบทางกายภาพต่ออิมัลชันที่มีแบคทีเรียและพอลิเมอร์เป็นองค์ประกอบ
4. เพื่อเพิ่มความคงตัวของอิมัลชันด้วยการเติม stabilizer

วัตถุประสงค์ที่ 1 ผลกระทบของ cationic polymer ต่อการเกิดอิมัลชัน

เนื่องจากพื้นผิวของเชื้อแบคทีเรียโดยทั่วไปมักมีประจุเป็นลบ ดังนั้นจึงสามารถจับกับ cationic polymer ด้วย electrostatic interaction ได้ค่อนข้างดี ในงานวิจัยนี้ เราเน้น cationic polymer ที่มาจากธรรมชาติและสามารถย่อยสลายได้ในธรรมชาติ จำนวนสองชนิด ได้แก่ ไคโตซาน (chitosan) และ poly-L-lysine (PLL) ไคโตซานเป็น polysaccharide ที่ได้จากกระบวนการ deacetylation ของไคติน ซึ่งไคตินได้มาจากเปลือกหอย เปลือกปู เป็นส่วนใหญ่ การทำ deacetylation ของไคตินจะทำให้หมู่ acetyl หลุดออก เหลือแต่หมู่ amine ส่งผลให้ ไคโตซานสามารถละลายน้ำได้ดีในสารละลายที่เป็นกรด นอกจากนี้ ไคโตซานยังเป็น polysaccharide เพียงชนิดเดียวในปัจจุบันที่ให้คุณสมบัติเป็นประจุบวกในสารละลายกรดอ่อน

PLL ประกอบด้วยกรดอะมิโน L-lysine เชื่อมต่อกันเป็นสายยาว สังเคราะห์ได้จากกระบวนการหมักของเชื้อแบคทีเรีย PLL จะประกอบไปด้วยหมู่ amine เป็นจำนวนมากจึงแสดงคุณสมบัติเชิงประจุบวก คล้ายกับ ไคโตซาน แต่มีความแตกต่างกันคือ backbone ของ PLL คือโครงสร้างของ protein แต่ backbone ของ ไคโตซานคือ polysaccharide ซึ่งถ้าพิจารณาจากโครงสร้างทางเคมีแล้ว จะพบว่า polysaccharide น่าจะให้ความเป็น hydrophobicity สูงกว่า PLL อย่างไรก็ตาม พอลิเมอร์ทั้งสองชนิดมีรายงานการจับตัวกับเชื้อแบคทีเรียอยู่เป็นจำนวนมาก

ในการเปลี่ยนความเข้มข้นของพอลิเมอร์ทั้งสองชนิด เพื่อดูคุณสมบัติการเกาะตัวกับเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* DH5 alpha รวมทั้งลักษณะการเกิดอิมัลชันนั้น ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 1-3 ดังนี้

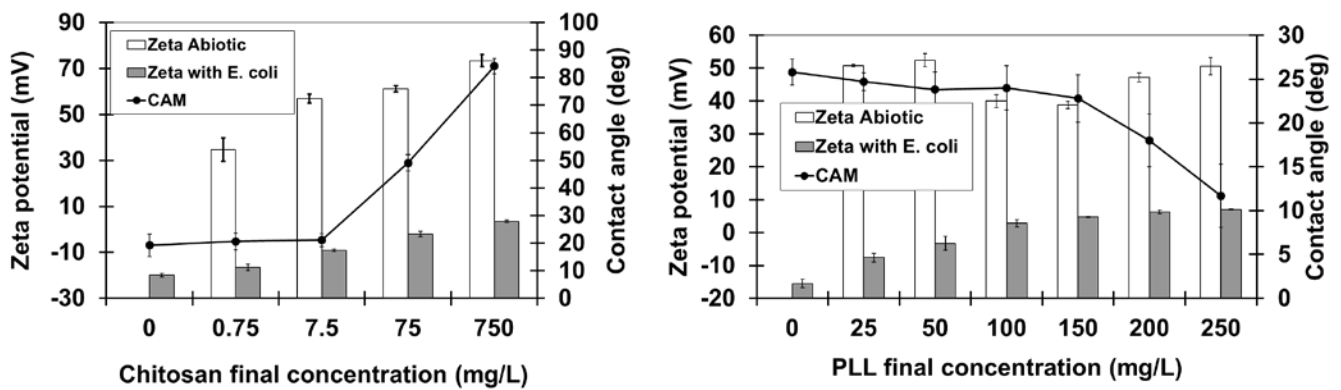


Figure 1. Zeta potential (bar) and contact angle measurement (•) of *E. coli* DH5 alpha after associated with chitosan (left) and PLL (right) at different concentrations.

จากรูปที่ 1 จะเห็นได้อย่างชัดเจนว่าค่า Zeta potential ของพอลิเมอร์ทั้งสองชนิดมีประจุบวก แต่เมื่อนำมาสร้างโครงข่ายกับเชื้อแบคทีเรีย ค่าความเป็นประจุบวกได้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ จนเข้าใกล้ศูนย์ในบางความเข้มข้นของพอลิเมอร์ กล่าวคือความเป็นประจุหายไปเกือบทั้งหมด ส่วนค่า contact angle ที่แสดงถึงความเป็น hydrophobicity นั้น ก็เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่สูงขึ้นของไคโตซาน แต่กลับลดลงเมื่อ PLL มีความเข้มข้นมากขึ้น ค่าความแตกต่างที่ได้น่าจะมาจากโครงสร้าง backbone ที่แตกต่างกัน เพราะไคโตซานเป็น polysaccharide ซึ่งมีความเป็น hydrophobicity ของ backbone สูงกว่า PLL ที่ backbone เป็น polypeptide การเปลี่ยนแปลงทั้งประจุและความเป็น hydrophobicity ของเชื้อแบคทีเรียหลังจากการสร้างโครงข่ายกับพอลิเมอร์ นับเป็นปัจจัยสำคัญที่นำเชื้อแบคทีเรียไปเกาะอยู่บนพื้นผิวของหยดน้ำมันในระบบอิมัลชัน

