

การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและ
สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต
Screening of Biosurfactant Producing Bacteria and
Optimization of Production Process



จันทร์เพ็ญ อิสลาม
Janpen Islam

๑

เลขหมู่	TP994 Q63 2544 ..
Bib Key	243073
	, ๒๘ ส.พ. ๒๕๔๔

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
Master of Science Thesis in Biotechnology
Prince of Songkla University
2544

ชื่อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต
ผู้เขียน	นางสาวจันทร์เพ็ญ อีสลาม
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2543

บทคัดย่อ

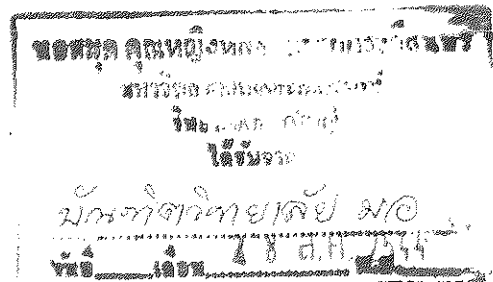
การผสมตัวอย่างดินและน้ำที่ปนเปื้อนด้วยน้ำมันปิโตรเลียมจำนวน 98 ตัวอย่าง จากบริเวณโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม อู่ซ่อมรถ และท่าเรือ สามารถแยกแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร nutrient agar (NA) ที่มี 3% NaCl ได้ทั้งหมด 122 สายพันธุ์ พบแบคทีเรีย 39 สายพันธุ์สามารถเจริญและให้วงใสรอบโคโลนีได้บนอาหาร blood agar ซึ่งเป็นลักษณะของแบคทีเรียที่มีแนวโน้มว่าจะมีการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยมีแบคทีเรียจำนวน 8 สายพันธุ์ ซึ่งติดสีแกรมลบทั้งหมด รูปแท่งและกลม สามารถอิมัลซิไฟด์ weathered oil ได้ และแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ คือ PA6 และ S7 มีการอิมัลซิไฟด์ weathered oil ได้ดีที่สุดและมีค่า %emulsifying capacity (%EC) สูงที่สุดเท่ากับ 0.47 ± 0.08 และ 0.51 ± 0.06 ตามลำดับ จากการศึกษาสมบัติบางประการด้านสัณฐานวิทยา ชีวเคมี ร่วมกับการใช้ชุดการทดสอบ kit ระบบเอพีไอ (api 20E) พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ PA6 จัดอยู่ในสกุล *Pasteurella* sp. และแบคทีเรียสายพันธุ์ S7 จัดอยู่ในสกุล *Acinetobacter* sp.

สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Pasteurella* PA6 มีการผลิตสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 48 โดยมีการผลิตสารลดแรงตึงผิวให้ค่า %EC และ oil displacement area (ODA) สูงที่สุดคือเท่ากับ 2.49 และ 44.2 ตารางเซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงใน marine broth (MB) ที่มีน้ำมันปาล์มความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีพีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 4.5 และเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Acinetobacter* S7 คือใช้อาหาร MB ที่มีน้ำมันปาล์ม 5 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมไนเตรท 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 7.2 และที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีการผลิตสารลดแรง

ตั้งผิวสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 72 ให้ค่า %EC และ ODA เท่ากับ 2.89 และ 407.3 ตารางเซนติเมตร ตามลำดับ

เมื่อศึกษาความคงตัวของสารลดแรงตึงผิว พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Pasteurella* PA6 ทำงานได้ดีคือมีค่า %EC และ ODA คงเหลือมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ในสภาวะที่มีพีเอช 4.0-8.0 ในที่มีเกลือเพิ่มขึ้นอีก 5-15 เปอร์เซ็นต์ และทนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 150 นาที สำหรับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Acinetobacter* S7 มีค่ากิจกรรมคงเหลือมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีพีเอช 2.0-6.0 และในที่มีเกลือเพิ่มขึ้น 5-20 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีความคงตัวต่ออุณหภูมิ 55, 80 และ 100 องศาเซลเซียส โดยมีค่า %EC และ ODA คงเหลือมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 240 นาที 120 นาที และ 90 นาที ตามลำดับ

ผลจากการศึกษาองค์ประกอบขั้นต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Pasteurella* PA6 และ *Acinetobacter* S7 พบว่า มีองค์ประกอบหลักคล้ายคลึงกัน คือ มีคาร์โบไฮเดรต ไขมัน และกรดอะมิโนรวมอยู่ด้วยในโครงสร้าง



Thesis Title Screening of Biosurfactant Producing Bacteria and
 Optimization of Production Process

Author Miss Janpen Islam

Major Program Biotechnology

Academic Year 2000

Abstract

During screening for biosurfactant producing bacteria, one hundred and twenty two marine bacterial strains were isolated in nutrient agar with 3% NaCl from ninety eight soil and seawater contaminated with petroleum wastes of palm oil mills, garages and ports. Thirty-nine isolates showed haemolytic activity on blood agar plate. The haemolytic activity was used as a primary selection criterion for the biosurfactant producing bacteria. Only eight strains, all were gram-negative bacteria (rods and cocci), had weathered oil degrading capability. Two strains (PA6 and S7) showed the highest %emulsifying capacity (%EC) (0.47 ± 0.08 and 0.51 ± 0.06 , respectively). After morphological examination and biochemical tests including the test with api 20E the isolate PA6 was identified as *Pasteurella* sp. And the isolate S7 was *Acinetobacter* sp.

Optimization of biosurfactant production by *Pasteurella* PA6 and *Acinetobacter* S7 was studied in marine broth (MB). *Pasteurella* PA6 produced maximum biosurfactant (2.49 %EC and displacement area (ODA) 44.2 cm^2) at 48 h in MB contained 0.1% palm oil, 0.5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 4.5 and 37°C . *Acinetobacter* S7 produced maximum biosurfactant (2.89 %EC and ODA 407.3 cm^2) at 72 h in MB contained 5.0% palm oil, 0.1% NH_4NO_3 , pH 7.2 and 30°C .

The biosurfactant from culture broth of *Pasteurella* PA6 had more than 70% of %EC and ODA remained at pH 4.0-8.0, in addition of 5-15% NaCl and at temperature 100°C for 150 min. The biosurfactant from culture broth of *Acinetobacter* S7 had more than 70% of %EC and ODA remained at pH 2.0-6.0

and in addition of 5-20% NaCl. In addition, when the culture broth of *Acinetobacter* S7 was kept at 50, 80 and 100 °C for 240 min, 120 min and 90 min, respectively the %EC and ODA still remained more than 70%.

The crude biosurfactants of *Pasteurella* PA6 and *Acinetobacter* S7 were presumptively characterized by TLC analysis and chemical tests. They contained carbohydrate, fat and amino acids.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรัญ หันพงศ์กิตติกุล ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนการทำวิจัยและการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เขียวลักษณ์ ดิสระ กรรมการที่ปรึกษาร่วม ที่ให้คำแนะนำต่างๆ ในการทำวิจัยและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. พูนสุข ประเสริฐสรรพ กรรมการผู้แทนคณะอุตสาหกรรมเกษตร และรองศาสตราจารย์ วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย และขอกราบขอบพระคุณ พ่อ แม่ และพี่ ๆ ที่ให้กำลังใจและกำลังใจในการศึกษามาโดยตลอด ขอขอบคุณ พี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ตลอดจนเจ้าหน้าที่คณะอุตสาหกรรมเกษตร และทุกท่านที่มีได้กล่าวมา ณ ที่นี้ด้วย ที่มีส่วนช่วยเหลือในการทำวิจัยและให้คำแนะนำ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

จันทร์เพ็ญ อีสลาม

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(10)
รายการตารางภาคผนวก	(11)
รายการภาพ	(15)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำตั้งเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	30
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	31
วัสดุ	31
อุปกรณ์	32
การวิเคราะห์	32
วิธีการทดลอง	34
3. ผลและวิจารณ์	40
4. สรุป	92
ข้อเสนอแนะ	94
เอกสารอ้างอิง	95
ภาคผนวก	101
ภาคผนวก ก สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย	101
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์	106

ภาคผนวก ค ผลการทดลอง	110
ประวัติผู้เขียน	135
ผลงาน	136

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1. จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวในกลุ่มต่าง ๆ	11
2. สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวจากจุลินทรีย์	13
3. ผลของแหล่งไนโตรเจนและยีสต์สกัดต่อการเจริญและการผลิต สารลดแรงตึงผิวของ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> °	18
4. ผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อการทำงานของสารลดแรงตึงผิวจาก <i>Serratia marcescens</i> ที่เจริญบนอาหารที่มี ซูโครสร้อยละ 2	21
5. ค่าความสามารถในการละลายน้ำของไฮโดรคาร์บอนบางชนิด	25
6. ตัวอย่างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้รับการจดสิทธิบัตรแล้ว	29
7. การทดสอบอิมัลซิไฟด์ weathered oil ของแบคทีเรีย 8 สายพันธุ์ ในเวลา 14 วัน	41
8. % emulsifying capacity ของแบคทีเรียทั้ง 8 สายพันธุ์	44
9. คุณสมบัติของแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิว สายพันธุ์ <i>Pasteurella</i> PA6 และ <i>Acinetobacter</i> S7	46
10. ผลของสารทดสอบต่อสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย <i>Pasteurella</i> PA6 และ <i>Acinetobacter</i> S7 บนแผ่น TLC aluminium sheets silica gel 60 F ₂₅₄ เมื่อเคลื่อนที่ในอัตราส่วนของตัวทำละลาย CHCl ₃ : C ₆ H ₁₄ O : CH ₃ COOH : H ₂ O เป็น 60: 30 : 1: 1	90

รายการตารางภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่	หน้า
ข1 การเตรียมสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (Tris-HCl buffer)	105
ค1. ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ <i>Pasteurella</i> PA6 ในชั่วโมงที่ 36 เมื่อเมื่อเจริญในอาหารต่าง ๆ กัน คือ 1=MB1, 2= MB1+0.1%hexadecane, 3=MB1+0.1%น้ำมันปาล์ม, 4= MB1+1%กลูโคสและ 5= MB1+1%ซูโครส	109
ค2. ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ <i>Acinetobacter</i> S7 ในชั่วโมงที่ 36 เมื่อเมื่อเจริญในอาหารต่าง ๆ กัน คือ 1=MB1, 2= MB1+ 0.1%hexadecane, 3=MB1+ 0.1%น้ำมันปาล์ม, 4= MB1+1%กลูโคส และ 5= MB1+1%ซูโครส	110
ค3. การเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวของ <i>Pasteurella</i> PA6 ในอาหาร 2 สูตร คือ 1)MB1+0.1%น้ำมันปาล์มและ 2)MB2 + 0.1%น้ำมันปาล์ม	111
ค4. การเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวของ <i>Acinetobacter</i> S7 ในอาหาร 2 สูตร คือ 1) MB1 + 0.1%น้ำมันปาล์ม และ 2) MB2 + 0.1% น้ำมันปาล์ม	112
ค5. ผลของปริมาณน้ำมันปาล์มในอาหาร MB2 ต่อการเจริญ %EC และ ODA ของ <i>Pasteurella</i> PA6 ในชั่วโมงที่ 36	113
ค6. ผลของปริมาณน้ำมันปาล์มในอาหาร MB2 ต่อการเจริญ %EC และ ODA ของ <i>Acinetobacter</i> S7 ในชั่วโมงที่ 36	114
ค7. ผลของปริมาณยีสต์สกัด และแบคทีเรียเปปโตไนในอาหาร MB2 ต่อการเจริญ %EC และ ODA ของ <i>Pasteurella</i> PA6 ในชั่วโมงที่ 36 เมื่อเจริญในอาหารต่าง ๆ กัน คือ 1=MB2 ที่มี ยีสต์สกัดและแบคทีเรียเปปโตไน+0.1% น้ำมันปาล์ม, 2=MB2 ที่ไม่มียีสต์สกัดและแบคทีเรียเปปโตไน + 0.1% น้ำมันปาล์ม, 3=MB2 ที่มียีสต์สกัดแต่ไม่มีแบคทีเรียเปปโตไน0.1% น้ำมันปาล์ม, 4=MB2 ที่ไม่มียีสต์สกัดแต่มีแบคทีเรียเปปโตไน+0.1% น้ำมันปาล์ม	115

รายการตารางภาคผนวก(ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่	หน้า
ค8. ผลของปริมาณยีสต์สกัด และแบคทีเรียเปปโตไนในอาหาร MB2 ต่อการเจริญ %EC และ ODA ของ <i>Acinetobacter</i> S7 ในชั่วโมงที่ 36 เมื่อเจริญในอาหารต่าง ๆ กัน คือ 1=MB2 ที่มียีสต์สกัดและแบคทีเรียเปปโตไน+5.0% น้ำมันปาล์ม, 2=MB2 ที่ไม่มียีสต์สกัดและแบคทีเรียเปปโตไน + 5.0% น้ำมันปาล์ม, 3=MB2 ที่มียีสต์สกัดแต่ไม่มีแบคทีเรียเปปโตไน+ 5.0% น้ำมันปาล์ม, 4=MB2 ที่ไม่มียีสต์สกัดแต่มีแบคทีเรียเปปโตไน+5.0% น้ำมันปาล์ม	116
ค9. ผลของแหล่งไนโตรเจนในอาหาร MB3 ที่มีน้ำมันปาล์ม 0.1% ต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ <i>Pasteurella</i> PA6 ในชั่วโมงที่ 36	117
ค10. ผลของแหล่งไนโตรเจนในอาหาร MB3 ที่มีน้ำมันปาล์ม 5.0% ต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ <i>Acinetobacter</i> S7 ในชั่วโมงที่ 36	118
ค11. ผลของปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหาร MB3 ต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ <i>Pasteurella</i> PA6ในชั่วโมงที่ 36	119
ค12. ผลของปริมาณแอมโมเนียมไนเตรในอาหาร MB3 ต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ <i>Acinetobacter</i> S7 ในชั่วโมงที่ 36	120
ค13. ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญ และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอาหาร MB3 ของ <i>Pasteurella</i> PA6 ในชั่วโมงที่ 36	121
ค14. ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญ และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอาหาร MB3 ของ <i>Acinetobacter</i> S7 ในชั่วโมงที่ 36	122
ค15. ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหาร MB3 ต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ <i>Pasteurella</i> PA6 ในชั่วโมงที่ 36 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	123

รายการตารางภาคผนวก (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่	หน้า
ค16. ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหาร MB3 ต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพของ <i>Pasteurella</i> PA6 ในชั่วโมงที่ 36 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	124
ค17. ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหาร MB3 ต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพของ <i>Acinetobacter</i> S7 ในชั่วโมงที่ 36 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	125
ค18. การเจริญ การเปลี่ยนแปลงพีเอชและการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพของ <i>Pasteurella</i> PA6 ที่สภาวะที่เหมาะสม เมื่อเลี้ยงในอาหาร MB3 ที่มีน้ำมันปาล์ม 0.1 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 0.1 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 4.5	126
ค19. การเจริญ การเปลี่ยนแปลงพีเอชและการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพของ <i>Acinetobacter</i> S7 ที่สภาวะที่เหมาะสม เมื่อเลี้ยงในอาหาร MB3 ที่มีน้ำมันปาล์ม 5 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมไนเตรต 0.1 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7.2	127
ค20. ผลของพีเอชต่อความคงตัวของสารลดแรงดึงผิวจาก <i>Pasteurella</i> PA6 (บ่มส่วนใสที่มีพีเอชต่าง ๆ กัน ซึ่งทำการปรับพีเอชด้วย 1 M HCl หรือ NaOH ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้ววิเคราะห์หาค่า %EC และ ODA)	128
ค21. ผลของพีเอชต่อความคงตัวของสารลดแรงดึงผิวจาก <i>Acinetobacter</i> S7 (บ่มส่วนใสที่มีพีเอชต่าง ๆ กัน ซึ่งทำการปรับพีเอชด้วย 1 M HCl หรือ NaOH ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้ววิเคราะห์หาค่า %EC และ ODA)	129

รายการตารางภาคผนวก (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่	หน้า
ค22. ผลของความเข้มข้นของไซโตมคลอไรด์ต่อความคงตัวของสารลดแรงดึงผิวจาก <i>Pasteurella</i> PA6 (ปมส่วนใสที่มีการเติมไซโตมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้ววิเคราะห์หา %EC และ ODA)	130
ค23. ผลของความเข้มข้นของไซโตมคลอไรด์ต่อความคงตัวของสารลดแรงดึงผิวจาก <i>Acinetobacter</i> (ปมส่วนใสที่มีการเติมไซโตมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้ววิเคราะห์หา %EC และ ODA)	131
ค24. ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสารลดแรงดึงผิวจาก <i>Pasteurella</i> PA6 (ปมส่วนใสที่อุณหภูมิ 55, 80 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 240 นาที วิเคราะห์ หา %EC สัมพัทธ์ และ ODA สัมพัทธ์)	132
ค25. ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสารลดแรงดึงผิวจาก <i>Acinetobacter</i> S7 (ปมส่วนใสที่อุณหภูมิ 55, 80 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 240 นาที วิเคราะห์ หา %EC สัมพัทธ์ และ ODA สัมพัทธ์)	133

รายการภาพ

ภาพที่	หน้า
1. โครงสร้างต่างๆ ของสารลดแรงตึงผิว ซึ่งเป็นโมเลกุลแอมฟิพาติก (a) surfactant monomer มีส่วนหัวเป็นส่วนที่ชอบน้ำและส่วนหาง เป็นส่วนไม่ชอบน้ำ; (b) circular micelle; (c) rod-shaped micelle; (d) micellar layer และ (e) vesicle representation	3
2. โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มไกลโคลิปิด (A) rhamnolipids จาก <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (B) trehalolipids จาก <i>Rhodococcus erythropolis</i> (C) sophorolipids จาก <i>Torulopsis bombicola</i>	9
3. การเจริญและการเปลี่ยนแปลงพีเอชของแบคทีเรียที่สามารถผลิตสาร ลดแรงตึงผิว สายพันธุ์ คือ PA6, PA4, P6, P3, S3, S6, S7 และ S13 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MB1 ที่มี 0.1% hexadecane	43
4. การเจริญ การเปลี่ยนแปลงพีเอชและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ของ <i>Pasteurella</i> PA6 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MB1+ 0.1%hexadecane และ MB1+0.1%น้ำมันปาล์ม	48
5. การเจริญ การเปลี่ยนแปลงพีเอชและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ของ <i>Acinetobacter</i> S7 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MB1+0.1%hexadecane และ MB1+0.1%น้ำมันปาล์ม	49
6. ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ของ <i>Pasteurella</i> PA6 ในชั่วโมงที่ 36 (1=MB1, 2= MB1 + 0.1% hexadecane, 3= MB1+ 0.1%น้ำมันปาล์ม, 4= MB1+1%กลูโคส และ 5= MB1+1%ซูโครส)	51
7. ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ของ <i>Acinetobacter</i> S7 ในชั่วโมงที่ 36 (1= MB1, 2= MB1+0.1% hexadecane,3= MB1+ 0.1%น้ำมันปาล์ม,4= MB1+1%กลูโคส และ 5= MB1+1%ซูโครส)	52

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
8. การเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวของ <i>Pasteurella</i> PA6 ในอาหาร 2 สูตร คือ 1) MB1 +0.1%น้ำมันปาล์ม และ 2) MB2 + 0.1% น้ำมันปาล์ม	54
9. การเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวของ <i>Acinetobacter</i> S7 ในอาหาร 2 สูตร คือ 1) MB1 +0.1%น้ำมันปาล์ม และ 2) MB2 + 0.1% น้ำมันปาล์ม	55
10. ผลของปริมาณน้ำมันปาล์มในอาหาร MB2 ต่อการเจริญ %EC และ ODA ของ <i>Pasteurella</i> PA6 ในชั่วโมงที่ 36	56
11. ผลของปริมาณน้ำมันปาล์มในอาหาร MB2 ต่อการเจริญ %EC และ ODA ของ <i>Acinetobacter</i> S7 ในชั่วโมงที่ 36	58
12. ผลของปริมาณยีสต์สกัด และแบคทีเรียเปปโตไนในอาหาร MB2 ต่อ การเจริญ %EC และ ODA ของ <i>Pasteurella</i> PA6 ในชั่วโมงที่ 36 (1=MB2 ที่มียีสต์สกัดและแบคทีเรียเปปโตไน+0.1% น้ำมันปาล์ม, 2=MB2 ที่ไม่มียีสต์สกัดและแบคทีเรียเปปโตไน+0.1% น้ำมันปาล์ม, 3=MB2 ที่มียีสต์สกัดแต่ไม่มีแบคทีเรียเปปโตไน+ 0.1% น้ำมันปาล์ม, 4=MB2 ที่ไม่มียีสต์สกัดแต่มีแบคทีเรียเปปโตไน+0.1% น้ำมันปาล์ม	59
13. ผลของปริมาณยีสต์สกัด และแบคทีเรียเปปโตไนในอาหาร MB2 ต่อ การเจริญ %EC และ ODA ของ <i>Acinetobacter</i> S7 ในชั่วโมงที่ 36 (1=MB2 ที่มียีสต์สกัดและแบคทีเรียเปปโตไน+5.0%น้ำมันปาล์ม, 2=MB2 ที่ไม่มียีสต์สกัดและแบคทีเรียเปปโตไน + 5.0% น้ำมันปาล์ม, 3=MB2 ที่มียีสต์สกัดแต่ไม่มีแบคทีเรียเปปโตไน+ 5.0% น้ำมันปาล์ม, 4=MB2 ที่ไม่มียีสต์สกัดแต่มีแบคทีเรียเปปโตไน+5.0% น้ำมันปาล์ม)	60
14. ผลของแหล่งไนโตรเจนในอาหาร MB3 ที่มีน้ำมันปาล์ม 0.1% ต่อ การเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ <i>Pasteurella</i> PA6 ในชั่วโมงที่ 36	62

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
15. ผลของแหล่งไนโตรเจนในอาหาร MB3 ที่มีน้ำมันปาล์ม 5.0% ต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ <i>Acinetobacter</i> S7 ในชั่วโมงที่ 36	64
16. ผลของปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหาร MB3 ต่อการเจริญ และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ <i>Pasteurella</i> PA6 ในชั่วโมงที่ 36	65
17. ผลของปริมาณแอมโมเนียมไนเตรทในอาหาร MB3 ต่อการเจริญ และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ <i>Acinetobacter</i> S7 ในชั่วโมงที่ 36	66
18. ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญ และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอาหาร MB3 ของ <i>Pasteurella</i> PA6 ในชั่วโมงที่ 36	68
19. ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญ และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอาหาร MB3 ของ <i>Acinetobacter</i> S7 ในชั่วโมงที่ 36	69
20. ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหาร MB3 ต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ <i>Pasteurella</i> PA6 ในชั่วโมงที่ 36 เมื่อ ก) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ข) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	71
21. ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหาร MB3 ต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ <i>Acinetobacter</i> S7 ในชั่วโมงที่ 36 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	72
22. การเจริญ การเปลี่ยนแปลงพีเอชและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ <i>Pasteurella</i> PA6 ที่สภาวะที่เหมาะสม (เมื่อเลี้ยงในอาหาร MB3 ที่มีน้ำมันปาล์ม 0.1 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 4.5)	74

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
23. การเจริญ การเปลี่ยนแปลงพีเอชและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ <i>Acinetobacter</i> S7 ที่สภาวะที่เหมาะสม (เมื่อเลี้ยงในอาหาร MB3 ที่มีน้ำมันปาล์ม 5 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมไนเตรต 0.1เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7.2)	76
24. ผลของพีเอชต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวจาก <i>Pasteurella</i> PA6 (ป้อนส่วนใสที่มีพีเอชต่าง ๆ กัน ซึ่งทำการปรับพีเอชด้วย 1 M HCl หรือ NaOH ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้ววิเคราะห์หาค่า %EC และ ODA)	77
25. ผลของพีเอชต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวจาก <i>Acinetobacter</i> S7 (ป้อนส่วนใสที่มีพีเอชต่าง ๆ กัน ซึ่งทำการปรับพีเอชด้วย 1 M HCl หรือ NaOH ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้ววิเคราะห์หาค่า %EC และ ODA)	79
26. ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวจาก <i>Pasteurella</i> PA6(ป้อนส่วนใสที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้ววิเคราะห์หา %EC และ ODA)	81
27. ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวจาก <i>Acinetobacter</i> (ป้อนส่วนใสที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้ววิเคราะห์หา %EC และ ODA)	83
28. ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวจาก <i>Pasteurella</i> PA6 (ป้อนส่วนใสที่อุณหภูมิ 55, 80 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 240 นาที วิเคราะห์ หา ก) %EC สัมพัทธ์ และ ข) ODA สัมพัทธ์)	84

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
29. ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวจาก <i>Acinetobacter</i> S7 (ปมส่วนใสที่อุณหภูมิ 55, 80 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 240 นาที วิเคราะห์ หา ก) %EC สัมพัทธ์ และ ข) ODA สัมพัทธ์)	85
30. ลักษณะและปริมาณของแถบที่แยกได้ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก <i>Pasteurella</i> PA6 และ <i>Acinetobacter</i> S7 โดยใช้วิธีวิเคราะห์บนแผ่น TLC aluminium sheets silica gel 60 F ₂₅₄ เมื่อเคลื่อนที่ในอัตราส่วนของตัวทำละลาย $\text{CHCl}_3 : \text{C}_6\text{H}_{14}\text{O} : \text{CH}_3\text{COOH} : \text{H}_2\text{O}$ เป็น 60: 30 : 1: 1	89

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปัจจุบันมีผู้สนใจศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวจากจุลินทรีย์ เรียกผลิตภัณฑ์ที่ได้ว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) ซึ่งสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด ทั้งจาก แบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อรา ซึ่งพบได้ทั้งในน้ำจืด น้ำเค็ม และบนพื้นดิน (Deziel *et al.*, 1996 ; Finnerty, 1994) และมีการนำไปใช้ในการลดปริมาณสารพิษที่ตกค้างในธรรมชาติ โดยใช้ ในอุตสาหกรรมปิโตรเลียม เช่น นำไปใช้ในขั้นตอนการเก็บเกี่ยวน้ำมัน ในกระบวนการขน ถ้าย้ำมันดิบ ทำให้เพิ่มผลผลิตได้สูงขึ้น และยังใช้ในการทำความสะอาดคราบน้ำมัน นอกจากนี้ยังนำไปใช้ในงานด้านอาหาร ในการปรุงยาและการผลิตเครื่องสำอาง เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (emulsifier) ที่ดี (Kim, *et al.*, 1997; Desai and Banat, 1997)

การผลิตสารลดแรงตึงผิวส่วนใหญ่ใช้กระบวนการทางเคมี แต่พบว่า ในธรรมชาติ สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ที่ได้มักย่อยสลายได้ยาก และเป็นสาเหตุให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม (Passeri *et al.*, 1992) ดังนั้นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากจุลินทรีย์จึงมีข้อดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตด้วยวิธีทางเคมี เช่น ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความหลากหลาย มีความเป็นพิษต่ำ สามารถย่อยสลายได้ดีในธรรมชาติ มีความเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม มีศักยภาพในการประยุกต์ใช้กับงานด้านการเก็บเกี่ยวน้ำมันดิบ ช่วยลดความหนืดของน้ำมัน ได้ มีคุณสมบัติเป็นสารซักล้างที่ดี สามารถทำงานได้ถึงแม้ที่อยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิ พีเอช และความเค็มที่สูงหรือต่ำมากจากสภาวะปกติ (Makkar and Cameotra, 1997; Desai and Banat, 1997)

เนื่องจากประสิทธิภาพในการประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในงานด้านต่าง ๆ ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติเฉพาะของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้น ๆ การแยกและการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิต จึงมีบทบาทสำคัญต่อการผลิตและการนำไปใช้ ประโยชน์ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นในการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิว

ที่มีในแหล่งธรรมชาติ ซึ่งพบได้จากดินหรือน้ำที่มีการปนเปื้อนของน้ำมัน ประกอบกับการหาสถานะที่เหมาะสมต่อการผลิตเพื่อเป็นแนวทางในการค้นคว้าต่อไป

ตรวจเอกสาร

1. สารลดแรงตึงผิว (surfactant)

สารลดแรงตึงผิวมีโครงสร้างของโมเลกุลเป็นแบบแอมฟิพาติก (amphipathic molecules) ประกอบด้วย 2 ส่วน คือส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ (hydrophilic and hydrophobic moieties)

1.1 ส่วนที่ชอบน้ำหรือส่วนหัว (head group) อาจจะเป็น carbohydrate, carboxylic acid, phosphate, amino acid, cyclic peptide หรือ alcohol

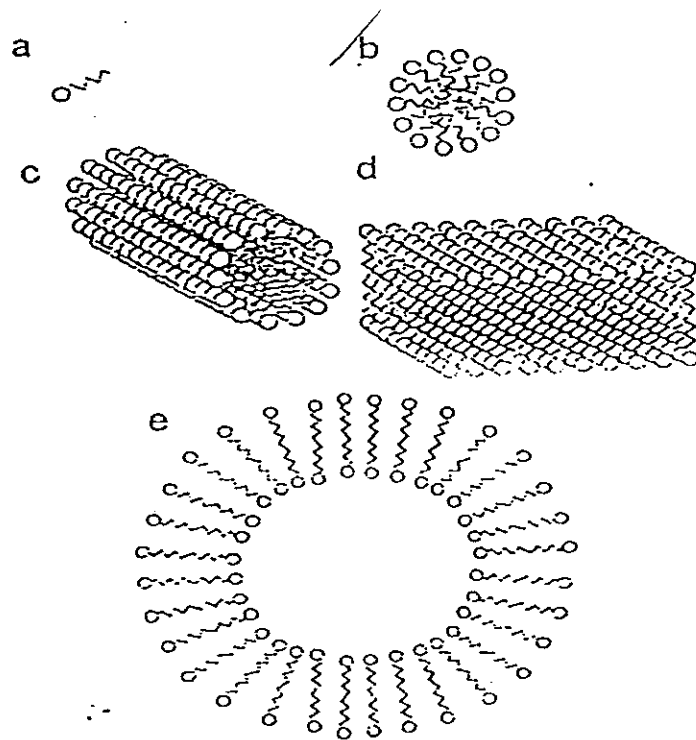
1.2 ส่วนที่ไม่ชอบน้ำหรือส่วนหาง (tail group) อาจจะเป็น long-chain fatty acid, hydroxy fatty acid หรือ α -alkyl- β -hydroxy fatty acid

เมื่ออยู่ในสารละลายโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวจะสะสมอยู่บริเวณผิว (surface) ของตัวทำละลายและเนื่องจากการมีโครงสร้างดังกล่าว ส่งผลให้เกิดการลดค่าแรงตึงผิวของตัวทำละลายนั้น ทำให้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนละลายได้ในน้ำหรือส่วนของน้ำละลายในสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ดีในการเป็นสารซักล้าง (detergent) สารเกิดฟองและการเกิดอิมัลชัน (Desai and Banat, 1997) ค่าแรงตึงผิวมีหน่วยเป็นมิลลินิวตันต่อเมตร (mN/m) หรือ ไดน์ (dyne) โดยทั่วไปสารลดแรงตึงผิวสามารถทำหน้าที่ลดแรงตึงผิวระหว่างสองพื้นผิวที่สัมผัสกันได้ เช่น ลดแรงตึงผิวระหว่างของแข็งกับของเหลว ระหว่างของเหลวกับของเหลว และระหว่างของเหลวกับก๊าซ ค่าแรงตึงผิวระหว่างพื้นผิวของสารที่สัมผัสกันนี้เรียกว่า ค่า interfacial tension

เมื่อสารลดแรงตึงผิวมีความเข้มข้นสูงในตัวทำละลาย โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวจะหันส่วนที่ไม่ชอบน้ำเข้าหากัน ด้วยแรงจับกันของสารลดแรงตึงผิว (surfactant self-association) เกิดเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า ไมเซลล์ (micelle) ขึ้น ลักษณะการเกิดไมเซลล์ดังภาพที่ 1 ซึ่งความเข้มข้น ณ จุดที่ทำให้โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวมารวมตัวกันนี้เป็นคุณ

สมบัติเฉพาะของสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิด เรียกความเข้มข้น ณ จุดนี้ว่า critical micelle concentration (CMC)

การเกิดไมเซลล์จะมีผลต่อค่าแรงตึงผิวของสารละลาย เมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวในสารละลายเพิ่มขึ้น ค่าแรงตึงผิวของสารละลายจะมีค่าลดลงจนถึงจุด CMC คือ ค่าแรงตึงผิวของสารละลายจะไม่ลดลงอีก ถึงแม้จะเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวในสารละลาย



ภาพที่ 1 โครงสร้างต่างๆ ของสารลดแรงตึงผิว ซึ่งเป็นโมเลกุลแอมฟิพาติก
 (a) surfactant monomer มีส่วนหัวเป็นส่วนที่ชอบน้ำและส่วนหาง
 เป็นส่วนไม่ชอบน้ำ ; (b) circular micelle ; (c) rod-shaped micelle ;
 (d) micellar layer และ (e) vesicle representation

ที่มา : Fiechter (1992)

2. สารลดแรงตึงผิวธรรมชาติ (natural surfactants)

สารลดแรงตึงผิวสามารถพบได้ในธรรมชาติ ในสิ่งมีชีวิตทั่วไป และมีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิต เช่น ในเยื่อเซลล์ที่มีฟอสโฟลิปิด(phospholipid) ฟอสโฟลิปิดนี้จะทำหน้าที่เป็นสารลดแรงตึงผิวในเยื่อหุ้มเซลล์

ในน้ำมันไขมันส่วนใหญ่อยู่ในรูปไตรกลีเซอไรด์ แต่มีจำนวนน้อยที่อยู่ในรูปฟอสโฟลิปิด และโคกลีเซอไรด์ ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ช่วยให้ไขมันชั้นในนมเสถียร ในระหว่างกระบวนการย่อยอาหารจำพวกไขมันจะถูกทำให้เป็นอิมัลชัน โดยฟอสโฟลิปิดหรือโคกลีเซอไรด์ จากนั้นเอนไซม์ไลเปส(lipase) จากตับอ่อนจะย่อยไตรกลีเซอไรด์ที่อยู่ในรูปของอิมัลชันของน้ำมันในน้ำ(oil/water) อิมัลชันนี้จะถูกเปลี่ยนให้เป็นกรดไขมันอิสระและโคกลีเซอไรด์ ซึ่งทั้งสองเป็นอิมัลชันที่แรง และสามารถเกิดไมเซลล์ร่วมกับเกลือน้ำดี ได้เป็นไขมันละลาย(solubilised fat) ที่จำเป็น ซึ่งสามารถผ่านผนังลำไส้ได้ เกลือน้ำดีซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวนี้จะผลิตขึ้นในตับและนำไปเก็บไว้ที่ถุงน้ำดี สารลดแรงตึงผิวที่พบในระบบเลือดได้แก่ ซีรัมอัลบูมินซึ่งมีคุณสมบัติในการก่ออิมัลชันที่ดี และยังมีสารลดแรงตึงผิวที่ได้จากธรรมชาติอื่น ๆ เช่น อคาเซีย (acacia) เจลาติน (gelatin) ลานอลิน (lanolin) ขี้ผึ้ง (beewax) และ เลซิธิน (lecithin) เป็นต้น (Clint,1992)

3. สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ (synthetic surfactants)

การดำเนินกิจกรรมและกระบวนการต่าง ๆ ทั้งในบ้านเรือนและในโรงงานอุตสาหกรรมต้องอาศัยสารลดแรงตึงผิว ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวที่ได้จากการสังเคราะห์มากกว่าสารลดแรงตึงผิวที่ได้จากธรรมชาติ สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ที่ผลิตได้จากกระบวนการปิโตรเคมี เช่น แอลกอฮอล์ อัลคิลเบนซีน อัลคิลฟีนอล หรือผลิตจากวัตถุดิบธรรมชาติ เช่น ได้จากน้ำมันพืช น้ำมันสัตว์ และไขมัน กรดไขมันและแอลกอฮอล์ คาร์โบไฮเดรต เป็นต้น โดยผ่านกระบวนการทางเคมี ตัวอย่างของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ที่ใช้ในชีวิตประจำวันคือ ดีเทอร์เจนท์(detergent) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ในการทำมาสะอาด โดยมีส่วนประกอบหลักเป็นสารลดแรงตึงผิว สบู่เป็นดีเทอร์เจนท์ที่มีการใช้มาตั้งแต่สมัยโรมัน ในตอนแรกสบู่ถูกผลิตขึ้น

ภายในครัวเรือน ต่อมาเมื่ออุตสาหกรรมขนสัตว์ได้เจริญเติบโตขึ้นเป็นผลให้มีโรงงานผลิตสบู่ เพื่อเป็นการค้าขึ้นในศตวรรษที่ 13 แม้ว่าสบู่ยังมีมูลค่ามากและมีแนวโน้มที่จะเพิ่มมากขึ้น แต่ก็มีภาระแนะนำสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ขึ้นในปี ค.ศ. 1940 เป็นการเริ่มต้นของ วิวัฒนาการของผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด ทั้งในบ้านเรือนและโรงงานอุตสาหกรรม ปัจจุบันทั่วโลกได้มีการใช้ผลิตภัณฑ์สารลดแรงตึงผิวประมาณ 1,000,000 ตันต่อปี ซึ่งนอกจากใช้ได้ ในบ้านเรือนแล้ว ในอุตสาหกรรมใหญ่ ๆ ก็มีการใช้สารลดแรงตึงผิว เช่น อุตสาหกรรมฟอก ย้อม อุตสาหกรรมเส้นใย อุตสาหกรรมถลุงแร่ อุตสาหกรรมน้ำมัน อุตสาหกรรมยาฆ่าแมลง อุตสาหกรรมยา และอุตสาหกรรมพลาสติก จึงจัดได้ว่าสารลดแรงตึงผิวมีบทบาทที่สำคัญ อย่างยิ่งในทางเศรษฐกิจ (Clint,1992)

ประเภทของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ (Clint,1992)

เราสามารถจำแนกประเภทของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์โดยอาศัยความแตกต่าง ในโครงสร้างของโมเลกุล ได้ดังนี้

3.1 กลุ่มที่ชอบน้ำ (hydrophilic group) สามารถแบ่งกลุ่มของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ตามโครงสร้างของโมเลกุล ความแรงของขั้ว และประจุของกลุ่มที่ชอบน้ำหรือกลุ่มหัว (head group)

3.1.1 สารลดแรงตึงผิวประจุลบ(anionic surfactant) ตัวอย่างของสารลดแรงตึงผิวประเภทนี้ประกอบด้วยสบู่ซึ่งเป็นสารคาร์บอกซิลิก ($-\text{CO}_2^-$) และสารดีเทอร์เจนท์สังเคราะห์ ในยุคต้น ๆ ซึ่งประกอบด้วย ซัลโฟเนต(sulphonates($-\text{SO}_3^-$)) และซัลเฟต (sulphates ($-\text{SO}_4^-$)) ทั้งหมดยังเป็นสารลดแรงตึงผิวที่นิยมใช้ในงานทำความสะอาด โดยที่ซัลโฟเนตและซัลเฟตมีสมบัติเหนือกว่าคาร์บอกซิเลต (carboxylates) โดยสามารถทนต่ออิออน ของโลหะของน้ำกระด้างได้ดีมาก

3.1.2 สารลดแรงตึงผิวประจุบวก(cationic surfactant) มักจะเป็นพวกควอเทอร์นารีแอมโมเนียม(quaternary ammonium) อิมิดาโซลิเนียม(imidazolium) หรือสารประกอบอัลคิลไพริดีเนียม (alkyl pyridinium) ในทางปฏิบัติประจุบวกที่กลุ่มหัวของมันจะ

จับกับประจุลบบนเส้นใย เช่น ฝ้าย และผม ได้แน่นมาก จึงนิยมใช้ในงานที่เกี่ยวข้องกับผ้า และในครีมขนาดผม

3.1.3 สารลดแรงตึงผิวที่มีทั้งประจุบวกและลบ(zwitterionic surfactant หรือ amphoteric surfactant) เป็นสารลดแรงตึงผิวที่โครงสร้างของโมเลกุลประกอบด้วยทั้งประจุบวกและประจุลบ มีโครงสร้างของบีเทน(betaines($-N^+(CH_3)_2CH_2CO_3^-$)) หรือ ซัลโฟบีเทน(sulphobetaines($-N^+(CH_3)_2CH_2SO_3^-$)) สารประกอบกลุ่มนี้ให้ความละมุนต่อผิวหนังมากกว่า สารลดแรงตึงผิวประจุลบ และระคายเคืองตาน้อยกว่าจึงนิยมใช้กับแชมพูเด็ก

