บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถผลิตได้จากสิ่งมีชีวิตหลายชนิดไม่ว่าจะเป็นสาร saponin จากพืช หรือ สาร surfactin จากแบคทีเรีย แม้กระทั่งในร่างกายมนุษย์ เช่น เกลือน้ำดี สำหรับข้อได้เปรียบในการผลิตสารลดแรงตึงผิว ด้วยวิธีการทางชีวภาพ เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตด้วยสารเคมี พบว่า จะมีความเป็นพิษต่ำ มีความสามารถในการปรับสภาวะให้เหมาะสมต่อการย่อยสลายสารชีวภาพโดยจุลินทรีย์ได้ดี ไม่มีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม เกิดฟองได้ดี มีความจำเพาะสูง และทนต่อสภาวะที่จำกัดได้ดี เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรด ด่าง และความเค็ม เป็นต้น

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ แบ่งตามลักษณะโครงสร้างของสารที่แตกต่างกันได้หลายกลุ่ม คือ ไกลโคลิปิด (glycolipid) ลิโพโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) ลิโปเปปไทด์ (lipopeptide) ฟอสโฟลิปิด (phospholipid) กรดไขมันและไขมัน (Fatty acid และ neutral lipid) โดยจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้แตกต่างกันไป เช่น *Serratia liquefaciens* MG1 (Lindum *et al*., 1998), *Norcadia* sp. L-417 (Kim *et al*., 2000), *Pseudomonas aeruginosa* (Al-Tahhan *et al*., 2000) และ แบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp. เช่น *Bacillus licheniformis* (Lin *et al.,* 1998) และ *Bacillus subtilis* (Makkar and Cameotra, 1998 ; Cooper *et al.,* 1981) ซึ่งแบคทีเรียในกลุ่มของ *Bacillus* sp. จะผลิตสารลดแรงตึงผิวที่อยู่ในกลุ่มลิโปเปปไทด์เป็นส่วนใหญ่ สารในกลุ่มนี้นอกจากจะลดแรงตึงผิวได้แล้วยังมีสมบัติเป็นสารต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial)

ปัจจุบันมีผู้สนใจศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากจุลินทรีย์กันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากมีความหลากหลาย ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม สามารถผลิตได้ด้วยกระบวนการหมักซึ่งจะให้ผลผลิตในปริมาณสูง และเหมาะกับการผลิตในขนาดใหญ่ (Kim *et al.,* 2000) มีการประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวในอุตสาหกรรมต่างๆได้มากมาย ตัวอย่างเช่น ใช้เก็บเกี่ยวน้ำมันดิบ ใช้เป็นตัวเร่งการย่อยสลายน้ำมัน ใช้กำจัดแมลงหรือวัชพืชในทางการเกษตร (Rosenberg and Ron, 1999) นอกจากนี้ยังมีการใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมเครื่องสำอางและเภสัชกรรม อีกด้วย (Lang, 2002) ในการศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นการแยก และการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* MUV4 และการใช้ประโยชน์เพื่อการประยุกต์ใช้ในโอกาสต่อไป

ตรวจเอกสาร

1. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพส่วนใหญ่เป็นสารที่ผลิตได้โดยจุลินทรีย์และมีสมบัติของการเป็นสารลดแรงตึงผิว (surface active agent) หรือสารที่ทำให้เกิดอิมัลชั่น (emulsifying agent) พบว่าแบคทีเรีย ยีสต์ และรา สามารถผลิตสารที่มีสมบัติดังกล่าวได้ ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจัดเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งจุลินทรีย์เริ่มสร้างขึ้นเมื่อเข้าสู่ระยะ stationary (Lin, 1996 ; Ron and Rosenberg, 2002)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ประกอบด้วย 2 ส่วนที่สำคัญ คือ ส่วนที่ชอบน้ำ และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ ส่วนที่ชอบน้ำ จะมีทั้งที่เป็นประจุ (ionic) และไร้ประจุ (non-ionic) และประกอบไปด้วยหมู่ของโมโน (mono-), ไค (di-) หรือโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide), หมู่คาร์บอกซิลิก, กรดอะมิโน และ เปปไทด์ ในขณะที่ส่วนที่ไม่ชอบน้ำ จะเป็นกรดไขมันทั้งชนิดอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว และกรดไขมันแอลกอฮอล์ (Lang, 2002)

สมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สำคัญคือ สามารถลดค่าแรงตึงผิวของสารละลายได้ พบว่า สามารถลดค่าแรงตึงผิวของน้ำกลั่นจาก 72 mN/m ให้เหลือประมาณ 27 mN/m ค่า interfacial tension จะมีค่าต่ำกว่า 1 mN/m และมีผลให้ค่า critical micelle concentration (CMC) เพิ่มสูงขึ้น (Cooper *et al*., 1981)

นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถเพิ่มการเกิดอิมัลชั่น และเพิ่มความสามารถในการละลายของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ดังนั้นจึงช่วยให้จุลินทรีย์สามารถใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนเพื่อการเจริญได้ง่ายขึ้น (Lin, 1996)

2. ประเภทของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

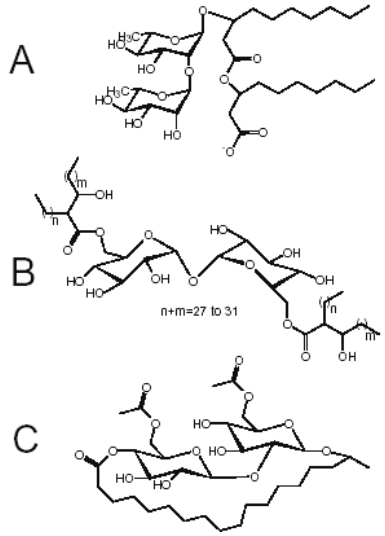
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพแบ่งเป็น 4 กลุ่มตามลักษณะองค์ประกอบ ได้แก่

2.1 ไกลโคลิปิด (glycolipids) เป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีคาร์โบไฮเดรตและลิปิดเป็นองค์ประกอบ โดยการเชื่อมหมู่อีเทอร์และเอสเทอร์ สารลดแรงตึงผิวไกลโคลิปิดที่พบได้เป็นส่วนใหญ่เป็น rhamnolipid, trehalolipid และ trisaccharide และ sophorolipids (ภาพที่ 1) ซึ่งกลุ่มไกลโคลิปิดนี้จะเกี่ยวข้องกับการรับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีความเป็นขั้วต่ำโดยจุลินทรีย์ (Bognolo, 1999)

2.2 ฟอสโฟลิปิด กรดไขมัน และ นิวทรัลลิปิด ฟอสโฟลิปิดมีพันธะเอสเทอร์เกิดขึ้นระหว่างหมู่แอลกอฮอล์ของลิปิดและฟอสเฟต (ภาพที่ 2) และมีอยู่ในจุลินทรีย์ทุกชนิด แต่มีการสร้างออกมานอกเซลล์เพียงเล็กน้อย สามารถพบได้จาก *Corynebacterium lepus* กรดไขมัน และนิวทรัลลิปิด ตัวอย่างเช่น ustilagic acid, corymomycolic acid, lipotheichoic acid และ hydrophobic protein

2.3 สารลดแรงตึงผิวชนิดโพลีเมอร์ เป็นสารที่เกิดขึ้นจากการรวมตัวของหน่วย saccharide และหน่วยของกรดไขมัน และมีลักษณะเป็นโพลีเมอร์ในธรรมชาติ ตัวอย่างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มนี้ คือ emulsan, alasan เป็นต้น

2.4 ลิโปเปปไทด์ และ ลิโปโปรตีน สารในกลุ่มนี้จะมีไขมันจับอยู่กับสายโพลีเปปไทด์ เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงสุด นอกจากนี้ยังมีสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ จุลินทรีย์สำคัญที่ผลิตสารในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Bacillus subtilis* (Lang, 2002) ซึ่งผลิต surfactin และ ornithine-containing lipid จาก *Thiobacillus thiooxidans* (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 1 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มไกลโคลิปิด

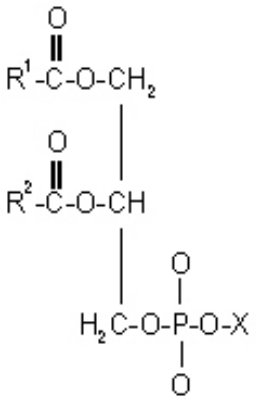
Figure 1. Structure of glycolipid biosurfactants.