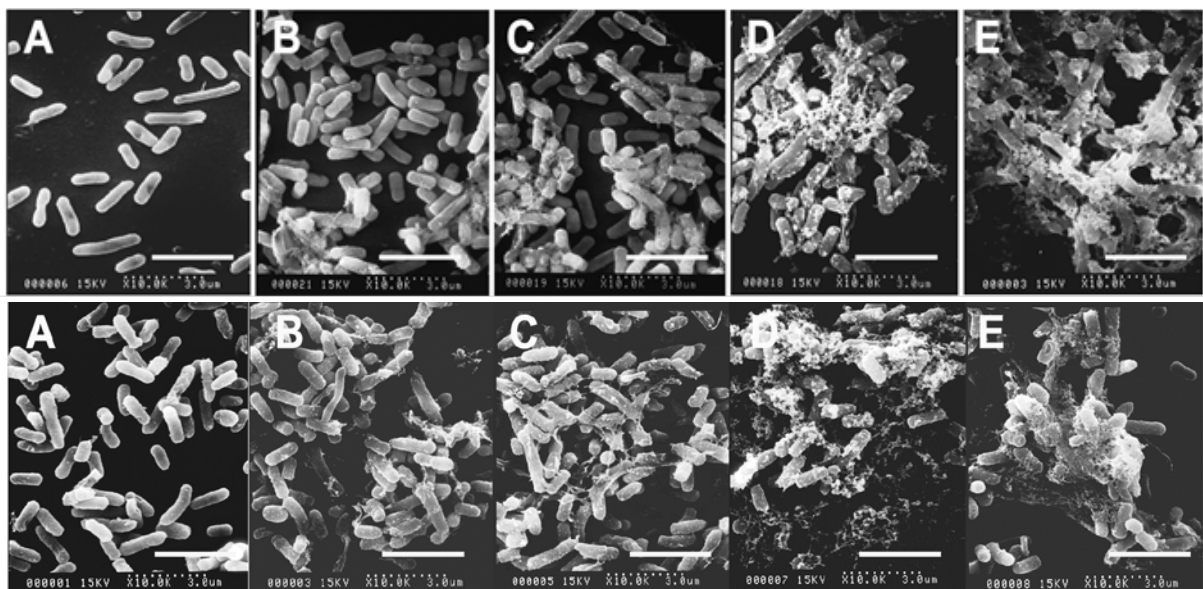


Figure 2. (above) SEM images of *E. coli* DH5 alpha after network formation with chitosan at concentration of 0 (A), 0.75 (B), 7.5 (C), 75 (D) and 750 mg/L (E). (below) SEM images of *E. coli* DH5 alpha after network formation with PLL at concentration of 0 (A), 25 (B), 100 (C), 200 (D), and 250 mg/L (E).

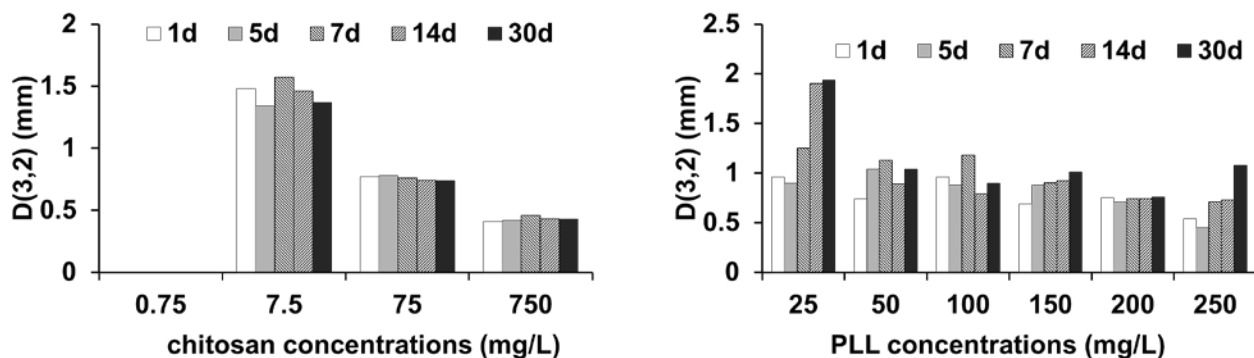


Figure 3. Droplet size (surface average diameter : D(3,2)) of bacteria interface Pickering emulsion consisted of *E. coli* DH5 alpha and chitosan (left) and PLL (right) at different cationic polymer concentrations in different storage days at 25°C.

รูปที่ 2 แสดงให้เห็นว่าพอลิเมอร์ทั้งสองชนิดที่นำมาใช้ ได้สร้างระบบโครงข่ายร่างแหกับเชื้อแบคทีเรีย โดยเชื้อแบคทีเรียถูกร่างแหจับแน่นมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของพอลิเมอร์สูงมากขึ้น เมื่อเติมวัฏภาคน้ำมันในสัดส่วน 1 : 1 กับวัฏภาคน้ำ แล้วทำการเขย่าอย่างรุนแรง จะได้อิมัลชันสีขาวขุ่น เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ดูจะพบหยดน้ำมันเล็กๆ ซึ่งได้ทำการวัดขนาดโดยการคำนวณจาก surface-average diameter, D(3,2) ดังรูปที่ 3 พบว่าเมื่อ PLL มีความเข้มข้นต่ำการเกิด coalescence จะเห็นได้ชัดเจนเนื่องจากขนาดของหยดน้ำมันใหญ่ขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป แต่ที่ความเข้มข้นในสัดส่วนที่สูงขึ้น ขนาดของหยดน้ำมันเปลี่ยนแปลงน้อยลงมากในช่วงเวลาเดียวกัน แสดงว่าอิมัลชันมีความคงตัวสูงกว่ามากเมื่อความเข้มข้นของ PLL มีค่าสูงขึ้น และโคโตะซานให้ความคงตัวของอิมัลชันมากกว่า PLL อย่างเห็นได้ชัด เนื่องจากขนาดของอิมัลชันแทบไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเวลาผ่านไป

วัตถุประสงค์ที่ 2 ความมีชีวิตของเชื้อแบคทีเรียในโครงสร้างอิมัลชัน 3 มิติ

ในการศึกษาความมีชีวิตของเชื้อแบคทีเรียในโครงสร้างของอิมัลชันที่เป็น 3 มิติ ได้ทำการศึกษาโดยใช้ 2 วิธี คือวิธีการทางจุลชีววิทยา คือนำชิ้นของเหลวในอิมัลชันมาทำ dilution แล้ว drop ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง ซึ่งจะได้จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่เป็นอิสระซึ่งอยู่ภายในระบบอิมัลชัน (Figure 4)

อีกวิธีหนึ่งเป็นการหาจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตโดยการดูจากค่า CO₂ ที่เกิดจาก metabolism ของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตภายในระบบ ซึ่งจำเป็นต้องทำการวัดค่า CO₂ ภายในระบบปิดอย่างรัดกุม เนื่องจาก CO₂ มีอยู่ทั่วไปในอากาศ และมีแหล่งกำเนิดอยู่ทั่วไป และหลากหลาย ดังนั้นในการศึกษาความมีชีวิตของเชื้อแบคทีเรียในโครงสร้างอิมัลชัน 3 มิติในช่วงแรกนี้ มีการทดลองวัดค่า CO₂ ในระบบปิดด้วยวิธีการที่แตกต่างกัน 4 วิธีเพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมที่สุดที่จะสามารถประเมินความมีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ภายในหลอดแก้วได้ โดยวิธีการที่นำมาใช้

ทั้ง 4 วิธีคือ gas chromatography, conductivity measurement, CO₂ gas sensor และ acid-base titration (Figure 5).