3.1.4 สารลดแรงตึงผิวที่ไร้ประจุ(non-ionic surfactant) ตัวอย่างที่สำคัญ ได้แก่ เอทอกซีเลต (ethoxylate($-(OCH_2CH_2)_nOH$)) ที่ใช้งานอย่างกว้างขวางสำหรับการชะล้าง โดยทำให้เกิดอิมัลชันที่อุณหภูมิต่ำ โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวในกลุ่มนี้อาจมีสารประกอบชนิดเซมิโพลาร์ (semi-polar) ร่วมอยู่ด้วย เช่น amine oxides, sulphoxide และ phosphine oxides โครงสร้างของโมเลกุลส่วนใหญ่มักจะประกอบด้วยเอทิลีนออกไซด์ (ethylene oxide chain) ซึ่งเป็นส่วนที่ชอบน้ำ ข้อดีของสารกลุ่มนี้คือไม่เป็นพิษ สามารถใช้ได้กับค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วงกว้าง

3.1.5 สารลดแรงตึงผิวแบบผสม(combination surfactant) ที่รวมเอากลุ่มหัวที่กล่าวมาแล้วข้างต้นในข้อ 3.1.1, 3.1.2, 3.1.3 และ 3.1.4 ไว้ในสารลดแรงตึงผิวชนิดเดียว โดยทั่วไปในโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชนิดนี้มักพบกลุ่มของสารลดแรงตึงผิวที่ไร้ประจุ และสารลดแรงตึงผิวประจุลบ เช่น alkyl ethoxy sulphates($-(OCH_2CH_2)_nOSO_3^-$) สารลดแรงตึงผิวในกลุ่มนี้มีความละมุนต่อผิวหนัง จึงมักใช้กับผลิตภัณฑ์ที่ผิวหนังมักสัมผัสด้วย เช่น น้ำยาล้างจาน และแชมพู

3.2 กลุ่มไม่ชอบน้ำ(hydrophobic group) ส่วนนี้ของสารลดแรงตึงผิวจะเป็นส่วนหาง (tail group) และโดยทั่วไปจะเป็นกลุ่มไฮโดรคาร์บอน ส่วนหางของสารลดแรงตึงผิวประเภทสบู่ มักจะเป็นกลุ่มอัลคิล(alkyl group) ที่อยู่ในรูปกรดไขมันที่ได้จากการย่อยไขมันและน้ำมัน ในยุคต้น ๆ สบู่ประกอบด้วยอัลคิลเบนซีนซัลโฟเนต(alkyl benzene sulphonates) ซึ่ง

เป็นกลุ่มอัลคิลที่มักจะมีกิ่งบนสายโซ่ สายอัลคิลที่มีกิ่งนี้จะย่อยสลายทางชีวภาพได้ยาก จึงยังคงตกค้างอยู่ในน้ำทิ้งที่บำบัดแล้ว เป็นเหตุให้เกิดฟองในแม่น้ำลำธาร อย่างไรก็ตามก็ได้มีการใช้อัลคิลเบนซีนซัลโฟเนต ที่มีโครงสร้างเป็นสายตรงแทนซึ่งสามารถย่อยสลายได้ง่าย และมีการทำให้กลุ่มหางของสบู่ปราศจากสารอะโรมาติก(aromatic) เพื่อให้เกิดความปลอดภัยต่อสภาวะแวดล้อมยิ่งขึ้น

4. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactants) จากจุลินทรีย์

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพส่วนใหญ่เป็นสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ ซึ่งคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวเหล่านี้ เป็นผลมาจากการรวมตัวกันของความมีขั้วและไม่มีขั้วไว้ในโมเลกุลเดียว ความไม่มีขั้วหรือส่วนที่ไม่ชอบน้ำจะเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนทั่วไป ตัวอย่างเช่น สายโซ่ไฮโดรคาร์บอนของกรดไขมัน ความมีขั้วหรือกลุ่มที่ชอบน้ำเช่น กลุ่มที่ทำหน้าที่เอสเทอร์และแอลกอฮอล์ของไขมัน ฟอสเฟตที่เป็นส่วนประกอบของฟอสโฟลิปิด และน้ำตาลของไกลโคลิปิด (Cooper *et al.*, 1980; Desai and Banat, 1997)

ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวจากจุลินทรีย์ วิธีการวัด surface activity ที่ใช้บอกคุณภาพของสารลดแรงตึงผิวเป็นสิ่งสำคัญ ส่วนใหญ่ใช้วิธีการวัดจากส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้หลังจากผ่านการเลี้ยงเชื้อ โดยค่าแรงตึงผิวของน้ำกลั่นเท่ากับ 72 mN/m พบว่าในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ *Corynebacterium lepus* สามารถลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 72 mN/m ลงมาต่ำกว่า 30 mN/m อย่างไรก็ตามก็ดีเมื่อมีการผลิตสารลดแรงตึงผิวมากเกินไป การเจือจางส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อเพื่อเพิ่มค่าแรงตึงผิวให้ถึงจุด CMC นั้นเป็นสิ่งจำเป็นในการหาปริมาณของสารลดแรงตึงผิวโดยคร่าว ๆ (Cooper *et al.*, 1979)

วิธีอื่นที่ใช้ในการวัดหาค่า surface activity มีหลายวิธีเช่น การวัดค่า interfacial tension ความเสถียรของอิมัลชันระหว่างน้ำและน้ำมันก็เป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย การเกิดฟอง การวัดความสามารถในการกระจายน้ำมัน (oil displacement) นอกจากนี้พบว่าการแตกของโปรโตพลาสต์ และการยับยั้งการแข็งตัวของหลอดเลือด ก็เป็นคุณสมบัติหนึ่งของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Arima *et al.*, 1968; Cooper *et al.*, 1987; Morikawa *et al.*, 1993)

จุลินทรีย์หลายชนิดที่มีคุณสมบัติในการทำให้น้ำและน้ำมันรวมตัวกันเป็นอิมัลชันได้
 *จุลินทรีย์เหล่านี้ส่วนใหญ่สามารถใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอนได้ซึ่งรวม
 ทั้งที่มีโครงสร้างเป็นสายตรง มีกิ่งบนโครงสร้าง เป็นไซคลิกอัลเคน(cyclic alkanes) อัลคีน
 (alkenes) และเป็นอะโรมาติก(aromatics) จุลินทรีย์ที่สามารถใช้สารประกอบไฮโดรคาร์
 บอนในน้ำเป็นแหล่งอาหารได้ จะต้องมีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิว สารลด
 แรงตึงผิวที่จุลินทรีย์ผลิตจะทำให้เกิดอิมัลชันระหว่างน้ำกับน้ำมันเป็นผลให้น้ำมันมีสภาพ
 เป็นหยดน้ำมันเล็ก ๆ อยู่ในน้ำ เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวระหว่างน้ำกับน้ำมัน พื้นที่ผิวเหล่านี้ช่วย
 ส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์โดยทำให้จุลินทรีย์สัมผัสกับน้ำมันได้มากขึ้น ดังนั้นการเพิ่มขึ้น
 ของสารลดแรงตึงผิวในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีทั้งน้ำและน้ำมันจะช่วยกระตุ้นการเจริญของจุลิน
 ทรีย์ได้ (Cooper and Zajic, 1980)

ประเภทของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

แบ่งเป็นกลุ่มหลัก ๆ 4 กลุ่ม คือ

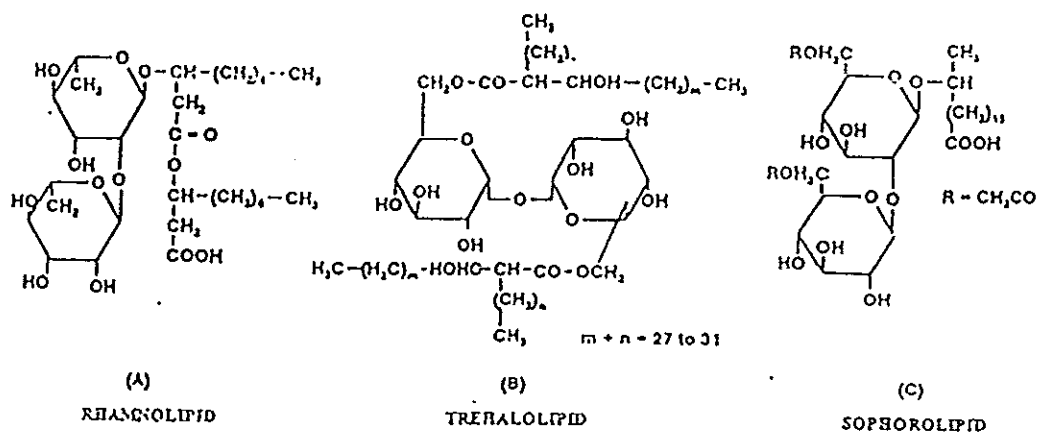
4.1 ไกลโคลิพิด (glycolipid) เป็นสารลดแรงตึงผิวที่พบส่วนใหญ่ โครงสร้างเป็นคาร์โบ
 ไฮเดรตที่เชื่อมต่อกับ long chain aliphatic acids หรือ hydroxyaliphatic acids ในกลุ่ม
 ของไกลโคลิพิด แบ่งเป็นกลุ่มย่อยที่รู้จักกันดี (ภาพที่ 2) ได้แก่ rhamnolipids, trehalo-
 lipids และ sophorolipids

4.2 ลิโปเปปไทด์ (lipopeptide) และ ลิโปโปรตีน (lipoprotein) ส่วนใหญ่ที่พบในกลุ่ม
 ของ cyclic lipopeptides ประกอบด้วย decapeptide antibiotics (gramicidins) และ
 lipopeptides antibiotics (polymyxins) ผลิตได้จาก *Bacillus brevis* และ *B. polymyxa*
 ตามลำดับ

ส่วนกลุ่มที่มีคุณสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีประสิทธิภาพสูง ได้แก่ cyclic lipo
 peptides surfactin จาก *B. subtilis* ATCC 21332 เมื่อใช้ปริมาณความเข้มข้นต่ำมากคือ
 0.005 % ก็สามารถลดแรงตึงผิวจาก 72 mN/m เป็น 27.9 mN/m (Arima et al., 1968)

Morikawa และคณะ (1993) นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด arthofactin ที่ผลิต
 จาก *Arthrobacter* สายพันธุ์ MIS38 มาศึกษาโครงสร้างทางเคมี พบว่า arthofactin เป็น

สารลดแรงตึงผิวในกลุ่มลิโปเปปไทด์ เมื่อศึกษาค่า surface activity ของ arthofactin โดยใช้ surfactin เป็นตัวเปรียบเทียบค่า CMC ของ arthofactin และ surfactin เท่ากับ 1.0×10^{-5} M และ 7.0×10^{-5} M ที่ 25 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ arthofactin กับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ (Triton X-100 และ Sodium dodecyl sulfate) ในการแทนที่ในน้ำมันพบว่า arthofactin มีประสิทธิภาพดีกว่า ดังนั้น arthofactin จึงเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดหนึ่งที่น่าสนใจ



ภาพที่ 2 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มไกลโคลิปิด

(A) rhamnolipids จาก *Pseudomonas aeruginosa*

(B) trehalolipids จาก *Rhodococcus erythropolis*

(C) sophorolipids จาก *Torulopsis bombicola*

ที่มา : Desai และ Banat (1997)

Yakimov และคณะ (1995) ศึกษาสารลดแรงตึงผิวชนิดลิโปเปปไทด์ (lichenysin A) จาก *B. licheniformis* BAS50 เมื่อนำมาศึกษาโครงสร้างทางเคมี พบว่า lichenysin A มีองค์ประกอบหลักคือลิโปเปปไทด์ ซึ่งมีขนาด 1,006-1,034 Da ส่วนหัวที่เป็นลิปิด ประกอบด้วยโครงสร้างที่เป็นเส้นตรงและมีสาขาของ β -hydroxy fatty acids (C_{12} - C_{17}) และมีกรดอะมิโน 7 ชนิด ใน 1 โมเลกุล ในส่วนหัวที่เป็นเปปไทด์ ประกอบด้วยกรดอะมิโนดังนี้ คือ glutamic acid เป็นส่วน N-terminal , asparagine, valine, leucine และ isoleucine เป็น C-terminal ในอัตราส่วนเท่ากับ 1.1 : 1.1 : 1.0 : 2.8 : 1.0 ตามลำดับ

4.3 กรดไขมัน (fatty acid), นิวทรัลลิปิด (neutral lipid) และ ฟอสโฟลิปิด (phospholipid) แบคทีเรียและยีสต์บางชนิดสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชนิดกรดไขมันและ ฟอสโฟลิปิด ในขณะที่เจริญบนอาหารที่ใช้ n-alkanes เป็นแหล่งคาร์บอน (Asselineau and Asselineau, 1978) ตัวอย่างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มนี้ คือ phosphatidylethanolamine จาก *Acinetobacter* sp. สายพันธุ์ HO1-N

4.4 สารลดแรงตึงผิวชนิดโพลีเมอร์ (polymeric surfactant) เป็นกลุ่มของ emulsan liposan mannoprotein และ polysaccharide-protein complex ชนิดอื่น ๆ ตัวอย่างโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มนี้ คือ emulsan จาก *Acinetobacter calcoaceticus*

โดยทั่วไปที่มีการศึกษาพบกลุ่มจุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวได้หลายกลุ่ม (ตารางที่ 1)

5. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวของจุลินทรีย์

จากรายงานที่มีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพพบว่า จุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องการสารอาหารที่เหมาะสมแตกต่างกัน เพื่อใช้เป็นพลังงานในกิจกรรมต่างๆ และใช้ผลิตสารตั้งต้นโดยกระบวนการสลายพลังงาน เพื่อนำไปผลิตสารประกอบที่เซลล์ต้องการในการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพซึ่งได้รวบรวมไว้ในตารางที่ 2 สูตรอาหารส่วนใหญ่ประกอบด้วย แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุ นอกจากสูตรอาหารที่เหมาะสมแล้ว ยังมีสภาวะอื่น ๆ อีกที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เช่น พีเอช อุณหภูมิ การกวนและการให้อากาศ เป็นต้น

ตารางที่ 1 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวในกลุ่มต่าง ๆ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	จุลินทรีย์
Glycolipids	
Rhamnolipids	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>P. aeruginosa</i> <i>Candida</i> sp.
Trehalolipids	<i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Nocardia erythropolis</i> <i>Mycobacterium</i> sp.
Sophorolipids	<i>Torulopsis bombicola</i> <i>T. apicola</i> <i>T. petrophilium</i>
Lipopeptides and lipoproteins	
peptide-lipid	<i>Bacillus licheniformis</i>
Serrawettin	<i>Serratia marcescens</i>
Viscosin	<i>P. fluorescens</i>
Surfactin	<i>B. subtilis</i>
Subtilisin	<i>B. subtilis</i>
Gramicidins	<i>B. brevis</i>
Polymyxins	<i>B. polymyxa</i>
Cerilipin	<i>Gluconobacter cerinus</i>
Lysin-lipid	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> <i>Streptomyces sioyaensis</i>

ตารางที่ 1 (ต่อ)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	จุลินทรีย์
Fatty acids, neutral lipids and phospholipids	
Fatty acids	<i>Candida lepus</i>
Neutral lipids	<i>N. erythropolis</i>
Phospholipids	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Polymeric surfactants	
Alasan	<i>Acinetobacter radioresistens</i>
Emulsan	<i>A. calcoaceticus</i>
	<i>P. fluorescens</i>
Biodispersan	<i>A. calcoaceticus</i>
Mannan-lipid-protein	<i>C. tropicalis</i>
Liposan	<i>C. lipolytica</i>
Carbohydrate-protein-lipid	<i>P. fluorescens</i>
Insecticide emulsifier	<i>P. tralucida</i>

ที่มา : ดัดแปลงจาก Desai และ Banat (1997)

ตารางที่ 2 สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวจากจุลินทรีย์

จุลินทรีย์	สูตรอาหาร (กรัมต่อลิตร)	ที่มา
<i>Escherichia coli</i> JM 101	K ₂ HPO ₄ , 5.0; KH ₂ PO ₄ , 5.0; MgSO ₄ , 2.0; NaCl, 0.1; NaNO ₃ , 5.0 ; yeast extract (sigma), 3.0 and molasses 20.0	Ghurye and Vipulanandan(1994)
<i>Bacillus subtilis</i> C9	NH ₄ HCO ₃ , 13.5; K ₂ HPO ₄ , 10.5; NaH ₂ PO ₄ , 1.5; MgSO ₄ .7H ₂ O, 0.5; MnSO ₄ .4H ₂ O, 0.05; yeast extract, 0.5 and glucose 40.0	Kim <i>et al.</i> (1997)
<i>Serratia marcescens</i>	K ₂ HPO ₄ , 5.0; KH ₂ PO ₄ , 2.0; (NH ₄) ₂ SO ₄ , 3.0; NaNO ₃ , 2.0 ; NaCl, 0.1 and sucrose 20.0	Pruthi and Cameotra (1997a)
<i>Arrthrobacter protophormiae</i>	K ₂ HPO ₄ , 5.0; KH ₂ PO ₄ , 2.0; (NH ₄) ₂ SO ₄ , 3.0; NaNO ₃ , 2.0 ; NaCl, 0.1; MgSO ₄ .7H ₂ O, 0.2 FeSO ₄ .7H ₂ O, 0.01; CaCl ₂ , 0.01; n-Hexadecane, 20.0 and trace element solution, 1.0 (mg/l) : ZnSO ₄ .7H ₂ O, 525; MnSO ₄ .4H ₂ O, 200; CuSO ₄ .5H ₂ O, 70.5; Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O, 15; CoCl ₂ .6H ₂ O, 20 and H ₃ BO ₃ , 15	Pruthi and Cameotra (1997b)
<i>Bacillus subtilis</i> MTCC 2423 and MTCC1427	KNO ₃ , 3.0; Na ₂ HPO ₄ , 2.2; KH ₂ PO ₄ , 1.4; NaCl, 0.1; MgSO ₄ , 0.60; CaCl ₂ , 0.04; FeSO ₄ , 0.02 and molasses 20.0	Makkar and Cameotra (1997)
<i>Acinetobacter</i> sp. and <i>Pseudomonas</i> sp.	K ₂ HPO ₄ , 0.003; Na ₂ HPO ₄ , 0.007; K ₂ HPO ₄ , 3.5; MgSO ₄ , 0.004; K NO ₃ , 0.03; NaCl, 0.5 and crude oil, 5.0	Huy <i>et al.</i> (1999)

5.1 แหล่งคาร์บอน แหล่งคาร์บอนสำคัญมากในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ แหล่งคาร์บอนที่ใช้มีทั้งชนิดที่มีคุณสมบัติละลายน้ำและไม่ละลายน้ำ ชนิดที่ละลายน้ำ เช่น กลีเซอรอล กลูโคส แมนนิทอล และ เอทานอล มีการนำมาใช้สำหรับการผลิต rhamnolipid โดย *Pseudomonas* spp. แต่พบว่าสารลดแรงตึงผิวที่ได้มีคุณสมบัติด้อยกว่าเมื่อใช้สารตั้งต้นที่มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ เช่น *n*-alkanes และน้ำมันมะกอก (Desai and Banat, 1997). แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและชนิดของจุลินทรีย์, อย่างเช่นการทดลองของ Hommel และ Huse (1993) พบว่า ในการควบคุมการผลิต sophorose lipid จาก *Candida apicola* เมื่อใช้กลูโคส ฟรุคโตส หรือ ซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอน ทำให้ได้ผลผลิตของ sophorose lipid ปริมาณมากในระยะการเจริญขั้นคงที่ (stationary growth phase) แต่ไม่มีการผลิต sophorose lipid เมื่อใช้ กาแลคโตส หรือ มอลโตส เป็นแหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนสามารถชักนำให้จุลินทรีย์บางชนิดผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ เช่น *P. aeruginosa* และ *Candida* sp. เมื่อเจริญบน *n*-alkanes จะผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่หากเปลี่ยนคาร์บอนเป็นคาร์โบไฮเดรต จะไม่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้ การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพอาจถูกยับยั้ง (repression) ได้โดย กลูโคสหรือเมตาบอไลต์ปฐมภูมิ (primary metabolites) เช่น *Acinetobacter calcoaceticus* และ *A. paraffineus* ไม่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้เมื่อมีการเจริญบนกรดอินทรีย์และกลูโคส ในทางตรงกันข้าม surfactin ซึ่งผลิตโดย *B. subtilis* ตรวจพบเมื่อเซลล์ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และจะถูกยับยั้งเมื่อเติมสารไฮโดรคาร์บอนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Kosaric, 1993)

Deziel และคณะ (1996) ทดสอบความสามารถของแบคทีเรียที่แยกได้จากธรรมชาติในการใช้ polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยแบคทีเรีย 23 ชนิดที่แยกได้จากดินที่มีการปนเปื้อนด้วยของเสียจากกระบวนการปิโตรเคมีที่สามารถเกิดวงไฮดรอกซิลบนอาหารแข็ง (mineral salt agar plates) ซึ่งมีการฟอสฟอรัสละลาย PAH บนผิวหน้าอาหาร ซึ่งใช้ naphthalene หรือ phenanthrene เป็นสารตั้งต้นเพื่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ นอกจากนี้เมื่อนำแบคทีเรีย 10 สายพันธุ์จากแบคทีเรียทั้งหมดที่แยกได้มาเลี้ยงในอาหารที่ให้อาหารเสริมที่จำกัดปริมาณของเกลือของเหล็กและมีปริมาณของน้ำตาลเดกโตรสหรือแมนนิทอลที่ความเข้มข้นสูง ทำการวัดค่าแรงตึงผิวที่ลดลงและ

ค่า emulsifying activitie ผลที่ได้ดีเท่ากับการใช้ naphthalene หรือ phenanthrene เป็นสารตั้งต้นในอาหาร และยังมีการทดลองหาปริมาณไกลโคลิปิดเมื่อมีการเลี้ยง *P. aeruginosa* 195J บนอาหารแข็งที่มี naphthalene พบว่ามีอัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงสุดไม่ดีกว่าการเลี้ยงบนอาหารแข็งที่มีแมนนิทอล

Pruthi และ Cameotra (1997b) ได้ทำการคัดเลือก *Arthrobacter protophormiae* ซึ่งเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ที่อยู่ทางขั้วโลกใต้ พบว่ามีคุณสมบัติในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยใช้ *n*-hexadecane 2% เป็นแหล่งคาร์บอน ผลของค่าแรงตึงผิวที่วัดได้จากน้ำหมักที่ปราศจากเซลล์มีค่าลดลง จาก 68 mN/m จนถึง 30.6 mN/m และผลผลิตของสารลดแรงตึงผิวเท่ากับ 5.0 กรัมต่อลิตร และจากการหา critical micelle dilution (CMD) โดยใช้วิธีการทดลองเหมือนกับ Prutri และ Cameotra (1997a) พบว่าผลที่ได้มีลักษณะเดียวกัน คือ สารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้สามารถแสดงคุณสมบัติการเป็นสารลดแรงตึงผิวที่ดี แม้ที่มีการเจือจางเป็น 100 เท่า

Kim และคณะ (1997) ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Bacillus subtilis* C9 พบว่า แหล่งคาร์บอนมีความสำคัญมากในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย โดยการทดลองมีการใช้ คาร์โบไฮเดรต ไฮโดรคาร์บอน และน้ำมันพืชเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว จะลดแรงตึงผิวของน้ำหมักได้สูงสุด คือ จาก 72.8 เป็น 28.2 dyne/cm และมีค่า emulsification activity สูงสุดด้วยเมื่อทดสอบกับไฮโดรคาร์บอนและน้ำมันถั่วเหลือง แต่พบว่า เมื่อใช้ *n*-hexadecane มีผลยับยั้งในการผลิตสารลดแรงตึงผิว ทั้งที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนชนิดเดียว หรือใช้ร่วมกับกลูโคส

Makkar และ Cameotra (1997) ศึกษาการใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *B. subtilis* MTCC 2423 และ MTCC1427 พบว่า แบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์เริ่มมีการผลิตสารลดแรงตึงผิว เมื่อเวลาในการหมักผ่านไป 24 ชั่วโมง สังเกตได้จากค่าแรงตึงผิวในน้ำหมักมีค่าเริ่มลดลง และยังมีการผลิตอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก ส่วนค่า CMD ของน้ำหมักที่ปราศจากเซลล์ที่มีการเจือจางน้ำหมัก 10 เท่า และ 100 เท่า คือ CMD^{-1} และ CMD^{-2} ผลที่ได้เป็นไปในทิศทางเดียวกัน น้ำหมักจาก *B. subtilis* MTCC 2423 ที่ไม่มีการเจือจาง, CMD^{-1} และ CMD^{-2} มีค่าแรงตึงผิวประมาณ 29,

37 และ 55 dyne/cm ตามลำดับ ส่วนในกรณี *B. subtilis* MTCC 1427 มีค่าแรงตึงผิวประมาณ 31, 38 และ 65 dynes/cm ตามลำดับ

Ghurye และ Vipulanandan (1994) ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวจากการเลี้ยง *E. coli* และยีสต์ร่วมกัน ซึ่งใช้ molasses เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ในส่วนของ *E. coli* เมื่อมีการทดสอบคุณสมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของสารลดแรงตึงผิว โดยวัดจากค่า emulsification capacity (EC) เมื่อเติม *n*-hexadecane ลงในน้ำหมักที่ไม่มีการแยกเซลล์ออกเท่ากับ 0.3 ± 0.1 และเมื่อมีการแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักค่า EC เพิ่มขึ้นเป็น 0.6 ± 0.1 แต่ในส่วนของยีสต์ มีค่า EC ต่ำกว่าของ *E. coli* ทั้ง จากน้ำหมักที่แยกและไม่แยกเซลล์ออกคือมีค่าเท่ากับ 0.2 ± 0.1 นอกจากนี้ยังมีการทดสอบผลการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของน้ำหมักที่มีการแยกเซลล์ออก โดยใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่แตกต่างกัน คือการใช้ *n*-hexadecane เปรียบเทียบกับ hexane และ dodecane พบว่า ค่า EC ที่ได้ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

Pruthi และ Cameotra (1997a) ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จาก *S. marcescens* โดยใช้น้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเมื่อมีการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิว ค่าแรงตึงผิวที่วัดได้จากน้ำหมักที่ปราศจากเซลล์มีค่าค่อย ๆ ลดลงจาก 68 mN/m จนถึง 27 mN/m เมื่อสกัดแยกสารลดแรงตึงผิวด้วยการตกตะกอนน้ำหมักที่ปราศจากเซลล์กับอะซิโตนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้ผลผลิตเท่ากับ 5.68 กรัมต่อลิตร จากการทดลองสามารถสรุปได้ว่า การผลิตสารลดแรงตึงผิวเริ่มในช่วงปลายของการเจริญและจากการหาค่า CMD ของน้ำหมักที่ปราศจากเซลล์ที่มีการเจือจาง 10 เท่า และ 100 เท่า มีค่าไม่แตกต่างกัน นั่นคือ สารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้สามารถแสดงคุณสมบัติการเป็นสารลดแรงตึงผิวที่ดี ถึงแม้จะมีการใช้ในระดัปดาห์ ๆ

5.2 แหล่งไนโตรเจน แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสำคัญมากต่อเมตาบอลิซึมของเซลล์ รวมทั้งการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเช่นเดียวกับแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและชนิดของจุลินทรีย์

Abu-Ruwaida และคณะ (1991a) พบว่าการใช้ไนโตรเจนเป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Rhodococcus* strain ST-5 ที่เจริญใน paraffin เชื้อเริ่มมี

การผลิตสารลดแรงตึงผิวหลังจากเจริญได้ 30 ชั่วโมง ซึ่งเป็นสภาวะที่มีไนโตรเจนอย่างจำกัด (N-limitation)

Guerra-Santos และคณะ (1986) พบว่า การผลิต rhamnolipid โดย *Pseudomonas* spp. มีปริมาณสูงสุดหลังจากเกิดภาวะที่มีไนโตรเจนอย่างจำกัดซึ่งมีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N) เท่ากับ 16:1 ถึง 18:1 และไม่มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวเมื่อมีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ต่ำกว่า 11:1 เนื่องจากไม่เกิดสภาวะของการขาดแคลนไนโตรเจน

Guerra-Santos และคณะ (1984) ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวจาก *P. aeruginosa* โดยกระบวนการเลี้ยงแบบต่อเนื่อง ซึ่งใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและมีการศึกษาเปรียบเทียบผลของแหล่งไนโตรเจน 2 ชนิดคือ NaNO_3 และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ กับการมีและไม่มี ยีสต์สกัดในอาหาร (ตารางที่ 3) ผลที่ได้คือ ในสภาวะที่ไม่มียีสต์สกัดและการใช้ NaNO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจน ให้ผลที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

จากการทดลองใช้ กลีโอนินทรีย์ได้แก่ กลีโอะแอมโมเนียม และ ยูเรีย เป็นแหล่งไนโตรเจน สำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Arthrobacter paraffineus* จะให้ผลผลิตสูง นอกจากนี้พบว่า การเพิ่มปริมาณสารลดแรงตึงผิวจาก *A. paraffineus* ทำได้โดยเติม L- amino acid เช่น aspartic acid, glutamic acid, asparagine และ glycine ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Duvnjak *et al.*, 1983)

Johnson และคณะ (1992) ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวจาก *Rhodotorula glutinis* IIP-30 โดยกระบวนการเลี้ยงแบบกึ่งกะ (fed batch fermentation) พบว่า สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตคือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 4.0 และ ในการทดลองได้ใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KNO_3 และ ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน ผลที่ได้คือ KNO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด แสดงได้จากการมีค่า emulsification activity สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และ ยูเรีย ซึ่งจากการทดลองยังพบว่า แหล่งไนโตรเจนมีผลโดยตรงต่อค่า emulsification activity แต่มีผลน้อยมากต่อค่าการเจริญ

ตารางที่ 3 ผลของแหล่งไนโตรเจนและยีสต์สกัดต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวของ *Pseudomonas aeruginosa*^a

แหล่งไนโตรเจน (g/l)	ยีสต์สกัด (g/l)	มวลเซลล์ (g/l)	สารตั้งต้นที่เหลือ (g/l)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.5	4.77	0.10	32
	0	3.11	1.48	30
NaNO ₃	1.5	5.1	0.10	30
	0	3.35	0.48	29

^a เลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องเมื่อใช้ dilution rate เท่ากับ 0.10 ต่อชั่วโมง ใช้กลูโคส 18.20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน

ที่มา : Guerra-Santos และคณะ (1984)

5.3 แหล่งของแร่ธาตุ แหล่งของแร่ธาตุนอกจากจะเป็นปัจจัยที่จุลินทรีย์ต้องการใช้เพื่อเจริญเติบโตแล้ว ยังมีผลในการยับยั้งหรือกระตุ้นการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยจุลินทรีย์ได้ เช่น ในการทดลองของ Guerra-Santos และคณะ(1984) ศึกษาการผลิต rhamnolipid โดย *Pseudomonas* spp. พบว่า ความเข้มข้นของธาตุเหล็กในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลสำคัญในการผลิต rhamnolipid โดยเมื่อย้ายเชื้อจากอาหารที่มีธาตุเหล็ก 36 μm ลงในอาหารที่มีธาตุเหล็ก 18 μm จะทำให้การผลิต rhamnolipid เพิ่มขึ้นเป็น 3 เท่า โดยไม่มีผลต่อการเจริญเติบโต

Abu-Ruwaida และคณะ(1991a) ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Rhodococcus* strain ST-5 ที่เจริญใน paraffin พบว่า การใช้อาหารที่มีองค์ประกอบของธาตุอาหารที่สำคัญ ได้แก่ ฟอสเฟต เหล็ก แมงกานีส และโซเดียม จะเป็นส่วนส่งเสริมให้มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากกว่าการใช้ โปแทสเซียมหรือแคลเซียม

Abu-Ruwaida และคณะ (1991b) รายงานว่าผลของความเข้มข้นของเกลือมีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพขึ้นอยู่กับกิจกรรมของเซลล์ของจุลินทรีย์แต่ละชนิด

Yakimov และคณะ (1995) ทำการแยก *B. licheniformis* BAS50 จากดินที่มีการปนเปื้อนของน้ำมันที่ระดับความลึก 1,500 เมตร พบว่าเชื้อสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิว

ชนิดลิโปเปปไทด์ พบว่าเชื้อสามารถเจริญและผลิตลิโปเปปไทด์ได้ในอาหารหลากหลายชนิด ที่ความเค็มมากกว่า 13% NaCl ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน แต่ระดับความเค็มที่เหมาะสมมากที่สุดต่อการผลิตคือ 5% NaCl และอุณหภูมิในช่วง 35-45 องศาเซลเซียส

Kim และคณะ (1997) ศึกษาผลของความเข้มข้นของเกลือต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *B. subtilis* C9 โดยการทดลองใช้ NaCl และ CaCl_2 ซึ่ง NaCl เป็นองค์ประกอบหลักของน้ำทะเล ส่วน CaCl_2 พบได้จากน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรม พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีกิจกรรมดีเมื่อมีความเข้มข้นของ NaCl และ CaCl_2 เท่ากับ 1,000 mM และ 10 mM ตามลำดับ เมื่อศึกษา emulsification activity เปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ คือ sodium dodecyl sulfate (SDS) และ linear alkyl sulfonate (LAS) พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *B. subtilis* C9 มี emulsification activity เท่ากับ 70% และ 80% ของกิจกรรมเริ่มต้น ที่ความเข้มข้นของเกลือเท่ากับ 1,000 mM NaCl และ 10 mM CaCl_2 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงกว่าการใช้สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทั้งสองชนิด โดยเมื่อใช้ LAS ที่ความเข้มข้นของเกลือเดียวกัน ผลปรากฏว่ามี emulsification activity เท่ากับ 15 % และ 19 % ของกิจกรรมเริ่มต้น

5.4 ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมและสภาวะของการเจริญ เช่น พีเอช อุณหภูมิ การกวนและการให้อากาศ ที่เหมาะสมมีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิว

5.4.1 พีเอช ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ มีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์มาก เนื่องจากการเจริญของจุลินทรีย์หรือสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ถูกควบคุมโดยกระบวนการเมตาบอลิซึมและการทำงานของเอนไซม์มีผลกระทบจากค่าพีเอช โดยทั่วไปค่าพีเอชที่เหมาะสมในการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิดแตกต่างกันไป ราวและยีสต์จะเจริญได้ดีในช่วงค่าพีเอชค่อนข้างต่ำ แต่แบคทีเรียจะเจริญได้ดีในช่วงค่าพีเอชที่เป็นกลาง องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยสำคัญอันหนึ่งที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากจุลินทรีย์จะมีการย่อยสลายสารอาหารที่เป็นแหล่งพลังงาน ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีองค์ประกอบที่เป็นโปรตีนและไนโตรเจนเมื่อถูกย่อยสลายจะปลดปล่อยสารที่เป็นแอมโมเนียหรืออัลคาไลน์อื่น ๆ ออกมา แต่ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีองค์ประกอบที่เป็นคาร์โบไฮเดรต เมื่อถูกย่อยสลายจะขับสารที่เป็นกรดอินทรีย์ออกมา ซึ่งสิ่งที่ขับออกมานี้ทำให้พีเอชของอาหาร

เปลี่ยนแปลงไปจนอาจจะส่งผลกระทบต่อการเจริญของจุลินทรีย์ นอกจากนี้ ค่าพีเอชยังมีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของจุลินทรีย์ ได้พบว่าค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยที่สำคัญมากในการผลิต rhamnolipid โดย *Pseudomonas* sp. และการผลิต sophorolipid โดย *T. bombicola* อย่างไรก็ดี ไม่พบผลกระทบของค่าพีเอชต่อปริมาณการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดย *P. fluorescens* ที่ค่าพีเอชในช่วง 6.5 ถึง 8.0 (Kosaric, 1993)

Guerra-Santos และคณะ (1984) ศึกษาการผลิต rhamnolipid โดย *Pseudomonas* spp. มีการผลิตสูงสุดที่พีเอชในช่วง 6.0-6.5 และมีค่าการผลิตลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อพีเอชมากกว่า 7 ในทางกลับกัน Powalla และคณะ (1989) พบว่าการผลิต penta- และ disaccharide lipid โดย *N. corynebacteroides* ไม่มีผลกระทบจากพีเอชในช่วง 6.5-8.0 นอกจากนี้ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ มีค่าแรงตึงผิวและค่า CMC ที่มีความคงตัวได้ดีในช่วงพีเอชที่กว้าง แต่การเกิดเป็นอิมัลชันไฟเออร์มีความคงตัวในช่วงพีเอชที่แคบกว่า (Abu-Ruwald et al., 1991b)

Kim และคณะ (1997) ศึกษาผลของพีเอชต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Bacillus subtilis* C9 เมื่อเปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ คือ SDS และ LAS พีเอชในช่วงทดสอบคือ 4.0-10.3 พบว่า พีเอชดังกล่าวไม่มีผลต่อค่าแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ในขณะที่การเกิดเป็นอิมัลชันกับไฮโดรคาร์บอนของ SDS และ LAS ลดลงที่พีเอช 10.3 และ 4.0 ตามลำดับ

Pruthi และ Cameotra (1997a) ได้ศึกษาคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จาก *S. marcescens* ในด้านความคงตัวต่อพีเอชที่มีการผันแปรในช่วง 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 และ 12.0 พบว่า ค่าแรงตึงผิวที่วัดได้มีค่าอยู่ในช่วง 27.65-32.00 mN/m (ตารางที่ 4) ค่าแรงตึงผิวที่วัดได้ มีความแตกต่างกันไม่มากนัก นั่นคือ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *S. marcescens* มีคุณสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิวได้แม้จะมีการเปลี่ยนแปลงพีเอชในช่วงกว้าง

ตารางที่ 4 ผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อการทำงานของสารลดแรงตึงผิวจาก *Serratia marcescens* ที่เจริญบนอาหารที่มี ซูโครส ร้อยละ 2

อุณหภูมิ (°C)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	พีเอช	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)
10	28.65	2.0	32.00
30	27.20	4.0	31.80
60	30.65	6.0	27.65
90	30.80	8.0	28.65
120	30.70	10.0	30.86
		12.0	30.95

ที่มา : Pruthi และ Cameotra (1997a)

5.4.2 อุณหภูมิ อุณหภูมิสามารถเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตขึ้นได้คล้ายกับแหล่งคาร์บอน อุณหภูมิมีความสำคัญต่อกระบวนการสร้างและการกระจายตัวของไขมันและกรดไขมัน ตัวอย่างเช่น มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงความยาวของสายกรดไขมัน มีผลต่อระดับ (levels) ของกรดไขมัน (fatty acid branching) และมีผลต่อการกระจายตัวและความแตกต่างของสัดส่วนระหว่างไกลโคลิปิดและฟอสโฟลิปิดที่เกิดเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (Kosaric, 1993)

Drouin และ Cooper (1992) รายงานว่า อุณหภูมิมีผลต่อสารลดแรงตึงผิวจาก *A. paraffineus* คือ การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ Abu-Ruwalda และคณะ (1991b) มีการใช้ความร้อนที่สูงโดยการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไปนึ่งเพื่อฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพบางชนิดมีความคงตัวได้ดีและไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติเฉพาะ เช่น ประสิทธิภาพของแรงตึงผิวและ emulsification activity

Pruthi และ Cameotra (1997b) ศึกษาคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จาก *A. protophormiae* ซึ่งเป็นสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่อยู่ทางขั้วโลกใต้ นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดแยกได้ด้วยการตกตะกอนกับอะซิโตนมาทดสอบความคงตัว เมื่อมีการผันแปรอุณหภูมิ (10-100 องศาเซลเซียส) พบว่า ยังสามารถลดค่าแรงตึงผิวได้ โดยไม่มีความแตก

ต่างกันคือ มีค่าแรงดึงผิวประมาณ 30.60 mN/m จากค่าแรงดึงผิวเริ่มต้นเท่ากับ 68.0 mN/m เช่นเดียวกันกับการทดลองของ Pruthi และ Cameotra (1997a) ซึ่งศึกษาความคงตัวของ อุณหภูมิของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่ได้จาก *S. marcescens* โดยใช้อุณหภูมิในช่วง 10-120 องศาเซลเซียส พบว่า ค่าแรงดึงผิวลดลงจาก 68.0 mN/m เป็นอยู่ในช่วง 27.20-30.80 mN/m (ตารางที่ 4) ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก นั่นคือ สารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่ได้จากเชื้อทั้ง 2 ชนิดมีความคงตัวในช่วงอุณหภูมิกว้าง

