รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การผลิต การทำบริสุทธิ์ และสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 ที่แยกได้จากน้ำทะเล

จัดทำโดย

ผศ. ดร. ศุภศิลป์ มณีรัตน์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2550-2551

บทคัดย่อ

เชื้อ *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 ที่แยกได้จากน้ำทะเลที่ปนเปื้อนคราบน้ำมันจากทะเลสาบสงขลา สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแล้วปลดปล่อยออกมานอกเซลล์เมื่อเลี้ยงในอาหาร minimal salt medium (พีเอช 7.0) ที่ประกอบด้วย *n*-heptadecane 0.3% เป็นแหล่งคาร์บอน มีแอมโมเนียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต 0.1% เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีเกลือ 3% โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (30± 2 องศาเซลเซียส) และเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที พบว่าเชื้อสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้สูงสุดที่เวลา 48 ชั่วโมง น้ำหมักปริมาตร 1 ลิตร เมื่อตกตะกอนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเอธานอล 95% จะได้ตะกอนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 2.94 กรัม โดยมีค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ทำให้เกิดอิมัลชันเท่ากับ 0.04 กรัมต่อมิลลิลิตร การศึกษาสมบัติเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้มีความคงตัวที่พีเอช 6 ถึง 12 โดยมีค่า emulsification activity อยู่ในช่วง 63.26% ถึง 67.37% สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ถึง 80 องศาเซลเซียส โดยมีค่า emulsification activity อยู่ในช่วง 65.50% ถึง 68.28% สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความคงตัวต่อโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-12% พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังคงมีค่า emulsification activity สูงกว่า 60% นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ยังมีความคงตัวต่อแมกนีเซียมคลอไรด์และแคลเซียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 0.06% และ 0.1% ตามลำดับ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้สามารถมีกิจกรรมได้ในน้ำทะเล (พีเอช 8.5) โดยมีค่า emulsification activity เท่ากับ 62.52% สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความสามารถในการอิมัลซิไฟด์ทั้ง aliphatic hydrocarbon และ aromatic hydrocarbon จากการศึกษาองค์ประกอบเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีโพลีแซคคาร์ไรด์ (57.74%) และโปรตีน (42.26%) เป็นองค์ประกอบและมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยเท่ากับ 1.97×10^6 จากการวัดด้วย Gel Permeation Chromatography สารลดแรงตึงผิวชีวภาพไม่มีกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ (*Bacillus subtilis* SM4, *Bacillus pumilus* SM9, *Bacillus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Vibrio* sp., *Pseudomonas* sp.) แต่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 สามารถเพิ่มการละลายของ polycyclic aromatic hydrocarbon ได้

Abstract

Acinetobacter calcoaceticus subsp. *anitratus* SM7, isolated from oil-spilled seawater in Songkhla Lake, Thailand, was found to produce an extracellular biosurfactant. *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 produced biosurfactant when cultivated in minimal salt medium (pH 7.0 at room temperature ($30\pm2^{\circ}$C) with agitation rate of 200 rpm) containing 0.3% *n*-heptadecane, 0.1% ammonium hydrogen carbonate as carbon source and nitrogen source, respectively and containing 3% NaCl and produced the highest emulsification activity at 48 h. Crude biosurfactant was recovered from the culture supernatant by ethanol precipitation to yield 2.94 g/l and had a critical emulsifier concentration of 0.04 g/ml. The crude biosurfactant was stable at pH range 6-12 with emulsification activity in the range of 63.26-67.37% and exhibited emulsification activity 65.50-68.28% when heated at temperature ranging from 30°C to 80°C. In the presence of NaCl up to 12%, the crude biosurfactant still exhibited emulsification activity more than 60% and was stable in $MgCl_2$ and $CaCl_2$ solution up to 0.06% and 0.1%, respectively. Emulsification activity of crude biosurfactant when dissolved in seawater (pH 8.5) was 62.52%. The crude biosurfactant was capable of emulsifying both pure aliphatic and aromatic hydrocarbons. Preliminary chemical characterization of partially purified biosurfactant indicated polysaccharide (57.74%) and protein (42.26%) composition. The molecular mass of biosurfactant produced by *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 was estimated to be $1.97\text{x}10^6$ by Gel Permeation Chromatography. Biosurfactant did not exhibit antimicrobial activity toward tested microorganisms (*Bacillus subtilis* SM4, *Bacillus pumilus* SM9, *Bacillus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Vibrio* sp., *Pseudomonas* sp.). However, biosurfactant produced by *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 enhanced the solubility of polycyclic aromatic hydrocarbon.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่ให้ทุนอุดหนุนในการทำวิจัยและขอขอบคุณคณะอุตสาหกรรมเกษตร ที่อำนวยความสะดวกในการทำวิจัย

ศุภศิลป์ มณีรัตน์

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	I
Abstract	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบาญ	IV
รายการตาราง	V
รายการภาพ	VII
บทนำ	1
บทตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	17
ขอบเขตงานวิจัย	17
วิธีดำเนินการวิจัย	18
ผลการทดลองและวิจารณ์	24
สรุปผลการทดลอง	51
เอกสารอ้างอิง	53
ภาคผนวก	59
Output	65

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดต่างๆ	7
2	แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนและปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *Acinetobacter* spp.	14
3	สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 ที่เวลา 48 ชั่วโมง	26
4	ผลของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 ที่เวลา 48 ชั่วโมง ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1% เป็นแหล่งไนโตรเจน	27
5	ผลของความเข้มข้นของ *n*-heptadecane ที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 ที่เวลา 48 ชั่วโมง ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1% เป็นแหล่งไนโตรเจน	28
6	ผลของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 ที่เวลา 48 ชั่วโมง	29
7	ผลของความเข้มข้นของแอมโมเนียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 ที่เวลา 48 ชั่วโมง	30
8	ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 ที่เวลา 48 ชั่วโมง	32
9	ผลของการให้อากาศต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 ที่เวลา 48 ชั่วโมง	32
10	วิธีการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7	35
11	ค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ทำให้เกิดอิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 และสารลดแรงตึงผิวที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี	35
12	ผลของพีเอชต่อความสามารถในการอิมัลซิไฟค์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7, SDS และ Tween 80	37
13	ผลของอุณหภูมิต่อความสามารถในการอิมัลซิไฟค์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7, SDS และ Tween 80	38

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
14	ผลของน้ำทะเลต่อความสามารถในการอิมัลซิไฟด์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 และสารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ทางเคมี (SDS และ Tween 80)	42
15	ความจำเพาะต่อไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7	47

รายการภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มไกลโคลิปิด (A) rhamnolipids จาก *Pseudomonas aeruginosa* (B) trehalolipids จาก *Rhodococcus erythropolis* (C) sophorolipids จาก *Torulopsis bombicola*	3
2	โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มฟอสโฟลิปิด	4
3	โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มลิโปเปปไทด์	5
4	โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดโพลิเมอริก	6
5	กิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ weathered crude oil โดยชุดควบคุม (buffer) (1) ตัวเซลล์ (2) ส่วนใส (3)	25
6	ผลของพีเอชเริ่มต้นที่มีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 ที่เวลา 48 ชั่วโมง	31
7	การเจริญ พีเอช และค่า emulsification activity ของน้ำหมักจากการเลี้ยงเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 ในอาหาร minimal salt medium (พีเอช 7) ประกอบด้วย *n*-heptadecane 0.3% และแอมโมเนียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต 0.1% ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	34
8	ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อความสามารถในการอิมัลซิไฟด์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 และสารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ทางเคมี (SDS และ Tween 80)	39
9	ผลของแมกนีเซียมคลอไรด์ต่อความสามารถในการอิมัลซิไฟด์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 และสารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ทางเคมี (SDS และ Tween 80)	41
10	ผลของแคลเซียมคลอไรด์ต่อความสามารถในการอิมัลซิไฟด์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 และสารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ทางเคมี (SDS และ Tween 80)	42
11	ผลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ทางเคมี (SDS และ Tewwn 80)ต่อความสามารถในการละลายน้ำของ naphthalene	44
12	ผลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ทางเคมี (SDS และ Tewwn 80)ต่อความสามารถในการละลายน้ำของ anthracene	44
13	ผลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ทางเคมี (SDS และ Tewwn 80)ต่อความสามารถในการละลายน้ำของ phenanthrene	45

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
14	ผลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ทางเคมี (SDS และ Tewwn 80)ต่อความสามารถในการละลายน้ำของ pyrene	45
15	GPC chromatogram ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7	48
16	ลักษณะ TLC chromatogram ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 โดยใช้ ethyl acetate: pyridine: water: acetic acid (5:5:5:1) โดยปริมาตร เป็น mobile phase	49
17	FT-IR spectrum ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7	50
18	กราฟมาตรฐานโปรตีนโดยวิธี Lowry method	61
19	กราฟมาตรฐานโปรตีนโดยวิธี Bradford method	62
20	กราฟมาตรฐานน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี phenol-sulfuric method	63

บทนำ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้จากสิ่งมีชีวิตหลายชนิด โดยเฉพาะ จุลินทรีย์ ทั้งในรูปของสารที่หลั่งออกมานอกเซลล์และที่ติดอยู่กับผนังเซลล์จุลินทรีย์ (Mulligan, 2005) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพประกอบด้วยส่วนที่ชอบน้ำและส่วนที่ไม่ชอบน้ำ สามารถพบได้ในธรรมชาติทั้งจากแบคทีเรีย ยีสต์ และรา โดยเฉพาะในแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีซับสเตรทไม่ละลายน้ำและใช้สารดังกล่าวเป็นแหล่งคาร์บอนและ/หรือแหล่งพลังงาน (Healy *et al.*, 1996)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมและใช้ในการปรับปรุงสภาพแวดล้อม ซึ่งรวมถึงการกำจัดโลหะหนักและสารอินทรีย์ที่ปนเปื้อนทั้งในดินและน้ำ เพิ่มการขนส่งสารเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย เพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดคราบน้ำมัน เป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอาง และใช้ในการควบคุมจุลินทรีย์ทางชีวภาพ (Banat, 1995; Bodour *et al.*, 2003) แต่ส่วนใหญ่แล้วสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะนำไปใช้ในการลดแรงตึงผิวหรืออิมัลซิไฟด์สารตั้งต้นที่ไม่ละลายน้ำหรือมีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ เพื่อเพิ่มการละลายของสารดังกล่าว ซึ่งสามารถนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไปใช้ประโยชน์ในการส่งเสริมการย่อยสลายคราบน้ำมันของแบคทีเรียที่ย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ ทำให้การย่อยสลายคราบน้ำมันเป็นไปอย่างรวดเร็วและสามารถนำไปใช้ทดแทนสารลดแรงตึงผิวที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมีก่อให้เกิดมลพิษต่อระบบนิเวศน์ทางทะเล เพราะย่อยสลายยาก มีความเป็นพิษและมีการสะสมอยู่ในระบบนิเวศน์ (Healy *et al.*, 1996) ซึ่งแตกต่างจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีข้อดีคือ ย่อยสลายได้ (Zajic *et al.*,1977) มีความเป็นพิษต่ำ (Poremba *et al.*,1991) และไม่เป็นพิษต่อสภาพแวดล้อม (Georgiou *et al.*,1990)

มีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Acinetobacter* spp. หลายเรื่อง โดยพบว่าชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *Acinetobacter* spp. ขึ้นกับสายพันธุ์ที่ทำการศึกษา ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มีความเป็นไปได้ที่จะนำไปใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง เช่น ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการลดความหนืดของน้ำมันเพื่อให้ง่ายต่อการขนถ่ายน้ำมันดิบไปตามท่อในอุตสาหกรรมปิโตรเลียม กำจัดคราบน้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในดินและน้ำ ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารโดยเป็นอิมัลซิไฟเออร์ในผลิตภัณฑ์ salad dressing (Desai and Banat, 1997) อย่างไรก็ตามเชื้อแบคทีเรีย *Acinetobacter* spp. ที่ศึกษาส่วนใหญ่แยกได้จากดิน ในการศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นการผลิตการทำบริสุทธิ์บางส่วนและศึกษาคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 ที่แยกได้จากทะเลสาบสงขลา ซึ่งมีความสามารถในการอิมัลซิไฟด์น้ำมันดิบ

บทตรวจเอกสาร

1. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นสารประกอบ amphipathic ที่ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่มีขั้ว (hydrophilic head group) และส่วนที่ไม่มีขั้ว (lipophilic tail) มีสมบัติของการเป็นสารลดแรงตึงผิว (surface active agent) หรือสารที่ทำให้เกิดอิมัลชัน (emulsifying agent) สามารถพบได้ในธรรมชาติทั้งจากแบคทีเรีย ยีสต์ และรา (Healy *et al.*, 1996)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ประกอบด้วย 2 ส่วนที่สำคัญ คือ ส่วนที่ชอบน้ำ และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ ซึ่งส่วนที่ชอบน้ำจะมีทั้งที่เป็นประจุ และไร้ประจุ และประกอบไปด้วยหมู่ของ โมโน (mono-), ได (di-), หรือ โพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide), หมู่คาร์บอกซิลิก, กรดอะมิโน และเปปไทด์ ในขณะที่ส่วนที่ไม่ชอบน้ำจะเป็นกรดไขมันทั้งชนิดอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว และกรดไขมันแอลกอฮอล์ (Lang, 2002) โดยคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ คือ ความสมดุลระหว่างส่วนที่มีขั้วและส่วนที่ไม่มีขั้ว และจากสมบัติของการเป็นสารลดแรงตึงผิว หรือสารที่ทำให้เกิดอิมัลชัน จึงสามารถช่วยให้จุลินทรีย์สามารถใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนเพื่อการเจริญได้ง่ายขึ้น เนื่องจากจะไปช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน หรือเพิ่มความสามารถในการละลายของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้

2. ประเภทของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถจัดจำแนกตามโครงสร้างได้ 4 ประเภท ได้แก่

2.1 ไกลโคลิปิด (Glycolipids) ไกลโคลิปิดเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตเชื่อมต่อกับ long - chain aliphatic acid หรือ hydroxyaliphatic acid โดยไกลโคลิปิดที่รู้จักกันดี คือ rhamnolipids, trehalolipids และ sophorolipids (Desai and Banat, 1997) (ภาพที่ 1)

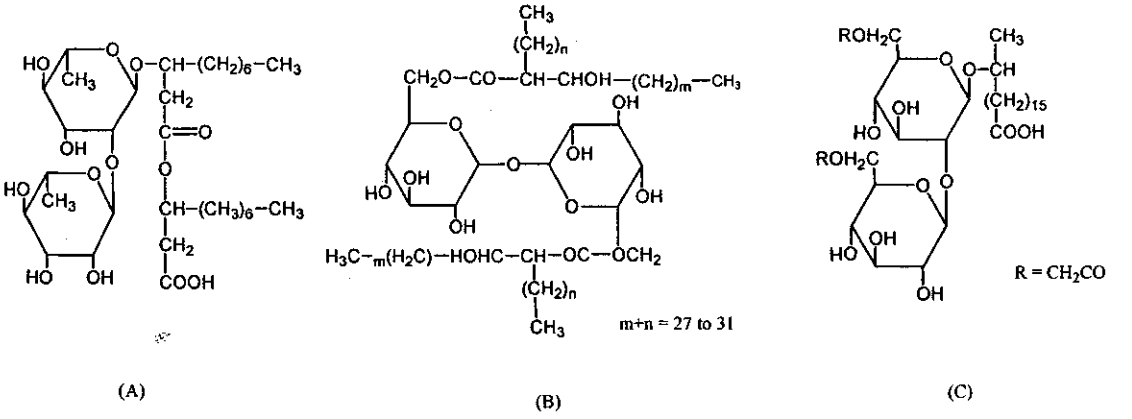
Rhamnolipid เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มไกลโคลิปิดที่มีการศึกษากันมาก ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลแรมโนส (rhamnose) 1-2 โมเลกุล เชื่อมต่อกับ β-hydroxy-decanoic acid 1-2 โมเลกุล (Desai and Banat, 1997) โดย *Pseudomonas aeruginosa* สามารถผลิต rhamnolipid หลายชนิด (RL-1, RL-2, RL-3, RL-4, RL-A และ RL-B) เมื่อเจริญในอาหารที่มี *n*-alkane น้ำมันพืช และเอธานอล เป็นต้น (Kitamoto *et al.*, 2002) โดย rhamnolipid จาก *Pseudomonas* spp. สามารถลดแรงตึงผิวระหว่างน้ำและ *n*-hexadecane จาก 40 mN/m ให้มีค่า 1 mN/m และลดแรงตึงผิวของน้ำจาก 72 mN/m ให้มีค่าเท่ากับ 25 ถึง 30 mN/m นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการอิมัลซิไฟด์สารประกอบไฮโดรคาร์บอนในกลุ่มของ alkane และยังส่งเสริมการเจริญของ *P. aeruginosa* ที่เจริญในอาหารที่มี *n*-hexadecane เป็นองค์ประกอบ (Desai and Banat, 1997)

Trehalolipid ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันจะมีขนาดและโครงสร้างของ mycolic acid, จำนวนคาร์บอน และระดับความอิ่มตัวที่แตกต่างกัน โดยสารที่มีการศึกษาอย่างแพร่หลายได้แก่ trehalose

dimycolate จาก *Rhodococcus erythropolis* ซึ่ง trehalolipid ที่ผลิตจาก *R. erythropolis* และ *Arthrobacter* sp. สามารถลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีค่าเท่ากับ 25 ถึง 40 mN/m (Desai and Banat, 1997)

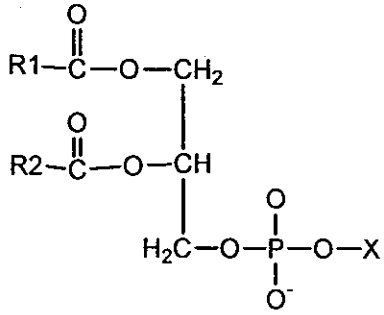
Sophorolipid เป็นสารในกลุ่มไกลโคลิปิดที่ผลิตจากยีสต์ เช่น *Torulopsis bombicola, T. petrophilum* และ *T. apicola* (Desai and Banat, 1997) ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มนี้มีสมบัติในการลดแรงตึงผิวที่ดีแต่ไม่มีสมบัติในการเป็นสารก่อให้เกิดอิมัลชัน (Cooper and Paddock, 1984) โดยทั้ง lactonic และ acidic sophorolipid สามารถลดแรงตึงผิวระหว่าง *n*-hexadecane และน้ำจาก 40 mN/m ให้มีค่าเท่ากับ 5 mN/m รวมทั้งยังมีความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงพีเอชและอุณหภูมิได้ดี (Cooper and Paddock, 1983; Lang and Wagner, 1987)

2.2 ฟอสโฟลิปิด, กรดไขมัน และนิวทรัลลิปิด (Phospholipids, fatty acid and neutral lipid) ฟอสโฟลิปิดประกอบด้วยลิปิดและฟอสเฟตเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์ ซึ่งแบคทีเรียและยีสต์หลายชนิดสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดฟอสโฟลิปิดเมื่อใช้ *n*-alkane (Cirigliano and Carman, 1985; Robert *et al.*, 1989) เช่น phosphatidylethanolamine (ภาพที่ 2) ที่ผลิตได้จาก *Acinetobacter* sp. Strain H01-N สามารถทำให้เกิดอิมัลชันของ alkanes ในน้ำ (Desai and Banat, 1997) phosphatidylethanolamine ยังสามารถผลิตได้จาก *Rhodococcus erythropolis* ที่เจริญในอาหารที่มี *n*-alkane เป็นแหล่งคาร์บอนสามารถลดแรงตึงผิวระหว่างน้ำและ *n*-hexadecane จาก 40 mN/m ให้มีค่าน้อยกว่า 1 mN/m และ มีค่า critical micelle concentration เท่ากับ 30 mg/l (Kretschmer *et al.*, 1982)



ภาพที่ 1 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มไกลโคลิปิด (A) rhamnolipids จาก *Pseudomonas aeruginosa* (B) trehalolipids จาก *Rhodococcus erythropolis* (C) sophorolipids จาก *Torulopsis bombicola*

ที่มา : Desai and Banat (1997)



R1, R2 = alkyl group

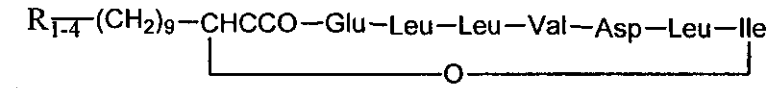
X = hydrogen, ethylamine, inositol

ภาพที่ 2 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มฟอสโฟลิปิด

ที่มา : Desai and Banat (1997)