A. rhamnolipid จาก *Pseudomonas aeruginosa*

B. trehaloselipid จาก *Rhodococcus erythropolis*

C. sophorolipid จาก *Torulopsis bombicola*

ที่มา : Rosenberg (1986)



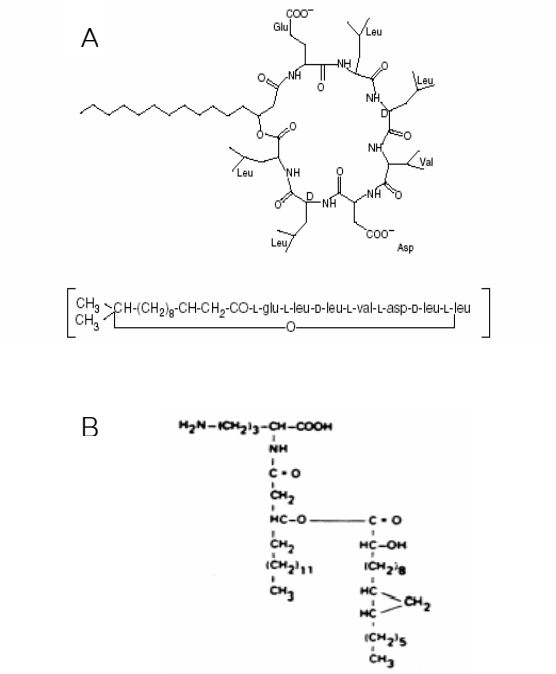
ภาพที่ 2 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวในกลุ่มฟอสโฟลิปิด

Figure 2. Structure of phospholipid biosurfactants.

R^1 และ R^2 เป็นหมู่ alkyl

X เป็น hydrogen, ethylamine, inositol

ที่มา : ดัดแปลงจาก Bognolo (1999)



ภาพที่ 3 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มลิโปเปปไทด์

Figure 3. Structure of lipopeptide biosurfactants.

A. Surfactin จาก *Bacillus subtilis*

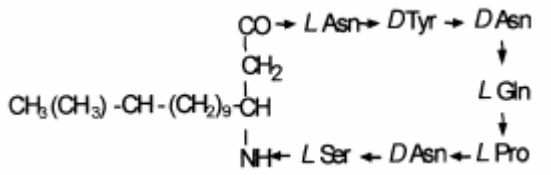
B. Ornithine-containing lipid จาก *Thiobacillus thiooxidans*

ที่มา : ดัดแปลงจาก Bognolo (1999) ; Christofi และ Ivshina (2002)

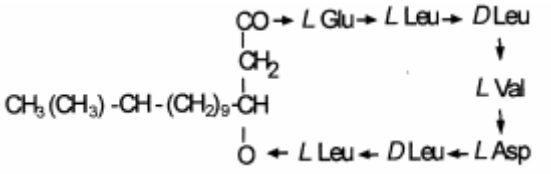
สารในกลุ่มลิโปเปปไทด์ มีหลายชนิดด้วยกัน คือ fengycin, iturin A และ surfactin ซึ่งจะแตกต่างกันที่โครงสร้างและสมบัติ กล่าวคือ fengycin มีกรดอะมิโน 10 โมเลกุลต่อกันเป็นวงมี 14-18 คาร์บอนอะตอม iturin A ประกอบด้วย กรดอะมิโนชนิดเบต้า 7 โมเลกุล ต่อกันเป็นวงและมีโมเลกุลของกรดไขมัน 14-17 คาร์บอนอะตอม สารในกลุ่ม iturin A (ภาพที่ 4a) ได้แก่ bacillomycin D, bacillomycin F, bacillomycin L และ mycosubtilin ซึ่งสังเคราะห์ได้ โดย *B. subtilis* (Besson *et al*.,1992) ทั้ง fengycin และ iturin A มีสมบัติในการเป็นสารต้านเชื้อราด้วย (Lang , 2002)

ส่วน surfactin มี กรดอะมิโนชนิดแอลฟา 7 โมเลกุล คือ L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-Leu และ β - hydroxyl fatty acid ที่มีคาร์บอน 13-15 อะตอม (ภาพที่ 4b) สาร surfactin สามารถลดแรงตึงผิวของน้ำกลั่นให้ลงเหลือ 27 mN m^{-1} และลดแรงตึงผิวของ น้ำ/n – hexadecane จาก 43 mN m^{-1} ให้มีค่าเหลือน้อยกว่า 1 mN m^{-1}

a.



b.



ภาพที่ 4 โครงสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดลิโปเปปไทด์

Figure 4. Structure of lipopeptide biosurfactants.

(a) iturin A

(b) surfactin

ที่มา : Ahimou และคณะ (2000)

นอกจากนี้ยังจำแนกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพตามน้ำหนักโมเลกุลได้เป็น 2 กลุ่มดังนี้คือ (Ron and Rosenberg, 2001)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพน้ำหนักโมเลกุลต่ำ หน้าที่หลักของสารในกลุ่มนี้คือ การลดแรงตึงผิวและแรงตึงระหว่างผิว (interfacial tension) ที่สำคัญได้แก่ไกลโคลิปิด เช่น rhamnolipid, trehalolipid และ sophorolipid เป็นสารพวก disaccharides ซึ่งถูก acylate ด้วย long chain fatty acid หรือ hydroxy fatty acid และลิโปเปปไทด์

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพน้ำหนักโมเลกุลสูง หน้าที่หลักของสารในกลุ่มนี้เกี่ยวข้องกับความคงตัวของสารอิมัลชั่น ทำให้แบคทีเรียสามารถติดอยู่กับพื้นผิวที่เป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ได้ดีขึ้น ซึ่งนำไปสู่ความสามารถของแบคทีเรียในการย่อยสลายสารชีวภาพได้ สารลดแรงตึงผิวที่อยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ โพลีแซคคาไรด์ โปรตีน ลิโพโพลีแซคคาไรด์ ลิโปโปรตีนหรือสารละลายเชิงซ้อน จากการรวมตัวของสารโพลีเมอร์ชีวภาพ ดังกล่าว

3. สมบัติและหน้าที่ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีองค์ประกอบและโครงสร้างทางเคมีแตกต่างกันแล้ว เช่น ไกลโคลิปิด ฟอสโฟลิปิด กรดไขมัน และ นิวทรัลลิปิด สารลดแรงตึงผิวชนิดโพลีเมอร์ ลิโปโปรตีน และ ลิโปเปปไทด์ ทำให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพแต่ละกลุ่มมีสมบัติและหน้าที่ที่หลากหลายและแตกต่างกัน

3.1 สมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ การวัดค่าแรงตึงผิวเป็นวิธีการเบื้องต้น สำหรับการวัดกิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิว โดยที่น้ำหมักจากการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นจะมีค่าแรงตึงผิวน้อยลงเมื่อเข้าสู่ระยะ stationary phase อย่างไรก็ตามการเปรียบเทียบผลของกิจกรรมการลดแรงตึงผิวค่อนข้างยาก ทั้งนี้เนื่องจากจากความแตกต่างของเชื้อจุลินทรีย์และสภาวะการเลี้ยงที่แตกต่างกัน ทั้งชนิดและความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ พีเอช การให้อากาศ เป็นต้น (Bognolo, 1999)

กิจกรรมการเป็นสารลดแรงตึงระหว่างผิวนั้น ขึ้นอยู่กับ องค์ประกอบของเกลือในส่วนของ aqueous phase ตัวอย่างเช่น สารไกลโคลิปิด จาก *Torulopsis apicola* ไม่สามารถลดค่าแรงตึงระหว่างผิวได้เมื่อมีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในปริมาณสูง ในขณะที่น้ำหมักจากการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus liceniformis* JF-2 สามารถลดค่าแรงตึงระหว่างผิวได้ เมื่อมีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 10%(w/v) ซึ่งให้ค่าที่ดีกว่าการเติมเกลือแคลเซียม (McInerney *et al*., 1990 อ้างโดย Lin, 1996)