Kim และคณะ (1997) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพของ *B. subtilis* C9 เมื่อเปรียบเทียบกับสารลดแรงดึงผิวสังเคราะห์ คือ SDS และ LAS ใช้อุณหภูมิในช่วง 20-100 องศาเซลเซียส บ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่า สารลดแรงดึงผิวชีวภาพและ LAS มีความคงตัวที่ดีในช่วงอุณหภูมิดังกล่าว แต่ SDS มี emulsification activity เริ่มลดลงที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสและมีค่ากิจกรรมเหลือเพียง 20 % ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส

5.4.3 การกวนและการให้อากาศ การกวนและการให้อากาศ เป็นการเพิ่มปริมาณออกซิเจนให้กับจุลินทรีย์เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมทางหนึ่ง นอกจากนี้ ยังเป็นการช่วยให้จุลินทรีย์อยู่ในสภาพสารแขวนลอย สามารถดูดซึมปริมาณออกซิเจนเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น Desai and Banat (1997) รายงานว่า การเพิ่มอัตราการกวนมีผลให้ผลผลิตของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ จาก *N. erythopolis* ลดลงเนื่องจากแรงเฉือน นอกจากนี้ Wang และ Wang (1990) ศึกษากลไกการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* RAG-1 พบว่า อัตราส่วนของ cell bound polymer ต่อเซลล์แห้งมีค่าลดลงนั้นมีผลเนื่องมาจากค่าแรงเฉือนที่เพิ่มขึ้น

El-sayed และคณะ (1996) ทำการแยกแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ ที่สามารถผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพจากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวแล้ววัดค่าอัตราการเจริญของเชื้อด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 546 นาโนเมตร พบว่า การให้อากาศโดยตรงมีผลทำให้แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มีอัตราการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกับที่ Sheppard และ Cooper (1990) ได้สรุปว่า ปัจจัยอย่างหนึ่งที่สำคัญต่อสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการผลิตและการขยายขนาดในการผลิตสารลดแรงดึงผิวจากจุลินทรีย์ คือ การส่งผ่านออกซิเจน (oxygen transfer) ซึ่งในการทดลองเลี้ยง

เชื้อที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเมื่อเลี้ยงในฟลาस्कที่มีการเขย่าใช้จำนวนรอบในการเขย่าเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ทำให้ได้ปริมาณผลผลิตสูงที่สุด (Pruthi and Cameotra, 1997a; Carrillo et al, 1996)

Yakimov และคณะ (1995) ศึกษาการเลี้ยง *B. licheniformis* BAS50 ในสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ พบว่า ในสภาวะที่มีอากาศ *B. licheniformis* BAS50 มีการปรับตัวเริ่มต้นในช่วง lag phase สั้นกว่าและมีผลผลิตมวลเซลล์มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ การเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีอากาศ ค่าแรงตึงผิวของน้ำหมักในสภาวะที่มีอากาศเริ่มมีค่าลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเชื้อมีการเจริญในช่วง log phase ค่าแรงตึงผิวต่ำสุดในสภาวะที่มีอากาศ และไม่มีอากาศเท่ากับ 28.3 และ 35 mN/m ตามลำดับ แสดงว่ากระบวนการให้อากาศเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญในการเลี้ยง *B. licheniformis* BAS50 เพื่อให้ได้ผลผลิตมวลเซลล์และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

6. ประโยชน์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ปัจจุบันมีผู้สนใจใช้จุลินทรีย์ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เพราะว่ามีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากสามารถย่อยสลายได้และมีความเป็นพิษต่ำ จากคุณสมบัติที่ดีหลายประการจึงสามารถนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาประยุกต์ใช้ในงานต่าง ๆ ดังนี้

6.1 อุตสาหกรรมปิโตรเลียม ในอนาคตมีความเป็นไปได้สูงที่จะมีผู้นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไปใช้ในงานด้านอุตสาหกรรมปิโตรเลียม โดยอาจใช้ในรูปแบบเซลล์จุลินทรีย์โดยตรง เนื่องจากเป็นอุตสาหกรรมที่ไม่ต้องการความบริสุทธิ์มากนัก และเมื่อเปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สังเคราะห์ได้ทางเคมี พบว่า สามารถใช้ได้ผลดีในปริมาณที่ต่ำกว่า ทั้งในขั้นตอนการเก็บเกี่ยวและทำความสะอาดคราบน้ำมันที่ตกค้าง ตัวอย่างการเก็บเกี่ยวน้ำมันดิบเมื่อใช้ emulsan เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่า สามารถช่วยให้น้ำมันมีความหนืดลดลงจาก 20,000 cP เป็น 100 cP ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้สูงในการขนถ่ายน้ำมันดิบไปตามท่อส่งที่มีความยาว 26,000 ไมล์ หลังจากที่มีการใช้สารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ทางเคมีแต่ไม่ประสบความสำเร็จ (Desai and Banat, 1997) และมีการใช้ *B. licheniformis* JF-2 ที่แยกได้จากดินที่มีการปนเปื้อนของน้ำมันนำมาผลิตสารลดแรงตึงผิวได้ค่า CMC เท่า

กับ 10 ไมโครกรัมต่อลิตร เมื่อนำมาใช้ในขั้นตอนการเก็บเกี่ยว พบว่าสามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัดและมีอุณหภูมิสูง นอกจากนี้ยังใช้ได้ดีเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง (Javaheri *et al.*, 1985 อ้างโดย Desai and Banat, 1997) แม้ว่ามันจะมีประโยชน์ แต่ในทางตรงกันข้าม สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถก่อให้เกิดปัญหาได้เช่นกัน จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในถังน้ำมันเชื้อเพลิง และความสามารถในการทำให้เกิดอิมัลชันของน้ำมัน ทำให้น้ำแพร่เข้าไปในน้ำมันได้ และทำให้อ่างน้ำมันเกิดสนิม (Fiechter, 1992)

6.2 การกำจัดสารไฮโดรคาร์บอน น้ำมันมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นสารประกอบกลุ่มไฮโดรคาร์บอนและมีสารอื่น ๆ เช่น ออกซิเจน ไนโตรเจน ซัลเฟอร์ และโลหะบางชนิดปนอยู่ในปริมาณเล็กน้อย เมื่อน้ำมันเมื่อรั่วไหลลงสู่ทะเลและแหล่งน้ำจะเกิดการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ทั้งทางฟิสิกส์ เคมีและชีวภาพ โดยทั่วไปกระบวนการทางฟิสิกส์และเคมีจะเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วและทันทีที่มีการรั่วไหลของน้ำมัน เช่น การแพร่กระจาย การละลาย และการระเหย ส่วนกระบวนการทางชีวภาพมักจะเกิดขึ้นภายหลังจากที่มีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของน้ำมันแล้ว การเปลี่ยนแปลงเนื่องจากกระบวนการต่าง ๆ เหล่านี้ เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการแพร่กระจายของสารไฮโดรคาร์บอนในรูปต่าง ๆ ในสภาวะแวดล้อม (คณิงิจ จรุงศักดิ์, 2540)

เมื่อน้ำมันรั่วไหลลงสู่แหล่งน้ำจะแพร่กระจายเป็นคราบปกคลุมผิวน้ำอย่างรวดเร็ว เนื่องจากองค์ประกอบในน้ำมันส่วนใหญ่มีคุณสมบัติที่ไม่ละลายน้ำหรือละลายน้ำได้น้อยมาก อิทธิพลของคลื่นและลมจะเป็นตัวทำให้คราบน้ำมันแพร่กระจายเป็นแผ่นบาง ๆ อัตราการระเหยของน้ำมันจะสูงหรือต่ำขึ้นกับขนาดพื้นที่ของน้ำมันที่ลอย ชนิดของน้ำมัน อุณหภูมิ จุดเดือดของน้ำมันและความเร็วลม น้ำมันปิโตรเลียมแต่ละชนิดมีคุณสมบัติในการละลายน้ำที่แตกต่างกัน กลุ่มที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยสามารถละลายน้ำได้ดีกว่ากลุ่มที่มีน้ำหนักโมเลกุลมาก ดังแสดงในตารางที่ 5 (ศิริพร เหลืองนฤทัย, 2535) ซึ่งค่าความสามารถในการละลายเป็นค่าที่ได้จากการละลายในน้ำกลั่น ความสามารถในการละลายในน้ำทะเลนั้นจะน้อยกว่าในน้ำกลั่นอยู่ประมาณ 12-30 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับจำนวนอะตอมของคาร์บอน โครงสร้างของโมเลกุล ธาตุที่เป็นองค์ประกอบ อิทธิพลของกระแสลม สภาพของแหล่งน้ำ

ตารางที่ 5 ค่าความสามารถในการละลายน้ำของไฮโดรคาร์บอนบางชนิด

ชนิดของไฮโดรคาร์บอน	ความสามารถในการละลายน้ำ (ppm)
อะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน	
นอร์มัล-เพนเทน (n-C ₅)	40.000
นอร์มัล-เฮกเซน (n-C ₆)	10.000
นอร์มัล-เฮปเทน (n-C ₇)	3.000
นอร์มัล-ออกเทน (n-C ₈)	1.000
นอร์มัล-ไดโอดีเคน (n-C ₁₂)	0.010
นอร์มัล-ไตรอะคอนเทน (n-C ₃₀)	0.002
อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน	
เบนซีน (benzene)	1,800.000
โทลูอีน (toluene)	500.000
ไซลีน (xylene)	175.000
อัลคิลเบนซีน (alkylbenzene)	50.000
แนพทาลีน (naphthalene)	32.000
แอนทราซีน (anthracene)	0.075
ฟิเรแนนทรีน (phenanthrene)	1.000
ไครซีน (chrysene)	0.002

ที่มา : ศิริพร เหลืองนฤทัย, 2535

ในการกำจัดสารไฮโดรคาร์บอนออกจากสิ่งแวดล้อม มีการใช้เครื่องมือกวาด หรือใช้ตาข่ายในการดักจับคราบน้ำมันที่ตกค้างก่อน จากนั้นมีการเติมสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมี ได้แก่ Triton X-100, Tergitol NPX, Brij 35, Igepal CA-720 เป็นต้น เพื่อช่วยให้เกิดการกระจายตัวของน้ำมันและละลายคราบน้ำมัน โดยมีการใช้จุลินทรีย์ในการย่อยสลายคราบน้ำมันซึ่งการเติมสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ควบคู่ไปด้วยจะไปกระตุ้นจุลินทรีย์ให้ย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนด้วยอัตราเร็วขึ้น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่จุลินทรีย์ผลิตได้ยังมีประโยชน์ที่สำคัญคือช่วยให้จุลินทรีย์เจริญบนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ดี และผลิตผลิตภัณฑ์ที่เป็นประโยชน์ออกมาจำนวนมาก

ปัจจุบันมีการใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการทำความสะอาดคราบน้ำมันทั้งที่ตกค้างในน้ำและบนดิน เมื่อเติมจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลงในน้ำมันเพื่อให้น้ำมันเป็นแหล่งอาหาร จุลินทรีย์จะผลิตสารลดแรงตึงผิวเพื่อให้ตัวมันเข้าถึงน้ำมันได้ดีขึ้น จึงทำให้เกิดการย่อยสลายน้ำมันทางชีวภาพ ทั้งจากตัวจุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวเองและจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น ซึ่งจากผลผลิตที่ได้จากการย่อยสลายคราบน้ำมันคือ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ มวลเซลล์ และสารประกอบอื่น ๆ ขึ้นอยู่กับกลไกในการย่อยสลายของกระบวนการต่าง ๆ นอกจากนี้ยังพบว่า จุลินทรีย์ที่เป็นกลุ่มเด่นในการย่อยสลายคราบน้ำมันในแหล่งน้ำคือ แบคทีเรีย (Tongpubesra, 1998) โดยพบว่า *Acinetobacter* sp. HO1-N สามารถย่อยสลาย hexadecane ได้ เป็น n-hexadecanoic acid และพบว่า *Pseudomonas* ย่อยสลาย alkane เช่น n-tridecane แบบ subterminal oxidation ได้เป็น undecanoic acid นอกจากนี้ *Brevibacterium erythrogenes* ย่อยสลาย pristane แบบ ω -oxidation ได้เป็น 2-methylpentanedioic acid และย่อยแบบ β -oxidation ได้เป็น 2,6,10-trimethylundecanoic acid (Atlas, 1984)

การทดลองของ Van Dyke และคณะ (1993) แสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้ rhamnolipid จาก *P. aeruginosa* สามารถกำจัดสารไฮโดรคาร์บอนออกจากดินทรายและตะกอนดินได้ 25-70 และ 40-80 % ตามลำดับ และเมื่อนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดเดียวกันมาใช้ในการกำจัด aliphatic hydrocarbon และ aromatic hydrocarbon ในดินทรายได้ 56 และ 73 % ตามลำดับ

6.3 อุตสาหกรรมอาหาร ตัวอย่างของการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้แก่ ในกระบวนการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว กรดอะมิโน น้ำตาลโพลีแซ็กคาไรด์ กรดนิวคลีอิก (nucleic acids) วิตามินและรงควัตถุ (pigment) นอกจากนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็น food additive เช่น กลุ่มของ lecithin และอนุพันธ์ กลุ่มของ fatty acid esters ที่ประกอบด้วย glycerol sorbitan หรือ ethylene glycol หรือเป็นกลุ่ม ethyloxylated ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ monoglyceride ปัจจุบันยังมีการใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นอิมัลซิไฟเออร์ในผลิตภัณฑ์ salad dressing (Desai and Banat, 1997)

6.4 อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง มีการใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด sophorolipid ซึ่งได้จากกระบวนการหมักที่ให้ผลผลิตสูงกว่า 90-150 กรัมต่อลิตร พบว่า ผลิตภัณฑ์ที่มี 1 โมลของ sophorolipid และ 12 โมลของ propylene glycol มีความสามารถในการซึมซาบเข้าสู่ผิวได้ดีจึงมีการนำมาใช้ในการผลิตสารควบคุมความชื้นในทางการค้า (Lee และ Kim, 1993) ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางมีการใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อการเก็บรักษาอย่างน้อย 3 ปี ตัวอย่างการนำไปใช้ เช่น บริษัท คาโอ จำกัด ได้นำ sophorolipid มาใช้กับเครื่องสำอางยี่ห้อ Sofina ซึ่งบริษัทนี้ได้มีการพัฒนากระบวนการหมักเพื่อให้ได้ผลผลิตในเปอร์เซ็นต์สูง ต่อมาได้ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการผลิตลิปสติกและสารควบคุมความชื้นสำหรับผิวและผมออกสู่ท้องตลาดได้สำเร็จ (Inoue *et al.*, 1979 อ้างโดย Desai and Banat, 1997)

7. บทบาทของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอนาคต

ในอุตสาหกรรมมีความต้องการสารลดแรงตึงผิวสูงมาก มูลค่าของสารลดแรงตึงผิวในตลาดทั่วโลกมีมูลค่ามากถึง 2.3 พันล้านดอลลาร์ในปี 1993 และจะเพิ่มขึ้นเป็น 3 พันล้านดอลลาร์ในปี 1997 (Desai and Banat, 1997) สารเหล่านี้ทั้งหมดได้จากการสังเคราะห์ทางเคมีโดยใช้ปิโตรเลียมเป็นวัตถุดิบนับเป็นมูลค่าและปริมาณมหาศาล เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวจากการสังเคราะห์ทนต่อการย่อยสลายทางชีวภาพ และปริมาณที่มีมากนั้นเป็นพิษต่อระบบนิเวศในสิ่งแวดล้อม จึงมีความคิดที่จะนำเอาสารลดแรงตึงผิวชีวภาพซึ่งถูกย่อยสลาย

ได้ง่ายและเป็นพิษน้อยกว่ามาใช้ทดแทนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสังเคราะห์ ด้วยคุณสมบัติที่หลากหลายของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เช่น เป็นสารก่ออิมัลชัน, เป็นสารเกาะติด, สารช่วยทำให้เกิดฟอง, สารช่วยในการละลาย ด้วยเหตุนี้จึงทำให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมหลายชนิด เช่น อุตสาหกรรมเกษตร อุตสาหกรรมก่อสร้าง อุตสาหกรรมอาหารและเบียร์ อุตสาหกรรมทำความสะอาด อุตสาหกรรมเครื่องหนัง อุตสาหกรรมกระดาษ อุตสาหกรรมเหล็ก อุตสาหกรรมเส้นใย เครื่องสำอาง อุตสาหกรรมยาและแม้แต่อุตสาหกรรมปิโตรเลียม (Desai and Banat, 1997; Cooper and Zajic, 1980) ปัจจุบันจึงมีการค้นคว้าวิจัยจนได้ค้นพบจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพซึ่งได้มีการจดสิทธิบัตรดังแสดงตารางที่ 6

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างหลากหลาย ทำให้มีลักษณะเฉพาะและคุณสมบัติทางกายภาพแตกต่างกัน นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงสัณฐานในการเจริญของจุลินทรีย์จะทำให้ได้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีความสามารถแตกต่างกันด้วย แต่การนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาใช้แทนสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ในทางอุตสาหกรรมนั้นยังมีข้อจำกัดเนื่องจากต้นทุนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังมีราคาสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ ดังนั้นการปรับปรุงกระบวนการผลิตและหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพและปริมาณมากเพื่อลดต้นทุนในการผลิตจึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง นอกจากนี้สามารถใช้แทนสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ในอุตสาหกรรมแล้ว สารลดแรงตึงผิวชีวภาพรวมทั้งจุลินทรีย์ที่ผลิตสามารถใช้ในการกำจัดคราบน้ำมันที่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมทั้งในน้ำและบนบก ซึ่งเป็นการช่วยแก้ไขปัญหามลพิษสิ่งแวดล้อมอีกทางเลือกหนึ่ง (Desai and Banat, 1997; Fiechter, 1992)

ตารางที่ 6 ตัวอย่างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้รับการจดสิทธิบัตรแล้ว

ผลิตภัณฑ์	จุลินทรีย์	สิทธิบัตร
Biosurfactant	<i>Arthobacter</i> sp.	Nikko Bio Technica Co., Ltd., Shizuka Japan US 5344913(1994)
Lipopeptide	<i>Methylomonas clara</i> ATCC 31226	Hoechst AG,DE 3312166(1984)
Sophorose lipid	<i>Torulopsis bombicola</i>	Kao Soap CO.,Ltd., DE 2834118(1979), DE 2938383(1980), Jpn Kokai Tokkyo Koho 8192,786(1981), EP 0005004(1983)
Emulsan	<i>Arthrobacter</i> sp ATCC 31012	Biotechnol.Aktienges., US 4276094(1981)
Biosurfactant	<i>Arthrobacter</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Pseudomonas</i>	Canadian Patents and Development Ltd.,CA 1114759(1981)
Biosurfactant	<i>Penicillium spiculisporum</i>	Inoue-Japax Research Inc., Jpn., Kokai 7837,189(1978)
Surfactin	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21331	Takada Chemical Ind. Ltd., Us 3687926(1972)

ที่มา : Kosaric (1993)

วัตถุประสงค์

1. แยกและคัดเลือกแบคทีเรียจากแหล่งธรรมชาติที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิว
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวของแบคทีเรียที่คัดเลือก
3. ศึกษาคุณสมบัติบางประการของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ
4. ศึกษาองค์ประกอบเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

1. ตัวอย่างเชื้อจากธรรมชาติ

เก็บตัวอย่างจากแหล่งดินและน้ำ ที่มีการปนเปื้อนของน้ำมันจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม จากอู่ซ่อมรถ จากบริเวณท่าเรือจังหวัดตรัง ภูเก็ต ปัตตานี และ สงขลา โดยเก็บตัวอย่างดินประมาณ 200 กรัมใส่ถุงพลาสติก และตัวอย่างน้ำประมาณ 200 มิลลิลิตร ใส่ในขวดพลาสติก นำตัวอย่างมาทำการแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวในห้องปฏิบัติการ

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

ใช้อาหารแข็ง nutrient agar (NA) ที่มี 3% NaCl และอาหาร blood agar ที่มี 3% NaCl ในการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแหล่งธรรมชาติ จากนั้นใช้อาหาร marine broth (MB) เป็นอาหารพื้นฐานที่ใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิว โดยอาหาร MB1 เตรียมจากน้ำทะเล อาหาร MB2 เตรียมจากสารเคมีเมื่อทราบองค์ประกอบที่แน่นอน และอาหาร MB3 เตรียมเช่นเดียวกับ MB2 แต่ไม่มีแอมโมเนียมแอมโมเนียมไนเตรทผสมในสูตรอาหาร (ภาคผนวก ก)

3. weathered oil

ได้จากกระบวนการกลั่นแยกน้ำมันดิบ (Oman crude oil) ที่อุณหภูมิ 350 องศาเซลเซียส ที่ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

4. สารเคมี

สารเคมีเกรดวิเคราะห์ (analytical grade) ใช้ในการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ และใช้ในการวิเคราะห์หา emulsification capacity การทำสารลดแรงตึงผิวที่สกัดได้ให้บริสุทธิ์ขั้นต้น รายการสารเคมีแสดงในภาพผนวก ข

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดพีเอช ยี่ห้อ ORION รุ่น 420A
2. เครื่องเขย่า ยี่ห้อ GFL รุ่น 3005
3. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ LAB-LINE รุ่น NO 3525-ICC
4. เครื่องหมุนเหวี่ยงแยกชนิดควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ APPENDROF รุ่น 5403
5. เครื่องหมุนเหวี่ยงแยกชนิดควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ HITACHI รุ่น SCR 20 B
6. ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ MEMMERT รุ่น ULM 500
7. ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ MEMMERT รุ่น B 50
8. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ MEMMERT รุ่น W 350
9. กล้องจุลทรรศน์ ยี่ห้อ NIKON รุ่น YS2-H
10. สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ยี่ห้อ HITACHI รุ่น U-2000
11. เครื่องระเหยสูญญากาศ (rotary evaporater) ยี่ห้อ EYELA SB-651
12. แผ่น Thin-layer chromatography (TLC) aluminium sheets silica gel 60 F₂₅₄ ขนาด 20X20 cm layer thickness 0.2 mm (MERCK)

การวิเคราะห์

1. ค่าพีเอช

ปิเปตตัวอย่างน้ำมันจากการเก็บที่เวลาต่าง ๆ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตรวจวัดค่าพีเอชของอาหารโดยใช้เครื่องวัดพีเอช

2. การเจริญของเชื้อ

วัดการเจริญของเชื้อโดยนำน้ำมันมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ส่วนในน้ำมันที่มี hexadecane หรือ น้ำมันปาล์ม (palm oil) เป็นส่วนประกอบ วัดการเจริญของเชื้อได้ดังนี้คือ ปิเปตตัวอย่างน้ำมันดังกล่าวมา 5 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงแยกเซลล์ ที่ความเร็ว 10,000 x g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกส่วนใสออก ล้างเซลล์ด้วย ethanol:acetone (1:1) แล้วหมุนเหวี่ยงและล้างเซลล์อีก 2 ครั้ง เติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตรและนำมาวัดค่าการดูด

คลื่นแสงที่มีความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร โดยนำเซลล์ที่ได้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นเพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่มีค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 0.1-0.5

3. การทดสอบ Haemolytic activity

นำเชื้อที่แยกได้ เชีกลงบนอาหารแข็ง blood agar plates ที่ประกอบด้วยเลือดคน 5 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน สังเกตวงใสที่เกิดรอบโคโลนี (Carrillo *et al.*, 1996)

4. การทดสอบความสามารถในการอิมัลซิไฟด์ (emulsify) weathered oil

นำเชื้อที่ให่วงใสรอบโคโลนีที่คัดเลือกได้มาเลี้ยงในอาหาร MB1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในหลอดทดลองขนาด 16x150 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหารชนิดเดียวกันปริมาตร 4 มิลลิลิตร ที่มี weathered oil 2 หยด บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 400 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Cooper and Paddock, 1984) เป็นเวลา 14 วัน สังเกตและบันทึกผลทุก 24 ชั่วโมง โดยสังเกตจากความขุ่นของอิมัลชันที่เกิดขึ้นระหว่าง weathered oil กับ อาหาร MB1 ที่มีเชื้อเจริญ

5. การทดสอบ emulsification capacity (EC)

ทำการแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก (cell free broth) โดยนำตัวอย่างน้ำหมักที่เวลาต่าง ๆ มาทำการหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใส (supernatant) ที่ได้มา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 25 มิลลิลิตร ที่มี 0.02 M Tris-HCl buffer ที่พีเอช 7.2 แล้วเติม weathered oil 2 หยด นำไปตั้งน้ำหนัก (W1) นำไปเขย่าอย่างแรงให้เข้ากัน เป็นเวลา 30 วินาที แล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาที สังเกตการเกิดเป็นอิมัลชัน (emulsion) ทำการทดลองซ้ำโดยมีการเพิ่มปริมาตรของ weathered oil ครั้งละ 2 หยด ตั้งน้ำหนักลดครั้งสุดท้ายเมื่อสังเกตเห็นว่าสารละลายในหลอดทดลองเกิดการสูญเสียสภาพที่เป็นอิมัลชัน (W2) คำนวณค่า %emulsification capacity (%EC) ดังสมการ

$$\% \text{ EC} = \frac{W_2 - W_1}{W_1} \times 100$$

6. การทดสอบความสามารถในการกระจายน้ำมัน (oil displacement test)

นำจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร ที่บรรจุน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร หยด weathered oil ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าของน้ำ จากนั้นจึงหยดตัวอย่างที่ต้องการทดสอบในที่นี้คือส่วนใส (supernatant) ที่ได้จากการแยกเซลล์ออก ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าของ weathered oil วัดความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลาง เพื่อนำไปคำนวณหาพื้นที่ของการกระจาย weathered oil เป็นตารางเซนติเมตร วงใสที่มีความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 15 เซนติเมตรมีการเจือจางส่วนใสเป็น 10 เท่า สูตรการคำนวณดังสมการ (Morikawa *et al.*, 1993)

$$\text{oil displacement area (ODA)} = 22/7 (r)^2 \quad \text{ตารางเซนติเมตร}$$

$$r = \text{รัศมีของการกระจายของตัวอย่างบนผิวหน้าของ weathered oil}$$

วิธีการทดลอง

1. การแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวจากแหล่งธรรมชาติ

นำตัวอย่างดิน 5 กรัมหรือตัวอย่างน้ำ 1 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำเกลือที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร และนำไปเขย่า 15 นาที หลังจากการเขย่า นำไปเจือจางตามลำดับ (serial dilution) แล้วดูดสารละลายในแต่ละระดับความเจือจางมา 0.1 มิลลิลิตร นำมากระจายเชื้อลงบนอาหารแข็ง nutrient agar (NA) ที่มี 3% NaCl ปมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน นำโคโลนีเดี่ยว ๆ มาทดสอบ haemolytic activity คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวที่เจริญบนอาหารและให้ลักษณะวงใสรอบโคโลนี คัดเลือกจนได้โคโลนีบริสุทธิ์ เก็บแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ไว้ในอาหารวุ้นแข็ง Nutrient agar ที่มี 3% NaCl

จากนั้นนำแบคทีเรียที่ได้มาหาความสามารถในการอิมัลซิไฟด์ weathered oil โดยคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการอิมัลซิไฟด์ weathered oil ได้ดีที่สุด เพื่อนำมาใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวขั้นต่อไป

2. การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิว

ทำการเลี้ยงแบคทีเรียที่แยกได้จากข้อ 1 การเตรียมเชื้อเริ่มต้นทำโดยถ่ายแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ จากอาหารแข็ง NA ประมาณ 1 ลูบ ลงในอาหาร MB1 ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุใน ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 18 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่า ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ถ่ายเชื้อเริ่มต้น 5 มิลลิลิตร (10 เปอร์เซ็นต์) ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร MB1 45 มิลลิลิตร ที่มี hexadecane เป็นแหล่งคาร์บอน เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 2 วัน ในสภาวะเช่นเดียวกัน โดยเก็บตัวอย่างชุดการทดลองละ 3 ขั้ว นำน้ำหมักมาวัดพีเอช วัดการเจริญ ค่า %EC และ ค่า ODA แบคทีเรียที่มีค่า %EC และ ค่า ODA ที่ดีที่สุด จะนำไปศึกษาต่อในข้อ 3 ต่อไป

3. การจำแนกแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวที่คัดเลือกได้

ใช้ชุดการทดสอบ kit ระบบเอพีไอ (api 20E) ร่วมกับวิธีการจำแนกแบคทีเรียที่ตามวิธีของดวงพร คันธโชติ (2537) ศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของแบคทีเรียที่สามารถให้ค่าความสามารถในการอิมัลซิไฟด์ weathered oil ค่า %EC และ ค่า ODA ที่ดีที่สุด เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียถึงระดับสกุลตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Krieg and Holt, 1984)

4. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 2 มาเลี้ยงในอาหารเหลว MB2 (ภาคผนวก ก) ที่มี hexadecane และน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้เชื้อเริ่มต้นที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เท่ากับ 1.0 เดิมเชื้อเริ่มต้นปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหารเหลวทั้งหมด บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่ 0, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง โดยเก็บชุดการทดลองละ 3 ขั้ว นำไปวัดพีเอช การเจริญ หา %EC และ ODA แล้วเลือกเก็บตัวอย่างจาก

การเลี้ยงที่ชั่วโมงที่มีค่า %EC และ ODA สูงที่สุด จากนั้นจึงเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของอาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิว ดังนี้

4.1 แหล่งคาร์บอน

4.1.1 ผลของชนิด

เลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้ในอาหารเหลวที่มี hexadecane 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน เปรียบเทียบกับการใช้น้ำมันพืช ในปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลซูโครส 1.0 เปอร์เซ็นต์

4.1.2 ผลของปริมาณ

ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม จากผลข้อ 4.1.1 โดยผันแปรในปริมาณต่าง ๆ คือ 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ในกรณีที่น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม ผันแปรในปริมาณ 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์

4.2 ผลของยีสต์สกัดและเปปโตน

เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีแหล่งคาร์บอนและมีปริมาณที่เหมาะสม จากผลข้อ 4.1.2 โดยเปรียบเทียบกับกรณีที่มีหรือไม่มียีสต์สกัดและเปปโตนอย่างใดอย่างหนึ่ง หรือไม่มีทั้งยีสต์สกัดและเปปโตนในสูตรอาหาร MB2

4.3 แหล่งไนโตรเจน

4.3.1 ผลของชนิด

ใช้อาหารที่เหมาะสมจากข้อ 4.2 ซึ่งใช้ NH_4NO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจน เปรียบเทียบกับการใช้ KNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ และ NaNO_3 ในปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์

4.3.2 ผลของปริมาณ

ใช้อาหารที่เหมาะสมจากข้อ 4.3.1 ผันแปรในปริมาณต่าง ๆ กันคือ 0.1, 0.3 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์

4.4 อุณหภูมิ

เลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เหมาะสม (ผลจากข้อ 4.3) โดยผันแปรอุณหภูมิในการบ่มเชื้อต่าง ๆ กัน คือ 25, 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส

4.5 พีเอชเริ่มต้น

เลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เหมาะสม (ผลจากข้อ 4.4) โดยผันแปรพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 4.5, 5.5, 6.5, 7.2, 8.0 และ 9.0

4.6 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เหมาะสม (ผลจากข้อ 4.5) เก็บตัวอย่างที่ 0, 6, 12, 24, 30, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง โดยเก็บชุดการทดลองละ 3 ข้ำ นำไปวัดพีเอช, การเจริญ, %EC และ ODA

5. ศึกษาคุณสมบัติบางประการของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เลี้ยงเชื้อในอาหารภายใต้สภาวะและเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตตามข้อ 4.6 จากนั้นเตรียมสไลด์ด้วยการปั่นเหวี่ยงน้ำหนัก ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำไปศึกษาปัจจัยต่าง ๆ คือ

5.1 ความคงตัวของพีเอช

นำส่วนใสมาปรับพีเอชกับ 1 M HCL หรือ 1M NaOH ผันแปรที่พีเอช 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 14 ตั้งทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บชุดการทดลองละ 3 ข้ำ นำไปวัดหา %EC และ ODA

5.2 ความคงตัวของอุณหภูมิ

บ่มส่วนใสที่อุณหภูมิ 55, 80 และ 100 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาการบ่ม 0, 30, 60, 90 และ 120 นาที เก็บชุดการทดลองละ 3 ข้ำ นำไปวัด %EC และ ODA

5.3 ความคงตัวต่อความเข้มข้นของเกลือ

นำเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) มาละลายกับส่วนใสให้เข้ากัน โดยผันแปรที่ความเข้มข้นของเกลือเท่ากับ 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ นำไปวัดหา %EC และ ODA

6. การแยกสารลดแรงตึงผิวให้บริสุทธิ์ในขั้นต้น

6.1 การแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากน้ำหมัก (crude biosurfactant)

นำส่วนใสที่ได้จากการหมุนเหียงแยกเซลล์ออกแล้ว ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เท่ากับ 2 ด้วย 2 M HCl นำไปปั่นที่ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งมีการควบคุมเวลา เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปหมุนเหียงเพื่อแยกเอาตะกอนออก นำตะกอนที่ได้มาละลายกับ 0.02 M Tris-HCl buffer (Yakimov *et al.*, 1995) นำสารละลายที่ได้มาหาค่า %EC และ ODA และนำส่วนใสมาสกัดแยกสารลดแรงตึงผิวที่ได้ด้วยการเติมเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) ปริมาตรเท่ากับส่วนใส เขย่าให้เข้ากันในกรวยแยก เก็บสารละลายส่วนบนซึ่งมีสารลดแรงตึงผิวละลายอยู่กับเอทิลอะซิเตท และนำส่วนใสส่วนล่างมาทำการสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง รวมสารละลายที่สกัดได้ทั้งหมดมาเติมโซเดียมซัลเฟต เพื่อกำจัดน้ำออก (Kim *et al.*, 1999) แล้วกำจัดเอทิลอะซิเตทด้วยการระเหยออกโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนเหลือปริมาตรของสารละลายในขวดระเหยเท่ากับ 2 มิลลิลิตร นำ crude biosurfactant ที่ได้ 0.01 มิลลิลิตร มาเจือจางกับ 0.02 M Tris-HCl buffer 5 มิลลิลิตร เขย่าให้กันนำมาหาค่า %EC และ ODA เก็บ crude biosurfactant ไว้ในหลอดฝาทึบขนาดเล็กเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

6.2 วิธี Thin-layer chromatography (TLC)

TLC เป็นการแยกองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวในขั้นต้น (Passeri *et al.*, 1991; Carrillo *et al.*, 1996) โดยนำ crude biosurfactant ที่ได้จากข้อ 6.1 ทั้งส่วนที่ได้จากการละลายตะกอนและที่มีการสกัดจากส่วนใส มา spot บนแผ่น Thin-layer chromatography (TLC) aluminium sheets silica gel 60 F₂₅₄ ให้ตัวอย่างมีลักษณะเป็นแถบที่เล็กที่สุด นำไปแช่ในตัวทำละลายเคลื่อนที่ต่าง ๆ กัน ได้แก่

$\text{CHCl}_3 : \text{C}_6\text{H}_{14}\text{O} : \text{CH}_3\text{COOH}$	45 : 25 : 1
$\text{CHCl}_3 : \text{C}_6\text{H}_{14}\text{O} : \text{CH}_3\text{COOH} : \text{H}_2\text{O}$	60 : 30 : 1 : 1
$\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH}$	95 : 5
$\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH} : \text{H}_2\text{O}$	65 : 25 : 4
	40 : 25 : 2
$\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH} : 28\% \text{NH}_4\text{OH}$	65 : 25 : 4
	65 : 35 : 5
$\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH} : \text{CH}_3\text{COOH} : \text{H}_2\text{O}$	50 : 5 : 4 : 1
	40 : 10 : 2 : 1
	25 : 15 : 4 : 2
$\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH} : \text{acetone}$	90 : 10 : 6
Butanol : acetone : H_2O	32 : 48 : 8
$\text{CH}_3\text{OH} : \text{H}_2\text{O}$	90 : 10

เปรียบเทียบลักษณะของแถบที่แยกได้ ภายใต้แสงยูวีความยาวคลื่นสั้น 280 นาโนเมตร เลือกใช้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ที่ทำให้ crude biosurfactant แยกแถบออกจากกันได้ดีที่สุด แล้วจึงนำแผ่น TLC aluminium sheets silica gel 60 F₂₅₄ ที่ได้มาหาค่า R_f ประกอบด้วยสารทดสอบดังนี้ (ภาคผนวก ข) (Dawson *et al.*, 1986)

6.2.1 คาร์ไฮเดรต : Alkaline potassium permanganate และ Iodine

6.2.2 ไขมัน : Iodine และ Rhodamine 6G

6.2.3 กลุ่มอะมิโน : ภายใต้แสงยูวี, Ninhydrin

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์

1. การแยกแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวจากแหล่งธรรมชาติ

จากตัวอย่างดินและน้ำ 98 ตัวอย่าง ที่เก็บได้จากบริเวณที่มีน้ำมันปนเปื้อนจากบริเวณโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม อู่ซ่อมรถ และท่าเรือ สามารถแยกแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร nutrient agar (NA) ที่มี 3% NaCl ได้ทั้งหมด 122 สายพันธุ์ โดยได้จากตัวอย่างของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม 7 สายพันธุ์ จากอู่ซ่อมรถ 12 สายพันธุ์ จากท่าเรือจังหวัดตรัง 3 สายพันธุ์ จากท่าเรือจังหวัดภูเก็ต 26 สายพันธุ์ จากท่าเรือจังหวัดปัตตานี 12 สายพันธุ์ และจากท่าเรือจังหวัดสงขลา 62 สายพันธุ์ เมื่อนำมาเพาะแบคทีเรียบนอาหารวุ้นที่มี weathered oil เป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าไม่มีแบคทีเรียที่สามารถเจริญและให้วงใสรอบโคโลนีอาจเนื่องจาก weathered oil เป็นสารตั้งต้นที่แบคทีเรียมีการนำไปใช้ได้ยาก จากนั้นจึงนำแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหาร NA ทั้งหมด มาทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่มี haemolytic activity คือสามารถเจริญและให้วงใสรอบโคโลนีได้ในอาหาร blood agar ซึ่งเป็นลักษณะของแบคทีเรียที่มีแนวโน้มว่าจะมีการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ (Lin *et al.*, 1998; Carrillo *et al.*, 1996; Morikawa *et al.*, 1993; Passeri *et al.*, 1991) พบว่าแบคทีเรียที่เจริญและให้วงใสรอบโคโลนีบนอาหาร blood agar ได้มีจำนวน 39 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างจากท่าเรือ จังหวัดภูเก็ต (P) 18 สายพันธุ์ ท่าเรือจังหวัดปัตตานี (PA) 6 สายพันธุ์ และท่าเรือ จังหวัดสงขลา(S) 15 สายพันธุ์

จากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ 39 สายพันธุ์ เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการอิมัลซิไฟด์ weathered oil โดยเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีอาหาร MB1 และมี weathered oil 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่า ที่ความเร็ว 400 รอบต่อนาที พบว่ามีแบคทีเรียที่สามารถอิมัลซิไฟด์ weathered oil ได้ 8 สายพันธุ์คือ S3, S6, S7, S13, P3, P6, PA4 และ PA6 ผลดังตารางที่ 7 โดยแบคทีเรีย 7 สายพันธุ์ คือ S3, S7, S13, P3, P6, PA4 และ PA6 มีการอิมัลซิไฟด์ weathered oil ได้ใน 2 วันแรก ส่วน S6 มีการอิมัลซิไฟด์ weathered oil ได้ในวันที่ 4 เมื่อพิจารณาแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้เร็วที่

ตารางที่ 7 การทดสอบอิมัลซิไฟด์ weathered oil ของแบคทีเรีย 8 สายพันธุ์ในเวลา 14 วัน

สายพันธุ์แบคทีเรีย	เวลา (วัน)													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
P3	-	+	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P6	-	++	++	++	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
PA4	-	++	++	++	++	++	+	+	+	-	-	-	-	-
PA6	-	++	++	++	++	++	++	+	+	+	-	-	-	-
S3	-	++	++	++	++	++	++	+	+	-	-	-	-	-
S6	-	-	-	+	++	++	++	-	-	+	+	+	+	+
S7	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
S13	-	+	++	++	++	++	++	++	+	+	+	-	-	-