2.3 ลิโปเปปไทด์ และ ลิโปโปรตีน (Lipopeptide and lipoprotein) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดลิโปเปปไทด์ประกอบด้วยส่วนที่ไม่ชอบน้ำ คือ กรดไขมันและส่วนที่ชอบน้ำ คือ กรดอะมิโนหรือโปรตีน โดยปกติจะมีกรดอะมิโนประมาณ 5 – 7 โมเลกุลและต่อกันเป็นวงแหวน (Cyclic peptide) (Roongsawang *et al.*, 1999)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดลิโปเปปไทด์ที่เป็นที่รู้จักอย่างแพร่หลายได้แก่ surfactin ซึ่งเป็นลิโปเปปไทด์ที่ต่อกันเป็นวงแหวนผลิตจาก *Bacillus subtilis* ATCC 21332 สามารถลดแรงตึงผิวของน้ำจาก 72 mN/m ให้มีค่าเท่ากับ 27.9 mN/m โดยใช้สารลดแรงตึงผิวความเข้มข้นต่ำกว่า 0.005% (Arima *et al.*, 1968) Jenny และคณะ (1991) ศึกษาโครงสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของเชื้อ *Bacillus licheniformis* พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้คือ lichenysin C (รูปที่ 3) โดยสามารถลดแรงตึงผิวของน้ำจาก 72 mN/m ให้มีค่าน้อยกว่า 27 mN/m และลดแรงตึงผิวระหว่างน้ำและ *n*-hexadecane ให้มีค่าน้อยกว่า 0.1 mN/m คุณสมบัติที่สำคัญของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มนี้ คือ เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูง และมีสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ (Lang, 2002)



R_1 (iso C_{14}) $= (CH_3)_2$-CH -

R_2 (normal C_{14}) $= CH_3$-CH_2-CH_2-

R_3 (iso C_{15}) $= (CH_3)_2$-CH-CH_2-

R_4 (anteiso C_{15}) $= CH_3$-CH_2-CH(CH_3) –

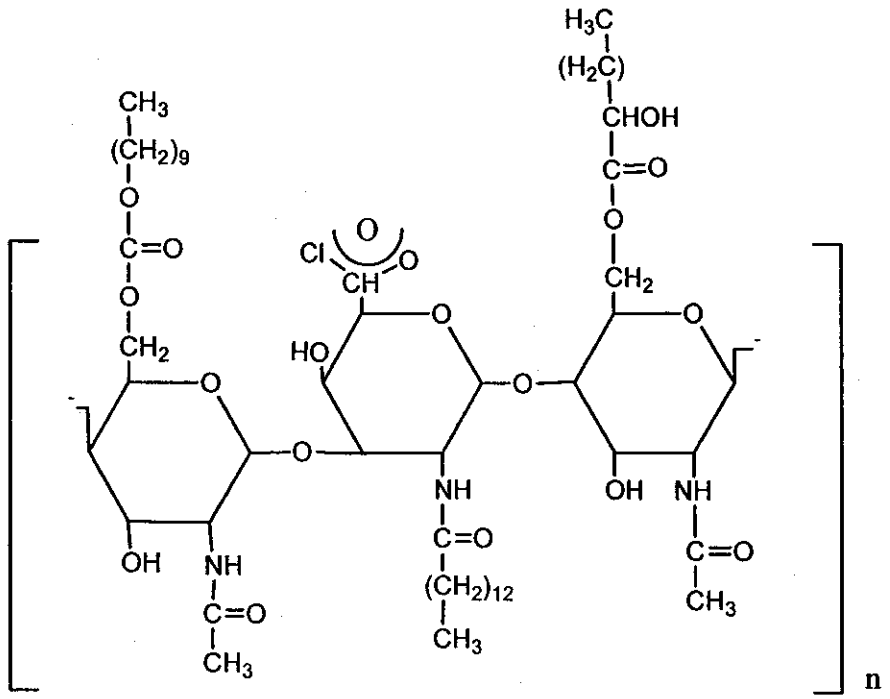
ภาพที่ 3 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มลิโปเปปไทด์

ที่มา : Jenny และคณะ (1991)

2.4 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดโพลีเมอริก (Polymeric biosurfactant) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดโพลีเมอริกประกอบด้วยหน่วยของแซคคาไรด์ (Saccharide) และหน่วยของกรดไขมัน มีลักษณะเป็นโพลีเมอร์ในธรรมชาติ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดนี้ที่มีการศึกษาอย่างแพร่หลาย ได้แก่ emulsan, liposan, mannoprotein และ polysaccharide protein complex ชนิดอื่นๆ

Rosenberg และคณะ (1979a) ศึกษาคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 พบว่าเชื้อสายพันธุ์นี้ผลิต emulsan ซึ่งเป็นสารประกอบของ polyanionic amphipathic heteropolysaccharide และโปรตีน (รูปที่ 4) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ที่ดีเพราะใช้ความเข้มข้นต่ำ (0.01 – 0.001%) ในการทำให้เกิดอิมัลชัน โดยสัดส่วนของ emulsan และสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเท่ากับ 1:100 ถึง 1:1000 อย่างไรก็ตาม emulsan ไม่สามารถทำให้เกิดอิมัลชันได้ถ้าใช้ aliphatic หรือ aromatic หรือ cyclic hydrocarbon เดี่ยวๆ แต่จะเกิดอิมัลชันในกรณีที่เป็นไฮโดรคาร์บอนผสมพบว่า emulsan สามารถอิมัลซิไฟด์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Cooper และ Goldenberg (1987) ศึกษาสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดโพลีเมอริกที่ผลิตโดย *Bacillus cereus* พบว่าเป็นโพลีเมอร์ของ D-glucosamine มีสมบัติในการเป็นสารที่ทำให้เกิดอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีกิจกรรมสูงที่พีเอชต่ำกว่า 7 (พีเอชเท่ากับ 2 – 6.5) และเริ่มลดลงที่พีเอชระหว่าง 6.5 – 7 เนื่องจากการสูญเสียประจุบวกของ glucosamine monomer ดังนั้นเมื่อพีเอชมีค่าเพิ่มขึ้นจะทำให้คุณสมบัติในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (emulsifier) ของโพลิเมอร์ลดลง



ภาพที่ 4 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดโพลิเมอริก

ที่มา : Desai and Banat (1997)

นอกจากนี้ยังจำแนกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพตามน้ำหนักโมเลกุลได้เป็น 2 กลุ่ม ดังนี้ คือ (Ron and Rosenberg, 2001)

- สารลดแรงตึงผิวน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (Low-molecular-weight biosurfactant) คุณสมบัติที่สำคัญของสารในกลุ่มนี้คือ การลดแรงตึงผิวและแรงตึงระหว่างผิวได้อย่างมีประสิทธิภาพ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มนี้ได้แก่ ไกลโคลิปิด และลิโปเปปไทด์ ซึ่งนอกจากคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิวแล้วสารลิโปเปปไทด์บางชนิดมีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์

- สารลดแรงตึงผิวชีวภาพน้ำหนักโมเลกุลสูง (Hight-molecular-weight biosurfactant) เป็นโพลิเมอร์น้ำหนักโมเลกุลสูงที่ติดกับพื้นผิวของส่วนที่ไม่ชอบน้ำอย่างแข็งแรง ทำให้จุลินทรีย์สามารถอยู่ติดกับสารตั้งต้นที่ไม่ละลายน้ำ และนำสารตั้งต้นนั้นไปเป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนได้ดีขึ้น คุณสมบัติที่สำคัญของสารในกลุ่มนี้คือ การทำให้เกิดความคงตัวของอิมัลชัน สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่อยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ โพลีแซคคาร์ไรด์ โปรตีน ลิโพโพลีแซคคาไรด์ ลิโปโปรตีนหรือสารละลายเชิงซ้อน จากการรวมตัวของสารโพลีเมอร์ชีวภาพดังกล่าว

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด โดยจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดต่างๆ

Biosurfactants	Microorganisms
Glycolipids	
Rhamnolipids	*Pseudomonas* sp.
	P. aeruginosa
Trehalolipids	*Rhodococcus erythropolis*
	Nocardia erythropolis
	Mycobacterium sp.
Sophorolipid	*Torulopsis apicola*
	T. bombicola
	T. petrophilium
Lipopeptide and lipoprotein	
Peptide-lipid	*Bacillus licheniformis*
Serrawettin	*Serratia macescens*
Viscosin	*P. fluorescens*
Surfactin	*B. subtilis*
Subtilisin	*B. subtilis*
Gramicidins	*B. brevis*
Polymyxins	*B. polymyxa*
Fatty acids, neutral lipids and phospholipids	
Fatty acids	*Candida lepus*
Neutral lipids	*Nocardia erythropolis*
Phospholipids	*Thiobacillus thiooxidans*
Bile acids	*Myroides* sp. SM1

ที่มา : ดัดแปลงจาก Desai and Banat (1997)

3. คุณสมบัติและการประยุกต์ใช้งานสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เนื่องจากจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ทำให้โครงสร้างทางเคมี คุณสมบัติและหน้าที่ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแต่ละชนิดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดและโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นมา

3.1 เพิ่มพื้นที่ผิวสารตั้งต้นที่ไม่ละลายน้ำหรือละลายน้ำต่ำ แบคทีเรียที่เจริญในบริเวณที่มีสารประกอบไฮโดรคาร์บอนมีการเจริญแบบจำกัดเนื่องจากแรงตึงระหว่างผิวของน้ำและน้ำมัน (Shreve *et al.*, 1995) ซึ่งในระบบเปิด เช่น แหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อนคราบน้ำมัน มีจำนวนของ จุลินทรีย์ไม่เพียงพอต่อการอิมัลซิไฟด์น้ำมันให้มีประสิทธิภาพ นอกจากนี้น้ำมันที่ถูกอิมัลซิไฟด์ที่กระจายอยู่ในน้ำก็ไม่เพียงต่อการนำไปใช้สำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ที่ผลิตอิมัลซิไฟด์เออร์ ดังนั้นสารลดแรงตึงผิวซึ่งมีสมบัติเป็นสารที่ทำให้เกิดอิมัลชันจึงมีความจำเป็นในการย่อยสลายคราบน้ำมันที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวของน้ำมันโดยการทำให้เกิดอิมัลชัน ทำให้เซลล์สัมผัสกับน้ำมันแล้วนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนได้ดียิ่งขึ้น (Ron and Rosenberg, 2001)

3.2 เพิ่ม bioavailability ของสารตั้งต้นที่ไม่ละลายน้ำ เหตุผลหลักที่ทำให้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนย่อยสลายได้ยาก คือ มีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ และถูกดูดซับอยู่ในพื้นผิว เช่น ถูกดูดซับในดิน จึงทำให้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนนำสารดังกล่าวไปใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนได้ยาก (Ron and Rosenberg, 2001) ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถเพิ่มการเจริญของเชื้อในสารตั้งต้นที่ถูกดูดซับโดยการชะสารออกจากพื้นผิวหรือเพิ่มความสามารถการละลายน้ำของสารดังกล่าว (Deziel *et al.*, 1996)

3.3 กำจัดโลหะหนัก สาร rhamnolipid มีความสามารถในการกำจัดแคดเมียม, ตะกั่ว และสังกะสีจากดิน (Herman *et al.*, 1995) ซึ่งกลไกในการในการกำจัดโลหะหนักของ rhamnolipid คือ การเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของ rhamnolipid และแคดเมียม และการทำปฏิกิริยาของ rhamnolipid ต่อผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ ทำให้จุลินทรีย์นำโลหะหนักเข้าสู่เซลล์ นอกจากนี้โพลีแซคคาไรด์ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดโพลีเมอริกสามารถจับกับโลหะหนักและทำให้เกิดการตกตะกอนของโลหะหนัก เช่น การจับกับยูเรเนียมของ emulsan จาก *A. calcoaceticus* RAG-1 (Zosim *et al.*, 1983)

3.4 การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มลิโปเปปไทด์ส่วนใหญ่มีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น ไลโปเปปไทด์ที่ต่อกันเป็นวงแหวน ได้แก่ polymyxins ที่ผลิตจาก *Bacillus polymyxa* (Marahiel *et al.*, 1977), gramicidins ที่ผลิตจาก *B. brevis* (Suzuki *et al.*, 1965), circulocins ที่ผลิตจาก *B. circulan* J2154 ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี รวมถึงแบคทีเรียที่ทนต่อสารยาปฏิชีวนะ (He *et al.*, 2001) และ iturin A ที่ผลิตจาก *B. amyloliquefaciens* ที่มีความสามารถในการเป็นสารควบคุมจุลินทรีย์ทางชีวภาพ ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* และเชื้อราก่อโรคในพืชได้ (Yu *et al.*, 2002)

3.5 บทบาทของอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่มีต่อฟิล์มชีวภาพ (Biofilm) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพน้ำหนักโมเลกุลสูงหรืออิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่ผลิตจากจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งสามารถถ่ายทอดสู่จุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ พบว่า alasan จาก *A. radioresistens* KA53 สามารถจับกับพื้นผิวเซลล์ของเชื้อ *Sphingomonas paucimobilis* EPA505 และ *A. calcoaceticus* RAG-1 และเปลี่ยนแปลงพื้นผิวเซลล์ของเชื้อดังกล่าว ซึ่งการถ่ายทอดดังกล่าวเกิดขึ้นหลังจากบ่มเซลล์ผู้รับกับอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพ นอกจากนี้ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *A.*

radioresistens KA53 ร่วมกับ *A. calcoaceticus* RAG-1 พบว่า alasan หลั่งออกมาจาก *A. radioresistens* KA53 แล้วจับกับเซลล์ผู้รับ คือ *A. calcoaceticus* RAG-1 (Osterreicher-Ravid *et al.*, 2000) การถ่ายทอดอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพของแบคทีเรียจากสายพันธุ์หนึ่งไปยังอีกสายพันธุ์หนึ่งแสดงให้เห็นถึงการอยู่รวมกันของจุลินทรีย์, การร่วมกลุ่ม และการเกิดฟิล์มชีวภาพ (Ron and Rosenberg, 2001)

4. การวัดกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

จากคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิว, การเป็นสารที่ทำให้เกิดอิมัลชัน และความสมดุลของส่วนที่ชอบน้ำและส่วนไม่ชอบน้ำ ทำให้สามารถวัดกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยอาศัยคุณสมบัติที่กล่าวมาข้างต้นเป็นพื้นฐานในการคิดค้นวิธีการวัดกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้หลายวิธี

4.1 การวัดแรงตึงผิว กิจกรรมในการลดแรงตึงผิวและแรงตึงระหว่างผิวของของเหลวสองชนิด วัดโดยใช้ tensiometer (Denger and Schink, 1995) ซึ่งมีหน่วยในการวัดเป็น mN/m หรือ dyne/cm โดยค่าแรงตึงผิวของน้ำกลั่นมีค่าเท่ากับ 72 mN/m สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ดีควรลดแรงตึงผิวของน้ำให้มีค่าต่ำกว่า 30 mN/m (Cooper, 1986)

4.2 การวัดกิจกรรมการเกิดอิมัลชัน อิมัลชันเกิดจากของเหลวชนิดหนึ่งกระจายตัวในลักษณะเป็นหยดขนาดเล็กในของเหลวอีกชนิดหนึ่ง เช่น อิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (oil-in-water emulsion) (Ron and Rosenberg, 2001) กิจกรรมการเกิดอิมัลชันวัดโดยอาศัยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทำให้เกิดอิมัลชันของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนหรือน้ำมันในของเหลว โดยอาจจะมีการใช้สารละลายผสมของ *n*-hexadecane และ 2-methylnaphthalene (Navon-Venezia *et al.*, 1995) หรือ dodecane (Burd and Ward, 1996) มาทำการทดสอบ

4.3 การวัดค่าสมดุลระหว่างส่วนที่ชอบน้ำและส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophilic-lipophilic balance : HLB) ค่า HLB ใช้ในการระบุว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพก่อให้เกิดอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันหรือน้ำมันในน้ำ ซึ่งถ้าหากค่า HLB ต่ำกว่า 6 แสดงว่าอิมัลชันที่เกิดเป็นแบบน้ำในน้ำมัน และถ้าหากค่า HLB มีค่าระหว่าง 10-18 แสดงว่าอิมัลชันที่เกิดเป็นแบบน้ำมันในน้ำ ซึ่งค่า HLB หาได้จากสูตรดังต่อไปนี้ (Oberbremer *et al.*, 1990)

HLB = (20 X น้ำหนักโมเลกุลของส่วนที่ชอบน้ำ) / น้ำหนักโมเลกุลทั้งหมด

สำหรับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประจุหรือถ้ามีส่วนที่ชอบน้ำและส่วนที่ไม่ชอบน้ำไม่สมดุลกันภายในโมเลกุลจะไม่สามารถใช้สมการข้างต้นในการคำนวณได้ จะได้จากการทดลองแทน เช่น ในการหาค่า HLB ของไกลโคลิปิดในอิมัลชันที่เกิดจากน้ำและสารที่ไม่ชอบน้ำ โดยสารที่ไม่ชอบน้ำที่ใช้คือ ไซโคลเฮกเซน (Cyclohexane) และน้ำมันถั่วเหลือง ซึ่งค่า HLB หาได้จากสูตรดังต่อไปนี้ (Vollbrecht *et al.*, 1999)

$$A = (HLB_{needed} - HLB_B) / (HLB_A - HLB_B)$$

โดย A คือ % ไซโคลเฮกเซน

HLB_A คือ ค่า HLB ของไซโครเฮกเซน (=15)

HLB_B คือ ค่า HLB ของน้ำมันพืช (=6)

5. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากจุลินทรีย์ที่แยกได้จากทะเล

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นสารลดแรงตึงผิวที่สามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์ซึ่งสามารถพบได้ในธรรมชาติทั้งจากแบคทีเรีย ยีสต์ และรา โดยเฉพาะในแบคทีเรีย แต่งานวิจัยเกี่ยวกับแบคทีเรียที่แยกได้จากทะเลที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังมีไม่มากนักเมื่อเทียบกับแบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งอื่น ตัวอย่างของแบคทีเรียที่แยกได้จากทะเลที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ได้แก่

Marinobacter hydrocarbonoclasticus เป็นแบคทีเรียที่เจริญในสภาวะไร้อากาศ โดยใช้สารตั้งต้นที่เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีไนเตรทเป็นองค์ประกอบ สามารถย่อยสลาย aliphatic hydrocarbon และสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เจริญได้ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ช่วงกว้าง (3-6%) สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพหรืออิมัลซิไฟเออร์เมื่อเจริญในอาหารที่มี *n*-alkane เป็นองค์ประกอบ (Gauther *et al.*, 1992)

Yakimov และคณะ (1998) พบว่า *Alkanivorax borkumensis* gen. nov. และ *Alkanivorax borkumensis* sp. nov. ซึ่งเป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ที่แยกได้จากทะเลที่มีความสามารถในการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดย *Alkanivorax borkumensis* gen. nov. สามารถใช้ aliphatic hydrocarbon เป็นแหล่งคาร์บอนและสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีองค์ประกอบเป็นกลูโคสเชื่อมต่อกับไขมันซึ่งมีโครงสร้างเป็น 3-hydroxydecanoic acid 4 โมเลกุล โดยเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเตอร์ และเชื่อมกับกลูโคสที่ตำแหน่ง C1 ด้วยพันธะไกลโคซิดิก ในขณะที่ *Alkanivorax borkumensis* sp. nov. เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส และในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบของโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 3-10 % ซึ่งมีการเจริญลดลงเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็น complex media และอาหารที่ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตและกรดอะมิโน แต่สามารถใช้ aliphatic hydrocarbon รวมทั้ง ฟอร์เมต (Formate), อะซิเตต (Acetate), โปรพิโนเอต(Propionate), เมธิลไพรูเวต (Methyl pyruvate) และ แอลฟา-คีโตกลูตาเรท (α-ketoglutarate) เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญ แต่สารลดแรงตึงผิวที่ผลิตขึ้นมามีโครงสร้างเช่นเดียวกับสารที่ *Alkanivorax borkumensis* gen. nov. ผลิตได้

โพลีแซคคาร์ไรด์ที่ผลิตออกมานอกเซลล์ของ *Rhodococcus rhodochrous S-2* (S-2 EPS) สามารถส่งเสริมการย่อยสลาย aromatic hydrocarbon ที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันดิบของแบคทีเรียในทะเล ซึ่งโพลีแซคคาร์ไรด์ที่ได้ประกอบด้วย D-glucose, D-galactose, D-mannose, D-glucuronic acid และไขมัน จากการศึกษาผลของ S-2 EPS ที่มีต่อการเจริญของแบคทีเรียประจำถิ่นในทะเลต่อ aromatic fraction (AF) ในน้ำมันดิบ พบว่าโดยทั่วไปแบคทีเรียประจำถิ่นไม่สามารถเจริญในน้ำทะเลที่มีการปนเปื้อน AF แม้จะเติมสารอาหารที่เป็น แหล่งไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและเหล็ก แต่เมื่อเติม S-2 EPS ลงในน้ำทะเลที่ประกอบไปด้วยสารอาหารดังกล่าวและ AF พบว่าโพลีแซคคาร์ไรด์สามารถอิมัลซิไฟด์ AF และส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียประจำถิ่น รวมทั้งเพิ่มความสามารถในการย่อยสลาย AF ของแบคทีเรียประจำถิ่น และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการเป็นสารลดแรงตึงผิวของ Polysaccharide กับสารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ทางเคมี 15 ชนิด พบว่าโพลีแซคคาร์ไรด์เป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีประสิทธิภาพดีกว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมี ซึ่งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการย่อยสลายคราบน้ำมันที่เป็นสาเหตุให้เกิดมลภาวะทางทะเลได้ (Iwabushi *et al.*, 2002)