3.2 หน้าที่ทางกายภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพส่วนใหญ่นั้นเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งมีสมบัติที่สำคัญต่อการอยู่รอดของจุลินทรีย์ที่ผลิตทั้งการนำสารเข้าสู่เซลล์หรือการปฏิสัมพันธ์กันระหว่างจุลินทรีย์และผู้ให้อาศัย (microbe-host interaction) หรือการเป็น biocide ซึ่งหน้าที่ดังกล่าวนั้นเกี่ยวข้องกับการเป็นสาร amphipathic ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

การที่จุลินทรีย์ผลิตสารลดแรงตึงผิวออกมาจะทำให้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนมีการสลายเพิ่มขึ้น และมีการเกิดอิมัลชั่นเพิ่มขึ้น เพิ่มการละลายของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ทำให้จุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตบนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ง่าย โดยการลดแรงตึงผิวรอบๆ บริเวณเซลล์ กระบวนการนำสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเข้าสู่เซลล์นั้นโดยการทำให้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนเกิดเป็น droplet หรืออิมัลชั่น ซึ่งสามารถละลายได้ในน้ำ ดังนั้น จุลินทรีย์จึงนำสารเข้าสู่เซลล์และกระบวนการเกิดเมทาบอลิซึมได้ง่ายขึ้น

นอกจากนี้กระบวนการหรือหน้าที่ทางกายภาพอื่นๆของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ คือ การมีสมบัติของการเป็นสาร antibiotic ต่อเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ ได้แก่ ยีสต์ แบคทีเรีย และเชื้อรา (Fiechter, 1992)

4. แบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus*

แบคทีเรียตระกูล *Bacillus* sp. มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยเฉพาะอย่างยิ่งสารในกลุ่มลิโปเปปไทด์ ซึ่ง Arima และคณะ (1968) พบว่า *Bacillus subtilis* ที่เลี้ยงในอาหาร nutrient broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถผลิตสารซึ่งมีสมบัติในการเป็นสารลดแรงตึงผิวได้ในน้ำหมัก เรียกว่า surfactin ประมาณ 0.1 กรัมต่อลิตร และยังมีสมบัติในการเป็นสารยับยั้งการเกิด fibrin clot และมีผลให้เกิดการแตกของ erythrocytes, spheroplasts และ protoplast ของแบคทีเรีย มี surfactin เป็น macrolide lipopeptide สามารถลดค่าแรงตึงผิวของน้ำจาก 72 mN/m เป็น 27 mN/m ได้

เชื้อ *Bacillus subtilis* MUV4 เป็นสายพันธุ์กลายของ *Bacillus* KUBA 8601 ที่ผ่านการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต *Bacillus subtilis* MUV4 มีรูปร่างเป็นแท่ง ปลายมน ขนาด 0.5 x 2.0-3.0 μm และเคลื่อนที่โดยใช้ peritrichous flagella สามารถผลิตสารปฏิชีวนะในกลุ่มของ macrolactin ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Aeromonas hydrophila, Bacillus anthracis* และ *Salmonella* sp. ได้ (อรัญ หันพงศ์กิตติกูล, 2537) ต่อมา Prommachan (2002) ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวจาก *Bacillus subtilis* MUV4 พบว่าสามารถผลิตสารลิโปเปปไทด์ได้ปริมาณ 0.8 g/L ในอาหาร Mckeen Medium

Ahimou และคณะ (2000) ได้ทำการศึกษาแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* ทั้งหมด 7 สายพันธุ์ คือ ATCC 7058, ATCC 12432, ATCC 12695, ATCC 15129, ATCC 15476, ATCC 15561 และ ATCC 15811 ในอาหารที่มี กลูโคส 20 กรัมต่อลิตร พบว่าจุลินทรีย์ทั้ง 7 สายพันธุ์ ดังกล่าวสามารถผลิตสารลิโปเปปไทด์ ได้อย่างน้อย 1 ชนิด ดังตารางที่ 1 และสามารถแบ่งกลุ่มจุลินทรีย์ออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่สามารถผลิตได้ทั้ง surfactin, iturin A และ fengycin ได้แก่ สายพันธุ์ ATCC 12695 และ ATCC 15129 กลุ่มที่สามารถผลิตได้เฉพาะ surfactin และ iturin A ได้แก่ ATCC 12432 และ ATCC 15811 และกลุ่มที่สามารถผลิตได้เฉพาะ iturin A เท่านั้น ได้แก่ ATCC 7058, ATCC 15476 และ ATCC 15561

ตารางที่ 1 ชนิดของลิโปเปปไทด์ที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis*

Table 1. Type of lipopeptide produced by *Bacillus subtilis.*

B. subtilis strains	Lipopeptides		
	Surfactin	Iturin A	Fengycin
ATCC 7058	-	+	-
ATCC 12432	+	+	-
ATCC 12695	+	+	+
ATCC 15129	+	+	+
ATCC 15476	-	+	-
ATCC 15561	-	+	-
ATCC 15811	+	+	-

ที่มา : Ahimou และคณะ (2000)

นอกจากนี้ยังมีการผลิตสารลิโปเปปไทด์ชนิดอื่นๆ อีก เช่น lichenysin หรือ halobacillin จาก *Bacillus licheniformis* (Javaheri *et al*., 1985 ; Jenny *et al*., 1991 ; Lin *et al*., 1994 ; Yakimov *et al*., 1995 ; Batrakov *et al*., 2003)

สาร lichenysin มีโครงสร้างที่คล้ายกับ surfactin แตกต่างกันที่ตำแหน่งที่ 1 ของกรดอะมิโนที่มี L-glutamine แทนที่ L-glutamate ของ surfactin สาร lichenysin มีสมบัติของสารลดแรงตึงผิวที่แรงกว่าสาร surfactin และเป็นสาร chelating agent

สารกลุ่ม iturin A สามารถผลิตได้จาก *B. subtilis* เช่นกันและมีสมบัติเป็นสารต้านจุลินทรีย์ ในกลุ่มนี้ได้แก่ bacillomycin D, bacillomycin F, bacillomycin L และ mycosubtilin ตัวอย่างเช่น การผลิต bacillomycin L c15 จาก *B. subtilis* NT02 บนอาหาร L-glutamate rich media (Akpa *et al*., 2001 อ้างโดย Lang, 2002)

การค้นพบสารลิโปเปปไทด์ชนิดใหม่ๆ จากการผลิตโดย *Bacillus* sp. ยังคงได้รับการศึกษาอย่างต่อเนื่องดังเช่น *Bacillus circulans* J2154 ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในน้ำหมัก คือ circulocin ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี (He *et al*., 2001)

Bacillus amyloliquefaciens มีความสามารถในการผลิต iturin A ซึ่งมีสมบัติเป็นสาร biocontrol agent ที่ยับยั้งเชื้อ *Rhizoctonia solani* และเชื้อราในพืชชนิดอื่นๆ (Yu *et al*., 2002)

นอกจากนี้การปรับปรุงสายพันธุ์ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. เพื่อให้มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้มีปริมาณสูงขึ้น มีด้วยกันหลายวิธีด้วยกันไม่ว่าจะเป็นวิธีทางกายภาพ เคมี หรือวิธีทางพันธุวิศวกรรม

วิธีทางกายภาพ เช่น การใช้รังสีอัลตราไวโอเลตเพื่อทำให้เกิดสายพันธุ์กลายของ *B. subtilis* ATCC 21332 โดยวิธี protoplast fusion ได้สายพันธุ์กลายคือ *B. subtilis* Suf-1 ที่มีการกลายพันธุ์ระหว่างตำแหน่ง *arg*C4 และ *his*A1 พบว่า Suf-1 สามารถเพิ่มการผลิตสาร surfactin ได้ 1124 มิลลิกรัม ซึ่งมีปริมาณสูงกว่าสายพันธุ์ ATCC 21332 ถึง 3 เท่า (328 mg) (Mulligan *et al*.,1989)