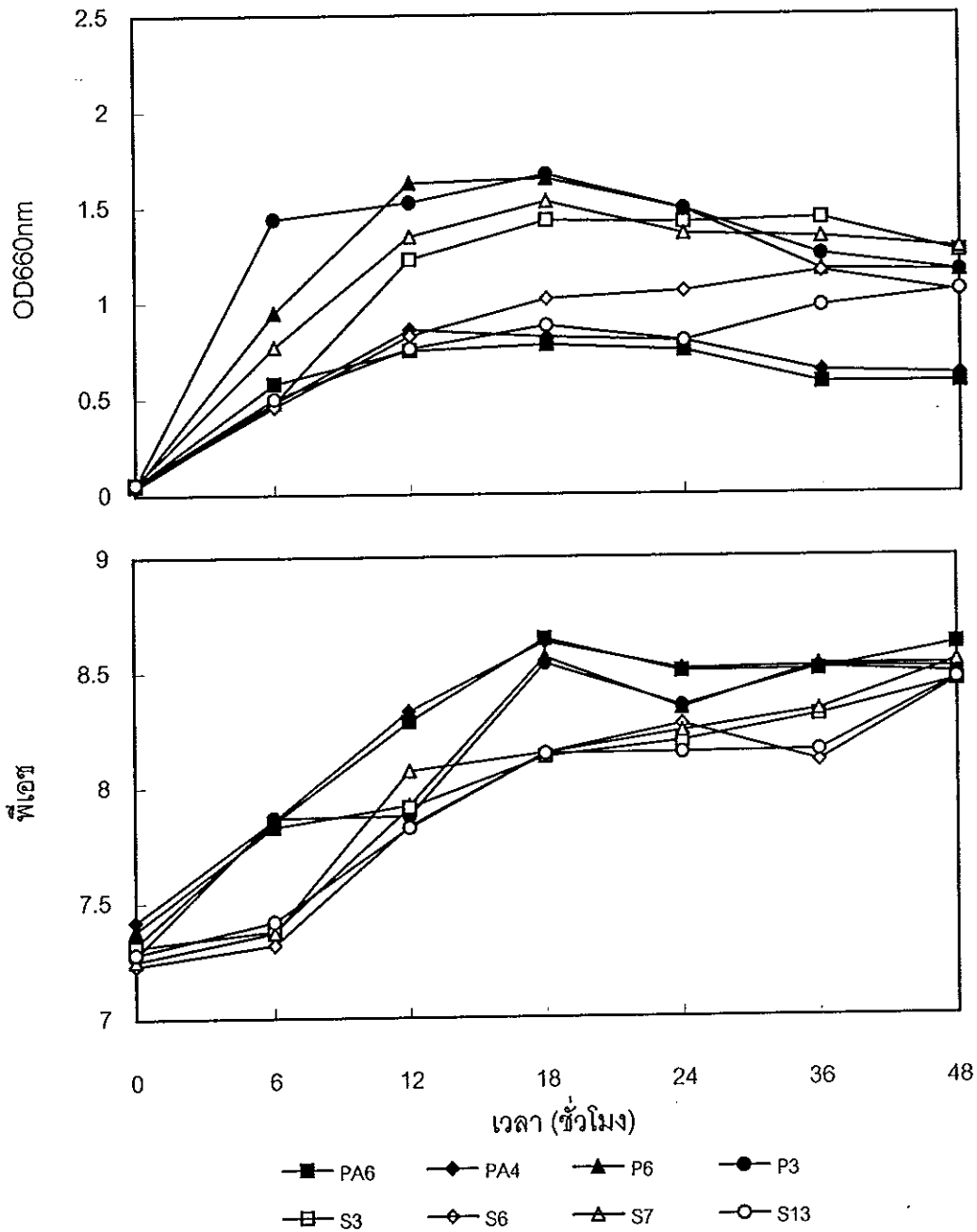
- หมายเหตุ
- ไม่เกิดอิมัลชันระหว่าง weathered oil กับ อาหาร MB1
 - + เกิดอิมัลชันระหว่าง weathered oil กับ อาหาร MB1 เพียงบางส่วน
 - ++ เกิดอิมัลชันระหว่าง weathered oil กับ อาหาร MB1 มองเห็นเป็นเนื้อเดียวกัน

สุดและคงสภาพเป็นนิมัลชันได้นานที่สุด พบว่า S7 มีคุณสมบัติดังกล่าวดีที่สุด จากการรายงานของ Zhang และ Miller(1995) รายงานว่าการละลายของสารลดแรงตึงผิวและการกระจายของ weathered oil หรือสารประกอบไฮโดรคาร์บอนแต่ละชนิดนั้นขึ้นอยู่กับชนิดหรือโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิว สารตั้งต้น (substrate) และจุลินทรีย์ ซึ่งสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตจากจุลินทรีย์มี 2 รูปแบบ คือ สารลดแรงตึงผิวแบบที่เกาะอยู่กับผนังเซลล์และ/หรือที่มีการปลดปล่อยออกมาออกเซลล์ (Passeri *et al.*, 1992) โดยในการทดลองนี้ใช้ตัวเซลล์จุลินทรีย์ทดสอบความสามารถในการนิมัลซิไฟด์ weathered oil ทำให้คัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวได้ในเบื้องต้นแต่ไม่สามารถสรุปได้ว่าแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวในรูปแบบใด ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงนำเฉพาะส่วนโสมที่ได้จากน้ำหมักของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มาทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวแบบที่มีการปลดปล่อยออกมาออกเซลล์

2. คัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตสารลดแรงตึงผิว

เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียทั้ง 8 สายพันธุ์ คือ S3, S6, S7, S13, P3, P6, PA4 และ PA6 ในอาหารเหลว MB1 ที่มี hexadecane 0.1% เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำส่วนโสมที่ได้จากการเลี้ยงมาตรวจวัดการเจริญ พีเอช ค่า %emulsifying capacity (%EC) และ ค่า oil displacement area (ODA) ซึ่งเป็นวิธีตรวจหาสารลดแรงตึงผิวจากจุลินทรีย์ที่มีการปลดปล่อยออกมาออกเซลล์ (Lindum *et al.*, 1998) พบว่า แบคทีเรียทั้ง 8 สายพันธุ์มีอัตราการเจริญสูงสุดในช่วง 6-12 ชั่วโมงแรก การเปลี่ยนแปลงของพีเอชของ P3, P6, PA4 และ PA6 เริ่มมีพีเอชคงที่เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 18 ส่วน S3, S6, S7 และ S13 มีแนวโน้มที่พีเอชจะเพิ่มสูงขึ้น(ภาพที่ 3)

แบคทีเรียแต่ละชนิดมีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้แตกต่างกันคือ แบคทีเรียที่ตรวจพบค่า %EC เร็วที่สุดในชั่วโมงที่ 6 คือ PA4 และ PA6 นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียโดยส่วนใหญ่ให้ค่า %EC สูงเมื่อทำการเลี้ยงไปจนถึงชั่วโมงที่ 36 และแบคทีเรียที่ให้ค่า %EC สูงที่สุด คือ S7 รองลงมาคือ PA6, S3, P6, PA4 และ S3 มีค่า %EC เท่ากับ 0.51 ± 0.06 , 0.47 ± 0.08 , 0.43 ± 0.04 , 0.39 ± 0.09 , 0.37 ± 0.10 และ 0.16 ± 0.10 ตามลำดับ (ตารางที่ 8) แบคทีเรียสายพันธุ์ P3 ตรวจพบค่า %EC ช้าที่สุดคือที่ 48 ชั่วโมง แต่ก็มีแบคทีเรียหนึ่งสายพันธุ์คือ S6 ที่ตรวจไม่พบค่า %EC ในการเลี้ยงตลอด 48 ชั่วโมง ในการ



ภาพที่ 3 การเจริญและการเปลี่ยนแปลงพีเอชของแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิว 8 สายพันธุ์ คือ PA6, PA4, P6, P3, S3, S6, S7 และ S13 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MB1 ที่มี 0.1% hexadecane

ตารางที่ 8 % emulsifying capacity ของแบคทีเรียทั้ง 8 สายพันธุ์

เวลา (ชั่วโมง)	% emulsifying capacity (%EC)*							
	P3	P6	PA4	PA6	S3	S6	S7	S13
0	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	0.21±0.07	0.07±0.06	-	-	-	-
12	-	-	0.33±0.08	0.17±0.07	-	-	0.10±0.10	-
18	-	0.07±0.08	0.33±0.07	0.20±0.08	0.07±0.13	-	0.36±0.09	-
24	-	0.16±0.05	0.42±0.13	0.36±0.03	0.32±0.09	-	0.46±0.04	0.06±0.05
36	-	0.39±0.09	0.37±0.10	0.47±0.08	0.43±0.04	-	0.51±0.06	0.16±0.10
48	0.2±0.07	0.25±0.04	0.25±0.06	0.34±0.01	0.38±0.08	-	0.44±0.02	0.41±0.05

* ค่าเฉลี่ย ± SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ

ทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองก่อนหน้าซึ่งพบว่า S6 ไม่สามารถอิมัลซิไฟด์ weathered oil ได้ใน 2 วันแรก ในส่วนการวัดค่า ODA จากแบคทีเรียทั้ง 8 สายพันธุ์ พบว่าไม่มีแบคทีเรียที่ให้ค่า ODA จากการเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง อาจเนื่องมาจากปริมาณสารลดแรงตึงผิวในน้ำหมักมีปริมาณน้อยและ/หรือสารลดแรงตึงผิวบางชนิดไม่มีความสามารถในการกระจายน้ำมัน (Haba *et al.*, 2000) สอดคล้องกับการรายงานของ Morikawa และคณะ (1993) ที่ว่าวิธีการตรวจค่า ODA ให้ผลได้เมื่อมีสารลดแรงตึงผิวในปริมาณที่มากกว่า 10 ไมโครลิตรหรือประมาณ 10 นาโนโมล

ในการศึกษาขั้นต่อไป จึงเลือกแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ คือ PA6 และ S7 ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยมีการอิมัลซิไฟด์ weathered oil และมีค่า %EC ได้ดีที่สุด

3. การจำแนกแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิว

จากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ 8 สายพันธุ์ พบว่ามีแบคทีเรียที่ให้ %EC สูงที่สุด 2 สายพันธุ์ คือ PA6 และ S7 นำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ PA6 มีลักษณะโคโลนีกลม สีเหลือง ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ S7 มีลักษณะโคโลนีกลมขอบเรียบ สีขาวนวล และศึกษาลักษณะทางชีวเคมี พบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ไม่เคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างสปอร์ สามารถผลิตเอนไซม์คะตาเลส (catalase) ได้ แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase) ไม่ย่อยแป้ง พบว่าเฉพาะแบคทีเรียสายพันธุ์ PA6 สามารถย่อยเจลาตินได้ นอกจากนี้เพื่อยืนยันผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียจึงมีการใช้ชุดการทดสอบ kit ระบบเอพีไอ (api 20E) ซึ่งได้ผลแสดงดังตารางที่ 9

จากคุณสมบัติทั้งหมดเมื่อเปรียบเทียบกับ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Kreig and Holt, 1984) พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ PA6 จัดอยู่ในสกุล *Pasteurella* sp. และแบคทีเรียสายพันธุ์ S7 จัดอยู่ในสกุล *Acinetobacter* sp. จากรายงานในการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ที่มีการเก็บตัวอย่างจากดินหรือน้ำที่มีการปนเปื้อนของน้ำมันพบว่าแบคทีเรียที่พบโดยส่วนใหญ่จัดอยู่ในสกุล *Acinetobacter* sp. (Huy *et al.*, 1999; Navon-venezia *et al.*, 1995) Deziel และคณะ (1996) แยกแบคทีเรียจากธรรมชาติจากดินมีการปนเปื้อนด้วยของเสียจากกระบวนการปิโตรเคมีและใช้

ตารางที่ 9 คุณสมบัติของแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิว สายพันธุ์ PA6 และ S7

คุณลักษณะที่ตรวจสอบ	สายพันธุ์	
	PA6	S7
1) Gram reaction	negative	negative
Cell morphology	rod	short rod
Colony morphology on NA+3%NaCl	bright yellow colony	white-cream round colony
Spore forming	-	-
motility test	-	-
Catalase test	+	+
Oxidase test	-	-
Starch hydrolysis	-	-
Gelatin hydrolysis	-	+
oxidation-fermentaion (O-F test)	-/-	-/-
2) β -galactosidase production (O-nitro-phenyl- β -D-galactopyranoside)	-	-
Arginine dihydrolase production	-	-
Lysine decarboxylase production	-	-
Ornithine decarboxylase production	-	-
Citrate utilization	-	+
H ₂ S production	-	-
Urease production	-	-
Tryptophane deaminase production	-	-
Indole production of tryptophane	-	-
Acetoin production	-	+
Hydrolysis of gelatin	-	+
Oxidation or fermentation		
- Glucose	-	+
- Mannitol	+	-
- Inositol	+	-
- Sorbitol	-	-
- Rhamnose	-	-
- Sucrose	-	-
- Melibiose	-	+
- Amygdalin	-	-
- Arabinose	-	+
Cytochrome oxidase	+	-

* 1) วิธีการจำแนกแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิว (ดวงพร คันธโชติ, 2537)

2) ใช้ kit ระบบเอพีไอ (api 20E)

polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่าแบคทีเรียที่ให้ประสิทธิภาพสูงสุด คือ *P. aeruginosa*

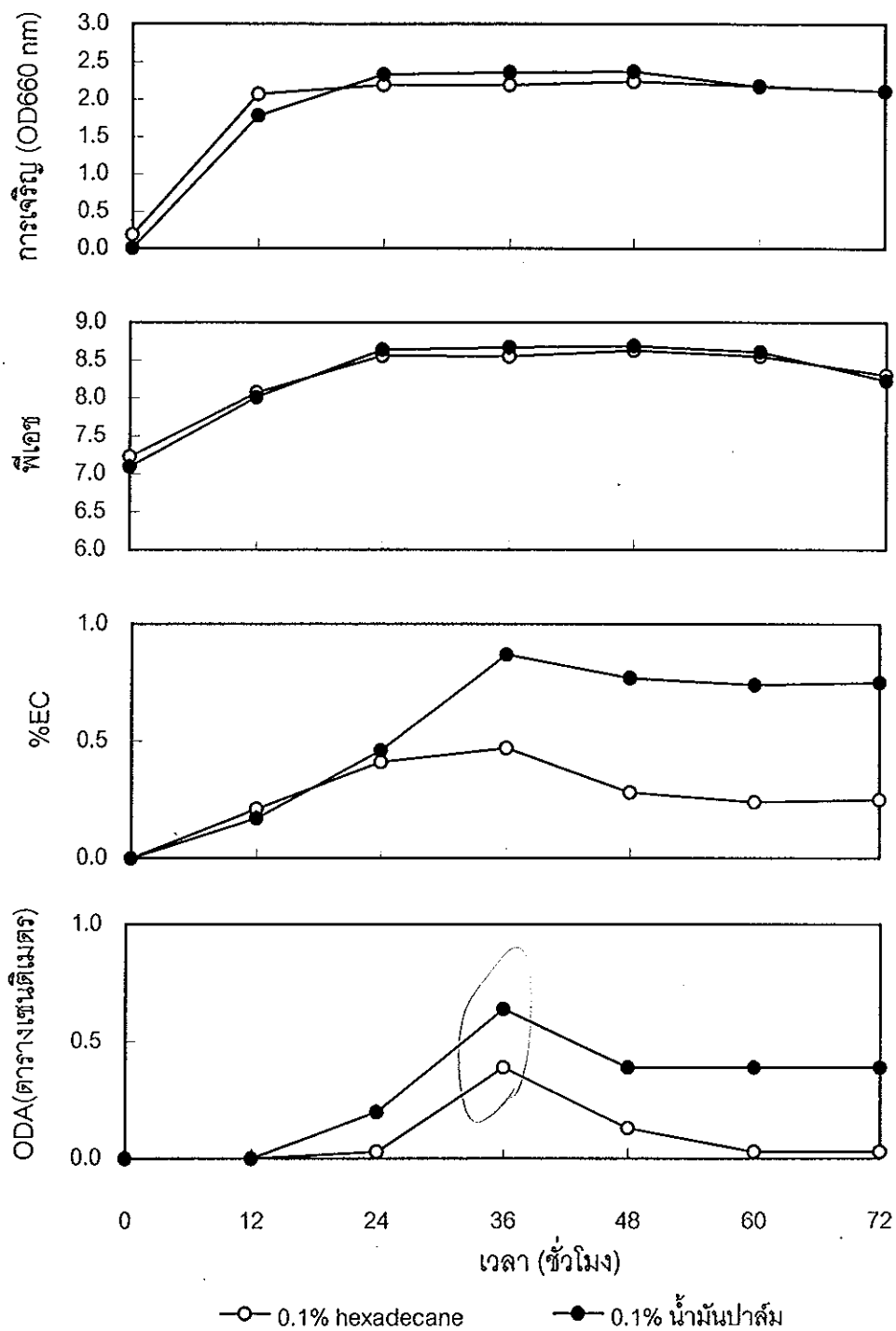
จากการศึกษายังไม่พบรายงานการผลิตสารลดแรงตึงผิวจากแบคทีเรียในจีนัส *Pasteurella*

4. สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

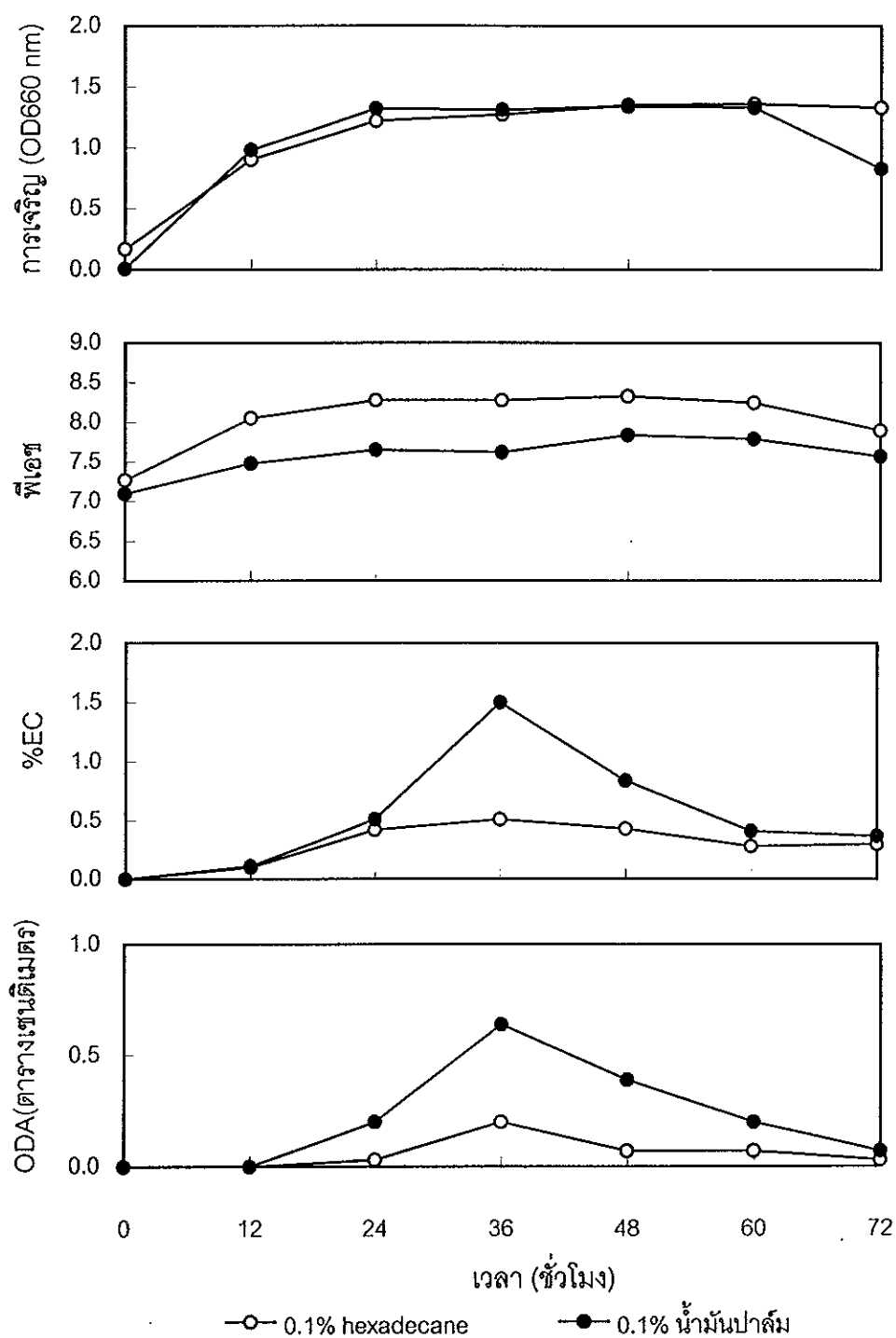
4.1 แหล่งคาร์บอน

การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Pasteurella* PA6 และ *Acinetobacter* S7 ซึ่งได้เลี้ยงแบคทีเรียทั้งสองชนิดในอาหาร MB1 ที่มี hexadecane หรือน้ำมันปาล์ม ในปริมาณ 0.1% บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อเป็นชุดควบคุมเปรียบเทียบโดยนำมาตรวจหาการเจริญ การเปลี่ยนแปลงของพีเอช ค่า %EC และ ค่า ODA พบว่า เมื่อเลี้ยง *Pasteurella* PA6 และ *Acinetobacter* S7 ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกันลักษณะการเจริญและการผลิตเป็นไปในทางเดียวกัน แบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์มีการเจริญสูงสุดในช่วง 6 ชั่วโมงแรก และเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่เมื่อเลี้ยงที่ 18 ชั่วโมง มีการเปลี่ยนแปลงพีเอชเพิ่มขึ้นจากชั่วโมงเริ่มต้นเล็กน้อย ส่วนการผลิตสารลดแรงตึงผิวที่ดูจากค่า %EC และ ODA พบว่า *Pasteurella* PA6 และ *Acinetobacter* S7 มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับการเจริญ สอดคล้องกับการรายงานของ Johnson และคณะ (1992) พบว่าการผลิตสารลดแรงตึงผิวของจุลินทรีย์ที่มีการผลิตออกมานอกเซลล์มีความสัมพันธ์กับการเจริญ

โดย *Pasteurella* PA6 มีการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวในอาหาร MB1 ที่มี 0.1% น้ำมันปาล์ม ได้ดีกว่าเมื่อใช้อาหาร MB1 ที่มี 0.1% hexadecane คือเมื่อเลี้ยงในอาหาร MB1 ที่มี 0.1% น้ำมันปาล์ม ให้ค่า %EC และ ค่า ODA สูงที่สุดเท่ากับ 0.87 และ 0.64 ตารางเซนติเมตรตามลำดับ และในอาหาร MB1 ที่มี 0.1% hexadecane ให้ค่า %EC และ ค่า ODA สูงที่สุดเท่ากับ 0.47 และ 0.39 ตารางเซนติเมตรตามลำดับ (ภาพที่ 4) เช่นเดียวกับการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวของ *Acinetobacter* S7 (ภาพที่ 5) พบว่าเมื่อเลี้ยงในอาหาร MB1 ที่มี 0.1% น้ำมันปาล์ม ให้ค่า %EC และ ค่า ODA สูงที่สุดเท่ากับ 1.50 และ 0.64 ตารางเซนติเมตรตามลำดับ ซึ่งให้ค่าการผลิตมากกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหาร MB1 ที่มี 0.1% hexadecane ซึ่งมีค่า %EC และ ค่า ODA สูงที่สุดเท่ากับ 0.51 และ 0.20



ภาพที่ 4 การเจริญ การเปลี่ยนแปลงพีเอชและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pasteurella* PA6 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MB1+0.1%hexadecane และ MB1+0.1% น้ำมันปาล์ม



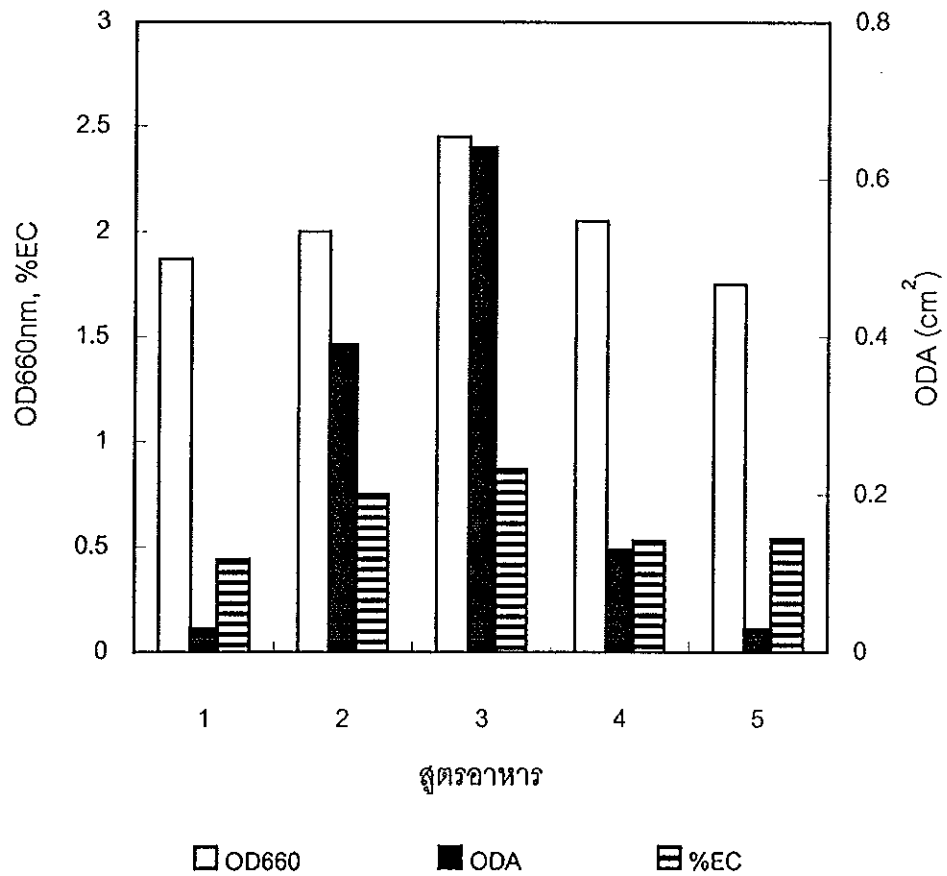
ภาพที่ 5 การเจริญ การเปลี่ยนแปลงพีเอชและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Acinetobacter* S7 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MB1+0.1%hexadecane และ MB1+0.1% น้ำมันปาล์ม

ตารางเซนติเมตรตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า *Pasteurella* PA6 และ *Acinetobacter* S7 มีการผลิตได้สูงที่สุดที่ 36 ชั่วโมงเมื่อเลี้ยงในอาหารทั้ง 2 ชนิดและมีการผลิตลดลงเมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ (48) ดังนั้นในการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตจึงทำการเก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 36

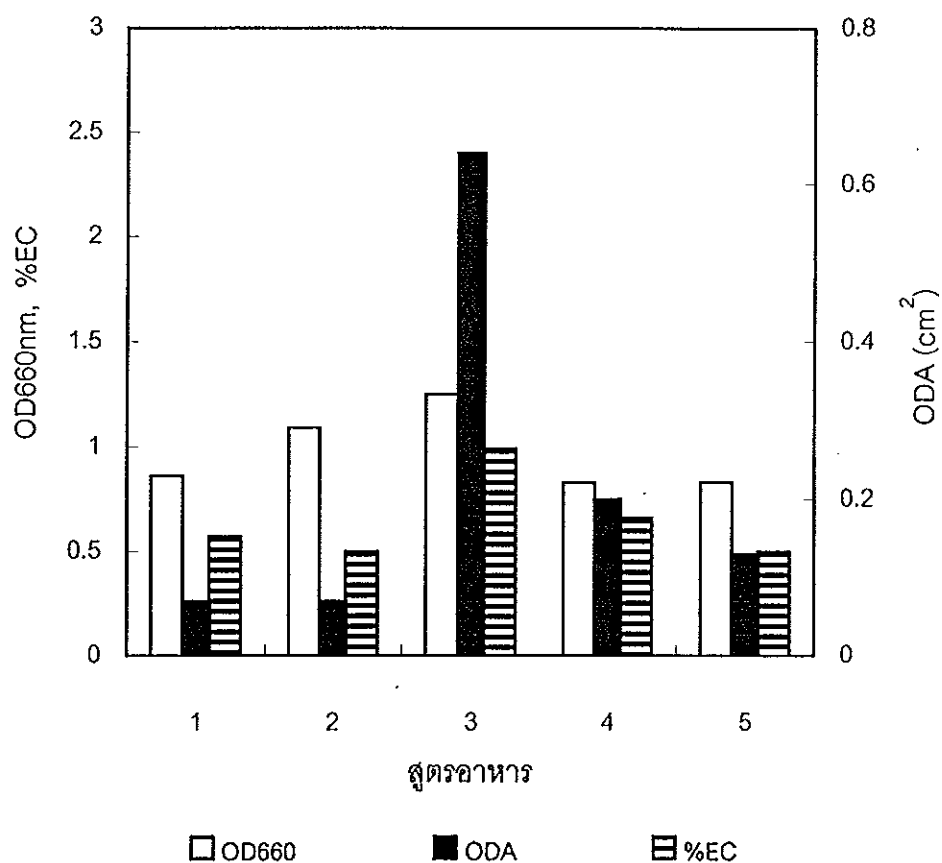
4.1.1 ผลของชนิดของแหล่งคาร์บอน

การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Pasteurella* PA6 และ *Acinetobacter* S7 ซึ่งได้เลี้ยงแบคทีเรียทั้งสองชนิดในอาหาร MB1 ที่มี hexadecane และ น้ำมันปาล์ม ในปริมาณ 0.1% เปรียบเทียบกับอาหาร MB1 ที่มี กลูโคส และ ซูโครส ในปริมาณ 1% เป็นแหล่งคาร์บอน ผลดังภาพที่ 6 และ 7 ตามลำดับ พบว่า *Pasteurella* PA6 เจริญได้ดีที่สุดในน้ำมันปาล์ม รองลงมาคือ กลูโคส hexadecane และเจริญได้น้อยที่สุดในซูโครส ค่าการเจริญที่ได้เฉพาะเมื่อเลี้ยงในอาหาร MB1 ที่มี กลูโคสและ hexadecane ที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับ *Acinetobacter* S7 ซึ่งเจริญได้ดีที่สุดในน้ำมันปาล์ม รองลงมาคือ hexadecane และมีการเจริญได้น้อยเมื่อเลี้ยงในอาหาร MB1 ที่มีกลูโคสและซูโครส(ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ) เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่าทั้ง *Pasteurella* PA6 และ *Acinetobacter* S7 มีค่า %EC (0.87 และ 0.99 ตามลำดับ) และ ODA (0.64 และ 0.64 ตารางเซนติเมตร ตามลำดับ) สูงที่สุดเมื่อใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน

จากผลการทดลองจะเห็นว่า *Pasteurella* PA6 และ *Acinetobacter* S7 มีการเจริญและการผลิตสูงที่สุดเมื่อใช้น้ำมันปาล์มเป็นสารตั้งต้นในอาหาร และมีการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้น้อยเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนในกลุ่มคาร์โบไฮเดรต จากการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Acinetobacter calcoaceticus* และ *A. paraffineus* ซึ่งพบว่า การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพอาจถูกยับยั้ง (repression) ได้โดยกลูโคสหรือเมตาบอไลต์ปฐมภูมิ (primary metabolites) ได้ (Kosaric, 1993) แตกต่างจากผลการทดลองในแบคทีเรียสกุล *Bacillus* เช่นในการทดลองของ Kim และคณะ (1997) พบว่าแหล่งคาร์บอนที่มีความสำคัญในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Bacillus subtilis* C9 คือกลูโคส โดยในการทดลองมีการใช้



ภาพที่ 6. ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญ และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pasteurella* PA6 ในชั่วโมงที่ 36 (1=MB1, 2=MB1+0.1% hexadecane, 3=MB1+0.1%น้ำมันปาล์ม, 4= MB1+1% กลูโคสและ 5= MB1+1%ซูโครส)



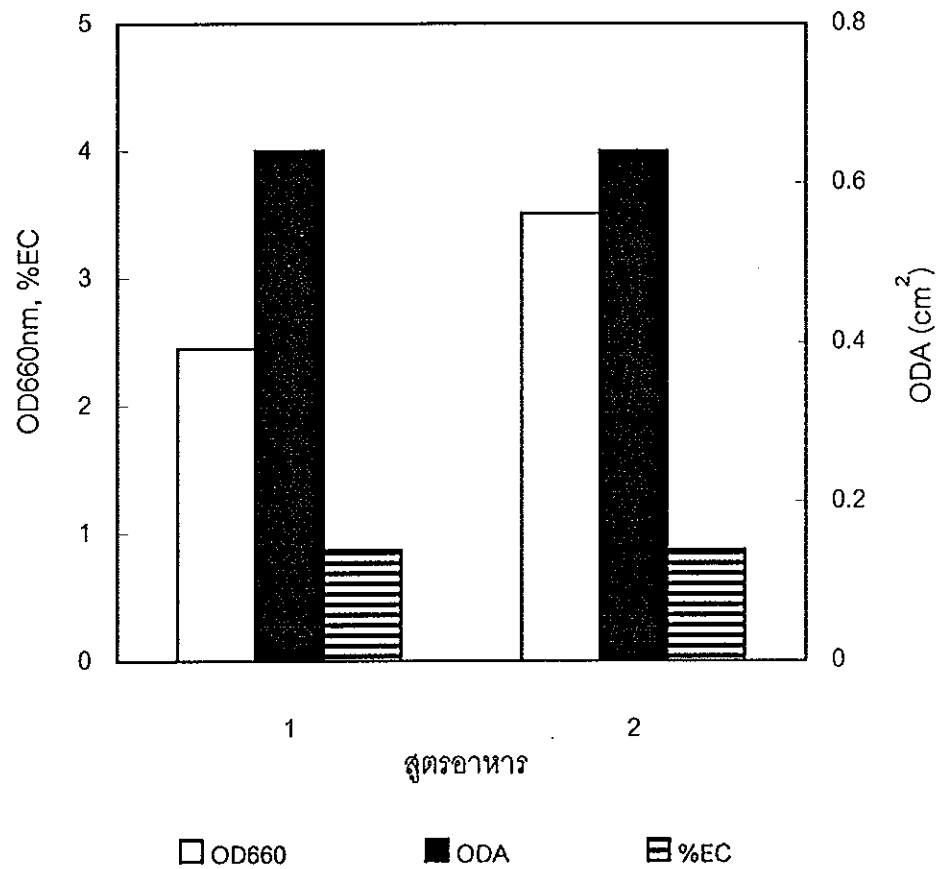
ภาพที่ 7 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญ และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Acinetobacter* S7 ในชั่วโมงที่ 36 (1=MB1, 2=MB1+0.1% hexadecane, 3= MB1 + 0.1%น้ำมันปาล์ม, 4= MB1+1% กลูโคส และ 5= MB1 + 1%ซูโครส)

คาร์โบไฮเดรต ไฮโดรคาร์บอนและ น้ำมันพืช จากการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวจะลดค่า surface tension ของน้ำหมักได้สูงที่สุดและมีค่า emulsification activity สูงที่สุด แต่เมื่อใช้ hexadecane มีผลยับยั้งในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทั้งที่เป็นแหล่งคาร์บอนชนิดเดียวหรือใช้ร่วมกับน้ำตาลกลูโคส

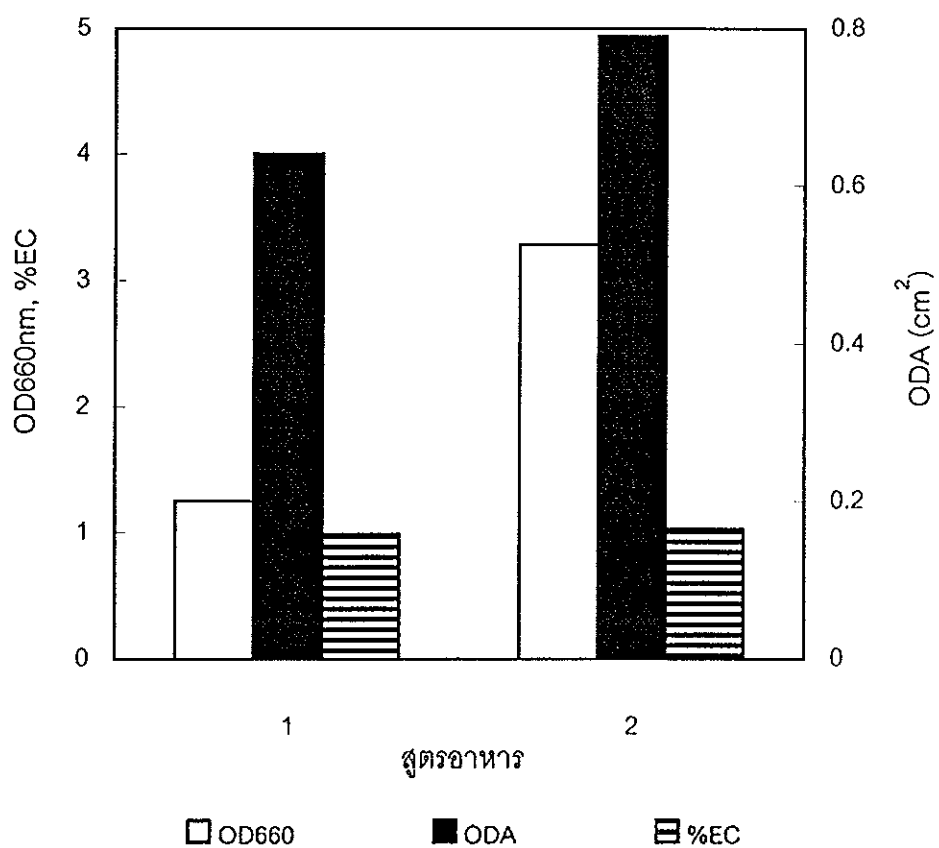
นอกจากนี้เมื่อทำการเลี้ยงแบคทีเรียทั้งสองชนิดในอาหาร MB2 เปรียบเทียบกับอาหาร MB1 พบว่า เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร MB2 มีผลทำให้แบคทีเรียทั้ง *Pasteurella* PA6 และ *Acinetobacter* S7 สามารถเจริญได้ดีขึ้น โดยมีค่าการเจริญจากการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตรเพิ่มขึ้นจาก 2.45 เป็น 3.51 และ 1.25 เป็น 3.28 ตามลำดับ (ภาพที่ 8 และภาพที่ 9 ตามลำดับ) เมื่อตรวจดูความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่า การใช้อาหาร MB2 เลี้ยง *Pasteurella* PA6 ไม่มีผลทำให้มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มขึ้น(ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ) แต่เมื่อใช้เลี้ยง *Acinetobacter* S7 พบว่าอาหาร MB2 ช่วยให้ค่าการผลิตเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากเดิมค่า %EC และ ODA เท่ากับ 0.99 และ 0.64 ตารางเซนติเมตร ตามลำดับ เพิ่มขึ้นเป็น 1.03 และ 0.79 ตารางเซนติเมตร ตามลำดับ ดังนั้นในการทดลองต่อไปของ *Pasteurella* PA6 และ *Acinetobacter* S7 จึงมีการใช้อาหาร MB2 แทน อาหาร MB1 และเลือกใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน

4.1.2 ผลของปริมาณของแหล่งคาร์บอน

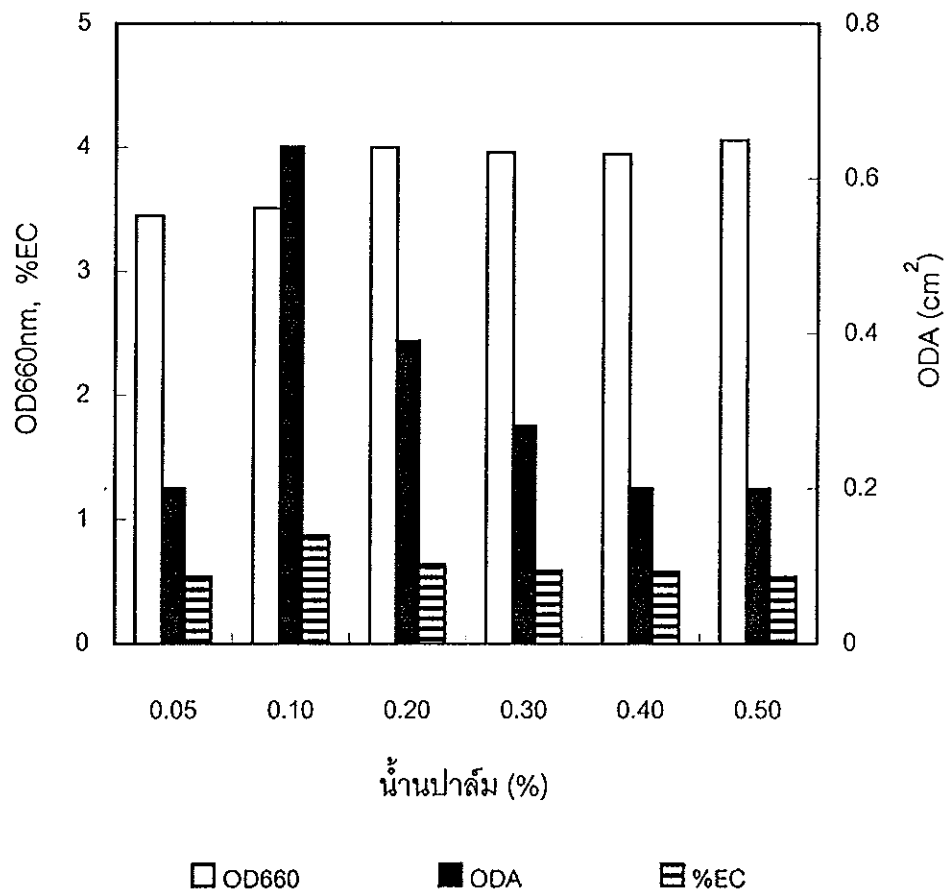
นอกจากชนิดของแหล่งคาร์บอนจะมีความสำคัญต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแล้วปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมก็มีความสำคัญเช่นกัน โดยปริมาณของน้ำมันปาล์มที่มากหรือน้อยเกินไปจะทำให้การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่ำ การศึกษาปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งมีการผันแปรน้ำมันปาล์มในปริมาณต่าง ๆ คือ 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนของ *Acinetobacter* S7 มีการผันแปรปริมาณน้ำมันปาล์มเพิ่มขึ้นคือ 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 และ 6.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่า *Pasteurella* PA6 มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สูงที่สุดเมื่อใช้น้ำมันปาล์มในปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ คือมีค่า %EC และ ODA เท่ากับ 0.87 และ 0.64 ตารางเซนติเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ 10) แต่สำหรับ *Acinetobacter* S7 มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สูงที่สุดเมื่อใช้น้ำมันปาล์มในปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ มีค่า %EC และ ODA เท่ากับ



ภาพที่ 8 การเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวของ *Pasteurella* PA6 ในอาหาร 2 สูตร คือ 1) MB1 + 0.1% น้ำมันปาล์ม และ 2) MB2 + 0.1% น้ำมันปาล์ม



ภาพที่ 9 การเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวของ *Acinetobacter* S7 ในอาหาร 2 สูตร คือ 1) MB1 + 0.1% น้ำมันปาล์ม และ 2) MB2 + 0.1% น้ำมันปาล์ม



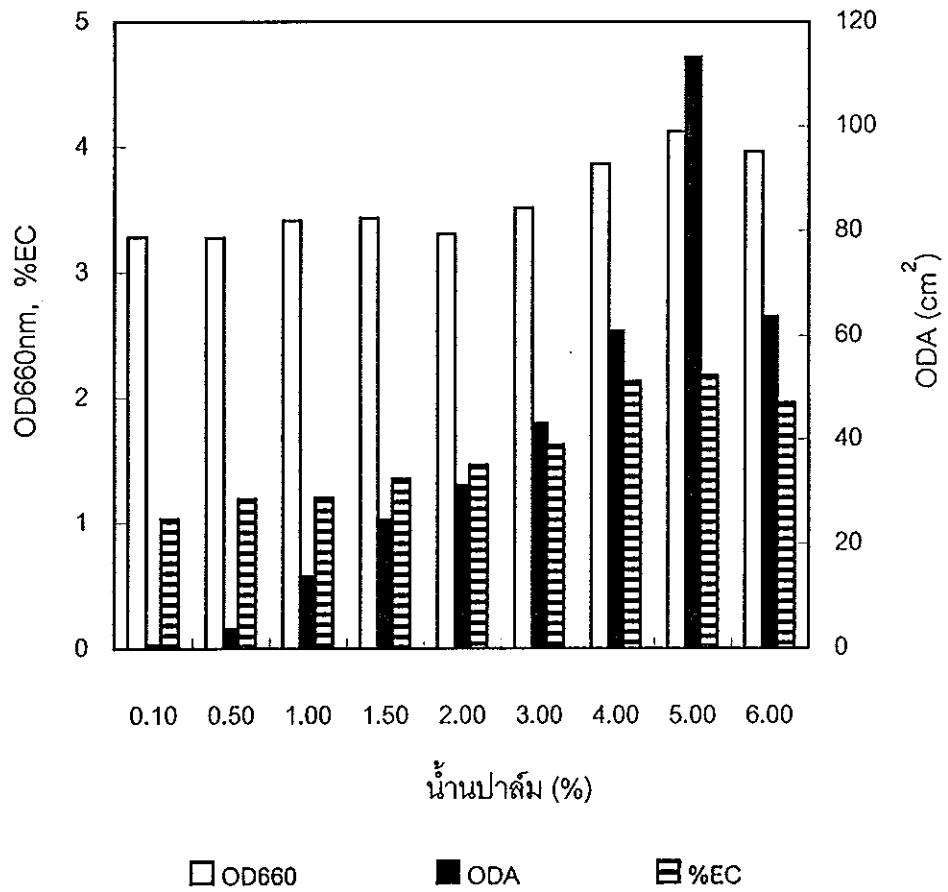
ภาพที่ 10 ผลของปริมาณน้ำมันปาล์มในอาหาร MB2 ต่อการเจริญ %EC และ ODA ของ *Pasteurella* PA6 ในชั่วโมงที่ 36

2.18 และ 113.14 ตารางเซนติเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ 11) ในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้ น้ำมันปาล์ม 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนของ *Pasteurella* PA6 และใช้น้ำมันปาล์ม 5.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนของ *Acinetobacter* S7

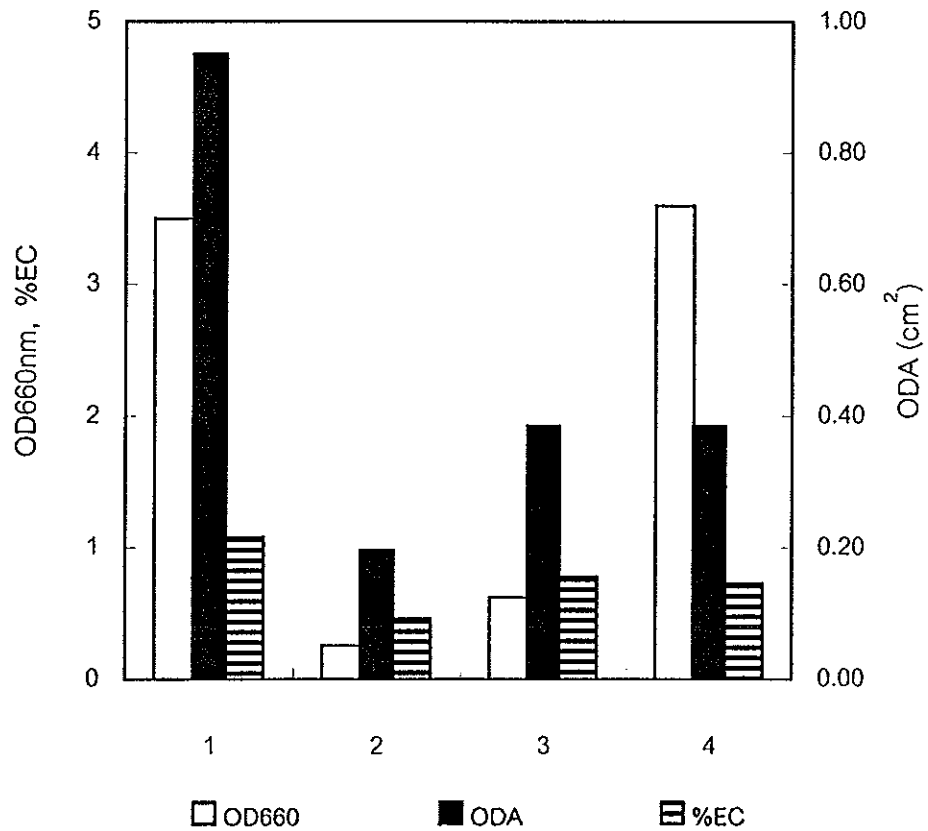
4.2 ผลของยีสต์สกัด (yeast extract) และแบคโตเปปโติน (bacto peptone)

ยีสต์สกัด และแบคโตเปปโติน ปริมาณ 0.1 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ในอาหาร MB2 เป็น แหล่งอาหารเสริมประเภทวิตามินและแร่ธาตุ การทดลองในขั้นนี้จึงทดสอบว่ายีสต์สกัดและ/ หรือแบคโตเปปโตินที่มีผลอย่างไรต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ แบคทีเรียทั้งสายพันธุ์ *Pasteurella* PA6 และ *Acinetobacter* S7 ผลการทดลองแสดงดัง ภาพที่ 12 และ 13 ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบกับอาหาร MB2 ทั้งหมด 4 สูตร คือ อาหาร MB2 ที่มีทั้งยีสต์สกัดและแบคโตเปปโติน อาหาร MB2 ที่ไม่มีทั้งยีสต์ สกัดและแบคโตเปปโติน อาหาร MB2 ที่มียีสต์สกัดแต่ไม่มีแบคโตเปปโตินและอาหาร MB2 ที่ไม่มียีสต์สกัดแต่มีแบคโตเปปโติน พบว่า อาหาร MB2 ที่ไม่มียีสต์สกัดแต่มีแบคโตเปปโติน มีผลส่งเสริมให้แบคทีเรีย *Pasteurella* PA6 มีการเจริญที่ดีที่สุดรองลงมาคือ อาหาร MB2 ที่ มีทั้งยีสต์สกัดและแบคโตเปปโติน และอาหาร MB2 ที่มียีสต์สกัดแต่ไม่มีแบคโตเปปโติน โดย *Pasteurella* PA6 มีการเจริญได้น้อยมากที่สุดในการอาหาร MB2 ที่ไม่มีทั้งยีสต์สกัดและแบคโต เปปโติน วัดค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 3.60, 3.50, 0.62 และ 0.25 ตามลำดับ จากการ ทดลองเห็นว่าอาหาร MB2 ที่มีแบคโตเปปโตินนั้นมีผลส่งเสริมต่อการเจริญของ *Pasteurella* PA6 ได้มากกว่ายีสต์สกัด แต่เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิว พบ ว่า เมื่อเลี้ยงในอาหาร MB2 ที่ไม่มียีสต์สกัดแต่มีแบคโตเปปโตินให้ค่า %EC และ ODA เท่า กับ 0.73 และ 0.39 ตารางเซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งได้น้อยกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหาร MB2 ที่มี ทั้งยีสต์สกัดและแบคโตเปปโตินคือมีค่า %EC และ ODA เท่ากับ 1.08 และ 0.95 ตาราง เซนติเมตร ตามลำดับ นั่นคือการที่มียีสต์สกัดร่วมอยู่ด้วยกับแบคโตเปปโตินในอาหาร MB2 มีผลให้ *Pasteurella* PA6 มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทาง สถิติ

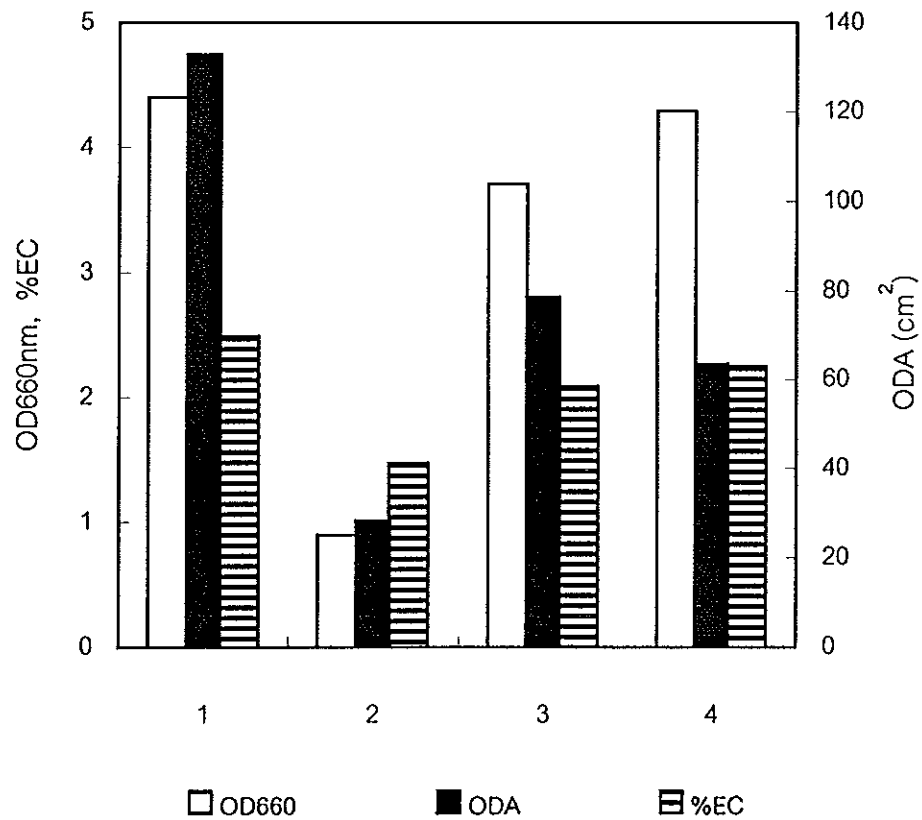
ในการทดลองเช่นเดียวกันของ *Acinetobacter* S7 พบว่า สามารถเจริญและผลิต สารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหาร MB2 ที่มีทั้งยีสต์และแบคโตเปปโติน คือ มีค่าการเจริญเท่ากับ 4.40 และมีค่า %EC และ ODA เท่ากับ 2.49 และ 132.79 ตาราง



ภาพที่ 11 ผลของปริมาณน้ำมันปาล์มในอาหาร MB2 ต่อการเจริญ %EC และ ODA ของ *Acinetobacter* S7 ในชั่วโมงที่ 36



ภาพที่ 12 ผลของปริมาณยีสต์สกัด และแบคทีเรียเปปโตโนในอาหาร MB2 ต่อการเจริญ %EC และ ODA ของ *Pasteurella* PA6 ในชั่วโมงที่ 36 (1=MB2 ที่มียีสต์สกัดและแบคทีเรียเปปโตโน+0.1% น้ำมันปลา, 2=MB2 ที่ไม่มียีสต์สกัดและแบคทีเรียเปปโตโน+0.1% น้ำมันปลา, 3=MB2 ที่มียีสต์สกัดแต่ไม่มีแบคทีเรียเปปโตโน+ 0.1% น้ำมันปลา, 4=MB2 ที่ไม่มียีสต์สกัดแต่มีแบคทีเรียเปปโตโน+0.1% น้ำมันปลา)



ภาพที่ 13 ผลของปริมาณยีสต์สกัด และแบคทีเรียเปปโตโนในอาหาร MB2 ต่อการเจริญ %EC และ ODA ของ *Acinetobacter S7* ในชั่วโมงที่ 36 (1=MB2 ที่มียีสต์สกัดและแบคทีเรียเปปโตโน+ 5.0% น้ำมันปาล์ม, 2=MB2 ที่ไม่มียีสต์สกัดและแบคทีเรียเปปโตโน + 5.0% น้ำมันปาล์ม, 3 = MB2 ที่มียีสต์สกัดแต่ไม่มีแบคทีเรียเปปโตโน + 5.0% น้ำมันปาล์ม, 4=MB2 ที่ไม่มียีสต์สกัดแต่มีแบคทีเรียเปปโตโน+5.0% น้ำมันปาล์ม)

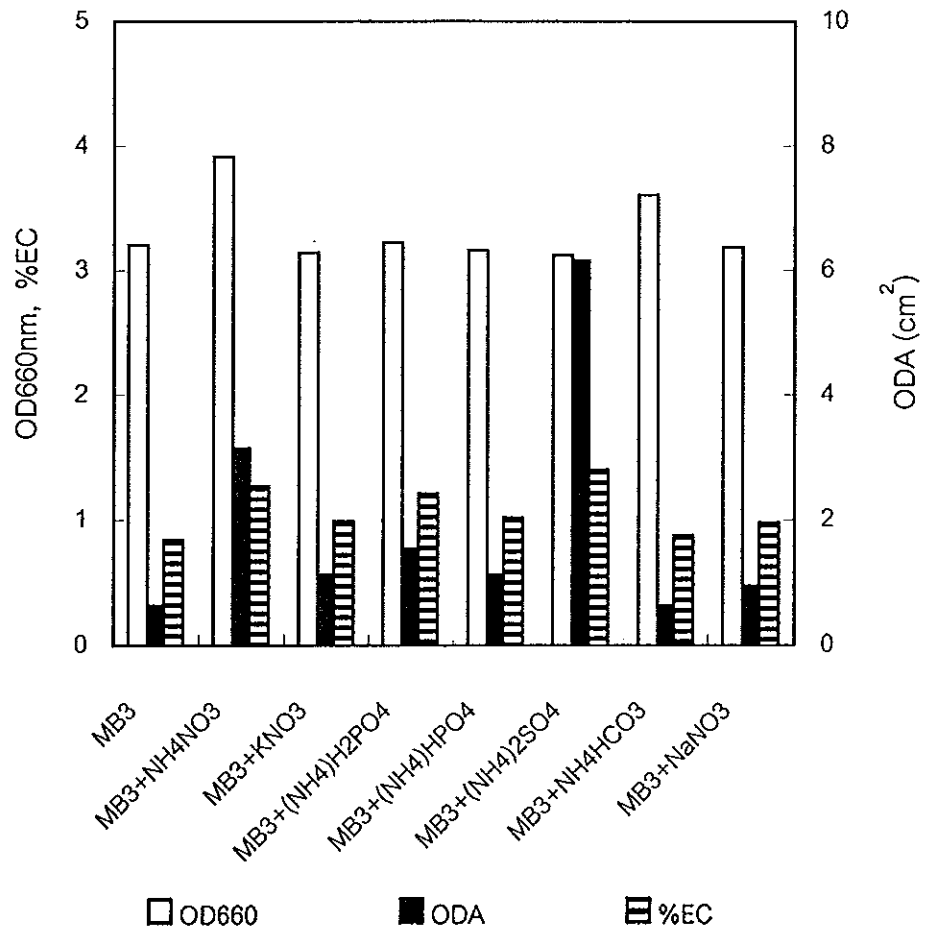
เซนติเมตร ตามลำดับ ในส่วนของอาหาร MB2 ที่มียีสต์สกัดหรือมีแบคทีเรียเปปโตโนอย่างเดียวย พบว่า *Acinetobacter* S7 มีสามารถในการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวได้ใกล้เคียงกัน แต่มีปริมาณที่น้อยกว่า ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเมื่อเลี้ยงในอาหาร MB2 ที่มีทั้งยีสต์และแบคทีเรียเปปโตโน นอกจากนี้พบว่า *Acinetobacter* S7 มีการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวได้น้อยที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหาร MB2 ที่ไม่มีทั้งยีสต์สกัดและแบคทีเรียเปปโตโน จากการทดลองนี้แสดงว่าทั้งยีสต์สกัดและแบคทีเรียเปปโตโนมีส่วนสำคัญในการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Acinetobacter* S7

จากการศึกษาของ Fox และ Bala (2000) พบว่าการใช้อาหาร potato medium เลี้ยง *B. subtilis* ในการผลิต surfactin เมื่อมีการเติมยีสต์สกัดและแบคทีเรียเปปโตโนไม่มีผลต่อการผลิต surfactin และการใช้มันฝรั่งเพียงอย่างเดียวทำให้ค่าแรงตึงผิวในน้ำหมักมีค่าลดลงได้ แต่จากการศึกษาของ Cooper และ Paddock (1984) พบว่ายีสต์สกัดมีผลต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวจาก *Torulopsis bombicola* แต่เมื่อใช้แบคทีเรียเปปโตโนแทนยีสต์สกัดมีผลทำปริมาณมวลเซลล์และการผลิต glycolipid ลดลงเหลือครึ่งหนึ่ง แต่สำหรับ *Pasteurella* PA6 และ *Acinetobacter* S7 การใช้อาหาร MB2 ที่มีทั้งยีสต์สกัดและแบคทีเรียเปปโตโนช่วยส่งเสริมการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

4.3 แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์

4.3.1 ผลของชนิดของแหล่งไนโตรเจน

จากการทดลองเลี้ยง *Pasteurella* PA6 และ *Acinetobacter* S7 ในอาหาร MB3 ที่มีน้ำมันปาล์ม 0.1 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ คือ NH_4NO_3 , KNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ และ NaNO_3 ในปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ พบว่า *Pasteurella* PA6 เจริญได้ดีที่สุดเมื่อใช้ NH_4NO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจน รองลงมาคือ $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ แต่พบว่าการผลิตสารลดแรงตึงผิวของ *Pasteurella* PA6 มีค่าสูงที่สุดเมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยให้ค่า %EC และ ODA เท่ากับ 1.40 และ 6.16 ตารางเซนติเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ 14) ต่างจากการทดลองของ Johnson และคณะ (1992) ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวจาก *Rhodotorula glutinis* IIP-30 ในการทดลองได้ใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KNO_3 และ ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน ผลที่ได้คือ KNO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจน



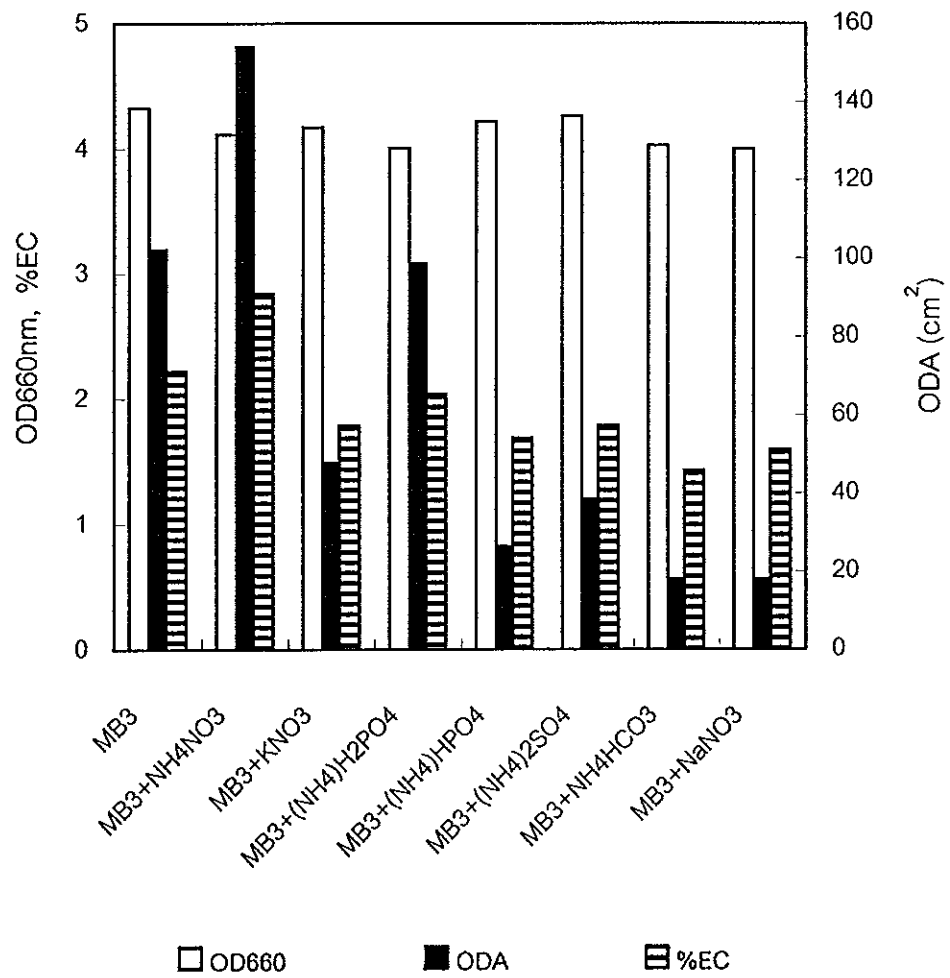
ภาพที่ 14 ผลของแหล่งไนโตรเจนในอาหาร MB3 ที่มี 0.1% น้ำมันปาล์ม ต่อการเจริญ และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pasteurella* PA6 ในชั่วโมงที่ 36

ที่ดีที่สุด แสดงได้จากการมีค่า emulsification activity เมื่อทดสอบกับ gas oil ให้ค่าสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และ ยูเรีย ซึ่งจากการทดลองยังพบว่า แหล่งไนโตรเจนมีผล โดยตรงต่อค่า emulsification activity แต่มีผลน้อยมากต่อค่าการเจริญ

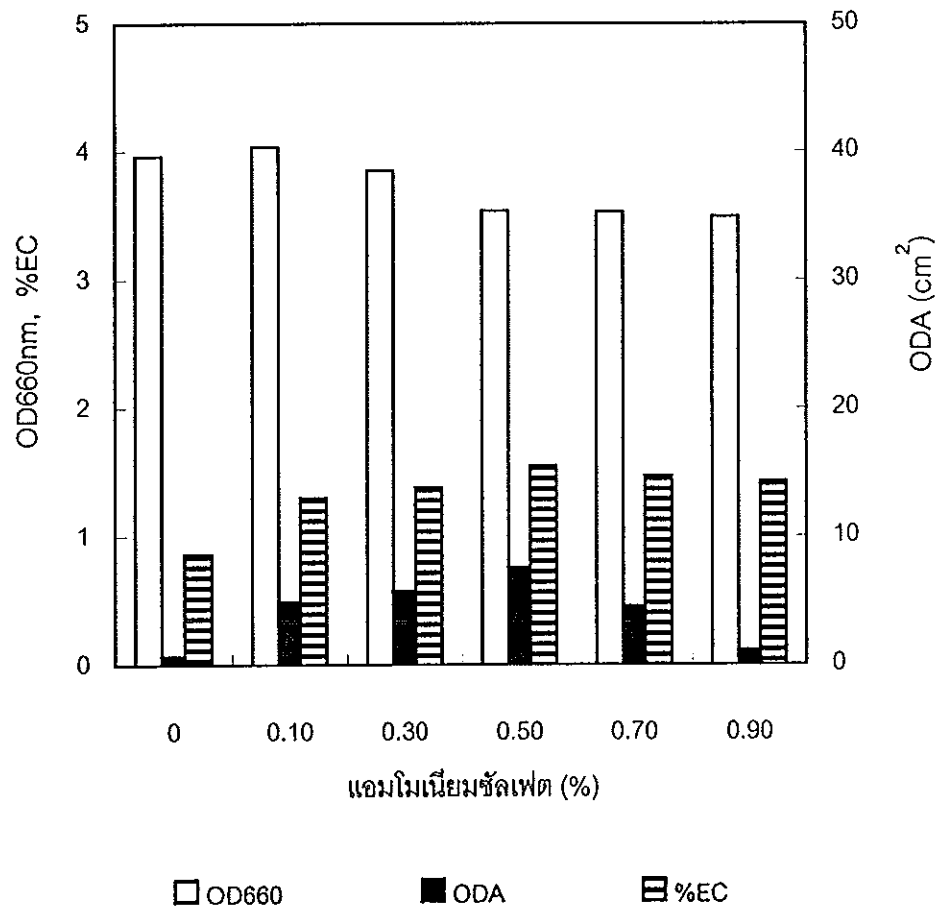
จากการศึกษาเช่นเดียวกันของ *Acinetobacter* S7 พบว่า เมื่อเลี้ยงในอาหาร MB3 ที่มีน้ำมันปาล์ม 5.0 เปอร์เซ็นต์ ใช้แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ทั้ง 7 ชนิดเปรียบเทียบกับ การเลี้ยงในอาหาร MB3 ซึ่งไม่ได้เติมแหล่งไนโตรเจน ผลแสดงดังภาพที่ 15 แบคทีเรีย สามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหาร MB3 (แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ) แต่เมื่อเปรียบเทียบค่า %EC และ ODA พบว่า NH_4NO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด ให้ค่า %EC และ ODA เท่ากับ 2.84 และ 154 ตารางเซนติเมตร ตามลำดับสอดคล้องกับการทดลองของ Sutthivanitchakul และ คณะ(1999) ศึกษาผลของชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิต surfactin จาก *Bacillus licheniformis* F2.2 โดยมีการเปรียบเทียบการใช้ NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl และ NaNO_3 พบว่า NH_4NO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด

4.3.2 ผลของปริมาณของแหล่งไนโตรเจน

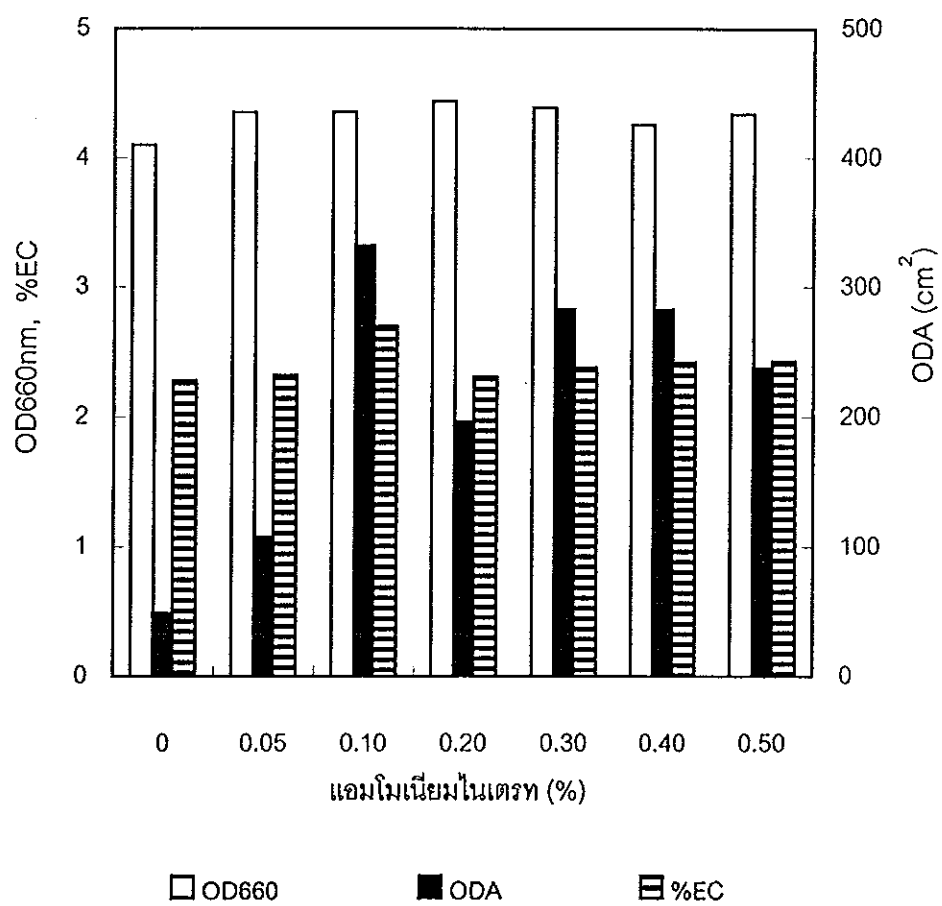
เมื่อศึกษาปริมาณ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดย *Pasteurella* PA6 ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 16 พบว่าเจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เท่ากับ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า การดูดกลืนแสงเท่ากับ 4.03 แต่พบว่ามีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีที่สุดเมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เท่ากับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่า %EC และ ODA เท่ากับ 1.55 และ 7.55 ตารางเซนติเมตร ตามลำดับ สำหรับแบคทีเรีย *Acinetobacter* S7 พบว่าปริมาณ NH_4NO_3 ที่เหมาะสมที่สุดในการเจริญคือ 0.2 เปอร์เซ็นต์ แต่ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่า ปริมาณ NH_4NO_3 ที่เหมาะสมที่สุดคือ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่า %EC และ ODA เท่ากับ 2.7 และ 332 ตารางเซนติเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ 17) ใกล้เคียงกับการทดลองของ Sutthivanithakul และคณะ(1999) พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ NH_4NO_3 แต่พบว่ามี การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus licheniformis* F2.2. ได้สูงที่สุดเมื่อมีปริมาณ NH_4NO_3 เท่ากับ 0.2 เปอร์เซ็นต์ และเช่นเดียวกับการทดลองของธนขวัญ บุษบัน(2539) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus subtilis* 3/38



ภาพที่ 15 ผลของแหล่งไนโตรเจนในอาหาร MB3 ที่มี 5.0% น้ำมันปาล์ม ต่อการเจริญ และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Acinetobacter* S7 ในชั่วโมงที่ 36



ภาพที่ 16 ผลของปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหาร MB3 ต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pasteurella* PA6 ในชั่วโมงที่ 36



ภาพที่ 17 ผลของปริมาณแอมโมเนียมไนเตรทในอาหาร MB3 ต่อการเจริญ และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Acinetobacter* S7 ในชั่วโมงที่ 36

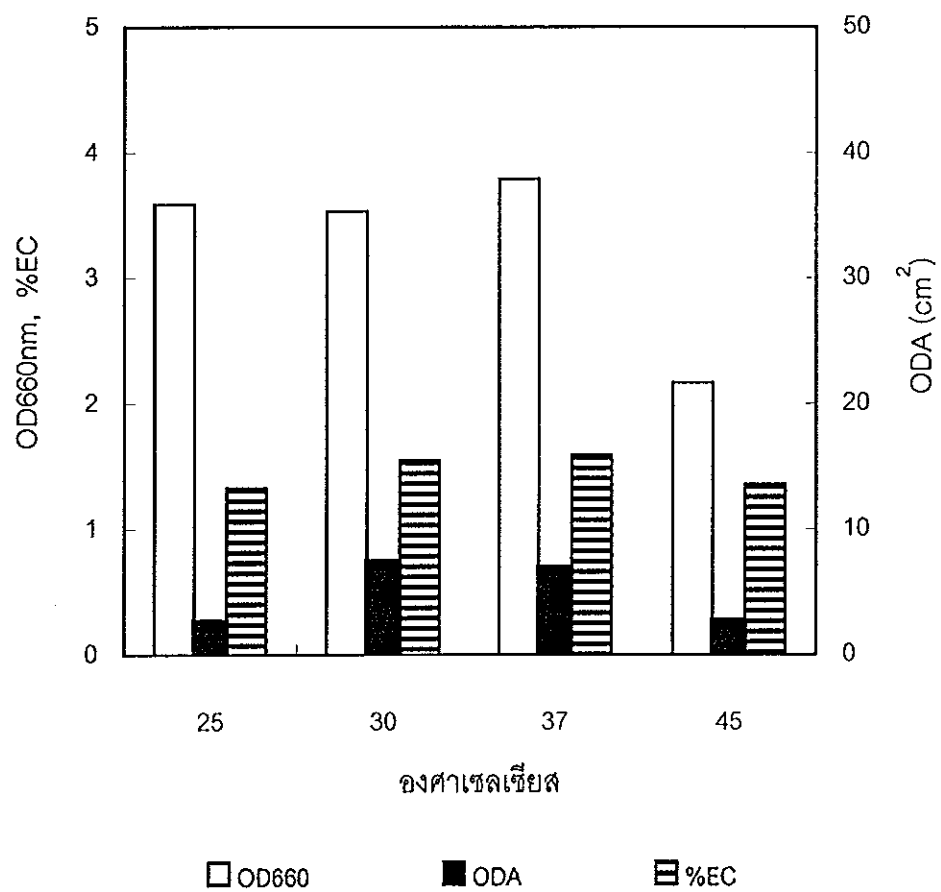
พบว่า NH_4NO_3 ปริมาณ 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด โดยให้ค่าอิมัลชันอินเด็กซ์สูงสุดเท่ากับ 74

ในการศึกษาขั้นต่อไปจึงใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ในระดับความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ *Pasteurella* PA6 และใช้ NH_4NO_3 ปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ *Acinetobacter* S7

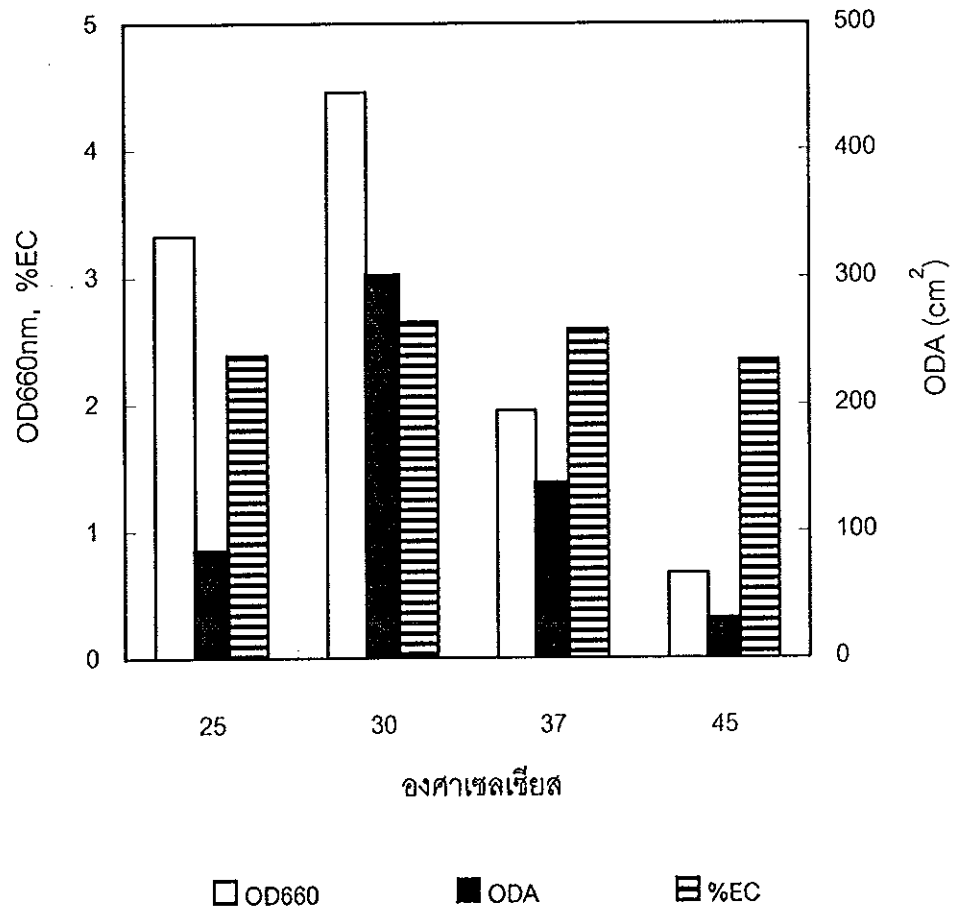
4.4 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสม

ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของ *Pasteurella* PA6 และ *Acinetobacter* S7 เพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแสดงในภาพที่ 18 และ 19 ตามลำดับ โดยทำการเลี้ยงที่ อุณหภูมิ 25, 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส พบว่า *Pasteurella* PA6 เจริญได้น้อยที่สุดที่ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และเจริญได้มากที่สุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และพบว่า การผลิตมีค่าใกล้เคียงกันที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียสคือมีค่า %EC เท่ากับ 1.55 และ 1.59 ตามลำดับ มีค่า ODA เท่ากับ 7.55 และ 7.07 ตารางเซนติเมตร ตามลำดับ จะเห็นว่าเมื่อเลี้ยง *Pasteurella* PA6 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสให้ค่า ODA สูงกว่าที่ 37 องศาเซลเซียสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียสกลับให้ค่า %EC สูงกว่าที่ 30 องศาเซลเซียสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในการทดลองขั้นต่อไปจึงคัดเลือกทั้งที่ อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส

สำหรับ *Acinetobacter* S7 เจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส คือมีค่าการเจริญวัดจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร เท่ากับ 4.45 และค่ามี %EC และ ODA เท่ากับ 2.65 และ 302 ตารางเซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการเลี้ยงในอุณหภูมิต่างๆ ดูจากค่า ODA ที่ลดต่ำลง เมื่อมีการเลี้ยงในอุณหภูมิต่ำขึ้นหรือลดลงจาก 30 องศาเซลเซียส โดยจะเห็นได้ชัดที่ อุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียส *Acinetobacter* S7 มีการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิว ได้น้อยที่สุดคือมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.67 และค่า %EC และ ODA เท่ากับ 2.35 และ 31.4 ตารางเซนติเมตร ตามลำดับ ดังนั้นจึงคัดเลือกอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สอดคล้องกับการทดลองของ ธนขวัญ บุชนัน (2539) พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus subtilis* 3/38 คือ 30 องศาเซลเซียส และเมื่อมีการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่ำมากเมื่อมีการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 และ 45 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 18 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญ และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ
ในอาหาร MB3 ของ *Pasteurella* PA6 ในชั่วโมงที่ 36