Schulz และคณะ (1991) แยกเชื้อจากทะเลที่สามารถย่อยสลาย *n*-alkane และผลิตสารลดแรงตึงผิวออกมานอกตัวเซลล์ได้ 3 สายพันธุ์ คือ *Alcaligenes* sp. MM1, *Arthrobacter* sp. EK1 และ *Arthrobacter* sp. SI1 โดย *Alcaligenes* sp. MM1 สามารถผลิตกลูโคสลิปิด โครงสร้างประกอบด้วย β-hydroxy-decanoic acids 4 หน่วย เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์ และเชื่อมต่อกับกลูโคสที่ตำแหน่งคาร์บอนตัวที่หนึ่งด้วยพันธะไกลโคซิดิก (Poremba *et al.*, 1991) ส่วน *Arthrobacter* sp. EK1 สามารถผลิต disaccharide trehalose หรือ trehalose tetraester ซึ่งประกอบด้วยกรดไขมัน (C_8-C_{14}) 3 หน่วย และ หมู่ succinyl 1 หน่วย โดย trehalose tetraester มีความคงตัวต่ออุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 3.5 ชั่วโมง ในขณะที่ *Arthrobacter* sp. SI1 ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพน้ำหนักโมเลกุลสูงที่มีความสามารถในการอิมัลซิไฟด์ mihagol-S (C_{14-15}-*n*-alkanes) (Schulz *et al.*, 1991) และเมื่อตรวจสอบความเป็นพิษของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทั้ง 3 ชนิด โดยเปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ทางเคมี พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทั้ง 3 ชนิด ไม่มีพิษต่อจุลินทรีย์ประจำถิ่นและสิ่งแวดล้อมในทะเล ในขณะที่สารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ทางเคมีเป็นพิษต่อเชื้อที่ใช้ทดสอบ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไปใช้กำจัดคราบน้ำมันที่ปนเปื้อนในทะเล (Poremba *et al.*, 1991)

6. แบคทีเรียสายพันธุ์ *Acinetobacter*

แบคทีเรียตระกูล *Acinetobacter* sp. มีความสามารถในการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยเฉพาะอย่างยิ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดโพลีเมอริก *A. calcoaceticus* RAG-1 เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนและผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพ เรียกว่า emulsan เมื่อเจริญในอาหารเหลวที่มี hexadecane, เอธานอลหรือ อะซิเตตเป็นแหล่งคาร์บอน (Rosenberg *et al.*, 1979b) ซึ่ง emulsan เป็น anionic heteropolysaccharide ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 9.9 x 10^5 โดยน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบหลักคือ N-acetyl-D-galactosamine และ amino uronic acid (Zuckerberg *et al.*, 1979) และมีส่วนของกรดไขมันเชื่อมต่อกับสายโพลีแซคคาไรด์โดย O-ester bonds (Belsky *et al.*, 1979)

Kaplan และคณะ (1982) ศึกษาการผลิตอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อ *A. calcoaceticus* BD4 และ BD413 พบว่า เชื้อมีการผลิตอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพเมื่อเจริญในอาหาร HPMS ที่มีกรดแลกติก 0.5% เป็นแหล่งคาร์บอน และเมื่อศึกษากิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ พบว่า *A. calcoaceticus* BD413 ผลิตอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพหลังจากชั่วโมงที่ 10 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยมีกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ 55 U/ml เมื่อเลี้ยงเชื้อ 33 ชั่วโมง และเมื่อเปรียบเทียบกับ *A. calcoaceticus* BD4 พบว่า มีกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์เพียง 7 U/ml ที่เวลาเดียวกัน

Rosenberg และคณะ (1988) ศึกษาการผลิต biodispersan จากเชื้อ *A. calcoaceticus* A2 ซึ่งเป็นอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่ทำให้เกิดการกระจายตัวของหินปูนในน้ำ พบว่าเชื้อมีการผลิต biodispersan เมื่อเจริญในอาหารเหลวที่มีเอธานอลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อสามารถผลิต biodispersan เมื่อเจริญในระยะ exponential phase ต่อเนื่องไปจนถึง stationary phase ได้ 4 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นที่เหมาะสมของ biodispersan ที่ทำให้เกิดการกระจายตัวของหินปูนคือความเข้มข้นระหว่าง 40 ถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งทำให้ค่าความขุ่นเพิ่มขึ้นจาก 200 K.U. เป็น 10,000 K.U.

เชื้อ *A. radioresistens* KA53 ผลิตอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพ เรียกว่า alasan เมื่อเจริญในอาหาร ethanol medium จากการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีเบื้องต้น พบว่า alasan เป็นสารประกอบในกลุ่ม Anionic และเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพน้ำหนักโมเลกุลสูง โดยโครงสร้างของ alasan ประกอบด้วย heteropolysaccharide และ โปรตีน (Navon-venezia *et al.*, 1995)

7. ผลขององค์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Acinetobacter*

แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และแร่ธาตุ มีความสำคัญมากในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากจุลินทรีย์ โดยสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และสภาพแวดล้อมเดิมที่จุลินทรีย์อาศัยอยู่

7.1 แหล่งคาร์บอน จุลินทรีย์ในกลุ่ม *Acinetobacter* sp. ไม่สามารถใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน แต่เจริญในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น เช่น ไฮโดรคาร์บอน แอลกอฮอล์ กรดไขมัน และไตรกลีเซอไรด์ เป็นต้น (Shabtai, 1990) สำหรับการผลิต emulsan โดยใช้เชื้อ *A. calcoaceticus* RAG-1 พบว่าเชื้อผลิต emulsan เมื่อเจริญในอาหารที่มี *n*-hexadecane และ เอธานอล เป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์เท่ากับ 14 U/ml และ 25 U/ml ตามลำดับ (Rosenberg *et al.* 1979b) นอกจากนี้ *A. radioresistens* KA53 และ *A. calcoaceticus* A2 ผลิต alasan และ biodispersan เมื่อเจริญในอาหารที่มีเอธานอลเป็นแหล่งคาร์บอนเช่นเดียวกัน (Navon-Venezia *et al.*, 1995; Rosenberg *et al.*, 1988) สำหรับการผลิตอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* BD4 และ BD413 มีการใช้กรดแลคติกเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์เท่ากับ 7 U/ml และ 55 U/ml ตามลำดับ

นอกจากไฮโดรคาร์บอนและแอลกอฮอล์แล้วพบว่าสามารถใช้น้ำมันพืชหรือกรดไขมันในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งการใช้น้ำมันพืชหรือกรดไขมันมีข้อดีคือ มีความเป็นพิษต่ำ ปริมาณการผลิตสูง และราคาถูก (Shabtai, 1990)

7.2 แหล่งไนโตรเจน แหล่งไนโตรเจนที่ใช้สำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความแตกต่างกันไป ขึ้นกับจุลินทรีย์ที่ใช้ผลิต และชนิดของแหล่งไนโตรเจน เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต (Kaplan *et al.*, 1982; Rosenberg *et al.*, 1988) และยูเรีย (Navon-Venezia *et al.*,1995; Rosenberg *et al.*, 1979b) ดังแสดงในตารางที่ 2

7.3 แหล่งฟอสเฟต ฟอสเฟตมีผลต่อการแสดงออกของยีนและเอนไซม์ในการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของจุลินทรีย์ ทั้งนี้ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งฟอสเฟตขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ สำหรับการผลิต emulsan จาก *A. calcoaceticus* RAG-1 พบว่าเชื้อผลิต emulsan ได้สูงที่สุดเมื่อมีฟอสเฟต 12.1 กรัมต่อลิตร (KH_2PO_4 3.65 กรัมต่อลิตร และ K_2HPO_4 8.45 กรัมต่อลิตร) (Choi *et al.*, 1996) สำหรับการผลิตอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* BD413 มีการเพิ่มความเข้มข้นของเกลือฟอสเฟตจาก $K_2HPO_4.3H_2O$ 9.17 กรัมต่อลิตร และ KH_2PO_4 3 กรัมต่อลิตร เป็น $K_2HPO_4.3H_2O$ 22.2 กรัมต่อลิตร และ KH_2PO_4 7.26 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อผลิตอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพเพิ่มขึ้นจาก 89 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็น 463 มิลลิกรัมต่อลิตร (Kaplan *et al.*, 1982) นอกจากการใช้ K_2HPO_4 และ KH_2PO_4 เป็นแหล่งฟอสเฟตแล้ว ยังมี

การใช้ Na_2HPO_4 ร่วมกับ KH_2PO_4 เป็นแหล่งฟอสเฟตในการผลิต alasan จาก *A. radioresistens* KA53 พบว่าเชื้อผลิต alasan 2.35 กรัมต่อลิตร (Navon-Venezia *et al.*, 1995)

ตารางที่ 2 แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนและปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *Acinetobacter* spp.

Microorganism	Carbon source	Nitrogen source	Biosurfactant	Reference
A. calcoaceticus RAG-1	0.1% ethanol	0.125% urea	emulsan (0.2 g/L)	Rosenberg *et al.*, 1979b
A. calcoaceticus BD4 and BD413	0.5% lactic acid	0.4% ammonium sulfate	bioemulsifier (0.5 g/L)	Kaplan *et al.*, 1982
A. calcoaceticus A2	1.6% ethanol	0.4% ammonium sulfate	biodispersan (3.5 g/L)	Rosenberg *et al.*, 1988
A. radioresistens KA53	0.5% ethanol	0.18% urea	alasan (2.35 g/L)	Navon-Venezia *et al.*, 1995

8. การเก็บเกี่ยวและทำบริสุทธิ์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดโพลีเมอริก

การเก็บเกี่ยวและการทำบริสุทธิ์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการหมักเป็นปัญหาหลักในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในเชิงการค้า โดยการเก็บเกี่ยวและการทำบริสุทธิ์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสำหรับเชื้อ *Acinetobacter* spp. ที่ใช้อย่างแพร่หลายจะมี 2 ขั้นตอน ได้แก่ การแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักโดยการปั่นเหวี่ยง และการแยกสารออกจากน้ำหมักโดยการตกตะกอน และทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นโดยการ dialysis

8.1 การแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากเชื้อ *Acinetobacter* spp. ส่วนใหญ่เป็นสารที่ผลิตออกมานอกเซลล์ วิธีที่นิยมใช้แยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ การปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 10,000 ถึง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15-20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8.2 การตกตะกอนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดโพลีเมอริกที่ผลิตจาก *Acinetobacter* spp. โดยเติมแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ความเข้มข้น 40-65% ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บตะกอนที่ได้ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไป Dialysis ในน้ำกลั่น จากนั้นทำแห้งด้วยวิธี lyophilized หรือ freeze dry (Rosenberg *et al.*, 1979b; Kaplan *et al.*, 1982; Rosenberg *et al.*, 1988; Navon-Venezia *et al.*, 1995)

นอกจากขั้นตอนที่กล่าวมาข้างต้นแล้วยังมีการนำเทคนิคอื่นๆ มาใช้ในการทำบริสุทธิ์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดโพลิเมอริกจาก *Acinetobacter* spp. ได้แก่

Gel electrophoresis ในการทำบริสุทธิ์โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดโพลีเมอริก จำเป็นจะต้องมีการตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลและตรวจสอบส่วนที่เป็นโปรตีนซึ่งเป็นองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยใช้ sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) นอกจากนี้การทำ SDS-PAGE ยังใช้ในการเตรียมโปรตีนที่แยกได้ให้มีปริมาณเป็นมิลลิกรัมเพื่อใช้ในการทำบริสุทธิ์และหาค่ากิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ต่อไป ซึ่งการแยกโปรตีนของ alasan (apo-alasan) ด้วย SDS-PAGE พบว่า มีโปรตีน 3 ขนาดที่เป็นองค์ประกอบหลัก ได้แก่ 16, 31 และ 45 kDa (Toren *et al.*, 2001)

Size exclusion chromatography การทำบริสุทธิ์โปรตีนของ alasan (apo-alasan) โดยใช้ Hi Load 16/60 Superdex 200 Prepgrade fast-performance liquid chromatography (FPLC) และชะด้วย Tris 50 มิลลิโมลาร์ (พีเอช 11) ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.17 โมลาร์ เป็นองค์ประกอบ แล้วเก็บตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์นำไปตรวจสอบกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ พบว่า โปรตีนขนาด 45 kDa มีกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์สูงที่สุด คือ 792 U/mg โดยมีกิจกรรมสูงกว่า alasan ซึ่งมีกิจกรรม 712 U/mg แต่ความคงตัวของอิมัลชันต่ำกว่า alasan (Toren *et al.*, 2001)

9. สมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดโพลิเมอริก

9.1 การคงตัวต่อความเป็นกรด-ด่าง alasan ที่ผลิตจาก *A. radioresistens* KA53 มีกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์สูงที่สุดที่พีเอชเท่ากับ 5 และ alasan มีกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์คงตัวในสภาวะที่เป็นด่างซึ่งชี้ให้เห็นว่าพันธะเอสเทอร์ไม่ได้มีผลต่อกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ของ alasan (Navon-Venezia *et al.*, 1995) แตกต่างจาก emulsan ที่ผลิตจาก *A. calcoaceticus* RAG-1 ซึ่งกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ลดลงเมื่ออยู่ใน

สภาวะที่เป็นด่าง โดยพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของ emulsan คือ พีเอชเท่ากับ 5 (Rosenberg *et al.*, 1979b) สำหรับความคงตัวต่อกรด-ด่างของ biodispersan จาก *A. calcoaceticus* A2 มีความคงตัวที่พีเอช 9-12 และกิจกรรมลดลงที่พีเอชต่ำกว่า 9 (Rosenberg *et al.*, 1988)

9.2 การคงตัวต่ออุณหภูมิ ผลการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของ alasan จาก *A. radioresistens* KA53 เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลานานสูงสุดคือ 60 นาที ทั้งในสภาวะที่เป็นกลางและในสภาวะที่มีโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล พบว่า alasan ยังคงมีกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ที่ดี กล่าวคือ มีกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์เท่ากับ 1500 U/ml และ 1080 U/ml ตามลำดับ

9.3 การคงตัวต่อเกลือ เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Acinetobacter* ssp. ส่วนใหญ่จะนำไปประยุกต์ใช้ในสภาวะแวดล้อมโดยเฉพาะทางทะเล ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาผลของเกลือที่เป็นองค์ประกอบในน้ำทะเล จากการทดลองของ Rosenberg และคณะ (1979b) พบว่าที่สภาวะที่เป็นด่าง emulsan จะมีกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์สูงขึ้นเมื่อมีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตหรือแมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 5 ถึง 40 มิลลิโมลาร์ สำหรับโซเดียมคลอไรด์ไม่มีผลต่อความคงตัวของกิจกรรมของ emulsan และพบว่ากิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ไฮโดรคาร์บอนของ emulsan ที่พีเอชสูงกว่า 6 ขึ้นอยู่กับการมีอยู่ของ divalent cation เช่นเดียวกับ alasan จาก *A. radioresistens* KA53 พบว่าเกลือแมกนีเซียมช่วยเพิ่มกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ของ alasan ในสภาวะที่มีพีเอชสูงหรือต่ำกว่า 5 และโซเดียมคลอไรด์ไม่มีผลต่อกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ของ alasan (Navon-Venezia *et al.*, 1995)

สำหรับกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ของ biodispersan พบว่า โซเดียมคลอไรด์ไม่มีผลต่อกิจกรรม แต่เกลือแมกนีเซียมมีผลในการยับยั้งกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ของ biodispersan ดังนั้นก่อนที่จะนำ biodisersan มาวัดกิจกรรมจำเป็นจะต้องผ่านกระบวนการ dialysis ก่อน

9.4 สมบัติในการอิมัลซิไฟด์สารประกอบไฮโดรคาร์บอน สารลดแรงตึงผิวชีวภาพแต่ละชนิดมีความจำเพาะต่อสารประกอบไฮโดรคาร์บอนแตกต่างกัน พบว่า emulsan จาก *A. calcoaceticus* RAG-1 และอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* BD4 และ BD413 มีกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เป็นอะลิฟาติก (aliphatic) และอะโรมาติก(aromatic) เดี่ยวๆ ได้ต่ำหรือไม่มีกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ แต่จะมีกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์สูงเมื่อสารตั้งต้นเป็นสารประกอบอะลิฟาติกและอะโรมาติกรวมกัน (Kaplan *et al.*, 1982; Rosenberg *et al.*, 1979a) แตกต่างจาก alasan จาก *A. radioresistens* ซึ่งสามารถอิมัลซิไฟด์สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เป็นอะลิฟาติกและอะโรมาติกเดี่ยวๆ ได้ (Navon-Venezia *et al.* 1995)

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญ และผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7
2. ศึกษาการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7
3. ศึกษาคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จากเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7
4. ศึกษาองค์ประกอบพื้นฐานของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จากเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7

ขอบเขตงานวิจัย

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญ และผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 รวมทั้งศึกษาวิธีการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ตลอดจนศึกษาองค์ประกอบพื้นฐานและคุณสมบัติต่างๆของสารลดแรงตึงผิวที่สกัดได้

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุ อุปกรณ์

1. จุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์สำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ได้แก่ *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 ซึ่งเก็บรักษาไว้ใน glycerol stock ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเชื้อที่แยกได้จากน้ำทะเลที่ปนเปื้อนคราบน้ำมันจากทะเลสาบสงขลา (Maneerat *et al.*, 2005)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารสำหรับการเตรียมเชื้อเริ่มต้น และเก็บรักษาเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 คือ Marine broth 2216 (Difco, USA)

วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์การเจริญของเชื้อ

ปิเปตตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แยกเอาส่วนใสออก ล้างเซลล์ด้วยโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0) 2 ครั้ง เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล บ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที (Shabtai, 1990) แล้วจึงนำไปหาปริมาณโปรตีนทั้งหมดโดยวิธี Lowry method (Lowry *et al.*, 1951) (ภาคผนวก ข)

2. การวิเคราะห์ค่า Emulsification activity (%EA)

เนื่องจากเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจึงมีความสามารถในการทำให้เกิดความคงตัวของอิมัลชันมากกว่าการลดแรงตึงผิว เติม *n*-hexadecane 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ที่อยู่ในหลอดทดลองผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer นาน 2 นาที แล้วทิ้งไว้ 10 นาที หาค่า emulsification activity โดยสามารถคำนวณได้จากสมการ (Cooper and Goldenberg, 1987)

$$\text{Emulsification activity (\%)} = \frac{\text{ความสูงของ emulsion ที่เกิดขึ้น} \times 100}{\text{ความสูงทั้งหมดของสารละลาย}}$$

3. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวิธี Bradford method (Bradford, 1976) (ภาคผนวก ข)

4. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล

วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เป็นองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวิธี phenol-sulfuric method (Dubois *et al.*, 1956) (ภาคผนวก ข)

วิธีการทดลอง

การเตรียมกล้าเชื้อ

ถ่ายเชื้อ *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 จาก glycerol stock 0.1 มิลลิลิตร ลงใน Marine broth ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาดกลาง เขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อ 1.0 มิลลิลิตร ลงใน marine broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใน ฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ โดยควบคุม OD_{600} ของกล้าเชื้อให้มีค่าเท่ากับ 0.5 โดยมีเชื้อประมาณ 10^6 CFU/ml

1. เปรียบเทียบความสามารถในการอิมัลซิไฟด์ Weathered crude oil (WCO) ของตัวเซลล์และส่วนใส

ถ่ายกล้าเชื้อ 1% ลงใน marine broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเหวี่ยงแยกเอาเซลล์ออกจากน้ำหมัก (culture broth) ล้างเซลล์ด้วยโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0) สองครั้ง แล้วละลายเซลล์กลับโดยใช้บัฟเฟอร์เดิมให้มีปริมาตรเท่ากับอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น จากนั้นเติม WCO ร้อยละ 1 ทั้งในส่วนใส (cell-free broth) และเซลล์แขวนลอย (cell suspension) เขย่าภายใต้สภาวะเดียวกับการเลี้ยงเชื้อ แล้วเปรียบเทียบผลการอิมัลซิไฟด์ WCO ของเซลล์แขวนลอยและส่วนใส