วิธีการทางเคมี Lin และคณะ (1998) ศึกษาผลของ N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) ต่อการกลายพันธุ์ของ *B. licheniformis* JF-2 ATCC 39307 เมื่อใช้ MNNG ความเข้มข้น 0.1 mg/mL และบ่มไว้ที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที พบว่ามีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เป็น 10% เกิดเป็นเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ คือ *B. licheniformis* KGL11 ที่มีความสามารถในการผลิตสารลิโปเปปไทด์ได้ปริมาณสูงสุดคือ 391 mg/L ซึ่งมีค่ามากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมถึง 12 เท่า

วิธีทางพันธุวิศวกรรม Nakayama และคณะ (1997) ได้นำพลาสมิด pC115 ซึ่งมียีน *lpa-14* ที่สามารถผลิตสาร surfactin และ iturin ได้โคลนเข้ากับ *B. subtilis* RB14-C และย้ายเข้าสู่ *B. subtilis* MI113 ซึ่งไม่สามารถผลิต surfactin ได้ เกิดเป็นสายพันธุ์ลูกผสมคือ *B. subtilis* MI113 (pC115) ซึ่งมีความสามารถในการผลิตสาร surfactin ได้สูงขึ้นเช่นกัน

5. การผลิตสารลิโปเปปไทด์

การผลิตสารลิโปเปปไทด์โดยวิธีการหมักนั้นมีทั้งแบบการหมักในอาหารแข็ง (solid state fermentation) และอาหารเหลว (submerged fermentation)

5.1 การผลิตในอาหารแข็ง (Solid state fermentation) Ohno และคณะ (1995) ได้นำยีน *lpa-14* ที่ควบคุมการผลิตสาร surfactin และ iturin A ที่ได้จาก *B. subtilis* RB14 เข้าสู่ plasmid pC112 และ transform เข้าสู่ *B. subtilis* MI113 เกิดเป็นสายพันธุ์กลายที่สามารถผลิต surfactin และ iturin A ได้เรียกว่า *B. subtilis* MI113 (pC112) และนำมาเลี้ยงบนอาหารแข็งคือกากถั่วเหลือง ซึ่งเป็นส่วนที่เหลือจากการทำน้ำนมถั่วเหลือง มีลักษณะที่เรียกว่า soybean curd มีองค์ประกอบที่ไม่ละลายน้ำค่อนข้างสูง ประกอบด้วย (%) คาร์บอน 46.34, ไฮโดรเจน 6.95, ไนโตรเจน 3.99, ซัลเฟอร์ 0.25 และเถ้า 3.59 และมีการเติมสารอาหารอื่นๆ อีกได้แก่ กลูโคส, KH_2PO_4, $MgSO_4$ เพื่อให้เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อมีการปรับความชื้นที่เปอร์เซ็นต์ต่างๆ พบว่า ความชื้นที่เหมาะสมต่อการผลิต surfactin ของ MI113 (pC112) คือ 82% ที่ 37 องศาเซลเซียส ที่ให้ปริมาณ surfactin สูงสุดที่ 2.0 กรัมต่อกิโลกรัมเปียก ซึ่งมีค่าสูงกว่าเชื้อ *B. subtilis* RB14 ถึง 8 เท่า การผลิตสาร surfactin บนกากถั่วเหลือง จะเป็นสารแบบทุติยภูมิ คือ เชื้อจะมีการเจริญสูงสุดที่ 24 ชั่วโมง ขณะที่การผลิต surfactin สูงสุดที่ 48 ชั่วโมง

5.2 การผลิตในอาหารเหลว (submerged fermentation) การผลิตสารลดแรงตึงผิว ซึ่งอาจมีการเลี้ยงแบบกะหรือแบบต่อเนื่อง ซึ่งการเลี้ยงแบบต่อเนื่องนั้นจะเป็นการผลิตในระดับใหญ่ (large-scale) เพื่อเป็นการเพิ่มผลผลิต

Cooper และคณะ (1981) ได้ทำการทดลองเลี้ยง *B. subtilis* ATCC 21332 ในถังหมักขนาด 28 ลิตร ที่มีปริมาตรอาหาร 20 ลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm ไม่มีการกำจัดฟองออกระหว่างการทดลอง พบว่าในน้ำหมักมีการผลิต surfactin ปริมาณน้อยมาก ต่อมาจึงเปลี่ยนขนาดของถังหมักเป็น 14 ลิตร มีปริมาตรอาหาร 12 ลิตร ซึ่งง่ายต่อการเก็บเกี่ยวฟองที่เกิดขึ้น พบว่าสาร surfactin ที่ผลิตได้ส่วนใหญ่จะอยู่ในส่วนที่เป็นฟองและปริมาณของ surfactin ที่ผลิตได้ด้วยวิธีแบบต่อเนื่องนั้นได้ 0.8 กรัมต่อลิตร ในขณะที่การผลิตแบบกะได้เพียง 0.1 ลิตร

Sandrin และคณะ (1990) พบว่าเชื้อ *B. subtilis* 13 สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองสามารถผลิตสารในกลุ่มลิโปเปปไทด์ ได้ ได้แก่ surfactin และ iturin A โดยสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตของ surfactin และ iturin A สูงสุดคือ *B. subtilis* S499 โดยให้ surfactin 760 mg/L และ iturin A 280 mg/L ใน

อาหาร Landy medium ซึ่งมีองค์ประกอบที่สำคัญคือน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และ L-glutamic acid เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

6. ผลขององค์ประกอบอาหารต่อการผลิต

แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และแร่ธาตุ มีความสำคัญมากในการผลิตสาร surfactin ซึ่งแหล่งคาร์บอนมีทั้งชนิดที่มีสมบัติละลายน้ำและไม่ละลายน้ำ ชนิดที่ละลายน้ำ เช่น กลูโคส ฟรุกโตส ซูโครส กลีเซอรอล เป็นต้น และชนิดที่ไม่ละลายน้ำ ได้แก่ สารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น hexadecane, dodecane, kerosene เป็นต้น ซึ่งแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสาร surfactin นั้นจะแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ สำหรับแหล่งไนโตรเจนมีความสำคัญต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ ซึ่งจะมีความสัมพันธ์กับแหล่งของแร่ธาตุต่อการทำงานของเอนไซม์ (Deshpande *et al*., 1981)

6.1 แหล่งคาร์บอน แหล่งคาร์บอนชนิดที่ละลายน้ำมีผลต่อการผลิตสารลิโปเปปไทด์ได้ดี ได้แก่ น้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ สำหรับการผลิตสาร surfactin โดยใช้จุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* คือ กลูโคส 4% (Cooper *et al*., 1981; Mulligan and Gibbs, 1990; Kim *et al*., 1997; Wei *et al*., 2003), กลูโคส 2% (Sandrin *et al*., 1990; Makkar and Cameotra, 1997) และ กลูโคส 1% เมื่อใช้จุลินทรีย์ *B. licheniformis* (Jenny *et al*., 1991) ซึ่งความเข้มข้นของกลูโคสที่ใช้จะแตกต่างกันขึ้นกับสายพันธุ์ของ *Bacillus* ที่ใช้ รวมทั้งสารอาหารอื่นๆที่เป็นองค์ประกอบอีกด้วย

นอกจากนี้น้ำตาลชนิดอื่นๆที่ละลายน้ำได้ดีก็สามารถผลิตสารลิโปเปปไทด์ได้เช่นกัน เช่น น้ำตาลซูโครส (Sandrin *et al*., 1990 ; Makkar and Cameotra, 1998 ; Roongsawang *et al*., 2003) และน้ำตาลฟรุกโตส (Sandrin *et al*., 1990) เป็นต้น

