ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตและการประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus* MUV4
ผู้เขียน นางสาวอรอนงค์ พรหมจรรย์
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2545

บทคัดย่อ

จากการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus* MUV4 ในอาหาร Mckeen medium (พีเอช 7.0) มีกลูโคส 2.0 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้สูงสุดที่เวลา 48 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ มีค่าการเจริญเริ่มต้นเท่ากับ 5.78 (OD_{660}) ค่า oil displacement area (ODA) และ emulsification capacity (EC) เท่ากับ 9.76 ตารางเซนติเมตร และ 0.89 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ กลูโคส 2.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เมื่อเปรียบเทียบการใช้แหล่งไนโตรเจนต่างๆ (0.5 เปอร์เซ็นต์) พบว่า กรดกลูตามิค (L-glutamic acid) และผงชูรส ให้ค่า ODA และ EC ปริมาณสูง แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจึงใช้ผงชูรสความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ในการศึกษาต่อไป การเติมยีสต์สกัด 0.3 เปอร์เซ็นต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้การเจริญ ค่า ODA, emulsification activity (EA) และ EC เพิ่มขึ้น การเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เหมาะสมซึ่งประกอบด้วยกลูโคส 2.5 เปอร์เซ็นต์ ผงชูรส 1.0 เปอร์เซ็นต์และยีสต์สกัด 0.3 เปอร์เซ็นต์ ทำให้การเจริญและค่า ODA, EA และ EC สูงขึ้น(78.50 ตารางเซนติเมตร, 81.82 เปอร์เซ็นต์ และ 5.18 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) เปรียบเทียบผลการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอาหารสูตรพื้นฐานและสูตรเหมาะสมที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า การเจริญเพิ่มขึ้น 1.9 เท่า ค่า ODA และ EC เพิ่มขึ้น 8.0 และ 5.8 เท่า ตามลำดับ การไม่ควบคุมพีเอชระหว่างการเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ให้ค่า ODA, EA และ EC สูงกว่าสภาวะการควบคุมพีเอชเป็น 7.0 การเพิ่มอัตราการให้อากาศจาก 0 ถึง 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ที่อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที ทำให้การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงขึ้น การทำให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพบริสุทธิ์บางส่วน โดยการตกตะกอนน้ำหมักจากการเลี้ยงเชื้อที่ 60 ชั่วโมง ด้วยกรดไฮโดรคลอริค 6 นอร์มอล ทำให้เป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2.0 นอร์มอล จนได้พีเอช 7.0 จากนั้นทำให้แห้งจะได้ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 0.8 กรัมต่อลิตร สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ตกตะกอนด้วยกรดนี้ละลายได้ในน้ำ, น้ำที่เป็นด่าง, เมทานอล, เอทานอล, เอธิลอะซิเตต, อะซิโตไนไตร, อะซิโตนและคลอโรฟอร์ม แต่ไม่ละลายในเฮกเซน พีเอชมีผลต่อค่า ODA และ EC มากกว่า EA โดยค่า ODA และ EC ของน้ำหมัก

จากเชื้อ *Bacillus* MUV4 คงตัวอยู่ในช่วงพีเอช 6.0-10.0 ส่วนค่า EC คงตัวอยู่ในช่วงพีเอช 4.0-14.0 ค่า ODA, EA และ EC สัมพัทธ์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ตกตะกอนด้วยกรดคงตัวอยู่ในช่วงพีเอช 6.0-12.0 ค่า ODA, EA และ EC คงเหลือสูงสุดมากกว่า 80% ที่พีเอช 8.0 ความเข้มข้นของเกลือมีผลอย่างมากต่อ ODA และ EA โดยเกลือ10-15 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ค่า ODA สัมพัทธ์ คงเหลือน้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ EA ไม่สามารถวัดค่าได้ ส่วน EC สัมพัทธ์ของน้ำหมักและสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ตกตะกอนด้วยกรดมีค่าคงเหลือมากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ และ 25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อุณหภูมิมีผลอย่างมากต่อค่า ODA และ EC และมีผลเล็กน้อยต่อ EA สัมพัทธ์ โดยกิจกรรมยังคงเหลือมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อบ่มที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