2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7

2.1 สูตรอาหาร

ถ่ายกล้าเชื้อ 1% ลงใน สูตรอาหาร 2 สูตร คือ minimal salt medium (ภาคผนวก ก) และ seawater medium (ภาคผนวก ก) โดยแต่ละสูตรมีกลูโคส และ *n*-hexadecane ความเข้มข้น 2% และ 1% เป็นแหล่งคาร์บอนตามลำดับ อาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 24, 48, 72 ชั่วโมง วัด emulsification activity แล้วเลือกสูตรอาหารและแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

2.2 แหล่งคาร์บอน

ถ่ายกล้าเชื้อ 1% ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมจากข้อ 2.1 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน คือ *n*-tridecane, *n*-tetradecane, *n*-pentadecane, *n*-hexadecane, *n*-heptadecane ความเข้มข้น 0.1% เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 24, 48, 72 ชั่วโมง วัดการเจริญโดยวิเคราะห์โปรตีนทั้งหมดของเซลล์, พีเอช, emulsification activity เลือกแหล่งคาร์บอนที่ให้ค่า emulsification activity สูงที่สุดเพื่อทดลองในขั้นตอนต่อไป

2.3 ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

ถ่ายกล้าเชื้อ 1% ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อ 2.2 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยปรับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนให้มีค่าเท่ากับ 0.1, 0.3 และ 0.5% เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 24, 48, 72 ชั่วโมง วิเคร์าะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.2 เลือกความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ให้ค่า emulsification activity สูงที่สุดเพื่อทดลองในขั้นตอนต่อไป

2.4 แหล่งไนโตรเจน

ถ่ายกล้าเชื้อ 1% ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อ 2.3 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยแหล่งไนโตรเจน คือ แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ความเข้มข้น 0.1 % เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 24, 48, 72 ชั่วโมง วิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.2 เลือกแหล่งไนโตรเจนที่ให้ค่า emulsification activity สูงที่สุดเพื่อทดลองในขั้นตอนต่อไป

2.5 ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

ถ่ายกล้าเชื้อ 1% ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 2.4 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยปรับความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนให้มีค่าเท่ากับ 0.1, 0.3 และ 0.5% เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 24, 48, 72 ชั่วโมง วิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.2 เลือกความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่ให้ค่า emulsification activity สูงที่สุดเพื่อทดลองในขั้นตอนต่อไป

2.6 พีเอชเริ่มต้น

ถ่ายกล้าเชื้อ 1% ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 2.5 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีค่าเท่ากับ 5, 6, 7 และ 8 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 24, 48, 72 ชั่วโมง วิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.2 เลือกพีเอชเริ่มต้นที่ให้ค่า emulsification activity สูงที่สุดเพื่อทดลองในขั้นตอนต่อไป

2.7 อุณหภูมิ

ถ่ายกล้าเชื้อ 1% ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน และพีเอชจากข้อ 2.6 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยเลี้ยงเชื้อที่ 25 องศาเซลเซียส, อุณหภูมิห้อง (30±2°C) และ 37องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 24, 48, 72 ชั่วโมง วิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.2 เลือกอุณหภูมิที่ให้ค่า emulsification activity สูงที่สุดเพื่อทดลองในขั้นตอนต่อไป

2.8 การเขย่า

ถ่ายกล้าเชื้อ 1% ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน และพีเอช ที่เหมาะสม ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 2.7 โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 100, 200, 300 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 24, 48, 72 ชั่วโมง วิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.2 เลือกความเร็วรอบที่ให้ค่า emulsification activity สูงที่สุดเพื่อทดลองในขั้นตอนต่อไป

2.9 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7

ถ่ายกล้าเชื้อ 1% ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด500 มิลลิลิตร และเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง วิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.2 เลือกช่วงเวลาที่ให้ค่า emulsification activity สูงที่สุด เพื่อใช้ในการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อไป

3. ศึกษาวิธีการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7

3.1 ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

เติมแอมโมเนียมซัลเฟตในส่วนใสที่ได้จากการเหวี่ยงแยกเซลล์ 500 มิลลิลิตร โดยให้อิ่มตัวที่ความเข้มข้นในช่วง 40-60 % เก็บตะกอนโดยเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที จากนั้นละลายตะกอนในน้ำกลั่น นำสารละลายตะกอนที่ได้มากำจัดเกลือ (dialysis) โดยใช้ dialysis bag ที่มี molecular weight cut-off 8,000 ดาลตันในน้ำกลั่นโดยเปลี่ยนน้ำกลั่นที่เวลา 1, 2, 4 ชั่วโมง และทิ้งไว้ข้ามคืน แล้วทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้คาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส เลือกความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการตกตะกอน วิเคราะห์ผลโดยชั่งน้ำหนักตะกอนและหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ทำให้เกิดอิมัลชัน (critical emulsifier concentration)

3.2 ตกตะกอนด้วยอะซิโตน

นำส่วนใสมาตกตะกอนด้วยอะซิโตนในอัตราส่วน 1:3 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตะกอนโดยเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ระเหยอะซิโตน วิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับข้อ 3.1

3.3 ตกตะกอนด้วยเมธานอล

นำส่วนใสมาตกตะกอนด้วยเมธานอลในอัตราส่วน 1:3 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตะกอนโดยเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ระเหยเมธานอล วิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับข้อ 3.1

3.4 ตกตะกอนด้วยเอธานอล

นำส่วนใสมาตกตะกอนด้วยเอธานอล 95%ในอัตราส่วน 1:3 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตะกอนโดยเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ระเหยเอธานอล วิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับข้อ 3.1

จากวิธีการตกตะกอนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทั้ง 4 วิธี เลือกวิธีที่ดีที่สุดในการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยเปรียบเทียบค่า critical emulsifier concentration และน้ำหนักตะกอนที่ได้ โดยเลือกวิธีการตกตะกอนที่ให้ตะกอนมากที่สุดและ/หรือมีค่า critical emulsifier concentration น้อยที่สุด

4. ศึกษาคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

4.1 พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ละลายสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับพีเอชด้วย 1N HCl หรือ 1N NaOH ให้มีค่าพีเอชเท่ากับ 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 และ 12 จากนั้นจากนั้นวัด emulsification activity ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้และสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ คือ sodiumdodecyl sulfate (SDS) และ Tween 80

4.2 ความคงตัวต่ออุณหภูมิของสารลดแรงตึงผิวที่สกัดได้

ละลายสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ด้วยน้ำกลั่น แล้วบ่มตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 และ 121 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ยกเว้นที่อุณหภูมิ 110 และ 121 องศาเซลเซียส บ่มนาน 15 นาที แล้วทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นวัดกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเช่นเดียวกับข้อ 4.1

4.3 ผลของเกลือต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

ละลายสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ด้วยน้ำกลั่น เติมโซเดียมคลอไรด์ให้มีความเข้มข้น 0, 1, 2, 3, 6, 9 และ 12% หรือแคลเซียมคลอไรด์หรือแมกนีเซียมคลอไรด์ให้มีความเข้มข้น 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.1% หรือทดสอบกิจกรรมกับน้ำทะเล จากนั้นวัดกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเช่นเดียวกับข้อ 4.1

4.4 ศึกษาความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารลดแรงตึงผิว

ตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก (*Bacillus subtilis* SM4 *Bacillus pumilus* SM9 *Bacillus* sp. *Staphylococcus aureus*) และแบคทีเรียแกรมลบ (*Escherichia coli Vibrio* sp. *Pseudomonas* sp.) โดยใช้วิธี Agar Diffusion Method (Jenney *et al.*, 1991)

4.5 ศึกษาผลของสารลดแรงตึงผิวต่อการเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำของ Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)

ใส่ PAHs (phenanthrene, anthracene, pyrene, fluorene) 100 มิลลิกรัมลงในหลอดหมุนเหวี่ยงขนาด 45 มิลลิลิตร แล้วเติมสารลดแรงตึงผิวที่ความเข้มข้น 50 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรลงไป เขย่าบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นหมุนเหวี่ยงที่ 5000 รอบต่อ

นาทีเป็นเวลา 1 ชั่วโมงเพื่อแยก PAHs ที่ไม่ละลาย แล้ววิเคราะห์ PAHs ที่ละลายได้โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 254 นาโนเมตร (Zhao *et al.*, 2005)

5. ศึกษาความจำเพาะของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ต่อไฮโดรคาร์บอนต่างๆ

ละลายสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยน้ำกลั่น วัดค่า emulsification activity ตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 2 ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้กับไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ *n*-tridecan, *n*-tetradecane, *n*-pentadecane, *n*-hexadecane, *n*-neptadecane, benzene, toluene และ xylene

6. ศึกษาองค์ประกอบบางส่วนของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้มากำจัด impurity โดยการทำไดอะไลซิส (dialysis) ซึ่งใช้ dialysis bag ที่มี molecular weight cut-off 8,000 ดาลตัน ในน้ำกลั่น ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนน้ำกลั่นที่เวลา 1, 2, 4 ชั่วโมง และทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นทำให้สารเข้มข้นขึ้นโดยใช้คาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลสจนมีปริมาตรเหลือประมาณ 10 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปทำแห้งแบบ freeze dry แล้วนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้มาตรวจสอบองค์ประกอบอย่างคร่าวๆ ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้โดย

8.1 Gel Permeation Chromatography

ศึกษาน้ำหนักโมเลกุลและตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนด้วย Gel Permeation Chromatography (GPC) ตรวจวิเคราะห์โดยศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ

8.2 Thin Layer Chromatography

ตรวจสอบองค์ประกอบอย่างคร่าวๆ ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนด้วย Thin Layer Chromatography (TLC) ที่มี silica gel 60 เป็น stationary phase โดยนำไปแช่ใน mobile phase คือ ethyl acetate: pyridine: water: acetic acid (5:5:5:1) โดยปริมาตร แล้วใช้ spraying reagent ต่างๆ ในการตรวจสอบองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

- ใช้ rhodamine B เพื่อตรวจสอบการมีอยู่ของกรดไขมัน (McInerney *et al.*, 1990) (ภาคผนวก ค)
- ใช้ ninhydrin เพื่อดูหมู่อะมิโนอิสระ (Wilkinson, 1972) (ภาคผนวก ค)
- ใช้ anisaldehyde ในการวิเคราะห์น้ำตาล (Schulz *et al.*, 1991) (ภาคผนวก ค)

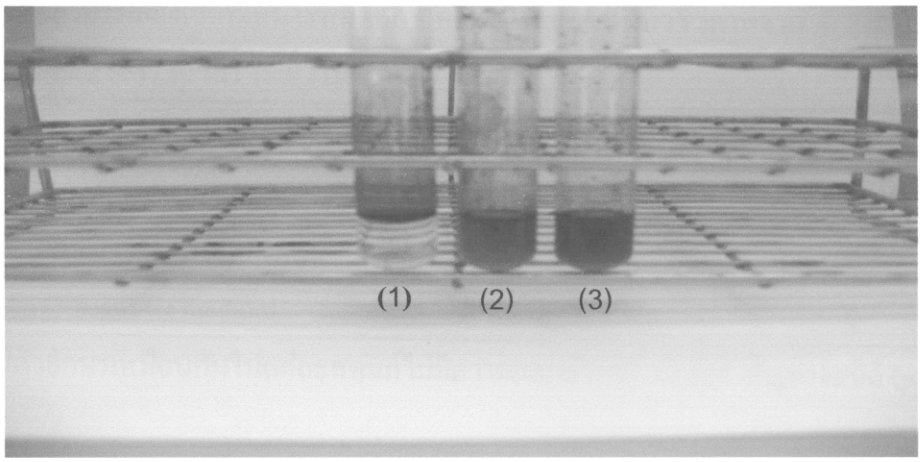
8.3 Fourier Transform Infrared Spectrometer

ตรวจสอบองค์ประกอบอย่างคร่าวๆ ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนโดย Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR) ตรวจวิเคราะห์โดยศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. เปรียบเทียบความสามารถในการอิมัลซิไฟด์ weathered crude oil (WCO) ของตัวเซลล์และส่วนใส

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 ในอาหาร marine broth 2216 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาเปรียบเทียบความสามารถในการอิมัลซิไฟด์ weathered crude oil ของตัวเซลล์และส่วนใส โดยเติม weathered crude oil 1% ในส่วนใสและเซลล์แขวนลอยแล้วเขย่าภายใต้สภาวะเดียวกับการเลี้ยงเชื้อ แล้วเปรียบเทียบผลการอิมัลซิไฟด์ weathered crude oil ของเซลล์แขวนลอยและส่วนใส พบว่าทั้งเซลล์แขวนลอยและส่วนใสมีความสามารถในการอิมัลซิไฟด์ weathered crude oil แต่ส่วนใสสามารถอิมัลซิไฟด์ weathered crude oil ได้ดีกว่าเซลล์แขวนลอย (ภาพที่ 5) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทั้งในรูปของสารที่หลั่งออกมานอกเซลล์และที่ติดอยู่กับตัวเซลล์ แต่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในรูปหลั่งออกมานอกเซลล์ได้มากกว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ติดอยู่กับตัวเซลล์ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการทดลองของ Rosenberg และคณะ (1979b) ที่ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* RAG-1 พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีอะซิเตตและเอธานอลเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อมีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทั้งในรูปที่หลั่งออกมานอกเซลล์และติดกับตัวเซลล์ โดยผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในรูปหลั่งออกมานอกเซลล์มากกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ทั้งหมด แต่เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี *n*-hexadecane เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เชื้อผลิตได้ทั้งหมดอยู่ในรูปหลั่งออกมานอกเซลล์เช่นเดียวกับ Rosenberg และคณะ (1988) ที่เปรียบเทียบความสามารถในการทำให้เกิดการกระจายตัวของหินปูนของตัวเซลล์และส่วนใสจาก *A. calcoaceticus* A2 และ HE5 พบว่าเซลล์แขวนลอยของเชื้อ *A. calcoaceticus* A2 และ HE5 ไม่ทำให้เกิดการกระจายตัวของหินปูนเนื่องจากตัวเซลล์เกิดการรวมตัวกันเป็นก้อนเมื่อทำปฏิกิริยากับหินปูน แต่เมื่อใช้ส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *A. calcoaceticus* A2 และ HE5 ในการทดสอบ พบว่าส่วนใสที่ได้ทำให้เกิดการกระจายตัวของหินปูน แสดงให้เห็นว่า *A. calcoaceticus* A2 และ HE5 ผลิตอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่มีความสามารถในการทำให้เกิดการกระจายตัวของหินปูนในรูปของสารที่หลั่งออกจากเซลล์



ภาพที่ 5 กิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ weathered crude oil โดยชุดควบคุม (buffer) (1) ตัวเซลล์ (2) ส่วนใส (3)

2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7

2.1 สูตรอาหาร

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 ในสูตรอาหาร 2 สูตร คือ minimal salt medium และ seawater medium โดยแต่ละสูตรมีกลูโคส และ *n*-hexadecane ความเข้มข้น 2% และ 1% เป็นแหล่งคาร์บอนตามลำดับ พบว่าเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 เจริญในอาหารที่มี *n*-hexadecane และกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน แต่เชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7ไม่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจากเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 เป็นเชื้อที่แยกได้จากน้ำทะเลที่มีการปนเปื้อนคราบน้ำมัน ดังนั้นเชื้อสายพันธุ์นี้จึงผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอาหารที่มีสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจากมีสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเป็นตัวกระตุ้นให้เชื้อมีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Maeng *et al.*, 1996) แต่เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อสามารถนำกลูโคสไปใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญแต่ไม่มีการกระตุ้นให้สร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยระยะเวลาที่มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงที่สุดคือที่เวลา 48 ชั่วโมง และจากข้อมูลในตารางที่ 3 พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่า emulsification activity ในการใช้ *n*-hexadecane เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด แต่เนื่องจากสูตรอาหาร minimal salt medium สามารถเตรียมได้ง่ายและไม่ต้องใช้น้ำทะเลในการเตรียม ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปจึงเลือกใช้สูตรอาหาร minimal salt medium เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ตารางที่ 3 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 ที่เวลา 48 ชั่วโมง

Media	Emulsification activity (%)	
	n-hexadecane	Glucose
minimal salt medium	37.50±2.61[a]	0
seawater medium	34.78±3.77[a]	0

* ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละสดมภ์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

2.2 แหล่งคาร์บอน

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 ในอาหาร minimal salt medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน คือ *n*-tridecane, *n*-tetradecane, *n*-pentadecane, *n*-hexadecane, *n*-heptadecane ความเข้มข้น 0.1% ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที พบว่าเชื้อไม่เจริญในอาหารที่ใช้ *n*-tridecane, *n*-tetradecane และ *n*-pentadecane เป็นแหล่งคาร์บอนจึงตรวจไม่พบกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิว แต่เจริญในอาหารที่มี *n*-hexadecane และ *n*-heptadecane เป็นแหล่งคาร์บอน (ตารางที่ 4) และเมื่อเปรียบเทียบค่า emulsification activity จากแหล่งคาร์บอนทั้ง 2 ชนิดที่เวลา 48 ชั่วโมง พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปจึงเลือกใช้ *n*-heptadecane เป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจากเชื้อเจริญได้ดีกว่าอาหารที่มี *n*-hexadecane เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ที่เลือกใช้ เช่น Rosenberg และคณะ (1979b) ศึกษาการผลิต emulsan จากเชื้อ *A. calcoaceticus* RAG-1 พบว่าเชื้อผลิต emulsan เมื่อเจริญในอาหารที่มี *n*-hexadecane และ เอธานอล เป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์เท่ากับ 14 U/ml และ 25 U/ml ตามลำดับ และพบว่าเชื้อมีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในรูปหลั่งออกมานอกเซลล์เมื่อใช้ *n*-hexadecane เป็นแหล่งคาร์บอน ส่วน *A. radioresistens* KA53 และ *A. calcoaceticus* A2 ผลิต alasan และ biodispersan เมื่อเจริญในอาหาร ที่มีเอธานอลเป็นแหล่งคาร์บอน (Navon-Venezia *et al.*, 1995; Rosenberg *et al.*, 1988) นอกจากนี้ Kaplan และคณะ (1982) ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* BD4 และ BD413 โดยเมื่อเลี้ยงเชื้อ *A. calcoaceticus* BD413 ในอาหารที่มีกรดแลกติกและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อที่เวลา 48 ชั่วโมง มีค่า emulsification activity เท่ากับ 25 U/ml และ 4 U/ml ตามลำดับ สำหรับเชื้อ *A. calcoaceticus* BD4 พบว่าส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อมีค่า emulsification activity เท่ากับ 61 U/ml และ 70 U/ml ตามลำดับ และไม่พบกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์จากส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิดในอาหาร brain heart infusion

สำหรับวิถีการนำ *n*-alkanes ไปใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์มี 3 แบบ ได้แก่ monoterminal oxidation pathway ($RCH_3 \rightarrow RCH_2OH \rightarrow RCHO \rightarrow RCOOH$), biterminal oxidative

pathway (H_3CRCH_3 → H_3CRCH_2OH → $HOCH_2RCH_2OH$ → HOOCRCOOH) และ subterminal oxidation pathway (RCH2CH3 → RCH(OH)CH3 → RC(O)CH3) (Markovetz, 1979; May and Katoposis, 1990; Rehm and Reiff, 1981)โดยทั้ง 3 วิถี จะเริ่มต้นการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ hydroxylase (monooxygenase) เพื่อให้ได้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิหรือทุติยภูมิ แต่สำหรับจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Acinetobacter* sp. จะมีวิถีการนำ *n*-alkanes ไปใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างออกไป โดยในช่วงต้นของการย่อยสลายจะใช้เอนไซม์ dioxygenase แทน monooxygenase ซึ่งการทำงานของเอนไซม์ dioxygenase จะต้องใช้ออกซิเจนในการออกซิเดชัน *n*-alkanes ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์เป็น *n*-alkyl hydroperoxide และออกซิไดซ์ต่อไปได้เป็น alkyl aldehyde (Maeng *et al.*, 1996) ดังนั้นความจำเพาะต่อ *n*-alkanes ของจุลินทรีย์แต่ละชนิดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับความจำเพาะของเอนไซม์ dioxygenase ต่อ *n*-alkanes ซึ่งจากการทดลองในตารางที่ 4 จะเห็นได้ว่า *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 มีความจำเพาะกับ *n*-alkanes ที่มีคาร์บอนมากกว่า 16 อะตอม ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Maeng และคณะ (1996) ซึ่งมีการศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์สำหรับออกซิเดชัน *n*-alkanes ของจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Acinetobacter* sp. ต่อ *n*-alkanes ชนิดต่างๆ พบว่าเอนไซม์ที่ได้มีความจำเพาะต่อ *n*-hexadecane ซึ่งมี relative activity เท่ากับ 100% ซึ่ง *n*-alkanes ส่วนใหญ่ในน้ำมันดิบหรือคราบน้ำมันจะมีคาร์บอนมากกว่า 16 อะตอม (Maneerat *et al.*, 2006)

จากผลการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้นชี้ให้เห็นว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธ์ของจุลินทรีย์ ซึ่งโดยส่วนใหญ่แล้วจุลินทรีย์ในกลุ่มของ *Acinetobacter* spp. ไม่สามารถใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนแต่สามารถใช้แอลกอฮอล์และสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอน (Shabtai, 1990)