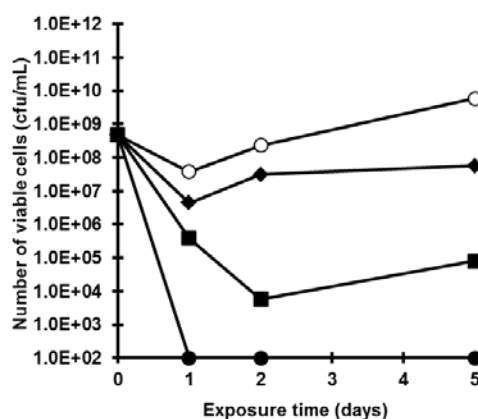


Figure 4. Bacterial cell viability of *E. coli* DH5 alpha in the bacteria interface emulsion system consisted of chitosan at the concentration of 0 (○), 0.75 (◆), 75 (■) และ 750 (●) mg/L. The C-14, n-tetradecane, were used as an oil phase.

ในระบบที่เชื้อจุลินทรีย์เป็น *E. coli* ปริมาณไคโตซานที่น้อยกว่า 75 mg/L ยังมีเชื้อที่มีชีวิตที่มากกว่า 10^4 cfu/mL แต่ในระบบที่เป็นเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ไม่มีเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตเหลือรอดภายในระบบเลยซึ่งแสดงว่าไคโตซานมีความเป็นพิษต่อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 มากกว่า *E. coli* DH5 alpha

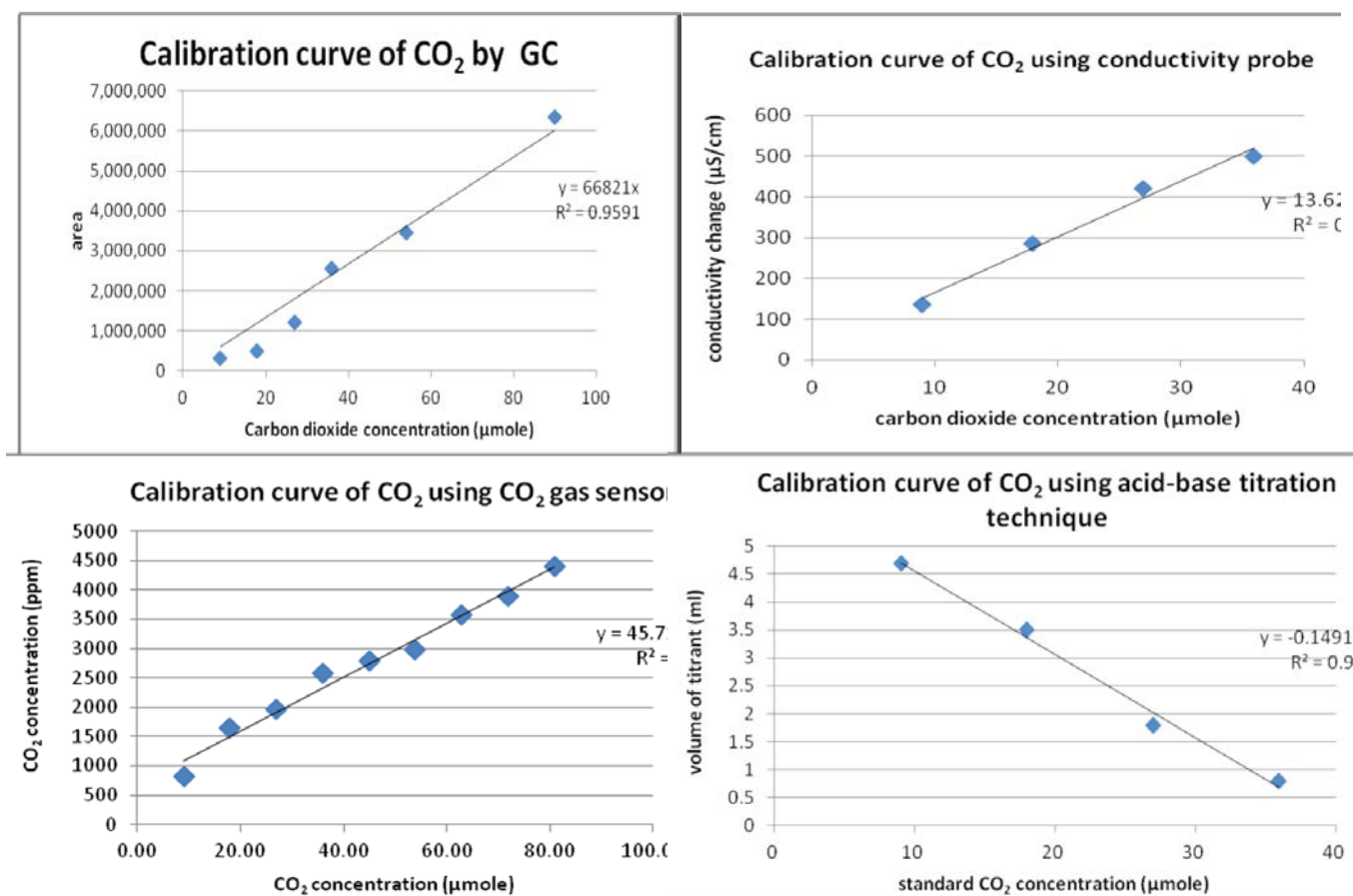


Figure 5. Calibration curve of carbon dioxide when accessed by gas chromatography (above left), conductivity (above right), gas sensor (below left) and acid-base titration (below right).

จากการสังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่า เชื้อแบคทีเรียในระบบอีมีลชันสามารถแบ่งได้ออกเป็น 3 กลุ่มคือ

1. เชื้อแบคทีเรียที่เป็นอิสระ
2. เชื้อแบคทีเรียที่บางส่วนถูกตรึงอยู่บนผิวของหยดน้ำมัน และยังมีชีวิต
3. เชื้อแบคทีเรียที่ถูกตรึงด้วยไคโตซานและอยู่บนหยดน้ำมันทั้งตัว ไม่มีการเคลื่อนไหว

คาดว่าจะไม่มีชีวิตแล้ว

การทำ drop dilution technique ดังในรูปที่ 4 สามารถบอกได้ถึงปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่มีชีวิตในกลุ่มที่ 1 แต่ในการทำ bioconversion หรือ bioremediation นั้น แบคทีเรียในกลุ่มที่ 2 น่าจะมีส่วนสำคัญมากกว่า ดังนั้นการวิเคราะห์หาค่า metabolic CO₂ น่าจะทำให้สามารถบอกได้ถึงปริมาณเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มที่ 2 ด้วย ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงพยายามหาวิธีที่เหมาะสมในการหาความเปลี่ยนแปลงของปริมาณ CO₂ ภายในหลอดแก้วความจุ

ประมาณ 3 mL ดังผลการทดลองที่แสดงในรูปที่ 5 ซึ่งจะนำทั้ง 4 วิธีไปลองหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อแบคทีเรียในหลอดแก้ว และปริมาณ CO₂ ที่เปลี่ยนไปจากการหายใจของเชื้อแบคทีเรีย การตรวจวิเคราะห์หาการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ CO₂ ที่เกิดจาก metabolism ของเชื้อแบคทีเรียนี้ เป็นการวิเคราะห์ที่ต้องการความละเอียดสูงมาก จาก 4 วิธีในข้างต้นที่นำมาทดสอบ พบว่า CO₂ gas sensor และ acid-base titration มีความไวไม่เพียงพอต่อการตรวจวิเคราะห์หา metabolic CO₂ ที่อยู่ในขวดแก้วระบบปิด ดังนั้นจึงเลือกใช้ gas chromatography และ conductivity measurement ควบคู่ไปกับการทำ viable cell count และได้มีการทดสอบในเชื้อ 2 ชนิดคือ *E. coli* DH5 alpha และ *Pseudomonas putida* F1 (*P. putida* F1) โดยเลือกใช้ oil phase ที่มีความเป็นพิษต่างกัน 4 ชนิดได้แก่ decane, hexane, toluene และ soybean oil

จากการวิเคราะห์ค่า metabolic CO₂ ของเชื้อทั้ง 2 ตัวที่อยู่ในระบบอิมัลชัน พบว่าชนิดของวัสดุภาคน้ำมันส่งผลกระทบโดยตรงต่อความเป็นพิษต่อเชื้อ หรือการมีชีวิตรอดของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองชนิด โดยที่ soybean oil มีความเป็นพิษน้อยที่สุด รองลงมาคือ decane hexane และ toluene มีความเป็นพิษมากที่สุด การวิเคราะห์ด้วย GC (Figure 6a, 7a) และ viable cell count (Figure 6b, 7b) ให้ผลไปในทางเดียวกัน เช่นเดียวกับ conductivity (data not shown) ซึ่งความเป็นพิษต่อเชื้อจุลินทรีย์นี้ เป็นไปตามหลักการทั่วไป ที่ว่า alkane สายยาว เป็นพิษน้อยกว่าสายสั้น และสารที่มีวงแหวนเบนซีนเป็นองค์ประกอบ จะมีความเป็นพิษมากกว่า alkane เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง *P. putida* F1 และ *E. coli* DH5 alpha พบว่า *P. putida* F1 สามารถทนและใช้ carbon source จาก soybean oil ได้สังเกตจากการที่ metabolic CO₂ ที่เพิ่มขึ้นแทนจำนวนเชื้อที่ได้จาก viable cell count ลดลง (Figure 7) ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากการที่ *P. putida* F1 มีเอนไซม์ที่ย่อย lipids และ glycerol ได้นั่นเอง