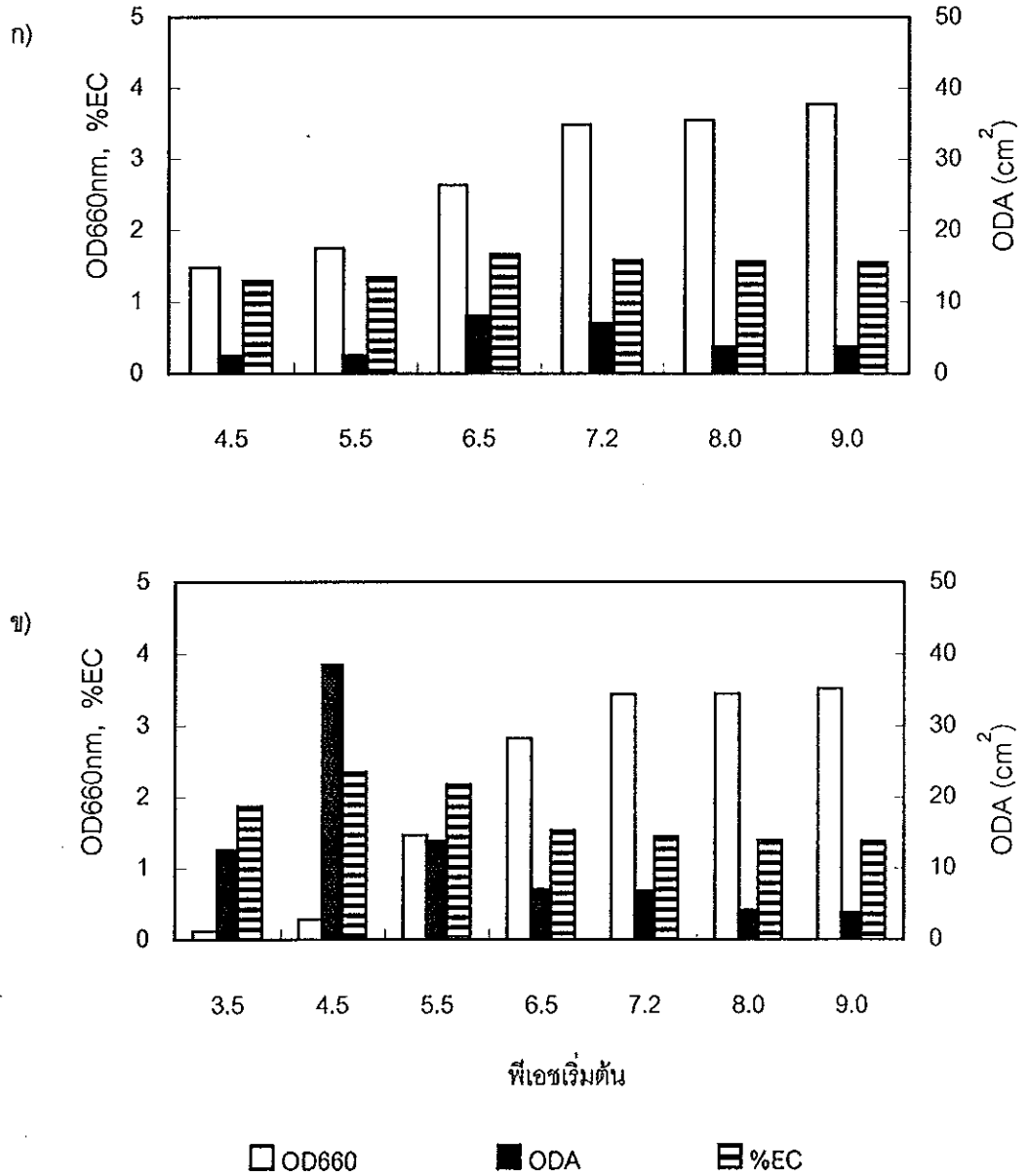
ภาพที่ 19 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญ และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ
ในอาหาร MB3 ของ *Acinetobacter* S7 ในชั่วโมงที่ 36

โดยดูจากค่าแรงดึงผิวของน้ำหมักและค่าอิมัลชันอินเด็กซ์ที่ลดต่ำลงมาก ซึ่งจากการรายงานของ Syldatk และคณะ (1985 อ้างโดย Kosaric, 1993) กล่าวว่า อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงที่เปลี่ยนแปลงไปอาจมีผลต่อโครงสร้างของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ได้

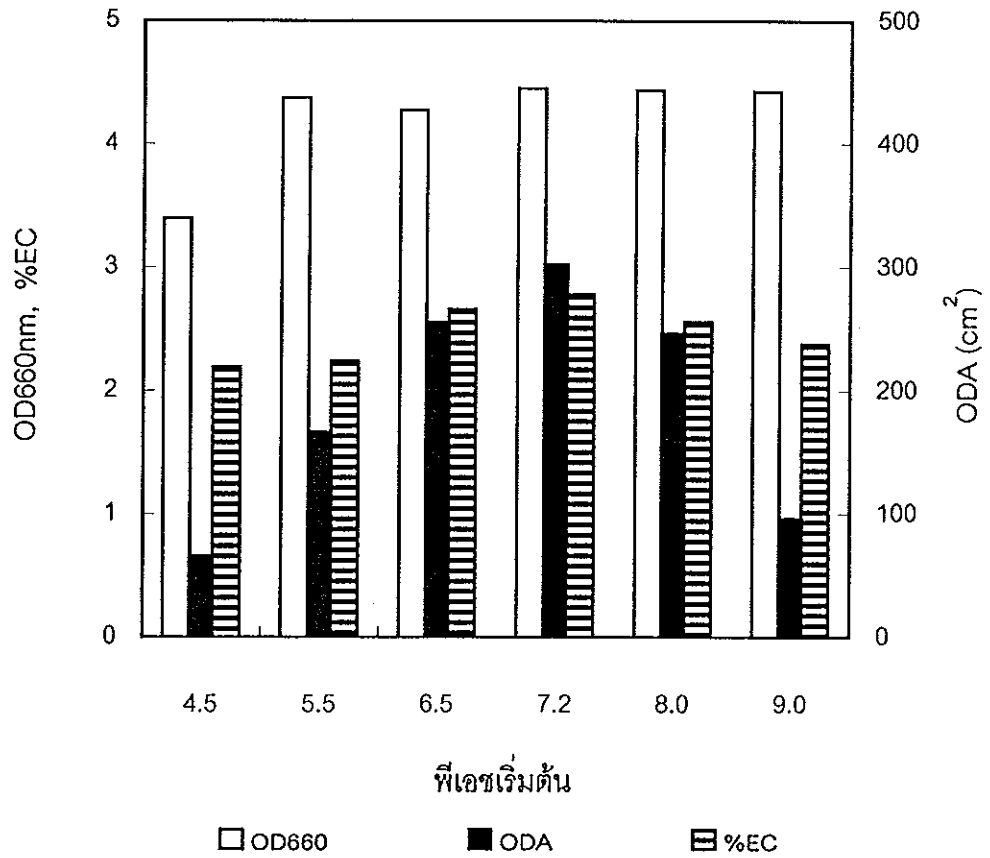
4.5 ผลของพีเอชที่เหมาะสม

เมื่อศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพของ *Pasteurella* PA6 และ *Acinetobacter* S7 โดยทำการปรับพีเอชอาหารด้วย 2.0 N HCl และ 2.0 N NaOH ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 20 และ 21 เมื่อ *Pasteurella* PA6 เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้นตั้งแต่ 4.5, 5.5, 6.5, 7.2, 8.0 และ 9.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเพิ่มการปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 3.5 เมื่อเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส พบว่า ที่ 30 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นของอาหารมีผลต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพของ *Pasteurella* PA6 เมื่อเปรียบเทียบกับ การเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่า มีการผลิตสารลดแรงดึงผิวได้ดีเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 ให้ค่า %EC และ ODA สูงที่สุดเท่ากับ 2.35 และ 38.5 ตารางเซนติเมตร ตามลำดับ และให้ค่ากิจกรรมต่ำมากเมื่อมีพีเอชเริ่มต้นของอาหารมากกว่า 7.2 ใกล้เคียงกับการทดลองของ Guerra-Santos และคณะ (1984) ศึกษาการผลิต rhamnolipid โดย *Pseudomonas* sp. เมื่อเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส มีการผลิตสูงสุดที่พีเอชในช่วง 6.0-6.5 และมีค่าการผลิตลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อพีเอชมากกว่า 7 นอกจากนี้ พบว่า *Pasteurella* PA6 มีการเจริญมากขึ้นเมื่อพีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็นต่างมากขึ้นในขณะที่มีการผลิตสารลดแรงดึงผิวได้น้อยลง นั่นคือ พีเอชมีผลต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพต่อ *Pasteurella* PA6 ในลักษณะที่ตรงกันข้ามกันคือพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวแต่กลับไม่เหมาะต่อการเจริญ ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงดึงผิวของ *Pasteurella* PA6 คือ อาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 และเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

การปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพด้วยเช่นเดียวกับการทดลองของ Johnson และคณะ (1992) ศึกษาการผลิตสารลดแรงดึงผิวจาก *Rhodotorula glutinis* IIP-30 โดยกระบวนการเลี้ยงแบบกึ่งกะ (fed batch fermentation) พบว่า สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตคือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พี



ภาพที่ 20 ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหาร MB3 ต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pasteurella* PA6 ในชั่วโมงที่ 36 เมื่อ ก) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ข) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส



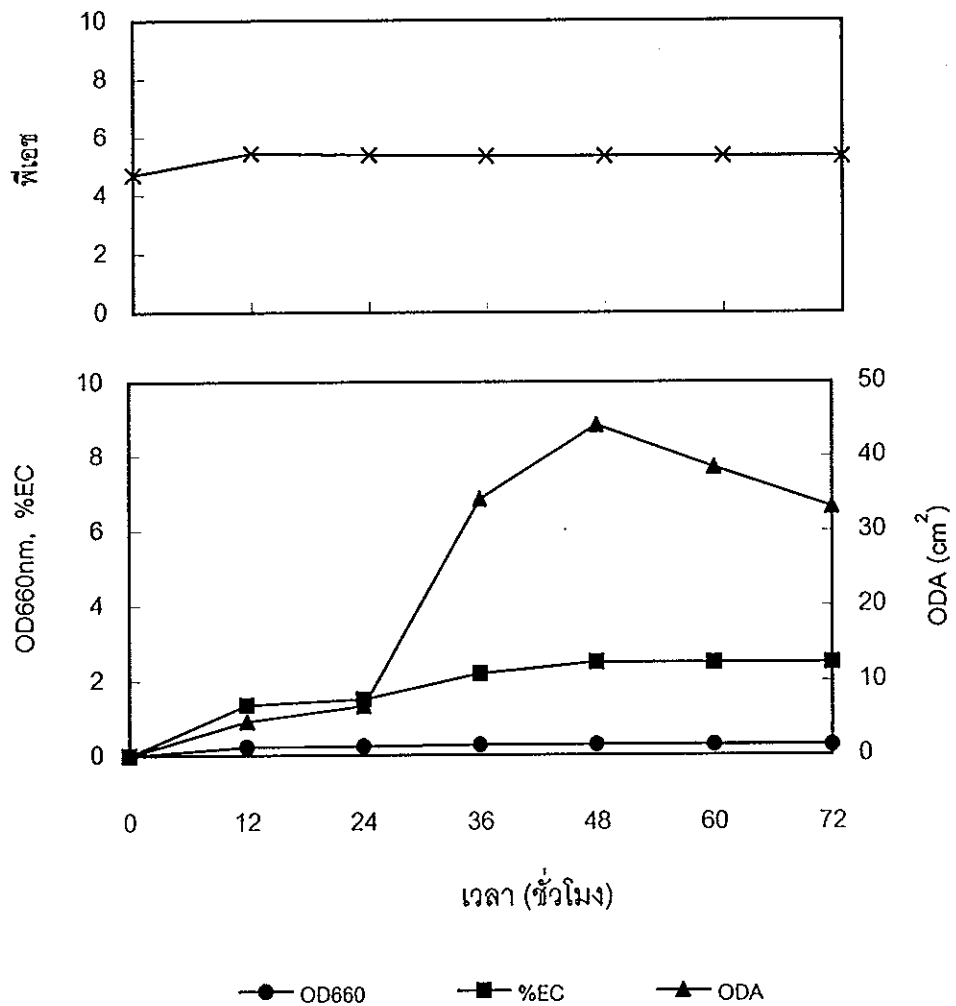
ภาพที่ 21 ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหาร MB3 ต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Acinetobacter* S7 ในชั่วโมงที่ 36 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เลข 4.0 เมื่อใช้ KNO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจนพบว่า ในสภาวะดังกล่าวมีผลช่วยส่งเสริมต่อค่า emulsification activity ตรงข้ามกับการทดลองของ Suthivanithakul และคณะ(1999) ซึ่งศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Bacillus licheniformis* F2.2 พบว่าการผลิตลดลงเมื่อปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 4.0 และ 4.5

เมื่อเลี้ยง *Acinetobacter* S7 ในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นเป็น 5.5, 6.5, 7.2, 8.0 และ 9.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่ามีการเจริญใกล้เคียงกัน และการเจริญลดลงอย่างเห็นได้ชัดในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นเป็น 4.5 โดยในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นเป็น 7.2 *Acinetobacter* S7 ผลิตสารลดแรงตึงผิวได้สูงสุดซึ่งให้ค่า %EC และ ODA เท่ากับ 2.78 และ 302 ตารางเซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อพีเอชเริ่มต้นของอาหารต่ำกว่าหรือสูงกว่า 7.2 ค่า %EC และ ODA มีแนวโน้มที่ลดลง นอกจากนี้พบว่าอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นที่ 7.2 ยังทำให้ *Acinetobacter* S7 มีการเจริญสูงที่สุดด้วย ดังนั้นจึงเลือกพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7.2 เป็นพีเอชที่เหมาะสมการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Acinetobacter* S7 ใกล้เคียงกับการทดลองของ Suthivanithakul และคณะ(1999) พบว่า *Bacillus licheniformis* F2.2 มีการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้เมื่อใช้อาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นในช่วง 7.0-9.0 และ Kim และคณะ(1997) พบว่า ในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 มีผลส่งเสริมให้ *Bacillus subtilis* C9 มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

4.6 ผลของระยะเวลาในการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เมื่อเลี้ยง *Pasteurella* PA6 ในอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพคือ อาหาร MB3 ที่มี น้ำมันปาล์ม 0.1 เปอร์เซ็นต์ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และพีเอช 4.5 พบว่า การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มขึ้นแต่มีการเจริญลดลงจากสภาวะเดิม (ภาพที่ 22) *Pasteurella* PA6 มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้อย่างรวดเร็วตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 48 ซึ่งให้ค่า %EC และ ODA สูงที่สุดคือเท่ากับ 2.49 และ 44.2 ตารางเซนติเมตร หลังจากนั้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 เป็นต้นมาค่า %EC ที่วัดได้มีค่าคงที่ ต่างกับค่า ODA ที่วัดได้มีค่าลดลงจาก 44.2 เป็น 33.2 ตารางเซนติเมตรในชั่วโมงที่ 72 ในส่วนของการเจริญพบว่า *Pasteurella* PA6 มีการเจริญได้น้อยเมื่อปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 4.5 และเริ่มมีการเจริญเข้าสู่



ภาพที่ 22 การเจริญ การเปลี่ยนแปลงพีเอชและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pasteurella* PA6 ที่สภาวะที่เหมาะสม (เมื่อเลี้ยงในอาหาร MB3 ที่มี น้ำมันปาล์ม 0.1 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 4.5)

ระยะคงที่ในช่วง 36-72 ชั่วโมงคือมีค่าการเจริญเท่ากับ 0.28 ค่าพีเอชที่วัดได้จากการเลี้ยงมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเป็น 5.3 ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24-72

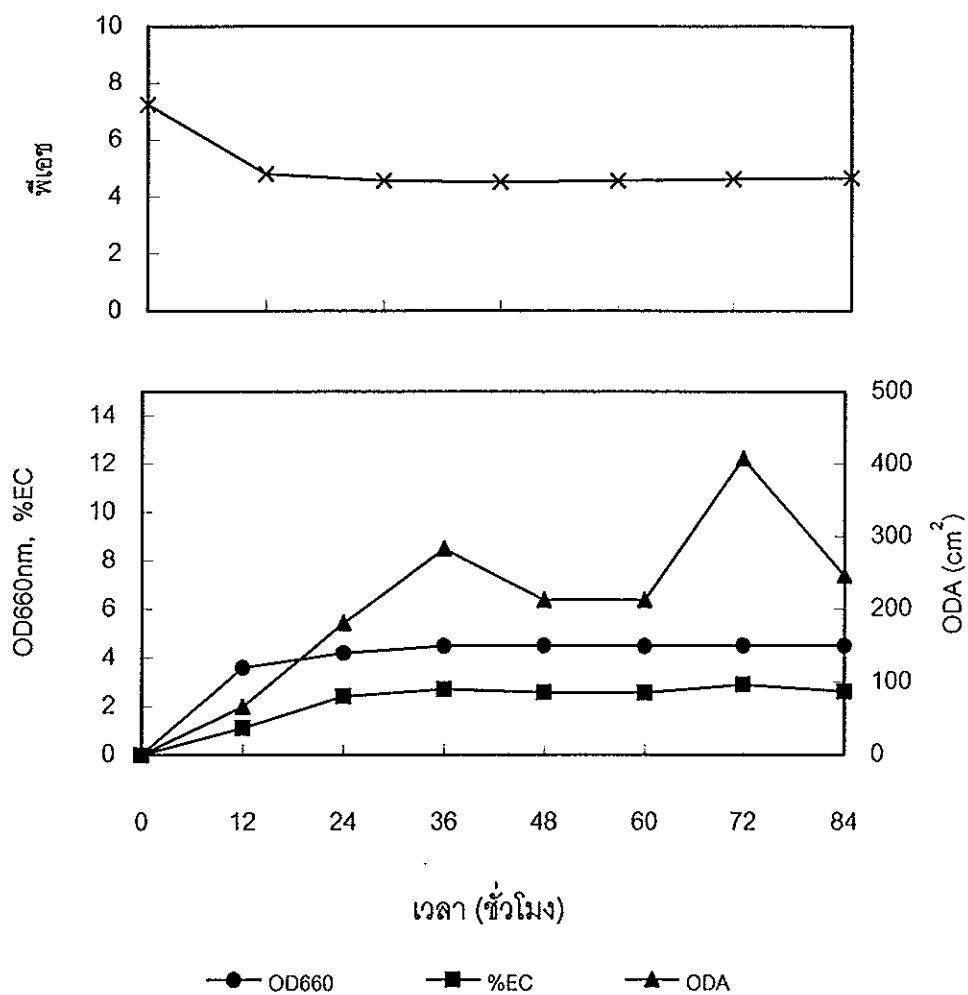
สภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพโดยแบคทีเรีย *Acinetobacter* S7 (ภาพที่ 23) คืออาหาร MB3 ที่ประกอบด้วย น้ำมันปาล์ม 5 เปอร์เซ็นต์ NH_4NO_3 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ พีเอช 7.2 พบว่า มีการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพเพิ่มขึ้นพร้อมกับการเจริญ การผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วตั้งแต่ 6-36 ชั่วโมง ซึ่งมีค่า %EC และ ODA สูงที่ 36 ชั่วโมง เท่ากับ 2.71 และ 282.9 ตารางเซนติเมตร ตามลำดับ หลังจากนั้น การผลิตเริ่มมีค่าลดลง จนกระทั่งที่ 72 ชั่วโมงมีการผลิตเพิ่มขึ้นสูงที่สุดมีค่า %EC และ ODA เท่ากับ 2.89 และ 407.3 ตารางเซนติเมตร ในส่วนของพีเอชพบว่าเริ่มมีค่าลดลงจาก 7.2 เป็น 4.80 เมื่อเลี้ยงที่ 12 ชั่วโมง และลดลงต่ำสุดเท่ากับ 4.52 ที่ 36 ชั่วโมง หลังจากนั้นค่าพีเอชมีค่าคงที่ที่ 4.5-4.6 ตลอดการเลี้ยงที่ 72 ชั่วโมง ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่ *Acinetobacter* S7 ผลิตได้เป็นสารประเภทที่มีองค์ประกอบเป็นกรด เช่นกลุ่มของกรดอะมิโนซึ่งมีผลทำให้พีเอชของอาหารมีค่าพีเอชลดต่ำลง

จากการเลี้ยงแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ในอาหารที่มีความแตกต่างกันแต่พบว่าการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพมีความสอดคล้องกัน กล่าวคือ การผลิตเกิดขึ้นเมื่อแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์มีการเจริญเข้าสู่ระยะคงที่และมีการผลิตสูงที่สุดเมื่อการเจริญอยู่ในช่วงปลายระยะคงที่ เช่นเดียวกับการศึกษาการเจริญและการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *P. aeruginosa* 195J (Deziel et al.,1996) และ *Bacillus subtilis* (Makkar and Cameotra,1997)

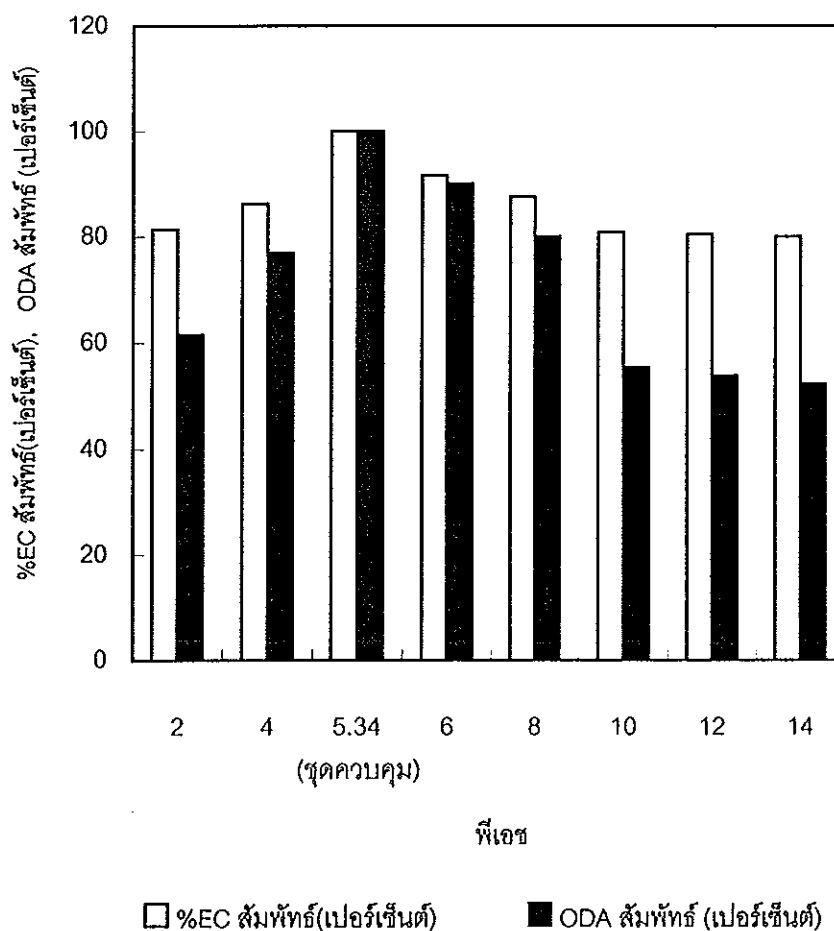
5. คุณสมบัติบางประการของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ

5.1 ความคงตัวของพีเอช

ทดลองเก็บส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยง *Pasteurella* PA6 ในอาหารที่เหมาะสมจากข้อ 4.6 โดยบ่มส่วนใสที่พีเอชต่าง ๆ ตั้งแต่ 2.0-14.0 เปรียบเทียบกับส่วนใสที่ไม่มีการปรับพีเอชที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง การทดลองดังแสดงในภาพที่ 24 พบว่าสารลดแรงดึงผิวชีวภาพจาก *Pasteurella* PA6 เมื่อพิจารณาทั้งค่า %EC และ ODA มีค่ากิจกรรมคงเหลือมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ในพีเอชช่วง 6-8 และมีค่ากิจกรรมคงเหลือสูงที่สุดเมื่อ



ภาพที่ 23 การเจริญ การเปลี่ยนแปลงพีเอชและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Acinetobacter S7* ที่สภาวะที่เหมาะสม (เมื่อเลี้ยงในอาหาร MB3 ที่มี น้ำมันปาล์ม 5.0 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมไนเตรท 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7.2)

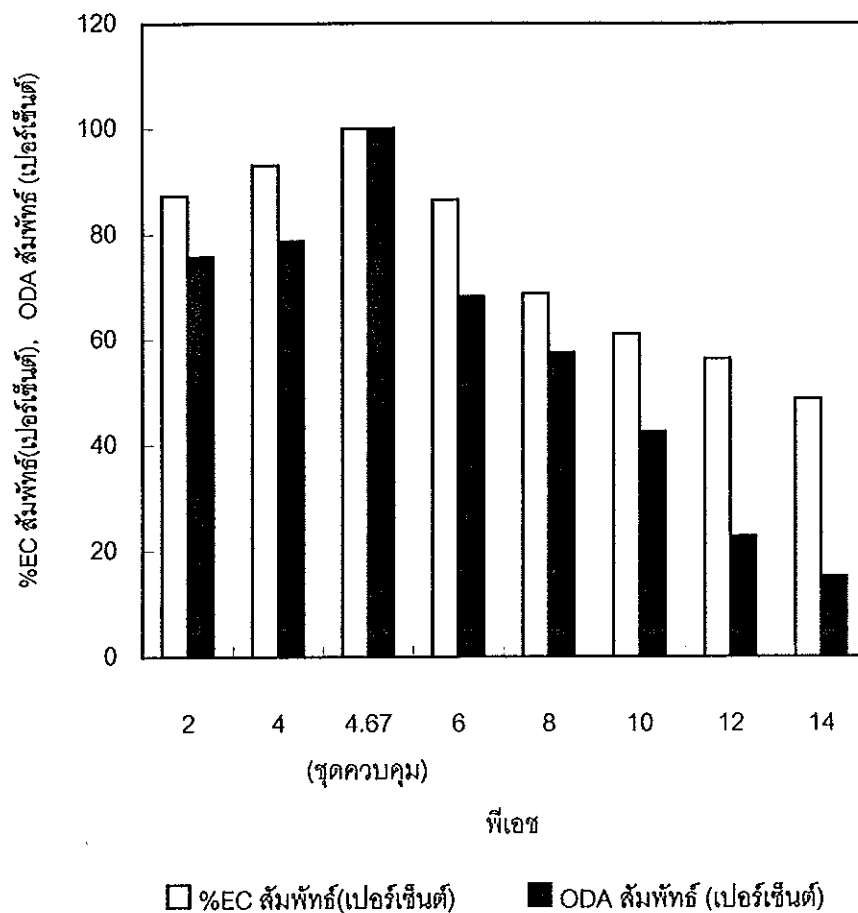


ภาพที่ 24 ผลของพีเอชต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวจาก *Pasteurella* PA6 (ปมส่วนไลที่มีพีเอชต่าง ๆ กัน ซึ่งทำการปรับพีเอชด้วย 1 M HCl หรือ NaOH ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้ววิเคราะห์ หาค่า %EC และ ODA)

ปรับพีเอชของส่วนใสเป็น 6 (มีค่า %EC และ ODA เท่ากับ 91.64 และ 90.00 ตามลำดับ) เนื่องจากเป็นสภาวะที่มีการเปลี่ยนแปลงจากเดิมน้อยที่สุด แต่หากพิจารณาเฉพาะค่า %EC พบว่าค่า %EC ในช่วงพีเอช 2.0-14.0 มีค่ามากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ถือว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Pasteurella* PA6 มีกิจกรรมในการเกิดอิมัลชันได้ดี แต่ในส่วนของ ค่า ODA พบว่าความเป็นต่างในช่วง 10.0-14.0 สารลดแรงตึงผิวมีกิจกรรมคงเหลือน้อยกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับการทดลองของ ธนขวัญ บุษบัน (2539) พบว่าเมื่อปรับพีเอชของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยง *Bacillus subtilis* 3/38 ในช่วง 2-14 แล้วนำไปบ่มที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความเสถียรต่อสภาวะที่มีพีเอช 6-12 และใกล้เคียงกับการทดลองของ Kim และคณะ 1997 พบว่า สารลดแรงตึงผิวจาก *Bacillus subtilis* C9 คงตัวได้ดีเมื่อทำการบ่มส่วนใสในสภาวะที่มีพีเอช 5.0-9.5 และมีค่า emulsifying activity ลดลงเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีพีเอชเท่ากับ 4.0 และ 10.3

ในส่วนของ *Acinetobacter* S7 ทำการทดลองเช่นเดียวกันพบว่า สารลดแรงตึงผิวมีค่ากิจกรรมที่ดีที่สุดที่พีเอช 4.0 โดยมีค่า %EC และ ODA เท่ากับ 93.09 และ 78.79 ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 25 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Acinetobacter* S7 มีความคงตัวได้ดีในสภาวะที่เป็นกรดซึ่งมีลักษณะใกล้เคียงกับการทดลองของ Navon-venezia และ คณะ (1995) ได้ศึกษาผลของพีเอชต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Acinetobacter radioresistens* โดยศึกษาพีเอชในช่วง 3.3-9.2 โดยวัดได้จากค่า emulsion turbidity พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพทำงานได้ดีที่สุดในพีเอช 5.0 ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าสารลดแรงตึงผิวมีโครงสร้างที่ใกล้เคียงกัน

เมื่อพิจารณาค่า %EC ของ *Acinetobacter* S7 พบว่าพีเอชในช่วง 2.0-6.0 มีค่ากิจกรรมของค่า %EC คงเหลือมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อปรับพีเอชเป็น 8 ค่า %EC เริ่มมีค่าลดลง และเห็นได้ชัดจากค่า ODA ที่ลดลง มีกิจกรรมคงเหลือน้อยลงกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ที่ความเป็นต่างในช่วง 10.0-14.0 โดยเมื่อปรับพีเอชเป็น 14.0 ค่า ODA ลดลงต่ำที่สุดเท่ากับ 15.15 เปอร์เซ็นต์ นั่นคือสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Acinetobacter* S7 มีความคงตัวต่อพีเอชได้น้อยกว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จาก *Pasteurella* PA6 จากการทดลองจะเห็นว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Pasteurella* PA6 และ *Acinetobacter* S7 มีความคงตัวได้น้อยในพีเอชที่เป็นด่างตั้งแต่ 10.0-14.0 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Cooper และคณะ (1981) พบว่าส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยง *Bacillus cereus* และ *Bacillus* sp. LAF 343 มี

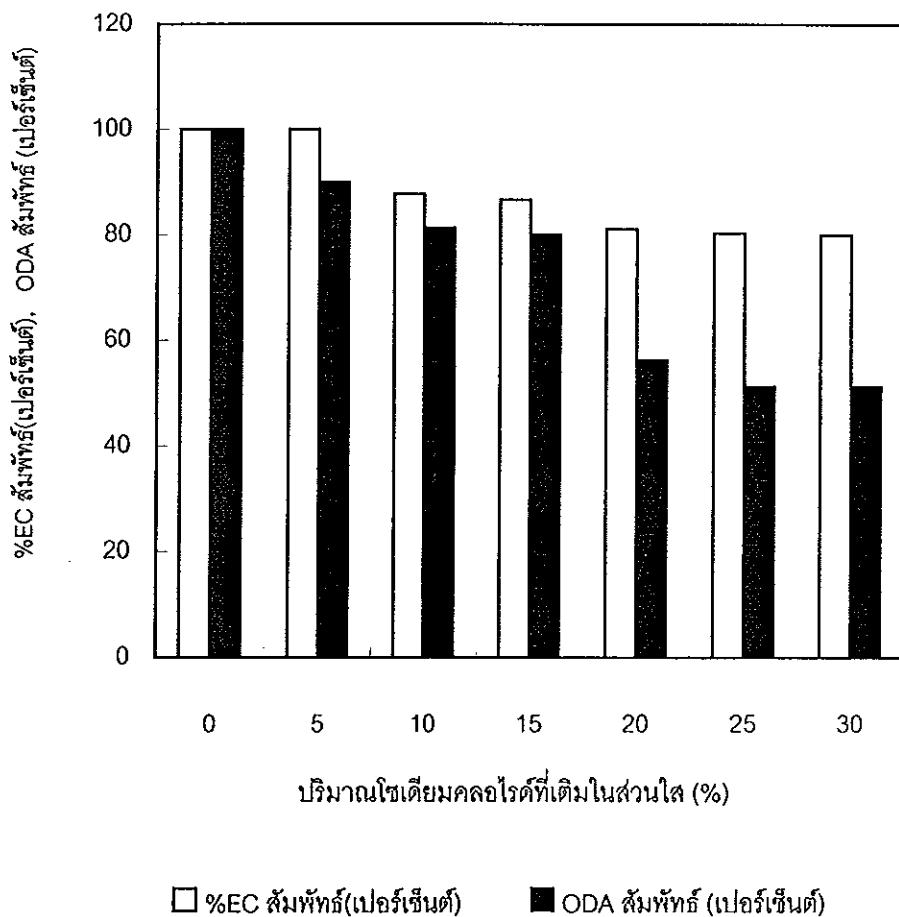


ภาพที่ 25 ผลของพีเอชต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวจาก *Acinetobacter S7* (ปมส่วนใหญ่ที่มีพีเอชต่าง ๆ กัน ซึ่งทำการปรับพีเอชด้วย 1 M HCl หรือ NaOH ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้ววิเคราะห์ หาค่า %EC และ ODA)

ความเสถียรต่อสภาวะที่มีพีเอชต่ำกว่า 7 และ 4-8 ตามลำดับ ตรงข้ามกับการทดลองของ Morikawa และ คณะ (2000) ซึ่งศึกษาผลของความคงตัวของพีเอชของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Arthrobacter* sp. MIS38 พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรียคือ arthrofactin ทำงานได้ดีขึ้นเมื่อมีการปรับพีเอชเป็นต่างมากขึ้นและที่พีเอช 13.5 ให้ค่า ODA สูงที่สุดคือ 17 ตารางเซนติเมตรต่อปริมาณของ arthrofactin 10 นาโนโมล ที่ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นต่าง เนื่องจากคุณสมบัติของ arthrofactin ที่ได้ทำการวิเคราะห์หาโครงสร้างพบว่า arthrofactin มีโครงสร้างเป็นโซ่กิ่งของหมู่คาร์บอกซิล 2 กลุ่มในสายของเพปไทด์จึงมีประจุเป็นบวกจึงมีการสูญเสียประจุเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกรดเป็นผลทำให้มีการละลายน้ำได้น้อยลงและทำให้ค่า ODA มีค่าลดลงด้วย

5.2 ความคงตัวของความเข้มข้นของเกลือ (NaCl)

ในการศึกษาผลของของความเข้มข้นของเกลือต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Pasteurella* PA6 และ *Acinetobacter* S7 มีความสำคัญในการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไปใช้ประโยชน์ เนื่องจากมีการนำไปใช้ในงานการกำจัดคราบไขมันที่ตกค้างในทะเลซึ่งมีองค์ประกอบหลักคือ เกลือโซเดียมคลอไรด์ และนอกจากนี้ ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เกลือโซเดียมคลอไรด์เป็นสารที่นำมาใช้เพื่อเพิ่มความข้นให้กับเครื่องสำอางบางชนิด (Fiedler and Umbanch, 1987 อ้างโดย Roongsawang *et al.*, 1999) ในการทดลองจึงเก็บส่วนไลต์ที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมจากข้อ 4.6 ซึ่งเดิมมีเกลือโซเดียมคลอไรด์ในสูตรอาหาร 1.94 เปอร์เซ็นต์และเกลืออื่น ๆ อีก 1.21 เปอร์เซ็นต์ บ่มส่วนไลต์หลังจากมีการเติมเกลือตั้งแต่ 5-30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที เปรียบเทียบกับส่วนไลต์ที่ไม่มีการเติมเกลือ พบว่าเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของเกลือความสามารถในการเกิดกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ มีแนวโน้มลดลงเรื่อย ๆ โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Pasteurella* PA6 มีค่ากิจกรรมที่ดีที่สุดเมื่อมีการเติมเกลือในส่วนไลต์ 5 เปอร์เซ็นต์ มีค่า %EC และ ODA เท่ากับ 89.09 และ 90.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 26) ในส่วนเฉพาะค่า %EC เมื่อมีการเติมเกลือในส่วนไลต์ 30 เปอร์เซ็นต์ยังพบว่าสารลดแรงตึงผิวจาก *Pasteurella* PA6 ยังมีกิจกรรมที่ดีคือมีค่า %EC มากกว่า 80.0 เปอร์เซ็นต์ แต่ในค่า ODA มีกิจกรรมที่ดีเมื่อมีการเติมเกลือ 5-15 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเติมเกลือ 20 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 26 ผลของความเข้มข้นของเกลือต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวจาก *Pasteurella* PA6 (บ่มส่วนใสที่มีการเติมเชื้อแบคทีเรียในปริมาณต่างๆ กัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้ววิเคราะห์หา%ECและODA)
 หมายเหตุ : ปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่เติมในส่วนใส 0 % เป็นชุดควบคุม ซึ่งเดิมมีเกลือ
 โซเดียมคลอไรด์ในสูตรอาหาร 1.94 % และเกลืออื่นๆ อีก 1.21 %

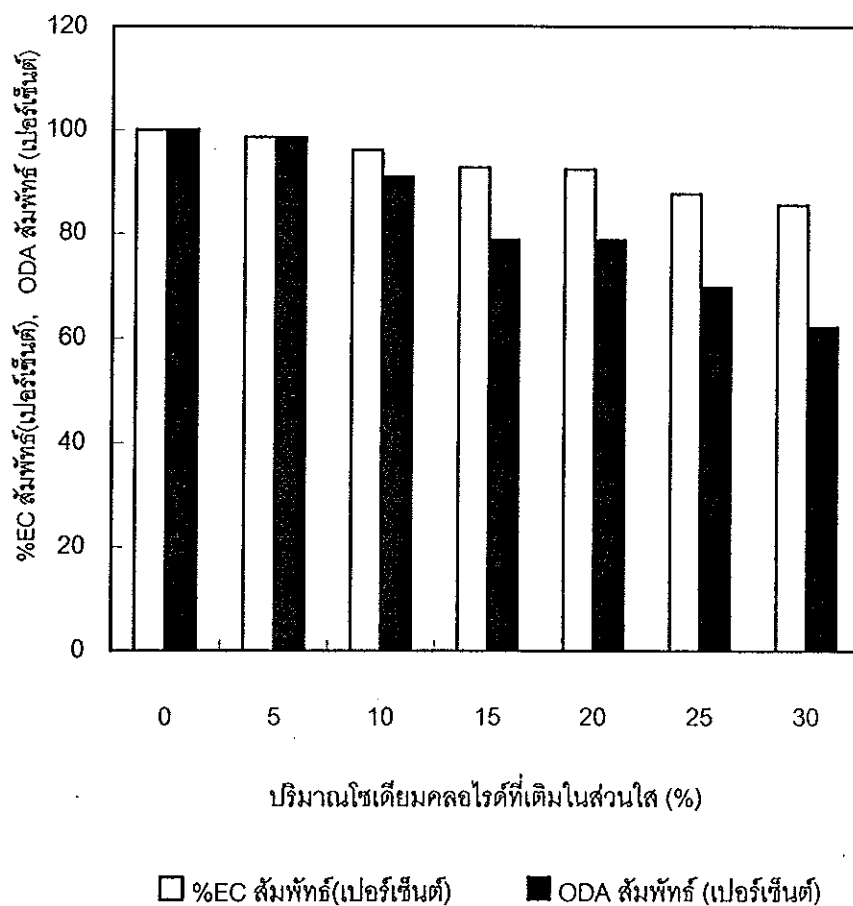
ค่า ODA ลดลงเป็น 56.25 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับการทดลองของ Roongsawang และคณะ(1999) ทดลองบ่มส่วนใสในที่มีเกล็ด ตั้งแต่ 0-30 เปอร์เซ็นต์ พบว่า สารลดแรงตึงผิวจาก *Bacillus* KP-2 มีความคงตัวต่อสภาวะที่มีเกล็ด 3-8 เปอร์เซ็นต์ และ เช่นเดียวกับการทดลองของ Suthivanithakul และคณะ(1999) พบว่า สารลดแรงตึงผิวจาก *Bacillus licheniformis* F2.2 มีความคงตัวได้ดีที่สุดในที่มีเกล็ด 5 เปอร์เซ็นต์ และมีความคงตัวได้ลดลงเมื่ออยู่ในที่มีเกล็ดมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์

