ชื่อวิทยานิพนธ์ การทำให้บริสุทธิ์บางส่วนและการประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus subtilis* MUV4

ผู้เขียน นางสาวพิชญ์นรี สุวรรณสุโข

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2549

บทคัดย่อ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นสารที่ผลิตได้จากสิ่งมีชีวิตหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นมีความเป็นพิษต่ำ ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม และทนต่อสภาวะจำกัดได้ดี เชื้อ *Bacillus subtilis* MUV4 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ในระดับขวดเขย่าในอาหาร Modified Mckeen Medium ที่มีน้ำตาลกลูโคส 1% เป็นแหล่งคาร์บอน และมี monosodium glutamate 1% และยีสต์สกัด 0.3% เป็นแหล่งไนโตรเจน ส่วนใสจากน้ำเลี้ยงเชื้อมีแรงตึงผิวลดลงจากจาก 53.50 mN/m ในชั่วโมงที่ 0 เป็น 33.50 mN/m ในชั่วโมงที่ 48 เมื่อตกตะกอนส่วนใสด้วยกรดไฮโดรคลอริก 6 นอร์มัลที่พีเอช 2 พบว่าได้ส่วนสกัดหยาบสารลดแรงตึงผิว 0.652 g/L *B. subtilis* MUV4 มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ 0.14 ต่อชั่วโมง มีผลผลิตของเซลล์ต่อสับสเตรต (Yx/s) เป็น 0.713 ผลผลิตของสารลดแรงตึงผิวต่อสับสเตรต (Yp/s) เป็น 0.072 และผลผลิตของสารลดแรงตึงผิวต่อเซลล์ (Yp/x) เป็น 0.101 เมื่อเลี้ยงในถังหมักในสภาวะที่ไม่มีการให้อากาศ และไม่ควบคุมความเป็นกรด-ด่าง 96 ชั่วโมง สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้ 0.30 g/L เมื่อนำส่วนสกัดหยาบสารลดแรงตึงผิวมาละลายในเมธานอล ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง vacuum evaporator ได้เป็นส่วนสกัดหยาบเมธานอล แล้วแยกด้วยคอลัมน์แบบดูดซับชนิดซิลิกาเจล 60 โดยมี คลอโรฟอร์ม:เมธานอล:น้ำ (65:15:1) ถึง เมธานอล:น้ำ (100:1) เป็นสารละลายเคลื่อนที่ ได้ส่วนย่อยทั้งหมด 6 ส่วน (F1-F6) ซึ่งส่วนย่อย F4 F5 และ F6 ให้กิจกรรมแรงตึงผิวเป็น 32.00 31.00 และ 35.20 mN/m ตามลำดับ นำส่วนย่อย F4 และ F5 แยกด้วยคอลัมน์แบบดูดซับชนิดซิลิกาเจล 60 อีกครั้ง ซึ่งส่วนย่อยที่ได้จากการแยก F4 มีทั้งหมด 5 ส่วนย่อย (F4-A ถึง E) ในขณะที่ส่วนย่อยจากการแยก F5 มีทั้งหมด 2 ส่วนย่อย (F5-A และ B) ซึ่งส่วนย่อย F4-A ถึง E ไม่มีกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิว ในขณะที่ส่วนย่อย F5-B ให้ค่าแรงตึงผิว 30.50 mN/m และแยกส่วนย่อย F5-B ด้วยวิธี preparative TLC ได้ส่วนย่อยทั้งหมด 3 ส่วนย่อย คือ S1 S2 และ S3 ซึ่งส่วนย่อย S3 ให้ค่าแรงตึงผิวเป็น 34.70 mN/m มีค่า critical micelle concentration (CMC) เท่ากับ 200 mg/L การศึกษาสมบัติเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่า ส่วนใสจาก

น้ำเลี้ยงเชื้อมีความคงตัวที่พีเอช 6-12 ส่วนสกัดหยาบและส่วนสกัดหยาบเมธานอลคงตัวที่พีเอช 7-10 และพีเอช 4-10 ตามลำดับ ความคงตัวของอิมัลชั่นพิจารณาจากค่า emulsion index (E24) พบว่าส่วนใสจากน้ำเลี้ยงเชื้อ ส่วนสกัดหยาบ และส่วนสกัดหยาบเมธานอลให้ค่า E24 ที่พีเอช 7 เป็น 66.67% 33.33% และ 33.33% ตามลำดับ ส่วนใสจากน้ำเลี้ยงเชื้อและส่วนสกัดหยาบมีความคงตัวที่อุณหภูมิ 4°C, อุณหภูมิห้อง (30±2°C) และ 50 องศาเซลเซียส ให้ค่าแรงตึงผิวเป็น 34.50-35.00 mN/m หลังจากบ่มไว้เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ในขณะที่ส่วนสกัดหยาบเมธานอลมีความคงตัวต่ออุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมงด้วย นอกจากนี้ส่วนใสจากน้ำเลี้ยงเชื้อมีความคงตัวของอิมัลชั่นที่อุณหภูมิห้อง (E24=66.67%) แต่ส่วนสกัดหยาบ และส่วนสกัดหยาบเมธานอลมีความคงตัวอิมัลชั่นที่ 4 องศาเซลเซียส (E24=50.00%) ส่วนใสจากน้ำเลี้ยงเชื้อและส่วนสกัดหยาบยังมีกิจกรรมของแรงตึงผิวเมื่อมีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 3-10%w/v แต่ส่วนสกัดหยาบเมธานอลยังมีกิจกรรมของแรงตึงผิวเมื่อมีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 3-20%w/v อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของเกลือที่มากกว่า 5%w/v ส่งผลให้ทุกตัวอย่างสูญเสียความคงตัวของอิมัลชั่น การนำสารลดแรงตึงผิวจาก *B. subtilis* MUV4 ไปประยุกต์ใช้ พบว่าส่วนย่อย F4-C สามารถยับยั้ง *Bacillus cereus* ATCC11778 ได้ที่ระดับ MIC 37.5 µg/mL ในขณะที่ส่วนสกัดหยาบเมธานอล ส่วนย่อย F5-B และ F6 ช่วยเพิ่มการละลายของสาร naphthalene และ phenanthrene ได้ดีกว่า sodium dodecyl sulfate ส่วนสกัดหยาบเมธานอลสามารถเก็บเกี่ยวน้ำมันดิบและน้ำมันก๊าดด้วยวิธี sand pack column ให้ค่าการการเก็บเกี่ยวเป็น 41.85% และ 75.00% ตามลำดับ ในการย่อยสลายน้ำมันดิบ เมื่อนำสารสกัดหยาบสารลดแรงตึงผิวเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันดิบ 0.3% เป็นแหล่งคาร์บอน ร่วมกับกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน พบว่า ชุดการทดลองที่เติมส่วนสกัดหยาบสารลดแรงตึงผิวลงไปนั้นสามารถทำให้สาร saturated hydrocarbon ลดลง 96.63% ในเวลา 7 วัน ในขณะที่ชุดการทดลองที่ไม่ได้เติมส่วนสกัดหยาบสารลดแรงตึงผิวนั้นปริมาณสาร saturated hydrocarbon ลดลงเพียง 19.96%