6.2 แหล่งไนโตรเจน แหล่งไนโตรเจนที่ใช้สำหรับการผลิตสารลิโปเปปไทด์มีความแตกต่างกันไป ขึ้นกับจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิต และธาตุอาหารอื่นๆที่เป็นองค์ประกอบ เช่น แอมโมเนียมไนเตรตและยีสต์สกัด (Roongsawang *et al*., 2003), แอมโมเนียมไบคาร์บอเนต (Kim *et al*., 1997), ยูเรีย, potassium nitrate และ sodium nitrate (Makkar and Cameotra, 1997; Makkar and Cameotra, 1998) นอกจากนี้การเติมกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบสำคัญในสารลิโปเปปไทด์แต่ละชนิดลงไป มีผลให้เกิดการสังเคราะห์สารลิโปเปปไทด์นั้นได้ดียิ่งขึ้น เช่น L-glutamic acid (Sandrin *et al*., 1990), L-alanine (Peypoux *et al*., 1994) มีผลต่อการผลิต surfactin

Prommachan (2002) ศึกษาการผลิตสารลิโปเปปไทด์จาก *Bacillus subtilis* MUV4 โดยศึกษาถึงแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต พบว่า การใช้น้ำตาลกลูโคส 2.5% เป็นแหล่งคาร์บอน และผงชูรส 1.0% และยีสต์สกัด 0.3% เป็นแหล่งไนโตรเจน ในอาหาร Mckeen medium มีผลให้เกิดการเจริญเติบโตของเชื้อสูงขึ้น 1.9 เท่า และทำให้สมบัติของสารลดแรงตึงผิวดีขึ้น โดยให้ค่า ODA สูงขึ้นจากอาหารสูตรเดิมจาก 9.76 ตารางเซนติเมตร เป็น 78.50 ตารางเซนติเมตร และค่า Emulsifying capacity (EC) จาก 0.89% เป็น 5.18%

ตารางที่ 2 แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนและปริมาณสารลิโปเปปไทด์ที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis*

Table 2. Source of carbon, nitrogen and type of lipopepide produced by *Bacillus subtilis*.

Microorganisms	**Carbon Source**	**Nitrogen Source**	**Lipopeptide (g/L)**	**References**
B. subtilis ATCC 21332	4% glucose	1% ammonium nitrate	surfactin (0.8 g/L)	Cooper *et al.,*1981
B. subtilis C9	4% glucose	0.05% yeast extract	surfactin (7 g/L)	Kim *et al.,* 1997
B. subtilis ATCC 21332	4% glucose	4% ammonium nitrate	surfactin (3.5 g/L)	Wei *et al.,* 2003
B. subtilis S 499	2% glucose, fructose	0.5% B-alanine, L-glutamic acid, L-valine, L-lysine	surfactin (0.1 g/L) and iturin A (0.039 g/L)	Sandrin *et al.,* 1990
B. subtilis MTCC 2423	2% sucrose	0.3% urea, potassium nitrate sodium nitrate	surfactin (0.7 g/L)	Makkar and Cameotra, 1997
B. subtilis MUV4	2.5% glucose	1.0% monosodium glutamate, 0.3% yeast extract	lipopeptide (0.8 g/L)	Prommachan, 2002

6.3 แหล่งของแร่ธาตุ แหล่งของแร่ธาตุ สามารถส่งเสริมการผลิตสารในกลุ่มลิโปเปปไทด์โดย *Bacillus subtilis* ดังการทดลองของ Cooper และคณะ (1981) ซึ่งพบว่า เหล็กและแมงกานีส สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสาร surfactin โดย *Bacillus subtilis* ATCC 21332 ได้ โดยมีอัตราส่วนคือ nitrogen : iron : manganese เป็น 920 : 7.7 : 1.0 (molar) (Sheppard and Cooper, 1991)

ต่อมา Wei และคณะ (2003) พบว่า *Bacillus subtilis* ATCC 21332 สามารถผลิตสาร surfactin ได้เพิ่มขึ้นจาก 0.33 กรัมต่อลิตร เป็น 2.6 กรัมต่อลิตร เมื่อเติม แมงกานีส ความเข้มข้น 0.01 mM ซึ่งอธิบายได้ว่าแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* มีการขนส่งเหล็กและแมงกานีส โดยระบบ active transport แมงกานีสมีหน้าที่เป็นโคแฟคเตอร์สำหรับเอนไซม์หลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของไนโตรเจน กลูตาเมต หรือ แอมโมเนีย ที่ถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ glutamine synthetase

ปริมาณของเกลือโซเดียมคลอไรด์ มีผลต่อการผลิตสาร surfactin Makkar และ Cameotra (1998) ทดสอบความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.01-4% พบว่าที่ความเข้มข้น 0.01% ให้ปริมาณสารลดแรงตึงผิวเพิ่มขึ้นเป็น 0.936 กรัมต่อลิตร ในขณะที่เมื่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงขึ้นจะลดความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวได้

7. สมบัติของสารลิโปเปปไทด์

7.1 สมบัติในการละลาย พบว่าสารลิโปเปปไทด์ที่ผลิตได้จาก *Bacillus subtilis* C9 สามารถละลายได้ใน น้ำ ethanol acetone methanol butanol chloroform และ dichloromethane แต่ไม่ละลายใน n-hexane ethyl acetate acetonitrile หรือ petroleum ether (Kim *et al*., 1997)

สารลิโปเปปไทด์ที่ผลิตได้จาก *Bacillus subtilis* MUV4 สามารถละลายได้ใน น้ำ น้ำที่เป็นด่าง methanol ethanol ethyl acetate acetonitrile และ chloroform แต่ไม่ละลายใน n-hexane (Prommachan, 2002)

7.2 สมบัติเกี่ยวกับความคงตัวต่อความเป็นกรด-ด่าง สารลิโปเปปไทด์ ที่ผลิตได้จาก *Bacillus subtilis* MTCC1427 มีความคงตัวต่อความเป็นกรด-ด่างในช่วงกว้าง นั่นคือสามารถลดค่า surface tension ให้มีค่าน้อยลงได้ประมาณ 32 และ 31 mN/m แม้ว่าอยู่ในความเป็นกรด-ด่างที่ต่ำและสูง คือ 3 และ 11 ตามลำดับ และจากการหา critical micelle dilution (CMD) พบว่าผลที่ได้ คือ สารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้สามารถแสดงสมบัติการเป็นสารลดแรงตึงผิวที่ดี แม้ว่ามีการเจือจางน้ำ

หมัก 10 เท่า (CMD^{-1}) และ 100 เท่า (CMD^{-2}) (Makkar and Cameotra, 1998)

การศึกษาของ Prommachan (2002) พบว่าสารลิโปเปปไทด์ที่ตกตะกอนด้วยกรดซึ่งผลิตได้จาก *Bacillus subtilis* MUV4 นั้นมีความคงตัวอยู่ในช่วงความเป็นกรด-ด่าง 6.0-12.0 โดยมีค่า oil displacement area (ODA) และ emulsification capacity (EC) คงเหลือสูงสุดมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์

7.3 สมบัติเกี่ยวกับความคงตัวต่ออุณหภูมิ Makkar และ Cameotra (1998) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *Bacillus subtilis* MTCC1427 พบว่าเมื่อให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลานานสูงสุดคือ 60 นาที สารลดแรงตึงผิวที่ได้ยังคงมีสมบัติของการเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ดี กล่าวคือ สามารถลดค่า surface tension แม้ว่ามีการเจือจางน้ำหมักลง 10 เท่า (CMD^{-1}) และ 100 เท่า (CMD^{-2})

Kim และคณะ (1997) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *B. subtilis* C9 เมื่อเปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ คือ sodium dodecyl sulfate (SDS) และ linear alkylbenzene sulfonate (LAS) ใช้อุณหภูมิในช่วง 20-100 องศาเซลเซียส บ่มที่อุณหภูมิต่างๆเป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และ LAS มีความคงตัวที่ดีในช่วงอุณหภูมิดังกล่าว แต่ SDS มี emulsification activity เริ่มลดลงที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และมีค่ากิจกรรมเหลือเพียง 20 เปอร์เซนต์ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส

Prommachan (2002) พบว่า ผลิตสารลิโปเปปไทด์ที่ผลิตได้จาก *Bacillus subtilis* MUV4 และผ่านการตกตะกอนด้วยกรด เมื่อนำมาบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ส่งผลให้ค่า ODA ลดลงเหลือประมาณ 45 เปอร์เซ็นต์ และค่า EC ลดลงเหลือ 20 เปอร์เซ็นต์

7.4 กิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ พบว่าสารในกลุ่มลิโปเปปไทด์มีสมบัติในการเป็นสารต้านจุลินทรีย์ดังการทดลองของ Yu และคณะ (2002) พบว่า *B. amyloliquefaciens* B94 สามารถผลิตสาร iturin A ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* และเชื้อราก่อโรคในพืชได้

He และคณะ (2001) ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวในกลุ่มลิโปเปปไทด์จาก *Bacillus circulans* J2154 และพบว่าสารที่ผลิตได้นั้นคือสาร circulocins ที่มีสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี รวมถึงแบคทีเรียที่ทนต่อสาร antibiotic เช่น piperacillin-resistant *Streptococci* และ vancomycin-resistant *Enterococci*

Vollenbroich และคณะ (1997) พบว่า สาร surfactin ความเข้มข้น 25 μM ในอาหารที่มี 5% fetal calf serum (FCS) มีผลต่อ envelop ของไวรัสหลายชนิด เช่น Herpes simplex virus (HSV-

1, HSV-2), vesicular stomatitis (VSV) และ suid herpes virus (SHV-1) เป็นต้น ไวรัสประกอบด้วยกรดนิวคลีอิกและโปรตีนห่อหุ้มที่เรียกว่า แคพซิด (capsid) นอกจากนี้ยังมีส่วนที่เรียกว่าเอนเวลโลป (envelop) ซึ่งประกอบด้วย โปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต เมื่อส่วนของ envelop ของไวรัสถูกทำลาย จึงไม่สามารถที่จะเกิดเป็นอนุภาคไวรัสที่สมบูรณ์ จึงมีผลให้ไม่สามารถเกิดการ infection เข้าสู่ host cell ได้

Yakimov และคณะ (1995) ศึกษาเปรียบเทียบสมบัติของการเป็นสารต้านจุลินทรีย์ระหว่าง surfactin และ lichenysin A จาก *B. licheniformis* BAS50 โดยวิธีการวางแผ่น filter paper disk ซึ่งมีสารลดแรงตึงผิวความเข้มข้น 15 μg และสังเกตการเกิด clear zone พบว่า สาร surfactin และ lichenysin A มีผลยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ แต่สาร surfactin มีผลการยับยั้งที่ดีกว่า เนื่องมาจากประจุลบของหมู่คาร์บอกซิลิกของกรดกลูตามิกและกรดแอสปาติกสามารถเกิดการฟอร์มตัวในรูปแบบที่ซับซ้อนกับ phospholipid bilayer ของเซลล์เมมเบรนได้ ในขณะที่สาร lichenysin A มีความเป็นขั้วน้อยกว่า surfactin เนื่องจากการมีกรดอะมิโนกลูตามีนแทนที่ตำแหน่งของกรดกลูตามิก จึงมีผลยับยั้งจุลินทรีย์ได้น้อยกว่า

สำหรับกิจกรรมการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ จากสารลิโปเปปไทด์ที่ผลิตได้จาก *Bacillus subtilis* MUV4 สามารถยับยั้งเชื้อ *Bacillus anthracis, Bacillus subtilis, Shigella* sp. และ *Streptococcus faecalis* ATCC 29212 แต่ไม่ยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa*, *Salmonella* sp. และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Prommachan, 2002)

สารในกลุ่มลิโปเปปไทด์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. subtilis* ที่มีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านจุลชีพได้แก่ iturin A ซึ่งสามารถทำลาย plasma membrane โดยการสร้าง vesicle เล็กๆ และทำให้เกิดการรวมกันของ intramembranous particles และนอกจากนี้ยังปลดปล่อยสาร electrolyte เพื่อทำลายชั้น phospholipids ของแบคทีเรียที่เป็นเชื้อโรค สาร surfactin มีความสามารถในการยับยั้งการเกิด fibrin clot หรือเหนี่ยวนำให้เกิด ion channel ในชั้น lipid bilayer membranes หรือยับยั้งกระบวนการ cyclic adenosine monophosphate (cAMP) เป็นต้น ซึ่งกระบวนการเหล่านี้ทำให้เซลล์ของจุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (Cameotra and Makkar, 2004)

สำหรับวิธีการวัดการเจริญของเซลล์โดยวิธี Alamar blue assay สารที่ใช้ในการทดลองและเป็น indicator ได้แก่ alamar blue หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า resazurin ซึ่งในปกติจะมีสีน้ำเงิน (nonfluorescent) เมื่อถูกรีดิวส์จะให้สารสีชมพู ชื่อ resorufin (highly fluorescent) และหาก resorufin ถูกรีดิวส์ต่อไปจะได้สารชื่อ hydroresorufin เป็นสารไม่มีสี (non fluorescent) ในสภาวะที่เซลล์มีการเจริญเติบโตสาร resazurin จะถูกรีดิวส์ได้มากกว่าเซลล์ที่ไม่มีการเจริญ (O' Brien *et al*., 2000) เพราะมีอัตราส่วนของ NADPH/NADP, FADH/FAD, FMNH/FMN และ NADH/NAD เกิด

มากในขณะที่เซลล์มีการเจริญ สำหรับวิธีการ Alamar blue assay นั้นมีข้อดีคือ รวดเร็ว มีประสิทธิภาพ น่าเชื่อถือได้ ประหยัดเวลา และมี sensitivity สูง

8. การเก็บเกี่ยวและการทำให้บริสุทธิ์สารลิโปเปปไทด์

การเก็บเกี่ยวและการทำให้บริสุทธิ์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากน้ำหมักหรืออาหารเลี้ยงเชื้อ จำเป็นต้องพิจารณาถึงราคา ความคุ้มค่า และความเหมาะสมกับลักษณะงานที่ต้องนำไปใช้ต่อไป เนื่องจากจุลินทรีย์ผลิตสารลดแรงตึงผิวออกมาในความเข้มข้นต่ำและสารมีลักษณะเป็นแบบ amphiphilic ซึ่งเป็นปัญหาที่สำคัญต่อการเก็บเกี่ยวสาร

ขั้นตอนการแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยทั่วไปแล้วจะเกี่ยวข้องกับขั้นตอนเพียง 2 ถึง 3 ขั้น เช่น การแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก โดย การตกตะกอนเซลล์ หรือการหมุนเหวี่ยง การสกัดสารออกจากน้ำหมักด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ และการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟี

8.1 การแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก สารลิโปเปปไทด์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. subtilis* ส่วนใหญ่ รวมทั้ง *Bacillus subtilis* MUV4 (Prommachan, 2002) เป็นสารที่ผลิตออกมานอกเซลล์ วิธีที่เป็นที่นิยมในการแยกตัวเซลล์ออกนั้น คือ การหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็วประมาณ 8,000 ถึง 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำน้ำหมักที่ได้ทำการแยกสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อไป

8.2 การตกตะกอนสารที่จุด isoelectric point (pI) และการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ การตกตะกอนสารลิโปเปปไทด์ ด้วยการปรับความเป็นกรด-ด่างเป็น 2.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก ทำให้สารเกิดการตกตะกอน ปั่นเหวี่ยงเพื่อนำส่วนที่เป็นตะกอนปรับความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.0 ด้วย 2 Mโซเดียมไฮดรอกไซด์ จากนั้นสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์คือ คลอโรฟอร์ม:เมธานอล อัตราส่วน 2:1 โดยปริมาตร และตามด้วยการสกัดด้วยเมธานอลอีกครั้งหนึ่ง (Sandrin *et al*., 1990) หรือสกัดด้วย คลอโรฟอร์ม:เมธานอล อัตราส่วน 65:15 (Makkar and Cameotra, 1998) หรือการทดลองของ Cooper และคณะ (1981) สกัดสารลิโปเปปไทด์ หลังผ่านการตกตะกอนแล้วด้วย dichloromethane และปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.0 จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง และปรับความเป็นกรด-ด่างเป็น 2.0 อีกครั้ง ด้วยกรดไฮโดรคลอริก จากนั้นปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกสารลิโปเปปไทด์

Wei และคณะ (2003) ได้แยกสาร surfactin ด้วยกันปรับความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักให้มีค่าต่ำกว่า 5 สกัดด้วย dimethyl sulfoxide และระเหยสารสกัดออก ล้างด้วยน้ำกลั่นและระเหยอีกครั้ง ได้ตะกอนของสาร จากนั้นละลายด้วยเอธานอล และกรองด้วยกระดาษกรองเพื่อกำจัดสาร

ปนเปื้อนที่ไม่ละลายออกไป และทำการระเหยสารเอธานอลและน้ำออกด้วยเครื่อง evaporator และ vacuum drying ที่ 50 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ตามลำดับ

8.3 วิธีการกรองแบบอัลตรา (ultrafiltration) เป็นวิธีที่ใช้สำหรับการทำให้สารมีความเข้มข้นและบริสุทธิ์ขึ้น นับว่าเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากในการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้โดยอาศัย molecular weight cut off (MWCO) ของเมมเบรน ดังเช่น การใช้เมมเบรนที่มี MWCO 30 kDa เพื่อใช้ในการเก็บเกี่ยวสาร surfactin จาก *B. subtilis* ส่วนที่เป็น permeate จะถูกเก็บและเติมเมธานอล 50%โดยปริมาตร ทำให้ได้ผลผลิต surfactin สุดท้ายได้ 95%

Mulligan และ Gibbs (1990) ศึกษาการแยกสาร surfactin ด้วยวิธีการกรองแบบอัลตราโดยการใช้เมมเบรนคือ เมมเบรน XM 50 และใช้ความดัน 172 กิโลปาสคาลในการแยก เมมเบรน XM 50 สามารถเก็บเกี่ยวสาร surfactin ได้ 98.2% มีค่า purification factor 9.8 และส่วนของ permeate ที่ได้นั้นสามารถลดค่า surface tension ของน้ำหมักได้ถึง 31.9 mN/m

8.4 Thin layer chromatography (TLC) ใช้ในการตรวจสอบองค์ประกอบขั้นต้นของสาร แผ่น TLC ส่วนใหญ่มักเคลือบด้วย alumina หรือ silica gel โดยทั่วไปการแยกสารลิโปเปปไทด์นิยมแยกบนแผ่น TLC ชนิด silica gel plate สำหรับตัวทำละลายเคลื่อนที่ที่ใช้เช่น คลอโรฟอร์ม:เมธานอล:กรดอะซิติก:น้ำ อัตราส่วน 25:15:4:2 โดยปริมาตร (Cooper *et al*., 1981), คลอโรฟอร์ม:เมธานอล:น้ำ อัตราส่วน 65:25:4 โดยปริมาตร (Kowall *et al*., 1998) หรือ คลอโรฟอร์ม:เมธานอล:น้ำ อัตราส่วน 65:15:1 โดยปริมาตร และตรวจสอบองค์ประกอบหยาบ เช่น กรดอะมิโนโดยการสเปรย์ด้วย ninhydrin (Makkar and Cameotra, 1997)

8.5 การใช้โครมาโตกราฟีแบบดูดซับ (Adsorption chromatography) ขั้นตอนต่อมาที่ใช้ในการทำสารให้บริสุทธิ์คือ การใช้โครมาโตกราฟีแบบดูดซับบนซิลิกาเจล โดยอาศัยความแตกต่างของความมีขั้วของสารละลายเป็นตัวแยก ซิลิกาเจลเป็นสารที่มีขั้ว และจับกับสารที่มีขั้วไว้ จากนั้นชะด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำก่อน เพื่อแยกสารที่มีขั้วต่ำออกไปก่อน และค่อยๆเพิ่มความเป็นขั้วของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้เป็นตัวชะ เพื่อชะสารที่มีขั้วมากออกมา ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้คือ สำหรับตัวดูดซับที่เป็นซิลิกาเจล คือ คลอโรฟอร์ม อะซิโตน คลอโรฟอร์ม:เมธานอล (2:1) และเมธานอล ตามลำดับ (Jenny *et al*., 1991; Kim *et al*., 1997)

8.6 การใช้โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (Ion exchange chromatography) การใช้โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ ที่มีตัวแลกเปลี่ยนประจุคือ DEAE-Sepharose ซึ่งเป็นตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ (anion exchanger) ในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl 0.01 โมลาร์ พีเอช 7.0 ซึ่งมีเอธานอล 20%โดยปริมาตร และชะแบบเกรเดียนท์โดยใช้โซเดียมคลอไรด์ 0-1 โมลาร์ พบว่ามีเพียง 1 fraction ที่มีสมบัติของการเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ดี และลดค่า surface tension ได้ดี ซึ่งสารที่แยกได้นั้นอยู่ในกลุ่มของสาร iturin (Jenny *et al*.,1991)

8.7 การแยกด้วยวิธี High pressure liquid chromatography (HPLC) เพื่อให้มีความบริสุทธิ์สูงขึ้นวิธีที่นิยมใช้คือ High pressure liquid chromatography (HPLC) แบบรีเวอร์ส (reverse phase HPLC) ซึ่งคอลัมน์ที่นิยมใช้เพื่อแยกสาร surfactin คือ C_{18} column เป็น stationary phase ที่ไม่มีขั้ว (non polar) และใช้ mobile phase ที่มีขั้วเป็นตัวชะ เช่น acetonitrile:10%TFA (70:30 โดยปริมาตร) (Kim *et al.,* 1997) หรือ acetonitrile:H_2O:TFA (Ahimou *et al.,* 2000) หรือ 3.8 mM TFA:acetonitrile (1:4 โดยปริมาตร) (Wei *et al*., 2003) เมื่อเปรียบเทียบลักษณะโครมาโทแกรมที่ได้มีจำนวน peak ที่ได้เท่ากันกับสาร surfactin มาตรฐาน

9. การประยุกต์ใช้สารลิโปเปปไทด์

สารลิโปเปปไทด์เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถย่อยสลายได้และมีความเป็นพิษต่ำ จึงไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ปัจจุบันจึงมีผู้สนใจที่จะนำสาร surfactin มาประยุกต์ใช้ในงานด้านสิ่งแวดล้อมมากขึ้น เช่น การกำจัดสารไฮโดรคาร์บอน การกำจัดโลหะหนัก การเก็บเกี่ยวน้ำมัน และการบำบัดสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน เป็นต้น

9.1 การกำจัดสารไฮโดรคาร์บอน การย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน หรือสารประกอบ xenobiotic แม้กระทั่งสารประกอบโลหะต่างๆ นิยมใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมากกว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์เพราะว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความจำเพาะ ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม สามารถย่อยสลายได้และมีความเสถียรมากกว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ (Healy *et al*., 1996)

สารประกอบไฮโดรคาร์บอนส่วนใหญ่เป็นสารที่ละลายน้ำได้น้อย โดยเฉพาะอย่างยิ่งสาร polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) โดยจะมีการดูดซับต่อพื้นผิวค่อนข้างสูงซึ่งจำกัดการเจริญหรือการทำงานของจุลินทรีย์ จึงก่อให้เกิดปัญหาต่อพื้นที่ที่เกิดการปนเปื้อน การใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการกำจัดสารประกอบไฮโดรคาร์บอนนั้น จะช่วยให้สารที่จับอยู่บนพื้นผิวนั้นหลุดออกหรือเพิ่มการละลายน้ำให้มากขึ้นจึงเป็นการเพิ่มการเจริญเติบโตและการย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนของจุลินทรีย์ได้มากขึ้น