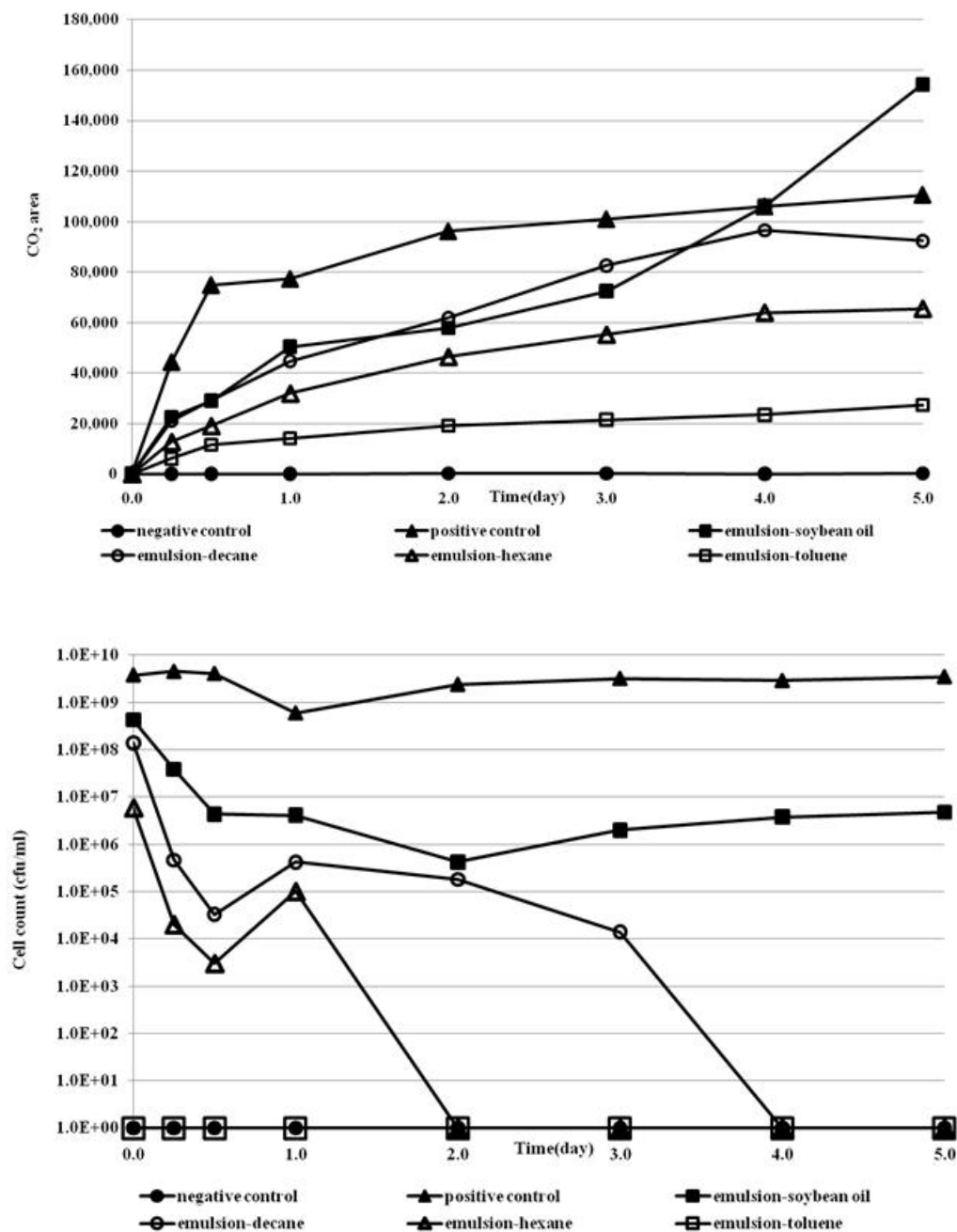


Figure 6. Area of metabolic CO₂ production (upper) and cell viability (lower) obtained from an emulsion prepared using *E. coli* DH5alpha with 4 types of oil phase (soybean oil, decane, hexane and toluene) and positive control (bacterial cell suspension at the same cell concentration of cell added in emulsion) subtracted by area of negative control (abiotic buffer) at each sampling time.

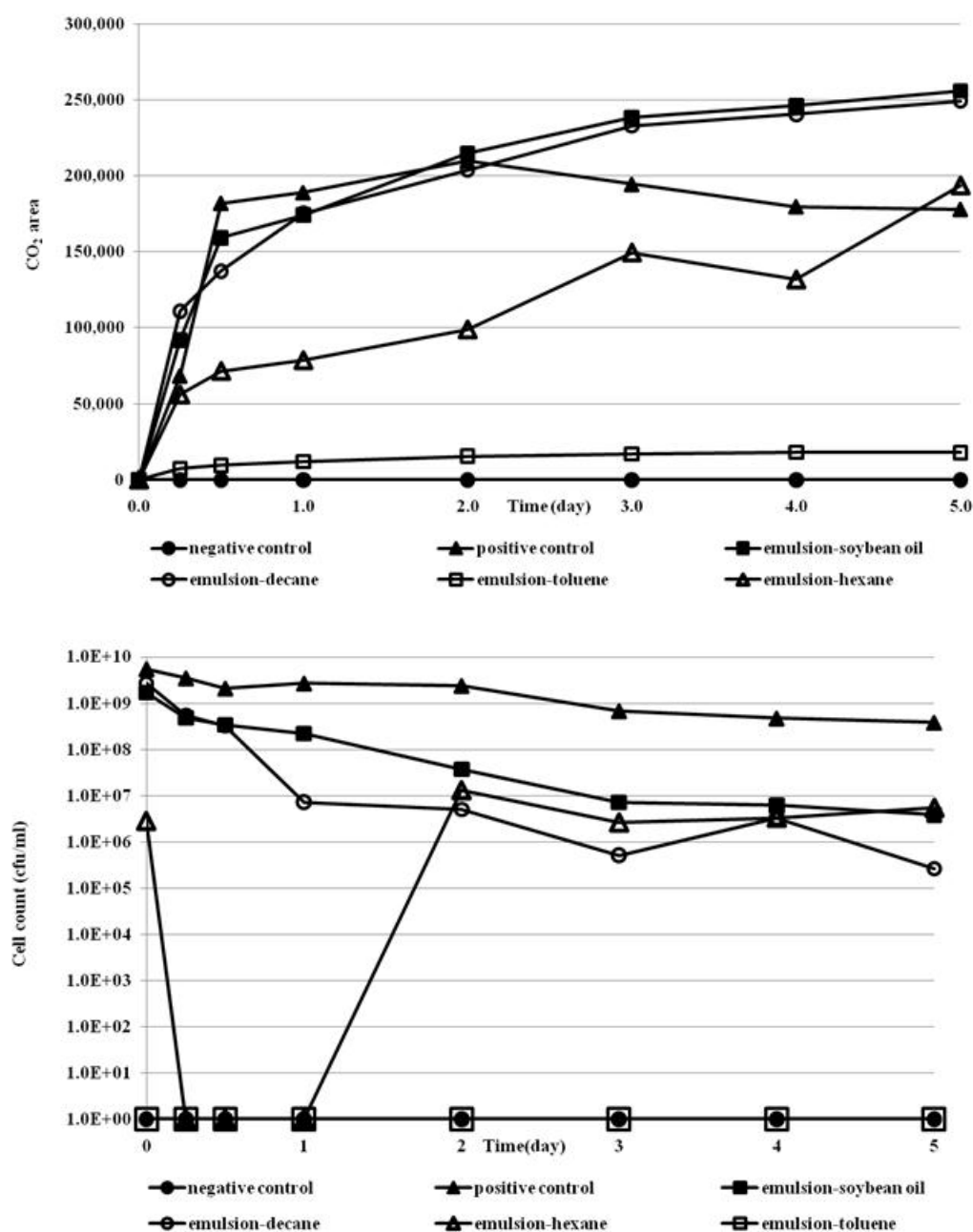


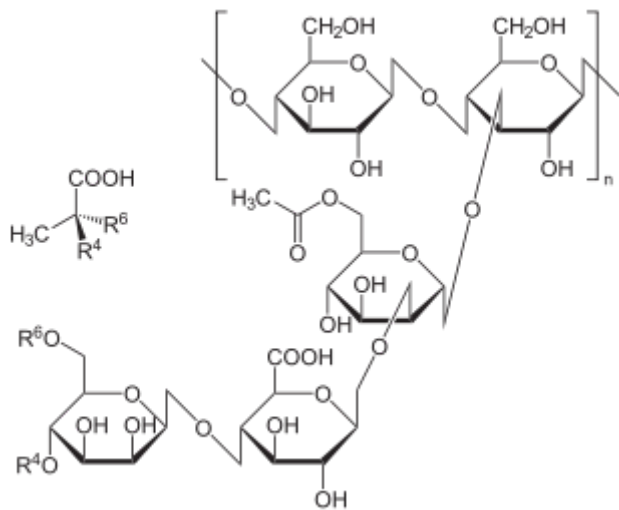
Figure 7. Area of metabolic CO₂ production (upper) and cell viability (lower) obtained from an emulsion prepared using *P. putida* F1 with 4 types of oil phase (soybean oil, decane, hexane and toluene) and positive control (bacterial cell suspension at the same cell concentration of cell added in emulsion) subtracted by area of negative control (abiotic buffer) at each sampling time.