Thesis Title	Partial Purification and Application of Biosurfactant from *Bacillus subtilis* MUV4
Author	Miss Phitnaree Suwansukho
Major Program	Biotechnology
Academic Year	2006

ABSTRACT

Biosurfactants are produced by many organisms, especially microorganisms such as bacteria. Biosurfactants are non toxic, friendly to the environment and stable to the extreme conditions. *Bacillus subtilis* MUV4 produced biosurfactant in flask with Modified Mckeen Medium containing 1 % glucose as carbon source and 1 % monosodium glutamate and 0.3 % yeast extract as nitrogen source. The supernatant of *B. subtilis* MUV4 reduced the surface tension of the medium from 53.50 mN/m to 33.50 mN/m at 48 hours. Crude biosurfactant from *B. subtilis* MUV4 after precipitated with 6 N HCl was 0.652 g/L. The growth kinetics were the specific growth rate (μ) 0.14 h^{-1}, yield biomass to substrate (Yx/s) 0.713, yield product to substrate (Yp/s) 0.072 and yield product to biomass (Yp/x) 0.101. Moreover, *B. subtilis* MUV4 produced 0.30 g/L crude biosurfactant in the fermenter with agitation rate 200 rpm, no aeration and uncontrolled pH after 96 hours. The crude biosurfactant was dissolved in methanol and was dried by vacuum evaporator (crude methanol). This crude methanol was separated by silica gel 60 column chromatography with chloroform : methanol : water (65:15:1) to methanol : water (100:1) as mobile phase resulted in 6 fractions (F1-F6). F4, F5 and F6 showed surface tension 32.00, 31.00 and 35.20 mN/m, respectively. F4 and F5 were separated by the second Silica gel column chromatography resulted in 5 fractions (F4-A-F4-E) and 2 fractions (F5A-F5-B), respectively. Subfractions of F4 did not show biosurfactant acitivity while subfraction of F5, F5-B showed surface tension 30.50 mN/m. Further separation of F5-B was performed by preparative TLC and subfractions S1, S2 and S3 were obtained. The subfraction S3 showed surface tension 34.70 mN/m with critical micelle concentration (CMC) 200 mg/L. The properties of partially purified biosurfactant showed that the supernatant was stable at pH 6-12 with surface tension 35.00-37.50 mN/m. Crude biosurfactant and crude methanol were stable at pH 7-10 and pH 4-10, respectively.

The emulsion stability at 24 hours (E24) of supernatant, crude biosurfactant and crude methanol at pH 7 were 66.67%, 33.33% and 33.33%, respectively. The supernatant and crude biosurfactant showed surface tension 34.50-35.00 mN/m at 4°C, room temperature (30±2°C) and 50°C after incubation for 5 hours. However, crude methanol was also stable at 100°C for 5 hours. The supernatant showed the highest E24 at room temperature (66.67%) but crude biosurfactant and crude methanol showed 50.00% E24 at 4°C. The surface tension of the supernatant and crude biosurfactant was stable in 3-10 % NaCl while crude methanol showed stability in 3-20 % NaCl. However, all samples lost emulsion stability when NaCl was higher than 5%w/v. For biosurfactant application, the subfraction F4-C showed an antibacterial activity against *Bacillus cereus* ATCC11778 with MIC 37.5 µg/mL. Crude methanol, subfraction F5-B and F6 enhanced the solubility of naphthalene and phenanthrene better than sodium dodecyl sulfate. Crude methanol enhanced the recovery of crude oil and kerosene oil by 41.85% and 75.00% by sand pack column technique, respectively. In hydrocarbon degradation application, crude biosurfactant was added to the culture medium containing 0.3 % crude oil as carbon source and the microorganism consortium from soil contaminated oil. The result showed that the saturated hydrocarbon was reduced by 96.63% when cultivated for 7 days while the control with no crude biosurfactant showed only 19.96% reduction.