ตารางที่ 4 ผลของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 ที่เวลา 48 ชั่วโมง ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1% เป็นแหล่งไนโตรเจน

C-source (0.1%)	Final pH	Emulsification activity (%)	Total cell protein (mg/ml)
n-tridecane	6.96±0.01	0	ND
n-tetradecane	6.95±0.02	0	ND
n-pentadecane	6.96±0.02	0	ND
n-hexadecane	6.82±0.08	27.08±1.31[a*]	0.01±0.0
n-heptadecane	6.34±0.13	30.67±3.77[a]	0.22±0.1

* ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละสดมภ์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

2.3 ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 ในอาหาร minimal salt medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้ *n*-heptadecane เป็นแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้น 0.1%, 0.3% และ 0.5% ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที พบว่าที่ความเข้มข้นของ *n*-heptadecane เท่ากับ 0.3% จะให้ค่า emulsification activity สูงที่สุด คือ 46.31 % (ตารางที่ 5) สำหรับที่ความเข้มข้นของ *n*-heptadecane เท่ากับ 0.5% เชื้อมีการเจริญสูงที่สุดแต่มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้น้อย ซึ่งเป็นผลมาจากค่าพีเอชในระหว่างการเลี้ยงเชื้อมีค่าลดต่ำลงจากพีเอชเริ่มต้นซึ่งมีค่าเท่ากับ 7.0 ดังนั้น กิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์จึงมีค่าลดลงเนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะตกตะกอนในสภาวะที่เป็นกรด (Suttivanitchakul *et al.*, 1999) ดังนั้นจึงเลือกใช้ *n*-heptadecane ความเข้มข้น 0.3% ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในขั้นตอนต่อไป ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนโดยเฉพาะสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่สูงขึ้นมีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดย Makar and Cameotra (1997) พบว่า *Bacillus subtilis* MTCC 2423 สามารถเจริญแต่ไม่มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเมื่อความเข้มข้นของ *n*-hexadecane และ pristane สูงถึง 2% และเชื้อไม่สามารถเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเมื่อใช้ dodecane, decane และ kerosene ความเข้มข้น 2 % เป็นแหล่งคาร์บอน แต่สามารถเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีเมื่อใช้กลูโคสและซูโครสที่ความเข้มข้นเดียวกันเป็นแหล่งคาร์บอน จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าการใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีความเข้มข้นสูงเป็นแหล่งคาร์บอนมีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เพราะสารไฮโดรคาร์บอนเหล่านี้อาจจะมีพิษต่อเซลล์จุลินทรีย์เช่นกัน (Nweke and Okpokwasili, 2003)

ตารางที่ 5 ผลของความเข้มข้นของ *n*-heptadecane ที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 ที่เวลา 48 ชั่วโมง ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1% เป็นแหล่งไนโตรเจน

n-heptadecane concentration (%)	Final pH	Emulsification activity (%)	Total cell protein (mg/ml)
0.1	6.55±0.05	28.08±5.87[b*]	0.18±0.04
0.3	5.28±0.04	46.31±3.34[a]	0.36±0.08
0.5	5.24±0.02	29.25±4.78[b]	0.48±0.02

* ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละสดมภ์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

2.4 แหล่งไนโตรเจน

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 ในอาหาร minimal salt medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม คือ *n*-heptadecane ความเข้มข้น 0.3% และแหล่งไนโตรเจน คือ แอมโมเนียมไนเตรต, แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ความเข้มข้น 0.1% ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที พบว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตเป็นแหล่งไนโตรเจนให้ค่า emulsification activity สูงที่สุด คือ 48.67% (ตารางที่ 6) นอกจากนี้แอมโมเนียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตยังช่วยในการควบคุมพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อไม่ให้ลดต่ำลงในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Kim และคณะ (1997) ที่พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus subtilis* C9 คือ แอมโมเนียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ซึ่งเมื่อวัดค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากเลี้ยงเชื้อ 3 วัน พบว่าการที่เชื้อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้สูงเนื่องจากแอมโมเนียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตช่วยป้องกันการลดลงของพีเอชในระหว่างการเลี้ยงเชื้อได้ดีกว่าแหล่งไนโตรเจนอื่น

ตารางที่ 6 ผลของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 ที่เวลา 48 ชั่วโมง

N-source (0.1%)	Final pH	Emulsification activity (%)	Total cell protein (mg/ml)
NH_4NO_3	5.67±0.08	42.54±3.85[b*]	0.34±0.07
$(NH_4)_2SO_4$	5.55±0.12	38.55±3.38[b]	0.41±0.03
NH_4HCO_3	6.58±0.02	48.67±1.15[a]	0.47±0.04

* ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละสดมภ์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

2.5 ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 ในอาหาร minimal salt medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม คือ *n*-heptadecane ความเข้มข้น 0.3% และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม คือ แอมโมเนียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต โดยใช้ความเข้มข้น 0.1%, 0.2% และ 0.3% ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที พบว่าแอมโมเนียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ความเข้มข้น 0.1% ให้ค่า emulsification activity สูงที่สุด คือ 58.33% (ตารางที่ 7) ส่วนแอมโมเนียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ความเข้มข้น 0.5% ไม่มีการเจริญของเชื้อเนื่องจากความเข้มข้นของแอมโมเนียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตที่สูงเกินไปทำให้พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าเพิ่มสูงขึ้นเป็น 9.05 ซึ่งไม่

เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ โดยปกติแบคทีเรียมีช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ระหว่าง 6.5-7.5 (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2544)

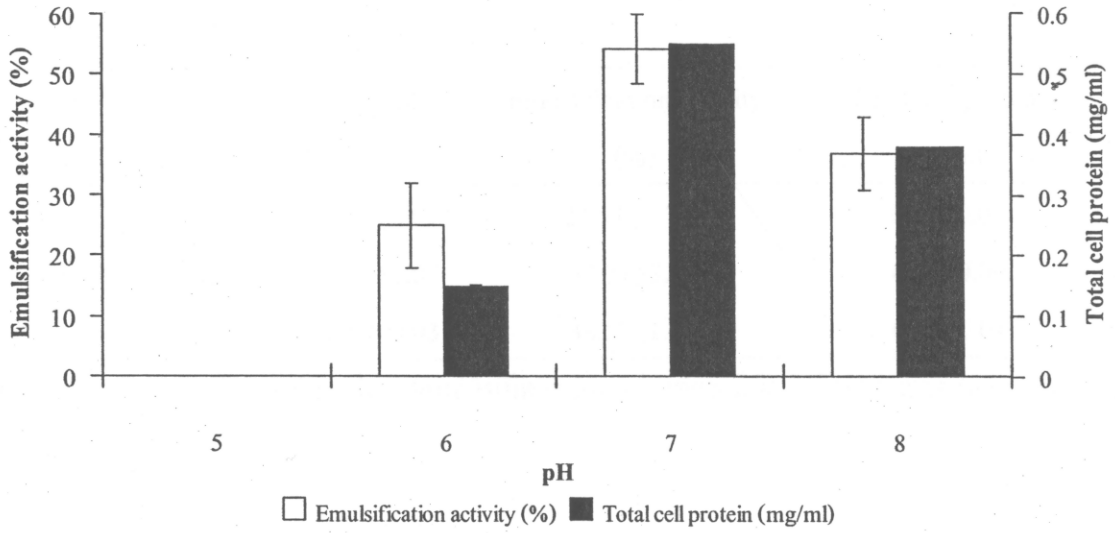
ตารางที่ 7 ผลของความเข้มข้นของแอมโมเนียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 ที่เวลา 48 ชั่วโมง

NH_4HCO_3 concentration (%)	Final pH	Emulsification activity (%)	Total cell protein (mg/ml)
0.1	6.65±0.10	58.33±4.17[a*]	0.59±0.09
0.3	7.37±0.06	36.59±2.61[b]	0.40±0.13
0.5	9.05±0.07	0	ND

* ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละสดมภ์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

2.6 พีเอชเริ่มต้น

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 ในอาหาร minimal salt medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม คือ *n*-heptadecane ความเข้มข้น 0.3% และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม คือ แอมโมเนียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ความเข้มข้น 0.1% โดยปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 5, 6, 7 และ 8 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง และเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 6 พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 เชื้อมีการเจริญสูงที่สุดและให้ค่า emulsification activity สูงที่สุด คือ 54.22% และที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5 เชื้อไม่มีการเจริญและไม่มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้นต่ำไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรีย และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะตกตะกอนในสภาวะที่เป็นกรด (Suttivanitchakul *et al.*, 1999) และพบว่าการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความสัมพันธ์กับการเจริญของเชื้อ เนื่องจากเมื่อเชื้อมีการเจริญมากขึ้นก็จะมีกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มสูงขึ้นด้วย (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 ผลของพีเอชเริ่มต้นที่มีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 ที่เวลา 48 ชั่วโมง

2.7 อุณหภูมิ

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. a*nitratus* SM7 ในอาหาร minimal salt medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม คือ *n*-heptadecane ความเข้มข้น 0.3% และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม คือ แอมโมเนียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ความเข้มข้น 0.1% โดยพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7 เลี้ยงเชื้อที่ 25 องศาเซลเซียส, อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) และ 37 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที พบว่าเชื้อเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีที่อุณหภูมิห้อง โดยค่า emulsification activity สูงที่สุด คือ 52.78% ดังแสดงในตารางที่ 8 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพขึ้นกับสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ใช้ ถ้าแบคทีเรียนั้นแยกมาได้จากแหล่งที่มีอุณหภูมิสูง เช่น ทะเลทรายหรือน้ำพุร้อน อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะสูงไปด้วย เช่น Gurjar และคณะ (1995) แยกเชื้อ *Bacillus stearothermophilus* VR-8 จากน้ำพุร้อน พบว่าเชื้อสามารถเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในช่วง 45-70 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 50 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ Yakimov และคณะ (1995) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* BAS 50 คืออุณหภูมิในช่วง 35-45 องศาเซลเซียส ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากทะเลเหนือ (North Sea) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ คือ 20 องศาเซลเซียส (Schulz *et al.*, 1991)

ตารางที่ 8 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 ที่เวลา 48 ชั่วโมง

Temperature (^{o}C)	Final pH	Emulsification activity (%)	Total cell protein (mg/ml)
25°C	6.78±0.09	31.11±2.77^{c*}	0.48±0.04
Room temperature (30±2°C)	6.51±0.07	52.78±5.21^{a}	0.55±0.09
37°C	6.59±0.03	38.57±1.38^{b}	0.47±0.01

* ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละสดมภ์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05)

2.8 การเขย่า

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 ในอาหาร minimal salt medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม คือ *n*-heptadecane ความเข้มข้น 0.3% และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม คือ แอมโมเนียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ความเข้มข้น 0.1% โดยพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7 เลี้ยงเชื้อที่ อุณหภูมิห้อง และเขย่าที่ความเร็วรอบ 100, 200 และ 300 รอบต่อนาที พบว่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เชื้อมีการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงที่สุด โดยดูจากค่า total cell protein และมีค่า emulsification activity เท่ากับ 50.72% แต่ที่ความเร็วรอบต่างๆ เชื้อเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 9)

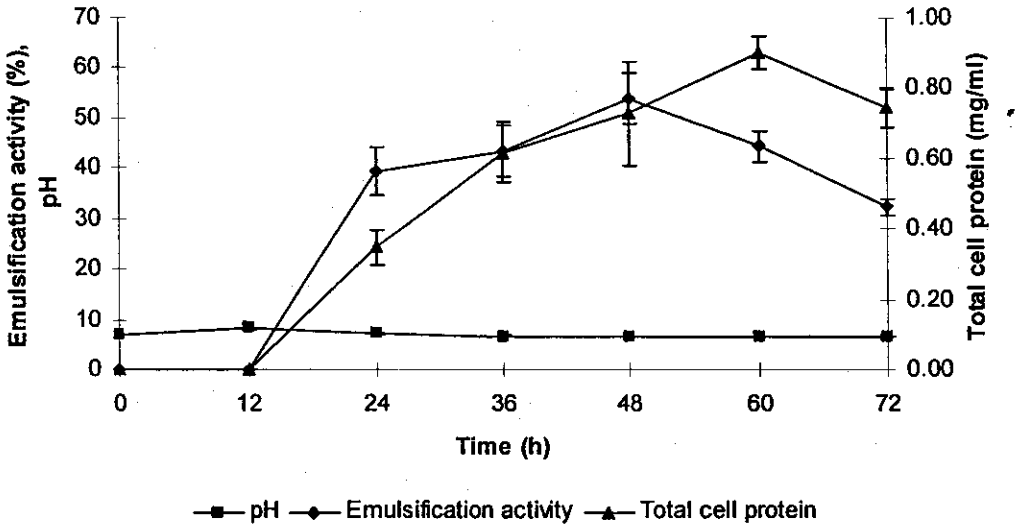
ตารางที่ 9 ผลของการเขย่าต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 ที่เวลา 48 ชั่วโมง

Agitation rate (rpm)	Final pH	Emulsification activity (%)	Total cell protein (mg/ml)
100	7.17±0.05	42.82±8.67^{a*}	0.34±0.09
200	6.66±0.05	50.72±1.25^{a}	0.89±0.16
300	6.65±0.06	43.05±8.67^{a}	0.81±0.05

* ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละสดมภ์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05)

2.9 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7

การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 7 พบว่าเชื้อเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง โดยให้ค่า total cell protein สูง และมีค่า emulsification activity เท่ากับ 53.86% ซึ่งการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับการเจริญของเชื้อ ชี้ให้เห็นว่าการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 เป็นแบบที่มีความสัมพันธ์กับการเจริญ (growth-associate production) ซึ่งสอดคล้องกับการผลิตอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* RAG-1 พบว่าเชื้อมีการผลิตอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพเป็นแบบสัมพันธ์กับการเจริญเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มี *n*-hexadecane เป็นแหล่งคาร์บอน (Rosenberg *et al.*, 1979b) และการผลิตอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจาก *A. radioresistens* KA53 พบว่า สัดส่วนของกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ต่อน้ำหนักเซลล์ในระหว่างการผลิตเพิ่มขึ้นจาก 5.3 เป็น 7.3 และ 11.6 ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง, 64 ชั่วโมง และ 87 ชั่วโมง ตามลำดับ (Navon-venezia *et al.*, 1995) นอกจากนี้ Kaplan และ Rosenberg (1982) พบว่าการเจริญและการผลิตอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* BD413 มีอัตราการเจริญเฉลี่ย 4.5 ชั่วโมง ในช่วง 20 ชั่วโมงแรก และเริ่มเข้าสู่ stationary phase ในชั่วโมงที่ 22 โดยเชื้อผลิตอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพหลังจากชั่วโมงที่ 10 จนกระทั่งชั่วโมงที่ 33 กิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเท่ากับ 55 U/ml



ภาพที่ 7 การเจริญ พีเอช และค่า emulsification activity ของน้ำหมักจากการเลี้ยงเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 ในอาหาร minimal salt medium (พีเอช 7) ประกอบด้วย *n*-heptadecane 0.3% และแอมโมเนียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต 0.1% ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

3. ศึกษาวิธีการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7

หลังจากการเลี้ยงเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการเหวี่ยงเซลล์ออก แล้วนำส่วนใสมาเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยเลือกใช้วิธีการตกตะกอนด้วยเกลือและตัวทำละลาย เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Acinetobacter* sp. โดยส่วนใหญ่เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพน้ำหนักโมเลกุลสูง (Sar and Rosenberg, 1983) โดยศึกษาวิธีการตกตะกอน 4 วิธี ได้แก่ ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ตกตะกอนด้วยอะซิโตน ตกตะกอนด้วยเมธานอล และตกตะกอนด้วยเอธานอล ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 10 พบว่า การตกตะกอนด้วยเอธานอล อะซิโตน และเมธานอลสามารถตกตะกอนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ 2.94 กรัมต่อลิตร, 1.04 กรัมต่อลิตร และ 0.76 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยการตกตะกอนด้วยเอธานอลให้ปริมาณตะกอนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงที่สุด เนื่องจากการตกตะกอนด้วยตัวทำละลายจะต้องเติมตัวทำละลายที่มีค่า dielectric constant ต่ำกว่าน้ำเพื่อทำให้ค่า dielectric constant ของน้ำลดต่ำลง (Castillo and Lopez-Munguia, 2004) เมื่อเปรียบเทียบค่า dielectric constant ของเอธานอลและเมธานอล พบว่าเอธานอลมีค่า dielectric constant ที่ต่ำกว่าเมธานอลและยังเป็นตัวทำละลายที่เป็น polar protic solvent ซึ่งแตกต่างกับอะซิโตนที่เป็น polar aprotic solvent ดังนั้นเอธานอลจึงสามารถตกตะกอนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีที่สุด เมื่อศึกษาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ทำให้เกิดอิมัลชัน (critical emulsifier concentration) พบว่าการตกตะกอนด้วยเอธานอลให้ค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ทำให้เกิดอิมัลชันต่ำที่สุด คือ 0.04 กรัมต่อมิลลิตร รองลงมา คือ เมธานอล และอะซิโตน โดยมีค่าเท่ากับ 0.05 กรัมต่อลิตร และ 0.06 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตทั้งที่ความเข้มข้นอิ่มตัว

0-40% และ 40-60% ไม่สามารถตกตะกอนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากน้ำหมัก แต่โดยทั่วไปการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Acinetobacter* sp. จะใช้วิธีการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 40% ถึง 65% (Navon-venezia *et al.*, 1995; Rosenberg *et al.*, 1979b; Rosenberg *et al.*, 1988)

เมื่อเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ทำให้เกิดอิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จากการการตกตะกอนด้วยเอธานอลและสารลดแรงตึงผิวที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี คือ sodium dodecyl sulfate (SDS) และ Tween 80 ซึ่งเป็นตัวแทนของสารลดแรงตึงผิวในกลุ่มประจุลบและไม่มีประจุตามลำดับ พบว่า SDS มีค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ทำให้เกิดอิมัลชันน้อยที่สุด คือ 0.03 กรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า emulsification activity เท่ากับ 65.91% ส่วนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 และ Tween 80 มีค่า ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ทำให้เกิดอิมัลชันเท่ากับ 0.04 กรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า emulsification activity เท่ากับ 65.58% และ 71.54% ตามลำดับ (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 10 วิธีการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7

Precipitation method	Yield (g/l) (Critical emulsifier concentration (g/ml))	Emulsification activity (%)
Ammonium sulfate	0.00^{d*} (0.00^{c})	0^{b}
Acetone	1.04^{b} (0.06^{a})	64.86 ± 1.03^{a}
Methanol	0.76^{c} (0.05^{ab})	65.00 ± 1.41^{a}
Ethanol	2.94^{a} (0.04^{b})	65.58 ± 2.74^{a}

* ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละสดมภ์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

ตารางที่ 11 ค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ทำให้เกิดอิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 และสารลดแรงตึงผิวที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี

Surfactant	Critical emulsifier concentration (g/ml)	Emulsification activity (%)
Crude extract	0.04	$65.58 \pm 2.74^{b*}$
SDS	0.03	65.91 ± 2.28^{b}
Tween 80	0.04	71.54 ± 1.89^{a}

* ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละสดมภ์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

4. ศึกษาคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

4.1 พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 และสารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ทางเคมี คือ SDS และ Tween 80 ซึ่งมีความเข้มข้น 0.04 กรัมต่อมิลลิลิตร ปรับพีเอชของตัวอย่างให้อยู่ในช่วง 2-12 ด้วย 1N NaOH หรือ 1N HCl แล้วทดสอบกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ *n*-hexadecane ซึ่งแสดงในตารางที่ 12 พบว่าค่า Emulsification activity ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7, Tween 80 และ SDS ลดต่ำลงเมื่อค่าพีเอชลดลงต่ำกว่า 5 เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวเกิดการตกตะกอนในสภาวะที่เป็นกรด (Sutthivanitchakul *et al.*, 1999) แต่กิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ *n*-hexadecane ไม่มีการเปลี่ยนแปลงที่ช่วงพีเอช 7-12 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 มีกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ต่ำกว่า Tween 80 เล็กน้อย แต่เมื่อเปรียบเทียบกับ SDS พบว่ากิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 มีความคงตัวต่อพีเอชในช่วงกว้าง (พีเอช 5-12) ซึ่งความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในสภาวะที่มีค่าพีเอชสูงแสดงให้เห็นว่าพันธะเอสเทอร์ไม่มีผลต่อกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ *n*-hexadecane ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Navon-venezia *et al.*, 1995) โดยผลที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Rosenberg และคณะ (1988) ที่ศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของ Biodispersan ที่ผลิตจาก *A. calcoaceticus* A2 พบว่าช่วงพีเอชที่เหมาะสมในการทำให้เกิดการกระจายตัวของหินปูน คือ 9 ถึง 12 สำหรับการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของ alasan และโปรตีนของ alasan ขนาด 45-kDa ที่ผลิตจาก *A. radioresistens* KA53 พบว่าค่า Emulsification activity มีค่าสูงที่สุดที่พีเอชเท่ากับ 9 และ 8 ตามลำดับ (Toren *et al.*, 2001)