วัตถุประสงค์ที่ 3 ผลกระทบทางกายภาพต่ออิมัลชันที่มีแบคทีเรียและพอลิเมอร์เป็นองค์ประกอบ

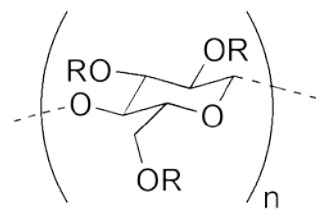
วัตถุประสงค์ที่ 4 เพื่อเพิ่มความคงตัวของอิมัลชันด้วยการเติม stabilizer

จากการที่อิมัลชันที่ได้มีความเสถียรต่ำ ไม่สามารถทนต่อแรง shear ที่เกิดจากการกวนผสมจึงเป็นข้อจำกัดหลักในการนำไปใช้งานในระบบ bioconversion และ bioremediation ดังนั้นจึงมีการเติมสารที่เป็น stabilizer เข้าไปเพื่อเพิ่มความคงตัวของอิมัลชันต่อแรง shear โดยในเบื้องต้นได้ศึกษาโดยใช้เลือกใช้ hydrocolloid ที่มาจากธรรมชาติ 2 ชนิดได้แก่ xanthan gum (XG) และ hydroxypropyl methyl cellulose (HPMC) โดยผสมกับไคโตซานและเชื้อแบคทีเรีย แล้วเติมน้ำมันถั่วเหลือง จากนั้นจึงทำการ Homogenize ที่ 11200 rpm

XG ผลิตขึ้นจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* โดยโครงสร้างเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ คล้ายกับเซลลูโลสดังรูปที่ 8 จากผลการทดลองที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ 0.2% w/v พบว่ามีความเป็นพิษต่อเชื้อแบคทีเรียที่ทำการทดลองคือ *E. coli* DH5 alpha น้อยมาก โดยภายหลังสัมผัสกับ 0.2% w/v XG ภายในระยะเวลาตั้งแต่ 0-2 เดือน ปริมาณเชื้อมีชีวิตที่ลดลงไม่แตกต่างกับ control อย่างมีนัยสำคัญ ส่วน HPMC ก็ให้ผลการทดลองไปในทางเดียวกับ XG คือไม่พบความเป็นพิษต่อ *E. coli* DH5 alpha ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้คือ 1.8% w/v



Xanthan gum (XG)



R = H or CH₃ or CH₂CH(OH)CH₃

Hydroxypropyl methyl cellulose (HPMC)

Figure 8. Chemical structures of Stabilizer used in this research

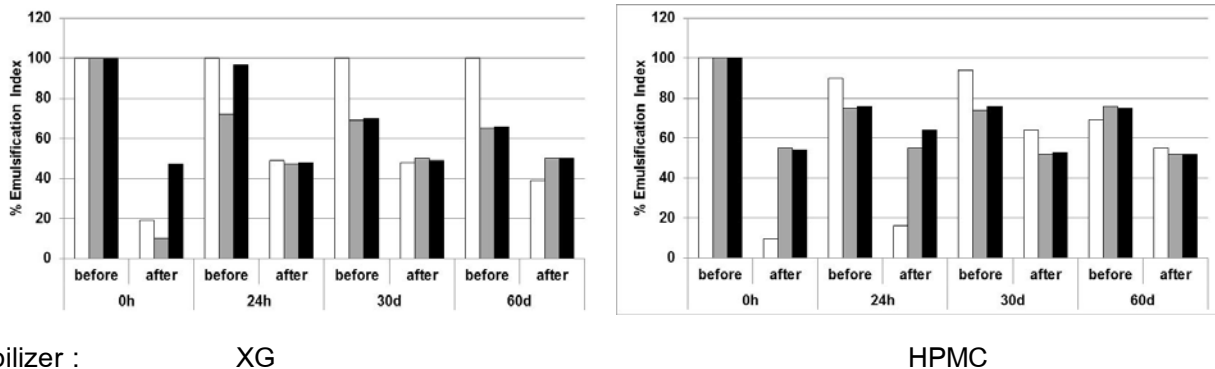
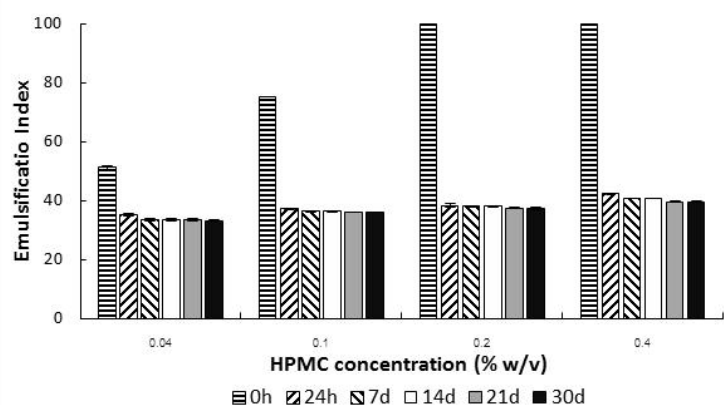


Figure 9. Emulsification index of the emulsion stabilized by sole *E. coli* DH5 alpha and chitosan (white), *E. coli* DH5alpha and chitosan mixed with XG (left) or HPMC (right) at 1:1 v/v (gray) and sole stabilizer (black) before and after centrifugation at 5000 rpm for 10 min at different time of storage at room temperature.