จากการศึกษาองค์ประกอบขั้นต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus* MUV4 พบว่าเป็นกลุ่มของไลโปเปปไทท์ (Glycopeptide) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพนี้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus anthracis, Bacillus subtilis*, *Shigella* sp. และ *Streptococcus faecalis* ATCC 29212 แต่ไม่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ATCC 2592*2*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* sp. และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 สารลดแรงตึงชีวภาพที่ตกตะกอนด้วยกรด (0.1 เปอร์เซ็นต์) มีประสิทธิภาพในการเก็บเกี่ยวน้ำมันจากคอร์ลัมน์ทราย (sandpack column) 50.04 เปอร์เซ็นต์

Thesis Title	Production and Application of Biosurfactant from *Bacillus* MUV4
Author	Miss Onanong Prommachan
Major Program	Biotechnology
Academic Year	2002

Abstract

Factors affecting the production of biosurfactant by *Bacillus* MUV4 cultivated in Mckeen medium (pH 7.0) at 30°C were investigated. The maximum biosurfactant was obtained after 48 h cultivation with cell growth, oil displacement area (ODA) and emulsification capacity (EC) values was 5.78 (OD_{660}), 9.76 cm^2 and 0.87%, respectively. Two point five percent of glucose was the best carbon source for biosurfactant production. Among the nitrogen source (0.5%) tested, L-glutamic acid and monosodium glutamate gave higher oil ODA and EC values but no significant difference in ODA and EC values were detected among L-glutamic acid and monosodium glutamate treatment. Therefore, monosodium glutamate with a concentration of 1.0% was selected for further study. Addition of 0.3% yeast extract in the medium improved growth and higher ODA, emulsification activity (EA) and EC values. Cultivation the organism in the optimal medium contained 2.5% glucose, 1.0% monosodium glutamate and 0.3% yeast extract improved the growth and biosurfactant production with higher ODA, EA and EC values (78.5 cm^2, 81.82% and 5.18%, respectively). Comparison on growth and biosurfactant production in the basal medium and optimized media with initial pH 7.0 at 30°C revealed that the growth was increased 1.9 folds and the ODA and EC increased 8.0 and 5.8 folds, respectively. Uncontrolled pH during cultivation in a fermentor gave higher ODA, EA and EC than those under controlled pH starting at 7.0 condition. An increase in the aeration rate from 0 to 1.0 vvm at agitation speed of 200 rpm

could elevate biosurfactant production. The partial purification of biosurfactant was performed by precipitation of 60 h culture supernate with 6 N HCl, neutralized with 2.0 N NaOH to pH 7.0 and freeze-drying. The acid precipitated biosurfactant yield was 0.8 g/l. This acid precipitated biosurfactant was soluble in water, alkaline water, methanol, ethanol, ethyl acetate, acetonitrile, acetone and chloroform but was insoluble in hexane. pH had much effect on ODA and EC. Relative ODA and EC of culture broth was stable at the pH range 6.0-10.0 while relative EA was stable at the pH range 4.0-14.0. Relative ODA, EA and EC of acid precipitated biosurfactant were stable at the pH range 6.0-12.0. The maximum ODA, EA and EC values retained more than 80% at pH 8.0. NaCl concentration had much effect on ODA and EA. At 15-20% NaCl the relative ODA was less than 10% and EA was not detectable while the relative EC was higher than 60% in culture broth and 25% in acid precipitated biosurfactant. Temperature had much effect on ODA and EC than EA. Even at 100 °C for 12 h the relative EA of the biosurfactant in culture broth still retained activity more than 80%.

The biosurfactant from *Bacillus* MUV4 was preliminarity characterized by TLC analysis and chemical tests. The compound included lipid and ninhydrin-positive compounds. The biosurfactant showed antimicrobial activity against the growth of *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis*, *Shigella* sp. and *Streptococus faecalis* ATCC 29212 but not against *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* sp. and *Staphylococcus aureus*. Effect of the acid precipitated biosurfactant (1.0 g/l) enhanced kerosene oil recovery from sandpack column to 50.04%.