ตารางที่ 12 ผลของพีเอชต่อความสามารถในการอิมัลซิไฟด์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7, SDS และ Tween 80

pH	Emulsification activity (%)		
	Crude extract	SDS	Tween 80
2	$48.24\pm3.36^{D*b**}$	50.30 ± 0.44^{Fb}	58.72 ± 0.86^{Da}
3	46.53 ± 4.34^{Db}	55.11 ± 0.70^{Ea}	60.33 ± 0.56^{Da}
4	49.31 ± 1.20^{Dc}	60.07 ± 0.80^{Db}	64.84 ± 0.61^{Ca}
5	53.08 ± 1.09^{Cc}	64.55 ± 1.35^{Cb}	68.46 ± 0.57^{Ba}
6	63.26 ± 0.75^{Bc}	67.47 ± 1.57^{ABb}	70.92 ± 1.27^{Aa}
7	66.22 ± 0.39^{ABc}	69.24 ± 0.92^{Ab}	72.39 ± 0.84^{Aa}
8	65.97 ± 1.21^{ABb}	67.98 ± 0.93^{ABb}	72.80 ± 0.92^{Aa}
9	67.37 ± 1.38^{Ab}	67.93 ± 0.43^{ABb}	71.53 ± 0.36^{Aa}
10	66.89 ± 2.12^{ABb}	67.47 ± 1.57^{ABb}	71.34 ± 1.89^{Aa}
11	67.31 ± 1.32^{Ab}	66.16 ± 0.44^{BCb}	71.04 ± 2.01^{Aa}
12	67.15 ± 1.06^{Ab}	66.42 ± 0.88^{Bb}	70.82 ± 2.17^{Aa}

* ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละสดมภ์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

** ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละแถวไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

4.2 ความคงตัวต่ออุณหภูมิของสารลดแรงตึงผิวที่สกัดได้

เมื่อนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 และสารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ทางเคมี คือ SDS และ Tween 80 ซึ่งมีความเข้มข้น 0.04 กรัมต่อมิลลิลิตร มาบ่มไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ แล้วทดสอบกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ *n*-hexadecane พบว่าอุณหภูมิมีผลต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งสังเกตได้จากค่า emulsification activity ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30-80 องศาเซลเซียสไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่ที่อุณหภูมิสูงกว่า 90 องศาเซลเซียส ค่า emulsification activity ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลดลงเล็กน้อย แต่ยังคงมีค่าสูงกว่า 60 % (ตารางที่ 13) ซึ่งสอดคล้องกับผลของอุณหภูมิต่อ SDS ในขณะที่ Tween 80 มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 30-100 องศาเซลเซียส และมีกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ *n*-hexadecane สูงกว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 และ SDS ซึ่งจากผลการทดลองแสดงว่าอุณหภูมิมีผลต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ นั่นคือ เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะทำให้สูญเสียกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ *n*-hexadecane ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 ในขณะที่การทดลอง

ของ Toren และคณะ (2001) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของ alasan และโปรตีนของ alasan ขนาด 45-kDa โดยบ่มที่อุณหภูมิ 27, 60, 80 และ 100 องศาเซลเซียส พบว่าหลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ค่า emulsification activity ของ alasan เพิ่มขึ้น 30% ส่วนโปรตีนของ alasan มีความคงตัวต่ออุณหภูมิน้อยกว่า alasan โดยค่า emulsification activity ของโปรตีนขนาด 45-kDa ลดลง 40% หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 13 ผลของอุณหภูมิต่อความสามารถในการอิมัลซิไฟด์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7, SDS และ Tween 80

Temperature (°C)	Emulsification activity (%)		
	Crude extract	SDS	Tween 80
30	$65.50\pm2.27^{AB*b**}$	67.71 ± 1.62^{Ab}	72.19 ± 0.94^{Aa}
40	65.96 ± 2.13^{ABb}	67.18 ± 1.16^{ABb}	72.72 ± 0.62^{Aa}
50	65.52 ± 1.06^{ABb}	67.19 ± 1.71^{ABb}	72.19 ± 0.50^{Aa}
60	66.42 ± 2.47^{Abb}	67.02 ± 1.81^{ABb}	72.25 ± 1.85^{Aa}
70	68.28 ± 0.41^{Ac}	66.93 ± 0.88^{ABb}	72.93 ± 0.35^{Aa}
80	66.44 ± 1.55^{ABb}	66.93 ± 0.88^{Ab}	72.53 ± 1.64^{Aa}
90	63.25 ± 3.03^{Bb}	65.70 ± 0.84^{ABb}	71.55 ± 1.89^{ABa}
100	63.97 ± 1.13^{Bb}	66.42 ± 0.88^{ABb}	71.55 ± 1.89^{ABa}
110	63.63 ± 2.43^{Bb}	65.67 ± 1.13^{ABb}	69.63 ± 0.12^{Ba}
121	60.15 ± 0.66^{Bc}	65.16 ± 0.74^{Bb}	69.29 ± 1.09^{Ba}

* ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละสดมภ์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

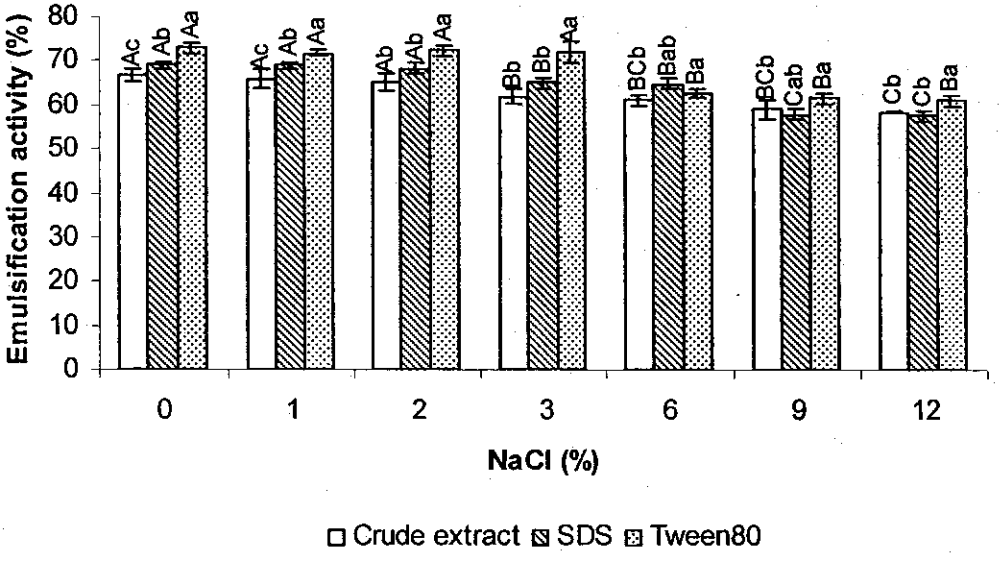
** ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละแถวไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

4.3 ผลของเกลือต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

ในการประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการกำจัดคราบน้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในทะเล โซเดียมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ และแคลเซียมคลอไรด์ ซึ่งเป็นองค์ประกอบของน้ำทะเลอาจมีผลต่อการทำงานของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ดังนั้นจึงต้องศึกษาผลของเกลือต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 แสดงดังภาพที่ 8 พบว่าที่โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2% ไม่มีผลต่อความของตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพอย่างมีนัยสำคัญ แต่กิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ *n*-hexadecane ลดลงเมื่อโซเดียมคลอไรด์

มีความเข้มข้น 12% แต่อย่างไรก็ตามค่า emulsification activity ยังคงมีค่ามากกว่า 60% จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นสูงมีผลให้ค่า emulsification activity ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลดต่ำลง สำหรับสารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ทางเคมีก็ให้ผลสอดคล้องในทิศทางเดียวกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้โดยพบว่ากิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ *n*-hexadecane ของ SDS และ Tween 80 มีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เพิ่มสูงขึ้น



ภาพที่ 8 ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อความสามารถในการอิมัลซิไฟด์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 และสารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ทางเคมี (SDS และ Tween 80)

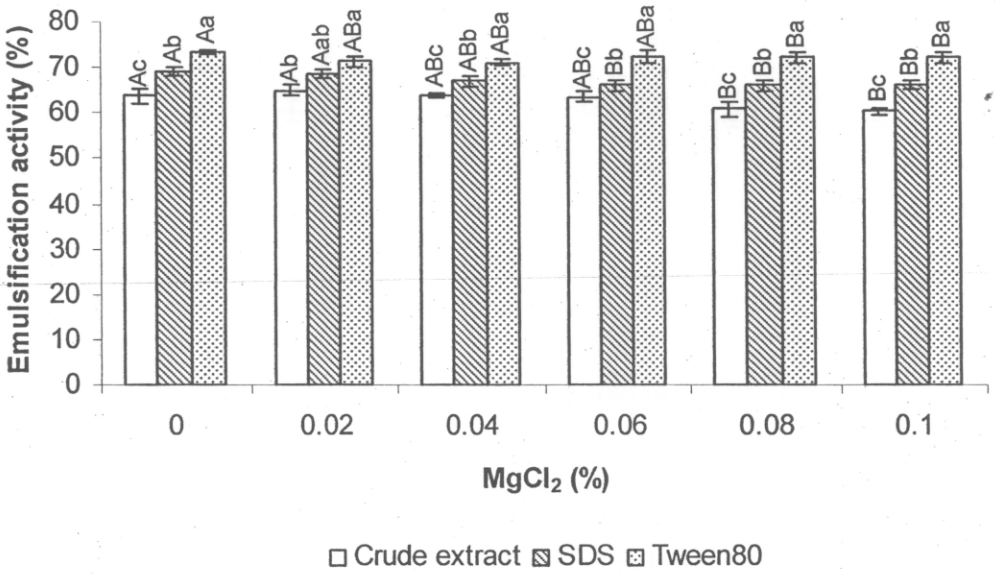
* ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับต่างๆ

** ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อเปรียบเทียบสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิด

ผลของแมกนีเซียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 แสดงดังภาพที่ 9 พบว่า แมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0% ถึง0.06% ไม่มีผลต่อกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 และสารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ทางเคมี คือ SDS และ Tween 80 จากผลการทดลองพบว่า Tween 80 มีค่า emulsification activity สูงกว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และ SDS ในทุกความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ และจากภาพที่ 10 พบว่าแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0% ถึง 0.1% ไม่มีผลต่อกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ *n*-hexadecane ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 และสาร

ลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ทางเคมี คือ SDS และ Tween 80 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า divalent ion ไม่มีผลต่อกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ *n*-hexadecane ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ แต่โดยปกติ divalent ion จะยับยั้งการเกิดอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (Kim *et al.*, 1997) และจากผลการทดลองของ Rosenberg และคณะ (1979b) พบว่าแมกนีเซียม อิออน และ ฟอสเฟต อิออน ยับยั้งกิจกรรมของ biodispersan A2 โดยพบว่าไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 2 มิลลิโมลาร์ และแมกนีเซียมคลอไรด์ 8 มิลลิโมลาร์ ยับยั้งกิจกรรมของ biodispersan A2 สูงถึง 50%

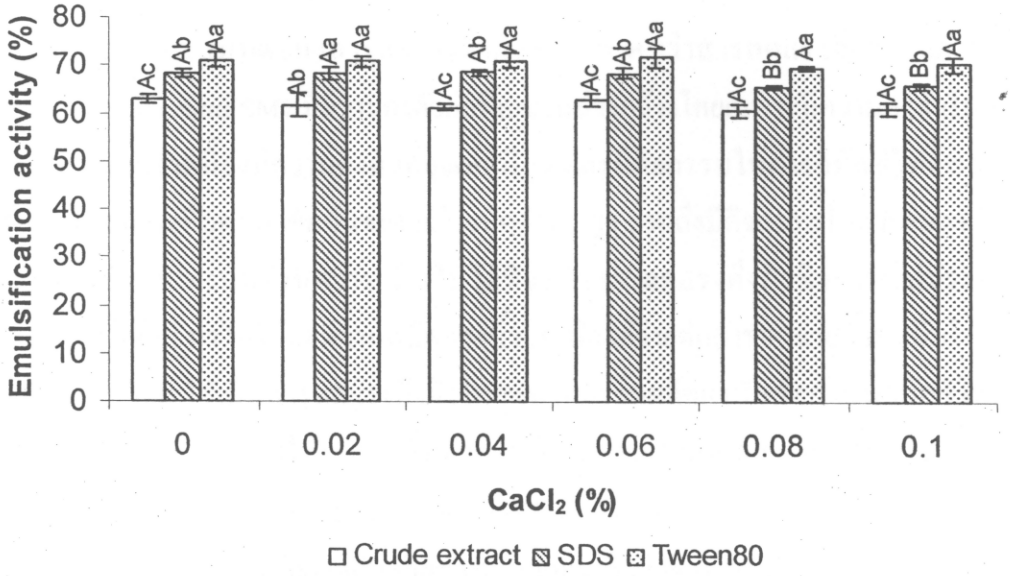
นอกจากการทดสอบผลของเกลือชนิดต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบในน้ำทะเลต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแล้ว ยังมีการใช้น้ำทะเลในการทดสอบความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 และสารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ทางเคมี คือ SDS และ Tween 80 ด้วย เพื่อดูผลโดยรวมของเกลือต่างๆ ต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวทั้งสามชนิด ซึ่งจากผลการทดลองในตารางที่ 14 พบว่าความสามารถในการอิมัลซิไฟด์ไม่แตกต่างกันในน้ำทะเลหรือน้ำกลั่น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ยังคงสามารถอิมัลซิไฟด์ *n*-hexadecane โดยให้ค่า emulsification activity เท่ากับ 62.52% โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้มีกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ *n*-hexadecane ในน้ำทะเลสูงกว่า SDS ซึ่งมีค่า emulsification activity เท่ากับ 55.61% สำหรับ Tween 80 พบว่ากิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ไฟด์ *n*-hexadecane ในน้ำทะเลมีค่าลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับการอิมัลซิไฟด์ *n*-hexadecane ในสภาวะปกติแต่ยังคงมีค่า emulsification activity สูงที่สุด คือ 65.97% (ตารางที่ 14) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 มีความสามารถในการอิมัลซิไฟด์สารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ทั้งในน้ำทะเลและน้ำจืดจึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการกำจัดคราบน้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในทะเลหรือในแหล่งน้ำจืดได้



ภาพที่ 9 ผลของแมกนีเซียมคลอไรด์ต่อความสามารถในการอิมัลซิไฟด์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 และสารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ทางเคมี (SDS และ Tween 80)

* ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ที่ระดับต่างๆ

** ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อเปรียบเทียบสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิด



ภาพที่ 10 ผลของแคลเซียมคลอไรด์ต่อความสามารถในการอิมัลซิไฟด์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 และสารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ทางเคมี (SDS และ Tween 80)

* ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่ระดับต่างๆ

** ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อเปรียบเทียบสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิด

ตารางที่ 14 ผลของน้ำทะเลต่อความสามารถในการอิมัลซิไฟด์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 และสารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ทางเคมี (SDS และ Tween 80)

Surfactant	Emulsification activity (%)	
	Dissolved in seawater	Dissolved in distilled water
Crude extract	$62.52\pm2.08^{a*A**}$	65.58 ± 2.74^{bA}
SDS	55.61 ± 1.05^{bB}	65.91 ± 2.28^{bA}
Tween 80	65.97 ± 2.13^{aB}	71.54 ± 1.89^{aA}

* ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละสดมภ์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

** ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละแถวไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

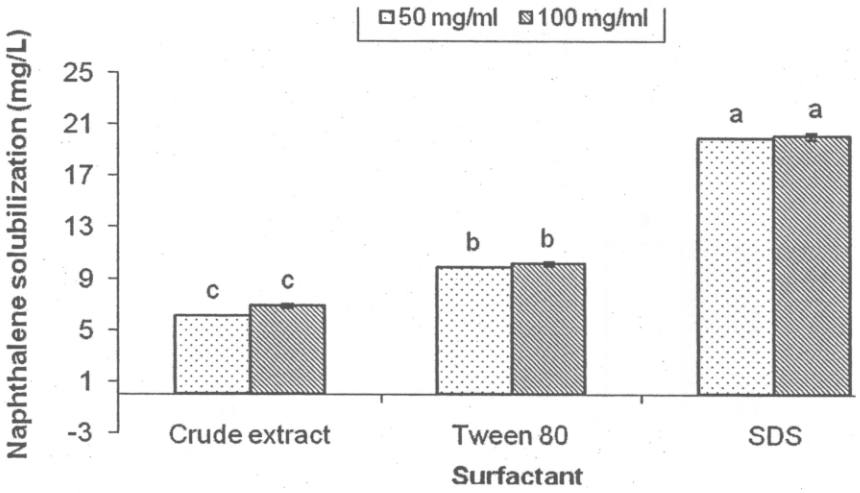
จากการศึกษาคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 มีความคงตัวต่อพีเอชในช่วงกว้างโดยเฉพาะมีความคงตัวในสภาวะที่มีความเป็นเบสสูง นอกจากนี้ยังมีความคงตัวที่อุณหภูมิสูง และมีกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์สารประกอบไฮโดรคาร์บอนในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือชนิดต่างๆ สูง รวมถึงมีกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์เมื่อใช้น้ำทะเลในการทดสอบ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้แก่ นำไปใช้ลดความหนืดของน้ำมันเพื่อให้ง่ายต่อการขนถ่ายน้ำมันดิบไปตามท่อในอุตสาหกรรมปิโตรเลียม ใช้เป็นสารลดแรงตึงผิวในอุตสาหกรรมผลิตผงซักฟอก เป็นอิมัลซิไฟด์เออร์ในอุตสาหกรรมอาหารและยา รวมถึงใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมโดยชีววิธี (Desai and Banat, 1997; Kim *et al.*, 1997)

4.4 ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

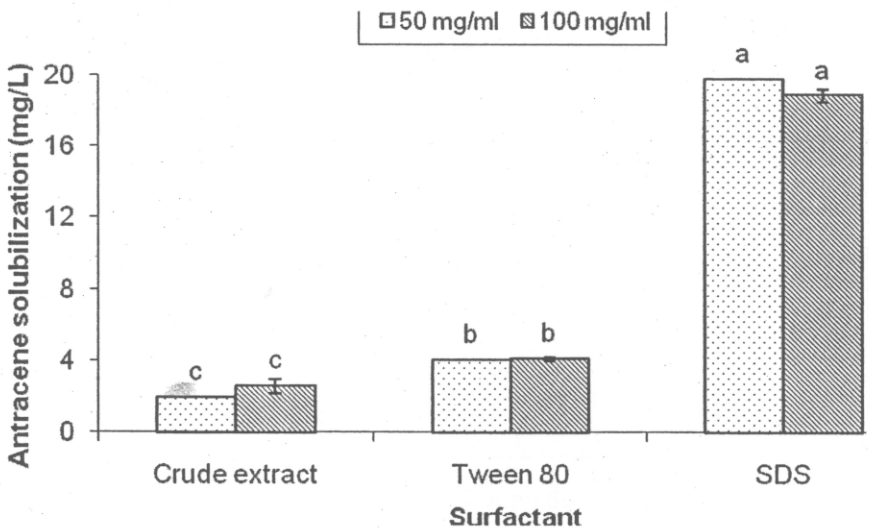
จากการตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก คือ *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* และแบคทีเรียแกรมลบ คือ *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus* โดยวิธี Agar diffusion method พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่นำมาทดสอบได้ โดยปกติสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดลิโปเปปไทด์บางชนิดจะมีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ (Lang, 2002)

4.5 ผลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อการเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำของ polycyclic aromatic hydrocarbon