เช่นเดียวกันสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Acinetobacter* S7 มีค่ากิจกรรมที่ดีที่สุดเมื่อมีการเติมเกล็ดในส่วนใส 5 เปอร์เซ็นต์ มีค่า %EC และ ODA เท่ากับ 98.55 และ 98.48 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงผลดังภาพที่ 27 ปริมาณของเกล็ดที่เพิ่มขึ้นมีผลให้กิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวลดลง อย่างไรก็ตามเมื่อมีการเติมเกล็ดในส่วนใสจนถึง 30 เปอร์เซ็นต์ ค่า %EC สัมพัทธ์ก็ยังมีค่าสูงกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ ค่า ODA สัมพัทธ์มีค่ามากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Pasteurella* PA6 และจาก *Acinetobacter* S7 แล้วพบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Acinetobacter* S7 มีความคงตัวต่อความเข้มข้นของเกล็ดได้มากกว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Pasteurella* PA6

จากการศึกษาของ Navon-venezia และคณะ(1995) ทดสอบความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Acinetobacter radioresistens* ต่อความเข้มข้นของเกล็ด พบว่า สารลดแรงตึงผิวที่ได้มีความเสถียรต่อสภาวะที่มีเกล็ด 0.5-3.0 เปอร์เซ็นต์ โดยดูจากค่า emulsifying activity ที่เปลี่ยนแปลงไปน้อยมาก

5.3 ความคงตัวต่ออุณหภูมิ

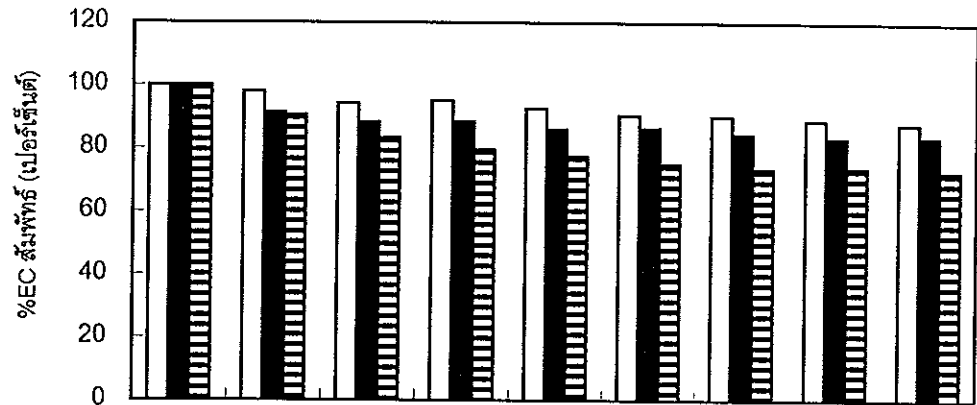
การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Pasteurella* PA6 และ *Acinetobacter* S7 เมื่อบ่มส่วนใสที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 55, 80 และ 100 องศาเซลเซียส และเก็บมาวิเคราะห์ที่เวลาทุก ๆ 30 นาที เปรียบเทียบกับส่วนในที่ไม่มีบ่มอุณหภูมิต่าง ๆ ซึ่งเห็นว่าค่า %EC และ ODA มีค่าลดลงเมื่อมีการบ่มที่เวลาเพิ่มขึ้นและอุณหภูมิต่าง ๆ ซึ่งเห็นว่าค่า %EC และ ODA มีค่าลดลงเมื่อมีการบ่มที่เวลาเพิ่มขึ้นและอุณหภูมิต่าง ๆ (ภาพที่ 28 และ 29 ตามลำดับ) เมื่อพิจารณาค่า %EC ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Pasteurella* PA6 มีความคงตัวได้ดีในทุกช่วงอุณหภูมิทำการทดลอง คือมีค่า %EC คงเหลือเมื่อทำการบ่มส่วนใสที่อุณหภูมิ 55, 80 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 240 นาที เท่ากับ 87.76 83.67 และ 72.65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ สารลดแรงตึงผิว



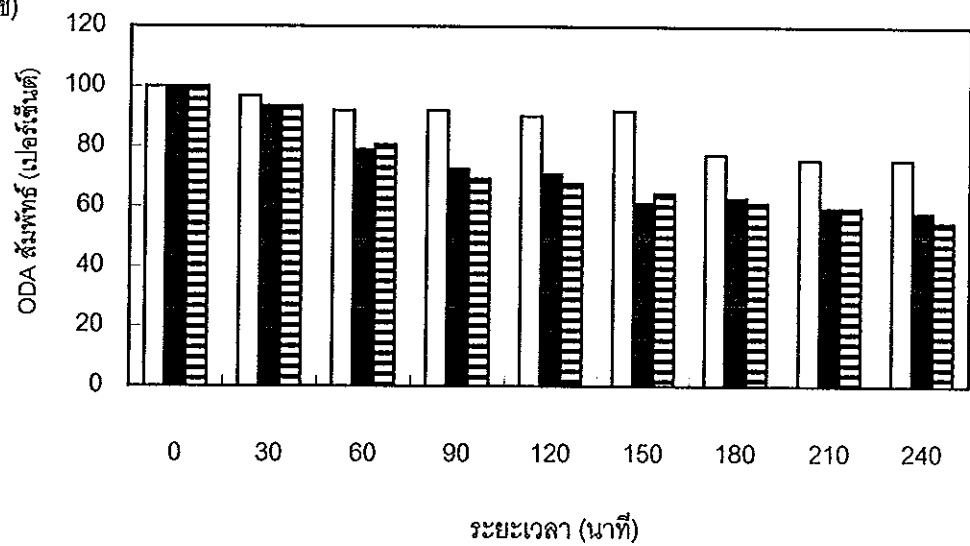
ภาพที่ 27 ผลของความเข้มข้นของเกลือต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวจาก *Acinetobacter S7* (บ่มส่วนใสที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ในปริมาณต่างๆ กัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้ววิเคราะห์หา%ECและODA)

หมายเหตุ : ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ที่เติมในส่วนใส 0 % เป็นชุดควบคุม ซึ่งเดิมมีเกลือโซเดียมคลอไรด์ในสูตรอาหาร 1.94 % และเกลืออื่น ๆ อีก 1.21 %

ก)



ข)

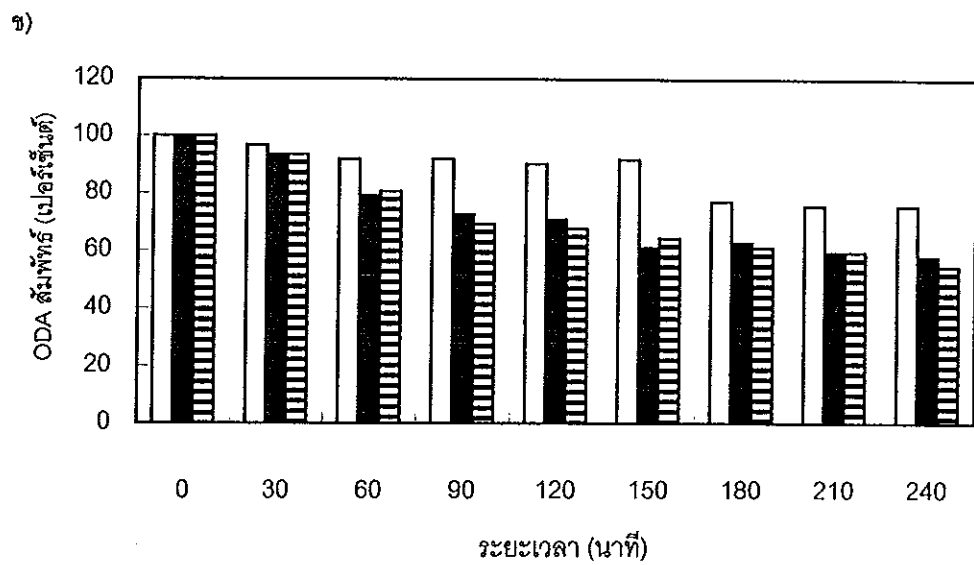
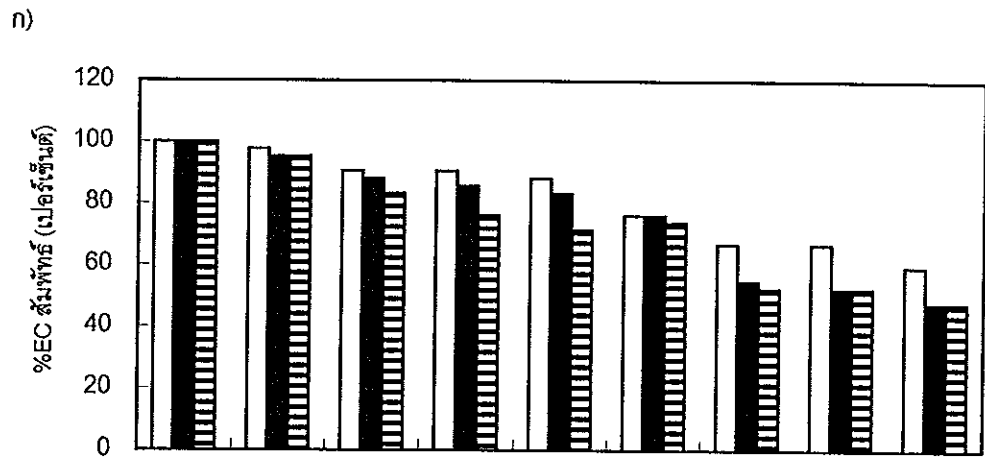


□ 55 องศาเซลเซียส

■ 80 องศาเซลเซียส

▨ 100 องศาเซลเซียส

ภาพที่ 28 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวจาก *Pasteurella* PA6 (ปมส่วนใสที่อุณหภูมิ 55, 80 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 240 นาที วิเคราะห์หา ก) %EC สัมพันธ์ และ ข) ODA สัมพันธ์)



□ 55 องศาเซลเซียส ■ 80 องศาเซลเซียส ▨ 100 องศาเซลเซียส

ภาพที่ 29 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสารลดแรงดึงผิวจาก *Acinetobacter S7* (ป้อนส่วนใสที่อุณหภูมิ 55, 80 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 240 นาที วิเคราะห์ หา ก) %EC สัมพันธ์ และ ข) ODA สัมพันธ์)

ชีวภาพจาก *Acinetobacter* S7 มีความคงต่ออุณหภูมิที่ทำการบ่มที่ 55 และ 80 องศาเซลเซียสได้ดีมาก เมื่อครบเวลาที่ 240 นาที โดยมีค่า %EC คงเหลือเท่ากับ 84.51 และ 81.48 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Acinetobacter* S7 มีความคงตัวได้ดีเมื่อผ่านการบ่มเป็นเวลา 150 นาที มีค่า %EC เท่ากับ 73.33 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นเมื่อบ่มต่อไปค่า %EC มีค่าลดลงเล็กน้อยคงเหลือ 68.15 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 240 นาที สอดคล้องกับการทดลองของ Kim และคณะ 1997 พบว่า สารลดแรงตึงผิวจาก *Bacillus subtilis* C9 คงตัวได้ดีเมื่อทำการบ่มส่วนใสที่อุณหภูมิ 20-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

แต่ถ้าหากพิจารณาค่า ODA พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Pasteurella* PA6 มีความคงตัวต่ออุณหภูมิทุกอุณหภูมิคือที่ 55, 80 และ 100 องศาเซลเซียส เมื่อมีการบ่มจนครบเวลา 150 นาทีคือมีค่า ODA เท่ากับ 76.16 76.19 และ 73.81 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่เมื่อทำการบ่มต่อไป ค่า ODA จะลดลงอย่างรวดเร็ว โดยมีค่า ODA คงเหลือเมื่อบ่มต่อจนครบเวลา 240 นาที เท่ากับ 59.52, 47.62 และ 47.62 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Acinetobacter* S7 มีความคงตัวที่ดีเมื่อทำการบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส โดยค่า ODA คงเหลือที่ 240 นาที เท่ากับ 75.81 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่ 80 และ 100 องศาเซลเซียส พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Acinetobacter* S7 มีความคงตัวได้ดีที่ 120 นาที และ 90 นาที ตามลำดับ หลังจากนั้นเมื่อทำการบ่มต่อไปที่อุณหภูมิดังกล่าวพบว่าค่า ODA มีค่าลดลงอย่างรวดเร็วจนคงเหลือค่า ODA ที่ 240 นาที เท่ากับ 58.06 และ 54.84 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สอดคล้องกับการทดลองของ ธนขวัญ บุษบัน (2539) พบว่า สารลดแรงตึงผิวจาก *Bacillus subtilis* 3/38 มีความคงตัวต่ออุณหภูมิสูงเมื่อทำการบ่มที่อุณหภูมิ 55 และ 80 องศาเซลเซียส มีความคงตัวได้ดีที่ 240 นาที แต่ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส พบว่า ค่าอิมัลชันอินเด็กซ์มีค่าลดลงเมื่อบ่มเป็นเวลา 180 นาที ส่วนค่าการกระจายของน้ำมันพบว่า เริ่มมีค่าลดลงที่ 30 นาทีแรกของการบ่ม และคงที่ไปจนตลอด 240 นาที คือมีค่า ODA เริ่มต้นเท่ากับ 36.8 ตารางเซนติเมตร และเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 55 80 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที มีค่า ODA ลดลงเป็น 36.3 36.3 และ 33.3 ตารางเซนติเมตร ตามลำดับ และเช่นเดียวกับการทดลองของ Suthivanithakul และคณะ (1999) พบว่า สารลดแรงตึงผิวจาก *Bacillus licheniformis* F2.2 มีความคงตัวได้ดีเมื่อบ่มส่วนใสที่อุณหภูมิ 55

และ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 ชั่วโมง และคงตัวได้ดีเมื่อป้อนส่วนผสมที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

จากการทดลองสารลดแรงตึงผิวจาก *Pasteurella* PA6 และ *Acinetobacter* S7 มีความคงตัวต่ออุณหภูมิได้ดีที่ 55, 80 และ 100 องศาเซลเซียส ถึงแม้ว่าระยะเวลาในการบ่มเป็น 240 นาที ยังพบว่า %EC และ ODA ของ *Pasteurella* PA6 และ *Acinetobacter* S7 มีค่ามากกว่า 70 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จึงอาจนำไปใช้ในงานที่ต้องใช้ความร้อนในกระบวนการ เช่น อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอาง เพื่อคงความเป็นอิมัลชันระหว่างน้ำกับน้ำมันได้เป็นอย่างดี

6 องค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

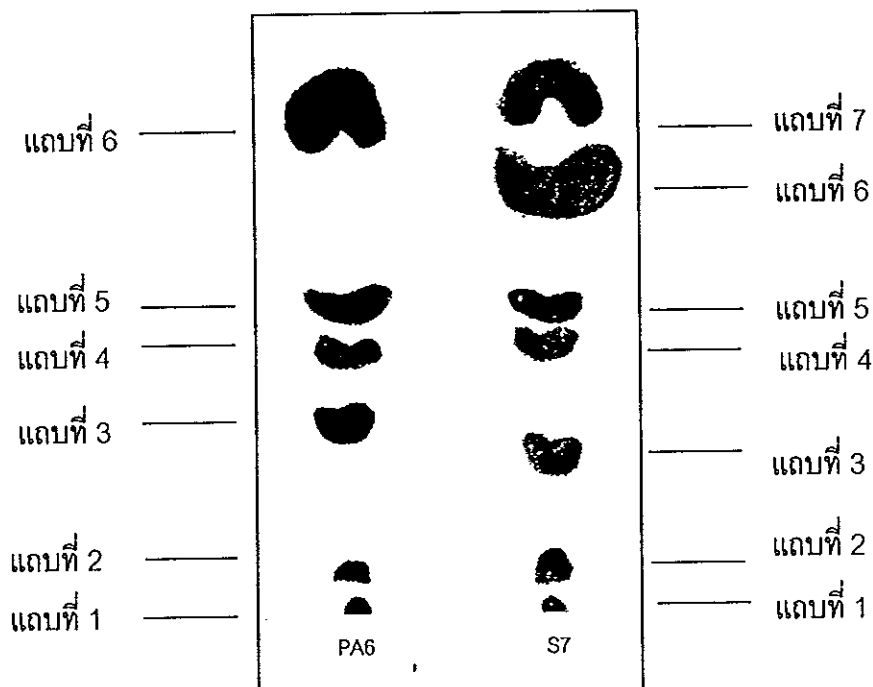
จากการเลี้ยง *Pasteurella* PA6 และ *Acinetobacter* S7 ซึ่งมีคุณสมบัติที่ดีในการอิมัลซิไฟด์ weathered oil ได้เร็วและนานที่สุด และเมื่อมีการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ยังพบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Pasteurella* PA6 และ *Acinetobacter* S7 สามารถให้ค่า %EC และ ODA ได้สูงขึ้นมา จากเริ่มต้นเมื่อเลี้ยง *Pasteurella* PA6 และ *Acinetobacter* S7 ในอาหาร MB1 ที่มี 0.1% hexadecane โดยให้ค่า %EC เท่ากับ 0.47 ± 0.08 และ 0.51 ± 0.06 ตามลำดับ และไม่พบค่า ODA จนเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 4.6 พบว่า ค่า %EC และ ODA ที่ได้จาก *Pasteurella* PA6 เป็น 2.46 และ 44.20 ตารางเซนติเมตร ตามลำดับ และจาก *Acinetobacter* S7 เป็น 2.89 และ 407.3 ตารางเซนติเมตร ตามลำดับ

นอกจากนี้ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Pasteurella* PA6 และ *Acinetobacter* S7 ยังมีความคงตัวต่อพีเอช คงตัวต่อความเข้มข้นของเกลือและคงตัวต่ออุณหภูมิได้ดีในช่วงกว้าง เมื่อนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ(crude biosurfactant) ที่แยกได้จากตะกอนและส่วนผสมที่นำมาสกัดด้วยเอธิลอะซิเตทมาตรวจหาค่า %EC และ ODA พบว่า ตรวจไม่พบค่ากิจกรรมดังกล่าวจากตะกอนที่ละลายกับ 0.02 M Tris-HCl buffer นั่นคือ ไม่มีสารลดแรงตึงผิวอยู่ในส่วนของตะกอนที่ได้จากส่วนผสมของการเลี้ยง *Pasteurella* PA6 และ *Acinetobacter* S7 แต่ส่วนผสมที่สกัดด้วยเอธิลอะซิเตท เมื่อนำมาเจือจางกับ 0.02 M Tris-HCl และนำมาหาค่ากิจกรรม พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Pasteurella* PA6 และ *Acinetobacter* S7 ให้ค่า %EC เท่ากับ 1.65 และ 2.68 ตามลำดับ และให้ค่า ODA เท่ากับ 9.88 และ 332 ตา

รางเซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งค่ากิจกรรมที่ได้ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมที่ได้ก่อนการสกัดแยกออกจากส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เหมาะสม อาจเนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีการสูญหายจากขั้นตอนในการสกัดแยก เช่น ขั้นตอนในการสกัดแยกกับเอธิลอะซิเตท ขั้นตอนในการระเหยเอธิลอะซิเตท กับเครื่องระเหยสูญญากาศ เป็นต้น

เมื่อนำ crude biosurfactant จากทั้งตะกอนและส่วนใสมาศึกษาหาองค์ประกอบและทดสอบหาสภาวะที่ดีที่สุดในการแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยการใช้วิธี Thin Layer Chromatography (TLC) พบว่าตัวทำละลายเคลื่อนที่ต่างกันและเมื่อมีการผสมสารในอัตราส่วนต่างกัน ทำให้ได้ลักษณะและปริมาณของแถบที่แยกได้บนแผ่น TLC aluminium sheets silica gel 60 F₂₅₄ แตกต่างกัน ค่า R_f ของสารในแต่ละแถบมีค่าต่างกันด้วย ซึ่ง crude biosurfactant ของ *Pasteurella* PA6 และ *Acinetobacter* S7 ที่ได้จากตะกอนไม่สามารถตรวจผลกับวิธีนี้ เนื่องจากไม่มีลักษณะของแถบที่แยกจากกันได้ถึงแม้มีการใช้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ต่าง ๆ กัน แตกต่างจาก crude biosurfactant ที่ได้จากส่วนใสโดยสามารถแยกแถบได้ดีที่อัตราส่วนของตัวทำละลาย CHCl₃ : C₆H₁₄O : CH₃COOH : H₂O เป็น 60: 30 : 1: 1 และสามารถวัดค่า R_f แสดงผลดังภาพที่ 30 และตารางที่ 10

ในการหาองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จาก *Pasteurella* PA6 และ *Acinetobacter* S7 โดยใช้วิธีวิเคราะห์องค์ประกอบบนแผ่น TLC aluminium sheets silica gel 60 F₂₅₄ เมื่อทดสอบกับ alkaline potassium permanganate ให้จุดสีเหลืองบนพื้นสีม่วงแล้วจะเปลี่ยนเป็นจุดสีเทาบนพื้นสีน้ำตาล แสดงว่าอาจมีสารในพวก sugar alcohols, glycosides, reducing หรือ non-reducing sugar จากการทดสอบกับ ไอโอดีน (Iodine) พบแถบที่เป็นสีน้ำตาลแสดงว่ามีองค์ประกอบที่เป็นคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ sugar mercaptals, alcohols, glycosides, hexonicacides, N-acylamino sugar และ neutral หรือ acidic polysaccharide หรืออาจเป็นพวกไขมันที่มี non-reducing carbohydrates เป็นองค์ประกอบ เมื่อทดสอบกับ rhodamine 6G ปรากฏจุดสีน้ำเงินและสีเหลืองบนพื้นสีส้มอมชมพู แสดงว่าเป็นสารในกลุ่มไขมันเมื่อทดสอบภายใต้แสงยูวีได้แถบสีน้ำเงินม่วง เป็นสารกลุ่มอะมิโนซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับกลุ่มอัลดีไฮด์อิสระ (free aldehyde groups) ในแผ่น TLC aluminium sheets silica gel 60 F₂₅₄ และการทดสอบกับ ninhydrin ปรากฏเพียงสีเทาแดง แสดงว่าอาจมีองค์ประกอบของอะมิโนในกลุ่มของ histidine หรือ glycine (Dawson et al., 1986)



ภาพที่ 30 ลักษณะและปริมาณของแถบที่แยกได้ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Pasteurella* PA6 และ *Acinetobacter* S7 โดยใช้วิธีวิเคราะห์บนแผ่น TLC aluminium sheets silica gel 60 F₂₅₄ เมื่อเคลื่อนที่ในอัตราส่วนของตัวทำละลาย $\text{CHCl}_3 : \text{C}_6\text{H}_{14}\text{O} : \text{CH}_3\text{COOH} : \text{H}_2\text{O}$ เป็น 60: 30 : 1: 1

* ค่า R_f ของสารลดแรงตึงผิวที่แยกได้จาก *Pasteurella* PA6 บนแผ่น TLC aluminium sheets silica gel 60 F₂₅₄ โดยแถบที่ 1 = 0, แถบที่ 2 = 0.06, แถบที่ 3 = 0.27, แถบที่ 4 = 0.37, แถบที่ 5 = 0.44 และแถบที่ 6 = 0.73

** ค่า R_f ของสารลดแรงตึงผิวที่แยกได้จาก *Acinetobacter* S7 บนแผ่น TLC aluminium sheets silica gel 60 F₂₅₄ โดยแถบที่ 1 = 0, แถบที่ 2 = 0.04, แถบที่ 3 = 0.20, แถบที่ 4 = 0.36, แถบที่ 5 = 0.41, แถบที่ 6 = 0.59 และ แถบที่ 7 = 0.70

ตารางที่ 10 ผลของสารทดสอบต่อสารลดแรงดึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *Pasteurella* PA6 และ *Acinetobacter* S7 บนแผ่น TLC aluminium sheets silica gel 60 F₂₅₄ เมื่อเคลื่อนที่ในอัตราส่วนของตัวทำละลาย CHCl_3 : $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}$: CH_3COOH : H_2O เป็น 60: 30 : 1: 1

สารที่ทดสอบ	แถบที่เกิดสีเมื่อทดสอบกับสารลดแรงดึงผิว ที่แยกได้จาก	
	<i>Pasteurella</i> PA6	<i>Acinetobacter</i> S7
Alkaline potassium permanganate	1,2,4 และ 6	1,2,3 และ 7
Iodine	1 และ 6	1,3 และ 6
Rhodamine 6G	1	1
Ninhydrin	1 และ 3	1
ภายใต้แสงยูวีความยาวคลื่นสั้น (280 nm)	1,3,4,5 และ 6	1,4,5 และ 7

จากการศึกษาองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จากแบคทีเรียในจีนัส *Acinetobacter* พบว่าส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่ม polymeric surfactants ซึ่งมีองค์ประกอบเป็น polysaccharide-lipid complex ตัวอย่างแบคทีเรีย *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 ผลิตสารลดแรงตึงผิวที่เรียกว่า emulsan เป็น lipoheteropolysaccharide polyanionic พบที่บริเวณผนังเซลล์ด้านนอกของแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่ง emulsan ที่ได้สามารถทำให้เกิดอิมัลชันที่เสถียรอยู่ได้ยาวนานและทนต่อการปั่นแยก (Fiechter, 1992) นอกจากนี้ยังมี biodispersan ที่ผลิตโดย *A. calcoaceticus* A2 มีองค์ประกอบเป็น anionic heteropolysaccharide (Kosaric, 1993) ดังนั้น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จาก *Acinetobacter* S7 อาจผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด polysaccharide-lipid complex เช่นเดียวกัน และผลจากการศึกษาองค์ประกอบขั้นต้นบนแผ่น TLC aluminium sheets silica gel 60 F₂₅₄ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากทั้ง *Pasteurella* PA6 และ *Acinetobacter* S7 มีองค์ประกอบหลักคล้ายคลึงกัน คือ มีคาร์โบไฮเดรต ไขมัน และกรดอะมิโนรวมอยู่ด้วยในโครงสร้าง

บทที่ 4

สรุป

ผลของการสุ่มตัวอย่างดินและน้ำที่ปนเปื้อนด้วยน้ำมันปิโตรเลียมจำนวน 98 ตัวอย่าง จากบริเวณโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม อู่ซ่อมรถ และท่าเทียบเรือ พบแบคทีเรียทั้งหมด 122 สายพันธุ์ เป็นแบคทีเรียที่มี hemolytic activity คือสามารถเจริญและให้วงใสรอบโคโลนีได้ในอาหาร blood agar ซึ่งเป็นลักษณะของแบคทีเรียที่มีแนวโน้มว่าจะมีการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำนวน 39 สายพันธุ์ และแบคทีเรีย 8 สายพันธุ์ซึ่งติดสีแกรมลบทั้งหมดที่สามารถอิมัลซิไฟด์ weathered oil ได้ โดยพบแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ คือ PA6 และ S7 ที่มีการอิมัลซิไฟด์ weathered oil ได้ดีที่สุดและมีค่า %EC สูงที่สุดเท่ากับ 0.47 ± 0.08 และ 0.51 ± 0.06 ตามลำดับ

จากการศึกษาสมบัติบางประการด้านสัณฐานวิทยา ชีวเคมี ร่วมกับการใช้ชุดการทดสอบ kit ระบบเอพีไอ (api 20E) พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ PA6 มีลักษณะโคโลนีกลม สีเหลือง จัดอยู่ในสกุล *Pasteurella* sp. และแบคทีเรียสายพันธุ์ S7 มีลักษณะโคโลนีกลมขอบเรียบ สีขาวนวล จัดอยู่ในสกุล *Acinetobacter* sp. แบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ไม่เคลื่อนที่ได้ ไม่สร้าง สปอร์ สามารถผลิตเอนไซม์คะตาเลสได้ แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ออกซิเดส ไม่ย่อยแป้ง และเฉพาะแบคทีเรียสายพันธุ์ PA6 สามารถย่อยเจลาตินได้

เมื่อเลี้ยง *Pasteurella* PA6 และ *Acinetobacter* S7 ในอาหารเหลว marine broth (MB1) โดยใช้ น้ำมันปาล์ม และ hexadecane เป็นแหล่งคาร์บอน เลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน เหย้าความเร็วเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 7.2 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำให้ได้ค่า % EC และ ODA จากทั้ง *Pasteurella* PA6 และ *Acinetobacter* S7 สูงที่สุดที่ 36 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะคงที่ของการเจริญ และเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร MB2 มีผลทำให้แบคทีเรียทั้ง *Pasteurella* PA6 และ *Acinetobacter* S7 สามารถเจริญได้ดีขึ้น และยังมีผลส่งเสริมการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Acinetobacter* S7 อีกด้วย

สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Pasteurella* PA6 มีการผลิตสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 48 โดยมีการผลิตสารลดแรงตึงผิวให้ค่า %EC และ ODA สูงที่สุดคือเท่ากับ 2.49 และ 44.2 ตารางเซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงในอาหาร MB3 ที่มีน้ำมัน

ปาล์มความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีพีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 4.5 และสภาวะที่เหมาะสม สำหรับ *Acinetobacter* S7 คือใช้อาหาร MB3 ที่มีน้ำมันปาล์ม 5.0 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียม ไนเตรท 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 7.2 มีการ ผลิตสารลดแรงตึงผิวสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 72 ให้ค่า %EC และ ODA เท่ากับ 2.89 และ 407.3 ตารางเซนติเมตร ตามลำดับ จะเห็นว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Acinetobacter* S7 มี ค่ากิจกรรมสูงกว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จาก *Pasteurella* PA6 โดยเฉพาะค่าความ สามารถในการกระจายน้ำมันสูงกว่ากันถึง 10 เท่า นั่นคือ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Acinetobacter* S7 มีความเป็นไปได้สูงที่จะมีการนำไปใช้ประโยชน์ได้ต่อไปในอนาคต

เมื่อศึกษาความคงตัวของของสารลดแรงตึงผิว พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Pasteurella* PA6 มีค่า %EC และ ODA คงเหลือมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ในสภาวะที่มีพีเอช 4.0-8.0 ในที่มีเกลือ 5-15 เปอร์เซ็นต์ และหนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 150 นาที ในส่วนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Acinetobacter* S7 มีค่ากิจกรรมคงเหลือมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีพีเอช 2.0-6.0 และในที่มีเกลือ 5-20 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ ยังมีความคงตัวต่ออุณหภูมิ 55, 80 และ 100 องศาเซลเซียส โดยมีค่า %EC และ ODA คง เหลือมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 240 นาที 120 นาที และ 90 นาที ตามลำดับ

ผลจากการศึกษาองค์ประกอบชั้นต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *Pasteurella* PA6 และ *Acinetobacter* S7 พบว่า มีองค์ประกอบหลักคล้ายคลึงกัน คือ มี คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และกรดอะมิโนรวมอยู่ด้วยในโครงสร้าง

ข้อเสนอแนะ

1. ในการศึกษาขั้นตอนการทดสอบหาแบคทีเรียที่สามารถอิมัลซิไฟด์ weathered oil ผู้วิจัยควรมีการนับปริมาณเชื้อด้วยวิธี plate count ควบคู่ไปกับการหา %EC จากการเก็บตัวอย่างที่เวลาต่าง ๆ เพื่อให้แน่ใจว่ามีแบคทีเรียเจริญอยู่ได้และสะดวกในการเปรียบเทียบหาการเจริญของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ เนื่องจากการวัดการเจริญจากค่าการดูดกลืนแสงจากเชื้อที่มีการเจริญในอาหารที่มี weathered oil นั้นมีความผิดพลาดจากความขุ่นของ weathered oil ร่วมด้วย

2. ในการศึกษาครั้งต่อไป ผู้วิจัยน่าจะให้ความสนใจในการเลี้ยงเชื้อแบบผสมจากตัวอย่างในแหล่งเดียวกัน โดยทำการเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำมันดิบหรือ weathered oil และมีการถ่ายเชื้อ(sub culture) ไปหลาย ๆ ครั้ง เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่เหลืออยู่ โดยมีการตรวจหาการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3. ในขั้นตอนของการสกัดแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ ผู้วิจัยควรจะมีการทดสอบหาสารตัวทำละลายหลาย ๆ ชนิด เช่น เฮกเซน(hexane) คลอโรฟอร์ม(chloroform) เป็นต้น เพื่อเปรียบเทียบหาสารตัวทำละลายที่สกัดแยกสารลดแรงตึงผิวออกจากส่วนใสให้ได้มากที่สุด

4. จากการทดลองในครั้งนี้ พบว่า *Acinetobacter* S7 มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับ *Pasteurella* PA6 จึงน่าจะมีการศึกษาการแยกสารลดแรงตึงผิวให้บริสุทธิ์ในขั้นต่อไป โดยใช้วิธี High performance liquid chromatography (HPLC) เพื่อทราบถึงองค์ประกอบของโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Acinetobacter* S7 เพื่อประโยชน์ในการนำไปใช้ในงานด้านต่าง ๆ ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- ดวงพร คันธโชติ. 2537. ปฏิบัติการเทียบเคียงแบคทีเรีย ใน อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและ
ปฏิบัติกร. หน้า 150-170. โอเดินสโตร. กรุงเทพฯ.
- คณิงนิจ จรุงศักดิ์. 2540. ปริมาณคราบและกากน้ำมันบริเวณชายฝั่งทะเลจังหวัดสงขลา.
วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ธนขวัญ บุชบัน. 2539. การลดแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* 3/38 ที่เลี้ยงใน
ภาวะต่าง ๆ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ศิริพร เหลืองนฤทัย. 2535. การย่อยสลายปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำทะเลโดย
Flavobacterium meningosepticum และ *Pseudomonas fluorescens*. วิทยา
นิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยมหิดล.
- Abu-Ruwaida, A. S., Banat, I. M., Haditirto, S. and Khamis, A. 1991a. Nutrition
requirements and growth characteristics of biosurfactant producing
Rhodococcus bacterium. World J. Microbiol. Biotechnol. 7: 53-61.
- Abu-Ruwaida, A. S., Banat, I. M., Haditirto, S., Salem, S and Kadri, M. 1991b.
Isolation of biosurfactant producing bacteria-product characteristion and
evaluation. Acta Biotechnol. 11:315-324.
- Arima, K., Kakinuma, A. and Tamura, G. 1968 Surfactin, a critalline peptide lipid
surfactant produced by *Bacillus subtilis* : isolation, characterization and its
inhibition of fibrin clot formation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 31:488-
494.
- Asselineau, C. and Asselineau, J. 1978. Trehalose containing glycolipids. Prog.
Chem. Fat Lipids. 16:59-99.
- Atlas, R. M. 1984. Petroleum Microbiology Macmillan. New York.
- ✓Carrillo, P.G., Merdaraz, C., Pitta-Alvarez, S. I. And Giulietti, A. M. 1996. Isolation
and selection of biosurfactant-producing bacteria. World J. Microbiol.
Biotechnol. 13:137-139.
- Clint, J. H. 1992. Surfactant Aggregation. Chapman and Hall. New York.

- Cooper, D. G. and Goldenberg, B. G. 1987. Surface active agent from two *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:224-229.
- Cooper, D. G. and Paddock, D. A. 1984. Production of biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:173-176.
- Cooper, D. G., Macdonald, C. R., Duff, J. B. and Kosaric, N. 1981. Enhanced production of surfactant from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation addition. *Appl. Environ. Microbiol.* 42:408-412.
- Cooper, D. G. and Zajic, J. E. 1980. Surface active compounds from microorganisms. *Adv. Appl. Microbiol.* 26:229-256.
- Cooper, D. G., Zajic, J. E. and Gerson, D. F. 1979. Production of surface active lipids by *Corynebacterium lipus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 37:4-10.
- Cooper, D. G. and Zajic, J. E., Gerson, D. F. and Menninen, K. I. 1980. Isolation and identification of biosurfactants produced during anaerobic growth of *Clostridium pasteurianum*. *J. Ferment. Technol.* 58:83-86.
- Dawson, R. M. C., Elliott, D. C., Elliott, W. F. and Jones, K. M. 1986. Method for the detection of biochemical compounds on paper and thin-layer chromatograms with some notes on separation. *In Data for Biochemical Research*. 3rd ed. p. 453-502. The Bath Press. Avon.
- Desai, J. D. and Banat, I. M. 1997. Microbial production of surfactant and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61(1):47-64.
- Deziel, E., Paquette, G., Villemur, R., Lepine, F. and Bisailon. 1996. Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbon. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1908-1912.
- Drouin, C. M. and Cooper, D. G. 1992. Biosurfactant and aqueous two phase fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 40:86-90.

- Duvnjak, Z., Cooper, D. G. and Kosaric, N. 1983. Effect of nitrogen source on surfactant production by *Arthrobacter paraffineus* ATCC 19558. In Microbial Enhanced Oil Recovery (Zajic, J. E., Cooper, D. G., Jack, T. R. and Kosaric, N., ed.). p. 66-72. Pennwell Books, Tulsa, Okla.
- El-sayed, A. H. M. M., Mahmoud, W. M., Davis, E. M. and Coughlin, R. W. 1996. Growth of hydrocarbon-utilizing isolates in chemically defined media. Int. Biodeterior. Biodegrad. 37(1-2):61-68.
- Fiechter, A. 1992. Biosurfactants : moving towards industrial application. Trends Biotechnol. 10(6):208-217.
- Finnerty, W. R. 1994. Biosurfactants in environmental biotechnology. Curr. Opin. Biotechnol. 5(3):291-295.
- Fox, S. L. and Bala, G. A. 2000. Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. Biores. Technol. 75:235-400.
- Ghurye, G. L. and Vipulanandan, C. 1994. A practical approach to biosurfactant production using nonaseptic fermentation of mixed cultures. Biotechnol. Bioeng. 44:661-666.
- Guerra-Santos, L. H., Kappeli, O. and Fiechter, A. 1984. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. Appl. Environ. Microbiol. 48:301-305.
- Guerra-Santos, L. H., Kappeli, O. and Fiechter, A. 1986. Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutrition and environmental factors. Appl. Environ. Microbiol. 24:443-448.
- Haba, E., Espuny, M. J., Busquets, M. and Manresa. 2000. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. J. Appl. Microbiol. 88:379-387.
- Hommel, R. K. and Huse, K. 1993. Regulation of sophorose lipid production by *Candida (torulopsis) apicola*. Biotechnol. Lett. 15(8):853-858.

- Huy, N. Q., Jin, S., Amada, K., Haruki, M., Huu, N. B., Hang, D. T., Camna, D. T., Imanaka, T., Morikawa, M. and Kanaya, S. 1999. Characterization of petroleum-degrading bacteria from oil-contaminated sites in Vietnam. *J. Biosci. Bioeng.* 88:100-102.
- Johnson, V., Singh, M., Saini, V. S., Adhikari, D. K., Sista, V. and Yadav, N. K. 1992. Bioemulsifier production by an oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* IIP-30. *Biotechnol. Lett.* 14(6):487-490.
- Krieg, N. R. and Holt, J. G. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. Williams and Wilkins. Baltimore.
- Kim, H. S., Yoon, B. D., Choung, D. H., Oh, H. M., Katsuragi, T. and Tani, Y. 1999. Characterization of a biosurfactant, mannosylerythritol lipid produced from *Candida* sp. SY16. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52:713-721.
- Kim, H. S., Yoon, B. D., Lee, C. H., Suh, H. H., Oh, H. M., Katsuragi, T. and Tani, Y. 1997. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. *J. Ferment. Bioeng.* 84(1):41-46.
- Kosaric, N. 1993. *Biosurfactants Production Properties Application*. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Lee, L. H. and Kim, J. H. 1993. Distribution of substrate carbon in sophorose lipid production by *Turolopsis bombicola*. *Biotechnol. Lett.* 15:263-266.
- Lin, S. C., Lin, K. G., Lo, C. C. and Lin, Y. M. 1998. Enhanced biosurfactant production by a *Bacillus licheniformis* mutant. *Enz. Micro. Technol.* 23:267-273.
- Lindum, P.W., Anthoni, U., Christophersen, C., Eberl, L., Molin, S. and Givskov, M. 1998. *N*-Acyl-*L*-Homoserine lactone autoinducers control production of an extracellular lipopeptide biosurfactant required for swarming motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *J. Bacteriol.* 180 (23):6384-6388.