การเพิ่มความสามารถในการย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนด้วยการเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพซึ่งผลิตได้จาก *B. subtilis* O9 คือ surfactin พบว่าเมื่อใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในความเข้มข้นต่ำจะไม่มีผลต่อการย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอน และไม่มีการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ในขณะที่ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สูงขึ้นนั้นจะส่งผลให้มีการเจริญของเซลล์และสามารถย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนสายยาว (aliphatic hydrocarbon) ได้เพิ่มขึ้นจาก 20.9% เป็น 35.5% และสามารถย่อยสลายสารอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (aromatic hydrocarbon) จาก 0% เป็น 41% เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองซึ่งไม่มีการเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลงไป (Moran *et al*., 2000)

9.2 การกำจัดโลหะหนัก การกำจัดโลหะหนักที่ปนเปื้อนในดิน ทำได้โดยการใช้ตัวจับโลหะ (metal chelators) เช่น Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) ซึ่งจะทำหน้าที่จับกับโลหะในดิน อย่างไรก็ตาม EDTA ไม่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ และจัดเป็นสารพิษ (Frazer, 2000) การใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อกำจัดโลหะหนักจึงเป็นแนวทางในการแก้ปัญหาได้ ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะช่วยให้สารอินทรีย์และโลหะที่ปนเปื้อนหลุดออกจากการจับตัวกับดิน เมื่อสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความเข้มข้นสูงจะเกิดการรวมตัวเป็นไมเซลล์ และใช้ส่วนหัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทประจุลบในการจับกับโลหะหนักที่มีประจุบวกได้ และเกิดพันธะไอออนิก

Mulligan และคณะ (2001) ศึกษาสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 3 ชนิด คือ surfactin จาก *B.subtilis*, rhamnolipid จาก *Pseudomonas aeruginosa* และ sophorolipid จาก *Torulopsis bombicola* เพื่อใช้กำจัดสารพวกโลหะหนัก คือ ทองแดงและสังกะสี ความเข้มข้น 110 และ 3300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ พบว่าสาร surfactin สามารถกำจัดทองแดงได้ 15% และกำจัดสังกะสีได้ 6% ซึ่งมีประสิทธิภาพน้อยกว่าสาร rhamnolipid ซึ่งสามารถกำจัดทองแดงได้ 65% และกำจัดสังกะสีได้ 18% สำหรับ sophorolipid กำจัดทองแดงได้ 25% และกำจัดสังกะสีได้ 60%

ต่อมาได้มีการพัฒนาวิธีการที่จะกำจัดสารโลหะหนักโดยการใช้วิธีที่เรียกว่า sortive floatation ซึ่งมี 2 ขั้นตอน กล่าวคือ ใช้ตัวดูดซับ goethite เพื่อดูดซับโลหะหนักในขั้นตอนที่หนึ่ง และตามด้วยขั้นตอนการลอย (floatation) ตัวดูดซับดังกล่าว โดยใช้สาร surfactin-105 และ lichenysin A ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถกำจัดสารโลหะหนักจาก 90% ลดลงเป็น 70% สำหรับการกำจัดโครเมียม (Cr(VI)) นั้นสามารถเพิ่มความสามารถในการกำจัดได้ประมาณ 50-95% (Zouboulis *et al*., 2003)

9.3 การเก็บเกี่ยวน้ำมัน น้ำมันที่เหลืออยู่ในถังเก็บน้ำมัน สามารถเก็บเกี่ยวออกมาใช้ประโยชน์ได้โดยการใช้เทคโนโลยีที่เรียกว่า microbially-enhanced oil recovery (MEOR) ซึ่งเป็นเทคโนโลยีที่สำคัญ เป็นการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ หรือสารเมทาบอไลท์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น น้ำมันที่หลงเหลืออยู่ในถังเก็บน้ำมันมีความหนืดสูง และแรงตึงระหว่างผิวของชั้นน้ำและน้ำมันสูง ส่งผลให้มีการเคลื่อนที่ต่ำ การเก็บเกี่ยวน้ำมันส่วนที่เหลือต้องใช้เทคนิคทั้งทางกายภาพและเคมี เช่น pressurization, waterflooding หรือ steaming หรือการใช้สารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ขึ้นทางเคมี ซึ่งเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม มีราคาแพง และอาจมีการปล่อยสารอื่นที่ไม่ต้องการและยากต่อการกำจัดเพิ่มขึ้นอีก ในกระบวนการ bioremediation นั้นมีการศึกษาการกำจัดองค์ประกอบของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยใช้สารลดแรงตึงผิวเป็นตัวชะล้าง การปนเปื้อนของน้ำมันดิบในดินยากต่อการกำจัดออก แต่สารลดแรงตึงผิวสามารถลดแรงตึงระหว่างผิวของน้ำมันและพื้นผิวของดินหรือทรายได้ ทำให้เกิดการชะน้ำมันที่ปนเปื้อนออกมาได้

กระบวนการสำคัญที่ช่วยให้สารลดแรงตึงผิวสามารถกำจัดน้ำมันที่ปนเปื้อนในดินได้มี 2 กระบวนการ คือ mobilization mechanism เกิดขึ้นเมื่อใช้สารลดแรงตึงผิวที่ความเข้มข้นต่ำกว่าค่า CMC โดยสารลดแรงตึงผิวสามารถลดค่าแรงตึงผิวและแรงตึงระหว่างผิว ลดค่า capillary force และค่า contact angle ระหว่าง air/water, oil/water และ soil/water ได้ เนื่องจากกระบวนการ mobilization จะเกิดขึ้นได้ขึ้นอยู่กับประจุของสารลดแรงตึงผิว ดังนั้น เมื่อสารลดแรงตึงผิวดูดซับบนดินอาจทำให้สูญเสียความสามารถในการชะน้ำมันปนเปื้อนออกจากดินได้ อีกกระบวนการคือ solubilization mechanism การละลายของน้ำมันเพิ่มขึ้นได้เนื่องจาก การเกิดเป็นไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิว โดยส่วนที่เป็น hydrophobic ของสารลดแรงตึงผิวจะจับกับส่วนที่เป็นน้ำมันและส่วนที่เป็น hydrophilic จะหันออกไปยัง aqueous phase ซึ่งอยู่ด้านนอก ทำให้เกิดลักษณะที่เป็นไมเซลล์หรือเกิดการละลายมากขึ้น (Urum and Pekdemir, 2004)

สำหรับการกำจัดน้ำมันดิบออกจากดินที่ปนเปื้อน ด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังไม่มีรายงานดังเช่นการกำจัดองค์ประกอบของสาร petroleum hydrocarbon ทั้งนี้เนื่องจากน้ำมันดิบมีองค์ประกอบที่ซับซ้อน ซึ่งบางอนุพันธ์อาจยังคงมีสมบัติทางกายภาพและเคมีอยู่ ซึ่งอาจจะแตกต่างจากสารเพียงหนึ่งหรือสององค์ประกอบของสาร petroleum hydrocarbon (Urum and Pekdemir, 2004) การใช้วิธี MEOR ในระดับห้องปฏิบัติการ โดยการใช้ sand-pack columns และเติมเชื้อ *B. subtilis* ลงไป พบว่ามีน้ำมันปล่อยออกมา 35% เมื่อเปรียบเทียบการชุดควบคุมที่มี nutrient solution สามารถปล่อยน้ำมันออกมา 21% (Banat, 1995)

9.4 การบำบัดสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน Banat (1993) นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *Bacillus subtilis* AB-2 ช่วยในการละลายและกำจัดน้ำมันที่ปนเปื้อนในดินโดยวิธี sand-packed column โดยการเปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์คือ 0.1%SDS, 1%spolene และ 1%petroleum sulfonate พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ AB-2 สามารถกำจัดน้ำมันได้สูงถึง 95% ซึ่งมีปริมาณสูงที่สุด

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาวิธีการสกัดและแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* MUV4
2. ศึกษาวิธีการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน (partial purification) และสมบัติเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ
3. ศึกษาการประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่แยกได้

ขอบเขตงานวิจัย

ทำการเพาะเลี้ยง *B. subtilis* MUV4 แล้วนำไปสกัดและแยกสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้ หลังจากนั้นจึงนำไปทำให้บริสุทธิ์บางส่วน และศึกษาสมบัติเบื้องต้น และการประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวที่แยกได้