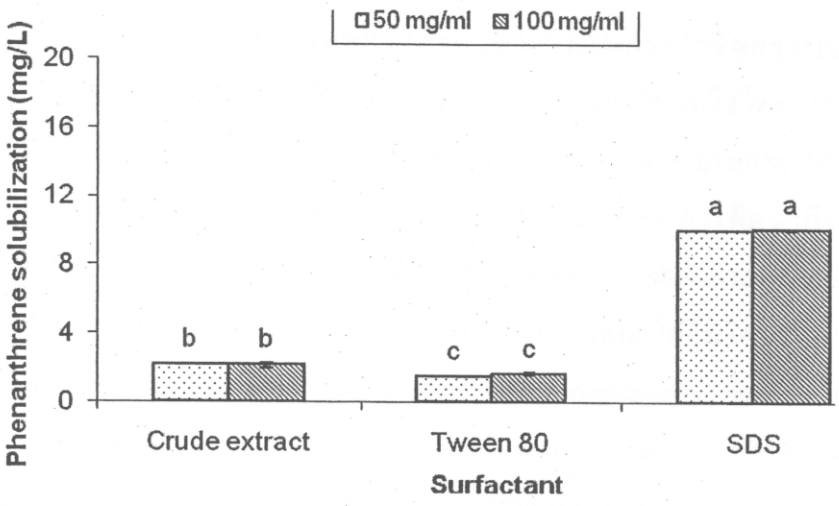
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 สามารถเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำของ polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) คือ naphthalene (ภาพที่ 11) anthracene (ภาพที่ 12) phenanthrene (ภาพที่ 13) และ pyrene (ภาพที่ 14) โดยสามารถเพิ่มการละลายของ naphthalene ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ pyrene, phenanthrene และ anthracene ตามลำดับ เนื่องมาจากโครงสร้างของ naphthalene ประกอบด้วย benzene ring 2 วง ทำให้การทำงานของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 ทำงานได้ง่ายกว่า polycyclic aromatic hydrocarbon ที่มี benzene ring 3 หรือ 4 วง และเมื่อเปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ทางเคมี คือ SDS และ Tween 80 พบว่า SDS มีความสามารถในการส่งเสริมการละลายของ PAHs ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ Tween 80 และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ตามลำดับ การใช้ระดับความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวทั้ง 2 ระดับคือ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีคจามแตกต่างกันในการเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำของ PAHs จากการทดลองพบว่าการเพิ่มความสามารถในการละลายของ PAHs ขึ้นกับโครงสร้างของ PAHs และโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิดด้วยเช่นกัน



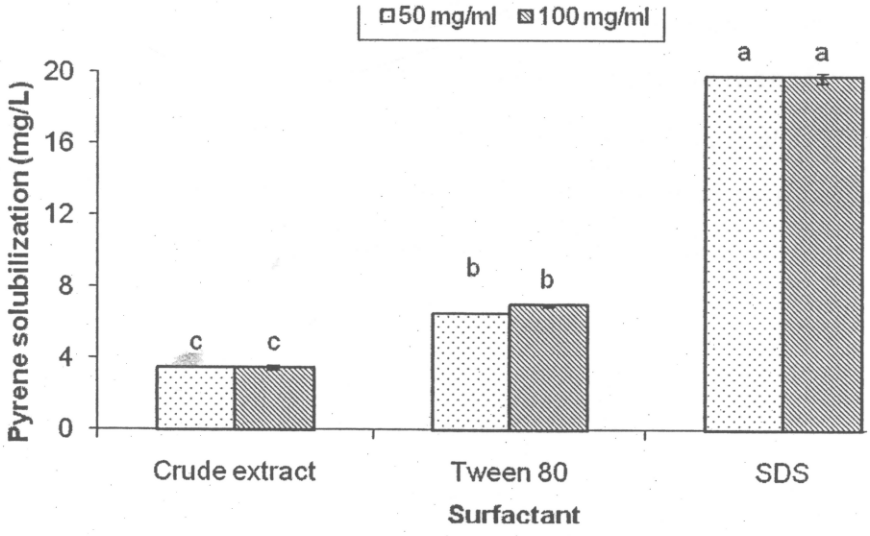
ภาพที่ 11 ผลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ทางเคมี (SDS และ Tewwn 80) ต่อความสามารถในการละลายน้ำของ naphthalene
ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)



ภาพที่ 12 ผลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ทางเคมี (SDS และ Tewwn 80) ต่อความสามารถในการละลายน้ำของ anthracene
ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)



ภาพที่ 13 ผลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ทางเคมี (SDS และ Tewwn 80) ต่อความสามารถในการละลายน้ำของ phenanthrene
ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)



ภาพที่ 14 ผลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ทางเคมี (SDS และ Tewwn 80) ต่อความสามารถในการละลายน้ำของ pyrene
ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

5. ศึกษาความจำเพาะของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ต่อไฮโดรคาร์บอนต่างๆ

ในการประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการกำจัดคราบน้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจำเป็นต้องมีการศึกษาความจำเพาะต่อสารประกอบไฮโดรคาร์บอนของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิดมีความจำเพาะต่อสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแต่ละชนิด การศึกษากิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 โดยวัดค่า emulsification activity ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้กับไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ *n*-tridecan, *n*-tetradecane, *n*-pentadecane, *n*-hexadecane, *n*-neptadecane, benzene, toluene และ xylene พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 สามารถอิมัลซิไฟด์ aliphatic hydrocarbon และ aromatic hydrocarbon โดยการอิมัลซิไฟด์ aliphatic hydrocarbon แต่ละชนิดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญและสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้มีความจำเพาะกับ aromatic hydrocarbon มากกว่า aliphatic hydrocarbon ซึ่งสามารถอิมัลซิไฟด์ toluene ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ xylene และ benzene โดยมีค่า emulsification activity เท่ากับ 75%, 74% และ 71% ตามลำดับ (ตารางที่ 15) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 สามารถอิมัลซิไฟด์ aliphatic hydrocarbon และ aromatic hydrocarbon เดี่ยวๆ ได้ ซึ่งมีคุณสมบัติเช่นเดียวกับ alasan ที่ผลิตจาก *A. radioresistens* (Navon-venezia *et al.*, 1995) ในขณะที่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* RAG-1, BD4 และ BD413 ไม่สามารถอิมัลซิไฟด์ aliphatic hydrocarbon และ aromatic hydrocarbon เดี่ยวๆ ได้หรืออิมัลซิไฟด์ได้ต่ำ แต่สามารถอิมัลซิไฟด์สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีการผสมกันระหว่าง aliphatic hydrocarbon และ aromatic hydrocarbon ได้ดี (Rosenberg *et al.*, 1979a; Kaplan and Rosenberg, 1982) ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ที่จะนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 ไปประยุกต์ใช้ในการกำจัดสารปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม

ตารางที่ 15 ความจำเพาะต่อไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7

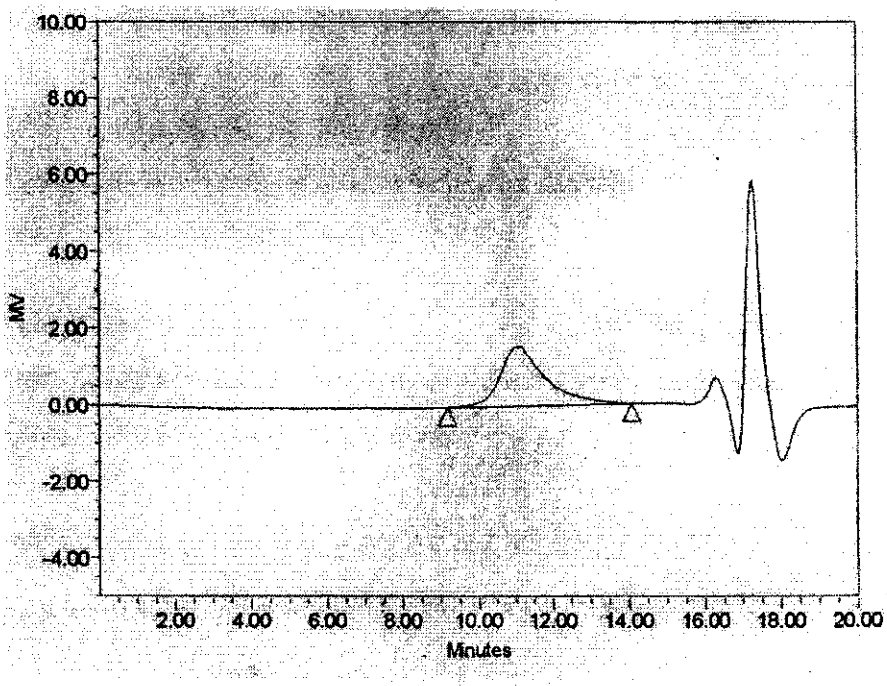
Hydrocarbon	Emulsification activity (%)
n-tridecan	$61.50\pm1.32^{c*}$
n-tetradecane	64.66 ± 2.40^{c}
n-pentadecane	61.07 ± 1.01^{c}
n-hexadecane	61.60 ± 1.64^{c}
n-heptadecane	62.86 ± 2.68^{c}
benzene	71.42 ± 3.06^{b}
toluene	75.51 ± 2.84^{a}
xylene	74.82 ± 0.84^{ab}

* ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละสดมภ์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$).

6. ศึกษาองค์ประกอบบางส่วนของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

6.1 Gel Permeation Chromatography

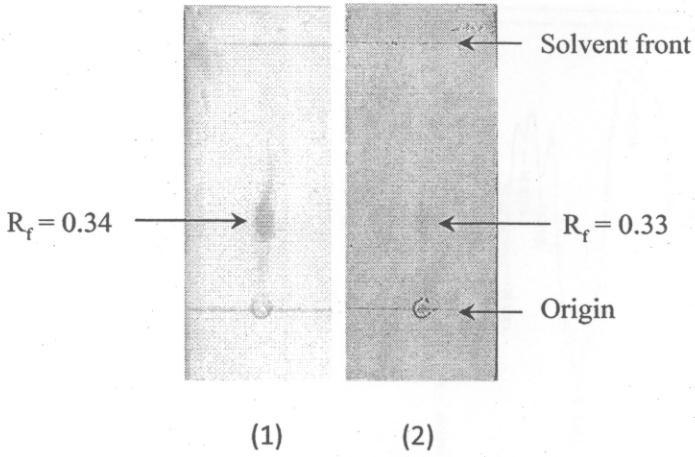
การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลและตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนโดย Gel Permeation Chromatography (GPC) ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 15 พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยเท่ากับ 1.97×10^{6} ซึ่งพบว่าเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพน้ำหนักโมเลกุลสูงเช่นเดียวกับ alasan และ apoemulsan (Polysaccharide ของ emulsan) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 10^{6} และ 9.9×10^{5} ตามลำดับ (Zuckerberg *et al.*, 1979; Navon-venezia *et al.*, 1995) จากการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนที่ได้จาก GPC chromatogram แสดงผลเพียง 1 peak โดยไม่ปรากฏ peak ของสารอื่น แสดงให้เห็นว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนมีความบริสุทธิ์สูงและมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยประมาณ 1.97×10^{6}



ภาพที่ 15 GPC chromatogram ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7

6.2 Thin Layer Chromatography

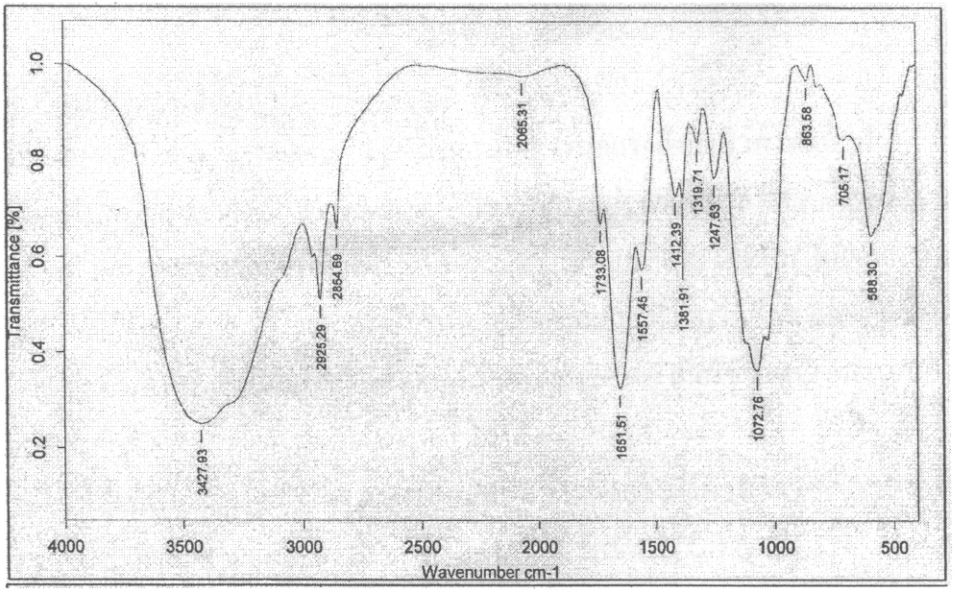
จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนโดย Thin Layer Chromatography (TLC) โดยใช้ mobile phase คือ ethyl acetate: pyridine: water: acetic acid (5:5:5:1) โดยปริมาตร ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 16 พบว่า TLC chromatogram ที่ตรวจสอบด้วย ninhydrin และ anisaldehyde ให้ค่า R_f เท่ากับ 0.34 และ 0.33 ตามลำดับ (รูปที่ 12) ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงกัน โดย ninhydrin เป็นสารที่ใช้ตรวจสอบการมีอยู่ของหมู่อะมิโนอิสระ (McInerney *et al.*, 1990) และ anisaldehyde เป็นสารที่ใช้ตรวจสอบการมีอยู่ของน้ำตาล (Schulz *et al.*, 1991) ส่วนการตรวจสอบด้วย rhodamine B ไม่ปรากฏจุดบน TLC chromatogram แสดงว่าไม่พบการมีอยู่ของกรดไขมัน จากตรวจสอบองค์ประกอบเบื้องต้นพบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีน้ำตาลและโปรตีนเป็นองค์ประกอบจึงสอดคล้องกับการตรวจสอบของข้อ 6.1 เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดโพลิเมอริกมักเป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโปรตีน ไขมันหรือโพลีแซคคาร์ไรด์จึงทำให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีน้ำหนักโมเลกุลสูง (Zuckerberg *et al.*, 1979; Kaplan *et al.*, 1982; Navon-venezia *et al.*, 1995)



ภาพที่ 16 ลักษณะ TLC chromatogram ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 โดยใช้ ethyl acetate: pyridine: water: acetic acid (5:5:5:1) โดยปริมาตร เป็น mobile phase
(1) ใช้ ninhydrin เพื่อดูหมู่อะมิโนอิสระ
(2)ใช้ anisaldehyde ในการวิเคราะห์น้ำตาล

6.3 Fourier Transform Infrared Spectrometer

เมื่อตรวจสอบองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนโดย Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR) ซึ่งใช้ในการศึกษาหมู่ฟังก์ชันของสาร ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 17 จาก FT-IR spectrum พบการยืดตัวของ O-H ที่ 3427 cm^{-1}, การยืดตัวของ C-H ที่อิ่มตัวที่ 2925 cm^{-1} และการยืดตัวของ C=O ที่ 1651 cm^{-1} ซึ่งจากการวิเคราะห์ผลจาก FT-IR chromatogram บ่งบอกถึงการมีโพลีแซคคาร์ไรด์และโปรตีนเป็นองค์ประกอบซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย TLC



ภาพที่ 17 FT-IR spectrum ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพความเข้มข้น 0.01 กรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณโปรตีน 0.576 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 0.787 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 มีองค์ประกอบเป็นโปรตีน 42.26% และน้ำตาล 57.74% จากการวิเคราะห์องค์ประกอบพื้นฐานและน้ำหนักโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดโพลีเมอริก ซึ่งมีองค์ประกอบเป็นโพลีแซคคาร์ไรเชื่อมต่อกับโปรตีน ซึ่งใกล้เคียงกับ alasan ที่ผลิตจาก *A. radioresistens* KA53 (Navon-Venezia *et al.*, 1995) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10^6

สรุปผลการทดลอง

เชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแล้วปลดปล่อยออกมานอกเซลล์เมื่อเลี้ยงในอาหาร minimal salt medium (พีเอช 7.0) ที่ประกอบด้วย *n*-heptadecane 0.3% เป็นแหล่งคาร์บอนและมีแอมโมเนียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต 0.1% เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (30± 2 องศาเซลเซียส) และเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที พบว่าเชื้อสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้สูงสุดที่เวลา 48 ชั่วโมง โดยให้ค่า emulsification activity เมื่อใช้น้ำหมักทดสอบกับ *n*-hexadecane เท่ากับ 53.86%

เมื่อใช้น้ำหมักปริมาตร 1 ลิตร มาตกตะกอนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเอธานอล 95% จะได้ตะกอนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 2.94 กรัม โดยมีค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ทำให้เกิดอิมัลชันเท่ากับ 0.04 กรัมต่อมิลลิลิตร และค่า emulsification activity เท่ากับ 65.58%

จากการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ พบว่ามีความคงตัวที่พีเอช 6 ถึง 12 โดยมีค่า emulsification activity เท่ากับ 63.26% ถึง 67.37% สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ถึง 80 องศาเซลเซียส และมีค่า emulsification activity เท่ากับ 65.50% ถึง 68.28% สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความคงตัวต่อโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2% และเมื่อโซเดียมคลอไรด์มีความเข้มข้น 12% พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังคงมีค่า emulsification activity สูงกว่า 60% นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ยังมีความคงตัวต่อแมกนีเซียมคลอไรด์และแคลเซียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 0.06% และ 0.1% ตามลำดับ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ยังคงมีกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ *n*-hexadecane ในน้ำทะเลโดยมีค่า emulsification activity เท่ากับ 62.52% สารลดแรงตึงผิวชีวภาพไม่มีกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียที่นำมาทดสอบ แต่สามารถเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำของ polycyclic aromatic hydrocarbon ได้

การศึกษาความจำเพาะต่อไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความจำเพาะต่อ aromatic hydrocarbon มากกว่า aliphatic hydrocarbon โดยสามารถอิมัลซิไฟด์ toluene ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ xylene และ benzene โดยมีค่า emulsification activity เท่ากับ 75%, 74% และ 71% ตามลำดับ

จากการศึกษาตรวจสอบความบริสุทธิ์และน้ำหนักโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนโดย Gel Permeation Chromatography พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนมีความบริสุทธิ์และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1.97×10^6 สำหรับการศึกษาองค์ประกอบบางส่วนของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนด้วย Thin Layer Chromatography และ Fourier Transform Infrared Spectrometer พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 มีโปรตีนและโพลีแซคคาร์ไรด์เป็นองค์ประกอบ และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp.

anitratus SM7 พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 มีองค์ประกอบเป็นโปรตีน 42.26% และน้ำตาล 57.74%

เอกสารอ้างอิง

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2544. อาหารเลี้ยงเชื้อและการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์. *ใน* จุลชีววิทยาทั่วไป. หน้า 74-96. กรุงเทพ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Ana, C.M., Oliyera, N., Commendatore, M., Esteves, J.L. and Sineriz, F. 2000. Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from *Bacillus subtilis* 09. Biodegradation. 11: 65-71.

Arima, K., Kakinuma. A. and Tamura, G. 1968. Surfactin, a crystalline peptide lipid surfactant produced by *Bacillus subtilis:* isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 31: 488-494.

Banat, I.M. 1995. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. Bioresource Technol. 51: 1-12.

Belsky, I., Gutnick, D.L. and Rosenberg, E. 1979. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: determination of emulsifier bound fatty acids. FEBS Lett. 101: 175-178.

Bodour, A.A., Drees, K.P. and Raina, M.M. 2003. Distribution of biosurfactant – producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. Appl. Environ. Microbiol. 69: 3280-3287.

Bradford, MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.

Burd, G. and Ward, O.P. 1996. Physicochemical properties of PM-factor, a surface-active agent produced by *Pseudomonas marginalis*. Can. J. Microbiol. 42: 243-251.

Castillo, E. and Lopez-Munguia, A. 2004. Synthesis of levan in water-miscible organic solvents. J. Biotechnol. 114: 209-217.

Choi, J.W., Choi, H.G. and Lee, W.H. 1996. Effects of ethanol and phosphate on emulsan production by *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1. J. Biotechnol. 45: 217-225.

Cirigliano, M.C. and Carman, G.M. 1985. Purification and characterization of liposan, and bioemulsifier from *Candida lipolytica.* Appl. Environ. Microbiol. 51: 846-850.

Cooper, D.G. 1986. Biosurfactants. Microbiol. Sci. 3: 145-149.

Cooper, D.G. and Goldberg, B.G. 1987. Surface active agents from *Bacillus* species. Appl. Environ. Microbiol. 53: 224-229.

Cooper, D.G. and Paddock, D.G. 1983. *Torulopsis petrophilum* and surface activity. Appl. Environ. Microbiol. 46: 1426-1429.

Cooper, D.G. and Paddock, D.G. 1984. Production of biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. Appl. Environ. Microbiol. 47: 173-176.

Denger, K. and Schink, B. 1995. New halo- and thermo- tolerant fermenting bacteria producing surface-active compounds. Appl. Microbiol. Biotechnol. 44: 161-166.

Desai, J.D. and Banat, I.M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61: 47-64.

Deziel, E., Paquette, G., Villemur, R., Lepine, F. and Bisaillon, J.G. 1996. Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. Appl. Environ. Microbiol. 62: 1908-1912.

Dubois, M., Gills, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination sugars and related substances. Anal. Chem. 28: 350-356.

Gauther, M.J., Lafay, B., Cristen, R., Fernandez, L., Acquaviva, M., Bonin, P. and Bertrand, J.C. 1992. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. Nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium. In. J. Syst. Bacteriol. 42: 568-576.