- Makkar, R. S. and Cameotra, S. S. 1997. Utilization of molasses for biosurfactant producing by two *Bacillus* strains at thermophilic conditions : short communication. J. Am. Oil Chem. Soc. 74(7):887-889.
- Morikawa, M., Daido, H., Takao, T., Murata, S., Shimonishi, Y. and Imanaka, T. 1993. A new lipopeptide biosurfactant from *Arthrobacter* sp. strain MIS38. J. Bacteriol. 175(20):6459-6466.
- Morikawa, M., Hirata, Y. and Imanaka, T. 2000. A study on the structure relationship of lipopeptide biosurfactants. Biochim. Biophys. Acta. 1488:211-218.
- 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.
- Passeri, A., Schmidt, M., Haffner, T., Wray, V., Lang, S. and Wagner, F. 1992. Marine biosurfactant. IV. Production, characterization and biosynthesis of an anionic glucose lipid from the marine bacterial strain MM1. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37: 281-286.
- Passeri, A., Lang, S. and Wagner, F. and Wray, V. 1991. Marine biosurfactants, II. Production and characterization of an anionic trehalose tetraester from the marine bacterium *Arthrobacter* sp. EK1. Z. Naturforsch. 46c : 204-209.
- Powalla, M., Lang, S. and Wray, V. 1989. Penta- and disaccharide lipid formation by *Nocardia corynbacteroides* grown on n-alkanes. Appl. Microbiol. Biotechnol. 31:473-479.
- Pruthi, V. and Cameotra, S. S. 1997a. Production of a biosurfactant exhibiting excellent emulsification and surface active properties by *Serratia marcescens* : short communication. World J. Microbiol. Biotechnol. 13:133-135.

- Pruthi, V. and Cameotra, S. S. 1997b. Production and properties of biosurfactant synthesized by *Arthrobacter protophormiae* - an Antarctic strain:short communication. World J. Microbiol. Biotechnol. 13:137-139.
- Roongsawang, N., Thaniyavarn, J. and Thaniyavarn, S. 1999. Properties of biosurfactant produced by *Bacillus* sp. strain KP-2. Thai J. Biotechnol. 1:54-60.
- Sheppard, J. D. and Cooper, D. G. 1990. The effect of biosurfactant on oxygen transfer in a cyclone column reactor. J. Chem. Technol. Biotechnol. 48:325-336.
- Stoll, V. S. and Blanchard, J. S. 1990. Buffer : Principles and Practice. *In* Method in Enzymology. Vol. 182. (Deutscher, M. P., ed). p. 24-38. Academic Press. New York.
- Suthivanithakul, B., Thaniyavarn, J. and Thaniyavarn, S. 1999. Biosurfactant production by *Bacillus licheniformis* F2.2. Thai J. Biotechnol. 1:46-53.
- Tongpubesra, K. 1998. Isolation and Characterization of Crude Oil Degrading Bacteria in Thailand. Master of Science. Mahidol University.
- Van Dyke, M. I., Couture, P., Brauer, M., Lee, H. and Trevors, J T. 1993. *Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactant:structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil. Can. J. Microbiol. 39:1071-1078.
- Wang, S. D. and Wang, D. I. C. 1990. Mechanisms for biopolymer accumulation in immobilized *Acetobacter calcoaceticus* system. Biotechnol. Bioeng. 36:402-410.
- Yakimov, M. M., Timmis, K. N., Wray, V. and Fredrickson, H. L. 1995. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. Appl. Microbiol. Biotechnol. 61(5):1706-1713.

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

1. อาหารที่ใช้ในการแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิว

1.1 Nutrient agar (NA) ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นแล้วต้มให้เดือด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

หมายเหตุ NA ที่มี 3%NaCl องค์ประกอบเหมือนกันแต่เพิ่มโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ลงในส่วนประกอบ 30 กรัม ละลายพร้อมกับองค์ประกอบอื่น ๆ

1.2 Blood agar

เตรียม Nutrient agar ที่มี 3%NaCl การเติมเลือดนั้นเติมหลังจากการฆ่าเชื้ออาหาร โดยปล่อยให้อาหารเย็นลง อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส แล้วค่อย ๆ เติมเลือดลงไป 5 % จากนั้นเทอาหารลงในจานเพาะเชื้อ

1.3 อาหาร Marine broth (MB1) ใช้ในการแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Bacto peptone	5	กรัม
Bacto yeast extract	1	กรัม
น้ำทะเลที่ผ่านการกรอง	1	ลิตร

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปปรับพีเอชให้ได้ 7.2 แล้วจึงเติม hexadecane นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน ที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

1.4 อาหาร Marine broth (MB2) ใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียและศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Bacto peptone ✓	5	กรัม
Bacto yeast extract ✓	1	กรัม
Sodium chloride ✓	19.45	กรัม
Ferric citrate	0.1 ✓	กรัม
Magnesium chloride dried	5.9	กรัม
Sodium sulfate	3.24 ✓	กรัม
Calcium chloride ✗	1.8	กรัม
Potassium chloride ✗	0.55	กรัม
Sodium bicarbonate ✓	0.16	กรัม
Potassium bromide ✗	0.08	กรัม
Strontium chloride ✗	0.034	กรัม
Boric acid	0.022	กรัม
Sodium fluoride ✗	0.0024	กรัม
Ammonium nitrate	0.0016	กรัม
Disodium phosphate	0.008	กรัม

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดให้เข้ากันในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปปรับพีเอช ให้ได้ 7.2 ก่อนแล้วจึงเติมน้ำมันปาล์ม (ใช้น้ำมันปาล์มทางการค้า ยี่ห้อมรกต) หรือ hexadecane นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน ที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

สำหรับอาหารแข็ง ทำได้โดยการเติมผงวุ้น 15.0 กรัม ลงในอาหารที่ปราศจากน้ำมันปาล์ม นำไปหลอมละลายด้วยความร้อน เมื่อวุ้นหลอมละลายแล้วจึงนำมานั่นกับน้ำมันปาล์มทันที ด้วยเครื่องปั่นผสม (homogenizer) ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.5 อาหาร Marine broth (MB3) ใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ องค์ประกอบในอาหารและวิธีการเตรียมเช่นเดียวกับ MB2 แต่ไม่มีแอมโมเนียมไนเตรทผสมในสูตรอาหาร

2. การจำแนกแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิว (ดวงพร คັນธโชติ, 2537)

2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ตรวจสอบการติดสีแกรม รูปร่าง โดยการย้อมสีแกรมแล้วส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์

2.2 การศึกษาความสามารถในการเคลื่อนที่

นำเชื้อแบคทีเรียอายุประมาณ 24 ชั่วโมง มา staph ลงในอาหาร motility test บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หรืออุณหภูมิห้องนาน 24-48 ชั่วโมง ถ้าเชื้อกระจายจากแนวที่มีการ staph ไปได้ แสดงว่าเชื้อมีความสามารถในการเคลื่อนที่

อาหาร motility test ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

Tryptone	10	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Agar	5	กรัม

2.3 การย้อมสปอร์

นำเชื้อแบคทีเรียที่จะทดสอบอายุประมาณ 24 ชั่วโมง ใช้ loop เขี่ยเชื้อแตะบนสไลด์ที่มี 0.85 % NaCl เกือบซัสเพนชั่นของเชื้อให้กระจาย ทิ้งไว้ให้แห้ง นำสไลด์ผ่านเปลวไฟ หยดสารละลาย 5% malachite green ให้ท่วมน้ำสไลด์วางเหนือไอน้ำเดือดนาน 10 นาที คอยเติม malachite green เมื่อสารละลายเริ่มแห้ง ล้างสีออกด้วยน้ำสะอาด ล้างสไลด์ด้วย 95 % alcohol นาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำสะอาด ติดสีด้วยสารละลาย safanin นาน 30 นาที ล้างสีออกด้วยน้ำสะอาด ทำให้สไลด์แห้งนำสไลด์ไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

2.4 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ catalase

หยด 3 เปอร์เซ็นต์ ของ H_2O_2 ลงบนแผ่นสไลด์ ที่สะอาดและแห้ง เขี่ยเชื้อที่จะทดสอบอายุ 24 ชั่วโมง มา 2 loopful แตะลงในหยด ของ H_2O_2 ถ้าเกิดฟองแก๊สแสดงว่าเชื้อสามารถ

สร้างเอนไซม์ catalase แสดงว่าผลการทดสอบเป็นบวก เลี้ยงเชื้อในอาหาร nutrient agar slant

2.5 การทดสอบคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ oxidase

หยด 1 เปอร์เซ็นต์ ของ tetramethyl paraphenylene diamine hydrochloride ลงบนกระดาษกรองให้ซึมพองหมด ๆ ใช้แท่งแก้วแตะเชื้อจาก nutrient agar slant อายุ 24 ชั่วโมง ลากบนกระดาษกรองดังกล่าว ถ้ามีสีม่วงเข้มเกิดขึ้นตามรอยลากแสดงว่าผลการทดลองเป็นบวกคือเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ oxidase

2.6 การทดสอบคุณสมบัติในการย่อยแป้ง

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียอายุ 24 ชั่วโมง ลงในอาหาร starch agar ป่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 2-3 วัน หยด lugol's iodine ลงบนอาหารที่มีเชื้อเจริญ ถ้าเกิดบริเวณใสแสดงว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถย่อยแป้งได้

อาหาร starch agar ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Potato starch	10	กรัม
Agar	15	กรัม

2.7 การทดสอบคุณสมบัติในการย่อยเจลาติน

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียอายุ 24 ชั่วโมง ลงในอาหาร nutrient gelatin ป่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 7 วัน เชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยเจลาตินได้ จะทำให้อาหารไม่แข็งที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

อาหาร nutrient gelatin ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Gelatin	120	กรัม

2.8 การทดสอบ oxidation-fermentation (O-F test)

นำเชื้อแบคทีเรียที่จะทดสอบอายุประมาณ 24 ชั่วโมง มา stab ลงในอาหาร Hugh and Leifson's O-F medium 2 หลอด หลอดหนึ่งทำให้อยู่ในสภาพที่ขาดอากาศโดยเททับผิวหน้าด้วยพาราฟินเหลวที่ฆ่าเชื้อแล้ว ให้ความหนาประมาณ 2 เซนติเมตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 48 ชั่วโมง ส่วนอีกหลอดไม่ต้องเติมอะไร ตรวจผลโดยดูว่าเกิดกรดในหลอดอาหาร ในสภาพที่มีอากาศหรือไม่มีอากาศ หรือทั้งสองสภาพ ถ้าเกิดในหลอดที่เททับด้วยพาราฟินและไม่เท แสดงว่าเป็น fermentation แต่ถ้าเกิดเฉพาะในหลอดที่ที่ไม่ได้เทพาราฟิน แสดงว่าเป็น oxidation การเกิดกรดแสดงให้ทราบโดยอาหารเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง

หมายเหตุ : ในอาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิดที่ใช้ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียในการทดลองนี้ มีการเติม sodium chloride 30 กรัม ลงในอาหาร 1 ลิตร เนื่องจากเป็นเชื้อที่แยกได้จากบริเวณที่มีความเค็มจากน้ำทะเล

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

ตารางภาคผนวกที่ ข1 การเตรียมสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (Tris-HCl buffer)

เตรียมได้จากการผสมสารละลาย A 50 มิลลิลิตร กับสารละลาย B ตามพีเอชที่ต้องการ

สารละลาย A : 0.02 M Tris(hydroxymethyl) amionomethane

สารละลาย B : 0.02 M HCl

พีเอช	สารละลาย B (มิลลิลิตร)
7.0	46.6
7.1	45.7
7.2	44.7
7.3	43.4
7.4	42.0
7.5	40.3
7.6	38.5
7.7	36.6
7.8	34.5
7.9	32.0
8.0	29.2
8.1	26.2
8.2	22.9
8.3	19.9
8.4	17.2
8.5	14.7
8.6	12.4
8.7	10.3
8.8	8.5
8.9	7.0

ที่มา : Bates and Bower(1956 อ้างโดย Stoll and Blanchard, 1990)

1. วิธีย้อมแกรม (ดวงพร คันธโชติ, 2537)

1.1 สารเคมี

1.1.1 สารละลาย A : ละลาย crystal violet 2.0 กรัม ในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

1.1.2 สารละลาย B : ละลาย ammonium oxalate 0.8 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 80 มิลลิลิตร

1.1.3 ผสมสารละลาย A และ B เข้าด้วยกัน ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง กรองผ่านกระดาษกรองได้เป็น crystal violet staining reagent

1.1.4 mordant : บดไอโอดีน 1.0 กรัม และ potassium iodide 2.0 กรัม เข้าด้วยกัน ค่อย ๆ เติมน้ำกลั่นลงไปและบดผสมไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งไอโอดีนละลาย ใช้น้ำกลั่น ปริมาตร 300 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา

1.1.5 decolorizing solvent : เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์

1.1.6 counterstain : ละลาย safranin 2.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

1.2 วิธีการ

1.2.1 ใช้ loop เกลี่ยซัสเพนชันของเชื้อให้กระจาย ทิ้งไว้ให้แห้ง นำสไลด์ผ่านเปลวไฟ แล้วหยดทับด้วย crystal violet staining ทิ้งไว้ 1 นาที

1.2.2 ล้างออกด้วยน้ำ หยดทับด้วย iodine mordant ทิ้งไว้ 1 นาที

1.2.3 ล้างออกด้วยน้ำ หยดทับด้วย decolorizing ทิ้งไว้ 30 นาที ใช้น้ำ

1.2.4 หยดทับด้วย counterstain 10 วินาที

1.2.5 ล้างออกด้วยน้ำ ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์

2. วิธีวิเคราะห์องค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิว (Dawson *et al.*, 1986)

2.1 คาร์โบไฮเดรต

2.1.1 Alkaline potassium permanganate

สเปรย์ด้วยสารละลายที่มี 1% aq. $KMnO_4$ และ 2% $NaCO_3$ ทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้องหรืออย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ถ้ามี sugar alcohols, glycosides, reducing หรือ non-reducing sugar จะปรากฏจุดสีเหลืองบนพื้นสีม่วงแล้วจะเปลี่ยนเป็นจุดสีเทาบนพื้นสีน้ำตาล

2.1.2 Iodine

นำเกล็ดไอโอดีนเก็บในขวดแก้วที่มีฝาปิดให้ไอกระจายทั่ว นำแผ่น TLC ที่ต้องการทราบวางในขวดประมาณ 15 นาที ถ้าเป็นสีน้ำตาลแสดงว่ามี sugar mercaptals, alcohols, glycosides, hexonicacides, N-acylamino sugar และ nutral หรือ acidic polysaccharide

2.2 ไขมัน

2.2.1 Iodine

วิธีการเช่นเดียวกับในข้อ 3.1.2 ใช้ตรวจผลไขมันทั่วไปและไขมันที่มี non-reducing carbohydrates เป็นองค์ประกอบ

2.2.2 Rhodamine 6G

สเปรย์กับสารละลาย 0.001% aq. Rhodamine 6G ที่ละลายใน 0.25 M K_2HPO_4 ส่องดูทั้งเปียกภายใต้แสงยูวี ปรากฏจุดสีน้ำเงินและสีเหลืองบนพื้นสีส้มอมชมพู

2.3 กลุ่มอะมิโน (Amino groups)

2.3.1 ภายใต้แสงยูวี

กลุ่มอะมิโนสามารถทำปฏิกิริยากับกลุ่มอัลดีไฮด์อิสระ (free aldehyde groups) ในแผ่น TLC ซึ่งเมื่อนำแผ่น TLC ไปส่องภายใต้แสงยูวี ปรากฏเป็นจุดสีน้ำเงิน

2.3.2 Ninhydrin

สเปรย์กับสารละลาย ninhydrine (เตรียมโดยละลาย ninhydrine 0.25 กรัม ในอะซิโตน 100 มิลลิลิตร) ให้ความร้อนโดยอบในตู้อบ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที สีที่ปรากฏแสดงว่ามีองค์ประกอบของอะมิโนกลุ่มต่าง ๆ คือ สีเทาแดง เป็นกลุ่มของ histidine และ glycine, สีน้ำเงิน เป็นกลุ่มของ phenylalanine, tyrosine และ aspartic, สีน้ำตาล เป็นกลุ่มของ tryptophan, สีเหลืองดำ เป็นกลุ่มของ asparagine, สีเหลือง เป็นกลุ่มของ proline, สีม่วง เป็นกลุ่มของ amino acids

ภาคผนวก ค
ผลการทดลอง

ตารางภาคผนวกที่ ค1 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญ และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pasteurella* PA6 ในชั่วโมงที่ 36 เมื่อเมื่อเจริญในอาหารต่าง ๆ กัน คือ 1=MB1 , 2= MB1+ 0.1%hexadecane , 3= MB1+ 0.1%น้ำมันปาล์ม 4= MB1+1%กลูโคส และ 5= MB1+1%ซูโครส

พารามิเตอร์	สูตรอาหาร				
	1	2	3	4	5
OD(660nm)	1.87 ^b	2.00 ^c	2.45 ^d	2.05 ^c	1.75 ^a
%EC	0.44 ^a	0.75 ^c	0.87 ^d	0.53 ^b	0.54 ^b
ODA	0.03 ^a	0.39 ^d	0.64 ^e	0.13 ^c	0.03 ^b
pH	8.59 ^a	8.55 ^a	8.67 ^a	8.58 ^a	8.61 ^a

* ตัวเลขในแนวนอนที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ ค2 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญ และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ของ *Acinetobacter* S7 ในชั่วโมงที่ 36 เมื่อเมื่อเจริญในอาหารต่าง ๆ กัน คือ 1=MB1 , 2= MB1+ 0.1%hexadecane , 3= MB1+ 0.1%น้ำมันปาล์ม , 4= MB1+1%กลูโคส และ 5= MB1+1%ซูโครส

พารามิเตอร์	สูตรอาหาร				
	1	2	3	4	5
OD(660nm)	0.86 ^b	1.09 ^c	1.25 ^d	0.83 ^a	0.83 ^a
%EC	0.57 ^a	0.50 ^a	0.99 ^c	0.66 ^b	0.50 ^a
ODA	0.07 ^a	0.07 ^a	0.64 ^e	0.20 ^d	0.13 ^c
pH	8.38 ^d	8.28 ^b	7.62 ^a	8.35 ^c	8.40 ^d

* ตัวเลขในแนวนอนที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ ค3 การเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวของ *Pasteurella* PA6
 ในอาหาร 2 สูตร คือ 1) MB1 +0.1%น้ำมันปาล์ม และ 2)
 MB2 + 0.1% น้ำมันปาล์ม

พารามิเตอร์	สูตรอาหาร	
	1	2
OD660	2.45 ^{a**}	3.51 ^{b**}
%EC	0.87 ^{a**}	0.87 ^{a**}
ODA	0.64 ^{a*}	0.64 ^{a*}
pH	8.67 ^{b**}	8.44 ^{a**}

* ตัวเลขในแนวนอนที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

** ตัวเลขในแนวนอนที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$)

ตารางภาคผนวกที่ ค4 การเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวของ *Acinetobacter* S7 ในอาหาร 2 สูตร คือ 1) MB1 + 0.1% น้ำมันปาล์ม และ 2) MB2 + 0.1% น้ำมันปาล์ม

พารามิเตอร์	สูตรอาหาร	
	1	2
OD660	1.25 ^{a**}	3.28 ^{b**}
%EC	0.99 ^{a**}	1.03 ^{b**}
ODA	0.64 ^{a*}	0.79 ^{b*}
pH	7.62 ^{a**}	7.69 ^{b**}

* ตัวเลขในแนวนอนที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

** ตัวเลขในแนวนอนที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$)

ตารางภาคผนวกที่ ค5 ผลของปริมาณน้ำมันปาล์มในอาหาร MB2 ต่อการเจริญ
%EC และ ODA ของ *Pasteurella* PA6 ในชั่วโมงที่ 36

พารามิเตอร์	ปริมาณน้ำมันปาล์ม (เปอร์เซ็นต์)				
	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
OD(660nm)	3.51 ^a	4.00 ^b	3.96 ^b	3.94 ^b	4.06 ^c
%EC	0.87 ^d	0.64 ^c	0.59 ^b	0.58 ^b	0.54 ^a
ODA	0.64 ^d	0.39 ^c	0.28 ^b	0.20 ^a	0.20 ^a
pH	8.44 ^b	8.39 ^a	8.43 ^b	8.51 ^c	8.44 ^b

* ตัวเลขในแนวอนที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ ค6 ผลของปริมาณน้ำมันปาล์มในอาหาร MB2 ต่อการเจริญ
%EC และ ODA ของ *Acinetobacter* S7 ในชั่วโมงที่ 36

พารามิเตอร์	ปริมาณน้ำมันปาล์ม (เปอร์เซ็นต์)								
	0.1	0.5	1.0	1.5	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0
OD(660nm)	3.28 ^a	3.28 ^a	3.41 ^c	3.43 ^d	3.30 ^b	3.51 ^e	3.86 ^f	4.12 ^h	3.96 ^g
%EC	1.03 ^a	1.19 ^b	1.20 ^b	1.35 ^c	1.46 ^d	1.62 ^f	2.13 ^h	2.18 ⁱ	1.96 ^g
ODA	0.79 ^a	3.80 ^a	13.86 ^b	24.64 ^c	31.19 ^d	43.03 ^f	60.85 ^f	113.14 ^g	63.64 ^f
pH	7.69 ^a	5.08 ^e	5.33 ^f	4.72 ^d	4.42 ^b	4.48 ^c	4.30 ^b	4.43 ^b	4.39 ^a

* ตัวเลขในแนวนอนที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ ค7 ผลของปริมาณยีสต์สกัดและแบคทีเรียเปปโตไนในอาหาร MB2 ต่อการเจริญ %EC และ ODA ของ *Pasteurella* PA6 ใน ชั่วโมงที่ 36 เมื่อเจริญในอาหารต่าง ๆ กัน คือ 1=MB2 ที่มี ยีสต์สกัดและแบคทีเรียเปปโตไน+0.1%น้ำมันปาล์ม, 2=MB2 ที่ไม่มียีสต์สกัดและแบคทีเรียเปปโตไน + 0.1% น้ำมันปาล์ม, 3=MB2 ที่มียีสต์สกัดแต่ไม่มีแบคทีเรียเปปโตไน+ 0.1% น้ำมันปาล์ม, 4=MB2 ที่ไม่มียีสต์สกัดแต่มีแบคทีเรียเปปโตไน+0.1% น้ำมันปาล์ม

พารามิเตอร์	ยีสต์สกัด	ไม่มี ยีสต์สกัด	มี แบคทีเรียเปปโตไน	ไม่มี แบคทีเรียเปปโตไน
	1	2	3	4
OD(660nm)	3.50 ^b	0.25 ^a	0.62 ^a	3.60 ^b
%EC	1.08 ^c	0.46 ^a	0.78 ^b	0.73 ^b
ODA	0.95 ^c	0.20 ^a	0.39 ^b	0.39 ^b
pH	8.33 ^b	8.18 ^a	8.53 ^c	8.34 ^b

* ตัวเลขในแนวนอนที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ ค8 ผลของปริมาณยีสต์สกัดและแบคทีเรียเปปโตในอาหาร MB2 ต่อการเจริญ %EC และ ODA ของ *Acinetobacter* S7 ใน ชั่วโมงที่ 36 เมื่อเจริญในอาหารต่าง ๆ กัน คือ 1=MB2 ที่มี ยีสต์สกัดและแบคทีเรียเปปโต+5.0% น้ำมันปาล์ม, 2=MB2 ที่ไม่มียีสต์สกัดและแบคทีเรียเปปโต + 5.0% น้ำมันปาล์ม, 3=MB2 ที่มียีสต์สกัดแต่ไม่มีแบคทีเรียเปปโต+ 5.0% น้ำมัน ปาล์ม, 4=MB2 ที่ไม่มียีสต์สกัดแต่มีแบคทีเรียเปปโต+5.0% น้ำมันปาล์ม

พารามิเตอร์	สูตรอาหาร			
	1	2	3	4
OD(660nm)	4.40 ^d	0.90 ^a	3.71 ^b	4.29 ^c
%EC	2.49 ^c	1.47 ^a	2.09 ^b	2.25 ^{bc}
ODA	132.79 ^d	28.29 ^a	78.57 ^c	63.54 ^b
pH	4.45 ^c	4.19 ^a	4.27 ^b	4.88 ^d

* ตัวเลขในแนวนอนที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทาง สถิติ ($p < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ ค9 ผลของแหล่งไนโตรเจนในอาหาร MB3 ที่มีน้ำมันปาล์ม 0.1% ต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิว
ชีวภาพของ *Pasteurella* PA6 ในชั่วโมงที่ 36

พารามิเตอร์	ชนิดของแหล่งไนโตรเจน							
	MB3	MB3+NH ₄ NO ₃	MB3+KNO ₃	MB3+(NH ₄) ₂ H ₂ PO ₄	MB3+(NH ₄)HPO ₄	MB3+(NH ₄) ₂ SO ₄	MB3+NH ₄ HCO ₃	MB3+NaNO ₃
OD(660nm)	3.21 ^d	3.91 ^g	3.14 ^a	3.23 ^e	3.16 ^b	3.12 ^a	3.61 ^f	3.19 ^c
%EC	0.84 ^a	1.27 ^d	0.99 ^{bc}	1.21 ^d	1.02 ^c	1.40 ^e	0.88 ^{ab}	0.98 ^{bc}
ODA	0.64 ^a	3.14 ^e	1.13 ^c	1.54 ^d	1.13 ^c	6.16 ^f	0.64 ^a	0.95 ^b
pH	8.83 ^{de}	8.80 ^{cd}	8.46 ^a	8.80 ^c	8.84 ^c	8.75 ^b	8.89 ^f	8.83 ^e

* ตัวเลขในแนวนอนที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

ตารางภาคผนวกที่ ค10 ผลของแหล่งไนโตรเจนในอาหาร MB3 ที่มีน้ำมันปาล์ม 0.1% ต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Acinetobacter* S7 ในชั่วโมงที่ 36

พารามิเตอร์	ชนิดของแหล่งไนโตรเจน							
	MB3	MB3+NH ₄ NO ₃	MB3+KNO ₃	MB3+(NH ₄) ₂ HPO ₄	MB3+(NH ₄)HPO ₄	MB3+(NH ₄) ₂ SO ₄	MB3+NH ₄ HCO ₃	MB3+NaNO ₃
OD(660nm)	4.32 ^b	4.11 ^a	4.17 ^c	4.00 ^{bc}	4.22 ^c	4.26 ^c	4.03 ^{bc}	4.00 ^{bc}
%EC	2.22 ^e	2.84 ^f	1.79 ^c	2.04 ^c	1.69 ^{bc}	1.79 ^c	1.43 ^a	1.60 ^b
ODA	102.11 ^d	154.00 ^e	47.80 ^b	98.56 ^c	26.43 ^a	38.50 ^b	18.10 ^a	18.10 ^a
pH	4.45 ^a	5.15 ^e	4.49 ^b	4.94 ^c	5.12 ^d	5.45 ^g	5.20 ^f	5.65 ^h

* ตัวเลขในแนวนอนที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

ตารางภาคผนวกที่ ค 11 ผลของปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหาร MB3 ต่อการเจริญการผลิิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pasteurella* PA6 ในชั่วโมงที่ 36

พารามิเตอร์	ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (เปอร์เซ็นต์)					
	0	0.1	0.3	0.5	0.7	0.9
OD(660nm)	3.96 ^d	4.03 ^e	3.85 ^c	3.53 ^b	3.52 ^b	3.49 ^a
%EC	0.86 ^a	1.30 ^b	1.38 ^{bc}	1.55 ^d	1.47 ^{cd}	1.43 ^{bcd}
ODA	0.67 ^a	4.91 ^d	5.73 ^e	7.55 ^f	4.53 ^c	1.13 ^b
pH	8.83 ^d	8.58 ^b	8.59 ^b	5.64 ^c	8.57 ^b	8.52 ^a

* ตัวเลขในแนวนอนที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ ค12 ผลของปริมาณแอมโมเนียมไนเตรทในอาหาร MB3 ต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Acinetobacter* S7 ในช่วงเวลาที่ 36

พารามิเตอร์	ปริมาณแอมโมเนียมไนเตรท (เปอร์เซ็นต์)						
	0	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50
OD(660nm)	4.10 ^a	4.35 ^a	4.35 ^a	4.44 ^a	4.39 ^a	4.26 ^a	4.34 ^a
%EC	2.28 ^a	2.32 ^a	2.70 ^b	2.31 ^a	2.38 ^a	2.42 ^a	2.43 ^a
ODA	49.10 ^a	107.60 ^b	332.00 ^f	196.40 ^c	282.90 ^e	282.90 ^e	237.70 ^d
pH	4.45 ^a	4.48 ^b	4.49 ^b	5.12 ^b	5.45 ^e	5.20 ^d	5.67 ^f

* ตัวเลขในแนวนอนที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ ค13 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิว
ชีวภาพของ *Pasteurella* PA6 ในชั่วโมงที่ 36

พารามิเตอร์	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)			
	25	30	37	45
OD(660nm)	3.59 ^c	3.53 ^b	3.79 ^d	2.17 ^a
%EC	1.33 ^a	1.55 ^c	1.59 ^d	1.36 ^b
ODA	2.77 ^a	7.55 ^c	7.07 ^b	2.84 ^a
pH	8.65 ^c	8.64 ^c	8.52 ^b	7.78 ^a

* ตัวเลขในแนวนอนที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ ค14 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิว
ชีวภาพของ *Acinetobacter* S7 ในชั่วโมงที่ 36

พารามิเตอร์	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)			
	25	30	37	45
OD(660nm)	3.32 ^c	4.45 ^d	1.95 ^b	0.67 ^a
%EC	2.39 ^{ab}	2.65 ^c	2.59 ^{bc}	2.35 ^a
ODA	85.60 ^b	302.00 ^d	138.60 ^c	31.40 ^a
pH	4.55 ^b	4.50 ^a	4.85 ^c	6.88 ^d

* ตัวเลขในแนวนอนที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ ค15 ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารต่อการเจริญและการผลิต
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pasteurella* PA6 ในชั่วโมง
ที่ 36 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

พารามิเตอร์	พีเอชเริ่มต้นของอาหาร					
	4.5	5.5	6.5	7.2	8.0	9.0
OD(660nm)	1.48 ^a	1.75 ^a	2.63 ^a	3.48 ^c	3.55 ^c	3.78 ^c
%EC	1.29 ^a	1.34 ^b	1.66 ^e	1.58 ^d	1.56 ^{cd}	1.55 ^c
ODA	2.55 ^a	2.55 ^a	8.05 ^d	7.07 ^c	3.80 ^b	3.80 ^b
pH	8.58 ^a	5.69 ^b	8.71 ^c	8.73 ^d	8.70 ^{bc}	8.70 ^{bc}

* ตัวเลขในแนวนอนที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ ค16 ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารต่อการเจริญและการผลิต
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pasteurella* PA6 ในชั่วโมง
ที่ 36 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

พารามิเตอร์	พีเอชเริ่มต้นของอาหาร						
	3.5	4.5	5.5	6.5	7.2	8.0	9.0
OD(660nm)	0.12 ^a	0.28 ^b	1.46 ^c	2.82 ^d	3.44 ^e	3.45 ^f	3.52 ^g
%EC	1.87 ^e	2.35 ^g	2.18 ^f	1.53 ^d	1.44 ^c	1.39 ^b	1.38 ^a
ODA	12.57 ^c	38.50 ^e	13.86 ^d	7.07 ^b	6.84 ^b	4.16 ^a	3.80 ^a
pH	5.02 ^a	5.15 ^b	8.15 ^b	8.24 ^c	8.19 ^d	8.22 ^a	8.19 ^d

* ตัวเลขในแนวนอนที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ ค17 ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Acinetobacter* S7 ในชั่วโมงที่ 36 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

พารามิเตอร์	พีเอชเริ่มต้นของอาหาร					
	4.5	5.5	6.5	7.2	8.0	9.0
OD(660nm)	3.40 ^a	4.37 ^c	4.27 ^b	4.45 ^f	4.44 ^e	4.43 ^d
%EC	2.19 ^a	2.24 ^a	2.66 ^{cd}	2.78 ^d	2.56 ^c	2.38 ^b
ODA	66.10 ^a	166.30 ^c	255.30 ^e	302.00 ^f	246.40 ^d	96.30 ^b
pH	4.87 ^f	4.39 ^a	4.44 ^c	4.43 ^b	4.60 ^d	4.76 ^e

* ตัวเลขในแนวนอนที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ ค18 การเจริญ การเปลี่ยนแปลงพีเอชและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pasteurella* PA6 ที่สภาวะที่เหมาะสม (เมื่อเลี้ยงในอาหาร MB3 ที่มีน้ำมันปาล์ม 0.1เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1เปอร์เซ็นต์ ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 4.5)

พารามิเตอร์	เวลา (ชั่วโมง)							
	0	6	12	24	36	48	60	72
OD(660nm)	0.00	0.20	0.23	0.24	0.28	0.28	0.28	0.28
%EC	0.00	1.21	1.35	1.50	2.19	2.49	2.48	2.48
ODA	0.00	3.14	4.53	6.61	34.23	44.20	38.50	33.20
pH	4.70	5.05	5.44	5.38	5.34	5.34	5.35	5.33

ตารางภาคผนวกที่ ค19 การเจริญ การเปลี่ยนแปลงพีเอชและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Acinetobacter* S7 ที่สภาวะที่เหมาะสม (เมื่อเลี้ยงในอาหาร MB3 ที่มีน้ำมันปาล์ม 5.0เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมไนเตรต 0.1เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7.2)

พารามิเตอร์	เวลา (ชั่วโมง)								
	0	6	12	24	36	48	60	72	84
OD(660nm)	0.00	1.09	3.60	4.20	4.50	4.51	4.48	4.52	4.51
%EC	0.00	0.97	1.11	2.41	2.71	2.58	2.56	2.89	2.61
ODA	0.00	5	66.1	181.0	282.9	212.5	212.5	407.3	246.40
pH	7.25	6.61	4.80	4.56	4.52	4.56	4.62	4.67	4.65

ตารางภาคผนวกที่ ค20 ผลของพีเอชต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวจาก *Pasteurella* PA6 (บ่มส่วนใสที่มีพีเอชต่าง ๆ กัน ซึ่งทำการปรับพีเอชด้วย 1 M HCl หรือ NaOH ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้ววิเคราะห์หาค่า %EC และ ODA)

พารามิเตอร์ (เปอร์เซ็นต์)	ปรับพีเอชเป็น							
	2	4	5.34	6	8	10	12	14
%EC สัมพัทธ์	81.33	86.22	100.00	91.56	87.56	80.89	80.44	80.00
ODA สัมพัทธ์	61.54	76.92	100.00	90.00	80.00	55.38	53.85	52.31

ตารางภาคผนวกที่ ค21 ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารต่อการเจริญและการผลิต
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Acinetobacter* S7 ในชั่วโมง
ที่ 36 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

พารามิเตอร์ (เปอร์เซ็นต์)	ปรับพีเอชเป็น							
	2	4	จุดควบคุม (พีเอช 4.67)	6	8	10	12	14
%EC สัมพัทธ์	87.27	93.09	100.00	86.55	68.73	61.09	56.36	48.73
ODA สัมพัทธ์	75.76	78.79	100.00	68.18	57.58	42.42	22.73	15.15

ตารางภาคผนวกที่ ค22 ผลของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวจาก *Pasteurella* PA6 (ป้อนส่วนผสมที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้ววิเคราะห์หา %EC และ ODA)

พารามิเตอร์ (เปอร์เซ็นต์)	ความเข้มข้นของเกลือ (เปอร์เซ็นต์)						
	0	5	10	15	20	25	30
%EC สัมพัทธ์	100.00	100.00	87.64	86.55	81.09	80.36	80.00
ODA สัมพัทธ์	100.00	90.00	81.25	80.00	56.25	51.25	51.25

ตารางภาคผนวกที่ ค23 ผลของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวจาก *Acinetobacter* S7 (บ่มส่วนใสที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที (แล้ววิเคราะห์หา %EC และ ODA)

พารามิเตอร์ (เปอร์เซ็นต์)	ความเข้มข้นของเกลือ (เปอร์เซ็นต์)						
	0	5	10	15	20	25	30
%EC สัมพัทธ์	100.00	98.55	96.00	92.73	92.36	87.64	85.45
ODA สัมพัทธ์	100.00	98.48	90.61	78.79	78.79	69.70	62.12

ตารางภาคผนวกที่ ค24 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสารลดแรงดึงผิวจาก *Pasteurella* PA6 (บ่มส่วนใสที่อุณหภูมิ 55, 80 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 240 นาที วิเคราะห์หา %EC และ ODA)

พารามิเตอร์ (เปอร์เซ็นต์)	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)								
		0	30	60	90	120	150	180	210	240
%EC สัมพัทธ์	55	100.00	97.96	94.29	95.1	92.65	90.61	90.2	88.98	87.76
	80	100.00	91.43	88.35	88.57	86.12	86.53	84.49	83.27	83.67
	100	100.00	90.61	83.27	79.59	77.55	75.1	73.47	73.88	72.65
ODA สัมพัทธ์	55	100.00	97.62	90.48	90.48	88.1	76.19	66.67	66.67	59.52
	80	100.00	95.24	88.10	85.71	83.33	76.19	54.76	52.38	47.62
	100	100.00	95.24	83.33	76.19	71.43	73.81	52.38	52.38	47.62

ตารางภาคผนวกที่ ค25 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวจาก *Acinetobacter* S7 (บ่มส่วนใสที่อุณหภูมิ 55, 80 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 240 นาที วิเคราะห์หา %EC และ ODA)

พารามิเตอร์	อุณหภูมิ (เปอร์เซ็นต์) (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)								
		0	30	60	90	120	150	180	210	240
%EC สัมพัทธ์	55	100.00	99.26	93.7	92.22	90.74	91.48	86.3	88.15	84.81
	80	100.00	94.44	89.26	87.78	86.3	85.19	85.56	82.96	81.48
	100	100.00	90.37	88.15	74.44	72.96	73.33	69.63	69.26	68.15
ODA สัมพัทธ์	55	100.00	96.77	91.94	91.94	90.32	91.94	77.42	75.81	75.81
	80	100.00	93.55	79.03	72.58	70.97	61.29	62.9	59.68	58.06
	100	100.00	93.55	80.65	69.35	67.74	64.52	61.29	59.68	54.84

ประวัติผู้เขียน

213073

ชื่อ นางสาวจันทร์เพ็ญ อิสลาม

วัน เดือน ปีเกิด 6 พฤศจิกายน 2519

วุฒิการศึกษา

วุฒิ

ชื่อสถาบัน

ปีที่สำเร็จการศึกษา

วิทยาศาสตร์บัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2540

(วาริชศาสตร์)

ทุนการศึกษา

ทุนผู้ช่วยสอน จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ผลงาน

Screening of Biosurfactant Producing Bacteria and Optimization of Production Process

Janpen Islam¹, Aran H-kittikun², Yaowaluk Dissara³

¹M. Sc. Student, ²Assoc. Prof., ³Assoc. Prof.

^{1,2}Department of Industrial Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Prince of Songkla University, Hat Yai 90112, THAILAND

(e-mail: g4182005@maliwan.psu.ac.th)

³Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hatyai 90112 THAILAND

During screening for biosurfactant producing, one hundred and twenty two marine bacterial strains were isolated from soil and seawater contaminated with petroleum wastes and enriched in (g/l) : bacto peptone, 5; yeast extract, 1; NaCl, 19.45; MgCl₂, 5.9; Na₂SO₄, 3.24; CaCl₂, 1.8; C₆H₅FeO₇.H₂O, 0.1; KCl, 0.55; CHNaO₃, 0.16; KBr, 0.08; SrCl₂.6H₂O, 0.034; H₃BO₃, 0.022; NaF, 0.0024; NH₄NO₃, 0.0016 and Na₂HPO₄, 0.008. The initial pH was 7.2 and the culture temperature was 30 °C. Haemolysis was used as a selection criterion for the primary isolation of biosurfactant-producing bacteria. Thirty-nine strains had haemolytic activity. Only eight strains, all of them were gram-negative bacteria, were positive for weathered oil degrading capability. Later, biosurfactant production was detected by emulsifying capacity and oil displacement test. Two strains (PA6 and S7) showed high emulsifying capacity (0.47% and 0.51%). When the organisms were

cultivated in a defined marine broth (palm oil as a carbon source) for 3 days on rotary shaker (200 rpm) at 30 °C, the maximum emulsifying capacity and oil displacement test was obtained at 36 h cultivation of both PA6 and S7 which was in the stationary phase growth. When palm oil was used as a carbon source both PA6 and S7, gave higher emulsifying capacity (0.87% and 2.18 %) and oil displacement test (0.64 cm² and 113.14 cm²) than when hexadecane, glucose or sucrose as a carbon source.

การนำเสนอผลงานวิจัยภาคโปรตีนในงานสัมมนา The 12th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology เรื่อง Biotechnology: Impacts and Trends ระหว่างวันที่ 1-3 พฤศจิกายน 2543 ณ โรงแรมเฟลิกซ์ จังหวัด กาญจนบุรี