จากรูปที่ 9 เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง stabilizer ที่เลือกใช้พบว่า อิมัลชันที่มี HPMC เป็นองค์ประกอบ จะมีความสามารถในการทนต่อแรงทางกายภาพ ได้ดีกว่า XG ทั้งในระยะยาวคือที่ 60 วัน และในระยะสั้นคือ 24 ชั่วโมงแรกของการเกิดอิมัลชัน ดังนั้น HPMC จึงถูกนำมาศึกษาต่อไป

อนุภาคหรือโมเลกุลที่ใหญ่จะเคลื่อนไหวได้ช้ากว่าอนุภาคหรือโมเลกุลขนาดเล็ก การที่ HPMC สามารถ stabilize หยดน้ำมันได้เป็นเพราะสาย chain ของ HPMC มีทั้งส่วนที่เป็น hydrophobic และ hydrophilic ผสมกัน จึงสามารถทำให้หยดน้ำมันในน้ำเสถียรได้ด้วยกลไก train-loop-trail ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ไม่มีใน hydrocolloids ตัวอื่นๆ แต่โมเลกุลของพอลิเมอร์นี้มีขนาดอยู่ในระดับของสตรอม (10^{-10} m) เมื่อเทียบกับ BCN ซึ่งมีขนาดประมาณไมครอน (10^{-6} m) ซึ่งโมเลกุลของ HPMC เล็กกว่า BCN ประมาณ 10,000 เท่า จึงมีความเป็นไปได้ที่ HPMC จะสามารถ competitive adsorption บน interface ของหยดน้ำมันได้ดีกว่า BCN ดังนั้นจึงได้ลองทำ competitive adsorption ระหว่าง BCN และ HPMC โดยการใส่ stabilizer ทั้งสองตัวพร้อมกันแล้ว homogenize ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 10

Figure 10. EI of emulsions stabilized by BCN (0.05% w/v chitosan) and HPMC at concentration ranged from 0.04 to 0.4% w/v



HPMC ที่ความเข้มข้น 0.04 – 0.4 % w/v สามารถทำให้ emulsion ที่ได้มีความเสถียรไม่แตกต่างกัน (Figure 10) แต่มีข้อสังเกตว่า HPMC อย่างเดียวที่ความเข้มข้น 0.04% w/v ไม่สามารถคงความเสถียรได้ถึง 7 วัน ดังนั้น BCN ก็สามารถช่วยเพิ่มความเสถียรให้กับ HPMC ได้ในทำนองเดียวกัน

ได้ทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ chitosan และ HPMC ที่ถูก adsorp ด้วย UV-vis spectrophotometer ภายใต้สภาวะที่ทำ competitive adsorption กัน ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 11

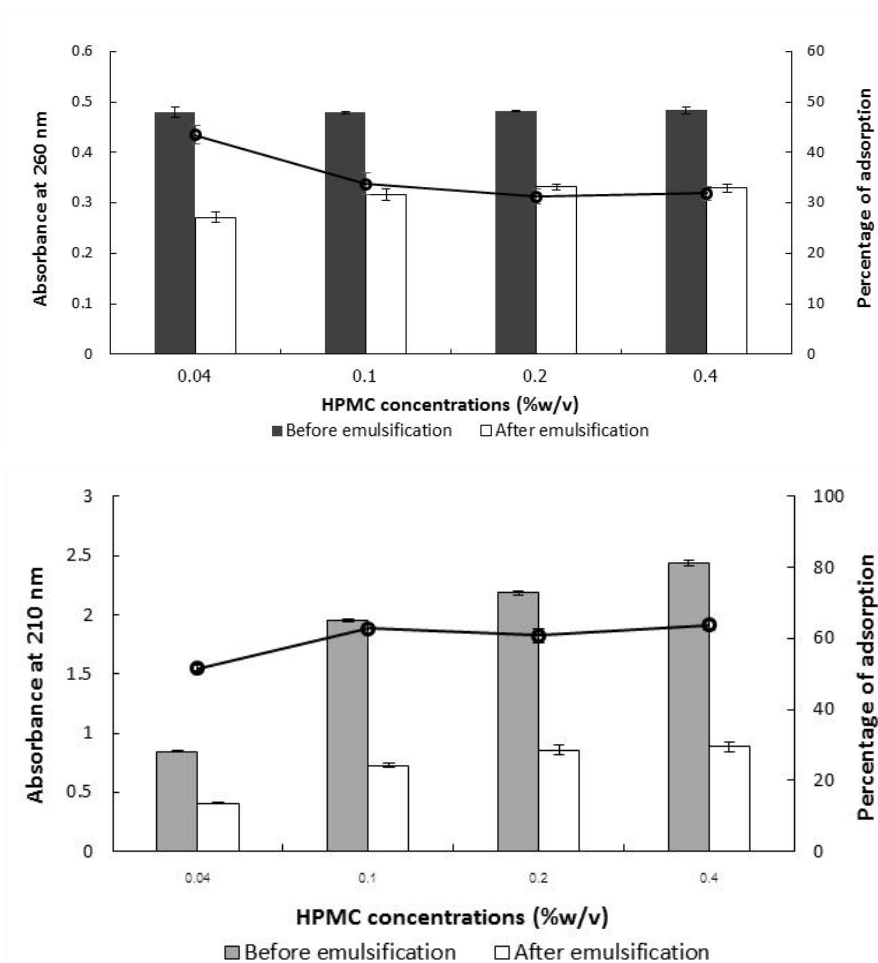


Figure 11. Percentage of chitosan (above) and HPMC (below) adsorption (O) when various concentrations of HPMC was mixed with BCN at chitosan concentration of 0.05% w/v before emulsification using homogenizer. Bar graphs present the UV-absorbance of chitosan at 260 nm (upper) and HPMC at 210 nm (lower), which is correlated well with its concentration, before (gray) and after (white) emulsification.

เมื่อกำหนดความเข้มข้นของโคโตซานและปริมาณเชื้อ *E. coli* DH5 alpha คงที่แล้วเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของ HPMC พบว่า ปริมาณของโคโตซานที่ถูกดูดซับบนพื้นผิวหยดน้ำมันลดลงจาก 43 % (Figure 11 above) ลงมาเป็น 31 % และคงที่ที่ความเข้มข้นของ HPMC เป็น 0.1 -0.4 % w/v ในขณะที่ HPMC ถูกดูดซับบนพื้นผิวมากขึ้น จาก 52 % เป็น 63 % เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ HPMC จาก 0.04% เป็น 0.1% แล้วคงที่

จึงสามารถสรุปได้ว่า competitive adsorption ระหว่าง HPMC และ BCN นี้ HPMC มีแนวโน้มที่จะถูกดูดซับบนพื้นผิวได้มากกว่า BCN เนื่องจากมีขนาดเล็กกว่าประมาณ 10,000 เท่า แต่การจำกัดปริมาณ HPMC ที่ใช้ จะสามารถทำให้ HPMC ช่วยทำให้ BCN-stabilized emulsion มีความเสถียรมากขึ้นได้ ดังแสดงในรูปที่ 9 อย่างชัดเจนว่า HPMC สามารถทำให้ BCN-stabilized emulsion ทนต่อแรง centrifugation ที่ 5000 rpm 10 min ได้มากขึ้น 50%

งานวิจัยได้ดำเนินไปตามแผนที่วางเอาไว้ 100%

หนังสืออ้างอิง

Binks, B. P. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2002**, 7, 21-41

Binks, B. P.; Horozov, T. S. *Colloidal Particles at Liquid Interface*, Cambridge University Press: Cambridge, 2006.