Georgiou, G., Lin, S.C. and Sharma, M.M. 1990. Surface activity compounds from microorganisms. Bio/Technol. 10: 60-65.

Gurjar, M., Khire, J.M. and Khan, M.I. 1995. Bioemulsifier production by *Bacillus stearothermophilus* VR-8. Lett. Appl. Microbiol. 21: 83-86.

He, H., Shen, B., Korshalla, J. and Carter, G.T. 2001. Circulocins, new antibacterial lipopeptides from *Bacillus curculans* J2154. Tetrahedron. 57: 1189-1195.

Healy, M.G., Devine, C.M. and Murphy, R. 1996. Microbial production of biosurfactants. Res. Conserv. Rec. 18: 41-57.

Herman, D.C., Artiola, J.F. and Miller, R.M. 1995. Removal of cadmium, lead and zinc from soil by a rhamnolipid biosurfactant. Environ. Sci. Technol. 29: 2280-2285.

Iwabuchi, N., Sunairi, M., Urai, M., Itoh, C., Anzai, H., Nakajima, M. and Harayama, S. 2002. Extracellular polysaccharide of *Rhodococcus rhodochrous S-2* stimulates the degradation of aromatic component in crude oil by indigenous marine bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 68: 2337-2343.

Jenny, K., Kappeli, O. and Fiechter, A. 1991. Biosurfactant from *Bacillus licheniformis*: structure analysis and characterization. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36: 5-13.

Kaplan, N. and Rosenberg, E. 1982. Exopolysaccharide distribution of and bioemulsifier production by *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 and BD413. Appl. Environ. Microbiol. 44: 1335-1341.

Kim, H.S., Yoon, B.D., Lee, C.H., Suh, H.H., Oh, H.M., Katsuraki, T. and Tani, Y. 1997. Production and properties of lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. J. Ferment. Bioeng. 84: 41-46.

Kitamoto, D., Isoda, H. and Nakahara, T. 2002. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants from energy-saving materials to gene carriers (review). J. Biosci. Bioeng. 94: 187-201.

Kretschmer, A., Bock, H. and Wagner, F. 1982. Chemical and physical characterization of interfacial-active lipids from *Rhodococcus erythropolis* grow on n-alkane. Appl. Environ. Microbiol. 44: 864-870.

Lang, S. 2002. Biological amphiphiles (microbial biosurfactant). Curr. Opin. Colloid Int. Sci. 7: 12-20.

Lang, S. and Wagner, F. 1987. Structure and Properties of Biosurfactants. *In* Biosurfactants and Biotechnology. (Kosaric, N., Cairns, W.L. and Gray, N.C. ed). Marcel Dekker, Inc. New York.

Lowry, O.H., Rosebrough, J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

Maeng, J.H., Sakai, Y., Tani, Y. and Kato, N. 1996. Isolation and characterization of a novel oxygenase that catalyzes the first step of *n*-alkane oxidation in *Acinetobacter* sp. strain M-1. J. Bacteriol. 178: 3695-3700.

Makkar, R.S. and Cameotra, S.S. 1997. Biosurfactant production by thermophilic *Bacillus subtilis* strain. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 18: 37-42.

Maneerat, S., Bamba, T., Harada, K., Kobayashi, A., Yamada, H. and Kawai, F. 2006. A novel crude oil emulsifier excreted in the culture supernatant of a marine bacterium, *Myroides* sp. strain SM1. Appl. Microbiol. Biotechnol. 70: 254-259.

Maneerat, S., Nitoda, T., Kanzaki, H. and Kawai, F. 2005. Bile acids are new products of a marine bacterium, *Myroides* sp. strain SM1. Appl. Microbiol. Biotechnol. 67: 679-683.

Marahiel, M., Denders, M., Krause, M. and Kleinkauf, H. 1977. Biological role of gramicidin S in spore functions. Studies on gramicidin – S negative mutants of *Bacillus brevis* 9999. Eur. J. Biochem. 99: 49-52.

Markovetz, A.J. 1971. Subterminal oxidation of aliphatic hydrocarbons by microorganisms. Crit. Rev. Microbiol. 1: 225-238.

May, S.W. and Katoposis, A.G. 1990. Hydrocarbon monooxygenase system of *Pseudomonas oleovolans*. Methods Enzymol. 188: 3-9.

McInerney, M.J., Javaheri, M. and Nagle Jr, D.P. 1990. Properties of the biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* strain JF-2. J. Ind. Microbiol. 5: 95-102.

Mulligan, C.N. 2005. Environment applications for biosurfactants. Environ. Pollut. 89: 183-198.

Navon-Venezia, S., Zosim, Z., Gottlieb, A., Legmann, R., Carmeli, S., Ron, E.Z. and Rosenberg, E. 1995. Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. Appl. Environ. Microbiol. 61: 3240-3244.

Nweke, C.O. and Okpokwasili, G.C. 2003. Drilling fluid base oil biodegradation potential of a soil *Staphylococcus* species. Afr. J. Biotechnol. 2: 293-295.

Oberbremer, A., Muller-Hurtig, R. and Wagner, F. 1990. Effect of the addition of microbial surfactants on hydrocarbon degradation in soil population in a stirred reactor. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32: 485-489.

Osterreicher-Ravid, D., Ron, E.Z. and Rosenberg, E. 2000. Horizontal transfer of an exopolymer complex from one bacterial species to another. Environ. Microbiol. 2: 366-372.

Poremba, K., Gunkel, W., Lang, S. and Wagner, F. 1991. Marine biosurfactants, III. Toxicity testing with marine microorganisms and comparison with synthetic surfactants. Z. Naturforsch. 46c: 210-216.

Rehm, H. and Reiff, I. 1981. Mechanism and occurrence of microbial oxidation of long chain alkanes. Adv. Biochem. Eng. 19: 175-215.

Robert, M., Mercade, M.E., Bosch, M.P., Parra, T.L., Espuny, M.J., Manresa, M.A. and Guinea, J. 1989. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T. Biotechnol. Lett. 11: 871-874.

Ron, E.Z. and Rosenberg, E. 2001. Natural roles of biosurfactants. Environ. Microbiol. 3: 229-236.

Roongsawang, N., Thaniyavarn, J. and Thaniyavarn, S. 1999. Properties of biosurfactant produced by *Bacillus* sp. Strain KP-2. Thai J. Biotechnol. 1: 54-60.

Rosenberg, E., Perry, A., Gibson, D.T. and Gutnick, D.L. 1979a. Emulsifier *Arthrobacter* RAG-1: Specificity of hydrocarbon substrate. Appl. Environ. Microbiol. 37: 409-413.

Rosenberg, E., Rubinovitz, C., Gottlieb, A., Rosenhak, S. and Ron, E.Z. 1988. Production of biodispersan by *Acenetobacter calcoaceticus* A2. Appl. Environ. Microbiol. 54: 317-322.

Rosenberg, E., Zuckerberg, A., Rubinovitz, C. and Gutnick, D.L. 1979b. Emulsifier *Arthrobacter* RAG-1: isolation and emulsifying properties. Appl. Environ. Microbiol. 37: 402-408.

Sar, N. and Rosenberg, E. 1983. Emulsifier production by *Acinetobacter calcoaceticus* strains. Curr. Microbiol. 9: 309-314.

Schulz, D., Passeri, A., Schmidt, M., Lang, S., Wagner, F., Wray, V. and Gunkel, W. 1991. Marine biosurfactants, I. Screening for biosurfactants among crude oil degrading marine microorganisms from the North Sea. Z. Naturforsch. 46c: 197-203.

Shabtai, Y. 1990. Production of exopolysaccharides by *Acinetobacter* strains in a controlled fed-batch fermentation process using soap stock oil (SSO) as carbon source. Int. J. Biol. Macromol. 12: 145-152.

Shreve, G.S., Inguva, S. and Gunnam, S. 1995. Rhamnolipid biosurfactant enhancement of hexadecane biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa*. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 4: 331-337.

Sutthivanichakul, B., Thaniyavarn, J. and Thaniyavarn, S. 1999. Biosurfactant production by *Bacillus licheniformis* F2.2. Thai J. Biotechnol. 1: 46-53.

Suzuki, T., Hayashi, K., Fujikawa, K. and Tsukamoto, K. 1965. The chemical structure of polymyxin E. The identities of polymyxin E_1 with colistin A and polymyxin E_2 with colistin B. J. Biol. Chem. 57: 226-227.

Toren, A., Navon-Venezia, S., Ron, E.Z. and Rosenberg, E. 2001. Emulsifying activities of purified alasan proteins from *Acinetobacter radioresistens* KA 53. Appl. Environ. Microbiol. 67: 1102-1106.

Vollbrecht, E., Rau, U. and Lang, S. 1999. Microbial conversion of vegetable oils into surface-active di-, tri-, and tetrasaccharide lipids (biosurfactants) by the bacterial strain *Tsukamurella* spec. Fett/Lipid 101: 389-394.

Wilkinson, S.G. 1972. Composition and structure of the ornithine-containing lipid from *Pseudomonas rubescens*. Biochim. Biophys. Acta . 270: 1-17.

Yakimov, M.M., Golyshin, P.N., Lang, S., Moore, E.R.B., Abraham, W.R., Lunsdorf, H. and Timmis, K.N. 1998. *Alkanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. In. J. Syst. Bacteriol. 48: 339-348.

Yakimov, M.M., Timmis, K.N., Wray, V. and Fredrickson, H.L. 1995. Characterization of a new lipopetide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant substrate *Bacillus licheniformis* BAS50. Appl. Mcrobial. Biotechnol. 61: 1706-1713.

Yu, G.Y., Sinclair, J.B., Hartman, G.L. and Bertagnolli, B.L. 2002. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. Soil. Biol. Biochem. 34: 955-963.

Zajic, J.E., Gignard, H. and Gerson, D.F. 1977. Properties and biodegradation of bioemulsifier from *Corynebacterium hydrocaboclastus*. Biotechnol. Bioeng. 19: 1303-1320.

Zhao, B., Zhu, L., Li, W. and Chen, B. 2005. Solubilization and biodegradation of phenanthrene inmixed anionic–nonionic surfactant solutions. Chemosphere 58 : 33-40.

Zosim, Z., Gutnick, D.L. and Rosenberg, E. 1983. Uranium binding by emulsan and emulsanosols. Biotechnol. Bioeng. 25: 1725-1735.

Zukerberg, A., Diver, A., Peeri, Z., Gutnick, D.L. and Rosenberg, E. 1979. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: chemical and physical properties. Appl. Environ. Microbiol. 37: 414-420.

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

1. Minimal salt medium (ดัดแปลงจาก Shabtai and Gutnick, 1985)

$K_2HPO_4.3H_2O$	2.2 g/l
KH_2PO_4	0.73 g/l
$(NH_4)_2SO_4$	1 g/l
NaCl	30 g/l
$MgSO_4.7H_2O$	0.2 g/l
pH 7.0	

นำส่วนผสมละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2. Seawater medium (ดัดแปลงจาก Ana *et al.*, 2000)

NH_4NO_3	1 g/l
Yeast extract	0.2 g/l
NaCl	30 g/l
Phosphate solution	4 ml/l
- $Na_2HPO_4.12H_2O$	25 g/l
- NaH_2PO_4	3.6 g/l
pH 7.0	

นำส่วนผสมละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ภาคผนวก ข

1. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมด โดยใช้วิธี Lowry method (Lowry *et al.*, 1951)

สารเคมี

1. สารละลาย I

สารละลาย Na_2CO_3 ความเข้มข้น 2% ในโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล

2. สารละลาย II

เตรียม $CuSO_4.5H_2O$ ความเข้มข้น 1% ในสารละลาย sodium potassium tatrate ความเข้มข้น 1%

3. สารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ (Alkaline copper solution)

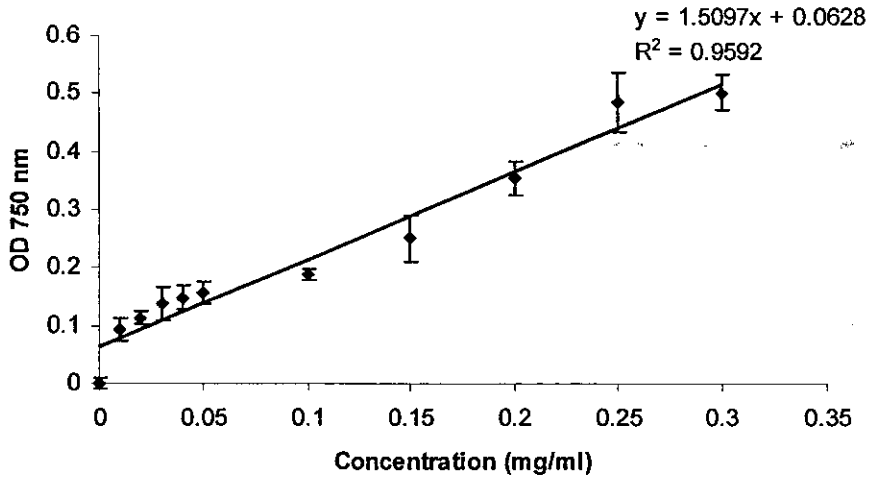
เตรียมโดยผสมสารละลาย I ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และสารละลาย II ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เตรียมก่อนใช้

4. Folin-ciocateus reagent

เตรียมโดยเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1: 1 อย่างรวดเร็วก่อนใช้

วิธีการ

1. เตรียมกราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin (BSA) เข้มข้น 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำกลั่น โดยบรรจุสารละลายมาตรฐานในหลอดทดสอบหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ 3 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เติม folin-ciocateus reagent 0.3 มิลลิลิตร เขย่าทันที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนและค่าการดูดกลืนแสง
2. วิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้ตัวอย่างที่เจือจางได้เหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร แล้ววิเคราะห์ตามวิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin



ภาพที่ 18 กราฟมาตรฐานโปรตีนโดยวิธี Lowry method

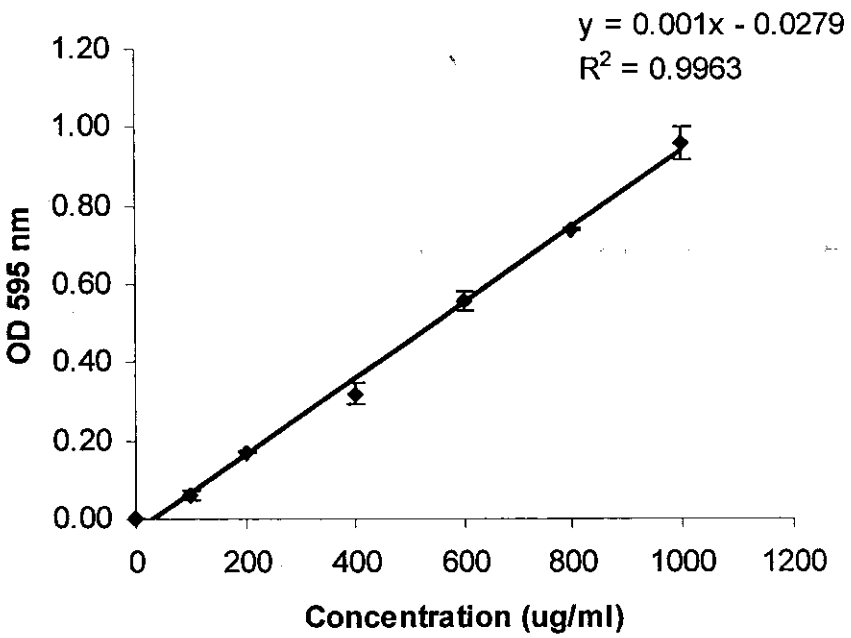
2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธี Bradford method (Bradford, 1976)

สารเคมี

1. สารละลายแบรดฟอร์ด (Bradford reagent)

วิธีการ

1. เตรียมกราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin (BSA) เข้มข้น 100, 200, 400, 600, 800, 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำกลั่น โดยบรรจุสารละลายมาตรฐานในหลอดทดสอบหลอดละ 100 ไมโครลิตร เติมสารละลายแบรดฟอร์ด 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนและค่าการดูดกลืนแสง
2. วิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้ตัวอย่างที่เจือจางได้เหมาะสม 100 ไมโครลิตร แล้ววิเคราะห์ตามวิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin



ภาพที่ 19 กราฟมาตรฐานโปรตีนโดยวิธี Bradford method

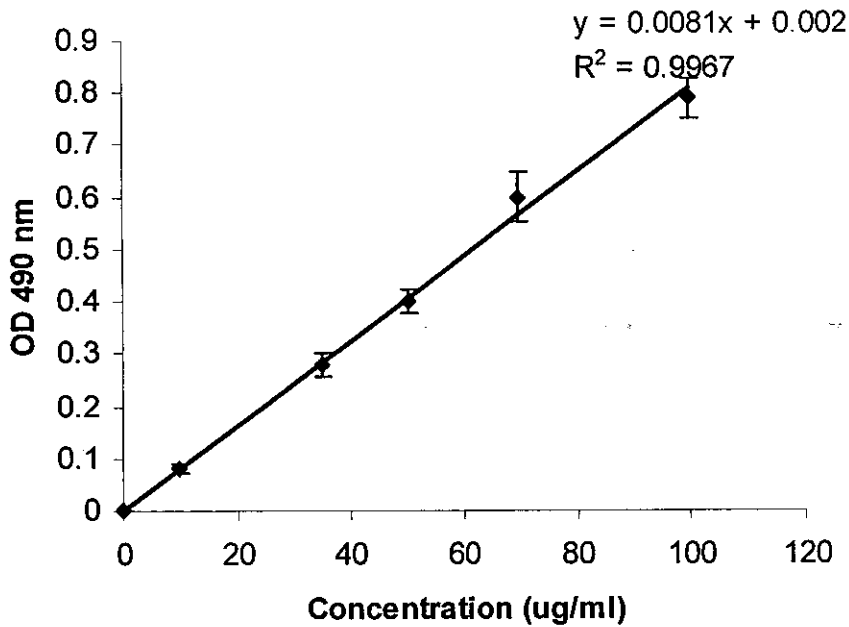
3. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธี phenol-sulfuric method (Dubois *et al.*, 1956)

สารเคมี

1. สารละลายฟีนอลความเข้มข้น 5%
2. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น

วิธีการ

1. เตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 10, 35, 50, 70, 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำกลั่น โดยบรรจุสารละลายมาตรฐานในหลอดทดสอบหลอดละ 100 ไมโครลิตร เติมสารละลายฟีนอลความเข้มข้น5% ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 มิลลิลิตร ให้สัมผัสกับสารละลายโดยตรงอย่างรวดเร็ว ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เขย่าอย่างรุนแรง ทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลและค่าการดูดกลืนแสง
2. วิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้ตัวอย่างที่เจือจางได้เหมาะสม 100 ไมโครลิตร แล้ววิเคราะห์ตามวิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส



ภาพที่ 20 กราฟมาตรฐานน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี phenol-sulfuric method

ภาคผนวก ค

Spraying reagent

1. Ninhydrin reagent

เตรียมโดยนำ ninhydrin 0.3 กรัม ละลายใน 1-butanol 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติม gracial acetic acid ลงไป 3 มิลลิตร ผสมให้เข้ากัน ใช้ในการทดสอบหมู่อะมิโนอิสระ ซึ่งจะปรากฏจุดสีม่วงโดยมีพื้นหลังเป็นสีขาวบนแผ่น TLC หลังจากให้ความร้อน 105 องสาเซลเซียส นาน 10 นาที

2. Rhodamine B

เตรียมโดยนำ rhodamine B 0.25 กรัม ละลายในเอธานอล 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันใช้ในการทดสอบกรดไขมัน ซึ่งจะปรากฏจุดสีชมพูบนแผ่น TLC เมื่อมองภายใต้แสง UV

3. Anisaldehyde

เตรียมโดยผสม anisaldehyde 0.5 มิลลิลิตร กับ เอธานอล 9 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.5 มิลลิลิตร และ กรดอะซิติก 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ใช้ในการทดสอบน้ำตาล ซึ่งจะปรากฏจุดสีม่วงเข้มโดยมีพื้นหลังเป็นสีชมพูบนแผ่น TLC หลังจากให้ความร้อน 105 องสาเซลเซียส นาน 10-15 นาที

Output

Original Article

Phetrong, K., H-Kittikun, A. and Maneerat, S. 2008. Production and characterization of bioemulsifier from a marine bacterium, *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7. Songklanakarin J. Sci. Technol. 30: 297-305.

Conferences/Meeting:

Phetrong, K., H-kittikun, A. and Maneerat, S. 2007. Production of biosurfactant from marine bacterium, *Acinetobacter anitratus* SM7. 7th National Grad-Research Conference. Surattani, Thailand. 4-5 April.

Phetrong, K., H-Kittikun, A and Maneerat, S. 2007. *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 a new bioemulsifier-producing marine bacterium. The 2nd International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology "Fostering Cross-disciplinary Applied Research in Microbiology and Microbial Biotechnology" Seville, Spain. 28 November - 1 December.