Colville, K. et al. *Langmuir* **2010**, 26, 2639-2644.

Dickinson, E. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2010**, 15, 40-49.

Hamada, T. et al. *J. Biosci. Bioeng.* **2008**, 106, 357-362.

Inoue, A.; Horikoshi, K. *Nature* **1989**, 338, 264-266.

Kalashnikova, I.; Bizot, H.; Cathala, B.; Capron, I. *Langmuir* **2011**, 27, 7471-7479.

Kongpol A. et al. *FEMS Microbiol. Lett.* **2009**, 297, 225-233.

Li, X-F.; Feng, X-Q.; Yang, S.; Fu, G-Q.; Wang, T-P.; Su, Z-X. *Carbohydr. Polym.* **2010**, 79, 493-499.

Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Parker, J. *Brock Biology of Microorganisms*, 10nd Ed.; Pearson Education: Upper Saddle River NJ, 2003.

Pickering, S. U. *J. Chem. Soc.* **1907**, 91, 2001.

Ramsden, W. *Proc. R. Soc.* **1903**, 72, 156.

Rosen, M. J.; Fei, L.; Zhu, Y-P.; Morrall, S. P. *J. Surfactant Deterg.* **1999**, 2, 343-347.

Schoemaker, H. E., Mink, D. & Wubbolts, M. G. *Science* **2003**, 299, 1694-1697.

Snyder, L. & Champness, W. *Molecular Genetics of Bacteria*. 2nd edition (ASM press, 2003)

Tadros, F. T. *Applied Surfactants*. (Wiley-VCH, 2005).

Wongkongkatep J.; Ladadat R.; Lappermpunsap W.; Wongkongkatep P.; Phinyocheep P.; Ojida A.; Hamachi I. *Chem. Letts.* **2010**, 39, 184-185.

Vignati, E.; Piazza, R.; Lockhart, T. P. *Langmuir* **2003**, 19, 6650-6656.

Yamashita, S. et al. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, 74, 761-767.

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

ควรจะเน้นไปที่การนำอีมีลชันที่ได้ไปใช้ประโยชน์จริงมากขึ้น ไม่ว่าจะเป็นการทำ bioconversion หรือ bioremediation หรือการใช้ประโยชน์เพื่อแทนที่ chemical-based emulsifier ต่างๆ เช่นการนำไปห่อหุ้มแผ่นคราบน้ำมัน (oil spills) ในทะเลเพื่อจะเก็บกวาดได้ง่ายและทำให้คราบน้ำมันไม่เกาะติดกับสิ่งมีชีวิตหรือชายหาดต่างๆ เป็นต้น

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

(ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และหน้า) พร้อมแจ้งสถานะของการตีพิมพ์ เช่น submitted, accepted, in press, published

- 1.1 ชื่อผู้แต่ง Archakunakorn S, Charoenrat N, Khamsakhon S, Pongtharangkul T,
Wongkongkatep P, Suphantharika M, Wongkongkatep J.

ชื่อเรื่อง Emulsification efficiency of adsorbed chitosan for bacterial cells accumulation at the oil-water interface

แหล่งพิมพ์ Bioprocess and Biosystems Engineering (Springer)

ปี พ.ศ. (ค.ศ.) 2015

ฉบับที่ 38

หน้า 701-709

สถานะ published

1.2 ชื่อผู้แต่ง Charoenrat N, Pongtharangkul T, Wongkongkatep J

ชื่อเรื่อง Metabolic activity of bacterial cells after exposure to toxic chemicals in biphasic system and in 3D scaffold of bacteria interface emulsion

แหล่งพิมพ์ Biotechnology letters (Springer)

ปี พ.ศ. (ค.ศ.) 2015

สถานะ submitted

1.3 ชื่อผู้แต่ง Hanpanich O, Pongtharangkul T, Wongkongkatep J

ชื่อเรื่อง Altering the physico-chemical characteristics of bacterial cells' surface by chitosan treatment and their performance as an emulsion stabilizer

แหล่งพิมพ์ Bioresources Technology (Elsevier)

ปี พ.ศ. (ค.ศ.) 2015

สถานะ submitted

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)

นักศึกษาระดับปริญญาตรี จำนวน 10 คน

1. น.ส. อรกานต์ หาญพานิช
2. น.ส. นฤมล เลี่ยมนาค
3. น.ส. เจนจิรา สันทาลุนัย
4. น.ส. อัญชดา ลาटनाเลา
5. น.ส. ขนิษฐ จรัสวิมลใส
6. น.ส. ชมภิกา คุณจักร
7. น.ส. จรรยา เล่ห์อ้อม
8. น.ส. ดวงหทัย แก้วอุไร
9. น.ส. นริศรา ชำรงพาณิชย์
10. น.ส. อรพินธ์ ถาวรศิลป์สุรกุล

นักศึกษาระดับปริญญาโท จำนวน 4 คน ดังนี้

1. น.ส. พิชชาภา รัตนบุรี
2. Miss Dorkjand Gunchinbat
3. น.ส. ณัฐภัทร์ เจริญรัตน์
4. นายขจรพงศ์ มานพิเศษเจริญ

3. อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ
การจดสิทธิบัตร)

Presentation

1. Society for Industrial Microbiology and Biotechnology (SIMB) 2013 Annual Meeting and
Exhibition, 11-14 August 2013, San Diego, CA, USA (Poster presentation)

2. TSB International Forum 2014 “Green Bioprocess Engineering”, 16-19 September 2014, Bangkok, Thailand (Poster presentation)
3. The 14th Science Project Exhibition, 14 March 2013, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand (Poster presentation)
4. The 16th Science Project Exhibition, 26 May 2015, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand (Plenary Talk)

ภาคผนวก

Reprint

ชื่อผู้แต่ง	Archakunakorn S, Charoenrat N, Khamsakhon S, Pongtharangkul T, Wongkongkatep P, Supphantharika M, Wongkongkatep J.
ชื่อเรื่อง	Emulsification efficiency of adsorbed chitosan for bacterial cells accumulation at the oil-water interface
แหล่งพิมพ์	Bioprocess and Biosystems Engineering (Springer)
ปี พ.ศ. (ค.ศ.)	2015
ฉบับที่	38
หน้า	701-709